대구외지 2006;32:418-425

성견 하악골 신장술 후 신생골조직에서 Osteopontin 발현에 대한 연구

변준호[1] · 박봉욱[1] · 성일용[2] · 조영철[2] · 김종렬[3]

[1]경상대학교 의과대학 구강악안면외과학교실, 경상대학교 건강과학연구원, 경상대학교 생명과학연구원,
[2]울산대학교 의과대학 구강악안면외과학교실, [3]부산대학교 치과대학 구강악안면외과학교실

Abstract (J. Kor. Oral Maxillofac. Surg. 2006;32:418-425)

IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY OF OSTEOPONTIN EXPRESSION IN THE DISTRACTED BONE AFTER CANINE MANDIBULAR DISTRACTION OSTEOGENESIS

June-Ho Byun[1], Bong-Wook Park[1], Iel-Yong Sung[2], Yeong-Cheol Cho[2], Jong-Ryoul Kim[3]

[1]Department of Oral & Maxillofacial Surgery and Institute of Health Science, Research Institute of Life Science, Gyeongsang National University,
[2]Department of Oral & Maxillofacial Surgery, College of Medicine, Ulsan University
[3]Department of Oral & Maxillofacial Surgery, College of Dentistry, Pusan National University

Purpose: This study was aimed at evaluating the histological changes of new bone and expression of osteopontin (OPN) after mandibular distraction osteogenesis.

Materials and Methods: Unilateral mandibular distraction (0.5 mm twice per day for 10 days) was performed in eight adult dogs. Two animals were sacrificed at 7, 14, 28 and 56 days after completion of distraction, respectively. The distracted bones and contralateral non-distracted control bones were harvested and processed for histological and immunohistochemical examinations.

Results: The new bone was arranged to tension direction after distraction osteogenesis. 7 days after distraction, numerous osteoblasts lining the immature trabecular bone and fibroblast-like cells in the fibrous intrezone were observed. 14 days after distraction, the new formed trabecular bones were thickened compared with 7 days after distraction. 28 days after distraction, the fibrous interzone was almost filled with newly calcified bone, and it was more hardened at 56 days after distraction. Increased OPN signals detected in the osteoblasts lining the trabecular bone and fibroblast-like cells in the fibrous interzone at 7 and 14 days after distraction. At 28 days after distraction, the OPN was weakly expressed in the osteoblasts, and it was not detected in all cellular components of distracted bone at 56 days later of distraction.

Conclusions: After distraction osteogenesis, the distracted zone was completely calcified during the 56 days of consolidation period. In this study, the staining intensity of OPN increased in the osteoblasts and fibroblast-like cells at 7 and 14 days after distraction. The expression pattern of this protein shown here suggested that OPN play an important role in the osteogenesis during the early consolidation period.

Key words: Distraction osteogenesis, Histological changes, Osteopontin

Ⅰ. 서 론

요즘은 종양이나 기형 및 외상 등으로 인한 골 결손이 나타나는 증례에서 골이식술 대신 골신장술의 사용이 일반화 되었다. 골신장술이 임상적으로 사용된 것은 1950년대 Ilizarov에 의해 하지에서 처음 적용되기 시작하면서, 그에 따른 이론과 실험적 연구가 소개되면서 부터이다[1,2]. Ilizarov는 이미 성견의 경골(tibia)에 대한 골신장술에서 1 mm/day의 속도로 한번에 0.25 mm씩 4번에 걸쳐서 골을 신장하는 것이 가장 효과적이라 하였다[2]. 악골에 있어서는 Snyder 등[3]이 실험동물의 하악골에 골신장술을 처음으로 적용하였고, 그 후 Karp 등[4]도 5개월 된 개 10두의 하악골에 골신장술을 1 mm/day로 20일간 실시하여 장골에서와 같이 막내골화가 이루어 진다고 보고 하였다.

임상적으로 악골에 골신장술을 이용한 것은 McCarthy 등[5]이 4명의 소아 환자에게 평균 75개월 동안 18-24 mm의 하악골을 신장한 것을 발표한 것이 처음이며, 그 후 골신장술에 대한 활발한 실험적, 임상적 연구는 지금까지 이어지고 있다. 골신장술에 대한 이러한 연구는 지금까지 신장되는 골 자체의 변화에 대한 연구와 효과적인 골 생성을 위한 방법 등에 치중 되었으며[6,7], 최근들어 골신장술에 따른 골 주변조직의 변화에 대해 관심이 높아졌다 할 것이다. 하지만, 아직까지 골신장술 후 골

박 봉 욱
660-702 경남 진주시 칠암동 90
경상대학교 의과대학 구강악안면외과학교실
Bong-Wook Park
Dept. of OMFS, College of medicine, Gyeongsang National University
Chilam-dong 90, Jinju-city, Gyeongnam, #660-702, Republic of Korea
Tel: 82-55-750-8264 Fax: 82-55-761-7024
E-mail: parkbw@gsnu.ac.kr

※이 논문은 경상대학교병원 임상연구비 지원에 의한 것임.

조직에 나타나는 조직학적 변화와 여러 가지 골기질 단백질들(bone matrix proteins)의 역할에 대하여 명확히 밝혀진 것은 아니다.

일반적으로 골은 약 33%가 유기질로 구성되는데, 이 중 28% 정도가 제 I형 교원질이고 나머지 5% 정도가 비교원성 골기질 단백질이다[8]. 이러한 비교원성 골기질 단백질은 골화 과정 동안 골모세포에서 생성되는데, 여기에는 osteonectin, osteocalcin, osteopontin 및 bone sialoprotein 등이 있다[9]. 이 중 osteopontin (OPN)은 골대사에 관여하는 세포들의 골조직과의 부착과 이동을 증진시키고, 골의 광화도를 증가시킨다고 알려져 있다[10,11]. 하지만, 다른 골기질 단백질과 달리 OPN은 골화세포 뿐 아니라 파골세포(osteoclast)나 골조직이 아닌 다른 장기에서도 발현이 관찰되고, 그 생물학적 기능이 명확하게 밝혀 지지 않고 복잡하여 다기능 역할 (multifunctional role)을 보인다고 설명되고 있다. 또한, 골신장술 후 골의 유기질 변화에 대한 연구도 제I형 및 II형 교원질에 대한 연구[8,12]나 osteonectin 및 osteocalcin 등의 골기질 단백질에 대한 연구[13,14]는 비교적 다양하게 진행되었지만, OPN에 대한 연구는 아직 미비한 수준이다.

이에 본 연구는 하악골의 신장술 후 경화기 기간동안 신장된 골조직의 골화양상에 대한 조직학적 소견을 관찰하고, 세포외 단백질의 일종인 OPN의 발현양상을 연구하여 골신장술 후 골화과정에 OPN의 역할을 관찰하는데 그 목적이 있다.

Ⅱ. 연구대상 및 방법

1. 실험재료

실험을 위하여 체중 10kg 내외의 1-2년 잡종성견(mongrel dogs) 8 두를 암수 구별 없이 사용하였다. 실험동물은 실험 시작 전 1주 동안 적응기간을 주기 위하여 고형사료와 물을 이용하여 사육하면서 구충제를 투여하였으며, 모든 동물실험은 경상대학교 동물실험 윤리기준을 준수하며 이루어졌다. 골신연기구로는 구강내 골 신장기(Leibinger, Germany)를 사용하였다.

2. 수술 및 골신장 방법

실험동물의 마취를 위하여 Ketamine (Ketalar®, 유한양행, 한국) 10 mg/kg과 2% Xylazine (Rompun®, 바이엘 코리아, 한국) 2.0 mg/kg을 혼합하여 정맥주사하여 전신마취를 시행하였다. 실험동물의 양쪽 하악골과 구강내에 베타딘으로 소독 후 1:100,000 에피네프린을 함유한 2% 리도카인(광명제약, 한국)을 우측 하악 하연에 피하주사 하였다.

우측 하악골 하연에 평행한 피부절개를 가하고 단계적으로 골막하 부위까지 박리하여 우측 하악골의 협측 및 설측 피질골을 노출 시켰다. 이때 하악 제3소구치와 제4소구치 사이 또는 제4소구치와 제1대구치 사이에 협설측 피질골절단술을 계획하였으며, 설측 골막은 최소한으로 조심스럽게 fissure bur가 들어갈 정도만 견인하였다. 그 후 fissure bur를 이용하여 양쪽 치아사이에서 교합면에 수직으로 협설측 피질골만 절단하였고, 하치조신경이 손상 받지 않게 조심스럽게 하악골을 선상골절시킨 후 협측 피질골에 골신장기(Leibinger, Germany)를 부착 하였다. 골신장기를 하악골에 부착시 하치조신경에 손상을 주지 않기 위하여, 피질골 나사(screws)는 최대한 치조골쪽에 가깝게 부착하였다. 하악 후연 피부를 천공시킨 후 골신장기 막대(distractor rod)를 하악 후방 부위에 노출 시켰다. 이후 협측 골막과 근육을 최대한 견인하여 봉합한 후 하악 하연의 피부를 봉합 하였다. 술 후 5일간 1세대 Cephalosporin (Cefazolin sodium®, 유한양행, 한국)을 20 mg/kg 용량으로 하루 2회 근주하였다.

골절단과 골신장기 장착 후 5일 동안 휴지기(latency period)를 두어 손상된 골막의 재생과 염증의 소실 및 일차성 가골이 형성되도록 하였다. 수술 6일째부터 하악 후방으로 노출된 골신장 막대를 이용하여 골신장기를 한 번에 0.5 mm씩, 1일 2회 활성화 시켜, 하루에 1.0 mm의 속도로 10일간 골신장을 하였다.

3. 표본의 제작

골신장 후 7일, 14일, 28일, 그리고 56일째 각각 2 마리의 실험동물을 희생하였다. 희생은 전신마취상태에서 염산칼륨(KCl) 용액을 혈과내로 다량 투여하여 안락사 시켰다. 실험동물의 안락사 직후 골신장을 실시한 우측 하악골체 부위(실험군)를 블록절제(block resection) 하였다. 반대측 하악골체 부위(대조군)도 같은 방법으로 블록절제 하여 채취하였다. 실험군과 대조군에서 채취한 골 조직은 10% 중성 포르말린 고정액 (neutral buffered formalin)에 24 시간동안 고정하였으며, 이 후 5% 질산 용액에 1주일 정도 탈회하였는데, 손으로 만져보아 탈회정도를 가늠하였다. 그 후 일반적인 조직처리 과정을 거쳐 파라핀 블록을 만들었다. 이 블록을 절제하여 4 ㎛ 두께의 절편으로 만들었고, 일반적인 조직소견을 관찰하기 위하여 hematoxylin & eosin 염색을 실시하였다.

OPN 항체에 대한 면역염색을 위하여 자동면역염색기인 Automated Immunostainer (Ventana, Biotek system, Tucson, Ariz, USA)를 사용하였다. 먼저 4 ㎛ 두께로 절편을 만든 후 염색과정에 조직이 탈락하는 과정을 최소화하기 위하여 silane이 코팅된 슬라이드글라스를 사용하였으며, 절편은 실온에서 12시간 보관한 후 탈파라핀과 함수 과정을 거친 뒤 자동면역염색기를 사용하여 면역염색 하였다. 1:200으로 희석한 일차항체인 rabbit polyclonal anti-Osteopontin (ab8448, abcam, Cambridge, UK)을 특별한 전처리 없이 사용하였다. 면역염색 과정을 요약하면, 조직을 과산화수소(hydrogen peroxide)로 내인성 peroxidase를 차단한 후 37℃에서 32분간 OPN의 일차항체를 반응 시켰다. 그 후 슬라이드글라스를 Biotin을 부착한 이차항체인 biotylated polyvalent secondary antibody 용액으로 처리하였다. 이 후 horseradish peroxidase-conjugated avidin-biotin complex로 반응시킨 후 3,3-diaminobenzidine과 과산화수소를 사용하여 발색 하였으며, hematoxylin으로 핵을 대조 염색 하였다.

4. 면역조직화학 염색의 평가

면역조직화학 염색의 평가는 광학현미경 하에서 실험에 대한 사전 지식이 없는 두 명의 병리학자에 의해서 실시 되었다. 신장된 골조직에서 각 시기별 최소 5개 이상의 조직표본을 제작하였고, 신생골소주 주변의 골모세포(osteoblast) 및 골세포(osteocyte)와 신장골조직의 섬유성 중간층(fibrous inter-zone)내에 있는 미성숙 섬유모세포-유사세포(immature fibroblast-like cells)에서 각각 발현을 조사하였다. Tavakoli 등[15], Hu 등[16], 그리고 Park 등[17]의 연구에서와 같이 면역염색의 발현 강도는 +++, ++, +, 그리고 - 등급을 나누어 강, 중, 약, 그리고 음성으로 각각 구분하였다. 발현이 의심스러울 때는 +/-로 표시 하였다.

Ⅲ. 연구결과

1. 방사선학적 평가

경화기 7일과 14일째 까지는 신장된 골조직에 방사선 투과성이 관찰되었지만, 경화기 28일째부터 방사선 불투과성이 관찰되었고, 56일째에는 골화가 상당히 진행되어 거의 완전히 불투과성이 관찰되었다(Fig. 1).

2. 조직학적 소견(Hematoxylin &eosin 염색) 및 OPN의 발현

(1) 대조군 골조직

대조군의 골조직은 조직학적으로 정상적인 피질골과 해면골의 양상을 보이며, 해면골내의 골소주에 골모세포(osteoblasts) 및 골세포(osteocytes) 등이 관찰된다. OPN은 정상 대조군의 골조직의 세포성분에서는 발현이 관찰되지 않았다(Fig. 3-A).

(2) 골신장 완료 후 7일째

골신장술 완료 후 7일째에의 조직소견으로는 얇은 골소주(trabecular bone)를 가지는 신생골이 관찰되고, 이의 배열은 골신장 방향과 평행하였다. 골신장부 중심에는 골화가 덜 된 섬유성 간엽조직이 대부분을 차지하는 섬유성-중간층(fibrous interzone)이 관찰 되고, 여기에는 섬유모세포-유사세포(fibroblast-like cells) 및 다양한 크기의 혈관 등이 산재해 있었다. 신생골 형성은 골절단부 주변에서 골신장부 중심부로 진행하는 신생 골소주의 관찰로 확인 할 수 있었고, 또한 신생 골소주 주변을 이개하는 많은 골모세포가 관찰 되었다(Fig. 2-A).

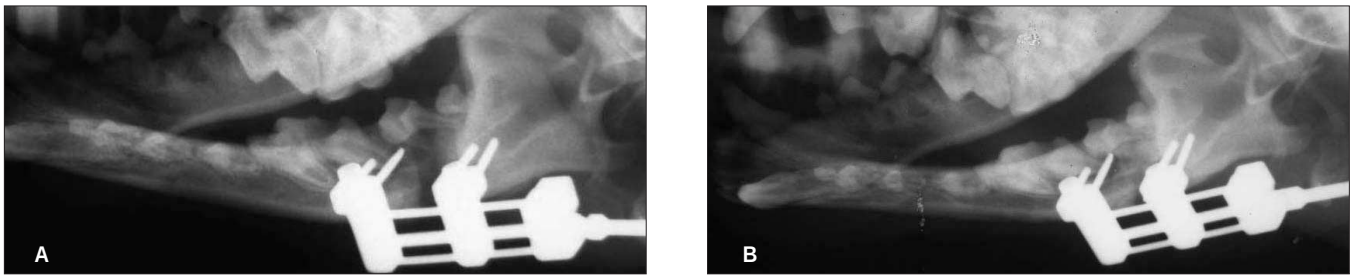

Fig. 1. Radiographs demonstrating the distraction and healing of the mandible.
(A) Immediately after completion of distraction, showing a distraction gap. (B) At 28 days after distraction; note the presence of bone consolidation within the gap.

Table 1. Semi-quantitative analysis of osteopontin staining in cellular components of the distracted bone following mandibular distraction osteogenesis.

	Osteoblasts	Osteocytes	Fibroblast-like cells
Control	–	–	–
7 days later	+++	++	+++
14 days later	+++	+	++
28 days later	+	+/-	–
56 days later	–	–	–

이 시기 OPN은 신생 골소주를 이개하는 골모세포와 섬유성-중간층 내부의 섬유모세포-유사세포 등에서 특히 강하게 관찰되었으며, 신생골 골내부의 골세포에서는 중증도로 발현이 증가되어 나타났다(Fig. 3-B).

(3) 골신장 완료 후 14일째

경화기 14일째에는 7일째와 비교하여 신생 골소주가 두꺼워졌으며, 골화가 점진적으로 진행됨에 따라 섬유성-중간층이 좁아져서 관찰되었다. 하지만, 전체적인 조직소견은 골신장 완료 후 7일째와 유사하게 신생 골소주를 이개하는 많은 골모세포와 섬유성-중간층내의 섬유모세포-유사세포가 관찰되었다(Fig. 2-B).

이 시기 OPN의 발현은 신생골소주를 이개하는 골모세포에서와 중간층 내부의 섬유모세포-유사세포에서 각각 강하거나 중증도로 발현이 증가 되어 나타났다. 이 시기 골세포에서는 OPN의 발현이 약하게 관찰되었다(Fig. 3-C).

(4) 골신장 완료 후 28일째

골신장 완료 후 28일째의 소견으로는 신생 골소주의 두께가 상당히 두꺼워졌으며, 신장부 중간의 섬유성-중간층은 거의 골화가 완전히 진행되어 섬유모세포-유사세포는 이 시기부터 거의 관찰되지 않았다. 신생골 골소주는 두꺼워 지면서 골모세포의 수가 감소된 것을 볼 수 있었다(Fig. 2-C).

이 시기 OPN의 발현은 신장술 완료 후 7일과 14일째 보다 현저히 감소되어 골모세포에서만 약하게 관찰되었다(Fig. 3-D).

(5) 골신장 완료 후 56일째

골신장 완료 후 56일째에는 신생골의 두께가 더욱 두꺼워져 대조군의 비신장 골과 차이가 없었다. 신생골 골소주 주변의 골모세포의 수는 상당히 감소하여 나타났고, 신장 중심부의 섬유성-중간층은 완전히 골화된 모습이며, 부분적으로 연골내 골화의 흔적은 관찰되었다. 특히, 이 시기는 중간층의 골화로 섬유모세포-유사세포는 관찰되지 않았다(Fig. 2-D).

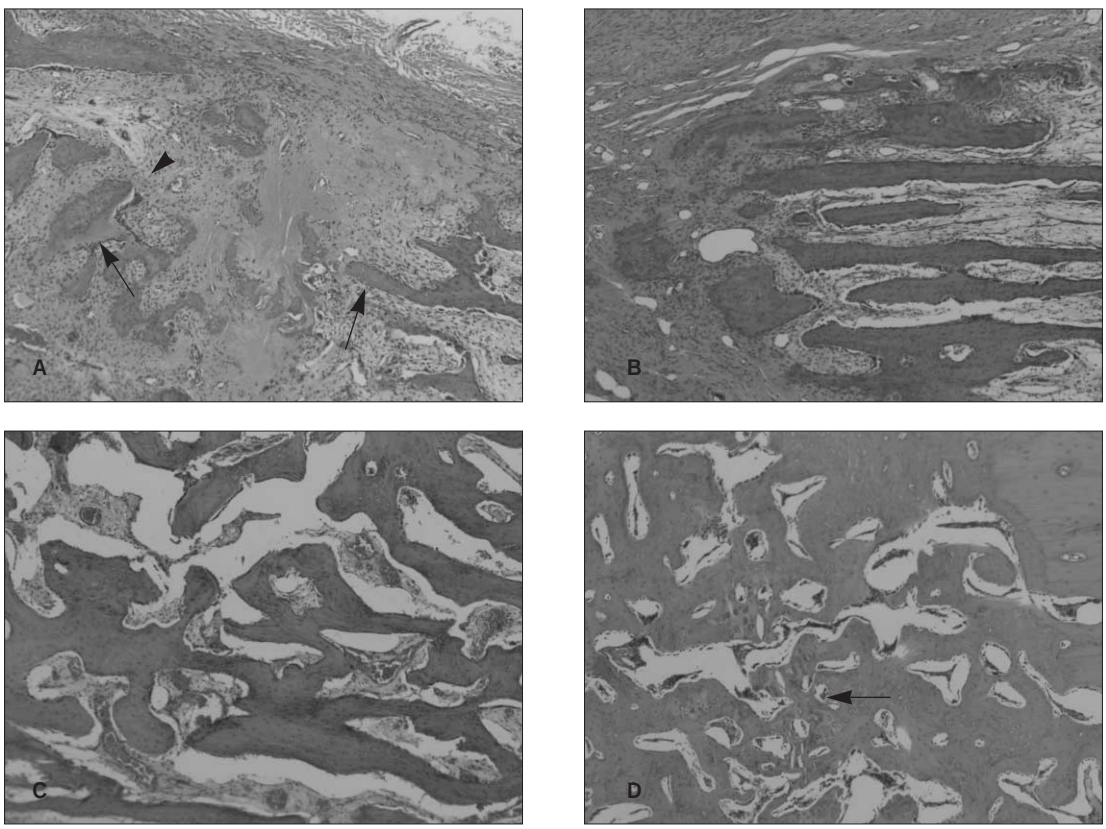

Fig. 2. Hematoxylin and eosin stained section (original magnification ×40).
(A) 7 days after distraction. Numerous immature fibroblast-like cells were observed in the gap interzone (arrowhead). At this time, we also found numerous osteoblasts lining immature trabecular bone (arrow). (B) 14 days after distraction. The fibrous interzone and lining osteoblast were also observed at this time. (C) 28 days after distraction. The fibrous interzone was almost filled with newly calcified bone, and newly formed trabecular bone was thickened compared with early stage of consolidation phase. (D) 56 days after the completion of distraction. The distracted gap was completely filled with matured bone, but partial cartilage-like tissues was observed in the center of distraction gap (arrow).

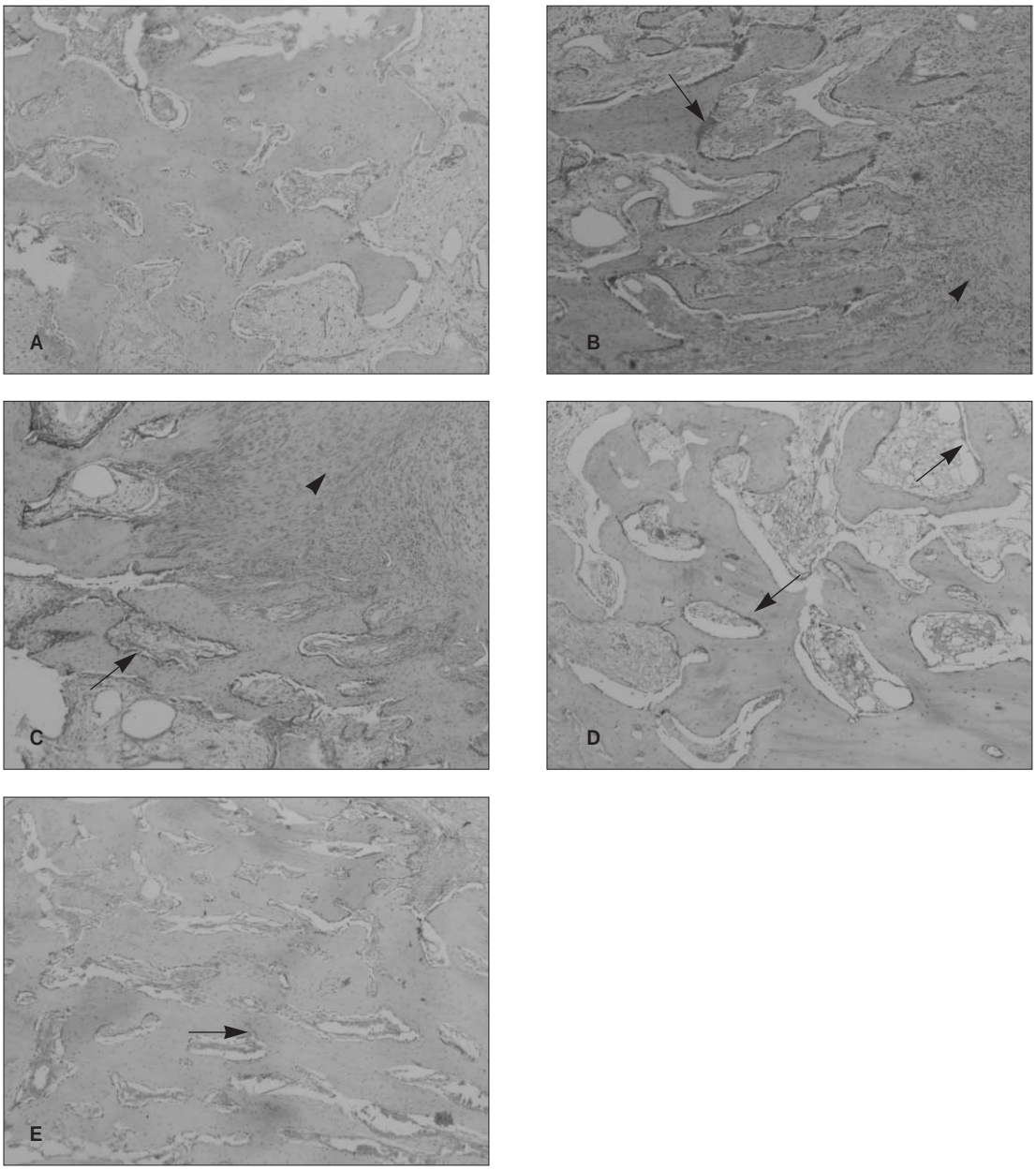

Fig. 3. Immunostaining of osteopontin (OPN) in distracted bone (original magnification ×40).
(A) Control specimen. Negative staining was detected in the cellular components of the undistracted control specimen. (B) 7 days after distraction. Strong OPN signals were detected in the osteoblasts lining immature trabecular bone (arrow). At this time, elevated OPN signals were also detected in the fibroblast-like cells in the distracted interzone (arrowhead). (C) 14 days after distraction. The increased OPN signals were also observed in the lining osteoblasts (arrow) and fibroblast-like cells (arrowhead). (D) 28 days after distraction. The OPN was weakly detected only in the lining osteoblasts (arrow). (E) 56 days after distraction. At this time, the OPN was not detected in cellular components of distracted zone. Arrow indicate that newly formed bone in the distracted interzone

이 시기 OPN의 발현은 대조군에서와 유사하게 거의 모든 골조직의 세포성분에서 발현이 관찰되지 않았다(Fig. 3-E).

골신장술 후 신생골조직 세포성분에서의 OPN발현 양상은 Table 1에 나타나 있다.

Ⅳ. 총괄 및 고찰

요즘은 임상적으로 골이식술이 필요한 많은 증례에서 골신장술이 사용되고 있으며, 또한 골신장술에 대한 많은 임상적-실험적 연구가 다양하게 진행되었다. 선행된 연구들에서 골신장술 후 골화되는 양상의 조직학적 특징에 대해서는 비교적 잘 알려졌다[1,2,13]. 일반적으로 골신장술시는 골절단부 중앙에 섬유성-중간층(fibrous interzone, FIZ)이 있으며, 여기에는 주로 섬유모세포-유사세포와 간엽세포가 교원질과 평행하게 관찰된다. 섬유성-중간층(FIZ)의 양측 바깥에 primary matrix fronts (PMFs)가 놓이는데, 여기에서 주로 미분화 간엽세포가 골모세포로 분화 및 증식하게 된다. PMFs의 양 바깥쪽으로 microcolumn formation (MCF)가 각각 양쪽으로 놓이며, 여기에서는 골모세포나 골세포 주변으로 확장된 골기질(bone matrix)이 관찰된다[18]. 또한, 골신장술에 따른 골형성은 상당히 빠른 속도로 진행되며, 발생기 때의 골형성 보다 7배정도 빠르다고 알려져 있다[19]. 이러한 현상은 기계적-인장력(mechanical tension stress)이 골형성을 증진시키기 때문으로 간주된다[18,20]. 하지만, 이러한 기계적 힘이 골신장술 동안에 골모세포에 어떠한 영향을 미치는지에 대해서는 아직 명확하지 않다. 골모세포는 골형성에 가장 중요한 역할을 할 뿐 아니라 다양한 세포외 단백질을 형성하는데, 골모세포에서 생성된 제 I형 교원질이 골의 세포외 단백질의 약 90%를 구성하고, 나머지 10% 정도의 세포외 유기질이 비교원성 단백질이다[8,12]. 이런 다양한 골의 비교원성 세포외 단백질 중 하나인 OPN은 정상적인 골조직에서는 구성비율이 적지만, 골의 형성과 개조시 골모세포에서 급격히 분비가 증가되는 것으로 알려져 있다. 다른 연구에 의하면 신생골 형성 시작 14일 째 OPN의 분비가 가장 높았으며, 그 후 천천히 발현이 감소한다고 하였다[21,22]. 하지만, OPN이 신생골 형성시 급격히 증가되고, hydroxyapatite와 결합하여 골의 광화도를 증가시키는 명확한 역할[11]이 있음에도 불구하고, 그 정확한 기능에 대해서는 아직도 논란이 많다. 그 이유는 OPN은 골모세포에서 생성되는 골기질 단백질이면서 다른 골기질 단백들과는 달리 골화세포 뿐 아니라 파골세포와 같은 골흡수성 세포와도 밀접하게 반응하며[10], 1,25-dihydroxyvitamine D3나 retinoid acid와 같은 골흡수성 인자에 의해서도 OPN의 합성이 증가되고[9], 골조직에서 뿐 아니라 신장이나 간 조직 같은 비광화성 조직에서도 OPN이 관찰되는[21] 등 서로 상반되고 모순되는 역할 때문이다. 이러한 OPN의 상반된 역할에 대해서 많은 학자들은 OPN의 다기능성 역할 (multifunctional role)이라 설명하고 있다. 또한, 구조적으로 OPN은 glycine-arginine-glycine-aspartate-serine (GRGDS)의 특징적인 세포부착 폴리카르복실기(polycarboxylate sequence)를 가지는데, 이를 이용하여 골기질내의 골모세포, 파골세포, 그리고 섬유모세포 등의 다양한 세포들과 결합한다고 알려져 있다[23-25].

골신장술에 따른 골형성은 대부분 막내 골화이다. 하지만, 빈번히 연골내 골화와 혼합형 골화가 관찰된다. OPN은 어떠한 골형성 단계에 중요하게 관여하는지 아직 잘 알려져 있지 않았다. 다른 연구에 의하면, 골신장술 중간에 OPN은 중심부의 섬유성-중간층에서 섬유모세포-유사세포에서 높게 발현 되었으며, 혼합형 골화 부위에서 또한 OPN이 높게 발현 되었다고 하였다[26]. 막내 골화 되는 부위에서 OPN은 양면발현(bimodal or biphasic expression)을 나타냈는데, 분화되는 골모세포-전구세포(proliferating pre-osteoblast)에서는 높게 발현되지만, 분화 후의 골모세포-전구세포(post-proliferating pre-osteoblast)에서는 발현되지 않았고, 성숙된 골모세포에서 다시 높게 발현되었다. 이러한 양면발현은 OPN의 다기능 역할을 잘 설명하는 것으로, OPN은 골신장술 초기에는 골모세포-전구세포의 분화와 이주에 관여하고, 후기에는 hydroxyapatite 결정체 형성에 필요할 것으로 추측하였다[18,26].

본 연구에서 조직학적으로 골 신장술 완료 후 7일째에는 아직 골화가 덜된 얇은 골소주가 골신장 방향에 평형하게 배열된 것을 볼 수 있었고, 신장 중심부에 골화가 덜 된 넓은 섬유성-중간층을 관찰 할 수 있었다. 이 후 경화기의 시간이 경과 함에 따라 골소주가 점점 두꺼워지고, 섬유성-중간층도 점점 골화가 진행되어 골신장술 후 28일째는 거의 모든 중간층이 사라졌고, 56일째는 골화가 완성된 것을 확인 할 수 있었다. 또한 신장술 완료 7일째 관찰되던 신생 골소주를 이개하는 많은 골모세포들도 신장부에 골화가 진행됨에 따라 점점 수가 감소하였다. 따라서 골신장술 후 약 56일 동안의 경화기 기간에 골신장부는 조직소견상 거의 모든 골화가 완성된다고 결론 내릴 수 있었다. 이는 생리학적 한계내의 골신장율을 적용하고 골화정도를 조직학적으로 관찰한 다른 연구들과도 유사한 결론이었다[2,13].

또한, 본 연구에서 관찰한 OPN의 발현양상은 정상 대조군의 세포성분에서는 발현이 관잘되지 않았으나, 골신장술 완료 후 7일째에는 신생골소주를 이개하는 골모세포와 중간층내의 섬유모세포-유사세포에서 강한 발현을 나타났고, 이는 골신장술 완료 14일째까지 유지 되었다. 골신장 완료 28째에는 OPN의 발현이 감소하여 골모세포에서만 약하게 발현되었고, 골신장 완료 56일째에는 신장된 골조직의 세포성분에서 OPN의 발현이 관찰되지 않았다. 즉, 골신장 후 7일째와 14일째까지 골화세포에서의 OPN의 발현이 높게 유지 되었는데, 이러한 결과는 신생골 형성시 14일 후 골모세포에서 OPN의 발현이 가장 높다는 연구[22]와는 발현 시기에서 약간의 차이를 보이는 것으로, 이는 골신장술과 발육성 골화라는 연구방법의 차이 때문으로 추측된다. 즉, 골신장술 적용은 지속적인 신장력을 적용하기에 본 연구에서와 같이 신장술 완료 후 7일째에 OPN이 가장 높게 나타났다고 볼 수 있으며, 이는 골신장술 완료 후 경화기 초기에 골모세포와 섬유모세포-유사세포 같은 골화세포에서 OPN의 생성과 분비가 이루어 진다는 증거이다. 또한 이러한 결과는 다른 연구들[18,25]에서 이미 밝혀진 것처럼 OPN이 골신장기 활성화 기간(distractor activation period)에만 작용하여 골모세포-전구세포의 분화를 촉진시키는 역할만 있는 것이 아니라, 골

신장술의 경화기에도 골화세포에서 분비가 증가되어 골신장 부위의 골화를 촉진 시킨다는 의미일 것이다. 또한, OPN의 다기능적 역할을 고려할 때, OPN은 골신장술 후 골화세포 뿐 아니라 파골세포의 활성을 증진시키고 골흡수를 유도하는 여러 요소와도 상호 작용하리라 추측된다. 이러한 일련의 작용은 결론적으로는 골신장술 후 골생성과 골개조의 골대사 과정을 활성화 시켜서 신생골 형성을 촉진하는 역할을 하리라 보인다. 향후 골신장술과 관계된 OPN의 좀더 명확한 역할을 규명하기 위하여는 골신장 도중과 골신장술 직후에 다른 세포외 골기질 단백질과 연계하여 추가적인 연구가 필요하리라 보인다.

Ⅴ. 결 론

저자 등은 하악골 골신장술 후 신장된 골조직의 조직학적 변화와 세포외 비교원성 단백질인 osteopontin (OPN)의 발현양상을 연구하기 위하여 1-2세 성견 8두의 하악골에 하루에 1 mm (0.5 mm 씩 하루 두 번)의 속도로 10일간 골신장술을 실시한 후 골신장술 완료 7일, 14일, 28일, 그리고 56일째에 각각 2두의 실험동물을 희생하여, hematoxylin & eosin 염색과 OPN에 대한 면역염색을 실시하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 대조군의 골조직은 해면골에서 골소주와 골모세포와 골세포 등이 관찰된다. OPN은 정상 대조군의 골조직에서는 발현이 관찰되지 않았다.
2. 신장술 완료 후 7일째에는 조직학적으로 얇은 골소주가 신장방향과 평행하게 관찰되고, 골소주를 이개하는 많은 골모세포가 관찰되었다. 신장 중심부에는 골화가 덜 된 섬유성 간엽조직이 섬유성-중간층을 형성하는 것이 관찰되고, 여기에는 많은 섬유모세포-유사세포가 관찰되었다. 이 시기 골소주를 이개하는 골모세포와 중심부의 섬유모세포-유사세포 등의 골화세포들에서 OPN의 강한 발현이 관찰되었다.
3. 신장술 완료 후 14일째에는 조직학적으로 신생골의 골소주가 신장술 완료 후 7일째에 비해 두꺼워진 양상을 보였으며, 신장 중심부의 섬유성-중간층의 간격이 좁아진 것을 관찰할 수 있었다. 이 시기에도 골모세포와 섬유모세포-유사세포에서 OPN의 발현이 증가되어 강하거나 중증도로 관찰되었다.
4. 신장술 완료 후 28일째에는 조직학적으로 신생 골소주가 상당히 두꺼워지고, 섬유성-중간층도 거의 골화가 이루어진 것을 관찰할 수 있었다. 이 시기 OPN은 신생 골소주를 이개하는 골모세포에서만 약한 발현이 관찰되었고, 다른 세포성분에서는 발현이 거의 관찰되지 않았다.
5. 신장술 완료 후 56일째에는 조직학적으로 신생 골소주가 상당히 두꺼워지고, 섬유성-중간층에도 완전 골화가 일어나 대조군의 골과 구분되지 않았다. 또한, 이 시기 OPN은 대조군 조직과 유사하게 신장된 골조직의 모든 세포성분에서 발현이 관찰되지 않았다.

참고문헌

1. 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 1989;238:249-281.
2. 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 1989;239:263-285.
3. Snyder CC, Levine GA, Swanson HM, Browne EZ: Mandibular lengthening in the craniofacial skeleton. Plast Reconstr Surg 1973;51:506-508.
4. Karp NS, Thorne CHM, McCarthy JG, Sisson HA: Bone lengthening in the craniofacial skeleton. Ann Plast Surg 1990;24:231-237.
5. McCarthy JG, Schreiber J, Karp NS, Thorne CHM, Grayson BH: Lengthening the human mandible by gradual distraction. Plast Reconstr Surg 1992;89:1-8.
6. Aqerreta JD, Forriol F, Canadell J: Complications of bone lengthening. Int Orthop 1994;18:299-303.
7. Fang TD, Nacamuli RP, Song HM, Fong KD, Warren SM, Salim A, Carano RA, Filvaroff EH, Longaker MT: Creation and characterization of a mouse model of mandibular distraction osteogenesis. Bone 2004;34:1004-1012.
8. 강대실, 지유진, 송현철: 가토 하악골에서 신연 골형성술시 제I형 및 II형 교원질의 발현. 대구외지 2004;30:261-270.
9. Kasugai S, Todescan R, Nagata T, Yao KL, Butler WT, Sodek J: Expression of bone matrix proteins associated with mineralized tissue formation by adult rat bone marrow cells in vitro: inductive effects or dexamethasone in the osteoblast phenotype. J Cell Physiol 2003;147:111-120.
10. Chen J, Shapiro HS, Sodek J: Developmental expression of bone sialoprotein mRNA in rat mineralized connective tissues. J Bone Mineral Res 1992;7:987-997.
11. Goldenberg A, Warner KJ, Li MC, Hunter GK: Binding of bone sialoprotein, osteopontin and synthetic polypeptides to hydroxyapatite. Connect Tissue Res 2001;42:25-37.
12. 임순모, 안병근, 박영주, 박희건, 박준우, 이건주: 성견 하악골체부 신장시 신장부위의 증식세포핵항원과 제I형 교원질 발현에 관한 연구. 대구외지 2001;27:385-393.
13. 백선호, 안병근, 박영주, 박희건, 박준우, 이건주, 이용찬, 조병욱: 성견 하악골 절단 후 기계적 골 견인에 의해 형성된 골 신장부에 대한 시기별 조직학적 변화. 대구외지 2001;27:404-414.
14. 김동준, 지유진, 송현철: 가토 하악골에서 신연 골형성술시 osteonectin의 발현. 대구외지 2004;30:391-399.
15. Tavakoli T, Yu Y, Shahidi S, Bonar F, Walsh WR, Poole MD: Expression of growth factors in the mandibular distraction zone: a sheep study. Br J Plast Surg 1999;52:434-439.
16. Hu J, Zou S, Li J, Chen Y, Wang D, Gao Z: Temporospatial expression of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor duringmandibular distraction osteogenesis. J Cranio-Maxillofac Surg 2003;31:238-243.
17. Park BW, Kim JR, Lee JH, Byun JH: Expression of nerve growth factor and vascular endothelial growth factor in the inferior alveolar nerve after distraction osteogenesis. Int J Oral Maxillofac Surg 2006;35:624-630.
18. Perrien DS, Brown EC, Aronson J, Skinner RA, Montague DC, Badger TM, Lumpkin CK Jr: Immunohistochemical study of osteopontin expression during distraction osteogenesis in the rat. J Histochem Cytochem 2002;50:567-574.
19. Pacicca DM, Patel N, Lee C, Salisbury K, Lehmann W, Carvalho R, Gerstenfeld LC, Einhorn TA: Expression of angiogenic factors during distraction osteogenesis. Bone 2003;33:889-898.
20. Bouletreau PJ, Warren SM, Longaker MT: The molecular biology of distraction osteogenesis. J Craniomaxillofac Surg 2002;30:1-11.
21. Nomura S, Wills AJ, Edwards DR, Heath JK, Hogan BL: Developmental expression of 2ar (osteopontin) and SPARC (osteonectin) RNA as revealed by in situ hybridization. J Cell Biol 1988;106:441-450.

22. Chen J, Singh K, Mukherjee BB, Sodek J: Developmental expression of bone sialoprotein mRNA in rat mineralised connective tissue. Matrix 1993;13:113-123.
23. Gordjestani M, Dermaut L, De Ridder L, Thierens H, De Waele P, De Leersnijder Willy W, Bosman F: Osteopontin and bone metabolism: a histology and scintiraphy study in rats. Int J Oral Maxillofac Surg 2005;34:794-799.
24. Nomura S, Takano-Yamamoto T: Molecular events caused by mechanical stress in bone. Matrix Biol 2000;19:91-96.
25. Huang W, Carlsen B, Rudkin G, Berry M, Ishida K, Yamaguchi DT, Miller TA: Osteopontin is a negative regulator of proliferation and differentiation in MC3T3-E1 pre-osteoblastic cells. Bone 2004;34:799-808.
26. Sato M, Yasui N, Nakase T, Kawahata H, Sugimoto M, Hirota S, Kitamura Y, Nomura S, Ochi T: Expression of bone matrix proteins mRNA during distraction osteogenesis. J Bone Miner Res 1998;13:1221-1231.