

MC3T3-E1 세포의 ALP activity에 대한 PDGF-BB의 영향

이경희* · 이재목* · 최병주** · 유현모*** · 서조영*

경북대학교 치과대학 치주과학교실*

경북대학교 치과대학 치과약리학교실**

경북대학교 치과대학 구강생화학교실***

I. 서론

치주 조직중의 하나인 골조직은 계속적인 흡수와 형성을 반복하는 동적인 조직으로서, 골조직의 성장과 개조는 조골세포, 파골세포 및 그 전구세포의 증식, 분화 및 활성화에 영향을 미치는 전신적 조절물질과 국소적 조절물질에 의해 조절되고 있다^{1, 2)}. 국소적 조절물질은 대부분이 성장인자로써 골기질에서 발견되고, 골세포에 의해 생성되며, autocrine 또는 paracrine action으로 그 조절기능을 나타내는 것으로 알려져 있으며, 골조직대사조절에 전신적 조절물질보다 더욱 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다²⁾. 성장인자에 대하여 Terranova와 Wikesjö³⁾는 세포의 성장, 형성 및 기능은 세포와 세포의 기질의 특이한 상호작용과 폴리펩타이드계 성장인자에 의해 조절된다고 보고함으로써 폴리펩타이드계 성장인자가 치주조직 치유에 중요한 역할을 할 수 있을 것이라고 시사한 바 있다. Graves 및 Cochran⁴⁾은 미분화된 중배엽세포의 분화에 관계하는 폴리펩타이드계 성장인자로써 혈소판 유래 성장인자(Platelet-derived growth factor, 이하 PDGF라 칭함), 변형성장인자(Transforming growth factor), 섬유아세포성

장인자(Fibroblast growth factor), 인슐린유사성장인자(Insulin-like growth factor), 상피성장인자(Epidermal growth factor)등이 있다고 보고하였으며, 이중 PDGF는 중배엽의 세포 즉 섬유아세포, 신경세포, 평활근세포, 골세포를 조절하는데 중요하다고 알려져 있다^{5, 6)}.

PDGF는 9.8의 isoelectric point와 30kDa의 분자량을 가지고 있는 조절성 단백질로써⁷⁾ 단종이량체(PDGF-AA, BB)와 이종이량체(PDGF-AB)로 존재함이 발견되었고⁸⁾ 유리되는 근원은 혈소판의 α -granule로 알려져 있다⁹⁾. 혈소판 이외에 단핵세포 및 대식세포¹⁰⁾, 섬유아세포¹¹⁾, 내피세포¹²⁾, 골기질¹³⁾ 등으로부터 분리된다고 밝혀졌다. PDGF A gene은 7번 염색체에 한정되어 위치하며, PDGF B gene과 아미노산 서열이 56% 동일하다¹⁴⁾. 동종이량체와 이종 이량체의 생물학적 활성은 동일하지만, PDGF BB가 PDGF AA나 AB보다 더 강력한 활성을 보인다고 보고된 바 있다¹⁵⁾. PDGF는 생쥐와 인간의 섬유아세포¹⁶⁾, 동맥 평활근 세포¹⁷⁾, 활액세포와 골신경교세포 등의 다양한 간엽세포의 증식을 자극하며^{15, 16)}, 이들 세포의 화학주성인자로 작용하고, 단백질 합성을 증가시키며, 세포막과 연관된 인지질, 콜레스테롤 에스터, 프로스타글란딘 등

의 복합체 합성도 자극한다고 알려져 있다¹⁸⁾. 또한, 배양된 섬유아세포 계열을 PDGF에 먼저 노출시키면 EGF에 의한 세포분열효과를 10배정도 증가시키는 등 다른 성장인자의 효과를 조절한다고 알려져 있다¹⁹⁾.

Cho 등²⁰⁾의 연구에 따르면 치주인대 섬유아세포에 PDGF와 IGF를 동시에 적용한 경우, 세포 증식에 상승효과를 일으킨다고 보고하였으며, Lynch 등²¹⁾은 돼지의 피부에 acute injury를 형성한 경우 상피세포에서는 PDGF와 수용기의 mRNA가 증가하였고, 결합조직에서는 PDGF mRNA가 발현된다고 보고하였으며, Cho 등²²⁾은 beagle dog의 3등급의 분지부 병소에 PDGF-BB를 처리한 후 e-PTFE membrane으로 조직유도재생술을 시행한 경우 완전한 치주조직재생 및 치조골의 형성이 일어났다고 보고하였다.

PDGF의 골세포에 대한 영향을 살펴보면, in vitro 실험에서 Centrella 등은 PDGF가 생체 두개골에서와 쥐에서 추출된 골아세포에서 골세포 복제와 DNA 합성을 자극하는 것으로 보아 PDGF의 골에서의 일차적 효과는 증식능과 연관된 것으로 보인다고 보고한 바 있으며²³⁾, 세포복제에 대한 영향의 결과 PDGF는 교원성 단백질을 합성하는 세포수를 증가시키나, cellular basis에서 볼 때, PDGF는 교원성 단백질의 합성을 직접적으로 증가시키지는 않으며, 골아세포의 교원성 단백질 생산을 어느정도 억제하는 효과를 갖는다고 보고하였다²⁴⁾. 이와 일치하는 것으로 Cochran 등은 PDGF가 신생쥐의 두개골에서 골기질의 축적속도를 억제한다고 보고하였다²⁵⁾. 그 외에도 Hock 및 Canalis²⁶⁾와 Cochran 등²⁵⁾은 PDGF는 interstitial collagenase의 증가에 의해 교원성 단백질의 분해를 증가시킨다고 보고하였다.

Centrella와 McCarthy 등²⁷⁾은 백서의 태내 두개관에서 배양한 조골세포에 PDGF를 적용한 경우 DNA, 교원질 및 비교원성 단백질의

합성이 증가한다고 보고하였으며, in vitro에서의 실험에서 Lynch 등²⁸⁾은 PDGF-BB를 쥐에 전신적으로 투여한 경우 골밀도 및 골격의 강도가 증가했다고 보고하였고, Andrew 등²⁹⁾과 Walther 등³⁰⁾은 정상적인 골질의 치유과정에서 PDGF가 발현되며 시험관적 실험에서도 PDGF가 중요한 조절인자라고 보고하였다.

여러 연구에도 불구하고 PDGF의 mineralization과 ALP 활성도에 미치는 효과에 대해 논란이 많아, 이에 본 실험에서는 골형성 세포 계열중 하나인 MC3T3-E1세포에 PDGF-BB를 농도별로 주입해서 bone nodule의 형성능과 골형성 세포로의 분화능에 대한 표지인자로 알려진 알칼린 인산 효소 활성도(이하 ALP활성도라 표기)에 대한 영향을 알아봄으로써 혈소관 유래 성장인자가 치주조직재생에 중요한 골세포의 분화에 미치는 영향을 알아보려고 한다.

II. 재료 및 방법

1. 재료(시약)

배양액은 alpha-modified eagle medium (Gibco사, 미국, 이하 α -MEM으로 표기)을 사용하였고, fetal bovine serum (Gibco사, 미국, 이하 FBS로 표기)을 성장 촉진제로 추가하였으며, 그외 β -glycerophosphate, ascorbic acid(Sigma, 미국), 유전자재조합형 PDGF-BB(Genzyme사, 미국)을 사용하였다.

2. 골아세포의 배양

MC3T3-E1세포를 취득하여 12 well plate에 1×10^5 cells/well, 24 well plate에 1×10^4 cells/well로 10% fetal bovine serum, 10mM β -glycerophosphate, 50 μ g/ml의 아스코빅 산, 100U/ml penicilline, 100 μ g/ml streptomycin을 함유한 α -MEM배양액에서 초기배양하여 37

℃, 5% CO₂ 함유 배양기에서 유지하였다. 10% fetal bovine serum에서 계속 배양한 군을 대조군-1로 하였고, PDGF-BB를 주입하기 48시간전에 성장인자의 최대의 효과를 위해 serum free media로 교체한 군을 대조군-2로 하였으며, serum free media로 교체하고 24시간 경과후 0.1, 1, 10ng/ml의 PDGF를 첨가한 군을 실험군으로 하여 3일 간격으로 배양액을 교체하였다.

3. Histochemical analysis

Bone nodule의 형성을 관찰하기 위해서 세포를 30일동안 100mm dish에서 배양하고, 칼슘 침착을 식별하기 위해서 세포를 ice-cold PBS로 2번 씻은 후 실온에서 1시간동안 0.1% Alizarin Red S 용액에서 배양하였고 세포를 30분동안 0.1% light green SF solution으로 염색하여 세포를 순차적으로 0.1% acetic acid와 absolute ethanol로 씻은 후 3, 7, 14, 21, 28일째에 광학현미경으로 관찰하였다.

4. alkaline phosphatase(ALP) 활성도 측정

세포를 24 well plate에 접종하고 앞서 설명한 대로 배양하여 0.1, 1, 10ng/ml의 PDGF를 첨가하여 3일 간격으로 배양액을 교체해 주면서 3일, 7일, 14일, 21일, 28일에 ALP 활성을 p-nitrophenyl phosphate(Sigma, USA)를 기질로 이용한 방법으로 아래와 같이 측정하였다. 부착된 세포를 인산완충식염수(phosphate buffered saline, 이하 PBS)로 2회 씻어내고 0.02%의 Nonidet P-40(Sigma) 1ml에 녹인 후 ultrasonicator에서 15초간 sonication시켜 (Fischer, Rockville, MD) 12,000 g에서 15분간 원심분리하였다. 효소활성을 측정하기 전에 상층액을 -20℃에 두고 37℃에서 30분간 cell digestion buffer(1.5M Tris-HCL, 1mM ZnCl₂, 1mM MgCl₂ · 6H₂O, pH 9.2,

containing 1% Triton X-100)로 처리하며 7mM p-nitrophenyl phosphate (Sigma, USA)를 기질로써 이용하여 410nm에서 흡수도를 측정하였다. 단백질 농도는 BCA protein assay reagent(Pierce, USA)를 사용하여 측정하며, bovine serum albumin을 standard로 하였고, ALP활성도는 nmole/min/mg of protein으로 나타내었다. 대조군과 실험군의 통계학적 처리는 student t-test로 시행하였다.

III. 결과

1. Bone nodule의 형성

Bone nodule의 형성은 대조군과 모든 실험군에서 3, 7, 14일째에는 전혀 관찰할 수 없었으며, 21일째에 관찰되기 시작하여 대조군은 28일째에도 별 변화가 없었으며, 모든 실험군에서 28일째에 대조군보다 많은 bone nodule 형성이 관찰되었다.

2. 시간의 경과에 따른 MC3T3-E1 세포의 ALP 활성에 대한 PDGF-BB의 영향

시간의 경과에 따른 MC3T3-E1 세포의 ALP 활성은 대조군-1, 대조군-2에서는 3일군, 7일군까지 증가하다가 14일, 21일, 28일에서 감소하는 것으로 나타났고, PDGF 0, 1, 1, 10 ng/ml 적용군에서는 3일, 7일, 14일까지 시간경과에 따라 증가하다가 21일, 28일군에서 점차 감소하는 것으로 나타났다.

MC3T3-E1 세포의 ALP 활성도를 nmole/min/mg of protein으로 나타내었을 때 PDGF-BB의 영향은 대조군-1에서 3일군의 2.13 ± 0.43 에 비해 7일군에서 3.44 ± 0.09 로 증가하다가 14일군에서 2.97 ± 0.34 , 21일 1.87 ± 0.33 , 28일군에서 1.57 ± 0.04 으로 점차 감소하였으나 7일군에서만 3일군에 비해 통계학적으로 유의성을 보였다($P < 0.05$).

대조군-2의 경우 3일군의 3.76 ± 0.61 에 비해 7일군에서 9.80 ± 2.12 으로 증가하였고 14일군에서 5.07 ± 1.06 으로 감소하였으나 대조군-1보다는 높은 ALP활성도를 보였고 21일군에서 2.07 ± 0.05 , 28일군에서 1.80 ± 0.11 로 나타나 모든 군에서 3일군에 비해 통계학적 유의성이 있는 감소양상을 보였다($P < 0.05$).

PDGF 0.1ng/ml 적용군에서 3일군의 1.63 ± 0.87 에 비해 7일군에서 4.42 ± 0.21 , 14일군에서 4.79 ± 0.33 으로 증가양상을 나타내어 3일군에 비해 통계학적 유의성을 보였고, 21일군은 2.30 ± 0.05 , 28일 1.73 ± 0.15 로 감소하였으나 통계학적 유의성은 없었다($P < 0.05$). PDGF 1 ng/ml 적용군에서 3일군의 0.86 ± 0.15 에 비해 7일군에서 2.79 ± 0.14 , 14일군에서 3.31 ± 1.01 로 증가하였고, 21일군은 0.79 ± 0.05 , 28일군은 0.65 ± 0.01 로 감소하였으며 모든 군에서 3일군에 비해 통계학적 유의성을 보였다. ($P < 0.05$, $P < 0.01$) PDGF 10 ng/ml 적용군에서 3일군의 0.60 ± 0.03 에 비해 7일군에서 2.01 ± 0.17 , 14일군에서 2.13 ± 0.14 로 증가하다가 21일군에서

1.72 ± 0.04 , 28일군에서 1.42 ± 0.07 로 감소하였으며 모든 군에서 3일군에 비해 통계학적으로 유의한 차이를 보였다($P < 0.01$)(표 1, 그림 1 참조).

3. PDGF-BB의 농도에 따른 MC3T3-E1세포의 ALP 활성에 대한 비교

대조군-1과 비교시 3일군에서는 PDGF-BB에 대해 농도의존적으로 ALP 활성이 감소, 7일, 14일군에서는 PDGF-BB 0.1 ng/ml 적용군에서는 증가, 1, 10 ng/ml에서는 감소했고 21일, 28일군에서는 0.1ng/ml 군에서는 증가, 1 ng/ml 적용군에서는 감소, 10ng/ml 적용군에서는 다시 증가하는 것으로 나타났다. 대조군-2와 비교시 21일군의 PDGF 0.1 ng/ml 적용군, 28일군의 PDGF 10ng/ml 적용군을 제외한 모든 군에서 PDGF-BB의 농도에 대해 농도의존적으로 ALP 활성이 감소되었다.

3일군에서 대조군-1, 대조군-2 와 비교시 PDGF-BB의 농도가 증가함에 따라 ALP 활

표 1 Time and Dose-response effect of Platelet-Derived growth factor-BB on Alkaline Phosphatase activity by MC3T3-E1 cells cultured for 3, 7, 14, 21, 28 days

| Conc.(ng/ml) | 3 day | 7 day | 14 day | 21 day | 28 day |
|--------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| Cont.-1 | 2.13 ± 0.43 | 3.44 ± 0.09 | 2.97 ± 0.34 | 1.87 ± 0.33 | 1.57 ± 0.04 |
| Cont.-2 | 3.76 ± 0.61 | 9.80 ± 2.12 | 5.07 ± 1.06 | 2.07 ± 0.05 | 1.80 ± 0.11 |
| PDGF-0.1 | 1.63 ± 0.87 | $4.42 \pm 0.21^{\#}$ | $4.79 \pm 0.33^{**}$ | 2.30 ± 0.05 | 1.73 ± 0.15 |
| PDGF-1 | $0.86 \pm 0.29^{\#}$ | $2.79 \pm 0.14^{**}$ | 3.31 ± 1.01 | $0.79 \pm 0.05^{\#}$ | $0.65 \pm 0.01^{**}$ |
| PDGF-10 | $0.60 \pm 0.03^{\#}$ | $2.01 \pm 0.17^{**}$ | $2.13 \pm 0.14^{\#}$ | 1.72 ± 0.04 | 1.42 ± 0.07 |

MC3T3-E1 cells were seeded at 1×10^4 cells/ml in alpha-minimum essential medium containing 10% fetal bovine serum, 10 mM β -glycerophosphate and 50 μ g/ml of ascorbic acid. Before 48 hours of indicated time, medium were changed with serum free medium containing 10 mM β -glycerophosphate and 50 μ g/ml of ascorbic acid. After 24 hours, indicated amounts of platelet derived growth factor were added. Alkaline phosphatase activity were measured as described in materials and methods. Each value represents the mean and S.D. of three determinants.

* : significantly different from control-1 value in Dose response effect ($P < 0.05$)

** : significantly different from control-1 value in Dose response effect ($P < 0.01$)

: significantly different from control-2 value in Dose response effect ($P < 0.05$)

: significantly different from control-2 value in Dose response effect ($P < 0.01$)

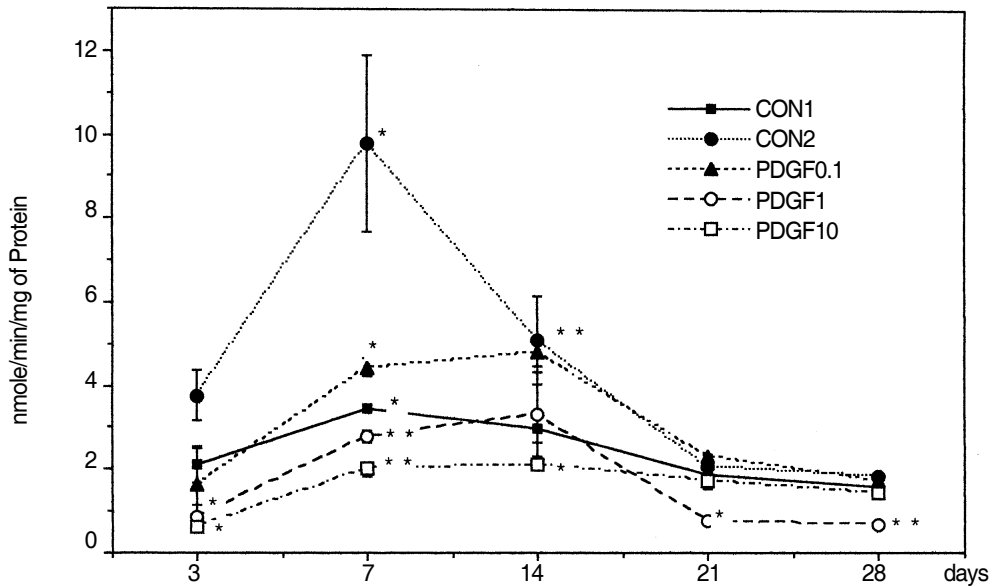


그림 1 Time-response effect of 0.1, 1, 10 ng/ml of Platelet-Derived Growth factor on alkaline phosphatase activity by MC3T3-E1 cells cultured for 3, 7, 14, 21, 28 days.

* : significantly different from the value of Day 3 group ($P < 0.05$)

** : significantly different from the value of Day 3 group ($P < 0.01$)

성은 농도의존적으로 감소하였는데 대조군-1의 2.13 ± 0.43 과 비교시 PDGF 0.1 ng/ml 적용군은 1.63 ± 0.87 로써 ALP활성의 미약한 감소를 보였으나 통계학적 유의성은 없었고, 1ng/ml 적용군의 0.86 ± 0.29 와 10ng/ml 적용군의 0.60 ± 0.03 에서는 대조군-1에 비해 통계적으로 유의성있는 감소를 보였다($P < 0.05$). 대조군-2와 비교시 0.1ng/ml의 1.63 ± 0.87 , 1ng/ml의 0.86 ± 0.29 , 10 ng/ml 적용군의 0.60 ± 0.03 모두에서 통계적으로 대조군-2의 3.76 ± 0.61 에 비해 유의성있는 감소를 보였다($P < 0.05$, $P < 0.01$).

7일군에서 대조군-1의 3.44 ± 0.09 에 비교시 PDGF 0.1ng/ml 적용군에서 4.42 ± 0.21 로 ALP 활성도가 증가했다가, 1ng/ml적용군에서는 2.79 ± 0.14 , 10ng/ml 적용군에서 2.01 ± 0.17 로 나타나 농도의존적으로 감소하였으며 모든 군에서 대조군-1에 비해 통계학적 유의성을 보였고 대조군-2의 9.80 ± 2.12 와 비교시

PDGF 0.1, 1, 10 ng/ml 적용군 모두에서 대조군-2에 비해 통계학적으로 유의성있는 농도의존적인 감소를 보였다($P < 0.05$, $P < 0.01$).

14일군에서 대조군-1의 2.97 ± 0.34 에 비해 PDGF 0.1ng/ml적용군에서 4.79 ± 0.33 로 ALP 활성도가 증가했다가 1ng/ml 적용군에서는 3.31 ± 1.01 로 감소했으나 여전히 대조군-1에 비해서는 높은 수치를 보였으며 10ng/ml 적용군에서는 2.13 ± 0.14 로써 대조군-1보다 더 낮은 수치로 감소했으며 1ng/ml 적용군을 제외한 군에서 통계학적 유의성을 보였다. ($P < 0.05$, $P < 0.01$) 대조군-2의 5.07 ± 1.06 과 비교시 PDGF의 농도증가에 대해 ALP 활성도는 농도의존적으로 감소하였는데 PDGF 10ng/ml 적용군에서만 통계학적으로 유의성있는 감소를 보였다($P < 0.05$).

21일군에서 대조군-1의 1.87 ± 0.33 에 비해 PDGF 0.1 ng/ml 적용군에서 2.30 ± 0.05 로써 ALP 활성도가 증가했다가 1 ng/ml 적용군에

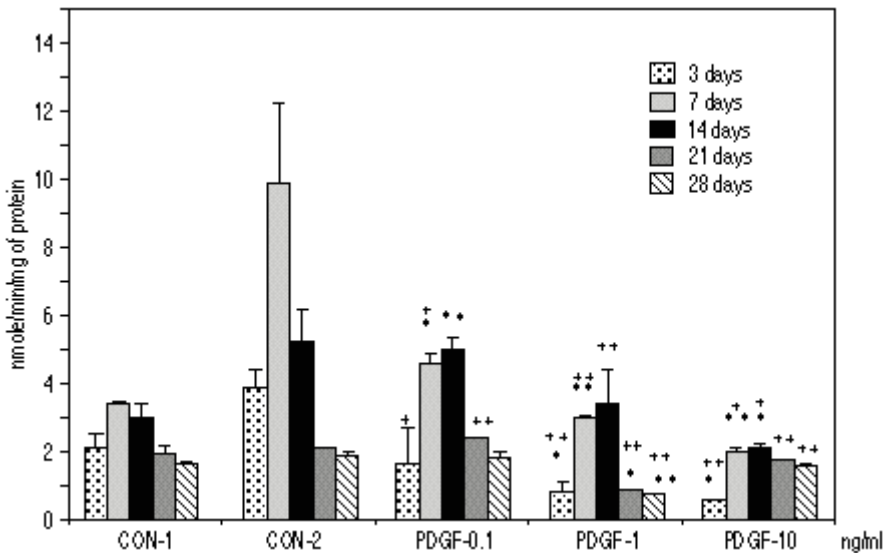


그림 2 Dose-response effect of 0.1, 1, 10 ng/ml of Platelet-Derived Growth factor on alkaline phosphatase activity by MC3T3-E1 cells cultured for 3, 7, 14, 21, 28 days.

* : significantly different from control-1 value in Dose response effect ($P < 0.05$)

** : significantly different from control-1 value in Dose response effect ($P < 0.01$)

+ : significantly different from control-2 value in Dose response effect ($P < 0.05$)

++ : significantly different from control-2 value in Dose response effect ($P < 0.01$)

서 0.79 ± 0.05 로 감소하고, 10 ng/ml 적용군에서 1.72 ± 0.04 로 다시 증가하였으나 대조군에 비해서는 더 낮은 활성도를 보였고 1 ng/ml 적용군에서만 통계학적 유의성이 있는 감소를 보였다($P < 0.05$). 대조군-2의 2.07 ± 0.05 와 비교시 PDGF 0.1 ng/ml 적용군에서 ALP 활성도가 증가했다가 1 ng/ml 적용군에서 감소하였으며, 10 ng/ml 적용군에서 다시 증가하지만 대조군에 비해서는 더 낮은 활성도를 보였고 모든 군에서 통계학적 유의성이 있었다($P < 0.01$).

28일군에서는 대조군-1의 1.57 ± 0.04 에 비해 PDGF 0.1 ng/ml 적용군에서 1.73 ± 0.15 으로 ALP 활성도가 증가하다가 1 ng/ml 적용군에서 0.65 ± 0.01 로 감소하여, 10 ng/ml 적용군에서 1.42 ± 0.07 으로 다시 증가하였으나 대조군에 비해서는 여전히 낮은 활성도를 보였고 1 ng/ml 적용군에서만 통계학적으로 유의성이

는 감소를 보였다. 대조군-2의 1.80 ± 0.11 과 비교시 PDGF 0.1 ng/ml 적용군과 1 ng/ml 적용군에서 적용농도에 대해 ALP 활성도가 농도의존적으로 감소하다가 10 ng/ml 적용군에서 약간 증가하지만 대조군-2에 비해서는 여전히 낮은 활성도를 보였으며 0.1 ng/ml 적용군을 제외한 모든 군에서 통계학적 유의성을 보였다($P < 0.01$)(표 1, 그림 2 참조).

III. 총괄 및 고찰

치주조직재생에 관여하는 치주조직은 치은, 치주 인대, 치근 백악질과 치조골로 되어 있으며¹⁾, 이 중 골조직의 재형성은 골흡수와 골형성의 복합된 과정으로 일어나고, 이러한 활동은 골기질과 연관되어 골흡수동안 분비되는 polypeptide계 성장인자의 영향을 받게 된다^{34, 35)}. 여러가지 호르몬과 PDGF와 EGF갈

은 전신적, 국소적 성장인자는 in vivo와 in vitro에서의 연구에서 골성장에 영향을 끼치는 것으로 알려져 있다^{36, 37)}. 이러한 성장인자 가운데 PDGF는 골세포 배양에서 세포의 복제와 분화기능을 조절하는 것으로 알려져 있다^{38, 39)}.

PDGF의 골세포에 대한 영향으로 Canalis 등³⁵⁾은 PDGF-AA 또는 -BB 0.3-3.3nM로 골세포를 처리한 경우 PDGF-A mRNA가 그 양과 비례해서 증가하는 양상을 보였다고 보고하였고, Hanks 등⁴⁰⁾은 배양한 쥐의 두개골 세포에 PDGF를 적용한 실험에서 새로운 단백질의 형성이 자극되는 것으로 보아 상해부위에서 혈관박으로 나온 혈액내에 존재하는 PDGF가 정상적인 골막하에서 골의 축적을 자극할 수 있다고 보고하였으며, Centrella 등¹⁵⁾은 PDGF-BB를 태생쥐의 parietal bone에서 채취한 골아세포에 적용시 핵산, 교원성 단백질 및 비교원성 단백질의 합성을 증가시킴을 보고하였다.

Pfeilschifter 등⁴¹⁾은 태생쥐의 두개골을 PDGF로 처리한 경우 골아유사세포의 증식을 증가시킴으로써 간접적으로 교원성 단백질의 합성을 증가시키는 효과를 가져오지만, 교원성 단백질의 분해에 대해서는 직접적인 자극 효과를 가진다고 보고하였다. Canalis 등³⁸⁾의 연구에서 PDGF는 골기질의 형성을 증가시키지 않는 것으로 보고되었고, Centrella 등¹⁵⁾의 연구에서는 태생기 쥐의 골에서 채취한 골아세포에 3nM PDGF-BB, -AB 적용시 알칼린 인산효소활성도가 대조군에 비해 현저히 감소하였으나, PDGF-AA에 의한 감소는 통계상 유의성이 없는 것으로 나타났다.

이처럼 PDGF의 골조직에 대한 영향은 여러 연구에서 다소 상반된 견해를 보이고 있어, 본 연구에서는 PDGF-BB의 적용이 골세포의 분화에 미치는 영향을 알아보기로 다양한 적용농도와 적용시간에 따른 MC3T3-E1 세포의 ALP활성도와 bone nodule의 형성을

관찰해 보고자 하였다.

본 연구에서 MC3T3-E1 세포에 대한 PDGF-BB의 영향을 알아보기 위해 농도별, 시간경과에 따른 골결절 형성을 측정해 본 결과 MC3T3-E1 세포는 대조군과 실험군에서 공히 21일경에 골결절의 형성을 보였으며, 28일경에는 대조군보다 실험군에서 현저히 많은 bone nodule의 형성을 보였다. 이러한 실험결과를 PDGF를 첨가하지 않은 신생쥐의 두개골에서 추출한 MC3T3-E1세포에서 21일경에 bone nodule의 형성이 관찰되었다는 Hiroko Sudo 등의 보고와⁴²⁾ 일치하였고, 동일한 세포의 배양시 16일경부터 bone nodule이 관찰되었으며 그 후 30일경까지 시간의 경과에 따라 nodule의 수와 크기가 차츰 증가했다는 최 등⁴³⁾의 보고와는 약간 다른 양상을 보이고 있다.

ALP는 칼슘과 인 대사에서 관여하는 효소로서 정확한 기능은 알려져있지 않지만 Robinson 등⁴⁴⁾은 유기인산 기질에서 무기인산을 분리해 낼 수 있는 효소라고 보고하였으며, Siffert³¹⁾는 골형성 이전의 세포대사와 칼슘과 인 이온이 결정화되기 이전의 골기질 형성에 주로 관여한다고 보고하였고, Stein 등⁴⁵⁾은 골세포의 표지인자로서 ALP활성도를 측정해 보아야 하며 높은 ALP활성도는 골세포 분화의 표지인자라고 보고하였다.

본 실험에서 시간 경과에 따른 ALP활성도를 측정하였던 바 대조군에서는 공히 7일째까지 ALP활성도가 증가하다가 그 이후 감소하는 양상을 보였으며, 실험군에서는 0.1, 1, 10ng/ml 투여군 모두에서 14일째까지 증가하다가 그 후 낮은 활성도를 보였다. 이는 오 등⁴⁶⁾의 연구에서 7일째보다 14일째에 높은 ALP활성도를 나타낸 것과 서 등⁴⁷⁾과 Nojima 등⁴⁸⁾의 연구에서 치주인대세포의 ALP활성도가 시간이 경과함에 따라 증가했다는 결과와 일치한다고 볼 수 있으며, MC3T3-E1 세포의 ALP활성도는 처음 며칠동안 증가하여

10일경에 최고치에 도달하였으며, 그 후에는 차츰 감소하였으나 처음 4일째보다는 높은 수치를 유지하였다는 최 등⁴²⁾의 연구와도 일치한다. 이로 보아 ALP활성도는 osteocalcin의 발현과 bone nodule 형성전에 최고치를 나타냄을 알 수 있다. 본 실험에서 실험군이 대조군보다 ALP활성도의 최고치가 늦게 나타난 결과는 PDGF-BB의 영향에 의해 골세포 분화 초기에 그 활성의 발현이 억제된 결과로 사료되는데, PDGF-BB가 단순히 ALP활성만을 지연시킨 결과인지 다른 성장인자나 다른 골기질 단백질에 영향을 미친 결과인지에 대해서는 본 실험에서는 알 수 없었다.

대조군-2와 비교시 PDGF-BB의 농도에 따른 영향은 농도가 증가함에 따라 ALP활성도가 감소하는 결과를 보이며, 이것은 Centrella³⁶⁾ 등이 태생기 쥐의 골에서 채취한 골아세포에 3nM의 PDGF-BB, -AB를 적용한 경우 알칼린인산효소활성도가 대조군에 비해 현저히 감소하였다는 보고와 일치하며, 그 원인으로서는 Canalis 등⁴⁹⁾이 PDGF-BB를 배양한 쥐의 골세포에 투여한 경우 Insulin-like growth factor의 합성을 억제시킨 결과와 유사하게 PDGF가 골아세포에 작용하는 다른 다양한 성장인자의 효과를 조절하기 때문인 것으로 사료된다. 본 실험에서 PDGF-BB를 투여한 군에서 ALP활성도는 14일째에 최고치를 나타내고 그 이후 차츰 감소하는 양상을 보였으며, bone nodule의 형성은 21일째부터 나타나며 그 이후 증가하는 양상을 보이는 것으로 보아 ALP활성은 bone nodule 형성의 초기에만 관여하는 것으로 사료된다.

이러한 PDGF-BB의 영향은 다른 골기질 단백질이나 성장인자에 직접적으로 영향을 끼치거나 PDGF-BB에 영향을 받은 ALP가 다른 성장인자나 골기질 단백질에 영향을 끼친 결과로 사료되며, 본 실험에서 PDGF-BB의 골세포에 대한 효과를 토대로, 다른 성장인자와 병용시 골세포의 분화와 증식에 대한

효과와 다양한 골기질 단백질 발현에 대한 연구가 더 필요하리라고 사료된다.

IV. 결론

치주조직의 재생을 위해서는 골조직의 재생이 필수적이라 할 수 있으며, 본 연구에서는 골세포에 대한 성장인자의 영향을 관찰하였다. 중배엽세포를 조절하는 성장인자 중의 하나인 혈소판유래성장인자(Platelet-Derived Growth Factor, 이하 PDGF-AA, BB로 표기)는 폴리펩타이드계 성장인자로서 골조직을 포함한 다양한 세포들에 대해 증식, 이주 및 기질합성에 촉진효과가 있다고 밝혀지고 있어, 본 연구에서는 배양된 MC3T3-E1 cell에 혈소판유래성장인자를 농도별로 주입해서 골결절 형성능과 골형성세포로의 분화에 대한 표식인자로 알칼린인산효소활성도를 알아봄으로써 혈소판유래성장인자가 골아유사세포의 분화에 미치는 영향을 규명하고자 본 실험을 시행하였다.

PDGF를 주입시키지 않은 군을 대조군으로 하고, PDGF를 각각 0.1, 1, 10ng/ml로 주입시킨 군을 실험군으로하여 3, 7, 14, 21, 28일째에 골결절 형성과 알칼린인산효소활성도를 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 골결절 형성은 대조군과 모든 실험군에서 ALP활성도가 최고치 이후 21일째에 관찰되었고, 28일째는 모든 실험군에서 대조군보다 많은 골결절 형성이 관찰되었다.
2. 대조군-1과 비교시 PDGF 0.1ng/ml군에서는 ALP활성도가 증가양상을 보였으며, 1, 10ng/ml군에서는 감소되는 양상을 보였고($p < 0.05$, $p < 0.01$), 대조군-2와 비교시 PDGF 0.1ng/ml, 21일째를 제외한 모든 실험군에서 ALP 활성도가 감소되는 양상을 나타내었다($p < 0.05$, $p < 0.01$).

3. 시간 경과에 따른 효과에서 모든 실험군에서 14일째까지 현저한 ALP 활성도 증가를 보였으며 이후 감소하는 양상을 보였고($p < 0.05$, $p < 0.01$), 농도변화에 따른 효과에서 PDGF의 농도가 증가할수록 14일까지 ALP 활성도가 감소하다가 21일 이후 1ng/ml에서 가장 낮게 나타났으며, 대조군은 7일째, 실험군은 0.1ng/ml군의 14일째 ALP 활성도가 가장 높게 나타났다.

V. 참고문헌

1. 서조영 외 17인 : 치주과학 지영문화사, pp6-59, 1992.
2. Maghji, S.: Bone remodeling, Br. Dent. J., 172 : 235-242, 1992
3. Terranova, V. P. and Wikesjo, U. M. E. : Extracellular matrices and polypeptide growth factors as mediators of functions of cell of the periodontium, J. Periodontol., 58 : 371-380, 1987.
4. Graves, D. T. and Cochran, D. L. : Mesenchymal cell growth factors, Crit. Rev. Oral Biol. Med., 1 : 17-36, 1990.
5. Ross, R., Raines, E. W. and Bowen-Popo, F. : The biology of platelet-derived growth factor, Cell, 46 : 155-169, 1986.
6. Stiles, C. D., Capone, G. T., Scher, C. D., Antoniades, H. N., Van Wyk, J. J., & Pledger, W. J. : The molecular biology of platelet-derived growth factor, Cell, 33 : 653-659, 1983.
7. Heldin, C. H., Backstrom, G. and Ostman, A. : Binding of different dimeric forms of PDGF to human fibroblast evidence for two separate receptor type, EMBO J., 7 : 1387-1393, 1988.
8. Hammacher, A., Hellman, U. and Johnsson, A. : A major part of PDGF purified from human platelet is a heterodimer of one A and one B chain, J. Biol. Chem., 263 : 16493-16498, 1988.
9. Hawiger, J. : Platelet secretory pathway: An overview. Method. Enzyme., 169:191-195, 1989
10. Rapploee, D. A., Mark, D. and Banda, M. J. : Wound macrophages express TGF-alpha and other growth factors in vivo: Analysis of mRNA phenotype, Science, 241: 707-712, 1988
11. Antoniades, H. N., Galanopoulos, T. and Neville-Golden, T. : Injury induces in vivo expression of platelet-derived growth factor(PDGF) and PDGF receptor mRNAs in skin epithelial cells and PDGF mRNA in connective tissue fibroblast, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 88: 565-569, 1991
12. Sitarus, N. M., Sariban, E. and pantagis, P.: Human iliac artery endothelial cells express both genes encoding the chains of platelet-derived growth factor(PDGF) and synthesize PDGF-like mitogen, J. Cell. Physiol., 132: 376-380, 1987
13. Hauschka, P.C., Mavrakos, A. E., lafrati, M. D., Doleman, S. E. and klagsbrun, M. : Growth factors in bone matrix, J. Biol. Chem., 261: 12665-12674, 1986
14. Betsholtz, C., Johnson, A., Heldin, C. H., Westmark, B., Lind, P., Urdea, M. S., Eddy, R., Shows, T. B., Philpott, K., Mellor, A. L., Knott, T. J. & Scott, J. : cDNA sequence and chromosomal localization of human platelet-derived growth factor a-chain and its expression

- in tumor cell lines, *Nature*, 320 : 695-699, 1986.
15. Centrella, M., McCarthy, T. L., Kusmik, W. F. & Canalis, E. : Relative binding and biochemical effects of heterodimeric and homodimeric isoforms of platelet-derived growth factor in osteoblast-enriched cultures from fetal rat bone, *J. Cell. Physiol.*, 147 : 420-426, 1991.
 16. Kohler, N. & Lipton, A : Platelets as a source of fibroblast growth-promoting activity, *Exp. Cell Res.*, 87 : 297, 1974
 17. Ross, R., Glomset, J. A., Kariya, B. & Harker, L. : Platelet dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 71 : 1207, 1974
 18. Antoniades, H. N., Pantazis, P. & Owen, A. E. : Platelet-derived growth factor and malignant transformation, *Biochem. Pharm.*, 33 : 2823, 1984
 19. Lynch, S. E., Nixon, J. C., Colvin, R. B. & Antoniades, H. N. : Role of platelet-derived growth factor in wound healing : Synergistic effects with other growth factors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84 : 7696-7700, 1987.
 20. N. Matsuda, W-L. Lin, N. M. Kumar, M. I. Cho, & R. J. Genco. : Mitogenic, chemotactic and synthetic responses of rat periodontal ligament fibroblastic cells to polypeptide growth factors in vitro, *J. Periodontol.*, 63: 515-525, 1992
 21. Lynch SE, Ruiz de Castilla G, Williams RC : Injury induces in vivo expression of PDGF and PDGF receptor mRNAs in skin epithelial cells and PDGF mRNA in connective tissue fibroblasts, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 88: 565-569, 1991
 22. Moon-Il Cho, Wen-Lang Lin, & Robert J. Genco : PDGF-modulated guided tissue regenerative therapy, *J. Periodontol.*, 66: 522-530, 1995
 23. Centrella, M., McCarthy, TL., and Canalis, E. : Platelet-derived growth factor enhances deoxyribonucleic acid and collagen synthesis in osteoblast-enriched cultures from fetal rat parietal bone, *Endocrinology*, 125 : 13-19, 1989.
 24. Canalis, E., McCarthy, T., Centrella, M. : Effects of platelet-derived growth factor on bone formation in vitro, *J. Cell. Physiol.*, 140 : 530-537, 1989
 25. Cochran, D. L., Rouse, C. A., Lynch, S. E. & Graves, D. T. : Effects of platelet-derived growth factor isoforms on calcium release from neonatal mouse calvariae, *Bone*, 14 : 53-58, 1993.
 26. Hock, J. M. and Canalis, E. : Platelet-derived growth factor enhances bone cell replication, but not differentiated function of osteoblasts, *Endocrinology*, 134 : 1423-1428, 1994.
 27. Centrella, M., McCarthy, T. L., Kusmik, W. F., & Canalis, E. : Relative binding and biochemical effects of heterodimeric and homodimeric isoforms of PDGF in osteoblast-enriched cultures from fetal rat bone, *J. of Cell. Physiol.*, 147: 420-426, 1991
 28. Lynch et al. : The effect of systemically administered PDGF-BB on the rodent skeleton, *J. Bone Mineral. Res.*, 11: 238-247, 1996
 29. Andrew, J. G., Hoyland, J. A., Freemont, A. J. & Marsh, D. R. :

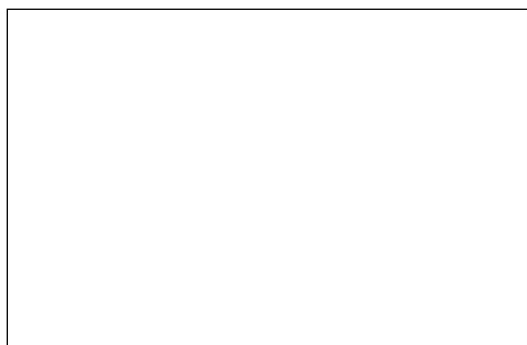
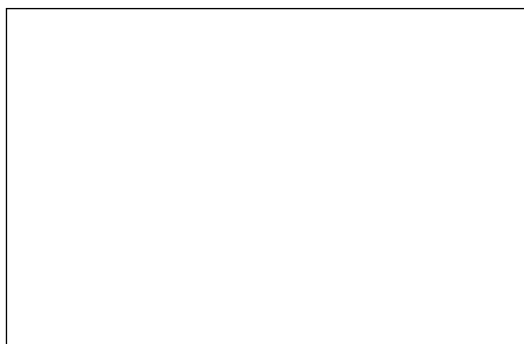
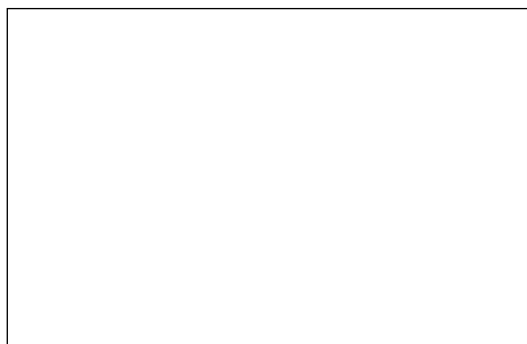
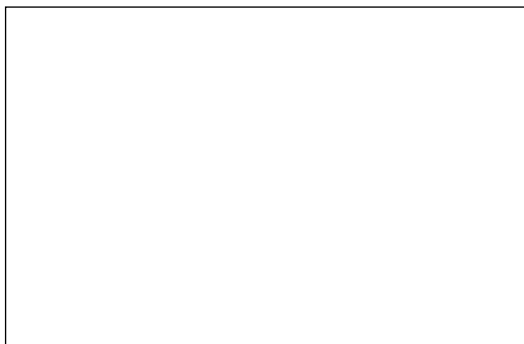
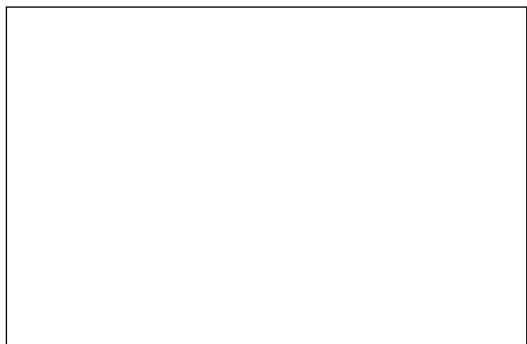
- PDGF expression in normally healing human fractures, *Bone*, 16: 455-460, 1995
30. Walther M. M., Kragel, P. J., Trahan, E., Venzon, D., Blair, H. C., Schlesinger, P. H., Jamai-Dow, C., Ewing, M. W., Myers, C. E., & Linehan, W. M. : Sumarin inhibits bone resorption and reduces osteoblast number in a neonatal mouse calvarial bone resorption assay, *Endocrinology*, 131 : 2263-2270, 1992.
 31. Siffert, R. S. : The role of ALPase in osteogenesis, *J. Exp. Med.*, 93: 415-425, 1951
 32. Bessay O.A., Lowry O.H., Brock M.J. : A Method for the rapid determination of alkaline phosphatase with fibecubic millimeters of serum, *J. Biol. Chem*, 164: 321-329, 1946
 33. Lowry O.B., Rosenbrough M.J., Farr A.L., Rebar R.W. : Protein measurement with folin phenol reagent, *J. Bone Joint Chem*, 193: 255-260, 1951
 34. Pierce G. F., Mustoe, T. A., Altrack, B. W., Deuel, T. F., & Thomason, A. : Role of platelet-derived growth factor in wound healing, *J. Cell. Biochem*, 45 : 319-326, 1991.
 35. Canalis, E., McCarthy, T., Centrella, M. : Growth factors and the regulation of bone remodeling, *J. Clin. Invest.*, 81 : 277, 1988.
 36. Hauschka, P.C., Mavrakos, A. E., Iafrazi, M. D., Doleman, S. E., & Klagsbrun, M. : Growth factors in bone matrix : isolation of multiple types by affinity chromatography on heparin-sepharose, *J. Biol. Chem.*, 261 : 12665, 1986.
 37. Raisz, L.G. : Studies on bone formation and resorption in vitro, *Horm. Res.*, 20 : 22, 1984.
 38. Canalis, E., Lian, J. B. : Effect of growth factors on bone cell replication and differentiation, *Clin. Orthop. Rel. Res.*, 193 : 246, 1985.
 39. Centrella, M., McCarthy, TL., Canalis, E. : Mitogenesis in fetal rat bone cells simultaneously exposed to transforming growth factor β and other growth regulators, *FASEB J.*, 1 : 312, 1987.
 40. Hanks, CT., Kim, J-S., Edwards, CA. : Growth control of cultured rat calvarium cells by platelet-derived growth factor, *J. Oral. Pathol.*, 15 : 476-483, 1986.
 41. Pfeilschifter, J., Oechsner, M., Naumann, A., Gronwald, R. G. K., Minne, H. W., & Ziegler, R. : Stimulation of bone matrix apposition in vitro by local growth factors : a comparison between insulin-like growth factor I, platelet-derived growth factor, and transforming growth factor β , *Endocrinology*, 127 : 69-75, 1990.
 42. Hiroko Sudo, Hiro-Ari Kodama, Yuji Amagai, Shigehisa yamamoto, & Shiro Kasai : In vitro differentiation and calcification in a new clonal osteogenic cell line derived from newborn mouse calvaria, *J. of Cell Biology*, 96 : 191-198, 1983
 43. Je-Yong Choi, Byung-Heon Lee, Keun-Bae Song, Rang-Woon Park, In-San Kim, Kun-Young Sohn, Joon-Seung Jo, & Hyun-Mo Ryoo : Expression patterns of bone-related proteins during osteoblastic differentiation in MC3T3-E1 cells, *J. Cell. Biochem.*, 61 : 609-618, 1996.

44. Robinson, R. : XXXIII. The possible significance of hexosephosphoric esters in ossification, *Biochem. J.*, 111 : 286-293, 1923
45. Stein, G. S., Lian, J. B. and Owen, T. A. : Relationship of cell growth to the regulation of tissue-specific gene expression during osteoblast differentiation, *FASER. J.*, 4 : 82-94, 1990.
46. 오상덕, 이재목, 서조영 : Platelet-derived growth factor-AA, BB가 치주인대세포의 세포활성에 미치는 영향에 대한 연구, *대한치주과학회지*, 24 : 303-320, 1994
47. 서조영, 최재용, 유현모, 박준봉, 조준승 : 치주인대세포와 치은섬유아세포의 성장에 관한 비교, *대한구강생물학회지*, 15 : 14-27, 1991
48. Nojima, N., Kobayachi, M., Shionomo, H., Takanashi, N., Sudo, T. and Hasegawa, K. : Fibroblastic cells derived from bovine periodontal ligaments have the phenotypes of osteoblast, *J. Periodont. Res.*, 25 : 179-185, 1990.
49. Canalis, E., Pash, J., Gabbitas, B., Rydziel, S., & Varghese, S. : Growth factors regulate the synthesis of insulin-like growth factor-I in bone cell cultures, *Endocrinology*, 133 : 33-38, 1993.

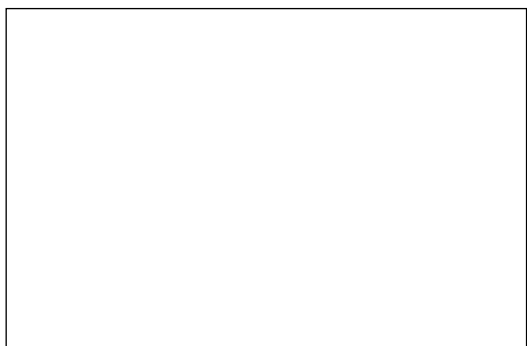
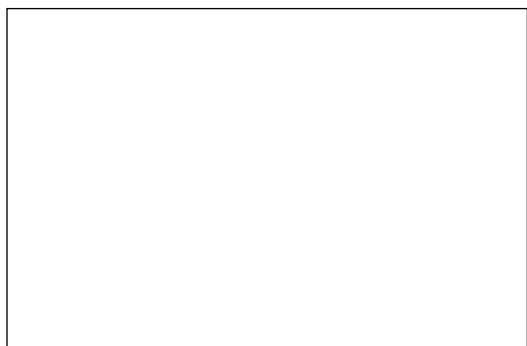
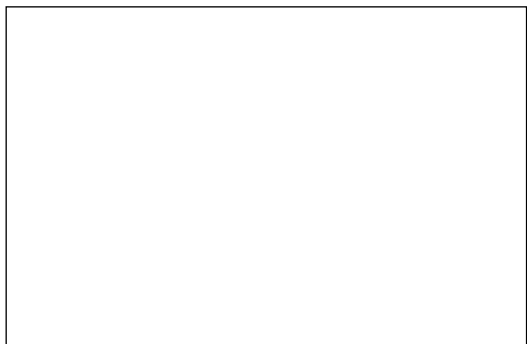
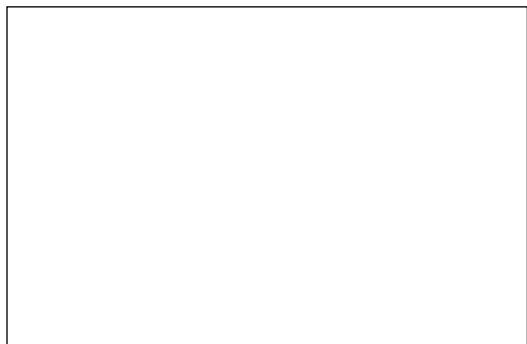
사진부도설명

- 그림 A & B 3 days control & experimental group. Photomicrograph shows no bone nodules.(× 40)
- 그림 C & D 7 days control & experimental group. Photomicrograph shows no evidence of bone nodules.(× 40)
- 그림 E & F 14 days control & experimental group. Photomicrograph shows no bone nodules.(× 40)
- 그림 G & H 21 days control & experimental group. Photomicrograph shows bone nodules both control & experimental group.(× 40)
- 그림 I & J 28 days control & Experimental group. Photomicrograph shows much more bone nodules in experimental group than control group.(× 40)
- # c; control group
e; experimental group

사진부도(1)



사진부도(Ⅱ)



The Effects of PDGF-BB on the ALP Activity of MC3T3-E1 Cells

Kyung-Hee Lee*, Jae-Mok Lee*, Byung-Ju Choi**, Hyun-Mo Yu***, Jo-Young 3Suh*

Department of Periodontology, School of Dentistry, Kyungpook National University Taegu, Korea*

Department of Dental Pharmacology, School of Dentistry, Kyungpook National University, Taegu, Korea**

Department of Oral Biochemistry, School of Dentistry, Kyungpook National University, Taegu, Korea***

The ultimate aim of periodontal treatment is periodontal regeneration, which necessitates the regeneration of bone tissues. This paper investigated the effect of growth factor on bone cells. Platelet-derived growth factor(PDGF) is the one of the polypeptide growth factor that has been reported as a biological mediator which regulates activities of the cell proliferation, migration and metabolism of undifferentiated mesenchymal cells. The purpose of this study is to evaluate the effects of PDGF on bone nodule formation and ALP activity of MC3T3-E1 cells.

Cells were seeded at 1×10^5 cells/well in alpha-modified eagle medium containing 10% fetal bovine serum, 10ml beta-glycerophosphate and $50 \mu\text{g/ml}$ of ascorbic acid. PDGF 0, 0.1, 1, 10 ng/ml were added to the cells at a confluent state and cultured for 3, 7, 14, 21, 28 days. We examined bone nodule formation and alkaline phosphatase activity.

The results were as follows :

There were bone nodule formation at day 21 both in control and all the experimental groups, and at day 28, all the experimental groups showed much more bone nodules than control groups.

Compared to control-1 group, ALP activity was increased in PDGF 0.1ng/ml group and was decreased in 1,10ng/ml PDGF treated groups. ($P < 0.05$, $P < 0.01$)

Compared to control-2, ALP activity was decreased in all the experimental groups except PDGF 0.1ng/ml in 21 day group.

In the time-response effect, ALP activity was increased by the day 14 in all the experimental groups and thereafter ALP activity was decreased. ($P < 0.05$, $P < 0.01$) In the dose-response effect, ALP activity was decreased as the dose of PDGF was increased, and after 21 day ALP activity was lowest in 1 ng/ml group, ALP activity was highest in the day 7 in control group and 0.1 ng/ml, 14 day experimental group.

In conclusion, PDGF is considered more effective in the proliferation than differentiation of osteoblast-like cells, and it may be useful to study the combined effect of PDGF and other growth factors on osteoblast-like cells.