MC3T3-E1 세포의 골기질 단백질 발현에 대한 혈소판유래성장인자-BB의 효과

김묘선 · 이재목 · 서조영

경북대학교 치과대학 치주과학교실

I.서론

골은 골흡수과정과 신생골 합성과정이 반복되어 지속적인 재형성이 일어나게 되는데 여기에는 골기질에 포함되어있거나 골흡수중 방출되는 폴리펩타이드계 성장인자(polypeptide growth factor)가 부분적으로 관련하게 된다[1,2]. 이는 Terranova와 Wikesjo[3]가 세포의 성장, 형성 및 기능은 세포와 세포외기질의 특이한 상호작용과 폴리펩타이드계 성장인자에 의해 조절되며 폴리펩타이드계 성장인자가 치주조직 재생에 중요한 역할을 한다고 시사한 바에서도 알 수 있다. 폴리펩타이드계 성장인자는 구조와 기능에서 호르몬과 유사하지만 합성되는 장소나 특이 표적세포에 이동하는 수단이 더 다양한 것으로 알려져 있다[4]. 이 중 하나가 혈소판유래성장인자(platelet-derived growth factor)이며 혈소판유래성장인자 골세포의 활성에 중요한 국소적 조절인자이고 골육종 배양에서도 발견되어 왔다[5]. 혈소판유래성장인자는 30kDa의 분자량을 가지고 있는 조절성 단백질로서[6-8] 단종이량체(혈소판유래성장인자-AA, BB)와 이종이량체(혈소판유래성장인자-AB)로 존재함이 발견되었으며[9] 세포막에는 α, β형 두가지 형태의 혈소판유래성장인자 수용기가 있는 것으로 알려져있다[10]. 혈소판유래성장인자가 유리되는 근원은 혈소판의 α과립으로 보고된 바 있고[11], 혈소판유래성장인자-BB는 혈소판유래성장인자-AA나 -AB에 비해 시험관적 실험에서 골표본의 생물학적활성을 자극하는데 더 효과적인 것으로 보고되고 있는데[13-16] 그 이유는 혈소판유래성장인자-AA가 α 수용기에만 결합하는 것에 비해 혈소판유래성장인자-BB는 α, β수용체 모두에 결합하기 때문인 것으로 알려져 있으며[16] 혈소판유래성장인자는 골육종세포[5], 정상인의 골아세포[17]에서도 역시 형성되고 골기질추출물[2]에서도 발견되어 왔다.

초기의 연구에서 쥐의 골아세포나 골아세포전구세포를 배양시 혈소판유래성장인자가 DNA와 교원질합성을 촉진하고[18]두개골배양시 골기질 축적을 증가시킨다고 밝혀졌으며[19] 조 등[20]은 개에서 실험적으로 야기된 치근이개부 병변에 혈소판유래성장인자를 단독투여시 전체적으로 조직재생의 속도가 빠르고 치유양상도 치주조직 고유형태로 변화진행됨이 관찰되었다고 보고하였으나, 혈소판유래성장인자는 두개골배양에서 교원질 분해도 증가시킨다고 보고되고 있으므로[14], 혈소판유래성장인자는 골형성과 골흡수에 대한 효과를 통해 골의 대사를 조절하는 것이라고 알려져 있다[21].

골기질은 제 I형 교원질 뿐 아니라 여러 종류의 골기질단백질을 포함하고 있는데 이것이 다른 결체조직과 구별되는 특징이라 할 수 있으며[22] 골형성은 복잡한 생물학적 과정으로 엄격하게 조정된 몇 가지

골기질 단백질의 유전자발현양상을 포함하고 있고 생체실험과 시험관적 실험을 통해 골기질 단백질의 표현양상은 시간에 따라 다르다고 보고되고 있다[23]. 예를 들면 세포주기나 성장에 관련된 유전자(histone, c-fos, c-myc)와 세포외기질유전자(type I collagen, fibronectin, transforming growth factor-β_1(TGF-β_1)가 먼저 증가한 후 osteocalcin, osteopontin, bone sialoprotein과 같은 골형성관련유전자가 증가하는데, 골아세포의 특징적인 mRNA 양상으로는 높은 osteopontin, alkaline phosphatase, vitamin D inducible osteocalcin mRNA가 있으며, 이들은 생체내에서와 시험관적 실험에서 골아세포계열의 세포에서 나타나기 때문에 alkaline phosphatase, osteopontin, 그리고 osteocalcin은 골아세포 분화의 표지인자라고 알려지고 있다[24]. 골기질단백질 중 제 I형 교원질은 MC3T3-E1 세포와 같은 골아세포전구세포가 골아세포적인 표현형을 발현하는데 반드시 필요하며 골기질의 골격을 제공하고[25] osteopontin, osteocalcin과 같은 골광화를 나타내는 유전자보다 초기에 발현된다고 보고되고 있으며[23], osteopontin은 골형성초기과정에서 형성중인 세포외기질에 골아세포를 부착시키고 골흡수시 파골세포를 부착시키며[26] 골의 광화에 관여하여 성장중인 결정에 결합, 성장을 억제하거나 완화시키는 기능을 가지는 등 결정의 크기를 조절하는 역할을 한다는 보고도 있다[27].

백서의 MC3T3-E1 세포는 골아세포분화의 정상적인 성장과정을 거치게 되는데 쥐의 두개골기원의 골아세포에서와 유사한 골과 같은 광화된 세포외기질의 형성을 관찰할 수 있고[28-30] 골아세포유사세포인 MC3T3-E1 세포는 골기질침착, 광화, 성장인자의 영향, 형태의 변화와 대사에 관해서 상당히 사용되어왔으며[31,32]. 교원질, osteocalcin과 다른 골아세포 분화의 표지인자에 대한 보고[33]도 있어 온 한편, Choi 등[30]의 연구에서 MC3T3-E1세포의 골아세포적 분화중 골기질단백질의 발현 양상에 대해 밝힌 바 있다.

이상의 연구들에서 골아세포의 증식과 분화에 영향을 미친다고 알려져 있는 성장인자인 혈소판유래성장인자-BB를 선택하였고, 골아세포유사세포인 MC3T3-E1 세포의 성장과 분화과정에서 골기질 단백질 중 비교적 초기에 발현된다고 알려져 있는 제 I형 교원질과 비교적 후기에 발현된다고 알려져 있는 osteopontin mRNA의 발현양상에 미치는 영향을 관찰하여 치주조직 재생과정에서 골조직치유의 임상적용에 응용하고자 본 실험을 시행하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재료(시약)

배양액은 minimum essential medium alpha medium(Gibco Co., USA, 이하 α-MEM으로 표기)를 사용하였고, fetal bovine serum(Gibco Co., USA, 이하 FBS로 표기), trypsin(Sigma Co., USA)과 유전자 재조합형 혈소판유래성장인자-BB(Genzyme Co., USA)을 사용하였고 RNA 추출을 위해 TRI REAGENT®(Molecular Research Center, INC, USA)를 사용하였다.

2. MC3T3-E1 세포의 배양

MC3T3-E1세포를 취득하여 100 mm 배양접시(Corning Co., USA)에 10% FBS, 10 mM β-glycerophosphate, 100 U/ml penicilline(근화제약, 한국), 100㎍/ml streptomycin(동아제약, 한국), 5㎍/ml amphotericin B(Sigma Co., USA)를 함유한 α-MEM 배양액에서 초기배양하여 37℃, 5% CO_2 공기혼합배양기(Sanyo Co., Japan)에서 유지하였다. 이틀에 한 번 0.05% trypsin/ 0.02% EDTA를 이용하여 세포를 분리시킨 후 계대배양하고, 사흘에 한 번 배양액을 교체해 주었다.

3. RNA 추출과 Northern Blot Hybridization

MC3T3-E1 세포를 5×10^5개의 세포수가 되도록 100 mm 배양접시에 넣고 위에서 설명한 방법으로 배양한 후 각각의 해당일인 3, 7, 14, 21, 28일의 48시간 전에 세포배양액을 제거한 세포층을 인산 완충식염수(phosphate buffered saline, 이하 PBS로 표기)

로 두 번 씻고 성장인자의 최대의 효과를 위해 배양액을 FBS가 첨가되지 않은 α-MEM으로 교체하여 24시간동안 배양한 후 0.1, 1, 10 ng/ml 혈소판유래성장인자-BB을 첨가한 군을 실험군으로 하고 첨가하지 않은 군을 대조군으로 하여 24시간동안 배양한 후 세포배양액을 제거하고 세포층을 차가운 PBS로 2회 세척하고 TRI REAGENT®(Molecular Research Center, INC, USA)를 사용하여 Chomczynski[33]의 방법에 따라 다음과 같이 total RNA를 추출하였다. 하나의 배양접시당 1 ml 씩의 TRI REAGENT®를 첨가하여 세포층을 녹인 후 centrifuge tube에 담고 실온에 5분간 방치하여 핵단백 복합체가 완전히 풀어지도록 하고 0.2 ml의 chloroform을 넣고 잘 섞어준 후 4℃, 12,000g에서 15분간 원심분리하여 상층액만 취해서 다른 centrifuge tube에 담아 0.5 ml의 isopropanol을 첨가하고 5-10분간 실온에 방치한 후 4℃, 12,000g에서 8분간 원심분리하였다. 상층액을 제거하고 침전된 RNA를 1 ml의 75% 에탄올로 2회 세척한 후 실온에서 건조시키고 diethyl pyrocarbonate(DEPC) 처리를 거친 증류수에 녹인 후 RNA의 농도를 측정하여 10㎍의 total RNA를 2.2 M formaldehyde를 함유하고 있는 1% agarose gel상에서 전기영동하여 Hybond N plus nylon(Amersham, Arlington Heights, IL)로 전이시킨 후 [α-^{32}P] dCTP로 labeling된 type I collagen cDNA인 Hf677, osteopontin cDNA로 hybridization 시켰다. 그 후 filter를 2×SSC, 0.05 % SDS로 실온에서 20분간 세척하고, 0.1×SSC, 0.1 % SDS로 20분간 50℃에서 2회 세척한 후 -70℃에서 film에 노출시켰다. autoradiography후 filter를 10분간 0.5 % SDS에 넣어 끓임으로써 방사능활성을 제거하고 다른 cDNA를 붙여 관찰하였다.

III. 결과

1. 제 I형 교원질 mRNA 발현에 대한 효과

대조군의 경우 시간경과에 따른 발현에서, 3일군에서 발현되고 7일군에서 증가하여 최대의 발현양상을 보였으며 14일군, 21일군에서 감소하여 거의 발현되지 않다가 28일군에서는 다시 증가하지만 여전히 3일군보다는 낮은 발현을 보였다. 실험군에서 혈소판유래성장인자-BB의 농도변화에 따른 발현양상은 3일군의 경우 0.1 ng/ml 투여군에서 대조군보다 증가한 양상, 1 ng/ml 투여시 감소, 10 ng/ml 투여시 증가하지만 대조군보다 감소한 양상을 보였고 7일군의 경우 0.1 ng/ml 투여시 대조군보다 증가한 양상, 1, 10 ng/ml 투여시 거의 발현되지 않았고 14일군의 경우 0.1 ng/ml 투여시 대조군과 비슷한 발현, 1, 10 ng/ml 투여군에서 증가하여 농도의존적인 증가양상을 보였으며, 21일군에서 0.1 ng/ml 투여시 대조군보다 증가한 양상을 보였으나 1 ng/ml 투여시 다시 감소하여 거의 발현되지 않았고, 28일군의 경우 0.1, 1 ng/ml 투여군 모두 대조군에 비해 감소하여 거의 발현되지 않은 양상을 보였다.

2. osteopontin mRNA 발현에 대한 효과

대조군의 경우 시간경과에 따른 변화에서 3일군보다 7일군에서 더 높은 mRNA 발현이 나타나다가 14일군에서 감소하여 가장 낮은 발현양상을 보였으며 21일군에서는 증가하여 최대증가양상을 보였고 28일군에서는 감소하지만 21일군을 제외한 다른 군보다는 여전히 높은 것으로 나타났다. 실험군에서 혈소판유래성장인자-BB의 농도변화에 따른 발현양상은 3일군에서 대조군에 비해 실험군 중 0.1, 1 ng/ml 혈소판유래성장인자-BB 투여군에서는 특이한 변화양상이 보이지 않다가 10 ng/ml 투여군에서는 증가된 양상을 보였으며 7일군에서 대조군에 비해 0.1 ng/ml 혈소판유래성장인자-BB 투여군에서 감소된 양상을 보이다가 1 ng/ml 투여군에서는 약간 증가된 양상을 보이지만 여전히 대조군보다 낮으며 10 ng/ml 투여군에서 다시 감소된 양상을 나타내었다. 14일군에서 대조군에 비해 실험군에서 mRNA 발현이 농도의존적으로 증가되는 양상을 보이며 21일, 28일군에서 대조군에 비해 실험군에서 mRNA 발현이 농도의존적으로 감소되는 양상으로 나타났다.

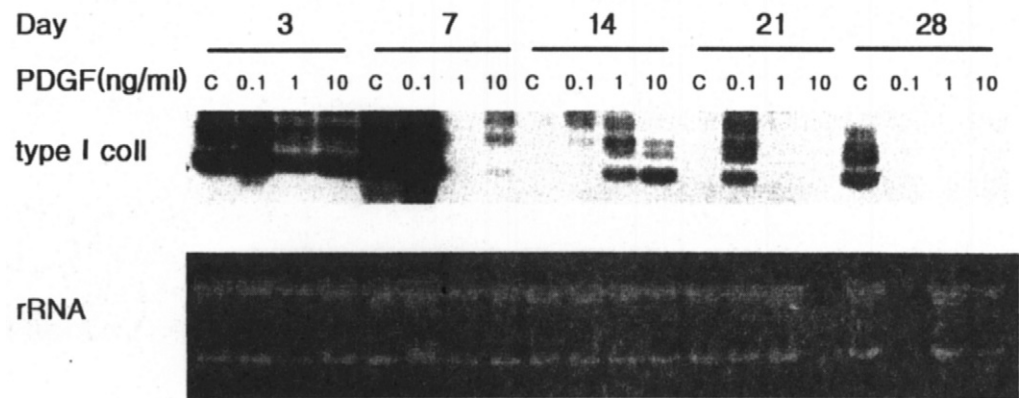


Figure 1. Time- and dose-response effect of 0.1, 1, 10 ng/ml of platelet-derived growth factor-BB on the expression of type I collagen mRNA in MC3T3-E1 cell culture. Cells were seeded at 5×10^5 cells in 10 ml of minimum essential medium alpha medium containing 10% fetal bovine serum, 10 mM β-glycerophosphate and cultured for 3, 7, 14, 21, 28 days. Before 48 hours of indicated time, media were changed to serum free media. After incubation for 24 hours, indicated amount of platelet-derived growth factor-BB were added. Northern blot analysis were performed as described in materials and methods.

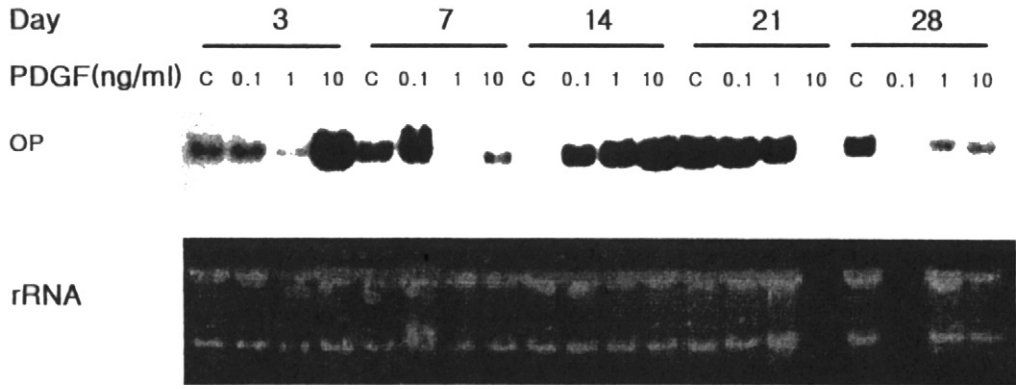


Figure 2. Time- and dose-response effect of 0.1, 1, 10 ng/ml of platelet-derived growth factor-BB on the expression of osteopontin mRNA in MC3T3-E1 cell culture. Cells were seeded at 5×10^5 cells in 10 ml of minimum essential medium alpha medium containing 10% fetal bovine serum, 10 mM β-glycerophosphate and cultured for 3, 7, 14, 21, 28 days. Before 48 hours of indicated time, media were changed to serum free media. After incubation for 24 hours, indicated amount of platelet-derived growth factor-BB were added. Northern blot analysis were performed as described in materials and methods.

IV. 고찰

골조직의 유지는 골합성 과정과 골흡수 과정의 지속적인 반복에 의해 이루어지며, 이 과정에 골기질에 포함되어있거나 골흡수중 방출되는 폴리펩타이드계 성장인자(polypeptide growth factor)가 부분적으로 관련하게 된다[1,2]. 본 실험은 폴리펩타이드계 성장인자 중 하나인 혈소판유래성장인자-BB가 골아세포유사세포인 MC3T3-E1 세포의 성장, 분화과정에서 골아세포적인 표현형의 발현에 어떤 영향을 주는가 알아보기 위해 MC3T3-E1 세포의 분화주기라고 알려져 있는[30] 약 1개월의 기간동안 배양한 세포에서 0.1, 1, 10 ng/ml 농도의 혈소판유래성장인자-BB를 투여한 후 골기질단백질인 제 I 형 교원질과 osteopontin

cDNA를 사용하여 northern blot analysis를 시행하였다.

Quarles 등[29]은 쥐의 MC3T3-E1 세포가 골아세포와 비슷한 성장과정을 거치며 1-9일은 성장의 초기과정으로서 활발한 DNA 복제, 합성, 세포수의 증가가 나타나는 단계라고 하였고, 9일경에는 세포의 성장은 중지되고 골아세포적인 기능이 발현되며 ALP 형성, 교원질의 합성이 증가되고, 16일 이후로는 골의 광화가 시작된다고 보고하였다. 최 등[30]은 MC3T3-E1 세포의 성장과 분화과정중 골아세포적인 표현형의 발현에 대해 보고하였으며 골기질 단백질의 발현양상은 일련의 성장 과정중 4-10일의 성장기에는 histone H3, H4, ribosomal protein S6과 같은 세포주기관련유전자가 증가하며 10-16일의 골기질 단백질 형성/성숙기에는 제 I형 교원질의 발현과 생합성, fibronectin, TGF-β_1, osteonectin의 발현이 높으며 16일에 최대치를 나타낸다고 보고하였다. 또한 16-30일의 광화기에는 nodule의 형성과 osteocalcin의 발현이 높으며 osteocalcin은 28일경까지 그 발현양상이 증가한다고 보고하였다. 이와 같이 MC3T3-E1세포는 골과 유사한 광화된 세포외기질을 합성하면서 정상적인 일련의 골아세포분화과정을 거치게 되며 골기질침착, 광화, 성장인자의 영향, 형태의 변화와 대사에 관한 연구에서 상당히 많이 사용되어왔고[31] 또한 교원질, Osteocalcin과 다른 골아세포적 지표에 대해 몇 가지 보고가 있어왔지만[29,33], MC3T3-E1세포의 골아세포적 분화중에 다양한 조건 하에서 골기질단백질의 발현에 대한 더욱 상세한 연구가 필요하리라고 사료되어 본 실험에서 이 세포를 사용하였다.

골의 재형성은 골흡수와 신생골 합성과정이 합쳐져서 일어나는 과정으로 여기에는 골기질에 포함되어있거나 골흡수중 방출되는 폴리펩타이드계 성장인자가 부분적으로 관련하게 되는데[1,2] 이중 하나가 혈소판유래성장인자이며 30kDa의 분자량을 가지고 있는 조절성 단백질로서[6,8] 단종이량체(혈소판유래성장인자-AA, BB)와 이종이량체(혈소판유래성장인자-AB)로 존재함이 발견되었으며 세포막에는 α, β형 두 가지 형태의 혈소판유래성장인자 수용기가 있는 것으로 알려져 있다[10]. 혈소판유래성장인자는 중성구, 단핵세포 그리고 섬유아세포에 대해 화학주성이 있으며, fibronectin, 교원질분해효소 그리고 다른 성장인자들의 합성을 포함하는 창상치유과정에 있어서 주된 역할을 하는 이들 세포들을 자극시킨다고 보고되었고[18] 골아세포유사세포의 증식을 촉진하여 간접적으로 교원질합성의 증가를 야기하지만 직접적인 교원질 분해를 촉진시키는 효과도 보고되고 있다[21].

혈소판유래성장인자가 골대사에 중요한 조절인자라는 가정의 근거로 다섯가지 정도를 제시할 수 있는데 먼저, 골아세포유사세포에서 세포의 증식, 화학주성, 골기질축적을 촉진시킨다는 것이며[18,19,34] 골기질내에 축적되어있고[2], 정상적 사람의 골아세포에 의해 합성되고[17,35] 또한 생체실험에서 신생골의 합성을 유도하며[36] 기관배양에서 골흡수를 촉진한다는 보고가 있다[37]. 배양된 태내백서두개골에서 10, 100 ng/ml의 혈소판유래성장인자-BB 투여시 DNA 합성촉진효과와 교원성단백질 뿐 아니라 비교원성 단백질의 합성이 촉진됨을 보인 Canalis 등[14]의 보고와 골아세포유사세포에 0.01-100 ng/ml 농도의 혈소판유래성장인자를 투여했을 때 10 ng/ml에서 최대의 DNA 합성, 섬유아세포, MC3T3-E1 세포의 유사분열능의 증가효과를 각각 밝힌 Kasperk 등[38]과 Rutherford 등[39], 그리고 Davidai등[40]의 보고, 또한 골수질의 미분화세포에 5 ng/ml의 혈소판유래성장인자-BB를 투여시 세포증식을 보고한 Cassiede 등[41]의 보고를 바탕으로 하여 본 실험에서는 혈소판유래성장인자-BB를 선택, 최대투여농도를 10 ng/ml로 하고 농도에 따른 변화를 알아보고자 0.1, 1 ng/ml 농도를 부가적으로 선택하였다.

골조직에는 제 I형 교원질이외에도 많은 비교원성 단백질이 포함되어 있어서 다른 결체조직과 구분된다[42]. 골아세포의 특징적인 mRNA 양상은 높은 osteopontin, alkaline phosphatase, vitamin D inducible osteocalcin mRNA 수치인데 이들이 생체내에서와 시험관적 실험에서 골아세포계열의 세포에 나타나기 때문에 골아세포적인 표현형의 분화지표라고 알려져 있다[24]. Marcus 등[43]은 골형성의 지표

를 제시했는데 골아세포를 배양했을 때 특징적인 일련의 기능적 활성이 나타난다고 하였고 먼저 *fos-Jun*과 같은 유전자가 나타난 후 type I collagen이 출현하며, alkaline phosphatase의 출현 후, osteopontin과 같은 여러 골기질 단백질이 나타나는데 그 중 osteocalcin이 가장 늦게 나타나므로 골아세포의 최종 분화를 의미한다고 보고하였다. 이중 osteopontin은 hydroxyapatite에 결합하는 44kD의 phosphorylated glycoprotein이며 섬유아세포와 골아세포유사세포의 부착을 촉진한다고 보고되고 있고[44] 시험관적 실험에서 골아세포유사세포에 의해 합성되는 것으로 밝혀졌다[45].

여러 생체실험 결과 정상적인 인간의 골절치유과정에서 혈소판유래성장인자가 발현되며[47] 시험관적 실험에서도 이 과정의 중요한 국소적조절인자임이 밝혀졌고[46] 혈소판유래성장인자-BB를 국소투여시 tibial osteotomy의 치유를 촉진시키고 골강도를 증진시키며 토끼의 골내, 골표면의 골형성을 자극했고[47], beagle dog의 하악치주수술후 인슐린 유사 성장인자(이하 IGF로 표기)-I과 함께 투여시 치유를 증진시키고 신생골형성을 촉진시켰다는 보고가 있었으며[48] 혈소판유래성장인자-BB를 전신적으로 투여한 경우 골의 체적을 증가시키고 골격전체의 강도가 증가되었다는 보고도 있다[36]. 이 결과는 시험관적실험의 결과와 대조되는 것인데 Hock 등[50]은 혈소판유래성장인자가 태내두개골표면의 세포에 대해서 저명한 유사분열촉진효과가 있기는 하지만 교원질이나 골기질합성에는 거의 증진효과가 없다고 밝혔고 혈소판유래성장인자-BB는 골아세포의 분화 기능에는 직접적인 효과가 없으며 혈소판유래성장인자-BB와 AA를 투여시 골아세포의 분화에 실제적으로 억제효과를 보여서 골아세포표지인자인 osteocalcin 합성과 염기성인산효소의 활성이 억제되며 골기질의 합성이 억제되고 고농도의 혈소판유래성장인자-BB를 투여한 경우 신생기질 합성이 억제됨이 관찰되었다[51]. 혈소판유래성장인자의 억제효과는 정상적으로 골아세포의 기능을 자극하는 골세포성장인자에 대한 효과에 의한 것이라는 보고도 있는데 최근 밝혀진 것으로 혈소판유래성장인자-BB는 골아세포의 분화 기능에 대한 국소적 자극제로서 가장 풍부한 IGF의 합성을 억제하는 것으로 나타났으며 이로 인해 골아세포의 분화 기능에 대한 억제효과가 나타나는 것으로 예측된다고 하였다[52]. 혈소판유래성장인자가 IGF-I과-II mRNA 수치를 쥐의 골아세포에서 시간, 농도의존적으로 억제하였고 혈소판유래성장인자-BB와 AB가 골흡수와 교원질 분해를 증진시킨다는 보고가 있어왔으며[53] 혈소판유래성장인자가 두개골 배양에서 파골세포의 수를 증가시키지만 골흡수 증진에 대한 혈소판유래성장인자의 효과의 기전은 잘 밝혀져 있지 않다.

본 실험에서 약 1개월간을 세포배양기간으로 하여 혈소판유래성장인자-BB를 농도별로 투여하여 제 I형 교원질 mRNA의 발현양상을 살펴본 결과 대조군에서, 7일군에서 가장 증가한 양상을 보였고 14일, 21일군에서 감소한 양상을 보였으며 이러한 양상은 MC3T3-E1 세포의 성장, 분화과정을 연구한 Quarles 등[29]의 보고에서 9일 이후에 교원질 합성증가를, 최 등[30]의 보고에서 10-16일경 교원질 발현의 증가를 보고한 것보다 더 초기의 발현을 보이는데, 이는 초기 접종 세포수의 차이에 따른 세포의 밀도 등과 같은 실험조건의 차이 때문인 것으로 사료되며 혈소판유래성장인자-BB의 농도에 따른 제 I형 교원질 mRNA의 발현양상은 3일, 7일, 21일군의 경우 0.1 ng/ml 혈소판유래성장인자-BB 투여군에서 증가된 발현을 보였고 1, 10 ng/ml 투여군에서 감소된 양상으로 0.1 ng/ml 혈소판유래성장인자-BB 투여군을 제외한 군에서는 제 I형 교원질 mRNA 발현이 감소하는 양상을 보여서 비교적 저농도의 혈소판유래성장인자-BB 투여시는 증가, 비교적 고농도의 혈소판유래성장인자-BB 투여시는 감소된 양상을 나타내었는데 이는 10, 100 ng/ml 농도에서 교원성 단백질 합성촉진효과를 보고한 Canalis 등[14]의 보고나 0, 10, 50, 250, 500 ng/ml의 혈소판유래성장인자-BB를 투여했을 때 제 I형 교원질 mRNA 발현에는 효과가 없었다고 보고한 Tanaka 등[54]의 보고와는 차이가 있는데 각각 태내백서두개골세포와 밀생상태의 골수세포를 사용하여 적용된 세포의 종류와 배양액의 차이 등 실험방법의 차이에 의한 것으로 사료되며 14일군에서 대

조군에 비해 실험군에서 농도의존적인 증가양상, 28일군에서 모든 실험군에서 대조군에 비해 감소된 양상을 보이므로 혈소판유래성장인자-BB가 골아세포유사세포인 MC3T3-E1 세포의 각 성장 및 분화과정에 다양한 효과를 나타낸다고 사료된다.

osteopontin mRNA의 발현양상은 대조군에서 21일째 최대의 발현양상을 보이는데 이는 Stein 등[23]의 보고와 일치하고, 혈소판유래성장인자-BB의 농도에 따른 osteopontin mRNA의 발현양상은 3일째, 대조군에 비해 실험군 중 0.1, 1 ng/ml 혈소판유래성장인자-BB 투여군에서는 특이한 변화양상이 보이지 않다가 10 ng/ml 투여군에서는 증가된 양상을 보였으나 RNA loading 양 역시 많았음을 고려해야 하며, 14일군에서 대조군에 비해 실험군에서 mRNA 발현이 농도의존적으로 증가되는 양상을 보이며 21일군의 10 ng/ml 투여군, 28일의 0.1 ng/ml 투여군이 RNA 변성으로 빠져 있기는 하지만 전체적인 양상을 고려할 때, 21일, 28일군에서 대조군에 비해 실험군에서 mRNA 발현이 농도의존적으로 감소되는 양상으로 나타났다. 이는 250 ng/ml에서 최대의 osteopontin mRNA 발현을 관찰한 Tanaka 등[54]의 보고와는 차이가 있지만 세포의 종류, 사용한 배양액의 차이, 배양기간의 차이 등 실험조건의 차이에 의한 것으로 사료된다. 한 가지 특이한 사실은 대조군에서 낮은 osteopontin mRNA 발현을 보인 14일군에서 실험군의 발현양상은 농도의존적으로 증가하나 대조군에서 증가된 mRNA 발현을 보인 21일, 28일군에서는 실험군의 경우 농도의존적으로 감소함에 따라, 이 결과로 혈소판유래성장인자-BB가 osteopontin mRNA 발현이 낮을 때는 발현을 증가시키는 효과를 보이고 발현이 높을 때는 반대로 감소시키는 효과를 나타내는 상반되는 조절 기능을 가지는 것이라고 사료된다. 따라서, 본 실험에서는 0.1 ng/ml 농도를 제외한 혈소판유래성장인자-BB의 투여시 골아세포유사세포의 초기 성장 과정에서 제 I형 교원질의 mRNA 발현을 감소시키는 것으로 나타났고, osteopontin mRNA의 발현은 분화과정에 따라 발현을 증가, 또는 감소시키는 조절기능을 관찰할 수 있었으나, 이에 대한 정확한 기전과 타 성장인자와의 병용에 대해 향후 더욱 많은 연구가 뒷받침되어야 할 것으로 사료된다.

V. 요약

골조직의 재생을 유도하기 위한 방법으로 연구되고 있는 폴리펩타이드계 성장인자 중 혈소판유래성장인자-BB를 이용하여 배양된 MC3T3-E1 세포에 농도별, 시간별로 주입하여 northern blot hybridization을 시행함으로써 혈소판유래성장인자-BB가 이들 세포의 제 I 형 교원질, osteopontin mRNA의 발현에 어떠한 영향을 미치는지 알아보고자 본 실험을 시행하였다.

골아세포유사세포인 MC3T3-E1세포의 분화주기라고 알려져 있는 약 1개월의 기간 중 3일, 7일, 14일, 21일, 28일간 배양한 세포에 0.1, 1, 10 ng/ml의 혈소판유래성장인자-BB를 투여하여 제 I형 교원질 cDNA와 osteopontin cDNA을 사용하여 northern blot hybridization을 시행하였으며 각각의 기간동안 배양한 세포에서 혈소판유래성장인자-BB를 투여하지 않은 군을 대조군으로 하고 0.1, 1, 10 ng/ml 혈소판유래성장인자-BB를 투여한 군을 실험군으로 하여 혈소판유래성장인자-BB의 투여 후 24시간동안 배양하여 아래와 같은 결과를 얻었다.

제 I형 교원질 mRNA의 발현은 대조군에서 시간에 따른 발현양상이 3일군, 7일군에서 높은 발현을 나타냈으며 전체 배양기간 중 7일군에서 최대의 발현을 보였고 14일, 21일군에서 감소하여 가장 낮은 발현을 보였으며 28일군에서 증가하지만 3일군보다는 낮았다. 실험군에서 농도에 따른 발현양상은 3일군, 7일군의 0.1 ng/ml 투여군에서 증가된 발현양상, 1, 10 ng/ml 투여군에서 감소한 발현양상을 보였고 14일군에서는 농도의존적인 증가양상을 보였으며 21일군에서 0.1 ng/ml 투여시 증가한 양상, 1, 10 ng/ml 투여군에서 감소하여 거의 발현되지 않았고 28일군에서 0.1, 1, 10 ng/ml 투여군 모두에서 대조군에 비해 감소된 발현양상을 보였다.

Osteopontin mRNA의 발현은 대조군에서 시간에 따른 발현양상이 3일군보다 7일군에서 높은 mRNA

발현이 나타나다가 14일군에서는 3일군보다 감소하여 가장 낮은 발현을 보였으며 21일군에서는 증가하여 최대의 증가양상을 보였고 28일군에서는 다시 감소하지만 21일군을 제외한 다른 군보다는 여전히 높은 것으로 나타났다. 실험군에서 농도에 따른 발현 양상은 14일군에서 대조군에 비해 실험군에서 mRNA의 발현이 농도의존적인 증가양상을 보였고 21일, 28일째 대조군에 비해 실험군에서 mRNA의 발현이 농도의존적인 감소양상을 보였다. 이상의 결과에서 0.1 ng/ml 농도를 제외한 혈소판유래성장인자-BB의 투여시 골아세포유사세포의 초기 성장 과정에서 제 I형 교원질의 mRNA 발현을 감소시키는 것으로 나타났고, osteopontin의 발현에 대해서는 분화과정에 따라 mRNA 발현을 증가, 또는 감소시키는 조절기능을 관찰할 수 있었다.

VI. 참고문헌

1. Canalis, E. : Growth factors and this regulation of bone remodeling, J. Clin. Invest., 81: 277, 1988.
2. Hauschka, P. V., Navrakos, A. E., Iafrati, M. D., Doleman, S. E., and Klagsburn, M. : Growth factors in bone matrix : Isolation of multiple types by affinity chromatography on heparin sepharose, J. Biol. Chem., 261: 12655-12674, 1986.
3. Terranova, V. P., Wikesjo, M. E. : Extracellular matrices and polypeptide growth factors as mediators of functions of cells of the periodontium, J. Periodontol., 58: 371-380, 1987.
4. Graves, D. T., Cochran, D. L. : Mesenchymal cell growth factors, Crit. Rev. Oral. Biol. Med., 1: 17-36, 1990.
5. Heldin, C. H., Johnson, A., Wennergern, S., Wernstedt, C., Betsholtz, C., and Westermark, B. : A human osteosarcoma cell line secrets a growth factor structurally related to a homodimer of PDGF-A chains, Mature, 319: 511-514, 1986.
6. Antoniades, H. N. : human platelet-derived growth factor(PDGF); Purification of PDGF-1 and PDGF-II and separation of their reduced subunits, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78: 7314-7317, 1981.
7. Deuel, T. F., Huang, J. S. A., Proffit, R. L., Baenzinger, J. U., Chang, D. and Kenneduy, B. B.: Human platelet-derived growth factor purification and resolution into two active protein fractions, J. Biol. Chem., 256: 8896-8899, 1981.
8. Raines, E. W. and Ross, R. : Platelet-derived growth factor I. High yielded purification and evidence for multiple forms, J. Biol. Chem., 257: 5154-5160, 1982.
9. 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.
10. Williams, L. T. : signal transduction by the platelet-derived growth factor receptor, Science, 243: 1564-1570, 1987.
11. Hawiger, J. : Platelet secretory pathway : An overview, Method, Enzyme, 169 : 191-195, 1989
12. Pfeilschifter, J., Krempien, R., Naumann, A., Gronwald, R. G. K., Hoppe, J., Ziegler, R. : Differential effects of platelet derived growth factor isoforms on plasminogen activator activity in fetal rat osteoblasts due to isoform specific receptor functions, Endocrinology, 130: 2059-2066, 1992.
13. Canalis, E., McCarthy, T. L., Centrella, M. : Effects of platelet derived growth factor on bone formation 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, 1989.
14. Canalis, E., McCarthy, T. L., Centrella, M. :

Effects of platelet derived growth factor on bone formation in vitro, J. Cell. Physiol., 140: 530-537, 1989.
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. Canalis, E., Vargese, S., McCarthy, T. L., Centrella, M. : Role of platelet derived growth factor in bone cell function, Growth Regul., 2: 151-155, 1992.
17. Zhang, L., Leeman, E., Carnes, D., and Graves, D. T. : Human osteoblasts synthesize and respond to platelet derived growth factor, Am. J. Physiol., 261:C348-C354, 1991.
18. Centrella, M., McCarthy, T. L., and Centrella, M. : Platelet derived growth factor enhances deoxyribonucleic acid and collagen synthesis in osteoblast enriched cultures from fetal rat parietal bone, Endocrinology, 125: 13-19, 1989.
19. Pfeilschifter, J., Oechsner, M., Naumann, A., Gronwald R. G. K., Minne, H. W., and Ziegler, R. : Stimulation of bone matrix apposition in vitro by local trowth factors; A comparison between insulin like growth factor I, platelet derived growth factor, and transforming growth factor, Endocrinology, 127: 69-75, 1990.
20. 조무현, 박준봉 : 혈소판유래성장인자-BB가 성견 치근이개부병변의 조직재생 에 미치는 효과, 대한치주과학회지, 23: 535-563, 1993.
21. Canalis, E., McCarthy, T. L., and Centrella, M. : Effects of platelet derived growth factor on bone formation in vitro, J. Cell. Physiol., 140: 530-537, 1989.
22. Sommer, B., Bickel, B., Hofstetter, W., Wetterwald, A., Expression of Matrix Proteins During the development of mineralized tissues, Bone, 19 : 371-380, 1996
23. Stein, G. S., Lian, J. B. : Molecular mechanisms mediating developmental and hormone regulated expression of genes in osteoblasts ; An integrated relationship of cell growth and differentiation. In Noda, M(ed):"Cellular and Molecular Biology of Bone" San Diego:Academic Press; 47-95, 1993.
24. Phoebe, S., Leboy : Dexamethasone induction of osteoblast mRNA in rat marrow stromal cell culture, J. of Cell. Physiol., 146:370-378, 1991.
25. Franceschi, R. T., Lyer, B. S. : Relationship between collagen synthesis and expression of the osteoblast phenotype in MC3T3-E1 cells, J. Bone Mineral Res., 7: 235-246, 1992.
26. Reinholt, F. P., Hultenby, K., Oldberg, A., Heinengard, D. : Osteopontin-a possible anchor of osteoclasts to bone, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83: 4473-4475, 1990.
27. Oldberg, A., Franzen, A., Heinegard, D. : Cloning and sequence analysis of rat bone sialoprotein(osteopontin) cDNA reveals an Arg-Gly-Asp cell binding sequence, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 83: 8819-8823, 1986.
28. Sudo, H., Kodama, H., Amagai, Y., Yamamoto, S., Kasai, S. : In vitro differentiation and calcification in a new clonal osteogenic cell line derived from newborn mouse calvaria, J. cell. Biol., 96: 191-198, 1983.
29. Quarles, L. D., Yohay, D. A., Lever, L. W., Caton, R., Wenstrup, R. J. : Distinct proliferative and differentiated stages of murine MC3T3-E1 cells in culture an in vitro model of osteoblast development, J. Bone Mineral Res., 7: 683-692, 1992.
30. Choe J-Y, Lee B-H, Song K-B, Park R-W, Kim J-S, Sohn K-Y, Jo J-S, Ryoo H-M : Expression patterns of bone related proteins during osteoblastic differentiation in MC3T3-E1 cells, J. Cell.

Biochem., 61: 609-618, 1996.
31. Kumegawa, M., Hiramatsu, M., Hatakeyama, K., Yajima, T., Kodama, H., Osaki, T., Kurisu, K. : Effects of epidermal growth factor on osteoblastic cells in vitro, Calcif. Tissue. Int., 35: 542-548, 1983.
32. Hurley, M. M., Abreu, C., Harrison, J. R., Lichtler, A. C., Raiaz, L. G., Kream, B. E. : Basic fibroblast growth factor inhibits type I collagen gene expression in osteoblastic MC3T3-E1 cells, J. Biol. Chem., 268: 5588-5593, 1993.
33. Chomczynski, P. : A reagent for the single step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples, BioTechniques 15: 532-537, 1993.
34. Gilardetti, R. S., Chaibi, M. S., Stroumza, J., Williams, S. R., Antoniades, H. N., Carnes, D. C. : Graves D.T. High affinity binding of PDGF-AA and PDGF-BB to normal osteoblastic cells and modulation by IL-I, Am. J. Physiol., 261:C980-C985, 1991.
35. Rydziel, S., Ladd, C., McCarthy, T. L., Centrella, M., Canalis, E. : Determination and expression of PDGF AA in bone cell cultures, Endocrinology 130:1916-1922, 1992.
36. Lynch, S. E., Williams, R. C., Polson, A. M., Howell, T. H., Reddy, M. S., Zappa, U. E., Antoniades, H. N. : A combination of platelet derived and insulin like growth factors enhances periodontal regeneration, J. Clin. Periodontol., 16: 545-548, 1989.
37. Tashjan, A. H., Hohmann, E. L., Antoniades, H., Levin, L. : Platelet derived growth factor stimulates bone resorption via a prostaglandin mediated mechanism, Endocrinology, 111: 118-124, 1982.
38. Kasperk, C. H., Wergedal, J. E., Mohan, S., Long, D. L., Lau, K. H. W., Baylink D. J. : Growth factor, 3:147-158, 1990.
39. Rutherford, R. B., Trailsmith, M. D., Ryan, M. E., Charette, M. F. : Synergistic effects of dexamethasone or platelet-derived growth factor on mitogenesis in vitro, Arch. Oral Biol., 37(2): 139-145, 1992.
40. Davidai, G., Lee, A., Schvartz, I., Hasum, E. : PDGF induces tyrosine phosphorylation in osteoblast-like cells: relevance to mitogenesis, Am. J. Physiol., 263:E205-9, 1992.
41. Cassiede, P., Dennis, J. E., Ma, F. : A I Caplan osteochondrogenic potential of marrow mesenchymal progenitor cells exposed to TGF-β1 or PDGF-BB as assayed in vivo and in vitro, J. Bone Mineral Res., 11: 1264-1273, 1996.
42. Triffit, J. T. : The special protein of bone tissue, Clinical Science, 72: 397-408, 1987.
43. R. Marcus : Biochemical Assessment of bone resorption and formation, Bone, supplement, 18(1): 155-165, 1996.
44. Craig, A. M. : Osteopontin, a transformation associated cell adhesion phosphoprotein, is induced by 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate in mouse epidermis, J. Biol. Chem., 264(16): 9682-9689, 1989.
45. Prince, C. W., Oosawa, T., Butler, W. T., Tomana, M., Bhown, A. S., Bhown, M., Schrohenloher, R. E. : Isolation, characterization and biosynthesis of a phosphorylated glycoprotein from rat bone, J. Biol. Chem., 262(6);2900-2907, 1987.
46. Noda M., Rodan, G. A. : Transcriptional regulation of osteopontin production in rat osteoblast like cells by parathyroid hormone, J. Cell. Biol., 108: 713-718, 1989.
47. Andrew, J. G., Hoyland, J. A., Freemont, A. J., Marsh D. R. : Platelet-derived growth factor exposure in normally healing human fractures, Bone, 16:4:455-460, 1995.
48. Nash, T. J., Howlett, C. R., Martin, C., Steele, J.,

Johnson, K. A., Hicklin, D. J. : Effect of platelet derived growth factor in tibial osteotomies in rabbits, Bone, 15: 203-208, 1994.

49. Mitlak, B. H., Finkelman, R. D., Hill, E. L., Li, J., Martin, B., Smith, T., D'Adrea, M. D., Antoniades, J. N., Lynch, S. E. : The effect of systemically administered PDGF-BB on the rodent skeleton, J. Bone Mineral Res., 11: 238-247, 1996.
50. Hock, J. E., Graves, D. T. : Study of the growth factor requirements of human bone derived cells; a comparison with human fibroblasts, Bone, 10: 131-138, 1989.
51. Janet. M. H., Canalis E. : Platelet-derived growth factor enhances bone cell replication, but not differentiated function of osteoblasts, Endocrinology, 134: 1423-1428, 1994.
52. Canalis, E., Pash, J., Gabbitas, B., Rydziel, S., Vargese, S. : Growth factors regulate the synthesis of insulin like growth factor-I in bone cell culture, Endocrinology, 133: 33-38, 1993.
53. Walther, M. M., Kragel, P. J., Tranhan, E., Venzon, D., Blair, J. C., Schlesinger, P. H., Jamai-Dow, D., Ewing, M. W., Myers, C. E., and Linehan, W. M. : Suramin inhibits bone resorption and reduces osteoblast number in a neonatal mouse calvarial bone resorption assay, Endocrinology, 131: 2263-2270, 1992.
54. Tanaka, H., Liang, C. T. : Effect of platelet-derived growth factor on DNA synthesis and gene expression in bone marrow stromal cells derived from adult and old rats, J. of Cell. Physiol., 164: 367-375, 1995.

-Abstract-

The Effects of Platelet-Derived Growth Factor-BB on the Expression of Bone Matrix Protein in the MC3T3-E1 Cells

Myo-Sun Kim, Jae-Mok Lee, Jo-Young Suh

Department of Periodontology Kyungpook National University School of Dentistry

Bone remodeling results from the combined process of bone resorption and new bone formation which is regulated in part by some of the polypeptide growth factors such as platelet derived growth factor(PDGF), which has been known to be an important local regulator of bone cell activity and participate in normal bone remodeling. This process includes strictly regulated gene expression of several bone matrix proteins such as type I collagen and osteopontin, a 44 kDa phosphorylated glycoprotein, which has important roles in bone formation. The purpose of this study is to evaluate the effecs of PDGF-BB on the mRNA expression of bone matrix protein, type I collagen and osteopontin, in MC3T3-E1 cell culture.

Cells were seeded at 5×10^5 cells in 10 ml of minimum essential medium

alpha(α-MEM) containig 10% fetal bovine serum, 10 mM beta glycerophosphate. 0.1, 1, 10 ng/ml PDGF-BB were added to the cells for the day 3, 7, 14, 21, 28 and cultured for 24 hours. Type I collagen cDNA, Hf677, and osteopontin cDNA were used as probes for northern blot analysis. Total cellular RNA was purified at indicated day and northern blot analysis was performed.

The results were as follows :

Type I collagen mRNA expressions were higher at the day 3 and 7, and lower in the day 14, 21 in the control groups. In the experimental groups, mRNA expressions were increased when 0.1 ng/ml PDGF-BB were added on the day 3, 7, 21, and decreased in dose-dependent manner on the day 14, decreased at all added dose on the day 28.

Osteopontin mRNA expressions were highest in the day 21 groups and lowest in the day 14 groups in the control groups. Interesting results were shown in the day 14 and 21 groups. We found that osteopontin mRNA level was increased in dose dependent manner in the day 14 groups, and decreased dose dependent manner in the day 21 groups. In conclusion, PDGF-BB may have various control effects on type I mRNA expression in the growth and differentiation process of MC3T3-E1 cells and may have contrary regulatory effects on osteopontin mRNA expression. For examples, when the baseline level of osteopontin mRNA was low, as in the day 14, PDGF-BB up-regulated osteopontin mRNA expression in dose dependent manner, and when the baseline level was high as in the day 21, PDGF-BB down-regulated dose dependent manner. Thus, it may be useful for clinical application in periodontal regeneration procedure if further study were performed.