

쥐의 골수로부터 추출한 줄기세포를 이용한 조골세포로의 분화 유도과정에서 나타난 문제점에 관한 분석 연구

김인숙²⁾ · 조태형²⁾ · 장옥련²⁾ · 이규백³⁾ · 박용두³⁾ · 노인섭⁴⁾ · F. Weber⁵⁾ · 이종호^{1,2)} · 김명진^{1,2)} · 황순정^{1,2)}

서울대학교 치과대학 구강악안면외과학교실¹⁾, 서울대학교 치학연구소²⁾,
고려대학교 의과대학 의공학교실, BK21 의과학사업단, 한국인공장기센터³⁾,
서울산업대학교 화학공학과⁴⁾, 스위스 취리히대학병원 두개악안면외과 뼈연구실⁵⁾

Abstract

PROBLEMS IN OSTEOGENIC DIFFERENTIATION OF RAT BONE MARROW STROMAL CELLS

In-Sook Kim²⁾, Tae-Hyung Cho²⁾, Yu-Lian Zhang²⁾, Kyu-Back Lee³⁾, Yong-Doo Park³⁾

In-Sub Rho⁴⁾, F. Weber⁵⁾, Jong-Ho Lee^{1,2)}, Myung-Jin Kim^{1,2)}, Soon-Jung Hwang^{1,2)}

Dept. of Oral & Maxillofacial Surgery, College of Dentistry, Seoul National University¹⁾,

Dental Research Institute, Seoul National University²⁾, Dept. of Biomedical Engineering,

College of Medicine, Brain Korea 21 Program for Biomedical Science, Korea Artificial Organ Center,

Korea University³⁾, Chemical Engineering Department, Seoul National University of Technology⁴⁾

Lab. for Osteology, Dept. of Craniomaxillofacial Surgery, University Hospital Zurich, Switzerland⁵⁾

This study was aimed to characterize osteogenic potential of rat bone marrow stromal cells (BMSC) isolated with standard flushing method and investigate the plasticity of transdifferentiation between osteoblastic and adipocytic lineage of cultured BMSC. Unlike aspiration method in human, rat bone marrow was extracted by means of irrigation with culture media that elevates the possibility of co-extraction of committed osteoprogenitor, or preosteoblast or other progenitor cells of several types present inside bone marrow. The cultured stromal cells showed high ALP activity which is representative marker of osteoblast without any treatment. Osteogenic inducers such as Dex and BMP-2 were examined for the evaluation of their effect on osteogenic and adipocytic differentiation of stromal cells, because they function as osteoinductive agent in stromal cells, but simultaneously induce adipogenic differentiation. Osteogenic differentiation was evaluated by measuring alkaline phosphatase activity or mRNA expression of osteoblast markers such as osteopontin, bone sialoprotein, collagen type I and CbfaI, and in vitro matrix mineralization by von Kossa staining. Oil red staining method was used to detect adipocyte and adipocytic marker, aP2 and PPAR γ 2 expression was examined using RT-PCR. It can be supposed that irrigation procedure resulted in high portion of already differentiation-committed osteoprogenitor cell showing elevated ALP activity and strong mineralization only under the supplement of 100 μ M ascorbic 2-phosphate and 10mM β -glycerophosphate without any treatment of osteogenic inducers such as Dex and BMP-2. Dex and BMP-2 seemed to transdifferentiate osteoprogenitor cells having high ALP activity into adipocytes temporarily, but continuous treatment redifferentiated into osteoblast and developed in vitro matrix mineralization. This property must be considered either in tissue engineering for bone regeneration, or in research of characterization of osteogenic differentiation, with rat BMSC isolated by the standard irrigation method.

Key words : Rat bone marrow stromal cell, Osteoblast, Adipocyte, Dex, BMP-2, Flushing method

※ 본 연구는 한국과학재단 특정기초연구사업 (과제번호: R01-2003-000-11592-0)의 지원으로 수행되었음.

I. 서 론

골수 (bone marrow)는 여러 종류의 세포들로 분화될 수 있는 강력한 잠재성을 가진 세포들의 군집으로, 자극에 따라 뼈세포 (osteoblast)¹⁾, 연골세포 (chondrocyte)²⁾, 지방세포 (지방세포)³⁾ 들로 분화될 수 있다. 골수는 사람에게서는 신체의 여러 부위에서 추출되고 있으며, 설치류동물과 토끼 같은 동물에서는 정강이뼈(tibia)나 대퇴골(femur)로부터 얻고 있다⁴⁾. 골수를 얻는 방법으로 사람의 신체에 대해서는 주로 타관침(bone marrow aspiration needle)을 사용하여, 골수액을 흡인하는 방법을 사용하나, rat와 같은 소동물에서는 뼈를 절제하여, 배지용액으로 씻어내는 방법을 이용한다. 골수 지질은 혈액생성을 도와주는 섬유세포, 혈관세포, 적혈구, 지방세포 등 다양한 종류의 조직들로 구성되어 있다⁵⁾. 또한 추출한 골수로부터 다양한 세포는 적절한 조건하에서 쉽게 골세포로 분화가 일어나므로, 골형성에 영향을 줄 수 있는 물질들을 분석하거나, 골격 손상부위를 복구할 수 있는 대체물질 분석에 골세포 공급원으로 사용될 수 있는 가능성으로 많은 연구가 진행되고 있다. 골세포 분화 유도는 다른 세포 형태보다 간단한 조건하에서 이루어지며, alkaline phosphatase 효소의 활성을 통해 쉽게 측정되고 있다. Bresford 등의 보고에 따르면, 줄기세포 배양에 있어서 초기부터 계속적인 dexamethsone(Dex) 처리 시 골세포 방향으로의 분화가 유도되는 반면, 1차 배양시에는 Dex를 첨가하지 않고 배양 후, 2차 배양부터 Dex를 처리할 경우 지방세포로의 분화가 유도된다는 결과를 제시하였다³⁾. 스테로이드 호르몬 계통인 glucocorticoid의 합성 물질인 Dex는 골세포 분화에 필요한 alkaline phosphatase의 활성을 유도하여 matrix mineralization 과정을 촉진시키며⁶⁾, 골세포 특이 유전자인 RUNX2 (or Cbfa1)의 합성을 유도한다⁷⁾. 또한 골세포로의 분화 유도뿐만 아니라 지방세포로의 분화를 유도하며, collagen type I의 발현을 억제한다는 보고가 있다^{8,9)}. Dex 처리에 의해 지방세포의 표지자인 peroxisome proliferators-activated receptor γ 2 (PPAR- γ 2)의 발현을 유도한다는 보고도 있다⁹⁾.

BMP-2는 TGF- β 1 군의 일원으로, 랫드와 마우스를 비롯한 설치류 동물에 있어서 골세포 분화에 있어서 크게 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. ALP 활성의 증가와 더불어 osteocalcin과 collagen type I의 합성을 유도시킴으로써 미네랄화 과정을 촉진시킨다. 세포 외 실험과 더불어 세포 내 실험에서 또한 골형성에 탁월한 결과를 보여 주고 있다. 뛰어난 골형성 유도인자인 BMP-2는 지방세포 분화에도 크게 영향을 미치고 있으며, 그 효과는 촉진과 저해의 두 양면성을 모두 나타낸다고 보고되고 있다^{10,11)}. 즉 PPAR γ 2의 합성을 증대시킴으로써 지방세포로의 분화를 유도하기

도 하고, 골세포 특이 전사인자의 일종인 MSX-2의 합성을 유도하여 이를 통해 지방세포의 분화를 저해시킨다. 즉 BMP-2는 골세포와 지방세포로의 분화를 모두 유도하는 기능을 갖고 있다고 볼 수 있다¹²⁾. 이는 줄기세포가 주위에 존재하는 호르몬이나 여러 물질들에 따라, 또는 신호 전달에 따라, 공통된 전구세포로부터 지방세포로 또는 골세포로 분화될 수 있음을 시사하고 있다¹³⁾.

최근, 지방세포와 골조직과의 상호 연관관계에 대한 연구 결과가 보고되고 있다. 지방세포와 골세포를 동시에 같은 플레이트에서 배양한 실험에서 지방세포에 의해 분비되는 불포화지방산(polyunsaturated fatty acids) 같은 물질이 초기 골세포의 성장을 저해하는 것으로 보고 되었다¹⁴⁾. 다른 동일한 실험에서는 지방세포가 골 흡수를 촉진하는 파골세포(osteoclast)의 분화와 기능을 도와주는 것으로도 보고되고 있다¹⁵⁾. 이런 결과들은 지방 조직들이 골세포 뿐만 아니라 파골세포의 분화와 그 기능에도 크게 영향을 미치고 있다는 것을 시사한다. 실제로 골다공증(osteoporosis)이나 골감소증(osteopenia) 같은 질병에서 골손실이 일어나고 있는 상태에서는 골세포의 수는 감소되고, 그 만큼 지방세포의 수가 증가된 것이 보고되었다^{16,17)}. 즉 공통 전구체로부터 주위 환경에 따라서 골세포와 지방세포로의 분화가 결정된다는 것을 의미한다. 또한 이는 조직 내에서 지방조직의 활성화로 인한 뼈 조직 손상을 뒷받침하는 결과로 보인다.

이 논문에서 현재 많은 논문에서는 골수조직에서 줄기세포를 분리하는 방법으로 랫드의 대퇴골이나 정강이뼈로부터 배지용액으로 씻어내는 방법(irrigation method)을 사용하고 있다. 이 방법으로 추출한 줄기세포의 골세포로의 분화능력을 분석하였으며, 특히 골세포와 지방세포 사이의 호환성을 관찰하였다. Dex를 1차배양에서는 첨가하지 않은 채, 2차 배양에서 골세포 분화 유도 조건하에서 첨가한 후 그 효과를 조사하였고, 또한 Dex와 BMP-2가 골세포와 지방세포로의 전환에 미치는 영향을 조사하였다. 골세포로의 분화를 측정하기 위해, ALP 효소 활성도 측정과 von Kossa staining을 통해 미네랄화 정도를 관찰하였고, RT-PCR을 통하여, 각각의 조건 배양에서 골세포 특이 유전자인 osteopontin, collagen type I, bone sialoprotein과 골분화 특이 전사인자인 Cbfa1의 발현을 측정하였다. 지방세포로의 분화는 표지자인 aP2 (adipocyte fatty acid binding protein)와 PPAR γ 2의 발현을 RT-PCR을 통해 조사하고, oil red staining을 통해 지방세포 형성을 관찰하였다.

본 연구의 목적은 rat의 골수에서 irrigation method를 사용하여 줄기세포를 분리하여, 줄기세포의 분화능력과 골세포와 지방세포 사이의 호환성을 관찰하여, 쥐의 골수세포를 이용한 골세포로의 분화 연구에 있어서 고려되어야 할 문제점들의 분석과 적절한 배양조건을 확립하는데 지표를 만들고자함에 있다.

II. 연구재료 및 방법

1. 연구 재료

줄기세포를 추출한 랫드는 4주와 15주된 Sprague-Dawley(SD) 랫드를 이용하였으며, 배양 배지는 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (JBI, Korea)에 10% FBS (Gibco, BRL)와 1% penicillin/streptomycin(Gibco, BRL)을 첨가하여 사용하였다. 분화 배지에 첨가한 ascorbate-2-phosphate (100 μ M), β -glycerophosphate (10mM), 그리고 Dex (10nM)은 Sigma, USA로부터 구입하였으며, BMP-2 (100ng/ml)는 스위스 취리히 대학의 D. F. Weber 박사로부터 공급받았다. Oil red staining과 von Kossa staining에 필요한 시약은 Sigma 회사로부터 구입하였고, RNA 분리에 필요한 Trizol

reagent와 cDNA 합성에 필요한 모든 효소와 Oligo(dT) 프라이머는 Invitrogen 회사 제품을 이용하였으며, AccuPower PCR premix는 Bioneer 회사로부터 구입하였다.

2. 랫드로부터 줄기세포 분리 및 배양

4주 된(160~180g) 랫드와 15주 된(250~280g) 랫드의 뒷다리 경골의 양끝을 잘라 15ml 튜브에 담아 2000rpm에서 5분간 원심분리 한다. 다시 DMEM 배지를 첨가하여, 1300rpm에서 3분간 원심분리를 한 뒤, Ficoll 용액을 이용한 gradient 방법으로 분리층을 형성하였다. 세포층을 조심스럽게 취해 다시 1300rpm에서 5분간 두 번 원심분리를 하여 깨끗이 씻어준 뒤 세포 수를 세어 1 \times 10⁶/cm²의 수로 10%혈청이 포함된 DMEM을 넣어 세포배양 접시에 넣어 배양한다(Fig. 1. A, B).

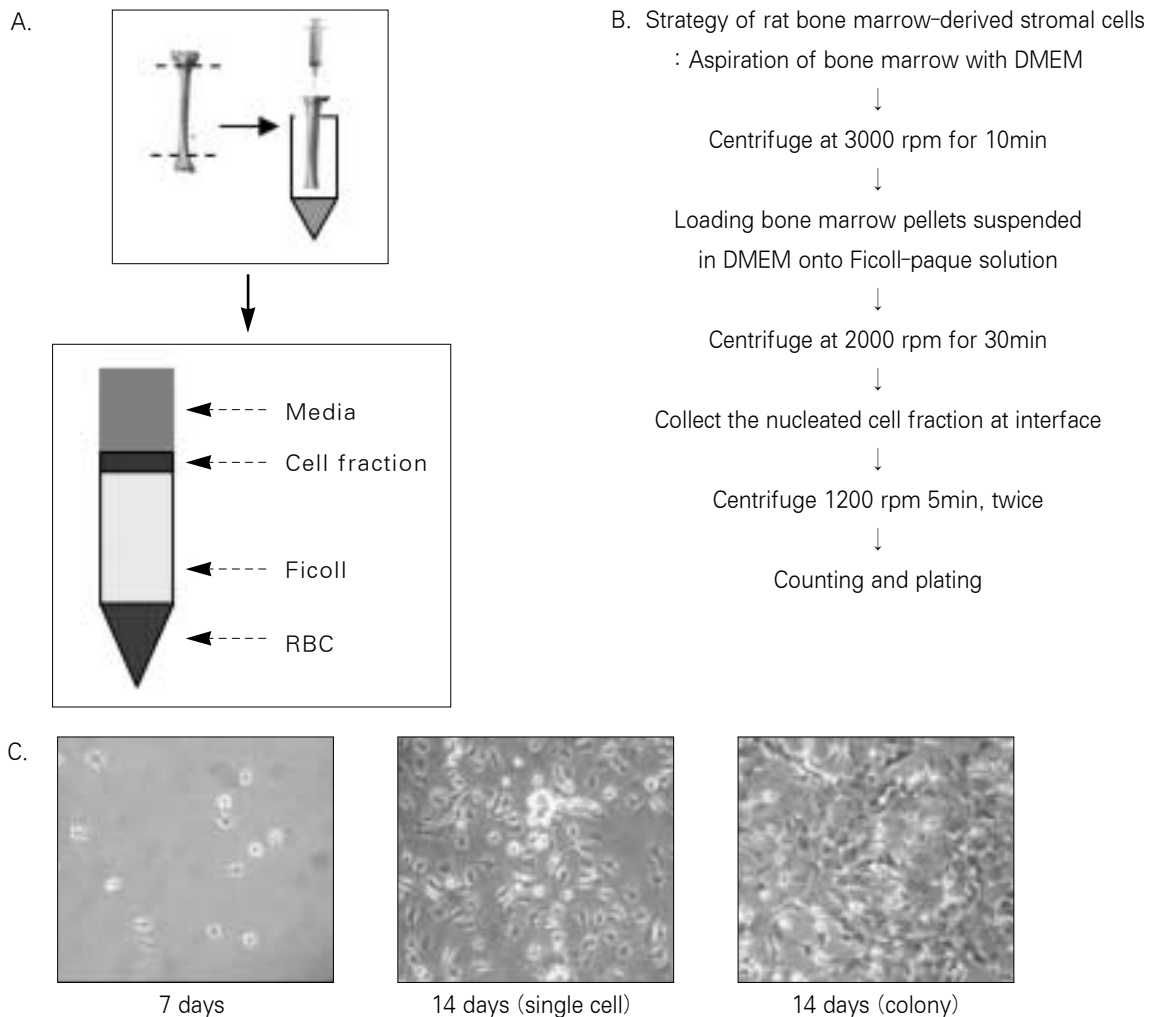


Fig. 1. Scheme (A) and strategy (B) of isolation of rat bone marrow stromal cell, and cell morphology of adherent stromal cells at 7 days and 14 days after plating (C).

3. ALP 효소 활성 측정

ALP 효소 활성 측정은 ALP assay kit (Sigma Aldrich Diagnostics)에 따른 방법으로 측정하였으며, 수치는 방출된 인산기 (Pi)의 농도 (nm)/ 30 분 반응시간 (min)/ 단백질 양 (mg)의 비율로 표시하였다.

4. 전체 RNA 분리와 RT-PCR

전체 RNA는 TRIZOL reagent (Invitrogen)를 사용하여 분리하여 -70도에 보관하였다. cDNA 합성은 분리한 RNA 1 µg을 이용하여, 전체 20 µl 부피에 superscript II reverse transcriptase (RT)와 oligo(dT) 12-18 primer (Invitrogen)를 이용하여 합성하였으며, 각각의 유전자에 대한 PCR 반응은 반응 부피의 1/20을 따서 진행한 다음, 10 µl씩 동일한 부피로 전기영동을 통하여 분석하였다. 각각의 유전자에 대한 프라이머는 직접 제작하였으며, PCR 반응시 94도에서 2분 denaturation 후 94도에서 40초 denaturation, 60도에서 40초 hybridization (primer 결합), 72도에서 1분 extension(합성) 과정을 30회 진행 후, 72도에서 10분 마지막 합성 과정으로 시도하였다.

5. Oil red-O staining

Oil red-O 300mg을 2-propanol 100ml에 잘 녹여 사용한다. 세포를 10% formaldehyde 용액으로 고정한 후 증류수로 고정액을 제거하였다. Oil red-O 염색 용액을 넣고 30분정도 반응 시킨 후, 증류수로 염색용액을 제거하고, 물기를 잘 털어낸 후 염색 여부를 관찰하였다.

6. Von Kossa staining

세포를 10% formaldehyde 용액으로 고정한 후 증류수로 씻어냈다. 5% silver nitrate 용액을 넣고 30분 동안 반응 시킨 후, 증류수로 씻어준 뒤 sodium-carbonate formaldehyde 용액을 2분간 처리하였다. 증류수에 10분간 방치 한 뒤 염색 용액 (1volume 10% K4Fe(CN)6.3H2O + 9volume 10% sodium thiosulfate)을 넣고 20분 동안 반응을 시킨 후 증류수로 씻어준 뒤, 염색 여부를 관찰 하였다.

Ⅲ. 연구 결과

1. 골수 줄기세포의 분리 배양과 형태학적인 고찰

대퇴골 (femur)이나 정강이뼈 (tibia)로부터 Fig. 1 A와

B 에서 설명한 순서로 추출한 뒤, DMEM 배지에서 성장시킨 후 7일 전후로(조건에 따라 더 일찍 형성되기도 함) 작은 다각형 모양의 세포가 플레이트 바닥에 형성되어 자라기 시작하였다. 14일을 전후로 하여 군집을 형성하기 시작하였으며, 군집 중앙 부분은 작고 둥글어진 형태의 모양을 띠고, 가장자리는 세포막이 늘어진 긴 방추사 형태의 모양이 관찰되었다 (Fig. 1C).

2. Dex 와 BMP-2 처리에 따른 ALP 효소 활성 측정

골세포로의 분화 유도 현상을 관찰하기 위해 Dex (10 nM)과 BMP-2 (100ng/ml)을 처리한 후 7일째 측정된 결과, 대조군에서 이미 높은 수치의 ALP 효소의 활성이 측정되었다. Dex 처리시 그 활성도가 오히려 낮아지는 현상이 측정되었으며, 4주된 어린 쥐에서는 대조군의 30%, 15 주된 쥐에서는 10% 수준으로 ALP 수치가 낮아졌으며, BMP-2에 대해서 4주된 쥐에서는 대조군과 거의 동일한 활성을 보인 반면, 15주된 쥐의 줄기세포는 40% 정도 낮아지는 현상이 나타났다. 쥐의 나이에 관계없이 Dex 처리에 의해 ALP 효소 활성이 억제되는 양상이 관찰되었다(Fig. 2).

3. 줄기세포의 골 세포 분화 능력 검증

Dex와 BMP-2를 처리한 후 7일째 각각의 조건하에서 RNA를 추출하여, ALP 유전자 이외의 다른 골세포 분화 관련 유전자들의 발현을 RT-PCR을 통해 관찰하였다. 대조군에서 높은 활성을 보였던 ALP와는 달리 골세포 분화에 있어서 중요한 물질인 osteopontin, collagen type I은 모

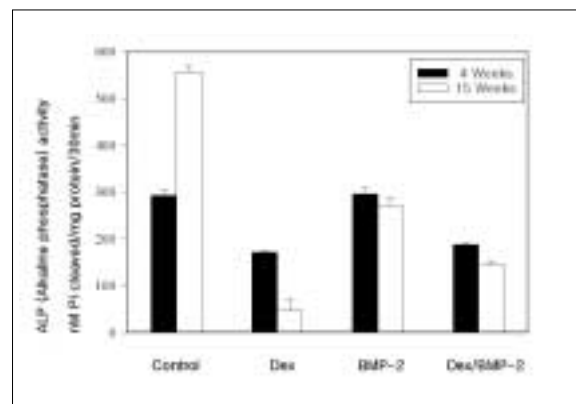


Fig. 2. Alkaline phosphatase activity of bone marrow-derived stromal cell of 4 weeks- and 15 weeks-aged rat in culture condition supplemented with Dex(10nM), BMP-2(100ng/ml) and dex/BMP-2 at 7 days after culturing.

든 조건하에서 고르게 발현이 되었고, 골세포 특이 전사인자인 CbfaI 의 발현되었으며, bone sialoprotein은 아주 약하게 발현되었다. 지속적인 유도 물질의 첨가를 21 일동안 지속한 후, von Kossa staining을 통하여 미네랄화를 측정 한 결과, 대조군에서 세포 전반에 걸쳐 붉은색의 칼슘 침전과 진한 흑색의 인산기가 침착이 되었고, Dex를 처리한 조건에서는 칼슘기의 침전보다는 흑색의 침전 덩어리가 곳곳에 형성되었으며, BMP-2를 처리한 배지에서는 큰 침착 덩어리가 나타나진 않았지만, 전체적으로 흑색 침전이 관찰되었다. Dex와 BMP-2를 같이 처리한 세포는 21일째에 세포가 불안정하여, 떠버리는 상태가 되어 염색을 시도할 수 없었다. 대조군에서 플레이트 전반에 걸쳐 가장 진한 염색이 이루어진 것으로 보아, 초기의 ALP 효소 활성도가 그대로 미네랄화에 영향을 미친 것으로 보인다 (Fig. 3). RT-PCR을 통한 골세포 분화 관련 유전자의 발현이나, von Kossa staining의 결과는 4주된 랫드와 15주된 랫드에서 큰 차이가 나지 않았다.

4. Dex와 BMP-2의 지방세포로의 분화에 미치는 영향

분리 배양한 줄기세포가 Dex에 의해 골세포로 분화가 유도될 것이라고 예상한 실험에서 Dex는 오히려 ALP 효소 활성을 떨어뜨리는 결과를 가졌다. 그 원인으로 Dex와 BMP-2가 지방세포로의 분화를 촉진시킨다는 보고가 있으므로 이를 검증하였다. 3일째와 7일째, oil red-O staining

을 통해 지방세포 형성을 조사하였으며, 또한 RT-PCR을 통해 지방세포 특이 유전자인 aP2와 PPAR γ 유전자의 발현을 7일째 조사하였다. Oil red-O staining 결과, 초기 단계인 3일째에는 대조군보다 Dex를 처리한 조건에서 두드러지게 많은 지방세포들이 관찰되었으며, BMP-2와 Dex/BMP-2를 처리한 조건하에서도 상당히 많은 세포들이 양성 반응을 보였다. 그러나 7일째 골세포 분화 배지내에서 지속적인 배양시, 지방세포 염색은 Dex 처리와 BMP-2를 처리한 배지내에서 현저히 약화되었으며, Dex와 BMP-2를 같이 처리한 조건에서는 양성반응을 나타내는 세포들이 잔류하였다 (Fig. 4A). Oil red-O staining 결과 7일째는 Dex나 BMP-2를 처리한 조건에서 양성 반응을 나타낸 세포가 현저히 줄어들었음에도 불구하고, Fig. 3의 ALP 효소 활성은 회복되지 않은 것으로 보인다. 또한 지방세포 특이 유전자인 aP2는 7일째에도 Dex 또는 BMP-2를 처리한 상태에서 계속 발현되었고, PPAR γ 2의 발현도 Dex가 첨가된 배지에서는 현저히 줄어들었으나, BMP-2를 처리한 상태에서는 아직 발현이 유지되었다. 7일째는 지방세포와 골세포의 특성을 갖는 세포들이 섞여 있거나, 두 유전자의 발현이 모두 발현되는 양상이 나타난 것으로 보인다. 그러나 21일째 시도한 von Kossa staining에서 Dex와 BMP-2를 처리한 배지에서도 상당한 미네랄의 침착이 이루어졌으므로 보아 초기의 지방세포로의 전환이 억제되고, 골세포로의 분화 방향으로 진행되었음을 알 수 있다 (Fig. 4B). 지방세포로의 분화현상에서는 15주된 랫드에서 뽑은

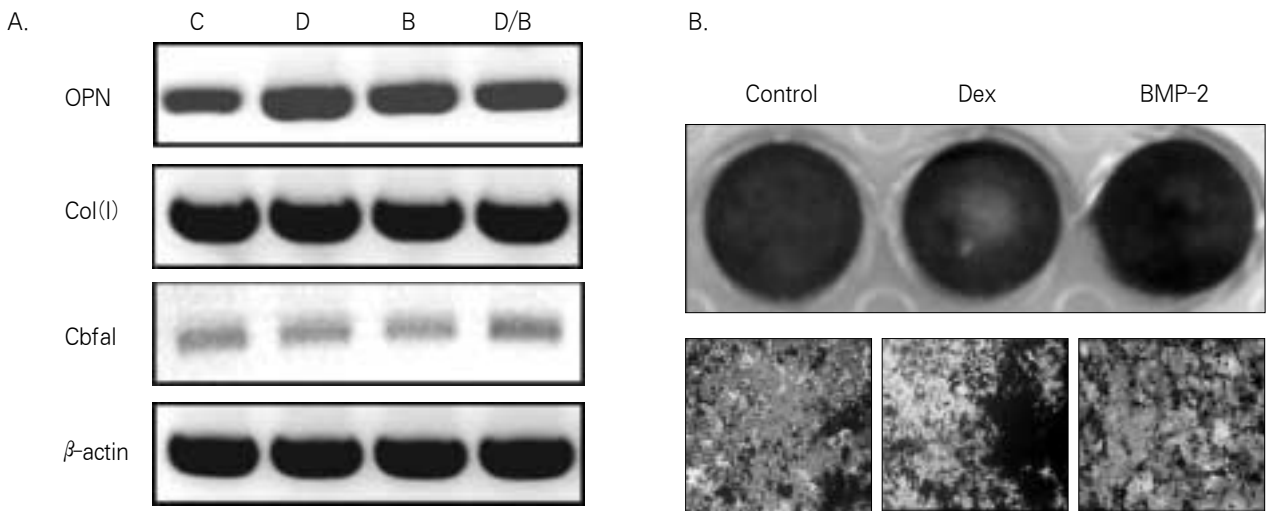


Fig. 3. A: Expression of osteoblast markers by RT-PCR at 7 days of rat stromal cells in culture condition supplemented with D(Dex, 10nM), B(BMP-2,100ng/ml) and D/B(Dex/BMP-2); OPN(osteopontin), Coll(collagen type I), CbfaI and β -actin as control B: Von Kossa staining at 21 days after culturing in Dex (10nM) and BMP-2(100ng/ml). Upper layer shows overall plate and lower layer means each magnified (x20) plate.

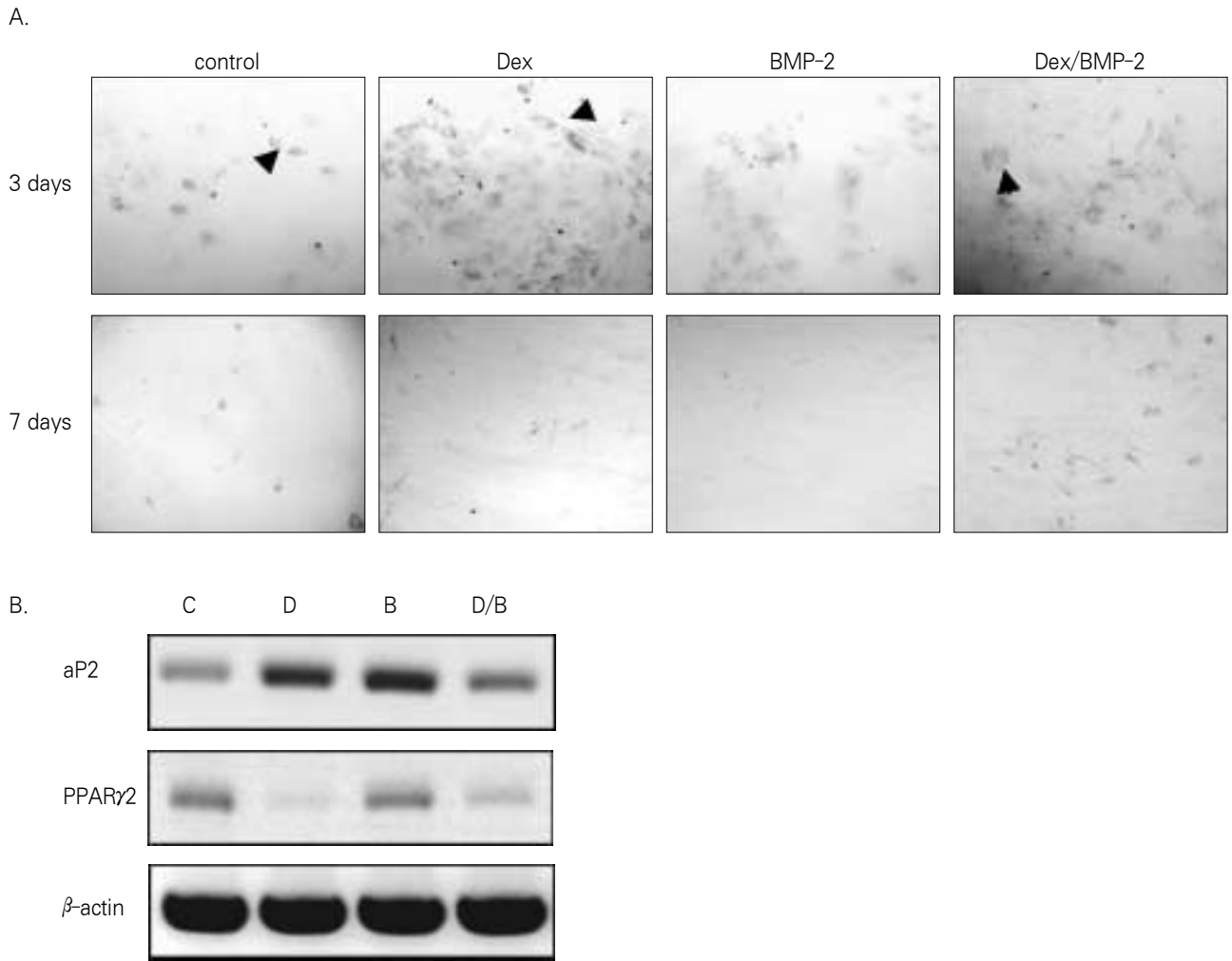


Fig. 4. Effect of Dex and BMP-2 on adipocytic differentiation:
 A. oil red staining at 3 days and 7 days after treatment of dex(10nM). BMP-2(100ng/ml) and Dex/BMP-2.
 B. RT-PCR for adipocytic marker genes, aP2 and PPAR γ at 7days.
 C(control), D(Dex), B(BMP-2), D/B(Dex/BMP-2) *arrows indicate red-stained adipocyte.

줄기세포가 4주된 랫드에서 뽑은 줄기세포보다 대조군과 비교하여 좀 더 강한 반응을 보였지만, Dex와 BMP-2에 대한 반응은 4주된 랫드의 줄기세포와 비슷한 경향을 나타냈다.

IV. 고 찰

골 재생을 목적으로 한 줄기세포를 응용한 조직공학적인 치료에서 성공할 수 있는 가장 중요한 요소로 주입한 줄기세포의 양이 고려되고 있다. 많은 수의 줄기세포를 얻기 위해, 시험관에서 배양 후 여러 계대배양을 넘기면서 세포 수를 증대시키는 방법을 쓰고 있다. 그러나 골세포 분화 진행의 효율성에 있어서 계대배양 횟수가 올라갈수록 개체수의 증

식으로 인한 골세포 분화를 비롯한 다양한 세포 형태로의 분화능력이 점차적으로 감소하며, 또한 증식이 멈춰지는 노화현상이 나타나기도 한다^{18,19)}.

랫드는 마우스에 비해 많은 양의 골수를 얻을 수 있는 장점으로 인해, 생체 내에서 골재생을 위한 여러 지지체(scaffold)를 이용한 동물실험에서 골수세포 공급원으로 많이 쓰이고 있다. 랫드의 골수에서 뽑은 액은 다양한 세포가 함유된 이질성(heterogeneity)을 나타낸다. 이번 실험에서는 지지체를 이용한 골 재생의 실험에 앞서 분리한 줄기세포들의 특성을 세포 외에서 실험한 결과, 현재 많은 논문에서 보고되고 분리 방법에 따른 문제점에 관한 분석을 시도하였다. 골세포 분화배지에는 ascorbic acid 2-phosphate (50-150 μ M)와 β -glycerophosphate (10mM) 함유하고,

일반적으로 유도 물질을 전혀 처리하지 않은 대조군에서는 유도물질을 첨가한 그룹에 비해 현저히 낮은 ALP 활성과 미네랄화를 보여주는데 비해, 이번 실험에서 시도한 분석에서는 대조군에서 높은 ALP 효소 활성을 나타냈고, 강력한 분화유도 물질인 Dex를 처리한 그룹에서는 오히려 ALP 효소 활성을 감소시켰으며, 미네랄화도 떨어졌다. BMP-2 또한 Dex만큼 지연시키지는 않았으나, 대조군에 비해 큰 상승효과는 나타나지 않았다. 그 원인 분석으로 Dex와 BMP-2에 의한 지방세포로의 전환 잠재력(potential)을 검증하였다. 유도물질을 처리한 후 3일째 되는 시점에서 시도한 oil red-O staining에서 양성반응을 보인 세포들이 Dex와 BMP-2를 처리한 조건에서 두드러지게 증가하였으나, 7일 이후부터는 급격하게 줄어드는 현상을 보였다. 대조군에서 높은 수치의 ALP 효소 활성도를 보인 것은, 세척 방법을 통한 종래의 방법에서 이미 초기 골세포로의 분화가 진행된 골세포 전구체가 다량 함유되어 있었고, 이는 2 번째 계대배양을 통해 많은 수로 증식된 것으로 보인다. 또한 골세포로 분화시키기 위해 Dex를 처리하거나, BMP-2를 처리하여 골세포 분화를 향상시킬 수 있다는 다른 실험 결과와 달리, 오히려 대조군보다 낮은 수치의 ALP 효소 활성도를 나타낸 것은, Dex나 BMP-2가 지방세포로의 전환을 일시적으로 유도함으로써 나타난 결과로 보인다. 그러나 지속적인 첨가시 지방세포 형성이 감소하고, 21 일째 측정된 von Kossa staining에서도, Dex와 BMP-2를 첨가한 배지 조건에서 대조군보다는 약하지만 상당한 미네랄화 과정이 진행된 것으로 관찰되었다. 즉 지방세포와 골세포는 주위 조건에 따라 지방세포는 골세포로의, 골세포는 지방세포로의 전환이 일어날 수 있다는 개념과 상응하는 결과로 볼 수 있다¹⁹⁾. 이 논문에서 나타난 결과로 보아 골재생성을 위한 조직 공학적인 줄기세포의 응용에 있어서, Dex의 첨가가 절대적으로 필요한 것으로 보이지 않으며, 오히려 지방세포로의 분화가 유도됨으로써, 미네랄화 과정이 지연될 수 있다는 사실을 알 수 있다. 사람의 골수줄기세포에서는 Dex에 의한 골세포 분화 유도 현상이 명확하게 일어나고, 지방세포로의 전환을 유도하기 위해서는 Dex 이외에 insulin과 IBMX(3-isobutyl-1-methyl xanthine)의 첨가가 필요한 반면²⁰⁾, Atmani 등의 보고에서와 같이 설치류 동물의 줄기세포는 Dex 처리만으로도 지방세포로의 분화 잠재력이 크게 증대되는 것으로 보인다²¹⁾. 이는 지방세포와 골세포로의 분화 호환현상이 설치류동물에서 좀더 쉽게 일어나고 있다는 것을 의미하며²²⁾, Dex와 BMP-2가 일시적으로 지방세포의 특징을 갖는 형질 발현이 나타나지만, 지속적인 공급은 세포로 하여금, 다시 골세포로의 전환을 촉진하는 유도체의 역할을 한다고 볼 수 있다. 15주된 쥐에서 추출한 줄기세포는 지방세포로의 전환이 좀 더 활발한 것으로 보아, 사람에게 있어서도 나이가 들수록 골조직내에서 지방조직 형

성이 좀 더 활발히 이루어진다고 예측할 수 있으며, 이로 인한 골다공증이 좀 더 빈번히 일어나는 원인이 될 수 있는 것으로 간주된다. 이번 논문에서 드러난 쥐의 줄기세포의 특성을 고려하여, 이를 이용한 조직 공학 연구에 오류가 형성되지 않도록, 사용 목적에 따른 배양 조건을 확립하는 것이 필요할 것으로 보인다.

V. 결 론

대퇴골이나 정강이뼈를 배지로 씻어내는 방법을 통하여 추출한 쥐의 골수 줄기 세포는 이미 골세포로의 분화가 진행된 골세포 전구체가 다량 함유되어 있어서 배양을 통해 많은 수로 증식되어 있었고, 그 결과 다른 분화 유도물질의 첨가 없이도 ALP 효소 활성이 높았으며, 미네랄화 과정이 잘 이루어졌다. 분화 유도물질인 Dex와 BMP-2는 처리한 후 초기 상태에서는 oil red-O staining을 통하여 지방세포 형성이 증가되는 것을 관찰할 수 있었으나, 계속적인 공급시 지방세포 형성이 감소되고, 골세포로의 분화가 다시 촉진되고 미네랄화도 일어났다. 골세포 분화를 유도하기 위해 처리한 Dex와 BMP-2는 골세포와 지방세포의 분화 모두를 유도하였으며, 그로 인해 미네랄화가 오히려 지연되는 양상이 나타났으며, Dex나 BMP-2 처리를 하지 않은 대조군에서 가장 높은 ALP 효소 활성이 나타나고 효율적인 미네랄화가 일어나는 현상이 특이하게 관찰되었다. 이 결과로 보아 골세포와 지방세포 사이에는 주위 환경에 따른 형질의 호환이 가능하다는 것을 예상할 수 있다. 또한 줄기세포의 특정세포로의 분화 유도시 줄기세포를 이용한 여러 기초 연구와 골대체 물질을 분석하는 시스템에서, 쥐로부터 얻은 줄기세포를 사용하는 경우, 정확한 분석이 이루어지도록 하기 위해서 이번 논문에서 나온 결과를 참조하면 많은 도움이 될 것으로 기대된다.

참고문헌

1. Maniopoulos C, Sodek J, Melcher AH : Bone formation in vitro by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats. *Cell Tissue Res* 254(2) : 317, 1988.
2. Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VM, Yoo JU : In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res* 238(1) : 265, 1998.
3. Beresford JN, Bennett JH, Devlin C, Leboy PS, Owen ME : Evidence for an inverse relationship between the differentiation of adipocytic and osteogenic cells in rat marrow stromal cell cultures. *J Cell Sci* 102:341, 1992.
4. Goldstein AS : Effect of seeding osteoprogenitor cells as dense clusters on cell growth and differentiation. *Tissue Eng* 7(6) : 817, 2001.
5. Caplan AI, Denis JE : Mesenchymal stem cells: Progenitors, progeny, and pathways. *J Bone Miner Metab* 14:193, 1996.

6. Cooper MS, Hewison M, Stewart PM : Glucocorticoid activity, inactivity and the osteoblast. *J Endocrinol* 163(2):159, 1999.
7. Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G : *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* 89(5):747, 1997.
8. Bennett JH, Joyner CJ, Triffitt JT, Owen ME : Adipocytic cells cultured from marrow have osteogenic potential. *J Cell Sci* 99 :131, 1991.
9. Wu Z, Bucher NL, Farmer SR : Induction of peroxisome proliferator-activated receptor gamma during the conversion of 3T3 fibroblasts into adipocytes is mediated by C/EBPbeta, C/EBPdelta, and glucocorticoids. *Mol Cell Biol* 16(8) : 4128, 1996.
10. Wang EA, Israel DI, Kelly S, Luxenberg 예 : Bone morphogenetic protein-2 causes commitment and differentiation in C3H10T1/2 and 3T3 cells. *Growth Factors* 9(1) : 57, 1993.
11. Gimble JM, Morgan C, Kelly K, Wu X, et al : Bone morphogenetic proteins inhibit adipocyte differentiation by bone marrow stromal cells. *J Cell Biochem* 58(3) : 393, 1995.
12. Ichida F, Nishimura R, Hata K, Matsubara T, et al : Reciprocal roles of *MSX2* in regulation of osteoblast and adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 279(32) : 34015, 2004.
13. Park SR, Oreffo RO, Triffitt JT : Interconversion potential of cloned human marrow adipocytes in vitro. *Bone* 24(6) : 549, 1999.
14. Maurin AC, Chavassieux PM, Frappart L, Delmas PD, et al : Influence of mature adipocytes on osteoblast proliferation in human primary cocultures. *Bone* 26(5) : 485, 2000.
15. Kelly KA, Tanaka S, Baron R, Gimble JM : Murine bone marrow stromally derived BMS2 adipocytes support differentiation and function of osteoclast-like cells in vitro. *Endocrinology* 139(4) : 2092, 1998.
16. Benayahu D, Shur I, Ben-Eliyahu S : Hormonal changes affect the bone and bone marrow cells in a rat model. *J Cell Biochem* 79(3) : 407, 2000.
17. Meunier P, Aaron J, Edouard C, ignon G : Osteoporosis and the replacement of cell populations of the marrow by adipose tissue. A quantitative study of 84 iliac bone biopsies. *Clin Orthop* 80:147, 1971.
18. Muraglia A, Cancedda R, Quarto R : Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *J Cell Sci* 113 : 1161, 2000.
19. Banfi A, Bianchi G, Notaro R, Luzzatto L, et al : Replicative Aging and Gene Expression in Long-Term Cultures of Human Bone Marrow Stromal Cells. *Tissue Eng* 8(6) : 901, 2002.
20. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, et al : Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284(5411) : 143, 1999.
21. Atmani H, Chappard D, Basle MF : Proliferation and differentiation of osteoblasts and adipocytes in rat bone marrow stromal cell cultures: effects of dexamethasone and calcitriol. *J Cell Biochem* 89(2) : 364, 2003.
22. Dorheim MA, Sullivan M, Dandapani V, Wu X, et al : Osteoblastic gene expression during adipogenesis in hematopoietic supporting murine bone marrow stromal cells. *J Cell Physiol* 154(2) : 317, 1993.

저자 연락처

우편번호 110-749

서울특별시 종로구 연건동 28

서울대학교 치과대학 구강악안면외과학교실

황 순 정

원고 접수일 2004년 7월 10일

게재 확정일 2004년 11월 5일

Reprint Requests

Soon-Jung Hwang

Dept. of OMFS, College of Dentistry, Seoul National University

28 Yeongun-Dong, Chongro-Gu, Seoul, 110-749, Korea

Tel: + +82-2-2072-2630 Fax: + +82-2-766-4948

E-mail: sjhwang@snu.ac.kr

Paper received 10 July 2004

Paper accepted 5 November 2004