

# Image J 프로그램을 사용한 마우스 두개골 결손모델상의 정량적인 분석방법

정홍문\*, 원도연\*, 정재은\*  
대구보건대학교 방사선과

## Quantitative Analysis Methods for Adapting Image J programs on Mouse Calvarial defected Model

Hongmoon Jung\*, Doyeon Won\*, Jaeun Jung\*  
Department of Radiological Science, Daegu Health College\*

**요 약** Image J 프로그램은 digital image 분석 또는 생명 공학적 분석에 사용되고 있다. 다양한 동물실험 중에서도 마우스 두개골 결손모델(Mouse calvarial defected model)은 조직공학자들에게 대표적으로 사용되고 있는 뼈의 결손모델이다. 이러한 마우스 두개골 결손 모델은 뼈의 재생 또는 새로운 지지체(scaffold)의 재생효과 실험에 사용되고 있다. 마우스 두개골에 지름 4mm의 원형 결손을 만들어 각종 실험재료를 처리하여 파괴된 마우스 두개골 뼈의 재생에 관련하여 측정하는 실험이 주를 이룬다. 실험 후에 마우스를 희생하여 대부분 헤마톡실린 과 에오신 염색을 통하여 분석을 하게 된다. 다른 한편으로는 마이크로 시티(u-CT)를 사용하여 정량적인 분석을 한다. 하지만 이는 시간이 오래 걸리고 고가의 비용이 드는 단점이 있다. 이번 실험은 마우스 두개골 결손 모델 시에 프리웨어 프로그램인 Image J를 통하여 간단하게 마우스 두개골 결손 뼈의 재생 량을 2D X-ray 상으로 농도를 측정하여 정량적인 분석을 실행하였다. 결론적으로 Image J를 사용한 농도 분석법은 빠르고 정확하게 뼈의 재생량을 상대적으로 비교함으로써 신생 뼈의 관한 재생 실험자에게 도움을 줄 수 있을 것으로 사료된다.

**주제어** : 이미지 J 프로그램, 이미지 J 신생뼈 정량법, 마우스 두개골 결손모델 정량법, 마우스 신생뼈 재생 분석

**Abstract** This mouse calvarial defected model is frequently used for new scaffold development in the bone regeneration. Most experiments are carried out in this way by measuring the bone regeneration of mouse calvaria defected area. As a next step, hematoxylin and eosin staining is analyzed by sacrificing mice. On the other hand, the quantitative analysis for bone regeneration is carried out by micro computed tomography. However, there are several drawbacks with the micro computed tomography. That is, it takes a long time and it is quite expensive for bone regeneration quantitative analysis. This study was performed by simply measuring the quantity of bone regeneration in mouse calvaria defected area on two-dimensional digital x-ray images via Image J. Consequentially, this experimental method by using J program might help bio-technologist researcher regarding new bone regeneration by comparing the quantity of bone regeneration quickly and precisely as well.

**Key Words** : Bone regeneration quantitative analyze, ImageJ program, Mouse calvarial defected model, New-bone regeneration quantitative analysis.

Received 10 July 2013, Revised 16 August 2013

Accepted 20 September 2013

Corresponding Author: Jae-Eun Jung (Daegu Health college)

Email: jejung@dhc.ac.kr

© The Society of Digital Policy & Management. All rights reserved. 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.

ISSN: 1738-1916

## 1. 서론

마우스 두개골 결손모델(Mouse clavarial defected model)은 대표적인 체내(In vivo) 뼈 재생 모델로 알려져 있다[1,2]. 마우스 두개골 상에 지름4mm의 원형 스펀 칼날을 이용하여 얇은 두개골 뼈를 파괴한 후에 그 부위에 다양한 지지체(Scaffold)나 약물 전달 시스템 (DDS: drug delivery system)을 적용하기도 하며 뼈 재생에 관한 사이토카인(cytokine)을 처리하여 뼈 재생에 관한 대체 물질을 찾아내기 위해 사용된다[3,4]. 실험 후에 신생 뼈의 재생 분석에 사용되는 분석 방법은 다양한 방법이 존재한다. 대표적 영상 분석으로서로는 단순한 2D digital 엑스레이 촬영 방법과 마이크로 시티(Micro computed tomography)를 이용한 3차원 영상 이미지 분석방법이다 [5,6]. 마이크로 시티를 사용하는 분석법이 더욱더 효과적이긴 하지만, 아직까지 장비의 고가로 인하여 널리 보급화 되지 못한 상황 이다. 때문에 이번 연구에서는 간단한 2D digital 엑스레이 영상을 이용하여 마우스 두개골 결손 모델 상에 신생 뼈의 재생에 관한 간단한 비교 정량적인 분석법을 Image J 프로그램에 적용시켜 뼈 재생의 연구자로 하여금 간단한 비교 분석법을 제시 하고자 한다. Image J program 은 NIH (National Institute of Health) 에서 개발한 프로그램이다. 이미지 J는 프리웨어 프로그램으로서 JAVA를 base 로 하여 각종 다른 프로그램과 효율적인 상호 호환성과 다양한 적합성을 제공하여 준다[7,8]. 또한 간단한 사용법과 프로그램에 관한 정보를 조금만 인지하고 있어도 쉽게 사용할 수 있는 접근성 또한 높아 많은 연구자들에게 사용되고 있다. 웨스턴 블랏팅 (western blotting)은 많은 분자생물학자들이 사용하는 단백질의 농도 분석 방법이다. 이러한 농도 분석법을 적용하기 위해 다양한 프로그램이 사용되는데 대표적으로 Image J를 사용한다. Digital 화질에서의 영상 정보는 Pixel 대조도(Contrast) 의 값을 수치화 하여 나타내지는데 이 화면 상의 수치(Arbitrary unit)를 이용하여 간단하게 단백질의 농도를 분석하게 된다[9].

이러한 간단한 농도 분석법을 마우스 두개골 결손 모델에 적용시켜 실험 하고자 하는 대체 물질 지지체나 사이토카인의 뼈 재생의 효과를 알아 낼 수 있다는 점에 착안하였다. 신생 뼈가 재생이 되면 농도의 수치가 변화가

되는 것에 착안하여 결손부위 4mm 원형의 ROI(Region of interest)의 부위의 농도를 측정하여 신생 뼈의 재생량을 측정하여 정량적으로 분석 하고자 한다.

## 2. 실험 및 방법

### 2.1 동물 실험 (마우스 두개골 결손 모델)

4주령 (4weeks) 마우스 총 6마리 (BL Mouse CD 57)에 케타민 과 럼폰 을 사용하여 복부 투여 마취한 후 마우스 두개골 정중앙에 베타딘을 바르고 매스를 사용하여 약 2cm 절개 후 두개골 좌측 부위에 지름 4mm 원형의 결손을 구현하였다. 핸드 피어스를 사용하여 원형을 만들었으며 수술부위를 봉합하였다. 대조군에는 아무것도 처리하지 않은 상태로 두었으며 실험군에는 뼈의 형성을 원활하게 하기위한 BMP2(Bone morphogenetic protein2)를 0.01 cc (concentration 10nM)을 1회용 주사기로 1회 주입하여 뼈의 원활한 재생을 유도하였다. 4주 후에 희생하여 두개골 결손부위에 재생된 신생 뼈의 양을 측정 하였다.

### 2.2 Digital soft X-ray 촬영

Faxitron digital x-ray(model : 100-120, USA)를 사용하여 조건 FOD (20cm), 관전압 (20kvp), 관전류 (1.5mA), 시간(20sec)를 사용하여 촬영후 digital reader 기로 영상을 획득하였다.

### 2.3 Image J 프로그램 측정방법

희생된 마우스 두개골을 적출하여 촬영한 digital 이미지를 image J 상으로 불러내어 각각에 이미지에 ROI 4mm의 원형을 잡아 농도수치인 arbitrary unit 를 측정하였다.

### 2.4 통계적 분석

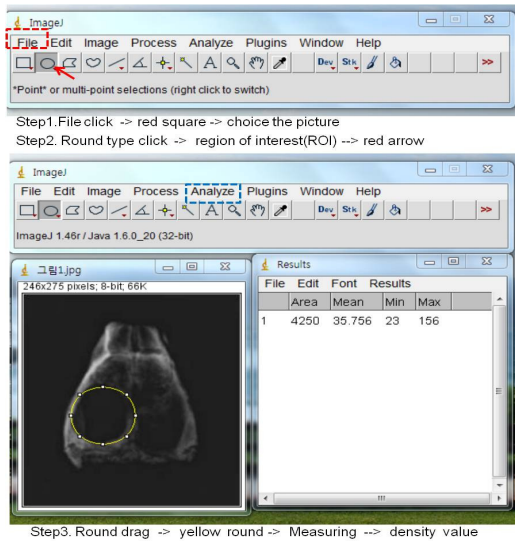
모든 통계적 수치의 차이는 엑셀을 사용하여 T-student (t-test) 를 통하여 검증되었으며 P값 value 0.05<P 의 범위에 있을 때 통계적 차이가 유의한 것으로 간주 하였다.

### 3. 결과

<Table 1> Density value of image J analysis programs

Sample types	density value	STDEV	T-Test
control	36.4	1.0	
BMP2 treated	44.2	1.4	7.64778E-06

Image J 프로그램을 사용하는 방법은 다음과 같다. 파일을 클릭한 후에(step1) 라운드 타입을 누른 후에 원형의 ROI를 구현한다(step2). [Figure.1] (red arrow)

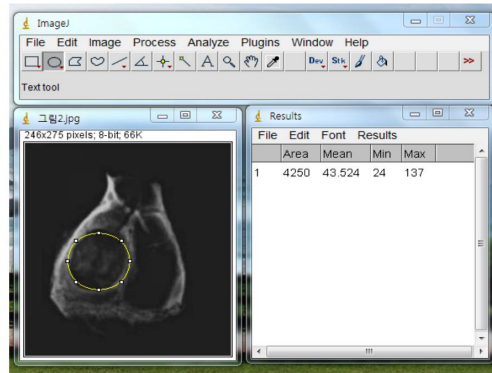


[Fig. 1] Steps of Image J program analysis (1)  
These data show that analysis steps of image J programs. control sample( no treated BMP2)

다음 단계로는 Analyze 를 클릭후 측정된 농도 값을 읽어간다(step3). 이때 주의할 점은 정확한 4mm의 ROI를 모든 샘플과 크기가 같아야 한다.

비교하고자 하는 파일을 동일한 방법으로 불러오기를 실행후에(step4), 동일크기에 4mm의 원형 ROI를 잡는다.(step5) 얻어진 숫자로 통계적 처리를 한다(step6). [figure.2]

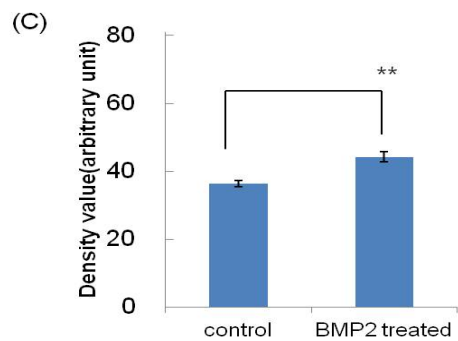
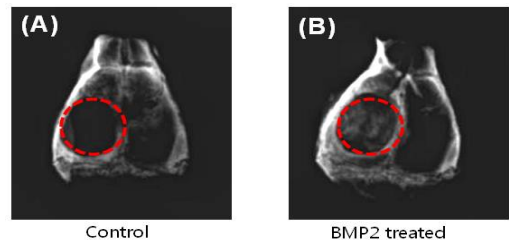
이러한 측정결과로 얻어진 데이터는 다음과 같다.<Table.1> 엑셀을 이용하여 통계분석처리 하였다. 결과가 보여주듯이 BMP2처리를 하면 신생 뼈의 양이 당연히 증가됨을 볼 수 있다.



Step4. Open the another picture -> same precedent method-> density value !!  
Step5. Certainly check the same area.(Both control and BMP)  
Step6. Statistical treatment

[Fig. 2] Steps of Image J program analysis (2). BMP2 treated sample

최종적인 결과는 다음과 같이 도출해 낼 수 있다. [Figure.3] 비교하고자 하는 두 가지의 실험 군에 측정을 하였다.



[Fig. 3] Prediction of regeneration bone density used by Image J programs Digital X-ray image of Mouse calvarial defected model (A),(B). Bar graph of density value (c). (arbitrary unit \*\* P(<= 0.05 )

아무것도 처리하지 않은 대조군보다 BMP2를 처리한 실험군에 재생 량이 당연히 증가됨을 알 수 있다. 여기서 중요한 점은 원형 ROI의 농도측정값을 수치화 한 arbitrary unit값을 적용하여 정량적인 비교분석을 했다는 점이다.

(A),(B) 이미지는 정성적인 분석을 통하여 비교하여 보는 결과이며 (C) 의 그래프는 Image J를 적용하여 얻은 수치를 도식화 하여 정량 분석한 결과 이다. 따라서 뼈의 재생 량을 측정하고자 한다면 Image J programs을 사용하면 보다 정확하게 비교분석 할 수 있게 만들어 준다.

#### 4. 고찰

인체에 있어서 중요한 지지체 역할을 하는 것은 뼈이다. 따라서 뼈의 결손(Loss) 과 손상(Damage)시에 인체는 다양한 질병을 얻을 수 있게 된다. 뼈는 끊임 없이 만들어지고 또한 파괴된다. 뼈의 생성과 파괴에 관여하는 주 세포는 뼈를 생성하는 조골세포(Osteoblast) 와 파괴 세포(Osteoclast) 등이 존재한다[10,11]. 이세포의 분화의 역할에 따라 뼈가 형성이 되고 파괴도 된다. 뼈를 형성하는 대표적인 전자 유전인자는 세포 핵내에 Runx2와 Osterix 로 알려져 있다[12,13]. 이들 유전자의 조절로 인하여 뼈의 형성에 시발점을 가져다준다고 보고되었다. 이것의 형성으로 만들어 지는 BMP2(Bone morphogenetic protein2) 는 뼈의 재생에 중요한 cytokine 역할로 작용 할 수 있어서 신생 뼈의 재생유도에 사용되고 있다[14,15]. 마우스 두개골 결손 모델은 calvarial osseus model 로도 불려진다. 마우스(생쥐) 뿐만 아닌 쥐(Rat)의 종류에도 이와 같은 결손 모델을 사용할 수 있다. 초기에는 쥐의 대퇴골을 인위적으로 부러뜨려(Fracture) 실험하였으나 쥐의 두개골상에 더 많은 골 줄기세포(Mesenchymal stem cells)가 존재 하고 있어서 신생 뼈의 원활한 재생효과에 관한 적합한 환경을 조성 해주기 때문에 두개골 모델을 선호하게 된다. 하지만 뇌에는 수많은 혈관과 다양한 연부조직이 존재하기 때문에 시술자로 하여금 많은 주의가 요구된다. Image J program은 수많은 연구자들이 데이터를 이미지 상으로 처리할 때 또는 이미지의 통계처리가 필요할 시에 사용된다. 단백질 농도분석으로 발현의 양을 정량적 수치로

비교할 때 사용되며, 재생영역 (Area)을 설정하여 정량적 재생 량을 분석 할 수 있게도 해준다. 본 실험은 이러한 간단한 프로그램으로 두개골 상의 원형 결손부위에 2D x-ray 이미지 상에 Pixel 값의 대조도 변화량을 수치화된 절대 값을 측정하여 비교하고자 하는 대조군과 실험군의 Pixel변화 수치를 정량 분석하는데 용이하게 접근 할 수 있게 하였다. 하지만 절대적인 재생 량을 측정하는 데는 마이크로 시티를 사용하여 분석을 해야 한다. 우리가 제시한 이 연구는 연구하고자 하는 물질이나 지지체에 있어서 단순히 X-ray 상의 2D 형태로 분석한 것이기 때문에 정밀한 세포수준의 결과는 예측 할 수 없다. pixel value 는 가장 어두운 값에서부터 가장 밝은 값(0~256; gray scale)로 되어 있으며, X-ray의 강도가 높을수록 투과성이 커져 어둡게 나타난다. 2D상의 이미지 결과로 연구하고자 하는 물질이 효과 적인가 그렇지 않은 것인가에 관한 이미지 수치화에 적용 될 수 있다. 따라서 좀 더 자세한 뼈재생이나 세포학적 수준에서는 각종 주어진 칼바리아를 탈회하여 면역염색(Immunohistochemistry) 을 시행하여 현미경을 관찰하는 것이 좋다. 따라서 X-ray 상의 Image J 분석법은 재생효과의 세포학적 분석에는 적용이 되기는 어렵다. 하지만 빠르고 쉽게 데이터를 분석해 낼 수 있다는 장점이 있어서 재생효과의 결과를 바로 찾아내 정량화 할 수 있다는 장점이 있다.

#### 5. 결론

마우스 두개골 결손모델(Mouse calvarial defected model)은 뼈 조직의 재생 연구자들에게 많이 사용되고 있다. 2D X-ray 상의 정성적인 분석 뿐만이 아닌, X-ray 2D image 상의 Image J programs 를 적용한 간단한 분석법은 정량적인 수치를 통하여 비교하고자 하는 대조군과 실험군의 뼈의 재생에 효과적 차이를 빠르고 간단하게 찾아 낼 수 있게 해준다. 이 방법을 이용하면 마우스 두개골 결손모델을 적용한 연구자들로 하여금 수많은 시행착오를 줄일 수 있으며 또한 적합한 약물이나 cytokine 의 효과를 단순한 2D 이미지를 통하여 빠르게 분석 할 수 있어 뼈의 재생공학자들에 도움을 줄 수 있을 것으로 사료된다.

## REFERENCES

- [1] B. Behr, M.Sorkin, M. Lehnhardt, A. Renda, M.T. Longaker, N.Quarto., A comparative analysis of the osteogenic effects of BMP-2, FGF-2, and VEGFA in a calvarial defect model. *Tissue Eng Part A*, Vol. 18, No. 10, pp.1079-1086,2012.
- [2] K.H. Lau, R.Gysin, S.T.Chen, J.E.Wergedal, D.J.Baylink, S.Mohan., Marrow stromal cell-based cyclooxygenase 2 ex vivo gene-transfer strategy surprisingly lacks bone-regeneration effects and suppresses the bone-regeneration action of bone morphogenetic protein 4 in a mouse critical-sized calvarial defect model. *Calcif Tissue Int*, Vol.85, No.4, pp. 356-367, 2009.
- [3] L. Zhao, M.Tang, M.D.Weir, M.S.Detamore, H.H Xu., Osteogenic media and rhBMP-2-induced differentiation of umbilical cord mesenchymal stem cells encapsulated in alginate microbeads and integrated in an injectable calcium phosphate-chitosan fibrous scaffold. *Tissue Eng Part A*, Vol.17, No.8, pp.969-979, 2011.
- [4] D.H. Kempen, L.B. Creemers, J. Alblas, L. Lu, A.J. Verbout, M.J.Yaszemski, W.J. Dhert., Growth factor interactions in bone regeneration. *Tissue Eng Part B Rev*, Vol.16, No.6, pp.551-566,2010.
- [5] O. Gauthier, R. Müller, D. V. Stechow, B. Lamy, P.Weiss, J.M. Bouler, et al., In vivo bone regeneration with injectable calcium phosphate biomaterial: a three-dimensional micro-computed tomographic, biomechanical and SEM study. *Biomaterials*, Vol.26, No.27, pp.5444-5453,2005.
- [6] S.V. Jacques, H.V. Oosterwyck, L. Muraru, T. V. Cleynebreugel, E. D. Smet E, M. Wevers, et al., Individualised, micro CT-based finite element modelling as a tool for biomechanical analysis related to tissue engineering of bone. *Biomaterials*, Vol.25, No.9, PP.1683-1696,2004.
- [7] J. Rittweger, I.Michaelis, M. Giehl, P.Wüsecke, D. Felsenberg., Adjusting for the partial volume effect in cortical bone analyses of pQCT images. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, Vol.4, No.4, PP.436-441,2004.
- [8] M.J. Tovée, P.J. Benson, J.L. Emery, S.M. Mason, E.M. Cohen-Tovée., Measurement of body size and shape perception in eating-disordered and control observers using body-shape software. *Br J Psychol*, Vol.94, No. 4, PP.501-516, 2003.
- [9] M.R. Martins, B. Njaine, M.S. Silveira., Avoiding pitfalls of internal controls: validation of reference genes for analysis by qRT-PCR and Western blot throughout rat retinal development. *PLoS One*, Vol.7, No.8, PP.e43028,2012.
- [10] L. Fong, B.S. Muhlhausler, R.A. Gibson, C.J. Xian., Perinatal maternal dietary supplementation of  $\omega$ 3-fatty acids transiently affects bone marrow microenvironment, osteoblast and osteoclast formation, and bone mass in male offspring. *Endocrinology*, Vol.153, No.5, PP.2455-2265,2012.
- [11] M.S. Cohen, M.C. de Vernejoul., [Bone remodeling]. *Therapie*, Vol.58, No.5, PP.391-393. Review, 2003.
- [12] L. D. Carbonare, G. Innamorati, M.T. Valenti., Transcription factor Runx2 and its application to bone tissue engineering. *Stem Cell Rev*, Vol.8, No.3, PP. 891-897, 2012.
- [13] T.Komori., Signaling networks in RUNX2-dependent bone development. *J Cell Biochem*, Vol.112, No.3, PP.750-755, Review,2011.
- [14] A.H. Monsoro-Burq, D. Duprez, Y. Watanabe, M. Bontoux, C. Vincent, P. Brickell, et al., The role of bone morphogenetic proteins in vertebral development. *Development*, Vol.122, No.11, PP.3607-3616,1996.
- [15] D. Chen, M.A. Harris, G. Rossini, C.R. Dunstan, S.L. Dallas, J.Q. Feng, et al., Bone morphogenetic protein 2(BMP-2) enhances BMP-3, BMP-4, and bone cell differentiation

marker gene expression during the induction of mineralized bone matrix formation in cultures of fetal rat calvarial osteoblasts. Calcif Tissue Int, Vol.60, No.3, PP.283-290, 1997.

### 정 홍 문(Jung, Hong Moon)



- 2005년 9월 : 고려대학교 생물공 (공학사)
- 2012년 2월 : 서울대학교 치의학과 (치의학 석사)
- 2013년 3월(현재) : 경북대학교 치 의과학과(박사과정)
- 2012년 3월부터 ~ 현재 : 대구보 건대학교 방사선과 조교수

· 관심분야 : 생체재료, 방사선치료 재생학, 방사선학  
· E-Mail : redmoon74@dhc.ac.kr

### 원 도 연(Won, Do Yeon)



- 2012년 2월 : 영남대학교 대학원 의 공학과(의공학석사)
- 2013년 5월 : 영남대학교 대학원 의 공학과(박사과정)
- 2011년 3월 ~ 현재 : 대구보건대학 교 방사선과 조교수
- 관심분야 : 생체재료, 디지털의료영 상, 방사선학

· E-Mail : dywon@dhc.ac.kr

### 정 재 은(Jung, Jae Eun)



- 2003년8월 : 고려대학교 의료기기 정보학과(의공학석사)
- 2010년2월 : 남부대학교 디지털경 영정보학과(공학박사)
- 2010년 3월 ~ 2012년2월 : 삼육 의 료원 의공학 팀장
- 2012년 3월부터 ~ 현재 : 대구보건 대학교 방사선과 조교수

· 관심분야 : 의용생체공학, 방사선중재학  
· E-Mail : jejung@dhc.ac.kr