

Efficiency Evaluation of Irradiated on Mouse Calvarial Model by BMP-2

Hongmoon Jung

Department of Radiological Science, Daegu Health College

Received: September 23, 2019. Revised: October 28, 2019. Accepted: October 31, 2019

ABSTRACT

Radiation-therapy causes the adverse radiation effect. It is called osteoradionecrosis. A protein-therapy is carried out in order to cure osteoradionecrosis. The typical method of the protein-therapy is using BMP-2. Considering to bone damage, it is more important that maintains enough to circumstance regeneration for osteoblast differentiation on damage site of bone. Thus, this study is on a tissue regeneration to cure radiation critical damage. I observed that the formation of new regeneration bone by injection of collagen sheet BMP-2 on irradiated mouse. Consequently, I examined new bone formation with collagen sheet BMP-2 on irradiated mouse after 8weeks. Therefore I suggested that using collagen sheet BMP-2 which can be good for new bone regeneration effect on radiation side effect area.

Keywords: irradiated mouse head, radiation bone damage, bone morphogenic protein-2, osteoradionecrosis

I. INTRODUCTION

방사선 치료는 암의 외과적 수술 후 잔존할 수 있는 세포단위 수준의 암을 사멸함과 동시에 암의 전이를 막기 위해 방사선 조사가 시행된다. 최근 통계적 연구에 따르면 미국 인구의 3.5%가 암환자로 구성되어 있으며 이들은 방사선 치료요법을 통하여 생존율을 증가시키고 있는 것으로 보고되었다.^[1-3] 그러나 방사선 조사 후에는 다양한 부작용들이 발생된다. 세포 수준으로는 연부조직(Soft-tissue)의 섬유화(Fibrosis)와 세포괴사(Cell necrosis) 및 혈관조직에 복합적인 문제를 발생시켜 Hypocellular, Hypoxic, Hypovascula 등의 부작용 결과가 나타난다. 이러한 복합적인 원인으로 골의 괴사 (Osteoradionecrosis: ORN)가 발생된다.^[2-4] 골의 괴사가 발병된 환자의 대표적인 치료법은 외부로부터의 골조직 이식 (Autologous bone graft)을 시행하게 된다. 하지만 뼈의 이식 방법은 병적으로 확인되지 않은 이식 골을

사용하게 됨으로써 환자인 수여자(Patient donor)에게 미생물학적 오염 (Microbiological contamination)이 발생할 수 있게 된다. 이런 문제점들에 극복을 위해서는 골의 괴사환자 몸에서 자가 적으로 뼈의 재생을 유도하는 것이 최적의 재생방법이할 수 있다.^[3-5]

현재 골 재생을 위해 환자의 몸에 골조직 대체지체 물질과 재생유도 단백질을 혼합하여 사용하는 치료법이 대두되고 있다. 대표적인 사이토카인 (Cytokines)의 종류인 골형성단백질체 집단(Bone morphogenetic proteins:BMPs), 인슐린 성장인자체 (Insulin-like growth factor: IGFs), 형질전환 성장인자체 (Transforming growth factors: TGFs), 섬유세포 성장 인자체 (Fibroblast growth factor: FGFs) 등을 인체에 직접 삽입시켜 파괴된 골부위의 새로운 골 재생 조직을 원활하게 만들어 줄 수 있도록 시도하고 있다. 이러한 사이토카인들의 특징은 줄기세포와 선구유도세포의 분화와 증식에 관련이 되어있으며 또한 새로운 조직 재생에 도움을 준다고 보고

* Corresponding Author: Jung hong-moon

E-mail: redmoon74@dhc.ac.kr

Tel: +82-53-320-4523

811

Address: Daegu Health College, 15[Taejeon-Dong] youngsong-ro, buk-gu, Daegu, 702-722, Republic of Korea

되어있다.^[7-10] 특히 이중에서도 골 형성 단백질 종류 (BMPs)의 계열인 BMP-2는 혈관형성을 유도하며 골 형성 줄기세포 (Mesenchymal stem cells)를 골유도 (Osteogenic) 세포로 분화 및 촉진시켜 이소성골과 동소성골 형성에 기인한다고 알려져 있다.^[7-10] 따라서 이번 연구에서는 쥐 두정부상에 방사선장해를 유도한 후 BMP-2를 콜라겐에 흡수시킨 지지체 (Scaffold) 를 쥐 두개골 모델에 편입하여 골의 재생 효과를 검증하고자 하였다. 따라서 쥐를 사용한 방사성골괴사 모델을 인위적으로 만든 후 콜라겐과 BMP-2를 혼합 처리하면 골의 재생의 효과가 발생할 수 있는지와 BMP-2의 효과 발현 시기에 관한 유용성검증을 하고자 한다.

II. MATERIAL AND METHODS

1. 쥐 두개골 조사 모델 구현

경북대학교 실험동물 승인된(KNU 2014 - 149) 7주령(Female)된 쥐(C57BL/4, total n=8)에 케타민 (100 mg/ 100 kg)과 자알라진 (5 mg / 100 kg)로 5대 1로 혼합한 주사로 마취를 시행하였다. 마취된 쥐 두정부 부위에만 한정하여 방사선 조사를 시행하였다. 쥐의 몸은 납(두께: 20 mm)판으로 차단하였다. 방사선 조사장비는 소형디지털 X-선 펌프장비인(Model CP:160 Faxitron.Arizona ,SA)을 사용하였다. 선원과 피사체의 거리는 12 inch로 설정하였으며 엑스레이 조사 조건은 40 kVp, 3 mA를 5분씩 6회 조사하였다. 방사선 조사량의 계산법은 펌프회사에서 제공하는 방사선량에 표시되어있는 조사선량단위 렌트겐(R)을 흡수선량의 그레이 (Gy)로 환산하여 계산하였다. 수치 계산 결과 약 4 Gy 로 예상된다. 방사선 조사 2 주 후 쥐 두정부에 핸드피어스를 사용하여 내경 (4 mm)의 골 결손 조직을 만든 후에 대조군에는 아무것도 편입하지 않은 콜라겐 지지체만 삽입하고 실험군에는 BMP-2가 편입된 콜라겐 지지체를 삽입한 후 8 주 후 각각 쥐를 이산화탄소(CO₂)로 희생시킨 후 분석하였다.

2. 콜라겐 지지체의 제조

콜라겐용액 (Collagen type I:BD,USA ,HEPES , 1N NaoH, HBSS) 을 제조한 후에 콜라겐 용액의 최종 BMP-2(Daewoong Pharmaceutical company:Seoul, Republic of Korea) 농도가 1 ug/ml이 되도록 만들었다. 이 용액을 페트리디쉬 (Corning® Costar® Sigma-Aldrich)에 2 ml 를 뿌려준 후에 37°C 인큐베이터에 12시간 (hr) 인큐베이션 한 후 -40°C 냉장고에 12시간 (hr) 보관 후 동결건조기를 사용하여 지지체를 제작하였다. 콜라겐 지지체의 두께는 캘리퍼로 측정하여 500 μm로 고정하였다.

3. 마이크로 시티의 분석

마이크로시티 (Skyscan,1172, kontich, belgium)을 이용하여 새로 만들어진 골을 분석하였다. 마이크로 시티의 해상력은 1장당 17.09 μm의 두께의 절편으로 되어있으며 픽셀의 크기는 2.5 μm로 고정하였으며 촬영조건은 50 kVp ,200 μA, 노출시간은 1.2 s, 회전각도는 180도를 유지하여 촬영하였다. 3차원 분석프로그램을 사용하였다. (CT analyzer software : CTAN, Skyscan) 또한 각각의 샘플의 퍼센트 볼륨 (Percent bone volume : mm³), 치밀골의 두께 (Trabecular thickness : μm), 치밀골의 수 (Trabecular number : 1/mm)를 측정하였다.

4. 소프트 엑스레이의 분석

적출된 쥐 칼바리아를 펌프장비(Model CP: 160 Faxitron, Arizona, USA)를 사용하여 엑스레이 노출 조건인 200 kVp, 2 mA, 20 s, 거리 0.2 m로 촬영하였다. 촬영된 디지털 엑스레이 이미지를 결과를 그레이 스케일의 단위인 image J 프로그램을 사용하여 분석하였다.

5. 조직의 분석

알데하이드(paraformaldehyde) 4% 파라포름 용액으로 고정시킨 후에 쥐 칼바리아를 EDTA에 1주간 탈회시킨 후 파라핀 블록에 고정 시킨 후 마이크로톰을 사용하여 두께 10 μm 크기로 박편후 트라이크롬 염색(Trichrome staining)을 시행하였다. 캐논 광학현미경을 통하여 1배율, 10배율로 촬영하여 골

조직이 새롭게 형성된 영역을 측정하였고 프로그램은 i-Solution software (Microscope Technology, Korea)을 사용하여 이미지를 분석하였다.

6. 전자현미경 사진

전자현미경(SEM, JSM-6700F, Jeol, Tokyo, Japan)은 SEI 0.5 kVp의 조건으로 촬영하였으며 각각 1,000배와 10,000배의 배율로 촬영하였다.

7. 통계적 분석

분석한 데이터는 평균에 ± 표준편차를 표시하였으며 통계적 유의 검사인 Tukey's post-hoc test에 의한 ANOVA test를 시행하여 유의성 결과인 P value가 0.05 이하인 것이 통계적으로 유효한 결과로 측정하였다. 통계프로그램은 SPSS PC 10 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 사용하였다.

III. RESULT

Fig. 1은 콜라겐으로 제작된 지지체를 전자 현미경 촬영하여 결과를 얻었다. 전형적인 콜라겐 형태의 네트워크 구조를 볼 수 있으며 세포가 착상이 잘 될 수 있는 다공성의 형태도 볼 수 있다.

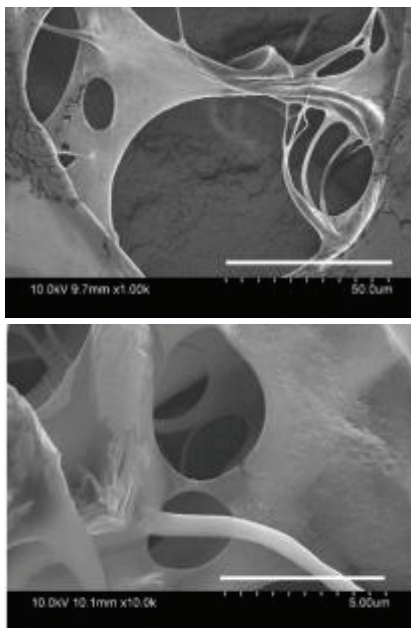
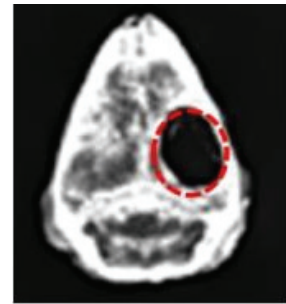
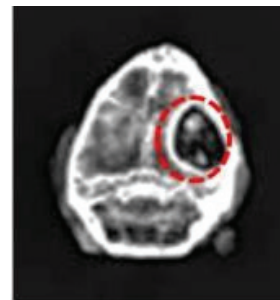


Fig. 1. SEM images of the collagen scaffold(left 1,000X magnification and Right 10,000X magnification).

Fig. 2는 8주 후 쥐를 희생한 후 칼바리아를 적출하여 엑스레이를 촬영한 후 이미지 J를 통해 분석하였다. 위 그림은 희생된 쥐 각각의 군에서 1마리씩만 촬영한 대표 엑스레이 사진이다. 레드 라운드에서 흰색의 방사성 불투과(Radio-paque)의 결과가 8주 지난 쥐 두개골 결손 상에서 더 많이 관찰됨을 볼 수 있다.



Control



**8weeks
BMP2/Collagen matrix
(Conc.1ug/ml)**

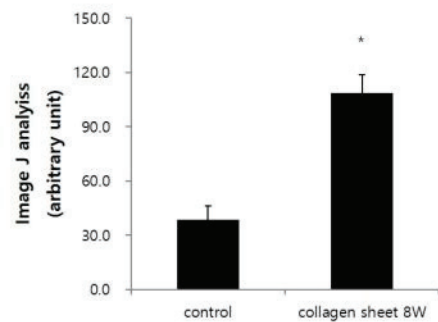


Fig. 2. Results of Soft digital X-ray applied to image J analysis program, s.ignificant inter-group difference to the other group (p < 0.05).

아울러 Fig. 2 아래 그림 데이터는 각각 군의 4마리씩 쥐 두정부 결손 부위인 레드 라운드 내에 방사성 불투과 물질을 검출하여 이미지 J를 통해 분석하였다. 이 결과도 8 주 후에 방사성 불투과 물

질이 많이 측정됨을 알 수 있었다.

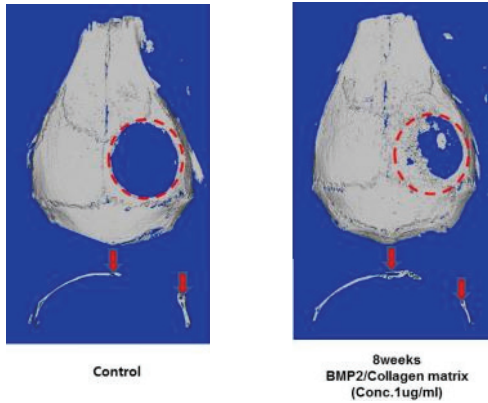


Fig. 3. Results of μ CT evaluation of bone regeneration in the mouse calvarial defected model.

Fig. 3에서는 8 주후 희생된 쥐 두개골 결손부위를 마이크로 시티로 분석한 그림이다. 왼쪽 콜라겐 단독 삽입보다는 오른쪽 콜라겐이 편입된 BMP-2 군에서 골의 재생이 더 많이 형성되는 결과를 나타내었다.

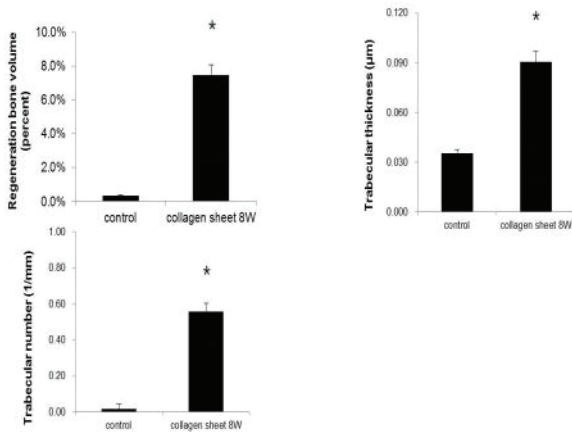


Fig. 4. Results of μ CT evaluation of bone regeneration in the mouse calvarial defected model. *Significant inter-group difference to the other group ($p < 0.05$)

Fig. 4 에서는 마이크로 시티의 결과로 대조군과 실험군의 퍼센트 볼륨 (Percent bone volume : mm^3), 치밀골의 두께 (Trabecular thickness : μm), 치밀골의 수 (Trabecular number : $1/\text{mm}$)를 측정하여 수치화 하였다. 이 결과도 8 주후 콜라겐과 BMP-2가 함께 처리된 쥐의 군에서 신생골의 재생 결정

인자인 퍼센트 볼륨, 치밀골의 두께, 치밀골의 수의 측정 결과가 높음을 알 수 있었다.

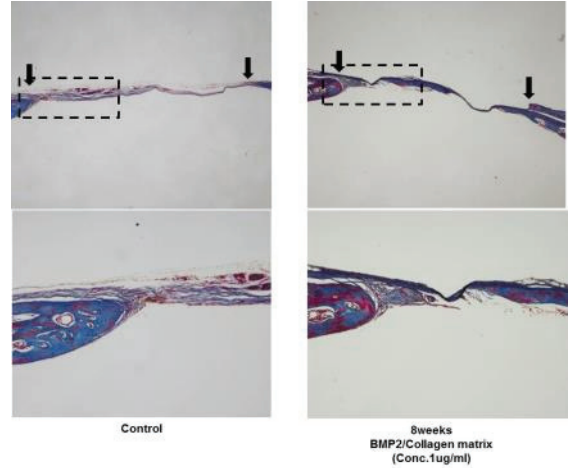


Fig.5. Histological findings of the calvarial specimen. Trichrome staining. Low ($\times 10$) and high magnification ($\times 1$).

Fig. 5 는 트라이크롬 염색의 그림으로 좌측 콜라겐만 삽입된 쥐의 군 결과보다 우측 콜라겐과 BMP-2를 함께 처리한 쥐 군이 상대적으로 골 재생에 효과가 발생됨을 볼 수 있었다. (검은색 화살표는 인위적으로 만든 쥐의 두정부 결손부위임)

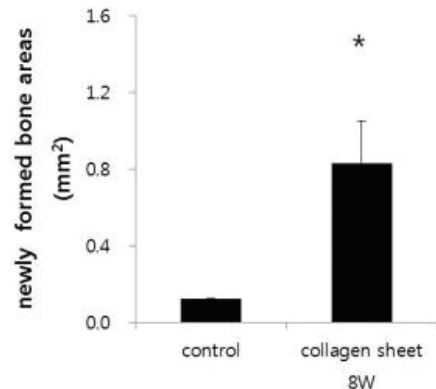


Fig.6. Analysis of new bone formation area from histological specimens. *Significant inter-group difference to the other group ($p < 0.05$)

Fig. 6 은 i-Solution software (Microscope Technology, Korea)을 사용하여 이미지의 면적을 분석한 결과로 이 결과 또한 콜라겐과 BMP-2를 함께 처리한 쥐 군이 골 형성이 영역이 많은 결과를 얻을 수 있었다.

IV. DISCUSSION

쥐 칼바리아 방사선 조사 모델은 방사선 조사 후에 2 주간의 후반 적응기(Postoperatively) 경과 후에 외과적 결손모델을 구현하였다. 왜냐하면 방사선 조사 후 2 주 동안은 쥐 두정부 내의 골유도 선도 인자(Osteoinductive)들의 능력이 최저치로 떨어져 있고 조골세포, 골세포, 조혈모줄기세포, 세포성장 단백질 등이 본질의 역할을 하지 못하는 방사선 저항기 기간이 발생되기 때문이다.^[6,7] 따라서 이 기간이 경과 후에 BMP-2가 편입된 콜라겐 지지체를 결손부위에 이식하였다. 또한 쥐 두정부 선량의 결정은 치료 방사선량에 있어서 사람의 경부 암 치료의 목적인 경우에는 60 Gy를 조사하게 되며 큰 쥐 (rat 계열)의 경우에는 12 Gy의 방사선량을 조사하게 된다. 이는 조사대상이 중량과 관련이 있기 때문이다. 큰 쥐(Rat) 6주령 몸무게는 평균적으로 0.15 kg, 반면 작은쥐(Mouse)의 몸무게는 평균 0.01 kg 이다. 따라서 이러한 무게를 고려하여 이번 실험의 쥐 방사선량은 약 4 Gy로 정하였다.^[12,13] 최근의 조직공학 기술은 암에 의한 뼈 제거 부분에 콜라겐 계열에 골재생 유도단백질을 편입하여 골재생 극복에 효과를 기대하고 있다. 콜라겐 단백질의 도메인 구조는 프롤린 (proline-Gly-X-Y)의 알파 나선형 펩타이드 구조로 되어있다. 그리고 글라이신 (Gly-X-Y)_n의 잔기를 가지며 반복적인 삼중펩타이드 서열로 1000개 이상의 아미노산 구조로 구성되어 있다. 또한 콜라겐은 세포외기질에서 가장 만연하게 볼 수 있으며 또한 골이나 건 (Tendon)에서 가장 많이 관찰된다. 더 나아가 콜라겐은 세포외기질의 구조를 형성하는 필수적인 성분으로서 새로운 조직의 형성과 세포내의 대사작용에 작용한다. 그리고 각종 재생조직의 구조형성에 결정적인 역할을 한다. 이러한 원인으로 콜라겐은 조직공학적으로 많이 사용하게 된다. 그리고 BMP-2는 골선구유도세포 (Progenitor cells) 및 조골세포의 증식과 분화를 촉진시켜 파괴된 골 조직 재생을 촉진시킨다는 결과가 보고되어져 왔다.^[7-11] 하지만 방사선 골괴사 영역에서는 BMP-2가 정확히 어떠한 효과 있는지 알려진 바 없고 방사선 골괴사 조직에 편입 시 효과에 따른 시간적인 발현시기에 관한 연

구가 아직 부족하다. 따라서 이번 연구에서는 콜라겐 지지체에 BMP-2를 편입하여 골 재생효과와 유용성 시기를 검증하고자 하였다. 실험결과에 따르면 디지털 엑스레이 결과 및 마이크로 시티 결과와 조직분석에서 모두 8주 경과 후에 BMP-2의 효과의 유용성이 급격하게 증가하는 결과를 얻었다.

만일 방사선을 조사하지 않은 쥐 두개골 결손부위에 BMP-2를 처리하면 짧게는 2-3주부터 골 재생효과가 발생하지만^[7,8] 반면 방사선에 노출된 쥐의 경우는 4주 이내에는 급격한 골 재생결과를 얻지 못하였다. 그러나 8주가 지나면 BMP-2로 인한 골재생의 유의한 결과를 얻을 수 있었다.

V. CONCLUSION

콜라겐에 BPM-2가 편입된 지지체는 적절하게 사용하면 방사성골괴사 부위에 골 재생에 효과적으로 사용할 수 있을 것으로 예측된다. 더 나아가 방사성골괴사 조직에서 콜라겐에 BPM-2가 편입된 지지체의 골재생 효과는 단시간 보다는 8주 이상의 시간이 경과 후 골 재생효과를 기대해야 할 것으로 사료된다.

Reference

- [1] F. Jegoux, O. Malard, E. Goyenville, E. Aguado, G. Daculsi, "Radiation effects on bone healing and reconstruction: interpretation of the literature," *Oral surgery, oral medicine, and oral pathology*, Vol. 109, No. 2, pp. 173-184, 2010.
- [2] O. R. van, H. D. Thames, A. W. Konings, J. D. Down, "Radiation dose-fractionation and dose-rate relationships for long-term repopulating hemopoietic stem cells in a murine bone marrow transplant model," *Radiation Research*, Vol. 136, No. 1, pp. 118-125, 1993.
- [3] Z. Wang, W. Qiu, W.M. Mendenhall, "Influence of radiation therapy on reconstructive flaps after radical resection of head and neck cancer," *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, Vol. 32, No. 1, pp. 35-38, 2003.
- [4] K. K. Wurzler, T. L. DeWeese, W. Sebald, A. H. Reddi, "Radiation-induced impairment of bone healing

can be overcome by recombinant human bone morphogenetic protein-2," *Journal of Craniofacial Surgery*, Vol. 9, No. 2, pp. 131-137, 1998.

- [5] B. Nussenbaum, R. B. Rutherford, P. H. Krebsbach, "Bone regeneration in cranial defects previously treated with radiation," *Laryngoscope*, Vol. 115, No. 7, pp. 1170-1177, 2005.
- [6] W. W. Hu, B. B. Ward, Z. Wang, P. H. Krebsbach, "Bone regeneration in defects compromised by radiotherapy," *Journal of Dental Research*, Vol. 89, No. 1, pp. 77-81, 2010.
- [7] C. Kirkby, E. Ghasroddashti, A. Kovalchuk, B. Kolb, O. Kovalchuk, "Monte Carlo-based dose reconstruction in a rat model for scattered ionizing radiation investigations," *International Journal of Radiation Biology*, Vol. 89, No. 9, pp. 741-749, 2013.
- [8] I. N. Springer, P. Niehoff, Y. Acil, M. Marget, A. Lange, P. H. Warnke, et al, "BMP-2 and bFGF in an irradiated bone model," *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, Vol. 36, No. 4, pp. 210-217, 2008.
- [9] L. Rivina, R. Schiestl, "Mouse models for efficacy testing of agents against radiation carcinogenesis - a literature review," *International Journal of Environmental Research and Public Health*, Vol. 10, No. 1, pp. 107-143, 2012.
- [10] J. D. Wernle, T. A. Damron, M. J. Allen, K. A. Mann, "Local irradiation alters bone morphology and increases bone fragility in a mouse model," *Journal of Biomechanics*, Vol. 43, No. 14, pp. 2738-2746, 2010.
- [11] H. M. Jung, J. E. Lee, S. J. Lee, J. T. Lee, T. Y. Kwon, T. G. Kwon, "Development of an experimental model for radiation-induced inhibition of cranial bone regeneration," *Maxillofacial Plastic and Reconstructive Surgery*, Vol. 40, No. 1, pp. 1-8, 2018.
- [12] I. W. Dimery, W. K. Hong, "Overview of combined modality therapies for head and neck cancer," *Journal of the National Cancer Institute*, Vol. 85, No. 2, pp. 95-111, 1993.
- [13] K. Muller, K. V. Meineke, "Advances in the management of localized radiation injuries," *Health*

전리방사선이 조사된 쥐의 두개골상의 BMP-2 효용성 연구

정홍문

대구보건대학교 방사선과

요 약

암 환자의 방사선 치료는 환자의 생존 수명을 연장하기 위해 사용한다. 그러나 방사선 조사 후 피폭으로 인해 정상적인 조직 재생은 치명적인 장애를 수반한다. 방사선 치료 후 발생 할 수 있는 장애는 골세포와 골대사 메커니즘에 결정적인 방사선 장애를 수반하여 방사성골괴사가 발생된다. 따라서 방사성골괴사를 극복하기 위해 방사선 장애의 극복을 위한 조직재생의 연구가 필수적으로 대두된다. 이번 연구에서는 골재생의 대표적인 사이토카인 단백질인 BMP-2가 방사성조사 쥐 두개골 모델에서 골재생의 효과가 있는지 또한 몇 주부터 골재생 효과가 많이 발생되는지를 검증하고자 하였다. 결론적으로 방사선이 조사된 쥐의 두개골 결손모델에서는 8주가 지나야 BMP-2의 효과가 더욱더 효과적으로 발생하는 결과를 얻을 수 있었다. 만일 BMP-2 가 처리된 지지체를 방사성골괴사 치료제로 사용한다면 단시간에 골 재생 효과를 기대하는 것보다는 8주 이상의 시간이 경과 후 골재생 효과를 기대해야 할 것으로 사료된다.

중심단어: 전리방사선 쥐 모델, 골 형성 단백질, 방사선 장애극복, 방사성골괴사

연구자 정보 이력

	성명	소속	직위
(단독저자)	정홍문	대구보건대학교 방사선과	교수