

백서 두개골 결손부에 Hydroxylapatite와 TGF- β 매식 후 치유과정에 관한 연구

권혁도 · 이동근 · 김은철*

원광대학교 치과대학 구강악안면외과학교실, 구강병리학교실*

Abstract

HEALING PROCESS OF THE CALVARIAL DEFECT FILLED WITH HYDROXYLAPATITE AND TGF- β IN RAT

Hyuk-Do Kwon, Dong-Keun Lee, Eun-Chol Kim*

Department of Oral and Maxillofacial Surgery, School of Dentistry, Wonkwang University

**Department of Oral Pathology, School of Dentistry, Wonkwang University*

The purpose of this study was to evaluate the healing process of the calvarial defect filled with hydroxylapatite (HA) and TGF- β in Rat. 72 Sprague-Dawley rats were divided into 3 groups, control and two experimental groups. Bony defects were artificially prepared in the calvaria of all 72 rats and followed by implantation of HA (experimental group of 24 rats) and HA + TGF- β (another experimental group of 24 rats) into the defects. Sequential sacrifice was performed at 1, 2, 4, 6, 8, 12 weeks of experiment. Obtained specimen was stained with Hematoxylin and Eosin, Masson's Trichrome and Immunohistochemistry.

The results were as follows;

1. Granulation tissue was prominent on control group in 1 and 2 weeks. Bony defects were filled with dense fibrous tissue through the whole experimental period and osteoinduction could not be observed in all groups.
2. Inflammatory cell infiltration was prominent on control group in 1 and 2 weeks and osteoclastic activity was high in HA implanted experimental group at 1 and 2 weeks.
3. Inflammatory cell infiltration was less and maturation of fibrous tissue could be found on HA + TGF- β implanted experimental group at 1 and 2 weeks.
4. Osteoconduction activity was high in HA + TGF- β implanted experimental group at 2 and 4 weeks but there was no difference after 6 weeks among 3 groups.
5. In grafted site of HA + TGF- β implanted group, osteonectin expression was slightly increased from 1 week to 6 weeks. In the host site, it was increased from 1 to 4 weeks.
6. In grafted site of HA + TGF- β implanted group, osteocalcin expression was high at 4 weeks. In the host site, we could find the difference among 3 groups.

From above results, the HA with mixture of TGF- β has the potentiality of promoting bone formation in the bony defect area in the rat.

Key Words : Animal Model, Hydroxylapatite, growth factor, Osteoconduction, Osteocalcin, Osteonectin

I. 서 론

구강악안면 영역에서 악골은 다른 부위의 골에 비하여, 치근 감염이나 진행성 치주염 등 여러가지 감염에 노출될 기회가 많고 형태학으로 외부에 노출이 용이하여 외력에 의한 손

상을 쉽게 받아 기능적 및 심미적인 문제를 야기시킨다. 임상에서는 감염이나 외상으로 발생하는 골 손상 이외에도 악안면 기형이나 발치로 인한 성형 술식 혹은 인공치아매식으로 인한 외과적 손상이 증가하고 있으므로 손상된 골을 빠르게 성숙된 골 조직으로 재생시키는 것이 많은 임상가들의 관

심사가 되고 있다. 이러한 골 조직의 성장과 개조는 골모세포, 파골세포 및 전구세포의 증식, 분화 및 활성이 중요하게 작용하며, 이러한 작용은 여러가지 호르몬 등의 전신적 인자와 싸이토카인 같은 국소적 인자에 의하여 조절되고 있다¹². 국소적 조절물질은 대부분 성장인자 (growth factor)이며³⁴, Terranova와 Wikes³⁵는 세포의 기능, 성장, 형성은 세포와 세포의 기질의 특이한 상호 작용과 polypeptide Growth Factor (PGF)에 의하여 조절된다고 하였다.

많은 종류의 PGF 중 창상 치유에 관여하는 인자로써 Platelet-Derived Growth Factor (PDGF), Fibroblast Growth Factor (FGF), Transforming Growth Factor (TGF), Insulin-like Factor, Interleukin-1등이 있으며 이중 TGF- β 는 여러 종류의 세포들의 증식과 분화에 관여하는 다기능 펩타이드로서 특히 골 조직에서 그 생성량이 많은 것으로 보고되고 있다⁶.

TGF는 TGF- α 와 TGF- β 로 분류되며 이들은 구조적, 기능적으로 무관하다. TGF- α 는 약 5,600 Dalton (Da)의 분자량을 가진 50-amino-acid single-chain protein이며⁷, 상피성 성장인자 (epithelial growth factor; EGF)와 42%의 동질성을 가지고 EGF 수용기에 경쟁적으로 작용하며 상피세포와 내피세포를 자극한다⁸⁹. TGF- β 는 분자량 25,000 Da의 homodimeric polypeptide로서 TGF- β 1, TGF- β 2 및 TGF- β 3의 3가지 형태로 구분되며 골과 혈소판이 주요 발생 기원으로¹⁰, 상피세포의 증식을 억제하고 간엽세포의 증식을 자극하며¹¹, 섬유모세포의 화학주성과 증식을 자극하며 세포외기질의 생성을 유도한다¹².

골 결손부의 회복을 위하여는 골 이식술이 일반적으로 사용된다. 이식골에는 종류에 따라 자가골, 동종골, 합성골 등으로 구분되며 이중 자가골을 이용한 이식이 가장 양호한 결과를 얻을 수 있다고 알려져 있다. 그러나 필요한 골의 채취에 양적인 제한이 있어 동종골과 합성골의 사용이 증가하고 있다. 동종골은 면역학적으로 문제점을 가지고 있어, 합성 재료를 이용한 골 이식에 관한 연구가 보고되고 있다¹³.

골이식 대체물에는 경석고¹⁴, 공막¹⁵, 콜라겐¹⁶등이 있었으나 이러한 물질들은 골유도 능력이 불확실하여, 최근에는 새로운 재료가 개발되어 β -TCP¹⁷, 결정형 HA¹⁸, 소공형 HA¹⁹등이 사용되고 있다. 이러한 대부분의 대체골은 치주질환 및 기타 골 결손부에 충전하는 것에 의하여 골 형태 회복을 기대하며 시술되고 있다. 이중 HA는 $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)$ 의 분자식을 가진 것으로 생물학적으로 살아있는 골과 강력한 결합을 하며 생체친화력이 있는 물질의 하나라고 하였다. 또한 골 재생시 골전도 능력을 가지고 있으며 기능적으로 숙주골과 융합되어 주위 정상골 대사를 방해하지 않는다고 하였다²⁰.

TGF- β 의 골조직에 대한 영향은 매우 다양하게 보고되고 있는데, TGF- β 가 골모세포의 증식, DNA 합성 및 교원단백질, osteonectin, fibronectin 합성과 alkaline phosphatase 활성을 증가시키고²¹⁻²³ 생체 실험에서 골 생성을 증가시킨다는 보고²⁴가 있는 반면 골모세포의 alkaline phosphatase 활성을 감소시

키고 증식을 억제하며, 교원단백질과 골 조직의 다른 단백질 합성을 감소시킨다는 보고와 연속 효소 처리방법에 의한 백서 두개관 세포에서의 골 형성을 억제한다는 보고가 있다^{25,26}. 또한 파골세포에서도 다양한 작용을 나타내고 있어 마우스 두개관배양시 골 흡수를 촉진시킨다는 보고²⁷가 있는 반면 백서 태아 장골의 경우는 골 흡수를 억제하며²⁸, 파골세포의 생성을 억제하고 분리된 파골세포의 활성을 감소시킨다는 보고²⁹가 있어 그 정확한 기능은 아직 모르는 상태이다.

생체 실험에서 생리학적 골 대사 과정에 TGF- β 가 작용하는 역할에 대해서는 아직 생체의 실험과 상관성이 확립되지 못하고 있으나 창상 치유시 TGF- β 가 일정한 역할을 할 것이라고 제안되고 있는데, TGF- β 의 주사시 육아조직의 생성을 증가한다는 보고가 있다^{30,31}. Lynch 등³²은 돼지의 표피 창상에 TGF- β 를 국소적으로 도포하면 재상피화를 막고, 결합조직의 양과 혈관 재생 및 교원질 합성을 증가시킨다고 하였고, Lawrence 등³³은 TGF- β 단독 또는 다른 요소를 복합 투여시 단백질과 교원질 합성의 상당한 증가를 보였으며 섬유모세포와 모세혈관의 증가된 성장을 발견하였다.

생체 내외의 다양한 실험에서 여러가지의 보고가 있다^{34,35}. 특히 생체내 골조직 대사에서 TGF- β 의 효과는 Noda 등³⁶에 의하여 처음으로 골 형성을 촉진한다는 증거가 제시되었으며, TGF- β 의 신생혈관 잠재능 (angiogenic potential)과 관계된 것으로 여기고 있고 Marcelli 등³⁷이나 최근 Hock 등³⁸도 TGF- β 가 골모세포의 수, 기질 침착율, 교원 또는 비교원 단백질 합성율을 증가시켰다고 보고하였으나 손상 골재생시 조직병리뿐 아니라 단백질 수준까지 동시에 연구된 바는 많지 않다.

외상 또는 인위적 치료 술식에 의하여 손상된 악골의 신속한 치유를 위하여 손상골 부위에서 신생골 유도를 촉진시킬 수 있는 방법들이 요구되고 있다. 그 중의 한 방법으로써 인위적으로 성장인자를 투입하여 조직의 재생능을 높이기 위한 연구가 최근에 관심 대상이다. 따라서 본 연구에서는 백서의 두개골을 이용하여 인위적인 골 결손을 유발시킨 후 HA 이식과 TGF- β 를 투여하여 일반 조직 검사와 면역 조직화학적 검사를 통한 생체내 골개조 과정에 TGF- β 가 어떠한 역할을 하는지 규명하고자 하였다.

II 연구재료 및 방법

1. 연구재료

실험동물은 일정기간 동안 동일 조건에서 사육된 체중 250g 내외의 생후 3개월된 Sprague-Dawley계 백서 72 마리를 24마리씩 세군으로 나누었다. 두군은 실험군으로 골 결손부에 대체골 이식군과 대체골에 형질전환 성장인자를 포함한 군이었으며, 한군은 대조군으로 결손부를 생리식염수로 세척한 후 그대로 방치하였다.

본 실험에 사용된 대체골은 porous hydroxylapatite (Calcitec, Sulzer, USA) 이었으며 성장인자는 TGF- β (R & D, USA)를 사용하였다. 면역조직화학적 검사를 위하여는 labelled streptavidine biotin (LSAB, Dako Co, USA) kit와 일차항체로는 osteonectin (Bioscience Co, USA)과 osteocalcin (Bioscience Co, USA)을 일차항체로는 anti-mouse IgG (Vector Lab, USA)를 사용하였으며, 발색을 위하여는 aminoethyl carbazole (AEC, Zymed Co, USA)을 이용하였다.

2. 연구방법

1) 동물실험

① 골 손상

실험동물을 Ketamine HCl (Ketalar, 유한)을 근육주사하여 전신마취를 유도하였으며 ether를 이용하여 전신마취를 유지하였다. 통법에 따라 두부 제모와 포타딘을 이용한 소독을 통하여 무균적 수술시야를 확보하였다. 각 실험군과 대조군의 두개골에 골막을 박리하고 치과용 No. 6 round bur를 이용하여 골 결손부를 형성하였다.

② 대체골 이식 및 TGF- β 투여

실험군은 골 결손부의 치유나 치조골의 심미적 재건 목적으로 사용하는 비흡수성 다공성 hydroxylapatite (HA)를 생리식염수에 혼합하여 두개골 결손부에 이식하였으며, 다른 실험군은 비흡수성 다공성 HA에 5 μ g/ml로 희석한 TGF- β 를 혼합하여 이식재료 사용하고 성공적인 골 이식을 위하여 골막, 근육, 피부를 면밀하게 층별 봉합을 시행하였다. 대조군에서는 정상적인 골 치유를 비교하고자 골 결손부를 생리식염수로 충분히 세척한 후 공간을 유지한 상태로 수술 부위를 봉합하였다. 술 후 감염을 방지하기 위하여 전 실험동물에게 겐타마이신을 2회 근육주사 하였다.

2) 표본 제작 및 검사 방법

① 동물 희생

조직검사를 위하여 실험 후 1주, 2주, 4주, 6주, 8주, 12주로 나누어 실험동물을 희생한 후 주위조직을 포함하여 이식부 골을 채취하고, 10% 중성포르말린 용액에 2일간 고정하였다.

② Hematoxylin & Eosin과 Masson's Trichrome 염색

각각의 표본은 formic acid-sodium citrate 방법으로 탈석회화를 시행한 후, paraffin으로 포매하고, 4 μ m 두께로 조직 절편을 만들어, Hematoxylin & Eosin 과 Masson's trichrome 염색을 실시하고 광학현미경을 통하여 수술부위에 염증세포 침윤, 육아조직 형성, 신생모세혈관 증식, 섬유화, 파골 및 골모세포 활성화, 골유도 (osteoinduction)나 골전도 (osteochonduction) 정도를 - (음성)에서 \pm (경미), + (약양성), ++ (중양

성), +++ (강양성)까지 5단계로 구분하여 검정하였다.

③ 면역 조직화학적 염색

면역 조직화학적 염색은 LSAB kit를 이용하였다. 이미 제작된 파라핀 절편을 탈파라핀화 후 수화시키고 일차 항체인 osteonectin은 1/40, osteocalcin은 1/80로 희석하여 80분간 반응시킨 후 이차 항체로 anti-mouse IgG를 20분간 처리 하였다. aminoethyl carbazole (AEC, Zymed Co, USA)을 이용하여 발색시킨 후 Harrison hematoxylin으로 대조 염색하였다. 검정은 glycerin을 도포한 후 시행하였다. 음성 대조군을 위하여는 일차 항체 대신 생리식염수를 사용하고 동일한 방법으로 염색을 하였다.

Osteonectin과 osteocalcin의 발현 정도는 이식골과 숙주골을 구분하여 부위에 따른 분포 양상을 알아보기 위하여 각 부위를 저배율로 관찰하여 염색 양상이 미만성인가 혹은 특정 부위에 국한된 것인가를 판별하고 고배율로 세포의 어느 부위가 양성으로 나타나는 지를 관찰하였다. 반정량적 분석을 위하여 저배율에서 염색의 강도가 비교적 강한 부위를 선택하여 염색 정도를 - (음성)에서 \pm (경미), + (약양성), ++ (중양성), +++ (강양성)까지 5단계로 구분하였다.

III. 연구성적

1) 조직학적 소견 (Table 1~6)

① 대조군

실험 1주에서는 결손부 내부에 많은 출혈 및 육아조직이 관찰되었고 결손부 변연에서 골모세포의 활성화나 신생골 형성은 거의 관찰되지 않았으며 파골세포의 활성화는 경미하였다(Fig. 1-1A).

2주군은 1주에 비하여 염증세포 침윤이 현저히 감소되었으며 결손부 주위에 다량의 섬유모세포의 유입 성장이 보이거나 신생골 형성은 미미하고 경도의 파골세포가 관찰되었다(Fig. 1-2A).

4주군과 6주군에서는 결손부 변연에 신생골 형성이 관찰되는 골 전도 (osteochonduction) 현상이 보이거나, 결손부 내부에서는 신생골이 관찰되지 않았고 신생혈관으로 구성된 성숙된 섬유조직으로 결손부를 대치하였다. 또한 주변의 골막이 잘 보존되었으며 파골세포의 출현도 거의 사라졌다(Fig. 1-3A).

8주 및 12주에서도 결손부 주위에 파골세포는 거의 사라졌으며 결손부에 골모세포의 활성화나 신생골 형성은 없었으나 결손부는 전체적으로 Masson's trichrome (MT) 염색에서 녹색의 충실한 섬유조직으로 채워져 있었다(Fig. 1-4A).

② Hydroxylapatite (HA) 이식 실험군

실험 1주에는 많은 임파구와 조직구 등의 염증세포 침윤이 이식체 주위에 나타났지만 대조군보다는 염증세포 침윤이

Table 1. Degree of Inflammatory Cell Infiltration According to Graft Type and Duration.

Group Week	Control	Hydroxylapatite(HA)	TGF-β+ HA
1	+++	++	+
2	+	+	±
4	±	±	±
6	±	±	±
8	±	±	±
12	-	-	-

; negative, ±; rare, +; mild, ++; moderate, +++; severe

Table 3. Degree of Fibrosis or Maturation of Fibrous Tissue According to Graft Type and Duration.

Group Week	Control	Hydroxylapatite(HA)	TGF-β+ HA
1	±	±	+
2	+	+	++
4	++	++	++
6	++	++	++
8	++	++	++
12	+++	+++	+++

; negative, ±; rare, +; mild, ++; moderate, +++; severe

Table 5. Degree of Osteoinduction Activity According to Graft Type and Duration.

Group Week	Control	Hydroxylapatite(HA)	TGF-β+ HA
1	±	±	±
2	±/+	±	±
4	±	±	±
6	±	±	±
8	±	±	±
12	±	±	±

; negative, ±; rare, +; mild, ++; moderate, +++; severe

Table 2. Degree of Angiogenesis or New Capillary Proliferation According to Graft Type and Duration.

Group Week	Control	Hydroxylapatite(HA)	TGF-β+ HA
1	+	++	++/+++
2	++	++	++
4	++	++	++
6	+	+	+
8	+	+	+
12	+	+	+

; negative, ±; rare, +; mild, ++; moderate, +++; severe

Table 4. Degree of Osteoclastic Activity According to Graft Type and Duration.

Group Week	Control	Hydroxylapatite(HA)	TGF-β+ HA
1	±	+++	±
2	+	++	+
4	+	+	+
6	±	±	±
8	±	±	±
12	±	±	±

; negative, ±; rare, +; mild, ++; moderate, +++; severe

Table 6. Degree of Osteoconduction Activity According to Graft Type and Duration.

Group Week	Control	Hydroxylapatite(HA)	TGF-β+ HA
1	±	±	±
2	+	+	++
4	++	++	+++
6	++	++	++
8	++	++	++
12	+	+	+

; negative, ±; rare, +; mild, ++; moderate, +++; severe

적었다. 그러나 결손부 주변의 골 흡수상이나 파골세포는 전 실험군에서 가장 많이 나타났으나 육아조직내에 hydroxylapatite crystal 부위는 빈공간으로 남아있으며 신생골 형성은 거의 없었다 (Fig. 1-1B).

2주군에서 이식골편 내부의 활성 및 HA crystal 주위에 골 모세포 활성은 거의 없었고 경도의 염증세포 침윤이 보였으며 또한 hydroxylapatite crystal 주변으로 파골세포 활성이 현저하게 나타났다 (Fig. 1-2B).

4주와 6주에서는 이식부가 섬유성 결체조직으로 이루어져 있으나 대조군에 비하여 섬유조직 형성은 MT 염색상 적게 관찰 되었다. 염증세포와 파골세포는 거의 사라졌으며 신생골형성은 이식부 주변의 정상 골조직에서 활발히 이루어지고 있어 골전도는 어느 정도 이루어짐을 알수 있다. 그러나 이식체 주변이나 내부에서는 골 형성이 이루어지지 않아 골 유도가 전혀 없었다 (Fig. 1-3B).

8주군과 12주군에서도 군간의 현저한 차이 없이 이물반응

이나 염증세포 침윤은 없었고, 신생골 형성은 거의 이루어지지 않았다. 대체골 결정 주위는 섬유조직으로 대체되었다 (Fig. 1-4B)

③ Hydroxylapatite (HA) + TGF- β 이식 실험군

실험 1주 소견으로 HA 단독 투여군보다 염증세포 침윤은 적었고 이식체 주위의 섬유성 결합조직의 성숙 및 섬유화가 많이 보였다. HA 단독 이식군과 유사하게 이식체 내부에서 골모세포 활성화나 신생골 형성은 미약했으나 파골세포 출현은 HA 단독 이식군보다 훨씬 적었으며 일부에서는 육골이 제한적으로 관찰되었다 (Fig. 1-1C).

2주군의 경우 HA 단독 이식군과 유사하였으나 염증세포 침윤 및 파골세포 출현이 적고 골막구조의 보존성이 우수하다는 점과 섬유성 결합조직의 성숙이 잘되어 조기에 염증반응이 사라지고 육아조직이 성숙한 섬유성 결합조직으로 대체되는 것이 특징이었다 (Fig. 1-2C).

4주 및 6주는 큰 차이가 없이 이식부를 둘러싼 섬유조직이 성숙되면서 이물반응 및 염증반응은 거의 없고 이식체 내부의 신생골 형성은 없었으나 이식체 주위에서 신생골 형성 즉 골전도 현상은 뚜렷하였고 전 실험군중 가장 많이 관찰되었다 (Fig. 1-3C).

8주와 12주간에는 다른 실험군과 유사하게 결손부가 치밀한 섬유성 결합조직으로 대체되었으며 염증 및 혈관증식, 파골세포 침윤은 사라졌다 (Fig. 1-4C).

2) 면역조직화학적 소견

① Osteonectin 발현 (Table 7)

면역조직화학 검사에서 osteonectin이 분포하는 부위는 peroxidase에 의하여 갈색으로 염색되었다. 수술 후 1주 조직 소견에서 실험군과 대조군 모두에서 정상적인 이식의 치유과정 중 염증기에 해당되는 조직 반응을 관찰할 수 있었으나, 실험군과 대조군에서 뚜렷한 조직학적 차이는 발견할 수 없었다. 즉 대조군과 HA 단독 이식군 1주에서는 결손부나 결

손부 주위 숙주골에서 거의 발현이 되지 않아 거의 음성 소견을 보였으며 (Fig. 2-1A, 1B), TGF- β 투여군에서만 육아조직 내 신생모세혈관에서 약한 발현을 보였다 (Fig. 2-1C).

수술 후 2주에서는 육아조직 형성기에 해당하는데 대조군의 숙주골에서 골세포나 골모세포에서 osteonectin의 발현이 되기 시작하였으나 (Fig. 2-2A) 결손부에서는 음성이었고 HA 단독 이식군과 현저한 차이를 볼 수 없었다 (Fig. 2-2B). 그러나 TGF- β 군에서는 인접 숙주골의 골세포나 골모세포에서의 발현이 대조군이나 HA 단독 이식군보다는 증가된 중등도를 보였다 (Fig. 2-2C).

실험 4주와 6주에는 섬유조직 단계로 대조군이나 HA 단독 이식군의 경우 이식체 내부나 결손부에서 osteonectin에 대한 발현이 없었고 결손부 주위골에서만 중등도의 발현을 보였는데 군간의 차이는 미약하였으며 (Fig. 2-3A, 3B), TGF- β 군에서는 4주까지만 숙주골의 골전도 현상 부위에서 많은 발현을 보였으나 6주에서는 군간의 차이를 볼 수 없었다 (Fig. 2-3C).

이식 8주와 12주에서는 성숙섬유조직 형성단계로 대조군 및 HA 단독 이식군 모두에서 특이한 소견이 없이 osteonectin이 이식부에서는 발현이 안되었다 (Fig. 2-4A, 4B). 그러나 TGF- β 군에서만 HA crystal과 섬유성 결합조직의 인접 부위에서 골형성이나 골모세포가 없는데도 osteonectin의 발현을 관찰할 수 있었다 (Fig. 2-4C).

② Osteocalcin 발현 (Table 8)

실험 1주와 2주에서, 실험군과 대조군 모두에서 osteocalcin의 발현이 미비하여 명확한 차이를 발견할 수 없는 상태이었다. 즉 대조군과 HA 단독 이식군에서는 결손부나 결손부 주위 숙주골에서 osteocalcin이 거의 발현이 되지 않아 음성에 가까웠고, TGF- β 군에서도 이식부 육아조직과 숙주골에서도 음성에 가까운 발현을 보였다 (Fig. 3-1A, 1B, 1C).

수술 후 4주에서는 대조군의 숙주골에서 골기질, 골세포나 골모세포에서 osteocalcin의 발현이 관찰되기 시작하였으나 (Fig. 3-2A) 결손부에서는 음성이었고, HA 단독 이식군과

Table 7. Expression of Osteonectin According to Graft Type and Duration.

Site Group Week	Graft			Host		
	Cont-rol	HA	TGF- β +HA	Cont-rol	HA	TGF- β +HA
1	±	±	±/+	±	±	±
2	±	±	±/+	+	+	++
4	±	±	±/+	+	+	++
6	±	±	±/+	++	++	++
8	±	±	±	+	+	+
12	±	±	±	+	+	+

; negative, ±; rare, +; mild, ++; moderate, +++; severe

Table 8. Expression of Osteocalcin According to Graft Type and Duration.

Site Group Week	Graft			Host		
	Cont-rol	HA	TGF- β +HA	Cont-rol	HA	TGF- β +HA
1	±	±	±	±	±	±
2	±	±	±/+	+	+	++
4	±	±	++	++	++	++
6	±	±	±	++	++	++
8	±	±	±	+	+	+
12	±	±	±	+	+	+

; negative, ±; rare, +; mild, ++; moderate, +++; severe

큰 차이가 없었다 (Fig. 3-2B). TGF- β 군에서는 인접 속주골의 골세포나 골모세포에서의 발현이 대조군이나 HA 단독 이식군에 비하여 중등도를 보였고, 이식부 내부에서는 HA crystal 내부와 주위에 비특이적인 양성반응이 나타나 특이한 점으로 관찰되었다 (Fig. 3-2C)

실험 6, 8주 12주에는 섬유조직 단계로 osteocalcin에 대한 발현이 이식부에서는 거의 음성이었다고 속주골에서 경미한 반응을 보여 대조군이나 HA 단독 이식군, TGF- β 군 사이에 차이는 거의 없었다.

IV. 총괄 및 고찰

골의 재형성은 인체내의 호르몬과 국소 성장 인자에 의하여 조절되는 일련의 복합적인 과정이며, 골 부피 (volume)의 조절은 골 형성과 파괴의 상호 균형으로 이루어지고 있다. 이러한 균형을 유지하는 기전으로는 체내에서 칼슘과 인의 균형을 조절하는 호르몬과 국소 작용으로 골 형성에 있어서 autocrine 또는 paracrine 효과를 지닌 성장 인자의 작용으로 유지되고 있다^{39,41}.

골 재생에는 세가지 기본적인 방법이 있는데 첫째로 골 형성 (osteogenesis)으로 기존에 있는 분화된 또는 결정된 골 형성 세포에 의하여 골이 형성되는 것으로, 자가골 또는 골수 이식에서 볼 수 있다. 둘째로는 골유도 (osteinduction)로 유도 자극이 있을 때 미분화된 결절조직이 골 형성 세포로 분화되어 골 형성을 유도하는 기전이다. 세번째로는 골전도 (osteoconduction)로 직접적으로는 골 형성을 못하고 자극에 반응하지 않지만 혈관을 자라 들어오게 하고 부복 치환 (creeping substitution)에 의하여 새로운 골 형성을 할 수 있게 한다⁴².

골 결손부 회복을 위한 일반적 치료 방법으로는 골 이식술이 이용되고 있다. 골 이식술에 사용되는 골 이식재는 공급원에 따라 자가골, 동종골, 합성골 등으로 구분될 수 있다. 이중 자가골을 이용한 이식은 골 채취를 위한 부가적 수술의 필요성과 양적인 제한이 있으며 동종골은 공여자의 확보에 어려움과 수술 후 감염과 같은 합병증, 일정치 않는 치유속도 및 항원성 문제 등의 어려움이 있어, 이를 해결하기 위하여 합성재료를 이용한 골 이식 대체물에 관한 많은 연구와 이를 응용한 실험들이 활발히 진행되어 왔다¹⁹.

골 결손의 충전 물질은 완전한 생체 친화성이 있어야 하고, 재생되는 신생골에 의하여 생리적으로 충분히 일부 또는 전부가 대체되어야 한다. 또한 세포 독성이 없어야 하고, 골유도 또는 골전도 기능을 가진 물질이어야 하는데, 골이식 대체물로 개발된 재료에는 경석⁴³, 공막⁴⁵, 콜라겐⁴⁶ 등이 있었으나 이러한 물질들은 불확실한 골유도 능력으로 인하여 임상응용 단계까지 이르지 못하였으며, 최근에는 β -TCP⁴⁷, 결정형 HA⁴⁸, 소공형 HA⁴⁹ 등이 있고, 최근에는 세라믹도 소개되

어 있다. 이러한 소재는 우수한 조직 친화성과 골전도 능력을 가지고 있으나 골유도 능력은 인정되지 않으며 일반적으로 기질 (matrix) 기능을 통하여 조골과정이 신속히 진행되어 골성 강직이 초래되는 경우가 문제로 나타나기도 했다. 따라서 대부분의 대체골은 치주질환 및 기타 골 결손부에 충전하는 것에 의하여 골 형태 회복을 기대하며 시술되고 있는 실정이다.

본 실험에서 대체골로 사용된 수산화인회석은 $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ 의 분자식을 가진 것으로, 인공적으로 합성된 수산화인회석은 골의 주성분인 칼슘과 인산으로 구성되어 있다. 최근에 임상에서 많이 사용되고 있는 HA는 생물학적으로 살아있는 골과 강력한 결합을 하며 생체친화력이 있는 물질의 하나라고 하였다. 또한 국소 또는 전신적인 독성이 없고 이물반응이나 염증반응이 최소한으로 발생하고 골 재생시 골전도 능력을 가지고 있으며 기능적으로 속주골과 융합되어 주위 정상골 대사를 방해하지 않는다고 하였다²⁰. 그러나 신생골이 형성되어 대체골과 융합하는데 많은 시간이 소요되고, HA의 외형에 따라 과립형과 불력형의 두가지가 있으나 원하는 위치에 과립을 유지하기가 힘들거나 또는 골 결손 부위의 모양을 만들기가 어려워 사공간 (dead space)이 생기는 등 단점을 가지고 있다^{19,20}.

수산화인회석은 결합조직 및 미세혈관의 성장 그리고 신생골의 침착을 용이하게 하기 위하여는 미세한 다공성 구조가 요구되며 적당한 소공의 직경은 190 - 230 μ m이며 다양한 보고가 있다. Hulbert 등⁴⁵은 신생골의 이식체 안으로의 성장 및 증식에 200 μ m 직경의 소공과 100 μ m 직경의 연결 통로 (interconnection)이 효과적이라고 하였다. White와 Shore⁴⁶는 소공의 크기에 따른 치유양상을 비교 연구한 결과 15 - 50 μ m 인 경우에는 섬유조직 및 혈관의 성장을 유도하며, 150 μ m 이상일 때에는 신생골의 성장을 유도한다고 보고하여 골 성장을 위하여는 어느 정도의 크기를 가져야 하는 것으로 되어 있다. 다공성 수산화인회석을 이용한 여러 연구에서 결손부에 이식한 2주 후에 소공내로 결합조직이 채워지고 점차적으로 골로 대체된다고 하며, 섬유조직, 혈관, 신생골이 소공 내부 및 매식체 주위가 석회화됨을 보고하였다. 또한 치주영역에서 현저한 치주낭의 감소 및 부착 수준의 향상을 보고되고 있다^{20,45,46}. 본 연구에서 수산화인회석 소공내로 섬유조직, 혈관들이 침윤되는 소견은 없고, 신생골이 형성되는 양상이나 이식체가 신생골에 의하여 완전히 둘러싸이는 소견은 관찰되지 않았으며 실험 12주에서도 치밀한 섬유결절조직으로 둘러싸인 구조를 보이며 주위 속주골에서 골전도 현상이 관찰되어 골유도를 자극한다기 보다는 대부분 치밀한 결합조직에 싸이는 단순한 충전물질로서 작용한다고 알려져 있는 다른 연구와 일치하였다⁴⁷. 이러한 사실은 두개골이 다른 골에 비하여 골 형성이 잘 안되는 특징과 본 실험에서 골 결손부는 너무 큰 결손이 아닌가 생각된다.

직접 또는 간접적으로 골 형성에 작용하는 조절 인자로 알려진 것으로는 성장 분화 인자 (growth and differentiation factor), 호르몬, 싸이토카인, 세포의 기질 등이 알려져 있다. 이 중 골의 성장 분화 인자로 알려진 것으로는 Insulin-like growth factor I과 II, TGF- β , acidic & basic FGF, PDGF, bone morphogenetic proteins (BMP) 등이 있다¹².

여러 성장인자 중 최근 TGF- β 에 대한 관심이 높아지고 있으며, 그 역할에 대하여 활발히 연구되고 있다. TGF- β 는 분자량이 25,000 Da이며, 가장 흔한 근원은 골과 혈소판으로서, 여러 세포에 광범위한 작용을 가지고 있는데 기질 전구세포, 연골세포, 골모세포, 파골세포 등의 증식과 분화에 영향을 미치는 것으로 알려졌다¹⁰⁻¹². 이러한 TGF- β 는 현재까지 최소한 다섯 가지 이상의 종류가 알려져 있는데, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3는 사람을 포함한 많은 종에서 발견되었으며, TGF- β 4는 닭에서, 그리고 TGF- β 5는 양서류에서 발견되었다. 이들 모두는 64%에서 82%까지 아미노산의 배열이 같은 것으로 알려졌다¹⁰. 그 중에서도 TGF- β 1과 TGF- β 2는 모두 세포의 복제와 유전자의 표현, 그리고 단백질의 생성에 관여하여, 골과 연골의 생성을 조절하는 것으로 알려져 있다¹⁰. 또한 면역조직화학적 검사나 In situ hybridization의 방법에 의한 연구에 의하면 연골세포와 골모세포에 의한 TGF- β 의 생성이 관찰되며, 골막내 골 생성에서도 TGF- β 의 축적이 관찰되고 있다^{12,50}.

여러 실험에 의하면 다단백질 성장 인자인 TGF- β 는 골 조직 세포의 복제, 발생, 형태의 분화 등에 자극 또는 억제 효과를 나타내는 것으로 알려졌다며, 연골세포에 작용하여 Type II collagen 합성을 증가 또는 감소시키는 것으로 보고되었다. 이러한 양면적인 효과는 혈청 내의 농도, 세포의 근원과 노화 등의 차이에 의한다고 한다. 또한 TGF- β 의 작용은 다른 성장인자, 또는 홀몬 등에 의하여 영향을 받을 수 있다고 알려졌다⁵¹. 이에 따라 TGF- β 와 이에 관련된 물질의 기능을 이해하면, 골의 성장이나 골절 치유의 촉진에 이용할 수 있을 것이라 생각된다.

TGF- β 는 생체의 실험에서 농도에 따라 두 가지 상반된 작용을 나타내는 것으로 낮은 농도에서는 세포의 증식을 촉진하며, 높은 농도에서는 세포의 증식을 억제한다고 한다. 태아 조직에 있어서 TGF- β 는 간엽 세포의 분화, 골모세포의 증식, 골 기질의 합성 등을 자극하며, 골모세포, 연골세포, 파골세포에 작용하여 성숙을 유도하며 골과 연골에 특징적인 세포 기질 단백질의 합성을 촉진하는 작용이 있는 것으로 알려졌다⁵².

생체내에서 TGF- β 는 피하 창상의 DNA와 교원질 양을 증가시키며^{31,34}, 피하에 주입시 교원질의 섬유화를 일으키고, 백서에서 피부 절개 창상의 치유를 촉진시킨다고 하였다^{31,33,34}. Noda 등³⁶에 의하여 처음으로 TGF- β 가 골 형성을 촉진한다는 증거가 제시되었는데, TGF- β 1 μ g을 12일간 매일 신

생 백서 두정골막에 주사하여 형성된 신생골은 미성숙형이나 혈관이 잘 발달된다고 하였는데 이는 TGF- β 가 신생 혈관 잠재능 (angiogenic potential)과 관계된 것으로 생각되어진다. Joyce 등⁵³은 TGF- β 가 골절의 치유에도 중요한 작용을 하는 것으로 보고하였다. 즉 TGF- β 는 골절이 발생시 혈소판에서 분비되며 골절 치유 과정에서 골모세포 및 연골세포에서도 생성된다고 한다. 이러한 TGF- β 는 간엽세포의 생성을 자극하여 가골을 형성하고 연골내 골화를 유도한다고 하였다. 또한 TGF- β 를 20ng 및 200ng의 농도로 주입하였을 때, TGF- β 의 극소 농도가 골막 내 간엽 세포가 연골세포로 분화되거나 골모세포로 분화되는 과정에 영향을 미치는 것으로 보인다고 하였다^{50,52}. TGF- β 1이 어떠한 경로를 거쳐 연골 및 골의 생성을 촉진하는지는 알려지지 않았으나 화주성의 효과로 여겨지고 있다⁵¹.

생체에 적용하는 농도에 관하여는 다양한 방법이 있으나 크게 두가지로 적은 농도를 일정기간 반복 주사하거나 높은 농도를 1회 주사하는 방법으로 본 연구에서는 Marcelli 등⁵⁷의 연구 방법에 따라 5 μ g의 TGF- β 를 이식체와 같이 투여하여 TGF- β 의 효과를 기대하였다. 이러한 여러 가지의 보고에도 불구하고, TGF- β 를 대체골과 동시에 사용하여 골 형성에 어떠한 영향을 미치는지에 대한 보고는 거의 없었다. 따라서 본 논문에서는 이러한 영향을 규명하고자 하였다. 실험 성적을 크게 보아서 염증세포 침윤, 파골세포 활성화, 섬유성 결체조직의 성숙, 골유도 및 골전도를 병리 조직 검사와 면역조직화학적 검사로 확인한 결과 TGF- β 의 투여시 염증세포 침윤은 대조군 실험 1주, 2주에 많았고, 파골세포 활성화는 HA 단독 이식군 1주, 2주에 많이 나타났으나 4주 이후에는 군간에 차이가 없었으며 TGF- β 군의 실험 1주, 2주에서 염증세포 침윤이 적었으며 파골세포 활성화도 적었고 이식체 주위의 섬유성 결체조직의 성숙이 조기에 많이 관찰되었다. 그러나 증기 즉 6주에서 12주 이후에는 염증반응이나 파골세포 활성화에서 각군과 비교하여 큰 차이가 없어 주로 초기 반응에 영향을 주는데 이러한 결과는 성장인자의 투여 방법이나 횟수에 영향을 받는다고 생각되었다.

본 실험에서 HA 소공 주위로 혈관과 섬유조직이 침윤 및 성장이 관찰되었다. 이런 섬유조직의 유입이나 성숙이 대조군과 HA 단독 이식군에 비하여 TGF- β 군이 빠르고 많은 양이 관찰되었다. 즉 조직학적 소견에서 TGF- β 군의 4주 이후에 특히 잘 발달된 섬유 조직에 둘러싸여 있는 것을 볼 수 있으며, 이는 TGF- β 가 섬유모세포에서 섬유조직이 형성되는 기전에 영향을 주기때문으로 여겨진다.

본 실험에서 골유도의 경우를 살펴보면 TGF- β 를 투여한다 해도 골의 형성을 자극하며, 정상적인 골 조직으로 재형성되는 과정은 관찰할 수 없었는데 이는 Barnett 등⁵⁸이 보고한 다공성 수산화인회석은 이식체의 흡수상을 볼 수 없고, 골형성을 유도한다는 증거도 미약하며 단지 결손부를 채우는 충전

물의 역할을 한다고 보고한 것과 일치하였다. 그러나 백서의 두개골에서는 골 결손부의 크기도 골형성에 영향을 주었으리라 생각된다. 실험 2주, 8주, 12주로 경과됨에 따라 이식재 밖의 숙주골에서 신생골 형성을 관찰할 수 있었는데 골전도 측면에서 TGF- β 투여군 2주와 4주에 가장 많았으나 6주이후에는 군간 차이가 없었다. 따라서 TGF- β 는 초기 골형성에 어느 정도 관여하는 것으로 생각되며 TGF- β 의 투여 방법과 양에 따라 후기에도 연관이 있을 것으로 생각된다.

본 연구에서 조직 검사를 통하여, TGF- β 가 골개조 과정 및 골모세포의 증식에 긍정적으로 작용한 사실은 면역조직화학 검사를 통하여 TGF- β 1의 투여 여부에 관계없이 이식 치유과정의 진행에 따라 비교원 단백질인 osteonectin의 생성이 증가된다는 것을 미루어 알 수 있었다. 즉 대조군과 HA 단독 이식군 2주에서 숙주골의 골세포나 골모세포에서 osteonectin의 발현이 시작하였으나 결손부에서는 음성이었고, HA 단독 이식군과는 큰 차이가 없었다. TGF- β 2주에서는 인접 숙주골의 골세포나 골모세포에서 발현이 대조군이나 HA 단독 이식군보다는 증가된 중등도의 양상을 보였다. 실험 4주와 6주에는 대조군이나 HA 단독 이식군의 경우 이식체 내부나 결손부에서 osteonectin에 대한 발현이 없었고 주위골에서만 중등도의 발현을 보였으며 군간의 차이는 미약하였다. TGF- β 군에서도 4주까지만 숙주골에서 약간 많은 발현을 보였으나 6주에서는 군간의 차이가 없었다. 이식 8주와 12주에서는 osteonectin이 대조군 및 HA 양군의 비교 검사에서는 거의 발현이 이식부에서는 안되었으나 TGF- β 군에서만 HA 소공과 섬유성 결합조직이 접하는 부위에서 골 형성이나 골모세포가 없는데도 발현을 유지하고 있었다. 따라서 TGF- β 는 일반 조직검사서 관찰되듯이 골 조직의 견고성 유지에 필요한 섬유조직의 합성이나 면역 염색에서 관찰되는 비교원 단백질의 합성을 촉진시키는 것으로 본 연구에서도 생각되어 제1형 교원질이나 osteopontin 같은 비교원 단백질 증가를 보인다는 다른 연구와 유사한 결과를 보였다²⁹.

그러나 상기의 조직 검사 소견이 골모세포의 증식 때문인지 아니면 간엽 세포의 분화 때문인지는 불명확하였다. 본 실험에서는 시간의 경과에 따른 osteonectin과 osteocalcin의 양적인 변화를 관찰하려 하였으나, 이 검사가 정량적인 것이 아니고, 같은 골 내에서도 관찰하는 위치에 따라 발현이 높은 부위와 낮은 부위가 섞여 있는 관계로 실험 초기에 목표 하였던 시간의 경과 및 TGF- β 의 투여 여부에 따른 비교원 단백질의 절대적인 양의 변화를 비교 할 수는 없었다. 그러나 전체적으로 대조군과 실험군 모두에서 결손부나 이식부에서는 적어도 이식부 숙주골에서 풍부한 osteonectin의 분포를 관찰 할 수 있었으며, 이에 비교하여 극히 소량의 osteocalcin의 분포를 관찰 할 수 있었다.

본 연구에 사용된 수산화인회석은 동종돌이나 자가골에서 처럼 골유도 능력이 없기 때문에 osteonectin이나 osteocalcin

의 검출이 완전하지 못한 것으로 판단되어 골 조직 내에 분포하는 비교원 단백질을 노출시키어 반응시킬 수 있는 새로운 조직 처리법이 강구 되어야 할 것으로 보인다. 따라서 면역조직화학 검사로서 양적인 측정은 불가능하여 국소적인 분포의 비교에 있어서도 같은 시기에서의 비교나 정성검사 목적으로 의의가 있을 것으로 보이며, 양적인 측정은 단백질 수준에서의 Western blot, RNA수준에서 Northern blot 등과 같은 검사를 이용하는 것이 적절할 것으로 보인다.

본 연구 결과를 토대로 현재 임상에서 사용되고 있는 동종골이나 제조회사의 원칙대로 비흡수성 수산화인회석을 이식할 때 TGF- β 를 동시에 투여해 초기 및 중기에 우수한 효과를 얻을 수 있을 것으로 생각된다. 또한 골절이나 교정 치료 시 성장인자를 투여하는 것은 매우 유용한 결과를 얻을 수 있다고 생각되며, 추 후 이에 대한 면역 조직학적 검사 및 장기 투여에 따른 기간별, 농도별의 안정성 여부가 반드시 확인되어야 할 것이다.

결론적으로, 본 실험을 통하여 저자는 두개골에 골 결손시 비흡수성 수산화인회석을 이식할 때 TGF- β 가 골 형성에 중요한 역할을 담당하지만 임상에서 골 연장술이나, 골절, 교정등을 실시함에 있어서 TGF- β 투여 후 방사선사진, 골밀도 측정 또는 초음파 검사 등으로 손상이나 목적 부위의 골 형성 정도를 초기에 측정하여 골 형성이 부실한 경우 TGF- β 등의 국소적 성장인자의 투여가 신생골의 형성 및 유합을 촉진할 수 있으리라 생각된다. 저자는 골수 이식, 골 기질 단백질 이식, 자가 망상골 이식 등의 조작이 골 치유를 촉진 시키는 것처럼, TGF- β 1이 골의 유도 작용 및 골의 치유 과정에서도 형성을 촉진 시키는 작용이 있음을 확인할 수 있었다. 임상적으로 골의 결손, 지연 유합, 불유합, 골의 연장술 등 골의 형성 촉진이 필요한 경우에 이를 이용하여 긍정적인 효과를 얻을 수 있을 것으로 기대되며, 골 이식술의 대체 방법 및 초기 골절 치료나 이식에 있어서도 그 효과가 기대된다. 따라서 골 조직 내에서 적절한 농도를 일정 기간 유지할 수 있는 장치나 방법 등의 개발과 함께 이러한 분야에서의 응용에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

V. 결 론

구강악안면 영역에서 손상 악골을 성공적으로 치유시키고 손상 부위의 신생골 유도를 촉진 시킬수 있는 방법을 연구하고자 백서 두개골에 결손을 만들어 비흡수성 hydroxylapatite (HA)를 이식과 동시에 TGF- β 를 투여하여 TGF- β 가 골 대사에 어떠한 역할을 하는지를 알아보고자 조직 및 면역조직화학적 검사를 통하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 대조군 1주와 2주에 육아조직 형성이 다른 실험군에 비하여 많았으며, 실험 8주 및 12주에서도 골 결손부가 섬유조직으로 채워져 골유도는 모든 실험군의 이식부에서 관찰

- 되지 않았다.
2. 염증세포 침윤은 대조군 실험 1, 2주에 제일 많았고, 파골세포 활성은 HA 단독 이식군 1주와 2주에 가장 많이 나타났으나 4주이후에는 군간에 차이가 없었다.
 3. TGF- β 투여군 실험1, 2주에는 염증세포 침윤이 제일 적었으며 이식체 주위의 섬유성 결합조직의 성숙이 조기에 많이 관찰 되었다.
 4. 골전도는 TGF- β 투여군 2주와 4주에 가장 많았으나 6주이후에는 군간 차이가 없었다.
 5. Osteonectin 발현에서 이식부 자체는 TGF- β 투여군의 1주에서 6주에서만 경미하게 증가되었으며, 인접 속주골에서는 이식 4주까지만 HA 단독 이식군이나 대조군에 비하여 증가되었다.
 6. Osteoclastin 발현은 이식부에서 TGF- β 투여 4주에서만 다른 실험군에 비하여 증가되었으나 속주골에서는 실험군간에 차이가 없었다.
- 이상과 같은 소견으로 악안면 영역의 골 손상시 비흡수성 hydroxylapatite 이식과 동시에 TGF- β 의 투여는 염증반응 감소 및 간엽세포 증식을 가져와 초기 및 중기 골전도에 효과가 있어 인공치아 매식이나 골 결손부 회복시 임상적 적용이 가능하다고 생각된다.

참 고 문 헌

1. Kahn AJ, Partridge NC : New concepts in bone remodeling. An expanding role for the osteoblast. *Am J Otolaryngol* 8:258-282, 1987.
2. Nijweide PJ, EH Burger, JHM Feyen : Cell of bones. Proliferation, Differentiation, and Hormonal Regulation. *Physiol Rev* 66:855-886, 1986.
3. Canalis E, McCarthy T, Centrella M : The regulation of bone formation by local growth factors. On bone and mineral research Vol. 6 edited by Peck WA, p.27 Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam, 1989.
4. Canalis E, McCarthy TL, Centrella M : The role of growth factors in skeletal remodeling. *Endocrin. Metabol. Clin N Am* 18:903, 1989.
5. Terranova VP, Wikesj UME : Extracellular matrixes and polypeptide growth factors as mediators of functions of cell of the periodontium, *J Periodontol* 58:371-380, 1987.
6. Seyedin SM, TC Thomas, AY Thompson, DM Rosen, Piez KA: Purification and characterization of two cartilage-inducing factors from bovine demineralized bone. *Proc Natl Acad Sci USA* 82; 2267-2271, 1985.
7. Derynck R, Jarrett JA, Chen EY : Human transforming growth factor-beta cDNA sequence and expression in tumor cell lines. *Nature* 316:701-705, 1985.
8. Burgess AW : Epidermal growth factor and transforming growth factor-alpha. In: Waterfield MD, ed. *Growth factor*. *Br Med Bull* 45:401-424, 1981.
9. Derynck R, Jarrett JA, Chen EY, Goeddel DV : The murine transforming growth factor-beta precursor. *J Biol Chem* 261:4377-4379, 1986.
10. Assoian RK, Komoriya A, Meyers CA, Miller DM, Sporn MB : Transforming growth factor beta in human platelets. *J Biol Chem* 258:7155-7160, 1983.
11. Keski-Oja J, Leof EB, Lyons RM, Coffey RJ Jr, Moses HL : Transforming growth factor and control of neoplastic cell growth. *J Cell Biochem* 33:95-107, 1987.
12. Ignortz R, Massague I : Transforming growth factor-beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into extracellular matrix. *J Biol Chem* 261:4337-4345, 1986.
13. Radell BI, Cassingham RJ : A clinical evaluation of Proplast as a periodontal implant material. *J Periodontol* 51:110-155, 1980.
14. Alderman NE : Sterile plaster of paris as an implant in the infrabony environment : A preliminary study. *J Periodontol* 40:11-13, 1969.
15. Feingold JP, Chasens AL : Preserved scleral allografts in periodontal defects in man. Preparation, preservation and use. *J Periodontol*, 48:1-3, 1977.
16. Lery P, Nevins A, Laporta R : Healing potential of surgically induced periodontal osseous defects in animals using mineralized collagen gel xenografts. *J Periodontol*, 52:303-306, 1981.
17. Levin MP, Getter L, Cutright DE, Bhaskar SN : Biodegradable ceramic in periodontal defects. *Oral Surg* 38:344-357, 1974.
18. Yukna RA, Mayer ET, Brite DV : Longitudinal evaluation of durapatite ceramic as an alloplastic implant in periodontal osseous defects after 3 years. *J Periodontol* 55:633-669, 1984.
19. Holmes RE : Bone regeneration within a coralline hydroxylapatite implant. *Plastic Reconst Surg* 63:626-633, 1979.
20. Blitterswijk CA, Grote JJ, Kuyepers W, Blokvan Hoek, CJG, Daems WT : Bioreactions at the tissue/hydroxyapatite interface. *Biometer* 6:243-251, 1985
21. Penttinen RP, S Kobayashi, P Bornstein : Transforming growth factor β increases mRNA for matrix proteins both in the presence and in the absence of changes in mRNA stability. *Proc Natl Acad Sci USA* 84; 1105-1108, 1988.
22. Wergedal JE, S Mohan, M Lundy, DJ Baylink : Skeletal growth factor and other growth factors and other growth factors known to be present in bone matrix stimulate proliferation and protein synthesis in human bone cells. *J. Bone Min. Res.* 5; 179-186, 1990.
23. Noda M, Rodan GA. Type β transforming growth factor (TGF- β) regulation of alkaline phosphatase expression and other phenotype-related mRNAs in osteoblastic rat osteosarcoma cells. *J Cell Physiol* 133; 426-437, 1987.
24. Noda M, Camilliere JJ : In vivo stimulation of bone formation by transforming growth factor- β . *Endocrinology* 124; 2991-2994, 1989.
25. Guenther HL, Cecchini MG, Elford PR, Fleisch H : Effects of transforming growth factor type beta upon bone cell population grown either in monolayer or semisolid medium. *J Bone Min Res* 3; 269-278, 1988.
26. Ibbotson KJ, Orcht CM, Anglin AM, D' Souza SM : Effects of transforming growth factors β 1 and β 2 on a mouse clonal, osteoblastlike cell line MC3T3-E1. *J Bone Min Res* 4; 37-45, 1989.
27. Kim JG, SH Ko, HR Kim, GS Kim, DK Cheong : Effects of some growth factors on the bone nodule formation in rat calvaria cells. *J Dent Coll* 14:93-105, 1990.
28. Chenu C, Pfeilschifter J, Mundy GR, Roodman GD : Transforming growth factor- β inhibits formation of osteoclast-like cells in long-term human marrow cultures. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 5683-5687, 1988.
29. Oreffo ROC, Bonewald L, Kukita A, Garrett IR, Seyedin SM, Rosen D, Mundy GR : Inhibitory effects of the bone-derived growth factors osteoinductive factor and transforming growth factor- β on isolated osteoclasts. *Endocrinology* 126; 3069-3075, 1990.
30. Mustoe TA, Peerce GF, Thomason A. Gramates P, Sporn MB, Deuel TF : Accelerated healing of incisional wounds in rats induced by transforming growth factor beta. *Science* 237:1333-1336, 1987.
31. Sporn MB, Roberts AN, Shull JH, smith JM, Ward JM, Sodek J : Polypeptide transforming growth factors isolated from bovine

- sources and sued for wound healing in vivo. *Science* 219:1329-1337, 1983.
32. Lynch SE, Colvin RB, Antoniadis HN : Growth factors in wound healing. single and synergistic effects on partial thickness porcine skin wounds. *J Clin Invest* 84:640-646, 1989
 33. Lawrence WT, Norton JA, Sporn MB, Gorschboth C, Grot EGR : The reversal of an Adriamycin-induced healing impairment with chemoattractant and growth factors. *Ann Surg* 203:142-147, 1986.
 34. Sprugel KH, McPherson JM, Clowes AW, Ross R : Effects of Growth factors in vivo. I. Cell ingrowth into porous subcutaneous chambers. *Am J Pathol* 129:601-613, 1987.
 35. Sampath TK, Muthukumar N, Reddi AH : Isolation of osteogenin, an extracellular matrix-associated bone-inductive protein, by heparin affinity chromatography. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:7109-7114, 1987.
 36. Noda M, Camilliere JJ : In vivo stimulation of bone formation by transforming growth factor β . *Endocrinology* 124:2991-2994, 1989.
 37. Marcelli C, Yates AJ, Mundy GR : In vivo effects of Human Recombinant Transforming Growth Factor β on Bone Turnover in Normal Mice. *J Bone & Mineral Res* 5:1087-1096, 1990.
 38. Hock JM, Canalis E, Centrella M : Transforming growth factor β stimulates bone matrix apposition and bone cell replication in cultured fetal rat calvariae. *Endocrinology* 126:421-426, 1990.
 39. Canalis E, McCarthy T, Centrella M : Growth factors and regulation of bone remodeling. *J Clin Invest* 81: 277-293, 1988.
 40. Gustilo RB : Overview of fracture management. In Lane, J. M.(Ed.) : Fracture healing. London, Churchill Livingstone, p. 3-21. 1987.
 41. Baylink DJ, Mohan S, Linkhart SG, Fitzsimmons RJ, Linkhart TA, Farley JR : The potential role of bone-derived growth factors as determinants of local formation. In Rosenfeld, R. G., and Grumbach, M.M. :Turner syndrome. New York. Marcel Dekker. p. 267-298. 1990.
 42. Lane JM, Sandhu HS : Current approaches to experimental bone grafting. *Orthop Clin North Am* 18:213-225, 1987.
 43. Hulbert SF, Young FA, Mathews RS : Potential skeletal prostheses. *J Biomed Mater Res* 4:433-475, 1970.
 44. White E, Shors EC : Biomedical aspect of intercore 200 porous hydroxyapatite. *Dent Res* 62:148-154, 1983.
 45. Finn RA, Bell WH, Brammer JA : Interpositional grafting with autogenous bone and coralline hydroxyapatite. *J Dent Res* 62:148-154, 1983.
 46. Kenney EB, Lekovic V, Han T, Carranza FA, Dimitrijevic B : The use of a porous hydroxyapatite implant in periodontal defects I. Clinical results after 6 months. *J Periodontol* 56 82-88, 1985.
 47. Baldock WT, Hutchens JLH, Mcfall JWT, Simpson DM : An evaluation of TCP implants in human periodontal osseous defects of two patients. *J Periodontol* 56:1-7, 1985.
 48. Einhorn TA, Lane JM, Burstein AH, Kopman CR, Vigortita VJ : The Healing of Segmental Bone Defects Induced by Demineralized Bone Matrix. *J. Bone Joint Surg* 66-A:274-279, 1984.
 49. Sandberg M, Aro H, Multimaki P, Aho H, Vuorio E : In Situ Localization of Collagen Production by Chondrocytes and Osteoblasts in Fracture Callus. *J. Bone Joint Surg* 71-A:69-77, 1989.
 50. Carrington, JL, Roberts AB, Flanders KC, Roche NS, Reddi AH : Accumulation, Localization, and Compartmentation of Transforming Growth Factor β During Endochondral Bone Development. *J Cell Biology* 107:1969-1975, 1988.
 51. Joyce ME, Roberts AB, Sporn MB, Bolander ME : Transforming Growth Factor- β and the initiation of Chondrogenesis and Osteogenesis in the Rat Femur. *J Cell Biology* 110:2195-2207, 1990.
 52. Thompson NL, Flanders KC, Smith JM., Ellingsworth LR, Roberts AB, Sporn MB : Expression of Transforming Growth Factor- β 1 in Specific Cells-and Tissues of Adult and Neonatal Mice. *J Cell Biology* 108:661-669, 1989.
 53. Barnett JD, Mellonig JT, Gray JL, Towle HJ : Comparison of freeze-dried bone allograft and porous hydroxyapatite in human periodontal defects. *J Periodontol* 60:231-237, 1989.

사진부도 설명

Fig. 1. Microphotography of Bone remodeling according to graft type and duration.

-1; 1 week, -2; 2weeks. -3; 4 weeks, -4; 12 weeks.

A(Control group), B(HA only group), C(TGF-beta & HA group) $\times 100$

Fig. 2. Immunohistochemical expression of osteonectin according to graft type and duration.

-1; 1 week, -2; 2weeks. -3; 4 weeks, -4; 12 weeks.

A(Control group), B(HA only group), C(TGF-beta & HA group) $\times 100$

Fig. 3. Immunohistochemical expression of osteocalcin according to graft type and duration.

-1; 1 week, -2; 2weeks. -3; 4 weeks, -4; 12 weeks.

A(Control group), B(HA only group), C(TGF-beta & HA group) $\times 100$

저자연락처

우편번호 570-711

전라북도 익산시 신룡동 344-2

원광대학교 치과대학 구강악안면외과학교실

권혁도

원고 접수일 1998년 10월 31일

게재 확정일 1998년 11월 25일

Reprint requests

Hyuk-Do Kwon

Dept. of OMFS, School of Dentistry, Wonkwang Univ.

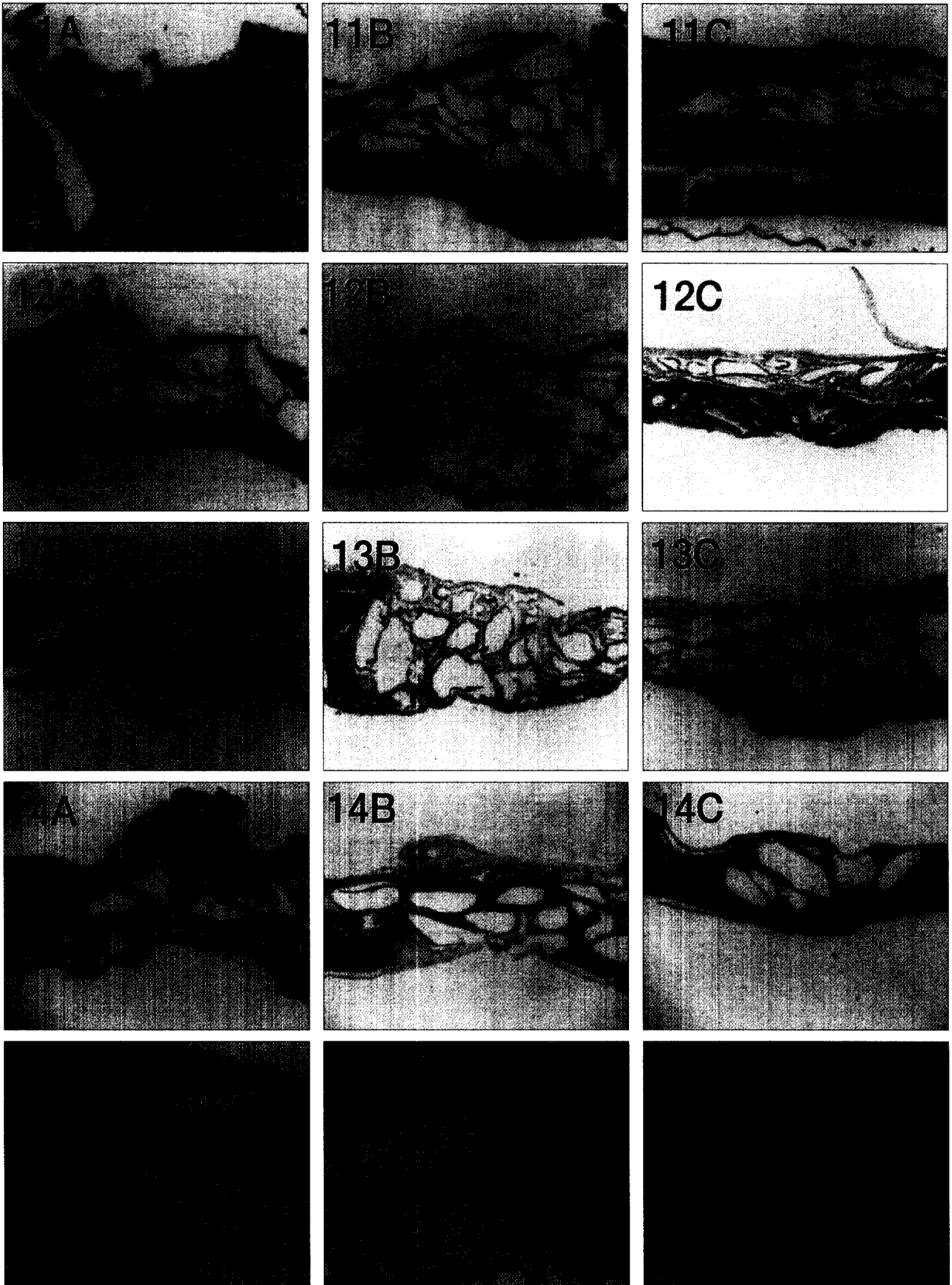
344-2, Sinyong-Dong, IkSan-City, Chunbuk, 570-711, KOREA

Tel. 850-1900~2 Fax. 857-4002

Paper received 31 October 1998

Paper accepted 25 November 1998

사진부도 ①



사진부도 ②

