

# 골막기원세포의 조골세포 분화과정에서 나타나는 혈관내피전구세포의 증식

김종렬 · 송정호 · 김옥규 · 박봉욱\* · 하영술\*\* · 김진현\*\* · 김덕룡\*\*\* · 조영철\*\*\*\* · 성일용\*\*\*\* · 변준호\*

부산대학교 치의학전문대학원 구강악안면외과학교실,

\*경상대학교 의학전문대학원 구강악안면외과학교실, 경상대학교 건강과학연구원, 의생명과학사업단 (BK21),

\*\*경상대학교병원 임상의학연구소,

\*\*\*경상대학교 의학전문대학원 생화학교실, 경상대학교 건강과학연구원, 의생명과학사업단 (BK21),

\*\*\*\*울산대학교 의과대학 구강악안면외과학교실

**Abstract** (J. Kor. Oral Maxillofac. Surg. 2009;35:205-212)

## PROLIFERATION OF ENDOTHELIAL PROGENITOR CELLS BY OSTEOGENIC DIFFERENTIATION OF PERIOSTEAL-DERIVED CELLS

Jong-Ryoul Kim, Jung-Ho Song, Uk-Kyu Kim, Bong-Wook Park\*, Young-Sool Hah\*\*, Jin-Hyun Kim\*\*,  
Deok Ryong Kim\*\*\*, Yeong-Cheol Cho\*\*\*\*, Iel-Yong Sung\*\*\*\*, June-Ho Byun\*

*Department of Oral and Maxillofacial Surgery, School of Dentistry, Pusan National University,*

*\*Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Gyeongsang National University School of Medicine and Institute of Health Sciences, Biomedical Center (BK21),*

*\*\*Clinical Research Institute, Gyeongsang National University Hospital,*

*\*\*\*Department of Biochemistry, Gyeongsang National University School of Medicine and Institute of Health Sciences, Biomedical Center (BK21),*

*\*\*\*\*Department of Oral and Maxillofacial Surgery, College of Medicine, Ulsan University*

**Purpose :** The purpose of this study was to examine the expression of various angiogenic factors during osteoblastic differentiation of periosteal-derived cells and the effects of osteogenic inductive medium of periosteal-derived cells on the proliferation of endothelial progenitor cells.

**Materials and methods :** Periosteal-derived cells were obtained from mandibular periosteums and introduced into the cell culture. After passage 3, the cells were divided into two groups and cultured for 21 days. In one group, the cells were cultured in the DMEM supplemented with osteogenic inductive agent, including 50g/ml L-ascorbic acid 2-phosphate, 10 nM dexamethasone and 10 mM -glycerophosphate. In the other group, they were cultured in DMEM supplemented without osteogenic inductive agent. VEGF isoforms, VEGFR-1, VEGFR-2, and neuropilin-1 mRNA expression was observed. Human umbilical cord blood-derived endothelial progenitor cell proliferation was also observed.

**Results :** The expression of VEGF isoforms was higher in osteogenic inductive medium than in non-osteogenic inductive medium. The expression of VEGFR-2 was also higher in osteogenic inductive medium than in non-osteogenic inductive medium. However, the expression of VEGFR-1 and neuropilin-1 was similar in both osteogenic inductive medium and non-osteogenic inductive medium. In addition, conditioned medium from differentiated periosteal-derived cells stimulated human umbilical cord blood-derived endothelial progenitor cell numbers compared to conditioned medium from non-differentiated periosteal-derived cells.

**Conclusion :** These results suggest that *in vitro* osteoblastic differentiation of periosteal-derived cells has angiogenic capacity to support endothelial progenitor cell numbers.

**Key words:** Periosteal-derived cells, Angiogenic capacity, Endothelial progenitor cells

(원고접수일 2009.6.18. / 1차수정일 2009.6.26. / 2차수정일 2009.7.3. / 게재확정일 2009.7.17.)

### 변준호

660-702경상남도 진주시 칠암동 90번지 경상대학교 의학전문대학원  
구강악안면외과학교실, 경상대학교 건강과학연구원, 의생명과학사업단(BK21)

### June-Ho Byun

Dept. of OMFS, Gyeongsang National University School of Medicine. Institute  
of Health Sciences, Biomedical center (BK21).

90 Chilam-dong, Jinju-city, Gyeongsangnam-do, 660-702, South Korea

Tel: 82-55-750-8258 Fax: 82-55-761-7024

E-mail: surbyun@gsnu.ac.kr

## I. 서 론

골 조직은 복잡하면서도 고도로 혈관화 되어있는 조직이므로 골의 재형성이나 골절 치유등과 관련하여 가장 중요하게 고려하여야 할 요소중의 하나는 활성화된 혈류공급이라 할 수 있다. 혈관계 (vasculature)는 산소, 영양물 및 각종 인자들을 신체 조직에 운반하며 성숙화된 혈관 구조의 발달이 기관형성 (organogenesis)의 가장 초기에 일어나는 현상이라 할 수 있다. 일반적으로 골 손상이 있을 경우, 관련 부위 혈관손상으로 산소부족에 따른 저산소 상태가 초래되어 이에 대한 보상 반응으로 혈류회복을 통한 산소증가를 위하여 혈관신생 기전이 발전하게 된다. 그러므로 사실 골의 재형성이 일어나기 전, 혈류의 회복은 골의 재형성에 가장 중요한 요소중의 하나가 되는 것이다. 그러므로 적절한 혈류공급이 골 조직에 제공되지 못할 경우 골격성 병변을 야기할 수 있다. 이를 고려하여 골 조직공학과 관련된 최신 경향은 근원이 되는 골 전구세포와 함께 혈관내피전구세포 (endothelial progenitor cells) 혹은 혈관내피세포 (endothelial cells)를 합동배양 (coculture)하여 좋은 결과를 산출하고 있다. Villars 등<sup>1)</sup>은 인간 제대정맥 혈관내피세포 (human umbilical vein endothelial cells)이 포함된 배지는 골수기원줄기세포의 증식을 증진시키며 인간 제대정맥 혈관내피세포와 골수기원줄기세포를 합동배양할 경우, 조골세포의 분화과정에서 초기 특이 표지자로 알려진 알칼리성 인산분해효소의 활성을 증진시킨다고 하였다<sup>2-5)</sup>. 이러한 결과들은 혈관내피세포가 골수기원줄기세포의 조골세포로의 분화에 직접적인 영향을 미칠 수 있다는 것을 나타낸다고 할 수 있다. 혈관내피전구세포는 골수에서 형성되어 혈류를 타고 움직이면서 혈류가 부족한 조직이나 손상받은 조직에서 혈관재생을 이루는 것으로 알려져 있다. 따라서 이러한 혈관내피전구세포를 심근경색이나 뇌졸중과 같이 혈류가 통하지 않아 생기는 질병들의 치료에 이용하고자 하는 연구가 현재 전 세계적으로 활발히 진행 중이다. 혈관내피전구세포는 사람의 혈액에서 얻을 수 있고, 좀 더 어렵게는 골수를 채취하여 얻을 수도 있으나, 그 수가 충분치 못하여 질병치료에까지 적용하기가 어려운 상황이다. 최근에 탯줄 안에 남아있는 제대혈액 (human umbilical cord blood)에 혈관내피전구세포 (endothelial progenitor cells)가 다량 존재하고 있음이 알려지면서 이를 안정적으로 분리, 증식시킬 수 있는 프로토콜을 확립하여 추후 질병모델을 이용한 전 임상실험에 활용하고자 하는 시도가 전 세계적으로 활발히 진행 중이다. 제대혈액은 분만 과정이 완전히 끝난 후에, 산모와 신생아의 몸에서 분리된 태반과 탯줄에 남아있는 혈액을 모아 얻게 되는 것으로 이 과정은 분만이 끝난 뒤 버려질 태반과 탯줄에서 이루어지므로 산모와 신생아의 건강에 어떠한 종류의 위해도 끼치지 않는다. 따라서 세포배양을 포함한 임상의학에서 그 활용가치는 크다고 여겨진다<sup>6,9)</sup>.

혈관신생 (angiogenesis)과 골신생 (osteogenesis)이 상호 밀접한 관계를 가진다는 것은 주지의 사실로 혈관투과성에 있어서 히스타민보다 약 5 만배 더 강력한 기능을 나타내어 혈관투과인자라고도 불리우는 혈관내피세포성장인자 (vascular endothelial growth factor, VEGF)와 혈관내피세포성장인자수용체 (vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR)가 가장 강력한 혈관신생인자 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 인간에서 혈관내피세포성장인자는 <sup>121</sup>, <sup>165</sup>, <sup>189</sup>, 그리고 <sup>206</sup> (VEGF<sup>121</sup>, VEGF<sup>165</sup>, VEGF<sup>189</sup>, and VEGF<sup>206</sup>) amino acid residues의 네가지 isoforms을 나타내며 주로 혈관내피세포에 존재하는 두가지 수용체, 혈관내피세포성장인자수용체-1 (VEGFR-1)과 혈관내피세포성장인자수용체-2 (VEGFR-2)에 결합하여 그 역할을 수행한다. Semaphorins에 대한 수용체로 처음 알려진 neuropilin-1은 비교적 최근에 밝혀진 혈관내피세포성장인자수용체로써 혈관내피세포성장인자/혈관내피세포성장인자수용체-2 (VEGF/VEGFR-2)의 상호작용을 증가시키는 일종의 보조수용체 (co-receptor) 역할을 하는 것으로 알려져 있다<sup>10-13)</sup>.

이에 본 연구에서는 제대혈액에서 혈관내피전구세포를 추출하고 골막기원세포에서 조골세포로의 분화과정에서 나타나는 다양한 혈관내피세포성장인자 관련 인자의 발현을 관찰하며 이러한 분화과정이 제대혈액에서 추출, 분리, 분화시킨 혈관내피전구세포의 증식에 어떠한 영향을 미치는지 관찰하고자 한다.

## II. 연구재료 및 방법

### 1. 골막기원세포의 추출, 증식 및 조골세포로의 분화

골막기원세포를 추출하고 증식하는 과정은 이전 연구방법에 의하여 실시하였다<sup>12,14)</sup>. 환자 동의하에 매복된 하악 제 3대구치의 발치과정에서 약 5×20 mm의 골막을 채취하여 몇조각으로 다시 자른다. 이를 100-mm culture dish에 넣은 후 넣은 후 10% fetal bovine serum, 100 IU/mL penicillin, 그리고 100 µg/mL streptomycin이 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 배지에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기를 통하여 배양하였다. 약 90%의 세포군집 (confluence)을 나타내면 증식된 세포들을 0.02% 트립신과 0.02% EDTA로 5분간 트립신 처리시키고 1,500 rpm에서 원심분리하여 계대배양을 실시하였다. Passage 3을 거친 후, 골막기원세포는 두 그룹으로 나누어 배양한다. 한 군에서는 3×10<sup>4</sup> cells/well의 밀도로 6-well plate에 주입하고 골형성 유도인자 50µg/ml L-ascorbic acid 2-phosphate, 10 nM dexamethasone, 그리고 10 mM β-glycerophosphate이 포함되고 10% fetal bovine serum (FBS)이 포함된 DMEM로 구성된 골형성 유도 배지에서 3주동안 배양한다. 다른 한 군에서는 골형성 유도인자가 포함되지 않고 10% FBS가 포함된 DMEM 배지에 3×10<sup>4</sup> cells/well의 밀도로 6-well plate에 주입하고 3

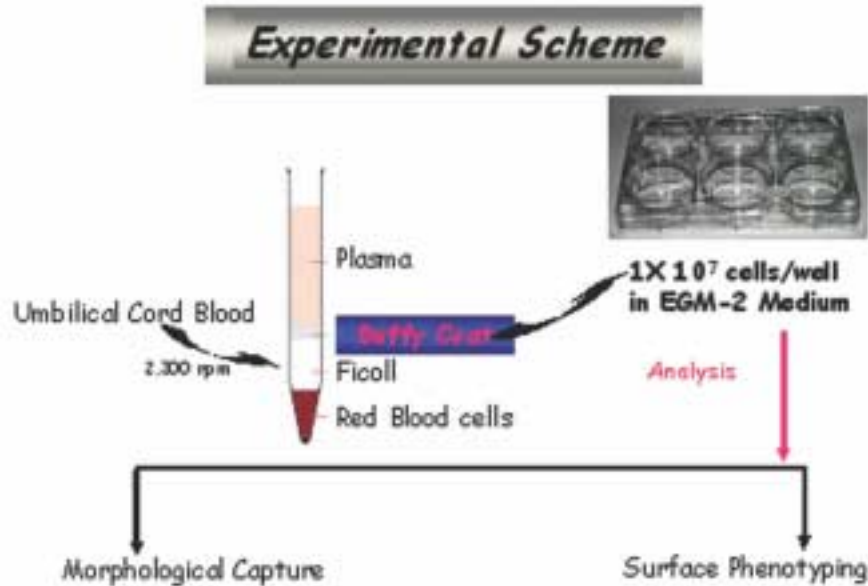


Fig. 1. Experimental schem for culture of endothelial progenitor cells from human umbilical cord blood.

주동안 배양하였다.

## 2. 혈관내피전구세포의 획득

혈관내피전구세포는 경상대학교 병원 암센터 혈관내피세포 연구실로부터 제공받았다. 제대혈액으로부터 혈관내피전구세포를 추출하고 이를 혈관내피세포로 분화시키는 과정은 경상대학교병원 윤리위원회의 승인을 받아 진행되었다. 이의 추출과정을 간략하게 요약하면, 신생아가 분만된 뒤 제대를 이중으로 결찰하고 소독한 후, 제대를 절단하고 채혈백 바늘을 주입하여 중력에 의해 흘러내리는 50 ml의 제대혈을 채취한다. 제대혈에 있는 단핵세포층은 2,300 rpm의 속도로 실온에서 25분간 Ficoll-Hypaque 밀도구배원심분리 (Ficoll-Hypaque density gradient centrifugation) 방법으로 분리하였으며 인산염완충식염수 (phosphate buffered solution (PBS)에 3회 반복 세척하였다. 분리된 단핵세포층은 fibronectin이 코팅된 배양접시에서 fetal bovine serum (FBS), human epidermal growth factor, human vascular endothelial growth factor, human insulin-like growth factor-1, human fibroblast growth factor-B, heparin, ascorbic acid 및 hydrocortisone 등이 포함된 혈관내피전구세포 유도배지 (endothelial cell basal medium-2, Clontech Laboratories Inc, CA, USA)에서 배양하여 혈관내피전구세포로의 분화를 유도한다. 약 4주 정도의 배양기간을 거치면 방추사 혹은 별모양(spindle-shaped or star-like structure)의 초기 혈관내피전구세포가 조약돌 형태 (cobblestone-like structure)의 성숙

한 혈관내피전구세포로 분화되게 된다(Fig. 1).

## 3. 인간 제대혈액 유래 혈관내피전구세포의 형태학적 관찰

Differential Interference Contrast (DIC) microscope 영상을 통하여 세포가 배양되면서 초기 혈관내피전구세포의 형태인 방추사 혹은 별모양의 형태를 나타내다가 지속적으로 배양시 성숙한 혈관내피전구세포의 형태인 조약돌 같은 모양을 나타내는지 형태학적 평가를 실시하였다.

## 4. 인간 제대혈액 유래 혈관내피전구세포의 표면 표지자 분석 (Cell surface markers analysis)

일차배양 후, 관련 세포들을 트립신 처리하고  $1 \times 10^7$ 개 정도의 세포들을 30분간 얼음에 일차항체와 배양시켜 조혈세포 표지자에 대한 세포표면 표지자 분석을 시행하였다. 조혈 줄기세포 표지자로는 CD34, VEGFR-2 및 VE-cadherin을 이용하여 이들에 대한 Fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated 항체를 이용하고 mouse IgG-FITC를 음성 대조군으로 이용하였다. 결과는 fluorescence-activated cell sorter (FACS) caliber flow cytometer를 통하여 히스토그램 점도 (histogram plot)로 평가하였다.

## 5. 혈관내피세포성장인자 및 혈관내피세포성장인자수용체에 대한 Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) 분석

두 군의 골막기원세포에서 발현되는 혈관내피세포성장인자 및 혈관내피세포성장인자수용체를 reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)을 통하여 배양 1, 2, 그리고 3주째에 분석하였다. 총 RNA를 각 주의 세포층에서 TRIzol reagent를 처리하여 추출하였고 oligo (dT) 시발체 (primer)와 Superscript First-Strand Synthesis System (Invitrogen Life Technologies, CA, USA)을 이용한 역전사반응으로 cDNA를 합성하였다. 적절한 시발체를 이용하여 합성된 cDNA로부터 알칼리성 인산분해효소, osteocalcin 및 GAPDH에 대한 PCR 증폭을 실시하였다. PCR을 위하여 사용체 시발체는 다음과 같다 (sense / antisense) : 5' - aatgcatcctgcaccaccaa-3' , 5' -gtagccatattcattgtcat-3' 515 bp for the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH); 5' - gggcagaatcatcacgaagt-3' , 5' -tcaccgectcggttcaca-3' for the VEGF; 5' -ggctctgtggaagttcagc-3' , 5' -gctcacactgctcatccaaa-3' 223 bp for the VEGFR-1; 5' -gtgaccaacatggagtcgtg-3' , 5' -tgcttcacagaagaccatgc-3' 218 bp for the VEGFR-2; 5' -caac-gataaatgtggcgatact-3' , 5' -tatactgggaagaagctgtgat-3' 820 bp for the neuropilin-1. RT-PCR 산물은 1.5% 아가로스겔을 사용하여 전기영동으로 확인하였다. 그리고 이러한 유전인자들의 mRNA 발현은 음영계측 (Densitometry, Bio-Rad Laboratories, CA, USA)을 통하여 상대적으로 평가하였다.

6. 혈관내피세포의 증식

두 군의 골막기원세포에서 분비되는 혈관신생인자들이 혈관내피전구세포의 증식에 미치는 영향을 관찰하고자 한다. 골형성 유도인자가 포함되었던 배지와 골형성 유도인자가 포함되지 않았던 배지에서 각각 골막기원세포를 배양하고 이후 골막기원세포를 배제시킨 상태에서 혈관내피전구세포의 증식을 CCK-8 kit (Dojindo, Gaithersburg, USA)를 이용하여 분석한다. 조약돌 형태를 나타내며 배양 4주의 성숙한 혈관내피전구세포들을  $5 \times 10^3$  cells/well의 밀도

로 96-well plate에 주입하고 혈관내피전구세포 유도배지에서 배양하였다. 24시간 지난 후, 세포들을 다시 0.5% FBS가 포함된 DMEM에 배양하여 세포기아 (cell starvation) 상태를 유도하였다. 그리고 다시 24시간이 지난 후, 골형성 유도인자가 포함되었던 배지와 골형성 유도인자가 포함되지 않았던 배지에서 혈관내피전구세포들을 주입하고 37°C에서 1시간동안 well당 10  $\mu$ l CCK-8 solution으로 처리하여 그 증식 양상을 3, 7, 10, 13, 16, 그리고 21일째 관찰하였다. 혈관내피전구세포들을 골형성 유도인자가 포함되었던 배지와 골형성 유도인자가 포함되지 않았던 배지에 주입하여 그 증식양상을 확인하기 위하여 두 군에서 혈관내피전구세포 주입 24시간 전, 미리 골막기원세포를 배제시켰다.

Ⅲ. 연구결과

1. 인간 제대혈액 유래 혈관내피전구세포의 관찰

제대혈액에서 분리된 단핵세포층을 fibronectin이 코팅된 혈관내피전구세포 유도배지에서 배양하였다. 배양 3일째부터 세포군집을 잘 형성하였으며 배양 2주까지의 배양 초기에는 초기 혈관내피전구세포의 형태인 방추사 혹은 별 모양의 형태를 나타내다가 배양 4주경에서는 성숙한 혈관내피전구세포의 형태인 조약돌 같은 모양을 나타내었다 (Fig. 2).

2. 인간 제대혈액 유래 혈관내피전구세포의 표면 표지자

FACS를 이용하여 인간 제대혈액의 단핵구층에서 채취한 세포들의 표면 표지자를 분석하였다. 인간 제대혈액의 단핵구층에서 채취한 세포들은 조혈 줄기세포 표지자로 알려진 CD34, VEGFR-2 및 VE-cadherin (VE-Cad)에 양성을 나타내어 배양된 이 세포들의 표현형은 혈관내피전구세포와 유사함을 관찰하였다(Fig. 3).

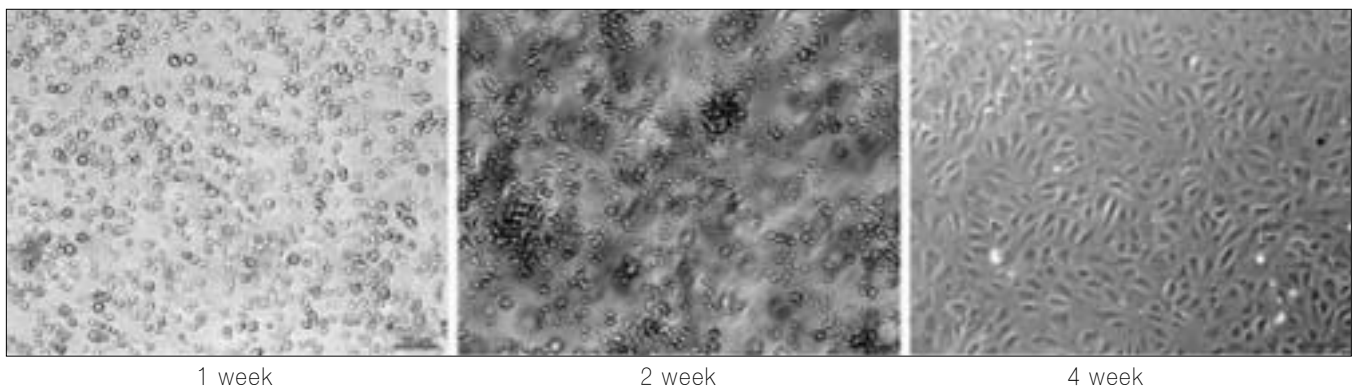
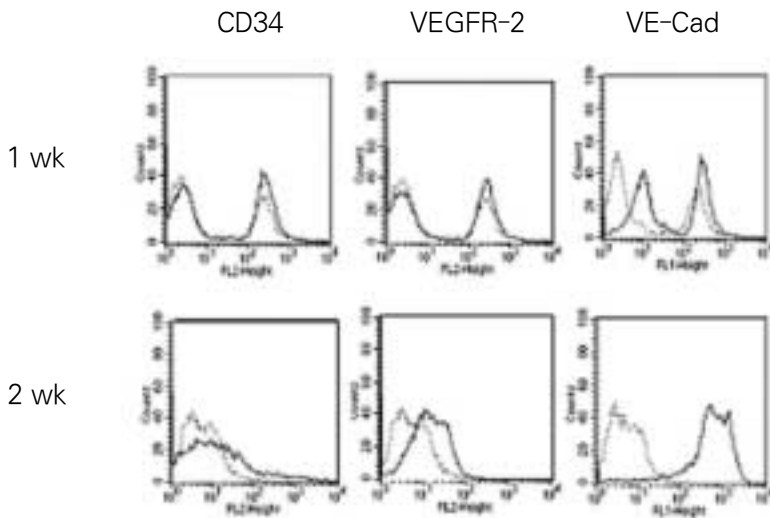


Fig. 2. Cellular morphology of putative endothelial progenitor cells from human umbilical cord blood-mononucleated cells culture at 1 week, 2 week, and 4 week of culture.

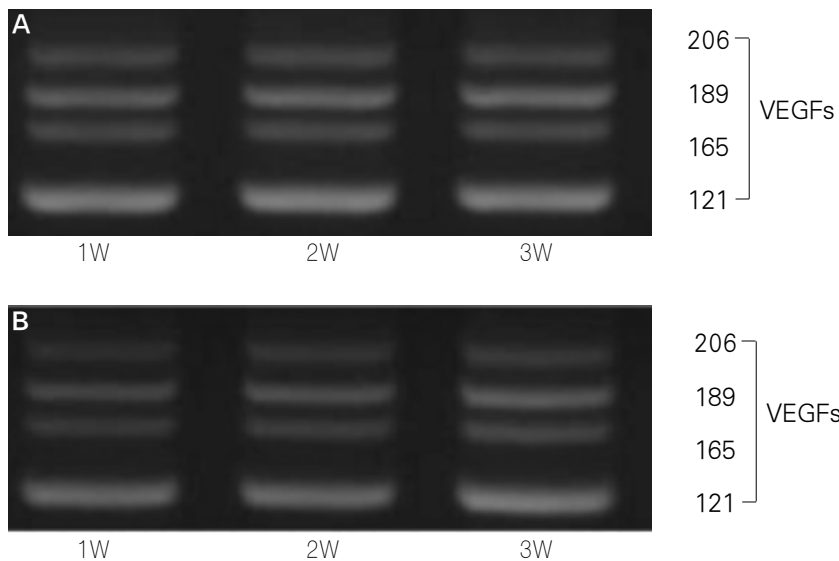
### 3. RT-PCR 분석

골형성 유도인자인 ascorbic acid, dexamethasone, 그리고  $\beta$ -glycerophosphate이 포함된 배지에서 배양한 경우나, 골형성 유도인자가 포함되지 않은 곳에서 배양한 경우 모두에서 골막기원세포에서는 네가지 isoforms의 혈관내피세포성장인자의 발현을 나타내었다. 그러나 골형성 유도인

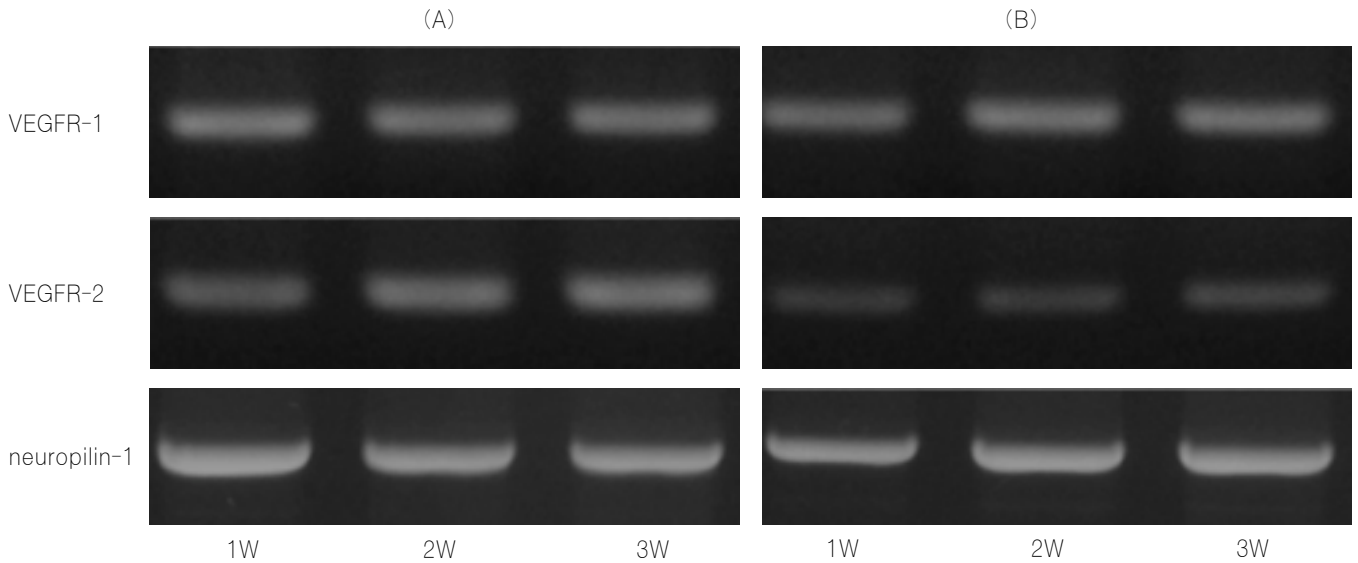
자가 포함된 배지에서 배양된 골막기원세포에서 혈관내피세포성장인자의 발현양상이 뚜렷하였다. 혈관내피세포성장인자수용체-1과 neuropilin-1의 발현은 두 군에서 비슷하였으나 혈관내피세포성장인자수용체-2의 발현은 골형성 유도인자가 포함된 배지에서 배양된 골막기원세포에서 그 발현정도가 증가되었다(Figs. 4, 5).



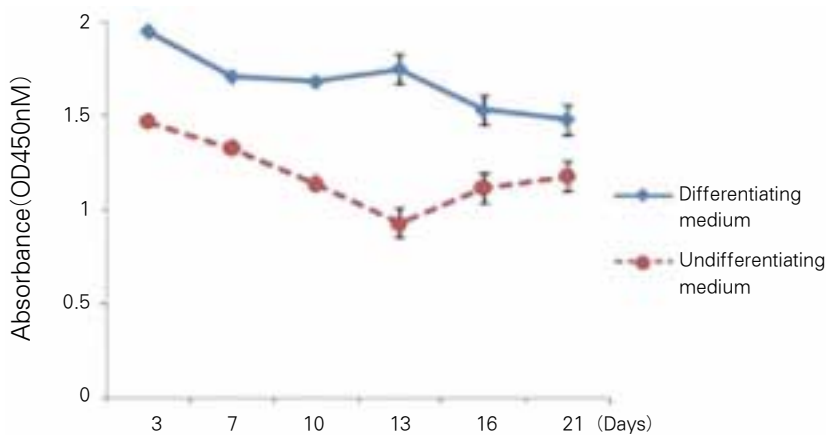
**Fig. 3.** FACS analysis of cultured endothelial progenitor cells. Primary endothelial progenitor cells were stained with specific antibodies to hematopoietic stem cell markers (CD34, VEGFR-2, VE-cadherin (VE-Cad) and isotype control-matched monoclonal antibody at 1 week (1 wk) and 2 week (2 wk) of culture. The thick histograms show the fluorescence intensity of the cells with each antibody. These results indicate that the cultured human umbilical cord blood-mononucleated cells own the phenotypic characterization of hematopoietic stem cells.



**Fig. 4.** (A) The expression of four VEGF isoforms in periosteal-derived cells of the medium with osteogenic inductive agent at 1 week (1W), 2 week (2W), and 3 week (3W) of culture. (B) The expression of four VEGF isoforms in periosteal-derived cells of the medium without osteogenic inductive agent. The expression of four isoforms of VEGF was observed in periosteal-derived cells in medium of both groups with or without osteogenic inductive agent. However, the expression of VEGF isoforms was higher in osteogenic inductive medium than in non-osteogenic inductive medium.



**Fig. 5.** (A) The expression of VEGFRs in periosteal-derived cells of the medium with osteogenic inductive agent at 1 week (1W), 2 week (2W), and 3 week (3W) of culture. (B) The expression of VEGFRs in periosteal-derived cells of the medium without osteogenic inductive agent. The expression of VEGFR-2 was higher in osteogenic inductive medium than in non-osteogenic inductive medium. However, the expression of VEGFR-1 and neuropilin-1 was similar in both osteogenic inductive medium and non-osteogenic inductive medium.



**Fig. 6.** Endothelial progenitor cell proliferation in differentiating undifferentiating medium of periosteal-derived cells. Differentiating conditioned medium of periosteal-derived cells resulted in higher endothelial progenitor cell numbers compared to undifferentiating conditioned medium.

#### 4. 혈관내피전구세포의 증식

골막기원세포들을 제거한 뒤, 골형성 유도인자가 포함되었던 배지와 골형성 유도인자가 포함되지 않았던 배지에 혈관내피전구세포들을 주입하고 그 증식정도를 관찰하였다. 골형성 유도인자가 포함된 배지에서 자란 혈관내피전구세포들의 증식정도는 배양기간이 지날수록 다소 감소되는 경향을 나타냈고 골형성 유도인자가 포함되지 않은 배지에서 자란 혈관내피전구세포들의 증식정도는 배양 13일정도까지 감소하다가 이후 다소 증가하는 경향을 나타냈다. 그러나 혈관내피전구세포의 증식정도는 골형성 유도인자가 포함되지 않은 배지에서보다 골형성 유도인자가 포함된 배지에서 그 양상이 증가되어 있음을 관찰하였다(Fig. 6).

#### IV. 총괄 및 고찰

혈관내피세포성장인자는 조골세포 및 조골세포-유사세포 (osteoblast-like cells)를 포함하여 다양한 세포들에서 분비되어 골신생과 혈관신생사이 상호작용의 조절에 관여하며 골의 재형성이나 골절의 치유과정에서 혈관내피세포성장인자-매개 혈관신생 (VEGF-mediated angiogenesis)이 중요한 역할을 하는 것은 주지의 사실로 여러 동물 모델에서 이에 대한 연구가 지속적으로 이루어지고 있다. Gerber 등<sup>15)</sup>에 의하며 내인성 혈관내피세포성장인자의 활성이 억제될 경우 골형성의 장애가 유도된다고 하였으며 Maes 등<sup>16)</sup>은 혈관내피세포성장인자 isoforms이 부족한 마우스의 모델에서 혈관계 및 골형성/연골형성 프로그램의 손상이 나타

났다고 보고하였다. 이러한 결과들은 혈관내피세포성장인자가 골의 혈관화에만 역할을 하는 것이 아니라 전구세포들을 조골세포나 연골세포로 분화시키는 데 역할을 한다는 것을 의미한다고 할 수 있다. 그러나 골 전구세포의 세포 배양과정에서 혈관내피세포성장인자 및 혈관내피세포성장인자수용체의 발현은 아직도 다소의 논란이 있다. 류마티스 관절염등과 같은 염증질환에서 흔히 이용되는 dexamethasone이 치료 약리학적 용량으로 적용될 경우, 골 조직에는 골다공증 혹은 무혈관성 괴사를 나타낸다고 알려져 있으나 세포배양에서 생리학적 용량으로 적용될 경우, 골 전구세포의 조골세포로의 분화과정을 촉진시킨다고 알려진 것과 같이 골 전구세포의 세포 배양과정에서 혈관내피세포성장인자의 역할과 관련하여 다소 상반된 연구도 보고되고 혈관내피세포성장인자수용체의 발현과 관련하여서도 다소 논란이 있다<sup>117</sup>. Furumatsu 등<sup>18</sup>은 인간 골수기원줄기세포의 골형성과정에서 네 개의 혈관내피세포성장인자 isoforms (혈관내피세포성장인자<sub>121</sub>, <sub>165</sub>, <sub>189</sub>, 그리고 <sub>206</sub>)과 neuropilin-1이 발현되었으나 혈관내피세포성장인자수용체-1과 혈관내피세포성장인자수용체-2의 발현은 관찰되지 않았다고 하였다. Wang 등<sup>17</sup>은 해면골편으로부터 배양한 조골세포-유사세포에서 혈관내피세포성장인자 isoforms중 혈관내피세포성장인자<sub>121</sub>만이 유일하게 발현되었고 V혈관내피세포성장인자수용체-1과 혈관내피세포성장인자수용체-2는 발현되지 않았다고 하였다. 또한 골 전구세포의 조골세포로의 분화과정에서 조골세포의 표지자로 알려진 알칼리성 인산분해효소와 관련하여 외인성 혈관내피세포성장인자의 주입이 해면골편으로부터 배양한 조골세포-유사세포의 알칼리성 인산분해효소의 활성을 증가시키지 않는다고 하였다. Deckers 등<sup>19</sup>은 생쥐의 preosteoblast-like cell line인 KS483에서 인간의 혈관내피세포성장인자<sub>121</sub>과 혈관내피세포성장인자<sub>165</sub>에 해당하는 혈관내피세포성장인자<sub>120</sub>과 혈관내피세포성장인자<sub>164</sub>의 발현과 혈관내피세포성장인자수용체-1, 혈관내피세포성장인자수용체-2 및 neuropilin의 발현을 보고하였다. Villars 등<sup>11</sup>은 인간 골수기원줄기세포로부터 추출한 골 전구세포의 조골세포 분화과정에서 외인성 VEGF 주입이 조골세포의 표지자인 ALP의 활성에 긍정적인 영향을 미치지 않는다고 보고하였다. 본 연구에서는 골형성 유도인자가 포함된 배지에서 배양한 경우나, 골형성 유도인자가 포함되지 않은 곳에서 배양한 경우 모두에서 골막기원세포에서는 네 가지 isoforms의 혈관내피세포성장인자의 발현을 나타내었다. 그러나 골형성 유도인자가 포함된 배지에서 배양된 골막기원세포에서 혈관내피세포성장인자의 발현양상이 뚜렷하였다. 혈관내피세포성장인자수용체에 대해서도 두 군에서 모두 발현이 나타났는데 혈관내피세포성장인자수용체-1과 neuropilin-1의 발현은 두 군에서 비슷하였으나 혈관내피세포성장인자수용체-2의 발현은 골형성 유도인자가 포함된 배지에서 배양된 골막기원세포에서 그 발현정도가 증가되었다. 이러

한 결과들을 통하여 골막기원세포가 조골세포로 유리하게 분화될 수 있게 하는 조건에서 혈관신생인자들의 발현도 좀 더 긍정적으로 나타나는 것이라 생각할 수 있다. 골신생과 혈관신생의 밀접한 상호작용중에서 또다른 관점으로 생각할 수 있는 것이 골신생과정자체가 혈관신생에 영향을 주는 것이라는 것이다. 이에 대하여 조골세포로의 분화나 연골세포의 정상적인 성숙과정에 장애가 나타날 경우, 관련된 골의 혈관화 장애를 유발할 수도 있다고 알려져 있다<sup>16</sup>. Otto 등<sup>17</sup>은 골 전구세포가 조골세포로 분화되는 초기 과정에서 가장 중요한 인자로 알려진 core-binding factor alpha 1 (Cbf $\alpha$ 1)이 부족한 마우스를 이용하여 이 인자가 부족할 경우, 조골세포로의 분화가 이루어지지 않을 뿐 아니라, 관련된 골내의 조혈 전구세포 (hematopoietic precursors) 또한 명확하게 관찰되지 않았다고 하였다. 본 연구에서도 이 점에 주목하여 골막기원세포의 세포배양과정에서 분비된 혈관신생인자들로 인하여 혈관내피전구세포의 증식에 어떠한 효과를 나타내는지 관찰하였다. 골형성 유도인자가 포함된 배지에서와 골형성 유도인자가 포함되지 않은 배지에서 골막기원세포들을 제거한 뒤, 혈관내피전구세포들을 주입하고 그 증식정도를 관찰하였는데 골형성 유도인자가 포함된 배지에서 혈관내피전구세포들의 증식이 더 잘 일어남을 관찰하였다. 이러한 결과와 상기의 결과들을 통하여 골막기원세포가 조골세포로 유리하게 분화될 수 있게 하는 조건 (골형성 유도인자가 포함)은 혈관신생인자들의 발현의 증가와 함께 혈관내피전구세포들의 증식에도 유리함을 관찰할 수 있었다. 향후 추가적인 방법을 통하여 골막기원세포의 조골과정과 혈관신생과정에 대하여 더 면밀한 고찰이 있어야 할 것으로 사료된다.

## V. 결 론

경상대학교 병원의 윤리위원회를 따르고 환자 동의하에 매복된 하악 제3대구치의 발치과정에서 채취한 골막에서 골막기원세포를 추출하고 ascorbic acid, dexamethasone, 그리고  $\beta$ -glycerophosphate의 골형성 유도인자가 포함된 배지에서와 골형성 유도인자가 포함되지 않은 배지에서 각각 3주동안 배양하고 경상대학교 병원 암센터 혈관내피세포 연구실로부터 인간 제대혈액으로부터 추출한 혈관내피전구세포를 제공받아 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 인간 제대혈액에서 분리된 단핵세포층을 혈관내피전구세포 유도배지에서 배양하는 과정에서 배양 2주까지는 초기 혈관내피전구세포의 형태인 방추사 혹은 별모양의 형태를 나타내다가 배양 4주경에서는 성숙한 혈관내피전구세포의 형태인 조약돌 같은 모양을 나타내었다.
2. 인간 제대혈액의 단핵구층에서 채취한 세포들은 조혈줄기세포 표지자로 알려진 CD34, VEGFR-2 및 VE-cadherin (VE-Cad)에 양성을 나타내어 배양된 이 세포들의

표현형은 혈관내피전구세포와 유사함을 관찰하였다.

3. 골형성 유도인자가 포함된 배지에서 배양된 골막기원 세포에서 혈관내피세포성장인자 및 혈관내피세포성장인자수용체-2의 발현양상이 뚜렷하였다.
4. 골막기원세포들을 배제시킨 가운데, 골형성 유도인자가 포함되지 않은 배지에서보다 골형성 유도인자가 포함된 배지에서 혈관내피전구세포의 증식이 더 증가되어 있음을 관찰하였다.

이상의 결과등을 통하여 골막기원세포가 조골세포로 분화될 때 혈관신생인자들의 발현 증가가 나타나고 이러한 것들이 혈관내피전구세포들의 증식에 유리할 수 있다는 것을 나타내는 것이라 할 수 있다. 혈관내피전구세포들의 증식 뿐 아니라, 여러 단계의 혈관신생과정에 골막기원세포의 조골과정이 유리하게 작용하는 지에 대해서는 향후 추가적인 연구, 고찰이 동반되어야 할 것으로 사료된다.

### 참고문헌

1. Villars F, Bordenave L, Bareille R, Amédée J: Effect of human endothelial cells on human bone marrow stromal cell phenotype: role of VEGF?. *J Cell Biochem* 2000;79:672-85.
2. Guillotin B, Bourget C, Remy-Zolghadri M, Bareille R, Fernandez P, Conrad V et al: Human primary endothelial cells stimulate human osteoprogenitor cell differentiation. *Cell Physiol Biochem* 2004;14:325-32.
3. Hausman HR, Schaffler MB, Majeska RJ: Prevention of fracture healing in rats by an inhibitor of angiogenesis. *Bone* 2001;29:560-4.
4. Kaigler D, Krebsbach PH, West ER, Horger K, Huang YC, Mooney DJ: Endothelial cell modulation of bone marrow stromal cell osteogenic potential. *FASEB J* 2005;19:665-7.
5. Street J, Bao M, deGuzman L, Bunting S, Peale FV Jr, Ferrara N et al: Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:9656-61.
6. Balbarini A, Barsotti MC, Di Stefano R, Leone A, Santoni T: Circulating endothelial progenitor cells characterization, function and relationship with cardiovascular risk factors. *Curr Pharm Des* 2007;13:1699-713.
7. Chachques JC, Duarte F, Cattadori B, Shafy A, Lila N, Chatellier G et al: Angiogenic growth factors and/or cellular therapy for myocardial regeneration: a comparative study. *J Thorac*

8. *Cardiovasc Surg* 2004;128:245-53.
8. Chen HK, Hung HF, Shyu KG, Wang BW, Sheu JR, Liang YJ et al: Combined cord blood stem cells and gene therapy enhances angiogenesis and improves cardiac performance in mouse after acute myocardial infarction. *Eur J Clin Invest* 2005;35:677-86.
9. Shyu KG, Wang BW, Hung HF, Chang CC, Shih DT: Mesenchymal stem cells are superior to angiogenic growth factor genes for improving myocardial performance in the mouse model of acute myocardial infarction. *J Biomed Sci* 2006;13:47-58.
10. Haper J, Gerstenfeld LC, Klagsbrun M: Neupilin-1 expression in osteogenic cells: down-regulation during differentiation of osteoblasts into osteocytes. *J Cell Biochem* 2001;81:82-92.
11. Mayer H, Bertram H, Lindenmaier W, Korff T, Weber H, Weich H: Vascular endothelial growth factor (VEGF-A) expression in human mesenchymal stem cells: autocrine and paracrine role on osteoblastic and endothelial differentiation. *J Cell Biochem* 2005;95:827-39.
12. Park BW, Byun JH, Ryu YM, Hah YS, Kim DR, Cho YC et al: Correlation between vascular endothelial growth factor signaling and mineralization during osteoblastic differentiation of cultured human periosteal-derived cells. *J Korean Assoc Maxillofac Plast Reconstr Surg* 2007;29:197-205.
13. Tao O, Spring SC, Terman BI: Characterization of a new alternatively spliced neuropilin-1 isoform. *Angiogenesis* 2003;6:39-45.
14. Park BW, Byun JH, Lee SG, Hah YS, Kim DR, Cho YC et al: Evaluation of osteogenic activity and mineralization of cultured human periosteal-derived cells. *J Korean Assoc Maxillofac Plast Reconstr Surg* 2006;28:511-9.
15. Gerber HP, Vu TH, Ryan AM, Kowalski J, Werb Z, Ferrara N: VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat Med* 1999;5:623-8.
16. Maes C, Carmeliet P, Moermans K, Stockmans I, Smets N, Collen D et al: Impaired angiogenesis and endochondral bone formation in mice lacking the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF164 and VEGF188. *Mech Dev* 2002;111:61-73.
17. Wang DS, Miura M, Demura H, Sato K: Anabolic effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on osteoblasts are enhanced by vascular endothelial growth factor produced by osteoblasts and by growth factors produced by endothelial cells. *Endocrinology* 1997;138:2953-62.
18. Furumatsu T, Shen ZN, Kawai A, Nishida K, Manabe H, Oohashi T et al: Vascular endothelial growth factor principally acts as the main angiogenic factor in the early stage of human osteoblastogenesis. *J Biochem (Tokyo)* 2003;133:633-9.
19. Deckers MM, Karperien M, van der Bent C, Yamashita T, Papapoulos SE, Löwik CW: Expression of vascular endothelial growth factors and their receptors during osteoblast differentiation. *Endocrinology* 2000;141:1667-74.