



임플란트 주위 골 결손 부위에 Choukroun's Platelet-rich-fibrin와 실크 분말 복합 이식재 사용

장은식 · 이형석 · 이희성 · 이희중 · 박기유 · 박영욱¹ · 윤연진² · 홍순민² · 박준우²

한림대학교 대학원 의학과, ¹강릉원주대학교 치과대학 구강악안면외과학교실,
²한림대학교 의과대학 강동성심병원 구강악안면외과학교실

Abstract

Effect of Combination Graft of Choukroun's Platelet-rich-fibrin with Silk Fibroin Powder in the Peri-implant Defects

Eun-Sik Jang, Hyung-Seok Lee, Hee-Sung Lee, Hee-Jong Lee, Ki-Yu Park, Young-Wook Park¹, Youn-Jin Yoon², Soon-Min Hong², Jun-Woo Park²

Department of Oral and Maxillofacial Implantology, Graduate School of Hallym University, Department of Oral and Maxillofacial Surgery, ¹College of Dentistry, Gangneung-Wonju National University, ²Kangdong Sacred Heart Hospital, College of Medicine, Hallym University

Purpose: Choukroun's platelet-rich-fibrin (PRF) is composed of platelets, white blood cells and fibrin matrix. It does not induce enough bone formation by itself but it can improve bone formation with calcium. Silk fibroin does not cause inflammatory reactions because it is bio-compatible and degradable. The purpose of this study was to exam the bone formation when a combination of Choukroun's PRF and silk fibroin was used.

Methods: In this study, cell reactions to silk powder with differing molecular weights was first tested to select the appropriate silk powder. Then we applied these bone graft materials on defects of skull and in a peri-implant bony defect model in New Zealand rabbits. The results between the experimental and control s (non-grafted) group were analyzed.

Results: The small sized silk fibroin powder showed increased cellular proliferation for bone-regeneration. There was no statistically significant difference between the experimental group and the control group at 6 weeks, but more new bone formation was observed in the combination graft group at 12 weeks ($P < 0.05$). And in the dental implant model, the combination bone graft group showed much improved torque test results, which was statistically significant. Histomorphometric analysis showed more regenerated cortical bone and a higher mean bone to implant in the experimental group. Both were statistically significant.

Conclusion: The combination graft of Choukroun's platelet-rich-fibrin (PRF) and silk fibroin powder can successfully restore the bony defects in a skull defected model and a peri-implant bony defects model.

Key words: Platelet rich fibrin, Silk, Graft, Bone, Implant

원고 접수일 2011년 2월 4일, 게재 확정일 2011년 2월 24일

책임저자 박준우
(134-010) 서울시 강동구 길동 445, 한림대학교 의과대학 강동성심병원 구강악안면
외과학교실
Tel: 02-2224-2333, Fax: 02-483-9647, E-mail: Junpark@hanafos.com

RECEIVED February 4, 2011, ACCEPTED February 24, 2011

Correspondence to Jun-Woo Park
Department of Oral and Maxillofacial Surgery, College of Medicine, Hallym
University
445, Gil-dong, Gangdong-gu, Seoul 134-010, Korea
Tel: 82-2-2224-2333, Fax: 82-2-483-9647, E-mail: Junpark@hanafos.com

© This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

서론

자연 치열로의 회복은 치과학에서 주요한 프로젝트로 여겨져 왔다. 치과 임플란트의 시대가 도래하기 전에는 고정성 또는 가철성 보철물이 치료의 방법으로 선택되었다. 현재는 치과 임플란트가 신뢰할 만한 대체물로 자리잡았고, 일반적인 보철물과 비교하여 기능적으로, 심미적으로 더 월등함을 보여 주고 있다[1]. 그러나 많은 환자들이 치과 임플란트 식립에 적합한 이상적인 치조골 상태를 갖는 것은 아니다. 즉시 임플란트 식립은 치조골 소실이 있기 전에 사용할 수 있다[2]. 그러나 즉시 임플란트가 항상 가능한 것은 아니다. 심한 치주염을 가진 환자의 경우 치아 발치 전 이미 치조골이 상실되어 있을 것이다. 이러한 경우 치조골을 보존하는 것은 불가능하다.

즉시 임플란트를 식립하는 많은 경우 치과 임플란트 주위로 부분적인 벽 결손을 가진 경우도 있다. 수평 결손의 크기가 1.5 mm이고, barrier membrane이 없다면 평균 골-임플란트 접촉이 대략 50% 정도에 불과하다[3]. 넓은 골 결손을 수복하기 위해서는 골 이식 또는 골유도재생술(guided bone regeneration, GBR)을 사용해야만 한다[3,4]. 자가골 이식은 골 결손을 수복하는 중요한 방법이다. 이전에는 장골능이나 늑골과 같은 구강 외 골을 사용했으나 하악지[5]나 이부[6]과 같은 구강 내 공여부위에서 채취한 골을 사용하는 것이 공여부 이환율을 감소시키고 수술 시간을 감소시키며 이식 후 흡수를 적게 한다는 장점을 보여주고 있다. 그러나 자가골 이식 시에도 이차 수술이 필요하며 공여부의 이환 가능성이 존재한다. GBR 술식은 필요로 하는 양에 비해 결손이 거의 없는 경우에 적용될 수 있다. 비흡수성 막을 사용하는 경우 막의 노출, 감염, 염증 반응과 같은 합병증이 나타날 수 있다고 보고되었다[7]. 흡수성 막이 비흡수성 막에 비해 더 좋은 결과를 보인대[8]. 하지만 일반적으로 더 비싸다.

Platelet-rich-plasma (PRP)는 환자의 혈액으로부터 얻어지지만, 임플란트 주위 골 결손 부위에서 골 재생을 개선시키지는 못한다[9]. Choukroun's platelet-rich-fibrin (PRF)는 PRP의 변형된 형태로 PRP보다 더 많은 이점을 갖는다. Choukroun's platelet-rich-fibrin (PRF)는 한 단계만으로도 준비가 가능하며 추가적 술식이 불필요하다[10]. Choukroun's PRF는 혈소판과 백혈구로 이루어진 섬유기질로 구성된다[11]. 섬유소 하나만이 구성원으로 사용되는 경우 골을 유도하기에는 충분하지 않다[12]. 만약 세라믹 생체재료와 함께 섬유소를 사용하면 골 형성을 증가시킬 수 있을 것이다[13]. 그러나 적절한 골격이 없다면 PRF는 빠른 속도로 흡수될 것이다.

Silk fibroin은 Choukroun's PRF에 결합할 수 있는 좋은 요소이다. Silk fibroin은 생체 분해성 및 생체 적합성의 특성을 갖는다[14]. 이것은 골 결손을 수복하기 위한 골격으로 사용되어 왔다[15]. 염증반응은 silk 반응과 연관되어있는 주요한 고려사항이다

[16]. 많은 염증반응이 sericin에서 비롯되며, 순수한 silk fibroin은 더 적은 염증 반응을 보인다[17]. 게다가 생체분해성은 분자량과 관련이 있다[18]. Silk fibroin의 작은 분절들은 더 빠른 속도로 분해되고 거대분자보다 더 적은 염증 반응을 일으킨다. 그러나 silk fibroin 분질의 다양한 분자량에 따른 세포 반응에 대해서는 잘 알려져 있지 않다.

이 연구에서는 powder의 분자 무게를 사용하여 silk fibroin powder의 세포 반응을 평가한다. 이는 MTT assay, alkaline phosphatase assay 그리고 microarray assay를 통해 측정되었다. 그리고 silk powder와 PRF 조합체를 이식 후 발생한 골 재생을 토끼 두개골 모델에서 평가하였다. 마지막으로 silk fibroin의 작은 분절들을 임플란트 주위 골 결손을 수복하기 위해 PRF와 함께 사용하였다.

연구방법

1. Silk powder

순수한 silk를 100°C에서 1시간 동안 0.5% fiber marsilles soap과 0.3% o.w.f. sodium carbonate 용액에서 고무 성질을 제거한 후 증류수로 세척하였다. Sericin을 제거한 후, silk fibroin을 hydrochloric acid에 용해시켰다. Sodium hydroxide를 첨가함으로써 산화과정을 중단시켰다. 전해투석장치를 사용하여 염을 제거하였다. 분해된 silk fibroin의 분자량은 0.5~1.0 kDa이었다. 또 다른 silk powder는 Rural Development Agency를 통해 준비하였다. 이것의 분자량은 30 kDa이었다. 준비과정에서 발생한 차이는 산에 노출된 시간이었다.

2. 세포 배양

MG63 cells (osteoblast like cell, ATCC, VA, USA)를 사용한 세포 외 실험이 시행되었다. 세포들은 37°C, 대기압 5% CO₂, 99% 습도에서 1% penicillin/streptomycin (×100)을 함유하고, 10% fetal bovine serum (PAA, Ontario, Canada)을 공급받는 Dulbecco Modified Eagle's Medium- high glucose (PAA Laboratories, laboratories, Austria) 배지에서 80%까지 성장시켰다. 배지는 매 3일마다 교체하였다.

3. DNA microarray analysis

배양배지를 제거하고, easy-BLUE (Intron biotechnology, Inc, Seoul, Korea)를 사용하여 총 RNA를 추출하였다. 다음의 과정들은 제조사의 지시에 따라 수행하였다. 총 RNA 농도는 spectrophotometer (Agilent 2100 Bioanalyzer, Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA)를 이용하여 측정하였다. Reverse transcriptase kit (Invitrogen, Inc., Carlsbad,

CA, USA)를 사용하여 추출된 총 RNA로부터 cDNA를 합성하였다. 반응은 3 μ l의 oligo (dT)와 1 μ l의 10 mM dNTP 혼합체로 시작되었다. 삼차중류수로 처리된 DEPC를 추가하고 총 부피를 40 μ l까지 증가시켰다. 반응은 65°C에서 5분간 이루어졌고, 온도는 실내 온도까지 천천히 낮추었다. 그리고 2 μ l 10 \times first-strand buffer, 4 μ l 25 mM MgCl₂, 2 μ l 0.1 M DTT, 1 μ l RNaseD block Ribonucleotide inhibitor (40 μ g/ μ l), 1 μ l RTase를 첨가하였다. 총 부피는 50 μ l가 되었고 반응은 42°C에서 1시간 동안 이루어졌다.

상업적으로 이용 가능한 chips (Cat, #: G4112A, Agilent technology, Santa Clara, CA)를 사용하였다. 다음의 과정들은 제조사의 지시에 따라 수행하였다. 간단히 요약하자면, 3개의 chips는 대략 41,000 (60-mer) oligonucleotide probes로 구성되며, 이것은 목표로 한 유전자 전체 길이의 전사과정을 걸치는 보존 exons까지 연장되어있다. 이 probes는 오늘날 잘 알려져 있는 전체 길이의 인간 게놈을 나타내며, 많은 public source에서 얻을 수 있는 부분 인간 유전자이다. 41 k chips (41,000 유전자)의 평가를 위한 분류를 위해서 결합 대조군의 평균에 대한 결합 실험군 분석이 시행되었다. 이를 통해 고정된 압축력을 적용받는 그룹에서 상향 또는 하향 조절되는 유전자의 부분 집합을 scatter plot으로 나타냈다.

4. MTT assay and Alkaline phosphatase assay

48시간 동안 배양 후 tetrazolium salt 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay를 통해 세포의 생존 가능성을 양적으로 측정하였다. 간략하게 설명하면, 세포를 실내 온도에서 4시간 동안 6-well plates에서 MTT solution (Cell proliferation kit I; Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany)에 배양하였다. Formazan crystals를 밤새 용해시키고 산물을 Victor Multilabel counter (Perkin-Elmer-Wallac, Freiburg, Germany)로 590 nm 흡수도로 측정하였다.

Alkaline phosphatase (ALP)는 appropriate reactivities (Sigma, NY, USA)를 사용하여 37°C, pH 10.2에서 p-nitrophenylphosphate가 p-nitrophenol로 형질전환되는 것으로 측정하며, 특이적 반응성은 colorimetric assay (Anaspec, CA, USA)를 통해 계산한다.

5. Animals and materials

1) Rabbit calvarial model

이 실험에서는 10마리의 3개월된 뉴질랜드 백색 토끼를 사용하였으며, 평균 무게는 2.3 kg (범위 2.0~2.5 kg)이었다. 이 실험은 Institutional Animal Care and Use Committee of the Bioventure Incubation Center, Hanbat National University,

Daejeon, Korea (No. 2009-NCT-004)의 승인을 받았다. Rural Development Administration (Suwon, Korea)에서 1 b molecular weight silk fibroin powder (molecular weight: 0.5~1.0 kDa)를 준비해 주었다. 간단히 이야기하자면, sericin이 없는 silk fibroin 거대분자를 hydrochloric acid에 용해시키고 전해투석장치를 사용하여 염을 제거하였다. 그리고 이것을 powder로 만들었다. 0.4 ml의 ketamine (100 mg/ml) (Ketara; Yuhan, Seoul, Korea)과 0.3 ml의 xylazine (10 mg/kg body weight; Rompun; Bayer Korea, Seoul, Korea)의 조합으로 근육 주사로 마취하였다. 부가적으로, 각 토끼의 귀의 중심동맥에서 5 cc의 혈액 샘플을 채취하였다. 그리고 이 샘플을 400 g 속도로 12분 동안 원심분리하였다. 원심분리 후, 혈액은 3층으로 나누어졌다. 이 중, 가운데 층이 Choukroun's PRF를 나타내며 이를 얻어냈다. 두개골 부위를 면도하고 povidine-iodine으로 소독하였다. 비골에서 후두골 융기까지 장축을 따른 절개를 두개골에 가하였다. 그리고 골막에 중앙선 절개를 가하였다. 두개골의 바깥쪽 테이블로부터 두개골막이 드러나도록 예개하여 두정골을 노출시켰다. 식염수 주수 하에 dental-trephine bur로 양측에 전층의 두개골 결손부를 형성하였다. 9 mm 지름을 갖는 두 개의 결손부를 중앙선 양 쪽으로 각각 형성하였다. Choukroun's PRF와 섞은 silk powder는 오른쪽에 놓고 왼쪽으로 비워두었다.

그리고 pericranium과 피부를 층별로 단아 3-0 silk로 봉합하였다. 술 후 토끼에게 근육 주사로 하루 3번, 3일 동안 gentamicin을 1 mg/kg (Kookje Inc., Seoul, Korea)씩 투여하였다. 토끼를 각각 우리로 옮기고 음식과 물을 제공하였다. 6주 후 5마리, 12주 후 5마리를 희생시켰다. 양 결손을 포함하는 가장 큰 두개골 표본의 크기는 25 \times 12 \times 3 mm였다. 이들을 10% 포르말린으로 고정하고 micro-computed tomogram (μ -CT)을 시행하였다.

2) Implant experiment

이 실험에는 4개월된 10마리의 뉴질랜드 백색 토끼를 사용하였으며, 평균 무게는 2.7 kg (범위 2.5~3.0 kg)이었다. 이 실험은 Institutional Animal Care and Use Committee of Bioventure Incubation Center, Hanbat National University, Daejeon, Korea (No. 2009-NCT-006)의 승인을 받았다. 낮은 분자량을 가진 silk fibroin powder (분자량: 0.5~1.0 kDa)는 임의의 산 분해로 얻어진 산물이며 Rural Development Administration (Suwon, Korea)에서 제공받았다.

근육 주사를 통한 일반적 마취를 시행하였으며, 마취 성분으로는 0.4 ml의 ketamine (100 mg/ml) (Ketara; Yuhan, Seoul, Korea)과 0.3 ml의 xylazine (10 mg/kg body weight; Rompun; Bayer Korea, Seoul, Korea)을 사용하였다. 그리고 각각의 토끼의 귀 정맥으로부터 10 cc의 혈액 샘플을 채취하였다. 그 후 400 g의 속도로 12분 동안 원심분리하였다. 이들 중 중간층

의 Choukroun's PRF을 얻었다. 경골 부위를 면도시키고 povidine-iodine으로 소독하였다. 그리고 골막에 절개를 가하였다. 골막하에 예개하여 골막을 절개하고 경골을 노출시켰다. Trephine bur (직경: 7.0 mm)로 2개의 골 구멍을 형성하였다. 각 구멍 간 간격은 5 mm였다. 각 구멍에 2개의 임플란트(직경: 3.0 mm, 길이: 10.0 mm: MSP30103R, Osstem, Seoul, Korea)를 식립하였다. 임플란트는 반대편 피질에 고정되었다. 대조군은 충전하지 않은 상태로 남겨두었다. 임플란트 주위 틈은 각 부분에서 2 mm였다. Choukroun's PRF와 silk fibroin powder 조합을 실험군의 임플란트 주위 틈에 제공하였다. 그리고 두개골막과 피부를 3-0 silk로 층별봉합하였다. 술 후 토끼에게 하루 3번, 3일 동안 근육주사로 gentamicin을 1 mg/kg (Kookje Inc., Seoul, Korea)씩 제공하였다. 토끼를 각각 우리에 넣은 뒤 음식과 물을 제공하였다. 8주 후 10마리의 토끼를 희생시켰다. 5마리에서 사용된 10개의 임플란트가 removable torque를 측정하는데 사용되었다. Digital torquimeter로 가장 높은 removable torque를 측정하였다. 5마리로부터 얻은 10개의 임플란트를 10% 포르말린 용액에 고정하고 조직형태학적 평가를 시행하였다.

6. Histomorphometrics evaluation

표본 준비는 이전의 논문에 따라 시행하였다. 19개의 샘플을 7일 동안 Villanueva bone stain solution에 염색하였다. 탈수 과정을 거친 후, 샘플을 methylmethacrylate resin에 포매하였다. 그리고 low speed wheel saw를 사용하여 임플란트 장축을 따라 색선택하였다. 마지막으로 색선택된 샘플들을 30 μ m 두께로 부드럽게 갈았다. Digital camera (DP-20; Olympus, Tokyo, Japan)로 색선택된 샘플들을 디지털 이미지화하였다. 이 상은 Sigma Scan Pro (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)로 분석하였다. 지대치 부위에서 얻어진 처음 3개의 가닥을 이미지 분석에 사용하였다. 새로 생성된 총 골의 양은 가닥 사이의 총 부위의 백분율로 계산하였다. 골-임플란트 접촉은 골-임플란트 가닥 접촉의 백분율로 계산하였다.

7. 통계 분석

Microarray 결과 분석을 위해, Cy3/Cy5 또는 Cy5/Cy3 value에서 2-fold 이상의 변화를 보인 유전자들을 silk fibroin 적용에 따른 유의한 영향으로 판단하였다. 실험군과 대조군 사이 평균값의 차이는 MTT assay와 ALP assay에 독립적인 t-test로 평가하였다. 유의 수준은 $P < 0.05$ 로 하였다.

같은 동물로부터의 샘플을 비교하기 위해 paired t-test를 사용하였다. 통계학적으로 유의한 수준은 $P < 0.05$ 로 하였다.

결 과

1. Silk gibroin powder의 크기 차이에 대한 세포 반응

Microarray 결과를 Table 1에 나타내었다. 작은 크기의 silk powder 그룹(fold ratio > 2.0 , Table 1)에서 *alkaline phosphatase (ALP)*, *collagen type I-alpha1 (Col1A)*, 그리고 *transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1)*의 발현이 유의하게 증가하였다. 게다가 작은 크기의 silk powder 그룹(fold ratio > 2.0 , Table 1)에서 *fibronectin*의 발현이 유의하게 증가하였다. 30 kDa silk powder 그룹(fold ratio > 2.0 , Table 1)에서도 *transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1)*와 *fibronectin*의 발현이 유의하게 증가하였다. 30 kDa silk powder 그룹에서는 *alkaline phosphatase (ALP)*와 *collagen type I-alpha1 (Col1A)*의 발현이 유의하게 증가하지 않았다. *Interleukin-1 receptor*는 30 kDa silk powder (fold ratio > 2.0 , Table 1)를 적용한 경우 유의하게 발현이 증가하였지만 작은 크기의 silk powder에서는 그렇지 않았다.

ALP assay에서는 두 fibroin이 모두 효소 활성을 증가시켰다 (Fig. 1A). 각각을 비교해보면, MG-63 세포를 1 μ g/ml, 10 μ g/ml 그리고 100 μ g/ml 농도의 silk fibroin에 적용시켰을 때, 적용 48시간 후 ALP 활성이 증가하였다(Fig. 1A). 특히 작은 크기의 silk powder를 적용한 그룹에서 1 μ g/ml와 10 μ g/ml의 silk fibroin을 적용하였을 때 ALP 활성이 더 증가하였으나 1시간 후 측정 시에는 통계학적으로 유의한 차이가 없었다($P > 0.05$, Fig. 1A). 그러나 30 kDa 크기의 silk powder를 적용한 그룹에서는 100 μ g/ml의 silk powder를 적용한 경우 ALP 활성이 더 증가하였다($P > 0.05$, Fig. 1).

MTT assay 결과, 두 silk powder는 100 μ g/ml의 silk powder를 적용했을 때 세포 증식을 억제하였다(Fig. 1B). 30 kDa silk powder 적용 시 1 그리고 10 μ g/ml 농도에서 세포 증식이 증가하였다. 그러나 작은 크기의 silk powder 적용한 그룹에서

Table 1. The results of microarray

	OS	NS
Alkaline phosphatase	2.055	0.512
COL1A1	2.221	0.959
COL5A3	2.054	1.350
FGF-7	3.945	0.779
Fibronectin 1	5.735	2.025
MMP3	0.111	0.276
TGF- β 1	3.072	2.840
IL1R1	1.023	2.022
IL1R2	1.025	10.651

OS < 1 kDa; NS, 30 kDa sized silk; COL, collagen; FGF, fibroblast growth factor; MMP, matrix metalloproteinase; TGF, transforming growth factor; IL1R1, interleukin 1 receptor 1; IL1R2, interleukin 1 receptor 2.

1 µg/ml 농도를 적용한 경우에만 MTT assay에서 세포 증식을 증가시켰다(Fig. 1B).

2. 토끼 두개골 결손 수복을 위한 silk powder 조합 이식

µ-CT 분석 결과를 Table 2에 나타내었다. 수술 후 6주에 측정된 평균값은 대조군보다 실험군에서 더 높게 나타났다(Fig. 2A). 그러나 통계학적인 유의성은 없었다($P>0.05$). 수술 후 12주차에 잔존하는 결손 크기는 실험군보다 대조군에서 더 크게 나타났다(Fig. 2B). 수술 후 12주차 실험군의 TMC는 132.09 ± 4.41 , 대조군에서는 126.42 ± 6.62 로 나타났다(Table 2). 이는

통계학적으로 유의한 값이다($P=0.011$). 수술 후 12주차 실험군의 TMD는 $2,088.88 \pm 648.34$, 대조군은 $2,029.72 \pm 668.22$ 이었다(Table 2). 이는 통계학적으로 유의한 값이다($P=0.013$). 다른 값들은 통계학적으로 유의한 차이를 보이지 않았다($P>0.05$). 조직형태학적 결과는 Table 3에 나타내었다. 수술 후 6주차에 대조군에서 새로 생성된 총 골의 양은 $36.59 \pm 6.11\%$ 이었다. 수술 후 6주차 실험군에서는 $44.38 \pm 17.00\%$ 로 나타났다. 그러나 이 차이는 통계학적으로 유의하지 않았다($P>0.05$). 수술 후 12주차 대조군에서는 $49.86 \pm 7.49\%$ 로 나타났다. 수술 후 12주차 실험군에서는 $59.83 \pm 10.92\%$ 로 나타났다. 이 차이는 통계학적

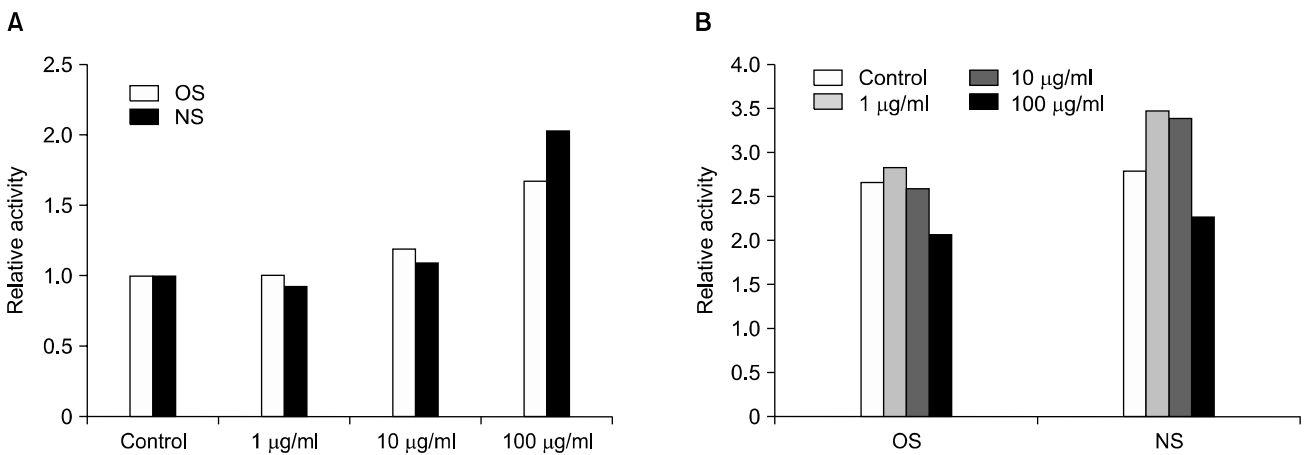


Fig. 1. (A) Alkaline phosphatase assay. (B) MTT assay.

Table 2. Micro-computerized tomogram results

	6 weeks			12 weeks		
	Unfilled	Silk fibroin+PRF	P value	Unfilled	Silk fibroin+PRF	P value
BMC (mg)	159.57±25.50	181.01±3.91	NS	271.25±20.69	279.37±14.82	NS
BMD (mg/cm ³)	1,059.66±166.69	1,202.46±28.99	NS	1,467.61±480.28	1,550.46±415.06	NS
TMC (mg)	60.19±20.26	72.80±3.40	NS	126.42±6.62	132.09±4.41	0.011
TMD (mg/cm ³)	1,867.98±147.12	1,989.24±117.30	NS	2,029.72±668.22	2,088.88±648.34	0.013

BMC, bone mineral content; BMD, bone mineral density; TMC, total mineral content; TMD, total mineral density.

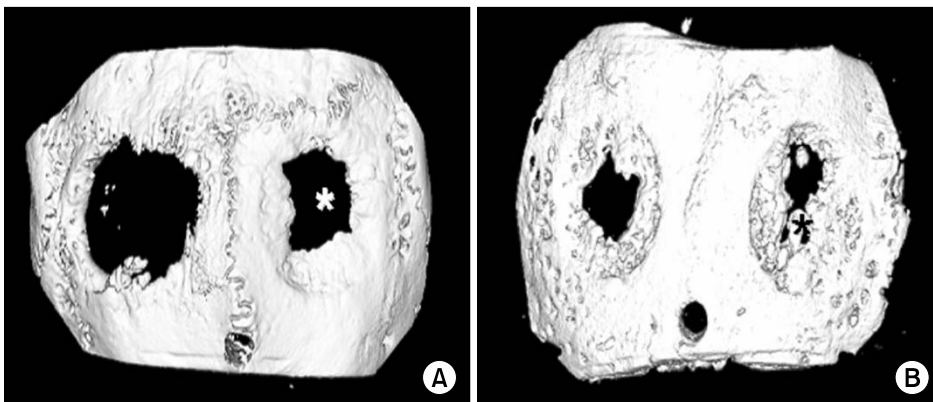


Fig. 2. Micro-computerized tomogram. (A) 6 weeks. (B) 12 weeks. Asterisk (*) was the experimental group.

으로 유의하였다($P=0.021$).

3. 임플란트 주위 결손 수복을 위한 silk powder 조합 이식

1) Torque test

Torque test의 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 수술 후 8주차에

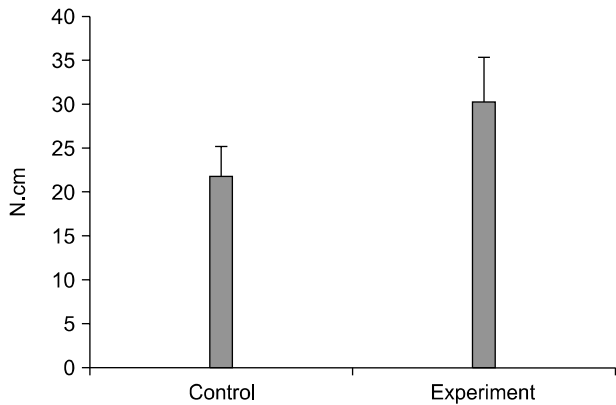


Fig. 3. The results of torque test. The difference between groups was statistically significant ($P<0.05$).

서 모든 평균 측정값이 대조군보다 실험군에서 높게 나타났다. 실험군에서의 removable torque은 30.34 ± 5.06 N.cm, 대조군에서는 21.86 ± 3.39 N.cm로 나타났다. 이 그룹 사이의 차이는 통계학적으로 유의하였다($P=0.010$).

2) Histomorphometry

임플란트-골 접촉은 대조군에서 더 낮게 나타났다(Fig. 4A). 그러나 실험군에서 피질골이 더 많이 재생되었다(Fig. 4B). Histomorphometry의 결과를 Table 4에 나타내었다. 평균 새로운 골 생성량은 실험군에서 $51.93 \pm 27.90\%$ 로 나타났다. 대조군에서는 $11.67 \pm 15.12\%$ 로 나타났다. 이 그룹 사이의 차이는 통계학적으로 유의하였다($P=0.003$). 평균 골-임플란트 접촉은 실험

Table 4. Peri-implant bone formation analysis

	Unfilled	Silk fibroin+PRF
Total new bone (%)	11.67 ± 15.12	$51.93 \pm 27.90^*$
Bone to implant contact (%)	15.37 ± 23.84	$43.07 \pm 21.96^*$

* $P<0.05$.

Table 3. The results of histomorphometric analysis

	6 weeks			12 weeks		
	Unfilled	Silk fibroin+PRF	P value	Unfilled	Silk fibroin+PRF	P value
Total new bone (%)	36.59 ± 6.11	44.38 ± 17.00	NS	49.86 ± 7.49	59.83 ± 10.92	0.021

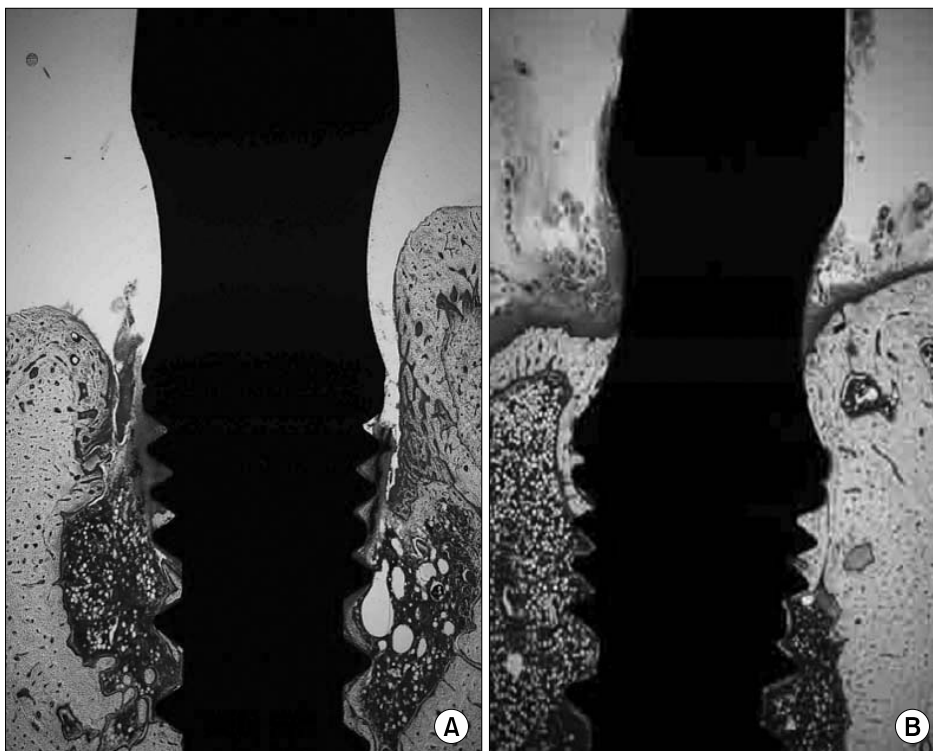


Fig. 4. The histological section of the implant experiment. (A) Control. (B) Experiment.

군에서 $43.07 \pm 21.96\%$, 대조군에서는 $15.37 \pm 23.84\%$ 로 나타났다. 이는 통계학적으로 유의한 차이이다($P=0.002$).

고 찰

이 연구에서는 다양한 크기의 silk fibroin이 다양한 세포 반응을 보여주었다. 두 silk powder 그룹(fold ratio >2.0, Table 1)에서 모두 transforming growth factor- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)와 fibronectin의 발현이 유의하게 증가하였다. 그러나 30 kDa silk powder 적용 그룹보다 작은 크기의 silk powder 적용 그룹에서 alkaline phosphatase와 type I collagen이 더 높은 발현을 보였다(Table 1). Cai 등[19]은 30 kDa silk fibroin으로 변형된 Poly(D,L-lactic acid) surface가 Poly(D,L-lactic acid) 자체보다 더 높은 ALP 활성을 보인다고 보고하였다. silk fibroin 막 위에서 배양한 MC3T3-E1 세포들 또한 surface-treated culture dish에서 배양한 세포들과 비교할만한 ALP 활성을 보여주었다[20]. 다른 연구자들은 생체 외 실험에서 골 조직의 성장이 silk fibroin이 골 세포 또는 줄기 세포와 함께 배양될 때 촉진될 수 있다고 보고하였다[21,22]. ALP는 초기 골형성 표지자로 광화된 산물과 연관되어 있기 때문에, 작게 분절된 silk fibroin은 잠재적인 골형성력을 가질 것이다. 현 연구에서는 30 kDa silk 또는 ALP 효소 활성을 증가시키기를 보여주었다(Fig. 1A). 그러나 30 kDa silk powder를 적용하는 것은 또한 TGF- $\beta 1$ and interleukin 1 receptor와 같은 염증과 관련된 유전자 발현을 증가시키기를 보여주었다. 비록 작은 크기의 silk powder 적용 또한 TGF- $\beta 1$ 유전자 발현을 증가시키지만, 이것은 type 1 collagen과 ALP도 함께 증가시켰다(Table 1). 두 유전자 모두 골 재생에 매우 중요한 요소이다.

거대분자의 silk fibroin은 분해되지 않은 형태이기 때문에 이것이 ALP 활성을 증가시킬 수 있는지는 불명확하다. 만약 거대분자의 silk fibroin이 ALP 활성을 증가시킬 수 없다면 골 결손 수복을 위한 골격으로 사용되는 silk fibroin은 서서히 분해되도록 설계되어야 할 것이다. Silk fibroin의 heavy chain의 분자량은 325 kDa이고 light chain은 25 kDa이다. Silk fibroin의 구조는 임의-코일형/무정형 또는 역평행 β -sheet 구조일 것이다[19]. 후자의 경우 소수성이며 산성 조건에서 용해된다. Silk fibroin의 분해를 위해 chymotrypsin, actinase 그리고 carboxylase와 같은 많은 단백질 가수분해 효소를 사용할 수 있다. 우리가 얻은 산물의 분자량은 0.5~1.0 kDa이었다. Silk fibroin의 분해는 기포와 분자량 분포를 변화시킴으로써 조절할 수 있다.

이 연구에서는 두 개의 silk fibroin이 주어진 세포에서 세포 접착에 관여하는 fibronectin의 발현이 증가하였다(Table 1). Fibronectin은 세포 접착, 성장, 이동 그리고 분화에 중요한 역할을 하고[23,24], 상처 치유와 배아 발달과 같은 발달에 중요한

역할을 한다[25]. 변형된 fibronectin의 발현, 퇴화 그리고 조직화는 암과 섬유화를 포함하는 많은 병리 현상과 연관되어 있다[26]. Silk fibroin coat는 세포독성을 띠지 않으며 불멸의 fibroblast cell line의 접착과 증식을 개선시킨다[27]. 두 silk powder 적용 시 fibronectin의 발현을 증가시키기 때문에 silk는 분자량과 관계 없이 세포 부착을 증가시킬 것으로 보인다.

TGF- $\beta 1$ 또한 분절된 두 silk powder에 의해 증가한다(Table 1). 골관절염(OA)은 고령층 질병들의 주요 원인이 되고 연골 퇴화, 소실, 활액막의 염증, osteophytes의 형성 그리고 골 경화에 의해 특징지어진다[28]. OA를 가진 환자의 대퇴골 두부의 trabecular bone에서 type I collagen 수준이 증가하기 때문에, 이는 광화의 증가로 이어져야 한다[29]. 비록 두 silk powder의 적용이 TGF- $\beta 1$ 의 발현이 증가함을 보였지만, type I collagen의 발현은 낮은 분자량의 silk powder 적용 시에만 증가하였다. 그러므로 30 kDa silk powder 적용은 TGF- $\beta 1$ 의 발현이 증가함에도 불구하고 골 형성을 유도하지 못할 수 있다. 같은 환자에서 얻은 골모세포는 TGF- $\beta 1$ 의 수준을 증가시켰고[30], 정상 조직과 비교하였을 때 관절염을 보이는 골 조직에서는 TGF- $\beta 1$ 의 발현이 증가하였다[31]. 염증 반응에서도 TGF- $\beta 1$ 의 발현이 증가하였다. 30 kDa silk powder 적용 후 interleukin 1 receptor의 발현이 증가하는 것을 고려하였을 때, 30 kDa silk powder는 골 형성보다 염증 반응을 유도할 것으로 보인다.

낮은 분자량의 silk powder를 PRF와 함께 토끼의 두개골 결손 부에 적용하였다. 충전하지 않은 대조군과 비교하였을 때, 조합된 이식을 사용한 경우 더 월등한 골 재생을 보였다. 수술 후 12주차에 존속하는 결손 크기는 실험군보다 대조군에서 더 크게 나타났다(Fig. 2B). 수술 후 12주차 실험군의 TMC는 132.09 ± 4.41 이었고 대조군에서는 126.42 ± 6.62 로 나타났다(Table 2; $P=0.011$). 수술 후 12주차 실험군의 TMD는 $2,088.88 \pm 648.34$, 대조군은 $2,029.72 \pm 668.22$ 이었다(Table 2, $P=0.013$). Histomorphometry 결과는 μ -CT에서도 발견되었다. 수술 후 12주차 대조군에서 새로 생성된 총 골의 양은 $49.86 \pm 7.49\%$ 이었고, 실험군에서는 $59.83 \pm 10.92\%$ 이었다(Table 3, $P=0.021$).

치아 발치 후, 즉시 임플란트 식립은 치조골 소실의 방지와 전반적인 치료 기간의 감소를 위해 제안되었다[32]. 이 연구에서는 PRF와 혼합한 낮은 분자량의 silk fibroin powder가 즉시 임플란트 식립 시 임플란트 주위 골 결손에 성공적으로 적용됨을 보여주었다. 이 조합 이식은 더 높은 removable torque 값을 보였고(Fig. 3), 더 좋은 골-임플란트 접촉을 보였다(Fig. 4, Table 4). Histomorphometry 결과 대조군보다 실험군에서 더 높은 골 형성을 보여주었다(Table 4). 평균 골 형성량은 실험군에서 $51.93 \pm 27.90\%$, 대조군에서 $11.67 \pm 15.12\%$ 이었다($P=0.003$). 평균 골-임플란트 접촉은 실험군에서 $43.07 \pm 21.96\%$, 대조군에서 $15.37 \pm 23.84\%$ 이었다($P=0.002$). 비록 조직학적 직접 절개

가 골융합에 대한 명확한 정보를 제공해줄에도 불구하고 이는 오직 하나의 절개만을 제공할 수 있으며 전체의 기하학적인 정보를 제공해줄 수는 없다[33]. Removal torque force의 측정은 골융합을 평가하는 추가적인 비교 기준을 제공할 수 있다. 실험군의 removal torque는 30.34 ± 5.06 N.cm, 대조군은 21.86 ± 3.39 N.cm이었다(Fig. 3, $P=0.010$). 밀집된 피질골은 망상골에 비해 치과 임플란트에 더 좋은 지지를 제공할 수 있으며 더 높은 removal torque를 보였다[34]. 몇 가닥에 의해 연결된 임플란트는 망상골에 의해 둘러싸인 임플란트보다 더 높은 유지력을 보여 준다[34]. 토끼는 낮은 질의 골을 가진 모델은 아니지만 실험실 동물 우리에 보관되고 운동이 부족하기 때문에 경골의 중앙부위가 매우 얇은 피질골을 갖는다. 양피질골로 식립된 임플란트는 단피질골로 식립된 임플란트보다 더 높은 removal torque를 보인다[35]. 실험군에서의 높은 torque값은 관상 피질골의 재생때문인 것으로 보여 진다(Fig. 4).

동종 재료 또는 세포 치료가 임플란트 주위 결손 수복을 위해 연구되어 왔다. 생체 활성 유리는 임플란트 주위 결손 수복을 위해 사용되어 왔으며 호의적인 결과를 보였다[36]. 임플란트 주위 골 치유를 위해 성장 인자를 포함한 몇몇 세포들을 준비된 socket에 첨가해보기도 했지만 그 결과가 인상적이지는 않았다[37]. 이는 아마도 성장인자가 매우 용해도가 높고 장시간 동안 치료 가능한 농도를 유지시키기가 매우 어렵기 때문으로 보여 진다. PRP는 자가골과 동종골 이식과 함께 임플란트 주위 결손 수복에 사용될 때 좋은 결과를 보였다[38].

성장 인자 저장고에 대해서는 Choukroun's PRF가 아마 좋은 원천이 될 것이다. 이는 내인성이며 면역 반응 또는 감염을 고려하지 않아도 된다. 혈소판은 platelet-derived growth factor (PDGF), insulin like growth factor (IGF), 그리고 vascular endothelial growth factor (VEGF)와 같은 cytokines를 방출한다[39,40]. PDGF와 IGF는 골형성 cytokines로 잘 알려져 있다. Choukroun's PRF는 적어도 7일 동안 성장인자를 방출하는 것으로 알려져 있다. Silk fibroin 또한 골격으로서 널리 연구되어져왔다[15]. Silk fibroin과 cytokine의 조합이 보고되어져 왔으며 새로운 골 형성에 성공적임을 보여주었다. 통용되는 powder와 같은 형태를 좁은 골 결손부에 쉽게 적용될 수 있다. 산전치리에 의해 분자량이 감소하기 때문에 silk fibroin의 분해가 더 빠르게 일어날 수 있다. Silk fibroin powder는 수술 후 8주치의 절개된 샘플에서는 발견되지 않았다. 생체 활성 유리 또는 hydroxyapatite와 같은 생체 재료는 완전히 생체 분해되지는 않는다[36]. 만약 이들을 작은 결손부에 사용한다면 새로운 골 형성률을 증가시키기 위한 과립 크기는 중요할 것이다. 큰 크기의 분해되지 않은 분자는 골 융합을 방해할 수 있다. Silk fibroin 거대분자는 또한 완전한 생체 분해를 위해서 상대적으로 긴 시간이 요구된다. 분해 기간은 분자의 크기가 커질수록 길어진다[18].

이 연구에서는 silk fibroin powder가 PRF와 함께 임플란트 주위 결손 수복에 성공적으로 사용될 수 있음을 보여주었다. 동물에서의 실험이 항상 인간에 적용될 수 있지는 않기 때문에 더 나아가 연구가 필요할 것이다.

결론

본 연구에서 실크 단백질 분말이 혈장 소재와 함께 사용되는 경우 치과용 임플란트 주위의 경미한 골결손부의 회복에 사용될 수 있음을 보였다. 하지만 동물실험의 결과가 늘 임상적인 성공을 보장하는 것은 아니므로 현재의 결과는 추후 실험을 통하여 보완되어야 할 것이다.

References

- Pietrabissa R, Gionso L, Quaglini V, Di Martino E, Simion M. An in vitro study on compensation of mismatch of screw versus cement-retained implant supported fixed prostheses. *Clin Oral Implants Res* 2000;11:448-57.
- Huys LW. Replacement therapy and the immediate post-extraction dental implant. *Implant Dent* 2001;10:93-102.
- Wilson TG Jr, Schenk R, Buser D, Cochran D. Implants placed in immediate extraction sites: a report of histologic and histometric analyses of human biopsies. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1998;13:333-41.
- Fiorellini JP, Nevins ML. Localized ridge augmentation/preservation. A systematic review. *Ann Periodontol* 2003;8:321-7.
- Hwang KG, Shim KS, Yang SM, Park CJ. Partial-thickness cortical bone graft from the mandibular ramus: a non-invasive harvesting technique. *J Periodontol* 2008;79:941-4.
- Cranin AN, Katzap M, Demirdjan E, Ley J. Autogenous bone ridge augmentation using the mandibular symphysis as a donor. *J Oral Implantol* 2001;27:43-7.
- Verardi S, Simion M. Management of the exposure of e-PTFE membranes in guided bone regeneration. *Pract Proced Aesthet Dent* 2007;19:111-7.
- Chiapasco M, Zaniboni M. Clinical outcomes of GBR procedures to correct peri-implant dehiscences and fenestrations: a systematic review. *Clin Oral Implants Res* 2009;20(Suppl 4):113-23.
- Casati MZ, de Vasconcelos Gurgel BC, Goncalves PF, et al. Platelet-rich plasma does not improve bone regeneration around peri-implant bone defects-a pilot study in dogs. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2007;36:132-6.
- Dohan DM, Choukroun J, Diss A, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part I: technological concepts and evolution. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006;101:e37-44.
- Dohan DM, Choukroun J, Diss A, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part II: platelet-related biological features. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006;101:e45-50.
- Jung RE, Schmoekel HG, Zwahlen R, Kokovic V, Hammerle

- CH, Weber FE. Platelet-rich plasma and fibrin as delivery system for rhBMP-2. *Clin Oral Impl Res* 2005;16:676-82.
13. Kania RE, Meunier A, Hamadouche M, Sedel L, Petite H. Addition of fibrin sealant to ceramic promotes bone repair: long-term study in rabbit femoral defect model. *J Biomed Mater Res* 1998;43:38-45.
 14. Dal Pra I, Freddi G, Minic J, Chiarini A, Armato U. De novo engineering of reticular connective tissue in vivo by silk fibroin non woven materials. *Biomaterials* 2005;26:1987-99.
 15. Zhao J, Zhang Z, Wang S, et al. Apatite-coated silk fibroin scaffolds to healing mandibular border defects in canines. *Bone* 2009;45:517-27.
 16. Altman GH, Diaz F, Jakuba C, et al. Silk-based biomaterials. *Biomaterials* 2003;24:401-16.
 17. Soong HK, Kenyon KR. Adverse reactions to virgin silk sutures in cataract surgery. *Ophthalmology* 1984;91:479-83.
 18. Cao Y, Wang B. Biodegradation of silk biomaterials. *Int J Mol Sci* 2009;10:1514-24.
 19. Cai K, Yao K, Lin S, et al. Poly(D, L-lactic acid) surfaces modified by silk fibroin: effects on the culture of osteoblast in vitro. *Biomaterials* 2002;23:1153-60.
 20. Li M, Ogiso M, Minoura N. Enzymatic degradation behavior of porous silk fibroin sheets. *Biomaterials* 2003;24:357-65.
 21. Roh DH, Kang SY, Kim JY, et al. Wound healing effect of silk fibroin/alginate- blended sponge in full thickness skin defect of rat. *J Mater Sci Mater Med* 2006;17:547-52.
 22. Karageorgiou V, Meinel L, Hofmann S, Malhotra A, Volloch V, Kaplan D. Bone morphogenetic protein-2 decorated silk fibroin films induce osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells. *J Biomed Mater Res A* 2004;71: 528-37.
 23. Kim KH, Jeong L, Park HN, et al. Biological efficacy of silk fibroin nanofiber membranes for guided bone regeneration. *J Biotechnol* 2005;120:327-39.
 24. Mori H, Tsukada M. New silk protein: modification of silk protein by gene engineering for production of biomaterials. *J Biotechnol* 2000;74:95-103.
 25. Barry EL, Mosher DF. Factor XIIIa-mediated cross-linking of fibronectin in fibroblast cell layers. Cross-linking of cellular and plasma fibronectin and of amino-terminal fibronectin fragments. *J Biol Chem* 1989;264:4179-85.
 26. Smith JC, Symes K, Hynes RO, DeSimone D. Mesoderm induction and the control of gastrulation in *Xenopus laevis*: the roles of fibronectin and integrins. *Development* 1990; 108:229-38.
 27. Pankov R, Ymada KM. Fibronectin at a glance. *J Cell Sci* 2002;115:3861-3.
 28. Williams CM, Engler AJ, Slone RD, Galante LL, Schwarzbauer JE. Fibronectin expression modulates mammary epithelial cell proliferation during acinar differentiation. *Cancer Res* 2008;68:3185-92.
 29. Cassinelli C, Cascardo G, Morra M, Draqui L, Motta A, Catapano G. Physical-chemical and biological characterization of silk fibroin-coated porous membranes for medical applications. *Int J Artif Organs* 2006;29:881-92.
 30. Couchourel D, Aubry I, Delalandre A, et al. Altered mineralization of human osteoarthritic osteoblasts is attributable to abnormal type I collagen production. *Arthritis Rheum* 2009; 60:1438-50.
 31. Mansell JP, Tarlton JF, Bailey AJ. Biochemical evidence for altered subchondral bone collagen metabolism in osteoarthritis of the hip. *Br J Rheumatol* 1997;36:16-9.
 32. Rosenquist B, Grenthe B. Immediate placement of implants into extraction sockets: implant survival. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1996;11:205-9.
 33. Sennerby L, Wennerberg A, Pasop F. A new microtomographic technique for non-invasive evaluation of the bone structure around implants. *Clin Oral Implant Res* 2001;12: 91-4.
 34. Sennerby L, Thomsen P, Ericson LE. A morphometric and biomechanic comparison of titanium implants inserted in rabbit cortical and cancellous bone. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1992;7:62-71.
 35. Ivanoff CJ, Sennerby L, Lekholm U. Influence of mono- and bicortical anchorage on the integration of titanium implants. A study in the rabbit tibia. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1996; 25:229-35.
 36. Turunen T, Peltola J, Makkonen T, Helenius H, Yli-Urpo A. Bioactive glass granules and polytetrafluoroethylene membrane in the repair of bone defects adjacent to titanium and bioactive glass implants. *J Mater Sci Mater Med* 1998;9: 403-7.
 37. Sykaras N, Woody RD, Lacopino AM, Triplett RG, Nunn ME. Osseointegration of dental implants complexed with rhBMP-2: a comparative histomorphometric and radiographic evaluation. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2004;19:667-78.
 38. Mannai C. Early implant loading in severely resorbed maxilla using xenograft, autograft, and platelet-rich plasma in 97 patients. *J Oral Maxillofac Surg* 2006;64:1420-6.
 39. Clausen C, Hermund NU, Donatsky O, Nielsen H, Osther K. Homologous activated platelets stimulate differentiation and proliferation of primary human bone cells. *Cell Tissues Organs* 2006;184:68-75.
 40. Ferreira CF, Carriel Gomes MC, Filho JS, Granjeiro JM, Oliveira Simoes CM, Magini Rde S. Platelet-rich plasma influence on human osteoblasts growth. *Clin Oral Implants Res* 2005;16:456-60.