

골다공증 유도 흰쥐에서 칼슘과 비타민 D 섭취가 티타늄 임플란트 주위의 골 형성에 미치는 영향

이재열 · 정석영 · 신상훈 · 김규천* · 김용덕 · 정인교 · 김욱규
부산대학교 치의학전문대학원 구강악안면외과학교실, *구강해부학교실

Abstract (J. Kor. Oral Maxillofac. Surg. 2008;34:276-284)

EFFECT OF CALCIUM AND VITAMIN D SUPPLEMENTATION ON BONE FORMATION AROUND TITANIUM IMPLANT IN OSTEOPOROSIS-INDUCED RATS

Jae-Yeol Lee, Seok-Young Jeong, Sang-Hun Shin, Gyo-Cheon Kim*,
Yong-Deok Kim, In-Kyo Chung, Uk-Kyu Kim

*Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, *Dept. of Oral Anatomy, School of Dentistry, Pusan National University*

Purpose: The purpose of this study was to observe the effect of calcium and vitamin D to the titanium implant osseointegration in the osteoporosis-induced animal model.

Material and method: Thirty-two rats, 10 weeks of age, were divided into two groups: experimental group was ingested additional calcium and vitamin D, and a control group was not. Titanium screw implant(diameter, 2.0 mm; length, 3.5 mm; pitch-height 0.4 mm) were placed into tibia of 32 rats, 16 in the control group and 16 in the experimental group. The rats were sacrificed at 1, 2, 4 and 8 weeks after implantation for histopathologic examination, histomorphometric analysis and immunohistochemistry with fibronectin and collagen type I antibody.

Result: In histopathological findings, newly formed bone was seen at 2 weeks and became lamellar bone at 4 weeks, and mature trabecular bone was seen at 8 weeks in experimental group. In control group, thickness of regenerated bone increased till 4 weeks gradually and trabecular bone was seen at 8 weeks. In histomorphometric analysis, marrow bone density increased significantly in experimental group compared to control group. Fibronectin immunoreactivity was strong at 2 weeks in experimental group and reduced after 4 weeks gradually. But it was maintained continuously from 2 to 8 weeks in control group. Collagen type I immunoreactivity was very strong from 2 to 4 week in experimental group. And the amount of Collagen type I expression was more abundant in experimental group.

Conclusion: The results of this study suggest that calcium and vitamin D supplementation promote bone healing around titanium implants in osteoporosis induced animals.

Key words: Osteoporosis, Implant, Calcium, Vitamin D

I. 서 론

근래에 와서 임플란트 치료는 부분 혹은 완전 무치악 환자에 있어서 높은 성공률을 보이는 일반적인 보철 술식의 하나로 자리 잡고 있다. 이러한 치과 임플란트가 만족스러운 기능을 유지하기 위해서는 악골내에 골유착(osseointegration)이 계속 유지되어야 한다. 따라서 임플란트 치료의 장기간의 임상적

성공은 식립된 악골의 변화에 영향을 받게 된다.

골다공증은 정상인에 비해 낮은 골질량과 골조직의 미세구조의 저하를 특징으로 하는 대사성 골질환으로 골질을 약화시키고 골절의 위험성을 증가시킨다¹⁾. 특히 폐경 후 골다공증은 골 밀도와 골질량의 감소를 일으키는 골격성 질환이고 폐경 후에 스트로겐의 결핍이 골의 화학적 조성의 변화 없이 골질량을 감소시킴으로써 골대사에 주로 영향을 미친다고 알려져 있다. 또한 골다공증은 골절의 치유를 지연시키며, 골의 turnover rate를 증가시켜 임플란트 주위 골 치유 능력을 감소시킬 수 있다²⁾.

골다공증의 치료에는 다양한 약물이 사용될 수 있으며, 이중 칼슘은 골을 형성하는 중요한 성분인데, 골다공증 환자에서는 부갑상선 호르몬의 증가로 신장과 소장에서의 흡수가 감소되어 체내 칼슘 요구량이 많아지게 된다. 또한 비타민 D는 장관에서 칼슘의 흡수뿐만 아니라, 경조직의 석회화에 관계되

신상훈

602-739 부산광역시 서구 아미동 1가 10번지
부산대학교 치의학전문대학원 구강악안면외과학교실

Sang-Hun Shin

Dept. of OMFS, School of Dentistry, Pusan National University
1-10, Ami-Dong, Seo-Ku, Pusan, 602-739, Korea
Tel: 82-51-240-7429 Fax: 82-51-244-8334
E-mail: ssh8080@pusan.ac.kr

는 지질의 합성에도 영향을 주며, 소장의 점막상피에 작용하여 칼슘의 흡수를 촉진한다. 따라서 칼슘과 비타민 D의 복용은 칼슘 흡수의 감소를 막고 골의 turnover rate를 낮추어 골질의 가능성을 줄이고 골질을 향상시킬 수 있다⁴⁾. 하지만 대부분의 연구가 척추 및 골반의 골질에 국한되어 있으며, 칼슘과 비타민 D의 복용이 골다공증 환자에서 임플란트 주위 골형성에 미치는 영향에 대한 연구는 거의 없다.

이에 본 연구에서는 난소를 제거하여 인위적 골다공증을 유발시킨 흰쥐의 경골에 티타늄 임플란트를 식립 한 후 칼슘과 비타민 D를 섭취시켜 임플란트 주위 골유착 과정을 관찰하여 임플란트 시술시 칼슘과 비타민 D의 복용이 골유착에 미치는 영향을 파악하여 임상 적용 시 지견을 얻고자 하였다.

II. 연구재료 및 방법

1. 연구재료

실험동물은 일정 기간 동일 조건하에서 사육한 10주령군 200-250 g 내외의 자성 흰쥐 32마리를 사용하였으며, 이것을 난소 절제만 시행한 정상 대조군 16마리와 난소 절제 후 칼슘과 비타민 D를 섭취시킨 실험군 16마리로 나누었다. 연구재료는 순수 티타늄 (Commercially Pure titanium - Grade 3)으로 주문 제작한 직경 2.0 mm 길이 3.5 mm pitch-height 0.4 mm의 나사형 임플란트(Cowellmedi, 한국)를 사용하였다.

2. 연구방법

1) 난소절제

10주된 흰쥐의 대퇴부에 Xylazine hydrochloride (Rompun®, Bayer사, 한국) 10 mg/kg, Ketamine chloride (Ketalar®, 유한양행, 한국) 100 mg/kg을 혼합하여 근육 주사하여 전신마취한 후 복부 제모를 시행하고 베타딘 용액을 도포하여 소독하였다. 수술용 가위를 이용하여 복부에 5 cm의 수평절개를 가하여 복부를 노출시키고, 양측 신장의 하방에 존재하는 난소를 조심스럽게 완전제거하고 통법에 따라 봉합하였다. 그리고 Gentamicin hydrochloride (겐타마이신®, 중외제약, 한국) 3 mg/kg을 근주하였다.

2) 임플란트 매식

난소를 절제하고 5주가 경과된 흰쥐 16마리의 좌,우측 경골부에 다음의 수술 술식을 사용하여 순수 티타늄으로 주문 제작된 나사형 임플란트를 매식하였다. Xylazine hydrochloride (Rompun®, Bayer사, 한국) 10 mg/kg, Ketamine chloride (Ketalar®, 유한양행, 한국) 100 mg/kg을 혼합하여 대퇴부에 근육 주사하여 전신마취한 후 슬관절부를 포함하여 좌측 경골부 피부에 제모하고 베타딘 용액을 도포하여 소독하였다. 좌측 경골 외측부에 절개를 가한 다음 바리자를 이용하여 골막까지 박리한 후

골을 노출시켰다. 노출된 경골 근심측 5 mm 부분의 경골 외측 최대 폭경부 중앙에, 생리식염수를 적하하면서 치과용 회전엔진으로 저속 회전시켰다. 직경 1.6 mm twist drill을 이용하여 피질골에 구멍을 뚫어, 직경 1.6 mm의 구멍을 정확히 형성하고, 형성한 구멍을 생리식염수로 충분히 세척하고 골편 등을 제거한 후 임플란트를 피질골에 심고, 골수강에 도달할 때까지 매입하였다. 창상은 통법에 따라 봉합하고 Gentamicin hydrochloride (겐타마이신®, 중외제약, 한국) 3 mg/kg을 근주하였다. 대조군 16마리도 동일한 방법으로 임플란트를 매식하였다.

3) 실험 기간 및 칼슘-비타민 D의 섭취

각 사육장마다 3~4마리씩 사육하였고 대조군은 실험동물용 고형사료와 생수를, 실험군에는 실험용 고형사료와 칼슘 (1 mg/day)과 비타민 D (6 ng/day)가 포함된 생수를 자유 섭식하도록 하였다. 실험동물은 매식 후 1주, 2주, 4주 및 8주간 사육하여 희생시킨 후 표본을 제작하였다.

4) 표본 제작

상기의 외과적 수술시행 후 1주, 2주, 4주 및 8주 경과한 흰쥐의 대퇴부에 Xylazine hydrochloride (Rompun®, Bayer사, 한국) 10 mg/kg, Ketamine chloride (Ketalar®, 유한양행, 한국) 100 mg/kg을 혼합하여 대퇴부에 근육주사하여 전신 마취한 후 심장관류법으로 조직을 고정하기 위하여 흉곽부에 Y절개를 가하여 흉곽을 열어 심장을 노출시킨 후 좌심실로 연동성 관류 펌프와 연결된 20 게이지 바늘을 삽입하여 지혈겸자로 고정하고 펌프를 작동한 후 우심방의 벽을 절개하여 체순환된 피를 배출시키고 phosphate buffered saline (PBS)를 사용하여 20분간 체내 혈액을 세척해 내었다. 그 후 pH 7.2인 4% paraformaldehyde 고정액을 30분간 관류 펌프로써 주입하였다. 관류고정 직후 대퇴골의 슬관절부와 비골을 포함하여 경골을 절단해서, 티타늄 임플란트의 중심축 방향으로 경조직 절단기 (Struers Minitom, Denmark)를 사용하여 양분하였다. 그 후 동일한 고정액에 6시간 동안 고정시킨 후 증류수 1750 ml에 250 g의 EDTA와 25 g의 NaOH를 녹인 탈회액에 7주간 탈회시켰다. 그 후 조직을 조직캡슐에 넣어 흐르는 물에 12시간동안 수세한 다음, 통상적인 방법에 따라 alcohol과 xylene으로 탈수와 투명화를 한 후 paraffin에 포매하고 6 µm 두께의 시상연속절편을 만들었다.

5) 병리조직학적 관찰

(1) Hematoxylin-Eosin(H-E) stain

골형성 정도는 H-E 염색표본을 광학현미경 (Zeiss Axioscop, German)을 이용하여 관찰하였다.

(2) Modified Goldner's trichrome stain

교원질의 생성 정도에 따른 광화된 골조직과 비광화된 골조직을 관찰하기 위해 상기 제작된 6 µm 두께의 파라핀 조직 절편을 xylene에서 파라핀을 제거하고 hematoxylin에 5분간 핵 염색

을 시행한 후 흐르는 물에 10분간 수세하고 Ponceau-acid fuchin 용액에 5분간 염색하였다. 그런 후 0.2% acetic acid 용액에서 헹구고 Phosphomolybdic acid-orange G 용액에서 3분간 감별한다. 다시 0.2% acetic acid에 헹구고 Light green 용액에 5분간 염색한다. 그 후 0.2% acetic acid에 헹구고 95% 알콜에 탈수한다. Xylene으로 투명화한 후 Balsam으로 봉입하였다.

6) 조직형태측정학적 분석

(1) 골수부 골밀도 (Bone Marrow Density) 측정

Modified Golder 염색된 표본을 광학현미경 (Zeiss Axioscop, German)을 통하여 카메라 (AxioCam MRC^S, Zeiss, German)로 찍고 컴퓨터에 저장한 후, 골수부에서 임플란트 경계부로부터 1 mm 떨어진 곳에서 1 mm의 동일한 범위를 4군데 지정한 후 화상 처리장치 (AxioVision 4.3, German)를 이용하여 3회 측정 한 후 석회화된 골의 양을 pixel의 수로 계산하여 수치화 한 후 통계 처리 하였다.

(2) 통계학적 분석

조직형태측정학적으로 측정된 자료를 각 시기별로 실험군과 대조군을 student t-test를 이용하여 유의차 검정을 실시하여 p<0.05를 유의차가 있다고 판정하였다.

7) 면역조직화학염색

상기 제작된 6 μm 두께의 파라핀 조직 절편을 xylene에서 파라핀을 제거하고 graded alcohol을 거쳐 흐르는 물로 수세한 후 내인성 peroxidase를 제거하기 위해 무수 메칠알콜에 0.3% hydrogen peroxide를 첨가시켜 20분간 처리한 다음 PBS에서 10분간 3회 세척하고 fibronectin의 분포를 알기 위해 5% normal goat serum을 30분간 적용하였고, collagen type I의 분포를 알기 위해서는 5% normal horse serum을 30분간 적용하였다. 그런 후 조직절편을 세척하지 않고 부드럽게 blotting 한 후 1:400으로 희석시킨 1차 항체인 rabbit anti-human fibronectin (DAKO, Denmark)과 mouse anti-human collagen type I (Serotec, U.S.A.)을 4°C에서 16시간 적용하였다. 그 후 PBS로 10분간 3회 세척한 후 2차 항체인 biotinylated goat anti-rabbit IgG (Verotor lab., U.S.A.)와 biotinylated horse anti-mouse IgG (Verotor lab., U.S.A.)를 각각 1:200으로 희석하여 실온에서 1시간동안 적용하였다. 그 후 조직절편을 PBS로 10분씩 3회 수세하고 30분전에 미리 만들어 실온에 방치해 놓은 ABC (avidin-biotin horseradish peroxidase complex)용액 (A:10 μl, B:10 μl in 1 ml PBS, Verotor lab., U.S.A.)에 조직절편을 실온에서 1시간동안 적용시켰다. 그 후 조직절편을 PBS로 10분간 3회 세척한 후, pH 7.6인 0.05M Tris-HCl buffer와 0.05% diaminobenzine (DAB) 및 0.01% hydrogen peroxidase 혼합용액에 3분 동안 실온에서 발색시켰다. 그리고 나서 Tris buffer, PBS 그리고 증류수에서 각각 10분 동안 순서대로 세척한 후, Harris hematoxyline으로 대조염색을 하고 Pmount (Polysciences, U.S.A.)로 봉입하였다.

III. 연구결과

1. 병리조직학적 소견

1) H-E 염색

(1) 대조군

매식 후 1주군에서 임플란트 계면 부위에 요철상을 보이는 두꺼운 골기질과 골기질내에 막내성 골형성의 양상을 보이는 많은 골소주를 관찰할 수 있었으며 (Fig. 1), 2주군에서는 임플란트 계면부위에 무기질화가 일어나지 않은 두꺼운 골기질 상태를 볼 수 있었다 (Fig. 2). 4주군에 이르러 임플란트 계면 부위에서는 2주군과 비교해 약간 두꺼워진 골조직 양상을 관찰할 수 있었으나 여전히 다공성의 특징을 보였다 (Fig. 3). 매식 후 8주군에서는 임플란트 계면 부위에 보다 두꺼워진 재생된 골조직을 볼 수 있으며, 무기질화 정도는 거의 성숙된 형태를 보였다 (Fig. 4).

(2) 실험군

매식 후 1주군에서 임플란트 주위로 나사상 모양의 부분적인 골재생이 관찰되었고, 이러한 골조직은 대조군에 비해 더 광화된 형태를 보였다 (Fig. 5). 2주군에서는 임플란트와 골이 접촉하는 계면부위에 요철상의 재생되는 골을 볼 수 있으며 이 들은 미성숙된 양상을 나타내고 있었다. 많은 골소주들이 골수강내에 관찰 되었다 (Fig. 6). 4주군에 이르러 임플란트 주위로 재생된 골의 성숙을 나타내고 있었으며, 성숙된 골의 두께가 두꺼워진 양상을 보였다 (Fig. 7). 매식 후 8주군에서는 4주군에 비해 잘 형성된 두꺼워진 요철 모양의 성숙골을 관찰할 수 있었으며 신생골의 층판 구조가 명확해지는 양상을 보였다 (Fig. 8).

2) Modified Goldner's trichrome stain

(1) 대조군

매식 후 1주군에서 임플란트 계면에서 신생골의 형태가 나타났으며 조금씩 광화된 골들이 전체적인 형태를 이루며 나타났다 (Fig. 9). 2주군에서는 광화된 골을 나타내는 초록색의 양이 더욱 증가하였으며 (Fig. 10), 4주군에서는 비석회화된 골을 나타내는 붉은 색의 양이 아직 많이 나타나는 것으로 보아 활발히 골기질을 분비하고 있음을 알 수 있었다 (Fig. 11). 8주군에 이르러서는 상당부분 치밀골의 형태가 임플란트 계면 사이로 파고 들어가 있으나, 표면에서는 비석회화된 골기질이 발견되는 것으로 보아 계속 신생골이 형성되고 있음을 알 수 있었다 (Fig. 12).

(2) 실험군

매식 후 1주군에서는 대조군에 비해 초록색의 치밀골이 더 뚜렷함이 관찰되었으며 (Fig. 13), 2주군에서 치밀골내에 빈 공간은 다소 보이지만 상당량의 광화된 골기질이 채워져 있음을 관찰할 수 있었다 (Fig. 14). 4주에 이르러서는 대조군에 비해 상

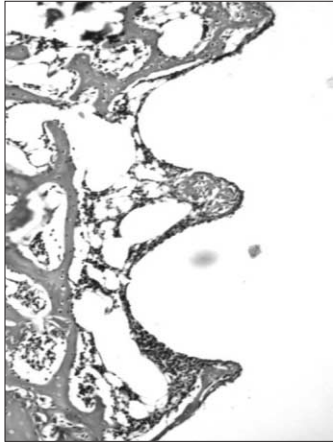


Fig. 1. Microphotograph at 1 week after implantation in control rat. H-E, × 100

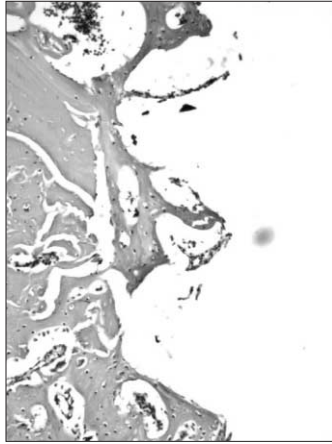


Fig. 2. Microphotograph at 2 week after implantation in control rat. H-E, × 100

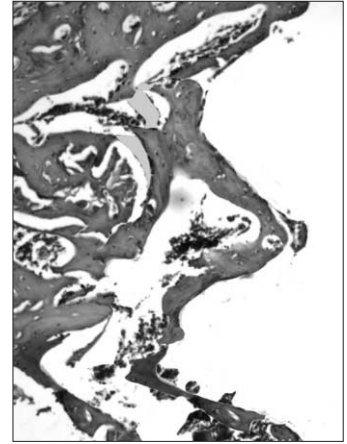


Fig. 3. Microphotograph at 4 week after implantation in control rat. H-E, × 100

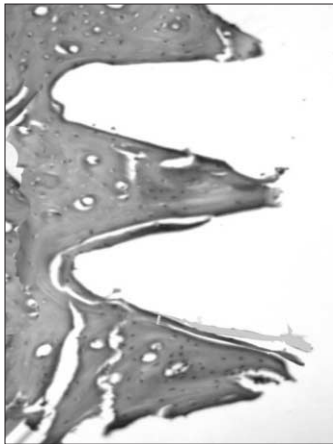


Fig. 4. Microphotograph at 8 week after implantation in control rat. H-E, × 100

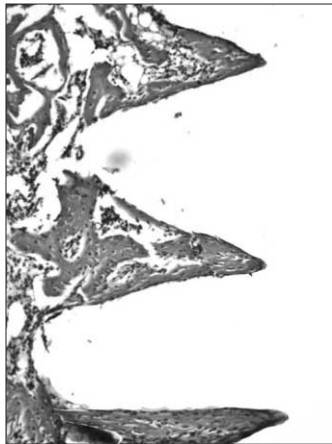


Fig. 5. Microphotograph at 1 week after implantation in experimental rat. H-E, × 100

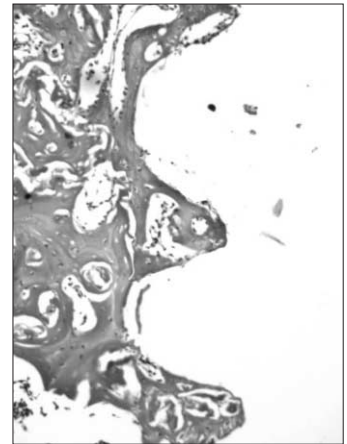


Fig. 6. Microphotograph at 2 week after implantation in experimental rat. H-E, × 100

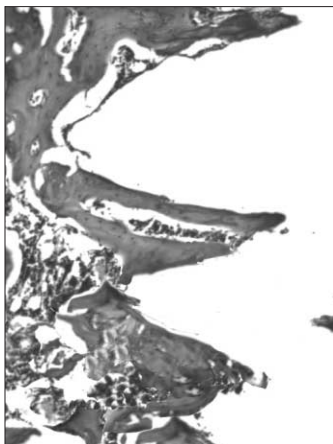


Fig. 7. Microphotograph at 4 week after implantation in experimental rat. H-E, × 100

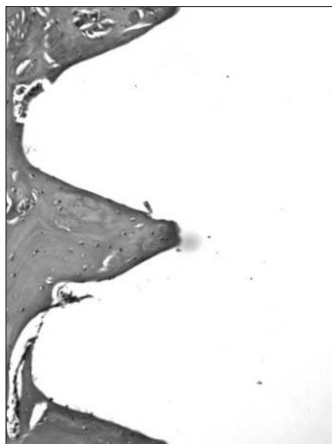


Fig. 8. Microphotograph at 8 week after implantation in experimental rat. H-E, × 100

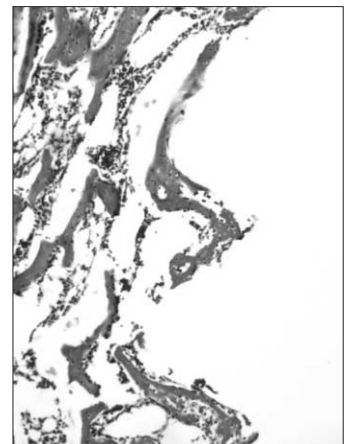


Fig. 9. Microphotograph at 1 week after implantation in control rat. Modified Goldner's trichrome stain × 100

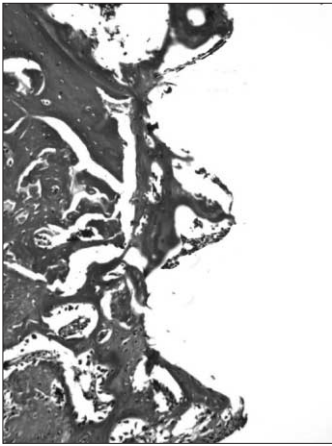


Fig. 10. Microphotograph at 2week after implantation in control rat. Modified Goldner's trichrome stain $\times 100$



Fig. 11. Microphotograph at 4week after implantation in control rat. Modified Goldner's trichrome stain $\times 100$

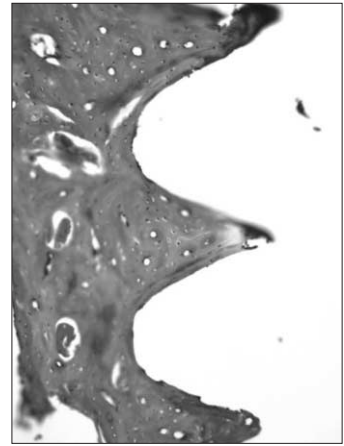


Fig. 12. Microphotograph at 8week after implantation in control rat. Modified Goldner's trichrome stain $\times 100$

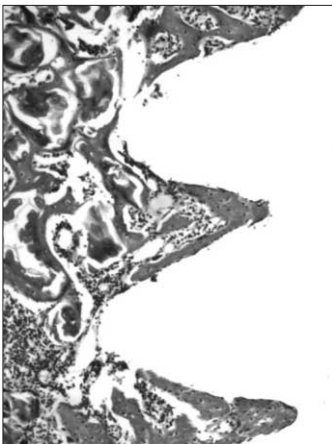


Fig. 13. Microphotograph at 1week after implantation in experimental rat. Modified Goldner's trichrome stain $\times 100$

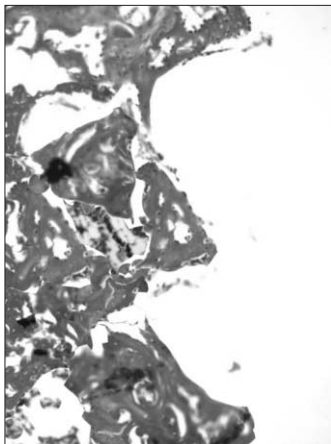


Fig. 14. Microphotograph at 2week after implantation in experimental rat. Modified Goldner's trichrome stain $\times 100$



Fig. 15. Microphotograph at 4week after implantation in experimental rat. Modified Goldner's trichrome stain $\times 100$

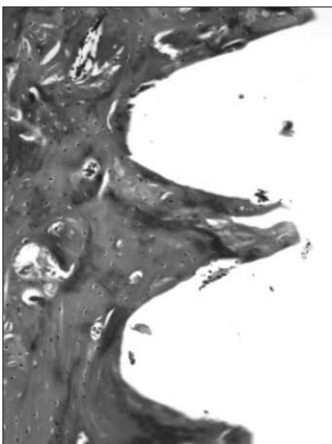


Fig. 16. Microphotograph at 8week after implantation in experimental rat. Modified Goldner's trichrome stain $\times 100$

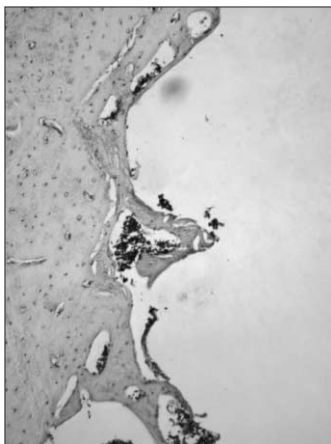


Fig. 17. Fibronectin antibody reaction of regenerating bone at 2 weeks after implantation on the tibia of the control rat. (original magnification $\times 100$)

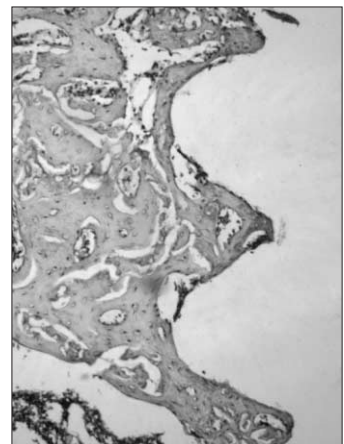


Fig. 18. Fibronectin antibody reaction of regenerating bone at 2 weeks after implantation on the tibia of the experimental rat. (original magnification $\times 100$)

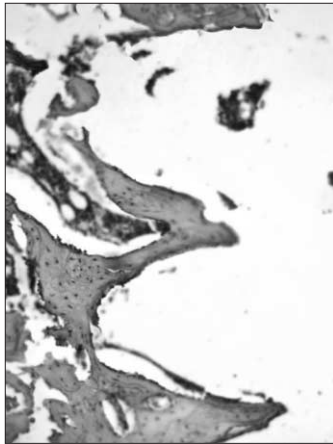


Fig. 19. Collagen type I antibody reaction of regenerating bone at 4 weeks after implantation on the tibia of the control rat. (original magnification × 100)

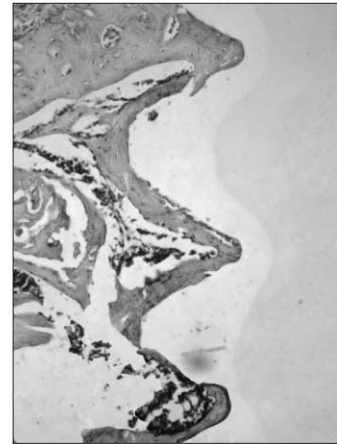


Fig. 20. Collagen type I antibody reaction of regenerating bone at 4 weeks after implantation on the tibia of the control rat. (original magnification × 100)

Table 1. Bone Marrow Density

	control group	experimental group
1 week	88.63 ± 7.53	113.28 ± 7.23*
2 weeks	91.91 ± 10.27	135.17 ± 9.82*
4 weeks	116.52 ± 8.54	143.67 ± 6.66*
8 weeks	128.31 ± 9.62	153.71 ± 8.12*

(* , p < 0.05)

- Value represent mean ± SD for four separate area (1 mm²) performed in triplicate.

당히 성숙된 골의 형태를 보였으나 임플란트 계면에서는 아직 까지 신생골이 생성됨을 알 수 있었다 (Fig. 15). 매식 후 8주군에서는 전반적으로 광화된 형태를 볼 수 있었다 (Fig. 16).

2. 조직형태측정학적 분석 (Histomorphometric Analysis)

1) 골수부 골밀도 (Bone Marrow Density)

대조군과 실험군 모두 1주군부터 8주군까지 골밀도가 점차적으로 증가하였으며 실험군에서는 1주군에서부터 대조군에 비해 유의한 증가를 보였다 (Table 1).

3. 면역조직화학염색

1) Fibronectin 면역 항체를 이용한 면역조직화학염색조건

Fibronectin 항체 발현 정도는 대조군에서 2주군에서 강한 발현을 보이다가 (Fig. 17), 그 이후 서서히 그 강도가 약해지는 것을 볼 수 있으나 발현은 지속적으로 보인 반면, 실험군에서는 2주군에서 가장 강한 발현을 보였고 (Fig. 18), 이후 대조군에 비해 발현의 강도가 약해지는 양상을 보였다 (Table 2).

Table 2. Fibronectin Expression after Implantation

periods after implantation	control group	experimental group
1 week	++	+++
2 weeks	++/+++	+++
4 weeks	+ / ++	+ / ++
8 weeks	+ / ++	+ / -

+++ , strong positive, ++, moderate positive, +, weak positive, -, no reaction

Table 3. Collagen Type I Expression after Implantation on the Tibia

periods after implantation	control group	experimental group
1 week	++/+	++
2 weeks	++	++/+++
4 weeks	++/+	++/+++
8 weeks	+	++

+++ , strong positive, ++, moderate positive, +, weak positive, -, no reaction

2) Collagen type I 면역 항체를 이용한 면역조직화학염색조건
대조군에서는 2주군에서 강한 발현을 보이다가 4주군부터 발현이 약해졌으며 (Fig. 19), 실험군에서는 1주군부터 발현의 강도가 서서히 증가하여 2주 및 4주군에서는 강한 발현이 나타났고 (Fig. 20), 8주군까지 발현이 지속되었다 (Table 3).

IV. 총괄 및 고찰

임플란트가 근래에 보철의 중요한 한 분야로 자리 잡으면서 높은 성공률을 얻기 위해서 골의 양과 질에 영향을 미치는 다양한 조건들에 관심을 가져왔다. 골은 계속적으로 흡수와 침착의 과정을 거치며 나이가 증가함에 따라 침착을보다 흡수가 더 빠르게 진행된다. 최근 노인환자에서의 임플란트 치료가 증가하고 있으며, 이러한 환자에서는 골재생의 균형에서 흡수가 더 두드러지게 나타난다.

여성에서 폐경기 후 흔히 나타나는 골다공증은 골흡수와 골형성의 균형이 맞지 않는 골 대체 과정의 이상을 특징으로 하는 질환으로써 여성 호르몬의 결핍에 의해 골흡수가 증가하고 골조직으로 칼슘의 흡수가 감소됨으로 발생되는데, 칼슘의 평형은 체내에 들어오고 나가는 양으로 조절되며 칼슘의 저장고인 골격계에 칼슘의 양이 부족하거나 과도한 양이 빠져나갈 때 negative balance로서 골량은 감소하게 되고 골다공증에 의한 골절이 쉽게 일어난다⁹.

골다공증의 모델로 난소를 절제한 흰쥐가 많이 사용되는데 Omi와 Ezawa¹⁰는 흰쥐에서 난소를 절제한 후 4주경부터 경골의 골질이 유의하게 감소한다고 보고하였다. 따라서 본 연구에서는 골다공증의 효과가 확실히 나타나게 하기 위해 난소를 절제한 후 5주 후에 임플란트를 매식하였다.

골다공증에서는 골대사가 더욱 흡수로 진행되어 임플란트 주위 골치유에 잠재적인 문제점을 일으킬 수 있다. 하지만, 골다공증이 임플란트에 금기증 혹은 위험 인자라는데는 논란의 여지가 많다. Martin 등⁷은 난소를 제거한 개를 이용한 연구에 근거하여 폐경기 혹은 난소를 제거한 여성에서 임플란트의 고정성이 감소할 수 있다고 하고 임플란트의 저항성이 골다공증의 정도에 따라 영향을 받는다고 주장하였다. Pan 등⁸은 쥐를 이용한 실험에서 난소를 절제한 군에서 임플란트 주위 골량 뿐 아니라 임플란트-골 접촉도 급격히 감소한다고 하였다. 하지만, Mori 등⁹은 난소를 적출한 토끼의 경골에 식립한 임플란트의 주위골 반응을 관찰한 결과 골다공증이 임플란트 주위골 치유에 영향을 미치지만 임플란트의 골유착은 일어난다고 보고하였으며, 김 등¹⁰은 흰쥐를 이용한 실험에서 유사한 결과를 얻었다. 따라서, 골대사의 장애를 가진 환자에서 칼슘의 균형을 맞추고 다른 대사 장애를 조절한다면 이러한 장애가 임플란트 치료의 금기증은 아니라 할 수 있다¹¹.

비록, 골다공증이 임플란트 시술의 절대적인 금기증은 아닐지라도 치료기간을 단축하고 성공률을 높이기 위해서는 골다공증의 극복이 반드시 필요하다. 현재 골다공증의 치료에는 호르몬 대체 요법, 칼슘과 비타민 D, 칼시토닌 등이 사용되고 있다. 골다공증에서 칼슘의 흡수와 배출의 불균형을 보인다는 점에서 골다공증의 치료에서 칼슘의 섭취는 매우 중요하다. 칼슘의 경구 투여는 혈청 칼슘의 농도를 증가시키고 이로 인한 칼시토닌의 분비를 촉진시켜 골에서의 칼슘 유출을 막고 기질(matrix)의 분해를 지연시키게 된다¹². 이러한 혈청 칼슘 농도의 증가는 잠재적으로 골모세포의 칼슘 이용을 증가시키고,

osteogenic cell에서의 골모세포로의 분화를 증가시켜 골형성을 촉진한다¹³. 칼슘의 투여가 골모세포의 활성화에 미치는 영향에 대해 Shirai 등¹⁴은 *in vitro*상에서 세포의 칼슘 투여 시 골모세포는 칼슘 농도에 반응하면서 저 농도 시에는 파골세포의 활성을 돕고 저 농도 시에 분화된 골모세포는 골 흡수 능력이 커진다고 하였다. 이러한 칼슘 투여가 골절 치유에 미치는 영향에 대해서는 Annefeld 등¹⁵이 칼슘 투여가 골 손상과 취약한 골질의 재수복에 우수한 효과를 나타낸다고 보고하였으며, Dent 등¹⁶은 골절의 치유속도를 빠르게 하였다고 보고하였다.

체내 칼슘 이동에는 회수되는 인체부위로 십이지장, 저장고로 골, 배설구로 신장 등 3가지 장기가 관여하며 이들을 칼슘 대사 조절기관이라고 한다. 이들 조절 기관이 독자적인 작용을 발휘하기 위해서는 체내에는 비타민 D, 부갑상선 호르몬, 칼시토닌 등 3가지 호르몬이 마련되어 있으며, 이들을 칼슘 대사의 조절호르몬이라 부른다. 이중 비타민 D는 간에서 대사되어 25(OH)D₃의 형태로 전환되며 신장에서 1 α ,25(OH)₂D₃와 24R,25(OH)₂D₃의 형태로 대사물을 만든다. 이후 VDRnuc (Vitamin D Nuclear receptor)와 VDRmen (Vitamin D Membrane receptor)에 결합하여 여러 가지 선택된 생리학적 기능 외에 장관내의 칼슘 흡수를 촉진하고 신장에서의 칼슘과 인의 재흡수를 도우며 골에서의 칼슘과 인의 침착을 촉진한다¹⁷. Kolar 등¹⁸은 비타민 D가 골절 치유에 효과적이었다고 보고하였으며, Blahos 등¹⁹은 쥐 모델에서 인위적으로 경골의 골절을 유도한 후 비타민 D를 투여하였을 경우 골 형성이 촉진된다고 하였다.

하지만, 이러한 골다공증의 치료제가 임플란트 주위 골형성에 영향을 준다는 연구는 아직 미비하다. Qi 등²⁰은 골다공증을 유도한 흰쥐에서 에스트로겐을 투여하였을 경우 임플란트 주위 골 치유가 촉진된다고 하였으나, 칼슘과 비타민 D의 섭취를 이용한 연구는 아직 없었다.

본 연구에서는 인위적으로 골다공증을 유도한 흰쥐에서 임플란트 식립 후 병리조직학적 관찰을 시행한 결과, 난소절제에 의한 다공성의 골조직에도 임플란트-골 접촉은 성공적으로 일어남을 볼 수 있었다. 하지만, 칼슘과 비타민 D를 추가적으로 섭취시킨 경우 임플란트 계면의 골조직은 더 빠르게 성숙되었으며 광화가 우수하게 진행됨을 관찰하였다. 또한 골조직의 조직 계층학적 분석에서 관찰기간 모두에서 대조군에 비해 유의한 골밀도의 증가를 보여 골다공증이 있는 환자에서 임플란트 시술시 칼슘과 비타민 D의 추가적인 섭취가 임플란트 초기 고정에도 도움이 될 것으로 사료된다.

Fibronectin은 모든 세포의 기질에 분포되어 있는 고분자 당단백의 하나로, 골모세포 및 간엽세포에서 합성되며 특히 골조직에 많이 관찰되고, 광화단계 초기에 많이 발현하는 것으로 알려져 있다. Couchourel 등²¹은 fibronectin이 골조직에서 인회석 결정 형성을 촉진한다고 하였으며, Moursi 등²²은 fibronectin이 TGF- β 와 상호 작용하여 골형성에 중요한 역할을 하며, 또한 integrin $\alpha 5 \beta 1$ 와 선택적으로 결합하여 골모세포의 생존과 분화를 조절하는 기능을 가지고 있다고 주장하였으며 또한 골모세포의 분화 초기에 fibronectin의 세포부착영역에 골모세포가 부

착하여 이로 인해 골모세포의 분화가 촉진된다고 하였다. 따라서, fibronectin은 골형성 초기에 강하게 발현하여 골모세포의 성숙 및 분화에 영향을 주어 골의 형성을 촉진시키는 물질이라고 생각된다.

본 연구에서는 대조군과 실험군에서 fibronectin의 분포를 관찰한 결과 대조군에서는 fibronectin의 발현이 2주군에서 강한 발현을 보이다가 그 이후 서서히 그 강도가 약해지는 것을 볼 수 있으며 실험군에서는 2주군까지 강하게 발현되다가 4주군부터는 점차 낮게 발현되었으며, 대조군에 비해 더 빨리 강도가 약해지는 양상을 보였다. 이는 실험군에서 초기 골형성 과정이 더 빠르고 왕성하게 일어남을 의미하고 대조군에서는 8주까지 골형성 반응이 상대적으로 적다는 것을 의미한다.

Collagen type I은 골의 주된 유기질 구성성분이며, 골세포 표현형의 발현에 영향을 미치고 골모세포 표현형의 성장발현 및 광화된 기질의 형성에 기초가 된다고 알려져 있다^{23,24}. Lynch 등²⁵은 Collagen type I 배지에서 흰쥐 두개골에서 채취한 골모세포가 대조군에 비해 더욱 빠르고 향상된 분화도를 보이는 표현형이 발현된다고 보고하였으며, Collagen type I이 세포의 기질의 광화를 촉진한다고 하였다. 따라서 임플란트 매식 후 인접 골형성 조직에서 Collagen type I의 발현정도를 보는 것은 골형성 진행정도 및 광화 정도를 파악할 수 있는 하나의 지표로 사용될 수 있을 것으로 생각된다.

본 연구에서 Collagen type I의 발현정도는 시간대비에서 실험군이 대조군에 비해 지속적으로 더 강하게 발현되었다. 이는 실험군에서 더 빠르고 더욱 광화된 골형성이 일어남을 의미하는 것이다.

따라서, 칼슘과 비타민 D의 섭취는 골다공증이 있는 환자에서 임플란트 매식 시 유의할 만한 골형성의 향상을 얻을 수 있으며 이는 임플란트의 부하시거나 이차 수술의 결정에 영향을 미칠 수 있을 것으로 생각된다.

하지만, 상악골과 하악골, 경골에서의 난소절제에 따른 골질의 변화와 칼슘 섭취에 따른 반응이 각각 다르게 보고되고 있으므로²⁶, 본 연구의 결과가 임상에서 악골에 식립된 임플란트에도 동일하게 적용할 수 있는지는 더 논의되어야 하며, 앞으로 더 많은 연구를 통해 칼슘과 비타민 D의 섭취가 골형성에 영향을 미치는 정도를 파악해야 할 것이며 섭취 간격, 섭취량 및 칼슘과 비타민 D의 비율 등에 관한 protocol을 수립해야 할 것이다.

V. 결 론

난소를 적출한 흰쥐에서 임플란트 매식 후 칼슘과 비타민 D의 섭취가 골형성에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 난소 적출 흰쥐의 경골에 주된 제작된 나사형 순수 티타늄 임플란트를 식립하고 실험군과 대조군을 1주, 2주, 4주, 및 8주 경과 후 각각 희생하여 병리조직학적, 조직형태계측학적 분석 및 fibronectin과 collagen type I 면역항체를 이용한 면역조직화학적 소견을 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

조직학적 소견에서 실험군에서 대조군에 비해 성숙된 골조직이 더 빨리 나타남을 알 수 있었다. 조직형태계측학적 분석에서 골밀도는 실험군에서 1주 이후로는 점차적으로 증가하였고 대조군에 비해 유의한 차이를 보였다. Fibronectin 항체를 이용한 면역조직화학 염색소견에서 실험군에서는 2주군에서 가장 강한 발현을 나타내고 4주군부터는 서서히 감소하였으며 대조군에서는 2주군에서부터 8주군까지 발현이 계속 지속되고 있었다. Collagen type I 항체를 이용한 면역조직화학염색 소견으로는 형성된 골세포에서 Collagen type I 발현은 실험군에서는 2주에서 4주군까지 강한 발현을 보였으며 그 정도가 대조군에 비해 전체적으로 강하게 발현되었다.

이상의 결과를 종합하여 보면, 난소를 적출한 흰쥐의 경골에 식립한 임플란트의 주위골 반응에서 칼슘과 비타민 D를 추가적으로 섭취시킨 경우 골수부의 골밀도가 대조군과 비교하여 유의하게 증가하며, 골형성의 속도가 빠르고, 성숙골이 빨리 나타남을 알 수 있었다.

참고문헌

1. Johnston CC Jr, Slemenda CW: Pathogenesis of Osteoporosis. *Bone* 17(2) 19, 1995.
2. Kubo T, Shiga T, Hashimoto J *et al*: Osteoporosis influences the late period of fracture healing in a rat model prepared by ovariectomy and low calcium diet. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1999;68:197.
3. Rahnema M, Swiatkowski W: Effect of ovariectomy on biochemical markers of bone turnover(ALP, ACP) and calcium content in rat mandible and teeth. *Bull. Vet Inst Pulawy* 2002;46:281.
4. Brixen K, Abrahamsen B, Kassem M: Prevention and treatment of osteoporosis in women. *Curr Obstet Gynecol* 2005;15:251.
5. Ernster VL, Huggins GR, Hulka BS *et al*: Benefits and risks of menopausal estrogen and/or rogestin hormone use. *Prev Med* 1998;17:201.
6. Omi N, Ezawa I: The effect of ovariectomy on bone metabolism in rats. *Bone suppl* 1995;17(4):163.
7. Martin RB, Daul HA, Bargar WL *et al*: Effect of estrogen deficiency on the growth tissue into porous titanium implant. *J Bone Joint Sur Am* 1988;70:540.
8. Pan J, Shirota T, Ohno K *et al*: Effect of ovariectomy on bone remodeling adjacent to hydroxyapatite-coated implants in the tibia of mature rats. *J Oral Maxillofac Surg* 2000;58:887.
9. Mori H, Manabe M, Kurachi Y *et al*: Osseointegration of dental implants in rabbit bone with low mineral density. *J Oral Maxillofac Surg* 1997;55:351.
10. Kim BM, Sung IY, Park BS *et al*: The effects of ovariectomy on titanium implants osseointegration in rat's tibia. *J Kor Oral Maxillofac Surg* 2003;29:397.
11. Roberts WE, Simmons KE, Garetto LP *et al*: Bone physiology and metabolism in dental implantology: Risk factors for osteoporosis and other metabolic bone disease. *Implant Dent* 1992;1:11.
12. Hong SM, Kim HJ: Effect of Ca supplementation on serum Ca level and psychological conditions in perimenopausal woman. *Korean J Community Nutrition* 2001;6(4):628.
13. Doetsch AM, Faber J, Lynnerup N *et al*: The Effect of calcium and vitamin D3 supplementation on healing of proximal humerus fracture: a randomized placebo-controlled study. *Calcif Tissue Int* 2004;75:183.
14. Shirai Y, Yoshimura Y, Yawaka Y: Effect of extracellular calci-

- um concentrations on osteoclast differentiation *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;265:484.
15. Annefeld. M, Caviezel. R, Schart. E *et al*: The influence of Ossein-hydroxyapatite compound on healing of a bone defect. *Cur. Med. Res Opinion* 1986;4:241.
 16. Dent CE, Davies IJT: Calcium metabolism in bone disease: effects of treatment with microcrystalline calcium hydroxyapatite compound and dihydrotachystero. *The Royal Society of Med* 1980;73:780.
 17. Norman AW, Okamura WH, Bishop JE *et al*: Update on biological actions of 1 α ,25(OH) $_2$ -Vitamin D $_3$ (rapid effect) and 24R,25(OH) $_2$ -Vitamin D $_3$. *Molecular Cellular Endocrinology* 2002;197:1.
 18. Kolar J, Babicky A, Blahos J : Influence of 1,25- hydroxycholecalciferol and calcitonin on experimental fractures. *Acta Chir Orthop Trauma* 1979;46:193.
 19. Blahos J, Babicky A, Porsova I *et al*: Effect of 1,25- hydroxycholecalciferol on fracture healing and on general posttraumatic skeletal response in rats. *Endocrinol Exp* 1989;23(4):287.
 20. Qi MC, Zhou XQ, Hu J *et al*: Oestrogen replacement therapy promotes bone healing around dental implants in osteoporotic rats. *Int J Maxillofac Surg* 2004;33:279.
 21. Couchourel D, Escoffier C, Rohanizadeh R *et al*: Effect of fibronectin on hydroxyapatite formation. *J Inorganic Biochemistry* 1999;73:129.
 22. Moursi AM, Damsky CH, Lull JC *et al* : Fibronectin regulates calvarial osteoblast differentiation. *J Cell Sci* 1996;109:1369.
 23. Aronow MA, Gerstenfeld LC, Tassinari MS *et al* : Factors that promote progressive development of the osteoblast phenotype in cultured fetal rat calvaria cells. *J Cell Physiol* 1990;143:213.
 24. Owen TA, Aronow MA, Shalhoub V *et al*: Progressive development of the rat osteoblast phenotype *in vitro*: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. *J Cell Physiol* 1990;143:420.
 25. Lynch MP, Stein JL, Stein GS *et al*: The influence of type I collagen on the development and maintenance of the osteoblast phenotype in primary and passaged rat calvarial osteoblasts: Modification of Expression of genes supporting cell growth, adhesion, and extracellular matrix mineralization. *Exp Cell Res* 1995;216:35.
 26. Shirai H, Sato T, Oka M *et al*: Effect of calcium supplementation on bone dynamics of the maxilla, mandible and proximal tibia in experimental osteoporosis. *J Oral Rehabilitation* 2002;29:287.