

배양된 사람 치주인대세포와 골수유래간엽줄기세포의 분화에 미치는 법랑기질유도체 (Enamel Matrix Derivative, EMD)의 영향

박상규 · 주성숙¹ · 권용대 · 최병준 · 김영란 · 이백수

경희대학교 치의학전문대학원 구강악안면외과학교실, 구강생물학연구소

¹경희대학교 치의학전문대학원 해부학교실

Abstract

EFFECT OF ENAMEL MATRIX DERIVATIVE (EMD, EMDOGAIN®) ON THE DIFFERENTIATION OF CULTURED HUMAN PERIODONTAL LIGAMENT CELLS AND MESENCHYMAL STEM CELLS

Sang-Gyu Park, Seong-Suk Jue¹, Yong-Dae Kwon, Byung Joon Choi, Young-Ran Kim, Baek Soo Lee

Departments of Oral and Maxillofacial Surgery, Institute of Oral biology, Kyung Hee University Dental School, Seoul, Korea

¹Departments of Oral anatomy, Kyung Hee University Dental School, Seoul, Korea

Introduction: Enamel matrix derivative (EMD) is a protein which is secreted by Hertwig root sheath and plays a major role in the formation of cementum and attachment of peridontium. Several studies have shown that EMD promoted the proliferation and differentiation of preosteoblasts, osteoblasts and periodontal ligament cells in vitro; however, reports showing the inhibition of osteogenic differentiation by EMD also existed. This study was designed to simultaneously evaluate the effect of EMD on the two cell lines (human mesenchymal stem cells: hMSC, human periodontal ligament derived fibroblasts : hPDLCs) by means of quantitative analysis of some bone related matrices (Alkaline phosphatase : ALP, osteopontin : OPN, osteocalcin : OC).

Materials and Methods: hMSCs and hPDLCs were expanded and cells in the 4~6 passages were adopted to use. hMSC and hPDLCs were cultured during 1,2,7, and 14 days with 0, 50 and 100 µg/ml of EMD, respectively. ALP activity was assessed by SensoLyte ALP kit and expressed as values of the relative optical density. Among the matrix proteins of the bony tissue, OC and OPN were assessed and quantification of these proteins was evaluated by means of human OC immunoassay kit and human OPN assay kit, respectively.

Results: ALP activity maintained without EMD at 1,2nd day. The activity increased at 7th day but decreased at 14th day. EMD increased the activity at 14th day in the hPDLCs culture. In the hMSCs, rapid decrease was noted in 7th and 14th days without regard to EMD concentrations. Regarding the OPN synthesis in hPDLCs, marked decrease of OPN was noted after EMD application. Gradual decrease tendency of OPN was shown over time. In hMSCs, marked decrease of OPN was also noted after EMD application. Overall concentration of OPN was relatively consistent over time than that in hPDLCs. Regarding the OC synthesis, in both of hPDLCs and hMSCs, inhibition of OC formation was noted after EMD application in the early stages but EMD exerted minimal effect at the later stages.

Conclusion: In this experimental condition, EMD seemed to play an inhibitory role during the differentiation of hMSCs and hPDLCs in the context of OC and OPN formation. In the periodontium, there are many kinds of cells contributing to the regeneration of oral tissue. EMD enhanced ALP activity in hPDLCs rather than in hMSCs and this may imply that EMD has a positive effect on the differentiation of cementoblasts compared with the effect on hMSCs.

The result of our research was consistent with recent studies in which the authors showed the inhibitory effect of EMD in terms of the differentiation of mineral colony forming cells in vitro. This in vitro study may not stand for all the characteristics of EMD; thus, further studies involving many other bone matrices and cellular attachment will be necessary.

Key words: Enamel matrix derivative, Human mesenchymal stem cell, Human periodontal ligament derived fibroblasts

I. 서 론

법랑기질단백은 치아발생 과정 중 Hertwig 상피근초에서 분비되며, 시멘트질 형성과 치주조직의 부착에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다¹⁾. 법랑기질유도체 (Enamel Matrix Derivatives, EMD; Emdogain[®], Straumann, Switzerland)는 상업적으로 생산되고 있는 법랑기질단백으로, 발육중인 돼지 치배의 법랑기관에서 추출한 법랑기질단백으로 구성되어 있다²⁾.

임플란트 시술 후 골 재생 시 EMD 효과에 대한 기대가 높아지면서 이에 대한 많은 연구가 진행되어 왔으나 성공적인 치주부착의 획득과는 달리 골증강술에 있어 그다지 성공적이지 못하다는 연구도 보고되고 있다. 또한 EMD가 전골모세포, 골모세포, 치주인대세포의 증식과 분화를 촉진한다는 연구보고가 있으나³⁻⁷⁾ 골모세포 분화를 저하시킨다는 보고도 있었다^{8,9)}.

인간 골수유래 간엽줄기세포(bone marrow derived human mesenchymal stem cells; hMSCs)는 미분화세포로 자기증식력을 가지고 있으며, 중배엽계의 다양한 세포로 분화할 수 있는 능력을 가지고 있다¹⁰⁾. 따라서 치조골을 포함한 안면골에서는 골모세포로 분화되어 골형성에 중요한 역할을 할 것으로 생각된다.

본 연구에서는 hMSCs와 인간 치주인대유래 섬유모세포(human periodontal ligament derived fibroblasts; hPDLs)의 분화에 EMD가 미치는 영향을 알아보기 위하여 알칼리성 인산분해 효소 (alkaline phosphatase, ALP), osteocalcin (OC) 및 osteopontin (OPN)의 단백질 형성 정도를 평가해 보았다.

II. 실험재료 및 방법

1. 실험재료

hPDLs를 얻기 위해서 교정목적으로 발거된 소구치의 치주조직을 이용하였다. 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco, USA)과 penicillin (100 U/ml)- streptomycin (100 µg/ml) (Gibco, USA)이 포함된 멸균 Dulbecco's

modified eagle media (DMEM ; Gibco, USA)을 사용하여 37°C, 5% CO₂ 하에서 초대 배양하였으며 계대배양 4-6 세대의 세포를 실험에 사용하였다.

hMSCs를 얻기 위해 장골 이식이 예정된 전신 질환이 없는 환자에서 서면동의를 얻어 골 이식 후 남은 약간의 해면골을 채취하여 동일한 환경에서 초대 배양하였으며 역시 계대배양 4-6세대의 세포를 실험에 사용하였다. 이 때 채취된 세포가 간엽줄기세포인지를 확인하기 위해 유세포분석(flow cytometry)을 시행하였다. 배양된 세포를 anti-CD105-phycoerythrin(PE), anti-CD95, anti-CD34 항체와 반응시킨 후, Cell-Lab QuantaTMSC (Beckman Coulter, USA)기기를 통해 분석하였다. 그 결과 CD105, CD95와 같은 표면항원은 발견되었으나 hematopoietic lineage marker인 CD34표면항원은 발견되지 않았으며 95%이상이 hMSCs로 확인되었다.

2. 실험방법

1) ALP활성의 평가

24-well plate에 hPDLs와 hMSCs이 2×10⁴cel/ml/well이 되도록 sample을 형성한 후 0, 50, 100 µg/ml의 Emdogain[®] (Straumann, Switzerland)을 첨가하여 1일, 2일, 7일, 14일간 배양하였다. 배양액은 각 실험군별로 3일에 한 번씩 교환하였다. 이와 같이 배양된 세포들은 SensoLyteTM Alkaline Phosphatase Assay Kit (Anaspec, USA and Canada)를 이용하여 405nm 파장에서 ALP 활성을 평가하였다.

2) 세포의 기질 합성 평가

24-well plate에 hPDLs와 hMSCs이 2×10⁴cel/ml/well이 되도록 sample을 형성한 후 0, 50, 100 µg/ml의 Emdogain[®] (Straumann, Switzerland)을 첨가하여 1일, 2일, 7일, 14일간 배양하였다. 배양액은 각 실험군별로 3일에 한 번씩 교환하였다. 이와 같이 배양된 세포들은 골기질의 주요 단백질인 OC, OPN의 합성을 평가하기 위해 Human osteocalcin immunoassay kit (Biosource, USA)와 Human osteopontin assay kit (IBL, Japan)를

사용하여 450 nm의 파장에서 그 정도를 측정하였다.

III. 결 과

1. ALP 활성의 평가

hPDLCs의 ALP활성은 EMD를 첨가하지 않은 대조군 1 일째를 100%로 하여 비교하였다. 대조군의 경우, 2일째까지는 변화가 없다가 대조군 7일째에 최고치 (105.6%)를 보이고 14일째에는 다시 감소하였다. 이에 비해 EMD 50 $\mu\text{g/ml}$ 를 첨가한 군의 경우, 1일째부터 대조군보다 높은 ALP 활성을 보이며 (102.7%) 이 활성은 시간이 경과함에 따라 크게 변화하지 않는 것을 볼 수 있었다. EMD 100 $\mu\text{g/ml}$ 를 첨가한 군은 배양 1일째에는 대조군과 거의 유사한 효소활성을 나타냈지만, 2일째부터 효소활성이 증가하여 배양 14일째에 최고치 (107.9%)를 나타내었다 (Fig. 1).

hMSCs의 ALP 활성은 EMD를 첨가하지 않은 대조군 1 일째를 역시 100%로 하여 비교하였다. 대조군의 경우, 2일째까지는 변화가 없다가 7일째에 급격하게 감소하여 (91.6%) 14일째까지 유지되었다. EMD를 첨가한 경우에는 50 $\mu\text{g/ml}$ 첨가군과 100 $\mu\text{g/ml}$ 첨가군 모두 대조군과 마찬가지로의 경향을 보여서 배양 2일째에 최대활성을 보이고 7일째에 효소활성이 급격히 감소하였으며, 배양 14일째에는 배양 7일째에 비해 ALP활성이 더욱 감소하여 나타났다. EMD첨가 농도에 따른 차이를 살펴보면, 50 $\mu\text{g/ml}$ 를 첨가한 경우 1일째는 대조군과 유사한 활성을 보이지만 2일째에는 대조군에 비해 활성이 증가 (92.4%)하였고 7일째에 효소활성이 급격히 감소한 후 배양 14일째까지 지속적으로 활성이 감소하는 것이 관찰되었다. EMD를 100 $\mu\text{g/ml}$ 첨가한 경우에는 배양 1일째부터 효소 활성이 대조군이나 50 $\mu\text{g/ml}$ 첨가군에 비해 낮았으며, 다른 군과 마찬가지로 배양 2일째에 최대치를 보이고 이후 감소하였다 (Fig. 2).

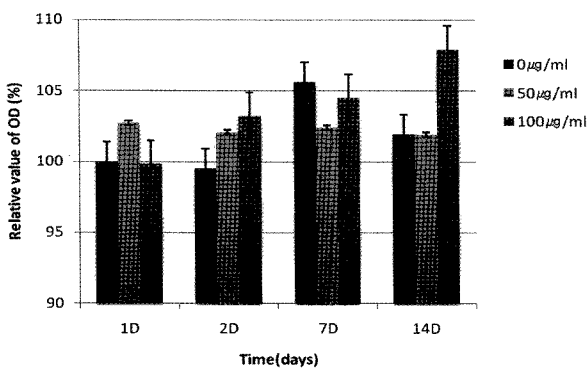


Fig. 1. ALP activity maintained without EMD at 1, 2nd day. The activity increased at 7th day but decreased at 14th day. EMD increased the activity at 14th day. (hPDLCs)

2. 세포의 기질 합성 평가

hPDLCs의 OPN 합성 정도를 살펴보면, 대조군의 경우 배양 시작 후 시간 경과에 따라 OPN 합성은 감소하는 것으로 관찰되었다. EMD를 첨가한 경우에는 대조군에 비해 OPN 합성이 감소되는 것이 관찰되었다. EMD 첨가군의 경우 대조군과는 달리 배양 1일에서 2일째까지는 OPN 합성이 감소하다가 7일째부터 다시 OPN 합성이 증가하는 양상을 보였다. 첨가된 EMD 양에 따라 비교하면, 7일째까지는 50 $\mu\text{g/ml}$ 첨가군에서 OPN 합성이 우세하게 나타나지만, 배양 14일째에는 100 $\mu\text{g/ml}$ 첨가군에서 OPN 합성이 우세하게 나타났다 (Fig. 3).

hMSCs의 경우, OPN 합성은 배양 2일째에 증가하였다가 이후 감소하였으나 큰 변화는 없었다. EMD를 첨가한 경우에는 대조군에 비해 OPN 합성이 크게 감소하여 hPDLCs와 같았으나 시간 경과에 따른 OPN 합성의 변화는 나타나지 않았다 (Fig. 4).

hPDLCs의 OC 합성정도를 살펴보면 대조군의 경우, 배양 2일째까지 감소하다가 배양 7일째에 크게 증가하고 배양 14일째에는 약간 더 증가하였다. EMD를 50 $\mu\text{g/ml}$ 첨가한 경우, 배양 2일째까지는 대조군보다 적은 OC 합성을 보였으나, 배양 7일째가 되면 대조군보다 많은 양의 OC 합성을 보였으며 이는 배양 14일까지도 지속되는 것을 볼 수 있었다. 이에 비해 EMD를 100 $\mu\text{g/ml}$ 첨가한 경우에는 배양기간 내내 대조군보다 적은 OC 합성을 보였다 (Fig. 5).

hMSCs의 OC 합성정도는 대조군의 경우, hPDLCs과 마찬가지로 배양 2일째까지 감소하다가 배양 7일째부터 증가하기 시작하는 것을 볼 수 있었다. EMD를 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 첨가한 경우에는 hPDLCs의 경우와 마찬가지로 배양 7일째부터 대조군보다 많은 양의 OC 합성이 관찰되었으며 이는 배양 14일까지 지속되었으나, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 첨가한 경우에는 배양기간 내내 대조군보다 적은 OC 합성을 보였다 (Fig. 6).

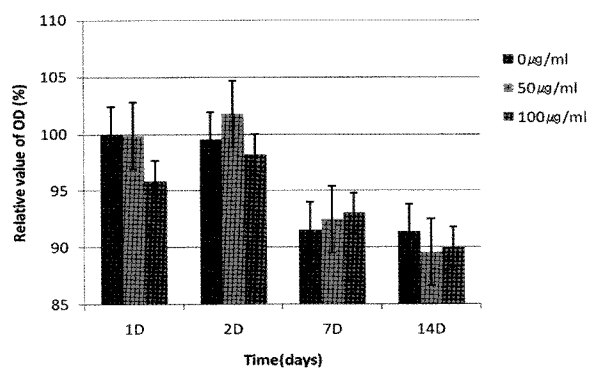


Fig. 2. Rapid decrease of ALP activity was noted from 7th and 14th days (hMSCs).

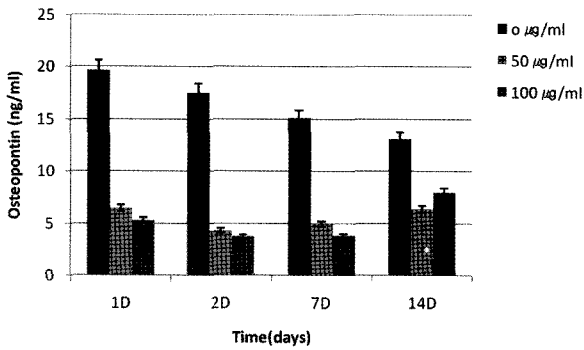


Fig. 3. Quantitative analysis of OPN in hPDLc cultures. Marked decrease of OPN was noted after EMD application. Gradual decrease tendency of OPN over time.

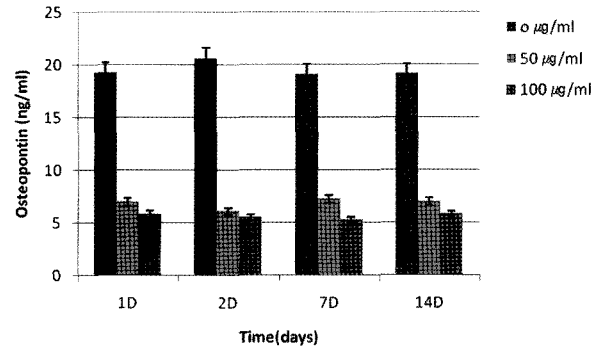


Fig. 4. Quantitative analysis of OPN in hMSCs cultures. Marked decrease of OPN was noted after EMD application. Overall concentration of OPN was relatively consistent over time.

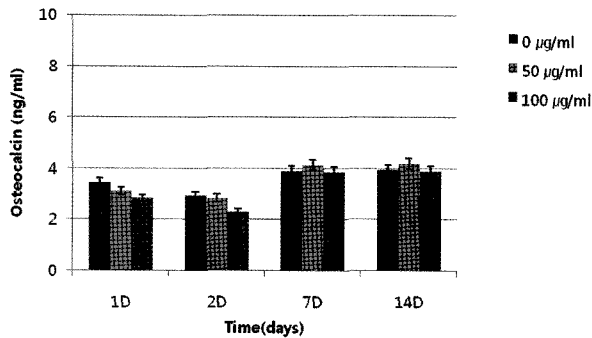


Fig. 5. Quantitative analysis of OC in hPDLc cultures. EMD application decreased OC concentration in early stages but almost remained same in the later stages.

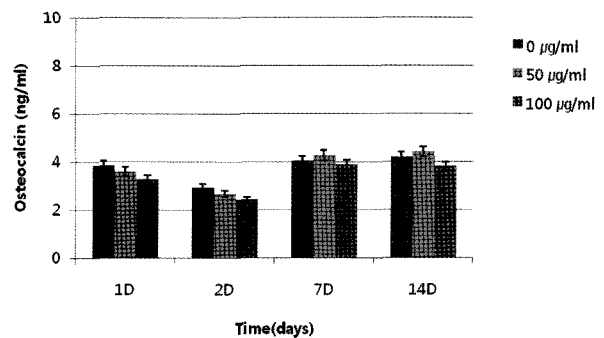


Fig. 6. Quantitative analysis of OC in hMSCs cultures. EMD application decreased OC concentration in the early stages. In the later stages, OC concentration increased but EMD exerted minimal effect on the OC formation.

IV. 총괄 및 고찰

지금까지 치아상피로부터 유래하는 EMD가 손상된 치주 조직의 재생에 도움이 되는지를 증명하기 위해 여러 실험들이 시행되어 왔다. 그 결과 EMD는 치주조직 치유 시 세포와 기질간에 긍정적인 상호작용이 일어나게 하는 것으로 나타났다¹¹⁾ 실제 임상적으로도 손상된 치주조직의 부착수준을 개선시킴을 보여주고 있다¹²⁾. 또한 Okuda 등은¹³⁾ 치주수술 후 EMD를 적용하였을 때 치은열구액 내 TIMP-1, MMP-1 및 MMP-8이 빠르게 감소함으로써 치유과정이 촉진된다고 보고하였다.

He 등³⁾은 EMD가 골모세포의 증식과 분화를 촉진하고 osteoprotegerin (OPG)과 같은 단백질 발현을 촉진한다고 하였는데 이는 골조직의 생산과 흡수 조절에 영향을 미침을 뜻한다. 또한 EMD가 다양한 농도에서 골모세포의 전반적인 대사활성을 증가시킨다는 연구도 있었으며 이러한 대사활성의 증가는 골 결손부의 재생을 촉진한다고 생각되었다¹⁵⁾. 반면, 최근 여러 연구자들은 EMD가 골모세포의 분화를 촉진

하지 못하며 오히려 분화를 방해한다고 보고하였으며 이와 같은 결과들은 EMD를 임플란트를 위한 골유도재생술이나 골이식술에 사용하는데 보다 신중해야함을 나타낸다.

이와 같은 연구결과들을 근거로 하여 EMD를 임플란트 식립부위에 각종 골 이식체와 함께 사용하려는 연구들이 있었다. Shimizu-Ishiura 등¹⁶⁾은 쥐의 두정골 세포 형성과 결합이 EMD를 첨가한 실험군이 대조군보다 향상되었음을 보고하였다. Yeneda 등⁹⁾은 Wistar rat의 두정골에 골 결손부를 만들어 EMD + atelocollagen 사용한 실험군과 atelocollagen만 사용한 대조군의 방사선 사진 비교 결과, 실험군에서 골 치유가 향상된 것으로 나타났다. 그러나 Donos¹⁷⁾는 Rat의 하악지에 형성한 골결손부의 연구에서 EMD가 새로운 골 형성에 아무런 영향을 주지 못하였다고 보고하였다.

Schwartz 등²⁰⁾은 세포주에 따른 EMD의 다양한 효과를 알아보기 위해 2T9세포(pre-osteoblasts), MG63 (Human osteoblast-like sarcoma cell), Normal human osteoblasts(NHOst cell)를 이용하여 증식과 분화의 변화

정도를 실험하였다. 2T9세포는 EMD를 첨가하였을 때 증식력이 향상되었으나 ALP의 활성화에는 변화가 없었으며 MG63세포에서는 ALP의 활성화 및 OC 생성이 증가되는 것으로 나타났다. 한편 normal human osteoblasts(NHOst cell)에 EMD를 첨가하였을 때 증식력과 ALP활성이 증가되었다고 보고하였다.

치주인대는 치근과 주위 치조골 사이에 위치하는 결합조직으로써 각각 시멘트질과 치조골을 형성하는 시멘트질모세포와 골모세포, 치주인대 섬유성분 및 기질을 형성하는 섬유모세포, 그리고 이들 모든 세포로 분화할 수 있는 능력을 지닌 미분화중간엽세포 모두를 포함하는 조직이다. 위에서 설명한 바와 같이 EMD가 골모세포 분화를 방해하는 역할을 할 수 있음에도 불구하고 치주조직 재생과정에서는 재생을 촉진하는 결과를 나타내는 것은 치주인대 조직 내에 있는 다양한 세포들에 대한 EMD의 효과가 서로 다르기 때문인 것으로 생각된다. 이에 본 실험에서는 hMSCs과 hPDLCs에 EMD가 어떠한 영향을 미치는지 살펴보고자 하였다.

실험결과 hMSCs과 hPDLCs에 EMD를 적용하였을 때, 시간 경과에 따라 ALP 활성이 각각 다르게 변화하는 것을 관찰할 수 있었다. hMSCs의 경우 배양 1일째에 비해 2일째에서 ALP 활성이 약간 증가하였다가 이후 감소하였으나, 전체적으로 거의 유사하게 ALP 활성이 유지되었다 (Fig. 2). 그러나 hPDLCs의 경우에는 배양 7일째까지 ALP 활성은 지속적으로 증가하였으며 이후 감소하는 양상을 보였다 (Fig. 1). 이는 hPDLCs의 heterogeneity에 의한 것으로 생각된다²¹⁾. 즉, hMSCs과 달리 hPDLCs는 간엽줄기세포와 시멘트질모세포의 두 가지 서로 다른 경조직형성세포로 분화 가능하고 이들 세포들의 분화 속도가 서로 상이하기 때문에 나타나는 결과인 것으로 생각된다. 이러한 결과로 볼 때 EMD가 간엽줄기세포보다는 시멘트질모세포의 분화, 특히 시멘트질모세포의 ALP 활성화 증가에 크게 기여하는 것으로 조심스럽게 예상해 볼 수 있다.

In vitro의 본 연구가 EMD의 성질을 모두 대표할 수는 없으며 또한 경조직 재생에 관련되는 보다 다양한 세포의 기질에 대한 추가적인 연구가 필요하며 세포 분화 이외에도 세포의 부착 및 증식 등에 관한 보다 다양한 접근이 필요할 것이다.

V. 결 론

EMD가 hMSCs와 hPDLCs의 ALP 활성화와 OPN 및 OC 합성에 미치는 영향을 살펴보았으며 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 50 µg/ml 농도의 EMD는 hPDLCs의 ALP 활성을 배

양 1일째부터 향상시켰으며 이는 시간변화에 따라 일정하게 유지되어, 배양 1, 2일째에 대조군보다 높은 ALP 활성을 보였다. 100 µg/ml 농도의 EMD는 배양 2일째부터 hPDLCs의 ALP 활성을 향상시켜 배양 14일째까지 지속적으로 증가시켰으며 이 기간 내내 대조군보다 높은 ALP 활성을 보였다.

2. 50 µg/ml 농도의 EMD는 배양 2일째에 hMSCs의 ALP 활성을 증가시켰다가 7일째부터 감소시켰으며, 배양 2일과 7일에 대조군보다 높은 ALP 활성을 보였다. 100 µg/ml 농도의 EMD도 배양 2일째에 ALP 활성을 증가시켰다가 7일째부터 감소시켰으며, 배양 7일째에 대조군보다 높은 ALP 활성을 보였다.
3. hPDLCs와 hMSCs 모두 EMD 첨가에 의해 OPN 합성이 감소하였다.
4. OC 합성은 모든 군에서 배양 2일째까지 감소하다가 7일째에 증가하는 양상을 보였는데, EMD 50 µg/ml 첨가군의 경우 배양 7일째부터 대조군보다 높은 OC 합성을 보였다.

이상의 결과로 보아 EMD는 hPDLCs과 hMSCs의 ALP 활성을 향상시킬 수 있으며 OC 합성을 촉진할 수 있는 것으로 보인다. 또한 EMD의 효과는 hMSCs보다는 hPDLCs에서 더욱 뚜렷하게 나타나는 것으로 생각된다.

References

1. Hammarstrom L : Enamel matrix, cementum development and regeneration. J of clinical periodontology 24 : 658, 1997.
2. Venezia E, Goldstein M, Boyan BD *et al* : The use of enamel matrix derivative in the treatment of periodontal defects: a literature review and meta-analysis. Crit Rev Oral Biol Med 15 : 382, 2004.
3. He J, Jiang J, Safavi KE *et al* : Emdogain promotes osteoblast proliferation and differentiation and stimulates osteoprotegerin expression. Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics 97 : 239, 2004.
4. Jiang J, Fouad AF, Safavi KE *et al* : Effects of enamel matrix derivative on gene expression of primary osteoblasts. Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics 91 : 95, 2001.
5. Jiang J, Goodarzi G, He J *et al* : Emdogain-gel stimulates proliferation of odontoblasts and osteoblasts. Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics 102 : 698, 2006.
6. Jiang J, Safavi KE, Spangberg LS *et al* : Enamel matrix derivative prolongs primary osteoblast growth. J of endodontics 27 : 110, 2001.
7. Lossdorfer S, Sun M, Gotz W *et al* : Enamel matrix derivative promotes human periodontal ligament cell differentiation and osteoprotegerin production in vitro. J of dental research 86 : 980, 2007.
8. Hama H, Azuma H, Seto H *et al* : Inhibitory effect of enamel matrix derivative on osteoblastic differentiation of

- rat calvaria cells in culture. *J of periodontal research* 43 : 179, 2008.
9. Yoneda S, Itoh D, Kuroda S *et al* : The effects of enamel matrix derivative (EMD) on osteoblastic cells in culture and bone regeneration in a rat skull defect. *J of periodontal research* 38 : 333, 2003.
 10. Chamberlain G, Fox J, Ashton B *et al* : Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells* 25 : 2739, 2007.
 11. Gestrelus S, Andersson C, Lidstrom D *et al* : In vitro studies on periodontal ligament cells and enamel matrix derivative. *J of clinical periodontology* 24 : 685, 1997.
 12. Sculean A, Windisch P, Keglevich T *et al* : Clinical and histologic evaluation of human intrabony defects treated with an enamel matrix protein derivative combined with a bovine-derived xenograft. *Int J Periodontics Restorative Dent* 23 : 47, 2003.
 13. Okuda K, Miyazaki A, Momose M *et al* : Levels of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 and matrix metalloproteinases-1 and -8 in gingival crevicular fluid following treatment with enamel matrix derivative (EMDOGAIN). *J of periodontal research* 36 : 309, 2001.
 14. He J, King Y, Jiang J *et al* : Enamel matrix derivative inhibits TNF-alpha-induced apoptosis in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics* 99 : 761, 2005.
 15. Hagewald S, Pischon N, Jawor P *et al* : Effects of enamel matrix derivative on proliferation and differentiation of primary osteoblasts. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics* 98 : 243, 2004.
 16. Shimizu-Ishiura M, Tanaka S, Lee WS *et al* : Effects of enamel matrix derivative to titanium implantation in rat femurs. *J Biomed Mater Res* 60 : 269, 2002.
 17. Donos N, Bosshardt D, Lang N *et al* : Bone formation by enamel matrix proteins and xenografts: an experimental study in the rat ramus. *Clin Oral Implants Res* 16 : 140, 2005.
 18. Keila S, Nemcovsky CE, Moses O *et al* : In vitro effects of enamel matrix proteins on rat bone marrow cells and gingival fibroblasts. *J of dental research* 83 : 134, 2004.
 19. Van der Pauw MT, Van den Bos T, Everts V *et al* : Enamel matrix-derived protein stimulates attachment of periodontal ligament fibroblasts and enhances alkaline phosphatase activity and transforming growth factor beta1 release of periodontal ligament and gingival fibroblasts. *Journal of periodontology* 71 : 31, 2000.
 20. Schwartz Z, Carnes DL, Lohmann CH *et al* : Porcine fetal enamel matrix derivative stimulates proliferation but not differentiation of pre-osteoblastic 2T9 cells, inhibits proliferation and stimulates differentiation of osteoblast-like MG63 cells, and increases proliferation and differentiation of normal human osteoblast NHOst cells. *J of periodontology* 71 : 1287, 2000.
 21. Lekic P, McCulloch CA : Periodontal ligament cell population: the central role of fibroblasts in creating a unique tissue. *Anat Rec* 245 : 327, 1996.

저자 연락처

우편번호 130-701
서울특별시 동대문구 회기동 1번지
경희대학교 치의학전문대학원 부속병원 구강약안면외과
이백수

원고 접수일 2009년 4월 8일
게재 확정일 2009년 7월 8일

Reprint Requests

Baek Soo Lee
Hoegi 1, Dongdaemunku, Seoul, 130-701, Korea
Dept. of OMFS, KyungHee University Dental School
TEL : 82-2-958-9440
E-mail : leeb@s@khu.ac.kr

Paper received 8 April 2009
Paper accepted 8 July 2009