백서 두개골 결손에서 rhBMP-2와 다양한 carrier의 골재생 유도효과

이서경[2], 김지선[2], 강은정[3], 엄태관[3], 김창성[1], 조규성[1], 채중규[1], 김종관[1], 최성호[1*]

1. 연세대학교 치과대학 치주과학교실
2. 국민건강보험공단 일산병원 치주과
3. (주)오스템

Effects of rhBMP-2 with various carriers on bone regeneration in rat calvarial defect

Seo-Kyoung Lee[2], Ji-Sun Kim[2], Eun-Jung Kang[3], Tae-Kwan Eum[3], Chang-Sung Kim[1], Kyoo-Sung Cho[1], Jung-Kiu Chai[1], Chong-Kwan Kim[1], Seong-Ho Choi[1*]

1. Department of Periodontology, Yonsei University College of Dentistry

2. Department of Periodontics, National Health Insurance Corporation Ilsan Hospital

3. Osstem Co.

ABSTRACT

Purpose: Bone morphogenetic protein (BMP) is a potent differentiating agent for cells of the osteoblastic lineage. It has been used in the oral cavity under a variety of indications and with different carriers. However, the optimal carrier for each indication is not known. This study evaluated the bone regenerative effect of rhBMP-2 delivered with different carrier systems.

Materials and Methods: 8 mm critical-sized rat calvarial defects were used in 60 male Sprague-Dawley rats. The animals were divided into 6 groups containing 10 animals each. Two groups were controls that had no treatment and absorbable collagen membrane only. 4 groups were experimentals that contained rhBMP-2 only and applied with absorbable collagen sponge(Collatape®), MBCP®, Bio-Oss® each. The histological and histometric parameters were used to evaluate the defects after 2- or 8-week healing period. The shape and total augmented area were stable in all groups over the healing time.

Results: New bone formation was significantly greater in the rhBMP-2 with carrier group than control group. rhBMP-2/ACS was the highest in bone density but gained less new bone area than rhBMP-2/MBCP® and rhBMP-2/Bio-Oss®. The bone density after 8 weeks was greater than that after 2 weeks in all groups. However, rhBMP-2 alone failed to show the statistically significant difference in new bone area and bone density compared to control group. Also MBCP® and Bio-Oss® particles remained after 8 weeks healing period.

Conclusion: These results suggest that rhBMP-2 with carrier system is an excellent inductive agent for bone formation and we can use it as the predictable bone tissue engieering technique. Future study will likely focus on the kinetics of BMP release and development of carriers that is ideal for it. ***(J Korean Acad Periodontol 2008;38:125-134)***

KEY WORDS: Bone regeneration; carrier; recombinant human bone morphogenetic protein-2; rat calvarial defect.

서론

골재생을 통한 재건수술은 선천적, 후천적으로 손상된 골구조를 회복하기 위해 치과영역 뿐만 아니라 정형외과 및 성형외과 영역에서도 광범위하게 진행되고 있다[28]. 현재 골재생을 목적으로 사용되는 재료는 골형성 능력에 따라 골생성(osteogenesis), 골전도(osteoconduction), 골유도(osteoinduction) 등 세 가지로 분류된다. 골생성 물질은 골재생에 필요한 세포 및 성장효소 등을 스스로 갖추어서, 스스로 골을 만들 수 있는 것으로 자가골이 해당한다. 이에 비해 골전도 물질은 골재생에 필요한 비계(scaffold)로서 역할을 한 후에 흡수되

Correspondence: Seong-Ho Choi
Department of Periodontology, School of Dentistry, Yonsei University, 134 Shin-Chon dong, Seodaemoon-gu, Seoul, 120-752, Korea.
e-mail: shchoi726@yuhs.ac., Tel: 82-2-2228-3189, Fax: 82-2-392-0398

* 이 논문은 Medical Science & Engineering Research Program of Korea Science & Engineering Foundation의 지원을 받아 수행된 연구임(R13-2003-13).

접수일: 2007년 12월 20일; 채택일: 2007년 12월 27일

는 것으로서, 다양한 동종골 및 이종골, 이종이식재 등이 있다. 마지막으로 골유도 물질은 미분화간엽세포를 골세포로 분화시켜서 골을 생성하게 하는 능력이 있는 재료이다. 골유도물질은 초기에는 Demineralized Bone Matrix(DBM)로 국한되어 있었으나, 최근에는 다양한 성장인자들이 연구되어 적용됨으로써, 골세포의 분화는 물론이고, 골의 치유에 관여하는 혈관화 및 대식세포의 기능까지 조절하는 경지에까지 이르고 있다. 2001년 Clokie와 Sandor 등은 이러한 능력을 가진 Bone Morphogenetic Protein(BMP), Platelet Rich Protein(PRP), Plasma Rich in Growh Factor(PRGR) 및 다양한 합성 polypeptide 물질에 대하여 골활성물질(osteoactive agent)이라 정의한 바 있다[27].

치주과 영역에서 적용되는 재생형 술식으로는 상실된 치주조직에 신생백악질과 치주인대섬유, 신생골을 형성하고 신부착을 달성하기 위하여 다양한 골이식술을 이용하고 있다. 현재까지 자가골 이식이 가장 많은 양의 골재생을 보이고 있으나, 공여부의 부가적인 수술과 획득량에 제한이 있으며, 골유착 및 치근흡수와 같은 합병증이 나타날 수 있다는 문제점이 있다[7,9,22]. 따라서 골형성 능력이 우수하면서도 공여부의 제한이 덜한 골유도 물질에 대한 관심 및 적용이 크게 증가하였다.

한편 또한 많은 관심을 받고 연구되고 있는 BMP는 Transforming Growth Factor(TGF-β) superfamily의 일원으로서 1965년 Urist가 최초로 소개하였고, 1980년에 토끼와 소의 DBM내에서 최초로 분리하였다[32-33]. 그 후 Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein(rhBMP)를 합성한 이후, 현재까지 알려진 BMP는 약 20여종에 이르고, 이들은 30~38 kDa의 homodimer로 400~525개의 아미노산으로 이루어진 prepropetides에서 합성되어 분비전에 다양한 길이로 절단된다. 이는 연골 및 골 형성을 유도할 수 있고, 골의 형성기간 동안 기능적 골수 형성을 위한 기초적인 환경을 만들어주는 것으로 알려져 있다. 특히 BMP-2는 직접 신경능세포를 발육시킬 수 있고, 연골모세포 및 골모세포를 유도할 수 있는 능력을 가져서, 주변의 미성숙 간엽세포를 골형성세포로 분화시키며, 골형성을 자극하고 조절할 수 있다[26].

BMP는 최근에 미국 FDA의 승인을 받아 상용화에 이르게 되었으며 임상에 쉽게 적용하기 위해 다양한 시도들이 이루어지고 있지만, 현재까지는 액상으로 공급된다. 따라서 BMP 자체만을 적용하면 조작성이 좋지 않을 뿐만 아니라, 매식부위로 확산되어 빨리 흡수되기 때문에 골형성을 유도하기 힘든 점이 있다[12]. 그러므로 BMP가 골유도를 일으키는 동안 이를 유지시켜 줄 매개체가 필요한데, 이는 생체친화성이 있고, 조작하기 쉬우며, 생체 내에서 분해되고, 주변조직과 조직반응을 일으키지 않아야 한다. 또한 신생골로 쉽게 대체가능하고, 일정기간 동안 공간 및 BMP를 유지시키며 서서히 방출해 주면 유리하다고 할 수 있다. 따라서 이러한 특성을 지향하는 여러 가지 재료들이 연구되어 왔는데, β-TCP, polylactic acid polymer, collagen, demineralized bone matrix, hydroxy apatite, gelatin, fibrin sealant, polylactic-polyglycolic polymer 및 기타 합성물들이 골결손을 치유하기 위한 BMP의 매개체로 사용되어 왔다. 하지만 아직까지는 이들 중에 가장 효과적이면서도 만족도가 높은 물질은 아직 규명되지 못한 실정이다[1,11,13,16,17,29].

1988년 Wozney 등이 recombinant human BMP 합성에 성공한 이후 rhBMP의 활성에 대한 여러 가지 연구가 진행되고 있다. Hyun 등은 rhBMP-2, 4, 7의 신생골 형성에 관한 연구에서 모든 rhBMP를 적용한 실험에서 신생골이 형성되었고 골 밀도가 증가함을 관찰하였다. Hong 등은 rhBMP-2의 carrier로서 fibrin-fibronectin sealing system과 β-TCP의 합성체를 사용하여 쥐의 두개골에 적용한 연구에서 유의성 있게 신생골과 신생조직의 형성이 활발히 일어남을 보고하였다[12,13].

본 연구에서는 외과적으로 형성된 백서 두개골 결손부에서 rhBMP-2를 각각 다른 매개물질들과 함께 적용하여 봄으로써, 골 형성능력이 가장 뛰어난 매개체를 알아보고자 한다.

재료 및 방법

본 연구에서는 체중 250~300 g의 수컷 백서(Sprague Dawley rat) 60마리를 사용하였고, 실험 부위는 두개골을 사용하였다. 실험동물의 선택 및 사육, 수술 과정은 연세대학교 의과대학 임상연구의학센터의 지침에 따랐다.

0.05 mg/ml 농도의 rhBMP-2(Sigma-Aldrich Co., Missouri, USA)를 준비하여, 무균냉동 상태로 보관하였다. 액상의 rhBMP-2에 흡수성 교원질막(Collatape®, Clacitek, Carlsbad, California, USA)을 침지시켜 충분히 흡수되게 한 후, 결손부에 적용하였다. 또한 합성골이식재(MBCP®, Purgo Tissue Bank, Seoul, Korea) 및 이종골이식재(Bio-oss®, Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Switzerland)도 각각 0.05 mg/ml의 rhBMP-2에 10분 동안 침윤시켜 충분히 흡수되게 한 후, 결손부에 적용하였다. 두개골 결손부

에 아무 것도 이식하지 않은 군을 대조 1군으로 하고, 흡수성 교원질막 만으로 피개한 군을 대조 2군으로 설정하였다.

결손부에 rhBMP-2를 처리하여 실험군으로 설정하고, 단독으로 적용한 군을 실험 1군, 흡수성 교원질막(Collatape®)과 함께 사용한 군을 실험 2군, 합성골이식재(MBCP®)를 함께 이식한 군을 실험 3군, 이종골이식재(Bio-Oss®)를 함께 이식한 군을 실험 4군으로 설정하였다.

각 군은 수술 후 2주, 8주의 치유기간 후 희생하여 관찰하였으며, 각 주별로 5마리씩 실험하여 총 60마리를 사용하였다.

각 군의 백서를 ketamine hydrochloride(Ketalar®, Yuhan Co, Seoul, Korea)를 근육주사(70 mg/kg)하여 전신마취시켰다. 두부제모를 시행하고, povidone iodine으로 소독한 후 고정하였다. 수술 부위는 2% lidocaine(1:100,000 epinephrine)으로 침윤마취한 후, 백서의 전두골 전방부에서 후방부까지 정중부를 따라 두피를 절개하고, 전측판막을 거상하여 두개골의 상면을 노출시켰다. 노출된 두개골의 상면에 내경 8 mm trephine bur를 이용하여, 지름 8 mm의 원형결손을 형성하였다. 대조군에는 아무 처치도 하지 않은 경우와 콜라겐으로 피개한 경우를 설정하고, 실험군에는 각각의 재료를 적용시켰다. 두피를 덮고 흡수사(Monosyn, B. Braun, Melsungen, Germany)로 층간 봉합을 하였다.

치유기간동안 이식부위의 노출이나 염증 소견, 그리고 수술부위의 다른 합병증 발병 여부를 임상적으로 관찰하였다.

실험동물을 술 후 각 군당 2주와 8주째에 희생하고, 실험부위를 적출하였다. 적출 부위를 20% 중성 포르말린에 10일간 고정시킨 후, 7일간 EDTA-HCl로 탈회시킨 후 통법에 따라 paraffin에 포매하였다. 포매된 표본을 5 μm 두께로 실험 부위 중간을 절편으로 만든 후, hematoxylin-eosin(HE) 염색 후 광학현미경으로 20배, 100배 배율로 관찰하였다.

조직계측학적 관찰은 다음과 같이 시행하였다. 100배 배율로 확대된 조직 표본상을 컴퓨터 모니터상에 재현하고 3차원 영상 분석 프로그램(Image-Pro Plus. Media Cybernetics, Silver Spring, Maryland, USA)을 이용하여 신생골에 대한 조직계측학적 분석을 시행하였다. 결손부의 변연과 신생골의 변연 간의 거리를 재서, 전체 결손부에 대한 피개율(%)을 계산하였다. 또한 신생골의 면적(mm^2)은 광화된 골 및 잔존골 이식재, 골수 및 섬유성 결합조직, 신생혈관 등을 포함한 새로 형성된 골 경계까지의 면적으로 하고, 골 밀도(%)는 신생골의 총 면적에서 다른 조직들을 제외하고 광화된 골만의 비율로 하였다(Fig. 1).

통계적 분석 시행시 결손부의 피개비율을 비교하기 위해 조직계측학적 관찰 결과는 평균±표준편차로 표현하고, Student's *t* test 분석을 시행하였다. 유의수준은 $p<0.05$로 하였다.

결과

임상적인 치유양상은 일반적으로 특이점 없이 진행되었다. 수술부위의 열개 및 재료의 노출, 염증 소견 등 기타의 합병증은 나타나지 않았으며, 임상적으로 우수한 치유양상을 보였다. 계획된 치유시간이 지난 후 결손부를 포함한 두개골 부위에 대해 조직학적 평가가 이루어졌다.

조직학적 관찰소견은 다음과 같다.

대조 1군 2주째에는 결손부 변연에서부터 삼각형 모양으로 골이 형성되고 있고, 그 말단에서는 골성조직이 관찰되고 있었으며, 주위로 얇고 성긴 결합조직이 둘러싸고 있었다. 결손부의 중앙은 성긴 결합조직이 불규칙하게 흩어진 양상을 띠고 있으며 대식세포 및 염증세포가 출현하였다(Fig. 2).

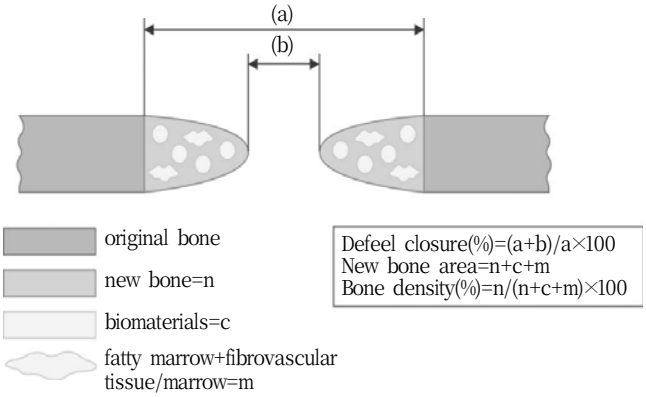

Figure 1. *Histological landmarks.*

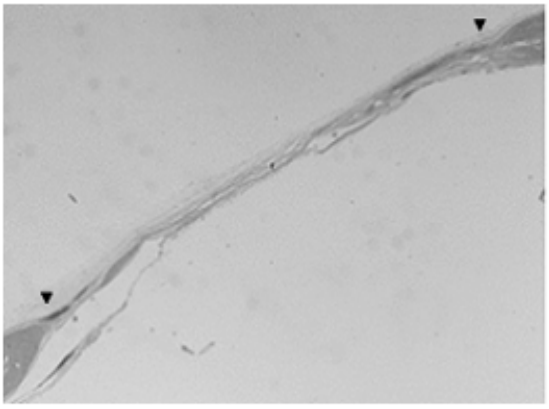

Figure 2. *Surgical control 2wks.(×20, HE), almost no regeneration was seen.*

Figure 3. *Surgical control 8 wks.(×20, HE), fibrous tissue was a little bit collapsed compared to 2 wks.*

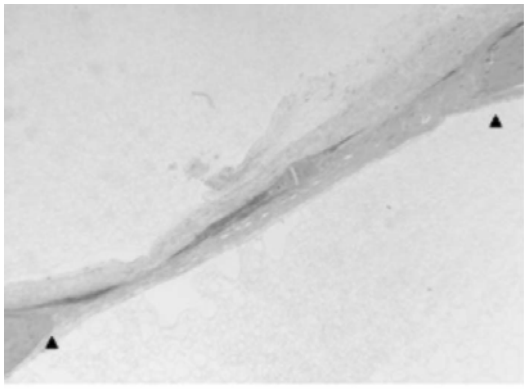

Figure 4. *Carrier control 2 wks.(×20, HE), thin bony bridge was connected between defect margin with thick fibrous tissue covered.*

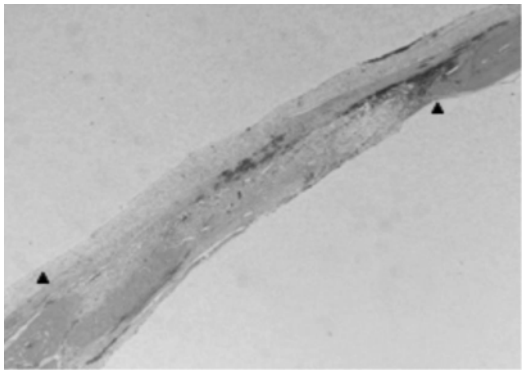

Figure 5. *Carrier contorl 8 wks.(×20, HE), bone formation increased compared to 2 weeks.*

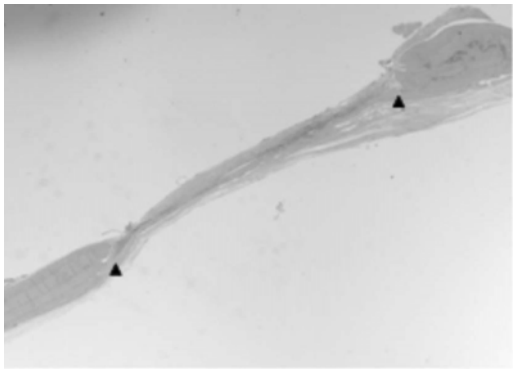

Figure 6. *rhBMP-2 alone 2 wks.(×20, HE), almost no bone regeneration was seen but fibrous tissue filled the defect.*

2주에 비해 8주에서는 신생골 주변의 섬유조직이 좀 더 질서있고 균일한 양상을 띠었으며, 특히 골막 주변의 섬유조직이 잘 정돈되어 있었으며 혈관이 발달되었다. 골성조직은 2주에 비해 조금 감소하였고 대신 신생골 말단에서 약간의 조골세포가 관찰되었다(Fig. 3).

대조 2군에서 2주째에는 결손부 변연과 하방의 경뇌막 주위에 신생골이 형성되고 있었고, 결손부 중앙에서는 섬유성 조직이 결을 이루며 양쪽 변연을 연결해주고 있었다. 골형성 능력을 보여주는 골아세포나 골성조직도 관찰되었으며, 신생골 주변으로는 염증세포 및 섬유아세포들도 관찰되었다(Fig. 4).

8주 소견은 2주 소견에 비해 좀 더 진행된 신생골 형성을 보였으며, 결손부 변연이 골무 모양으로 신생골을 형성하며 양쪽 변연이 근접하고 있었다. 신생골은 2주에 비해 좀더 안정화된 모습을 보였으며, 결손부 변연은 어느 정도 질서있는 결을 형성하며 골개조가 되고 있는 양상을 띠었으며, 좀 더 규칙적인 형상의 결합조직으로 이어져 있었다(Fig. 5).

실험 1군 2주째에는 결손부 변연에서부터 신생골 형성이 진행되어 결손부의 중앙 부위에서는 보다 얇고 성긴 망상골 양상으로 관찰되었다. 특이할 만한 염증 반응이나 이물질 반응은 나타나지 않았다(Fig. 6).

8주째 소견은 2주 소견에 비해 좀 더 진행된 신생골 형성을 보였으며, 결손부 변연이 골무 모양으로 신생골을 형성하며 양쪽 변연이 근접하고 있었다. 그러나 골형성량 자체는 대조군에 비해 크게 증가하지 않았으며 결손 부위의 공간이 제대로 유지되지 못한 채 얇고 축소된 공간으로 신생골이 형성되었다(Fig. 7).

실험 2군 2주째에는 결손부 변연에서부터 다수의 조골세포가 두드러지게 보이고, 중앙부로 갈수록 신생골은 얇게 형성되고 있었다. 골막하방으로 교원질막의 잔사가 보이고,

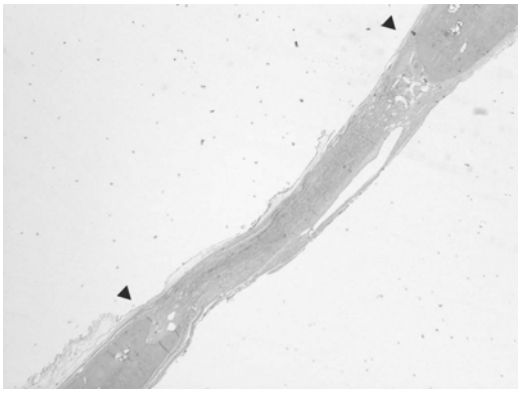

Figure 7. *rhBMP-2 alone 8 wks.(×20, HE), bone formation did not increase compared to 2 weeks.*

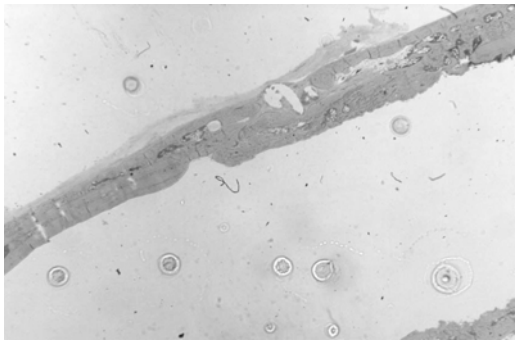

Figure 8. *rhBMP-2/ACS 2 wks.(×20, HE), new bone formation was found and remnant of ACS still remained.*

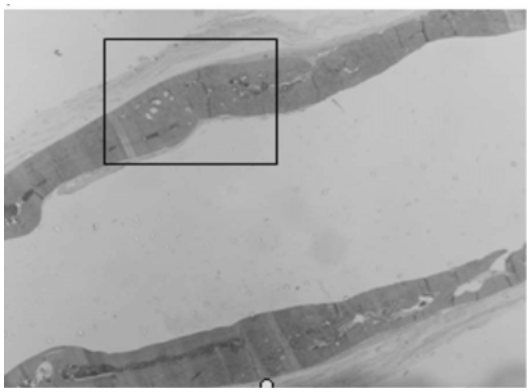

Figure 9. *rhBMP-2/ACS 8 wks.(×20, HE), bone regeneration in regular and mature pattern.*

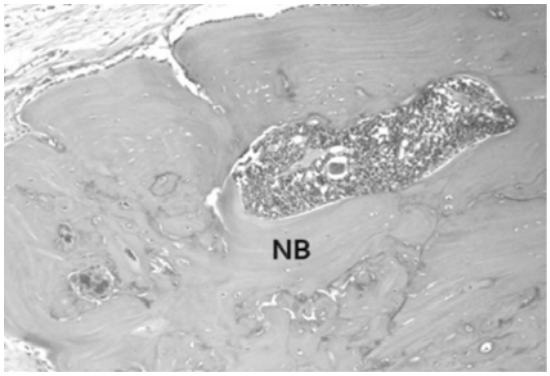

Figure 10. *rhBMP-2/ACS 8 wks.(×100, HE), dense and mature bone was formed and osteocytes were found within the lacunae.*

신생골 주변으로 대식세포 등이 출현해 있어서, 교원질막의 흡수가 완전히 진행되지 않았음을 알 수 있다. 그러나 피막형성은 관찰되지 않았으며 결합조직과는 분리된 양상을 띠고 있었다. 또한 기존골과 신생골의 경계가 비교적 명백하게 보이고 망상골이 상당히 많은 부분을 이루고 있음이 관찰된다(Fig. 8).

이에 비해 8주 소견에서는 결손부가 거의 완전하게 신생골로 채워져서 양쪽 결손부 변연이 신생골로 연결된 듯한 양상을 보인다. 교원질막의 잔사가 거의 관찰되지 않는 것으로 보아 이 시기에는 모두 흡수된 것으로 보인다. 조골세포가 거의 보이지 않고, 골성조직도 거의 치밀한 성숙골로 대체되고 있는 양상을 띠었다. 2주째의 망상골이 상당히 많은 부분 층판골로 대체되어 골 성숙이 진행되고 있는 것으로 보이며, 신생골과 기존골의 경계가 모호해진 모습을 관찰할 수 있었다. 2주에 비해 조골세포가 변연부에서부터 더 멀리 도달한 양상을 띠었으며, 따라서 결손부 중앙까지도 신생골이 도달한 양상을 보였으며, 결손부 변연에서 신생골과 기존골의 경계에서 점차 흔화가 진행되고 있었다. 또한 2주째보다 골아세포 및 조골세포의 수가 감소하였고, 망상골 양상보다는 층판골의 형태가 증가하여 골이 성숙되고 있음을 알 수 있다. 약간의 골성조직은 여전히 관찰되고 있었으며 결합조직은 좀 더 질서있게 배열된 모습을 보였다(Fig. 9, 10).

실험 3군에서 2주째에는 MBCP® 파편들이 많이 관찰되고 있으며, 신생골은 다량 형성된 것으로 보인다. MBCP® 잔사들은 흡수가 거의 진행되지 않았지만 신생골이 MBCP® 조각의 표면에 근접하여 형성되며 이는 망상골의 양상을 띠고 있다. 이 주변은 다시 섬유성의 결합조직이 두텁게 형성되어있었으며, 혈관이나 염증세포들의 출현도 눈에 띈다. MBCP® 조각의 표면을 따라서 골형성 능력을 보이는 골아세

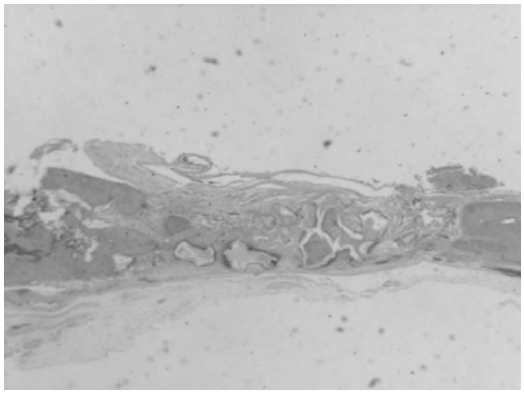

Figure 11. *rhBMP-2/MBCP® 2 wks.(×20, HE), newly formed bone and MBCP particle were intermingled.*

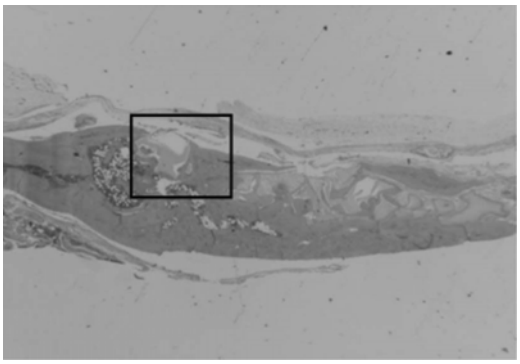

Figure 12. *rhBMP-2/MBCP® 8wks.(×20, HE), bone regeneration increased compared to 2 weeks and MBCP particles were actively replaced by new bone.*

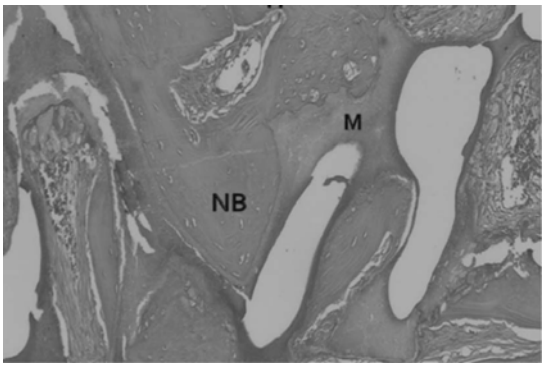

Figure 13. *rhBMP-2/MBCP® 8wks.(×100, HE), MBCP particles were surrounded by new bone and irregular border between the two means of remodeling process.*

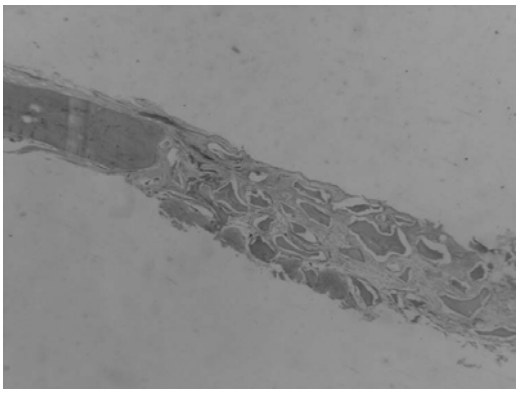

Figure 14. *rhBMP-2/Bio-Oss® 2wks.(×20, HE) large amount of Bio-Oss particles remained but defect was alomost all closed.*

포나 골성물질들이 축적된 모습을 관찰할 수 있다(Fig. 11).

8주째에는 2주 소견에 비하여 MBCP® 잔사들이 상당히 줄어들었고, 남은 조각들은 주로 결손의 상부에 집중적으로 모여 있다. 그 하방으로는 신생골이 왕성히 형성되어 결손부의 중앙까지 거의 완벽하게 채우고 있는 모습을 볼 수 있다. 대신 MBCP® 조각들은 흡수된 부분이 신생골로 채워진 듯한 양상을 띠고 있으며 주변으로 여전히 골아세포의 출현이 있어서 계속 골형성이 진행되고 있음을 추측할 수 있다. 하지만 후기에 형성된 골들은 이전에 형성된 골과 구분되어 보이고 분리된 양상처럼 보인다. 한편 섬유성 결합조직과 혈관들도 여전히 관찰되지만, 2주 소견에 비해 망상골보다 층판골의 비율이 높아지고 있음을 알 수 있다. 하방의 변연에서는 기존골과 신생골의 경계를 구분하기 힘들고, MBCP® 조각들도 신생골과 거의 흔화되어 있음을 추측할 수 있다(Fig. 12, 13).

실험 4군에서는 2주째에 Bio-Oss® 잔사들이 대부분 잔존해 있는 가운데 그 주변을 둘러싸고 신생골이 형성되고 있으며, 인접한 부위에 다량의 염증세포 및 섬유성 결합조직의 개제가 관찰된다. 신생골은 아직 층판구조로 성숙되지는 못한 채 대부분 망상골의 형상을 띠고 있다. 결손부 변연에서 좀 더 왕성하게 신생골이 형성되고 있음을 알 수 있고, 중앙으로 갈수록 조금 얇아지는 양상을 보인다(Fig. 14).

8주 소견은 2주 소견에 비하여 Bio-Oss® 잔사들의 양은 상당히 감소하였지만 결손부의 상부에 집중적으로 Bio-Oss® 잔사들이 눈에 띠고, 그 주변으로 망상골과 층판골이 함께 나타나는 양상을 보인다. Bio-Oss® 하방으로는 신생골이 왕성하게 형성되어 있고, 결손부는 거의 완벽하게 신생골로 피개된 양상을 보였다. 염증세포는 소량으로 관찰되며 섬유성 결합조직의 양도 2주째에 비해 줄어든 모습을 띠고 있으

며, 결손부의 중앙부까지 신생골의 형성이 활발히 이루어지고 있음을 알 수 있다. 또한 초기에 형성된 골과 후기에 형성된 골이 구분되며 규칙적인 층판배열로 골이 안정화되고 개조되고 있음을 추측할 수 있다(Fig. 15, 16).

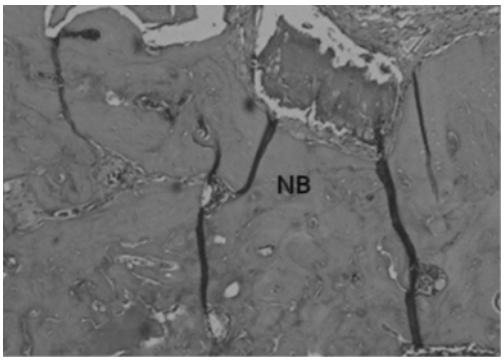

Figure 15. *rhBMP-2/Bio-Oss® 8wks.(×20, HE), new bone increased and Bio-Oss particles were kept within the hollow lacunae.*

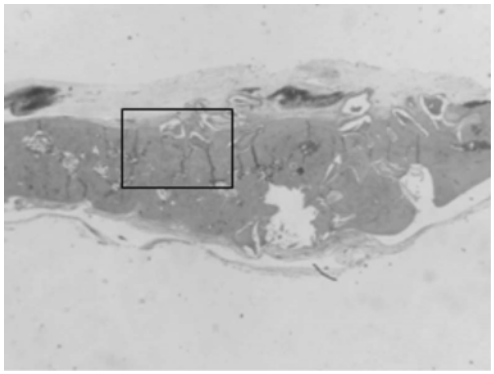

Figure 16. *rhBMP-2/Bio-Oss® 8wks.(×100, HE), Bio-Oss was in close contact with newly formed bone and osteocyte was found.*

조직계측적 결과는 Table 1, 2, 3에 요약되어 있다. rhBMP-2를 매개체와 함께 사용한 경우는 대조군 및 rhBMP-2를 단독으로 적용한 군에 비해 신생골의 형성 비율이 유의성있게 증가되었다. 결손부는 rhBMP-2와 매개체를 함께 사용시 8주째에 이르면 완전히 피개되었고, 재생된 조직의 양도 대조군에 비해 유의성있는 증가양상을 보였으며, 골밀도는 2주째에 비해 8주째에 더 증가하였다.

Table 1. *Defect Closure (mm,[%]) (Group Mean±SD ; N=5)*

Group	2 weeks	8 weeks
Sham surgery control	0.9±0.3 [11.9±5.2]†	1.1±0.6 [13.1±8.0]†
Carrier control	1.3±0.5 [21.9±10.4]*	1.6±0.7 [24.9±11.5]*
rhBMP-2 alone	1.1±0.7 [13.1±10.9]	1.2±0.6 [14.0±9.3]†
rhBMP-2/ACS	6.1±1.1 [95.4±8.7]*†	6.8±0.7 [100±0.0]*†
rhBMP-2/MBCP®	5.8±1.3 [93.1±13.5]*†	6.3±1.0 [100±0.0]*†
rhBMP-2/Bio-Oss®	5.6±0.9 [91.8±11.9]*†	6.4±1.9 [100±0.0]*†

* Statistically significant difference compared to sham surgery control group. (p<0.05)
† Statistically significant difference compared to carrier control group. (p<0.05)

Table 2. *New Bone Area (mm²) (Group Mean±SD; N=5)*

Group	2 weeks	8 weeks
Sham surgery control	0.2±0.1†	0.3±0.2†
Carrier control	2.9±1.6*	1.9±3.2*
rhBMP-2 alone	0.4±1.8†	0.4±1.7†
rhBMP-2/ACS	3.9±1.5*†	4.8±0.9*†
rhBMP-2/MBCP®	5.1±1.1*†	6.0±1.3*†
rhBMP-2/Bio-Oss®	5.0±0.9*†	6.3±0.7*†

* Statistically significant difference compared to sham surgery control group. (p<0.05)
† Statistically significant difference compared to carrier control group. (p<0.05)

Table 3. *Bone Density (%) (Group Mean±SD; N=5)*

Group	2 weeks	8 weeks
Sham surgery control	88.3±12.3†	91.6±4.9†
Carrier control	12.8±3.0*	86.3±11.9*
rhBMP-2 alone	89.1±11.1†	91.1±7.1†
rhBMP-2/ACS	51.9±13.9*†	90.1±8.1*†
rhBMP-2/MBCP®	57.9±18.4*†	72.1±17.2*†
rhBMP-2/Bio-Oss®	59.1±15.9*†	70.8±15.9*†

* Statistically significant difference compared to sham surgery control group. (p<0.05)

† Statistically significant difference compared to carrier control group. (p<0.05)

고찰

골유도능력이 있다고 알려진 rhBMP-2는 골재생을 위한 조직공학에서 다양하게 활용되어 자가골을 대체할 훌륭한 치료방법이 될 것으로 기대되고 있다. 하지만 기존의 많은 연구에서 rhBMP-2의 이러한 능력은 매개체의 성격에 크게 의존한다고 밝혀졌으며, 이에 따라 최적의 매개체를 찾기 위해 다양한 생체물질들이 연구되어오고 있다[1,11,13,16,17,29].

이상적인 매개는 BMP를 적절한 속도로 유출시켜줄 수 있어야 하고, 새로운 조직형성의 비계로서 판막을 지지하여 공간을 유지할 수 있어야 한다[13,14,34]. 또한 다공성을 가져서 신생 혈관들이 자라 들어올 수 있을 뿐만 아니라, 적절한 분해 속도로 어느 정도의 공간을 유지한 후에는 신생골로 대체될 수 있어야한다. 왜냐하면 너무 빨리 분해되면 공간유지와 장기적인 BMP의 유출이 저해되고, 너무 느리게 분해되면 골의 성장을 방해하여 섬유성 조직이나 피막을 형성할 수 있기 때문이다.

따라서 이번 연구에서는 rhBMP-2를 다양한 매개체와 함께 적용했을 때 골재생 효과를 알아보고자 하였다. 이를 위해 백서 두개골에 인위적인 결손을 형성하여, rhBMP-2 0.05 ml/mg을 흡수성교원질막(Collatepe®), 합성골이식재(MBCP®), 동종골이식재(Bio-Oss®)와 함께 적용하여 보았다. 이번 실험에서 8 mm의 critical-sized defect를 적용했는데, 이것은 실험동물의 생명주기동안 스스로 치유되지 않는 정도의 결손을 의미한다[10,30]. 또한 우리가 백서의 두개골을 선택한 것은 이전의 연구에서 골유도의 측면에서 BMP의 효과를 잘 구현해낼 수 있는 숙주의 상태를 지녔을 뿐만 아니라, 접근성이 좋고 고정물질이 필요 없기 때문이다.

실험결과에서 가장 두드러진 점은 rhBMP-2를 매개체와 함께 적용했을 때, rhBMP-2를 적용하지 않거나 단독으로 적용했을 때보다 신생골의 형성이 증가한다는 것이었다. 결손부는 rhBMP-2와 매개체를 함께 사용시 2주째에도 90% 이상 피개되었고, 8주째에 이르면 거의 완료되었다. 신생조직 형성에 있어서는 MBCP®와 Bio-Oss®가 견고한 공간유지를 하며 가장 많은 양이 생성되었지만, 광화골의 비율은 흡수성 교원질막을 이용한 경우보다 적었다. 세 가지 매개체 중에서 흡수성 교원질막이 가장 밀도가 높은 골생성에 기여했으며, 이는 β-TCP, fibrin-fibronectin sealing system, polylactic-polyglycolic polymer 등의 매개체와 비교한 기존의 많은 연구들의 결과와 일치한다[1,6,11-14,16-18]. 흡수성교원질막은 BMP을 빠르게 흡수할 수 있고 생체친화성이 우수하며, 흡수속도가 빨라서 신생골로 대체되기가 용이하다. 그러나 견고함이 부족하여 공간유지나 판막의 지지에 불리하며, 너무 일찍 흡수되므로 장기간으로 골형성을 유도해 줄 수 없는 단점을 가지고 있기도 하다.

이에 비해 Bio-Oss®나 MBCP®는 골전도성 골대체물질로서 흡수가 느려서 오랫동안 공간을 유지해줄 수 있으므로, 장기간 BMP를 유지해줄 수 있다. 하지만 골형성이 왕성한 시기에 계속 잔존하므로 이 공간으로 신생골이 자라 들어오지 못하기 때문에 이번 연구에서처럼 신생조직의 형성량에서는 우수하지만, 골밀도가 흡수성교원질막에 비해 낮은 점을 보인다.

한편 rhBMP-2를 단독으로 적용한 경우에는 아무 처치도 하지 않은 군과 유사한 결과를 보였다. 이는 rhBMP가 액상으로 공급되어 단독으로 적용했을 경우 인접조직으로 빠르게 흡수되기 때문에 골생성을 충분히 유도해 줄 수 없었던

것으로 추측할 수 있다. 이러한 결과는 선행된 많은 연구들에서 이미 밝혀진 바 있다[12].

각 군의 2주 소견에서는 결손부의 비유합수립기로서 혈종과 섬유소가 감소하고 교원질의 조직화가 이루어지는 시기로 결손부 변연으로부터 중앙 부위로 신생골 형성이 섬모양으로 나타나는 시기이다. 모든 군에서 2주 해면골 침착은 대부분 골결손 변연에서 이루어지는 것을 볼 수 있는데, 이는 초기 골형성이 결손 부위의 골소주 간극으로부터 골결손부 변연부로의 골내조직 증식의 결과인 것을 알 수 있다. 대조군의 8주 소견에서는 성숙기의 소견대로 조골세포가 거의 나타나지 않으며, 골성조직도 감소하여 성숙한 골양상을 보여주고 있다. 결손부 전역에는 두껍고 잘 조직화된 결합조직이 나타나고 있어서 성숙된 반흔조직의 양상을 보인다. rhBMP-2와 매개체를 적용한 경우 2주째보다 8주째에 광화골의 형성이 많았으며, 층판골로의 성숙도 진행되는 경향을 보였다. 이는 8주째에는 매개물질의 분해가 상당히 진행되어 이 부분이 신생골로 대체되었기 때문이다. 그러나 교원질막에 비해 Bio-Oss®나 MBCP®는 흡수가 상대적으로 느리게 진행되기 때문에 여전히 매개체의 잔사와 신생골이 혼재된 양상을 보였다. 백서의 두개골 결손부는 비교적 얇은 두께의 작은 공간이었기 때문에 실제 임상에서 적용될 때보다 공간유지의 효과가 결정적인 요소로 작용하지 않았고, 이 실험에서는 매개체의 용량을 표준화하지 않았기 때문에 충분한 교원질막을 견고하게 적용한 점이 실험 2군의 골형성비율을 높이는데 기여했을 것으로 추측된다. 이처럼 백서의 두개골 결손의 깊이가 상대적으로 얕고, 치조골과 같지 않은 특성이 있기 때문에 이 실험의 결과를 구강내 큰 골결손에 그대로 적용하기에는 무리가 있다.

따라서 본 연구의 실험 결과 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

1. 신생골 형성에 있어서 rhBMP-2를 매개체와 함께 적용한 경우, rhBMP를 적용하지 않거나 혹은 단독으로 적용한 경우보다 골유도 효과가 뚜렷이 증가하였다.
2. rhBMP-2의 매개체로서 이종골이식재나 합성골이식재를 적용한 경우 양적인 면에서 신생골의 형성이 두드러지고, 질적인 면에서는 흡수성 교원질막에서 골밀도가 더 높게 나타났다.
3. 모든 군에서 8주 경과시에 2주보다 골의 밀도가 더 증가하였다.
4. rhP-2를 단독으로 적용한 경우는 대조군에 비해 신생골의 양이나 밀도면에서 유의성있는 증가를 보이지 않았다.
5. 이종골이식재나 합성골이식재는 8주가 지나서도 잔존하여 신생골로 대체되지 않는 부분이 남아 있었다.

이러한 연구결과는 rhBMP-2가 골형성에 있어서 훌륭한 유도물질이 될 수 있으며, 이러한 역할을 수행하기 위해서는 반드시 매개체가 필요함을 보여준다. 그리고 초기 골의 부피 증가를 위해서는 이종골이나 동종골이식재가 유리하지만, 골의 밀도 증가에는 흡수성 콜라겐 막이 더 뛰어남을 제시해 준다. 앞으로의 연구는 매개체에서 rhBMP-2가 유출되는 기전 및 환경과 이를 통하여 가장 이상적인 매개체를 개발하는데 초점이 맞춰질 것이다.

참고문헌

1. Ahn SH, Han SB, Cho KS et al. Effect of Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein- 4 with Carriers in Rat Calvarial Defects. J Periodontol 2003;74:787-797.
2. Alam MI, Asahina I. Comparative study of biphasic calcium phosphate ceramics impregnated with rhBMP-2 as bone substitute. J Biomed Mater Res 2001;54:129-138.
3. Alam MI, Asahina I. Evaluation of ceramics composed of different hydroxyapatite to tricalcium phosphate ratios as carriers for rhBMP-2. Biomaterials 2001;22:1643-1651.
4. Boden SD. Differential effects and glucocorticoid potentiation of bone morphogenetic protein action during rat osteoblast differentiation in vitro. Endocrinology 1996;137:3401-3407.
5. Bosch C. Importance of the critical-size bone defect in testing bone-regenerating materials. J Craniofac Surg 1998;9: 310-316.
6. Choi SH, Cho KS, Kim CK et al. Effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2/absorbable collagen sponge (rhBMP-2/ACS) on healing in 3-wall intrabony defects in dogs. J Periodontol 2002;73:63-72.
7. Cordaro. Clinical results of alveolar ridge augmentation with mandibular block bone grafts in partially edentulous patients prior to implant placement. Clin Oral Implants Res 2002;13:103-111.
8. Dragoo MR, Sullivan HC. A clinical and hitological evaluation of autogenous iliac bone trafts in humans. II External root resorption. J Periodontol 1973;44:614-625.

9. Goldbefg VM. Natural history of autografts and allografts. Clin Orhop 1987;225:7-16.
10. Hollinger JO, Slots J, Bell et al. Carriers for bone morphogenetic proteins. Biometerials 1996;17:187-194.
11. Han DK, Kim CS, Cho KS et al. Effect of a Fibrin-fibronectin sealing system as a carrier for recombinant human bone morphogenetic protein-4 on bone formation in rat calvarial defects. J Periodontol 2005 Dec;76:2216-2222.
12. Hong SJ, Kim CK, Cho KS et al. The Effect of a Fibrin-Fibronectin/ß-Tricalcium Phosphate/Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 System on Bone Formation in Rat Calvarial Defects. Biomaterials 2006;27:3810-3816.
13. Hyun SJ, Kim CK, Kim CS et al. The effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2, 4 and 7 on bone formation in rat calvarial defects. J Periodontol 2005;76:1667-1674.
14. Jung UW, Choi SY, Cho KS et al. The Effect of varying the Particle Size of Beta Tricalcium Phosphate carrier of Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-4 on Bone Formation in Rat Calvarial Defects. J Periodontol 2006; 77:765-772.
15. Karring T, Lindhe J, Cortellini P. Regenerative periodontal therapy. Clin Perio Imp Dent 2002;599-602.
16. Kim CS, Choi SH, Cho KS et al. The effect of recombinant human bone morphogenetic protein-4 on the osteoblastic differentiation of mouse calvarial cells affected by Porphyromonas gingivalis. J Periodontol 2002;73:1126-1132.
17. Kim CS, Kim CK, Cho KS et al. Ectopic bone formation associated with recombinant human bone morphogenetic protein-2 using absorbable collagen sponge and beta tricalcium phosphate as carriers. Biomaterials 2004;19:1-7.
18. Lee YM, Kim CS, Kim CK et al. The bone regenerative effect of platelet-derived growth factor-BB delivered with a chitosan/tricalcium phosphate sponge carrier. J periodontol 2000;71:418-424.
19. Mallonig JT. Autogenous and allogenic bone grafts in peiodontal therapy. Crit Rev Oral Biol Med 1992;3:333-352.
20. Mao T, Chung M, Ting B et al. An experimental study on rhBMP-2 composite bone substitute for repairing craniomaxillary bone defects. Clin J Dent Res 1998;1:21-25.
21. Marden LJ. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 is superior to demineralized bone matrix in repairing craniotomy defects in rats. J Biomed Mater Res 1994; 28:1127-1138.
22. Misch CE, Dietsh F. Bone-grafting materials in implant dentistry. Implant Dent 1993;2:158-167.
23. Mizutani H, Urist MR. The nature of bone morphogenetic protein(BMP) fractions derived from bovine bone matrix gelatin. Clin Orhop 1982;171:213-223.
24. Okura K. Takake M, Isibu I et al. Healing of segmental bone defects in rats induced by a β TCP-MCPM cement combine with rhBMP-2. J Biomed Mater Res 1999;44:168-175.
25. Pang EK, Han SB, Cho KS et al. Effect of recombinant human bone morphogenetic protein-4 dose on bone formation in rat calvarial defects. J Periodontol 2004;75:1364-1370.
26. Sampath TK, Maliakal JC, Hauschka PV. Recombinant human osteogenic protein-1 (hOP-1) induces new bone formation in vivo with a specific activity comparable with natural bovine osteogenic protein and stimulates osteoblast proliferation and differentiation in vitro. J Biol Chem 1992;267:20352-20362.
27. Sandor G, Clockie C, Urist M et al. Successful mandibular reconstruction using a BMP bioimplant. J Craniofac Surg 2001;12(2):119-127.
28. Schwartz-Arad D. Surgical success of intraoral autogenous block onlay bone grafting for alveolar ridge augmentation. Implant Dent 2005;14:131-138.
29. Sigurdsson TJ. Periodontal repair in dogs: Evaluation of rhBMP-2 carriers. Int J Perio Rest Dent 1996;16:524-537.
30. Takagi K, Urist MR. The reaction of the dura to bone morphogenetic protein(BMP) in repair of skull defects. Ann Surg 1982;196:100-109.
31. Uludag H. Implantation of recombinant human bone morphogenetic proteins with biomaterial carriers; A correlation between protein pharmacokinetics and osteoinduction in the rat ectopic model. J Biomed Mater Res 2000;50:227-238.
32. Urist MR. Bone formation by autoinduction. Science 1965;150:893-899.
33. Urist MR. A bovine low molecular weight bone morphogenetic protein (BMP) fraction. Clin Orthop 1982;162:219-232.
34. Wikesjoð UM. Periodontal repair in dogs: Effect of BMP-2 concentration on regeneration of alveolar bone and periodontal attachment. J Clin Periodontol 1999;26:392-400.
35. Winn SR. Carrier systems for bone morphogenetic proteins. Clin Orhop 1999;367(suppl):95s-106s.
36. Yamaguchi A. Effects of BMP-2, BMP-4, and BMP-6 on osteoblastic differentiation of bone marrow-derived stromal cell lines, ST2 and MC3T3-G2/PA6. Biochem Biophys Res Commun 1996;220:336-371.