

마우스 골수세포 배양시 transforming growth factor- β 와 epidermal growth factor가 파골세포양세포의 형성에 미치는 영향

단국대학교 치과대학 치과약리학교실 및 구강생화학교실*

임충남·고선일*·김정근*·김세원

목 차

- I. 서 론
- II. 연구대상 및 연구방법
- III. 연구결과
- IV. 고 찰
- V. 결 론
- 참고문헌
- 영문초록

I. 서 론

골조직대사는 조골세포에 의한 골형성과 파골세포에 의한 골흡수과정에 의해 일어나며 골조직은 일생을 통하여 지속적인 성장 및 개조를 나타내는 특징을 갖고 있다. 이중 골흡수를 담당하고 있는 파골세포는 1873년 Kölliker에 의하여 처음으로 보고된 이래 세포의 기원, 미세구조 및 파골세포에 의한 골흡수 기전등에 관하여 많은 연구가 진행되어 왔다^{1,2)}. 파골세포의 기원에 관하여는 많은 논란이 있어 왔으며 parabiosis³⁾, quail-chick nuclear marker⁴⁾ 및 osteopetrotic mouse⁵⁾등을 이용한 여러 실험결과 조골세포와는 다르게 파골세포는 조혈계통의 전구세포로부터 유래되며 단핵전구세포의 융합에 의하여 형성되는 것으로 알려져 있다^{6,7)}. 한편 파골세포는 분리 및 배양이 매우 어려워 파골세포의 기능을 규명하는데 어려움을 겪어왔으며 위의 연구들을 토대로 시험관내에서 파골

세포의 형성을 유도하고자 하는 시도들이 많이 있어 왔다^{8,9)}. 이와 관련하여 병아리 장골의 골내막면을 긁어내어 골수세포를 분리, 배양하는 방법이 시도되고 있으며¹⁰⁾, 이를 다시 gradient centrifugation하거나 nylon membrane에 걸러서 좀 더 순수한 파골세포를 분리하는 방법이 이용되기도 한다¹¹⁾. 그러나 이러한 연구들은 많은 수의 파골세포들을 얻기가 어렵고 파골세포의 분화과정을 연구하는데 어려움이 있어 그 단점을 보완하고자 파골세포 전구세포들이 포함되어 있는 골수세포들을 배양하여 이로부터 파골세포의 특성을 갖는 세포들을 시험관내에서 형성하고자 하는 시도가 있어 왔다. Burger 등⁹⁾은 설치류의 골수세포들을 골조직과 같이 배양하는 경우 골수세포가 파골세포로 분화될 수 있는 가능성을 시사하였으며, 이외에도 고양이, 토끼 및 사람의 골수세포들이 이용되고 있다¹²⁻¹⁴⁾.

한편 골조직의 성장과 개조는 골형성과 골흡수과정에 의하여 조절되며 이러한 골조직대사는 여러 조절인자들에 의하여 영향을 받는다¹⁵⁾. 최근 들어 전신적 호르몬뿐만 아니라 여러 성장인자들도 골조직대사에 매우 중요한 역할을 담당하고 있음이 알려져 있어 골조직대사에 미치는 여러 성장인자에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. 이 중 transforming growth factor(TGF)는 바이러스에 감염된 마우스 종양세포의 조건배지(conditioned media)에서 최초로 발견되었으며¹⁶⁾, 정상세포의 형질을 전환시키는 성질을 가지고 있다¹⁷⁾. TGF는 그 기능상 TGF- α 와 TGF-

β로 구분되고 이 중 TGF-β는 EGF 수용체에 결합하지 않으며, 단독으로는 NRK 세포배양시 세포집락을 형성시키지는 않으나 TGF-α나 EGF가 같이 존재하는 경우 커다란 세포집락을 형성하는 것으로 알려져 있어 EGF가 TGF-β의 기능에 영향을 줄 수 있음을 시사하고 있다¹⁷⁾. 또한 TGF-β는 혈소판 등에서도 많은 양이 발견되나 골조직에 가장 많은 양이 존재함이 알려져 있어 골조직대사에 중요한 기능을 담당하고 있을 것으로 추측된다¹⁸⁾. 골조직대사에 미치는 TGF-β의 영향에 관하여는 매우 다양한 연구결과들이 보고되어 있다. 즉, TGF-β가 조골세포의 세포증식은 억제하나 기능을 촉진시키며¹⁹⁾ 비조골세포인 MC3T3-E1 세포의 경우 그 기능을 감소시킨다는 보고도 있으며²⁰⁾, 분리한 골조직 세포중 조골세포 유사세포군의 증식을 억제시킨다는 여러 상반된 결과들이 알려져 있다²¹⁾. 한편 TGF-β가 파골세포 전구세포의 증식을 억제하고²²⁾, 파골세포의 기능을 억제하는 것으로 알려져 있으나²³⁾ 아직까지 파골세포의 형성과정이나 활성에 미치는 TGF-β의 영향에 관하여는 연구가 미진한 실정이라 할 수 있다. 또한 EGF 자체도 배양중인 골조직의 DNA 합성을 증가시키며 조골세포의 기능을 억제하는 등 골조직에 대해 다양한 영향을 나타낸다²⁴⁾. 이러한 보고들은 TGF-β가 단독으로 골조직대사에 영향을 미칠 수도 있으며 EGF 존재시 또다른 영향을 미칠 수 있는 가능성을 시사한다고 볼 수 있다.

본 연구는 마우스 골수세포 배양시 파골세포양세포의 형성과정과 이에 미치는 몇몇 골지향성 호르몬의 영향을 관찰하고자 하였으며 골수세포 배양시 골조직대사에 다양한 영향을 미치는 것으로 알려진 TGF-β와 EGF를 단독 혹은 복합 첨가한 후 이들이 파골세포양세포의 형성에 미치는 영향을 규명하고자 시행하였다.

II. 연구대상 및 연구방법

1. 마우스 골수세포의 분리 및 배양

생후 7-9주된 웅성 마우스를 경부염전 방법으로 희생시킨 후 대퇴골과 경골을 무균적으로 적출한 다음 부착 연조직을 분리하였다. 각 장골(long bone)의 양 끝을 절단한 후 26G의 주사침을 이용하여 한쪽 끝단부의 절단면을 통하여 골수강에 1 ml의 α-minimum essential medium(α-MEM, Gibco)을 서서히 주사하

여 골수세포를 분리하였다. 분리한 골수세포를 5% fetal bovine serum(FBS, Gibco)이 첨가된 α-MEM으로 2시간동안 전배양하여 섬유아세포와 분화된 대식세포등을 부착시킨 후 부착되지 않은 세포들을 200 x g로 원심분리하여 모은 다음 세포 수를 측정한 후 24-well culture plate(Nunc)에 분주하였다. 각 세포들은 10% FBS가 첨가된 α-MEM으로 8일간 배양하였으며 배양액은 매 3일마다 0.4 ml의 배양액을 교환하여 주었다. 배양시 습도는 95%, 온도는 37℃를 유지하면서 5%의 CO₂를 계속 공급하였으며 파골세포양세포의 형성에 미치는 여러 골지향성 호르몬의 영향을 관찰하기 위하여 배양액내에 PTH(Sigma), PGE₂ (Sigma), 및 Vit. D₃(Biomol)을 배양 첫날부터 각각 첨가하여 배양하였다.

2. 다핵세포 및 tartrate-resistant acid phosphatase(TRAP)-양성 다핵세포의 측정

마우스 골수세포 배양시 다핵세포의 형성 및 이에 미치는 골지향성 호르몬의 영향을 평가하기 위하여 분리한 골수세포를 well당 1.5-2 x 10⁶ cells가 되도록 분주하여 8일간 배양하였다. 대조군은 신선한 배양액으로 배양하였으며 배양이 끝난 후 세포들을 ethanol-acetone(50:50, vol/ vol, Merck)으로 1분간 고정하고 toluidine blue로 염색하여 다핵세포의 수를 측정하였다. 이때 3개 이상의 핵을 가진 세포를 다핵세포로 인정하였다. 한편 골수세포 배양시 TRAP-양성 다핵세포의 형성과 이에 미치는 골지향성 호르몬의 영향을 관찰하기 위하여 분리한 골수세포를 well당 1.5-2 x 10⁶ cells가 되도록 분주하여 같은 방법으로 8일간 배양하였다. 배양이 끝난 세포들은 인산완충생리식염수(phosphate-buffered saline, PBS, pH 7.4)로 한 번 세척한 다음 citrate-acetone-formaldehyde 용액으로 1분간 고정하고 commercial kit(Sigma)를 이용하여 TRAP 염색을 시행하였다. 이때 naphthol AS-BI phosphate를 기질로, fast Garnet GBC base를 coupler로 사용하였으며 7 mM의 L-tartrate가 첨가된 acetate 완충액에서 30분간 반응시켜 효소활성을 검색하였다. 그 후 일부는 hematoxylin 또는 toluidine blue로 대조염색을 시행한 후 광학현미경상에서 TRAP-양성인 다핵세포의 수를 측정하였으며 3개 이상의 핵을 가진 세포를 다핵세포로 인정하였다.

3. 상아질편을 이용한 흡수와(resorption pit) 관찰

마우스 골수세포 배양시 형성되는 다핵세포의 상아질편 흡수능을 관찰하기 위하여 상아질편 위에서 골수세포를 배양하였다. New England Aquarium (Boston, USA)에서 구한 Pilot whale (*Globicephala melaena*) 치아를 초음파세척기를 이용하여 세척한 후 범랑질을 제거하고 저속 다이아몬드 톱을 이용하여 약 200 μm 의 두께로 절단하여 상아질편을 준비하였다. 이를 증류수에 담그어 초음파세척기로 10분간 세척한 다음 다시 acetone에 10분, 70% ethanol에 10분씩 2회 초음파세척기로 세척하여 건조하였다. 준비된 상아질편을 24-well dish에 각각 한 개씩 위치시킨 후 TRAP 염색시와 동일한 방법으로 마우스 골수세포를 분리하여 상아질편 위에서 배양하였으며, 신선한 배양액 및 PTH 또는 PGE_2 가 첨가된 배양액으로 8일간 배양하였다. 배양이 끝난 후 상아질시편 중에서 일부는 세포를 제거한 후 상아질 표면을 관찰하기 위하여 1 M NH_4OH 용액에 30분간 담근 후 초음파세척기로 세포들을 제거하였으며, 일부는 세포를 제거하지 않은 상태로 고정하였다. 0.1 M cacodylate 완충액(pH 7.4)에 각각 5분씩 2회 수세하고 2.5% glutaraldehyde 용액(0.1 M cacodylate 완충액, pH 7.4)으로 4 $^\circ\text{C}$ 에서 1시간 동안 전고정하고 세척한 다음 1% osmium tetroxide 용액(0.1 M cacodylate 완충액, pH 7.4)으로 4 $^\circ\text{C}$ 에서 후고정 하였다. 그 다음 통법에 따라 탈수하여 임계점 건조기로 건조한 후 gold-palladium으로 피복하여 주사전자현미경(JEOL 840A)으로 관찰하였다.

4. 파골세포양세포의 형성에 미치는 TGF- β 와 EGF의 영향

위의 실험을 통하여 확인된 파골세포양세포의 형성에 미치는 TGF- β 와 EGF의 영향을 관찰하기 위하여 동일한 방법으로 골수세포의 분리, 배양을 시행하였다. 배양시 대조군은 10^{-8} M의 Vit. D_3 이 첨가된 배양액으로 배양하였으며 실험군은 Vit. D_3 과 0.1, 1 및 5 ng/ml의 TGF- β (R&D system) 또는 2 ng/ml의 EGF(Chemicon International Inc.)가 단독 혹은 복합 첨가된 배양액으로 교환하여 배양하였고 8일간의 배양이 끝난 후 TRAP 염색을 시행하여 TRAP-양성 다핵세포의 수를 측정, 비교하였다.

III. 연구결과

1. 다핵세포의 형성에 미치는 골지항성 호르몬의 영향

마우스 골수세포를 8일간 배양시 대조군의 경우 약 12-13개 정도의 다핵세포가 형성되었으며 PTH를 첨가하여 배양한 경우 첨가된 PTH 농도에 비례하여 형성된 다핵세포의 수가 증가되는 양상을 나타내었다(Table 1). 또한 PGE_2 를 첨가하여 배양한 경우 10^{-7} M의 농도에서는 형성된 다핵세포의 수가 약간 감소되는 양상을 나타내었으나 통계적 유의성은 없었고 10^{-6} M의 농도로 PGE_2 를 첨가하여 배양한 경우 유의성있는 증가가 관찰되었다(Table 2).

Table 1. Effect of PTH on the generation of multinucleated cells in the mouse bone marrow cell culture

Treatment	Number of Multinucleated cells	Ratio (Treated/Control)
Control	12.7 \pm 2.22	-
PTH 100 ng/ml	18.8 \pm 2.75	1.48 \pm 0.22
PTH 200 ng/ml	19.0 \pm 2.74*	1.50 \pm 0.22*
PTH 500 ng/ml	21.7 \pm 3.68**	1.71 \pm 0.29**

Values are Mean \pm S.E. (n=4-6).

* P<0.05, ** P<0.01, compared to control.

Table 2. Effect of PGE_2 on the generation of multinucleated cells in the mouse bone marrow cell culture

Treatment	Number of Multinucleated cells	Ratio (Treated/Control)
Control	12.0 \pm 0.71	-
PGE_2 10^{-7} M	10.2 \pm 1.35	0.85 \pm 0.11
PGE_2 10^{-6} M	20.5 \pm 3.49*	1.71 \pm 0.29*

Values are Mean \pm S.E. (n=4-6).

* P<0.05, compared to control.



Fig. 1. TRAP staining of mouse bone marrow cells. No TRAP(+)-MNC was observed in control culture (A. x40). TRAP(+)-MNCs (Arrow, x100) were seen in PTH-treated (B) and PGE₂-treated cultures (C).

Table 3. Effect of PTH on the generation of TRAP (+)-multinucleated cells in the mouse bone marrow cell culture

Treatment	Number of TRAP(+)-MNCs
Control	4.4 ± 0.95
PTH 100 ng/ml	11.6 ± 2.32*
PTH 200 ng/ml	15.9 ± 3.11**
PTH 500 ng/ml	18.3 ± 3.48**

Values are Mean ± S.E. (n=7-10).

* P<0.05, ** P<0.01, compared to control.

MNCs : multinucleated cells.

Table 4. Effect of PGE₂ on the generation of TRAP(+)-multinucleated cells in the mouse bone marrow cell culture

Treatment	Number of TRAP(+)-MNCs
Control	0.6 ± 0.24
PGE ₂ 10 ⁻⁷ M	12.4 ± 3.24**
PGE ₂ 10 ⁻⁶ M	69.0 ± 14.75**
PGE ₂ 10 ⁻⁵ M	98.0 ± 17.54**

Values are Mean ± S.E. (n=9-10).

** P<0.01, compared to control.

MNCs : multinucleated cells.

2. TRAP-양성 다핵세포의 형성에 미치는 골지항성 호르몬의 영향

마우스 골수세포를 8일간 배양한 경우 대조군에서는 TRAP-양성인 단핵세포는 관찰되었으나 TRAP-양성 다핵세포는 거의 관찰되지 않았으며(Fig. 1A), PTH 또는 PGE₂를 첨가하여 배양한 경우 다수의 TRAP-양성 다핵세포가 형성됨을 관찰할 수 있었다(Fig. 1B 및 1C). 또한 PTH 또는 Vit. D₃을 첨가하여 배양한 경우에는 약 10개 내외의 핵을 갖는 다핵세포가 다수 출현한 반면 PGE₂를 첨가하여 배양한 경우 수십개 이상의 핵을 갖는 거대한 TRAP-양성 다핵세포도 관찰되었다(Fig. 1C). 골지항성 호르몬을 첨가하여 배양한 후 형성되는 TRAP-양성 다핵세포의 수를

Table 5. Effect of Vit. D₃ on the generation of TRAP (+)-multinucleated cells in the mouse marrow cell culture

Treatment	Number of TRAP(+)-MNCs
Control	0
Vit. D ₃ 10 ⁻⁹ M	0
Vit. D ₃ 10 ⁻⁸ M	7.8 ± 1.85**
Vit. D ₃ 10 ⁻⁷ M	15.0 ± 6.61**

Values are Mean ± S.E. (n=4-6).

** p<0.01, compared to control.

MNCs : multinucleated cells.

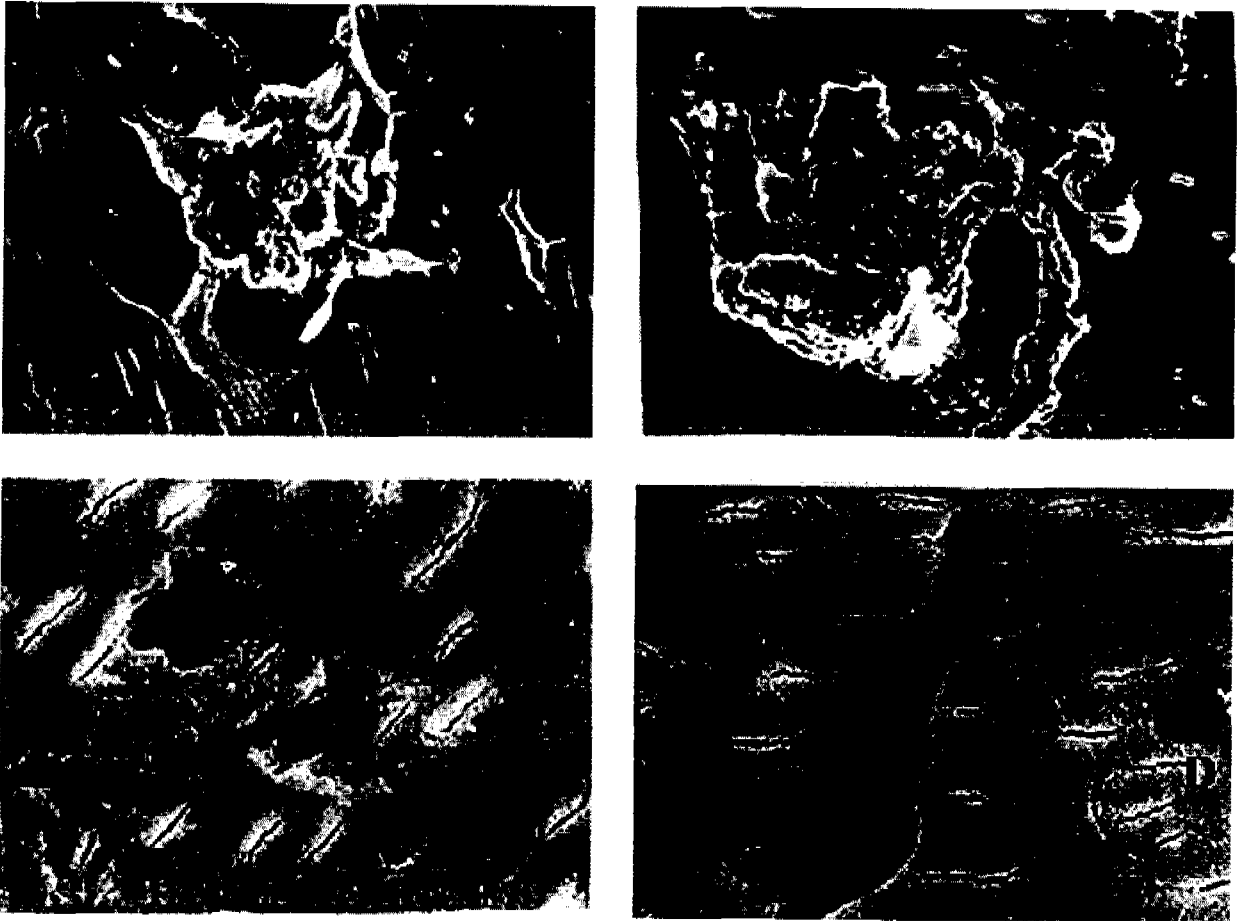


Fig. 2. SEM view of giant cells (x1,000) attached to the dentin slice in control culture (A) and PGE₂- treated cultures (B). SEM view of resorption pits (x2,500) formed in dentin slices by bone marrow cell in control culture (C) and PTH-treated cultures (D).

관찰하였으며 PTH를 첨가하여 배양한 경우 첨가된 PTH의 농도에 비례하여 형성된 TRAP-양성 다핵세포의 수가 증가하였다(Table 3). PGE₂를 첨가하여 배양한 경우에도 형성된 TRAP-양성 다핵세포의 수가 첨가된 PGE₂의 농도에 비례하여 증가된 양상을 나타내었으며 형성된 파골세포의 수도 PTH 또는 Vit. D₃ 첨가시에 비하여 가장 많은 경향을 나타내었다(Table 4). 한편 Vit. D₃을 첨가하여 배양한 경우 10⁻⁹ M의 농도에서는 TRAP-양성 다핵세포의 형성이 관찰되지 않은 반면 10⁻⁸ 및 10⁻⁷ M의 농도로 첨가하여 배양한 경우 다수의 TRAP-양성 다핵세포가 형성되었다(Table 5).

3. 주사전자현미경 소견

마우스 골수세포를 상아질편 위에서 배양한 후 상아질편에 부착되는 세포의 모양과 상아질편에 형성되는 흡수와의 모양을 주사전자현미경으로 관찰하였다. 8일간의 배양이 끝난 후 대조군뿐만 아니라 PTH 또는 PGE₂를 첨가하여 배양한 경우에 다양한 형태의 거대세포가 상아질편에 부착되어 있는 양상을 관찰할 수 있었다(Fig. 2A 및 2B). 부착된 세포를 제거한 다음 상아질편에 형성된 흡수와의 관찰한 결과 대조군에서도 흡수와의 나타났으나(Fig. 2C), PTH 또는 PGE₂를 첨가하여 배양한 경우 다양한 형태의 흡수와의 관찰되었다(Fig. 2D).

Table 6. Effect of TGF- β on the generation of Vit. D₃-induced TRAP(+)-multinucleated cells in the mouse marrow cell culture

Treatment	Number of TRAP(+)-MNCs
Vit. D ₃ 10 ⁻⁸ M	7.8 ± 1.85
Vit. D ₃ + TGF- β 0.1 ng/ml	14.7 ± 5.29*
Vit. D ₃ + TGF- β 1 ng/ml	1.0 ± 1.00**
Vit. D ₃ + TGF- β 5 ng/ml	1.0 ± 0.58**

Values are Mean ± S.E. (n=4-6).

* P < 0.05, compared to Vit. D₃ only.

** P < 0.01, compared to Vit. D₃ only.

MNCs : multinucleated cells.

4. 파골세포양세포의 형성에 미치는 TGF- β 와 EGF의 영향

위의 실험을 통하여 마우스 골수세포 배양시 형성되는 다핵세포가 파골세포양세포임을 확인한 후 이러한 파골세포양세포의 형성에 미치는 TGF- β 와 EGF의 영향을 관찰하였다. 골수세포 배양시 10⁻⁸ M의 Vit. D₃을 첨가하여 배양한 경우 TRAP-양성 다핵세포가 형성되었고 TGF- β 를 복합 첨가하여 배양한 경우 0.1 ng/ml농도에서는 그 수가 증가하였으나 1 및 5 ng/ml의 농도로 첨가하여 배양한 경우 Vit. D₃에 의하여 형성된 TRAP-양성 다핵세포의 형성이 억제됨을 관찰할 수 있었다(Table 6). 한편 골수세포 배양시 Vit. D₃과 EGF를 복합첨가하여 배양한 경우 Vit. D₃에 의해 형성된 TRAP-양성 다핵세포의 수가 EGF에 의하여 증가되었으며 여기에 다시 TGF- β 를 복합 첨가하여 배양한 경우 TGF- β 단독첨가시와 유사하게 저농도에서는 TRAP-양성 다핵세포의 수가 증가되었고 높은 농도에서는 억제되어 상반된 작용을 나타내었다(Table 7).

IV. 고 찰

본 연구에서는 시험관내에서 파골세포의 분화를 연구하기 위하여 가장 많이 사용되는 마우스 골수세포 배양법을 이용하여 파골세포양세포의 형성에 미치는 수종의 골지향성 호르몬과 TGF- β 및 EGF의 영향을 관찰하였다. 마우스 골수세포를 분리하여 8일

Table 7. Effect of EGF alone and combination with TGF- β on the generation of Vit. D₃-induced TRAP(+)-multinucleated cells in the mouse marrow cell culture

Treatment	Number of TRAP(+)-MNCs
Vit. D ₃ 10 ⁻⁸ M	7.8 ± 1.81
Vit. D ₃ + EGF 2 ng/ml	21.7 ± 13.7*
Vit. D ₃ + EGF + TGF- β 0.1 ng/ml	26.3 ± 7.53**
Vit. D ₃ + EGF + TGF- β 1 ng/ml	13.3 ± 5.81
Vit. D ₃ + EGF + TGF- β 5 ng/ml	0.7 ± 0.33**

Values are Mean ± S.E. (n=4-6).

* P < 0.05, compared to Vit. D₃ only.

** P < 0.01, compared to Vit. D₃ only.

MNCs : multinucleated cells.

간 배양한 경우 약 12-13개의 다핵세포가 관찰되었으며 형성된 다핵세포의 수는 PTH를 첨가하여 배양한 경우 농도에 비례하여 증가되었고(Table 1), PGE₂를 첨가하여 배양한 경우 10⁻⁶ M 농도에서 유의성있는 증가가 관찰되었다(Table 2). 이러한 다핵세포들이 파골세포의 특성을 갖고 있는지 확인하기 위하여 여러 골지향성 호르몬을 첨가하여 골수세포를 배양한 후 파골세포의 표지효소인 TRAP 염색을 시행하였다. 대조군의 경우 8일간의 배양후 TRAP-양성 단핵세포는 관찰되었으나 TRAP-양성 다핵세포는 거의 형성되지 않았으며(Fig. 1A), PTH, PGE₂ 및 Vit. D₃을 첨가하여 배양한 경우 다수의 TRAP-양성 다핵세포가 관찰되었다(Fig. 1B 및 1C). 또한 각각의 골지향성 호르몬을 첨가하여 배양한 경우, 모두 첨가된 호르몬의 농도에 비례하여 TRAP-양성 다핵세포의 수가 증가하였고(Table 3, 4 및 5), 특히 PGE₂를 첨가하여 배양한 경우 수십개 이상의 핵을 갖는 거대한 다핵세포도 형성됨을 관찰할 수 있었다(Fig. 1C).

PTH는 골흡수를 촉진하는 대표적인 호르몬으로써 생체 및 시험관내에서의 많은 연구결과 파골세포의 크기와 주름변연의 크기를 증가시킴으로써 파골세포의 활성을 증가시킨다고 알려져 있다²⁵⁾. 최근 들어 PTH 수용체가 파골세포가 아닌 조골세포에 존재하며²⁶⁾, PTH가 조골세포에 작용한 후 간접적으로 파골세포를 활성화시킨다는 주장들이 대두되고 있으나²⁷⁾, PTH가 파골세포 전구세포의 분화를 촉진시킬 수도

있음이 알려져 있어¹⁾ 다양한 방법으로 파골세포의 분화과정과 기능에 영향을 미칠 것으로 추측된다.

PGE₂도 골흡수를 촉진하는 대표적인 국소인자로 백서태자의 장골을 배양시 파골세포의 크기, 주름변연과 투명대의 범위가 증가되는 등 파골세포의 활성을 촉진시킨다²⁸⁾. 그러나 골조직에 대한 PGE₂의 영향은 매우 다양하며 파골세포의 수와 활성을 증가시켜 골흡수를 촉진한다고 생각되어 왔으나²⁹⁾, 최근 들어 PGE₂가 골형성과 조골세포의 증식을 촉진하고³⁰⁾, Conaway 등³¹⁾은 PGE₂가 골흡수 촉진 및 억제에 이중작용을 갖는다고 보고하였다. 본 연구에서는 PGE₂가 TRAP-양성 다핵세포의 수를 증가시키기에 관찰되어 파골세포의 형성을 촉진하는 효과가 있다고 추측되며 골수세포 배양시 PGE₂ 첨가에 의하여 파골세포 유사세포의 형성이 증가되었다는 Akatsu 등³²⁾의 보고와 일치하였다. 한편 Vit. D₃도 골흡수 촉진물질중의 하나로 파골세포의 핵의 수를 증가시키고³³⁾, 골수단핵세포 배양시 파골세포의 분화를 촉진하는 것으로 알려져 있다³⁴⁾. 본 연구에서도 위의 여러 연구들과 유사하게 골수세포 배양시 Vit. D₃를 첨가하여 배양한 경우 TRAP-양성 다핵세포의 수가 증가됨을 관찰할 수 있었다. 이러한 결과들은 골수세포 배양시 형성되는 다핵세포들이 파골세포의 특성을 갖고 있음을 나타내주는 것이라 추측된다.

분리된 골수세포들을 상아질편 위에서 8일간 배양한 후 상아질편 위에 형성된 세포를 주사전자현미경으로 관찰하였다. 대조군 또는 PTH나 PGE₂를 첨가하여 배양한 경우 모두 다핵세포가 상아질편에 부착되어 있는 것이 관찰되었으며 부착되어 있는 세포의 모양은 매우 다양하게 나타났다(Fig. 2A 및 2B). 한편 상아질편 위에서 골수세포를 배양한 후 부착된 세포를 제거하고 상아질편에 형성된 흡수과를 관찰한 결과 대조군에서도 일부 흡수과가 관찰되었으며 PTH 또는 PGE₂를 첨가하여 배양한 경우에도 여러 형태의 흡수과가 관찰되었다(Fig. 2C 및 2D). 이러한 연구결과들을 종합해볼때 마우스 골수세포 배양시 여러 골지향성 호르몬 첨가에 의하여 파골세포양세포의 형성이 유도될 수 있다고 생각할 수 있으며 이러한 파골세포양세포의 형성에 미치는 TGF- β 와 EGF의 영향을 관찰하였다.

골조직에 대한 TGF- β 의 작용에 관하여는 상이한 연구결과들이 보고되어 있으며 조골세포의 세포증식은 억제하나 그 기능은 촉진시킨다는 보고도 있고¹⁹⁾, MC3T3-E1 세포의 경우 기능을 감소시키기도 하며

²⁰⁾, 조골세포 유사세포군의 증식을 억제한다는 보고도 있어²¹⁾ 조골세포에 대해 다양한 기능을 갖고 있리라 추측된다. 본 실험에서 골수세포 배양시 Vit. D₃과 TGF- β 를 복합첨가하여 배양한 후 파골세포양세포의 형성을 관찰한 결과 TGF- β 가 0.1 ng/ml의 농도에서는 Vit. D₃에 의한 파골세포양세포의 형성을 촉진하였으며 1 또는 5ng/ml의 농도에서는 억제시키는 이중적인 효과를 나타내었다(Table 6). 이러한 연구결과는 마우스 골수세포 배양시 TGF- β 가 낮은 농도에서는 Vit. D₃에 의한 파골세포의 형성을 증가시키며 높은 농도에서는 파골세포의 형성을 억제시킨다는 Shinar와 Rodan³⁵⁾의 연구결과와 유사하였으나 사람의 골수세포 배양시 0.01-10 ng/ml의 농도에서 TGF- β 가 Vit. D₃, PTH 및 interleukin-1 등에 의한 파골세포의 형성을 농도에 비례하여 억제시켰다는 Chenu 등³⁶⁾의 보고와는 차이점을 보였다. 한편 EGF도 골조직대사에 다양한 영향을 미치는 것으로 알려져 있으며 백서태자 두개관 배양시 세포성장을 촉진하고³⁷⁾, 조골세포의 활성을 억제시킨다²⁴⁾. 또한 EGF는 골조직 장기배양시 골흡수를 촉진하는 것으로 알려져 있으며³⁸⁾, 본 연구에서는 골수세포 배양시 Vit. D₃에 의한 파골세포양세포의 형성을 촉진하는 것으로 나타나(Table 7) 파골세포 전구세포의 분화를 촉진하여 골흡수를 촉진시키는 것으로 추측된다. 또한 골수세포 배양시 TGF- β 와 EGF를 복합첨가하여 배양한 경우 낮은 농도의 TGF- β 를 첨가한 경우에는 파골세포양세포의 형성이 촉진되었고, 높은 농도에서는 억제되는 상반되는 효과가 관찰되었다.

이러한 연구결과들을 종합해보면 TGF- β 나 EGF 모두 파골세포의 형성에 영향을 미칠 수 있으며 특히 TGF- β 는 골조직 형성뿐만 아니라 골흡수과정에도 중요한 역할을 담당하고 있는 국소조절물질로 생각되나 아직까지 TGF- β 의 생물학적 기능이 많이 밝혀지지 않은 상태이고 특히 파골세포의 생성 또는 기능에 대한 연구는 미진한 실정이므로 이에 대한 지속적인 연구가 필요하리라 사료된다.

V. 결 론

시험관내에서 파골세포의 분화를 유도하기 위하여 가장 흔히 사용되는 마우스 골수세포배양법을 이용하여 골수세포를 분리, 배양하였고, 여러 골지향성 호르몬 첨가시 형성되는 다핵세포를 파골세포의 표지 효소인 TRAP 염색을 시행하고, 상아질편위에 부착

되는 세포들의 모양 및 상아질편에 형성되는 흡수와를 주사전자현미경을 통하여 관찰함으로써 파골세포양세포임을 확인한 다음 이러한 파골세포양세포의 형성에 미치는 TGF- β 와 EGF의 영향을 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 마우스 골수세포를 분리하여 8일간 배양한 경우 약간의 다핵세포가 관찰되었으나 그 수는 PTH 또는 PGE₂를 첨가하여 배양한 경우 유의하게 증가하였다.
2. 마우스 골수세포를 분리하여 배양한 경우 대조군에서 TRAP-양성 다핵세포가 거의 관찰되지 않았으나 PTH, PGE₂ 및 Vit. D₃을 첨가하여 배양한 경우 다수의 TRAP-양성 다핵세포가 출현하였다.
3. 상아질편 위에 골수세포를 배양하면서 골지향성 호르몬을 첨가한 경우 다양한 형태의 세포들이 상아질편 위에 부착됨을 관찰할 수 있었다.
4. 분리한 골수세포를 상아질편 위에서 골지향성 호르몬을 첨가하여 배양한 후 세포를 제거한 다음 주사전자현미경으로 상아질편을 관찰한 결과 여러 형태의 흡수구가 나타남을 관찰할 수 있었다.
5. 골수세포 배양시 Vit. D₃과 EGF를 복합첨가하여 배양한 경우 Vit. D₃에 의하여 형성되는 TRAP-양성 다핵세포의 수가 EGF에 의하여 증가되었고 TGF- β 를 Vit. D₃와 복합첨가하거나 Vit. D₃ 및 EGF와 복합첨가하여 배양한 경우 TGF- β 는 낮은 농도에서는 TRAP-양성 다핵세포의 형성을 촉진하였으나 높은 농도에서는 억제시키는 상반적인 효과를 나타내었다.

참 고 문 헌

1. Mundy GR, Roodman GD. Osteoclast ontogeny and function. In: Peck WA ed, Bone and Mineral Research. vol. 5. p.209-279, Elsevier, Amsterdam, 1987.
2. Vaes G. Cellular biology and biochemical mechanism of bone resorption. A review of recent developments on the formation, activation and mode of action of osteoclasts. Clin Orthop Rel Res 231: 239-271, 1988.
3. Göthlin G, Ericsson JLE. On the histogenesis of the cells in fracture callus. Electron microscopic and autoradiographic observations in parabiotic rats and studies on labeled monocytes. Virchow Arch B 12: 318-329, 1973.
4. Kahn AJ, Simmons DJ. Investigation of cell lineage in

- bone using a chimera of chick and quail embryonic tissue. Nature 258: 325-327, 1975.
5. Marks SC. Jr. Osteopetrosis in the *ia* rat cured by spleen cells from a normal littermate. Am J Anat 146: 331-338, 1976.
6. Chambers TJ. The cellular basis of bone resorption. Clin Orthop Rel Res 151: 283-293, 1980.
7. Burger EH, van der Meer JWM, Nijweide P. Osteoclast formation from mononuclear phagocytes, role of bone-forming cells. J Cell Biol 99: 1901-1906, 1984.
8. Ko JS, Bernard GW. Osteoclast formation in vitro from bone marrow mononuclear cells in osteoclast-free bone. Am J Anat 161: 415-425, 1981.
9. Burger EH, van der Meer JWM, van de Gevel JS, Gribnau JC, Thesingh CW, van Furth R. In vitro formation of osteoclasts from long-term cultures of bone marrow mononuclear phagocytes. J Exp Med 156: 1604-1614, 1982.
10. Osdoby P, Martini MC, Caplan AI. Isolated osteoclasts and their presumed progenitor cells, the monocyte, in culture. J Exp Zool 224: 331-334, 1982.
11. Martini MC, Osdoby P, Caplan AI. Adhesion of osteoclasts and monocytes to developing bone. J Exp Zool 224: 345-354, 1982.
12. Testa NG, Allen TD, Lajtha LG, Onions D, Jarrets O. Generation of osteoclasts in vitro. J Cell Sci 47: 127-137, 1981.
13. MacDonald BR, Takahashi N, McManus LM, Holahan J, Mundy GR, Roodman GD. Formation of multinucleated cells that respond to osteotropic hormones in long term human bone marrow cultures. Endocrinology 120: 2326-2333, 1987.
14. Fuller K, Chambers TJ. Bone matrix stimulates osteoclastic differentiation in cultures of rabbit bone marrow cells. J Bone Min Res 3: 532(abstract), 1988.
15. Canalis E, McCarthy T, Centrella M. The regulation of bone formation by local growth factors. In: Peck WA ed, Bone and Mineral Research. vol. 6. p.27-56, Elsevier, Amsterdam, 1989.
16. DeLarco JE, Todaro GJ. Growth factors from murine sarcoma virus-transformed cells. Proc Natl Acad Sci USA 75: 4001-4005, 1978.
17. Roberts AB, Frolik CA, Anzano MA, Sporn MB. Transforming growth factors from neoplastic and nonneoplastic tissue. Fed Proc 42: 2621-2623, 1983.
18. Seyedin SM, Thomas AY, Bentz H, Rosen DM, McPherson JM, Conti A, Siegel NR, Gallupi GR, Piez KA. Cartilage-inducing factor-A : Apparent identity

- to transforming growth factor- β . *J Biol Chem* 261: 5693-5695, 1986.
19. Pfeilschifter J, D'Souza SM, Mundy GR. Effect of transforming growth factor- β on osteoblastic osteosarcoma cells. *Endocrinology* 121: 212-218, 1987.
 20. Noda M, Rodan GA. Type β transforming growth factor inhibits proliferation and expression of alkaline phosphatase in murine osteoblast-like cells. *Biochem Biophys Res Commun* 140: 56-65, 1986.
 21. Centrella M, McCarthy TL, Canalis E. Transforming growth factor β is a bifunctional regulator of replication and collagen synthesis in osteoblast-enriched cell cultures from fetal rat bone. *J Biol Chem* 262: 2869-2874, 1987.
 22. Pfeilschifter JP, Seyedin S, Mundy GR. Transforming growth factor- β inhibits bone resorption in fetal rat long bones. *J Clin Invest* 82: 680-685, 1988.
 23. Oreffo ROC, Bonewald L, Garrett IR, Seyedin S, Mundy GR. Transforming growth factor β I and II inhibits osteoclast activity(Abstract). *J Bone Min Res* 439: S178, 1989.
 24. Canalis E. Effect of hormones and growth factors on alkaline phosphatase activity and collagen synthesis in cultured rat calvariae. *Metabolism* 32: 14-22, 1983.
 25. Feldman RS, Krieger NS, Tashjian AH. Jr.: Effects of parathyroid hormone and calcitonin on osteoclast formation in vitro. *Endocrinology* 107: 1137-1143, 1980.
 26. Silve CM, Hradek GT, Jones AL, Arnaud CD. Parathyroid hormone receptor in intact embryonic chicken bone : Characterization and cellular localization. *J Cell Biol* 94: 379-386, 1982.
 27. Rodan GA, Martin TJ. Role of osteoblasts in hormonal control of bone resorption - A Hypothesis. *Calcif Tissue Int* 33: 349-351, 1981.
 28. Holtrop ME, Raisz LG, King GJ. The response of osteoclasts to prostaglandin and osteoclast activating factors as measured by ultrastructural morphometry. In: Horton JE ed, *Mechanisms of Localized Bone Loss*. p.13, Inf. Retrieval Inc, Washington DC, 1978.
 29. Vanderwiel CJ, Talmage RV. Comparison of the effects of prostaglandin E_2 and parathyroid hormone on plasma calcium concentration and osteoclast function. *Endocrinology* 105: 588-595, 1979.
 30. Chyun YS, Raisz LG. Stimulation of bone formation by prostaglandin E_2 . *Prostaglandins* 27: 97-103, 1984.
 31. Conaway HH, Diez LF, Raisz LG. Effects of prostacyclin and prostaglandin E_1 on bone resorption in the presence and absence of parathyroid hormone. *Calcif Tissue Int* 38: 130-134, 1986.
 32. Akatsu T, Takahashi N, Debari K, Morita I, Murota S, Nagata N, Takatani O, Suda T. Prostaglandins promote osteoclast-like cell formation by a mechanism involving cyclic adenosine 3',5'-monophosphate in mouse bone marrow cell cultures. *J Bone Min Res* 4: 29-35, 1989.
 33. Hefley TJ, Stern PH. Isolation of osteoclasts from fetal rat long bones. *Calcif Tissue Int* 34: 480-487, 1982.
 34. Roodman GD, Ibbotson KJ, MacDonald BR, Kuehl TJ, Mundy GR. 1,25-dihydroxy vitamin D_3 causes formation of multinucleated cells with several characteristics in cultures of primate marrow. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 8213-8217, 1985.
 35. Shinar DM, Rodan GA. Biphasic effects of transforming growth factor- β on the production of osteoclast-like cells in mouse bone marrow cultures : The role of prostaglandins in the generation of these cells. *Endocrinology* 126: 3153-3158, 1990.
 36. Chenu C, Pfeilschifter J, Mundy GR, Roodman GD. Transforming growth factor- β inhibits formation of osteoclast-like cells in long term human marrow cultures. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 5683-5687, 1988.
 37. Canalis E, Raisz LG. Effect of epidermal growth factor on bone formation in vitro. *Endocrinology* 104: 862-869, 1979.
 38. Raisz LG, Simmons HA, Sandberg AL, Canalis E. Direct stimulation of bone resorption by epidermal growth factor. *Endocrinology* 107: 270-273, 1980.

- ABSTRACT -

Effects of Transforming Growth Factor- β and Epidermal Growth Factor on the Osteoclast-like Cell Formation in the Mouse Bone Marrow Cell Culture.

Choong-Nam Lim, D.D.S., M.D.S., Seon-Yle Ko*, D.D.S., M.S.D., Ph.D.,
Jung-Keun Kim* D.D.S., M.S.D., Ph.D., Se-Won Kim, D.D.S., M.S.D., Ph.D.

Department of Dental Pharmacology and Oral Biochemistry, School of Dentistry, Dankook University*

Bone marrow culture systems are widely used to differentiate osteoclast-like cells in vitro using several osteotropic hormones. In this study, we isolated and cultured the mouse bone marrow cells with or without some osteotropic hormones such as parathyroid hormone(PTH), prostaglandin E₂(PGE₂) and 1,25(OH)₂-vitamin D₃(Vit. D₃). We confirmed the formation of osteoclast-like cells morphologically and functionally by the expression of tartrate-resistant acid phosphatase(TRAP) and by their capability to resorb dentin slices. We also studied the effects of transforming growth factor- β (TGF- β) and epidermal growth factor(EGF) on the Vit. D₃-induced osteoclast-like cell formation. In control, a few multinucleated cells were formed whereas PTH and PGE₂ increased the number of multinucleated cells. PTH, PGE₂ and Vit. D₃ induced the formation of TRAP-positive multinucleated cells. After culture of mouse bone marrow cells on the dentin slices with or without osteotropic hormones, giant cells with diverse morphology were found on the dentin slices under the scanning electronmicroscopy. After removing the attached cells, resorption pits were identified on the dentin slices, and the shape of resorption pits was variable. EGF increased the osteoclast-like cell formation induced by Vit. D₃, however, TGF- β showed biphasic effect, which at low concentration, increased and at high concentration, decreased the osteoclast-like cell formation induced by Vit. D₃.