

우골 유도 합성골이 사람 태아 골모세포의 골 광물화 과정에 미치는 영향

선기종 · 현하나 · 유형근 · 신형식

원광대학교 치과대학 치주과학교실

I. 서론

치은연상 및 치은연하 치태 또는 여러 종류의 혐기성 세균의 작용에 의해 발생하는 염증성 치주질환의 진행 정지와 치주질환에 의해 파괴된 치조골, 백악질 및 치주인대의 재생이 치주치료의 궁극적인 목적이다¹⁾.

치주질환이 진행됨에 따라 발생하는 치조골 결손부 재생을 위해 사용되고 있는 술식으로는 질환에 이환된 연조직과 하부 치조골을 절제하고 성형하여 생체의 자가 재생능력을 기대하는 방법과 골조직이나 골 대체물을 이식하는 방법²⁾, 치주인대세포의 다양한 분화능력을 이용한 이상적인 치유형태인 조직 유도 재생술 등이 있으며, 교원질 섬유가 매입된 무세포성 백악질의 생성 및 새로운 치조골의 형성을 유도한다는 법랑기질 단백질(enamel matrix protein)에 관한 연구³⁾와 치주조직 재생 관련 세포의 증식과 분화를 유도하여 치주조직의 치유과정을 조절하는 것으로 알려진 성장인자의 연구⁴⁾, 여러 생약제제에 대한 연구⁵⁻⁸⁾ 등이 있다.

골 이식술에 사용되는 골 이식재를 공급원에 따라 분류하면 자가골, 동종골, 이종골, 합성골 등으로 구분할 수 있으며, 이 중 자가골 이식은 골 채취를 위한 부가적인 수술의 필요성과 채취 골의 양적 제한성,

이식편 흡수 등의 단점이 있으며⁹⁾, 동종골 이식의 경우 불확실한 면역반응, 저장의 문제, 골편 흡수 등의 제한점이 있어서¹⁰⁾, 이를 해결하기 위해 합성재료를 이용한 골 이식 대체물과 이종골에 관한 많은 연구와 실험들이 진행되고 있다. 여러 가지 흡수성 및 비흡수성 합성골이 개발되어 임상에 이용되고 있으며, 골질의 주 무기질 성분인 인산칼슘계 생체재료로는 hydroxyapatite(HA)¹¹⁾와 tricalcium phosphate(TCP)¹²⁾가 포함되며, 최근에는 천연산호에서 추출된 생체재료¹³⁾와 골조직과 결합할 수 있는 무정형의 생체활성 요업재인 생체유리 이식제¹⁴⁾ 등이 합성골에 포함된다. 이러한 합성의 골 이식 대체물은 우수한 조직 친화성과 골전도 능력을 가지고 있으나 골유도 능력은 인정되지 않으며 일반적으로 기질 기능을 통하여 조골 과정이 신속히 진행되어 골성 강직이 초래되는 경우가 문제로 나타나기도 했다¹⁵⁾. 따라서 대부분의 대체물질은 치주질환 및 기타 골 결손부에서 미약한 골전도성과 충전재(filler)에 불과한 것으로, 즉 신부착을 증진시키는 능력이 적고 입자들은 주로 결합조직에 둘러싸이게 되는 형태로 치유되는 것을 기대하며 시술하고 있는 실정이다.

교차항원성을 해결하기 위해 탈단백화를 시행한 이종골인 우골유도 HA 중 대표적으로 Bio-Oss[®]가

*이 논문은 2002년도 원광대학교 교비 지원에 의해서 수행됨.

치주과 영역에 사용되고 있는데 부가적인 공여부가 필요 없고¹⁶⁾, 유기물질의 제거를 위하여 비교적 낮은 온도(300°C)에서 화학적인 과정을 통하므로, 골의 자연적인 구조를 유지한다고 보고되었으며¹⁷⁾ 표면적, 다공성, 입자의 크기, calcium/phosphorous 비율과 같은 지수의 평가에 있어서도 탈회 냉동 건조골이나 합성 hydroxyapatite에 비하여 사람의 망상골과 매우 유사하다고 보고되었다. 또한 Kinge등¹⁸⁾은 다른 물질에 비해 초기 골형성을 촉진한다고 보고하였다. 또한 Bio-Oss[®]는 이식재가 신생 층판골과 치밀하게 접촉하므로 흡수성 골전도 물질로 작용하는 것으로 보였다. Wetzel등¹⁹⁾은 beagle dog에 Bio-Oss[®]를 이용한 실험적 증대술을 통해 이 재제가 신생골 형성을 촉진하는 골전도 물질이라고 하였다. 골전도 물질이란 신생골 형성시 격자 울타리 또는 뼈대 역할을 하는 것을 말한다. 이런 탈단백 무기질 골은 사용의 편리성과 채취의 용이성으로 매식체 식립시, 상악동 거상술과 발치와 결손부 증대술을 위해, 그리고 치주적 결손부에 골 이식재로서 사용되어 왔다.

본 연구의 목적은 치주과 영역에 사용되고 있는 대표적 우골유도합성골인 Bio-Oss[®]가 hFOB1의 염기성 인산분해 효소 활성에 미치는 영향을 세포단위의 실험을 통해 알아봄으로써 골형성과 관련된 다양한 측정법을 사용한 더욱 세밀한 평가 및 cytokine, 성장인자 등 골개조와 관련된 물질과 Bio-Oss[®]의 병용시 상승효과를 나타낼 수 있는지 등의 향후 심도있는 연구의 기초가 되고자 시행하였다.

II. 연구 재료 및 방법

1. 세포배양

hFOB1 (human fetal osteoblasts) 세포주를 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco BRL, USA)과 0.03 mg/ml의 G-418 (DUCHEFA, Netherlands)이 첨가된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium Nutrient Mixture F-12 HAM (DMEM/F-12 1:1 Mixture, Sigma, USA) 2 ml이 담긴 6-well 배양접시에 적정 세포(5×10^4 cell/well)를 분주하였다. 이를 34°C의 온도와

100% 습도조건에서 95%의 공기와 5% CO₂를 계속 공급하면서 배양하였다. 배양액은 세포가 충분한 증식이 일어날 때까지 2-3일 간격으로 교환하였다.

2. 골이식재의 준비

실험재료로는 어린 송아지 뼈에서 추출한 이종골 대체물인 Bio-Oss[®] (Osteohealth Co., USA)를 사용하였다.

3. 염기성 인산분해효소 측정

hFOB1을 6-well plate에 1×10^5 cell/well이 되도록 분주한 후, 10% FBS가 첨가된 DMEM/F-12 1:1 Mixture에서 단일 밀생층(mono layer)이 형성될 때까지 34°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 µg/ml ascorbic acid, 10 mM sodium β-glycerophosphate가 첨가된 DMEM/F-12 1:1 Mixture에 음성 대조군에는 Bio-Oss[®]를 첨가시키지 않고 분주하였으며, 양성 대조군에는 10⁻⁷ M의 dexamethasone을 첨가하였고, 실험군은 100 µg/ml, 2 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml, 20 mg/ml 농도의 Bio-Oss[®]를 첨가하여 분주한 후 3일 동안 각각 배양하였다. 일정 배양시간이 지난 후 배지를 제거하고, trypsin-EDTA로 세포를 분리시키고 1,500 rpm에서 6분간 원심분리하였다. 상층액을 제거하고 0.2 ml의 멸균된 증류수를 첨가하여 초음파 분쇄기로 현탁하였다. 각 세포 현탁액 0.1 ml에 0.1 M glycine NaOH buffer (pH 10.4) 0.2 ml, 15 mM의 p-nitrophenyl phosphate (pNPP; Sigma, USA) 0.1 ml, 0.1% triton X-100/saline 0.1 ml와 멸균된 증류수 0.1 ml를 잘 혼합하여, 이 반응물을 37°C에서 30분간 배양하였다. 0.1 N NaOH를 0.6 ml 첨가함으로써 이들 반응을 중지시켰다. p-NPP의 가수분해는 410 nm 파장의 ELISA reader에서 흡광도의 차이로 나타나며, p-nitrophenol (p-NP; Sigma, USA)을 기준으로 이용했다. 단백질 농도는 BCA protein assay reagent

(Pierce, USA)를 사용하여 측정하였으며, bovine serum albumin을 standard로 하였고, ALP 활성도는 nM/min/mg of protein으로 나타내었다.

4. Mineralization assay

6-well plate에 세포를 1×10^5 /well가 되도록 분주한 후, 실험군에는 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 Bio-Oss[®]를 첨가한 DMEM/F-12 1:1 Mixture 2 ml을 배양액으로 하고, 음성 대조군에는 Bio-Oss[®]가 함유되지 않은 DMEM/F-12 1:1 Mixture 표준배양액을 배지로 이용하였고, 양성 대조군에는 10^{-7} M의 dexamethasone을 첨가하고 19일 동안 배양하였다. extracellular matrix mineralization을 유도하기 위해 19일 배양되기 이틀 전에 4 mM/L NaHPO₄를 첨가해서 배양하였으며 Alizarin red-S(AR-S)염색은 Stanford²⁰⁾의 방법을 사용하였다. 19일이 지난 후 배지를 제거하고, phosphate-buffered saline (PBS)로 세척하였다. Ice-cold

70 % ethanol로 한 시간동안 4°C에서 고정하고 ethanol을 제거한 후 40 mM/L AR-S (pH 4.2)로 실온에서 10분 동안 염색하였다. 염색된 부분은 도립현미경(Eclipse TE 300, Nikon, Japan)을 사용하여 촬영한 후 육안으로 비교 관찰하였다.

5. 통계분석

각각의 농도의 Bio-Oss[®]내 대조군과 실험군 간의 차이를 알아보기 위하여 각각의 ALP 활성도 값, bone nodule formation 면적을 one way ANOVA를 이용하여 실험결과에 유의성이 있는지를 통계적으로 검증하였다.

III. 결과

1. Bio-Oss[®]에 대한 hFOB1의 염기성 인산분해효소의 합성 계측

Table 1. Alkaline Phosphatase Activity of hFOB1 treated with Bio-Oss[®] (nM/min/mg, Mean \pm S.D.)

	C-	C+	100 μg	2mg	5mg	10mg	20mg
Bio-Oss [®]	0,224 \pm 0,012	0,402 \pm 0,007*	0,294 \pm 0,014*	0,252 \pm 0,019	0,25 \pm 0,017	0,237 \pm 0,009	0,238 \pm 0,014

* ; Statistically significant compared to negative control (p (0,05)

C- (negative control) ; added distilled water

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

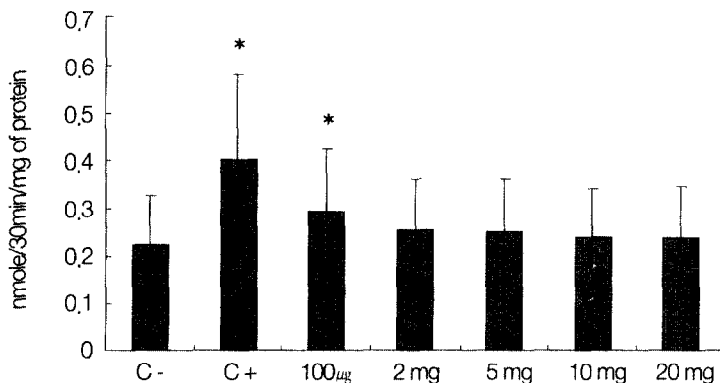


Figure 1. Alkaline Phosphatase Activity of hFOB1 treated with Bio-Oss[®]. Vertical bars represent standard deviation of four independent experiments.

* : Statistically significant difference compared to negative control (p<0,05)

Bio-Oss[®]가 hFOB1의 ALP의 합성에 미치는 영향을 평가하기 위하여 배양중인 hFOB1에 음성 대조군에는 Bio-Oss[®]를 첨가시키지 않고 분주하였으며, 양성 대조군에는 10⁻⁷M의 dexamethasone을 첨가하였고, 실험군은 100 μ g/ml, 2 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml, 20 mg/ml 농도의 Bio-Oss[®]를 첨가하여 분주한 후 3일 동안 각각 배양한 후 ALP의 합성을 계측한 결과, 3일군에서 음성대조군에 비해 양성대조군, 실험군 중 100 μ g/ml군이 통계학적으로 유의한 증가를 보였다 (Table 1, Figure 1).

2. Bio-Oss[®]에 대한 hFOB1의 Bone nodule formation

Bio-Oss[®]가 hFOB1의 Bone nodule formation에 미치는 영향을 평가하기 위하여 배양중인 hFOB1에 음성 대조군에는 Bio-Oss[®]를 첨가시키지 않고 분주하였으며, 양성 대조군에는 10⁻⁷M의 dexamethasone을 첨가하였고, 실험군은 100 μ g/ml농도의 Bio-Oss[®]를 첨가하여 분주한 후 19일 동안 배양하고 염색된 부분은 도립현미경 (Eclipse TE 300, Nikon, Japan)을 사용하여 촬영한 후 육안으로 비교 관찰한 결과, 음성 대조군과 양성 대조군에 비하여 Bio-Oss[®] 100 μ g/ml군에서 더 많은 mineralized nodule이 나타났다(Figure 2).

IV. 총괄 및 고찰

치주질환은 인류의 역사와 같이 해왔다고 여겨지며, 이에 대한 치료법이 1970년대까지는 치은절제술, 치주관막수술, 골수술을 이용한 치주낭의 철저한 제거였다. 이러한 치료법의 단점은 치주조직의 과도한 회생과 재생의 결핍 및 임상적으로 치아가 길어 보일 수 있다는 것이다. 1980년대에는 이러한 단점들을 알게되어 비수술적 치주치료가 주를 이루었으나, 수술적 및 비수술적 치주치료 결과를 종단학적으로 비교한 연구에 의하면 두 치료 모두 제한된 양의 재생과 긴 접합상피를 가지는 치유결과를 보인다는 것이다. 그리하여 1990년대에 들어 조직유도재생술, 이식재료 등을 이용한 치주조직의 재생에 초점이 맞추어졌다²¹⁾.

최근에는 초기단계이지만 국소적으로 다양한 성장인자를 투여해 재생을 얻는 방법이 각광을 받고 있다. 그러나 이들 성장인자는 대부분의 인체를 구성하는 전반적인 섬유아세포의 성장과 증식에 많은 영향을 미치므로 특정조직의 재생에는 임상시술과정에 고도의 기술을 요하게 된다. 또한 각종 종양조직에서 다량 발견되어 임상적용을 위한 안정성 연구가 부족하고 부작용에 관해 명확히 규명되어 있지 않기 때문에 아직 연구단계에 있는 실정이다.

골대사의 기본적인 방법은 골형성(Osteogenesis)을 통하여 기존에 존재하는 분화된 또는 결정된 선조골

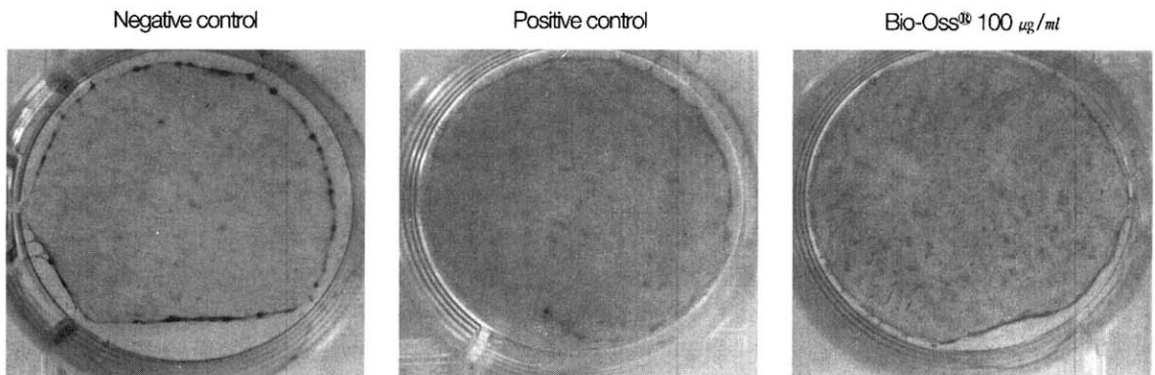


Figure 2. Formation of calcification nodules in hFOB1

세포(Osteoprogenitor cell)에 의하여 골이 형성되는 것으로 자가골 또는 골수이식에서 볼 수 있는 방법과 유도자극이 있을 때 미분화된 결체조직이 골형성세포로 분화되어 골 형성을 유도하는 골유도(Osteoinduction) 기전이 있으며, 골전도(Osteoconduction)는 직접적으로 골형성을 못하고 자극에 반응하지 않지만 혈관이 증식되게 하고 부복 치환(Creeping substitution)에 의하여 새로운 골형성을 하는 방법이다²²⁾.

이상적인 이식재의 조건으로는 골 형성 및 백악질 형성의 유도 능력이 있으며 숙주 조직에 대하여 친화성 및 생물학적 불활성이 있어야 하며 채취가 용이하고 경제적인 재료이어야 하는데 이러한 모든 조건을 만족하는 재료는 찾기가 힘들다²³⁾.

골이식 재료로는 자가골, 동종골, 이종골, 합성골이 사용될 수 있다. 그 중 골 이식재의 모든 요건을 구비했다고 여겨지는 자가골은 골형성(Osteogenesis), 골유도(Osteoinduction), 골전도(Osteoconduction) 세 가지 기전 모두를 이용하여 신생골을 형성하나 이차적 수술부위가 필요하고, 구강내에서는 충분한 양을 확보할 수 없으며, 치근흡수, 골성장지 등의 단점이 있다²⁴⁾. 동종골은 사체의 골을 동결, 동결 건조, 탈회 동결건조 및 방사선 조사를 통한 방법으로 제조된 골로 골 형성능력은 없는 이식재료이다. 공여부는 불필요하고, 충분한 양을 공급받을 수 있다는 점에서 자가골의 단점을 보완하고 있으나 다른 개체의 조직을 사용함으로써 인해 질병 전염의 가능성이 논란이 되고 있고, 숙주의 면역기능에 의한 거부 반응이 보고되기도 한다²⁵⁾. 합성골의 경우 다양한 구조나 크기 및 형태로 제작되어 공급되고 있으며, 일반적으로 사용되거나 연구되고 있는 합성골로는 calcium phosphate ceramics(hydroxyapatite와 TCP), calcium carbonate, polymer, bioactive glass ceramics 등이 있으나 조직학적인 연구에서 이들 합성골 이식은 거의 결합조직의 피막화에 의한 치유가 일어났다고 보고되었다²⁶⁾.

이에 이상적인 골 이식재료로서 이종골 이식재인 탈단백 우골이 평가되어 왔고, 이 이종골을 쥐에 매식한 실험에서 면역 반응을 일으키지 않고 골전도가 되는 것이 보고 되었다²⁷⁾. 대표적 이종골이식재료 Bio-Oss[®]가 치주과 영역에 사용되고 있는데 부가적

인 공여부가 필요 없고¹⁶⁾, 유기물질의 제거를 위하여 비교적 낮은 온도(300℃)에서 화학적인 과정을 통하여, 골의 자연적인 구조를 유지한다고 보고되었으 며¹⁷⁾ 표면적, 다공성, 입자의 크기, calcium/phosphorous 비율과 같은 지수의 평가에 있어서도 탈회 냉동 건조골이나 합성 hydroxyapatite에 비하여 사람의 망상골과 매우 유사하다고 보고되었다. 또한 Kinge 등¹⁸⁾은 다른 물질에 비해 초기 골형성을 촉진한다고 보고하였다. 또한 Bio-Oss[®]는 이식재가 신생 증판골과 치밀하게 접촉하므로 흡수성 골전도 물질로 작용하는 것으로 보였다. Wetzel 등¹⁹⁾은 beagle dog에 Bio-Oss[®]를 이용한 실험적 증대술을 통해 이 재료가 신생골 형성을 촉진하는 골전도 물질이라고 하였다. Thaller 등²⁸⁾은 토끼 두개모형에서 Bio-Oss[®]가 흡수되어 정상적인 생리적 골개조를 보임을 보고 하였다. Skoglund 등²⁹⁾은 생검에서 약 44개월 후 매식된 입자 주위에서 골재생을 보고하였고, Clergeau 등³⁰⁾은 Bio-Oss[®]와 콜라겐을 이용한 사람의 골내당의 생검을 전자현미경으로 관찰한 후 많은 골 침착 부위 뿐 아니라 파골강과 같이 존재하는 혈관통로를 관찰 하였음을 보고하였다. Cohen 등³¹⁾에 의하면 사람의 골내당에서 2.6mm의 골높이의 증가 69%의 골재생을, 1991년 Brion은 골 높이 3.1mm의 증가와 65%의 골 재생을 보고하였다. 이런 탈단백 무기질 골은 사용의 편리성과 채취의 용이성으로 매식체 식립시, 상악동 거상술과 발치와 결손부 증대술을 위해, 그리고 치주적 결손부에 골 이식재료로서 사용되어 왔으나 몇몇 중례 보고에서 이 재료의 조직학적 평가가 이루어진 반면^{32, 33)}, 대부분의 연구에서는 임상적인 관찰에 근거하여 평가하고 있다²⁸⁻³¹⁾.

Alkaline Phosphatase (ALP)는 유기인산 에스테르를 가수분해하여 석회화가 이루어지는 부위에서 국소적으로 인산이온의 농도를 증가시키는 효소로서, 세포외기질에 인산칼슘을 침착시켜 석회화를 유도하는 기능을 갖는다고 알려져 있다³⁴⁾. De Bernard³⁵⁾는 ALP가 국소적으로 인산이온 농도를 증가시켜 단백질의 인산염으로 전환시키고 이것이 칼슘결합 성향을 가지면서 석회화의 핵 역할을 한다고 하였다. 본 연구의 양성대조군에 첨가한 dexamethasone은

조골유사세포를 분화시켜 골 형성을 증가시킨다고 하며³⁶⁾, 쥐의 두개골과 골수에서 채취한 조골성 dexamethasone으로 처리한 경우 골 특이 단백질인 osteopontin과 ALP, osteocalcin 등의 합성이 증가한다고 하였다³⁷⁾. 한편, dexamethasone이 부족한 배지에서는 치주인대세포 뿐만 아니라 조골유사세포도 결절과 같은 물질을 형성시키지 못한다고 하였다³⁸⁾.

본 연구에서는 100 $\mu\text{g/ml}$, 2 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml, 20 mg/ml 농도의 Bio-Oss[®]를 hFOB1에 투여하여 ALP의 합성량을 측정 한 결과, 농도 의존적 양상은 보이지 않았으며 3일군에서 음성 대조군에 비해 양성 대조군, 실험군 중 100 $\mu\text{g/ml}$ 군이 통계학적으로 유의한 증가를 보였다.

Mineralization assay를 위한 Stanford 등의 방법을 사용한 AR-S로 염색한 결과 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 Bio-Oss[®]를 첨가한 실험군에서 Bio-Oss[®]가 함유되지 않은 음성 대조군과 10^{-7} M의 dexamethasone을 첨가한 양성 대조군에 비하여 다량의 bone nodule 형성을 관찰할 수 있었다.

본 연구 결과 Bio-Oss[®]는 hFOB1의 ALP 활성을 증가시켜 세포외기질에 calcium phosphate를 침착시켜 골형성의 핵 역할을 하도록 함으로써 석회화를 유도하여 hFOB1의 분화와 성숙에 중요한 기능을 할 것으로 사료된다. 앞으로 골형성과 관련된 다양한 측정법을 사용한 더욱 세밀한 평가와 cytokine 및 성장인자 등 골개조와 관련된 물질과 Bio-Oss[®]의 병용시 상승효과를 나타낼 수 있는지에 대해서도 향후 심도있는 연구가 필요하리라 생각되며, 더 나아가 임상적 활용 방안을 모색할 필요가 있으리라 사료된다.

V. 결론

본 연구는 100 $\mu\text{g/ml}$, 2 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml, 20 mg/ml 농도의 Bio-Oss[®]를 사람 태아 골모세포주인 hFOB1에 투여 배양한 후, 염기성인산분해효소(ALP) 합성능 및 bone nodule 형성을 분광측광기 및 미세 현미경 사진을 이용하여 측정 한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. ALP의 합성량을 측정 한 결과, 농도 의존적 양상

은 보이지 않았으며 3일군에서 음성대조군에 비해 양성대조군, 실험군 중 100 $\mu\text{g/ml}$ 군이 통계학적으로 유의한 증가를 보였다.

2. Mineralization assay를 위한 Stanford 등의 방법을 사용한 Alizarin red-S(AR-S)로 염색한 결과 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 Bio-Oss[®]를 첨가한 실험군에서 Bio-Oss[®]가 함유되지 않은 음성 대조군과 10^{-7} M의 dexamethasone을 첨가한 양성 대조군에 비하여 다량의 bone nodule 형성을 관찰할 수 있었다.

이상과 같은 결과로 Bio-Oss[®]는 hFOB1의 ALP 합성에 영향을 미치는 것으로 나타났으며, 이를 이용해 앞으로 골형성과 관련된 다양한 측정법을 사용한 더욱 세밀한 평가가 이루어져야 할 것이다. 또한 cytokine 및 성장인자 등 골개조와 관련된 물질과 Bio-Oss[®]의 병용시 상승효과를 나타낼 수 있는지에 대해서도 향후 심도있는 연구가 필요하리라 생각된다.

VI. 참고문헌

1. Caton J.G., Greenstein G. : Factors related to periodontal regeneration, Periodontol 2000; 1: 9-15, 1993.
2. Listgarten M.A., Rosenberg M.M. : Histological study of repair following new attachment procedures in human periodontal lesions. J Periodontol 1979;50: 333-344.
3. Hammarstrom L. : Enamel matrix, cementum development and regeneration. J Clin Periodontol 1997;24: 658-668.
4. Lynch S.E., de Castilla G.R., Williams R.C., Kiristy C.P., Howell T.H., Reddy M.S., Antoniadis H.N. : The effects of short-term application of a combination of platelet-derived and insulin-like growth factors on periodontal wound healing. J Periodontol 1991;62: 458-467.
5. 신승윤, 이용무, 구 영, 배기환, 정종평. : 후박 및 홍화종자 추출혼합물이 치주인대세포 및 골아세

- 포의 활성화 및 백서의 두개골 재생에 미치는 영향. 대한치주과학회지 1998;28: 545-557.
6. 두진수, 강정구, 유형근, 신형식. : 생약제제가 세포활성도에 미치는 영향. 대한치주과학회지 1997;27: 459-468.
 7. 강정구, 유형근, 신형식. : 홍화씨 추출물이 치주인대세포와 조골유사세포의 골 광물화 작용에 미치는 효과. 대한치주과학회지 1998;28: 475-489.
 8. 이광수, 홍성우, 유경태, 유형근, 김윤철, 신형식. : 홍화씨 성분 분리 추출물이 치주인대세포와 조골모유사세포의 광물화에 미치는 영향. 대한치주과학회지 1998;28: 745-754.
 9. Rosenberg M.M. : Free osseous tissue autografts as a predictable procedure. J Periodontol 1971;42: 195-209.
 10. Rummelhart J.M., Mellonig J.T., Gray J.L., Towel H.J. : A comparison of freeze-dried bone allograft and demineralized freeze-dried bone allograft in human periodontal osseous defects. J Periodontol 1989;60: 655-663.
 11. Carranza F.A., Kenney E.B., Lekovic V., Talamante E., Valencia J., Dimitrijevic B. : Histologic study of healing of human periodontal defects after placement of porous hydroxyapatite implants. J Periodontol 1987;58: 682-688.
 12. Baldock W.T., Hutchens L.H., McFall W.T., Simpson D.M. : An evaluation of tricalcium phosphate implants in human periodontal osseous defects of two patients. J Periodontol 1985;56: 1-7.
 13. Yukna R.A. : Clinical evaluation of coralline calcium carbonate as a bone replacement graft material in human periodontal osseous defects. J Periodontol 1994;65: 177-185.
 14. Froum S.J., Weinberg M.A., Tarnow D. : Comparison of bioactive glass synthetic bone graft particles and open debridement in the treatment of human periodontal defects. A clinical study. J Periodontol 1998;69: 698-709.
 15. Garret S. : Periodontal regeneration around natural teeth. Ann, Periodontol 1996;1: 621-666.
 16. Cohen R, Mullarky R, Noble B, Comeau R, Neiders: Phenotypic characterization of mononuclear cells following anorganic bovine implantation in rats. J periodontol 1994;65: 1008.
 17. Gross J. Bone grafting material for dental application: A practical guide. Compendium 1997;18: 1013-1036.
 18. Klinge B., Alberius P., Isaksson S., Jonsson J.: Osseous response to implanted natural bone mineral and synthetic hydroxylapatite ceramics in the repair of experimental skull bone defects: J Oral Maxillofac Surg 1992;50: 241-249.
 19. Wetzel AC, Stich H, Caffese RG: Bone apposition onto oral implants in the sinus area filled with different grafting materials: Clin Oral Implants Res 1995;6: 155-163.
 20. Stanford CM., Jacobson PA., Eanes ED., Lembke L.A., Midura R.J. : Rapidly forming apatitic mineral in an osteoblastic cell line (UMR 106-01 BSP). J Biol Chem 1995;270: 9420-9428.
 21. Froum S.J., Gomez C. : Periodontal regeneration. Current Opinion Periodontol 1993;1:111-128.
 22. Lane J.M., Sandhu HS : Current approaches to experimental bone grafting. Orthop. Clin North Am 1987;18 : 213-225.
 23. Issahakian S., Ouhayoun J.P. : Evaluation clinique et histologique d'un nouveau materiau de comblement: le corail naturel. J Parodontologie 1989;8:251-259.
 24. Ellegaard B, Karring T, Loe H. : Retardation of epithelial migration in new attachment attempts in infrabony defects in monkeys. J Clin Periodontol 1976;3: 23-37.
 25. Garraway R., Young WG., Daley T., Harbrow D., Bartold P.M. : An assessment of the osteoin-

- ductive potential of commercial demineralized freeze-dried bone in the murine thigh muscle implantation model. *J Periodontol* 1998;69:1325-1336.
26. Froum S., Kushner L., Scopp I., Stahl S. : Human clinical and histologic response to durapatite implants in intraosseous lesions. case reports. *J periodontol* 1982;53: 719-725.
 27. Cohen RE., Mullarky R.H., Noble B., Comeau R.L., Neiders M.E. : Phenotypic characterization of mononuclear cells following anorganic bovine bone implantation in rats. *J Periodontol* 1994;65: 1008-1015.
 28. Thaller S, Hoyt J, Dart A, Borjesen K, Tesluk H. : Repair of experimental calvarial defects with Bio-Oss particles and collagen sponges in a rabbit model. *J Craniofac Surg* 1994; 5: 242-246.
 29. Skoglund A, Hising P, Young C. : A clinical and histologic examination in humans of the osseous response to implanted natural bone mineral. *Int. J Oral Maxillofac Impl* 1997; 12: 194-199.
 30. Pinholt E.M., Bang G., Haanaes H.R. : Alveolar ridge augmentation in rats by Bio-Oss. *Scand. J Dent Res* 1991; 99: 154
 31. Brion M. : Anorganic bone plus collagen in the treatment of periodontal intrabony lesions. *AAP Meeting in Details*, 1990. *J Periodontol* 1991; 62, abstr 83.
 32. Cohen R., Mullarky R., Noble B., Comeau R., Neiders M. : Phenotypic characterization of mononuclear cells following anorganic bovine implantation in rats. *J Periodontol* 1994; 65: 1008.
 33. Camelo M., Nevin M., Schenk R., Simion M., Rasperini G., Lynch S., Nevin M. : Clinical, radiographic and histologic evaluation of human periodontal defects treated with Bio-Oss and Bio-Guide. *Int. J Periodont Rest Dent* 1998; 18 : 321.
 34. Beertsen W., van den Bos T. : Calcification of dentinal collagen by cultured rabbit periosteum: The role of alkaline phosphatase. *Matrix* 1989;9(2): 159-171.
 35. de Benard B. : Glycoproteins in the local mechanism of calcification. *Clin Orthop* 1982;162: 233-244.
 36. Tenenbaum H.C., Heersche J.N. : Dexamethasone stimulates osteogenesis in chick periosteum in vitro. *Endocrinology* 1985;117(5): 2211-2217.
 37. Owen T.A., Aronow M., Shalhoub V., Barone L.M., Wilming L., Tassinari M.S., Kennedy M.B., Pockwinse S., Lian J.B., Stein G.S. : Progressive development of the rat osteoblast in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. *J Cell Physiol* 1990;143(3): 420-430.
 38. Yamashita Y., Sato M., Noguchi T. : Alkaline phosphatase in the periodontal ligament of the rabbit and macaque monkey. *Arch Oral Biol* 1987;32(9): 677-8.

Effects of a xenographic bovine bone on the bone mineralization in human fetal osteoblasts

Ki-Jong Sun, Ha-Na Hyun, Hyung-Keun You, Hyung-Shik Shin

Department of Periodontology, School of Dentistry, Wonkwang University

The ultimate goal of periodontal therapy is to promote the regeneration of lost periodontal tissue, there have been many attempts to develop a method to achieve this goal, but none of them was completely successful. The purpose of this study is to evaluate the effects of Bio-Oss® on alkaline Phosphatase (ALP) activity in human fetal osteoblasts (hFOB1). The results of this study were as follows, in ALP Activity, 100 $\mu\text{g/ml}$ Bio-Oss® treated group showed significantly increased value than negative control group, but positive group (10⁻⁷ M dexamethasone treated group) showed the highest ALP activity at 3 day. In mineralization assay, numerous mineralized nodules were identified as darkly stained spots in 100 $\mu\text{g/ml}$ Bio-Oss® treated group than two control groups, whereas a small number of mineralized nodules were showed in the positive control. ALP may relate to the initial phase of bone nodule formation. On the basis of these results, this study showed Bio-Oss® is capable of accelerating new bone formation through hFOB1 differentiation *in vitro*.

Key words : bovine bone, human fetal osteoblasts, alkaline phosphatase