

가토 하악골체부 신연 골형성술시 하이알루론산이 세포외  
기질 단백질의 발현과 골형성에 미치는 영향

The effect of hyaluronic acid on expression of extracellular matrix  
proteins and bone formation in rabbit mandibular distraction  
osteogenesis

박기남<sup>1</sup>, 송현철<sup>1</sup>, 지유진<sup>1</sup>, 유진영<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 가톨릭대학교 성빈센트병원 치과 구강악안면외과

<sup>2</sup> 가톨릭대학교 성빈센트병원 임상병리과

Ki-Nam Park<sup>1</sup>, Hyun-Chul Song<sup>1</sup>, Yu-Jin Jee<sup>1</sup>, Jin-Young Yoo<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Div. of OMFS, Dept. of Dentistry, St. Vincent's Hospital, The Catholic University of Korea

<sup>2</sup> Dept. of pathology, St. Vincent's Hospital, The Catholic University of Korea

교신저자

송현철

442-060 경기도 수원시 팔달구 지동 93 가톨릭대학교 성빈센트병원 치과

*Hyun-Chul Song*

*Department of Dentistry, St. Vincent's Hospital, The Catholic University of Korea, 93  
Chi-Dong, Paldal-Ku, Suwon 442-060, Korea*

*Tel: 82-31-249-7670 Fax: 82-31-258-3352*

*E-mail: [omsjyj@kornet.net](mailto:omsjyj@kornet.net)*

공지사항 (Acknowledgement)

본 연구에 기구 및 재료를 제공해 주신 (주)제일코퍼레이션의 후원에 감사드리며, 실험에 참여해 주신 가톨릭대학교 성빈센트병원 임상의학연구소에 감사드립니다.

별책부수 : 50부

# ABSTRACT

## The effect of hyaluronic acid on expression of extracellular matrix proteins and bone formation in rabbit mandibular distraction osteogenesis

Ki-Nam Park<sup>1</sup>, Hyun-Chul Song<sup>1</sup>, Yu-Jin Jee<sup>1</sup>, Jin-Young Yoo<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Div. of OMFS, Dept. of Dentistry, St. Vincent's Hospital, The Catholic University of Korea

<sup>2</sup> Dept. of pathology, St. Vincent's Hospital, The Catholic University of Korea

Distraction osteogenesis is a new bone formation technique. There is a advantage of the environmental adaptation when distraction force is applied to the gap between osteotomy lines. But it has a disadvantage of long-term wearing of the appliance and long consolidation period. Therefore we make an effort to reduce it and repair normal function.

Extracellular matrix proteins have a function to control the cellular growth, migration, shape and metabolism. In these, hyaluronic acid is a member of polysaccharide glycosaminoglycans (GAGs) and has a important function as bone formation and osteoinduction property.

**Purpose :** In this experimental study in rabbit mandibular distraction osteogenesis, we investigated the bone enhancing property of hyaluronic acid and the expression of extracellular proteins such as osteocalcin and osteonectin.

**Materials and Methods :** The experimental study was carried out on 24 Korean male white rabbits (both mandibular body, n=48). Distraction group was divided to distraction experimental (A, n=16) and distraction control (B, n=16) by the application of hyaluronic acid (Hyruan, LGCI, Seoul, Korea). Normal control group (C, n=16) was only osteotomized. After 5 days latency, distraction devices were activated at a rate of 1.4 mm per day (0.7 mm every 12hours) for 3.5 days. Animals were sacrificed at postoperative 3, 7, 14, and 28 days. H&E stain and immunohistochemical stain was done on decalcified section. Additionally RT-PCR

analysis was done for the identification of the expression of osteocalcin and osteonectin.

**Results** : The bone formation in distraction experimental group was much more than that in distraction and normal control group at postoperative 28 days. In immunohistochemical stain, osteocalcin was enhanced at only postoperative 14 days, but osteonectin was not different at each post-operation days. In RT-PCR analysis, osteocalcin was not different at each post-operation days, but osteonectin was strongly expressed in distraction experimental group at postoperative 7 days. The expression of osteocalcin and osteonectin was elevated during the healing period.

**Conclusion** : We found the good bone formation ability of hyaluronic acid in distraction osteogenesis through the immunohistochemistry and RT-PCR analysis to osteocalcin and osteonectin, known as a bone formation marker. The application of hyaluronic acid in distraction osteogenesis is a method to reduce the consolidation period.

**Key words** : distraction osteogenesis, extracellular matrix proteins, hyaluronic acid

# 서론

골연장, 기형교정, 골결손부 수복 등을 위한 전통적인 외과적 수술법은 급격히 주변조직이 변화한다는 제한점을 가지게 된다.<sup>1,2)</sup> 이러한 제한점을 극복하기 위한 한 가지 방법으로 신연 골형성술이 대두되었으며, 1954년 Ilizarov 에 의해 이론적으로 정립된 이후 정형외과영역에서 사지신장에 널리 이용되었다.<sup>3)</sup> 약골에 있어서는 Snyder 등<sup>4)</sup>이 성견의 하악골에서 골신장에 대해 처음으로 보고한 이후로 약안면 영역에서는 McCarthy 등<sup>5)</sup>이 하악골 왜소증 환자에서 18-20 mm의 하악골 신장에 대해 첫 임상증례를 보고하였으며, 이후 많은 실험적, 임상적 연구가 약안면 영역에서 신연 골형성술이 기존의 골 재건술 및 성형술을 대체할 만한 유용성이 있다고 증명하였다.<sup>2,5)</sup> 그러나 신연 골형성술의 단점으로 구외장치로 인한 반흔 형성과 장기간의 장치물 장착으로 인한 불편감 등이 있으며, 이러한 단점을 극복하기 위하여 구내 장치물을 이용하거나 골성장을 촉진시키는 방법을 모색하였다.<sup>6,7)</sup>

신연 골형성술은 임상적으로 골절단술, 잠복기, 신연기, 경화기의 단계로 구분되며, 골간극이 섬유성 유합이 되지 않는 골형성을 얻어야 한다.<sup>3,8,9)</sup> 충분한 골을 얻으며 성공률을 높이고 치료기간을 단축시키기 위한 방법 등을 찾아보기 위하여 최적의 신연율과 신연빈도에 대한 연구<sup>10,11)</sup>와 TGF $\beta$ , IGF, FGF 및 BMP등의 성장인자의 관여효과에 대한 연구<sup>12,13)</sup> 및 Collagen, Osteonectin, Osteopontin 및 Osteocalcin 등의 세포외 기질 단백질의 관여효과에 대한 연구<sup>14,15)</sup> 등이 시행되어 오고 있다. 이중 세포외 기질에 대한 연구는 비교적 미약하지만 다양한 세포외 기질 성분 (glycoprotein and proteoglycan)들이 복합적으로 세포의 기능을 조절하는 것으로 보고 되고 있다. 특히 1973년 Toole은 이러한 세포외 기질이 세포의 발달, 이주, 증식, 형태 유지 및 대사 등 세포의 기능을 조절하는데 활동적인 역할을 함을 보고 하였으며, 이중 하이알루론산의 역할을 규명하였다.<sup>16,17,18)</sup> 또한 Yanagashita는 하이알루론산과 같은 점액다당류 (polysaccharide glycosaminoglycans, GAGs)가 세포 기능을 조절함에 있어서 중요한 역할을 한다고 보고하였다.<sup>19)</sup>

본 연구에서는 세포외 기질 성분의 하나인 하이알루론산의 투여가 신연골형성술에 미치는 영향을 알아보고, 세포외 기질 단백질로 비교원성 골 기질 단백질인 Osteocalcin 과 Osteonectin 의 발현 정도를 면역조직화학검사와 RT-PCR analysis 를 통하여 골절치유시의 발현상과 비교하여 알아보고자 하였다.

## 실험재료 및 방법

## 1. 실험재료

24마리 (양측 하악골체부, n=48)의 건강하고 성장 중인 체중 2.5-3 kg의 수컷 가토를 실험에 사용하였으며, 안정상태를 유지하기 위하여 3-5일간 동물용 고형사료와 물을 이용하여 사육하였고, 예비실험을 시행하여 가토의 하악골을 채취하고 정상 해부학적 구조를 인지하여 골절단부와 신연 장치의 위치를 설정하였다 (Fig. 1). 신연장치는 한바퀴 회전에 0.7 mm, 최대 6.5 mm까지 신장 가능한 Mini stainless steel skeleton-type expansion screw (Denturum, Germany)와 신연기를 골면에 고정하기 위한 Mini titanium screw (2.0 diameter × 18 mm, Jeil corporation, Seoul, Korea) 2개를 레진 포매하여 자체 제작하였다 (Fig. 2).

## 2. 실험방법

### 1) 실험

정상 대조군 (C군, n=16)으로는 골절단술만을 시행하였으며, 신연군은 하이알루론산의 투여 여부에 따라서 하이알루론산을 투여하지 않은 신연 대조군 (B군, n=16)과 투여한 신연 실험군 (A군, n=16)으로 나누었다.

술전 8시간 금식을 시행하고, 전신마취를 위하여 Ketamin (Ketalar, 유한양행, 한국) 30 mg/kg와 Xylazine (Rompun, 바이엘코리아, 한국) 10 mg/kg를 혼합하여 근육주사하였다. 가토를 양와위로 고정하고 통법에 따라 양측 하악 하연부의 제모와 포타딘을 이용한 소독을 통하여 무균적 수술시야를 확보하고, 국소마취와 지혈목적으로 1:100,000 epinephrine 함유 2% Lidocaine (유한양행, 한국)을 시술부위에 피하주사하였다. 하악 하연부를 절개하고 층별 박리를 통하여 하악골을 노출시키고 소구치 전방의 이공을 통해 나오는 이신경을 확인하고 조심스럽게 견인하였다. 소구치 전방과 이공사이의 설정된 골절단부를 확인하고 신연장치를 2개의 Mini titanium screw를 사용하여 일차고정 후 제거하고 저속 치과용 절삭 기구를 사용하여 피질골 절제술을 시행하였으며, 골체부내의 하치조 신경 손상에 주의하여 완전 골절단을 시행하였다. 골의 가동성을 확인한 다음 신연장치를 재고정하고 생리식염수로 깨끗이 세척한 뒤 0.5 ml의 하이알루론산 (sodium hyaluronate 10 mg/ml, Hyruan, LGCI, 서울, 한국)을 편측 하악 골절단부위에 국소적 투여를 시행하여 신연 실험군으로 설정하였다. 반대측 하악 골체부도 같은 방법으로 시행하였으며 하이알루론산은 투여하지 않고 신연 대조군으로 설정하였다. 이후 3-0 흡수성 봉합사와 비흡수성 봉합사로 층별 봉합을 시행하였으며, 신연 실험군에 있어서 봉합시 0.5 ml의 하이알루론산을 추가로 도포하였다 (Fig. 3, 4a, 4b)

정상 대조군은 같은 방법으로 소구치부와 이공사이에서 골절단을 시행 후 가동성을 확인하고 금속판과 4 mm Mini titanium screw를 사용하여 고정하였다. 모든 실험동물은 술후 감염 방지와 저작곤란으로 인한 영양결핍을 방지하기 위하여 3일간 Gentamycin (20 mg/kg)과 Beecom을 근육 주사하였다.

골 신연은 술후 5일간의 잠복기를 두어 골절단부의 재혈관화, 일차성 가골 형성 및 연조직 치유를 도모한 후, 0.7 mm씩 12시간마다 (1.4 mm / a day) 신연을 시행하여 3.5일간 총 4.9 mm의 신연량을 얻도록 계획하였으며, 술후 최장 28일까지 경과를 관찰하기로 하였다.

## 2) 육안적 검사

술후 가토의 식이상태 등 전반적인 건강상태를 확인하고, 신연장치 회전시 저항감의 정도를 관찰하였으며, 하악 전치의 위치의 변화를 통해 신연상태를 파악하였다. 또한 각 시기별로 채취된 조직에서 골 신연부의 골치유 상태를 육안적으로 관찰하여 기록하였다.

## 3) 방사선학적 검사

각 시기에 채취된 조직을 치과용 교합필름을 이용하여 일정거리 하에서 65 kvp, 7.5 mA, 25 msec의 조건하에서 촬영하여 골절단부 및 신연골 생성부에 대한 방사선학적 변화에 대한 검사를 시행하였다.

## 4) 조직표본제작

잠복기, 신연기, 경화기의 과정을 보기 위하여 술후 3일, 7일, 14일 및 28일에 신연군 4마리 (A군, n=4 ; B군, n=4)와 정상 대조군 2마리 (C군, n=4)씩 희생시켜 절반은 조직표본제작을 위하여 사용하였으며, 나머지는 RT-PCR analysis를 위하여 사용하였다.

### a. 탈회표본 제작

채취한 조직검체는 10% 중성 포르말린에 3일간 고정시키고, 5% formic acid-sodium citrate 방법으로 5일간 탈회를 시행하였다. 통상의 방법으로 파라핀 포매를 시행하여 4  $\mu$ m 두께의 조직절편을 제작하였으며, H&E 염색을 시행하여 광학현미경하에서 전반적인 조직학적 양상을 관찰하였다.

### b. 면역조직화학검사

골형성에 관여하는 비교원성 세포의 기질 단백질인 Osteocalcin과 Osteonectin의 발현을 면역조

직화학검사를 통하여 분석하였다. Osteocalcin에 대한 일차 항체는 bovine osteocalcin으로 면역화하여 생쥐에서 얻어진 monoclonal antibody (OC4-30, Takara, Japan)를 사용하였으며, Osteonectin에 대한 일차 항체는 human platelet osteonectin으로 면역화하여 생쥐에서 얻어진 monoclonal antibody (OSN4-2, Takara, Japan)를 사용하였다. 면역조직화학염색은 H&E 염색을 위해 준비된 조직을 사용하였으며, 통상적인 peroxidase avidin-biotin complex법으로 다음과 같이 염색하였다. Xylene, Acetone, 100%, 95%, 75% Alcohol을 사용하여 탈파라핀 후 흐르는 물에 세정하였고, 실온에서 5분간 0.4 mg/ml Proteinase K (V302B, Promega)로 처리하고 TBS (Tris Buffered Saline, TBS999, ScyTek) 완충액으로 전단계에 남아 있는 시약을 실온에서 5분간 3회 세정하고, 내인성 peroxidase의 활성을 억제하기 위하여 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 실온에서 5분간 반응시켰다. 다시 TBS 세정 후 streptavidin biotin universal detection system을 사용하여 단백질 억제 완충제 (Cat No. 2391, Immutech)로 실온에서 10분간 반응 후 Osteocalcin과 Osteonectin의 일차항체를 5 µg/ml의 농도로 실온에서 90분간 반응시켰다. 다시 TBS 세정 후 Biotin 표식 이차 항체로 실온에서 10분간 반응시키고 TBS 세정 후 streptavidin peroxidase (Cat No. 2391, Immunotech)로 실온에서 10분간 반응시키고 TBS 세정 후 실온에서 2분간 발색제 (ACE substrate, AEC500, ScyTek)로 처리한 뒤 DW 용액에 넣어 반응을 정지 시켰다. 그 뒤 대조 염색으로 Mayers hematoxylin (HMM500, ScyTek)을 실온에서 20초간 처리하였다. 면역조직화학염색 결과는 1명의 병리조직학자에 의해서 관찰하였고, 각 항체의 염색상에 대한 검사방법은 염색상을 관찰할 수 없는 경우를 음성 (-), 정상 성숙골에 산재된 세포에서만 약한 염색상을 보이는 경우를 약양성 (+), 염색상이 세포질 내에서 중등도로 보이는 경우를 양성 (++), 강한 세포질내 염색상을 보이는 경우를 강양성 (+++)으로 표시하여 각 시기별로 Osteocalcin과 Osteonectin의 발현 정도를 분석하였다.

##### 5) RT-PCR Analysis

세포의 기질인 Osteocalcin과 Osteonectin의 발현 양상을 RT-PCR (reverse transcriptase-polymerase chain reaction) analysis를 이용하여 다음과 같이 검사하였다. 신원균 및 정상 대조군에서 포르말린 고정을 시행하지 않은 나머지 조직을 혈액의 오염을 최소화 하여 즉시 액화질소에 급냉 시킨 후 잘게 분쇄하여 Trizol (Invitrogen Co., USA)를 첨가한 후 1/10배의 chloroform으로 처리하여 상층을 분리하였다. 다음 동량의 isopropanol로 처리하여 pellets을 DEPC-70% ethanol로 세척 후 건조시켜 DEPC-D/W에 녹였다. cDNA는 260nm에서 흡광도를 측정 후 정량하여 reverse transcription reaction을 실시하였다. Random primer로 70 ℃에서 5분간 annealing 후 10mM dNTPs(Roche Germany), RNasin, AMV(Avian Myoblastosis Virus) reverse transcriptase(Promega, USA), 5xbuffer(Promega, USA)를 42 ℃에서 1시간 반응시켰다. cDNA를

조합한 후 TDMH(670mM Tris-HCl(pH 8.8), 1% Tween 20, 166mM ammonium sulphate, 100uM dNTP, 2mM magnesium chloride)buffer, 10uM sense 및 antisense primer, 1 unit Taq polymerase 및 증류수를 가하여 총량을 25  $\mu$ l 한 후 58 °C 에서 30분간 처리한 후 다시 92 °C 에서 15초, 60 °C 에서 30초, 72 °C에서 30초간 35회 실시한 후 72 °C 에서 10분간 PCR 반응을 시켰다. Primer 서열은 Table 1과 같이 각 인자에 대한 sense primer와 antisense primer를 적용하였다. mRNA level의 정확한 정량을 위해  $\beta$ -actin으로 확인하였다(Fig. 13). PCR 반응이 종료된 검체들에서 각 산물을 5  $\mu$ l씩 취하여 6  $\times$  loading buffer (0.25% bromphenol blue, 0.25% xylene cyanol, 30% glycerol in water) 2  $\mu$ l와 혼합하여 2% agarose gel에 100 V에서 30분간 전기영동하고 ethidium bromide로 염색하여 자외선 투사기로 관찰한 다음 폴라로이드 카메라로 촬영하여 검사하였다.

## 결 과

### 1. 육안적 소견

술후 가토의 상태는 모두 양호하였으며, 신연량의 증가는 하악 전치부의 반대교합 또는 심한 마모 양상으로 나타났다 (Fig. 5).

검체 채취시 잠복기에 해당하는 3일째에 모든 군은 골절단부에 혈액의 응고와 육아조직으로 쌓여있는 상태로 가골 형성은 보이지 않았다. 신연기에 해당하는 7일째에 정상 대조군에서는 가골 형성을 확인하였으며, 신연 실험군과 신연 대조군에서는 골절단부 폭경의 증가와 함께 가골 및 혈종이 혼재된 양상을 보였다.

경화기 초에 해당하는 14일째에 정상 대조군에서는 골절제부가 골양 조직으로 치유되었고, 신연 실험군과 신연 대조군 모두 골양 조직으로 채워져 골 신연부를 확인할 수 없었으나 신연 실험군이 신연 대조군에 비하여 더 많은 골양 조직과 섬유성 조직을 나타내는 것으로 보였다.

경화기 말에 해당하는 28일째 정상 대조군에서는 거의 구별되지 않는 골조직으로 치유된 상태로 금속관을 덮는 골형성도 관찰할 수 있었다. 신연 실험군과 신연 대조군에서는 비교적 단단한 골양 조직이 관찰되었으나 둘 간의 차이는 구별할 수 없었다 (Fig. 6).

### 2. 방사선학적 소견



신연 실험군과 신연 대조군에 있어서, 술후 3일, 7일째에 촬영된 방사선 사진상에서 방사선 투과상을 관찰할 수 있으며, 신연부와 인접 골절단부의 구별이 명확하였다. 술후 14일째에 신연 중심부에 방사선 투과상과 불투과상이 혼재된 상태로 나타나고 있으며 28일째에 더욱 증가하였다. 그러나 신연 실험군과 신연 대조군의 차이는 명확하지 않았다.

정상 대조군에 있어서, 14일째에 방사선 투과상이 매우 감소하여 골절단부의 경계가 불분명하였으며, 28일째에 신연 실험군과 신연 대조군에 비해 증가된 방사선 불투과상으로 주위 정상 골과의 구별이 어려웠다 (Fig. 7).

### 3. 일반조직학적 소견

술후 3일째 모든 군에서 골절단부의 혈종과 염증세포의 침윤상을 보이고 있었으며, 신연 실험군과 신연 대조군의 차이는 보이지 않았다 (Fig. 8a).

술후 7일째 소견으로 신연 실험군과 신연 대조군에서 섬유성 가골과 함께 골형성을 관찰할 수 있었으며 연골성 성분이 관찰되었다. 신연 실험군에서는 신연 대조군에 비해 많은 섬유성 조직이 관찰되었고 상대적으로 골형성은 적게 나타났다. 정상 대조군에 있어서 피사조직과 함께 섬유성 조직, 골형성부 등이 혼재되어 나타났으며, 약간의 연골성 조직도 관찰되었다. 즉 술후 7일에 있어서 대부분의 골화과정은 연골내골화를 나타내는 것으로 관찰되었다 (Fig. 8b, 8c).

경화기 초에 해당하는 14일째 소견으로 신연 실험군과 신연 대조군에서 혈관 침투의 증가, 골형성의 증가, 연골성 조직의 감소, 골소주 두께의 증가가 나타났으나, 신연 대조군보다 신연 실험군에서 더 많은 연골성 조직이 관찰되며 섬유성 조직이 아직 증가된 상태를 보였다. 정상 대조군은 증가된 골형성부에서 골소주를 관찰할 수 있었다. 즉 연골내골화 과정과 막내골화 과정이 모두 활발히 진행되는 과정으로 관찰되고 있다 (Fig. 8d, 8e, 8f).

경화기 말에 해당하는 28일째 소견으로 신연 실험군과 신연 대조군에서 신생혈관이 잘 관찰되며, 신생골이 기존골과 잘 연결되어 구별이 어려웠으며, 14일째의 소견과는 달리 신연 실험군이 신연 대조군보다 더 많은 골형성을 보였다. 또한 대부분은 막내골화에 의한 골화과정을 보였다. 정상 대조군에서는 신생골과 기존골의 연결이 우수하였고 신생골대로 혈관이 잘 발달되어 있는 소견을 나타내었다 (Fig. 8g, 8h, 8i).

### 4. 면역조직화학염색 소견

### 1) Osteocalcin 발현

술후 3일째 모든 군에서 발현 양상은 나타나지 않았다. 술후 7일째 신연 실험군과 신연 대조군에서 골형성이 시작되는 부위의 세포질이 풍부한 조골세포에서 Osteocalcin 이 약양성의 발현을 나타내기 시작하였고, 신장부의 대부분을 채우고 있는 섬유성 조직과 연골성 조직에서는 음성이었다. 그러나 신연 실험군과 신연 대조군 간의 차이는 뚜렷하지 않았다. 정상 대조군에서는 인접 골절단면 주변의 조골세포에서는 발현이 되는 것으로 보이나 중심부에서는 음성이었다.

술후 14일째 모든 군에서 발현이 된 부위가 증가되었으며, 신연 실험군에서는 신생골 주변의 조골세포에서 양성의 발현을 보이고, 하방 골기질에서도 발현 양상을 관찰할 수 있었다. 신연 대조군에서의 발현 양상은 신연 실험군과 비슷하지만 하방 골기질에서의 발현 양상은 적은 것으로 보였다. 정상 대조군의 발현은 골절단부에서 약양성을 나타내었으며 신연 대조군과는 큰 차이를 보이지 않았다.

술후 28일째 모든 군에서 14일째보다 발현이 증가되었으며, 신연 실험군에서 일부 강양성을 보이는 부분이 나타나는 반면, 신연 대조군에서는 전반적으로 비슷한 발현 양상을 나타내었다. (Fig. 9, Table 2)

### 2) Osteonectin 발현

Osteonectin의 발현은 시기별, 부위별로 Osteocalcin과 비슷한 양상을 보였으며, 3일, 7일째에 신연 실험군과 신연 대조군 간의 차이는 명확하지 않았다. 14일, 28일째 소견에서는 Osteocalcin과는 달리 차이가 없었다. (Fig. 10, Table 3)

## 5. RT-PCR 소견

### 1) Osteocalcin

술후 3일째 모든 군에서 발현이 되었으며, 각 군 간의 차이는 뚜렷하지 않았다. 술후 7일에 있어서 여전히 3일과 비슷한 발현을 보이고 있다. 또한 신연 실험군과 신연 대조군의 차이는 뚜렷하지 않으며, 정상 대조군과의 차이도 뚜렷하지 않았다. 술후 14일째 신연 실험군에서 여전히 발현되고 있으나 신연 대조군보다는 약한 것으로 보이며, 신연 대조군에서는 7일째보다 증가된 양상으로, 정상 대조군에서는 7일째의 발현상을 유지하는 것으로 보였다. 술후 28일째 소견은 신연 실험군과 신연 대조군에서 강한 발현을 보이고 있으나, 둘 간의 차이는 뚜렷하지 않으며, 정상 대조군은 나타나지 않았다 (Fig. 11).

## 2) Osteonectin

Osteocalcin의 술후 3일째 발현과는 달리 Osteonectin은 모든 군에서 발현되지 않았다. 술후 7일째에 신연 실험군에 있어서 신연 대조군보다 강한 발현상이 나타나고, 정상 대조군은 신연 실험군과 신연 대조군보다 매우 약한 발현을 보였다. 술후 14일까지 각 군들은 점차 발현상이 증가하는 것으로 나타났으나, 술후 28일째에 있어서 신연 실험군은 약간 감소한 결과를 보이고 신연 대조군과의 차이는 뚜렷하지 않으며, 신연 대조군은 14일의 발현을 유지하고 있었다. 정상 대조군은 14일째보다 감소된 상태로 신연 실험군과 신연 대조군보다 적었다 (Fig. 12).

# 고찰

전통적인 골이식술의 한계를 극복하기 위한 노력으로 신연 골형성술이 대두되었으며, 구강악안면 영역에서도 많은 연구가 진행되어 골조직 뿐만 아니라 근육, 신경 및 측두하악관절에서의 변화도 보고 되었다.<sup>20,21,22,23</sup> 이러한 신연 골형성술은 공여부가 없이도 새로운 골이 형성된다는 장점에도 불구하고 신생골의 충분한 강도를 얻기 위하여 장기간 동안 장치물을 장착해야하는 문제점이 있으며, 경화기를 단축시키고 골형성을 증가시키기 위하여 여러 성장 인자의 투여를 통하여 골형성을 촉진하려는 시도가 필요하였다. 본 연구에서는 외인성 하이알루론산의 국소적 투여가 골형성 여부에 어떠한 영향을 미치는지 알아보려고 하였으며 골형성 표지 인자로 알려진 Osteocalcin과 Osteonectin의 발현 양상을 평가하였다.

세포외 기질 중 하이알루론산은 1934년 Meyer와 Palmer에 의해 소의 눈에서 처음 발견되었고 음이온의 점액다당류 (glycosaminoglycans ; GAGs)로써 생체 고분자 물질이며 골세포에서도 세포외 기질 중의 하나로 존재하는 것으로 알려져 있다.<sup>24</sup> Maurer와 Hudack<sup>25</sup>은 골절된 장골부의 치유과정에 대한 보고에서 가골 형성 초기단계에 하이알루론산이 다량 합성됨을 보고하였고, 이후 골형성과정에 관련됨을 많은 연구가들이 추론하였으며, Iwata와 Urist<sup>26</sup>는 동종 탈회 피질골 기질을 근육 내 매식 시 2일째에 최대치의 하이알루론산 수치를 보이고, 12일째에 골수가 형성됨을 확인하였다. Sasaki와 Watanabe<sup>27</sup>는 고분자량의 하이알루론산이 백서의 골유도를 촉진하였다고 보고하였고, Piloni와 Bernard<sup>28</sup>는 세포배양을 통한 하이알루론산의 단독 효과를 보고하였으며, Liu 등<sup>29</sup>은 collagen / hyaluronate matrix를 합성하여 쥐의 두개골 결손부에 이식후 활발한 골전도 능력을 나타내었다고 보고하였다. 또한 조직 공학 영역에서 bone-marrow stem cell의 delivery vehicle로써의 하이알루론산 중합체의 유용성이 보고 되기도 하였다.<sup>30,31</sup> 국내에서는 조용민 등<sup>32</sup>이 이러한 하이알루론산의 역할을 세포배양을 통하여 확인하였으며 좋은 결과를 얻었다고 보고하

였다. 그러나 Hunt 등은 골형성시 하이알루론산 단독으로는 작용하지 못한다고 하였으며, 다른 성장인자들을 활성화시키는 기능으로 골형성을 유도한다는 보고를 하기도 하였다.<sup>31,33)</sup>

이처럼 하이알루론산이 골형성에 관여한다는 여러 보고가 있으나 골결손부에 사용하거나 세포배양을 통한 방법이었으며, 신연 골형성술에 대한 연구는 부족하였다. Califano 등은 신연초기에 하이알루론산이 높은 정도로 발현되며, 골형성이 가속화될수록 하이알루론산 분해효소의 활성이 증가하고 이는 mesenchymal cell의 이차적인 촉진과 미세혈관 발달에 기여한다고 하였다<sup>34)</sup> 또한 Cho 등<sup>6)</sup>은 성견의 신연 골형성술시 외인성 하이알루론산 투여가 경화기에 방사선 골밀도의 증가를 가져왔다고 보고 하였으나, 골형성과정에 대한 분자생물학적 연구는 시행하지 않았다. 본 연구에서는 신연 골형성술에서 Osteocalcin과 Osteonectin의 발현 양상을 비교함으로써 신연골 형성 정도를 평가 하였으며, 하이알루론산의 유용성을 알아보려고 하였다.

Osteocalcin은 골의 비교원성 세포의 기질 중 가장 풍부한 물질로 gamma carboxyglutamic acid를 함유한 Vit-K 의존성 단백질이다. 이는 성숙된 조골세포에서 분비되고, 골화 과정에 있어서 새로이 형성된 골부위로 파골세포의 참여를 돕거나 수산화인회석 결정의 성장을 방해하여 골의 석회화를 조절하는 기능을 수행한다고 한다.<sup>35)</sup> 즉 생성된 골이 성숙된 골로 대체될 수 있도록 도우며, 골형성의 활성화를 표현하는 수단으로 볼 수 있다.<sup>14)</sup> 또한 Osteonectin은 칼슘과 수산화인회석에 대한 높은 결합능을 보이며, 골절의 치유 과정 중 가골의 석회화 단계에서 높은 정도로 발현되는 것으로 알려져 있으며, 골치유 과정을 거쳐서 높은 정도로 발현되고 있는 것으로 보고 되었다.<sup>36,37)</sup>

본 연구에서 전반적인 조직의 평가는 H&E 염색으로 이루어졌으며, 술후 3일째 모든 군에서 많은 혈종과 염증세포 침윤을 보이고 있으며, 골형성은 7일째 시작되어 14일째에 많은 골형성을 나타내는 것으로 보였다. 골형성에 있어서 연골내골화와 막내골화의 양상을 모두 관찰할 수가 있었으며, 술후 28일째의 조직 소견은 신연 실험군에서 더 많은 골이 형성된 것으로 나타났다. 이러한 두 가지 골형성의 기전은 Komuro 등<sup>38)</sup>의 보고와 비슷하게 나타났으나, 교원질에 대한 평가가 이루어지지 않았기에 Yasui 등<sup>39)</sup>이 언급한 연골부에서 모세혈관의 침투 없이 직접 골화가 일어난다는 transchondroid bone formation은 알 수 없었다. 신연 실험군의 술후 7일과 14일 소견에서 골형성은 신연 대조군보다 적었지만 연골조직의 분포가 많이 나타났다는 것은 본 연구에서 하이알루론산이 연골내골화에 의한 골화과정을 촉진하여 술후 28일에 전체적인 골형성부를 증가시켰다고 볼 수도 있다. 하지만 일반적으로 막내골화과정이 주된 골화과정으로 받아들여지고 있으며 이러한 골화과정은 실험 조건에 따라 나타나는 현상이라고 볼 수 있다. 또한 본 연구에서 연골성 부위에서는 Osteocalcin과 Osteonectin이 발현되지 않았다는 것이 최종 골형성에 있어서는 막내골화가 주된 골화과정으로 나타났다고 미루어 볼 수 있겠다.

본 연구에서 하이알루론산 투여가 비투여한 경우보다 더 많은 골형성을 보였다는 Cho 등<sup>6)</sup>의 조직학적인 결과와 마찬가지로 H&E 염색상 술후 28일에 좀 더 많은 골을 형성하는 것으로 보였다. 그러나 골형성의 활성 정도를 나타내는 Osteocalcin과 Osteonectin의 면역조직화학 소견에 있어서 활성도 자체는 그다지 차이가 나지 않으며, RT-PCR analysis에서만 술후 7일에 Osteonectin의 발현상이 하이알루론산 투여군에서 차이가 크다는 것을 보여주고 있다. 따라서 하이알루론산의 투여가 신연 골형성술에 있어서 신연기에 작용하여 최종 골화를 증가 시킨 것이라고 사료된다.

신연군의 Osteocalcin과 Osteonectin의 발현 양상이 단순 골절단의 경우보다 많은 부위에서 발현이 나타났으며, 이는 골형성이 활발한 상태에 이들의 발현이 증가한다는 Sato 등<sup>14)</sup>의 보고와 일치하는 결과로 본 연구에서 이들을 골활성의 표지인자로 평가함에 있어 정당성을 보여주고 있는 바이다.

하지만 세가지 고려해야 할 사항이 있다. 첫 번째는 조직소견상 실험군에서 최종 골형성을 많이 이루고 있음에도 불구하고 면역조직화학염색상 신연 실험군과 신연 대조군 간에 큰 차이가 없다는 점이며, 하이알루론산의 투여가 막내골화에 있어서는 그리 효과적이지 못하다는 것이다. 또한 Osteocalcin과 Osteonectin의 발현이 연골성 부위에서는 발현이 되지 않았다는 것과 연관하여 연골내골화 부위에 대한 하이알루론산의 효과를 입증하기에는 불충분하다는 문제점이 있다. Knudson과 Toole<sup>40)</sup>에 따르면 연골부에서 간세포의 분화를 촉진하는 세포 축적의 기시작용에 하이알루론산이 기여한다고 하였고, Boskey 등<sup>41)</sup>은 하이알루론산과 같은 undersulfated proteoglycan이 광화가 빠르게 일어나는 환경을 형성하게 된다고 보고하였으며, 이것이 본 연구 결과에서 연골내골화로 최종 골형성에 기여하지 않았나 사료된다.

두 번째로 외인성 하이알루론산의 국소적 투여시 잔존 시간이다. 골형성시 내인성 하이알루론산의 생산으로 외인성 하이알루론산만의 효과를 입증하기는 어려우며, 신연부에서 잔존량을 평가하기도 어렵다는 것이다. 하지만 고분자량의 높은 점탄성 물질로 상당시간 초기에 다른 성장인자들의 저장소로서의 역할을 어느 정도 수행할 수 있는 가능성이 있다. 또한 최근에는 이러한 하이알루론산의 분해 정도를 조절하기 위하여 여러 가지 합성 방법이 개발되고 있다.<sup>42)</sup>

세 번째로 하이알루론산 투여시기와 투여량에 대한 적합성 여부이다. 골절 치유 단계에 있어서 골형성 시기에 다량의 내인성 하이알루론산이 합성되어 하이알루론산 분해효소의 활성이 증가하며 골화가 진행이 되기 때문이다. 본 연구에서는  $1 \times 10$  mg/ml의 하이알루론산을 사용하였는데, 이것은 단지 골절단시 결손부를 채울 정도를 약간 넘는 양이며, 또한 Cho 등<sup>6)</sup>이 성견에서 사용한 것과 같은 시기, 같은 양을 사용하여 가토에 사용하기에는 과잉투여의 가능성이 있다는 것이다.

## 결 론

가토 24마리를 이용하여 1.4 mm/day의 신연속도로 하루 두 번에 나누어 하악골의 신연 골형성술을 시행함에 있어서 다음과 같은 결과를 얻었다.

신연 골형성술시 연골내골화와 막내골화의 과정이 모두 관찰되었으며, 단순 골질의 치유와 신연 골형성술시의 Osteocalcin과 Osteonectin의 발현을 면역조직화학염색과 RT-PCR analysis를 통하여 비교함으로써 이들의 발현 양상이 증가함에 따라 신연부의 골형성이 활발히 진행됨을 관찰하였다. 또한 외인성 하이알루론산의 국소적 투여가 면역화학염색에서 Osteonectin의 발현에는 차이를 보이지 않으나 경화기 초에 해당하는 술후 14일에 Osteocalcin의 발현에 증가를 보이고 있으며, RT-PCR analysis에서는 Osteocalcin의 발현에는 차이를 보이지 않으나 신연기에 해당하는 술후 7일에 Osteonectin의 발현이 증가되는 소견을 보였다. 이는 외인성 하이알루론산의 국소적 투여가 신연기와 경화기 초의 골화과정을 촉진하여 술후 28일의 최종 골형성에 증가를 나타낸 것으로 사료된다.

하이알루론산의 투여 여부에 따른 Osteocalcin과 Osteonectin의 발현의 차이는 미비하였으나 최종골 형성에는 차이가 있는 것을 관찰할 수 있었다. 외인성 하이알루론산의 골형성 촉진에 대한 효과를 증명하기에는 Osteocalcin과 Osteonectin 같은 골형성 표지 인자들의 발현 양상에 있어서 차이가 크지 않다 하더라도, 다른 성장인자들 (growth factors)이나 새로운 매식체들의 운반체로서의 기능을 통하여 신연 골형성술에 있어서 경화기를 단축시킬 수 있는 좋은 결과를 얻을 수 있으리라 판단되며, 신연기 투여나 투여량의 변화 등 다양한 실험 조건을 통하여 하이알루론산의 골형성 촉진에 대한 추가적인 연구가 필요하리라 사료된다.

## 참고문헌

1. Schendel SA, Epker BN. Result after mandibular advancement surgery: an analysis of 87 cases. *J Oral Surg* 1980 ; 38 : 265-282
2. Cope JB, Samchukov ML, Cherkashin AM. Mandibular distraction osteogenesis: A historic perspective and future directions. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1999 ; 115 : 448-460
3. 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 Rel Res* 1989 ; 238 : 249-281
4. Snyder CC, Levine GA, Swanson HM, Browne EZ. Mandibular lengthening by gradual distraction. *Plast Reconstr Surg* 1973 ; 51 : 506-508
5. McCarthy JG, Schreiber J, Karp NS, Thorne CH, Grayson BH. Lengthening the human mandible by gradual distraction. *Plast Reconstr Sug* 1992 ; 89 : 1-10
6. Cho BC, Park JW, Baik BS, Kwon IC, Kim IS. The role of hyaluronic acid, chitosan, and calcium sulfate and their combined effect on early bony consolidation in distraction osteogenesis of a canine model. *J Craniofac Surg* 2002 ; 13 : 783-793
7. Weinzweig J, Baker SB, Mackay GJ, Whitaker LA, Bartlett SP. Immediate versus delayed midface distraction in a primate model using a new intraoral internal device. *Plast Reconstr Surg* 2002 ; 109 : 1600-1610
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 Rel Res* 1989 ; 239 : 263-285
9. Ilizarov GA. Clinical application of the tension-stress effect for limb lengthening. *Clin Orthop Rel Res* 1990 ; 250 : 8-26
10. Costantino PD, Shybut G, Fiedeman CD, Pelzer HJ, Masini M, Shindo ML, Sisson GA Sr. Segmental mandibular regeneration by distraction osteogenesis. An experimental study. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1990 ; 116 : 535-545
11. Karp NS, Thorne CHM, McCarthy JG. Bone lengthening in the craniofacial skeleton. *Ann Plastic Surg* 1990 ; 24 : 231-237
12. Mehrara BJ, Rowe NM, Steinbrech DS, Dudziak ME, Saadeh PB, McCarthy JG. Rat

- mandibular distraction osteogenesis: Part II. Molecular analysis of transforming growth factor beta1 and osteocalcin gene expression. *Plast Reconstr Surg* 1999 ; 103 : 536-547
13. Sato M, Ochi T, Nakase T, Hirota S, Kitamura Y, Nomura S et al. Mechanical tension-stress induces expression of bone morphogenetic protein(BMP)-2 and BMP-4, but not BMP-6, BMP-7, and GDF-5 mRNA, during distraction osteogenesis. *J Bone Miner Res* 1999 ; 14 : 1084-1095
  14. Sato M, Yasui N, Nakase T, Kawahata H, Sugimoto M, Hirota S et al. Expression of bone matrix proteins mRNA during distraction osteogenesis. *J Bone Miner Res* 1998 ; 13 : 1221-1231
  15. Meyer U, Meyer T, Vossians J, Joos U. Decreased expression of osteocalcin and osteonectin in relation to high strains and decreased mineralization in mandibular distraction osteogenesis. *J CranioMaxillofac Surg* 1999 ; 27 : 222-227
  16. Toole BP, Jackson G, Gross J. Hyaluronate in morphogenesis in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1972 ; 69 : 1384-1386
  17. Toole BP. Hyaluronate and hyaluronidase in morphogenesis and differentiation. *Am Zool* 1973 ; 13 : 1061-1065
  18. Toole BP. Proteoglycans and hyaluronan in morphogenesis and differentiation. In : Hay ED(ed) *Cell biology of extracellular matrix*. New York, Plenum Press, 1991
  19. Yanagashita M. Function of proteoglycans in extracellular matrix. *Acta Pathol Jpn* 1993 ; 43 : 283-293
  20. Fink B, Neuen-Jacob E, Lehmann J, Francke A, Ruther W. Changes in canine peripheral nerves during experimental callus distraction. *Clin Orthop* 2000 ; 376 : 252-267
  21. Castano FJ, Troulis MJ, Glowacki J, Kaban LB, Yates KE. Proliferation of masseter myocytes after distraction osteogenesis of the porcine mandible. *J Oral Maxillofac Surg* 2001 ; 59 : 302-307
  22. Hayatsu K, De Deyne PG. Muscle adaptation during distraction osteogenesis in skeletally immature and mature rabbits. *J Orthop Res* 2001 ; 19 : 897-905
  23. Kruse-Losler B, Meyer U, Floren C, Joos U. Influence of distraction rates on the temporomandibular joint position and cartilage morphology in a rabbit model of mandibular lengthening. *J Oral Maxillofac Surg*. 2001 ; 59 : 1452-1459
  24. Meyer K, Palmer JW. The polysaccharide of the vitreous humor. *J Biol Chem* 1934 ; 107 :



25. Maurer PH, Hudack SS. The isolation of hyaluronic acid from callus tissue of early healing. *Arch Biochem Biophys* 1952 ; 38 : 49-53
26. Iwata H, Urist MR. Hyaluronic acid production and removal during bone morphogenesis in implants of bone matrix in rats. *Clin Orthop Rel Res* 1973 ; 90 : 236-245
27. Sasaki T, Watanabe C. Stimulation of osteoinduction in bone wound healing by high molecular hyaluronic acid. *Bone* 1995 ; 16 : 9-15
28. Pilloni A, Bernard GW. The effect of hyaluronan on mouse intramembranous osteogenesis in vitro. *Cell Tissue Res* 1998 ; 294 : 323-333
29. Liu SS, Thompson AY, Heidaran MA, Poser JW, Spiro RC. An osteoconductive collagen / hyaluronate matrix for bone regeneration. *Biomaterials* 1999 ; 20 : 1097-1108
30. Radice M, Brun P, Cortivo R, Scapinelli R, Battaliard C, Abatangelo G. Hyaluronan-based biopolymers as delivery vehicles for bone marrow derived mesenchymal progenitors. *J Biomed Mater Res* 2000 ; 50 : 101-109
31. Lisignoli G, Zini N, Remiddi G, Piacentini A, Puggioli A, Trimarchi C, Fini M, Maraldi NM, Facchini A. Basic fibroblast growth factor enhances in vitro mineralization of rat bone marrow stromal cells grown on non-woven hyaluronic acid based polymer scaffold. *Biomaterials* 2001 ; 22 : 2095-2105
32. 조용민, 민승기, 김수남, 유용욱. 히알루론산이 골 형성에 미치는 영향에 관한 실험적 연구. *대한구강악안면외과학회지* 2002 ; 28 : 216-225
33. Hunt DR, Jovanovic SA, Wikesjo UME, Wozney JM, Bernard GW. Hyaluronan supports recombinant human bone morphogenetic protein-2 induced bone reconstruction of advanced alveolar ridge defects in dogs. A pilot study. *J Periodontol* 2001 ; 72 : 651-658
34. Califano L, Cortese A, Zupi A, Tajana G. Mandibular lengthening by external distraction: an experimental study in the rabbit. *J Oral Maxillofac Surg* 1994 ; 52 : 1179-1183
35. Desbois C, Karsenty G. Osteocalcin cluster. Implications for functional studies. *J Cell Biochem* 1995 ; 57 : 379-383
36. Hiltunen A, Aro HT, Vuorio E. Regulation of extracellular matrix genes during fracture healing in mice. *Clin Orthop Rel Res* 1993 ; 297 : 23-27
37. Hirakawa K, Hirota S, Ikeda T, Yamaguchi A, Takemura T, Nagoshi J, Yoshiki S, Suda T, Kitamura Y, Nomura S. Localization of the mRNA for bone matrix proteins during

fracture healing as determined by in situ hybridization. *J Bone Miner Res* 1994 ; 9 : 1551-1557

38. Komuro Y, Takato T, Harii K, Yonemara Y. The histologic analysis of distraction osteogenesis of the mandible in rabbits. *Plast Reconstr Surg* 1994 ; 94 : 152-159
39. Yasui N, Sato M, Ochi T, Kimura T, Kawahata H, Kitamura Y, Nomura S. Three modes of ossification during distraction osteogenesis in the rat. *J Bone Joint Surg Br.* 1997 ; 79 : 824-830
40. Knudson CB, Toole BP. Changes in the pericellular matrix during differentiation of limb bud mesoderm. *Dev Biol* 1985 ; 112 : 308-318
41. Boskey AL, Maresca M, Wikstrom B, Hjerpe A. Hydroxyapatite formation in the presence of proteoglycans of reduced sulfate content: studies in the brachymorphic mouse. *Calcif Tissue Int* 1991 ; 49 : 389-393
42. Baier Leach J, Bivens KA, Patrick Jr CW, Schmidt CE. Photocrosslinked hyaluronic acid hydrogels : Natural, Biodegradable tissue engineering scaffolds. *Biotechnol Bioeng* 2003 ; 82 : 578-589

Table 1. Polymerase chain-reaction primer information

Gene	bp	Sense primer	Antisense primer
Osteocalcin	678	GACACCATGAGGACCCTCTC	GGCTCCAGGGGATCTGGG
Osteonectin	291	CTCCACCTGGACTACATCG	GCTGGCCAAACTGCCAGTG

Table 2. The expression of osteocalcin in mandibular distraction area

Group	3day	7day	14day	28day
A group	0	+	++	++
B group	0	+	+	++
C group	0	+	+	++

Table 3. The expression of osteonectin in mandibular distraction area

Group	3day	7day	14day	28day
A group	0	+	+	++
B group	0	+	+	++
C group	0	+	+	++

# 논문사진부도

Fig. 1. Rabbit's mandible and distraction design of the model. Arrow describes the osteotomy lines.

Fig. 2. Custom-made distraction device.

Fig. 3. Hyaluronic acid (Hyruan, LGCI, Seoul, Korea).

Fig. 4. Surgical procedures.

a. Osteotomy was performed anterior to the premolar and posterior to the mental foramen (arrow : mental nerve, arrow head : osteotomy line).

b. Distraction device was fixed to the mandibular body.

Fig. 5. Extraoral photographs demonstrating mandibular distraction.

a. Prior to distraction, normal occlusion.

b. After distraction, severe cross-bite.

c. After distraction, severe attrition of lower incisors (arrow).

Fig. 6. Bone regeneration photographs of each group in post-op 28 days.

a. normal control group (arrow : excessive bone tissue).

b. distraction control group.

c. distraction experimental group.

Fig. 7. Radiologic findings.

Distraction gap was described with arrow. Osteotomy line was radiolucent in all group of post-op 3 days and 7 days. Distraction gap was filled with radiopacity from post-op 14 days.

Fig. 8. Histologic findings (H&E stain).

a. osteotomy line was filled with hematoma and inflammatory tissue in post-op 3 days. Normal control and distraction experimental group was similar to distraction control group.

b. Arrow described the cartilagenous tissue and arrow head described the bone formation in distraction control group of post-op 7 days.

c. Arrow described the cartilagenous tissue and arrow head described the bone formation in distraction experimental group of post-op 7 days.

d. Normal control group of post-op 14 days described the complete healing with new bone and arrow described the trabecular bone formation.

e. Arrow described the new vessels and arrow head described the trabecular bone formation in distraction control group of post-op 14 days.

f. The cartilagenous tissue (arrow head) still remained and fibrosis (arrow) was seen in distraction experimental group of post-op 14 days. But bone formation was similar to

distraction control group of post-op 14 days.

g, h, i. Post-op 28 days. The gap was filled with new bone and distraction experimental group showed more bone formation than normal and distraction control group.

Fig. 9. Immunohistochemical expression of osteocalcin in post-op 3, 7, 14, and 28 days.

Arrow described the expression of osteocalcin. Osteocalcin was detected in new bone formation area (osteoid) and cell cytoplasm. Distraction experimental group of post-op 14 days showed more expression than normal and distraction control of post-op 14 days. All group showed ++ expression in post-op 28 days.

Fig. 10. Immunohistochemical expression of osteonectin in post-op 3, 7, 14, and 28 days.

Arrow described the expression of osteonectin. Each group didn't show the expression of osteonectin in post-op 3 days and it had no difference in the extent of expression.

Fig. 11. RT-PCR analysis in osteocalcin of post-op 3, 7, 14, and 28 days.

Osteocalcin expression had no difference in distraction control and experimental group. It was not expressed in normal control of post-op 28days.

Fig. 12. RT-PCR analysis in osteonectin of post-op 3, 7, 14, and 28 days.

Osteonectin expression didn't appear in each group at post-op 3 days. In post-op 7 days, the expression of osteonectin in distraction experimental group was higher than that in normal and distraction control group.

Fig. 13. Expression of  $\beta$ -actin.

Sequence: ATCGTGGGCCGCCCTAGGCA, TGGCCTTAGGGTTCAGAGGGG, bp(293)