

가토 하악골에서 신연 골형성술시 신연속도에 따른 TGF- β 1, IGF-I, bFGF의 발현

신선아 · 자유진 · 송현철

가톨릭대학교 성빈센트병원 치과 구강악안면외과

Abstract

THE EXPRESSION OF TGF- β 1, IGF-I, bFGF IN DISTRACTION OSTEOGENESIS ACCORDING TO DIFFERENT DISTRACTION RATES IN RABBIT'S MANDIBLE

Sun-A Shin, Yu-Jin Jee, Hyun-Chul Song

Div. of Oral & Maxillofacial Surgery, Dept. of Dentistry, St. Vincent Hospital, The Catholic University of Korea

Distraction osteogenesis is a technique of lengthening bone including soft tissue by gradual separation of surgically divided bone surfaces. Although the biomechanical, histological, and ultrastructural changes associated with distraction osteogenesis have been widely described, the molecular mechanisms governing the formation of new bone in distracted bone segments remain largely unclear. However, such information has significant clinical implications because it may enable targeted therapeutic manipulations designed to accelerate osseous regeneration.

The purpose of this study was to evaluate the expression of TGF- β 1, IGF-I and bFGF in distraction osteogenesis according to different distraction rates in a rabbit's mandible.

When twenty-four adult rabbits underwent open osteotomy between the premolar and mental foramen, an external bilateral distraction device was applied. Latency was allowed for five days before distraction. Three different distraction rates were 0.7 mm/day (A, n=8), 1.4 mm/day (B, n=8) and 2.4 mm/day (C, n=8). The distraction device was activated with the same distraction rhythms of twice a day until 4.9 mm (A & B group) and 8.4 mm (C group) length gains was achieved. The animals were sacrificed at postoperative 3, 7, 14 and 28 days. The bony specimens were stained with H&E for histologic examination, and RT-PCR analysis was done for the identification of the expression of TGF- β 1, IGF-I and bFGF.

The results obtained from this study were as follows :

The 0.7 mm/day and 1.4 mm/day distraction rate groups were shown to improve regenerative bone formation on radiographic and histologic examination. Also, TGF- β 1, IGF-I and bFGF expression increased in the 0.7 mm/day and 1.4 mm/day distraction rate groups. But the 2.4 mm/day distraction rate group specimen was different with adjacent normal bone and hardly expressed of growth factors.

These findings suggest that improved new bone formation in the 0.7 mm/day and 1.4 mm/day distraction rates is associated with enhanced expression of TGF- β 1, IGF-I and bFGF by mechanical tension stress. Additionally, the 0.7 mm/day and 1.4 mm/day distraction rate groups were significantly different from the 2.4 mm/day distraction rate group in the expression of growth factors.

According to the above results, it seems possible to apply a distraction rate of up to 1.4 mm/day a day in rabbit's mandible. And further studies are needed to evaluate growth factors of TGF- β 1 and IGF-I, which are excellent in expression.

Key words : Distraction osteogenesis, Distraction rate, Growth factors, Gene expression

※ 본 연구는 2003년도 가톨릭대학교 성빈센트병원 임상의학 연구비 지원에 의해 이루어졌음.

I. 서 론

신연 골형성술은 인위적으로 절골술이나 피질골 절골술을 시행 후 내부 또는 외부 고정장치를 이용하여 분리된 골편에 점진적, 주기적인 신장력을 가하여 절골면 사이에 신생골 형성을 유도하는 술식으로, 골조직 뿐만 아니라 부착근육, 신경, 피부 등의 연조직도 신장이 가능하여 부가적인 수술 없이도 골결손부 재건이 가능한 장점을 가지고 있다.

골신연술은 1905년 Codivilla가 대퇴골의 신장을 처음으로 보고하였고¹⁾, 1988년 Ilizarov에 의해 이론적으로 정립되었으며²⁻³⁾ 정형외과영역에서 널리 연구가 이루어 졌다. 악안면 영역에서는 1973년 Snyder 등은 개의 하악골을 이용하여 실험적 연구결과를 처음으로 발표하였고⁴⁾ 이후 많은 연구가 이루어졌다. 그러나 많은 장점에도 불구하고 신연 장치가 다소 크며, 입체적인 신연이 어렵고, 불유합 되는 등의 어려움 때문에 처음에는 악안면 영역에 임상적으로 적용하기에 많은 제한이 있었다. 이러한 단점을 극복하기 위해 신연 장치의 개발과 더불어 신연속도와 신연빈도에 관련된 연구들이 이루어졌다⁵⁻⁷⁾.

최근에는 분자생물학의 발전으로 신연 골형성에 대한 세포 수준에서의 분자생물학적 기전이 보고 되었다⁸⁻¹⁰⁾. 또한 골형성에 관여하는 성장인자와 교원성 및 비교원성 세포외 기질 단백질 등의 발현에 관련된 연구가 활성화되었다¹¹⁾. 골절 치유기전과의 비교를 통한 연구¹²⁻¹⁴⁾ 및 신연 골형성술 시기에 따른 성장인자 발현에 대한 연구도 이루어졌다¹⁵⁻¹⁶⁾. 여러 인자들의 분자생물학적 발현 연구를 통해 신연 골형성술 시 최상의 골형성을 유도할 수 있는 신연속도와 신연빈도를 정립하는 것이 가능하게 되었다.

또한 골생성에 관여하는 재조합 성장인자의 국소적¹⁷⁻¹⁹⁾ 또는 전신적 투여²⁰⁾로 양질의 신생골을 형성하는 치료학적 목적의 연구가 시행되어 신연술 시 임상 적용의 제한적 요소였던 불유합을 줄일 수 있는 가능성도 제시되었다. 이에 본 연구에서는 신연속도를 일반적인 신연 (0.7 mm/day), 급속신연 (1.4 mm/day), 그리고 매우 빠른 급속신연 (2.4 mm/day) 등으로 설정하여 그에 따른 골형성 정도를 관찰하고자 하였으며, 신연 자극에 의해 발현이 증가되는 것으로 알려진 골형성 관여 성장인자들 중 TGF- β 1, IGF-I, bFGF 가 신연속도에 따라 발현되는 정도가 어떻게 달라지는지 비교 분석하여 생체에 적합한 신연속도의 설정 및 성장인자들의 골형성 촉진 가능성에 대한 이론적 근거로 활용하고자 하였다.

II. 실험대상 및 방법

1. 실험 재료

실험동물은 체중 2.5~3 kg인 가토 24마리를 암수 구별 없이 사용하였으며, 실온에서 동물용 고형사료와 물을 이용하여 일정기간 사육하였다. 예비실험을 시행하여 가토의 정상 해부학적 구조를 인지하기 위하여 하악골을 채취하였다. 신연 장치는 Medium stainless steel skeleton-type expansion screw (Dentaram, Germany)와 Mini titanium screw (2.0mm×18mm, Med-Tech corporation, Korea)을 이용하여 레진포매하여 제작하였다 (Fig. 1, 2). 이 신연 장치는 2개의 나사에 의해 고정되었고 한 바퀴 회전 시 0.7mm와 1.6 mm 신연 되는 2종류이며 이는 각각 최대 6.5 mm와 9.6 mm까지 신장 가능하였다.

2. 실험방법

1) 실험군

실험군은 다음과 같이 신연속도를 다르게 설정하여 3그룹으로 나누었다.

A (n=8) :

0.7 mm/day, 하루 두 번에 나누어 7일 동안 신연

B (n=8) :

1.4 mm/day, 하루 두 번에 나누어 3.5일 동안 신연

C (n=8) :

2.4 mm/day, 하루 두 번에 나누어 3.5일 동안 신연

2) 수술방법

Ketamin HCl (Ketalar, 유한양행, 한국) 30 mg/kg와 Xylazine HCl (Rompun, 바이엘코리아, 한국) 10 mg/kg를 혼합하여 근육주사 하여 전신마취를 시행하였다. 가토를 양와위로 고정하고 양측 하악 하연부를 제모한 뒤 베타딘 용액으로 소독한 후 국소마취와 지혈목적으로 1:100,000 epinephrine을 함유한 2% lidocaine HCl (유한양행, 한국)을 피하주사 하였다. 하악 하연부를 절개하고 층별 박리를 통해 하악골을 노출시킨 후 소구치 전방부에서 이공을 통해 나오는 이신경을 확인하고 조심스럽게 견인하였다. 골절단부는 소구치 전방과 이공사이에 설정한 후 2개의 나사로 신연 장치를 고정 위치시킨 다음 장치를 제거하고 지속 치과용 절삭기구로 완전 피질골 절골술을 시행한 후, 골절 골기를 이용하여 수질강 내에 있는 하치조신경혈관다발의 손상에 주의하여 골의 가동성을 확인하였다. 그런 다음 신연 장치를 재위치 시켰고 수술부위를 생리식염수로 깨끗이 세척한 뒤 3-0 흡수성 봉합사와 비흡수성 봉합사로 층별 봉

합하였다 (Fig. 3). 반대쪽 하악골도 같은 방법으로 수술하였다 (Fig. 4). 술 후 감염예방과 저작곤란으로 인한 영양결핍을 방지하기 위하여 3일간 Gentamycin (20 mg/kg)과 Beecom을 근육주사 하였다.

3) 신연

골절단부의 재혈관화와 염증의 소실 및 일차성 가골 형성을 도모하기 위하여 5일간의 잠복기를 부여하였고, 하루 두 번에 나누어 A군은 0.7 mm/day 씩, B군은 1.4 mm/day 씩 그리고 C군은 2.4 mm/day 씩 신연하여 총 신연량을 A군과 B군은 4.9 mm가 될 때까지 그리고 C군은 8.4 mm가 될 때까지 각각 A군은 7일, B군과 C군은 3.5일 동안 신연하였으며 술 후 28일까지 경화시간을 부여하였다.

4) 조직표본제작

수술 후 잠복기인 3일, 신연기인 7일, 경화기인 14일과 28일에 각 실험군에서 2마리씩 희생시켜 한쪽 악골에서 조직표본을 얻었다 (Table 1). 탈회표본제작을 위하여 채취한 골신장부의 검체를 10% 중성 포르말린에 3일간 일차 고정 한 후 흐르는 물에서 세척하였고 5% 포름산과 구연산나트륨을 동량으로 희석한 탈회액에서 5일간 탈회를 하였다. 그 후 조직을 조직캡슐에 넣어 흐르는 물에 12시간 동안 수세한 다음 통상의 방법으로 파라핀 포매를 시행하였고 4 μ m 두께로 시상연속 절편을 제작하였으며 절편에는 골절제부와 골신연부 및 정상부위가 모두 포함되도록 제작하였다. H&E 염색을 시행하였고, 광학현미경하에서 전반적인 조직학적 양상을 관찰하였다.

5) 육안적 검사

신연 장치 장착 후 가토의 사료 습식 상태, 신연 부위 및 장치 장착부위의 조직반응에 대해 검사하였고 신연을 위한 회전 시 저항감의 정도를 관찰하였다. 상, 하악 전치간의 교합변화를 통해 신연 상태를 파악하였으며 각 시기에 채취된 검체에서 골신연부와 골 치유 상태를 육안적으로 관찰 기록 하였다.

6) 방사선학적 검사

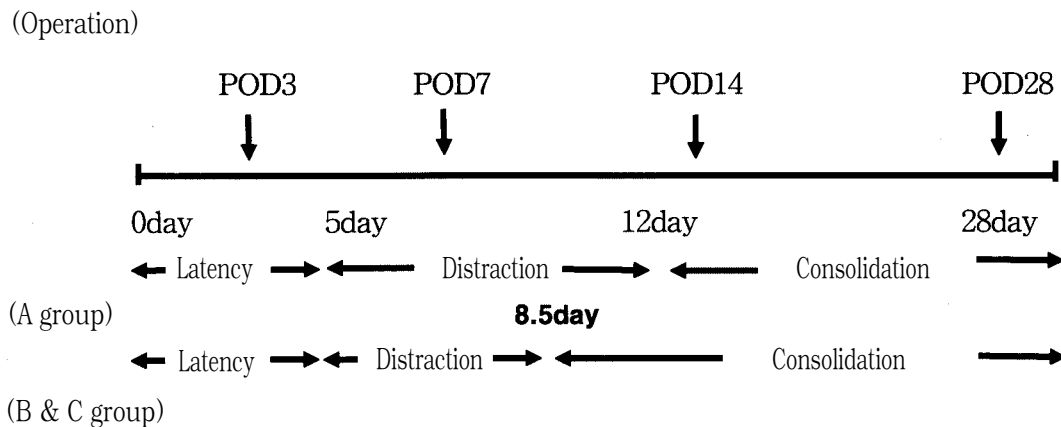
골신연부를 각 시기마다 채취 한 후 치과용 교합필름을 이용하여 일정 거리 하에서 65 kvp, 7.5 mA, 25 msec의 조건 하에 촬영하여 골절단부 및 신연골부에 대한 방사선학적 변화 양상을 검사하였다.

7) Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) Analysis

(1) Total RNA isolation

골형성에 관여하는 TGF- β 1, IGF-I 및 bFGF의 발현을 RT-PCR analysis를 이용하여 다음과 같이 검사하였다. 조직표본제작을 위해 채취된 부위의 반대편 골신장부를 양측 고정용 나사 내측부위에서 절제하고 즉시 액화질소에 넣어 급냉 시킨 뒤 막자사발에서 잘게 부수고 Trizol (Invitrogen Co, USA)를 첨가한 후 1/10배의 chloroform으로 처리하여 상층을 분리하였다. 다음 동량의 isopropanol로 처리하여 pallet을 DEPC-D.W 70% ethanol로 씻은 후 건조시켜 DEPC-D.W에 녹였다.

Table 1. Experimental Schedule.



(2) cDNA synthesis

분리된 total RNA를 random primer로 70℃에서 5분간 annealing 후 10 mM dNTPs (Roche Germany), RNasin, AMV (Avian Myoblastosis Virus) reverse transcriptase (Promega, USA), 5×buffer (Promega, USA)를 42℃에서 1시간 반응시켰다. cDNA는 260 nm에서 흡광도를 측정하여 reverse transcription reaction을 실시하였다.

(3) reverse transcription-PCR

정량된 cDNA로 TDMH (670 mM Tris-HCl (pH 8.8), 1% Tween 20, 166 mM ammonium sulphate, 100uM dNTP, 2 mM magnesium chloride buffer, 10 uM sense 및 antisense primer, 1 unit Taq polymerase 및 증류수를 가하여 총량을 25 μl로 한 후 58℃에서 30분간 처리한 후 다시 92℃에서 15초, 60℃에서 30초, 72℃에서 30초간 35회 실시한 후 72℃에서 10분간 PCR 반응을 시켰다. Primer sequence는 다음 Table 2와 같았다²¹⁾. mRNA level의 정확한 정량을 위해 human house keeping gene인 β-actin으로 확인하였다 (Fig. 8d). PCR 반응이 종료된 검체 들에서 각 산물을 10μ씩 취하여 6×loading buffer (0.25% bromphenol blue, 0.25% xylene cyanol, 30% glycerol in water) 2 μl와 혼합하여 2% 한천 겔 (agarose gel)에 100 V에서 30분간 전기영동하고 ethidium bromide로 염색하여 gel document system (Bio-Rad, USA)에서 분석하였다.

8) Quantitative analysis of PCR-product

각 군에서 발현된 성장인자들의 PCR-product 상을 스캔하여 Image Master VDS software (Pharmacia Biotech, version 2.0) 프로그램을 이용하여 두 마리 표본의 발현에 대한 절대치를 구하고, 평균치 값을 계산하였다. 각 그룹의 술 후 3일째 발현을 100으로 하여 상대치를 구하여 발현을 비교 분석하였다.

III. 결 과

1. 육안적 소견

술 후 모든 실험동물들은 저작장애로 1-2일 정도 고형사로 섭취가 제한적이었으나 감염, 체중감소 등의 합병증은 발생하지 않았다. 신연기 동안 A군은 신연장치를 회전시킬 때 저항감은 비교적 적었으나 B군에서는 다소 저항감이 느껴졌으며, 특히 C군에서는 그 정도가 심했다.

신연량의 증가로 하악 전치부는 반대교합 또는 심한 마모 상태를 보였는데 그 정도 또한 C군에서 현저하게 나타났다 (Fig. 5).

동물 희생으로 검체를 채취하여 실험군에 대한 골절단 부위의 육안적 평가를 시행하였다. 잠복기에 해당하는 술 후 3일째에서는 A군과 B군 그리고 C군 모두에서 골절단부에 혈액이 응고되어 있었다. 신연기에 해당하는 술 후 7일째에 A군과 B군 그리고 C군 모두 장치 제거 시 신연 부위가 쉽게 분리되었다. 술 후 28일째 A군은 뚜렷한 골신연부가 관찰되었으며 진전된 골형성으로 주위 정상골과 경계가 불분명하였고, B군은 감소된 섬유조직과 함께 골조직이 관찰되었으나, 인접 정상골에 비해 골밀도가 적어 경계 구별이 가능하였다. 그리고 C군은 약간의 골조직이 관찰되었으나 그 정도가 미미하였고, 장치 제거 시 여전히 쉽게 분리되었다.

2. 방사선적 소견

술 후 3일째에는 수술 시 절단한 부위가 A군과 B군 그리고 C군 모두 방사선 투과상을 나타내어 골절단부의 확인이 가능하였다. 신연기에 촬영된 술 후 7일째 방사선 사진에서는 A군과 B군 그리고 C군에서 신연 부위가 증가된 폭경 부위가 방사선 투과상을 보여 신연정도를 알 수 있었다. 술 후 28일째 촬영된 사진에서 A군은 골절단부 가까이 방사선 불투과상이 그리고 신연 중심부위에는 방사선 투과상이 나타났다 (Fig. 6a). B군은 신연부위에서 불규칙한 방사선 불투과상이 관찰되었다 (Fig. 6b). C군에서는 균일한 방사선 투과상을 보였다 (Fig. 6c).

Table 2. Polymerase Chain-Reaction Primer Information.

Gene	bp	Sense Primer	Antisense Primer
TGF-β1	271	CGGCAGCTGTACATTGACTT	AGCGCACGATCATGTTGGAC
IGF-I	345	GTACTIONTCAGAAGCAATGGGA	GGTGCGCAATACATCTCCAG
bFGF	282	TACAACCTTCAAGCAGAAGAG	CAGCTCTTAGCAGACATTGG

3. 조직학적 소견

잠복기에 해당하는 술 후 3일째 A군과 B군 그리고 C군 모두 혈종과 염증세포의 침윤상이 골절단 부위에서 관찰되었다 (Fig. 7a, b, c). 신연기에 해당하는 술 후 7일째 A군에서는 섬유성 가골이 보였으며 이와 함께 골형성도 관찰되었다 (Fig. 7d). B군에서는 섬유성 가골과 함께 A군보다는 미약하였지만 골형성이 관찰되었다 (Fig. 7e). 그리고 C군에서도 미약한 골형성이 관찰되었다 (Fig. 7f). 경화기에 해당하는 술 후 14일째 A군에서는 더욱 성숙된 골형성과 미약하지만 연골성 조직이 관찰되었다 (Fig. 7g). B군에서는 섬유성 조직이 여전히 관찰되었으며, 골형성도 보였다 (Fig. 7h). C군에서도 미약하게 골형성이 관찰되었다 (Fig. 7i). 술 후 28일째 A군에서는 신연부 양측의 가골 형성 및 신연 부위 내측으로 규칙적인 배열을 하는 섬유성 조직들이 관찰되었다. 또한 기존골과 신생골은 잘 연결된 양상을 보였다 (Fig. 7j). B군에서는 가골 형성 부위에서 부분적으로 연골내골화가 관찰되었으며, A군과 마찬가지로 신생혈관이 관찰되었다 (Fig. 7k). 또한 C군에서는 신연 부위에 인접한 부위에서 연골세포의 배열이 관찰되었다 (Fig. 7l).

4. RT-PCR 소견

1) TGF- β 1

신연기에 해당하는 술 후 7일째 A군과 B군에서 강한 발현을 보였으나, C군에서는 발현이 되지 않았다. 경화기에 해당하는 술 후 14일째에도 A군과 B군은 술 후 7일째와 비슷한 발현을 보였으나, C군에서는 거의 발현되지 않았다. 술 후 28일째까지 A군과 B군에서는 술 후 7일과 술 후 14일째보다는 약간 감소하였지만 여전히 발현이 유지되었으며, C군에서는 미미하나마 약한 발현을 보였다 (Fig. 8a, 9a).

2) IGF-I

술 후 7일째 A군과 B군에서는 모두 뚜렷한 발현을 보였고, 술 후 28일째까지 비교적 유지되었다. B군에서 A군보다 더 강한 발현이 나타났다. C군은 모든 시기에 발현이 되지 않았다 (Fig. 8b, 9b).

3) bFGF

술 후 7일째에 A군과 B군에서 TGF- β 1과 IGF-I 보다는 약하지만 증가된 발현을 보였고 술 후 14일까지 유지되었으며, 술 후 28일째에 A군은 감소된 발현을 보였고 B군은 거의 발현이 되지 않았다. 그리고 C군에서는 모든 시기에 발현이 되지 않았다 (Fig. 8c, 9c).

IV. 고 찰

신연 골형성술은 임상 적용 시 골절골술 (osteotomy), 잠복기 (latency period), 신연기 (distraction period), 경화기 (consolidation period), 재형성기 (remodelling period)의 5단계로 구성된다. 먼저 신연 시킬 부위에 골절단술 또는 피질골 절단술을 시행한 후 신연 장치를 장착하고 신연을 시작하기 전에 골절단부의 재혈관화와 염증의 소실을 위해 일정기간의 잠복기를 요한다. 이 시기는 골절 치유의 초기 단계와 유사한데 이 기간이 너무 짧으면 신연부위가 섬유성 결합이나 불유합이 될 수 있으며 너무 길면 조기 유합이 생길 수 있어 적절한 잠복기를 갖는 것이 중요하다²²⁾. 신연기 동안에는 신연속도와 신연빈도가 신연 골형성에 매우 중요한데⁷⁾, 하루에 신연되는 길이를 의미하는 신연속도 (distraction rate)에 대하여 Ilizarov 등은²⁻³⁾ 개의 경골을 이용한 실험에서 1 mm의 속도가 적절한 것으로 보고하였으며, 하루에 시행되는 신연횟수를 의미하는 신연빈도 (distraction rhythm)는 신연속도가 일정할 때 신연빈도가 증가하면 신연 골형성이 향상되고 연조직 손상이 최소로 되며, 신생혈관과 골형성이 촉진된다고 한다. 경화기는 신연 완료 후 신연 장치가 제거되기 전까지의 기간으로 신연 후 형성된 신생골이 더욱 성숙되고 필요한 강도를 얻게 되는 시기이다. 마지막 재형성기는 장치제거 후 신생골의 완전한 골개조가 이루어지기까지의 기간으로 초기에 형성된 신생골이 충만골에 의해 강화되고 피질골과 골수강 및 하버스관의 개조가 이루어지게 된다. 이와 같은 과정을 거쳐 신생골은 약 1년 이상의 기간이 지나면 기존의 골과 유사한 구조와 강도를 가지게 된다.

신연 골형성 시 나타나는 조직학적 골형성 기전에 대해 Ilizarov는²⁻³⁾ 개의 경골을 이용한 실험에서 연골내골화에 의해 골형성이 이루어 졌으며, 최상의 조건 하에서는 막내골화에 의한 골형성이 된다고 보고하였다. Delloye 등²³⁾과 Karp 등²⁴⁾은 신연골의 대부분이 장골에서와 유사하게 막내골화에 의해 형성된다고 하였다. 반면 Kojimoto 등²⁵⁾은 가토의 경골에서 신연골은 주로 연골내골화에 의해 형성된다고 보고하였고, Yasui 등²⁶⁾은 백서 대퇴골을 이용한 실험에서 연골내골화, 막내골화와 더불어 그 중간단계로 제시되는 제3의 골화기전을 보고하였다. 이는 연골세포에서 모세혈관 침투 없이 직접적으로 골형성이 일어나는 과정으로 transchondroid bone formation으로 구분하였다. 또한 Sato 등²⁷⁾은 잠복기 동안에는 골절 치유 시와 비슷한 조직학적 소견을 보이며 신연기에는 연골내골화에 의한 골형성이 이루어지다가 신연에 의한 골형성이 진행되면서 점차적으로 막내골화에 의해 골형성이 이루어진다고 하였으며 이와 같은 결과는 각각의 단계에서 일어나는 골화기전에 차이가 있음을 의미한다고 하였다. 신연 골형성에 있어 골형성

기전에 대한 현재의 지견은 막내골화와 연골내골화가 혼재되어 형성되지만 주로 막내골화에 의해 형성된다는 것이 받아들여지고 있다.

본 연구에서 A군의 술 후 7일째에 골세포와 함께 신생골 형성의 소견이 관찰되었는데 이는 막내골화에 의한 골형성으로 여겨진다. 그리고 술 후 28일째 소견에서는 주로 막내골화에 의한 골형성이 관찰되었으며, 일부 신생골 주변으로 연골세포의 배열이 관찰되었는데 이는 연골내골화에 의한 골형성으로 여겨진다. 이로써 적절한 조건 하에서는 주로 막내골화에 의한 골형성이 이루어진다고 보고한 다른 문헌 보고 들과 비슷하다. 이에 비해 B군과 C군에서는 막내골화 보다는 연골내골화에 의해 골형성이 이루어지는 것을 관찰할 수 있었다. 이는 1.4mm/day와 2.4mm/day로 신연속도를 빠르게 하였을 때는 신연 골형성이 진행되면서 막내골화에 의해 골형성이 된다고 보고한 Sato 들²⁷⁾의 연구결과와 차이를 보이는데 이것은 빠른 신연속도로 인해 신연 골형성이 진행되면서 연골내골화에 의한 골형성이 막내골화에 의한 골형성으로 진행되지 못한 것으로 추측되며, 본 연구에서는 술 후 28일까지 관찰을 하였는데 그 이후의 경화기에 일어나는 조직학적 소견 관찰이 필요할 것으로 생각된다.

지금까지 골형성에 관여하는 것으로 알려진 물질로는 transforming growth factor-betas (TGF- β), insuliner-like growth factor-I (IGF-I), basic fibroblast growth factor (bFGF), bone morphogenetic proteins (BMPs) 등의 성장인자가 있고, 교원성 단백질로는 제I형 교원질이 있고²⁸⁾ 비교원성 세포외기질 단백질로는 osteocalcin, osteonectin, osteopontin, collagen I 등이 있다²⁹⁾.

TGF- β 군은 25-kDa의 이합체 단백질군으로 골아세포를 비롯한 많은 세포의 성장과 분화를 조절한다고 알려져 있다. 이 성장인자 군에는 β_1 , β_2 , β_3 의 3가지 다른 형태가 있으며 유사하지만 다른 생물학적 기능을 하는 것으로 알려져 있다. 특히 TGF- β_1 은 골아세포 전구체에 대해 유사분열 촉진 (mitogenic) 효과를 가지며 배양 시 골아세포에 의해 생산되며 연골내골화 과정동안 골아세포와 골아세포 전구체에 의해 표현된다고 한다. 또한 재조합된 외인성 TGF- β_1 은 골절 치유를 가속화시킨다고 한다. Liu 등¹⁴⁾과 Yeung 등³⁰⁾은 골절 치유 기전과 비교하여 신연과 같은 기계적 자극이 TGF- β_1 의 발현 증가를 유도한다고 보고하였으며, Mehrara 등⁹⁾은 신연골 형성술 시 잠복기, 신연기, 그리고 경화 초기에는 TGF- β_1 의 발현이 정상골에 비하여 증가되며 신연 후 4주에는 거의 정상수준으로 감소된다고 보고하였고 이 결과는 하악골의 신연 골 형성 동안 골아세포의 이주, 분화, 세포의 기질 합성, 혈관 형성에 중요한 조절 역할을 한다는 것을 의미한다고 하였다.

본 연구에서 술 후 7일째부터 A군과 B군에서 강한 발현을 보였으며 술 후 28일까지 유지되었는데, 이와 같은 결과

는 다른 문헌보고와 비슷하였다. 그러나 A군과 B군에서 술 후 28일째까지 발현이 유지되는 것은 Mehrara 등⁹⁾이 신연기와 경화 초기에 증가된 발현을 보이다가 골형성이 진행되면서 발현이 감소한다는 연구결과와 다소 차이가 있었으므로, 개체수를 늘이고 동물의 종류를 달리하여 연구가 추가되어야 하겠다. 또한 C군에서 신연을 해도 적절한 골형성이 되지 않았으며, TGF- β_1 의 발현도 뚜렷하게 유도되지 않은 것으로 보아 골형성과 TGF- β_1 과의 연관 관계가 있을 수 있을 것으로 사료된다.

IGF-I은 골아세포의 증식 및 분화를 촉진하는 기능을 가지고 있다. 또한 다른 성장인자와 함께 골아세포 전구물질의 증식과 분화를 자극함으로써 골 발육, 성장과 재생 등의 과정에도 기여한다고 알려져 있다. 신연술 시 IGF-I 발현에 대해서 Schumacher 등³¹⁾은 확실한 신연 동안에만 골막성 IGF-I이 증가한다고 보고하였으며, Tavakoli 등³²⁾은 신연 20일 후와 경화기 20일 후에는 감소한다고 하였다. 이는 IGF-I이 신연기 동안에 중요한 작용을 하는 성장인자인 것을 알 수 있다.

본 연구에서 A군과 B군에서 신연 자극에 의해 IGF-I이 유도된 것은 다른 문헌결과와 비슷하였으나, 경화기까지 발현이 유지된다는 차이점이 있었다. 또한 B군에서 A군보다 더 뚜렷하게 발현이 되었으므로 골형성과 관련하여 1.4mm/day의 신연속도가 0.7mm/day의 신연속도 보다 더 좋을 수도 있을 가능성에 대해 더 연구되어야 하겠다.

bFGF는 골과 연골에 많이 존재하며 골아세포를 자극하여 골형성을 증진시키는데 중요한 작용을 한다고 알려져 있다. 또한 중요한 기능 중 하나는 골치유 동안 신경혈관 재생에 중요한 혈관화인자의 기능을 수행한다고 한다. 신연술 시 이 성장의 발현에 대한 연구로 Yeung 등³⁰⁾은 잠복기 또는 경화기 때 보다 신연 동안에 증가된 발현을 보였으며 이것은 신연과 같은 기계적 자극이 bFGF의 발현을 자극했다고 보고하였다.

본 연구에서도 Yeung 등³⁰⁾과 비슷한 결과를 보였으나, TGF- β_1 과 IGF-I 보다는 약하게 나타나서 상대적으로 골형성 지표로 이용하기에는 적절치 않은 것으로 생각된다.

이상의 연구결과를 종합해 볼 때 A군과 B군에서도 조직학적으로 골형성이 잘 되면서 동시에 세 성장인자들도 발현되는 것으로 나타나, 세 성장인자들이 골형성 정도의 지표로서 이용될 수 있을 가능성을 제시하였다. 또한 C군과 같이 매우 빠른 급속 신연 시 골형성이 잘 안되었으나, 세 성장인자들을 국소적 혹은 전신적으로 투여하였을 때 골형성이 잘 안될 것인지에 대해서는 앞으로 연구되어야 할 것이다. 그러나 Rauch 등¹⁹⁾은 TGF- β_1 의 치료학적 적용을 위한 실험 연구에서 골형성 효과를 증명하는데 실패하였으며, Marcus 등³³⁾은 오히려 골형성에 역효과를 보였다고 하였으므로, 정상적인 골형성을 보이는 경우에 세 성장인자를 더

많이 투여한다고 해서 골형성이 증가되는 것은 크게 기대되는 않으나, 다시 한번 연구가 필요하리라 생각된다.

V. 결 론

24마리 가토의 양측 하악골을 이용하여 0.7 mm/day, 1.4 mm/day와 2.4 mm/day로 신연속도를 다르게 하였고, 신연빈도는 모든 그룹에서 1일 2회로 설정했다. 5일간의 잠복기 후에 0.7 mm/day군은 7일 동안, 1.4 mm/day군과 2.4 mm/day군은 3일 12시간 동안 신연 하였다. 각 군에서 2마리씩 술 후 3일, 7일, 14일, 28일에 희생시켰으며 육안적, 방사선적 검사를 시행하였다. 표본은 조직 검사를 위해 H&E 염색을 하였고, RT-PCR 분석을 하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 0.7 mm/day와 1.4 mm/day 신연속도 군에서는 육안적, 방사선적 및 조직학적으로 성공적인 골형성이 관찰되었으며 2.4 mm/day 신연속도 군에서도 골형성은 관찰되었으나 인접 정상골과 뚜렷한 차이점을 보였다.
2. 성장인자 발현에 있어서는 0.7 mm/day와 1.4 mm/day군에서 신연으로 인하여 세 성장인자 모두 증가된 발현을 보였다. 두 군에서 모두 TGF- β 1과 IGF-I이 bFGF보다 강하게 나타났다. 2.4 mm/day군에서는 세 성장인자 모두 증가하지 않았다.

이상의 결과에서 볼 때, 가토의 하악골에서 하루에 1.4 mm/day의 신연속도 까지 적용하는 것이 좋을 것으로 보이며, 발현이 우세한 TGF- β 1과 IGF-I의 성장 촉진 효과에 대하여는 앞으로 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Codivilla A : On the means of lengthening in the lower limb, the muscles and tissues which are shortened through deformity. *Am J Orthop Surg* 2 : 353, 1905.
2. Ilizarov GA : The tension-stress effect on the genesis and growth of tissues: Part I. The influence of stability of fixation and soft-tissue preservation. *Clin Orthop* 238 : 249, 1988.
3. Ilizarov GA : The tension-stress effect on the genesis and growth of tissues: Part II. The influence of the rate and frequency of distraction. *Clin Orthop* 239 : 263, 1988.
4. Snyder CC, Levine GA, Swanson HM et al : Mandibular lengthening by gradual distraction. *Plast Reconstr Surg* 51 : 506, 1973.
5. Enigartner C, Coerper S, Fritz J, Gaissmaier C et al : Growth factors in distraction osteogenesis. Immunohistological pattern of TGF-beta 1, IGF- I in human callus induced by distraction osteogenesis. *Int Orthop* 23 : 253, 1999.
6. Boo-Kyoung Kim, Sang-Hun Shin, Jong-Ryoul Kim : A comparison study on distraction osteogenesis in the rat's tibia according to distraction rates. *J Kor Oral Maxillofac Surg* 26 : 620, 2000.

7. Jung-Ho Song, Sang-Hun Shin, Jong-Ryoul Kim : A comparison study on distraction osteogenesis in the rat's mandible according to distraction rhythm. *J Korean Academy Maxillofac Plast Reconstr Surg* 24 : 115, 2002.
8. Rowe NM, Mehrara BJ, Dudziak ME et al : Rat mandibular distraction osteogenesis: Part I. Histologic and radiographic analysis. *Plast Reconstr Surg* 102 : 2022, 1998.
9. Mehrara BJ, Rowe NM, Steinbrech DS et al : Rat mandibular distraction osteogenesis: II. Molecular analysis of transforming growth factor beta 1 and osteocalcin gene expression. *Plast Reconstr Surg* 103 : 536, 1999.
10. Warren SM, Mehrara BJ, Steinbrech DS et al : Rat mandibular distraction osteogenesis: Part III. Gradual distraction versus acute lengthening. *Plast Reconstr Surg* 107 : 441, 2001.
11. Campici P, Hamdy RC, Lauzier D et al : Expression of BMPs during mandibular distraction osteogenesis. *Plast Reconstr Surg* 111 : 201, 2003.
12. Kloen P, Doty SB, Gordon E et al : Expression and activation of the BMP-signaling components in human fracture nonunions. *J Bone Joint Surg Am* 84 : 1909, 2002.
13. Lammens J, Liu Z, Aerssens J et al : Distraction bone healing versus osteotomy healing: A comparative biochemical analysis. *J Bone Miner Res* 13 : 279, 1998.
14. Liu Z, Luyten FP, Lammens J et al : Molecular signaling in bone fracture healing and distraction osteogenesis. *Histol Histopathol* 14 : 587, 1999.
15. Li G, Berven S, Simpson H et al : Expression of BMP-4 mRNA during distraction osteogenesis in rabbits. *Acta Orthop Scand* 69 : 42, 1998.
16. Yu-Jin Jee, Hyun-Chul Song, Yeo-Gab Kim et al : Current review of molecular biology in distraction osteogenesis. *J Kor. Oral Maxillofac. Surg* 28 : 456, 2002.
17. Kawaguchi H : Stimulation of bone formation by recombinant fibroblast growth factor-2 in callotaxis bone lengthening of rabbits. *Calcif Tissue Int* 64 : 542, 1999.
18. Okazaki H, Kurokawa T, Nakamura K et al : Stimulation of bone formation by recombinant fibroblast growth factor-2 in callotaxis bone lengthening of rabbits. *Calcif Tissue Int* 64 : 542, 1999.
19. Rauch F, Lauzier D, Travers R et al : Effects of locally applied transforming growth factor-beta 1 on distraction osteogenesis in a rabbit limb-lengthening model. *Bone* 26 : 619, 2000.
20. Raschke MJ, Bail H, Windhagen S et al : Recombinant growth hormone accelerates bone regenerate consolidation in distraction osteogenesis. *Bone* 24 : 81, 1999.
21. Marie-Pierre Hellio, Le Graverand, Carol Reno et al : Gene expression in menisci from the knees of skeletally immature and mature female rabbits. *Orthop Res* 17 : 738, 1999.
22. Yu-Keun Oh, Hee-Kyun Oh, Sun-Youl Ryu : Effect of the latency period on alveolar ridge distraction using the intraoral distraction device in dogs. *J Korean Academy Maxillofac Plast Reconstr Surg* 23 : 324, 2001.
23. Delloy C, Delefortrie G, Coutelier L et al : Bone regenerate formation in cortical bone during distraction lengthening. An experimental study. *Clin Orthop* 250 : 34, 1990.
24. Karp NS, McCarthy JG, Schreiber JS et al : Membranous bone lengthening: a serial histologic study. *Ann Plast Surg* 29 : 2, 1992.
25. Kojimoto H, Yasui N, Goto T et al : Bone lengthening in rabbits by callus distraction. *J Bone Joint Surg(Br)* 70 : 543, 1988.
26. Yasui N, Sato M, Ochi T et al : Three modes of ossifica-

- tion during distraction osteogenesis in the rat. *J Bone Joint Surg Br* 79 : 824, 1997.
27. Sato M, Yau N, Nakase T et al : Expression of bone matrix proteins mRNA during distraction osteogenesis. *J Bone Miner Res* 13 : 1221, 1998.
28. Harris SE, Bonewald LF, Harris MA : Effects of transforming growth factor beta on bone nodule formation and expression of BMP-2, osteocalcin, osteopontin, alkaline phosphatase, and type 1 collagen mRNA in long-term cultures of fetal rat calvarial osteoblasts. *J Bone Miner Res* 9 : 855, 1994.
29. Hiltunen A, Hannu TA, Vuorio E : Regulation of extracellular matrix genes during fracture healing. *Clin Orthop* 297 : 23, 1993.
30. Yeung HY, Lee KM, Fung KP et al : Sustained expression of transforming growth factor-beta1 by distraction during distraction osteogenesis. *Life Sci* 24 : 67, 2002.
31. Schumacher B, Albrechtsen J, Keller J et al : Periosteal insulin-like growth factor I and bone formation. Changes during tibial lengthening in rabbits. *Acta Orthop Scand* 67 : 237, 1996.
32. Tavakoli K, Yu Y, Shahidi S et al : Expression of growth factor in the mandibular distraction zone: a sheep study. *Br J Plast Surg* 52 : 434, 1999.
33. Marcus F, Sciadini, John M. Dawson, Daxes Banit et al : Growth factor modulation of distraction osteogenesis in a segmental defect model. *Clin Orthop* 381 : 266, 2000.

저자 연락처

우편번호 442-060
경기도 수원시 팔달구 지동 93
가톨릭대학교 성빈센트병원 치과
송현철

원고 접수일 2004년 12월 3일
게재 확정일 2005년 2월 16일

Reprint Requests

Hyun-Chul Song
Dept. of Dentistry, St. Vincent's Hospital, The Catholic Univ.
of Korea, 93 Ji-Dong, Paldal-Ku, Suwon, 442-060, Korea
Tel : 82-31-249-7670 Fax : 82-31-258-3352
E-mail : omsjy@kornet.net

Paper received 3 December 2004
Paper accepted 16 February 2005

사진부도 설명

Fig. 1. Rabbit's mandible and distraction design of the model.

Fig. 2. Radiograph of rabbit's mandible.

Fig. 3. Osteotomy was performed between the premolar and mental foramen and the distraction device was placed.

Fig. 4. Extraoral photographs after operation.

Fig. 5. Extraoral photographs of rabbit demonstrating mandibular distraction.

a. Prior to distraction.

b. After distraction, severe cross-bite developed.

Fig. 6. Radiographic findings at 28 days in all groups.

Osteotomy line was remodeled in all groups and A28 & B28 distracted site were more radiopaque than C28.

Fig. 7. Histologic findings at 3, 7, 14, 28 days in all groups (H-E stain). Newly formed osteoid tissue (arrow) was viewed in A7. Small foci of endochondral ossification (arrow) was existed in A14, B7. The distraction gap was filled with new bone trabeculae in A28, B28. New bone trabeculae with osteoblast rimming were seen in C28.

Fig. 8. RT-PCR analysis demonstrating expression of growth factors.

a. Expression of TGF- β 1 at 3, 7, 14, 28 days in all groups.

b. Expression of IGF-I at 3, 7, 14, 28 days in all groups.

c. Expression of bFGF at 3, 7, 14, 28 days in all groups.

d. Expression of β -actin.

Note that growth factors expression increased during distraction, early consolidation, consolidation period in A, B group than C group.

Fig. 9. Quantitative analysis of growth factors.

a. Quantitative analysis of TGF- β

b. Quantitative analysis of IGF-I

c. Quantitative analysis of bFGF

Note that expression of TGF- β 1, IGF-I and bFGF were maintained at high level during distraction and consolidation period in A and B groups than C group.

사진부도 ①



Fig. 1. Rabbit's mandible and distraction design.

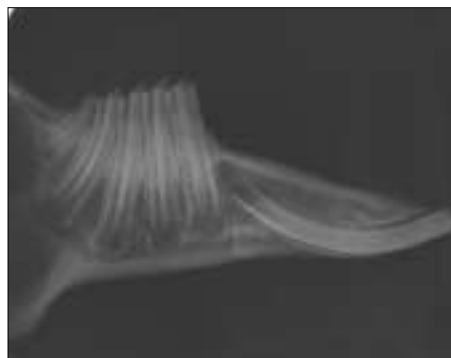


Fig. 2. Radiographic feature.



Fig. 3. Surgical procedure.



Fig. 4. Application of device.



a) preoperative feature

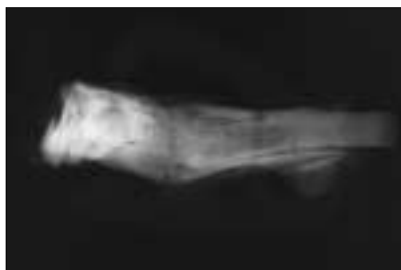


b) postoperative feature

Fig. 5. Extraoral photographs.



a) A28 (post-op 28 days)



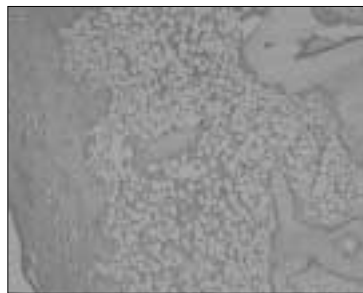
b) B28 (post-op 28 days)



c) C28 (post-op 28 days)

Fig. 6. Radiographic findings.

사진부도 ②



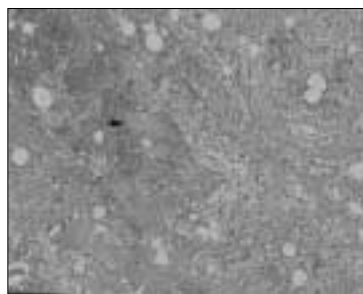
a) A3 (x 40)



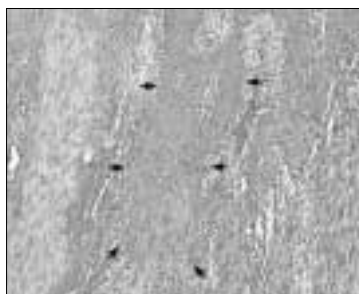
b) B3 (x 40)



c) C3 (x 40)



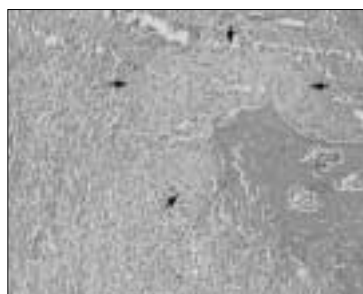
d) A7 (x 100)



e) B7 (x 100)



f) C7 (x 100)



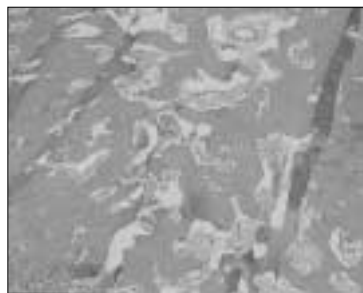
g) A14 (x 100)



h) B14 (x 100)



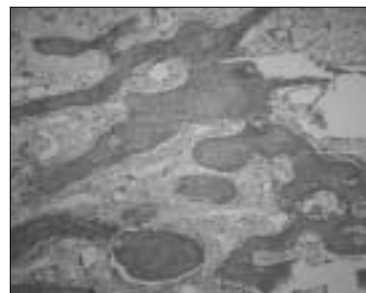
i) C14 (x 100)



j) A28 (x 40)



k) B28 (x 40)



l) C28 (x 100)

Fig. 7. Histologic findings (H&E stain).

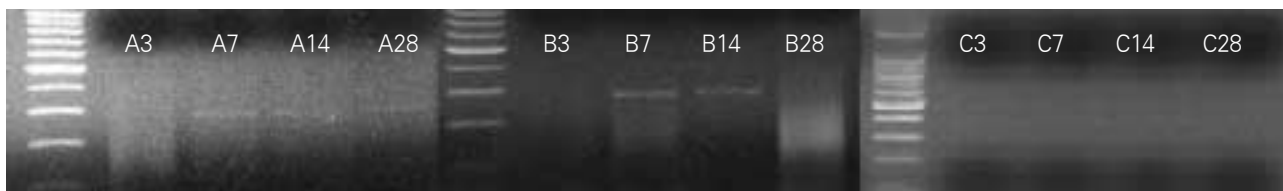
사진부도 ③



a. Expression of TGF- β 1



b. Expression of IGF-I



c. Expression of bFGF



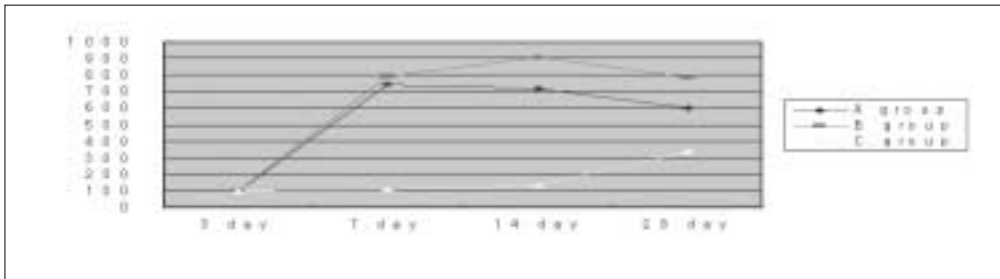
d. Expression of β -actin

Fig. 8. RT-PCR analysis.

사진부도 ④

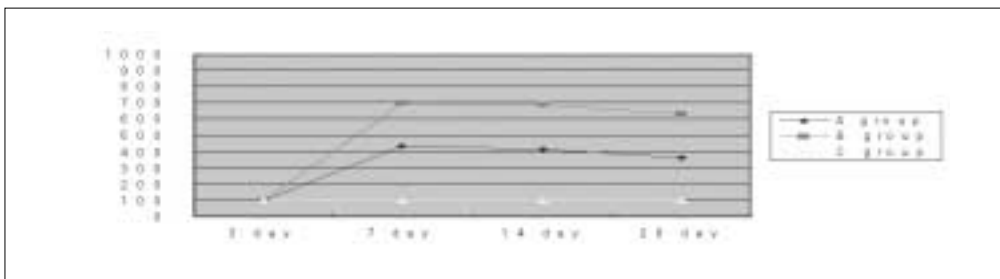
a. TGF- β 1

	3 day	7 day	14 day	28 day
A group	100	742	715	601
B group	100	790	903	789
C group	100	111	133	340



b. IGF-I

	3 day	7 day	14 day	28 day
A group	100	437	418	363
B group	100	695	687	632
C group	100	100	100	100



c. bFGF

	3 day	7 day	14 day	28 day
A group	100	341	358	260
B group	100	360	362	100
C group	100	100	100	100

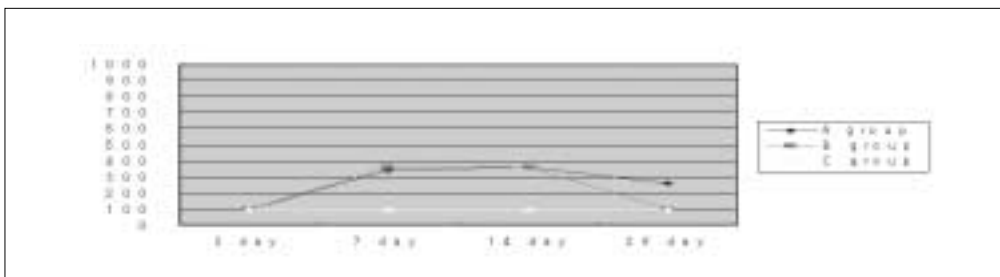


Fig. 9. Quantitative analysis of growth factors.