

## 가토의 상악동 골이식술시 미분화 간엽 줄기세포의 골형성 효과

오승환 · 채영원 · 김범수 · 여인범 · 조필귀  
원광대학교 치과대학 구강악안면외과학교실

### Abstract

#### THE EFFECTS OF UNDIFFERENTIATED MESENCHYMAL STEM CELLS ON SINUS BONE GRAFTING IN RABBIT

Sung-Hwan Oh, Young-Won Choi, Bum-Soo Kim, In-Bum Yeo, Pil-Kwy Jo  
*Department of Oral & Maxillofacial Surgery, School of Dentistry, Wonkwang University*

Undifferentiated mesenchymal stem cells(UMSCs) have been thought to be multipotent cells that can replicate as undifferentiated cells and that have the potential to differentiate into lineages of mesenchymal tissue including the bone, cartilage, fat, tendon, muscle, and marrow stroma. It can be used to sinus lifting, Guided bone regeneration, other bone graft in dental part. The purpose of this study is to evaluate the effect of mesenchymal stem cells on sinus augmentation with autogenous bone, fibrin glue mixture in a rabbit model.

8 New Zealand white rabbits were divided randomly into 4 groups based on their time of sacrifice(1, 2, 4 and 8 weeks). First, undifferentiated mesenchymal stem cells were isolated from iliac crest marrow of rabbits and expanded in vitro. cell culture was performed in accordance with the technique described by Tsutsumi et al.

In the present study, The animals were sacrificed at 1, 2, 4 and 8 weeks after transplantation, and the bone formation ability of each sides was evaluated clinically, radiologically, histologically and histomorphologically. According to the histological observations, Stem cell group showed integrated graft bone with host bone from sinus wall. At 2 and 4weeks, It showed active newly formed bone and neovascularization. At 8 weeks, lamella bone was observed in sinus graft material area. Radiologically, autobone with stem cell showed more radiopaque than autobone without stemcell. there were significant differences in bone volume between 2 and 4 weeks ( $p < 0.05$ ).

In summary, the autobone with stem cells had well-formed, newly formed bone and neovascularization, compared with the autobone without stem cells (esp. 2 weeks and 4 weeks) The findings of this experimental study indicate that the use of a mixture of mesenchymal stem cell yielded good results in osteogenesis and bone volume comparable with that achieved by autogenous bone. Therefore, this application of this promising new sinus floor elevation method for implants with tissue engineering technology deserves further study.

**Key words:** Undifferentiated mesenchymal stem cell, Autobone with stem cell, Autobone without stem cell, Sinus floor elevation, Tissue engineering, Fibrin glue

※ 본 논문은 2004년도 원광대학교 교내연구비 지원하에 수행되었습.

## 1. 서 론

구강악안면 부위의 다양한 악골 및 치조골의 결손은 일반적으로 골 이식술을 통하여 재건될 수 있지만, 악골은 항상 저작압을 받고 있고, 또 형태적으로 복잡하기 때문에 의치나 임플란트를 유지할 수 있는 새로운 악골이나 치조골을 형성하는 일은 매우 어려운 작업이다. 이는 무엇보다 이식된 골이 빠른 시간 내에 생착되고, 또한 기능을 받았을 때 흡수되지 않고, 잘 견뎌야 하며, 만약 임플란트 치료와 병행된다면 임플란트가 식립 되어지는 위치에 알맞은 형태로 재건되어야 하기 때문이다. 그러므로, 골 이식술은 빠른 골생착과 함께 형태 형성과 유지가 좋은 골이식 기법과 골 이식재가 요구된다.

상악동 거상술은 상악 구치부에서 임플란트를 이용하여 재건하려 할 때 상악동의 공기화(pneumatization)로 인한 상악 구치부 치조골의 수직적 결손을 보충하기 위하여 상악동 내 상악동 막을 거상하고 이 공간에 골이식을 하는 기법이다<sup>1,2)</sup>. 이는 1975년 Tatum<sup>3)</sup>, 1981 Boyne 등<sup>4)</sup>이 임상적 술식을 발표한 이래, 이에 대한 임상적 술기와 결과, 또 이에 사용되는 골이식재 등에 대하여 많은 연구와 발표가 있어 왔으며, 상악 구치부 치조골을 재건하는 가장 믿을 만한 술식으로 인정 받고 있다. 하지만, 상악동 거상술은 골막하의 상악동 공간에 재골 이식 (Inlay bone graft) 형태로 시행되기 때문에 골치유시간이 오래 걸리고(약 6-9개월), 또 골이식체로써 자가골을 쓴다면 자가골 채취에 따른 합병증이 뒤따르기 때문에 골치유 시간을 단축 시키고, 보다 신뢰성 있는 자가골이 아닌 새로운 골 이식재를 찾기 위한 연구가 부단히 진행되어 왔다<sup>5)</sup>. 일반적으로 자가골 이식재는 이식시 골생성 및 생착이 빠르고 우수하여, 전통적으로 가장 선호되는 이식재이다. 하지만, 자기 신체 부위에서 채취되기 때문에 환자 및 술자에게 큰 부담을 주며, 골생착 후 장기적으로 쉽게 흡수되는 단점을 가진다<sup>5,7)</sup>. 그러므로, 이를 극복하기 위한 다양한 골이식 기법과 골 이식재가 연구되어 왔는데 최근 조직공학의 발달과 더불어 인체내 미분화 간엽 줄기세포를 이용하여 골이식의 성공을 높이고 우수한 이식골을 얻는 방법이 활발하게 연구되고 있다. 통상적으로 골이 이식되어 숙주골에 생착되고 새로운 골이 형성되기 위해서는 3가지의 기본요소가 필요하다. 즉, 골을 형성하는 골모세포 (osteoblast, chondroblast 등), 골 형성 세포의 활성을 유도하는 신호 분자 (signalling molecule: BMP 등) 그리고 이들 두가지 구성 요소를 골이식 부위에서 유지 보존시키기 위한 비계체 (scaffold)이다.

인체내 미분화 간엽 줄기세포를 이용한 조직 공학 방법은 골이식시 골모세포의 숫자와 질 (quantity and quality)을 획기적으로 향상시켜 골이식시 빠른 생착과 우수한 골 이식체를 형성하기 위한 방법<sup>5,7)</sup>이라 할 수 있다. 즉 숙주의 골수

로부터 미분화 간엽 줄기세포를 채취하여 이를 체외에서 골형성세포로 증식 또는 분화시켜 적당한 비계체와 함께 이식함으로써 골이식의 성공률을 높이고 우수한 이식골을 얻으려는 것이다. 이때 미분화 간엽 줄기세포의 채취, 증식 및 분화의 방법에 대해서는 많은 연구가 있었으며, 비계체로서 무엇을 사용할 것인가<sup>8-10)</sup>, 또는 어떤 신호분자를 사용할 것인가<sup>11)</sup>에 대한 방법에 대하여도 현재 활발한 연구가 진행 중이다. 일반적으로 골이식을 위한 간엽 줄기세포는 흡입법 (aspiration)<sup>12)</sup>, 또는 골 블록을 채취하여 이를 세척 하는 방법 (bone washing) 등으로 얻어진다. 이렇게 하여 얻어진 간엽 줄기세포는 실험실 내에서 증식, 분화의 과정을 거쳐 다양한 골 형성세포 전구집단을 만드는데 사용되어진다. 미분화 간엽줄기세포를 실험실에서 직접 골 형성세포로 분화시켜 사용할 것인가 혹은 미분화된 상태로 증식만 시켜 이식할 것인가 하는 것은 아직 많은 논란이 있다. 이때 전통적으로 골 형성세포로 분화시키기 위한 유도 배지로는 Dexamethasone, L-Ascorbic acid phosphate magnesium salt n-hydrate와  $\beta$ -glycerophosphate (Sigma Chemical Co.)가 사용된다. 또 골수에서 채취된 간엽 줄기세포가 골 형성세포로 분화되어 이식되고 이어서 골형성을 이루려면 이것이 안착되고 유지되는 매개체 즉, 기계적 강도와 3차원 구조를 가진 비계체가 반드시 필요하다. 대표적인 비계체로는 bioactive hydroxyapatite<sup>13)</sup>,  $\beta$ -tricalcium phosphate ceramics<sup>8)</sup>, glass ceramics<sup>9,10)</sup>, bioinert alumina ceramics<sup>14)</sup>. 또한 calcium carbonate<sup>15)</sup>나 polylactic acid같은 중합체<sup>16)</sup>도 사용하고 있는데, 이러한 재료를 간엽 줄기세포와 함께 이식하거나, 실험실내에서 비계체 내에 세포를 증식, 분화하여 이식하는 방식 등이 있다. Harris 등<sup>17)</sup>은 간엽줄기 세포를 위한 골 전도성 비계의 물리적 지지, 숙주 조직과의 친화도, 혈관 재생, 세포의 보완, 다공성, 표면형태, 화학적 구성을 강조하였으며, 특히 불용성의 Bio-oss 보다 비교적 수용성인 합성 Hydroxyapatite /Tricalcium phosphate를 비계체로 이용시 골형성이 높았다고 보고하였다.

신호 분자 (signalling molecules), 즉 성장인자는 기존에 골 이식술에서 골화 촉진과 골이식 재료의 활성을 위해 사용 되어졌었다. 이러한 인자들이 미분화 간엽 줄기세포의 생착과 골에 대한 효과에서도 상승작용을 하는 것으로 보고되고 있는데, Tsutsumi 등<sup>11)</sup>은 섬유아세포 성장인자가 간엽줄기 세포의 자가 복제에 많은 영향을 주는 것으로 보고하였고, Ueda 등<sup>12)</sup>은 상악동 공간에서 간엽 줄기세포와 자가골 및 혈소판 풍부 혈장의 골형성 효과에 대해서 분석하여 빠른 골생성을 보였다고 하였다. 이에 본 연구에서는 가토에서 미분화된 간엽 줄기세포를 추출하여 실험실에서 증식시킨 후 자가골 및 조직접착제와 혼합하고 이를 가토의 상악동에 이식하여 상악동 골이식시 미분화 간엽 줄기세포

가 골생성 및 골치유 과정에 미치는 영향을 분석함으로써 향후 미분화 간엽 줄기세포의 임상적 유용성을 연구하고자 하였다.

## II. 실험 재료 및 방법

### 1. 실험 동물 및 재료

체중 3.2~3.3 kg의 수컷 가토 16 마리를 실험동물로 사용하였으며 실온에서 동물용 고형사료와 물을 이용하여 일 정기간 사육하였다.

#### 가) 미분화 간엽 줄기세포 배양

##### (1) 골수 채취

미분화 간엽 줄기세포를 얻기 위하여 가토의 골수로부터 채취하였다. 먼저 가토의 장골부위를 손가락으로 촉진한 후 위치를 확인하였다. 피부 부위를 1: 100,000 에피네프린을 함유한 2 % 리도카인 (유한양행, 한국)으로 국소마취 한 후, 수술 3 주전에 보고된 방식<sup>20)</sup>에 따라 가토의 장골 중앙 으로부터 18 gauge 바늘을 사용하여 3 ml 골수를 채취하였다.

##### (2) 골수 배양

가토의 장골 중앙에서 채취된 3 ml의 골수세포는 전체 10 U/ml 중 3 ml의 heparinized phosphate buffered saline (PBS, Invitrogen Corporation, CA, U. S. A)을 함유한 용기에 담아 40 C에 10 분 동안 140x g으로 원심 분리했다. 혈장의 표면에 지방층은 제거하였고, 잔여 buffy coat와 적혈구들은 2개의 용기에 동등하게 나누어 담았다. 배양 배지는 20 % fetal bovine serum, L-glutamine, 항생제를 함유하고 있는  $\alpha$ -minimun essential medium ( $\alpha$ -MEM, Gibco, USA)을 채택하였으며, 본 실험의 목적상 조골 세포로의 분화는 유도하지 않았다. 세포들은 95% 공

기와 5% 이산화탄소를 함유한 37°C 습한 환경에서 배양 되어졌고, 배양액은 세포가 충분한 증식이 일어날 때까지 2-3 일 간격으로 교환하였다. 증식된 간엽 줄기세포는 기질화된 alkaline phosphatase 염색으로서 p-nitrophenyl phosphatase를 사용한 alkaline phosphatase 활성에 의해 확인하였다. 미분화 간엽 줄기세포가 배양접시에서 밀생에 도달하면 0.25 % trypsin/ EDTA로 분리하였다. 이 세포들을 배양액으로 현탁 시키고 plate에 분주한 후  $1 \times 10^7$  cells/ ml로 농축하였다 (Fig. 1, 2).

#### 나) 대조군 및 실험군 준비

수술 직전 실험실에서 배양해  $1 \times 10^7$  cells/ ml로 농축된 미분화 간엽 줄기세포 1 ml를 분리시키고, 가토의 전두골에서 채취한 입자형 자가골과 조직 접착제 (Greenplast®, 녹십자, 한국)를 혼합하여 이를 대조군으로 제작하였으며, 자가골 대신 Bio-Oss®를 혼합하여 이를 실험군으로 준비 하였다.

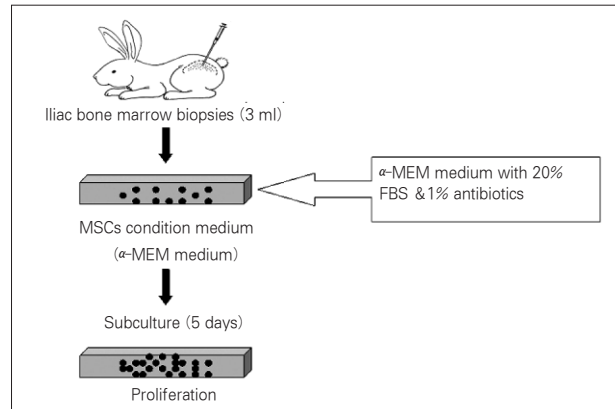
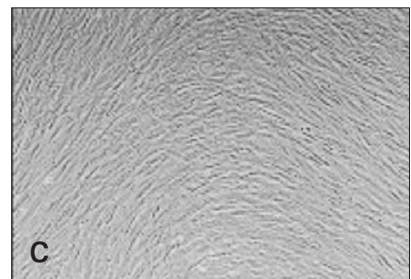
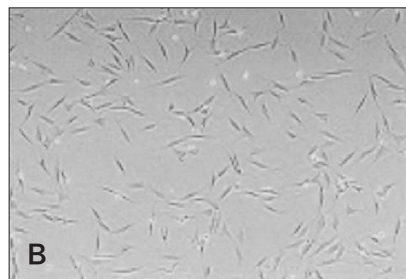
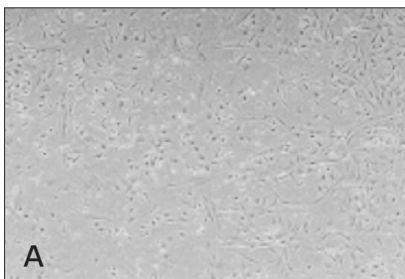


Fig. 1. Culture procedures of undifferentiated mesenchymal stem cell.



A. culture for 5th days in vitro after plate 0.

B. culture for 3rd days in vitro after plate 1.

C. culture for 5th days in vitro after plate 1.

Fig. 2. Plating of undifferentiated mesenchymal stem cell ( $\times 100$ ).

## 2. 실험 방법

상악동 골 이식술을 위해 동물용 진정 마취제 (럼폰® 3 mg/ kg, 한국 바이엘화학)와 미다졸람 (도미کم® 1 mg/ kg, 한국 로슈)을 각각 근육 주사하여 전신마취를 유도하였다. 전두부위에서 코 부위까지 제모를 하고 포타딘 용액으로 소독을 한 후 국소마취 유도과 지혈을 위해 1:100,000 에피네프린을 함유한 2 % 리도카인 (유한양행, 한국)을 피하 주사하였다.

가토의 전두부에 5 cm 정도의 절개를 가해 층별 박리를 시행하였고 골을 노출시킨 후 전두골 봉합선 (frontal bone suture line) 의 1.5 cm 하방, 5 mm 측방에 5 mm × 10 mm 의 골편을 제거하여 상악동의 전벽을 제거한 후 둔한 큐렛을 이용하여 상악동 점막을 상방으로 거상 시켰다. 대조군은 전두골에서 1 cm × 2 cm 크기의 골을 채취하였고, 제거된 상악동 전벽의 골과 함께 섞은 후 골 결자를 이용하여 입자형 골편을 제작하였다. 이어 4개의 용기로 분리되어 있는 조직 접착제 (Greenplast, 녹십자, 한국)를 통법에 따라 처리하여 여기에 자가골 1 ml와 3.5 ml 미분화 간엽 줄기세포를 혼합하여 겔화를 유도하였다.

8마리의 가토에서 실험군인 우측의 상악동 내에는 자가골

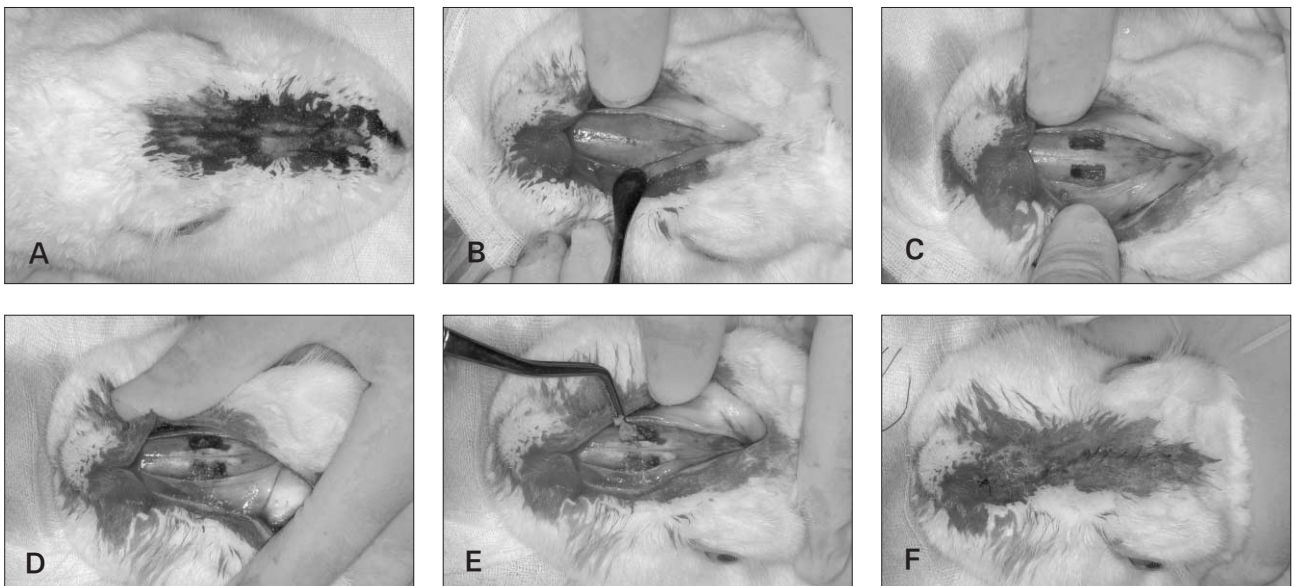
과 간엽 줄기세포, 조직 접착제를 적용하였고, 실험군인 좌측에는 자가골과 조직 접착제만을 이식하였다. 그 후 골막을 4-0 vicryl을 이용하여 봉합하였으며 4-0 nylon을 이용하여 피부 봉합을 시행하였다. 모든 실험동물은 술 후 감염 예방을 위하여 3일간 아목사실린 (티라목스, 삼진제약, 한국)과 디클로페낙 나트륨 (킨포인, 삼진제약, 한국)을 근육 주사 하였다 (Fig. 3).

## 3. 육안적 검사

상악동 골 이식술 후 가토의 사료 섭취상태, 골이식 부위의 조직반응에 대해 검사하였다. 술 후 1, 2, 4, 8 주에 희생하여 탈회하기 전에 골이식 부위의 치유양상과 염증 상태 및 골화 정도를 육안적으로 관찰한 후 탐침을 이용한 골 경도 검사를 시행하였다.

## 4. 방사선학적 검사

이식술 후 1, 2, 4, 8주에 가토를 희생하여 상악골을 채취한 후 골이식 부위를 중심으로 치과용 CDX 2000 sensor (Medico TECH, Finland)를 이용하여 65 kvp, 7.5 mA,



**Fig. 3.** Surgical procedures.

A. painting with povidon iodine.

B. incision & dissection to exposure the bone with periosteal elevator.

C. trap door was removed, and the antral membrane was elevated carefully to avoid perforation.

D. E. MSCs/ fibrin glue/ autobone mixture was placed into the left sinus, and autobone/ fibrin glue mixture was placed into the right one.

F. the periosteum and skin flap were replaced, sutured, and allowed to heal.

0.25 sec의 조건하에 Step wedge와 함께 방사선 촬영을 하였고, Scion image program으로 step-wedge를 기준으로 흑화도를 측정하였다. Step wedge는 0.03 mm 두께에서 0.27 mm 까지 9 단계로 0.03 mm씩 두께가 증가하는 것을 이용 하였다. Scion program 을 이용하여 각 방사선 사진 마다 바탕면과 각 step wedge층의 흑화도를 측정 한 후 골이식 부위를 측정 하였다. 평가는 골이식 부위의 흑화도가 step wedge의 어느 두께에 해당되는지 측정하여 골 밀도를 평가하였다.

### 5. 조직학적 검사

상악동 거상술 후 1, 2, 4, 8 주에 희생시켜, 상악동 부위에서 조직 표본을 형성한 후 2 일간 10 % 중성 포르말린용액에 고정하고, 10 % EDTA로 50 일간 탈회한 후, 통상적인 방법에 의하여 탈수 및 파라핀 포매를 하였으며, 4~6 μm의 박절 표본을 Poly-L-Lysine 을 도포한 슬라이드에 부착하여 표본을 제작하였다. 조직 절편에는 골이식 부위 및 정상부위가 모두 포함되도록 제작하였으며 신생골과 섬유조직의 형태 관찰과 변화를 알아보기 위해 H & E, Masson's trichrome, Periodic acid Schiff (PAS) 염색을 시행하여 검경하였다.

### 6. 조직 계측학적 검사

상악동벽의 측면 중심부에서 석회화된 조직상은 color reversal film에 8 비트의 밀도 값의 256 × 256 array로 디지털화하여 복사되었고, 분석을 위해 마이크로 컴퓨터에 전사되었다 (NIH image, version 1.61, National Institutes of Health).

골 이식 부위는 상악과 비강 벽, 상악동 막, 상악동 전벽에 골 라벨에 둘러싸인 부위로 규정하였다. 증대된 부위에서 전체 골량 (새로 형성된 골과 이식 골)과 증대된 높이 (증대된 공간의 최대 높이)는 컴퓨터 이미지 분석 시스템으로 정량화 하였다.

### 7. 통계 분석

각각의 분석 값을 가지고 그룹의 평균과 표준 편차를 산출 하였다. 데이터는 p < 0.05 이하에서 유의성 검정을 하였으며 paired, two-tailed Student' t-test를 시행하였다.

## III. 실험 성적

### 1. 육안적 검사

모든 실험 동물들은 상악동 골 이식술 후 체중감소 등의 별다른 이상소견 없이 건강하였으며, 수술 부위는 특별한 염증 소견이나 창상 이개 없이 잘 치유된 모습을 보였다. 가토를 희생 후 수술부위를 다시 노출 시켰을 때, 1, 2 주군에 좌측 대조군에서 약간의 염증 소견을 볼 수 있었고, 8 주군에서는 주변골과 구분하기 힘들 정도로 골화 되었다.

실험군은 1, 2 주군에서 숙주골과 부분적 분리는 보이나 4 주, 8 주에서는 주변 숙주골과 잘 융합 되어졌다. 대조군에서는 1, 2, 4 주군에서 주변 숙주골과 분리 된 양상을 보였다. 그러나 8 주군에서는 주변 숙주골과 구별이 가지 않고 잘 융합되어 있는 것을 볼 수 있었다. 탐침을 이용하여 눌러 보았을 때 1, 2 주군과 4 주군에서는 주변 숙주골에 비해 골의 경도가 낮았으나 실험군과 대조군을 비교할 시에는 실험군이 대조군에 비해 골의 경도가 높았다. 8 주군에서는 실험군과 대조군 모두 4 주군에 비해 경도는 증가하였으나 대조군에서 실험군에 비해 낮은 경도를 보였으며 두군 간의 차이는 없는 것처럼 느껴졌다.

### 2. 방사선학적 소견

방사선학적 소견에서 실험군과 대조군 모두 8 주로 갈수록 골밀도가 증가하는 경향을 보였다. 1 주군에서는 각각의 군에서 큰 흑화도 차이를 보이지는 않지만, 2, 4 주군에서는 간엽 줄기세포와 함께 이식한 군에서 대조군에 비해 유의할 정도의 흑화도 차이를 보였고 (p<0.05), 8 주에는 차이를 보였으나, 유의성은 없었다 (Fig. 4-7, Table 1).

**Table 1.** Changes of Bone Density

	1 week	2 weeks	4 weeks	8 weeks
Control group	0.10	0.09	0.13	0.15
Experimental group	0.11	0.13*	0.16*	0.17

Control group : Autobone + Fibrin glue

Experimental group : Autobone + Mesenchymal stem cell + Fibrin glue

\* P < 0.05

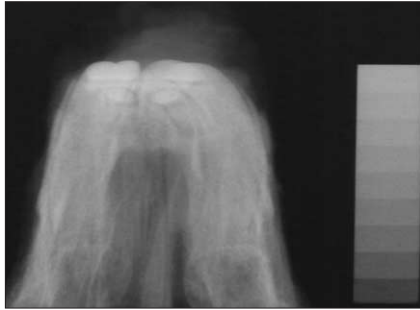


Fig. 4. 1 week.

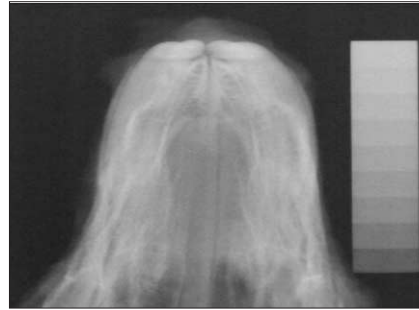


Fig. 5. 2 weeks.

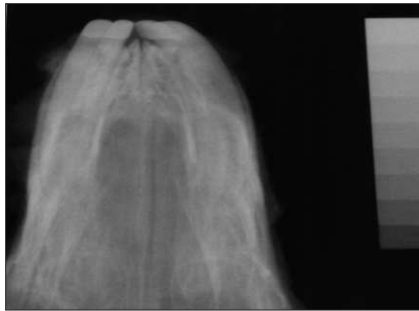


Fig. 6. 4 weeks.

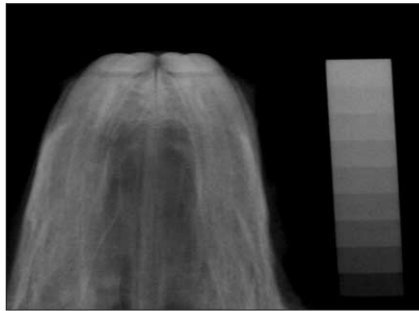


Fig. 7. 8 weeks.

Rt : Experimental group, Lt : Controle group.

### 3. 조직학적 소견

#### 가. 대조군 (자가골 + 조직 접착제)

상악동 내부의 골 이식부 (Fig. 8 B)는 1주에서는 출혈 및 육아조직을 관찰할 수 있었는데 급 만성 염증세포에 의한 이식골의 파괴가 일부에서 볼 수 있었고 신생골 형성은 거의 없었으나 파골세포에 의한 골 흡수는 현저하였다 (Fig. 8 D). 2 주의 대조군은 급성 염증반응이 사라지고 만성염증세포 침윤과 함께 이식골 주위에서 많은 신생골 형성과 함께 우수한 조골세포를 보였으나 파골세포의 활성화는 미약하였다 (Fig. 9 B, 9 D). 4 주에는 섬유아세포가 이주하여 조골세포로 분화되어 현저한 신생골의 형성이 이루어졌고 (Fig. 10 B) 일부 파골세포에 의한 골 흡수가 잔존되었다 (Fig. 10 D). 8 주에는 이식부는 층판골로의 대체는 관찰되지 않았고 만성염증세포 침윤이 잔존되고 있으며 골흡수가 남아 있었다 (Fig. 11 C). 결론적으로 대조군은 초기 염증반응이 심하고 골흡수가 장기간 지속되며 말기에도 완전한 골개조가 나타나지 않았다.

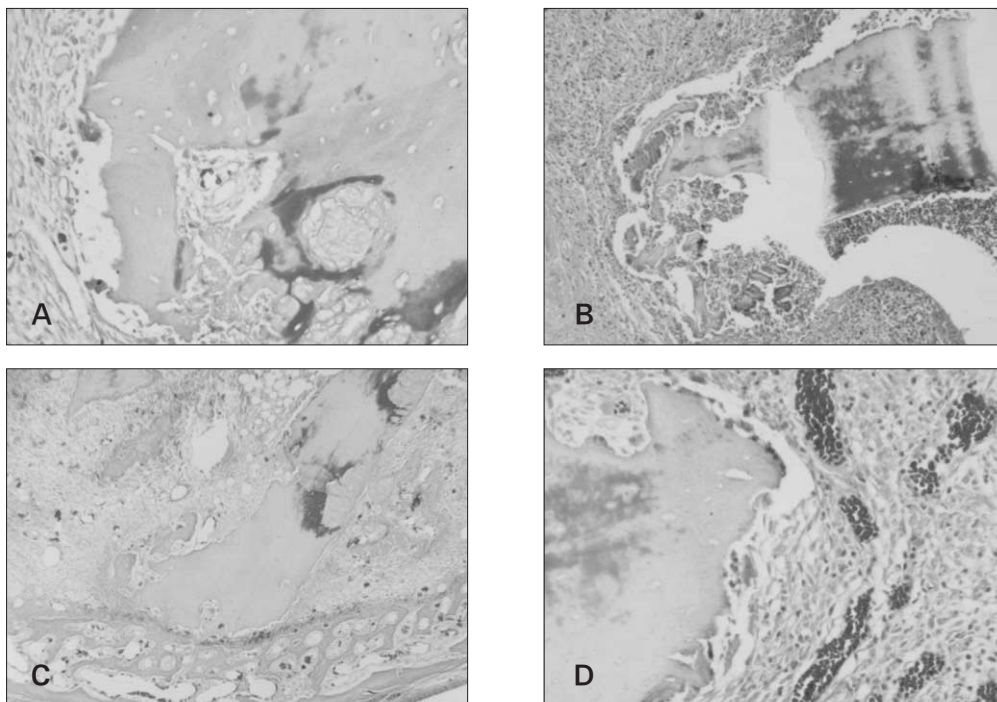
#### 나. 실험군 (자가골 + 미분화 간엽 줄기세포 + 조직 접착제)

상악동 내부의 골 이식부 (Fig. 8 A)는 1 주에서는 출혈

및 육아조직은 거의 없어 대조군보다 염증반응이 적었고 숙주골과 이식골간의 융합도 관찰 되었으나 (Fig. 8 C), 골 흡수와 골 형성이 동반되는 골 개조가 활성을 보였다. 2 주의 미분화 간엽 줄기세포군은 파골세포에 의한 골 흡수와 염증세포침윤은 거의 사라졌으며 신생골 형성이 현저하게 나타나 실험군중 가장 우수한 신생골 형성과 골모세포 활성을 보였다 (Fig. 9 A, 9 C). 4 주에서는 골 개조가 계속 진행되어 이식부가 신생골과 치밀 섬유조직으로 대체되었는데 골모세포 활성화는 2 주에 비해 4 주에서부터 감소되었다 (Fig. 10 A, 10 C). 8 주에서는 이식부가 층판골로 대체되었으며 완전한 골성 융합을 이루었으며 염증세포 침윤이나 골 흡수는 관찰되지 않았다 (Fig. 11 A, 11 B). 결론적으로 실험군은 대조군에 비해 초기 염증반응 및 골 흡수가 적고 골치유가 우수한 것으로 나타났다 (Table 2).

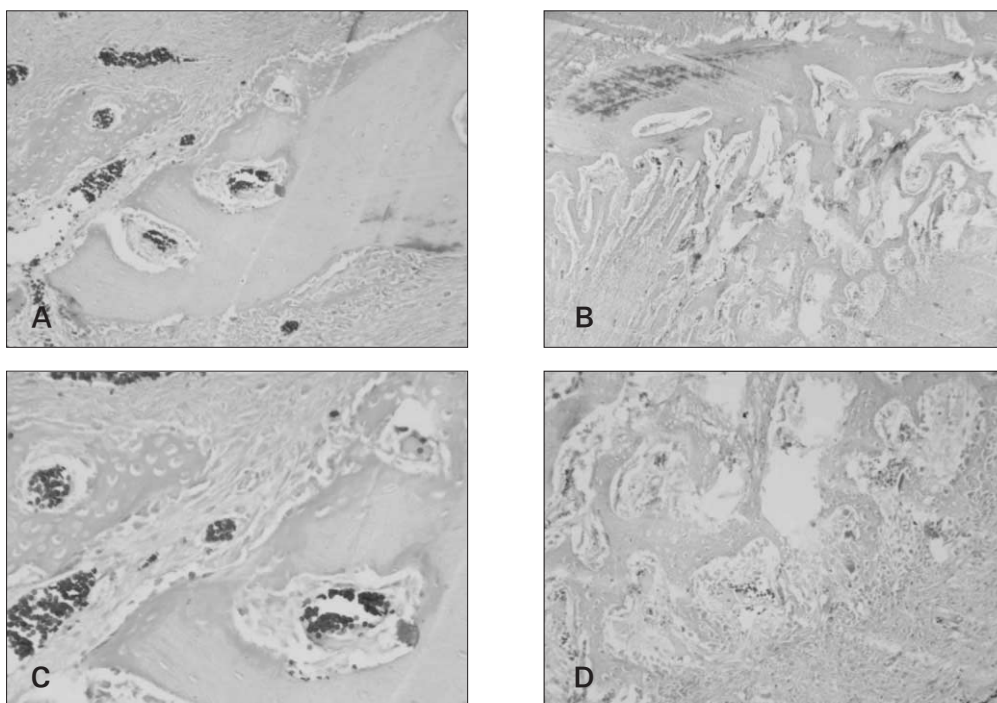
### 4. 조직 계측학적 소견

조직 형태학적인 분석에서는 실험군의 2 주, 4 주, 8 주에 유의성 있게 골 형성이 우수하였으며 ( $p < 0.05$ ), 결과적으로 대조군의 8 주에서 약 40 %의 골 형성을 보였고, 실험군은 정상적인 숙주골과 유사한 소견을 보였다 (Table 3).



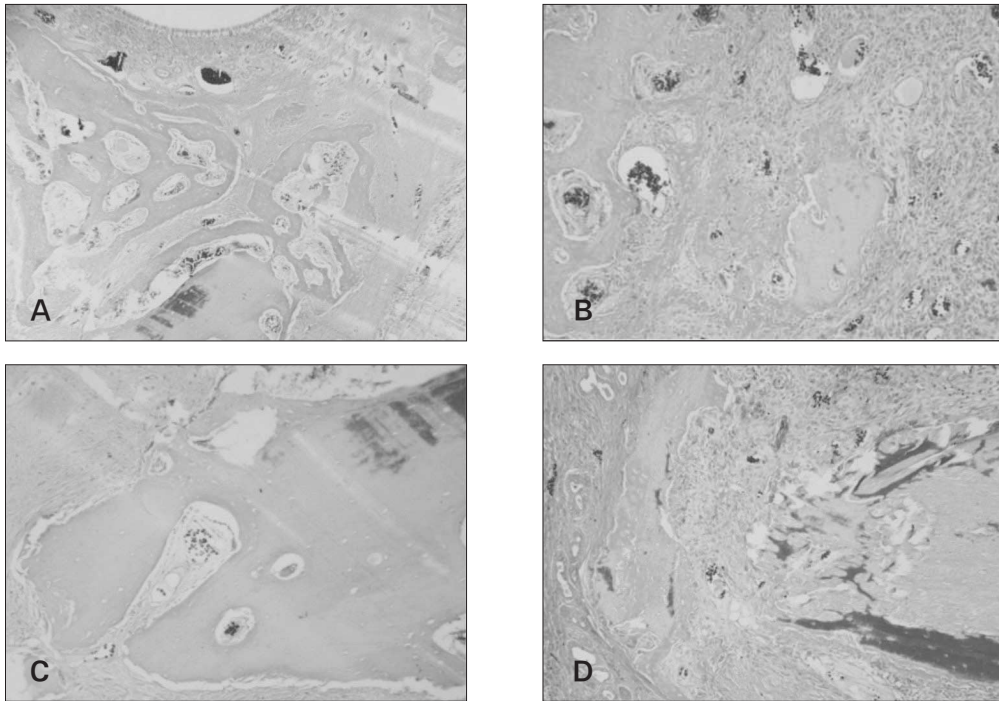
**Fig. 8.** 1 week.

8A-8D. Microphotography in Maxillary Sinus Antrum at 1 week. (Modified M.T. stain, A and C; Autobone with Stem cell Group, B and D; Autobone without Stem cell Group, A and B;  $\times 40$ , C, D;  $\times 200$ ). Stem cell group shows integrated graft bone with host bone from sinus wall (A), which reveal severe bone resorption by osteoclasts and new bone formation (C) at 1 week. Without stem cell group reveal severe bone resorption by osteoclasts and inflammatory cell infiltration (B, D) at 1 week.

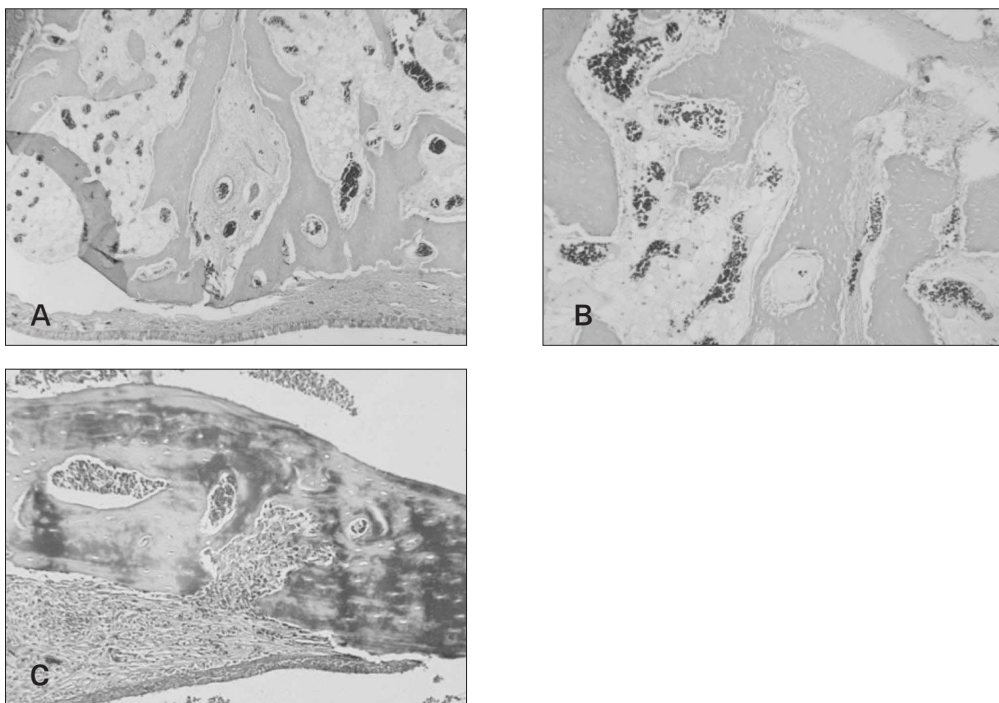


**Fig. 9.** 2 weeks.

9A-9D. Microphotography in Maxillary Sinus Antrum at 2 weeks. (Modified M.T. stain, A and C; Autobone with Stem cell Group, B and D; Autobone without Stem cell Group, A and B;  $\times 40$ , C, D;  $\times 200$ ). Stem cell group shows disappearance of osteoclasts and active bone formation by osteoblasts (A, C). Without Stem cell group shows appositional new bone formation (B), active osteoblasts and rare osteoclast (D) at 2 weeks.



**Fig. 10.** 4 weeks.  
10A-10D. Microphotography in Maxillary Sinus Antrum at 4 weeks. (Modified M.T. stain, A and C; Autobone with Stem cell Group, B and D ; Autobone without Stem cell Group, A and B;  $\times 40$ , C, D;  $\times 200$ ). Stem cell group shows fibrous union of grafted bone and inactive osteoblasts (A, C). Without stem cell group reveal still bone remodeling and bone resorption by osteoclasts and inflammatory cell infiltration (B, D) at 4 weeks.



**Fig. 11.** 8 weeks.  
11A-11C. Microphotography in Maxillary Sinus Antrum at 8 weeks. (Modified M.T. stain, A and B; Autobone with Stem cell Group, C ; Autobone without Stem cell Group, A;  $\times 40$ , B, C;  $\times 200$ ). Stem cell group shows normal appearing union of grafted bone and host bone (A, B). Without stem cell group shows persistent inflammatory cell infiltration and bone resorption by osteoclasts (C) at 8 weeks.



**Table 2.** Histological Summary of the Grafted Maxillary Sinus

Period (week)	Control group				Experimental group			
	1	2	4	8	1	2	4	8
Inflammation	+++	++	+	±	+	±	-	-
Hemorrhage	++	+	±	-	±	±	-	-
New bone formation	-	++	±	±	++	+++	++	+
Angiogenesis	+	±	±	±	++	+	±	±
Fibrosis	++	+++	±	±	+	+++	±	±

(- : negative ± : rare + : mild ++ : moderate +++ : intense)

Control group: Autobone + Fibrin glue

Experimental group: Autobone + Mesenchymal stem cell + Fibrin glue

**Table 3.** Histomorphology of New Bone Formation (%)

	1 week	2 weeks	4 weeks	8 weeks
Control group	3.1	10.5	20.9	40.8
Experimental group	7.6	17.5*	32.3*	77.9*

Control group : Autobone + Fibrin glue

Experimental group : Autobone + Mesenchymal stem cell + Fibrin glue

\* P < 0.05, %: new bone formation area/ total grafted area.

#### Ⅳ. 총괄 및 고찰

골격계는 골모세포 (osteoblast)와 파골세포 (osteoclast)의 상호 작용에 의하여 골 흡수 및 생성이 지속적으로 일어나는 동적인 구조이다. 외상 혹은 수술 등에 의하여 골 결손이 발생 되거나 이 결손부위에 인위적으로 골이식을 시행한 경우에는 이 골모세포와 파골세포의 상호작용으로 골 생성 및 재생이 일어난다. 이러한 골 치유 (bone healing) 과정은 인간에게 있어서는 골 이식부 또는 골 결손부에 염증반응이 일어나면서 재 혈관화가 이루어지는 초기 2 주내의 염증기와 이어 3, 4 주에 걸쳐 골유도 (osteoinduction), 골전도 (osteoconduction) 및 골 생성 (osteogenesis)의 과정을 거쳐 가골 및 직조골 (woven bone)이 형성되는 1 단계 골재생 (phase I bone regeneration) 및 이후 6 주에서 수개월 동안 1단계 골재생에서 형성된 가골 및 직조골이 흡수, 교체되어 골 개조 (remodeling)가 일어나는 2 단계 골재생으로 이루어진다<sup>18)</sup>. 2 단계 골재생을 거치면 이식되어 새로 생성된 골은 광화되어 단단하고 세포수는 적으며, 성숙한 haversian system을 갖춘 층판골로써 외부의 압력이나 기능적인 힘을 견딜 수 있다.

그러므로 골이식의 성공과 골 창작 효율을 향상시키기 위해서는 첫째로 초기 염증기 과정에서 효율적인 재 혈관화로 염증 반응을 줄여 이식골의 소실을 감소시키고, 둘째 1 단계 골재생 과정에서 새로 형성되는 골의 양을 증가시키고, 반대로 골 흡수는 줄여야 한다. 셋째로 2 단계 골재생 과정

에서는 비정상적인 골 흡수를 줄여 성숙한 골로 완전히 대체시켜야 한다. 이 때, 이러한 전 과정이 될 수 있는 한 빠른 시간 내에 이루어 진다면 골이식 후 치유 과정이 한층 예지력 있게 진행될 것이다.

본 연구의 목적은 골 이식시 미분화 간엽줄기세포가 위와 같이 골치유의 3단계의 과정에 어떤 역할을 하는가를 알아 보기 위함이었다. 즉, 가토의 골수로부터 미분화 간엽 줄기세포를 채취하여 실험실에서 증식시키고 이어 10<sup>7</sup>cells/ml의 미분화 간엽 줄기세포를 얻은 후 이를 자가골 1 ml와 섞은 후 적당량의 조직 접착제를 이용하여 고정하였다. 이 이식편은 용적이 1 ml인 상악동에 압축하여 이식하였다. 이의 치유과정을 이식 후 1 주, 2 주, 4 주, 8 주 기간동안 육안적, 방사선학적, 조직학적 및 조직 형태학적으로 관찰 하였다.

그 결과, 미분화 간엽 줄기세포를 첨가한 실험군에서 그렇지 않은 대조군에 비하여 육안적으로 보다 빠르게 그리고 단단하게 치유되는 것을 관찰할 수 있었으며 방사선학적으로는 초기 2, 4 주군에서 유의성 있는 방사선 흑화도의 차이를 보여 빠른 골 생성과 광화를 관찰할 수 있었다 (p<0.05).

위와 같은 사실은 조직학적 또는 조직형태학적 검사결과에서도 증명되었는데 먼저 대조군에 비하여 실험군에서 현저하게 초기 염증반응이 적어 염증세포에 의한 골 파괴가 적었으며 신생 혈관증식이 우수하여 빠른 시간 내에 골생성이 시작되었고 이에 따라 보다 많은 양의 신생골 형성을 볼

수 있었는데 조직형태학적 검사결과에서도 보듯이 이식 8주에서는 대조군에 비하여 약 38% 이상 골형성량이 증가된 소견이었다. 위와 같은 결과는 이식된 미분화 간엽줄기세포가 초기 염증기와 1 단계 골재생 과정에서 획기적으로 골이식 치유를 촉진시키고 있음을 추정케 한다. 이것은 단지 다른 골 유도물질 (BMP등의 성장인자)이 숙주골의 골모세포의 활성을 유도하는 방식이 아닌 이식된 미분화 간엽줄기세포가 직접적으로 조골세포로 분화되어 1 단계 골을 형성하는데 관여했음을 나타낸다. Bruder 등<sup>19)</sup>, Tsutsumi 등<sup>11)</sup> 도 이식된 미분화 간엽 줄기세포가 골모세포 또는 연골모세포 등으로 분화될 수 있다고 하였으며 Liechty 등<sup>20)</sup>은 이때 미분화 간엽 줄기세포가 기타 다른 조직세포로 분화되지 않고 골을 생성하고 세포로 분화되는 것은 숙주의 환경이 크게 영향을 미친다고 하였다. 본 실험에서는 상악동 공간에 미분화 간엽 줄기세포가 자가골과 같이 이식 되었기 때문에 이런 환경에선 쉽게 골모세포로 분화되었음을 추정할 수 있었으며 조직학적 검사에서도 초기 1주, 2주군에서 골모세포의 활성도가 매우 높은 것으로 보아 위와 같은 사실을 뒷받침할 수 있었다. 결과적으로 골모세포로 분화된 미분화 간엽 줄기세포는 직접적인 골 재생 (osteogenesis)의 과정을 거쳐 제 1단계 골 재생 (phase 1 bone regeneration)을 대조군에 비하여 유의성 있게 높게 형성하였다고 할 수 있다<sup>27-31)</sup>.

본 실험의 결과로 추정할 수 있는 또 한가지 사실은 간엽 줄기 세포가 골이식의 치유 과정에서 초기 염증반응의 활성을 줄이고 또한 숙주골로부터 신생혈관의 형성 (angiogenesis)을 촉진시켰다는 것이다. 이는 초기 염증반응에 의한 이식골의 파괴를 감소시키면서 이식골을 조기에 안정화시킨 효과를 가져왔으며 이것은 골이식의 성공 기준에서 가장 중요한 초기 생착의 효율을 획기적으로 증가시켰다고 할 수 있다.

이것은 골이식시 혈소판 농축혈장 (platelet rich plasma)을 첨가함으로써 골이식 효율을 증가시키는 기법의 임상적 및 실험적 결과와 매우 유사하다. 이에 따르면 혈소판 농축 혈장 내의 여러 성장인자, 주로 PDGF<sup>21-23)</sup>나 TGF- $\beta$ <sup>25,24)</sup>는 숙주골의 세포분열을 유도하여 염증세포의 활성을 도와주며 내피세포의 분열을 촉진하여 혈관 신생을 증가시키며 대식세포의 기능을 활성화 한다고 한다. 이에 따라 골 이식시 혈소판 농축 혈장을 첨가 하였을 때 이식골의 경화 시간을 약 50 % 가량 감소시키며 골소주의 밀도를 15-30 % 향상시킬 수 있다 하였다.

본 실험의 결과에서 이식된 간엽줄기세포에 의해서도 위와 같은 성장인자의 작용이 똑같이 진행된다고 추정할 수 있어 아마도 이는 분화된 조골세포에서 다양한 성장인자들이 분비되어 초기 염증반응을 줄이고 신생혈관의 침투를 촉진시켜 골이식의 생착을 안정적으로 이루게 하였다고 볼 수

있다. Ueda 등<sup>12)</sup>은 혈소판 농축 혈장의 이러한 작용을 첨가하기 위하여 간엽줄기세포를 이식할 때 혈소판 농축 혈장도 같이 이식하여 초기 골 생착을 촉진시키려 시도하였으나, 본 실험의 결과에서는 미분화 간엽 줄기세포에서도 위와 같은 작용이 있음이 증명되었다.

이상과 같은 본 연구의 실험적 결과는 향후 미분화 간엽 줄기세포의 임상적 적용에 매우 긍정적인 면을 제시한다고 볼 수 있다. 최근에는 실제로 인간에게 미분화 간엽 줄기세포를 사용하여 악골 및 치조골 이식을 시행하여 우수한 결과를 보인 연구결과도 많이 발표되고 있다. 하지만, 줄기세포의 채취방법과 보관법, 분화방법 및 효과적인 비계체등에 대해서는 아직 정립되지 못한 난제들이 많이 남아있으며 향후 지속적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## V. 결 론

본 연구는 가토에서  $1 \times 10^7$  cells/ml로 농축된 미분화 간엽 줄기세포를 자가골에 혼합한 후 조직 접착제를 이용하여 고정하고, 이를 상악동에 이식하였으며, 대조군인 자가골과 조직 접착제만을 혼합한 군과 비교하여 미분화 간엽 줄기세포가 골 치유과정에서 어떤 효과를 보이는지 육안적, 방사선학적, 조직학적 및 조직 형태학적 평가를 통해서 다음과 같은 결과를 얻었다.

가토의 상악동 골이식시 미분화 간엽 줄기세포를 첨가하였을 때 대조군에 비하여

첫째, 육안적 검사에서 대조군에 비하여 보다 빠르게 그리고 단단하게 골화되었다.

둘째, 방사선학적 검사에서 대조군에 비하여 2 주, 4 주에서 보다 높은 골밀도를 보였다.

셋째, 조직학적 및 조직 계측학적 검사에서 대조군에 비하여 초기 염증반응이 적고, 신생 혈관의 증식이 우수하였으며 또한 보다 많은 초기 골 생성을 보였다.

결론적으로 골이식시 골수에서 채취한 미분화 간엽줄기세포를 첨가하는 술식은 골치유 과정을 촉진시켜 보다 많은 양의 골 생성을 이루게 한다고 사료된다.

## 참고문헌

1. Block MS, Kent JN : Sinus augmentation for dental implants: the use of autogenous bone. J Oral Maxillofac Surg 55 : 1281, 1997.
2. Leonardi D, Pecora GE : Augmentation of the maxillary sinus with calcium sulfate: one year clinical report from a prospective longitudinal study. Int J Oral Maxillofac Implants 14 : 869, 1999.
3. Tatum H Jr : Maxillary and sinus implant reconstructions. Dent Clin North Am 30 : 207, 1986.
4. Boyne PJ, James RA : Grafting of the maxillary sinus floor with autogenous marrow and bone. J Oral Maxillofac Surg

- 38 : 613, 1980.
5. Lind M : Growth factors: Possible new clinical tools. *Acta Orthop Scand* 67 : 407, 1996.
  6. Cawood JI, Howell RA : A classification of the edentulous jaws. *Int J Oral Maxillofac Surg* 17 : 232, 1996.
  7. Garg Ak : The future role of growth factors in bone grafting. *Dent Implantol Update* 10 : 5, 1999.
  8. Ohgushi H, Goldberg VM, Caplan AI : Heterotopic osteogenesis in porous ceramics induce by marrow cells. *J Orthop Res* 7 : 568, 1989.
  9. Ohgushi H, Dohi Y, Yoshikawa T, Inoue K. et al : Osteogenic differentiation of cultured marrow stromal stem cells on the surface of bioactive glass ceramics. *J Biomed Mat Res* 32 : 341, 1996.
  10. Ohgushi H, Okumura M, Yoshikawa T, Inoue K. et al : Dropped apatite-wollaston-ite containing glass ceramic provokes osteogenic differentiation of marrow stromal stem cells. *J Biomed Mater Res* 44 : 381, 1999.
  11. Tsutsumi S, Shimazu A, Miyazaki K, Pan H. et al : Retention of multilineage differentiation potential of mesenchymal cells during proliferation in response to FGF. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 288 : 413, 2001.
  12. Ueda M, Yamada Y, Naiki T, Takahachi M. et al : Autogenous injectable bone for regeneration with mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma.- Tissue engineered bone regeneration. *Tissue Engineering* 10 : 955, 2004.
  13. Ohgushi H, Dohi Y, Katuda T, Tamai S. et al : In vitro bone formation by rat marrow cell culture. *J Biomed Mat Res* 32 : 333, 1996.
  14. Kitamura S, Hirose M, Funaoka H, Takakura Y. et al : Osteogenic differentiation of human bone marrow derived mesenchymal cells cultured on alumina ceramics. *Artif Organs* 28 : 72, 2003.
  15. Ohgushi H, Okumura M, Yoshikawa T, Inoue K. et al : Bone formation process in porous calcium carbonate and hydroxyapatite. *J Biomed Mat Res* 26 : 885, 1992.
  16. Hasegawa Y, Ishimura M, Habata T, Tamai S. et al : Marrow cell culture on poly-L-lactic acid fabrics. *Clin Orthop* 358 : 235, 1999.
  17. Harris CT, Cooper LF : Comparison of bone graft matrices for human mesenchymal stem cell-directed osteogenesis. *J Dent Res* 25 : 747, 2004.
  18. Martin RB : Skeletal biology. In : 29, 1998.
  19. Bruder SP, Fox BS : Tissue engineering of bone: Cell based strategies. *Clin Orthop* 367 : 68, 1999.
  20. Liechtye KW, Mackenzie TC, Shaaban AF : In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res* 238 : 265, 2000.
  21. Marx RE, Carson ER, Eichstaedt RM. et al : Platelet-rich plasma, growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol* 85 : 638, 1998.
  22. Anitua E : Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the treatment of future sites for implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 14 : 529, 1999.
  23. Noshi T, Gibran NS, Isik FF, Heimbach DM. et al : Recombinant human bone morphogenic protein-2 potentiates the in vivo osteogenic ability of marrow/hydroxyapatite composites. *Artificial Organs* 25 : 201, 2001.
  24. Rose LF, Rosenberg E : Bone grafts and growth and differentiation factor for regenerative therapy. *Aesthet Dent* 13 : 725, 2001.
  25. Cochran DL, Woxney JM : Biological mediators for periodontal regeneration. *Periodontol* 19 : 19, 2000.
  26. Kadiyara S, Young RG, Thiede MA, Bruder SP. et al : Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro. *Cell Transplantation* 6 : 125, 1997b.
  27. Younger EM, Chapman MW : Morbidity at bone graft donor sites. *J Orthop Trauma* 3 : 192, 1989.
  28. Lundgren S, Moy P, Johansson C, Nilsson H : Augmentation of the maxillary sinus floor with particulated mandible. *Int J Oral Maxillofac Implants* 11 : 760, 1996.
  29. Piatelli M, Favero GA, Scarano A, Orsini G, Piatelli A : Bone reactions to anorganic bovine bone (Bio-Oss) used in sinus augmentation procedures. *Int J Oral Maxillofac Implants* 14 : 835, 1999.
  30. Jensen OT, Sennerby L : Tissue reaction and material characteristics of four bone substitutes. *Int J Oral Maxillofac Implants* 11 : 55, 1996.
  31. Buser D, Dula K, Hess D, Hirt HP : Lateral ridge augmentation using different bone fillers and barrier membrane application. *Clin Oral Impl Res* 12 : 260, 2001.
  32. Cho MI, Lee DM : Platelet derived growth factor modulated guided tissue regenerative therapy. *J Periodont* 66 : 522, 1995.

#### 저자 연락처

우편번호 570-710  
전라북도 익산시 신룡동 344-2번지  
원광대학교 치과대학 구강악안면외과학교실  
오 승 환

원고 접수일 2006년 9월 1일  
게재 확정일 2006년 11월 13일

#### Reprint Requests

Sung-Hwan Oh  
Department of Oral & Maxillofacial Surgery,  
School of Dentistry, Wonkwang University,  
#344-2, Sinyoung-Dong, Iksan city, Chunbuk, 570-710, Korea  
Tel: 82-63-850-6931  
E-mail: omsosh@wonkwang.ac.kr

Paper received 1 September 2006  
Paper accepted 13 November 2006