

R-1. 세포부착에 관여하는 펩타이드를 흡착시킨 골이식재에 대한 골아세포의 활성능에 대한 평가

강승훈, 박진우, 이재목, 서조영

경북대학교 치과대학 치주과학교실

I. 연구배경

손상된 조직 치유 과정의 초기에 나타나 이후 과정을 조절하는 대표적인 물질 중의 하나로 성장인자를 들 수 있는데, 이들은 손상된 조직치유 과정 전반에 걸쳐 강력한 영향을 미치면서 세포의 성장, 분화, 대사 등을 조절하고, 손상된 조직 주변 환경을 조절하므로, 이를 이용한 치료제의 개발이 꾸준히 진행되고 있다. 현재 손상된 조직치료를 위하여 연구되는 것으로는 PDGF(platelet-derived growth factor), TGF- β (transforming growth factor- β), β ig-h3 및 피브로넥틴 등이 있다.

β ig-h3은 TGF- β 에서 유도되는 세포부착분자로써 fas-1이라고 명명된 4개의 반복 도메인(repeat domain)을 가지고 있다. β ig-h3은 섬유아세포 등을 비롯한 여러 세포를 부착시킬 수 있는 기능을 가지고 있으며 각각의 fas-1 도메인만으로도 세포의 부착을 매개할 수 있다.

세포의 부착에는 인테그린(integrin)이라 불리는 세포 표면 부착 수용체가 중요한 역할을 하는데, 인테그린과 세포의 기질과의 상호작용을 통해 세포의 성장, 분화, 사멸 및 발생과정을 조절하고, 또한 여러 병적 상태에 반응한다. 인테그린과 작용하여 세포의 기능을 조절하는 중요한 세포의 기질 중에 가장 잘 알려진 것 중 하나가 피브로넥틴(fibronectin)이다. 피브로넥틴은 분자량이 약 220 kDa의 비교적 큰 단백질로서 RGD 모티프를 비롯한 몇 개의 모티프들이 있어 다양한 인테그린과 작용을 하여 세포의 기능을 조절한다(Hynes R.O., *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 1998). 피브로넥틴의 인테그린과 작용하는 모티프 중 가장 중요한 세포 부착 모티프인 RGD는 타입 III 10번째 도메인에 있으며 RGD와 함께 세포의 부착작용의 기능이 있다고 알려진 PHSRN 모티프는 타입 III 9번째 도메인에 존재한다(Richard P. Grant, *The Journal of Biological Chemistry*, 1997).

세포의 이주와 부착은 지지대(scaffold)를 필요로 한다. 체내에서 세포는 세포의 기질에 부착하고 이주하며 세포의 기질과 다른 세포에 의해 형성된 3차원적 구조에서 존재하여 세포의 기질과 세포사이, 인접한 세포들 사이의 화학적 기계적 정보의 흐름으로 분화에 기여한다(Hay, 1989). 그러나 불활성 지지대들은 정보전달의 경로를 통하여 세포와 정보를 교환할 수 없다. 그러므로 우리의 가정은 세포의 기질의 세포 부착능을 불활성 제재인 골 이식재에 3차원적으로 접목시킴으로써 골 형성 세포의 부착, 이주, 분화를 촉진시키고자 한다. 이런 기질형성은 조직공학(tissue engineering)을 위한 세포를 위한 안식처로서 작용할 수 있고, 생체 내 이식재가 사용될 때 생체활성 지지대로서 작용할 수 있다.

이에 본 연구는 피브로넥틴 및 β ig-h3은 둘 다 손상된 조직에 치유 효과가 있을 것으로 예상되어 피브로넥틴의 주요 모티프인 PHSRN과 RGD를 함유하는 9번 및 10번 타입 III 도메인과 β ig-h3의 4번 fas-1 도메인을 결합시킨 재조합 단백질(T-CAM 이라 명명)을 골이식재로 사용되고 있는 Hydroxyapatite(HA)

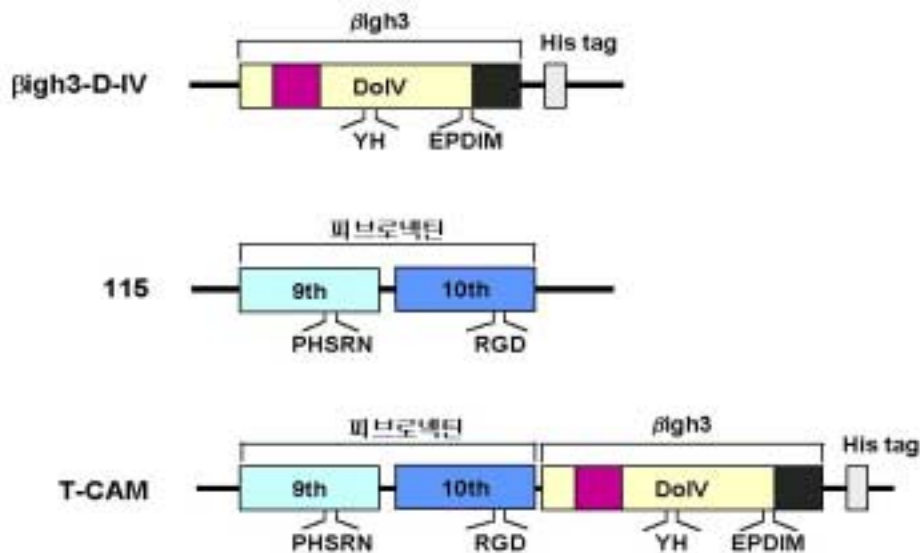
와 흡착시킴으로서 골 형성에 관여하는 골아세포의 활성능을 평가해 보고자 한다.

11. 연구방법 및 재료

1. 펩타이드의 합성

피브로넥틴의 주요 모티프인 PHSRN과 RGD를 함유하는 9번 및 10번 타입 III 도메인과 β g-h3의 4번 fas-1 도메인(그림 1)을 solid phase procedure에 의해 합성한다. (Zeng et al., 1997). 펩타이드는 acetonitrile과 H₂O의 gradient에서 C-18 column을 이용한 reverse phase high precision liquid chromatography(HPLC)에 의해 정제한다. amino acid sequence는 sequence analysis에 의해 확인한다.

【그림 1】



2. hydroxyapatite(HA)와 T-CAM 복합체 형성

평균 0.13cc/g의 pore volume과 총 28%의 porosity를 가지는 다공성 HA에서 기원한 입자 크기가 250-420 μ m인 과립 형태의 bovine bone(CeraMed Corp, Lakewood, CO)을 사용할 예정이다. 세포 부착에 대한 T-CAM의 효과를 평가하기 위해 HA 1g당 2ml의 100 μ g/ml T-CAM이 포함된 생리식염수 용액(PBS) 2ml를 주입하여 24시간 실온에서 배양함에 따라 펩타이드가 HA에 흡착되게 하였다. 비흡착된 펩타이드는 5배 volume의 PBS로 세척함으로써 HA로부터 제거하였다. HA-T-CAM 복합체는 gamma-irradiation에 의해 소독하여 세포실험에 사용하였다.

3. MTT assay

96 well plate의 각 well당 2×10^4 개 세포를 분주 후 1, 4, 7일에 부착되지 않은 세포를 제거하고, 생리식염수에 용해한 MTT 용액 50 μ l 씩을 각각의 well에 첨가하여 3시간동안 배양 후 배지를 제거하고

200ul의 dimethyl sulfoxide(DMSO)와 50ul의 glycin buffer를 첨가하였다. 용해된 formazan 결정은 새로운 well plate상으로 옮겨서 ELISA분석기(Precision Microplate Reader, Molecular Devices, USA)로 570nm에서 흡광도를 측정하였다. 또한 4일째 H & E 염색을 시행하여 세포의 증식상태를 관찰하였다.

4. 골기질 단백질 유전자발현 양상 관찰

10, 20, 30일째 RNA를 추출하여 Chomczynski와 Sacchi의 방법에 따라 분리하였다. 각 샘플의 10ug RNA 전기영동, Northern blot, cDNA labeling 및 분리, hybridization과 자가방사법 시행하였다. cDNA probe는 OPN cDNA, ALP cDNA, type I collagen cDNA를 사용하였다.

5. 광물화 형성 관찰을 위한 Alizarin Red 염색

HA 또는 HA-T-CAM가 함유된 배양접시에 세포를 배양한 후 30일째 배양액을 제거하고, PBS로 세포를 세척한 후, 80% ethanol에 5분간 고정하고 PBS로 다시 세척하였다. 세포들은 1% Alizarin Red S(pH 6.4)에 2시간동안 염색한 후 비반응 염색은 95% ethanol + 5% concentrated HCl 에 10분간 노출시켜 제거한 다음 광학현미경으로 관찰하였다.

III. 결과

1. 1, 4, 7 일째 T-CAM을 흡착 시킨 HA군이 HA만을 주입한 군에 비해 시간이 경과함에 따라 세포의 활성도가 더 증가 하였으며, 이는 통계학적으로 유의하였다. 또한 4 일째 H & E 염색을 시행하여 관찰해 본 결과 같은 결과를 관찰할 수 있었다.
2. 골기질 단백질 유전자 발현 양상을 관찰한 실험에서는 osteopontin의 발현 양상이 10일과 20일째 HA만을 주입한 군에 비해 T-CAM을 흡착 시킨 HA군이 약간 증가된 양상을 나타내었으며, 알칼라인 인산효소의 활성도와 제1형 교원질의 유전자 발현 양상에서는 별 차이를 나타내지 않았다.
3. 광물화 형성 관찰을 위한 Alizarin Red 염색에서는 양군 공히 골 이식재 주위에 광물화 형성 양상을 관찰할 수 있었으나 그 정도에 있어서는 별 차이를 나타내지 않았다.

IV. 결론

본 실험에서 불활성 골이식재에 골아세포의 부착을 증진 시킬 수 있는 펩타이드를 결합시킨 골이식재에서 세포의 활성도 및 골기질 단백질의 하나인 osteopontin의 발현이 증가된 결과를 미루어 볼 때 이 새로운 생체활성 골이식재가 골 형성능의 증가에 기여하리라 생각된다.