

당뇨 유도 백서 경골에 매식한 티타늄 임플란트 주위에 지방조직 유래 줄기세포 적용 시 골치유에 미치는 영향

김민구¹ · 정인교² · 신상훈² · 김철훈¹ · 김복주¹ · 김정한¹ · 황영섭² · 정유진² · 김진우¹ · 김옥규²

¹동아대학교 의과대학 구강악안면외과학교실, ²부산대학교 치의학전문대학원 구강악안면외과학교실

Abstract (J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg 2010;36:392-401)

Effect of adipose-derived stem cells on bone healing on titanium implant in tibia of diabetes mellitus induced rats

Min-Gu Kim¹, In-Kyo Jung², Sang-Hun Shin², Chul-Hoon Kim¹, Bok-Joo Kim¹, Jung-Han Kim¹,
Young-Sup Hwang², Eu-Gene Jung², Jin-Woo Kim¹, Uk-Kyu Kim²

¹Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Collage of Medicine, Dona-A Universty, Busan, Korea

²Department of Oral and Maxillofacial Surgery, School of Dentistry, Pusan National University, Yangsan, Korea

Introduction: Diabetes mellitus, as a major health problem for the elderly has been shown to alter the properties of the bone and impair bone healing around a titanium implant in both humans and animals. The aim of this study was to examine the effect of adipose-derived stem cells on the healing process around a titanium implant in streptozotocin-induced diabetic rats.

Materials and Methods: Thirteen rats were divided into two groups: adipose-derived stem cells injected group and a control group. A titanium screw implant (diameter: 2.0 mm, length: 3.5 mm) was placed into both tibia of 13 rats: 13 right tibia as the control group and 13 left tibia as the experimental group. The rats were sacrificed at different intervals (1, 2, and 4 weeks) after implantation for histopathology observations and immunohistochemical analysis.

Results: The histopathological findings revealed earlier new formed bone in the experimental group than the control group. In particular, at 1 week after implantation, the experimental group showed more newly formed bone and collagen around the implant than the control group. In immunohistochemical analysis, osteoprotegerin (OPG) expression in the experimental group increased early compared to that of the control group until 2 weeks after implantation. However, after 2 weeks, OPG expression in the experimental group was similar to OPG expression in the control group. The receptor activator of nuclear factor κ B ligand (RANKL) expression in the experimental group increased early compared to that of the control group, and then decreased at 2 weeks. After 2 weeks, the level of RANKL expression was similar in both groups.

Conclusion: These results suggest that adipose-derived stem cells in implantation can promote bone healing around titanium, particularly in diabetes mellitus induced animals.

Key words: Stem cell, Dental implants, Diabetes mellitus, Rats

[paper submitted 2010. 6. 2 / revised 2010. 9. 30 / accepted 2010. 10. 18]

I. 서 론

일반적으로 상,하악골 내에 인공치아 매식 후 인공치아 표면과 치조골사이의 골유착이 생기기까지 최소 3개월에서 6개월이 필요하다. 특히 악골의 골질이 불량할 경우에는 더욱 긴 유착기간이 필요하다. 이러한 경우에는 환자의

치료기간이 길어질 뿐 아니라 인공치아 골유착의 실패가 발생할 수 있다. 이에 많은 학자들은 골유착 기간을 줄이고 골유착률을 높이기 위해 인공치아의 표면처리방식을 다양하게 함으로써 그 효력을 얻고자 수년간 노력해 왔다. 최근에는 이러한 골유착 임플란트가 임플란트의 성공적인 사용에 필수적이라고 받아들여지고 있으며 현재 대다수의 치과 임플란트는 골유착성 이론에 따라 시술되고 있다.

골유착과 관련하여 임플란트 치료에서 당뇨병은 높은 혈당이 골아세포의 분화를 억제하고 골침착과 광화작용을 막음으로써 골재 형성을 방해하고 전반적인 골대사과정을 변화시킨다. 인슐린 및 약물치료에 의한 혈당 조절을 통해 인공치아 매식이 가능하지만 여러 가지 한계가 있는 것은 사실이다. 특히 골이식의 경우에는 더욱 그러하다¹⁻³. 골생성과 더 나은 골유착을 위해 이용되는 골이식술의 경우

김옥규

626-870 경상남도 양산시 물금읍 범어리

부산대학교 치의학전문대학원 구강악안면외과학교실

Uk-Kyu Kim

Department of Oral and Maxillofacial Surgery, School of Dentistry, Pusan National University

Beomeo-ri, Mulgeum-eup, Yangsan, 626-870, Korea

Tel: +82-55-360-5100 Fax: +82-55-360-5104

E-mail: kuksjs@pusan.ac.kr

*본 논문은 부산대학교 2년 자유연구과제 지원에 의함.

에서 동종골, 이종골의 항원성과 감염의 위험성, 골유도 능력에 대한 논란, 자가골의 채취량의 한계 등으로 인해 동종골과 이종골을 대신할 수 있는 물질 개발에 대한 관심이 고조되고 있다^{4,5}. 그 중에서도 줄기세포와 관련된 골대체물질의 연구가 최근 많이 이루어지고 있다.

중간엽 줄기세포는 골수에서 처음으로 확인되어, 골막, 활액막, 골격근, 폐를 비롯하여 지방조직에서도 분리되는데, 지방세포, 연골세포, 근모세포 및 뼈모세포 등으로 분화가 가능하며 배양조건에 따라 신경과 혈관의 표현형을 나타내기도 한다⁶⁻¹². 이러한 중간엽 줄기세포를 이용한 골형성 유도는 지금까지 사용하였던 대체골 및 골형성 유도 인자와는 달리 환자 자신에게서 그 세포를 채취한다는 점에서 큰 의미를 가질 수 있으며 임플란트 영역에서도 골형성 유도를 통한 초기 고정 및 기능에 큰 역할을 할 것으로 기대해 볼 수 있다.

골형성 및 골유착과 관련된 최근의 연구들에서 골의 재형성에 관여하는 인자로 소개되고 있는 것이 osteoprotegerin (OPG), receptor activator of nuclear factor κ B ligand (RANKL) 등이다. 이 사이토카인들은 생체 내에서 파골세포의 분화, 활성을 조절하는 중요한 단백질이다¹³⁻¹⁵. 기계적인 자극이나 호르몬, 사이토카인의 자극이 가해지면 그 자극의 종류에 따라서 조골세포에서 OPG, RANKL이 생성되며 이것은 파골세포에 영향을 미치게 된다. OPG가 증가할 경우에는 파골전구세포에서 파골세포로의 분화와 활성화에 방해를 받으며 파골세포의 세포사가 증가하여 골흡수가 억제되고 조골세포에 의한 골형성이 우세하게 나타난다. 그러나 RANKL이 증가하게 되면 파골전구세포에서 파골세포의 분화와 활성이 증가되어 골흡수가 증가하게 된다¹³⁻¹⁵. 골의 재형성이 활발하게 이루어지기 위해서는 골흡수 및 골형성 증가가 필수적이므로 골재형성 과정에 중요하게 기여하는 OPG, RANKL의 변화를 살펴봄으로써 골개조 양상을 판단할 수 있다.

이에 본 연구에서는 미분화세포로 대체되거나 연골, 지방, 뼈, 근육 그리고 골수와 같은 간엽성조직의 계통으로 분화할 수 있는 잠재성이 있는 지방조직 유래 성체줄기세포^{11,12}를 당뇨 환자에서 임플란트 매식 부위에 주입 후 보다 효율적으로 골생성을 유도하는 술식을 개발하고자 동물실험을 진행하고 병리조직학적 관찰 및 면역조직 화학적 검사를 시행하였다.

II. 연구대상 및 방법

1. 연구재료

실험동물은 일정 기간 동일 조건으로 사육한 250 g 내외의 백서 13마리를 사용하였으며, 이것을 당뇨를 유도한 후 임플란트 매식 시 지방조직 유래 성체줄기세포를 주입한 좌측 경골과 지방조직 유래 성체줄기세포를 주입하지 않

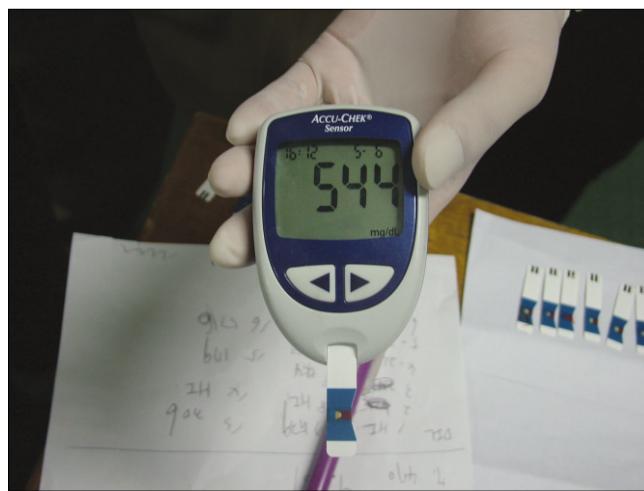


Fig. 1. Blood sugar level test.

은 우측 경골을 각각 실험군과 정상 대조군으로 나누었다. 연구재료는 순수 티타늄(commercially pure titanium-grade 3)으로 주문 제작한 폭경 2.0 mm, 직경 3.5 mm (pitch height 0.4 mm)의 나사형 임플란트(Cowell-Medi Co., Busan, Korea)를 사용하였다.

2. 연구방법

임플란트 매식에 앞서 당뇨 유발된 백서의 복부에서 지방조직 유래 성체줄기세포를 분리 후 배양하였다. 이후 경골 부위에 임플란트 매식과 함께 줄기세포를 함께 주입하였다. 1주, 2주 및 4주 경과 후에 백서를 희생한 후 표본 제작을 하고 이에 대한 병리조직학적 관찰 및 OPG, RANKL의 발현에 대한 면역조직 화학적 검사를 시행하였다. 모든 실험은 ○○대학교 동물실험윤리위원회 운영규정에 따라 적의 심의하고, 그 내용이 동물실험의 신뢰성, 안전성, 윤리성의 측면에서 적합하여 동물실험을 승인받았으며 모든 사항을 준수하여 시행하였다.(승인번호: PNU-2009-23)

1) 당뇨 유발

스트렙토조토신(Sigma Chemical Co., St. Louis, USA)을 citrate acid (0.1 mol/L, pH4.5)에 용해시켜 60 mg/kg을 복강내에 투여하는 방법을 사용하였다. 1주 후에 꼬리정맥에서 혈액을 채취하여 혈당계로 혈당치를 측정하고 그 수치가 300 mg/dL 이상이며 실험기간동안 지속적으로 유지된 동물만을 당뇨 백서로 인정하였다.(Fig. 1)

2) 백서의 복부 지방조직 분리

Enflurane (Gerolan, Choongwae Pharmaceutical Co., Seoul, Korea)과 산소암의 농도를 1:1로 혼합하여 백서에 흡입마취를 통한 전신마취를 시행한 후 복부 제모를 시행하고 베타딘 용액을 도포하여 소독하였다 수술용 가위를 이용하

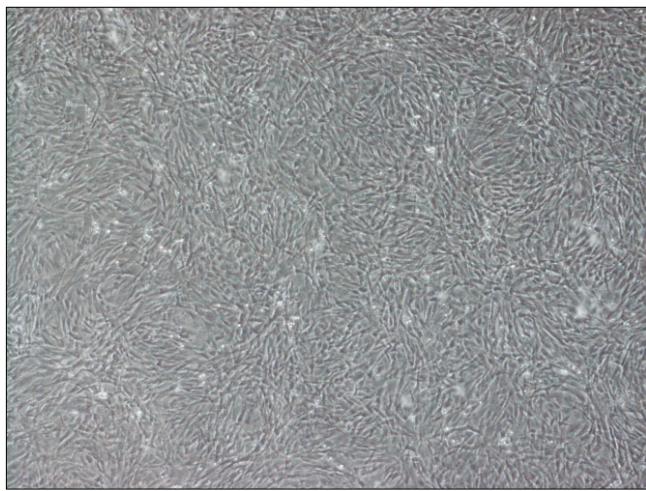


Fig. 2. Microphotograph of stem cell (Original magnification $\times 100$).

여 복부에 3 cm의 수직 절개를 가하여 복부를 노출시키고, 복부에 존재하는 지방을 조심스럽게 분리한 후 통법에 따라 봉합하였다. 이후 젠타마이신 항생제 주사를 근주하였다. 백서의 복부에서 지방을 분리한 후 phosphate-buffered saline (PBS)로 2-3회 washing을 시행하고 잘게 mincing한 지방에 0.075% collagenase 1A를 넣어 섞은 후, 37°C에서 20-30분간 incubation하였다. 이 후 지방과 동량의 10% 배지(α -minimum essential medium, α -MEM)를 넣어 섞고, 2,000 rpm에서 10분간 centrifugation을 시행하였다. Pellet만 남기고 나머지 내용물을 suction한 후 10% 배지를 이용하여 pellet suspension 및 nylon mesh에 걸러서 dish에 분주하였다.(Fig. 2)

3) 지방조직 유래 성체줄기세포의 배양 및 주입 준비
분리한 줄기세포를 2주간 37°C의 incubator에서 배양한 후 세포의 washing, detachment, counting 과정을 시행하였다. 그 과정은 다음과 같다. 세포가 들어있는 배지를 suc-

tion하고 PBS 5 mL를 넣어 dish를 천천히 흔든 다음 PBS suction 후 한 번 더 washing을 한다. 그 후 trypsin ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 1 mL를 넣고 37°C incubator에서 2분간 둔 다음 혼미경으로 세포가 떨어졌는지 확인하고 fetal bovine serum (FBS)가 들어간 배지 5-10 mL를 넣어 세포를 회수하여 tube에 담는다. 1, 200 rpm에서 4분간 centrifugation한 다음 tube 아래 모인 pellet은 남기고 배지는 suction한다. Pellet을 1 mL PBS로 suspension한 후 count meter기에 cover glass를 깔고 suspension한 세포 중 10 uL를 넣는다. counting을 하고 난 후, 동물에 주입할 세포의 경우 PBS를 넣고 위와 동일한 조건에서 centrifugation을 한다. 필요한 개수의 세포를 total 10-15 uL 정도에 PBS로 suspension한다. 세포가 suspension되지 않으면 tail vein 등의 방법으로 injection할 때는 혈관이 막힐 수 있으므로 injection 바로 전에 suspension을 한 번 더 해준다.

4) 임플란트 매식과 동반된 지방조직 유래 성체줄기세포 주입

당뇨가 유도된 13마리의 백서에 Enflurane과 산소압의 농도를 1:1로 혼합하여 흡입마취를 통한 전신마취를 시행한 후 좌, 우측 경골부를 골막까지 박리한 후 골노출을 시킨 후 경골 근심측 5 mm 부분의 경골 외측 최대 폭경부 중앙부에 직경 1.6 mm twist drill을 이용하여 피질골에 구멍을 내고 준비한 임플란트를 골수강에 도달할 때까지 조심스럽게 매식하였다. 이 때 실현군인 좌측 경골에 stem cell을 주입한 후 임플란트를 매식하였다. 이후 젠타마이신 항생제 주사를 근주하였다.(Figs. 3, 4)

5) 골치유 및 희생

각 사육장마다 3-4마리씩 사육하였고 실험동물용 고형사료와 수돗물을 자유 섭식하도록 하였다. 실험동물은 매식 후 1주, 2주 및 4주간 사육하여 희생하였다.



Fig. 3. Photo of stem cell injection.

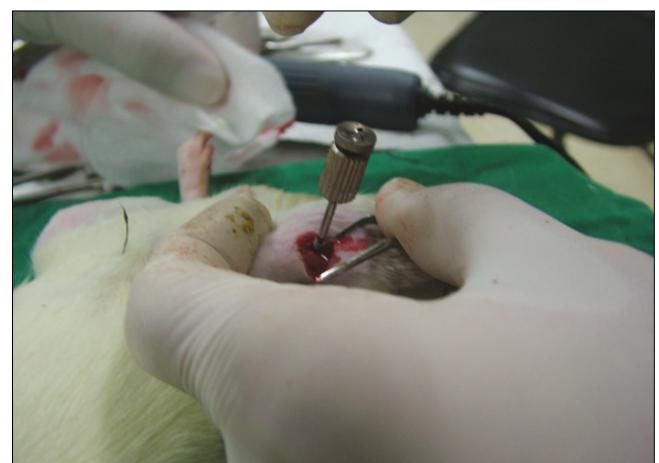


Fig. 4. Photo of Implantation.

6) 표본 제작

상기의 외과술을 시행한 후 1주, 2주 및 4주 경과한 백서를 흡입을 통한 전신마취를 시행한 후 심장 관류법으로 흉곽을 열어 심장을 노출시킨 후 좌심실에 20 gauge 바늘을 삽입하고 겹자 고정 후 연동 관류 펌프를 작용시켜서 체순환 시킨 후 우심방벽을 절개하여 피를 배출시키고 PBS를 사용하여 체내 혈액을 세척하였다. 이후 4% paraformaldehyde 고정액을 다시 30분간 펌프 관류시킨 후 대퇴관절을 포함하여 경골을 절단하여 임플란트 매식 부위를 채취하였다. 그 후 동일한 고정액에 24시간 고정시킨 후 10% EDTA와 NaOH를 녹인 탈회액에 12주간 탈회시켰다. 그 후 조직을 조직캡슐에 넣어 흐르는 물에 12시간 동안 수세한 다음, 통상적인 방법에 따라 alcohol과 xylene으로 탈수와 투명화를 한 후 paraffin에 포매하고 6 μm 두께의 시상연속 절편을 만들었다.

7) 병리조직학적 관찰

(1) Hematoxylin and eosin (H&E) stain

통법에 의해 HE 염색처리 후 표본에서 골형성과 관련된 세포 및 세포외 기질을 관찰하기 위해 광학현미경(Zeiss Axioscop, Hallbergmoos, German)을 이용하였다.

(2) Masson's trichrome stain

Masson's trichrome stain 염색표본에서 collagen 및 골형성과 관련된 세포 및 세포외 기질을 관찰하기 위해 광학현미경을 이용하였다. 염색과정은 다음과 같다. 교원질의 생성 정도에 따른 광화된 골조직과 비 광화된 골조직을 관찰하기 위해 상기 제작된 6 μm 두께의 파라핀 조직절편을 xylene에서 파라핀을 제거하고 실온에서 Bouin 용액(Sigma Co., St Louis, USA)에 1일을 담가 놓은 후 조직표본의 노란색이 없어질 때까지 유수에 수세한다. 증류수로 여러 번 행구고 weigert iron hematoxylin 용액에 10분간 핵염색을 한다. 이후 유수에 10분간 수세하여 핵을 청화시키고 Biebrich Scarlet-acid fuchsin 용액에 10분간 염색한다. 증류수로 여러 번 행군 후 Phosphomolybdic-phosphotungstic acid 용액에 10분간 처리한다. 수세하지 않고 aniline blue 용액에 5분간 염색한 후 증류수로 여러 번 행군다. 이 후 1% acetic acid 용액을 1-3분간 적용시킨 다음 증류수로 여러 번 행군다. 탈수, 투명과정을 거친 후 봉입한다.

8) OPG, RANKL의 발현에 대한 면역조직화학적 검사

파라핀 포매 조직으로부터 4 μm 두께의 절편을 얻어 코팅 슬라이드에 부착시킨 다음 1시간 동안 60°C 오븐에 넣은 후 xylene으로 5분간 4회 반복 처리하여 탈 파라핀을 시행하고 여러 단계의 알코올로 함수 후 증류수로 세척하였다. 세척 완충액으로 3분씩 3회 세척하고 조직 내의 내인성 과산화효소를 제거하기 위하여 0.3% H₂O₂ 용액에 5분간 반

응시켰다. 이어서 세척 완충액으로 4회 수세 후 조직 내 비특이적 결합을 억제하기 위해 blocking serum (goat Immuno Cruz Staining System, Santa Cruz biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)을 1시간 반응시킨 후 각각의 1차 항체를 희석하여 (OPG 1:80, RANKL 1:70) 1일 동안 반응시켰다. 세척 완충액으로 수세한 다음 biotin이 label된 secondary antibody (goat ImmunoCruz Staining System, Santa Cruz biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)를 1시간 반응시킨 후 세척 완충액으로 4회 수세하고 enzyme conjugate streptavidin (goat ImmunoCruz Staining System, Santa Cruz biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)로 1시간 반응시켰다. 다시 세척 완충액으로 4회 수세 후 diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB)로 발색하고 증류수로 수세한 후 헤마톡실린으로 대조 염색하여 관찰하였다. 이후 광학현미경을 이용하여 OPG, RANKL의 발현 양상을 관찰하고 그 결과를 -: no immunoreactivity, +: weak but visible staining, ++: moderate staining, +++: strong staining intensity로 4등급 발색 반응으로 나누어 분석하였다.

III. 결 과

1. 병리조직학적 소견

1) H&E stain

(1) 대조군

매식 후 1주군에서 임플란트 계면 부위에 요철상을 보이는 골기질과 골기질 내에 막내성 골형성 양상을 보이는 골소주를 관찰할 수 있었다. 2주군에서는 임플란트 계면 부위에 무기질화가 일어나지 않은 두꺼운 골기질 상태를 볼 수 있었다. 4주군에 이르러 임플란트 계면 부위에서는 2주군과 비교해 두꺼워지고 성숙된 골의 양상을 관찰할 수 있었다.(Figs. 5-7)

(2) 실험군

매식 후 1주군에서 임플란트 주위로 나사상 모양의 부분적인 골재생이 관찰되었고, 이러한 골조직은 대조군에 비해 더 광화된 형태를 보였다. 또한 대조군에 비해 많은 골소주 및 혈관을 관찰할 수 있었다. 2주군에서는 임플란트와 골이 접촉하는 계면 부위에 요철상의 재생되는 골을 볼 수 있으며 이들은 미성숙된 양상을 나타내고 있었지만, 대조군에 비해 재생된 골의 양이 더 많은 것을 관찰할 수 있었고 골소주들이 골수강 내에 관찰되었다. 4주군에 이르러 임플란트 주위로 재생된 골의 성숙을 나타내고 있었으며, 성숙된 골의 두께가 두꺼워진 양상을 보였다. 결과적으로 1주군과 2주군에서 실험군의 골재생 양상이 대조군에 비해 뛰어났으며 4주군으로 갈수록 임플란트 주위 골양상이 대조군과 비슷해짐을 확인할 수 있었다.(Figs. 8-10)

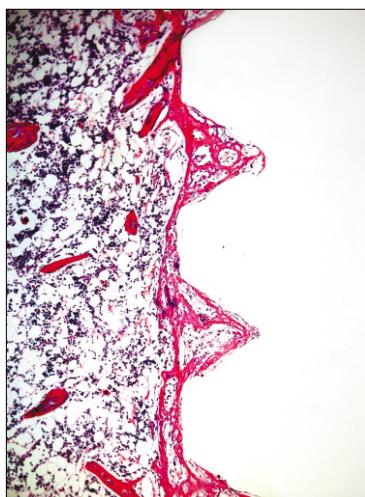


Fig. 5. Microphotograph at 1 week after implantation in control rat.(H&E staining, original magnification $\times 100$)

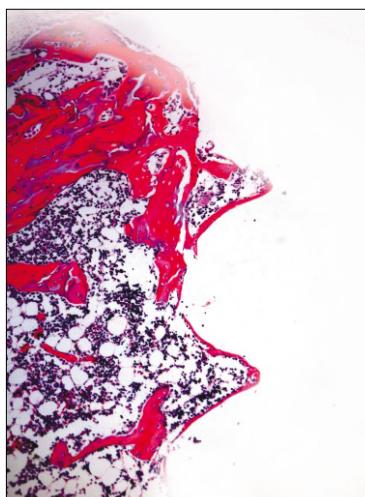


Fig. 6. Microphotograph at 2 weeks after implantation in control rat.(H&E staining, original magnification $\times 100$)



Fig. 7. Microphotograph at 4 weeks after implantation in control rat.(H&E staining, original magnification $\times 100$)

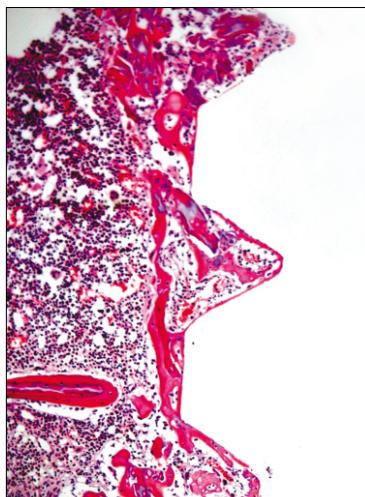


Fig. 8. Microphotograph at 1 week after implantation in experimental rat.(H&E staining, original magnification $\times 100$)

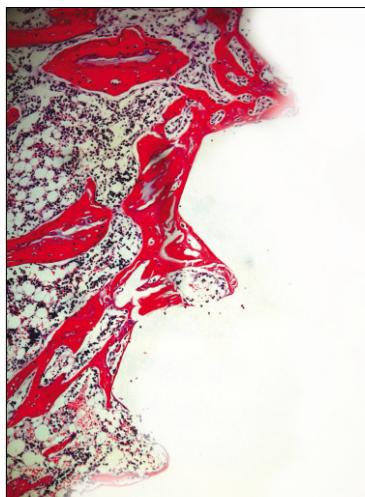


Fig. 9. Microphotograph at 2 weeks after implantation in experimental rat.(H&E staining, original magnification $\times 100$)

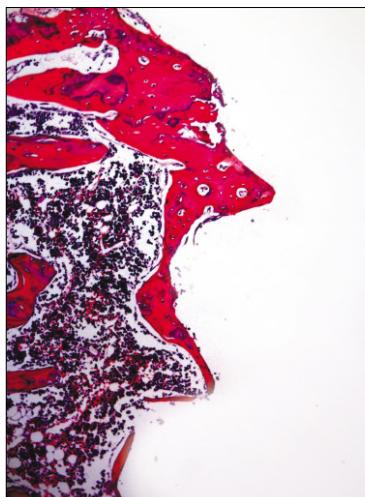


Fig. 10. Microphotograph at 4 weeks after implantation in experimental rat.(H&E staining, original magnification $\times 100$)

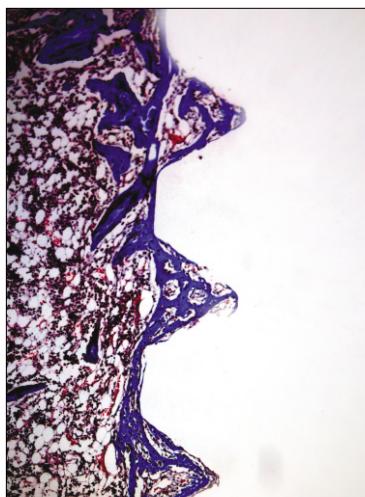


Fig. 11. Microphotograph at 1 week after implantation in control rat. (Masson's trichrome stain. Original magnification $\times 100$)

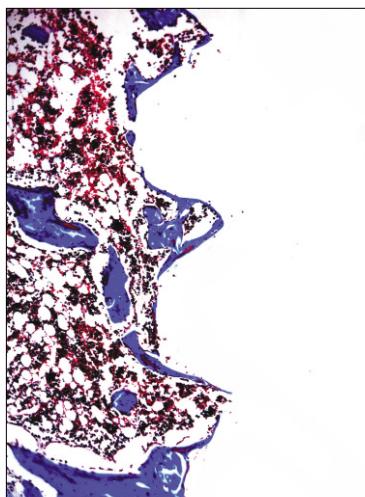


Fig. 12. Microphotograph at 2 weeks after implantation in control rat. (Masson's trichrome stain. Original magnification $\times 100$)

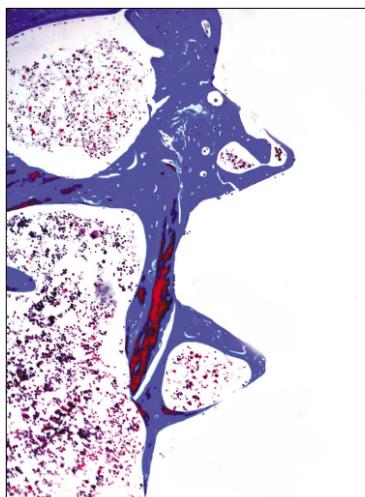


Fig. 13. Microphotograph at 4 weeks after implantation in control rat. (Masson's trichrome stain. Original magnification $\times 100$)

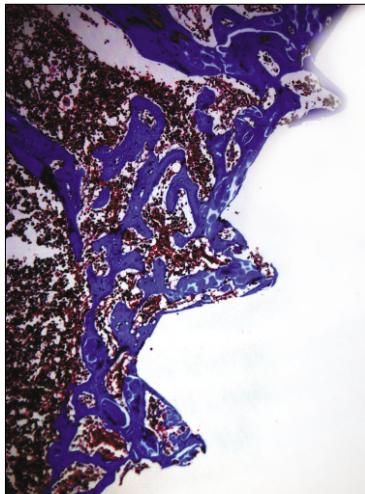


Fig. 14. Microphotograph at 1 week after implantation in experimental rat. (Masson's trichrome stain. Original magnification $\times 100$)

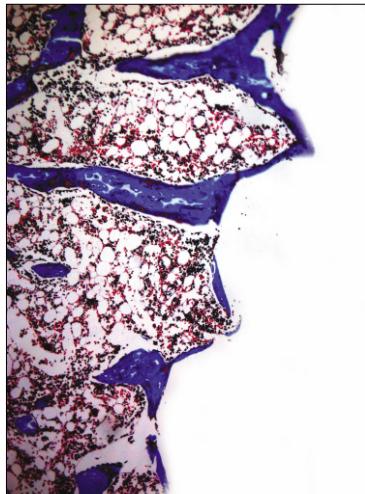


Fig. 15. Microphotograph at 2 weeks after implantation in experimental rat. (Masson's trichrome stain. Original magnification $\times 100$)

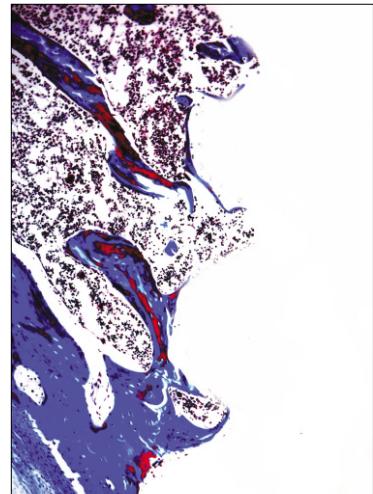


Fig. 16. Microphotograph at 4 weeks after implantation in experimental rat. (Masson's trichrome stain. Original magnification $\times 100$)

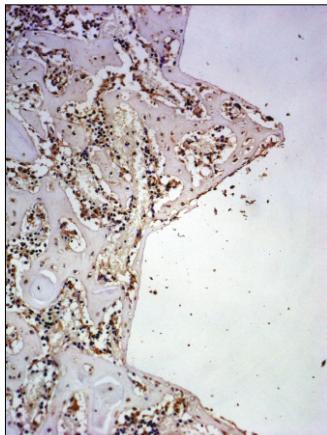


Fig. 17. Osteoprotegerin antibody reaction of regenerating bone at 1 week after implantation on tibia of the control rat. $\times 200$.

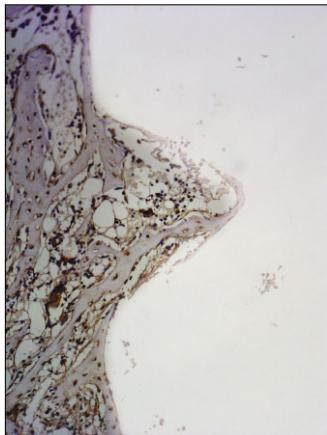


Fig. 18. Osteoprotegerin antibody reaction of regenerating bone at 2 weeks after implantation on tibia of the control rat. $\times 200$.

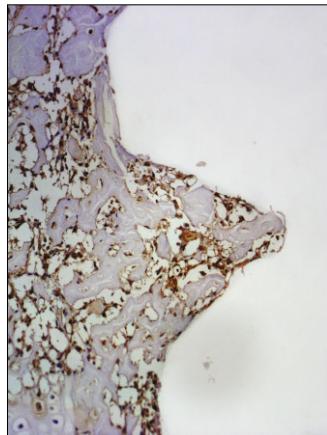


Fig. 19. Osteoprotegerin antibody reaction of regenerating bone at 1 week after implantation on tibia of the Experimental rat. $\times 200$.

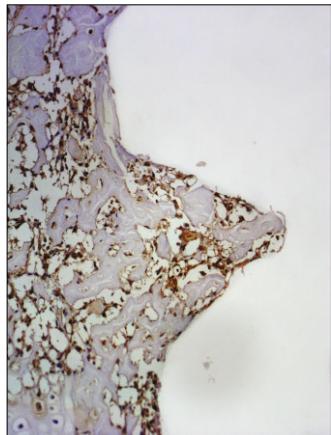


Fig. 20. Osteoprotegerin antibody reaction of regenerating bone at 2 weeks after implantation on tibia of the Experimental rat. $\times 200$.

2) Masson's trichrome stain

(1) 대조군

매식 후 1주군에서 임플란트 계면에서 collagen 및 골형성을 의미하는 푸른색이 나타났다. 4주군에서는 2주군에 비해 collagen 및 골형성이 줄어든 것으로 보아 골개조 활성이 낮아진 것을 알 수 있었으며 골소주가 더욱 규칙적인 형태로 관찰되고 형성된 collagen 및 골 내부에서 붉은 색의 성숙된 골이 관찰되었다.(Figs.11-13)

(2) 실험군

매식 후 1주군에서는 대조군에 비해 푸른색의 collagen 및 골형성이 우세함을 확인할 수 있었다. 4주군에 이르러서는 대조군에서와 마찬가지로 2주군에 비해 collagen 및

골형성이 줄어든 것을 관찰할 수 있었으나 대조군에 비해 collagen 및 골형성이 많고 골내부의 성숙된 골 또한 많음을 확인하였다. 또한 대조군처럼 임플란트 나사선 근처에서 규칙적인 골소주를 보였다.(Figs. 14-16)

2. OPG, RANKL의 발현에 대한 면역조직 화학적 검사 소견

1) OPG

OPG의 발현을 분석한 결과, 매식 후 2주까지 대조군에 비해 실험군에서 OPG의 발현이 보다 뚜렷하게 관찰되었다. 또한 대조군 및 실험군 모두에서 1주군에 비해 2주군에서 발현의 증가를 보였으나 실험군에서의 발현 양상은 대조군에 비해 1주가량 빠르게 나타난 것으로 파악되었다.(Table 1, Figs. 17-20)

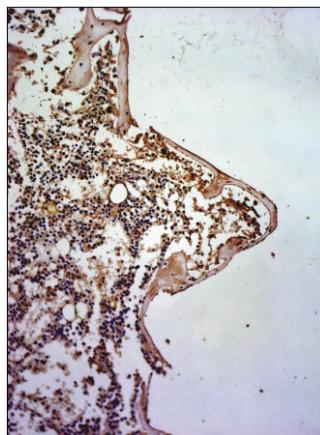


Fig. 21. Receptor activator of nuclear factor kB ligand antibody reaction of regenerating bone at 1 weeks after implantation on tibia of the Control rat. $\times 200$.

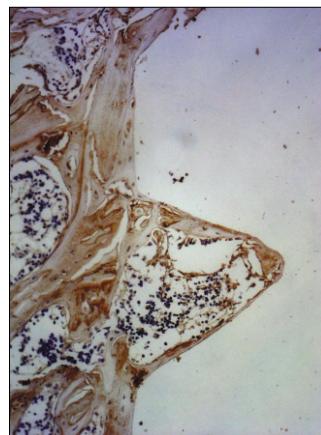


Fig. 22. Receptor activator of nuclear factor kB ligand antibody reaction of regenerating bone at 2 weeks after implantation on tibia of the Control rat. $\times 200$.

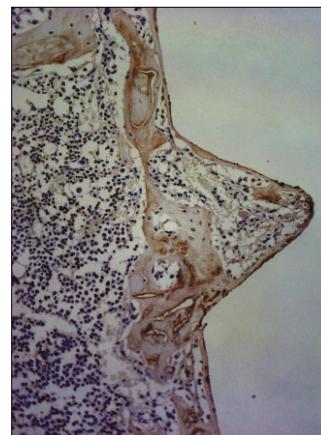


Fig. 23. Receptor activator of nuclear factor kB ligand antibody reaction of regenerating bone at 1 weeks after implantation on tibia of the Experimental rat. $\times 200$.

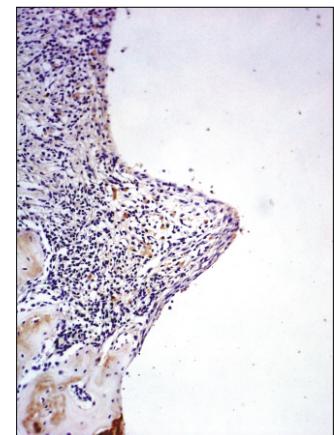


Fig. 24. Receptor activator of nuclear factor kB ligand antibody reaction of regenerating bone at 2 weeks after implantation on tibia of the Experimental rat. $\times 200$.

Table 1. Osteoprotegerin (OPG) Expression after Implantation.

Periods after implantation	control	experimental group
1 week	+	++
2 week	++	++

(-: no immunoreactivity; +: weak but visible staining; ++: moderate staining; +++: strong staining intensity)

Table 2. Receptor activator of nuclear factor kB ligand (RANKL) Expression after Implantation

Periods after implantation	control	experimental group
1 week	++	++/+++
2 week	++/+++	++

(-: no immunoreactivity; +: weak but visible staining; ++: moderate staining; +++: strong staining intensity)

2) RANKL

실험군, 대조군 모두에서 RANKL이 파골세포와 연관되어 관찰되었으며 임플란트 계면 및 혈관 주위 세포에서 관찰되었다. 매식 후 1주 실험군에서 대조군에 비해 RANKL의 발현이 뚜렷하게 나타났으며, 2주 실험군에서는 1주 실험군에 비해 RANKL의 발현 양상은 오히려 감소하였다. 이에 반해 2주 대조군은 1주 대조군에 비해 RANKL 발현이 증가되었다.(Table 2, Figs. 21-24)

IV. 총괄 및 고찰

당뇨병은 인슐린 분비의 결함으로 인해 혈장 내 글루코즈의 증가를 보이는 대사성 질환이다. 당뇨병 환자는 여러 가지 합병증을 보이며 높은 이환율과 사망률로 인해 현대 사회에서 그 심각성이 대두되고 있다. 지난 10년간 전 세계적으로 1억 4천만 명에 가까운 당뇨병 환자가 발생하였고 2010년까지는 2억 2천만 명, 2025년까지는 3억 명까지 증가할 것으로 예상된다¹.

당뇨병이 골에 미치는 영향은 광범위하다. 고혈당 상태가 골모세포 분화를 억제하고 체내 인과 칼슘의 대사를 조

절하는 부갑상선 호르몬의 반응을 변화시킬 뿐만 아니라 골기질(bone matrix)와 그 구성 요소에 해로운 영향을 미치고 세포의 기질(extra-cellular matrix)의 부착, 성장, 축적에도 영향을 준다¹⁶. Nyomba 등¹⁷에 의한 당뇨 쥐에서 골미네랄 대사에 관한 연구에 의하면 당뇨의 여러 가지 실험적 모델에서 무기질 대사, osteoid의 생산, 골형성이 감소되었음을 보여주었다. 당뇨병 환자에 있어서 임플란트 식립 시 골재형성 과정에 변화가 생기고 골-임플란트 접촉을 감소시키는 결핍된 광화 작용이 관찰된다. 몇몇 연구에 의하면 당뇨 유도된 동물 실험군과 대조군을 비교했을 때 임플란트 주위에 형성된 골의 양은 비슷했지만 골-임플란트 접촉의 감소를 보였다^{16,18-20}. 이러한 이유로 인해 당뇨병은 임플란트 치료의 상대적인 금기증으로 분류되고 있다. 215개의 임플란트를 40명의 당뇨 환자에 식립한 Fiorellini 등²¹의 연구에서 24개(11.2%)의 임플란트가 기능적 부하를 가한 후 1년 안에 실패했다. 이는 정상인과 비교했을 때 높은 실패율이었다. 이러한 실패율에도 불구하고 당뇨병에 이환된 환자의 수 및 그 증가 추세를 고려해 볼 때 당뇨병이 임플란트 식립의 절대적 금기증이 될 수는 없다. 당뇨병과 같이 임플란트의 상대적 금기증이 되는 질환을 가지고 있는 환

자에 있어서 임플란트 식립 시 성공률을 높이기 위해 많은 연구가 이루어졌다. 특히 골생성 및 임플란트 표면과 치조골 사이의 유착의 성공을 위한 여러 가지 시도가 계속 이어지고 있다. 본 연구에서는 당뇨병과 같이 임플란트의 상대적 금기증이 되는 질환에서의 임플란트 주위의 골형성 및 접촉에 관한 실험을 진행하고자 스트렙토조토신을 이용하여 백서에 인위적으로 당뇨병을 유도하고 임플란트와 골간 유합을 증진시키고자 줄기세포를 이용한 실험을 진행하였다.

골생성 및 골-임플란트 접촉은 임플란트의 성공률과 직접적으로 관련이 있으며 악골의 골질이 불량하거나 골량이 부족할 경우 더욱 긴 유착기간이 요구될 뿐만 아니라 골생성 및 더 나은 골유착을 위해 골이식술을 추가적으로 시행한다. 오늘날 골이식재로 많이 사용되고 있는 동종골, 이종골의 항원성과 감염의 위험성, 골유도 능력에 대한 논란, 자가골 채취량의 한계 등으로 인해 동종골과 이종골을 대신할 수 있는 물질의 개발에 대한 관심이 고조되고 있다^{4,5}. 이와 관련하여 골대체물질로 최근 많이 연구되고 있는 것이 줄기세포이다.

줄기세포에는 사람의 배아를 이용해 만들 수 있는 배아줄기세포, 그리고 사람의 제대혈과 골수 등에서 얻을 수 있는 성체줄기세포가 있다. 수정한지 14일이 안된 배아기의 세포인 배아줄기세포는 장차 인체를 이루는 모든 세포와 조직을 분화할 수 있기 때문에 전능세포 또는 만능세포로 불리우지만, 윤리적인 이유로 사용에 제한이 있다. 반면 성체줄기세포는 제대혈이나 다자란 성인의 골수와 혈액 등에서 추출해낸 것으로, 뼈와 간, 혈액 등 구체적 장기의 세포로 분화되기 직전의 원시세포이며 배아줄기세포의 사용에 따른 윤리적인 제한이 없어 조직공학에 널리 사용되고 있다. 조직공학에서 많이 이용되는 성체줄기세포 중 지방조직 유래 성체줄기세포는 부착성 세포이며 자가 생성능력이 있어 생체 내에서 환경에 따라 여러 가지 조직으로 분화됨에 따라 많은 주목을 받고 있다. 이 줄기세포는 미분화세포로 대체되거나 연골, 지방, 뼈, 근육 그리고 골수와 같은 간엽성 조직의 계통으로 분화할 수 있는 잠재성을 지니고 있다^{22,23}. 최근의 연구에서 골수로부터 분리한 성체줄기세포를 배양하여 골아세포로 분화 증식시키는 방법에 진전이 있었으며, 이를 통한 임상 적용의 가능성도 높아지고 있다²⁴⁻²⁶. 하지만, 이러한 성체줄기세포가 임플란트 주위 골형성에 미치는 영향에 대한 연구는 아직 미비하다.

이에 본 연구에서는 인위적으로 당뇨를 유도한 흰쥐에서 임플란트 매식 후 지방조직 유래의 성체줄기세포가 골형성에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 당뇨 유도된 백서의 경골에 주문 제작된 나사형 순수 티타늄 임플란트를 매식하고 지방조직 유래 줄기세포를 주입한 실험군과 주입하지 않은 대조군을 1주, 2주 및 4주 경과 후 각각 희생하여 병리조직학적, 조직면역학적 분석 및 소견을 관찰하였다.

병리조직학적 분석 결과 당뇨병이 유도된 백서에서도 임

플란트 주위의 골형성은 성공적으로 일어남을 볼 수 있었다. 하지만 지방조직 유래 줄기세포를 추가적으로 적용한 경우 임플란트 계면의 골조직은 더 빠르게 성숙되었으며 광화가 우수하게 진행됨을 관찰하였다. 특히 임플란트 매식 후 1주 경과 후 대조군에 비해 실험군에서 임플란트 주위 골형성 정도가 뛰어났으며 collagen 및 골내 혈관의 수 역시 대조군에 비해 실험군에서 많음을 관찰할 수 있었다. 이는 지방조직 유래 줄기세포를 주입함으로써 임플란트 매식 후 초기에 발생하는 골개조 활성이 증가하였다고 판단할 수 있으며 대조군에 비해 더 이른 시기에 발생하는 골개조 활성이 임플란트 초기 고정에 도움이 된 것으로 사료되었다.

또한 본 연구에서는 지방조직 유래 줄기세포가 당뇨 유도된 쥐에서 조골 작용을 촉진시키는지 알아보기 위하여 골아세포 및 파골세포의 분화, 생성 등에 중요하게 관여하는 OPG, RANKL의 변화를 면역조직 화학염색법으로 확인하고 발현도를 분석하였다. 치조골의 흡수와 형성에 관여하는 중요한 사이토카인으로 밝혀진 것이 OPG, receptor activator of nuclear factor κ B (RANK), RANKL이다¹³⁻¹⁵. 이것들은 파골세포의 형성과 분화, 활성, 세포사에 관여하여 골흡수와 형성의 균형에 영향을 끼치게 되는데 OPG는 유전자가 변형된 쥐에서 파골세포의 형성과 활성을 감소시켜서 골화석증을 유발하는 인자로 인지되었다¹⁴. OPG가 발견된 후 이것을 표식자로 사용하여 OPG ligand를 찾아내었으며 이것이 RANKL이며¹⁴ RANKL의 자연 수용체가 RANK이다¹⁵. RANKL이 파골세포 전구체의 RANK 수용체와 결합함으로써 파골세포의 분화, 형성, 활성이 이루어지고 전반적인 골흡수 과정이 시작되게 된다²⁷. 본 연구에서 OPG의 발현도를 분석한 결과 대조군과 실험군 모두에서 OPG의 발현이 증가됨을 관찰할 수 있었으며 매식 후 2주 까지 OPG 발현 양상은 대조군에 비해 실험군에서 뚜렷했고 이후 4주까지 발현 양상은 대조군과 실험군에서 차이가 없었다. RANKL의 발현은 매식 후 1주 실험군에서 1주째 대조군에 비해 뚜렷하게 차이가 나타났으며 2주 실험군에서는 1주 실험군에 비해 RANKL의 발현은 감소하였다. 이에 반해 2주 대조군은 1주 대조군에 비해 RANKL 발현의 증가를 보였으며 2주 이후의 RANKL의 발현 양상은 실험군과 대조군이 비슷하게 나타났으며 2주 이후부터 4주째 까지의 발현 양상은 비슷하였다. OPG 및 RANKL의 발현 양상으로 볼 때 실험군에서 매식 1주 후 발현이 빠르게 증가한 것은 줄기세포 주입 시 더 이른 시기에 파골세포의 분화가 증가함으로써 왕성한 골개조 활성이 일어났음을 추정할 수 있었다. 대조군에 비해 빠른 골개조 활성을 보여준 실험군을 통해 당뇨병에 이환된 환자에서 임플란트 시술 시 지방조직 유래 골줄기세포의 추가적인 적용이 임플란트 주위의 조골 작용 및 초기 임플란트 골유합에 도움이 될 것으로 사료된다.

V. 결 론

당뇨를 유도한 백서에서 임플란트 매식 후 지방조직 유래의 줄기세포가 골형성에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 당뇨 유도 백서의 경골에 주문 제작한 나사형 순수 티타늄 임플란트를 매식하고 지방조직 유래 줄기세포를 주입한 실험군과 주입하지 않은 대조군을 1주, 2주 및 4주 경과 후 각각 희생하여 병리조직학적, 면역조직학적 분석 및 소견을 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 병리조직학적 분석을 통해 당뇨병이 유도된 백서에서도 4주 이후 임플란트 주위의 골형성은 성공적으로 일어남을 확인하였다. 하지만 지방조직 유래 줄기세포를 추가적으로 적용한 경우 임플란트 계면의 골조직은 더 빠르게 성숙되었으며 광화가 우수하게 진행됨을 관찰하였다. 특히 임플란트 매식 1주 경과 후 대조군에 비해 실험군에서 임플란트 주위 골형성 정도가 뛰어났으며 collagen 및 골내 혈관의 수 역시 대조군에 비해 실험군에서 많이 형성되었다.
2. 면역조직 화학적 분석을 통해 OPG의 발현 정도를 관찰한 결과 대조군과 실험군 모두 OPG의 발현이 증가되었으며 매식 후 2주까지 OPG 발현 양상은 대조군에 비해 실험군에서 뚜렷했고 이후 4주까지 발현양상은 대조군과 실험군에서 차이가 없었다.
3. 면역조직 화학적 분석을 통해 RANKL의 발현 정도를 관찰한 결과 RANKL의 발현은 매식 후 실험군에서는 1주째 가장 뚜렷하게 나타났으며 2주군에는 1주군에 비해 RANKL의 발현은 감소되었다. 또한 대조군에서는 1주군에 비해 2주군에서 RANKL 발현의 증가를 보였다. 2주 이후의 RANKL의 발현 양상은 실험군과 대조군이 비슷하게 나타났다.

이상의 결과를 종합하여 보면, 지방조직 유래의 성 줄기세포의 추가적인 적용 시 임플란트의 주위 골 반응에서 초기 골세포 분화 형성에 긍정적인 효과를 보이는 것으로 나타났다. 이는 임플란트 식립 후 초기 골개조 활성을 빠르게 하고 이어 임플란트의 초기 고정에도 도움이 될 것으로 생각한다.

References

1. Zimmet P, Shaw J, Alberti KG. Preventing type 2 diabetes and the dysmetabolic syndrome in the real world: a realistic view. *Diabet Med* 2003;20:693-702.
2. Weiss RE, Gora A, Nimni ME. Abnormalities in the biosynthesis of cartilage and bone proteoglycans in experimental diabetes. *Diabetes* 1981;30:670-7.
3. Goodman WT, Hori MT. Diminished bone formation in experimental diabetes. Relationship to osteoid maturation and mineralization. *Diabetes* 1984;33:825-31.
4. Schwartz Z, Somers A, Mellonig JT, Carnes DL Jr, Dean DD, Cochran DL, et al. Ability of commercial demineralized freeze-dried bone allograft to induce new bone formation is dependent on donor age but gender. *J Periodontol* 1998;69:470-8.
5. Traianedes K, Russell JL, Edwards JT, Stubbs HA, Shanahan IR, Knaack D. Donor age and gender effects on osteoinductivity of demineralized bone matrix. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2004;70:21-9.
6. Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Latsinik NV, Panasyuk AF, Keiliss-Borok IV. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. *Cloning in vitro and retransplantation in vivo*. *Transplantation* 1974;17:331-40.
7. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 1991;9:641-50.
8. Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VM, Yoo JU. *In vitro* chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res* 1998;238:265-72.
9. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284:143-7.
10. Fukumoto T, Sperling JW, Sanyal A, Fitzsimmons JS, Reinholz GG, Conover CA, et al. Combined effects of insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor-beta1 on periosteal mesenchymal cells during chondrogenesis *in vitro*. *Osteoarthritis Cartilage* 2003;11:55-64.
11. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: Implications for cell based therapies. *Tissue Eng* 2001;7:211-28.
12. de Ugarte DA, Morizono K, Elbarbary A, Alfonso Z, Zuk PA, Zhu M, et al. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs* 2003;174:101-9.
13. Kwan Tat S, Padrones M, Théoleyre S, Heymann D, Fortun Y. Survey: IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1:interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004;15:49-60.
14. Theoleyre S, Wittrant Y, Tat SK, Fortun Y, Redini F, Heymann D. Survey: the molecular triad OPG/RANK/RANKL: involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004;15:457-75.
15. Boyle WJ, Simonet WS, Lecey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 2003;423:337-42.
16. McCracken M, Lemons JE, Rahemtulla F, Prince CW, Feldman D. Bone response to titanium alloy implants placed in diabetic rats. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2000;15:345-54.
17. Nyomba BL, Verhaeghe J, Thomasset M, Lissens W, Bouillon R. Bone mineral homeostasis in spontaneously diabetic BB rats. Abnormal vitamin D metabolism and impaired active intestinal calcium absorption. *Endocrinology* 1989;124:565-72.
18. Nevins ML, Karimbux NY, Weber HP, Giannobile WV, Fiorellini JP. Wound healing around endosseous implants in experimental diabetes. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1998;13:620-9.
19. Morris HF, Ochi S, Winkler S. Implant survival in patients with type 2 diabetes: placement to 36 months. *Ann Periodontol* 2000;5:157-65.
20. Mellado-Valero A, Ferrer García JC, Herrera Ballester A, Labaig Rueda C. Effects of diabetes on the osseointegration of dental implants. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2007;12:E38-43.
21. Fiorellini JP, Chen PK, Nevins M, Nevins ML. A retrospective study of dental implants in diabetic patients. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2000;20:366-73.
22. Song L, Baksh D, Tuan RS. Mesenchymal stem cell-based cartilage tissue engineering: cells, scaffold and biology. *Cyotherapy* 2004;6:596-601.
23. Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical application and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol* 2004;36:568-84.
24. Kassem M, Kristiansen M, Abdallah BM. Mesenchymal stem cells: cell biology and potential use in therapy. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2004;95:209-14.
25. Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP.

- Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* 1968;6:230-47.
26. Ohgushi H, Caplan AI. Stem cell technology and bioceramics: from cell to gene engineering. *J Biomed Mater Res* 1999;48:913-
27. Hofbauer LC, Heufelder AE. Role of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin in bone cell biology. *J Mol Med* 2001;79:243-53.