

백서의 하악골 결손부 치유시 골형성단백질 2/4의 발현에 관한 연구

최재용 · 이상철

경희대학교 치과대학 구강악안면외과학교실

Abstract

IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY FOR THE EXPRESSION OF BMP-2/4 ON THE HEALING PROCESS IN THE MANDIBULAR BONE DEFECT OF RAT

Jae-Yong Choi, Sang-Chull Lee

Department of Oral and Maxillofacial Surgery, College of Dentistry, Kyung Hee University

Bone morphogenetic protein-2/4 are members of Transforming Growth Factor- β (TGF- β) superfamily and they may induce formation of cartilage and bone in vivo.

This study was performed to investigate the cellular target and period of action of BMP-2/4 and understanding of actions of BMP-2/4 at cellular level. The appearance of BMP-2/4 during healing of mandibular and periodontal defect in rat was evaluated immunohistochemically. 40 Sprague-Dawley strain white male rats, each weighing about 300gm were used. Bony defect was performed in the mandible and they were sacrificed at the day of 3rd, 10th, 20th, 30th after operation. The specimens were harvested and examined histologically and immunohistochemically by localization of anti-BMP-2/4.

The results were as follows:

1. Woven bone was observed at 10th day and perfect healing of defect with compact bone and periodontal ligament space at 30th day.
2. Osteoprogenitor cells, osteoblastic cells and periosteum were positive reaction to immunohistochemical stain at 10th day.
3. Cells of bone marrow space and surface cells of osteocytes and cementoblasts were positive reaction to immunohistochemical stain at 20th day.
4. Newly formed osteocytes and cementocytes were positive reaction to immunohistochemical stain at 30th day.

From the above findings, we could conclude that BMP-2/4 acted significant roles as factors of induction, proliferation and differentiation during bone healing process.

I. 서 론

구강악안면외과 의사들에게 있어서 악안면 영역의 선천적 기형, 외상, 종양 등의 수술 후 조직 결손부의 심미적 및 기능적인 완전한 수복을 위한 노력은 중요한 과제로 남아있다. 술후 결손부의 재건을 위한 다양한 연구가 진행되고 있는데 생체조직 중 골조직은 손상 후 재형성되어 완전한 재생을 이루는 조직이지만 골결손 부위의 크기에 따른 치유능력 차이의 문제점과 골의 재형성을 촉진시키기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다.

1965년 Urist가 수종의 산으로 탈회한 골기질을 근육과 피하에

이식 후 이소성 연골이나 골의 분화가 일어난다는 사실을 밝힌 이래 비교적 성 단백질인 골형성 유도인자에 대한 연구가 시작되었다¹⁾.

이러한 이소성 골형성 유도는 태생성 분화가 끝난 태생기 이후에도 미분화 골형성 전구세포를 분화시키는 물질이 존재한다는 것을 의미한다. 이들은 후에 골형성단백질(Bone Morphogenetic Protein : BMP)이라 명명되었으며²⁾ 탈회된 세포외골기질에서 태생기 이후에 발생한 손상의 치유시 태생기와 유사한 골분화를 일으킨다는 점에서 관심이 집중되었다. 그러나 이러한 골분화의 유도는 연속적인 연골과 골이 분화하는 태생기 골단의 골판에서와는 달리 한 주기의 연골내골형성 만이 일어나는 것으로 알려져 있다.

이 후 골형성 단백질의 추출 및 정제를 위한 많은 연구들이 시행되었으며^{3,4)} 기능적 생물검정을 통하여 천연의 골형성단백질이 정제되었고 분자 클로닝(molecular cloning)과 재조합된 인간의 골형성단백질의 발현으로 수종의 골형성단백질을 발견, 분류가 이루어지게 되었다⁵⁾. 인간의 분자 클로닝 방법이 알려진 후

이 상 철

130-702 서울 동대문구 회기동 1번지
경희대학교 치과대학 구강악안면외과학교실

Sang-Chull Lee

Dept. of OMFS, College of Dentistry, Kyung Hee University
1, Hoegi Dong, Dongdaemoon-Gu, Seoul, 130-702 Korea
Tel. 82-2-958-9440, 9441 Fax. 82-2-966-4572

BMP-2(BMP-2a), BMP-3 (Osteogenin), BMP-4(BMP-2b), BMP-5, BMP-6(Vgr-1), BMP-7(Osteogenic protein-1), BMP-8(Osteogenic Protein-2), BMP-9, BMP-10, Dpp (Decapentaplegic protein), GDP-10 (BMP-3b), BMP-12(GDF-7), BMP-13(GDF-6) 등 12종 이상의 골형성 단백질 및 성장과 분화요소로 분류되었으며 BMP-1을 제외한 이들은 일반적인 특성 뿐 아니라 아미노산 서열과 삼차원적인 구조가 유사하고 카르복시말단에 cysteine을 공유하는 등 Transforming Growth Factor (TGF)- β 와 유사성을 가지는 TGF- β 의 상과(superfamily)로 분류되었다^{6,10}. 아미노산 서열의 유사성의 정도로 이들은 다시 BMP-2/-4군, BMP-5/-6/-7/-8군, BMP-3/-12/-13군의 3개의 소군(subgroups)으로 나누어지며 BMP-9와 BMP-10은 분류가 확실치 않다^{10,11}. 각각의 골형성단백질들은 생체 및 시험관에서의 골형성능력에서 다양한 차이가 나타나고 천연의 골형성 단백질 뿐 아니라 재조합된 사람의 골형성단백질(rh BMP) 역시 국소적인 연골내골을 형성하며 유전자 서열도 유사하나¹² 천연의 골형성단백질이 더 강력한 골형성 작용을 하는 것으로 알려져 있다¹³.

다양한 방법을 이용하여 인간 및 실험동물로부터 골형성단백질의 추출이 이루어졌으며 이들 연구를 통해 골형성단백질이 골기질 뿐 아니라 골육중조직¹⁴, 상아질의 기질, 세포내 성분 및 세포의 성분에 존재하며¹⁵, 골형성시에 전구세포에 비가역적으로 작용하여 시험관내에서 연골을, 생체내에서는 연골과 골을 형성하는 유도 인자임이 밝혀졌다¹⁶.

골형성단백질은 다양한 실험 동물의 여러 부위에서 골조직의 손상시의 치유에 다양한 경로로 영향을 미치는 것으로 보고되었는데^{17,23} 농도가 높을수록, 실험동물의 연령이 낮을수록 그리고 인간의 재조합된 골형성단백질이나 다른 동물에서 추출한 골형성단백질보다 우골에서 추출한 것이 가장 강력한 작용을 하는 것으로 알려져있다^{13,16,24}.

여러 가지 골형성단백질 중 BMP-2/4군이 다른 군의 골형성단백질과 성장인자 등에 비하여 유전자 서열이 가장 유사하고 생체 및 시험관에서 낮은 농도에서의 골형성 능력이 뛰어나 골형성단백질의 골형성 유도를 검증하는 동물실험에서 많이 이용되고 있다^{6,11,24-31}.

BMP-2/4군을 특히 구강생물학자와 치주과 및 구강악안면외과의사들에게서 관심이 높는데 이는 BMP-2/4가 심장, 신경조직 뿐 아니라 치배, 상아모세포층, 구개궁 및 두개안면부조직의 발생에 기여하는 등 구강악안면영역의 발생에 많은 영향을 미치기 때문이다^{12,32}. 많은 연구를 통해 BMP-2/4가 치주조직에 가해진 손상의 치유과정에서 치근흡수를 방지하고 치아의 유착발생 등의 합병증을 줄여주며 치주인대와 백악질, 치조골의 생성을 촉진하는 등 치주조직의 재생에 영향을 미친다는 것이 확인되었다^{6,7,12,33,34}.

일반적인 BMP-2/4군의 특징은 다른 군의 골형성단백질에 비해 낮은 농도에서 생체에서 골형성을 유도하고 alkaline phosphatase(ALP)활성을 증가시키고³⁵ 교원질의 합성을 자극하고^{31,35} 시험관내에서 MC3T3, W-20-17 cell에서 골모세포화를 유도하며 골모세포와 골형성전구세포를 자극하여 골형성에 기여하고¹⁸ 쥐의

골모세포에서 DNA와 교원질 합성, 단백질 축적, ALP의 활성을 자극한다^{11,28,36-38}. Yamaguchi 등의 연구에서는 BMP-2가 골형성 전구세포의 증식과 분화는 자극하나 섬유모세포의 증식은 저하시킨다고 하였다³⁸.

Reddi 등의 가설에 의하면 BMP-3와 BMP-4가 단핵세포와 전구세포의 화학주성, 원층세포의 부착, 간엽세포의 분열, 연골모세포의 분화, 연골모세포의 증식과 석회화, 맥관형성과 혈관의 합입, 골모세포의 분화, 세포외조직의 생합성과 광화, 골흡수와 재형성, 소골내의 조혈골수의 분화 등의 복잡한 연골내 골화과정에서 단핵세포의 화학주성과 TGF- β mRNA의 분비를 자극하고 간엽세포의 화학주성과 이주를 자극하여 연골내 골화에 영향을 미친다고 알려져 있으며 이 인자들의 주 표적세포(cellular target)로 골형성 전구세포가 지목되고 있으나 아직까지 이 인자들이 기질의 어느 부분에 존재하는 지와 정확한 표적세포 및 작용기전에 대해서는 확인하지 못하였다^{11,32,39-42}.

이와 같이 골조직의 손상 후 골형성단백질이 치유과정에 미치는 영향에 대한 많은 실험과 연구가 시행되어 왔으며 이들의 추출 및 정제방법, 이들의 효과를 최대한으로 발휘할 수 있는 운반체 등에 대해서는 어느 정도 밝혀져 있으나 이들의 작용기전 및 표적세포에 대한 부분이 아직까지 밝혀지지 않은 부분 중 하나이다. 이를 밝혀내기 위해서는 이들의 위치를 가지적으로 확인하는 것이 필요한데 이를 위한 방법으로는 항체와 같이 세포에 특이성을 가지고 있는 표식자를 가진 항원-항체 반응을 이용한 면역조직화학염색을 실시하여 확인하는 방법이 많이 사용된다⁴³⁻⁴⁹.

이에 본 연구는 흰쥐의 하악골을 모델로 하여 치아 주위 조직을 포함한 하악골 손상의 치유 과정에서 BMP-2/4가 분포하는 세포 및 작용 시기를 연구하기 위해 이들 요소들의 발현부위를 가지적으로 확인하는 방법인 면역조직화학염색을 이용하여 이들의 분포를 연구함으로써 골형성단백질의 치과적 응용에 보탬이 되고자 하였다.

II. 실험 재료 및 방법

1. 실험 재료

실험동물로는 동일한 조건하에서 사육된 체중 300g 내외의 음성 Sprague-Dawley계 백서 40마리를 사용하였으며 이 중 20마리는 면역조직화학염색에, 나머지는 일반조직 절편제작에 사용하였다.

2. 실험 방법

Ketamine (유한, 한국) 0.12cc (0.4ml/kg)를 동물의 복강내 주사하여 전신 마취시키고 실험동물의 좌측 하악골의 하연을 따라 길이 4~5mm의 절개를 하여 피부와 근육을 근육으로부터 분리하고 교근이 나올 때까지 박리 후 교근의 정지 부위를 절개하고 골막기자로 교근을 하악 대구치의 치조정 부위까지 박리하여 하악 제1, 2, 3대구치의 치조 돌기부위가 노출되도록 하였다.

저속 round bur (No.4, 700rpm)를 사용하여 하악 제1대구치의 근심 치근부위의 치조 돌기로부터 시작하여 약 3~4mm의 길이와 근심 치근 및 협측 치근이 노출될 때까지의 깊이로 창상을 형성하였다.

수술이 끝난 후 수술 부위를 봉합하고 감염방지를 위하여 gentamycin을 하루 1회씩 3일간 근육내 주사하고 수술 3, 10, 20 및 30일 째에 일반 조직 관찰용 5마리와 면역 조직 관찰용 5마리씩 한 군당 10마리를 희생하였다.

3. 일반 조직 절편 제작

각 실험 동물을 ketamine(유한, 한국) 0.12cc (0.4ml/kg)을 실험 동물의 복강내 주사하여 전신 마취시키고 2.5% glutaraldehyde (pH 7.4)로 심장 관류 고정을 하였다. 수술한 하악골을 적출하고 같은 용액에 4시간 더 고정하였다. 그 후 구강 점막 이외의 불필요한 연조직을 제거하고, 0.1M 인산완충용액 (pH 7.4)으로 30분간 수세하여 0.1M 인산완충용액에 희석시킨 10% EDTA (pH 7.4)로 4°C에서 7일간 탈회하였다. 일련의 ethanol로 탈수한 후 propylene oxide를 거쳐 Epon 포매 박절기(RMC MTX USA)로 1 μ m의 준박 절편을 제작하였다.

조직 절편을 건조시킨 후 1% alkaline toluidine blue 용액을 절편에 떨어뜨려 염색하였다. 따뜻한 물로 남은 염색액을 세척해 낸 후 봉입하여 광학현미경으로 관찰하였다.

전자현미경 관찰을 위해 포매된 시료를 RMC MTX 초박절편기로 600~900Å로 잘라 uranyl acetate와 lead citrate로 이중 전자 염색한 후 Jeol 1010 투과 전자현미경으로 관찰하였다.

4. 면역 조직 화학 염색

탈회가 끝난 조직을 0.1M 인산완충용액 (pH 7.4)으로 30분간 수세한 후, 10% sucrose에 5시간, 15% sucrose에 5시간, 20% sucrose에 24시간, 30% sucrose용액에 24시간 동안 침지시켰다. 조직을 OCT compound로 embedding 하고 액체질소에 급속 냉동시킨 후, cryostat (Reichert-Jung, Germany)로 10 μ m의 두께로 절편을 제작하였다. 내재성 과산화효소를 불활성화시키기 위해 메탄올에 희석한 0.5% H₂O₂로 실온에서 30분간 처리하였다. 0.01M phosphate buffered solution(PBS)으로 10분씩 2회 수세한 후, 비특이적 반응을 방지하기 위해 Rabbit 정상 혈청으로 20분간 반응시켰다. 여분의 혈청을 제거해 내고, 조직절편에 일차항체로서 goat anti-rat BMP-2.4 항체를 25°C에서 2시간 반응시켰다. 0.01M PBS로 5분씩 3회 수세한 후, 이차항체로서 biotinylated rabbit anti-goat IgG를 실온에서 30분 반응시켰다. 0.01M PBS로 5분씩 2회 수세 후 avidin-biotin conjugate reagent로 실온에서 30분간 작용시켰다. 절편을 0.01M PBS로 5분간 수세하고, 마지막으로 0.1M Tris-HCl buffer(pH 7.2)에 희석한 0.02% diaminobenzidine tetrahydrochloride(DAB)와 0.02% H₂O₂를 혼합한 후 적용하여 암조건에서 5분간 반응시킨 후 흐르는 물에 10분간 수세하고 수용성 봉입제로 봉입하여 광학현미경으로 관찰하였다.

III. 실험 성적

1. 수술 3일 째

손상부위는 상처의 범위를 나타내는 매끈한 경계선에 의해 조직학적으로 명확하게 구별되었고 길쭉한 섬유모세포를 가진 미성숙 결합조직으로 채워져 있었으며 가끔 염증세포 침윤이 군데군데 관찰되었다(Fig. 1).

BMP-2/4 항체를 이용한 면역염색에는 음성반응을 보였다.

전자현미경 관찰에서 손상부위의 세포는 길고 납작한 섬유모세포로서 많은 세포들이 밀집되어 있었다. 세포핵은 긴 방추형이며 세포질에는 과립세포세망, 사립체, 자유리보솜체 등 대다수 소기관의 발달이 미약하였다. 그 주위에는 소량의 아교섬유가 성글고 불규칙하게 배열되어 있었다(Fig. 2).

골모세포의 전자현미경 소견은 입방형으로 그 표면에는 약간의 세포돌기가 형성되어 있었으며 골침의 표면을 따라 배열되어 있었다. 핵은 대체로 둥글고 뚜렷한 핵소체를 가지고 있었으며 세포질에는 잘 발달된 골지장치와 과립세포질세망, 많은 사립체, 작은 용해소체, 자유리보솜체, 분비소포 등 대다수 소기관들이 잘 발달되어 있었으며, 이웃하고 있는 골모세포 돌기사이에는 교통연접이 형성되어 있었다(Fig. 3).

2. 수술 10일 째

미성숙 과상골이 처음 생겨났다(Fig. 4). 아교섬유 다발이 불규칙하게 얽혀 있어 층판은 형성하고 있지 않으며 많은 수의 골세포들이 아교섬유사이에 무질서하게 분포된 바늘모양의 골침이 형성되어 있었다. 골침의 곁에는 중간엽세포로부터 분화된 골모세포가 둘러싸여 있었다(Fig. 5). 손상 받지 않은 주변 골의 바깥 면을 덮고 있는 골막은 두꺼운 치밀 결합조직층으로 구성되어 있고 그 속층은 혈관이 풍부하고 골모세포가 엉성하게 배열되어 있었고, 바깥 층은 소수의 섬유모세포로 구성된 섬유결합조직으로 구성되어 있었다(Fig. 6).

BMP-2/4 항체를 이용한 면역염색에 의해 신생 골모세포와 그 주변 골발생세포, 골막이 양성반응을 보였다(Fig. 7, 8).

3. 수술 20일 째

골침은 부가성장으로 커져 골주를 이루고 이들이 부분적으로 붙어서 망상의 해면골조직이 관찰되었다(Fig. 9). 신생 골의 해면골사이에 형성된 골수공간은 세포성 결합조직으로 구성되어 있었고 이 세포들은 섬유모세포와 닮은 납작한 모습의 세포로 골 표면을 따라 배열되어 있고 그 주위에 다각형세포가 채워져 있었다(Fig. 10). 삭제된 치주공간의 미분화 중간엽세포들이 집결되어 노출된 치근을 덮었고 새로 형성된 아교섬유의 방향은 불규칙적이었다. 치근부위에서 골과의 유착은 관찰되지 않았다(Fig. 11).

BMP-2/4 항체를 이용한 면역염색에 의해 골수공간의 세포들과

신생백악질의 주변과 표면의 세포들이 양성반응을 보였다(Fig. 12, 13).

골수 공간의 전자현미경 소견에서 많은 돌기를 가진 입방형 또는 약간 납작한 세포로서 일차 골수 공간 내면을 따라 배열되어 아교섬유와 기질을 형성하고 있었다(Fig. 14).

치주 공간의 전자현미경 소견에서 치근 표면에 인접한 세포는 백악모세포로 분화되어 크기가 커졌고 단백질의 합성 및 분비와 관련된 모든 세포 소기관들이 발달되어 있었다(Fig. 15).

4. 수술 30일 째

주변은 치밀골로 싸여있고 기능적으로 배열된 아교섬유를 가진 치주인대공간이 유지된 완전한 손상치유가 관찰되었다(Fig. 16). 발생 중인 해면골의 길을 싸고 있는 결합조직이 치밀해졌고, 이 속에 입방형 골모세포가 등근 핵과 뚜렷한 핵소체를 가지고 특징적으로 골 표면을 따라 관상으로 배열되어 있었다(Fig. 17). 주변 손상받지않은 치주인대와 마찬가지로 결합조직부착이 치면에 평행하게 부착되었고 종종 기능적으로 주행하는 아교섬유가 관찰되었다. 간혹 Malassez상피 잔사와 유사한 상피세포섬이 치주인대공간에서 관찰되었다(Fig. 18).

BMP-2/4 항체를 이용한 면역염색에 의해 골모세포와 새로 발육된 세포성 백악질에 있는 백악세포가 양성반응을 보였다(Fig. 19, 20).

IV. 총괄 및 고안

골조직은 물리적 요구에 반응하여 지속적인 흡수와 재형성이 일어나는 복합조직으로서 연조직이 손상시 섬유성 반흔조직으로 치유되는데 반해 골조직은 손상시 치유와 재생에 뛰어난 능력을 가지고 있으며 이 때에 태생기의 막내골형성 기전처럼 치유가 된다는 것은 잘 알려진 사실이다. 이러한 골흡수와 골재생이 동시에 일어나는 골조직의 치유 과정에는 국소적인 성장인자와 분화인자, 세포외기질, 호르몬 그리고 아직까지 밝혀지지 않은 미지의 요소들이 작용한다²⁹. 이 중 호르몬의 작용은 널리 연구되어 왔으며 최근에는 성장인자에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 과거에는 이들 성장인자들도 전신적으로 작용하는 것으로 알려져 왔으나 최근의 연구에서 그들이 세포성장기에 국소적으로 작용하고 소실되는 초기 조절자임이 밝혀졌다. 또 골세포는 다양한 성장인자를 합성하고 골기질은 이들의 풍부한 자원이 되는 것으로 알려져있다^{30,31}.

Bolander 등은 손상받은 골조직의 치유과정을 조직학적으로 4 단계로 나누고 각 단계별로 여러 가지 성장인자가 영향을 미치는 세포에 대한 면역염색을 실시하였는데 1단계는 손상후 나타나는 조직의 염증반응으로 혈종이 형성되고 미분화 간엽세포들의 이주와 증식이 일어나며 주변의 다형핵백혈구와 대식세포 및 염증세포들이 혈종주위에서 육아조직을 형성하는 단계로 섬유성 골막이 TGF- β 에 양성반응을 보이며 2단계는 막내골화 단계로 초기에 나타난 간엽세포에서 분화된 것으로 믿어지는 연골모

세포들이 막내골을 형성하며 골모세포가 TGF- β 에 양성을 나타냈다. 3단계는 연골화 단계로 연골외세포들은 조혈세포와 내피세포들에 의해 혈관화가 일어나고 연골세포와 연골기질에서 TGF- β 에 양성반응을, 4단계는 연골내 골화단계로 태생기와 성장판에서의 골형성 과정과 유사한 과정을 거쳐 연골에서 골로 대체되는 단계로 증식된 연골세포와 석회화된 연골기질이 TGF- β 에 양성반응을 보인다고 하였다³². 본 연구에서는 백서의 하악골과 치아주위에 정상적으로 치유 가능한 크기인 1×3mm의 창상을 형성하여 치유과정을 관찰하였으며 40중례 모두에서 정상적인 치유양상을 관찰할 수 있었다. 수술 3일 째에서는 다수의 염증세포와 미성숙 결합조직으로 채워져 있어 Bolander 등이 기술한 치유 1단계와 같은 소견을 보였으며 시간이 지남에 따라 연골모세포들에 의한 미성숙 파상골과 골침이 발생하고 망상의 해면골조직이 나타난 후 30일 째에는 치밀골로 싸여있는 완전한 손상치유가 이루어져 Bolander 등의 연구와 부합되는 양상을 관찰할 수 있었다.

본 연구에서는 골조직의 손상 치유시 세포의 변화를 알아보기 위해 투과 전자현미경적인 관찰도 시행하였는데 3일째 대다수 미약한 발달을 보이던 소기관들이 20일째 단백질의 합성 및 분비와 관련된 모든 세포 소기관들이 발달되어 정상적인 세포질의 소견을 보여 손상 치유시의 나타나는 세포학적인 치유양상을 관찰할 수 있었다. 이는 Lee 등이 막내골 골질의 치유과정의 투과 전자현미경을 이용한 세포학적인 연구를 시행하여 죽어 없어지는 세포와 증식하는 세포의 균형, 즉 흡수와 재형성의 과정을 통해 골질의 치유가 일어나며 이때의 투과 현미경을 사용하여 밝힌 세포내의 소기관의 발달과정과 유사하였다³³.

이러한 일련의 정상적인 자연 치유 과정은 미분화 간엽세포가 어떠한 요소에 의해 골격조직을 이루는 골모세포, 연골세포, 골기질세포로 분화됨으로써 이루어지게 되는데 이들 세포에 골형성단백질이 미치는 영향에 대한 연구가 선학들에 의해 이루어져왔다. 이 중 특히 골모세포를 대상으로 많은 연구가 진행되고 있는데 Wada³⁴와 Erickson³⁵ 등의 연구에 의하면 골모세포가 Alkaline Phosphatase(ALP)의 활성을 높여주고, 부갑상선 호르몬(PTH)에 대한 감수성이 있으며, 교원질과 Osteocalcin과 같은 비교원질성 단백질을 합성하는 등의 작용을 하며 생체 및 시험관에서 석회화된 골을 형성하는 것으로 알려져 있으며 이러한 골형성 과정에 있어서 지금까지 알려진 여러 종의 골형성단백질이 각각 다른 표적세포에 작용하여 연골화 및 골화의 다양한 시기에 작용하여 골모세포, 연골모세포의 분화의 조절자로서의 역할을 하는 것으로 알려져 있다³⁶.

최근의 연구는 생체내에 내재성으로 존재하고 있는 것으로 밝혀진 골형성단백질이 작용 시기와 표적세포를 확인하고 골조직과 치주조직의 치유 기전을 밝히는데 많은 노력이 경주되고 있다. Lianjia 등은 골형성단백질이 정상 골조직의 교원섬유, 골막세포, 골수내의 간엽세포에서 강하게, 층판골의 골세포와 석회화된 골기질에서 약하게 발현되고 인간의 상아전질, 법랑상피의 내,외층 등의 법랑기관에 존재함을 보고하였으며 이외에도 골육종과 연골육종에도 존재함을 확인하여 이와 같은 방법이 골육종

과 기타 다른 골절환의 진단과 치료, 예후의 판단에 도움을 줄 수 있을 것이라고 하였다⁴²⁾. Jin 등도 골육종과 섬유육종의 감별진단에 이용할 수 있다고 하였다⁵⁰⁾.

일반적인 골형성단백질은 태생기의 골격발생기에 나타나는 것으로 알려져 있으나 BMP-2/4의 경우 골격기관 이외에 별도로 태생성 외피, 간엽세포 및 신경조직에서도 발견되었다. 이들은 골절의 치유시 특별한 세포에서 나타나는데 TGF- β 가 연골형성을 방해하는데 반해 BMP-2/4의 분비로 인해 이들 방해를 극복하고 연골모세포의 기시 및 분화가 일어나는 것으로 알려져 있다. BMP-2/4는 골기질내의 전구세포로부터 골모세포로의 분화에 관여하는데 시험관 실험에서 골형성전구세포가 근세포로 분화되는 것을 막고 골모세포로의 분화를 유도하는 것이 밝혀졌다³⁹⁾.

치주조직 및 치근 부위의 치유과정에 있어서의 BMP-2/4의 영향도 여러 문헌을 통해 입증되었는데^{6,7,12,33,34)} Sigurdsson 등은 BMP-2/4가 치주인대와 백악질의 재생에 영향을 미치며 치근의 흡수도 감소시켜 치주조직의 재생에 중요한 역할을 한다고 하였으며⁷⁾ Ripamonti 등은 치주인대에서 발견되는 골모세포, 백악모세포의 전구세포들이 치조돌기에서 유래하며 골형성단백질은 교원기질에서 발생되어 외과적으로 형성된 창상의 치주조직의 치유에 영향을 미친다고 하였다^{12,34,57)}. King 등은 BMP-2의 사용으로 정상적인 막내골 형성율을 높일 수 있었으며 선택적으로 치유 초기단계에서 백악질의 재생을 증진시킬 수 있었다고 보고하였다³⁹⁾. 본 실험에서도 20일 째와 30일 째의 소견에서 미분화 중간엽세포들이 집결되어 노출된 치근을 덮은 후 이들이 치주인대로 분화하는 정상적인 치유 양상을 관찰할 수 있었으며 이 기간 중 백악모세포와 신생 백악세포에 BMP-2/4가 분포함을 확인할 수 있었다.

이와 같이 골 손상후의 치유과정에서 골형성단백질이 내재성으로 존재하는지의 여부, 작용하는 시기와 표적세포, 이들의 작용기전을 알기 위해서는 이들의 위치를 가시적으로 확인하는 것이 필요한데 이를 위한 방법으로는 항체와 같이 세포에 특이성을 가지고 있는 표식자를 사용하여 항원-항체 반응을 이용하는 면역조직화화법을 이용함으로써 이들 인자의 존재를 가시적으로 확인하는 방법이 많이 이용되고 있다⁴³⁻⁴⁹⁾.

내재성 골형성단백질의 정상적 및 비정상적 상황에서의 발현에 대한 연구로는 Wozney 등이 치아의 발달 단계별 골형성단백질의 분포 연구에서 BMP-2/4가 초기 종상기(bell stage)에 내법랑상피에서 나타나 간엽세포가 상아모세포와 법랑모세포로 분화하는 과정을 자극하여 상아질과 법랑질의 형성에 기여한다고 하였고¹⁰⁾, Wada 등은 백서두개골의 발달 과정에서의 BMP-2/4의 발현에 대한 시험관 연구를 통해 미석회화 초기 결절이 형성된 5일째 소수의 양성반응을 보이는 세포가 나타나기 시작하여 석회화 결절이 형성되는 10일과 15일에서 강한 양성반응을 관찰함으로써 이들이 골모세포의 석회화에 중요한 역할을 함을 밝혀냈다⁵⁰⁾.

Lianjia 등은 가토 하악골의 골절시의 골형성단백질의 분포연구에서 3일 째에 혈종을 이루는 간엽세포에서 강하게 염색되고, 7일 째에 골막주위와 골수내에 강하게 염색되는 세포들이 보이

며 14일 째에 골모세포, 신생 연골과 골에서 강한 양성반응을, 21일 째부터 간엽세포의 양성반응이 줄기 시작하여 완전한 치유가 일어난 30일 째에는 반응하는 세포가 거의 없어짐을 발견하였다⁴²⁾.

Urist 등의 가토의 귀에 부여한 손상의 치유시 내재성 골형성단백질의 분포에 관한 연구에서 14일 째에는 연골막에서 약하게, 간엽세포와 혈관주위조직에서 강하게 반응하였으며 3주 째에는 반응하지 않던 유리연골(hyaline cartilage)이 5주 째에 강하게 반응하는 골조직으로 대체되는 것을 관찰하였다. 5주 째에는 연골이 거의 대부분 혈관화가 잘 이루어진 막골로 대체되어 세포질내에만 염색되고 8주 째에는 골막과 혈관 주위조직에서만 양성반응을 보이는 것을 관찰하였으나 이들의 수용기나 신호전달기전에 대해서는 명확한 증거를 발견하지 못하였다⁵⁰⁾.

Yazaki 등이 시행한 신생 백서의 대퇴골의 골단 성장판에서의 골형성단백질의 발현 연구에서 증식되고 성숙하고 있는 연골모세포에서 강한 양성반응을 보여 연골내골화에 중요한 역할을 함을 밝혀냈다³⁹⁾. Nakase 등은 BMP-4에 대한 연구에서 쥐의 장골골절시 분화가 덜된 골형성 전구세포와 가골 형성 조직에서 많이 발생하여 골절의 초기 치유과정에 많은 기여를 한다고 하였다⁵⁰⁾.

본 연구에서도 초기에 해당하는 3일 째에서는 골형성단백질의 발현을 확인할 수 없었으나 수술 10일 째에 골발생세포, 신생 골모세포, 및 골막에 양성반응을 확인함으로써 골형성단백질이 골손상의 초기 단계에서 골발생세포를 자극하여 골모세포로의 분화를 자극하고 골막에서의 골형성에 기여한다는 Lianjia, Yazaki, Urist의 연구 결과와 일치되는 소견을 볼 수 있었으나 골형성단백질의 발현시기의 차이는 다소 있었으며 이러한 차이는 실험동물과 실험부위가 다르기 때문으로 생각된다. 수술 20일 째에 골수공간의 기질을 이루는 세포와 신생백악질 세포들이 양성반응을 보여 이들이 Wozney 등의 연구에서 태생기의 치근과 치주조직의 발달 양상과 마찬가지로 치근 손상시에도 삭제된 치근의 백악질의 재생에 영향을 미침을 확인할 수 있었다. 30일 째에는 새로 발육된 골기질의 골세포와 세포성 백악세포가 양성반응을 보였으나 성장이 완성된 골세포에서는 음성 반응을 보여 골형성단백질이 골형성시에 미분화 간엽세포 및 골형성 전구세포에서 발생되어 골모세포 및 백악모세포의 분화와 증식에 관여하고 완전한 치유가 끝난 후 소멸됨으로써 골조직 및 치주조직의 손상치유시 태생기의 골발생과 같은 양상을 보였으며 구강악안면외과 영역의 골 및 치주조직의 치유에 있어서 많은 영향을 미침을 알 수 있었다.

저자의 실험에서 골과 치아 주위 조직 손상후의 치유과정에서 BMP-2/4가 내재성으로 존재하며 치유 기간이 경과함에 따라 주로 발현되는 세포가 다른 것을 확인할 수 있었으나 3일 군에서는 BMP-2/4의 발현을 확인할 수 없었다. 따라서 손상 직후의 치유과정에 영향을 미치는 다른 성장인자 또는 골형성단백질이 작용하는지의 여부를 알기 위해서는 TGF- β 등 다른 성장인자와의 관련성을 알아보기 위한 특이성이 있는 항체의 개발을 통한 세밀한 연구가 계속 필요할 것으로 생각되었다.

V. 결 론

골형성 유도인자로 알려진 골형성단백질 2/4 (BMP-2/4)가 백서의 하악골과 치아 주위 조직 손상의 치유시 작용하는 시기와 작용 세포를 알아보기 위하여 일반조직염색과 면역조직화학염색을 실시하여 광학현미경과 전자현미경으로 검경하여 다음의 결과를 얻었다.

1. 하악골 치유과정에서 술후 10일 제, 미성숙 파상골이 처음 생겨났으며 술후 30일 제, 주변이 치밀골로 싸이고 치주인대 공간이 유지된 완전한 손상치유가 관찰되었다.
2. 술후 10일 제, BMP-2/4 항체를 이용한 면역 염색에 의해 골발생세포, 신생 골모세포 및 골막이 양성반응을 보였다.
3. 술후 20일 제, BMP-2/4 항체를 이용한 면역 염색에 의해 골수 공간의 세포, 신생 골과 신생백악질 표면세포들이 양성반응을 보였다.
4. 술후 30일 제, BMP-2/4 항체를 이용한 면역 염색에 의해 새로 발육된 골기질의 골세포와 세포성 백악질에 있는 백악세포가 양성반응을 보였다.

이상의 결과로 BMP-2/4는 골조직의 형성과정에서 세포의 유도, 증식 및 분화과정에 분비되어 중요한 역할을 하는 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Urist MR : Bone Formation by autoinduction. *Science*. 150:893-899, 1965.
2. Urist MR and Strates BS : Bone morphogenetic protein. *J Dent Res*. 1392-1406, 1971.
3. Wang EA, Rosen V, Cordes P, et al. : Purification and characterization of other distinct bone inducing factors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 85:9484-9488, 1988.
4. Luyten FP, Cunningham NS, Ma S, et al. : Purification and partial amino acid sequence of osteogenin, a protein initiating bone differentiation. *J Biol Chem*. 264:13377-13380, 1989.
5. Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, et al.: Novel regulators of bone formation: Molecular clones and activities. *Science*. 242:1582-1534, 1988.
6. King GN, King N. and Hughes FJ : The effect of two delivery systems for recombinant human bone morphogenetic protein-2 on periodontal regeneration in vivo. *J Periodont Res* 33:226-236, 1998.
7. Sigurdsson TJ, Lee MB, Kubota K, et al. : Periodontal repair in dogs: recombinant human bone morphogenetic protein-2 significantly enhances periodontal regeneration. *J Periodontol*. 66:131-138, 1995.
8. Celeste AJ, Iannazzi JA, Taylor RC, et al. : Identification of transforming growth factor- β family members present in bone-inductive protein purified from bovine bone. *Proc Natl Acad Sci USA*. 87:9843-9847, 1990.
9. Sampath TK, Coughlin JE, Whetstone RM, et al. : Bovine osteogenic protein is composed of dimers of OP-1 and BMP 2A, two members of TGF- β superfamily. *J Biochem*. 265:13198-13205, 1990.
10. Åberg T, Wozney J and Thesleff I : Expression patterns of bone morphogenetic proteins(Bmps) in the developing mouse tooth suggest roles in morphogenesis and cell differentiation. *Dev Dyn*. 210:383-396, 1997.
11. Hughes FJ, Clooyer J, Stanfield S, Goodman S : The effects of bone

- morphogenic protein-2,4, and 6 on differentiation of rat osteoblastic cells in vitro. *Endo*. 136:2671-2677, 1995.
12. Ripamonti U and Reddi AH : Periodontal regeneration : Potential role of bone morphogenetic proteins. *J Periodont Res*. 29:225-235, 1994.
13. Wang EA, Rosen V, D' Alessandro JS, et al. : Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation. *Proc Nat Acad Sci USA*. 87:2220-2224, 1990.
14. Bauer FC and Urist MR : Human osteosarcoma derived soluble bone morphogenetic protein. *Clin Orthop*. 154:291-295, 1981.
15. Bessho K, Tagawa T and Murata M : Purification of rabbit bone morphogenetic protein derived from bone, dentin and wound tissue after tooth extraction. *J. Oral Maxillofac Surg*. 48:162-169, 1990.
16. Ferguson D, Davis WL, Urist MR, et al. : Bovine bone morphogenetic protein (bBMP) fraction-induced repair of craniotomy defects in the rhesus monkey (*Macaca speciosa*). *Clin Orthop*. 219:251-258, 1987.
17. Lindholm TC, Lindholm TS, Alitalo I and Urist MR : Bovine bone morphogenetic protein(bBMP) induced repair of skull trephine defects in sheep. *Clin Orthop*. 227:265-268, 1988.
18. Urist MR, Nilsson O, Rasmussen J, et al. : Bone Regeneration under the influence of a bone morphogenetic protein (BMP) beta tricalcium phosphate (TCP) composite in skull trephine defects in dogs. *Clin Orthop*. 214:295-304, 1987.
19. Gerhart TN, Kirder-Head CA, Kriz MJ, et al. : Healing segmental femoral defects in sheep using recombinant bone morphogenetic protein. *Clin Orthop*. 293:317-326, 1993.
20. Park YW, Lee JH, and Kim SK : An experimental study on the bone induction activity of the porcine bone matrix-derived bone morphogenetic protein. *J Korean academy plas. Recon Surg*. 19:265-283, 1997.
21. Oh DW, Lee SH, and Shin HI : Histological evaluation of the ectopic bone formation induced by partially purified BMP-fibrous glass membrane complex. *J Korean academy Oral Maxillofac Surg*. 22:86-97, 1996.
22. Lee JH and Vang MS : Prefabricated neo-osseous flap design using bovine bone morphogenetic protein(bBMP). *J Korean academy Oral Maxillofac Surg*. 21:25-35, 1995.
23. Nakahara H, Takaoka K, Koexuka M, et al. : Periosteal bone formation elicited by partially purified bone morphogenetic protein. *Clin Orthop Rel Res*. 239: 299-305, 1989.
24. Schimandle JH, Boden SD and Hutton WC : Experimental spinal fusion with recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Spine*. 20:1326-1337, 1995.
25. Yasko AW, Lane JM, Fellingner EJ, et al. : The healing of segmental bone defects, induced by recombinant bone morphogenetic protein (rhBMP -2). A radiographic, histological, and biochemical study in rats. *J Bone Joint Surg*. 74A:659-670, 1992.
26. Paralkar VM, Hammonds RG and Reddi AH : Identification and characterization of cellular binding proteins (receptors) for recombinant human bone morphogenetic protein-2B, an initiator of bone differentiation cascade. *Proc Natl Acad Sci USA*. 88:3397-3401, 1991.
27. Thies RS, Bauduy M, Ashton BA, et al. : Recombinant human bone morphogenetic protein-2 induces osteoblastic differentiation in W-20-17 stromal cells. *Endocrinology*. 130:1318-1324, 1992.
28. Takuwa Y, Ohse C Wang EA, et al. : Bone Morphogenetic protein-2 stimulates alkaline phosphatase activity and collagen synthesis in cultured osteoblastic cells MC3T3-EL. *Biochem Biophys Res Commun*. 174:96-101, 1991.
29. Hammonds RG, Schwall R, Dudley A, et al. : Bone inducing activity of mature BMP-2B produced from a hybrid BMP-2A/2B precursor. *Mol Endocrinol* 5:149-155, 1991.
30. Rickard DJ, Sullivan TA, Shenker BJ, et al. : Induction of rapid osteoblast differentiation in rat bone marrow stromal cell cultures by dexamethaxone and BMP-2. *Dev Biol*. 161:218-228, 1994.
31. Chen P, Carrington JL, Hammonds RG and Reddi AH : Stimulation of chondrogenesis in limb bud mesoderm cells by recombinant human bone morphogenetic protein-2B(BMP-2B) and modulation

- by transforming growth factor 1 and 2. *Exp Cell Res.* 195:509-515, 1991.
32. Reddi AH : Initiation and promotion of differentiation by bone morphogenetic proteins. *J Bone Min Res.* 8:449-502, 1993.
 33. King GN, King N and Hughes FJ : The effect of root surface demineralization on bone morphogenetic protein-2-induced healing of rat periodontal fenestration defects. *J Periodontol.* 69:561-570, 1998.
 34. Ripamonti U, Heever B and Reddi AH : Bone morphogenetic proteins induced periodontal regeneration in baboon. *J Periodontal Res.* 29:439-445, 1994.
 35. Nakashima M : Mitogenic and dentin inductive effects of crude bone morphogenetic protein from bone and dentin in primary adult pulp cell culture. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 73:484, 1992.
 36. Chen TL, Bates RL, Dudley A, Hammonds RG and Amento EP : Bone morphogenetic protein-2B stimulation of growth and osteogenic phenotypes in rat osteoblast-like cells: comparison with TGF- β 1. *J Bone Mineral Res.* 6:1387-1393, 1991.
 37. Hiraki Y, Inoue H, Shigeno C, et al. : Bone morphogenetic proteins (BMP-2 and BMP-3) promote growth and expression of the differentiated phenotype of rabbit chondrocytes and osteoblastic MC3T3-E1 cells in vitro. *J Bone Min Res.* 6:1371-1385, 1991.
 38. Yamaguchi A, Katagiri T, Ikeda T, et al. : Recombinant human bone morphogenetic protein-2 stimulates osteoblastic maturation and inhibits myogenic differentiation in vitro. *J Cell Biol.* 113:681-687, 1991.
 39. Riley EH, Lane JM, Urist MR, Lyons KM and Lieberman JR : Bone morphogenetic protein-2: biology and applications. *Clin Orthop.* 324:39-46, 1996.
 40. Cunningham NS, Paralkar V and Reddi AH : Osteogenin and recombinant bone morphogenetic protein-2B are chemotactic for human monocytes and stimulate transforming growth factor β 1 mRNA expression. *Proc Natl Acad Sci USA.* 89:11740-11744, 1992.
 41. Massague J : Receptors of the TGF- β family. *Cell.* 69:1067-1070, 1992.
 42. Lianjia Y and Yan J : Immunohistochemical observations on bone morphogenetic protein in normal and abnormal conditions. *Clin Orthop Rel Res.* 257:249-256, 1990.
 43. Thompson NL, Flanders KC, Smith JM, et al. : Expression of TGF β in specific cells and tissues of adult and neonatal mice. *J. cell Biol.* 108:661-669, 1989.
 44. Heine UI, Munoz EF, Flanders KC, et al. : Roles of TGF- in the development of the mouse embryo. *J Cell Biol.* 105:2861-2876, 1987.
 45. Wetterwald A, Hofstetter W, Cecchini MG, et al. : Characterization and cloning of the Ell antigen, a marker expressed by rat osteoblasts and osteocytes. *Bone.* 18:125-132, 1996.
 46. Joyce ME, Robert AB, Sporn MB and Bolander ME : TGF and initiation of chondrogenesis and osteogenesis in the rat femur. *J Cell Biol.* 110:2195-2207, 1990.
 47. Bang SJ, Kim KW and Lee JH : Immunohistochemical study of TGF-b on the healing process in the rat femur bone defect. *J Korean academy plast Recon Surg.* 20:173-177, 1998.
 48. Ghosh-Choudhury N, Windle JJ, Koop BA, et al. : Immortalized murine osteoblasts derived from BMP2-T-antigen expressing transgenic mice. *Endocrinology.* 137:331-339, 1996.
 49. Masuhara K, Nakase T, Suzuki S, et al. : Use of monoclonal antibody to detect bone morphogenetic protein-4 (BMP-4). *Bone.* 16:91-96, 1995.
 50. Canalis E, McCarthy T and Centrella M : Growth factors and the regulation of bone modeling. *J Clin Invest.* 81:277-281, 1988.
 51. Urist MR, Delange RJ and Finerman GA : Bone cell differentiation and growth factors. *Science.* 220:680, 1993.
 52. Bolander MK : Regulation of fracture repair by growth factors. *Proc Soc Exp Biol Med.* 200:165-170, 1992.
 53. Lee FY, Choi YW, Behrens FF, DeFouw DO and Einhorn TA : Programmed removal of chondrocytes during endochondral fracture healing. *J Orthop Res.* 16:144-150, 1998.
 54. Wada Y, Kataoka H, Yokose S, et al. : Changes in osteoblast phenotype during differentiation of enzymatically isolated rat calvaria cells. *Bone.* 22:479-485, 1998.
 55. Erickson DM, Harris SE, Dean DD, et al. : Recombinant bone morphogenetic protein(BMP)-2 regulates costochondral growth plate chondrocytes and induces expression of BMP-2 and BMP-4 in a cell maturation-dependent manner. *J Orthop Res.* 15:371-380, 1997.
 56. Jin Y and Yang LJ : Immunohistochemical analysis of bone morphogenetic protein(BMP) in osteosarcoma. *J Oral Pathol Med.* 19:152-154, 1990.
 57. Melcher AH, McCulloch CAG, Cheong T, et al. : Cells from bone synthesize cementum-like and bone-like tissue in vitro and may migrate into periodontal ligament in vivo. *J Periodont Res.* 22:246-247, 1987.
 58. Urist MR, Raskin K, Goltz D and Merikel K : Endogenous bone morphogenetic protein : Immunohistochemical localization in repair of punch hole in the rabbit's ear. *Plast. Recon. Surg* 99:1382-1389, 1997.
 59. Yazaki Y, Matsunaga S, Onishi T, et al. : Immunohistochemical localization of bone morphogenetic proteins and the receptors in epiphyseal growth plate. *Anticancer Res* 18:4A, 2339-2344, 1998.
 60. Nakase T, Nomura S, Yoshikawa H, et al. : Transient and localized expression of bone morphogenetic protein 4 messenger RNA during fracture healing. *J Bone Miner Res.* 9:651-9, 1994.

사진부도 설명

- Fig. 1. The bony defect area contained immature connective tissues(CT) with osteoblasts and inflammatory cells. (at 3rd day, Toluidine blue, × 40)
- Fig. 2. The defect area was filled with long and squamous osteoblasts(OB). The nucleus was long spindle shape and minimal development of granular reticulum, mitochondria, and free ribosome. (at 3rd day, EM)
- Fig. 3. Osteoblasts(OB) were cubiform and arranged on bone spicular surface. Nucleus had round nucleolus and there were well developed organoids as kike Golgi apparatus, mitochondra, free ribosome, and lysosome. (at 3rd day, EM)
- Fig. 4. The woven bone(WB) and bone spicule were appeared. (at 10th day, Toluidine blue, × 40)
- Fig. 5. The bone spicule(BS) was appeared and surrounded with osteoblasts(arrow). (at 10th day, Toluidine blue, × 200)
- Fig. 6. The periosteum of intact area consisted of thick compact connective tissues and the inner layer was occupied by loose osteoblasts(OB) and outer layer was occupied by fibroblasts(FB). (at 10th day, Toluidine blue, × 400)
- Fig. 7. The positive reaction was observed at newly formed osteoblasts and osteoprogenitor cells(arrow). (at 10th day, A-20, × 200)
- Fig. 8. The positive reaction was observed at periosteum(PO). (at 10th day, A-20, × 400)
- Fig. 9. The bone spicules made bony trabecule(BT) and spongy bone tissue. (at 20th day, Toluidine blue, × 40)
- Fig. 10. The marrow space(MS) was filled with cellular connective tissues and the osteoblast like flat cells arranged around the bone surface. (at 20th day, Toluidine blue, × 400)
- Fig. 11. The exposed root was covered with undifferentiated mechenchymal cells(MC) but collagen fiber' s direction was irregular. (at 20th day, Toluidine blue, × 400)
- Fig. 12. The positive reaction was observed at cells in the bone marrow(arrow). (at 20th day, A-20 × 400)
- Fig. 13. The positive reaction was observed at newly formed cells surrounding cementum(C). (at 20th day, A-20, × 400)
- Fig. 14. The cells in the marrow space were cuboidal and squamous shape with many processes, arranged along the inner surface, formed matrix with collagen fibers(arrow). (at 20th day, EM)
- Fig. 15. The cells in the periodontal space were differentiated to cementoblasts(CB) and all organoids were well developed. (at 20th days, EM)
- Fig. 16. The complete healing was observed with compact bone(CMB), functional collagen fiber, and periodontal space. (at 30th day, Toluidine blue, × 40)
- Fig. 17. The osteoblasts(OB) surrounding sponge bone were compact and osteocyte has round nucleus and nucleolus. (at 30th day, Toluidine blue, × 400)
- Fig. 18. The connective tissue attachment was observed as like normal periodontal ligament, without ankylosis(PDL). (at 30th day, Toluidine blue, × 400)
- Fig. 19. The positive reaction was observed at newly formed osteocytes(NOB). (at 30th day, A-20, × 400)
- Fig. 20. The positive reaction was observed at cementocytes in newly formed cellular cementum(CC). (at 30th day, A-20, × 400)

사진부도 ①

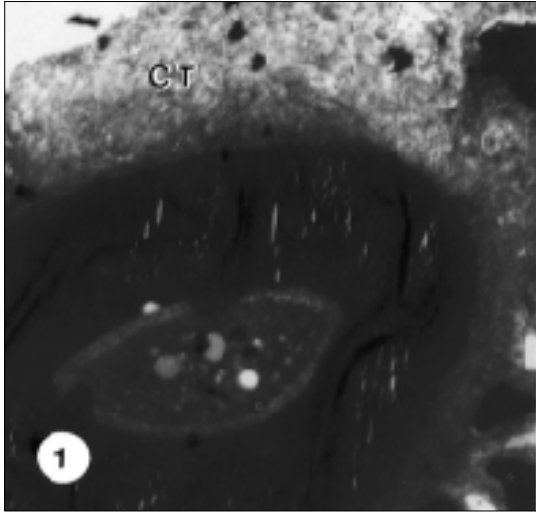


Fig. 1

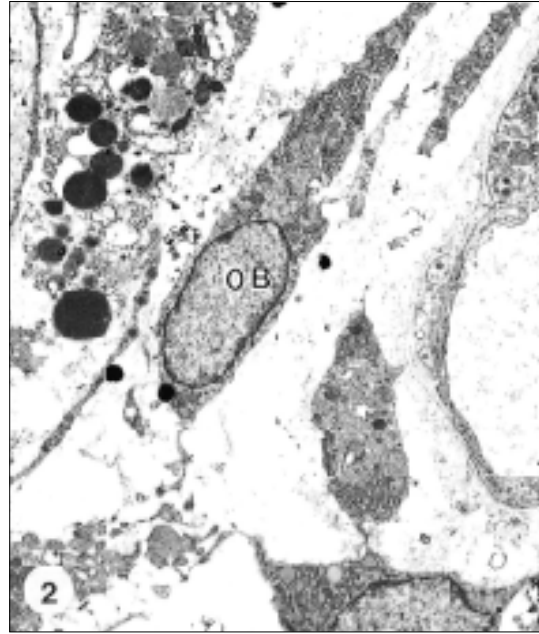


Fig. 2

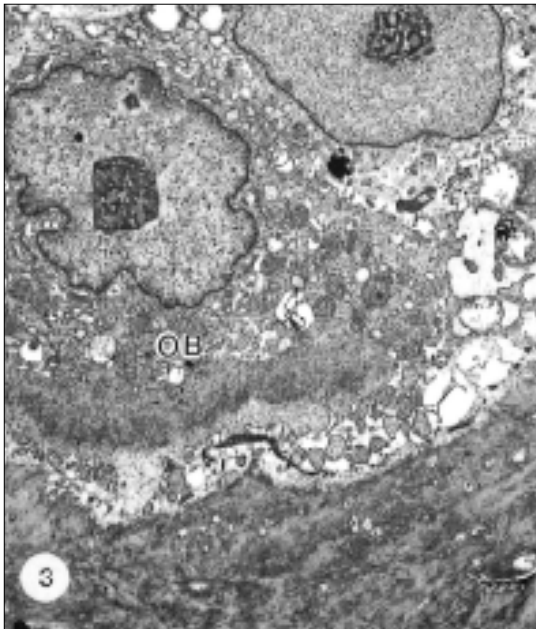


Fig. 3

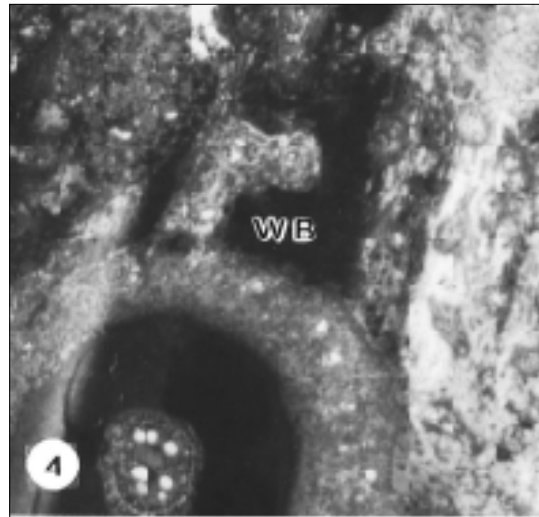


Fig. 4

사진부도 ②

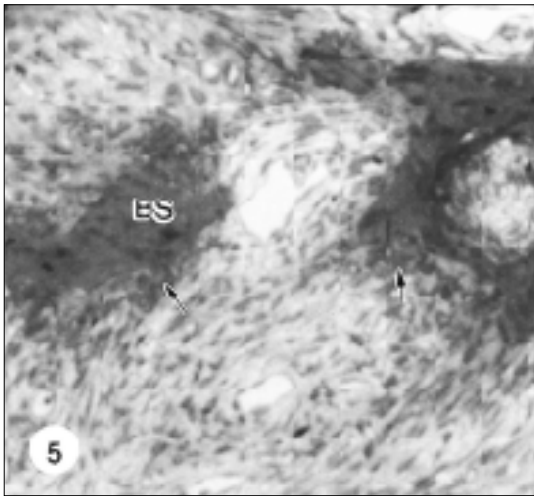


Fig. 5

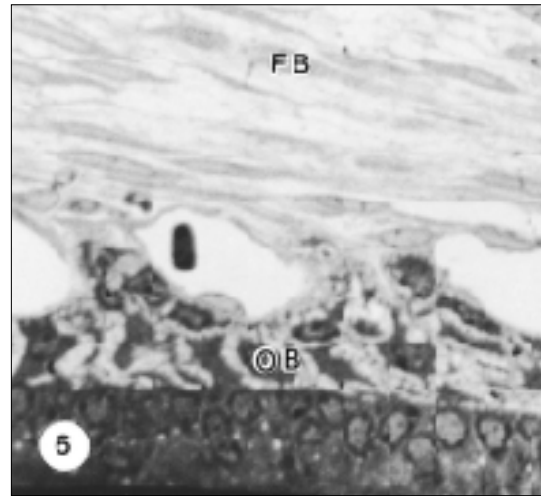


Fig. 6

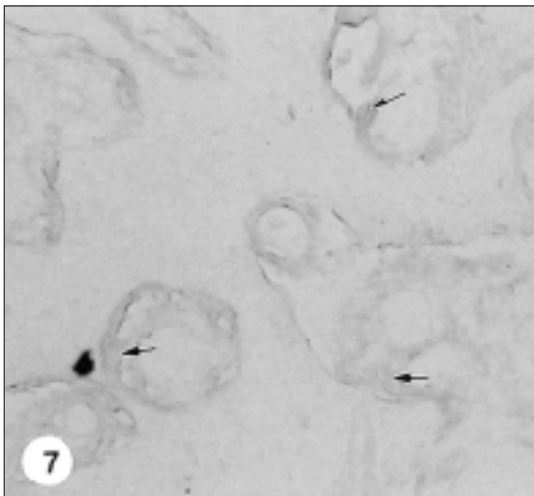


Fig. 7

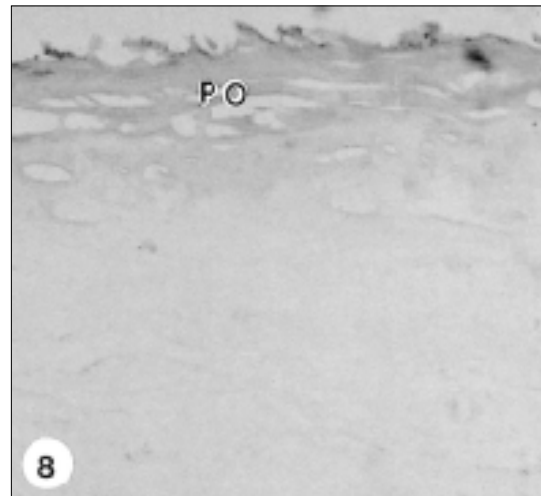


Fig. 8

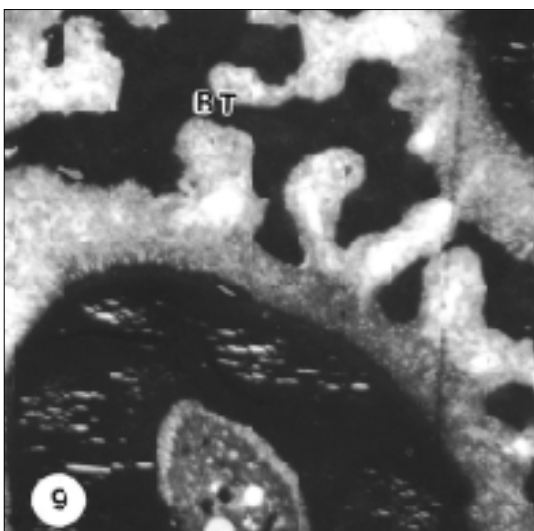


Fig. 9

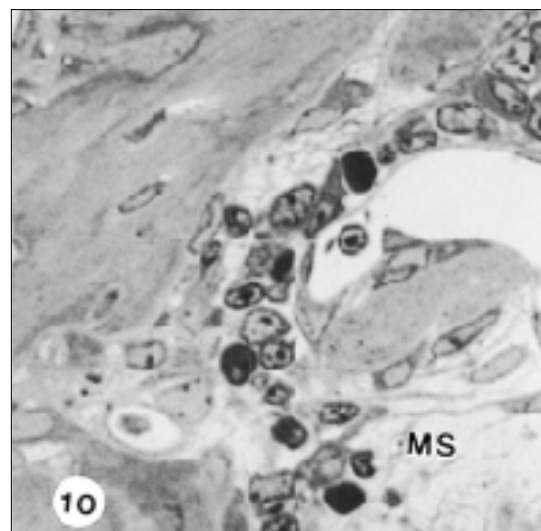


Fig. 10

사진부도 ③

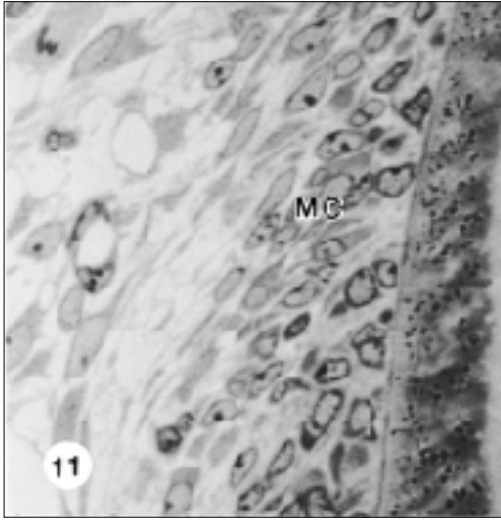


Fig. 11

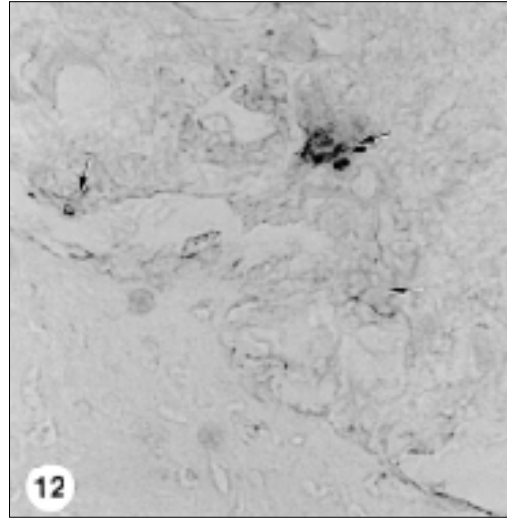


Fig. 12

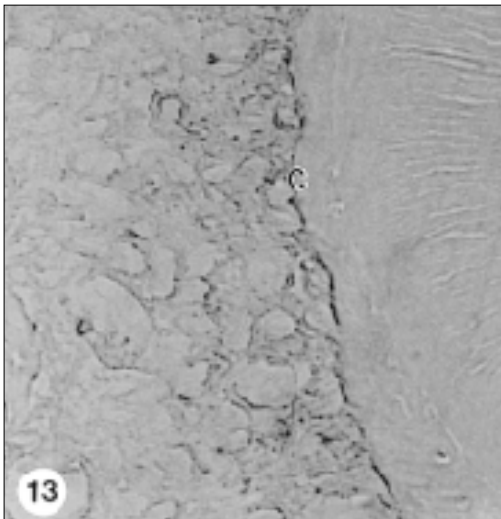


Fig. 13

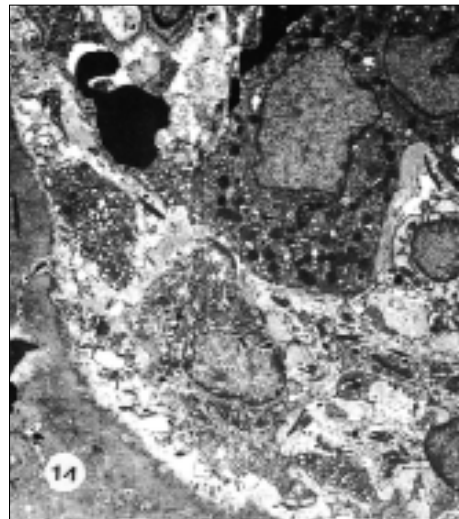


Fig. 14

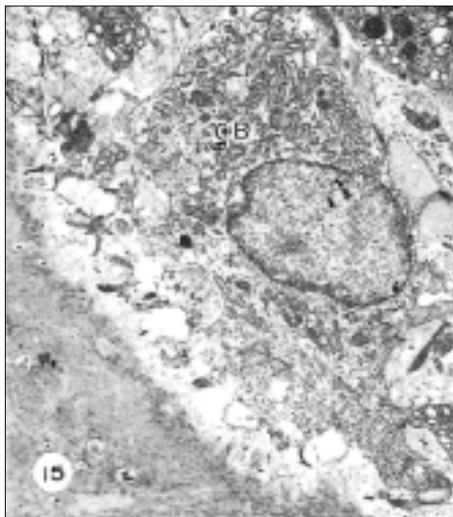


Fig. 15

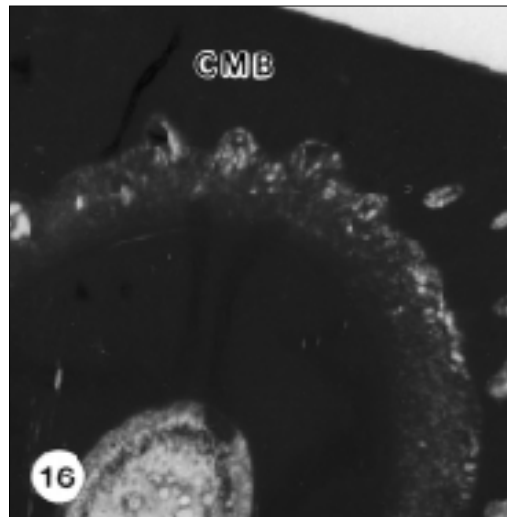


Fig. 16

사진부도 ④

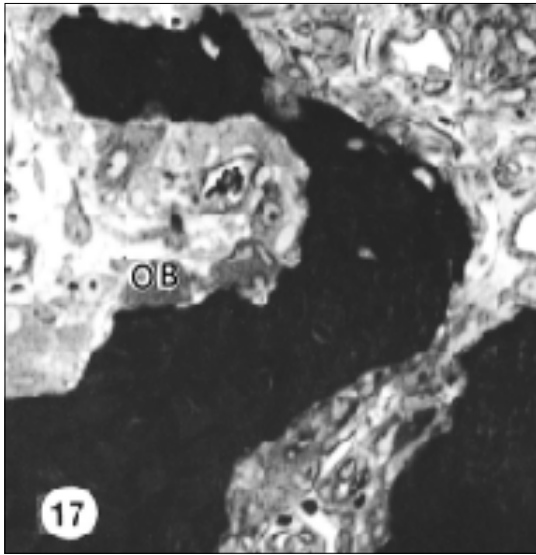


Fig. 17

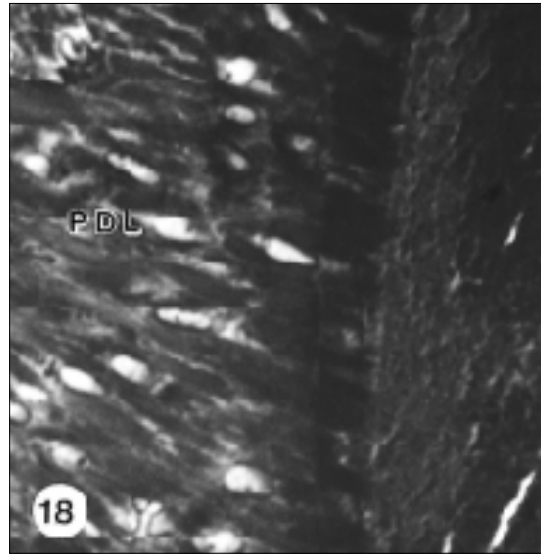


Fig. 18

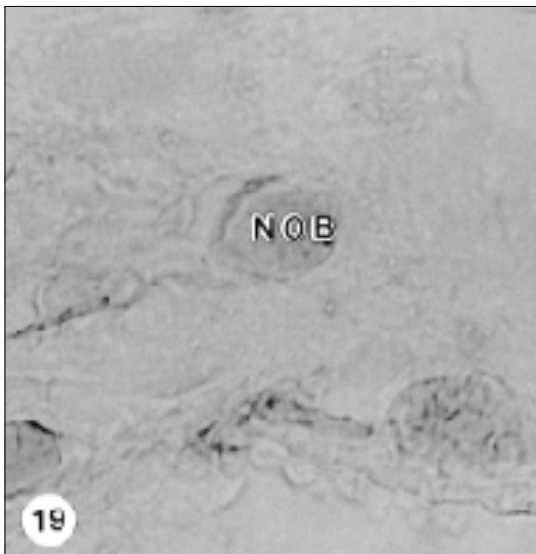


Fig. 19

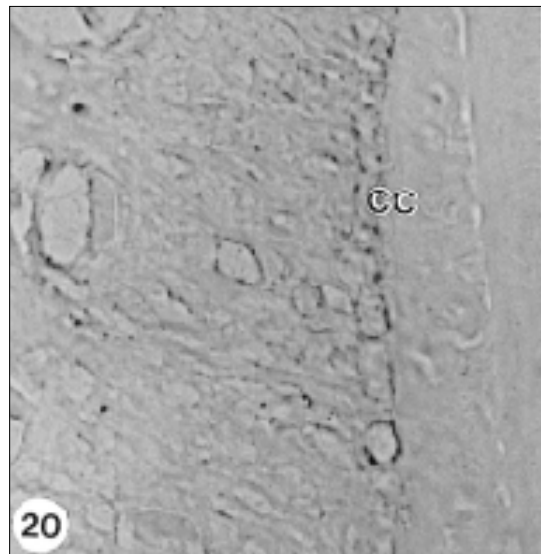


Fig. 20