rh-BMP-4가 재식치아 치주조직의 재생에 관한 연구

이세준 · 최경규 · 박상진 · 최호영 · 최기운
경희대학교 치과대학 치과보존학교실

ABSTRACT

THE STUDY ON PERIODONTAL REGENERATION OF REPLANTED TEETH FOLLOWING THE APPLICATION OF RH-BMP-4

Se-Joon Lee, Kyung-Ku Choi, Sang-Jin Park, Ho-Yong Choi, Gi-woon Choi
Department of Conservative Dentistry, College of Dentistry, Kyung-Hee University

The rh-BMP-4 is a subgroup of TGF-β superfamily. The application of rh-BMP in alveolar bony defect was reported to new alveolar bone and new cementum formation. For minimized complications following tooth replantation, a operator must replant a tooth fast at the pertinent position. This study was to evaluate the effect of rh-BMP-4 on periodontal regeneration and root resorption following tooth replantation in rats.

The 50 Sprague-Dawley rats weighting about 130gm were used in this study. The animals were divided into three groups. Group 1 ; immediate replantation after extraction : Group 2 ; replantation stored teeth - extraction of first molar, the removal of periodontal ligament with collagenase, and etching with citric acid : Group 3 ; replantation stored teeth with treated rh-BMP-4 in mesial root. Experimental animals were sacrificed 3, 7, 14 days after replantation by heart infusion. The maxillae were removed, fixed, demineralized, dehydrated, infiltrated and embedded with JB-4 mixture. For light microscopic observation, 5 micron sections were cut and stained with toluidine blue.

The results of this study were as follows :

1. After experimental 3 days, all groups were observed dead space between periodontum and root.
2. After experimental 7 days, group 1 and group 3 were observed filling periodontal fibers between alveolar bone and root but group 2 were not.
3. After experimental 7 days, group 3 were observed appearance of attached cementoblast like cell on root surface. Group 1 were observed regular arrangement of fibroblasts and collagen fibers at ×400 observation.
4. After experimental 14 days, all group were observed filling periodontal fibers between alveolar bone and root. Group 1 were observed normal arrangement of periodontal fibers. Group 3 were observed less abnormal arrangement of periodontal fibers. Group 2 were not observed functional normal arrangement of periodontal fibers.
5. After experimental 14 days, group 2 and 3 were observed several root resorption and irregular root surface but group 1 were not.

These results suggest that the rh-BMP-4 can stimulate cementogenesis and enhance to attach collagen fibers.

Key Words : Replantation, Periodontal regeneration, BMP, Cementogenesis

"이 논문은 1999년도 전북대학교의 지원 연구비에 의하여 연구되었음"

Ⅰ. 서 론

통법의 근관치료가 실패한 치아를 구강내 해부학적 구조로 인해 치근단 수술을 시행하기 어려운 경우나, 치아의 완전탈구 또는 발거될 치아의 대체를 위하여 치아재식을 시행할 수 있다. 치아재식의 경우 치조골과 백악질 사이 치주인대 손상 없이 치아를 발거하기란 불가능하며 치주인대의 손상은 필연적이다.

백악질 표면이 기계적 손상을 받을 경우 손상받은 부위에 얕은 흡수와가 발생되며 이를 표면흡수(surface resorption)라고 불리우며, 치근막의 생활력이 손상받지 않고 치수와 상아질이 세균에 오염되지 않은 경우 빠른 치주인대 재생과 신생백악질 회복이 일어난다고 보고되었다[1,2].

완성된 치근을 가진 치아의 경우 탈구 후 치수에 혈액공급 중단이 일어나고 재혈관화는 일어나지 않는다고 보고되었다[3,4]. 그 결과 치수는 괴사되고 타액이나 세균과의 접촉으로 인해 감염이 된다. 치근면을 덮고 있는 백악질이 손상받지 않은 경우 세균과 치수조직의 변성으로 인한 산물은 근관내에만 머물게 된다. 일단 백악질과 intermediate cementum이 표면흡수로 소실되면 상아세관은 세균과 독소 산물의 통로로 작용하여 치근막에서 염증반응이 일어나고 치근과 치조골이 파괴된다. 이 과정을 염증성 치근흡수(inflammatory root resorption)라 부른다[5,6].

치근막이 괴사된 치아를 재식하는 경우 치주인대의 재생없이 골과 치근 사이의 유착성 융합이 일어나게 되고 점진적으로 치근은 층판골로 대치되게 된다. 이를 대치성 치근흡수(replacement root resorption)라 한다. 만일 백악질이 건전하다면 대치성 치근흡수(replacement root resorption)는 지연된다고 한다[7].

치주인대와 치근백악질의 손상은 치근에 치주인대의 부착소실을 유발하고 이로 인한 대치성 치근흡수를 유발한다. 또한 괴사된 치주인대 세포와 치수의 괴사는 세균감염의 배지 또는 자극원으로 작용하여 치근의 염증성흡수를 유발한다. 그러므로 치근흡수를 방지하기 위해서는 치주인대세포의 손상을 극소화하고 완성된 치근의 경우 적절한 근관치료를 시행하는 것이 치근흡수에 있어 중요하다고 보고되었다[7].

치근흡수를 예방하기 위해서는 발치 시 외상을 줄여 치주인대세포의 손상을 최소화하고 발거된 치아는 15~20분 이내에 재식하는 것이 예후에 중요한 영향을 미친다고 보고되었다[5,8]. 발거된 치아의 건조를 방지하기 위해서는 보관용액의 선택이 중요하며 보관용액으로는 구강저(타액), 생리식염수, 우유, 조직배양액이 있다고 보고되었다[9]. 조직배양액은 실험적 연구에서 치주인대세포의 보존이 좋았으며, 그중 Viaspan이 탁월한 효과를 보였다고 보고되었다[10]. 발거 후 20분에서 60분간 방치된 경우 어느 정도의 치근흡수는 피할 수 없으며 이러한 경우 치근흡수를 줄이기 위하여 여러가지 soaking media에 대한 연구가 진행되었다. Pettiette 등[11]은 Viaspan이란 간이식 시 보관액으로 사용하는 media에 30분간 침지 시킨 다음 재식한 경우 치근흡수를 줄일 수 있다고 하였다. 발거 후 60분 이상 경과된 경우는 치주인대세포의 소생이 불가능 한 것으로 보고되었으며[12-14], citric acid에 5분간 침지하고 2% stannous fluoride에 5분간 침지한[15-17] 후 구강외에서 근관치료를 시행하고 재식하는 것이 치근흡수를 줄일 수 있다고 보고되었다[18-20]. 부가적 처치로 전신적 항생제 투여는 괴사 치수와 치주인대의 감염을 방지하여 염증성 치근흡수를 예방할 수 있으므로 항생제를 재식 시에서 splint제거 시까지 투여하는 것이 바람직하다고 보고되었다[7]. 최근 Sae-Lim 등[21]의 연구에서는 tetracycline을 전신적으로 투여한 경우에서 더 좋은 효과를 보였다고 보고하였다.

Bone morphogenic protein(BMP)은 1965년 Urist[22]가 수종의 산으로 탈회한 뼈 바탕질을 근육 또는 피하에 이식하여 뼈가 유도됨을 확인함으로써 그 존재가 알려진 이래 1971년 Urist[23]에 의해 bone morphogenic protein으로 명명되었다. 1972년 Reddi와 Huggins[24]는 피하조직에 이식한 bone matrix가 토끼와 흰쥐에서 간엽세포의 metaplastic change를 유도하여 연골내골화를 일으키며 이는 배자형성 시나 골절치유 시에 일어나는 연골내골화와 같은 방식을 따르는 것이 관찰되었고 골화를 유도하는 신호전달체계(signal)가 있음을 제시하였다. 이를 시작으로 BMP의 정재가 시도되었으며 그 결과 BMP는 약 16~18kDa의 subunit를 가지는 dimeric molecule임이 밝혀졌다. 이후 1988년 Wozney 등[25]이 액체 chromatography법에 의해 부분정재된 골유도 활성분획에 함유된 peptide단편을 시료로하여 유전공학적 기법을 응용하여 4종류의 골유도활성물질 complementaly DNA cloning에 성공함으로써 그 가능성이 제시 되었고, 현재까지 BMP-1에서 BMP-13까지 13종류의 BMP가 밝혀져 있다[26]. 최근 C-proteinase임이 밝혀진 BMP-1을 제외한 BMP는 transforming growth factor(TGF)-beta superfamily의 일원으로 분류되고 있다[27].

BMP는 성장인자인 TGF-β의 superfamily로써 TGF-β와 그 아미노산의 구조가 같은 특징을 가지는 구조로 이루어져 있다. BMP는 다시 세 개의 subgroup으로 나눌 수 있으며 첫 번째 군인 BMP-2와 BMP-4는 서로간에 86%정도가 동일한 아미노산 구조를 가지며, 두 번째 subgroup인 BMP-5, BMP-6, BMP-7은 71~80%의 동질성을 가진다. 세 번째 subgroup인 BMP-3(Osteogenin)이라고도 하며, 가장 독특하여 BMP-2와 45%의 동질성을 가진다. BMP는 각 subgroup간에도 동질성을 보이는 구조로 되어 있다고 한다[28]. 일반적으로 BMP는 미분화중간엽세포를 뼈형성세포로의 분화를 유도하는 것으로 알려져 있으나 어떤 기전에 의해 이뤄지는지는 완전히 밝혀져있지 않고 있다. 지금까지 밝혀진 BMP의 기능을 살펴보면 BMP-3는 배아

골격형성, 골격의 항상성 유지, BMP-2, 3, 4, 6는 태아발달중에서 기관형성, BMP-7은 CNS 발달에 영향을 주며 BMP-2, 4는 치배, 조상아세포층, palatal shelves, craniofacial 조직의 형성에 영향을 주는 것이 밝혀졌다[28].

치아와 치아주위조직에 관한 BMP의 연구에서 BMP가 신생골과 신생백악질 형성을 촉진하여 치주재생을 증진시킬 수 있다는 것이 보고되었다[29,30]. 또한 BMP가 쥐의 신생골과 신생백악질의 형성을 증진시켜 치아유착없이 쥐 대구치에서 치주조직 재생을 보였다고 보하였다[31]. 건전한 치주인대조직에 BMP을 적용한 경우 초기에 골형성을 보이다가 기능운동이 가해지면서 정상적인 치주인대강을 유지할 수 있다고 보고하였다[32].

치주조직의 재생이란 손상된 백악질의 재생과 치주인대의 적절한 부착에 의하여 재생이 일어나게 된다. 그렇지 않을 경우 골유착성 회복 또는 상피성 접착을 일으키게 된다. 최근에 재부착과 신부착의 형성에 관한 실험적 연구에 의하면 노출된 치근면을 향해 근단쪽으로 증식할 수 있는 치근막 세포의 잠재성은 치조골과 치주낭의 상피가 동시에 침입하는 것을 막아준다고 보고되었다[33-35].

여러 가지 조직요소들 간의 경쟁개념은 Andreasen[36]에 의해서도 연구된 바 있는데 그는 재식전에 치근면에서 생활력 있는 치근막이 벗겨진 경우 치경부 치은조직으로부터 치주세포가 근단 쪽으로 증식함을 보고하였다. 치경부로부터 새로운 치근막의 하방성장과 치주공간을 가로 지르는 치조골의 성장사이의 경쟁적인 상황이 적절히 조절된다면 새로운 치주 인대가 형성될 것이라고 가정하였다. 이의 조절을 위한 방법으로는 BMP의 사용에 대한 연구가 미미하여 본 실험에서 재식치아에서 BMP처리에 의한 치주인대의 조직학적 치유에 미치는 영향을 관찰 평가하여 의의 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

Ⅱ. 실험재료 및 방법

1. 실험재료

실험동물로는 동일한 조건하에서 사육된 체중 130gm의 Sprague Dawley계 흰쥐 50마리를 사용하였다. 치아를 발거하기 5일 전부터 각 실험동물에 0.4% β-aminopropionitrile(β-APN)을 1일 3회 경구투여하였다.

2. 실험방법

1) 재식치아의 처리

각 실험동물은 ketamin(유한양행, 한국)으로 전신마취(0.25㎖/100g 체중)하고 상악 좌우측 제1대구치를 발거하였다. 발거한 치아를 0.1M 인산완충액으로 수세하여 혈병을 제거한 후 Tris buffered saline(TBS)에 800 unit/㎖의 농도로 희석시킨 교원분해효소(Sigma, U.S.A.)로 37℃에서 4시간 저어주면서 처리하여 치근표면의 연조직 및 치주인대성분을 제거하였다. 교원분해효소 처리후 0.1M phosphate buffered saline(PBS)로 수세한 후 4℃ 냉장고에서 건조시켰다.

건조 후 다시 구연산(pH 1.12)으로 1분간 근심치근면을 탈회하고 멸균증류수로 30분간 수세한 후 4℃ 냉장고에서 건조시키고 보관하였다.

2) 재식시술

마취하에 실험동물의 상악 좌우측 제1구치를 발거한 후 형성된 발치와에 다음과 같이 세가지 군으로 나누어 치아를 재식하였다. 제1군은 발치 후 즉시 발거한 치아를 생리식염수로 세정하여 재식하였고, 제2군은 발거 후 교원분해효소로 처리한 후 구연산 처리된 보관 치아를 재식하였으며, 제3군은 2군과 동일한 처리를 한 치아의 근심 치근을 재식 직전 recombinant human bone morphogenetic protein-4(rh-BMP-4; R&D System, U.S.A.) 20㎍/㎖에 5초간 soaking 하였다가 재식하였다. 각 실험동물은 재식 후 3일, 1주 및 2주에 각 군당 3마리씩 희생하였다.

3) 조직절편제작

각 실험동물을 ethyl ether로 흡입마취시킨 후 10% 중성완충 formalin(pH 7.0)으로 전신관류고정한 후 상악대구치를 포함하여 상악골을 절취하여 같은 용액에 4시간 고정하였다. 그 후 0.1M 인산완충액(pH 7.4)으로 30분간 수세하여 인산완충액으로 희석한 10% EDTA(pH 7.4)로 4℃에서 10일간 탈회하고 일련의 에탄올로 탈수한 후 JB-4(Polyscience, U.S.A.)로 포매하고 실온에서 48시간 중합을 시킨 후 약 5㎛ 두께의 절편을 제작하였다.

4) 조직절편염색

조직절편은 sodium veronal과 sodium acetate가 함유된 buffer solution 각 5㎖에 1gm의 toluidine blue와 90㎖의 증류수를 사용하여 농도를 1%로 하고 1~2시간 동안 spinbar에 장착하여 혼합하였다. 1% toluidine blue를 사용하기 전에 #2 filter paper를 사용하여 여과하여 사용하였다. 이 후 통법의 방법으로 toluidine blue 염색하고 광학현미경을 사용하여 40배와 400배로 관찰하였다.

Ⅲ. 실험성적

1. 치아재식 후 3일째 소견

치아재식 후 3일째 치유과정에서 1, 2, 3군 모두 치주인대가 치아면에서 떨어져 빈 공간이 관찰되었다.

제1군에서, 치아 발거시 치근에 붙은 치주인대의 반쪽은

치아와 함께 제거되었지만 치조골에 붙은 반쪽은 그대로 세포와 함께 남아 있었다. 손상된 치주조직이 치아에 상당히 접근되어 있었고 일부 치근단 부위에서는 치아와 치주조직의 부착이 관찰되었다(Fig. 1).

제2군에서, 발치와의 바닥에서도 측면과 마찬가지로 남아있는 치주인대가 존재하였으나 치근부와는 더 거리를 두고 있었다(Fig. 2).

제3군에서, 치조골에 붙은 치주인대섬유와 세포가 많이 존재하고 불규칙한 교원섬유가 관찰되었다(Fig. 3).

2. 치아재식 후 1주째 소견

치아재식 후 1주째 치유과정에서, 1군과 3군에서 불규칙하게 배열된 치주인대 섬유에 의해 치아면과 치조골이 연결되었으나, 2군에서는 치주인대 섬유가 치아표면에 완전히 부착되지 않았다.

1군에서 아교섬유는 일정한 주행방향성과 성숙도를 가지며, 섬유모세포도 아교섬유의 방향성에 따라 규칙적으로 배열되었다(Fig. 4). 치아표면에 백악모세포의 출현이 관찰되었으며, 아교섬유와 섬유모세포의 배열이 규칙적으로 관찰되었다. 치주인대 섬유도 많은 분포를 보이면서 치근면에 부착되어 있었으며 새로 형성된 백악질을 따라서 백악모세포가 관찰되었다(Fig. 5).

2군에서 많은 양의 교원섬유가 재생되었지만 고유층의 결합조직이 치근백악질에서 일부 떨어져 관찰되었고, 주행방향과 섬유배열이 아직 불규칙 하였다. 이 시기에 아직 치근흡수나 골흡수 양상은 관찰되지 않았다(Fig. 6). 신생 치주인대 섬유들의 배열과 성숙도는 완전하지는 못하였으며 그 섬유사이의 섬유모세포의 수가 적고 방향도 불규칙하였다(Fig. 7).

3군에서 치주인대섬유는 치근의 백악질과 치조골사이를 연결하였지만 일정한 방향성을 가지고 있지 않았다(Fig. 8). 치주인대섬유가 매입된 백악질이 관찰되었고 치근백악질을 따라서 많은 백악모세포가 관찰되었으며, 많은 섬유모세포가 섬유의 주행을 따라서 분포되었다(Fig. 9).

3. 치아재식 후 2주째 소견

치아재식 후 2주째 치유과정에서 모든 군에서 치주인대로 채워져 치유된 상이 관찰되었다.

1군에서, 거의 정상적인 섬유배열을 하고 있었다. 치주인대섬유는 방향성을 가지고 성숙되어 있었으며, 치조골과 치근의 흡수는 관찰되지 않았으며 골성유착도 없었다(Fig. 10).

2군에서, 기능적인 섬유배열이 관찰되지 않았다. 치조골과 치근의 흡수가 부분적으로 관찰되었다(Fig. 11).

3군에서는 치주인대에 불규칙한 공간이 존재하고 섬유배열이 다소 불규칙하였고 소수의 치근흡수가 관찰되었다(Fig. 12).

Ⅳ. 총괄 및 고안

치주조직의 치유에 있어서 미약한 손상을 받은 경우는 대식세포와 파치세포에 의하여 손상부위의 흡수가 진행되다 이어 신생 백악질과 Sharpey's fiber의 형성으로 치유가 일어나는 반면 광범위한 손상과 감염이 있는 경우는 염증세포의 침윤과 파치세포에 의한 치근의 흡수에 이은 치유과정으로 치조골과의 유착이 일어나게 된다. 파골세포에 영향을 주는 여러 cytokine을 살펴보면 IL(interleukin)-1, 3, 6, TNFs(tumor necrosis factors), PGs(prostaglandins)등은 파골세포의 분화와 성숙에 긍정적인 영향을 미치는 반면 TGF-β는 반대의 영향을 미치는 것으로 알려지고 있다[37]. 단 PGs가 있는 경우에는 파골세포의 분화에 유리하게 작용한다고 보고되었다[37]. 이러한 성장인자는 세포막 수용체에 부착하여 G_0상태에 있는 세포를 자극하여 세포분열을 일으키는 효과가 있으며, 정상세포의 분열의 경우에는 세포가 transmembrane protein(막횡단 단백질)인 fibronectin이나 integrin family와 같은 세포외 기질의 부착단백질에 부착되어있는 상태에서 성장인자의 부착으로 세포분열이 일어난다고 한다. Fig. 5, 7, 9의 비교에서 Fig. 5와 Fig. 9에서는 다수의 세포들이 치근부에 부착되어 있는 양상을 보이며 그 형태가 방추형이 아니고 사각형의 형태를 보이는 것으로 보아 백악모세포로 추정되나 Fig. 7에서는 세포의 부착이 보이지 않는 것으로 미루어 세포분열과 분화가 더디다는 것을 보여 주는 것이고 이는 조직의 치유가 지연될 것이라고 추정할 수 있다.

재식치아의 치근흡수에 대한 동물실험에서 쥐를 사용한 경우를 살펴보면 Birkedal-Hanseen[38]은 10주된 쥐의 하악 제1대구치를 탈구하여 3가지 형태의 치근흡수를 관찰하였고 표면흡수는 3일에서 관찰되어 10일 최대를 보였다. Andreasen과 Skougaard[39]는 쥐 대구치의 치경부위에 외과적으로 손상을 주어 치아유착을 유도하는 방법을 소개하였다. 10~14일 사이에 치아유착이 최고조에 달함을 보였다. Hellsing 등[40]의 연구에서도 2주후에 치아유착이 최고조에 달함을 보였다. Nishioka 등[41]은 일반쥐와 germ-free 쥐의 대구치를 즉시 재식한 경우 일반쥐에서는 염증성 치근흡수와 치수괴사를 보인 반면 germ-free 쥐에서는 치수의 병변은 적었고 치근유착을 보였다. 이상과 같이 쥐도 다른 포유류와 같은 치근흡수 양상을 볼 수 있었다.

실험동물은 발치와 재식시 기술적인 어려움이 없어야하고 동물을 다루기 쉬워야 하며 결과가 재현성이 있어야하고 가격이 싸야하며 치아와 주위조직이 인간과 유사하고 인간과 유사한 치유양상을 보여야 한다. 이러한 목적에 부합되는 동물로 원숭이와 beagle dog이 주로 사용되었다. 그러나 이

러한 동물은 가격이 비싸고 많은 수의 동물을 사용할 수 없는 단점이 있다고 보고되고 있다[42]. 이러한 단점을 보완하기 위하여 쥐를 사용하였으나 쥐의 경우는 적절한 근관치료를 시행하기가 어렵고 구강내 접근이 어렵고 시야확보의 어려움으로 치아재식 시 치근을 제위치시키기가 어려운 단점이 있다. 이로 인하여 실험과정에서 실험동물의 치아발거시 와 치아재식시의 부주의와 접근의 어려움으로 치아 손상이 발생되어 13마리의 실험동물이 더 희생되었다. 그러므로 쥐를 통한 다양한 연구를 토대로 효과가 있을 경우 원숭이나 beagle dog과 같은 동물을 사용하는 것이 바람직하리라 생각된다.

본 실험에서 시술 전 5일간 β-APN을 투여하였다. 이는 β-APN이 collagen fiber의 alpha chain의 aldehyde group의 형성을 억제하여 교차결합을 손상시켜 인장력을 감소시키는 효과가 있다고 보고된 것을 참고로 하였다[43]. β-APN 투여는 상악 제1대구치의 발치 시 치주인대와 치근의 손상을 최소로 하여 치근흡수를 줄일 수 있는 효과가 있다고 알려져 있다. 치아 탈구시 가해지는 회전력에 의해 볼록한 협측과 설측의 치근에 더 많은 손상을 줌으로 인하여 오목한 인접면에 비하여 대치성 흡수가 증가 되었다는 보고[2]를 토대로 이러한 약제가 치아 탈구시의 손상을 최소로 하여 실험의 표준화에 도움이 되었으리라고 사료된다.

Andreasen[44]의 연구에 의하면 원숭이 전치에서 재식 후 2주가 경과하면서 염증성흡수는 증가되고 대치성흡수와 표면흡수는 감소하는 양상을 보였다고 보고하고 있다. 이를 토대로 본실험에서 쥐의 치아에서도 유사한 흡수반응을 보임으로 2주 후에는 근관치료가 되지 않은 치아에서 염증성 치근흡수가 증가되어 실험의 적절성이 보장되지 않을 것으로 생각되어 실험기간은 최장 2주로 한정하여 시행하였다.

King 등[45]은 쥐를 이용한 연구에서 치근부 치조골과 치주인대에 손상을 준 후 BMP를 사용한 군과 사용하지 않은 군에서 백악질의 생성과 골의 형성에 차이가 있었으며 기능력을 가한 경우와 그렇지 않은 경우에서 치아유착이 기능력을 가하지 않은 군에서 유의성이 있었음을 보고한 바 있다. 즉 손상부위의 지속된 외력은 섬유성 치유를 유발하므로 재식치아의 경우에서는 적절한 기능력을 가하는 것이 치주인대로의 재생에 도움이 될 것이다. 이와 같은 가설을 토대로 치아에 가해지는 기능력이 치주인대의 재생과 기능적 배열에 중요한 역할을 할 것으로 사료된다. 그러므로 초기 재식치아에 있어서 BMP의 사용은 치아유착을 유발하나 지속적인 기능력의 적용은 치주인대의 기능적 배열과 재생을 유발할 것으로 사료되며, 이로 재식시 BMP의 사용이 조직의 재생에 있어 긍정적인 면으로 작용하였음을 예상할 수 있다. 그러나 이러한 BMP는 세포의 증식과 분화에는 효과가 있는 것으로 사료되었으나 임상적인 사용에 있어서는 양과 농도에 관한 연구가 선행되어야 할 것으로 생각되었으며 다른 cytokine이 존재할 경우에는 오히려 골흡수세포의 증식에 영향을 미치는 것으로 보고되고 있으므로[46] 실험의 변수를 줄일 수 있는 표준화된 요소들을 사용한 각 조직들의 경쟁적인 치유과정을 관찰해 보는 것이 바람직할 것으로 사료된다.

Hertwig 상피근초의 세포들은 치근상아질 표면에 10㎛ 두께의 고도로 광화된 무구조층을 만드는데 관여한다. 이층은 Hopewell-Smith 유리질층(hyaline layer) 또는 중간백악질(intermediate cementum) 등으로 불리우며, 일종의 법랑질로 추정되고 있다. 이 유리질층의 기능은 백악질을 상아질에 접착시킬 뿐 아니라 인대원섬유가 치아에 초기 부착하는데 기여하는 것으로 알려져 있다[47]. 차후 과연 BMP가 백악질을 형성시켜 치주인대원섬유의 치아부착을 가능하게 할 수 있는지에 관한 연구가 진행되야 할 것으로 사료되며 치근주위의 상피세포에 BMP가 영향을 미쳐 중간백악질의 생성을 가능하게 하는지에 관한 연구도 필요하리라고 본다.

손상된 치아를 회복하는 방법으로는 직접적인 치아발생을 시행하는 경우, 치아를 이식하는 경우, 인공대체물로 치아를 대신하는 경우로 생각해 볼 수 있다. 치아발생의 경우는 구강상피에 영향을 받은 신경능성 외배엽성 중배엽세포의 배양을 통하여 원하는 부위에 이식하여 치아발생이 가능할 것이라 사료된다. 본 연구는 치아를 이식하는 경우로서 손상된 치주인대세포를 고유치조골에 부착된 치주인대세포에 BMP를 사용하여 성장, 분화를 촉진하여 재식한 치아와의 정상적인 부착을 유도하려는 목적으로 고안되었다. 기존의 연구에서는 부착단백질인 fibronectin을 이용한 경우에서 치주조직 치유에 효과가 있었다는 보고가 있었다[48]. 그러므로 세포부착에 관여하는 단백질인 laminin과 기질부착분자인 fibronectin을 성장인자와 혼합하여 사용해 봄으로써 더 완벽한 조직의 재생이 가능할 수 있을 것으로 사료된다. 이에 대한 연구가 진행되어야 될 것으로 사료된다. 또한 치근단 병소가 큰 경우, 미완성근첨을 가진 치아, 치근천공된 치아에서 barrier material에 BMP를 첨가하여 사용한 경우의 치유양상과 기존의 root sealer에 BMP를 첨가하여 사용한 경우를 기존의 방법과 비교해 보는 연구도 흥미 있을 것으로 사료된다.

Ⅴ. 결 론

본 연구는 rh-BMP-4가 치아재식 시 치주인대 주위조직의 재생에 관한 효과를 알아보기 위하여 흰쥐를 사용 3개의 군으로 분류하였다. 제1군은 발치 후 즉시 재식한 군, 제2군은 발치 후 치주인대를 제거하고 치근탈회 후 재식한군, 제3군은 2군에 BMP를 처리하여 재식한 군으로 분류하여 3일, 1주, 2주 후 실험동물을 희생하여 고정, 절편제작, 염색 후 광학현미경 관찰결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 실험 3일 후 모든 군에서 치주인대가 치근면에서 떨어져 빈 공간이 관찰되었다.
2. 실험 7일 후 1군과 3군에서 불규칙하게 배열된 치주인대 섬유에 의해 치근면과 치조골이 연결되었으나, 2군에서는 치주인대 섬유가 치근표면에 완전히 부착되지 않았다.
3. 실험 7일 후 1군에서는 아교섬유와 섬유모세포의 배열이 규칙적으로 관찰되었으며, 3군에서 치아표면에 백악모세포의 출현이 많았다.
4. 실험 14일 후 모든 군에서 치근막강이 치주인대로 채워져 있었으며, 1군에서는 정상적인 섬유배열을 하고 있었고, 2군에서는 비정상적인 섬유배열이 관찰되었으며, 3군에서는 치주인대에 불규칙한 공간이 존재하고 섬유배열이 다소 비정상적이었다.
5. 실험 14일 후 1군에서는 치아표면이 규칙적이고 치근흡수가 발견되지 않았으나, 2군과 3군에서 여러 곳에서 치근흡수가 관찰되었다.

이상의 결과로 치아재식 후 치유과정에서 rh-BMP-4는 교원섬유의 부착과 치근백악질 형성을 촉진하는 결과를 보였다.

REFERENCES

1. Andreasen JO: The effect of splinting upon periodontal healing after replantation of permanent incisors in monkeys. Acta. Odontol. Scand., 33:31-323, 1975.
2. Andreasen JO: Analysis of topography of surface and inflammatory root resorption after replantation of mature permanent incisors in monkeys. Swed. Dent. J., 4:135-143, 1980.
3. Öhman A: Healing and sensitivity to pain in young replanted human teeth. Odont. Tidskrifl., 73:165-220, 1963.
4. Skoglund A: Pulp reactions and autotrasplanted teeth in dogs. Int. J. Oral. Surg., 10:111-121, 1981.
5. Andreasen JO, Hjörting-Hansen E. Replantation of teeth. Ⅰ. Radiographic and clinical study of 110 human teeth replanted after accidental loss. Acta. Odontol. Scand., 24:263-286, 1966.
6. Andreasen JO, Hjörting-Hansen E: Replantation of teeth. Ⅱ. Histological study of 22 replanted anterior teeth in humans. Acta. Odontol. Scand., 24:287-306, 1966.
7. Hammarström L et al: Tooth avulsion and replantation: a review. Endodont. Dent. Traumatol., 2:1-8, 1986.
8. Andreasen JO: The effect of extra-alveolar period and storage media upon periodontal and pulpal healing after replantation of mature permanent incisors in monkeys. Int. J. Oral. Surg., 10:43-53, 1981.
9. Hiltz J, Trope M: Vitality of human lip fibroblasts in milk, Hanks Balanced Salt Solution and Viaspan storage media. Endodont. Dent. Traumatol., 7:69-118, 1991.
10. Andreasen JO, Andreasen FM: Textbook and color atlas of traumatic injuries to the teeth, 3rd ed, Copenhagen and St Louis, Munksgaard and Mosby, p98-104, 1994.
11. Pettiette M et al: Periodontal healing of extracted dog teeth air dried for extended periods and soaked in various media. Endodont. Dent. Traumatol., 13:113, 1997.
12. Soder PO et al: Effect of drying on viability of periodontal membrane. Scand. J. Dent. Res., 85:164-168, 1977.
13. Lindskog S, Blomlof L, Hammarstrom L: Repair of periodontal tissues in vivo and vitro. J. Clin. Periodontol., 10:188-205, 1983.
14. Trope M, Friedman S: Periodontal healing of replanted dog teeth stored in Viaspan, milk and Hanks Balanced Salt Solution. Endodont. Dent. Traumatol., 8:183-188, 1992.
15. Bjorvatn K, Selvig KA, Klinge B: Effect of tetracycline and SnF2 on root resorption in replanted incisors in dogs. Scand. J. Dent. Res., 97:477-482, 1989.
16. Selvig KA, Zander HA: Chemical analysis and microradiography of cementum and dentin from periodontally diseased human teeth. J. Periodontol., 33:303-310, 1962.
17. Barbakow FH et al: Healing of replanted teeth following topical treatment with fluoride solutions and system administration of thyrocalcitonin : a histometric analysis. J. Endod., 7:302-308, 1981.
18. Pitaru et al : The influence of te morphological and chemical nature of dental surfaces on the migration, attachment, and orientation of human gingival fibroblast in vitro. J. Periodont. Res., 19:408-418, 1984.
19. Hanes P, Polson A, Thomas H : Hyaluronidase-enhanced connective tissue attachment to demineralized dentin. J. Dent. Res., IADR/AADR Abstracts(Abs#528):233, 1985.
20. Lowenberg BF et al : Attachment, migration, and orientation of human gigival fibroblast to collagen-coated, surface-demineralized, and untreated root slices. J. Dent. Res., 64:1106-1110, 1985.
21. Sae-Lim V, Wang CY, Choi GW, Trope M: The effect of systemic tetracycline on resorption of dried replanted dogs' teeth. Endodont. Dent. Traumatol., 14:127-132, 1998.
22. Urist MR. Bone formation by autoinduction. Science, 150:893-899, 1965.
23. Urist MR, Strates BS. Bone morphogenic protein. J. Dent. Res., 50:1391-1406, 1971.
24. Reddi AH, Huggins CB. Biochemical sequences in the transformation of mormal fibroblasts in adolescent rats. Proc. Natl. Acad. Sci., USA 69:1601-1605, 1972.
25. Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ. Novel regulators of bone formation Molecular clons and activities. Science, 242:1528-1534, 1988.
26. Noda M. Signalling in osteoblastic differentiation. Experimental medicine, 15:169-177, 1996.
27. Aldinger G, Herr G, Kusswetter W. Bone morphogenic protein. a review Int. Orthop., 15:169-177, 1991.
28. Ripamonti U, Reddi AH. Tissue engineering, morpogenesis, and regeneration of the periodontal tissues by bone morphogenetic proteins. Crit. Rev. Oral Biol. Med., 8:154-163, 1997.
29. Sigurdsson TJ, Tatakix DN, Lee MB, Wikesjö UM. Periodontal regenerative potential of space-providing expanded polytetrafluroethylene membranes and recombinant human bone morphogenetic proteins. J. Periodontol., 66:511-521, 1995.
30. Ripamonti U, Heliotis M, van den Heever B, Reddi AH. Bone morphogenetic proteins induce periodontal regeneration in baboons(Papio ursinus). J. Periodont. Res., 29:439-445, 1994.
31. King GN, King N, Cruchley AT, Wozney JM, Hughes FJ. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 promotes wound healing in rat periodontal fenestration defects. J. Dent. Res., 76:1460-1470, 1997.

32. Rajashankar D, McCulloch CA, Tenenbaum HC, Lekic PC. Osteogenic inhibition by rat periodontal ligament cells: modulation of bone morphogenic protein-7 activity in vivo. Cell Tissue Res., 294:475-483, 1998.
33. Gottlow J, Nyman S, Karring T: Healing following citric acid conditioning of roots implanted into bone and gingival connective tissue. J. Periodont. Res., 19:214-220, 1984.
34. Karring T et al: Potentials for root resorption during periodontal wound healing. J. Clin. Periodontol., 11:41-52, 1984.
35. Lindhe J, Nyman S, Karring T: Connective tissue reattachment as related to presence or absence of alveolar bone. J. Clin. Periodontol., 11:33-40, 1984.
36. Andreasen JO, Kristersson L: Repair processes in the cervical region of replanted and transplanted teeth in monkeys. Int. J. Oral Surg. 10:128-136, 1981.
37. Andreasen JO, Andreasen FM: Response of oral tissues to trauma in textbook and color atlas of traumatic injuries to the teeth. 3rd ed. Copenhagen, Denmark, Munksgaard, p128, 1994
38. Birkedal-Hanseen H. External root resorption caused by luxation of rat molars. Scand J. Dent. Res., 81:47-61, 1973.
39. Andreasen JO, Skougaard MR. Reversibility of surgically induced dental ankylosis in rats. International J. of Oral Surg., 1:98-102, 1972.
40. Hellsing E, Alatli-Kut, Hammarström L: Experimentally induced dentoalveolar ankylosis in rats. International Endodontic Journal, 26:93-98, 1993.
41. Nishioka M, Shiiya T, Ueno K, Suda H. Tooth replantation in germ-free and conventional rats. Endodont. Dent. Traumatol., 14:163-173, 1998.
42. Lee SJ et al: Morphological study on periodontal regeneration and root resorption following tooth reimplantation in rats. J. Kor. Acad. Cons. Dent., 24(1) : 116-123, 1999.
43. Borstein P: The cross-linking of collagen and elastin and its inhibition in osteolathyrism. Am. J. Med., 49:429-432, 1970.
44. Andreasen JO: A time-related study of periodontal healing and root resorption activity after replantation of mature permanent incisors in monkeys. Swed. Dent. J., 4:101-110, 1980.
45. King GN, Hughes FJ: Effects of occlusal loading on ankylosis, bone, and cementum formation during bone morphogenetic protein-2-stimulated periodontal regeneration in vivo. J. Periodontol., 70:1125-35, 1999.
46. Koide M et al: Bone morphogenetic protein-2 enhances osteoclast formation mediated by interleukin-1 alpha through upregulation of osteoclast differentiation factor and cyclooxygenase-2. Biochem. Biophys. Res. Commun., 259(1):97-102, 1999.
47. Ten Cate AR: Development of the Periodontum in Oral Histology, 4th ed, St Louis, Missouri, Mosby, p257-275, 1994.
48. Carlos EN et al: Effect of fibronectin on healing of replanted teeth in monkeys: A histologic and autoradiographic study. Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol., 63:291-9, 1987

사진부도 설명

Fig. 1. Photomicrograph showing the wound area 3 days after replantation of a molar of the first group(×40).
The periodontal attachment between root and alveolar bone were observed at the apical portion of root but another portion of root were observed space between root and alveolar bone.
D: dentin
P: periodontum
B: alveolar bone

Fig. 2. Photomicrograph showing the wound area 3 days after replantation of a molar of the second group(×40).
The space between root and alveolar bone was observed at more separation.

Fig. 3. Photomicrograph showing the wound area 3 days after replantation of a molar of the third group(×40).
Many fibroblasts and irregular collagen fiber were observed.

Fig. 4. Photomicrograph showing the wound area 3 days after replantation of a molar of the first group(×40).
Collagen fibers were matura-tion and functional arrang-ement.

Fig. 5. Photomicrograph showing the wound area 1 week after replantation of a molar of the first group(×400).
Collagen fibers and fibroblasts attaching root surface were observed regular arrangement and cementoblasts attaching new cementum were observed.
C: cementum

Fig. 6. Photomicrograph showing the wound area 1 week after replantation of a molar of the second group(×40).
Collagen fibers and fibroblasts were observed irregular arrangement. Root resorption and alveolar bone resorption were not observed.

Fig. 7. Photomicrograph showing the wound area 1 week after replantation of a molar of the second group(×400).
New collagen fibers and fibroblasts were incomplete maturation, non-functional arrangement. The number of fibroblasts were few between collagen fibers.

Fig. 8. Photomicrograph showing the wound area 1 week after replantation of a molar of the third group(×40).
New collagen fibers and fibroblasts attached root surface but were irregular direction.

Fig. 9. Photomicrograph showing the wound area 1 week after replantation of a molar of the third group(×400).
Cementum invested periodontal fibers and many of cementoblast were observed. The orientation of fibroblasts were followed the direction of collagen fibers.

Fig. 10. Photomicrograph showing the wound area 2 weeks after replantation of a molar of the first group(×40).
Collagen fibers were normal arrangement. The root resorption and ankylosis were not observed.

Fig. 11. Photomicrograph showing the wound area 2 weeks after replantation of a molar of the second group(×40).
Collagen fibers were not functional arrangement. The root resorption and alveolar bone resorption were observed.
R: root resorption

Fig. 12. Photomicrograph showing the wound area 2 weeks after replantation of a molar of the third group(×40).
The irregular space in periodontum were observed. The root resorption and irregular arrangement of collagen fibers were observed.

사진부도 ①

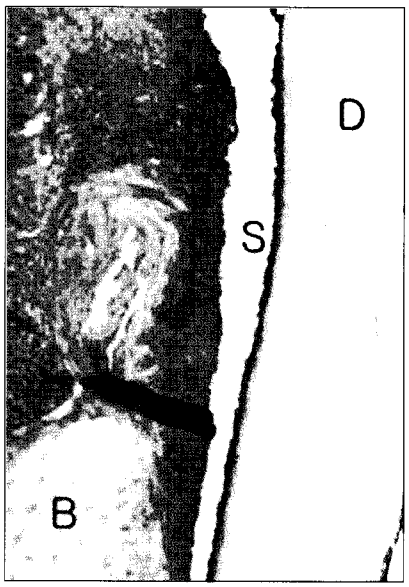

Fig. 1

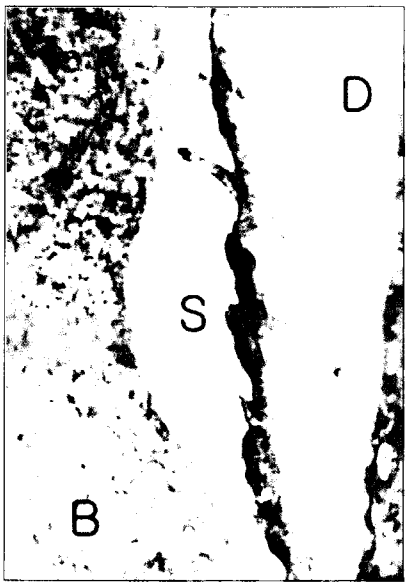

Fig. 2

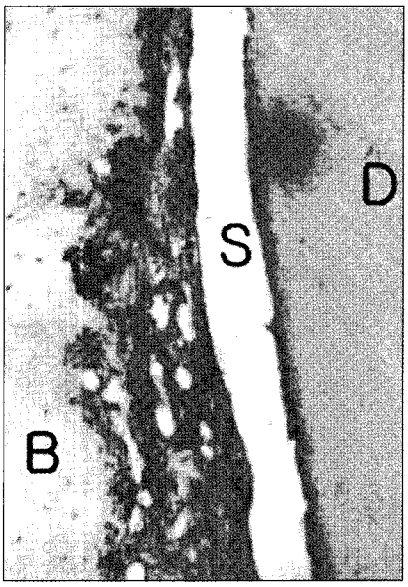

Fig. 3

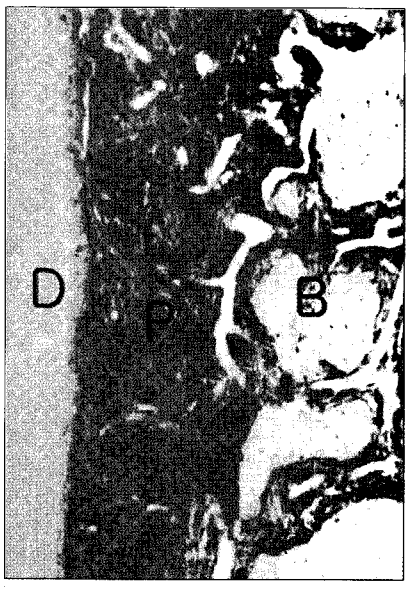

Fig. 4

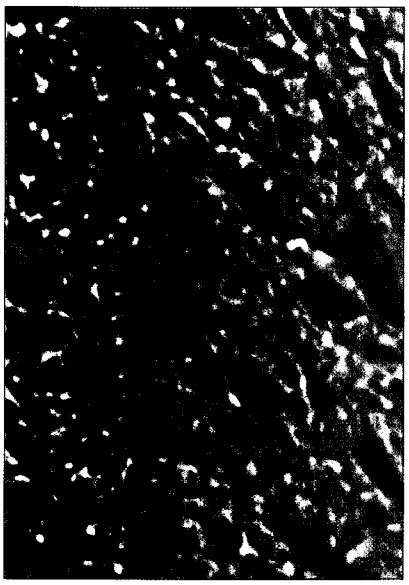

Fig. 5

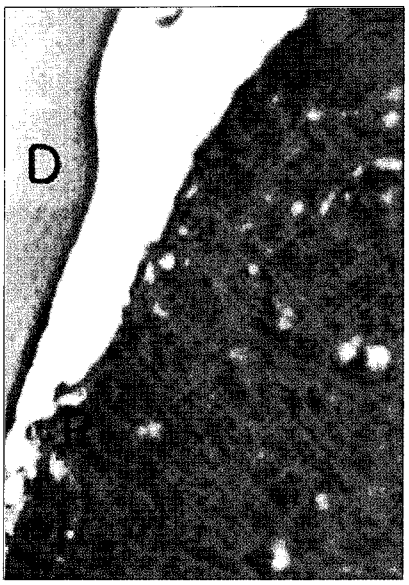

Fig. 6

사진부도 ②

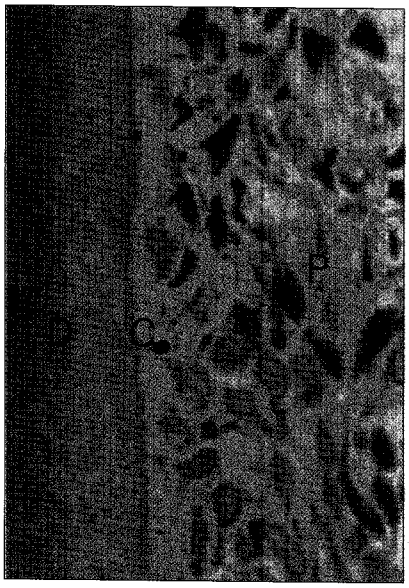

Fig. 7

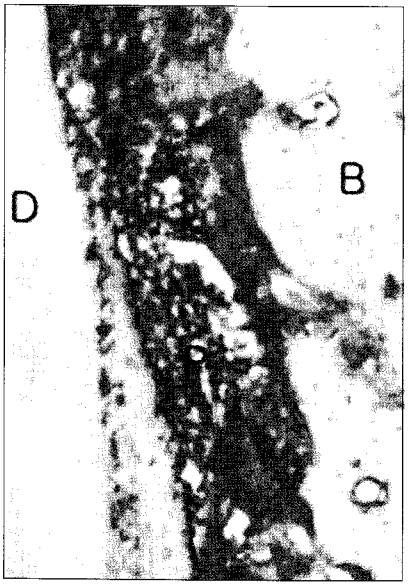

Fig. 8

Fig. 9

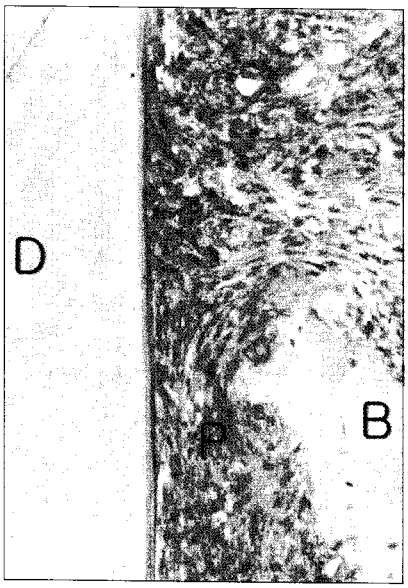

Fig. 10

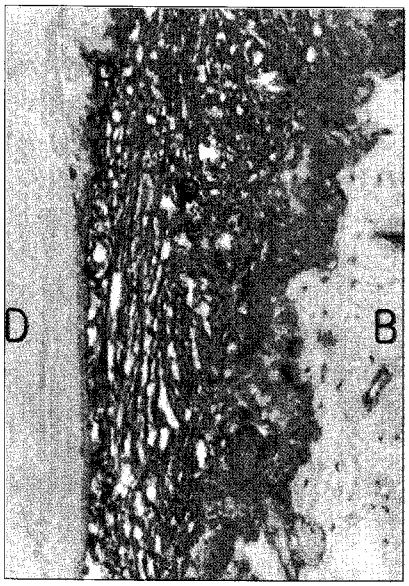

Fig. 11

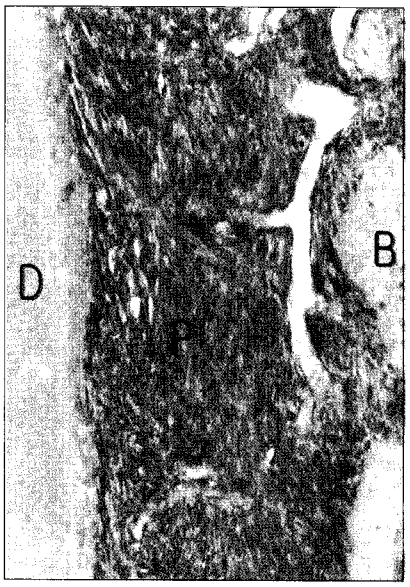

Fig. 12