

표지

논문제목

가토 하악골에서 신연 골형성술시 제 I형 및 II형 교원질의 발현

Expression of type I, type II collagen on distraction osteogenesis in the rabbit mandible

저자

강대실, 지유진*, 송현철*

Dae-Sil Kang, Yu-Jin Jee*, Hyun-Chul Song*

소속기관

가톨릭대학교 임상치과학대학원 구강악안면외과학과

가톨릭대학교 성빈센트병원 치과 구강악안면외과*

Department of Oral & Maxillofacial Surgery, Graduate School of Clinical Dental Science, The Catholic University of Korea

Division of Oral & Maxillofacial Surgery, Department of Dentistry, St. Vincent's Hospital, The Catholic University of Korea*

교신저자

지유진

442-060 경기도 수원시 팔달구 지동 93 가톨릭대학교 성빈센트병원 치과

Yu-Jin Jee

Department of Dentistry, St. Vincent's Hospital, The Catholic University of Korea, 93 Chi-Dong, Paldal-Ku, Suwon 442-060, Korea

Tel: 82-31-249-7670 Fax: 82-31-258-3352

E-mail: omsjyj@kornet.net

별책부수

30부

공지사항

1. 본 연구는 2003년도 가톨릭대학교 성빈센트병원 임상의학 연구비 지원에 의해 이루어졌음.
2. 본 연구에 사용된 신연장치 제작을 위하여 도움을 주신 (주)제일메디칼코퍼레이션 사에 감사드립니다.

초록

Expression of type I, type II collagen on distraction osteogenesis in the rabbit mandible

Dae-Sil Kang, Yu-Jin Jee*, Hyun-Chul Song*

*Department of Oral & Maxillofacial Surgery, Graduate School of Clinical Dental Science,
The Catholic University of Korea*
*Division of Oral & Maxillofacial Surgery, Department of Dentistry, St. Vincent's Hospital,
The Catholic University of Korea**

The purpose of this experiment was to examine the histological changes and the pattern of expression of type I, II collagen in the elongated area by distraction osteogenesis in the rabbit mandible. Sixteen rabbits weighing 2.5kg-3kg were used for this experiment. Experimental group was distracted at the rate of 0.7mm, twice/day for 7days, and control group was only osteotomized. After 5 days latency, osteotomic site is distracted for 7days. Consolidation period is 28days. The animal was sacrificed at the 3rd, 7th, 14th, 28th day after the operation. The distracted bone was examined by histological analysis and RT-PCR analysis. The results were summarized as follows:

1. Experimental group was observed that the gaps between the distracted bone edges were occupied by new bone.
2. Expression of Type I collagen were detected throughout the experiment in both groups and Expression of Type I collagen were markedly increased during distraction and consolidation period in experimental group than control group.
3. Expression of Type II collagen were detected throughout the experiment in both groups and expression of Type II collagen were maintained at high level during distraction and consolidation period in experimental group than control group.

From these results, in contrast to type II collagen, type I collagen seemed to be more expressed by mechanical stimuli during distraction and consolidation period. The predominant mechanism of new bone formation in the distraction gap was intramembranous bone formation, but some of the regenerated bone was formed by endochondral ossification.

Key words: **distraction osteogenesis, type I collagen, type II collagen, histological analysis, RT-PCR analysis**

본문

I. 서론

신연 골형성술(distraction osteogenesis)은 Codivilla¹가 점진적 신연에 의해 사지 신장을 처음으로 보고한 이래 Ilizarov^{2,3}에 의해 이론적으로 정립되었고 이후 이 술식은 정형외과영역에서 사지신장에 널리 이용되었다. Ilizarov가 개발한 새로운 골신장술을 악골에서도 적용하기 위해 개의 하악골을 대상으로 한 실험이 Snyder⁴에 의해 이루어졌고 그 적용 가능성이 밝혀지게 되었다. 그 후 Costantino⁵에 의해 하악골의 연속성이 상실된 결손부의 재건에 골신연술을 이용한 실험보고가 있었다. McCarthy⁶은 하악골 왜소증 환자에서 18-24mm의 하악골 신장에 대한 첫 임상증례를 보고하였는데 이후 많은 실험적, 임상적 연구들을 통하여 악안면 영역에서도 신연 골형성술이 기존의 골 재건술 및 성형술을 대체할만한 유용성이 있다고 증명되었다^{7,8}. 신연 골형성술은주위 연부조직에 최소한의 손상을 주면서 골절제를 시행하고 골의 고정 기구로 골절편을 점진적으로 신연시킴으로서 신연 간격에 신생골이 유도 되도록 하는 방법이다.

골은 광화된 특수 결합 조직으로서 33%가 유기기질로 되어 있으며, 이 중 28%는 제 I형 교원질이고 나머지 5%는 osteonectin, osteocalcin 등과 같은 비교원성 골기질 단백질로 되어있다. 최근의 연구에 의하면, 신연 골형성시에 세포외 기질분자의 발현이 촉진된다고 보고 되었다⁹. 이 중 세포외 기질의 주요 구성 성분인 교원질은 골형성에 중요한 역할을 담당하는데 제 I형 교원질은 골 조직, 피부, 건등에서 발견되며 골형성에 중요한 기능을 수행하고 제 II형 교원질은 연골조직에서 특이하게 발견된다. 사지골의 성장은 연골내 골형성에 의해 생성되며 악골 성장은 주로 막내골화에 의해 형성이 된다고 보고되었다¹⁰. 임순모¹¹은 성견 하악골체부 신연후 조직학적 검사 및 면역조직화학적 검사를 하여 골신연부위에 제 I형 교원질이 광범위하게 발현된 것을 보고하였고 그러므로 신연 골형성술시 주된 골형성 과정이 막내골 형성이라고 보고하였다. 그러나 신연 골형성술시 제 I, II 형 교원질의 발현차이를 분자생물학적으로 연구한 논문은 많지 않고 또한 골형성시 막내 골화 뿐 만아니라 연골내 골화과정도 관찰되기도 한다. 이에 본 실험은 가토 하악골에서 신연 골형성술시 신연되는 부위에서 일어나는 골형성 과정을 시기별로 관찰하고, 가장 풍부한 골기질 성분인 제 I, II형 교원질의 발현 양상을 Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction(RT-PCR) Analysis 방법으로 관찰하여 신연 골형술시 제 I형 및 제 II형 교원질의 발현 차이를 분석하는 것을 목적으로 하였으며 이를 통해 골형성 기전을 규명하고 향후 신연 골형성술에서 진행될 분자생물학적 연구를 위한 기초자료로 활용하고자 한다.

II. 대상 및 방법

1. 대상

체중 2.5kg - 3kg의 가토 16마리를 암수 구별없이 실험동물로 사용하였으며 실온에서 동물용 고품사료와 물을 이용하여 일정기간 사육하였고 예비실험을 시행하여 가토의 하악골을 채취하고 정상 해부학적 구조를 인지하여 골절제부와 골신장부, 신연기 위치등을 설정하였다. 신연장치는 360° 회전엔 0.7mm, 최대 6.5mm까지 신장가능한 Mini stainless steel skeleton - type expansion screw(Dentaurum, Germany)을 레진포매하여 자체 제작하였고 신연기를 골면에 고정하기 위하여 Mini titanium screw(2.0 x 18mm, (주)제일메디칼코퍼레이션, 한국) 2개를 이용하였다(Fig. 1).

2. 방법

1) 실험

골절제만 시행한 대조군(C군, n=8)과 신연 골형성술을 시행한 신연군(E군, n=8)으로 나누어 실험하였다. 술 전 8시간 금식을 시행하고 전신마취를 위하여 Ketamin(Ketalar, 유한양행, 한국) 30mg/kg와 Xylazine(Rompun, 바이엘코리아, 한국) 10mg/kg를 혼합하여 근육주사 하였다. 가토를 앙와위로 고정하고 양측 하악 하연부를 제모한 뒤 베타딘 용액으로 소독하고 국소마취와 지혈 목적으로 1:100,000 epinephrine을 함유한 2% lidocaine(유한양행, 한국)을 피하주사 하였다. 하악 하연부를 절개하고 층별 박리를 통해 하악골을 노출시킨 후 소구치 전방부에서 이공을 통해 나오는 이신경을 확인하고 조심스럽게 견인하였다. 신연군에서는 소구치 전방과 이공 사이에 골절제부를 설정한 후 신연장치를 2개의 나사로 고정시켜 위치를 확인한 다음 장치를 제거하고 저속 치과용 절삭기구로 피질골 절제술을 시행하였다. 수질강내에 있는 하치조신경혈관다발의 손상에 주의하여 치즐을 이용하여 완전 골절제를 시행하고 골의 가동성을 확인한 다음 신연장치를 재위치 시켰다. 반대측도 같은 방법으로 수술하고 생리식염수로 깨끗이 세척한 뒤 3-0 흡수성 봉합사와 비흡수성 봉합사로 층별 봉합하였다(Fig. 2). 대조군에서는 같은 방법으로 소구치부와 이공사이에서 골절제를 시행 후 골가동성을 확인하고 금속판과 길이 4mm의 나사를 이용하여 골절단부 고정을 시행하였다. 모든 실험동물은 술 후 감염예방과 저작곤란으로 인한 영양결핍을 방지하기 위하여 3일간 Gentamycin(겐타마이신, 대성, 한국) 0.2mg/kg과 Becom(비콤씨, 대성, 한국) 2ml/1회 을 근육 주사하였다.

신연군에서 골신연은 골절단과 장치고정 후 5일간의 잠복기를 두어 골절단부의 재혈관화와 염증의 소실 및 일차성 가골형성을 도모한 후 신연군에서는 0.35mm씩 12시간 마다 (0.7mm/day) 신연을 시행하여 7일 동안 총 4.9mm의 신연량을 얻도록 계획하였으며, 술 후 최장 28일 까지 경과를 관찰하기로 하였다. 잠복기, 신연 초기, 경화 초기, 경화 말기에 해당되는 3일, 7일, 14일 및 28일에 각 실험군에서 2마리씩 희생시켰으며 좌측 신연골부는 조직검사에 사용하였으며 우측 신연골부는 RT-PCR 분석에 사용하였고 조직표본은 신연기 고정에 사용된 2개의 나사 내측을 절단하여 신연 골형성부와 정상 인접 골부가 모두 포함되도록 채취하였다(Table 1). 대조군에서도 골절부와 인접 정상골이 모두 포함되도록 조직표본을 채취하였다.

2) 육안적 검사

신연장치 장착 후 가토의 사료 습식상태, 신연부위 및 장치 장착부위의 조직반응에 대해 검사하고 신연을 위한 회전시 저항감의 정도를 관찰하였으며 상, 하악 전치간의 교합변화를 통해 신연상태를 파악하였고 각 시기에 채취된 검체에서 골신연부와 골치유 상태를 육안적으로 관찰 기록하였다.

3) 표본제작

탈회표본제작을 위하여 채취한 골신장부의 검체를 10% 중성 포르말린에 3일간 일차 고정된 후 흐르는 물에서 세척하고 5% 포르산과 구연산 나트륨을 동량으로 희석한 탈회액에서 5일간 탈회를 하였다. 그후 조직을 조직캡슐에 넣어 흐르는 물에 12시간 동안 수세한 다음 통상의 방법으로 파라핀 포매를 시행하고 4 μ m 두께로 시상연속 절편을 제작하였으며 절편에는 골절제부와 골신연부 및 정상부위가 모두 포함되도록 제작하였으며 H&E(hemotoxyline-eosin)염색을 시행하여 광학현미경하에서 전반적인 조직학적 양상을 관찰하였다.

4) Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) Analysis

골형성에 관여하는 제 I, II형 교원질의 발현양상을 RT-PCR analysis를 이용하여 다음과 같이 검사하였다. 표본제작을 위해 채취된 부위의 반대편 골신장부를 고정용 나사 내측부위에서 절제하고 즉시 액화질소에 넣어 급냉시킨 뒤 막자사발에서 잘게 부수고 Trizol(Invitrogen Co., USA)을 첨가한 후 1/10배의 chloroform으로 처리하여 상층을 분리하였다. 다음 동량의 isopropanol로 처리하여 pellets을 DEPC-D.W70% ethanol로 씻은 후 건조시켜 DEPC-D.W에 녹였다. cDNA는 260nm에서 흡광도를 측정된 후 정량하여 reverse transcription reaction을 실시하였다. Random primer로 70°C에서 5분간 annealing 후 10mM dNTPs(Roche Germany), RNasin, AMV(Avian Myoblastosis Virus) reverse transcriptase(Promega, USA), 5xbuffer(Promega, USA)를 42°C에서 1시간 반응시켰다. cDNA를 조합한 후 TDMH(670mM Tris-HCl(pH 8.8), 1% Tween 20, 166mM ammonium sulphate, 100uM dNTP, 2mM magnesium chloride)buffer, 10uM sense 및 antisense primer, 1 unit Taq polymerase 및 증류수를 가하여 총량을 25 μ l 한 후 58°C에서 30분간 처리한 후 다시 92°C에서 15초, 60°C에서 30초, 72°C에서 30초간 35회 실시한 후 72°C에서 10분간 PCR 반응을 시켰다. Primer서열은 type I collagen은 sense primer GAGGAATTTCCGTGCCTGGC와 antisense primer AGCTGTTCCGGGCAATCCTC(312bp), type II collagen은 sense primer AGAGGTTATCCAGGCCTGGA와 antisense primer TTGAGCACCTTC AGGACCAC(366bp)를 적용하였다(Table 2). mRNA level의 정확한 정량을 위해 β -actin으로 확인하였다(Fig 9). PCR 반응이 종료된 검체들에서 각 산물을 10 μ l씩 취하여 6xloading buffer(0.25% bromphenol blue, 0.25% xylene cyanol, 30% glycerol in water) 2 μ l와 혼합하여 2% 한천 겔(agarose gel)에 100V에서 30분간 전기영동하고 ethidium bromide로 염색하여 gel document system(Bio-Rad, USA)에서 분석하였다. RT-PCR Analysis를 시행하여 나온 발현상을 Image Master VDS software(Pharmacia Biotech, version2.0)를 이용하여 발현의 비교분석을 위하여 술 후 3일군의 양을 100으로 하여 각 군간의 발현 차이를 비교하였다.

III. 결 과

1. 육안적 소견

모든 실험동물은 골절제 및 신연장치 장착을 위한 수술 후 저작장애로 1~2일 정도 고형사로 섭취가 제한적이었으나 비교적 잠복기동안 체중감소 등의 별다른 이상 없이 건강하였다. 실험 기간 중 신연장치 주위의 감염, 신연장치 탈락 등과 같은 합병증은 발생하지 않았다. 신연기 동안 신연장치 회전에 따른 저항감은 비교적 적었다.

잠복기에 해당하는 술 후 3일군에서 신연군 및 대조군 모두 골절제부에 혈액이 응고되어 있는 상태로 가골형성은 보이지 않았다. 신연 초기에 해당하는 술 후 7일째 대조군에서는 가골형성을 확인하였으며 신연군에서는 골절제부 폭경의 증가와 함께 가골 및 혈종이 혼재된 양상을 보였다. 또한 조직표본제작을 위한 장치제거 시 골단부가 쉽게 분리되는 소견을 나타내었다. 경화 초기에 해당하는 술 후 14일째 대조군에서는 골절제부가 희미하게 나타나는 골양조직으로 치유되었고 신연군은 골양조직과 함께 골신연부를 확인할 수 있었다. 경화 말기에 해당하는 28일째 신연군 모두에서 뚜렷한 골신연부를 관찰할 수 있었다. 신연군은 진전된 골형성과 함께 경계가 불명확해졌고 골신연부의 섬유성 조직은 보이지 않았다(Fig. 3). 대조군에서는 골절제부가 완전히 신생골로 치유되었으며 주위 골과의 경계가 불분명하였고 금속판위로의 골형성도 관찰할 수 있었다.

2. 조직학적 소견

수술 후 3일째 신연군과 대조군 모두에서 골절제부의 혈종과 염증세포의 침윤상을 보이고 있었다. 신연 초기에 해당하는 술 후 7일째에서 신연군은 섬유성 가골과 함께 골형성을 관찰할 수 있었으며 대조군에서는 피사조직과 함께 섬유성조직, 골형성부 등이 혼재되어 나타났으며 연골성 조직도 관찰되었다. 경화 초기에 해당하는 술 후 14일째에서 신연군은 약간의 연골성 조직이 관찰되었고 더욱 성숙된 골형성부를 관찰할 수 있었으며 대조군은 증가된 골형성부에서 골소주를 관찰할 수 있었다. 경화 말기에 해당하는 술 후 28일째에서 신연군은 신생골이 기존골과 잘 연결되어 있는 소견과 신생혈관을 관찰할 수 있었으며 대조군에서는 신생골과 기존골의 연결이 우수하였고 신생골 내로 혈관이 잘 발달되어 있는 소견을 나타내었다(Fig. 4).

3. RT - PCR 소견

제 I형 교원질은 신연군과 대조군 모두에서 실험기간 동안 강한 발현상을 보였다. 술 후 3일군의 발현 양을 100으로 하여 상대적 발현차이를 분석한 결과 신연군에서는 신연기에 해당하는 술 후 7일째 5배 이상이 발현이 증가하였으며 이는 경화기까지 계속 유지되었다. 그러나 대조군에서는 술 후 7일째 2배 이상 발현이 증가한 후 경화기까지 점차 감소하는 소견을 보였다(Fig. 5, Fig. 6). 제 II형 교원질 역시 신연군, 대조군 모두에서 실험기간 동안 뚜렷한 발현 소견을 보였다. 그러나 경화기까지 점차적으로 감소하였으며 대조군에서 비교적 많은 감소를 나타내어 약 27% 정도의 발현차이를 보였다. 이와는 달리 신연군은 서서히 감소하는 소견을 나타내었고 술 후 28일

제 2군에서 술 후 3제 군에 비해 75% 정도의 발현차이를 보였다(Fig. 7, Fig. 8).

IV. 고찰

신연 골형성술에 대한 분자생물학적 연구에 있어서 성장인자에 대한 연구와 더불어 현재까지 많은 연구가 골형성과 관련된 세포외기질 단백질의 발현에 관한 것이다. 세포외 기질은 크게 교원성과 비교원성으로 분류된다. 교원성 단백질은 주로 제 I, II, III, IV 형으로 나뉘지는데, 그 중 제 I형 교원질은 osteoblast에 의해 형성되며, 이 교원원섬유 내이나 주위에 무기질이 침착되어서 골조직이 형성되고 제 II형 교원질은 chondroblast에 의해 형성된다. 즉, 경조직 형성은 광물질을 받아들일 수 있는 능력을 가진 유기기질을 생성해내는, 혈액공급의 좋은 부위에 밀접하게 위치해 있는 세포들에 의해 일어난다¹². 비교원성 단백질로는 Osteocalcin, Osteonectin, Osteopontin 등이 있다.

교원성 단백질은 골절 치유와 장골 발육과 관련하여 많은 연구가 보고 되었고, 신연 골형성술과 관련된 교원성 세포외 기질 단백질에 대한 연구는 비교적 최근에 와서 시행되었으며 주로 골절 치유시 나타나는 양상과 비교하여 신연 골형성의 골 생성 기전을 규명하려는 목적으로 시행되었다⁹. Lane등¹³은 골절과 관련하여 연골성 골화과정인 염증성시기, 수복기, 골화기등 각 단계별로 교원질 발현에 관한 연구를 하였다. 그들의 연구에 의하면 수복기에는 연골성 기질과 신생골이 침착성 성장을 하며 연골 세포에 의해서 제 II형 교원질이 생성되고 골화시기에는 층판골이 재형성되며 제 II형 교원질을 대체하면서 제 I형 교원질이 강력히 발현 한다고 하였다. 즉, 가골을 형성하는 골절의 치유과정은 제 II형 교원질을 합성하는 섬유성 연골기를 거친다. 반면에 신연과 관련하여서는 Sato 등¹⁴은 막성 골화를 중심으로 골형성이 일어난다고 하였고 연골내 골화도 일부 골형성에 기여 한다고 하였다. 골편의 견인에 의한 골형성에서는 제 II형 교원질의 형성 없이 제 I형 교원질이 주로 형성되는 막내 골형성이 주된 과정^{15,16,17}이지만 연골내 골형성도 어느 정도 기여하는 것으로 알려져 있다^{18,19}. 골조직의 발육이나 재생의 과정에서 조직의 분화는 혈류공급과 조직내 산소분압에 의하여 결정된다고 한다²⁰. 혈관화가 잘 되어있지 않은 부위에서는 조직내 산소분압이 낮아지게 되고 이러한 상황에서 골형성 전구 세포들은 골형성 세포보다는 연골형성 세포로 분화하게 된다. 또한 골절의 치유과정 중 골화는 가골의 점진적인 혈관화와 밀접한 관계가 있다고 한다²¹. 임순모등¹¹은 골절제 후 골편 견인에 의한 골신장시 일어나는 조직학적인 변화는 막내골화 과정이 주로 이루어지지만, 혈관 형성이 골편의 동요로 인하여 방해를 받은 일부 부위에서 연골내 골화 과정이 나타난다고 하였으며 신생골 형성은 혈관화가 미약한 신장 중심부가 아닌 인접부에서 충분한 혈관화와 함께 골형성이 시작되어 골절단면 쪽으로 진행되는 막내골화과정을 거치며 제 I형 교원질이 광범위하게 발현된다고 보고하였다. Warren등⁹은 점진적 신연과 급속 신연을 비교 하였을때 신연 초기(술 후 5일)에는 제 I형 교원질 mRNA의 발현이 점진적 신연군과 급속 신연군 모두에서 급속히 감소되나 점진적 신연군에서는 경화기말(술 후 37일)에는 정상수준으로 돌아 온다고 하였다. 그러나 급속 신연군에서는 제 I형 교원질의 발현이 30%이하로 감소되어 섬유성 결합을 야기 한다고 보고하였다. 본 실험에서는 신연군에서 제 I형 교원질 및 제 II형 교원질 모두 실험기간 동안 강력한 발현상을 보였다. 특히 제 I형 교원질은 신연 자극이 가해진 후 대조

군에 비해 강력한 발현 소견을 보여 신연과 같은 생기계적 자극이 제 I형 교원질 합성을 유도하는 것을 증명하였다. 제 II형 교원질은 기존의 문헌보고와는 달리 제 I형 교원질과 함께 신연술 동안 강력한 발현을 보였다. 또한 대조군에 비해 신연자극이 가해진 후 다소 많은 발현이 나타났으나 전체적으로 제 I형 교원질과는 달리 감소하는 발현 소견을 보였다. 이를 통해 골절제후 강력한 발현을 보이는 제 I, II형 교원질은 신연과 같은 자극이 가해지면서 제 I형 교원질의 합성이 더욱 증가되고 이후 골형성 기전에 중요한 역할을 하는 것을 알 수 있었다. 조직학적 변화와 함께 골 형성기전 측면에서 분석해 보면 단순골절 초기에는 연골성 골화가 많이 일어나서 연골세포에 의해서 제 II형 교원질이 생산된다고 생각되며 신연을 시작하는 술 후 7일부터는 제 I형 교원질이 강력하게 발현되는 것으로 미루어 보아 막성골화가 골형성의 주된 기전으로 생각되나 술 후 14일째 신연군에서 연골성 성분이 관찰되고 제 II형 교원질도 대조군에 비하여 증가된 발현을 보이고 있어 연골내 골화 역시 골형성에 어느 정도 기여 한다고 볼 수 있다.

그동안의 많은 연구에서 제 I형 교원질이 신연 골형성술시 골형성에 중요한 역할을 담당하는 것으로 보고되었고 제 II형 교원질에 대해서는 연구 되어진 것이 드물었다. 또한 순수한 막성 골화에 의한 골형성 보다는 많은 실험조건, 신연기 고정상태, 신연속도 등과 같은 변수에 따라 막성 골화와 연골내 골화가 혼합된 골형성이 일어나며 이러한 골형성 기전을 규명하는 연구는 없었다. 본 연구는 제 I, II형 교원질의 발현을 동시에 비교하여 제 I형 교원질의 신여 자극에 의한 증가 뿐 만아니라 제 II형 교원질의 발현을 통한 골형성 기여형태를 분석하였다. 이상과 같은 실험결과는 향후에 진행될 다른 신연군 형성술에 대한 연구에서 중요한 기초자료로 활용될 것으로 사료된다. 또한 각종 동물에서 다양한 신연 방법이 적용 될 때 제 I, II형 교원질의 발현을 분자생물학적 방법으로 측정한다면 최적의 신연술식을 알아내는 지표로써 사용될 수 있을 것이다.

V. 결론

신연 골형성술시 골형성에 관여하는 기질성 교원 단백질의 발현 양상을 관찰하기 위하여 가토 16마리를 이용하여, 하악골에 신연군(0.35mm×2/day)과 대조군(골절제만 시행)으로 나누어 실험하였다. 제 I형 교원질과 제 II형 교원질 발현을 분자 생물학적 연구 방법인 RT-PCR분석법을 통하여 잠복기(3일), 신연 초기(7일), 경화 초기(14일), 경화 말기(28일)에 각각 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 신연군의 신연부위에서 신생골 형성을 관찰하였다.
2. 제 I형 교원질은 신연군과 대조군 모두에서 실험기간동안 뚜렷한 발현상을 보였고 신연자극이 가해진 후 경화기까지 대조군에 비해 신연군에서 강력히 증가된 발현상을 보였다.
3. 제 II형 교원질은 신연군과 대조군 모두에서 실험기간동안 뚜렷한 발현상이 나타났으나 경화기까지 점차 감소하는 소견을 보였고 대조군에 비해 신연군에서 높은 수준으로 발현되었다.

결론적으로 제 I, II형 교원질 발현과 조직학적 분석을 통해 골신연부의 신생골 형성기전은 제 I형 교원질 발현에 의한 막내 골화가 주 기전으로 일어나며 어느정도 연골내 골화가 골형성에 기여하는 것으로 사료된다.

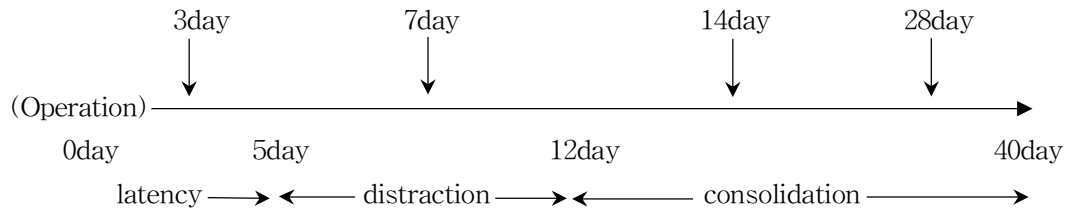
참고문헌

1. Codivilla A: On the means of lengthening in the lower limb, the muscles and tissues which are shortened through deformity. *Am J Orthop Surg* 1905; 2:353-359.
2. Ilizarov GA: The tension-stress effect on the genesis and growth of tissues; I. The influence of stability of fixation and soft-tissue preservation. *Clin Orthop* 1989;238:249.
3. Ilizarov GA: The tension-stress effect on the genesis and growth of tissues; II. The influence of the rate and frequency of distraction. *Clin Orthop*. 1989;239:263.
4. Snyder CC, Levine GA, Swanson HM, Browne EZJ: Mandibular lengthening by gradual distraction. Preliminary report. *Plast Reconstr Surg* 1973;51: 506-508.
5. Costantino PD, Shybut G, Friedman CD, Pelzer HJ, Masini M, Shindo ML et al: Segmental mandibular regeneration by distraction osteogenesis. An experimental study. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg* 1990;116:535-545.
6. McCarthy JG, Schreiber J, Karp N, Throne CH, Grayson BH: Lengthening the human mandible by gradual distraction. *Plast Reconstr Surg* 1992;18:280.
7. Karaharju-Suvanto T, Karaharju EO, Ranta R: Mandibular distraction. An experimental study on sheep. *J Craniomaxillofac Surg* 1990;18:280.
8. Karaharju-Suvanto T, Peltonen J, Kahri A, Karaharju EO: Distraction osteogenesis of the mandible. An experimental study on sheep. *J Maxillofac Surg* 1992;21:118.
9. Warren SM, Mehrara BJ, Steinbrech DS, Paccione MF, Greenwald JA, Spector JA et al: Rat mandibular distraction osteogenesis. Part III Gradual distraction versus acute lengthening. *Plast Reconstr Surg* 2001;107:441-453.
10. Proffit WR. Etiologic factors in the development of dentofacial deformity In: White RPJ. *Surgical Orthodontic Treatment*. St. Louis, Mosby-Year Book Inc. 1991;24-70.
11. 임순모, 안병근, 박영주, 박희건, 박준우, 이건주 등: 성견 하악골체부 신장시 신장부위의 증식세포핵항원과 제 I형 교원질 발현에 관한 연구. *대구외지* 2001;27:385-393.
12. Ten cate AR. *ORAL HISTOLOGY. development structure and function*. St. Louis, Mosby Co. 1985.
13. Lane JM, Suda M, von der Mark K, Timpl R: Immunofluorescent localization of structural collagen types in endochondral fracture repair. *J Orthop Res* 1986;4:318-329.
14. Sato M, Yau N, Nakase T, Kawahata H, Sumimoto M, Hirota S et al: Expression of bone matrix proteins mRNA during distraction osteogenesis. *J Bone Miner res* 1998;13:1221-1231.
15. Ashhurst DE: Collagens synthesized by healing fractures. *Clin Orthop* 1990;255:273-283.
16. Kallio TJ, Vauhkonen MV, Peltonen JI, Karaharju EO: Early bone matrix formation during distraction. A biochemical study in sheep. *Acta Orthop Scand* 1994;65:467-471.
17. Sandberg M, Aro H, Multimaki P, Aho H, Vuorio E: In situ localization of collagen production by chondrocytes and osteoblasts in fracture callus. *J Bone Joint Surg [Am]* 1989;71: 69-77.
18. Yasui N, Kojimoto H, Sasaki K, Kitada A, Shimizu H, Shimoura Y: Factors affecting callus distraction in limb lengthening. *Clin Orthop* 1993;293: 55-60.

19. Yasui N, Sato M, Ochi T, Kawahata H, Kitamura Y, Nomura S: Three modes of ossification during distraction osteogenesis in the rat. *J Bone Joint Surg Br* 1997;79:824-830.
20. Carter DR, Blenman PR, Beaupre GS: Correlations between mechanical stress history and tissue differentiation in initial fracture healing. *J Orthop Res* 1988;6:736-748.
21. Chidgey L, Chakkalakal D, Blotcky A, Connolly JF: Vascular reorganization and return of rigidity in fracture healing. *J Orthop Res* 1986;4:173-179.
22. Morone M A, Boden S D, Hair G: Gene expression during autograft lumbar spine fusion and the effect of Bone Morphogenetic Protein 2 *Clin Orthop* 1998;351:252-265.

도표

Table 1. Experimental schedule.



Experimental groups were sacrificed at 3rd, 7th, 14th, and 28th day after operation.

Table 2. Primer sequences²². *From: Morone: Clin Orthop, Volume(351). June 1998.252-65*

Protein	Forward	Reverse	bp
Type I collagen	GAGGAATTTCCGTGCCTGGC	AGCTGTTCCGGGCAATCCTC	312
Type II collagen	AGAGGTTATCCAGGCCTGGA	TTGAGCACCTTCAGGACCAC	366

사진

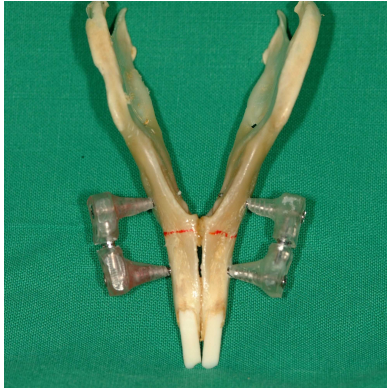


Figure 1. Distraction design

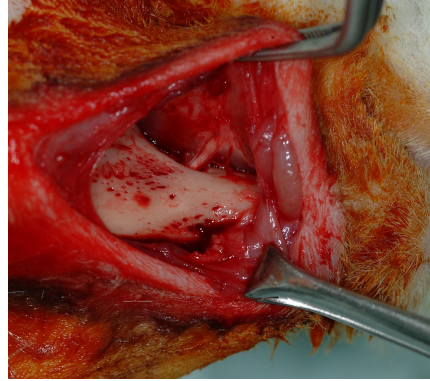


Figure 2. Operation



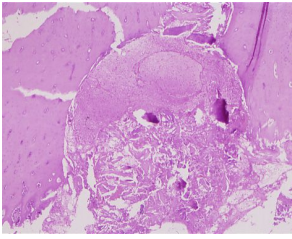
a. Prior to distraction



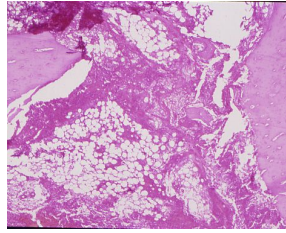
b. After distraction

Figure 3. Clinical feature

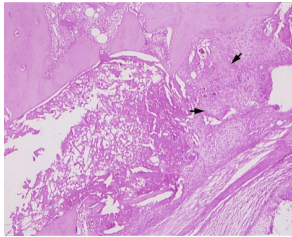
C3 (×40)



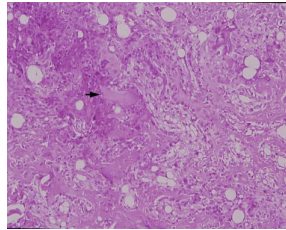
E3 (×40)



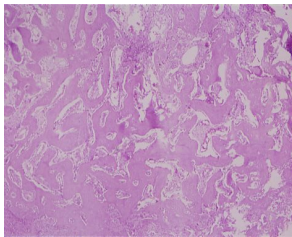
C7 (×40)



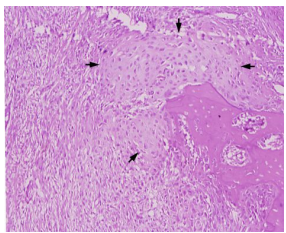
E7 (×100)



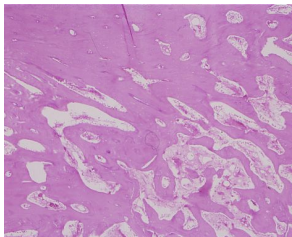
C14 (×40)



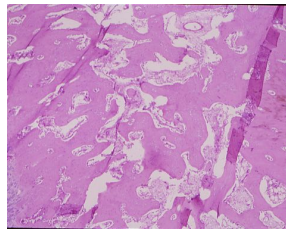
E14 (×40)



C28 (×40)



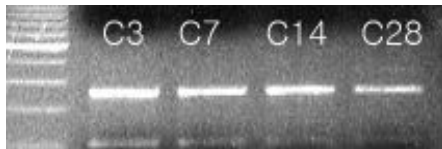
E28 (×40)



Control groups

Experimental groups

Figure 4. Histologic feature (H-E stain)



Control group



Experimental group

Figure 5. Expression of Type I collagen

	3 day	7 day	14 day	28 day
E group	100	574	574	547
C group	100	220	141	82.7

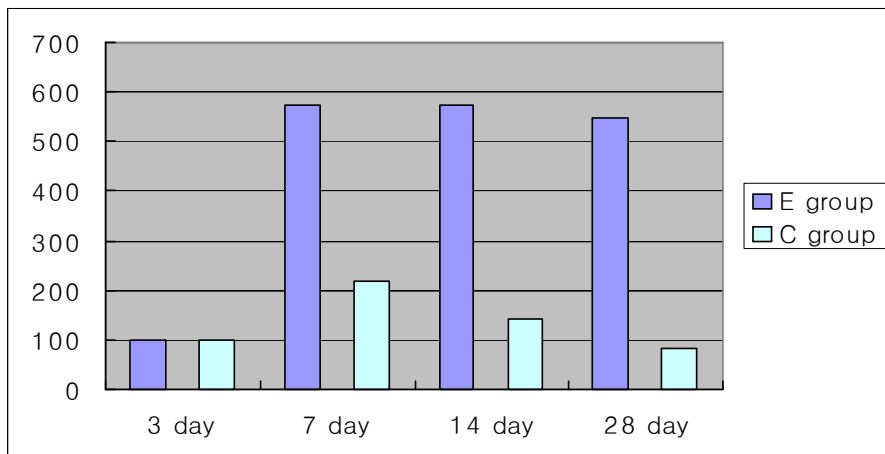
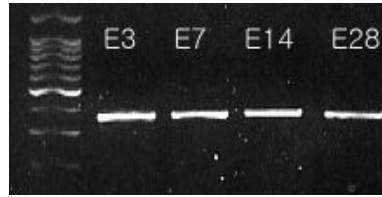
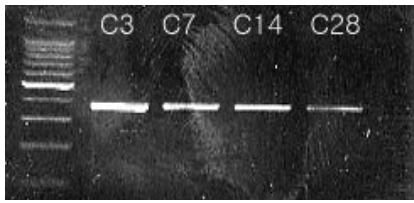


Figure 6. Quantitative analysis of Type I collagen.



Control group

Experimental group

Figure 7. Expression of Type II collagen .

	3 day	7 day	14 day	28 day
E group	100	83.7	88.2	74.7
C group	100	65.9	70.9	27.4

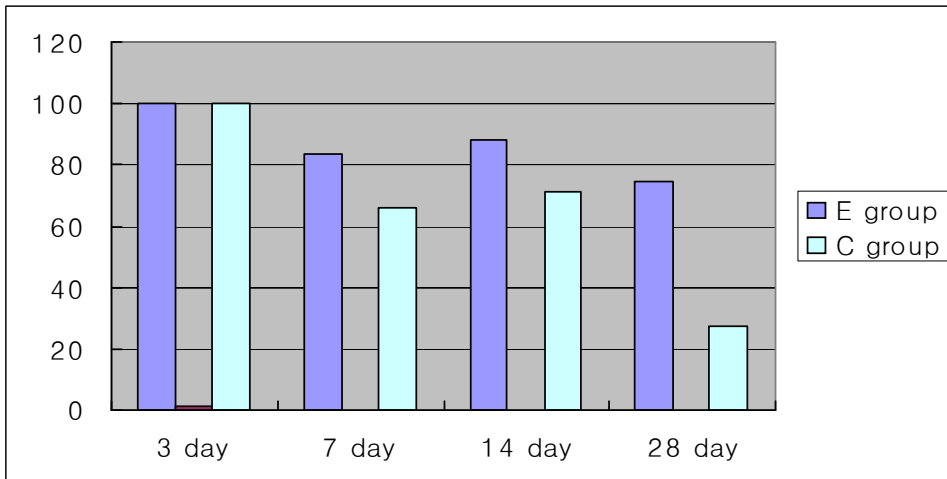


Figure 8. Quantitative analysis of Type II collagen.

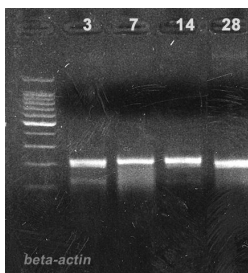


Figure 9. Expression of β -actin

논문사진설명

Figure 1. Distraction design.

Note that osteotomy was made bilaterally anterior to the first premolar.

Figure 2. Operation.

Periosteum was elevated along the border of the mandible and mental nerve was identified.

Figure 3. Clinical feature.

After distraction, slightly cross-bite developed.

Figure 4. Histologic feature (H-E stain).

Newly formed osteoid tissue(arrow) was viewed in E7, and small foci of endochondral ossification(arrow) was existed in E14. The new bone trabeculae resulted in a near complete closure of distraction gap in E28.

Figure 5. Expression of Type I collagen.

Expression of Type I collagen were detected throughout the experiment in both groups.

Figure 6. Quantitative analysis of Type I collagen.

Note that expression of Type I collagen were markedly increased during distraction and consolidation period in E group than C group.

Figure 7. Expression of Type II collagen.

Expression of Type II collagen were detected throughout the experiment in both groups.

Figure 8. Quantitative analysis of Type II collagen.

Note that expression of Type II collagen were maintained at high level during distraction and consolidation period in E group than C group.

Figure 9. Expression of β -actin.

Sequence: ATCGTGGGCCCGCCCTAGGCA, TGGCCTTAGGGTTCAGAGGGG, bp(293)