

법랑기질유도체가 탈회 치근표면에서 치주인대섬유아세포의 생물학적 성상에 미치는 영향

이강운, 김태일, 설양조, 이용무, 구영, 류인철, 정종평, 한수부*

서울대학교 치의학대학원 치주과학교실

Effects of enamel matrix derivatives on biologic activities of human periodontal fibroblasts to demineralized root surface

Kang-Woon Lee, Tae-Il Kim, Yang-Jo Seol, Yong-Moo Lee, Young Ku, In-Chul Rhyu,

Chong-Pyung Chung, Soo-Boo Han*

Department of Periodontology, School of dentistry, Seoul National University

ABSTRACT

Purpose: The aim of this study was to investigate the effects of EMD on demineralized root surface using human periodontal ligament cells and compare the effects of root conditioning materials(tetracycline(TCN), EDTA).

Material and Methods: Dentin slices were prepared from the extracted teeth and demineralized with TCN and EDTA. Demineralized dentin slices were incubated at culture plate with 25, 50 and 100 µg/ml concentration of EMD. Cell attachment, alkaline phosphatase activity test, protein synthesis assay and scanning electronic microscopic examination were done.

Results: Cells were attached significantly higher in EMD treated group at 7 and 14 days. Cell numbers were significantly higher in EMD treated group.

Alkaline phosphatase activity was significantly higher in EMD treated group at 7 and 14 days. Protein synthesis was significantly higher in EMD treated group at 7 and 14 days.

Conclusion: Enamel matrix derivatives enhance the biologic activities of human periodontal ligament cells on demineralized root surface and its effects are dependent on the concentration of EMD. (*J Korean Acad Periodontol 2008;38:679-690*)

KEY WORDS: Enamel matrix derivatives; PDL cell; Tetracycline; EDTA.

서론

치주질환으로 인한 치주조직의 상실은 치아 발거의 주요한 원인 중의 하나이며, 약화되거나 결손된 치주조직을 재생시키는 것이 치주치료의 궁극적인 지향점이다. 치주질환으로 인해 상실된 치주조직의 재생을 위해서 다양한 술식이 행해지고 있다. 일반적인 치주치료인 기계적 방법으로는 이상적인 치주조직의 재생이 아닌 긴 접합상피만으로 치유되는 것으로 알려져 있어, 진정한 의미의 조직재생을 위한 다

양한 방법들이 시도되어 왔다. 자카골, 동종골 이식 또는 이종골 등을 이용한 골대체재 이식, 치근면 탈회, 차폐막을 이용한 조직 유도 재생술(Guided Tissue Regeneration)¹⁾ 등의 방법이 개발되어 왔다.

근래 들어 생물학적 방법을 이용한 재생 술식이 소개되었다. 그 중 법랑기질유도체(Enamel Matrix Derivative, EMD)는 백악질의 형성에 관여하는 아멜로제닌에 대한 연구에 기초를 두고 있다²⁾. 이 단백질은 백악질, 치주인대, 지지골의 배아형성시기에 높은 활성을 보인다고 알려져 있으나, 그 기전은 아직 명확히 밝혀져 있지 않다. 시험관적 연구를 통하여 EMD가 세포의 부착, 분화 및 생합성에 영향을 미쳐 치주인대섬유아세포의 부착을 증가시키지만, 치은섬유세포나 상피세포에서는 효과가 없다고 알려져 있다. 이는 EMD

Correspondence: Dr. Soo-Boo Han
Department of Periodontology, College of dentistry, Seoul National University, 28 Yeongon-Dong, Chongno-Ku, Seoul, 110-744, Korea, E-mail: perioh@snu.ac.kr, Tel: 82-2-2072-2644, Fax: 82-2-744-0051
Received: Nov. 3, 2008; Accepted: Dec. 18, 2008

가 치유의 초기 단계에서 선택적인 작용을 함을 의미한다고 하였고³⁾, 다른 연구에서는 EMD의 농도, 세포의 밀도와 증식 조건, 실험 디자인과 방법, 시간, 재료 등에 따라 차이를 나타내며 기여하였다고 보고하였다⁴⁾.

또다른 연구에서는 EMD가 치주인대섬유아세포와 미분화된 간엽세포에서 뚜렷한 분화 촉진작용을 나타낸다고 하였으며⁵⁾, EMD가 치은섬유아세포보다 치주인대섬유아세포에서 그 효과가 더 크게 나타난다고 하였다⁶⁾. 이는 EMD의 작용이 초기 재생 단계에서 상피의 허방증식을 억제하는 방향으로 나타나는 것으로 보이며, 상피세포에 의한 치유보다 결합조직에 의한 치유를 도와주는 작용을 한다고 볼 수 있다⁷⁾. 또한 EMD의 적용은 치주인대섬유아세포의 대사 활성을 증가시키며 세포외 간질 입자의 생합성을 증가시키고, 석회화에 연관된 유전자 발현과 치주세포 분화에 영향을 미치며, 치주인대섬유아세포에서 알칼리성 인산효소 발현을 유도한다⁸⁾. 법랑기질유도체의 다기능 활동은 포함되어 있는 법랑기질단백질에 의해 나타날 수 있다. 법랑기질단백질의 주요한 역할은 생석회화를 조절하는 것이며, 또한 성장인자와 유사한 작용을 할 수 있는 잠재성을 가지고 있다⁹⁾.

구연산 등에 의한 치근면 탈회가 치주조직 염증 치료에 효과가 있다고 보고된 이후 효소나 산 등을 국소적으로 적용해 보려는 시도들이 있어 왔다. 치주 질환에 이환된 치근면에 조직 재생이 일어나지 않는 원인으로는 세균이나 내독소에 의한 치근면의 오염, 광물질의 조성 및 밀도의 변화, 교원질 섬유의 감소 등이 있으며, 이는 치주질환에 이환된 치근면에서 치주치료 후 접합상피로 치유되는 동물실험을 통해서 알 수 있다. 치석제거술이나 치근활택술만으로는 신생 결합조직부착을 재생하지 못하며 긴 접합상피로 치유가 되게 되는데, 치근면 탈회가 동반되면 섬유아세포의 이동과 부착이 촉진된다고 보고되었다⁸⁾.

테트라사이클린(Tetracycline HCl, TCN)을 치근 표면에 도포하는 것은 세포독성인자를 제거하고 상아질 간질 교원 섬유를 노출시켜 치유과정에서 새로운 섬유와 결합할 수 있는 근거를 마련해주어 접합상피의 근단이동을 방지함으로 신생결합조직의 부착을 촉진시킨다고 알려져있다. 구연산과 TCN을 비교했을 때, TCN으로 탈회한 경우가 섬유아세포의 부착이 더 많이 일어났다는 연구가 있었고⁹⁾, TCN과 EDTA(Ethylene diamine tetra acetic acid) 탈회 후 치주인대섬유아세포의 부착을 관찰했을 때 TCN이 더 효과적이었다는 연구도 있었다¹⁰⁾.

이 연구의 목적은 치근활택술 후 TCN 또는 EDTA로 탈회된 치근면에서 다양한 농도의 EMD의 적용이 치주인대섬유아세포의 생물학적 성상에 미치는 영향을 알아보는 데 있으며, TCN과 EDTA로 탈회를 했을 때 어떤 제제가 더 효과적인지 비교해보고자 한다.

재료 및 방법

1. 치주인대섬유아세포의 배양

실험에 사용된 치주인대섬유아세포는 서울대학교 치과병원에서 교정치료를 목적으로 발거된 건강한 치아의 치근에서 분리하여 사용하였다. 발거된 치아를 생리식염수로 세척하고 1%의 항생제(penicillin G sodium 10,000 units/ml, streptomycin sulfate 10,000 ug/ml, amphotericin B 25 ug/ml, Gibco, U.S.A)가 첨가된 α -MEM(Gibco, U.S.A)에 담근 후, 치근의 중앙 1/3 부분에서 큐렛으로 치주인대조직을 조심스럽게 박리한 후 배양접시에 부착시켜 배양하였다. 배양액으로는 10%의 fetal bovine serum(FBS, Gibco, U.S.A)과 1%의 항생제(penicillin G sodium 10,000 units/ml, streptomycin sulfate 10,000 ug/ml, amphotericin B 25 ug/ml, Gibco, U.S.A)를 첨가한 α -MEM을 사용하였고, 2-3일마다 배지를 교환하였다. 세포들은 1:4의 비율로 계대배양하였으며, 3-4회 계대배양된 치주인대섬유아세포를 사용하였다.

2. 치근 절편의 준비

잔존 치조골의 높이가 치근단 1/3 이하이고 최근 6개월간 치주 치료를 받지 않은 치주질환을 가진 환자에서 발거된 치아를 큐렛(Hu-Friedy, Chicago, IL, USA)을 이용하여 치근활택술을 시행한 후, 절단기(Exakt, Exact cutting & grinding system, Hamburg, Germany)를 이용하여 크기 5×5×1 mm의 치아 절편을 얻었다.

실험에 사용된 절편은 아무런 처치를 하지 않은 균을 음성대조군(Control, C)으로, 치근면을 TCN 또는 EDTA로 탈회한 균을 양성대조군으로 하였으며, TCN 또는 EDTA 탈회 후 EMD 포함 배지(25, 50, 100 ug/ml)에서 배양된 균을 실험군으로 하였다.

3. 치근 절편의 탈회

준비한 치근 절편을 증류수로 충분히 세척 후 TCN과 EDTA를 이용하여 탈회시켰다. TCN(Tetracycline HCl, Chonggeundang, Korea)은 10% 농도로 증류수에 녹인 후 3분간 탈회시켰으며, EDTA(PrefGel, Biora, Sweden)는 24%의 농도로 2분간 적용시켜 탈회하였다. 탈회시킨 절편을 다시 잘 세척한 후 모든 절편을 1000 units/ml penicillin과 1000 ug/ml streptomycin 용액을 넣은 α -MEM에 24시간을 둔 후, 100 units/ml penicillin과 100 ug/ml streptomycin 용액을 넣은 α -MEM으로 세척하였다.

EMD(30 mg/ml)는 10%의 FBS와 1%의 항생제 용액 (penicillin G sodium 10,000 units/ml, streptomycin sulfate 10,000 ug/ml, amphotericin B 25 ug/ml, Gibco, U.S.A)이 함유된 α -MEM 배지와 acetic acid를 이용하여 각 농도별로 희석하였다.

4. 세포 접종

배양한 치주인대섬유아세포를 0.25%의 trypsin과 4 mM EDTA를 혼합한 효소용액에 넣고서 37°C에서 10분간 반응시켜 탈리시킨 후, 원침(1200 rpm, 4°C, 10분)하여 수집하였다. 10%의 FBS와 1%의 항생제 용액, 10 mM Na β -glycerolphosphate(Sigma, U.S.A), 50 ug/ml의 L-ascorbic acid(Sigma, U.S.A), 그리고 10⁻⁷ M Dexamethasone(Sigma, U.S.A)이 포함된 α -MEM 배지를 준비하고 이 배지에서 수집된 세포가 5×10⁴ cell/ml이 되도록 하였다. 24 well 배양접시(Nunc, Rochester, NY, U.S.A)에 치근 절편을 well당 1개씩 위치시킨 후 세포가 들어있는 배지를 well당 1 ml씩 접종한 후 95% air, 5% CO₂, 37°C 조건의 배양기에서 실험 기간 동안 배양하였다.

5. 세포수의 측정

배양 7일, 14일째에 각 well의 치근 절편을 10개씩 꺼내어 각각 1.5 ml 튜브에 넣고 500 ul의 효소 용액(0.25% trypsin in 4 mM EDTA)으로 탈리시킨 후, 곧바로 튜브를 진탕하여 세포부유액이 균일하도록 혼합하고 광학현미경에서 혈구측정기로 세포 수를 측정하였다.

6. 알칼리성 인산효소 활성의 측정

치주인대섬유아세포의 알칼리성 인산효소 활성을 측정하였다. 1 mM MgCl₂, 25 mM sucrose, 5 mM tris-HCl buffer(pH=9.8), 그리고 2 mM p-nitro-phenylphosphate(Wako Pure Chemical, Osaka, Japan)의 반응액을 미리 준비하여, 7일, 14일째의 치근 절편을 각각 10개씩 well에서 꺼내어 25 mM의 sucrose용액으로 씻은 후, 다시 새로운 24 well 배양 접시로 옮겼다. 준비한 반응액을 각 well당 300 ul씩 넣어 치근 절편이 잠기도록 하였다. 반응액과 세포-치근 절편이 들어있는 24 well 배양 접시를 37°C 수조로 옮겨 반응이 일어나도록 하였고, 30분 후에 24 well 배양 접시를 얼음 위에 위치시키고, 0.1 N 1.5 mM의 NaOH를 첨가함으로써 반응을 중지시켰다. 각 well에서 반응이 일어난 용액을 200 ul씩 96well 배양접시로 옮기고, spectrophotometry를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 알칼리성 인산효소의 활성은 분해된 p-nitrophenol의 양으로 나타내었다.

7. 단백질양의 측정

알칼리성 인산효소 활성을 측정한 후, 세포가 부착되어 있는 치근 절편을 25 mM의 sucrose에 2회 세척 후 10%의 SDS(sodium dodecyl sulfate, Sigma, U.S.A)를 100 ul씩 첨가하여 흔들어주면서 세포를 용해시킨 후, 세포의 단백질 농도를 Bradford의 방법대로 Bio-Rad protein assay kit(Bio-Rad, U.S.A)를 이용해서 595 nm의 흡광도로 측정하였다. 흡광도를 단백질양으로 환산하기 위하여 BSA를 표준으로 하였다.

8. 주사전자현미경 관찰

표면에 세포가 배양된 치근 절편을 1일, 14일째에 새로운 24 well 배양 접시로 옮겨 well당 1.0 ml씩 2.5% glutaraldehyde를 넣었다. 4°C에서 20분간 고정된 후, PBS로 세척한 후, 1% aqueous OsO₄(Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, PA, USA)를 이용하여 20분 동안 후고정을 하였다. 에탄올에서 70, 80, 90, 100% 순서로 계열탈수 과정을 거친 후, 표본을 금박한 후에 주사전자현미경으로 관찰하였다.

9. 통계처리

통계분석을 위하여 statview(version 5.01, The SAS Institute, CA, U.S.A) 프로그램을 사용하였다. 모든 데이터는 각 군간 분류하여 일원분산분석(one-way ANOVA) 방법을 사용하였다. 실험군간 분산분석 결과에서 유의한 차이는 최소유의차검정법(Fisher's protected least significance difference: PLSD)으로 사후 검정법(post-hoc test)을 수행하여 차이를 규명하였다.

결과

1. 세포수의 측정

배양 7일과 14일의 세포수 측정 결과 아무것도 처리하지 않은 음성대조군과 비교하였을 때, 모든 군에서 유의성있게

높은 세포 증식을 보였으며, TCN 탈회 후 100 ug/ml 농도의 EMD에 배양한 군에서 유의성있게 가장 높은 세포증식이 나타났다. 배양 7일 및 14일 모두 EDTA 탈회 후 50 ug/ml 및 100 ug/ml 농도의 EMD에 배양한 군에서 EDTA로 탈회만 시킨 군에 비해 통계학적으로 유의성 있는 세포증식이 관찰되었다(p<0.05). 또한 배양 7일과 14일 모두 TCN 탈회 후 100 ug/ml 농도의 EMD에 배양한 군에서 TCN으로 탈회만 시킨 군에 비해 통계학적으로 유의성 있는 세포증식이 관찰되었다(p<0.05).

배양 7일째 EDTA 탈회 후 100 ug/ml 농도의 EMD에 배양한 군에서 25 ug/ml 농도의 EMD에 배양한 군에 비해 통계학적으로 유의성 있는 세포증식이 관찰되었고, TCN 처리 후 100 ug/ml 농도의 EMD에 배양한 군에서 25 ug/ml 농도의 EMD에 배양한 군 및 50 ug/ml 농도의 EMD에 배양한 군에 비해 통계학적으로 유의성 있는 세포증식이 관찰되었다(p<0.05).

Table 1. Cell numbers of PDL cells cultured on dentin slices at 7 and 14 days(numbers/mm²)

	C	EDTA	TCN	EDTA+EMD			TCN+EMD		
				25	50	100	25	50	100
Day 7	378 ±33.4	532 ±44.4	588 ±77.2	628 ±66.6	722 ±100.2*	732 ±85.8*	655 ±57.0	692 ±100.5	824 ±137.0**
Day 14	515 ±34.7	930 ±90.3	998 ±97.8	1074 ±128.8	1298 ±130.7*	1378 ±142.3*	1120 ±211.0	1178 ±117.7	1512 ±216.1**

* Statistically significant difference between EDTA+EMD group and EDTA (p<0.05).
 ** Statistically significant difference between TCN+EMD group and TCN (p<0.05).
 † † Statistically significant difference between the EMD concentrations : confer Figure 1.

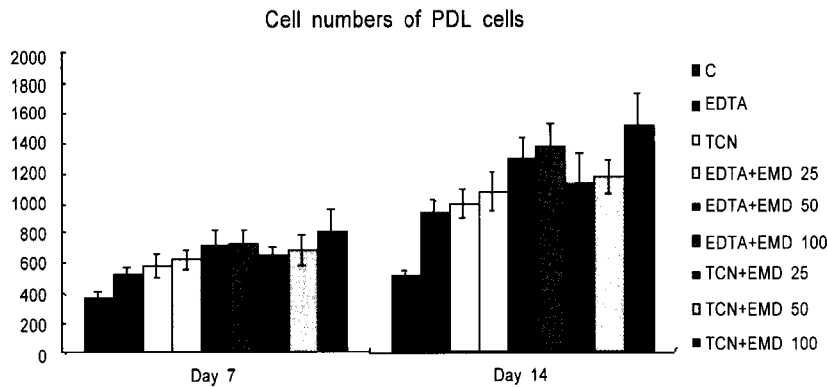


Figure 1. Cell numbers of PDL cells cultured on dentin slices at 7 and 14 days(number/mm²).

* Statistically significant difference between EDTA+EMD group and EDTA (p<0.05).
 ** Statistically significant difference between TCN+EMD group and TCN (p<0.05).
 † Statistically significant difference between the EMD concentrations within EDTA+EMD group (p<0.05).
 ‡ Statistically significant difference between the EMD concentrations within TCN+EMD group (p<0.05).

배양 14일째 EDTA 탈회 후 100 ug/ml 농도 및 50 ug/ml 농도의 EMD에 배양한 군에서 25 ug/ml 농도의 EMD에 배양한 군에 비해 통계학적으로 유의성 있는 세포증식이 관찰되었고, TCN 처리 후 100 ug/ml 농도의 EMD에 배양한 군에서 25 ug/ml 농도의 EMD에 배양한 군 및 50 ug/ml 농도의 EMD에 배양한 군에 비해 통계학적으로 유의성 있는 세포증식이 관찰되었다(p<0.05) (Table 1, Fig. 1).

2. 알칼리성 인산효소 활성의 측정

배양 7일째 TCN으로 탈회한 군을 제외하고는 7일 및 14일의 모든 군에서 아무것도 처리하지 않은 군에 비해 통계학적으로 유의성있는 알칼리성 인산효소의 활성이 관찰되었다.

배양 7일 및 14일 모두 EDTA 탈회 후 50 ug/ml 및 100 ug/ml 농도의 EMD에 배양한 군에서 EDTA로 탈회만 시킨 군에 비해 통계학적으로 유의성 있는 알칼리성 인산효소의

활성이 관찰되었다(p<0.05). 또한 배양 7일과 14일 모두 TCN 탈회 후 25 및 100 ug/ml 농도의 EMD에 배양한 군에서 TCN으로 탈회만 시킨 군에 비해 통계학적으로 유의성 있는 알칼리성 인산효소의 활성이 관찰되었다(p<0.05).

배양 7일 및 14일째 모두 EDTA 탈회 후 100 ug/ml 농도의 EMD에 배양한 군에서 25 ug/ml 농도 및 50 ug/ml 농도의 EMD에 배양한 군에 비해 통계학적으로 유의성 있는 알칼리성 인산효소의 활성이 관찰되었고, 50 ug/ml 농도의 EMD에 배양한 군은 25 ug/ml 농도의 EMD에 배양한 군에 비해 통계학적으로 유의성 있는 알칼리성 인산효소의 활성이 관찰되었고, 100 ug/ml 농도의 EMD에 배양한 군은 50 ug/ml 농도의 EMD에 배양한 군에 비해 통계학적으로 유의성 있는 알칼리성 인산효소의 활성이 관찰되었고, TCN 탈회 후 25 ug/ml 농도 및 100 ug/ml 농도의 EMD에 배양한 군에서 50 ug/ml 배양한 군에 비해 통계학적으로 유의성 있는 알칼리성 인산효소의 활성이 관찰되었다(Table 2, Fig. 2).

Table 2. ALP activity of PDL cells cultured on dentin slices at 7 and 14 days (nmolPNP/min/ug protein)

	C	EDTA	TCN	EDTA+EMD			TCN+EMD		
				25	50	100	25	50	100
Day 7	65.1 ±10.3	79.6 ±14.9	75.7 ±12.7	80.4 ±16.4	102.3 ±14.4 [†]	125.6 ±12.0 [†]	117.1 ±11.6 ^{**}	83.8 ±10.6	117.8 ±9.8 ^{**}
Day 14	80.1 ±12.3	101.6 ±15.8	109.1 ±7.0	106.1 ±7.8	128.2 ±8.7 [†]	151.7 ±14.1 [†]	138.0 ±13.4 ^{**}	112.6 ±11.2	139.1 ±9.2 ^{**}

* Statistically significant difference between EDTA+EMD group and EDTA (p<0.05).
 ** Statistically significant difference between TCN+EMD group and TCN (p<0.05).
 † ‡ Statistically significant difference between the EMD concentrations : confer Figure 2.

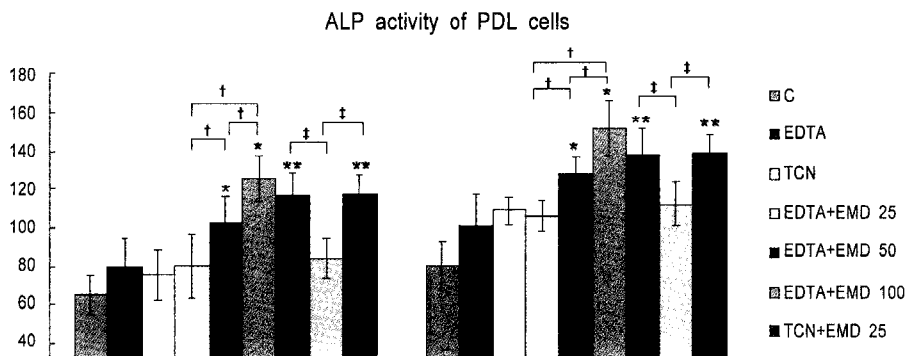


Figure 2. ALP activity of PDL cells cultured on dentin slices at 7 and 14 days (nmolPNP/min/ug protein).

* Statistically significant difference between EDTA+EMD group and EDTA (p<0.05).
 ** Statistically significant difference between TCN+EMD group and TCN (p<0.05).
 † Statistically significant difference between the EMD concentrations within EDTA+EMD group (p<0.05).
 ‡ Statistically significant difference between the EMD concentrations within TCN+EMD group (p<0.05).

3. 단백질양의 측정

배양 7일 및 14일 모두 EDTA 처리 후 25 ug/ml 및 50 ug/ml 농도의 EMD에 배양한 군에서 EDTA로 탈회만 시킨 군에 비해 통계학적으로 유의성 있는 단백질합성이 관찰되었다($p < 0.05$). 또한 배양 7일째 TCN 처리 후 100 ug/ml 농도의 EMD에 배양한 군에서 TCN으로 탈회만 시킨 군에 비해 통계학적으로 유의성 있는 단백질합성이 관찰되었다($p < 0.05$).

배양 7일째 EDTA 처리 후 50 ug/ml 농도의 EMD에 배양한 군에서 100 ug/ml 농도의 EMD에 배양한 군에 비해 통계학적으로 유의성 있는 단백질합성이 관찰되었고, TCN 처리 후 100 ug/ml 농도의 EMD에 배양한 군에서 25 ug/ml 농도의 EMD에 배양한 군에 비해 통계학적으로 유의성 있는

단백질합성이 관찰되었고, 50 ug/ml 농도의 EMD에 배양한 군에서 25 ug/ml 농도의 EMD에 배양한 군에 비해 통계학적으로 유의성 있는 단백질합성이 관찰되었다($p < 0.05$).

배양 14일째 EDTA 처리 후 50 ug/ml 농도의 EMD에 배양한 군에서 25 ug/ml 농도의 EMD에 배양한 군 및 100 ug/ml 농도의 EMD에 배양한 군에 비해 통계학적으로 유의성 있는 단백질합성이 관찰되었고, TCN 처리 후 100 ug/ml 농도의 EMD에 배양한 군에서 25 ug/ml 농도의 EMD에 배양한 군에 비해 통계학적으로 유의성 있는 단백질합성이 관찰되었고, 50 ug/ml 농도의 EMD에 배양한 군에서 25 ug/ml 농도의 EMD에 배양한 군에 비해 통계학적으로 유의성 있는 단백질합성이 관찰되었다($p < 0.05$) (Table 3, Fig. 3).

Table 3. Protein assay of PDL cells on dentin slices at 7 and 14 days ($\mu\text{g protein/mm}^2$)

	C	EDTA	TCN	EDTA+EMD			TCN+EMD		
				25	50	100	25	50	100
Day 7	6.51 ± 0.60	6.95 ± 1.41	7.80 ± 1.22	8.92 $\pm 1.76^*$	9.13 $\pm 1.36^*$	7.88 ± 1.50	7.24 ± 1.40	8.76 ± 1.52	9.05 $\pm 1.41^{**}$
Day 14	8.89 ± 1.03	9.04 ± 1.11	10.82 ± 1.21	11.16 $\pm 1.58^*$	12.93 $\pm 1.85^*$	10.03 ± 1.19	9.72 ± 1.42	11.30 ± 1.41	11.98 ± 1.57

* Statistically significant difference between EDTA+EMD group and EDTA ($p < 0.05$).

** Statistically significant difference between TCN+EMD group and TCN ($p < 0.05$).

† ‡ Statistically significant difference between the EMD concentrations : confer Figure 3.

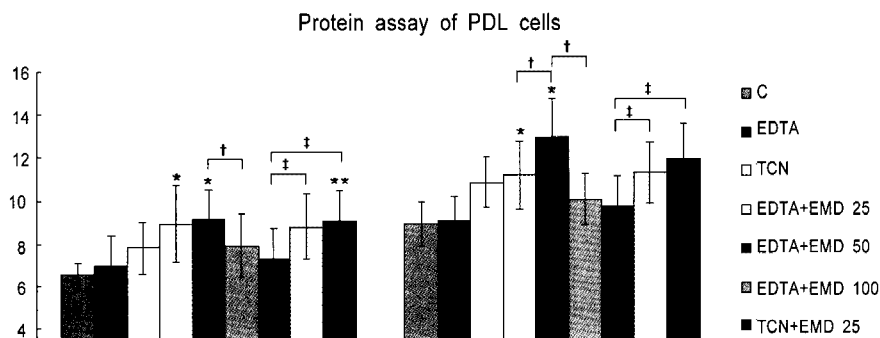


Figure 3. Protein assay of PDL cells on dentin slices at 7 and 14 days ($\mu\text{g protein/mm}^2$).

* Statistically significant difference between EDTA+EMD group and EDTA ($p < 0.05$).

** Statistically significant difference between TCN+EMD group and TCN ($p < 0.05$).

† Statistically significant difference between the EMD concentrations within EDTA+EMD group ($p < 0.05$).

‡ Statistically significant difference between the EMD concentrations within TCN+EMD group ($p < 0.05$).

4. 주사전자현미경 관찰

배양 1일 및 14일째에 각 군의 치근 절편에 부착된 치주인대섬유아세포들을 주사전자현미경을 통해 관찰하였다. 배양 1일째의 모든 군에서 치근절편 위에 잘 부착된 방추사 모양의 치주인대섬유아세포가 관찰되었으나, 탈회 처리 후 여러 농도의 EMD에 배양한 군과 탈회처리만 한 군 사이에는 별다른 세포부착 양상의 차이점을 발견할 수는 없었다.

배양 14일째의 주사전자현미경적 소견 또한 모든 군에서 1일째에 비해 많은 부착세포를 관찰할 수 있었으며, 세포는 1일째에 비해 더욱 편평한 방추사 모양을 띠며, 세포돌기가 잘 발달된 소견을 보였다. 탈회 후 EMD액에 배양한 군은 탈회만 한 군에 비해 부착된 세포수가 증가한 소견을 보였으며, 치근절편상에 매우 편평하게 부착되는 양상을 나타내었다(Fig. 4, 5).

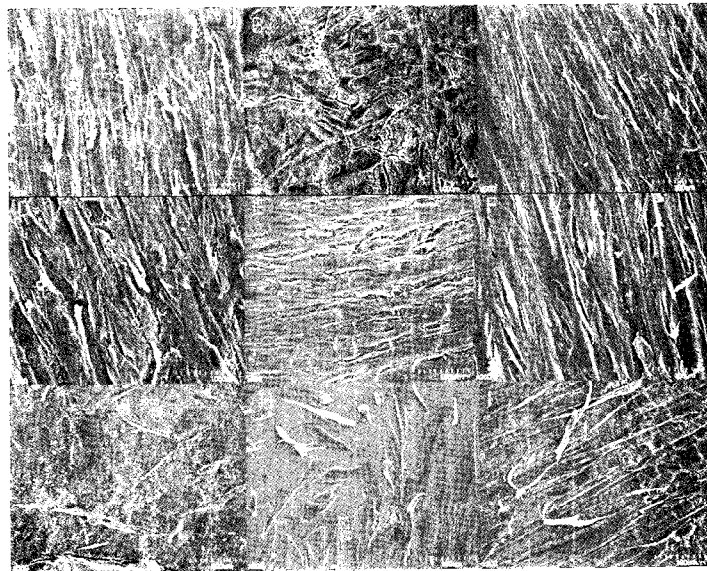


Figure 4. SEM views at day 1 after seeding of PDL cells($\times 300$).
A) Control; B) EDTA; C) TCN; D) EDTA+EMD25; E) EDTA+EMD50; F) EDTA+EMD100; G) TCN+EMD25; H) TCN+EMD50; I) TCN+EMD100

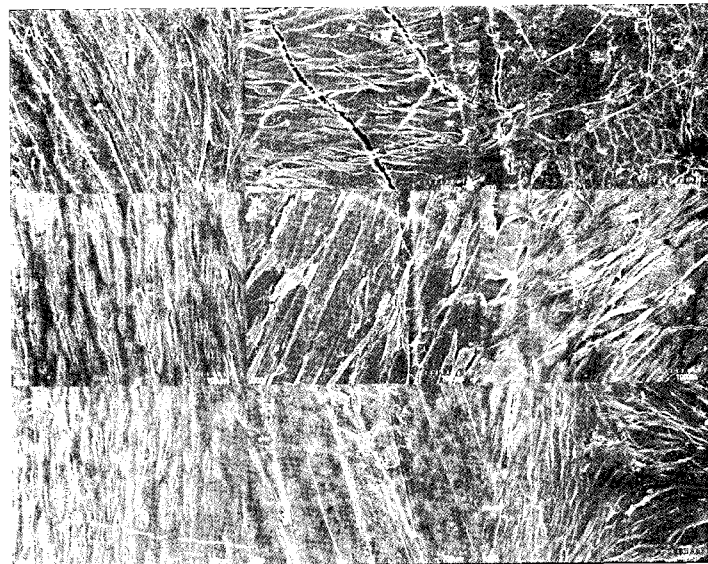


Figure 5. SEM views at day 14 after seeding of PDL cells($\times 300$).
A) Control; B) EDTA; C) TCN; D) EDTA+EMD25; E) EDTA+EMD50; F) EDTA+EMD100; G) TCN+EMD25; H) TCN+EMD50; I) TCN+EMD100

고찰

Hammarström은 손상된 치주조직의 재생에 enamel matrix protein(EMP)의 사용은 원래의 치주조직과 유사한 조직재생이 가능하다고 하였다¹¹⁾. 최근 EMD는 임상적으로 치주조직의 재생에 널리 사용되고 있으나 그 작용기전에 대하여는 아직 명확하게 밝혀져 있지는 않다. EMD의 다양한 생물학적 효과는 EMD에 포함되어 있는 EMP에 기인하며, 이 단백질에 포함되어 있는 다른 성장인자 즉 fibroblast growth factor, insulin-like growth factor, epidermal growth factor, PDGF-BB, TGF, interleukin 등을 추출하려는 노력이 있었는데, Gestrelus는 EMD는 성장인자를 포함하고 있지는 않으며 단지 세포에 대한 활성기질(vital matrix)로 작용한다고 하였고, 원송이를 대상으로 한 실험에서 EMD의 적용이 섬유아세포의 증식에 유의한 결과를 보인다고 하였다¹²⁾. Lyngstadaas는 EMD의 적용하에 세포 부착이 증가된 것을 보임으로서 이 가정을 뒷받침하였고¹³⁾ Haase 등은 EMD에서 growth factor를 추출하지 못했으며, EMD는 치주인대섬유아세포의 mRNA 합성을 증가시켜 초기 재생에 기여한다고 보고하였다¹⁴⁾.

EMD가 생체 또는 실험실에서 사용되었을 때 좋은 결과를 보인 수많은 연구들이 보고되고 있으며, 여러 가설들이 제기되었다¹⁵⁻¹⁶⁾. Hasse 등은 배양된 치주인대섬유아세포에서 EMD의 기질 합성 효과를 조사한 결과, 초기 재생 단계에서 기질 합성을 크게 조절할 잠재력을 가지고 있다고 하였고¹⁴⁾, Hakki 등은 쥐의 미분화 세포를 대상으로 EMD를 실험한 결과, 미분화세포는 백악아세포나 골아세포로 작용할 잠재성을 가지고 있으며, EMD는 이러한 세포의 활동성을 조절할 수 있고, 이것은 치주조직의 발생 단계에서 상피-간엽 상호 작용이 중요하다는 것을 제시한다고 하였다⁵⁾. Ohyama 등은 간엽 세포에 EMD를 적용시킨 결과 알칼리성 인산효소의 활동성이 유의성있게 증가했다고 하였고¹⁷⁾, Hoang 등은 치주조직 재생에 EMD가 효과가 있는 것은 EMD의 주성분인 아멜로제닌이 수산화인회석과 선택적으로 결합을 하는 경향을 가지고 있으며, 교원질이나 히파린과는 결합을 하지 않기 때문이라고 하였다²⁾. 김 등 역시 초기 치유 단계에서 EMD가 골밀도 증가와 신생골 합성에서 큰 기여를 나타냈다고 보고하였다¹⁸⁾.

많은 연구에서 EMD를 사용했을 때의 좋은 결과에 대해

보고하고 있으나, 그렇지 않은 연구들도 있었다. Chong 등은 EMD와 아멜로제닌이 치주인대섬유아세포의 증식에 별 기여를 하지 못한다고 하였고, EMD의 다른 구성 요소가 이러한 증식 및 이동에 관여하거나, 아멜로제닌이 다른 요소와 복합 작용이 있어야만 효과가 나타날 수 있을 것이라고 보고하였고¹⁹⁾, Pischon 등은 organoid culture 상태에서 EMD가 단백질의 합성을 증가시킬 수 있으나, 기질 광화 작용(mineralization)은 증가시키지 못한다고 하였다²⁰⁾.

효과적인 EMD의 농도에 대해서 여러 연구가 진행되었는데, 어느 농도가 최적이라는 결론은 아직 나오지 않은 상태이다. 실험에 따라 0.03 ug/ml에서 30 mg/ml까지 다양하게 관찰되었다. Davenport 등은 25 ug/ml, 50 ug/ml, 75 ug/ml, 100 ug/ml의 농도로 치주인대섬유아세포의 활성과 부착 정도를 관찰한 결과, 활성은 농도가 높을수록 감소하였다고 하였으나 부착은 도와준다고 하였다²¹⁾. Cattaneo 등은 100 ug/ml의 농도로 치주인대섬유아세포의 증식과 형태를 관찰하였고¹⁵⁾, Chano 등은 3 mg/ml과 30 mg/ml의 농도로 쥐에 대한 실험을 하였는데, EMD가 백악질의 두께, 골의 양, 오스테오폰틴이나 시알로프로테인 등에서 효과를 나타내지 못했다고 보고하였다¹⁶⁾. 정 등은 치주인대섬유아세포에 대한 EMD의 효과에 관한 연구에서 100 ug/ml의 농도를 사용하였고²²⁾, 김 등은 0.03 ug/ml에서 300 ug/ml까지의 농도로 사용하였다²³⁾. Rincon 등은 EMD를 농도별로 치주인대섬유아세포, 치은섬유아세포 등에 적용시킨 결과, EMD의 농도가 20 ug/ml에서 세포분화를 가장 잘 촉진시켰다고 하였다²⁴⁾. Schlueter 등은 미세혈관세포에 대한 EMD의 효과를 관찰하였는데, 25 ug/ml, 50 ug/ml, 100 ug/ml의 농도를 사용하였고, EMD의 농도가 50 ug/ml 이하일 때 인간 미세 혈관 내피 세포의 증식에 대한 효과가 크게 나타났다고 하였고, 모든 농도에서 혈관 생성이 증가하였다고 하였다²⁵⁾. 이번 실험에서는 25 ug/ml에서 100 ug/ml의 농도를 사용하였는데, 여러 연구에서 사용된 농도 중 많은 빈도를 보이며 중간 정도에 해당하는 것을 선택하였다.

EMD를 적용시키기 전 치석제거술이나 치근활택술을 시행하거나 치근면 탈회를 병행하여 효과를 높이고자 하는 노력들이 있어왔으며, 인산, 구연산, TCN, EDTA 등이 사용되었다. Davenport 등²¹⁾의 실험과 마찬가지로, 대다수의 실험에서는 탈회 제제가 한 가지만 사용되었으나, 이번 실험에서는 두 가지 탈회 제제를 비교하고자 하였다.

본 연구에서는 치주염에 이환된 자연치를 사용하였으며,

치근활택술 후 세포 형성을 관찰하였다. 임상적 상황을 재현하기 위해서 실험에 사용된 치아 표면을 TCN과 EDTA로 탈회하였고, 가장 많은 실험에서 사용된 농도인 25 ug/ml, 50 ug/ml, 100 ug/ml를 사용하였다. 실험시 EMD를 적용시키는 방법도 다양하게 행하여졌다. 배양액에 EMD를 희석시키는 방법이 많이 사용되었고, 배지에 EMD를 코팅시키는 방법도 사용되었다¹⁴⁾. 배양액에 희석시킬 때 증류수를 사용한 경우도 있었으나, EMD의 단백질 조성 때문에 생리적인 pH에서는 녹지 않고 산성에서 용해도가 증가한다는 연구가 있었다. 그래서 이번 연구에서는 5 mM acetic acid를 사용하여 용해도를 증가시켰다. Hoang 등은 EMD를 배양액에 희석시켜 처리한 군과 배지에 코팅시켜 처리한 군간의 치주인대섬유아세포의 증식을 비교하였을 때 유의성있는 차이가 나타나지 않았다고 하였고, 법랑기질유도체가 임상적으로 적용되었을 때 치주인대세포의 분화와 이동을 특정하게 조절함으로써 치주조직 재생을 촉진시킨다고 하였다⁶⁾.

EMD는 이종 동물에서 추출되는 물질이기 때문에 임상적으로 사용될 경우 안정성이 보장이 될지, 부작용은 없는지의 여부가 중요한 문제로 대두될 수 있다. Yuan 등은 돼지에서 추출된 EMD가 IgG를 포함하고 있으며, 인체에 사용시 항원항체 반응을 유도할 수 있다고 하였다. 그렇지만 증가된 항체가 치주인대섬유아세포에 대한 EMD의 기능의 하나인 TGF- β 1의 생산을 방해하지는 못한다고 하였고²⁶⁾, George 등은 외과적 골연하양의 처치에 EMD를 적용시켰을 때, 6개월에서 24개월까지 관찰한 결과 염증성 치근 흡수가 관찰된 경우가 있었다고 보고하였다²⁷⁾.

EMD를 사용할 때, 다른 요소를 같이 사용하여 부가적인 효과를 얻고자 하는 연구들도 진행되었다. Rodrigues 등은 EMD와 TGF- β 1를 치주인대 세포에 적용시킨 결과, EMD는 치주인대 세포의 분화, 이동, 단백질 합성, 알칼리성 인산효소 활성 등을 촉진시키고, TGF- β 1는 세포 부착을 증가시키나, 두 요소를 결합시켰을 때에는 바라는 효과가 나타나지 않았다고 보고하였다²⁸⁾. 이번 실험에서는 다른 요소를 같이 사용하지 않고 EMD 단독으로 적용시켰다. Cattaneo 등은 EMD로 처리한 치주인대섬유아세포를 주사전자현미경으로 관찰한 결과, 납작한 표면과 부드럽고 둥근 외형을 가진 형태로 보였고, 대조군의 세포는 다른 형태를 나타내는데 이들은 확장된 모양, 거친 형태 등 섬유아세포의 전형적인 특징을 보인다고 하였다¹⁵⁾. 이러한 명백한 외형적인 변화는 EMD 처리된 세포가 기능적인 분화를 보였다는 것을 의

미하지만, 법랑아세포의 구분은 특별한 표지자가 없기 때문에 어렵다고 하였다. 법랑아세포는 다각형의 형태를 나타내며, 조골세포(사각형 형태) 모양이나 편평한 형태의 두 가지 외형을 보인다²⁹⁻³⁰⁾. 일부 연구자들은 알칼리성 인산효소를 조사하여 백악아세포를 구분하는데 사용하였는데, 이 효소가 증등 정도로 나타나면 치주인대섬유아세포이고, 활동성이 보이지 않으면 백악아세포라고 하였다²⁹⁻³⁰⁾. 그러나 이번 실험에서 관찰한 결과, 대조군과 EMD에서 배양한 군을 비교해 보았을 때 외형상의 차이를 발견하기는 어려웠고, 탈회 후 EMD액에 배양한 군은 탈회만 한 군에 비해 부착된 세포수가 증가한 소견을 보였으며, 치근절편상에 매우 편평하게 부착되는 양상을 나타내었다.

본 연구에서 세포수를 관찰하였을 때, 음성 대조군이나 TCN과 EDTA로 탈회한 군, EMD에 배양한 군을 비교해 보았을 때, 치근 탈회만 시행된 군은 7일, 14일 모두 TCN으로 탈회한 군이 EDTA로 탈회한 군보다 많이 보였으나 유의성은 없었고, EMD에 배양된 군은 7일, 14일 모두 25 ug/ml 및 100 ug/ml 농도에서는 TCN으로 탈회된 군이 높았고 50 ug/ml에서는 EDTA로 탈회된 군이 높게 나타났다. 배양 7일과 14일째 EDTA 탈회 후 50 ug/ml 및 100 ug/ml 농도의 EMD에 배양한 군에서 EDTA로 탈회만 시킨 군에 비해 통계학적으로 유의성 있는 세포증식이 관찰되었고, TCN 탈회 후 100 ug/ml 농도의 EMD에 배양한 군에서 TCN으로 탈회만 시킨 군에 비해 통계학적으로 유의성 있는 세포증식이 관찰되었다. 이러한 결과는 치근 탈회만으로도 세포수 증가에 효과가 있음을 입증하였고, 부가적으로 EMD를 처리하면 더 좋은 결과를 얻을 수 있음을 보였다. EMD의 농도는 저농도보다는 100 ug/ml의 고농도에서 더 많은 세포수를 보였는데, 이 결과는 Davenport²¹⁾, Rincon²⁴⁾, Schlueter²⁵⁾ 등의 실험과는 다소 다른 양상을 나타내었으나 Cattaneo¹⁵⁾의 실험과는 유사한 양상을 보였다.

알칼리성 인산효소를 관찰한 결과, 치근 탈회만 시행된 군은 7일째는 EDTA로 탈회한 군이 TCN으로 탈회한 군보다 활성이 높게 나타났고, 14일째는 TCN으로 탈회한 군이 활성이 높게 나타났으나 유의성은 없었다. EMD에 배양한 군은 7일, 14일째 모두 EDTA로 탈회 후 100 ug/ml의 농도를 적용시켰을 때가 가장 높게 나타났고, 배양 7일 및 14일 모두 EDTA 탈회 후 50 ug/ml 및 100 ug/ml 농도의 EMD에 배양한 군에서 EDTA로 탈회만 시킨 군에 비해 통계학적으로 유의성 있는 알칼리성 인산효소의 활성이 관찰되었다.

이러한 결과는 EDTA가 TCN보다 치주인대 세포의 분화 촉진에 다소 유리하게 작용한다고 해석할 수 있는데, 산성을 띠는 탈회 물질이 분화억제의 영향을 미친 것으로 추측되며, 유의성을 찾기는 어려웠다.

또한 배양 7일과 14일 모두 TCN 처리 후 25 ug/ml 및 100 ug/ml 농도의 EMD에 배양한 군에서 TCN으로 탈회만 시킨 군에 비해 통계학적으로 유의성 있는 알칼리성 인산효소의 활성이 관찰되었는데, 50 ug/ml 농도의 군에서 25 ug/ml 및 100 ug/ml 농도의 군보다 알칼리성 인산효소의 활성이 유의성있게 낮게 관찰된 것은 의외의 결과이며, 원인을 찾기는 어려웠으며, 앞으로 추가 연구가 필요할 것으로 보인다.

단백질 합성능을 측정한 결과, 7일, 14일 모두 EDTA로 처리 후 50 ug/ml의 농도를 적용시켰을 때가 가장 높게 나타났고, EDTA로만 처리한 군은 대조군을 제외하고 7일, 14일 모두 가장 낮게 나타났다. 배양 7일 및 14일 모두 EDTA 처리 후 25 ug/ml 및 50 ug/ml 농도의 EMD에 배양한 군에서 EDTA로 탈회만 시킨 군에 비해 통계학적으로 유의성 있는 단백질 합성이 관찰되었다. 100 ug/ml 농도의 EMD에 배양한 군에서 유의성있게 단백질 합성이 낮게 관찰된 것은 의외의 결과이며, 추가 연구가 필요한 것으로 보인다. 또한 배양 7일째 TCN 처리 후 100 ug/ml 농도의 EMD에 배양한 군에서 TCN으로 탈회만 시킨 군에 비해 통계학적으로 유의성 있는 단백질 합성이 관찰되었다. 이러한 결과는, 치근면의 탈회만으로는 세포를 증식시키는 데에 한계가 있으나, EMD와 같이 적용될 경우 세포의 증식에 부가적인 효과가 큰 것으로 생각된다.

본 실험의 결과는 치근면의 탈회 후 EMD에서 배양한 치주인대섬유아세포가 증식, 분화, 부착에서 부가적인 효과를 보이는 것을 관찰할 수 있으며, 이는 임상에서도 유용하게 EMD를 사용할 수 있음을 보여준다. 그러나 가장 적절한 EMD의 농도에 대해서는 보다 많은 연구가 요구되며, EMD와 함께 사용할 수 있는 효과적인 탈회 제제에 대해서도 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Peter Eickholz. Long term result of guided tissue regeneration therapy with nonresorbable and bioabsorbable barrier. *J Periodontol* 2001;72:35-42.
2. Hoang AM, Klebe RJ, Steffensen B, et al. Amelogenin is a cell adhesion protein. *J Dent Res* 2002;81:497-500.
3. Van der Pauw MT, Van den Bos T, Everts V, Beertsen W. Enamel matrix derived protein stimulates attachment of periodontal ligament fibroblasts and enhances alkaline phosphatase activity and transforming growth factor β release of periodontal ligamental and gingival fibroblasts. *J Periodontol* 2000;71:31-43.
4. Stuart J. Froum. A comparative study utilizing open flap debridement with and without enamel matrix derivative in the treatment of periodontal intrabony defects. *J Periodontol* 2001;72:25-34.
5. Hakki SS, Berry JE, Somerman MJ. The effect of enamel matrix protein derivative on follicle cells in vitro. *J Periodontol* 2001;72:679-687.
6. Hoang AM, Oates TW, Cochran DL. In vitro wound healing responses to enamel matrix derivative. *J Periodontol* 2000;71:1270-1277.
7. Kawase T, Okuda K, Yoshie H, Burns DM. Cytostatic action of enamel matrix derivative (EMDOGAIN) on human oral squamous cell carcinoma-derived SCC25 epithelial cells. *J Periodontal Res* 2000;35:291-300.
8. Pitaru S, Melcher AH. Organization of an oriented fiber system in vitro by human gingival fibroblast attached to dental tissue: relationship between cells and mineralized and demineralized tissue. *J Periodontal Res* 1987;22:6-13.
9. Madison JG 3rd, Hokett SD. The effects of different tetracyclines on the dentin root surface of instrumented, periodontally involved human teeth: a comparative scanning electron microscopy study. *J Periodontol* 1997;68:739-745.
10. Behavior of human periodontal ligament cells on CO₂ laser irradiated dentinal root surfaces: an in vitro study. *J Periodon Res* 2004;39:373-379.
11. Hammarström L, Gestrelus S. Periodontal regeneration in a buccal dehiscence model in monkeys after application of enamel matrix proteins. *J Clin Periodontol* 1997;24:669-677.
12. Gestrelus S, Andersson C, Lidstrom D, Hammarström L, Somerman M. In vitro studies on periodontal ligament cells and enamel matrix derivative. *J Clin Periodontol* 1997;24:685-692.
13. Lyngstadaas SP, Lunderberg E, Ekdahl H, Andersson C, Gestrelus S. Autocrine growth factors in human periodontal ligamental cells cultured on enamel matrix

- derivative. *J Clin Periodontol* 2001;28:181-188.
14. Haase HR, Bartold PM. Enamel matrix induces matrix synthesis by cultured human periodontal fibroblast cells. *J Periodontol* 2001;72:341-348.
 15. Cattaneo V, Rota C, Silverstri M, et al. Effect of enamel matrix derivative on human periodontal fibroblast: proliferation, morphology and root surface colonization. An in vitro study. *J Periodont Res* 2003;38:568-574.
 16. Chano L, Tenenbaum HC, Lekic PC, Sodek J, McCulloch CA. Emdogain regulation of cellular differentiation in wounded rat periodontium. *J Periodontal Res* 2003;38:164-174.
 17. Ohyama M, Suzuki N, Yamaguchi Y, et al. Effect of enamel matrix derivative on the differentiation of C2C12 cells. *J Periodontol* 2002;73:543-550.
 18. You-Seok Kim, Hyun-Seon Jang, Ju-chol Park, et al. The effect of enamel matrix derivative(EMD) in combination with deproteinized bovine bone material(DBBM) on the early wound healing of rabbit calvarial defects. *J Korean Acad Periodontol* 2005;35:199-216.
 19. Chong CH, Carnes DL, Moritz AJ, et al. Human periodontal fibroblast response to enamel matrix derivative, amelogenin, and platelet-derived growth factor-BB. *J Periodontol* 2006;77:1242-1252.
 20. Pischon N, Zimmermann B, Bernimoulin JP, Hagewald S. Effects of enamel matrix derivative on human osteoblasts and PDL cells grown in organoid cultures. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodod* 2006;102:551-557.
 21. Davenport DR, Mailhot JM, Wataha JC, et al. Effects of enamel matrix protein application on the viability, proliferation, and attachment of human periodontal ligament fibroblasts to diseased root surfaces in vitro. *J Clin Periodontol* 2003;30:125-131.
 22. Jeong YJ, Kim KW, Kim TI, et al. The Effects of enamel matrix derivatives on the proliferation and gene expression of PDL fibroblast, SaOs₂ cells and Cementum derived cells. *J Korean Acad Periodontol* 2005;35:321-333.
 23. Kim DW, Chung CH, Lim SB, Ko SY. Effects of enamel matrix protein derivatives on the periodontal ligament like fibroblast and osteoblast like cells. *J Korean Acad Periodontol* 2003;33:225-246.
 24. Rincon JC, Haase HR, Bartold PM. Effect of Emdogain on human periodontal fibroblasts in an in vitro wound-healing model. *J Periodontal Res* 2003;38:290-295.
 25. Schlueter SR, Carnes DL, Cochran DL. In vitro effects of enamel matrix derivative on microvascular cells. *J Periodontol* 2007;78:141-151.
 26. Yuan K, Hsu CW, Tsai WH. The induction and possible subsequent effect of human antibodies against porcine enamel matrix derivative. *J Periodontol* 2006;77:1355-1361.
 27. St George G, Darbar U, Thomas G. Inflammatory external root resorption following surgical treatment for intrabony defects: a report of two cases involving Emdogain and a review of literature. *J Clin Periodontol* 2006;33:449-454.
 28. Rodrigues TL, Marchesan JT, Coletta RD, et al. Effects of enamel matrix derivative and transforming growth factor-beta 1 on human periodontal ligament fibroblasts. *J Clin Periodontol* 2007;34:514-522.
 29. Gao J, Symons AL, Haase H, Bartold PM. Should cementoblasts express alkaline phosphatase activity? Preliminary study of rat cementoblasts in vitro. *J Periodontol* 1999;70:951-959.
 30. Tenorio D, Cruchley A, Hughes FJ. Immunocytochemical investigation of the rat cementoblast phenotype. *J Periodont Res* 1993;28:411-419.

