

이형상 칼슘 인산염(Biphasic Calcium Phosphate)에 의한 성체 줄기세포의 골아세포 분화

이명구 · 임성우 · 피성희 · 김윤상 · 신형식 · 유형근

원광대학교 치과대학 치주과학 교실

I. 서론

대표적인 치주질환인 만성 치주염은 치태 내 박테리아와 숙주간의 면역반응을 통해 국소적 염증반응과 치근단으로 이동하는 치주낭을 지속적으로 형성하여 치조골을 파괴시킨다. 이러한 치조골의 파괴는 국소적 원인과 치아주변의 해부학에 따라 수평적, 혹은 수직적 골파괴를 나타내게 된다. 질환 이전 상태로의 완전한 재생이 이상적인 치료 목표이지만, 치아주변의 골소실이 발생한 경우 정상 조직으로의 회복이 매우 어려우며, 경우에 따라 골이식술이 시행되어야 한다¹⁾.

골이식술의 이상적인 치유양상은 이식재의 완전 숙주골화이다. 하지만, 여러 연구에서 이식재의 기원이나 처리과정에 따라 치조골의 치유양상이 다른 것이 밝혀지고 있다. 골 이식재는 공급원에 따라 분류하면 자가골, 동종골, 이종골, 합성골로 나눌 수 있다. 자가골은 동일개체에서 채취한 피질골, 해면골, 골수를 말하며 공여부에 따라서 구내자가골, 구외자가골로 나뉘게 된다²⁾. 채취된 자가골을 치조골

결손에 사용하는 경우 구외자가골은 치조골과 발생배열의 기원이 다르기 때문에 구내자가골에 비해 쉽게 흡수되는 경향이 있다. 반면 구내자가골의 경우는 채취양의 한계로 인해 많은 양의 자가골 이식에는 사용이 제한적이다. 또한 치근흡수와 골강직의 단점을 가지고 있기도 하다^{3,4)}. 동종골은 동일한 종으로부터 채취하는 골이식재를 말한다. 채취된 동종골은 항원성과 감염의 위험성으로 인해 동결건조 과정 혹은 탈회동결건조 과정을 거치게 된다. 동결 건조골을 사용하여 골 재생이 일어났다는 보고들이 있으며, 탈회 동결 건조골은 골형성단백질이 노출되므로써 골유도를 일으킨다는 보고가 있다. 그러나 최근의 논문에서는 기증자의 연령에 따라서 골형성단백질의 양이 달라진다고 보고되고 있고, 또한 조직은행에 따라서도 골유도 효과에 차이가 있다는 등 효과에 대한 논란이 계속되고 있다^{5,6)}.

이종골은 종이 다른 개체로부터 채취되어 사용되는데, 우골(bovine bone)을 탈단백과정을 통해 불활성 시킨 탈단백 우골이 널리 사용되고 있다. 탈단백 우골에 대한 최근의 연구에 따르면 조직 내에서 흡

*이 논문은 2005년도 원광대학교의 교비 지원에 의해서 수행됨

*교신저자 :유형근, 전북 익산시 신용동 344-2 원광대학교 치과대학 치주과학 교실, 우편번호: 570-749

수가 잘 일어나지 않으며, 오랜 기간 유지되는 것으로 보고되고 있다. 한편, 탈탄백 우골의 골유도능력은 탈회 동결건조골 보다 떨어진다는 보고가 있는가 하면 동일한 능력을 가졌다는 보고도 있어 논란이 계속되고 있다⁷⁾.

한편, 이러한 동종골과 이종골을 대신할 수 있는 생체 친화성 물질의 개발에 관심이 고조되고 있다. 합성골 이식재는 생체조직의 반응 양상에 따라 일반적으로 생체 허용성재, 생체 불활성재, 생체 활성재 및 생체 내 붕괴제 등으로 나누어지며, 치주치료 영역에서는 natural coral, tricalcium phosphate, hydroxyapatite 등이 사용되어져 왔다^{8,9)}. 그리고, 비흡수성 합성골인 hydroxyapatite는 dense hydroxyapatite와 porous hydroxyapatite로 구별되는데 dense hydroxyapatite의 경우 이식 후 대부분 긴 접합상피로 치유되며 골유도나 신생백악질의 형성은 없다고 보고하였다^{10,11)}. 반면, porous hydroxyapatite는 골조직과 유사한 공간을 가지고 있어 그 공간 내로 세포의 유입성장이 가능하다고 보고되었다¹²⁾. Biphasic calcium phosphate (BCP)는 hydroxyapatite와 β -tricalcium phosphate가 함께 존재하는 이식재로 개발되었다¹³⁾. 임상에서는 세포부착을 위한 접촉면을 이식재 공간에 형성한 micro-macro biphasic calcium phosphate가 최근 개발되어 널리 사용되고 있다. Micro-macro biphasic calcium phosphate는 안정적인 형태의 hydroxyapatite와 높은 용해성을 지닌 β -tricalcium phosphate를 60:40으로 혼합한 화학구조를 지니고 있는 다공성 이식재로 이러한 구조적 화학적 특징으로 인해 hydroxyapatite는 신생골 조직이 구조적으로 안정성을 유지할 때까지 지지대의 역할을 제공하며, β -tricalcium phosphate는 빠른 용해를 통한 이온교환으로 신생 골아세포가 이식재 사이의 공간으로 잘 확산되도록 한다. 그리고 이식재내의 무수한 다공질은 이온교환을 가능하게 하며 골결정체의 침전을 통한 세포부착을 위한 새로운 접촉면을 형성하고 또한, 혈관 형성 및 신생골의 리모델링과 성장 등에 도움을 준다는 연구결과가 있

다. 한편, 이식후 긍정적인 효과를 얻기 위해 이식재를 처리하는 것과 함께 조직공학을 이용하여 술후 예견성을 높이기 위한 시도가 최근 줄기세포를 통해 이루어지고 있다. 줄기세포란 인간의 몸을 구성하는 서로 다른 세포나 장기로 성장하는 일종의 모세포이다. 줄기세포에는 사람의 배아를 이용해 만들 수 있는 배아줄기세포, 그리고 사람의 체대혈과 골수 등에서 얻을 수 있는 성체줄기세포가 있다. 수정한지 14일이 안된 배아기의 세포인 배아줄기세포(embryonic stem cell)는 장차 인체를 이루는 모든 세포와 조직으로 분화할 수 있기 때문에 전능세포 혹은 만능세포로 불리우지만, 윤리적인 이유로 사용에 제한이 있다¹⁴⁾. 반면, 성체줄기세포는 체대혈이나 다 자란 성인의 골수와 혈액 등에서 추출해낸 것으로, 뼈와 간, 혈액 등 구체적 장기의 세포로 분화되기 직전의 원시세포이며 배아줄기세포의 사용에 따른 윤리적인 제한이 없어 조직공학에 널리 사용되고 있다.

조직공학에서 많이 이용되는 성체 줄기 세포 중 골수유래 줄기세포는 부착성 세포이며 자가 재생능력이 있어 생체 내에서 환경에 따라 여러 가지 조직으로 분화됨이 밝혀짐에 따라 많은 주목을 받고 있다. 골수에는 골형상성과 말초성숙 혈구세포의 재생에 관여하는 여러 세포가 있으며, 이중 줄기세포도 포함되는데, 이 줄기세포는 미분화세포로 대체되거나 연골, 지방, 뼈, 근육 그리고 골수와 같은 간엽성 조직의 계통으로 분화할 수 있는 잠재성을 지니고 있다^{15~17)}. 줄기세포의 골형성 능력은 1968년 Friedenstein 등¹⁸⁾이 보고한 후 인간과 동물을 대상으로 한 여러 연구에서 골형성 세포로 분화되는 것이 보고 되었다. 최근의 연구에서는 골수로부터 분리한 줄기세포를 배양하여 골아세포로 분화증식시키는 방법에 진전이 있었으며, 이를 통한 임상적용의 가능성도 높아지고 있다¹⁹⁾.

본 연구는 치조골 재생의 효과를 높이기 위한 방법으로 골 이식술에 성체줄기세포를 이용한 세포 치료를 적용하기 위해, 사람의 골수에서 채취한 성체줄기세포를 골이식재인 BCP에 배양하여 골아세포로 분화되는 정도를 평가하였다. 이를 위하여

BCP 위에 성체줄기세포를 배양하였으며, 증식에 미치는 영향을 관찰하고자 배양기간에 따른 세포수를 측정하였고, 골화과정에 미치는 영향을 알아보기 위해 교원질합성과 염기성 인산분해효소를 측정하였다. 또한 골 형성 과정에 관련된 유전자의 발현을 알아보기로 Western blot 분석을 시행하였다.

II. 연구재료 및 방법

1. 연구재료

1) 성체줄기세포(adult stem cells, ASC)의 일차 배양

골수 유래 성체줄기세포는 원광대학교 치과대학병원에 내원한 환자의 골수를 채취하여 100 mm dish에 FBS가 포함된 α -MEM 배지에 혼합하여 37°C, 5% CO₂, 95% 공기와 100% 습도에서 5일간 배양한 후 α -MEM으로 이물질과 혈액을 깨끗이 제거하였다. α -MEM는 세포의 충분한 증식이 명확히 나타날 때까지 2일 간격으로 교환하였다.

2) MBCP 준비

본 실험에 사용된 합성골은 micro-macro biphasic calcium phosphate(MBCP, Biomatlante, Vigneux, France)를 사용하였다. 5×5×10 mm 규격의 MBCP 조각을 사용하였으며, 구성은 60%의 hydroxyapatite와 40% tricalcium phosphate이며, 평균 소공의 직경은 10 μ m이하, 대공은 300-600 μ m이다.

2. 연구방법

1) 세포 증식 측정

배양접시에서 단일 밀생에 도달한 ASC를 0.25% trypsin/EDTA로 분리하였다. 이 세포들을 배양액으로 현탁시키고 실험군에는 10mm×5mm의 MBCP 표면에 1×10⁴개의 세포가 들어가도록 분주

하였고, 대조군에는 MBCP사용 없이 실험군과 같은 공간을 만들어 1×10⁴개의 세포가 되도록 분주하였다. 세포들이 부착할 수 있도록 24시간 동안 37°C, 5% CO₂, 95% 공기와 100% 습도상태에서 배양한 후 부착되지 않은 세포들은 배지로 제거하였다. 1, 3, 5일 동안 각각 배양한 후 혈구계수기를 이용하여 세포의 수를 계산하였다.

2) 교원질 합성량 측정

사람의 ASC의 총 교원질 합성량을 측정하기 위해 hydroxyproline 함량이 측정되었다. 세포내 각각의 hydroxyproline을 측정하기 위해 Rojkind 등의 방법을 변형하여 실시하였다²⁰⁾.

실험군에는 10mm×5mm의 MBCP에 1×10⁶개의 세포가 들어가도록 분주하였고, 대조군에는 실험군과 같은 공간을 확보한 후 적정 세포를 분주한 후 각각 50 μ g/ml ascorbic acid, 10mM sodium β -glycerophosphate가 포함된 α -MEM를 2일 간격으로 교환하면서 배양하였다. 5, 7일동안 배양한 후 배지와 구분하여 세포만을 수거하였고, 배양 배지 내에 죽은 세포를 제거하기 위해 15,000 rpm에서 5분간 원심 분리한 후 10N HCl 3 ml를 첨가하고, 각 세포는 trypsin-EDTA로 분리시켜 원심 분리한 후 상층액은 제거하고 3 ml 6N HCl을 첨가하였다. 110°C에서 10-24시간 가수분해 시킨 다음 각 시료를 여과하였다. 시료는 duplication하여 100 μ l씩 첨가하였다. 완전히 건조시킨 다음 methanol 50 μ l을 가하여 남아있는 염산이 제거될 때까지 60°C에서 반응시켰다. 1.2 ml 50% isopropanol을 넣어 남은 침전물을 용해하고, 200 μ l chloramin-T 용액과 섞어 10분간 방치하였다. 1.2 ml의 Ehrlich 반응 시약을 넣어 섞은 후, 50°C에서 90분간 배양한 다음 상온에서 냉각시킨다. 교원질 합성량 측정은 standard curve를 표준 지표로 하여 558 nm에서 흡광도를 spectrophotometer(Beckman, DU-650, USA)로 측정하였다.

3) 염기성 인산분해효소 활성 측정

ASC를 10mm×5mm의 MBCP에 1×10^6 개 되도록 분주한 후, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ascorbic acid, 10mM sodium β -glycerophosphate가 첨가된 α -MEM에 5% CO_2 , 95% 공기와 100% 습도, 37°C의 혼합 배양기에서 실험군의 경우는 MBCP 위에 배양하였고, 대조군은 MBCP 없이 배양하였다. 5, 7일동안 배양 후 배지를 제거하고, trypsin-EDTA로 세포를 분리하고, 15,000 rpm에서 6분간 원심 분리하였다. 상층액을 제거하고 0.2ml의 멸균된 증류수를 첨가하여 초음파 분쇄기로 현탁하였다. 각 세포 현탁액 0.1ml에 0.1M glycine NaOH buffer(pH 10.4) 0.2ml, 15mM 의 p-nitrophenyl phosphate(pNPP : Sigma, USA) 0.1 ml, 0.1% triton X-100/saline 0.1 ml와 멸균된 증류수 0.1 ml를 잘 혼합하여, 이 반응물을 37°C에서 30분간 배양하였다. 0.1N NaOH를 0.6 ml 첨가함으로써 이들 반응을 중지시켰다. 배양된 세포는 96-well 배양접시에 옮기고, p-NPP의 가수분해는 410 nm 파장의 ELISA reader(Spectra MAX250, Molecular Devices CO., Sunnyvale, CA, USA)에서 흡광도의 차이로 나타내며, p-nitrophenol(p-NP : Sigma, USA)을 기준 값으로 이용하였다. 단백질농도는 BCA protein assay reagent(Pierce, USA)를 사용하여 측정하였으며, 효소활성도는 nM/30min/mg of protein으로 표시하였다.

4) Western blot 분석

실험군은 MBCP 표면에서 25일동안 배양된 ASC를 0.25% trypsin/EDTA 로 분리하여 사용하였고, 대조군은 MBCP가 없는 환경에서 배양된 ASC를 분리 사용하였다. 분리된 ASC를 PBS로 세척한 후, lysis buffer(10mM Na_2HPO_4 (pH 7.2), 0.9% NaCl, 1% Triton X-100, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1%SDS, 0.2%sodium azide, 0.004%sodium fluoride)로 세포 단백질을 추출하였고, BCA용액(Bicinchoninic acid sol. Sigma Co.,

USA)에 Copper(II)sulfate(Sigma Co., USA)를 50:1로 혼합하여 단백질 농도를 측정하였다. 대조군과 실험군에서 추출된 단백질 50 μg 을 사용하여 15% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis를 시행한 PVDF membrane(Millipore Corp., Bedford, MA, USA)에 transfer하였다. 비특이 항체의 결합을 막기 위하여 실온 상태에서 membrane을 각각의 차단 용액(Zymed, USA)에 1시간 동안 처리하였다. 그 후에 Osteocalcin(OC, Biogenesis, Kingston, NH, USA)와 Bone Sialoprotein(BSP, Chemicon, Temecula, CA, USA)의 1차 항체를 90분 동안 반응하였다. 1차 항체로 반응시킨 후 PBS로 2회 세척하고 그 다음 2차 항체(Santa Cruz Biotechnology)와 결합된 anti-mouse IgG-alkaline phosphatase로 60분간 처리한 후 다시 PBS로 7분 동안 2회에 걸쳐 세척을 하고, ECL kit로 1분 동안 반응시켜 Hyperfilm-MP(Amersham, UK)에 노출시켰다.

5) 통계분석

통계학적 유의성은 SPSS 10.0 Version 프로그램을 사용하여 평균과 표준오차를 구하고, 이들의 통계학적 유의성은 일원분산분석법(ANOVA)을 이용하여 사전 검정하였으며, 사후 검정은 Tukey법을 사용하였다($p < 0.05$).

III. 연구결과

1. 세포증식 측정

MBCP표면에 ASC를 1×10^4 개의 세포가 들어갈도록 분주한 후 각각 1, 3, 5일동안 배양하여 비교 측정한 세포 수 측정검사에서 1, 3, 5 일군 모두에서 실험군과 대조군간의 세포 증식에 있어 유의한 차이는 관찰되지 않았다. 5일간의 배양에서 약간의 세포 증식은 일어났지만 MBCP에 의한 세포 증식 유도일 것으로 보기에 어려웠다(Table 1, Figure 1).

Table 1. Cell proliferations of adult stem cells cultured on MBCP(Mean±S.D.)
(X10⁴ cells/well)

	1 day	3 days	5 days
Control	1.20±0.06	2.58±0.12	4.30±0.13
MBCP	1.11±0.04	2.68±0.17	4.65±0.08

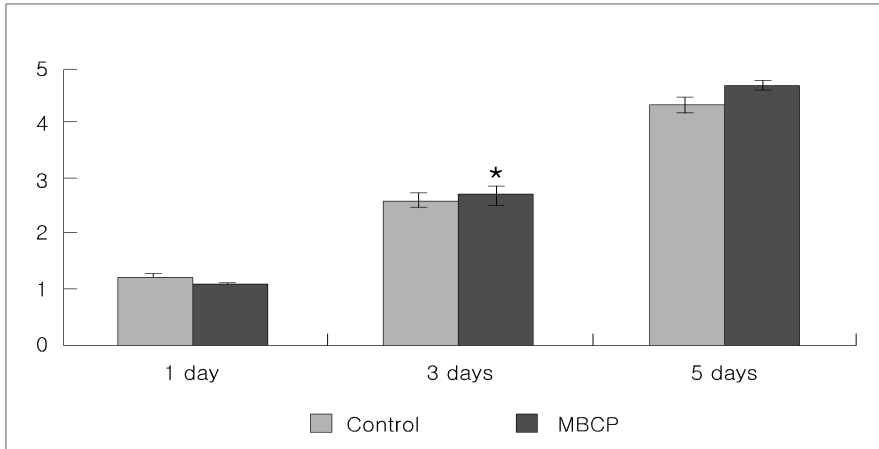


Figure 1. Cell proliferations of adult stem cells cultured on MBCP(×10⁴). Cell number counting was performed after 1,3,5 days incubation. Vertical bars represent standard deviation of each experiments.

2. 교원질 합성

MBCP 표면에 ASC를 1×10⁶개의 세포가 들어가도록 분주한 후 각각 5, 7일 동안 배양하여 교원질 합성량을 측정하였다. 5일군에서 대조군은 0.30±0.02, MBCP 표면에 성체줄기세포를 배양한 경우는 2.30±0.25으로 두 군간에 유의한 차이를 보이며 교원질 합성량이 약 8배 정도 증가하였다. 7일군에서도 실험군(3.33±0.26)은 대조군(0.45±0.02)에 비해 약 7배 정도 유의성 있는 교원질 합성의 증가가 관찰되었다. 또한 실험군과 대조군 모두에서 5일군에 비해 7일군에서 교원질 합성이 유의성 있게 증가하였다.(p<0.05)(Table 2, Figure 2)

3. 염기성 인산분해효소(Alkaline Phosphatase, ALP) 활성

MBCP표면에 ASC를 1×10⁶개의 세포가 들어가도록 분주한 후 각각 5, 7일동안 배양하여 비교 측정한 염기성 인산분해효소 활성을 측정하였다. 5일군에서 MBCP를 사용한 실험군(0.20±0.03)은 MBCP를 사용하지 않은 대조군(0.04±0.01)에 비해 유의성 있는 염기성 인산분해효소 활성이 약 5배 증가되었다. 7일군에서도 MBCP를 사용한 실험군(0.19±0.02)은 MBCP를 사용하지 않은 대조군(0.03±0.01)에 비해 유의성 있는 염기성 인산분해효소 활성이 약 6배 정도 증가되었다(p<0.05)(Table 3, Figure 3).

Table 2. Collagen synthesis of ASC cultured on MBP (Mean±S.D.)
[collagen/ total protein (μg/ml)]

	Control	MBP
5 days	0.30±0.02	2.30±0.25 *
7 days	0.45±0.02	3.33±0.26 *

* : Statistically significant difference compared with the control (p<0.05)

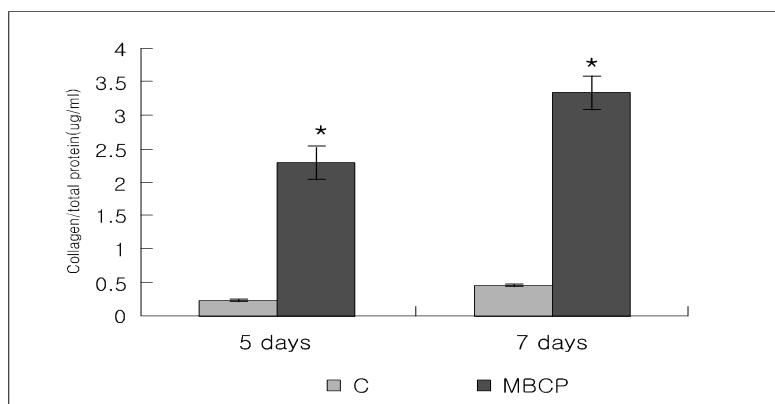


Figure 2. Collagen synthesis of adult stem cells cultured on MBP (Mean± S.D.).

* : Statistically significant difference compared with the control(p<0.05)

Table 3. ALP activities of adult stem cells cultured on MBP(Mean±S.D.)
(nM/ 30min/mg of protein)

	Control	MBP
5 days	0.04±0.01	0.20±0.03 *
7 days	0.03±0.01	0.19±0.02 *

* : Statistically significant difference compared with the control (p<0.05)

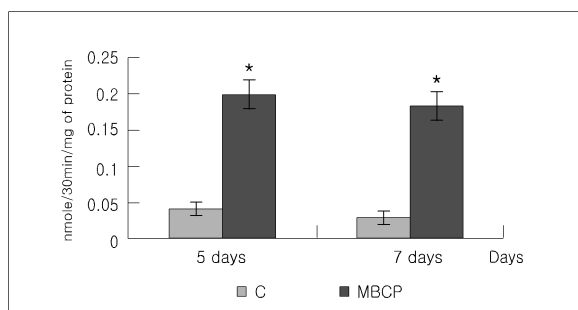


Figure 3. Alkaline phosphatase activities of adult stem cells cultured on MBP(Mean±S.D.)

* : Statistically significant difference compared with the control(p<0.05).

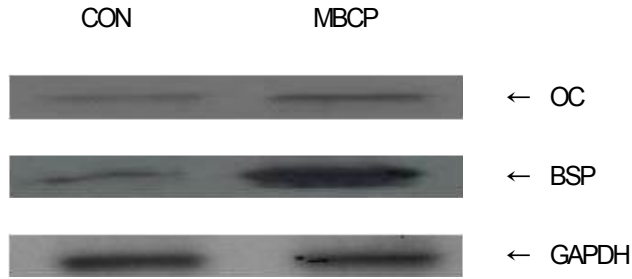


Figure 4. Western blot analysis for osteocalcin and bone sialoprotein in ASC cultured on MBCP. Cell extract equivalent to 100 μ g/ml of total cellular protein of ASC was electrophoresed by 15% SDS-PAGE and transferred to a PVDF membrane. The intracellular protein levels of osteocalcin and bone sialoprotein in ASC were probed with respective antibodies diluted by 1 : 1000.

4. Western blot 분석

MBCP 표면에서 25일 동안 배양된 ASC를 실험군으로 western blot 분석한 결과 대조군에 비해 MBCP를 첨가한 실험군에서 OC와 BSP의 발현이 증가하였으며, OC보다 BSP의 발현이 더욱 강하게 나타났다(Figure 4).

이상의 연구 결과에서 보듯이 MBCP를 사용하여 성체줄기세포를 배양하는 경우 줄기세포들이 골아세포로 분화됨을 알 수 있었다.

IV. 총괄 및 고찰

질환이전 상태로의 완전한 조직 재생이 이상적인 치주 치료이지만, 현실적으로는 상실된 치주조직의 안정화를 이루는 것을 의미한다. 그러나, 골내낭의 치료와 임플란트 식립을 위한 치조골의 형성을 위해 골재생에 대한 임상에서의 필요도가 점차 증가하고 있다. 이를 위해 다양한 기원과 처리방법으로 골이식재를 제조하여 치료에 사용하고 있으며 최근 조직공학이 발전하면서 더욱 많은 생체재료들이 사용되고 있다. 이식재의 생체적합성은 재료의 화학적 성질과 물리적 성질, 즉 이식재의 크기와 거칠기, 표면

의 형태에 의해 영향을 받게 된다. 본 연구에 사용된 MBCP는 항원성과 감염의 위험이 없는 골이식재료 치과와 정형외과 영역에서 널리 사용되고 있다. 여러 연구에서 합성골은 골을 형성하는 능력은 결여되어 있지만, 골유도능과 골전도능이 있음이 보고되고 있고^{21,22)}. 본 연구에 사용된 MBCP도 골전도능을 가지고 있다는 보고가 있다^{23,24)}.

골 이식술의 성공을 위해서는 이식부위의 세포가 골아세포로 분화하여 증식하여야만 한다. 최근 분자생물학 및 유전공학의 눈부신 발전으로 성체줄기세포를 통한 조직재생에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. Thomson 등에 의해 수정란으로부터 인간 배아줄기 세포가 처음 만들어진 이후 최근에는 성체조직으로 특이적 분화를 하는 줄기세포가 존재하며 줄기세포로부터 성숙한 기능성 세포로 성숙, 재생이 이루어지고 있다는 사실이 밝혀지고 있다²⁵⁾.

성체줄기세포는 본래 자신이 있던 조직과는 성격이 다른 세포로 분화할 수 있는 능력에는 한계가 있다. 그러나, 성체줄기세포를 세포치료에 사용할 때 잠재적인 유용성은 성체줄기세포를 세포배양을 통해서 증식을 시킨 후에 다시 환자 자신에게 이식할 수 있다는 점이다. 이렇게 함으로서 환자 자신의 성체줄기세포를 자신의 치료에 사용하며 이 세포는 자기

자신의 세포이기 때문에 면역학적인 거부반응을 일으키지 않으며, 배아줄기세포의 사용에 따른 윤리적 문제도 없다는 장점이 있다.

본 연구에서는 임상에서 골이식재로 사용하고 있는 재료 중 하나인 MBCP가 성체줄기세포에서 골아세포로의 분화에 미치는 영향을 관찰하기 위해서 세포 증식과 세포 분화 과정을 관찰하였다. 그 결과 MBCP를 성체줄기세포에 첨가한 경우 세포증식에는 아무런 영향을 미치지 않았으나 세포 분화과정에는 많은 영향을 미치는 것으로 나타났다. MBCP는 Biphasic calcium phosphate로 hydroxyapatite와 β -tricalcium phosphate로 이루어져 있다. Hydroxyapatite보다 β -tricalcium phosphate가 더 높은 용해성을 가지고 있으므로, 세포에 미치는 영향은 β -tricalcium phosphate가 더 클 것으로 사료된다.

교원질합성은 MBCP를 첨가한 경우 증가하였다. 골은 광화된 특수 결합조직으로 33%가 유기기질로 되어 있으며, 이중 28%는 제1형 교원질, 나머지 5%는 osteonectin, osteocalcin 등과 같은 비교원성 골기질 단백질로 되어 있다. 제1형 교원질은 주로 골아세포에 의해 형성되며, 이 교원원섬유 내와 주위에 무기질이 침착되어 골조직이 형성된다. 본 연구에서 MBCP에 의해 성체줄기세포의 교원질 합성이 촉진됨이 증명되었고, MBCP가 성체줄기세포의 골아세포로의 초기 분화 과정에 효과가 있다는 것을 알 수 있었다.

ALP는 골아세포의 활성도를 반영하는 대표적인 지표로 알려져 있다^{26~28)}. ALP는 연골 및 골의 무기질화를 촉진하며 혈청내 ALP는 골아세포 및 간이나 장에서 생성된다. 골형성 과정에서 골아세포의 활성이 증가하면 염기성 인산분해효소와 같은 골 형성 지표들 또한 증가하게 된다. 본 연구에서는 MBCP가 성체줄기세포의 세포증식을 촉진시키지는 못하였으나, ALP의 활성 증가가 관찰되었으며, 이러한 결과는 교원질 합성의 증가 결과와도 일치하였다.

OC와 BSP는 ALP와 함께 골아세포의 분화 정도를 나타내는 대표적인 지표로 알려져 있다. OC는

비타민 K 의존성 단백질로 골아 세포에서 생성되어 골 기질내 비교원 단백질의 약 10-20%정도를 차지하며, 골 흡수와 골 형성과정에서 중요한 기능을 한다. BSP는 무기질 결정 형성을 조절할 수 있는 골 석회화와 분화의 대표적인 표지유전자로 여겨져 왔다. BSP는 골의 총 비교원성 단백질 중에서 15%를 차지하고 있으며, 골 석회화 및 재형성과 관련이 있는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 성체줄기 세포를 MBCP 표면에서 25일 동안 배양한 후 OC와 BSP의 유전자 발현을 측정하여 OC와 BSP의 발현이 증가되는 것을 알 수 있었다. 즉, 다양한 세포로의 분화능을 가지고 있는 성체줄기세포가 MBCP로 인해 골아세포로의 분화가 일어나고 있음을 알 수 있었다. 또한 OS의 발현에 비해 BSP의 발현이 더욱 강하게 나타났는데, 이는 MBCP에 BSP 유전자가 더 민감하게 반응하는 것을 의미한다. 조골작용을 촉진시키는 여러 물질들도 다양한 세포에 따라 유전자의 발현 종류와 민감도가 상이하게 된다. 즉, MBCP가 성체줄기세포에서 골아세포로 분화하는데 있어 BSP에 더 많은 영향을 준다는 것을 확인할 수 있었다.

본 연구는 hydroxyapatite와 β -tricalcium phosphate로 이루어진 biphasic calcium phosphate인 MBCP가 골수유래성체줄기세포의 골아세포로의 분화에 미치는 영향을 평가하기 위해 시행되었다. MBCP는 골아세포 분화 과정과 관련된 모든 지표를 현저하게 증가시킴을 확인할 수 있었다. 본 연구결과를 바탕으로 MBCP의 첨가가 성체줄기세포의 조골작용을 촉진시킨다는 것을 단정적으로 판단하기 어렵지만, 본 연구의 결과는 향후 성체줄기세포의 분화에 있어 골이식재에 따른 생화학적 특성 등의 연구에 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

V. 결론

본 연구는 성체줄기세포에 대한 MBCP(micro-macro biphasic calcium phosphate)의 효과를 알아보기 위해 실시하였다. 성인에서 골수를 채취하여 성

체줄기세포를 분리한 후 MBCP 위에 배양하여 세포증식, 교원질합성, 염기성 인산분해효소, osteocalcin과 bone sialoprotein 유전자의 발현을 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. MBCP 위에 배양된 성체줄기세포의 증식은 1, 3, 5 일군 모두에서 대조군과 유의한 차이가 없었다($p < 0.05$).
2. 교원질 합성에 있어서, MBCP 위에 배양된 실험군에서 대조군에 비해 교원질 합성이 증가하였으며, 배양 5일군보다 배양 7일군에서 더 많은 교원질 합성이 관찰되었다($p < 0.05$).
3. 염기성 인산분해효소의 활성에 있어서, 배양 5, 7일 모두 대조군에 비해 실험군에서 활성이 유의하게 증가하였다($p < 0.05$).
4. Osteocalcin과 bone sialoprotein 유전자의 발현이 실험군에서 증가되었으며, Osteocalcin보다 bone sialoprotein 유전자의 발현이 강하게 나타났다.

이상과 같은 결과로 MBCP는 성체줄기세포에 대해 교원질합성, 염기성 인산분해효소의 활성, osteocalcin과 bone sialoprotein 유전자 발현 등의 촉진을 통해 골 분화과정에 긍정적인 효과를 보이는 것으로 나타났다. 그러므로, 임상에서 치주조직의 회복을 위해 MBCP와 성체줄기세포를 사용한다면 더 나은 효과를 보일 수 있다고 사료된다. 앞으로, 이식제에 따른 성체줄기세포의 정확한 분화양상을 파악하기 위한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

VI. 참고문헌

1. Schallhorn RG. Present status of osseous grafting procedures. J Periodontol. 1977;48(9):570-576.
2. Froum S., Thaler R., Scopp I., Stahl S. Osseous autografts. II. Histological responses to osseous coagulum-bone blend grafts. J Periodontol. 1975;46:656-661.
3. Ray R.D. Vascularization of bone grafts and implants. Clin Ortho. 1972;87:42-48.
4. Enneking W.F., Morris J.L. Human autologous cortical bone transplants. Clin Ortho. 1972;87:28-35.
5. Schwartz Z., Somers A., Mellonig JT., Carnes DL Jr., Dean DD., Cochran DL., Boyan BD. Ability of commercial demineralized freeze-dried bone allograft to induce new bone formation is dependent on donor age but not gender. J Periodontol. 1998;69(4):470-478.
6. Traianedes K., Russell JL., Edwards JT., Stubbs HA., Shanahan IR., Knaack D. Donor age and gender effects on osteoinductivity of demineralized bone matrix. J Biomed Mater Res. 2004;70B(1):21-29.
7. Richardson CR., Mellonig JT., Bruns-vold MA., McDonnell HT., Cochran DL. Clinical evaluation of Bio-Oss: a bovine-derived xenograft for the treatment of periodontal osseous defects in humans. J Clin Periodontol. 1999;26(7):421-428.
8. Barney VC., Levin MP., Adams DF. Bioceramic implants in surgical periodontal defects. A comparison study. J Periodontol. 1986;57(12):764-770.
9. Bowers GM., Vargo JW., Levy B., Emerson JR., Bergquist JJ.. Histologic observations following the placement of tricalcium phosphate implants in human intrabony defects. J Periodontol. 1986;57(5):286-287.
10. Froum SJ., Kushner L., Scopp IW., Stahl SS. Human clinical and histologic responses to Durapatite implants in

- intraosseous lesions. Case reports. *J Periodontol.* 1982;53(12):719-725.
11. Moskow BS., Lubarr A. Histological assessment of human periodontal defect after durapatite ceramic implant. Report of a case. *J Periodontol.* 1983;54(8):455-462.
 12. Roy DM., Linnehan SK. Hydroxyapatite formed from coral skeletal carbonate by hydrothermal exchange. *Nature.* 1974;247(438):220-222.
 13. Gauthier O., Bouler JM., Aguado E., Pilet P., Daculsi G. Micro-macro biphasic calcium phosphate ceramics: influence of macropore diameter and macroporosity percentage on bone growth. *Biomaterials.* 1998;19:133-139.
 14. Holm S. Embryonic stem cell research and the moral status of human embryos. *Reprod Biomed Online.* 2005;10 Suppl 1:63-67.
 15. Song L., Baksh D., Tuan RS. Mesenchymal stem cell-based cartilage tissue engineering: cells, scaffold and biology. *Cytherapy.* 2004;6(6):596-601.
 16. Barry FP., Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004;36(4):568-584.
 17. Kassem M., Kristiansen M., Abdallah BM. Mesenchymal stem cells: cell biology and potential use in therapy. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2004;95(5):209-214.
 18. Friedenstein AJ., Petrakova KV., Kurolesova AI., Frolova GP. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation.* 1968;6(2):230-247.
 19. Ohgushi H., Caplan AI. Stem cell technology and bioceramics: from cell to gene engineering. *J Biomed Mater Res.* 1999;48(6):913-927.
 20. Dunn MA., Kamel R., Kamel IA., Biempica L., Kholy AE., Hait PK., Rojkind M., Warren KS., Mahmoud AA. Liver collagen synthesis in schistosomiasis mansoni. *Gastroenterology.* 1979;76(5 Pt 1):978-982.
 21. Barrack RL., Cook SD., Patron LP., Salkeld SL., Szuszczewicz E., Whitecloud TS. Induction of bone ingrowth from acetabular defects to a porous surface with OP-1. *Clin Orthop Relat Res.* 2003;(417):41-59.
 22. Gauthier O., Bouler JM., Aguado E., Pilet P., Daculsi G. Micro-macro biphasic calcium phosphate ceramics: influence of macropore diameter and macroporosity percentage on bone ingrowth. *Biomaterials.* 1998;19(1-3):133-139.
 23. De Groot K. Effect of porosity and physicochemical properties on the stability, resorption, and strength of calcium phosphate ceramics. *Ann N Y Acad Sci.* 1988;523:227-233.
 24. Gauthier O., Bouler JM., Aguado E., Pilet P., Daculsi G. Micro-macro biphasic calcium phosphate ceramics: influence of macropore diameter and macroporosity percentage on bone ingrowth. *Biomaterials.* 1998;19(1-3):133-139.
 25. Thomson JA., Itskovitz-Eldor J., Shapiro SS., Waknitz MA., Swiergiel JJ., Marshall VS., Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blas-

- tocysts. *Science*. 1998;282(5391):1145-1147.
26. Leung KS., Fung KP., Sher AH., Li CK., Lee KM. Plasma bone-specific alkaline phosphatase as an indicator of osteoblastic activity. *J Bone Joint Surg Br*. 1993;75(2):288-292.
27. Delmas PD. Biological markers of bone metabolism *Presse Med*. 1993 ;22(6):263-268.
28. van Straalen JP., Sanders E., Prummel MF., Sanders GT. Bone-alkaline phosphatase as indicator of bone formation. *Clin Chim Acta*. 1991;201(1-2):27-33.
29. Duda RJ Jr., O'Brien JF., Katzmann JA., Peterson JM., Mann KG., Riggs BL. Concurrent assays of circulating bone Gla-protein and bone alkaline phosphatase: effects of sex, age, and metabolic bone disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 1988;66(5):951-957.
30. Bowles SA., Kurdy N., Davis AM., France MW., Marsh DR. Serum osteocalcin, total and bone-specific alkaline phosphatase following isolated tibial shaft fracture. *Ann Clin Biochem*. 1996; 33(Pt 3):196-200.
31. Marazuela M., Astigarraga B., Tabuenca MJ., Estrada J., Marin F., Lucas T. Serum bone Gla protein as a marker of bone turnover in acromegaly. *Calcif Tissue Int*. 1993;52(6):419-421.
32. Bouman AA., Scheffer PG., Ooms ME., Lips P., Netelenbos C. Related Articles, Two bone alkaline phosphatase assays compared with osteocalcin as a marker of bone formation in healthy elderly women. *Clin Chem*. 1995;41(2):196-199.
33. Shimizu-Sasaki E., Yamazaki M., Furiyama S., Sugiya H., Sodek J., Ogata Y. Identification of a novel response element in the rat bone sialoprotein(BSP) gene promoter that mediates constitutive and fibroblast growth factor 2-induced expression of BSP. *J Biol Chem*. 2001;276:5459-5466.
34. Wuttke M, Muller S, Nitsche DP, Paulsson M, Hanisch FG, Maurer P. Structural characterization of human recombinant and bone-derived bone sialoprotein. Functional implications for cell attachment and hydroxyapatite binding. *J Biol Chem*. 2001;276:36839-36848.

Osteoblastic differentiation of adult stem cells by Biphasic Calcium Phosphate

Myoung-Ku Lee · Sung-Woo Lim · Sung-Hee Pi · Yun-Sang Kim

Hyung-Shik Shin · Hyoung-Keun You

Department of Periodontology, School of Dentistry, Wonkwang University

The present study was to determine the influence of micro-macro biphasic calcium phosphate(MBCP) on proliferation and differentiation of human marrow-derived mesenchymal stem cells. Primary stem cells were cultured from bone marrow and 3-4 passaged cells were used. This study tested the proliferative effects by cell counting. Collagen sythensis, alkaline phosphatase activity, expression of osteocalcin and bone sialoprotein by Western blot analysis were evaluated. The cellular proliferation of ASC was not influenced by MBCP. Collagen synthesis of ASC cultured on MBCP significantly increased at 5th and 7th days($p<0.05$). The ALP activity in ASC cultured on MBCP significantly increased at 5th and 7th days($p<0.05$). The expression of OC and BSP increasaed in ASC cultured on MBCP. These results suggest that MBCP may stimulates the osteoblastic activity of ASC.

Key words : Osteoblastic differentiation, mesenchymal stem cells, biphasic calcium phosphate(MBCP)