

사람 태아 골모 세포에 대한 냉동 동종골과 근골격이식재의 골형성 유도에 관한 효과

윤호상, 피성희, 유형근*

원광대학교 치과대학 치주과학교실

I. 서 론

대부분의 치주질환은 치주병원균과 숙주사이의 면역반응으로 인해 치주조직에 염증성 반응이 발생하게 된다. 이러한 염증반응은 치주조직을 구성하고 있는 치은, 치조골, 백악질, 치주인대에 병적 변화를 야기하게 되는데, 특히 다형핵백혈구에서 유리된 여러 가지 염증성 세포전달물질에 의해 치조골에 있어 파골세포를 활성화시키게 되고 치조골을 구성하고 있는 골기질이 파괴되며, 치아의 기능상실을 초래하게 된다. 치주치료의 최종 목적은 질환의 진행을 정지시키는 것 뿐만 아니라 파괴된 지지조직들을 파괴 이전의 상태로 재생시키는 데 있다¹⁾. 그러나, 치주 치료를 통해 치주병원균을 감소시키고 염증반응을 제거 하더라도 파괴된 치조골은 이전의 정상상태로 완전하게 재생되지는 않으며, 치주치료 후 치주조직을 이루고 있는 치은, 치주인대, 치조골, 백악질은 상실된 상태로 재배열되고 안정화를 이루게 된다^{2,3)}. 특히, 연조직인 치은조직보다 경조직인 치조골의 치유

과정이 상대적으로 느림으로 인해, 골결손부가 있는 경우 조직유도재생술이나 골이식술을 시행하지 않으면, 육아조직을 제거한 골결손부가 완전한 치조골로 재생되는 것은 어렵다^{4,5,6)}. 많은 연구에서 골 결손부의 재생과 회복을 위한 골 이식술의 긍정적인 효과가 보고되어져 왔다⁷⁾. 또한 치아주변의 지지골의 재생 뿐만 아니라 보다 광범위한 치조골 재생이 요구되는 임플란트 식립을 위해 감소된 치조제의 고경과 폭경의 극복과 상악동 이식술과 같은 골이식술의 필요성은 점차 증가하고 있다.

치아주위의 골내양의 제거와 임플란트 식립을 위한 치조제의 회복을 위해 사용되는 골 이식술에 사용되는 이식재로는 기원에 따라 자가골, 동종골, 합성골로 구분할 수 있다^{8,9,10)}. Schallorn¹¹⁾은 이상적인 이식재로 생물학적 적합성, 예견성, 임상적 실현성, 최소한의 수술 위험성과 후유증, 술자 및 환자의 부담이 적을 것 등을 제시하였으나, 이상의 모든 조건들을 만족시킬 만한 이식재는 존재하지 않는다. 그러나, 여러 연구에서 가장 우수한 이식재는 자가

* 연구비 : 본연구는 2005년도 원광대학교의 교비지원에 의한 연구임

* 교신저자 : 피성희, 전북 익산시 신용동 344-2, 원광대학교 치과대학 치주과학교실, 우편번호 : 570-749

Email : pshperio@wonkwang.ac.kr

골이 추천되는 데 동종골, 이종골, 합성골이 갖고 있지 않은 골형성능을 갖고 있기 때문이다^{12,13}. 그러나 자가골의 경우 채취량의 제한, 부가적 수술부위의 필요와 그로 인한 환자의 불편감증가, 치근흡수들의 단점을 가지고 있다^{14,15}. 자가골과 함께 동종골, 이종골, 합성골 등이 치과임상에서 널리 사용되고 있다.

동종골 이식에 대한 연구는 1867년 Ollier가 골의 보존에 대한 개념을 처음 기술하였고, 1889년 Senn¹⁶이 탈회한 골의 사용을 소개한 이후, Inclan¹⁷과 Wilson¹⁸이 저장된 골의 선택적 사용과 임상적 유의성에 관하여 보고하였고 Hyatt와 Butler¹⁹가 1950년 미해군 조직은행에서 임상적용을 보고한 이후 현재까지 이루어지고 있다. 초기의 동종골 이식은 동결건조 형태로 사용되었으나 자가골 이식에서와 같은 일차적 골유도 효과를 기대할 수는 없었다. 하지만 1965년 Urist 등²⁰이 골기질내에 존재하는 골형성유도단백질에 의해 골 형성을 유도 할 수 있다고 보고하였고 이후 많은 연구자들에 의해서 동종골의 골형성에 대한 연구가 활발해지면서 현재에 이르러 상품화된 수많은 재료가 임상에서 사용되고 있다.

동종골에 있어 사용상 한계는 이물반응 및 면역반응, 혈관 재형성능력, 완전한 소독방법, 질환 이환성 등이며, 이를 극복하기 위해 냉동, 동결건조, 자기용해성 항원추출, 방사선 조사, 화학제 처리 등과 같이 여러 방법으로 처리된 동종골이 사용되고 있다.

끓이거나 화학제로 처리한 골은 항원성을 감소시키지만 골내의 골형성단백질을 파괴하여 골유도 능력을 감소시키고, 골내 유기성분을 응고시켜 숙주세포가 이들의 제거를 어렵게 만들어 사용하지 않는 방법이다. 면역반응을 제거하고 단백질 변성을 줄이기 위한 방법으로 냉동법이나 냉동건조법이 널리 사용되고 있다^{21,22}. 이러한 냉동법에 의해 단백질 변성이 최소로 보존된 골이식재들은 탈단백질화, 비등법 또는 다른 처치에 의한 이인자형 이식재들보다 흡수가 잘되며, 혈류재생이 더욱 완전하게 되고, 골이식

시 골전도가 야기된다²³. 냉동법에 대한 연구로 Bradly²⁴는 쥐와 돼지에서 냉동시킨 악골이 천천히 흡수되면서 동시에 신생골로 대체되는 것을 관찰하였고, Marciani 등²⁵은 악골을 체외로 적출하여 액체질소에서 급냉 실험시킨 후 재이식하여 좋은 결과를 보고한 바 있다. 한편, Fred²⁶는 냉동상태에서의 이식재의 항원성에 대하여 신선골과 냉동골간의 유도된 세포성 면역정도는 확실한 차이가 없다고 보고한 바 있다. 그러나 동일한 방법으로 처리된 동종골 간에도 골 내용물이나 성상에 따라 항원성에 차이가 있어 피질골은 비항원성이지만 해면골은 미약하나마 계속 항원성이 존재한다고 한다. 이러한 항원성의 존재에 따른 이식재의 면역기전을 변화시키기 위하여 이식재에 방사선을 조사하거나 탈회시키기도 하며, 숙주에게 방사선조사를 하거나 면역억제제를 사용하기도 한다^{27,28}. 또한 방사선조사는 부가적인 살균 수단으로도 이용된다. 대부분의 골은행에서는 모든 잠재적 공급원에 대한 평가에서 HIV나 다른 전염 가능한 바이러스 검사를 사용한다. 감마 방사선을 2-4M rad으로 조사하면 대부분의 박테리아에 대해 살균효과가 있다²⁹. 그러나 지나친 방사선 조사는 골질에 불리하게 영향을 미치고, 과량의 조사는 무익하게 만든다³⁰. 따라서, 골이식재의 다양한 처리과정에서는 골전도나 골유도를 촉진하는 단백질의 파괴여부와 면역반응을 야기하는 항원성의 존재 유무가 골이식재의 예후에 큰 영향을 미치는 요인이라고 할 수 있을 것이다.

이에 본 연구에서는 각각 방사선 조사 냉동건조와 탈회동결건조 처리만으로 제조된 동종골인 ICB ((IFAB, Irradiated Allogenic Cancellous Bone & Marrow; Rocky Mountain Tissue Bank, USA)와 MTF(Musculoskeletal Transplant Foundation, USA)가 골형성에 미치는 영향을 비교 평가하고자, 사람골모세포의 배양액에 ICB와 MTF를 첨가하여 세포증식, 염기성 인산분해효소 활성, 칼슘 축적, 조골관련유전자의 발현 분석을 시행하였다.

II. 연구재료 및 방법

1. 연구 재료

(1) 세포배양

골기질 단백을 만들고 광화시킬 수 있는 태아골모세포주(hFOB1 1.19 ; American Type Culture Collection, Manassas, VA)를 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco BRL, GibcoBRL, Grand Island, NY, USA)과 0.03mg/ml의 G-418 (Duchefa, Netherlands)이 첨가된 Dulbecuo's Modified Eagle's Medium Nutrient Mixture F-12 HAM (DMEM/F-12 1:1 Mixture, Sigma, St.Louis, MO, USA) 8ml이 담긴 100mm 배양접시에 적정세포 5×10^5 cell/well를 분주하였다. 이를 34°C의 온도 및 100% 습도조건에서 95%의 공기와 5% CO₂를 계속 공급하면서 배양하였다. 배양액은 세포가 충분한 증식이 일어날 때까지 2일 간격으로 교환하였으며 계대 배양은 1:3의 비율로 시행하였다. 본 실험에서는 4-6 계대 배양된 세포를 사용하였다.

(2) ICB와 MTF의 준비

방사선 조사 냉동 동종골 (ICB, Irradiated Frozen Allogenic Cancellous Bone & Marrow; Rocky Mountain Tissue Bank, USA) 0.5g을 공급받아 LN₂ gas를 이용하여 분말로 분쇄한 후 10ng/ml로 만들어 사용하였으며, 탈회동결건조 동종골로는 MTF(Musculoskeletal Transplant Foundation, USA)를 0.5g을 공급받아 LN₂ gas를 이용하여 분말로 분쇄한 후 10ng/ml로 만들어 사용하였다.

2. 연구 방법

(1) MTT 측정

배양접시에서 단일 밀생에 도달한 사람의 태아 골모세포를 0.25% trypsin/EDTA 로 분리하였다. 혈구계수기로 세포 수를 세어 24-Well plate(Nunc,

Naperville, IL, USA)에 각 well당 2×10^4 개의 세포가 들어가도록 분주하였다. 세포들이 부착할 수 있도록 1일간 34°C, 5% CO₂, 95% 공기와 100% 습도에서 배양한 후 부착되지 않은 세포들은 배지로 제거하였다. 실험군에는 ICB와 MTF을 각각 10ng/ml이 되도록 첨가하였고, 양성 대조군에는 2ng/ml의 BMP을 첨가하여 2, 4일간 배양하였다. 일정기간 배양 후 300 μ l의 MTT(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide ; Sigma, USA)을 각각의 Well에 넣어 formazan 염을 환원시키고, 200 μ l의 dimethyl sulfoxide(DMSO; Junsei, Japan)를 첨가하여 형성된 formazan결정을 용해시킨 후 96-Well plate로 옮겼다. 배양접시를 잘 흔들어 용액을 균질화시킨 후 ELISA 분석기(Spectra MAX 250, Molecular Devices Co., Sunnyvale, CA, USA)에 넣고 540 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

(2) 염기성 인산분해효소 활성 측정

사람의 태아골모세포주를 6-well 배양접시에 1×10^5 cell/well이 되도록 분주한 후, 10% FBS가 첨가된 DMEM/F-12 1:1 Mixture에서 단일 밀생층이 형성될 때까지 34°C, 100% 습도, 5% CO₂ 공기 혼합 배양기에서 배양하였다. 단일 밀생층이 형성된 후 배지를 제거하였다. DMEM/F-12 1:1 Mixture로 2회 세척 후, 10% FBS, G-418 항생제, 50 μ l/ml ascorbic acid, 10mM sodium β -glycerophosphate가 첨가된 DMEM/F-12 1:1 Mixture에 음성 대조군에는 DMSO를 첨가하고, 양성대조군에는 2ng/ml의 BMP을 첨가하고, 실험군에는 ICB와 MTF 각각 10ng/ml농도가 되도록 첨가한 후 추가로 5일 동안 각각 배양하였다. 일정배양시간이 지난 후 배지를 제거하고, trypsin-EDTA로 세포를 분리 후, 15,000rpm에서 6분간 원심 분리하였다. 상층액을 제거하고 0.2ml의 멸균된 증류수를 첨가하여 초음파 분쇄기로 현탁하였다. 각 세포 현탁액 0.1ml에 0.1M glycine NaOH buffer(pH 10.4) 0.2ml, 15mM 의 p-nitrophenyl phosphate (pNPP ;

Sigma, USA) 0.1ml, 0.1% triton X-100/saline 0.1 ml와 멸균된 증류수 0.1ml를 잘 혼합하여, 이 반응물을 37°C에서 30분간 배양하였다. 0.1 N NaOH를 0.6ml 첨가함으로써 이들 반응을 중지시켰다. 배양된 세포는 96-well 배양접시에 옮기고, p-NPP의 가수분해는 410nm 파장의 ELISA reader에서 흡광도의 차이로 나타내며, p-nitrophenol (Sigma, USA)을 기준 값으로 이용하였다. 단백질농도는 BCA protein assay reagent (Pierce, USA)를 사용하여 측정하였으며, ALP 활성도는 nM/30min/mg of protein으로 표시하였다.

(3) 칼슘축적 측정

6-Well 배양접시에 1×10^5 개의 세포가 들어가도록 분주한 후 각각 적정농도로 25일간 배양하였다. Extracellular matrix mineralization을 유도하기 위해 19일째 되는 날, 4mM/l NaHPO_4 를 첨가해서 배양하였으며 Alizarin red sulfate(AR-S, Sigma) 염색 방법을 사용하였다. 21일이 된 배지를 제거하고, PBS로 세척하였다. Ice-cold 70% ethanol로 한 시간 동안 4°C에서 고정하고 ethanol를 제거한 후 40mM/L AR-S(pH 4.2)로 실온에서 10분 동안 염색하였다. AR-S 용액을 제거하고 멸균증류수로 조심스럽게 3회에 걸쳐 세척하였다. 염색된 부분을 육안으로 비교 관찰하기 위하여 디지털 카메라(Nikon E995, Nikon Corporation, Japan)로 촬영을 한 후, 이를 계량적으로 비교하기 위하여 10mM/l sodium phosphate(pH 7.0)에 10%(w/v)cetylpyridinium chloride가 녹아있는 용액을 이용해 염색부위를 녹여 AR-S의 농도를 562nm의 흡광도에서 읽었으며 AR-S standard curve는 같은 용액을 사용하였다.

(4) Western blot 분석

ICB와 MTF가 첨가된 배양액에서 25일간 배양된 사람의 태아골모세포를 PBS로 세척한 후, lysis buffer [10mM Na_2HPO_4 (pH 7.2), 0.9% NaCl, 1% Triton X-100, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1%SDS, 0.2%sodium azide, 0.004%sodium flu-

oride]로 세포 단백질을 추출하였고, BCA용액 (Bicinchoninic acid sol. Sigma Co., USA)에 Copper(II)sulfate(Sigma Co., USA)를 50:1로 혼합하여 단백질 농도를 측정하였다. 대조군과 실험군에서 추출된 단백질 100 μg 을 사용하여 15% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis를 시행한 PVDF membrane(Millipore Corp., Bedford, MA, USA)에 transfer 하였다. 비특이 항체의 결합을 막기 위하여 실온 상태에서 membrane을 각각의 차단 용액 (Zymed, USA)에 1시간 동안 처리하였다. 그 후에 Osteocalcin (OC, Biogenesis, kingston, NH, USA)와 Bone sialoprotein (BSP, Chemicon, Temecula, CA, USA)의 1차 항체를 90분동안 반응하였다. 1차 항체로 반응시킨 후 PBS로 2회 세척하고 그 다음 2차 항체(Santa Cruz Biotechnology)와 결합된 anti-mouse IgG-alkaline phosphatase로 60분간 처리한 후 다시 PBS로 7분 동안 2회에 걸쳐 세척을 한 후 ECL kit로 1분 동안 반응시켜 Hyperfilm-MP(Amersham, UK)에 노출시켰다.

(5) 통계분석

통계학적 유의성은 SPSS 10.0 Version 프로그램을 사용하여 평균과 표준오차를 구하고, 이들의 통계학적 유의성은 일원분산분석법(ANOVA)을 이용하여 사전 검정하였으며, 사후 검정은 Tukey법을 사용하였다. ($p < 0.05$)

III. 연구결과

1. MTT 측정

사람의 태아 골모세포에 대해 ICB와 MTF를 각각 10ng/ml, 이 되도록 첨가한 실험군과 음성대조군, 양성대조군을 가지고 각각 2, 4일간 배양하여 비교 측정된 세포 증식 검사에서 2일군에서 각각의 대조군과 실험군과의 유의한 차이는 없었다. 또한, 4일군에서도 2일군과 동일하게 각각의 대조군과 실험군과의 유의한 차이는 없었다. 하지만, 2일군과 4일군

Table 1. MTT of hFOB1 treated with ICB and MTF (10⁴cell/well)

	C-	C+	ICB	MTF
2 days	0.212±0.008	0.241±0.020	0.232±0.006	0.233±0.008
4 days	0.561±0.028 *	0.576±0.022 *	0.58±0.011 *	0.591±0.016 *

All value are expressed in Mean ± standard deviation

* : Statistically significant different with 2 days at each group (p<0.05).

C- (negative control) : added DMSO

C+ (positive control) : added BMP(2ng/ml,)

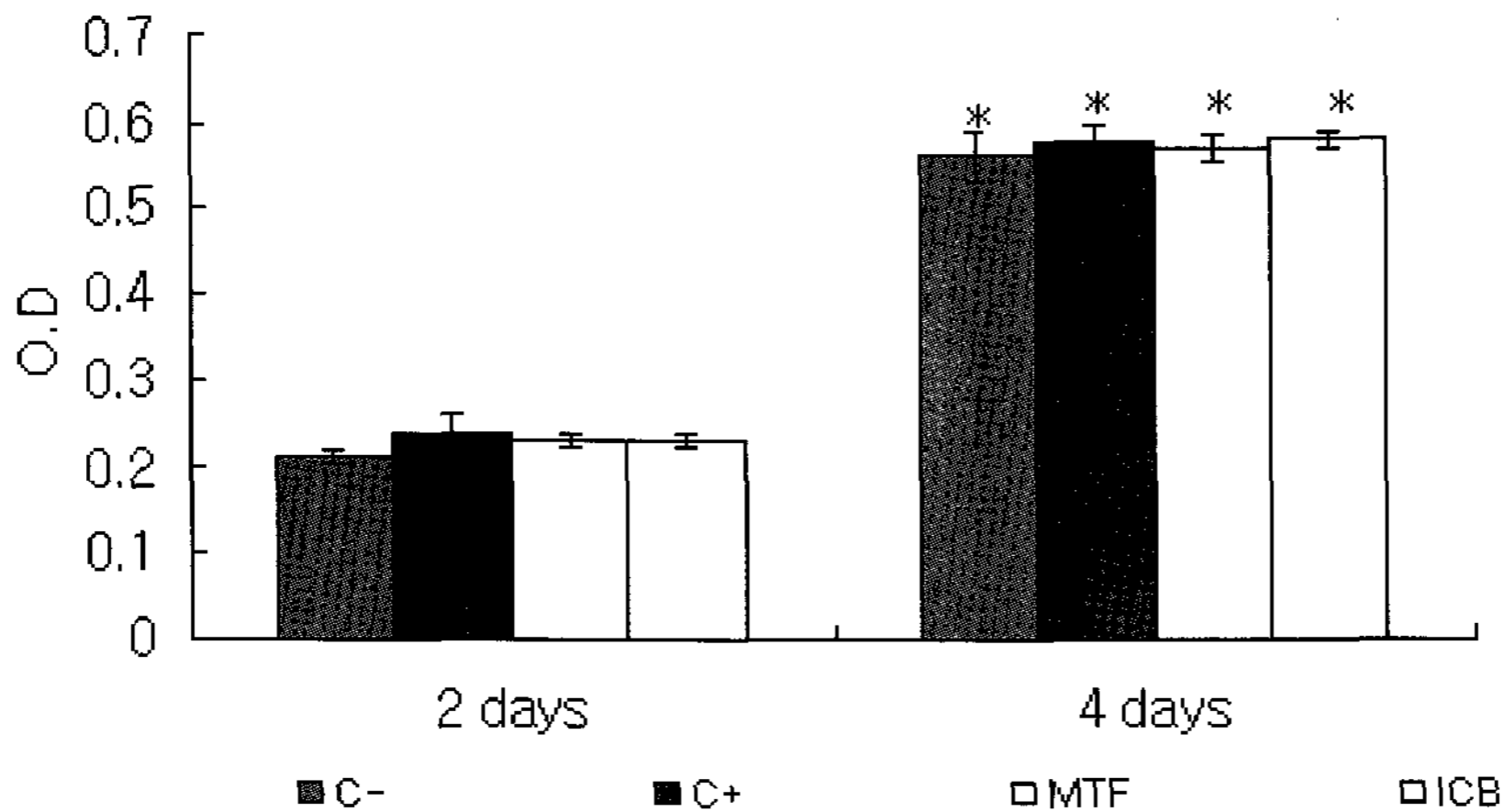


Figure 1. MTT of hFOB1 treated with MTF and ICB (10⁴cell/well)

* : Statistically significant different with 2 days at each group (p<0.05).

C- (negative control) : added DMSO

C+ (positive control) : added BMP(2ng/ml,)

과의 통계분석에서 모든 연구군은 2일군에 비해 4일군에 유의성 있는 세포증식의 결과를 보였다(Table 1, Figure 1).

2. 염기성 인산분해효소의 활성도 측정

사람의 태아 골모세포에 대해 ICB와 MTF을 각각 10ng/ml,이 되도록 첨가한 후 5일간 배양하여 ALP

Table 2. Alkaline phosphatase activity of hFOB1 treated with MTF and ICB. (nmole/30min/mg of protein)

	C-	C+	ICB	MTF
ALP	0.346±0.022	0.430±0.015 *	0.421±0.016 *	0.416±0.006 *

All value are expressed in Mean ± standard deviation

* : Statistically significant different with negative control at each group (p<0.05).

C- (negative control) : added DMSO

C+ (positive control) : added BMP(2ng/ml,)

ALP : Alkaline phosphatase

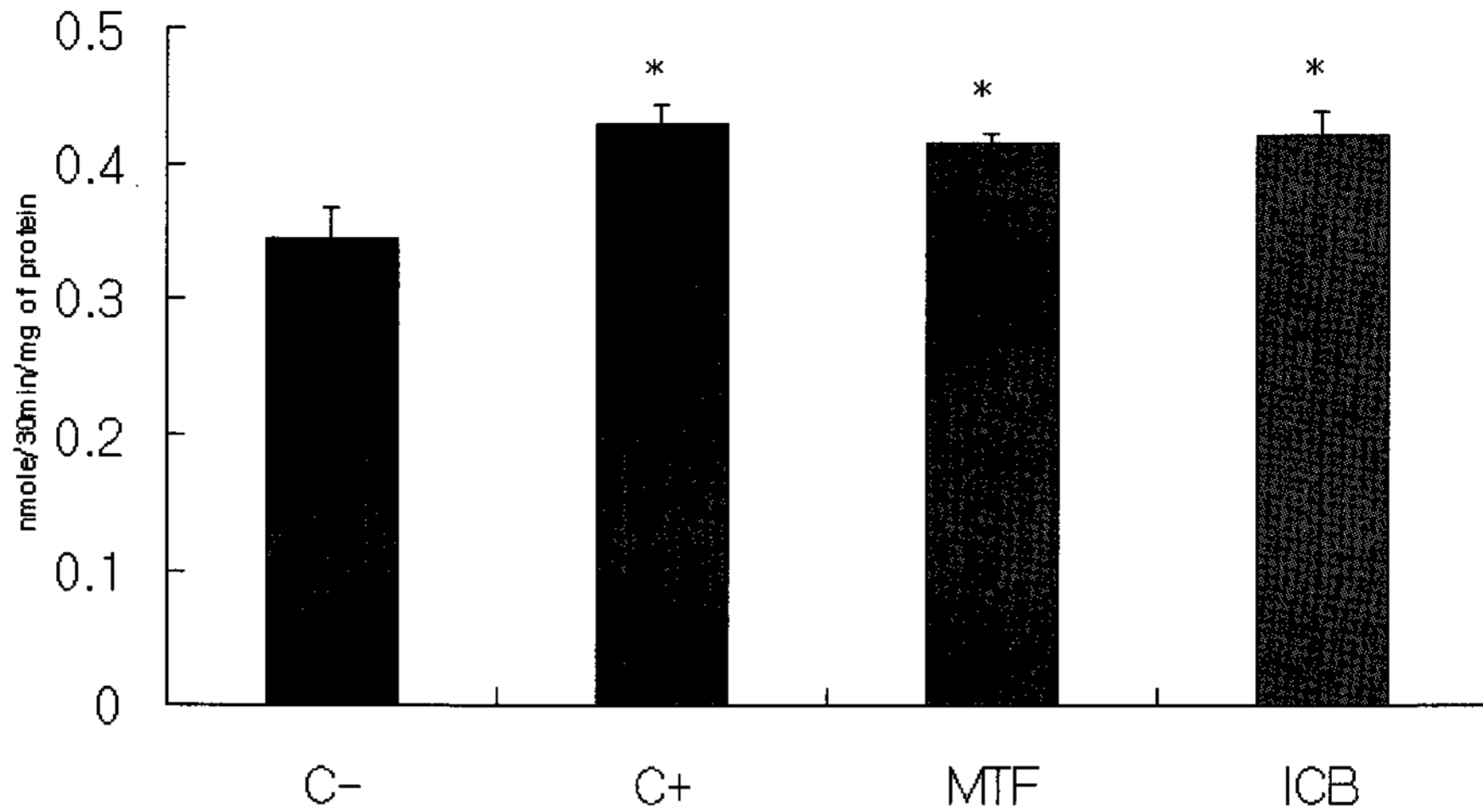


Figure 2. Alkaline phosphatase activity of hFOB1 treated with MTF and ICB (nmole/30min/mg of protein)
 * : Statistically significant different with negative control at each group (p<0.05).
 C- (negative control) : added DMSO
 C+ (positive control) : added BMP(2ng/ml,)

의 활성을 측정하였다. 실험결과 음성대조군에 모든 실험군에서 유의성 있는 염기성 인산분해효소의 활성이 관찰되었으며, BMP를 첨가한 양성대조군에 대해서는 유의성 있는 인산분해효소의 활성이 관찰되지 않았다. 또한 음성 대조군과의 비교에서 양성 대

3. 칼슘축적 측정

사람의 태아 골모세포에 대해 ICM와 MTF를 각각 10ng/ml이 되도록 첨가한 후 태아골모세포에 투여한 뒤 석회화된 결절을 관찰한 결과 음성대조군에

Table 3. Calcium accumulation Alkaline phosphatase activity of hFOB1 treated with MTF and ICB.

	C-	C+	ICB	MTF
O. D	220.60 ± 28.95	605.50 ± 8.63*	506.50 ± 7.78*	505.15 ± 8.70*

All value are expressed in Mean ± standard deviation

* : Statistically significant different with negative control at each group (p<0.05).

C- (negative control) : added DMSO

C+ (positive control) : added BMP(2ng/ml,)

O.D : Optical Density

조군이 유의성 있는 인산분해 효소의 활성이 관찰되었다(Table 2, Figure 2).

비해 모든 실험군에서 칼슘축적이 증가하였으며, BMP를 첨가한 양성대조군과는 칼슘축적이 유사하게 증가함을 관찰할 수 있었다(Table 3, Figure 3, Photo 1).

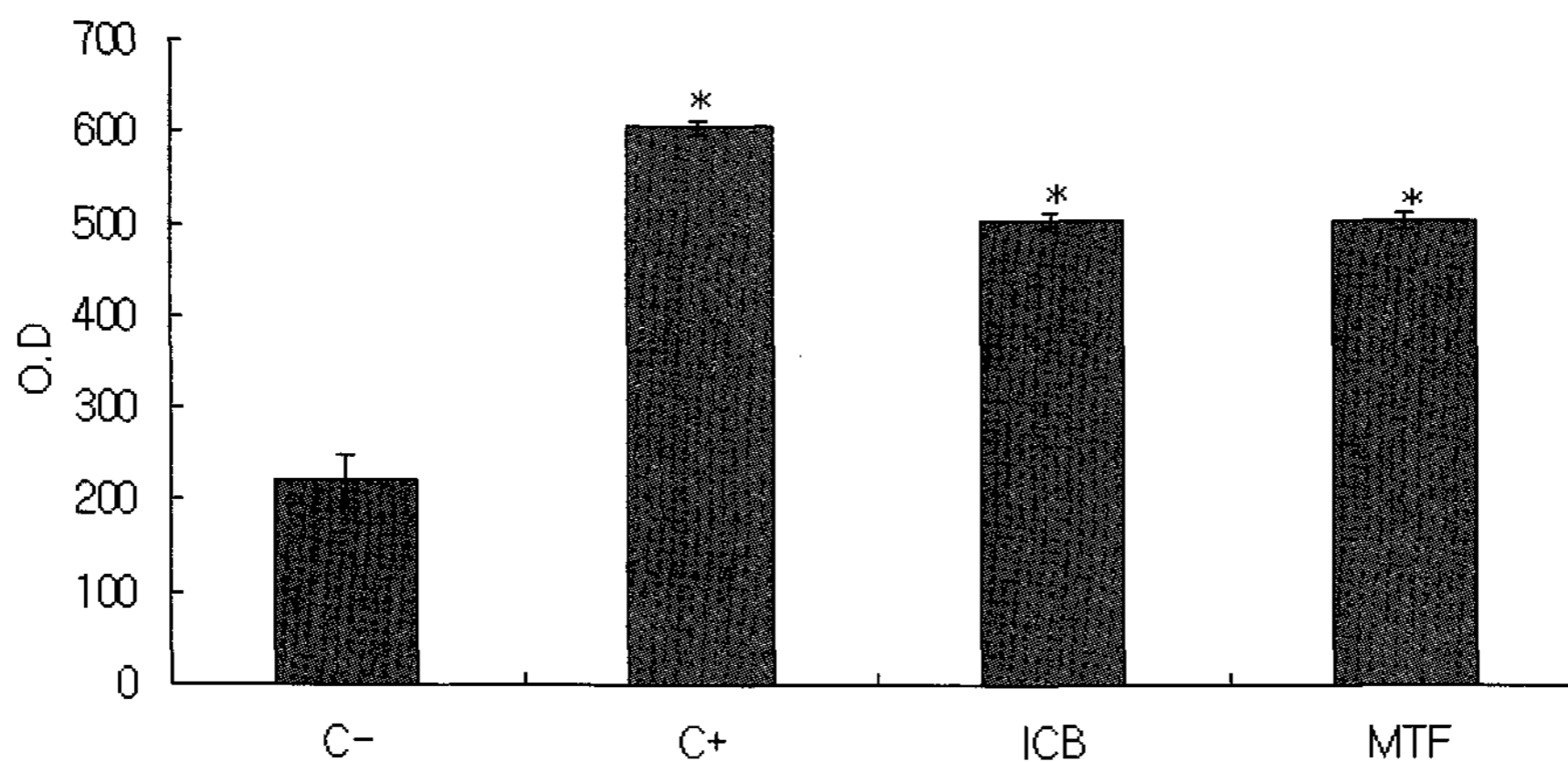


Figure 3. Calcium accumulation Alkaline phosphatase activity of hFOB1 treated with MTF and ICB.

* : Statistically significant different with negative control at each group ($p < 0.05$).

C- (negative control) : added DMSO

C+ (positive control) : added BMP(2ng/ml,)

O.D : Optical Density

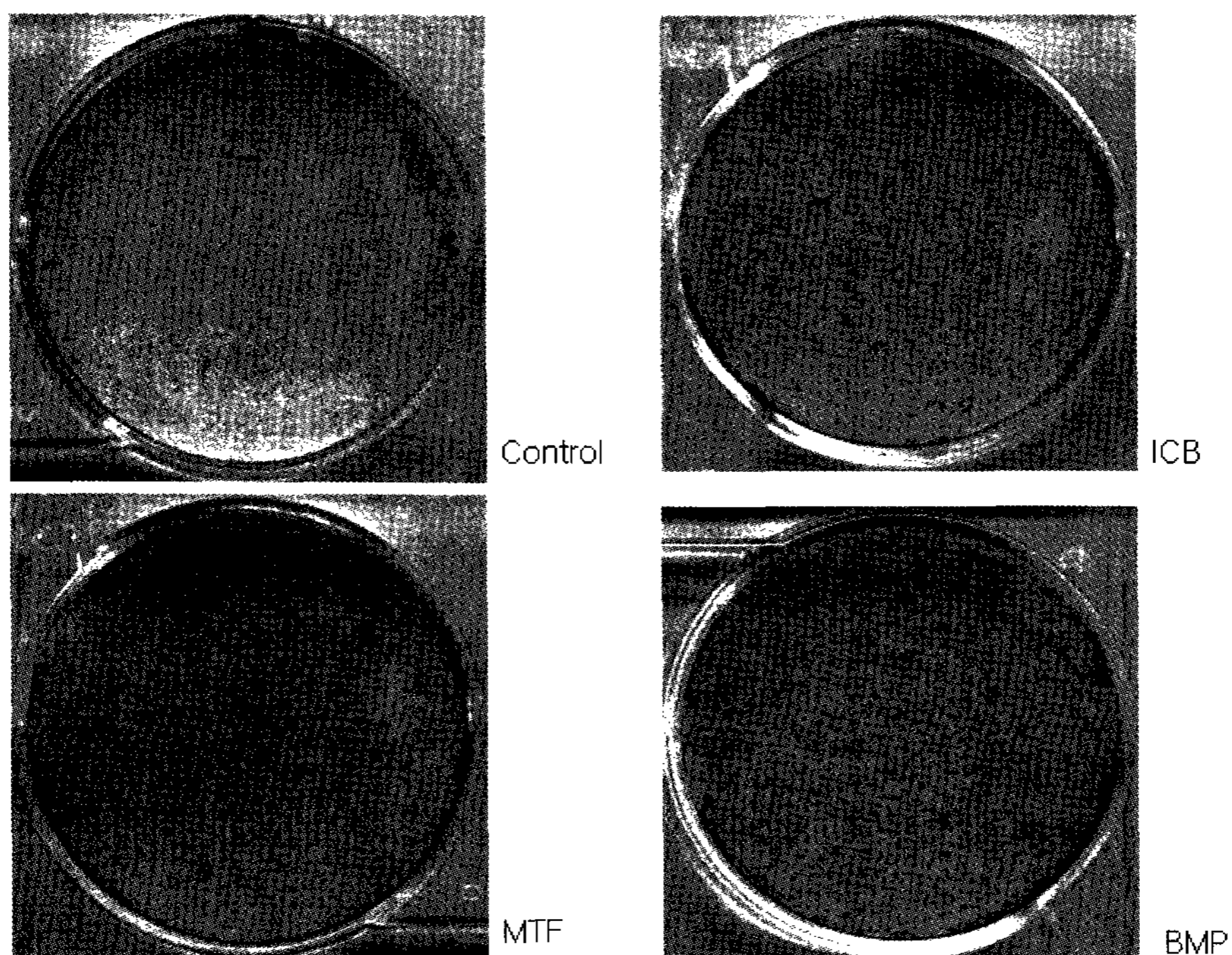


Photo 1. Alizarin Red Stain of hFOB1 treated with MTF and ICB at 25 days of incubation. The mineralized matrix was stained with Alizarin Red-s for calcium. Stained cells were photographed.

4. Western blot 분석

ICB와 MTF가 첨가된 배양액에서 25일간 배양된 사람의 태아골모세포를 western blot 분석한 결과 음성대조군에 비해 양성대조군과 모든 실험군에서 Osteocalcin와 bone sialoprotein의 발현이 증가하는 경향을 보였다. (Photo 2)

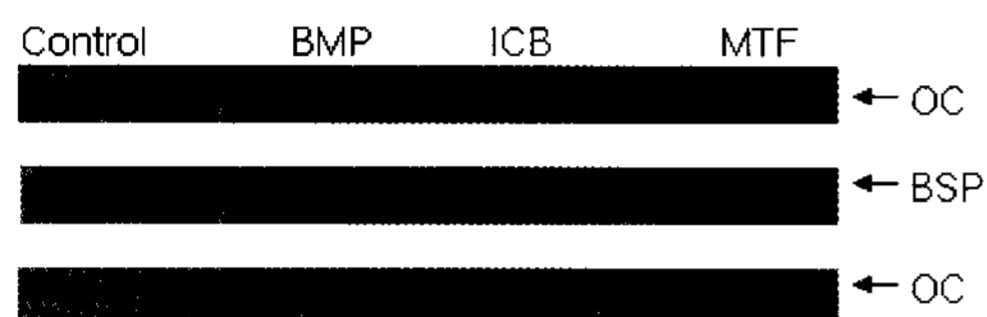


Photo 2. Western blot analysis for osteocalcin and bone sialoprotein in hFOB1. Lane 1 is a negative control group, lane 2 is an experimental group that supplemented with ICB, lane 3 is an experimental group that supplemented with MTF, and lane 4 is a positive control group that supplemented with BMP. Cell extract equivalent to 100 μ g/ml of total cellular protein of hFOB1 was electrophoresed by 15% SDS-PAGE and transferred to a PVDF membrane. The intracellular protein levels of osteocalcin and bone sialoprotein in hFOB1 were probed with respective antibodies diluted by 1 : 1000.

IV. 종괄 및 고찰

자가골 이외에 치조골의 결손부를 수복하기 위한 대체이식재들이 활발하게 개발되고 있다. 임상에서 이러한 이식재를 사용한 후에는 이식골에 대한 정확한 평가방법은 한계가 있으며, 방사선 검사, 생검을 통한 조직학적 검사들을 통해 이루어지고 있다. 성공적인 이식술의 결과는 면역반응을 유발하지 않으며, 숙주의 골재생에 기여해야 할 것이다. 또한 치아나 임플란트를 통해 가해지는 물리적 힘에 저항할 수 있는 구조로 치유되어야 하며, 궁극적으로는 숙주골과 이식재가 분리되어 관찰되지 않는 완전한 골

조직으로의 치환이 일어나야 할 것이다.

동종골은 이종골에 비해 거부반응이 적지만, 자가골에 비해 이식후의 면역거부반응이 다양하게 나타나므로 이를 억제하기 위한, 동결, 동결건조, 비등 등의 방법이 시도 되었고, 최근에는 동결건조방법이 동종골의 처리에 널리 사용되고 있다. 동결건조를 통해 면역반응을 억제시키고, 단백질 변성도 감소시킨다. 또한 동결 처리 방법에서는 상온보관이 불가능하나, 동결건조방법은 상온에서도 보관이 가능하다³¹⁾. 항원을 감소시킨 항원 추출동종골은 이식재의 골소주가 얇아지고 소주내의 공간이 확장되면서 이 공간으로의 신생조직의 확장이 용이하여 골 형성을 촉진하는 것으로 알려져 있는데, 물리적 성질이 원래 상태보다 매우 떨어지는 단점이 있다³²⁾.

여러 연구에 의하면 동결건조과정이 동종골의 처리과정 중에서 면역항원성을 줄이고 단백질 변성도 최소화시킬 수 있는 우수한 방법이라고 하였다^{33,34,35,36)}. 그러나, 일부의 연구에서 이식재를 통한 면역결핍증, B형간염, C형간염 등의 바이러스성 감염이 보고되었다^{37,38)}. 이를 예방하기 위해 FDA(Food and Drug Administration)에서는 공여자에 대한 바이러스성 감염에 대한 사전 검사를 통해 수여자의 감염의 가능성을 배제하도록 하고있다. 그러나, 골 이식재는 채취와 제조과정을 통해 외인성 미생물의 감염이 발생할 수도 있으며 환자에게 전염될 수 있다는 보고도 있다^{39,40)}. 그러므로 동종골은 전염성 질환의 감염을 억제하는 과정을 거쳐야 한다.

본 연구에서는 공급에 있어 한계가 있고, 채취부위를 위한 부가적 수술이 필요한 자가골의 단점을 보완할 수 있는 동종골 이식재인 ICB와 MTF를 사용하여 태아골모세포주에 대한 세포활성도, 염기성 인간분해효소 활성, 칼슘축적, osteocalcin의 발현, bone sialoprotein의 발현 등을 측정하여 치주질환 치료제로서의 효용을 확인하고자 실험을 진행하였다.

ICB는 동결건조와 방사선조사를 통해 제조되었으며, MTF는 탈회동결건조과정을 통해 제조되었다. ICB는 채취된 공여자의 골을 영하 75도에서 냉동시

킨 뒤 항원성을 제거하기 위해 2.5-3.8 Mrad의 방사선을 조사하였으며, MTF는 미국의 비영리 조직인 MTF 조직은행에서 제조되는 데 이식재를 통한 바이러스성 감염을 막기 위해 PCR검사로 바이러스성 질환을 지닌 공여자를 배제하여, 골을 채취 탈회 동결건조골을 제조한다. 실험에 사용된 각각의 이식재는 태아골모세포에 적용하기 위해 더 작은 미립의 분말로 제조하여 사용하였다.

각각의 이식재가 태아골모세포의 증식에 미치는 영향을 알아보기 위해 동일 조건아래에서 음성대조군에서 DMSO를 양성대조군에서는 BMP를 첨가하였다. 골형성 단백질인 BMP는 여러 연구에서 태아골모세포의 증식과 골기질의 형성을 촉진함이 보고되었기 때문에 양성대조군으로 사용하였다. 박⁴¹⁾ 과 이⁴²⁾ 등은 동종골이 태아골모세포에 미치는 영향을 연구하여 동종골 이식재 농도 10ng/ml가 태아골모세포의 활성을 촉진시킨다고 하였다. 이에 본 연구에서는 실험농도로 10ng/ml를 선택하여 각각의 동종골을 실험 농도로 태아골모세포의 배양액에 첨가하여 2일간 배양하였다. 배양 후 태아골모세포의 증식에 미치는 영향을 MTT 검사로 관찰하였을 때 각각의 실험군과 대조군간의 세포증식에 차이가 미약하게 관찰되지만 통계학적 유의성은 없었다. 4일간 배양하였을 경우에도 2일군과 동일하게 각각의 실험군과 대조군간의 세포증식에 있어 통계학적 유의성은 없었다. 그러나, 2일군과 4일군과의 통계분석에서 모든 연구군은 2일군에 비해 4일군에 유의성 있는 세포증식의 결과를 보였다. ($p < 0.05$)

각각의 이식재가 태아골모세포의 증식에 영향을 주지는 않지만 골화과정에 어떤 양상으로 영향을 주는지 확인하기 위해 염기성 인산분해효소의 활성을 측정하였다. 염기성 인산분해효소는 생체내에 널리 분포되어 있는데, 내피세포, 모세혈관벽, 결합조직의 섬유, 혈청, 백혈구, 신장, 비장, 폐, 석회화과정에 있는 치수 조상아세포, 염증 상태에 있는 치수, 치은과 골에 분포되어 있으며, 조골세포의 표지자로 알려져 있다.^{43,44,45)} Ecarot 등⁴⁶⁾은 염기성 인산분해효소 수치가 높은 세포들이 석회화 결정형성을 기시

할 수 있다는 보고를 하여, 골화 과정에서 골모세포의 증식이 왕성하게 일어나고 따라서 염기성 인산분해효소와 같은 골 형성 지표들 또한 증가할 것이 예상된다.

본 연구에서는 태아골모세포의 염기성 인산분해효소의 활성이 배양액에 ICB와 MTF를 첨가하여 5일간 배양한 후 음성대조군에 비해 유의성 있게 증가하였으며, BMP를 첨가한 양성대조군과 각각의 실험군과는 차이가 없었다. 양성대조군과 각각의 실험군간의 비슷한 염기성 인산분해효소의 활성 증가는 방사선조사와 탈회동결건조과정이 동종골의 BMP의 변형이나 감소를 일으키지 않는다는 것을 가정할 수 있으나 비슷한 활성의 증가가 어떻게 발생했는지에 대한 연구도 필요할 것으로 사료된다.

증가된 염기성 인산분해효소가 골 광물화과정에 영향을 주는지 관찰하기 위해 석회화 결정 측정을 통한 칼슘축적의 정도를 보았는데, 태아골모세포의 배양액에 ICB와 MTF를 첨가한 각각에 실험군에서 음성대조군보다 석회화 결정이 증가하였으며, BMP를 첨가한 양성대조군과는 증가 양상이 유사하였다. 이와 같은 결과 역시 염기성 인산분해효소의 발현과 유사하게 나타났다. 이와 같은 결과는 박⁴¹⁾ 과 이⁴²⁾의 연구 결과와 거의 일치한 것을 보여준다.

본 연구에서 앞서의 연구 결과가 태아골모세포의 어떤 유전자의 발현 증가를 통해 나타나는지를 보기 위해 osteocalcin과 bone sialoprotein 유전자의 발현을 western assay를 통해 진행하였다. Osteocalcin은 염기성 인산분해효소와 함께 골모세포의 활성도를 나타내는 지표로 알려져 있다. Osteocalcin은 비타민 K 의존성 단백질로 골모 세포에서 생성되어 골기질 내 비 교원 단백질 의 약 10-20%정도를 차지한다^{47,48)}. Osteocalcin은 칼슘과 결합력이 높고 골모 세포에서 생성되어 골 흡수와 골 형성에 중요한 기능을 하며, 골의 구조에서는 hydroxyapatite 및 칼슘과 단단하게 결합된다. 골모세포 활동이 증가하게 되면 골모세포에서 osteocalcin의 합성이 증가되는 것으로 보고 되고 있다^{49,50)}. Bone sialoprotein 유전자는 무기질 결정 형성을 조절할 수 있는 골석

회화와 분화의 대표적인 표지유전자로 여겨져 왔다⁵¹⁾. Bone sialoprotein은 골의 총 비교원성 단백질 중에서 15%를 차지하고 있으며, 골석회화 및 재형성과 관련이 있는 것으로 알려져 있다⁵²⁾. Chen⁵³⁾과 Cowles⁵⁴⁾ 등은 bone sialoprotein이 수산화인회석과 매우 높은 친화성을 보이며, 수산화인회석의 유핵화를 기시하는 기능이 있음을 보고하였다. 따라서 bone sialoprotein은 골의 석회화 과정과 관련되는 것으로 추정할 수 있고 bone sialoprotein이 골형성 및 골흡수 모두와 관련되어 있는지, 혹은 단지 이중 하나만이 생체내에서 관련되어 있는지는 아직 분명하지 않다. Hipskind 등⁵⁵⁾은 bone sialoprotein 유전자 결핍 생쥐는 태생 6주에 골격의 이상이 관찰되었다고 하였다. 본 연구에서도 보고된 여러 연구결과를 바탕으로 골단백질 발현양의 최대값을 측정하기 위해 ICB와 MTF가 첨가된 배양액에서 25일간 배양된 사람의 태아골모세포를 western blot 분석을 하였으며, 그 결과 음성대조군에 비해 양성대조군과 모든 실험군에서 osteocalcin과 bone sialoprotein의 발현이 증가하는 경향을 보였다.

본 연구의 결과는 방사선조사와 탈회냉동건조 과정을 거친 각각의 동종골의 이식 후에 나타나는 긍정적인 효과들이 골화관련 세포의 증식을 촉진하는 과정이 아닌 골화관련 유전자의 발현의 촉진, 염기성 인산분해효소의 증가, 석회화 결정의 형성 촉진을 통해 이루어진다는 것을 확인할 수 있었다. 또한 방사선조사와 탈회냉동건조 과정이라는 각기 다른 처리과정을 거쳤음에도 불구하고 두 동종골간에는 차이점은 발견되지 않았다. 하지만, 이러한 동종골의 처리과정이 바이러스성 감염의 위험성을 충분히 제거하는 지에 대한 확인은 향후 연구되어야 할 사항으로 사료된다.

V. 결 론

본 연구는 Irradiated Frozen Allogenic Bone인 ICB와 탈회동결건조 동종골인 MTF가 골모세포 활성에 미치는 영향을 알아보고자, 사람태아골모세포

(hFOB1.19)를 이용하여 MTT, 염기성 인산분해효소 활성도 측정, 칼슘 축적 측정, Osteocalcin의 발현, Bone sialoprotein의 발현 등을 분석하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. MTT측정에서는 대조군과 실험군간에 유의한 차이는 보이지 않았으며, 실험군과의 차이도 없었다. 대조군과 실험군 공히 2일군에 비해 4일군에서 유의성 있는 세포증식의 결과를 보였다($p < 0.05$).
2. 염기성 인산분해효소의 활성을 측정한 실험에서 음성대조군에 비해 양성대조군과 ICB와 MTF를 첨가한 실험군에서 활성이 증가함을 보였다. 실험군 상호간 및 양성대조군과 실험군간의 차이는 관찰되지 않았다($p < 0.05$).
3. 칼슘 축적 검사에서는 음성대조군에 비해 양성대조군과 ICB와 MTF를 첨가한 실험군에서 축적이 증가함을 보였으며, 실험군간의 차이는 없었다. 양성대조군과 실험군간과는 차이는 관찰되지 않았다($p < 0.05$).
4. Western blot 검사에서는 실험군과 양성대조군이 음성대조군에 비해 osteocalcin와 bone sialoprotein의 발현이 증가하였으며, 실험군간의 발현이 차이는 없었다.

이상과 같은 소견으로 동종골인 ICB와 MTF가 태아골모세포의 증식보다는 염기성 인산분해효소의 활성, 칼슘 축적, 조골에 관여하는 단백질의 발현을 증가시킴으로 골형성 과정에 긍정적인 효과가 있을 것으로 보이며, 동종골의 제조과정의 차이에 기인한 효과의 차이는 없을 것으로 사료된다.

VI. 참고문헌

1. Zander HA., Polson AM., Heijl LC. Goals of periodontal therapy. *J Periodontol.* 1976;47(5):261-266.
2. Stahl SS., Froum SJ., Kushner L.

- Periodontal healing following open debridement flap procedures. II. Histologic observations. *J Periodontol*. 1982;53(1):15-21.
3. Froum SJ., Coran M., Thaller B., Kushner L., Scopp IW., Stahl SS. Periodontal healing following open debridement flap procedures. I. Clinical assessment of soft tissue and osseous repair. *J Periodontol*. 1982;53(1):8-14.
 4. Cortellini P., Tonetti MS. Focus on intrabony defects: guided tissue regeneration. *Periodontol 2000*. 2000;22:104-132.
 5. Lang NP. Focus on intrabony defects—conservative therapy. *Periodontol 2000*. 2000;22:51-58.
 6. Cortellini P., Bowers GM. Periodontal regeneration of intrabony defects: an evidence-based treatment approach. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 1995;15(2):128-145.
 7. Mellonig JT. Periodontal bone graft technique. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 1990;10(4):288-299.
 8. Hiatt WH., Schallhorn RG. Human allografts of iliac cancellous bone and marrow in periodontal osseous defects. I. Rationale and methodology. *J Periodontol*. 1971;42(10):642-647.
 9. Bump RL., Salimeno T., Hooker SP., Wilkinson EG. The use of woven ceramic fabric as a periodontal allograft. *J Periodontol*. 1975 ;46(8):453-458.
 10. Altiere ET., Reeve CM., Sheridan PJ. Lyophilized bone allografts in periodontal intraosseous defects. *J Periodontol*. 1979; 50(10):510-519.
 11. Schallhorn RG. Present status of osseous grafting procedures. *J Periodontol*. 1977; 48(9):570-576.
 12. Mellonig JT. Autogenous and allogeneic bone grafts in periodontal therapy. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1992;3(4):333-352.
 13. Kim CS., Choi SH., Cho KS., Chai JK., Wikesjo UM., Kim CK. Periodontal healing in one-wall intra-bony defects in dogs following implantation of autogenous bone or a coral-derived biomaterial. *J Clin Periodontol*. 2005;32(6):583-589.
 14. Dragoo MR., Sullivan HC. A clinical and histological evaluation of autogenous iliac bone grafts in humans. II. External root resorption. *J Periodontol*. 1973;44(10):614-625.
 15. Dragoo MR., Sullivan HC. Clinical and histological evaluation of autogenous iliac bone grafts in humans. I. Wound healing 2 to 8 months. *Periodontol*. 1973;44(10):599-613.
 16. Senn N. On the healing of aseptic bone cavities by implantation of antiseptic decalcified bone. *Am J Med Sci*. 1889;98:219.
 17. Inclan A. The use of preserved bone graft in orthopedic surgery. *J Bone Joint Surg*. 1942;24:81.
 18. Wilson PD. Experience with the use of refrigerated homogenous bone. *J Bone Joint Surg*. 1951;3B:301.
 19. Hyatt GW., Butler MC. Bone grafting. The procurement, storage and clinical use of bone homograft. In : *Instructional Course Lecture, The American Academy of Orthopedic Surgeons*. 1957;1(14):343
 20. Urist MR., Mikulski AJ., Nakagawa M., Yen K. A bone matrix calcification-initiator noncollagenous protein. *Am J Physiol*. 1977;232: 115-127.
 21. Urist MR. Surface-decalcified allogenic bone implant. *Clin Orthop*. 1979;140: 208.

22. Williams G. Experiences with boiled cadaveric cancellous bone for fracture of long bones. *J Bone Joint Surg.* 1964;46B:398.
23. Nisbet NW. Immunology of bone transplantation. *Clin Ortho Rel Res* 1966; 47:199.
24. Bradly PF. Modern trend in cryosurgery of bone in the maxillofacial regions. *Int J Oral Surg* 1978;7:405.
25. Marciani RD., Roth GI., White DK. Healing of reimplanted freeze-treated maxillary bone. *J Oral Maxillo Surg.* 1982;40:401.
26. Fred L. The immunogenicity of fresh and frozen allogenic bone. *J Bone Joint Surg.* 1975;57A:216.
27. Narang R., Ruben MP., Harris MH., Wells H. Improved healing of experimental defects in the canine mandible by grafts of decalcified allogeneic bone. *Oral Surg.* 1970;30(1):142-150.
28. Narang R., Wells H. Bone Induction in experimental periodontal bony defects in dogs with decalcified allogeneic bone matrix graft : A preliminary study. *Oral Surg.* 1972;33(2):306-313.
29. Sullivan R., Fassolitis AC., Larkin EP., Read RB Jr., Peeler JT. Inactivation of thirty viruses by gamma radiation. *Appl Microbiol.* 1971 ;22(1):61-65.
30. Pellet S., Strong DM., Temesi A., Matthews J.G. Effects of irradiation on frozen corticocancellous bone allograft incorporation and immunogenicity. In : Fried GE, Mankin HJ, Sell KW (eds) *Osteochondral Allo* Little Brown, Boston, pp 353-361
31. Boyne PJ., Zarem H. Osseous reconstruction of the resected mandible. *Am J Surg.* 1976;132(1):49-53.
32. Urist MR., Mikulski A., Boyd SD. A chemosterilized antigen-extracted autodigested alloimplant for bone banks. *Arch Surg.* 1975 ;110(4):416-428.
33. Friedlaender GE. The antigenicity of preserved allografts. *Transplant Proc.* 1976;8(2 Suppl 1):195-200.
34. Langer F., Czitrom A., Pritzker KP., Gross AE. The immunogenicity of fresh and frozen allogeneic bone. *J Bone Joint Surg Am.* 1975;57(2):216-220.
35. Stevenson S. The immune response to osteochondral allografts in dogs. *J Bone Joint Surg Am.* 1987;69(4):573-582.
36. Friedlaender GE., Strong DM., Sell KW. Studies on the antigenicity of bone. I. Freeze-dried and deep-frozen bone allografts in rabbits. *J Bone Joint Surg Am.* 1984;66(1):107-112.
37. Schwarz A., Hoffmann F., L'age-Stehr J., Tegzess AM., Offermann G. Human immunodeficiency virus transmission by organ donation. Outcome in cornea and kidney recipients. *Transplantation.* 1987;44(1):21-24.
38. Glasscock ME 3rd, Jackson CG., Knox GW., Can acquired immunodeficiency syndrome and Creutzfeldt-Jakob disease be transmitted via otologic homografts? *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1988;114(11) :1252-1255.
39. Trasancos CC., Kainer MA., Desmond PV., Kelly H. Investigation of potential iatrogenic transmission of hepatitis C in Victoria, Australia. *Aust N Z J Public Health.* 2001;25(3):241-244.
40. Patel R., Trampuz A. Infections transmitted through musculoskeletal-tissue allografts. *N Engl J Med.* 2004;350(25):2544-2546.
41. 박재영. 사람태아골모세포에 대한 근골격이식재의 골형성 유도에 관한 효과 원광대학교 대학원

- 석사논문, 2004.
42. 이상재. 사람태아골모세포에 대한 방사선조사 냉동 동종골의 골형성 유도에 관한 효과 원광대학교 대학원 석사논문, 2004
 43. Leung KS., Fung KP., Sher AH., Li CK., Lee KM. Plasma bone-specific alkaline phosphatase as an indicator of osteoblastic activity. *J Bone Joint Surg Br.* 1993;75(2): 288-292.
 44. Delmas PD. Biological markers of bone metabolism. *Presse Med.* 1993 20;22(6): 263-268.
 45. van Straalen JP., Sanders E., Prummel MF., Sanders GT. Bone-alkaline phosphatase as indicator of bone formation. *Clin Chim Acta.* 1991;201(1-2):27-33.
 46. Ecarot-Charrier B., Shepard N., Charette G., Grynepas M., Glorieux FH. Mineralization in osteoblast cultures: a light and electron microscopic study. *Bone.* 1988;9(3):147-154.
 47. Duda RJ Jr, O'Brien JF., Katzmann JA., Peterson JM., Mann KG., Riggs BL. Concurrent assays of circulating bone Gla-protein and bone alkaline phosphatase: effects of sex, age, and metabolic bone disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 1988;66(5): 951-957.
 48. Bowles SA., Kurdy N., Davis AM., France MW., Marsh DR. Serum osteocalcin, total and bone-specific alkaline phosphatase following isolated tibial shaft fracture. *Ann Clin Biochem.* 1996;33 (Pt 3):196-200.
 49. Marazuela M., Astigarraga B., Tabuenca MJ., Estrada J., Marin F., Lucas T. Serum bone Gla protein as a marker of bone turnover in acromegaly. *Calcif Tissue Int.* 1993;52(6):419-421.
 50. Bouman AA., Scheffer PG., Ooms ME., Lips P., Netelenbos C. Related Articles, Two bone alkaline phosphatase assays compared with osteocalcin as a marker of bone formation in healthy elderly women. *Clin Chem.* 1995;41(2):196-199.
 51. Shimizu-Sasaki E., Yamazaki M., Furuyama S., Sugiya H., Sodek J., Ogata Y. Identification of a novel response element in the rat bone sialoprotein (BSP) gene promoter that mediates constitutive and fibroblast growth factor 2-induced expression of BSP. *J Biol Chem.* 2001;276: 5459-5466.
 52. Wuttke M., Muller S., Nitsche DP., Paulsson M., Hanisch FG., Maurer P. Structural characterization of human recombinant and bone-derived bone sialoprotein. Functional implications for cell attachment and hydroxyapatite binding. *J Biol Chem.* 2001;276: 36839-36848.
 53. Chen Y., Bal BS., Gorski JP. Expression of bone sialoprotein (BSP) in developing human tissues. *J Biol Chem.* 1992;267: 24871-24878.
 54. Cowles EA., DeRome ME., Pastizzo G., Brailey LL., Gronowicz GA. Mineralization and the expression of matrix proteins during in vivo bone development. *Calcif Tissue Int.* 1998;62:74-82.
 55. Hipskind RA., Halleux C., Susa M., Evans D., Bilbe G. Multiple signaling pathways are implicated in LIF induction of c-fos in human osteoblast-like cells. *Bone.* 1995;17:558.

Effects of Irradiated Frozen Allogenic Bone and Musculoskeletal Transplant Foundation on Bone Formation in Human Fetal Osteoblasts

Ho-Sang Yoon, Sung-Hee Pi, Hyung-sik Shin*

Department of Periodontology, School of Dentistry, Wonkwang University

The purpose of this study was to investigate the effects of ICB(Irradiated frozen allogenic bone, Rocky Mountain Tissue Bank, USA) and MTF(Decalcified freeze-dried bone allograft, Musculoskeletal Transplant Foundation, USA) on the cell proliferation and differentiation of human fetal osteoblasts. Human fetal osteoblasts (hFOB1) were cultured with 10 ng/ml of ICB and MTF. The negative control group was cultured with DMSO and positive control group was cultured with BMP (2 ng/ml). MTT was performed to examine the viability of the cell, and alkaline phosphatase activity was analyzed to examine the mineralization. Calcium accumulation was also evaluated.

ICB and MTF did not increase the rate of the cellular proliferation of hFOB1s while they enhanced ALP and calcium accumulation. The expression of osteocalcin (OC) and bone sialoprotein (BSP) increased in hFOB1 treated with ICB and MTF (10 ng/ml).

These results suggest that ICB and MTF stimulate osteoblastic activity of the hFOB1.