

# Calcium Phosphate Glass가 마우스 두개골 세포에 미치는 영향

김민경<sup>1</sup> · 김창성<sup>1</sup> · 이덕연<sup>3</sup> · 이용근<sup>3</sup> · 조규성<sup>1,2</sup> · 채중규<sup>1</sup> · 김종관<sup>1,2</sup> · 최성호<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>연세대학교 치과대학 치주과학교실, 치주조직 재생연구소

<sup>2</sup>BK21 의과학 사업단

<sup>3</sup>연세대학교 치과대학 치과생체재료학교실

## I. 서론

치주 질환은 치태내 치주 병원균에 의한 만성 질환으로서 치아 주위 조직의 염증과 부착 상실, 치조골과 결합조직의 상실을 동반한 치주낭 형성등의 치주 조직 파괴가 수반된다<sup>1)</sup>. 따라서 치주치료의 목적은 치주 질환을 정지시키는 것뿐만 아니라 최종적으로는 치주 조직을 재생시키고 치아의 기능을 회복시키는데 있다<sup>2)</sup>.

이러한 재생 술식으로는 치은 박리 소파술 등의 기계적인 치주치료, 차폐막을 사용하는 조직 재생 유도술, 골대체 물질의 이식, 성장인자와 bone morphogenetic protein을 이용한 유도성 조직 재생술 등이 있다.

이중 치조골의 재생과 보다 많은 신생 결합조직의 부착을 위하여 오래전부터 골이식술이 애용되기 시작하였다. 골이식중 가장 좋은 결과를 보이는 자가골 이식의 경우 수년간 치조골 결손부위에 사용하였을 때 임상적으로 성공적인 결과를 나타내었으나<sup>3)</sup>, 부가적인 이차 수술부위의 필요, 골유착 유발, 치근 흡수, 충분한 양을 얻기가 어렵다는 제한점이 있다<sup>4,5)</sup>. 그리고 동종골이나 이종골 이식의 경우 광범위

한 골 결손부위에 이식하기가 적합하고 환자에게 부가적인 외상을 주지 않는 장점이 있으나 사체 질환의 전이 가능성이 존재하고 이식항원에 대한 거부반응이 나타날 우려가 있다<sup>6)</sup>.

이러한 문제들 때문에 충분한 양을 쉽게 얻을 수 있고 질환의 전이 가능성이 없는 합성골 이식제에 관한 연구가 많이 이뤄지고 있다. 대표적인 합성골 이식재로는 hydroxyapatite (HA)<sup>3,7)</sup>, tricalcium phosphate (TCP)<sup>8)</sup> 등의 calcium phosphate와 polymer<sup>9)</sup>, bioglass<sup>10)</sup>, calcium carbonate<sup>11)</sup> 등이 있다.

특히 이중 HA와 TCP 형태로 이용되고 있는 calcium phosphate는 생체적합성이 우수하고 결정구조가 골의 무기물과 유사하여 연구가 많이 이루어지고 있다<sup>12,13)</sup>. Bowers 등은 TCP 이식 1년후 판막을 거상하였더니 이식재 주위로 골성 조직이 생성되었고 성숙된 골도 관찰하였음을 보고하였으며<sup>14)</sup>, 1995년 Hashimoto 등은 calcium phosphate를 조직유도재생술에 병용하였을 때 골치유가 활발하게 일어났음을 보고하였다<sup>15)</sup>. 그러나 1986년 Stahl은 calcium phosphate를 이식하였을 때 신생골은 생성되지 않고 입자 주위가 결체조직만으로 둘러싸였다고 보고하였다<sup>16)</sup>.

계속적인 합성골의 개발과 동물 실험 및 임상 실험

\*본 연구는 보건복지부 보건의료기술진흥사업의 지원에 의하여 이루어진 것임. (01-PJ5-PG3-20507-0105)

교신 저자: 최성호, 서울시 서대문구 신촌동 134 연세대학교 치과병원 치주과, 우편번호 120-752

을 통해, 골내낭에서 합성골 이식과 치은박리 소파술을 비교하여 합성골 사용에 대한 임상적인 장점을 보고하고 있으나<sup>17,18)</sup>, 여러 조직학적 연구에서 합성골 이식체는 생적합성 충전재로 작용하여 재생보다는 결합조직이 게재되는 회복만이 일어난다고 보고하고 있다<sup>19,20)</sup>.

이에 골재생에 맞추어 적절히 흡수되어 재생골로 치환될 수 있는 흡수성 골이식체가 필요한 상황이다. 이전의 연구에서 calcium phosphate가 흡수성 골이식체로서 연구가 되었으나 골에 비해서 경도가 낮고<sup>21)</sup>, 골개조시 흡수가 잘 일어나지 않는다<sup>22)</sup>는 단점 때문에 그에 비해 상대적으로 강한 경도를 가지고 화학구조도 골과 유사한 calcium polyphosphate (CPP;  $[Ca(PO_3)_2]_n$ )가 연구가 되고 있다. 이 중에서 쇠상 길이가 가장 길고 생화학적으로 가장 안정한  $\beta$ 형의 CPP는 열처리방법에 따라 무결정 혹은 결정질을 얻을 수 있고 제조방법이나 CPP상에 따라 생분해 속도를 조절할 수 있다<sup>23,24)</sup>. 이전의 연구에서도 CPP의 골이식체로서의 기능뿐만 아니라 조직공학에서 세포지지체로서의 가능성도 확인한바 있다.

그러나 이러한 재료들은 기존의 재료와 마찬가지로 흡수속도가 느리고 잘 흡수가 안되어 이를 보완하기 위해 제조공정에 변화를 주어 흡수속도를 조절하고자 하였다. 2003년 양등은 무결정 CPP 분해가 결정성보다 빠르다는 점에 착안하여 CPP에  $Na_2O$ 를 첨가하여 무결정성 CPP를 증가시키려 하였으나 분해속도가 해결되지는 않았다고 보고하였고 추가적인 연구가 필요하다고 하였다<sup>25)</sup>.

따라서, 최근 이 등은 이러한 생분해성을 증진시키기 위해 기존의 calcium phosphate 화합물에 비해 Ca/P 비율은 0.6으로 비율을 낮추어 결정성은 낮추고 용해도는 증가하였으며 분해속도는 빨리하여 주위 골조직이 빨리 자라 들어가게 하고 점성을 낮추어 적합성을 개선한 비정질인 Calcium Phosphate Glass(CPG)에 관하여 보고하였다<sup>26)</sup>. 이러한 CPG는 800℃에서 열처리하여 결정화도를 증가시킬 수 있으며 결정화도의 변화에 따라 분해 속도 및 기계적 물성이 변하게 되고 이때 결정화도는 열처리 시간에 의존하게 된다. 이번 실험에서 이용한 As-

Quenched(AQ)로 제작한 CPG는 순수한 비정질로서 생분해성을 증진시켜 제작하였고, Heat-Treated(HT)로 제작한 CPG는 AQ의 기계적 성질을 보완하여 제작한 것으로 순수한 비정질은 아니지만 결정도는 다른 calcium phosphate보다 낮추어 제작한 것이다.

이 등은 백서 두개골 결손부에 이러한 CPG를 이식하여 골조직 형성에 효과적이라고 보고하였고<sup>27)</sup>, Lee 등은 성견 1면 골내낭에서 CPG 단독 사용시에 상피 억제와 신생치조골 형성에는 효과가 없었으나 신생백악질 형성에 효과가 있었다고 보고하였다<sup>28)</sup>.

따라서, 본 연구에서는 열처리 전후의 calcium phosphate glass를 *in vitro* 실험을 통해 마우스 두개골 세포에 적용하여 MITT (Methylthiozole tetrazolium bromide) 검정법을 이용한 생체 적합성을 평가하고, 교원질 발현과 ALP 활성도를 이용하여 치주 조직 재생 활성능을 평가하고자 한다.

## II. 연구 재료 및 연구 방법

### 가. 연구 재료

#### 1. Calcium Phosphate glass(CPG) 준비

$CaCO_3$ ,  $CaF_2$ ,  $H_3PO_4$ ,  $MgO$  및  $ZnO$ 를 출발 물질로 사용하여 Ca/P의 원자비가 0.6이 되도록 혼합하고, 1250℃에서 용융한 후 급냉하여 CaO-CaF<sub>2</sub>-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-MgO-ZnO계 calcium phosphate glass를 제조하였다. 평균 입도 170 $\mu m$ 로 분쇄한 비정질 분말을 실험 1군(AQ-CPG)으로 하였으며, 800℃에서 열처리하여 결정화도를 50%로 증가시킨 것을 실험 2군(HT-CPG)으로 하였다. 실험 2군의 평균 입도는 실험 1군과 동일하였다.

#### 2. 마우스 두개골 세포 배양

마우스 두개골 세포는 생후 1일된 ICR 마우스에서 분리하여 배양하였다.

### 나. 연구 방법

### 1. 실험군 설정

$\alpha$ -MEM에서 배양한 세포를 대조군으로 하고, CPG를 넣어 배양한 군을 실험군으로 설정하였다. 이 때 실험군의 CPG의 농도는 각각 0.01, 0.02, 0.1, 0.2g/ml의 네 군으로 나누어 실험하였다.

### 2. 마우스 두개골 세포의 분리 및 배양

생후 1-2일된 ICR 마우스를 에탄올 용액에 담가 희생시킨 후 핀셋을 이용하여 두피를 벗기고, 마우스 두개골에서 Y자 봉합을 확인하여 포함되게 적출하였다. 적출된 두개골을 washing solution에서 씻은 후, 10ml 효소 용액(0.2% collagenase와 0.1% dispase가 함유된  $\alpha$ -MEM)에 넣었다. 37°C water bath에서 20분간 shaking을 하는데 첫 번째 상층액은 버리고, 이를 3회 반복하여 두 번째, 세 번째, 네 번째 상층액을 모아 총 30ml를 만들었다. 이를 1500rpm에서 원심분리하고 상층액을 제거하였다. 여기에 10% FBS  $\alpha$ -MEM을 10ml 첨가하여 이를 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 배양하고 2-3일마다 배지를 바꿔주었다.

### 3. MTT assay에 의한 생체 적합성 평가<sup>29,30)</sup>

96well의 배양접시에 세포를  $1 \times 10^4$ 개씩 분주하고 대조군과 실험군으로 구분하여 동일조건하에서 배양하였다. 배양 3일후 각각 배양접시에서 배양액을 제거하고 대조군에는 새로운 10% FBS가 함유된  $\alpha$ -MEM 배양액 200 $\mu$ l를, 실험군에는 각각 0.01, 0.02, 0.1, 0.2g/ml 농도의 CPG 용액 동량을 각각의 well에 첨가하였다. 생리식염수로 용해한 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT) 용액 50 $\mu$ l를 각 well에 첨가한 후 4시간동안 방치하였다. 반응액을 제거한 후 200 $\mu$ l의 Dimethyl sulfoxide(DMSO)를 첨가하여 형성된 formazan 결정을 용해시키고 배양접시를 잘 흔든 후 ELISA reader로 파장 570nm로 흡광도를 측정하였다. 이 실험을 3회 반복 시행하여 마우스 두개골 세포에 독성을 나타내지 않는 최고 농도를 결정하였다.

### 4. 교원질 합성능 측정-Collagen assay

6 well plate에 세포를 배양하고 적정농도로 처치

한다. FBS에는 교원질 함량이 아주 높으므로 collagen assay할 때에는 FBS 함량을 5% 이하로 하였고, 3일후 Sircol collagen assay kit<sup>¶</sup>를 이용하여 collagen assay를 시행하였다. blank, collagen standard, test sample에 Sircol dye를 가하고 shaker에서 30분간 혼합하고 collagen dye가 침전되도록 하였다. 10000g에서 10분간 원심분리하고 상층액인 unbound dye를 따라 버렸다. 각각의 tube에 1ml의 alkali 시약을 가하고 vortex하여 bound dye를 녹여낸다. spectrophotometer를 이용하여 3시간 이내에 540nm에서 흡광도를 측정하였다. blank와 collagen standard의 흡광도를 이용하여 collagen 농도와 흡광도간 선형관계식을 구하여 standard curve를 작성하였다. test sample의 흡광도를 선형관계식에 대입하여 collagen 농도를 구하였다. 이 실험을 3회 반복하였다.

### 5. 마우스 두개골 세포에서의 Alkaline Phosphatase (ALP) 활성도 측정

6 well plate에 마우스 두개골 세포를 배양한 다음 50 $\mu$ g/ml ascorbic acid와 10mM  $\beta$ -glycerophosphate 그리고 CPG 용액 적정 농도를 처치하였다. 배양 6일 후 배양된 세포를 수집하고 ALP-10 kit<sup>†</sup>를 이용하여 ALP 활성도를 측정하였다. 각 well에서 배양액을 제거하고 효소용액(0.2% collagenase와 0.1% dispase)으로 세포를 분리시킨 후 세포부유액을 4°C 8000rpm으로 10분동안 원심분리 시킨다. 원심분리하고 상층액을 제거하여 PBS로 세척한 후 0.5% Triton X-100 100 $\mu$ l, PBS 200 $\mu$ l를 첨가하였다. 이를 얼음에 옮겨 1시간 방치하여 세포막을 파괴하였다. PBS 200 $\mu$ l 첨가하고 다시 4°C 8000rpm으로 10분동안 원심분리 시킨다. 그 상층액에 준비된 ALP-10<sup>®</sup> 1ml를 첨가하고 30°C에서 30초간 혼합한 후 즉시 405nm에서 흡광도를 측정하였다(Initial data). 2분 경과 후 흡광도를 측정하여(Final data), 2분간의 흡광도 변화를 이용하여 다음과 같이 ALP 활성도를 계산하였다.

<sup>¶</sup> Sircol collagen assay kit, Biocolor Ltd., USA

<sup>†</sup> ALP-10<sup>®</sup> kit, Sigma diagnostics INC., Ireland

$$\begin{aligned} \text{ALP(U/L)} &= (\text{Final data} - \text{Initial data}) / 2 * \text{Total vol.} * \\ &1000 / (18.45 * \text{sample vol.} * \text{Lightpath}) \\ &= (\text{Final data} - \text{Initial data}) * 1382 \end{aligned}$$

test를 시행하였다.

### III. 연구 결과

#### 1. MTT assay에 의한 세포 생체 적합성 평가

96 well plate에 bovine serum albumin(BSA) standard 0, 250, 500, 1000, 2000 $\mu\text{g/ml}$ 와 각군별 세포액을 5 $\mu\text{l}$ 씩 분주하였다. 여기에 각각 250 $\mu\text{l}$ 의 Coomassie Assay Reagent를 첨가하여 즉시 ELISA reader를 이용하여 570nm에서 흡광도를 읽었다. BSA standard 흡광도를 이용하여 단백질 농도와 흡광도간의 관계식을 구하고 이를 이용하여 각군별 세포액의 단백질 농도를 구하였다. ALP 농도를 단백질 농도로 나누어 ALP 활성도를 계산하였다. 이 실험을 3회 반복하였다.

대조군과 각 농도별로 처리한 실험군을 배양 2, 3일후에 MTT assay를 이용하여 세포활성을 평가하였다. AQ-CPG는 0.1g/ml가 3일째에 대조군과 비교시에 활성 감소가 유의하게 일어났으며, 0.2g/ml에서는 2, 3일째에 활성감소가 유의하게 일어났다. HT-CPG에서는 0.1, 0.2g/ml에서 2, 3일 모두에서 세포독성이 유의하게 일어났다(Table 1,2 & Figure 1, 2).

이상의 결과를 근거로 하여 마우스 두개골 세포에 독성을 나타내지 않는 최고의 농도를 AQ-CPG 0.02g/ml, HT-CPG 0.02g/ml로 각각 결정하였다.

#### 6. 통계학적 분석

모든 측정치는 평균과 표준편차로 나타내었으며, 각 농도별 차이를 규명하기 위해 ANOVA post hoc

#### 2. 교원질 합성능 측정 - Collagen assay

Table 1. Effects of AQ-CPG on proliferation of mouse calvarial cells

AQ-CPG conc. (g/ml)	Absorbance (Mean $\pm$ S.D.)	
	after 2 days	after 3days
Control	1.92 $\pm$ 0.21	1.58 $\pm$ 0.10
0.01	2.14 $\pm$ 0.16	1.76 $\pm$ 0.13
0.02	2.03 $\pm$ 0.33	1.57 $\pm$ 0.60
0.1	1.61 $\pm$ 0.30	1.19 $\pm$ 0.17*
0.2	1.47 $\pm$ 0.32	0.73 $\pm$ 0.11*

\* : Statistically significant from control group at  $p < 0.05$

Table 2. Effects of HT-CPG on proliferation of mouse calvarial cells

HT-CPG conc. (g/ml)	Absorbance (Mean $\pm$ S.D.)	
	after 2 days	after 3days
Control	1.76 $\pm$ 0.06	1.51 $\pm$ 0.03
0.01	1.91 $\pm$ 0.02	1.53 $\pm$ 0.00
0.02	1.75 $\pm$ 0.02	1.57 $\pm$ 0.07
0.1	1.15 $\pm$ 0.12*	1.15 $\pm$ 0.05*
0.2	1.03 $\pm$ 0.25*	0.85 $\pm$ 0.10*

\* : Statistically significant from control group at  $p < 0.05$

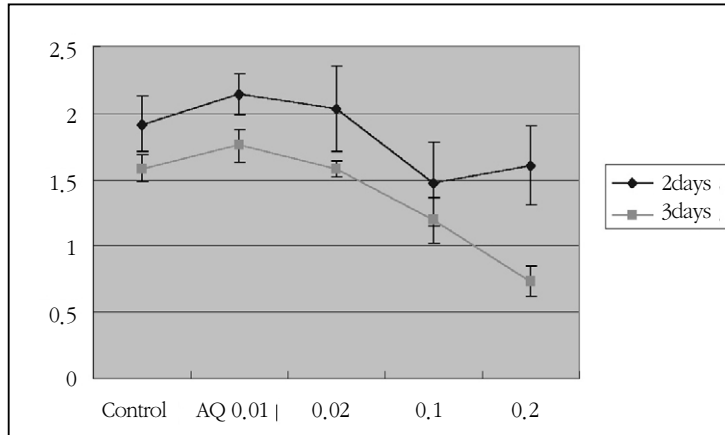


Figure 1. Effects of AQ-CPG on proliferation of mouse calvarial cells

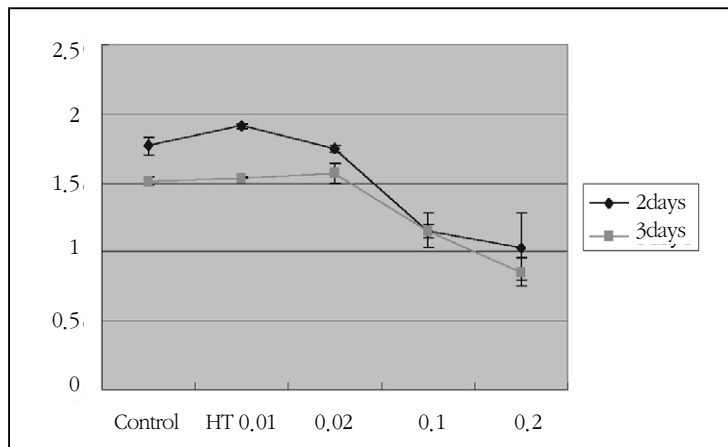


Figure 2. Effects of HT-CPG on proliferation of mouse calvarial cells

Table 3. Effects of AQ-, HT-CPG on collagen synthesis of mouse calvarial cells

CPG conc. (g/ml)	Control	AQ-CPG 0.02	HT-CPG 0.02
Collagen synthesis ( $\mu\text{g/ml}$ )	$9.34 \pm 4.77$	$15.62 \pm 5.97^*$	$17.10 \pm 8.80^*$

\* : Statistically significant from control group at  $p < 0.05$

AQ-CPG군과 HT-CPG군 모두, 세포 독성을 나타내지 않은 최고 농도인 0.02g/ml를 처리하여 교원질 합성능을 대조군과 비교하였다. 두군 모두 대조군에 비하여 교원질 합성능이 유의하게 증가하였다(Table 3 & Figure 3).

### 3. 마우스 두개골 세포에서의 Alkaline Phosphatase 활성도 측정

각각 AQ-, HT-CPG 0.02g/ml를 함유한 배지에서 배양된 마우스 두개골 세포의 분화능을 보기 위해 6 일 배양후 세포막을 파괴시켜 세포내 ALP 활성도를

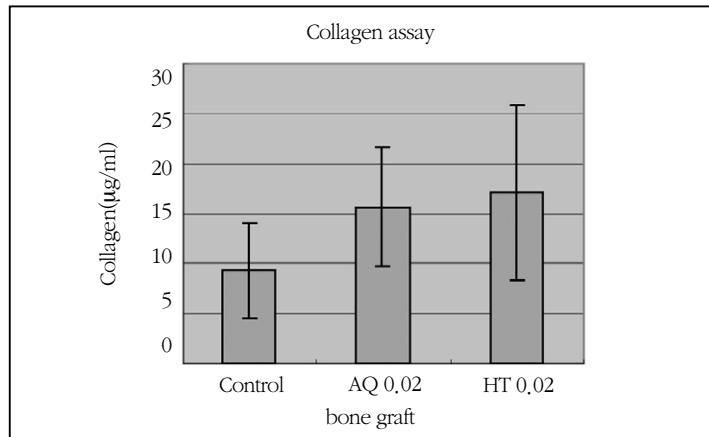


Figure 3. Effects of AQ-, HT-CPG on collagen synthesis of mouse calvarial cells

Table 4. Effects of AQ-, HT-CPG on ALP activity of mouse calvarial cells

CPG conc. (g/ml)	Control	AQ-CPG 0,02	HT-CPG 0,02
ALP activity(U/g)	404 ± 34	417 ± 74	419 ± 22

\* : Statistically significant from control group at  $p < 0,05$

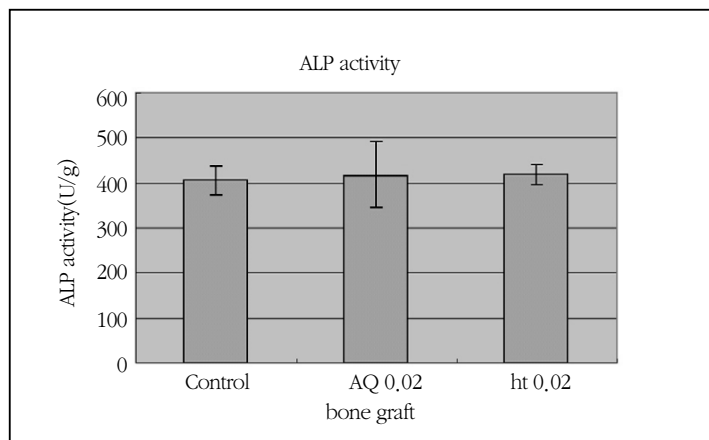


Figure 4. Effects of AQ-, HT-CPG on ALP activity of mouse calvarial cells

측정하였다. 두 군 모두에서 대조군에 비하여 ALP 활성도가 증가하였으나 통계학적으로 유의하지는 않았다(Table 4 & Figure 4).

#### IV. 총괄 및 고찰

국민 구강 보건과 국민 의식의 발달에 의해 노령인

구에서 치아 수의 증가에 따라 치주질환을 가진 환자의 유병률이 증가하게 되었다<sup>31)</sup>. 따라서 치주질환 감염의 원인이 되는 치태나 치석 등의 세균성 요인의 예방, 치료와 더불어 파괴된 치주조직을 기능적, 구조적으로 재건하기 위한 재생술식 등의 치주치료의 요구도가 증가하고 있다. 특히 재생술식 중 합성골의 개발은 자가골과 동종골의 한계를 극복하기 위

해 오랫동안 연구되어 왔다.

Saffar는 TCP를 이식한 후 생검하여 조직 검사를 시행하여 이식후 흡수까지의 과정을 보고하였는데, 이식재 주위로 먼저 골이 침착되고 골성숙, 골개조가 이뤄지면서 이식재가 흡수된다고 하였다<sup>32)</sup>. 즉 골형성이 완료되는 시기에 완전히 흡수가 된다고 하였다. 그러나 임상적인 관찰을 보면 이식재의 흡수속도가 골 재생속도보다 느려 재생이 잘 이뤄지지 않는 것을 자주 관찰할 수 있다. 그리하여 제조 공정에 변화를 주어 흡수 속도를 개선하고자 하는 노력이 이뤄져 왔다.

이 등은 기존의 calcium phosphate 화합물에 비해 결정성은 낮아지고 용해도는 증가하였으며 분해속도는 빨라져 주위 골조직이 빨리 자라 들어가게 하고 점성을 낮추어 적합성을 개선한 비결정질인 CPG를 개발하게 되었다<sup>26)</sup>. 비결정질은 결정질에 비하여 흡수속도가 빠르다는 장점이 있으므로 CPG를 As-Quenched로 결정도를 '0'으로 낮추어 순수한 비결정질 AQ-CPG를 제작하였다. 또한 순수 비결정질의 기계적 성질을 보완하기 위해 순수한 비결정질은 아니지만 결정성을 낮추어 HT-CPG를 제작하였다.

세포의 조직학적 연구에서 골재생이 성공적으로 일어나려면 세포의 여러층을 형성하는 증식기, 기질형성과 성숙, 세포합입 과정을 동반한 세포활성 그리고 활성화된 골 표면과 성숙된 골세포를 동반한 피질골의 석회화가 일어나야 한다<sup>33,34)</sup>. 이중, 초기 단계에 교원질, BSP(Bone sialoprotein), ALP, osteocalcin등이 발현이 된다<sup>35)</sup>. 이에 실험실적 실험에서 두 가지 CPG가 조골세포에 미치는 영향을 알아보기 위해 농도를 AQ-, HT-CPG 각각 0.01, 0.02, 0.1, 0.2g/ml로 달리하여 마우스 두개골 세포의 증식, 교원질의 합성, ALP 활성도를 관찰하였다.

MTT assay는 살아있는 세포의 미토콘드리아 세포에 의해 MTT가 환원되어 blue formazan 결정이 형성되는데 여기에 용해제를 넣고 분광 분석기로 흡광도를 재어서 간접적으로 세포수를 측정하는 방법이다<sup>29)</sup>. 이러한 MTT assay 결과 AQ-, HT-CPG 두 군 모두 저농도에서 흡광도의 증가를 보였으나 통계학적으로 차이는 없었고, 0.1g/ml, 0.2g/ml에서 통계학적

으로 유의하게 독성을 나타내었다. 그러므로 AQ-, HT-CPG 두 군 모두 독성을 나타내지 않는 최고 농도인 0.02g/ml로 실험 농도로 결정하였다.

치주조직의 석회화에 필수적인 요소인 교원질 합성능 분석 결과 AQ, HT 두 군 모두에서 대조군에 비하여 통계학적으로 유의한 증가를 보였다. 이러한 결과로 볼 때 적정 농도의 AQ-, HT-CPG는 마우스 두개골 세포의 성장과 교원질 생성을 촉진한다고 볼 수 있다.

그리고 마우스 두개골 세포의 조골세포로의 분화양상을 확인하기 위해 ALP 활성도를 측정하였다. 염기성 인산분해 효소(ALP)는 유기인산 에스테르를 가수분해하여 석회화가 이뤄지는 곳에서 국소적으로 인산이온의 농도를 증가시키는 효소로서 세포의 기질에 인산칼슘을 침착시켜 석회화를 유도하는 기능을 갖는다고 알려져 있다<sup>36)</sup>. Woldarski와 Reddi는 이러한 ALP 활성은 골형성능이 있는 세포에서는 높지만 그렇지 않은 세포에서는 낮다고 보고하였다<sup>37)</sup>. 즉 ALP는 골형성능을 가진 세포의 표식자로 유용하다고 주장하였고, 1991년 Arceo등은 ALP 활성도의 증가는 석회화가 촉진됨을 반영한다고 보고하였다<sup>38)</sup>.

ALP 활성도 검사를 예비 실험에서 10일 data를 측정하였으나 매우 낮은 수치를 보여 본 실험에서는 6일 data로 측정하였다. 결과는 ALP 활성도가 AQ-, HT-CPG 두 군 모두에서 대조군과 통계학적으로 유의한 차이는 보이지 않았으나 대조군보다 활성도가 증가된 양상을 보였다. 이러한 결과는 선행되었던 선견 1면 골내낭에서 비결정 CPG 단독 사용시에 신생 백악질 형성에만 유의한 효과가 있었고, 신생골 형성에서 약간 증가한 양상은 보이나 유의성 없었던 결과와 유사하다고 할 수 있다<sup>28)</sup>.

본 실험에서의 결과는 위에서 언급한 바와 같이 0.02g/ml의 농도에서 AQ-, HT-CPG가 교원질 합성에서는 유의성 있는 결과를 보였고 ALP 발현은 유의성이 없었다. 이러한 결과는 Ohgushi등이 bioactive glass ceramic을 처리한 배지에 마우스 골수세포를 배양하여 조골세포로의 분화를 관찰한 결과와 유사한 것이며<sup>39)</sup>, 2002년 Viornery도 phosphonic acids로 modified한 티타늄 디스크에 조골세포를 배양한 실험

험과도 유사하다<sup>40)</sup>. 이 두 연구 모두 ALP가 증가하였으나 유의성은 없었고 교원질 합성능이 유의성있게 증가하였음을 보고하였으며, 이를 토대로 하여 조골세포의 분화를 촉진하고 골 형성을 증가시킬 수 있다고 결론을 내리고 있다. 또한 교원질 분석이 ALP 활성도 검사보다 더 민감하게 작용한 것이 아닐까 조심스러운 분석을 하기도 하였다. 이를 기반으로 한다면 새로 개발한 CPG는 조골세포로의 분화를 촉진하고 골재생을 증가시킬 수 있다고 할 수 있겠다. 그러나, 새로 개발한 CPG는 골 형성과 관련하여 더욱 세밀한 평가와 안전성과 효능의 개선이 필요할 것으로 사료되며, 향후 심도있는 연구를 통해 임상적인 활용 방안을 모색할 필요가 있다고 생각된다.

## V. 결론

새로 개발한 calcium phosphate glass가 마우스 두개골 세포에 미치는 영향을 평가하기 위해 마우스 두개골 세포의 증식과 교원질 및 ALP 발현을 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. AQ-, HT-CPG는 0.02g/ml 농도이하에서 독성을 나타내지 않았다(P<0.05).
2. AQ-, HT-CPG는 0.02g/ml 농도에서 교원질 합성이 통계학적으로 유의하게 증가하였다(P<0.05).
3. AQ-, HT-CPG는 0.02g/ml 농도에서 ALP 활성도를 증가시키기는 하였으나 유의성은 없었다(P<0.05).

이상의 연구 결과로 볼때, 새로 개발한 AQ-, HT-calcium phosphate glass는 조골세포로의 분화를 촉진시키고 골재생에 기여 할 수 있을 것으로 생각되며 임상적인 활용을 위해선 계속적인 실험을 통해 안전성, 효능을 개선시켜야 할 것이다.

## VI. 참고 문헌

1. Caton JG, Quinones CR : Etiology of periodontal

- disease. Curr Opin Dent 1: 17-28, 1991.
2. Froum SJ, Gomez C: Periodontal regeneration. Curr Opin Periodontol 64: 744-753, 1993.
3. Brunsdold MA, Mellonig JT: Bone grafts and periodontal regeneration. Periodontol 2000 1:80-91, 1983.
4. Dragoo MR, Sullivan HC: A clinical and histological evaluation of autogenous iliac bone grafts in humans II. External root resorption. J Periodontol 44: 614-625, 1973.
5. Quintero G, Mellonig JT: A six months clinical evaluation of decalcified freeze-dried bone allograft in periodontal osseous defects. J Periodontol 53: 726-730, 1982.
6. Cecilia Y, Peter S, Annika S: A comparative study of anorganic xenogenic bone and autogenous bone implants for bone regeneration in rabbits. Int J Oral Maxillof Implant 14: 72-76, 1999.
7. Froum SJ, Kushner L, Scopp Stahl SS: Human clinical and histologic response to durapatite implants in intraosseous lesions. J Periodontol 57: 7-13, 1986.
8. Ogoe A, Hotta T, Hatano H, Kawashima H, Tokunaga K, Endo N, Umezu H: Histologic examination of beta-tricalcium phosphate graft in human femur. J Biomed Mater Res 63(5): 601-604, 2002.
9. Yukna RA: Clinical evaluation of HTR polymer and freeze-dried bone allograft. A case report. J Clin Periodontol 23: 615-620, 1996.
10. Zarnet JS, Dabar UR, Griffiths GS, Bulman JS, Bragger U, Burgin W, Newman HN: Particulate bioglass as a grafting material in treatment of periodontal intrabony defects. J Periodontol 24: 410-418, 1997.
11. Louise F, Borghetti A: Clinical evaluation of natural coral implantation in osseous periodontal defects. Results after one year. J Periodontol 10: 69-76, 1991.



12. Higashi S, Ohsumi T, Ozumi K, Kuroki K, Inokuchi Y, Terashita M: Evaluation cytotoxicity of calcium phosphate cement consisting of  $\beta$ -tricalcium phosphate and dicalcium phosphate dihydrate. *Dent Mater J* 17: 186-194, 1998.
13. Yoshimine Y, Sumi M, Isobe R, Anan H, Maeda K: In vitro interaction between tetracalcium phosphate-based cement and calvarial osteogenic cells. *Biomaterials* 17: 2241-2245, 1996.
14. Bowers GM, Vargo JW, Levy B, Emerson JR, Bergquist JJ: Histologic observations following the placement of tricalcium phosphate implants in human intrabony defects. *J Periodontol* 57(5): 286-287, 1986.
15. Hashimoto UM, Ishikawa I, Kinoshita A, Weng HT, Oda S: Clinical and histologic observation of replacement of biphasic calcium phosphate by bone tissue in monkeys. *Int J Periodontics Restorative Dent* 15(2): 205-213, 1995.
16. Stahl SS, Froum SJ: Histologic evaluation of human intraosseus healing response to the placement of tricalcium phosphate ceramic implants. *J Periodontol* 57: 211-217, 1986.
17. Shahmiri S, Singh IJ, Stahl SS: Clinical response to the use of HTR polymer implant in human infrabony lesions. *Int J Periodontics Restorative Dent* 12: 294-299, 1992.
18. Trisi P, Rao W, Rebaudi A, Fiore P: Histologic effect of pure-phase beta-tricalcium phosphate on bone regeneration in human artificial jaw-bone defects. *Int J Periodontics Restorative Dent* 23(1): 69-77, 2003.
19. Yukna RA: Synthetic bone grafts in periodontics. *Periodontol* 2000 1: 92-99, 1993.
20. Garret S: Periodontal regeneration around natural teeth. *Ann Periodontol* 1: 621-666, 1996.
21. Ratner BK, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JE, Hench LL: *Biomaterial science*. Academic press, 1996.
22. Yamamuro T, Hench LL, Wilson J, Davies JF, Brady J: *Handbook of Bioactive ceramics 2*. CRCc Press, 1990.
23. Andriano KP, Daniels AJ: Biocompatibility and mechanical properties of a totally absorbable composite material for orthopedic fixation devices. *J Appl Biomat*, 3: 197-206, 1992.
24. Gross JM, Lickfield G, Latour RA: Calcium phosphate reinforced bioabsorbable polymer composites. *Prec 23rd meeting of biomat* 159, 1997.
25. 양승민, 설양조, 계승범, 이인경, 김석영, 이용무, 구영, 한수부, 정종평, 최상묵, 류인철: 다양한 형태의 다공질 calcium phosphate의 생분해성에 관한 장기적인 연구. 33(2): 301-305, 2003.
26. Lee YK, Lin S, Rohanizadeh R, eGeros JP, LeGeros RZ: Preparation and properties of calcium phosphate glasses obtained from the system  $\text{CaO-CaF}_2\text{-P}_2\text{O}_5\text{-MgO-ZnO}$ . *J Biomed mater Res*, In Press
27. 이용근, 문현주, 이상배, 김광만, 김경남, 최성호: 치주조직 재생을 위한 칼슘 포스페이트 글라스 분말이 백서 두개골 결손부의 골조직 재생에 미치는 영향. *대한 치과기재학회지* 30(2): 153-161, 2003.
28. Lee YK, Kim HS, Cho KS, Kim KN, Choi SH: Investigation of bone formation using non-crystalline calcium phosphate glass in beagle dogs. *Key Engineering Materials*: 391-394, 2003.
29. Mosmann T: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65: 55-63, 1983.
30. Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB: Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res* 47(4): 936-42, 1987.
31. Hugoson A, Laurell L, Lundgren D: Frequency

- distribution of individuals aged 20-70 years according to severity of periodontal disease experience in 1973 & 1983. *J Clin Periodontol*. 19(4): 227-232, 1992.
32. Saffar JL, Colombier ML, Detienvile R: Bone formation in tricalcium phosphate filled periodontal intrabony lesions. *J Periodontol* 61: 209-216, 1990.
  33. Nefussi JR: Sequential expression of bone matrix proteins during rat calvaria osteoblast differentiation and bone nodule formation in vitro. *J Histochem Cytochem* 45: 493-503, 1997.
  34. Ramakrishnan PR, Lin WL, Sodek J, Cho MI: Synthesis of noncollagenous extracellular matrix protein during development of mineralized nodules by rat periodontal ligament cells in vitro. *Calcif Tissue Int* 57: 52-59, 1995.
  35. Roth JA, Kim BG, Lin WL, Cho MI: Melatonin promotes osteoblast differentiation and bone formation. *J Bio Chem* 274: 22041-22047, 1999.
  36. Bellows CG, Aubin JE, Heersche JN: Initiation and progression of mineralization of bone nodules formed in vitro: the role of alkaline phosphatase and organic phosphate. *Bone and Mineral* 14(1): 27-40, 1991.
  37. Woldarski KH, Reddi AH: Alkaline phosphatase as a marker of osteoinductive cells. *Calcif Tissue Int* 39: 382-385, 1986.
  38. Arceo N, Sauk JJ, Moehring J, Foster RA, Somerman MJ: Human periodontal cells initiate mineral-like nodules in vitro. *J Periodontol* 62: 499-503, 1991.
  39. Ohgushi H, Dohi Y, Yoshikawa T, Tamai S, Okunaga K, Shibuya T: Osteogenic differentiation of cultured marrow stromal stem cells on the surfaces of bioactive glass ceramics. *J Biomed Mater Res* 32(3): 341-348, 1996.
  40. Viornery C, Guenther H, Aronsson B, Péchy P, Descouts P, Grätzel M: Osteoblast culture on polished titanium disks modified with phosphonic acids. *J Biomed Mater Res* 62: 149-155, 2002.

## The Effects of Calcium Phosphate Glass on Mouse Calvarial Cell

Min-Kyoung Kim<sup>1</sup>, Chang-Sung Kim<sup>1</sup>, Doug-Youn Lee<sup>2,3</sup>, Yong-Keun Lee<sup>3</sup>,  
Kyoo-Sung Cho<sup>1,2</sup>, Jung-Kiu Chai<sup>1</sup>, Chong-Kwan Kim<sup>1,2</sup>, Seong-Ho Choi<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Department of Periodontology, College of Dentistry, Yonsei University,  
Research Institute for Periodontal Regeneration

<sup>2</sup>Brain Korea 21 Project for Medical Science

<sup>3</sup>Department and Research Institute of Dental Biomaterials and Bioengineering, College of Dentistry, Yonsei University

The goal of periodontal treatment is not only to arrest the progression of the disease but also to promote the functional, esthetic regeneration of the periodontium. Flap operation, bone graft, guided tissue regeneration, growth factors and bone morphogenetic protein have been used for this purpose. Among these techniques of regeneration, alloplastic graft, especially calcium phosphate is getting more attention recently.

The purpose of this study was to evaluate the effects of calcium phosphate glass on mouse calvarial cell *in vitro*. The toxicity of calcium phosphate glass was measured using MTT assay, the synthesis of collagen was measured using collagen assay, and ALP activity was measured. The experimental groups were cultured with calcium phosphate glass(both AQ-, and HT-CPG) in concentration of 0.01, 0.02, 0.1, 0.2g/ml.

The results are as follows

1. In concentrations not exceeding 0.02g/ml, both the groups(AQ-CPG, HT-CPG) didn't show any toxicity on mouse calvarial cell( $p < 0.05$ ).
2. In both the experimental groups are the concentration of 0.02g/ml, collagen expressions were significantly up-regulated ( $p < 0.05$ ).
3. In both the experimental groups are the concentration of 0.02g/ml, ALP activity was not significantly up-regulated, but ALP activity in both experimental groups were greater than control group( $p < 0.05$ ).

The results suggested that the use of calcium phosphate glass may promotes periodontal regeneration. Ongoing studies are necessary in order to determine their regeneration effects.

---

Key words: calcium phosphate glass, mouse calvarial cell, MTT assay, collagen assay, ALP activity