

# rhBMP-2가 저칼슘식이 투여 백서의 골결손부 치유에 미치는 영향

경희대학교 치과대학 구강악안면방사선학교실  
최용석 · 황의환 · 이상래

## Effect of rhBMP-2 on the healing of bone defect in the low calcium diet rat

Yong-Suk Choi, Eui-Hwan Hwang, Sang-Rae Lee

Department of Oral and Maxillofacial Radiology, College of Dentistry, Kyung Hee University

### ABSTRACT

**Purpose** : To investigate the effect of rhBMP-2 on the healing of bone defect in the low calcium diet rat.

**Materials and Methods** : To prepare the experimental model, control group was fed a normal diet and experimental group was fed a low calcium diet for 3 weeks. And then, 4 mm bicortical perforated bone defect was made on mandibular body of each rats. Experimental group was subdivided into two groups; experimental group 1 (rats given a low calcium diet before and after bone defect) and experimental group 2 (rats given a low calcium diet before and after bone defect with rhBMP-2 application). At 1, 3, 5 and 7 weeks after bone defect formation, the rats were terminated. The healing of bone defect was assessed by three-dimensional computerized tomography, soft x-ray radiography, and histopathological examination.

**Results** : The wound healing of the bone defect for control group, experimental group 1, and experimental group 2 showed a increase from 3 weeks after bone defect formation. The experimental group 2 showed a more increase in healing amount than control group and experimental group 1 from 5 weeks after bone defect formation and the experimental group 2 showed a complete recovery of bone defect at 7 weeks after bone defect formation.

**Conclusion** : The healing process of bone defect is accelerated by rhBMP-2 application in the low calcium diet rats. (Korean J Oral Maxillofac Radiol 2004; 34 : 35-48)

**KEY WORDS** : Wound Healing; BMP-2; Osteoporosis

### 서 론

골격계는 골형성과 골소실의 조화와 균형에 의하여 정상 골량을 유지한다. 이러한 골교체 과정은 골격을 유지하고 기능을 수행하는데 있어 중요한 역할을 한다. 그러나 폐경에 따른 여성호르몬의 변화, 연령의 증가에 따른 칼슘 흡수의 감소 등에 의해 골대사의 항상성에 불균형이 초래되면 골량의 소실을 일으키는 골다공증이 발생한다.<sup>1-3</sup>

이러한 골다공증은 골의 화학적 성분에는 변화가 없으나, 단위용적당 골량이 감소하는 대사성 골질환으로 전신성과 국소성으로 분류되는데, 전신성 골다공증은 폐경 후 또는 노인성으로 발생하는 원발성과 쿠싱증후군, 갑상선기능항진

증, 부신피질호르몬과 헤파린 투여 등에 의해 발생하는 속발성으로 다시 나뉘며, 국소성 골다공증도 원발성과 근위축 및 운동부족 등에 의한 속발성으로 분류된다.<sup>4,6</sup> Rigg와 Melton<sup>7</sup>은 원발성 골다공증을 폐경기성 골다공증인 I형과 노인성 골다공증인 II형으로 분류하였는데, 폐경기성 골다공증은 에스트로겐의 감소와 관련이 있으며,<sup>8,9</sup> 골흡수의 항진으로 인한 대사회전이 높은 형인 반면, 노인성 골다공증은 주로 골형성의 감소가 일어나는 대사회전이 낮은 형으로서, 성장인자의 생산이나 그 작용이 저하되고, 조골세포로 분화되는 전구세포의 수적인 감소로 발생된다.<sup>10</sup>

골다공증은 외상 등에 의한 골절의 발생 뿐만 아니라 연골조직의 치유 및 발치와나 골결손부 치유에도 많은 영향을 미친다.<sup>11-14</sup> Matsumoto 등<sup>12</sup>은 백서의 하악과두에서 연골세포의 발육이 저하되고 세포외기질의 석회화가 감소한다고 하였고, Smith<sup>13</sup>는 백서 발치창 치유시 신생골의 형성장애와 석회화의 지연이 발생된다고 하였으며, Lindholm<sup>14</sup>는 백서의 경골 골절시 치유과정에서 신생골의 형성과 석회화

접수일 : 2004년 1월 5일; 심사일 : 2004년 1월 6일; 채택일 : 2004년 1월 29일  
Correspondence to : Prof. Sang-Rae Lee  
Department of Oral and Maxillofacial Radiology, College of Dentistry, Kyung Hee University, 1 Hoegi-dong, Dongdaemun-gu, Seoul 130-701, Korea  
Tel) 82-2-958-9404, Fax) 82-2-965-1256  
E-mail) sangrae@khu.ac.kr

가 지연된다고 하였다.

노령인구의 증가와 함께 늘어나는 골다공증의 경우, 이상적인 치료방법은 골밀도를 골절 역치 이상으로 증가시킬 수 있으며, 골의 구조를 회복시켜 골절률을 감소시키고 골결손부에 대한 치유를 촉진할 수 있는 것이라 할 수 있다.<sup>15</sup> 그러나 현재까지의 주된 치료방법은 골흡수를 억제하여 골량을 유지시키며, 골절의 위험도를 낮추는 것으로,<sup>16-18</sup> 이러한 치료에 따른 골량의 증가는 크지 않지만 골절률이 감소되는 것은 골교체율의 감소에 기인하는데, 골흡수를 억제하는 장기간의 치료방법은 조골세포의 기능까지 감소시킬 수 있다.<sup>15,18</sup> 따라서 파골세포에 의해 소실된 골기질을 회복하고 골격계의 항상성을 유지하는 활동적인 골형성을 위해서는 조골세포의 분화가 필수적인 요소로 관여할 것으로 생각된다.

골형성을 증진시킬 수 있는 방법으로는 불소,<sup>19</sup> 소량의 부갑상선 호르몬<sup>20</sup> 및 성장인자<sup>15</sup> 등의 투여를 들 수 있다. 이 중에서 골결손이 발생할 때 국소적으로 사용 가능한 성장인자들로는 골형성단백질 (bone morphogenetic protein; BMP), 인슐린유사 성장인자 (insulin-like growth factor; IGF), 형질변형 성장인자 (transforming growth factor- $\beta$ ; TGF- $\beta$ ) 등이 있다.<sup>15,17,18</sup>

광범위한 골결손을 회복하거나, 성공적인 임플란트 시술 등을 위해 필요한 골질과 골량을 증가시키기 위해서는 치유에 도움을 줄 수 있는 자가골이나 생체재료가 필요하다. 현재 임상적으로 가장 우수하다고 알려져 있는 자가골을 획득하기 위해서는 부가적인 수술이 필요하며, 또한 채취 가능한 골량이 한정되어 있다. 따라서 자가골을 대체할 수 있는 생체재료가 요구되는데, 특히 골다공증 상태의 노령인구에서는 더욱이 이의 필요성이 요구된다.

골재생과 치유에 관여하는 생체재료는 손상골의 치유시 골결손의 매식체 주변으로 골발생이 일어날 수 있는 환경을 유지하는 골전도 및 매식체가 주위로부터 전구세포나 미분화간엽세포의 이주를 촉진하며, 이를 조골세포로 분화시켜 골형성을 유도하는 골유도의 과정으로 골재생 및 치유를 야기한다. 이 중 골유도 과정에 골형성단백질이 관여하는 것으로 알려지면서 이에 대한 많은 연구가 이루어졌다.<sup>21-23</sup> Urist<sup>21,22</sup>가 탈회골의 골기질을 쥐의 근육에 삽입한 후 이소성 골형성이 발생됨을 보고하였고, 골기질에 존재하는 이 성분을 BMP라고 명명하였다. Wozney 등<sup>24</sup>은 TGF- $\beta$  군에 속하는 BMP를 아미노산 배열에 따른 BMP-1, BMP-2, BMP-3, 그리고 BMP-4의 유전자를 암호화하는 클론 (clone)을 구명하였으며, 현재까지 최소한 13종의 BMP가 발견, 보고되었다.<sup>24-28</sup> Mundy<sup>15</sup>는 골다공증에 대한 이상적인 치료제로서 BMP의 우수성을 제시하였으며, Suzawa 등<sup>29</sup>은 BMP-2에 의한 조골세포 분화능의 증진은 골다공증과 같은 골질환의 치료 시에 중요한 역할을 할 수 있다고 보고하였다.

한편 이들 BMP들을 골결손부에 적용시킬 경우, 골형성에 장애를 주지 않으면서 결손부에 균일하게 확산 시킬 수 있는 담체가 필요하다. 이러한 담체로는  $\beta$ -tricalcium phosphate,<sup>30</sup> polylactic polyglycolic acid polymers,<sup>31</sup> porous hydroxyapatite,<sup>32</sup> collagen membrane,<sup>33,34</sup> collagen gel<sup>33</sup> 등이 이용되고 있다.

골다공증 상태에서 골결손이 발생된 경우, 치유가 지연되므로 골결손부의 정상적인 치유를 도모하기 위해서는 골결손부위의 골형성을 촉진시킬 수 있는 치료방법의 선택이 중요하다고 할 수 있다. 따라서 본 연구는 골유도능이 우수하다고 알려진 recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2)가 골다공증 상태의 골결손부 치유에 미치는 영향을 구명하는데 목적이 있다.

## 재료 및 방법

### 1. 재 료

실험동물로는 일정한 조건 하에서 사육된 체중 350 gm 내외의 Sprague Dawley계 웅성 백서 60마리를 사용하였으며, 이들을 실험목적에 따라 정상식이군을 대조군으로, 저칼슘식이군 (실험 1군)과 저칼슘식이 및 rhBMP-2 적용군 (실험 2군)을 실험군으로 하여 각 군에 백서 20마리씩을 배정하였다.

### 2. 방 법

#### 1) 식이 투여

정상식이군에는 칼슘 1.25%, 인 0.95%, 비타민 D 340 IU/100 mg이 함유된 백서용 고행사료 (Samyang Oil and feed Co., Ltd., Korea)와 상수도물을, 저칼슘식이군에는 칼슘 0.01%, 인 0.95%, 비타민 D 340 IU/100 gm이 함유된 백서용 고행사료 (Oriental Yeast Co., Ltd., Japan)와 멸균된 증류수를 자유섭취 시켰다.

#### 2) 골결손부 형성

대조군에게는 정상식이를, 실험 1군과 실험 2군에게는 저칼슘식이를 3주간 각각 투여한 후, 실험동물용 마취제인 Zoletil (Vibrac Laboratories, France)을 체중 100 gm당 0.02 ml씩 근육 내 주사하여 전신 마취시킨 다음, 하악 하연에서 절개하고 골막을 박리한 후, 치과용 절삭 bur를 사용하여 하악체 부위에 양측 피질골을 관통하는 직경 4 mm의 원형의 골결손부를 형성하였다. 그 후, 대조군과 실험 1군에는 흡수성 I형 교원질막 (absorbable type I collagen membrane, Sulzer Dental Inc. USA)만을 매식하였다. 한편, 실험 2군에는 rhBMP-2 (Sigma-Aldrich Co., USA)를 0.1% serum albumin을 포함한 phosphate buffered saline (PBS)에 50  $\mu$ g/mL 농도로 하여 20  $\mu$ L를 흡수성 I형 교원질막에 흡착시켜 매식하

었다. 또한 실험 각 군에는 감염 방지를 위하여 겐타마이신 (Dongshin Pharmacy Co., Korea) 0.1 ml를 3일간 근육 내 주사하였다.

### 3) 실험동물의 희생 및 하악골 적출

골결손부 형성 후, 1주, 3주, 5주, 7주가 경과된 후에 각 군의 실험동물을 관류고정하여 희생시킨 다음, 하악골을 적출하였다.

## 4) 관찰

### (1) cone beam형 3차원 전산화 단층영상 관찰

실험동물용 마취제인 Zoletil (Vibrac Laboratories, France)을 0.02 ml/100 gm을 복강 내 주사하여 전신 마취시킨 다음, PSR-9000 Dental CT system (Asahi Roentgen Ind. Co., Ltd., Japan)을 이용하여 촬영하였으며, 촬영조건은 관전압 60 kVp, 관전류 2 mA, 조사시간은 13.3초로서, 자체 제작한 고정판위에 고정하여 촬영 중 움직임이 발생하지 않도록 하였다. 영상처리는 workstation (Dual Xeon Process 2.8GHz)에서 window용 Asahi Vision software로 하였으며, 3차원 영상 재구성시 임계치를 550으로 설정하여 영상을 획득하여 관찰하였다.

### (2) 연X선사진 관찰

연X선사진촬영에 사용된 X선 발생장치는 Hitex HA-80 (Hitex Co., Ltd., Japan)이었고, 사용된 필름은 Fuji X-ray FR (Fuji Photo Film Co., Ltd., Japan)이었으며, X선 촬영조건은 관구와 필름간의 거리가 60 cm, 관전압 30 kVp, 관전류 2.5 mA, 조사시간은 20초이었다. 촬영된 필름은 20°C에서 Rendol (Fuji Photo Film Co., Ltd., Japan)으로 2분간 현상하였으며, RenFix (Fuji Photo Film Co., Ltd., Japan)로 4분간 정착하였고, 수세, 건조한 후 관찰하였다.

### (3) 병리조직학적 관찰

절취한 하악골을 10% 중성 formalin 용액에 충분히 고정 한 후, Calci-clean Rapid (National Diagnostic Co., USA)로 탈회시켜 통법에 따라 paraffin 포매하고, 6-8 μm 두께의 연속절편을 만들어 hematoxylin-eosin 이중염색과 Van Gieson 염색을 시행하여 골치유 양상을 광학현미경으로 관찰하였다.

## 결 과

### 1. cone beam형 3차원 전산화 단층영상

#### 1) 대조군

실험 1주에는 골결손 부위의 골형성 소견이 관찰되지 않았으나, 실험 3주에는 골결손부의 변연에서 골형성 소견이 관찰되기 시작하여, 실험 5주군에서는 골결손부의 변연으로부터 심부로 진행된 골형성 소견이 관찰되었다. 실험 7주에

는 보다 진행된 골형성 소견이 관찰되었으나, 전체 골결손부의 회복은 관찰되지 않았다 (Fig. 1-a, b, c, d).

#### 2) 실험 1군

실험 1주에는 골결손 부위에서 골형성 소견이 관찰되지 않았으며, 실험 3주에는 골결손부의 변연에서 골형성 소견이 관찰되었으나, 골형성은 대조군에 비해 미약하였다. 실험 5주에는 골결손부의 변연으로부터 심부로 진행된 골형성 소견이 관찰되었고, 실험 7주에는 진행된 골형성 소견이 관찰되었으나, 결손부의 전체가 회복되지 않았고, 이의 정도는 대조군에 비해 미약하였다 (Fig. 2-a, b, c, d).

#### 3) 실험 2군

실험 1주에는 골결손 부위에서 골형성 소견이 관찰되지 않았으나, 실험 3주에는 골결손부의 변연에서 뿐만 아니라 심부에서도 골형성 소견이 관찰되었으며, 실험 5주에는 골결손부의 변연 및 심부 전체에 걸친 골형성 소견이 관찰되었다. 실험 7주에는 보다 더 진행된 골형성 소견이 관찰되었고, 전체 골결손부의 회복도 관찰되었다 (Fig. 3-a, b, c, d).

## 2. 연X선 사진 소견

### 1) 대조군

실험 1주에는 골결손 부위에 골형성 소견이 보이지 않았으나, 실험 3주에는 골결손부의 변연에서 신생골의 형성이 관찰되었으며, 실험 5주에는 골결손부의 변연으로부터 심부로 골소주의 형성이 관찰되었다. 실험 7주에는 실험 5주에 비하여 뚜렷한 골소주가 관찰되었다. 그러나 골결손부의 전체가 회복되지는 않았으며, 골형성된 부위의 골소주는 보다 치밀하게 관찰되었다 (Fig. 4-a, b, c, d).

### 2) 실험 1군

실험 1주에는 골결손 부위에 골형성 소견이 보이지 않았으며, 실험 3주에는 골결손부의 변연에서 미약한 신생골의 형성이 관찰되었으나, 대조군에 비하여 신생골의 양이 적게 관찰되었고, 정상 주위 골소주의 비박된 소견이 관찰되었다. 실험 5주에는 변연으로부터 심부로 골형성 소견이 관찰되었으나, 대조군에 비하여 골형성 정도가 미약하였으며, 골소주 양상도 치밀하지 못하였다. 실험 7주에는 실험 5주에 비하여 골형성 정도가 증가되었지만, 골결손부의 회복이 이루어지지 않는 것이며, 골형성 부위의 골소주는 대조군에 비해 비박된 소견이 관찰되었다 (Fig. 5-a, b, c, d).

### 3) 실험 2군

실험 1주에는 골결손 부위에 골형성 소견이 보이지 않았으나, 실험 3주에는 골결손부의 변연에서 신생골의 형성이 관찰되었으며, 대조군에 비해 골결손부의 중앙부에서도 신생골의 형성이 관찰되었다. 실험 5주에는 골결손부의 변연 및 심부에서의 골형성 소견이 관찰되었고, 뚜렷한 골소주

양상이 관찰되었다. 대조군보다는 골결손부의 넓은 부위에서 골형성이 관찰되었으며, 실험 1군보다는 골소주 양상도 치밀하게 관찰되었다. 실험 7주에는 보다 뚜렷한 골소주가 관찰되었으며, 전체 골결손부의 회복이 이루어지는 소견도 관찰되었다. 골소주의 형성이 실험 1군에 비해서는 치밀하였으나, 대조군에 비하여 골소주가 비박된 부위도 관찰되었다(Fig. 6-a, b, c, d).

### 3. 병리조직학적 소견

#### 1) 대조군

실험 1주에는 골결손부에 응혈피와 이식재가 관찰되었으며, 골결손부위의 변연으로부터 섬유모세포와 모세혈관을 가진 섬유성 결합조직이 관찰되었다. 실험 3주군에서는 골결손부 내에 골양조직의 형성과 많은 수의 신생 골소주가 활성화된 양상으로 관찰되었으며, 골결손부의 변연부에서 잘 분화된 조골세포가 관찰되었다. 실험 5주에는 골결손부에 점차로 골조직이 형성되어 성숙된 골소주 양상을 보이는 골개조 소견이 관찰되었고, 실험 7주군에서는 골결손부의 석회화가 더욱 진행되었고, 골소주도 치밀해졌으며, 정상에 가까운 성숙된 골소주가 치밀하게 배열되었다(Fig. 7-a, b, c, d).

#### 2) 실험 1군

실험 1주에는 골결손부에 응혈피와 이식재가 관찰되었고, 골결손부의 변연으로부터 섬유모세포와 모세혈관을 가진 섬유성 결합조직이 관찰되었다. 실험 3주에는 골결손부 내에 골양조직의 형성과 많은 수의 신생 골소주가 관찰되었으나, 대조군에 비하여 매우 미약하였고, 손상받지 않은 부위의 골조직은 매우 위축되어 가늘거나 불규칙한 양상의 골소주가 성기게 배열하여 골소주 간격이 넓게 나타났으며, 골결손부에는 교원섬유가 치밀하게 배열되었다. 실험 5주에는 골결손부의 변연에서 부분적으로 신생 골조직이 미약하게 형성되었으며, 골결손부의 심부에는 교원섬유가 다발을 이루기 시작하였으나, 골화되는 소견은 관찰할 수 없었고, 실험 7주에도 골결손부의 변연부에 미약한 골형성 소견이 관찰되었으나, 골결손부의 심부는 치밀한 교원섬유로 채워져 있었다(Fig. 8-a, b, c, d).

#### 3) 실험 2군

실험 1주에는 골결손부에 응혈피와 이식재가 관찰되었으며, 골결손부의 변연으로부터 많은 섬유모세포와 모세혈관을 가진 섬유성 결합조직이 관찰되었다. 실험 3주에는 골결손부 변연과 심부에 골양조직의 형성과 많은 수의 신생 골소주가 관찰되었으며, 대조군과 실험 1군에 비하여 보다 골결손부의 넓은 부위에서 신생골 형성이 관찰되었다. 실험 5주에는 점차 골조직이 형성되어 골소주가 성숙되고 치밀해지는 양상이 관찰되었으나, 손상받지 않은 인접한 골조직은

골수강이 넓고, 골소주의 배열이 성긴 골다공성 양상이 관찰되었다. 실험 7주에는 석회화가 진행된 소견이 관찰되었으며, 골소주가 치밀해지는 소견이 관찰되었고, 골결손부의 대부분에서도 골소주의 치밀한 배열이 관찰되었다(Fig. 9-a, b, c, d).

## 고 찰

골다공증은 척추, 늑골, 골반골 등에서 뚜렷한 골량의 감소를 보이지만,<sup>10,35,36</sup> 악골에서도 현저한 골량의 감소가 나타난다.<sup>37,38</sup> Ulm 등<sup>37</sup>은 연령이 증가함에 따라 70세 이상의 노령인구에서 하악골의 피질골과 해면골의 골량이 감소됨을 보고하였고, Hirai 등<sup>39</sup>은 골다공증시 악골의 골량 감소로 인한 치조골의 흡수가 일어남을 보고하였다.

실험적으로 골다공증을 유발시키는 방법에는 저칼슘식이 투여법, 좌골신경절단술, 부동화, 편측척수신경로 절단술, 난소 적출술 등이 있는데,<sup>40-42</sup> 본 실험에서는 저칼슘식이 투여법을 이용하여 백서에 골다공증을 유발시켰다. 본 실험에서 저칼슘식이에 사용된 칼슘의 함량은, 성숙 백서의 체내 칼슘요구량이 0.5%라는 Henry와 Kon<sup>43</sup>의 보고와 선행들의 연구<sup>12,44,45</sup>에서 이용된 칼슘함량을 참조한 0.01%이었으며, 또한 장관에서 칼슘흡수 및 골흡수에 영향을 미치는 비타민 D와 칼슘/인의 비율을 일정하게 하기 위해 정상식이와 저칼슘식이의 비타민 D와 인의 함량을 동일하게 하였다.

골다공증 상태의 하악골에 골결손이 발생할 경우, 이의 치료를 위해서는 골형성을 유도하는 성장인자를 이용하는 방법이 상용되는데, 성장인자 중 골형성능이 우수한 것으로 알려진 BMP-2가 이용되고 있다.<sup>15</sup> 따라서 본 연구에서는 골다공증 상태의 하악골에 골결손을 형성한 다음 rhBMP-2가 골치유에 미치는 영향을 관찰하였다.

성장인자들은 폴리펩타이드 구조를 이루며, 세포막의 특정수용체와 결합하여 세포내에서 특정기능의 수행을 자극하거나 방해하는 역할을 하는데, 이 중 BMP-1을 제외한 12종의 골형성단백질은 아미노산의 서열이 유사하여 형질변형성장인자의 대가계(superfamily)에 해당된다.<sup>24-26</sup> 이 중 BMP-2는 개체 발생시 골격의 형성,<sup>47</sup> 치아의 형성<sup>48</sup> 등에 관여하는 매개체로서의 역할 뿐만 아니라 조골세포의 분화를 유도하는 등의 다양한 기능을 수행하는 세포의 신호전달물질로 알려져 있다.<sup>23-28</sup>

BMP-2은 secretory leader sequence와 프로펩타이드 및 성숙펩타이드로 구성되며, 이의 활성형은 성숙펩타이드의 disulfide bond를 통하여 동종이량체나 이종이량체를 형성한다.<sup>24,28,46</sup> 세포막에서의 신호전달은 serine/threonine kinase 활성을 보이는 수용체에 의해 전달되고, 핵내로 전달된 BMP 신호는 전사인자로 작용하여 조골세포의 분화에 필요한 유전자를 발현시킨다.<sup>28,47,49</sup> 이러한 일련의 과정을 통해

여 BMP-2는 미분화 전구세포나 초기분화 간엽세포의 조골 세포로의 분화를 유도하여 골형성을 일으킨다.

BMP는 골조직으로부터 여러 단계의 분리과정을 거쳐 추출되기도 하지만,<sup>50</sup> Wozney 등<sup>24</sup>은 Chinese hamster의 난소 세포주를 이용한 유전자 재조합 기술을 적용하여 BMP-2, BMP-4, BMP-7을 순수하게 분리 정제하였다. 본 실험에서는 rhBMP-2를 사용하였으며, 이는 32 kDa의 분자량을 가지는 동종이량체의 당단백질로 이루어져 있다.

rhBMP-2의 골형성 시작시기 및 정도에 대한 영향은 rhBMP-2의 순도 및 농도 구배에 따라 달라지는데, Wang 등<sup>51</sup>은 백서를 이용한 동물실험에서 정제된 rhBMP-2가 50% 정도로 정제된 rhBMP-2보다 10배 이상의 골형성능을 보인다고 하였으며, 농도 구배를 달리 하였을 때는 매식된 rhBMP-2의 농도가 증가 할수록 골형성 시기가 빨라지며 그 양도 증가한다고 하였다. Lecanda 등<sup>52</sup>은 인간 골수 간질 세포와 인간 조골세포에 대한 rhBMP-2의 석회화 기질 형성능에 관한 비교에서, 적용된 BMP의 농도 구배에 따라 석회화 기질 형성에 차이가 있다고 하였으며, Yasko 등<sup>53</sup>은 백서의 대퇴부 분절 골절시 BMP의 골형성능에 관한 실험에서 1.4 µg과 11.4 µg으로 농도를 달리 적용하였을 때 두 실험군 모두에서 골형성이 관찰되었으나, 높은 농도에서 통계적으로 유의하게 많은 골형성이 관찰된다고 하였다. 본 실험에서는 98% 수준으로 정제된 rhBMP-2를 50 µg/mL 농도로 하여 20 µL를 적용하였는데, 이는 King 등<sup>34</sup>이 백서의 하악체 부위에 골결손을 유발한 후, 골형성을 발현시킨 순도와 농도를 기준으로 하였다.

rhBMP-2를 적용시킬 경우에 이용되는 담체의 선택에는 조직 내 생체 적합성 및 흡수성, 구조적인 안정성, 생체 내 면역반응의 존재 여부, BMP가 유리되는 속도 및 정도에 대한 고려가 이루어져야 한다.<sup>33</sup> Howell 등<sup>54</sup>과 Wang 등<sup>51</sup>은 흡수성 교원질을 담체로 해서 rhBMP-2를 이식하였을 때 국소적 및 전신적으로 안전하며 조작이 쉽고 임상적으로 유용하다고 보고하였다. 본 실험에서 사용된 담체로는 흡수성 I형 교원질막을 결손부와 같은 크기로 절개하여 사용하였는데, 이는 다공성 구조를 가지므로 물질의 90% 이상을 액체로 채울 수 있어 용해된 BMP의 수용부로서 작용하고, 생체 내에서 독성이나 면역반응이 없으며, 결손부의 치유기간 동안 흡수되는 특성을 가진다.

골 결손부의 치유를 유도할 때, 골재생 물질이나 매식체의 골형성능을 평가하는데 이용되는 critical defect의 크기에 대해, Schmitz 등<sup>55</sup>과 Linde 등<sup>56</sup>은 백서의 하악골의 결손인 경우 5 mm라고 하였다. 본 실험에서는 골결손부의 크기를 4 mm로 하였는데, 이는 골재생술에 사용하는 차폐막을 사용하지 않았기 때문에 선택들이 제한한 5 mm보다는 작게 형성하였다.

골결손부의 치유과정의 평가에는 전산화 단층사진이 이용될 수 있는데, Alden 등<sup>57</sup>은 백서의 하악체 부위의 골결손

부의 회복 정도를 전산화 단층촬영 3차원영상을 통하여 관찰하였고, Sweeney 등<sup>58</sup>은 백서의 두개골에 형성한 골결손의 치유과정을 전산화 단층촬영 3차원영상으로 관찰하여 얻은 소견이 조직학적인 결과와 일치한다고 하였다. 본 실험에서는 골다공증 백서 하악골에서 골결손부의 치유과정을 관찰하기 위하여 cone beam형 3차원 전산화 단층영상을 이용하였는데, 이는 하나의 입체적인 체적소(voxel)가 정육면체로 형성되므로 X, Y, Z축 각 방향에서의 균일한 해상도가 얻어지며, 3차원 영상 재구성시에도 그 정확도와 미세 재현성이 우수하고, 또한 재현 가능한 화소의 최소단위가 0.136 mm이므로 fan beam형 전산화 단층영상에 비해 보다 해상도가 높다.<sup>59,60</sup> 이에 본 연구에서는 cone beam형 3차원 전산화 단층영상을 이용하여 골결손 부위가 치유되는 과정에서의 변화를 관찰한 결과, 각 실험군에서의 골치유 과정에서 실험군 간의 차이를 인지할 수 있었다. 실험 2군에서 실험 5주에 대조군과 실험 1군보다 광범위한 부위에서의 골회복에 의한 형태 변화가 관찰되었으며, 실험 7주에는 골결손부에서 외부 형태의 대부분이 회복되는 소견을 관찰할 수 있었는데, 이는 연X선사진 소견 및 병리조직학적 소견과도 일치하였다.

또한 본 연구에서 골밀도가 낮고, 얇은 조직표본에서 골조직의 형성 상태의 평가가 가능한 연X선사진으로 관찰하였던 바, 대조군과 실험 1군에서는 실험 3주에 골결손부의 변연에서 방사선투과성이 감소하는 골형성 소견이 관찰되었으나, 대조군에 비하여 실험 1군에서 그 정도가 미약하였으며, 실험 2군에서는 실험 3주에 골결손부의 변연 및 심부에서도 방사선투과성이 감소된 소견이 관찰되어 골결손부의 보다 넓은 부위에서 골형성이 일어남을 관찰할 수 있었다. 실험 5주와 7주에 실험 2군에서는 대조군과 실험 1군에 비해 골결손부의 심부에서 골소주가 관찰되는 소견이 관찰되었으나, 대조군과 실험 1군에서는 골결손부의 변연에서 골형성은 증가하였으며, 심부에서는 골소주가 관찰되지 않았다.

Smith<sup>13</sup>은 저칼슘식이 투여 백서의 골결손의 치유시에 골교체율의 항진에 의해 신생골의 형성장애와 골형성 시기에 골흡수가 뚜렷해지는 골다공증 양상이 보인다고 하였는데, 본 실험에서도 실험 1군에서의 신생골 형성시기는 대조군인 정상식이군과 유사했으나, 골형성이 진행되면서 골다공증 양상이 관찰되었다. 또한 rhBMP-2의 골결손 치유에 관하여, Yasko 등<sup>53</sup>은 백서의 분절 골결손시에 연X선 사진상에서 골형성단백질 적용군이 대조군에 비하여 실험 3주에서 보다 넓은 부위에서 골형성 소견이, 실험 6주에는 대부분 치유된 소견이 관찰되었다고 하였는데, 본 실험에서도 실험 2군에서 실험 3주에 대조군과 실험 1군에 비하여 골결손부의 넓은 부위에서 골형성과 실험 7주에 골결손부의 대부분이 치유된 소견이 관찰되었다.

병리조직학적 검사에서 대조군에서는 실험 3주와 실험 5

주에 골결손부 변연부에서 골형성 및 골경화상이 관찰되었으나, 골결손부의 중심부는 실험 전 기간에 걸쳐 섬유성 결합조직이 존재하였다. 실험 1군에서는 실험 3주와 실험 5주에 섬유성 결합조직 내로 미약한 골소주가 관찰되고 전반적으로 골소주의 수가 감소된 소견이 관찰되었다. 한편 실험 2군에서는 실험 3주와 실험 5주에 보다 많은 골소주가 형성되는 소견이, 실험 5주에는 대부분의 골결손부가 회복되는 소견이, 실험 7주에는 골소주가 성숙되는 소견이 관찰되었다.

BMP-2의 실험적 연구에서, Toriumi 등<sup>61,62</sup>은 성견의 하악에 형성한 분절골결손에 rhBMP-2를 이식하였을 때 실험 4주째에 명확한 골형성이 관찰되었으며, 골기질만 이식한 경우에 비해 빠르게 골이 형성되었는데, 특히 이식 후 3개월과 6개월 상태를 비교시에 rhBMP-2 적용군에서 실험 기간이 경과함에 따라 신생골의 기계적 강도와 석회화가 증가한다고 하였으며, 조직학적으로 혈관신생, 세포분화, 미성숙 해면골 형성의 단계를 거치는 골형성이 발생하였고, 연골의 형성이 없이 막내골화가 발생됨을 보고하였다. 또한 King 등<sup>34</sup>은 백서 하악체 부위에 형성한 골결손의 치유시 rhBMP-2를 매식한 경우, 골형성이 골결손의 변연부에서 뿐만 아니라 골결손의 중심부에서도 관찰된다고 하였다. 본 실험에서도 대조군에 비해 실험 1군에서 지연된 골형성과 정도의 석회화가 관찰되어 저칼슘식이에 의한 골다공증시 골치유가 장애를 받음을 알 수 있었다. 그러나 실험 2군에서는 실험 3주에 대조군 및 실험 1군과 비교시보다 많은 신생골이 형성되었으며, 골결손부의 변연 뿐만 아니라 중심부에서도 골이 형성되어 보다 빠르게 치유되는 소견을 보였고, 실험 5주와 실험 7주에는 실험 1군에서는 지속적인 골다공증 상태로의 골개조 소견이 보이는데 비하여, 실험 2군에서는 골소주의 배열이 보다 치밀한 상태로 유지되는 것이 관찰되었는데, 이는 골다공증 상태의 결손부 치유시 rhBMP-2가 신생골의 형성에 지속적으로 관여한 것으로 사료된다.

본 실험을 통하여 rhBMP-2는 골유도 과정에 관여하여 골다공증 상태의 골결손부의 치유시 신생골의 형성을 촉진하는 것을 알 수 있었으나, 향후 BMP의 국소적인 임상 적용을 위해서는 이의 농도구획과 이를 매식하기 위한 담체에 대한 연구와 더불어 골다공증 환자의 골결손 치유시에 전신적인 골흡수 억제제와 골량 증가제인 bisphosphonate나 활성형 비타민 D에 대한 연구도 함께 이루어져야 할 것으로 사료된다.

## 참 고 문 헌

1. Wasserman SNS, Brazel US. Osteoporosis; the state of the art in 1987: a review. Nucl Med 1987; 17 : 283-92.
2. Johnston Jr. CC, Epstein S. Clinical, biochemical, radiographic, epidemiologic and economic features of osteoporosis. Orthop Clin

- North Am 1981; 12 : 559-69.
3. Wahner HW. Single- and dual-photon absorptiometry in osteoporosis and osteo malacia. Semin Nucl Med 1987; 17 : 305-15.
4. Isselbacher KJ, Braunwald E, Wilson JD, Martin JB, Fauci AS, Kasper DL. Harrison's principles of internal medicine. 13rd ed. McGraw-Hill Inc; 1994. p. 2172-7.
5. Parfitt AM. Trabecular bone architecture in the pathogenesis and prevention of fracture. Am J Med 1987; 82 : 68-72.
6. Frost HM. Bone dynamics in metabolic bone disease. J Bone Joint Surg 1966; 48 : 1192-3.
7. Rigg BL, Melton LJ. Evidence for two distinct syndroms of involuntional osteoporosis. Am J Med 1983; 75 : 899-901.
8. Gallagher JC, Rigg BL, Eismann J. Intestinal calcium absorption and serum Vit-D metabolites in normal subject and osteoporotic patients. J Clin Invest 1979; 64 : 729-36.
9. Gruber HE, Ivey JL, Baylink DJ, Mathews M, Nelp WB, Sison K, et al. Long-term calcitonin therapy in postmenopausal osteoporosis. Metabolism 1984; 33 : 295-303.
10. Riggs BL, Melton LJ. Clinical heterogeneity of involuntional osteoporosis; implications for preventive therapy. J Clin Endocrinol Metab 1990; 70 : 1229-32.
11. Rasmussen P. Effect of extreme calcium deprivation an degree of mineralization of alveolar bone, dentin and enamel in rat. Scand J Dent Res 1972; 80 : 327-33.
12. Matsumoto F, Miyamoto Y, Nagayama M. Light- and electron-microscopic observation on the mandibular condylar cartilage in growing rats on a low-calcium diet. Acta Anat 1991; 142 : 41-8.
13. Smith N. Extraction socket healing in the calcium deficient rat. Aust Dent J 1975; 20 : 22-6.
14. Lindholm TS. Histological components of tibial fracture callus in growing osteopenic rats. Acta Chir Scand 1975; 449 : 7-18.
15. Mundy GR. Vision for the future in osteoporosis research. Osteoporosis Int 1993; 2 : 29-34.
16. Kenny AM, Prestwood KM. Osteoporosis; pathogenesis, diagnosis and treatment in older adult. Rheum Dis Clin North Am 2000; 26 : 569-91.
17. Altkorn D, Vokes T. Treatment of postmenopausal osteoporosis. J Am Med Assoc 2001; 258 : 1415-8.
18. Kanis JA, Delmas P, Burckhardt P, Cooper C, Torgerson D. Guideline for diagnosis and management of osteoporosis. Osteoporosis Int 1997; 7 : 390-406.
19. Pak CY, Sakhaee K, Zerwekh JE, Parcel C, Peterson R, Johnson K. Safe and effective treatment of osteoporosis with intermittent slow release sodium fluoride; augmentation of vertebral bone mass and inhibition of fractures. J Clin Endocrinol Metab 1989; 68 : 150-9.
20. Sone T, Fukunaga M, Ono S, Nishiyama T. A small dose of human parathyroid hormone (1-34) increase bone mass in the lumbar vertebrae in patient with senile osteoporosis. Miner Electrolyte Metab 1995; 21 : 232-5.
21. Urist MR. Bone: formation by autoinduction. Science 1965; 150 : 893-9.
22. Urist MR, Strates BS. Bone morphogenetic protein. J Dent Res 1971; 50 : 1392-406.
23. Urist MR, Mikulski A, Lietze A. Solubilized and insolubilized bone morphogenetic protein (cell differentiation/ osteogenesis/ noncollagenous protein). Proc Nat Acad Sci USA 1979; 76 : 1828-32.
24. Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW, et al. Novel regulators of bone formation; molecular clones and activities. Science 1988; 242 : 1528-34.

25. Celeste AJ, Iannazzi JA, Taylor RC, Hewick RM, Rosen V, Wang EA, et al. Identification of transforming growth factor beta family members present in bone-inductive protein purified from bovine bone. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990; 87 : 9843-7.
26. Wozney JM. Bone morphogenetic proteins. *Prog Growth Factor Res*. 1989; 1 : 267-80.
27. Wozney JM. Bone morphogenetic proteins and their gene expression. in "Cellular and Molecular Biology of Bone" edited by Noda M, Academic press 1993; pp.132-69.
28. 류현모, 배석철. Osteoblast 분화에 미치는 BMP-2의 역할. *대한골대사학회지* 1998; 5 : 83-95.
29. Suzawa M, Takeuchi Y, Fukumoto S, Kato S, Ueno N, Miyazono K, et al. Extracellular matrix associated bone morphogenetic proteins are essential for differentiation of murine osteoblastic cells in vitro. *Endocrinology* 1999; 140 : 2125-33.
30. Urist MR, Lietze A, Dawson E.  $\beta$ -tricalcium phosphate delivery system for bone morphogenetic protein. *Clin Othop* 1984; 187 : 227-80.
31. Ferguson D, Davis WC, Hurt WC. Bovine bone morphogenetic protein (bBMP) fraction induced repair of craniotomy defect in rhesus monkey. *Clin Othop* 1987; 219 : 251-8.
32. Kawamura M, Iwata H, Sato K. Chondrogenetic Response to crude bone matrix protein bond to hydroxyapatite. *Clin Othop* 1987; 217 : 281-92.
33. King GN, King N, Hughes FJ. Effect of two delivery systems for recombinant human bone morphogenetic protein-2 on periodontal regeneration in vivo. *J Periodont Res* 1998; 33 : 226-36.
34. King GN, King N, Hughes FJ. The effect of root surface demineralization on bone morphogenetic protein-2-induced healing of rat periodontal fenestration defects. *J Periodontol* 1998; 69 : 561-70.
35. Harrison M, Fraser R. Bone structure and metabolism in calcium deficient rats. *J Endocrinol* 1960; 21 : 197-205.
36. Nordin BEC. Investigation of bone metabolism with  $^{47}\text{Ca}$ -preliminary report. *Proc Roy Soc Med* 1959; 52 : 351-3.
37. Ulm CW, Solar P, Ulm MR, Matejka M. Sex-related changes in the bone mineral content of atrophic mandible. *Calcif Tissue Int* 1994; 54 : 203-7.
38. Kroger H, Tuppurainen M, Honkanen R, Alhava E, Saarikoski S. Bone mineral density and risk factors for osteoporosis-a population-based study of 1600 perimenopausal women. *Calcif Tissue Int* 1994; 55 : 1-7.
39. Hirai T, Ishijima T, Hashikawa Y, Yajima T. Osteoporosis and reduction in edentulous patients. *J Prosthet Dent* 1993; 69 : 49-56.
40. Nicolaysen R, Eeg-Larsen N, Malm OJ. Physiology of calcium metabolism. *Physiol Rev* 1953; 33 : 424-44.
41. Aitken JM, Armstrong E, Anderson JB. Osteoporosis after oophorectomy in the mature female rat and the effect of estrogen and/or progesterone therapy in its prevention. *J Endocrinol* 1972; 55 : 79-82.
42. Uhthoff HK, Jaworski ZFG. Bone loss in response to long term immobilization. *J Bone and Joint Surg* 1978; 60 : 420.
43. Henry KM, Kon SK. The relationship between calcium retention and body stores of calcium in the rat: effect of age and of vitamin D. *Br J Nutr* 1953; 7 : 147-59.
44. Beary DF. Effect of fluoride and low calcium on physical properties of rat femur. *Anat Rec* 1969; 164 : 305-16.
45. Lundgren S, Rosenquist JB. Short term bone healing in calcium deficiency osteopenia and disuse osteopenia: experimental studies in the adult rat. *Scand J Dent Res* 1992; 100 : 337-9.
46. Israel DI, Nove J, Kern KM, Kaufman RJ, Rosen V, Cox KA, et al. Heterodimeric bone morphogenetic proteins show enhanced activity in vitro and in vivo. *Growth Factors* 1996; 13 : 291-300.
47. Francis PH, Richardson MK, Brickell PM, Tickle C. Bone morphogenetic proteins and a signaling pathway that controls patterning in the developing chick limb. *Development* 1994; 120 : 209-18.
48. Tucker AS, Matthews KL, Sharpe PT. Transformation of tooth type induced by inhibition of BMP signaling. *Science* 1998; 282 : 1136-8.
49. Kawabat M, Imamura T, Miyazono K. Signal transduction by bone morphogenetic proteins. *Cytokine Growth Factor Rev* 1998; 9 : 49-61.
50. Luyten FP, Cunningham NS, Ma S, Muthukumaran N, Hammonds RG, Nevins WB, et al. Purification and partial amino acid sequence of osteogenin, a protein differentiating bone differentiation. *J Biol Chem* 1989; 264 : 13377-80.
51. Wang EA, Rosen V, D'Alessandro JS, Bauduy M, Cordes P, Harada T, et al. Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation (cartilage induction). *Proc Nat Acad Sci USA* 1990; 87 : 2220-4.
52. Lecanda F, Avioli LV, Cheng SL. Regulation of bone matrix protein expression and induction of differentiation of human osteoblasts and human bone marrow stromal cells by bone morphogenetic protein-2. *J Cell Biochem* 1997; 67 : 386-98.
53. Yasko AW, Lane JM, Fellingner EJ, Wozney JM, Wang EL. The healing of segmental bone defects, induced by recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2). *J Bone and Joint Surg* 1992; 74 : 659-70.
54. Howell TH, Fiorellini J, Jones A. A feasibility study evaluating rhBMP-2/ absorbable collagen sponge for maxillary sinus floor augmentation. *Int Periodont Rest Dent* 1997; 17 : 11-25.
55. Schmitz JP, Hollinger JO. The critical size defects as an experimental model for craniomandibular nonunions. *Clin Othop Rel Res* 1985; 205 : 299-308.
56. Linde A, Hender E. Recombinant bone morphogenetic protein-2 enhanced bone healing, guided by osteopromotive e-PTFE membranes: an experimental study in rats. *Calcif Tissue Int* 1994; 56 : 549-53.
57. Alden TD, Beres EJ, Laurent JS, Engh JA, Das S, London SD, et al. The use of bone morphogenetic protein gene therapy in craniofacial bone repair. *J Craniofac Surg* 2000; 11 : 24-30.
58. Sweeney TM, Opperman LA, Persing MD, Ogle RC. Repair of critical size rat calvarial defects using extracellular matrix protein gels. *J Neurosurg* 1995; 83 : 710-5.
59. Arai Y, Tammisalo E, Iwai K, Hashimoto K, Shinoda K. Development of a compact computed tomographic apparatus for dental use. *Dentomaxillofac Radiol* 1999; 28 : 245-8.
60. Ito K, Gomi Y, Sato S, Arai Y, Shinora K. Clinical application of a new compact CT system to assess 3-D images for the preoperative treatment planning of implant in the posterior mandible *Clin Oral Impl Res* 2001; 12 : 539-42.
61. Toriumi DM, Kotler HS, Luxembeg DP. Mandibular reconstruction with recombinant bone-inducing factor; functional, histologic and biomechanical evaluation. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1991; 117 : 1101-12.
62. Toriumi DM, O'Grady K, Horlbeck DM, Desai D, Turek TJ, Wozney J. Mandibular reconstruction using bone morphogenetic protein 2: long-term follow-up in a canine model. *Laryngoscope* 1999; 109 : 1481-9.

### Explanation of Figures

**Fig. 1.** Three dimensional image of computerized tomogram on the bone defect of control group on the 1st week (a), 3rd weeks (b), 5th weeks (c) and 7th weeks (d)

**Fig. 2.** Three dimensional image of computerized tomogram on the bone defect of experimental group 1 on the 1st week (a), 3rd weeks (b), 5th weeks (c) and 7th weeks (d)

**Fig. 3.** Three dimensional image of computerized tomogram on the bone defect of experimental group 2 on the 1st week (a), 3rd weeks (b), 5th weeks (c) and 7th weeks (d)

**Fig. 4.** Soft x-ray radiography of the bone defect of control group on the 1st week (a), 3rd weeks (b), 5th weeks (c) and 7th weeks (d).

**Fig. 5.** Soft x-ray radiography of the bone defect of experimental group 1 on the 1st week (a), 3rd weeks (b), 5th weeks (c) and 7th weeks (d).

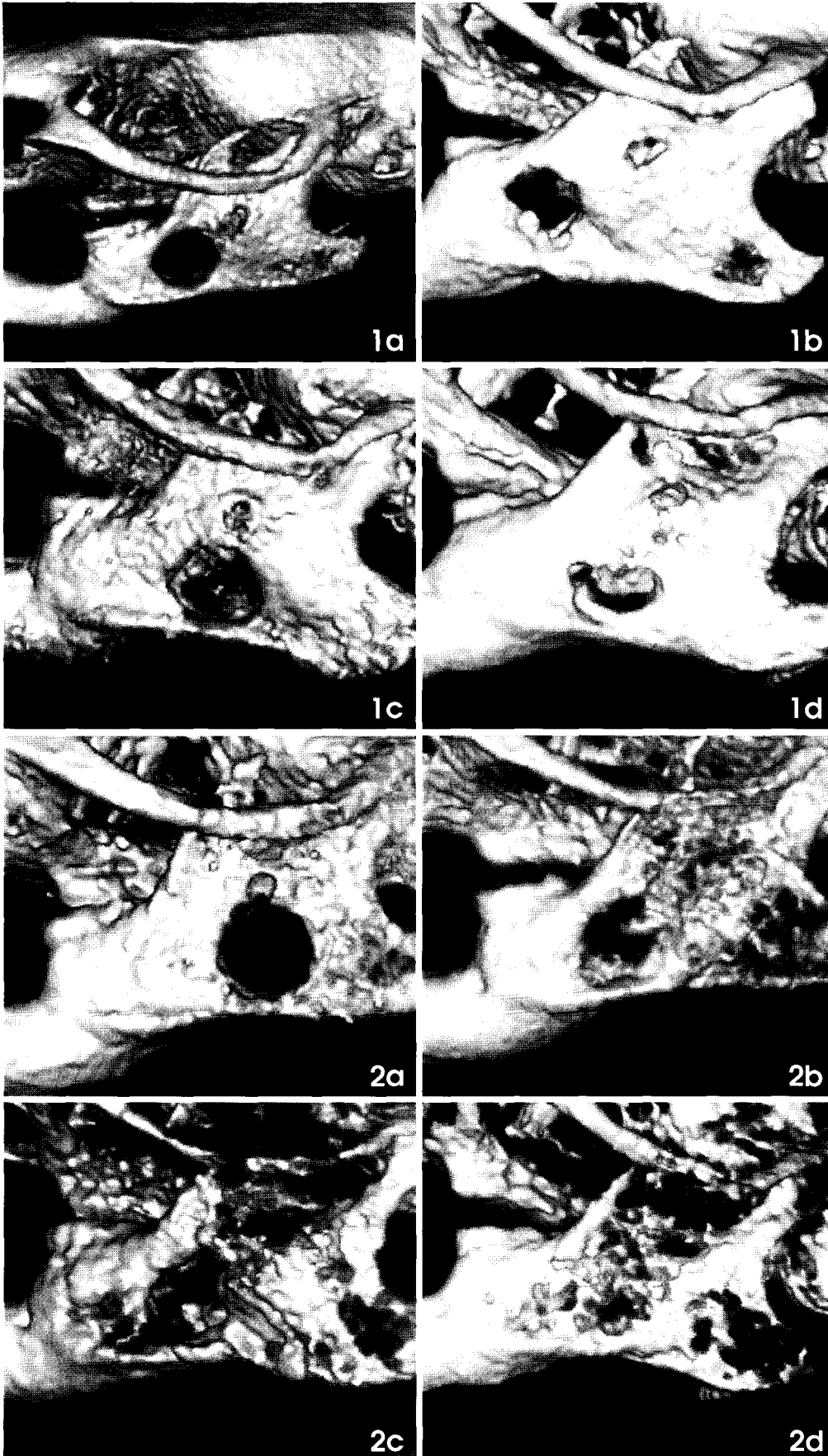
**Fig. 6.** Soft x-ray radiography of the bone defect of experimental group 2 on the 1st week (a), 3rd weeks (b), 5th weeks (c) and 7th weeks (d).

**Fig. 7.** Photomicrography of the bone defect of control group on the 1st week (a), 3rd weeks (b), 5th weeks (c) and 7th weeks (d). (H & E and Van Gieson's stains,  $\times 40$ )

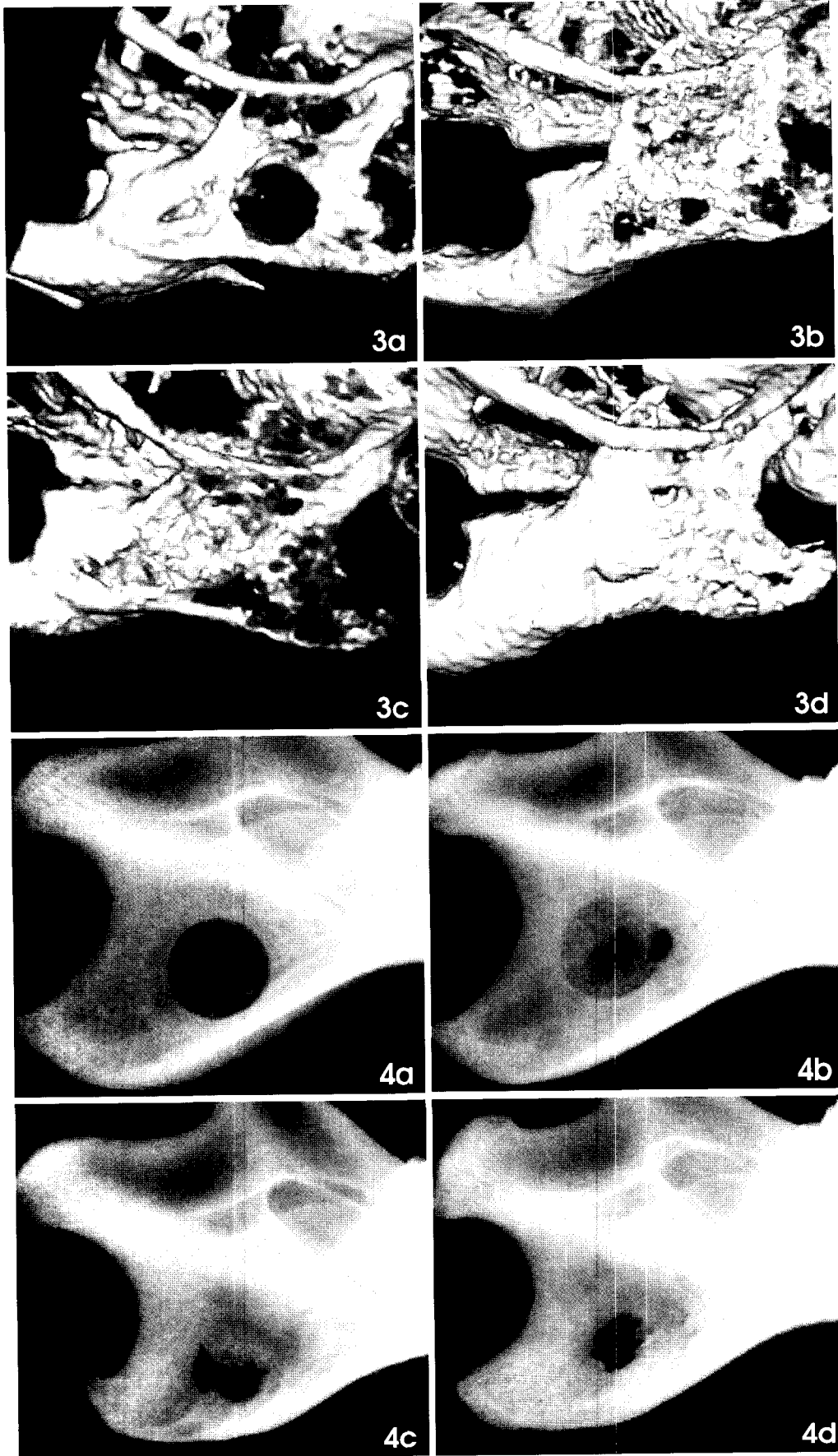
**Fig. 8.** Photomicrography of the bone defect of experimental group 1 on the 1st week (a), 3rd weeks (b), 5th weeks (c) and 7th weeks (d). (H & E and Van Gieson's stains,  $\times 40$ )

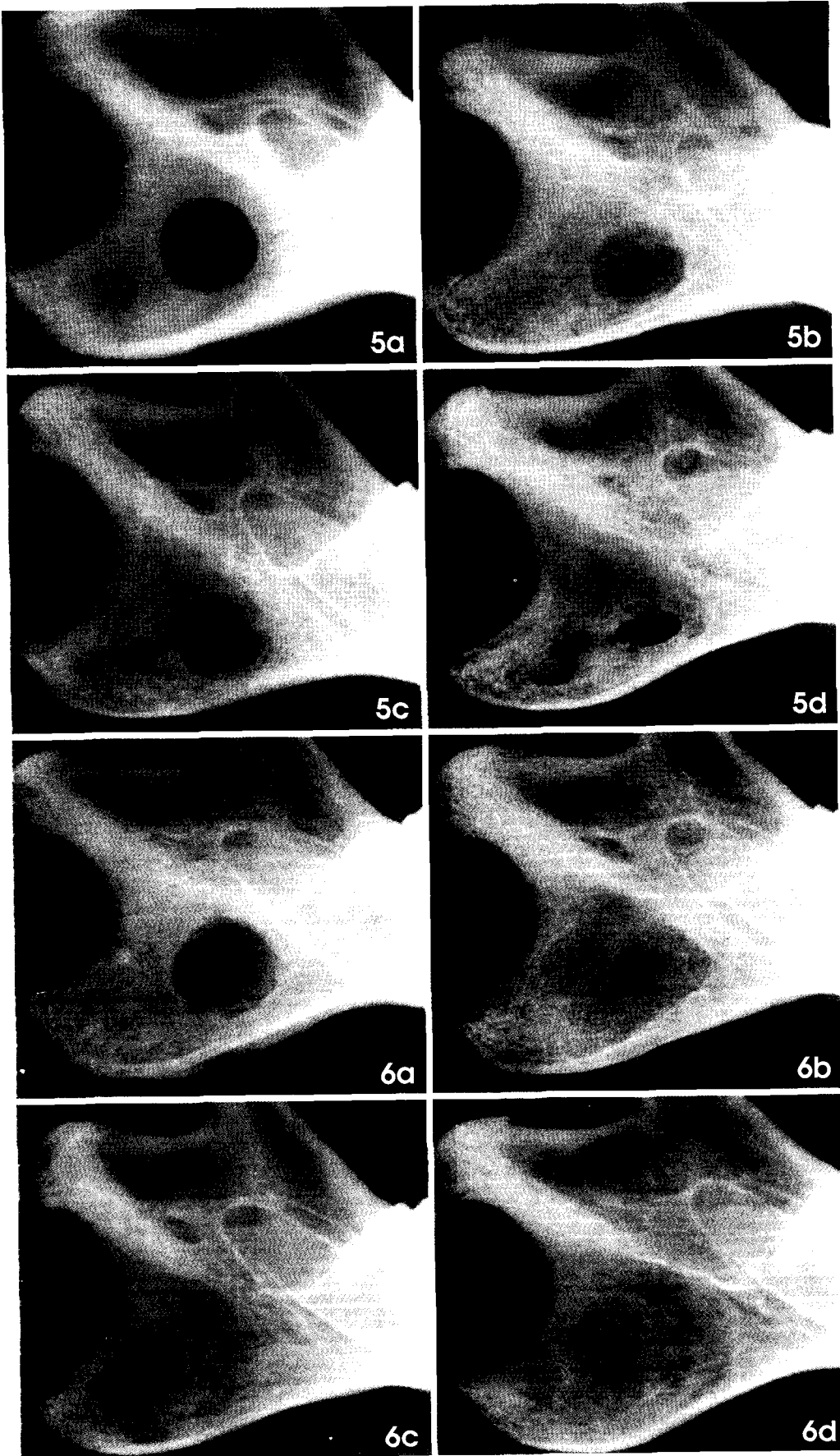
**Fig. 9.** Photomicrography of the bone defect of experimental group 2 on the 1st week (a), 3rd weeks (b), 5th weeks (c) and 7th weeks (d). (H & E and Van Gieson's stains,  $\times 40$ )



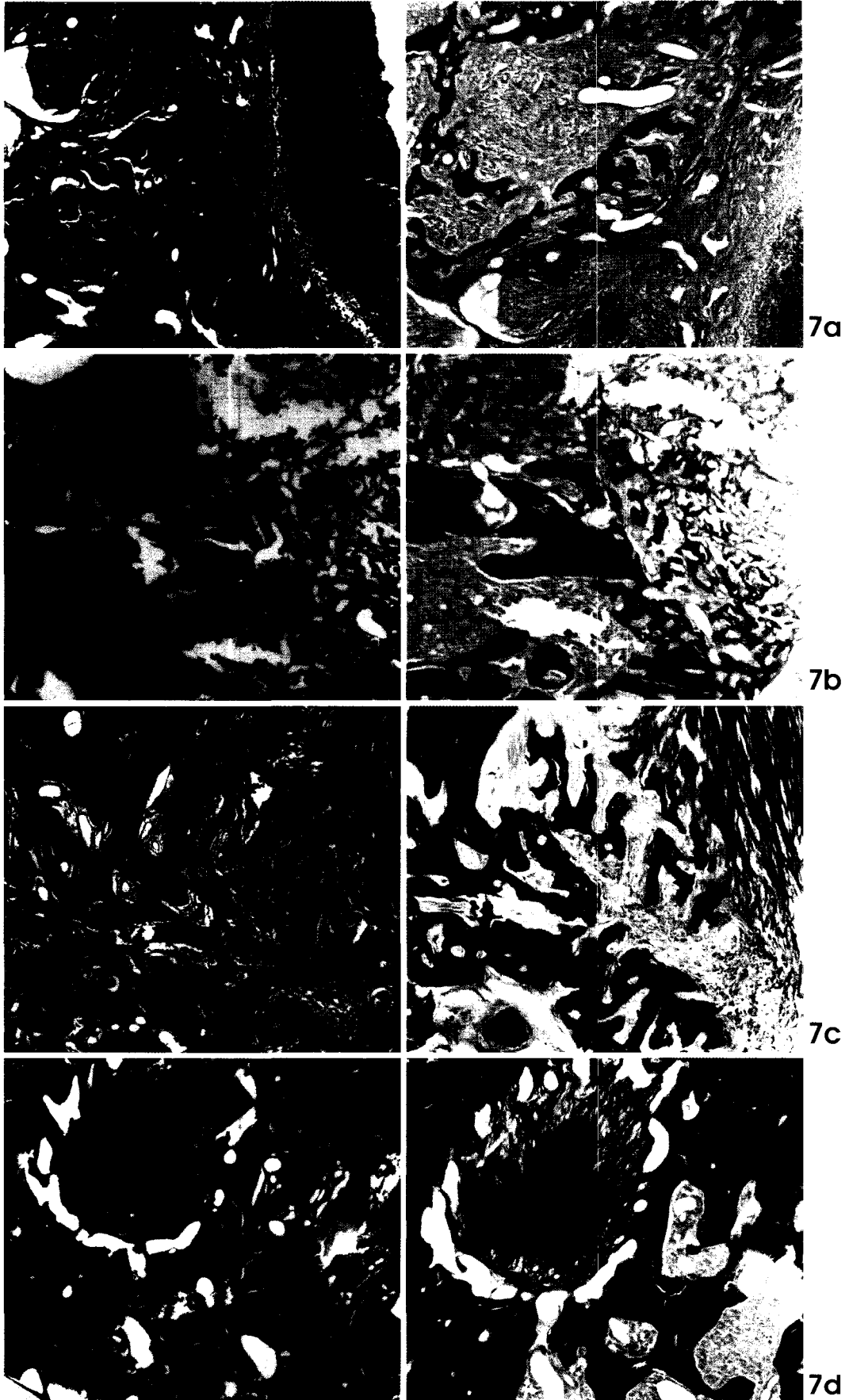


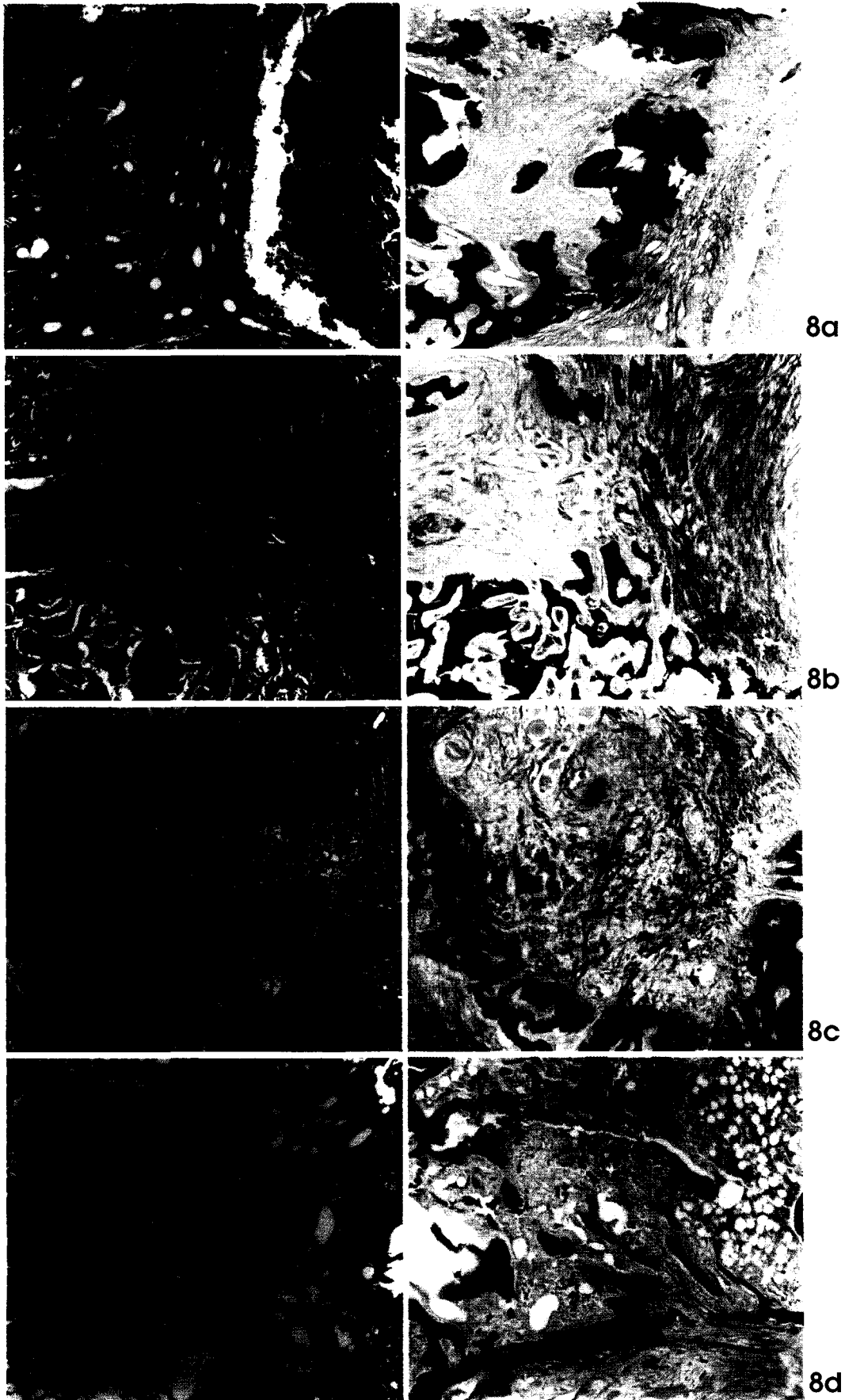
rhBMP-2가 저칼슘식이 투여 백서의 골결손부 치유에 미치는 영향





rhBMP-2가 저칼슘식이 투여 백서의 골결손부 치유에 미치는 영향





rhBMP-2가 저칼슘식이 투여 백서의 골결손부 치유에 미치는 영향

