

# 칼슘과 비타민 D 섭취가 티타늄 임플란트 주위의 골 형성에 미치는 영향

박광일 · 이재열 · 황대석 · 김용덕 · 김규천\* · 신상훈 · 김육규 · 정인교

부산대학교 치과대학 구강악안면외과학교실, \*구강해부학교실

**Abstract** (J. Kor. Oral Maxillofac. Surg. 2007;33:131-138)

## EFFECT OF CALCIUM AND VITAMIN D SUPPLEMENTATION ON BONE FORMATION AROUND TITANIUM IMPLANT

Kwang-Il Park, Jae-Yeol Lee, Dae-Seok Hwang, Yong-Deok Kim, Gyoo-Cheon Kim\*, Sang-Hun Shin, Uk-Kyu Kim, In-Kyo Chung

*Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, College of Dentistry, Pusan National University*

*\*Dept. of Oral Anatomy, College of Dentistry, Pusan National University*

The purpose of this study was to observe the effect of calcium and vitamin D to the titanium implant osseointegration in animal model.

32 rats, 10 weeks of age, were divided into two group: additional calcium and vitamin D supplementation group and a control group. Titanium screw implant(diameter, 2.0mm; length, 3.5mm; pitch-height 0.4 mm) were placed into tibia of 32 rats, 16 in the control group and 16 in the experimental group. The rats were sacrificed at different time interval(1, 2, 4, and 8 weeks after implantation) for histopathologic observation, histomorphometric analysis and immunohistochemistry with osteocalcin and osteopontin antibody.

Histopathologically findings, newly formed bone was seen at 1 weeks and became lamellar bone at 2 weeks, and mature trabecular bone was seen at 4 weeks experimental group. In control group, thickness of regenerated bone increased till 4 weeks gradually and trabecular bone was seen at 8 weeks. By histomorphometric analysis, bone marrow density was increased significantly at 1 and 2 weeks in experimental group compared to control group. Osteocalcin immunoreactivity was strong at 1 week experimental group and reduced after 4 weeks gradually. But it was continuously weakly from 1 to 4 weeks in control group. Osteopontin immunoreactivity was very strong in newly formed bone from 2 to 8 weeks experimental group. And the amount of osteopontin expression was more abundant in experimental group.

The results of this study suggest that calcium and vitamin D supplementation promotes bone healing around dental implants

**Key words:** Calcium, Vitamin D, Implant

### I. 서 론

1969년 Brånemark 등<sup>1)</sup>이 골내형 티타늄 임플란트의 성공적인 골유착 개념을 발표한 이후, 임플란트는 상실된 치아의 수복에 있어 중요한 치료방법이 되어왔다. 이러한 골유착을 성공적으로 유도하기 위해서는 임플란트 매식 후 초기 안정이 절대적으로 요구되는데, 이는 매식부의 골질과 골량에 따라 영향을 받는다. Jaffin과 Berman<sup>2)</sup>은 임상연구 결과 실패한 임플란트의 55%가 매식부 골질이 불량한데서 기인하였다고 보고하면서, 특히 골주의 발달이 미약하고 피질골판이 매우 얇은 골

에서 시행한 임플란트 중 35%가 5년 이내에 실패하였는데 이러한 원인은 골수강이 차지하는 면적이 크고 임플란트 주위에 긴밀한 골접촉을 얻지 못함으로써 초기안정을 얻지 못한다었다고 주장하였다. 또 Laney<sup>3)</sup>는 매식부 골의 상태에 따라 임플란트 적용에 제한을 받는다고 주장하면서 방사선사진상에서 골소주의 형태가 불량하거나 환자가 고령일 때에는 사용이 곤란한 경우도 있다고 설명하였다.

칼슘은 대부분의 대사과정과 연관된 필수 영양소이며, 골과 치아의 기계적 견고함을 제공해주는 인산염으로 구성되어 있다. 이러한 칼슘의 적절한 흡수를 위해서는 비타민 D가 필요하다. 비타민 D는 1,25-dihydroxyvitamin D의 전구체이며 골의 발달 및 성장뿐만 아니라 골다공증의 예방 및 골질의 방지를 위해서도 반드시 필요한 물질이다<sup>4)</sup>.

현재 임플란트 초기 안정을 향상시키기 위한 칼슘의 적용은 티타늄 임플란트 표면처리와 같은 국소적용에 국한되어 있고, 전신적인 칼슘 섭취가 임플란트 주위 골형성에 미치는 영향에 대한 연구는 거의 없다.

#### 신 상 훈

602-739 부산광역시 서구 아미동 1-10 부산대학교  
치과대학 구강악안면외과학교실

#### Sang-Hun Shin

Dept. of OMFS, School of Dentistry, Pusan National University

1-10 Ami, Seo-Gu, Busan, 602-739, Korea

Tel: +82-51-240-7429 Fax: +82-51-244-8334

E-mail: ssh8080@pusan.ac.kr

※ 이 논문은 부산대학교 자유과제 학술연구(2년)에 의하여 연구되었음.

이에 본 연구에서는 백서에서 나사형 티타늄 임플란트를 경골에 식립한 후 칼슘과 비타민 D를 섭취시킨 후 임플란트 주위 골유착 과정을 광학 현미경으로 관찰하였으며, 골밀도를 조직형태계측학적으로 분석하였고, 또한 골형성 시기 중에 발현되는 osteocalcin, osteopontin의 분포를 면역조직화학염색법으로 관찰하여 임플란트 시술시 칼슘과 비타민 D의 복용이 골유착에 미치는 영향을 파악하여 임상적용시 지견을 얻고자 하였다.

## II. 연구재료 및 방법

### 1. 연구재료

실험동물은 일정 기간 동일 조건하에서 사육한 10주령군 200-250 g내외의 자성 백서 32마리를 암수 구별 없이 사용하였으며, 이것을 임플란트만을 시술한 정상 대조군 16마리와 추가로 칼슘과 비타민 D를 섭취시킨 실험군 16마리로 나누었다. 연구재료는 순수 티타늄 (Commercially Pure titanium - Grade 3)으로 주문 제작한 직경 2.0 mm 길이 3.5 mm pitch-height 0.4 mm의 나사형 임플란트를 사용하였다.

### 2. 연구방법

#### 1) 임플란트 매식

백서 16마리의 좌,우측 경골부에 다음의 수술 술식을 사용하여 순수 티타늄으로 주문 제작된 나사형 임플란트를 매식하였다. Xylazine hydrochloride (Rompun®, Bayer사, 한국) 10 mg/kg, Ketamine chloride (Ketalar®, 유한양행, 한국) 100 mg/kg을 혼합하여 대퇴부에 근육주사하여 전신마취한 후 슬관절부를 포함하여 좌측 경골부 피부에 제모하고 베타딘 용액을 도포하여 소독하였다. 좌측 경골 외측부에 절개를 가한 다음 박리자를 이용하여 골막까지 박리한 후 골을 노출시켰다. 노출된 경골 근심측 5 mm 부분의 경골 외측 최대 폭경부 중앙에, 생리식염수를 적용하면서 치과용 회전 엔진으로 저속회전시켰다. 직경 1.6 mm twist drill을 이용하여 피질골에 구멍을 뚫어, 직경 1.6 mm의 구멍을 정확히 형성하고, 형성한 구멍을 생리식염수로 충분히 세척하고 골편 등을 제거한 후 임플란트를 피질골에 심고, 골수강에 도달할 때까지 매입하였다. 창상은 통법에 따라 봉합하고 Gentamicin hydrochloride (겐타마이신®, 중외제약, 한국) 3 mg/kg을 근주하였다. 대조군 16마리도 동일한 방법으로 임플란트를 매식하였다.

#### 2) 실험 기간 및 칼슘-비타민 D의 섭취

각 사육장마다 3~4마리씩 사육하였고, 대조군은 실험동물용 고형사료와 생리식염수를, 실험군에는 실험동물용 고형사료와 칼슘 (1 mg/day)과 비타민 D (6 ng/day)가 포함된 생리식염수를 자유 섭취하도록 하였다. 실험동물은 매식 후 1주, 2주, 4주 및 8주간 사육하여 희생시킨 후 표본을 제작하였다.

### 3) 표본 제작

상기의 외과적 수술시행 후 1주, 2주, 4주 및 8주가 경과한 백서의 대퇴부에 Xylazine hydrochloride (Rompun®, Bayer사, 한국) 10 mg/kg, Ketamine chloride (Ketalar®, 유한양행, 한국) 100 mg/kg을 혼합하여 대퇴부에 근육주사하여 전신 마취한 후 심장관류법으로 조직을 고정하기 위하여 흉곽부에 Y절개를 가하여 흉곽을 열어 심장을 노출시킨 후 좌심실로 연동성 관류 펌프와 연결된 20게이지 바늘을 삽입하여 지혈검자로 고정하고 펌프를 작동한 후 우심방의 벽을 절개하여 체순환된 피를 배출시키고 Phosphate buffered saline (PBS)를 사용하여 20분간 체내 혈액을 세척해 내었다. 그 후 pH 7.2인 4% paraformaldehyde 고정액을 30분간 관류 펌프로써 주입하였다. 관류고정 직후 대퇴골의 슬관절부와 비골을 포함하여 경골을 절단해서, 티타늄 임플란트의 중심축 방향으로 경조직 절단기 (Struers Minitom, Denmark)를 사용하여 양분하였다. 그 후 동일한 고정액에 6시간 동안 고정시킨 후 증류수 1750 ml에 250 g의 EDTA와 25 g의 NaOH를 녹인 탈회액에 7주간 탈회시켰다. 그 후 조직을 조직캡슐에 넣어 흐르는 물에 12시간동안 수세한 다음, 통상적인 방법에 따라 alcohol과 xylene으로 탈수와 투명화를 한 후 paraffin에 포매하고 6 µm 두께의 시상연속절편을 만들었다.

### 4) 병리조직학적 관찰

#### (1) Hematoxylin-Eosin(H-E) stain

골형성 정도 관찰은 H-E 염색표본을 광학현미경 (Zeiss Axioscop, German)으로 하였다.

#### (2) Modified Goldner's trichrome stain

교원질의 생성 정도에 따른 광화된 골조직과 비광화된 골조직을 관찰하기 위해 상기 제작된 6 µm 두께의 파라핀 조직 절편을 xylene에서 파라핀을 제거하고 hematoxylin에 5분간 핵 염색을 시행한 후 흐르는 물에 10분간 수세하고 Ponceau-acid fuchin 용액에 5분간 염색하였다. 그런 후 0.2% acetic acid 용액에서 헹구고 Phosphomolybdic acid-orange G 용액에서 3분간 감별한다. 다시 0.2% acetic acid에 헹구고 Light green 용액에 5분간 염색한다. 그 후 0.2% acetic acid에 헹구고 95% 알콜에 탈수한다. Xylene을 통해 청명하고 Balsam으로 봉입하였다.

### 5) 조직형태계측학적 분석

Modified Golder 염색된 표본을 각군당 4개씩 32개를, 광학현미경 (Zeiss Axioscop, German)을 통하여 카메라 (AxioCam MRC®, Zeiss, German)로 찍고 컴퓨터를 이용한 화상처리장치 (AxioVision 4.3, German)를 이용하여 다음과 같은 방법으로 골수부 골밀도를 측정하였다.

#### (1) 골수부 골밀도 (Bone Marrow Density) 측정

골수부에서 임플란트 경계부로부터 1 mm까지의 범위를 지정하고 석회화된 골의 양을 pixel의 수로 계산하여 수치화하였다.

## (2) 통계학적 분석

상기 조직형태학적으로 계측된 자료를 각 주당 실험군과 대조군을 student t-test를 이용하여 유의차 검정을 실시하여  $P < 0.05$ 를 유의하다고 판정하였다.

## 6) 면역조직화학염색

상기 제작된 6  $\mu\text{m}$  두께의 파라핀 조직 절편을 xylene에서 파라핀을 제거하고 graded alcohol을 거쳐 흐르는 물로 수세한 후 내인성 peroxidase를 제거하기 위해 무수 메칠알콜에 0.3% hydrogen peroxide를 첨가시켜 20분간 처리한 다음 PBS에서 10분간 3회 세척하고 osteocalcin의 분포를 알기 위해서 5% normal goat serum을 30분간 적용하였고, osteopontin의 분포를 알기 위해서는 5% normal horse serum을 30분간 적용하였다. 그런 후 조직절편을 세척하지 않고 부드럽게 blotting 한 후 1:400으로 희석도의 1차 항체인 rabbit anti-human osteocalcin (DAKO, Denmark)과 mouse anti-human osteopontin (Serotec, U.S.A.)을 4°C에서 16시간 적용하였다. 그 후 PBS로 10분간 3회 세척한 후 2차 항체인 biotinylated goat anti-rabbit IgG (Verotor lab., U.S.A.)와 biotinylated horse anti-mouse IgG (Verotor lab., U.S.A.)를 각각 1:200으로 희석하여 실온에서 1시간동안 적용하였다. 그 후 조직절편을 PBS로 10분씩 3회 수세하고 30분전에 미리 만들어 실온에 방치해 놓은 ABC (avidin-biotin horseradish peroxidase complex)용액 (A:10  $\mu\text{l}$ , B:10  $\mu\text{l}$  in 1 ml PBS, Verotor lab., U.S.A.)에 조직절편을 실온에서 1시간동안 적용시켰다. 그 후 조직절편을 PBS로 10분간 3회 세척한 후, pH 7.6인 0.05M Tris-HCl buffer와 0.05% diaminobenzine (DAB) 및 0.01% hydrogen peroxidase 혼합용액에 3분 동안 실온에서 발색시켰다. 그리고 나서 Tris buffer, PBS 그리고 증류수에서 각각 10분 동안 순서대로 세척한 후, Harris hematoxyline으로 대조염색을 하고 Pmount (Polysciences, U.S.A.)로 봉입하였다.

## III. 연구결과

### 1. 병리조직학적 소견

#### 1) H-E 염색

##### (1) 대조군

매식 후 1주군에서 임플란트 계면을 따라 골막이 형성되고, 그 아래로 골조직이 형성되고 있었으며 섬유성 조직과 세포가 골조직을 만들 틀을 구성하고 있었다 (Fig. 1). 매식 후 2주군에서는 1주군에 비해 섬유성 조직이 골조직으로 많이 대치되어 있었고 (Fig. 2), 4주군에 이르러서는 치밀골이 상당히 자리잡고 있으며 성숙한 골조직의 형태가 나타나기 시작하였다 (Fig. 3). 매식 후 8주군에서는 4주군에 비해 보다 더 완성된 골조직의 형태를 보였으며, 임플란트 계면을 채우고 있는 대부분을 치밀골이 차지하고 있었다 (Fig. 4).

#### (2) 실험군

매식 후 1주군에서 대조군에 비해 좀 더 많은 치밀골이 관찰되며, 섬유질 성분이 치밀골로 대치되고 있었다 (Fig. 5). 매식 후 2주군에서는 섬유성 조직이 더 많이 골로 대치되었고, 대조군에 비해서도 신생골 조직이 더 많이 관찰되었다 (Fig. 6). 4주군에 이르면 대조군의 8주군에 상응할 만큼 임플란트 계면을 따라 치밀골의 양이 증가하였으며 (Fig. 7), 매식 후 8주군에서는 전체적으로 완성된 골조직의 형태를 보였다 (Fig. 8).

## 2) Modified Goldner's trichrome stain

### (1) 대조군

매식 후 1주군에서는 전체적으로 콜라겐의 염색 정도가 약했으며, 기존에 형성된 치밀골이 임플란트의 식립에 의해 훼손된 상태를 보였다 (Fig. 9). 매식 후 2주군에서 신생골의 형성이 활발히 진행되고 있었으며 골막이 임플란트 계면을 따라 이어지며 곳곳에서 비석회화된 골들이 관찰되었다 (Fig. 10). 4주군에 이르면 골은 임플란트 계면을 따라 거의 다 형성되었으며 비석회화된 골들이 기질의 전반적인 면에서 나타나는 것으로 보아 골기질을 활발히 생성하며 광화작용이 이루어지는 것을 알 수 있었다 (Fig. 11). 8주군에서는 거의 광화가 완료된 것을 볼 수 있었다 (Fig. 12).

### (2) 실험군

매식 후 1주군에서는 곳곳에서 비석회화된 골 기질이 보였지만 (Fig. 13), 2주군에서는 상당량의 광화된 골기질이 채워져 있는 것을 관찰할 수 있었고 (Fig. 14), 매식 후 4주군과 8주군에서는 전반적으로 광화가 모두 이루어져 있으며 대조군에 비해 더 일찍 광화를 끝낸 것으로 관찰되었다 (Fig. 15, 16).

## 2. 조직형태계측학적 분석 (Histomorphometric Analysis)

### 1) 골수부 골밀도 (Bone Marrow Density)

대조군과 실험군 모두 1주군부터 8주군까지 골밀도가 점차적으로 증가하였으며 실험군에서는 1주군과 2주군에서 대조군에 비해 유의한 증가를 보였다 (Table 1).

## 3. 면역조직화학염색

### 1) Osteocalcin 면역 항체를 이용한 면역조직화학염색소견

Osteocalcin 항체 발현 정도는 대조군에서 1주군에서 중등도의 발현을 보이다가 (Fig. 17), 이후 서서히 그 강도가 약해지는 것을 볼 수 있었으며 실험군에서는 1주군에서 가장 강한 발현을 보였고 (Fig. 18), 이후 강도가 약해지는 양상을 보였다 (Table 2).

### 2) Osteopontin 면역 항체를 이용한 면역조직화학염색소견

대조군에서는 2주군에서 강한 발현을 보이다가 4주군부터 발현이 약해졌으며 (Fig. 19), 실험군에서는 1주군부터 발현의

**Table 1.** Marrow bone density (Pixel)

	control group	HCa+ vitamin D
1 week	121.44 ± 8.35	134.76 ± 7.45*
2 weeks	133.65 ± 7.24	145.73 ± 6.53*
4 weeks	147.23 ± 11.58	152.39 ± 10.96
8 weeks	149.98 ± 10.43	154.17 ± 8.33

(\*: P < 0.05)

**Table 3.** Osteopontin expression after implantation

periods after implantation	control group	HCa+ vitamin D
1 week	+	++
2 weeks	++/+	++/+
4 weeks	+/-	+++
8 weeks	+	+++/>++

+++ : strong positive, ++:moderate positive, +:weak positive, -: no reaction

강도가 서서히 증가하여 4주군에서는 매우 강한 발현을 나타냈고 (Fig. 20), 8주군까지 강한 발현이 지속되고 있었다 (Table 3).

#### IV. 총괄 및 고찰

골은 성장기뿐만 아니라 일생 동안 거듭되는 골의 생성과 흡수를 통해 끊임없이 재형성되는 조직으로, 이러한 과정을 통하여 골질량이 결정된다. 성장기에는 생성과정이 우세하게 작용하고, 정상 성인인 경우, 생성과 흡수 작용이 균형을 이루고 있으나 노령화에 따라 흡수량이 생성량을 능가하여 골격의 약화가 초래된다. 최근 골의 개조 균형이 흡수 쪽에 치우친 노인 환자에서 임플란트의 사용이 증가하면서 높은 성공률을 얻기 위한 골의 양과 질에 영향을 미치는 다양한 조건들에 많은 관심을 가져왔다.

Zoldos와 Kent<sup>9)</sup>는 골내에 임플란트를 매식한 후 손상을 받은 주위골은 염증기, 증식기, 성숙기 3 단계를 거쳐 치유되면서 골유착이 발생된다고 하였는데, 제1기인 염증기는 1-10일경, 2단계인 증식기는 3-42일경, 3단계인 성숙기는 28일 이후 나타난다고 하였다. 이는 Wray<sup>8)</sup> 등이 보고한 골질의 치유단계와 유사하다. 이는 1 단계인 가골 형성을 위한 골단 사이의 골의막과, 골내막 세포의 증식에 의한 혈중성 가골 형성기, 2 단계 가골내로의 혈관신생기, 3단계 혈중성 가골 형성기 4단계인 성숙골로 이행하는 골성 가골의 재수복기로 이루어진다. 따라서, 골질의 치유를 촉진시키는 방법은 임플란트 주위의 골 형성도 촉진시키고 빠른 초기고정을 얻어 임플란트의 성공률을 높일 수

**Table 2.** Osteocalcin expression after implantation

periods after implantation	control group	HCa+ vitamin D
1 week	++	+++
2 weeks	+++	+++/>++
4 weeks	+	++
8 weeks	+/-	+

+++ : strong positive, ++:moderate positive, +:weak positive, -: no reaction

있을 것으로 생각된다. 골절 치유 속도를 높이고, 골질을 개선시키기 위한 약물요법으로 phenytoin, calcitonin 등이 연구되고 있으며 칼슘과 비타민 D도 여기에 포함된다.

칼슘은 포유동물에서 두 가지 큰 생체 기능을 가지고 있다. 첫째는 무기질 내에 풍부한 무기 양이온으로써 존재하면서 골격을 이루는데 중요한 역할을 하며 이온의 중요한 저장고인 골조직에서 많은 호르몬의 표적으로 칼슘의 항상성이 조절된다. 두 번째 칼슘의 역할은 신경 전달, 심장근과 골격근의 수축, 호르몬, 신경전달물질 및 효소의 분비 및 유리 그리고 표적기관에서 호르몬 작용 등 다양한 대사 활성화에 중요한 역할을 한다<sup>8)</sup>. 성인의 체중 칼슘 (1-2kg) 중 98% 이상이 골조직 내에 존재하고 나머지 2%는 골의 구조와 상관없이 체내에 중요한 생리적 기능을 나타내며 존재한다. 세포 내액에 존재하는 칼슘이온의 농도는 대략 조직 kg당 0.2 g이며, 혈중에는 8.8-10.4 mg/dl로 들어있다.

칼슘을 경구 투여하게 되면 혈청 칼슘의 농도가 증가하게 되고 이로 인한 칼시토닌의 분비를 촉진시켜 골에서의 칼슘 용출을 막고 기질 (matrix)의 분해를 지연하게 된다<sup>7)</sup>. 이러한 혈청 칼슘 농도의 증가는 잠재적으로 골모세포의 칼슘 이용을 증가시키고, osteogenic cell에서의 골모세포로의 분화를 증가시켜 골형성을 촉진한다<sup>8)</sup>. 칼슘의 투여가 골모세포의 활성화에 미치는 영향에 대해 Shirai 등<sup>9)</sup>은 *in vitro*상에서 세포의 칼슘 투여시 골모세포는 칼슘 농도에 반응하면서 저 농도시에는 파골세포의 활성을 돕고 저 농도시에 분화된 골모세포는 골 흡수 능력이 커진다고 하였다. 이러한 칼슘 투여가 골절 치유에 미치는 영향에 대해서는 Annefeld 등<sup>10)</sup>이 칼슘 투여가 골손상과 취약한 골질의 재수복에 우수한 효과를 나타낸다고 보고하였으며, Dent 등<sup>11)</sup>은 골절의 치유속도를 빠르게 하였다고 보고하였다. 하지만, 칼슘 보충 수준에 따른 골격대사에 미치는 영향은 실험대상에 따라 많은 차이를 보이므로 어느 정도 수준의 칼슘 섭취가 최대 골질을 유지할 수 있는지에 대한 많은 연구가 필요한 실정이다.

체내 칼슘 이동에는 회수되는 인체부위로 십이지장, 저장고로 골, 배설구로 신장 등 3가지 장기가 관여하며 이들을 칼슘 대사 조절기관이라고 한다. 이들 조절 기관이 독자적인 작용을 발휘하기 위해서는 체내에는 비타민 D, 부갑상선 호르몬, 칼시토닌 등 3가지 호르몬이 마련되어 있으며, 이들을 칼슘 대

사의 조절호르몬이라 부른다. 이중 비타민 D는 간에서 대사되어 25(OH)D<sub>3</sub>의 형태로 전환되어 신장에서 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>와 24R,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>의 형태로 대사되며 VDR<sub>nuc</sub> (Vitamin D Nuclear receptor)와 VDR<sub>mem</sub> (Vitamin D Membrane receptor)에 결합하여 여러 가지 선택된 생리학적 기능 외에 장관내의 칼슘 흡수를 촉진하고 신장에서의 칼슘과 인의 재흡수를 도우며 골에서의 칼슘과 인의 침착을 촉진한다<sup>12)</sup>. Kolar 등<sup>13)</sup>은 비타민 D가 골절 치유에 효과적이었다고 보고하였으며, Blahos 등<sup>14)</sup>은 쥐 모델에서 인위적으로 경골의 골절을 유도한 후 비타민 D를 투여하였을 경우 골 형성이 촉진된다고 하였다. 하지만, 과도한 비타민 D를 투여하였을 경우 석회화가 이루어지지 않은 osteoid가 과도하게 증가한 점을 미루어 무기질화에 손상이 있었음을 예측할 수 있다는 보고가 있으며<sup>15)</sup>, 과도한 비타민 D의 투여는 과칼슘혈증이나 신장 결석의 부작용이 생길 수 있다. 하지만 부작용 없이 골 치유를 촉진시킬 수 있는 용량에 대해서는 더 많은 연구가 필요하다.

칼슘과 비타민 D의 투여는 골절에서와 같이 새로운 골형성이 필요한 경우 치유를 촉진시킬 수 있지만, 그것이 임플란트 주위 골형성을 촉진시킨다는 연구는 부족하다. 본 연구에서는 백서에서 임플란트 식립 후 병리조직학적 관찰을 시행한 결과, 실험군과 대조군 모두 임플란트 계면을 따라 신생골 형성이 잘 이루어짐을 관찰할 수 있었으나, 칼슘과 비타민 D를 추가로 섭취시킨 경우 골 성숙과 광화가 더 빨리 진행됨을 볼 수 있었다. 골조직의 조직 형태계측학적 분석상 골밀도는 1, 2주군에서 대조군에 비해 유의한 증가를 보였으며 4, 8주군에서는 유의한 차이가 없었다. 이는 칼슘과 비타민 D의 섭취가 특히 골형성 초기에 많은 영향을 준다는 것으로 해석할 수 있다. 따라서, 임플란트 시술시 이들 약물의 투여가 임플란트 초기 고정에 도움이 될 수 있을 것으로 생각된다.

Osteocalcin은 5800 Da의 상대적으로 작은 단백질로 기질의 광화 기간동안 골모세포에 의해 생산된다. Osteocalcin은 bone에서 가장 풍부한 비교원성 단백질이며, osteocalcin의 합성은  $\gamma$ -carboxyglutanic-acid와 함께 gene product를 변화시키는 비타민 K에 의해 일어난다<sup>16)</sup>. 비록, osteocalcin의 정확한 기능은 알려져 있지 않으나 Desboid 등<sup>17)</sup>은 osteocalcin이 광화를 조절하며 새로 생성되는 골에서 조직 병리학적인 지표로 사용될 수 있다고 하였다. 또한 Sandberg 등<sup>18)</sup>은 osteocalcin의 발현이 골절 치유의 초기에는 낮게 나타나지만, 가골의 골화가 진행될 때에 증가한다고 보고하였다. 따라서 임플란트 매식 후 인접 골형성 조직에서 osteocalcin의 발현 정도를 보는 것은 골형성의 정도와 광화 정도를 파악할 수 있는 지표로 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

본 연구에서는 대조군과 실험군에서 osteocalcin의 분포를 관찰한 결과 실험군에서는 osteocalcin의 발현이 2주군까지 강하게 발현되다가 4주군부터는 점차 낮게 발현되었으며 대조군에서는 1주군부터 실험군에 비해 약하게 발현되었다. 이는 실험군에서 초기 골형성 과정이 더 빠르고 왕성하게 일어남을 의미하고 광화가 더 일찍 마무리된다는 것을 알 수 있었다.

Osteopontin 역시 골모세포에 의해 생성되며, osteopontin의 활성은 alkaline phosphatase의 활성에 따라 달라진다고 알려져 있다<sup>19)</sup>. Mark 등<sup>20)</sup>은 성장중인 백서의 악골에서 osteopontin이 강하게 발현되는 proosteoblast가 많다고 보고하였으며, Hsieh 등<sup>21)</sup>은 백서의 발치창에서 망상골의 형성이 시작되는 4-5일 후 osteopontin이 발현된다고 하였다. 따라서 osteopontin은 광화를 조절하는 기능이 있을 것으로 보인다.

본 연구에서 osteopontin 발현 정도는 실험군에서 대조군에 비해 더 오래 더 강하게 발현되었다. 이는 실험군에서 더 빠르고 우수한 골형성 과정이 일어남을 의미하는 것으로 보였다.

## V. 결 론

백서에서 칼슘과 비타민 D를 추가 섭취가 임플란트 매식 후 주위 골형성에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 백서의 경골에 주문 제작된 나사형 순 티타늄 임플란트를 식립하고 대조군과 실험군에서 1주, 2주, 4주 및 8주 경과 후 각각 희생하여 병리조직학적, 조직형태계측학적 분석 및 osteocalcin과 osteopontin을 이용한 면역조직화학적 소견을 관찰하였다.

조직학적 소견에서 실험군 1주군에서부터 요철모양으로 형성된 골조직이 나타나고 2주군에 이르러 층판골이 명확하였고 4주군에 골소주가 있는 성숙된 골조직이 나타남을 알 수 있다. 대조군에서는 4주군까지는 점차적으로 형성된 골조직의 양과 두께가 증가하였으며 8주군에서는 골조직의 양과 두께가 상당히 두꺼워지고 거의 성숙골과 유사한 골조직을 관찰할 수 있었다. 조직형태계측학적 분석에서 골밀도는 실험군에서 점차적으로 증가하였고 1, 2주군에서 대조군에 비해 유의한 차이를 보였다. Osteocalcin 항체를 이용한 면역조직화학 염색소견에서 실험군에서는 1주군에서 가장 강한 발현을 나타내고 4주군부터는 서서히 감소하였으며 대조군에서는 1주군에서부터 4주군까지 발현이 약하게 계속 지속되고 있었다. Osteopontin 항체를 이용한 면역조직화학 염색소견에서 실험군에서는 2주에서 8주군까지 강한 발현을 보였다. 하지만 대조군에서는 전체적으로 약한 발현을 보였다.

이상의 결과를 종합하여 보면, 백서의 경골에 식립한 임플란트의 주위골 반응에서 골수부의 골밀도는 대조군과 비교하여 더 빨리 증가하였고, osteocalcin과 osteopontin 항체를 이용한 면역조직화학 소견으로 보아 골형성의 속도가 빠르고 또한 층판골과 골소주가 형성된 골조직으로의 이행도 촉진됨을 알 수 있었다.

## 참고문헌

1. Branemark PI, Adell R, Breine U, Hansson BO, Lindstrom J, Ohlsson A: Intra-osseous anchorage of dental prostheses. I. Experimental studies. *Scand J Plast Reconstr Surg* 1969;3:81-100.
2. Jaffin RA, Berman CL: The excessive loss of Brånemark fixtures in type IV bone: A 5-year analysis. *J Periodontol* 1991;62:2-4.
3. Laney WR: Selecting edentulous patients for tissue-integrated prostheses. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1986;1:129-138.

4. Utiger RD: The need of more vitamin D. *N Engl J Med* 1998; 338:828-829.
5. Zoldos J, Kent JN: Healing of Endosseous Implants. In Block MS, Kent JN(eds): *Endosseous Implants For Maxillofacial Reconstruction*. Philadelphia, WB Saunders Co. 1995:40-69.
6. Bowers GN, Brassard C: Measurement of ionized calcium serum with ion-selective electrode: A mature technology that can meet the daily service needs. *Clin Chem* 1986;32:1437-1447.
7. Hong SM, Kim HJ: Effect of Ca Supplementation on Serum Ca Level and Psychological Conditions in Perimenopausal Woman. *Korean J Community Nutrition* 2001;6:628-634.
8. Doetsch AM, Faber J, Lynnerup N, Wätjen I, Bliddal H, Danneskiold-Samsøe: The Effect of Calcium and Vitamin D3 Supplementation on Healing of Proximal Humerus Fracture: A Randomized Placebo-Controlled Study. *Calcif Tissue Int* 2004;75:183-188.
9. Shirai Y, Yoshimura Y, Yawaka Y: Effect of extracellular calcium concentrations on osteoclast differentiation in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;265: 484-488.
10. Anfeld M, Caviezel R, Schart E, Schicketanz KH: The influence of Ossein-hydroxyapatite compound on healing of a bone defect. *Cur Med Res and Opinion* 1986;4:241-250.
11. Dent CE, Davies IJT: Calcium metabolism in bone disease: effects of treatment with microcrystalline calcium hydroxyapatite compound and dihydrotachysterol. *The Royal Society of Med.* 1980;73: 780-785.
12. Norman AW, Okamura WH, Bishop JE, Henry HL: Update on biological actions of 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>-Vitamin D<sub>3</sub>(rapid effect) and 24R,25(OH)<sub>2</sub>-Vitamin D<sub>3</sub>. *Molecular and Cellular Endocrinology.* 2002;197:1-13.
13. Kolar J, Babicky A, Blahos J: Influence of 1,25- hydroxycholecalciferol and calcitonin on experimental fractures. *Acta Chir Orthop Trauma* 1979;46:193-199.
14. Blahos J, Babicky A, Porsova I, Kolar J: Effect of 1,25-hydroxycholecalciferol on fracture healing and on general posttraumatic skeletal response in rats. *Endocrinol Exp* 1989;23:287-294.
15. Hey MG, Gera I, Fonseca J, Raiz LG, Hock JM: 1,25- Dihydroxy-vitamin D<sub>3</sub> alone or in combination with parathyroid hormone does not increase bone mass in young rats. *Calcif Tissue Int* 1988;43:284-288.
16. Fottrell PF, Power MJ: Osteocalcin:diagnosis method and clinical applications. *Crit Rev Lab Sci* 1991;28:287-335.
17. Desboid C, Karsenty G: Osteocalcin cluster: implication for functional studies. *J Cell Biochem* 1995;57:379-383.
18. Sandberg MM, Aro HT, Vuorio EI: Gene expression during bone repair. *Clin Orthop* 1993;289:292-312.
19. Beck Jr, GR, Sullivan EC, Moran E, Zerler B: Relationship between alkaline phosphatase levels, osteopontin expression, and mineralization in differentiating MC3T3-E1 osteoblasts. *J Cell Biochem* 1998;68:269-280.
20. Mark MP, Prince CW, Oosawa T, Gay S, Bronckers ALJJ, Butler W: Immunohistochemical demonstration of a 44-kD phosphoprotein in developing rat bones. *J Histochem. Cytochem* 1987;35:707-715.
21. Hsieh YD, Devlin H, McCord F: The effect of ovariectomy on the healing tooth socket of the rat. *Archs Oral Biol* 1995;40:529-531.

사진부도 ①

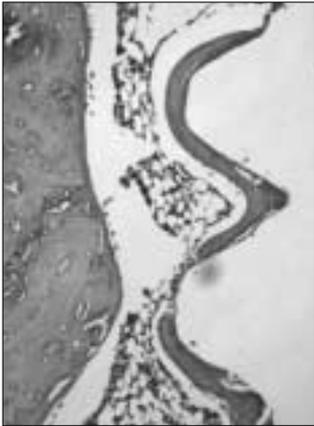


Fig. 1. Microphotograph at 1week after implantation in control rat. H-E, × 100



Fig. 2. Microphotograph at 2week after implantation in control rat. H-E, × 100



Fig. 3. Microphotograph at 4week after implantation in control rat. H-E, × 100

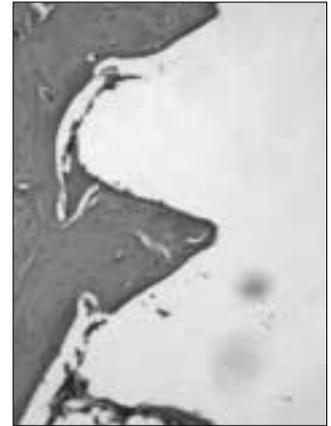


Fig. 4. Microphotograph at 8week after implantation in control rat. H-E, × 100

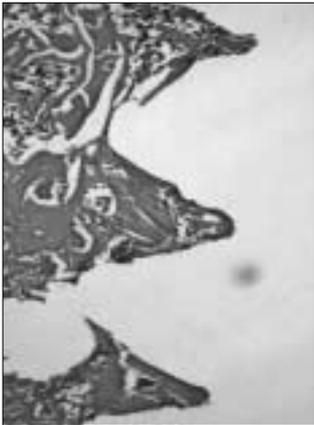


Fig. 5. Microphotograph at 1week after implantation in experimental rat. H-E, × 100



Fig. 6. Microphotograph at 2week after implantation in experimental rat. H-E, × 100



Fig. 7. Microphotograph at 4week after implantation in experimental rat. H-E, × 100

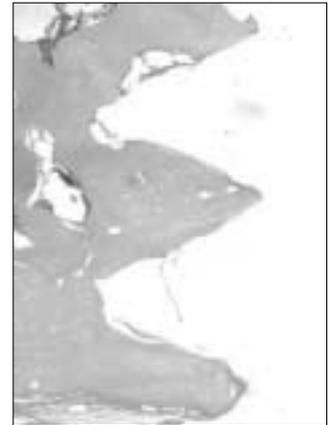


Fig. 8. Microphotograph at 8week after implantation in experimental rat. H-E, × 100



Fig. 9. Microphotograph at 1week after implantation in control rat. Modified Goldner's trichrome stain × 100



Fig. 10. Microphotograph at 2week after implantation in control rat. Modified Goldner's trichrome stain × 100



Fig. 11. Microphotograph at 4week after implantation in control rat. Modified Goldner's trichrome stain × 100



Fig. 12. Microphotograph at 8week after implantation in control rat. Modified Goldner's trichrome stain × 100

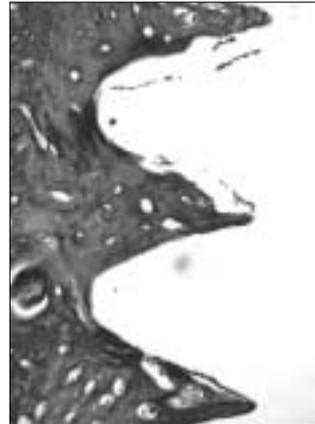
사진부도 ②



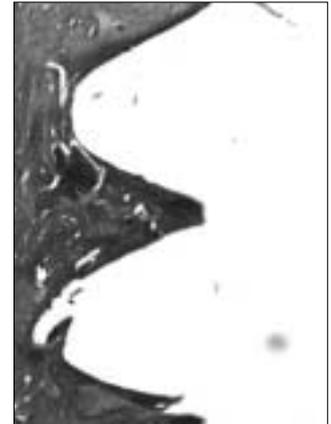
**Fig. 13.** Microphotograph at 1week after implantation in experimental rat. Modified Goldner's trichrome stain × 100



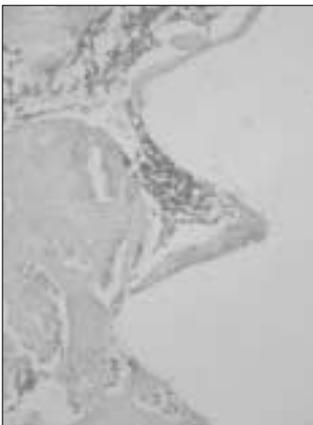
**Fig. 14.** Microphotograph at 2week after implantation in experimental rat. Modified Goldner's trichrome stain × 100



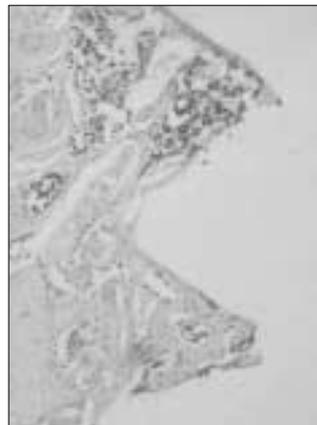
**Fig. 15.** Microphotograph at 4week after implantation in experimental rat. Modified Goldner's trichrome stain × 100



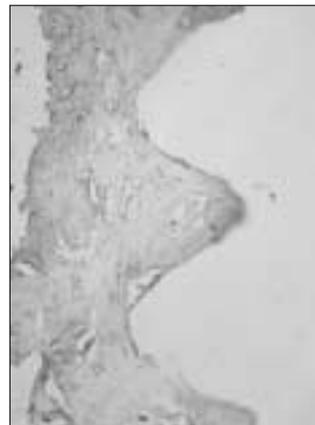
**Fig. 16.** Microphotograph at 8week after implantation in experimental rat. Modified Goldner's trichrome stain × 100



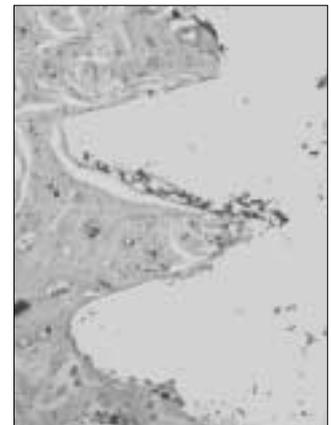
**Fig. 17.** Osteocalcin antibody reaction of regenerating bone at 1 weeks after implantation on the tibia of the control rat. (original magnification × 100)



**Fig. 18.** Osteocalcin antibody reaction of regenerating bone at 1 weeks after implantation on the tibia of the experimental rat. (original magnification × 100)



**Fig. 19.** Osteopontin antibody reaction of regenerating bone at 4 weeks after implantation on the tibia of the control rat. (original magnification × 100)



**Fig. 20.** Osteopontin antibody reaction of regenerating bone at 4 weeks after implantation on the tibia of the control rat. (original magnification × 100)