

Thrombospondins Mediate the Adhesion of Osteoblast to Extracellular Matrix

Dong-Jin Lim¹, In-Ho Bae^{1,2}, Byung-Chul Jeong^{1,2}, Sun-Hun Kim², Bae-Keun Park³, In-Chul Kang²,
Shee-Eun Lee^{1,2}, Sang-Hun Song⁴, and Jeong-Tae Koh*^{1,2}

¹Dept. of Pharmacology and Dental Therapeutics, Chonnam National University, Gwangju, 500-757

²Dental Science Research Institute and BK21 Project for Dentistry, Chonnam National University, Gwangju, 500-757, Korea

³Biomedical Research Center, Ulsan University Hospital, Dong-Gu, Ulsan, Korea

⁴Department of Oral & Maxillofacial Surgery, College of Medicine, Hallym Univ. Medical center, Anyang, 431-070, Korea

(Received September 10, 2008 ; Revised September 19, 2008 ; Accepted September 22, 2008)

Thrombospondins (TSP-1, TSP-2) are secretory extracellular glycoproteins that are involved in a variety of physiological processes such as tumor cell adhesion, invasion, and metastasis. The present study was undertaken to elucidate the involvement of thrombospondins in the adhesion of osteoblast-like cells using the TSP-1 or TSP-2 antisense MG63 and MC3T3-E1 cell lines. For down-regulation of TSPs expression, we prepared antisense constructs for TSP-1 and TSP-2 using the pREP4 an episomal mammalian expression vector, which be able to produce the specific antisense oligonucleotides around chromosome. MG63 and MC3T3-E1 osteoblast-like cells were transfected with the antisense constructs and non-liposomal Eugene 6, and then selected under hygromycin B (50 µg/ml) treatment for 2 weeks. Western blot analysis revealed that expression of the TSP proteins was down-regulated in the antisense cell lines. The cell adhesion assay showed that adhesive properties of TSP-1 and TSP-2 antisense MG63 cells on the polystyrene culture plate were reduced to 17% and 21% of the control cells, respectively, and those of the TSP-1 and TSP-2 antisense MC3T3-E1 cells also decreased to 19% and 27% of control, respectively. Adhesion of TSP-1 and TSP-2 antisense MC3T3-E1 cells on Type I collagen-coated culture plate decreased to 27% and 76%, respectively. These results indicate that TSP-1 and

TSP-2 proteins may have an important role in adhesion of osteoblast-like cells to extracellular matrix.

Key words: Thrombospondins, Extracellular Matrix, Adhesion, MG63, MC3T3-E1

서 론

혈소판에서 처음 분리된 트롬보스폰딘(thrombospondins, TSPs)은 트롬빈에 의해 활성화되는 당단백질로서 신경세포의 분화, 혈관신생의 억제, 상처 치유와 재생, 암세포의 증식 및 전이와 부착 등에 관여함이 알려져 있다 (Streit 등, 1999; De Fraipont 등, 2001; Hawighorst 등, 2001; Sargiannidou 등, 2001; Agah 등, 2002). 현재까지 5개의 아형이 보고되어 있으며, 그 중 약 145 kDa의 분자량을 갖는 삼중합체인 TSP-1과 TSP-2는 아미노산 N-말단의 heparin결합 부위와 한 개의 procollagen 상동부위, 세 개의 properdin-like type 1 repeats, 세 개의 epidermal growth factor (EGF)-like type 2 repeats, 7개의 calcium 결합부위와 C-말단의 구상 도메인으로 구성되어 있다. Calcium 결합부위에는 인티그린(integrin)과 결합하는 RGD motif를 가지고 있다. 반면, TSP-3, 4, 5는 TSP-1, 2와는 달리 100 kDa의 분자량을 갖는 다섯개의 중합체로 이루어져 있고, 4개의 type 2 repeats를 가지고 있으나, procollagen 상동부위와 type 1 repeats는 가지고 있지 않다(Bornstein 등, 2000; Chen 등, 2000).

TSP-1과 TSP-2는 혈소판 이외에도 섬유모세포, 혈관내

*Corresponding author: Jeong-Tae Koh, Department of Pharmacology and Dental Therapeutics, School of Dentistry, Chonnam National University, 300 Yong-Bong Dong, Buk-gu, Gwangju, 500-757, Korea. Tel.: 82-62-530-4861; Fax.: 82-62-530-4865; E-mail: jtkoh@chonnam.ac.kr

피세포, 뇌교모세포, 면역세포에서 발견되며, 인티그린(integrin; $\alpha v\beta 3$, $\alpha IIb\beta 3$)과 결합하는 RGD 도메인을 통해 세포간 또는 세포외 기질과의 부착에 관여하며, 그 밖에도 heparan sulfate, 인티그린 결합단백(IAP), CD36, 저밀도 지질 단백 수용체 등을 통해 세포와 세포, 세포와 기질과의 결합에 관여함도 알려지고 있다(Chandrasekaran 등, 2000; Feitsma 등, 2000; Lawler 등, 2000; De Fraipont 등, 2001; Li 등, 2002; Saumet 등, 2002; Shahein 등, 2002).

TSP-1과 TSP-2는 배양한 골모세포에서도 그 발현이 관찰되며(Robey 등, 1989; Carron 등, 1999), 골모세포로의 분화 과정 중에서 TSP-1 mRNA의 발현이 증가한다(Sherbina and Bornstein, 1992). TSP-2는 신생골, 연골, 치아, 피부와 같이 교원질섬유가 풍부한 조직에서 발현하며, 골형성 과정, 분화와 성장, 피부 손상의 치유 등에 관여함이 알려지고 있다(Reed 등, 1993; 1995; Kyriakides 등, 1999). TSP-2 유전자가 결여된 생쥐에서 골조직, 특히 치밀골 생성이 증가되었으며, 진피 섬유모세포의 fibronectin과 같은 세포외기질에 대한 부착 작용은 현저히 감소하였다(Kyriakides 등, 1998; Bein and Simons, 2000; Yang 등, 2000).

골형성 세포와 기질과의 부착은 골모세포의 골형성 능력을 향상 시킨다는 점에서 중요한 의미를 지닌다. 골육종 세포에 인티그린(α_6 , β_1) 항체를 투여하면 세포의 부착 감소와 함께 골육종 세포의 석회화가 억제되며, α_6 , β_3 , α_2 , β_1 등의 인티그린을 투여하면 석회화가 촉진된다(Schneider 등, 2001). MC3T3-E1 및 치수유래 줄기세포에 ascorbic acid, glycerophosphate의 투여는 세포외기질의 양을 증가시켜 석회화 작용을 촉진시키는 잘 알려져 있다(Quarles 등, 1992; Aikawa 등, 2006). 그러나 골모세포의 기질 부착에 대한 TSPs의 역할에 대해서는 잘 알려져 있지 않다.

본 연구에서 TSP-1, TSP-2 발현 억제는 골모세포와 세포외기질과의 부착을 억제하는 결과를 초래하였으며, TSPs이 골모세포의 부착 및 분화에도 중요한 인자로 작용할 가능성을 시사하였다.

실험재료 및 방법

Construct

TSPs 발현을 억제하기 위한 antisense construct는 다음과 같은 방법으로 제작하였다. 먼저, 사람의 TSP-1, TSP-2 cDNA를 얻기 위하여 사람의 골육종 세포주인 MG63 세포로부터 TRI reagent(Molecular Research Center, Ohio, USA)를 이용하여 total RNA를 추출하였다. 200 ng RNA를 100 pmol random primer, 100 unit MMLV 역전사 효소(Gibco-BRL, NY, USA)와 함

께 42°C에서 60분 동안 반응시켜 total cDNA를 얻었다. XhoI과 KpnI 인식부위가 연결된 TSP-1 및 TSP-2 primers (TSP-1-S, XhoI-5'-CCGCTCGAGATGGGGCTGGCCTGGGGACTA-3'; TSP-1-AS, KpnI-5' -GGGGTACCTTCTCCACAGACACCA-3'; TSP-2-S, XhoI-CCGCTCGAGATGGTCTGGAGGCTGGTCTCTGCT-5'; TSP-2-AS, KpnI-5'-GGGGTACCTTTGGCCACGTACATCCGCTCTT-3', Bioneer, Co, Korea)와 앞에서 얻은 10 μ l의 역전사효소 반응산물, 1 unit Taq DNA 중합효소(Gibco-BRL, NY, USA)를 94°C에서 5분의 초기 변성과정을 거친 후, 94°C, 1분의 변성(denature) 과정과 72°C, 2분의 연장(elongation) 과정, 그리고 60°C, 1분(TSP-1) 및 58°C, 1분(TSP-2)의 연화(annealing) 과정을 30회 반복하여 XhoI과 KpnI이 연결된 TSP-1과 TSP-2 cDNA 분획을 얻었다.

TSP-1 및 TSP-2 cDNA와 상염색체 발현 벡터인 pREP4 벡터(Invitrogen, CA, USA)를 XhoI (Takara, Japan)과 KpnI (Takara, Japan) 효소로 각각 반응시킨 후, 이를 각각 정제하여 T4 ligase (Takara, Japan)로 재조합함으로써 antisense nucleotide를 생성하도록 하는 plasmid vector를 제작하였다. 재조합된 각각의 plasmid는 XhoI과 KpnI으로 처리하고, 전기영동을 시행하여 각각의 유전자 분획(TSP-1, 478 bp; TSP-2, 583 bp)을 확인하였고, DNA 염기서열분석기(PE/ABI DNA sequencer, Model 377, USA)로 염기서열을 재확인하였다.

세포 배양 및 형질 전환

사람의 골육종에서 유래한 MG63 세포와 생쥐의 두개골에서 유래한 MC3T3-E1 세포는 10% FBS와 gentamycin (50 μ g/ml, Gibco-BRL, NY, USA)을 함유한 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)에서 배양하였다. Antisense 벡터의 도입은 FuGene 6 (Roche, Germany)를 이용하였으며, 제작사에서 추천하는 방법에 준하여 시행하였다. 즉, 각 plasmid DNA 2 μ g, FuGene 3 μ l, serum-free DMEM 97 μ l의 비율로 각각 섞어 20분간 실온에서 반응시킨 후, 세포 배양액에 첨가하였다. 각 세포를 hygromycin B (50 μ g/ml, Gibco-BRL, NY, USA) 존재 하에서 선택 배양하여 각각의 antisense 세포를 얻었다.

Western blot 분석

배양한 세포를 nonidet P-40 buffer (150 mM NaCl, benzamidine 1 mM, 50 mM Tris, trypsin inhibitor 1 μ g/ml, 5 mM EDTA, pH 8.0, PMSF 1 mM, NP-40 1%)에서 용해시키고, 14,000 rpm으로 15분간 원심분리하여 세포 단백을 추출하였다. 각 단백질의 양은 BCA (Pierce, USA) 정량법으로 측정하였다. 30 μ g의 전체 단백질을 10% polyacrylamide gel에 전기영동하여 분리한 다음,

nitrocellulose막에 전이시켰다. 이어 단백질이 전이된 막을 blocking buffer (5% nonfat dry milk, 1% BSA, 0.02% sodium azide in tris-buffered saline)로 2시간 동안 반응시킨 다음, 다클론성 TSP-1(1:1,000)과 TSP-2(1:1,000)항체(Santa Cruz, CA, USA)를 상온에서 2시간 반응시켰다. Horseradish peroxidase가 결합된 이차항체를 실온에서 1시간 반응시키고, 화학발광제(Amersham Life Science, Arlington Heights, IL, USA)를 반응시켜 TSP-1, TSP-2 단백 발현을 확인하였다.

세포 부착능 측정

각각의 세포를 0.05% trypsin/EDTA (Gibco-BRL, NY, USA)로 분리하여 3,000 rpm으로 실온에서 5분간 원심분리하고, 100 μ 당 40,000개의 세포가 되도록 재부유하여 폴리스티렌 96 well plate (Costar, NY, USA)에 분주한다. 4 시간 후에 부착되지 않은 세포를 흡입 제거하고, 바닥에 부착되어 있는 세포를 CellTiter 96 Aqueous proliferation assay kit (Promega, USA)와 분광기(Bio-Tek instrument, USA)를 이용하여 부착된 세포의 양을 비교하였다.

세포외기질과의 부착능은 96 well plate에 제1형 콜라젠(Sigma, USA)을 코팅하여 다음과 같은 방법으로 측정하였다. 즉, 콜라젠을 제조사의 지시에 따라 각 well 당 50 μ g이 들어가도록 분주하고, 콜라젠이 well 표면에 잘 결합되도록 24시간 동안 상온에 방치한다. 여분의 용액을 제거한 후 콜라젠이 도포되지 않은 남은 부분을 채우기 위해 1.5% bovine serum albumin으로 37°C에서 2시간 반응시킨다. 각 well에 40,000개의 세포를 분주하고 4시간 후 부착되지 않은 세포를 흡입 제거한다. 위상차 현미경(inverted phase microscope, Olympus IM, Japan) 관찰 하에서 같은 면적을 갖는 네 부위에서 단위 면적당 부착된 세포의 수를 세어 콜라젠 기질에 대한 각 세포의 부착 정도를 비교하였다.

통계

각각의 실험결과는 평균과 표준오차로 나타내었으며, unpaired Student's t-test를 시행하여 0.01%의 신뢰구간에서 유의성 검정을 실시하였다.

실험 결과

Antisense 벡터를 이용한 TSP-1 및 TSP-2 발현 억제

TSP-1, TSP-2 antisense 벡터가 올바르게 형성되었는지를 확인하고자 각각의 벡터를 Kpn I 과 Xho I 효소를 처리한 후 1% agarose gel 상에서 전기영동을 시행하였다.

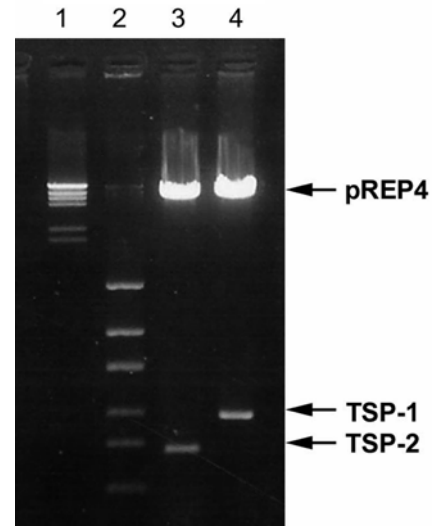


Fig. 1. Identification of antisense pREP4-TSP-1 and pREP4-TSP-2 constructs. Each construct was reacted with Xho I and Kpn I enzyme, and electrophoresis was done. Lane 1 and 2 are molecular size markers, high-range Hind III and low-range pWon 600, respectively. Lane 3 and 4 showed Xho I and Kpn I-restricted plasmid DNAs corresponding TSP-1 and TSP-2, separately, with 10.1 kb size of pREP4 vector.

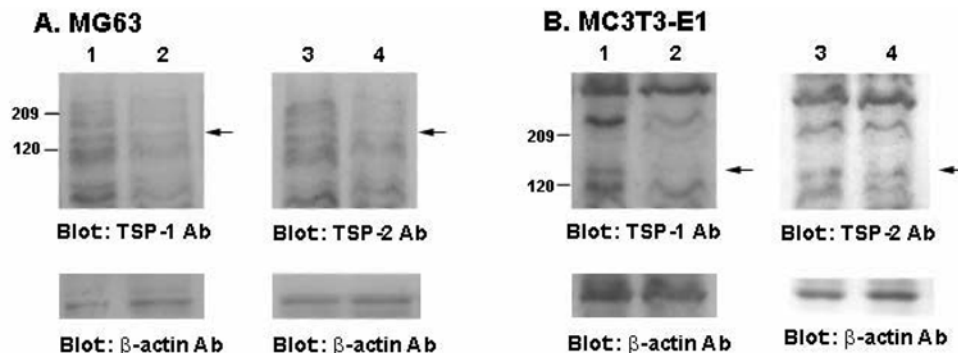


Fig. 2. Inhibition of TSP-1 or TSP-2 expression in MG63 (A) and MC3T3-E1 (B) cells by using antisense constructs. Antisense construct for TSP-1 or TSP-2 was transfected into each cell with non-liposomal Fugene 6. pREP4 control vector used as a control. Transfected cells were selected under hygromycin (50 μ g/ml) treatment, and level of TSP-1 or TSP-2 expression was determined by western blot analysis. Lane (1) and (3), pREP4 vector; lane (2), TSP-1 antisense; lane (4), TSP-2 antisense.

pREP4 벡터 크기에 해당하는 약 10 kb DNA 분획과 PCR로 증폭한 TSP-1과 TSP-2 크기에 해당하는 DNA 분획(TSP-1, 478 bp; TSP-2, 583 bp)을 확인하였다(Fig. 1). 정확한 확인을 위해 각 벡터의 염기서열을 분석하였으며, 그 결과 삽입한 염기서열이 전사개시부위를 포함하는 TSP-1 및 TSP-2의 염기서열과 일치하였다 (data not shown). 인간과 생쥐 사이의 TSP-1, TSP-2 cDNA는 각각 95%, 90%의 유사성을 보인다. TSPs 유전자를 함유한 각각의 antisense 벡터는 Fugene 6와 함께 MG63 및 MC3T3-E1 골모세포에 첨가되었고, hygromycin (50 µg/ml)으로 형질전환된 세포를 선택 배양하여 각각의 antisense 세포를 얻었다. 배양한 각각의 세포로부터 단백을 추출하여 Western blot 분석을 시행한 결과, antisense 벡터를 투여한 MG63 및 MC3T3-E1 세포에서 TSP-1과 TSP-2 발현이 정상 세포보다 억제됨을 확인하였다(Fig. 2).

TSP-1, TSP-2 발현 억제 세포의 부착능

골형성 세포의 부착에 있어서 TSP-1과 TSP-2의 역할을 알아보기 위하여 TSP-1, TSP-2 발현 억제 세포와 정상 세포의 부착능력을 비교하였다. 폴리스티렌 세포 배양판에 40,000개의 세포를 분주한 후 4 시간 후에 바닥에 부착된 세포의 양을 비교하였다. TSP-1, TSP-2 발현이 억제된 MG63 세포의 부착은 정상세포에 비해 83%, 79%가 감소하였으며(Fig. 3A), MC3T3-E1 세포에서도 각각 81%, 73%의 부착 감소가 관찰되었다(Fig. 3B).

뼈를 구성하는 세포외기질 중에서 가장 많은 비중을 차지하는 것은 제1형 콜라젠이다. 골모세포의 콜라젠 기질에 대한 부착과정에서 TSPs의 작용을 알아보하고자 제1형 콜라젠 섬유를 세포 배양판에 코팅하고 이 기질에 대한 각각의 세포 부착을 관찰하였다. TSP-1, TSP-2 발현이 억제된 MC3T3-E1 세포의 부착이 정상 세포에 비해 각각 73%, 34%가 감소하였다(Fig. 4).

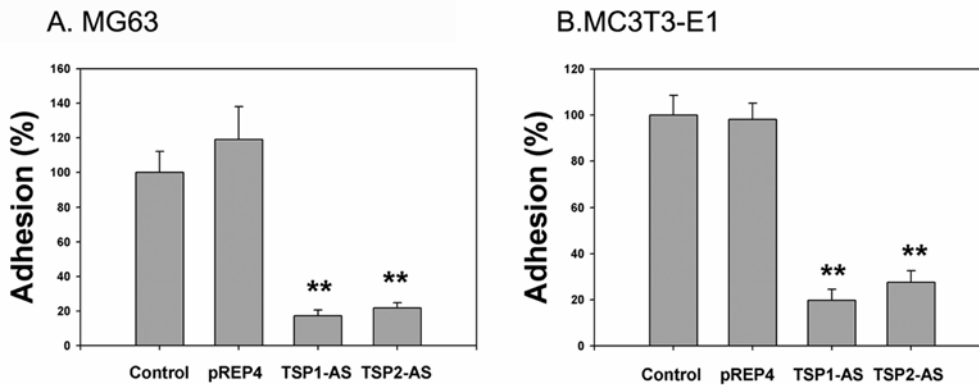


Fig. 3. TSP-dependant adhesion of MG63 and MC3T3-E1 on polystyrene culture plate. Forty thousand of trypsin-treated cells were separately seeded in serum-free DMEM medium on polystyrene culture plate, and 4 hours later non-attached cells were aspirated. Then CellTiter 96 AQueous proliferation assay solution was added, and absorbance was measured by spectrophotometer at 490 nm wave-length. Adhesive properties of the cells in TSP-1 and TSP-2 antisense-transfected groups decreased compare to vector control group (**p<0.001, n = 5).

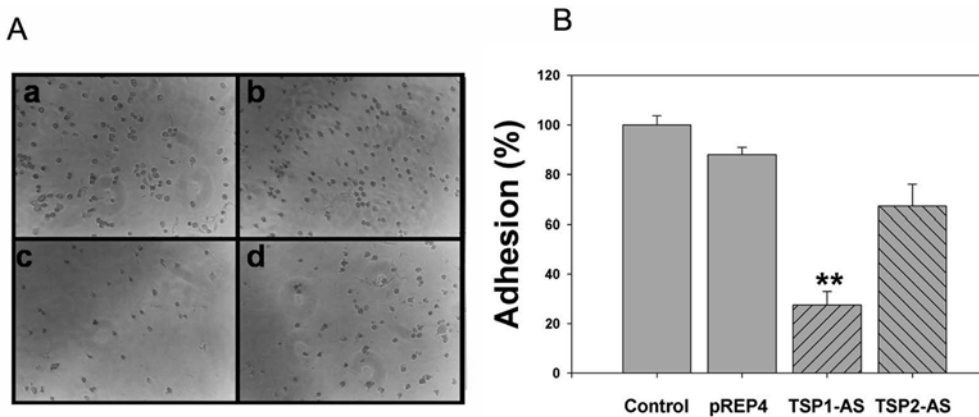


Fig. 4. TSP-dependant adhesion of MC3T3-E1 on Type I collagen-coated plate. Ninety six well was coated with 50 µg of Type I collagen at room temperature, and then cells were seeded as in Fig. 3. (A) Representative photomicrographs of attached cells, (a) control, (b) pREP4 group, (c) TSP-1 antisense group, and (d) TSP-2 antisense group (× 100). (B) Relative adhesion of each cell. The values were calculated from numbers of attached cells, which are counted in 4 consecutive areas of each group. The data are expressed mean ± SE. Adhesion of TSP-1 antisense group was significantly reduced compare to vector only group (**p<0.01, n=4).

고 찰

골모세포와 세포외기질/금속 생체 재료와의 부착은 골모세포의 활성을 촉진시키며, 이는 손상된 골조직의 치유 과정과 금속재료 이식의 성공 여부에 중요하다(Anselme, 2000; Bornstein 등, 2000; 진 등, 2006). 본 연구에서는 면역세포와 섬유모세포 등의 부착에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 thrombospondins 단백질이 골모세포와 세포외 기질과의 부착에는 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여, 염색체 근처에 TSP-1과 TSP-2 역전사 핵산 발현을 유도하는 벡터를 제작하여 이들 각 세포에 주입함으로써 각각의 단백질 발현이 억제된 골형성 세포를 유도하였다. 이러한 방법의 세포 내 특정 유전자 발현 감소는 Lee 등(2005)에 의해 시도되어 왔으며, 본 연구의 Western blot 실험결과에서도 이러한 방법의 사용이 골모세포 특성을 지닌 MG63 세포와 MC3T3-E1 세포에서 TSP-1과 TSP-2 발현 감소를 유도하였다(Fig. 2). TSPs 단백질은 신생골, 골막, 연골 성장판 등에서 발현되고, 또 시험관 내 배양되는 MC3T3-E1세포와 골육종 세포에서도 발현된다(Cleazard 등, 1989). 이러한 사실은 TSPs가 골모세포 분화 및 골형성 과정에도 관여할 가능성이 있음을 시사한다. 부착능 실험 결과, TSP-1과 TSP-2 발현 억제 세포는 세포 배양판 또는 제1형 콜라겐이 도포된 세포 배양판에서 부착능력이 현저히 감소하였다(Fig. 3과 4). 이러한 결과는 TSP-1을 도포한 세포 배양판에서 U2OS, Saos-2 골육종 세포의 부착이 농도 의존적으로 증가하며(Decker 등, 2002), TSP-2 유전자를 제거한 생쥐로부터 얻은 섬유모세포는 정상 생쥐로부터 유래된 섬유모세포보다 폴리스티렌 세포배양판 및 fibronectin 기질을 도포한 배양판에 대한 부착이 약화되어 있다는 결과(Kyriakides 등, 1998)와 같은 의미를 지닌다. 이는 TSPs 단백질이 골모세포와 기질간의 부착에 중요함을 시사한다.

TSP 단백질은 N-말단의 heparin결합 부위, properdin-like type 1 repeats, calcium 결합부위, C-말단의 구상 도메인에서 세포 표면에서 발현되는 수용체로 알려진 heparan sulfate, 저밀도 지질 단백질 수용체, 인티그린, IAP, CD36와의 결합을 통해 세포 부착에 관여하는 것으로 알려져 있다(Chen 등, 1996). 그 예로 U2OS와 Saos-2 골육종 세포는 TSP-1 또는 RGD 부위가 없는 70 kDa의 TSP 분획을 코팅한 배양판에서 농도 의존적으로 세포 부착이 증가하였으며, 이러한 부착 증가는 α_4 와 β_1 인티그린 항체에 의해 억제되었다(Decker 등, 2002). 또한 피부 및 골조직에서 발현되고 있는 항부착 단백질인 decorin은 TSP-1의 N-말단 heparin 결합부위와 결합하여 골모세포의 부착을 경쟁적으로 억제하였다(Merle 등, 1997). 또 Adams와 Lawler(1993)는 G361 흑색종 세포, 사람의 소장 평활근세포, 상피각화세포 및 MG63 골육종 세포주의 TSP-

1에 대한 부착 기전은 세포마다 각각 다르며, MG63세포의 경우 $\alpha_v\beta_3$ 인티그린이 TSP-1의 RGD 부위와의 작용을 통하여 부착을 증진시키는 것으로 보고하였다. TSP-2 knock-out 생쥐에서 유래한 섬유모세포는 정상세포에 비해 부착능이 감소하였으며, 이는 TSP-2 감소에 따른 MMP-2 활성 증가와 세포외기질 파괴와 관련이 있다(Yang 등, 2000). 이러한 일련의 결과들을 고려해 볼 때, 본 실험에서의 MG63 및 MC3T3-E1 세포의 부착 능력 감소는 TSPs 발현 억제에 따른 인티그린 및 그 밖의 세포 표면 단백질과의 결합 감소로 초래되었을 것으로 추론할 수 있다. 이에 대한 정확한 작용은 앞으로 더 추구하고자 할 부분이다.

골형성 능력을 지닌 세포와 기질 및 금속재료와의 부착은 세포의 골형성 능력과 금속 재료의 생체 적합성에 많은 변화를 야기하고, 이러한 작용기전으로서 다양한 인자들의 관여가 제시되고 있다. 인티그린을 통한 골모세포와 기질간의 부착은 bone sialoprotein의 발현 증가와 함께 골모세포의 석회화를 촉진시키며, 이러한 작용에는 α_v , β_1 , $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_2\beta_1$ 인티그린을 통한 세포 내 신호전달과정이 제시되고 있다(Schneider 등; 2001). Saos-2 세포는 티타늄 합금(Ti6Al4V)와 코발트-크롬-몰리브덴 합금 표면과 부착하며, 인티그린과 결합하여 경쟁 인자로 작용하는 GRGDSP 펩타이드를 첨가하면 골모세포와 금속물질간의 부착이 감소한다(Gronowicz and McCarthy; 1996). 또한, 인티그린을 통한 골모세포와 기질 또는 금속재료간의 부착은 세포 내 focal adhesion kinase (FAK) 활성화와 골형성 관련 단백질의 발현을 증가시키며, 이와 더불어 talin, vinculin, paxillin, tensin과 같은 actin 결합 단백질의 활성을 촉진시킨다(Anselme, 2000). 이러한 결과는 골모세포 표면의 인티그린이 세포와 기질 및 금속간 부착에 중요하며, 인티그린 결합도메인인 RGD를 함유한 TSPs도 골모세포와 기질/금속재료와의 결합에서 중요한 작용을 할 것으로 추론 가능하게 한다. 본 연구의 결과는 TSP-1과 TSP-2 단백질이 골모세포와 기질과의 결합에 관여하고, 향후 임플란트와 골모세포와의 부착증진에 대한 연구로서 TSPs 단백질(부착 관련 중요 도메인분획 포함)에 대한 이해가 필요함을 시사한다.

감사의 글

이 논문은 전남대학교 병원 임상의학연구소 학술연구비(CRI07005-1)에 의하여 연구되었음.

Conflict of interest

The authors state that they have no conflicts of interest.

참고문헌

- Adams JC, Lawler J. Diverse mechanisms for cell attachment to platelet thrombospondin. *J Cell Sci.* 1993;104:1061-71.
- Agah A, Kyriakides TR, Lawler J, Bornstein P. The lack of thrombospondin-1 (TSP-1) dictates the course of wound healing in double-TSP-1/TSP-2-null mice. *Am J Pathol.* 2002;161:831-9.
- Aikawa F, Nakatsuka M, Kumabe S, Jue SS, Hayashi H, Shin JW, Iwai Y. Expression of DSPP mRNA During Differentiation of Human Dental Pulp-derived Cells (HDPC) and Transplantation of HDPC Using Alginate Scaffold. *International J Oral Biol.* 2006;31:73-9.
- Anselme K. Osteoblast adhesion on biomaterials. *Bio-materials.* 2000;21:667-81.
- Bein K, Simons M. Thrombospondin type 1 repeats interact with matrix metalloproteinase 2. Regulation of metalloproteinase activity. *J Biol Chem.* 2000;275:32167-73.
- Bornstein P, Armstrong LC, Hankenson KD, Kyriakides TR, Yang Z. Thrombospondin 2, a matricellular protein with diverse functions. *Matrix Biol.* 2000;19:557-68.
- Carron JA, Bowler WB, Wagstaff SC, Gallagher JA. Expression of members of the thrombospondin family by human skeletal tissues and cultured cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;263:389-91.
- Chandrasekaran L, He CZ, Al-Barazi H, Krutzsch HC, Iruela-Arispe ML, Roberts DD. Cell contact-dependent activation of alpha3beta1 integrin modulates endothelial cell responses to thrombospondin-1. *Mol Biol Cell.* 2000;11:2885-900.
- Chen H, Herndon ME, Lawler J. The cell biology of thrombospondin-1. *Matrix Biol.* 2000;19:597-614.
- Chen H, Sottile J, Strickland DK, Mosher DF. Binding and degradation of thrombospondin-1 mediated through heparan sulphate proteoglycans and low-density-lipoprotein receptor-related protein: localization of the functional activity to the trimeric N-terminal heparin-binding region of thrombospondin-1. *Biochem J.* 1996;318:959-63.
- Cleardin P, Jouishomme H, Chavassieux P, Marie PJ. Thrombospondin is synthesized and secreted by human osteoblasts and osteosarcoma cells. A model to study the different effects of thrombospondin in cell adhesion. *Eur J Biochem.* 1989;181:721-6.
- De Fraipont F, Nicholson AC, Feige JJ, Van Meir EG. Thrombospondins and tumor angiogenesis. *Trends Mol Med.* 2001;7:401-7.
- Decker S, van Valen F, Vischer P. Adhesion of osteosarcoma cells to the 70-kDa core region of thrombospondin-1 is mediated by the alpha 4 beta 1 integrin. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;293:86-92.
- Feitsma K, Hausser H, Robenek H, Kresse H, Vischer P. Interaction of thrombospondin-1 and heparan sulfate from endothelial cells. Structural requirements of heparan sulfate. *J Biol Chem.* 2000;275:9396-402.
- Gronowicz G, McCarthy MB. Response of human osteoblasts to implant materials: integrin-mediated adhesion. *J Orthop Res.* 1996;14:878-87.
- Hawighorst T, Velasco P, Streit M, Hong YK, Kyriakides TR, Brown LF, Bornstein P, Detmar M. Thrombospondin-2 plays a protective role in multistep carcinogenesis: a novel host anti-tumor defense mechanism. *EMBO J.* 2001;20:2631-40.
- Jeon EY, Kim HM, Lee SB. Regulation of ADAMTS-2 by 1,25-Dihydroxyvitamin D3 in Osteoblastic Cells. *International J Oral Biol.* 2006;31:93-8.
- Kyriakides TR, Hartzel T, Huynh G, Bornstein P. Regulation of angiogenesis and matrix remodeling by localized, matrix-mediated antisense gene delivery. *Mol Ther.* 2001;3:842-9.
- Kyriakides TR, Leach KJ, Hoffman AS, Ratner BD, Bornstein P. Mice that lack the angiogenesis inhibitor, thrombospondin 2, mount an altered foreign body reaction characterized by increased vascularity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999;96:4449-54.
- Kyriakides TR, Tam JW, Bornstein P. Accelerated wound healing in mice with a disruption of the thrombospondin 2 gene. *J Invest Dermatol.* 1999;113:782-7.
- Kyriakides TR, Zhu YH, Smith LT, Bain SD, Yang Z, Lin MT, Danielson KG, Iozzo RV, LaMarca M, McKinney CE, Ginns EI, Bornstein P. Mice that lack thrombospondin 2 display connective tissue abnormalities that are associated with disordered collagen fibrillogenesis, an increased vascular density, and a bleeding diathesis. *J Cell Biol.* 1998;140:419-30.
- Kyriakides TR, Zhu YH, Yang Z, Huynh G, Bornstein P. Altered extracellular matrix remodeling and angiogenesis in sponge granulomas of thrombospondin 2-null mice. *Am J Pathol.* 2001;159:1255-62.
- Lawler J, Weinstein R, Hynes RO. Cell attachment to thrombospondin: the role of ARG-GLY-ASP, calcium, and integrin receptors. *J Cell Biol.* 2000;107:2351-61.
- Lee JH, Cho ES, Kim MY, Seo YW, Kho DH, Chung IJ, Kook H, Kim NS, Ahn KY, Kim KK. Suppression of progression and metastasis of established colon tumors in mice by intravenous delivery of short interfering RNA targeting KITENIN, a metastasis-enhancing protein. *Cancer Res.* 2005;65:8993-9003.
- Li SS, Ivanoff A, Bergstrom SE, Sandstrom A, Christensson B, van Nerven J, Holgersson J, Hauenberger D, Arencibia I, Sundqvist KG. T lymphocyte expression of thrombospondin-1 and adhesion to extracellular matrix components. *Eur J Immunol.* 2002;32:1069-79.
- Merle B, Malaval L, Lawler J, Delmas P, Cleardin P. Decorin inhibits cell attachment to thrombospondin-1 by binding to a KKTR-dependent cell adhesive site present within the N-terminal domain of thrombospondin-1. *J Cell Biochem.* 1997;67:75-83.
- Quarles LD, Yohay DA, Lever LW, Caton R, Wenstrup RJ. Distinct proliferative and differentiated stages of murine MC3T3-E1 cells in culture: an in vitro model of osteoblast development. *J Bone Miner Res.* 1992;7:683-92.
- Reed MJ, Iruela-Arispe L, O'Brien ER, Truong T, LaBell T, Bornstein P, Sage EH. Expression of thrombospondins by endothelial cells. Injury is correlated with TSP-1. *Am J Pathol.* 1995;147:1068-80.
- Reed MJ, Puolakkainen P, Lane TF, Dickerson D, Bornstein P, Sage EH. Differential expression of SPARC and thrombospondin 1 in wound repair: immunolocalization and

- in situ hybridization. *J Histochem Cytochem.* 1993; 41:1467-77.
- Robey PG, Young MF, Fisher LW, McClain TD. Thrombospondin is an osteoblast-derived component of mineralized extracellular matrix. *J Cell Biol.* 1989;108:719-27.
- Sargiannidou I, Zhou J, Tuszynski GP. The role of thrombospondin-1 in tumor progression. *Exp Biol Med.* 2001;226:726-33.
- Saumet A, Jesus N, Legrand C, Dubernard V. Association of thrombospondin-1 with the actin cytoskeleton of human thrombin-activated platelets through an alphaIIb beta3- or CD36-independent mechanism. *Biochem J.* 2002;363:473-82.
- Schneider GB, Zaharias R, Stanford C. Osteoblast integrin adhesion and signaling regulate mineralization. *J Dent Res.* 2001;80:1540-4.
- Shahein YE, de Andres DF, Perez de la Lastra JM. Molecular cloning and functional characterization of the pig homologue of integrin-associated protein (IAP/CD47). *Immunology.* 2002;106:564-76.
- Sherbina NV, Bornstein P. Modulation of thrombospondin gene expression during osteoblast differentiation in MC3T3-E1 cells. *Bone.* 1992;13:197-201.
- Streit M, Riccardi L, Velasco P, Brown LF, Hawighorst T, Bornstein P, Detmar M. Thrombospondin-2: a potent endogenous inhibitor of tumor growth and angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999;96:14888-93.
- Yang Z, Kyriakides TR, Bornstein P. Matricellular proteins as modulators of cell-matrix interactions: adhesive defect in thrombospondin 2-null fibroblasts is a consequence of increased levels of matrix metalloproteinase-2. *Mol Biol Cell.* 2000;11:3353-64.