백서 두개골 결손모델에서 하이드록시아파타이트 입자로 입혀진 실크단백이 골재생에 미치는 영향

석 현 · 박용태 · 김성곤 · 진형준¹

강릉원주대학교 치과대학 구강악안면외과학교실, ¹인하대학교 고분자신소재공학과

Abstract

The Effect of Silk Fibroin Particles Coated with Hydroxyapatites on Bone Regeneration in the Rat Calvarial Defect Model

Hyun Seok, Young-Tae Park, Seong-Gon Kim, Hyung-Joon Jin¹

Department of Oral and Maxillofacial Surgery, College of Dentistry, Gangneung-Wonju National University,

¹Department of Polymer Science and Engineering, Inha University

Purpose: This study evaluated the capability of bone formation of silk fibroin particles coated with hydroxyapatites (HA/SF), as bone graft material when put into the calvarial defect of rats.

Methods: Twenty Sprague Dawley rats were used for this study and round shaped defects were formed in the center of parietal bones (diameter: 8.0 mm). The defect was filled with (1) HA/SF (experimental group), or (2) left as a vacant space (control group). The animals were sacrificed at 4 or 8 weeks, postoperatively. The specimens were decalcified and stained with Masson's trichrome for histomorphometric analysis.

Results: The average of new bone formation was $33.18 \pm 3.10\%$ in the experimental group and $20.49 \pm 5.79\%$ in the control group at 4 weeks postoperatively. That was $42.52 \pm 7.74\%$ in the experimental group and $25.50 \pm 7.31\%$ in the control group at 8 weeks postoperatively. The difference between the groups was significantly higher at both 4 weeks and 8 weeks postoperatively ($P < 0.05$).

Conclusion: The rat calvarial defect was successfully repaired by HA/SF graft. The HA/SF graft showed more new bone formation compared with the unfilled control.

Key words: Silk fibroin, Hydroxyapatite, Bone regeneration, Rat calvarial defect

원고 접수일 2012년 12월 19일, 원고 수정일 2013년 1월 2일,
게재 확정일 2013년 1월 24일

책임저자 석 현
(210-702) 강릉시 죽현길 7, 강릉원주대학교 치과대학 구강악안면외과학교실
Tel: 033-640-3139, Fax: 033-640-3113, E-mail: sok8585@hanmail.net

RECEIVED December 19, 2012, REVISED January 2, 2013,
ACCEPTED January 24, 2013

Correspondence to Hyun Seok
Department of Oral and Maxillofacial Surgery, College of Dentistry,
Gangneung-Wonju National University
7 Jukheon-gil, Gangneung 210-702, Korea
Tel: 82-33-640-3139, Fax: 82-33-640-3113, E-mail: sok8585@hanmail.net

© This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

서론

악안면성형재건외과 영역에서는 악안면부에 발생하는 다양한 병소 및 이에 대한 관혈적 치료를 통해 자연적으로 회복하기 힘든 골결손부가 발생할 수 있다[1]. 결손부의 수복을 위하여 다양한 치료 방법 및 이식재가 개발되어 왔다. 골이식재들 중 자가골이 가장 이상적인 재료이나 사용할 수 있는 골량의 한계, 공여부의 손상 및 골결손, 전체적 수술시간의 지연 등의 단점이 있어 사용에 제한이 있다[2]. 이 외 동종골 및 이종골이 사용될 수 있는데 이는 자가골에 비해 자기 스스로의 골형성(osteogenesis)이 불가능하고 공여자나 공여 동물로부터의 질병의 전염과 감염이 발생할 수 있다[3,4]. 합성골은 질병의 전염 위험이 없고 술자가 필요한 만큼 사용할 수 있어 편리하게 적용할 수 있으나 골형성 능력이 다른 골이식재에 비해 낮고 흡수되지 않고 남아 있는 경우도 있다. 이러한 다양한 골이식재들의 문제점들을 해결하기 위해 현재 다양한 연구가 진행되고 있다.

본 연구에 사용된 hydroxyapatite (HA)는 체내의 골조직과 치아의 주요한 무기질 성분이다[5]. HA는 뛰어난 생체적합성 및 골전도성을 가지고 있어 골결손부 발생 시 이를 대체할 수 있는 뛰어난 골이식 재료로 사용되고 있다[6,7]. HA는 골격을 구성하는 기본물질이기 때문에 현재 많은 종류의 골이식 재료들이 HA를 기본성분으로 사용하고 있고 주로 소(bovine), 산호(coral)를 비롯한 탈탄백된 동종골로부터 얻을 수 있다[8-10]. 하지만 HA는 그 자체의 취성(brittleness)과 낮은 탄성(elasticity) 때문에 높은 응력이 가해지는 부위에 단독으로 사용하기 어려운 점이 있다. 이런 단점을 보완하고 기계적 성질을 개선하기 위해 특정한 합성물(composite)에 HA를 적용하여 적절한 중합체(polymer)를 만들어 사용할 수 있는데[11], 이런 합성물로는 gelatin[12], collagen[13], cellulose[14] 등이 사용되고 있다. 특정 합성물을 HA의 주형(template)으로 사용함으로써 HA 중합체의 탄성, 강도와 같은 기계적 성질과 생체적합성을 향상시킬 수 있다[11].

Silk는 누에의 유충으로부터 만들어지는 섬유상 단백질로 fibroin과 sericin으로 구성되어 있다[15]. silk가 체내에 사용될 경우 외층에 존재하는 sericin에 의해서 미약한 염증과 면역 반응을 유발할 수 있다. 반면에 fibroin은 최소한의 염증반응을 일으켜 부작용 없이 안전하게 사용할 수 있다[16,17]. Silk fibroin (SF)는 뛰어난 생체친화성[18], 세포 부착능, 높은 산소 투과도를 가지고 있고 체내에서 특별한 독성 반응 없이 분해된다[19,20]. 또한 강한 인장력과 수용액에서의 낮은 용해도를 가지는 뛰어난 기계적 성질을 가지고 있어 조직공학에서 생체재료로 다양하게 사용되고 있다[21]. SF는 조직공학영역에서 scaffold, 인공혈관, drug-delivery 물질로 사용되어 왔다[22-24]. 또한 여러 연구를 통해 SF를 이용하여 만든 차폐막이 골결손부에서 뛰어난 골유도 재생 효과를 가지고 있음이 보고되었다[25,26].

최근의 연구를 통해 SF와 nano-HA 복합체에서 SF가 HA 입자의 성장을 촉진시키고 중합체의 bioactivity와 기계적 강도를 증가시킨다고 알려져 있다[27]. 하지만 SF 입자를 주형으로 한 HA 복합체에 관한 연구는 아직까지 보고된 바가 없다. 만약 SF가 HA/polymer의 주형으로 사용될 경우 조직공학 분야에서 골결손부를 대체할 수 있는 훌륭한 골이식 재료로 사용될 수 있을 것이다.

이 논문의 목적은 백서의 두개골에 원형의 골결손부를 형성하고 SF입자의 표면에 HA를 입힌 HA/SF를 이식한 후 조직학적, 조직형태학적 분석을 통해 HA/SF이식재가 신생골 형성을 증가시키는지 알아보고자 함이다.

연구방법

1. 실험 재료

HA/SF particle은 인하대학교 고분자신소재공학과로부터 제공받은 것을 사용하였다.

2. 실험 동물 및 수술

본 연구는 강릉원주대학교 연구윤리위원회의 승인을 받고 감독 하에 수행하였다(승인번호 GWNU-2012-8). 본 실험에서는 Sprague Dawley rat (Samtako, Osan, Korea) 20마리를 사용하였으며 이식재의 유무에 따라 HA/SF군(10마리)과 아무것도 넣지 않은 대조군(10마리)으로 분류하여 실험하였다.

실험동물은 전신마취를 유도하기 위해 Xylazine 20 mg/mL (Rompun, Bayer Korea, Seoul, Korea)와 Tiletamine 25 mg/mL 와 Zolazepam 25 mg/mL (Zoletil 50, Virbac Laboratories, Carros, France)를 1:1로 혼합하여 백서의 대퇴부에 주입하였다. 실험동물의 수술 부위인 전두부를 제모하고 10% povidone-iodine 용액으로 소독한 다음 1:100,000 에프네프린이 함유된 2% lidocaine을 주사하였다. 비골에서 후두골 사이의 두개 골시상봉합을 따라 약 2 cm 가량의 절개를 가한 다음 피부 및 골막을 거상하여 두정골을 노출시킨다. 8 mm trephine bur를 이용하여 백서의 두개골 정중봉합부에 8 mm의 원형골결손부를 형성하였다(Fig. 1). 실험군에는 제작한 골이식재를 이식하고 대조군은 골결손부만 형성하고 골결손부 상방에 골막을 위치시킨 후 골막과 근육을 3-0 black silk로 봉합하였다.

수술 4주 후 실험군, 대조군 각각 5마리를 이산화탄소(CO₂) 질식을 통하여 희생시킨 다음 두개골 부위 표본을 채취하였다. 표본은 10% 중성 formalin 용액에 담가 보관하고 조직형태학적 분석을 시행하였다. 수술 8주 후 나머지 10마리에 대해서도 4주 후와 같은 과정을 실행하였다.

3. 조직학적 검사 및 조직 형태학적 분석

채취한 표본은 10% 중성 formalin 용액에 고정하고 5% Nitric

Fig. 1. Hydroxyapatite/silk fibroin particle was grafted into the center of parietal bone.

acid 용액을 이용하여 탈회하였다. 파라핀 블록에 포매한 후 4 μ m 두께로 절단한 후 Masson's trichrome (MT) 염색을 시행하였다. 염색한 조직 표본은 디지털 현미경 카메라를 사용하여 이미지를 취득한 후 Sigma Scan Pro 5.0 (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA)을 이용하여 신생골의 면적 비율을 측정하였다. HA/SF군과 아무것도 넣지 않은 대조군의 신생골 면적 비율 차이의 통계학적 유의성 검사를 위해 SPSS 18.0 (IBM Co., Armonk, NY, USA)를 이용해 independent-samples t-test를 시행하였다.

결 과

MT 염색을 한 조직절편을 현미경으로 관찰한 결과 실험군, 대조군 모두에서 신생골의 형성을 확인할 수 있었다(Fig. 2). 실험군에서는 4주 및 8주에서 분해되지 않고 남아 있는 일부 HA/SF particle을 발견할 수 있었다(Fig. 2, arrow). Particle 주위로 특별한 염증반응 및 감염소견은 발견되지 않았다.

Fig. 2. Histologic section (Masson's trichrome staining, $\times 200$). New bone formation of each group was found at the border area of bone defect. Residual hydroxyapatite/silk fibroin particle were found in this group (arrow). (A) The experimental group at 4 weeks, (B) The control group at 4 weeks, (C) The experimental group at 8 weeks, (D) The control group at 8 weeks.

Table 1. Mean new bone formation

Week	Unfilled (control)	Hydroxyapatite/silk fibroin (experiment)	P-value
4	20.49±5.79	33.18±3.10	0.038
8	25.50±7.31	42.52±7.74	0.013

염색한 조직 표본의 이미지에서 골결손부에 대한 신생골의 면적 비율을 측정하고 각 그룹에 대한 평균치를 구하였다(Table 1). 4주에서 신생골 면적의 비율은 실험군에서 평균 33.18±3.10%이고 대조군에서 평균 20.49±5.79%로 실험군에서 유의하게 더 많이 생성되었다($P<0.05$). 8주에서 신생골 면적의 비율은 실험군에서 평균 42.52±7.74%이고 대조군에서 25.50±7.31%로 4주에서와 마찬가지로 통계적으로 유의하게 골이 많이 생성되었다($P<0.05$).

고 찰

구강악안면 영역에서는 악안면부에 발생하는 다양한 낭종, 종양과 같은 병소 및 외상으로 인해 자연적으로는 치유되기 힘든 골결손부가 발생할 수 있다[1]. 또한 치아상실로 인해 임플란트 식립을 통한 보철치료가 필요할 경우 치조골이 충분치 못하여 추가적인 골이식을 시행해야 하는 경우가 발생할 수 있다[28]. 구강악안면 영역에서의 이러한 골결손부는 구강의 저작 및 연하기능에 영향을 주고 악안면 영역의 심미적 장애를 일으킬 수 있다. 본 연구에서는 HA와 SF의 복합물질을 이용하여 대조군에 비하여 유의할 수준으로 높은 신생골 형성을 관찰하였다($P<0.05$). 기존의 HA/SF 복합이식재의 경우 스폰지 형태나 블록 형태이었던 것에 비하여 이번에 연구한 재료는 입자 형태의 재료로 뼈 이식을 필요로 하는 구강영역의 복잡한 해부학적인 형태를 감안하면 이전에 개발된 재료에 비하여 임상적으로 다양하게 적용될 수 있을 것으로 생각된다.

본 연구에 사용된 HA/SF particle은 SF 표면에 HA를 도입한 것으로 기존의 알려진 HA와 SF 복합체와 달리 sphere 형태의 SF를 사용했다는 점에서 차이가 있다. 과거 Kye 등[29]은 전기방사된 silk nano-fiber와 nano-HA 복합체가 가토의 두개골 결손부 모델에서 아무런 처치를 하지 않은 대조군에 비해 신생골 형성량이 유의하게 증가함을 확인하였고, Park 등[30]은 SF/nano-HA/Corn starch composite가 가토 두개골 결손부 모델에서 신생골 형성에 효과가 있음을 보고하였다. 이외에도 SF와 platelet-rich fibrin 복합체를 골결손부에 적용 시 신생골 형성에 효과적이었고[31], 치과용 임플란트 주위의 경미한 골결손부 수복에도 효과적으로 사용될 수 있음이 보고되었다[32]. 이번 연구에 사용된 이식재의 경우에는 polyethylene oxide (PEO)를 이용한 상분해를 통해 크기 제어가 가능한 silk sphere를 제조하였고, 균일도가 뛰어난

silk sphere를 제작할 수 있었다[33]. 이렇게 제조한 silk sphere에 HA를 도입하여 HA의 주형으로 사용하여 HA/SF 복합체의 물리적 강도를 향상시킬 수 있었다.

본 연구에서 사용된 HA/SF particle은 제조과정 중 상분해 시 PEO ratio에 따라 그 입자의 크기가 0.9 ± 0.2 에서 $5.8\pm2.9\mu\text{m}$ 로 다양하게 만들어진다[33]. 만들어진 HA/SF particle은 고운 분말 형태로서 임상적 적용 시 매우 세심한 조작이 필요하며 골결손부에 적용 후 잘 유지될 수 있도록 주의가 필요하다. 골결손부에서 스며나오는 혈액이나 타액에 의해 particle의 유지력이 조금 향상될 수 있으나 실제 임상에 적용하기에는 어려움이 있다. 새로운 생체 친화적인 재료를 첨가하거나 제조과정의 개선을 통하여 조작하기 쉬우면서 적절한 강도를 가질 수 있는 HA/SF particle이 필요할 것이다.

본 연구에서는 HA/SF particle이 신생골 형성에 미치는 영향을 알아보기 위해 백서의 두개골에 8 mm 골결손부를 형성하고 아무 처치도 하지 않은 군을 대조군으로 설정하였다. 수술 후 4주가 지났을 때 신생골 형성량이 실험군에서 평균 33.18±3.10%였고 대조군에서 20.49±5.79%로 형성되었고 그 차이도 통계적으로 유의하였다. 수술 8주 후 신생골 형성량은 실험군에서 42.52±7.74%, 대조군에서 25.50±7.31%로 4주에 비해 증가하였고 4주 결과와 마찬가지로 그 차이가 통계적으로 유의하였다. 결과적으로 HA/SF particle은 골결손부에서의 신생골 형성을 효과적으로 증가시켰다. 이는 SF가 HA 입자의 주형으로 작용하여 HA 입자의 성장을 촉진시키고 유지시켰기 때문이라고 판단된다. 또한 HA/SF particle이 특별한 염증반응 및 감염 없이 분해되어 신생골 형성을 특별한 영향을 주지 않았고 이는 particle이 대부분 분해되고 일부 입자만 실험군 4주와 8주에서 조직에서 관찰되었다는 사실을 통해 알 수가 있다. 이렇게 대부분 분해되고 일부 입자만 남았다는 사실은 SF의 염증반응에 대한 기존 연구에[17] 비해 긍정적인 결과라 할 수가 있다.

결 론

본 연구에서는 백서의 두개골에 지름 8 mm의 골결손부를 인위적으로 형성한 후 실험군에는 HA/SF particle을, 대조군에는 아무 처치도 하지 않고 수술 후 4주 및 8주에 백서를 희생하여 조직형태학적 분석을 통해 신생골 형성량을 알아보았다. 실험 결과 조직형태학적 분석을 통해 4주 및 8주 모두에서 실험군의 신생골 형성이 대조군에 비해 유의하게 증가하였으며, 특별한 염증반응 없이 대부분의 HA/SF particle 생체 내에서 분해되었다. HA/SF particle의 물성 및 조작성이 보다 더 개선된다면, 비용이 저렴하면서도 임상적으로 사용 가능한 골이식재로 활용될 수 있을 것이다.

Acknowledgements

이 연구는 농촌진흥청 차세대 바이오그린 21사업(과제번호: PJ009051052012)에 의해 이루어진 것임.

References

1. Bianchi B, Ferri A, Ferrari S, Copelli C, Boni P, Sesenna E. Iliac crest free flap for maxillary reconstruction. *J Oral Maxillofac Surg* 2010;68:2706-13.
2. Laurie SW, Kaban LB, Mulliken JB, Murray JE. Donor-site morbidity after harvesting rib and iliac bone. *Plast Reconstr Surg* 1984;73:933-8.
3. Friedlaender GE. Immune responses to osteochondral allografts. Current knowledge and future directions. *Clin Orthop Relat Res* 1983;174:58-68.
4. Carlson ER, Marx RE, Buck BE. The potential for HIV transmission through allogeneic bone. A review of risks and safety. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1995;80:17-23.
5. Bucholz RW, Carlton A, Holmes RE. Hydroxyapatite and tricalcium phosphate bone graft substitutes. *Orthop Clin North Am* 1987;18:323-34.
6. Radin SR, Ducheyne P. Effect of bioactive ceramic composition and structure on in vitro behavior. III. Porous versus dense ceramics. *J Biomed Mater Res* 1994;28:1303-9.
7. Valentini P, Abensur D. Maxillary sinus floor elevation for implant placement with demineralized freeze-dried bone and bovine bone (Bio-Oss): a clinical study of 20 patients. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1997;17:232-41.
8. Barakat NAM, Khil MS, Omran A, Sheikh FA, Kim HY. Extraction of pure natural hydroxyapatite from the bovine bones bio waste by three different methods. *J Mater Process Technol* 2009;209:3408-15.
9. Sivakumar M, Kumar TS, Shantha KL, Rao KP. Development of hydroxyapatite derived from Indian coral. *Biomaterials* 1996;17:1709-14.
10. Piattelli A, Scarano A, Corigliano M, Piattelli M. Comparison of bone regeneration with the use of mineralized and demineralized freeze-dried bone allografts: a histological and histochemical study in man. *Biomaterials* 1996;17:1127-31.
11. Neumann M, Eppler M. Composites of calcium phosphate and polymers as bone substitution materials. *Eur J Trauma* 2006;32:125-31.
12. Chang MC, Ko CC, Douglas WH. Preparation of hydroxyapatite-gelatin nanocomposite. *Biomaterials* 2003;24:2853-62.
13. Kikuchi M, Ikoma T, Itoh S, *et al*. Biomimetic synthesis of bone-like nanocomposites using the self-organization mechanism of hydroxyapatite and collagen. *Composites Sci Technol* 2004;64:819-25.
14. Wan Y, Hong L, Jia S, *et al*. Synthesis and characterization of hydroxyapatite-bacterial cellulose nanocomposites. *Composites Sci Technol* 2006;66:1825-32.
15. Cao Y, Wang B. Biodegradation of silk biomaterials. *Int J Mol Sci* 2009;10:1514-24.
16. Aramwit P, Kanokpanont S, De-Eknamkul W, Srichana T. Monitoring of inflammatory mediators induced by silk sericin. *J Biosci Bioeng* 2009;107:556-61.
17. Santin M, Motta A, Freddi G, Cannas M. In vitro evaluation of the inflammatory potential of the silk fibroin. *J Biomed Mater Res* 1999;46:382-9.
18. Dal Pra I, Freddi G, Minic J, Chiarini A, Armato U. De novo engineering of reticular connective tissue in vivo by silk fibroin nonwoven materials. *Biomaterials* 2005;26:1987-99.
19. Um IC, Kweon HY, Park YH, Hudson S. Structural characteristics and properties of the regenerated silk fibroin prepared from formic acid. *Int J Biol Macromol* 2001;29:91-7.
20. Minoura N, Tsukada M, Nagura M. Physico-chemical properties of silk fibroin membrane as a biomaterial. *Biomaterials* 1990;11:430-4.
21. Gosline JM, DeMont ME, Denny MW. The structure and properties of spider silk. *Endeavour* 1986;10:37-43.
22. Kim UJ, Park J, Li C, Jin HJ, Valluzzi R, Kaplan DL. Structure and properties of silk hydrogels. *Biomacromolecules* 2004;5:786-92.
23. Arai T, Freddi G, Innocenti R, Tsukada M. Biodegradation of Bombyx mori silk fibroin fibers and films. *J Appl Polym Sci* 2004;91:2383-90.
24. Sofia S, McCarthy MB, Gronowicz G, Kaplan DL. Functionalized silk-based biomaterials for bone formation. *J Biomed Mater Res* 2001;54:139-48.
25. Song JY, Kim SG, Lee JW, *et al*. Accelerated healing with the use of a silk fibroin membrane for the guided bone regeneration technique. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2011;112:e26-33.
26. Lee SW, Park YT, Kim SG, Kweon HY, Jo YY, Lee HS. The effects of tetracycline-loaded silk fibroin membrane on guided bone regeneration in a rabbit calvarial defect model. *J Korean Assoc Maxillofac Plast Reconstr Surg* 2012;34:293-8.
27. Wang J, Yu F, Qu L, Meng X, Wen G. Study of synthesis of nano-hydroxyapatite using a silk fibroin template. *Biomed Mater* 2010;5:041002.
28. von Arx T, Kurt B. Implant placement and simultaneous peri-implant bone grafting using a micro titanium mesh for graft stabilization. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1998;18:117-27.
29. Kye JY, Kim SG, Kim MK, *et al*. Electrospun silk nano-fiber combined with nano-hydroxyapatite graft for the rabbit calvarial model. *J Korean Assoc Maxillofac Plast Reconstr Surg* 2010;32:293-8.
30. Park YT, Kwon KJ, Park YW, *et al*. The effect of silk fibroin/nano-hydroxyapatite/corn starch composite porous scaffold on bone regeneration in the rabbit calvarial defect model. *J Korean Assoc Maxillofac Plast Reconstr Surg* 2011;33:459-66.
31. Song JY, Kweon H, Kwon KJ, Park YW, Kim SG. The bone regenerative effect of silk fibroin mixed with platelet-rich fibrin (PRF) in the calvaria defect of rabbit. *J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg* 2010;36:250-4.
32. Jang ES, Lee HS, Lee HS, *et al*. Effect of combination graft of chondron's platelet-rich-fibrin with silk fibroin powder in the peri-implant defects. *J Korean Assoc Maxillofac Plast Reconstr Surg* 2011;33:103-11.
33. Choi Y, Cho SY, Park DJ, Park HH, Heo S, Jin HJ. Silk fibroin particles as templates for mineralization of calcium-deficient hydroxyapatite. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2012;100:2029-34.