

하악골 신장술에서 압축자극을 통한 골재생시 TGF-β1, Osteonectin 및 BMP-4의 발현

박성진 · 김욱규 · 정인교 · 황대석 · 김용덕 · 신상훈 · 김철훈* · 변준호**
부산대학교 치과대학 구강악안면외과학교실, *동아의료원 구강악안면외과,
**경상대학교 의과대학 구강악안면외과

Abstract (J. Kor. Oral Maxillofac. Surg. 2007;33:288-296)

EXPRESSION OF TGF-β1, OSTEONECTIN AND BMP-4 ON BONE REGENERATION IN MANDIBULAR DISTRACTION OSTEOGENESIS COMBINATION WITH A COMPRESSION STIMULATION

Seong-Jin Park, Uk-Kyu Kim, In-Kyo Chung, Dae-Seok Hwang, Yong-Deok Kim,
Sang-Hun Shin, Cheol-Hoon Kim*, June-Ho Byun**
Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, College of Dentistry, Pusan National University,
**Dept. of OMS, Dong-A Medical Center,*
***Dept. of OMS, Gyeongsang National University*

Distraction osteogenesis(DO) is a technique of lengthning bone including soft tissue by gradual separation of surgically divided bone surfaces.

Distraction osteogenesis combination with a compression stimulation(DO-CO) was a new technique by authors to enhance new bone quality and to shorten the consolidation period.

The purpose of this study was to compare DO with DO combined with compression force in efficiency by evaluating the expression of TGF-β1, osteonectin and BMP-4 on bone regenerate in rabbit mandible.

Fourty two rabbits were used for this experiment.

On the control group, the distraction was carried out at the rate of 1 mm per day to obtain the amount of 8 mm distraction for 8 days.

On the experimental group, the distraction was carried out at the rate of 1mm per day for 10 days, 3 days-latency period, and then the compression was carried out as counter direction 1 mm per day for 2 days. After 0 day, 5 days, 13 days, 20 days, 27 days, 34 days and 41 days, three rabbits on each group were sacrificed and the distracted portion of mandible were cut and treated for RT-PCR observation. The level of expression of TGF-β1 and osteonectin were shown more and longer expression in the experimental group than in the control group. The expression of BMP-4 was maintained with high level during the entire experimental period in both groups.

These findings suggested that DO with compression stimulation could be a favorable technique for obtaining a good new bone quality.

Key words: Distraction osteogenesis, Compression, TGF-β1, Osteonectin, BMP-4

I. 서 론

구강악안면 결손부위의 재건을 위해 다양한 방법의 이식술이 사용되어져 왔으나 이식골의 감염, 흡수, 공여부의 장애 등

의 문제점들이 나타나고 있다. 이러한 전통적인 이식술의 문제점들을 해결하기 위해 신장골 형성술이 최근 많이 보급되고 있다. 신장골 형성술은 골 길이의 확장, 기형의 수정 및 큰 골 결손부를 회복하는데 효과적인 수단으로 정형외과 영역에서 먼저 시행되었다. 신장골 형성술의 발전은 1905년 Codivilla¹⁾는 대퇴골의 사선골 절제술 후에 외부골격 견인을 이용하여 지속적인 확장(continuous expansion)의 개념을 도입한 사지 연장술을 최초로 시행하였고, 1950년대에 Ilizarov²⁾는 점진적이고 지속적인 신장력을 적용함으로써 상당한 양의 신생골이 형성된다는 것을 임상적으로 정립하였으며, 1989년 생체에 인장력을 가하면 조직대사가 활성화 되어 세포증식 및 생합성이 촉진된다

김욱규

602-739 부산 서구 아미동 1-10번지
부산대학교 치의학전문대학원 구강악안면외과학교실
Uk-Kyu Kim
Dept. of OMFS, School of Dentistry, Pusan National University
1-10, Amidong, Seogu, Pusan, 602-739, Republic of Korea
Tel: 82-51-240-7803 Fax: 82-51-244-8334
E-mail: kuksjs@pusan.ac.kr

는 "The law of tension-stress"를 발표하면서 이론적 정립이 되었다³⁴⁾. 악안면 영역에의 적용은 1973년 Snyder 등³⁵⁾이 개의 하악골을 이용한 결과를 처음 보고하였으며 1992년 McCarthy 등³⁶⁾이 소아의 편측 하악골에서 구외장치를 이용하여 하악골을 신장시킨 임상 증례를 발표한 이후 많은 임상 증례들이 보고 되고 있다.

그 후 보다 우수한 골질과 치료시간의 단축을 위한 많은 연구들이 시행되어 왔다. Pepper 등³⁷⁾은 신생골에 electric stimulation을 가하는 방법을 시도하였으며, Greenwald 등³⁸⁾은 가골에 신장력과 압축력을 번갈아 적용하는 pumping stimulation을 적용하였으며, Mizumoto 등³⁹⁾은 신장골 형성술 동안 BMP-7을 투여하여 골화(ossification)를 가속화시킬 수 있다고 하였고, Mofid⁴⁰⁾은 일정기간의 신장술 이후 생긴 가골의 경화기 초기에 신장력과 수축력을 번갈아 적용함으로써 통상적인 신장술식에 비해 골성속도를 증가시킬 수 있다고 보고하였다. 또한 Sakurakichi 등⁴¹⁾은 저강도의 초음파 자극(low-intensity pulsed ultrasound)은 막내골화의 방식으로 골성속도를 증가시키고 골신장술시 잠복기, 신장기, 성숙기 중 신장기에 적용되었을 때 가장 효과적이었다고 보고하였으며, Claes 등⁴²⁾은 저강도의 초음파 자극을 통하여 치유가골의 보다 나은 강도를 얻을 수 있다고 하였다. 김 등⁴³⁾은 통상적인 골절단, 잠복기, 신장기를 시행하고 경화기의 일정기간에 압축력(Compression force)을 부여함으로써 조직학 및 방사선학적으로 관찰한 결과 보다 나은 골질이 형성되고, 전체 골형성 유도기간이 단축될 수 있다고 보고하였다. 압축량, 압축빈도, 압축시 잠복기 등에 대한 연구에서는 압축량이 신장량의 1/5인 경우, 압축력 적용전 잠복기는 3일인 경우 가장 좋은 골형성이 이루어진다고 하였다⁴⁴⁾. 이러한 기계적 자극이 세포수준에서의 골형성을 유도하는 것에 대해 많은 연구가 있지만, 이에 대한 기전 및 관여인자에 대해서 밝혀진 것은 아직까지 미약하며 신장골 형성을 유도하는 분자생물학적 기전들은 아직 불명확한 상태이다. 1990년대 말부터 현재까지 시행된 분자 생물학적인 연구에서 골절치유 및 신장골 형성시 골형성에 관여하는 것으로 보이는 성장인자로는 transforming growth factor-betas(TGF- β), insuline-like growth factor- I (IGF-I), basic fibroblast growth factor(bFGF), bone morphogenetic proteins(BMPs)등이 있고, 교원성 단백질로는 제I형 교원질, 비교원성 세포외기질 단백질로는 osteocalcin, osteonectin, osteopontin 등이 있다. 그 중 TGF- β 1은 신생골 형성 동안 골모세포의 이주, 분화, 세포의 기질 합성, 혈관 형성에 중요한 조절 역할을 하는 단백질로 알려져 있으며, 골형성이 더 왕성한 곳에서 상대적으로 높은 발현을 보인다. 비교원성 세포의 기질 단백질 중 Osteonectin은 주로 제 I형 교원질과 결합하는 당단백으로 수산화인회석에 대한 친화력이 높으며, 골의 석회화의 시작 및 골의 재개조, 무기질화 초기 등의 조절에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. BMP-4는 골세포의 증식과 분화에 관여하며, 신생골 형성능력이 뛰어나고 골절 치유 및 신장골 형성술에서 중요한 조절 인자로 작용한다고 알려져 있다.

본 연구는 통상적인 신장골 형성술과 신장력-압축력을 병용

한 신장골 형성술시 골형성에 관계되는 인자들 중 TGF- β 1, Osteonectin 및 BMP-4의 발현 양상을 Western blot analysis와 RT-PCR(Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction) analysis를 통해 비교해 봄으로써 신장력-압축력을 병용한 신장골 형성술 연구에 기초를 제공하고자 함이다.

II. 연구재료 및 방법

1. 연구재료

(1) 실험동물

체중 3 kg의 가토 42 마리를 사용하였다. 가토의 사료는 실험동물용 분말 사료를 이용하여 부정교합 유발 이후에도 사료의 섭취가 가능하도록 하였다.

(2) 실험장치

신장력 및 압축력을 적용하기 위한 골신장 장치는 교정용 확대 screw (Expansion screw, Dentarum, Germany)와 자가중합레진 (Orthodontic resin, Densply, U.S.A.)을 이용하여 자체제작 하였으며 하악골의 고정을 위해 mini titanium screw (2.0 mm \times 18 mm, 제일메디칼코퍼레이션, 한국) 2개를 이용하였다. 이 신장기의 신장력은 시계방향회전으로 압축력은 반시계방향회전으로 적용하였고 최대 11 mm까지 신장가능 하였다.

2. 연구방법

(1) 실험군

전신마취를 위해 Ketamin Hcl(Ketalar, Yuhan, Korea) 30 mg/kg과 Xylazine (Rumpun, Bayer, Korea) 10 mg/kg를 혼합하여 근육주사하여 전신마취를 시행하였다. 마취 유도된 가토의 하악 부위를 제모한 뒤 베타딘으로 소독하여 수술대에 고정하였다. 국소마취와 지혈의 목적으로 1:100,000 epinephrine을 함유한 2% lidocaine Hcl을 피하주사 하였다. 하악 하연부에 절개를 시행하여 하악골을 노출 시킨 후 소구치의 전방부에서 이공을 통해 나오는 이신경을 견인하였다. 소구치부위에 골절단부를 표시한 후 전방과 후방부에 치과용 저속엔진을 이용해서 직경 2.0 mm의 screw 장착을 위한 구멍을 양측의 피질골을 관통하여 형성하였다. 형성된 구멍은 직경 2.0 mm의 나사를 이용하여 고정하고 이후에 치과 기공용 디스크를 이용하여 골절단을 시행하였다. 골의 가동성을 확인한 다음 신장장치를 정 위치로 위치시킨 후 자가중합용 레진을 이용해 고정하였고 이후에 고정된 장치물이 잘 유지되는가를 확인하였다(Fig. 1). 수술부위를 생리식염수로 깨끗이 세척한 후 골막과 근육을 4-0 dextron으로 피부는 4-0 nylon으로 층별 봉합하였다. 모든 실험동물은 3일간 gentamycin을 근육 주사하여 감염 예방을 하였다. 수술 후 5일간의 잠복기를 가지며 그 후 하루에 1 mm씩 10일 동안 10 mm의 신장을 한 뒤, 3일간의 잠복기를 부여하고 1 mm씩 2일 동안 2 mm의 압축력을 적용하여 총 8 mm의 신장량을 얻도록 하였다. 수

Table 1. Experimental schedule

Experimental group

OP

Latency	10mm distraction		Latency	2mm compression	consolidation			
Pod 0	5	13	15	18	20	27	34	41
		A	B	C	D	E	F	G

Control group

OP

Latency	8mm distraction	consolidation					
Pod 0	5	13	20	27	34	41	
A	B	C	D	E	F	G	

- A. op
- B. after latency (postoperation day 5: pod 5)
- C. after 8 mm distraction (pod 13)
- D. after compression (pod 20)
- E. 1 week after compression (pod 27)
- F. 2 weeks after compression (pod 34)
- G. 3 weeks after compression (pod 41)



Fig. 1. Rabbit's mandible and experimental design of the model.

술직후, 잠복기후(수술 후 5일), 신장 8 mm 완료 후(수술 후 13 일), 압축력 적용 후(수술 후 20일), 압축력 적용 1주후(수술 후 27일), 압축력 적용 2주후(수술 후 34일), 압축력 적용 3주후(수술 후 41일)에 각 군당 3마리씩 희생하였다(Table 1).

(2) 대조군

수술방법은 실험군과 동일하며, 수술 후 5일 간의 잠복기를 가지며 그 후 하루에 1 mm씩 8일 동안 신장한 뒤 경화기를 가졌다. 수술직후, 잠복기후(수술 후 5일), 신장 8 mm 완료 후(수술 후 13일), 수술 후 20일, 수술 후 27일, 수술 후 34일, 수술 후 41일에 각 군당 3마리씩 희생하였다(Table 1).

(3) 육안적 검사

실험기간 동안 가토의 체중과 활동성 등의 생활력 및 신장장치 주위조직의 감염소견이나, 동요도, 골신장이나 압축을 위한 회전시 저항감의 정도 및 안정성, 절치의 정중선 변위나 과성장을 관찰 하였다. 희생시에는 하악골에서 골의 치유상태나 골 생성정도, 신생골의 골질을 육안적으로 관찰하였다.

(4) Western Blot Analysis

절편을 채취한 후 즉시 액화질소에 넣어 냉동시켰다. 냉동시킨 절편을 막대사발에 넣고 액화질소를 부어 잘게 부순 뒤 이 등분하여 받은 Western blot analysis에 사용하고 나머지 받은 RT-PCR analysis에 이용되었다. 잘게 부순 sample을 lysis buffer에

넣어 잘 흔들어 주고 얼음에 30분 정도 둔 후 원심 분리하여 단백질을 추출하였다. Protein standard marker와 각각의 단백질(50 μ g) 20 μ l 에 4 \times loading buffer를 첨가하고 90 $^{\circ}$ C에서 7분간 변성시킨 후 5%, 15%, SDS-polyacrylamide gels에서 100 V로 2시간 동안 전기 영동하였다. 전기 영동후 gel을 transfer buffer (25 mM Tris, 192 mM glycine, 20% methanol)에 15분간 담근 뒤 20 V에서 1 시간 동안 nitrocellulose membrane(American phar macia biotech Co.)에 transfer 시켰다. Antibody의 nonspecific binding을 막기 위하여 blocking solution(TBS buffer에 녹인 5% nonfat milk)에 NC-filter를 넣고 상온에서 2시간 동안 약하게 흔들며 반응시켰다. 5% nonfat milk를 녹인 TBS-Tween buffer(TBS buffer에 0.02% Tween 20)에 1/500으로 준비된 일차항체 anti-TGF- β 1, anti-Osteocalcin, anti-Osteonectin(Santa-cruz Co.)을 넣어 준 후, NC-filter를 넣어 4 $^{\circ}$ C에서 overnight한 뒤 TBS-Tween buffer로 10분씩 3번 씻어 주었다. 이차항체 anti-rabbit-IgG를 1/1,000으로 5% nonfat milk를 녹인 TBS-Tween buffer로 희석하여 NC-filter를 넣고 90분간 흔들어 준 뒤 TBS-Tween buffer로 10분씩 3번 씻어 주었다. NC-filter를 ECL chemiluminescence detection kit(PIERCE Co.)에 5분간 반응시킨 후 암실에서 15분간 감광한 뒤 필름에 detection한 후 밴드를 확인하였다.

5) Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction(RT-PCR) Analysis

액화질소를 넣어 잘게 부순 sample에 RNAzol B(TEL-TEST, INC)를 첨가한 후 1:10배의 chloroform을 처리하여 상층을 분리한 다음 동량의 isopropanol을 처리하여 pellets을 DEPC와 70% ethanol로 씻은 후 건조시켜 DEPC-D/W에 녹였다. RNA는 260 nm에서 흡광도를 측정 한 후 정량하여 reverse transcription reaction을 실시하였고 그 반응액은 1 \times RT buffer (Promega, USA), 20 μ M dNTP, 0.25 μ g oligo(dT)15 primer, 5unit AMV(Avian Myoblastosis Virus) reverse transcriptase(Promega, USA) 및 2 μ g DEPC-D/W를 가하여 총량을 10 μ l로 한 뒤 42 $^{\circ}$ C에서 60분간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 RT product 5 μ l에 1 \times PCR buffer(Promega, USA), 10 pmol sense 및 antisense primer^{15,16)}, 1unit Taq polymerase 및 증류수를 사용하여 총량을 25 μ l로 한 후, 94 $^{\circ}$ C에서 1분, 55 $^{\circ}$ C에서 1분, 72 $^{\circ}$ C에서 1분간 35회 실시한 후 72

$^{\circ}$ C에서 5분간 반응시켰다. PCR 반응이 종료된 검체들에서 각 산물을 10 μ l씩 취하여 6 \times loading buffer (0.25% bromphenol blue, 0.25% xylene cyanol, 30% glycerol in water) 2 μ l와 혼합하여 1.5% 한천 겔(agarose gel)에 100V에서 20분간 전기영동하고 ethium bromide로 염색하여 자외선 투사기로 관찰한 다음 플라로이드 카메라로 촬영하여 판독하였다 (Table 2).

III. 연구결과

1. 육안적 소견

모든 실험동물은 수술 후 전반적으로 잠복기와 신장초기에는 활동성이 약간 감소하였으나 분말사료 섭취에 있어 큰 문제는 없었으며 뚜렷한 체중감소 없이 건강하였다. 또한 신장장치 주위의 감염, 신장장치 탈락등과 같은 합병증은 없었고 잠복기 이후 신장초기에는 장치의 회전시 저항감이 느껴졌으나 그 후 저항감은 감소하였으며 압축력 적용 시에도 저항감은 크게 느껴지지 않았다. 골신장량이 증가할수록 하악골은 정중부가 반대편으로 편위되는 양상이 나타났다.

동물 희생시 골절단부에 대한 실험군과 대조군의 육안적 평가를 시행하였다. 수술후 5일에는 골절단부에 혈액이 응고되어 있는 상태이며 가골형성은 관찰 되지 않았다. 신장 8 mm 완료시(수술후 13일)에는 골절단부가 골양조직으로 치유되는 양상을 보였으며 압축력 적용 후(수술후 20일)에는 실험군에서는 골양조직이 관찰되면서 골양조직이 골형성을 이루는 과정처럼 관찰되었으며 대조군에서는 골형성을 보였다. 압축력 적용 1주(수술후 27일)에는 실험군에서는 골양조직은 관찰되지 않고, 진전된 골형성이 관찰되었으며 대조군에서는 골절단부가 신생골로 치유되는 양상을 보였으며 진전된 골형성이 관찰되고 섬유성 조직은 보이지 않았다. 압축력 적용 2주(수술후 34일)에는 대조군과 실험군 모두 완전한 골형성이 이루어졌으며 과형성 된 경우도 관찰되었다. 압축력 적용 3주(수술후 41일)에는 대조군과 실험군 모두에서 신연부위와 기존골 부위의 경계가 없어질 정도로 신생골로 치유가 잘 된 모습이 관찰되었다 (Fig. 1).

Table 2. Polymerase Chain-Reaction Primer Information

Gene	bp	Sense Primer	Antisense Primer
TGF- β 1	271	CGGCAGCTGTACATTGACTT	AGCGCACGATCATGTTGGAC
BMP-4	257	GCTGGCCATTGAGGTGAC	GAATGGCGACGGCAGTTC
Osteonectin	291	CTCCACCTGGACTACATCG	GCTGCCAAACTGCCAGTG

2. RT-PCR 소견

(1) TGF-β1 (Fig. 2, 3)

가. 실험군 : 수술후 5일 군부터 증가되는 발현을 보였으며, 수술후 13일에는 더 증가되어 나타났고, 압축력 적용 후(수술후 20일)에는 더욱 증가하는 소견을 보였으며, 압축력 적용 1주(수술후 27일)에 가장 강한 발현 보였고, 압축력 적용 2주(수술후 34일)부터 감소하는 소견이 나타났지만 대조군과 비교해서 감소하는 정도가 약하게 관찰 되었으며, 압축력 적용 3주(수술후 41일)에는 많이 감소되어서 나타났다.

나. 대조군 : 수술후 5 일 군부터 가장 강한 발현을 보였으며, 수술후 13 일 수술후 20일 경에도 강한 발현이 지속되어 나타났다. 수술후 27 일부터는 그 전 보다 발현이 많이 감소되어 나타

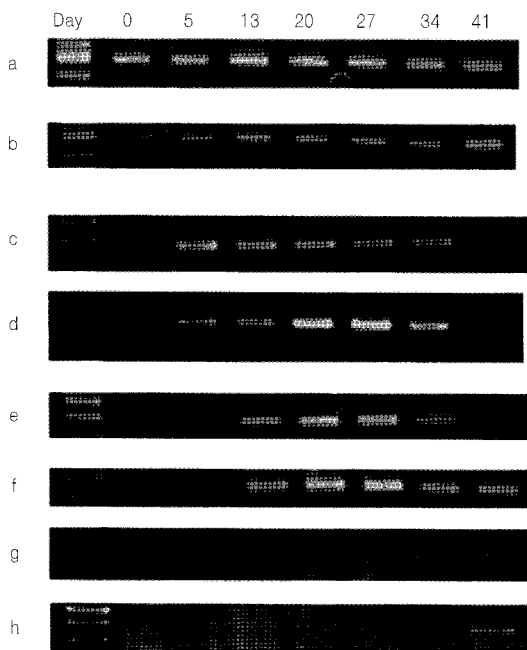


Fig. 2. RT-PCR analysis demonstration expression of factors
 a. Expression of GAPDH at 0,5,13,20,27,34,41days in control group.
 b. Expression of GAPDH at 0,5,13,20,27,34,41days in experimental group
 c. Expression of TGF-β1 at 0,5,13,20,27,34,41days in control group.
 d. Expression of TGF-β1 at 0,5,13,20,27,34,41days in experimental group.
 e. Expression of Osteonectin at 0,5,13,20,27,34,41 days in control group.
 f. Expression of Osteonectin at 0,5,13,20,27,34,41 days in experimental group.
 g. Expression of BMP-4 at 0,5,13,20,27,34,41 days in experimental group.
 h. Expression of BMP-4 at 0,5,13,20,27,34,41 days in control group.

났고, 수술후 41일 에는 거의 발현되지 않는 소견이 관찰되었다.

(2) Osteonectin (Fig. 2, 4)

가. 실험군 : 수술후 5일에는 약한 발현 보였고, 수술후 13일부터 증가되어 압축력 적용 직후(수술후 20일)에는 더욱 증가되어서 나타났고, 압축력 적용 1주(수술후 27일)에 최대의 발현양상이 관찰되었고 압축력 적용 2주(수술후 34일), 압축력 적용 3주(수술후 41일)에는 약간 감소되어 나타났지만, 여전히 증가된 발현이 지속되어 나타났다.

나. 대조군 : 수술후 5일에는 약한 발현 보였고, 수술후 13일부터 증가되는 양상이 관찰되었으며, 수술후 20일에 최대의 발현 보였고, 수술후 27일부터 감소하는 양상이 관찰되었고, 수술후 34일 수술후 41일로 갈수록 감소되는 발현이 관찰되었다.

Day \ Group	0 day	5 day	13 day	20 day	27 day	34 day	41 day
E group	100	429	410	670	693	514	221
C group	100	349	315	311	260	264	111

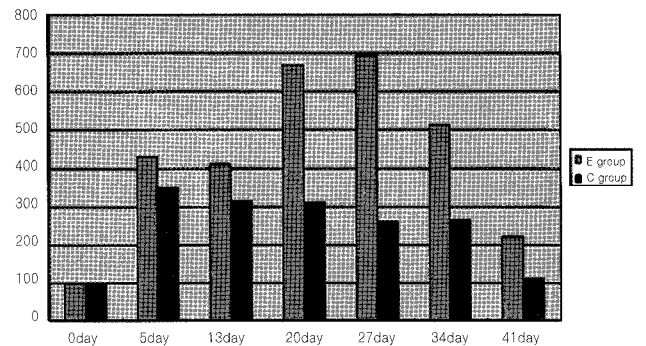


Fig. 3. Quantitative analysis of TGF-β1.

Day \ Group	0 day	5 day	13 day	20 day	27 day	34 day	41 day
E group	100	322	1575	2108	2041	1409	1509
C group	100	239	1000	1263	1271	771	278

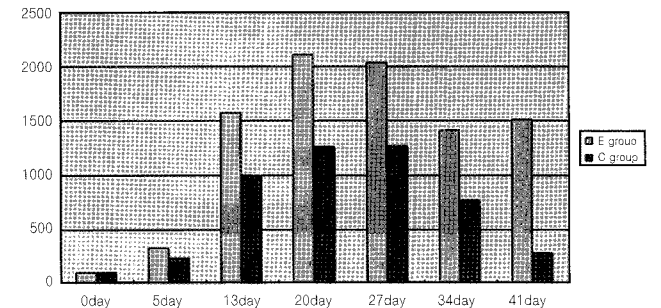


Fig. 4. Quantitative analysis of Osteonectin.

Group	Day						
	0 day	5 day	13 day	20 day	27 day	34 day	41 day
E group	1	5	100	275	321	293	201
C group	0	0	100	70	56	44	79

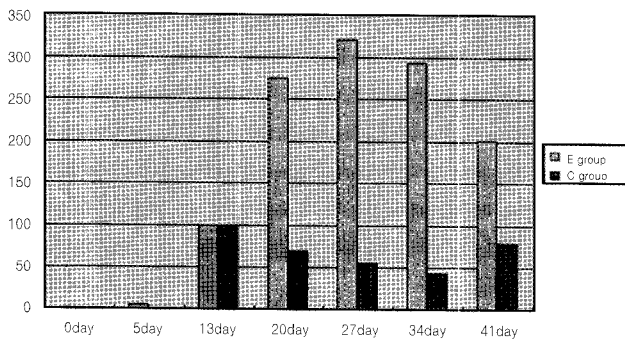


Fig. 5. Quantitative analysis of BMP-4.

(3) BMP-4 (Fig. 2, 5)

가. 실험군 : 수술후 13일부터 발현이 증가되어 나타났으며, 압축력 적용(수술후 20일)시에는 더 증가되어 나타났고, 압축력 적용 1주(수술후 21일)에 최대의 발현 보였으며, 압축력 적용 2주(수술후 34일), 압축력 적용 3주(수술후 41일)에도 증가된 발현이 지속되어 나타났다.

나. 대조군 : 수술후 13일부터 발현이 증가되어 최고의 발현 보였으며, 그 이후로 점차 감소되어 나타났다.

3. Western Blot 소견

RT-PCR 소견과 대체로 유사한 발현양상의 소견을 보였으나 일부 시료에서 처리 시 결과가 뚜렷이 나오지 않아서 본 소견 결과는 실험에서 제외시켰다.

IV. 고 찰

신장골 형성술은 골절단술을 이용하여 분리된 골절단편에 인장력을 가하여 골면 사이에 신생골 형성을 유도하는 술식이다. 이 술식은 결손부위의 골을 필요한 만큼 신장시켜 골형성을 유도할 수 있으며 골을 신장하는 동안 인접한 주변의 연조직도 동시에 신연되어 연조직의 부족을 해소할 수 있으므로 연조직 이식 등의 부가적인 시술을 피할 수 있는 장점이 있다. 임상적으로 신장골 형성술은 골절단술(Osteotomy), 잠복기(Latency period), 신장기(Distracton period), 경화기(Consolidation period), 개조기(Remodeling period)의 5단계로 구성된다. 골절단술에 대해서 Ilizarov³⁴⁾는 해면골 내의 혈류공급을 보존하기 위해 피질골만 절단할 것을 권고 하였지만 Delloye¹⁷⁾등은 피질골 절단과 비교해서 완전한 골절단이 골치유나 신생골 형성 정도에 영향을 주지 않는다고 하였으며, Kojimoto¹⁸⁾등은 해면골이

손상된 후에도 골막이 보존된다면 치유가 일어날 수 있으므로 골막을 보존하는 것이 중요하다고 하였다. 본 실험에서는 최소한의 골막박리를 시행하였고 골절단시에는 충분한 생리식염수를 사용하여 절단부위가 과열되지 않도록 주의하였고, 이후에는 골막을 흡수사로 봉합하였다.

잠복기는 골절단 후 신장이 시작되는 시기까지의 기간으로 골절치유의 초기단계와 유사한 과정이 일어나며 적절한 잠복기는 신장하고자 하는 골의 종류, 주위 연조직의 손상정도, 환자의 연령 등을 고려하여야 한다. White와 Kenwright^{19,20)}는 잠복기 없이 골신장을 시행하면 신장부위에 섬유화와 반흔형성이 일어난다고 하였으며 Tavakoli²¹⁾등은 하악골에서 잠복기 자체는 신장골의 물리적, 기계적 성질에 유의한 영향을 미치지 않으며, 악안면 영역에서는 골 신장시 잠복기를 두면 연골성 요소들이 우세하게 나타난다고 보고하였다. Aronson²²⁾ 등은 잠복기를 두지 않은 경우 막내골화만 이루어 졌으나 7일간의 잠복기를 둔 경우 처음 2주간은 막내골화와 연골골화가 함께 나타난 후 3-6주 경에는 주로 막내골화가 나타난다고 보고하였다. 본 실험에서는 가도임을 감안하여 골절단부의 재 혈관화와 염종의 소실을 도모하기 위하여 5일간의 잠복기를 부여하였다.

신장기는 만들어진 일차성 가골에 점차적인 견인력이 적용되고, 절단된 골절면 사이에 신장골의 형성이 일어나는 시기이다. 이때에는 신장속도와 신장빈도가 중요하게 작용하며 실험동물의 크기나 생체 내 대사의 활성, 세포의 크기 등에 따라 다르게 적용되어야 한다. Stewart²³⁾등은 가토에서 하루에 1.5 mm 속도로 신장한 결과 불 유합 소견을 보인다고 하였으며, 신²⁴⁾등은 가토에서 하루에 1.4 mm 미만의 속도로 신장해야 한다고 하였다. 신장빈도는 하루에 시행하는 신장의 횟수를 의미하며, 동일한 신장속도에서는 신장빈도가 증가하면 신장골 형성을 향상시킬 뿐만 아니라 연조직 손상을 최소화 하고 신생 혈관 형성을 촉진한다. 이상의 문헌과 예비실험을 통해 본 실험에서는 한번에 0.5 mm씩 하루에 2번 (1 mm/day) 신장하였다.

신장력과 더불어 적용된 압축력(compression force)에 대한 연구들을 고찰해보면 1986년 Wolff²⁵⁾는 stress에 대한 반응으로 생기는 기능적인 골 적응의 개념에 대해 기술 하였는데, 장골골절이 일어난 부위에 압축력을 적용한 경우, 가골 부피의 증가, 골절치유의 증진 및 골결합 시간의 단축을 가져올 수 있다고 보고하였으며, 2002년 Mofid²⁶⁾는 일정기간의 신장술 이후 생긴 가골의 경화기 초기에 신장력과 압축력을 번갈아 적용함으로써 통상적인 신장 술식에 비해 골성숙도를 증가 시킬 수 있다고 보고하였다. 국내에서는 김¹⁹⁾ 등이 신장골 형성술에서 경화기 동안 압축력을 적용하는 것이 신장력 단독으로 부여하는 것보다 더 나은 골질을 형성하였다고 보고하였으며, 2005년 김¹⁴⁾ 등은 골신장후 압축량이 신장량의 1/5일 때, 압축력 적용 전 잠복기는 3일 부여 시에 가장 좋은 골질이 형성되는 것을 밝혔다. 이러한 실험 결과들을 토대로 본 실험은 압축량을 신장량의 1/5(신장량 10 mm, 압축량 2 mm, 총 8 mm의 골신장)하고 압축력 적용 전 잠복기를 3일로 부여하였다.

신장골 형성술에 의해 만들어지는 신생골의 형성기전에 대

해서 Ilizarov³⁴⁾는 신장골 형성시 막성 골화에 의한 골형성을 보고 하였고, Kojimoto²⁶⁾등은 골신장시 연골내골화가 일어난다고 보고 하였으며, Yasui²⁷⁾등은 막내골화와 연골내골화와 더불어 연골세포에서 모세혈관 침투 없이 직접적으로 골형성이 일어나는 제3의 골화(transchondroid bone formation) 기전을 관찰하여 이를 막내골화와 연골내골화의 중간 단계로 제시하였다. 현재까지의 많은 연구들에 의해 지금은 연골내골화와 막성골화가 혼재하며 막성골화가 지배적 골화기전이라고 받아들여지고 있다. 골절단 후 잠복시기에 나타나는 조직학적 변화는 골절 치유 단계와 유사하며 골막세포의 증식과 초자연골로 구성된 외부 연성 가골이 형성되고 골절편부에는 골막성 강성 가골이 형성된다. 그 후 신장이 시작됨에 따라 외측의 연성가골은 신장되고 변형되어 근심과 원심 편으로 분리된다. 그리고 골절단 간격은 섬유성 조직과 신생혈관으로 채워지고 신장된 섬유성 조직과 골막성 가골사이의 경계에서 고도로 분화된 연골이 생기게 되는 전형적 연골성 골화가 신장 초기의 신장부위에서 나타난다. 이 시기의 신장부 중앙에는 연골세포, 섬유모세포, 난원형세포(연골세포와 섬유아세포의 중간단계 세포) 등이 나타나며, 난원형세포는 신장력의 방향과 평행하게 배열된다. 이는 골절치유에서는 보이지 않고 신장골 형성에서만 특이하게 나타나는 현상이다. 신장이 진행되면서 연골성 가골은 연골성 골화에 의해 골성 가골로 대체되고, 중심부 섬유성 조직의 양쪽에서도 골형성이 관찰되는 데 이 신생골은 막성 골화에 의해 직접적으로 형성되는 것이다. 신장 후반기에는 대부분 막성골화가 일어나 신장된 교원섬유가 연골성 조직의 개재 없이 침상골로 변한다. 이러한 막성 골화 현상은 골절치유시와는 다른 형태로 생각되며, 이는 기계적 인장 자극이 환경을 변화시키고 세포의 형태와 표현형을 조절하여 연골생산을 중단시켜 막성골화가 일어나게 하는 것으로 알려진다^{28,29)}.

지금까지의 많은 연구들로 인해 신장골 형성술이 골형성을 유도하고 임상적으로 유용한 술식이라는 것이 밝혀졌다. 그리고 신장골 형성술과 같은 기계적 자극이 세포수준에서의 골형성 유도 및 조직학적 변화로 관찰한 많은 연구가 있었지만 정확한 기전과 관련인자는 밝혀지지 않았다. 이를 위한 분자생물학적인 연구는 1990년대 말부터 시도 되었으며 현재까지 골절 치유 시 골형성에 관여하는 것으로 알려진 성장인자들과 교원성 단백질, 비교원성 세포외기질 단백질 등이 신장골 형성술에서도 어떻게 관여하는지에 대한 분자생물학적 연구가 이루어지고 있다. 현재까지 연구에 의해 골절치유 및 신장골 형성시 골형성에 관여하는 것으로 보이는 물질로는 transforming growth factor-betas(TGF- β), insuline-like growth factor- I (IGF-I), basic fibroblast growth factor(bFGF), bone morphogenetic proteins(BMPs) 등의 성장인자가 있고, 교원성 단백질로는 제I형 교원질이 있고, 비교원성 세포외기질 단백질로는 osteocalcin, osteonectin, osteopontin 등이 있다.

TGF- β 군은 25-kDa의 이합체 단백질군으로 골모세포를 비롯한 많은 세포의 성장과 분화를 조절한다고 알려져 있다. 이

성장인자 군에는 $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$ 의 3가지 다른 형태가 있으며 유사하지만 다른 생물학적 기능을 하는 것으로 알려져 있다. 특히 TGF- $\beta 1$ 은 골모세포 전구체에 대해 유사분열 촉진 효과를 가지며 골절치유 속도를 가속화시키고 골결손부를 폐쇄시킨다는 결과가 있다. 신장골 형성술시 TGF- $\beta 1$ 의 발현에 대한 분자생물학적 연구에서는 골절부 치유시의 발현정도와 비교하여 신장골 형성술의 기전 및 TGF- $\beta 1$ 의 역할에 대해서 보고된다. Yeung 등³⁰⁾은 TGF- $\beta 1$ 이 골절 초기에서 증가하다가 골절 치유 1주 후부터 차츰 감소되어 3주 후에는 매우 감소된 소견을 보이거나 신장골 형성술시에는 초기에는 비슷한 양상을 보이거나 가골이 신장되는 동안 계속적으로 강한 발현 소견을 보인다고 하였다. 이는 기계적 자극이 골모세포를 자극하여 TGF- $\beta 1$ 의 발현을 유도하고 TGF- $\beta 1$ 은 다시 골모세포를 자극하여 교원질과 alkaline phosphatase의 합성을 촉진하여 골형성과 무기질화를 유도하기 때문이라고 하였다. Rowe 등^{31,32)}은 백서 하악골에서 신장골 형성술시 골절단면 인접부의 중간엽세포, 염증세포, 골모세포 등에서 TGF- $\beta 1$ 의 발현이 증가되었고, 신장이 계속되는 동안 활성 골모세포, 신생혈관 그리고 세포의 기질내에 있는 교원질 등에서 강한 발현이 보이며, 잠복기, 신장기, 경화 초기에는 TGF- $\beta 1$ 의 발현이 정상골에 비하여 현저히 증가되며 신장 후 4주에는 거의 정상수준으로 감소된다고 하였다. 이러한 TGF- $\beta 1$ 의 시간적, 공간적 발현 양상은 이 단백질이 하악골의 신장골형성 동안 골모세포의 이주, 분화, 세포외기질 합성, 혈관형성에 중요한 조절 역할을 한다는 것을 의미한다고 할 수 있다. 또한 송 등³³⁾은 같은 신장량에서 신장빈도가 높아질수록 더욱 우수한 골형성이 이루어지며 TGF- $\beta 1$ 발현 또한 비례해서 나타난다고 보고하였으며 이러한 결과는 TGF- $\beta 1$ 이 높은 수준으로 발현 될수록 보다 우수한 골형성이 나타난다고 하였다.

본 연구에서 대조군에서는 위의 문헌들과 비슷한 발현양상을 나타냈다. 골절단 초기에 발현이 증가되기 시작해서 잠복기 신장기 및 경화초기에 증가해서 나타나다 신장 후 4주(수술 후 41일)에 감소가 나타나는 소견이 관찰되었다. 그러나 실험군에서는 잠복기 및 신장초기에 대조군과 비슷한 정도의 발현양상이 관찰되다가 압축력 적용 직후(수술 후 20일)부터 실험군에서 대조군 보다 높은 수준의 TGF- $\beta 1$ 발현이 관찰되었으며, 압축력 적용 1주(수술 후 27일), 압축력 적용 2주(수술 후 34일)까지 실험군에서 더 높은 발현이 계속 유지되어 나타났으며 압축력 적용 3주(수술 후 41일)에는 대조군에서는 정상골 수준으로 감소되는 것이 관찰 되었고 실험군에서는 그 전보다 감소되어 나타나지만 대조군에 비해서는 높은 수준의 발현이 관찰되었다. 위의 결과는 신장골 형성의 경화기동안 압축자극(compression force)이 가해진 때문이라 추측할 수 있으며, 신장골 형성술의 경화기동안 가해진 압축자극이 골모세포를 더 많이 자극하여 TGF- $\beta 1$ 의 발현을 더 많이 유도하게 되고 이로 인해 더 많이 분비된 TGF- $\beta 1$ 이 다시 골모세포를 자극하여 더 많은 골형성을 촉진하게 되며, 많은 문헌들에도 보고되었듯이 실험군에서 TGF- $\beta 1$ 이 지속적으로 높게 발현되는 것으로 미루어 보아 실험군에서 대조군보다 우수한 골형성이 나타난다고

생각할 수 있다.

골형성에 관여하는 여러 가지 인자 중 비교원성 세포의 기질 단백질로 osteocalcin, osteonectin, osteopontin 등이 있다. 그 중 Osteonectin³⁴⁾은 주로 제 I 형 교원질과 결합하는 당단백으로 칼슘, 수산화인회석에 대한 친화력이 높으며, 골의 무기질화의 시작 및 골의 재개조, 무기질화 초기 등의 조절에 중요한 역할을 한다. Meyer³⁵⁾ 등은 신장시 골절단부에 생리적 한계 이상의 인장력이 발생될 때 osteonectin과 osteocalcin의 발현이 급격히 감소됨과 동시에 결정체 형성이 감소됨을 관찰하고 osteonectin과 osteocalcin의 발현이 골양조직(osteoid tissue)의 무기질화 및 골모세포의 분화와 밀접한 관계가 있으며 수산화인회석 결정 성장과 크기를 조절하는 기능을 한다고 보고하였다. 백³⁶⁾ 등은 성견 하악골 신장 골형성술시 osteonectin의 발현이 전 시기에 걸쳐 골신장부 중심에 인접한 신생골 형성부에서 강하게 나타났으며 이는 이 부위가 신장 골형성술에 의한 골형성에서 중요한 역할을 하는 부위로서 골신장부 중심의 미분화 중간엽 세포가 골모세포로 이행하면서 골형성이 시작된다는 것을 보여준다. 또한 김³⁷⁾ 등은 가토 하악골 신장골 형성술에서 osteonectin의 발현양상을 관찰하였는데, 술 후 7일에 신장군에서 대조군보다 3배 정도 강하게 osteonectin의 발현이 증가하였고, 술 후 14일 째에 가장 강하게 나타나다가 술 후 28일 까지 약간 감소하였으나 여전히 많이 발현되며, 대조군에서는 술 후 14일 군에서 osteonectin의 발현이 최고에 이르렀다가 술 후 28일 째에 이르러서는 현저히 감소하는 양상을 보인다고 하였다. 즉 신장군에서 osteonectin의 발현이 현저히 증가된 사실에 근거하여 신장골 형성시 중요한 역할을 하는 것으로 추정되며, 경화 시간의 단축을 위해 비교원성 세포의 기질 단백질 중의 하나인 osteonectin의 발현을 증가시키는 것도 좋은 방법이라 제시하였다. 본 실험에서는 대조군에서는 문헌 보고와 비슷한 발현양상이 관찰되었으며, 실험군에서는 압축력 적용 직후(수술 후 20일)부터 대조군보다 더 높은 수준의 발현이 나타났으며, 압축력 적용 1주(수술 후 27일), 압축력 적용 2주(수술 후 34일)에서도 높은 발현이 유지되며, 압축력 적용 3주(수술 후 41일)에서는 대조군에서는 발현이 많이 감소되어 나타났으나 실험군에서는 여전히 높은 발현이 유지되어 나타났다. 위의 실험 결과로 미루어 보아 경화기 동안의 압축자극이 골신장에 의해 만들어진 신생골을 더 응축시키고 이로 인해 신생골의 골질개선과 함께 빠른 무기질화를 이룬 것이라 생각되며 임상적으로는 경화기간의 단축을 기대 할 수 있으리라 추정된다.

BMP는 TGF- β 군계에 속하는 성장인자로 비골격성 중간엽 세포들로부터 연골과 골형성을 유도할 수 있는 능력을 갖고 있으며 1965년 Urist³⁸⁾에 의해 알려졌다. 여러 가지 BMP의 아형들 가운데 BMP-4는 골절치유의 초기단계에서 강하게 발현되며 골형성이 일어난 후 점차 감소되기 때문에 BMP-4가 골절치유에 관여하는 요소 중 하나라고 알려져 있다³⁹⁾. 또한 BMP-4는 신장 골형성술과 골절치유에서 수술 전에 비해 모두 지속적으로 술 후 8주 까지 계속 증가되어 있는 양상을 보인다고 하였는데 이로 미루어 보아 BMP-4는 분화가 진행된 후에도 더욱

오랜 기간 지속된다고 할 수 있다^{40,41)}. 본 실험에서는 대조군에서는 수술 후 13일부터 발현이 증가되어 나타나며, 수술 후 21일부터 감소되는 양상을 보였으며, 실험군에서는 수술 후 13일부터 증가되어 나타난 후 압축력 적용(수술 후 20일)에 대조군은 감소하기 시작하는 데 반하여, 더 증가되어 나타나며, 압축력 적용 1주(수술 후 27일)에는 최고의 발현양상을 나타내고, 압축력 적용 2주(수술 후 34일)에도 여전히 높은 발현 보이고, 압축력 적용 3주(수술 후 41일)에는 감소되어 나타나지만 대조군에 비해 높은 발현을 보였다. 이는 BMP-4가 분화가 진행된 후에도 더욱 오랜 시간 지속 되어 발현된다는 것을 보여주며 또한 압축자극에 의해 BMP-4의 발현이 더 증가되어 나타나며, 이는 더 우수한 골형성이 가능할 수 있다는 것을 보여준다.

V. 결 론

통상적인 신장골 형성술과 신장력-압축력을 병용한 신장골 형성술을 비교하기 위하여 가토를 이용하여 신장장치 장착 후 대조군은 하루에 1 mm 씩 8일간 8 mm의 신장량을 얻고, 실험군은 하루에 1 mm 씩 10일간 10 mm의 신장 후 3일간의 잠복기 후 하루에 1 mm 씩 2일 동안 압축력 적용하여 총 8 mm의 신장량을 얻도록 하여 수술 직후, 잠복기 후(수술 후 5일), 신장 8 mm 완료 후(수술 후 13일), 압축력 적용 후(수술 후 20일), 압축력 적용 1주 후(수술 후 27일), 압축력 적용 2주 후(수술 후 34일), 압축력 적용 3주 후(수술 후 41일)에 각각 희생하여 육안적 관찰과 TGF- β 1, Osteonectin 및 BMP-4의 발현양상을 RT-PCR법으로 관찰하여 다음의 결과를 얻었다.

1. 육안적 검사 결과 실험군과 대조군 모두에서 단단한 골질의 새로운 신생골 형성이 관찰되었다.
2. 실험군에서 압축력 적용 후(수술 후 20일)에 더 높은 수준의 TGF- β 1 발현이 관찰되었으며, 압축력 적용 1주(수술 후 27일), 압축력 적용 2주(수술 후 34일)까지 대조군 보다 높은 수준의 발현이 지속되었고, 압축력 적용 3주(수술 후 41일)에는 감소가 관찰되었다.
3. 실험군에서 압축력 적용 후(수술 후 20일)부터 더 높은 수준의 osteonectin의 발현이 관찰되었으며, 압축력 적용 1주(수술 후 27일), 압축력 적용 2주(수술 후 34일)까지 대조군 보다 높은 수준의 발현이 지속되었고, 압축력 적용 3주(수술 후 41일)에는 대조군에서는 발현이 감소되지만, 실험군에서는 여전히 높은 수준의 발현이 유지되어 나타났다.
4. BMP-4의 발현은 실험군, 대조군 모두 수술 후 13일부터 증가되어 발현되었으며, 대조군은 그 후 점차 감소하는 양상이 관찰 되었으나, 실험군에서는 압축력 적용(수술 후 20일)되는 시점부터 더 증가하며 압축력 적용 1주(수술 후 27일)에 최대의 발현을 보였고, 압축력 적용 2주, 3주에도 발현이 높게 지속되어 나타났다.

위의 결과에서 압축력을 적용한 신장골 형성술이 통상적인 신장골 형성술 보다 더 우수한 골질과 경화시간의 단축에 영향을 줄 수 있으리라 생각된다.

참고문헌

- Codivilla A: On the means of lengthening in the lower limb, the muscles and tissues which are shortened through deformity. *Am J Orthop Surg* 1905;2:353-369.
- Iizarov GA: A new principle of osteosynthesis with the use of crossing pins and rings. In *Collection of Scientific Works of the Kurgan Regional Scientific Medical society*. Kurgan, USSR 1954:145-160.
- Iizarov GA: The tension-stress effect on the genesis and growth of tissues: I, The influence of stability of fixation and soft-tissue preservation. *Clin Orthop* 1989;238-249.
- Iizarov GA: The tension-stress effect on the genesis and growth of tissues: II, The influence of the rate and frequency of distraction. *Clin Orthop* 1989;239-263.
- Snyder CC, Levine GA, Swanson HM, Browne EZ: Mandibular lengthening by gradual distraction. *Plast Reconstr Surg* 1973;51:506-508.
- McCarthy JG, Schreiber J, Karp NS, Throne CH, Grayson BH: Lengthening the human mandible by gradual distraction. *Plast Reconstr Surg* 1992;89:1-10.
- Pepper JR, Herbert MA, Anderson JR, et al: Effect of capacitive coupled electrical stimulation on regenerate bone. *J Orthop Research* 1996;14:296.
- Greenwald JA, Luchs JS, Mehrara BJ, et al: "Pumping the tegetate": an evaluation of oscillating distraction osteogenesis in the rodent mandible. *Ann Plast Surg* 2000;44:516.
- Mizumoto Y, Moseley T, Timothy BS, et al: Acceleration of regenerate ossification during distraction osteogenesis with tecombinant human bone morphogenetic protein-7. *J Bone Joint Surg Am* 2003;85:124.
- Mofid MM, Inoue N, Atabay A, Marti G, Chao EY, Manson PN, Vandrt Kolk CA: Callus stimulation in distraction osteogenesis. *Plast Reconstr Surg* 2002 Apr;15:109:1620-1629.
- Sakurakichi K, Tsuchiya H, Uehara K, Yamashiro T, Tomita K, Qzuma Y: Effect of timing of low-intensity pulsed ultrasound on distraction osteogenesis. *J Orthop Res* 2004;Mar:22(2):395-403.
- Claes L, Rutter A, Mayer E: Low-intensity ultrasound enhances maturation of callus after segmental transport. *Clin Orthop Relat Res* 2005;Jan:430:189-94.
- 김옥규, 이광호, 신상훈, 정인교, 박봉수: 백서 하악골에서 신연골 형성술시 신장력과 수축력 복합적용후의 조직반응. *대한구강악안면외과학회지* 2002;28:103.
- 김옥규, 신상훈, 정인교, 김철훈, 허준, 윤일: 수축력과 신장력을 병용한 골신장술에서의 다양한 힘의 비와 부여시기에 따른 신연골 반응. *대한악안면성형재건외과학회지* 2005;27:403.
- Marie-Pierre Hello, Le Graverand, Carol Reno et al: Gene expression in menisci from knees of skeletally immature and mature female rabbits. *Orthop Res* 1999;17:738.
- Morone MA, Boden SD, Hair G: Gene expression during autograft lumbar spine fusion and the effect of Bone Morphogenetic Protein 2. *Clin Orthop* 1998;351:252-265.
- Delloye C, Delefortrie G, Coutelier L, Vincent A: Bone regenerate formation in cortical bone during distraction lengthning. An experimental study. *Clin Orthop* 1990;250:34-42.
- Yasui N, Kojimoto H, Sasaki K, Kitada A, Shinomura Y: Factors affecting callus distraction in limb lengthning. *Clin Orthop* 1993;293:55-60.
- White SH, Kenwright J: The timing of distraction of an osteotomy. *J Bone Joint Surg Br* 1990;72:356-361.
- White SH, Kenwright J: The importance of delay in distraction of osteotomies *Orthop Clin North Am* 1991;22:569-579.
- Tavakoli K, Walsh WR, Bonar F, Smart R, Wulf S, Poole MD: The role of latency in mandibular osteodistraction. *J Craniomaxillofac Surg* 1998;26:209-219.
- Aronson J, Shen XC, Skinner RA, Hogue WR, Badger TM, Lumpkin CK Jr: Rat model of distraction osteogenesis. *J Orthop Res* 1997;15:221-226.
- Stewart KJ, L'voff GO, White AS, Bonar SF, Wslsh WR, Smart RC, et al: Mandibular distractio osteogenesis: A comparison of distraction rates in the rabbit model. *J Craniomaxillofac Surg* 1998;26:43-49.
- 신선아, 지유진, 송현철: 가토하악골에서 신연 골형성술시 신연 속도에 따른 TGF- β 1, IGF-I, bFGF의 발현. *대한악안면성형재건외과학회지* 2005;27:205-217.
- Wolff J: The law of bone remodeling. *Orthopade*, 1995;24:378.
- Kojimoto H, Yasui N, Goto T, Matsuda S, Shimomura Y: Bone lengthning in rabbit by callus distraction. *J Bone Joint Surg Br* 1988;70B:543-549.
- Yasui N, Sato M, Ochi T, Kimura T, Kawahata H, Nomura S: Three modes of ossification during distraction osteogenesis in the rat. *J Bone Joint Surg Br* 1997;79:5:824-830.
- Buckley MJ, Banes AJ, Jordan RD: The effects of mechanical strain on osteoblasts in vitro. *J Oral Maxillofac Surg* 1990;48:276-282.
- Burger EH, Klein-Nulend J, Veldhuijzen JP: Mechanical stress and osteogenesis in vitro. *J Bone Miner Res. Suppl* 1992;2:S397-401.
- Yeung HY, Lee KM, Fung KP, Leung KS: Substained expression of transforming growth factor-beta 1 by distraction during distraction osteogenesis in vitro. *Life Sci* 2002;24:71(1):67-79.
- Rowe NM, Mehrara BJ, Dudziak ME, Steinbrech DS, Mackool RJ, Gittes GK et al: Rat mandibular distraction osteogenesis: Part I. Histologic and radiographic analysis. *Plast Reconstr Surg* 1998;102:2022-2032.
- Mehrara BJ, Rowe NM, Steinbrech DS, Dudziak ME, Saadeh PB, McCarthy JG et al: Rat mandibular distraction osteogenesis: II, Molecular analysis of transforming growth factor beta 1 and osteocalcin gene expression. *Plast Reconstr Surg* 1999;103:536-547.
- 송정호, 신상훈, 김종렬: 백서 하악골에서 신연빈도에 따른 골형성 비교연구. *대한악안면성형재건외과학회지* 2002;24:2:115-125.
- Hiltunen A, Hannu TA, Vuorio E: Regulation of extracellular matrix genes during fracture healing. *Clin Orthop* 1993;297:23-27.
- Meyer U, Meyer T, Vossians J, Joos U: Decreased expression of osteocalcin and osteonectin in relation to high strains and decreased mineralization in mandibular distraction osteogenesis. *J Craniomaxillofac Surg* 1999;27:222-227.
- 백선호, 안병근, 박영주, 박희건, 박준우, 이건주 외: 선견 하악골 절단 후 기계적 골건인에 의해 형성된 신장부에 대한 시기별 조직학적 변화. *대한구강악안면외과학회지* 2001;27:5:404-413.
- 김동준, 지유진, 송현철: 가토하악골에서 신연 골형성술시 osteonectin의 발현. *대한악안면성형재건외과학회지* 2004;30:5:391-399.
- Urist MR: Bone formation by autoinduction. *Science* 1965;150:893-899.
- James H, Beaty MD Editor. *Orthopaedic knowledge update*, 1993;30-32.
- 조태준, 최인호, 정진엽: 신연골 형성술과 골절 치유에서 제2형 및 제4형 골형성 단백질 유전자 mRNA의 시간적, 공간적 발현. *대한정형외과학회지* 1998;33:595-603.
- Li G, Berven S, Simpson H, Triffitt JT: Expression of BMP-4 mRNA during distraction osteogenesis in rabbits. *Acta Orthop Scand* 1998;69:42-45.