

Gallate로 표면 코팅된 이중인산칼슘 골이식재가
골형성에 미치는 영향

연세대학교 대학원

치 의 학 과

박 노 제

Gallate로 표면 코팅된 이중인산칼슘 골이식재가 골형성에 미치는 영향

지도 정 문 규 교수

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함

2011년 12월 일

연세대학교 대학원

치 의 학 과

박 노 제

박노제의 박사 학위논문을 인준함

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

연세대학교 대학원

2011년 12월 일

감사의 글

본 논문이 완성되기까지 많은 격려와 지도 편달해 주신 정문규 교수님께 진심으로 감사드립니다. 논문의 작성 및 심사에 아낌없는 조언과 도움을 주신 이근우 교수님, 문홍석 교수님, 정한성 교수님 그리고 권공록 교수님께도 감사드립니다.

실험의 전 과정과 논문 작성까지 일일이 살펴주신 김성태 교수님, 기초실험을 맡아 주신 오승한 교수님, 문석준 교수님께 감사의 인사를 드리며 동물실험에 많은 도움을 주신 자미안 선생님, 데이터 정리를 도와주신 박상현 선생님과 이채은 선생님께도 감사드립니다.

항상 부족한 저를 끊임없이 응원해주시는 부모님과 주말마다 제가 공부할 수 있도록 손자손녀 돌보기를 마다하지 않으신 장모님께 다시 한 번 감사와 사랑의 마음을 전합니다. 끝으로 사랑하고 존경하는 나의 아내 김소연과 언제나 내 삶의 기쁨이 되어주는 딸 서영과 아들 준서에게도 큰 감사와 기쁨의 마음을 전합니다.

차 례

그림 차례	ii
표 차례	iv
국문 요약	v
I. 서론	1
II. 연구 재료 및 방법	5
III. 연구 결과	15
IV. 고찰	32
V. 결론	41
참고 문헌	42
영문 요약	49

그림 차례

Figure 1. Schematic diagram of HA surface coating procedure	6
Figure 2. Surgical procedure	11
Figure 3. Radiographic analysis : micro CT	12
Figure 4. HE stained slide	13
Figure 5. Masson's trichrome stained slide	13
Figure 6. Image-Pro-plus program (The Proven Solution™,USA) for histometrical analysis	14
Figure 7. Broad XPS scan of peptide grafted HA	15
Figure 8. FDA result	17
Figure 9. MTT assay result	18
Figure 10. Bone nodule formation test result : gallate	19
Figure 11. Histologic findings - 8 week	25
Figure 12. Histologic findings - high magnification	25

Figure 13. Histologic findings of 4 week ErhBMP-2 group	26
Figure 14. Histologic findings of 8 week Oligopeptide group	27
Figure 15. Histologic findings of 8 week Oligopeptide group	
:Cuboidal osteoblast	28
Figure 16. Histologic findings of 8 week ErhBMP-2 group	29
Figure 17. Histologic findings of 8 week Oligopeptide group	
:osteoblast	30
Figure 18. Histologic findings of 8 week Oligopeptide group	
:osteoclast	31

표 차례

Table 1. Design of experiment	5
Table 2. BEs(eV) assigned to specific nitrogen-carbon and silicium containing functional groups in agreement with literature data	16
Table 3. Micro CT result : 4 week	19
Table 4. Micro CT result : 8 week	20
Table 5. Histometrical result : 4 week	21
Table 6. Histometrical result : 8 week	21
Table 7. Histometrical result : 4 week vs 8 week (NB%)	22
Table 8. Histometrical result : 4 week vs 8 week (RG%)	22

국문요약

Gallate로 표면 코팅된 이중인산칼슘 골이식재가 골형성에 미치는 영향

최근 각광받는 합성골 이식재 중에서 많이 사용되는 재료로는 하이드록시아파타이트(hydroxyapatite, HA)와 베타-트리칼슘포스페이트(β -tricalcium phosphate, β -TCP)를 성분으로 하는 이중인산칼슘(biphasic calcium phosphate, BCP) 골이식재가 있다. 이중인산칼슘 골이식재는 다른 물질들로 표면을 코팅처리함으로써 골형성능력을 향상시키는 등 보다 우수한 성질을 가지게 할 수 있을 것으로 보인다. 본 연구의 목적은 이중인산칼슘 골이식재 표면을 gallate로 코팅 처리하였을 때 기존의 문헌에 보고된 다른 표면 처리 방법인 oligopeptide, ErhBMP-2를 이용한 경우와 비교하여 골형성능의 향상에 미치는 영향을 비교 분석하는 것이다.

총 36마리의 토끼(male New Zealand white rabbit)에서 72개의 상악동을 대상으로 실험을 진행하였다. 토끼 상악동의 양측 외벽에 외경 6mm의 원도우를 형성하고 각 토끼의 우측 상악동을 대조군으로 좌측 상악동을 실험군으로 설정하였다. 대조군에는 이중인산칼슘골이식재(OSTEON™, Dentium, Seoul, Korea)만을 넣었고, 실험1군에는 oligopeptide 5mg/ml로 표면처리한 OSTEON™을, 실험2군에는 녹차추출물인 gallate 5mg/ml로 표면처리한 OSTEON™을, 그리고 실험3군에는 ErhBMP-2 0.05mg/ml로 표면처리한 OSTEON™을 각각 적용하였다. 대조군과 각 실험군의 토끼 중 일부는 4주간의 치유 후 희생시켰고, 일부는 8주간의 치유 후 희생시켰다. 희생시킨 토끼의 두개골을 micro CT(SkyScan 1076, SkyScan, Aartselaar, Belgium)로 스캔하여, 증강된 골부피(CT volume) 및 최대 증강된 골높이(MAH, maximum augmented height)와 결손부 최고깊이(DDD, deepest depth of the defect)를 측정하였다. Image-Pro-plus(The Proven Solution™, USA) 프로그램으로 토끼 상악동내에 골이식재를 넣어 증강된 부위에 대한 조직계측학적 분석을 시행하였다. 통계프로그램 (SAS)을 이용하여, 4주와 8주 희생군에서 대조군과 각 실험군간의 비교는 Kruskal-Wallis Test 를, 각 군에서 4주, 8주 치유기간에 따른 비교는 Mann whitney U test 를 수행하였다. ($p < 0.05$)

이중인산칼슘 골이식재의 표면을 oligopeptide, gallate, ErhBMP-2로 코팅하여 골이식재의 골형성능 향상정도를 비교한 결과 다음의 결과를 얻었다.

1. 4주 희생군에서 조직계측학적 분석으로 얻은 신생골 면적비(NB%)를 보면 대조군인 이중인산칼슘 골이식재(OTSEON™) 만을 적용한 군에 비해 ErhBMP-2로 표면처리한 이중인산칼슘 골이식재를 적용한 군에서 유의성 있게 신생골의 형성이 증가하였다.
2. 8주 희생군에서 조직계측학적 분석으로 얻은 신생골 면적비(NB%)를 보면 대조군인 이중인산칼슘 골이식재(OTSEON™) 만을 적용한 군에 비해 oligopeptide, gallate 로 표면처리한 이중인산칼슘 골이식재를 적용한 군에서 유의성 있게 신생골의 형성이 증가하였다.
3. 4 주 희생군과 8주 희생군 간의 비교시 gallate 로 표면처리한 군에서 신생골 면적 비(NB%)가 유의성있게 증가하였다.

이상의 결과로 보아 이중인산칼슘 골이식재에 대한 gallate 코팅처리가 골이식재의 골형성능력을 향상시킨 것으로 생각되며, 4주 이후 8주까지 신생골의 형성이 현저히 증가하였다.

핵심어: 이중인산칼슘골이식재, gallate, oligopeptide, ErhBMP-2, 골이식재, 표면코팅

Gallate로 표면 코팅된 이중인산칼슘 골이식재가 골형성에 미치는 영향

연세대학교 대학원 치의학과

(지도 정문규 교수)

박 노 제

I. 서론

치조골내, 골외 결손 부위의 골 재생을 위해 다양한 골이식재들이 연구되고 사용되어 왔다. 이러한 골이식재는 성분에 따라 자가골, 동종골, 이종골, 합성골등으로 분류되어지며, 그 작용기전은 골형성, 골전도, 골유도의 3가지양상으로 구분되어진다.

자가골은 최고의 골이식재로 평가되어왔는데, 골형성, 골전도 및 골유도성이 있는 유일한 재료이다.¹ 하지만, 공여부에 대한 부가적인 수술이 필요한 불편함이 있고, 자가골을 채취할 수 있는 공여부에 한계가 있으므로 사용가능한 양에도 제한이 있다.² 동종골은 사람의 시신에서 채취한 뼈를 탈회,살균, 소독시켜 사용하는 것으로 골유도 및 골전도성을 가지는 골이식재이다. 동종골은 다른 사람의 시신에서 유래하기 때문에 면역반응이 생길 수 있는 가능성의 문제,시신에 감염되었을지 모르는 B형 간염,C형 간염 및 AIDS등 감염성 질환의 전염 위험성 등으로 그 사용에 우려가 제기되는 재료이기도 하다.¹ 이종골은 동물의 뼈 특히,소의 뼈를 가공하여 만든 골이식재로 골전도성을 가진다. 이종골은 인간 광우병 (Creutzfeldt-Jakob disease, CJD) 발병 위험에 대한 논란과 골이식재 자체의 흡수성 여부에 대한 논란이 있기도 한 재료이다.² 최근에는 세라믹이나 폴리머등으로 만든 합성골이 각광받고 있다. 합성골은 골전도성 골이식재로서 생체불활성 혹은 생체활성을 가지는 재료이다.¹ 이중 최근 많이 사용되는 재료로는 하이드록시아파타이트(hydroxyapatite,HA)와 베타-트리칼슘포스페이트(β -tricalcium phosphate, β -TCP)를 성분으로 하는 이중인산칼슘(biphasic calcium phosphate,BCP) 골이식재가 있다.

이중인산칼슘 골이식재는 다양한 형태로 제조되고 있으나 가장 대표적인 것은 베타-트리칼슘포스페이트(β -tricalcium phosphate, β -TCP)로 코팅된 하이드록시아파타이트를 주성분으로 하는 것이다. 이중인산칼슘 골이식재는 생체활성, 생분해성 및 골전도성을 가지고 있고 조골세포의 부착을 촉진하는 기능과 이식재가 생분해되면서 신생골의 침착을 일으키는 특성을 가진다.³

베타-트리칼슘포스페이트는 생체활성이 뛰어난 재료로서 하이드록시아파타이트에 비해 많은 양의 신생골을 형성하지만 흡수속도가 너무 빠른 단점을 가지고 있다. 반면, 하이드록시아파타이트는 비교적 안정적인 재료로서 베타-트리칼슘포스페이트 보다는 적은 양의 골을 형성하지만 흡수속도가 느려서 베타-트리칼슘포스페이트와 서로 보완되는 성질을 가진다. 너무 빨리 골이식재가 흡수되면 신생골이 형성될때까지 적절한 공간을 유지시켜주지 못하므로 바람직하지 않고, 너무 늦게 골이식재가 흡수되는 것도 역시 신생골 형성에 도움이 되지 않으므로 적절한 흡수속도의 조절이 필요하다. 두 성분의 구성비를 조절하여 흡수속도를 조절하려는 연구가 많이 진행되었는데, 이전의 연구에 따르면 하이드록시아파타이트의 성분비가 높은 경우 (HA: β -TCP = 75:25) 흡수속도가 느려지게 되고 베타-트리칼슘포스페이트의 성분비가 높은 경우 (HA: β -TCP = 25:75) 흡수속도가 빨라지게 됨을 확인할 수 있었다.^{4,5} 동물실험에서 하이드록시아파타이트와 베타-트리칼슘포스페이트의 성분비가 20:80인 경우에서 높은 흡수율을 보이고, 골형성량도 자가골과 유사한 수준을 나타낸 것으로 보고되기도 하였다.⁵ 이와같이 하이드록시아파타이트와 베타-트리칼슘포스페이트의 성분비를 조절하여 흡수속도를 변화시킬 수 있으므로 최상의 조합비율을 찾고자하는 노력이 이어져왔다.

세포실험에서 이중인산칼슘 골이식재의 흡수양상은 자연상에 존재하는 석회화된 유기질 조직이 흡수되는 양상과 매우 유사하여 흡수강이 관찰되었다. 이중인산칼슘 골이식재는 많은 증례를 통해 임상적으로 만족스러운 결과를 보였고 자가골을 대체할 만한 골이식재로 평가되고 있다.⁶ 이러한 많은 장점에도 불구하고 이중인산칼슘 골이식재는 골형성능(osteogenetic potential)이 결여된 치명적인 단점을 가지는데 이를 개선하기 위해 다양한 표면처리방법이 연구되어 왔다. 이중인산칼슘 골이식재의 골형성능을 향상시키기 위해 여러 단백질 첨가하는 실험들도 이루어져 왔는데, 여러 단백질 중 TGF- β 에 높은 친화성을 보이고 있는 것으로 밝혀져, 이를 결합시켜서 골형성능을 향상시키

려는 연구가 시도되었다.⁷ 또한, 골형성 단백질(BMP-2)와의 결합⁸, osteocalcin과의 결합⁹, alkaline phosphatase 같은 효소와의 결합¹⁰, 법랑기질 단백질과의 결합¹¹ 등 이중인산칼슘 골이식재의 다양한 표면처리방법이 연구되었다. 이처럼 이중인산칼슘 골이식재를 다른 물질들로 표면처리함으로서 골형성능력을 향상시키는 등 보다 우수한 성질을 가지게 할 수 있을 것으로 보인다. 본 실험에서는 녹차추출물인 gallate, oligopeptide, ErhBMP-2 를 이용하여 이중인산칼슘 골이식재의 표면을 코팅처리한 후 골형성 효과를 비교하여 보았다.

녹차는 널리 응용되는 음료로서 건강에 유익하다는 것이 과학적 사실로 판명되었다. 암발생예방, 심혈관질환예방 및 골다공증 예방등 많이 알려진 녹차의 효능은 녹차에 많이 함유된 epigallocatechin-3-gallate(EGCG) 라는 polyphenol에 주로 기인한다. EGCG의 작용은 골형성과도 관련이 있는데, EGCG 는 collagenase 혹은 gelatinase의 활성과 발현을 억제하며, 파골세포(osteoclast)의 apoptotic cell death를 유도하여 파골세포(osteoclast) 형성을 억제하는 것으로 알려져있다.^{12,13} 또한, EGCG는 alkalinephosphatase(ALP)의 활성을 증가시켜서 multipotent mesenchymal stem cell 이 조골세포로 분화되는 과정을 촉진하고 결국 광화된 골결절의 형성에 영향을 주는 것으로 보인다.¹²

15개의 아미노산으로된 BMP-2 유사 배열을 가진 oligopeptide가 골재생을 향상시킨 예가 보고되었고,¹⁴ 콜라겐(collagen)의 세포부착 도메인에 상응하는 펩타이드 배열이 조섬유세포(fibroblast), 조골세포(osteoblast) 등의 세포 부착에 관여하는 것으로 보고되는등¹⁵ 적은 양의 합성oligopeptide를 골이식재와 혼합하여 사용하면 골이식재의 골형성능 향상에 큰 영향을 줄 것으로 생각된다.

골형성단백질(bone morphogenetic protein,BMP)은 성장인자의 하나로서 골유도성을 가지는데, 골이식재의 골유도성을 높이기 위해서 골형성단백질로 골이식재 표면을 처리하기도 한다. 이렇게 골이식재표면을 처리하여 사용하면 다양한 골이식재가 생체적합성과 골전도성을 가지고 있음에도 불구하고 골유도성이 결핍되어 생기는 골이식재로서의 한계를 극복할 수 있다.¹⁶

본 연구에서는 녹차추출물인 gallate, oligopeptide, ErhBMP-2 등으로 이중인산칼슘 골이식재의 표면을 코팅처리한 후 골형성정도를 비교하였는데, oligopeptide와 ErhBMP-2 에 대한 이전의 연구가 많은데 비하여 상대적으로 gallate 를 이용한 연구는 찾아보기 어려웠다. 많은 연구에서 녹차추출물중 EGCG

가 골형성에 미치는 영향에 관하여 보고하였으나 gallate 에 대한 연구실적은 거의 전무하였다. 반면, 본 실험의 기초실험으로 진행한 gallate 와 EGCG 를 이용한 골결절 형성실험결과에서는 gallate 를 이용했을때 더 많은 골결절이 형성된 결과를 얻을 수 있었고, 이에 따라 gallate 코팅처리가 이중인산칼슘 골이식재의 골형성능향상에 어떤 영향을 주는지를 oligopeptide, ErhBMP-2와 비교하게 되었다.

본 연구의 목적은 이중인산칼슘 골이식재 표면을 gallate로 코팅 처리하였을 때 기존의 문헌에 보고 된 다른 표면 처리 방법인 oligopeptide, ErhBMP-2 를 이용한 경우와 비교하여 골형성능의 향상에 미치는 영향을 비교 분석하는 것이다.

II. 연구 재료 및 방법

1. 실험동물

실험동물은 male New Zealand white rabbit을 선택하여 총 36마리의 토끼에서 72개의 상악동을 대상으로 실험을 진행하였다. 토끼 상악동에 윈도우를 형성하는 위치는 두개골의 nasofrontal suture line 전방으로 20mm 그리고 정중선에서 10mm 측방을 기준으로 하였다.¹⁷ 실험동물의 선택, 관리, 수술과정등은 Institutional Animal Care and Use Committe of Yonsei Medical Center 의 표준을 따랐다.

2. 대조군과 실험군 설정

본 실험에서는 토끼의 양측 상악동 외벽에 각각 외경 6mm의 윈도우를 형성한 후 우측 상악동은 대조군으로 좌측 상악동은 실험군으로 설정하였다. 대조군에는 이중인산칼슘골이식재(OSTEON™, Dentium, Seoul, Korea) 0.1 cc 를 적용하였다. 실험1군에는 oligopeptide 5mg/ml로 표면 코팅한 OSTEON™(0.1cc)을, 실험2군에는 gallate 5mg/ml로 표면 코팅한 OSTEON™(0.1cc)을, 실험3군에는 ErhBMP-2 0.05mg/ml로 표면 코팅한 OSTEON™(0.1cc)을 각각 적용하였다. 대조군과 각 실험군의 토끼 중 일부는 4 주간의 치유 후 희생하고, 일부는 8주간의 치유 후 희생하였다.

Table 1. Design of experiment

group	실험재료	대조군	희생시기	group당 개체수
실험1군	Oligopeptide	OSTEON™	4주, 8주	4주(6마리) 8주(6마리)
실험2군	Gallate	OSTEON™	4주, 8주	4주(6마리) 8주(6마리)
실험3군	ErhBMP-2	OSTEON™	4주, 8주	4주(6마리) 8주(6마리)

3. 골이식재 표면 코팅

본 실험에 사용한 재료 중 이중인산칼슘 골이식재인 OSTEON™ (Dentium, Seoul, Korea)은 100% 합성골이식재로서 사람의 해면골과 유사한 공극구조를 가지며 하이드록시아파타이트와 베타-트리칼슘포스페이트가 7대3의 성분비율(HA: β -TCP = 70:30)로 함유되어 있다. 이중인산칼슘 골이식재의 표면처리에 사용한 재료중에서 oligopeptide(5mg/ml, Sigma, MO, USA)는 GTPGPQGIAGQRGVV(P-15)의 펩타이드 배열을 가지는데, 이는 사람의 type I collagen 의 세포부착 도메인에 해당한다.^{18,19} P-15 펩타이드로 코팅된 무기질 골입자가 골기질성분과 유사하게 작용하여 골재생을 촉진하는 것으로 보고 된 바 있다.²⁰ gallate(Sigma, purity 97.5-102.5%, MO, USA)는 5mg/ml의 농도로 사용하여 이중인산칼슘 골이식재 표면을 코팅하였다. ErhBMP-2 (Cowellmedi®, Busan, Korea)는 0.05mg/ml의 농도로 골이식재 표면 코팅에 사용하였다. 실험재료를 이중인산칼슘 골이식재표면에 코팅한 방법은 다음과 같다.

1) 이중인산칼슘 골이식재의 표면 코팅 과정

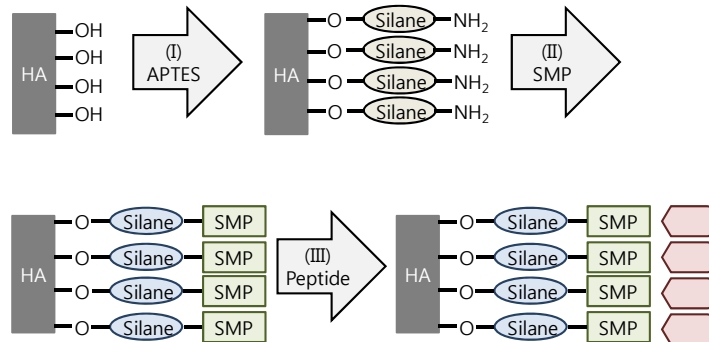


Fig. 1 Schematic diagram of HA surface coating procedure: (I) APTES treatment; (II) Bi-functional cross-linker (SMP) connection; (III) thiolized peptide grafting.

이중인산칼슘 골이식체인 OSTEON™ (Dentium, Seoul, Korea)의 성분 중 하이드록시아파타이트에 실험재료인 oligopeptide, gallate, Erh BMP-2 를 결합시키는 방법으로 골이식체의 표면코팅을 시행하였다. 하이드록시아파타이트의 수산화기 (OH-)에 silane coupling agent인 3-aminopropyltriethoxysilane(APTES)(Sigma, MO, USA)를 먼저 결합시키고, 여기에 다시 중간결합제(bifunctional cross-linker)인 N-succinimidyl-3-maleimidopropionate(SMP)(Sigma, MO, USA)를 결합시킨후 실험재료인 oligopeptide, gallate, ErhBMP-2를 이 SMP 와 다시 결합하도록 하였다. 이러한 표면코팅과정은 골이식체 표면에 아민기(NH-)를 형성시키는 과정인 silanization과 중간결합제(bifunctional cross-linker)인 SMP를 아민기에 결합시키는 과정, oligopeptide, gallate, ErhBMP-2를 SMP와 결합시키는 과정의 3단계로 구분할 수 있다.^{21,24} Fig.1은 이중인산칼슘 골이식체의 표면 코팅 과정의 모식도이다. 각 단계를 자세히 기술하면 다음과 같다.

우선, 골이식체 표면에 있는 carbon, oxygen 등의 오염물질을 제거하기 위하여 골이식체를 속슬렛 장치에 넣고 에탄올을 용매로 하여 100℃에서 24시간 순환시켰다. 이 과정이 완료된 후 100℃의 진공상태(10^{-5} torr)에서 20시간 동안 outgassing을 시행하였다. 이후에 3단계로 이루어진 코팅과정을 진행하였다.

첫번째 단계는 silanization과정으로서 골이식체 표면에 아민(NH-)기를 형성시키는 과정을 수행하였다. 3-aminopropyltriethoxysilane(APTES)를 헥산(Hexane, sigma, MO, USA)에 녹이고, 그 용액 내에 골이식체를 넣었다.(농도: 1×10^{-2} M = 10mM) 실험은 아르곤(Ar)가스 환경에서 진행하고, 2시간 동안 stirring 하여 반응시켰다.²¹ 반응이 완료되고 난 후, 깨끗한 헥산으로 3회 세척하였다. 아르곤(Ar)가스 환경에서 수행하였고, 세척방법은 30분동안 stirring을 3회 반복수행하였다. (각각 30분이 아니라 3번 세척이 30분 안에 이루어져야 한다.) silanization이 완료된 후 70℃의 진공에서 4시간 보관하여 outgassing 시켰다.

두번째 단계는 중간결합제(bifunctional cross-linker)를 아민(NH-)기에 결합시키는 과정으로서 silane처리된 골이식체를 SMP와 결합시키는데, SMP를 2×10^{-3} M 농도인 dimethylformamide(DMF, Sigma, MO, USA)에 녹인 후, 2시간동안 아르곤(Ar)가스 환경에서 stirring하여 반응시켰다.

반응이 완료되고 난 후 깨끗한 헥산으로 3회 세척하였다. 아르곤(Ar)가스 환경에서 수행하였고, 세척방법은 30분 동안 stirring이나 sonication을 3회 반복수행하였다. 결합이 완료되고 난 후 70℃의 진공에서 4시간 보관하여 out gassing 시켰다.

세번째 단계는 oligopeptide, gallate, Erh BMP-2 를 SMP와 결합시키는 과정으로서 Erh BMP-2를 DMF에 녹이고 그 용액안에 SMP 처리된 골이식재를 넣은 후 1시간동안 반응시켰다. gallate와 oligopeptide에는 SH-기가 없으므로, thiolation 과정을 거쳐서 표면의 반응기를 SH-기로 치환시킨 후, 이 과정을 수행하였다.(thiolation 과정은 아래에 따로 기술한 바에 따랐다.) gallate와 oligopeptide가 결합된 시편은 DMF를 이용하여 2회 세척시행하였다. 아르곤가스 환경에서 수행하였고, 세척방법은 30분동안 stirring이나 sonication을 2회 반복 수행하였다. 세척이 완료된 시편은 PBS를 넣어 냉동실(-4℃)에 보관하였는데, 저장기간은 1주일을 넘기면 안된다. 1주일 이상 보관이 필요한 경우, 동결건조(lyophilize)시켜야 한다.

위에 언급한 gallate와 oligopeptide의 thiolation 과정은 다음과 같으며, 이 과정도 오염물질(carbon, oxygen등)을 배제하기 위해 아르곤가스 환경에서 시행하였다.²² 유리 아민(NH-)기가 없는 pH 8 의 buffer를 준비한 후 buffer 용액에 degassing 과정을 시행하였다. 새로운 thiol의 산화를 방지하기 위하여 1mM EDTA를 첨가하고 10 mg의 peptide를 용해시켰다. 1 mg의 2-iminothiolane를 첨가하고 반응이 이루어지도록 30-60 분간 실온에서 보관하였다. 반응하지 않은 2-iminothiolane은 Sephadex G-10(Equilibrated in degassed PBS with 1 mM EDTA)으로 desalting 하여 제거하였다. 이렇게 thiolated 된 펩타이드는 즉시 사용하도록 하거나, 아니면 동결건조(lyophilize) 시킨다.

2) Oligopeptide-HA 분석 및 세포실험

골이식재의 표면처리과정이 성공적인지를 알기 위해 silane 처리 후와 oligopeptide를 결합시킨 후에 각각 X-선 광전자분광분석기(XPS, K-Alpha ESKA SYSTEM, Thermofisher Scientific Inc., MA, USA)로 분석하였다²³. oligopeptide가 결합된 골이식재에 대해서는 fluorescein diacetate(FDA)염색과 MTT assay를 시행하여 세포에 대한 초기부착정도를 관찰하기 위한 세포실험을 시행하였다.

FDA는 살아있는 세포에만 착색되며 녹색의 형광으로 발현된다. 따라서, 살아서 골이식재 표면에 부착한 세포들만 관찰가능한 방법이다. 48well plate에 이중인산칼슘 골이식재인 OSTEON™ 150mg을 넣고, human mesenchymal stem cell(Lonza AG,Switzerland)를 이용하여 1×10^4 cell/well로 분주 한 다음 각각 2시간, 24시간 동안 배양한 뒤 1×PBS로 세척하였다. FDA stock solution(Sigma,USA,5mg/ml acetone)을 1×PBS로 working solution($20 \mu\text{g/ml}$)을 만들어 30초 동안 반응 시킨 후 시편에 부착된 살아있는 세포의 수를 형광현미경(JuLI™, Smartfluorescentcellanalyzer,USA)을 이용하여 시편 당 5군데를 촬영하여 촬영된 면에 부착된 세포를 계산하였다.

MTT assay는 세포의 증식을 측정하기 위한 표준 비색분석법이다. 세포의 증식을 정확하고 신속하게 판단하기 위해 hemocytometer를 이용하여 생존세포수를 세거나 광학밀도(optical density)를 측정하는 방법이 사용되지만 많은 수의 세포를 측정해야 하는 경우 많은 시간과 노력이 요구되고 부정확한 결과를 가져올 수 있다. 반면, MTT assay는 살아있는 세포의 미토콘드리아 탈수소 효소작용(dehydrogenases)에 의하여 노란색의 수용성 기질인 3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide(MTT)를 자주색을 띄는 비수용성의 MTT-formazan 결정으로 환원시키는 미토콘드리아의 능력을 이용하는 검사법으로서 신속하고 정확하게 많은 양의 세포 증식을 측정할 수 있는 방법이다. 자주색 결정은 DMSO에 용해되고 흡광도 (Optical Density)는 540nm의 파장에서 최대가 되며, 이 파장에서 측정된 흡광도는 살아있는 세포의 수와 직선적인 상관관계를 나타내게 된다.²⁴

3) Gallate 에 대한 기초실험

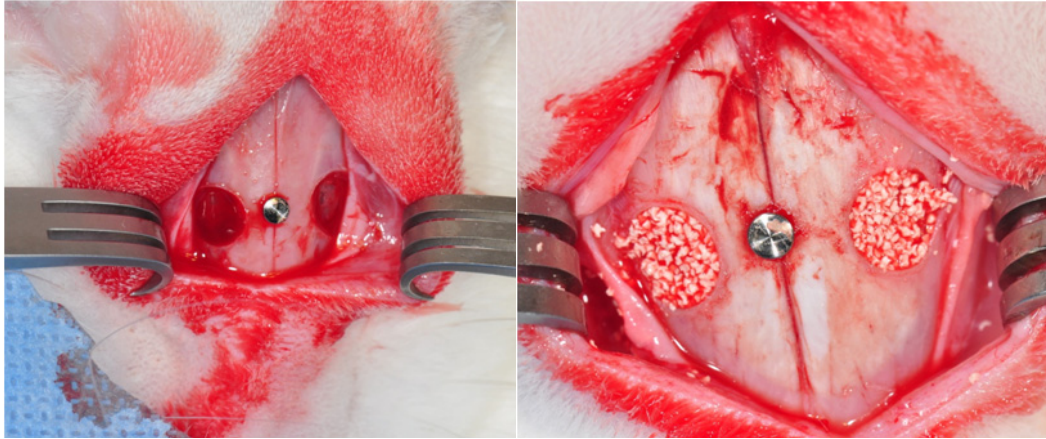
골이식재표면의 코팅 처리에 사용한 재료중 gallate(Sigma,purity 97.5-102.5%,MO,USA)에 대하여 골결절 형성에 관한 기초실험을 진행하였다. NIH3T3 cell을 사용해서 골결절의 형성정도를 관찰하였다. NIH3T3 cell line은 스위스 마우스 태자(胎仔,fetus)세포를 지름 50mm 살레에 3×10^5 개씩 이식한 후 3일마다 계대배양을 반복하여 제작한 세포주 (3T3: 3day/Transfer/ 3×10^5 개)로서 여기에 vitamin C 를 추가하여 골형성을 일으키게 된다. 추가로 $1 \mu\text{M}$, $5 \mu\text{M}$, $25 \mu\text{M}$, $50 \mu\text{M}$ 의 gallate 를 더 넣어 골결절이 형성되는 정도를 계측하였다.

4. 수술과정 및 시편 처리

실험에 사용된 모든 토끼에는 Zoletil(Virbac, Virbac Korea, Seoul, Korea)(15mg/kg)과 xylazine(Rumpun, Bayer Korea, Seoul, Korea)(5mg/kg)를 혼합한 후 근육주사하여 전신마취를 시행하였다. 상악동 부위의 털을 깎은 후 표면 소독을 시행하였고, 수술부위에는 2% lidocaine(epinephrine 1:100000, lidocaine HCl, Huons, Seoul, Korea)를 이용하여 침윤마취를 추가로 시행하였다. nasal bone의 sagittal midline을 따라 절개한 후 피부와 골막을 포함하는 전층판막(full thickness flap)을 거상하였다.

충분한 식염수 관주하에 외경 6mm 의 trephine bur (3i Implant Innovation, Palm Beach Gardens, FL, USA)를 사용하여 상악동에 윈도우를 형성하였다. 토끼 두개골의 sagittal midline 과 좌우 윈도우를 연결한 가상의 선이 만나는 위치에 핀을 식립하여 추후에 micro CT 촬영 및 조직표본 채취시에 기준점이 될 수 있게 하였다. 골편을 제거한 후 조심스럽게 상악동 막을 거상하고 막 하방에 대조군 및 실험군에 해당하는 골 이식재료를 넣었다. 모든 토끼에서 우측 상악동은 대조군, 좌측 상악동은 실험군으로 설정하였다. 좌우 방향은 토끼를 기준으로 정하는데 토끼 두개골의 전면부를 앞으로 향하게 했을때 술자가 위에서 바라보는 방향으로 좌우측을 구분하였다.

실험재료를 넣은 후 차단막을 사용하지 않은 채로 골막을 제 위치시키고 봉합하였다. 4-0 Monosyn(Glyconate absorbable monofilament, B-Braun, Aesculap, PA, USA)을 사용하여 봉합하고 봉합사는 일주일 후 제거하였다. 수술 후 1주일간 항생제 Enrofloxacin(5mg/kg)을 근육 주사하였다. 이미 실험군 설정에서 계획된 대로 수술 후 4주 희생군과 8주 희생군에 각각 마취제를 과량 주입하여 해당하는 시기에 희생시켰다.



(a) (b)
 Fig.2 Surgical procedure : (a) bilaterally prepared windows (b) insertion of grafting material (metal pin was inserted at the midline as a reference point for microCT scanning and section.)

5. 방사선 분석 - micro CT

상악동과 주위의 골을 포함하는 두개골 블록을 10% 포르말린으로 10일간 고정 후 micro CT(SkyScan 1076, SkyScan, Aartselaar, Belgium)로 스캔하였다. 스캔한 데이터는 CT analyser 프로그램(SkyScan, Aartselaar, Belgium)을 이용하여 3차원적으로 분석하였다. 3차원적 분석을 통해 증강된 골부피(CT volume)를 측정하였다. Dataviewer 프로그램(SkyScan, Aartselaar, Belgium)으로 최대 증강된 골높이(MAH, maximum augmented height)와 결손부 최고깊이(DDD, deepest depth of the defect)를 측정하였다.

MAH는 단면 영상에서 직선적으로 측정하고 (Fig.3(a)), DDD는 원래 골위치에 해당하는 가상의 선에서 결손부 최하방까지 직선으로 측정하였다(Fig.3(b)). MAH와 DDD를 측정하기 위해 dataviewer 프로그램에서 이미지 파일을 3차원적으로 재구성하였고, 3차원적 좌표값중에서 X(sagittal 좌표)와 Z(frontal 좌표)좌표를 이동하면서 가장 높이 증강된 부위에서 MAH를 측정하고, 결손부가 가장 깊은 부위에서 DDD를 측정하였다. CTvolume은 micro CT 영상에서

신생골이나 잔존골이식재의 입자로 보이는 것들이 분포하는 전 영역을 지정하여 계측하였다.

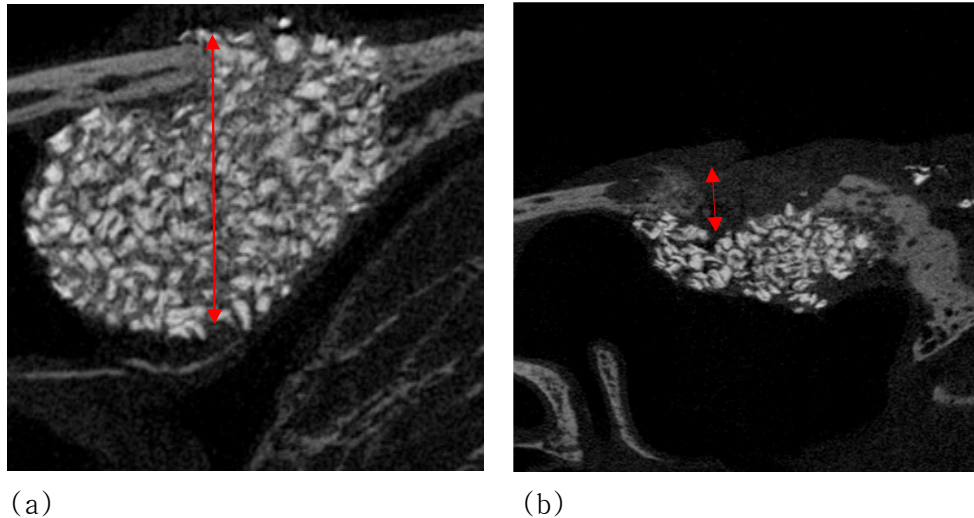


Fig.3 Radiographic analysis : micro CT

(a)MAH - maximum augmented height (b)DDD - deepest depth of the defect

6. 조직학적 관찰

micro CT 를 촬영한 후 상악동 절편을 채득하여 5% formic acid 로 2주간 탈회시키고, 파라핀으로 포매하였다. 골이식에 의해 증강된 상악동 중심부를 따라 5 μ m 두께로 절편을 만들어 관상면으로 절단하고, HE 염색(Fig.4)과 Mass on's trichrome 염색(Fig.5)을 시행 후 조직 슬라이드를 광학 현미경(BX50,01 ympus,Tokyo,Japan)으로 관찰하였다.

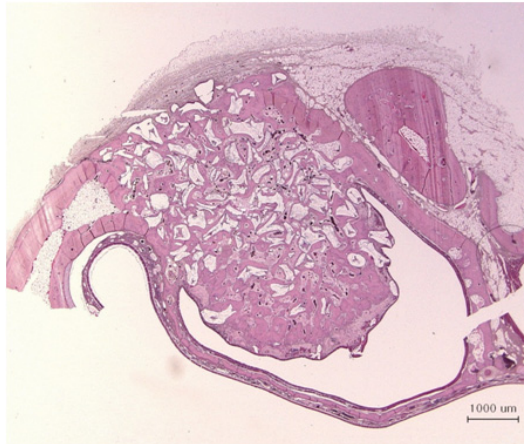


Fig.4 HE stained slide

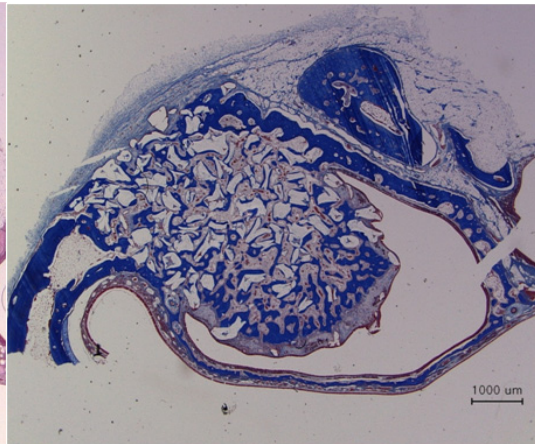


Fig.5 Masson's trichrome stained slide

7. 조직계측학적 관찰

광학현미경으로 조직표본을 관찰한 후 Image-Pro-plus 프로그램(The Proven Solution™, USA)으로 조직계측학적 분석을 수행하였다. Fig.6은 조직계측학적인 측정을 수행하는 과정을 보여주는 사진이다. 토끼 상악동내에 골이식이 시행된 부위의 총면적(total augmented area)과 신생골의 면적(newly formed bone area) 및 잔존 골이식재의 면적(remaining grafts area)을 계측하였다.

Image-Pro-plus 프로그램(The Proven Solution™, USA)상에서 토끼 상악동내의 신생골과 잔존하는 골이식재를 모두 포함하는 영역(Fig.6에서 녹색선으로 표시된 영역)을 지정하면 상악동내 골이식이 시행된 부위의 총면적(total augmented area)이 계산되어 표시된다. 또, 사진에서 붉은색으로 표시되는 신생골의 영역을 지정하면 신생골의 면적(newly formed bone area)을 구할 수 있다. 화면에서 흰색의 거친 입자로 보이는 잔존 골이식재의 면적(remaining grafts area)도 같은 방법으로 구하였다. 표본간의 비교를 위하여 계측한 총면적과 신생골 면적간의 백분율값인 신생골 면적비(NB%), 총면적과 잔존 골이식재의 면적간의 백분율값인 잔존 골이식재 면적비(RG%)를 계산하였다.

$\text{신생골 면적비(NB\%)} = \text{신생골 면적} / \text{총면적} \times 100$
 $\text{잔존 골이식재 면적비(RG\%)} = \text{잔존 골이식재 면적} / \text{총면적} \times 100$
 (NB%: newly formed bone area %, RG%: remaining grafts area %)

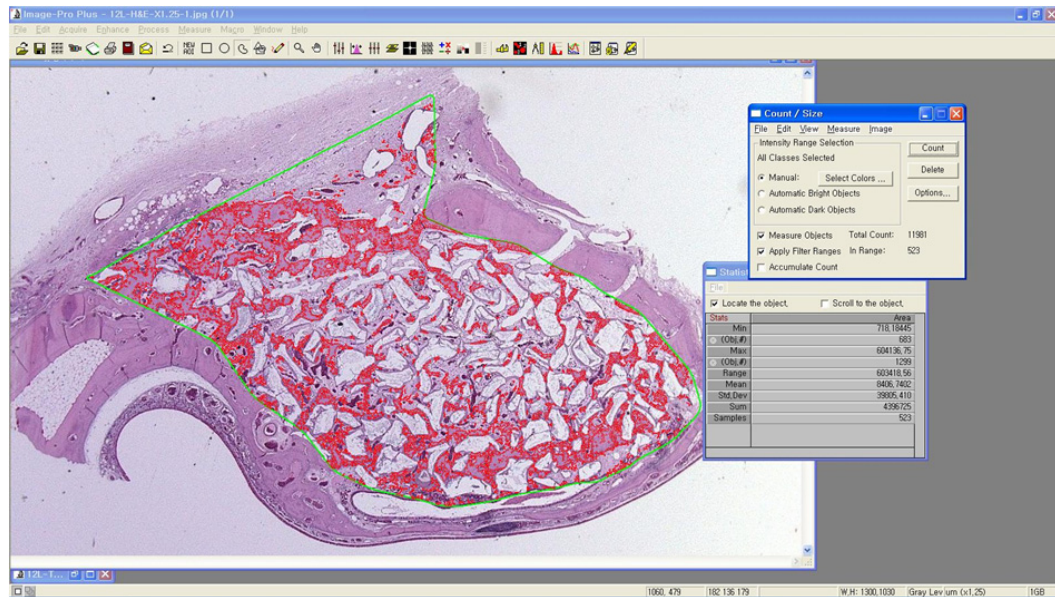


Fig.6 Image- Pro-plus program(The Proven Solution™, USA) for histometrical analysis

8. 통계

micro CT 분석 및 조직계측학적 분석에서 얻어진 데이터에 대한 통계처리는 통계프로그램(SAS)을 이용하여 수행하였다. 4주,8주 희생군에서 대조군과 실험군간 비교를 위해 Kruskal-Wallis Test를 시행하였다. 각 군에서 4주,8주 치유기간에 따른 비교를 위해서는 Wilcoxon Two-Sample Test 를 시행하였다. ($p < 0.05$)

III. 연구결과

1. Oligopeptide-HA 분석 및 세포실험 결과

XPS 분석

골이식재표면의 코팅처리를 위해 실험재료들(oligopeptide, gallate, ErhBMP-2)을 골이식재 성분중 하이드록시아파타이트(HA) 표면에 결합시켜 코팅하였다. 이 과정이 성공적인지 확인하기 위해 X-선 광전자분광분석기(XPS, K-Alpha ESKA SYSTEM, Thermofisher Scientific Inc., MA, USA)로 분석하였다.²³ Fig.7의 그래프는 그 결과를 보여주는데, Si2p 밴드가 100eV 부근에 보이는 것으로 보아 silane 처리가 잘되었음을 알 수 있었다. 또한, N1s, C1s 등이 보이므로 펩타이드 결합이 이루어진 것도 확인 할 수 있었다.

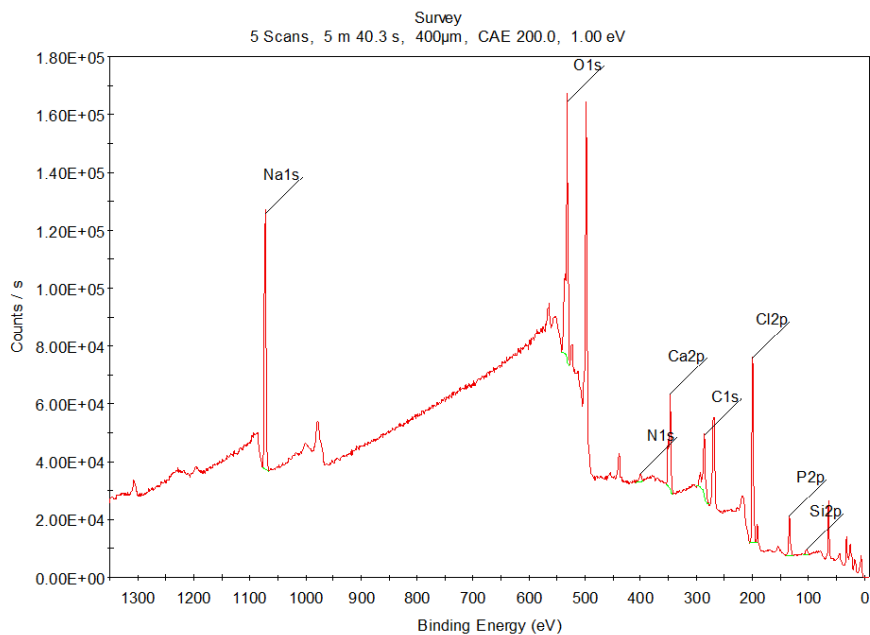


Fig. 7 Broad XPS scan of peptide grafted HA

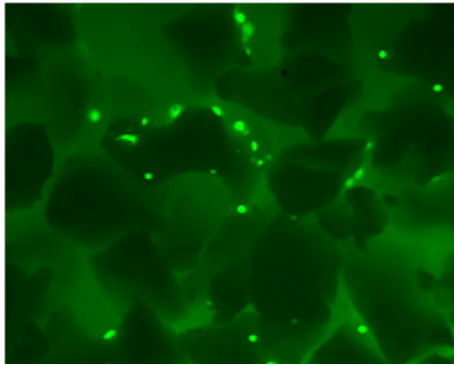
Table 2.에서 보면 SiO₃C에서 Si2p 밴드가 102.7eV에서 나타나는데 이는 Silane 처리가 되면 나오는 피크이다. C-NH₂,C-O와 N-C=O 에서 C1s 와 N1s등이 보이는 것은 펩타이드가 붙어있다는 증거이다. Maleimide에서 C1s,N1s등이 보이는 것은 중간결합제(bifunctional cross-linker,SMP)가 사용된 증거이다. 이러한 결과로 보아 HA 표면과 실험 재료간의 결합이 잘 되어있다는 것을 알 수 있었다.

Table 2. BEs(eV) assigned to specific nitrogen-carbon and silicium containing functional groups in agreement with literature data

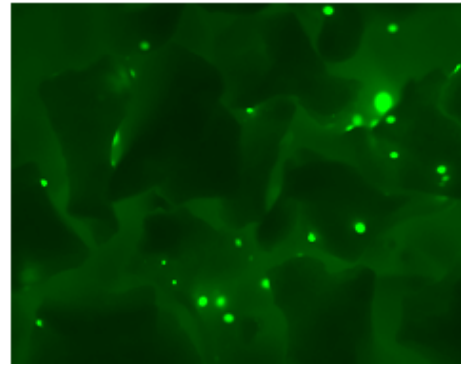
	C1s	Si2p	N1s
SiO ₃ C	283.9	102.7[27]	
CH _x	284.8[28]		
C-CO	285.3[29,28]		
C-NH ₂ ,C-O	285.9-286.1[28]		398.9[30]
N-C=O	286.4[28]		399.7-400.8[29]
Maleimide	287.2-288[28]		399.7-400.7[9,31]
COOH	288.5[28]		

FDA 염색

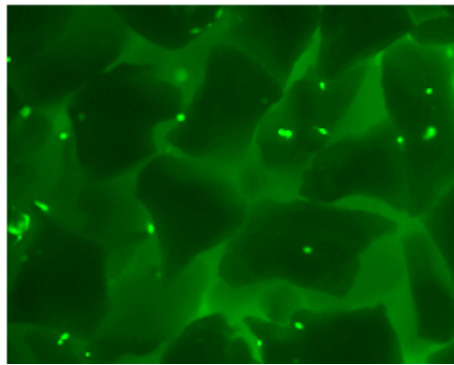
Oligopeptide로 표면처리된 골이식재(oligopeptide-HA)에 대해서 FDA(fluorescein diacetate)염색을 시행한 결과 Fig.8에서 보듯이 분주2시간 후, 분주24시간 후 모두 oligopeptide로 코팅된 하이드록시아파타이트(HA)에서 더 많은 녹색의 형광발현을 볼 수 있었는데, 이는 세포의 초기부착이 증진된 것을 눈으로 확인할 수 있는 결과이다.



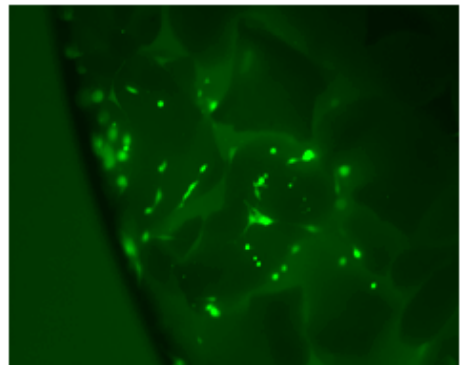
(a)



(b)



(c)



(d)

Fig.8 FDA result : (a) after 2 hrs. HA (b) after 2 hrs. Oligopeptide-HA (c) after 24 hrs. HA (d) after 24 hrs Oligopeptide-HA

MTT assay

Fig.9는 MTT assay 시행 결과를 보여준다. Fig.9 그래프에서 대조군(control)은 pure HA, SM6은 oligopeptide로 코팅처리된 골이식재 (peptide grafted HA), S7은 silane 처리된 골이식재 (silane treated HA)를 나타내는데, 24시간 분석과 48시간 분석에서 모두 oligopeptide나 silane 으로 표면처리된 골이식재가 세포부착이 더 우수한 것을 알 수 있었다. 특히, oligopeptide로 표면처리한 골이식재(SM6)는 24시간 분석에서 더 높은 세포부착수치를 나타내었는데, 이는 oligopeptide가 세포의 초기부착향상에 도움을 준 결과로 보인다.

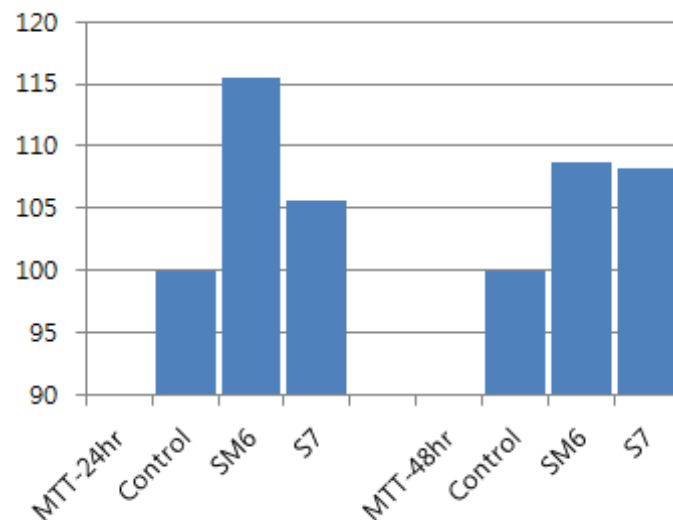


Fig.9 MTT assay result : control-pure HA, SM6-peptide grafted HA, S7-silane treated HA

2. Gallate 기초실험 결과

NIH3T3 cell line 에 gallate를 추가하여 골결절이 형성되는 정도를 관찰한 결과(Fig.10) gallate의 농도가 25 μ M 일때 형성되는 골결절의 수가 가장 많았다. 원래 vitamine C 등을 추가해서 골형성을 시키는데 본 실험에서는 gallate를 추가로 넣어주면 더 많은 골형성이 일어나는 것을 확인할 수 있었다. gallate 농도 50 μ M에서는 오히려 골결절 형성이 줄어들는데, 이 농도에서 gallate의 세포독성이 있는지 확인 해볼 필요가 있을 것으로 보인다.

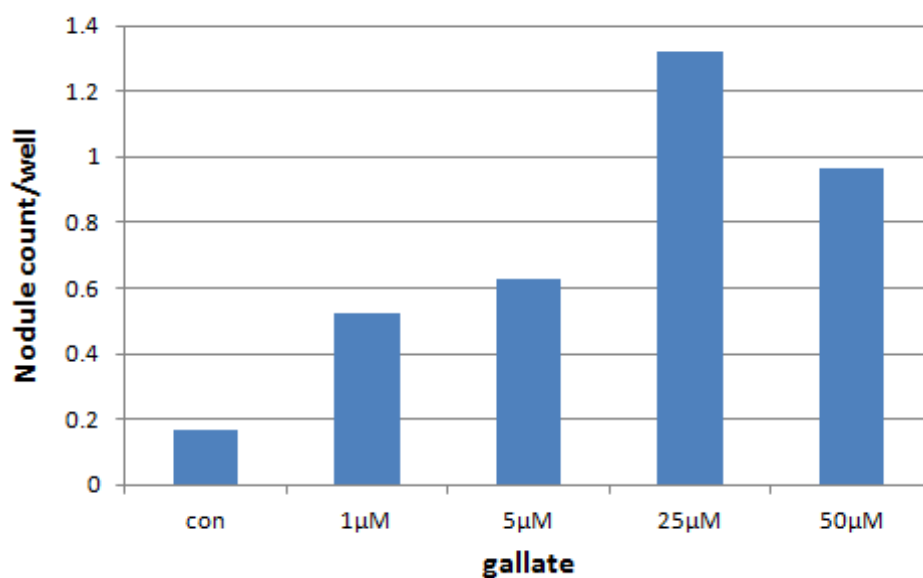


Fig.10 Bone nodule formation test result : gallate

3. 방사선 분석 결과: micro-CT

Table 3. Micro CT result : 4 week

	MAH(mm)	DDD(mm)	CTvolume(mm ³)
OSTEON™	5.02± 0.87	1.05± 0.60	24.81± 4.06
Oligopeptide	4.48± 0.81	0.80± 0.55	27.44± 6.69
Gallate	4.93± 0.85	1.40± 0.56	27.73± 3.57
ErhBMP-2	5.03± 1.00	1.00± 0.60	23.36± 1.67

* Data are mean± standard deviation.

* MAH : maximum augmented height, DDD : deepest depth of the defect
CTvolume : total volume of augmented area

Table 4. Micro CT result : 8 week

	MAH(mm)	DDD(mm)	CTvolume(mm ³)
OSTEON™	5.24 ± 0.97	1.00 ± 0.50	22.94 ± 5.85
Oligopeptide	4.15 ± 0.52	0.64 ± 0.44	24.53 ± 1.55
Gallate	4.70 ± 0.83	1.06 ± 0.66	26.71 ± 4.86
ErhBMP-2	5.37 ± 0.94	0.93 ± 0.66	24.37 ± 2.91

* Data are mean ± standard deviation.

위의 Table 3 에 정리한 바와 같이 4주 희생군에서 MAH 는 ErhBMP-2군(5.03 ± 1.00)이 가장 크고, OSTEON™군(5.02 ± 0.87),gallate군(4.93 ± 0.85),oligo peptide군(4.48 ± 0.81)의 순으로 나타났다. 4주 희생군에서 DDD 는 oligopeptide 군(0.80 ± 0.55)이 가장 작고, ErhBMP-2군(1.00 ± 0.60),OSTEON™군(1.05 ± 0.60),gallate군(1.40 ± 0.56)의 순으로 나타났다. 4주군에서 CTvolume 은 gallate군(27.73 ± 3.57)이 가장 크고,oligo peptide군 (27.44 ± 6.69),OSTEON™군 (24.81 ± 4.06), ErhBMP-2군(23.36 ± 1.67) 순서로 나타났다.

Table 4 는 8주 희생군에서의 microCT 측정결과를 정리한 것이다. 8주 희생군에서 MAH 는 ErhBMP-2군(5.37 ± 0.94)이 가장 크고,OSTEON™군(5.24 ± 0.97), gallate군 (4.70 ± 0.83),oligo peptide군(4.15 ± 0.52)의 순으로 나타났다. DDD 는 oligopeptide군(0.64 ± 0.44)이 가장 작고 ErhBMP-2군(0.93 ± 0.66),OSTEON™군(1.00 ± 0.50),gallate군(1.06 ± 0.66)의 순서로 커진다. CTvolume은 gallate군(26.71 ± 4.86)에서 가장 크고 oligopeptide군(24.53 ± 1.55),ErhBMP-2군 (24.37 ± 2.91),OSTEON™군(22.94 ± 5.85)순서로 작아진다.

4. 조직계측학적 관찰

Table 5. Histometrical result : 4 week

	NB% (HE)	RG%(HE)
OSTEON™	18.80 ± 5.73 [†]	31.50 ± 4.72
Oligopeptide	26.30 ± 7.02	30.64 ± 11.25
Gallate	23.34 ± 4.81	32.50 ± 9.00
ErhBMP-2	26.08 ± 5.84 [†]	30.07 ± 4.71

* Data are mean ± standard deviation.

* NB% : newly formed bone area %, RG% : remaining grafts area %

* HE : hematoxylin-eosin stain

* [†] : significantly different(p<0.05)

Table 6. Histometrical result : 8 week

	NB% (HE)	RG%(HE)
OSTEON™	21.26 ± 6.91 [†]	27.23 ± 5.49
Oligopeptide	30.53 ± 5.36 [†]	26.51 ± 6.17
Gallate	31.60 ± 4.94 [†]	29.59 ± 2.63
ErhBMP-2	28.46 ± 3.38	27.02 ± 4.67

* Data are mean ± standard deviation.

* [†] : significantly different(p<0.05)

Table 7. Histometrical result : 4 week vs 8 week (NB%)

	4week NB%(HE)	8week NB%(HE)
OSTEON™	18.80± 5.73	21.26± 6.91
Oligopeptide	26.30± 7.02	30.53± 5.36
Gallate [†]	23.34± 4.81	31.60± 4.94
ErhBMP-2	26.08± 5.84	28.46± 3.38

* Data are mean± standard deviation.

* [†] :significantly different(p<0.05)

Table 8. Histometrical result : 4 week vs 8 week (RG%)

	4week RG%(HE)	8week RG%(HE)
OSTEON™ [†]	31.50± 4.72	27.23± 5.49
Oligopeptide	30.64± 11.25	26.51± 6.17
Gallate	32.50± 9.00	29.59± 2.63
ErhBMP-2	30.07± 4.71	27.02± 4.67

* Data are mean± standard deviation.

* [†] :significantly different(p<0.05)

4주 희생군에서 HE 염색으로 관찰한 결과 신생골 면적비(NB%)는 oligopeptide군(26.30± 7.02)이 가장 크고, ErhBMP-2군(26.08± 5.84),gallate군(23.34± 4.81), OSTEON™군(18.80± 5.73)의 순으로 작아진다. 대조군인 OSTEON™군(18.80± 5.73)과 ErhBMP-2군(26.08± 5.84)간에는 통계적으로 유의한 차이가 있었다. 4주 희생군에서 HE 염색으로 관찰한 잔존 골이식재 면적비(RG%)는 gallate군(32.50± 9.00)이 가장 크고, OSTEON™군(31.50± 4.72), oligopeptide군(30.64± 11.25), ErhBMP-2군(30.07± 4.71)순으로 작아진다.통계학적 유의성은 없었다.

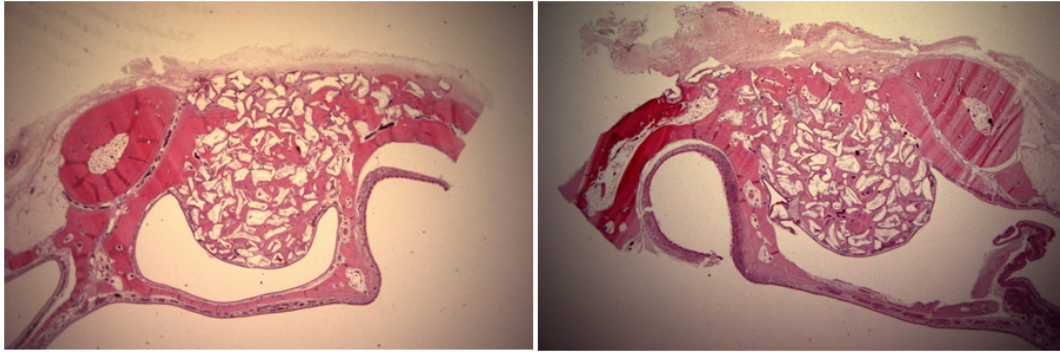
8주 희생군에서 HE 염색으로 관찰한 결과 NB% 는 gallate군(31.60 ± 4.94)이 가장 크고, oligopeptide군(30.53 ± 5.36), ErhBMP-2군(28.46 ± 3.38), OSTEON™(21.26 ± 6.91)순이며, 이중 대조군인 OSTEON™군(21.26 ± 6.91)과 gallate군(31.60 ± 4.94) 및 oligopeptide군(30.53 ± 5.36)간에 통계학적 유의성이 있었다. 8주 희생군 HE 염색에서 RG%는 gallate군(29.59 ± 2.63), OSTEON™군(27.23 ± 5.49), ErhBMP-2군(27.02 ± 4.67), oligopeptide군(26.51 ± 6.17)순이다. 각 군에서 4주와 8주 희생시기에 따른 NB% 와 RG %값을 비교했을때 gallate 군에서 4주 NB%(23.34 ± 4.81) 와 8주 NB%(31.60 ± 4.94) 사이에 통계학적으로 유의성있게 그 값이 증가하였고, OSTEON™군에서 4주와 8주 RG% 간에 통계학적 유의성 있게 RG% 값이 감소하였다.

5. 조직학적 관찰

전반적으로 Schneiderian membrane 하방으로 신생골과 cortical layer 가 형성된 것을 볼 수 있고, augmented 된 골은 pseudostratified ciliated columnar epithelium 으로 덮여있었다(Fig.11). 골이식재 주변으로 신생골이 보이고 신생혈관, 조골세포, 신생골내 lacuna 속 골세포(osteocyte)를 관찰할 수 있다(Fig.12). 비교적 이른 시기인 4주에 주변 결손부 마진에서 자라나온 골이 아니라 골이식재 주변에서 신생된 골이 형성되는 것을 볼 수 있었다(Fig.13).

신생골은 주변의 원래 있던 골에서 기원된 것으로 보이고, trabecular pattern 은 상악동내 잔존골에서부터 발생한 듯한 양상을 가지기도 하며, 골이식재 변연부가 부드럽게 변하여 이식재 particle이 흡수가 진행되고 있는 양상을 볼 수 있었다(Fig.14). 대부분의 신생골은 결손부가 치유되면서 결손부 주변에서 발견되고 있다. 결손부 변연에서 생겨나고 있는 신생골을 확인하기 위해 고배율로 보았을 때 골이식재가 신생골에 둘러 싸여 있는 모습을 볼 수 있었는데, 이러한 골이식재와 신생골이 incorporation되어 있는 양상을 통해 점차 골이식재 흡수가 진행되면서 해당 부위는 완전히 신생골로 바뀔 것을 기대할 수 있다.

Fig.15에서는 Cuboidal osteoblast를 볼 수 있는데, 이는 mesenchymal stem cell이 osteoblast로 differentiation 되는 과정에서 나타난다고 보고된다. 3가지 실험군에서 대부분 비슷한 소견을 발견할 수 있었다. osteoblast들이 생겨서 신생골이 생성되는 것이 8주에서도 계속 진행되고 있다는 것을 보여주고 있다. 골이식재 주변으로 성숙된 lamellar bone의 소견인 Haversian system, Haversian Canal, interstitial lamella가 나타났으며(Fig.16), 이는 신생골이 형성된 후 성숙된 양상을 보이는 것으로 파악된다. 다수의 osteoblast가 신생골 주변으로 배치 되어있는 것을 볼 수 있었고(Fig.17), Fig.18은 8주 oligopeptide 군으로 osteoclast가 관찰 되고 있다. 다른 개체에서는 이러한 흡수 양상을 거의 찾아볼 수 없었는데, 이는 이중인산칼슘골이식재가 흡수되면서 나오는 Ca^{2+} 이온이 osteoclast를 억제하기 때문으로 보인다.



(a)

(b)

Fig.11 Histologic findings - 8 week : (a) Erh BMP-2 group 8 week. (b) OSTEON™ group 8 week .

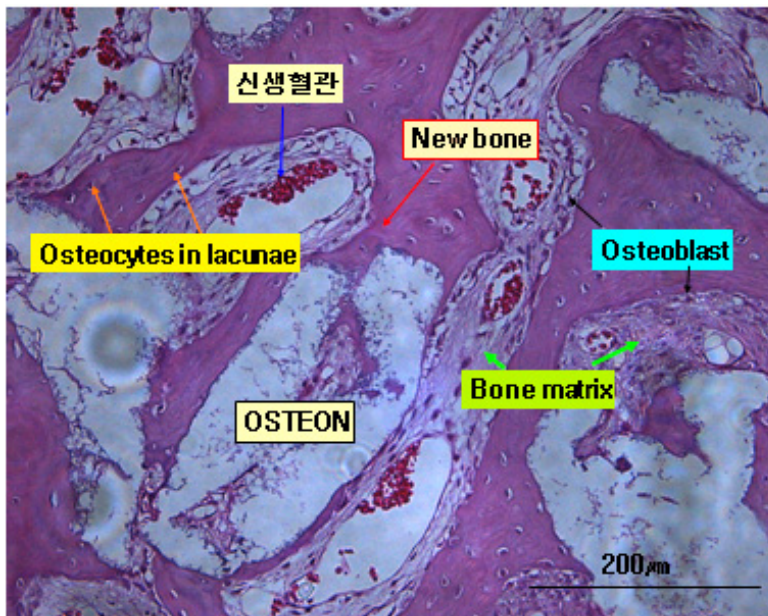
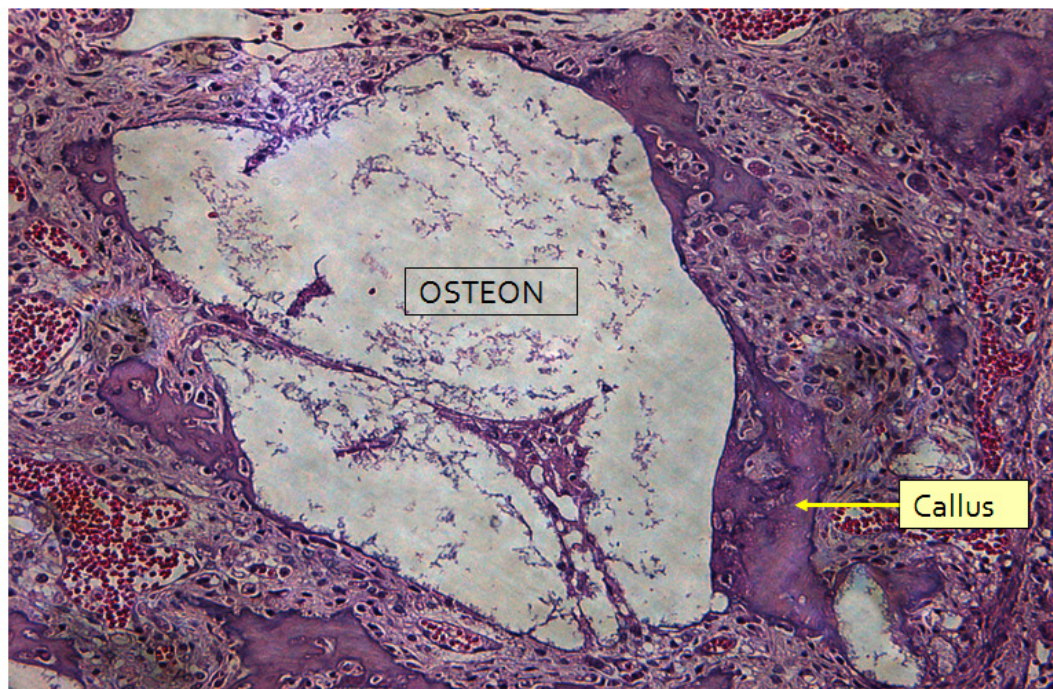
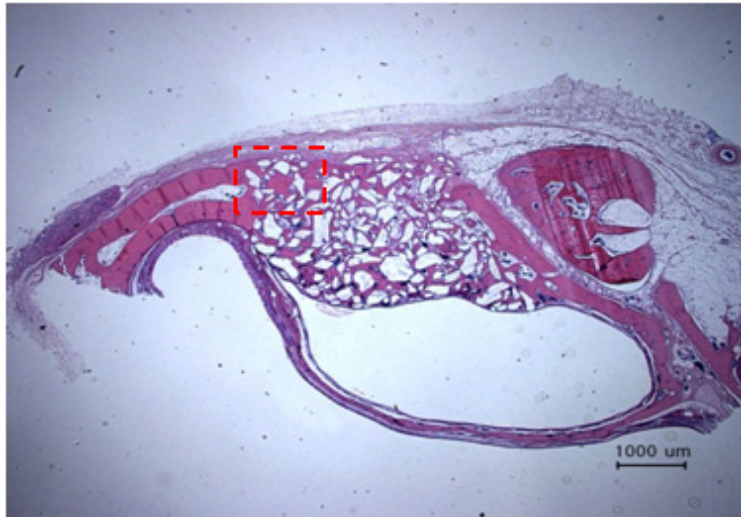


Fig.12 Histologic findings - high magnification : Newly formed bone and blood vessel, osteoblast, osteocyte in lacuna were observed around graft material (OSTEON™).

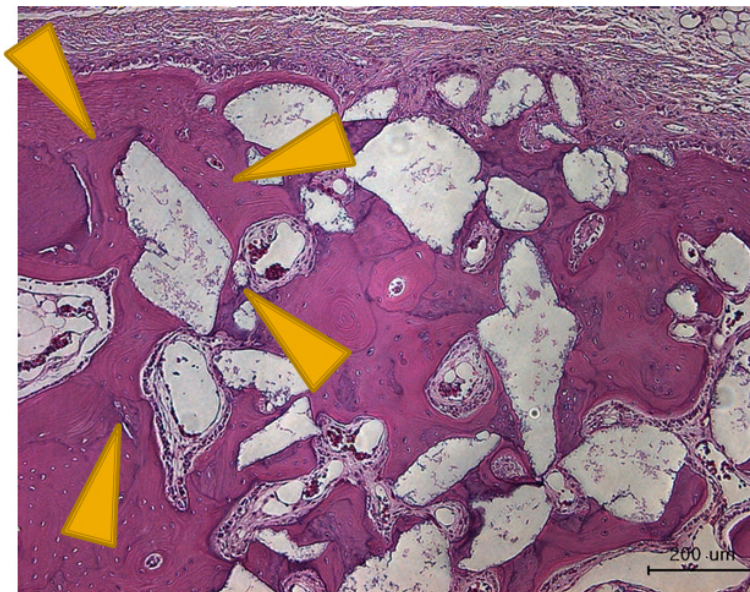


Microscopic view X200

Fig.13 Histologic findings of 4 week ErhBMP-2 group: Callus was found near graft material(OSTEON™). It seemed to be originated from graft material, not the margin of window site.

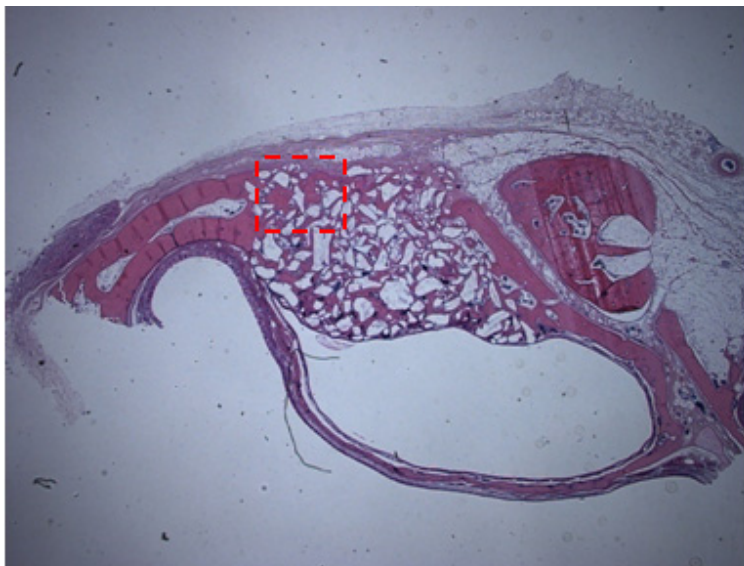


(a)

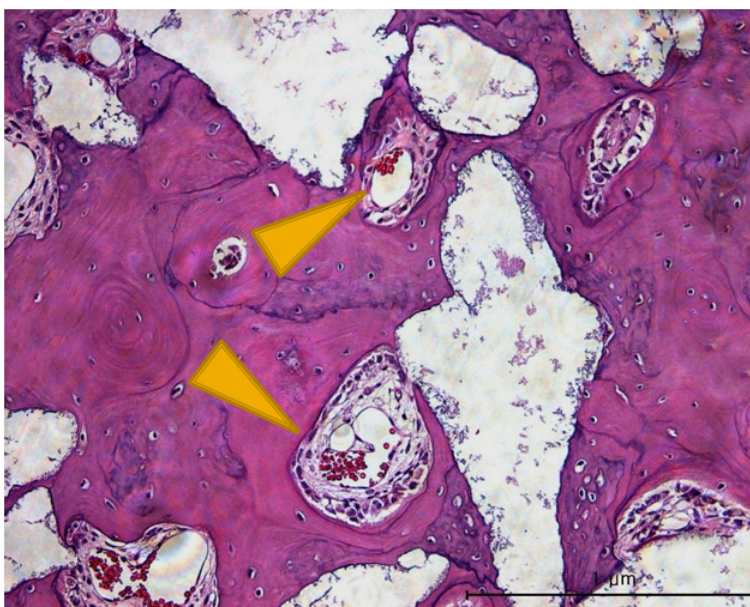


(b)

Fig.14 Histologic findings of 8 week Oligopeptide group : (a) low magnification finding (b) Shape of graft material was smoothed due to resorption of graft material particles.

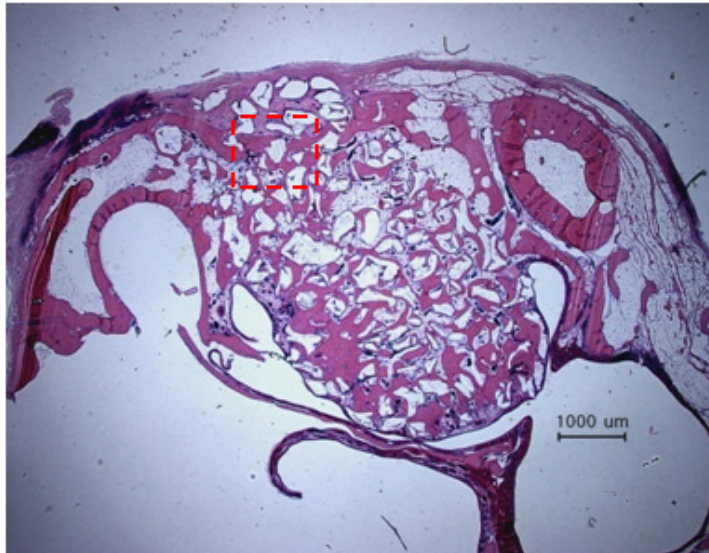


(a)

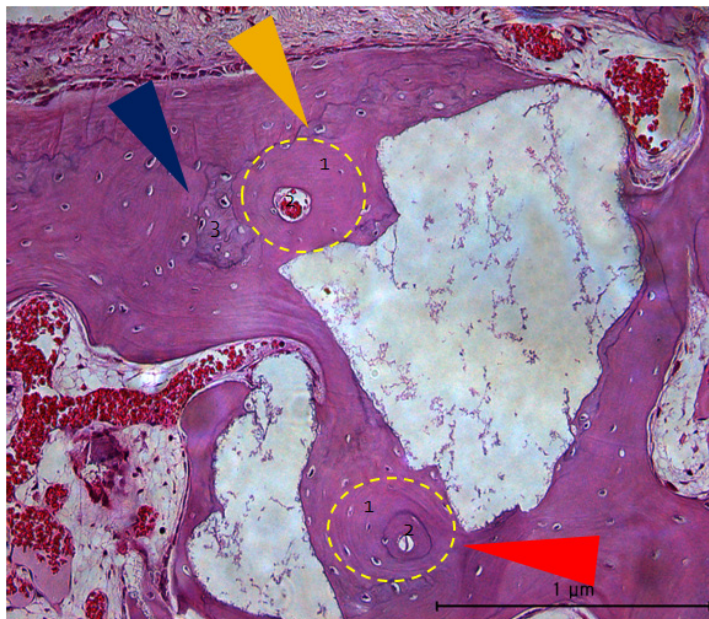


(b)

Fig.15 Histologic findings of 8 week Oligopeptide group : (a) low magnification (b) Cuboidal osteoblast (yellow arrowhead) was found, which occurred when osteoblast was differentiated from mesenchymal stem cell.



(a)

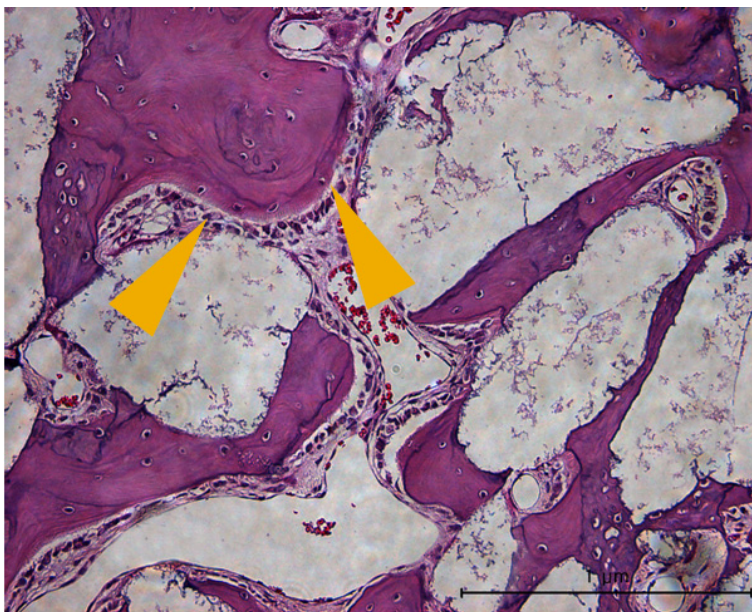


(b)

Fig.16 Histologic findings of 8 week ErhBMP-2 group : (a) low magnification (b) Haversian system(yellow arrowhead,1),Haversian Canal(red arrowhead,2),interstitial lamella(blue arrowhead,3) were found.

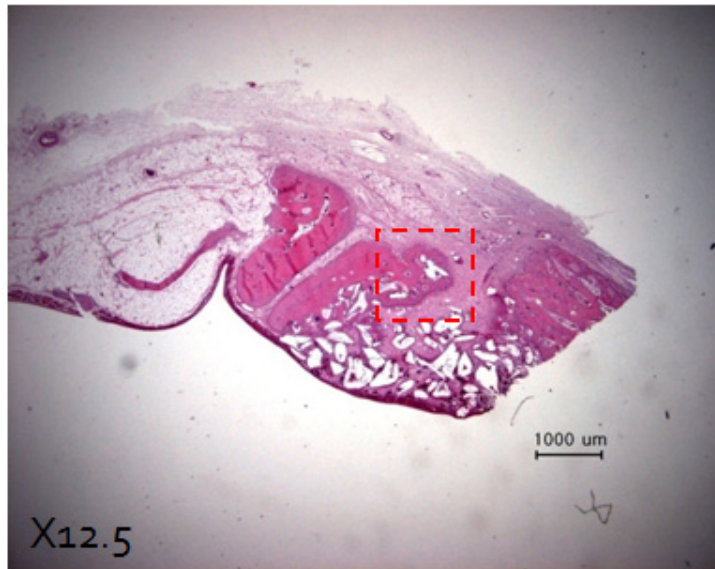


(a)



(b)

Fig.17 Histologic findings of 8 week Oligopeptide group : (a) low magnification (b) Many osteoblast were found near newly formed bone.(yellow arrowheads)



(a)



(b)

Fig.18 Histologic findings of 8 week Oligopeptide group : (a) low magnification (b) Many osteoclast were found.

IV. 고찰

이중인산칼슘 골이식재는 베타-트리칼슘포스페이트(β -Tricalcium phosphate, β -TCP)와 하이드록시아파타이트(hydroxyapatite, HA)성분이 혼합된 골이식재로서 세포실험과 동물실험 및 임상 적용에서 좋은 결과를 보이는 대표적인 합성골이식재이다.²⁵ 이중인산칼슘 골이식재는 생체활성, 생분해성 및 골전도성을 가지고 있으며 조골세포(osteoblast)의 부착을 지지하는 기능과 골이식재가 생분해되면서 새로운 골의 침착을 일으키는 기능을 가지고 있다.³

베타-트리칼슘포스페이트(β -TCP)는 생체활성이 뛰어난 성분으로서 하이드록시아파타이트(HA) 보다 더 많은 골을 형성하도록 작용하지만 너무 빠르게 흡수되는 단점을 가지고 있다. 반면에 하이드록시아파타이트(HA)는 비교적 안정적인 재료로 알려져 있는데, 베타-트리칼슘포스페이트(β -TCP)보다는 더 적은 양의 골을 형성하도록 작용하지만 흡수속도가 느려서 골이식재가 흡수되는 시기를 연장할 수 있는 성분이다. 너무 이른 시기에 골이식재가 흡수되면 신생골이 형성될때까지 적절한 공간을 유지하지 못하므로 신생골 형성에 불리하고, 너무 늦게 골이식재가 흡수되는 것 또한 신생골이 자리잡을 공간을 잔존 골이식재가 차지하게 되어 신생골 형성에 도움이 되지 않는다. 이중인산칼슘 골이식재에서는 베타-트리칼슘포스페이트(β -TCP)와 하이드록시아파타이트(HA)의 성분비를 조절함으로써 흡수속도와 미세구조나 입자사이 공간의 크기를 변화시키고⁵, 이로인해 골형성능의 차이를 보이게 할 수 있다. 현재까지 여러 연구를 통해 이상적인 혼합비율을 찾게 되었는데, 이전의 연구에서 하이드록시아파타이트(HA)가 많으면 (HA: β -TCP = 75:25) 흡수율이 낮아지게 되고 하이드록시아파타이트(HA)가 적고 베타-트리칼슘포스페이트가 많으면 (HA: β -TCP = 25:75) 흡수율이 높아지게 됨을 확인하였다.^{4,5}

세포실험에서 이중인산칼슘골이식재가 흡수되는 양상은 자연상에 존재하는 석회화된 유기질 조직이 흡수되는 양상과 아주 비슷하여 흡수강이 관찰되는 것으로 보고되었다. minipig를 대상으로 한 동물실험에서는 하이드록시아파타이트(HA)와 베타-트리칼슘포스페이트(β -TCP)의 혼합비율이(HA/ β :TCP) 20대 80 인 경우에서 높은 흡수율을 보였고 자가골과 대등할 정도의 골형성량을 보였다고 보고되었으며⁵, 총 52주 간의 치유기간을 거치더라도 20% 이상의 하이

드록시아파타이트(HA)가 포함된 골이식재는 흡수가 되지 않고 잔존하는 것으로 나타났다. 이중인산칼슘 골이식재는 많은 장점에도 불구하고 골형성능(osteogenetic potential)이 결여된 치명적인 단점을 가지는데 최근에는 이러한 이중인산칼슘 골이식재의 골형성능을 개선시키기 위해 여러 단백질을 첨가하는 실험들이 이루어져왔다. 그중에서 TGF- β 에 높은 친화성을 보이고 있는 것으로 밝혀져 골이식재와 TGF- β 를 결합시켜 골형성능을 향상하려는 연구가 진행되기도 하였다.^{7,42} 또한 골형성 단백질-2 (BMP-2)⁸, Osteocalcin⁹, alkaline phosphatase 같은 효소¹⁰, 범랑기질 단백질과의 결합¹¹ 등 다양한 방법으로 이중인산칼슘 골이식재의 표면을 처리하여 골형성능을 개선하려는 시도가 진행되었다.

녹차는 널리 음용되는 음료로서 건강에 유익하다는 것이 과학적 사실로 판명되었다. 다수의 역학조사 등에서 녹차를 마시는 것이 암의 발생과 심혈관질환을 예방한다는 것이 입증되었는데, 이런 효능은 녹차에 많이 함유된 epigallocatechin-3-gallate(EGCG)라는 polyphenol 에 주로 기인한다. EGCG가 풍부한 녹차를 마시는 것은 골밀도의 증가와도 관련이 있는 것으로 여겨지는데, 역학조사에 의하면 녹차음용과 골다공증의 위험도 감소간에 연관성이 있다고 보고되었다. 녹차잎의 polyphenol 중 30~40% 는 catechin(혹은 flavonol)에 해당하고, 녹차에 함유된 catechin의 주성분은 EGCG, ECG 와 epicatechin이다.¹²

EGCG의 작용은 골형성과도 관련이 있다. EGCG 는 collagenase 혹은 gelatinase(MMP-2 와 MMP-9)의 활성과 발현을 억제하며, 파골세포(osteoclast) 의 apoptotic cell death를 유도하여 파골세포(osteoclast) 형성을 억제한다.^{12,13} 또한, EGCG는 쥐의 파골세포(osteoclast)에서 apoptotic cell death를 유도하고²⁸ 쥐의 bone marrow 에서의 파골세포(osteoclast) 형성과 두개골의 초기 조골세포(primary osteoblast)의 형성을 억제하는 것으로 알려졌다.¹³ 골을 형성하는 조골세포(osteoblast)와 흡수하는 파골세포(osteoclast)의 활성이 조화를 이루어야 완전한 골이 유지된다. 성숙한 조골세포는 세포외기질(extracellular matrix)의 분자를 합성하고 분비하는 특성을 가지며, alkaline phosphatase(ALP)를 생산하여 세포외기질의 광화를 조절한다. ALP 는 phosphate esters 를 가수분해하여 국소적인 phosphate 농도를 증가시키고 세포외기질의 광화를 촉진한다. ALP 를 합성하는 능력도 성숙한 조골세포의 특징 중 하나로서 ALP의 합성은 조골세포의 분화의 초기지표로 간주된다.

multipotent mesenchymal stem cell이 조골세포로 분화되는 과정은 Runt-related transcription factor-2(Runx2)로 알려진 runt-domain gene family에 의해 조절된다. Runx2 는 type I 과 type II의 두가지 형태가 있는데, 이 둘은 N-terminal 만 다르고, SaOS-2 세포를 포함한 다수의 osteoblast-like cell line 에서 나타난다. 기존의 문헌에서 EGCG의 조골세포 에 대한 직접적인 효과를 연구하기 위해 SaOS-2 cell 을 이용하였는데, 이는 사람의 조골세포(human osteoblast, HOB)는 배양하는데 긴 시간이 소요되고 비용이 많이 드는 반면 SaOS-2같은 osteosarcoma cell line은 변형이 많기는 하지만 cell culture 상에서 안정적인 osteoblast-like phenotype을 가지므로 조골세포의 특징과 기능을 연구하는데 좋은 모델이 되기 때문이다. 그 결과 EGCG가 광화된 골결절(mineralized bone nodule)의 형성을 강하게 촉진하는 효과를 나타냄을 증명하였다.¹²

EGCG는 ALP의 활성을 증가시켜서 multipotent mesenchymal stem cell 이 조골세포로 분화되는 과정을 촉진하고 결국 광화된 골결절의 형성에 영향을 주는 것으로 보인다. Runx2가 결핍되면 multipotent mesenchymal stem cell이 조골세포로 분화하는 능력이 결여된다. 반면, transgenic mice에서 보여진 것처럼 조골세포의 Runx2가 과도하게 발현되는 경우, 조골세포의 숫자는 많아지지만 골기질형성이나 광화같은 기능은 떨어진다. 즉, Runx2는 조골세포분화의 초기단계에서는 조골세포의 분화를 촉진하여 숫자를 늘리지만, 후기단계에서는 조골세포의 성숙을 억제하여 골을 약하게 한다. EGCG는 Runx2단백질을 억제하여 광화된 골 결절의 생성을 증가시킨다. 즉, EGCG는 Runx2 단백질의 합성을 막아서 조골세포의 성숙을 촉진하여 bone matrix의 광화를 증가시키고 더 많은 골결절을 만들게 된다.¹² 이와같이 녹차추출물중 EGCG에 관하여는 많은 연구가 진행되어왔다. 반면, 녹차추출물의 성분 중 gallate(gallic acid)에 대하여는 거의 연구된 바가 없었다. 본 연구의 초기에 녹차 성분중에 골형성에 더 효과적인 성분을 찾아보기 위해 골결절 형성실험을 진행하면서 gallate와 EGCG의 골결절형성능을 비교하는 실험을 진행하였는데 그때 특정 농도에서 gallate 가 현저히 많은 골형성을 일으키는것을 확인하게 되었고 본 실험에서도 EGCG 대신 gallate를 이용하여 연구를 진행하게 되었다. 앞으로 gallate의 작용 기전에 대하여는 많은 연구가 진행되어야 하리라 생각된다.

세포막에 있는 골형성단백질 receptor 와의 결합에 관여하는 골형성단백질의 특정 펩타이드배열(peptide sequence)을 이용하는 것도 골이식재의 골형성

능향상을 위한 훌륭한 대안이 된다. 15개의 아미노산으로 된 BMP-2 mimicking 배열을 가진 oligopeptide가 골재생을 향상시킨 예가 보고되었다. Saito A등에 의하면 73-92 펩타이드를 주입한 α -tri scaffolds가 토끼의 요골(radial bone)에 생긴 20mm 크기의 결손부를 12주만에 거의 재생시켰다.¹⁴ 작은 아미노산 배열이 큰 단백질의 counterpart 만큼이나 세포의 결합, 세포증식 그리고 골재생에 효과적으로 알려져 있는데, 특히, 콜라겐(collagen)의 세포부착 도메인에 상응하는 펩타이드 배열은 조섬유세포(fibroblast), 조골세포(osteoblast) 등의 세포 부착에 관여하는 것으로 보고되었다.¹⁵ Bhatnagar 등은 α 1(I) 사슬 내에서 사람의 type-I collagen 세포부착 도메인(P-15)으로 코팅된 무기질의 골입자를 관찰하였는데,^{18,19} 이들이 골기질과 유사하게 기능하여 골형성을 촉진하는 것으로 보고하였다.²⁰ 또한, 골형성단백질-2(BMP-2)에서 기원한 oligopeptide와 알지네이트를 결합시켰을때 정상적인 장소를 벗어난 부위에서 골형성이 일어나는 것이 보고된 바 있다.²⁶

이전의 실험에서 BMP receptor I과 BMP receptor II와 결합하는 도메인에 해당하는 15개의 아미노산을 이중골에 코팅을 한 후 토끼 두개골 결손부에 이식하였을때 대조군과 비교하여 2주, 4주 쯤에서 골형성이 증가된다는 것이 보고되었다.²⁷ 이로인해 골형성단백질(BMP)과 결합하는 도메인에 해당하는 oligopeptide가 초기 골형성에 영향을 준다는 사실이 확인되었다. 또한 개의 3벽성 결손부에 대하여 시행된 실험을 통해서도 이 oligopeptide가 골형성에 미치는 영향이 규명되었다.²⁷ 따라서, 적은 양의 합성oligopeptide를 골이식재와 혼합하여 사용하면 골이식재의 골형성능 향상에 큰 영향을 줄 것으로 생각된다. 본 실험에서는 사람의 type I collagen 의 세포부착 도메인에 해당하는 GTPGPQGIAGQRGVV(P-15)의 서열을 가지는 oligopeptide로 이중인산칼슘 골이식재의 표면을 코팅하여 실험재료로 사용하였다.^{16,17}

1965년 Urist 가 골형성단백질의 골유도성과 골형성능력을 보고한 이래로 유전자재조합기술에 의해 골형성단백질을 생산해 왔는데, 대부분은 chinese hamster ovary cell(BMP-2), mouse myeloma cell(BMP-4), human embryonic kidney cell(BMP-4) 또는 기타 영장류 cell (BMP-7)로부터 생산하였다. 그러나, 이런 방식으로 생산하는 경우 생산량의 한계 및 고비용의 문제가 있어 최근에는 주로 Escherichia coli bacteria에서 생산된 Erh-BMP가 임상적으로 많이 사용된다.¹⁶ 다른 성장인자들의 경우와 마찬가지로 Erh-BMP 역시 운반시스템

이 필요한데, 하이드록시아파타이트나 베타-트리칼슘포스페이트 등이 최적의 후보물질이다. 이들 하이드록시아파타이트나 베타-트리칼슘포스페이트 같은 운반시스템 재료들은 세포성장, 혈관생성, 세포부착을 위한 최적의 상황을 제공하며 공간확보의 기능도 한다.²⁹

골형성단백질이 유용하기는 하지만 분자량이 크고 공간유지용 물질과 커플링하기에 어려우며, 면역반응, 고비용, 다른 장기에 대한 예상밖의 영향등의 문제점이 있기도 하다. 또한, 골형성단백질에 대한 운반시스템은 초기에 다량의 골형성단백질을 방출해버려서 국소적으로는 치료레벨 이하로 골형성단백질의 농도가 떨어지게 하기도 한다. 골형성단백질을 골결손부의 재생에 활용하기 위해서는 이를 적절하게 방출하기 위한 운반체가 필요하며, 이 운반체는 새로운 조직의 template로서의 기능도 하게 된다. 이를 위해서 단백질 펩타이드 유사체(mimicry) 개발에 주목하게 되었다.¹⁴ 성장인자(growth factor)중 하나인 골형성유도단백질(BMP)을 골이식재와 같이 사용하는 것이 골이식재의 골형성능력을 향상시키는 가장 효율적인 방법중 하나로 여겨지고 있다. 골형성유도단백질(BMP) 중 가장 효과적인 형태인 BMP-2 와 BMP-7이 생체재료(콜라겐, 인산칼슘cement, 중합체, 세라믹)와 함께 정형외과 영역에서 적용되어 왔다.^{30,31}

골형성유도단백질(BMP)과 다공성의 세라믹을 같이 사용할때는 단순한 방법으로 결합하고 건조하여 적용하나 그 결합방법과 골형성단백질(BMP)이 유리되는 비율에 대해서는 아직 결정되어 있지는 않다.³² 대부분의 연구에서는 골형성단백질(BMP)을 병용하였을때 치유가 빠르게 일어나고 골형성능이 향상되었음을 보고하였다. 반면 몇몇 연구에서는 골형성유도단백질(BMP)이 파골세포(osteoclast)를 활성화시켜 골 흡수가 진행된다고도 보고하고 있다.³³ 최근의 연구에 의하면 골형성단백질(rhBMP-2)이 인산칼슘제재에 흡착되는 특성이 언급되었는데, 한 실험에서는 흡착등온선에 대해 조사하였고, 칼슘의 농도, 포스페이트의 농도, 염화나트륨의 농도 및 산도(pH)등과 같은 흡착에 영향을 주는 요소들을 연구한 결과 rhBMP-2가 하이드록시아파타이트(HA)에 흡착되는 양은 초기 4시간 이내에 최대에 도달하고 칼슘이온은 흡착을 촉진하고 인산이온은 흡착을 억제하는 것으로 보고되었다.³⁴ 다른 실험에서는 골형성단백질-2(BMP-2)가 다른 단백질에서보다 인산칼슘제의 하이드록시아파타이트표면에 강한 친화력을 보였음을 발견하였고³⁵, 또 다른 연구에서는 하이드록시아파타이트 표면들이 BMP-2의 기능그룹들과 상호작용하는 이론적인 모델을 근거로 하여 카르

복합 기능그룹들과 하이드록시아파타이트 표면으로부터 기인한 칼슘이온사이의 선택적인 상호작용에 대해 보고하였다.³⁶ 이중인산칼슘 골이식재의 내부의 미세공극은 재료표면에 순환하는 성장인자가 재료표면에 잘 결합하는데 중요한 역할을 한다고 주장되기도 하였다.^{37,38}

본 실험에서는 토끼를 실험동물로 선택하였는데, 토끼는 큰 동물에 비해 상악동 크기와 형태의 변이가 적고 상악동 측방벽의 두께도 얇아서 대체로 일관되게 결손부를 형성할 수 있는 장점이 있다. 토끼의 신진대사는 사람보다 3~4배 빠른 것으로 알려져 있는데³⁹, 따라서 4주의 치유기간은 사람의 3~4개월, 8주의 치유기간은 사람의 6~8개월에 해당한다. 토끼에서 8주 이후에는 치유에 별다른 변화는 없을 것으로 보여 8주는 충분한 치유기간으로 보여진다. 토끼 상악동에 대한 수술은 구강내로 접근하지 않고 구강외로 접근하여 시행하였는데, 구강외 접근법이 수술시야의 확보, 수술 부위로의 접근성 확보에 유리하다. 또한, 이러한 구강외 접근법으로 골 이식재의 노출, 감염, wound dehiscence, 저작시 가해질 수 있는 과도한 부하 등의 위험요인들을 예방할 수 있다.⁴⁰

본연구 과정에서 수술 중이나 수술 후 특이한 치유과정을 보인 개체는 없었다. 상악동 모델의 특성상 호흡 과정 중에 shneiderian membrane이 들어올려지는 압력이 골생성을 방해하는 역할을 했을 것으로 추측되지만 본 실험에서 그렇게 큰 영향을 미치지 않은 것으로 고려되므로 이 실험 모델이 골이식재의 성능을 비교하는데 사용되기에 적합한 모델이라고 생각되어진다.

이중인산칼슘 골이식재인 OSTEONTM의 표면에 oligopeptide, gallate 및 Erh BMP-2 를 결합시키는 과정은 앞서 실험방법에서 상세히 기술하였다. 처음 단계가 골이식재를 속슬렛 장치에 넣고 에탄올을 용매로 사용하여 100℃에서 24시간 순환시키는 과정이었는데, 이는 air pollutant로 일컫는 H,C,O,N 등이 골이식재의 표면에 달라붙어 재료를 소수성, 비활성화 상태로 만들어 표면처리과정이 방해받는 것을 막기 위함이었다. 단, OSTEONTM같은 제품화된 골이식재는 이미 멸균 처리되어 포장된 것이므로 이 과정을 생략해도 무방하리라 생각된다. 골이식재의 표면 코팅이 잘 되었는지 확인하기 위한 기초실험(XPS 분석, MTT assay, FDA 염색)은 oligopeptide에 대하여만 시행하였는데 이는 ErhBMP-2의 경우 구조식에 SH-기가 있어 상대적으로 HA와 결합이 용이할 것으로 판단했기 때문이다. 반면, oligopeptide와 gallate는 SH-기를 포함하지

않아 별도로 thiolation 과정을 수행하여야 했으므로 oligopeptide에 대한 기초실험을 통해 thioaltion 과정의 성공여부도 동시에 파악할 수 있었던 것이다.

신생골의 형성을 비교하기 위해서 3차원 적으로 신생골 형성량을 분석하여 군간의 차이를 비교한다면 더 좋은 결과를 얻을 수 있을 것이다. 그러나 본 실험에서는 신생골 형성을 파악하기 위해 2차원적으로 조직시편을 만들어서 비교하는 방법을 선택하였는데, 이러한 실험상의 한계를 보상하기 위해 신생골의 절대량을 비교하는 방법 대신 전체 결손부에서 신생골이 차지하는 비율을 계산하는 방법을 사용하였다.

micro CT를 이용하여 최대로 증강된 골높이(MAH), 결손부 최고 깊이(DDD) 및 증강된 골부피(CTvolume) 을 계측하였다. MAH 는 특정위치의 단면에서 골이식으로 인해 증강된 높이이므로 전반적인 증강된 양상은 CTvolume 이 더 객관적 데이터라고 할 수 있다. CTvolume 수치는 4주군, 8주군 모두 군간에 유의성은 없었으나, 4주, 8주 희생군 모두에서는 gallate군에서 가장 큰 CTvolume 을 보이는 경향을 나타냈다. 4주, 8주 희생군 모두 oligopeptide군에서 DDD 가 가장 작다. 각군간에 DDD 수치사이에 통계적인 유의차는 없었지만, oligopeptide의 역할에 의해 골이식 부위에 결손이 적게 생기도록 하였다고 생각해 볼 수 있다. 동물실험상의 한계로 인해 4주, 8주 희생군은 각각 다른 개체여서 시간에 따른 영향을 확실히 보여주지는 못하지만 Erh BMP-2군에서는 4주보다는 8주에서 MAH 와 CTvolume이 모두 커지고 DDD 는 작아지므로 방사선분석결과에 국한하여 생각하면 가장 좋은 결과를 보였다고 추측할 수 있다.

조직학적관찰에서 비교적 이른 시기인 4주에 주변 결손부 경계에서 자라나온 골이 아니라 골이식재 주변에서 신생된 골이 형성되는 것을 볼 수 있었다 (Fig.18). 3차원적으로 보면 연결되어있을지도 모르지만 결손부 변연에서 상당 부분 거리가 있는 부위임을 미루어 짐작할 때 골이식재 표면코팅의 영향으로 신생골이 형성되었다고 생각해 볼 수 있다. Fig.23에서는 osteoclast가 관찰 되고 있는데, 다른 개체에서는 이러한 흡수 양상을 거의 찾아볼 수 없었다. 이는 이중인산칼슘골이식재 가 흡수 되면서 나오는 Ca^{2+} 이온이 osteoclast를 억제하기 때문으로 보인다. 이중인산칼슘 골이식재가 흡수되면서 나타나는 이러한 양상으로 osteoclast 가 억제되는 것이 신생골 형성에 도움이 되는 것으로 추측할 수 있다.

조직계측학적 분석결과 4주 희생군의 신생골면적비(NB%) 값은 HE 염색 표본에서 oligopeptide, ErhBMP-2, gallate, OSTEON™군의 순으로 나타났고, 8주 희생군에서는 gallate, oligopeptide, ErhBMP-2, OSTEON™군의 순으로 나타났다. 이중 4주군에서는 ErhBMP-2군과 OSTEON™군간에, 8주군에서는 oligopeptide군과 OSTEON™군, gallate군과 OSTEON™군간에 통계학적 유의성이 있었다. 비록 통계학적인 유의성이 없는 데이터도 있었으나 전반적으로 oligopeptide, ErhBMP-2, gallate 로 표면처리 한 골이식재를 적용했을때 OSTEON™ 만을 적용한 경우보다 골형성량이 증가했다고 생각할 수 있다.

통계적으로 유의차는 없으나 4주희생군에서는 oligopeptide군에서 신생골형성이 가장 많았는데, 이는 MTT assay 결과에서 나타나듯이 oligopeptide가 초기 세포부착을 향상시키는데 영향을 준 결과로 생각해 볼 수 있다.

본 연구 결과를 보면 신생골면적비(NB%) 값이 4주 희생군에서는 oligopeptide군과 ErhBMP-2군, 8주 희생군에서는 gallate 군에서 크게 나타났다. 초기에는 oligopeptide와 ErhBMP-2로 표면처리한 이중인산칼슘 골이식재의 골형성능력이 더 우수한 것으로 보인다. 하지만, 8주까지의 충분한 치유시간이 주어지면 gallate 군에서 상대적으로 더 많은 양의 신생골을 형성하는 것으로 나타났다. 이는 gallate가 EGCG와 유사하게 짧은 기간에 골형성을 촉진하는 기능보다는 파골세포에 대한 억제효과로 골흡수를 줄이고 조골세포의 성숙을 도와 세포외기질의 광화를 촉진하여 골질을 향상시키고 유지하는 기능이 더 추가되기 때문으로 생각된다. 또한, gallate 의 파골세포에 대한 억제효과로 인해 잔존 골이식재면적비(RG%)가 gallate 군에서 가장 크게 나타났다고 생각된다. 또한 조골세포의 성숙을 도와 골기질의 광화를 촉진하므로써 결과적으로 증강된 골부피(CTvolume) 값도 gallate에서 가장 크게 나타났다.

bone graft를 시행하였을때 신생골은 골이식재에 의해 유지된 공간에 생기게 된다. 따라서, Remaining graft의 양에 대한 결과가 통계학적인 유의성은 없었지만 8주 치유기간이 지난 뒤에도 gallate군에서 더 많이 남아 있으므로 향후 신생골이 생길 가능성은 더 높은 것으로 예측해볼 수 있다. 또한, remaining graft의 양의 감소와 신생골 생성 양의 증가 사이의 관계를 분석하였을때 gallate군과 ErhBMP-2군에서는 감소된 graft 양에 비해 많은 신생골이 생성되었음을 알 수 있으므로 신생골 형성에 보다 효율적으로 작용했다고 추측할 수 있다.

실험에 사용된 재료들의 코팅 농도는 기존의 문헌에서 좋은 결과를 보인 농도를 채택하였다. 그 중 특히 ErhBMP-2의 농도는 기존 논문⁴¹에 보고된 실험 농도인 0.1mg/ml의 반에 해당하는 0.05mg/ml이었는데, 이는 BMP-2의 임상적용 시 나타날 수 있는 부작용을 고려했을때 가능하면 낮은 농도로 최적의 효과를 낼 수 있다면 그것이 더 안전성이 있는 방법이 아닌가 생각했기 때문이다. 척추수술 후 고농도의 골형성단백질(BMP)을 적용하여 골형성을 유도하였을때 원치않는 부위에서 골형성이 일어나고 이로 인한 신경압박 사례가 보고되기도 하는 등^{43,44} 골형성단백질(BMP) 사용에는 위험성이 따르는 것으로 알려져 있다. 특히, 구강악안면 영역에서는 낮은 농도로 사용하더라도 부작용의 위험성을 완전히 배제하지는 못할 것으로 생각된다.

본 실험에서는 차단막을 사용하지 않았는데 이로 인해 골이식부위에 연조직이 개입할 수 있는 여지가 있었다. 결손부를 덮는 차단막을 사용하지 않았기 때문에, 자라 들어온 연조직으로 인해 healing이 저해 받았을 가능성이 있지만 이중인산칼슘 골이식재는 비교적 공간유지를 하면서 연조직이 자라 들어오는 압력에 저항할 수 있는 재료라 생각되었기 때문에 차단막을 사용하지 않았고 결과를 보면 많은 영향을 받지 않은 것으로 보인다. 그러나 향후 실험에서 차단막을 사용한다면 연조직의 침범으로 인한 골생성 방해를 완전히 배제할 수 있으므로 보다 가치 있을 것으로 추측된다. 또한, 이중인산칼슘 골이식재의 표면처리가공 중에 골이식재 입자의 크기가 변했을 가능성이 있고, 이것이 결과에 영향을 미칠 수도 있을 것으로 사료된다.

앞으로는 골이식재에 대한 표면처리를 한 가지 재료로 1회만 시행 할 것이 아니라 몇 가지 재료로 여러 번 시행하여 복합적인 효과를 추구하는 것도 시도되어야 할 것이다. 예를들어, BMP와 gallate로 표면처리를 2회 시행하여 먼저 BMP가 초기 골형성에 작용하고 이어서 gallate가 골광화를 촉진시키는 기능을 가지도록 한다면 더 좋은 골형성 결과를 기대해볼 수 있을 것이다. 동시에 표면처리에 사용한 재료들을 더 적은 농도로 효율적으로 적용할 수 있는 방법도 연구되어야 하며, 좀더 장기간의 관찰을 통해 골이식재가 흡수되는 양상에 대한 연구도 이루어져야 할 것으로 생각된다. 미래에는 더욱 실제 임상과 유사한 실험모델로 같은 이식재에 대한 실험을 진행 해 보고자 한다.

V. 결론

이중인산칼슘골이식재의 표면을 oligopeptide, gallate, ErhBMP-2로 코팅하여 골이식재의 골형성능 향상정도를 비교한 결과 다음의 결과를 얻었다.

1. 4주 희생군에서 조직계측학적 분석으로 얻은 신생골 면적비(NB%)를 보면 대조군인 이중인산칼슘 골이식재(OTSEON™) 만을 적용한 군에 비해 ErhBMP-2로 표면처리한 이중인산칼슘 골이식재를 적용한 군에서 유의성 있게 신생골의 형성이 증가하였다.
2. 8주 희생군에서 조직계측학적 분석으로 얻은 신생골 면적비(NB%)를 보면 대조군인 이중인산칼슘 골이식재(OTSEON™) 만을 적용한 군에 비해 oligopeptide, gallate 로 표면처리한 이중인산칼슘 골이식재를 적용한 군에서 유의성 있게 신생골의 형성이 증가하였다.
3. 4주 희생군과 8주 희생군 간의 비교시 gallate 로 표면처리한 군에서 신생골 면적비(NB%)은 유의성있게 증가하였다.

이상의 결과로 보아 이중인산칼슘 골이식재에 대한 gallate 코팅처리가 골이식재의 골형성능을 향상시킨 것으로 판단되며, 4주 이후 8주까지 신생골의 형성이 현저히 증가하였다.

참고문헌

1. Carl E. Misch DDS,MDS, Francine Dietsh DCD,MDS. Bone-grafting materials in implant dentistry. Implant Dentistry. fall 1993:158-167
2. Jensen SS, Broggini N,Hj ø rting-hansen E, Schenk R, Buser D. Bone healing and graft resorption of autograft, anorganic bovine bone and beta-tricalcium phosphate. A histologic and histomorphometric study in the mandibles of minipigs. Clin Oral Implants Res. 2006 Jun;17(3):237-243
3. Daculsi G, Passuti N. Effects of the macroporosity for osseous substitution of calcium phosphate ceramics. Biomaterials. 1990 Jul;11:86-87
4. Yamada S, Heymann D, Bouler JM, Daculsi G. Osteoclastic resorption of calcium phosphate ceramics with different hydroxyapatite/beta-tricalcium phosphate ratios. Biomaterials. 1997 Aug;18(15):1037-1041
5. Jensen SS, Bornstein MM, Dard M, Bosshardt DD, Buser D. Comparative study of biphasic calcium phosphates with different ratio in mandibular bone defects. A long-term histomorphometric study in minipigs. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2009 Jul;90(1):171-181
6. Ji Hyun Lee, Ui Won Jung, Chang Sung Kim, Seong Ho Choi, Kyoo Sung Cho. Histologic and clinical evaluation for maxillary sinus augmentation using macroporous biphasic calcium phosphate in human. Clin. Oral Impl. Res. 2008;19:767-771
7. Zhu XD, Fan HS, Xiao YM, Li DX, Zhang HJ, Luxbacher T, Zhang XD. Effects of surface structure on protein adsorption to biphasic calcium phosphate ceramics in vitro and in vivo. Acta Biomater. 2009 may;5(4):1311-1318

8. Autefage H, Briand-Mésange F, Cazalbou S, Drouet C, Fourmy D, Gonçalves S, Salles JP, Combes C, Swider P, Rey C. Adsorption and release of BMP-2 on nanocrystalline apatite-coated and uncoated hydroxyapatite/beta-tricalcium phosphate porous ceramics. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2009 Nov;91(2):706-715

9. Vater C, Lode A, Bernhardt A, Reinstorf A, Heinemann C, Gelinsky M. Influence of different modifications of a calcium phosphate bone cements on adhesion, proliferation, and osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells. *J Biomed Mater Res A*. 2010 Mar 15;92(4):1452-1460

10. Lise T, de Jonge, Jeroen J.J.P, van der Beucken, Sander C.G., Leeuwenburgh, Anouk A.J., Hamers, Joop G.C., Wolke, John A. Jansen . In vitro responses to electrosprayed alkaline phosphatase/calcium phosphate composite coatings. *Acta Biomaterialia* 2009;5: 2773-2782

11. Roldán JC, Detsch R, Schaefer S, Chang E, Kelantan M, Waiss W, Reichert TE, Gurtner GC, Deisinger U. Bone formation and degradation of a highly porous biphasic calcium phosphate ceramic in presence of BMP-7, VEGF and mesenchymal stem cells in an ectopic mouse model. *J Craniofac Surg*. 2010 Sep; 38(6):423-430.

12. Bahareh vali, Leticia G. Rao, Ahmed El-Sohemy. Epigallocatechin-3-gallate increase the formation of mineralized bone nodules by human osteoblast-like cells. *Journal of Nutritional Biochemistry* 2007;18: 341-347

13. Yun J-H, Pang E-K, Kim C-S, Yoo Y-J, Cho K-S, Chai J-K, Kim C-K, Choi S-H. Inhibitory effects of green tea polyphenol (-) - epigallocate

chin gallate on the expression of matrix metalloproteinase-9 and on the formation of osteoclasts. J Periodont Res 2004;39;300-307.

14. Chang-Kyun Lee, DDS,MS et al. Biomimetic surface modification using synthetic oligopeptide for Enhanced Guided bone regeneration in beagles. J Periodontol. 2011 May 4. [Epub ahead of print]
15. Jun-Beom Park, Jue-Yeon Lee, Ho-Nam Park, Yang-Jo Seol, Yoon-Jeong Park, Sang-Hoon Rhee, Sang-Cheol Lee, Kyoung-Hwa Kim, Tae-Il Kim, Yong-Moo Lee, Young Ku, In-Chul Rhyu, Soo-Boo Han, and Chong-Pyoung Chung. Osteopromotion With Synthetic oligopeptide-Coated Bovine Bone Mineral In Vivo. J Periodontol Jan 2007: 157-163
16. Jee-Hee Jung, DDS, Jeong-Ho Yun, DDS, PhD, Yoo-Jung Um, DDS, PhD, Ui-Won Jung, DDS, PhD, Chang-Sung Kim, DDS, PhD, Seong-Ho Choi, DDS, PhD, and Kyoo-Sung Cho, DDS, PhD. Bone formation of Escherichia coli expressed rhBMP-2 on absorbable collagen block in rat calvarial defects. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2011;111:298-305
17. Asai, S., Shimizu, Y. & Ooya, K. (2002) Maxillary sinus augmentation model in rabbits: effect of occluded nasal ostium on new bone formation. Clin Oral Implants Res 13:405-409.
18. Bhatnagar RS, Qian JJ, Gough CA. The role in cell binding of a β -band within the triple helical region in collagen $\alpha 1(I)$ chain: Structural and biological evidence for conformational tautomerism on fiber surface. J Biomol Struct Dyn 1997; 14: 547-560
19. Bhatnagar RS, Qian JJ, Wedrychowska A, Sadeghi M, Wu YM, Smith N. Design of biomimetic habitats for tissue engineering with P-15, a synthetic peptide analogue of collagen. Tissue Eng 1999;5:53-65

20. Yukna RA,callan DP, Krauser JT, Evans GH, Aichelmann-Reidy ME, Moore K, Cruz R, Scott JB. Multi-center clinical evaluation of combination a norganic bovine-derived hydroxyapatite matrix (ABM)/cell binding pepti de (P-15) as a bone replacement graft material in human periodontal os seous defects. 6-month results. J Periodontol. 1998 Jun;69(6):655-663.

21. Xiao SJ, Textor M, Spencer ND, Wieland M, Keller B, Sigrist H. Immo bilization of the cell-adhesive peptide Arg-Gly-Asp-Cys (RGDC) on ti tanium surfaces by covalent chemical attachment. J Mater Sci Mater M ed. 1997 Dec;8(12):867-872.

22. JM Carter, Chapter 118. Conjugation of peptide to carrier proteins via m-maleimidobenzyl-N-Hydroxysuccinimide Ester (MBS)

23. M.C.Durrieu , Pallu,F. Guillemot,R. Bareille,J. Amedee,CH Baquey, C.Labrugere, M.Dard . Grafting RGD containing peptides onto hydroxya patite to promote osteoblastic cells adhesion. Journal of Materials science : Material in Medicine 15;2004:779-786.

24. Mosmann, Tim . Rapid colorimetric assay for cellular growth and sur vival: application to proliferation and cytotoxicity assays. Journal Of Immunological Methods Dec 1983;65 (1-2): 55-63.

25. Jensen SS, Alvin Yeo, Michael Dard, Ernst Hunziker,Robert Schenk, D aniel Buser. Evaluation of a novel biphasic calcium phosphate in sta ndardized bone defects - A histologic and histomorphometric study in the mandibles of minipigs. Clin. Oral Impl. Res. 18,2007:752-760

26. Suzuki Y, Tanihara M, Suzuki K, saitou A, Sufan W, Nishimura Y. Alg inate hydrogel linked with synthetic oligopeptide derived from BMP-2

allows ectopic osteoinduction in vivo. J Biomed Mater Res. 2000 Jun 5;50(3):405-409

27. Jun-Beom Park, Jue-Yeon Lee, Yoon-Jeong Park, Sang-Hoon Rhee, Sang-Cheol Lee, Tae-Il Kim, Yang-Jo Seol, Yong-Moo Lee, Young Ku, In-Chul Rhyu, Soo-Boo Han, and Chong-Pyoung Chung. Enhanced Bone Regeneration in Beagle Dogs With Bovine Bone Mineral Coated With a Synthetic oligopeptide. J Periodontol Nov 2007;78(11):2150-2155.
28. Nakagawa H, Wachi M, Woo J, Kato M, Kasai S, Takahashi F, et al. Fenton reaction is primarily involved in a mechanism of (-)-epigallocatechin-3-gallate to induce osteoclastic cell death. Biochem Biophys Res Commun 2002;292:94-101
29. Jin-Woo Kim, Kyung-Hee Choi, Jeong-Ho Yun, Jung Ui-Won, Chang-Sung Kim, Seong-Ho Choi, Kyoo-Sung Cho. Bone formation of block and particulated biphasic calcium phosphate lyophilized with Escherichia coli-derived recombinant human bone morphogenetic protein 2 in rat calvarial defects. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2011 Sep;112(3):298-306
30. Seeherman H, Wozney JM. Delivery of bone morphogenetic proteins for orthopedic tissue regeneration. Cytokine Growth factor Rev. 2005 Jun;16(3):329-345.
31. Calori GM, Taqliabue L, Gala L, d'Imporzano M, Peretti G, Albisetti W. Application of rh BMP-7 and platelet-rich plasma in the treatment of long bone non-unions: a prospective randomised clinical study on 120 patients. Injury 2008 Dec;39(12):1391-402

32. Alam I, Asahina I, Ohmamiuda K, Enomoto S. Comparative study of biphasic calcium phosphate ceramics impregnated with rhBMP-2 as bone substitutes. *J Biomed Mater Res*. 2001 Jan;54(1) 129-138
33. Liu Y, Enggist L, Kuffer AF, Buser D, Hunziker EB. The influence of BMP-2 and its mode of delivery on the osteoconductivity of implant surfaces during the early phase of osseointegration. *Biomaterials* 2007 Jun;28(16):2677-2686
34. Boix T, Gómez-Morales J, Torrent-Burgués J, Monfort A, Puigdomènech P, Rodríguez-Clemente R. Adsorption of recombinant human bone morphogenetic protein rhBMP-2m onto hydroxyapatite. *J Inorg Biochem*. 2005 May;99(5):1043-1050
35. Barroug A, Lernoux E, Lemaitre J, Rouxhet PG. Adsorption of Catalase on Hydroxyapatite. *J Colloid Interface Sci*. 1998 Dec 1;208(1):147-152
36. Xiuli Dong, Qi Wang, Tao Wu, Haihua Pan. Understanding Adsorption-Desorption Dynamics of BMP-2 on Hydroxyapatite(001) Surface. *Biophysical Journal* 2007 Aug;93:750-759
37. Habibovic P, Yuan H, van der Valk CM, Meijer G, van Blitterswijk CA, de Groot K. 3D microenvironment as essential element for osteoinduction by biomaterials. *Biomaterials*. 2005 Jun; 26(17): 3565-3575
38. Rouahi M, Gallet O, Champion E, Dentzer J, Hardouin P, Anselme K. Influence of hydroxyapatite microstructure on human bone cell response. *J Biomed Mater Res A*. 2006 Aug;78(2):222-235
39. Roberts E, G.J., Breznak N. Bone physiology and metabolism. In: Mishra C. Contemporary implant dentistry : Mosby Year Book.

40. Olsen ,M.L., Aaboe,M., Hjorting-Hansen,E. & Hansen,A.K. Problems related to an intraoral approach for experimental surgery on minipigs. Clin Oral Implants Res 2004; 15: 333-338.
41. Choi Y, Yun JH, Kim CS, Choi SH, Chai JK, Jung UW. Sinus augmentation using absorbable collagen sponge loaded with Escherichia coli-expressed recombinant human bone morphogenetic protein 2 in a standardized rabbit sinus model: a radiographic and histologic analysis. Clin Oral Implants Res. 2011 Jun 2. doi: 10.1111/j.1600-0501.2011.02222.x. [Epub ahead of print]
42. Seqarini PR, Rosen DM, Seyedin SM. Binding of transforming growth factor-beta to cell surface proteins varies with cell type. Mol Endocrinol. 1989 Feb;3(2):261-272
43. Haid RW Jr,Branch CL Jr,Alexander JT,Burkus JK. Posterior lumbar interbody fusion using recombinant human bone morphogenetic protein type 2 with cylindrical interbody cages. Spine J.2004;4:527-538
44. Wong DA,Kumar A,Jatana S,Ghiselli G,Wong K. Neurologic impairment from ectopic bone in the lumbar canal:a potential complication of off-label PLIF/TLIF use of bone morphogenetic protein-2. Spine J. 2008; 18:1011-1018

Abstract

Effect of gallate-coated biphasic calcium phosphate bone substitute on osteogenesis

No Je Park

Department of Dental Science

Graduate School, Yonsei University

(Directed by Prof. Moon-Kyu Chung, D.D.S., Ph.D)

Biphasic calciumphosphate (BCP) bone substitute is one of the most popular alloplastic material these days. BCP does have osteoconductive characteristic only, not osteoinductive characteristic. To enhance osteogenetic property of BCP, surface modification with various materials has been tried. In this study the efficiency of 3 different modification materials (gallate, oligopeptide and ErhBMP-2) for bone regeneration were compared. The purpose of this study was to investigate the effects of BCP bone substitute surface modification with gallate on osteogenetic function of BCP when compared with Oligopeptide and ErhBMP-2.

We compared the efficacy of bone regeneration of these 3 materials in a well-documented animal model. The maxillary sinuses of 36 male white rabbit were prepared bilaterally. The window of 6mm-diameter were prepared with trephine bur. Surface modified BCP with oligopeptide, gallate and ErhBMP-2 was inserted into left maxillary sinuses and BCP alone was inserted right sinuses as control. After a healing period of 4,8 weeks sections of the augmented sinus and surrounding bone were made. They were analyzed by micro-CT, with histometrical method and observed histologically.

According to the histometrical study,

1. In 4 week healing group, BCP coated with ErhBMP-2 showed more new bone formation compared with control group.($p < 0.05$)
2. In 8 week healing group, BCP coated with oligopeptide, gallate showed more new bone formation compared with control group.($p < 0.05$)
3. BCP coated with gallate increased new bone formation between 4 week and 8 week healing period.($p < 0.05$)

In conclusion, the surface modification of BCP with gallate was effective in enhancing the osteogenetic potential of BCP within the limit of this study.

Keywords : biphasic calcium phosphate, gallate, oligopeptide, ErhBMP-2, surface modification.