



## 혈관내피유사세포 채취의 원천으로 골막의 활용

박봉욱 · 김신원<sup>1</sup> · 김육규<sup>1</sup> · 하영술<sup>2</sup> · 김진현<sup>2</sup> · 김덕룡<sup>3</sup>  
성일용<sup>4</sup> · 조영철<sup>4</sup> · 손장호<sup>4</sup> · 김종렬<sup>5</sup> · 변준호

경상대학교 의학전문대학원 구강악안면외과학교실, 경상대학교 건강과학연구원, 의생명과학사업단(BK21),  
<sup>1</sup>부산대학교 치의학전문대학원 구강악안면외과학교실, <sup>2</sup>경상대학교병원 임상의학연구소,  
<sup>3</sup>경상대학교 의학전문대학원 생화학교실, 경상대학교 건강과학연구원, 의생명과학사업단(BK21),  
<sup>4</sup>울산대학교 의과대학 구강악안면외과학교실, <sup>5</sup>온 종합병원 턱얼굴센터

### Abstract

### Use of Periosteum as a Source of Endothelial-like Cells

Bong-Wook Park, Shin-Won Kim<sup>1</sup>, Uk-Kyu Kim<sup>1</sup>, Young-Sool Hah<sup>2</sup>, Jin-Hyun Kim<sup>2</sup>, Deok Ryong Kim<sup>3</sup>,  
Iel-Young Sung<sup>4</sup>, Yeong-Cheol Cho<sup>4</sup>, Jang-Ho Son<sup>4</sup>, Jong-Ryoul Kim<sup>5</sup>, June-Ho Byun

Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Gyeongsang National University School of Medicine and Institute of Health Sciences, Biomedical Center (BK21), <sup>1</sup>Department of Oral and Maxillofacial Surgery, School of Dentistry, Pusan National University, <sup>2</sup>Clinical Research Institute, Gyeongsang National University Hospital, <sup>3</sup>Department of Biochemistry, Gyeongsang National University School of Medicine and Institute of Health Sciences, Biomedical Center (BK21), <sup>4</sup>Department of Oral and Maxillofacial Surgery, College of Medicine, Ulsan University, <sup>5</sup>Maxillofacial Center, Onhospital

**Purpose:** The periosteum is a well-known source of osteogenic precursor cells for tissue-engineered bone formation. However, cultured endothelial or endothelial-like cells derived from periosteum have not yet been investigated. This study focused on endothelial-like cell culture from the periosteum.

**Methods:** Periosteal tissues were harvested from the mandible during surgical extraction of lower impacted third molars. The tissues were treated with 0.075% type I collagenase in phosphate-buffered saline (PBS) for 1 hr at 37°C to release cellular fractions. The collagenase was inactivated with an equal volume of DMEM/10% fetal bovine serum (FBS) and the infranatant was centrifuged for 10 min at 2,400 rpm. The cellular pellet was filtered through a 100 μm nylon cell strainer, and the filtered cells were centrifuged for 10 min at 2,400 rpm. The resuspended cells were plated into T25 flasks and cultured in endothelial cell basal medium (EBM)-2.

**Results:** Among the hematopoietic markers, CD146 was more highly expressed than CD31 and CD34. The periosteal-derived cells also expressed CD90 and CD166, mesenchymal stem cell markers. Considering that the expression of CD146 was constant and that the expression of CD90 was lower at passage 5, respectively, the CD146 positive cells in passage 5 were isolated using the magnetic cell sorting (MACS) system. These CD146 sorted, periosteal-derived cells formed tube-like structures on Matrigel. The uptake of acetylated, low-density lipoprotein, labeled with 1,1'-dioctadecyl-3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate (DiI-Ac-LDL) was also examined in these cells.

**Conclusion:** These results suggest that the CD146-sorted positive cells can be referred to as periosteal-derived CD146 positive endothelial-like cells. In particular, when a co-culture system with endothelial and osteoblastic cells in a three-dimensional scaffold is used, the use of periosteum as a single cell source would be strongly beneficial for bone tissue engineering.

**Key words:** Periosteum, Periosteal-derived endothelial like cells

원고 접수일 2011년 6월 2일, 원고 수정일 2011년 7월 6일,  
게재 확정일 2011년 7월 6일

책임저자 변준호  
(660-702) 경남 진주시 칠암동 90번지, 경상대학교 의학전문대학원 구강악안면외과  
학교실  
Tel: 055-750-8258, Fax: 055-761-7024, E-mail: surbyun@gsnu.ac.kr

RECEIVED June 2, 2011, REVISED July 6, 2011,  
ACCEPTED July 6, 2011

Correspondence to June-Ho Byun  
Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Gyeongsang National  
University School of Medicine, Institute of Health Sciences, Biomedical  
Center (BK21)  
90, Chilam-dong, Jinju 660-702, Korea  
Tel: 82-55-750-8258, Fax: 82-55-761-7024, E-mail: surbyun@gsnu.ac.kr

© This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

## 서론

골 조직은 복잡하면서도 고도로 혈관화되어 있는 조직이므로 골의 재형성이나 골절 치유 등과 관련하여 가장 중요하게 고려하여야 할 요소 중의 하나는 활성화된 혈류공급이라 할 수 있다. 일반적으로 골 손상이 있을 경우, 관련 부위 혈관손상으로 산소부족에 따른 저산소 상태가 초래되어 이에 대한 보상 반응으로 혈류회복을 통한 산소증가를 위하여 혈관신생 기전이 발전하게 된다. 그러므로 사실 골의 재형성이 일어나기 전, 혈류의 회복은 골의 재형성에 가장 중요한 요소 중의 하나가 되는 것이다. 그러므로 적절한 혈류공급이 골 조직에 제공되지 못할 경우 골격성 병변을 야기할 수 있다. 이러한 점을 고려하여 담체를 이용한 골 조직공학의 최신 경향은 다공성의 담체에 미리 혈관형성을 이루어 혈관화된 담체를 제작하고 이에 골 전구세포를 적용하여 골재생시 미리 형성된 혈관형성을 통하여 골형성이 더더욱 잘 일어날 수 있게 하는 것이라 할 수 있다. 최근 일부의 연구에서 골수기원줄기세포를 인간 제대혈 유래 혈관내피세포와 함께 합동 배양(coculture)시 골수기원줄기세포가 조골세포로 더 잘 분화됨이 보고되고 있다. 이러한 것들을 고려할 때, 어떤 원천이 되는 조직으로부터 혈관내피세포를 쉽게 추출, 배양, 증식시켜 적절한 방법으로 다공성 담체에 적용하여 혈관화된 담체를 형성한다면 골 조직공학의 본연의 목표를 더 잘 이루리라 생각된다[1-8]. 또한 어떤 원천이 되는 조직으로부터 혈관내피세포를 추출, 배양, 증식시켜 적절한 방법으로 다공성 담체에 적용하여 혈관화된 담체를 형성하고 골 전구세포를 적용하여 조직공학적으로 혈관형성 골을 형성할 때, 혈관내피세포를 추출하기 위한 조직과 골 전구세포를 채취하기 위한 조직이 동일할 경우, 조직공학적으로 편리함과 함께 이상 면역반응의 배제를 이룰 수 있으므로 골 조직공학 본연의 목표를 더 잘 이룰 수 있으리라 여겨진다. 일반적으로 혈관내피세포에 대한 세포배양이 쉽지 않은 상황에서 쉽게 접근할 수 있는 원천으로, 덧붙여 향후 골 전구세포를 추출하기 위한 원천과 동일한 원천에서 혈관내피세포를 추출하고 활용할 수 있다면 조직공학으로 상당한 장점을 제공할 수 있으리라 여겨진다. 최근에는 혈관내피세포의 원천으로 인간 제대혈 유래 혈관내피세포의 이용이 많이 보고되고 있다. 인간 제대혈 유래 혈관내피세포는 신체의 비자가세포에 대한 거부반응에서 중요한 역할을 하는 MHC (major histocompatibility complex) 항원에 대하여 극히 낮은 수준을 나타내어 다방면의 치료 영역에서 활용가치가 높다고 알려져 있고 상업적으로도 쉽게 구할 수 있어 조직공학적 연구뿐만 아니라 치료영역에서도 많이 이용되고 있지만 실지 이는 태아와 관련된 파생조직이라 할 수 있으므로 신체의 일반적인 내피계(endothelial system)와는 다소 다른 비전형적 산물이다. 대혈관계 혈관내피세포와 미세혈관계 혈관내피세포는 다소 다른 조직학적 특성을 나타낸다고 알려져 있으며 사실 인간의 모든

혈관내피세포의 95%는 미세혈관 혈관내피세포이므로 혈관내피세포를 응용하여 의학과 관련된 생리학/병리학 상태를 연구하는 모델에서는 미세혈관 혈관내피세포를 이용하는 것이 유리하다고 할 수 있다. 최근 이와 관련하여 지방조직에 존재하는 미세혈관 혈관내피세포가 혈관내피세포를 응용하는 여러 분야에서 좋은 성과를 제공해 주고 있다. 지방조직은 상대적으로 고도로 혈관화되어 있으며 지방세포를 제외하고 간질 부분이 비교적 적어 혈관내피세포를 추출하기에 용이함을 제공한다[9-13].

일반적으로 골막은 섬유아세포 및 콜라겐 섬유등으로 구성된 외부층과 골에 부착되어 조골세포 및 골 전구세포를 함유하고 있는 내부층으로 구분될 수 있다. 외부층에는 콜라겐 섬유뿐만 아니라 각종 신경섬유와 풍부한 혈관분포도 잘 이루어져 있으며 이곳에 존재하는 혈관은 대부분 모세혈관 형태로 알려져 있다. 모세혈관은 소동맥과 소정맥을 연결하는 그물 모양의 매우 가는 혈관으로 탄성 섬유나 근육이 없는 한 층의 혈관내피세포, 기저막, 그리고 일부 혈관주위세포로 이루어져 있다. 이러한 조직학적 소견을 고려하면 골막 또한 혈관내피세포 혹은 혈관내피유사세포의 원천이 될 수 있을 것으로 생각된다[14-17]. 그러나 현재까지 혈관내피세포 혹은 혈관내피유사세포 추출과 관련하여 이의 원천으로 골막에 대한 보고는 극히 미비한 실정이다. 그러므로 본 연구에서는 치과적으로 국소마취하에 매복치 발치 등을 포함한 일반적인 시술을 통하여 쉽게 채취할 수 있는 골막에서 골막기원세포를 얻어 조골세포로 분화시켜 활용하는 것과 마찬가지로 골막 조직으로부터 혈관내피유사세포의 추출과 관련된 현상을 관찰하고자 한다.

## 연구방법

### 1. 골막조직으로부터 혈관내피유사세포의 채취

협부 매복된매복된 하악 제3대구치의 발치과정에서 약 5×20 mm의 골막을 채취하여 몇 조각으로 다시 자른 다음, 인산염 식염수에 세척하고 약 1시간 정도 0.075% 제1형 콜라겐분해효소(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)로 처리하였다. 동일량의 Dulbecco's modified Eagle's medium/10% fetal bovine serum (DMEM/ 10% FBS)을 통하여 콜라겐 분해효소를 비활성화시킨 후, 10분간 2,400 rpm에서 원심분리를 실시하였다. 세포층을 DMEM/10% FBS로 부유시키고 100- $\mu$ m 나일론 세포여과체에서 여과시켰다. 여과된 세포들을 다시 10분간 2,400 rpm에서 원심분리를 시행하였다. 인산염 식염수에 세척한 후, 세포들을  $1 \times 10^5$  cells/well의 밀도로  $2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 로 fibronectin이 코팅되어 있는 24-well plate에 주입하고 FBS, human epidermal growth factor, human vascular endothelial growth factor, human insulin-like growth factor-1, human fibroblast

growth factor-B, heparin, ascorbic acid 및 hydrocortisone 등이 포함된 혈관내피세포 유도배지인 혈관내피세포 유도배지-2 (EBM-2, Cambrex, Charles, MD, USA)에서 배양하여 혈관내피유사세포를 추출하였다.

## 2. 세포 표면 표지자 분석(Cell surface markers analysis)

배양 후, 관련 세포들을 트립신 처리하고  $1 \times 10^5$ 개 정도의 세포들을 30분간 얼음에 일차항체와 배양시켜 조혈세포 표지자와 간엽 줄기세포 표지자에 대한 세포 표면 표지자 분석을 시행하였다. 조혈세포 표지자로는 CD31, CD34, 그리고 CD146을 이용하였으며 간엽 줄기세포 표지자로는 CD90과 CD166을 이용하였다.

## 3. CD146 양성 세포의 분리(Isolation of the CD146 + cells from periosteal-derived cells)

골막조직은 간엽조직으로 세포배양 과정을 거치더라도 조직에 포함된 모든 세포들이 완전히 혈관내피세포 혹은 혈관내피유사세포 등의 조혈세포만 발현되는 것은 아니므로 조혈세포의 특이성을 다수 가지고 있는 세포만을 추출하기 위하여 자기 세포분리(magnetic cell sorting)를 이용하여 CD146에 양성인 세포들을 추출하였다. CD146 MicroBead Kit (Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA)를 사용하여  $1 \times 10^8$ 개의 세포당  $100 \mu\text{l}$  microbeads로 labeling을 시행하고 column과 분리기를 이용하여 자기 세포분리를 시행하였다.

## 4. CD146 양성 세포의 matrigel에 의한 혈관내피세포 세포망 형성(Endothelial network formation of CD146 + cells on Matrigel)

자기 세포분리를 통해 획득한 CD146 양성 세포들이 혈관내피세포 혹은 혈관내피유사세포라 표현할 수 있을지, 관모형(tube formation) 형성 정도로 평가하였다. 일반적으로 혈관내피세포는 이의 기질역할을 하는 matrigel을 적용할 경우, 3차원적으로 혈관 형태인 관모형을 형성하는 것으로 알려져 있다. 그러므로 CD146 양성 세포들이 matrigel에 적용되었을 경우, 일반적인 혈관내피세포처럼 관모형을 형성하는지를 관찰하였다. Chamber slides를 matrigel (BD bioscience, San Jose, CA, USA)로 입히고 1시간 정도 지난 후, chamber slides에 well당  $2 \times 10^4$  세포들을 주입하였다. 48시간 후, 세포망 형성정도를 관찰하였다. HUVEC 세포를 양성 대조군으로 사용하였고 음성 대조군으로는 대장암 세포주 SW620을 이용하였다.

## 5. CD146 양성 세포의 Dil-Ac-LDL 발현(Dil-Ac-LDL uptake of CD146 + cells)

자기 세포분리를 통해 획득한 CD146 양성 세포들이 혈관내피세포 혹은 혈관내피유사세포라 표현할 수 있을지 Dil-Ac-LDL의

발현을 통해서도 관찰하였다. 일반적으로 혈관내피세포 혹은 혈관내피유사세포는 특이적인 형광 표지자인 Dil-Ac-LDL에 양성 발현을 나타내는 것으로 알려져 있으므로 자기 세포분리를 통해 획득한 CD146 양성 세포들이 이의 발현을 나타내는지 관찰하였다.  $1 \times 10^5$ 개의 CD146 양성 세포들을 4-well chamber slide에 주입하고  $10 \mu\text{g/ml}$ 의 Dil-Ac-LDL (Biomedical Technologies Inc, Stoughton, MA, USA)를 함께 배양하였다. 배양 4시간 후, 세포들을 세척하고 3% 파라포름알데히드로 고정된 후, 형광현미경으로 분석하였다.

## 6. 통계학적 분석(Statistically analysis)

통계학적 분석은 GraphPad Prism software (GraphPad Prism software, La Jolla, CA, USA)를 이용하여 Turkey's multiple comparison test를 통한 one-way ANOVA로 분석하였으며 probability ( $P$ ) < 0.01 이하를 유의성 있는 것으로 평가하였다.

# 결 과

## 1. 세포 표면 표지자 분석

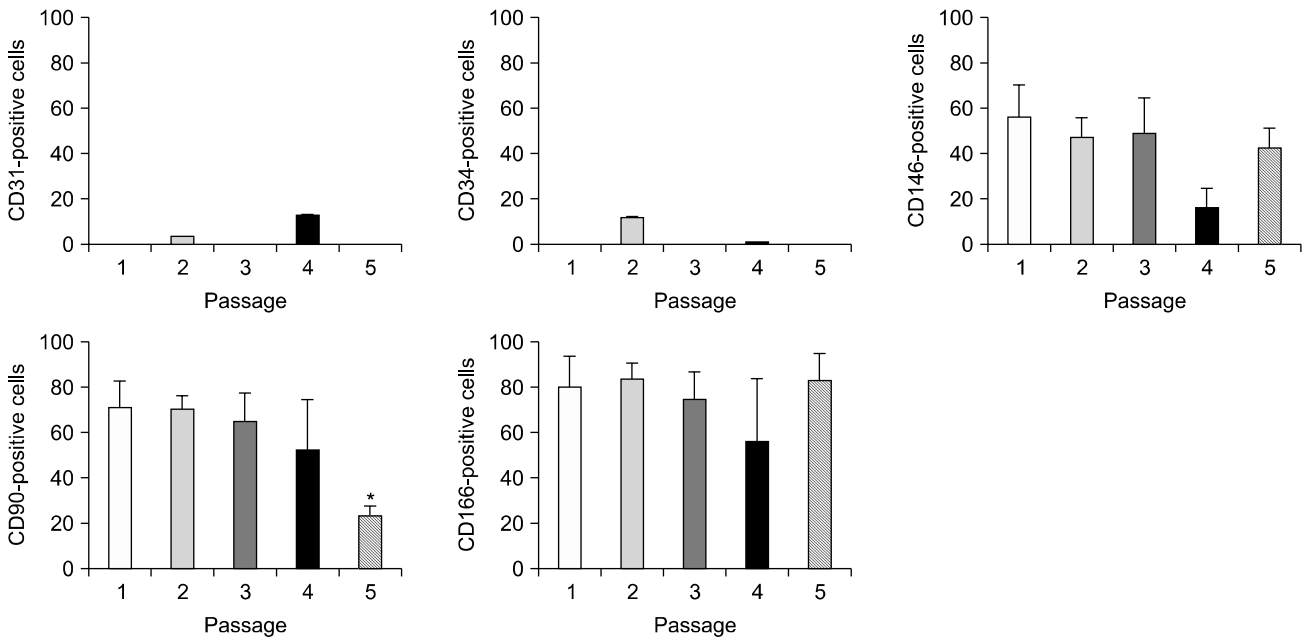
골막조직에서 추출한 세포들은 계대배양이 지속되면서 조혈세포 표지자 중 CD146의 발현은 비교적 일정한 양상을 나타내었지만 CD31과 CD34에 대해서는 의미있는 발현을 나타내지 않았다. 또한 골막조직세포들은 간엽 줄기세포 표지자인 CD90과 CD166에 대해서도 강한 발현양상을 나타내었다. 그러나 간엽 줄기세포 표지자중 CD90에 대해서는 passage 5에서 의미있는 발현의 감소를 나타내었다(Fig. 1, 2).

## 2. CD146 양성 세포의 분리

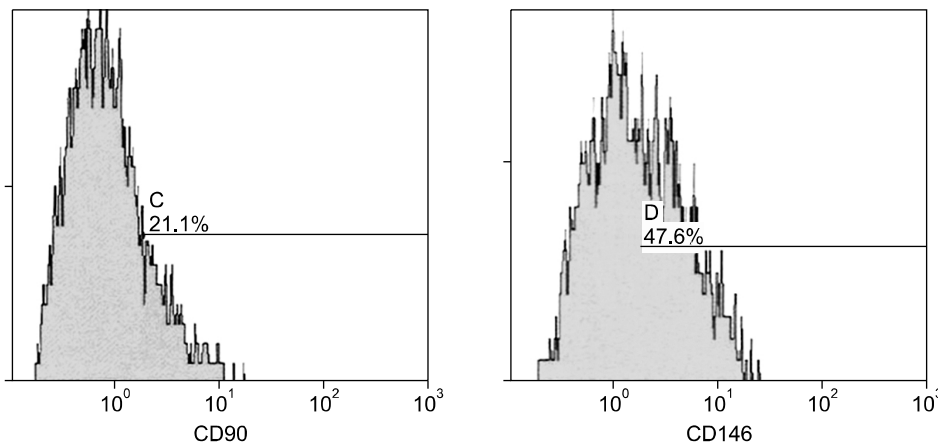
계대배양을 지속하면서 골막조직에서 추출한 세포들이 혈관내피세포의 특성을 나타내지만 원천적으로 간엽조직이므로 간엽 줄기세포 표현형의 발현이 완전히 없어지는 않음을 알 수 있었다. 그리하여 세포 배양과정에서 조혈세포 표현형인 CD146의 발현은 유지되는 반면, 간엽 줄기세포 표현형인 CD90의 발현이 passage 5에서 의미있는 감소를 보이는 것을 고려하여, passage 5에서 조혈세포 표지자 중 CD146에 대한 양성 세포를 자기 세포 분리 원리를 이용하여 추출하였다. 자기 세포분리한 CD146 양성 세포들은 CD146에 98% 이상의 양성을 나타내었다(Fig. 3).

## 3. CD146 양성 세포의 matrigel에 의한 혈관내피세포 세포망 형성

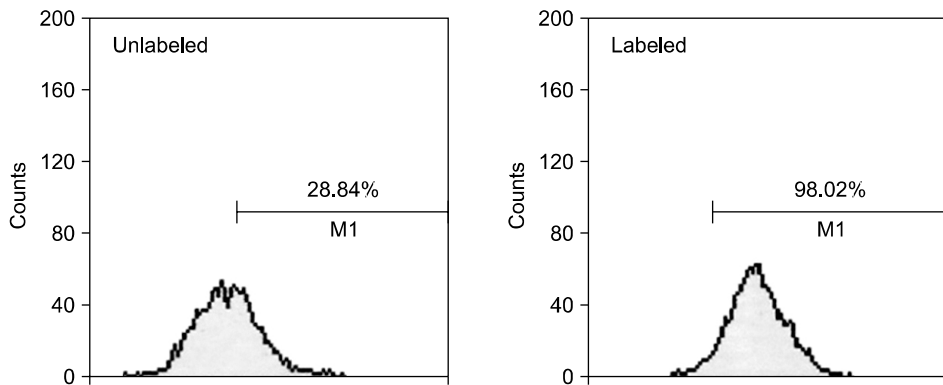
자기 세포분리된 CD146 양성 세포들이 진정한 혈관내피세포라 표현할 수 있을지, 관모형 형성정도로 평가하였다. HUVEC 세포를 양성 대조군으로 사용하였고 음성 대조군으로는 대장암



**Fig. 1.** Flow cytometric analysis of periosteal-derived cells. Among the hematopoietic markers, CD146 was more expressed than CD31 and CD34. The periosteal-derived cells also expressed CD90 and CD166, mesenchymal stem cell marker. \* $P < 0.01$ , compared to the passage 1 group.



**Fig. 2.** Representative photograph of flow cytometric analysis of passage 5 periosteal-derived cells.



**Fig. 3.** CD146 sorted periosteal-derived cells.

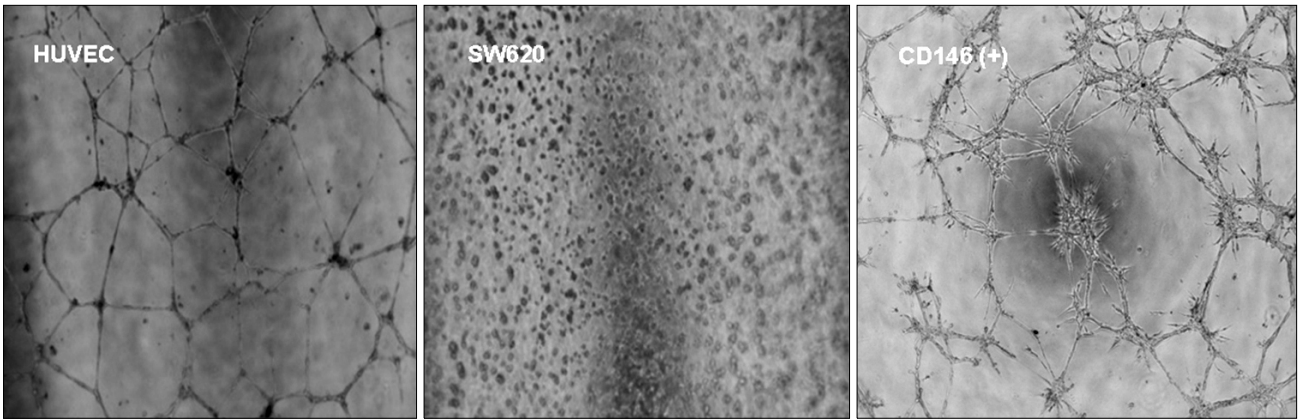


Fig. 4. Tube formation of CD146 sorted periosteal-derived cells.

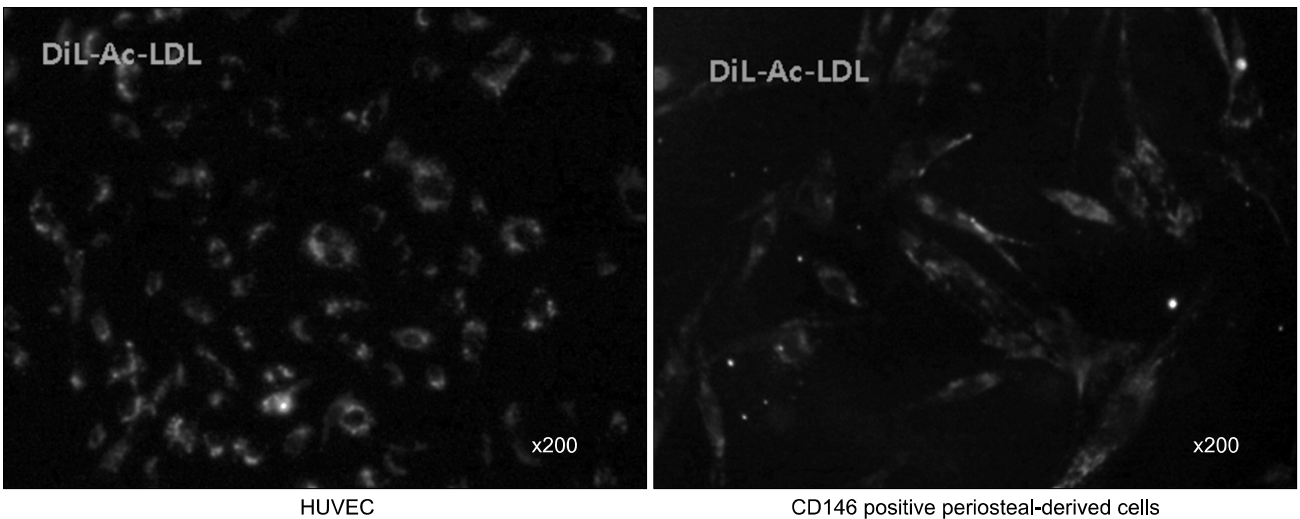


Fig. 5. Dil-Ac-LDL uptake of CD146 positive periosteal-derived cells.

세포주인 SW620 세포를 이용하였다. 관찰 결과, 자기 세포분리된 CD146 양성 세포들도 HUVEC 세포와 마찬가지로 matrigel을 적용할 경우, 일반적인 혈관형태인 관모형을 형성하는 것으로 관찰되었으며 음성 대조군인 SW620 세포는 matrigel이 적용되더라도 관모형을 형성하지 못하였다(Fig. 4).

#### 4. CD146 양성 세포의 Dil-Ac-LDL 발현

자기 세포분리된 CD146 양성 세포들은 또한 혈관내피세포의 주요한 특성 중의 하나인, Dil-Ac-LDL의 발현에 대하여 양성반응을 나타내었다(Fig. 5).

### 고 찰

최근까지 조직공학을 이용한 골조직 재생을 위한 연구는 다양한 조직으로부터 골 전구세포의 획득을 목표로 하는 것으로 골

전구세포를 조골세포로 분화시키는 데 관심을 가졌던 것이 사실이다. 하지만 이제는 단순하게 원천이 되는 전구세포에서 조골세포의 획득을 목표로 하지 않고 골 전구세포에서 조골세포로의 분화를 촉진시킬 수 있는 방법에 대한 연구가 진행되고 있다. 그리하여 골 전구세포에서 조골세포로의 분화 시, 여러 가지 성장인자 등을 적용하는 것이 지속적으로 보고되고 있다. 조직공학에서 사용되는 담체에 대해서는 기존의 생체적합성과 생분해성뿐 아니라, 적절한 강도 및 적용되는 세포 표현형의 발현에 긍정적인 효과까지 제공할 것을 요구하는 상황이다. 이에 본 연구에서는 골재생과 혈관재생의 밀접한 상관관계를 고려하여 하나의 원천인 골막이라는 간접 조직으로부터 혈관내피유사세포와 조골세포를 추출하고 향후 이들을 순차적으로 생체적합성, 생분해성 및 적절한 강도를 가지는 다공성 친수성 담체에 적용하여 내부 혈관계와 조골세포를 동시에 가진 담체의 형성을 목표로 하는 과정의 일환으로 진행하였다. 이러한 혈관형성과 골형성을 위하여 세포를 추출할 때,

단 하나의 원천이 되는 조직으로부터 이러한 세포들을 추출할 수 있다면 조직공학적인 편리함과 함께 이종세포의 적용시 나타날 수 있는 면역반응의 배제를 동시에 획득할 수 있으므로 골 조직공학 본연의 목표를 더 잘 이룰 수 있으리라 여겨진다. 현재까지 골막으로부터 혈관내피세포를 체계적으로 추출, 배양한 것에 대한 연구는 세계적으로도 극히 드문 상태이고 치과영역에서 혈관내피세포의 활용에 대한 연구도 많지 않은 실정이다. 골신생과 혈관신생사이의 밀접한 상호작용에 대해서는 이미 많이 알려져 있다. Gerber 등<sup>11</sup>은 가장 강력한 혈관신생인자로 알려진 혈관내피세포성장인자의 역할과 관련하여, 이의 내인성 발현이 억제될 경우 골형성에 장애를 일으킬 수 있다고 하였으며, Maes 등<sup>18</sup>은 혈관내피세포성장인자의 isoform들이 부족한 실험쥐에서 혈관계뿐 아니라 골형성이나 연골형성의 손상이 나타났다고 보고하였다. 세포배양과 관련하여서도 Villars 등<sup>19</sup>은 인간 제대혈 유래 혈관내피세포가 포함된 배지는 골수기원줄기세포의 증식을 증진시키며 인간 제대혈 유래 혈관내피세포와 골수기원줄기세포를 합동 배양할 경우, 조골세포의 분화과정에서 초기 특이 표지자로 알려진 알칼리성 인산분해효소의 활성을 증진시킨다고 하였다. 이러한 결과들은 혈관내피세포가 골수기원줄기세포의 조골세포로의 분화에 직접적인 영향을 미칠 수 있다는 것을 나타낸다고 할 수 있다. 혈관내피세포는 골수에서 형성되어 혈류를 타고 움직이면서 혈류가 부족한 조직이나 손상받은 조직에서 혈관재생을 이루는 것으로 알려져 있다. 따라서 이러한 혈관내피세포를 심근경색이나 뇌졸중과 같이 혈류가 통하지 않아 생기는 질병들의 치료에 이용하고자 하는 연구가 현재 전 세계적으로 활발히 진행 중이다. 혈관내피세포는 사람의 혈액에서 얻을 수 있고, 좀더 어렵게는 골수를 채취하여 얻을 수도 있으나, 그 수가 충분치 못하여 질병치료에까지 적용하기가 어려운 상황이다. 최근에 탯줄 안에 남아 있는 제대혈액에 혈관내피세포가 다량 존재하고 있음이 알려지면서 이를 안정적으로 분리, 증식시킬 수 있는 프로토콜을 확립하여 추후 질병모델을 이용한 전 임상실험에 활용하고자 하는 시도가 전 세계적으로 활발히 진행 중이다. 그러나 임상 치의학적 관점에서 본다면 인간 제대혈 유래 혈관내피세포보다 좀더 쉽게 추출할 수 있는 원천으로부터 혈관내피세포를 추출할 수 있다면 여러 가지 장점을 제공할 수 있으리라 여겨진다. 그래서 본 연구에서는 골막으로부터 혈관내피세포를 추출하였다.

골막에도 풍부한 혈관계가 존재하므로 혈관내피세포 배양을 위한 배지에서 어렵지 않게 혈관내피세포를 추출할 수 있을 것으로 생각되었으나 조혈세포 표지자에 양성이고 간엽 줄기세포 표지자에 특이적인 반응을 나타내지 않는 세포군을 획득하는 것은 쉽지 않았다. 이는 골막조직이 본질적으로 간엽조직이므로 혈관내피세포 유도배지에서 배양된 세포들도 어느 정도 간엽세포 특성을 함유하고 있다는 것을 의미한다고 할 수 있다. 그리하여 혈관내피세포만을 분리하기 위해 자기 세포분리 방법을 이용하여 조혈세

포 표지자에 양성이면서 간엽 줄기세포 표지자에 비특이적인 CD146 양성 골막기원세포를 추출하게 되었다. 조혈세포 표지자인 CD31과 CD34은 본 연구에서 의미있는 발현을 나타내지 않았다. CD31과 CD34는 기본적으로 가장 중요한 조혈세포 표지자로 알려져 있다. 본 연구에서 CD31과 CD34의 발현이 의미있게 나타나지 않은 것과 관련하여 이들이 성숙한 혈관내피세포 등에도 양성을 나타내지만 혈관내피전구세포의 표현형 발현에 주로 이용되는 것을 고려하면 CD31과 CD34은 본질적으로 혈관기원조직의 발현에 더 긍정적인 발현을 나타낸다고 할 수 있으리라 여겨진다<sup>[20-22]</sup>. 이 CD146 양성 세포가 혈관내피세포인가를 확인하기 위하여 혈관내피세포의 주요한 기능으로 여겨지는 세포망 형성 정도와 DiI-Ac-LDL 발현을 평가하였다. 결과, 골막에서 추출하여 CD146에 양성인 골막기원세포들은 인간 제대혈 유래 혈관내피세포와 유사하게 세포망 형성정도를 나타내며 DiI-Ac-LDL 발현에 양성으로 나타나 본 연구에 의하여 추출된 세포들이 혈관내피세포의 특성을 나타낸다고 할 수 있으며 이를 CD146 양성인 골막기원 혈관내피유사세포(CD146 positive periosteal-derived endothelial like cells)라 명할 수 있을 것으로 생각되었다. 이를 토대로 향후 적절한 다공성의 담체에 본 연구를 통하여 골막에서 추출한 골막기원 혈관내피유사세포와 같은 원천인 골막에서 추출한 골막기원 조골세포를 함께 적용한다면 골 조직공학 분야에서 좀 더 진보된 목표를 이룰 수 있으리라 여겨진다.

## 결론

하악 제3대구치의 발치과정에서 채취한 골막조직에서 추출한 세포들을 혈관내피세포 유도배지에서 배양하고 계대배양을 지속하면서 조혈세포 표지자와 간엽 줄기세포 표지자의 발현을 관찰한 결과, passage 5에서 조혈세포 표지자인 CD146의 발현은 큰 변화없었으나 간엽 줄기세포 표지자 CD90의 발현은 의미있는 감소를 나타내는 것을 고려하여 passage 5에서 CD146에 대한 양성 세포를 자기 세포분리 원리를 이용하여 추출하였다. 이러한 자기 세포분리된 CD146 양성 세포들은 관모형을 형성하였고 DiI-Ac-LDL에도 양성의 발현을 나타내는 것을 관찰하였다. 이러한 결과들을 고려하면 골막에서 추출한 CD양성 골막조직기원 세포들은 혈관내피유사세포라 명할 수 있을 것으로 생각된다.

## Acknowledgements

This research was supported by Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Education, Science and Technology (2010-0007397).

## References

- Gerber HP, Vu TH, Ryan AM, Kowalski J, Werb Z, Ferrara N. VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat Med* 1999;5:623-8.
- Deckers MM, Karperien M, van der Bent C, Yamashita T, Papapoulos SE, Löwik CW. Expression of vascular endothelial growth factors and their receptors during osteoblast differentiation. *Endocrinology* 2000;141:1667-74.
- Sorrell JM, Baber MA, Caplan AI. Influence of adult mesenchymal stem cells on in vitro vascular formation. *Tissue Eng Part A* 2009;15:1751-61.
- Rouwkema J, Westerweel PE, de Boer J, Verhaar MC, van Blitterswijk CA. The use of endothelial progenitor cells for prevascularized bone tissue engineering. *Tissue Eng Part A* 2009;15:2015-27.
- Park BW, Byun JH, Lee SG, et al. Evaluation of osteogenic activity and mineralization of cultured human periosteal-derived cells. *J Korean Maxillofac Plast Reconstr Surg* 2006;28:511-9.
- Park BW, Byun JH, Ryu YM, et al. Correlation between vascular endothelial growth factor signaling and mineralization during osteoblastic differentiation of cultured human periosteal-derived cells. *J Korean Maxillofac Plast Reconstr Surg* 2007;29:197-205.
- Park BW, Hah YS, Kim JH, et al. Use of human adipose tissue as a source of endothelial cells. *J Korean Maxillofac Plast Reconstr Surg* 2010;32:299-305.
- Park BW, Hah YS, Kim JH, et al. Proliferation and functional activity of human adipose tissue-derived CD146 positive endothelial cells according to culture mediums. *J Korean Maxillofac Plast Reconstr Surg* 2010;32:504-10.
- Hewett PW, Murray JC. Human microvessel endothelial cells: isolation, culture and characterization. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 1993;29A:823-30.
- Cines DB, Pollak ES, Buck CA, et al. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood* 1998;91:3527-61.
- Assmus B, Schachinger V, Teupe C, et al. Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation* 2002;106:3009-17.
- Gulati R, Jevremovic D, Peterson TE, et al. Diverse origin and function of cells with endothelial phenotype obtained from adult human blood. *Circ Res* 2003;93:1023-5.
- Kim SY, Park SY, Kim JM, et al. Differentiation of endothelial cells from human umbilical cord blood AC133-CD14+ cells. *Ann Hematol* 2005;84:417-22.
- Burstein FD, Canalis RF, Canalis EM, Ariyan S. Scanning electron microscopy and gel electrophoresis of vascularized periosteal autografts. *Plast Reconstr Surg* 1989;83:500-10.
- Squier CA, Ghoneim S, Kremenak CR. Ultrastructure of the periosteum from membrane bone. *J Anat* 1990;171:233-9.
- Chanavaz M. Anatomy and histophysiology of the periosteum: quantification of the periosteal blood supply to the adjacent bone with 85Sr and gamma spectrometry. *J Oral Implantol* 1995;21:214-9.
- Arnsdorf EJ, Jones LM, Carter DR, Jacobs CR. The periosteum as a cellular source for functional tissue engineering. *Tissue Eng Part A* 2009;15:2637-42.
- 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* 2002;111:61-73.
- Villars F, Bordenave L, Bareille R, Amédée J. Effect of human endothelial cells on human bone marrow stromal cell phenotype: role of VEGF? *J Cell Biochem* 2000;79:672-85.
- Goon PK, Boos CJ, Stonelake PS, Blann AD, Lip GY. Detection and quantification of mature circulating endothelial cells using flow cytometry and immunomagnetic beads: a methodological comparison. *Thromb Haemost* 2006;96:45-52.
- Jacques N, Vimond N, Conforti R, et al. Quantification of circulating mature endothelial cells using a whole blood four-color flow cytometric assay. *J Immunol Methods* 2008;337:132-43.
- Timmermans F, Plum J, Yöder MC, Ingram DA, Vandekerckhove B, Case J. Endothelial progenitor cells: identity defined? *J Cell Mol Med* 2009;13:87-102.