

## Bone Matrix Gelatin이 일차배양 골아세포의 DNA생합성에 미치는 영향

울산대학교 의과대학 부속 서울중앙병원 정형외과 · 울산대학교 의과대학 생화학교실\*

김기용 · 이춘성 · 오원혁 · 김정재 · 이재담\* · 조성우\* · 김금이\*

= Abstract =

### The Effect of Bone Matrix Gelatin on DNA Synthesis in Primary Culture of Osteoblast

Key-Yong Lee, M.D., Choon-Sung Lee, M.D., Won-Hyeok Oh, M.D., Jung-Jae Kim, M.D.,  
Jae-Dam Lee, M.D.\*, Sung-Woo Cho, Ph. D.\* and Geum-Yi Kim\*

*Department of Orthopaedic Surgery, Asan Medical Center and  
Department of Biochemistry\*, College of Medicine, Ulsan University*

Bone matrix gelatin (BMG) is the insoluble extract with osteoinductive capacity, obtained during the intermediate step of bone morphogenetic protein (BMP) extraction. The effect of BMG on the rate of DNA synthesis was assessed in the primary cultures of osteoblast from fetal rat calvariae by the rate of  $^3\text{H}$ -thymidine incorporation into DNA. At the concentrations of 15-60 ng/ml for 24 hours of incubation, BMG stimulated the incorporation of  $^3\text{H}$ -thymidine by 127-165% in primary osteoblast cultures. Dose-response curve was obtained with the peak response at 30 ng/ml of BMG. We also assessed the effect of BMG in the famous osteoblast cell line, that is, MC3T3-E1 cells, and the similar increase in  $^3\text{H}$ -thymidine uptake was obtained at the lower doses of BMG. To compare the effect of BMG on the osteoblast with that on the periosteal cells, such as fibroblast, the uptake of  $^3\text{H}$ -thymidine was measured in NRK fibroblast, the uptake of  $^3\text{H}$ -thymidine was and found that 2.5-30 ng/ml of BMG caused the increase in uptake by 160-220%. These studies indicated that BMG, which has high level of BMP activity, stimulates DNA synthesis and cell replication in the isolated osteoblasts and in MC3T3-E1 cells, that is periosteum-free differentiated bone cells, as well as in the osteoprogenitor periosteal cells, such as fibroblasts and undifferentiated mesenchymal cells.

**Key Words :** Bone matrix gelatin, Osteoblast, DNA synthesis.

## 서 론

Bone matrix gelatin (BMG)은 피질골로부터 골형성단백 (Bone morphogenetic protein ; BMP)을 추출할 때에 가용성 비교원 단백질 (soluble non-collagenous protein)을 순차적으로 제거하는 과정에서 얻어지는 물질로 근육이나 피하조직

에 이식 (implant)하면 신생골을 형성하는 능력이 있다<sup>10)</sup>. 이러한 골형성 능력 (osteoinductive capacity)은 혈관주위 미분화 간엽 결체조직 (perivascular undifferentiated mesenchymal connective tissue)을 분화 (differentiation)시켜 골을 형성하는 성질로 in vivo 및 in vitro assay를 통하여 측정할 수 있다. Canalis등은 골의 organ culture를 통하여 부분 정제된 골형성 단백질은 골막이 포함된 골에서만, 즉 골막에 포함된 미분화 간엽 세포나 섬유아세포의 효과가 없어 골형성 단백질이 작용하는 세포는 골아세포가

\* Authors thanks to Dr. Yuji Amagai et al (Ohu University School of Dentistry) for favorable gift of their original MC3T3-E1 cells.

아니라 골막의 세포라고 이야기한 바 있다<sup>3)</sup>. 그러나 *Centrella* 등은, BMP가 그 family의 일부라고 밝혀진, Transforming growth factor  $\beta$  (TGF  $\beta$ )의 골에 대한 효과를 골아세포의 배양을 통하여 밝히면서 TGF  $\beta$ 의 분열 원질성 효과 (mitogenic effect)가 주로 나타나는 부위는 골아세포라고 이야기 하였다<sup>5, 6, 14)</sup>.

이에 저자들은 골아세포에 골형성 단백질 어떤 효과를 미치는지 알아보기 위하여 골막이 없는 상태, 즉 태생 3주된 쥐의 두정부골 (calvariae)로부터 일차배양한 골아세포에서, 비교적 높은 골형성 단백질의 활성도 (BMP activity)를 가진 BMG의 분열 원질성 효과 (mitogenic effect), 즉 DNA 합성에 미치는 효과를 DNA에 융합 (incorporation)되는 <sup>3</sup>H-thymidine의 측정을 통하여 알아보았으며 아울러 비교를 위하여 MC3T3-E1 골아세포 및 NRK 섬유아세포에서 BMG의 효과를 측정하였다.

## 재료 및 방법

### 1. Preparation of Bone matrix gelatin

생후 1년된 돼지의 피질골 10kg을 1mm크기의 미세한 분말로 만든 후 Ko등의 방법으로 BMG를 만들었다<sup>9)</sup>. 우선 뼈 분말을 100% Ethanol과 1:1 Ether/Ethanol로 처리하여 지방을 제거하고 (defatting) 0.5N HCl에서 48시간 동안 무기질을 제거하여 (demineralization) 3일간 건조시킨 후 6M urea/0.5N HCl/10mM MEM 용액에서 65시간 동안 용해시켜 여과하여 BMG를 만들었다. 10kg의 피질골로부터 약 1.4kg의 BMG가 추출되었으며 본 실험에서는 1M acetate (pH 5.5)에 희석하여 사용하였다.

### 2. 세포배양

골아세포는 저자들이 1991년 12월 대한 정형외과 학회지에 보고한 바와 같이, 태생 3주된 쥐의 두정부골로부터 분리 및 일차배양하는 방법을 사용하였다<sup>1, 7, 13)</sup>. 이를 간단히 기술하면, 태생 3주된 Sprague-Dawley rat 25마리의 두정부골 (calvariae)을 무균 조작하에서 적출하여 Ca, Mg-free phosphate buffered saline (PBS)속에서 잘게 썰어 1-2mm<sup>2</sup>크기의 조각을 얻은 후 이 골편들을 0.1% collagenase, 0.05% trypsin을 함유한 효소용액에 넣고 20분간 용해시키는 과정을 4회 반복하였다. 제 1, 2회의 효소처리에서 나오는 상층액을 버리고 제

3, 4회의 처리에서 나오는 상층액을 취하여 200 mesh로 여과한 후 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco) 5cc로 원심분리하여 세척하는 과정을 2회 반복하였다. 단층배양 (monolayer culture)이 되게 하기 위하여 이때 생긴 cell pellet을 배양액인 10% FCS (fetal calf serum)를 함유한 DMEM으로 세포수가  $2 \times 10^5$ 개/ml되게 희석하여 그 세포 부유액을 35mm tissue culture dish에 2cc씩 분주하였다.

상기의 일차배양 골아세포에 대한 BMG의 분열 원질성 효과와 비교하기 위하여 골막세포인 섬유아 세포와 이미 확립된 골아세포인 MC3T3-E1 세포에서 BMG의 효과를 측정하였다. ATCC (American Type Culture Collection)로부터 구입한 NRK 섬유아 세포주 (clone 49F)와 Ohu대학교 치과대학으로부터 제공받은 MC3T3-E1 세포주는 각각 10% fetal calf serum (FCS)이 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 및  $\sigma$ -modification of Eagle's minimum essential medium ( $\sigma$ -MEM)을 배양액으로 하여 세포수가  $2 \times 10^5$ 개/ml되게 35mm tissue culture dish에 2cc씩 분주한 후 CO<sub>2</sub> incubator (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% air)에서 배양하였다.

### 3. Measurement of DNA synthesis

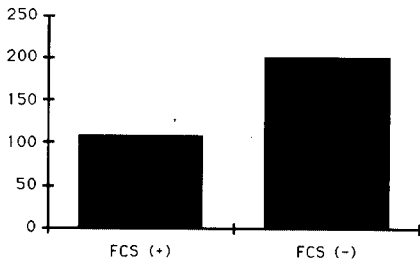
DNA 합성은 thymidine이 DNA에 융합되는 정도로 측정하였다. 배양중인 35mm dish내의 세포가 confluent하여 졌다고 판단되는 약 5일째에 배양액을 FCS가 들어있지 않은 DMEM으로 갈아주고 이때에 각 농도의 BMG를 배양액에 첨가하여 22시간이 경과한 후 <sup>3</sup>H-thymidine 20  $\mu$ l (1 mCi/ml)를 배양액에 넣고 2시간만에 harvest하였다. 이때 대조군에는 BMG대신 1M acetate 20  $\mu$ l를 넣어 주었으며 매 실험마다 대조군 및 각 농도의 BMG에 3개 이상의 dish가 배정되도록 하여 실험의 정확성을 기하였다. Harvest를 위하여 각각의 35mm dish의 배양액을 흡입하고 rubber-policeman으로 세포를 긁어 모아 5% trichloroacetic acid (TCA)와 phosphate buffered saline (PBS) 용액으로 GF-C filter가 설치된 cell harvester에서 세척 (wash)하여 filter에 걸려진 TCA-insoluble residues에 융합된 <sup>3</sup>H-thymidine의 방사능 (radioactivity) incorporation을 CPM (counts per minute) 단위로 측정하여 각각의 BMG농도에서의 평균치를 대조군과 비교하여 percent of control로 표시하

였다.

## 결 과

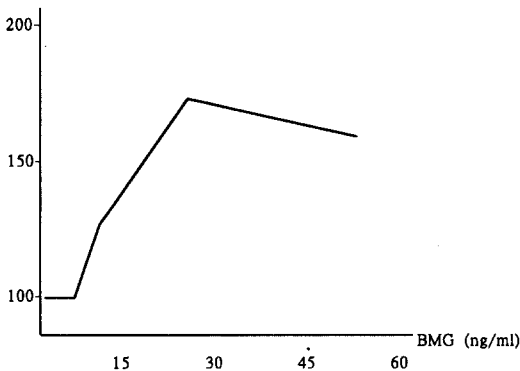
Fetal calf serum의 유무가 실험에 미치는 영향을 알아보기 위하여 BMG를 배양액에 넣을 때에 FCS가 들어있는 경우와, 안들어있는 경우를 1차배양 골아세포에서 비교하여 보면 15 ng/ml의 BMG농도에서 FCS가 들어있는 경우는 대조군과 비교하여 108%의  $^3\text{H}$ -thymidine의 방사능 흡수를 보였으나 FCS가 안들어 있는 배양조건하에서는 193%의 흡수의 증가를 보여 FCS를 안넣는 경우에 BMG의 효과가 더욱 강화되는 것을 알 수 있었다(Fig. 1). 따라서 본 실험에서 저자들은 BMG의 효과를 더 잘 알기 위하여 BMG를 넣을 때에 배양액을 10% FCS가 들어있는 DMEM대신 FCS-free

$^3\text{H}$ -Thymidine Incorporation  
(percent of control)



**Fig. 1.** Elimination of FCS (fetal calf serum) from culture media potentiates the effect of BMG on  $^3\text{H}$ -thymidine uptake in primary osteoblast.

$^3\text{H}$ -Thymidine Incorporation  
(percent of control)



**Fig. 2.** Dose-response curve of effect of bone matrix gelatin (BMG) on  $^3\text{H}$ -thymidine incorporation into DNA in primary osteoblast.

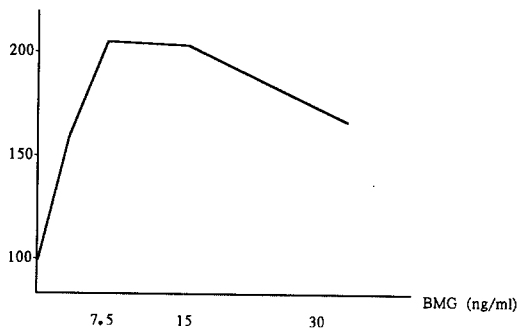
DMEM으로 교체하여 실험에 사용하였다.

일차배양 골아세포에 2.5-60 ng/ml의 BMG를 같이 넣고 24시간동안 배양한 후 GF-B filter에 걸러진 acid-insoluble residues에 융합된  $^3\text{H}$ -thymidine의 방사능을 측정하면 15 ng/ml에서 증가를 보이기 시작하여 15-60 ng/ml에서 대조군과 비교하여 127-165%의 증가를 보였다. BMG의 양에 따른 DNA합성의 증가의 정도를 알아보기 위하여 dose-response curve를 그려보면 BMG농도의 증가에 따라 방사능이 점차로 증가하다가 30 ng/ml에서 peak response를 보여주었다(Fig. 2).

골막세포에 대한 BMG의 효과를 알아보기 위하여 NRK 섬유아 세포에서  $^3\text{H}$ -thymidine의 방사능을 측정한 결과 2 ng/ml에서  $^3\text{H}$ -thymidine의 DNA에의 융합이 증가되기 시작하여 2-30 ng/ml에서 대조군과 비교하여 160-220%의 방사능의 증가를 보였으며 7.5 ng/ml에서 peak response를 보였다(Fig. 3).

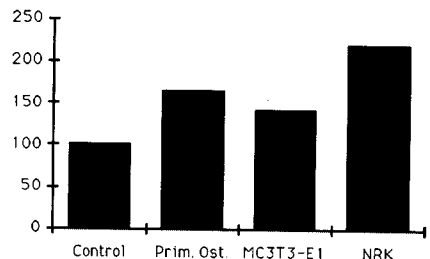
이미 확립된 골아세포주인 MC3T3-E1 골아

$^3\text{H}$ -Thymidine Incorporation  
(percent of control)



**Fig. 3.** Dose-response curve of effect of bone matrix gelatin (BMG) on  $^3\text{H}$ -thymidine incorporation into DNA in NRK fibroblast.

$^3\text{H}$ -Thymidine Incorporation  
(percent of control)



**Fig. 4.** Comparison of peak response among different cells.

세포에서의  $^3\text{H}$ -thymidine의 uptake는 대조군과 비교하여 0.5-8 ng/ml에서 125-141%로, 일차 배양 골아세포의 경우보다 적은 BMG농도에서 비슷한 정도의 증가를 보였으며 8 ng/ml에서 peak response를 보였다.

각 세포의 peak response를 나타내는 BMG의 농도는 다르나 그 정도는 일차배양 골아세포에서 165%, MC3T3-E1세포에서 141%, NRK 섬유아 세포에서 220%로 골막세포인 NRK 섬유아 세포에서 가장 민감한 반응을 나타내었다 (Fig. 4).

## 고 찰

골형성 단백을 추출하여 그 골형성 능력을 측정하는 방법중 in vivo assay는 근육 혹은 피하 주사시 주위 미분화 간엽 결체조직을 분화시켜 골을 형성하는 것을 통하여 알아볼 수 있으며 in vitro assay에는 diffusion chamber, organ culture, tissue culture, 세포배양 등의 다양한 방법이 사용될 수 있다.<sup>3,4,6,8,10)</sup>

골형성은 골 세포증식 (bone cell replication) 과 분화된 세포의 기능 (differentiated cell function)이라는 두가지에 의하여 조절되는 과정이라고 할 수 있으며 전자는 DNA합성의 정도, 후자는 교원질 합성의 정도의 측정을 통하여 알아볼 수 있다<sup>2)</sup>. 이러한 과정에는 호르몬 뿐만 아니라 epidermal growth factor, fibroblast growth factor, platelet-derived growth factor, insulinlike growth factor등의 전신적인 성장인자 (systemic growth factor)뿐만 아니라 여러 국소 성장인자 (local growth factor)들이 관여하게 된다. 이러한 성장인자 중 골자체로부터 유래된 성장인자의 DNA합성과 골 교원질 형성에 미치는 영향을 알아보기 위한 연구 중 1985년 Canalis등은 부분정제된 골형성 단백질의 골에서의 DNA합성과 세포증식 (cell replication)에 대한 효과를 알아보기 위하여 태생 3주된 쥐의 두정골의 organ culture와 섬유아 세포의 배양에서 DNA에 융합되는  $^3\text{H}$ -thymidine의 방사능 (radioactivity)측정을 통한 in vitro assay를 시행하였다. 이들에 따르면 골형성 단백질은 골막이 포함된 두정골과 섬유아 세포에서는  $^3\text{H}$ -thymidine의 방사능 흡수, 즉 DNA합성을 증가시키나 골막을 제거한 두정골의 배양에서는 증가시키지 않는다고 하였다. 즉 골형성 단백질은 골막에 존재하는 미분화 간엽세포나 섬유

아 세포의 DNA합성이나 세포증식은 증가시키지만 이미 분화된 세포인 골아세포의 증식이나 단백질 합성은 증가시키지 않는다고 주장하며 골형성 단백질의 작용세포는 골아세포가 아니라 골막에 존재하는 세포들이라고 하였다<sup>3)</sup>.

그러나 1978년 Centrella등은 Transforming growth factor  $\beta$ 의 골세포 증식과 교원질 생성에 미치는 영향에 대한 연구에서 TGF- $\beta$ 의 주된 작용세포는 골아세포라고 이야기 한 바 있으며 1989년 Wozney가 골형성 단백질 특히 BMP-2와 BMP-3가 TGF- $\beta$ 의 super gene family임을 입증한 이래 BMP는 TGF- $\beta$ 의 일 부임이 밝혀지고 있어, 골형성 단백질의 작용세포에 대하여는 이견이 있는 상태이다<sup>5,6,14)</sup>.

이에 저자들은 골의 organ 혹은 tissue culture가 아닌 골막이 배제된 골아세포만의 배양을 이용하여 골아세포에 대한 골형성 단백질의 효과를 알아보았으며 또한 기존의 확립된 세포주는 분열 원질성 효과를 파악하는데는 부적절하다고 판단하여 태생쥐의 두정골로부터 골아세포를 분리하여 일차배양하여 사용하였다<sup>7)</sup>. 또한 골형성 단백질의 효과를 가진 물질로는 피질골로부터 골형성 단백을 형성하는 과정중에 용해성의 비교원 단백을 (noncollagenous protein: NCP) 순차적으로 제거하여 얻어지는 bone matrix gelatin (BMG)을 사용하였는데 BMG는 비교적 다루기 쉽고 높은 골형성 단백질효과를 가진 비용해성의 물질로 10kg의 돼지 뼈로부터 1.4kg의 BMG를 얻을 수 있었다. 본 실험의 목적인 골아세포가 골형성 단백질의 작용세포인지를 알아보는데 골형성 단백질 대신 BMG를 사용하는데 있어서의 문제점은 BMG에 BMP 이외에도, 분화된 골세포에서 DNA합성을 증가시킨다고 알려진, bone derived growth factor (BDGF)가 들어 있어 BMP만의 효과가 아닌 BDGF의 효과가 나타날 수 있는 점이다. 그러나 Urist등에 따르면 BMG를 만들 때의 demineralization과 용해성 비교원단백 (NCP)을 제거하는 과정에서 BDGF는 모두 제거되므로 BMP가 BDGF로 오염될 가능성은 적다고 하였다<sup>12)</sup>.

Canalis등이 사용한 골의 배양보다 좀 더 세분된 골아세포의 일차배양을 이용한 저자들의 실험결과를 보면 BMG는 DNA에 융합되는  $^3\text{H}$ -thymidine방사능의 증가를 보여주어, BMG는 이미 분화된 골아세포에서도 DNA합성을 증가시키는 효과를 가지고 있다고 볼 수 있으며,

그 증가의 정도는 BMG의 양에 비례하여 증가하다가 30 ng/ml에서 peak response를 보이고 그 이후에는 약간 감소하며, 이로부터 BMP의 임상 적용시 가장 효과적인 적정량이 있으리라 유추할 수 있겠다.

골막세포에 대한 골형성 단백질의 효과를 알아보기 위하여 TGF- $\beta$ 의 효과 측정에 주로 사용되는 세포인 NRK 섬유아 세포에서 BMG에 의한  $^3\text{H}$ -thymidine의 흡수의 증가를 측정하였으며 그 결과는 일차배양 골아세포보다 좀 더 민감한 반응을 보여주었다. 1991년 Takuwa등은 MC3T3-E1세포에서 BMP-2가 20 ng/ml의 농도에서부터 alkaline phosphatase의 활성도를 증가시키며, BMP-2, 3는 교원질 합성을 증가시키나 BMP-2, 3, 4 어느것도 DNA 합성은 증가시키지 않는다고 이야기 하였다<sup>11)</sup>. 즉 MC3T3-E1세포는 BMP에 대하여 분열 원질성 효과를 보이지 않는다고 하였으나 저자들의 실험에서는 MC3T3-E1세포가 BMG에 반응하여 DNA 합성이 증가하였으며 그 정도는 일차배양 골아세포의 경우와 비슷하였으나 훨씬 적은 농도에서부터 반응하기 시작하였다.

## 결 론

1. 높은 골형성 단백질의 활성도를 가진, bone matrix gelatin은 미분화된 골막세포에서 뿐만 아니라 분화된 세포인 골아세포에서도 작용하여 DNA 합성이 증가되는 분열 원질성 효과를 보여주었다.

2. BMG에 대한 반응은 섬유아 세포에서 가장 민감하였으며 기존의 세포주인 MC3T3-E1 세포에서도 DNA 합성이 증가되었다.

## REFERENCES

- 1) 김기용, 이춘성, 이수호, 이재담, 김곤섭 : 골아세포의 일차배양. 대한정형외과학회지, 26 : 1860-1863, 1991.
- 2) Canalis, E. : Effect of growth factors on bone cell replication and differentiation. Clin. Orthop., 193 : 246-263, 1985.
- 3) Canalis, E., Centrella, M. and Urist, M.R. : Effect of partially purified bone morphogenetic protein on DNA synthesis and cell replication

in calvarial and fibroblast culture. Clin Orthop, 198 : 289 : 296, 1985.

- 4) Canalis, E., Peck, W.A. and Raisz, L.G. : Stimulation of DNA and collagen synthesis by autologous growth factor in cultured fetal rat calvariae. Science, Vol. 210 : 1021-1023, 1980.
- 5) Celeste, A.J. : Identification of transforming growth factor  $\beta$  family members present in bovine-inductive protein purified from bovine bone. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., Vol., 87 : 9843-9847, 1990.
- 6) Centrella, M., McCarthy, T.L. and Canalis, E. : Transforming growth factor  $\beta$  is a bifunctional regulator of replication and collagen synthesis in osteoblast-enriched cell cultures from fetal rat bone. The Journal of Biological Chemistry. Vol. 262, No. 6 : 2869, 1987.
- 7) Colowick, S.P. and Kaplan, N.O. : Methods in Enzymology. Vol. 145 : 303-334, Academic Press, 1987.
- 8) Goldring, M.B. and Goldring, S.R. : Skeletal tissue response to cytokines. Clin. Orthop., 258 : 245-278, 1990.
- 9) Lan Ko, B.M., et al. : Purification and chemical modification of porcine bone morphogenetic protein. Clin. Orthop., 256 : 229-237, 1990.
- 10) Okamoto, Y., et al. : Muscle tissue reactions to implantation of bone matrix gelatin. Clin. Orthop., 263 : 242-253, 1991.
- 11) Takuwa, Y., Ohse, C., Wang, E.A., Wozney, J.M. and Yamashita, K. : Bone morphogenetic protein-2 stimulates alkaline phosphatase activity and collagen synthesis in cultured osteoblastic cells, MC3T3-E1. Biochem-Biophys-Res-Commun., 174 : 96-101, 1991.
- 12) Urist, M.R., DeLange, R.J. and Finerman, G. A.M. : Bone cell differentiation and growth factors. Science, Vol. 220 : 680-686, 1983.
- 13) Wong, G.L. and Cohn, D.V. : Separation of parathyroid hormone and calcitonin-sensitive cells from non-responsive bone cells.
- 14) Wozney, J.M., et al. : Novel regulators of bone formation : Molecular clones and activities. Science, Vol. 242 : 1528-1534, 1988.