

배양된 인간 골막기원세포의 조골세포 분화과정에서 골기질 형성정도와 혈관내피세포성장인자 신호와의 상관관계

박봉욱 · 변준호 · 류영모 · 하영술* · 김덕룡* · 조영철** · 성일용** · 김종렬***

경상대학교 의과대학/의학전문대학원 구강악안면외과학교실, 경상대학교 건강과학연구원, 경상대학교 생명과학연구원

*경상대학교 의과대학/의학전문대학원 생화학교실, 경상대학교 건강과학연구원, 경상대학교 생명과학연구원

울산대학교 의과대학 구강악안면외과학교실, *부산대학교 치의학전문대학원 구강악안면외과학교실

Abstract

CORRELATION BETWEEN VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR SIGNALING AND MINERALIZATION DURING OSTEOBLASTIC DIFFERENTIATION OF CULTURED HUMAN PERIOSTEAL-DERIVED CELLS

Bong-Wook Park, June-Ho Byun, Young-Mo Ryu, Young-Sool Hah*, Deok Ryong Kim*,
Yeong-Cheol Cho**, Iel-Yong Sung**, Jong-Ryoul Kim***

Department of Oral and Maxillofacial Surgery, College of Medicine and Institute of Health Sciences,

Research Institute of Life Science, Gyeongsang National University School of Medicine

**Department of Biochemistry, College of Medicine and Institute of Health Sciences,*

Research Institute of Life Science, Gyeongsang National University School of Medicine

***Department of Oral and Maxillofacial Surgery, College of Medicine, Ulsan University*

****Department of Oral and Maxillofacial Surgery, School of Dentistry, Pusan National University*

Angiogenesis is an essential part for bone formation and bone fracture healing. Vascular endothelial growth factor (VEGF), one of the most important molecules among many angiogenic factors, is a specific mitogen for vascular endothelial cells. VEGF-mediated angiogenesis is required for bone formation and repair. However, the effect of VEGF on osteoblastic cells during osteogenesis is still controversial. In recent days, substantial progress has been made toward developing tissue-engineered alternatives to autologous bone grafting for maxillofacial bony defects. Periosteum has received considerable interest as a better source of adult stem cells. Periosteum has the advantage of easy harvest and contains various cell types and progenitor cells that are able to differentiate into a several mesenchymal lineages, including bone. Several studies have reported the bone formation potential of periosteal cells, however, the correlation between VEGF signaling and cultured human periosteal cell-derived osteogenesis has not been fully investigated yet.

The purpose of this study was to examine the correlation between VEGF signaling and cultured human periosteal-derived cells osteogenesis. Periosteal tissues of 5 × 20 mm were obtained from mandible during surgical extraction of lower impacted third molar from 3 patients. Periosteal-derived cells were introduced into the cell culture and were subcultured once they reached confluence. After passage 3, the periosteal-derived cells were further cultured for 42 days in an osteogenic inductive culture medium containing dexamethasone, ascorbic acid, and β -glycerophosphate. We evaluated the alkaline phosphatase (ALP) activity, the expression of Runx2 and VEGF, alizarin red S staining, and the quantification of osteocalcin and VEGF secretion in the periosteal-derived cells.

The ALP activity increased rapidly up to day 14, followed by decrease in activity to day 35. Runx2 was expressed strongly at day 7, followed by decreased expression at day 14, and its expression was not observed thereafter. Both VEGF 165 and VEGF 121 were expressed strongly at day 35 and 42 of culture, particularly during the later stages of differentiation. Alizarin red S-positive nodules were first observed on day 14 and then increased in number during the entire culture period. Osteocalcin and VEGF were first detected in the culture medium on day 14, and their levels increased thereafter in a time-dependent manner. These results suggest that VEGF secretion from cultured human periosteal-derived cells increases along with mineralization process of the extracellular matrix. The level of VEGF secretion from periosteal-derived cells might depend on the extent of osteoblastic differentiation.

Key words: Periosteal-derived cell, Osteoblastic differentiation, Mineralization, VEGF signaling

I. 서 론

자가골 이식이 가지는 술후 합병증과 공여부 손상 가능성이라는 피할 수 없는 단점으로 인하여 최근 악안면영역의 골결손의 해결방법으로 조직공학적 골형성이 주목을 받고 있다. 조직공학이란 생명 과학과 공학의 기본 개념과 기술을 통합 응용하여 생체조직의 구조와 기능 사이의 상관관계를 이해하고 나아가서 생체 조직의 대용품을 만들어 이식함으로써 우리 몸의 기능을 유지, 향상 또는 복원시키는 것을 목적으로 하는 응용학문으로 골수기원줄기세포 (bone marrow-derived mesenchymal stem cells), 골막기원세포 (periosteal-derived cells), 그리고 지방기원세포 (adipose-derived cells) 등이 함유된 적은양의 절편을 국소마취하에 채취하고 이를 통하여 관련 세포를 추출, 증식시키며 원하는 골관련 세포로 분화시키는 것이 조직공학적 골형성의 장점이다¹⁻⁴⁾. 임상적으로 성공적인 조직공학적 골형성을 위하여 가장 중요한 요소로 여겨지는 것은 자가 골형성 세포를 쉽게 획득하는 것이다. 현재 많은 연구를 통하여 만족할 만한 골생성 원천으로 잘 알려져 있으며 주로 흡입 (aspiration) 방법을 통하여 채취되는 골수기원줄기세포가 다능성 (multipotent) 세포로서 조골세포, 연골세포 및 지방세포등으로 분화할 수 있는 능력을 가지고 있으나 임상적으로 치과에서 이를 채취하는 것은 그 준비과정의 복잡함과 패혈증, 술후 동통의 증대 및 감염과 같은 합병증의 존재가능성으로 골조직공학을 위한 유리한 환경을 제공하지 못하는 것이 사실이다. 그리하여 골수와 마찬가지로 골을 포함하여 여러 가지 간엽조직 세포들로 분화할 수 있는 다양한 전구세포 (progenitor cells)를 함유하고 있으며 치과적으

로 매복치 발치 등을 포함한 일반적인 구강내 시술을 통하여 쉽게 채취할 수 있는 장점을 제공하는 골막을 이용하는 것이 조직공학적 골형성에 있어서 여러 가지 장점을 제공할 수 있다⁵⁻⁸⁾.

혈관신생 (angiogenesis)이란 기존에 존재하는 혈관망에서 새로운 혈관이 형성되는 것으로 이에 다양한 혈관신생 인자가 관여하는 것으로 알려져 있으나 혈관투과성에 있어서 히스타민보다 약 5만배 더 강력한 기능을 나타내어 혈관 투과인자라고도 불리우는 혈관내피세포성장인자 (vascular endothelial growth factor, VEGF)가 혈관내피세포에 특이적으로 반응하여 혈관의 증식과 이주를 촉진시키는 가장 강력한 혈관신생인자중의 하나이다. 혈관내피세포성장인자는 family로 구성되어 있으며 혈관내피세포성장인자-A로도 알려진 혈관내피세포성장인자, 태반성장인자 (placenta growth factor), 혈관내피세포성장인자-B, 혈관내피세포성장인자-C, 혈관내피세포성장인자-D 및 혈관내피세포성장인자-E의 6가지 요소가 지금까지 알려지고 있다⁹⁻¹¹⁾. 혈관내피세포성장인자-매개 혈관신생이 골의 재형성이나 골절의 치유과정에서 중요한 역할을 하는 것은 주지의 사실로 혈관내피세포성장인자는 조골세포 및 조골세포-유사세포를 포함하여 다양한 세포들에서 분비되어 골신생과 혈관신생 사이 상호작용의 조절에 관여한다. 그러나 골형성 과정동안 조골세포의 분화에 대한 혈관내피세포성장인자의 효과는 아직 논란이 되고 있으며 더욱이 배양된 인간 골막기원세포의 조골세포 분화과정과 혈관내피세포성장인자 신호와의 상호 관계는 잘 알려져 있지 않다¹²⁻¹⁵⁾.

이에 본 연구에서는 골막기원세포를 통한 조골세포의 분화과정에서 골기질 형성정도를 시기별로 평가하고 이의 양

상과 혈관내피세포성장인자 신호와의 상관관계를 관찰하고자 한다.

II. 연구재료 및 방법

1. 골막기원세포의 추출 및 증식

골막기원세포를 추출하고 증식하는 과정은 이전 연구방법에 의하여 실시하였다²⁾. 간단히 요약하면, 경상대학교 병원의 윤리위원회를 따르고 환자 동의하에 매복된 하악 제3대구치의 발치과정에서 약 5 × 20 mm의 골막을 채취하여 100-mm culture dish에 넣은 후 10% fetal bovine serum, 100 IU/mL penicillin, 그리고 100 µg/mL streptomycin이 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 배지에서 37°C, 5% CO₂ 배양기 (Model 3546, Forma Scientific Inc, OH, USA)를 통하여 배양한다. 약 90%의 세포군집 (confluence)을 나타내면 증식된 세포들을 5분간 트립신 (0.02% 트립신과 0.02% EDTA)처리하고 1,500 rpm에서 원심분리하여 계대배양을 실시한다.

2. 골막기원세포의 조골세포로의 분화

골막기원세포에서 조골세포로의 분화과정은 이전 연구방법과 동일한 방법으로 실시하였다²⁾. Passage 3을 거친 후, 골막기원세포들을 3 × 10⁴ cells/well의 밀도로 6-well plate에 주입하고 10% fetal calf serum, 50µg/ml L-ascorbic acid 2-phosphate, 100 nmol dexamethasone, 그리고 10 mM β-glycerophosphate이 포함된 DMEM로 구성된 골형성 유도 배지에서 6주동안 배양한다. 골형성 유도 배지는 매 일주일마다 교체해주며 6주동안 배양하였다.

3. 배양된 골막기원세포의 조골세포관련 유전인자 및 혈관신생 유전인자의 활성

골형성 유도 배지에서 7, 14, 21, 28, 35, 그리고 42일의 배양기간동안 골막기원세포가 나타내는 골형성 관련인자 표현형 및 혈관내피세포성장인자의 발현을 평가하였다.

(1) 알칼리성 인산분해효소 활성도의 측정 (biochemical measurement of ALP activity)

ALP 활성도는 pH 10.4의 Glycine-NaOH 완충액에서 p-nitrophenylphosphate (pNPP)를 기질로 이용하여 골막기원세포에서 유리되는 pNPP를 흡광도 410 nm에서 측정하였으며 µmol/min/mg protein으로 표기하였다. 총단

백량 측정은 Bradford protein assay를 이용하여 측정하였다.

(2) Runx2 및 VEGF에 대한 Western blot 분석

6주까지의 골막기원세포 각각의 표본에서 30 µg의 단백질을 추출하여 용해시키고 SDS/15% polyacrylamide gel 전기영동 후 nitrocellulose membrane로 옮겨 goat polyclonal anti-Runx2 antibody (Santa Cruz, CA, USA)와 rabbit polyclonal anti-VEGF antibody (Santa Cruz, CA, USA)를 이용하여 골막기원세포에서 Runx2 및 VEGF의 발현을 관찰하였다.

(3) Alizarin red S 염색

무기질이 침착된 기질을 적색으로 표현되게 하는 alizarin red S 염색을 통하여 골기질 형성정도를 평가하였다. 배양된 세포를 인산염 식염수로 세척하고 4% 포름알데히드로 10분간 고정하였다. 2% alizarin red S 용액으로 5분간 부드럽게 진탕한 후 탈염수로 여러번 세척하여 여분의 염색액을 제거하였다.

(4) Osteocalcin 분비의 정량화적 평가 (Quantification of osteocalcin secretion)

6주까지의 골막기원세포 각각의 배지에서 분비되는 osteocalcin의 정량화적 평가를 위하여 분석하기 48시간 전, 혈청이 배제되고 100 nmol dexamethasone, 50 µg/ml L-ascorbic acid 2-phosphate, 그리고 10 mM β-glycerophosphate이 포함된 배지로 교체하였다. 48시간 배양후, 분비되는 osteocalcin의 양은 효소면역분석법 (Enzyme immuno assay (EIA), Intact Osteocalcin EIA kit, Biomedical Technologies Inc, MA, USA)을 통하여 흡광도 450 nm에서 측정하였으며 측정된 값은 ng/mL로 표시하였다.

(5) 분비되는 VEGF의 정량화적 평가 (Quantitative measurement of VEGF secretion)

6주까지의 골막기원세포 각각의 배지에서 분비되는 VEGF의 정량화적 평가를 위하여 분석하기 48시간 전, 혈청이 배제되고 100 nmol dexamethasone, 50µg/ml L-ascorbic acid 2-phosphate, 그리고 10 mM β-glycerophosphate이 포함된 배지로 교체하였다. 48시간 배양후, 분비되는 osteocalcin의 양은 효소면역측정법 (Enzyme-linked immunosorbent assay, human VEGF ELISA kit R & D systems, MN, USA)을 통하여 측정하였으며 측정된 값은 pg/mL로 표시하였다.

Ⅲ. 연구결과

1. 골막기원세포 배양

골막기원세포는 골형성 유도배지에서 배양되기전, 계대 배양을 거치는 동안 섬유아세포 유사형태를 나타내었으나 골형성 유도 배지는 입방형태의 세포모양을 나타내었고 배양기간에 따라 다층구조로 증식되었으며 배양 2주부터 무기질 결절을 침착시키는 것으로 보였다(Fig. 1).

2. 배양된 골막기원세포의 조골세포관련 유전인자 및 혈관신생 유전인자의 활성화

(1) 알칼리성 인산분해효소 활성도의 측정

배양 2주에 ALP 활성도가 가장 높았으며 이후 배양기간 동안 이의 활성도는 지속적으로 감소하는 양상을 나타내었다(Fig. 2).

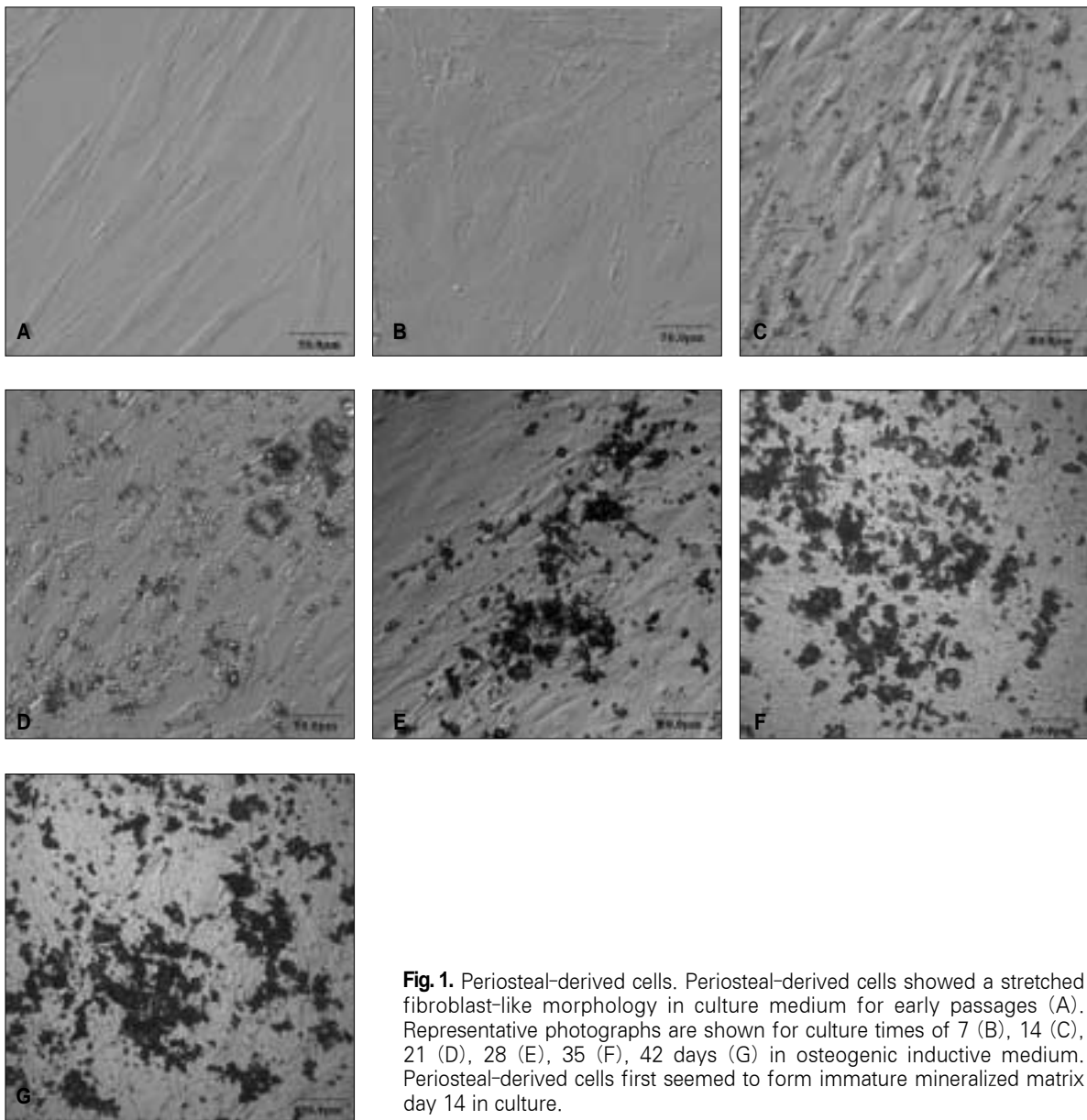


Fig. 1. Periosteal-derived cells. Periosteal-derived cells showed a stretched fibroblast-like morphology in culture medium for early passages (A). Representative photographs are shown for culture times of 7 (B), 14 (C), 21 (D), 28 (E), 35 (F), 42 days (G) in osteogenic inductive medium. Periosteal-derived cells first seemed to form immature mineralized matrix day 14 in culture.

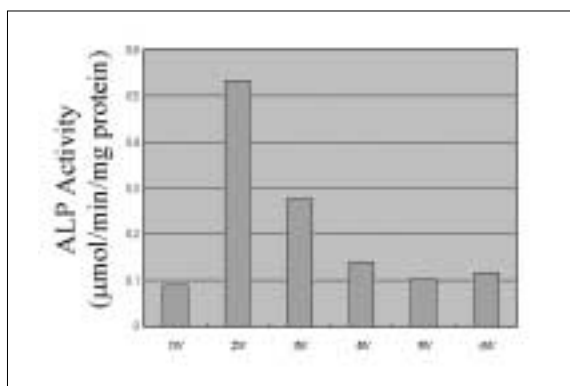


Fig. 2. ALP activity in periosteal-derived cells. Periosteal-derived cells showed positive ALP activity during 42 days of culture period. ALP activity showed its peak level day 14 in culture, followed by continuous decreased activity during the culture period. ALP activity was expressed as μmol of *p*-nitrophenylphosphate produced per min per mg of protein.

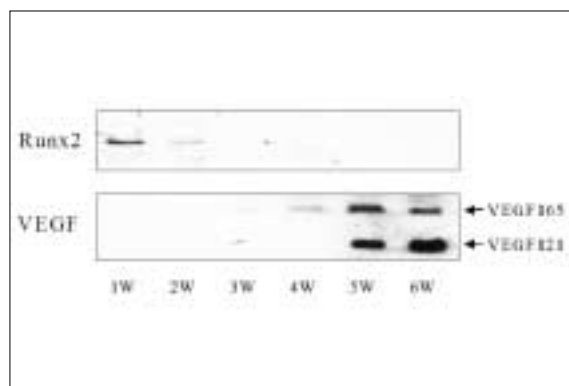


Fig. 3. Runx2 and VEGF expression in the periosteal-derived cells. Increased Runx2 expression appeared at day 7 and decreased to day 14 followed by no expression during the culture period. VEGF₁₆₅ expression appeared at low level at day 28 and increased up to the end duration of the culture period. VEGF₁₂₁ expression was not observed up to day 28, after that its intense expression was observed.

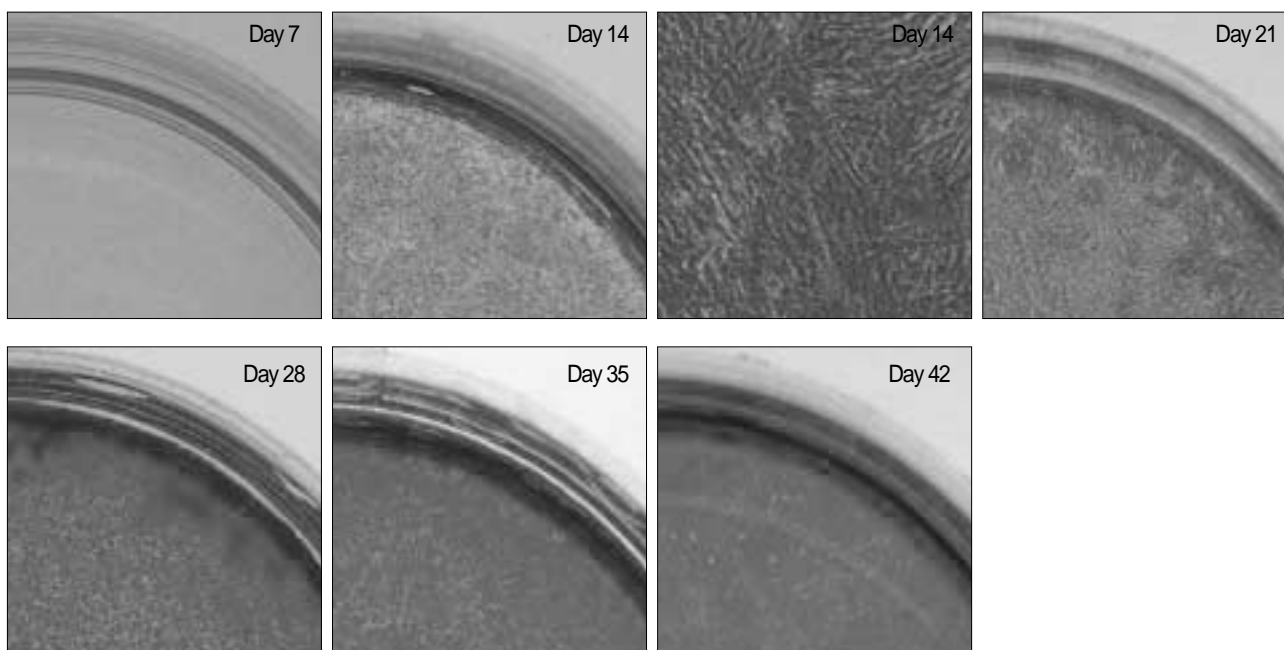


Fig. 4. Alizarin red S staining for mineralized nodule formation in periosteal-derived cells at sequential time points. Alizarin red S-positive mineralization nodules were first visible at day 14 in culture followed by an increased number of positive nodules during 42 days of culture period.

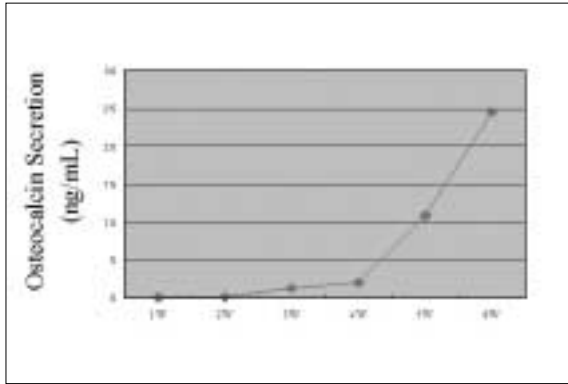


Fig. 5. Osteocalcin secretion in periosteal-derived cells. The osteocalcin level was measured and expressed as secretion of osteocalcin of each culture (ng/mL medium) at the time points indicated. Osteocalcin secretion increased in a time-dependent manner from day 14 to day 42 of culture period. The secretion of osteocalcin from periosteal-derived cells in culture medium increased rapidly between day 28 and day 42 of culture, especially.

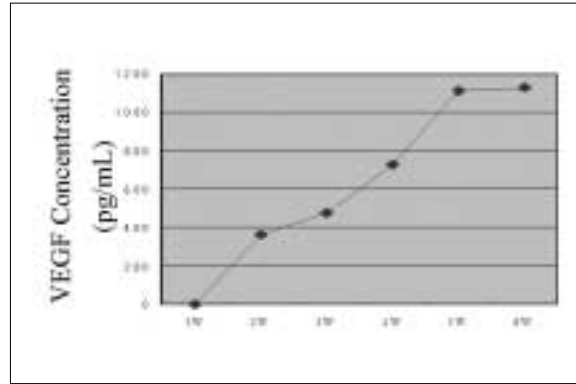


Fig. 6. VEGF secretion in periosteal-derived cells. The VEGF level was measured and expressed as secretion of VEGF of each culture (pg/mL medium) at the time points indicated. VEGF secretion increased in a time-dependent manner from day 14 to day 42 of culture period.

(2) Runx2 및 VEGF에 대한 Western blot 분석

Runx2 발현은 배양 2주까지 관찰되었으며 배양 1주에 가장 강하였고 2주째에는 이의 발현이 감소되어 나타났다. VEGF의 발현은 배양 후반기에서 관찰되었다. VEGF 165의 발현은 배양 4주에 처음으로 약하게 나타났고 배양 5주와 6주에서 뚜렷한 발현 양상을 나타냈다. VEGF 121의 발현도 배양 초기에는 관찰되지 않았으나 배양 5주와 6주에서 뚜렷하게 나타났다(Fig. 3).

(3) Alizarin red s 염색

무기질이 침착되어 적색으로 인기되는 의미있는 골기질 형성은 배양 14일에 나타나 이후 이의 양상은 계속적으로 증가하였다(Fig. 4).

(4) Osteocalcin 분비의 정량화

골막기원세포에서 분비되는 osteocalcin은 배양 1주에서는 관찰되지 않았으나 배양 2주째부터는 그 분비가 지속적으로 증가됨을 관찰하였다. 배양 후반기인 4주와 6주 사이에서 osteocalcin의 분비는 급격히 증가되었다(Fig. 5).

(5) VEGF 분비의 정량화

골막기원세포에서 분비되는 VEGF는 배양 1주에서는 관찰되지 않았으며 배양 2주째부터 시간의존성으로 배양 6주

까지 그 분비가 지속적으로 증가되었다. 배양 후반기인 4주와 5주사이에서 VEGF 분비가 뚜렷하였으며 배양 5주와 6주에서는 분비되는 VEGF 양이 비슷하였다(Fig. 6).

IV. 총괄 및 고찰

공여부에 대한 손상가능성 등으로 인하여 최근 자가골 이식의 대안으로 조직공학적인 접근이 악안면영역의 골결손에 대하여 많이 보고되고 있다. 골조직공학에 의한 성공적인 골형성을 위하여 가장 중요한 요소중의 하나가 적절한 자가골전구세포를 획득하는 것이다. 현재 골수기원줄기세포, 골막기원세포, 그리고 지방기원세포등과 같은 다양한 세포들이 이를 위하여 응용되고 있는 실정이고 이중 골수기원줄기세포의 조골세포로의 분화에 대해서는 이미 많은 연구들이 진행되어 만족할 만한 골형성 양상이 보고되고 있다^{1,6,8)}. 그러나 골수기원줄기세포가 골조직공학을 위한 훌륭한 원천이 될 수 있지만 그 채취 및 일련의 과정은 적은양의 절편을 쉽게 채취하고 관련 세포를 추출, 증식 및 분화시키는 골조직공학의 본연의 장점을 고려할 때, 이러한 골수기원줄기세포의 임상적 이용은 그리 유리하지 않은 않다. 이에 조직공학적인 골형성을 위하여 좀 더 쉽게 접근할 수 있는 원천으로 고려할 수 있는 것이 골막이다. 매복치 발치등을 포함한 일반적인 구강내 시술로 쉽게 채취할 수 있는 골막 또한 골수

와 마찬가지로 여러 가지 간엽조직 세포들로 분화할 수 있는 다양한 전구세포를 함유하고 있다. 이러한 골막에서 추출한 골막기원세포의 골형성 능력은 이미 본 교실의 이전 연구에 의하여 보고되었다²⁾.

혈소판유래성장인자 (platelet-derived growth factor) 류에 속하고 생물학적으로 활동형으로 분비되며 일반적으로 혈관내피세포성장인자-A라고도 불리는 혈관내피세포성장인자는 46 kDa의 헤파린 결합형 다기능 이합체 당단백으로 혈관내피세포에 특이적인 유사분열촉진제이다. 주로 두가지 수용체, 혈관내피세포성장인자수용체-2 (vascular endothelial growth factor receptor-2, VEGFR-2 or Flk-1/KDR)와 혈관내피세포성장인자수용체-1 (vascular endothelial growth factor receptor-1, VEGFR-1 or Flt-1)에 결합하여 혈관신생의 성장, 분화, 그리고 성숙등의 단계를 거쳐 결과적으로 미세혈관 밀도의 증가를 가져오게 된다⁹⁻¹¹⁾. 이러한 혈관내피세포성장인자-매개 혈관신생은 정상적인 골의 재형성이나 골절치유과정에서도 중요한 역할을 한다. 일반적으로 골 손상이 있을 경우, 관련 부위 혈관손상으로 손상된 부위에서 산소부족에 따른 저산소 상태가 초래되어 이에 대한 보상 반응으로 혈류회복을 통한 산소증가를 위하여 혈관신생 기전이 발전하게 된다. 그러므로 사실 골의 재형성이 일어나기 전, 골의 재형성을 위하여 혈관신생기전이 나타나게 되는 것이다^{15,16)}. Gerber¹²⁾등에 의한 연구에서도 내인성 혈관내피세포성장인자의 활성을 억제할 경우 골형성의 장애가 나타났다고 하였으며 Maes¹⁷⁾등은 혈관내피세포성장인자 아이소형 (isoforms)이 부족한 쥐의 모델에서 혈관계 및 골형성/연골형성 프로그램의 손상을 나타내었다고 보고하였다. 그러나 골형성 과정동안 조골세포의 분화에 대한 혈관내피세포성장인자의 효과는 아직 논란이 있는 것이 사실이다. 여러 연구에서 골형성 과정동안 조골세포와 혈관신생은 밀접한 상호 기능적 관계를 나타낸다고 하지만 조골세포로의 분화시 분화초기에 발현되어 초기 조골세포 분화 표지자로 알려진 알칼리성 인산분해효소에 대하여 인간 골수기원줄기세포로부터 배양된 골형성 전구세포의 경우 혈관내피세포성장인자가 알칼리성 인산분해효소 활성에 긍정적인 역할을 하지 못한다고 하는 보고도 있다¹⁸⁾.

이에 본 연구에서는 골막기원세포를 통한 조골세포의 분화과정에서 알칼리성 인산분해효소 활성도, Runx2 발현, alizarin red s 염색 및 osteocalcin 분비 정량화 평가를 통하여 골형성 관련인자의 활성 정도를 평가하고 이의 양상과 VEGF의 발현 및 VEGF 분비의 정량화적 평가를 통한 혈관신생인자와의 상호관계를 관찰하였다. 알칼리성 인산분

해효소는 조골세포의 분화과정에서 초기 특이 표지자로 잘 알려져 있으며 Core-binding factor alpha1 (Cbf α 1) 라고도 불리는 Runx2 또한 전구세포의 조골세포로의 분화 초기 단계에 중요한 역할을 하는 전사인자이다¹⁹⁻²¹⁾. 본 연구에서 알칼리성 인산분해효소 활성도는 배양 초기기간인 배양 2주에 가장 높았고 이후 감소하는 경향을 나타내었으며 Runx2의 발현 또한 배양 초기기간인 배양 1주에 강한 발현 양상을 나타내었고 배양 2주에 약화된 발현을 보였으며 이후에는 발현되지 않았다. 성숙한 조골세포에 대한 평가에 주로 사용되는 Alizarin red s 염색을 통한 석회화된 골기질의 평가에서는 배양 2주부터 의미있는 석회화된 결절이 관찰되었다. Alizarin red s 염색이나 von Kossa 염색을 통해 나타나는 석회화된 골기질의 형성정도가 조골세포 관련 배양에서 골형성 정도의 최종 잠재력을 평가하는데 이용될 수 있지만 그 정도에 대하여 정량화적 평가 방법이 가장 정확한 평가방법이 될 수 있으므로 본 연구에서는 석회화된 골기질에 대하여 osteocalcin 정량화도 실시하였다. 골막기원세포에서 분비되는 osteocalcin은 배양 2주째부터 시간의존성으로 배양 42동안 지속적으로 증가하는 경향을 나타내었으며 특히 배양 후반기인 4주와 6주사이에서 이의 분비가 증가되었다.

혈관내피세포성장인자의 발현에 대해서는 이의 isoforms 중 VEGF 165와 VEGF 121을 평가하였다. 인간에서 혈관내피세포성장인자는 121, 165, 189, 그리고 206 amino acid residues의 네가지 isoforms을 나타낸다. 이중 VEGF 165와 VEGF 121이 가장 풍부한 isoform이므로 본 연구에서는 VEGF 165와 VEGF 121을 평가하였다. Western blot 분석을 통한 연구에서 VEGF 165의 발현은 배양 4주에 처음으로 약하게 나타났으며 배양 5주와 6주에서 뚜렷한 양상을 나타내었으며 VEGF 121의 발현도 배양 후기인, 배양 5주와 6주에서 뚜렷하게 관찰되었다. 혈관내피세포성장인자 분비의 정량화적 평가에서도 배양 후기에 그 분비가 증가됨을 알 수 있었다. 혈관내피세포성장인자의 분비는 배양 1주에서는 관찰되지 않았으나 배양 2주째부터 시간의존성으로 배양 6주까지 그 분비가 지속적으로 증가되었다.

이러한 결과를 통하여 인간 골막기원세포에서 조골세포로의 분화과정동안 나타나는 혈관내피세포성장인자의 발현 및 그 분비정도는 조골세포로의 분화과정과 비례하여 나타나는 것으로 보이며 특히 osteocalcin 분비가 증가되는 분화과정의 후반기인 석회화 과정동안 그 양상이 뚜렷하다고 할 수 있다. 이러한 결과를 통하여 인간 골막기원세포의 조골세포로의 분화과정에서 혈관내피세포성장인자 신호 정도는 성숙한 조골세포로의 분화 정도 의존성을 나타내는 것이

라 할 수 있을 것이다. 향후 혈관내피세포성장인자의 외인성 주입을 통하여 골막기원세포의 조골세포로의 분화 정도에 대한 평가가 필요할 것으로 사료되나 본 연구를 통하여 혈관내피세포성장인자는 골막기원세포의 조골세포로의 분화과정에서 석회화와 관련된 특이 표지자가 될 수도 있으리라 사료된다.

V. 결 론

경상대학교 병원의 윤리위원회를 따르고 환자 동의하에 매복된 하악 제3대구치의 발치과정에서 5 × 20 mm의 골막을 채취하여 일차배양 및 계대배양을 실시하고 passage 3을 거친 골막기원세포를 50μg/ml L-ascorbic acid 2-phosphate, 100 nmol dexamethasone, 그리고 10 mM β-glycerophosphate이 포함된 DMEM 배지에서 6주동안 배양하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 골막기원세포에서 42일간의 배양기간동안 알칼리성 인산분해효소 활성도가 나타났으며 배양 14일까지는 이의 활성도가 증가하였으나 이후 지속적으로 감소하였다.
2. 골막기원세포에서 Runx2 발현은 배양 2주까지 관찰되었으며 배양 1주에 가장 강하였고 2주째에는 이의 발현이 감소되어 나타났으며 이후 이의 발현은 관찰되지 않았다.
3. 골막기원세포에서 VEGF의 발현은 배양 후반기에서 관찰되었는데 VEGF 165의 발현은 배양 4주에 처음으로 약하게 나타나 배양 5주와 6주에서 뚜렷한 발현 양상을 나타내었고 VEGF 121의 발현도 배양 5주와 6주에서 뚜렷하게 나타났다.
4. 무기질이 침착되어 적색으로 나타나는 alizarin red s 염색을 통하여 골막기원세포에서 배양 14일에 처음으로 무기질 침착이 나타났음을 관찰하였으며 이후 이의 양상은 계속적으로 증가하였다.
5. 골막기원세포에서 분비되는 osteocalcin은 배양 1주에서는 관찰되지 않았으나 배양 2주째부터는 그 분비가 인지되어 이후 이의 정도는 시간의존성으로 지속적으로 증가되었으며 특히, 배양 후반기인 4주와 6주 사이에서 그 분비는 급격히 증가되었다.
6. 골막기원세포에서 분비되는 VEGF는 배양 1주에서는 관찰되지 않았으며 배양 2주째부터 시간의존성으로 배양 6주까지 그 분비가 지속적으로 증가되었다. 배양 후반기인 4주와 5주사이에서 VEGF 분비가 뚜렷하였으며 배양 5주와 6주에서는 분비되는 VEGF 양이 비슷하였다.

참고문헌

1. Meinel L, Karageorgiou V, Fajardo R et al : Bone tissue engineering using human mesenchymal stem cells: effects of scaffold material and medium flow. *Ann Biomed Eng* 32 : 112, 2004.
2. Park BW, Byun JH, Lee SG et al : Evaluation of osteogenic activity and mineralization of cultured human periosteal-derived cells. *J Kor Maxillofac Plast Reconstr Surg* 28 : 511, 2006.
3. Laino G, Graziano A, d'Aquino R et al : An approachable human adult stem cell source for hard-tissue engineering. *J Cell Physiol* 206 : 693, 2006.
4. Dudas JR, Marra KG, Cooper GM et al : The osteogenic potential of adipose-derived stem cells for the repair of rabbit calvarial defects. *Ann Plast Surg* 56 : 543, 2006.
5. Takushima A, Kitano Y, Harii K : Osteogenic potential of cultured periosteal cells in a distracted bone gap in rabbits. *J Surg Res* 78 : 68, 1998.
6. Meirelles Lda S, Nardi NB : Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, in vitro expansion, and characterization. *Br J Haematol* 123 : 702, 2003.
7. Huttmacher DW, Sittlinger M : Periosteal cells in bone tissue engineering. *Tissue Eng* 9 Suppl : S45, 2003.
8. Kiramura S, Ohgushi H, Hirose M et al : Osteogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells cultured on alumina ceramics. *Artif Organs* 28 : 72, 2004.
9. Feng D, Nagy JA, Hipp J et al : Vesiculo-vacuolar organelles and the regulation of venule permeability to macromolecules by vascular permeability factor, histamine, and serotonin. *J Exp Med* 183 : 1981, 1996.
10. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S et al : Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J* 13 : 9, 1999.
11. Dvorak HF : Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor : a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *J Clin Oncol* 20 : 4368, 2002.
12. Gerber HP, Vu TH, Ryan AM et al : VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat Med* 5 : 623, 1999.
13. Tatsuyama K, Maezawa Y, Baba H et al : Expression of various growth factors for cell proliferation and cytodifferentiation during fracture healing repair of bone. *Eur J Histochem* 44 : 269, 2000.
14. Deckers MM, Karperien M, van der Bent C et al : Expression of vascular endothelial growth factors and their receptors during osteoblast differentiation. *Endocrinology* 141 : 1667, 2000.
15. Street J, Bao M, deGuzman L et al : Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 : 9656, 2002.
16. Hausman HR, Schaffler MB, Majeska RJ : Prevention of fracture healing in rats by an inhibitor of angiogenesis. *Bone* 29 : 560, 2001.
17. Maes C, Carmeliet P, Moermans K et al : Impaired angiogenesis and endochondral bone formation in mice lacking the vascular endothelial growth factor isoforms

- VEGF164 and VEGF188. *Mech Dev* 111 : 61, 2002.
18. Villars F, Bordenave L, Bareille R et al : Effect of human endothelial cells on human bone marrow stromal cell phenotype : role of VEGF?. *J Cell Biochem* 79 : 672, 2000.
19. Hoshi K, Komori T, Ozawa H : Morphological characterization of skeletal cells in *Cbfa1*-deficient mice. *Bone* 25 : 639, 1999.
20. Safadi FF, Xu J, Smock SL et al : Expression of connective tissue growth factor in bone : its role in osteoblast proliferation and differentiation in vitro and bone formation in vivo. *J Cell Physiol* 196 : 51, 2003.
21. Shui C, Spelsberg TC, Riggs BL et al : Changes in *Runx2/Cbfa1* expression and activity during osteoblastic differentiation of human bone marrow stromal cells. *J Bone Miner Res* 18 : 213, 2003.

저자 연락처

우편번호 660-702
경상남도 진주시 칠암동 90번지
경상대학교 의과대학/의학전문대학원 구강악안면외과학교실
변준호

원고 접수일 2007년 1월 11일
게재 확정일 2007년 5월 9일

Reprint Requests

June-Ho Byun
Dept. of OMFS, College of Medicine, Gyeongsang National Univ.
School of Medicine
90 Chilam-dong, Jinju-city, Gyeongsangnam-do, 660-702, South Korea
Tel: 82-55-750-8264 Fax: 82-55-761-7024
E-mail: surbyun@nongae.gsnu.ac.kr

Paper received 11 January 2007
Paper accepted 9 May 2007