

A-2. 골형성단백질 플라스미드 유전자를 이용한 골조직 재생에 관한 연구

설양조^{1,2}, 이용무¹, 구 영¹, 류인철¹, 이영규², 한수부¹, 정종평¹

¹서울대학교 치과대학 치주과학교실

²성균관대학교 의과대학 삼성서울병원 치과진료부 치주과

연구 배경

이 연구의 목적은 세포매개 유전자전달법과 플라스미드유전자 직접전달법을 통해 골형성단백질-2 (BMP-2) 플라스미드 유전자가 골조직 재생에 응용될 수 있는지 알아보는 것이다.

연구방법 및 재료

pcDNA3.1 플라스미드 벡터 내부에 골형성단백질-2 유전자를 삽입시켜 BMP-2/pcDNA3.1 플라스미드 유전자를 만들고, 이 플라스미드 유전자를 대장균(DH5 α)을 이용하여 대량으로 복제하였다. 먼저, 세포매개 유전자 전달법에 관한 연구를 하였다. 생쥐의 골수기질세포 (Bone marrow stromal cell, W-20-17 세포 주)를 배양하여 리포펙션 방법을 통해 준비한 플라스미드 유전자를 세포내에 트랜스펙션 시켰다. 트랜스펙션된 세포에서 이 플라스미드가 어디에 위치하고 있는지를 confocal laser scanning microscope을 통해 관찰하였다. 트랜스펙션시킨 세포들을 배양한 액을 수집하여 배양액 내에 골형성단백질-2가 분비되었는지를 알아보았다. 또, 수집한 배양액을 트랜스펙션되지 않은 골수기질세포의 배양액으로 이용하여 이 세포들의 염기성인산화효소 활성화와 오스테오칼신의 분비에 어떤 영향을 끼치는지를 알아 보았다. 다음에는 플라스미드를 직접 전달하는 방법에 관한 연구를 가토를 이용하여 실험하였다. BMP-2/pcDNA3.1 플라스미드 유전자를 콜라겐 지지체에 삽입시키고, 플라스미드가 콜라겐에서 유리되는 양상을 관찰하였다. 가토의 두개골에 지름10 mm의 원형골결손부를 형성하고 플라스미드-콜라겐 복합체 (실험군)와 콜라겐 (대조군)을 각각 이식하였다. 유전자의 발현을 알아보기 위하여 수술 2 주 후에 수술부위의 육아조직을 채취하고, 골형성단백질-2 유전자의 mRNA를 분리하여 역전사효소-중합효소연쇄반응을 시키고 젤 전기영동을 하였다. 수술 4주, 8주 후에 각각 실험동물의 두개골 수술부위를 절제하여 표본을 제작한 후, 광학현미경하에서 신생 골조직을 관찰하였고, 신생 골조직의 면적을 측정하여 실험군과 대조군을 비교하였다.

연구결과

세포매개유전자 전달법 연구에서 트랜스펙션된 세포내에서 전달된 유전자는 세포의 핵내에 위치하고 있었다. 트랜스펙션된 세포에서 4일째에 분비된 골형성단백질-2의 양은 트랜스펙션되지 않은 세포에서보다 유의성 있게 많았다. 또, 수집된 배양액내의 골형성단백질-2는 트랜스펙션되지 않은 세포의 염기성인산화효소 (3일)와 오스테오칼신의 발현 (7일, 14일)을 유의성 있게 증가시켰다. 플라스미드유전자 직접전달법 연구에서 플라스미드-콜라겐 복합체에서 플라스미드는 28일째까지 지속적으로 유리

되었고, 유리된 플라스미드는 원형을 유지하고 있음을 전기영동을 통해 확인하였다. 수술 받은 가토의 2주 후 두개골 육아조직에서 골형성단백질-2 유전자 mRNA의 발현을 확인하였다. 4주와 8주 후, 실험군에서는 새로 형성된 골조직의 양이 대조군에서보다 유의하게 많았다. ($p < 0.01$)

결론

세포매개 유전자전달법 연구에서 BMP-2/pcDNA3.1 플라스미드 유전자를 골수기질세포에 리포펙션 방법으로 전달한 결과, 골수기질세포의 골형성단백질-2 분비를 유의성 있게 증가시켰고, 이 단백질은 트랜스펙션되지 않은 골수기질세포가 골모세포로 분화되도록 영향을 미쳤다. 플라스미드유전자 직접전달법에서 BMP-2/pcDNA3.1 플라스미드 유전자를 콜라겐에 함입시켜 가토 두개골 결손부에 적용한 결과 신생 골조직의 양을 유의성 있게 증가시켰다. 이상의 결과로 BMP-2/pcDNA3.1 플라스미드 유전자는 골조직 재생 치료의 수단으로서 가능성을 보였다.