

bFGF, PDGF-BB가 백서 골수기원 간엽 줄기세포의 조직골세포 분화에 미치는 영향에 관한 연구

송진아 · 최진영

서울대학교 치과대학 구강악안면외과학교실

Abstract (J. Kor. Oral Maxillofac. Surg. 2006;32:495-505)

EFFECTS OF bFGF AND PDGF-BB ON OSTEOBLAST DIFFERENTIATION OF BONE MARROW-DERIVED MESENCHYMAL STEM CELL IN RAT

Gin-Ah Song, Jin-Young Choi

Department of Oral and Maxillofacial Surgery, College of Dentistry, Graduate School, Seoul National University

In this study we evaluate the effects of bFGF-BB and PDGF on in vitro proliferation, differentiation and mineralization of mesenchymal stem cells (MSCs) from rat.

MSCs were prepared from the bone marrow of 6 or 7-week-old male rats with a technique previously described by Maniopoulos et al. in 1988. Lineage differentiation to osteogenesis, chondrogenesis and adipogenesis were performed. At first, we characterized the cultured cell on passage 1, 3, 5, 7 with immunocytochemical staining using CD29, 44, 34, 45, α -SMA and type I collagen. And to study the effects of bFGF and PDGF-BB on proliferation, differentiation and mineralization, we seeded the expanded cell at a density of 6×10^3 cells/cm² to 100-mm dish for evaluation of cell proliferation and MTT assay was carried out on day 2, 4, 7, 9. We also resuspended the cells with same density (6×10^3 cells/cm²) to 24 well plates for subculture. On the following day, the attached cells were exposed to 2.5ng/ml bFGF and/or 25ng/ml PDGF-BB daily during 5 days. The osteocalcin (OC) level was assessed and mineral contents were evaluated with alizarin red S staining on subculture day 2, 7, 14, 21.

We identified the mesenchymal stem cell from the bone marrow derived cells of rat through their successful multi-differentiation and stable display of its phenotype. And bFGF and PDGF-BB showed the effect that inhibited osteoblastic differentiation and mineralization mildly in above concentration at in vitro culture.

This study was supported by grant 04-2004-0120 from the Seoul National University Hospital Research Fund.

Key words: Tissue engineering, Mesenchymal Stem Cell, Osteoblast, bFGF, PDGF-BB

I. 서 론

1966년 Friedenstein은 처음으로 백서의 간엽줄기세포(adult mesenchymal stem cell)를 분리해 냄으로써 간엽조직의 재생을 위한 조직공학적 접근의 문을 열었다¹⁾. 이후 조직공학에 대한 연구가 활발하게 진행되었고 골(bone), 연골(cartilage), 건(tendon) 조직 등에서 간엽줄기세포를 이용한 조직공학의 성공 사

례들이 보고되었다^{2,7)}. 이러한 연구들을 통해서 간엽줄기세포는 조직 내에 존재하는 비율은 낮지만 미분화(undifferentiated) 세포이자 다형성능(multipotency)을 가지고 있어 조직의 재생 및 조직공학(tissue engineering)에 이용될 수 있는 잠재적 가능성이 있음이 확인되었다⁸⁻¹²⁾. 조직공학적 골재생(bone tissue engineering)은 현재까지 가장 좋은 골이식법으로 인정하는 자가골 이식이 가져오는 공여부의 합병증과 골 채취량의 한계, 술후 감염이나 골이식의 실패 등을 고려할 때 그 임상적 필요가 매우 크다^{13,14)}. 동종골과 합성골 이식 역시 면역반응, HIV나 Hepatitis C 같은 감염성 질환의 전염, 단백질 처리 과정에서 발생하는 골유도능(osteoinductive property)의 감소, 높은 술후 감염률 등의 문제가 지적되고 있기 때문에 골전도능(osteoconductive property)과 골유도능을 모두 갖출 수 있는 조직공학적 골재생(bone tissue engineering)은 골조직을 다루는 수많은 임상들의 관심이 되고 있다¹⁵⁻²⁰⁾.

최진영

110-768 서울특별시 종로구 연건동 275-1
서울대학교 치과대학 구강악안면외과학교실

Jin-Young Choi

Dept. of OMFS, College of Dentistry, Seoul National University
275-1, Yeongseon-dong, Jongno-gu, Seoul, 110-768, Korea
Tel: 82-2-2072-3992 Fax: 82-2-766-4948
E-mail: jinychoi@snu.ac.kr

* 본 연구는 서울대학교병원 일반 연구비지원에 의해 이루어진 것임.

조직공학을 이용한 골(bone) 재생의 성공은 높은 증식능(high proliferative capacity)과 미분화(undifferentiated) 특성을 유지하고 있는 간엽줄기세포의 추출(purification), 체외(in vitro)에서의 증식(expansion) 및 적절한 유도배지(induction media)를 통한 분화(differentiation)를 어떻게 조절하느냐 그리고, 필요한 기간 동안 세포를 3차원적으로 구성해줄 수 있으며 세포 독성이 없는 지지체(scaffold)를 확보하여 세포-지지체간 미세환경(cell-matrix microenvironment)을 어떻게 만들어주는냐에 달려있다고 할 수 있다.

골수에 존재하는 간엽줄기세포의 비율은 골수세포 2만개 ~10만개 중 1개(0.001% ~ 0.01%)로 매우 낮으며 골수세포에는 간엽줄기세포, 조혈줄기세포, 전구세포, 혈구세포, 조골세포들이 함께 혼합되어 있어 간엽줄기세포에 관한 연구는 이 세포들의 분리 및 확인 과정부터 시작되었다^{8,9,21}. 간엽줄기세포는 체외배양(in vitro culture) 시에 플라스틱 용기에 잘 부착하는 특성을 가지며 배양 시 높은 증식능을 보인다^{8,11,22,24}. 그러나 골수내 존재하는 낮은 분포율을 생각할 때 체외 배양기간이 길어지는 단점이 있다.

세포증식을 촉진한다고 알려져 있는 여러 성장인자들에 대한 연구는 1965년 Urist에 의해 탈회골(DBM; demineralized bone matrix)이 근육 조직에서 골형성을 유도할 수 있다는 내용이 보고된 이후²⁷ BMP(Bone morphogenetic protein), TGF β (Transforming growth factor β), PDGF(Platelet derived growth factor), FGF(Fibroblast growth factor), IGF(Insulin-like growth factor) 등이 보고되며 활발하게 진행되었다. 1998년 Marx는 풍부한 혈소판풍부혈장(PRP, Platelet Rich Plasma)을 처리한 합성골이 대조군에 비해서 수질골의 밀도를 높이는 효과가 있다고 보고하여²⁸ 혈소판풍부혈장(PRP) 및 성장인자에 대한 관심을 높였다.

1994년 Nash는 80 μ g의 혈소판유래성장인자(PDGF)를 처리한 콜라겐을 골절 부위에 주사하였을 때 조골세포로의 분화도가 더 좋아지는 결과를 보였지만 부골의 강도면에서는 통계적인 유의성이 없었다는 결과를 보고하였다²⁹. 그리고 1999년 Radomsky는 하이알루로네이트겔(hyaluronate gel)을 지지체(scaffold)로 하여 섬유세포성장인자(bFGF)를 피하로 직접 주사한 경우에 부골(callus)의 크기, 골막반응(perioosteal reaction)의 증가, 혈관화(vascularity)와 세포밀도(cellularity)의 증가가 있어 섬유세포성장인자(bFGF)가 골절의 재생에 기여하는 효과가 있다고 보고하였다³⁰. 그러나 1990년, 1996년 각각 Jingushi, Wang 등에 의해 유사하게 이루어진 동물실험(in vivo)의 결과를 보면 섬유세포성장인자(aFGF, bFGF)는 적용되는 용량에 따라 골재생을 유도할 수도 있고 저해할 수도 있다고 하였고 혈소판유래성장인자(PDGF) 역시 고농도에서는 골재생을 억제한다고 보고하였다^{31,32}. 각각의 성장인자에 대한 연구는 조직 재생에 관련된 분야에서 먼저 시작되어 1990년대 후반부터 조직공학분야로 이어졌고 동물실험(in vivo)을 통해서 뿐만 아니라 체외 배양 시(in vitro)에도 조골세포를 여러 성장인자에 노출시켰을

때 조골세포의 증식(proliferation)과 분화(differentiation)에 미치는 영향에 대해서 그 연구가 진행되어 왔다. 2004년 Chaudhary 등은 섬유세포성장인자(FGF), 혈소판유래성장인자(PDGF) 등의 성장인자가 조골세포의 분화를 촉진시키지는 못하지만 무기질 결정의 생성에는 기여하며, 섬유세포성장인자(bFGF)가 골형성단백질-7(BMP-7)의 작용을 억제하였다고 보고하였다³³.

현재 골형성단백질(Bone Morphogenetic Protein, BMP)의 경우 골형성 촉진 효과가 인정되고 있으나 그 외의 성장인자에 대해서는 긍정적 효과와 부정적 효과가 모두 보고되고 있으며 그 효과가 아직 입증되지 않은 상태이다. 이에 본 연구에서는 백서의 골수에서 미분화 세포(undifferentiated cell)를 채취하고 배양하여 먼저 간엽줄기세포(mesenchymal stem cell)인지를 확인하고, 조골세포로 분화시키는 단계에서 섬유세포성장인자(bFGF)와 혈소판유래성장인자(PDGF)에 단독, 혹은 함께 노출시켰을 때 이 성장인자들이 조골세포의 증식(proliferation), 분화(differentiation)와 무기질화(mineralization) 정도에 어떠한 영향을 미치는지 알아보았다.

II. 재료 및 방법

1. 골수기원 간엽줄기세포의 채취(harvesting) 및 배양(culture)

6~7주령, 220-250g 체중의 수컷 Sprague-Dawley 백서 8마리(샘타코)를 Ketamin(Ketara[®], 50mg/ml, 유한양행)/Xylazine(Rompun[®], 5mg/ml, 바이엘코리아)를 과량으로 복강 내에 주사하여 희생시키고 clean bench 내에서 대퇴골(femur)과 비골(tibia)을 채취하였다. 골수세포의 채취에는 1988년 Maniopoulos가 제안한 방법을 이용하였는데 양측 골단(epiphyses)을 절단한 후 23 게이지 주사바늘의 10 ml 주사기를 이용하여 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM, Gibco, USA)과 10% fetal bovine serum(FBS, Gibco, USA)로 구성된 기본 배지(expansion media)를 통과시키면서 씻어내려 골수세포를 얻었다³⁴.

8마리로부터 얻은 골수세포는 40 ml의 기본 배지에 담겨져 70 μ m 크기의 세포여과기(cell strainer, BD Falcon, USA)에 거른 후, T75 플라스크(Nalge Nunc, USA) 4개에 각각 10 ml씩 배분하고 항온배양기(1 기압, 5% CO₂, 37°C)에서 배양을 시작하였다. 배지는 48 시간 후부터 교체하기 시작하여 2-3일에 한번씩 갈아주었다. 초대배양(primary culture)을 8 일 동안 시행한 후 70%의 포화도(confluency)에 도달하면 PBS에서 5분 동안 2번씩 washing하고, 0.05% trypsin-1ml EDTA를 4분간 처리하여 세포들을 수확하고 50 ml conical tube에 담아 원심분리(900 rpm, 5분, 실온)하였다. 백서 8마리로부터 모두 2 \times 10⁶ 개 정도의 세포를 얻어서 T75 플라스크에 6 \times 10⁵ 세포/cm² 밀도로 계대하였다. 배지는 2-3일에 한번씩 교체하였다.

2. 골수기원 간엽줄기세포의 확인(identification)

1) 세포 표면표지자(stem cell surface marker)를 이용한 확인

Passage 1, 3, 5, 7 세포에서 간엽줄기세포 표면표지자 CD29, 44, α -SMA, I형 collagen과 조혈줄기세포 표면표지자 CD34, 45 단백질의 존재 여부를 확인하기 위해 면역염색(immunocytochemical staining)을 시행하였다. 세포를 0.05% trypsin-EDTA 1 ml을 이용하여 수확한 후 원심분리(900 rpm, 5분, 실온)하여 펠렛(pellet)을 얻은 후, 24 well plate에 1×10^4 세포/cm² 농도로 배분(resuspension)하고 37°C, CO₂ 배양기에서 48 시간 동안 배양한 후 3.7% paraformaldehyde를 사용하여 고정하였다. Cell permeabilization을 위해 0.2% TritonX-100을 처리하고 20% normal goat serum을 처리하여 과정을 중단시켰다. 일차항체[Mouse anti-human integrin beta1 monoclonal antibody(CHEMICON, USA), Rabbit anti-CD44v6 polyclonal antibody(CHEMICON, USA), Rabbit anti mouse CD34(MCA 1825GA, Serotec, USA), Rabbit anti mouse CD45(MCA 1388, Serotec, USA), α -Smooth muscle actin(DAKO, USA), type I collagen(DAKO, USA)]와 함께 4°C에서 24시간 동안, 이차항체(FITC, Fluorecein Isothiocyanate)와 함께 실온에서 1 시간 30분 동안 배양(incubation)하고 나서 핵을 동시에 관찰하기 위해 1 μ g/ml DAPI(D9542, DNA stain, Sigma, USA) 염색을 추가로 시행하였다. 위상차 현미경 200배에서 관찰하였으며, 핵을 관찰한 화면에서 동시에 필터를 바꾸어 세포 표면표지자를 염색한 화면을 촬영하여 화면을 중첩하였다.

2) 교차분화(lineage differentiation)를 통한 형성능(plasticity) 확인

적절한 유도 배지를 조성하였을 때 간엽줄기세포가 지방세포와 연골세포로 선택적으로 분화하는 것을 확인하기 위해 간엽줄기세포를 트립신 처리한 후 기본 배지[expansion media: DMEM, 10% FBS, Pen-Strp, Fungizone(Gibco, USA)], 조골세포 유도배지[osteogenic medium: DMEM, 10% FBS, Pen-Strp, Fungizone, 10 m mol β -glycerophosphate, 80 μ g/ml vitamin C, 10⁻⁵ mol dexamethasone(Gibco, USA)], 연골세포 유도배지[chondrogenic medium: DMEM, 10% FBS, 0.1 mM non-essential amino acids, 50 μ g/ml ascorbic acid-2-phosphate, 10 nM dexamethasone(10⁻⁸ M)(Gibco, USA), 5 ug/ml insulin, 5 ng/ml TGF β 1(R&D, USA), 지방세포 유도배지[adipogenic medium: DMEM, 10% FBS, 10 μ g/ml insulin, 10 nM dexamethasone(10⁻⁸ M)(Gibco, USA), 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine(IBMx, Sigma, USA), 0.2 mM indomethacin(Fluka, USA)]에서 각각 6×10^3 세포/cm² 농도로 100-mm 배양접시(culture dish)에서 배양하였다. 각각 4주 후에 세포의 분화유무를 확인하기 위해 alizarin red S, safranin O, oil red O (Sigma, USA) 염색을 시행하였다. 또한 교차염색을 시행하여 조골세포 유도배지에서 배양한 세포들 중에 연골세포의 성분이 있는지, 연골세포 유도배지에서 배양한 경우 조골세포로 분화한 세포가 있는지 확인하였다.

3. 세포 증식(proliferation) 평가

1) 분화 전 단계에서 세포의 증식을 살펴보기 위해 100-mm 배양접시(culture dish)에 6×10^4 개(6×10^3 개/cm²의 세포 밀도)의 세포를 배분(seeding)시키고 배양 2, 4, 7, 9, 11, 16일에 세포를 수확하여 트립판 블루로 염색을 시행하여 살아있는 세포(viable cell) 수를 확인하였다(n=4).

2) 분화 단계에서 섬유세포성장인자와 혈소판유래성장인자가 세포의 증식에 미치는 영향을 관찰하기 위해 MTT assay를 시행하였다(n=4). 24 well plate에 1×10^4 개의 세포를 배양하여, 조골세포분화 배지(osteogenic media)에서만 배양한 대조군과 2.5 ng/ml의 섬유세포성장인자를 첨가한 군, 25 ng/ml의 혈소판유래성장인자를 첨가한 군, 2.5 ng/ml의 섬유세포성장인자와 25 ng/ml의 혈소판유래성장인자를 함께 첨가한 군으로 나누었다. 각각의 성장인자는 배양 2일째부터 시작하여 매일 첨가하였으며 배양 2, 4, 7, 9일에 MTT assay를 시행하였다³⁹. 0.25 mg/ml MTT solution을 처리하고 20 간 37°C에서 배양한 후, 0.2 ml DMSO로 녹여서 혼합 후 OD_{550 nm}에서 ELISA reader기로 흡광도를 측정하였다(PowerWave x340, Bio-Tek Instruments Inc).

4. 성장인자가 조골세포의 분화, 무기질화에 미치는 영향 확인

24 well plate에 6×10^3 세포/cm² 농도로 세포를 배분(seeding)하여 60% Dulbecco's Modified Eagle's Medium, 10% fetal bovine serum(FBS), 10⁻⁵ mol dexamethasone, 항생제(100U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin), 0.25 μ g/ml amphotericin B, 10 m mol Na β -glycerophosphate, 80 μ g/ml vitamin C phosphate등을 첨가한 조골세포 분화 유도배지에서 간엽줄기세포를 배양하였다. 배양 1 일째부터 7 일째까지 2.5 ng/ml 섬유세포성장인자(recombinant bovine bFGF, Invitrogen, USA), 25 ng/ml 혈소판유래성장인자(recombinant bovine PDGF-BB, Sigma, USA)에 단독으로 혹은 같이 노출시켰다(n=6). 배양 2, 7, 14, 21일에 osteocalcin assay, alizarin red S staining을 시행하였다(Table 1).

1) Osteocalcin assay

조골세포로의 분화를 확인하기 위해 osteocalcin의 농도를 측정하였다. Osteocalcin의 양은 Gla-type Osteocalcin EIA Kit (TaKaRa, Japan)를 사용하여 측정하였고, OD_{450nm}에서 ELISA

Table 1. Experimental group

Group I	Osteogenic media + 2.5 ng/ml bFGF
Group II	Osteogenic media + 25 ng/ml PDGF-BB
Group III	Osteogenic media + 2.5 ng/ml bFGF + 25 ng/ml PDGF-BB
Control	Osteogenic media only

reader로 흡광도를 측정하였다(PowerWave × 340, Bio-Tek Instruments Inc).

2) Alizarin red S 염색

무기질 결정의 침착 및 생성 정도를 확인하기 위해 alizarin red S 염색을 시행하였다.

III. 결 과

1. 백서의 골수기원 간엽줄기세포의 배양(culture)과 확인(identification)

배양 24시간 후에 일부 세포의 부착이 시작되는 것이 관찰되고, 배양 6일째 50% 정도의 포화도(confluency)가 관찰되며 배양 8일에서 9일 사이에 80% 정도의 포화도에 도달하였다. 세포는 섬유세포(fibroblast)와 유사하게 자루 모양의 형태이지만 세포질이 넓게 퍼져있지 않고 뭉툭한 모양의 세포들이 군집을 이루고 있는 것이 관찰되었다(Fig. 1).

1) 줄기세포 표면표지자(stem cell surface marker)를 이용한 확인

백서 간엽줄기세포의 passage 1, 3, 5, 7 세포들에 여러 개의 세포 표면표지자를 부착하여 면역 염색한 결과 CD29, α-SMA, I형 collagen(전형적인 간엽줄기세포 표면단백질)에 양성 반응을 보였고, 조혈줄기세포 표지자로 알려진 CD34, 45에는 반응을 보이지 않아 배양된 세포들에서 조혈줄기세포의 혼합은 관찰되지 않았다. 단, 간엽줄기세포 표면표지자로 사용되고 있는 CD44에는 염색이 되지 않았다. 핵 염색을 동시에 시행하여 핵의 수와 위치를 확인하고 세포 표면표지자 염색을 관찰하여 중첩해본 결과 95% 이상에서 핵과 세포 표면이 동시에 염색되

는 것을 관찰할 수 있었다. 또한 이러한 특성이 passage 7까지 유지되었다(Fig. 2).

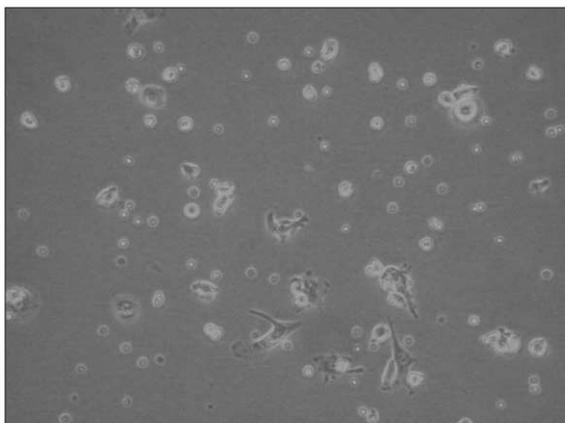
2) 교차분화(lineage differentiation)시켜 형성능(plasticity) 확인

조골세포분화 유도배지에서 분화시킨 경우 2주부터 무기질이 상당량 침착되어 alizarin red S에 염색반응을 보였고 safranin O, oil red O에는 염색 반응을 보이지 않았다. 연골세포분화 유도배지에서 분화 시킨 경우에도 safranin O에만 염색반응을 보였으며 alizarin red S, oil red O 염색에는 반응을 보이지 않았다. 지방세포 분화유도배지에서 자란 세포 역시 oil red O에만 염색이 되었다(Fig. 3).

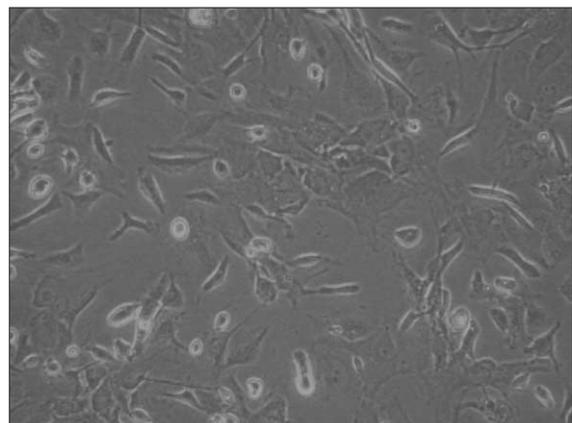
2. 세포 증식(proliferation) 평가

1) 분화 전 단계에서 세포의 증식을 살펴본 결과 초기 세포는 100-mm 배양 접시에 6×10^5 cells/cm² 농도로 분배(seeding)하였는데 배양 2일째에는 4.8×10^5 cells/dish, 4일째에는 6×10^5 cells/dish, 7일에는 11×10^5 cells/dish, 9일에는 17×10^5 cells/dish, 11일에는 26×10^5 cells/dish로 증식하였다. 배양한지 4일 후에 10 배로 세포가 증가하였고, 9일 후에는 29배 정도 증가하였다(Fig. 4a).

2) 분화 단계에서 성장인자가 세포의 증식에 미치는 영향을 관찰한 결과 조골세포 분화배지(osteogenic media)에서 세포의 증식이 가장 높았고, 섬유세포성장인자를 첨가한 군, 섬유세포성장인자와 혈소판유래성장인자를 함께 첨가한 군, 혈소판유래성장인자를 첨가한 군의 순서로 세포의 증식효과가 낮아졌다. 혈소판유래성장인자를 첨가한 군에서 세포의 수가 현저하게 낮았다(Fig. 4b). (Cell Proliferation: Control>FGF>FGF+PDGF>PDGF)



(a) P0, after 1day, attached cells



(b) P0, after 6days, 60% confluency

Fig. 1. Primary culture of rat bone marrow stromal stem cells. (×300)

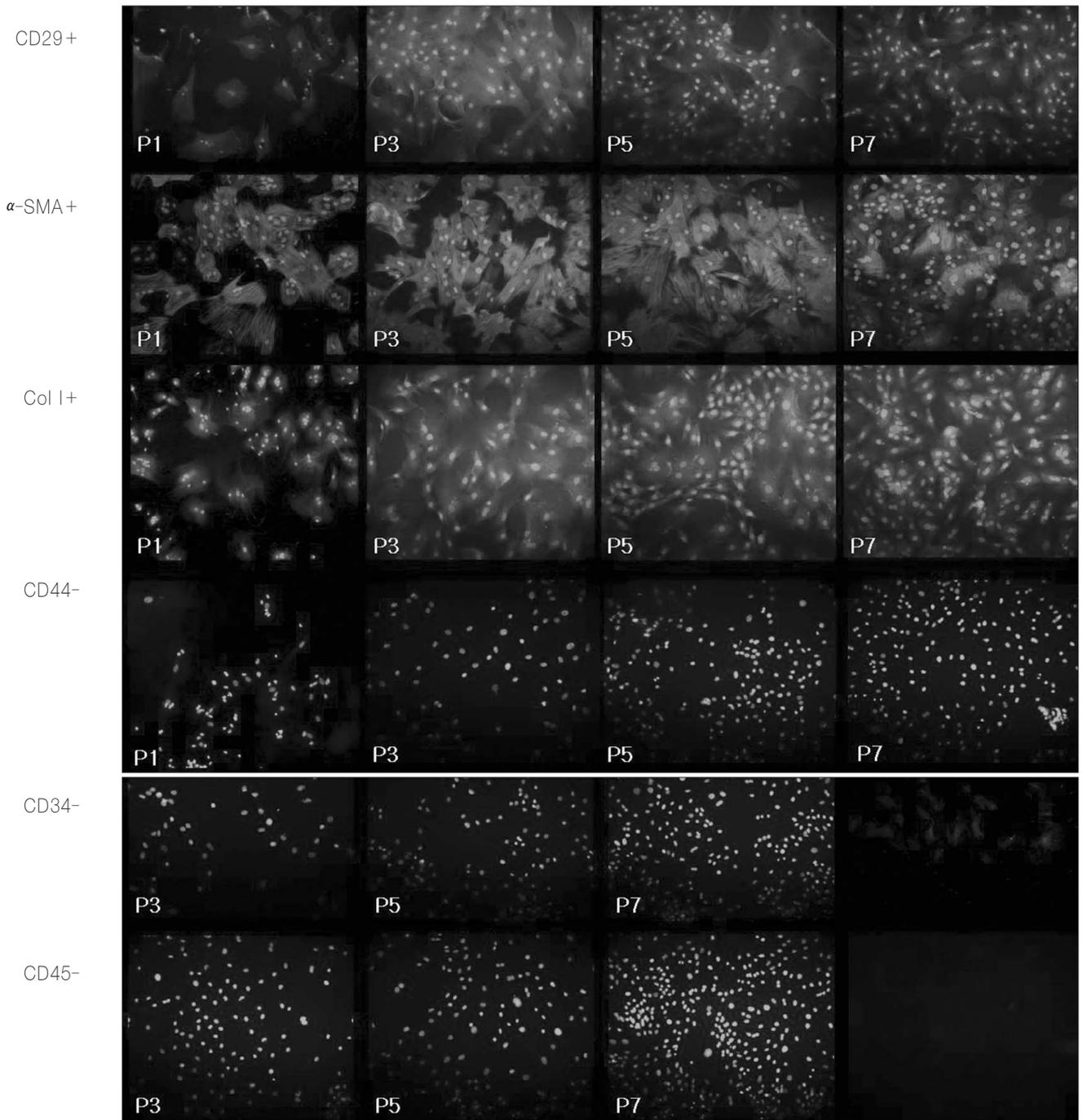


Fig. 2. Expression of cell surface markers in serial cell cultures (passage 1, 3, 5, 7).
(Upper) Mesenchymal cell surface marker: CD29, 44, collagen I, α -SMA
(Lower) Hematopoietic cell surface marker: CD34, 45

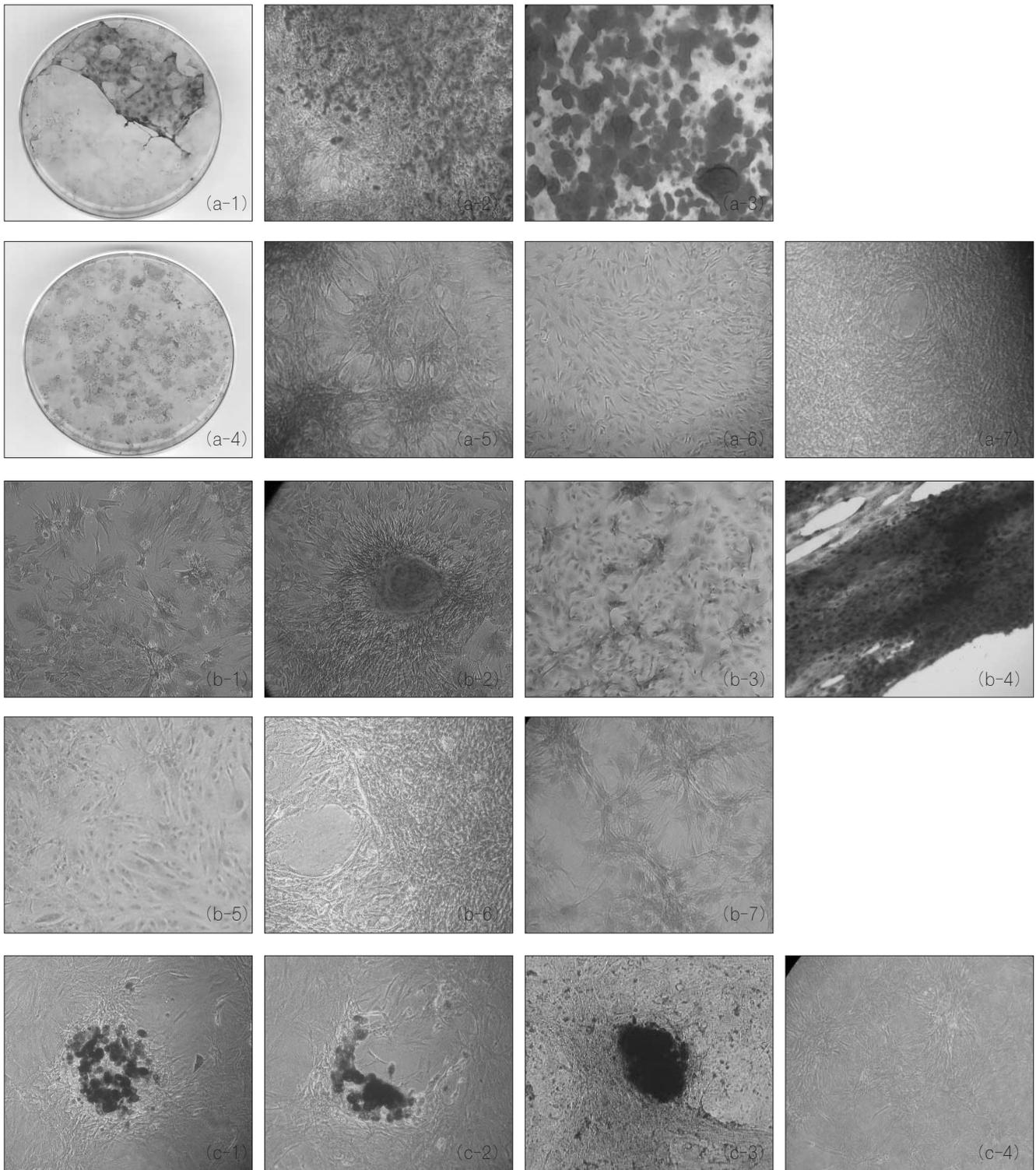


Fig. 3. In vitro differentiation of rat bone marrow derived mesenchymal stem cells (30 days). (a-1) Osteogenic media, Alizarin red S staining, (a-2, 3) Mineralization nodule, $\times 100$ & $\times 400$, (a-4) Only expansion media, Control, Alizarin red S staining, (a-5) $\times 100$, (a-6, 7) Osteogenic media, Safranin O staining & Oil-red O staining, $\times 100$ (b-1, 2) Chondrogenic media, Safranin O staining, $\times 100$ & $\times 400$, (b-3, 4) $\times 200$ & $\times 100$, (b-5) Only expansion media, control, Safranin O staining, $\times 100$, (b-6, 7) Chondrogenic media, Oil-red O staining, & Alizarin red S staining, $\times 200$, (c-1, 2, 3) Adipogenic media, Oil-red O staining, $\times 200$, (c-4) Only expansion media, control, Oil-red O staining, $\times 100$

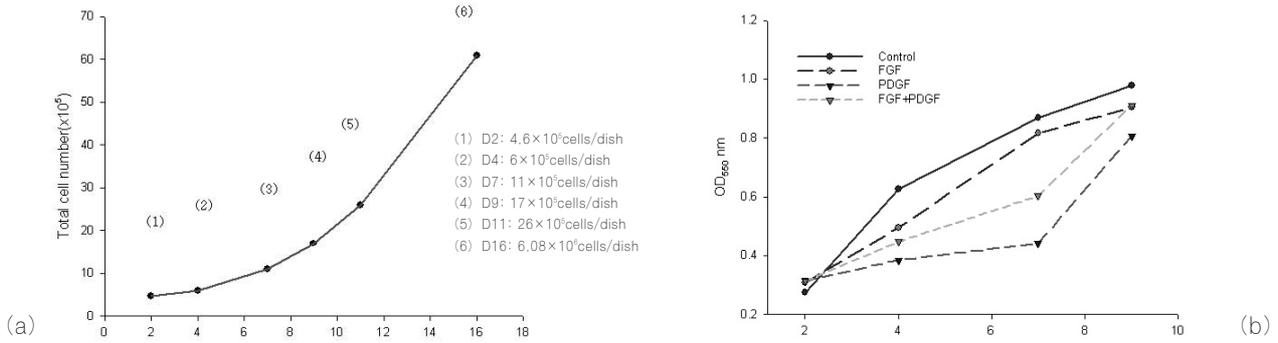


Fig. 4. Cell proliferation Capability in different culture condition (Initial cell density of 6×10^3 cells/cm² in 100-mm culture dish). (n=4)
 (a) Direct cell counting for cell proliferative capacity in expansion media
 (b) MTT assay for cell proliferation in osteogenic media(control) with only bFGF or PDGF-BB or combination (group I, II, III)

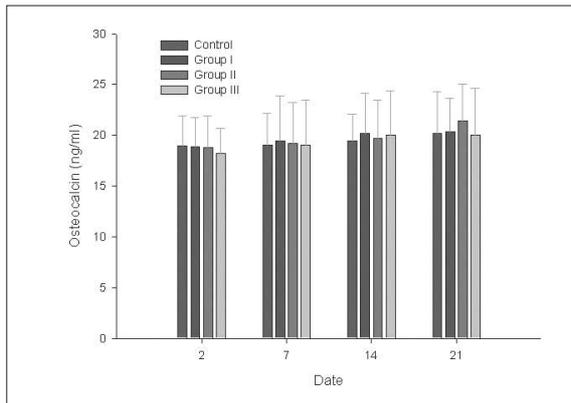


Fig. 5. Osteocalcin assay for different culture conditions (Gla-type Osteocalcin EIA Kit, TaKaRa, Japan). (n=6)

3. 조골세포로의 분화 및 무기질 침착 확인

1) OC assay

무기질 침착(mineralization) 시작 시기에 발견되는 단백질인 osteocalcin의 농도는 대조군에서 2일부터 21일 사이에 큰 변화를 보이지 않았고 2, 7, 14, 21일에 관찰한 결과 각각의 실험군 간에 유사한 결과를 보였다. One-way ANOVA로 분석한 결과 각 실험군 간의 차이를 인정할 수 있는 통계적 유의성은 관찰되지 않았다(Fig. 5). 두 성장인자를 함께 첨가한 경우에도 OC 농도의 증가나 감소는 관찰되지 않았다.

2) Alizarin red S 염색

대조군에서 관찰되지 않은 무기질 결정은 두 성장인자에 노출시킨 지 3일째, 즉 배양 4일째부터 성장인자를 첨가한 실험군(I, II, III 군)에서 관찰되기 시작하였다. 그러나 21일째에 염색하였을 때 두 성장인자를 함께 첨가한 경우(III 군)에 단독으로

성장인자를 사용한 경우들(I, II 군)보다 많은 양의 무기질 침착이 관찰되었다. 그리고 성장인자를 첨가한 그룹보다 대조군에서 더 많은 양의 무기질 침착부위를 보였다. 무기질 침착 순서는 대조군, III 군, II 군, I 군의 순서를 보였다(Fig. 6).

IV. 고 찰

간엽줄기세포는 플라스틱 배양 용기에 잘 부착(adherent)하는 특성을 지니고 있고 증식능(proliferative)이 높아서 골수로부터 채취한 세포들로부터 배양 과정을 통해 간접적인 분리가 용이하다고 알려져 있다^{8,11,22,24}. 본 실험은 이러한 간엽줄기 세포 특성을 이용하여 백서의 골수로부터 얻은 세포들을 별도의 분리 과정을 거치지 않고 초대 배양(primary culture)을 시작하였고, 배양 용기에 부착하지 못하는 혈구세포, 조혈줄기세포들은 배양 3일 이내에 배지 교체 시에 제거되었다. 세포들은 배양 8일에서 9일 정도에 70~80% 정도의 포화도(confluency)에 도달하였고, 배양 4일째에 10배 가량의 증식을 보였으며, 배양 9일째에는 약 29배의 증식을 보여 높은 증식능(proliferative capacity)을 확인할 수 있었다. 이렇게 얻은 세포들이 이미 분화된 조골세포인지, 간엽줄기 세포인지를 확인하기 위해 먼저 두 가지 과정의 확인 작업을 진행하였다.

첫째, 장기간 배양을 통해 세포 증식을 얻기 위해서 반드시 요구되는 세포의 미분화 특성을 확인하는 과정이었다. 초기 배양시 세포의 모양은 세포질이 넓게 퍼져 있지 않고 몽툰한 자루 모양을 보였으며 작고 길쭉한 형태를 보인 반면에 계대를 거듭할수록 세포질은 넓게 퍼지며 별 모양으로 변화하여 섬유세포와 유사하게 보이는 양상을 나타냈다. Dr. Mark Pittenger는 간엽줄기세포의 확인(characterization)에 첫째, 배양시 잘 부착하고 잘 증식하는 특징 둘째, 일련의 여러 가지 세포 표면 표지자들을 확인 셋째, 다른 여러 가지 세포로의 분화능(lineage differentiation)을 지닌 특성을 확인하는 종합적인 방법

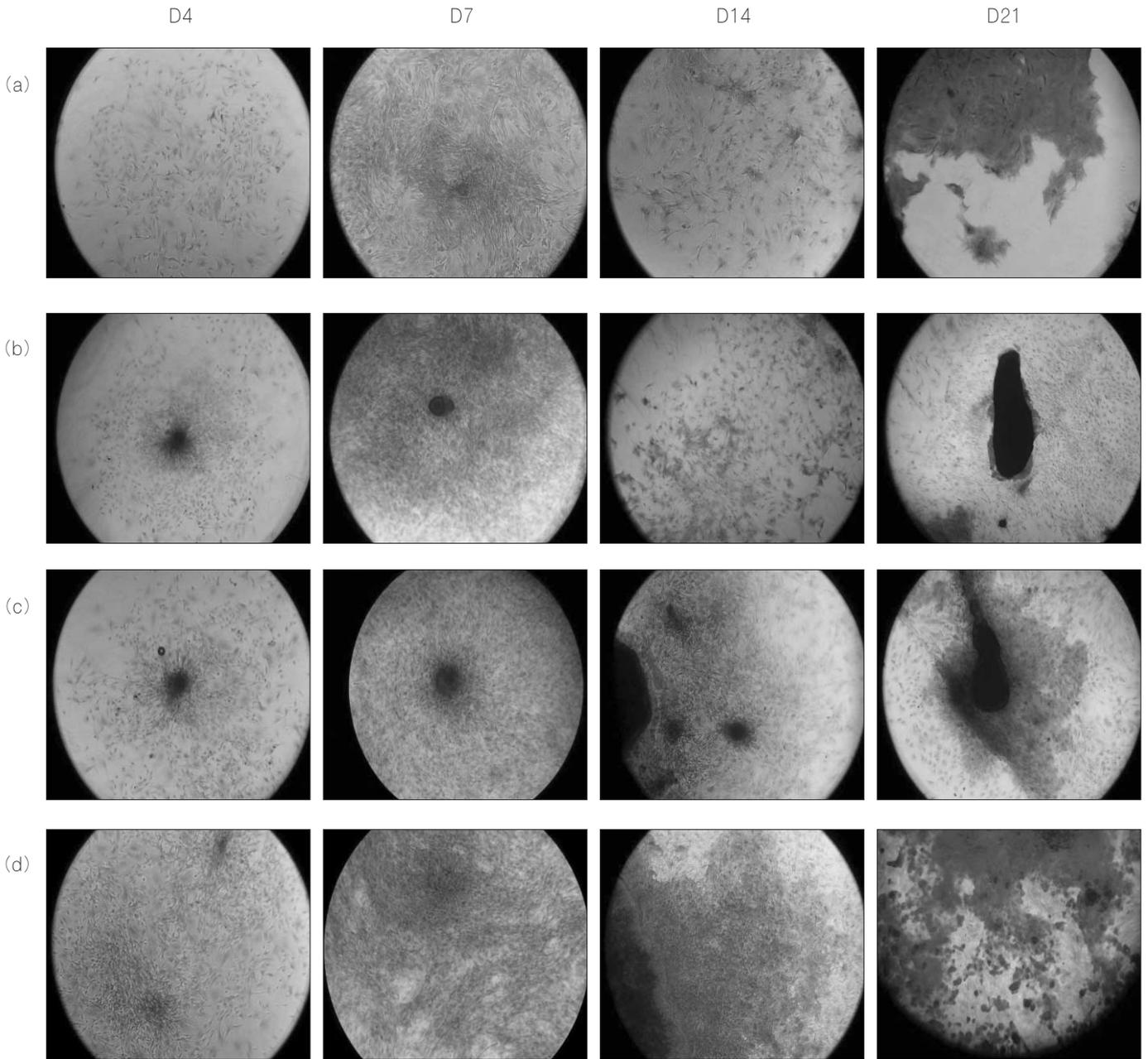


Fig. 6. Alizarin red Staining for in vitro mineralization. (n=6)
 (a) Control (BMSC),
 (b) Group I (BMSC+2.5 ng/ml bFGF),
 (c) Group II (BMSC+25 ng/ml PDGF-BB),
 (d) Group III (BMSC+2.5 ng/ml bFGF+ 25 ng/ml PDGF-BB)

을 이용하였다⁸⁾. 현재까지 알려진 간엽줄기세포 표면표지자로는 양성 표지자로서 SH2, SH3, SH4, CD29, CD71, CD90, CD106, CD120a, CD124, CD166 등이 있고 음성 표지자로서 CD14(lipoplysaccharide receptor), CD34(lipoplysaccharide receptor), CD45(leukocyte common antigen)등이 있다⁸⁾. 간엽줄기세포임을 확인하기 위해서는 조혈줄기세포와 혼합되어 있지 않은 것을 확인하기 위해 CD34, CD45-임을 확인하는 과정이 중요

하다고 언급 하였다. 본 실험에서는 CD29, 44, 34, 45, α -SMA, I형 collagen 등의 세포표면 단백질의 존재여부를 확인한 결과 배양된 세포들은 CD29, α -SMA, I형 collagen 등에는 염색 반응을 보였고 CD34, 45에는 전혀 염색되지 않아 조혈줄기세포들이 혼합되어 있지 않은 것을 확인할 수 있었다. CD29, I형 collagen, α -SMA에는 모두 95% 이상 염색되었으나 CD44에는 염색이 되지 않았다. 또한 이러한 특성은 passage 7까지 동일하게 유

지되어서 세포표면 단백질의 발현 특성은 비교적 안정적인 것을 확인할 수 있었고 이를 통해 미분화 세포의 특성이 장기간 세포 배양시에도 유지되는 것을 알 수 있었다.

2003년 Deschaseaux는 초기의 간엽줄기세포는 CD45+의 특성을 보였다가 배양을 하거나 성숙된 간엽줄기세포가 되었을 때 CD45-의 특성을 보인다고 하였다³⁶. 간엽줄기세포의 배양과정에서 CD45가 저하되는 방향으로 조절된다고 보고하였고 그것의 기전은 아직 밝혀지지 않은 상태이다. 또한 I형 collagen, α -SMA는 세포의 신축성을 반영하는 세포 표면표지자로서 간엽기원의 조직인 근육, 건, 연골, 지방 등이 모두 신축성을 가지고 있기 때문에 그 특성을 확인하는 지표로서 간엽줄기세포 확인에 사용하는 연구들이 보고된 바 있다^{37,38}. 이처럼 세포 표면표지자에 대해 연구가 계속 진행되고 있기 때문에 세포 표면표지자(단백질)를 확인하는 과정 단독으로 간엽줄기세포임을 확인하는 방법은 현재까지는 받아들여지지 않고 있다.

간엽줄기세포인지를 가장 확실하게 확인할 수 있는 방법은 조골세포, 연골세포, 지방세포, 근육세포, 신경세포 등의 간엽기원의 다른 세포들로 분화할 수 있는 능력(multipotency)을 가지고 있는지를 직접 관찰하는 것이라고 할 수 있겠다. 그래서 본 실험에서는 간엽줄기세포 확인 과정의 두 번째로 초대배양을 통해 증식시킨 세포를 조골세포 유도배지, 연골세포 유도배지, 지방세포 유도배지에서 키운 후에 형성능(plasticity)을 확인하였다. 모든 유도배지에는 지금까지 보고된 여러 논문에서 조골세포의 분화에 결정적 역할을 하고 있다고 보고되는 dexamethasone을 첨가하였고 농도의 차이는 논문마다 조금씩 차이가 있으나 조골세포 분화시에는 10^{-8} M 농도로 비교적 높은 농도를 사용하였고 연골세포와 지방세포의 분화에는 모두 10^{-8} M 농도를 사용하였다. 혈청 농도에 있어서는 혈청의 농도를 낮추거나, 성장인자를 첨가하는 대신 혈청을 전혀 사용하지 않고 배양하고자 하는 시도들이 있었지만 본 실험에서는 안정적 연구 결과를 보이는 10% FBS(fetal bovine serum)를 선택하였다. 그리고 조골세포로의 분화를 위해서 추가로 β -glycerophosphate, vitamin C를 첨가하였고 그 결과 무기질 결정은 10일 이후부터 14일에 다량 형성되기 시작하여 30일에는 단층세포 배양에도 불구하고 육안으로도 확인이 가능한 넓은 면적의 무기질 결정(nodule)이 형성되어 성공적인 조골세포분화를 확인할 수 있었다.

연골세포분화 배지에는 추가로 $5 \mu\text{g/ml}$ insulin, 5 ng/ml TGF β 1, $50 \mu\text{g/ml}$ ascorbic acid-2-phosphate을 첨가하였고, 지방세포분화 배지에는 $10 \mu\text{g/ml}$ insulin, 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxantine, 0.2 mM indomethacin을 첨가하였다. 연골세포 분화 시에 중요한 인자는 TGF β 1이라고 알려져 있으며, 지방세포 분화 시에 중요한 인자는 논문에서는 찾아볼 수 없었지만 고농도의 인슐린이라고 추정된다. 조골세포 분화뿐만 아니라 연골세포와 지방세포로도 잘 분화되는 것을 각각의 염색반응을 통해 알 수 있었고, 교차염색을 시행하여 연골세포분화배지에서 골세포분화가 일어났는지를 확인해 보았지만 전혀 반응을 보이지 않았으며 다른 교차염색 결과 역시 마찬가지로 해서 각각의 분화가

잘 일어났음을 확인할 수 있었다.

간엽줄기세포임을 확인한 세포들은 조골세포분화 배지에서 분화시키는데 7일째 Alizarin Red S염색을 시행하였을 때 염색반응이 나타나지 않고 10일에서 14일 이후에 염색되기 시작하였다. 이때 배양 2일부터 7일째까지 섬유세포성장인자와 혈소판유래성장인자를 단독 혹은 같이 첨가하였을 때 세포 증식능은 오히려 낮아지는 결과를 보였다. 증식능(proliferative capacity)은 혈소판유래성장인자를 첨가한 경우에 가장 낮았고, 두 성장인자를 함께 첨가한 경우 혈소판유래성장인자를 단독으로 사용한 경우보다 증식능이 더 낮아지지 않은 것으로 보아 두 성장인자 사이에 상호상승효과는 없으며, 혈소판유래성장인자가 첨가된 경우 낮아진 증식능을 섬유세포성장인자의 첨가로 약간은 회복시키는 것으로 분석되었다. 성장인자 첨가시 세포수가 감소되는 원인으로 조골세포분화배지에 포함된 dexamethasone으로 인해 조골세포의 분화가 유도하면서 두 성장인자가 분화에 보다 기여함으로써 증식능(cell proliferative capacity)이 낮아지는 것을 생각해 볼 수 있고, 둘째로 두 성장인자가 dexamethasone의 조골세포 분화능을 저해시킬 가능성을 생각해 볼 수 있었다.

성장인자가 조골세포의 분화를 촉진하는 효과가 있는 것인지, 성장인자가 dexamethasone의 조골세포 분화능을 억제시키는 것인지를 알기 위해 두 성장인자가 조골세포의 무기질(mineralization) 침착에 기여하는 효과를 알아보았다. 무기질 침착 정도를 알 수 있는 osteocalcin(OC)의 정량 결과를 보면 2, 7, 14, 21일에 관찰한 결과 각각의 실험군 간에 유사한 결과를 보였는데, 이는 성장인자의 첨가가 OC의 발현에 영향을 미치지 않았다고 해석된다. 또한 두 성장인자를 함께 사용한 경우에도 단독으로 사용한 경우들과 비교 시에 차이가 없어 성장인자의 첨가가 배양 21일까지는 조골세포의 분화에 영향을 미치지 않은 것으로 여겨진다. 그래서 성장인자가 dexamethasone의 조골세포 분화능을 저해할 수 있다는 가능성을 생각할 수 있었다.

21일째 무기질 결정의 침착을 살펴보면 성장인자를 첨가하지 않은 군에서 가장 많은 무기질 침착을 보였고 섬유세포성장인자가 첨가된 경우에 가장 적은 양의 무기질 침착부위를 보였다. 이는 조골세포 증식능이 성장인자를 첨가하지 않은 경우에 가장 높게 나타난 결과와 일치한 경향을 보였다. 그러나 다음으로는 두 성장인자를 함께 첨가한 그룹에서 무기질 침착이 높게 나타나 단순하게 성장인자가 조골세포의 분화능을 억제한다고 생각하기는 어려운 결과를 보였다.

현재까지 성장인자에 대한 연구들을 보면 골절부위나 당뇨 환자의 소실된 치은 조직 등을 재생시키기 위해 체내에 직접 성장인자를 주입하거나 적용한 결과들이 먼저 보고된 것을 알 수 있다. 그리고 1990년 후반에 이르러 세포배양 실험에 성장인자들이 적용된 결과들이 보고되었다^{39,40}. 서론에서도 언급한 바와 같이 초기의 임상 실험에서는 혈소판풍부혈장(PRP), BMP, IGF, FGF, PDGF, TGF- β 등이 현저한 골형성 촉진 효과 및 조골세포 분화 촉진효과를 가지고 있다고 보고되었으나 이후 체외 실험의 결과에서는 이견이 많다. 1997년 Hanada의 실

험에서 보면, 백서의 골수기원 간엽줄기세포에서 조골세포로 분화시킬 때 체외에서 bFGF, BMP-2에 노출시킨 결과 mRNA 발현, 골결절(bone nodule)의 수, 칼슘 함량을 비교하였을 때 bFGF는 조골분화능을 현저하게 상승시켰고, BMP-2는 소량 증가시켰으며, bFGF와 PDGF의 상호상승효과도 나타나는 결과를 보여 bFGF가 체외 배양시에 미치는 효과가 높다고 보고하였다. 그는 조골세포의 분화에 dexamethasone이 필수적이라는 이전의 논문 보고들을 통해 dexamethasone이 첨가된 배지를 사용하였는데 dexamethasone이 존재하는 경우에 bFGF에 노출시킨 지 초기 3일째에 골형성 유도가 보다 높게 나타나며 bFGF에 노출시키지 않은 경우보다 더 이른 시기에 골형성능을 보였다고 하였다⁴⁵. 또한 2005년 Richmon의 실험에 의하면, 혈청 (serum)을 첨가하지 않은 분화 배지와 2% FBS에서 bFGF와 TGF-beta1의 농도차에 의한 세포 분화능, 무기질 침착 등을 관찰한 결과 역시 성장인자를 단독 혹은 혼합하여 첨가하는 경우에 혈청의 농도를 낮추어도 세포 분화능이 저해되지 않고 유지되었다는 결과를 보여 역시 체내 이식 전에 세포배양 단계에서 성장인자의 첨가가 세포분화를 증가시켜 무기질 농도를 증가시키고 골화 속도를 높일 수 있는 방법으로 고려될 수 있는 가능성을 제시하였다²⁵. 그러나 2004년 Chaudhary는 정상 사람의 골수 세포를 얻어 조골세포로 분화시킬 때 BMP-7, PDGF-BB, bFGF의 성장인자가 조골세포의 분화, 체외에서 골형성능에 미치는 효과를 평가하였는데 bFGF는 ALP를 촉진시키지 않았고, PDGF 역시 ALP 활성, 무기질화에 미치는 효과가 매우 적거나 거의 없다고 보고하였다. 그러나 alizarin red S staining와 calcium assay(FTIR)에서는 다르게도 BMP-7, Dex, bFGF 모두 무기질 침착을 증가시켰으나 대조군과 PDGF-BB, bFGF를 처리한 실험군에서 모두 자연골과 유사한 하이드록시아파타이트(HA) 형성을 보이지는 않았다고 보고하였다. 결론적으로 bFGF는 무정형성의 옥타칼슘포스페이트(octacalcium phosphate) 침착을 촉진하였지만 성숙한 골형태의 결정을 형성하는 데에는 실패하였다고 하였다. 또한 bFGF는 BMP-7의 ALP 활성 상승효과, HA 형성효과를 오히려 저해하는 결과를 보였다고 하였다³³. Chaudhary의 실험과 유사하게 2005년 Hakk의 논문을 보면, 체외에서 bFGF와 dexamethasone이 백악질세포(cementoblast)의 무기질화에 미치는 영향을 알아본 결과 dexamethasone은 무기질화를 증가시키는 반면 bFGF는 이러한 효과를 차단시켰고, dexamethasone과 bFGF를 함께 사용한 경우에도 이러한 bFGF의 저해 효과는 변화하지 않았다고 보고하였다. 그러나 유전자 발현을 살펴본 결과에서는 bFGF의 경우 Osteocalcin (OCN), Bone sialoprotein(BSP)을 감소시켰지만 Matrix gamma carboxyglutamic acid protein(MGP)를 증가시키며 Osteopontin(OPN) 역시 상당량 발현을 촉진시켰다고 하였고 dexamethasone의 경우에는 OCN 감소와 BSP, OPN의 증가를 가져왔다고 하였다. 그러나 bFGF와 dexamethasone을 함께 사용한 경우 OPN의 상승 효과는 관찰되지 않았다고 하였다⁴⁶. 그 역시 bFGF가 dexamethasone의 무기질화 증가효과를 저해하는 경향을 가지고 있는 것을 보여주었다. 본 실험에서는 MTT 결과를 볼 때 bFGF,

PDGF를 사용한 경우에 모두 조골세포로의 증식능이 저하하여 유전자 발현 단계에서는 이 두 성장인자가 dexamethasone의 무기질화를 증가시키는 효과를 저해할 수 있는 것으로 볼 수 있고 OC 결과를 볼 때 두 성장인자가 조골세포의 분화에 기여하는 효과가 거의 없어서 이러한 결과를 보다 뒷받침한다고 볼 수 있으나, alizarin red S 염색 결과에서는 두 성장인자를 첨가한 경우보다 첨가하지 않은 경우에 무기질 침착이 잘 이루어졌다. 단순한 무기질 결절의 생성과 최종적인 골형성이 별개라는 논문이 보고된 바 있어 이러한 무기질 결절의 생성만으로는 조골세포로의 분화가 성공적이었다고 할 수 없겠다. 그러나 두 가지 결과를 종합해 볼 때 섬유세포성장인자와 혈소판유래성장인자는 각각 2.5ng/ml, 25ng/ml의 농도로 6일동안 체외(in vitro)에서 조골세포분화과정에 첨가되었을 때 조골세포로의 분화를 저해하는 효과가 있다고 여겨지며, 혈소판유래성장인자의 경우 단독으로 첨가하지 않고 섬유세포성장인자와 함께 첨가한 경우에는 조골세포로의 분화 저해 효과가 상쇄되는 것을 확인할 수 있었다.

V. 결 론

- 1) 백서의 골수에서 채취한 세포들은 적절한 유도배지에서 조골세포, 연골세포, 지방세포로 모두 분화하였으며 passage 7까지 간엽줄기세포의 세포 표면표지자를 특징적으로 나타내고 있었다.
- 2) 골수기원 간엽줄기세포를 체외에서 조골세포로 분화시킬 때 2.5ng/ml 섬유세포성장인자(FGF)와 25ng/ml 혈소판유래성장인자(PDGF)를 6일 동안 매일 첨가한 경우, 단독으로는 조골세포의 분화를 저해하는 효과가 관찰되었다.
- 3) 섬유세포성장인자(2.5ng/ml)는 혈소판유래성장인자(25ng/ml)와 함께 첨가한 경우 혈소판유래성장인자의 조골세포 분화억제, 무기질화 억제효과를 상쇄시키는 효과가 있었으나 대조군보다 더 나은 효과를 보이지는 않았다.

참고문헌

1. Friedenstein AJ, Piatetzky S, II, Petrakova KV: Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. J Embryol Exp Morphol 1966; 16(3):381-90.
2. Ohgushi H, Goldberg VM, Caplan AI: Repair of bone defects with marrow cells and porous ceramic. Experiments in rats. Acta Orthop Scand 1989;60(3):334-9.
3. Dennis JE, Haynesworth SE, Young RG, Caplan AI: Osteogenesis in marrow-derived mesenchymal cell porous ceramic composites transplanted subcutaneously: effect of fibronectin and laminin on cell retention and rate of osteogenic expression. Cell Transplant 1992;1(1):23-32.
4. Perka C, Schultz O, Spitzer RS, Lindenhayn K, Burmester GR, Sittlinger M: Segmental bone repair by tissue-engineered periosteal cell transplants with bioresorbable fleece and fibrin scaffolds in rabbits. Biomaterials 2000;21(11):1145-53.
5. Wakitani S, Yamamoto T: Response of the donor and recipient cells in mesenchymal cell transplantation to cartilage defect. Microsc Res Tech 2002;58(1):14-8.
6. Young RG, Butler DL, Weber W, Caplan AI, Gordon SL, Fink DJ:

- Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for Achilles tendon repair. *J Orthop Res* 1998;16(4):406-13.
7. Awad HA, Butler DL, Harris MT, et al.: In vitro characterization of mesenchymal stem cell-seeded collagen scaffolds for tendon repair: effects of initial seeding density on contraction kinetics. *J Biomed Mater Res* 2000;51(2):233-40.
 8. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al.: Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284(5411):143-7.
 9. Phinney DG, Kopen G, Isaacson RL, Prockop DJ: Plastic adherent stromal cells from the bone marrow of commonly used strains of inbred mice: variations in yield, growth, and differentiation. *J Cell Biochem* 1999;72(4):570-85.
 10. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, et al.: Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002;418(6893):41-9.
 11. Tropel P, Noel D, Platet N, Legrand P, Benabid AL, Berger F: Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells from adult mouse bone marrow. *Exp Cell Res* 2004;295(2):395-406.
 12. Barry FP, Murphy JM: Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol* 2004;36(4):568-84.
 13. Laurie SW, Kaban LB, Mulliken JB, Murray JE: Donor-site morbidity after harvesting rib and iliac bone. *Plast Reconstr Surg* 1984;73(6):933-8.
 14. Younger EM, Chapman MW: Morbidity at bone graft donor sites. *J Orthop Trauma* 1989;3(3):192-5.
 15. Stevenson S, Shaffer JW, Goldberg VM: The humoral response to vascular and nonvascular allografts of bone. *Clin Orthop Relat Res* 1996(326):86-95.
 16. Friedlaender GE, Horowitz MC: Immune responses to osteochondral allografts: nature and significance. *Orthopedics* 1992;15(10):1171-5.
 17. Jootar S, Angchaisuksiri P, Chiewsilp P, Sathapatayavongs B, Chuncharunee S, Tanprasert S: HIV infection after autologous bone marrow transplantation despite HIV-antibody and HIV-antigen screening. *Bone Marrow Transplant* 1993;12(2):167-8.
 18. Carlson ER, Marx RE, Buck BE: The potential for HIV transmission through allogeneic bone. A review of risks and safety. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1995;80(1):17-23.
 19. Conrad EU, Gretch DR, Obermeyer KR, et al.: Transmission of the hepatitis-C virus by tissue transplantation. *J Bone Joint Surg Am* 1995;77(2):214-24.
 20. Hallfeldt KK, Stutzle H, Puhlmann M, Kessler S, Schweiberer L: Sterilization of partially demineralized bone matrix: the effects of different sterilization techniques on osteogenetic properties. *J Surg Res* 1995;59(5):614-20.
 21. Spangrude GJ, Heimfeld S, Weissman IL: Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science* 1988;241(4861):58-62.
 22. Vacanti V, Kong E, Suzuki G, Sato K, Canty JM, Lee T: Phenotypic changes of adult porcine mesenchymal stem cells induced by prolonged passaging in culture. *J Cell Physiol* 2005;205(2):194-201.
 23. Niemeyer P, Krause U, Fellenberg J, et al.: Evaluation of mineralized collagen and alpha-tricalcium phosphate as scaffolds for tissue engineering of bone using human mesenchymal stem cells. *Cells Tissues Organs* 2004;177(2):68-78.
 24. Sharma B, Elisseff JH: Engineering structurally organized cartilage and bone tissues. *Ann Biomed Eng* 2004;32(1):148-59.
 25. Richmon JD, Sage AB, Shelton E, Schumacher BL, Sah RL, Watson D: Effect of growth factors on cell proliferation, matrix deposition, and morphology of human nasal septal chondrocytes cultured in monolayer. *Laryngoscope* 2005;115(9):1553-60.
 26. Salgado AJ, Coutinho OP, Reis RL: Bone tissue engineering: state of the art and future trends. *Macromol Biosci* 2004;4(8):743-65.
 27. Van de Putte KA, Urist MR: Osteogenesis in the interior of intramuscular implants of decalcified bone matrix. *Clin Orthop Relat Res* 1965;43:257-70.
 28. Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR: Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998;85(6):638-46.
 29. Nash TJ, Howlett CR, Martin C, Steele J, Johnson KA, Hicklin DJ: Effect of platelet-derived growth factor on tibial osteotomies in rabbits. *Bone* 1994;15(2):203-8.
 30. Radomsky ML, Aufdemorte TB, Swain LD, Fox WC, Spiro RC, Poser JW: Novel formulation of fibroblast growth factor-2 in a hyaluronan gel accelerates fracture healing in nonhuman primates. *J Orthop Res* 1999;17(4):607-14.
 31. Jingushi S, Heydemann A, Kana SK, Macey LR, Bolander ME: Acidic fibroblast growth factor (aFGF) injection stimulates cartilage enlargement and inhibits cartilage gene expression in rat fracture healing. *J Orthop Res* 1990;8(3):364-71.
 32. Wang JS, Aspenberg P: Basic fibroblast growth factor enhances bone-graft incorporation: dose and time dependence in rats. *J Orthop Res* 1996;14(2):316-23.
 33. Chaudhary LR, Hofmeister AM, Hruska KA: Differential growth factor control of bone formation through osteoprogenitor differentiation. *Bone* 2004;34(3):402-11.
 34. Maniopoulos C, Sodek J, Melcher AH: Bone formation in vitro by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats. *Cell Tissue Res* 1988;254(2):317-30.
 35. Chen SJ, Bradley ME, Lee TC: Chemical hypoxia triggers apoptosis of cultured neonatal rat cardiac myocytes: modulation by calcium-regulated proteases and protein kinases. *Mol Cell Biochem* 1998;178(1-2):141-9.
 36. Deschaseaux F, Gindraux F, Saadi R, Obert L, Chalmers D, Herve P: Direct selection of human bone marrow mesenchymal stem cells using an anti-CD49a antibody reveals their CD45med,low phenotype. *Br J Haematol* 2003;122(3):506-17.
 37. Zhang Y, Lin HK, Frimberger D, Epstein RB, Kropp BP: Growth of bone marrow stromal cells on small intestinal submucosa: an alternative cell source for tissue engineered bladder. *BJU Int* 2005;96(7):1120-5.
 38. Spector M: Musculoskeletal connective tissue cells with muscle: expression of muscle actin in and contraction of fibroblasts, chondrocytes, and osteoblasts. *Wound Repair Regen* 2001;9(1):11-8.
 39. Andreassen TT, Oxlund H: Local anabolic effects of growth hormone on intact bone and healing fractures in rats. *Calcif Tissue Int* 2003;73(3):258-64.
 40. Kimoto T, Hosokawa R, Kubo T, Maeda M, Sano A, Akagawa Y: Continuous administration of basic fibroblast growth factor (FGF-2) accelerates bone induction on rat calvaria--an application of a new drug delivery system. *J Dent Res* 1998;77(12):1965-9.
 41. Bak B, Jorgensen PH, Andreassen TT: Dose response of growth hormone on fracture healing in the rat. *Acta Orthop Scand* 1990;61(1):54-7.
 42. Takita H, Tsuruga E, Ono I, Kuboki Y: Enhancement by bFGF of osteogenesis induced by rhBMP-2 in rats. *Eur J Oral Sci* 1997;105(6):588-92.
 43. Unda FJ, Martin A, Hernandez C, et al.: FGFs-1 and -2, and TGF beta 1 as inductive signals modulating in vitro odontoblast differentiation Evidence that fibroblast growth factors 1 and 4 participate in regulation of cardiogenesis Skeletal growth factors. *Adv Dent Res* 2001;15(4):34-7.
 44. Zhang L, Leeman E, Carnes DC, Graves DT: Human osteoblasts synthesize and respond to platelet-derived growth factor. *Am J Physiol* 1991;261(2 Pt 1):C348-54.
 45. Hanada K, Dennis JE, Caplan AI: 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 Miner Res* 1997;12(10):1606-14.
 46. Hakki SS, Nohutcu RM, Hakki EE, Berry JE, Akkaya MS, Somerman MJ: Dexamethasone and basic-fibroblast growth factor regulate markers of mineralization in cementoblasts in vitro. *J Periodontol* 2005;76(9):1550-8.