

누드마우스에서 골 형성에 대한 BMP와 PDGF 복합사용의 효과

이승호¹ · 최병호² · 주석강² · 허진영³ · 정재형⁴ · 김병용⁵

이화여자대학교 임상치의학대학원 치주과학교실¹,
원주의과대학 치과학교실², 울산대학교 의과대학 강릉아산병원 치과³,
일산병원 치과⁴, 서울 미플러스치과의원⁵

I. 서론

최근 골수간엽줄기세포, Scaffold, 그리고 성장인자들을 사용하는 실험동물들에서 성공적인 In vivo 골 형성을 보고하는 연구들이 있다.^{12,17)} 몇 가지 성장인자들(e.g. IGF-1, PDGF, TGF- β 그리고 BMP)이 세포 수 증식, 화학구성, 분화, 그리고 세포외 기질합성, 그리고 결국에는 골 결손회복을 조장시키는데 효과적임을 보여준다. 성장인자들 가운데에는 PDGF와 BMP가 가장 널리 연구되어왔다. PDGF는 골 기질 내에 저장되어있고, 유리되면 골아 세포를 활성화시키며^{2,21)} 골아 세포에 대하여 유사분열제이다.²⁾ 한편, BMP들은 골 기질 내에서 높은 수치로 발견이 되고 있는데, 장래를 약속하는 골 유도물질이다. 여러 BMP중에서 BMP-2는 가장 활성적이며 골아 세포의 분화 및 증식기능 모두에 영향을 미쳐서 신생 골의 형성을 유도할 수 있다.^{1,13)} In vivo 골 형성을 하도록 하는 성장인자들의 능력을 바르게 이용하기 위하여 그들의 실제 역할과 상호작용을 확립하는 것이 필요하다. 이 같은 사실들

을 바탕으로 BMP와 PDGF의 복합사용이 In vivo 골 형성의 조장효과와 상승효과를 가지리라 가정하였다. 이 연구의 목적은 누드마우스 ectopic 분석조사에서 골 형성에 대한 BMP와 PDGF 복합사용의 효과를 확인하고자 한다.

II. 연구재료 및 방법

1. 간엽줄기세포의 준비와 연구재료

간엽줄기세포의 분리와 배양확장은 과거에 출판된 방법을 따라 시행하였다.^{4,10)} 간단히 서술하면 생후 5주된 두 마리 수컷 Fisher rat를 과량의 Pento-babital을 사용해서 희생시킨 다음 대퇴골 양쪽 끝을 골 단 부위에서 잘라낸다. 골수 plug를 23G 주사바늘을 통해 담아 둔 10ml 배양배지를 사용해서 골 단으로부터 씻어낸다. 배양 배지는 20% fetal bovine serum과 항생제(100 μ penicillin과 100mg/ml streptomycin)를 포함하는 소량의 필수배지로 구성되었다. 유리된 세포를 15ml 배지

*이 논문은 2003년도 이화여자대학교 교내연구비(관리번호 2003-0709-1) 지원에 의하여 연구되었음.

교신저자 : 이승호, 서울특별시 양천구 목6동 911-1 이화여자대학교 의과대학/임상치의학대학원 치주과, 우편번호: 158-710
전화번호: 02-2650-2679, 팩스: 02-2650-5764, E mail: perio772@ewha.ac.kr

가 들어있는 두개의 조직배양 flask(75cm²)에 모아 담는다. 48시간 후 배지를 교환하고 flask에 달라붙지 않은 세포들을 제거한다. 결국 일주일에서 세 번 배지를 교환해 준다. 1ml양은 5% CO₂, 37°C 의 습기 환경에 유지시켰다.

Fibrin glue(Beriplast, Germany)는 두 가지 분리된 용액 A와 B를 준비했다. A용액은 fibrinogen(80mg/ml)과 1ml의 plasmin inhibitor aprotinin(1000kIE/ml)에 녹인 피브리린 안정화 인자 XIII(75units/ml)로 이루어졌다. B용액은 1ml의 40M CaCl₂에 녹아있는 thrombin(250units)이다. A용액과 B용액을 1:1비율로 섞어서 응고반응이 일어나도록 했고 실온에서 반 고형 상태의 삼차원적 겔이 만들어졌다.

2. 실험동물의 준비와 연구방법

생후 6주가 된 12마리 athymic nude mouse를 준비하고 각기 다른 4개 군으로 나누었다.

제1군 (n=3) : 약 1×10⁶개의 간엽줄기세포(MSCs)를 inert carrier로서 500ml의 fibrin glue와 섞었고 다시 2mg의 rh BMP-2(R&D system, MN, USA)와 섞었다. 즉 fibrin glue/ MSCs/ rh BMP-2복합체를 1ml 주사기에 담고 18G 주사침을 통해서 누드마우스 등에 피하 주사하였다. 한 마리당 2회 주사하여 전체 6회 주사하였다.

제2군(n=3) : 약 1×10⁶개의 간엽줄기세포를 포함하는 fibrin glue와 2mg PDGF-BB(chemicon, CA, USA)를 섞은 것을 피하 주사 하였다.

제3군(n=3) : 약 1×10⁶개의 간엽줄기세포를 포함하는 fibrin glue와 2mg의 rh BMP-2와 2mg PDGF-BB를 섞은 것을 피하 주사했다.

제4군(n=3) : 대조군으로 약 1×10⁶개의 간엽줄기세포를 포함하는 fibrin glue를 피하 주사하였는데 간엽줄기세포만으로는 골 형성을 유도하지 않는다는 사실을 확인하기 위해서였다.

3. 표본제작과 조직형태학적 분석

12주 뒤에 실험동물 전부를 희생시키고 시편을 얻었다. 얻어진 시편을 10% buffered formalin에 고정한 뒤, 탈회, HE 염색한 다음 광학현미경 하에서 조사하였다. 신생골에 대하여 image analysis system (IBAS, Contron, Erching, Germany)을 사용하여 computerassisted histomorphometric measurement를 실시하였다. 골세포와 기질의 형태로 재생 골을 구별하였다. 신생 골의 주변길이를 추적하였고 영상분석 소프트웨어를 사용해서 둘러싸인 지역을 mm²로 측정하였다. 표본 내 신생 골의 백분율을 계산하였다.

조직형태 계측학적 분석을 위하여 성장인자들에 반응하여 형성된 신생 골의 량에 있어 현저한 차이들은 ANOVA(analysis of variance)에 의하여 알아냈다. 얻어진 결과는 p value < 0.05로서 유의성 있었으며 통계학적 분석은 statistical software package(SPSS for Windows)를 사용하였다.

III. 결과

제1군 mice에는 fibrin glue/MSCs/BMP-2, 제2군 mice에는 fibrin glue/MSCs/ PDGF-BB, 제3군 mice에는 fibrin glue/MSCs/BMP-2/ PDGF-BB복합체를 각각 주사한 다음 12주 뒤에 피하결절이 생겼고, 이들 결절은 단단하여 누르면 저항하였다. 피하조직으로부터 절개하고 분리하고자 할 때 결절의 변연이 명확했다. 부피는 fibrin glue/MSCs/BMP-2 부위에서 165±25ml, fibrin glue /MSCs/ PDGF-BB 부위에서 121±18ml, 그리고 fibrin glue/MSCs/BMP-2/PDGF-BB부위에서 98±15ml 이었는데 각기 다른 성장인자들에 반응하여 형성된 결절의 부피에서 각각 현저한 차이를 보였다. 결절들을 조직학적으로 조사해 보면 섬유성 껍질로 싸여 있고 시편 전부에서 소주 골과 함께 무정형 석회기질이 있었다. 소주에는 수많은 골세포 있었고 수많은 골아 세포가 규칙적으로 그 바깥에 늘어서 있는

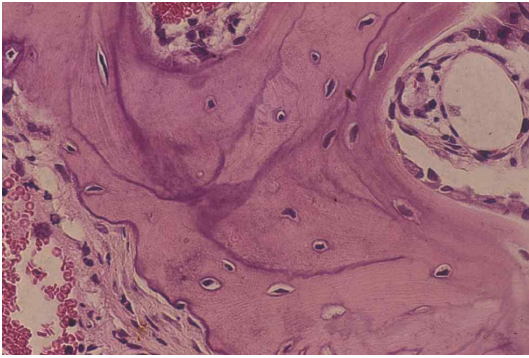


Figure 1. Histological findings of the nodule from the fibrin glue/MSCs/BMP-2 admixture(HE, x200)

데 이는 골 형성 활성을 나타내는 것이다(Figure 1). 주변에는 그 골이 정상 골과 유사한 laminar pattern을 하고 있었다. 신생 골에 인접한 숙주조직에 염증이나 이물질 반응의 증거를 찾을 수 없었으며 연골형성의 증거도 없었다. 신생 골의 백분율은 fibrin glue/MSCs/BMP-2/PDGF-BB implants에서는 $25.3 \pm 5.2\%$, glue/MSCs/BMP-2/PDGF-BB implants에서는 $8.9 \pm 4.6\%$ (Figure2)로서 각기 다른 성장인자들 그리고 성장인자들을 섞은 것들에 반응하여 형성이 된 신생 골의 양에는 유의성 있

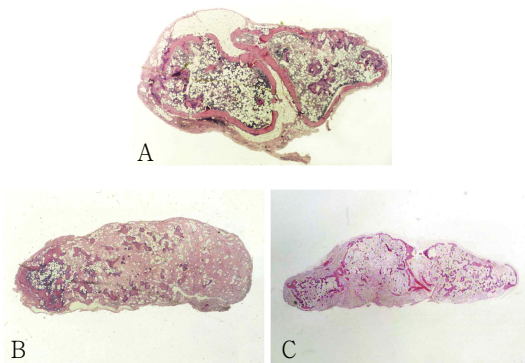


Figure 2. Histological comparison of the implants developed from the fibrin glue/MSCs/BMP-2 admixture (A), fibrin glue/MSCs/PDGF-BB admixture (B), or fibrin glue/MSCs/BMP-2/PDGF-BB admixture (C) (HE, x4)

는 차이가 있음을 나타내 보였다(Figure3).

성장인자들을 적용하지 않았던 대조군에서는 이 같은 조직학적 특징이 나타나지 않았다. 대조군 mice에서는 implants 내에 어떠한 골 형성도 없었다. 시간이 경과할수록 composite들이 점차 흡수되어 더 작고 편편해지더니 implant는 마침내 섬유성 조직으로 변해갔다.

IV. 총괄 및 고찰

이번 연구에서 골 형성에 대한 BMP-2, PDGF-BB, 혹은 BMP-2와 PDGF-BB를 혼합한 것의 효과를 비교하였다. 얻어진 골 형성을 조직형태 계측학적으로 정량하였으며 BMP-2/ PDGF-BB 혼합 매식에 대한 골이 BMP-2나 PDGF-BB만의 매식에 대한 골과 비교했을 때 현저히 적었다. 이 반응은 각개 성장인자들의 효과를 합한 수치로부터 기대한 수치에 비해서 훨씬 적었으며 BMP-2/PDGF-BB 섞은 것이 In vivo 골 형성에 상승적 자극이 일어나지 않았음을 뜻한다. 즉 BMP-2 존재 하에서 PDGF-BB는 골수 간엽 줄기세포의 분화를 억제한다고 설명할 수도 있다.

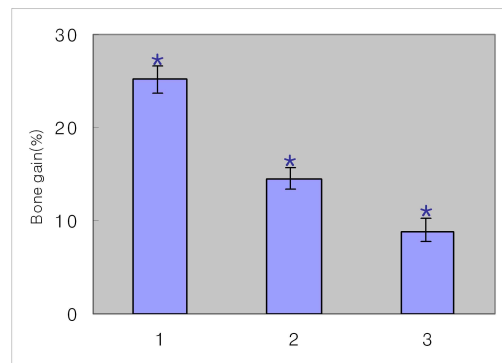


Figure 3. Histomorphometric data for the percentages of the newly formed bone within the specimens. 1: fibrin glue/MSCs/BMP-2, 2: fibrin glue/MSCs/PDGF-BB, 3: fibrin glue/MSCs/BMP-2/PDGF-BB. Data are presented as means \pm SD, N= 6; * : P < 0.05

성장인자들은 단독 혹은 특이세포표면 수용기들에 결합함으로써 함께 세포증식, 세포분화, 운동성 및 기질합성을 조절하는 것으로 알려져 있다.⁹⁾ 더욱이, 성장인자들이 성장인자들의 존재 하에서 조직재생을 자극하거나 억제한다는 사실을 관찰했던 연구자들이 많이 있다.^{8,9,15,18)} In vivo 골 형성이 일어나도록 하는 성장인자들의 능력을 이용하기 위해서는 이것이 일어나도록 하는 기전에 대한 더 많은 기초연구가 필요하다는 사실은 명백하다.

BMP와 PDGF의 복합사용으로 골 형성을 일으키는데 있어 실험에 사용된 PDGF의 용량이 효과적이지 않다고 하는 이번 결과는 골 형성에 PDGF의 어떠한 가능한 역할을 반박하지 않는다. 이번의 실험에서 사용한 PDGF-BB량이 지나치게 높았을 수도 있다. 우리가 사용한 용량은 보고된 효과적 범주에 기초했다. Pierce et al¹⁴⁾는 가토에서 창상치유를 촉진하는데 5mg이 적정용량이라고 한 반면 이들은 200mg PDGF의 적용으로 rat들에서 두개 관골손 부 치유를 증진시켰다.⁷⁾

BMP-2와 PDGF-BB를 동시에 첨가하여 결합효과를 연구해서 이 성장인자들의 순차적인 적용으로 생겨난 효과들을 조사한다는 사실은 흥미 있을 것이다. 이 같은 연구로부터 얻어진 결과들은 골 형성 동안 다양한 형태 유전적 과정에서 각기 다른 성장인자들의 기능적 역할을 이해하는데 도움을 주게 될 것이다. 골 형성동안 일어나는 복잡한 기전들에 대하여 더 완전하게 이해하게 된다면, 치주 및 구강 악안면 영역의 임상에서 신생 골 형성을 촉진시키기 위하여 다양한 성장인자들을 효과적으로 이용할 수 있을 것이다.

이번 연구는 PDGF-BB로 처리한 MSCs를 매식한 뒤 신생 골 형성의 확고한 증거를 제시한다. 이 PDGF-BB 효과는 PDGF가 In vivo 골 형성을 자극한다는 보고들과 일치한다.^{11,20)}

또한 이번연구는 BMP-2를 갖는 매식체에 대한 골 형성이 PDGF-BB를 처리한 매식체에 비교할 때 유의성 있게 더 많은 골 형성을 보였는데, 이는 BMP-2가 PDGF-BB가 미분화 간엽줄기세포들에

대한 골아 세포 유도 작용을 일으키는 것보다 더욱 강력한 작용을 유발한다는 사실을 나타낸다. 이들 성장인자들의 실제 임상적 적용은 경조직 복구 혹은 수복 부위로의 전달에 사용되는 운반체계에 달려있을 것인데,^{6,16)} heterotopic 골 형성을 유도하기 위한 충분히 긴 기간 동안 지속적으로 성장인자들이 분비될 필요가 있기 때문이다.¹⁹⁾

이 작업은 누드마우스 전위의 분석에서 골 형성을 유도시킴으로써 생체에서 유리된 BMP-2와 PDGF-BB의 생존능력을 확인했다. 이번 연구에서 fibrin glue로부터 점차적으로 보급된 성장인자들이 인접하는 간엽줄기세포들과 상호작용하여 이 세포들을 골아 세포로 분화를 유도하고 결국 신생 골을 형성시켰다고 추측하였다.

이번 연구에서 신생 골의 크기가 fibrin glue/MSCs/성장인자 복합체의 원래 크기보다 훨씬 작았다. 이것은 fibrin glue의 빠른 감성 때문일 것이다. glue의 감성을 조절하여 신생 골을 형성시키기 위한 각개 세포들의 능력을 적절히 하기 위하여 더 많은 연구가 필요할 것이다.

천천히 분비되고 천천히 분해되는 성질은 매식체의 원래 크기와 비슷하게 신생 골을 만드는데 충분하도록 더 오랜 기간동안 성장인자들과 MSCs이 유지할 수 있도록 해 줄 것이다.

V. 결론

BMP와 PDGF는 In vivo에서 국소 적용 시 골 형성을 촉진한다. BMP와 PDGF의 복합사용이 In vivo 골 형성에 조장효과 혹은 상승효과가 있는지 여부를 알아내고자 골수간엽줄기세포를 BMP-2, PDGF-BB, 또는 BMP-2와 PDGF-BB를 함께 처리한 다음, 누드마우스 등 부위에 피하 주사하였다. 12주 뒤에 골 형성을 평가하였다.

조직형태학적 분석 결과 누드마우스에서 형성된 피하 결절들은 BMP-2처리 세포 경우에 25.3%의 신생 골, PDGF-BB처리 세포의 경우에는 14.4%의 신생 골, 그리고 BMP-2와 PDGF-BB를 함께

처리했던 세포의 경우에는 8.9%의 신생 골을 포함하고 있었다. 이 같은 결과들은 BMP-2와 PDGF-BB의 복합적용이 In vivo 골형성에 조장효과 혹은 상승효과가 없음을 보여준다.

VI. 참고문헌

1. Bostrom MPG. Expressions of bone morphogenetic proteins in fracture healing. Clin Orthop 1998;355(Suppl):S116-S123.
2. Canalis E, McCarthy TL, Centrella M. Effects of platelet-derived growth factor on bone formation in vitro. J Cell Physiol 1989;140:530-537.
3. Cassiede P, Dennis JE, Ma F, Caplan AI. Osteochondrogenic potential of marrow mesenchymal progenitor cells exposed to TGF-beta 1 or PDGF-BB as assayed in vivo and in vitro. J Bone Miner Res 1996;11:1264-1273.
4. Dennis JE, Haynesworth SE, Young RG, Caplan AI. Osteogenesis in marrow-derived mesenchymal stem cells/porous ceramic composites transplanted subcutaneously: effect fibronectin and laminin on cell retention and rate of osteogenesis expression. Cell Transplant 1992;1:23-32.
5. Fiedler J, Roderer G, Gunther KP, Brenner RE. BMP-2, BMP-4, and PDGFBB stimulate chemotactic migration of primary human mesenchymal progenitor cells. J Cell Biochem 2002;87:305-312.
6. Hollinger JO, Leong K. Poly(a-hydroxy acids):carriers for bone morphogenetic proteins. Biomaterials 1996;17:187-194.
7. Lee YM, Park YJ, Lee SJ, Ku Y, Han SB, Klokkevold PR, Chung CP. The bone regenerative effect of platelet-derived growth factorBB delivered with a chitosan/tricalcium phosphate sponge carrier. J Periodontol 2000;71:418-424.
8. Lynch SE, Nixon JC, Colvin RB, Antoniades HN. Role of platelet-derived growth factor in wound healing: synergistic effects with other growth factors. Proc Natl Acad Sci USA 1987;84:7696-7700.
9. Lynch SE, Colvin RB, Antoniades HN. Growth factors in wound healing. J Clin Invest 1989;84:640-646.
10. Maniatopoulos C, Sodek J, Mekcher AH. Bone formation in vitro by stromal cells obtained from marrow of young adults. Cell Tissue Res 1988;254:317-330.
11. Mitlak BH, Finkelman RD, Hill EL, Li J, Martin B, Smith T. The effects of systemically administered PDGF-BB on the rodent skeleton. J Bone Miner Res 1996;11:238-247.
12. Noshi T, Yoshikawa T, Dohi Y, Ikeuchi M, Horiuchi K, Ichijima K, Sugimura M, Yonemasu K, Ohgushi H. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 potentiates the in vivo osteogenic ability of marrow/hydroxyapatite composites. Artif Organs 2001;25:201-208.
13. Onishi T, Ishidou Y, Nagamine T. Distinct and overlapping patterns of localization of bone morphogenetic protein (BMP) family members and a bmp type II receptor during fracture healing in rats. Bone 1998;22:605-612.
14. Pierce GF, Vande Berg J, Rudolph R, Tarpley J, Mustoe TA. Platelet-derived growth factorBB and transforming growth

- th factor beta 1 selectively modulate glycosaminoglycans, collagen, and myofibroblasts in excisional wounds. *Am J Pathol* 1991;138:629-646.
15. Roberts AB, Anzano MA, Wakefield LM, Roche NS, Stern DF, Sporn MB. Type beta transforming growth factor: a bifunctional regulator of cellular growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82:119-123.
 16. Schmitt JM, Hwang K, Winn SR, Hollinger JO. Bone morphogenetic proteins: an update on basic biology and clinical relevance. *J Orthop Res* 1999; 17:269-278.
 17. Shimakura Y, Yamazaki Y, Uchinuma E. Experimental study on bone formation potential of cryopreserved human bone marrow mesenchymal cell/hydroxyapatite complex in the presence of recombinant human bone morphogenetic protein-2. *J Craniofac Surg* 2003;14:108-116.
 18. Sporn MB, Roberts AB, Wakefield LM, Assoian RK. Transforming growth factor beta: biological function and chemical structure. *Science* 1986;233:532-534.
 19. Vehof JW, Mahmood J, Takita H. Ectopic bone formation in titanium mesh loaded with bone morphogenetic protein and coated with calcium phosphate. *Plast Reconstr Surg* 2001;108:434-443.
 20. Vikjaer D, Blom S, Hjorting-Hansen E, Pinholt EM. Effect of platelet-derived growth factor-BB on bone formation in calvarial defects: an experimental study in rabbits. *Eur J Oral Sci* 1997;105: 59-66.
 21. Zhang L, Leeman E, Carnes DC, Graves DT. Human osteoblasts synthesize and respond to platelet-derived growth factor. *Am J Physiol* 1991;261:C348-C354.

Effect of the combined use of bone morphogenetic protein and platelet-derived growth factor on bone formation in nude mouse

Seoung-Ho Lee¹ · Byung-Ho Choi² · Shi-Jiang Zhu² · Jin-Young Huh³ ·
Jae-Hyung Jung⁴ · Byung-Yong Kim⁵

Department of Periodontology, Graduate School of Clinical Dentistry,
Ewha Woman's University¹

Department of Dentistry, Wonju Christian Hospital, Yonsei University²

Department of Dentistry, Gangneung Asan Hospital, University of Ulsan³

Department of Dentistry, Ilsan Hospital⁴

Mi plus dental clinic, Seoul⁵

Bone morphogenetic protein(BMP) and platelet-derived growth factor(PDGF) have been demonstrated to stimulate bone formation when applied locally in vivo. To explore whether or not the combined use of BMP and PDGF could have a promotive effect and synergic interaction on bone formation in vivo, bone marrow mesenchymal stem cells were treated with BMP-2, PDGF-BB, or BMP-2 plus PDGF-BB, and then these cells were injected into the subcutaneous space on the dorsum of nude mice. The bone formation was evaluated after 12 weeks. Histomorphometric analysis demonstrated that the subcutaneous nodules formed in nude mice contained 25.3% newly formed bone in the BMP-2 treated cells, 14.4% newly formed bone in the PDGF-BB treated cells, and 8.9% newly formed bone in the BMP-2 plus PDGF-BB treated cells. The results showed that the combination of BMP-2 and PDGF-BB had neither a promotive effect nor synergic interaction on bone formation in vivo.

Key words : BMP, PDGF, growth factor, bone formation