

# 사람태아골모세포에 대한 근골격이식재의 골형성 유도에 관한 효과

박재영, 피성희, 신형식\*

원광대학교 치과대학 치주과학교실

## I. 서 론

치주질환은 치주병원박테리아와 숙주 간의 염증반응으로 인해 일어나며 치아의 지지조직인 치조골, 치주인대, 치은, 백악질 소실을 초래하여, 치아는 기능을 상실하게 된다. 치주질환 치료의 목적은 소실된 치아지지조직을 치아가 기능하고, 더 이상 치주질환에 이환되지 않도록 치유시켜주는 것이다. 치주 치료 후의 치유의 과정은 재생, 재부착, 신부착의 세 가지로 구분할 수 있다.<sup>1)</sup>

재생은 신체의 일부가 손괴되었을 때 잃었던 조직과 기관은 생리적인 과정을 통해 원래의 상태로 복구시키는 과정으로 이상적인 치주치료의 결과이다. 그러나, 치주조직의 재생은 치주인대세포와 치조골 세포가 치주결손부로 분화, 증식되어 결체조직을 형성하여야 하며, 증식과 이주속도가 상대적으로 빠른 상피세포의 치주결손부로의 침입을 막아야 하므로 일반적인 치주치료인 치근면활택술과 치주판막술 후 치유에는 회복과 재부착, 신부착 등이 일어나게 된다.<sup>2,3)</sup>

이상적인 치주질환의 치료결과인 재생을 위해서 차폐막의 사용, 이식재의 사용, 재생유도인자 등이 임상에서 시도되고 있다. 상피의 하방증식을 차단하기 위한 차폐막의 사용은 선택적인 세포증식을 유도할 수 있으므로 신생조직의 재생을 용이하게 하지만, 차폐막은 노출되지 않아야 하며, 감염이 일어나서는 안된다.<sup>4)</sup> 또한, 비흡수성 차폐막의 경우 제거를 위한 2차수술로 인해 신생조직의 손상과 환자 및 술자의 부담이 발생한다. 이로 인한 조직학적, 임상적 결과들이 보고되고 있다. 또한 임플란트를 위한 수평적 골소실은 사용이 제한되고 있다.<sup>5)</sup>

치주질환으로 파괴된 골 결손부를 위해 광범위하게 사용되는 것이 이식재를 사용한 치조골이식술이다. 이식재는 원료에 따라 자가골, 동종골, 이종골, 합성골 이식등으로 구별할 수 있다. 자가골은 골형성, 골유도, 골전도들의 기전으로 신생골을 유도하지만, 수술부위 이외의 채취부위가 부가적으로 필요하며, 골유착과 치근흡수의 부작용등이 보고되고 있다.<sup>6)</sup>

\* 연구비 : 본 연구는 2006년도 원광대학교의 교비지원으로 이루어졌음

\* 교신저자 : 신형식, 전북 익산시 신용동 344-2 원광대학교 치과대학 치주과학교실, 우편번호570-749,

Email : periohs@wonkwang.ac.kr

동종골과 합성골은 일반적으로 자가골에 비해 골형성능력이 부족하지만<sup>7,8)</sup>, 부가적인 채취 술식이 불필요하고, 충분한 양을 사용할 수 있어 널리 사용되고 있다. 동종골 이식에 대한 연구는 Senn<sup>9)</sup>이 탈회한 골의 사용을 소개한 이후, 미 해군 조직 은행에서 Hyatt와 Butler<sup>10)</sup>가 저장골을 임상에 적용하였고 Urist<sup>11)</sup>는 골을 탈회시키면 내제되었던 골유도단백질(BMP)이 노출되어 조직내에 이식되었을 때 숙주의 간엽세포를 조골세포로 분화시켜 골형성을 유도할 수 있다고 보고하였다. 이후 여러 연구자들은 동종골이 자가골의 대체물로 이용가능하고 자가골보다 느리게 흡수되어 골형성의 틀로 작용한다고 하였다. 그러나 동종골은 질환을 전염시킬 가능성이 있고 골은행이 필요하며 신선 동종골 이식 후에 면역학적 거부반응을 야기할 가능성이 있다.<sup>12)</sup> 이러한 질환 전염의 가능성 및 면역학적 거부현상을 감소하기 위해 r-ray에 노출시키거나 냉동 혹은 화학처리를 하는데 이러한 과정은 골형성 능력을 감소시킬 수 있다. 이를 방지하기 위해 Schallhom과 Hyatt는 조직 적합성검사(HL-A 항원 검사)를 실시하였고 동결건조하므로 이식항원을 제거하는 방법도 개발되어 현재 가장 널리 사용되고 있다.<sup>13)</sup>

동종골 이식은 Mellonig<sup>14)</sup>에 의해 처음 치주치료에 사용되었으며 Nade<sup>15)</sup>은 여러 다양한 동물에 이식재를 이용한 실험에서 탈회동결건조골 이식이 냉동건조골 이식보다 더 많은 신생골 유도 능력이 있다는 것을 보고하였다.

탈회동결건조동종골(decalcified freeze-dried bone allograft)은 지난 40년이상 치과와 의과분야에서 골이식재로써 사용되어 왔으며 여러 실험들을 통하여 골내낭 결손부, 치조능 결손부, 임플란트 주위의 골 결손부를 포함하는 다양한 골 결손부에서 골 생성의 우수한 결과를 보고 하였다. 그러나 Becker<sup>16,17)</sup>은 DFDBA의 신생골 형성의 생물학적 활성도는 입증될 수 없으며 따라서 임상적 효과 역시 의심스럽다고 보고하였다. DFDBA의 효과에 대해 이러한 상반된 결과가 나오는 이유로 상품화된 DFDBA가 제조 방법, 공여자의 나이등 여러 조건에

따라 다양한 생물학적 활성도를 가지기 때문이라는 연구결과가 있다.<sup>18,19,20)</sup> 치유과정에서 이런 활성도의 차이는 이식재에 따라 골유도단백질의 양이 충분하지 않거나, 골유도단백질이 불활성화되었기 때문에 치료결과를 예측하는 것이 곤란하다.<sup>18)</sup>

본 실험에 사용된 MTF(Musculoskeletal Transplant Foundation)는 상품화된 DFDBA로 골유도 및 골전도 능력이 예상되어진다. 하지만 신생골 형성의 생물학적 활성도에 대한 논란이 아직까지 계속 되고 있고 제조방법이나 공여자의 상태에 따라 활성도가 달라지므로 이에 MTF의 골생성효과를 실험실상에서 검증하고자 실시하였다.

## II. 연구 재료 및 방법

### 1. 연구 재료

#### (1) 세포배양

골기질 단백을 만들고 광화시킬 수 있는 태아골모세포주(hFOB1.19 ; American Type Culture Collection, Manassas, VA)를 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco BRL, GibcoBRL, Grand island, NY, USA)과 0.03mg/ml의 G-418 (Duchefa, Netherlands)이 첨가된 Dulbecuo's Modified Eagle's Medium Nutrient Mixture F-12 HAM (DMEM/F-12 1:1 Mixture, Sigma, St.Louis, MO, USA) 8ml이 담긴 100mm 배양접시에 적정세포 5×10<sup>5</sup>cell/well를 분주하였다. 이를 34°C의 온도 및 100% 습도조건에서 95%의 공기와 5% CO<sub>2</sub>를 계속 공급하면서 배양하였다. 배양액은 세포가 충분한 증식이 일어날 때까지 2일 간격으로 교환하였으며 계대 배양은 1:3의 비율로 시행하였다. 본 실험에서는 4~6 계대 배양된 세포를 사용하였다.

#### (2) MTF의 준비

MTF(Musculoskeletal Transplant Foundation)를 0.5g을 공급받아 LN<sub>2</sub> gas를 이용하여 분말로 분쇄한 후 1mg/ml, 100µg/ml, 10µg/ml, 1µg/ml, 100ng/ml

ml, 10ng/ml, 1ng/ml로 만들어 사용하였다.

## 2. 연구 방법

### (1) 세포 증식 측정

배양접시에서 밀생에 도달한 단층의 세포들을 0.25% trypsin/EDTA로 분리해 내었다. 이 세포들을 배양액으로 현탁시키고 6-well plate에  $2 \times 10^4$  개의 세포수가 되도록 분주하였다. 24시간 후에 배양액을 제거하고 실험군에는 1mg/ml, 100 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml, 1 $\mu$ g/ml, 100ng/ml, 10ng/ml, 1ng/ml의 MTF를 첨가하고, 양성 대조군에는  $10^{-7}$ M의 dexamethasone을 넣었다. 각각 3, 5일 동안 34°C에서 배양한 후, 혈구계수기를 이용하여 세포의 수를 계산하였다. 시일별로 각 그룹에서 3번 배양을 시행했다.

### (2) 염기성 인산분해효소 활성 측정

hFOB1.19을 6-well plate에  $1 \times 10^5$  cell/well이 되도록 분주한 후, 10% FBS가 첨가된 DMEM/F-12 1:1 Mixture에서 단일 밀생층(mono layer)이 형성될 때까지 34°C, 100% 습도, 5% CO<sub>2</sub> 공기 혼합 배양기에서 배양하였다. 단일 밀생층이 형성된 후 배지를 제거하고 DMEM/F-12 1:1 Mixture으로 2회 세척 후, 10% FBS, G-418 항생제, 50 $\mu$ g/ml ascorbic acid, 10mM sodium  $\beta$ -glycerophosphate가 첨가된 DMEM/F-12 1:1 Mixture에 음성 대조군에는 다른 처리 없이 분주하였으며, 양성 대조군에는  $10^{-7}$  M의 dexamethasone을 첨가하였고, 실험군은 1mg/ml, 100 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml, 1 $\mu$ g/ml, 100ng/ml, 10ng/ml, 1ng/ml 농도의 MTF를 첨가하여 분주한 후 추가로 5일간 더 배양하였다.

일정 배양시간이 지난 후 배지를 제거하고, trypsin-EDTA로 세포를 분리시키고, 1,500rpm에서 6분간 원심분리하였다. 상층액을 제거하고 0.2ml의 멸균된 증류수를 첨가하여 초음파 분쇄기로 현탁하였다. 각 세포 현탁액 0.1ml에 0.1 M glycine NaOH

buffer (pH 10.4) 0.2ml, 15 mM의 p-nitrophenyl phosphate (pNPP ; Sigma, USA) 0.1ml, 0.1% triton X-100/saline 0.1ml와 멸균된 증류수 0.1ml를 잘 혼합하여, 이 반응물을 37°C에서 30분간 배양하였다. 0.1 N NaOH를 0.6ml 첨가함으로써 이들 반응을 중지시켰다. p-NPP의 가수분해는 410nm 파장의 ELISA reader에서 흡광도의 차이로 나타나며, p-nitrophenol (p-NP ; Sigma, USA)을 기준값으로 이용했다. 단백질 농도는 BCA protein assay reagent (Pierce, USA)를 사용하여 측정하며, bovine serum albumin을 표준으로 하였고, ALP 활성도는 nM/min/mg of protein으로 나타내었다. 매 실험마다 ALP 활성도를 음성대조군에 대한 백분율로 산출하였으며, 각각의 실험은 3회 반복 시행하였다.

### (3) 칼슘 축적 측정

6-well 배양 접시에  $1 \times 10^5$  개의 세포가 들어가도록 분주한 후 각각 적정 농도로 25일간 배양하였다. 세포외기질 무기질화를 유도하기 위해 23일째 되는 날, 4mM/L NaHPO<sub>4</sub>를 첨가해서 배양하였으며 Alizarin red-sulfate (AR-S, Sigma) 염색 방법을 사용하였다. 25일이 된 후 배지를 제거하고, PBS로 세척하였다. Ice-cold 70% ethanol로 한 시간 동안 4°C에서 고정하고 ethanol을 제거한 후 40mM/L AR-S (pH 4.2)로 실온에서 10분동안 염색하였다. AR-S 용액을 제거하고 멸균 증류수로 조심스럽게 3회에 걸쳐 세척하였다. 염색된 부분을 육안으로 비교 관찰하기 위하여 digital color camera (Nikon E995, Nikon Corporation, Japan)로 촬영 후, 이를 계량적으로 비교하기 위하여 10mM/L sodium phosphate (pH 7.0)에 10%(w/v) cetylpyridinium chloride가 녹아있는 용액을 이용해 염색부위를 녹여 AR-S의 농도를 562nm의 흡광도에서 읽었으며 AR-S standard curve는 같은 용액을 사용하였다.

### (4) 통계분석

통계학적 유의성은 SPSS 10.0 Version 프로그램을 사용하여 평균과 표준오차를 구하고, 이들의 통

계학적 유의성은 일원분산분석법(ANOVA)을 이용하여 사전 검정하였으며, 사후 검정은 Tukey법을 사용하였다. ( $p < 0.05$ )

### III. 연구 성적

#### 1. 세포증식 측정

hFOB1.19에 대한 MTF 1mg/ml, 100 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml, 1 $\mu$ g/ml, 100ng/ml, 10ng/ml, 1ng/ml을 배양액에 첨가후 3, 5일간 배양하여 살아있는 세포수를 대조

군과 비교 측정하였다. 3일간 배양한 경우 음성대조군에 비해 양성대조군에서만 유의한 차이를 나타내는 세포수 증가가 있었으며, 모든 실험군에서 음성대조군에 비해 유의한 차이를 보이지 않았다. 5일간 배양한 경우에는 음성대조군에 비해 양성대조군 뿐만 아니라 모든 실험군에서 통계학적으로 유의한 세포수 증가를 나타냈다. 특히 100ng/ml와 10ng/ml에서 유의한 증가를 나타내었다. 그리고, 각 실험군 간에는 농도 차이에 따른 유의한 변화가 없었다. (Table 1, Figure. 1).

Table 1. MTT assay on MTF in hFOB 1.19. (Mean $\pm$ S.D.)

	C-	C+	1mg/ml	100 $\mu$ g/ml	10 $\mu$ g/ml	1 $\mu$ g/ml	100ng/ml	10ng/ml	1ng/ml
3day	6.27 $\pm$ 0.16	7.03 $\pm$ 0.21*	6.6 $\pm$ 0.19	6.82 $\pm$ 0.25	6.9 $\pm$ 0.11	6.9 $\pm$ 0.19	6.97 $\pm$ 0.16	6.92 $\pm$ 0.06	6.83 $\pm$ 0.31
5day	12.77 $\pm$ 0.18	14.73 $\pm$ 0.18*	13.73 $\pm$ 0.01*	13.8 $\pm$ 0.22*	13.93 $\pm$ 0.22*	13.98 $\pm$ 0.08*	14.03 $\pm$ 0.20*	13.98 $\pm$ 0.16*	13.9 $\pm$ 0.23*

\*Statistically significant compared to the negative control( $p < 0.05$ ).

C-(negative control): added distilled water

C+(positive control): added 10<sup>-7</sup> M dexamethasone

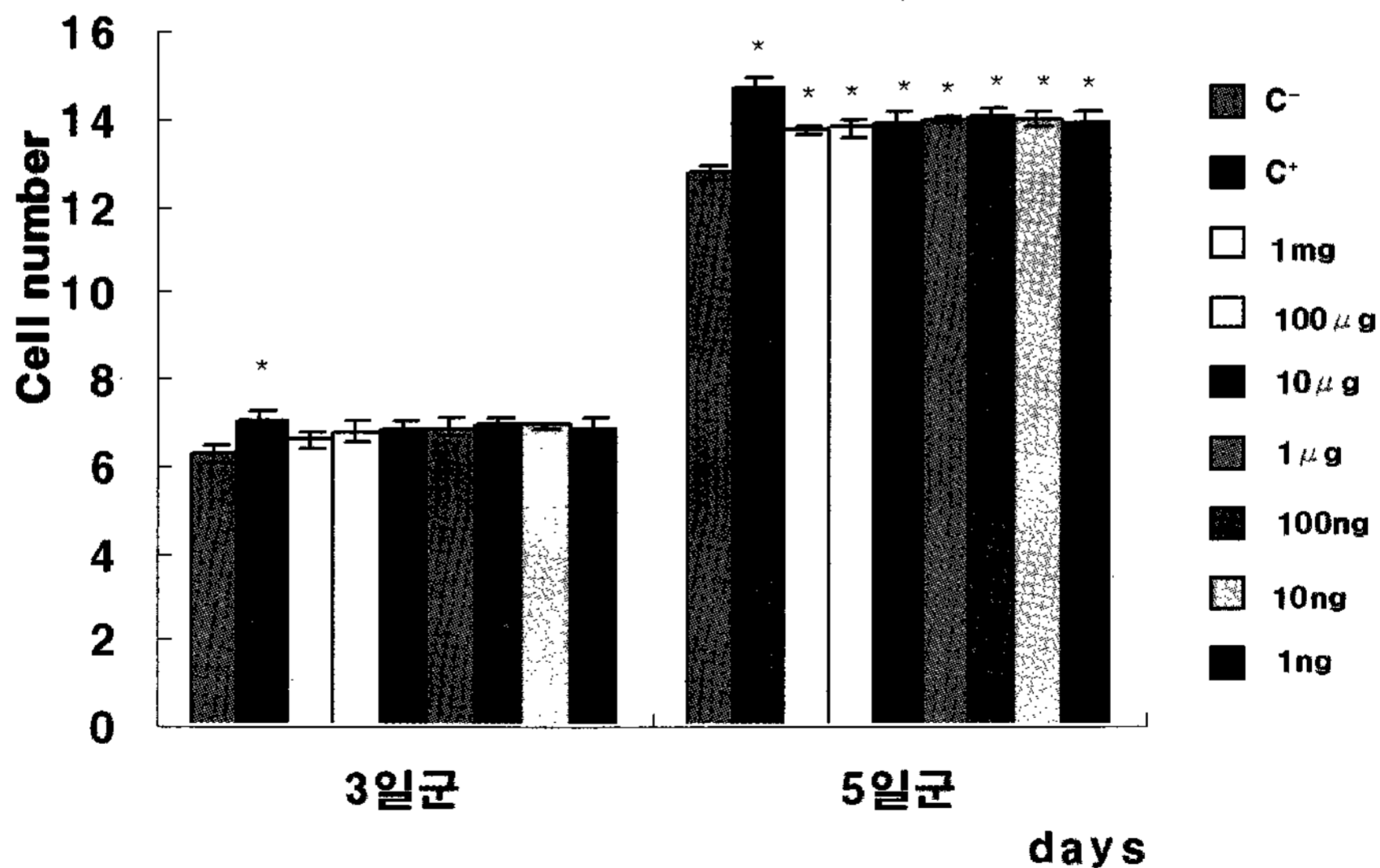


Figure 1. MTT assay on MTF in hFOB 1.19.

MTT assay was performed after 3 and 5 day incubation.

Vertical bars represent standard deviation of each independent experiments.

C-(negative control): added distilled water

C+(positive control): added 10<sup>-7</sup> M dexamethasone

\* : Statistically significant difference compared with the negative control ( $p < 0.05$ ).

## 2. 염기성 인산분해효소의 활성도 측정

MTF 1mg/ml, 100 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml, 1 $\mu$ g/ml, 100ng/ml, 10ng/ml, 1ng/ml을 hFOB1.19에 투여하여, 골재형성과 재생이 일어나는 부위에서 국소적 인산이온 농도를 증가시키는 ALP의 합성을 측정하는 결과는 Table 2와 같다. 실험결과 음성대조군에 비하여 양성대조군과 실험군의 100ng/ml, 10ng/ml, 1ng/ml에서 통계학적으로 유의한 증가를 보였으며,

그 이외의 농도에서는 유의한 차이를 보이지 않았다. (Table 2, Figure. 2)

## 3. 칼슘측정.

MTF 1ng/ml, 10ng/ml을 배양 태아골모세포에 투여한 뒤 석회화된 결절을 관찰한 결과 음성대조군과 비교시 양성대조군과 모든 실험군에 유의한 증가를 보였다. ( $p < 0.05$ ) (Table 3, Figure 3)

Table 2. ALP activity on MTF in hFOB 1.19.

(nmole/30min/mg of protein) (Mean $\pm$ S.D.)

C-	C+	1mg/ml	100 $\mu$ g/ml	10 $\mu$ g/ml	1 $\mu$ g/ml	100ng/ml	10ng/ml	1ng/ml
0.28 $\pm$ 0.01	0.39 $\pm$ 0.01*	0.30 $\pm$ 0.01	0.31 $\pm$ 0.01	0.31 $\pm$ 0.00	0.31 $\pm$ 0.01	0.32 $\pm$ 0.01*	0.34 $\pm$ 0.01*	0.34 $\pm$ 0.01*

\*Statistically significant compared to the negative control( $p < 0.05$ ).

C-(negative control): added distilled water

C+(positive control): added 10 $^{-7}$  M dexamethasone

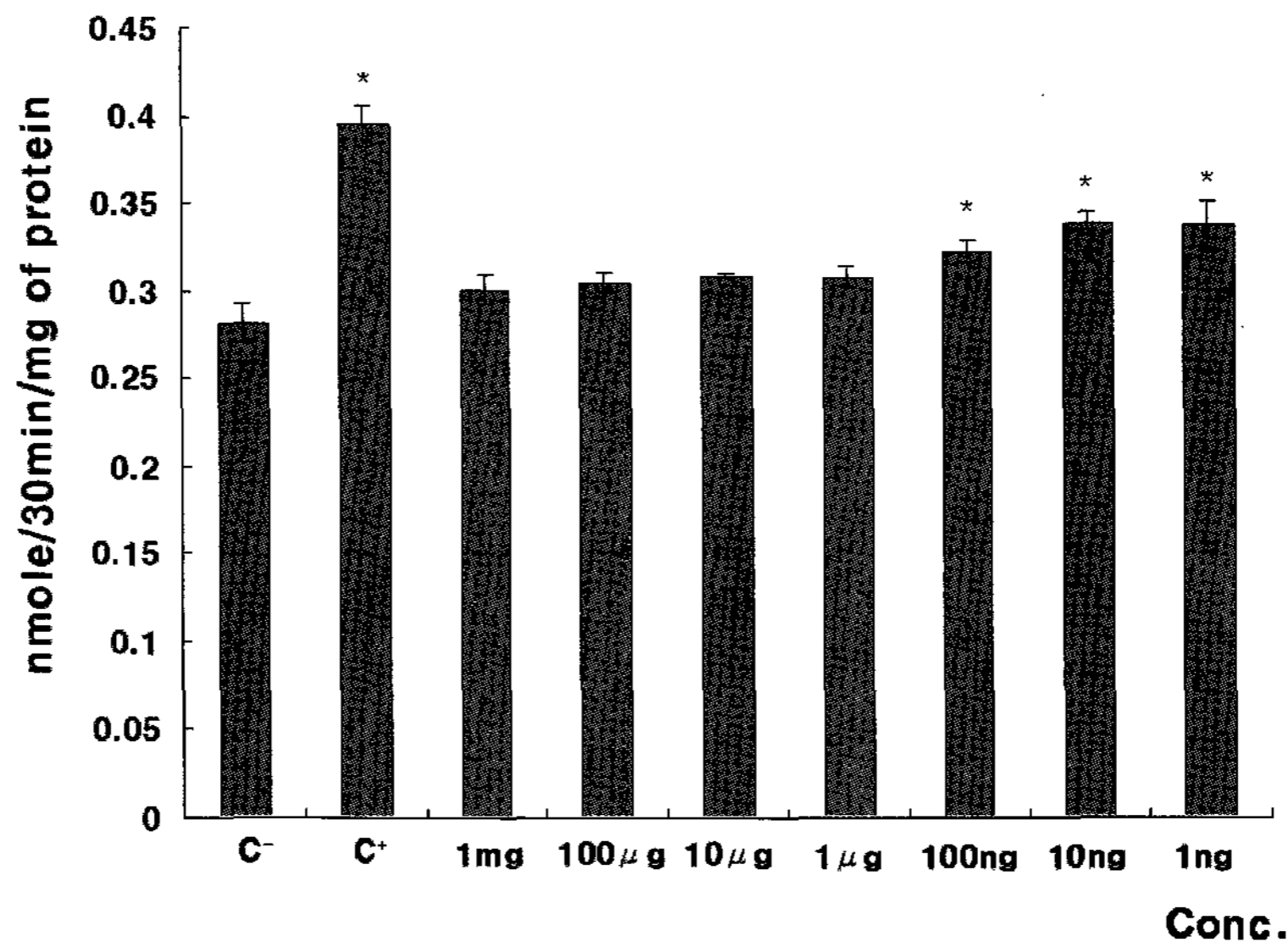


Figure 2. ALP Activity on MTF in hFOB 1.19.

ALP activity was performed at 3 day after confluence.

Vertical bars represent standard deviation of each independent experiments.

C-(negative control): added distilled water

C+(positive control): added 10 $^{-7}$  M dexamethasone

\* : Statistically significant difference compared with the negative control ( $p < 0.05$ ).

**Table 3.** Calcium accumulation assay of hFOB1.19 exposed to MTF

(Mean±S.D.)

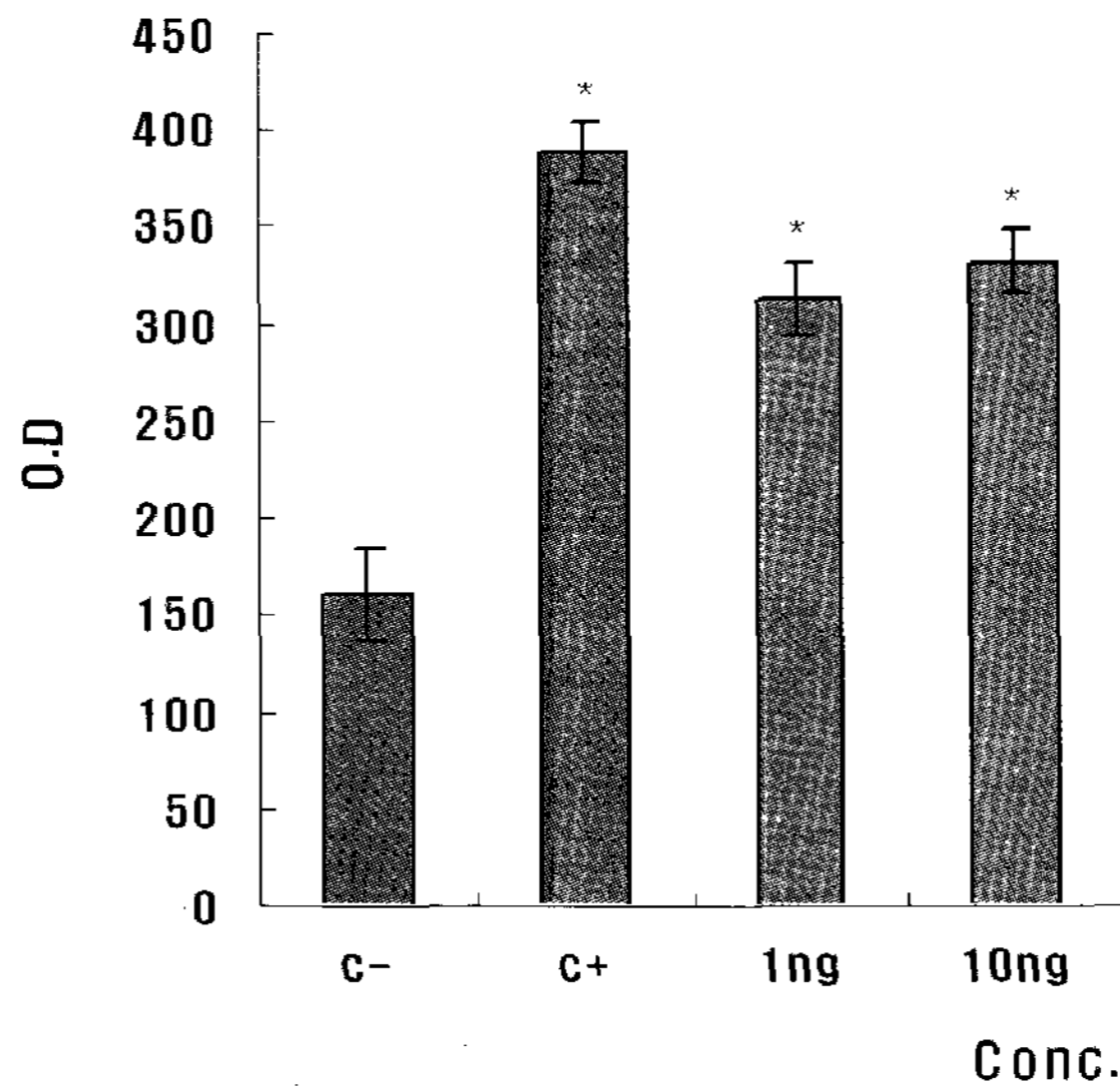
	negative control	positive control	1 ng/ml	10 ng/ml
O.D	160.85±24.54	241.91±15.41*	194.84±19.23*	206.58±16.38*

\*Statistically significant compared to the negative control(p<0.05).

C-(negative control): added distilled water

C+(positive control): added 10<sup>-7</sup> M dexamethasone

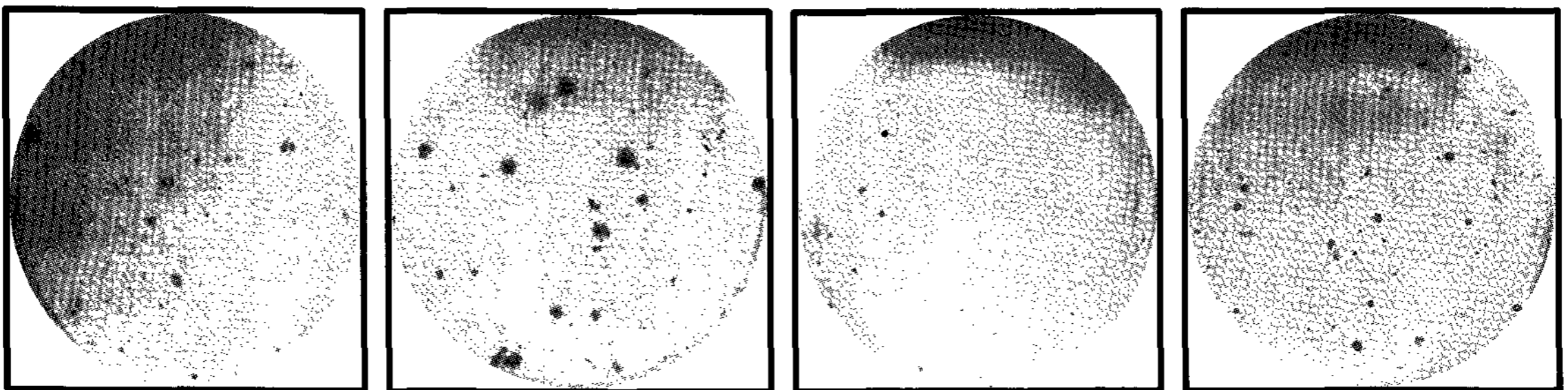
O.D : Optical Density



**Figure 3.** Calcium accumulation assay of hFOB1 treated with MTF.

Vertical bars represent standard deviation of each independent experiments.

(C- : negative control, C+ : Positive control, O.D: Optical Density \* : p<0.05)



**Photo 1.** AR-S staining of cultured hFoB1.19 with MTF. The mineralized matrix was stained with AR-R for calcium accumulation

그리고, AR-S로 염색된 석회화 결절을 육안으로 비교하였을 때, 음성대조군과 비교하여 양성대조군

과 1ng/ml, 10ng/ml 처리군에서 증가된 결절의 수를 보인다. (Photo 1)

#### IV. 총괄 및 고찰

본 연구는 치주질환으로 파괴된 골조직의 회복을 위해 널리 사용되고 있는 동종골 중 MTF (Musculoskeletal Transplant Foundation) 조직은행의 탈회동결건조골을 사용하여 태아골모세포주에 대한 세포활성도와 칼슘의 침착을 밝혀 치주질환 치료제로서의 효용을 확인하고자 실험을 진행하였다.

이식수술시 동종골은 수술부위 이외의 외상을 주지 않으면서 원하는 양을 획득할 수 있는 장점이 있지만, 그대로 사용할 경우 항원성으로 인해 면역거부반응을 초래하거나 감염의 위험성, 오염 등의 위험을 가지고 있다. 그러므로, 항원성을 제거하고 생체 조직 적합성을 얻기 위하여 단순, 냉동 건조, 탈회, 방사선 조사, 열, 멸균 등의 다양한 방법으로 처리 보관되고 있다. 특히 탈회는 골기질의 골생성 단백질 제거하지 않으며, 골유도능을 유지하고 있어 숙주조직의 신생골 형성능력을 쉽게 하는 것으로 알려져 있다.

Urist<sup>11)</sup>는 동물실험에서 피질골을 염산으로 탈회시키고 냉동 건조시킨 탈회동결건조골을 사용한 결과 골형성이 유도된다는 것을 보고 하여 동종 탈회골 이식의 임상적 이용의 근간을 마련하였다. 피질골이 탈회되면서 골 기질내의 BMP를 노출시키며, 이로 인해 골이식편의 골형성 능력을 증가시키게 된다. 이 BMP는 협수성 당단백으로 혈관주위의 간엽조직 세포의 분화를 유도하여 골결손부나 골격 외부에서도 골조직을 형성하도록 하며 골아세포계열 뿐만 아니라 골을 형성하지 않는 비조골간엽세포군의 조골세포로의 분화를 유도해서 신생골과 백악질의 형성을 촉진하므로써 치주조직재생에 관여하는 것으로 알려져 있다. 세포배양실험을 통해 rhBMP-2가 미분화 간엽세포들이 조골세포로 분화되게 하는 것이 관찰되었고, 개의 하악골에 형성된 골결손부 치유과정에서 rhBMP-2가 구강 악안면부위의 골재생에 폭넓은 치료효과를 가지고 있음이 보고 되었다. 탈회동결건조골의 임상적 사용은 Libin<sup>21)</sup>에 의해 처음으로 사람에게 사용되었고, Pearson<sup>22)</sup>, Mellonig

등<sup>23)</sup>이 치조골 결손부위에 탈회동결건조골을 사용하여 좋은 임상결과를 나타냈다고 보고하였다. Quintero<sup>24)</sup>은 인간의 골내낭에 탈회동결건조골을 이식한 후 6개월에 걸쳐 골형성능력을 평가하였는데 골높이 2.4mm의 증가와 65%의 골재생을 나타내었다. 한편으로는 탈회동결건조골의 골형성 유도 효과에 대하여 의문을 제기하는 연구결과들도 보고 되어 논란이 되고 있다. Becker<sup>16,17)</sup>은 자가골과 탈회동결건조골로 골이식을 시행한지역의 조직학적 관찰에서 탈회동결건조골은 단지 골형성의 틀로 작용하고 골유도성에는 영향을 주지 않는다고 보고하였으며 임플란트 주위의 골 결손부에 골유도재생술을 시행한 연구에서도 동종골의 사용 효과가 의심스럽다고 보고하였다. Schwartz<sup>19,20)</sup>은 상업적으로 판매되고 있는 DFDBA의 BMP양이 조직은행마다 또한 같은 조직은행이라도 제품마다 다르기 때문에 신생골을 유도하는 능력이 차이가 있으며, 이는 DFDBA의 질이 본래 다르다며, 이런 차이가 연령의 차이에 의한 것이라고 보고 하였다. 이전 1996년 연구에서는 6개의 조직은행의 DFDBA를 사용하여 신생골 형성을 관찰하였는데, 각기 신생골이 형성되는 시기가 달랐으며, 한 조직은행의 DFDBA는 전혀 신생골을 형성하지 못하였음을 보고하였다.

본 실험에 사용한 탈회동결건조골은 MTF 조직은행에서 제조되어 상업적으로 판매되는 것으로 MTF는 미국조직은행연합의 공인조직은행으로 의과대학, 학술단체, 조직이식단체의 비영리 콘소시엄으로 기증자는 PCR검사(Polymerase Chain Reaction Test)를 이용하여 HIV감염여부를 판단한 후 B형감염, C형감염, 매독등 가능한 전염성 질환들의 감염여부를 검사하여 감염되지 않은 기증자를 대상으로 골을 채취하여 탈회동결건조골을 제조한다. 실험에 사용된 MTF 조직은행의 탈회동결건조골은 250-850 micro의 피질골 분말로 태아골모세포주에 적용하기 위해 더 작은 미립의 분말로 처리하여 사용하였다.

세포의 증식을 관찰한 실험에서 5일후 음성대조군에 비해 모든 실험군에서 통계학적으로 유의한 세포수 증가를 나타냈다. 세포증식의 증가는 세포의 증

식단계에서 여러 층을 형성할 수 있다는 것을 나타내므로 이는 골 형성의 초기에 도움을 줄 것으로 사료되었다.

경조직의 형성과정은 알칼리성 인산분해효소(alkaline phosphatase, ALP) 활성이 높은 세포가 무기질(mineral)이 침착될, I형 교원질이 주성분인 유기기질(organic matrix)을 혈액공급이 풍부한 상태에서 형성하는 것으로 요약할 수 있다.<sup>25)</sup> ALP는 유기인산 에스테르를 가수분해하여 석회화가 이루어지는 부위에서 국소적으로 인산이온의 농도를 증가시키는 효소로서, 세포외기질에 calcium phosphate를 침착시켜 석회화를 유도하는 기능을 갖는다고 알려져 있다.<sup>26)</sup>

본 실험에서 MFT 100ng/ml, 10ng/ml, 1ng/ml을 투여한 실험군에서 통계학적으로 유의한 증가를 보였으며 이렇게 증가된 ALP 합성은 세포외기질에 calcium phosphate를 침착시켜 골 형성의 핵역할을 함으로써 석회화를 유도하여 조골 세포의 분화와 성숙에 중요한 역할을 할 것으로 생각되었다.

본 연구에서 골 광물화 과정 중 칼슘축적 정도를 알아내기 위하여 AR-S 염색법을 사용하였는데, MTF 1ng/ml, 10ng/ml을 투여한 군에서 석회화 결절을 계량한 결과 유의하게 증가하였으며 육안으로 증가된 석회화 결절을 관찰 할 수 있었다. 이 염색법은 세포의 형태학적 특성 분석 즉 세포의 경계부위를 염색하여 세포의 밀도, 면적, 주변둘레, 한 변의 길이 등을 광학 현미경으로 촬영 후 분석할 수 있다. 특히 AR-S 염색법은 칼슘염에 특이하게 반응하여 칼슘과 칼슘간에 reddish-orange complex를 형성하는 견본에서 적은 양의 칼슘을 알아내는데 유용하다.<sup>27)</sup> 본 연구를 통해 MTF가 골 재형성 과정 중 골 모세포의 광물화 과정에 긍정적인 영향을 미치는 것으로 사료되었다.

골세포 분화단계에서 교원질과 ALP가 초기 단계에서 발현되며, 후기 분화단계로 가면서 bone sialoprotein, osteopontin, osteocalcin등이 발현된다.<sup>28)</sup> bone sialoprotein는 mineralization의 기시 과정에서 역할 하는 것으로 알려져 있고 osteocalcin

는 mineralization 초기단계에서 crystal growth를 조절하는 기능을 담당할 것으로 여겨지고 있다. Osteopontin는 그 기능이 명확하게 밝혀져 있지 않지만 crystal growth의 조절과, 골생성 혹은 골흡수 부위로의 세포 이동과 부착의 촉진인자로 여겨지고 있다. 이러한 단백질의 발현은 치주조직 내에서 경조직 형성능력을 가져 골 재생의 지표 물질이 될 수 있을 것이다.<sup>29)</sup>

본 실험을 통하여 MTF가 골형성에 초기에 긍정적 역할을 할 것으로 기대되지만 후기 분화단계에 영향을 주는 bone sialoprotein, osteopontin, osteocalcin과 같은 인자들에 대한 부가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## V. 결 론

본 연구는 사람태아골모세포에서 MTF (Musculoskeletal Transplant Foundation)를 첨가하였을 경우에 골형성능력에 미치는 영향을 평가하기 위해 세포 증식정도, ALP, 칼슘축적을 분석하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 세포의 증식 정도를 평가한 결과 3일군에서는 유의한 차이는 없었고 5일군에서는 모든 실험군에서 음성대조군에 비해 유의한 수준의 증가를 나타내었다( $p < 0.05$ ).
2. ALP의 합성을 측정한 결과 MTF 100ng/ml, 10ng/ml, 1ng/ml를 투여한 실험군에서 음성대조군에 비해 유의한 수준의 증가를 보였다( $p < 0.05$ ).
3. 칼슘축적은 음성대조군에 비하여 1ng/ml, 10ng/ml 처리군에서 유의하게 증가하였다( $p < 0.05$ ). 그리고, AR-S로 염색된 석회화 결절을 육안으로 비교하였을 때, 음성대조군과 비교하여 1ng/ml, 10ng/ml 처리군에서 증가된 결절 수를 보였다.



본 연구를 통해 MTF가 세포 증식률, ALP의 활성화도 증가를 나타내는 결과를 확인할 수 있었으며 AR-S를 통한 염색법으로 칼슘 축적의 결과를 보여주므로써 골세포의 활성을 촉진시키며 골 형성 과정에 효과가 있을 것으로 사료된다.

## VI. 참고문헌

- Melcher AH. On the repair potential of periodontal tissues. *J Periodontol*. 1976 May;47(5): 256-60.
- Caton J, Nyman S, Zander H. Histometric evaluation of periodontal surgery. II. Connective tissue attachment levels after four regenerative procedures. *J Clin Periodontol*. 1980 Jun;7(3):224-31.
- Nyman S, Karring T, Lindhe J, Planten S. Healing following implantation of periodontitis-affected roots into gingival connective tissue. *J Clin Periodontol*. 1980 Oct;7(5):394-401.
- Gottlow J, Nyman S, Lindhe J, Karring T, Wennstrom J. New attachment formation in the human periodontium by guided tissue regeneration. Case reports. *J Clin Periodontol*. 1986 Jul;13(6):604-16.
- Urbani G, Graziani A, Lombardo G, Caton JG. Clinical results with exposed polyglactin 910 resorbable membranes for guided tissue regeneration. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 1997 Feb;17(1):41-51
- Moskow BS, Karsh F, Stein SD. Histological assessment of autogenous bone graft. A case report and critical evaluation. *J Periodontol*. 1979 Jun;50(6):291-300.
- Becker W, Becker BE, Caffesse R. A comparison of demineralized freeze-dried bone and autologous bone to induce bone formation in human extraction sockets. *J Periodontol*. 1994 Dec;65(12):1128-33.
- Egelberg J. Regeneration and repair of periodontal tissues. *J Periodontal Res*. 1987 May;22(3):233-42.
- Senn, N. On the healing of aseptic bone cavities by implantation of antiseptic decalcified bone. *Am. J. Med. Sci.* 98:219, 1889.
- Hyatt, G.W. and Butler, M.C. The procurement, storage and clinical use of bone homografts. *AAOS Instructional Course Lecture XIV*:343, 1957.
- Urist MR. Bone formation by autoinduction. *Science* 1965;150:893-899.
- Garraway R., Young WG., Daley T., Harbrow D., and Bartold PM. : An assessment of the osteoinductive potential of commercial demineralized freeze-dried bone in the murine thigh muscle implantation model. *J Periodontol* 69 : 1325-1336, 1998.
- 전국치주과학교수협의회, 치주과학 제4판, 군자출판사, 574-596.
- Mellonig J.T., Bowers G.M., Cotton W.R. : Comparison of bone graft materials. Part II. New bone formation with autografts and allografts: a histological evaluation. *J Periodontol* 52:297-302, 1981
- Nade S, Burwell RG. Decalcified bone as a substrate for osteogenesis. An appraisal of the interrelation of bone and marrow in combined grafts. *J Bone Joint Surg Br*. 1977 May;59(2):189-96.
- Becker W, Urist M, Becker BE, Jackson W, Parry DA, Bartold M, Vincenzi G, De Georges D, Niederwanger M. Clinical and histologic observations of sites implanted with intraoral autologous bone grafts or allografts. 15 human case reports. *J Periodontol*. 1996 Oct;67(10):1025-33.

17. Becker W, Lynch SE, Lekholm U, Becker BE, Caffesse R, Donath K, Sanchez R. A comparison of ePTFE membranes alone or in combination with platelet-derived growth factors and insulin-like growth factor-I or demineralized freeze-dried bone in promoting bone formation around immediate extractionsocket implants. *J Periodontol.* 1992 Nov;63(11):929-40.
18. Shigeyama Y, D'Errico JA, Stone R, Somerman MJ. Commercially-prepared allograft material has biological activity in vitro. *J Periodontol.* 1995 Jun;66(6):478-87.
19. Schwartz Z, Somers A, Mellonig JT, Carnes DL Jr, Dean DD, Cochran DL, Boyan BD. Ability of commercial demineralized freeze-dried bone allograft to induce new bone formation is dependent on donor age but not gender. *J Periodontol.* 1998 Apr;69(4):470-8.
20. Schwartz Z, Mellonig JT, Carnes DL Jr, de la Fontaine J, Cochran DL, Dean DD, Boyan BD. Ability of commercial demineralized freeze-dried bone allograft to induce new bone formation. *J Periodontol.* 1996 Sep;67(9):918-26.
21. Libin BM, Ward HL, and Fishman L.: Decalcified, lyophilized bone allografts for use in human periodontal defects, *J. Periodontol.*, 46:51-56, 1975.
22. Pearson GE., Rosen S., and Deporter DA.: Preliminary observations in the usefulness of a decalcified freeze-dried cancellous bone allograft material in periodontal surgery, *J. Periodontol.*, 52:55-59, 1981.
23. Mellonig JT.: Freeze-dried bone allografts in periodontal reconstructive surgery, *Dent. Clin. North Am.*, 35:505-520, 1991.
24. Quintero G., Mellonig JT., Gambill VM., and Pelleu GM.: A six-month clinical evaluation of decalcified freeze-dried bone allograft in periodontal osseous defects. *J. Periodontol.*, 53:726-730, 1982.
25. A. R. Ten Cate, *Oral Histology* 111-119, 1994. FOURTH EDITION.
26. Beertesn, W., and Theo Van Den Bos. Calcification of dentinal collagen by cultured rabbit periosteum: The role of alkaline phosphatase matrix., 9:159-171, 1989.
27. Bancroft JD, and Stevens A. : *Theory and practice of histological techniques*, 3rd edition. Churchill Livingstone, New York 245-267, 1990.
28. Yao KL, Todescan R, and Sodek J. : Temporal changes in matrix protein synthesis and mRNA expression during mineralized tissue formation by adult rat bone marrow cells in culture. *J Bone Miner Res.*;9:231-24, 1994.
29. Boskey AL, Matrix proteins and mineralization : an overview. *Connect Tissue Res.*;35:357-36, 1996.

## Effects of Musculoskeletal Transplant Foundation on Bone Formation in Human Fetal Osteoblasts

Jae-young Park, Sung-Hee Pi, Hyung-Shik Shin\*

Department of Periodontology, School of Dentistry, Wonkwang University

DFDBA(Decalcified freeze-dried bone allograft) is one of the allograft materials for periodontal bone regeneration. DFDBA provides an osteoconductive surface and osteoinductive factors. Therefore, DFDBA have been used successfully to regenerate the attachment apparatus during periodontal treatment. But recent studies was reported that wide variations in commercial bone bank preparations of DFDBA do exist, including the ability to induce new bone formation.

DFDBA was experimental materials that was recovered, processed, tested, shipped and invoiced through Musculoskeletal Transplant Foundation. MTF(Musculoskeletal Transplant Foundation) is the world largest, non-profit, AATB(American Association of Tissue Banks) accredited tissue bank.

The objective of this study was to determine the effects of serial dilutions of a DFDBA on human fetal osteoblastic cell proliferation and their potential to form and mineralize bone nodules.

Human fetal osteoblastic cell line(hFOB 1.19) was cultured with DMEM and SSE(1 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml, 100 $\mu$ g/ml, 1mg/ml) at 34°C with 5% CO<sub>2</sub> in 100% humidity.

Cell proliferation was significantly increased at 1mg/ml, 100 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml, 1 $\mu$ g/ml, 100ng/ml, 10ng/ml, 1ng/ml of DFDBA after 5 days incubation (p<0.05). Alkaline Phosphatase(ALP) level was significantly increased in 100ng/ml, 10ng/ml, 1ng/ml of DFDBA(p<0.05). A quantified calcium accumulation was significantly increased at 1ng/ml, 10ng/ml of MTF(p<0.05).

These results indicated that DFDBA has an inductive effect on bone formation in vitro.