대구외지 2008;34:250-265

신연 골형성술시 신연속도에 따른 골형성 관여 인자의 발현

지유진* · 김여갑**

*경희대학교 동서신의학병원 치대병원 구강악안면외과, **경희대학교 치의학전문대학원 구강악안면외과

Abstract (J. Kor. Oral Maxillofac. Surg. 2008;34:250-265)

EXPRESSION OF OSTEOGENESIS RELATED FACTORS ACCORDING TO DISTRACTION RATE IN THE DISTRACTION OSTEOGENESIS

Yu-Jin Jee*, Yeo-Gab Kim**

**Division of Oral & Maxillofacial Surgery, Dental Hospital, East-West Neo Medical Center, Kyung Hee University*

***Department of Oral & Maxillofacial Surgery, Professional Graduate School of Dentistry, Kyung Hee University*

Distraction osteogenesis is a well-established clinical treatment for limb length discrepancy and skeletal deformities. Appropriate mechanical tension-stress is believed not to break the callus but rather to stimulate osteogenesis. In contrast to fracture healing, the mode of bone formation in distraction osteogenesis is primarily intramembranous ossification. Although the biomechanical, histological, and ultrastructural changes associated with distraction osteogenesis have been widely described, the basic biology of the process is still not well known. Moreover, the molecular mechanisms in distraction osteogenesis remain largely unclear. Recent studies have implicated the growth factor cascade is likely to play an important role in distraction. And current reserch suggested that mechanical tension-stress modulates cell shape and phenotype, and stimulates the expression of the mRNA for bone matrix proteins.

The purpose of this study is to examine the pattern of expression of growth factors(TGF-β1, IGF-I, bFGF) and extracellular matrix proteins(osteoclacin, osteonectin) related to osteogenesis by osteodistraction of the mandible in rabbits. 24 rabbits is used for this experiment. Experimental group are gradual distraction(0.7mm, twice/day), acute distraction(1.4mm, twice/day) and control group is only osteotomized. After 5 days latency, osteotomic site is distracted for each 7 days and 3.5 days. Consolidation period is 28 days. The animal is sacrificed at the 3th, 7th, 14th, 28th. The distracted bone is examined by immunohistochemical analysis and RT-PCR analysis.

The results obtained from this study were as follow :

No significant difference was found on clinical examination according to distraction rate, but gradual distraction was shown to improve regenerate bone formation on radiographic and histologic examination. Growth factors and extracelluar matrix proteins expression increased in distraction group than control group.

From these results, it could be stated that graudal distraction is shown to improve and accelerate bone formation and mechanical stress like distraction has considerable effects on osteogenesis related factors. And rabbit is the most appropriate animal model for further reseach on the molecular mechanisms that mediate osteodistraction. It is believed that understanding the biomolecular mechanisms that mediate distraction osteogenesis may guide the development of targeted strategies designed to improve distraction osteogenesis and accelerate bone healing.

Key words: Distraction osteogenesis, Molecular mechanisms, Growth factors, Extracellular matrix proteins

Ⅰ. 서 론

Ilizarov[1]는 강직성 무릎의 신장 치료를 위하여 골이식을 계획하고 외부 고정기를 장착하는 과정에서 우연히 자발적인 골형성을 관찰하게 되었고 이후 동물과 인체의 장골을 이용한 일련의 연구를 통해 신연 골형성술과 함께 골형성을 조절하는 기계적 생물학적 요소들을 확인하고 이를 바탕으로 신연 골형성술의 이론적 근거를 제시하였다. 그 후 많은 임상 및 실험적 연구에 의해서 이 술식의 타당성이 입증되었다. 실제적인 인체조직의 신장은 과거부터 시행되어 왔으며 Codivilla[2]가 점진적 신연에 의해 사지 신장을 처음으로 보고하기도 하였으나 실제 임상적용 시 많은 합병증이 발생되어 이 술식은 널리 사용되어지지 않았다. Ilizarov[3-4]의 연구결과가 보고된 이후 새로운 주목을 받으면서 정형외과영역에서 많은 연구가 시행되었다. 또한 신연술식을 사지 뿐 만 아니라 악안면영역에 적용하

김 여 갑
130-701 서울시 동대문구 회기동 1
경희대학교 치과대학 구강악안면외과학교실
Yeo-Gab Kim
Dept. OMFS, Professional Graduate School of Dentistry, Kyung Hee Univ.
Hoegidong 1, Dongdaemunku, Seoul, 130-701, Korea
Tel: +82-2-958-9440 Fax: +82-2-966-4572
E-mail: omsjyj@khu.ac.kr

려는 연구가 시도되어 Snyder 등[5]이 성견의 하악골을 이용한 골신장을 처음으로 보고하기도 하였다. 1990년대까지 하악골을 비롯한 악안면골의 신장을 위한 실험적 연구를 기반으로 McCarthy 등[6]이 하악골 왜소증 환자에서 하악골 신장을 시행한 임상증례를 처음으로 보고하였다. 이후 악안면부의 선천적 또는 외상, 감염, 종양 등으로 인한 후천적 골결손의 치료와 접근방법에 있어서 새로운 변화가 생기게 되었고 많은 실험적, 임상적 보고를 통해 악안면 영역에서 신연 골형성술이 기존의 자가골 이식술, 혈행골 포함 근피판술, 유리혈관화 골이식술, 동종 및 이종골 이식술등을 대치할 만한 유용성이 있다고 증명되었다. 또한 성장기 아동에서의 골재건술이 가능할 뿐 만 아니라 골조직과 더불어 피복 연조직의 신장으로 연조직 재건술이 불필요하여 부가적인 공여부로 인한 외과적 손상이 없다는 장점이 다른 골재건술에 비해 부각되었다. 그러나 많은 장점에도 불구하고 현재 신연 골형성술은 악안면영역에서 제한적으로 사용되고 있다. 여기에는 몇 가지 이유가 있는 데 그 첫째는 골경화를 위하여 장기간 신연장치를 장착하고 있어야 하며 이로 인한 감염과 반흔의 형성이 야기될 수 있고 둘째는 구강내 적용하기에는 장치가 다소 크며 다방향으로의 입체적인 신장이 어렵다는 것이다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여 많은 연구가 시행되고 있으며 특히 골형성과 신연장치개발에 그 초점이 맞춰지고 있다. 신연 골형성술에서의 분자생물학적 연구는 신연술에 따른 조직학적, 초미세구조의 변화를 지배하는 분자생물학적 기전을 밝히기 위하여 도입되었으며 1990년대 들어서 분자생물학적 기법을 이용한 세포수준에서의 연구가 가능해지면서 비로소 골형성에 관여하는 성장인자들에 대한 세포수준에서의 연구가 시작되었다. Rowe 등[9], Mehrara 등[10], Warren 등[11]의 일련의 연구에 의해서 신연술에서 골형성에 대한 분자생물학적 기전이 처음으로 보고되었고 또한 여러 실험종에서의 염기서열(DNA sequence)이 알려지면서 다양한 실험동물을 이용한 분자생물학적 연구가 활기를 띄게 되었다. 현재 골형성에 관여하는 성장인자와 교원성 및 비교원성 세포외 기질 단백질등의 발현과 관련된 분자생물학적 연구가 활성화되고 있다. 이러한 분자생물학적 기전에 대한 이해와 규명은 임상적으로 매우 중요한 의미를 가지고 있다. 이는 재조합 성장인자(recombinant growth factor)의 주입 또는 유전자 치료를 통하여 골재생을 촉진시키고 골경화기를 단축함으로써 전체적인 신연 골형성술 기간을 단축할 수 있기 때문이다.

본 연구는 지금까지 알려진 여러 골형성 관여 인자들의 발현을 동시에 비교 분석하여 신연속도에 따른 골형성기전을 이해하고 생체적으로 적합한 신연속도의 설정 및 성장인자 주입등에 대한 이론적 근거로 활용하기 위해서 시행하게 되었으며 이 연구를 통해 임상 적용시 재조합 성장인자의 주입에 적당한 인자를 규명하고자 하였다. 본 연구에서는 하루 0.7mm, 1.4mm의 신연속도로 하악골 신연을 시행하였고 이때 발현되는 인자들 중 신연과 같은 기계적 자극에 의해 발현상이 증가되는 것으로 알려진 TGF-β1, IGF-I, bFGF 등의 성장인자와 osteocalcin, osteonectin 등의 세포외 기질 단백질 등에 대한 발현정도를 RT-PCR analysis와 면역조직화학검사 방법을 통해 골절치유 시의 발현상과 비교하여 연구하였다.

Ⅱ. 연구방법

1. 실험 동물 및 재료

체중 2.5 - 3 Kg의 가토 24마리를 암수구별 없이 실험동물로 사용하였으며 실온에서 동물용 고형사료와 물을 이용하여 일정기간 사육하였고 예비실험을 시행하여 가토의 하악골을 채취하고 정상 해부학적 구조(Fig. 1, 2)를 인지하여 골절단부와 골신장부, 신연기 위치 등을 설정하였다(Fig. 4). 신연장치는 360° 회전에 0.7mm, 최대 6.5mm까지 신장 가능한 Mini stainless steel skeleton-type expansion screw(Dentarum, Germany)을 레진포매하여 자체 제작하였고 신연기를 골면에 고정하기 위하여 Mini titanium screw(2.0mm×18mm, Jeil Medical co., Korea) 2개를 이용하였다(Fig. 3).

2. 실험방법

1) 실험군

점진적 신연군 (A, n=2)

: 0.7mm/day, 하루 두 번에 나누어 7일 동안 신연

급속 신연군 (B, n=2)

: 1.4mm/day, 하루 두 번에 나누어 3.5일 동안 신연

정상 대조군 (C, n=2) : 골절단만 시행

2) 수술방법

전신마취를 위하여 Ketamin(Ketalar, 유한양행, 한국) 30mg/kg와 Xylazine(Rompun, 바이엘코리아, 한국) 10mg/kg를 혼합하여 근육주사하였다. 가토를 앙와위로 고정하고 양측 하악 하연부를 제모한 뒤 베타딘 용액으로 소독하고 국소마취와 지혈목적으로 1:100,000 epinephrine을 함유한 2% lidocaine(유한양행, 한국)을 피하주사하였다. 하악 하연부를 절개하고 층별박리를 통해 하악골을 노출시킨 후 소구치 전방부에서 이공을 통해 나오는 이신경을 확인하고 조심스럽게 견인하였다(Fig. 5a). 소구치 전방과 이공사이에 골절단부을 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 골절단을 시행하고 골의 가동성을 확인한 다음 신연장치를 재위치 시켰다(Fig. 5b). 반대측도 같은 방법으로 수술하고 생리식염수로 깨끗이 세척한 뒤 3-0 흡수성 봉합사와 비흡수성 봉합사로 층별봉합하였다(Fig. 5c). 대조군은 같은 방법으로 소구치부와 이공사이에서 골절단을 시행 후 골가동성을 확인하고 금속판과 길이 4mm의 나사를 이용하여 골절단부 고정을 시행하였다. 모든 실험동물은 술후 감염예방과 저작곤란으로 인한 영양결핍을 방지하기 위하여 3일간

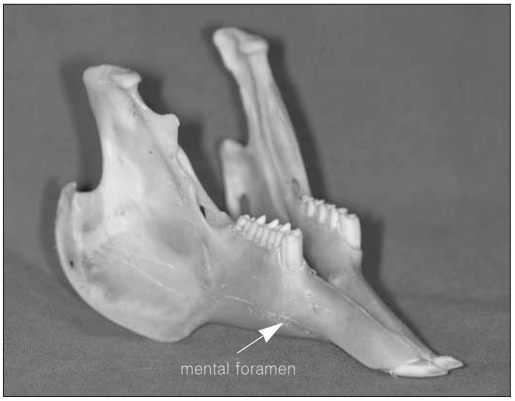


Fig. 1. Rabbit's mandible.

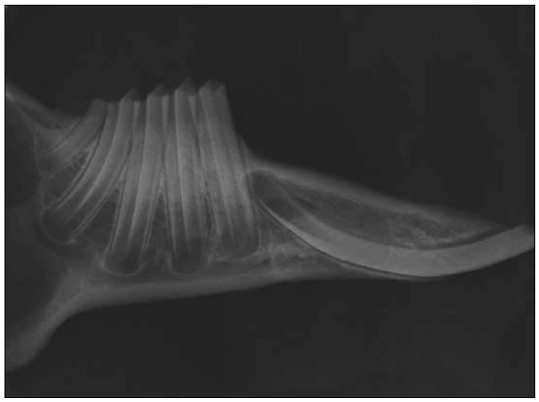


Fig. 2. Radiograph of rabbit's mandible.
Note that 360° turning produces a distraction of 0.7mm.

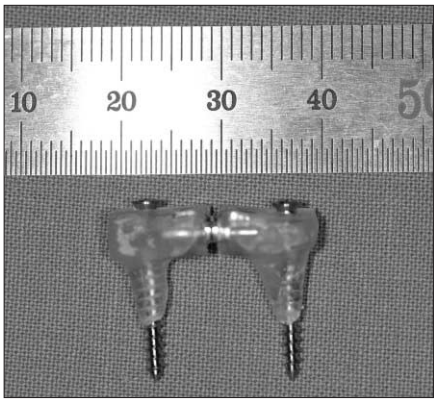


Fig. 3. Photograph of custom-made distraction device.

Fig. 4. Distraction design of the model.
Note that osteotomy was made bilaterally anterior to the first premolar.

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

b, Osteotomy was performed between the premolar and mental foramen and the distraction device was placed.

c, Extraoral photographs after operation.

Fig. 5. Surgical technique.

Table 1. Polymerase chain-reaction primer information
From: Morone: Clin Orthop, Volume(351). June 1998.252-65

Gene	bp	Sense Primer	Antisense Primer
TGF-β1	271	CGGCAGCTGTACATTGACTT	AGCGCACGATCATGTTGGAC
IGF-I	345	GTACTTCAGAAGCAATGGGA	GGTGCGCAATACATCTCCAG
bFGF	282	TACAACTTCAAGCAGAAGAG	CAGCTCTTAGCAGACATTGG

Gentamycin(20mg/kg)과 Beecom을 근육주사하였다.

3) 신연

골절단과 장치고정 후 5일간의 잠복기를 두어 골절단부의 재혈관화와 염증의 소실 및 일차성 가골형성을 도모한 후 A군은 하루에 0.7mm씩 하루에 두 번, B군은 하루에 1.4mm씩 하루에 두 번 신연하여 총 신연량 4.9mm가 될 때까지 각각 7일, 3.5일 동안 시행하였고 신연 후 28일간 경화기간을 부여하였다.

4) 표본제작

수술 후 잠복기, 신연초기, 신연말, 경화기에 해당되는 3일, 7일, 14일 및 28일에 각 실험군에서 2마리씩 희생시켜 조직표본을 얻었다. 탈회표본제작을 위하여 채취한 골신장부의 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 4μm두께로 시상연속 절편을 제작하였으며 절편에는 골절제부와 골신연부 및 정상부위가 모두 포함되도록 제작하였으며 H&E 염색을 시행하여 광학현미경하에서 전반적인 조직학적 양상을 관찰하였다.

5) 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 관찰기록하였다.

6) 방사선학적 검사

각 시기에 채취된 골신연부를 치과용 교합필름을 이용하여 일정거리 하에서 65kvp, 7.5mA, 25msec의 조건하에서 촬영하여 골절단부 및 신연골부에 대한 방사선학적 골치유 양상에 대한 검사를 시행하였다.

7) 면역조직화학검사

골형성에 관여하는 비교원성 세포외 기질 단백질인 osteonectin과 osteocalcin의 발현을 면역조직화학검사를 통하여 분석하였다. Osteonectin에 대한 일차항체는 인체 혈소판의 osteonectin으로 면역화하여 생쥐에서 얻어진 단클론성 항체(OSN4-2, Takara, Japan)를 사용하였고, osteocalcin에 대한 일차항체는 소의 osteocalcin으로 면역화하여 생쥐에서 얻어진 단클론성 항체(OC4-30, Takara, Japan)를 사용하였다. 면역조직화학염색은 포르말린 고정과 탈회과정을 거쳐 파라핀 포매된 조직을 4μm두께로 시상연속 절편으로 제작한 뒤 peroxidase Avidin-Biotin Complex법으로 다음과 같이 염색하였다. Xylene, Acetone, 100%, 95%, 75% Alcohol을 사용하여 탈파라핀 후 흐르는 물에 세정하였고 실온에서 5분간 0.4mg/ml Proteinase K(V302B, Promega)로 처리하고 TBS(Tris Buffered saline, TBS999, ScyTek) 완충액으로 전단계에 남아 있는 시약을 실온에서 5분간 3회 세정하고 내인성 과산화 효소의 활성을 억제하기 위하여 3% H_2O_2로 실온에서 5분간 반응시켰다. 다시 TBS 완충액 세정 후 Streptavidin Biotin Universal Detection System을 사용하여 단백질 억제 완충액(Cat No.2391, Immunotech)으로 실온에서 10분간 반응 후 osteonectin과 osteocalcin의 항체를 5ug/ml의 농도로 실온에서 90분간 반응시켰다. TBS 세정 후 다시 Biotin 표식 2차 항체(Cat No.2391, Immunotech)을 실온에서 10분간 반응시켰다. 세정 후 Streptavidin peroxidase(Cat No.2391, Immunotech)로 실온에서 10분간 반응시키고 TBS 세정 후 실온에서 2분간 발색제(AEC substrate, ACE500, ScyTek)로 처리한 뒤 DW 용액에 넣어 반응을 정지 시켰다. 그 뒤 대조염색으로 Mayer Hematoxylin(HMM500, ScyTek)을 실온에서 20초간 시행하였다. 면역조직화학염색결과는 1명의 병리조직학자에 의해서 관찰하였고 각 항체의 염색상에 대한 검사방법은 염색상을 관찰할 수 없는 경우를 음성(-), 정상 성숙골의 산재한 세포에서만 약한 염색성을 보이는 경우를 약양성(+), 염색상이 세포질내에서 중등도로 보이는 경우를 양성(++), 강한 세포질내 염색상을 나타내는 경우를 강양성(+++)으로 표시하여 각 시기별로 osteocalcin과 osteonectin의 발현상을 분석하였다.

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

골형성에 관여하는 성장인자중 TGF-β1, IGF-I, bFGF 등의 발현양상을 RT-PCR analysis을 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)를 첨가한 후 1/10배의 chloroform으로 처리하여 상층을 분리하였

다. 다음 동량의 isopropanol로 처리하여 pellets을 DEPC-70% ethanol로 씻은 후 건조시켜 DEPC-D/W에 녹였다. RNA는 260nm에서 흡광도를 측정한 후 정량하여 reverse transcription reaction을 실시하였고 그 반응액은 1×RT buffer(Promega, USA), 20㎛M dNTP, 0.25㎛g oligo(dT)$_{15}$primer, 5units AMV(Avian Myoblastosis Virus) reverse transcriptase(Promega, USA) 및 2㎛g RNA에 DEPC-D/W를 가하여 총량을 10㎕로 한 뒤 42°C에서 60분간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 RT product 5㎕에 1×PCR buffer(Promega, USA), 10 pmol sense 및 antisense primer, 1 unit Taq polymerase 및 증류수를 가하여 총량을 25㎕로 한 후 58°C에서 30분간 처리한 후 다시 92°C에서 15초, 60°C에서 30초, 72°C에서 30초간 30회 실시한 후 72°C 에서 10분간 반응시켰다. Primer 서열은 Table 1과 같이 각 인자에 대한 sense primer와 antisense primer을 적용하였다. PCR 반응이 종료된 검체들에서 각 산물을 5㎕씩 취하여 6×loading buffer(0.25% bromphenol blue, 0.25% xylene cyanol, 30% glycerol in water) 2 ㎕와 혼합하여 2% 한천 겔(agarose gel)에 100V에서 30분간 전기영동하고 ethidium bromide로 염색하여 자외선 투사기로 관찰한 다음 폴라로이드 카메라로 촬영하여 검사하였다.

Ⅲ. 연구결과

1. 육안적 소견

모든 실험동물은 골절단 및 신연장치 장착을 위한 수술 후 저작장애로 1~2일 정도 고형사료 섭취가 제한적이었으나 비교적 잠복기동안 체중감소 등의 별다른 이상 없이 건강하였다. 실험기간중 신연장치 주위의 감염, 신연장치 탈락 등과 같은 합병증은 발생하지 않았다. 신연기 동안 신연장치 회전에 따른 저항감은 점진적 신연군(A군)에서는 비교적 적었으며 급속 신연군(B군)에서는 회전시 통증과 함께 다소 증가하였다. 신장길이가 증가할수록 전치부에서는 반대교합이 형성되었으며(Fig. 6b) 일부 가토에서는 골절단과 장치 장착을 위한 나사고정시 하악전치 치근단부 손상으로 인한 감염과 함께 전치의 탈락도 발생하였다.

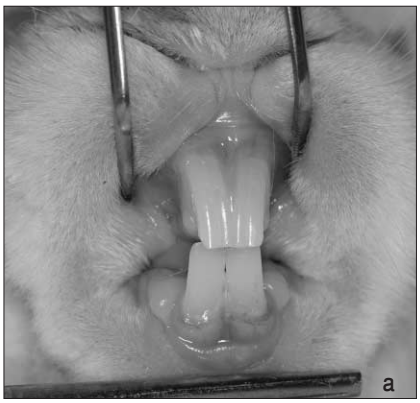
잠복기에 해당하는 술 후 3일군에서 실험군(A, B) 및 대조군(C) 모두 골절단부에 혈액이 응고되어 있는 상태로 가골형성은 보이지 않았다. 신연기 초에 해당하는 술후 7일째 대조군에서는 가골형성을 확인하였으며 실험군에서는 골절단부 폭경의 증가와 함께 가골 및 혈종이 혼재된 양상을 보였다. 또한 조직표본제작을 위한 장치제거시 골단부가 쉽게 분리되는 소견을 나타내었다. 신연기 말과 경화기 초에 해당하는 술후 14일째 대조군에서는 골절제부가 희미하게 나타나는 골양조직으로 치유되었고 실험 A, B군 모두 골양조직과 함께 골신연부를 확인할 수 있었고 A군이 B군에 비해서 더 많은 골양조직과 감소된 섬유성 조직을 나타내었다. B군에서는 신연부가 얇은 섬유성 조직으로 피복되어 있었고 주위 정상골과 구별이 되었다. 경화기에 해당하는 28일째 실험군 모두에서 뚜렷한 골신연부를 관찰할 수 있었으며 전치부에서는 반대교합 및 골신연에 따른 전치 마모와 치수감염으로 인한 치아변색이 발생하였다. A군은 진전된 골형성과 함께 경계가 불명확해졌고 골신연부의 섬유성 조직은 보이지 않았다. B군에서는 감소된 섬유성 조직과 함께 비교적 단단한 골양조직이 관찰되었으나 골표면은 주위 정상골에 비해 불규칙하고 골밀도가 적어 구별이 가능하였다. 그러나 장치제거시 골 동요도는 보이지 않았다. 대조군에서는 골절제부가 완전히 신생골로 치유되었으며 주위 골과의 경계가 불분명하였고 금속판위로의 골형성도 관찰할 수 있었다(Fig. 7).

2. 방사선학적 소견

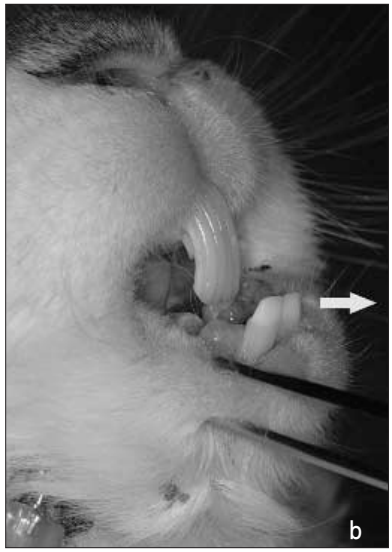
수술 후 3일째에 촬영된 방사선 사진에서 골절단부의 방사선 투과상을 볼 수 있었으며 골절단으로 인한 골파절부와 전치 치근단부의 방사선 투과상도 관찰할 수 있었다. 장치고정을 위한 나사의 위치는 협설측 피질골을 관통하여 안정된 모습을 보였다. 수술 후 7일째에서 A군에 비해 B군에서 폭경이 증가된 방사선 투과상의 골절제부가 관찰되었고 14일째에는 증가된 폭경과 함께 A군은 방사선 불투과상이 골신연 중심부에서 증가되었고 양측 골절제면부에 방사선 투과상이 나타났으며 B군은 방사선 투과상과 불투과상이 혼재되어 있는 소견이 관찰되었다. 대조군은 골절제부의 방사선 투과상이 매우 감소하였고 인접골과의 경계가 불분명하였다. 28일째 실험군 모두 골신연 중심부 양측으로 방사선 투과상과 함께 중심부에 방사선 불투과상이 관찰되어 골신연부의 확인이 가능하였으나 A군이 B군에 비해 증가된 방사선 불투과상을 나타내었다. 대조군은 골절단부의 방사선 투과상이 매우 적어 주위 정상골과 구별이 어려웠다(Fig. 8).

3. 조직학적 소견

수술 후 3일 째 A, B, C군 모두에서 골절단부의 혈종과 염증세포의 침윤상을 보이고 있었다. 신연 초기에 해당하는 7일째에서 A군은 섬유성 가골과 함께 골형성을 관찰할 수 있었으며 B군에서는 A군에 비해 많은 섬유성 조직이 관찰되었고 상대적으로 골형성은 적게 나타났으며 연골성 성분이 관찰되었다. 대조군 C에서는 괴사조직과 함께 섬유성조직, 골형성부 등이 혼재되어 나타났으며 연골성 조직도 관찰되었다. 신연 후기 및 경화 초기에 해당하는 14일째에서 A군은 약간의 연골성 조직이 관찰되었고 더욱 성숙된 골형성부를 관찰할 수 있었으며 B군에서는 골형성이 증가되었으나 여전히 섬유성 조직을 관찰할 수 있었다. C군은 증가된 골형성부에서 골소주를 관찰할 수 있었다. 경화기 말의 28일째에서 A군은 신생골이 기존골과 잘 연결되어 있는 소견과 신생혈관을 관찰할 수 있었으며 B군은 이보다 적은 골형성과 골소주를 보이고 있으나 비교적 신생골이 기존골과 잘 연결되어 있는 소견을 보였고 C군에서는 신생골과 기존골의 연결이 우수하였고 신생골내로 혈관이 잘

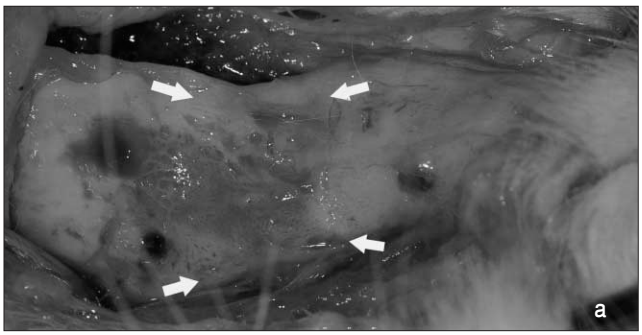


a, Prior to distraction.

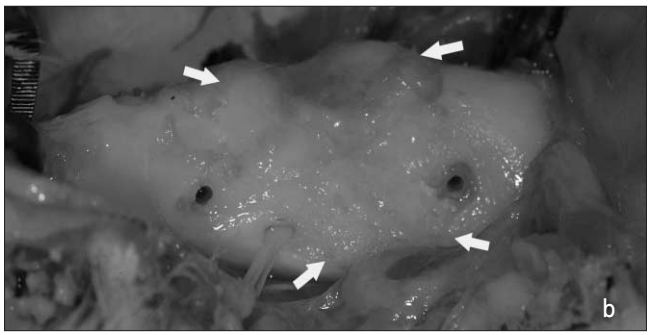


b, After distraction, severe cross-bite developed.

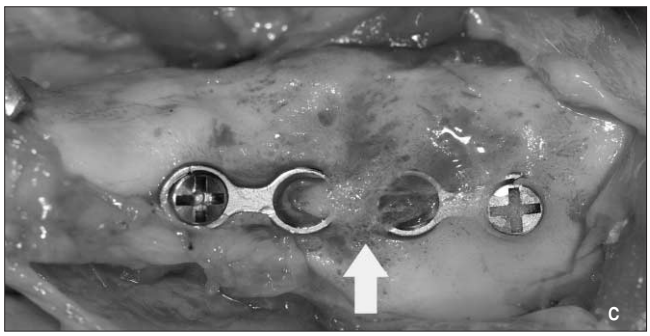
Fig. 6. Extraoral photographs of rabbit demonstrating mandibular distaction.



a, Bone regenerate(arrow) is confirmed in A28 distraction gap.



b, Bone regenerate(arrow) is confirmed in B28 distraction gap but slightly fibrous tissue was seen on newly formed bone.



c, Bone formation(arrow) above fixation plate was seen in C28.

Fig. 7. Bone regenerate photographs of experimental and control group after postoperative 28 days.

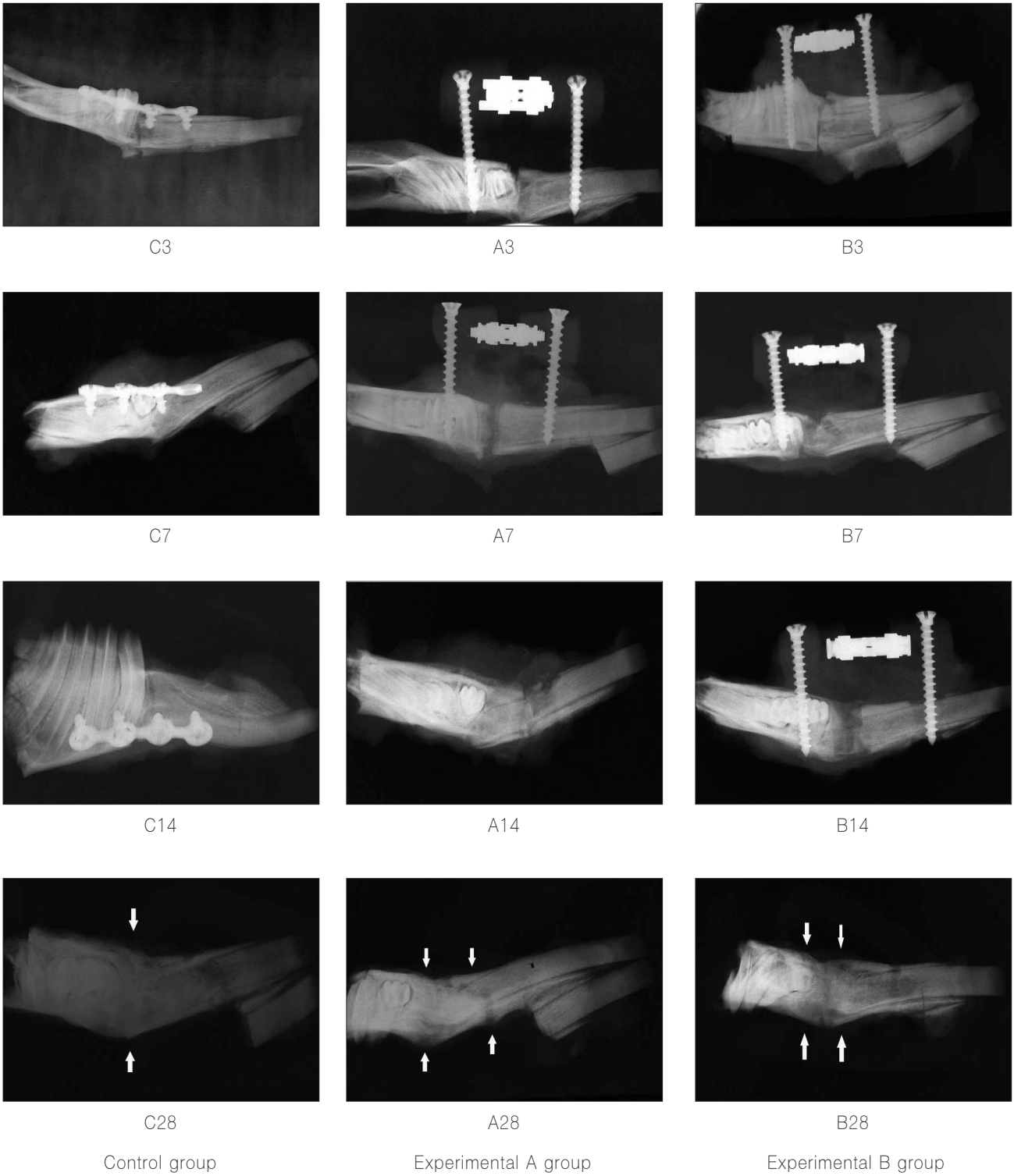


Fig. 8. Radiographic findings at 3, 7, 14, 28 days in all groups.
Fracture site was completely remodeled and indistinguishabe from the adjacent normal bone in C28 and distracted areas(arrow) were identified in A28 and B28, but A28 distraction gap was more radiopaque than B28.

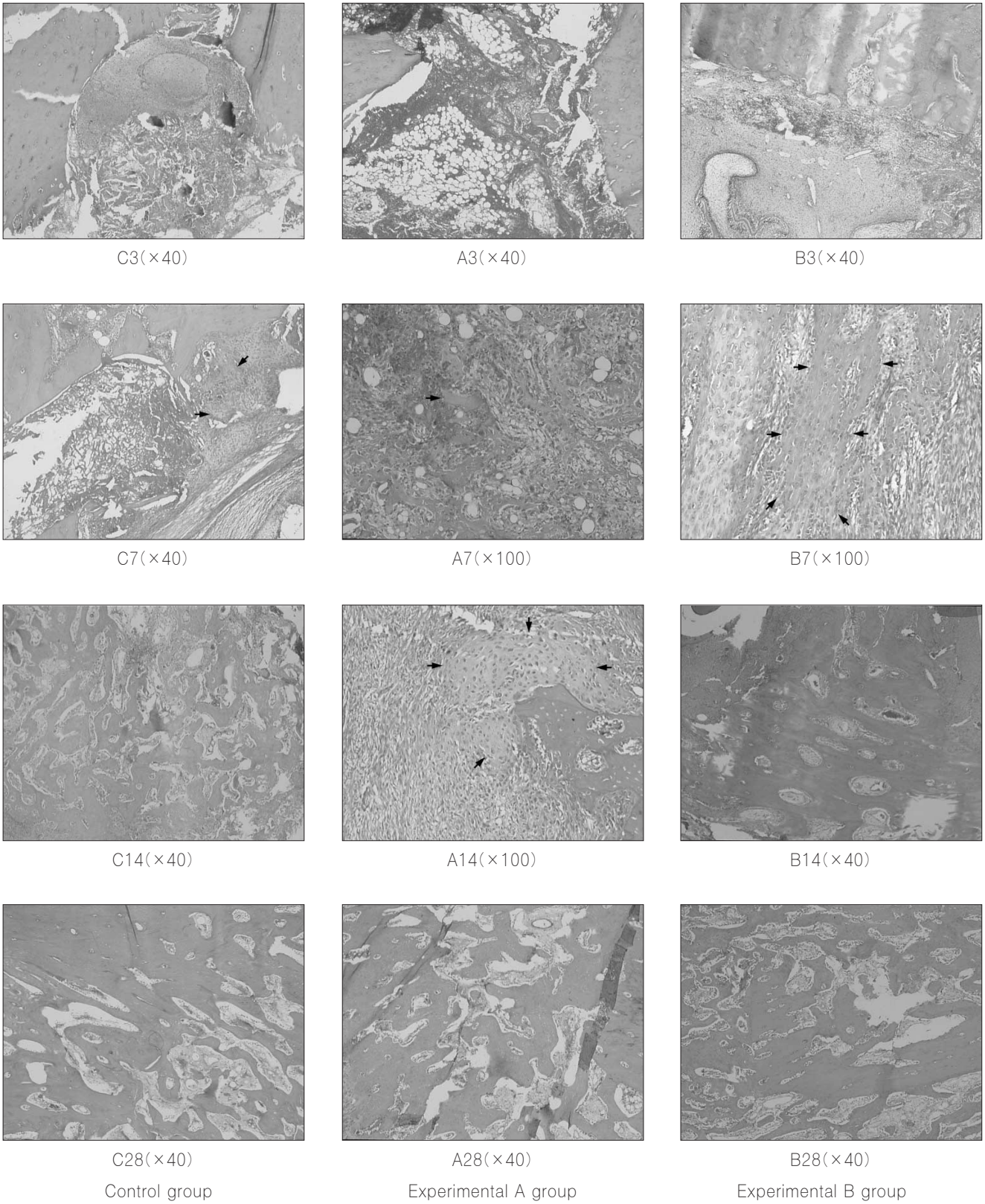


Fig. 9. Histologic findings at 3, 7, 14, 28 days in all groups (H-E stain).
Small foci of endochondral ossification(arrow) was existed in A14, B7, C7. Newly formed osteoid tissue(arrow) was viewed in A7 and new bone trabeculae were noticed in C14.
The new bone trabeculae resulted in a near complete closure of distraction gap in A28, B28.

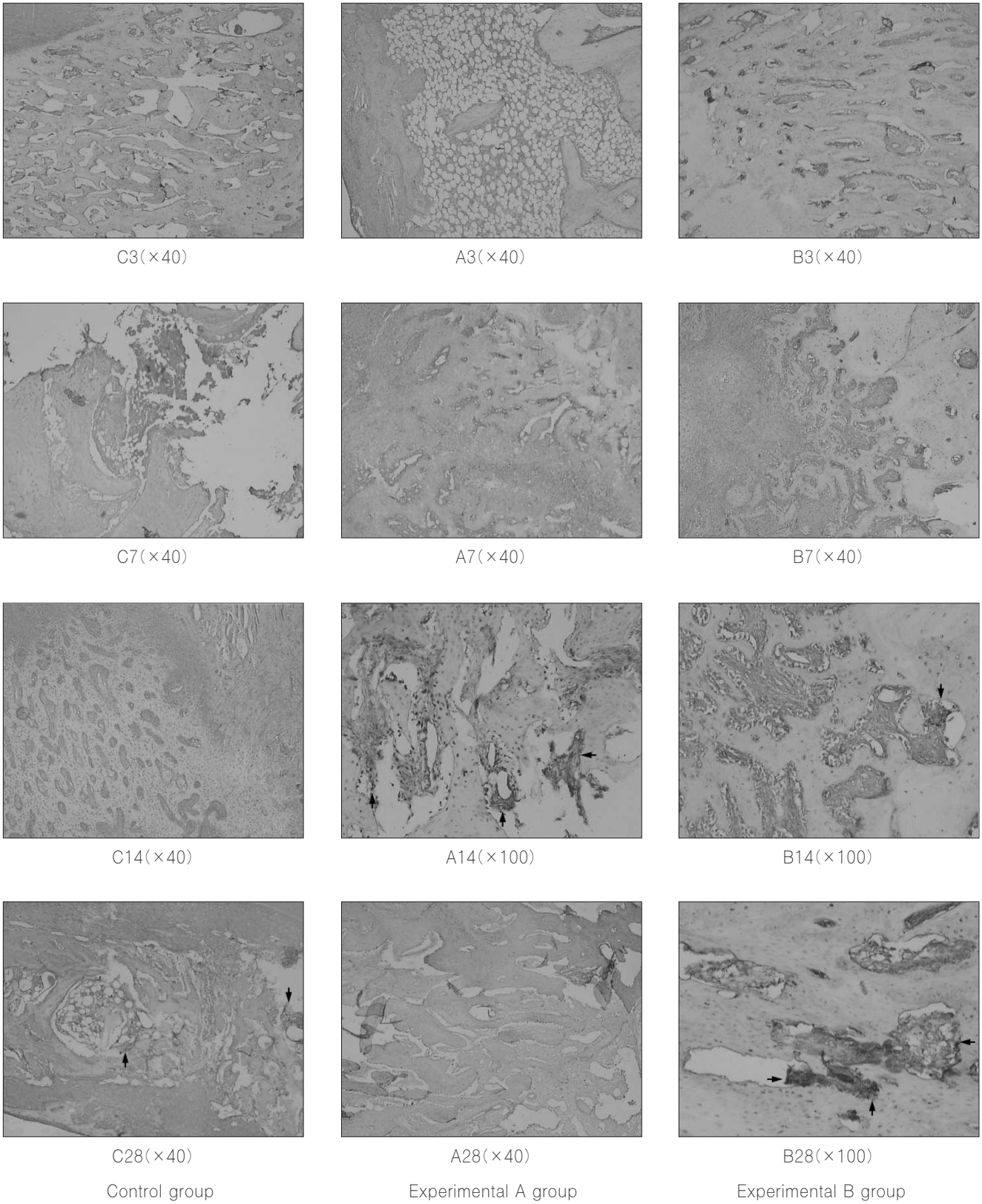


Fig. 10. Immunohistochemical distribution of osteocalcin in all groups.
Note that osteocalcin staining(arrow) is prominent in A14, 28 than others.

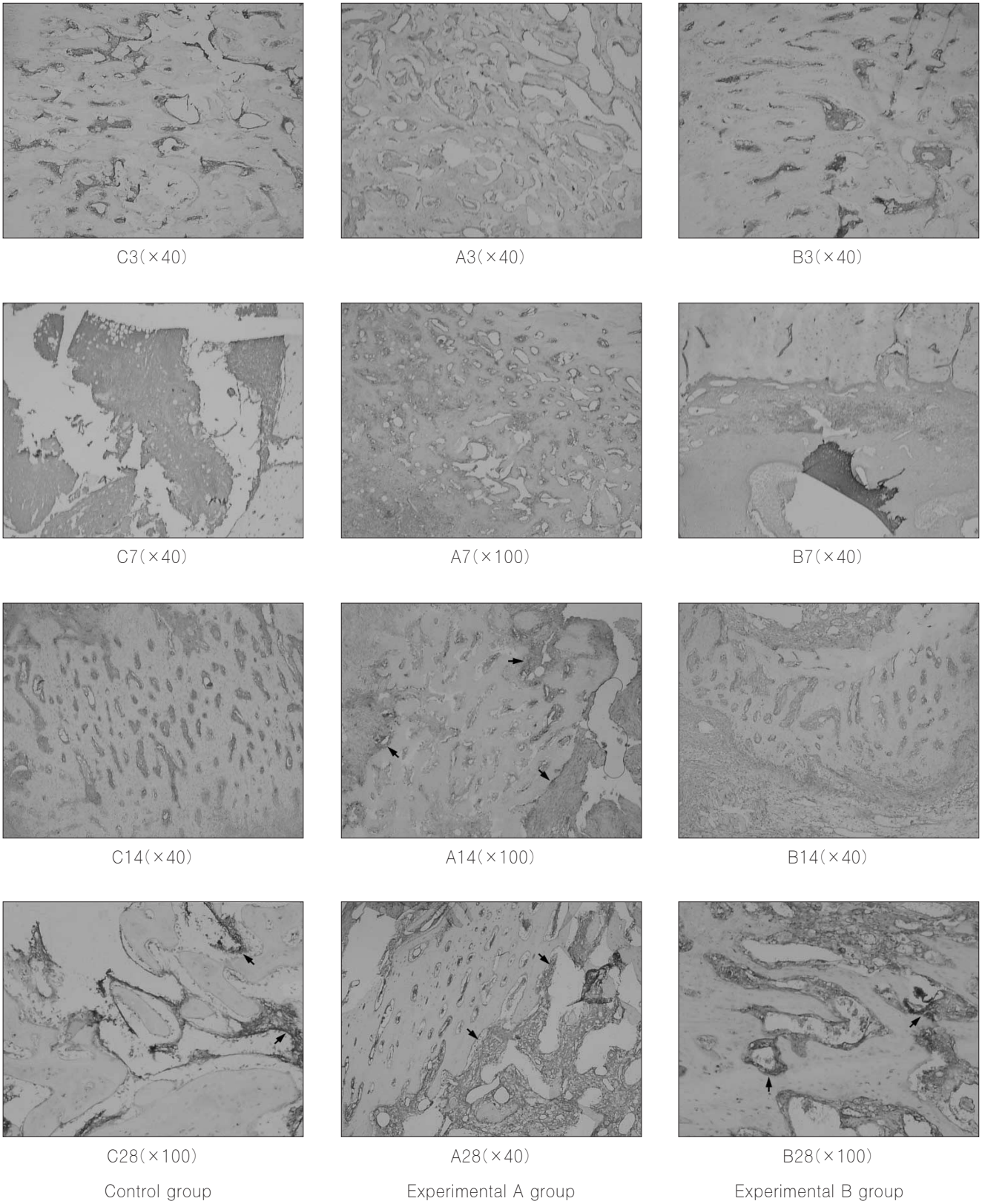
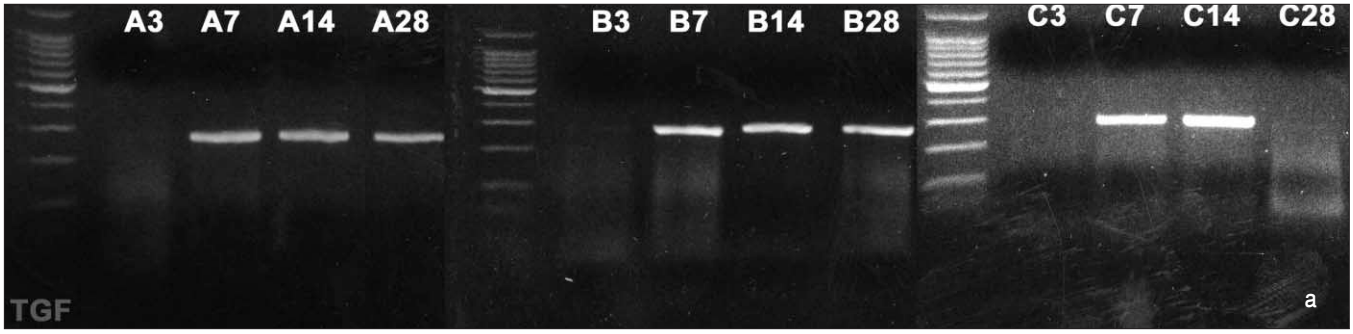
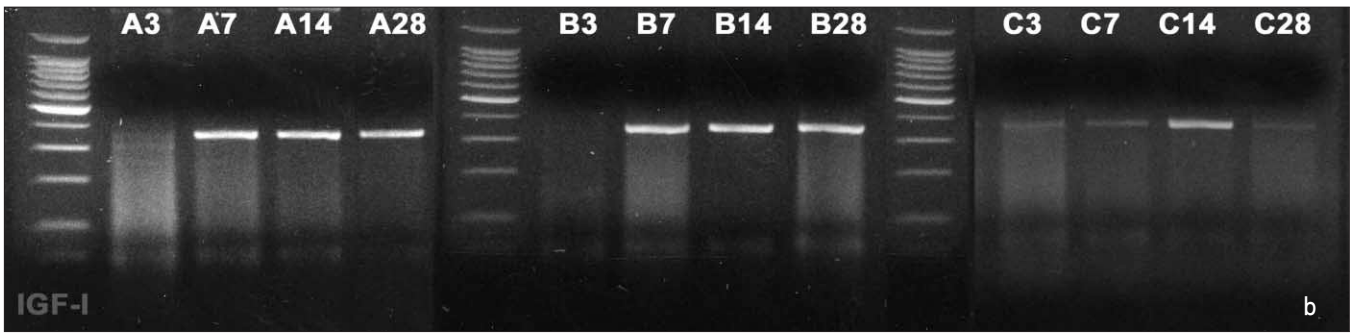


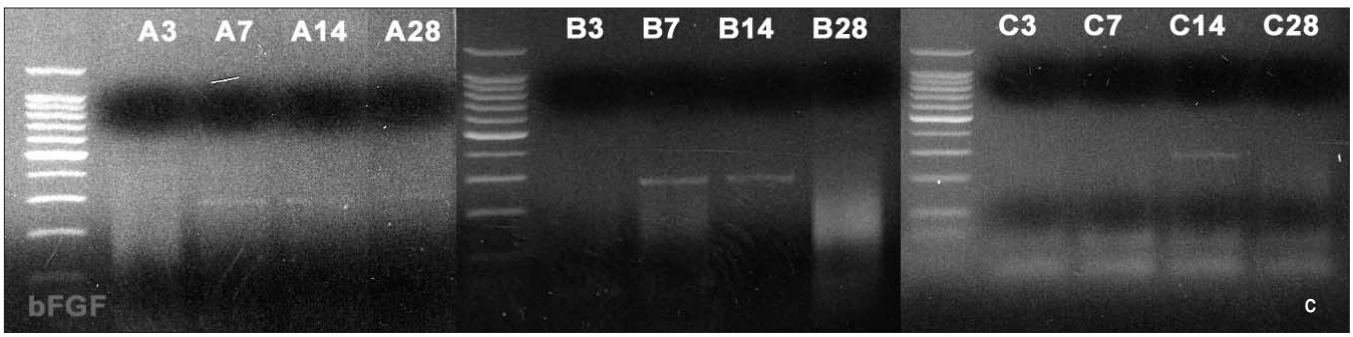
Fig. 11. Immunohistochemical distribution of osteonectin in all groups.
Note that osteonectin staining(arrow) is prominent in A14, 28 than others.



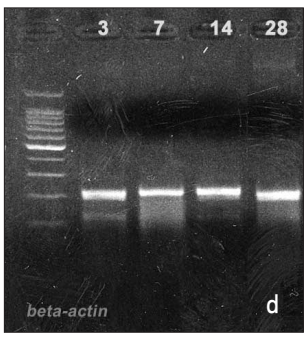
a. Expression of TGF-β1 at 3, 7, 14, 28 days in all groups.



b. Expression of IGF-I at 3, 7, 14, 28 days in all groups.



c. Expression of bFGF at 3, 7, 14, 28 days in all groups.



d. Expression of β-actin.

Fig. 12. RT-PCR analysis demonstrating expression of growth factors.
Note that growth factors expression increased during distraction, early consolidation,consolidation period in A, B group than C group.

Table 2. The expression of osteocalcin and osteonectin in A group

	A3	A7	A14	A28
osteocalcin	-	+	++	++
osteonectin	-	+	++	++

Table 3. The expression of osteocalcin and osteonectin in B group

	B3	B7	B14	B28
osteocalcin	-	+	+	++
osteonectin	-	+	+	++

Table 4. The expression of osteocalcin and osteonectin in C group

	C3	C7	C14	C28
osteocalcin	-	+	+	++
osteonectin	-	+	+	++

발달되어 있는 소견을 나타내었다(Fig. 9).

4. 면역조직학적 소견

A, B, C군 모두에서 3일째 OC과 ON 모두 발현되지 않았으나 술 후 7일째에서 OC와 ON은 A, B, C군에서 경도의 발현상이 관찰되었고 14일째에서 A군은 신생골내 골아세포와 주위 기질등에 중등도의 발현상이 나타났으나 B, C군은 7일째와 비슷한 발현상을 보였다. 28일째에서 A, B, C군 모두 신생골부 골아세포의 핵과 세포질이 강하게 염색되는 중등도의 발현상을 관찰할 수 있었다(Fig. 10, 11, Table 2, 3, 4).

5. RT-PCR 소견

1) TGF-β1

수술 후 3일 째 A ,B, C군 모두 발현상을 보이지 않았다. 신연초기에 해당하는 7일째 A, B, C군 모두 강력한 발현상을 나타내었으며 신연말 또는 경화기 초에 해당하는 14일째에서 역시 강력한 발현상을 보였고 경화기에 해당하는 28일째에서는 A, B군만이 발현상을 보였고 대조군 C에서는 발현상이 나타나지 않았다(Fig. 12a).

2) IGF-I

수술 후 3일째 A, B, C군 모두 희미한 발현상을 보였고 술 후 7일째 A, B군에서 강력한 발현상을 보였으며 이와는 달리 C군에서는 3일째보다는 약간 진한 발현을 보였다. 14일째에서 A, B, C군 모두 강력한 발현이 나타났으며 28일째에서 A, B군은 동일한 발현양상을 보였다. 그러나 C군에서는 감소된 발현소견을 보였다(Fig. 12b).

3) bFGF

수술 후 3일째에는 A, B, C군 모두 발현되지 않았고 술 후 7일째에서 A, B군에서만 희미한 발현상을 보였으며 14일째에서는 A, B, C군 모두에서 약한 발현상이 관찰되었다. 28일째에서는 A군에서만 7일, 14일과 비슷한 발현상이 관찰되었고 B, C군은 발현되지 않았다(Fig. 12c).

Ⅳ. 총괄 및 고찰

의학분야에서 신연 골형성술에 대한 초기 연구는 신연 골형성술시 골생성 유무에 관한 것으로 이러한 연구들을 통해 신연 골형성술시 골형성이 유도되는 것은 이제는 널리 받아들여지고 있으며 또한 최근에 와서 분자생물학의 발전과 더불어 세포수준에서 기계적 자극이 골형성을 어떻게 유도하는 지와 이에 관여하는 성장인자들(growth factors)의 역할이 무엇인지에 대한 연구가 가능하게 되었다. Row 등[9]은 분자생물학적 연구에 주로 이용되는 백서를 사용하여 점진적 신연술이 TGF-β1과 같은 골유도 성장인자와 제 1형 교원질, osteocalcin과 같은 세포외 기질 단백질의 생산을 유도한다는 것을 증명하였고, Mehrara 등[10], Warren 등[11]이 일련의 연구를 통해 같은 동물모델에서 골신연술의 성공과 실패시 분자 기전의 차이를 관찰하고 점진적 신연시 골 특이성 세포외 기질 분자의 발현이 조절되어 성공적인 골형성이 증진된다고 보고하였다. 이후 신연 골형성술에서의 분자생물학적 연구는 활성화되어 Sato 등[24-25], Eingartner 등[26], Tavakoli 등[27]이 골생성에 관여하는 성장인자와 세포외 기질 단백질등의 발현에 대하여 보고하였다. 지금까지 알려진 성장인자에는 transforming growth factor-betas(TGF-β), insuline-like growth factor-I(IGF-I), basic fibroblast growth factor(bFGF), bone morphogenetic proteins(BMPs) 등이 있고 세포외 기질 단백질로는 osteocalcin, osteonectin, osteopontin, collagen I 등이 있다. 이 인자들의 발현 연구를 통해 신연 골형성술을 지배하는 분자생물학적 기전이 밝혀지고 있으며, 특히 골절시 골치유기전과의 비교를 통해 신연 골형성술에서의 골형성기전이 다름을 증명하였고 최상의 골형성을 유도할 수 있는 신연속도와 빈도를 정립하는 것이 가능하였다. 또한 골생성에 관여하는 재조합 성장인자를 주입함으로써 골경화기를 줄여

전체적 신연기간을 단축하고 골형성을 증진하는 치료학적 목적의 연구가 시행되어 신연술시 임상 적용의 제한적 요소였던 장기간의 경화기간을 줄일 수 있는 가능성이 제시되었다.

신연 골형성술시 조직학적 골형성기전에 대해서 Ilizarov[3,4]는 신연 골형성시 막성 골화(intramembranous ossification)에 의한 골형성을 보고하였고 신연 속도와 빈도에 따라 나타나는 연골내 골화과정(endochondral ossificaiton)은 직접 골화되는 과정보다 느린 과정으로 간주하였다. 이후 대다수의 연구에서 신생골의 막내골화 기전이 증명되었으며 현재 널리 받아들여지고 있다. 이와는 달리 Kojimoto 등[28]은 골신연시 연골내 골화가 일어난다고 보고하면서 이는 실험종과 환경에 따른 차이의 결과라는 가설을 제시하였다. 또한 Yasui 등[29]은 막내 골화와 연골내 골화와 더불어 연골세포에서 모세혈관 침투없이 직접적으로 골형성이 일어나는 제 3의 골화(transchondroid bone formation) 기전을 관찰하였고 이를 막내 골화와 연골내 골화의 중간단계로 제시하였다. Ueda 등[30]은 막성골화와 연골내 골화는 신연속도와 혈액 공급에 따라 다르게 나타남을 보고하였다. Sato 등[24]은 신연시기에 따라 골화기전에 차이가 나타난다고 주장하면서 시기별 조직학적 변화와 골화기전에 대해서 보고하였다. 이를 종합해 보면 골절단후 잠복기시에 일어나는 조직학적 변화는 골절시 치유과정의 초기단계와 유사하여 골막세포의 증식과 초자연골로 구성된 외부(연성) 가골이 형성되고 골절편부에는 골막성 가골(강성)이 형성된다. 잠복기 후 신연이 시작되면 외측의 연성 가골은 신장되고 변형되어 결국에 근원심편으로 분리된다. 골절단 간격은 섬유성 조직과 신생혈관으로 채워지고 신장된 섬유성 조직과 골막성 가골사이의 경계에서 고분화된 연골이 나타난다. 연골은 세층의 연골세포로 구성된다. 작은 다각형의 세포층(prechondrocytes), 변색성 기질(metachromatic matrix)내에 있는 원형의 연골세포층, 밀집된 기질내에 있는 비대성 연골세포층으로 비대성 연골세포층에 모세혈관이 침투하여 신생골이 연골성 기질표면에 침착한다. 이와같은 전형적 연골성 골화가 신연기 초기의 신장부에서 보인다. 신연부 중앙에서는 몇가지 세포형태가 보인다. 연골세포, 섬유아세포, 난원형의 세포(oval-shaped cell, 연골세포와 섬유아세포의 중간단계 세포)등으로 특히 난원형 세포는 신장력의 방향과 평행하게 배열되며 신연 골형성에서만 나타나고 골절치유시에는 보이지 않는다. 신연이 진행되면 연골성 가골은 연골성 골화에 의해 골성 가골로 대치되고 중심부 섬유성 조직의 양쪽에서 골형성을 관찰할 수 있으며 이 신생골은 막성골화에 의해 직접적으로 형성된다. 신연 후반기에는 막성 골화가 지배적으로 일어나 신장된 교원섬유가 어떠한 연골성 조직의 개재없이 신생 침상골로 변한다. 이러한 현상은 골절치유시 재형성 과정과는 분명히 다른 조직학적 소견을 보인다. 이러한 막성 골화로의 변화는 기계적 인장 자극(mechanical tension-stress)이 환경을 변화시키고 세포의 형태와 표현형(phenotype)을 조절하여 연골생산을 중단시켜 막성 골화가 일어나게 하며 이는 여러 실험실 분자생물학 연구[31-32]에서 세포수준에 가해진 인장 자극(tension-stress)이 골형성 유도세포의 분화를 촉진한다고 증명되었다.

본 연구에서 신연술을 시행하였던 A, B군 모두 골형성이 관찰되었으며 점진적 신연을 시행하였던 A군에서 보다 빠른 골형성과 골소주, 혈관신생화 소견을 보이고 있었다. A군은 7일째에 신생골을 관찰 할 수 있었으며 14일째에서 신생골 인접부에 연골성분이 관찰되었다. 급속 신연을 시행한 B군에서는 7일째 신연부 섬유조직내에서 연골성분과 인접부에서 신생골이 관찰되었다. 28일째 실험 A, B군 모두 골소주 형태를 띤 신생골로 골신연부가 채워졌으나 A군에서 보다 치밀한 구조를 띠고 있었다. 대조군은 7일째 골절단면 인접부에서 연골성 조직이 관찰되었으며 연골성 골화과정을 거쳐 14일째에 골소주 형태를 보이는 신생골 형성을 보였고 28일째에는 인접 골과 잘 연결되어 있었으며 신생골내로 잘 발달된 혈관을 보이고 있었다. 이를 통해 골절치유시 골형성은 연골성 골화기전으로 치유됨을 알 수 있었고 점진적 신연을 시행한 A군은 신연 기간동안은 막성 골화에 의한 골형성이 이루어 졌으면 경화기에는 연골성 골화과정이 혼합되어 신생골이 형성되었다. 그러나 급속 신연을 시행한 B군에서는 막성 골화보다는 연골성 골화기전에 의한 골형성이 이루어졌다. 즉 적절한 신연 자극이 가해졌을 때는 막성 골화가 일어난다는 다른 문헌들의 결과와 일치하며 경화기에 보이는 연골성 골화는 실험조건, 신연장치의 고정여부, 신연속도, 혈액공급등에 따라 막성 골화와 혼재되어 나타난다는 Ueda 등[30]의 연구와 일치한다고 볼 수 있다.

골형성에 관여하는 성장인자의 역할 및 기전에 대해서 지금까지 광범위하게 연구되어졌고 Linkhart 등[33]은 문헌고찰을 통해 이에 대한 최신 지견과 가설을 보고하였다. 이를 통해 골형성 기전을 지배하는 분자생물학적 기전에 대한 이해가 가능하게 되었다. 골형성에 관여하는 성장인자로는 TGF-β1, IGF-I, bFGF 등이 주요 기능을 담당하는 것으로 알려졌다.

TGF-β군은 골아세포를 비롯한 많은 세포의 성장과 분화를 조절하며 골의 성장 및 발육시 골절부 가골 등의 골표면에 있는 성숙 골아세포에서 높은 수준으로 발현된다[34]. 신연골 형성술시 TGF-β1의 발현에 대한 분자생물학적 연구에서는 종종 골절부 치유시 TGF-β1의 발현정도와 비교하여 신연 골형성술의 기전 및 TGF-β1의 역할에 대해서 보고되었다. Yeung 등[35]은 염소를 이용한 경골의 골신연시 TGF-β1 발현에 대해 연구하여 다음과 같은 보고를 하였다. 즉 골절부의 TGF-β1은 치유 초기에 골아세포나 골막에서 유래한 섬유아세포 유사 세포(fibroblast like cell)에서 증가하나 골절 치유 1주 후부터 차츰 감소되어 3주 후에는 매우 감소된 소견을 보이나 신연 골형성술시에는 초기에 비슷한 양상을 나타내지만 가골이 신연되는 동안 계속적으로 강력한 발현소견을 보였고 이는 기계적 자극이 골아세포에 형질도입 신호(transduction signal)로 작용하여 TGF-β1의 발현을 유도하고 TGF-β1은 골아세포를 자극하여 교원질과 alkaline phosphatase의 합성을 촉진하여 골형성과 무기질화(mineralization)를 유도한다는 가설을 제시하였다. 또한 TGF-β1은 섬유아세포 유사세포 및 골세포에서도 증가된 발현양상을 나타내는 데 특히 섬유아세포 유사세포에서 중등도의 TGF-β1발

현은 다른 성장인자 발현과 함께 작용하여 이 세포를 골아세포로 분화하여 직접적인 골형성을 유도하며 골절 치유시에는 감소된 TGF-β1로 인하여 골막에서 유래한 섬유아세포 유사세포를 연골세포로 분화시켜 연골성 골형성을 유도한다는 가설을 제시하면서 이러한 기전으로 경화기동안 TGF-β1의 감소와 더불어 연골성 골형성이 관찰된다고 하였다. Mehrara 등[11]은 백서의 하악골 신연시 골절제 인접부의 중배엽세포, 염증세포, 골아세포등에서 TGF-β1의 발현이 증가되었고 신연이 계속되는 동안 활성 골아세포, 신생혈관, 세포외 기질내에 있는 주위 교원질등에서 강력한 TGF-β1의 발현이 보이며 이는 TGF-β1이 골아세포의 이주, 분화, 세포외 기질합성, 혈관화(angiogenesis)를 조절하는 중요한 역할을 한다고 보고하였다. 즉 TGF-β1이 초기에는 원시 중배엽세포를 골절제부로 이주시키고 계속적인 TGF-β1의 자극이 이 세포들을 골 세포외 기질 단백질을 형성할 수 있는 전구 골아세포 와 골아세포로 분화시키고 다른 성장인자와의 상호작용을 통해 골화와 재형성을 유도한다고 하였다. 또한 TGF-β1은 제 I형 교원질 분자의 침착과 유지를 야기하여 막성골화를 유도하며 vascular endothelial growth factor, basic fibroblast growth factor 등의 합성을 촉진하여 혈관화 반응을 일으켜 신생혈관 형성에 간접적 역할을 하고 혈관형성 후에는 신연기동안 혈관의 유지에 중요한 역할을 한다고 하였다.

본 연구에서 다른 성장인자에 비해서 TGF-β1의 강력한 발현상이 나타났다. 골절제후 초기에 해당하는 3일군에서는 A, B, C군 모두 발현상을 관찰할 수 없었으나 7일째군에서 발현상이 모든 군에서 보였다. 14일군에서도 역시 같은 발현을 보였고 28일째에는 신연군 A, B군에서만 관찰이 가능하였으며 C군에서는 발현되지 않았다. 이는 다른 문헌보고와는 약간의 차이를 두고 있으나 28일째 대조군 C에서 발현되지 않은 것으로 보아 초기 발현과 함께 신연자극으로 경화기까지 TGF-β1의 발현이 증가됨을 암시하며 이를 통해 재조합 성장인자로서 TGF-β1이 경화기를 단축시키는 잠재적 치료물질이 될 수 있음을 알 수 있다. 실제 적용에 대해서 Critchlow 등[36], Rauch 등[37]은 골치유시 외인성 TGF-β2, TGF-β1 등을 투여하였으나 골형성 효과를 증명하는 데 실패하였다. 이는 외인성 TGF-β가 내인성 TGF-β와 같은 역할을 수행하지 못하였거나 적용방법, 적용시기등이 적절치 못함을 의미하며 이는 향후 더 진행되어야 할 연구과제이다.

IGF-I은 골아세포의 증식 및 분화를 촉진하는 기능을 가지고 있으며 다른 성장인자와 함께 골아세포 전구물질의 증식과 분화를 자극하여 골발육, 성장, 재생 등의 과정에 기여한다[38-39]. Lammens 등[40]은 신연기 초기에 혈청 IGF I이 먼저 증가하고 이어 신연 가골과 주위 골조직내의 IGF I이 증가한다고 보고하였으며, Liu 등[41]은 전신수준에서 초기 증가는 주위 연조직으로부터 IGF I이 유리되어 생긴 결과라고 보고하였다. Schumacher 등[42]은 가토의 경골을 이용한 연구에서 확실한 골 신연동안에만 골막성 IGF I이 증가된다고 보고하였다. Tavakoli 등[27]은 신연 20일 후에 감소되는 결과를 보고하였다. 이들 연구를 종합하여 보면 IGF I은 시간의존성 성격을 띠는 성장인자로 주로 신연기 초기의 작용에 중요한 역할을 하는 것으로 생각할 수 있다.

본 연구에서는 IGF-I은 3일군 모두에서 미약한 발현상이 관찰되었고 특히 신연술을 시행한 A, B군은 C군에 비해 14일, 28일 모두 강력한 발현상를 보였다. 이를 통해 신연자극이 IGF-I의 발현을 유도함을 알 수 있으며 경화기까지 발현을 통해 골형성이 이루어지는 것으로 볼 수 있다. 그러나 A, B군에서의 차이는 TGF-β1과 마찬가지로 관찰되지 않았다. 이러한 결과는 IGF-I의 주입에 대한 이론적 정당성과 TGF-β1과 함께 골형성을 증진시킬 수 있는 재조합 성장인자로 사용이 가능하다는 것을 의미한다. 실제로 Stewart 등[43]은 가토의 하악골 신연시 IGF-I을 국소적으로 투여하여 하루 3mm의 급속 신연에서도 골형성이 관찰되었다고 보고하였다. 또한 성장호르몬(growth hormon)을 투여하면 GH-IGF axis이 자극되어 IGF가 증가되고 골형성이 증가되었다는 연구도 발표되었다[44].

FGF군은 세포이주, 혈관화, 골발육, 재생, 상피-중배엽 상호작용 등을 조절한다. 또한 주로 골과 연골에 많이 존재하고 있으나 골 및 연골에 대한 분화효과보다는 유사 섬유아세포에 대한 증식효과를 더 가지고 있다는 연구도 보고되었다[45-46]. 또한 골치유동안 신경혈관재생에 중요한 혈관화 인자(angiogenic factors)의 기능을 수행하기도 한다. 신연술시의 bFGF의 발현에 대해서는 주로 TGF-β, IGF-I 등의 다른 성장인자와 같이 발현되는 정도에 대해서 보고되었다. Tavakoli 등[27]은 양의 하악골을 이용한 신연술 후 TGF-β, IGF-I, bFGF의 발현을 연구하여 신연 20일 후에 TGF-β, IGF-I의 발현은 미약하였지만 bFGF는 강력한 발현양상을 나타내어 각각의 성장인자가 신연술동안 다른 기능을 수행한다고 보고하였다.

본 연구에서는 bFGF은 다른 성장인자들에 비해 미약한 발현상을 보였다. 그러나 대조군 C군에서는 14일째에서만 발현을 보이는 것과는 달리 A, B군은 신연자극이 가해진 7일째부터 발현상을 관찰할 수 있었으며 경화기까지 발현상을 보였다. 이를 통해 신연후기에 발현되어 경화기중 중요 역할을 담당한다는 기존의 보고와는 다르지만 신연자극으로 bFGF의 발현이 유도되는 것을 확인할 수 있었다. Okazaki 등[47]은 rhFGF-2을 경화기에 신연 중앙부에 주입하여 골형성이 촉진됨을 보고하였고 경화기에 rhFGF-2을 투여하는 것이 다른 성장인자에 비해서 강력한 효과를 나타낸다고 주장하였다. 그러나 본 연구에서 bFGF의 발현이 다른 성장인자에 비해 미약한 것으로 보아 골형성에 큰 역할을 하지 않은 것으로 추정되며 이에 대해 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

신연 골형성술에 대한 분자생물학적 연구에 있어서 성장인자에 대한 연구와 더불어 현재까지 많은 연구가 골형성과 관련된 세포외 기질 단백질의 발현에 관한 것으로 비교원성 기질 단백질인 osteocalcin(OC)과 osteonectin(ON)등이 골화와 골재형성에 중요한 기능을 수행하는 것으로 알려졌다. OC는 골조직의 비교원성 기질 단백질 중 가장 풍부히 존재하며 성숙된 골아세포, 연골세포, 치아세포 등에 의해 생산되는 γ-carboxyglutamic-acid-containing protein으로 그 기능에 대해서 정확히 밝

혀지지 않았으나 신생골에서 무기질화와 혈청농도를 조절하는 기능을 하는 것으로 알려졌다[48]. ON은 분비된 칼슘과 제 I형 교원질과 결합하는 당단백(glycoprotein)으로 칼슘의 교체(turnover), 골 재형성, 무기질화 과정등을 조절하는 기능을 가지고 있다[49]. Meyer 등[50]은 ON과 OC의 발현은 골양조직의 무기질화와 골아세포의 분화기능과 밀접한 관계가 있으며 수산화인회석 결정 성장과 크기를 조절하는 중요한 기능을 한다고 보고하였다. Warren 등[10]은 급속 신연과 점진적 신연시 OC의 발현에 대해 연구하여 점진적 신연시 OC의 발현이 강력히 나타나며 급속 신연시 정상 발현의 50%이하로 발현되고 OC의 발현이 성공적인 신연 골형성과 관련되어 있다고 보고하였다. Sato 등[24]은 신연 골형술시 각 시기별로 비교원성 세포외 기질 단백질의 발현에 대해 연구하여 골절 치유과정 또는 태아 골발육과정보다는 신연 골형성술에서 다양한 세포형태에 따라 비교원성 단백질(OPN, OC, ON)이 강력히 발현되며 이 결과로 기계적 인장자극이 세포 형태와 표현형을 조절하여 골기질 단백질에 대한 mRNA를 발현한다고 보고하였다. 국내에서는 백선호 등[21]이 성견 하악골 신장시 골신연 중심부와 인접 골막부에서 OC, ON의 발현정도를 대조군과 비교하여 인접 골막부에서 높은 발현상을 관찰하고 신생골 형성시 골막의 중요성을 보고하였다.

본 연구에서는 OC, ON은 3일째 A, B, C군 모두 관찰되지 않았으나 7일째부터 발현상을 관찰할 수 있었으며 특히 A군에서 신연부 전체에 걸쳐 중등도의 염색상이 14일, 28일 군까지 관찰되었다. 그러나 B군은 경도의 염색상이 신연기 전체기간 중 관찰되었고 28일째 증가된 소견을 보였으며 C군은 7일, 14일째에서 경도의 염색상을 보이나 B군에 비해서 매우 미약하였으며 28일째에서 비교적 중등도의 염색상이 관찰되었다. 기질 단백질은 골형성 과정중 일시적으로 발현되어 나타나는 것으로 면역조직화학염색으로 관찰가능하나 본 연구에서는 각 군에서의 뚜렷한 차이점을 발견하지 못하였다. 그러나 비교적 점진적 신연을 시행한 A군에서 강한 염색상을 관찰할 수 있는 것으로 보아 적절한 신연 술식을 선정하는 지표로의 활용과 골형성에서 중요한 역할을 하는 부위를 규명하는 데 이용이 가능할 것으로 사료된다.

이밖에도 세포외 기질인 osteopontin(OPN)에 관한 연구도 시행되고 있으며 Perrien 등[51]은 백서의 경골을 신연시키면서 신장부위, 세포형태, 조직형태, 골화양상 등에 따라 다양하게 발현되는 OPN을 관찰하고 조직치유와 기계적 자극 전도에 있어서 OPN의 다양한 기능에 대해서 보고하였다. 세포외 기질 단백질에 관한 연구는 비교적 최근에 와서 시행되고 있으며 이에 대해서 교원성 기질인 제 1, 2형 교원질과 함께 복합적인 연구가 필요하다.

Ⅴ. 결 론

본 연구를 통해 신연자극에 의해 골형성에 관여하는 성장인자 및 세포외 기질 단백질등의 발현이 유도되고 복합적인 작용에 의해 골형성이 이루어 지며, 적절한 신연자극이 가해지면 직접적인 골형성 과정인 막성 골화가 일어나고 실험조건 및 환경에 따라 어느정도 연골성 골화가 일어난다는 것을 확인 할 수 있었다. 또한 신연자극으로 강력한 발현을 보이는 TGF-β1, IGF-I이 골형성시 중요한 역할을 담당함을 알 수 있었고 이들 인자들을 재조합 성장인자로 사용하는 것이 골형성 증진에 매우 유리할 것으로 사료되며 신연 골형성에 있어서 개개 인자의 역할에 대한 규명 및 인자들의 주입시기, 방법, 양 등은 앞으로 임상적용에 앞서 풀어야 할 연구 과제이다. 그밖에 신연 자극과 같은 생기계적 정보가 신연술시 골생성 세포로 전달되어지는 것과 같은 기전은 현재까지 밝혀지지 않았으며 단지 골세포(osteocyte)가 감각세포로 작용한다는 가설만이 제시되고 있다[52]. 즉 골기질에 있는 골세포가 그들 자신 및 골아세포와 서로 연결되어 일종의 네트워크를 형성하여 기계적 자극에 대한 골 적응에 중요한 역할을 하고 또한 세포내에서 화학물질 생산, 효소 와 NO 분비, cAMP상승, 유전자 발현 등 일련의 변화가 발생한다는 것이다[53-54]. 이것은 앞으로 더욱 진행되어야 할 연구방향이며 성장인자 및 세포외 기질 단백질의 발현 및 기능에 대한 것을 기초로 세포수준에서 신호전달에 대한 기전 및 발현물질을 찾아내고 이를 재조합 성장인자 주입 또는 유전자 치료와 같이 임상적으로 활용한다면 장기간의 신연기간을 단축할 수 있고 또한 활발한 임상적용이 가능할 것이다.

참고문헌

1. Ilizarov GA: A new principle of osteosynthesis with the use of crossing pins and rings. In Collection of Scientific Works of the Kurgan Regional Scientific Medical Society. Kurgan, USSR, 1954. 145-160.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. Snyder CC, Levine GA, Swanson HM, Browne EZ: Mandibular lengthening by gradual distraction. Plast Reconstr Surg 1973;51:506-508.
6. McCarthy JG, Schreiber J, Karp NS, Thorne CH, Grayson BH: Lengthening the human mandible by gradual distraction. Plast Reconstr Surg 1992;89:1-10.
7. Swennen G, Schliephake H, Dempf R, Schierle H, Malevez C: Craniofacial distraction osteogenesis: a review of the literature. Part I: clinical studies. Int J Oral Maxillofac Surg 2001;30:89-103.
8. Swennen G, Dempf R, Schliephake H: Craniofacial distraction osteogenesis: a review of the literature. Part II: experimental studies. Int J Oral Maxillofac Surg 2002;31:123-135.
9. Rowe NM, Mehrara BJ, Dudziak ME, Steinbrech DS, Mackool RJ, Gittes GK *et al*: Rat mandibular distraction osteogenesis: Part I. Histologic and radiographic analysis. Plast Reconstr Surg 1998;102:2022-2032.
10. 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.
11. 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.
12. 김부경, 신상훈, 김종렬: 백서경골에서 신연속도에 따른 골형성 비교 연구. 대구외지 2000;26:6:620-627.
13. 김기영, 유선열: 가토에서 하악골 신연 양에 따른 하치조신경의 조직학적 변화. 대악성외지 1998;20:3:250-255.
14. 윤경인, 박재억: 하악골 신연술후 생성된 신생골의 조직학적 및 면역화학적 소견. 대악성외지 2001;23:3:258-262.
15. 오유근, 오희균, 유선열: 구내 신연장치를 이용한 치조골 신연에 미치는 잠복기의 영향. 대악성외지 2001;23:4:324-331.
16. 정현, 오희균, 유선열: 치조골 신연후 임프란트 매식시기에 따른 골유착 효과. 대구외지 2000;26:3:238-244.
17. 김명진, 윤필영, 신동준, 김수경, 김종원, 김규식: Callus distraction method를 이용한 하악골 신장술: 계단골절단 술식의 적용. 대악성외지. 2000;22:2:254-261.
18. 박영욱, 차봉근, 김지혁: 점진적 Distraction Technique을 이용한 상악골의 전방이동. 대악성외지. 2000;22:6:687-696.
19. 김진, 윤현중: 악안면 기형 환자에서 악골 신장술의 적용. 대악성외지 2000;22:6:657-663.
20. 임순모, 안병근, 박영주, 박희건, 박준우, 이건주 외: 성견 하악 골체부 신장시 신장부위의 증식세포핵항원과 제 1형 교원질 발현에 관한 연구. 대구외지 2001;27:5:385-393.16.
21. 백선호, 안병근, 박영주, 박희건, 박준우, 이건주 외: 성견 하악골 절단 후 기계적 골 견인에 의해 형성된 골 신장부에 대한 시기별 조직학적 변화. 대구외지 2001;27:5:404-413.
22. 송정호, 신상훈, 김종렬: 백서 하악골에서 신연빈도에 따른 골형성 비교연구. 대악성외지 2002;24:2:115-125.
23. 류수장, 이충국, 최병호: 성견 하악골의 신연 부위에서 골형성에 대한 혈소판-풍부 혈장의 효과. 대구외지 2001;27:6:498-510.
24. Sato M, Yaui N, Nakase T, Kawahata H, Sugimoto M, Hirota S *et al*: Expression of bone matrix proteins mRNA during distraction osteogenesis. J Bone Miner Res 1998;13:1221-1231.
25. Sato M, Ochi T, Nakase T, Hirota S, Kitamura Y, Nomura S *et al*: Mechanical tension-stress induces expression of bone morphogenetic protein (BMP)-2 and BMP-4, but not BMP-6, BMP-7, and GDF-5 mRNA, during distraction osteogenesis. J Bone Miner Res 1999;14:1084-1095.
26. Eingartner C, Coerper S, Fritz J, Gaissmaier C, Koveker G, Weise K: Growth factors in distraction osteogenesis. Immunohistological pattern of TGF-beta 1, IGF-I in human callus induced by distraction osteogenesis. Int Orthop 1999;23:253-259.
27. Tavakoli K, Yu Y, Shahidi S, Bonar F, Walsh WR, Poole MD: Expression of growth factor in the mandiblar distraction zone: a sheep study. Br J Plast Surg 1999;52:434-439.
28. Kojimoto H, Yasui N, Goto T, Matsuda S, Shimomura Y: Bone lengthening in rabbits by callus distraction. J Bone Joint Surg(Br) 1988;70B:543-549.
29. Yasui N, Sato M, Ochi T, Kimura T, Kawahata H, Nomura S: Three modes of ossification during distraction osteogenesis in the rat. J Bone Joint Surg Br 1997;79:5:824-830.
30. Ueda M, Matsuno M, Sakai K, Hata KI: Mechanisms of new bone formation during distraction osteogenesis a preliminary report: Samchukov ML, Cope JB, Cherkashin AM Craniofacial Distraction Osteogenesis. Mosby 2001;37-41.
31. Buckley MJ, Banes AJ, Jordan RD: The effects of mechanicl strain on osteoblasts *in vitro*. J Oral Maxillofac Surg 1990; 48:276-282.
32. Burger EH, Klein-Nulend J, Veldhuijzen JP: Mechanical stress and ostogenesis *in vitro*. J Bone Miner Res. Suppl 1992;2:S397-401.
33. Linkhart TA, Mohan S, Baylink DJ: Growth factors for bone growth and repair: IGF, TGFb, and BMP. Bone 19:1S-12S, 1996.
34. Wahl SM: Transforming growth factor β: the good, the bad, and the ugly. J Exptl Med 1994;180:1587-1590.
35. Yeung HY, Lee KM, Fung KP, Leung KS: Sustained expression of transforming growth factor-beta1 by distraction during distraction osteogenesis. Life Sci 2002;24:71(1):67-79.
36. Critchow MA, Bland YS, Ashhurst DE: The effect of exogenous transforming growth factor-beta 2 on healing fractures in the rabbit. Bone 1995;16:521-527.
37. Rauch F, Lauzier D, Travers R, Glorieux F, Hamdy R: Effects of locally applied transforming growth factor-beta 1 on distraction osteogenesis in a rabbit limb-lengthening model. Bone 2000a;26:619-624.
38. Rosen CJ, Donahue LR, Hunter S: Insulin-like growth factors and bone: the osteoporosis connection. Proc Soc Exptl Biol Med 1994;206:83-102.
39. Baxter RC: Insulin-like growth factor(IGF) binding proteins: the role of serum IGFBPs in regulating IGF availability. Acta Paed Scand(Suppl) 1991;372:107-114.
40. Lammens J, Liu Z, Aerssens J, Dequeker J, Fabry G: Distraction bone healing versus osteotomy healing: A comparative biochemical analysis. J Bone Miner Res 1998;13:279-286.
41. Liu Z, Luyten FP, Lammens J, Dequeker J: Molecular signaling in bone fracture healing and distraction osteogenesis. Histol Histopathol 1999;14:587-595.
42. Schumacher B, Albrechtsen J, Keller J, Flyvbjerg A, Hvid I: Periosteal insulin-like growth factor I and bone formation. Changes during tibial lengthening in rabbits. Acta Orthop Scand 1996;67:237-241.
43. Stewart KJ, Weyand B, Van't Hof RJ, White SA, Lvoff GO, Maffulli N *et al*: A quantitative analysis of the effect of insulin-like growth factor-1 infusion during mandibular distraction osteogenesis in rabbits. Br J Plast Surg 1999;52:343-350.
44. Bail HJ, Kolbeck S, Lindner T, Dahne M, Weiler A, Windhagen HJ *et al*: The effect of growth hormone on insulin-like growth factor I and Bone metabolism in distraction osteogenesis. Growth Horm & IGF Res, 2001;11(5):314-323.
45. Kimoto T, Hosokawa, R, Kubo T, Maeda M, Sano A, Akagawa Y: Continuous administration of basic fibroblast growth factor(FGF-2) accelerates bone induction on rat calvaria an application of a new drug delivery system. J Dent Res 1998;77:1965-1969.
46. McCarthy TL, Centrella M, Canalis E: Effects of fibroblast growth factors on deoxyribonucleic acid and collagen synthesis in rat parietal bone cells. Endocrinology 1989;125:2118-2126.
47. Okazaki H, Kurokawa T, Nakamura K, Matsushita T, Mamada K, Kawaguchi H: Stimulation of bone formation by recombinant fibroblast growth factor-2 in callotasis bone lengthening of rabbits. Calcif Tissue Int 1999;64:542-546.
48. Desbois C, Karsenty G: Osteocalcin cluster: implications for functional studies. J Cell Biochem 1995;57:379-383.
49. Hiltunen A, Hannu TA, Vuorio E: Regulation of extracellular matrix genes during fracture healing. Clin Orthop 1993;297:23-27.
50. 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.
51. Perrien DS, Brown EC, Aronson J, Skinner RA, Montague DC, Badger TM *et al*: Immunohistochemical study of osteopontin expression during distraction osteogenesis in the rat. J Histochem Cytochem 2002;50:4:567-574.
52. Lanyon LE: Osteocytes, strain detection, bone modeling and remodeling. Calcif Tissue Int 1993;53:S102-S106.
53. Aarden EM, Burger EH, Nijweide PJ: Function of osteocytes in bone. J Cell Biochem 1994;55:287-299.
54. Nomura S, Takano-Yamamoto T: Molecular events caused by mechanical stress in bone. Matrix Biol 2000;19:91-96.