

## Transforming Growth Factor- $\beta_2$ 에 의한 연골세포 분화 촉진 효과

정재창 · 손종경\* · 박대규 · 강신성

경북대학교 자연과학대학 생물학과, \*사범대학 생물교육과

계배 limb bud 간충직 연골원성 세포로부터 연골세포로의 분화에 미치는 transforming growth factor- $\beta_2$ (TGF- $\beta_2$ )의 영향을 알아보기 위하여, Hamburger-Hamilton stages 23/24의 간충직 세포들을 미세배양법으로 배양하면서, TGF- $\beta_2$ 의 농도 및 처리시간에 따른 연골세포의 분화에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과 TGF- $\beta_2$ 는 배양 첫 24시간 동안 1-2 ng/ml의 농도로 처리하였을 때 가장 효과적으로 연골세포의 분화를 촉진하였으며, 또한 TGF- $\beta_2$ 의 처리군에서 배양 3일째에 [ $^{35}$ S]sulfate의 glycosaminoglycan으로의 유입량이 현저히 증가함을 보였다. 한편, 배양 48시간내에 TGF- $\beta_2$ 를 처리한 경우 분화를 촉진 유도한 반면, 배양 48시간 이후에 처리하였을 때에는 분화 촉진 효과가 나타나지 않았다. 이상의 결과로부터 TGF- $\beta_2$ 는 연골원 세포의 분화 초기단계에 세포외기질의 합성을 촉진시켜 세포응축을 유발하고, 세포-세포 및 세포-세포외기질의 상호작용을 증대시킴으로써 연골세포로의 분화를 촉진시킬 것으로 추정되었다.

**KEY WORDS: Transforming Growth Factor, Chondrogenesis, Extracellular Matrix**

계배 limb bud의 발생 초기단계에서 가장 중요한 과정은 세포의 증식과 성장이다(Ahrens *et al.*, 1977; Knudson and Toole, 1985; Park *et al.*, 1990). 즉, Hamburger-Hamilton(HH) stage 16-20의 중배엽성 간충직 세포들이 증식 후 성장함에 따라 세포외기질(extracellular matrix, ECM) 성분이 급격히 증가하면서 limb bud의 central core 부위로 응집하게 되고, 일정 밀도의 세포가 모이게 되면 응축과정을 거쳐 연골원성 간충직 세포로부터 연골세포로의 분화가 시작된다(Bee and Jeffries, 1987; Park *et al.*, 1990).

다른 세포의 발생, 분화과정에서와 같이 연골세포에서도 외부의 여러가지 신호전달계에 의해 조절된다. 즉, 칼슘이온, 세포내 cyclic AMP의 농도변화, 그리고 protein kinase C 등과 같은 신호전달에 의해 연골세포의 분화가 촉진 혹은 억제되는 것으로 알려지고 있다(Rodgers *et al.*, 1989; Kang *et al.*, 1991; Kim *et*

*al.*, 1991; Sonn and Solursh, 1993). 또한 세포의 성장에 영향을 미치는 여러 성장인자 중 transforming growth factor  $\beta$ (TGF- $\beta$ )는 분자량 25 kDa의 homodimer로서, 중배엽성 세포의 증식 또는 응축시 그 작용시기에 따라 ECM 구성성분의 합성을 조절하는 것으로 알려지고 있다. 간충직 세포는 TGF- $\beta$ 의 작용에 의해 fibronectin이나, 여러 종류의 collagen, proteoglycan 등의 ECM 성분과 그 밖의 세포 부착 단백질의 발현을 촉진시켜 세포의 증식과 분화를 조절하며, 이때 ECM 성분에 대한 막 수용체의 발현도 증가됨이 밝혀져 있다(Ignotz and Massague, 1986; Roberts *et al.*, 1988; Leonard *et al.*, 1991). 이와같이 TGF- $\beta$ 는 ECM 생성의 조절인자로서 또한 limb bud 발생의 형태형성 인자로서 중요한 작용을 할 것으로 추측된다.

따라서 본 연구에서는 발생초기 계배 limb bud의 미분화 상태인 연골원 세포로부터 연골세

포로 분화해 나가는 기작을 규명하기 위한 연구의 일환으로 TGF- $\beta_2$ 를 HH-stage 23/24 연골원 세포에 처리, 배양하면서 연골원 세포의 분화에 대한 영향을 알아 보고자 하였다. 본 연구 결과, TGF- $\beta_2$ 는 계배 간충직 세포의 세포외기질 성분의 합성을 유도하였으며, 연골세포 분화초기의 세포응축을 유도하여 분화를 촉진할 것으로 추정되었다.

## 재료 및 방법

### 재료

계배 간충직 세포를 얻기 위한 동물재료로 Leghorn종의 수정란을 구입하여(신기농장, 대구) 37°C, 상대습도 60%의 조건으로 부란시킨 계배를 사용하였다(Park *et al.*, 1990). 본 실험에 사용한 시약중 cetylpyridinium chloride, collagenase 등은 Sigma사(St. Louis, USA)에서, rabbit anti-TGF- $\beta_1$ 과 anti-TGF- $\beta_2$ 는 R & D System사(Oxford, UK)에서, 그리고 [ $^{35}$ S]Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>은 Amersham 사(Arlington, USA)에서 구입하였다. 세포배양용 시약들은 GIBCO사(Grand Island, USA)로부터, 배양조는 Falcon사(New Jersey, USA)에서 구입하였다.

### 세포 배양

계배 limb bud 간충직 세포의 분리 및 배양은 HH-stage 23/24의 계배를 절취하여 Park 등(1990)의 방법에 준하여 실시하였다. 분리된 간충직 세포의 현탁액은 세포밀도가  $2 \times 10^7$  cells/ml이 되도록 F-12/10% FCS 배양액을 가하여 Falcon 24-well plate 또는 35 mm dish에 plating하였고, 배양액은 24 시간 간격으로 갈아 주었다.

### Transforming growth factor- $\beta_2$ 의 분리

계배 조직으로부터 TGF- $\beta_2$ 의 분리는 Roberts 등(1988)의 방법에 따라 acid/ethanol 추출을 하였다. 추출액을 다시 Sephadex G-

75, CM-cellulose, 그리고 FPLC Mono S column chromatography(Pharmacia Biotech)를 이용하여 순수분리하였다. 분리한 TGF- $\beta_2$ 는 4 mM HCl에 녹여 농축액을 만들고 배양세포에 일정 농도로 처리 하였다.

### 연골세포 분화도의 측정

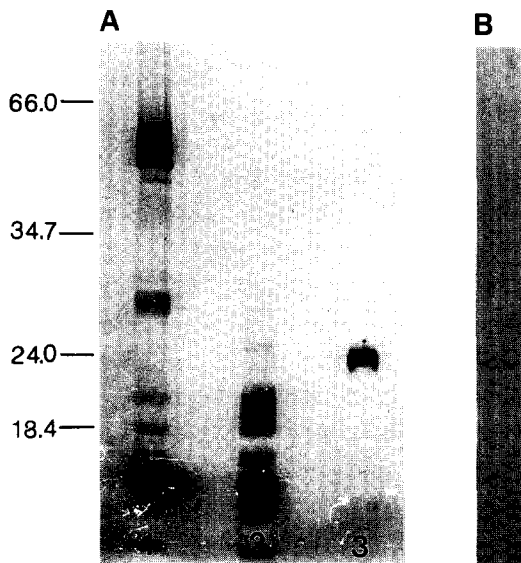
계배 간충직세포의 분화도 검정은 Kim 등(1991)에서 보고한 바와 같이 cartilage nodule에 결합된 염색량의 정량으로 행하였다. 즉, 배양세포를 1일 간격으로 phosphate buffered saline(PBS)로 2회 수세 후 Kahle's fixative solution으로 5 분간 고정시킨 다음, 다시 PBS 로 2회 수세한 후 Alcian blue(pH 1.0)로 3시간 동안 염색하여 sulfated glycosaminoglycan을 염색하였다. 결합된 염색액을 정량하기 위해서는 염색 후 6 M guanidine-HCl을 처리하여 Alcian blue를 추출한 다음, Titertek Multiskan ELISA reader(Flow Lab)로 600 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### Proteoglycan 합성량의 측정

배양 후 계배 연골세포의 proteoglycan 합성량은 Goldberg와 Toole(1984)의 방법에 준하여 다음과 같이 실시하였다. 배양 중인 세포에 [ $^{35}$ S]sulfate(1  $\mu$ Ci/ml)를 6시간 동안 표지시킨 후 배지를 제거하고, 1.4 ml의 0.15 N NaOH을 가한 후 세포를 모아 6 N HCl로 중화시켰다. 이어서 0.2 M Tris-HCl, pH 7.8, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 4 mg pronase를 가한 다음 55°C에서 12시간 동안 반응시켰다. Carrier chondroitin sulfate를 가한 다음, 1% cetylpyridinium chloride를 가하고 1시간 방치하여 polysaccharide를 침전시켰다. 반응물은 Millipore filter disc (직경 25 mm, 0.45  $\mu$ m pore size)에 여과시켜 filter 를 말린 후 liquid scintillation counter(Packard, Tricarb 1500)로 방사능을 측정하였다.

## 결과 및 고찰

계배 간충직 세포로부터 연골세포 분화 과정 중에 TGF- $\beta_2$ 에 의한 영향을 알아보기 위하여, HH stage 23/24 limb bud의 간충직 세포에 TGF- $\beta_2$ 를 처리한 후 배양하면서 연골세포의 분화에 미치는 영향을 조사하였다. 먼저 TGF- $\beta_2$ 의 분리는 12일 된 계배 조직을 절취하여 균질화한 다음 acid/ethanol 추출을 한 후, Sephadex G-75(1.5×75 cm), CM-cellulose(1×10 cm), FPLC Mono S(1×5 cm) chromatography의 순으로 수행하였다. 분리 단계별로 각각의 분획을 mink lung inhibition assay(Danielpour *et al.*, 1989)를 하였고, 순수도와 단백질 양상을 알아보기 위

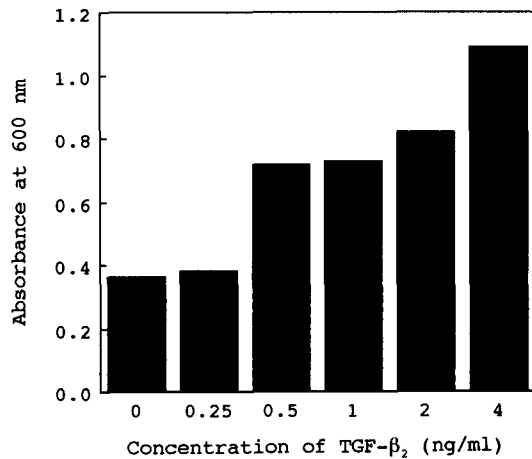


**Fig. 1.** Purification of TGF- $\beta_2$  from chick embryo. A. The active fractions from Sephadex G-75 (lane 1), CM-cellulose (lane 2), and FPLC Mono S chromatography (lane 3) were analyzed on a 12.5% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Markers were run in the adjoining lane and molecular weights (kDa) were indicated by number. B. Western blot of purified TGF- $\beta_2$ . The blot was reacted with rabbit anti-TGF- $\beta_2$  antibody and the immune complex was detected with horse radish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG.

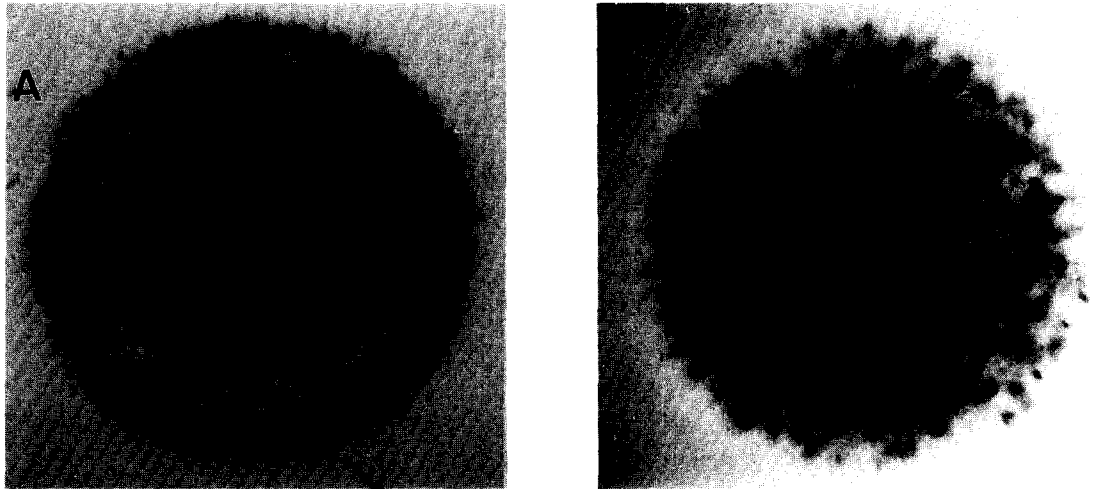
해 전기영동한 결과, Fig. 1A와 같이 분자량 25 kDa의 단일 밴드로 나타났다. 그리고 rabbit anti-TGF- $\beta_1$ 과 anti-TGF- $\beta_2$ 를 사용한 Western blot으로 검증한 결과, anti-TGF- $\beta_2$ 에만 반응하는 것으로 보아 순수분리한 단백질이 TGF- $\beta_2$ 임이 확인되었다(Fig. 1B).

계배 연골원세포를 배양하면서 순수 분리한 TGF- $\beta_2$ 를 배양초기 24시간 동안 농도를 각기 달리 처리하여 4일 동안 배양해 가면서 분화과정 중 proteoglycan 합성량에 미치는 영향을 알아보았다. Cartilage nodule의 구성성분이 되는 glycosaminoglycan에 결합하는 Alcian blue 염색액의 추출양의 변화를 측정된 결과는 Fig. 2와 같았으며, 1 ng/ml 이상의 농도로 TGF- $\beta_2$ 를 처리한 경우 proteoglycan의 합성량이 대조군에 비해 약 2배 이상 증가한 반면, 0.25 ng/ml 이하에서는 대조군과 유사하였다. 따라서 TGF- $\beta_2$ 에 의한 연골세포 분화의 촉진은 농도 의존적임을 알 수 있었고, 이후의 연골세포 분화에 대한 TGF- $\beta_2$ 의 영향분석은 2 ng/ml의 농도로 처리하여 실시하였다.

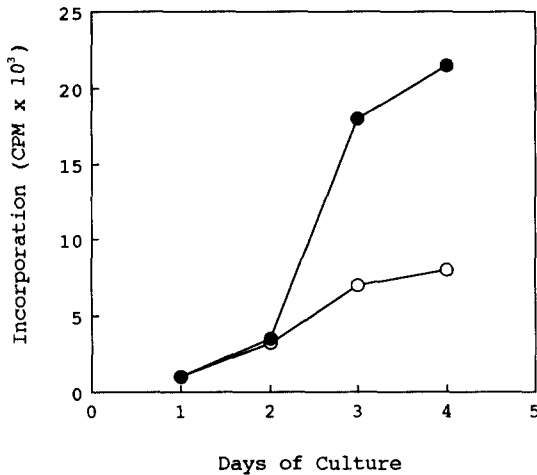
TGF- $\beta_2$  처리군의 세포형태학적인 변화를 관



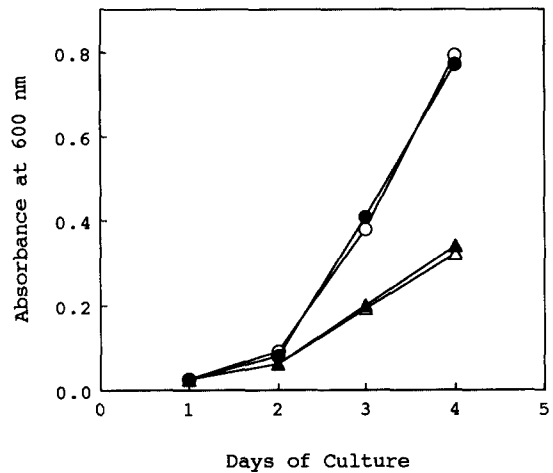
**Fig. 2.** Dose-dependent effect of TGF- $\beta_2$  on chondrogenesis. Chondroblasts ( $2 \times 10^7$  cells/ml) were treated with various concentrations of TGF- $\beta_2$  at the initial time of culture for 24 hrs. Each absorbance of Alcian blue extracts at 4 days of culture was measured using a Titertek Multiscan ELISA reader at 600 nm.



**Fig. 3.** Photomicrographs of mesenchymal cells cultured in the presence and absence of TGF- $\beta_2$  at 96 hrs. A. Control cells. B. Cells treated with 2 ng/ml of TGF- $\beta_2$ . The cells were stained with Alcian blue and photomicrography was taken at  $\times 25$ .



**Fig. 4.** Effect of TGF- $\beta_2$  on the incorporation rate of [<sup>35</sup>S] sulfate into the proteoglycans. At the indicated time, [<sup>35</sup>S] sulfate (1  $\mu$ Ci/ml) was added and incubated for 6 hr. The cells were then washed three times with PBS and their radioactivities were counted. Values are means of three independent experiments. Control cells,  $\circ$ ; TGF- $\beta_2$  treated cells,  $\bullet$ .



**Fig. 5.** Time dependent effect of TGF- $\beta_2$  on the accumulation of proteoglycans. Cells were treated with TGF- $\beta_2$  at the initial time of culture for 24 hrs ( $\circ$ ), for 48 hrs ( $\bullet$ ), or treated with TGF- $\beta_2$  after 48 hrs of culture ( $\blacktriangle$ ). Values are means of three independent experiments. Control cells,  $\triangle$ .

찰한 결과, 배양 2일째 대조군에서는 cartilage nodule이 거의 형성되지 않았으나, 처리군에서는 약간의 cartilage nodule이 나타나기 시작하였다. 그러나 배양 3일째는 Fig. 3에 보는 바

와 같이 대조군보다 처리군에서 nodule의 수적 및 양적인 증가가 뚜렷이 관찰되었다. 한편, TGF- $\beta_2$  처리 후 배양시기 별로 측정된 proteoglycan 합성량의 변화는 Fig. 4에서와 같이 배양 3일째부터 sulfated proteoglycan의

합성량이 급격히 증가하기 시작하여 4일째에는 대조군에 비해 약 2-3배로 증가하였다. 이와같이 계배 간충직 세포배양시 TGF- $\beta_2$ 를 처리하면 배양 2-3일째에 cartilage nodule이 증가하는 것으로 보아, TGF- $\beta_2$ 는 연골세포 분화과정중 ECM의 조절 인자로서 작용할 것으로 생각된다.

TGF- $\beta_2$ 가 연골세포 분화 과정 중 어느 시기에 영향을 미치는지 알아보기 위해 배양시기별로 배양조에 TGF- $\beta_2$ 를 처리하여 4일간 배양한 후 분화 정도를 조사하였다. Fig. 5에서 보는 바와 같이 배양 24시간, 48시간 동안 처리군에서는 거의 유사한 분화 촉진효과를 보인 반면, 배양 48시간 이후 처리군에서는 TGF- $\beta_2$ 에 의한 분화 촉진효과가 나타나지 않았다. Leonard 등 (1991)에 따르면 HH-22/23 stage의 계배 연골세포 배양초기에 5시간 동안 TGF- $\beta$ 를 처리한 경우에는 분화 촉진 효과가 없었지만, 배양 1일째 되는날 6시간 동안 처리한 경우에는 1.5-2배의 촉진효과가 있음을 보고하였다. 이는 HH-stage 22/23 limb bud 간충직 세포배양시 TGF- $\beta$ 의 작용시기가 배양 24시간 이후임을 의미하지만, 본 실험에 사용한 23/24 stage limb bud 간충직 세포의 경우 배양초기 24시간 동안만 처리하더라도 분화촉진 효과가 나타나는 것으로 보아 거의 유사한 시기에 세포분화에 중요한 영향을 미치리라 본다.

한편, TGF- $\beta_2$ 에 의한 연골원 세포의 증식에 미치는 영향을 [ $^3\text{H}$ ]thymidine 유입량 분석을 비교해 본 결과, 대조군과 TGF- $\beta_2$  처리군 사이에 거의 차이가 없었다(data not shown). 이 결과는 Kulyk 등(1989)의 보고와 유사하다. 따라서 세포외기질 물질의 증가현상이 단순히 세포의 증식에 의존하는 것이 아니라 아직 밝혀 지지 않은 경로를 가짐을 의미하며, 발생중인 계배 limb bud의 연골원성 간충직 세포로부터 연골 세포로의 분화는 우선적으로 세포증식에 의해 일정농도 이상으로 응축이 일어난 다음에 연골세포로의 분화가 일어나리라고 추정된다.

이상에서 보는 바와 같이 TGF- $\beta_2$ 는 연골원성 간충직 세포의 분화과정 초기에 세포외기질의 합성을 촉진함으로써, 세포응축을 유발하고 세포와

세포 그리고 세포외기질과의 상호작용을 증대시킴으로써 연골세포로의 분화를 촉진시킬 것으로 본다. 그러므로 연골세포 분화과정 중 TGF- $\beta_2$ 와 그 수용체를 통하여 세포내로 신호전달되는 세포분화 조절기작은 앞으로 규명되어야 할 과제이다.

## 감사

본 연구는 교육부 기초과학 육성연구비와 과학재단 세포분화연구센터 연구비 지원에 의해 수행되었음.

## 참고문헌

- Ahrens, P.B., M. Solursh and R.S. Relter, 1977. Stage-related capacity for limb bud chondrogenesis in cell culture. *Dev. Biol.* **60**: 69-82.
- Bee, J.A. and R. Jeffries, 1987. The relationship between intracellular calcium levels and limb bud chondrogenesis in vitro. *Development* **100**: 73-81.
- Danielpour, D., L.L. Dart, K.C. Flanders, A.B. Robert and M.B. Sporn 1989. Immunodetection and quantitation of the two forms of Transforming growth factor-Beta (TGF- $\beta_1$  and TGF- $\beta_2$ ) secreted by cells in culture. *J. Cell. Physiol.* **138**: 79-86.
- Goldberg, G.L. and B.P. Toole, 1984. Hyaluronate containing pericellular coats of chondrocytes. *J. Cell Biol.* **101**: 2134-2144.
- Ignatz, R.A. and J. Massague, 1986. Transforming growth factor- $\beta$  stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. *J. Biol. Chem.* **261**: 4337-4345.
- Kang, S.-S., C.-D. Jun, J.C. Jung, H.-T. Chung, and T.K. Park, 1991. A possible role of protein kinase C in the chondrogenesis of chick limb bud mesenchyme cells. *Mol. Cells* **1**: 475-481.
- Kim, S.D., J.K. Sonn, T.K. Park, and S.-S. Kang, 1991. Studies on the differentiation of chondrogenic cells in developing chick embryo II. *Korean J. Zool.* **34**: 460-468.
- Kulyk, W.M., B.J. Rodgers, K. Greer, and R.A. Kosher, 1989. Promotion of embryonic chick limb cartilage differentiation by transforming growth factor- $\beta$ . *Dev. Biol.* **135**: 424-430.
- Knudson, C.B. and B.P. Toole, 1985. Changes in the

- pericellular matrix during differentiation of limb bud mesoderm. *Dev. Biol.* **112**: 308-318.
- Leonard, C.M., H.M. Fuld, D.A. Frenz, S.A. Downie, J. Massague, and S.A. Newman, 1991. Role of Transforming growth factor- $\beta$  in chondrogenic pattern formation in the embryonic limb: stimulation of mesenchymal condensation and fibronectin gene expression by exogenous TGF- $\beta$  and evidence for endogenous TGF- $\beta$  like activity. *Dev. Biol.* **145**: 99-109.
- Park, T.K., J.K. Sonn, J.A. Yoo, and S.-S. Kang, 1990. Studies on the differentiation of chondrogenic cells in developing chick embryo I. *Korean J. Zool.* **33**: 310-321.
- Roberts, C.J., T.M. Birkenmeier, J.J. Mcquillan, S.K. Akiyama, S.S. Yamada, W.T. Chen, K.M. Yamada, and J. A. McDonald, 1988. Transforming growth factor  $\beta$  stimulates the expression of fibronectin and of both subunits of the human fibronectin receptor by cultured human lung fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **263**: 4586-4592.
- Rodgers, B.J., W.M. Kulyk, and R. Kosher, 1989. Stimulation of limb cartilage differentiation by cyclic AMP is dependent on cell density. *Cell Diff. Devel.* **28**: 179-188.
- Sonn, J.K. and M. Solursh, 1993. Activity of protein kinase C during the differentiation of chick limb bud mesenchymal cells. *Differentiation* **53**: 155-162.

(Accepted October 29, 1994)

---

#### Promoting Effects of Transforming Growth Factor- $\beta_2$ on Chondrogenic Differentiation *in vitro*

Jae Chang Jung, Jong Kyung Sonn\*, Tae Kyu Park and Shin-Sung Kang (Department of Biology, College of Natural Sciences and \*Department of Biology Education, Teacher's College, Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea)

To investigate the effect of transforming growth factor  $\beta_2$  (TGF- $\beta_2$ ) on the chondrogenesis of chick limb bud mesenchymal cells, chondroblasts ( $2 \times 10^7$  cells/ml) of Hamburger-Hamilton stage 23/24 were micromass cultured in the presence of various concentrations of TGF- $\beta_2$  and chondrogenesis *in vitro* was assayed. Above 1 ng/ml of TGF- $\beta_2$  treated cultures, the level of Alcian blue bound to proteoglycan increased over the two-fold higher than that of control cultures. Also treatment TGF- $\beta_2$  to the culture increased the formation of cartilage nodule and incorporation of [ $^{35}$ S]sulfate into glycosaminoglycans. When TGF- $\beta_2$  was added to cultures incubated for 24 to 48 hrs, its enhancing effect on chondrogenesis was similar to that seen in cultures treated for the whole 4 days. On the other hand, the synthesis of proteoglycan was not promoted in the cultures treated with TGF- $\beta_2$  after 48 hrs. These data indicate that TGF- $\beta_2$  promotes the chondrogenesis by inducing synthesis of extracellular matrix at the early embryonic stage.