

# 골수유래줄기세포에서 분화된 골유사세포에서 $\beta$ -TCP와 rhBMP-2의 골형성 효과에 관한 연구

최용수<sup>1</sup> · 황경균<sup>1,2</sup> · 이재선<sup>2</sup> · 박창주<sup>1,2</sup> · 심광섭<sup>1</sup>

<sup>1</sup>한양대학교 의과대학 치과학교실 구강악안면외과, <sup>2</sup>한양대학교 의과대학 의생명연구소

**Abstract** (J. Kor. Oral Maxillofac. Surg. 2008;34:419-427)

## THE EFFECTS OF $\beta$ -TCP/rhBMP-2 ON BONE FORMATION IN OSTEOBLAST-LIKE CELLS INDUCED FROM BONE MARROW-DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS

Yong-Soo Choi<sup>1</sup>, Kyung-Gyun Hwang<sup>1,2</sup>, Jae-Seon Lee<sup>2</sup>, Chang-Joo Park<sup>1,2</sup>, Kwang-Sup Shim<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Division of Oral and Maxillofacial Surgery / Department of Dentistry, College of Medicine, Hanyang University

<sup>2</sup>Institute of Biomedical Science, College of Medicine, Hanyang University

The present study aimed to investigate the osteogenic potentials of differentiated osteoblast-like cells (DOCs) induced from bone marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) on  $\beta$ -tricalcium phosphate ( $\beta$ -TCP) with recombinant human bone morphogenetic protein (rhBMP-2) *in vitro*.

Osteoblast differentiation was induced in confluent cultures by adding 100 nM dexamethasone, 10 mM  $\beta$ -glycerophosphate, 50 mM L-ascorbic acid. The Alizarin red S staining and reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) were performed to examine the mRNA expression of alkaline phosphatase (ALP), bone sialoprotein (BSP), osteocalcin (OCN), receptor activator for nuclear factor  $\kappa$ B ligand (RANKL), runt-related transcription factor 2 (RUNX2), collagen- I (COL- I).

There were no significant differences in the osteogenic potentials of DOCs induced from MSCs on  $\beta$ -TCP(+/-). According to the incubation period, there were significant increasing of Alizarin red S staining in the induction 3 weeks. The mRNA expression of ALP, RUNX2, and RANKL were higher in DOCs/ $\beta$ -TCP(-) than DOCs/ $\beta$ -TCP(+). According to rhBMP-2 concentrations, the mRNA expression of BSP was significantly increased in DOCs/ $\beta$ -TCP(+) compared to that of DOCs/ $\beta$ -TCP(-) on rhBMP 10 ng/ml.

Our study presented the  $\beta$ -TCP will have the possibility that calcium phosphate directly affect the osteoblastic differentiation of the bone marrow-derived MSCs.

**Key words:** mesenchymal stem cell, rhBMP -2,  $\beta$ -TCP, differentiated osteoblast-like cell

## I. 서 론

구강 및 악안면 영역의 외상, 종양, 선천적 질환에 의한 결손은 저작, 발음과 같은 기능저하와 심미적인 부조화를 야기한다. 악안면 영역의 골결손은 자가골이식, 동종골이식, 이종골이식, 생체친화성 인공골을 이용하여 회복되어 왔고, 인공치아의 발달로 인해서 구강악안면영역의 골이식재 사용은 더욱

증가하고 있다<sup>1,2</sup>. 그렇지만, 자가골은 부가적인 수술로 인한 통증, 수술시간과 감염가능성의 증가, 제한적 골량 등의 문제점이 대두되었다<sup>3</sup>. 동종골이나 이종골의 사용은 면역반응과 관련된 항원성과 전염성질환에 대한 안전성이 완벽하게 검증되지 않고 있다. 이에 생체친화성이 우수한 인공골들이 개발 연구되고 임상에도 적용되고 있다<sup>4</sup>.

골형성에 있어서 생체친화적인 인공골의 역할은 골형성을 직접 유발하는 것이 아니라, 조골세포가 작용할 수 있는 환경을 조성하는 지지체(scaffold)의 역할이 주된 기능이다. 이러한 인공골이 자가골과 유사한 골유도성(osteoinductivity)과 골전도성(osteoconductivity)을 동시에 가지기 위해서는 골형성(osteogenesis)을 유도할 수 있는 골형성 단백질과 골형성을 진행하는 세포의 존재가 필요하다<sup>5</sup>. 많은 연구들에서 인공골에 골유도

### 황 경 균

133-791 서울 성동구 행당동 17

한양대학교 의과대학 치과학교실 구강악안면외과

**Kyung-Gyun Hwang**

Division of OMFS/Department of Dentistry, College of Medicine, Hanyang Univ.

#17 Haengdang-Dong, Seongdong-Ku, Seoul, 133-791, Korea

Tel: +82-2-2290-8676 Fax: +82-2-2290-8673

E-mail: hkg@hanyang.ac.kr

※ 이 논문은 2006년도 정부재원(교육인적자원부 학술연구조성사업비)으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 연구되었음(KRF-2006-331-E00330).

성을 부여하기 위해서 PRP(platelet-rich plasma), 인간재조합골형성단백질(recombinant human bone morphogenetic protein; rhBMP)을 동시에 이식하기도 하고, 골형성을 향상시키기 위해 전기 자극 또는 맥동전자기장의 원리를 이용하기도 한다. 골수유래 줄기세포(bone marrow derived stem cell; BMSC)와 골형성유도물질을 인공골과 같이 이식하는 조직공학적 골이식술도 최근 시도되고 있다<sup>6,14)</sup>.

골형성단백질은 transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) superfamily의 일종으로 7개의 subgroup이 발견되었다<sup>15)</sup>. 골형성단백질은 중간엽줄기세포증식(mesenchymal cell proliferation), 연골 형성, 혈관형성, 골형성, 골의 재형성(remodeling), 발생(embryonic development processes)등에 관여한다. 골형성단백질을 임상적으로 이용하기 위해서는 bovine bone에서 추출을 하거나, cDNA를 이용하여 클로닝하는 방법으로 rhBMP를 만든다. 골형성단백질을 골결손부에 사용하기 위해서는 collagen sponge나 calcium phosphate particle 등의 전달체(carrier material)가 필요하다. 최근  $\beta$ -tricalcium phosphate( $\beta$ -TCP)와 같은 골전도성 인공골이 BMP의 전달체로 임상에서 많이 이용되고 있다<sup>16,18)</sup>.

줄기세포(stem cell)는 미분화 상태로 존재하면서 다양한 세포로 분화할 수 있는 능력을 가진 세포이다. 줄기세포는 기원에 따라 배아줄기세포와 성체줄기세포로 나눌 수 있고, 성체 줄기세포는 배아줄기세포보다는 제한적인 분화능을 가지며, 신체의 특정 위치에서 성장하고 특정 조직 세포로의 증식과 분화를 준비하고 있다. 조혈과 골형성 대사가 항상 진행되는 골수는 중간엽줄기세포(mesenchymal stem cells) 및 조혈세포 생성에 관여하는 세포외기질(extracellular matrix; ECM)로 구성된 복잡한 구조를 가지고 있어 골화세포 및 연골세포로의 분화가 가능한 줄기세포를 추출할 수 있고, 추출된 줄기세포의 골모유사세포(osteoblast-like cell)로의 분화에 대한 연구도 많이 진행되고 있다<sup>19,22)</sup>.

최근 줄기세포의 추출, 확립 및 분화의 기술이 급속히 발달함에 따라 조직공학적 생체재료에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 골재생을 향상시키기 위한 줄기세포의 임상적 적용도 조금씩 진행되고 있다. 이에 본 연구는 골수유래줄기세포의 분화와 이에 따른 골형성능력을 확인하고, 서로 다른 rhBMP-2의 농도와  $\beta$ -TCP 여부에 따른 골형성의 차이를 평가하여 보다 적합한 골재생을 위한 환경을 찾음으로서 조직공학적 골재생의 임상적 적용에 기여하고자 한다.

## II. 연구 방법

### 1. 세포 배양(Cell culture)

사람의 중간엽줄기세포는 Cambrex (USA)에서 구입하여 사용하였다. 세포는 같은 회사의 mesenchymal stem cell basal medium과 mesenchymal stem cell growth supplements, 그리고 L-glutamin (Gibco, USA), penicillin-streptomycin (Gibco, USA)을 혼합하여 미분화상태로 4번째까지 계대 배양하였다.

### 2. 골모유사세포의 분화 실험

실험군으로 미분화상태의 중간엽줄기세포를 100 nM Dex (dexamethasone, Sigma, USA), 50 mM  $\beta$ -GP ( $\beta$ -glycerophosphate, Fluka, Switzerland), 50  $\mu$ M L-ascorbic acid (Sigma, USA), 10% FBS (fetal bovine serum, Gibco, USA)가 혼합된 LG-DMEM (low-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium, Gibco, USA) 배지에서 1주부터 4주동안 배양하여 각각 조골세포로의 분화를 유도하였다. 대조군으로 미분화상태의 중간엽줄기세포를 10% FBS가 혼합된 LG-DMEM 기본 배양배지에서 4주동안 배양하였다. 배양은 5% CO<sub>2</sub>, 37.5°C 배양기내에서 배양하였으며 10% FBS가 포함된 LG-DMEM은 3~4일마다 교환하였다. 배양이 끝난 후, 각 세포의 배지를 걷어내고 4% paraformaldehyde 용액으로 4°C에서 30분간 고정시켰다. 이후에 phosphate buffered saline (PBS)로 세척하고 증류수로 한번 더 세척한 다음 40 mM Alizarin red S (Usb, OH, USA) 용액(pH 4.2)을 1 ml 넣어 실온에서 10분간 염색하였다. 증류수로 한번 세척하여 여분의 용액을 제거한 다음 염색 정도를 관찰하고, 10 mM sodium phosphate가 포함된 10% cetylpyridinium chloride (Sigma, USA) 용액에 탈염(de-staining)하여 562 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 염색정도를 정량화하였다.

### 3. 인간재조합골생성 단백질(rhBMP)과 인공이식재( $\beta$ -TCP)하에서 골모유사세포 배양 후 RT-PCR을 통한 mRNA발현 관찰

중간엽줄기세포가 분화하는 동시에 인공이식재( $\beta$ -TCP)와 rhBMP-2 (R&D systems, USA)를 0, 1, 10ng/ml의 농도로 각각 배지에 혼합하여 배양하였다.

배양이 끝난 세포를 회수하여 배지를 걷어내고 Easy Blue (Intron, Korea)를 처리하여 전체 mRNA를 추출하였다. 이를 정제하기 위해서 200  $\mu$ l의 chloroform을 넣고 잘 섞은 다음 13000 rpm에서 15분간 원심분리하고, 상등액을 취해 동량의 isopropanol을 넣어 잘 섞은 다음 mRNA를 침전시켜, 13000 rpm에서 10분간 원심분리하여 pellet을 얻었다. Pellet을 75% ethanol로 세척한 다음 nuclease free water (Promega, USA)에 녹여 cDNA 합성에 사용하였다. 추출된 mRNA를 cDNA로 바꾸기 위해서, 0.5  $\mu$ g random nonamer (Genotech, Korea) 와 70°C에서 5분간 반응시킨 후 4°C로 식혔다. mRNA-nonamer 중합체는 10 mM dNTP mix (Intron, Korea) 1  $\mu$ l, reverse transcriptase M-MuLV (MBI Fermentas, USA) 1 unit, 5X M-MuLV dilution buffer (MBI, USA) 4  $\mu$ l, 그리고 RNase inhibitor (MBI, USA) 0.5  $\mu$ l 와 섞고, nuclease-free water를 사용하여 전체 volume을 20  $\mu$ l로 맞추었다. 이를 25°C에서 10분, 42°C에서 60분, 72°C에서 10분, 4°C 5분간 차례로 반응시킨 다음 PCR에 사용하였다. 1  $\mu$ l의 cDNA와 2.5 mM dNTP mix (Intron, Korea) 2  $\mu$ l, 10  $\times$  Taq buffer (Intron, Korea) 2  $\mu$ l, Taq polymerase (Intron, Korea) 0.2  $\mu$ l, 10 pmol의 각 target 유전자 primer (Genotech, Korea)를 섞어 필요한 부분을 증폭시켰다. 본 실험에서는 alka-

**Table 1.** Primer sequences

target genes	sequences	conditions			size (bp)
		temp(°C)	time	cycle	
GAPDH - FW	GAA GTG GAA GGT CGG AGT C	94	3 min	25	313
		94	30 sec		
		57	30 sec		
GAPDH - RV	GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC	72	30 sec	4	∞
		72	7 min		
		4	∞		
ALP - FW	ACG TGG CTA AGA ATG TCA TC	94	3 min	35	475
		94	30 sec		
		55	30 sec		
ALP - RV	CTG GTA GGC GAT GTC CTT A	72	30 sec	4	∞
		72	7 min		
		4	∞		
OCN - FW	GGC CAG GCA GGT GCG AAG C	94	3 min	35	255
		94	30 sec		
		70	30 sec		
OCN - RV	GCC AGG CCA GCA GAG CGA CAC	72	30 sec	4	∞
		72	7 min		
		4	∞		
RUNX2 - FW	ATG CTT CAT TCG CCT CAC AAA C	94	2 min	35	261
		94	30 sec		
		50	30 sec		
RUNX2 - RV	CCA AAA GAA GTT TTG CTG ACA TGG	72	60 sec	4	∞
		72	7 min		
		4	∞		
RANKL - FW	CAG GAG ACC TAG CTA CAG A	94	3 min	29	381
		94	30 sec		
		55	30 sec		
RANKL - RV	CAA GGT CAA GAG CAT GGA	72	30 sec	4	∞
		72	7 min		
		4	∞		
OL-I - FW	GGA CAC AAT GGA TTG CAA GG	94	3 min	30	461
		94	60 sec		
		60	60 sec		
OL-I - RV	TAA CCA CTG CTC CAC TCT GG	72	60 sec	4	∞
		72	7 min		
		4	∞		
BSP - FW	GCA TCG AAG AGT CAA AAT AG	94	3 min	40	534
		94	60 sec		
		55	30 sec		
BSP - RV	TTC TTC TCC ATT GTC TC TC	72	40 sec	4	∞
		72	7 min		
		4	∞		

Abbreviation: GAPDH (glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase), ALP (alkaline phosphatase), OCN (osteocalcin), RUNX2 (runt related transcription factor 2), RANKL (receptor activator of nuclear factor kB ligand), COL- I (collagen type I), BSP (bone sialoprotein), FW (forward), RV (reverse), Temp (temperature).

line phosphatase (ALP), bone sialoprotein (BSP), osteocalcin (OCN), receptor activator for nuclear factor  $\kappa$ B ligand (RANKL), runt-related transcription factor 2 (RUNX-2), collagen- I (COL- I) 를 증폭하였다. 각 mRNA의 primer sequence는 Table 1과 같다.

결과는 GAPDH의 band intensity에 대한 각 mRNA의 band intensity를 각각 Gel-doc (Bio-Rad, USA)으로 측정, 비율을 산출하여 그래프로 나타내거나, BMP-2로 자극된 그룹의 intensity/자극하지 않은 그룹의 intensity 값으로 표시하였다.

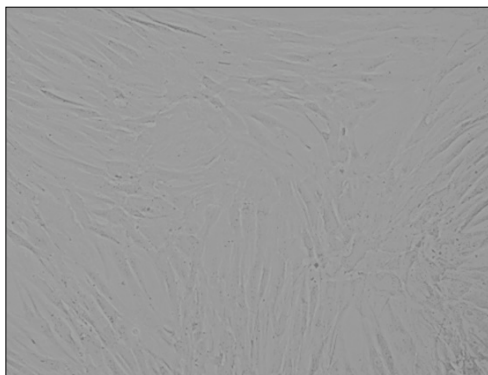
#### 4. 통계처리

Alizarin red-S 염색결과는 특별한 통계처리를 하지 않았고 배양기간이나 rhBMP-2의 배양 농도에 따른 각 mRNA 발현의 GAPDH에 대한 비율은  $\beta$ -TCP가 없이 배양된 경우와  $\beta$ -TCP와 함께 배양된 경우를 SigmaStat Version 8 (Systat software Inc, USA)을 이용하여 Mann-Whitney U-test로 비교하였다. 유의수준이 .05보다 적게 나타나는 경우를 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 검정하였다.

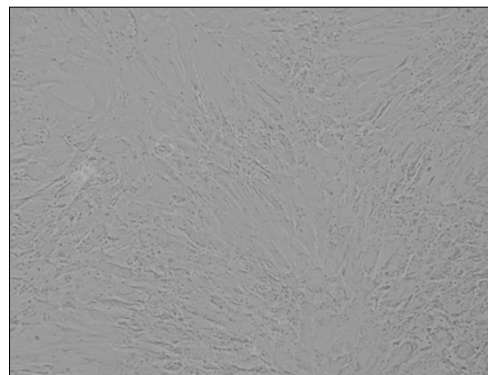
### III. 연구결과

#### 1. 세포 배양

골수로부터 분리된 중간엽줄기세포는(Cambrex, USA)는 10% FBS (fetal bovine serum)가 포함된 기본배지인 LG-DMEM (low-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium)에서 4회 계대 배양을 시킨 후 실험에 이용하였다(Fig. 1).



a. BMSCs



b. Osteoblast-like cells

**Fig. 1.** Phase-contrast microphotographs of Bone marrow derived MSCs (BMSCs) (a) osteoblast-like cells (b) at 1st week.

#### 2. 골모유사세포의 분화 실험

##### 1) 분화기간에 따른 Alizarin red S staining 변화

줄기세포의 골모유사세포로의 분화를 확인하기 위해서 Alizarin red S staining을 시행한 결과 2주, 3주, 4주 시간이 지남에 따른 staining은 증가하는 양상이 보였고,  $\beta$ -TCP를 동시에 배양하였을 경우에도 유사한 staining결과를 보이나,  $\beta$ -TCP가 Alizarin red S를 흡수하는 양상을 보여 두 군 간의 시각적인 분화능력의 비교는 어려웠다. 하지만 Alizarin red S의 정량분석을 시행하여 각 군간의 결정화의 정도를 비교한 결과  $\beta$ -TCP가 없는 군에서는 3주부터 골결정화가 본격적으로 이루어지는 것으로 보이는 반면  $\beta$ -TCP가 첨가된 군에서는 2주부터 골결정화가 본격적으로 진행되는 것으로 보였다(Fig. 2).

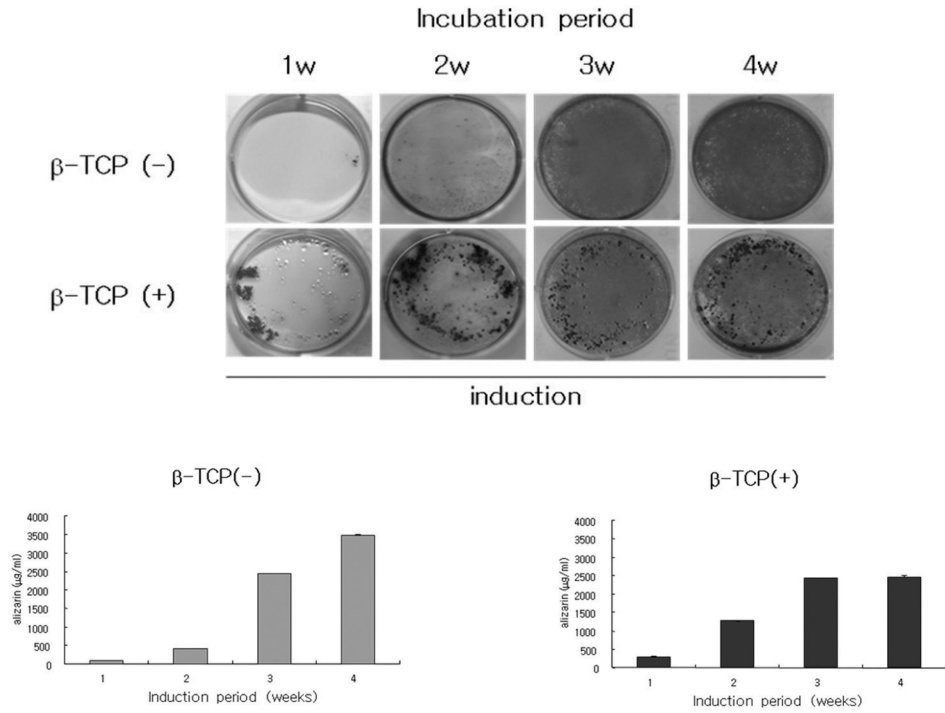
##### 2) rhBMP-2의 농도에 따른 Alizarin red S staining 변화

중간엽줄기세포에 Alizarin red S staining을 시행한 결과  $\beta$ -TCP가 없는 군에서는 rhBMP-2의 농도가 높을수록 염색의 정도가 낮았으며  $\beta$ -TCP가 첨가된 군에 있어서는  $\beta$ -TCP에 흡수가 일어나 시각적 판단이 어려웠다. Alizarin red 정량분석을 시행한 결과  $\beta$ -TCP가 없는 군에서는 rhBMP-2농도가 0과 1 ng/ml인 경우에 결정화가 높게 나타났으나  $\beta$ -TCP가 있는 군에서는 rhBMP-2 농도가 1 ng/ml인 군에서 가장 높게 나타났다(Fig. 3).

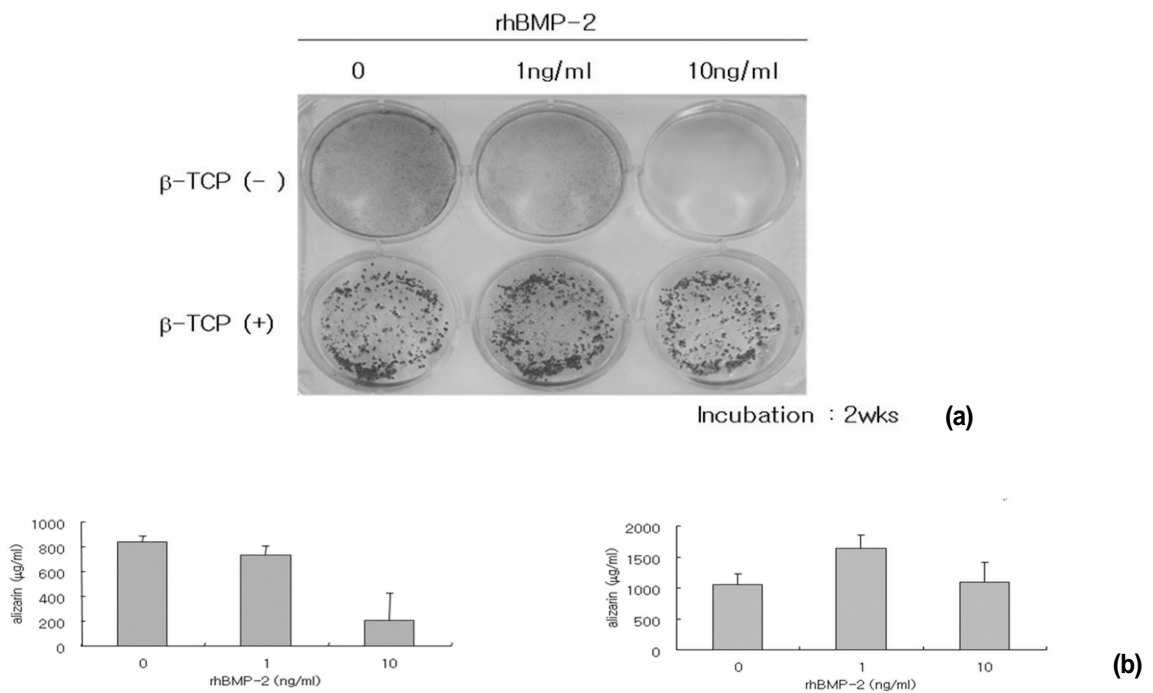
##### 3. $\beta$ -TCP와 rhBMP-2하에서 골모유사세포 배양 후 mRNA 발현 양상

###### 1) $\beta$ -TCP여부와 배양기간에 따른 mRNA 발현양상

전반적으로 골유사세포로 분화된 골수유래줄기세포에서의



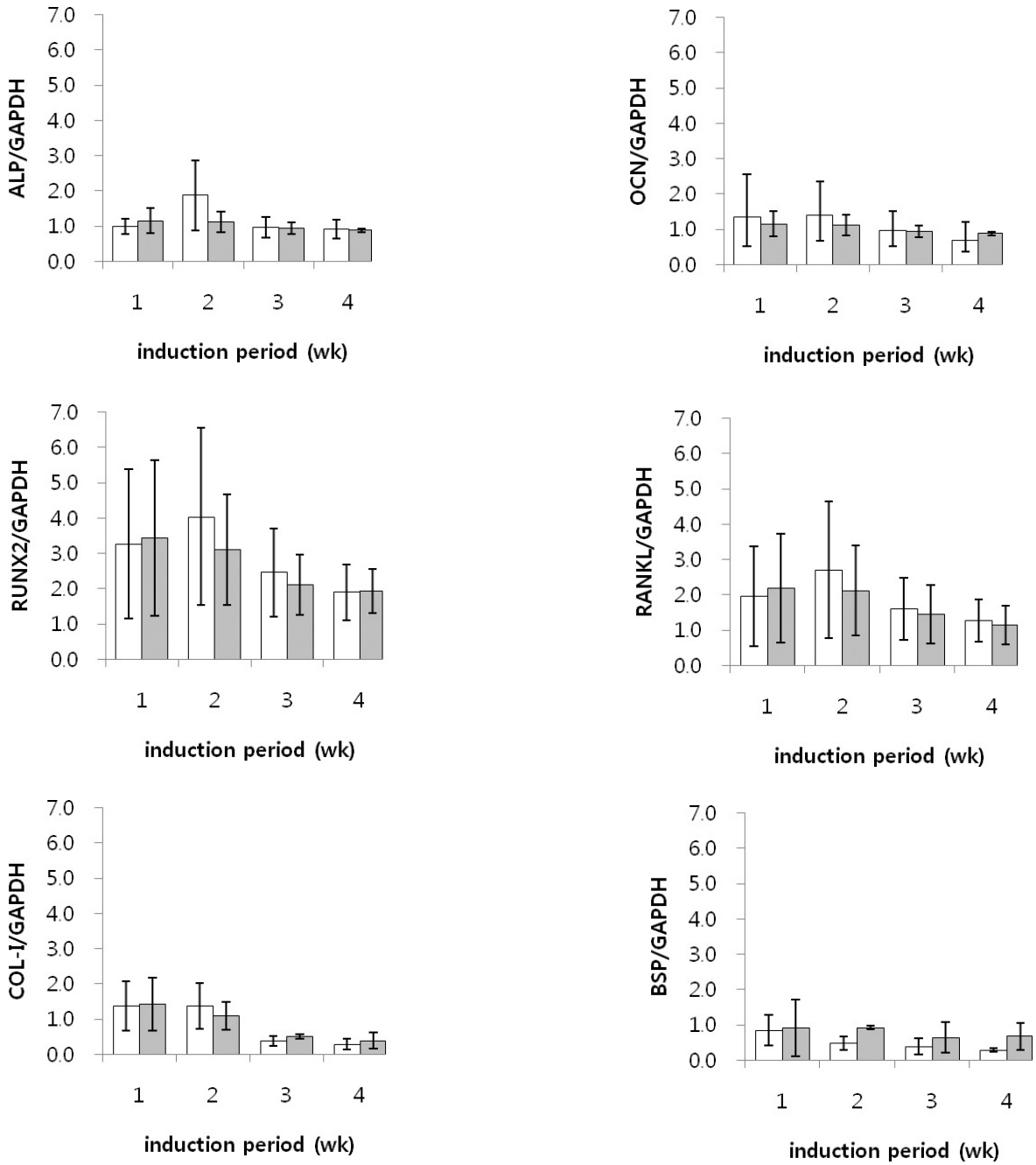
**Fig. 2.** Effect of osteogenic supplements and  $\beta$ -TCP on osteogenic differentiation. The 4th passage MSCs were seeded at  $5 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup> in each dish, grown in control medium or medium containing osteogenic supplements, fixed and stained by Alizarin red S staining.



**Fig. 3** Pictures of alizarin red stained MSCs which were treated with different concentrations of rhBMP-2 (a). The effect of different concentrations of rhBMP-2 and  $\beta$ -TCP presence (b).

배양기간에 따른 mRNA 발현은 다른 단백질에 비하여 RUNX2와 RANKL의 발현이 두드러졌으며 이는 모두 배양 2주에서 최고점을 이루고 이후 감소하는 양상을 보였다. 또한  $\beta$ -TCP가 없

이 배양된 경우,  $\beta$ -TCP와 함께 배양된 경우에 비하여 ALP, RUNX2, 그리고 RANKL의 mRNA 발현이 배양 2주에서 통계적으로 유의성 있게 높게 나타났다(Fig. 4).



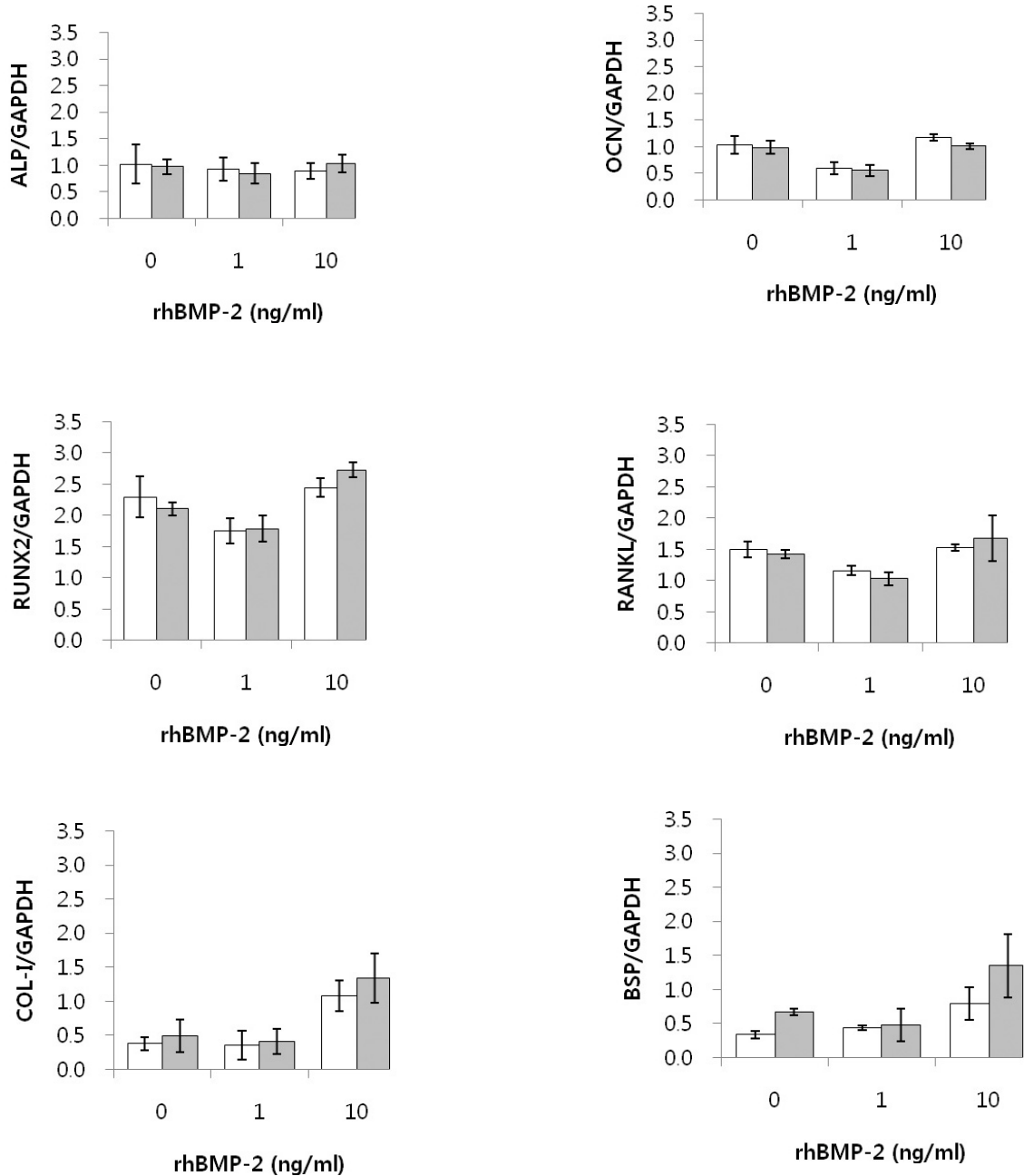
**Fig. 4.** mRNA expression of ALP, OCN, RUNX2, COL-1, RANKL, and BSP after MSCs were cultured for 1, 2, 3, and 4 weeks in osteogenic medium (data were expressed as mean  $\pm$  SD; white bar =  $\beta$ -TCP(-) and dark bar =  $\beta$ -TCP(+))

2) rhBMP-2 농도에 따른 mRNA 발현양상

전반적으로 골유사세포로 분화된 골수유래줄기세포를 rhBMP-2의 각 농도 별로 4주간 배양하였을 때 각 단백질의 mRNA 발현은 rhBMP-2의 농도에 따라 특별한 변화가 관찰되지 않았으나 COL-1과 BSP가 rhBMP-2를 10 ng/ml의 농도로 배

양하였을 때 증가하였다.

또한  $\beta$ -TCP와 함께 배양된 경우,  $\beta$ -TCP가 없이 배양된 경우와 비교하여 BSP의 mRNA 발현이 rhBMP-2 10 ng/ml로 배양하였을 때 통계적으로 유의성 있게 높게 나타났다(Fig. 5).



**Fig. 5.** mRNA expression of ALP, OCN, RUNX2, COL-1, RANKL, and BSP after MSCs were cultured for 4 weeks in osteogenic medium with different concentrations of rhBMP-2. (data were expressed as mean  $\pm$  SD; white bar =  $\beta$ -TCP(-) and dark bar =  $\beta$ -TCP(+))

#### IV. 총괄 및 고찰

골전도성만을 가진 인공골 대체재료가 자가골과 유사한 기능을 발휘하기 위해서는 골형성세포를 직접 유도하는 신호전달 역할을 가진 단백질과 골형성세포의 동시식이 필수적이라고 볼 수 있다. 최근 이와 관련된 조직공학적 생체재료에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며 골형성을 위한 줄기세포의 적용도 조금씩 진행되고 있다<sup>12-14</sup>. 골수의 간질에는 지방세포, 망상적혈구, 내피세포 및 섬유모세포 등을 포함한 불균일한 세포들이 혼합되어 있으며 골, 연골, 지방과 조혈간세포의 분화를 돕는 결합조직으로 분화하는 세포들을 포함한다는 사실이 이미 알려져 있었고, 이는 간엽줄기세포로 언급되었다<sup>19,23</sup>. 최근에는 골수간엽줄기세포를 dexamethasone, ascorbic acid,  $\beta$ -glycerophosphate가 첨가된 골형성배지에서 배양하여 골유사세포로 유도분화가 가능함도 밝혀졌다<sup>24,25</sup>. 이렇게 분리배양된 골수간엽줄기세포는 일차 골재생세포로서 그 수가 아주 적지만 필요한 양만큼의 증식이 가능하며 배아줄기세포와 같은 윤리적 문제의 소지가 없어 임상적인 적용에 많은 기대를 걸고 있다. 하지만 계대배양의 수가 지나치게 늘어날 경우 세포노화현상과 같은 한계를 보이며 분화능력이 떨어지는 결과를 보이므로 이번 실험과 같이 주로 3-5회 계대배양된 초기의 세포들을 이용하게 된다<sup>26</sup>.

골수줄기세포를 임상적으로 적용하기 위해서는 이식부위 내에서의 안정성을 위한 전달체가 필요하며 이 같은 전달체로는 동종골이나 이종골, HA,  $\beta$ -TCP 등과 같은 합성골이나 gelatin sponge 등이 있다. 특히 합성골은 감염의 문제나 비용적인 문제들을 극복할 수 있어 활발하게 연구되고 있는데 생체 내에서의 흡수가 거의 일어나지 않는 HA에 비하여  $\beta$ -TCP는 흡수를 통한 자가골 치환율이 높고 형태 유지를 위한 충분한 강도를 가지고 있어 이번 실험에 전달체로 선택하였다.

줄기세포의 골세포유도를 촉진시키고 골재생을 활발히 이루기 위해 BMP와 같은 골유도물질이 사용된다<sup>27,30</sup>. 특히 BMP-2는 TGF- $\beta$ 1 계열로 ALP활성의 증가와 더불어 OCN과 COL-I의 합성을 유도하여 광화 과정을 촉진시키며 골세포와 지방세포로의 분화에 영향을 끼치는 것으로 보고되고 있다<sup>31</sup>. 그러나 이번 실험에서는 이런 연구와는 달리 BMP-2의 처리가 상기 보고된 단백질의 발현으로 나타나지는 않았다. 이는 처리 농도와 연관되는 것으로 사료되며 Lecanda 등<sup>15</sup>은 인간 골수간엽줄기세포에서 BMP-2는 증식은 억제하면서 분화를 유도하며, 골세포분화와 골광화를 위해 100 ng/ml의 BMP-2농도가 필요하다고 보고한 반면 Chaudhary 등<sup>29</sup>은 골세포 분화를 위해 40 ng/ml의 BMP-7 농도가 필요하다고 하였다. 이번 실험에서는 Alzarín red-S 염색 정도로 판단되는 골형성능이  $\beta$ -TCP 없이 배양하였을 경우보다  $\beta$ -TCP와 함께 배양하였을 경우 10 ng/ml의 농도에서 가장 증가한 것으로 보아 전달체로  $\beta$ -TCP를 사용할 경우 기존의 BMP농도보다는 적은 농도에서도 골형성능을 증가시킬 수 있는 가능성이 있다고 할 수 있다.

골유사세포에서  $\beta$ -TCP 없이 배양한 경우에  $\beta$ -TCP와 함께 배양한 경우와 비교하여 배양 2주째 ALP, RUNX2, RANKL의 발현이 보다 높은 이유는 보다 추가적인 연구가 필요하다고 생각된다. 각 단백질의 기능을 간략히 살펴보면 ALP는 골형성의 지표로 알려져 있으며 조골세포 표면에서 골활성도가 증가할 때 농도가 증가하고<sup>32</sup>, RUNX2은 조골세포분화와 골격 형성에 필수적인 전사인자이다<sup>33</sup>. 특히 RANKL은 파골세포의 자극과 관계가 있어 골흡수에 관련하는 골대사에 중요한 성분이다.

본 연구결과에서  $\beta$ -TCP(-)군에서 ALP의 mRNA 발현의 증가가 배양 2주에 증가하다 감소하는 경향을 보였지만,  $\beta$ -TCP(+)에서는 발현 증가를 관찰할 수 없는 것은  $\beta$ -TCP에 의해서 ALP의 발현이 억제되는 것으로 판단할 수 있다. 일반적으로 ALP는 조골세포의 초기 분화에 관여하는 전사인자로 줄기세포 및 조골세포에서 2주에서 발현이 증가하는 것으로 보고되는 것으로 판단할 때에 calcium phosphate에 의한 ALP의 발현에 관련성은 더욱 추가적인 연구가 필요할 것으로 판단된다<sup>34,35</sup>.

RUNX2 또한 초기 조골전구세포 및 조골세포의 분화에 밀접하게 관여하는 전사인자로 본 연구결과에서 1-3주경에 높은 발현을 나타내고 있다. 그리고, ALP와 유사하게  $\beta$ -TCP(-)에서  $\beta$ -TCP(+)보다 유의한 증가를 보여주고 있다.  $\beta$ -TCP(+)에서 발현이  $\beta$ -TCP(-)보다 낮은 것은 ALP와 비슷하게 calcium phosphate의 영향으로 볼 수 있다.

최근 calcium phosphate의 표면 자체가 골형성을 유도한다는 보고와<sup>36</sup> Alizarin red S staining결과를 가지고 판단한다면, 골형성의 양은 차이가 없는데, ALP와 RUNX2의 발현 차이는 초기 줄기세포의 분화과정에서 calcium phosphate에 의한 직접적인 관여가 있는 것으로 판단할 수 있다.

골유사세포를 BMP-2의 각 농도로 처리한 결과 높은 발현을 나타내는 RUNX2와 RANKL보다는  $\beta$ -TCP를 함께 배양한 경우  $\beta$ -TCP 없이 배양한 경우보다 BSP가 유의성있게 나타난 이유는  $\beta$ -TCP와 함께 배양한 경우 초기광화가 보다 조속하게 일어날 수 있는 가능성을 제시한다고 볼 수 있다. 특히 BSP는 골, 상아질, 백악질과 석회화된 연골과 같은 광화된 조직의 구성성분으로 골의 세포외기질에 중요한 요소이며 골과 백악질에서 발견되는 비교원성 단백질의 대략 8%를 구성하는 것으로 알려져있다.<sup>37</sup> 골과 상아질의 BSP의 양은 대략 비슷하지만 광화된 조직내에서의 기능은 명확히 알려지지 않는 것이며 초기 apatite 결정의 형성에서 핵으로서 작용한다<sup>38</sup>. 세포외기질에서 교원섬유를 따라 apatite 가 형성될 때 BSP가 방향을 결정하거나 결정의 성장을 억제하기도 한다.

현재까지 중간엽줄기세포의 골세포분화를 명령하는 동적인 세포간의 상호관계에 대한 분자적 기전은 많이 알려져 있지 않다. 본 연구에서 이러한 상호관계에 대한 기반을 제시하며 추가적인 실험이 필요할 것으로 사료된다.



## 참고문헌

- Oklund SA, Prolo DJ, Gutierrez RV, King SE: Quantitative comparisons of healing in cranial fresh autografts, frozen autografts and processed autografts, and allografts in canine skull defects. *Clin Orthop Relat Res* 1986;205:269-91.
- Becker W: Treatment of small defects adjacent to oral implants with various biomaterials. *Periodontol* 2000 2003;33:26-35.
- Langer R, Vacanti JP: *Tissue Engineering*. Science 1993;260:920-6.
- Wiltfang J, Schlegel KA, Schultze-Mosgau S, Nkenke E, Zimmermann R, Kessler P: Sinus floor augmentation with beta-tricalciumphosphate (beta-TCP): does platelet-rich plasma promote its osseous integration and degradation? *Clin Oral Implants Res* 2003;14;213-8.
- Goldberg VM, Stevenson S: Nature history of autograft and allograft. *Clin Orthop* 1987;225: 7-16.
- Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR: Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998;85:638-46.
- Aghaloo TL, Moy PK, Freymiller EG: Evaluation of platelet-rich plasma in combination with anorganic bovine bone in the rabbit cranium: a pilot study. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2004;19:59-65.
- Ahn SH, Kim CS, Suk HJ, Lee YJ, Choi SH, Chai JK et al: Effect of recombinant human bone morphogenetic protein-4 with carriers in rat calvarial defects. *J Periodontol* 2003;74:787-97.
- Takahashi Y, Yamamoto M, Tabata Y. Enhanced osteoinduction by controlled release of bone morphogenetic protein-2 from biodegradable sponge composed of gelatin and beta-tricalcium phosphate. *Biomaterials* 2005;26:4856-65.
- Borsalino G, Bagnacani M, Bettati E, Fornaciari F, Rocchi R, Uluhogian S, Ceccherelli G, Cadossi R, Traina GC: Electrical stimulation of human femoral intertrochanteric osteotomies. *Clin Orthop Relat Res* 1988;237:256-63.
- Hastings GW, Mahmud FA: Electrical effects in bone. *J Biomed Eng* 1988;10:515-21.
- Bjerre L, Bttinger CE, Kassem M, Mygind T: Flow perfusion culture of human mesenchymal stem cells on silicate-substituted tricalcium phosphate scaffolds. *Biomaterials* 2008;29:2616-27.
- Chen F, Feng X, Wu W, Ouyang H, Gao Z, Cheng X et al : Segmental bone tissue engineering by seeding osteoblast precursor cells into titanium mesh-coral composite scaffolds. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2007;36:822-27.
- Kinoshita K, Hibi H, Yamada Y, Ueda M: Promoted new bone formation in maxillary distraction osteogenesis using a tissue-engineered osteogenic material. *J Craniofac Surg* 2008;19:80-7.
- Lecanda F, Avioli LV, Cheng SL: Regulation of bone matrix protein expression and induction of differentiation of human osteoblasts and human bone marrow stromal cells by bone morphogenetic protein-2. *J Cell Biochem* 1997;67:386-98.
- Chu TM, Warden SJ, Turner CH, Stewart RL: Segmental bone regeneration using a load-bearing biodegradable carrier of bone morphogenetic protein-2. *Biomaterials* 2007;28:459-67.
- Jingushi S, Urabe K, Okazaki K, Hirata G, Sakai A, Ikenoue T, Iwamoto Y: Intramuscular bone induction by human recombinant bone morphogenetic protein-2 with beta-tricalcium phosphate as a carrier: in vivo bone banking for muscle-pedicle autograft. *J Orthop Sci* 2002;7:490-4.
- Mastrogiacomo M, Muraglia A, Komlev V, Peyrin F, Rustichelli F, Crovace A, Cancedda R: Tissue engineering of bone: search for a better scaffold. *Orthod Craniofac Res* 2005;8:277-84.
- Beresford JN: Osteogenic stem cells and the stromal system of bone and marrow. *Clin Orthop Rel Res* 1989;240:270-80.
- Haynesworth SE, Goshima J, Goldberg VM, Caplan AI: Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. *Bone* 1992;13:81-8.
- Wakitani S, Goto T, Pineda SJ, Young RG, Mansour JM, Goldberg VM, Caplan AI: Mesenchymal cell-based repair of large full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg* 1994;76:579-92.
- Caplan AI: Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 1991;9:641-50.
- Chen Y, Shao JZ, Xiang LX, Dong XJ, Zhang GR: Mesenchymal stem cells: A promising candidate in regenerative medicine. *Int J Biochem Cell Biol* 2008;40:815-20.
- Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI, Bruder SP: Osteogenic differentiation of purified culture expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem* 1997;64:295-312.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR: Multilineage potential of adult mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284:143-7.
- Banfi A, Bianchi G, Notaro R, Notaro R, Luzzatto L, Cancedda R, Quarto R : Replicative aging and gene expression in long-term cultures of human bone marrow stromal cells. *Tissue Eng* 2002;8:901-10.
- Sato Y, Takita H, Ohata N, Tamura M, Kuboki Y: Pleiotrophin regulates bone morphogenetic protein (BMP)-induced ectopic osteogenesis. *J Biochem* 2002;131:877-86.
- 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. *Endocrinology* 1995;136:2671-7.
- Chaudhary LR, Hofmeister AM, Hruska KA: Differential growth factor control of bone formation through osteoprogenitor differentiation. *Bone* 2004;34:402-11.
- Fromiguet O, Marie PJ, Lomri A: Bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor-beta2 interact to modulate human bone marrow stromal cell proliferation and differentiation. *J Cell Biochem* 1998;68:411-26.
- Ichida F, Nishimura R, Hata K, Matsubara T, Ikeda F, Hisada K, Yatani H, Cao X, Komori T, Yamaguchi A, Yoneda T: Reciprocal roles of MSX2 in regulation of osteoblast and adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 2004;279:34015-22.
- Swallow DM, Povey S, Parkar M: Mapping of the gene coding for the human liver/bone/kidney isoenzyme of alkaline phosphatase the chromosome 1. *Ann Hum Genet* 1986;50:229-35.
- Li YL, Xiao ZS: Advances in Runx2 regulation and its isoforms. *Med Hypotheses* 2007;68:169-75.
- Christodoulou I, Buttery LD, Saravanapavan P, Tai G, Hench LL, Polak JM : Dose- and time-dependent effect of bioactive gel-glass ionic-dissolution products on human fetal osteoblast-specific gene expression. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2005;74:529-37.
- Guillot PV, De Bari C, Dell'Accio F, Kurata H, Polak J, Fisk NM: Comparative osteogenic transcription profiling of various fetal and adult mesenchymal stem cell sources. *Differentiation* 2008;13: in press.
- Mtiller P, Bulnheim U, Diener A, Luthen F, Teller M, Klinkenberg ED, Neumann HG, Nebe B, Liebold A, Steinhoff G, Rychly J: Calcium phosphate surfaces promote osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *J Cell Mol Med* 2008;12:281-91.
- Fisher LW, McBride OW, Termine JD, Young MF: Human bone sialoprotein. Deduced protein sequence and chromosomal localization. *J Biol Chem* 1990;265:2347-51.
- Hunter GK, Goldberg HA: Modulation of crystal formation by bone phosphoproteins: role of glutamic acid-rich sequences in the nucleation of hydroxyapatite by bone sialoprotein. *Biochem J* 1994;302:175-79.