

골형성유도단백질의 첨가가 Δ^{12} -PGJ₂가 유도하는 석회화에 미치는 영향

김원경¹ · 김경화² · 김종진¹ · 이영규¹ · 구 영²

¹서울 아산병원 치과,

²서울대학교 치과대학 치주과학교실

I. 서론

치주염을 비롯하여 노화, 외상, 종양 등 여러가지 원인에 의하여 치조골이 손상된다. 손상된 치조골을 재생하기 위해서 자가골을 비롯한 여러 종류의 이식재의 사용과 차폐막을 이용한 골조직유도재생술 등이 사용되고 있으며 다양한 연구결과들이 보고되고있다.¹⁻⁴⁾ 이식재 중 가장 골조직 재생효과가 뛰어나다고 알려진 자가골의 경우, 자가골을 채취하기 위해서는 추가로 수술부위가 필요하며, 구강에서 채취할 수 있는 양이 상당히 제한적이라는 단점이 있다. 동종골 이식은 자가골의 단점을 보완할 수 있지만 공여자로부터 질병이 감염될 가능성을 완전히 배제할 수는 없다.⁵⁾ 따라서 기존의 골 이식재를 대체하거나 골 이식재의 골재생효과를 더욱 증진시킬 수 있는 물질들에 대해 관심이 높아지고 있으며 그중의 하나가 골형성유도단백질(BMP)이다. BMP는 transforming growth factor(TGF- β) super family에 속하는 단백질로서 Urist에 의해 처음으로 이소성 골형성능력을 갖고 있는 것으로 알려졌다.⁶⁾ In vitro 실험에

서 다양한 세포들이 조골세포로 분화되도록 유도하는 효과가 밝혀졌고,⁷⁻¹¹⁾ 여러 동물실험을 통해 치주조직¹¹⁻¹³⁾과 골조직의 재생을 유도하는 효과가 있으며, 재생된 골은 정상골과 유사하다고 보고되었다.¹⁴⁻¹⁹⁾ BMP 중 특히 rhBMP-2를 이용한 많은 실험에서 골조직 재생효과가 높으며, 최근에는 사람에서도 성공적으로 사용됨이 보고된 바 있다.^{20,21)}

Prostaglandin은 세포막으로부터 유래된 아라키도닉산의 대사산물로서 염증반응에 관여하는 중요한 매개인자로 알려져 있으며,²²⁾ 치주염에서 일어나는 골흡수에도 관여하는 것으로 알려져 있다.²³⁻²⁵⁾ 골흡수를 촉진하는 효과에 대해 여러 논문에서 보고되고 있는 반면,²²⁻²⁶⁾ 조골세포로의 분화와 성장을 촉진시켜 골형성을 유도한다는 상반된 결과도 보고되고 있다.²⁷⁻³¹⁾ Δ^{12} -PGJ₂는 프로스타그란딘 유도체의 하나인 PGD₂으로부터 수용액상에서 탈수반응을 거쳐 대사된 산물로서 Fukushima 등은 항염증, 항바이러스 및 항암효과가 있다고 보고한 바 있다.³²⁾ In vitro에서 PGD₂ 및 그의 대사물인 Δ^{12} -PGJ₂가 인간 조골세포의 증식 및 콜라겐 합성과 석회화를 촉진하

*본 연구는 아산생명과학연구소의 연구비 지원에 의하여 이루어졌음(2003-319).

교신저자 : 구 영, 서울시 종로구 연건동 28 서울대학교 치과대학 치주과학교실, 우편번호 : 110-749

E-mail : guy@snu.ac.kr

는 효과가 있으며,³³⁻³⁵⁾ 난소를 제거한 쥐 실험에서는 골형성을 촉진하므로써 난소적출로 유발되는 골다공증을 부분적으로 예방하였다고 보고되었다.³⁶⁾ 따라서 Δ^{12} -PGJ₂와 BMP-2는 모두 골대사에 관여하는 국소조절인자로써, BMP-2가 조골세포에 작용하는 Δ^{12} -PGJ₂의 기능에 어떤 영향을 미칠 수 있을지를 예상할 수 있다. 따라서 이 연구에서는 Δ^{12} -PGJ₂에 의한 조골세포의 증식 및 분화촉진으로 석회화가 일어나는 과정에서 rhBMP-2를 첨가함으로써 얻어지는 효과를 알아보고자 한다.

II. 연구재료 및 방법

1. 세포증식도 측정

인간 골육종세포주인 Saos-2 cell(ATCC-HTB 85, American Type culture collection)를 습도 95%, 온도 37C, 5% CO₂를 포함한 공기조건에서 10% fetal bovine serum(FBS; Gibco, NY)과 페니실린 100units/ml 및 스트렙토마이신 100ug/ml(Gibco, NY)이 포함된 20ml의 minimum essential medium(α -MEM; Gibco, NY)에서 배양하였다. 세포증식도 측정을 위해서 배양된 세포를 96-well multiplate에 5×10^4 cells/well이 되도록 접종한 후, 음성대조군에는 일반배지만, 양성대조군에는 일반배지에 100ng/ml농도의 rhBMP-2(R&D Systems, USA)를, 실험군에는 경조직형성배지에 각각 10^{-7} M농도의 Δ^{12} -PGJ₂ (Cayman Chemicals, Ann Arber, MI)를 단독으로 넣거나, 10^{-8} M농도의 Δ^{12} -PGJ₂와 100ng/ml rhBMP-2 혼합물을 첨가하였다. 배양 1, 2, 4일째 2mg/ml의 MTT-(Sigma, USA)를 넣고 4시간 후에 MTT 용액을 제거한 후 DMSO를 첨가하여 formazone을 녹인 후 microplate reader로 540nm에서 OD(Optical Density)를 측정하였다.

2. 알칼리성 인산효소(Alkaline phosphatase) 활성도 측정

배양된 Saos-2 cell을 12-well plate에 1×10^5 cell/well이 되도록 접종한 후, 음성대조군에는 일반배지만, 양성대조군에는 일반배지에 100ng/ml농도의 rhBMP-2(R&D Systems, USA)를, 실험군에는 경조직형성배지에 각각 10^{-7} M농도의 Δ^{12} -PGJ₂ (Cayman Chemicals, Ann Arber, MI)를 단독으로 넣거나, 10^{-8} M농도의 Δ^{12} -PGJ₂와 100ng/ml rhBMP-2혼합물을 첨가하였다. 배양 3일째 각 well로부터 배지를 제거하고, 0.25% trypsin-EDTA 용액으로 5분간 처리하여 세포를 탈락시킨 후, 세포 현탁액을 원심분리하였다. 분리된 세포들을 모아 0.5ml의 증류수를 가한 뒤 1분간 얼음위에서 초음파분쇄하고 0.1ml의 세포분쇄액을 0.1ml의 0.1M glycine-NaOH buffer, 0.1ml의 15mM para-nitrophenol phosphate(PNPP), 생리식염수에 용해한 0.1% Triton X-100 및 0.1ml의 증류수와 혼합하고 30분간 37C에서 반응시켰다. 반응 후에 2.5ml의 0.1N NaOH를 첨가하고 얼음위에 놓아 반응을 중지시키고 microplate reader로 405nm에서 흡광도를 측정하는 방법으로 용액 내에 생산된 para-nitrophenol(PNP)를 정량하였다. Alkaline phosphatase(ALPase)활성도의 단위는 단백질 양을 기본으로 하였다.

3. 석회화 결절 형성능 관찰

쥐의 조골세포주인 MC3T3-E1 cell(Rinken cell bank, Japan)을 6 well plate에 접종한 후, 음성대조군에는 10% fetal bovine serum(FBS; Gibco, NY)과 페니실린 100units/ml 및 스트렙토마이신 100ug/ml(Gibco, NY)이 포함된 minimum essential medium(α -MEM; Gibco, NY)20ml의 경조직형성배지만 넣고, 양성대조군에는 경조직형성배지에 100ng/ml 농도의 rhBMP-2를, 실험군에는 경조직형성배지에 각각 10^{-7} M 농도의 Δ^{12} -PGJ₂

단독 또는 100ng/ml 농도의 rhBMP-2와 10^{-8} M 농도의 Δ^{12} -PGJ₂ 혼합물을 넣고 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 배양 21일째 95% 에탄올로 고정한 후, Alizarin red solution으로 염색하여 광학 현미경하에서 석회화 결절의 형성여부를 대조군과 비교하여 관찰하였다.

4. 조골세포 분화의 표지자들에 대한 간 이정량적 역전사효소-증합효소연쇄반 응(RT-PCR)

100mm 세포배양접시에 배양된 Saos-2 cell을 배양 8시간, 1일, 7일째 TE로 처리하여 cell을 모은 후 total RNA extraction kit(Roche, Germany)를 사용하여 RNA를 분리해 냈다. 추출한 RNA 1 μ g을 Reverse Transcriptase, RNase inhibitor, 10X reaction buffer, dNTP 등과 혼합하여 25°C에서 10분, 45°C에서 60분, 4°C에서 5분 동안 반응시켜 cDNA를 합성하였다. 이렇게 얻은 cDNA 2 μ l와 20pmole의 primer를 DNA poly-

merase, dNTPs 및 reaction buffer 등이 포함된 AccuPower[®] PCR PreMix(Bioneer, Korea)에 넣고 증류수를 더해 50 μ l로 만들어 thermal cycler(ependorf, Germany)로 polymerase chain reaction(PCR)을 시행하였다. 사용된 primer의 염기서열과 크기, PCR조건은 표 1과 같다. PCR 생성물은 2% agarose gel상에서 전기영동을 시행하고 0.5 μ g/ml ethidium bromide로 염색하여 GelDoc 2000 Gel Documentation System(BIO-RAD, USA)으로 밴드의 intensity를 관찰하였다. 18s rRNA의 intensity에 대한 각각의 osteoblast marker의 intensity의 비를 구하여 mRNA의 상대적인 발현양을 관찰분석하였다.

5. 통계학적 분석

세포증식도 및 ALPase 활성도 측정값은 one-way ANOVA와 사후검정에 Duncan 방법을 시행하였다.

Table 1. Primer 염기서열과 크기

Sequence	Expected size of PCR product (bp)
Human COL I	(s) 5'-TATGGCGGCCAGGGCTCCGACCCTG-3' (as) 5'-CCAAGGGGGCCACATCGATGATGGG-3'
Human ALP	(s) 5'-ACGTGGCTAAGAATGTCATC-3' (as) 5'-CTGGTAGGCGATGTCCCTTA-3'
Human BMP-2	(s) 5'-GAAACGCCTTAAGTCCAGCTGT-3' (as) 5'-CTAGCGACACCCACAACCCTC-3'
cbfa1	(s) CCCACGACAACCGACCAT-3' (as) TGATTTAAAAGGACTTGGTG-3'
18s ribosomal RNA	(s) 5'-GCGAATTCCTGCCAGTAGCATATGCTTG-3' (as) 5'-GGAAGCTTAGAGGAGCGAGCGACCAAGG-3'

* s : sense, as : antisense

* COL I : type I collagen, ALP : alkaline phosphatase, BMP-2 : bone morphogenetic protein-2

Table 2. Cell proliferation by MTT assay in Saos-2 cells treated with Δ^{12} -PGJ₂ and rhBMP-2. rhBMP-2;100ng/ml, Δ^{12} -PGJ₂:10⁻⁷M, Δ^{12} -PGJ₂(10⁻⁸M) + rhBMP-2(100ng/ml)

	Control	rhBMP-2	Δ^{12} -PGJ ₂	Δ^{12} -PGJ ₂ +rhBMP-2
1 day	0.334±0.02	0.234±0.02 *	0.253±0.05 *	0.296±0.02
2 day	0.343±0.03	0.340±0.03	0.418±0.03 *	0.314±0.02
4 day	0.413±0.02	0.374±0.02 *	0.442±0.02	0.363±0.03 *

* : indicates significant difference compared to the control(p<0.001)

Table 3. Alkaline phosphatase activity of Saos-2 cells treated with Δ^{12} -PGJ₂ and rhBMP-2.(nmol-PNP/30min/ μ g prot), rhBMP-2 ; 100ng/ml, Δ^{12} -PGJ₂ :: 10⁻⁷M, Δ^{12} -PGJ₂(10⁻⁸M) + rhBMP-2(100ng/ml)

Control	rhBMP-2	Δ^{12} -PGJ ₂	Δ^{12} -PGJ ₂ +rhBMP-2
0.183±0.01	0.469±0.02 *	0.233±0.02	0.326±0.03 *

* : indicates significant difference compared to the control(p<0.001)

III. 연구결과

1. 세포증식도 측정

세포증식도 측정결과는 표 2와 같다. 인간골육종 세포(SAOS-2 cell)수는 1일째 rhBMP-2 단독군과 Δ^{12} -PGJ₂ 단독군에서 음성 대조군보다 유의한 수준으로 적었다.

2일째에는 Δ^{12} -PGJ₂ 단독군에서 다른 군보다 유의하게 세포수가 많았으며, 4일째에는 rhBMP-2 단독군과 rhBMP-2 / Δ^{12} -PGJ₂혼합군에서 다른 군보다 유의한 수준으로 세포수가 적었다. 시간에 따른 세포증식도를 비교하면 각 군 모두 1일, 2일, 4일째 시간이 경과될수록 세포수가 증가하는 양상을 보였다(Table 2).

2. 알칼리성 인산효소(ALPase)활성도 측정

ALPase의 활성도 측정 결과는 표 3과 같다. 음성대조군에 비해 양성대조군과 실험군 모두에서 높은 활성도를 보였으며, 활성도 크기는 양성대조군, rh BMP-2/ Δ^{12} -PGJ₂ 혼합군, Δ^{12} -PGJ₂단독군, 음성대조군 순으로 높게 나타났다(Table 3).

3. 석회화 결절 형성능 관찰

석회화 결절 형성은 그림 1과 같다. 다른 군에 비해 음성대조군에서 석회화 결절이 가장 적게 형성되었다. 양성 대조군에서 석회화 결절이 가장 많이 형성되었으며, 실험군에서는 Δ^{12} -PGJ₂단독군보다 rh-BMP-2/ Δ^{12} -PGJ₂혼합군에서 석회화 결절이 더 많이 형성된 것으로 관찰되었다(Figure 1).

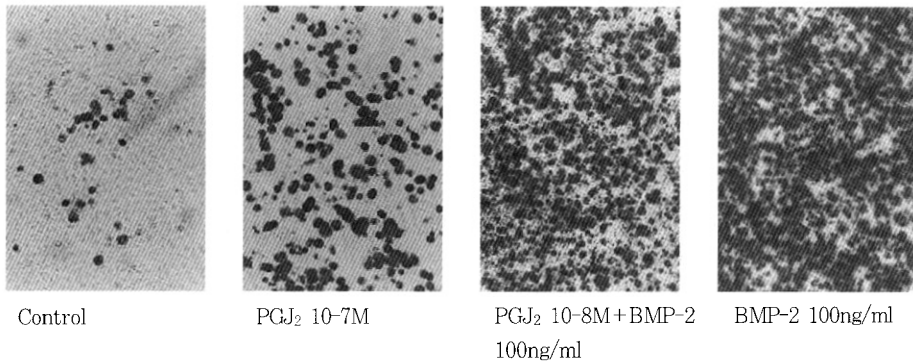


Figure 1. Representative in vitro mineralization data obtained from 21-day cultures of MC3T3-E1 cells.

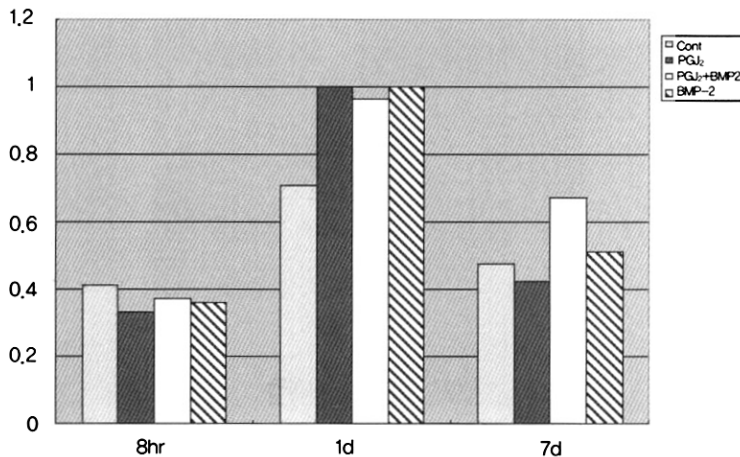


Figure 2. Effect of Δ^{12} -PGJ₂ on mRNA expression of ALPase

4. 역전사효소-중합효소연쇄반응(RT-PCR)

골모세포 분화 표지자인 Alkaline phosphatase(ALPase), Bone morphogenetic protein-2 (BMP-2), cbfa 1, type I Collagen의 RNA 발현량을 8시간, 1일, 7일 동안 관찰한 결과는 그림 2-5와 같다.

ALPase의 경우에는 1일까지 모든 군에서 발현량이 증가했다가 7일째 감소하는 경향을 보였다. 1일째 음성대조군에 비해 양성대조군과 실험군에서 발현량이 많았다(Figure 2).

BMP-2의 경우에는 8시간째 음성대조군에 비해 양성대조군과 실험군에서 발현량이 많았으며 특히 rhBMP-2와 Δ^{12} -PGJ₂혼합군에서 제일 높은 수치를 나타냈다. 1일째에는 모든 군에서 8시간째보다 증가하는 경향을 보였으며 각 군간에 발현량은 비슷하였다. 7일째에는 음성대조군과 Δ^{12} -PGJ₂단독군에서 다른 군보다 약간 높게 발현되었다(Figure 3).

cbfa1에서는 8시간과 1일째 모든 군에서 유사한 정도의 발현량을 보였으며, 7일째 모든 군에서 발현량이 약간 증가했으며 각 군간에는 차이가 없었다(Figure 4).

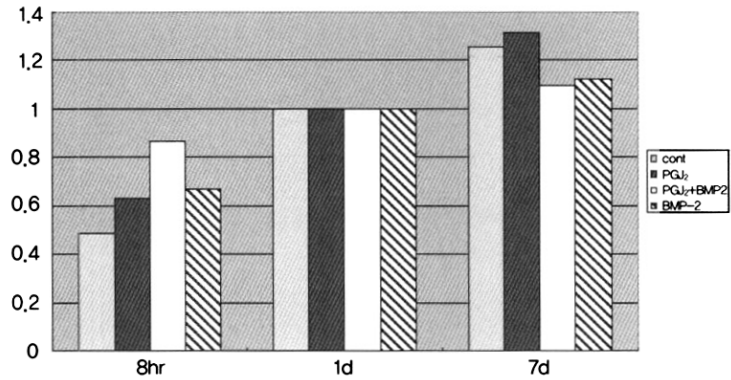


Figure 3. Effect of Δ^{12} -PGJ₂ and rhBMP-2/ Δ^{12} -PGJ₂ on the mRNA expression of BMP

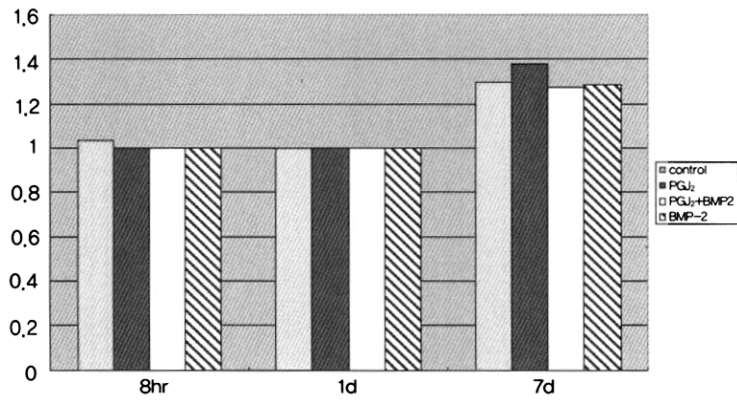


Figure 4. Effect of Δ^{12} -PGJ₂ on the mRNA expression of cbfa1

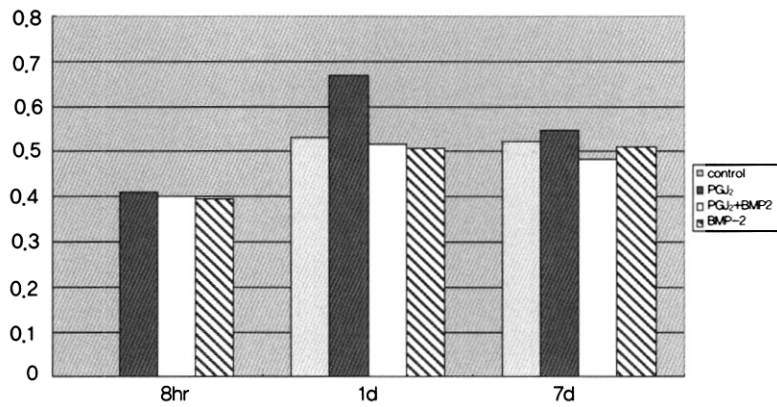


Figure 5. Effect of Δ^{12} -PGJ₂ on the mRNA expression of Collagen type 1

TypeI Collagen의 경우에는 음성대조군을 제외한 나머지 군에서 8시간째 유사한 양이 발현됐으며, 1일째 모든 군에서 발현됐으나 Δ^{12} -PGJ₂ 단독군에서 다른 군보다 약간 높았다. 7일째에는 모든 군에서 1일째에 비해 변화를 보이지 않았으며 각 군간에 차이가 없었다(Figure 5).

IV. 총괄 및 고찰

본 연구는 rhBMP-2와 Δ^{12} -PGJ₂가 골조직 재생을 위해 적합하게 사용될 수 있는지를 평가하는 기초단계의 실험으로서, 인간 골육종 세포에서 세포 증식 및 조골세포로의 분화에 미치는 효과와 석회화 결절 형성 효과를 평가하였다. rhBMP-2가 세포증식에 미치는 효과를 알아보는 이전의 연구들에서는 상반되는 결과들을 보고하였는데^{7,10,11,37}, 본 실험에서는 rhBMP-2 단독 투여군과 rhBMP-2/ Δ^{12} -PGJ₂ 혼합 투여군에서 대조군과 Δ^{12} -PGJ₂ 단독 투여군보다 세포수가 적었으며 이 결과를 토대로 rhBMP-2가 골육종세포의 증식을 억제하는 효과가 있음을 추정해 볼 수 있다. 반면, Δ^{12} -PGJ₂ 단독 투여군에서는 2일째 세포수가 대조군에 비해 유의한 수준으로 많았으며, 4일째에는 다른 세 군에 비해서 세포수가 많았지만, 대조군과는 통계학적으로 유의한 차이는 없었다. 이 결과는 같은 종류의 세포와 같은 배양조건에서 시행한 허 등³⁵의 연구 결과와 일치한다. rhBMP-2에 있어서 세포증식에 미치는 효과가 연구마다 다른 결과를 보이는 것은 세포종류와 배양조건이 각각 다르기 때문인 것으로 추정된다.

ALPase는 초기 골세포 분화단계에서 발현되는 단백질로 이 효소의 활성도는 조골세포의 분화 정도를 나타내는 지표로 널리 사용되어 왔다. 인간 골육종 세포를 이용한 본 연구에서 rhBMP-2와 Δ^{12} -PGJ₂는 각각 ALPase의 활성도를 증가시켰으며, 이 결과는 이전의 연구들의 결과와 일치한다.^{10,11,31,35,37} rhBMP-2 단독 투여군에서 활성도가 제일 컸으며, Δ^{12} -PGJ₂ 단독 투여군보다 rhBMP-2/ Δ^{12} -PGJ₂ 혼합 투여군에서 활성도가 큰

것으로 보아 rhBMP-2에 의한 활성화 증가 효과가 Δ^{12} -PGJ₂에 의해서 감소되는 것을 추정해볼 수 있으나 rhBMP-2와 Δ^{12} -PGJ₂ 상호간의 작용을 규명하기 위해 앞으로 많은 연구들이 필요하리라 사료된다.

석회화 형성 정도를 평가하는 실험에서도 rhBMP-2 및 Δ^{12} -PGJ₂ 모두 조골세포의 석회화를 촉진시켰다. 다수의 연구에서 rhBMP-2가 조골세포의 석회화를 촉진하는 효과가 있음이 밝혀진 반면¹⁵⁻²¹, Δ^{12} -PGJ₂의 경우에는 드물다³³⁻³⁶. 인간 조골세포를 이용한 Koshihara 등³⁴의 연구와 쥐 조골세포를 이용한 허 등³⁵의 연구에서 Δ^{12} -PGJ₂의 농도가 10^{-5} - 10^{-6} 몰일 때 석회화를 촉진하는 효과가 크다고 보고하였는데, 10^{-7} 농도의 Δ^{12} -PGJ₂를 사용한 본 연구에서도 석회화 촉진효과가 있었다. rhBMP-2와 Δ^{12} -PGJ₂의 석회화 촉진효과를 비교해 보면 rhBMP-2가 Δ^{12} -PGJ₂보다 석회화를 촉진시키는 효과가 크게 나타났다. 또한 rhBMP-2/ Δ^{12} -PGJ₂ 혼합 한 경우에 rhBMP-2 단독 투여군보다 석회화 촉진효과가 감소하는 경향을 보임으로써 rhBMP-2에 의한 골형성 효과가 Δ^{12} -PGJ₂에 의해 억제되는 것으로 보이며, 이는 ALPase 활성도 실험 결과와도 유사한 양상을 띄었다.

골성세포의 분화단계에서 골기질 단백질이 발현됨이 보고되어 왔다.^{38,39} 골기질단백질로 알려진 ALPase, TypeI collagen, BMP-2 및 cbf1의 mRNA 발현정도를 살펴본 본 연구에서 골성세포의 초기 분화단계에서 발현된다고 알려진 ALPase와 Type I collagen³⁹은 1일째 모든 군에서 발현됐으며, 7일째 발현량이 감소하거나 1일째와 유사한 정도로 발현되었다. rhBMP-2와 Δ^{12} -PGJ₂를 단독 또는 혼합 투여한 군에서 음성대조군에 비해 1일째 ALPase의 mRNA 발현량이 많았으며, Type I collagen의 mRNA는 초기 8시간째 rhBMP-2와 Δ^{12} -PGJ₂ 단독 또는 혼합 투여한 군에서 역시 음성대조군에 비해 많이 발현되었다. BMP-2의 mRNA도 모든 군에서 발현되었는데, 초기 8시간째에는 음성대조군에 비해 rhBMP-2와 Δ^{12} -PGJ₂를 단독 또는 혼합 투여한 군에서 발현량이 많았다. 7일째에는 음

성대조군과 Δ^{12} -PGJ₂ 단독 투여군에서 다른 군보다 발현량이 많았는데 이런 결과를 보이는 것은 rh-BMP-2를 투여한 군에서 초기에 생성되는 BMP-2 인해 이것의 농도가 높아지게 되면 BMP-2의 생성을 오히려 억제하는 반응이 일어나기 때문일 것으로 추측해볼 수 있으나 이것을 규명하기 위한 연구가 앞으로 필요하리라 본다. 골성기질 단백질의 발현을 측정함으로써 조골세포로의 분화에 미치는 효과를 알아본 이전의 연구들에서 BMP-2와 Δ^{12} -PGJ₂가 각각 골성세포에서 조골세포로의 분화를 촉진함을 반영하는 결과들이 나왔는데^{10,35,40}, 본 연구에서도 BMP-2와 Δ^{12} -PGJ₂ 각각 또는 혼합한 경우에 이전의 연구결과와 유사한 양상을 보임을 확인하였다.

따라서 본 연구의 결과들을 종합해 볼 때 rh-BMP-2의 골 형성을 촉진하는 효과를 재확인할 수 있었고, rhBMP-2를 Δ^{12} -PGJ₂와 혼합했을 때 Δ^{12} -PGJ₂단독으로 사용했을 때보다 골형성을 촉진시키는 효과를 기대해 볼 수 있으나 Δ^{12} -PGJ₂와 rhBMP-2간의 상호작용을 알기 위해서는 앞으로 많은 연구가 필요하리라 사료된다.

V. 결론

Δ^{12} -PGJ₂에 의한 조골세포로의 분화 촉진 및 석회화 과정에서 rhBMP-2를 첨가함으로써 얻어지는 효과를 알아보고자 인간 골육종세포를 이용한 세포 증식도 측정, ALPase활성도 측정과 조골세포 분화 표지자들에 대한 RT-PCR 및 쥐 조골세포의 석회화 결절 형성능 관찰을 시행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. rhBMP-2 단독 또는 rhBMP-2/ Δ^{12} -PGJ₂ 혼합군에서는 세포증식을 억제하는 효과가 있었다.
2. ALPase 활성도 및 석회화 결절 형성 효과는 rhBMP-2 단독군에서 제일 높았으며, rhBMP-2/ Δ^{12} -PGJ₂ 혼합군, Δ^{12} -PGJ₂ 단독군순으로 나타났다.

3. rhBMP-2, Δ^{12} -PGJ₂ 단독 또는 rhBMP-2/ Δ^{12} -PGJ₂ 혼합군에서 골형성관련 분화특이 단백질 발현을 유도하였다.

이상의 결과를 볼 때, Δ^{12} -PGJ₂와 rhBMP-2을 혼합함으로써 Δ^{12} -PGJ₂단독으로 사용할 때보다 골형성 효과는 증가되나 rhBMP-2 단독에 의한 골형성 효과보다는 낮은 것으로 보이며, 이들간의 상호작용을 밝히기 위해 앞으로 많은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

VI. 참고문헌

1. Altieri ET, Reeve CM & Sheridan PJ. Lyophilized bone allografts in periodontal intraosseous defects. J Periodontol 1979; 50:510-526.
2. Bowers G, Felton F, Middleton C, et al. Histologic comparison of regeneration in human intrabony defects when osteogenin is combined with demineralized freeze-dried bone allograft and with purified bovine collagen. J Periodontol 1991;62:690-702.
3. Caffesse RG, Smith BA, Duff B, et al. Class II furcations treated by guided tissue regeneration in humans: case reports J Periodontol 1990;61:510-514.
4. Carraro JJ, Sznajder N & Alonso CA. Intraoral cancellous bone autografts in the treatment of infrabony pockets. J Clinical Periodontol 1976;3:104-109.
5. Tomford WW. Current concepts review. Transmission of disease through transplantation of musculoskeletal allografts. J. Bone and Joint Surg. 1995;77-A:1742-1754.
6. Urist MR, DeLange RJ, Finerman GAM.

- Bone cell differentiation and growth factors : induced activity of chondro-osteogenic DNA. *Science* 1983;220:680-686.
7. Asahina I, Sampath TK, Nishimura I, et al. Human osteogenic protein-1 induces both chondroblastic and osteoblastic differentiation of osteoprogenitor cells derived from newborn rat calvaria. *J Cell Biol* 1993;123:921-933.
 8. Christopher L, Strayhorn J, Stephen Garrett, et al. Growth factors regulate expression of osteoblast-associated genes *J periodontol* 1999;70:1345-1354.
 9. Hughes FJ, Collyer J, Stanfield M, Goodman SA. The effects of bone morphogenetic protein-2, -4, and -6 on differentiation of rat osteoblast cells in vitro. *Endodont* 1995;136:2671-2677.
 10. 김현중, 최상목, 구영 등. 치주인대세포와 치은 섬유아세포의 분화에 미치는 rh BMP-2의 효과에 대한 연구. *대한치주과학회지* 2002;32:389-402.
 11. Knutsen R, Wergedal JE, Sampath TK, Baylink DJ, Mohan S. Osteogenic protein-1 stimulates proliferation and differentiation of human bone cells in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993;194:1352-1358.
 12. King GN, King N, Hughes FJ. Effect of two delivery systems for recombinant human bone morphogenetic protein-2 on periodontal regeneration in vivo. *J Periodont Res* 1998;33:226-236.
 13. Ripamonti U, Heliotis M, Vander Heerer B, Reddi AH. Bone morphogenetic proteins induce periodontal regeneration in the baboon(papioirsinus). *J Periodont Res* 1994;29:439-445.
 14. Sigurdsson TJ, Tatakis DN, Lee MB, Wikesjo UME. Periodontal regenerative potential of space-providing expanded polytetrafluoroethylene membranes and recombinant human bone morphogenetic proteins. *J Periodontol* 1995;66:511-521
 15. Barbozoa EP, Caula AL, Caula FO, et al. Effect of Recombinant human bone morphogenetic protein-2 in an absorbable collagen sponge with space-providing biomaterials on the augmentation of chronic alveolar ridge defects. *J Periodontol* 2004;75:702-708.
 16. Noshi T, Yoshikawa T, Dohi Y, et al. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 potentiates the in vivo osteogenic ability of marro/hydroxyapatite composites *Artificial Organs* 2001;25:201-208.
 17. Schwartz Z, Weesner T, Van Dijk S, et al. Ability of deproteinized cancellous bovine bone to induce new bone formation. *J Periodontol* 2000;71:1258-1269.
 18. Sigurdsson TJ, Fu E, Tatakis DN, Rohrer MD, Wikesjo UME Bone morphogenetic protein-2 for peri-implant bone regeneration and osseointegration *Clin Oral Impl Res* 1997;8:367-374.
 19. Zegzula HD, Buck DC, Brekke J, et al. Bone formation with use of rhBMP-2 *J Bone & Joint Surgery* 1997;79-A 1778-1790.
 20. Cochran DL, Jones AA, Lilly LC, et al. Evaluation of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in oral applications including the use of endosseous implants: 3-year results of a pilot study in humans. *J Periodontol* 2000;71:1241-1257.

21. Jung RE, Glauser R, Schärer P, et al. Effect of rhBMP-2 on guided bone regeneration in humans. A randomized, controlled clinical and histomorphometric study. *Clin. Oral Impl. Res.* 2003; 14:556-568.
22. Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA. Principles of bone biology, 2nd ed. Academic Press, 2002:979-994.
23. Offenbacher S, Collins JG, Heasman PA. Diagnostic potential of host response mediators. *Advances in Dental Research* 1993;7:175-181.
24. Offenbacher S, Odle BM, Gray RC, Van Dyke TE. Crevicular fluid prostaglandin E level as a measure of periodontal disease status of adult and juvenile periodontitis patients. *J Periodont Res* 1984; 19:1-13.
25. Offenbacher S, Heasman PA, Collins JG. Modulation of host PG2 secretion as a determinant of periodontal disease expression. *J Periodontol* 1993;64:432-444.
26. Klein DC, Raisz LG. Prostaglandins: Stimulation of bone resorption in tissue culture. *Endocrinology* 1970;86:1436-1440.
27. Flanagan AM, Chambers TJ. Stimulation of bone nodule formation in vitro by prostaglandins E1 and E2. *Endocrinology* 1992;130:443-448.
28. Jee WS, Ma YF. The in vivo anabolic actions of prostaglandins in bone. *Bone* 1997;21:297-304.
29. Ono I, Inoue M, Kuboki Y. Promotion of the osteogenetic activity of recombinant human bone morphogenetic protein by prostaglandin E1. *Bone* 1996;19:581-588.
30. Weinreb M, Suponitzky I, Keila S. Systemic administration of an anabolic dose of PGE2 in young rats increases the osteogenic capacity of bone marrow. *Bone* 1997;20:521-526.
31. Hakeda Y, Hiramatsu M, Tsunoi M, Kumegawa M. Inductive effects of prostaglandins on alkaline phosphatase in osteoblastic cells, clone MCT3-E1 *J Biochem* 1985;97:97-104.
32. Fukushima M. Prostaglandin J2-antitumor and anti-viral activities and mechanisms involved. *Eicosanoids* 1999; 3: 189-199.
33. Tasaki Y, Takamori R, Koshihara Y. Prostaglandin D2 stimulates collagen synthesis by human osteoblasts during calcification. *Prostaglandins* 1991;41: 303-313.
34. Koshihara Y, Kawamura M. Prostaglandin D2 stimulates calcification of human osteoblastic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;159:1206-1212.
35. 허정미, 김경화, 정경옥, 이해준, 류인철, 구영, 정종평. Δ^{12} PGJ₂ 및 PPAR 감마 길항체가 조골세포의 증식 및 분화에 미치는 효과. *대한치주과학회지* 2005;35(1):13152.
36. Takagi T, Yamamoto T, Asano S, Tamaki H. Effect of prostaglandin D2 on the femoral bone mineral density in ovariectomized rats. *Calcified Tissue* 1993;52: 442-446.
37. Kobayashi M, Takicuchi T, Suzuki R, et al. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 stimulates osteoblastic differentiation in cells isolated from human periodontal ligament. *J Dent Res* 1999;78:1624-1633.

38. Lian J, Stein GS. Concepts of osteoblast growth and differentiation: Basic for modulation of bone cell development and tissue formation. *Crit Rev Oral Bio Med* 1992;3:269-305.
39. Yao KL, Todescan R, Sod J. Temporal changes in matrix protein synthesis and mRNA expression during mineralized tissue formation by adult rat bone marrow cells in culture. *J Bone Miner Res* 1994;9:231-240.
40. Lecanda F, Avioli LV, Cheng SL. Regulation of bone matrix protein expression and human osteoblasts and human bone marrow stromal cells by bone morphogenetic protein-2. *J Cell Biochem*. 1997;67:386-396.

The effect of rhBMP-2 on Δ^{12} -PGJ₂ induced osteoblastic differentiation and mineralization

Won-Kyung Kim¹ · Kyoung-Hwa Kim² · Jong-Jin Kim¹ · Young-Kyu Lee¹ · Young Ku²

¹Department of Dentistry, Asan Medical Center, Seoul, Korea

²Department of Periodontology, Seoul National University, Seoul, Korea

Prostaglandin plays a significant role in the local control of bone metabolism associated with periodontal disease. Δ^{12} -PGJ₂ is a natural PGD₂ metabolite that is formed in vivo in the presence of plasma. It is known for Δ^{12} -PGJ₂ to stimulate calcification in osteoblastic cells. Bone morphogenetic protein(BMP) stimulated osteoblastic differentiation in various types of cells and greatly enhanced healing of bony defects.

The purpose of this study was to evaluate the effect of rhBMP-2 on Δ^{12} -PGJ₂ induced osteoblastic differentiation and mineralization in vitro. A human osteosarcoma cells line Saos-2 were cultured. In the test groups, 10⁻⁷M of Δ^{12} -PGJ₂ or mixture of 10⁻⁸M of Δ^{12} -PGJ₂ and 100ng/ml of rhBMP-2 or 100ng/ml of rhBMP-2 were added to culture media. After 1 day, 2 days and 4 days of culture period, the cell number was measured. Alkaline phosphatase activity was measure at 3 days. Reverse transcription polymerase chain reaction(RT-PCR) was performed to determine the expression of mRNA of bone matrix protein at 8 hours, 1 day and 7 days. The ability to produce mineralized nodules in rat osteoblasts(MC3T3-E1) was evaluated at 21 days.

The results were as follows :

1. rhBMP-2 or mixture of rhBMP-2 and Δ^{12} -PGJ₂ inhibited cell proliferation of human osteosarcoma cells.
2. rhBMP-2 or mixture of rhBMP-2 and Δ^{12} -PGJ₂ stimulated alkaline phosphatase activity significantly higher than Δ^{12} -PGJ₂ alone.
3. rhBMP-2 or mixture of rhBMP-2 and Δ^{12} -PGJ₂ stimulated mineralization compared to Δ^{12} -PGJ₂ alone.
4. mRNA of alkaline phosphatase, BMP-2, cbfa 1, Type I collagen were detected in the group treated with Δ^{12} -PGJ₂/rhBMP-2, rhBMP-2 alone, Δ^{12} -PGJ₂ alone.

These results show that mixture of Δ^{12} -PGJ₂ and rhBMP-2 causes more bone formation than Δ^{12} -PGJ₂ alone while the bone formation effects of mixture of Δ^{12} -PGJ₂ and rhBMP-2 are less than those of rhBMP-2 alone.

Further researches would be necessary to clarify the interactions of these agents.

Key words : BMP-2, Δ^{12} -PGJ₂, Saos-2 cell, MC3T3-E1 cell, Alkaline phosphatase activity, RT-PCR