



The Bone Grinding and Scaffold Grafting Techniques for Guide Bone Regeneration Induce the Stress on the Rat Brain

Yeon Kyung Lee¹, Ji Eun Kim¹, So Hee Nam¹, Sun il Choi¹, Eon Pil Lee¹, Hae Wook Choi¹, Hong Sung Kim¹, Jae Ho Lee¹, Young Jin Jung¹, Byeong Cheol Kang², Jung Sik Cho³ and Dae Youn Hwang^{1*}

¹Department of Biomaterials Science, College of Natural Resources & Life Science, Pusan National University/ PNU-Laboratory Animal Resources Center, Miryang, Korea

²Department of Experimental Animal Research, Clinical Research Institute, Seoul National University Hospital, Seoul, Korea

³Multidisciplinary Technology Institute, Hoseo University, Asan, Korea

Guided bone regeneration (GBR) is a technique that a barrier membrane is placed over the bone defect to prevent the cell growth from the connective tissue and epithelium. In this study, in order to determine whether GBR technique could induce stress in rats, the standardized bone defect in rat calvaria was covered with apatite membrane. Bone and brain tissues were collected from rats at 3 days, 2, 4, and 16 weeks post-operation, and then alteration of the new bone formation at the defects and stress-related factors were detected with histological examination and Western blot, respectively. From 4 to 16 weeks after the operation, the apatite membrane was attached to the region of regenerated bone and encapsulated with a thick fibrous layer. Furthermore, the concentration of cortisol, a good indicator of stress, significantly increased 3 days post-operation. However, the increase at 3 days was returned to the basal level in 2 weeks. In Western blot analysis, the highest phosphorylation level of extracellular signal-regulated kinase (ERK) was observed 3 day post-operation, while those of the c-jun N-terminal kinase (JNK) and p38 were detected 4 weeks post-operation. Taken together, the results suggest that GBR technique may induce the serious stress on the brain tissue via the induction of ERK phosphorylation during 2 weeks, and that the stress responses restored in 4 week via JNK and p38 signaling pathway.

Key words: Guided bone regeneration, cortisol, mitogen-activated protein kinase (MAPK), stress, apatite membrane

Received 10 June 2010; Revised version received 21 July 2010; Accepted 28 August 2010

Guided bone regeneration (GBR)은 조직공학분야에 새롭게 도입된 개념으로서, 이식된 scaffold의 구조물과 표면을 따라 발생하는 조직의 재생(regeneration)과 성장(growth)을 목적으로 시행되는 기술이다(Kellomaki et al., 2000). 이러한 기술에서, 특정한 장치의 표면에서 골성장은 bioceramics과 같은 재질을 사용함으로써 혹은 이식물질의 다공성에 의해 유도가 가능하다. 또한, 골의 파손부위 혹은 골절부위에 scaffold를 덮어주는 기술은 섬유조직(fibrous tissue)과 같이 원하지 않는 조직이 손상부위에 침투하는 것을 막아주거나 가이드해 주는 방법으로 사용되기도 한다. 이러한 기술에 적용되는 scaffold는 막

(membranes), 그물망(meshes), 평판(plates), 나사(screws), 마개(plugs), 막대(rods) 등의 형태로 사용이 가능하다(Kellomaki et al., 2000). Scaffold의 재질로는 다양한 합성 혹은 천연물유래 폴리머(polymers), 세라믹(ceramics), 유리(glasses) 그리고 복합재료(composites) 등이 사용되고 있으며(Hench and Wilson, 1999), 최근에는 생물학적으로 안전하고, 생분해성(biodegradability)이 있으며, 생활성(bioactivity)을 지니는 재질을 찾기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다(Kellomaki et al., 2000).

최근에 GBR은 치주골 결손(periodontal bone defects)을 치료하기 위하여 사용되고 있다. 이러한 과정에 사용되는 차단막(barrier membrane)은 치주골 손상부위를 차단함으로써 치주결합조직(gingival connective tissues), 치주상피(gingival epithelium) 또는 치근막(periodontal ligament)이 손상부위로 침투하여 성장하지 못하도록 억제하는 기능을 수행하게 된다(Aslan et al., 2004). 또한, GBR 기술은 골손상(intra-bony defects) 부위에 골의 재생에도 사용되

*Corresponding author: Dae Youn Hwang, Department of Biomaterials Science, College of Natural Resources & Life Science, Pusan National University, 50 Cheonghak-ri, Samnangjin-eup, Miryang, Gyeongnam 627-706, Korea
Tel: +82-55-350-5388
Fax: +82-55-350-5389
E-mail: dyhwang@pusan.ac.kr

며, 이 과정에 사용되는 기계적인 막은 골세포에 의한 골 생성과정(osteogenesis)이 진행되도록 공간을 만들어주는 목적으로 사용되며, 결국은 골의 손상부위에 섬유피막형성(fibrous encapsulation)을 방지하여 골성장을 유도한다(Sandberg et al., 1993).

GBR 실험과정에는 다양한 동물들이 사용되고 있으며, 대부분은 뼈를 제공하기에 적합한 랫드 혹은 토끼가 주로 사용되고 있다. 일반적인 방법은 랫드나 토끼의 두개골(calvaria) 부위에 치과용드릴(dental-handle piece)을 이용하여 지름 3-5 mm, 깊이 0.1-0.2 mm를 갖는 구멍(cavities)을 만들고, 여기에 막을 덮고 일정기간 후 GBR의 효능을 평가하게 된다(Aslan et al., 2004; Kojima et al., 2007). 그러나, 이러한 실험과정 중에서 두개골 부위에 적절한 크기의 구멍을 만드는 것은 실험동물에게 상당한 스트레스를 유발할 것으로 예측되고 있다. 그러나 최근까지도 이러한 과정에서 실험동물이 접하게 되는 스트레스가 어느 정도이며, 이들이 언제까지 지속되는지에 대한 연구가 수행된 적이 없다.

실험동물을 비롯하여 다양한 생물체에 가해지는 스트레스는 여러 가지 상해 및 자극에 대하여 체내에서 일어나는 비특이적인 생물학적 반응이며, 이러한 스트레스의 원인이 되는 인자나 자극을 스트레스(stressors)라고 한다(Selye, 1976; Moberg, 1985). 일반적으로 스트레스는 경고반응단계(alarm), 적응단계(adaptation), 소모단계(exhaustion)의 3단계로 나눌 수 있다(Selye, 1976). 이러한 상태는 위장궤양(gastrointestinal ulceration), 고혈압(hypertension)과 같은 병리학적 변화를 동반하고, glucocorticoids와 같은 스트레스 호르몬을 지속적으로 분비하여 심할 경우 죽음에 이르는 경우도 있다. 생체의 방어기구는 면역현상과 같은 특이적인 방어기구뿐만 아니라 고온, 저온, 외상, 감염, 정신적 압박 등 자극의 종류에 관계없이 일정한 반응형식으로 작용하는 비특이적 방어기구로서 스트레스 반응을 나타낸다(Dallmann et al., 2006). 특히 생체는 외부의 급격한 환경 변화에도 불구하고, 체내를 항상성(homeostasis)을 유지하기 위하여 다양한 작용을 수행한다. 이러한 작용 중 대표적인 것이 자율신경-부신피질계를 조절하는 catecholamine과 corticosterone의 분비이다. 이러한 스트레스는 다양한 외부환경에 의해서 유발되며, 특히 동물실험을 수행하는 과정에서 발생하는 스트레스는 실험결과에 지대한 영향을 주기 때문에 매우 중요한 것으로 간주된다. 그러나 실제 다양한 실험과정에서 실험동물에게 미치는 스트레스에 대한 평가는 많이 실시되지 않고 있다.

따라서 본 연구에서는 골재생을 위한 연삭(grinding)과 이식(grafting)기술이 뇌조직에 미치는 스트레스 영향을 연구하고자 Sprague-Dawley (SD) 랫드에 apatite막을 이식한 후 스트레스 지표단백질의 변화를 관찰하였다. 그 결과, 연삭과 이식 후 2주까지 이러한 스트레스 반응이 지

속됨을 관찰하였다. 이러한 결과는 골재생을 위한 실험과정에서 동물에 미치는 영향을 분석하기 위한 기초자료로 활용성이 높을 것으로 사료된다.

재료 및 방법

실험동물

실험동물은 생후 15주령된 체중 600-800 g의 female SD 랫드로서, 10마리를 샘타코(오산, 경기도, 한국)로부터 구입하여 실험에 사용하였다. 랫드는 케이지에 3-5마리를 포함하도록 사육하였으며, 온도 $23\pm 2^{\circ}\text{C}$, 습도 $50\pm 10\%$, 12시간의 명암주기가 유지되는 부산대학교 청정실험동물 센터에서 사육하였다. 또한 실험동물은 멸균된 상업용 펠렛 사료와 멸균수를 자유급식하도록 하였다. 본 연구수행에 포함된 동물실험계획서는 부산대학교 동물실험윤리위원회에서 윤리성과 과학성에 대한 심의를 거쳐 승인을 받아 수행되었다.

동물실험

랫드를 5개 그룹(비수술 대조군, 수술-3일군, 수술-2주군, 수술-4주군, 수술-16주군)으로 분류하고, 그룹당 3마리의 랫드를 무작위로 배정하였다. 수술 전에 랫드에 Zoletil 1 mL/kg을 투여하여 마취한 후 두개골 부위에 털을 일부 제거하고, 수술용 메스를 이용하여 2-3 cm 정도를 외피와 내피를 절개하여 두개골을 노출시켰다. 랫드의 노출된 두개골에 드릴을 이용하여 지름 3-5 mm, 깊이 0.1-0.2 mm의 원형의 구멍을 만들고, apatite막 이식그룹에는 골재생에 많이 사용되는 chitosan/fibroin/hydroxy apatite막을 이식하고(Figure 1A), 봉합사를 이용하여 봉합하고 수술부위를 소독하였다. 드릴을 이용하여 구멍을 만들 때에는 열이 발생할 수 있으므로 생리식염수를 이용하여 지속적으로 식혀주면서 실시하였다. 이식 후 3일, 2주, 4주, 16주에 각 동물을 이산화탄소를 이용해 안락사한 후 두개골과 뇌조직을 채취하였다(Figure 1B). 해파린 튜브에 채혈한 혈액은 실온에서 30분 동안 방치한 후 15,000 rpm에서 15분 동안 원심분리하여 혈장을 분리하여 호르몬 분석 전까지 -70°C 에 보관하였다. 두개골은 막이 분리되지 않도록 잘 분리하여 10% formalin 용액으로 고정하여 조직분석에 사용하였으며, 뇌 조직은 단백질 분석을 위해 액체질소에 급속냉동하여 -70°C 냉장고에 보관하였다.

조직학적 분석

실험동물에서 적출한 두개골은 10% formalin 용액에 담겨 48시간 정도 고정한 뒤, 골조직의 칼슘을 제거하기 위하여 3차 증류수 100 mL에 formic acid 5 mL와 formalin 5 mL를 섞은 용액에서 4일간 탈회하였다. 골조직을 골손

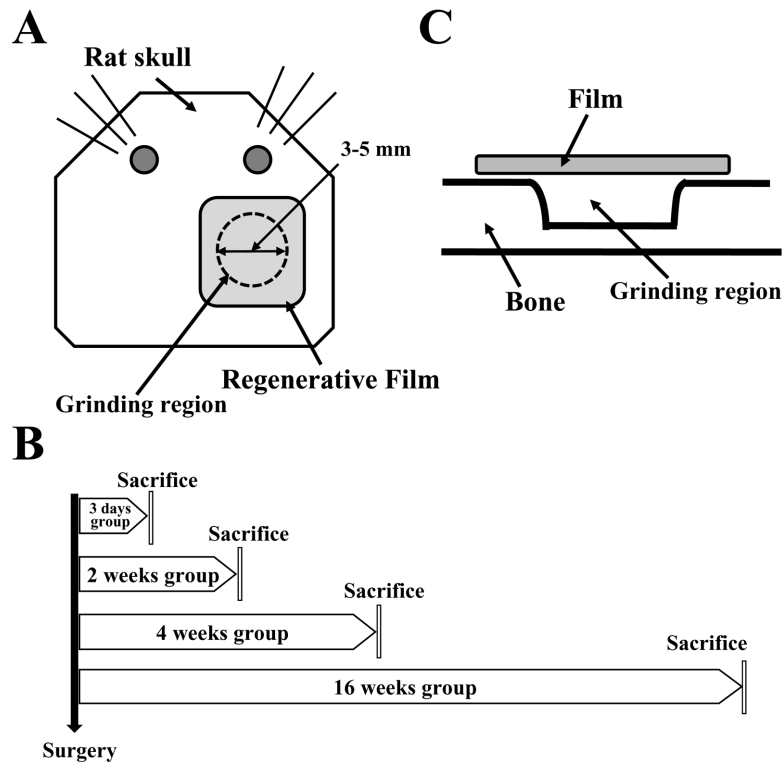


Figure 1. Experimental scheme and procedure of guided bone regeneration of bone defect. A. Two cavities were created using a drill. A round defect of 3-5 mm in diameter and 0.1-0.2 mm in depth was formed in the calvaria and covered with apatite membrane. B. After the operation of apatite membrane, bone and brain tissue were collected from rats at 3 days and 2, 4 and 16 weeks to examine histological alterations and Western blot analysis. C. Rat cranium showing two full-thickness bone defects with 3-5 mm in diameter.

상 부위가 관찰될 수 있도록 적당한 크기로 절단하여 카세트에 넣었다. 카세트에 담긴 조직은 조직처리기(Thermo Shandon Ltd./Thermo Fisher Scientific, Bakewell, England)를 이용해서 alcohol 70, 80, 90, 95, 100%에 각각 1-2 시간 정도 처리하고, xylene으로 4시간 처리하였다. Praffin Embedding Station (Leica, Heidelberg, Germany)을 사용하여 embedding한 후, 냉동실에서 하루정도 보관한 뒤 Rotary Microtome (Leica, Heidelberg, Germany)을 사용하여 블록(block)을 박절하였다. 조직 슬라이드는 일반적인 조직처리 과정을 거쳐 hematoxylin & eosin (H&E)으로 염색한 후 광학현미경으로 골조직의 변화를 관찰하였다.

Cortisol 농도의 측정

Cortisol 분석은 Coat-A-Count Cortisol kit (Diagnostic Products, Los Angeles, CA, USA)를 이용하여 제조사의 권장법에 따라 실시하였다. 먼저, 혈청샘플 혹은 cortisol standard를 antibody-coated 튜브에 25 μ L씩 첨가한 후 방사선동위원소가 표지된 125 I-CORT를 첨가하여 37°C 배양기에서 45분 동안 배양하였다. 배양된 용액에 포함된 비결합물질을 제거하고 남아 있는 radioactivity는 감마 카운터(Cobra 510, Quantum, Packard Instruments Co.,

Meriden, CT, USA)를 이용하여 측정하였다. Standard curve는 0, 10, 50, 100, 200 및 500 μ g/mL로 사용하였으며, 측정검출한계는 0.5 μ g/mL였다.

Western blotting

Stress에 의해 유도되는 mitogen-activated protein kinase (MAPK) 신호전달과정의 변화를 관찰하기 위하여, 실험동물로부터 뇌조직을 추출하여 extracellular signal-regulated kinase (ERK), c-jun N-terminal kinase (JNK) 및 p38 단백질의 인산화 정도를 Western blot을 이용하여 관찰하였다. 먼저 실험동물로부터 뇌조직 100 mg에 cell lysis solution (iNtRON Co., Seoul, Korea)을 첨가하여 분쇄한 후 13,000 rpm에서 5분 동안 원심분리하여 단백질을 분리하고, bincinchoninic acid assay 방법을 이용하여 단백질을 정량하여 Western blot에 사용하였다. 4-20% SDS-PAGE gel에 50 μ g의 단백질을 전기영동 한 후 hybond-enhanced chemiluminescence (ECL) membrane (GE healthcare, Pittsburgh, PA, USA)에 transfer하고, 3% skim milk에서 2시간 동안 blocking하였다. Anti-ERK (sc-94, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), anti-p-ERK (sc-7383, Santa Cruz Biotechnology), anti-

JNK (#9252, Cell Signaling Technology Inc., Beverly, MS, USA), anti-p-JNK (#9251, Cell Signaling Technology Inc.), anti-p38 (#9212, Cell Signaling Technology Inc.), anti-p-p38 (#9211, Cell Signaling Technology Inc.), anti-actin antibody (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 로 4°C에서 밤새 배양한 후 horse radish peroxidase-conjugated된 secondary antibody를 첨가하여 ECL kit를 이용하여 develop하였다. 확보된 band density는 GraphPad Prism 5 프로그램(GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA)을 이용하여 분석하여 집단 간에 상대적인 변화를 그래프로 제시하였다.

통계분석

시험결과에 대한 유의성 분석은 One-Way ANOVA (SPSS for Windows, Release 10.10, Standard Version, Chicago, IL, USA)를 이용하여 실시하였으며, 제시된 모든 값은 mean±standard deviation으로 표기하였다. 유의성은 P value<0.05인 경우에 인정하였다.

결 과

골조직의 변화

실험동물의 체내에서 GBR이 성공적으로 골재생을 유도하기 위해서는 apatite막이 완전히 분해되고, 골조직이 최대로 생성되기 위해 27-30주까지의 기간이 필요하다(Nyman *et al.*, 1995). 그러나 이식부위에서 apatite막에 의한 효과가 있는지를 확인만하기 위해서는 대부분의 연구에서 12-16주 정도의 관찰기간을 설정한다(Kojima *et al.*, 2007). 따라서 본 연구에서는 일반적으로 GBR의 성공적 변화만을 확인하기 위해 필요로 하는 최소한의 기간인 16주 동안 이식부위의 변화를 관찰하고, 이 기간 동안에 뇌조직에서 스트레스 지표의 변화를 관찰하였다. 그 결과, 수술-3일군의 apatite막은 골조직에 접착되지 않은 상태로 관찰되었으며, 수술-3주군에서는 apatite막이 완전히 골조직에 결합하여 상피조직에 의해 덮여 있었다. 그리고 많은 골아세포(osteocytes)를 포함하는 새로운 골이 두개골의 아래쪽부터 확장되기 시작하였다. 4주에 도달하면, apatite막은 섬유결합조직(fibrous connective tissues)으로 완전히 둘러싸이고, 새롭게 형성된 골은 점점 성숙되어 간다. 16주에서는 apatite막의 생분해가 진행됨에 따라 소실되어 가면서 새로운 골조직의 점진적 증가를 관찰할 수 있었다(Figure 2). 따라서 이러한 결과는 GBR실험에 사용된 SD 랫드에서 정상적으로 apatite막이 이식되고 분해되는 과정이 진행됨을 제시하고 있다. 그러므로 본 실험에서 스트레스 분석에 이용된 apatite막을 이식한 랫드는 스트레스 인자의 변화를 관찰하기에 적합한 상태를 제시하고 있다.

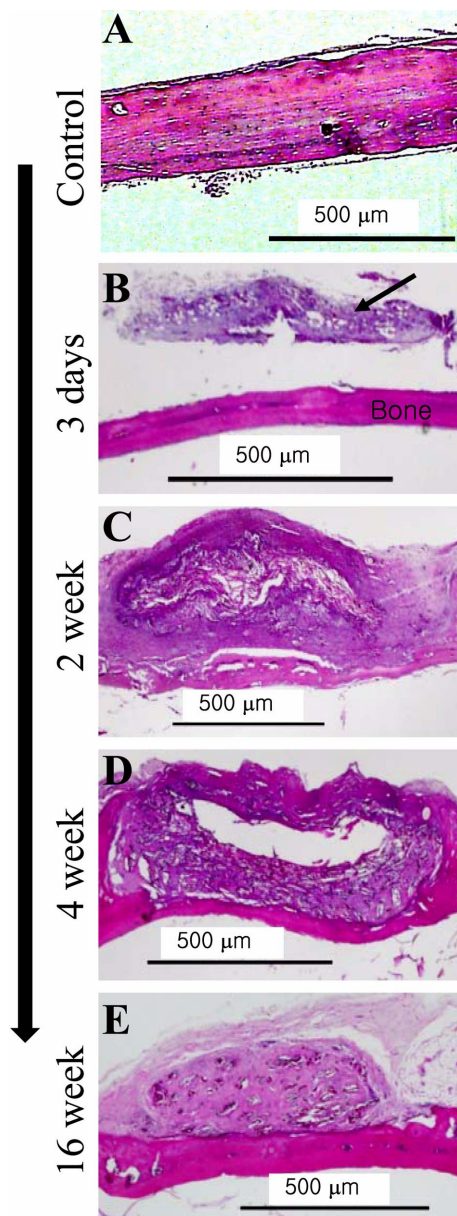


Figure 2. Representative histological findings of control (A) and 3 days (B) and 2 (C), 4 (D) and 16 weeks (E) post-operation. The arrow in Figure 2B indicates regenerative film.

GBR의 이식이 혈청 cortisol 농도에 미치는 영향

일반적으로 동물의 스트레스를 나타내는 지표로는 catecholamine, adrenaline, cortisol, corticosteroid-binding globulin 등이 사용되고 있다(Sanhouri *et al.*, 1989; Dalin *et al.*, 1993; Van Loo *et al.*, 2004). GBR 과정에서 나타나는 스트레스 정도를 측정하기 위하여 이식된 동물의 혈청을 이용하여 cortisol의 농도를 측정하였다. 그 결과, 수술-3일군에서는 대조군에 비하여 cortisol의 농도가 1.17 μg/dL까지 급속히 증가하였으며, 수술-2주에서 0.78 μg/dL까지 일부 감소하였다. 수술-4주군과 수술-16주

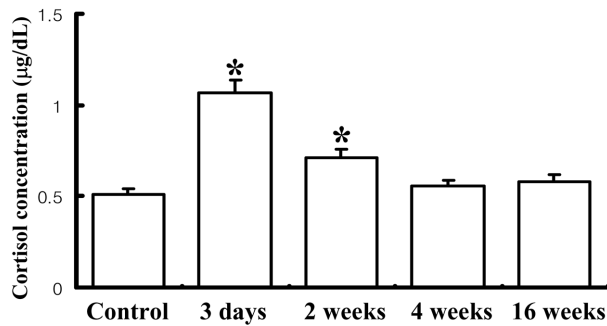


Figure 3. Changes of the plasma cortisol concentration in rats with regenerated bone. The serum cortisol level was measured by radioimmunoassay. Values are mean \pm SD. * P <0.05 is the significance level compare to control group.

군에서 cortisol의 농도는 0.5 µg/dL으로 대조군과 동일한 수준까지 감소되었다(Figure 3). 따라서 이러한 결과는 GBR을 위한 골조직의 연삭과 이식기술이 SD 랫드에 심각한 스트레스를 유발하며, 이러한 효과는 적어도 2주 이상 지속됨을 제시하고 있다.

MAPK 신호전달 단백질의 변화

MAPK 신호전달과정은 외부환경으로부터 세포내로의 다양한 신호를 전달에 매우 중요한 역할을 한다. 따라서 골조직의 연삭과 이식과정에서 MAPK 신호전달과정의 3가지 중요단백질에 미치는 영향을 관찰하였다. 먼저 ERK 단백질의 인산화는 이식 후 3일에는 크게 증가하고, 2주, 4주, 16주로 시간이 경과되면서 급속히 감소한다. 그러나 JNK의 인산화는 3일에는 증가되지 않다가 2주에 조금 증가한 후 4주에서 가장 많이 증가하였다. 그리고 16주에는 다시 3일 그룹과 비슷한 수준으로 감소하였다. p38단백질은 2주 그룹의 인산화 정도는 큰 변화가 없다는 것을 제외하고는 JNK와 매우 유사한 변화양상을 나타내었다(Figure 4). 따라서 이러한 결과는 GBR 실험과정에 연삭과 이식기술에 의한 뇌조직에 미치는 영향은 초기에 ERK 신호전달과정을 통하여 발생함을 제시하고 있다.

고 찰

사람의 수명이 점진적으로 연장되면서 노령층에서 빈발하는 많은 질병들은 사회적 비용의 증가를 유발하고 있으며, 그 중에서 치아, 연골과 같은 골관련 질환들에 관심이 집중되고 있다. GBR은 고령화사회에서 골관련 질환을 치료하기 위한 좋은 방법으로 제시되고 있으며, 보다 완전한 골재생을 통해 유착불량 등의 문제를 제거할 수 있는 장점이 있다. 골손상 부위의 재생과정에서 골손상이 발생하면, 섬유아세포는 골을 재생하는 골아세포보다 빠르게 손상부위로 이동하기 때문에 내골 손상부위(intra-

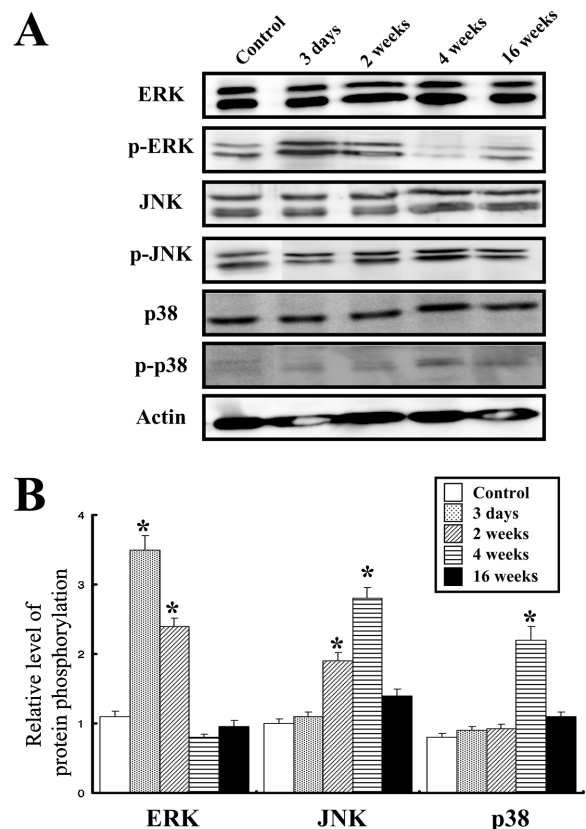


Figure 4. Effects of guided bone regeneration on MAPK signaling pathway. Fifty micrograms of the protein per sample were immunoblotted with the antibodies for ERK, p-ERK, JNK, p-JNK, p38, p-p38 and β -actin, respectively. The samples were assayed in triplicate. The values are mean \pm SD. * P <0.05 is the significance level compare to control group.

osseous wound)에서 섬유아세포에 의한 응고(clot)의 유도는 골의 유착불량(non-union)을 초래한다 (Mundell et al., 1993). 그러나 GBR은 이러한 과정에서 섬유아세포가 골손상부위로 침투하는 것을 방지함으로써 골생성 골아세포(bone-producing osteoblasts)의 성장을 허용하게 되어 정상적으로 신속한 골재생을 유도하게 된다. 따라서 GBR은 최근에 다양한 골손상의 치료와 연구에 많이 적용되고 있어 실험과정과 결과의 정확한 분석을 위해 실험동물에 미치는 영향을 정확히 파악하는 것은 매우 중요하다.

실험동물은 온도, 소음 등의 외부환경요인에 의해 스트레스를 받으며, 특히 다양한 수술과정에서의 스트레스가 매우 중요한 요인으로 간주되고 있다. 이러한 스트레스가 오래 지속되면, 생체는 hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis를 통해서 여러 가지 대사반응을 일으키며, 이러한 반응의 일환으로 corticotrophin-releasing hormone (CRH)이 분비된다. 분비된 CRH는 adrenocorticotrophic hormone (ACTH)의 분비를 유도하여 부신피질(adrenal cortex)에서 corticosterone의 분비를 촉진함으로써 스트레스 대사반응

을 조절하게 된다(Bornstein et al., 2008). 따라서 corticosterone은 스트레스반응의 중요한 지표가 된다. 스트레스의 지표로는 catecholamine, adrenaline, cortisol, corticosteroid-binding globulin 등이 있으며, 이들은 실험 동물 운송 등과 같은 스트레스 요인에 의해서 혈청 내에 농도가 유의적으로 증가하는 것으로 보고되었다(Sanhour et al., 1989; Dalin et al., 1993; Van Loo et al., 2004). 스트레스 반응이 시작되면, 시상하부는 CRH의 분비를 증가시킴으로써 cortisol 생산의 증가를 유도한다. Corticosteroids는 스트레스에 노출된 후 부신으로부터 분비되고 (De Kloet et al., 1991), 특히 랫드의 hippocampal CA1 부분에서 농도가 크게 증가하는 것으로 보고된 바 있다(Diamond, 1992).

그러나 cortisol은 단순히 스트레스 강도만을 나타내는 역할만 하는 것이 아니며, 체내의 각종 장기가 정상적으로 작동할 수 있게 조절해 주기 때문에 매우 중요하다. 또한 cortisol은 체내에 일정한 농도로 유지되어야 하며, 지나치게 많거나 모자라게 되면, 여러 가지 질병의 원인으로 작용할 수 있다. 신체가 스트레스 상태에 놓이게 되면 단백질, 탄수화물 및 지방의 사용에 중요한 역할을 하는 cortisol이 분비되면서 근육단백질을 분해시켜 아미노산을 생성한다(Choi and Kim, 1990). 생성된 아미노산은 혈당조절 기전에 관여함으로써 뇌에서 에너지를 만드는데 절대적으로 필요한 포도당의 생성에 중요한 역할을 수행하며(Lee et al., 2005), 근육이 필요로 하는 지방산의 합성에도 관여한다. 따라서 cortisol은 스트레스에 반응하는 대표적인 지표로서의 기능뿐만 아니라 각 장기에서 필요로 하는 에너지를 제공하기 위한 과정에도 절대적으로 필요로 하는 호르몬이다(Rhee et al., 1997). 따라서, 본 연구에서는 이러한 스트레스지표 호르몬으로 cortisol의 농도를 GBR 수술 후 시간의 경과에 따라 측정하여 비교하였다. 그 결과 수술 후 3일에는 cortisol의 농도가 급격히 증가하였으며, 4주까지 점진적으로 감소하여 원래상태로 회복되는 것을 확인할 수 있다. 이처럼 마우스, 개, 염소 등이 운송스트레스로부터 회복되는 시간보다 약간 긴 것으로 나타나(Aguila et al., 1988; Sanhour et al., 1989; Kuhn et al., 1991; Shim et al., 2009) GBR이 실험동물에 상당한 스트레스를 유발함을 알 수 있다.

MAPK 신호전달과정은 스트레스, 사이토카인(cytokines), 성장인자(growth factors), mitogen 등 다양한 세포 내외부의 자극에 대한 신호전달을 통해 세포의 성장, 분화, 발생, apoptosis 등을 유발하는 매우 중요한 과정으로 알려져 있다(Marshall, 1994; Waskiewicz and Cooper, 1995; Fanger et al., 1997). 지금까지 3개의 MAPK 신호전달과정이 잘 알려져 있으며, 여기에는 ERK1/2, JNK 그리고 p38 kinase 등이 포함된다(Huot et al., 1997). 이들은 각기 다른 자극에 의해서 조절된다. ERK는 성장인자,

mitogens 등에 의해서 주로 활성화되며, 세포의 분화, 성장, 생존을 유도한다. 다른 한편으로 JNK와 p38은 tumor-necrosis factor- α , hydrogen peroxide, UV, X선, heat shock, 성장인자, 무혈청 등 다양한 세포독성 스트레스에 의해서 활성화되며, 최종적으로 염증(inflammation)과 apoptosis를 유도한다(Huot et al., 1997; Verheij et al., 1996). 한편, 이들 MAPK의 3개 신호전달과정은 서로 다른 분비와 세포기작에 의해 신경과 조직의 손상 후에 고통을 인식하는 과정에 기여한다. 말초신경과 척수 손상은 microglia에서의 p38과 ERK의 활성을 유도한다(Jin et al., 2003; Hains and Waxman, 2006). 또한 신경손상은 astrocytes에서 JNK의 활성을 유도하며(Zhuang et al., 2006), 홍미류계도 신경손상은 초기와 후기에 microglia와 astrocytes에서 ERK의 활성을 유도하였다(Ji et al., 2009).

본 연구에서 GBR 시험과정에서 발생하는 스트레스가 뇌조직에 미치는 영향은 MAPK 신호전달과정의 3가지 주요 단백질이 다른 변화를 나타내었다. 먼저, ERK는 수술 후 3일에 급격히 활성이 증가된 후 2주 정도에서는 정상수준으로 회복되었다. 그러나, JNK는 초기 3일에는 별다른 반응이 없다가 2주, 4주로 시간이 증가되면서 인산화가 증가되는 양상을 나타낸 후 16주에서는 정상수준으로 회복되었다. p38은 4주에만 반응을 나타내고 다른 기간에는 반응이 없었다. 이러한 결과는 GBR에 의해서 유도된 스트레스에 반응하는 MAPK 신호전달과정은 수술 후 시간 경과에 따라 서로 다른 신호전달 메커니즘이 관여하는 것으로 추측할 수 있다. 이러한 시간 경과에 따른 반응이 실험동물의 회복에 서로 다른 반응의 전달과 상관관계가 있을 것으로 추측된다. 그러나 특별히 cortisol의 농도 조절에는 ERK 신호전달과정이 밀접한 관계가 있는 것으로 실험결과를 통해 추측할 수 있다.

따라서 이상의 결과에서 관찰한 것처럼, GBR의 시험과정에서 실험동물에게 시행되는 연삭과 이식기술은 SD 랫드에 심각한 스트레스를 유발하였다. 그리고 이러한 스트레스는 적어도 2주까지 회복되지 않으며, 4주 정도에 완전히 정상수준으로 회복됨을 알 수 있다. 이러한 결과는 GBR 시험과정에서 스트레스가 실험결과와 해석과 도출에 중요한 인자로 작용할 수 있음을 제시하고 있다.

감사의 글

이 논문은 부산대학교 자유과제 학술연구비(2년)에 의하여 연구되었습니다.

참고문헌

- Aguila, H.N., Pakes, S.P., Lai, W.C. and Lu, Y.S. (1988) The effect of transportation stress on splenic natural killer cell activity in C57BL/6 mice. *Lab. Anim. Sci.* 38(2), 148-151.

- Aslan, M., Simsek, G. and Dayi, E. (2004) Guided bone regeneration (GBR) on healing bone defects: A histological study in rabbits. *J. Contemp. Dent. Pract.* 5(2), 114-123.
- Bornstein, S.R., Engeland, W.C., Ehrhart-Bornstein, M. and Herman, J.P. (2008) Dissociation of ACTH and glucocorticoids. *Trends Endocrinol. Metab.* 19(5), 175-180.
- Choi, J.H. and Kim, H. (1990) The effects of tryptophan and tyrosine-enriched diet on the serum cortisol, glucose and free fatty acid levels of stressed rats. *Korean J. Nutr.* 23(4), 229-236.
- Dalin, A.M., Magnusson, U., Haggendal, J. and Nyberg, L. (1993) The effect of transport stress on plasma levels of catecholamine, cortisol, corticosteroid-binding globulin, blood cell count, and lymphocyte proliferation in pigs. *Acta Vet. Scand.* 34(1), 59-68.
- Dallmann, R., Steinlechner, S., von Horsten, S. and Karl, T. (2006) Stress-induced hyperthermia in the rat: comparison of classical and novel recording methods. *Lab. Anim.* 40, 186-193.
- De Kloet, E.R., Sutanto, W., Rots, N., van Haarst, A., van den Berg, D., Oitzl, M., van Eekelen, A. and Voorhuis, D. (1991) Plasticity and function of brain corticosteroid receptors during aging. *Acta. Endocrinol. (Copenh.)* 125 Suppl. 1, 65-72.
- Diamond, D.M. (1992) Inverted-U relationship between the level of peripheral corticosterone and the magnitude of hippocampal primed burst potentiation. *Hippocampus* 2(4), 431-430.
- Fanger, G.R., Gerwins, P., Widmann, C., Jarpe, M.B. and Johnson, G.L. (1997) MEKs, GCKs, MLKs, PAKs, TAKs, and tpls: upstream regulators of the c-Jun amino-terminal kinases? *Curr. Opin. Genet. Dev.* 7(1), 67-74.
- Hains, B.C. and Waxman, S.G. (2006) Activated microglia contribute to the maintenance of chronic pain after spinal cord injury. *J. Neurosci.* 26, 4308-4317.
- Hench, L.L. and Wilson, J. (1999) *An Introduction to Bioceramics*, 2nd ed., World Scientific Publishing Co., Pte. Ltd., Singapore.
- Huot, J., Houle, F., Marceau, F. and Landry, J. (1997) Oxidative stress-induced actin reorganization mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase/heat shock protein 27 pathway in vascular endothelial cells. *Circ. Res.* 80(3), 383-392.
- Ji, R.R., Gereau, I.V.R.W., Malcangioc, M. and Strichartz, G.R. (2009) MAP kinase and pain. *Brain Res. Rev.* 60(1), 135-148.
- Jin, S.X., Zhuang, Z.Y., Woolf, C.J. and Ji, R.R. (2003) p38 mitogen-activated protein kinase is activated after a spinal nerve ligation in spinal cord microglia and dorsal root ganglion neurons and contributes to the generation of neuropathic pain. *J. Neurosci.* 23, 4017-4022.
- Kellomaki, M., Niiranen, H., Puumanen, K., Ashammakhi, N., Waris, T. and Tormala, P. (2000) Bioabsorbable scaffolds for guided bone regeneration and generation. *Biomaterials* 21, 2495-2505.
- Kojima, T., Amizuka, N., Suzuki, A., Henrique, P., de Freitas, L., Yoshizawa, M., Kudo, A., Saito, C. and Maeda, T. (2007) Histological examination of bone regeneration achieved by combining grafting with hydroxyapatite and thermoplastic bioresorbable plates. *J. Bone Miner. Metab.* 25, 361-373.
- Kuhn, G., Lichtwald, K., Hardegg, W. and Abel, H. (1991) The effect of transportation stress in circulating corticosteroids, enzyme activities and hematological values in laboratory dogs. *J. Exp. Anim. Sci.* 34(3), 99-104.
- Lee, S.G., Hur, J.H., Yuk, J.Y. and Kang, C.B. (2005) Changes of Serum Cortisol Concentrations by Clipping Stress in Dogs. *J. Vet. Clin.* 22(2), 136-140.
- Marshall, C.J. (1994) MAP kinase kinase kinase, MAP kinase kinase and MAP kinase. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 4, 82-89.
- Moberg, G.P. (1985) Biological response to stress: key to assessment of animal well-being. In *Animal Stress* (Moberg, G.P. ed.), pp. 27-49, American Physiology Society, Maryland.
- Mundell, R.D., Mooney, M.P. and Siegel, M.I. (1993) Osseous guided tissue regeneration using a collagen barrier membrane. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 51(9), 1004-1012.
- Nyman, R., Magnusson, M., Sennerby, L., Nyman, S. and Lundgren, D. (1995) Membrane-guided bone regeneration. *Acta. Orthop. Scand.* 66(2), 169-173.
- Rhee, S.J., Park, G.Y., Kim, M.J., Kim, S.O., Choi, J.H., Chai, Y.M., Hong, H.J. and Yun, J.Y. (1997) Changes of insulin, cortisol, and methallothionein contents according to time in streptozotocin induced diabetic rats. *HSAJAS* 6-1, 93-98.
- Sandberg, E., Dahlin, C. and Linde, A. (1993) Bone regeneration by the osteopromotion technique using bioabsorbable membranes: an experimental study in rats. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 51(10), 1106-1114.
- Sanhoury, A.A., Jones, R.S. and Dobson, H. (1989) The effect of different types of transportation on plasma cortisol and testosterone concentrations in male goats. *Br. Vet. J.* 145, 446-450.
- Selye, H. (1976) *The Stress of Life*, 1st ed., pp. 3-8, McGraw-Hill Book Co., New York.
- Shim, S.B., Lee, S.H., Kim, C.K., Kim, B.G., Jee, S.W., Lee, S.H., Sin, J.S., Bae, C.J., Woo, J.M., Cho, J.S., Lee, E.P., Choi, H.W., Kim, H.S., Lee, J.H., Jung, Y.J., Cho, B.W., Chae, K.R. and Hwang, D.Y. (2009) Effects of air transportation cause physiological and biochemical changes indicative of stress leading to regulation of chaperone expression levels and corticosterone concentration. *Exp. Anim.* 58(1), 11-17.
- Van Loo, P.L.P., Van der Meer, E., Kruitwagen, C.L.J.J., Koojhaas, J.M., Van Zutphen, L.F.M. and Baumans, V. (2004) Long-term effects of husbandry procedures on stress-related parameters in male mice of two strains. *Lab. Anim.* 38, 169-177.
- Verheij, M., Bose, R., Lin, X.H., Yao, B., Jarvis, W.D., Grant, S., Birrer, M.J., Szabo, E., Zon, L.I., Kyriakis, J.M., Haimovitz-Friedman, A., Fuks, Z. and Kolesnick, R.N. (1996) Requirement for ceramide-initiated SAPK/JNK signalling in stress-induced apoptosis. *Nature* 380, 75-79.
- Waskiewicz, A.J. and Cooper, J.A. (1995) Mitogen and stress response pathways: MAP kinase cascades and phosphatase regulation in mammals and yeast. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7(6), 798-805.
- Zhuang, Z.Y., Wen, Y.R., Zhang, D.R., Borsello, T., Bonny, C., Strichartz, G.R., Decosterd, I. and Ji, R.R. (2006) A peptide c-Jun N-terminal kinase (JNK) inhibitor blocks mechanical allodynia after spinal nerve ligation: respective roles of JNK activation in primary sensory neurons and spinal astrocytes for neuropathic pain development and maintenance. *J. Neurosci.* 26, 3551-3560.