

사람태아골모세포에 대한 방사선조사 냉동 동종골의 골형성 유도효과

홍지연, 정성원, 임유정, 채경준, 정의원, 김창성, 최성호, 김종관*

원광대학교 치과대학 치주학교실

I. 서론

치주질환은 치주병원균에 의한 감염질환으로써 만성염증에 의한 치주조직의 파괴가 수반된다. 이런 치주질환에 의해 파괴된 조직을 치료하기 위해 감염의 원인이 되는 치태 및 치석 등의 세균요인을 물리적으로 제거함과 더불어 상실된 치주조직을 재생시키는 것에 치료의 목적을 두고 있다. 치주질환으로 파괴된 부분에 치조골, 백악질, 치주 인대 등으로 이루어진 치주조직의 재생을 위하여 골 이식술, 조직유도재생술, 성장인자를 이용하는 방법, 성장인자를 이용한 조직유도재생술 등의 많은 연구가 있었다^{1,2)}. 이 중 한 방법으로서 골이식술이 응용되고 있으며 자가골, 동종골, 이종골 및 합성골 이식 등이 치주조직의 신부착 및 치조골의 재생을 위해 사용되어 왔다³⁾.

자가골 이식은 이식술에 있어서 가장 우수한 방법으로 알려져 있다⁴⁾. 자가골 이식은 골응괴(osseous coagulum), 골혼합(bone blend), 구내 망상골수강 이식(intraoral cancellous marrow autograft), 구

외 망상골수강 이식(extraoral cancellous marrow autograft) 등의 형태로 이루어지며 수년간의 여러 연구에서 성공적인 치주조직 재생의 결과가 보고되었다⁵⁾. 그러나 골 채취를 위한 부가적 수술의 필요, 시술 후의 합병증 발생, 항원성 문제, 골 수집의 제한성, 시술 비용의 증가, 치근흡수 등 여러 가지 단점을 내포하고 있다^{6,7)}. 이에 자가골을 대신하기 위한 동종골 이식은 임상적으로 손쉽게 다루어 질 수 있고 표준화된 조직을 제공한다는 점에서 빈번하게 사용되어진다⁸⁾.

동종골 이식의 치유기전은 초기에 숙주로부터 모세혈관과 간엽조직세포가 성장하여 들어가 신생 골을 형성하고 후기에는 골의 유기질 성분이 조직간엽세포를 연결 모세포와 골아세포로 표현형 변성을 유도하여 신생골 형성을 유도함으로 골전도와 유도 기능을 함께 가지고 작용한다⁹⁾. 동종골 이식에 대한 연구는 1867년 Ollier가 골의 보존에 대한 개념을 처음 기술한 이래로 Inclan¹⁰⁾과 Wilson¹¹⁾이 저장된 골의 선택적 사용과 임상적 유의성에 관하여 보고하였

연구비 : 본 연구는 2006년도 원광대학교의 교비지원에 의한 연구임

* 교신저자 : 김윤상, 경기도 군포시 산본동 1142번지, 원광대학교 산본치과대학교병원 우편번호 : 435-040

전자우편 : den94@wonkwang.ac.kr

고 Hyatt와 Butler¹²⁾가 1950년 미해군 조직은행에서 임상적용을 보고한 이후 현재까지 이루어지고 있다. 초기의 동종골 이식은 동결건조 형태로 사용되었으나 자가골 이식에서와 같은 일차적 골유도 효과를 기대할 수는 없었다. 하지만 1965년 Urist 등¹³⁾이 골기질내에 존재하는 골형성유도단백질(Bone Morphogenic Protein: BMP)에 의해 골 형성을 유도(Osteoinduction)할 수 있다고 보고하였고 이후 많은 연구자들에 의해서 동종골의 골형성에 대한 연구가 활발해지면서 현재에 이르러 상품화된 수많은 재료가 임상에서 사용되고 있다.

동종골에 대한 이물반응 및 면역반응, 혈관 재형성능력, 완전한 소독방법, 질환 이환성 등의 논란이 있다. 이에 대한 해결을 위해 끓이는 방법, 탈단백법, 단순 냉동법, 냉동건조법, 방사선 조사, 화학제 처리법 등 다양한 방법이 연구되었다.

끓이거나 화학제로 처리한 골은 항원성을 감소시키지만 골내의 골형성단백질을 파괴하여 골유도 능력을 감소시키고, 골내 유기성분을 응고시켜 숙주세포가 이들의 제거를 어렵게 만들어 사용하지 않는 방법이다. 면역반응을 제거하고 단백질 변성을 줄이기 위한 방법으로 냉동법이나 냉동건조법이 널리 사용되고 있다^{14,15)}. 이러한 냉동법에 의해 보존된 골이식재들은 탈단백질화, 비등법 또는 다른 처치에 의한 이인자형 이식재들보다 흡수가 잘되며, 혈류재생이 더욱 완전하게 이루어진다¹⁶⁾. 냉동법에 대한 연구로 Bradly¹⁷⁾는 쥐와 돼지에서 냉동시킨 악골이 천천히 흡수되면서 동시에 신생골로 대체되는 것을 관찰하였고, Marciani 등¹⁸⁾은 악골을 체외로 적출하여 액체질소에서 급냉 실험시킨 후 재이식하여 좋은 결과를 보고한 바 있다. 한편, Fred는 냉동상태에서의 이식체의 항원성에 대하여 신선골과 냉동골간의 유도된 세포성 면역정도는 확실한 차이가 없다고 보고한 바 있다¹⁹⁾. 그러나 동일한 방법으로 처리된 동종골간에도 골 내용물이나 성상에 따라 항원성에 차이가 있어 피질골은 비항원성이지만 해면질골은 미약하나마 계속 항원성이 존재한다고 한다. 이러한 항원성의 존재에 따른 이식체의 면역기전을 변화시키

기 위하여 이식체에 방사선을 조사하거나 탈회시키기도 하며, 숙주에게 방사선조사를 하거나 면역억제제를 사용하기도 한다^{20,21)}. 또한 방사선조사는 부가적인 살균 수단으로도 이용된다. 대부분의 골은행에서는 모든 잠재적 공급원에 대한 평가에서 HIV나 다른 전염 가능한 바이러스 검사를 사용한다. 감마 방사선을 2~4Mrad으로 조사하면 대부분의 박테리아에 대해 살균효과가 있다²²⁾. 그러나 지나친 방사선 조사는 제공되는 골의 질에 불리하게 영향을 미치고, 과량의 조사는 무익하게 만든다²³⁾.

본 연구에 사용된 Irradiated frozen allogenic bone(IFAB)은 공여자의 골을 채취한 뒤 -75℃에서 냉동 시킨 뒤 항원성을 없애기 위해 2.5~3.8 Mrad의 방사선 조사를 시행한 동종골로 상품으로 출시되어 임상에서 사용되고 있다. 본 연구의 목적은 실험실상에서 IFAB가 골형성에 미치는 영향을 세포 증식률 평가, 염기성 인산분해효소 활성도 평가, 칼슘 축적 분석을 통하여 검증해 보고자 하였다.

II. 연구 재료 및 방법

1. 연구 재료

(1) 세포배양

골기질 단백을 만들고 광화시킬 수 있는 태아골모세포주(hFOB1 1.19 ; American Type Culture Collection, Manassas, VA)를 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco BRL, GibcoBRL, Grand Island, NY, USA)과 0.03mg/ml의 G-418 (Duchefa, Netherlands)이 첨가된 Dulbecuo's Modified Eagle's Medium Nutrient Mixture F-12 HAM (DMEM/F12 1:1 Mixture, Sigma, St. Louis, MO, USA) 8ml 이 담긴 100mm 배양접시에 적정세포 5×10⁵cell/cell를 분주하였다. 이를 34℃의 온도 및 100% 습도 조건에서 95%의 공기와 5% CO₂를 계속 공급하면서 배양하였다. 배양액은 세포가 충분한 증식이 일어날 때까지 2일 간격으로 교환하였으며 계대 배양은 1:3의 비율로 시행하였다. 본 실험에서는 4~6 계대 배

양된 세포를 사용하였다.

(2) IFAB의 준비

방사선 조사 냉동 동종골 (IFAB, Irradiated allogenic cancellous bone ; ICB, Rocky Mountain Tissue Bank, USA) 0.5g을 공급받아 LN2 gas를 이용하여 분말로 분쇄한 후 1mg/ml, 100 μ g/ml, 10 μ g/ml, 1 μ g/ml, 100ng/ml, 10ng/ml, 1ng/ml로 만들어 사용하였다.

2. 연구 방법

(1) 세포 증식 측정

배양접시에서 밀생에 도달한 단층의 세포들을 0.25% trypsin/EDTA로 분리해 내었다. 이 세포들을 배양액으로 현탁시키고 6-well plate에 2 \times 10⁴개의 세포수가 되도록 분주하였다. 24시간 후에 배양액을 제거하고 실험군에는 1mg/ml, 100 μ g/ml, 10 μ g/ml, 1 μ g/ml, 100ng/ml, 10ng/ml, 1ng/ml의 IFAB를 첨가하고, 양성 대조군에는 10⁻⁷M의 dexamethasone을 넣었다. 각각 3, 5일 동안 34 $^{\circ}$ C에서 배양한 후, 혈구계수기를 이용하여 세포의 수를 계산하였다. 시일별로 각 그룹에서 3번 배양을 시행했다.

(2) 염기성 인산분해효소 활성 측정

hFOB1.19를 6-well plate에 1 \times 10⁵cell/well이 되도록 분주한 후, 10% FBS가 첨가된 DMEM/F 12 1:1 mixture에서 단일 밀생층(mono layer)이 형성될 때까지 34 $^{\circ}$ C, 100% 습도, 5% CO₂ 공기 혼합 배양기에서 배양하였다. 단일 밀생층이 형성된 후 배지를 제거하고 DMEM/F-12 1:1 mixture으로 2회 세척 후, 10% FBS, G-418 항생제, 50 μ g/ml ascorbic acid, 10mM sodium β -glycerophosphate가 첨가된 DMEM/F-12 1:1 mixture에 음성 대조군에는 다른 처리 없이 분주하였으며, 양성 대조군에는 10⁻⁷M의 dexamethasone을 첨가하였고, 실험군은 1mg/ml, 100 μ g/ml, 10 μ g/ml, 1 μ g/ml, 100ng/ml, 10ng/ml, 1ng/ml 농도의 IFAB를 첨가하여 분주한 후 추가

로 5일간 더 배양하였다.

일정 배양시간이 지난 후 배지를 제거하고, trypsin-EDTA로 세포를 분리시키고, 1,500rpm에서 6분간 원심분리하였다. 상층액을 제거하고 0.2ml의 멸균된 증류수를 첨가하여 초음파 분쇄기로 현탁하였다. 각 세포 현탁액 0.1ml에 0.1 M glycine NaOH buffer (pH 10.4) 0.2ml, 15 mM의 p-nitrophenyl phosphate (pNPP ; Sigma, USA) 0.1ml, 0.1% triton X-100/saline 0.1ml와 멸균된 증류수 0.1ml를 잘 혼합하여, 이 반응물을 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 배양하였다. 0.1 N NaOH를 0.6ml 첨가함으로써 이들 반응을 중지시켰다. p-NPP의 가수분해는 410nm 파장의 ELISA reader에서 흡광도의 차이로 나타나며, p-nitrophenol (p-NP ; Sigma, USA)을 기준값으로 이용했다. 단백질 농도는 BCA protein assay reagent (Pierce, USA)를 사용하여 측정하며, bovine serum albumin을 표준으로 하였고, ALP 활성도는 nM/min/mg of protein으로 나타내었다. 매 실험마다 ALP 활성도를 음성대조군에 대한 백분율로 산출하였으며, 각각의 실험은 3회 반복 시행하였다.

(3) 칼슘 축적 측정

6-well 배양 접시에 1 \times 10⁵개의 세포가 들어가도록 분주한 후 각각 적정 농도로 25일간 배양하였다. 세포외기질 무기질화를 유도하기 위해 23일째 되는 날, 4mM/L NaHPO₄를 첨가해서 배양하였으며 Alizarin red-sulfate (AR-S, Sigma) 염색 방법을 사용하였다. 25일이 된 후 배지를 제거하고, PBS로 세척하였다. Ice-cold 70% ethanol로 한 시간 동안 4 $^{\circ}$ C에서 고정하고 ethanol을 제거한 후 40mM/L AR-S (pH 4.2)로 실온에서 10분 동안 염색하였다. AR-S 용액을 제거하고 멸균 증류수로 조심스럽게 3회에 걸쳐 세척하였다. 염색된 부분을 육안으로 비교 관찰하기 위하여 digital color camera (Nikon E995, Nikon Corporation, Japan)로 촬영 후, 이를 계량적으로 비교하기 위하여 10mM/L sodium phosphate (pH 7.0)에 10%(w/v) cetylpyridinium chloride가 녹아있는 용액을 이용해 염색부위를 녹

여 AR-S의 농도를 562nm의 흡광도에서 읽었으며 AR-S standard curve는 같은 용액을 사용하였다.

하였다. ($p < 0.05$)

III. 결과

(4) 통계분석

통계학적 유의성은 SPSS 10.0 version 프로그램을 사용하여 평균과 표준오차를 구하고, 이들의 통계학적 유의성은 일원분산분석법(ANOVA)을 이용하여 사전 검정하였으며, 사후 검정은 Tukey법을 사용

1. 세포증식 측정

IFAB 1mg/ml, 100 μ g/ml, 10 μ g/ml, 1 μ g/ml, 100ng/ml, 10ng/ml, 1ng/ml을 hFOB1.19 배양액에 첨가 후 3, 5 일간 배양하여 살아있는 세포수를 비

Table 1. Cell proliferation of hFOB1.19 treated with IFAB. (Mean \pm S.D.) (10^4 cell/well)

| Group | C- | C+ | 1mg | 100 μ g | 10 μ g | 1 μ g | 100ng | 10ng | 1ng |
|-------|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Day 3 | 6.27 \pm 0.16 | 7.03 \pm 0.02* | 6.35 \pm 0.11 | 6.28 \pm 0.16 | 6.57 \pm 0.13 | 6.60 \pm 0.11 | 6.83 \pm 0.14 | 6.67 \pm 0.12 | 6.55 \pm 0.27 |
| Day 5 | 12.77 \pm 0.18 | 14.73 \pm 0.18* | 13.65 \pm 0.21* | 13.77 \pm 0.23* | 13.9 \pm 0.11* | 13.88 \pm 0.24* | 13.95 \pm 0.11* | 13.77 \pm 0.13* | 13.67 \pm 0.12* |

* Statistically significant compared to the negative control ($p < 0.05$).

C- (negative control) : added distilled water

C+ (positive control) : added 10^{-7} M dexamethasone

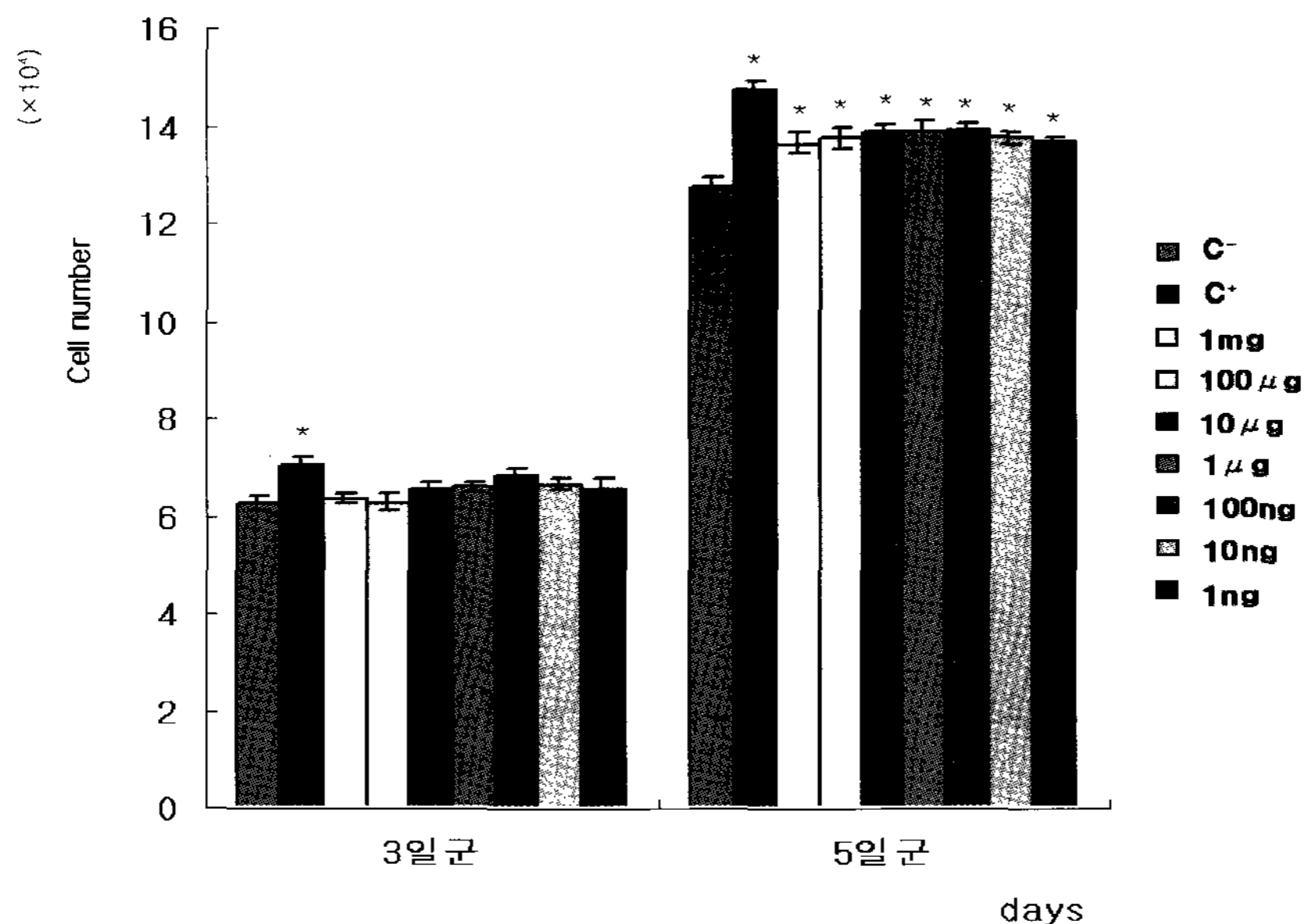


Figure 1. Effect of IFAB on cell proliferation of hFOB1.19 between the control and the experimental group(1mg, 100 μ g, 10 μ g, 1 μ g, 100ng, 10ng, 1ng). Cell counting was performed after 3 or 5 day incubation. Vertical bars represent standard deviation of each independent experiments.

* Statistically significant compared to the negative control($p < 0.05$)

C-(negative control) : added distilled water

C+(positive control) : added 10^{-7} M dexamethasone

교 측정하였다. 3일간 배양한 경우 음성대조군에 비해 양성대조군에서만 유의한 차이를 나타내는 세포 수 증가가 있었으며, 모든 실험군에서는 음성 대조군에 비해 유의한 차이를 보이지 않았다. 5일간 배양한 경우에는 음성대조군에 비해 양성대조군 뿐 만 아니라 모든 실험군에서 통계학적으로 유의한 세포 수 증가를 나타냈다. 그리고, 각 실험군 간에는 농도 차이에 따른 유의한 변화가 없었다. (Table 1, Figure 1).

2. 염기성 인산분해효소의 활성화 측정

IFAB 1mg/ml, 100 μ g/ml, 10 μ g/ml, 1 μ g/ml, 100ng/ml, 10ng/ml, 1ng/ml을 hFOB1.19 배양액에 첨가한 후 ALP의 활성을 측정하였다. 음성 대조군에는 증류수를 첨가하였으며, 양성 대조군에는 10⁻⁷M dexamethasone을 첨가하였다. 실험결과 음성대조군에 비하여 양성대조군과 실험군의 100ng/ml에서 통계

Table 2. Alkaline phosphatase activity of hFOB1.19 treated with IFAB. (nmole/30min/mg of protein) (Mean \pm S.D.)

| C- | C+ | 1mg | 100 μ g | 10 μ g | 1 μ g | 100ng | 10ng | 1ng |
|-----------------|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|-----------------|-----------------|
| 0.26 \pm 0.01 | 0.36 \pm 0.03* | 0.24 \pm 0.02 | 0.26 \pm 0.01 | 0.29 \pm 0.01 | 0.30 \pm 0.01 | 0.32 \pm 0.02* | 0.31 \pm 0.00 | 0.30 \pm 0.00 |

* Statistically significant compared to the negative control (p<0.05).

C- (negative control) : added distilled water

C+ (positive control) : added 10⁻⁷M dexamethasone

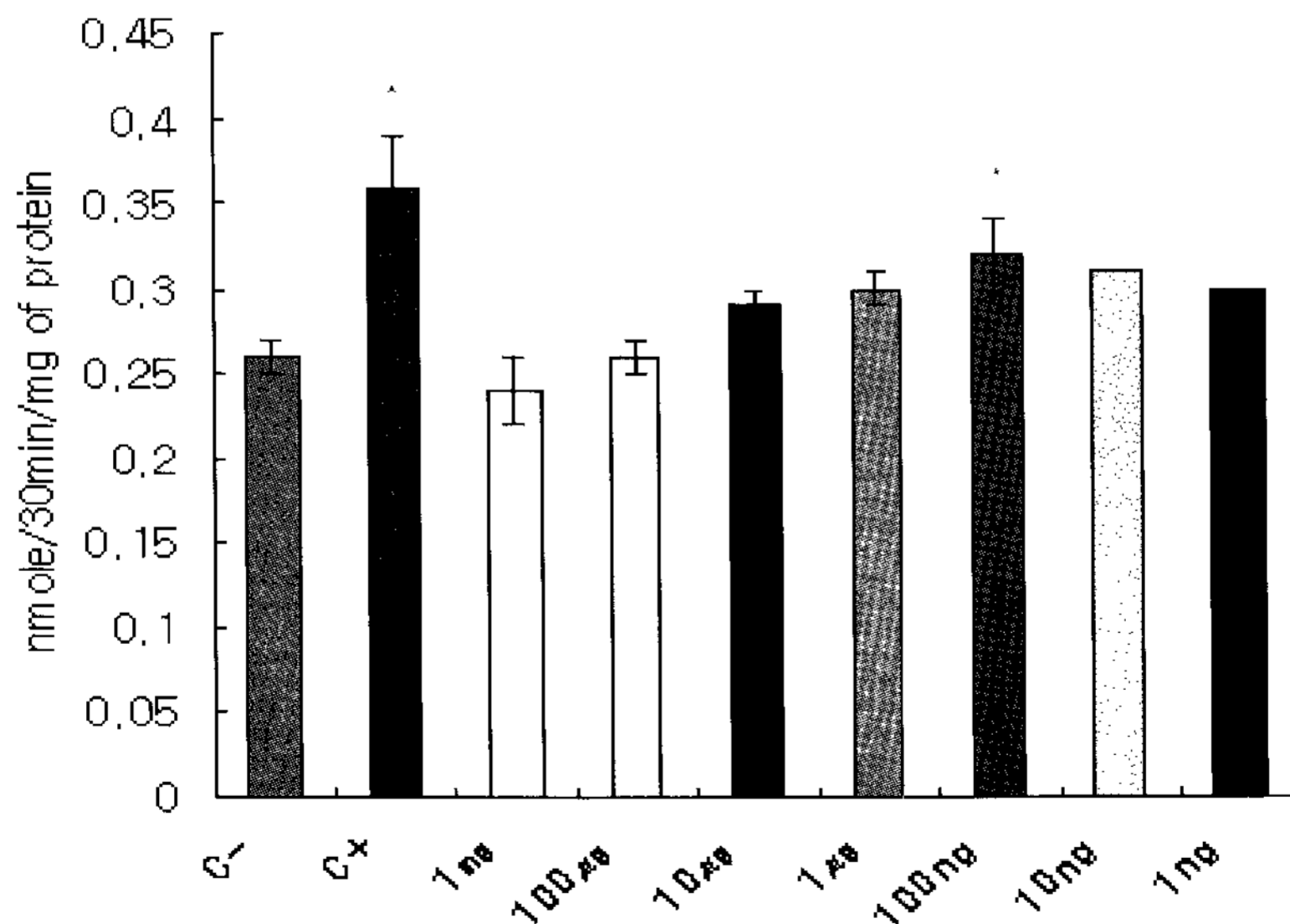


Figure 2. The effect of IFAB on ALP activity of hFOB1.19. hFOB1.19 were plated in 6-well plates at 1 \times 10⁵ cells/well and cultured in F-12 HAM:DMEM until cells reached a confluence. After that, 1mg/ml, 100 μ g/ml, 10 μ g/ml, 1 μ g/ml, 100ng/ml, 10ng/ml, 1ng/ml of IFAB and dexamethasone as a positive control were added and cultured for another 5 days more. Values represent averages from four independent experiments and standard deviation.

* Statistically significant compared to the negative control (p<0.05).

C- (negative control) : added distilled water

C+ (positive control) : added 10⁻⁷M dexamethasone

Table 3. Calcium accumulation assay of hFOB1.19 exposed to IFAB (Mean±S.D.)

| C- | C+ | 10ng | 100ng |
|-------------|---------------|---------------|--------------|
| 183.28±8.09 | 387.07±15.66* | 271.75±12.37* | 318.92±4.50* |

* : Statistically significant difference compared with the negative control (p<0.05)

C- (negative Control) : added distilled water

C+ (positive control) : added 10⁻⁷M dexamethasone

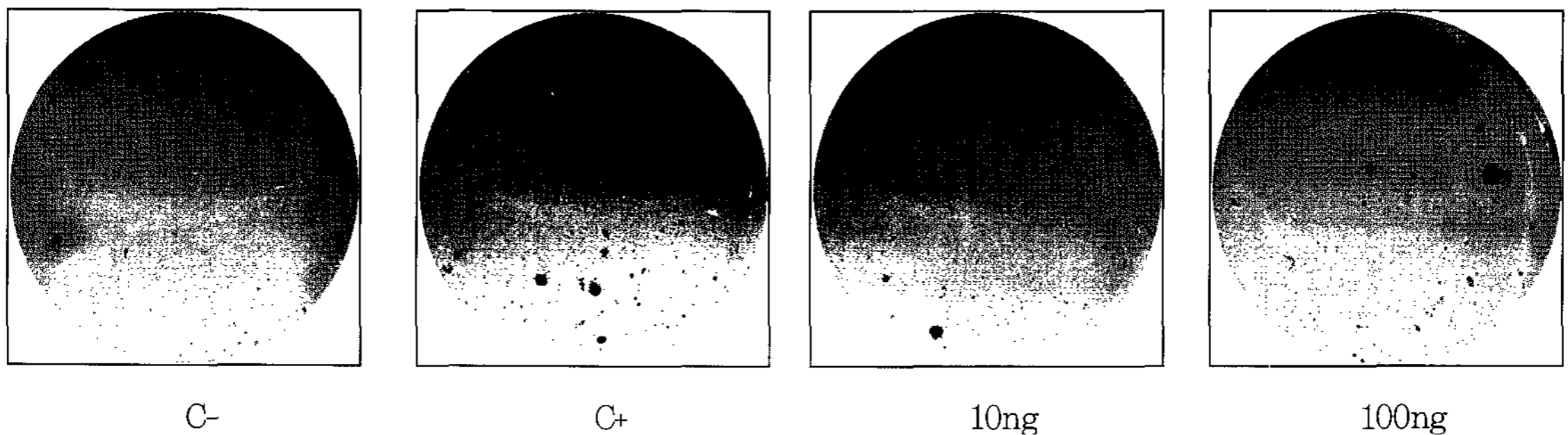


Figure 3. AR-S staining of cultured hFOB1.19 with IFAB. The mineralized matrix was stained with AR-S for calcium accumulation.

학적으로 유의한 증가를 보였으며, 그 이외의 농도에서는 유의한 차이를 보이지 않았다. (Table 2, Figure 2)

3. 칼슘축적

IFAB 100ng/ml, 10ng/ml을 배양 태아골모세포에

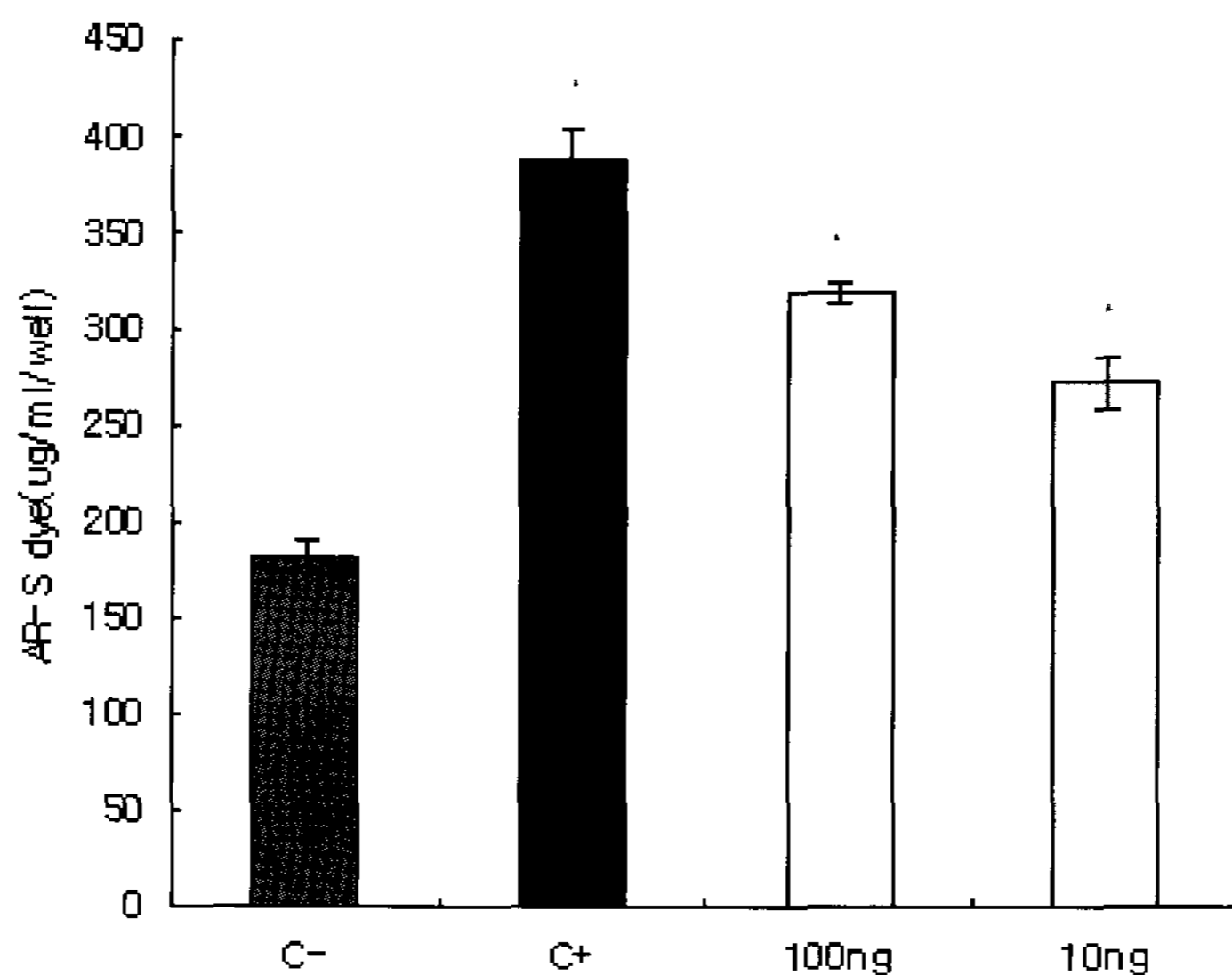


Figure 4. Calcium accumulation assay of hFOB1.19 treated with IFAB. Vertical bars represent standard deviation of each independent experiments.

C- : negative control, C+ : positive control

* : Statistically significant difference compared with the negative control (p<0.05)

투여한 뒤 석회화된 결절을 관찰한 결과 음성대조군과 비교시 양성대조군과 모든 실험군에 유의한 증가를 보였다. ($p < 0.05$) (Table 3, Figure 3, 4)

Figure 3에서 AR-S로 염색된 석회화 결절을 관찰할 수 있는데, 육안으로는 붉은 결절로 나타나며, 음성대조군과 비교하였을 때 IFAB 100ng/ml, 10ng/ml 투여군에서 명확하게 증가를 보였다.

IV. 고안

치주질환으로 인한 광범위한 골결손부의 치료와 임플란트를 위한 치조제의 회복을 위한 여러 방법 중 골이식술이 최선의 치료방법으로 임상에서 사용되어 지고 있다. 이는 골이식술 후 수술부위에서 일어나는 신생골의 형성과 치근면 주위의 백악질, 치주인대의 형성에 대한 연구를 통해 밝혀지고 있다. 면역거부반응과 전염성 질환의 감염이 적은 살아있는 조골세포, 골유도인자가 포함되어 있고 골구조가 같은 자가골의 이식은 골이식술 중에도 최선의 치료 방법이다²⁴⁾. 그러나, 골결손부와 회복해야만 하는 치조제가 커질수록 한정된 양의 자가골은 사용이 제한될 수밖에 없으며, 제공부를 형성하는 부가적 수술, 제공부에 생길 수 있는 감염, 신경의 손상, 연조직 외형의 변화 등과 같은 합병증으로 인해 자가골의 사용은 한계가 있다.

뇌사자 혹은 기증자로부터 채취된 동종골은 면역거부반응으로 인해 골이식술에 바로 사용될 수 없어, 면역성을 감소시키기 위한 과정을 거쳐야한다. 면역거부반응이 발생하면 이식재는 숙주의 면역계에 의해 이물질로 인식되어 제거되며 신생골의 형성을 이루어지지 않게 된다. 면역거부반응과 더불어 이식재를 통해 인간면역결핍증, B형간염, C형간염과 전염될 수 있다는 보고가 연구가 있다^{25,26)}. 이러한 이유로 FDA(Food and Drug Administration)는 공여자에 대한 바이러스성 감염에 대한 사전 검사를 통해 수여자의 감염의 가능성을 배제하고 있다. 그러나, 골이식재는 채취와 제조과정을 통해 외인성 미생물의 감염이 발생할 수도 있으며 환자에게 전염될 수

있다는 보고도 있다^{27,28)}. 그러므로, 동종골은 전염성 질환의 감염과 면역거부반응을 억제하는 과정을 거쳐야 한다.

이식재의 면역성을 감소시키기 위한 방법으로는 단순냉동, 냉동건조, 탈단백법, 방사선조사 등의 방법이 있다. 가장 흔히 사용되는 것은 냉동 혹은 액체 질소를 이용하는 것이다. 냉동법은 공여자의 면역성을 감소시키는 것으로 보고 되고 있지만 박테리아와 바이러스 감염에는 영향이 없다고 알려져 있다^{29,30)}. 동결건조법은 또 다른 방법으로 진공상태 하에서 골조직을 완전히 탈수시키는 방법이다. 동결건조된 재료들은 실내온도에서 저장될 수 있는 장점이 있지만 큰 동종골에 적용하기 힘들고 비싼 가격으로 문제가 되며 완전한 멸균이 이루어지지 않는 단점이 있다³¹⁾. 감마 방사선 조사는 현재 넓게 용인되고 있는 술식으로 2500gray가 추천되어진다. 방사선 조사는 박테리아에 효과적이지만 바이러스에는 의문시 되며 또한 골의 물리적인 성질을 변화시킨다고 보고 되기도 하였다³²⁾.

본 연구에서 IFAB의 영향을 받은 사람태아골모세포(hFOB1.19)의 세포 증식률을 분석한 결과에 따르면 5일간 배양한 경우에 실험군에서 통계학적으로 유의한 세포수 증가를 나타냈다. 세포증식의 증가는 세포의 증식단계에서 여러 층을 형성할 수 있다는 것을 나타내므로 이는 골 형성의 초기에 도움을 줄 것으로 사료된다.

세포외 골기질은 교원성, 비교원성 단백질로 구성되며 비교원성 단백질 중 ALP는 160kDa glycoprotein의 골세포 표식자로서 조골아유사세포, 전조골아유사세포, 골세포, 골육종세포에서 발현된다. ALP는 유기인산 에스테르를 가수분해하여 석회화가 이루어지는 부위에서 국소적으로 인산이온의 농도를 증가시키는 효소³³⁾로써, 세포외 기질에 calcium phosphate를 침착시킴으로써 석회화를 유도하는 기능³⁴⁾을 갖는다. ALP는 국소적으로 인산이온 농도를 증가시켜 단백질을 인단백으로 전환시켜 칼슘결합 성향을 가지게 되어 인단백질이 석회화의 핵으로서 역할을 하게 된다³⁵⁾. 이러한 골 관련 단백질은 칼슘

염과 인산염에 결합하는 성질을 가지며 수산화인회석 결정체 형성의 핵으로 작용하고 핵의 성장과 용해와 같은 조절과정에도 관여한다고 보고 되었다. 본 실험에서 IFAB 100ng/ml을 투여한 실험군에서 통계학적으로 유의한 증가를 보였으며 이렇게 증가된 ALP 합성은 세포외기질에 calcium phosphate를 침착시켜 골 형성의 핵역할을 함으로써 석회화를 유도하여 조골 세포의 분화와 성숙에 중요한 역할을 할 것으로 생각된다.

본 연구에서 골 광물화 과정 중 칼슘축적 정도를 알아내기 위하여 AR-S 염색법을 사용하였는데, IFAB 1ng/ml, 10ng/ml을 투여한 군에서 석회화 결절을 계량한 결과 유의하게 증가하였으며 육안으로 증가된 석회화 결절을 관찰 할 수 있었다. 이 염색법은 세포의 형태학적 특성 분석 즉 세포의 경계부위를 염색하여 세포의 밀도, 면적, 주변둘레, 한 변의 길이 등을 광학 현미경으로 촬영 후 분석할 수 있다. 특히 AR-S 염색법은 칼슘염에 특이하게 반응하여 칼슘과 칼슘간에 reddish-orange complex를 형성하는 견본에서 적은 양의 칼슘을 알아내는데 유용하다³⁶⁾. 본 연구를 통해 IFAB가 골 재형성 과정 중 골모세포의 광물화 과정에 긍정적인 영향을 미치는 것으로 사료되었다.

현재 가장 많이 사용되어지고 있는 동종골은 탈회 냉동건조법에 의한 동종골(DFDBA)로 1965년부터 치과와 의학계에서 널리 사용되어졌으며 체계화된 임상 조직학적 연구가 이루어진 단 하나의 동종골이다. 탈회된 기질에 의한 골 유도는 세포학적, 생화학적으로 여러 단계로 구성되는데 가장 중요한 단계는 첫째, 화학 주성(chemotaxis)이며 둘째는 세포 분열(mitosis)이고 셋째는 세포 분화(differentiation)인 것이다. 화학 주성은 화학적 환경의 변화에 따라 세포가 직접적으로 이동하는 것을 의미한다. 탈회된 기질을 매식하면 주위 조직 세포의 화학 주성을 자극한다. 교원질, 피브린, 해파린등의 골 외상부위의 중요 성분들에 친화력이 있는 혈장 피브리넥틴이 탈회된 기질에 부착되는데 이 피브리넥틴에 있는 펩타이드가 화학주성을 지니고, 아마도 세포 분열로 유

도하지 않는가 생각된다. 골 유도의 다음 단계는 세포 분열이다. 새로 부착된 간엽세포의 증식은 골 기질 자체가 국소 세포 분열을 유도하는 작용은 자가 방사선 사진이나 방사선 동위원소 융합을 통하여 DNA 형성량을 측정하면 알 수 있다. 세포 분열 단계를 지나면 연골의 분화, 혈관의 성장, 골 분화등이 따른다^{14,15)}. 중등도의 치주병 환자의 조직학적 연구에서는 DFDBA로 골손상부위를 이식하여 새로운 골, 백악질, 치주인대로 치유되었으며 이식하지 않은 부위는 긴 점합상피부착으로 치유되었다³⁷⁾. 또 골모세포에 DFDBA의 영향을 실험한 연구에서 증가된 ALP의 활성, osteocalcin의 생성, 광화된 결절을 관찰할 수 있었다³⁸⁾.

본 연구에서도 DFDBA의 세포실험의 결과와 마찬가지로 증가된 ALP의 활성과 광화된 결절을 관찰할 수 있었다. 이는 IFAB가 골세포의 분화에 긍정적인 영향을 줄 것으로 사료되지만 화학 주성, 세포 분열, 세포 분화와 같은 골 유도 단계에 따른 IFAB의 효과와 영향에 대한 실험실적인 연구가 이루어져야 할 것이다.

V. 결론

본 연구는 IFAB가 조골세포 활성화에 미치는 영향을 알아보고자, 사람태아골모세포(hFOB1.19)를 이용하여 세포 증식률 측정, 염기성 인산분해효소 활성도 측정, 칼슘 축적 측정을 시행하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 세포 증식률을 측정한 MMT분석에서는 음성대조군에 비해 5일째에 유의한 차이를 나타내는 세포수의 증가를 보였다(p<0.05).
2. 염기성 인산분해효소(ALP)의 활성을 측정한 실험에서는 음성대조군에 비해 IFAB 100ng/ml 농도에서 유의한 증가를 보였다(p<0.05).
3. 칼슘 축적 검사에서는 음성대조군에 비해

IFAB 100ng/ml, 10ng/ml 농도에서 유의한 증가를 보였다($p < 0.05$). 또한, AR-S 염색법으로 붉게 염색된 칼슘축적을 관찰한 결과, IFAB를 투여한 실험군에서 뚜렷하게 증가된 수의 석회화 결절이 나타났다.

이상과 같은 소견으로 세포 증식률을 측정한 결과에 따르면 IFAB가 골세포의 증식에 영향을 미치는 것으로 보여지며, ALP의 활성도 증가를 나타내는 결과와 칼슘의 축적을 나타내는 결과에 따르면 IFAB는 골 형성 과정에 긍정적인 효과가 있을 것으로 보인다.

VI. 참고문헌

1. Froum SJ, Gomez C. Periodontal regeneration. *Current Opinion Periodontol* 1993;1:111-128.
2. Page R.C. Periodontal therapy : Prospects for the future. *J Periodontol* 1993;64:744-753.
3. Sullivan H, Vito A and Melcher A. A histological evaluation of the use of hemopoietic marrow in intrabony periodontal defects. *Int Assoc Dent Res abstracts* 1971:171.
4. Kaban L.B., Mulliken J.B. and Glowacki J. Treatment of jaw defects with demineralized bone implants. *J Oral Maxillofac Surg* 1982;40:623-626.
5. Froum S., Thaler R., Scopp I., and Stahl S. Osseous autografts. II. Histological responses to osseous coagulum-bone blend grafts. *J Periodontol* 1975;46:656-661.
6. Ray R.D. Vascularization of bone grafts and implants. *Clin Ortho* 1972;87:42-48.
7. Enneking W.F. and Morris J.L. Human autologous cortical bone transplants. *Clin Ortho* 1972;87:28-35.
8. Quintero G., Mellonig J.T., Gambill V.M., and Pelleu G.M. A six-month clinical evaluation of decalcified freeze-dried bone allograft in periodontal osseous defects. *J Periodontol*, 1982;53:726-730.
9. Chalmer J. Transplantation immunity in bone formation in isograft of bone. *Acta Ortho Scand* 1975;64:549.
10. Inclan, A. The use of preserved bone graft in orthopaedic surgery. *J Bone Joint Surg* 1942;24:81.
11. Wilson, P.D. Experience with the use of refrigerated homogenous bone. *J Bone Joint Surg* 1951;33:301.
12. Hyatt GW, Butler MC. Bone grafting. The procurement, storage and clinical use of bone homograft. In : *Instructional Course Lecture, The American Academy of Orthopaedic Surgeons* 1957;14:343.
13. Urist MR, Mikulski A.J., Nakagawa M., and Yen K. : A bone matrix calcification-initiator noncollagenous protein. *Am J Physiol* 1977; 232:115-127.
14. Urist MR. Surface-decalcified allogenic bone implant. *Clin Orthop* 1979;140:208.
15. Williams G. Experience with bolid cadaveric cancellous bone for fracture of long bones. *J Bone Joint Surg* 1964;46:398.
16. Nisbet NW. Immunology of bone transplantation. *Clin Ortho Rel Res* 1966;47:199.
17. Bradly PF. Modern trend in cryosurgery of bone in the maxillofacial regions. *Int J Oral Surg* 1978;7:405.
18. Marciani RD, Roth GI, White DK. Healing of reimplanted freeze-treated O) Fred, L. : The immunogenicity of fresh and frozen allogeneic bone. *J Bone Joint Surg* 1975; 57A : 216. maxillary bone. *J Oral Maxillo Surg* 1982;40:401.
19. Fred, L. : The immunogenicity of fresh and frozen allogeneic bone. *J Bone Joint Surg* 1975;57A:216.
20. Narang, R., Ruben, M.P., Harris, M.H., Wells, H. : Improved healing of experimental defects in the canine mandible by grafts of

- decalcified allogeneic bone. *Oral Surg* 1970; 30:142-150.
21. Narang R, Wells H. Bone Induction in experimental periodontal bony defects in dogs with decalcified allogeneic bone matrix graft : A preliminary study. *Oral Surg* 1972;33:306-313.
 22. Sullivan R, Fassolitis AC, Larkin EP, Read RB Jr, Peeler JT. Inactivation of thirty viruses by gamma radiation. *Appl Microbio* 1971;22:61-65.
 23. Pellet S., Strong D.M., Temesi A., Matthews J.G. Effects of irradiation on frozen corti-cocancellous bone allograft incorporation and immunogenicity. In : Fried GE, Mankin HJ, Sell KW (eds) *Osteochondral Allo* Little Brown, Boston 1987;353-361.
 24. Betz RR. Limitations of autograft and allograft: new synthetic solutions. *Orthopedics* 2002 ;25:561-570.
 25. Schwarz A, Hoffmann F, L'age-Stehr J, Tegzess AM, Offermann G. Human immunodeficiency virus transmission by organ donation. Outcome in cornea and kidney recipients. *Transplantation* 1987;44:21-24.
 26. Glasscock ME 3rd, Jackson CG, Knox GW. Can acquired immunodeficiency syndrome and Creutzfeldt-Jakob disease be transmitted via otologic homografts? *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1988;114:1252-1255.
 27. Trasancos CC, Kainer MA, Desmond PV, Kelly H. Investigation of potential iatrogenic transmission of hepatitis C in Victoria, Australia. *Aust N Z J Public Health* 2001; 25:241-244.
 28. Patel R, Trampuz A. Infections transmitted through musculoskeletal-tissue allografts. *N Engl J Med*. 2004;17:2544-2546.
 29. Friedlaender GE, Strong DM, Sell M. Studies on the antigenicity of bone. I. Freezed -dried and deep-frozen bone allografts in rabbits. *J Bone Jt Surg* 1976;58A:854-858.
 30. Salzman NP, Psallidopoulos, Prewett AA, O'Leary R. Detection of HIV in bone allografts prepared from AIDS autopsy tissue. *Clin Orthop Rel Res* 1993;292:384-390.
 31. Tomford WW, Doppelt SH, Mankin HJ, Friedlaender GE. Bone bank procedure. *Clin Orthop Rel Res* 1983;174:15-21.
 32. Loty B, Courpied JP, Tomeno B, Postel M, Forest M, Abelanet R. Radiation sterilized bone allografts. *Int Orthop* 1990;14:237-242.
 33. Pellet S, Strong D.M, Temesi A, Matthews JG. Effects of irradiation on frozen corti-cocancellous bone allograft incorporation and immunogenicity. In : Fried GE, Mankin HJ, Sell KW (eds) *Osteochondral Allo* Little Brown, Boston 1984;353-361.
 34. Pellet S, Strong D.M, Temesi A, Matthews JG. Effects of irradiation on frozen corti-cocancellous bone allograft incorporation and immunogenicity. In : Fried GE, Mankin HJ, Sell KW (eds) *Osteochondral Allo* Little Brown, Boston 1982;353-361
 35. De Bernard B. : Glycoproteins in the local mechanism of calcification. *Clin Orthop* 1982; 162:233-244.
 36. 백종민, 김기산 : 접안현미경과 Alizarin Red S 염색에 의한 가토 각막 내피세포의 형태학적 차이. *J Korean Ophthalmol Soc* 1991;32:31-34.
 37. Bowers G, Chacroff B, Carnevale R. et. al Histologic evaluation of human new attachment apparatus in humans. Part III. *J Periodontol* 1989;60:683-693.
 38. Carnes DL Jr, De La Fontaine J, Cochran DL, Mellonig JT, Keogh B, Harris SE, Ghosh-Choudhury N, Dean DD, Boyan BD, Schwartz Z. Evaluation of 2 novel approaches for assessing the ability of demineralized freeze-dried bone allograft to induce new bone formation. *J Periodontol*. 1999;70:353-363.

Effects of irradiated frozen allogenic bone on bone formation in human fetal osteoblasts

Sang-Jae Lee, Yun-Sang Kim, Hyung-Sik Shin

Department of Periodontology, School of Dentistry, Wonkwang University

The purpose of this study was to investigate the effects of irradiated frozen allogenic bone (IFAB) on the cell proliferation and differentiation of human fetal osteoblasts. Human fetal osteoblasts (hFOB1) were cultured to examine the cellular proliferation for 3 days and 5 days with 1mg/ml, 100µg/ml, 10µg/ml, 1µg/ml, 100ng/ml, 10ng/ml, 1ng/ml of IFAB, and to compare the ALP synthesis to control groups for 3 days with DMEM/F-12 1:1 Mixture and 1mg/ml, 100µg/ml, 10µg/ml, 1µg/ml, 100ng/ml, 10ng/ml, 1ng/ml of IFAB. To compare the calcium accumulation, hFOB1 cultured for 23 days were quantified and photographed. The cellular proliferation of hFOB1s treated with IFAB was increased at 5 days to control ($p < 0.05$). The activity of ALP in hFOB1s treated with 100ng/ml IFAB was significantly increased at 5 days ($p < 0.05$). A quantified calcium accumulation in hFOB1 was significantly increased at 100ng/ml, 10ng/ml of IFAB ($p < 0.05$).

In the present study, we found that IFAB play a important role of bone formation in the early stage. There was considered that IFAB could be used in the bone graft material.