International Journal of Oral Biology, Vol. 42, No. 4 December 31 2017, p. 203-211
Copyright ⓒ 2017, *The Korean Academy of Oral Biology*
http://dx.doi.org/10.11620/IJOB.2017.42.4.203
pISSN 1226-7155, eISSN 2287-6618

International Journal of Oral Biology

The Effect of Autogenous Demineralized Dentin Matrix and Interleukin-6 on bone Regeneration

Won Seok Jang[1], Min Gu Kim[1], Dae Suk Hwang[1], Gyoo Cheon Kim[2,*] and Uk Kyu Kim[1,*]

[1]*Department of Oral and Maxillofacial Surgery, School of Dentistry, Pusan National University, Yangsan, Korea*
[2]*Department of Oral Anatomy, School of Dentistry, Pusan National University, Yangsan, Korea*

(received November 21, 2017; revised December 15, 2017; accepted December 16, 2017)

The aim of this study was to evaluate the role of demineralized and particulate autogenous tooth, and interleukin-6 in bone regeneration.

A demineralized and particulate autogenous tooth was prepared and human osteoblast-like cells (MG63) and human osteosarcoma cells were inoculated into the culture. The rate of cell adhesion, proliferation and mineralization were examined, and the appearance of cellular attachment was observed. An 8 mm critical size defect was created in the cranium of rabbits. Nine rabbits were divided into three groups including: An experimental group A (3 rabbits), in which a demineralised and particulate autogenous tooth was grafted; an experimental group B (3 rabbits), in which a demineralized, particulate autogenous tooth was grafted in addition to interleukin-6 (20 ng/mL); and a control group. The rabbits were sacrificed at 1, 2, 4 and 6 weeks for histopathological examination with H-E and Masson's Trichrome, and immunohistochemistry with osteocalcin.

The cell-based assay showed a higher rate of cell adhesion, mineralization and cellular attachment in the experimental group A compared with the control group. The animal study revealed an increased number of osteoclasts, newly formed and mature bones in the experimental group A compared with the control group. Eventually, a higher number of osteoclasts were observed in the experimental group B. However, the emergence of newly formed and mature bone was lower than in the experimental group A.

The current results suggest that treatment with demineralized and particulate autogenous tooth and interleukin-6 is not effective in stimulating bone regeneration during the bone grafting procedure.

Key words: demineralized autogenous tooth, interleukin 6, bone regeneration

*Correspondence to: Gyoo Cheon Kim, Department of Oral Anatomy, School of Dentistry, Pusan National University, Beomeo- ri, Mulgeum-eup, Yangsan-si, Gyongsangnam-do, 626-870, Korea
Tel: +82-51-510-8243, Fax: +82-51-510-8241
E-mail: ki91000m@pusan.ac.kr
ORCID : 0000-0003-3568-3529

*Correspondence to: Uk Kyu Kim, Department of Oral and Maxillofacial Surgery, School of Dentistry, Pusan National University, Beomeo-ri, Mulgeum-eup, Yangsan-si, Gyongsangnam-do, 626-870, Korea
Tel: +82-55-360-5112, Fax: +82-55-630-5104
E-mail: kuksjs@pusan.ac.kr
ORCID : 0000-0003-1251-7843

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

서 론

이상적인 뼈 이식재가 되기 위해서는 면역반응이나 이물반응 없이 우수한 생체적합성을 가지고, 뼈를 만드는 세포가 분화 및 증식할 수 있는 안정적인 담체(scaffold)의 역할을 하며, 뼈 형성을 촉진할 수 있는 유기질을 함유하고 있으면서 일정 기간이 지나 신생뼈가 충분히 형성되었을 때 흡수되어 안전하게 제거되어야 한다[1]. 아직 이러한 조건을 완벽하게 갖추는 뼈 이식재는 없는 실정이다. 정형

외과 영역에서 사용되는 뼈 이식재와는 다르게 구강악안면외과 영역, 특히 인공치아매식과 관련된 뼈 이식재는 초기에 적절한 기계적 물성을 유지하면서 임플란트 매식체와 뼈가 유착을 이룰 수 있는 신생뼈의 빠른 생성과 뼈 이식재의 단계적인 흡수가 이루어져야 한다. 이러한 조건을 충족시켜 줄 수 있고 임상에서 쉽게 얻을 수 있는 이식재 중의 하나가 환자에게서 발거한 치아이다. 탈무기질화된 치아, 좀 더 구체적으로 탈무기질화된 상아질이 신생뼈 생성 능력을 가지고 있어 치조골 재생에 있어서 이식재로 사용될 수 있다는 것이 1967년 Yeomans 등에 의해 보고된 이후로[2], 사람의 치아를 이용한 생체재료 개발과 함께 많은 동물 실험과 사람을 대상으로 한 임상 연구가 국내외의 여러 학자들을 통해 진행되었고 학술 논문 발표가 있었다[3-10]. 현재 저자를 포함한 여러 임상가들이 유용하게 사용하고 있는 자가치아이식재는 동종골, 이종골과 합성골이 가지고 있는 문제점들-감염의 가능성, 높은 비용, 골형성 능력의 한계 등-을 해결함과 동시에 자가골이 가지고 있는 문제점들-제한적인 채취량, 이식 후 예측불가능한 골흡수, 공여부의 이차 결손 등[7,11]-도 일부 해결할 수 있어 자가골을 대체할 수 있는 뼈 이식재로 각광을 받고 있다.

하지만, 현재 시판되고 있는 기존 자가치아이식재는 제조회사의 특수공법에 의해 유기질을 최대한 보존하는 것을 최대의 강점으로 소개하면서 무기질과 유기질의 비율을 약 55 : 45로 제조하고 있다[12]. 이는 유기질 함량이 높은 경우에 나타날 수 있는 문제점인 빠른 흡수로 인해 뼈 개조(bone remodeling) 과정에서 이식한 전체적 뼈 부피(Volume)가 줄어드는 양상을 초래할 수도 있다. 임상에서 기존 뼈 이식재를 이용한 뼈이식술을 한 증례에서 약 10%의 뼈 부피가 줄어드는 경우가 보고 되고 있다[13]. 그렇다고 유기질의 함량을 무조건 많이 줄이는 것은 치아의 유기질에서 얻을 수 있는 골유도(bone induction) 기능을 상실하게 하고 이식재의 뼈 개조 기간이 길어지는 단점을 가질 수 있고 이는 빠른 뼈 대사 회전율(turnover rate)을 보이는 치조골의 개조에 역효과를 가져올 수 있다[14].

이러한 문제점들을 최대한 줄이기 위해서 자가치아이식재의 구성성분에서 골유도 기능에 필수 유기질- Type Ⅰ 콜라겐, 뼈형성단백질 등-은 보존하고, 골전도(bone conduction) 기능은 극대화하면서도 이식재의 흡수를 촉진시킬 수 있는 첨가제를 주입한다면 치조골 개조 과정을 보다 효율적으로 촉진시킬 수 있는 한 가지 방법이 될 수 있을 것이라 사료된다.

본 연구는 탈무기질화 자가치아이식재의 식립 후 뼈 흡수과정에서 중요한 역할을 하는 뼈파괴세포의 활성화에 관여하는[15] 인터루킨-6를 첨가함으로써 이식재의 흡수를 촉진시키고 이러한 과정을 통해 뼈 재생과정을 훨씬 효과적으로 촉진시키는 시술 방법을 제시하고 이 과정에 관여하는 세포 및 조직학적 양상을 분석하고자 한다.

재료 및 방법

무기물이 제거된 자가 치아 이식재 준비

Bone maker 자가치아이식재 제조기기(Korean Dental Solution, 한국)에서 0.6 M의 염산을 이용하여 치아조직의 무기물성분을 제거하고 세척을 거친 후 에틸알콜과 클로로포름을 이용하여 지방과 단백질 성분을 제거했다. 그리고 나서 과산화수소를 사용하여 표백과 살균 과정을 거친 후 다섯 번의 세척작업을 시행한 후 멸균된 탈무기 자가 치아 이식재를 준비하였다.

세포배양

MG63 조골세포(Human osteoblast-like MG63)와 사람 뼈육종세포주인 HOS(Human osteosarcoma) 세포를 ATCC (Rockville, MD, USA)에서 구입하였고, 각각 DMEM/F12 1:1 배지와 RPMI1640 배지에 100 μg/ml penicillin/streptomycin, 4 mM L-glutamine, 10% fetal bovine serum (FBS)를 첨가한 다음 37℃의 5% CO2 배양기에서 배양되었다

세포 부착율 측정

제작된 시편을 멸균한 후에 $5x10^3$개의 세포를 파종한 다음 24시간 배양하였다. 가공하지 않은 치아표면에 파종한 군을 대조군, 탈무기화 과정을 거친 치아에 파종한 군을 실험군으로 하였다. 생리식염수(phosphate buffered saline, PBS)로 시편을 2번 세척 한 후, 부착되어 있는 세포들을 trypsin-EDTA에 5분간 37℃에서 적용하였다. Hemacytometer를 사용하여 세포수를 측정하여 세포 부착율을 계산하였다.

세포 생존율 측정

세포 생존율은 WST-1 방법으로 사용되었다. 6-well 플레이트에서 편평한 시편을 준비하고 그 위에 5 x 10^3개의 세포를 파종한 다음 24, 48, 72시간 배양하였다. 가공하지 않은 치아표면에 파종한 군을 대조군, 탈무기화 과정을 거친 치아에 파종한 군을 실험군으로 하였다. 그 후 각 웰에 WST-1 용액을 10 ul씩 첨가하고 2시간동안 배양기에서 반응을 시켰다. 이후, ELISA reader (Tecan, mannedorf, Swiss)로 450 nm 파장에서 흡광도를 측정했다. 각각의 분석은 세 번 시행되었다.

주사전자현미경 관찰

시편 위에 세포들의 부착된 양상을 관찰하기 위해 주사전자현미경(scanning electron microscopy, SEM; S3500N,

HITACHI, Japan) 촬영을 하였다. 시편들은 2.5% glutaraldehyde (Sigma aldrich, USA)로 30분 동안 고정했다. 그 후 1% osmium tetroxide(Sigma aldrich, USA)를 30분간 처리한 후 에탄올로 저농도에서 고농도(Sigma aldrich, USA)로 탈수 시켰다(70%, 80%, 90%, 100%). 그리고 hexamethyldisilazane (HMDS; Sigma aldrich, USA)을 이용하여 드라이시켰다. 모든 시편은 알루미늄 판 위에 고정시켜 진공 상태인 gold-sputter를 이용해 코팅시켰다. 주사전자현미경은 15 kV accelerating voltage에서 작동되었다. 모든 이미지는 무작위로 선택하여 2000배와 5000배의 배율로 찍었다.

뼈 광화력 분석

시편 위에 놓인 뼈모세포들의 광화 능력은 시편 위에 형성된 층과 새롭게 형성된 결정을 정량화하기 위하여 Energy dispersive X-ray spectroscopy (EDS, Supra40 vp, Carl zeiss, Germany) 분석을 시행했다. EDS를 통한 line scan과 영역을 지정한 성분 분석은 15 kV, 40배율에서 시행되었다. 상아질 시편은 상하좌우로 나누어 똑같은 크기로 line을 지정해주어 line을 따라 칼슘(Ca)과 인(P)의 함량을 측정하였다. 또한 line을 중심으로 똑같은 크기로 영역을 지정하여 그 영역에 있는 칼슘과 인의 값을 측정하였다. 각각의 구해진 칼슘과 인의 값을 통하여 칼슘/인 비율(Ca/P ratio)을 구하여 광화능력을 평가했다.

동물실험

생후 8개월 된 토끼의 두개골에 8mm의 size defect를 형성하고 이식재 적용한 후 1, 2, 4, 6주가 경과되면 토끼를 희생하여 두개골 조직을 관찰하였다. 대조군은 결손부에 아무런 처치도 하지 않은 군과 실험군 A는 결손부위에 탈무기질화 자가치아 이식재를 이식한 군이며, 실험군 B는 결손부위에 탈무기질화 자가치아이식재 및 20 ng/ml 농도의 인터루킨 6(IL-6)를 동시에 이식한 군으로 뼈형성 정도를 비교, 관찰하였다. 본 실험에 사용된 토끼는 체중 약 3.5kg의 수컷이고 각 주당 3마리씩을 사용했으며 25±1℃ 온도와 53±5% 습도를 유지하는 실험실에서 표준 실험실 식이 요법과 함께 동물 관리에 관한 모든 실험 계획서는 동물 윤리위원회의 지침과 규정에 따라 수행하였다(Pusan National University. PNU-2017-1446).

Hematoxylin과 Eosin(H&E) 염색

각각의 토끼 뼈 조직을 10% 중성 포르말린 용액에 24시간 동안 고정시켰다. 그런 다음 조직을 5 μm의 두께로 자른 후 H&E 염색을 시행하였다. 각 군의 조직 변화를 광학현미경(Pixel link PL-B686 CU, Canada)으로 관찰하여 결손부위의 뼈조직 재생 정도를 관찰하였다.

Masson's Trichrome 염색

각각의 토끼 뼈 조직을 10% 중성 포르말린 용액에 24시간 동안 고정시켰다. 그런 다음 조직을 5 μm의 두께로 자른 후 Masson 's trichrome 염색을 시행하였다. 각 군의 조직 변화를 광학현미경(Pixel link PL-B686 CU, Canada)으로 관찰하여 결손 부위의 뼈조직 재생에 있어서 신생뼈 조직의 증거가 되는 아교질의 생성 정도를 관찰하였다.

Immunohistochemistry

파라핀 절편을 68℃오븐에서 1시간 녹인 후 파라핀을 제거하기 위해 Xylene에 7분씩 3번 세척하였다. 그 후 Xylene의 제거를 위해 100% 에탄올에 5분씩 3번 세척 후 90%, 80%, 70% 에탄올 순으로 각각 5분씩 순서대로 함수 시켰다. 함수시킨 절편을 알콜 성분을 완전히 제거하기 위해 PBS (phosphate buffer saline)로 5분씩 3번 세척하였다. 그 후 Mouse and Rabbit Specific HRP/DAB (ABC) Detection IHC Kit (Abcam Inc., Cambridge, UK)를 사용하여 순서에 맞게 시행하였다.

먼저 함수시킨 절편은 hydrogen peroxide block으로 실온에서 5분 동안 도포시킨다. 그리고 PBS로 5분 동안 3번씩 세척하였다. 그 다음 protein Block으로 실온에서 5분 동안 도포한 후 다시 PBS로 5분 동안 1번 세척하였다. 그런 다음 primary antibody osteocalcin (Abcam Inc., Cambridge, UK)을 1:200의 농도로 희석한 후(antibody diluent with backgroud reducing components, Dako 제품으로 희석함) 조직이 잠길 만큼 도포 후 습윤 박스에 넣어 4℃ 냉장고에서 하루 동안 보관하였다. 다음 날 냉장고에 보관한 조직절편을 꺼내 PBS로 5분씩 3번 세척하였다. 그리고 Biotinylated Goat anti-polyvalent (2차 안티바디 용)으로 10분 동안 도포 후 PBS로 5분씩 3번 세척하였다. 그런 다음 streptavidin peroxidase를 10분 동안 도포한 후 동일하게 PBS로 5분씩 3번 세척하였다. 그런 다음 DAB (Diaminobenzidine)를 1분에서 5분 사이 동안 발색시킨 후 Mayer' Hemotoxylin (Dako)으로 5분 동안 대조 염색을 시행하였다. 모든 염색 과정을 마친 후 다시 수분 제거를 위해 저농도에서 고농도 알콜에 70%-90%-100%-100% 순으로 탈수 시킨 후 xylene에 7분씩 3번 세척하여 알코올을 완전히 제거하였다. 봉입한 조직표본은 Slide Scanner (Axio Scan.Z1,Germany)로 관찰하였다.

결 과

세포부착

BonMaker 시스템을 이용하여 자가치아에서 무기물을

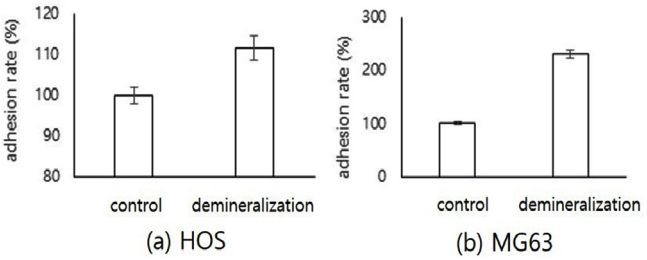

Fig. 1. Adhesion rate of HOS cell (a) and MG63 cell (b).

제거한 시편의 세포 친화성을 알아보기 위해서 먼저 세포 부착 실험을 시행하였다. HOS 세포의 부착성은 대조군과 탈무기질화군에서 각각 100%과 111%였으며, MG63 세포의 부착성은 대조군과 탈무기질화군에서 각각 100%와 231%였다(Fig. 1a, b).

세포부착형태

대조군인 치아조직에서 HOS 세포들은 표면에 잘 부착되어 세포들 바닥에 부착하기 위해 다수의 방추형태의 세포발을 뻗고 있고, 탈무기 시편에서는 세포간의 틈이 거의 없을 정도로 많은 세포들이 도포되고 발을 뻗고 있어서 굉장히 높은 부착성을 보였다. MG63 세포들은 부착된 세포 형태는 다르나 부착양상은 HOS 세포와 유사하며, 탈무기질화 시편에서 많은 세포들이 부착되어 있음을 알 수 있다(Fig. 2a, b).

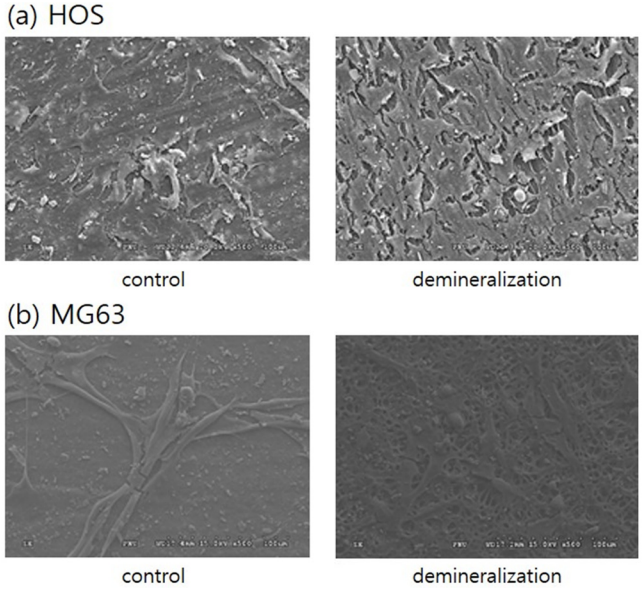

Fig. 2. (a) Attachement pattern of HOS cell (b)Attachement pattern of MG63 cell.

세포증식

HOS 세포의 증식율은 시간에 따라 치아표면에서는 100%, 148%, 215%였으며, 탈무기질화 시편에서는 110%, 132%, 193%였다.

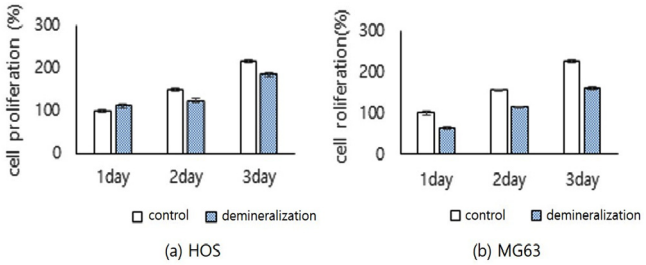

Fig. 3. Cell proliferation of HOS cell (a) and MG63 (b) cell in process of time.

MG63 세포의 증식률은 시간에 따라 치아표면에서는 100%, 155%, 225%였으며, 탈무기질화 시편에서는 63%, 114%, 160%였다(Fig. 3a, b).

광화분석

세포의 분비물의 광화정도는 HOS와 MG63 세포 모두에서 대조군에 비해 높게 나왔다. HOS 세포는 대조군에서는 100%와 탈무기질화 시편에서는 156%였다. MG63 세포는 대조군에서는 100%, 탈무기질화 시편에서는 126%였다(Fig. 4a, b).

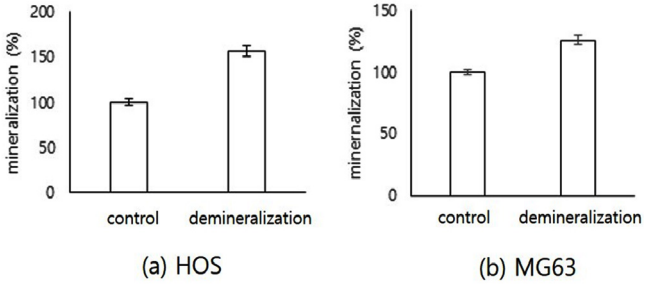

Fig. 4. Mineralizaton rate of HOS cell (a) and MG63 cell (b).

조직결과

H-E 염색

대조군 1주와 2주군에서는 신생뼈조직의 발생이 매우 약하고, 4주군부터 뼈막이 형성되며 양쪽의 뼈막 사이로 신생뼈와 혈관이 조금씩 생성되기 시작했다. 6주군에서는 결손부 전반적으로 뼈조직이 채워졌지만 여전히 정상조직에 비해 뼈기질의 양이 부족하여 두께가 얇다. 신생뼈조직 주변으로 뼈모세포가 질서 정연하게 배열되어 있으며 많은 지방조직이 두드러지게 관찰된다(Fig. 5a).

탈무기질화 자가치아이식재를 매식한 군에서는 이식재가 결손부위를 잘 채우고 있으며 이식재 주변부로 뼈조직의 전구체에 해당하는 결합조직이 치밀하게 조성되어 있다. 1주군에서는 마치 그물구조의 결합조직처럼 가는 세포질 돌기를 많이 뻗고 있는 세포들이 이식재 주

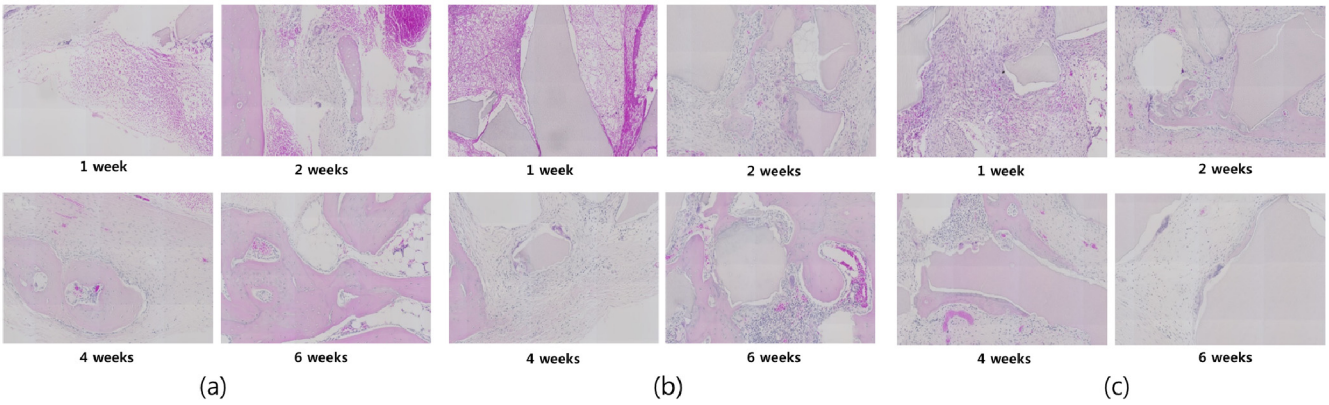

Fig. 5. H&E staining analysis. (a) control group that the bone defect was not treated with anything, (b) experimental group A that autogenous demineralized dentin matrix was grafted into the bone defect, (c) experimental group B that autogenous demineralized dentin matrix and IL-6 were grafted into the bone defect. (magnification ×50).

변부를 가득 채우고 빈 공간을 서로 이어 주고 있다. 2주군에서는 치밀한 결합조직으로 채워져 있으며, 이식재 주변부로에서부터 새로운 뼈들이 생성되며, 국소적으로 뼈침이 형성되고 있다. 4주군에서는 새롭게 만들어진 뼈조직이 상당부분 결손부위로 연장되어 있으며, 조직시편 제작 중 파우더가 떨어진 여러 자리에서 뼈파괴세포가 관찰되는 것으로 보아서 이 시기에 활성적으로 파우더의 흡수가 이루어짐을 알 수 있다. 6주군에서는 파우더 주변부를 중심으로 해서 상당히 많은 뼈기질이 결손부를 채우고 있다. 파우더 결정들의 표면에는 여러개의 함몰부와 함께 뼈파괴세포가 많이 보이고 있다. 이 근처에 1주군에 비해 2주군에서 뼈기질의 양이 증가하였으며 4주군에서 성숙한 뼈조직들이 관찰되기 시작했으며, 6주군에서는 결손부위의 대부분을 채우는 성숙 뼈조직이 많이 형성되어 있다 (Fig. 5b).

탈무기질화 자가치아이식재와 IL-6를 처리한 조직의 1주군에서는 파우더 주변부로 세포들이 밀집하여 분포하고 막뼈 발생의 초기 단계 현성을 보여주고 있다. 2주군에서는 1주군에서 관찰되었던 파우더 주변부의 밀질된 결합조직 형태는 안 보이는 대신 파우더 주변부에서 뼈조직이 생성되기 시작한다. 4주군에서는 신생뼈 조직의 발생은 느린 반면 파우더 주변부에서 다수의 뼈파괴세포들이 발견된다. 6주군에서도 신생 뼈조직 과정은 여전히 느리며 4주군에 비해 더 많은 뼈파괴세포가 발견되고 파우더 결정이 많이 흡수되어 있는 것을 관찰할 수 있다. 시간이 지남에 따라 생성되는 뼈기질 양은 더 늘어나고 있으나 뼈의 성숙도는 탈무기질화 자가치아이식재만 매식한 군에 비해 떨어진다(Fig. 5c).

Masson's trichrome 염색

대조군의 1주군에서는 신생뼈 형성은 관찰할 수 없었으며 뇌를 덮고 있는 뼈막이 보인다. 2주군 역시 신생뼈의 형성이 매우 미약하며 잔존한 뼈 근처에서 뼈침이 발견된다. 4주군에서 얇은 신생뼈조직이 생성되기 시작했으며,

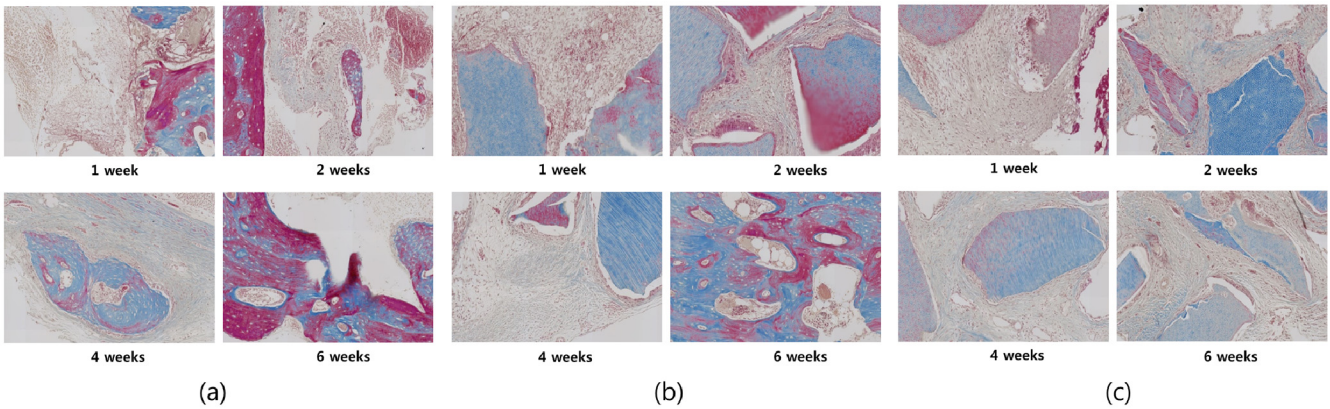

Fig. 6. Masson's trichrome staining analysis. (a) control group that the bone defect was not treated with anything, (b) experimental group A that autogenous demineralized dentin matrix was grafted into the bone defect, (c) experimental group B that autogenous demineralized dentin matrix and IL-6 were grafted into the bone defect. (magnification ×50).

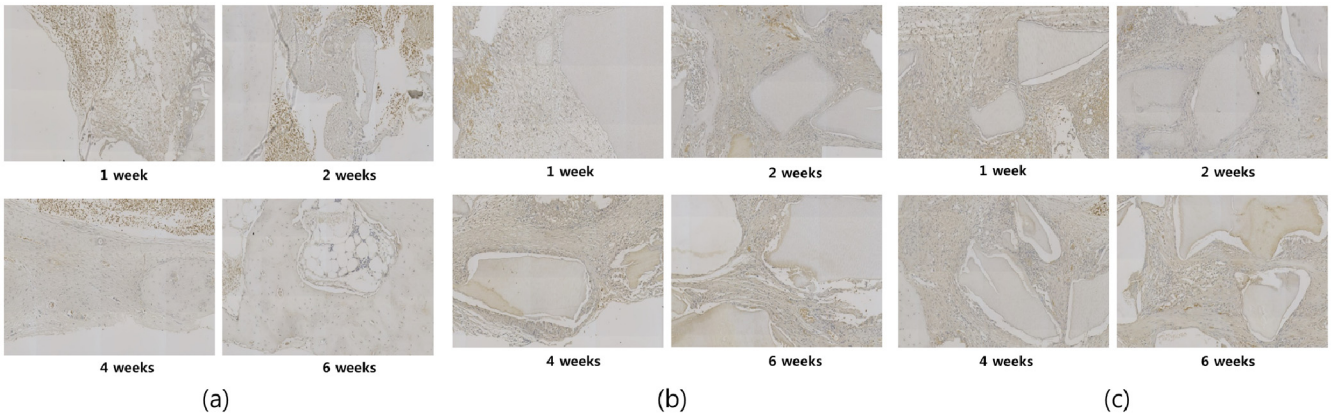

Fig. 7. Immnohistochemistry analysis for osteocalcin. (a) control group that the bone defect was not treated with anything, (b) experimental group A that autogenous demineralized dentin matrix was grafted into the bone defect, (c) experimental group B that autogenous demineralized dentin matrix and IL-6 were grafted into the bone defect. (magnification ×50).

이로 인해 콜라겐의 발현들이 많이 관찰되었고 중간 신생뼈 조직이 관찰된다. 기존 뼈조직에서도 붉은색의 신생뼈가 많이 형성되고 있다. 6주군에서는 얇은 층의 성숙뼈가 결손부위를 메우고 있으며, 광화되지 않은 신생뼈 조직이 관찰되며, 아직 콜라겐 발현이 약하다(Fig. 6a).

탈무기질화 자가치아이식재를 매식한 조직의 1주군에서는 이식재 주변으로 신생뼈 조직을 위한 치밀한 세포조직을 형성하고 있으며 아직 결합조직을 만들지 않고 있다. 2주에서는 세포들이 콜라겐을 분비하여 세포사이에 분포하고 있다. 4주군의 조직에서는 세포들이 훨씬 더 활성적으로 콜라겐을 발현하여 세포사이에 많은 양의 콜라겐이 누적되어 있다. 6주군에서는 대부분의 결손조직 얇은 층의 콜라겐으로 채워지며 신생뼈와 성숙뼈가 혼재해 있는 양상을 보이고 있다(Fig. 6b).

탈무기질화 자가치아이식재와 IL-6를 병용 처리한 조직에서는 신생뼈 조직의 양상은 탈무기질화 자가치아이식재만 처리한 군에 비해서는 상당히 떨어진다. 결손조직에서 생성되는 신생 콜라겐의 합성은 모든 군에서 발현이 약하다. 4주와 6주군에서도 콜라겐합성이 다소 증가하지만 성숙뼈의 양상은 6주군이 되어도 미약하다. 뼈파괴세포들이 많이 보이고 파우더의 흡수가 많이 된 것으로는 보이나 콜라겐의 합성은 미약하다(Fig. 6c).

Osteocalcin 면역조직화학염색

대조군 1주와 2주에서는 신생조직이 거의 생성되지 않아 OSC의 발현을 관찰할 수 없으며, 4주와 6주에서도 OSC의 발현을 관찰할 수 없었다. 갈색으로 OSC 발현을 나타내는 부위는 혈관과 적혈구세포였다(Fig. 7a).

탈무기질화 자가치아이식재를 매식한 조직에서도 전 군에 걸쳐 OSC는 신생뼈 조직에서는 발현되지 않고, 혈액과 매식된 파우더의 일부에서 발현을 관찰할 수 있다(Fig. 7b).

탈무기질화 자가치아이식재 및 IL-6를 처리한 군에서도 1주와 6주군에 걸쳐 신생뼈 조직에서 OSC의 발현은 관찰 할 수 없었다(Fig. 7c).

고 찰

구강악악면외과 영역에 있어서 자가치아이식재를 이용한 골 이식술은 이미 많은 학자들의 연구와 다양한 분야의 임상 적용을 통해서 그 효용성이 증명되었다.

자가치아이식재는 동종골 및 이종골과 비교의 대상이 아니라 자가골과 비교하여 자가치아이식재가 가지고 있는 장점인 추가적인 수술 부위가 필요 없고 발거한 자기 치아를 재활용할 수 있는 등을 고려할 때 자가골을 대체할 수 있는 대안으로 자리 잡고 있다. 더 나아가, 신생뼈 형성의 능력을 극대화하고 뼈개조 시간을 단축시키기 위해서는 자가치아이식재의 유기질과 무기질의 구성성분비율에 변화를 두는 등 다양한 시도들이 있을 수 있다.

신체의 방어체계를 제어하고 자극하는 당단백질의 총칭인 사이토카인(cytokine) 중 일부가 골 대사에 관여하며 구강악안면영역 특히, 치주질환에 있어서 염증 진행 과정에 관여하고 치주 조직의 파괴를 가속화 시키고 계속 진행되게 하는 데 있어 중요한 역할을 한다는 많은 연구[16-21]가 있어왔다. 뼈 흡수를 촉진시키는 사이토카인에는 인터루킨-1 (α와 β)[22, 23], 종양괴사인자 (α와 β)[24, 25], 형질전환생장인자[26], 혈소판유래생장인자[27], 그리고 인터루킨-6[28] 등이 있다.

그 중 인터루킨-6는 주로 국소 뼈 흡수 인자들과 반응하여 뼈형성세포에 의해 생성되며 인터루킨-6 단독으로 또는 다른 뼈 흡수 인자들과 함께 뼈 흡수를 유발한다. 인터루킨-6는 적어도 부분적으로 뼈파괴세포 수를 증가시킴으로써 뼈 흡수를 유도하는 것 같으며 Kurihara 등은 인터루킨-6는 장기간의 인간 골수 배양 실험을 통해 뼈파괴세포 유전형을 표현하는 다핵세포를 생성하며, 재조합된 인간 인터루킨-6의 활성화는 인터루킨-1β 의 유도에 의해 중재된다고 제안하였다[28]. 본 연구는 뼈파괴세포의 활성화를 촉진하는 인터루킨-6를 탈무기질화 자가치아 이식재에 병용 처리함으로써 기존의 자가치아이식재의 신생뼈 형성과 뼈 개조 속도를 보다 향상시키기 위한 목적으로 시행되었다.

본 연구는 동물실험에 앞서 탈무기질화 자가치아이식재의 세포 친화성 여부를 평가하기 위해 세포실험을 하였다. 세포와 뼈이식재의 상호작용에 대한 것이기 때문에 이식재에 대한 세포부착율과 부착형태를 살펴보았으며 아울러 자가치아이식재에 부착된 뼈세포가 잘 자라나는지를 알아보기 위해 세포생존율을 같이 살펴보았다. 나아가 본 실험이 뼈세포를 사용했기 때문에 자가치아이식재에서 잘 자란다면 뼈세포의 본연의 임무인 기질광화 능력도 좋아져야 하기 때문에 뼈 광화력 분석 검사를 시행하였다. 본 연구에서는 성장이 늦어서 관리하기가 어렵고 실험에 걸리는 시간이 길어지는 단점을 가진 정상 뼈세포 대신에 뼈모세포의 특성을 거의 그대로 가지고 있는 사람 조골세포 유사 MG63 세포와 사람 뼈육종세포주인 HOS 세포을 사용하였다. 세포 실험 결과, 예상했던 대로 아무런 처치를 하지 않았던 대조군에 비해 탈무기 파우더 형태의 자가치아이식재에서 높은 세포부착율과 더 조밀한 부착양상을 보였으며 뼈 광화 능력도 더 높게 나왔다. 이러한 결과는 자가치아이식재를 탈무기질화 하면서 노출된 콜라겐과 뼈형태형성단백질 등으로 인해 뼈세포와 더 높은 친화력을 가지게 된 것에 기인한다고 생각된다. 다만, 세포 증식율은 대조군이 탈회된 이식재보다 더 높게 나왔는데 이에 대해서는 세포에 대한 독성이 존재하지 않느냐는 의문을 제기할 수도 있다. 하지만, 탈무기질화 자가치아이식재에서도 세포의 증식은 시간이 경과함에 따라 분명 증가하는 양상을 보였으며 다른 세 가지 세포실험 결과를 함께 고려할 때 단순히 세포 증식율이 낮다고 해서 세포 독성을 가진다고 보기에는 무리가 있다고 본다. 이에 대해서는 좀 더 심도있는 분석이 필요할 것으로 사료된다.

H-E 염색을 이용한 조직소견에서 탈무기질화 자가치아이식재를 매식한 군에서 1주군과 2주군에서 결합조직이 파우더의 주변부로부터 시간의 경과에 따라 점점 더 치밀하게 채워지는 양상을 관찰하였고 4주군과 6주군에서 뼈파괴세포의 활성화가 점차 더 증가하고 뼈파괴세포들에 의해 흡수된 부분으로 성숙된 뼈조직의 관찰이 증가하는 양상을 관찰하였다. 이를 통해 우리는 탈무기질화 자가치아이식재 자체가 뼈의 결손부위를 채우고 주변의 신생뼈 형성을 잘 되도록 하는 가교 역할을 한다는 것을 확인할 수 있었다. 하지만 인터루킨-6를 병용처리한 실험군에서는 인터루킨-6가 뼈파괴세포의 활성화를 가속화 시켜 이식재의 흡수를 증가시키고 흡수된 자리에 좀 더 많은 신생뼈가 더 빠른 속도로 생성될 것이라는 우리의 예상과는 달리, 탈무기질화 자가치아이식재만 매식한 군에서 2주차에 보였던 밀집된 결합조직 형태는 보이지 않았고 4주군과 6주군에서도 점점 더 많아지는 뼈파괴세포들만 관찰될 뿐 신생뼈 조직의 발생은 탈무기질화 자가치아이식재만 매식한 군에 비해 느린 것으로 보였다. 신생뼈 조직 발생의 증거가 되는 콜라겐의 생성 정도를 더 명확하게 볼 수 있는 Messon's Trichrome 염색을 이용한 조직 소견에서도 4주군에서 6주군으로 갈수록 뼈파괴세포들에 의해 파우더의 흡수가 더 많이 되는 것은 보이지만 콜라겐의 합성은 탈무기질화 자가치아이식재만 처리한 군에 비해 현저히 떨어지는 유사한 결과가 도출되었다.

뼈바탕질을 구성하는 주요한 비콜라겐단백질[29]인 오스테오칼신(osteocalcin)은 프로트트롬빈 내에서 발견된 ɣ-카르복시글루탐산(Gla)을 포함하는 골격의 산성단백질로 뼈형성세포와 상아아세포에서만 생성된되며 혈장 내 오스테오칼신 농도는 뼈형성세포의 활성을 반영한다고 보고 있다[29]. 즉, 오스테오칼신은 뼈 특이단백질로서 실험에서 이의 발현은 뼈기질이 석회화가 진행되고 있다는 것을 반영한다는 점에서 뼈광화 및 뼈재생과 관련이 높은 것으로 알려져 있고[30] Gla화 되지 않은 오스테오칼신은 혈액으로 방출되며 이의 혈청수준은 신생뼈의 생성시 이에 대한 조직형태학적 표시자로 알려져 있다[31]. 하지만 본 연구에서는 흥미롭게도 대조군, 탈무기파우더만 적용한 실험군, 그리고 탈무기질화 자가치아이식재 및 인터루킨-6를 병용처리한 실험군 모두에서 생성된 신생뼈 조직에서 오스테오칼신의 발현은 볼 수가 없었다. 이것은 본 연구의 실험 기간이 6주간이었고 이 시기에는 석회화가 많이 된 성숙뼈 보다는 신생뼈가 대부분을 이루는 시기였다는 것과 관련이 있을 것으로 생각된다. 시간이 경과되어 뼈기질이 석회화가 되는 성숙뼈가 많이 발생된다면 오스테오칼신의 발현을 관찰할 수 있을 것으로 사료된다. 혹, 항체에 문제가 있을 수도 있다는 의구심을 가질 수 있었지만 뼈 조직 내 혈액조직에서 강하게 발현되는 것으로 보아서 항체에 문제가

있는 것은 아닌 것으로 밝혀졌다. 탈무기질화 가 이식된 막내 뼈 발생과정에서는 오스테오칼신의 발현이 관여하지 않을 수도 있을 것 같다.

이러한 결과를 비추어 볼 때, 인터루킨-6는 알려진 대로 뼈파괴세포 수를 증가시켜 뼈조직의 흡수에는 관여하지만 뼈 형성에는 긍정적인 작용을 못하는 것으로 보인다. 뿐만 아니라, 뼈 개조과정 즉, 뼈파괴세포에 의한 미성숙골의 흡수와 뼈형성세포에 의한 신생뼈생성의 순환과정 중 뼈형성세포의 기능을 떨어뜨릴 수도 있을 것이라고 생각되어진다. 본 실험은 여러 가지 문제로 인해 사람의 치아로 만든 이식재를 토끼의 두개골에 이식했다는 점에서 진정한 자가치아이식이라고 보기에는 한계가 있는 실험 디자인이지만 다행히 면역거부 반응은 일어나지 않았다. 비록, 인터루킨-6는 자가치아이식재의 골전도 능력을 촉진하여 보다 빠른 시일 내에 신생뼈 생성을 이끌어 내기 위해 이식재와 함께 첨가할 만한 싸이토카인으로 적합하지 못한 것으로 생각되지만 앞으로도 자가치아이식재의 골전도 능력을 증가시킬 수 있는 첨가재를 찾기 위한 시도는 계속되어야 할 것이다. 나아가 골개조 과정의 큰 축 중 하나인 뼈형성세포의 역할에 대해서도 관심을 가지고 뼈형성세포의 수나 활성화를 촉진할 수 있는 물질을 찾아 자가치아이식재에 첨가하는 시도 또한 필요할 것으로 사료된다.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

본 연구는 한국연구재단(과제번호NRF-2012R1A1A2003550)의 지원으로 이루어졌음.

References

1. Chung JH, Lee JH. Study of bone healing pattern in extraction socket after application of demineralized dentin matrix material. J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg. 2011;37:365-374.
2. Yeomans JD, Urist MR. Bone induction by demineralized dentine implanted into oral, osseous and muscle tissues. Arch Oral Biol. 1967;12:999-1008.
3. Gomes MF, Goulart MG. Densitometric analysis of the autogenous demineralized dentin matrix on the dental socket wound healing process in humans. Braz Oral Res. 2006;20:324-330. doi:10.1590/S1806-83242006000400008.
4. Kim SG, Yeo HH, Kim YK. Grafting of large defects of the jaws with a particulate dentin-plaster of paris combination. Oral Surg Oral Pathol Oral Radiol Endod. 1999;88:22-25. doi:10.1016/S1079-2104(99)70188-5.
5. Kim SG, Kim HK, Lim SC. Combined implantation of particulate dentin, plaster of Paris, and a bone xenograft (Bio-Oss) for bone regeneration in rats. J Cranio-Maxillofac Surg. 2001;29:282-288. doi:10.1054/jcms.2001.0236.
6. Choi DK. Kim SG, Lim SC. The effect of particulate dentin-plaster of Paris combination with/without fibrin glue in the treatment of bone defects around implants. Hosp Dent. 2007;19:120-126.
7. Kim SG. Bone grafting using particulate dentin. Key Engineering Materials. 2007;342-343:29-32. doi:10/4028/www.scientific.net/342-343.29.
8. Kim YK. Scientific evidence of autogenous teeth bone graft material: Domestic literature. Dental Success. 2009;29:718-726.
9. Kim YK. The experimental study of the implantation of toothash and plaster of paris and guided tissue regeneration using lyodura. J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg. 1996;22:297-306.
10. Kim SG, Kim S, Park JC. Maxillary sinus augmentation for dental implants-the use of a particulate dentin-plaster of paris combination with and without platelet-rich plasma. J Korean Maxillofac Plast Reconstr Surg. 2002;24:293-301.
11. Na TH, Kim SG, Yoon JH, Lim SC. Effect of the bone regeneration of the mixture of human or bovine tooth-ash and the Plaster of Paris in rats. J Korean Assoc Maxillofac Plast Reconstr Surg. 2004;26:334-340.
12. Kim SG. Bone grafting material using autogenous teeth. Daily Dental. 2010.
13. Kang DW, Kim YK. Repair of large maxillary sinus membrane perforation using a collagen membrane: retrospective clinical study. Journal of Dental Implant Research. 2017;36:1-5
14. Kim YK, Lee HJ, Kim KW, Kim SG, Um IW. Guide bone regeneration using autogenous teeth: case reports. J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg. 2011;37:142-147.
15. Ishimi Y, Miyaura C, Jin CH, Akatsu T, Abe E, Nakamura Y, Yamaguchi A, Yoshiki S, Matsuda T, Hirano T et al. IL-6 is produced by osteoblasts and induces bone resorption. J Immunnol. 1990;145:3297-3303.
16. Kabashima H, Maeda K, Iwamoto Y, Hirofuh T, Yoneda M, Yamashita K, Aono M. Partial characterization of interleukin-1-like factor in human gingival crevicular fluid from patients with chronic inflammatory periodontal disease. Infect Immun. 1990:58:2621-2627.
17. Rossomando EF, Kennedy JE, Hadjimicheal J. Tumor necrosis factor alpha in gingival crevicular fluid as a possilbe indicator of periodontal disease in humans. Arch Oral Biol. 1990:35:430-434. doi:10.1016/0003-9969(90)90205-O.
18. Jandinski JJ. Stashenko P, Fedor LS, Leuing CC, Peros WJ, Rynar JE, Deasy MJ. Localization of interleukin-1 beta in human periodontal tissue. J Periodontal. 1991;62:36-43. doi:10.1902/jop.1991.62.1.36.
19. Matsuki Y, Yamamoto T, Hara K. Interleukin-1 mRNA-

expressing macrophage in human chronically inflamed gingival tissues. Am J Pathol. 1991;138:1299-1305.
20. McFarlane CG, Reynolds JJ, Meikle MC. The release of interleukine-1β, tumor necrosis-α and interferone-ɣ by cultured peripheral blood mononuclear cells from patients with periodontitis. J Periodont Res. 1990;25:207-214. doi: 10.1111/j.1600-07 65.1990.tb00906.x.
21. Stashenko P, Jandinski JJ, Fujiyoshi P, Rynar JE, Socransky SS. Tissue levels of bone resorptive cytokines in periodeontal disease. J Periodontal. 1991;62:504-509. doi:10.1902/jop. 1991.62.8.504.
22. Thomson BM, Saklatvala J, Chamber TJ. Osteoblasts mediate interleukin-1 stimulation of bone resorption by rat osteoclasts. J Exp Med. 1986;164:104-112.
23. Akatsu T, Takahashi N, Udagawa N, Imamura K, Yamaguchi A, Sato K, Nagata A, Suda T. Role of prostaglandins in interleukin-1 induced bone resorption in mice in vitro. J Bone Miner Res. 1991;6:183-189. doi:10.1002/jbmr.5650060212.
24. Stashenko P, Dewhirst FE, Pero WJ, Kent RL, Ago JM. Synergistic interactions between interleukin-1, tumor necrosis factor and lymphotoxin in bone resorption. J Immunol. 1987;138:1464-1468.
25. Thomson BM, Mundy GR, Chambers TJ. Tumor necrosis factor-α and-β induce osteoclastic cells to stimulate osteoclastic bone resorption. J Immunol. 1987;138:775-779.
26. Tashjian AH, Voelkel EF, Lazzaro M, Singer FR, Roberts AB, Deryrick R, Winkler ME, Levine L. α and β transforming growth factors stimulate prostaglandin production and bone resorption in cultured mouse calvaria. Proc Natl Acad Sci USA. 1985;82:4535-4538.
27. Tashjian AH, Hohmann EL, Antoniades NH, Levin L. Platelet derived growth factor stimulates bone resorption via prostaglandin mediated mechanism. Endocrinology. 1982; 111:118-124. doi:10.1210/endo-111-1-118.
28. Kurihara N, Bertolini D, Suda T, Akiyama Y, Roodman GD. Interleukin-6 stimulates osteoclast like multinucleated cell formation in long term human marrow cultures by inducing IL-1 release. J Immunl. 1990;144:4226-4230.
29. Jo YW, Min WK, Park CJ, Ji HS. The clinical usefulness of biochemical markers of bone formation in patients with multiple myeloma. Annals Lab Medicine. 2005;25:285-289.
30. Kang YH, Encyclopedia of life science. Academy. 2014.
31. Yoshikawa Y, Peel SA, Gladstone JR, Davies JE. Biochemical analysis of the response in rat bone marrow cell cultures to mechanical stimulation, Biomed Mater Eng. 1997;7:369-377.