

백서의 신연 골 형성에서 G-CSF를 이용한 혈관형성 및 골 형성의 촉진 효과

Enhancement of Vasculogenesis and Osteogenesis Using Granulocyte-Colony Stimulating Factor in the Rat Model of Tibial Distraction Osteogenesis

신성진* · 이동연 · 이혜란 · 김중일 · 유원준 · 조태준 · 최인호

서울대학교 의과대학 정형외과학교실, *제주대학교 의과대학 정형외과학교실

목적: 신연 골 형성술 시 골형성이 성공적으로 일어나기 위해서는 적절한 신연속도의 유지가 중요하다. 본 연구에서는 백서 신연 골 형성술 모델에서 granulocyte colony stimulating factor (G-CSF)의 피하 투여 후 혈류 증가 및 골형성에 미치는 영향을 평가하여 신연속도를 증가 시키면서도 골형성을 유지할 수 있는 방법을 찾고자 하였다.

대상 및 방법: 42마리의 백서를 대상으로 우측 경골에 신연 가능한 외고정 장치를 장착한 뒤 절골술을 시행하였으며, 1.5 mm/day의 속도로 10일간 신연한 군(1군), G-CSF를 투여하고 1.5 mm/day의 속도로 신연한 군(2군), 그리고 0.75 mm/day의 속도로 10일간 신연한 군(3군)으로 나누어 매주 방사선 검사를 시행하여 골 형성 촉진 효과를 비교하였으며, laser doppler perfusion image (LDPI)를 이용하여 신연 부위의 혈류량을 비교하였다. 특히, G-CSF를 투여한 군에서는 투여전과 2주, 5주에 각각 혈액을 채취하여 FACS 분석을 시행하여 혈관 내피전구 세포 동원 유도 효과를 알아보았다.

결과: 단순 방사선 사진상 신연이 끝난 후 경화기 동안에 1군에 비하여 2군과 3군에서 신연 부위의 골 형성이 증가하였으나, 그 차이는 통계적으로 유의하지 않았다. LDPI를 이용한 혈류량 측정 결과에서 골 신연 부위와 정상과의 혈류량 비는 1군에 비하여 2군과 3군에서 통계적으로 유의하게 높았고($p < 0.05$), 2군과 3군간의 차이는 없었다. FACS 분석에서 G-CSF를 투여한 군에서 혈관 내피전구세포의 표면 항체인 Scal-1+, C-kit+의 분포의 증가소견을 관찰할 수 있었다.

결론: 백서의 경골 신연 골 형성술에서 G-CSF를 투여할 경우 적절한 신연속도보다 빠른 속도로 신연을 시행하여도 혈류 증가 및 신생골 형성이 유지됨을 확인하였다. 이는 G-CSF 투여에 의한 혈관 내피전구 세포 동원의 유도 효과에 의한 혈관형성 촉진으로 생각된다.

색인단어: 혈관 내피전구세포, Granulocyte-colony stimulating factor, 신연 골 형성술

서 론

신연 골 형성술은 G.A. Ilizarov에 의해서 처음 소개된 골 연장술의 가장 기본이 되는 방법으로, 절골술시 최대한 골외막과 골내막의 혈류를 다치지 않도록 하는 "피질골 절골술(corticotomy)"을

시행한 후 점진적인 신연을 시킴으로써 신연 부위의 추가적인 골 이식술 없이도 신생 골의 형성을 유도하는 것이다.¹⁾ 최근에는 점진적인 신연 골 형성술이 불유합, 외상이나 감염에 의한 사지 부동, 선천성 기형, 그리고 만성 골수염 등과 같은 일반적인 방법으로 치료하기 어려운 경우에 가장 효과적인 치료법으로 여겨지고 있다.^{2,3)}

이러한 신연 골 형성술의 가장 바탕이 되는 기전은 신생 혈관형성(angiogenesis)과 석회화(mineralization)로,^{1,4)} 특히, Carvalho 등⁵⁾은 매 신연 시마다 혈관형성인자의 분비가 촉진됨을 확인하였고 신생혈관 형성이 성공적인 신연 골 형성술을 위해서 가장 중요한 인자임을 보고 하였다. Choi 등⁶⁾과 Lee 등²⁾은 신생 골 형성

접수일 2010년 9월 29일 게재확정일 2011년 5월 31일

교신저자 이동연

서울시 종로구 대학로 101, 서울대학교 의과대학 정형외과학교실

TEL 02-2072-1863, FAX 02-764-2718

E-mail: leedy@snu.ac.kr

*본 연구는 서울대학교병원 연구비(04-2006-1130)의 지원으로 수행되었음.

과 신생 혈관 형성이 서로 밀접히 연관되어 있음을 보고 하였으며, 상호간의 매개 인자 및 신호 전달에 대하여 Lee 등²⁾은 신연 골 형성술시 혈류량이 증가하여 일반적인 골절 치유시에 비하여 수배 정도 혈류량이 증가됨을 확인하고, 신연 골 형성 시에 혈관 내피전구세포(endothelial progenitor cell)가 골수에서 말초 혈액으로 동원(mobilizing)되고, 신연 부위로 회귀(homing)하는 것이 혈류량을 증가하는 하나의 기전임을 확인하였다.

신연 골 형성술시 성공적인 신생혈관 형성 및 골형성이 일어나기 위해서는 적절한 신연속도의 유지가 매우 중요하여, 실제 임상에서 성인의 경우 하루 1 mm를 4회로 나누어 신연하는 것을 기본으로 하고 있으며, 골 생성이 잘 되지 않는 경우에는 신연속도를 더 느리게 하고 있다.^{7,8)} 따라서, 신연 골 형성술의 가장 큰 장애 요인인 긴 외고정장치의 장착 기간을 최소화 하기 위해서는 신연 속도를 증가시키거나 골형성을 촉진시킬 수 있는 보조적인 치료법의 개발이 요구된다.

혈관 내피전구세포는 심근경색이나 뇌 경색과 같은 허혈성 손상에 반응하여 골수에서 동원되는 말초 혈액 줄기 세포로,^{9,10)} granulocyte colony stimulating factor (G-CSF)는 이러한 줄기 세포의 동원을 유도하여 신생혈관 형성을 촉진시켜 허혈성 심질환 환자에서 임상적으로 사용되고 있다.¹¹⁻¹³⁾

이에 저자들은 백서 신연 골 형성술 모델에서 granulocyte colony stimulating factor (G-CSF)의 피하 투여 후 혈류 증가 및 골형성에 미치는 영향을 평가하여 신연속도를 증가시키면서도 골형성을 유지할 수 있는 방법을 찾고자 하였다.

대상 및 방법

1. 연구대상

10 주령의 male Sprague-Dawley 종의 백서(체중 260-300 g) 42마리를 대상으로 실험을 시행하였다. Zoletil (Tiletamin-zolazepam, Virbac, Korea)과 rompun (xylazine, 바이엘동물약품, 한국)을 각각 5 mg/kg, 2 mg/kg 용량으로 혼합하여 복강내 주사하여 전신 마취를 시행하였으며, 우측 경골에 신연이 가능한 양측 선형 외고정장치를 장착하였다(Fig. 1). 그 후, 경골 간부 부위에 종 절개를 가하고 골막 손상에 주의하면서 절삭기를 이용하여 경골 간부에서 절골술을 시행한 뒤 신연이 되는지를 확인하였다.^{4,6)} 42마리 백서들은 세가지 군으로 분류되었는데, 제1군(n=14)은 빠른 신연 속도(1.5 mm/day, 2회)로 10일간 신연하고 6주간의 경화기(consolidation period)를 둔 군으로 하였고, 제2군(n=14)은 1군과 같은 신연 속도(1.5 mm/day, 2회)로 10일간 신연하고 6주간의 경화기를 두었으나 G-CSF (류코스틴, 동아제약)를 50 ug/kg 용량으로 술 후 1일차부터 4일간 피하 주사한 군으로 하였으며, 마지막으로 제3군(n=14)은 신연 속도를 하루 0.75 mm씩 2회로 나누어 10일간 신연하고 6주간의 경화기를 둔 군으로 하였다. 모든 군에서 수술 후 3

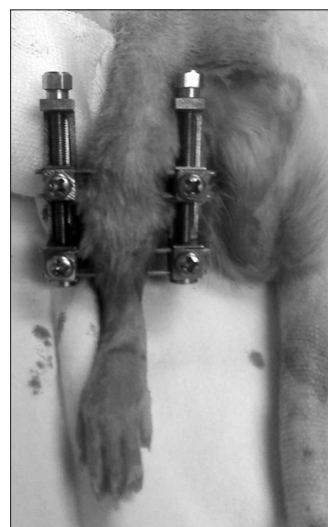


Figure 1. This photo shows bilateral mono-fixators at the right tibia in rat DO (distraction osteogenesis) model.

일간의 유지기(latent period)를 둔 후 신연을 시행하였다.

2. 단순 방사선 검사

각군에서 5마리씩, 총 15마리가 방사선 검사를 위해 이용되었다. 신연부의 골형성 정도를 분석하기 위해서 1주 간격으로 digital C-arm을 이용하였다. 1주마다 시행한 digital C-arm image를 JPEG 파일로 변환하여 신연부위를 region of interest로 구분하였다. 각군의 백서들의 경골의 bone quality가 서로 다르기 때문에 정상측 상응부위와의 비율을 이용하여 골형성 정도를 정량화 하였다. 즉, 신연 부위를 직사각형 모양으로 도식화하여 Image J[®] program으로 측정하여 계산하면 region of interest부위의 평균값을 얻게 되는데, region of interest와 같은 넓이 만큼 정상측 상응 부위에서 평균값을 얻은 뒤, 두 값의 비율을 정량화 하였다.

3. 골 신연 기간 동안의 혈류량 검사

각 군당 9마리씩, 총 27마리가 혈류량 검사를 위해 이용되었다. 혈류량 측정은 앞서 언급한 방법을 이용하여 전신 마취 하에 laser doppler perfusion image (LDPI)를 이용하여 수술 후 1주 간격으로 측정하였으며 골 신연 부위와 이에 상응하는 건측 부위의 혈류량 비를 측정하였다. Data의 변이성을 줄이기 위해 혈류량 절대값이 아닌 양측간의 비율을 Moor LDI Image Processing software (v3.09, Moor Instruments Limited)로 측정하여 비교하였다.³⁾

4. G-CSF에 의한 혈관 내피전구 세포의 동원 유도 효과 분석

G-CSF 투여군 중 3마리에서 혈관내피전구세포의 세포표면항체 발현의 변화를 측정하였다. G-CSF 투여군은 절골술 후 4일 동안 복강내로 주사 투여 하였으며 혈액 채취는 신연을 시작하기 직

전과 10일간의 신연이 끝난 후, 3주간의 경화기가 지난 후에 각각 미정맥으로부터 혈액을 채취하였다. 채취된 혈액에서 density-gradient centrifugation method (Histopaque 1077, Sigma, St. Louis, Mo.)를 이용하여 단핵 세포층을 분리하였다.¹⁴⁾ 분리된 단핵 세포를 이용하여 fluorescence-activated cell sorter (FACS)분석을 시행하였으며 분리된 단핵 세포 중 혈관 내피 전구세포를 분석하기 위하여 1×10^6 cells를 50 ul phosphate-buffered saline에 주입하고 fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-mouse Sca-1 monoclonal antibody (BD bioscience, cat. 553335), Allophycocyanin (APC)-conjugated anti-mouse c-kit monoclonal antibody (BD bioscience, cat. 553356)와 각각 얼음에서 30분간 반응시켰다. 두 차례 세척하고 1% paraform aldehyde (PFA) 1 ml로 4°C에서 5분간 고정하고 다시 세척한 후 Becton Dickinson FACS flow cytometer (FACScan)로 분포를 분석하였다.

5. 통계학적 분석

각 군간의 방사선학적 및 혈류량 비율의 차이를 비교하기 위하여 일원 분산 분석(one-way ANOVA)과 student t-test를 이용하였으며, 통계학적인 방법은 SPSS 12.0 (SPSS, Chicago, IL)을 사용하였으며, p-value가 0.05 미만인 경우에서 통계적으로 유의하다고 판단하였다.

결 과

1. 단순 방사선 소견

각 군에서 5 마리씩 시행한 방사선 소견에서 초기 경화기(1-3주)에 신생 골 형성 정도(화소 분석, 신연부/전측 상응부)가 증가됨을 확인하였으나, 각 군간의 차이는 통계적으로 유의하지 않았다(Fig. 2). 또한 6주간의 평균 골 형성 정도를 비교한 경우에 1군에 비하여 2, 3군에서 골형성이 증가됨을 관찰하였으나 그 차이 또한 통계적으로는 유의하지 않았다(Fig. 3).

2. 골 신연 기간 동안의 혈류량 소견

1, 2, 3군 모두에서 절골술 후 신연부위의 혈류량은 건측에 비하여 감소하다가 신연 중단 이후 4주까지는 혈류량 비가 증가하는 소견을 보였다. 이러한 결과는 단순 방사선 사진상의 골 형성 정도의 변화와 일치하였다. 각 군에서 신연 중단 이후 4주째 혈류량 비(신연부/전측 상응부)의 차이는 가장 두드러졌으며, 1군에 비하여 2, 3군에서 통계적으로 유의하게 증가되는 것을 확인하였다($p < 0.05$). 또한 6주간의 평균 혈류량 비는 2, 3군에서 1군에 비하여 혈류량이 통계적으로 유의하게 증가됨을 관찰할 수 있었으며($p < 0.05$), 2군과 3군에서의 혈류량의 차이는 각각 147.43 ± 7.04 , 156 ± 27.12 (신연부/전측 상응부)로 두 군간의 혈류량비는 통계적으

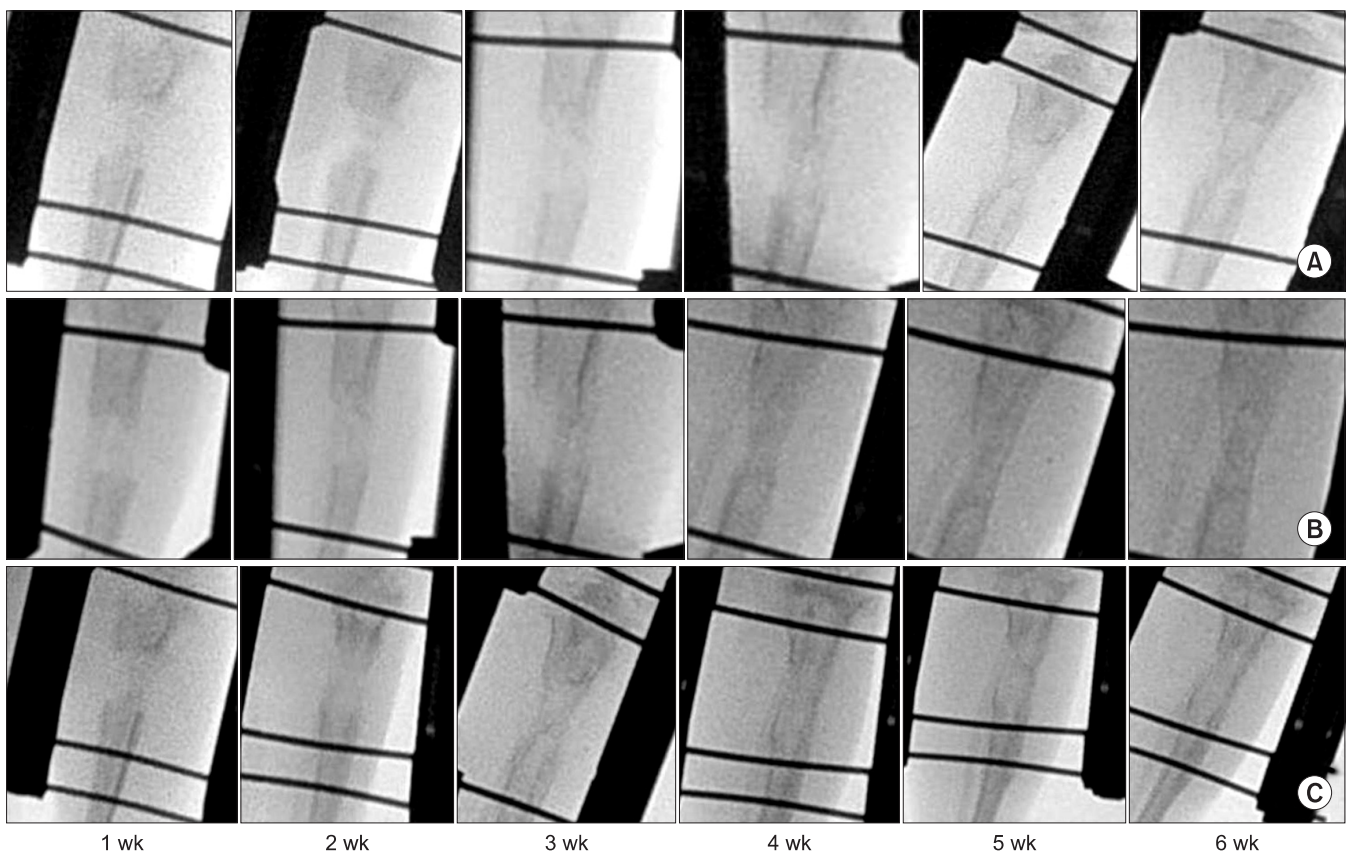


Figure 2. Serial radiographs during consolidation period in groups 1 (A), 2 (B), and 3 (C).

로 유의한 차이를 보이지 않았다(Fig. 4).

3. G-CSF에 의한 혈관 내피전구 세포의 동원 유도 효과

혈관 내피전구세포의 표면 항체인 Sca-1과 C-kit의 cell fraction이 G-CSF 주입 후와 신연 후에 증가된 소견을 보였고 신연 중단 3주 후에는 감소된 소견을 보였다(Fig. 5).

고 찰

신연 골 형성술 시에 신생 혈관 생성의 기전에 대하여 많은 연구들이 진행되었으며, 이러한 연구들은 신생 혈관 형성이 성공적인 신연 골 형성술을 위해서 가장 중요한 인자임을 보고하였다.^{5,13)}

더 나아가서 신생 혈관 형성에 관여하는 systemic factor들도 신생 골 형성에 영향을 줄 수 있음이 보고된 후에,^{5,6,13,15-17)} Asahara 등⁹⁾은 혈관 내피전구 세포가 심근경색이나 뇌 경색과 같은 허혈성 손상에 반응하여 골수에서 동원되는 말초 혈액 줄기 세포임을 보고하였으며 혈관 내피전구 세포에 의한 신생 혈관 형성의 기전을 처음으로 밝혀냈다. 이러한 기전을 바탕으로 혈관 내피전구 세포들은 심근 경색과 같은 허혈성 심질환의 치료로써 환자에서 임상적으로 사용되고 있으며,^{12,18,19)} 정형외과 영역에서는 Lee 등³⁾이 신연 골 형성술시 신생 혈관 형성의 상호간의 매개 인자 및 신호 전달에 대하여 보고하였는데, 그들은 신연 골 형성술시 일반적인 골절 치유시에 비하여 수배 정도 혈류량이 증가됨을 확인하였고, 이러한 증가는 신연 골 형성 시에 혈관 내피전구세포가 골수에서

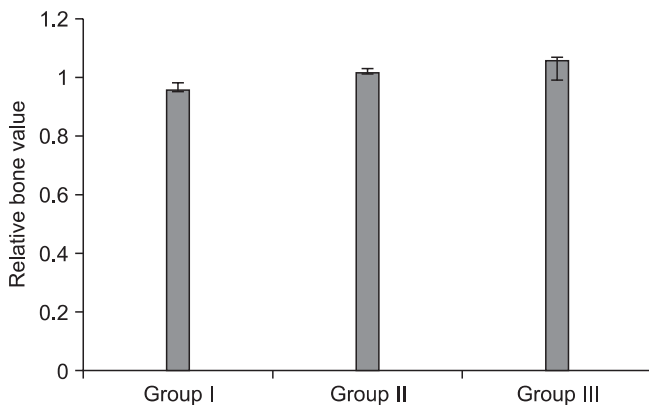


Figure 3. This graph shows average of relative bone density value during consolidation period after cessation of distraction in 3 groups. Relative bone densities of groups 2, and 3 were higher than that of group 1 during 6 weeks and that was not statistically significant ($p>0.05$, by student t-test).

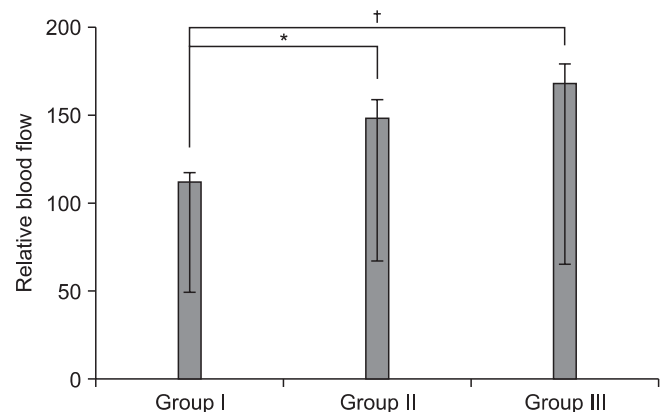


Figure 4. This graph shows average of relative blood flow after operation (corticotomy) in 3 groups. Relative blood flows of groups 2, and 3 were higher than that of group 1 during 6 weeks and that was statistically significant (* $p=0.04$, † $p=0.03$, by student t-test).

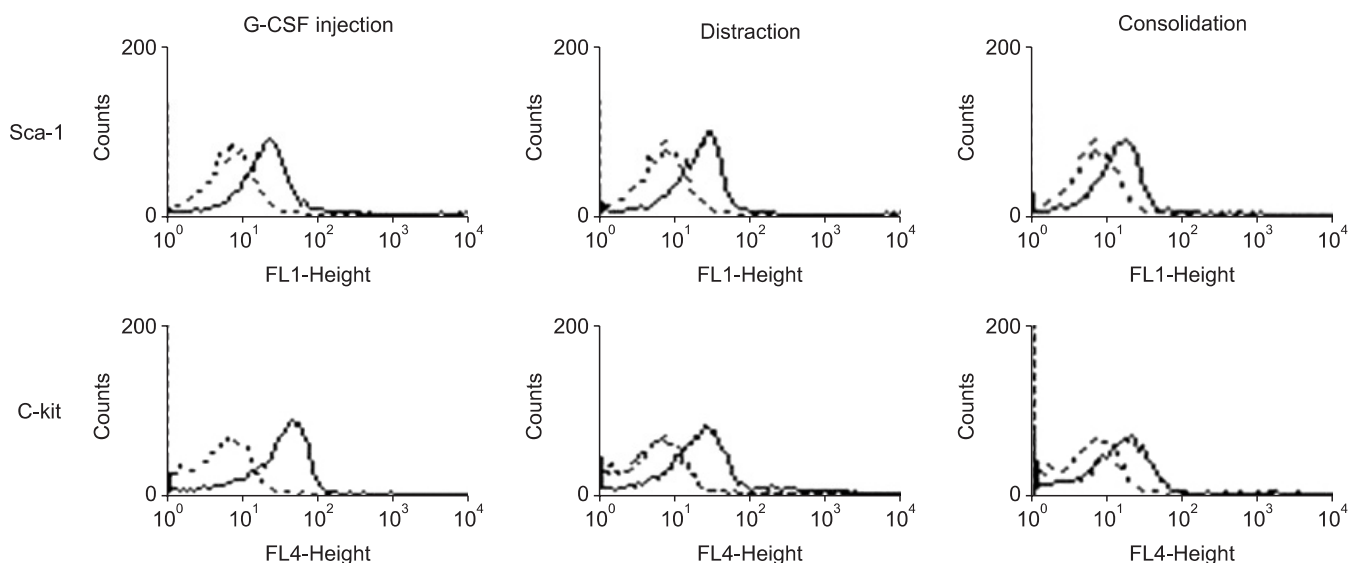


Figure 5. G-CSF induced the mobilization of Sca-1 and C-kit positive cell fractions (right shift in FACS analysis, solid line) before the start of distraction (dash line). Sca-1 and C-kit positive cell fractions maintained during distraction and it decreased after 3 weeks of consolidation.

말초 혈액으로 동원(mobilizing)되고, 신연 부위로 회귀(homing)하는 기전이 원인임을 보고 하였다.

Granulocyte colony stimulating factor (G-CSF)는 이러한 조혈 모세포 계열의 혈관 내피전구세포를 말초 혈액으로 동원을 유도하는 것으로 Orlie 등¹²⁾과 Powell 등²⁰⁾은 그 작용 기전을 골수 유래 내피전구세포의 동원에 의한 신생 혈관 형성 기전으로 설명하고 있다. 그들의 연구에 따르면 G-CSF를 허혈성 심질환 환자에게 피하로 투여하였으며, G-CSF 투여 후 혈관 내피전구세포의 표면 항체인 CD34+/CD133+와 CD133+/VEGFR-2+가 증가됨과 새로운 혈관이 형성됨을 보고하였다. 본 연구에서도 G-CSF를 4일 동안 복강내로 주사 투여 하였으며 신연을 시작하기 직전과 10일간의 신연이 끝난 후, 3주간의 경화기가 지난 후에 각각 미정맥으로부터 혈액을 채취하였다. Fluorescence-activated cell sorter (FACS) 분석에서 주입 후와 10일간의 신연이 끝난 후에 Sca-1과 C-kit의 cell fraction이 증가되고 3주 후 그 양이 감소됨을 확인하였다. 하지만 본 연구에서 사용된 G-CSF는 인체에서 재 조합한 것으로 백서 모델에서도 인체에서 작용하는 것과 같은 기전으로 작용하는지 밝혀져 있지 않지만, G-CSF 투여 후 혈관내피전구 세포의 표면항체의 cell fraction이 증가 되는 것을 확인 하였고, 이것과 동반되어 혈류량의 증가됨을 관찰하여, 백서 모델에서도 G-CSF에 의하여 말초 혈액으로 혈관 내피전구세포가 동원됨을 확인 할 수 있었다.

세 군 모두에서 6주 경화기 후 신연 부위에서 신생 골이 형성됨을 확인하였다. 특히, 경화기 초기 및 평균적인 골 형성 정도가 1 군 보다 2군과 3군에서 높았으나, 그 차이는 통계적으로 유의하지 않았다. Aronson 등²¹⁾은 그들의 연구에서 신연 속도를 0.5 mm/day로 신연한 군 보다 2.0 mm/day로 빠르게 신연한 군에서 지연 유합이 많았다고 보고 하였으며, 이러한 현상은 조직학적 소견상 섬유 중양대(fibrous interzone)에 미성숙된 섬유 연골이 포함되어 있기 때문이라고 하였다. 하지만 본 연구에서 2.0 mm/day보다 느린 1.5 mm/day의 속도로 신연을 시행하였으며 6주(42일)간의 짧은 경화기를 유지함으로써, 결과적으로 1, 2, 3군에서 골 형성 정도의 유의한 차이가 발생하지 않았으리라 생각된다. 또한 각군마다 14예 모두에서 방사선학적 분석을 시행하지 못한점은 골형성이 증가된다는 결론을 뒷받침하기에는 부족하다고 생각되었다. 이러한 점들은 본 연구의 제한점으로 생각되며 추후 연구에서는 각 군마다 증례수를 늘리고 또한 각 군마다 경화기를 다르게 함으로써 경화기 기간에 따른 결과적 차이를 줄일 수 있을 것이며, 단순 방사선 사진을 통한 이차원적인 분석보다는 micro-CT를 이용한 골소주의 삼차원적인 정량적 분석¹⁴⁾이 필요하리라 사료된다.

Lee 등²⁾은 백서의 신연 골 형성술 모델에서 신연 부위의 혈류량의 비를 분석하였다. 절골술을 시행한 후 신연 부위의 혈류량은 신연을 시행하지 않았던 견측에 비하여 감소하는 소견을 보

였으나 신연을 중단 후 경화기 동안에 혈류량이 급속히 증가함을 보고하였다. 본 연구에서는 1, 2, 3군 모두에서 절골술 직후 혈류량은 감소하다가 신연 중단 후 경화기 초기에 증가하는 양상을 보였으며, 그 정도는 1군에 비하여 2군과 3군에서 통계적으로 유의하게 증가함을 관찰 할 수 있었다. 또한 G-CSF투여 후 경화기 초기에 혈관 내피전구세포의 동원 증가와 시간적으로 일치하는 소견을 보였다. 즉, G-CSF에 의한 혈관 내피전구세포의 동원으로 인하여 빠르게 신연을 시행한 부위에서도 신생 혈관 형성이 증가하는 것을 알 수 있었다. 추가적으로 혈관 촬영술과 같은 직접적인 방법으로 부행 혈관(collateral vessel) 형성 정도를 평가²²⁾를 하거나 또는 신연 부위보다 원위부에서 신생 혈관에 대한 조직학적 검사²³⁾ 등이 추후 연구에서 필요하리라 생각된다.

결론

백서 경골의 신연 골 형성에서 정상보다 빠른 속도로 신연을 시행한 군에서 G-CSF를 투여 하였을 때 그렇지 않은 군에 비해 신생 혈관 생성에 대하여 우수한 결과를 보였으며, G-CSF 투여에 의해서 혈관 내피전구 세포의 동원이 유도됨을 알 수 있었다. 따라서, 골 형성이 지연되는 위험인자들이 존재하는 경우나 빠른 신연속도가 필요한 경우 G-CSF 투여와 같이 혈중에 순환하는 혈관 내피전구세포의 양을 증가시키는 방법을 사용함으로써 신연 골 형성술시 혈관 신생에 도움을 주어 신생 골 형성 촉진 및 수술 후 합병증 감소에 기여할 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Choi IH, Chung CY, Cho TJ, Yoo WJ. Angiogenesis and mineralization during distraction osteogenesis. J Korean Med Sci. 2002;17:435-47.
2. Lee DY, Cho TJ, Lee HR, et al. Distraction osteogenesis induces endothelial progenitor cell mobilization without inflammatory response in man. Bone. 2010;46:673-9.
3. Lee DY, Cho TJ, Kim JA, et al. Mobilization of endothelial progenitor cells in fracture healing and distraction osteogenesis. Bone. 2008;42:932-41.
4. Ilizarov GA. The tension-stress effect on the genesis and growth of tissues. Part I. The influence of stability of fixation and soft-tissue preservation. Clin Orthop Relat Res. 1989;238: 249-81.
5. Carvalho RS, Einhorn TA, Lehmann W, et al. The role of angiogenesis in a murine tibial model of distraction osteogenesis. Bone. 2004;34:849-61.
6. Choi IH, Ahn JH, Chung CY, Cho TJ. Vascular proliferation

- and blood supply during distraction osteogenesis: a scanning electron microscopic observation. *J Orthop Res*. 2000;18:698-705.
7. Aronson J. Limb-lengthening, skeletal reconstruction, and bone transport with the Ilizarov method. *J Bone Joint Surg Am*. 1997;79:1243-58.
 8. Ilizarov GA. The tension-stress effect on the genesis and growth of tissues: Part II. The influence of the rate and frequency of distraction. *Clin Orthop Relat Res*. 1989;239:263-85.
 9. Asahara T, Masuda H, Takahashi T, et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res*. 1999;85:221-8.
 10. Takahashi T, Kalka C, Masuda H, et al. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med*. 1999;5:434-8.
 11. Stroncek DF, Clay ME, Herr G, et al. The kinetics of G-CSF mobilization of CD34+ cells in healthy people. *Transfus Med*. 1997;7:19-24.
 12. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:10344-9.
 13. Fang TD, Salim A, Xia W, et al. Angiogenesis is required for successful bone induction during distraction osteogenesis. *J Bone Miner Res*. 2005;20:1114-24.
 14. Chappard D, Retailleau-Gaborit N, Legrand E, Baslé MF, Audran M. Comparison insight bone measurements by histomorphometry and microCT. *J Bone Miner Res*. 2005;20:1177-84.
 15. Street J, Bao M, deGuzman L, et al. Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:9656-61.
 16. Schipani E, Maes C, Carmeliet G, Semenza GL. Regulation of osteogenesis-angiogenesis coupling by HIFs and VEGF. *J Bone Miner Res*. 2009;24:1347-53.
 17. Riddle RC, Khatri R, Schipani E, Clemens TL. Role of hypoxia-inducible factor-1alpha in angiogenic-osteogenic coupling. *J Mol Med (Berl)*. 2009;87:583-90.
 18. Körbling M, Reuben JM, Gao H, et al. Recombinant human granulocyte-colony-stimulating factor-mobilized and apheresis-collected endothelial progenitor cells: a novel blood cell component for therapeutic vasculogenesis. *Transfusion*. 2006;46:1795-802.
 19. Cho HJ, Kim TY, Cho HJ, et al. The effect of stem cell mobilization by granulocyte-colony stimulating factor on neointimal hyperplasia and endothelial healing after vascular injury with bare-metal versus paclitaxel-eluting stents. *J Am Coll Cardiol*. 2006;48:366-74.
 20. Powell TM, Paul JD, Hill JM, et al. Granulocyte colony-stimulating factor mobilizes functional endothelial progenitor cells in patients with coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:296-301.
 21. Aronson J, Shen XC, Skinner RA, Hogue WR, Badger TM, Lumpkin CK Jr. Rat model of distraction osteogenesis. *J Orthop Res*. 1997;15:221-6.
 22. Takeshita S, Pu LQ, Stein LA, et al. Intramuscular administration of vascular endothelial growth factor induces dose-dependent collateral artery augmentation in a rabbit model of chronic limb ischemia. *Circulation*. 1994;90:II228-34.
 23. Fadini GP, Sartore S, Schiavon M, et al. Diabetes impairs progenitor cell mobilisation after hindlimb ischaemia-reperfusion injury in rats. *Diabetologia*. 2006;49:3075-84.

Enhancement of Vasculogenesis and Osteogenesis Using Granulocyte-Colony Stimulating Factor in the Rat Model of Tibial Distraction Osteogenesis

Sung Jin Shin, M.D.*, Dong Yeon Lee, M.D., Hye Ran Lee, Jung Il Kim, M.D.,
Won Joon Yoo, M.D., Tae-Joon Cho, M.D., and In Ho Choi, M.D.

Department of Orthopaedic Surgery, Seoul National University College of Medicine, Seoul,

**Jeju National University College of Medicine, Jeju, Korea*

Purpose: Proper speed of distraction is critical for successful new bone formation in distraction osteogenesis. The purpose of this study was to evaluate the effect of granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) on formation of new blood vessels and new bones in the rat model of tibial distraction osteogenesis (DO) to develop enhancement method of bone formation while increasing the distraction speed.

Materials and Methods: Forty two rat-tibial DO models were included in this study, and were divided into 3 groups; group I (rapid distraction), group II (rapid distraction with G-CSF), and group III (slow distraction). The amount of bone formation and relative blood flow were analyzed by sequential radiographs and laser Doppler perfusion imaging (LDPI). Blood sampling was done before G-CSF injection, at 2 weeks and 5 weeks after G-CSF injection and surface expression such as Scal-1+ and C-kit+ of endothelial progenitor cells (EPCs) was analyzed by fluorescence-activated cell sorter (FACS) for the effects of G-CSF in inducing mobilization of EPCs.

Results: The amount of new bone formation in the distraction gap on serial radiographs was higher during the consolidation period in groups II and III than in group I but, the difference was not significant ($p>0.05$). The relative blood flow in the distraction gap in groups II and III increased more significantly than in group I ($p<0.05$). FACS analysis showed an increased EPCs fraction after G-CSF injection.

Conclusion: We demonstrated that G-CSF administration ameliorated bone formation and blood flow during rapid distraction in the rat model of tibial distraction osteogenesis. We think that G-CSF has an effect on mobilization of EPCs resulting in an increase in the blood flow.

Key words: endothelial progenitor cell, granulocyte-colony stimulating factor, distraction osteogenesis

Received September 29, 2010 Accepted May 31, 2011

Correspondence to: Dong Yeon Lee, M.D.

Department of Orthopaedic Surgery, Seoul National University College of Medicine, 101, Daehak-ro, Jongno-gu, Seoul 110-744, Korea

TEL: +82-2-2072-1863 FAX: +82-2-764-2718 E-mail: leedy@snu.ac.kr