

# 사람 치조골세포의 배양에 관한 연구

최병호 · 박진형 · 유재하

연세대학교 치과대학 구강악안면외과학교실 (원주기독병원)

## Abstract

### A STUDY ON A CULTURE OF HUMAN ALVEOLAR BONE CELLS

Byung-Ho Choi, Jin-Hyung Park, Jae-Ha Yoo

Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, College of Dentistry, Yonsei University

Human alveolar bone cells were isolated from alveolar bone fragments obtained from normal individual undergoing third molar extractions. Alveolar bone fragments were cultured as explant. Cells began to migrate in the first 5~7 day and were confluent in 5~7 week. Matrix mineralization was observed by 4 week. Our studies utilize established protocols for the characterization of these cells as osteoblasts by means of alkaline phosphatase activity determination, identification of osteocalcin antigens, establishing the presence of cells expressing type I collagen and determining the ability of cells to produce calcification. Transmission electron microscopic observations confirmed the presence of a collagen matrix undergoing a mineralization process. This new model, using human alveolar bone cells, may provide a tool to investigate alveolar bone development and physiology and to set up new therapeutic approaches.

**Key words** : Osteoblast, Culture, Alveolar bone

## I. 서 론

자가조직이식이 생물학적으로 가장 이상적이라 할 수 있겠으나 여러 제한점이 동반된다. 예를들면 자가골 채취시 부가적인 수술이 필요하고 채취할 수 있는 골의 양이 한정되어 있는 단점이 있다. 따라서 합성물질이나 동종조직이 문제점이 있지만 현재 많이 사용되고 있는 형편이다. 작은 크기의 골은 구강내에서 쉽게 채취할 수 있다. 특히 치조골은 발치 또는 치주수술 또는 인공치아매식시 공여부에 큰 합병증없이 얻을 수 있다. 만약 이 치조골을 조금 채취하여 세포배양을 통해 다량의 치조골을 만들 수 있다면 자가골 이식의 문제점이 극복될 수 있다고 본다.

치조골은 치아가 존재하지 않으면 소실되어 버리는 골로써 다른 부위의 골과는 다른 특성을 가지고 있다<sup>1)</sup>. 그러므로 치과영역에서 골세포를 이용한 연구나 골이식에 골세포를 사용할 경우 치조골세포를 이용하는 것이 바람직하다고 본다. 지금까지 골세포는 주로 쥐의 골세포를 배양하여 실험에 이용하여 왔으며 사람의 골세포를 배양하여 이용하기 시작한 것은 오래되지 않았다<sup>2)</sup>. 사람 골세포를 이용한 골세포배양은 대부분 두개골, 골반골, 혹은 장골을 사용하여 왔다<sup>3,4)</sup>. 특히 사람의 치조골세포를 배양하

여 실험에 이용한 논문은 매우 적다<sup>5)</sup>. 우리나라에서는 지금까지 사람의 치조골세포의 배양에 관한 문헌보고는 없었다. 저자들은 환자의 구강내에서 얻은 소량의 치조골을 실험실에서 배양하여 치조골세포를 얻는데 성공하여 그 배양방법과 치조골세포의 특성에 관하여 보고하고자 한다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 치조골세포의 일차배양

실험에 사용한 골편은 본 병원 외래에서 매복치발치시 0.5cm×0.3cm×0.1cm 의 크기의 치조골편을 채취하여 사용하였다. 치조골편을 채취한 환자는 연령이 18~34세 였으며 골대사질환이 없었다. 채취한 골편은 즉시 Dulbecco's Minimum Essential Medium (DMEM)에 넣어 실험실로 운반하였다. 5%의 항생제용액이 첨가된 DMEM으로 3회 세척한 후 잘게 잘랐다. 이 골조각들을 25cm<sup>2</sup> 배양용기 바닥에 위치시켰다. 배양액은 DMEM을 기초 배지로 하여 여기에 20% 우태혈청 (Gibco, NY, USA), 10 ml/L non essential amino acid, 10 ml/L sodium pyruvate, 10 ml/L vitamin, 10 ml/L antibiotic (Gibco, NY, USA)를 첨가한 것을 사용하였다. 배양 조건은 37°C, 5% CO<sub>2</sub>가 섞인 실내공기를 사용하였으며, 7일후 부터 배양액을 2~3일 간격으로 교환공급하였다. 전도광학현미경으로 세포증식을 관찰하였다.

최 병 호

강원도 원주시 일산동 162

연세대학교 원주의과대학 구강악안면외과

Byung-Ho Choi

Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, Wonju Christian Hospital, Yonsei Univ.

162, Il-san-Dong, Wonju, Kangwon-Do, South Korea

Tel. 82-33-741-1430 Fax. 82-33-748-2025

\* 이 논문은 1999년도 연세대학교 학술연구비의 지원에 의하여 이루어진 것임.

## 2. 치조골세포의 특성분석

골편에서 증식되어 나온 세포들이 합류를 이루면 이를 트립신 처리하여 계대배양하였다. 계대배양한 세포들이 합류를 이루면 다시 계대배양을 시행하였다. 2차 계대배양시  $1 \times 10^5$ /ml 세포수를 24wells에 접종하여 1주일간 배양후 alkaline phosphatase 분석, 제 I형 콜라겐 분석, osteocalcin 분석으로 치조골세포의 특성을 분석하였다. 2주간 배양후 Von Kossa 염색과 전자현미경관찰을 시행하였다. 이때 사용한 배지는 위의 배지성분에  $50 \mu\text{g/ml}$  ascorbic acid,  $10 \text{ nM}$  dexamethasone,  $10 \text{ mM}$   $\beta$ -glycerophosphate (Sigma Chemical Co., USA)를 첨가하였다.

### (1) Alkaline phosphatase 분석

Alkaline phosphatase assay kit (86-C, Sigma Diagnostics, St. Louis, MO, USA)를 사용하여 분석하였다. 25ml citrate 용액에 65ml acetone과 8ml의 formaldehyde를 첨가하여 고정액을 만들어 세포를 고정한 후 증류수로 세척하였다. 0.25ml sodium nitrate 용액과 0.25ml fast red-violet alkaline phosphatase 용액과 11.25ml naphthol phosphate를 혼합하여 alkaline phosphatase 염색용액을 만들어 염색한 후 hematoxylin 용액으로 다시 염색하였다. 세척후 공기중에서 건조시킨 후 현미경으로 alkaline phosphatase 염색을 관찰하였다.

### (2) 제 I형 콜라겐 분석

70% 에탄올로 세포를 고정한 후 공기중에서 건조시키고 염소혈청으로 실온에서 30분간 배양기에 넣어 두었다. Collagen-I-antibody (Southern Biotechnology Ass)를 첨가하여 1시간 둔 후 2차항체를 처리하였다. 이어서 hydrochinon/silver-acetate로 처리하고 hematoxylineosine으로 염색하였다.

### (3) Osteocalcin 분석

세포배양에 사용한 배지에서 osteocalcin 량을 측정하였다. 상품으로 나온 immunoassay kit (DAKO Osteocalcin Elisa, Denmark)를 사용하였다.

### (4) Von Kossa 염색

2주배양한 세포를 이용하여 Von Kossa 방법 (Mailhot-Bancroft)으로 무기질형성능력을 검사하였다. 세포를 먼저 10% 포르말린으로 고정하고 이어서 2.5% silver nitrate 용액에 30분간 둔 후 증류수로 세척하고 sodium carbonate formaldehyde로 처리하였다. 세척하고 건조시킨 후 무기질형성을 관찰하였다.

### (5) 전자현미경 (transmission electron microscopy) 관찰

배양접시에서 2주간 배양후 2.5% glutaraldehyde로 고정하여 완충액(buffer solution)으로 세척한 다음 2% osmium tetroxide로 후고정하였다. 알콜농도를 높이면서 탈수후, epon 액을 첨가한 상태에서  $60^\circ\text{C}$  항온기에서 2일간 경화시켜 포매를 시행하였다. 증식된 세포면에 수직으로 70nm의 두께로 절단하고 uranyl acetate와 lead citrate로 염색한 후 전자현미경으로 관찰하였다.

## III. 결 과

치조골에서 채취한 골편으로 치조골세포를 효과적으로 배양시킬 수 있었다. 골편이 바닥에 안정되게 위치시킬 경우 증식하는 세포들이 초기부착하는데 문제점이 없었다. 치조골편에서 단일세포들이 5~7일째 증식을 시작하여 골편을 중심으로 주변으로 자라나가는 것이 관찰되었으며, 5~7주후에는 배양용기의 바닥 전체가 세포로 덮였다. 2주경에는 일부분에서 검은 물질의 반점이 관찰되기 시작하였다 (Fig. 1). DMEM을 기본배지로 하여 20% 우태혈청, 10 ml/L non essential amino acid, 10 ml/L sodium

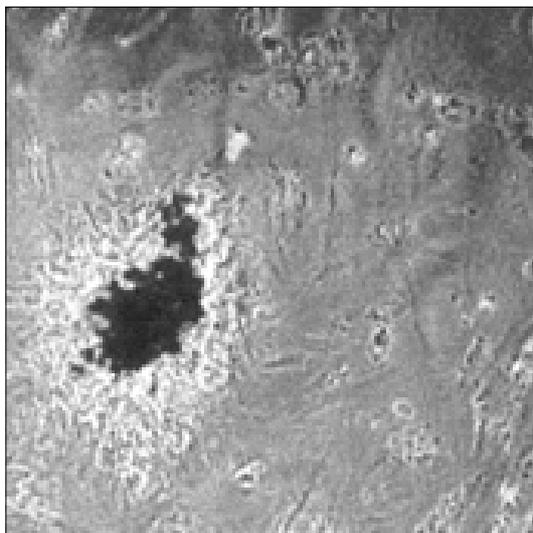


Fig. 1. 증식된 치조골세포의 모습과 검은 물질의 반점을 보여 줌.

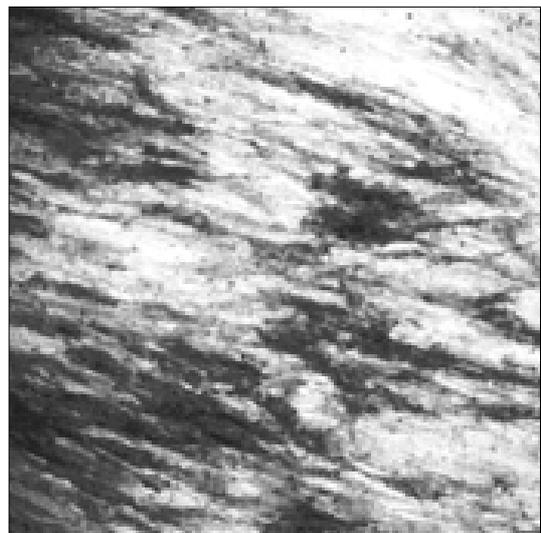


Fig. 2. Alkaline phosphatase염색결과 양성반응을 보여 줌.

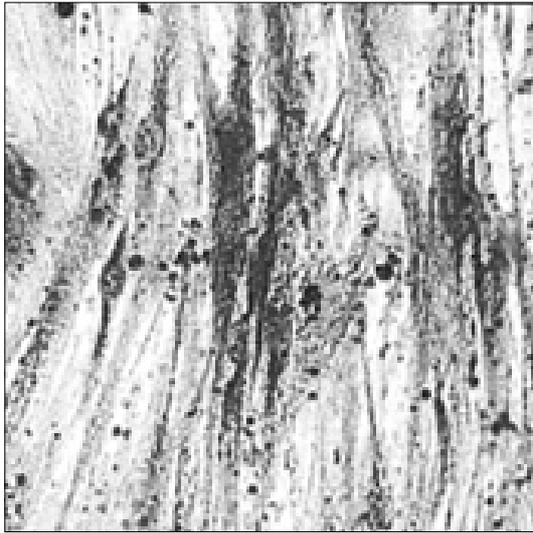


Fig. 3. 제 I 형 콜라겐검사에서 양성반응을 보여줌.

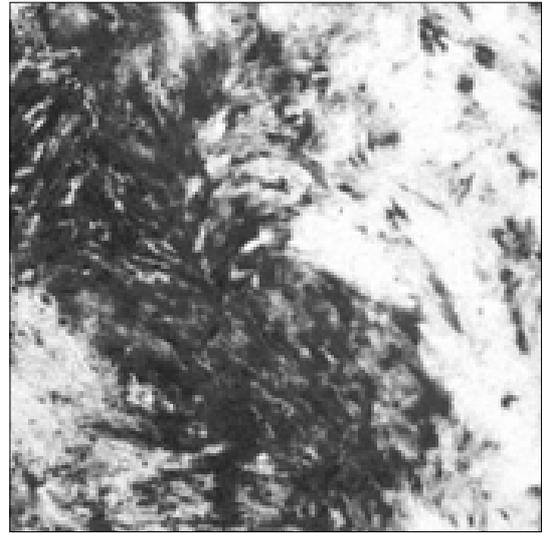


Fig. 4. Von Kossa염색에서 양성반응을 보여줌.

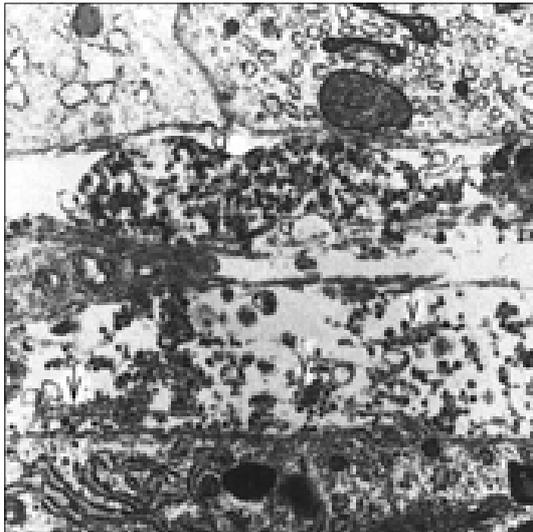


Fig. 5. 치조골세포의 전자현미경 모습 (×8000).  
↑ 콜라겐섬유

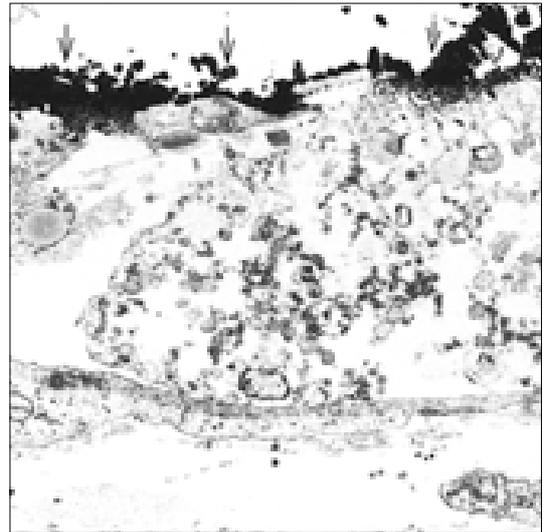


Fig. 6. 무기질침착을 보여주는 전자현미경 모습 (×8000).  
↑ 무기질

pyruvate, 10 ml/L vitamin, 10 ml/L antibiotic을 첨가한 배지가 세포들을 증식시키는데 어려움이 없었고 또한 트립신으로 처리하여 계대배양하는데도 어려움이 없었다. 또한 이들 배지에 50 $\mu$ g/ml ascorbic acid, 10 nM dexamethasone, 10 mM  $\beta$ -glycerophosphate를 첨가한 배지가 무기질 형성을 도와 주었다.

치조골편에서 증식된 세포의 특성을 alkaline phosphatase 분석, osteocalcin 분석, 제 I형 콜라겐 분석, Von Kossa 염색으로 시행하였다. alkaline phosphatase 염색에서 치조골편에서 증식된 세포들이 보라빛으로 염색되어 양성반응을 보였다 (Fig. 2). 비콜라겐성 골단백질의 약 20%를 구성하고 있는 osteocalcin의 검사에서 치조골편에서 증식된 세포들에서 osteocalcin이 검출되었고 평균 7.7g/l의 량을 분비하였다. 골기질 단백질의 약 90%이상을 구성하고 있는 제 I 형 콜라겐에 대한 검사에서 거의 모든 세포들이

양성반응을 보였다 (Fig. 3). 무기질결절 생성능력을 검사한 Von Kossa 염색에서 다양한 정도의 석회화된 부위를 보였다. 즉, 국소적으로 석회화된 부위를 보이거나 또는 광범위하게 석회화된 양상을 보였다 (Fig. 4). 전자현미경으로 관찰한 결과 여러층의 세포들을 보였고 세포들은 많은 rough endoplasmic reticulum과 Golgi를 가지고 있었고 콜라겐섬유를 분비하였다. 이들 콜라겐섬유는 특정한 방향이 없이 배열되어 있었다 (Fig. 5). 세포표면에는 기포 (vesicles)와 무기질형성이 관찰되었다 (Fig. 6).

#### IV. 고 찰

골세포를 배양하여 실험한 논문들은 대부분 쥐의 두개(cranium)에서 얻은 골세포를 이용하거나 또는 정형외과분야에서 채

취한 사람의 골세포를 이용하였다<sup>24)</sup>. 그러나 이들 세포들은 채취에 어려움이 있고 골의 기원에 있어서도 차이가 있고 세포의 생리에도 차이가 있을 수 있다. 골의 특성은 골이 처한 환경에 따라 변한다는 사실은 잘 알려져 있다<sup>1)</sup>. 그래서 본 연구에서는 치조골에서 골세포를 배양하고자 하였으며 그 골세포의 특성을 밝히고자 하였다. 치과영역의 연구에서 치조골세포를 이용하므로써 더 적합한 실험모형을 제시하게 된다. 골세포를 분리, 배양하는 방법으로 많은 저자들이 골세포를 골편에서 유리해 내기 위해서 콜라겐분리효소를 사용하였다<sup>25)</sup>. 그러나 본 연구에서는 효소처리없이 채취한 골편에서 바로 골세포를 배양하였다. 치조골에서 채취한 골편에서 골세포가 증식되어 나오는 것을 전도현미경으로 관찰할 수 있었다. 즉, 치조골편은 치조골세포의 배양을 위한 근원으로 역할을 하였다. 콜라겐분리효소를 사용할 경우 세포들이 초기부착하는데 어려움이 있어 fibrinectin을 배양용기 바닥에 사용한 보고가 있다<sup>26)</sup>. 본 연구에서는 fibrinectin사용없이도 세포들이 초기부착하는데 어려움이 없었다. 골편의 무게로 골편이 바닥에 유지되었고 그 골편에서 증식되어 나오는 세포들로 초기부착이 확보될 수 있었다.

치조골편에서 증식된 세포들은 골세포외에 다른 세포들도 함유되어 있을 수 있다. 또한 배양조건에 따라 세포의 형태 및 특성이 변화될 수 있다. 그리하여 본 연구에서는 치조골에서 배양된 세포들의 특성을 골세포의 표지(marker)로 사용되고 있는 alkaline phosphatase, 제 I 형 콜라겐, osteocalcin, 무기질침착을 조사하여 골세포의 표현형(phenotype)을 가지는지 검사하였다. Osteocalcin은 골기질내에 있는 비콜라겐성 단백질로서 골세포에 의해 주로 생산되며 골에서 비콜라겐성 단백질의 약 20%를 차지한다<sup>27)</sup>. 이들은 섬유아세포나 치주인대세포에 의해서는 생산되지 않고, 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>에 노출되었을 때 골내에서 생산된다<sup>28)</sup>. 본 연구에서 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>를 함유하는 배지에서 배양하였으며 osteocalcin이 생산된 것을 확인할 수 있었다. 이것은 본 실험에서 배양한 세포들이 골세포 표현형을 가지고 있음을 나타낸다.

섬유아세포는 제 III 형 콜라겐을 주로 생성하지만 골기질에서는 제 I 형 콜라겐이 주로 만들어진다. 특히 골장기배양에서 제 I 형 콜라겐만 생성되는 것으로 보고되었다<sup>11)</sup>. 본 실험에서 배양한 세포들이 제 I 형 콜라겐항체를 생성하였다. 골세포는 alkaline phosphatase를 분비해 내는 것으로 알려져 있다. 골세포에서 alkaline phosphatase의 역할은 석회화(calcification)를 억제시키는 무기성 pyrophosphate를 감소시킴으로서 광물질 형성을 위한 phosphate를 공급한다고 알려져 있다<sup>29)</sup>. 본 실험에서 배양한 치조

골세포들이 alkaline phosphatase검사에서 높은 양성반응을 보였고 또한 Von Kossa 검사에서 무기질형성을 관찰할 수 있었다. 2주 배양한 세포에서 전도광학현미경으로 관찰된 검은 반점은 무기질로 추정된다. Von Kossa검사에서 은염색반응(silver staining reaction)은 calcium phosphate를 나타내는데<sup>30)</sup> 이것이 2주간 배양한 세포의 세포외기질에 침착된 것을 전자현미경으로 관찰되었으며, 동시에 콜라겐섬유가 분비된 것이 관찰되었다. 이것은 배양한 세포가 골형성세포임을 나타내 준다.

결론적으로 치조골에서 채취한 골편을 배양하여 골세포를 증식시킬 수 있었으며 이들 세포들은 골아세포의 원형을 나타내었다. 이들 골세포를 치조골과 관련된 생체외실험에 이용하거나 골세포를 이용한 치조골재건에 사용될 수 있다고 생각된다.

### 참고문헌

1. Kasperk C, Wergedal J, Strong D et al. Human bone cell phenotypes differ depending on their skeletal site of origin. *J Clin Endocrinol Metab* 80:2511,1995.
2. Bhargava U, Bar-Lev M, Bellows CG, Aubin JE. Ultrastructural analysis of bone nodules formed in vitro by isolated rat calvaria cells. *Bone* 9:155,1988.
3. Beresford JN, Gallagher JA, Poser JW, Russel RGG. Production of osteocalcin by human bone cells in vitro. Effects of 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, parathyroid hormone, and glucocorticoids. *Metab Bone Dis Related Res* 5:229,1984.
4. Robey PG, Termine JD. Human bone cells in vitro. *Calcif Tissue Int* 37:453,1985.
5. Mailhot JM, Borke JL. An isolation and in vitro culturing method for human intraoral bone cells derived from dental implant preparation sites. *Clin Oral Impl Res* 9:43,1998.
6. Wong G, Cohn DV. Preparation of parathyroid hormone and calcitonine sensitive cells from non-responsive bone cells. *Nature* 252:713,1974.
7. Bellows CG, Aubin JE, Heersche JNM, Antosz ME. Mineralized bone nodules formed in vitro from enzymatically released rat calvaria cell populations. *Calcif Tissue Int* 38:143,1986.
8. Aronow MA, Gerstenfeld LC, Owen TA et al. Factors that promote progressive development of the osteoblast phenotype on cultured fetal rat calvaria cells. *J Cell Physiol* 143:213,1990.
9. Auf' m'kol'k B, Hauschka PV, Schwartz ER. Characterization of human bone cells in culture. *Calcif Tissue Int* 37:228,1985.
10. Price PA, Bankol S. 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> increases serum levels of vitamin K-dependent bone protein. *Bioch Biophys Res Comm* 99:928,1981.
11. Wiestner M, Fisher S, Dessau W, Muller PK. Collagen types synthesized by isolated calvarium cells. *Experim Cell Res* 133:115,1981.
12. Mundy GR. Current concepts: Anatomy, physiology, and function of bone. Kalamazoo, MI: Upjohn Company. 1990, p10-21.