

# Simvastatin이 골결손부 회복에 미치는 영향

\*경희대학교 치의학전문대학원 구강악안면방사선과학교실, \*\*경희대학교 치의학전문대학원 치과약리학교실,  
\*\*\*경희대학교 치의학전문대학원 구강생물학연구소

강정호\* · 김규태\* · 최용석\*\*\*\* · 이현우\*\*\*\*\* · 황의환\*\*\*\*

## Effect of Simvastatin collagen graft on wound healing of defective bone

Jung-Ho Kang\*, Gyu-Tae Kim\*, Yong-Suk Choi\*\*\*\*, Hyeon-Woo Lee\*\*\*\*\*, Eui-Hwan Hwang\*\*\*\*

\*Department of Oral and Maxillofacial Radiology, School of Dentistry, Kyung Hee University

\*\*Department of Pharmacology, School of Dentistry, Kyung Hee University

\*\*\*Institute of Oral Biology, School of Dentistry, Kyung Hee University

### ABSTRACT

**Purpose** : To observe and evaluate the effects of Simvastatin-induced osteogenesis on the wound healing of defective bone.

**Materials and Methods** : 64 defective bones were created in the parietal bone of 32 New Zealand White rabbits. The defects were grafted with collagen matrix carriers mixed with Simvastatin solution in the experimental group of 16 rabbits and with collagen matrix carriers mixed with water in the controlled group. The rabbits were terminated at an interval of 3, 5, 7, and 9 days, 2, 4, 6, and 8 weeks after the formation of defective bone. The wound healing was evaluated by soft X-ray radiography. The tissues within defective bones were evaluated through the analysis of flow cytometry for the manifestation of Runx2 and Osteocalcin, and observed histopathologically by using H-E stain and Masson's trichrome stain.

**Results** : 1. In the experimental group, flow cytometry revealed more manifestation of Runx2 at 5, 7, and 9 days and Osteocalcin at 2 weeks than in the controlled groups, but there was few difference in comparison with the controlled group.

2. In the experimental group, flow cytometry revealed considerably more cells and erythrocytes at 5, 7, and 9 days in comparison with the controlled group.

3. In the experimental group, soft x-ray radiography revealed the extended formation of trabeculation at 2, 4, 6, and 8 weeks.

4. Histopathological features of the experimental group showed more fibroblasts and newly formed vessels at 5 and 7 days, and the formation of osteoid tissues at 9 days, and the newly formed trabeculations at 4 and 6 weeks.

**Conclusion** : As the induced osteogenesis by Simvastatin, there was few contrast of the manifestation between Runx2 and Osteocalcin based on the differentiation of osteoblasts. But it was considered that the more formation of cells and erythrocytes depending on newly formed vessels in the experimental group obviously had an effect on the bone regeneration. (*Korean J Oral Maxillofac Radiol* 2008; 38 : 133-46)

**KEY WORDS** : Simvastatin; Wound healing; Flow cytometry; Radiography

### 서론

악안면부의 골절, 감염, 낭, 종양 등에 대한 외과적 수술로 인해 발생한 골결손부의 신속한 치유와 기능적 회복을

위해 사용되는 골이식재의 선택은 임상적으로 매우 중요하다. 일반적으로 광범위한 골결손부의 회복이나, 성공적인 임플란트 시술 등을 위해 필요한 골질과 골량을 얻기 위한 골이식재료는 자가골이나 생체재료가 이용되고 있다. 이 중 현재까지 임상적으로 우수하다고 알려져 있는 자가골을 획득하기 위해서는 부가적인 외과적 수술이 필요하고 한정된 골량의 채취만이 가능하므로 자가골을 대체할 수 있는 생체재료가 요구된다.

접수일 (2008년 7월 18일), 수정일 (2008년 8월 14일), 채택일 (2008년 8월 19일)  
Correspondence to : assist. Prof. Yong-Suk Choi  
Department of Oral and Maxillofacial Radiology, School of Dentistry, Kyung Hee University, #1 Hoigi-dong, Dongdaemun-gu, Seoul 130-701, Korea  
Tel) 82-2-958-9406, Fax) 82-2-965-1256, E-mail) omrcys@khu.ac.kr

골의 재생과 치유에 관여하는 생체재료는 골결손부를 채운 매식체 주변으로 골 형성이 일어날 수 있는 환경을 유지하는 골전도 기능과 매식체가 골결손부 주위로부터 전구세포나 미분화간엽세포의 이주를 촉진하고, 이들 세포를 골모세포로 분화시켜 골 형성을 유도하는 골유도 기능을 가지고 있어야 한다.

한편 폐경에 따른 여성호르몬의 변화, 연령의 증가, 칼슘 흡수의 감소 등에 의해 골대사의 항상성에 불균형이 초래 되면 골량의 소실을 일으키는 골다공증이 발생된다.<sup>1-3</sup> 골다공증은 가벼운 외상에 의해서도 쉽게 골절이 발생할 뿐만 아니라 연골조직의 치유 및 발치와나 골결손부 치유에도 많은 영향을 미친다.<sup>4,7</sup> 또한 골다공증상태에서 골결손이 발생하면 이의 치료가 어려울 뿐만 아니라 골결손부가 충분한 기능적 골 밀도와 강도를 가지는 골로 회복되지 못하여 심각한 후유증을 남길 수 있다. 따라서 골다공증에 대한 이상적인 치료방법은 골밀도를 골절 역치 이상으로 증가시키고, 골결손부에 대한 치유를 촉진할 수 있도록 골모세포의 분화를 유도하는 것이다.<sup>7-10</sup>

골결손부의 빠른 회복을 위해서는 골결손부에서 골유도를 일으킬 수 있는 인자가 필요한데, Urist<sup>11,12</sup>에 의해 골형성단백질 (bone morphogenic protein: BMP)이 골유도 과정에 관여한다는 것이 보고된 이래, BMP의 골유도능에 관한 많은 연구가 이루어져 왔다.<sup>1-3,11-25</sup> 그러나 BMP를 얻기 위해서는 많은 비용과 노력이 들어 실제 임상에 적용하기에는 한계가 있다.<sup>14-17</sup>

최근 심혈관질환의 발생을 억제시키는 것으로 알려진 고지혈증 치료제인 Statin계열 약물이 콜레스테롤의 생합

성 억제효과 이외에 내피세포의 기능장애를 호전시키고, 항염증작용을 갖는 다면발현성 효과 (Pleiotropic effect)를 가지고 있는 것으로 보고되고 있다.<sup>26-31</sup> 또한 Statin계열 약물은 BMP의 합성을 증가시킴으로써 골모세포의 분화를 촉진하여 골 형성을 유도하는 것으로 보고되고 있다.<sup>26,27</sup>

따라서 BMP 유전자의 발현에 효과가 있는 것으로 보고되고 있는 Statin계열 약물의 국소적인 적용을 통해 골결손부에서의 골유도 효과를 극대화시킬 수 있다면 적은 비용과 노력으로 양질의 임상결과를 얻을 수 있을 것으로 생각되어진다.

이에 본 연구에서는 가토의 두정골 부위에 인위적으로 골결손부를 형성하고, HMG-CoA reductase 억제제로 알려진 Statin계열 약물인 Simvastatin을 교원질로 구성된 담체에 적용하여 이를 골결손부에 매식한 후, 골결손부에서의 신생골 형성 과정을 연X선사진과 병리조직학적 검사를 시행하여 관찰하고, flow cytometry로 유세포 분석을 통해 골모세포로의 분화에 관여하는 유전자의 중요 전사인자인 runt-related transcription factor-2 (Runx2)와 골모세포로의 분화 시에 증가를 보이는 osteocalcin의 발현 정도를 평가하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 연구재료

실험동물로는 일정한 조건에서 사육된 체중 2.5 kg 내외의 New Zealand계 웅성 가토 32마리를 사용하였다. 이들을

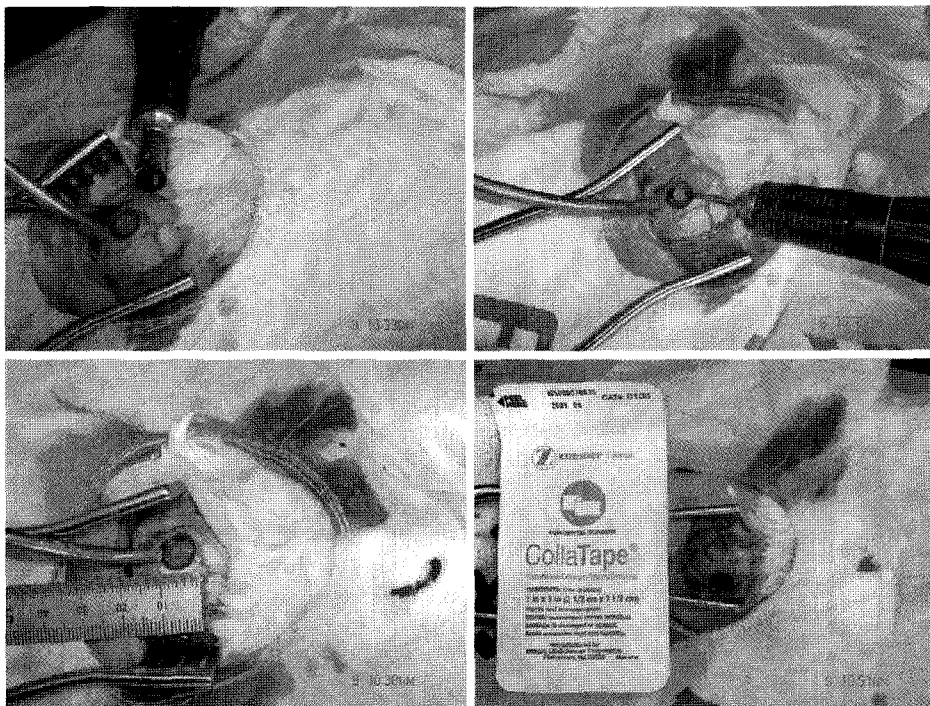


Fig. 1. Critical size bone defect (diameter: 9 mm) formation using trephine bur with implantation of collagen sponge.

실험목적에 따라 골결손부에 water collagen graft를 매식한 대조군과 Statin collagen graft를 매식한 실험군으로 나누었으며, 각 군에 16마리씩을 배정하였다.

2. 연구방법

1) 골결손부 형성

실험동물용 마취제인 Zoletil (Vibrac Laboratories, France) 을 체중 100 gm 당 0.04 mL/100 gm 근육 내 주사하여 전신 마취시키고, 두정골 부위의 피부를 4 cm 정도 절개하여 골막을 박리한 다음, 치과용 절삭 trephine bur를 사용하여 두정부의 두개봉합선의 양측에 걸쳐 뇌경막의 손상이 발생되지 않도록 직경 9 mm의 내, 외측 피질골을 천공하는 원형의 골결손부를 형성하였다. 이후 실험군의 골결손부에는 Statin collagen graft (Simvastatin 2.5 mg/mL concentration, Zocor tablet, 10 mg Simvastatin; mixed with 0.02 g of absorb-

able collagen matrix sponge)를 매식하고 대조군의 골결손부에는 water collagen graft를 매식한 다음 흡수성 봉합사인 4-0 catgut으로 골막봉합과 4-0 silk로 피부봉합을 시행하였다. 술 후 감염방지를 위하여 젠타마이신 (Dongshin Pharmacy Co., Korea) 0.1 mL를 5일간 근육 내 주사하였다 (Fig. 1).

2) 실험동물의 희생 및 두정골 적출

골결손부를 형성하고 3일, 5일, 7일, 9일, 2주, 4주, 6주, 8주가 경과된 후, 각각의 실험동물을 전신마취하고 희생시킨 다음, 두정골 적출하였다.

3. 관찰 항목

1) 연X선촬영

적출된 두정골에 대한 연X선촬영에 사용된 X선발생장치는 Softex CSM-2 (Softex Co., Ltd., Japan)이었으며, 사용된 필름은 Fuji X-ray FR (Fuji photo Film Co., Ltd., Japan)이었다. 촬영조건은 관구와 필름 간의 거리가 60 cm, 관전압 40 kVp, 관전류 2.5 mA, 노출시간은 30초였다. 촬영된 필름은 20°C에서 Rendol (Fuji Photo Film Co., Ltd., Japan)으로 2분간 현상하였으며, RenFix (Fuji Photo Film Co., Ltd., Japan)로 4분간 정착하였고, 수세, 건조한 후 관찰하였다 (Fig. 2).

2) Flow cytometry analysis

적출된 조직에서 주변의 근육과 연조직을 무균상태에서 제거한 후, 10 mL of 0.1% ethylene diamine tetra acetic acid (EDTA in Ca 2<sup>++</sup> and Mg 2<sup>++</sup> free, balanced salt solution) 용액에서 37°C 조건으로 20분간 처리한 후 세포를 분리하기 위해 5 mL의 sterile enzyme solution (0.2% collagenase and 0.2% trypsin)으로 37°C에서 1시간 처리하였다. 45 µm pore size의 nylon sieve로 여과된 세포는 PBS 용액과 함께 2회에 걸쳐 원심분리 후 분리된 세포들을 유세포 분석기 (Flow cytometer, Quanta SC, Becton Coulter, USA)에서 분석하기 위해 4% paraformaldehyde와 0.2% Triton X100 용액에

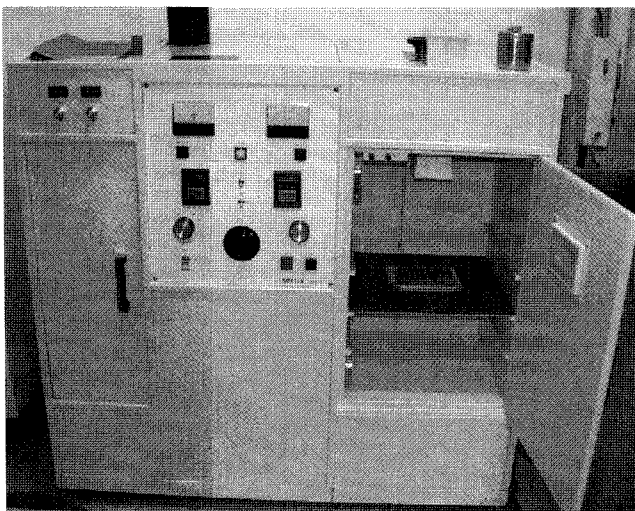


Fig. 2. Soft x-ray apparatus and examination for specimens extracted.

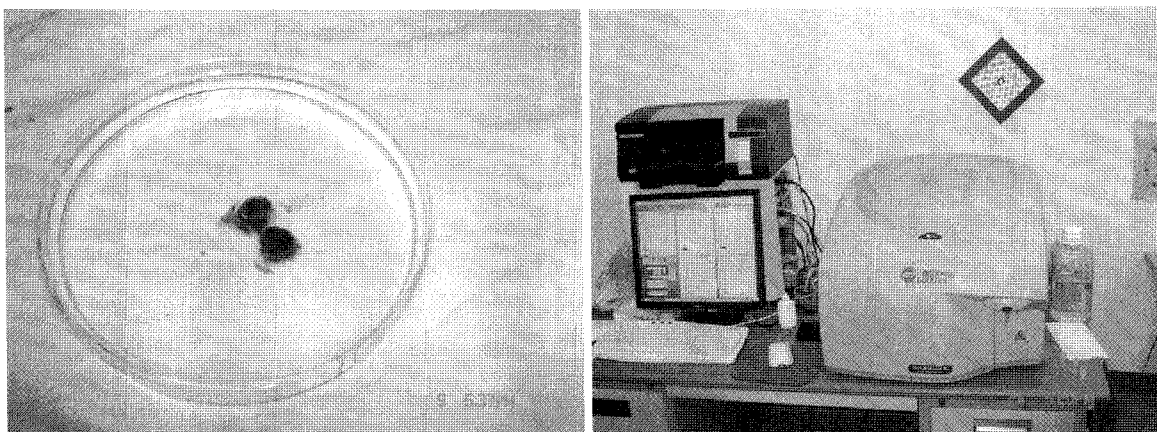


Fig. 3. Fluorescent Activated Cell Sorter (FACS, Quanta SC, Becton Coulter, USA) equipment for flow cytometry analysis.

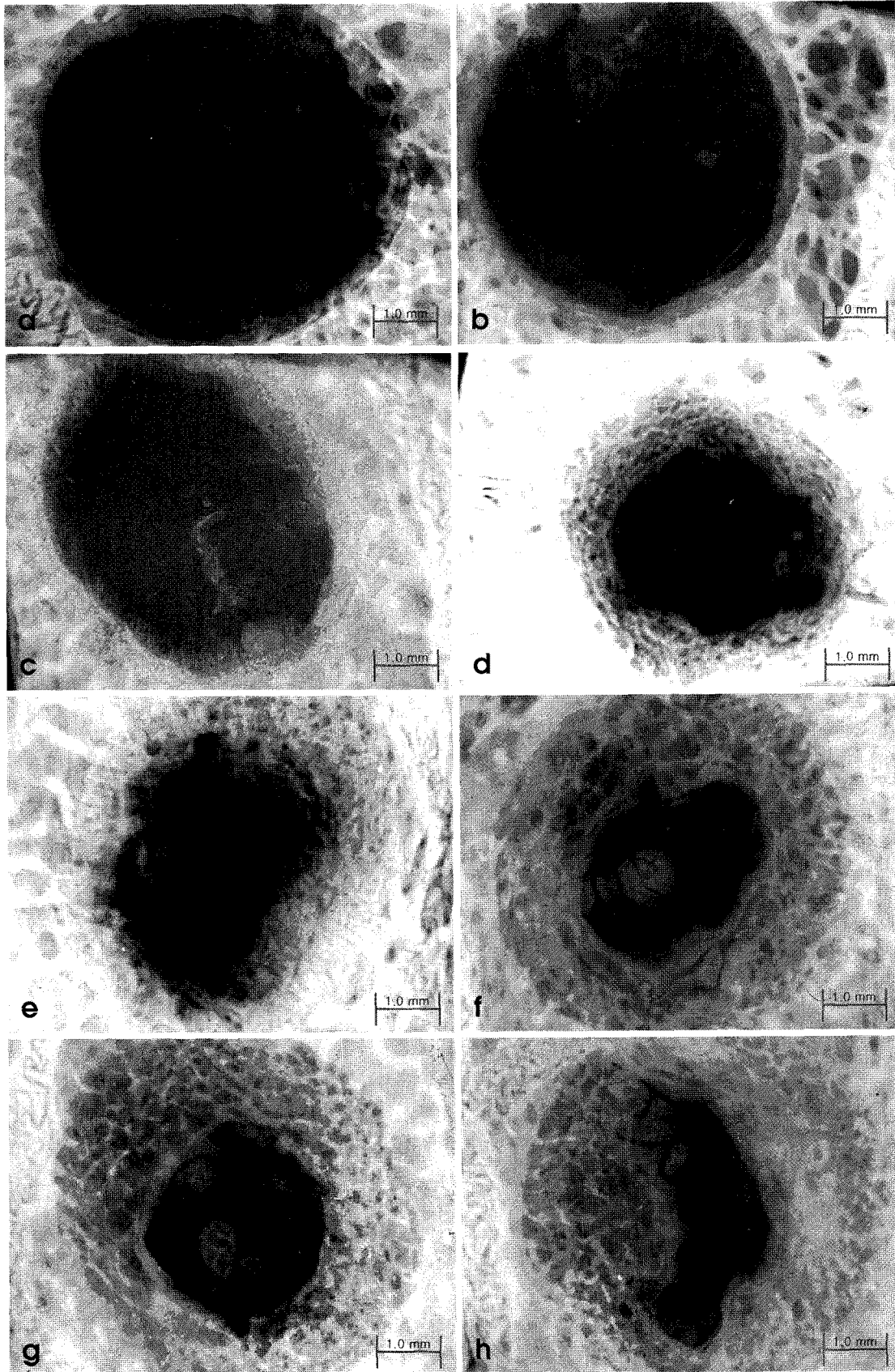
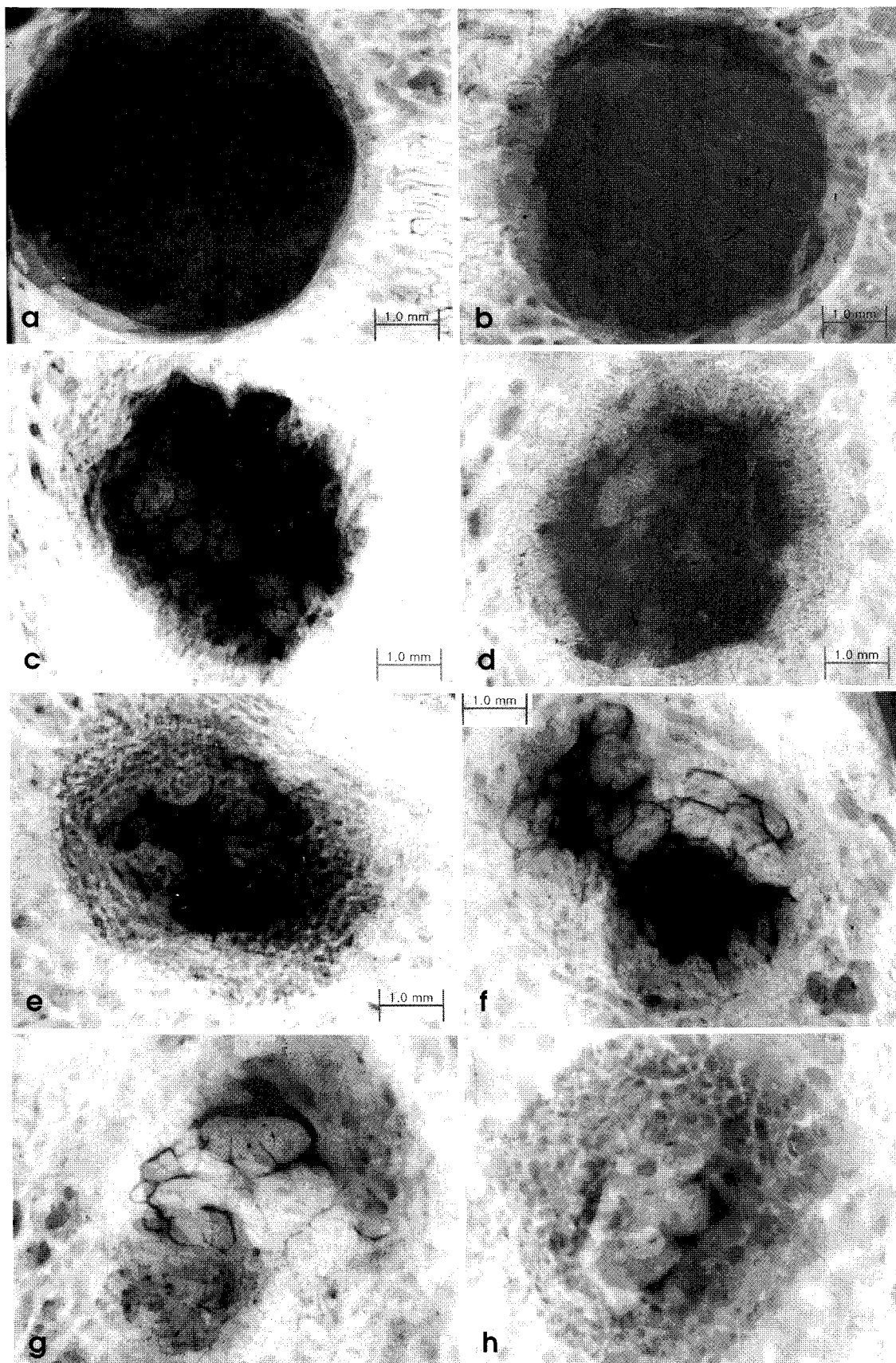


Fig. 4. Soft X-ray radiographies of controlled groups at 3 days (a), 5 days (b) 7 days (c), 9 days (d), 2 weeks (e), 4 weeks (f), 6 weeks (g), and 8 weeks (h) after bone defect formation.



**Fig. 5.** Soft X-ray radiographies of experimental groups at 3 days (a), 5 days (b) 7 days (c), 9 days (d), 2 weeks (e), 4 weeks (f), 6 weeks (g), and 8 weeks (h) after bone defect formation.

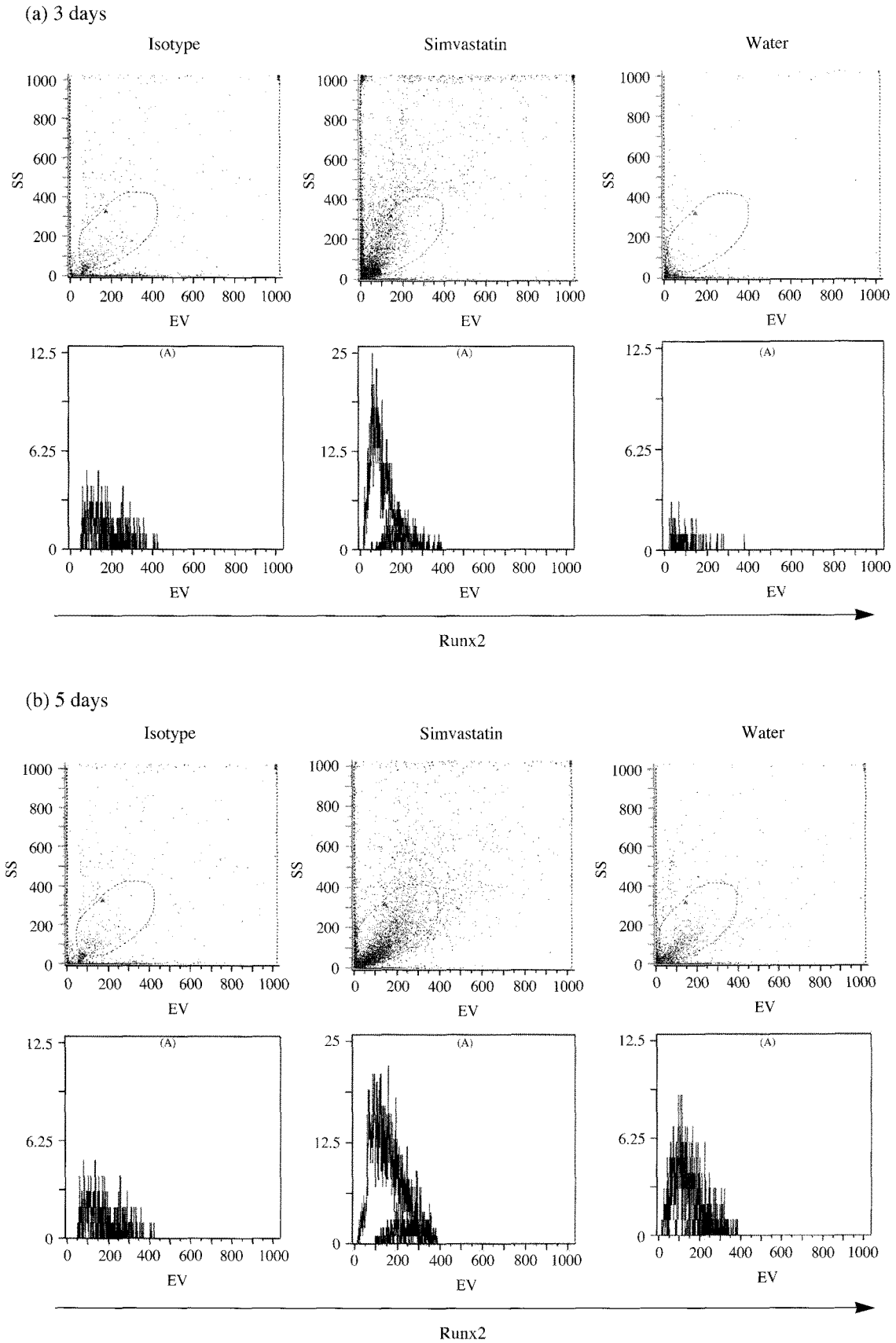
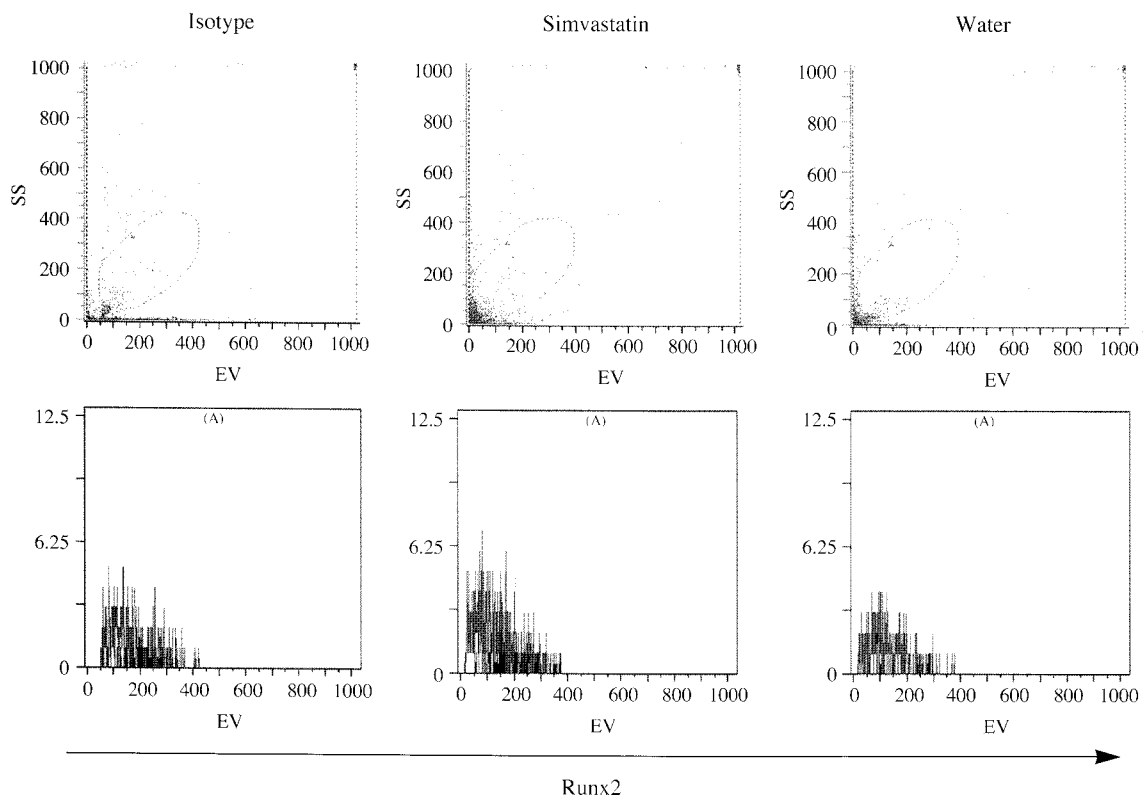


Fig. 6. Histograms of flow cytometry analysis about Runx2 and osteocalcin by FACS, Runx2 expression at 3 days (a), 5 days (b), and 9 days (c) after bone defect formation. Osteocalcin expression at 2 weeks (d) and 4 weeks (e) after bone defect formation.

(c) 9 days



(d) 2 weeks

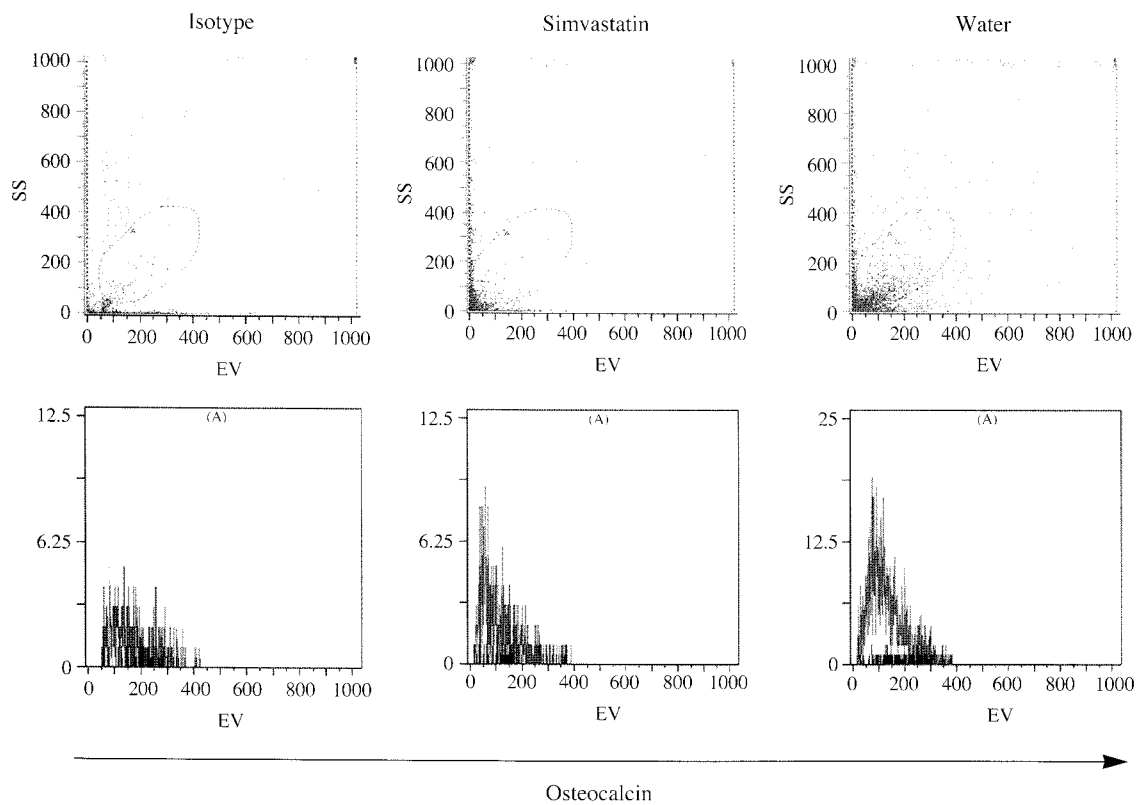


Fig. 6. Continued.

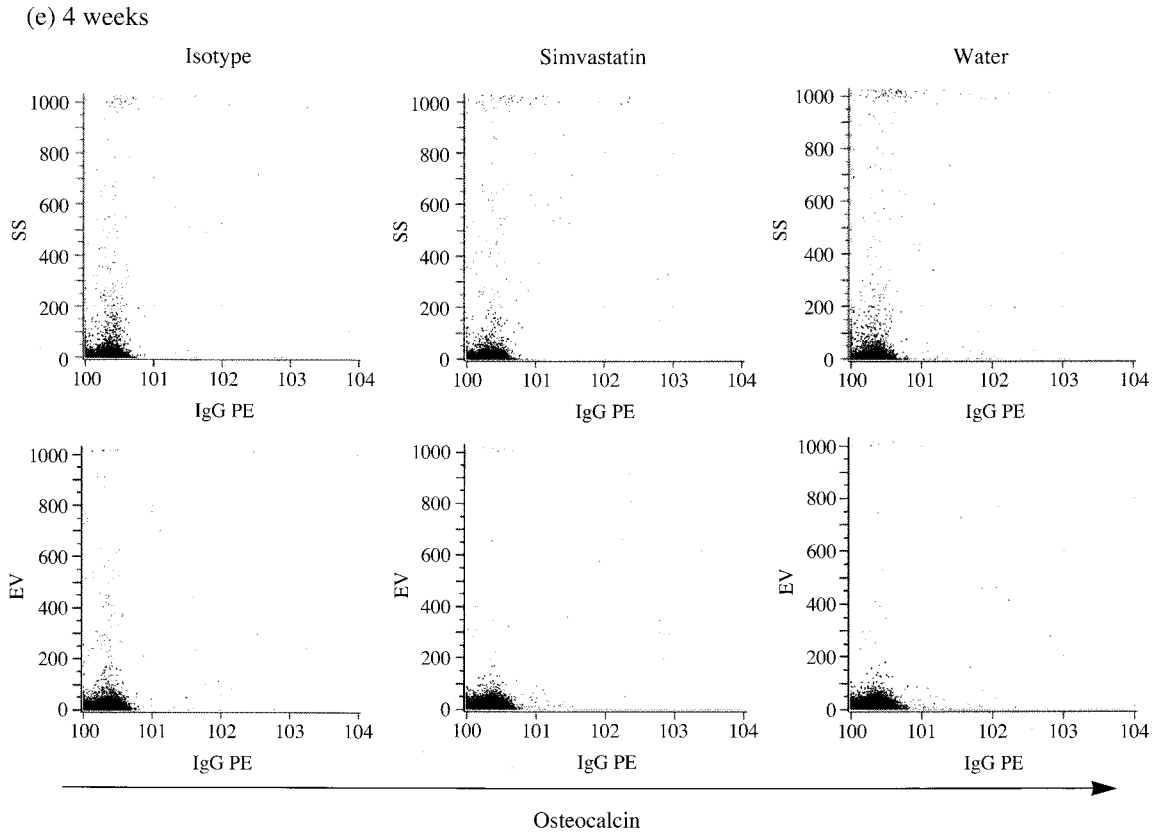


Fig. 6. Continued.

서 4°C로 30분간 고정하고 FACS (Fluorescence-Activated Cell Sorter) buffer (0.1 %BSA in PBS)로 두 번 세정한 후 anti Runx2 Ab (sc8566, Santa Cruz Biotech. CA. USA)와 anti Osteocalcin Ab (sc18319, Santa Cruz Biotech. CA. USA)를 일차항체로 처리한 후 FACS buffer로 세척한 후 다시 이차항체인 anti Human IgG-PE로 면역 염색을 시행하여 유세포 분석하였다. 술 후 3일, 5일, 7일, 9일에 Runx2의 발현을, 술 후 2주, 4주에 Osteocalcin의 발현을 관찰하였다(Fig. 3).

3) 병리조직학적 관찰

절취한 두정골을 10% formalin 용액에 고정한 후 EDTA 용액으로 탈회시켜 통법에 따라 paraffin 포매하고, 6-8 μm 두께의 연속절편을 만들어 hematoxylin-eosin 이중염색과 Masson's trichrome 염색을 시행하여 골결손부에서의 신생골 형성과정을 광학현미경으로 관찰하였다.

연구 성적

1. 연X선사진 소견

1) 대조군

실험 3일과 5일에는 골결손부에서 골형성 소견이 관찰되지 않았으나, 실험 7일과 9일에는 골결손부의 변연에서

신생골의 형성이 관찰되었으며, 실험 2주에는 골결손부의 변연에서 심부로의 골소주의 형성이 관찰되었다. 실험 4주에는 심부로부터 진행된 골양조직과 신생 골소주가 나타났고 변연부의 골소주가 보다 치밀하게 관찰되었다. 실험 6주와 8주에는 골결손부 전체가 골로 대체되지는 않았으나, 골형성 부위의 골소주는 보다 치밀하였다(Fig. 4-a, b, c, d, e, f, g, h).

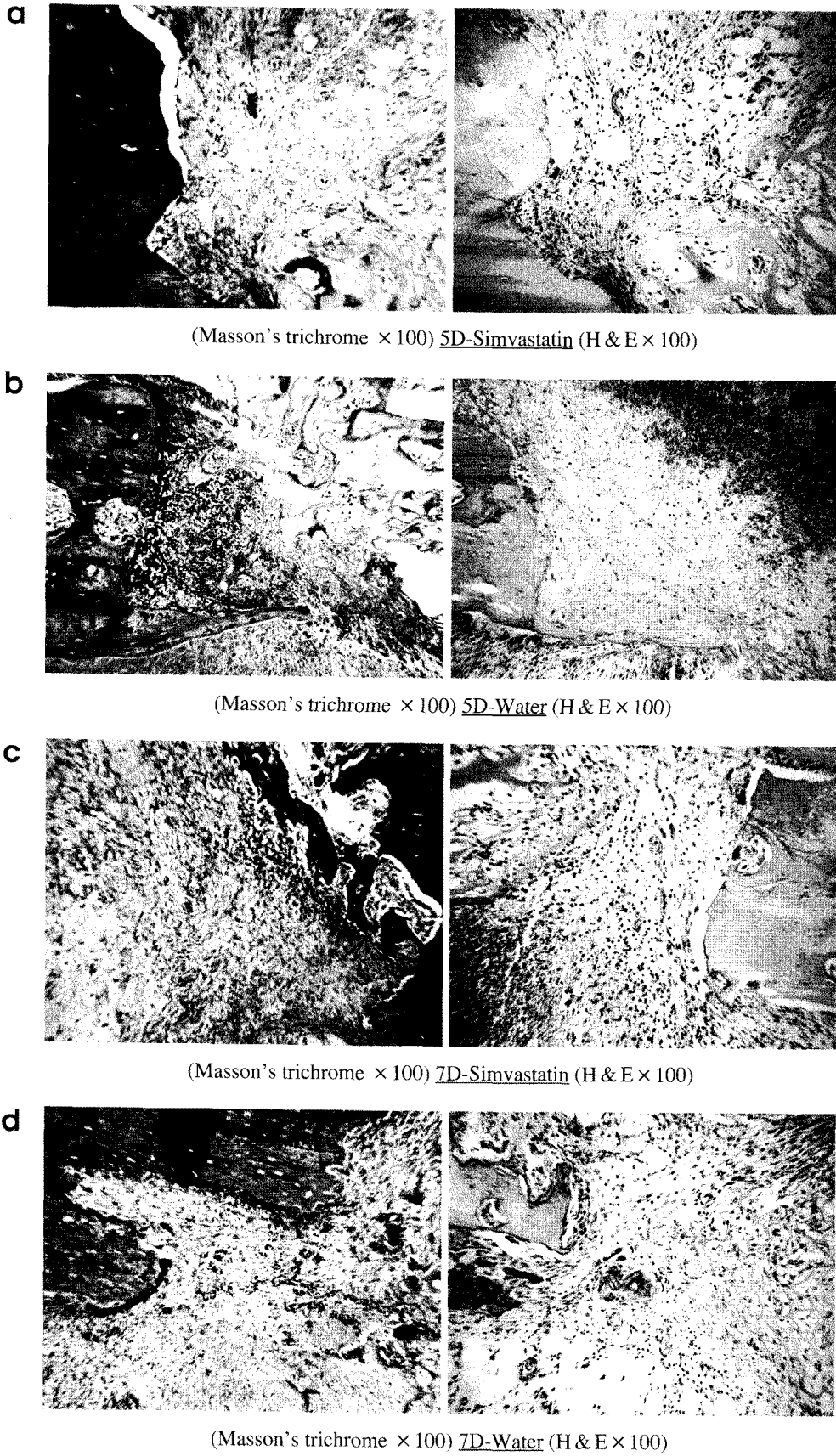
2) 실험군

실험 5일부터 골결손부의 변연에서 미약한 신생골의 형성이, 심부에서는 미약한 골양조직이 관찰되었다. 실험 7일과 9일에는 심부에 보다 많은 골양조직이 나타났으며, 대조군에 비해 골결손부의 변연에서 많은 골소주가 관찰되었다. 실험 2주와 4주에는 골결손부 변연에서 심부로의 골소주의 형성이 치밀해졌으며, 심부에서는 대조군에 비해 무구조한 골소주의 형성이 뚜렷하게 관찰되었다. 실험 6주에는 대조군에 비해 변연부에서 심부로 보다 확장된 뚜렷한 골소주 형태가, 실험 8주에는 골결손부 전체에서 치밀하고 뚜렷한 골소주가 관찰되었다(Fig. 5-a, b, c, d, e, f, g, h).

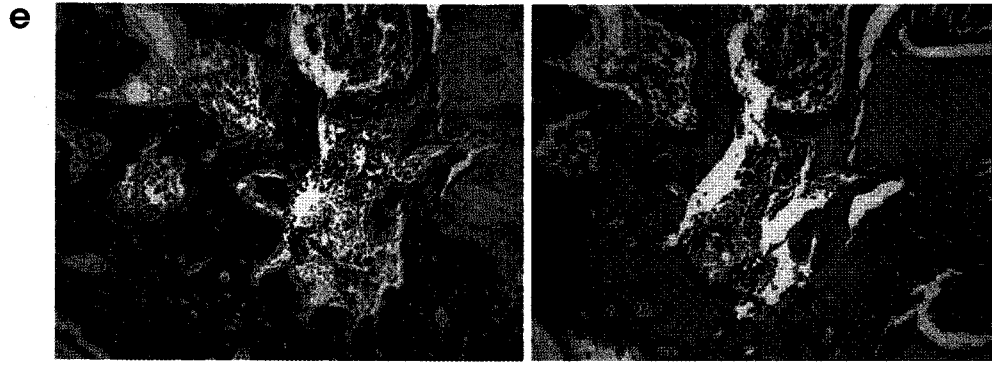
2. Flow cytometry 소견

Runx2의 발현을 관찰하기 위해 유세포 분석 시, 실험 3

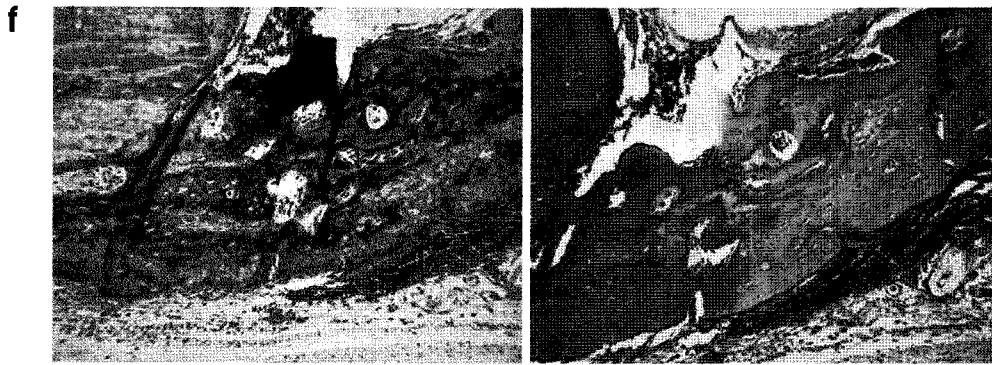




**Fig. 7.** Photomicrography of the bone defect of experimental (a, c, e, g) & controlled (b, d, f, h) groups (H & E and Masson's trichrome stains,  $\times 200$ ).



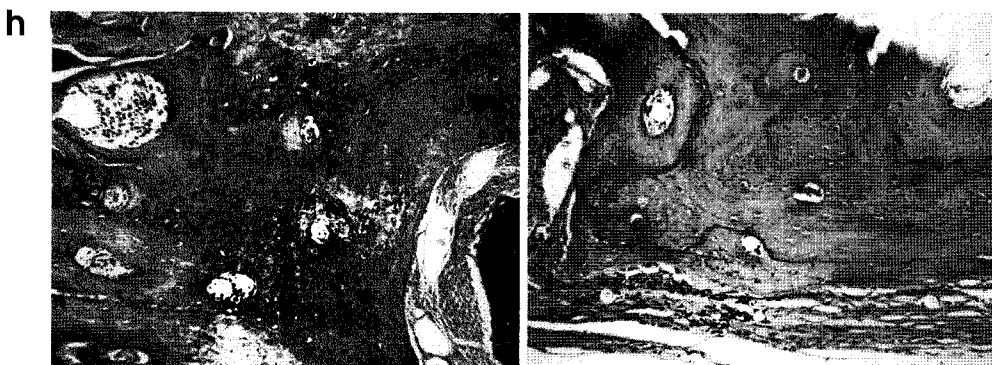
(Masson's trichrome  $\times 100$ ) 2W-Simvastatin (H & E  $\times 100$ )



(Masson's trichrome  $\times 100$ ) 2W-Water (H & E  $\times 100$ )



(Masson's trichrome  $\times 100$ ) 4W-Simvastatin (H & E  $\times 100$ )



(Masson's trichrome  $\times 100$ ) 4W-Water (H & E  $\times 100$ )

Fig. 7. Continued.

일군에서 실험군과 대조군에서 동기준표본(isotype)에 비하여 대비되는 증가는 관찰되지 않았으며 실험군이 대조군에 비하여 많은 세포의 출현이 관찰되었다. 실험 5일군에서는 대조군에 비하여 미약한 증가가 관찰되었으나 대비되는 차이를 보이지 않았다. 대조군에 비하여 많은 세포의 출현이 관찰되어 결손부내에 대조군보다 세포들의 집적이 높게 나타났다. 실험 7일과 9일군에서는 대조군에 비하여 대비되는 차이를 보이지 않았고 세포수는 비교적 높게 관찰되었다.

Osteocalcin의 발현을 관찰하기 위해 유세포 분석 시, 실험 2주와 4주에서 실험군과 대조군에서 동기준표본(isotype)에 비하여 미약한 증가가 관찰되었으나 대비되는 차이는 관찰되지 않았으며, 실험 2주에서 실험군에서 대조군에 다소 높은 발현이 관찰되었으나 대비되는 차이를 보이지는 않았다(Fig. 6-a, b, c, d).

### 3. 병리조직학적 소견

#### 1) 대조군

실험 3일과 5일에는 골결손부에 응혈괴와 이식재가 관찰되었으며, 골결손부위의 변연으로부터 섬유모세포와 모세혈관을 가진 섬유성 결합조직이 관찰되었다. 실험 7일과 9일에서는 골결손부내에 골양조직의 형성과 많은 수의 신생 골소주가 활성화된 양상으로 관찰되었으며, 골결손부의 변연부에서 잘 분화된 골모세포가 관찰되었다. 실험 2주와 4주에는 골결손부에 점차로 골조직이 형성되어 성숙된 골소주 양상을 보이는 골개조 소견이 관찰되었고, 실험 6주와 8주에서는 골결손부의 석회화가 더욱 진행되었고, 골소주도 치밀해졌으며, 정상에 가까운 성숙된 골소주가 치밀하게 배열되었다(Fig. 7-b, d, f, h).

#### 2) 실험군

실험 3일에는 골결손부에 응혈괴와 이식재가 관찰되었고, 골결손부의 변연으로부터 섬유모세포와 모세혈관을 가진 섬유성 결합조직이 관찰되었다. 실험 5일과 7일에는 골결손부의 변연부에서 보다 많은 섬유모세포와 모세혈관들이 관찰되었고 변연부에서 골양조직의 형성과 신생 골소주가 관찰되었으며, 대조군에 비하여 풍부하고 넓은 부위에서 관찰되었다. 실험 9일과 2주에는 골결손부의 변연은 점차로 골조직이 형성되어 성숙된 골소주 양상을 보이는 골개조 소견이 관찰되었고, 심부에는 골양조직과 신생골소주가 풍부하게 관찰되었다. 실험 4주와 6주에서는 골결손부의 골화가 더욱 진행되었고, 골소주도 치밀해졌으며, 정상에 가까운 성숙된 골소주가 치밀하게 배열되었다. 실험 8주에서는 골결손부 전체를 회복하는 골양조직과 신생골소주가 관찰되고, 변연부위에서는 골소주의 배열이 치밀해지고 성숙된 골개조가 관찰되었다(Fig. 7-a, c, e, g).

### 총괄 및 고안

Statin제제는 간에서 HMG-CoA reductase를 억제함으로써 콜레스테롤의 생합성을 억제한다. Statin이 mevalonic acid 합성 과정을 억제하게 되면, 하위 단계로 farnesyl PP (pyrophosphate)를 거쳐 geranylgeranyl-PP로 합성되는 과정을 억제하게 되고, 이는 endothelial nitric oxide synthase (eNOS)의 상승을 일으키며, 궁극적으로 eNOS에 의한 심혈관의 보호 효과를 얻을 수 있다. Statin 제제가 지질 수치의 감소와 무관하게 심장보호 효과를 나타내며, statin 제제가 콜레스테롤과의 관련성 이외, 즉 다면발현성(pleiotropic) 효과를 가지고 있으며 이는 내피세포의 기능장애(dysfunction)를 호전시키는 것이 관련 기전일 것으로 제시되었다.<sup>32</sup> 내피세포의 기능을 호전시키는 기전으로, statin은 eNOS의 증가 외에도 plasminogen activator inhibitor-1의 발현 억제 및 혈관 내 평활근세포의 증식 억제와, protein kinase Akt의 활성화에 관여한다고 알려져 있다. Statin과 관련된 이런 모든 기능들은 statin이 동맥경화 혈관에 대하여 항염증 효과를 갖는다는 것을 설명할 수 있다.<sup>33,34</sup> 또한, Statin계열 약물은 BMP-2의 합성을 증가시킴으로써 골모세포의 분화를 촉진시키고, 골모세포와 골세포에서 eNOS의 발현을 상승시킨다.

Mundy 등<sup>26</sup>에 의하면 세포 배양 실험 및 동물 실험 모델에서 statin에 의한 BMP-2의 증가는 용량 의존적으로 골형성을 증가시킨다고 하였다. 그러나 다른 동물모델에서는 statin의 용량에 따라 골밀도의 증가뿐만 아니라 감소 효과가 나타나서 statin의 골형성능에 관해 아직은 논란의 여지가 있다.<sup>27-30</sup> 하지만 Mundy 등<sup>26</sup>은 자연계에 존재하는 물질을 포함하여 30,000가지 이상의 물질로부터 BMP-2 발현에 관여하고 골형성능이 있는 물질로서 Statin계열 물질이 유일하게 가치가 있음을 보고함으로써 많은 연구자들의 관심을 불러 일으키게 했다. 이에 본 연구에서도 Statin계열 약물 중 시험관내 및 동물실험에서 골형성능에 관여하는 것으로 알려진 Simvastatin을 택하여 본 연구에 임하였다.

골형성을 증진시킬 수 있는 방법으로는 전신적으로 불소, 소량의 부갑상선 호르몬 및 성장인자 등의 투여를 들 수 있으며, 골결손이 발생한 부위에서 국소적으로 사용할 수 있는 성장인자들로는 골형성단백질(bone morphogenetic protein: BMP), 인슐린유사 성장인자(insulin-like growth factor: IGF), 형질변형 성장인자(transforming growth factor- $\beta$ ; TGF- $\beta$ ) 등이 있다.<sup>21-23</sup> 이들 성장인자들은 폴리펩타이드 구조를 이루며, 세포막의 특정수용체와 결합하여 세포내에서 특정기능의 수행을 자극하거나 방해하는 역할을 하는데, 이 중 골형성단백질은 아미노산의 서열이 유사하여 형질변형성장인자의 대가족(superfamily)에 해당된다.<sup>12-16</sup> 이 중 BMP-2는 개체 발생시 골격의 형성, 치아의 형성 등에

관여하는 매개체로서의 역할뿐만 아니라 골모세포의 분화를 유도하는 등의 다양한 기능을 수행하는 세포의 신호전달물질로 알려져 있다.<sup>12-18</sup>

Runx2는 간엽조직내 전구세포에서 BMP-2 신호전달에 따른 골모세포로의 분화에 중요한 역할을 하는 전사조절인자로 알려져 있다. 이는 BMP-2가 BMP수용체에 결합하게 되고, 이 결합에 의해 bone morphogenetic protein receptor (BMPR)-I을 가진 세포질의 serine/threonine kinase가 활성화되며, 이것은 세포질에 존재하는 Smad (Smad1, Smad5, Smad8)를 인산화시키고, 인산화된 이들 Smad는 Smad4와 결합하여 핵으로 들어가게 된다. 이 과정을 통하여 골모세포로의 분화를 촉진한다고 알려져 있다. 결국 활성화된 Smad는 Dlx5라고 하는 homeodomain을 가진 전사인자의 발현을 촉진하여, Dlx5는 골모세포 분화의 핵심 전사인자라 할 수 있는 Runx2의 발현을 촉진함으로써 궁극적으로 골모세포 분화의 표지인자인 alkaline phosphatase (ALP), bone sialoprotein, osteocalcin 등의 발현을 증가시키면서 석회화에 이르게 한다. 이에 본 연구에서는 이러한 일련의 과정에서 골모세포의 분화와 그에 따른 Runx2와 Osteocalcin의 발현을 flow cytometer을 이용한 유세포 분석을 통해 살펴 봄으로써 Simvastatin에 의한 골형성과정에서 MBP-2의 발현에 의한 골유도과정을 관찰하고자 하였다.

실험동물에서 골결손부 형성 후 치유과정을 관찰하고자 할 때, 골재생 물질이나 매식체의 골형성능을 평가하는 데 이용되는 골결손부의 critical defect의 크기에 대해, Schmitz 등<sup>35</sup>은 백서의 하악골의 결손인 경우 5 mm라고 하였고 LinkShand 등<sup>36</sup>과 Haddad 등<sup>37</sup>은 가토의 두경골 부위에서 8-15 mm의 골결손부가 critical bone defect라고 제안하였다. 본 실험에서는 골결손부의 크기를 9 mm로 하였는데, 이는 골재생술에 사용하는 차폐막을 사용하지 않았기 때문에 선학들<sup>36-38</sup>이 제안한 크기보다는 작게 형성하였다.

조직 내 또는 골결손 부위에 Statin제열과 같은 약물을 적용시킬 경우에 이용되는 담체의 선택에는 조직내 생체적합성 및 흡수성, 구조적인 안정성, 생체내 면역반응의 존재 여부, 이식된 담체로부터 약물이 유리되는 속도 및 정도에 대한 고려가 이루어져야 한다. 많은 선학들<sup>33,34,42,43</sup>의 보고에서 흡수성 교원질을 담체할 경우 국소적 및 전신적으로 안전하며 조작이 쉽고 임상적으로 유용하다고 하였다. 본 연구에서 사용된 담체로는 흡수성 I형 교원질막을 결손부와 같은 크기로 절개하여 사용하였는데, 이는 다공성 구조를 가지므로 물질의 90% 이상을 액체로 채울 수 있어 용해된 Simvastatin의 수용부로서 작용하고, 생체 내에서 독성이나 면역반응이 없으며, 결손부의 치유기간 동안 흡수되는 특성을 가진다.

일반적으로 실험병소에 대한 골치유 평가의 가장 기본적인 기준으로는 병리조직학적 소견이 우선적으로 고려되고 있으나, 절편의 제작과정 중에 발생하는 오차와 단편적

인 정보로 인해 전체적인 골치유 양상의 평가에는 한계가 있는 것으로 보고되고 있다. Zellin 등<sup>39</sup>과 Higuchi 등<sup>40</sup>은 실험적 골병소에서 중심부로의 불균일한 골형성으로 인해 전체적인 골형성에 대한 평가에는 한계가 있다고 하였다. 본 연구에서 골형성능의 정도를 평가함에 있어 연X선사진 소견을 비교, 평가하였는데, Schortinghuis 등<sup>41</sup>은 백서의 하악골 골결손부의 치유 양상 평가시 연X선사진에서는 신생골의 두께가 0.09 mm 미만인 경우에만 관찰이 불가능하므로 골형성 여부에 대한 평가에 연X선사진이 매우 적합하다고 하였다.

연X선 사진소견에서 실험군이 대조군에 비하여 빠른 신생골소주의 발현과 심부에서의 골양조직과 무구조한 신생골형성을 보였고 골결손의 변연부에서 골개조가 빨리 진행되어 성숙하고 뚜렷한 골소주가 관찰되었으며, 실험 8주에서는 실험군의 골결손부 전체가 골조직으로 회복되었으나 대조군에서는 중심부에 골결손부가 잔존한 상태로 치유가 이뤄졌다. 이는 Simvastatin이 골결손부의 골형성에 보다 높은 골형성과정을 일으키는 동화작용(anabolic effect)을 일으킬 수 있음을 나타내며, 이러한 영향의 결과 실험군에서 대조군에 비해 증대된 골결손부의 회복소견이 관찰되었다. Wong과 Rabie<sup>27</sup>는 Simvastatin collagen matrix를 이식한 실험에서 대조군에 비하여 308% 이상의 골형성이 증가되었음을 보고하였고 다른 연구들에서도 보다 높은 골결손부의 회복소견을 보고하였다.<sup>26-30</sup>

Statin에 의해 유도되는 증가된 골형성능에 관하여 BMP-2 발현과 이에 따른 미분화간엽세포에서 보다 많은 골모세포로의 분화가 관련된다고 제시되고 있으나 아직까지 확립되지 않은 단계이다. 이에 본 연구에서는 골모세포의 분화 및 골형성능을 표지자로서 Runx2와 Osteocalcin에 대한 flow cystometry 분석을 시행하였는데, 실험군에서 대조군에 비해 다소 높은 발현을 보이나 대비되는 차이가 나지 않았다. 이는 골결손부내와 골수내에 골모세포의 비율이 낮기 때문이라 사료된다. Tsuru 등<sup>44</sup>의 보고에 따르면 골모세포는 골수내에 2-3% 정도로 낮은 분포를 보인다고 하였고, 다른 연구에서도 골모세포의 분포가 낮음을 보고하였다.<sup>45</sup>

그러나 연X선사진과 조직병리학적 소견에서 실험군이 보다 많은 골형성을 보였는데, 이러한 결과를 나타내는 다른 요인으로 본 실험에서 실험군이 대조군에 비하여 골결손부위에서 세포수가 많이 관찰되었으며 이는 보다 많은 적혈구의 존재와 신생혈관의 형성에 따른 많은 세포의 골결손부로의 이주가 이뤄졌을 가능성을 고려할 수 있다. Wong과 Rabie<sup>46</sup>의 보고에서 statin 유도 골형성 시 vascular endothelial growth factor (VEGF)의 발현이 관찰된다고 하였는데, 골재생에 있어 신생혈관의 형성은 중요한 역할을 하며 VEGF는 angiogenic cytokine으로서 강력한 혈관의 형성과 유사분열을 유도하고 혈관벽으로부터 세포의 이주

를 촉진하는 인자이다.<sup>47-50</sup> 본 연구에서 실험군에서 보다 많은 신생모세혈관과 섬유모세포가 관찰되었으며 Flow cytometry 분석에서도 실험군에 많은 세포수의 발현을 보인 것으로 보아 VEGF의 발현에 따른 효과가 있었음을 추정할 수 있다. 하지만 본 연구에서는 VEGF의 발현에 대한 직접적인 구명을 시도하지 않아서 명확한 관계를 설명하기 곤란하다. 이에 statin에 의한 골형성을 유도 시 VEGF 발현과 이에 따른 영향을 구명하는 연구가 필요하다고 사료된다. 또한 Runx2와 osteocalcin의 발현에서 실험군과 대조군 간에 뚜렷이 대비되는 차이가 나타나지 않은 것이 본 연구에서 시행한 실험 방법적인 요인에서 기인한 것인지에 대한 고려도 필요하며, 이에 대한 지속적인 연구가 이뤄져야 한다.

이상의 연구결과 statin에 의해서 유도되는 골형성에 있어 골모세포의 분화에 따른 실험군과 대조군에서 Runx2와 Osteocalcin의 발현의 대비되는 차이를 보이지 않았으나, 실험군에서 보다 많은 신생혈관의 형성에 따른 많은 세포수 및 적혈구의 발현이 골재생에 영향을 주었다고 사료된다.

## 참 고 문 헌

1. Wasserman SNS, Brazel US. Osteoporosis; the state of the art in 1987: a review. *Nucl Med* 1987; 17 : 283-92.
2. Johnston Jr CC, Epstein S. Clinical, biochemical, radiographic, epidemiologic and economic features of osteoporosis. *Orthop Clin North Am* 1981; 12 : 559-69.
3. Wahner HW. Single- and dual-photon absorptiometry in osteoporosis and osteo malacia. *Semin Nucl Med* 1987; 17 : 305-15.
4. Kawamura M, Iwata H, Sato K. Chondrogenetic Response to crude bone matrix protein bond to hydroxyapatite. *Clin Othop* 1987; 217 : 281-92.
5. King GN, King N, Hughes FJ. Effect of two delivery systems for recombinant human bone morphogenetic protein-2 on periodontal regeneration in vivo. *J Periodont Res* 1998; 33 : 226-36.
6. King GN, King N, Hughes FJ. The effect of root surface demineralization on bone morphogenetic protein-2-induced healing of rat periodontal fenestration defects. *J Periodontol* 1998; 69 : 561-70.
7. Rasmussen P. Effect of extreme calcium deprivation on degree of mineralization of alveolar bone, dentin and enamel in rat. *Scand J Dent Res* 1972; 80 : 327-33.
8. Mundy GR. Vision for the future in osteoporosis research. *Osteoporosis Int* 1993; 2 : 29-34.
9. Kenny AM, Prestwood KM. Osteoporosis: pathogenesis, diagnosis and treatment in older adult. *Rheum Dis Clin North Am* 2000; 26 : 569-91.
10. Altkorn D, Vokes T. Treatment of postmenopausal osteoporosis. *J Am Med Assoc* 2001; 258 : 1415-8.
11. Urist MR. Bone: formation by autoinduction. *Science* 1965; 150 : 893-9.
12. Urist MR, Strates BS. Bone morphogenetic protein. *J Dent Res* 1971; 50 : 1392-406.
13. Urist MR, Mikulski A, Lietze A. Solubilized and insolubilized bone morphogenetic protein (cell differentiation/osteogenesis/noncollagenous protein). *Proc Nat Acad Sci USA* 1979; 76 : 1828-32.
14. Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW, et al. Novel regulators of bone formation; molecular clones and activities. *Science* 1988; 242 : 1528-34.
15. Celeste AJ, Iannazzi JA, Taylor RC, Hewick RM, Rosen V, Wang EA, et al. Identification of transforming growth factor beta family members present in bone-inductive protein purified from bovine bone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87 : 9843-7.
16. Wozney JM. Bone morphogenetic proteins. *Prog Growth Factor Res* 1989; 1 : 267-80.
17. Wozney JM. Bone morphogenetic proteins and their gene expression. In: Noda M. *Cellular and Molecular Biology of Bone*. Academic press; 1993. p. 132-69.
18. Suzawa M, Takeuchi Y, Fukumoto S, Kato S, Ueno N, Miyazono K, et al. Extracellular matrix associated bone morphogenetic proteins are essential for differentiation of murine osteoblastic cells in vitro. *Endocrinology* 1999; 140 : 2125-33.
19. Urist MR, Lietze A, Dawson E.  $\beta$ -tricalcium phosphate delivery system for bone morphogenetic protein. *Clin Othop* 1984; 187 : 227-80.
20. Ferguson D, Davis WC, Hurt WC. Bovine bone morphogenetic protein (bBMP) fraction induced repair of craniotomy defect in rhesus monkey. *Clin Othop* 1987; 219 : 251-8.
21. Matsumoto F, Miyamoto Y, Nagayama M. Light- and electronmicroscopic observation on the mandibular condylar cartilage in growing rats on a low-calcium diet. *Acta Anat* 1991; 142 : 41-8.
22. Smith N. Extraction socket healing in the calcium deficient rat. *Aust Dent J* 1975; 20 : 22-6.
23. Lindholm TS. Histological components of tibial fracture callus in growing osteopenic rats. *Acta Chir Scand* 1975; 449 : 7-18.
24. Nakase T, Nomura S, Yoshikawa H. Transient and localized expression of bone morphogenetic protein 4 messenger RNA during fracture healing. *J Bone Miner Res* 1994; 9 : 651-9.
25. Wang EA, Israel DI, Kelly S, Luxenberg DP. Bone morphogenetic protein-2 causes commitment and differentiation in C3H10T1/2 and 3T3 cells. *Growth Factors* 1993; 9 : 57-71.
26. Mundy G, Garrett R, Harris S, Chan J, Chen D, Rossini G, et al. Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins. *Science* 1999; 286 : 1946-9.
27. Wong RWK, Rabie ABM. Statin collagen grafts used to repair defects in the parietal bone of rabbits. *Br J Oral Maxillofacial Surg* 2003; 41 : 244-8.
28. Maritz F, Conradie M, Hulley P, Gopal R, Hough S. Effect of statins on bone mineral density and bone histomorphometry in rodents. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21 : 1636-41.
29. Meier C, Schlienger R, Kraenzlin M, Schlegel B, Jick H. HMG-CoA reductase inhibitors and the risk of fractures. *JAMA* 2000; 283 : 3205-10.
30. Mundy G. Statins and their potential for osteoporosis. *Bone* 2001; 29 : 495-7.
31. Watanabe S, Fukumoto S, Takeuchi Y, Fujita H, Nakano T, Fujita T. Effects of 1-year treatment with fluvastatin or pravastatin on bone. *Am J Med* 2001; 110 : 584-7.
32. LaCroix A, Cauley J, Pettinger M, Hsia J, Bauer D, McGowan J, et al. Statin use, clinical fracture, and bone density in postmenopausal women: results from the women's health initiative observational study. *Ann Intern Med* 2003; 139 : 97-104.
33. Vita JA, Yeung AC, Winniford M, Hodgson JM, Treasure CB, Klein JL, et al. Effect of cholesterol-lowering therapy on coronary endothe-

- lial vasomotor function in patients with coronary artery disease. *Circulation* 2000; 102 : 846-51.
34. Whitney C, Warburton D, Frohlich J, Chan S, McKay H, Khan K. Are cardiovascular disease and osteoporosis directly linked? *Sports Med* 2004; 34 : 779-807.
  35. Schmitz JP, Hollinger JO. The critical size defects as an experimental model for craniomandibular nonunions. *Clin Othop Rel Res* 1985; 205 : 299-308.
  36. LinksShand JM, Heggie AA, Holmes AD, Holmes W. Allogeneic bone grafting of calvarial defects: an experimental study in the rabbit. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2002; 31 : 525-31.
  37. Haddad AJ, Peel SA, Clokie CM, Sandor GK. Closure of rabbit calvarial critical-sized defects using protective composite allogeneic and alloplastic bone substitutes. *J Craniofac Surg* 2006; 17 : 926-34.
  38. Clokie CM, Moghadam H, Jackson MT, Sandor GK. Closure of critical sized defects with allogenic and alloplastic bone substitutes. *J Craniofac Surg* 2002; 13 : 111-21.
  39. Zellin G, Linde A. Importance of delivery systems for growth-stimulatory factors in combination with osteopromotive membranes. An experimental study using rhBMP-2 in rat mandibular defects. *J Biomed Mater Res* 1997; 35 : 181-90.
  40. Higuchi T, Kinoshita A, Takahashi K, Oda S, Ishikawa I. Bone regeneration by recombinant human bone morphogenetic protein-2 in rat mandibular defects. An experimental model of defect filling. *J Periodontol* 1999; 70 : 1026-31.
  41. Schortinghuis J, Ruben JL, Meijer HJ, Bronckers AL, Raghoobar GM, Stegenga B. Microradiography to evaluate bone growth into a rat mandibular defect. *Arch Oral Biol* 2003; 48 : 155-60.
  42. Wang EA, Rosen V, D'Alessandro JS, Bauduy M, Cordes P, Harada T, et al. Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation (cartilage induction). *Proc Nat Acad Sci USA* 1990; 87 : 2220-4.
  43. Howell TH, Fiorellini J, Jones A. A feasibility study evaluating rhBMP-2/absorbable collagen sponge for maxillary sinus floor augmentation. *Int Periodont Rest Dent* 1997; 17 : 11-25.
  44. Tsuru S, Kitani H, Oguchi M, Mashiko M, Zinnaka Y, Shimomura Y. Separation of osteoblast-like cells from bone marrow by fluorescence-activated cell sorting. *J Histochem Cytochem* 1984; 32 : 43-8.
  45. Chen JL, Hunt P, McElvain M, Black T, Kaufman S, Choi ES. Osteoblast precursor cells are found in CD34+ cells from human bone marrow. *Stem Cells* 1997; 15 : 368-77.
  46. Wong RW, Rabie AB. Early healing pattern of statin-induced osteogenesis. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2005; 43 : 46-50.
  47. Bates D, Lodwick D, Williams B. Vascular endothelial growth factor and microvascular permeability. *Microcirculation* 1999; 6 : 83-9.
  48. Yancopoulos G, Davis S, Gale N. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 2000; 407 : 242-52.
  49. Deckers MM, Karperien M, van der Bent C, Yamashita T, Papapoulos SE, Löwik CW. Expression of vascular endothelial growth factors and their receptors during osteoblast differentiation. *Endocrinology* 2000; 141 : 1667-74.
  50. Rabie ABM, Shum L, Chayanupatkul A. VEGF and bone formation in the glenoid fossa during forward mandibular positioning. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2002; 122 : 202-9.