

백서 치주인대세포의 분화에 대한 Bone morphogenetic protein-7의 영향

이오재¹ · 김영준^{1,2} · 정연주^{1,2}

¹전남대학교 치과대학 치주과학교실 및 ²치의학연구소

I. 서론

궁극적인 치주치료 목적은 질환에 의해 손상된 치주조직을 재생하는 것이다. 이러한 치주조직 재생은 염증에 이환된 치근면의 신생 백악질의 형성, 신생골의 침착, 이 두 조직 간에 기능적으로 배열되는 신생 결합조직 섬유 및 상부 치은조직의 재형성을 의미한다. 그러나 치주조직 치유시 치근백악질, 치주인대, 치조골 및 치은조직으로부터 유래되는 다양한 세포들의 영향을 받아 치유되는 양태가 매우 다르다¹⁻²⁾.

치주조직의 재생 과정에는 치주조직 내 여러 세포들 중 특히 치주인대세포의 역할이 중요하다. McCulloch³⁾는 치주조직의 재생에 관여하는 전구세포들은 치주인대의 혈관주위에 존재한다고 하였고, Aukil 등⁴⁾은 이들 전구세포들이 치조골과 백악질쪽으로 이동하면서 골모세포 유사세포와 백악아세포로 분화한다고 하였다. 또한 Herr 등⁵⁾은 잔존하는 건강한 치주인대 부위의 세포활성을 통하여 치주조직의 재생이 얻어진다고 하는 등, 성공적인 치주조직의 재생을 위해서는 치주인대세포의 활성이 중요함

을 시사하였다.

치주인대세포는 치은 섬유모세포와는 달리 광물화 능력을 가지고 있고⁶⁾, 골모세포와 유사하게 높은 염기성 인산효소 활성도를 보이며⁷⁾ 또한 골관련 단백질인 osteonectin이나 osteopontin 등을 합성할 수 있는 능력을 갖고 있다^{8,9)}. 그러므로 치주인대세포는 세포외기질의 효율적인 합성에 관여하며 이것은 성장인자나 호르몬, bone morphogenetic proteins(BMPs) 등에 의하여 그 활성이 향상된다고 알려져 있다¹⁰⁻¹²⁾.

BMPs는 태생기 분화 및 구강악안면 조직을 포함한 신체 골격형성과 기관형성에 관여하며 태생기 이후에도 치유될 골조직으로 세포들의 이주와 부착, 세포들의 증식 및 골모세포의 분화를 촉진시켜 골형성을 촉진시킨다고 알려져 있다¹³⁾. 성장인자들은 분화된 골형성세포에만 작용하므로 골조직 형성에는 한계가 있지만 BMPs는 미성숙된 골전구세포 뿐만 아니라 성숙된 골모세포에도 영향을 주기 때문에 골형성능력은 매우 뛰어나다^{14,15)}.

BMP는 1965년 Urist¹⁶⁾가 처음 발견하여 명명

교신저자: 정연주, 광주시 동구 학동 5번지 전남대학교 치과대학, 치주과학교실, 우편번호: 501-757
Email: jchung@jnu.ac.kr

하였으며 일반적인 특성, 아미노산 서열, 삼차원적 구조가 TGF- β 와 유사성을 갖고 있다. 아미노산 서열의 유사성에 따라서 BMP-2/-4군, BMP-5/-6/-7/-8군, BMP-3/-12/-13군의 3개 소군으로 나누어지며 생체내 여러 세포에 의해 합성되어, 이량체 당단백의 형태로 존재한다^{13,17)}. BMP의 골형성 유도능력이 여러 실험과 연구를 통하여 평가되었는데, BMP-2/-4와 BMP-7군이 골 형성능력이 우수한 것으로 보고되고 있다^{14,18,19)}. BMP-2/-4는 낮은 농도에서도 골형성능력이 우수하고 치주조직 재생능력이 뛰어난 것으로 평가²⁰⁻²²⁾되지만, 치주조직 재생 실험모델에 따라서 그 능력에는 차이가 있다²⁰⁻²²⁾. 또한 치근강직과 같은 부작용도 나타나기 때문에 다양한 치주 결손부위의 적용에는 좀더 많은 연구가 필요하다²²⁾. 그러나 BMP-7은 백서, 개, 원숭이 등의 여러 실험모델에서 우수한 치주조직 재생이 관찰되었으며 치근강직도 관찰되지 않아 치주조직 재생에 유용한 물질로 평가되고 있다²³⁻²⁵⁾.

지금까지 골형성과 관련된 BMP-7에 대한 연구는 주로 미분화된 골원성 세포와 전골모세포의 분화에 대한 연구가 시행되어 왔으며 BMP-7 자극에 의한 치주인대세포의 분화나 골 형성과 관련된 기질합성에 대한 연구는 드물었다. 이에 본 연구에서는 치주조직 재생에 중요한 역할을 하는 치주인대세포에 BMP-7을 적용하였을 때 치주인대세포의 분화와 골형성능력을 관찰하고자 하였다.

II. 실험재료 및 방법

1. 백서 치주인대세포의 배양

1) 백서 치주인대세포의 분리

백서 치주인대세포는 Matsuda 등²⁶⁾의 방법에 준하여 분리 배양하였다. 치아발거 전 5일 동안 0.4% β -aminopropionitrile(Sigma Chemical Co., U.S.A.) 수용액을 수분으로 섭취시켰다. 실험동물에 pentobarbital sodium 30 mg/kg을 복강내 주사하여 마취시킨 후 상악 좌, 우측 제 1 대구치를

발거하였다. 발거 1-2일 후 발치와내의 혈병을 제거하여 세절한 다음 35 mm 배양접시에 고르게 분산시켜 1% 항생제-항진균제 용액(Penicillin-Streptomycin, GibcoBRL, U.S.A.)이 첨가된 DMEM 배지를 이용하여 세포배양을 시행하였으며, 3일 간격으로 배양액을 교환해 주었다. 실험에는 계대배양 5-7세대의 세포들을 사용하였다.

2) 배양접시내 rhBMP-7의 적용

rhBMP-7은 Dr. Higgins(State University of New York, School of Medicine, U.S.A)로부터 제공받았다. rhBMP-7은 배지에 녹였으며 배지내 최종농도가 각각 10, 25, 50, 100 ng/ml이 되도록 stock solution으로 준비하여 실험에 사용하였다. 대조군은 rhBMP-7을 적용하지 않은 군을, 실험군은 rhBMP-7을 적용한 군으로 하였다.

2. 염기성 인산분해 효소 활성도 측정

염기성 인산분해 효소 활성도 측정은 Cho 등¹⁰⁾의 방법에 준하여 시행하였다. 백서 치주인대세포를 배양한 후 12 well 접시에 well당 1×10^5 cell을 분주하였다. 24시간 후 해당 농도의 rhBMP-7을 적용하고 3일과 5일간 배양하였다. 배지를 제거한 후 1% TritonX-100으로 세포를 용해시키고 초음파로 분쇄시켰다. 0.4 mM Tris HCl, 2 mM MgCl₂, 4 mM p-nitrophenol phosphate가 함유된 완충용액 50 μ l/well을 가한 후 30분간 반응시키고, 150 μ l의 1N NaOH를 가하여 반응을 중지시킨 후 분해된 p-nitrophenol을 405 nm에서 spectrophotometer(SmartSpecTM, BioRad, CA, U.S.A.)로 비색 정량하였다.

3. 석회화 결절의 형성

석회화 결절의 형성에 대한 rhBMP-7의 영향을 알아보기 위하여 백서 치주인대세포를 12 well plate에 1×10^5 개의 세포가 되게 분주한 후 10%

FBS, 1% antibiotic-antimycotic solution, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ascorbic acid, 10 mM sodium β -glycerophosphate가 첨가된 DMEM solution에 rhBMP-7 최종 농도 10 ng/ml, 25 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml가 되도록 처리하고 3일마다 배지를 교환하면서 14일간 배양하였다. 배양 14일에 세포를 4% formaldehyde에 1시간 고정한 후 1% alizarin red S 염색 용액을 넣어 20분간 반응시켜 석회화 결절을 염색하였다. 염색된 표본들은 CCD camera (Sony, Japan)에서 촬영하고 Optimas image-processing program(Media cybernetics, Carlsbad, CA, U.S.A)을 이용하여 모니터 상에서 석회화 결절 부분의 면적을 측정하였다.

4. 총 RNA 추출과 역전사증합효소연쇄반응 (Reverse transcriptase-polymerase chain reaction; RT-PCR)

100mm dish에 백서 치주인대세포를 분주하고 10% FBS가 함유된 DMEM 배지에 배양하였다. 배양액은 세포가 밀생에 도달할 때까지 3일 간격으로 교환하였다. 세포가 밀생에 도달하면 10% FBS, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ascorbic acid, 10 mM sodium β -glycerophosphate가 첨가된 DMEM solution에 rhBMP-7의 최종 농도가 10, 25, 50, 100 ng/ml 되도록 처리하고 배양하였다. 배양 7일에 세포의 RNA를 추출하였다. RNA의 분리는 배양액을 제거하고 2.0 ml의 Trizol[®](Promega, U.S.A.) 용액을 첨가하여 각각의 rhBMP-7 농도로 처리한 세포를 1.8ml tube에 수집하였다. 200 μl 의 chloroform을 첨가하여 RNA를 용해시킨 후 4°C, 12,000 rpm에서 10분간 원심 분리하였다. 상층액만을 취한 후 500 μl isopropyl alcohol을 첨가하여 RNA를 침전시키고 4°C, 10,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 상층액을 제거하였다. 분리한 총 RNA는 Tris-EDTA buffer 40 μl 에 녹인 후 spectrophotometer로 그 양을 측정하였으며 -70°C 냉동고에 보관하였다.

추출된 총 RNA 중 5 μg 을 Superscript II (GibcoBRL, U.S.A.)를 이용하여 70°C에서 10분, 42°C에서 70분, 37°C에서 15분 동안 역전사증합반응을 유도하여 cDNA를 합성하였다.

백서의 cDNA 염기서열에 의거하여 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, bone sialoprotein, type I collagen, osteocalcin primer를 제작한 후(Figure 1), PCR 완충용액 5 μl , 1.5 mM MgCl₂ 3 μl , 10 mM dNTP mix 1 μl , 각각의 primer 2.5 μl , 5 unit Taq polymerase 0.2 μl , cDNA 2 μl 와 3차 증류수를 넣어 50 μl 가 되게 하여 Thermal cycler(Perkin Elmer, U.S.A.)를 이용하여 증폭하였다(Figure 1). 증폭된 PCR 산물들을 1.5% agarose gel에서 전기영동을 시행하여 얻은 mRNA 영상을 Gel Image Analysis System(QualityOne[®], BioRad, U.S.A)에서 house keeping gene인 GAPDH의 발현을 기준으로 각 primer의 mRNA 발현정도를 평가하였다.

5. Western blot 분석

백서치주 인대세포를 배양한 후 6 well dish에 well당 5×10^5 cell을 분주하였다. 24시간 후 인산화된 Smad 1,5,8 단백질의 발현양상을 시간대별로 관찰하기 위하여 100 ng/ml의 rhBMP-7을 0분, 15분, 30분, 60분, 및 120분간 각각 적용하였다. 세포 배양액을 제거한 후 4°C 인산원충 생리식염수(pH 7.4)로 3회 세척 후 cell lysis buffer (Cellsignaling Technology[™], U.S.A)를 이용하여 세포를 녹여 cell lysate를 얻었다. rhBMP-7 농도에 따른 Smad 1,5,8 단백질의 발현을 관찰하기 위하여 10~100 ng/ml rhBMP-7를 백서 치주 인대세포에 30분간 적용하고 cell lysate를 얻었다.

rhBMP-7이 mitogen-activated protein(MAP) kinase 경로에 영향을 미치는지를 알아보기 위하여 rhBMP-7 농도 100 ng/ml을 30분간 치주인대세포에 적용하고 cell lysate를 얻었다. 각각의 실험을 위해 얻은 시료들은 Bradford의 방법을 이

용하여 단백질의 정량분석을 시행하였으며, 각각에서 15 μ g의 시료를 SDS-PAGE 전기영동하였다. Gel 상의 단백질을 nitrocellulose membrane에 옮기고, membrane blocking solution(Cellsignaling TechnologyTM, U.S.A)으로 1시간 blocking한 후 1000:1의 비율로 TTS buffer(Cellsignaling TechnologyTM, U.S.A)에 희석한 rabbit anti-human Smad 1,5,8 polyclonal antibody(Cellsignaling TechnologyTM, U.S.A)나 anti-mouse p38 monoclonal antibody, 인산화된 p38 monoclonal antibody(Cell-Signaling

TechnologyTM, U.S.A)를 4°C에서 16시간 반응시킨 후 ECL chemiluminescence detection kit (Cellsignaling TechnologyTM, U.S.A)를 이용하여 제조회사의 지시에 따라 방사선 필름상에 감광하여 현상하였다.

6. 통계학적 분석

모든 실험은 3회 시행하였으며 실험에서 얻어진 수치는 one-way ANOVA와 Duncan 법으로 결정하였다.

PCR primers

Primer	Expected base pairs	Sequence (5'-3')
GAPDH-sense (+)	418	CACCATGGAGAAGCCGGGG
GAPDH-antisense (-)		GACGGACACATTGGGGGTAG
COL I-sense (+)	250	TCTCCACTCTTCTAGGTTCCCT
COL I-antisense (-)		TTGGGTCAATTTCCACATGC
BSP-sense (+)	1068	AACAATCCGTGCCACTCA
BSP-antisense (-)		GGAGGGGCTTCACTGAT
OCN-sense (+)	198	TCTGACAAACCTTCATGTCC
OCN-antisense (-)		AAATAGTGATACCGTAGATGCG

PCR programs

GAPDH	94 °C	94 °C	60 °C	72 °C	72 °C
	1 min	1 min	2 min	1 min	10 min
25 Cycles					
COL I	94 °C	94 °C	55 °C	72 °C	72 °C
	1 min	1 min	2 min	1 min	10 min
30 Cycles					
BSP OCN	94 °C	94 °C	50 °C	72 °C	72 °C
	1 min	1 min	2 min	1 min	10 min
30 Cycles					

Figure 1. Amplification primer sets and conditions used in polymerase chain reaction. GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; COL I, type 1 collagen; BSP, bone sialoprotein; and OCN, osteocalcin.

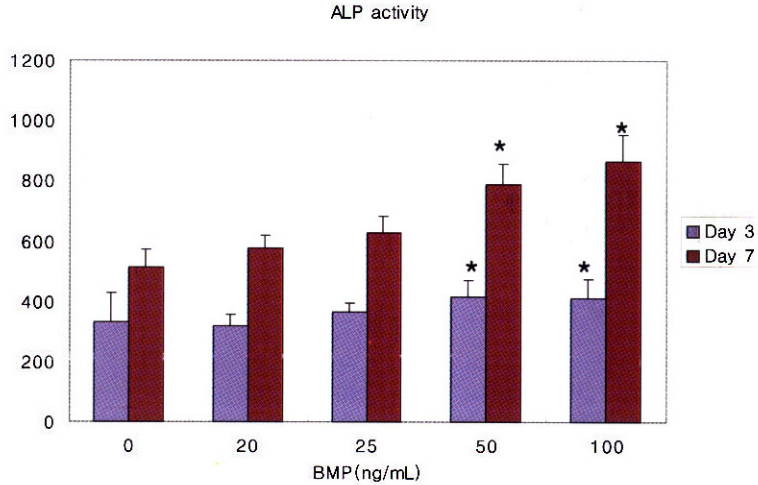


Figure 2. Alkaline phosphatase activity(U/105 cells) of rat periodontal ligament cells treated with BMP-7(*: indicates significant difference compared to the control(p<0.05)).

III. 결과

1. 염기성 인산분해효소 활성도 검사

BMP-7을 넣지 않은 대조군과 각 해당농도의 BMP-7을 첨가하고 배양한 실험군들의 염기성 인산분해효소활성도를 측정하였다. 배양 3일에 대조군은 331.7 U였고, 실험군은 BMP-7 농도 10-100 ng/ml에서 320.6-415.3 U로 BMP-7 농도 50 ng/ml와 100 ng/ml에서 대조군에 비해 효소 활성도가 유의하게 높게 나타났다(Table 1, p<0.05). 배양 5일에 대조군은 513.2 U였고, 실험군은 BMP-7 농도 10 ng/ml~100 ng/ml에서는 575.8-865.4 U로 모든 농도에서 배양 3일보다 효소 활성도가 증가하였다. BMP-7 농도 50 ng/ml~100 ng/ml까지 대조군에 비해 효소 활성도가 유의하게 높게 나타났다(p<0.05, Figure 2).

2. 석회화 결절 형성률

백서 치주인대세포를 석회화 결절 형성을 배지에 배양하고 배양 14일과 21일에 alizarin red S

염색을 실시하고 석회화 결절의 형성 면적을 측정하였다. 결절은 원형으로 주위에 세포가 밀집되어 있었고 결절 중앙쪽으로 진한 적색으로 염색되어 있었다.

배양 14일에 대조군의 석회화 결절의 형성 비율은 15%, BMP-7 10 ng/ml은 18.4%, 25 ng/ml은 24.3%, 50 ng/ml은 47.6%, 100 ng/ml은 62.7%로, BMP-7 50 ng/ml과 100 ng/ml을 투여한 군에서 대조군보다 석회화 결절이 많이 형성되었다(p<0.01, Figure 3).

3. 골기질 단백 mRNA 수준

백서 치주인대세포를 10 ng/ml에서 100 ng/ml까지의 BMP-7이 함유된 배지에 백서 치주인대세포를 7일간 배양한 후 RNA를 분리하여 type I collagen, osteocalcin, bone sialoprotein mRNA 발현 정도를 RT-PCR로 관찰하였다. Type I collagen mRNA의 수준은 BMP-7으로 처리한 모든 군(10~100 ng/ml)에서 2.2~2.4배 더 많은 mRNA의 발현이 관찰되었다. Osteocalcin mRNA은 대조군에 비하여 BMP-7 농도 10 ng/ml과 25 ng/ml 처리 시 각각 1.2배, 1.6배 증가하였으나 50 ng/ml

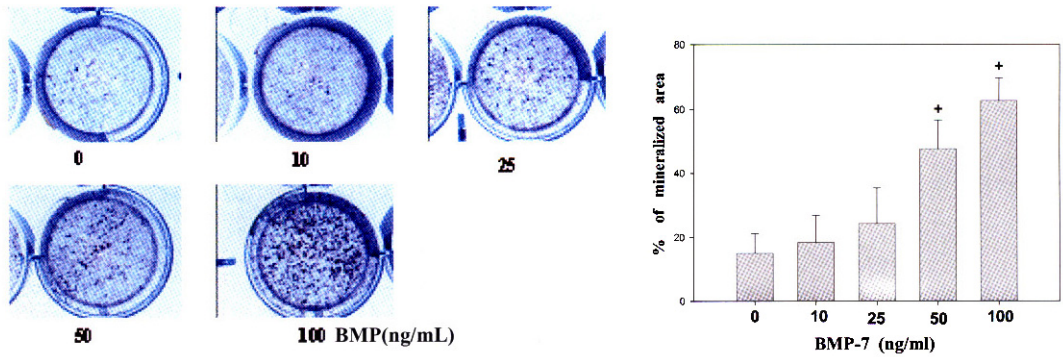


Figure 3. Representative in vitro mineralization data obtained from 14-day cultures of primary rat periodontal ligament cells(+: indicates significant difference from the control($p < 0.01$)).

과 100 ng/ml로 처리하였을 때는 약 2.5배정도 그 수준이 증가하였다. Bone sialoprotein mRNA 발현은 대조군에 비하여 BMP-7 농도 10 ng/ml과 25 ng/ml에서는 각각 1.3배, 1.8배 증가하였으나 50 ng/ml과 100 ng/ml로 처리하였을 때는 약 3.3배 정도 증가하였다(Figure 4).

4. 세포신호전달 단백질의 발현

BMP-7 100 ng/ml을 적용하고 phosphorylate Smad 1,5,8 단백질의 발현양상을 시간별로 관찰하

였을 때 Smad 1,5,8 protein은 자극 15분 후부터 활성이 관찰되기 시작하여 30분과 60분에 가장 잘 발현이 되다가 120분 후에는 그 발현이 감소하였다 (Figure 5). 10~100 ng/ml 농도의 BMP-7을 적용하여 관찰한 경우에는 Smad 1,5,8 protein의 발현은 농도 의존적인 양상이었다(Figure 6).

BMP-7이 Smad-BMP pathway 이외의 다른 신호전달 경로를 자극하는지를 확인하고자 p38 MAP kinase 단백질 분석결과, BMP-7은 치주인대 세포내 p38 MAP kinase의 활성을 증가시키지 않았다(Figure 7).

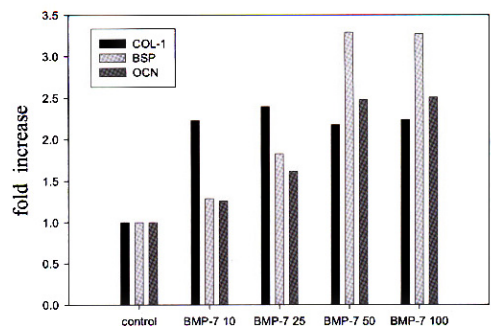
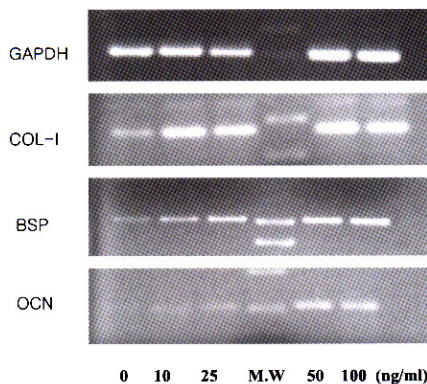


Figure 4. RT-PCR analysis of glyceral-dehyde-3-phosphate dehydrogenase(GAPDH), type I collagen(COL-I), bone sialoprotein(BSP), and osteocalcin(OCN) messenger RNA expression in primary rat calvarial cells.

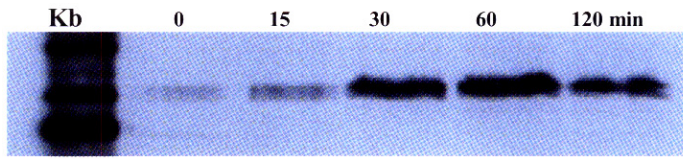


Figure 5. Western blot analysis of phosphorylated form of Smad 1,5,8 antibody by varying the treatment periods (0, 15, 30, 60 and 120 min) with 100 ng/ml BMP-7.

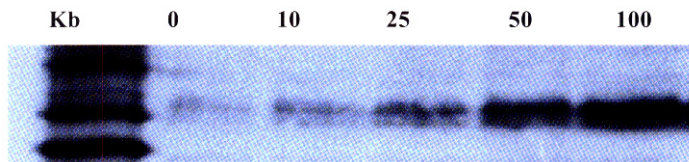


Figure 6. Western blot analysis of phosphorylated Smad 1,5,8 showing activation by dose-dependent manner (control, BMP-7 10, 25, 50, and 100 ng/ml).

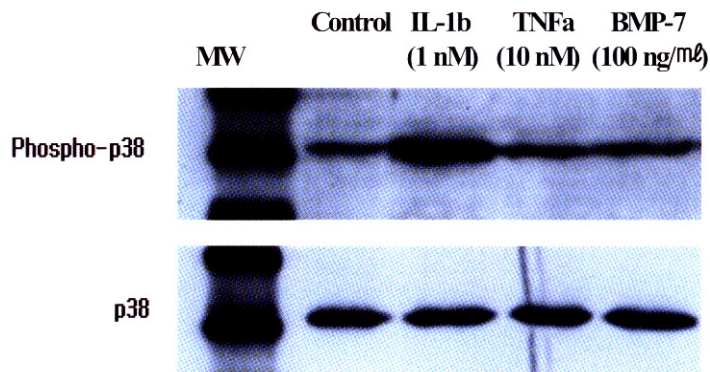


Figure 7. Western blot analysis of phosphorylated and un-phosphorylated p38 MAP Kinase. p38 MAP Kinase is activated by IL-1 β (lane 1; MW, 2; control, 3; IL-1 β (1 nM), 4; TNF α (10 nM), 5; BMP-7(100 ng/ml)).

IV. 고찰

치주조직의 재생수복 과정에는 치은 섬유모세포, 치주인대세포, 그리고 골모세포가 주로 관여한다¹⁾. 치은 섬유모세포에 의한 치유는 치근 흡수와 결합조직으로 수복이 이루어지고, 골모세포에 의한 치유는 치근강직과 골조직으로 수복된다. 치주인대세포에 의한 치유는 백악질을 포함한 건강한 치주조직으로

수복이 가능하다²⁷⁾. 그러므로 창상부위에 약제, 성장인자 및 BMP 등을 첨가함으로써 치주인대세포의 활성을 도모하고 치주조직의 재생을 증진시키려는 연구가 진행 중에 있다.

BMPs은 골의 분화과정의 기시제로 작용하여 태생기 분화 및 구강악안면 조직을 포함한 신체골격 형성과 기관형성에 관여하며 태생기 이후에도 골이 형성되는 부위로 세포들의 이주와 부착, 그리고 연

골모세포와 골모세포의 분화를 촉진시켜서 골형성을 유도한다^{13-15,17)}.

BMPs는 미분화간엽세포를 자극하여 정상적인 골대사 과정, 골절부위의 치유 및 이식골의 생착 등에 관여한다고 Urist가 보고하였다¹⁶⁾. BMPs은 BMP-1을 제외하고는 아미노산 서열과 삼차원적인 구조가 TGF- β 와 유사하여 TGF- β superfamily로 분류된다. 그 중 BMP-2와 BMP-4는 낮은 농도에서도 우수한 골형성 능력과 치주조직 재생능력이 뛰어난 것으로 평가되지만, 실험모델에 따라서 재생능력에는 차이가 있다. 실험동물에 외과적으로 형성된 치주골 결손부에 BMP-2/-4를 적용시 많은 양의 신생골과 백악질 형성이 보고되고 있으나, 대부분의 경우 구강내로 노출이 안되는 submerged defect type에서의 결과^{20,22,28)}로 구강내로 노출시키는 형태의 치주 결손부에서는 그 효과가 미미하였다²¹⁾. 그러나 BMP-7도 백서, 개, 원숭이 등의 치주 실험 모델에서 우수한 치주조직 재생이 관찰되었으며 치주 결손의 형태와 상관없이 유의하게 많은 양의 치주조직의 재생이 관찰되었다^{14,23-25)}. 또한 치근장직도 거의 관찰되지 않아²⁴⁾ 치주조직 재생에 유용한 물질로 평가되고 있다. 치주 결손 모델에 적용된 BMPs에 대한 결과의 차이는 실험동물과 적용된 결손 모델 및 적용된 농도등의 차이에 의한 것으로 생각될 수 있지만 적용된 각각의 BMPs가 치주인대세포에 미치는 영향의 차이도 있을 것으로 추정된다.

지금까지의 연구결과로 볼 때 BMP-7은 치주인대세포의 기능을 향상시키고 별다른 부작용이 없이 치주조직의 형성을 증진시키는 효과가 있는 것으로 생각된다. 그러나 아직까지 BMP-7에 의한 치주조직 재생 효과를 세포학적 수준에서 연구한 것은 드물다. 이에 본 연구는 in vitro 상에서 BMP-7이 백서 치주인대세포의 골모세포 유사세포로의 분화 및 골형성 능력에 미치는 영향을 관찰하고자 하였다.

골원세포에서 골모세포로의 분화과정에서 관찰되는 표식자들을 살펴보면 전골모세포에서 골모세포로 분화되는 초기에는 type I collagen, 염기성 인산분해효소의 생산이 증가되고 그 이후 bone sialopro-

tein, osteopontin 등의 세포외기질 합성이 증가되고 골모세포의 광물화가 시작되면 osteocalcin이 증가된다^{18,29)}.

치주인대세포는 섬유모세포와 골모세포 유사 표현형을 가지고 있는데, 세포 주변에 존재하는 여러 가지 사이토카인이나 호르몬에 의하여 세포의 특성이 변화될 수 있다. 이에 이 연구에서는 BMP-7에 의한 치주인대세포의 염기성 인산분해효소 활성도를 측정하였는데, 10-100 ng/ml의 농도에서 농도 의존적으로 활성이 증가하였다. 이때 BMP-7 50 ng/ml과 100 ng/ml 농도에서 대조군에 비해 유의한 차이를 보였다($p < 0.05$, Table 1). 이 결과는 BMP-7 농도 2.5~80 ng/ml에서 골모세포의 염기성 인산분해효소의 활성이 농도 의존적으로 높게 나타났다는 Asahina 등³⁰⁾ 그리고 rhBMP-7 100 ng/ml에서 대조군보다 더 높은 활성을 관찰한 Yeh 등³¹⁾의 결과와 유사하였다.

Nojima 등³²⁾은 백서 장골의 골수에서 채취한 간엽세포를 대상으로 배양 14일 이후부터 석회화 결절이 형성됨을 보고하였는데, 이러한 석회화 결절의 형성은 골조직 재생의 기본이 되는 석회화 능력을 나타내는 중요한 지표이다. 이 연구에서도 10-100 ng/ml의 농도로 14일간 배양하여 석회화 결절 형성을 관찰하였는데 BMP-7 10 ng/ml과 25 ng/ml를 투여한 군에서는 대조군과 유의한 차이는 없었지만 결절이 더 많이 형성되었으며 BMP-7 50 ng/ml과 100 ng/ml를 투여한 군에서 대조군에 비해 석회화 결절 형성이 약 3배에서 4배 더 크게 나타났다 (Figure 2, $p < 0.01$). 이는 Li 등¹⁸⁾이 백서 두개관 세포에 BMP-7을 투여하여 석회화 결절 형성율을 관찰하였을 때 100 ng/ml 농도에서 대조군에 비해 약 3배 증가된 결절 형성율을 얻은 결과와 유사하였다. 그러므로 치주인대세포가 아무런 자극을 받지 않았을 경우에 골모세포와 유사한 특성을 갖는 세포로 분화되지 않거나 지연되지만, BMP-7 자극시에는 골모세포와 유사한 세포로 빠르게 분화됨을 알 수 있다.

BMP-7이 치주인대세포의 골모세포 표현형 분화

와 관련된 세포외기질 형성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 여러 농도의 BMP-7을 첨가하고 7일간 배양하여 type I collagen과 bone sialoprotein (BSP), osteocalcin(OCN) mRNA 수준을 RT-PCR로 관찰하였다. 그 결과 type I collagen의 mRNA 수준은 BMP-7 농도에 상관없이 잘 발현되었으나 대조군에서는 그 발현이 약했다. BSP와 OCN은 골모세포가 분비하는 비교원성 단백질로 골형성과 흡수에 중요한 단백질의 하나이다³³⁾. 특히 BSP는 골의 광물화 초기에 잘 발현되며 결정핵으로 알려져 있다³⁴⁾. 또한 OCN은 골양조직(osteoid)과 골모세포 뿐만 아니라 골기질에 풍부하게 존재하며 특히 OCN은 장차 석회화가 될 부위에서 발현이 되고, 성장 중인 골조직에서 많이 발현되며 골의 석회화와 골의 교체 과정에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다^{18,33)}. 이번 실험 결과 BSP 유전자는 대조군에서는 mRNA 수준이 매우 약했지만 BMP-7 투여군에서는 농도 의존적으로 그 수준이 증가되었으며 농도 50 ng/ml 과 100 ng/ml에서는 그 발현이 현저하였다. 치주인대세포에 성장인자를 투여시 세포외기질의 발현을 관찰한 연구들은 다소 차이가 있다. Zaho 등¹²⁾에 의하면 100 ng/ml의 BMP-2를 치낭세포(dental follicle cell)에 적용시 BSP, OCN mRNA가 모두 잘 발현되었고, 치주인대세포에 적용시에는 OCN mRNA의 발현은 증가하였으나 BSP는 발현이 관찰되지 않았다고 하였다. 그러나 Chien 등¹⁰⁾은 백서 치주인대세포에 TGF- β 를 적용시 석회화 결절의 형성시기에 BSP와 OCN 모두 발현되었다고 하였다. 따라서 연구자들이 사용한 세포의 종류 및 agent에 따라 그 결과에 차이가 나는 것으로 추정되나 더 많은 연구가 필요하리라 생각된다. 이 연구는 Chien 등의 방법과 유사하게 백서 치주인대세포를 이용하여 석회화를 촉진시키는 물질과 함께 장기간 배양하였으며 그 결과 BMP-7 투여군에서는 BSP, OCN mRNA의 발현이 관찰되었다. 따라서 본 실험의 결과는 BMP-7의 투여에 의하여 치주인대세포가 골모세포 유사세포로 분화되어 석회화 물질의 분비와 광물화를 촉진시킴을 의미

한다.

분자생물학적 수준에서 BMP 신호전달 경로는 크게 TGF- β pathway와 BMP-Smad pathway로 구분된다²⁵⁾. 일반적으로 BMP-7은 BMP-Smad pathway를 따르는데, BMP-7이 세포막에 존재하는 관련 2개의 수용체와 결합하고 이 신호가 세포질 내로 전달되어 Smad 1,5,8의 인산화를 유도한다. 이후 하부 신호전달경로가 계속적으로 활성화되어 생물학적인 반응을 나타내게 된다. 발생기나 창상치유시기에 나타나는 이런 신호전달 경로는 제한적인 ligand 발현을 통하여 일어남으로서 조절이 가능하고 정교한 형태의 조직 재형성이 가능하다³⁵⁾. 본 연구에서는 다양한 농도의 BMP-7를 적용하였을 때 Smad 1,5,8 단백질의 발현양상을 Western blot을 통하여 관찰하였다. 그 결과 Smad 1,5,8은 BMP-7 자극 15분 후부터 발현되기 시작하여 60분에 가장 잘 발현되다가 120분 후에는 그 발현이 감소하였으며 농도별로 관찰한 경우에는 Smad 1,5,8의 발현은 농도 의존적인 양상이었다. 이는 BMP-7을 치주인대세포에 적용하였을 때 빠른 시간에 세포의 수용기에 결합하여 BMP target 유전자의 조절을 통하여 세포에 영향을 준다는 것을 의미한다.

BMP의 효과는 BMP-Smad pathway 뿐만 아니라 mitogen activated protein kinases(MAP kinases)와 같은 다른 경로에 의해서도 조절이 된다고 알려져 있다^{36, 37)}. MAP kinase는 염증성 사이토카인에 의한 염증반응의 매개 뿐만 아니라 성장인자와 같은 물질의 신호전달의 매개를 통하여 세포의 분화 및 이와 관련된 유전자의 조절에 관여한다. Wang과³⁸⁾ Hirschberg의 연구에서 mesangial cells은 BMP-7으로 자극하였을 때, p38을 포함한 MAP kinase의 신호전달 경로와는 무관하다고 보고하였고, Hu 등³⁶⁾과 Nishihara 등³⁷⁾은 상피세포의 형태형성, 그리고 연골세포의 분화과정에 p38 MAP kinase의 활성이 관찰되었다고 보고하였다. 이러한 차이는 사용된 세포들의 종류, 그리고 적용된 BMP-7의 농도등의 차이가 고려될 수 있다. 이

연구에서는 치주인대세포에서 BMP-7에 의한 분화 및 석회화 물질의 조절이 BMP-Smad pathway 이외에 p38 MAP kinase에 의해서 영향받는지 알아보았다. p38 MAP kinase 단백질 분석결과, BMP-7은 치주인대 세포내 p38 MAP kinase의 활성을 증가시키지 않았다. 그러므로 치주인대세포에 대한 BMP-7의 자극은 p38 MAP kinase에 의해서는 활성화되지 않음을 의미하여 각각의 경로에 따른 단백질의 상호교통은 발생하지 않을 것으로 사료된다.

본 연구 결과 BMP-7을 치주인대세포에 적용하면 염기성 인산분해효소의 활성, 석회화 및 세포외기질 형성을 증진시키며, 이는 BMP-Smad pathway를 통하여 조절됨을 알 수 있었다. 향후 BMP 수용체 길항제의 역할 및 BMP-Smad pathway 이외의 다른 경로를 통한 BMP 활성화에 대한 연구가 필요하며 임상적응에 앞서 BMP-7의 적절한 송달체 및 적용 농도에 대한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

V. 결론

Recombinant human bone morphogenetic protein-7(rhBMP-7)은 치주 결손부의 조직 재생에 유용한 물질로 평가되고 있으나 BMP-7에 의한 치주조직 재생 효과를 세포학적 수준에서 연구한 것은 드물다. 이에 본 연구는 *in vitro* 상에서 BMP-7이 백서 치주인대세포의 골모세포 유사세포로의 분화 및 골형성 능력에 미치는 영향을 관찰하고자 하였다.

백서 치주인대세포에서의 골기질 형성능력을 알아보기 위하여 BMP-7 10, 25, 50, 100 ng/ml을 세포에 적용하고 염기성 인산분해효소 활성도와 석회화 기질 형성능력을 측정하였다. 또한 치주인대세포에서의 세포외기질 분비를 알아보기 위하여 같은 농

도의 BMP-7을 세포에 적용하고 collagen type I (COL-I), bone sialoprotein(BSP) osteocalcin (OCN) gene expression을 RT-PCR을 통해 관찰하였으며 세포 수준에서 BMP-7의 신호전달 경로의 일부를 단백질 분석을 통해 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 염기성 인산분해효소 활성도 측정 결과, 배양 3일에 BMP-7 농도 50 ng/ml 이상에서 대조군에 비해 효소 활성도가 유의하게 높게 나타났다($p < 0.05$). 배양 5일에 모든 군에서 배양 3일후에 비하여 효소 활성도가 증가하였으며 BMP-7 농도 50 ng/ml 이상에서 대조군에 비해 효소 활성도가 유의하게 높게 나타났다($p < 0.05$).
2. 배양 14일 후 대조군의 석회화 결절 형성율은 BMP-7 농도 50 ng/ml 과 100 ng/ml 군에서 대조군에 비해 유의하게 높았다($p < 0.01$).
3. 배양 7일후 RT-PCR의 결과에서 COL-I mRNA 수준은 대조군에 비해 BMP-7 투여군에서 더 높았다. BSP와 OCN mRNA 수준도 대조군에 비해 BMP-7 투여군에서 그 수준이 증가하였으며 BMP-7 농도 50 ng/ml, 100 ng/ml에서 대조군보다 그 수준이 더 증가하였다.
4. Western blot 분석에서 Smad 1,5,8의 활성은 BMP-7 농도 의존적이었다. p38 MAP kinase 단백질 분석결과, BMP-7은 치주인대 세포내 p38 MAP kinase의 활성을 증가시키지 않았다.

이상의 결과로부터 BMP-7이 백서 치주인대세포에 작용하여 골모세포 유사세포로의 분화를 유도하고 BMP-Smad 신호전달 경로를 통하여 세포외기질 형성을 증진시킨다고 추정된다.

VI. 참고문헌

1. Melcher AH. On the repair potential of periodontal tissue. *J Periodontol* 1976; 47:256-260.
2. Iglhaut J, Aukhil I, Simpson DM, Johnston MC, Kock G. Progenitor cell kinetics during tissue regeneration in experimental periodontal wounds. *J Periodont Res* 1988;23:107-117.
3. McCulloch CAG. Progenitor cell populations in periodontal ligament of mice. *Anat rec* 1985;211:258-262.
4. Aukhil I, Simpson DM, Suggs C, Peterson E. *In vivo* differentiation of progenitor cells of periodontal ligament. *J Clin Periodontol* 1986;13:862-868.
5. Herr Y, Matsuda M, Lin WL, Genco RJ, Cho MI. The origin of fibroblast and their role in the early stages of horizontal furcation defects healing in the beagle dogs. *J Periodontol* 1995;66:716-730.
6. Ohshima M, Kuwata F, Otsuka K, Saito R, Sato K, Shioji S. Alkaline phosphatase activities of cultured human periodontal ligament cells. *J Nihon Univ Sch Dent* 1988;30:209-217.
7. Cho MI, Matsuda N, Lin WL, Moshier A, Ramakrishnan PR. *In vitro* formation of mineralized nodules by periodontal ligament cells from the rat. *Calcif Tissue Int* 1992;50:459-467.
8. Wasi S, Otsuka K, Yao KL, Tung PS, Aubin JE, Soddek J. An osteonectin-like protein in porcine periodontal ligament and its synthesis by periodontal ligament fibroblasts. *Can J Biochem Cell Biol* 1984;62:470-478.
9. Lekic P, Soddek J, McCulloch CAG. Relationship of cellular proliferation to expression of osteopontin and bone sialoprotein in regenerating rat periodontium. *Cell Tissue Res* 1996;285:491-499.
10. Chien HH, Lin WL, Cho MI. Expression of TGF-beta isoforms and their receptors during mineralized nodule formation by rat periodontal ligament cells in vitro. *J Periodontal Res*. 1999;34:301-309.
11. Hobbs HC, Rowe DJ, Johnson PW. Periodontal ligament cells from insulin-dependent diabetics exhibit altered alkaline phosphatase activity in response to growth factors. *J Periodontol*. 1999;70:736-742.
12. Zhao M, Xiao G, Berry JE, Franceschi RT, Reddi A, Somerman MJ. Bone morphogenetic protein 2 induces dental follicle cells to differentiate toward a cementoblast/osteoblast phenotype. *J Bone Miner Res* 2002;17:1441-1451.
13. Lee MB. Bone morphogenic proteins. Background and implications for oral reconstruction. A review. *J Clin Periodontol* 1997;24:355-365.
14. Ripamonti U and Reddi AH. Periodontal regeneration: potential role of bone morphogenic proteins. *J Periodont Res* 1994; 29:225-235.
15. Thies RS, Bauduy M, Ashton BA, Kurtzberg L, Wozney JM, Rosen V. Recombinant human bone morphogenic protein-2 induces osteoblastic differentiation in W-20-17 stromal cell. *Endocrinology* 1992;130:1318-1324.
16. Urist MR. Bone formation by autoin-

- duction. *Science* 1965;150:893-899.
17. Wozney JM, Rosen V. Bone morphogenic proteins and Bone morphogenic protein gene family in bone formation and repair. *Clin Ortho Rel Res* 1998;346:26-37.
 18. Li WS, Cheifetz S, McCulloch CAG, Sampath K, Sodek J. Effects of osteogenic protein-1 on bone matrix protein expression by fetal rat calvarial cell are differentiation stage specific. *J Cell Physiol* 1996;169:115-125.
 19. Kim DJ, Moon SH, Kim H, Kwon UH, Park MS, Han KJ, Hahn SB, Lee HM. Bone morphogenetic protein-2 facilitates expression of chondrogenic, not osteogenic, phenotype of human intervertebral disc cells. *Spine*. 2003;28:2679-2684.
 20. King GN, King N, Cruchley AT, Wozney JM, Hughes FJ.. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 promotes wound healing in rat periodontal fenestration defects. *J Dent Res*. 1997;76:1460-1470.
 21. Wikesjo UM, Guglielmoni P, Promsudthi A, Cho KS, Trombelli L, Selvig KA, Jin L, Wozney JM. Periodontal repair in dogs: effect of rhBMP-2 concentration on regeneration of alveolar bone and periodontal attachment. *J Clin Periodontol*. 1999;26:392-400.
 22. Wikesjo UM, Xiropaidis AV, Thomson RC, Cook AD, Selvig KA, Hardwick WR. Periodontal repair in dogs: rhBMP-2 significantly enhances bone formation under provisions for guided tissue regeneration. *J Clin Periodontol*. 2003;30:705-714.
 23. Giannobile WV, Ryan S, Shih MS, Su DL, Kaplan PL, Chan TC. Recombinant human osteogenic protein-1(OP-1) stimulates periodontal wound healing in class III furcation defects. *J Periodontol* .1998;69: 129-137.
 24. Rajshankar D, McCulloch CA, Tenenbaum HC, Lekic PC. Osteogenic inhibition by rat periodontal ligament cells: modulation of bone morphogenic protein -7 activity *in vivo*. *Cell Tissue Res*. 1998 ;294:475-483.
 25. King GN, Cochran DL. Factors that modulate the effects of bone morphogenetic protein-induced periodontal regeneration: a critical review. *J Periodontol*. 2002;73:925-36.
 26. Matsuda N, Kumar M, Ramakrishnan PR, Lin WL, Genco RJ, Cho MI. Evidence for up-regulation of epidermal growth factors on rat periodontal ligament fibroblastic cells associated with stabilization of phenotype *in vitro*. *Arch Oral Biol*. 1993;38:559-569.
 27. Nyman S, Gottlow J, Karring T, Lindhe J. The regenerative potential of the periodontal ligament. *J Clin Periodontol* 1982;9:257-265.
 28. Sigurdsson TJ, Takakis DN, Lee MB, Wikesjo UM. Periodontal regenerative potential of space-providing ePTFE membranes and recombinant human bone morphogenetic proteins. *J Periodontol* 1995;66:511-521.
 29. Franceschi RT. The developmental control of osteoblast-specific gene expression: Role of specific transcription factors and the extracellular matrix envi-

- ronment. *Crit Rev Oral Biol Med* 1999;10:40-57.
30. Asahina I, Sampath TK, Hauschka PV. Human osteogenic protein-1 induces chondroblastic, osteoblastic, and/or adipocytic differentiation of clonal murine target cells. *Exp Cell Res* 1996;222:38-47.
31. Yeh LC, Adamo ML, Olson MS, Lee JC. Osteogenic protein-1 and insulin-like growth factor I synergistically stimulate rat osteoblastic cell differentiation and proliferation. *Endocrinology*. 1997;138:4181-4190.
32. Nojima N, Kobayashi M, Shionome M, Takahashi N, Suda T, Hasegawa K. Fibroblastic cells derived from bovine periodontal ligaments have the phenotypes of osteoblasts. *J Periodontal Res* 1990;25:179-185.
33. Young MF, Kerr JM, Ibaraki K, Heegaard AM, Robey PG. Structure, expression, and regulation of the major noncollagenous matrix proteins of bone. *Clin Orthop* 1992;192:275-294.
34. Roach HI. Why does bone matrix contain non-collagenous proteins? The possible roles of osteocalcin, osteonectin, osteopontin and bone sialoprotein in bone mineralization and resorption. *Cell Biol Int* 1994;18:617-628.
35. Bubnoff A and Cho KWY. Intracellular BMP signaling regulation in vertebrates: Pathway or Network. *Devl Biol*. 2001;239:1-14.
36. Hu MC, Wasserman D, Hartwig S, Rosenblum ND. p38MAPK acts in the BMP7-dependent stimulatory pathway during epithelial cell morphogenesis and is regulated by Smad1. *J Biol Chem* 2004;279:12051-12059.
37. Nishihara A, Fujii M, Sampath TK, Miyazono K, Reddi AH, Hu Nishihara. Bone morphogenetic protein signaling in articular chondrocyte differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;301:617-622.
38. Wang S, Hirschberg R. Bone morphogenetic protein-7 signals opposing transforming growth factor beta in mesangial cells. *J Biol Chem* 2004;279:23200-23206.

Effect of BMP-7 on osteoblastic differentiation of rat periodontal ligament cells

Ho-Jae Lee¹ · Young-Jun Kim^{1,2} · Hyun-Ju Chung^{1,2}

¹Dept. of Periodontology

²Dental Science Research institute, Chonnam National University

Periodontal therapy has dealt primarily with attempts at arresting progression of disease, however, more recent techniques have focused on regenerating the periodontal ligament having the capacity to regenerate the periodontium. Recombinant human bone morphogenetic protein-7(rhBMP-7) can differentiate the osteoprogenitor cells and induce bone formation.

The purpose of this study was to evaluate the effect of BMP-7 on rat periodontal ligament cells differentiation, *in vitro*. In the control group, cells was cultured with DMEM media. In the experimental groups, cells were cultured with rhBMP-7 in concentration of 10, 25, 50 and 100 ng/ml. Each group was characterized by examining alkaline phosphatase activity at 3 and 5 days of culture and the ability to produce mineralized nodules of rat calvarial cells at 14 days of culture. Synthesis of type I collagen(COL-1), osteocalcin(OCN), and bone sialoprotein (BSP) was evaluated by RT-PCR at 7 days of culture. Activation of Smad proteins and p38 MAP kinase was determined by western blot analysis of the cell lysates.

Alkaline phosphatase activity was significantly increased in the concentration of BMP-7 50 ng/ml and 100 ng/ml compared to the control($p < 0.05$). The mineralized bone nodule formation was greater with addition of 50 ng/ml and 100 ng/ml BMP-7 than the control($p < 0.01$). In 7 days' culture, the expressions of COL-1, BSP, and OCN was increased by BMP-7 in concentration of 10 ng/ml~100 ng/ml. In western blot analysis, BMP-7 treated culture cells expressed Smad 1,5,8 in dose-dependent manner, whereas BMP-7 did not activate phosphorylated form of p38 MAP kinase.

These result suggested that BMP-7 stimulate rat periodontal ligament cells to differentiate toward osteoblast phenotype and increase bone matrix production by activation of BMP-Smad pathway.

Key words : rat periodontal ligament cell, BMP-7, BMP-Smad pathway