

표지

논문제목

가토 하악골에서 신연 골형성술시 Osteonectin의 발현

Expression of osteonectin on distraction osteogenesis in the rabbit mandible.

저자

김동준, 지유진*, 송현철*

Dong-Joon Kim, Yu-Jin Jee*, Hyun-Chul Song*

소속기관

가톨릭대학교 임상치과대학원 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 osteonectin on distraction osteogenesis in the rabbit mandible.

Dong-Joon Kim, 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**

Distraction osteogenesis has been thought to be promising technique for replacing bone graft in maxilla and mandible. The purpose of this study was to investigate the expression of osteonectin on distraction osteogenesis.

Sixteen rabbits were used for this experiment. Osteotomy was performed between premolar and mental foramen. On the experimental group, distraction device was connected to the respective bone segments. On the control group, bone segments were fixed using plate and screws after osteotomy. Distraction was carried out at the rate of 0.7mm per day to obtain a 4.9mm elongation on the experimental group. After 3 days, 7 days, 14 days, and 28 days two rabbits of each group were sacrificed.

The results obtained from this study were as follow :

Experimental group was observed that the gaps between the distracted bone edges were occupied by new bone. Expression of Osteonectin were detected throughout the experiment in both groups and Expression of Osteonectin were markedly increased during distraction and consolidation period in experimental group than control group.

From these results, it could be stated that distraction was shown to improve and accelerate bone formation and mechanical stress like distraction has considerable effects on osteonectin.

Key words: **distraction osteogenesis, Osteonectin, histological analysis, RT-PCR analysis**

본문

서론

안면골의 골결손을 재건하기 위해 유리비혈관화 골이식술, 유리혈관화 골이식술, 혈행골 포함 근피관술, 동종골 이식술, 이종골 이식술, 인공물질 삽입 등 다양한 술식이 사용되어져 왔으나 유리비혈관화 골이식술의 경우 감염, 이식골의 흡수, 골 공여부의 손상 등의 단점이 있고 유리혈관화 골이식술과 혈행골포함 근피관술은 수술 술식이 복잡하고 공여부에 심각한 장애를 초래할 수 있으며 동종 및 이종골 이식술의 경우 이식골의 흡수, 감염 등이 가장 큰 단점으로 나타나고 있다. 이러한 전통적인 골이식술의 문제점을 해결하기 위해 정형외과영역에서 사지골 재건에 사용되던 신연 골형성술을 안면골에 적용하여 새로이 각광 받고 있다.

Codivilla¹가 처음으로 보고한 신연 골형성술(distraction osteogenesis)은 골절단술이나 피질골절단술을 이용하여 분리된 골절단편에 인장력을 가하여 줌으로써 골면사이에 신생골 형성을 유도하는 술식이다.

이러한 신연 골형성술은 1950년대에 Ilizarov^{2,3}가 생체조직에 점진적 인장력을 가하면 조직대사가 활성화되어 세포증식 및 생합성이 촉진된다는 "the law of tension-stress"을 주장하면서 이론적으로 정립되었다. 이후 안면골에서는 Snyder 등⁴이 개의 하악골에서 처음으로 시도한 이래, McCarthy 등⁵이 소아의 편측 하악골에서 하악골 신연을 시행하여 18 - 24mm의 골신장에 성공한 증례를 보고하였으며, 이후 많은 연구를 통하여 신연 골형성술이 악안면 영역에서의 성장장애나 골결손의 치료에 있어 기존의 골 이식술을 대체할 수 있는 방법으로 확고한 자리를 잡아가고 있으며 그 적용부위도 상,하악골뿐 아니라 전체 중안면, 안와, 두개골 등에도 성공적으로 시도되고 있다.

Ilizarov^{2,3}에 의해 신연 골형성술의 이론적 근거가 성립된 이후 인장 자극(tension-stress)과 같은 기계적 자극이 세포수준에서의 골형성을 유도하는 기전에 대해 광범위하게 연구되었으며 동물 실험 및 실험실 연구에서 조직학적 관찰이 가능하였다. 하지만 이에 대한 기전 및 관여 인자에 대해서 밝혀진 것은 아직까지 미미하며 이를 위한 분자생물학적 연구가 1990년대 말부터 시도되었고 현재 골절시 골형성에 관여하는 성장인자와 교원성 단백질 및 비교원성 세포외 기질 단백질 등의 발현정도를 통해 신연 골형성 기전에 대한 분자생물학적 연구가 활성화되었다. 현재까지 알려진 성장 인자는 Transforming Growth Factor- β 1, Bone Morphogenic Proteins, Fibroblast Growth Factor, Insulin-like Growth Factor-1 등이고 교원성 단백질로는 제 I형 교원질이 있으

며 비교원성 세포의 기질 단백질에는 Osteonectin, Osteopontin, Osteocalcin 등이 있다. 이 중 osteonectin은 제 I형 교원질과 결합하고 칼슘과 수산화인회석에 대한 친화력이 높으며, 골의 석회화의 시작 및 골의 재개조 등에 중요한 역할을 하는 당단백이다. 면역세포화학적으로 osteonectin은 어린 골세포 뿐만 아니라 활동중인 조골세포와 골전구세포에서는 발견되지만, 오래 되었거나 무활동성의 골세포에서는 발견되지 않기 때문에 골세포의 골형성 표시인자라고 할 수 있다.

본 연구에서는 가토의 하악골에 신연 골형성술을 시행하여 시기별로 육안적, 조직학적 검사를 시행하였으며, 또한 Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) Analysis를 시행하여 골형성에 관여 하는 것으로 알려진 osteonectin의 발현양상을 관찰함으로써 보다 성공적인 신연 골형성술을 위한 기초자료로 활용하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 대상

실험동물로 체중 2.5 - 3 Kg의 가토 16마리를 사용하였으며 예비실험을 시행하여 가토의 하악골을 채취하고 정상 해부학적 구조를 인지하였다. 가토의 하악 우각부는 골이 매우 얇아서 골 신연에 부적합하고 비교적 소구치부와 이공사이가 골두께가 두꺼워 이 부위에서 골절단을 시행하기로 계획하고 신연기 위치등을 설정하였다(Fig. 1). 신연장치는 구개부의 확장에 사용되는 Mini stainless steel skeleton-type expansion screw(Dentaram, Germany)와 Mini titanium screw(2.0mm×18mm, (주)제일메디칼코퍼레이션, 한국) 2개를 이용하여 제작하였다. 이 신연기는 360°회전에 0.7mm, 최대 6.5mm까지 신장 가능하였다.

2. 방법

1) 실험

골절단만 시행한 대조군 (C군, n=8)과 신연 골형성술을 시행한 신연군 (E군, n=8)으로 나누어 실험하였다. 술 전 8시간 금식을 시행하고 Ketamin(Ketalar, 유한양행, 한국) 30mg/kg와 Xylazine(Rompun, 바이엘코리아, 한국) 10mg/kg를 혼합하여 근육주사하여 전신마취를 시행하고 가토를 양와위로 고정 한 뒤 양측 하악 하연부를 베타딘 용액으로 소독하고 국소마취와 지혈 목적으로 1:100,000 epinephrine을 함유한 2% lidocaine(유한양행, 한국)을 피하주사하였다. 하악 하연부에 절개를 시행하여 하악골을 노출시킨 후 소구치 전방부에서 이공을 통해 나오는 이신경을 조심

스럽게 견인하였다(Fig. 2). 신연군에서는 소구치 전방과 이공사이에 골절단부를 표시한 후 신연장치를 2개의 나사로 고정시켜 위치를 확인한 다음 장치를 제거하고 저속 치과용 절삭기구로 피질골 절단술을 시행하였다. 신경 손상에 주의하여 골수강내는 절단을 시행하지 않고 치즐을 이용하여 완전 골절단을 시행하였다. 그 후 골의 가동성을 확인한 다음 신연장치를 고정하였다. 수술부는 생리식염수로 깨끗이 세척한 후 층별 봉합하였다. 이후 반대측도 같은 방법으로 수술을 시행하였다. 대조군에서는 같은 방법으로 소구치부와 이공사이에서 골절단을 시행 후 골가동성을 확인하고 금속판과 길이 4mm의 나사를 이용하여 골절단부 고정을 시행하였다. 모든 실험동물은 3일간 Gentamycin(겐타마이신, 대성, 한국) 0.2ml/kg과 Beccom(비콤 씨, 대성, 한국) 2ml/1회를 근육주사하여 감염예방과 술 후 저작근란으로 인한 영양결핍을 방지하였다.

신연군에서의 골신연은 골절단과 장치고정 후 5일간의 잠복기를 두어 골절단부의 재혈관화와 염증의 소실 및 일차성 가골형성을 도모한 후 0.35mm씩 12시간마다 (0.7mm / day) 신연을 시행하여 7일동안 총 4.9mm의 신연량을 얻도록 계획하였으며, 술후 최장 28일까지 경과를 관찰하기로 하였다.

잠복기, 신연초기, 경화초기, 경화말기에 해당되는 술 후 3일, 7일, 14일 및 28일에 각 실험군에서 2마리씩 희생시켜다(Table 1). 좌측 신연골부는 조직검사에 사용하였으며 우측 신연골부는 RT-PCR 분석에 사용하였고 조직표본은 신연기 고정에 사용된 2개의 나사 내측을 절단하여 신연골형성부와 정상 인접 골부가 모두 포함되도록 채취하였다. 대조군에서도 골절부와 인접 정상골이 모두 포함되도록 조직표본을 채취하였다.

2) 육안적 검사

신연장치 장착 후 가토의 사료 섭취상태, 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 관찰기록하였다.

3) 표본제작

탈회표본제작을 위하여 채취한 검체를 10% 중성 포르말린에 3일간 일차 고정한 후 흐르는 물에서 세척하고 5% 포름산과 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 m두께로 시상연속 절편을 제작하였으며 절편에는 골절단부와 골신연부 및 정상부위가 모두 포함되도록 제작하였으며 H&E 염색을 시행하여 광학현미경하에서 전반적인 조직학적 양상을 관찰하였다.

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

골형성에 관여하는 osteonectin 등의 발현양상을 RT-PCR analysis을 이용하여 다음과 같이 검사하였다. 표본제작을 위해 채취된 부위의 반대편 골신연부를 고정용 나사 내측부위에서 절제하고 즉시 액화질소에 넣어 급냉시킨 뒤 막자사발에서 잘게 부수고 Trizol(Invitrogen Co., USA)를 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 측정 한 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 osteonectin sense primer CTCCACCTGGACTACATCG와 antisense primer GCTGGCCAAA CTGCCAGTG (291 bp)를 적용하였다(Table 2). mRNA level의 정확한 정량을 위해 β -actin으로 확인하였다(Fig 7). 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 analysis을 시행하여 나온 발현상을 Image Master VDS software(Pharmacia Biotech, version 2.0, USA)를 이용하여 술 후 3일군의 양을 100으로 하여 상대치를 구하였고 이를 통해 신연군과 대조군의 발현차이를 분석하였다.

연구결과

1. 육안적 소견

모든 실험동물은 수술 후 저작장애로 1-2일 정도 고형사료 섭취가 제한적이었으나 잠복기동안 체중감소 및 감염 등의 별다른 합병증 없이 건강하였다. 또한 신연장치 주위의 감염, 신연장치 탈락 등과 같은 합병증은 발생하지 않았고 신연장치 회전에 따른 저항감은 초기에는 증가되었으나

신연이 진행될수록 저항감이 감소하였고 전치부에서는 반대교합이 형성되었다(Fig. 3).

동물 희생시 골절단부에 대한 신연군과 대조군의 육안적 평가를 시행하였다. 잠복기에 해당하는 술 후 3일군에서 신연군 및 대조군 모두 골절단부에 혈액이 응고되어 있는 상태로 가골형성은 보이지 않았다. 신연초기에 해당하는 술 후 7일째 대조군에서는 가골형성을 확인하였으며 신연군에서는 골절단부 폭경의 증가와 함께 가골 및 혈종이 혼재된 양상을 보였다. 또한 조직표본제작을 위한 장치제거시 골절단부가 쉽게 분리되는 소견을 나타내었다. 경화초기에 해당하는 술 후 14일째 대조군에서는 골절단부가 희미하게 나타나는 골양조직으로 치유되었고 신연군은 골양조직과 함께 골신연부를 확인할 수 있었다. 경화말기에 해당하는 술 후 28일째 전치부에서는 반대교합이 발생했다. 신연군은 진전된 골형성과 함께 경계가 불명확해졌고 골신연부의 섬유성 조직은 보이지 않았다. 대조군에서는 골절단부가 완전히 신생골로 치유되었으며 주위 골과의 경계가 불분명하였고 금속판위로의 골형성도 관찰할 수 있었다.

2. 조직학적 소견

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

3. RT-PCR 소견

술 후 3일째 신연군과 대조군에서 미약한 발현상을 보였다. 신연군에서는 신연 초기에 해당하는 술 후 7일째에 대조군에 비해 3배 이상의 발현 증가상을 보였으며 경화초기에 해당하는 술 후 14일째에 강력한 발현상을 보였고 경화말기에 해당하는 술 후 28일째에 조금 감소하였다. 대조군에서는 술 후 7일째과 술 후 14일째에 완만히 증가하다가 술 후 28일째에 초기 수준으로 감소하였다(Fig. 5, Fig. 6).

고 찰

신연 골형성술은 결손부위의 골을 요구되는 만큼 신연시켜 골형성을 유도할 수 있으므로 종래의 재건술에 비해 여러가지 장점을 가진다. 특히 신연 골형성을 위하여 골을 신연하는 경우 인접한 주변의 연조직도 동시에 신연되어 연조직의 부족을 해소할 수 있으므로 연조직 이식 등의 부가적인 시술을 피할 수 있다. 방사선치료와 동반된 종양절제수술후에는 결손부위의 혈류량이 골세포의 파괴, 혈관소실, 섬유화로 인해 감소하므로, 이런 경우에 신연 골형성술을 시행하면 골신연을 시행하는 동안 신생골이 형성되는 부위에서 새로운 혈관이 생성되어 결손부의 재건 및 치료가 용이해질 수 있다. Sawaki 등⁶은 구강저의 종양때문에 화학적 요법 및 방사선 치료와 함께 광범위한 하악골 절제술을 시행한 환자에서 신연 골형성술을 시행하여 임상적으로 안정적인 결과를 얻었음을 보고하였다. Minematsu 등⁷은 악골의 종양절제술 전후에 화학적 요법을 받은 환자들에서 신연 골형성술을 시술하여 국소적으로 감소된 혈류량이 정상범위나 그 이상으로 증가함을 보고하였다. 신연 골형성술을 시행한 부위에서 보이는 혈류량의 증가는 골결손부의 재건이나 만성골수염이 동반되어 있는 골절비유합부의 치료에 도움이 된다고 할 수 있다.

신연 골형성술은 골절단(osteotomy), 잠복기(latency period), 신연기(distraction period), 경화기(consolidation period), 개조기(remodeling period)의 5단계로 구성된다. 먼저 신연시킬 부위에 골절단술 또는 피질골절단술을 시행한다. 골절단술의 방법에 대하여 여러 가지 보고가 있는데, Ilizarov^{2,3}는 해면골내의 혈류공급을 보존하기위해 피질골만 절단할 것을 권고하였지만 Delloye 등⁸은 피질골절단과 완전한 골절단이 골치유나 신생골 형성 정도에 영향을 주지 않음을 보고한 바 있으며, Yasui 등⁹도 해면골까지 포함해서 완전하게 골절단한 후 신연을 시작할 때까지 10일간의 경과시간 동안 절단되었던 골수내 혈관들이 재생되고 성공적인 골신장이 이루어졌음을 보고하면서 불확실한 피질골절단보다는 완전하게 골절단을 한 후 신연까지 적절한 경과기간을 두는 것이 더 효과적이라고 주장하였다.

잠복기는 골절치유의 초기단계와 유사한데, 적절한 잠복기에 대해서는 여러 가지 연구가 진행되고 있으나 실험동물이나 부위에 따라서 많은 이견을 보이고 있다. 적절한 잠복기를 위해서는 신연하고자 하는 골의 종류, 골절단술의 방법, 주위 연조직의 손상정도, 환자의 연령 등을 고려하여야 하며, 임상적으로 사람에서 사지의 신연에는 2-15일, 하악골의 신연에서는 0-14일의 잠복기를 추천하고 있다. White와 Kenwright^{10,11}에 의하면 잠복기 없이 골신연을 시행한 경우 신연부위에 섬유화와 반흔형성 등이 일어난다고 보고하였으며, Tavakoli 등¹²에 의하면, 악안면 영역에서는 잠복기를 두는 경우 연골성 요소들이 우세하게 나타난다고 보고하였다. Aronson 등¹³은 잠복기를 두지 않은 경우 막내골화만 이루어졌으나 7일간 잠복기를 둔 경우에는 처음 2주 간은 막내골화와 연골내골화가 함께 나타난 후 3-6주경까지는 주로 막내골화가 나타났다고 보고하였다. 이 연구에서 잠복기를 부여한 군에서는 골절단시에 손상받았던 골막이 잠복기를 통하여 치유가 되면서 초기에

연골성 가골이 생성된 것으로 보고하였다. 본 연구에서는 가토임을 감안하여 골절단부의 재혈관화와 염증의 소실 및 일차성 가골형성을 도모하기 위하여 5일간의 잠복기를 부여하였다.

개의 경골을 대상으로 한 실험에서 Ilizarov³는 사지골에서의 이상적인 일일 신연속도로 1mm를 추천하였다. 백서 경골을 이용한 연구에서 Aronson 등¹³은 0.5 mm를 하루에 두번으로 나누어 신연하는 것이 가장 좋다고 보고하였고, 심중섭 등¹⁴은 0.25-0.75mm의 신연속도가 가장 성공적이거나 0.25mm의 신연 속도에서 더 우수한 골형성을 보인다고 보고하였다. Yasui 등¹⁵은 0.5mm 씩 하루에 두번 신연시키는 것이 가장 양호한 골형성을 보인다고 하였으며, 김부경 등¹⁶의 연구에서는 하루 0.5mm의 신연속도를 적용하는 것이 가장 좋다고 보고하였다.

가토를 이용한 연구에서 Stewart 등¹⁷은 0.5mm, 1.5mm의 신연속도로 하루에 두번 신연을 한 결과 1.5mm군에서 조직학적으로 불유합 소견을 보였다고 하였다. Li 등¹⁸의 연구에 의하면 견인속도가 하루에 0.7mm까지 증가할 때 골화부위에서의 세포 증식이 증가하였고, 0.7mm의 견인속도에서 세포증식은 최대의 수준을 보인다고 하였으며 그 이후에는 세포증식의 증가는 관찰할 수 없었다고 하였다. 하지만, 이상적인 견인속도와 세포증식능의 관계는 연구에 사용된 종에 따라 달라질 수 있으므로 이러한 연구 결과들을 임상에 그대로 적용하는 것은 어렵다고 할 수 있다. 신연빈도는 하루에 시행하는 신연의 횟수로, 일정한 신연속도를 몇번으로 나누어 신연하는지를 의미한다. 신연속도가 일정한 경우 신연횟수를 증가시키면 신연 골형성이 향상되고 연조직 손상이 최소로 되며 신생혈관의 형성 또한 촉진된다. 이상의 연구들과 예비실험을 통하여 본 연구에서는 한번에 0.35mm씩 하루에 두 번 (0.7mm / day) 신연시켰다.

지금까지의 많은 연구들로 인해 신연 골형성술이 골형성을 유도하고 임상적으로도 유용하게 쓰일 수 있는 술식이라는 것이 증명되었다. 그러나, 신연 골형성술의 골형성 기전에 대해서는 아직까지 밝혀지지 않은 부분이 많이 있다. 최근에는 골절치유시 골형성에 관여하는 것으로 알려진 성장인자들과 교원성 단백질 및 비교원성 세포외 기질 단백질 등이 신연 골형성술에서도 어떻게 관여하는지에 대해 분자생물학적으로 연구가 시도되고 있다. Rowe 등¹⁹과 Mehrara 등²⁰이 백서 하악골에서 신연 골형성술시 Transforming growth factor β -1과 Osteocalcin의 발현에 대해 보고한 후, 신연 골형성술에 대한 분자생물학적 연구가 많이 보고되었고 최근에는 골생성에 관여하는 성장인자를 주입함으로써 골형성을 증진하고 골경화기를 줄여 전체적 신연기간을 단축하고자 하는 치료적 목적의 논문이 나오고 있다.

국내에서 임순모 등²¹이 신연 골형성술 시 증식세포핵항원과 제 I 형 교원질의 발현에 대해 보고하였고, 백선호 등²²은 Osteonectin, Osteocalcin의 발현양상을 면역조직화학적 검사를 통하여 다른 부위보다 왕성한 골형성을 나타내는 특정 부위가 존재하는지를 확인하였다.

골형성에 관여하는 여러가지 인자 중 비교원성 세포외 기질 단백질로 Osteonectin, Osteopontin, Osteocalcin 등이 있다. Osteonectin은 주로 제 I 형 교원질과 결합하는 당단백으로

칼슘, 수산화인회석에 대한 친화력이 높으며, 골의 석회화의 시작 및 골의 재개조, 무기질화 초기 등의 조절에 중요한 역할을 한다. Osteopontin은 인산화당단백으로 재형성된 세포의 기질에 조골 세포의 부착을 증진시키는 작용을 하며, Osteocalcin은 성숙된 조골세포, 연골세포, 치아세포 등에 의해 생산되는 γ -carboxyglutamic acid containing protein으로 그 기능에 대해서 정확히 밝혀지지 않았으나 골의 칼슘 축적을 조절하는 칼슘결합 단백질로 신생골에서 무기질화와 혈청농도를 조절하는 것으로 알려졌다. Meyer 등²³은 신연시 골절단부에 생리적 한계 이상의 인장력이 발생될 때 이 두 단백질 Osteonectin과 Osteocalcin의 발현이 급격히 감소됨과 동시에 결정체 형성이 감소됨을 관찰하고 Osteonectin과 Osteocalcin의 발현이 골양조직의 무기질화 및 조골세포의 분화와 밀접한 관계가 있으며 수산화인회석 결정 성장과 크기를 조절하는 기능을 한다고 보고 하였다.

골절된 골의 회복에 있어서 연골성 조직이 골조직으로 변환되는 cartilage-to -bone transition(CBT)은 골절 치유에 있어서 골절 부위가 회복되기 위한 중요한 단계이다. Nakase 등²⁴은 CBT의 개시에 있어서 전제조건인 연골 기질의 광화를 연구하기 위해 광화와 관련된 골기질 단백질을 유전적으로 분리하였다. 이 연구에서 골절 12일 후 골절부위 가골에서 연골세포가 성숙하는 CBT 단계에 있어서 Osteonectin의 mRNA가 소실됨과 동시에 Osteopontin의 mRNA가 나타남을 관찰 할 수 있었다. 이런 결과는 연골 성숙에 있어서 Osteonectin에서 Osteopontin 으로의 전환이 CBT 단계에 일어나는 중요한 현상임을 시사해준다.

상견 하악골에서의 신연 골형성술시 Osteonectin의 발현을 관찰한 백선호 등²²의 연구에서는 정상골을 대조군으로 설정하여 면역조직화학염색으로 발현부위를 알아보았는데 Osteonectin의 발현이 전 시기에 걸쳐 골신연부 중심에 인접한 신생골 형성부에서 강하게 나타났으며 이는 이 부위가 신연 골형성술에 의한 골형성에서 중요한 역할을 하는 부위로서 골신연부 중심의 미분화 간엽세포가 조골세포로 이행하면서 골형성이 시작된다는 것을 보여준다. 특히, 골신연부 주변부의 골막에서 형성된 신생골이 해면골 부위보다 강한 발현정도를 보여주었다는 것은 신생골 형성에 있어서의 골막의 중요성을 시사해준다고 할 수 있다.

본 연구에서는 Osteonectin의 발현양을 확인하기위해 Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) Analysis를 시행한 결과 술 후 7일에 신연군에서는 대조군보다 3배정도 강하게 Osteonectin의 발현이 증가하였고, 술 후 14일 째에 가장 강하게 나타나다, 술 후 28일까지 약간 감소하였으나 여전히 많이 발현되는 것으로 나타났다. 대조군에서는 술 후 14일 군에서 Osteonectin의 발현이 정점에 이르렀다가 술 후 28일째에 이르러서는 현저히 감소하는 양상으로 나타났다.

신연군에서 Osteonectin의 발현이 현저히 증가된 사실에 근거하여 신연 골형성시 중요한 역할을 하는 것으로 추정되었다. 현재 신연 골형성술을 시행함에 있어서 가장 큰 문제점 중의 하나로 알려진 경화기간의 단축을 위해 비교원성 세포의 기질 단백질 중의 하나인 Osteonectin의 발현을

증가시키는 것도 좋은 방법이라 사료되며 이를 위해 세포외 기질 단백질과 성장인자의 발현 및 기능, 영향을 미치는 요소 등에 대한 분자생물학적 연구가 활발해져야 하며 아울러 임상에서 성장인자 주입이나 유전자 치료 등의 방법으로 적용되어야 할 것이다.

결론

골형성에 관여하는 것으로 알려진 osteonectin의 발현양상을 알아보기 위해서 가토의 하악골에 신연 골형성술을 시행하고 잠복기, 신연초기, 경화초기, 경화말기에 희생하여 육안적, 조직학적 검사를 시행하고, 분자생물학적 연구방법인 Reverse Transcriptase -Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) Analysis 를 통해서 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 육안적, 조직학적 검사결과 신연군에서 신연으로 인한 새로운 신생골의 형성을 관찰할 수 있었다.
2. Osteonectin이 골절의 치유과정보다 신연 골형성술을 통한 신생골 형성과정에서 강력한 발현을 보였다.
3. Osteonectin이 골절의 치유과정보다 신연 골형성술 시 더 오랜 기간 지속적으로 유지되었다.

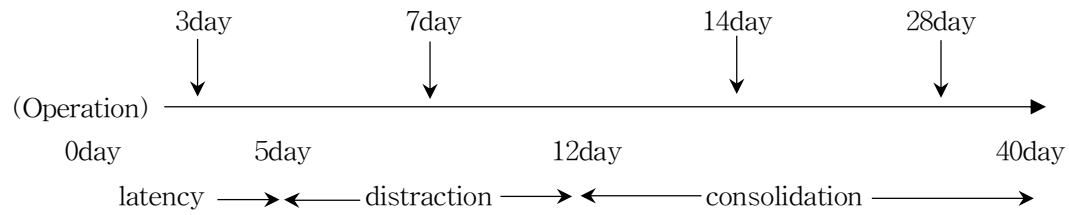
참고문헌

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;2:353-369.
2. Ilizarov GA: The tension-stress effect on the genesis and growth of tissues: Part I. The influence of stability of fixation and soft-tissue preservation. *Clin Orthop* 1989;238:249-281.
3. Ilizarov GA: The tension-stress effect on the genesis and growth of tissues: Part II. The influence of the rate and frequency of distraction. *Clin Orthop* 1989;239:263-285.
4. Snyder CC, Levine GA, Swanson HM, Browne EZ Jr: Mandibular lengthening by gradual distraction. Preliminary report. *Plast Reconstr Surg* 1973;51:506-508.
5. McCarthy JG, Schreiber J, Karp N, Thorne CH, Grayson BH: Lengthening the human mandible by gradual distraction. *Plast Reconstr Surg* 1992;89:1-8.
6. Sawaki Y, Hagino H, Yamamoto H, Ueda M: Trifocal distraction osteogenesis for segmental mandibular defect: a technical innovation. *J Craniomaxillofac Surg* 1997;25:310-315.
7. Minematsu K, Tsuchiya H, Taki J, Tomita K: Blood flow measurement during distraction osteogenesis. *Clin Orthop* 1998;347:229-235.
8. Delloye C, Delefortrie G, Coutelier L, Vincent A: Bone regenerate formation in cortical bone during distraction lengthening. An experimental study. *Clin Orthop* 1990;250:34-42.
9. Yasui N, Kojimoto H, Sasaki K, Kitada A, Shimizu H, Shinomura Y: Factors affecting callus distraction in limb lengthening. *Clin Orthop* 1993;293:55-60.
10. White SH, Kenwright J: The timing of distraction of an osteotomy. *J Bone Joint Surg Br* 1990;72:356-361.
11. White SH, Kenwright J: The importance of delay in distraction of osteotomies. *Orthop Clin North Am* 1991;22:569-579.
12. Tavakoli K, Walsh WR, Bonar F, Smart R, Wulf S, Poole MD: The role of latency in mandibular osteodistraction. *J Craniomaxillofac Surg* 1998;26:209-219.
13. Aronson J, Shen XC, Skinner RA, Hogue WR, Badger TM, Lumpkin CK Jr: Rat model of distraction osteogenesis. *J Orthop Res* 1997;15:221-226.
14. 심중섭, 최인호, 성상철: 백서 경골에서 신연골 형성시 신연속도가 골아세포계의 활성화에 미치는 영향. *대한정형외과학회지* 1996;31:790-800.
15. Yasui N, Sato M, Ochi T: Three modes of ossification during distraction osteogenesis in the rat. *J Bone Joint Surg Br* 1997;79:824-830.
16. 김부경, 신상훈, 김종렬: 백서경골에서 신연속도에 따른 골형성 비교 연구. *대구외지* 2000;26:620-627.
17. Stewart KJ, Lvoff GO, White SA, Bonar SF, Walsh WR, Smart RC et al: Mandibular distraction osteogenesis: A comparison of distraction rates in the rabbit model. *J Craniomaxillofac Surg* 1998;26:43-49.

18. Li G, Simpson AH, Kenwright J, Triffitt JT: Assessment of cell proliferation in regenerating bone during distraction osteogenesis at different distraction rates. *J Orthop Res* 1997;15:765-772.
19. Rowe NM, Mehrara BJ, Dudziak ME, Steinbreck DS, Mackool RJ, Gittes GK et al: Rat mandibular distraction osteogenesis: Part I. Histologic and radiographic analysis. *Plast Reconstr Surg* 1998;102:2022-2032.
20. Mehrara BJ, Rowe NM, Steinbrech DS, Dudziak ME, Saadeh PB, McCarthy JG et al: Rat mandibular distraction osteogenesis: II. Molecular analysis of transforming growth factor beta-1 and osteocalcin gene expression. *Plast Reconstr Surg* 1999;103:536-547.
21. 임순모, 안병근, 박영주, 박희건, 박준우, 이건주 등: 성견 하악 골체부 신장시 신장부위의 증식 세포핵항원과 제 1형 교원질 발현에 관한 연구. *대구외지* 2001;27:386-393.
22. 백선호, 안병근, 박영주, 박희건, 박준우, 이건주 등: 성견 하악골 절단 후 기계적 골 견인에 의해 형성된 골 신장부에 대한 시기별 조직학적 변화. *대구외지* 2001;27:404-413.
23. Meyer U, Meyer T, Vosshans J, Joos U: Decreased expression of osteocalcin and osteonectin in relation to high strains and decreased mineralization in mandibular distraction osteogenesis. *J Craniomaxillofac Surg* 1999;27:222-227.
24. Nakase T, Sugimoto M, Sato M: Switch of osteonectin and osteopontin mRNA expression in the process of cartilage-to-bone transition during fracture repair. *Acta Histochem* 1998;100:287-295.
25. Morone MA, Boden SD, 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 sequences²⁵. *From: Morone: Clin Orthop, Volume(351). June 1998:252-65*

Protein	Forward	Reverse	bp
Osteocalcin	CTCCACCTGGACTACATCG	GCTGCCCAAACCTGCCAGTG	291

논문사진부도

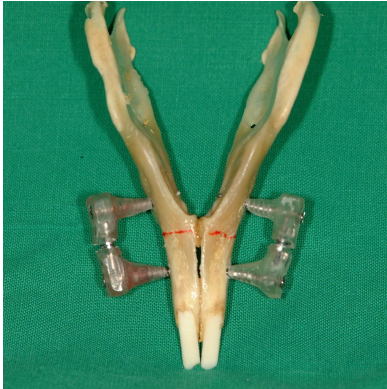


Figure 1. Distraction design

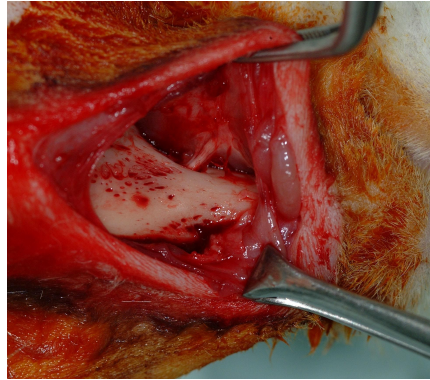


Figure 2. Operation

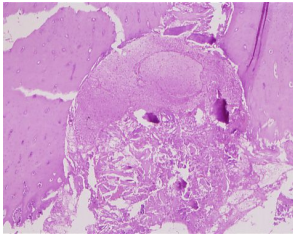


a. Prior to distraction

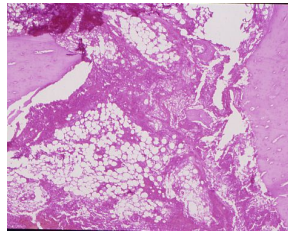


b. After distraction

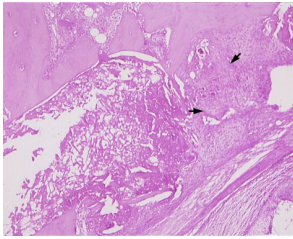
Figure 3. Clinical feature



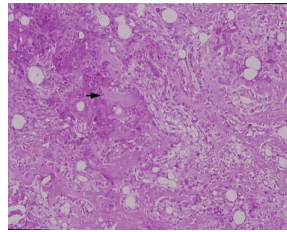
C3



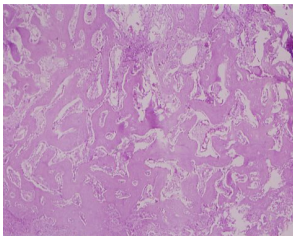
E3



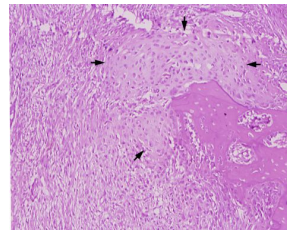
C7



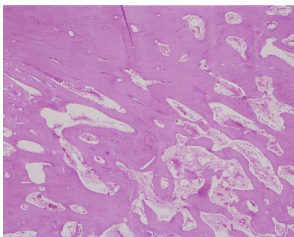
E7($\times 100$)



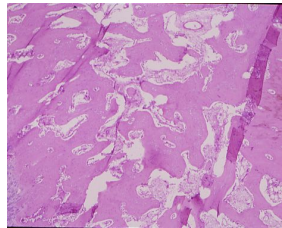
C14



E14



C28

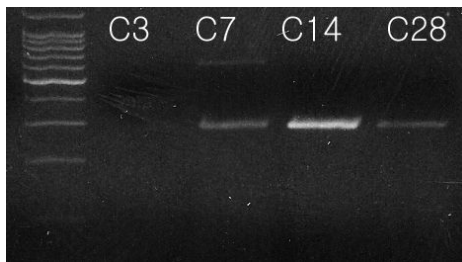


E28

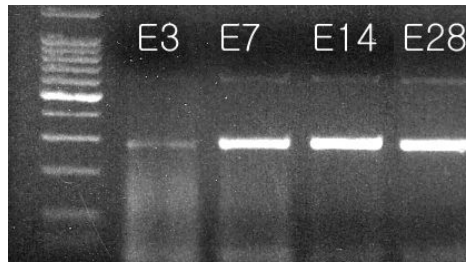
a. Control groups

b. Experimental groups

Figure 4. Histologic feature (H-E stain. $\times 40$)



a. Control group



b. Experimental group

Figure 5. Expression of Osteonectin

	3 day	7 day	14 day	28 day
E group	100	1700	3460	2900
C group	100	602	1760	397

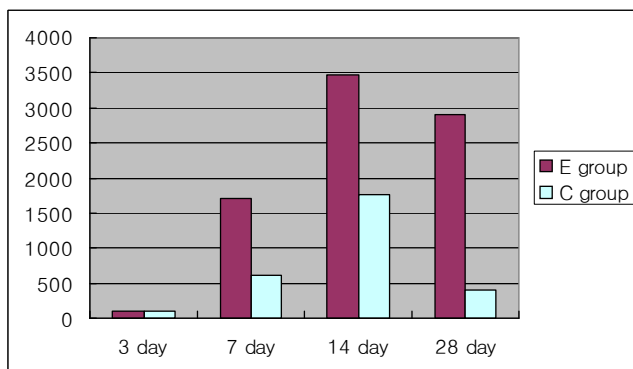


Figure 6. Quantitative analysis of Osteonectin

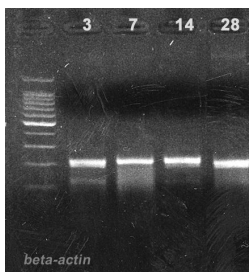


Figure 7. Expression of β -actin

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 Osteonectin.

Expression of Osteonectin were detected throughout the experiment in both groups.

Figure 6. Quantitative analysis of Type I collagen.

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

Figure 7. Expression of β -actin.

Sequence; ATCGTGGGCCCGCCCTAGGCA, TGGCCTTAGGGTTCAGAGGGG, bp(293)