

성장 인자가 배양된 토끼의 심부 골극 건
세포에서 제 1형 교원질 합성에 미치는 영향

연세대학교 대학원

의과학사업단

신 동 은

성장 인자가 배양된 토끼의 심부 골극 건
세포에서 제 1형 교원질 합성에 미치는 영향

지도교수 강 응 식
김 성 재

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함


2000년 12월 일


연세대학교 대학원


의과학사업단


신 동 은


신동은의 박사 학위논문을 인준함

심사위원 강응식 

심사위원 김성재 

심사위원 한두봉 

심사위원 강호량 

심사위원 이영호 

연세대학교 대학원

의과학사업단

2000년 12월 일

감사의 글

이 논문을 완성하기까지 세심한 배려와 격려로 지도하여 주신 강응식 교수님과 김성재 교수님께 무한한 감사를 드리며, 논문 심사중 훌륭한 지적과 방향을 잡아 주신 한수봉 교수님, 강호정 교수님, 이영호 교수님께 충심으로 감사드립니다. 또한 연구 기간 중 항상 격려와 용기를 주신 연세대학교 정형외과 교실원들과 포천 중문 의과대학 정형외과 교실원들에게 감사의 마음을 드립니다.

항상 오늘이 있기까지 크신 사랑으로 돌보아주신 부모님과 물심 양면으로 지원해 주신 장모님, 사랑하는 아내, 그리고 딸과 아들에게 이 논문이 작은 기쁨이 되었으면 하는 마음입니다.

저자 씀

목 차

국문요약	1
I. 서 론	4
II. 재료 및 방법	8
1. 토끼의 심부 골극 건에서 건세포의 분리 및 배양	8
2. 실험군 및 건 세포 배양	8
3. 세포 증식율 측정	10
4. 제1형 교원질 mRNA 분석(Northern blot analysis)	10
5. 배양액에서의 제 1 형 교원질 분석(Western blot analysis)	10
6. 통계 분석 방법	11
III. 결 과	12
1. 세포 증식율	12
2. 제 1 형 교원질 mRNA의 발현	13
가. 성장 인자 투여 5일 후 제 1 형 교원질 mRNA 발현	13
나. 성장 인자 투여 10일 후 제 1 형 교원질 mRNA 발현	15
다. 성장 인자 투여 15일 후 제 1 형 교원질 mRNA 발현	16
3. 세포 배양액에서의 제 1 형 교원질 생성	17
IV. 고 찰	20
V. 결 론	25
참고 문헌	27
영문 요약	31

그림 목 차

그림 1. 성장 인자 단독 투여군의 세포 증식율	12
그림 2. 성장 인자 복합 투여군의 세포 증식율	13
그림 3. 성장 인자 단독 및 복합 투여군에서 제 1 형 교원질 mRNA 발현을 보기 위한 Northern blot 분석	14
그림 4. 성장 인자 투여 5일 후 제 1 형 교원질 mRNA 발현	15
그림 5. 성장 인자 투여 10일 후 제 1 형 교원질 mRNA 발현	16
그림 6. 성장 인자 투여 15일 후 제 1 형 교원질 mRNA 발현	17
그림 7. 성장 인자 단독 및 복합 투여군에서 배양액내 제 1 형 교원질 생성을 보기 위한 Western blot 분석	18
그림 8. 성장 인자 투여 5일, 10일, 15일 후 제 1 형 교원질 생성	19

성장 인자가 배양된 토끼의 심부 골극 건 세포에서 제 1형 교원질 합성에 미치는 영향

수부의 골극 건 손상은 정형외과 영역에서 흔하게 접할 수 있다. 심부 골극 건은 해부학적 특성상 활액막으로 싸여있어 혈액 공급이 원활하지 않고, 신경의 지배도 다른 장기와 비교하여 현저히 감소되어 있어 치료에 많은 어려움이 있으며, 치료 후에도 주위 조직과의 유착, 재파열 등과 같은 합병증으로 인해 기능적으로 만족하지 못한 결과들이 보고되고 있다.

건의 치유과정에 대한 기전에는 아직까지도 논란이 있으나 건의 외부에 있던 섬유 모세포(fibroblast)에 의한 외적 치유와 건 세포(tenocyte)에 의해 직접 치유되는 내적 치유의 두 가지 기전으로 설명하고 있다. 손상된 건의 제한된 내적 치유 능력은 임상적으로 중요한데, 치유가 되기 위해서는 손상 받은 부위에서 건 세포의 증식, 교원질(collagen) 및 다른 기질(matrix) 구성 성분들의 합성과정이 필요하다. 이러한 대사 과정에 영향을 주고 조절하는 인자들 중 여러 가지 성장 인자들의 역할이 강조되고 있다. 생체내에서의 건 조직도 정상적인 상태 및 손상 시 반응하기 위한 성장인자를 저장하고 있으며, 내적 치유과정에서 건 세포에서 분비되는 몇 가지 성장인자가 건의 치유과정에서 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다.

본 연구의 목적은 건 조직에서 건 세포를 분리 배양한 다음 transforming growth factor- β (TGF- β), insulin-like growth factor-I(IGF-I), epidermal growth factor(EGF), platelet-derived growth factor(PDGF)를 단독 또는 복합 투여(PDGF/IGF, PDGF/EGF, IGF/EGF, TGF/ PDGF, TGF/ EGF, TGF/ IGF) 후 제 1형 교원질의 mRNA의 표현 변화와 교원질의 형성정도를 각각 Northern 및 Western blot 법으로 분석하여, 건 조직에 대한 성장인자의 효과를 규명하고,

향후 건의 치유에 이용될 수 있는 이상적인 성장인자와 성장인자의 조합을 알아 보고자 함이다.

생후 6개월 이상 경과된 New Zealand white rabbit(2.2-2.5kg) 15 마리 앞발을 실험 재료로 사용하였으며, 무균적 방법으로 심부 골극 건을 각각 4개씩 채취한 후 건 세포의 분리 및 배양을 하였다. 실험군은 크게 대조군, 우태혈청군, 단독 투여군과 복합 투여군으로 각각 실험을 진행하였다.

각각의 실험군에서 혈구계(hemocytometer)를 이용하여 세포증식율을 측정 분석하였고, 제 1형 교원질 mRNA 표현 분석은 Northern blot법으로, 배양액에서의 제 1형 교원질 생성 정도는 Western blot법으로 분석 하였으며, 각 군간의 차이를 비교하기 위한 통계 분석은 ANOVA를 사용하였다.

성장 인자 단독 투여시 세포 증식율은 10% 우태혈청군에서 대조군에 비해 5일째 $200 \pm 17\%$, 10일째 $250 \pm 19\%$, 15일째 $250 \pm 13\%$ 로 가장 높았고, TGF와 EGF군도 대조군에 비해 통계학적으로 의미 있게 증가하였다. 성장인자 복합 투여시 10% 우태혈청군을 비롯하여 성장인자를 복합적으로 투여한 모든 군에서 대조군에 비하여 세포 증식율이 통계적으로 의미 있게 증가하였다.

Northern blot을 통한 제1형 교원질 mRNA의 발현은 단독 투여 5일째는 IGF군과 PDGF군이 대조군에 비하여 각각 $270 \pm 18\%$, $280 \pm 19\%$ 증가 하여 통계학적으로 의미가 있었다. 복합 투여 5일째는 PDGF/EGF군, PDGF/IGF군이 대조군에 비하여 각각 $200 \pm 13\%$, $280 \pm 17\%$ 증가 하여 통계학적으로 의미가 있었고 PDGF/IGF군에서 가장 높은 제1형 교원질 mRNA의 발현을 보였으나 단독 투여군에 비해 높은 발현은 보이지 않았다. 단독 투여 10일째에는 IGF군과 PDGF군의 경우 제1형 교원질 mRNA의 발현이 더욱 증가하여 대조군에 비하여 각각 $350 \pm 23\%$, $540 \pm 28\%$ 증가하였으며, PDGF군에서 가장 높은 제1형 교원질 mRNA의 발현을 보였다. 복합 투여 10일째에는 PDGF/EGF군과 PDGF/IGF군에서 대조군에 비하여 각각 $200 \pm 17\%$, $170 \pm 11\%$ 로 제1형 교원질 mRNA의 발현이 증가하였으나 단독 투여군에 비해 낮은 발현을 보였

다. 단독 투여 15일째에도 IGF군과 PDGF군이 대조군에 비하여 각각 $120 \pm 8\%$, $210 \pm 12\%$ 증가하였으나, 10일째에 비해 증가 정도는 감소 하였다. 15일째 역시 PDGF군에서 가장 높은 제1형 교원질 mRNA의 발현을 보였다. 복합 투여 15일째에도 PDGF/EGF군과 PDGF/IGF군에서 대조군에 비하여 각각 $150 \pm 8\%$, $140 \pm 13\%$ 로 제1형 교원질 mRNA의 발현이 증가하였으나, 10일째에 비해 증가 정도는 감소 하였다.

Western blot을 통한 세포 배양액에서의 제1형 교원질 생성 정도는 단독 투여군 및 복합 투여군 모두 제1형 교원질 mRNA의 발현과 비슷한 양상을 보였다.

결론적으로 토끼 굴곡 건 세포 배양에서 성장 인자의 종류에 따른 제 1형 교원질 mRNA의 발현은 성장인자 중 PDGF와 IGF 단독 투여와 PDGF/IGF, PDGF/EGF 복합 투여 시 가장 높게 나타나, 토끼 심부 굴곡건의 치유과정에서 가장 효과적인 성장인자로 사료된다.

핵심 되는 말 : 건 세포 배양, 성장 인자, 제 1 형 교원질, 토끼 굴곡 건

성장 인자가 배양된 토끼의 심부 굴곡 건 세포에서 제 1형 교원질 합성에 미치는 영향

<지도 강 응 식·김 성 재 교수>

연세대학교 대학원 의과학사업단

신 동 은

I. 서 론

수부의 굴곡 건 손상은 정형외과 영역에서 흔하게 접할 수 있다. 심부 굴곡 건은 해부학적 특성상 활액막으로 싸여있어 혈액 공급이 원활하지 않고, 신경의 지배도 다른 장기와 비교하여 현저히 감소되어 있어 치료에 많은 어려움이 있으며, 치료 후에도 주위 조직과의 유착, 재파열 등과 같은 합병증으로 인해 기능적으로 만족하지 못한 결과들이 보고되고 있다.¹

손상된 건의 치유 과정은 아직 완전하게 알려져 있지 않다. 건의 영양 공급은 혈관에 의한 혈액 공급과 활액 확산의 두 방법이 있는데, 최근의 연구에 의하면 활액의 역할이 더 중요한 것으로 강조되고 있다. 굴곡 건의 혈액 공급은 분절적으로 이루어지는데, 활액막에 싸여 있지 않은 부분에서는 혈관 분포가 많은 건주위 조직(paratenon)과 건 주위의 느슨한 결합 조직에서 공급 받는다. 활액막에 싸여 있는 부분에서는 외재 혈관이 건 바로 위에 있는 내재 혈관과 건 뉴(vincula)를 통하여 연결되므로써 이루어진다. 수지에서 굴곡건의 내재 혈관은 그 후방에 세로로 배열되어 있다. 따라서 이 부위에서 건의 앞쪽과 옆은 상대적으로 혈관 분포가 적다. 손상된 건 조직은 혈액 공급이 차단 되더라도 살아 남을 수 있는데, 이는 활액에 의한 영양 공급이 있기 때문이다. 활액에 의한 영양

공급은 확산에 의해서 이루어진다.^{2,3,4}

건의 치유과정에 대한 기전에는 아직까지도 논란이 있으나 건의 외부에 있던 섬유 모세포(fibroblast)에 의한 외적 치유와 건 세포(tenocyte)에 의해 직접 치유되는 내적 치유의 두 가지 기전으로 설명하고 있다.^{5,6} 외적 치유 과정은 반흔에 의해 치유되는 것이며, 치유 후 어느 정도의 유착을 피할 수 없다. 특히 내재 혈관의 분포가 적고 활액막으로 싸여 있는 수지의 심부 굴곡건이 손상된 경우 내적 치유 과정을 유도함으로써 반흔을 최소화할 수 있을 것으로 생각된다.⁷ 손상된 건의 제한된 내적 치유 능력은 임상적으로 중요한데, 치유가 되기 위해서는 손상 받은 부위에서 건 세포의 증식, 교원질(collagen) 및 다른 기질(matrix) 구성 성분들의 합성과정의 필요하다. 그러나 이러한 대사 과정에 영향을 주고 조절하는 인자들에 대한 연구는 극소수에 불과하며, 이러한 인자들의 역할을 좀 더 이해하기 위한 방법으로 실험을 통해 여러 인자들의 건에 미치는 효과를 알아보는 연구가 진행되고 있다. 1987년 Koob과 Vogel은 소의 건 조직 배양을 통해 proteoglycan 합성 정도를 연구하여, 혈청과 성장 인자들이 세포의 증식과 이동, 교원질 합성에 영향을 준다고 발표 하였다.⁸ 이들의 연구에서처럼 건 조직 배양 실험시 세포의 증식과 이동, 교원질 대사는 혈장(plasma), 혈청(serum), 성장 인자들에 의해서 영향을 받는다.

많은 종류의 세포들에서 분비되어 특수한 수용체와 결합한 후 세포의 증식과 분화를 조정하는 신호 전달 체계를 중개하는 국소 단백질을 성장 인자라고 하는데, 모든 근 골격계 조직은 이러한 성장 인자를 합성하고 또한 이에 반응한다. 성장인자는 정상적인 성장 및 발육 뿐만 아니라 손상, 질환 및 치유 과정에 관여 하는 것으로 알려져 있다.

현재까지 많이 알려진 성장 인자는 epidermal growth factor(EGF), platelet-derived growth factor(PDGF), transforming growth factor- β (TGF- β), insulin-like growth factor-I(IGF-I)등이 있다.

생체내에서의 건 조직도 정상적인 상태 및 손상 시 반응하기 위한 성장인자

를 저장하고 있으며, 내적 치유과정에서 건 세포에서 분비되는 몇 가지 성장인자가 건의 치유과정에서 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다.⁹ 그러나 성장인자의 최대효과는 해부학적 위치, 주변 환경 및 성장 인자들의 조합 등 여러 가지 조건에 따라 매우 다양한 결과를 내고 있어서 각각의 성장인자에 대한 고유의 역할, 이상적인 농도, 조직 재생에의 기여도 등의 포괄적인 연구는 이루어지지 못하고 있다. 그러나 연골세포에 미치는 성장인자의 영향력에 대한 연구 결과에 의하면 이들 성장인자는 유전자 수준에서 제1 형 교원질 mRNA의 표현 변화와 교원질의 전사 후 변화(post-transcriptional change)등에 관계한 증거들이 보고되고 있다.¹⁰ 따라서 건의 주요성분을 이루고 있는 건 세포에 대한 각각의 성장인자에 대한 교원질의 합성에 대한 영향을 알아보는 연구는 추후 성장인자에 의한 건 손상의 치유에 많은 기여를 할 수 있을 것으로 사료된다.

현재까지 건에서 분리한 세포에 대한 성장인자의 효과에 대한 연구는 주로 Abrahamsson 등이 보고한 IGF-I에 대한 연구만이 활발히 보고되어 있고^{11,12} 다른 세포에서 보고되고 있는, TGF- β , EGF, PDGF 등에 대한 포괄적인 연구는 매우 미흡한 상태이다. 따라서 건 조직에 대한 이들 성장인자의 효과를 규명하여 향후 건의 치유 및 인공 건의 조직공학적 개발에 이용될 수 있는 이상적인 성장 인자의 조건을 규명하는 것이 필요하다.

건은 건 세포와 세포 외 기질로 구성되어 있으며, 세포 외 기질은 주로 제1 형 교원질(86%)로 구성되어 있고, 그 외에 소량의 제3 형 교원질과 단백다당 등을 포함한 비교원질성 단백질로 구성되어 있다. 교원질은 농축된 glycine(33%), proline(15%), hydroxyproline(15%)를 함유하고 있으며, 이중 hydroxyproline은 교원질의 유일한 아미노산이다. 시험관내 배양된 건의 섬유아세포는 제1 형 및 제3 형 교원질을 생산하지만 역시 제1 형 교원질을 주로 생산한다고 한다. 또한 그 비율은 일차 배양에서부터 약 20계대 배양의 기간 동안까지 일정하게 유지되는 것으로 보고되어 있어, 주어진 실험 조건에서 배양된 건의 섬유모세포의 제1 형 교원질 생산량을 측정하는 것은 성장인자의 효과를 측정할 수 있는 아

주 유용한 수단이 될 수 있다.

본 연구의 목적은 건 조직에서 건 세포를 분리 배양한 다음 TGF- β , IGF-I, EGF, PDGF를 단독 또는 복합 투여 (PDGF/IGF, PDGF/EGF, IGF/EGF, TGF/PDGF, TGF/EGF, TGF/IGF) 후 제 1형 교원질의 mRNA의 표현 변화와 교원질의 형성정도를 각각 Northern 및 Western blot 법으로 분석하여, 건 조직에 대한 성장인자의 효과를 규명하고, 향후 건의 치유에 이용될 수 있는 이상적인 성장인자와 성장인자의 조합을 알아보려고 함이다.

II. 재료 및 방법

1. 토끼의 심부 골극 건에서 건 세포의 분리 및 배양

생후 6개월 이상 경과된 New Zealand 산 흰 토끼(2.2-2.5kg)의 앞발을 채취한 다음 털을 자르고 소독 후에 무균적 방법으로 심부 골극 건을 각각 4개씩 채취하여 phosphate-buffered saline(PBS)으로 세척하였다. 수술용 칼을 이용하여 아주 작은 조각으로 잘라서 3회 PBS로 세척 후 무균병으로 옮겨 Dulbecco's modified essential medium (DMEM) 50 ml에 collagenase A(1 mg/ml, Boehringer-Mannheim, Germany)와 DNase I (0.1 mg/ml, Boehringer-Mannheim, Germany)을 넣고 금속봉으로 천천히 흔들며 주면서 5시간 동안 기질을 소화시켰다. 원심분리 후 획득된 작은 pellet은 DMEM 용액으로 3회 세척한 후 10%의 우태혈청(FBS, Fetal bovine serum)과 DMEM이 함유된 75 cm² 배양용기에서 배양하였다. 배양액은 일주일에 두 번 교환하여 주고, 배양용기에 세포가 가득 차게 되면 계대배양을 하였다.

2. 실험군 및 건 세포 배양

토끼의 심부 골극 건에서 분리 배양한 건 세포를 0.5% 우태혈청이 함유된 배양액에서 각각 세포를 배양 하면서 4가지 종류의 성장인자 (EGF, IGF-I, PDGF, TGF- β)를 단독 또는 복합 투여하였다. 실험군은 크게 2가지 조건 (단독 투여군, 복합 투여군)으로 각각 실험을 진행하였으며 각 조건에서의 실험군의 구성은 다음과 같다.

대조군 : 0.5% 우태혈청만 함유된 배양액에서 배양한 군

FBS군 : 10% 우태혈청만 함유된 배양액에서 배양한 군

단독 투여군 :

EGF군: 우태혈청과 EGF가 10ng/ml 함유된 배양액으로 배양한 군

IGF군: 우태혈청과 IGF-I이 10ng/ml 함유된 배양액으로 배양한 군

PDGF군: 우태혈청과 PDGF가 10ng/ml 함유된 배양액으로 배양한 군

TGF군: 우태혈청과 TGF- β 가 10ng/ml 함유된 배양액으로 배양한 군

복합 투여군 :

PDGF + EGF군: 우태혈청과 PDGF 10ng/ml와 EGF 10ng/ml 함유된 배양액으로 배양한 군

PDGF + IGF군: 우태혈청과 PDGF 10ng/ml와 IGF-I 10ng/ml 함유된 배양액으로 배양한 군

PDGF + TGF군: 우태혈청과 PDGF 10ng/ml와 TGF- β 10ng/ml 함유된 배양액으로 배양한 군

IGF + EGF군: 우태혈청과 IGF-I 10ng/ml와 EGF 10ng/ml 함유된 배양액으로 배양한 군

TGF + EGF군: 우태혈청과 TGF- β 10ng/ml와 EGF 10ng/ml 함유된 배양액으로 배양한 군

TGF + IGF군: 우태혈청과 TGF- β 10ng/ml와 IGF-I 10ng/ml 함유된 배양액으로 배양한 군

상기의 실험군에서 건 세포 배양은 일차 배양된 세포를 0.25% trypsin-EDTA 용액을 이용하여 배양용기의 바닥에서 떼어낸 후, 혈구계(hemocytometer)를 이용하여 1×10^6 개의 세포가 되도록 하여 100 mm의 배양용기에 분주한 후 각 실험군의 주어진 조건에서 배양하였고, 배양액은 2일에 한번 교환하였다. 배양 5일, 10일과 15일째에 세포를 모은 후 70°C 에서 보관하였다가 추후 실험에 사용하였고, 각 군마다 3회 반복 하였다.

3. 세포 증식율(cell proliferation) 측정

동수의 세포를 6-well plate에서 각각의 조건으로 배양한 다음 배양 5일, 10일, 15일에 각 군별로 비교 관찰하였다. 혈구계를 이용하여 세포수를 측정함과 동시에 세포 역가 96 AQueous 비 방사성 세포 증식 측정기(Cell Titer 96 AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay kit)(Promega, Madison, WI, USA)를 이용하여 각 배지 내의 세포의 증식 정도를 분석하였다. 20 μ l의 MTS/PMS 용액을 well에 넣어준 후 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 배양기에서 4시간 배양 후 ELISA plate reader로 490nm의 흡광도를 측정하였다.

4. 제 1 형 교원질 mRNA 분석(Northern blot analysis)

각 군의 배양 세포를 배양 5, 10, 15일째 분리하여 RNeasy kit (Qiagen, Germany)를 이용하여 전체 리보핵산(RNA)을 추출하였다. 추출된 리보핵산을 분광 광도계(spectrophotometer)를 이용하여 정량한 후 동량의 전체 리보핵산을 포름알데히드가 함유된 1% 아가로즈 겔(agarose gel)에서 전기영동을 실시하였다. 전기영동된 아가로즈 겔을 나일론 흡착지(nylon membrane)로 전달 하고, 나일론 흡착지를 상온에서 건조시킨 후 UV cross-linker로 안정화 시킨 다음 보합 결합(hybridization)을 실시하였다. 제 1 형 교원질 cDNA 소식자(probe)는 토끼의 제 1 형 교원질의 α 2 chain의 mRNA를 기초로 하여 역전사 중합 효소 연쇄 반응을 통하여 제작하였으며, 이는 cDNA 배열 순서(sequencing)를 통하여 확인하였다. 제작된 cDNA 소식자를 Rediprime kit (Amersham, UK)를 이용하여 ³²P방사선 동위원소로 표지(labeling)를 실시한 다음 준비된 나일론 막에 보합 결합을 하고, 나일론 막을 세척한 후 phosphoimager로 정량 분석을 하였다.

5. 배양액에서의 제 1 형 교원질 분석(Western blot analysis)

각 군의 배양 세포를 배양 5, 10, 15일에 세포배양액을 분리한 후 Bradford방

법을 이용하여 595 nm에서 단백질을 정량하여 25 μ g에 해당되는 양을 취한 다음 이를 동량의 SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) loading buffer와 혼합한 후, 100 $^{\circ}$ C에서 3분간 가열하여 변성(denature)시킨 후 얼음 냉각(ice chilling)하여 원심 분리하였다. 5% 폴리아크릴아마이드 겔(polyacrylamide gel)을 만든 후, SDS-PAGE buffer(25 mM Tris, 250 mM glycine, 0.1% SDS)를 이용하여 100 V로 90분 동안 전기 영동하였다. 전기이동 완충액(20 mM Tris-HCl, 150 mM glycine, 20% Methanol, pH 8.3)을 이용하여 전기이동 장치(transter system)를 만든 다음 4 $^{\circ}$ C 저온실에서 전기영동이 끝난 겔을 나이트로 셀룰로즈 흡착지와 겹친 후 전기이동 단위(transfer unit)에 장착하고, 일정한 전압(40V)에서 24시간 단백을 이동시켰다. 면역 염색은 흡착지 차단용액(membrane blocking solution)을 TBST buffer(10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.1% tween 20, pH 8.0)에 5% 비지방 우유를 첨가해 제조 후, 전기이동 장치에서 막을 분리하여 3시간이상 차단을 실시하였다. TBST buffer를 3회 세척 후 1% 차단 용액(blocking solution)에 1 μ g/ml되게 첨가된 항체용액(goat anti-type I collagen)에서 90분 반응시켰다. 반응 후 TBST buffer로 3회 세척 후 항체에 결합된 제 1형 교원질을 관찰하기 위하여 항 염소 면역 글로불린 (anti-goat Ig)G-HRP를 1:7500으로 희석하여 1시간 동안 반응시킨 후, TBST buffer로 3회 세척하였다. ECL(enhanced chemiluminescence)-Plus reagent를 처리하여, 4분간 반응시킨 후 막을 플라스틱 포장으로 봉한 후 방사선 필름에 노출시켜 단백질대를 관찰하였다.

6. 통계 분석 방법

자료는 SAS Ver 6.12(SAS Institute Inc, Cary, NC, USA)를 이용하여 통계 분석을 하였으며, 각 군간의 차이를 비교하기 위하여 ANOVA를 사용하였다.

III. 결 과

1. 세포 증식율

성장인자의 단독 투여시 세포 증식율은 IGF군, PDGF군에서는 5일, 10일, 15일째 모두 대조군에 비하여 차이가 없었으나, 10% 우태혈청군의 경우 세포 증식율은 대조군에 비해 5일째 $200 \pm 17\%$, 10일째 $250 \pm 19\%$, 15일째 $250 \pm 13\%$ 로 통계학적으로 의미 있게 증가하였고, TGF군의 경우는 5일째 $180 \pm 12\%$, 10일째 $175 \pm 15\%$, 15일째 $180 \pm 14\%$ 로 의미 있게 증가하였으며, EGF군의 경우 각각 $160 \pm 19\%$, $150 \pm 13\%$, $150 \pm 11\%$ 로 통계학적으로 의미 있게 증가하였다($p < 0.05$). 특히, 10% 우태혈청군에서 가장 높은 세포 증식율을 보였다(그림 1).

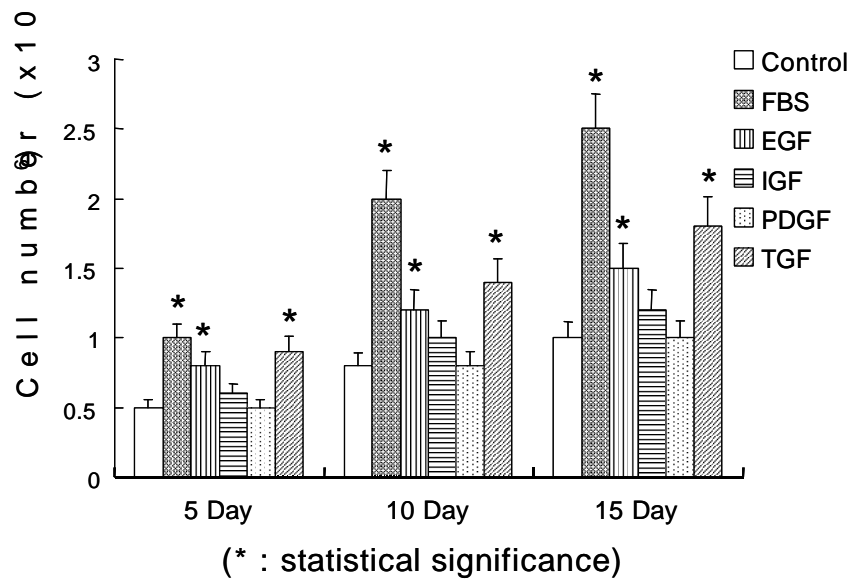


그림 1. 성장 인자 단독 투여군의 세포 증식율

성장인자 복합 투여 5일째는 10% 우태혈청군과 PDGF/EGF, IGF/EGF군에서 대조군에 비해 세포 증식율이 의미있게 증가 하였고, 10일과 15일째는 10% 우태혈청군을 비롯하여 성장인자를 복합적으로 투여한 모든 군에서 대조군에 비하여 세포 증식율이 통계적으로 의미 있게 증가하였다($p < 0.05$) (그림 2).

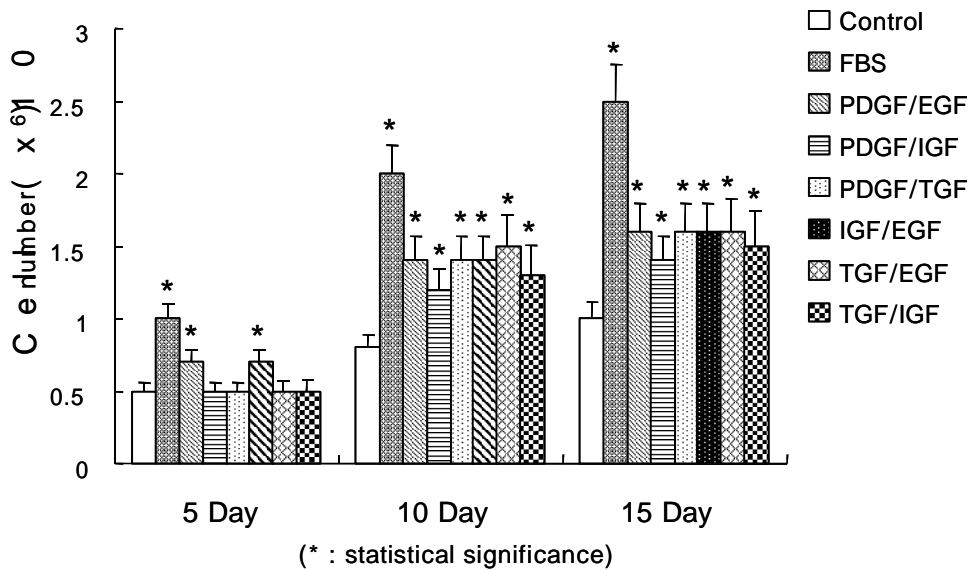


그림 2. 성장 인자 복합 투여군의 세포 증식율

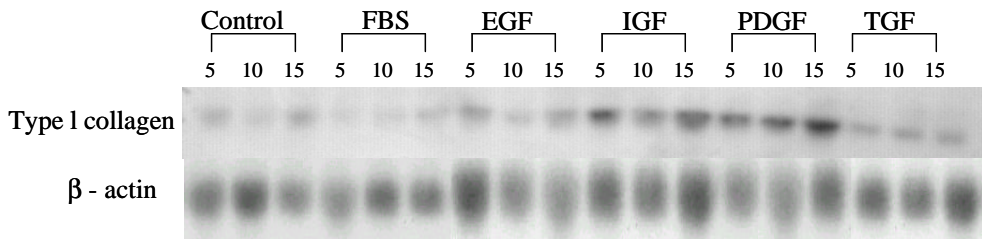
2. 제1형 교원질 mRNA의 발현

가. 성장 인자 투여 5일 후 제 1 형 교원질 mRNA 발현

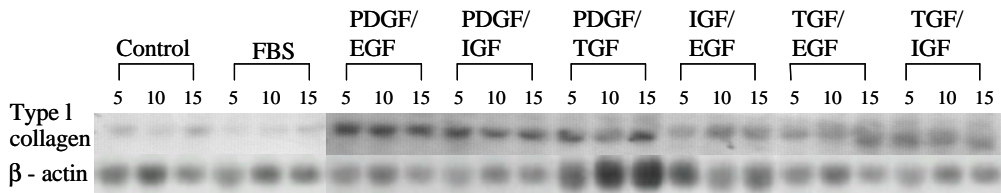
성장 인자 단독 투여 5일 후 제1형 교원질 mRNA의 발현은 IGF군과 PDGF군이 대조군에 비하여 각각 $270 \pm 18\%$, $280 \pm 19\%$ 증가 하여 통계학적으로 의미가 있었으나($p < 0.05$), 10% 우태혈청군, EGF군, TGF군의 경우 의미 있는 제1형 교원질 mRNA의 발현은 보이지 않았다(그림 3-4).

성장 인자 복합 투여 5일 후 제1형 교원질 mRNA의 발현은 PDGF/EGF군,

PDGF/IGF군, PDGF/TGF군, TGF/IGF군이 대조군에 비하여 각각 $200 \pm 13\%$, $280 \pm 17\%$, $180 \pm 11\%$, $200 \pm 15\%$ 증가 하여 통계학적으로 의미가 있었으나($p < 0.05$), 10% 우태혈청군과 IGF/EGF군에서는 대조군에 비하여 감소되는 소견을 보였으며, TGF/EGF군에서는 대조군과 통계학적으로 의미 있는 차이가 없었다. PDGF/IGF군에서 가장 높은 제1형 교원질 mRNA의 발현을 보였다(그림 3-4).



(단독투여군)



(복합투여군)

그림 3. 성장 인자 단독 및 복합 투여군에서 제 1 형 교원질 mRNA 발현을 보기 위한 Northern blot 분석

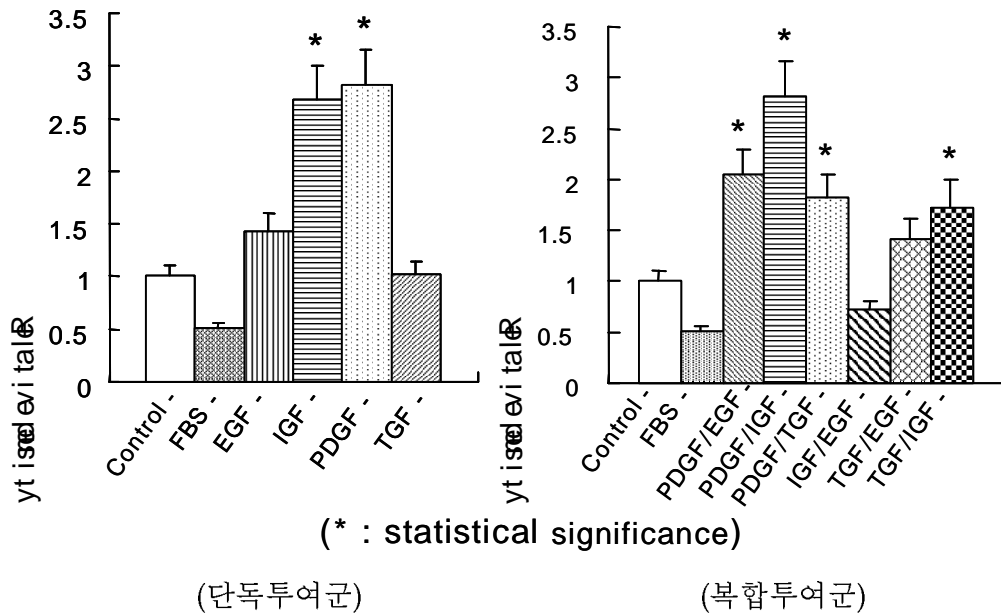


그림 4. 성장 인자 투여 5일 후 제 1 형 교원질 mRNA 발현

나. 성장 인자 투여 10일 후 제 1 형 교원질 mRNA 발현

성장 인자 단독 투여 10일 후에는 IGF군과 PDGF군의 경우 제1형 교원질 mRNA의 발현이 더욱 증가하여 대조군에 비하여 각각 $350 \pm 23\%$, $540 \pm 28\%$ 증가하였으며($p < 0.05$), PDGF군에서 가장 높은 제1형 교원질 mRNA의 발현을 보였다(그림 5).

성장 인자 복합 투여 10일 후에는 PDGF/EGF군과 PDGF/IGF군에서만 대조군에 비하여 각각 $200 \pm 17\%$, $170 \pm 11\%$ 로 제1형 교원질 mRNA의 발현이 증가하였으며($p < 0.05$), 5일째에 대조군에 비하여 제1형 교원질 mRNA의 발현이 높았던 PDGF/TGF군과 TGF/IGF군의 경우 대조군에 비해 의미 있는 증가는 없었다(그림 5).

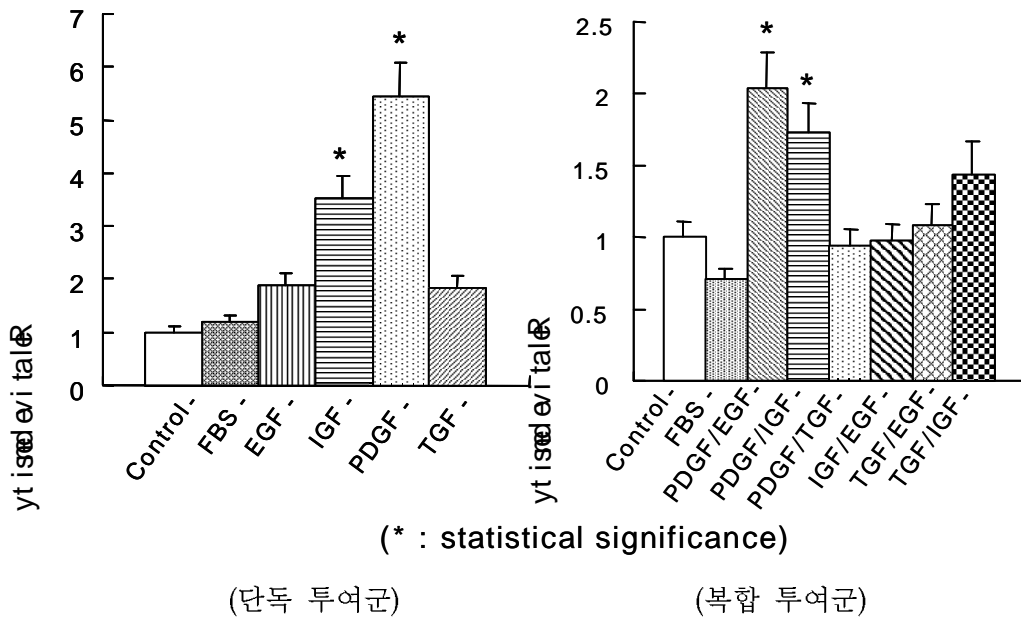


그림 5. 성장 인자 투여 10일 후 제 1형 교원질 mRNA 발현

다. 성장 인자 투여 15일 후 제 1형 교원질 mRNA 발현

성장 인자 단독 투여 15일 후에도 IGF군과 PDGF군이 대조군에 비하여 각각 $120 \pm 8\%$, $210 \pm 12\%$ 증가하였으나($p < 0.05$), 10일째에 비해 증가 정도는 감소하였다. 15일째도 PDGF군에서 가장 높은 제1형 교원질 mRNA의 발현을 보였다(그림 6).

성장 인자 복합 투여 15일 후에도 PDGF/EGF군과 PDGF/IGF군에서 대조군에 비하여 각각 $150 \pm 8\%$, $140 \pm 13\%$ 로 제1형 교원질 mRNA의 발현이 증가하였으며($p < 0.05$), 5일째와 10일째 대조군에 비해 제1형 교원질 mRNA의 발현이 적었던 IGF/EGF군에서 15일째는 대조군에 비하여 제1형 교원질 mRNA의 발현이 $140 \pm 14\%$ 로 의미있게 증가하였다($p < 0.05$)(그림 6).

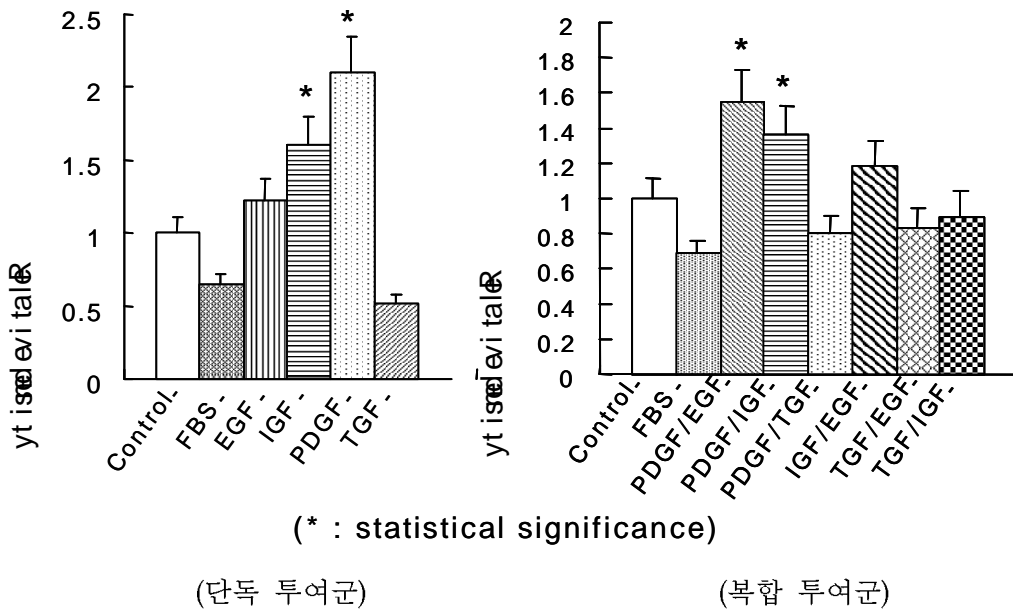


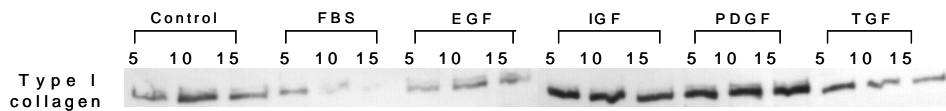
그림 6. 성장 인자 투여 15일 후 제 1형 교원질 mRNA 발현

3. 세포 배양액에서의 제1형 교원질 생성

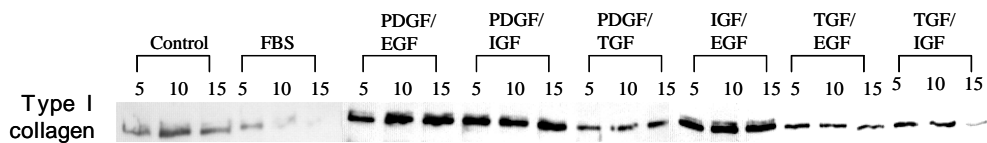
성장 인자 단독 투여 5일 후 세포 배양액내의 제1형 교원질 생성 정도는 IGF 군과 PDGF군이 대조군에 비하여 $140 \pm 9\%$ 증가하여 통계학적으로 의미가 있었으나($p < 0.05$), 그 이외의 군에서는 의미 있는 제1형 교원질 생성은 보이지 않았다. 10일째와 15일째에도 세포 배양액내의 제1형 교원질 생성 정도는 5일째와 비슷 하였다(그림 7-8).

성장 인자 복합 투여 5일 후 세포 배양액 내의 제1형 교원질 생성은 앞에서 관찰 하였던 5일째 제1형 교원질 mRNA의 발현과는 달리 PDGF/IGF군만이 대조군에 비하여 $140 \pm 13\%$ 로 의미 있게 제1형 교원질 생성이 증가하였고 ($p < 0.05$), IGF/EGF군과 PDGF/EGF군에서는 증가된 양상을 보였으나 통계학적인 의의는 없었다.

10일째에는 5일째와 다르게 PDGF/EGF군과 PDGF/IGF군이 대조군에 비하여 각각 $140 \pm 13\%$, $140 \pm 11\%$ 로 세포 배양액에서의 제1형 교원질 생성이 의미 있게 증가하였다($p < 0.05$). 15일째에도 10일째와 비슷하게 PDGF/EGF군과 PDGF/IGF군이 대조군에 비하여 각각 $140 \pm 9\%$, $140 \pm 7\%$ 로 세포 배양액에서의 제1형 교원질 생성이 의미 있게 증가하였다($p < 0.05$)(그림 7-8).

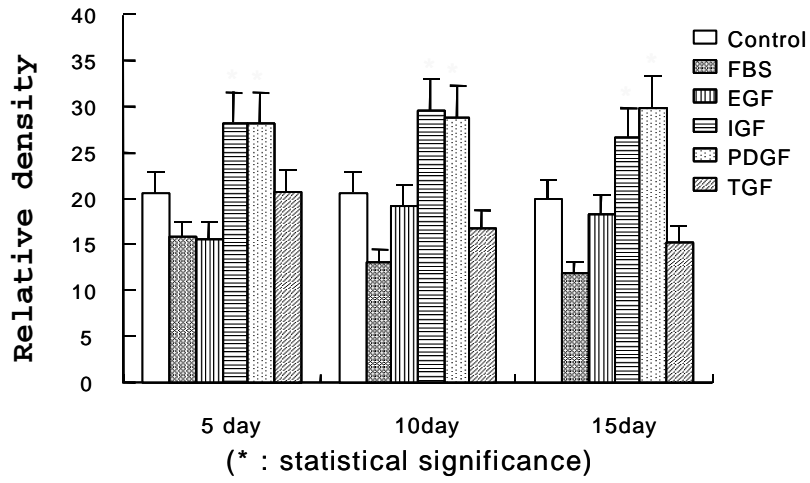


(단독 투여군)

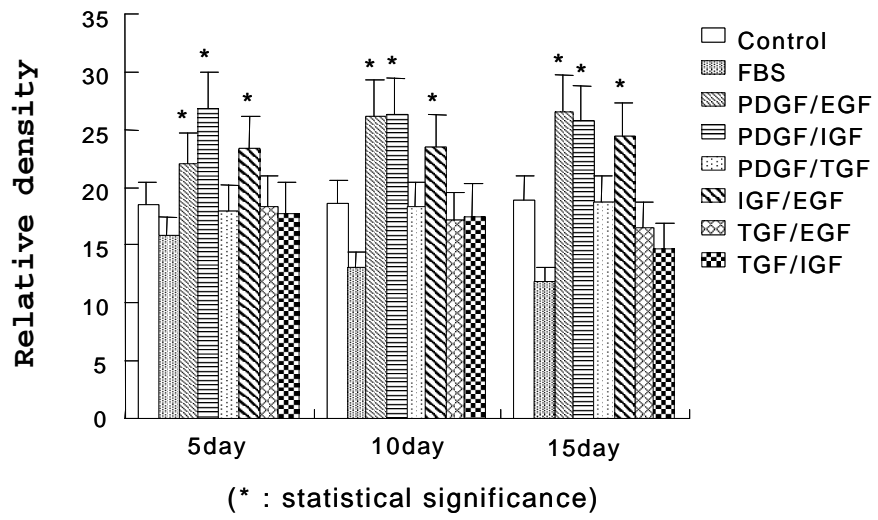


(복합 투여군)

그림 7. 성장 인자 단독 및 복합 투여군에서 세포 배양액내 제 1형 교원질 생성을 보기 위한 Western blot 분석



(단독 투여군)



(복합 투여군)

그림 8. 성장 인자 투여 5일, 10일, 15일 후 제 1 형 교원질 mRNA 생성

IV. 고찰

손상된 건의 제한된 내적 치유 능력은 임상적으로 중요한데, 치유가 되기 위해서는 손상 받은 부위에서 건 세포의 증식, 교원질 및 다른 기질 구성 성분들의 합성과정이 필요하다. 실험상 세포의 증식과 이동, 교원질 대사는 혈장(plasma), 혈청(serum), 성장 인자들에 의해서 영향을 받는다. 생체내에서 건은 정상적인 상태와 손상 시 반응하기 위한 성장인자를 저장하고 있으며, 내적 치유과정에서 건 세포에서 분비되는 몇 가지 성장인자가 건의 치유과정에서 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다.⁹

현재까지 많이 알려진 성장 인자는 epidermal growth factor(EGF), platelet-derived growth factor(PDGF), transforming growth factor- β (TGF- β), insulin-like growth factor-I(IGF-I)등이 있다. EGF는 여러 종류의 세포들을 자극하여 증식을 유도하는 기능을 갖고있으며, 주로 골 및 연골 세포에 작용을 하나 현재까지 골격 조직의 중요한 조절인자로 생각 되지 않고있다. EGF는 주로 창상 치유에 대한 연구에서 많이 이용 되었으며, 연구 결과들에 의하면, 이는 창상 치유 과정을 촉진 시키는데, 특히 신생 혈관 형성, 섬유모세포에 의한 기질화, 교원질 축적을 촉진 시킨다.^{13,14,15} 또한 고양이의 추간판 배양을 통한 연구에서 EGF는 추간판 이행부에 있는 세포의 증식을 촉진 하였다고 보고되었다.¹⁶ PDGF는 혈청내에서 간엽 세포에 대한 가장 강력한 유사분열물질(mitogen)로 인식 되었으나, 현재는 치유 과정에서 중요한 조절 인자로 작용하는 것으로 알려져 있다.¹⁷ PDGF는 여러 종류의 세포들을 자극하여 세포 분열을 유도하며, 주로 혈소판과 혈관 내피 세포에 존재한다고 밝혀졌다.¹⁸ PDGF는 손상부위에 있는 혈소판에서 많이 분비되어 회복 세포의 초기 증식에 중요한 역할을 담당하며, 또한 PDGF는 건 조직의 치유를 자극하고, 연골세포 및 골아세포의 증식을 자극하는 것으로 알려져 있다.¹⁹ 창상 치유 과정에서 PDGF는 염증 과정을 과대화 시켜 치유를 촉진시킨다고 보고되었다.^{17,18,19} 일반적으로 TGF- β 는 상피

세포에서는 세포 증식을 저해하지만, 간엽 조직에서 기원된 세포에서는 세포 증식을 자극한다고 알려져 있다.¹⁸ 뼈에서 TGF- β 는 matrix 합성 뿐만 아니라 골아 세포의 증식을 자극하고, 불활성화 상태로 골 기질 내에 저장되어 있으며, 골 형성 및 골 흡수 과정에서 골 모세포와 파골 세포의 상호작용을 증대하는 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다. 또한 연골 및 골절 치유를 자극 하는 기능을 수행하는 것으로 밝혀졌다.¹⁸ IGF-I은 somatomedin-C라고도 하며, 간과 골격 조직에서 생성되어 성장 호르몬에 대한 세포 표면의 수용체를 자극하는 것으로 알려져 있으며, 성장판에서 생성된 IGF-I은 연골 세포의 증식을 자극하여 성장 호르몬에 의한 장관골 성장을 자극하는 중요한 기능을 수행 하는 것으로 알려져 왔다. 또한 토끼의 건 조직 배양을 통한 연구에서 IGF-I은 proteoglycan, 교원질, 비교원성 단백질, DNA 합성을 촉진시켜 건 치유 과정에서 중요한 역할을 하는 성장 인자임이 밝혀졌다.^{11,12,20,21}

여러 학자들에 의한 연구 결과 건의 치유 과정은 크게 염증기, 증식기 또는 섬유모세포기, 그리고 재형성기로 나눌 수 있다.^{3,4,21} 이중 제 1 기인 염증 초기 (손상 후 24-72 시간)에 macrophage가 출현 하며, 이는 손상 후 수일간 주된 세포로 피사 조직의 식작용을 담당하는 것으로 알려졌다. 또한 대식 세포는 신생 혈관과 육아 조직 형성을 유도하는 여러 가지 성장인자를 분비하는 것으로 밝혀졌다. 손상 후 3일이 되면 손상 부위는 혈소판, 대식 세포, 다형핵 백혈구, 임파구, 다능성 간엽세포(multipotential mesenchymal cell)를 포함하게 되며, 혈소판은 PDGF, TGF- β 와 EGF를 유리하고, 대식 세포는 basic fibroblast growth factor(B-FGF), TGF- α , TGF- β 와 PDGF를 생산하는 것으로 알려졌다. 이러한 성장 인자들은 섬유모세포와 다른 세포들의 화학 주성인자(chemotactic factor)일 뿐만 아니라 섬유 모세포의 증식과 교원질 및 비교원성 단백질 합성을 자극하는 것으로 밝혀졌다. 제 2 기인 증식기 또는 섬유모세포기는 손상 후 1-2주 사이에 섬유 모세포의 증식과 함께 교원질과 다른 기질 단백질을 형성하고, 점차 기질화되는 과정이며, 이후 수 개월에 걸쳐 손상된 건이 재형성되는 과정을

겪는 것으로 알려졌다.

건의 치유 과정 중 염증기와 증식기인 손상 후 2일-2주 동안 대식 세포와 혈소판 등에서 분비되는 다단백 성장인자는 세포간의 신호전달에 중요한 역할을 수행하는 단백질이다.^{9,10,22} 성장 인자가 활성을 보이기 위해서는 세포의 기질에 부착되어 작용하는데, 세포의 기질은 세포를 지지해 주는 구조체를 제공해 주고 성장인자는 복잡한 세포 구성체를 유지하기 위한 정보를 전달하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다.²³ 따라서 손상 초기에 성장인자와 다른 인자들을 적절히 사용함으로써 건 치유를 향상시킬 수 있을 것이다.

본 연구의 목적도 건 손상에서 건 치유 능력을 향상시키고 건의 조직공학적 개발의 기초단계로 성장 인자를 건 치유에 적용하기 위한 기초 정보를 얻으려는데 있다. 본 연구에서 토끼의 심부 굴곡 건 세포 배양 후 5일, 10일, 15일째 여러 가지 성장 인자를 단독 또는 복합 투여 후 세포 증식율, 제1형 교원질 mRNA 변화와 배양액 내의 제1형 교원질 mRNA 생성을 분석 하였는데, 이러한 시기별 구분의 배경은 앞에 기술된 건의 치유 과정 중 성장 인자들이 여러 세포에서 분비가 시작 되고 작용을 나타내는 시기가 건 손상 후 2일-2주 사이에 일어나기 때문이다.

본 연구에서 세포 증식율은 10% 우태혈청이 포함된 배양액에서 가장 높은 세포 증식율을 보였다. 혈청은 아직까지도 구성성분을 정확히 알지 못하고 있는데, 10% 우태혈청에서 세포를 배양할 경우 왕성한 세포 증식을 보여 세포배양시 널리 사용되고 있다.⁵ 우태혈청은 구성성분뿐만 아니라 생체내에서의 작용도 정확히 알려지지 않은 것이 많으므로, 성장인자의 효과를 알아보는 실험에서는 우태혈청을 사용하지 않거나 세포의 최소한의 생존을 위해 미량의 우태혈청을 사용하고 있는데,²⁴ 본 연구에서도 성장인자가 건 세포에 미치는 영향을 보다 정확히 평가하기 위하여 우태혈청의 농도를 0.5%로 줄여서 사용하였다. 앞선 보고자의 연구 결과와 마찬가지로 0.5%의 우태혈청을 사용한 대조군이나 다른 성장인자를 투여한 군보다 10% 우태혈청이 함유된 배양액에서 가장 높은 세포

증식율을 보였다.

성장 인자 단독 투여군에서 성장 인자에 따른 세포 증식율은 EGF와 TGF 투여군은 대조군에 비해 세포 증식율이 의미 있게 증가한 반면에 제1형 교원질 mRNA의 발현은 대조군과 차이가 없었다. 두 가지 성장 인자는 세포의 종류와 농도에 따라 차이가 있지만, 주로 세포 증식을 촉진시키나 세포의 표현형의 발현을 억제하는 것으로 알려져 있다.⁹ 특히 EGF의 경우 상처 치유의 생체내 실험에서 많이 연구된 성장 인자로 절개 상처에서 인장 강도를 증가시키며, 섬유아세포의 증식을 촉진시켜 세포외 기질을 촉진시키는 것으로 알려져 있다.^{13,19,25,26} 본 연구에서는 저우태혈청 세포 배양 시 EGF와 TGF는 지속적인 세포 증식을 유도하였으나, 제 1형 교원질의 발현은 지속적으로 억제되어 있는 소견을 보였다. 따라서 생체내에서 다른 성장 인자나 환경의 영향에 의해 세포외 기질 형성을 촉진할 수 있으나, 생체외에서는 세포의 증식을 주로 촉진할 뿐 기질형성에 별 도움을 주지 않았다. 물론 본 실험이 생체외 실험으로, 생체내에서 있을 수 있는 세포의 다양성, 세포의 표현형, 정상적인 세포외 기질 조절능력이라는 점에서 생체외의 세포환경과 차이가 있으나 초기 건 치유과정에서 세포의 증식을 주로 유도하는 것으로 판단된다.

IGF-I과 PDGF는 대조군에 비하여 세포 증식율에는 큰 차이가 없었으나 제 1형 교원질의 발현에 있어서는 다른 성장 인자에 비하여 통계학적으로 의미있는 증가를 보였다. 특히 PDGF의 경우 가장 높은 제 1형 교원질 mRNA 발현을 보인 바, 세포외 기질의 형성을 촉진할 수 있는 가장 중요한 성장인자로 사료된다. IGF-I에 대한 결과는 Abrahamsson 등^{11,12,20}이 굴곡 건 조직배양에서 IGF-I을 단독 투여하여 건 치유를 효과적으로 촉진하였다고 발표한 내용과 같은 결과를 유도하였다. 물론 조직 배양을 하였다는 점에서 본 연구와 차이는 있지만 조직내의 세포에 영향을 줄 것이므로 조직이나 세포에도 동일한 결과를 유도한 것으로 생각된다. PDGF는 강력한 mitogen으로 알려져 있고 상처의 치유과정에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.^{17,27,28,29} 본 실험의 건 세포배양에서는

다소 차이가 있어 세포 증식율에서는 대조군과 의미 있는 차이를 발견할 수 없었으나 가장 뚜렷한 제 1형 교원질 mRNA의 발현을 보여 건 세포의 생체외 기질 형성에 가장 중요한 성장인자로 판단된다.

성장 인자를 복합 투여 한 모든 군에서 대조군에 비해 세포 증식율이 의미있게 증가 하였는데, 이는 성장 인자 본래의 기능인 세포 증식 효과가 서로 복합적으로 작용된 것으로 사료된다. 그러나 제 1형 단백질 mRNA 발현은 시간이 경과함에 따라 PDGF/EGF군과 PDGF/IGF군에서 의미 있는 증가를 보였으나, PDGF와 IGF 단독 투여 시 10일째 대조군에 비해 각각 $540 \pm 28\%$, $350 \pm 23\%$ 증가한 것에는 미치지 못하였다. 성장 인자 단독 또는 복합 투여 후 세포 배양액내의 제 1형 교원질 생성 정도에 대한 분석도 배양된 건 세포내의 제 1형 mRNA 발현과 일치되는 결과를 보였는데, 이러한 결과는 성장 인자가 배양된 건 세포에 작용하여 세포내에서 건의 구성 성분에 중요한 교원질을 합성하고 분비하는 기능을 보여준다고 하겠다.

본 연구의 목적은 건 치유 또는 건의 재건에서 건 세포의 내재적인 치유효과를 촉진할 수 있는 성장 인자를 규명하고자 하였으며, 연구결과 PDGF와 IGF의 단독 투여 또는 PDGF/IGF, PDGF/EGF 복합 투여에서 그 가능성을 발견할 수 있었다. 이러한 결과는 건의 치유과정에 대한 기초 자료를 제공할 수 있을 뿐만 건의 조직공학적인 개발에도 적용할 수 있을 것으로 생각된다. 예를 들면 건을 조직공학적으로 개발할 경우 상기 연구결과처럼 10% FBS에서 세포를 대량 증식시킨 후 생체내에서는 PDGF와 IGF 또는 PDGF/IGF, PDGF/EGF를 일정한 농도로 분비할 수 있는 구성체(scaffold)를 같이 이식함으로써 건의 재생과 재건에 이용할 수 있을 것이다. 그러나 본 연구는 일정한 성장인자 농도로 성장 인자의 효과를 비교하였다는 제한 점이 있다. 이점은 추후 실험을 통하여 세포외 기질의 형성을 촉진할 수 있는 가장 이상적인 성장인자의 농도에 대한 연구가 뒤따라야 될 것으로 사료된다.

V. 결 론

토끼의 골극 건에서 건세포를 분리하여 일차 배양한 다음 EGF, IGF-I, PDGF, TGF- β 를 단독 그리고 두 가지의 성장 인자를 복합 투여(PDGF/EGF, PDGF/IGF, PDGF/TGF, IGF/EGF, TGF/EGF, TGF/IGF)하여 이차 배양 후 세포 증식율, Northern blot을 통한 제 1형 교원질 mRNA 표현 변화, Western blot을 통한 제 1형 교원질 생성을 분석 하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) 성장 인자 단독 투여시 세포 증식율은 10% 우태혈청군에서 대조군에 비해 5일째 2배, 10일째 2.5배, 15일째 2.5배로 가장 높았고, TGF와 EGF군도 대조군에 비해 통계학적으로 의미 있게 증가하였다. 성장인자 복합 투여시 10% 우태혈청군을 비롯하여 성장인자를 복합적으로 투여한 모든 군에서 대조군에 비하여 세포 증식율이 통계적으로 의미 있게 증가하였다.

2) Northern blot을 통한 제1형 교원질 mRNA의 발현은 단독 투여 5일째는 IGF군과 PDGF군이 대조군에 비하여 각각 2.7배, 2.8배 증가 하여 통계학적으로 의미가 있었다. 복합 투여 5일째는 PDGF/EGF군, PDGF/IGF군이 대조군에 비하여 각각 2.0배, 2.8배 증가 하여 통계학적으로 의미가 있었고 PDGF/IGF군에서 가장 높은 제1형 교원질 mRNA의 발현을 보였으나 단독 투여군에 비해 높은 발현은 보이지 않았다.

단독 투여 10일째에는 IGF군과 PDGF군의 경우 제1형 교원질 mRNA의 발현이 더욱 증가하여 대조군에 비하여 각각 3.5배, 5.4배 증가하였으며, PDGF군에서 가장 높은 제1형 교원질 mRNA의 발현을 보였다. 복합 투여 10일째에는 PDGF/EGF군과 PDGF/IGF군에서 대조군에 비하여 각각 2배, 1.7배로 제1형 교원질 mRNA의 발현이 증가하였으나 단독 투여군에 비해 낮은 발현을 보였다.

단독 투여 15일째에도 IGF군과 PDGF군이 대조군에 비하여 각각 1.2배, 2.1

배 증가하였으나, 10일째에 비해 증가 정도는 감소 하였다. 15일째 역시 PDGF군에서 가장 높은 제1형 교원질 mRNA의 발현을 보였다. 복합 투여 15일째에도 PDGF/EGF군과 PDGF/IGF군에서 대조군에 비하여 각각 1.5배, 1.4배로 제1형 교원질 mRNA의 발현이 증가하였으나, 10일째에 비해 증가 정도는 감소 하였다.

- 3) Western blot을 통한 세포 배양액에서의 제1형 교원질 생성 정도는 단독 투여군 및 복합 투여군 모두 제1형 교원질 mRNA의 발현과 비슷한 양상을 보였다.

결론적으로 토끼 굴곡 건 세포 배양에서 성장 인자의 종류에 따른 제 1형 교원질 mRNA의 발현은 성장인자 중 PDGF와 IGF 단독 투여와 PDGF/IGF, PDGF/EGF 복합 투여 시 가장 높게 나타나, 토끼 심부 굴곡건의 치유과정에서 가장 효과적인 성장인자로 사료된다.

참고문헌

1. Schneider LH, Bush DC. Primary care of flexor tendon injuries. *Hand Clin* 1989; 5:383-94.
2. Meals RA. Flexor tendon injuries. *J Bone Joint Surg* 1985;67A:817-21.
3. Strickland JW. Flexor tendon injuries(anatomy, physiology, biomechanics, healing, and adhesion formation around a repaired tendon). *Orthop Rev* 1986;10:632-45.
4. Manske PR. The flexor tendon. *Orthopedics* 1987;10:1733-41.
5. Becker H, Graham MF, Cohen IK, Diegelmann RF. Intrinsic tendon cell proliferation in tissue culture. *J Hand Surg* 1981;6A:616-9.
6. Mass DP, Tuel RJ. Participation of human superficialis flexor tendon segments in repair in vitro. *J Ortho Res* 1990;8:21-34.
7. Potenza AD. Critical evaluation of flexor-tendon healing and adhesion formation within artificial digital sheaths. An experimental study. *J Bone Joint Surg* 1963;45A:1217-33.
8. Koob TJ, Vogel KG. Proteoglycan synthesis in organ cultures from regions of bovine tendon subjected to different mechanical forces. *Biochem J* 1987;246:589-598.
9. Duffy FJ Jr, Seiler JG, Gelberman RH, Hergueter CA. Growth factors and canine flexor tendon healing: initial studies in uninjured and repair models. *J Hand Surg* 1995; 20A:645-9.
10. Luyten FP, Hascall VC, Nissley SP, Morales TI, Reddi AH. Insulin-like growth factors maintain steady state metabolism of proteoglycans in bovine articular cartilage explants. *Arch Biochem Biophys* 1988;276: 416-25.

11. Abrahamsson SO, Lundborg G, Lohmander LS. Long term effect explant culture of rabbit flexor tendon: effects of recombinant human insulin-like growth factor-I and serum on matrix metabolism. *J Ortho Res* 1991;9:503-15.
12. Abrahamsson SO, Lundborg G, Lohmander LS. Recombinant human insulin-like growth factor-I stimulates in vitro matrix synthesis and cell proliferation in rabbit flexor tendon. *J Orthop Res* 1991;9:495-502.
13. Buckley A, Davidson JM, Kamerath CD, Wolt TB, Woodward SC. Sustained release of epidermal growth factor accelerates wound repair. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82:7340-4.
14. Brown GL, Curtsinger LJ, White M, Mitchell RO, Pietsch J, Nordquist R, et al. Acceleration of tensile strength of incisions treated with EGF and TGF-beta. *Ann Surg* 1988;208:788-94.
15. Schultz G, Rotatori S, Clark W. EGF and TGF-beta in wound healing and repair. *J Cell Biochem* 1991;45:346-52.
16. Thompson JP, Oegema TR jr, Bradford DS. Stimulation of mature canine intervertebral disc by growth factors. *Spine* 1991;16:53-60.
17. Pierce GF, Mustoe TA, Altrock BW, Duel TF, Thomason A. Role of platelet-derived growth factor in wound healing. *J Cell Biochem* 1991;45:319-26.
18. Schreier T, Degen E, Baschong W. Fibroblast migration and proliferation during in vitro wound healing(A quantitative comparison between various growth factors and a low molecular weight blood dialyzate used in the clinic to normalize impaired wound healing). *Res Exp Med* 1993;193:195-205.

19. Brown RL, Breeden MP, Greenhalgh DG. PDGF and TGF- α act synergistically to improve wound healing in the genetically diabetic mouse. *J Surg Res* 1994;56:562-70.
20. Abrahamsson SO. Similar effects of recombinant human insulin-like growth factor-I and II on cellular activities in flexor tendons of young rabbits: experimental studies in vitro. *J Orthop Res* 1997;15:256-62.
21. Woo SLY, Hildebrand K, Watanabe N, Fenwick JA, Papageorgiou CD, Wang JHC. Tissue engineering of ligament and tendon healing. *Clin Orthop* 1999;367:312-23.
22. Miyashita S, Hirota M, Yamamoto T, Shiroyama C, Furukawa Y, Hayashi K. Effect of basic fibroblast growth factor on synthesis/secretion of PS2 protein by human breast cancer cells(MCF-7). *European J Biochem* 1994;225:1041-6.
23. Amadio PC, Wood MB, Cooney WP III, Bogard SD. Staged flexor tendon reconstruction in the fingers and hand. *J Hand Surg* 1988;13A:559-62.
24. Maltese WA, Volpe IJ. Induction of an oligodendroglial enzyme in C-6 glioma cells maintained at high density or in serum-free medium. *J Cell Physiol* 1979;101:459-70.
25. Frank C, Woo SLY, Amiel D, Harwood F, Gomez M, Akeson W. Medial collateral ligament healing: a multidisciplinary assessment in rabbits. *Am J Sports Med* 1983; 11:379-89.
26. Gartner MH, Shearer JD, Bereiter DF, Mills CD, Caldwell MD: Wound fluid amino acid concentrations regulate the effect of epidermal growth factor on fibroblast replication. *Surgery* 1991;110:448-56.

27. Gospodarowicz D, Tauber JP. Growth factors and the extracellular matrix. *Endor Rev* 1980;1:201-27.
28. Clemmons DR: Exposure to platelet-derived growth factor modulates the porcine aortic smooth muscle response to somatomedin-C. *Endocrinol* 1985;117:77-83.
29. Soma Y, Takehera K, Ishibashi Y. Alteration of the chemotactic response of human skin fibroblast to PDGF by growth factors. *Exp Cell Res* 1994;212:274-7.

Abstract

**Effect of growth factors on Type I collagen synthesis in cultured
rabbit's deep flexor tendon cell**

Dong-Eun Shin

Department of Brain Korea 21 Project for Medical Sciences

The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Eung-Shick Kang and Sung-Jae Kim)

Although an injury of the flexor tendons of the hand can be easily treated by orthopedic surgeon, an injury to the deep flexor tendon is difficult because of insufficient blood supply due to envelopment by synovial membrane and significant suppression of nerve innervation compared to other organs. Even after its treatment the results has been reported to be unsatisfactory because of complications such as adhesion to surrounding tissue and re-ruptures. There is still much controversy surrounding the healing mechanism of the tendon, which has been classified into two types: extrinsic healing by fibroblasts outside the tendon and intrinsic healing directly by tenocytes. The limited intrinsic healing capacity of an injured tendon is important clinically, but for healing the proliferation of tenocytes and synthesis of collagen and other matrix components are needed. Among the factors that affect and control the metabolism of the healing process, the various types of growth factors are the focus of much attention. The body stores growth factors that respond to normal and injured conditions of a tendon tissue. Of these, the growth factors secreted by the tendon cells during intrinsic healing have been known to play important roles in the

healing process.

The purpose of this study is to analyze the change in the expression of type-I collagen mRNA and extent of collagen synthesis by Northern and Western blot analyses, after separating tendon cells from tendon tissue, culturing them, and treating them with transforming growth factor- β (TGF- β), insulin-like growth factor-I(IGF-I), epidermal growth factor(EGF) and platelet-derived growth factor(PDGF), either independently or in combination (PDGF/IGF, PDGF/EGF, IGF/EGF, TGF/ PDGF, TGF/ EGF, TGF/ IGF); to elucidate the effects of growth factors on tendon tissue; and to assess the ideal growth factors and their combinations that can be used in future treatments. The front feet of 15 New Zealand white rabbits (2.2-2.5kg) over 6 months old were used as materials of this study. Four deep flexor tendons were removed aseptically from each of the rabbit's front feet. Then, the cells were separated from these tendons and cultured. The test groups were the control group, fetal bovine serum group, single treatment group and combination treatment group.

The cell proliferation in each of the test group was analyzed using a hemocytometer. The expression of type-I collagen mRNA was analyzed by Northern blot method. The extent of type I collagen synthesis in the culture medium was analyzed by Western blot method. ANOVA was used to statistically analyze the differences among the test groups. Cell proliferation in the 10% fetal bovine serum with single treatment was $200 \pm 17\%$, $250 \pm 19\%$, $250 \pm 13\%$ (the highest proliferation) that of the control group on the 5th, 10th and 15th day, respectively. TGF and EGF groups also showed statistically significant increases in cell proliferation compared to that of the control group. All groups including 10% fetal bovine serum group showed

statistically significant increases in cell proliferation under combination growth factor treatment compared to the control group.

Northern blot analysis showed that the expression of type-I collagen mRNA increased significantly in the IGF and PDGF groups by $270 \pm 18\%$, $280 \pm 19\%$, respectively, compared that of the control group on the 5th day of single growth factor treatment. PDGF/EGF and PDGF/IGF groups both showed statistically significant increases of $200 \pm 13\%$ and $280 \pm 17\%$ that of the control group, respectively, on the 5th day of the combination treatment, and PDGF/IGF group showed the highest expression of type-I collagen mRNA, although this was less than that of the group with single treatment. On the 10th day of single treatment, the expression of type-I collagen mRNA in the IGF and PDGF groups increased even more to $350 \pm 23\%$ and $540 \pm 28\%$ that of the control group, respectively, and the PDGF group had the highest expression of type-I collagen mRNA. On the 10th day of combination treatment, the expression of type-I collagen mRNA in the PDGF/EGF and PDGF/IGF groups increased to $200 \pm 17\%$ and $170 \pm 11\%$ that of the control group respectively, though they were less than those of the groups with single treatment. On the 15th day of single treatment, the expressions in both IGF and PDGF groups increased to $120 \pm 8\%$ and $210 \pm 12\%$ that of the control group, respectively, but the amount of increase had reduced compared to those of the 10th day of treatment. On the 15th day, the PDGF group again showed the highest expression of type-I collagen mRNA. On the 15th day of combination treatment, the expression of type-I collagen in both PDGF/EGF and PDGF/IGF groups increased to $150 \pm 8\%$ and $140 \pm 13\%$ that of the control group, respectively, but the amount of increase had reduced compared to those of the 10th day of treatment.

Western blot analysis showed that the extent of type-I collagen synthesis in culture media of single and combination treated groups was similar to extent of type-I collagen mRNA expression.

Conclusively, in the expression of type-I collagen mRNA in rabbit tendon tissue cell culture according to the type of growth factors, the highest expression was exhibited under PDGF and IGF single treatments and PDGF/IGF and PDGF/EGF combination treatments. These are therefore considered to be the most effective growth factors in the healing process of a rabbit deep flexor tendon.

Key Words : tendon cell culture, growth factor, type-I collagen, rabbit flexor tendon