

# 복합 및 유격배양한 섬유모세포가 마우스 두개관 미분화간엽세포의 골세포 분화에 미치는 영향

황유선 · 김명래

이화여자대학교 의과대학 치과학교실

**Abstract** (J. Kor. Oral Maxillofac. Surg. 2002;28:114-125)

## INFLUENCE OF CO-CULTURED FIBROBLASTS ON THE DIFFERENTIATION OF MOUSE CALVARIA-DERIVED UNDIFFERENTIATED MESENCHYMAL CELLS *IN VITRO*

Yu-Sun Hwang, Myung-Rae Kim

*Department of Medicine, Ewha Womans University Graduate School*

This study was designed to evaluate the influence of fibroblasts or connective tissue from mouse oral mucosa on differentiation of neonatal mouse calvaria-derived osteoblasts and mineralization of bone nodules. Primary cell cultures from mouse calvarial osteoblasts and 2-4 passaged fibroblasts from oral mucosa were co-cultured in monolayer cultures, divided into 6 experimental group according to cell density or cell confluency. Osteoblasts were also co-cultured with fibroblasts in Transwell® culture plate with different co-cultured period according to osteoblast differentiation. The alkaline phosphatase activity were measured in monolayer cultures and cultures using Transwell®. The mineralized bone nodules were presented by Von Kossa staining and density of mineralized nodules was measured by image analysis. The connective tissues with or without osteoblast seeding were cultured and examined histologically by Von Kossa and Trichrome Goldner staining.

The results were as follows;

1. Prolonged maturation of matrix and delayed mineralization of bone nodules were resulted in monolayer cultures.
2. Co-culture of fibroblast with osteoblast using Transwell® during osteoblast proliferation stage stimulated proliferation of osteoblasts and increased alkaline phosphatase activity and mineralization of bone nodules.
3. Co-culture of fibroblast with osteoblast using Transwell® during matrix mineralization stage decreased and delayed mineralization of bone nodules.
4. *In vitro* cultured connective tissue with osteoblast seeding resulted in proliferation of osteoblasts and matrix formation with mineralization.

**Key words** : Osteoblast differentiation, Mineralization, Fibroblast co-culture

### I. 서 론

골수내 미분화 간엽세포(undifferentiated mesenchymal stem cell)는 환경에 따라 근육모세포, 지방세포, 골모세포, 연골모세포, 섬유모세포로 분화함이 알려져 있다<sup>1)</sup>. 골수내 간엽세포의 골형성 능력에 대하여 Friedenstein 등<sup>2)</sup>은 배양된 골수세포를 diffusion chamber에 부하한 후 복강 내에 이식하여 골과 연골이 형성됨을

보고하였고, Ashton 등<sup>3)</sup>도 골수세포나 골수세포의 실험실 배양으로 얻은 섬유모세포가 실험동물의 복강 내에 이식된 diffusion chamber에서 골과 연골을 형성함을 보고하였다. Beresford 등<sup>4)</sup>은 실험실에서 증식된 골수세포는 생체 내에서 골형성과 조혈유도 환경(hematopoietic inductive microenvironment) 조성에 필요한 세포로 증식하고 분화될 수 있음을 보고하였으며, Haynesworth 등<sup>5)</sup>은 배양된 사람의 골수세포를 마우스의 피하조직에 이식하여 골이 형성됨을 보고하였다.

배양한 골수세포를 골 결손 부위에 이식하는 실험으로 Kadiyala 등<sup>6)</sup>은 백서 대퇴골의 부분 결손부에 골수를 이식하여 골형성을 보고하였고, Bruder 등<sup>7)</sup>은 실험 동물에서 배양된 자가골수의 간엽세포를 대퇴골 부분 결손부에 다공 세라믹 원주를 통해 이식하여 골 결합이 이루어짐을 보고하였다. Niedzwiedzki 등<sup>8)</sup>은 토끼 요골에 실험적으로 골 결손부를 형성한 후 골수세포를

#### 황 유 선

158-710, 서울 양천구 목동 911-1  
이화여자대학교 의과대학 치과학교실

Yu-Sun Hwang

Department of Medicine, Ewha Womans University Graduate School  
911-1, Mok-dong, Yangcheon-gu, Seoul, 158-710, Korea

Tel. 82-2-650-5014 Fax: 82-2-652-1588

E-mail: yushw@korea.com

경피 이식하여 치밀골이 형성됨을 보고하였으며, Wertz 등<sup>9)</sup>은 백서 대퇴골의 부분적 골결손부에 골수를 경피주사하여 상당한 골형성을 얻었음을 보고하였다. Yasko 등<sup>10)</sup>이 사람의 재조합형 골형성단백(recombinant human bone morphogenetic protein)을 백서의 피하 조직에 이식하여 연골내에서 골형성이 유도됨을 보고하는 등 골수세포의 직접 또는 운반체를 통한 이식이나 골형성단백에 의한 골형성 유도에 관해 많은 연구가 진행되어 왔다.

Connolly 등<sup>11)</sup>은 골수세포내의 미분화 간엽세포나 골형성세포를 배양하여 골조직 재생 및 재건이 필요한 부위에 이식하는 방법 중, 재생이 필요한 부위의 기존 육아조직이나 섬유조직을 외과적으로 제거하지 않고 육아조직이나 섬유조직내로 세포를 단독 혹은 성장 인자와 함께 주입하여 골형성을 유도함을 보고하였는데, 이는 술식이 간단하고 비침습적이며 반복 주입이 가능하고 외과적 술식자체에 의한 외상을 피할 수 있어 비유합 골절 치료에도 적용한 바 있다<sup>12)</sup>.

구강 악안면 영역에서 배양된 골수세포이식은 악안면 결손 부위의 골재생이나 임플란트 식립을 위한 지지골의 확보 외에 치주조직 재생을 위해 시행될 수 있다. 치주조직의 재생은 치조골, 치주인대 및 치아의 백악질이 재생되어야 하며 조직상부는 두께 2mm 이내의 상피층이 형성되어야 하고, 다양한 세포가 관여하므로 이들이 적절하게 재생되도록 골이식, 치근막처리, 조직유도재생술, 성장인자의 이용 등 다양한 치료술식이 발전되어 왔으나 만족할 만한 골재생을 얻지는 못하였다. 최근에는 치주재생을 위한 방법의 하나로 조직공학에 관한 연구가 진행되어 배양세포를 운반체를 통해 이식할 수 있는 가능성을 보였다<sup>13)</sup>. 이때 치조골 세포는 치조골형성 뿐 아니라 치주조직 재생에 필수적인 백악질 형성과 관련됨이 보고되므로써<sup>14)</sup> 배양된 치조골 세포의 이식이 치주재생에 중요한 역할을 할 것으로 기대된다.

배양세포의 이식을 통한 골재생방법 뿐 아니라 골재생을 위해 시도되는 다양한 이식재의 성공적인 골유도를 위해서는 치유과정에서 세포 및 세포의 기질을 포함하는 기존 주위조직과의 상호작용에 대한 폭넓은 이해와 고려가 요구된다. 생체 조직은 세포와 세포의 기질 및 조직액으로 구성되어 있어 세포들이 생명 활동을 유지하고 세포의 증식, 분화 과정에서 표현형을 발현하는데 세포와 세포, 세포와 세포의 기질간의 상호 작용이 영향을 준다. 생체내의 이소성 조직내로 세포가 유입되면 그 세포의 생존, 증식, 분화는 조직 내에 이미 존재하는 세포에서 분비되는 용해성 물질과 세포의 기질의 영향을 받게 된다. 그러나 이전의 연구는 주로 실험실에서 배양한 골수 세포를 생체 내 이식하여 골모세포의 분화, 석회화 및 골양조직의 형성을 확인한 바 있으나 조직 내로 유입된 미분화 간엽세포나 골유도인자에 의해 유도 분화된 골모세포의 골형성과과정에서 조직에 존재하는 특정 세포나 세포의 기질과의 상호작용에 대하여는 아직 알려져 있지 않다.

골모세포의 실험실 배양에서 섬유모세포가 미치는 영향에 관하여 Ogiso 등<sup>15)</sup>은 백서의 골수기질세포(marrow stromal cell)를 피부의 섬유모세포, 사람의 치주인대 섬유모세포와 복합 배양하여 섬유모세포에 의해 석회화된 골결절의 형성이 억제됨을 보고하

였고, 이어서 섬유모세포에서 분비하는 prostaglandin이 골수기질 세포의 골형성을 억제한다고 보고하였다<sup>16)</sup>. Lennon 등<sup>17)</sup>은 사람 골수내의 간엽세포를 진피 섬유모세포와 비율을 달리하여 복합 배양하였을 때 섬유모세포의 비율이 50%이하인 군에서는 단독 골수세포배양에서와 유사한 calcium level을 나타낸다고 보고하였다. 골모세포를 섬유모세포와 함께 배양하게 되면 서로 다른 세포 간 증식 속도의 차이나 접촉억제(contact inhibition)와 같은 물리적인 영향과 함께 세포에서 분비되는 용해물질과 세포의 기질에 의해 서로 다른 세포 사이에서 복합적인 상호작용이 일어난다.

이에 본 연구에서는 골모세포와 섬유모세포의 단층복합배양 및 유격배양을 통하여 섬유모세포가 골모세포 분화에 미치는 영향을 알아보고 결합조직상부에 골모세포를 이식후 배양하여 골형성 여부와 그 정도를 관찰함으로써 섬유모세포 및 결합조직이 골모세포 분화에 미치는 영향을 구명하고자 하였다.

## II. 실험재료 및 방법

### 1. 일차배양

실험에 사용된 미분화간엽세포와 섬유모세포는 출생 1일된 마우스(ICR)의 두개관과 출생 3주 마우스의 협점막에서 각각 채취하였다. 골모세포는 마우스 두개관의 피부와 결합조직을 제거하고 골막을 제거한 후 봉합부에서 떨어진 부위의 골편에서 얻었다. 채취한 골편을 잘게 자른 후 Aronow 등<sup>18)</sup>이 제시한 방법에 따라 다음과 같이 세포 분리 및 배양을 시행하였다. 0.2% collagenase(Wako chemical, Osaka, Japan)와 0.1% dispase(GIBCO, Grand Island, NY, U.S.A.)를 free fetal bovine serum- $\alpha$ -Minimal Essential Medium(free FBS- $\alpha$ -MEM, GIBCO, Grand Island, NY, U.S.A.) 용액 100ml에 첨가하여 만든 효소 용액으로 10분간 37°C의 진동수조(shaking water bath)에서 처리하여 상층액은 버리고 다시 효소 용액으로 진동수조에서 60분간 재처리하여 얻어진 상층액을 20 $\mu$ m Nylon Net Filter(Millipore20, Millipore Corp., Bedford, MA, U.S.A.)로 여과한 후 1800rpm으로 5분간 원심분리하여 얻어진 세포를 10% FBS와 항생제(penicillin sodium, streptomycin, amphotericin B, GIBCO, Grand Island, NY, U.S.A.)를 첨가한  $\alpha$ -MEM 배지로 37°C CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다.

섬유모세포는 마우스의 구강내 협점막(buccal pouch) 조직을 채취하여 이를 0.5% collagenase 와 0.25% dispase를 함유한 free-10% FBS- $\alpha$ -MEM 용액에 10분간 처리한 후 상층액은 버리고 60분간 재처리한 후 상층액을 모아 위와 같은 방법으로 여과, 원심분리하여 얻어진 세포를 같은 조건으로 60mm 세포배양접시에 배양하였다. 이렇게 일차 배양된 세포가 배양접시의 70%를 차지하면 이를 분리하여 복합배양실험에 이용하였다.

### 2. 단층세포배양

일차배양의 골모세포와 섬유모세포를 6군으로 나누어 복합배

양하였다. 각 군에서 설정한 세포수를 30mm 세포배양접시에 접종하여 10% FBS와 항생제를 첨가한  $\alpha$ -MEM 배지로 37°C CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다.

1. OB군(osteoblast군) : 1×10<sup>6</sup>개의 골모세포 단독배양군
  2. OBC+FB군(osteoblast confluent+fibroblast군) : 1×10<sup>6</sup>개의 골모세포를 단독배양 증식하여 완전히 배양접시를 덮는 단층이 형성된 후, 5×10<sup>4</sup>개의 섬유모세포를 복합배양한 군
  3. OB+FB(1/0.5)군(osteoblast+fibroblast 1/0.5군) : 1×10<sup>6</sup>개의 골모세포와 5×10<sup>4</sup>개의 섬유모세포를 동시에 복합배양한 군
  4. OB+FB(0.5/0.5)군(osteoblast+fibroblast 0.5/0.5군) : 5×10<sup>4</sup>개의 골모세포와 5×10<sup>4</sup>개의 섬유모세포를 동시에 복합배양한 군
  5. FBC+OB군(fibroblast confluent+osteoblast군) : 1×10<sup>6</sup>개의 섬유모세포를 단독배양 증식하여 완전히 배양접시를 덮는 단층이 형성된 후, 5×10<sup>4</sup>개의 골모세포를 복합배양한 군
  6. FB군(fibroblast군) : 1×10<sup>6</sup>개의 섬유모세포 단독배양군
- 배지는 세포배양 통법에 따라 2일마다 교환하였고 배양세포가 완전히 배양접시를 덮어 단층이 형성되는 5일 이후에는 50 $\mu$ g/ml ascorbic acid(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, U.S.A.)와 10mM  $\beta$ -glycerophosphate(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, U.S.A.)을 배지에 첨가하였다.

### 3. 유격배양

섬유모세포와 골모세포의 유격조건으로 Transwell®(Costar, Cambridge, MA, U.S.A.) 세포배양접시를 이용하였다. 10 $\mu$ m 두께의 막이 바닥에서 1mm 상부에 위치하는 12-well의 세포배양접시(그림 1)의 바닥에 5×10<sup>4</sup>개의 골모세포를 접종하고 상부 well에는 5×10<sup>4</sup>개의 섬유모세포를 접종하여 배양하였다. 골모세포 분화에 대한 섬유모세포의 영향을 골모세포 분화시기에 따라 확인하기 위하여 섬유모세포는 60mm 세포배양접시에서 배양하면서 필요한 시기에 상부 well에 접종하여 골모세포와 유격배양하였다. 배지는 2일마다 교환하고 골모세포 대조군에서 세포가 증식하여 완전히 배양접시를 덮어 단층이 형성되는 7일 이후에는 ascorbic acid(50 $\mu$ g/ml)와  $\beta$ -glycerophosphate(10mM)을 첨가한 배지로 배양하였다. 석회화기가 시작하는 골결절의 관찰시기는 골모세포 대조군에서 결정하였다. 섬유모세포가 유격배양되는 기간은 골모세포 분화시기에 따라 다음과 같이 분리하였다.

1. OB군(osteoblast군): 골모세포 대조군
2. PR-MT-MN군(proliferation-maturation-mineralization군): 골모세포의 증식기, 성숙기, 석회화기에 유격배양한 군(배양 0-42일)
3. MT-MN군(maturation-mineralization군): 골모세포의 성숙기, 석회화기에 유격배양한 군(배양 7-42일)
4. MN군(mineralization군): 골모세포의 석회화기에만 유격배양한 군(배양 16-42일)
5. PR군(proliferation군): 골모세포의 증식기에만 유격배양한 군(배양 0-7일)
6. MT군(maturation군): 골모세포의 성숙기에만 유격배양한 군(배양 8-15일)

증식기는 골모세포의 배양 1일부터 세포가 배양접시를 완전히 덮어 단층을 형성하는 7일까지로 하였고, 성숙기는 ascorbic acid와  $\beta$ -glycerophosphate를 처리하기 시작한 7일부터 골결절이 형성되기 전까지로 하였으며 석회화기는 골결절 형성 이후 배양이 끝나는 날까지로 정하였다.

### 4. 3차원 결합조직에의 골모세포 접종 및 배양

출생 3주된 마우스의 협점막에서 상피와 하부 결합조직을 포함한 조직을 채취하였다. 60mm 세포배양접시 위에 금속망사(metal mesh)를 접어 세워놓고 membrane filter(Millipore Corp., Bedford, MA, U.S.A.)를 덮어 그 위에 결합조직부를 상방으로 놓은 후 membrane filter가 배지에 닿아 이를 흡수하게 하여 air-liquid 상태로 동일한 배지에서 1일간 배양기에서 배양한 후 결합조직 상부에 2×10<sup>6</sup>개의 골모세포를 접종하였다. ascorbic acid(50 $\mu$ g/ml)와  $\beta$ -glycerophosphate(10mM)을 첨가한 배지에서 배양하며 2일마다 배지를 교환하였다. 배양 후 4주, 6주에 조직을 배지에서 제거하여 -20°C에서 10분간 methanol에 고정한 후 결합조직면이 상부에 위치하도록 수직으로 paraffin wax에 포매하였다. 이를 수직으로 연속절편한 후 Von Kossa 와 Trichrome Goldner 염색을 하여 광학현미경으로 관찰하였다.

### 5. 염기성 인산분해효소 활성도 측정

단층세포배양과 유격배양에서 골모세포의 염기성 인산분해효소(alkaline phosphatase, ALP)의 활성도를 Bowers 등<sup>19)</sup>이 소개한 방법에 따라 정량분석하였다. 배지를 제거하고 배양접시를 phosphate buffered saline(PBS)으로 세척한 후 효소용액 1ml를 넣어 10분간 놓아둔 후 scraper로 Eppendorf tube에 세포를 수집하였다. 수집한 세포를 와동(vortexing)시키고 37°C에서 40분간 놓아둔 다음 10000rpm으로 5분간 원심분리하여 상층액을 제거하고, PBS 1ml로 씻어 다시 원심분리하여 상층액은 제거한 후 0.5% TritonX-100으로 용해하여 1시간 동안 얼음 위에 정치한 후 와동시켰다. 이를 원심분리하여 상층액을 모으고 미리 16 mM p-Nitrophenyl phosphate이 함유된 용액 1ml를 넣어 37°C 수조에 담가 놓은 시험관에 표본 20 $\mu$ 를 넣어 반응시킨 후 각각 30초, 2분 후에 분광광도계(spectrophotometer)로 405nm에서 흡광도를 측정하여 염기성 인산분해효소 활성도를 측정하였다.

### 6. 세포 총단백질 농도 분석

유격배양의 염기성 인산분해효소 활성도를 측정할 때 Transwell®의 바닥에 배양한 골모세포의 총 단백질 농도를 Smith 등<sup>20)</sup>이 제시한 방법에 따라 bicinchoninic acid protein assay(BCA Protein Assay Kit, Pierce Rockford, IL, U.S.A.) 방법으로 측정하였다. 우골혈청알부민 표준용액(bovine serum albumin standard)을 희석하여 준비한 후 96-well 배양접시에 표준 표본과 염기성 인산분해효소 활성도 측정에 사용된 같은 상층액 표본 25 $\mu$ 를 각각 넣

고 용매 (working reagent)를 200 $\mu$ l 씩 첨가하였다. 이를 37°C에 30분간 위치한 후 실온에서 식혀 분광광도계로 562nm에서 흡광도를 측정하였다. 얻어진 총단백질 농도를 이용하여 유격배양에서의 염기성 인산분해효소 활성도를 micromole/min/mg protein으로 표시하였다.

### 7. 석회화된 골결절의 측정

단층세포배양과 유격배양에서 석회화된 골결절을 측정하기 위해 배양세포군을 5% silver nitrate 용액에 30분간 염색하여 증류수로 씻은 후 sodium carbonate formaldehyde로 고정한 뒤 흐르는 물에 10분 간 세척하고 1시간 동안 물에 담가 둔 후 공기 중에 건조하였다. 석회화된 골결절의 측정을 위해 Von Kossa 염색 후 골결절 면적의 배양면적에 대한 밀도를 영상분석기 (Image-Pro plus, Version 3.0, Media cybernetics, Maryland, U.S.A.)로 측정하였다.

## III. 결 과

### 1. 단층세포배양

골모세포와 섬유모세포의 복합배양군을 대조군 포함 6군으로

**Table 1.** Initiation of bone nodule formation in monolayer cultures.

Experimental groups	Initial day of bone nodule formation
	days in culture
OB	15 days
OBC+FB	15 days
OB+FB(1/0.5)	17 days
OB+FB(0.5/0.5)	17 days
FBC+OB	20 days
FB	not appeared

OB: osteoblast, OBC: osteoblast confluent, FB: fibroblast, FBC: fibroblast confluent

**Table 2.** Effect of culture condition on alkaline phosphatase activity of osteoblasts in monolayer cultures (Mean $\pm$ SD)

Experimental groups	ALP activity (p-nitrophenol micromole/min/ml)				
	day 7	day 15	day 19	day 26	day 33
OB	0.016 $\pm$ 0.001	0.149 $\pm$ 0.006	0.125 $\pm$ 0.002	0.123 $\pm$ 0.005	0.076 $\pm$ 0.006
OBC+FB	0.023 $\pm$ 0.001	0.160 $\pm$ 0.015	0.120 $\pm$ 0.005	0.123 $\pm$ 0.001	0.070 $\pm$ 0.003
OB+FB(1/0.5)	0.018 $\pm$ 0.002	0.063 $\pm$ 0.006	0.064 $\pm$ 0.003	0.095 $\pm$ 0.002	0.055 $\pm$ 0.001
OB+FB(0.5/0.5)	0.014 $\pm$ 0.001	0.043 $\pm$ 0.006	0.049 $\pm$ 0.002	0.067 $\pm$ 0.002	0.055 $\pm$ 0.012
FBC+OB	0.016 $\pm$ 0.001	0.022 $\pm$ 0.006	0.023 $\pm$ 0.002	0.048 $\pm$ 0.003	0.024 $\pm$ 0.005
FB	0.009 $\pm$ 0.001	0.016 $\pm$ 0.002	0.014 $\pm$ 0.001	0.023 $\pm$ 0.002	0.016 $\pm$ 0.002

OB: osteoblast, OBC: osteoblast confluent, FB: fibroblast, FBC: fibroblast confluent

나누어 석회화시기까지 배양하면서 광학현미경으로 세포형태와 골결절 형성여부를 관찰한 결과, 골모세포만을 배양한 대조군(OB군)에서는 배양 5일 후에 세포배양접시를 완전히 덮는 단층을 이루고 분화 성숙과정을 거쳐 배양 15일경에 골결절이 관찰되었다. 그러나 복합배양한 군에서는 골결절이 OB군에 비해 늦게 나타나 석회화기가 지연되는 경향이 관찰되었다(Table 1).

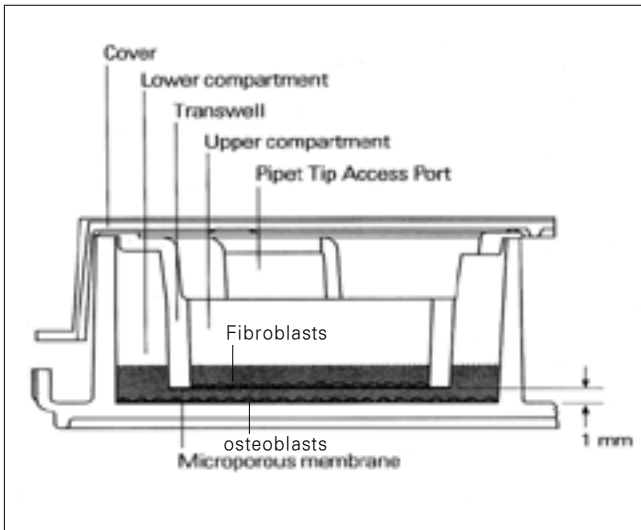
### 가. 염기성 인산분해효소 활성도 측정

세포배양 7일, 15일, 19일, 26일, 33일 후에 염기성 인산분해효소 활성도를 측정된 결과 대조군과 실험군간에 분화성숙기 시기의 차이가 있었다. 대조군에서는 15일에 염기성 인산분해효소 활성도의 최고점을 보인 반면 OB+FB(1/0.5)군, OB+FB(0.5/0.5)군, FBC+OB군에서는 26일에 최고점을 보여 염기성 인산분해효소 활성도가 대조군에 비해 지연되는 양상이 관찰되었다. FB군을 제외하면 FBC+OB군에서 가장 낮은 염기성 인산분해 효소 활성도를 보였고 OBC+FB군에서는 OB군과 차이를 보이지 않거나 더욱 증가하였다(Table 2, Fig. 2).

### 나. 석회화된 골결절의 측정

세포배양 19일, 33일, 41일째에 Von Kossa 염색으로 석회화된 골결절을 관찰한 결과 OBC+FB군을 제외한 모든 실험군에서 OB군에 비해 석회화된 골결절이 적게 나타났다. 배양 19일에 OB군과 OBC+FB군은 석회화된 골결절이 배양접시 중앙부위에 집중되어 많이 나타났고 OB+FB(1/0.5)군과 OB+FB(0.5/0.5)군에서 석회화가 흩어져서 나타나기 시작하여 33일에는 중앙 부위에도 집중된 골결절이 나타났다. FBC+OB군에서는 19일에 거의 석회화가 일어나지 않았으나 33일, 41일에는 골결절이 흩어져 나타나며 41일에서는 OB군과 비슷한 정도까지 골결절이 증가하였다(Fig. 3). FB군은 41일째에도 석회화가 일어나지 않았다.

석회화된 골결절의 밀도를 영상분석기 (Image Pro plus, Media cybernetics, Maryland, U.S.A.)로 측정한 결과는 Fig. 4와 같다. 41일까지의 배양에서 OB군은 석회화 후반기로 가면서 석회화 정도가 조금씩 증가하였고 OBC+FB군은 전반기에는 OB군에 비해 더 빠르게 석회화가 일어나다가 후반기에서 OB군보다 골결절이 감



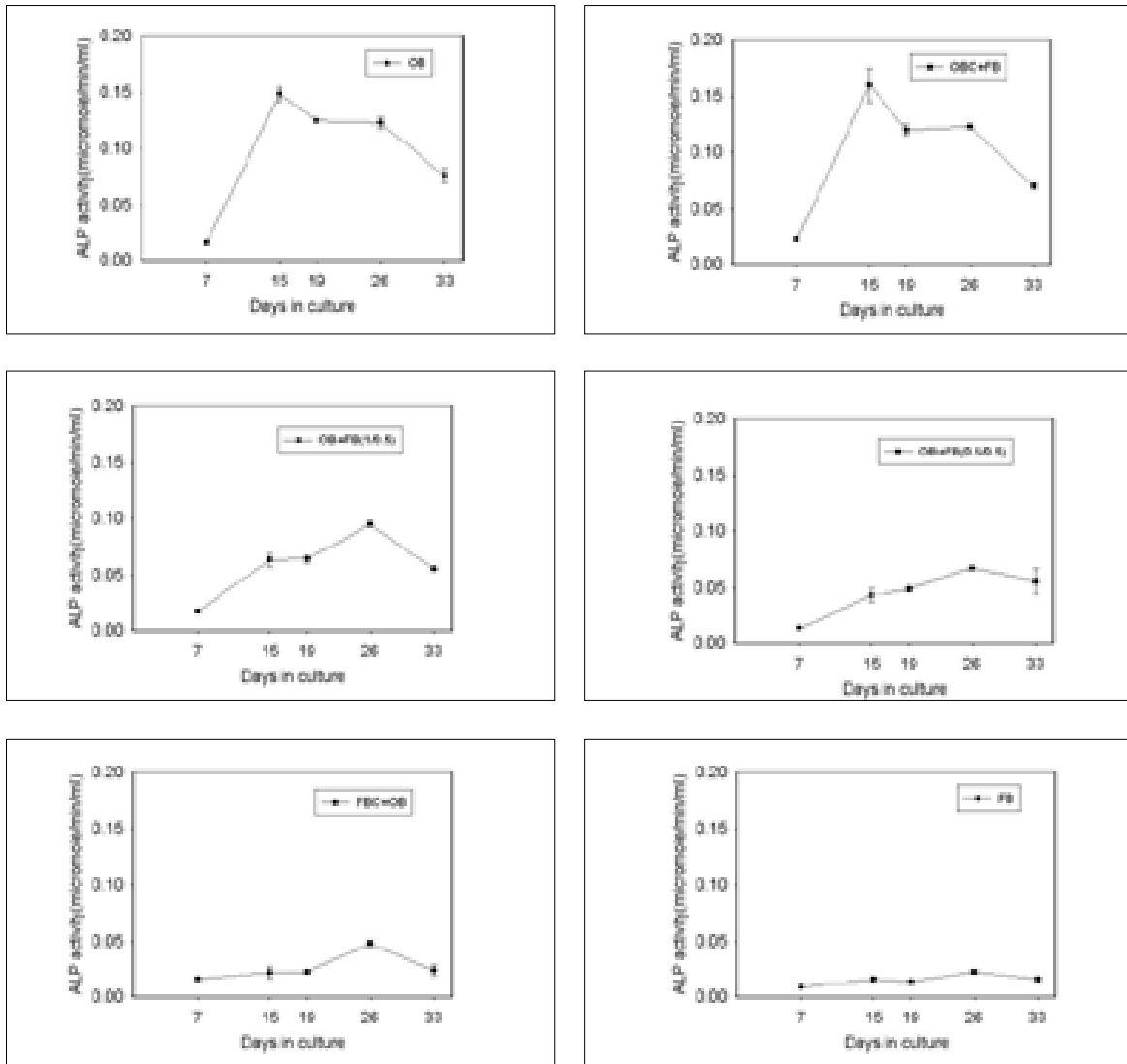
**Fig. 1.** Illustration of Transwell® used for osteoblast and fibroblast co-culture.

소하였다. OB+FB의 두 군을 보면 0.5/0.5군은 1/0.5군에 비해 석회화가 상당히 적게 일어났고 후반기에는 석회화가 더욱 둔화되었다. FBC+OB군은 후반기에 석회화가 급속히 진행되었다.

## 2. 유격배양

### 가. 염기성 인산분해효소 활성도 측정

골모세포 배양 중 시기별로 섬유모세포를 유격배양한 결과 염기성 인산분해효소 활성도의 최고점에 이르는 시기는 실험군이 대조군에 비해 모두 지연되어 단층세포배양에서와 같은 결과를 보였으나 활성도 측정값은 단층세포배양과는 다른 양상을 보였다(Fig 5). 각 유격배양의 염기성 인산분해효소 활성도는 세포 총 단백질 농도를 측정하여 단백질양(mg)에 대한 값으로 환산하였다. 골모세포의 증식기부터 섬유모세포를 유격배양한 실험군(PR군, PR-MT-MN군)은 모두 OB군에 비해 높은 염기성 인산분해효

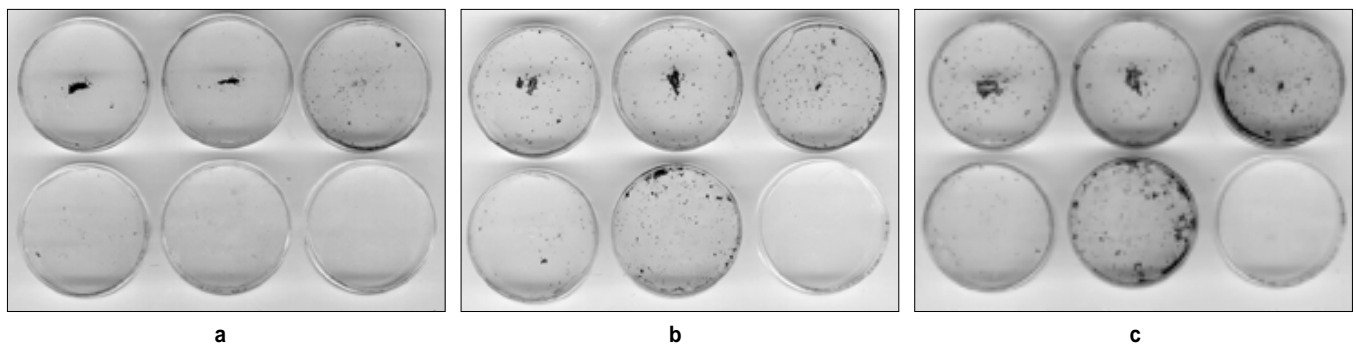


**Fig. 2.** Graphs showing effect of culture condition on alkaline phosphatase activity of osteoblasts in monolayer cultures.

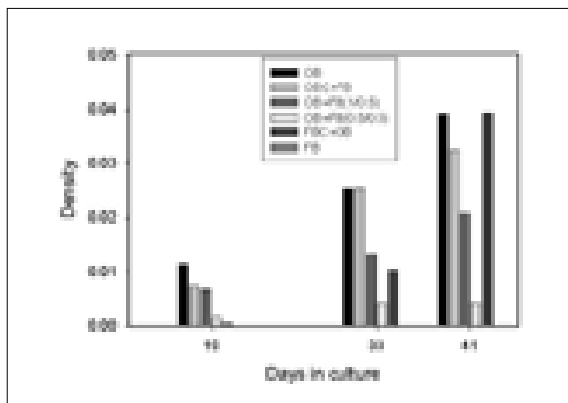
**Table 3.** Effect of fibroblast co-culture through Transwell® with various co-culture periods on alkaline phosphatase activity of osteoblasts (Mean±SD)

Experimental groups	ALP activity (p-nitrophenol micromole/min/mg)			
	day 17	day 21	day 28	day 35
OB	0.827±0.069	0.405±0.030	0.365±0.017	0.317±0.016
PR-MT-MN	0.556±0.063	0.468±0.074	0.715±0.010	0.504±0.024
MT-MN	0.200±0.060	0.526±0.002	0.387±0.025	0.332±0.011
MN	0.184±0.013	0.401±0.023	0.442±0.012	0.376±0.006
PR	0.515±0.024	1.010±0.041	0.871±0.023	0.735±0.013
MT	0.286±0.007	0.737±0.054	0.493±0.032	0.408±0.016

OB: osteoblast, PR: proliferation, MT: maturation, MN: mineralization



**Fig. 3.** Photographs of the mineralized bone nodules stained by Von Kossa in monolayer cultures at day-19 (a), day-33 (b), and day-41 (c). Culture plates: OB(upper left), OBC+FB(upper middle), OB+FB(1/0.5)(upper right), OB+FB (0.5/0.5)(lower left), FBC+OB (lower middle) and FB (lower right).



**Fig. 4.** A graph showing densitometric measurements of mineralized bone nodules in monolayer cultures.

소 활성도를 보였으며 PR군에서 가장 높은 염기성 인산분해효소 활성도가 관찰되었다. 섬유모세포와 초기에 유격배양되다 제거된 군(PR군, MT군)에서는 섬유모세포가 제거된 후 염기성 인산분해효소 활성도의 최고점이 나타났다가 감소하였으며 전반적

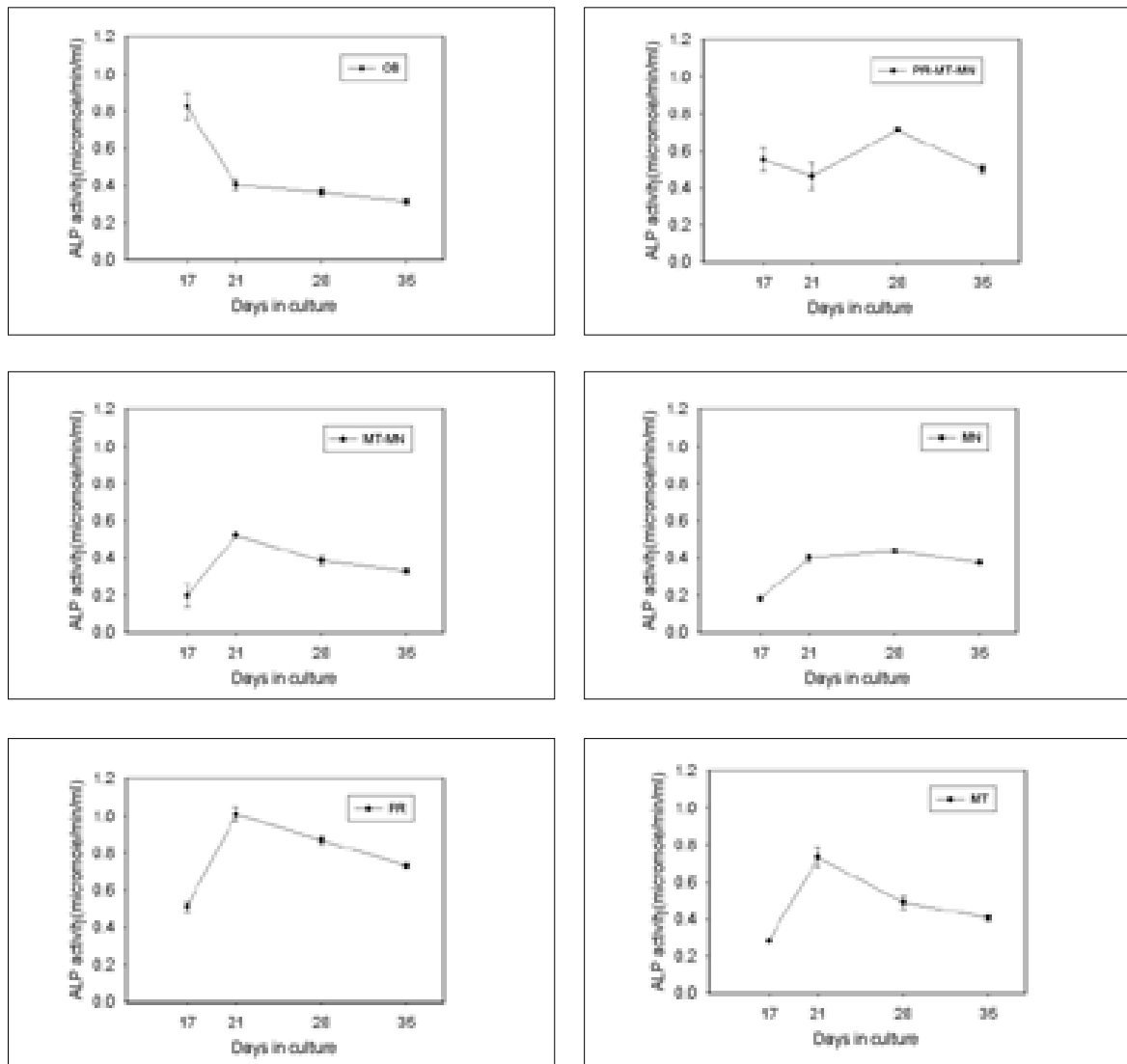
인 염기성 인산분해효소 활성도는 대조군에 비해 높게 나타났다. 반면 성숙기 이후에 유격배양을 하면서 섬유모세포를 제거하지 않고 계속 유격배양하면 뚜렷한 염기성 인산분해효소 활성도의 최고점을 보이지 않으면서 OB군에 비해 감소된 염기성 인산분해효소 활성도를 보였다(Table 3).

#### 나. 석회화된 골결절의 측정

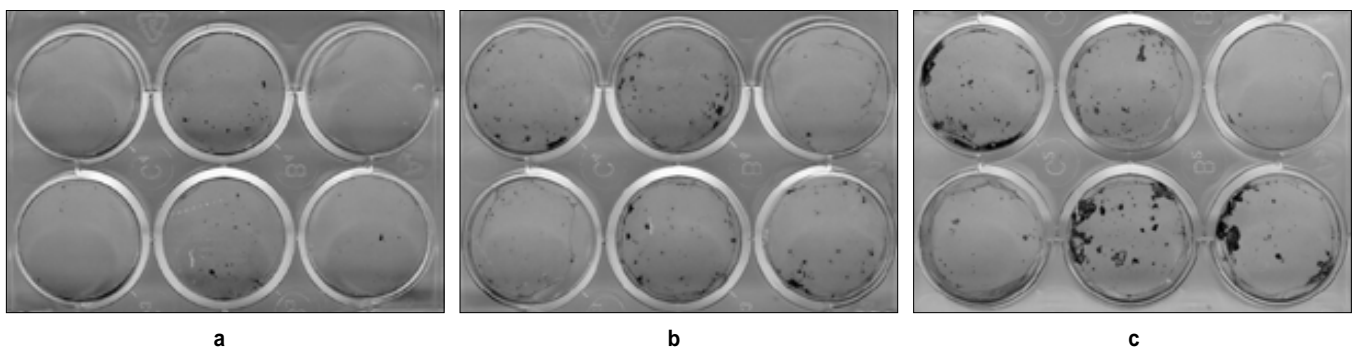
유격배양 후 21일, 35일, 42일에 석회화된 골결절을 Von Kossa 염색하여 세포배양접시를 관찰한 결과 단층세포배양의 결과와는 다르게 PR군, MT군, PR-MT-MN군에서는 골결절을 측정할 모든 시기에서 OB군에 비해 더 많은 석회화를 보였다 (Fig 6). 이 가운데 PR군과 MT군은 OB군에 비해 후반기로 갈수록 석회화가 더 진행되는 양상을 보였다. 반면 석회화기가 포함된 유격배양군(PR-MT-MN군, MT-MN군, MN군)에서는 배양 35일과 42일에서 OB군에 비해 석회화가 둔화되는 경향을 보였다(Fig 7).

### 3. 3차원 결합조직 배양

결합조직 상부에 골모세포를 점적한 실험군과 결합조직 대조

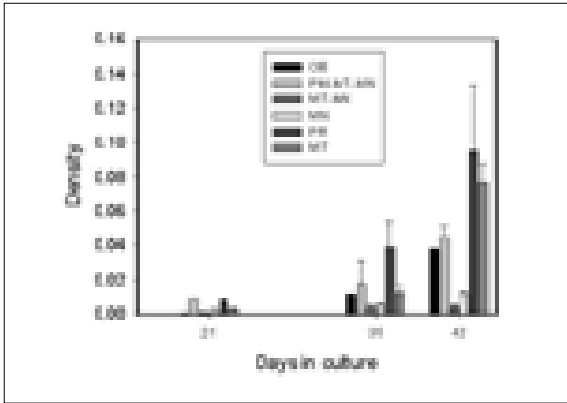


**Fig. 5.** Graphs showing effect of fibroblast co-culture through Transwell® with various co-culture periods on alkaline phosphatase activity of osteoblasts.

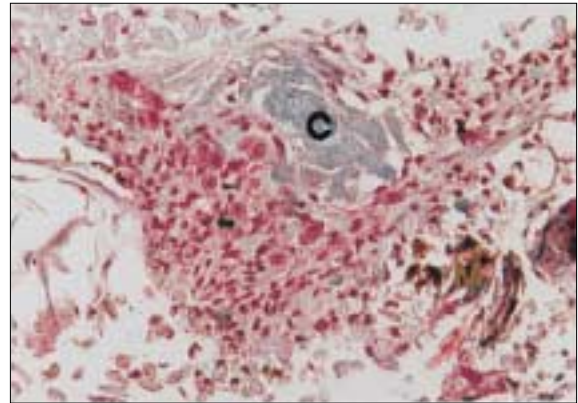


**Fig. 6.** Photographs of the mineralized bone nodules stained by Von Kossa in cultures through Transwell® at day 21 (a), day 35 (b), and day 42 (c). Culture plates: OB(upper left), PR-MT-MN(upper middle), MT-MN(upper right), MN(lower left), PR(lower middle) and MT(lower right).

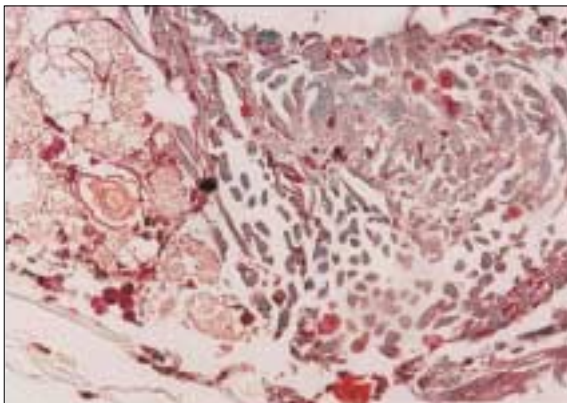




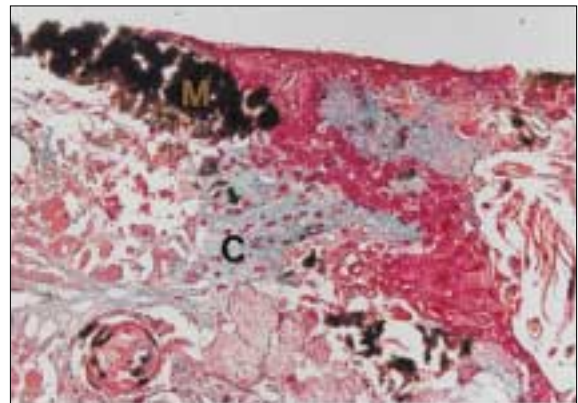
**Fig. 7.** A graph showing densitometric measurement of mineralized bone nodules in cultures through Transwell®.



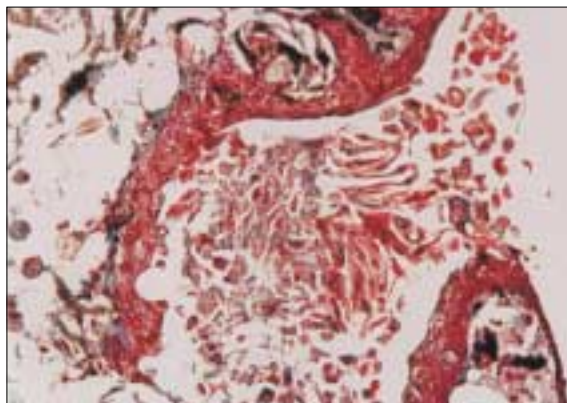
**Fig. 8.** Longitudinal section of 4-week-cultured connective tissue with osteoblast seeding on the top of tissue. Showing osteoblasts (arrow), C: collagen matrix and M: mineralized area.(Von Kossa & Trichrome Goldner staining, x200).



**Fig. 9.** Longitudinal section of 4-week-cultured connective tissue without osteoblast seeding(Von Kossa & Trichrome Goldner staining, x200).



**Fig. 10.** Longitudinal section of 6-week-cultured connective tissue with osteoblast seeding on the top of tissue. Showing osteoblast(arrow), C: collagen matrix, M: mineralized area(Von Kossa & Trichrome Goldner staining, x200).



**Fig. 11.** Longitudinal section of 6-week-cultured connective tissue without osteoblast seeding(Von Kossa & Trichrome Goldner staining, x200).

군을 배양하여 4주와 6주 후 조직 표본을 만들어 Von Kossa 와 Trichrome Goldner 염색을 하여 조직조건을 광학현미경으로 관찰하였다. 전체적으로 골모세포를 점적한 실험군은 대조군에 비해 조직의 두께가 두꺼우면서 조직내부는 치밀한 구조를 보였다. 배양 4주 후의 실험군은 골모세포가 조직내부로 증식한 조건을 보이고(Fig. 8), 배양 6주에는 대조군에 비해 교원질 기질(collagen matrix)이 많이 형성되었고 Von Kossa 염색이 된 석회화 부위가 부분적으로 나타났다(Fig. 10).

#### IV. 고 찰

악안면결손부위의 골재생이나 치주조직의 재생을 위해 외부로부터 결손부에 이식되는 골이식재료는 자가골이 유리하나 공여부의 한계나 동통 수반의 단점이 있고 동종골이나 이종골이



식은 진정한 골재생을 얻기 어렵다. 그러므로 배양한 세포의 이식이나 성장인자 또는 골형성단백등을 이용한 골형성에 대해 연구가 있어왔고<sup>9,10,21,22</sup>, 골수에서 얻은 골형성세포를 배양하여 이를 직접 혹은 운반체나 성장인자와 함께 이식하여 골재생을 유도하는 생체조직공학에 관한 많은 연구가 있다<sup>23,25</sup>. 이와 같이 배양되어 이식된 골모세포는 세포분화 및 골형성과정에서 기존 조직내의 세포 및 세포외 기질과 다양한 상호작용의 과정을 거치게 되므로 이에 대한 이해와 고려가 필요하다.

본 연구에서는 마우스의 두개관에서 효소 처리하여 얻은 골모세포를 일차 배양하여 사용하였다. 두개관에서 얻은 골형성세포 배양시의 골형성 특성에 대하여 Ecarot-Charrier 등<sup>26</sup>은 마우스 골세포의 배양을 통해 염기성 인산분해효소 활성이 세포막, 기질소포(vesicle) 및 교원질 원섬유 사이에 나타나고  $\beta$ -glycerophosphate가 배지 내에 존재하면 골모세포는 배양 중에 석회화를 일으키게 된다고 하였다. Aronow 등<sup>19</sup>은 배양한 세포군집은 세포 증식기 이후에 ascorbic acid와  $\beta$ -glycerophosphate를 투여하면 제 1형 교원질의 형성과 염기성 인산분해효소 활성도를 보이는 성숙기의 과정을 거쳐 세포외 기질의 석회화가 일어나는 과정을 통해 골모세포 표현형을 발현한다고 하였다. 본 연구에서는 섬유모세포를 골모세포와 함께 단층세포배양 및 유격배양하여 골모세포의 염기성 인산분해효소 활성도와 40일 이상 장기 배양한 세포의 기질의 석회화 정도에 미치는 영향을 관찰하였다.

골모세포의 분화에 섬유모세포의 복합배양이 미치는 영향에 대한 이전의 연구로 Lennon 등<sup>17</sup>은 사람 골수의 미분화간엽세포를 피부의 섬유모세포와 희석하여 복합배양하여도 골형성, 또는 연골형성세포로 분화함을 보고하였다. 또한 Ogiso 등<sup>15</sup>은 백서의 골수기질세포와 피부의 섬유모세포, 사람의 치주인대 섬유모세포를 복합배양하여 섬유모세포가 석회화된 골결절 형성을 억제한다고 보고하면서 서로 다른 세포간의 증식 속도의 차이, 접촉억제(contact inhibition)와 섬유모세포에서 분비되는 용해물질이 관련한다고 하였다. 이들 연구에서는 섬유모세포를 골모세포와 단층복합배양하여 이들 연구결과에 있어 다소 상이한 결과는 있으나 섬유모세포의 증식이 골모세포의 증식과 분화를 억제한다는 데에 동의하고 있다.

본 연구의 단층세포배양에서 세포수나 복합배양시점을 달리하여 섬유모세포와 복합배양한 결과 골모세포가 증식하여 단층을 형성한 후 섬유모세포를 복합배양한 군에서는 염기성 인산분해효소의 활성도나 석회화 시기와 정도에 있어 골모세포 대조군과 유사한 결과를 보였다. 또한 섬유모세포가 증식하여 단층을 형성한 후 골모세포를 배양한 군에서는 염기성 인산분해효소 활성도의 최고점이 늦게 나타나 성숙기가 지연되고 골결절의 출현도 지연되었으나 배양 41일에서의 석회화 정도는 골모세포 대조군에서와 유사한 정도까지 증가하여 정착된 섬유모세포층 위에서의 골모세포 분화는 지연은 나타나지만 분화가 상당히 진행되었음을 관찰할 수 있었다. 그러나 섬유모세포와 골모세포를 동시에 복합배양하는 경우 각각의 세포수가 골모세포의 분화에 영향을 주어 1/0.5군이 0.5/0.5군에 비해 4배까지 석회화가 증가함

을 보였다. 이 결과는 서로 다른 세포가 각각 증식 분화하면서 증식속도의 차이나 접촉억제와 같은 요인이 작용하여 나타나는 것이라고 해석된다.

골모세포와 섬유모세포를 1/0.5로 복합배양한 군이 0.5/0.5로 복합배양한 군에 비해 석회화 정도가 4배까지 증가하였고 섬유모세포가 증식하여 단층을 형성한 후 골모세포를 복합배양한 군에서 상당한 석회화가 일어난 결과는 Ogiso 등의 연구에서 복합배양이 대조군에 비해 현저히 낮은 석회화를 보여 섬유모세포가 석회화된 골결절의 형성을 억제한다는 연구결과와는 다르다고 생각된다. 오히려 이러한 연구결과는 복합배양시 형성되는 골이나 연골의 양은 섬유모세포가 증가할수록 감소하지만 전체 세포수의 50%이상 미분화간엽세포가 포함되면 100% 미분화간엽세포 배양과 비교될 정도의 골형성 속도를 얻을 수 있으며 미분화간엽세포의 일정비율 이하에서는 형성되는 골의 양이 급속히 감소함을 보고한 Lennon 등의 연구결과와 유사한 경향을 보였다. 그러나 Lennon 등이 보고한 대로 복합배양시 일정비율 이하로 골모세포가 배양될 경우 장기배양에서도 골의 양이 억제되는지를 알아보기 위해 섬유모세포가 증식하여 단층을 형성한 후 골모세포를 복합배양시킨 결과 성숙기와 석회화기가 모두 연장되고 염기성 인산분해효소 활성도와 석회화정도가 대조군에 비해 감소한 소견을 보였으나 배양 33일부터 석회화가 급격히 진행되어 배양 42일에는 대조군보다 석회화가 증가한 소견을 보였다. 이러한 결과는 Ogiso 등의 연구에서 16일간의 복합배양 결과 복합배양이 대조군에 비해 현저히 낮은 석회화를 보여 섬유모세포가 석회화된 골결절의 형성을 억제한다고 보고하였지만, 42일간 장기배양한 결과는 섬유모세포와의 단층세포배양이 골모세포의 분화과정에서 성숙기를 연장시키고 석회화기의 출현을 지연시키는 효과를 보였으나 이것으로 골모세포의 분화를 억제한다고 단정할 수는 없음을 보여주었다.

또한 Ogiso 등도 그의 연구에서 지적하였듯이 골모세포와 섬유모세포간의 증식속도의 차이와 접촉억제가 단층세포배양에서는 중요한 요소로 작용하기 때문에 이같은 요소를 배제하고 섬유모세포가 분비하는 물질이 골모세포 분화에 미치는 영향을 관찰하기 위해 섬유모세포와 골모세포를 유격배양하였고 유격배양과정에서 골모세포의 분화시기에 따라 섬유모세포의 유격배양이 미치는 영향에 차이가 있는지를 알아보기 위하여 섬유모세포를 유격배양하는 시기를 달리하였다.

본 연구결과 유격배양에서도 단층세포배양과 같이 성숙기의 염기성 인산분해효소 활성도 최고점을 보이는 시기는 지연되어 나타났지만 유격배양에서는 몇 가지 점에서 단층세포배양과는 다른 양상이 관찰되었다. 복합배양시기를 달리하여 실험한 결과 증식기에만 유격배양한 군이 가장 염기성 인산분해효소 활성도나 석회화 정도가 높았고 골모세포 분화 전 단계에서 함께 배양한 군과 증식기나 성숙기에만 함께 배양한 군에서는 OB군보다 높은 석회화를 보였다. 이러한 결과는 단층세포배양과는 달리 골모세포와 섬유모세포간의 증식 속도의 차이, 접촉억제와 같은 요소를 배제한 조건에서는 섬유모세포와의 복합배양이 골모세포의 석회화기를 지연시키지만 석회화를 억제한다고 단정할 수

없음을 보여 준다. 또한 연구결과는 섬유모세포의 복합배양이 미치는 영향이 골모세포의 전 분화 단계에서 항상 같지 않음을 보였다. 세포 총단백질 농도 분석 결과에 의하면 섬유모세포와의 유격배양 기간 중에 증식기가 포함되어 있는 군들(PR군, PR-MT-MN군)에서 세포 단백질양이 다른 군에 비해 증가하여 유격배양한 섬유모세포는 골모세포 증식기에서 골모세포의 증식을 촉진하는 역할을 하는 것으로 보인다. 또한 이 시기에 섬유모세포가 유격배양되면 염기성 인산분해효소 활성도가 증가하고 세포의 기질의 석회화 역시 증가함이 관찰되었다. 증식기에만 유격배양한 경우 염기성 인산분해효소 활성도 최고점이 OB군에 비해 지연되어 나타나지만 증가하는 점으로 미루어 볼 때 이들 군에서 나타나는 염기성 인산분해효소 활성도 최고점의 지연이 섬유모세포가 골모세포의 분화를 억제함으로써 나타난다고 하기보다는 골모세포 증식을 촉진하여 증식기가 연장됨으로써 나타나는 것으로 사료된다. 이들 군에서는 석회화가 지연되지도 않을 뿐더러 OB군에 비해 더 높은 석회화를 보였다는 결과도 이 가설을 뒷받침한다.

반면 석회화기에 섬유모세포가 함께 배양된 두 군에서는(MT-MN군, MN군) 배양 21일에는 OB군과 큰 차이가 없지만 분화 35일, 42일로 갈수록 석회화가 현저히 둔화되어 석회화기에 함께 배양을 시행하지 않았던 다른 군과 특징적으로 구별되었다. 그러나 유격배양기간이 증식기는 7일, 성숙기는 8일, 석회화기는 25일이므로 이러한 경향이 석회화기에 유격배양되었기에 나타나는 영향인지 유격배양기간이 길어서 나타난 영향인지는 확인할 수 없었으나 전 분화기간 모두에서 유격배양한 경우와 비교하면 유격배양 기간에 따른 영향은 아닌 것으로 생각되며 전 분화기간에서 유격배양한 군의 석회화 결과는 초기에는 증식기에만 유격배양한 군과 같이 OB군에 비해 높은 염기성 인산분해효소 활성도를 보이다가 후반기에는 OB군에 비해 석회화가 둔화됨을 보여 초기의 석회화 증가 효과와 후반기의 석회화 억제 효과가 복합되어 나타난 것으로 생각된다. 유격배양의 이러한 결과는 섬유모세포가 골모세포의 분화과정에 미치는 영향이 그 시기마다 상이할 수 있음을 추측하게 한다.

본 연구의 단층세포배양과 유격배양 결과를 종합하면 섬유모세포가 골모세포의 분화과정에서 미치는 영향은 서로 다른 세포의 증식 속도의 차이에 따른 공간 확보의 영향에 의한 저해효과나 접촉억제에 의한 요소 이외의 다른 요소에 의해 분화시기에 따라 상이한 복합적인 영향을 주고 있음을 추론할 수 있다. 단층세포배양에서 골모세포가 증식하여 단층을 형성한 후 섬유모세포를 복합배양한 군에서 OB군보다 더 염기성 인산분해효소 활성도나 석회화가 증가되었다는 결과와 유격배양의 결과는 섬유모세포가 생성한 물질이 배지나 세포의 기질을 통해 골모세포 분화에 영향을 주고 있음을 암시한다.

Ogiso 등은 섬유모세포에서 분비되는 용해성 물질로 prostaglandin이 이에 관여한다고 보고하였고, 또한 여러 연구에서 섬유모세포성장인자(fibroblast growth factor, FGF)나 변형성장인자(transforming growth factor-beta, TGF- $\beta$ )를 포함한 여러 성장인자가 골모세포의 증식과 분화과정에 관여함을 보고하였다<sup>22,27</sup>.

특히 FGF는 섬유모세포를 포함한 여러 세포의 배양에서 합성 분비되고 섬유모세포나 골모세포의 증식에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다<sup>28</sup>. 골형성에 있어 FGF-2의 효과에 대해 Canalis 등<sup>29</sup>은 백서의 골모세포 배양에서 DNA와 교원질의 합성은 증가시키나 염기성 인산분해효소 활성도를 감소시킨다고 하였다. 또한 Pitaru 등<sup>30</sup>에 의하면 FGF-2는 골모세포 분화를 촉진한다고 하였고 Major 등<sup>31</sup>에 의하면 FGF-2는 골모세포 증식을 유도하나 분화는 억제한다고 보고하였다. 최근에는 골모세포 분화시기에 따라 미치는 영향이 다르다고 보고되어 Debais 등<sup>32</sup>에 의하면 FGF-2는 골모세포의 증식기에서는 증식을 촉진하고 덜 분화된 세포에서는 골모세포 표현형의 발현을 감소시키나 분화가 많이 되어 성숙한 세포에서는 골모세포 표현형과 기질의 석회화를 유도하는 등 골모세포 분화 단계마다 미치는 영향이 다르다고 보고하였고 Hanada 등<sup>33</sup>은 FGF-2가 골모세포 증식을 촉진하고 분화를 증가시키며 후기에 비해 배양 초기에 역할을 한다고 보고하였다. 또한 Tanaka 등<sup>34</sup>은 FGF-2가 골모세포 증식과 분화를 조절하고 성장인자에 따라 골형성을 조절함에 있어 다른 역할을 한다고 보고하였다.

FGF는 골에서는 세포의 기질에 주로 저장되어 있으며<sup>35</sup> 상해나 PH의 변화, 저산소 상태와 같은 자극조건에 따라서는 세포에 의해 합성이 촉진되거나 세포의 기질에서 유리되어 활성형으로 유리된다고 알려져 있다<sup>36,37</sup>. 따라서 본 연구에서는 유격배양에서 섬유모세포가 골모세포의 증식기에 증식을 촉진하는 역할을 할 수 있다는 가설 아래 배지에서 FGF 항체를 이용한 면역조직화학검사를 시행하였다. 그 결과 증식기에서만 미약한 항체반응을 얻을 수 있었다. 그러나 대조군에 비해 유의하게 크지 않고 다른 시기에서는 항체반응을 얻지 못하여 FGF가 증식기에 섬유모세포에서 생성되어 골모세포 분화에 영향을 주는 물질인지에 대해서는 분명치 않다. 추후에 이에 대한 추가적인 연구가 필요하리라 생각된다.

이와 같은 섬유모세포의 골모세포에 대한 영향에서 나아가 결합조직내에서의 골모세포의 분화를 관찰하기 위해 3차원 결합조직상에 골모세포를 배양하였다. 이 결과 실험실 조직배양에서도 골모세포는 생존하여 조직의 상부에서 뿐 아니라 조직 내부로도 침투되어 증식 및 분화가 일어나 세포의 기질이 형성되고 기질의 석회화가 일어남을 보여 주었다. 이는 이식된 골모세포는 결합조직내에서 생존하고 증식하여 세포의 기질을 형성하고 골조직을 형성할 수 있음을 의미한다.

본 연구에서는 골모세포의 분화와 표현형 발현에 관한 여러 가지의 지표 가운데서 염기성 인산분해효소 활성도와 골결절형성에 대한 실험만을 시행하였기에 섬유모세포가 골모세포의 분화과정에서 미치는 영향을 설명하기 위해서는 골모세포의 분화과정에서 발현되는 collagen type I, osteocalcin, osteonectin, osteopontin, calcium level과 같은 분화지표와 1.25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>와 부갑상선 호르몬을 비롯한 골모세포의 분화과정에 관여하는 여러 성장인자가 섬유모세포의 복합배양에 의해 어떠한 영향을 받는지에 대한 추가적인 연구가 필요하리라 사료된다.

## V. 결 론

섬유모세포가 두개관 미분화 간엽세포의 골세포 분화에 미치는 영향을 알아보기 위해 마우스의 두개관 골모세포와 협점막의 섬유모세포를 단층세포배양, 유격배양하여 염기성 인산분해효소 활성도와 석회화된 골결절을 측정하고 골모세포를 결합조직 위에 3차원 조직배양하여 다음의 결과를 얻었다.

1. 섬유모세포와 골모세포를 단층세포배양한 상태에서는 골모세포의 성숙기가 연장되고 석회화가 지연되었다.
2. 섬유모세포를 골모세포의 증식기에 유격배양하면 골모세포 증식이 촉진되고 염기성 인산분해효소 활성도와 골결절의 석회화가 증가하는 경향을 보였다.
3. 섬유모세포를 골모세포의 석회화기에 유격배양하면 골결절의 석회화가 감소되고 석회화기가 지연되는 경향을 보였다.
4. 3차원 결합조직상에 골모세포를 이식하면 결합조직내에서 골모세포가 증식하여 교원질 기질이 형성되고 석회화가 나타났다.

이와 같은 결과는 증식 속도의 차이와 접촉억제가 있는 조건에서는 섬유모세포가 골모세포의 분화를 지연시키지만 증식 속도의 차이와 접촉억제요인을 배제한 유격배양에서는 골모세포 증식기에 섬유모세포가 석회화 증가에 영향을 주고, 석회화기에는 오히려 석회화를 감소시키므로써 골모세포의 분화시기에 따라 섬유모세포는 다르게 작용할 수 있음을 시사한다.

## 참고문헌

1. Caplan, A.I. (1991). Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*, 9:641-650.
2. Friedenstien, A.J., R.K. Chailakhjan, K.S. Lalykina (1970). The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet*, 3:393-403.
3. Ashton, B.A., T.D. Allen, C.R. Howlett, C.C. Eaglesom, A. Hattori (1980). Formation of bone and cartilage by marrow stromal cells in diffusion chambers in vivo. *Clin. Orthop*, 151:294-307.
4. Beresford, J.N. (1989). Osteogenic stem cells and the stromal system of bone and marrow. *Clin Orthop*, 240:270-280.
5. Haynesworth, S.E., J. Goshima, V.M. Goldberg, A.I. Caplan (1992). Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. *Bone*, 13:81-88.
6. Kadiyala, S., N. Jaiswal, S.P. Bruder (1997). Culture-expanded, bone marrow-derived mesenchymal stem cells regenerate a critical-sized segmental bone defect. *Tissue Engineering*, 3:173-185.
7. Bruder, S.P., K.H. Kraus, V.M. Goldberg, S. Kadiyala (1998). The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects. *J bone joint surgery*, 80A(7):985-996.
8. Niedzwiedzki, T., Z. Dabrowski, H. Miszta, M. Pawlikowski (1993). Bone healing after bone marrow stromal cell transplantation to the bone defects *Biomaterials*, 14:115-121.
9. Wernitz, J.R., J.M. Lane, A.H. Burstein, R. Justin, R. Klein, R. Tomin (1996). Qualitative and quantitative analysis of orthotopic bone regeneration by marrow. *Journal of orthopaedic research*, 14(1):85-93.
10. Yasko, A.W., J.M. Lane, E.J. Fellingner, V. Rosen, J.M. Wozney, E.A. Wang (1992). The healing of segmental bone defects, induced by recombinant human bone morphogenetic protein(rhBMP-2). *Journal of bone and joint surgery*, 74-A(5):659-670.

11. Connolly, J., R. Guse, L. Lippiello, R. Dehne (1989). Development of an osteogenic bone marrow preparation. *The journal of bone and joint surgery*, 71A(5):684-691.
12. Connolly, J.F., R. Guse, J. Tiedeman, R. Dehne (1991). Autologous marrow injection as a substitute for operative grafting of tibial nonunions. *Clinical orthopaedics and related research*, 266:259-270.
13. Bartold, P.M., C.A. McCulloch, A.S. Narayana, S. Pitaru (2000). Tissue engineering: a new paradigm for periodontal regeneration based on molecular and cell biology. *Periodontology 2000*, 24:253-269.
14. Lang, H., N. Schuler, R. Nolden (1998). Attachment formation following replantation of cultured cells into periodontal defects-a study in minipigs. *J Dent Res*, 77(2):394-405.
15. Ogiso, B., F.J. Hughes, A.H. Melcher, C.A.G. McCulloch (1991). Fibroblasts inhibit mineralized bone nodule formation by rat bone marrow stromal cells in vitro. *Journal of cellular physiology*, 146:442-450.
16. Ogiso, B., F.J. Hughes, J.E. Davies, C.A.G. McCulloch (1992). Fibroblastic regulation of osteoblast function by prostaglandins. *Cellular Signalling*, 6:627-639.
17. Lennon, D.P. S.E. Haynesworth, D.M. Arm, M.A. Baber, A.I. Caplan (2000). Dilution of human mesenchymal stem cells with dermal fibroblasts and the effects on in vitro and in vivo osteochondrogenesis. *Development dynamics*, 219:50-62.
18. Aronow, M.A., T.A. Gerstenfeld, M.S. Owen, G.S. Tassinari (1990). Factors that promote progressive development of the osteoblast phenotype in cultured fetal rat calvaria cells. *J cellular physiology*, 143:213-221.
19. Bowers, G.N., R.B. McComb (1966). A continuous spectrophotometric method for measuring the activity of serum alkaline phosphatase. *Clin Chem*, 2:70.
20. Smith, P.K., R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem*, 150:76-85.
21. Giannobile, W.W. (1996). Periodontal tissue engineering by growth factors. *Bone*, 19:23S-37S.25. Boyne, P.J. (1996). Animal studies of application of rhBMP-2 in maxillofacial reconstruction. *Bone*, 19(1S):83S-92S.
22. Linkhar, T.A., S. Mohan, D.J. Baylink (1996). Growth factors for bone growth and repair:IGF, TGF beta and BMP. *Bone*, 19(supplement 1):1S-12S.
23. Malekzadeh, R., J.O. Hollinger, D. Buck, D.F. Adams, B.S. McAllister (1998). Isolation of human osteoblast-like cells and in vitro amplification for tissue engineering. *J Periodontol*, 69:1256-1262.
24. Lee, Y.M., Y.J. Park, S.J. Lee, Y. Ku, S.B. Han, S.M. Choi, P.R. Klokkevold, C.P. Chung (2000). Tissue engineered bone formation using chitosan/tricalcium phosphate sponges. *J Periodontol*, 71(3):410-417.29. Canalis, E., M. Centrella, T. McCarthy (1988). Effect of basic fibroblast growth factor on bone formation in vitro. *J. Clin Invest*, 81:1572-1577.
25. Boyne, P.J. (1996). Animal studies of application of rhBMP-2 in maxillofacial reconstruction. *Bone*, 19(1S):83S-92S.
26. Ecatot-Charrier, B., F.H. Glorieux, M. Rest, G. Perreira (1983). Osteoblasts isolated from mouse calvaria initiate matrix mineralization in culture. *J cell biology*, 96:639-643.
27. Zheng, M.H., D.J. Wood, J.M. Papadimitriou (1992). What's new in the role of cytokines on osteoblast proliferation and differentiation? *Path. Res. Pract*, 88:1104-1121.
28. Gospodarowicz, D., N. Ferrara, L. Schweigerer, G. Neufeld (1987). Structural characterization and biological functions of fibroblast growth factor. *Endocrine Reviews*, 8:95-114.
29. Canalis, E., M. Centrella, T. McCarthy (1988). Effect of basic fibroblast growth factor on bone formation in vitro. *J. Clin Invest*, 81:1572-1577.
30. Pitaru, S., S. Lotev, D. Noff, S. Kaffuler, N. Savion (1993). Effect of basic fibroblast growth factor on the growth and differentiation of adult stromal bone marrow cells:Enhanced development of mineralized bone-like tissue in culture. *J Bone Miner Res*, 8:919-929.

31. Majors, A.E., G.F. Muschler (1996). Basic FGF enhance proliferation and reversibly inhibits differentiation of osteoblastic progenitors. *Trans Orth Res Soc*, 21:113(abstract).
32. Debiais, F., M. Hott, A.M. Graulet, P.J. Marie (1998). The effects of fibroblast growth factor-2 on human neonatal calvaria osteoblastic cells are differentiation stage specific. *Journal of bone and mineral research*, 13(4):645-654.
33. Hanada, K., J.E. Dennis, A.I. Caplan (1997). Stimulatory effects of basic fibroblast growth factor and bone morphogenetic protein-2 on osteogenic differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J bone and mineral research*, 12(10):1606-1614.
34. Tanaka, H., H. Ogasa, J. Barnes, C.T. Liang (1999). Actions of bFGF on mitogenic activity and lineage expression in rat osteoprogenitor cells: effect of age. *Molecular and cellular endocrinology*, 150:1-10.
35. Globus, R.K., J. Plouet, D. Gospodarowicz (1989). Cultured bovine bone cells synthesize basic fibroblast growth factor and store it in their extracellular matrix. *Endocrinology*, 124:1539-1547.
36. Baroni, A., B. Perfetto, G. Buttini, P. Catalanotti, F. Gorga (1999). Topical amikacin formulation induces fibroblast growth factor and cytokine release from human dermal fibroblasts. *Arch Dermatol Res*, 291:296-299.
37. Bikfalvi, A., S. Klein, G. Pintucci, D.B. Rifkin (1997). Biological roles of fibroblast growth factor-2. *Endocrine Reviews*, 18:26-45.