

## 하악골 신연술 후 생성된 신생골의 조직학적 및 면역화학적 소견

윤경인 · 박재억\*

을지의과대학교 치과학교실 을지병원 구강악안면외과  
가톨릭대학교 의과대학 치과학교실 강남성모병원 구강악안면외과\*

### Abstract

#### THE HISTOLOGICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL FINDINGS OF THE NEWLY FORMED HUMAN BONE AFTER DISTRACTION OSTEOGENESIS

Kyoung-In Yun, Je-Uk Park\*

*Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, Eul Ji Hospital, Eul Ji University, The School of Medicine  
Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, Kangnam St. Mary's Hospital, The Catholic University of Korea\**

Distraction osteogenesis(DO) can be performed in the bony defect associated with trauma, anomaly, and various kinds of disease. The gap generated by DO is filled with growing callus : during the period of distraction, the osteogenesis is continued. However, there have been few reports about expression pattern of growth factors in newly formed bone during the consolidation periods. We performed DO in the mandibular defect case and studied the expressed pattern of growth factors. Its pattern was compared to that of the same patient. BMP-2 and -4 were strongly expressed in the DO site. Paticularly, BMP-4 was not expressed in the normal mature bone, but expressed in new bone in DO. However, there was no difference in the FGF-7 expression between the sites. Therefore, strong expression of BMP-4 are related to new bone formation in DO and they may not be related to the normal homeostasis in human bone. Though FGF-7 is related to the growth of keratinocyte, it may have minimal role in the DO and normal mature bone.

**Key words** : Distraction osteogenesis, BMP, New bone formation

### I. 서 론

골 신연술은 외상, 기형 또는 여러 가지 질환으로 인한 골 결손 부위의 재건에 다양하게 적용되고 있다. 골 신연술은 이미 1905년에 Codivilla가 가설의 형태로 대퇴골의 인장을 통하여 사지골의 길이 차이를 교정하면서 언급한 바 있으나 임상적이 개념은 1951년 Ilizarov에 의하여 도입되었다<sup>1)</sup>. 그는 2차 대전 후 시베리아의 Kurgan에서 사지의 부정 유합을 치료하던 중 우연히 골 신연술을 개발하여 이 방법을 골의 불유합 및 골수염 등의 치료에 도입하였다. 이후 이러한 골 신연술은 사지의 연장이나 골 결손 부위의 재건에 다양하게 시도되게 되었다.

1990년 Karp들은 골 신연 부위의 조직학적 연구를 시행하여 골 신연 10일 후 신생골의 침상골(spicule)들이 인장력이 작용하는 방향으로 생성되며, 8주 후 신연 부위가 전

반적으로 새로운 골로 연결됨을 보고하였다<sup>2)</sup>. 또한 Yuzo들은 가토의 하악골에 골 신연술을 시행하여 조직학적 분석을 시행한 결과 골 신연 완료 직후에는 골 신연의 중심부에 섬유 조직과 혈종이 형성되나 골 신연 완료 2주 후에는 그 중심부에 신생골의 지주(trabecule)들이 형성되고, 그 주변 부위에서는 신생골 지주(trabecule)의 흡수 및 파절골의 재형성이 이루어짐을 관찰하였다. Yuzo들은 이 연구에서 골 신연 완료 4주 후부터 가골이 사라지고, 조골 세포가 골 기질을 형성하여 골 신연 완료 6~8주 후 신생골이 증가함을 보고하였다<sup>3)</sup>.

최근에는 골 신연 부위의 신생골 형성 시 골형성 단백질의 역할에 대한 연구가 많이 진행되고 있다. Sato 들은 기계적인 장력-부하가 골형성 단백질의 형성에 미치는 영향에 대해 연구하여 기계적인 장력-부하가 지속되면 BMP-2와 BMP-4의 발현이 증가된다는 결론을 얻었다<sup>4)</sup>.

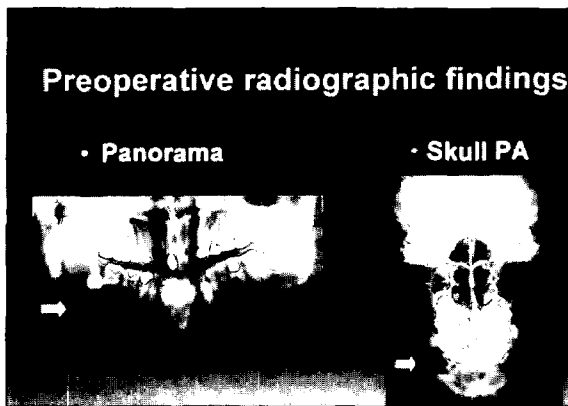
그러나, 대부분의 논문은 실험 동물에서 확인된 것들이고 사람에서 골 신연 중이나 후에 어떤 골형성 단백질이 형성되고 또 어떠한 역할을 하는지에 대해서는 명확히 규명되지 않은 상태이다. 이에 저자들은 하악골 낭종 적출술 후 발생한 골 결손부를 골 신연술을 이용하여 재건한 후 임플란트를 식립한 증례에서 환자 동의하에 신생골과 정상골을 채취하여 조직학적 및 면역화학적 검사를 시행하여 골형성 단백질의 발현 차이를 확인하였기에 문헌고찰과 함께 보고하는 바이다.

## II. 증례 보고

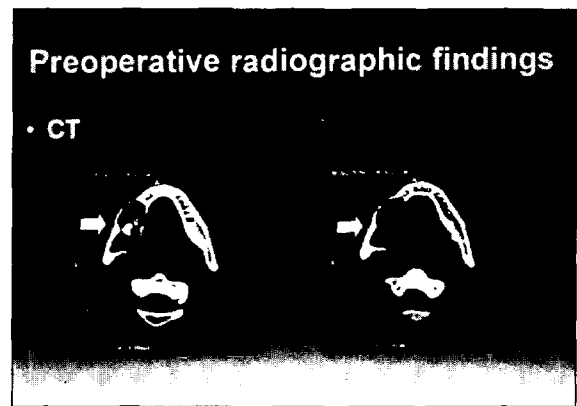
### 1. 증례

27세 남자 환자가 우측 안면부 종창을 주소로 내원하였다. 구강내 검사상 하악 우측 제2대구치의 2급 동요도 및

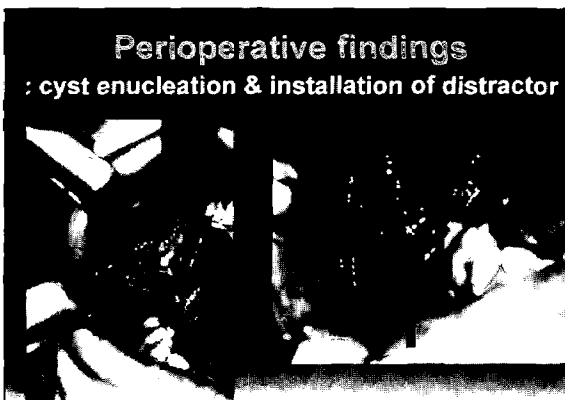
치는 종창의 소견을 보였다. Panorama 소견상 우측 제2소구치후방부터 하악지 상방까지 경계가 명확한 방사선 투과성 병소가 발견되었으며, 때때로 제3대구치의 변위 소견을 보였다. 하악 우측 제1, 2대구치는 치근단 흡수의 소견을 보였으며, 하악 하연은 골 팽창 소견을 보였다. Skull PA 소견상 협측골의 팽창 소견을 보였다(Fig. 1). CT상 협측 및 설측 피질골판의 팽창 소견을 보였다(Fig. 2). 조직 생검 결과 치성 낭종으로 판명되었으며, 이에 따라 낭종 적출술 및 하악골 신연술을 계획하였다. 수술실 소견상 하치조 신경이 노출되어 있었으며, 제2대구치 후방 골의 흡수 소견을 보여 낭종 제거 및 하악 우측 제1, 2, 3대구치의 발거술을 시행하였다(Fig. 2). 낭종 제거 후 하악골 신연 장치를 장착하였다(Leibinger Co.)(Fig. 3). 하악골 신연술은 수술 7일 후부터 0.8mm/day 씩 시행하였다. 전체 신연 기간은 30일이었으며, 총 신연 길이는 24mm였다. Consolidation 기간은 110일이었다(Fig. 4). Consolidation 기간동안 환



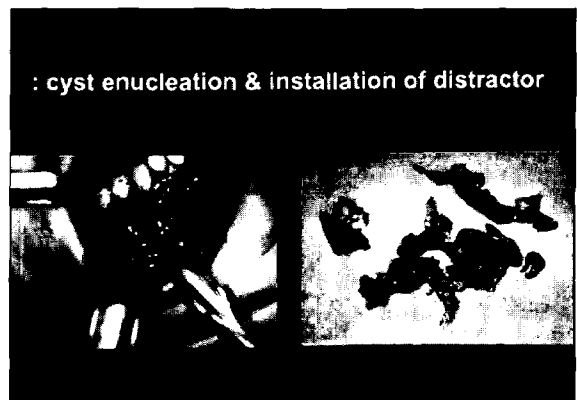
**Fig. 1.** Preoperative radiographic findings(panorama & skull PA) : The arrow shows the well defined radiolucent lesion of the right mandible.



**Fig. 2.** Preoperative radiographic findings(CT) : The arrow shows the expansion of the mandibular buccal and lingual plate.



**Fig. 3.** Perioperative findings : The arrow shows the inferior alveolar nerve.



**Fig. 4.** Perioperative findings.

자가 장치의 외부 돌출부에 대해 불편감을 호소하여 외부 돌출부를 외래에서 절단하였다. 하악골 신연 기간 중이나 consolidation 기간 동안 염증반응이나 특이한 소견은 보이지 않았다. 하악골 신연 장치 제거 3개월 후 신연 부위에 임프란트를 식립하였다. 임프란트 식립을 위한 CT 소견상 하악골 신연 부위에 신생골 형성을 확인할 수 있었다. 임프란트 식립시 임상적으로 신생골의 형성을 확인할 수 있었으며, drilling시 특이한 소견은 관찰되지 않았다. 임프란트 식립시 환자 동의하에 신연 부위와 정상골 부위의 골조직을 채취하여 조직 검사 및 면역화학검사를 시행하였다.

2) 면역조직화학적 검사

H-E stain은 통상의 방법대로 시행하였다.

면역화학검사는 다음과 같이 시행하였다. 사람의 유전자를 기반으로 얻어진 BMP-2, -4 그리고 FGF-7의 단백질을 peptide mapping을 시행하여 염소에 주입한 후 얻어진 polyclonal antibody를 사용하였으며, 이는 Santa Cruz Biotechnology Inc.(Santa Cruz, CA, USA)에서

상품화한 것을 구입하여 사용하였다. 면역화학검사를 위해 표본을 4 $\mu$ m 두께로 절단하였다. 배양을 제외한 모든 과정은 실온에서 행해졌다. 표본에서 파라핀을 제거하고 침수시킨 후 메탄올에서 7분간 3% 과산화수소로 처리하여 내재성 peroxidase를 차단하였다. 표본을 PBS로 세척한 후 10% 정상 가토 혈청에서 30분간 전배양을 시행하였다. 이 표본을 1차 항체와 함께 4 $^{\circ}$ C에서 하루 동안 배양하였다. 배양된 표본을 PBS로 다시 세척한 후 항염소 면역단백질에서 60분간 배양하였으며, 이것을 다시 PBS로 세척한 후 streptavidine에서 30분간 배양하였다. 표본을 0.05% 3,3-diaminobenzine과 0.03% hydrogen peroxide의 50mM Tris-HCl 완충액에 3분동안 담구어 발색시켰다. 역염색은 Mayer hematoxylin으로 시행하였다.

3) 면역조직화학적 소견

H-E stain 소견상 신연골 부위에서는 정상골과 같은 층판 구조를 관찰할 수 없었으며, 미성숙골의 양상을 보였다 (Fig. 5).

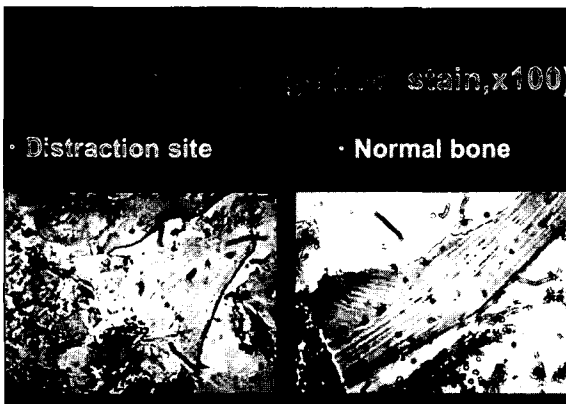


Fig. 5. Histological findings.(H-E stain, x100)

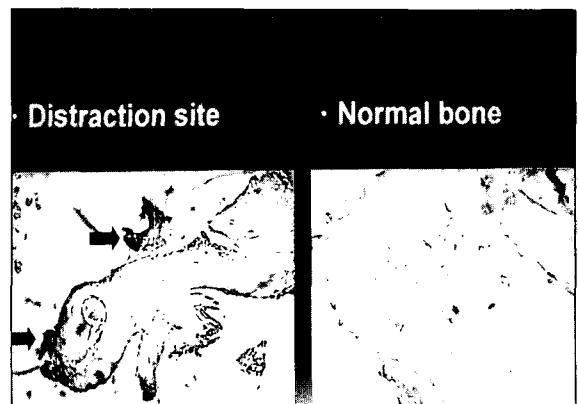


Fig. 6. Immunohistochemical findings.(BMP-2, x100)

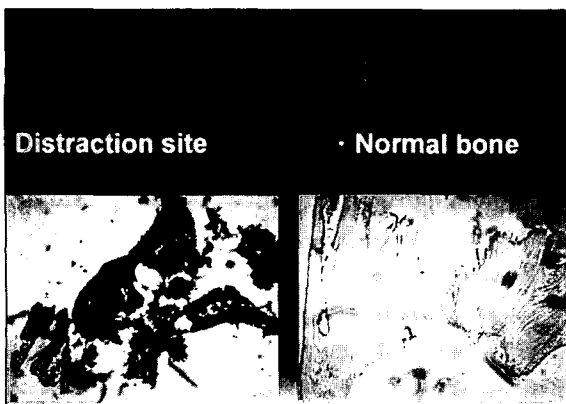


Fig. 7. Immunohistochemical findings.(BMP-4, x100)

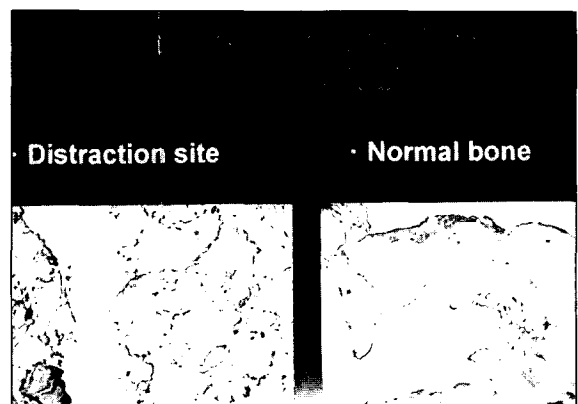


Fig. 8. Immunohistochemical findings.(FGF-7, x100)

BMP-2에 대한 면역화학소견상 신연골 부위에서 정상골보다 약간 강하에 발현되었다(Fig. 6). 그러나, BMP-4에 대한 면역화학소견은 신연골과 정상골이 현저한 차이를 보였다(Fig. 7). 즉, 신연골에서는 BMP-4가 강한 발현 양상을 보였으나, 정상골에서는 BMP-4가 전혀 발현되지 않았다. FGF-7은 정상골과 신연골에서 발현 양상의 차이를 발견할 수 없었다(Fig. 8).

### III. 총괄 및 고찰

골절 후 골막 주변 세포에서는 골형성 단백질이 유도된다. Nakase 등의 연구에 의하면 골절 후 12~72시간 이후 BMP-4 mRNA가 발현되는 것으로 알려져 있다. Nakase 등은 이러한 BMP-4 mRNA는 골막, 골수강, 및 골절부 주위 근육에 분포하고 있으며, 골절 후 가골이 형성되기 전에 발현된다고 하였다. 그는 BMP-4 mRNA의 발현을 골절 초기 가골 형성의 중요한 요소로 생각하였으며, BMP-gene은 osteoprogenitor cell에서 유래하는 것으로 생각하였다<sup>5)</sup>. 또한 Takagi 등은 백서를 이용한 실험에서 대퇴골 결손 부위에 BMP와 자가 골을 이식한 군에서 자가골만 이식한 군보다 결손 부위의 유합이 더 빠르게 일어남을 관찰하였다<sup>6)</sup>.

골 신연술시 관찰되는 일련의 과정들은 골절의 치유과정과 유사한 것으로 알려져 있다. 따라서, 본 증례에서 강하게 발현된 BMP-4는 골 신연 기간 동안 osteoprogenitor cell에서 유래한 것으로 생각되며, 초기 가골 형성에 중요한 역할을 한 것으로 생각된다. 그러나, 본 증례의 석회화가 완료된 신생골 표본에서 다량의 BMP-4가 검출된 것은 Nakase 등의 연구 결과와 일치하지 않았다.

Sato 등은 골 절단 4일 후부터 BMP-2, BMP-4, BMP-6 mRNA가 발현되기 시작하여 7일 후부터 BMP-2, BMP-4 mRNA가 감소한다고 하였다. 그러나, 10일 후부터 다시 증가하여 골 신연이 완료될 때까지 유지된다고 하였으며, 석회화 기간동안에는 BMP mRNA가 검출되지 않는다고 하였다. 이러한 골형성 단백질은 정상골에서는 발현되지 않는다고 하였다<sup>7)</sup>.

Gang 등은 골 신연 동안 신생골 형성 부위에서 BMP-4 mRNA가 나타나는 것을 발견하였다. 골절 시에는 BMP-4 mRNA가 12~72시간 정도 발현되는 반면 골 신연술시에는 35~40일 정도 장기간 발현된다는 것도 발견하였다<sup>8)</sup>.

Rauch 등은 동물 실험을 통하여 골 신연술의 각 단계별로 골형성 단백질의 발현 양상에 대해 관찰하였다. 즉, 수술 1주일 후, 골 신연 중, 석회화 단계에서 골형성 단백질의 발현 양상에 대해 관찰하였다. Rauch 등은 골 신연 중 골형성 단백질이 지속적으로 증가하는 양상을 보이다가 골 신연이

완료되면 다시 감소하기 시작하는 것을 발견하였다. 그들은 골 신연에 의한 기계적인 자극이 골형성 단백질의 형성을 유도하는 것으로 생각하였다<sup>4)</sup>.

본 증례에서는 골 신연 및 석회화 기간이 완료된 후 신생골을 채취하여 조직 소견을 관찰하였다. 충분한 석회화 기간을 두었으나, 신연술 후 생성된 신생골은 H-E stain상 미성숙골의 양상을 보였다. 또한 신생골에서 다량의 BMP-4가 검출되었다. 이것은 BMP는 골 신연이 완료되면 감소하기 시작하여 석회화 기간동안에는 검출되지 않는다는 지금까지의 동물 실험과는 다른 결과였다. 이러한 조직 소견은 석회화 기간이 완료된 후에도 신생골 부위에서는 골의 재형성이 진행되고 있으며, 이 과정에서 BMP가 작용하고 있다는 것을 나타낸다.

BMP-2는 중요한 골형성 단백질이다. Wang 등은 recombinant human BMP-2를 이용한 실험에서 BMP 투여 14일 후 골 형성을 관찰할 수 있었으며, 이러한 골형성은 BMP의 양과 시간에 비례한다고 하였다<sup>9)</sup>. 그러나, 본 증례에서는 신생골에서 좀 더 많이 발현되기는 하였으나, 신생골과 정상골에서 큰 차이를 보이지 않았다. 이러한 현상은 정상골에서 지속적으로 일어나고 있는 골 대사 과정에 BMP가 관여하였기 때문이라고 생각한다. 즉, 정상골에서는 일반적인 골 흡수와 생성 과정에 BMP가 관여하였기 때문에<sup>10)</sup> 신생골과 정상골에서 BMP-2 발현에 큰 차이를 보이지 않는 것으로 생각된다.

그러나, BMP-4의 발현이 신생골과 정상골에서 다른 것은 BMP-4의 역할이 단순한 골 형성 이상일 것임을 생각할 수 있다. BMP-4는 BMP-2보다 강력한 골형성 유도 단백질이며<sup>11)</sup>, 또한 가장 널리 알려진 미분화 세포의 분화에 관여하는 신호 전달 물질이다. 백서의 치아 발생에 BMP-4가 매우 중요한 역할을 수행하고 있다<sup>12)</sup>. 또한 양서류에서는 초기 발생 단계에서 전면과 후면의 방향성을 결정하는 데도 중요한 역할을 담당한다<sup>13)</sup>. 따라서, 충분한 양이 성숙골이 존재하는 정상적인 대사 과정의 골 재형성 과정에는 BMP-4의 역할이 거의 필요하지 않을 수 있다. 그러나, 잔존하는 정상골이 거의 없는 비정상적인 상태에서 신장력이라는 물리력에 의하여 골막이 미분화 세포가 골형성 세포로 분화되는 특수한 상황이라면 BMP-4가 중요한 역할을 수행할 수 있을 것으로 생각된다. 왜냐하면 BMP-4가 세포 분화 단계에서 방향성을 결정하기 때문이다. 만약 충분한 양의 BMP-4가 발현되지 않는 상황을 가정한다면 BMP-2 단독 발현으로는 총판 구조의 정상골로의 성숙이 일어날 수 없다고 가장할 수 있다.

위 증례에서는 골 신연 동안 형성된 가골에 대해서는 표본을 제작 조사하지 않았기 때문에 BMP-2의 증감 여부는 골형성의 단계별로 확인할 수 없었다. 따라서, BMP-2 및

BMP-4의 역할에 대한 저자들의 가정을 검증하기 위해서는 추가적인 동물 실험이 필요할 것으로 생각된다. 또한 임프란트 식립 시 osseointegration과 BMP의 관계에 대한 검증도 필요할 것으로 생각된다.

#### IV. 결 론

안면부 골 결손에 대해 최근에 골 신연술이 많이 적용되고 있다. 저자들은 하악골 낭종 후 발생한 골 결손 부위에 대해 골 신연술을 시행한 후 임프란트를 식립한 증례에서 환자 동의 하에 신생골과 정상골을 채취하여 조직 및 면역화학적 검사를 시행하여 BMP-2와 BMP-4의 발현을 관찰하였기에 문헌고찰과 함께 증례 보고하는 바이다.

#### Acknowledgement

표본 제작에 도움을 주신 한림대학교 치과학교실 구강악안면외과 김성곤 전임의에게 심심한 감사를 드립니다.

#### 참고문헌

1. Ilizarov GA, Soybelman LM, Chirkowa AMS : ome roentgenographic and morphologic data on bone tissue regeneration in distraction epiphysiolysis in experiment. *Orto Traumatol Protol* 1970 : 31 : 36.
2. Karp NS, Thorne CH, McCarthy JG, Sissons HA : Bone lengthening in the craniofacial skeleton. *Ann Plast Surg* 1990 : 24 : 231.
3. Yuzo Komuro, Tsuyoshi Takato, Kiyonori Harii and Yoshiyuki Yonemara : The histologic analysis of distraction osteogenesis of the mandible in rabbit. *Plas Reconstr Surg* 1994 : 94 : 152-159.

4. Sato M, Ochi T, Nakase T, Hirota S, Kitamura Y, Nomura S, Yasui N : Mechanical tension-stress induces expression of bone morphogenic protein(BMP)-2 and BMP-4, but not BMP-6, BMP-7 and GDF-5 mRNA, during distraction osteogenesis. *J Bone Miner Res* 14 : 1084-1095. 1999.
5. Nakase T, Nomura S, Yoshikawa H, Hashimoto J, Hirota S, Kitamura Y, Oikawa S, Ono K, Takaoka K : Transient and localized expression of bone morphogenic protein 4 messenger RNA during fracture healing. *J Bone Miner Res* 9 : 651-659. 1994.
6. Takase T, Nomura S, Yoshikawa H, Hashimoto J, Hirota S, Kitamura Y, Oikawa S, Ono K, Takaoka K : Transient and localized expression of bone morphogenic protein 4 messenger RNA during fracture healing. *J Bone Miner Res* 9 : 651-659. 1994.
7. Li G, Berven S, Simpso H, Triffitt J : Expression of BMP-4 mRNA during distraction osteogenesis in rabbit. *Acta Orthop Scand* 69 : 420-425. 1998.
8. Rauch F, Lauzier D, Croteau S, Travers R, Glorieux H, Hamdy R : Temporal and spatial expression of bone morphogenic protein-2, -3, and -7 during distraction osteogenesis in rabbit : *Bone* 26 : 611-617. 2000.
9. Wang EA, Rosen, D' Alessandro JS, Bauduy M, Cordes P, Harada T, Israel DI, Hewick RM, Kerns HK, Lapan P, Luxenberg DP, McWuaid D, Moutsatsos IK, Nove J, Wozney JM : Recombinant human morphogenic protein induces bone formation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 87 : 2220-2224. 1990.
10. Reddi AH, Chunninghan NS. Initiation and promotion of bone differentiation by bone morphogenic protein. *J Bone Miner Res* 8(supp.2) : s499-2502. 1993.
11. Wozney JM, The bone morphogenic protein family and osteogenesis. *Molec Rep Dev* 32 : 160-167 : 1992.
12. Tucker AS, Matthews KL, Sharpe PT : Transformation of tooth type induced by inhibition of BMP signaling. *Science* 282 : 1136-1138. 1998.
13. Northorp J, Woods A, Rony Seger, Suzuki A, Ueno N, Krebs E, Kimelman D : BMP-4 regulates the dorsal-ventral differences in FGF/MAPKK-mediated mesodermal induction in xenopus. *Develop Bio* 172 : 242-252. 1995.

#### 저자연락처

우편번호 137-401  
서울시 서초구 반포동 505번지  
가톨릭대학교 강남성모병원 구강악안면외과  
박 재 역

원고 접수일 2001년 01월 06일  
게재 확정일 2001년 04월 10일

#### Reprint requests

Je-Uk Park  
Dept. of OMFS, Kangnam St. Mary's Hospital, The Catholic Univ  
505 Banpo-Dong, Secho-Gu, Seoul, 137-401, Korea  
Tel. 82-2-590-2601 FAX. 82-2-533-2603

Paper received 6 January 2001  
Paper accepted 10 April 2001