

탈회골기질에 의한 황색인대세포,
근모세포, 골모세포 및
간엽줄기세포에서의 골형성도

연세대학교 대학원

의 학 과

문 은 수

탈회골기질에 의한 황색인대세포,
근모세포, 골모세포 및
간엽줄기세포의 골형성도

지도교수 박희완

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함

2009년 12월

연세대학교 대학원

의 학 과

문 은 수

문은수의 박사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2009년 12월

감사의 글

지금 이 한편의 논문이 완성될 수 있도록 아낌없는 격려와 도움을 주셨던 많은 분들이 계셨기에 이 만큼의 결과가 있었습니다.

심신 양면으로 많은 가르침을 주시고 항상 지도를 아끼지 않으신 박희완 교수님께 진심으로 감사의 뜻을 전합니다. 또한 이 논문이 있기까지 많은 조언과 지도를 해주신 정형외과 김학선 교수님과 문성환 교수님, 내분비내과 임승길 교수님, 해부학과 박형우 교수님께도 감사를 드립니다. 실험 과정 동안 많은 도움을 준 이정욱, 강영미, 권언혜, 남미란 연구원에게도 감사를 드립니다.

정형외과 의사 및 교수로서 현재의 저의 모습이 될 수 있게 많은 가르침을 주신 한대용 교수님, 강응식 교수님, 한수봉 교수님, 김성재 교수님, 그 외 정형외과학 교실 모든 교수님께도 감사를 드립니다.

저를 낳으시고 항상 헌신적인 사랑과 기도로 뒷받침 해주신 사랑하는 아버지와 어머니 그리고 든든한 후원자이신 장인, 장모님께도 진심으로 감사의 마음을 전하고 싶습니다.

마지막으로 항상 옆에서 나를 믿어주고 평안한 보금 자리를 만들어주는 나의 가장 사랑하는 아내 나지애와 사랑하는 아들 병운, 승주, 딸 다솔이에게 이 논문과 함께 사랑을 전하고 싶습니다.

저자 씀

<차례>

국문요약.....	1
I. 서론.....	4
II. 재료 및 방법.....	6
1. 골형성단백-2 추출.....	7
2. 인간 황색인대세포의 일차 배양.....	7
3. 인간 근모세포의 일차 배양.....	7
4. 인간 조골세포의 일차 배양	8
5. 인간 간엽줄기세포의 일차 배양	8
6. 일차 배양 세포의 골원성 분화.....	9
7. 세포 골형성 표지자 측정.....	10
8. Alkaline phosphatase, von Kossa 염색.....	10
9. In vivo 실험.....	11
III. 결과	12
1. 골형성단백-2 추출.....	12
2. 골원성 분화.....	13
가. 황색인대세포.....	13
(1) 세포 증식 검사.....	13
(2) 골형성 표지자 측정.....	13
(3) Alkaline phosphatase, von Kossa 염색.....	14
나. 근모세포.....	16
(1) 세포 증식 검사.....	16
(2) 골형성 표지자 측정.....	17

(3) Alkaline phosphatase, von Kossa 염색.....	18
다. 골모세포.....	19
(1) 세포 증식 검사.....	19
(2) 골형성 표지자 측정.....	20
(3) Alkaline phosphatase, von Kossa 염색.....	21
라. 간엽줄기세포.....	22
(1) 세포 증식 검사.....	22
(2) 골형성 표지자 측정.....	23
(3) Alkaline phosphatase, von Kossa 염색.....	24
3. In vivo 실험.....	25
가. 탈회골기질 단독 또는 골형성단백-2를 포함한 탈회골 기질.....	25
나. 세포를 포함한 탈회골기질.....	26
(1) 단순 방사선 촬영.....	26
(2) Hematoxylin and Eosin 염색.....	26
(3) Alkaline phosphatase 염색.....	27
(4) von Kossa 염색.....	28
(5) Osteocalcin 염색.....	28
(6) Bone sialoprotein 염색.....	30
 IV. 고찰.....	 31
 V. 결론	 38
 참고문헌.....	 39
 영문요약.....	 47

그림 차례

그림 1. The content of bone morphogenetic protein-2 in demineralized bone matrix.....	12
그림 2. Proliferation result of ligamentum flavum cell.....	13
그림 3. Reverse transcriptase polymerase chain reaction and densitometry of ligamentum flavum cell.....	14
그림 4. Alkaline phosphatase staining of ligamentum flavum cell.....	15
그림 5. von Kossa staining of ligamentum flavum cell.....	16
그림 6. Proliferation result of myoblast.....	16
그림 7. Reverse transcriptase polymerase chain reaction and densitometry of myoblast.....	17
그림 8. Alkaline phosphatase staining of myoblast.....	18
그림 9. von Kossa staining of myoblast.....	19
그림10. Proliferation Result of osteoblast.....	19
그림11. Reverse transcriptase polymerase chain reaction and densitometry of osteoblast.....	20

그림12. Alkaline phosphatase staining of osteoblast.....	21
그림13. von Kossa staining of osteoblast.....	22
그림14. Proliferation result of mesenchymal stem cell.....	22
그림15. Reverse transcriptase polymerase chain reaction and densitometry of mesenchymal stem cell.....	23
그림16. Alkaline phosphatase staining of mesenchymal stem cell.....	24
그림17 von Kossa staining of mesenchymal stem cell.....	25
그림18. Demineralized bone matrix or bone morphogenic protein-2 + demineralized bone matrix.....	26
그림19. Hematoxylin and Eosin staining of in vivo specimen.....	27
그림20. Alkaline phosphatase staining of in vivo specimen.....	28
그림21. von Kossa staining of in vivo specimen.....	29
그림22. Osteocalcin staining of in vivo specimen.....	29
그림23. Bone sialoprotein staining of in vivo specimen.....	30

국문요약

탈회골기질에 의한 황색인대세포, 근모세포, 골모세포 및 간엽 줄기세포에서의 골형성도

골이식재가 자가골 이식을 대체할 수 있는 이상적인 골대체재가 되기 위해서는 골아전구세포, 골유도 인자 그리고 골전도 지지체라는 세 가지 요소를 포함하고 있어야 한다. 탈회골기질(demineralized bone matrix: DBM)은 골유도 기능 및 골전도 기능을 포함하면서 골유도 물질의 지속적인 유리 속도를 조절해 주는 장점이 있다. 이러한 탈회골기질의 장점을 이용하여 골형성 전구세포와 더불어 사용하면 이상적인 골대체재로 사용이 가능하리라는 데 착안하여 본 실험을 계획하였다. 골형성 전구세포로의 가능성을 알아보기 위해 황색인대세포, 근모세포, 골모세포 및 간엽줄기세포를 사용하였다.

상품화된 탈회골기질(Regeneration™ Technologies INC, Alachua, FL, USA)을 사용하였으며, 탈회골기질의 골형성 능력의 대표적 단백질인 골형성단백(bone morphogenetic protein: BMP)-2 함유량에 대한 분석을 시행하였다. 세포 배양을 위한 조직은 동의를 얻은 환자로부터 수술적 치료 과정을 통해 획득한 후, 세포별 분리 및 배양 과정을 거쳐 냉동 보관 후 실험에 사용하였다. 세포별 골분화 과정에서는 골형성 배지만을 사용한 대조군과 탈회골기질을 추가하여 배양한 실험군으로 나누어 진행하였다. 배양 3일과 7일째 세포 증식 여부를 확인하기 위해 Cyquant 분석과 세포 골형성 표지자 측정(Collagen type I, Osteocalcin, Osterix, MSX2, Dlx5)을 위해 역전사 중합 효소 연쇄 반응(reverse transcriptase polymerase chain reaction: RT-PCR)을 시행하였다. 배양 2주째 alkaline phosphatase(ALP) 염색과 4주째 von

Kossa 염색 및 염색 정도에 대한 정량 분석을 시행함으로 세포의 골형성도를 측정하였다.

본 실험에서 사용한 탈회골기질 내에는 BMP-2가 1.0667 μ g/g 함유되어 있었다. 세포 증식 검사에서는 모든 세포의 대조군과 실험군에서 세포 독성 없이 시간이 흐름에 따라 세포수의 증가를 보였다. RT-PCR 결과에서는 모든 세포에서 실험군에서의 골형성 표지자의 증가 소견은 관찰되지 않았다. ALP 염색과 von Kossa 염색 결과에서는 황색인대세포와 근모세포에서 실험군에서 의미 있는 골형성능의 증가를 보였다. 그러나 골모세포 및 간엽줄기세포에서는 대조군과 실험군 모두에서 풍부한 골형성능을 보였으며, 두군 간 비교에서는 통계학적으로 의미 있는 차이는 보이지 않았고, 오히려 실험군에서 떨어지는 경향을 보였다. 추가적으로 세포 실험에서 의미 있는 결과를 보였던 황색인대세포와 골모세포를 대상으로 동물 실험을 진행하였다. 세포와 배양액을 탈회골기질과 혼합하여 동시에 누드마우스의 피하에 삽입하였으며, 4주 및 8주째 골형성 정도를 알아보기 위해 Hematoxylin and Eosin 염색, ALP 염색, 및 von Kossa 염색을 시행하였으며, 추가로 Osteocalcin 및 Bone sialoprotein에 대한 면역 염색을 통해 세포가 골모세포로 분화되었는지를 확인하였다. 결과에서 두 가지 세포 모두에서 탈회골기질 사이에서 골형성능을 가진 세포의 증식을 확인하였으며, 면역 염색을 통해 증식된 세포가 골모세포임을 확인할 수 있었다. 또한 세포를 직접 삽입한 군에서 대조군에 비하여 골형성이 조기에 발생함을 확인하였다.

결론적으로 탈회골기질은 위 4가지 세포의 증식 과정에 세포독성이 없음을 확인하였고, 4가지 세포 모두 탈회골기질과 동시 배양시 골형성도를 나타내었으며 그 중 황색인대와 근모세포는 탈회골기질 내 작은 양의 BMP-2 함유량에도 불구하고 골형성도의 증가를

확인할 수 있었다. 또한 이 두 세포는 탈회골기질과 직접 이식하는 과정에서도 세포수의 증식을 확인할 수 있었으며, 탈회골기질의 골형성능을 촉진시킴을 확인할 수 있었다. 본 연구는 골형성 전구세포 연구에 아직까지 사용하지 않았던 사람 척추 기립근의 근모세포도 골조직 공학의 골형성 전구세포의 새로운 후보자로 사용 될 수 있다는 사실과 세포를 직접 탈회골기질과 더불어 혼합하여 임상에 적용할 수 있는 가능성을 확인함에 의의가 있겠다. 그러나 세포와 탈회골기질의 직접 이식은 탈회골기질 내 골형성 인자 함유량의 다양성이라는 단점으로 인해 아직까지는 자가골 대체 효과를 얻기에는 제한점이 있음을 알 수 있었다.

핵심 되는 말: 탈회골기질, 황색인대세포, 근모세포, 골모세포,
간엽줄기세포, 골형성도.

탈회골기질에 의한 황색인대세포, 근모세포, 골모세포 및 간엽줄기세포에서의 골형성도

<지도교수 박희완>

연세대학교 대학원 의학과

문은수

I. 서론

척추 수술에 있어서 유합술은 다양한 척추 질환에 대한 중요한 치료법 중 하나이다. 현재 척추 수술 시 견고한 유합을 얻기 위해 많은 골유도 및 골전도 물질들이 사용되고 있다.

골유합 방법 중 자가골 이식술은 견고한 척추 유합을 얻는데 가장 좋은 방법 중 하나로 알려져 있다. 이는 골유합을 위해 필수 조건인 풍부한 골형성 세포, 골형성 인자 및 골전도 지지체(scaffold)를 모두 갖추고 있기 때문이다. 그렇지만 이는 골 채취와 연관되어 많은 합병증들이 있다. 자가골 공여부로 주로 사용되는 장골능 및 후상장골극과 연관된 합병증으로는 혈종, 감염, meralgia paraesthetica, 골반골 골절, 요관 손상, 복막 손상 등이 있다. 또한 공여부 통증, 감각 소실 및 불편감 등과 같은 만성 합병증이 자주 발생하며, 이러한 유병률은 많게는 30%까지도 보고되고 있다¹⁻⁵.

자가골의 대체를 위한 시도로 동종골 이식 및 합성골이 사용되었다. 그러나 동종골은 감염 및 타인으로부터 질환의 전파라는 문제점을 안

고 있으며 자가골에 비하여 골유합 및 골형성 능력이 떨어진다고^{6,7}. 또한 합성골은 골형성 지지체로서의 역할이 주요 기능이기 때문에 자가골의 골확장재로서 사용되어질 수 있으나⁸ 단독 사용 시는 골유합률의 현저한 감소라는 문제점을 여전히 안고 있다⁹.

골조직 공학은 앞서 설명한 자가골, 동종골 및 합성골의 제한점을 해결하고 골유합 및 골결손 치료 방법에 대한 연구에 사용되고 있다¹⁰⁻¹². 조직 공학 골대체재가 자가골 이식을 대체할 수 있는 이상적인 골대체재가 되기 위해서는 골형성 전구세포, 골유도 인자 그리고 골전도 지지체라는 세 가지 요소를 모두 포함하고 있어야 한다¹³.

탈회골기질(demineralized bone matrix: DBM)은 잘 알려져 있는 골유도 골 이식 재료이다¹⁴⁻¹⁶. 탈회골기질이란 기본적으로 뼈 속의 지질층 및 미네랄 성분을 제거 처리한 것으로서 골성장 인자 및 기타 단백질 성분의 인자들이 보존되어 있다. 여기에 포함되어 있는 대표적인 골성장 인자는 골형성 단백질(bone morphogenetic protein: BMP)-2, BMP-4, BMP-7 등이며, 그 외에도 fibroblast growth factor(FGF), Insuline like growth factor(IGF), platelet-derived growth factor(PDGF), transforming growth factor- β 1(TGF- β 1), vascular endothelial growth factor(VEGF) 등이 보고되고 있다¹⁷⁻¹⁹. 탈회골기질은 골유도 기능 및 골전도 기능으로 인해 현재 임상분야에서 자가골과 혼합하여 많이 이용되고 있으며 임상적으로 비교적 좋은 결과가 보고되고 있다^{14,15,20-22}. 그러나 탈회골기질은 자가골과는 달리 골형성 세포를 포함하고 있지 않아 자가골을 완전 대체하지 못하는 것이 현실이다. 즉 탈회골기질의 단독 사용 시는 골유합능이 떨어질 것은 미루어 짐작할 수 있으며, 저자도 이러한 이유로 임상적으로 단독 사용하지 않는다.

이런 탈회골기질의 특징에 추가적으로 골형성 세포를 더불어 사용한다면 이상적인 골대체재로서 임상적 적용이 가능하리라는 데 착안해 본 실험을 계획하였다.

골형성 세포로서 사용될 수 있는 대표적인 것은 골모세포와 간엽줄기세포이다. 그 이외 본 교실에서 이미 실험이 진행되었던 황색인대세포^{23,24}와

수술장에서 풍부히 얻을 수 있는 근육으로부터 근모세포를 확보하여 더불어 실험에 이용해 보기로 하였다.

저자는 본 실험을 통해서 황색인대세포, 근모세포, 골모세포 및 간엽줄기세포를 배양 후 탈회골기질을 첨가하여 각각의 세포의 골형성도를 알아보고, 세포와 탈회골기질을 골형성도가 확인된 세포와 탈회골기질을 직접 누드마우스의 피하에 삽입하여 생체 내에서 골형성이 진행되는지를 확인함으로써 골이식 대체재로서의 가능성을 평가하고자 한다.

II. 재료 및 방법

모든 실험 과정에 필요한 조직은 병원 윤리위원회 승인된 절차에 따랐다. 본 실험에서는 상품화된 탈회골기질(Regeneration™ Technologies INC, Alachua, FL, USA)을 사용하였으며, 탈회골기질 내 골형성능의 대표적 단백질인 BMP-2 함유량에 대한 분석을 시행하였다. 세포 배양을 위한 조직은 환자로 부터 수술 전 동의를 얻은 후 수술적 치료 과정에서 획득하였다. 황색인대세포는 척추관 협착증 환자의 후방 감압술 과정에서 조직 손상을 최소화 하면서 황색인대의 중앙 부위에서 통으로(en block) 채취한 후 얻었다. 근모세포는 척추 수술 부위 노출 과정에서 전기 소작에 의해 손상되지 않은 신선한 근육 조직을 채취한 후 얻었다. 골모세포와 간엽줄기세포는 척추 유합술을 위해 시행한 후상장골극으로부터 골 채취 과정에서 나온 해면골 조각 및 골수를 이용하였다. 골수는 응고를 방지하기 위해 헤파린이 섞인 용기를 이용하여 보관하였다. 황색인대세포, 근모세포, 골모세포는 점진적 효소처리를 이용하였고 간엽줄기세포는 골수로부터 분리 하였다. 각 세포의 구체적 분리 및 배양 과정은 아래와 같다.

1. 골형성단백-2 추출

탈회골기질에서 BMP-2 추출 과정은 다음과 같다. 먼저 탈회골기질 추출 완충액을 제조하였다(4M Guanidine-HCl; 50mM Tris; 50mM EDTA pH 7.4, 5mM benzamidine HCl; 1mM phenyl-methyl-suffonyl fluoid and 0.1M ϵ -aminocaproic acid)(Sigma, St. Louis, Mo, USA). 제조된 완충액 3.8ml와 탈회골기질 60mg을 반응시켜 원심 분리하였고, 이후 한차례 완충액 3.8ml를 추가한 후 섭씨 4도에서 70rpm 속도로 밤새 원심 분리하여 반응시켰다. 이후 Nanosep(Pall Corp. Portsmouth, VA, USA)과 원심분리기를 이용하여 농축 과정을 거친 후 시료를 분배하여 BMP-2 Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) kit(R&D system, Minneapolis, NM, USA)를 이용 BMP-2의 함유량을 분석하였다.

2. 인간 황색인대세포의 일차 배양

인간의 황색 인대 조직을 멸균된 D-PBS(Dulbecco's phosphate buffered saline, Gibco BRL, Paisley, Scotland)로 한차례 닦아서 환자의 혈액 성분을 제거한 후, 5%의 우태아 혈청이 들어있는 Dulbecco's modified eagle's medium(DMEM, Gibco BRL, Paisley, Scotland) 배지에서 미세 가위를 이용하여 조직을 잘게 잘랐다. 잘게 자른 황색인대 조직 단편을 250U/ml의 제 1A형 collagenase(Sigma, St. Louis, MO, USA)가 함유된 DMEM 배지에서 1시간 30분 동안 효소 처리 하였다. 효소 처리한 황색 인대 조직을 D-PBS로 두 차례 씻어 낸 후, 10% 우태아 혈청과 100 unit/ml penicillin, 100 g/ml streptomycin이 들어 있는 DMEM(Gibco BRL, Paisley, Scotland) 배지로 교환하여 37°C, 5% 배양기에서 배양하였다. 배지는 3일에 한 번씩 교환하였다. 계대수가 2일 때 trypsin / EDTA(Sigma, St. Louis, MO, USA) 효소 처리 방법으로 인간 황색 인대 세포를 수집하여 액체 질소에 냉동 보관 하였다.

3. 인간 근모세포의 일차 배양

인간의 근육 조직을 멸균된 D-PBS로 한차례 닦아서 환자의 혈액 성분을

제거한 후, 5%의 우태아 혈청이 들어있는 DMEM 배지에서 미세 가위를 이용하여 조직을 잘게 잘랐다. 잘게 자른 근육 조직 단편을 100U/ml 의 제 2형 collagenase(Sigma, St. Louis, MO, USA) 가 함유된 DMEM 배지에서 1시간 동안 효소 처리 하였다. 효소 처리한 근육 조직을 DMEM 배지로 두 차례 씻어 낸 후, 10% 우태아 혈청과 100 unit/ml penicillin, 100 g/ml streptomycin, Glutamax I, b FGF가 들어 있는 Ham's nutrient mixture(Gibco BRL, Paisley, Scotland) 배지로 교반하여 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 계대수가 2일 때 trypsin / EDTA 효소 처리법으로 인간 근모 세포를 수집하여 액체 질소에 냉동 보관 하였다.

4. 인간 조골세포의 일차 배양

인간의 골 조직을 멸균된 D-PBS에서 주사기를 이용하여 환자의 혈액 성분을 제거한 후, 본 커터를 이용하여 골 조직을 잘게 잘랐다. 잘게 자른 골 조직을 1mg/ml 의 제 4형 collagenase(Sigma, St. Louis, MO, USA)가 함유된 DMEM 배지에서 20분 동안 3번 효소 처리 하였다. 효소 처리 한 것을 각각 모아서 원심분리기로 돌린 후 상등액을 빨아올린 후 10% 우태아 혈청과 100 unit/ml penicillin, 100 g/ml streptomycin이 들어 있는 DMEM(Gibco BRL, Paisley, Scotland) 배지로 교반하여 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 배지는 3일에 한 번씩 교환하였다. 계대수가 2일 때 trypsin / EDTA 효소 처리법으로 인간 조골 세포를 수집하여 액체 질소에 냉동 보관 하였다.

5. 인간 간엽줄기세포의 일차 배양

골수 천자액 10ml씩을 항응고제로 헤파린이 첨가된 시험관에 무균의 조작으로 모아 밀도구배원심분리(density gradient centrifugation) 방법으로 골수의 단핵 세포를 분리하였다. 간단히 설명하면 Ficoll(GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden)을 50ml 원심 관에 담고 골수 천자액을 이 시험관 위에 조심스럽게 중첩하여 2500 rpm에서 30분간 원심 분리하여

단핵세포층만을 모았다. 모아진 단핵세포층을 D-PBS로 두 차례 씻어 낸 후, 10% 우태아 혈청과 100 unit/ml penicillin, 100 g/ml streptomycin이 들어 있는 DMEM(Gibco BRL, Paisley, Scotland) 배지로 교반하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 배지는 3일에 한 번씩 교환하였다. 계대수가 2일 때 trypsin / EDTA 효소 처리법으로 인간간엽줄기세포를 수집하여 액체 질소에 냉동 보관 하였다.

6. 일차 배양 세포의 골원성 분화

4가지 세포를 역전사 중합 효소 연쇄 반응(reverse transcriptase polymerase chain reaction: RT-PCR), von Kossa 염색 그리고 alkaline phosphatase (ALP) 염색을 위해 1×10^5 개 세포를, Cyquant 분석을 위해 각각 2×10^4 개 세포를 각각 6 well plate와 24 well plate에 파종(seeding)하였다. 인간 황색인대세포는 DMEM-HG(Gibco BRL, Paisley, Scotland)에 10% 우태아 혈청이 들어간 배지에서, 인간 조골세포와 간엽줄기세포는 DMEM-LG(Gibco BRL, Paisley, Scotland)에 10% 우태아 혈청이 들어간 배지에서, 인간 근모세포는 Ham's nutrient mixture(Gibco BRL, Paisley, Scotland) 배지에 10% 우태아 혈청이 들어간 배지에서 각각 배양 하였다. 세포 부착 24시간 후에 배지는 1% 우태아 혈청과 10m M-glycerophosphate(Sigma, St. Louis, MO, USA), 0.2mM ascorbic acid(Gibco BRL, Paisley, Scotland), 10^{-8} M dexamethasone(Sigma, St. Louis, MO, USA)가 들어있는 minimum essential medium alpha medium(α -MEM, Gibco BRL, Paisley, Scotland) 골유도 배지로 교체되었다. 탈회골기질은 무게를 달아 1% 우태아 혈청이 들어있는 α -MEM 배지와 혼합하였으며, 분석을 위해 24well-plate에 well 당 각각 5mg의 양으로 1ml씩 넣어 주었고 6well-plate에 25mg의 양으로 3ml씩 넣어 주었다. 세포별 골분화 과정에서는 골형성 배지만을 사용한 대조군과 탈회골기질을 추가하여 배양한 실험군으로 나누어 진행하였다. 평가로는 Cyquant 분석, 세포 골형성 표지자에 대한 RT-PCR, ALP 염색 및 von Kossa 염색을 시행하였다.

세포 증식을 알아보기 위한 Cyquant 분석은 시간의 흐름에 따른 핵산의 양을 알아보는 검사로서 Cyquant 녹색 염료(Invitrogen, Eugene, OR, USA)를 배양 접시에 직접 삽입한 후 2-5분 동안 실온에서 배양하고, 이후 시료의 형광 발광의 증가를 측정하였다.

7. 세포 골형성 표지자 측정(Collagen type I, Osteocalcin, Osterix, MSX2, Dlx5)

배양한 각 세포를 RNeasy mini kit (QIAGEN, Germantown, MD, USA)를 이용하여 총 리보핵산(ribonucleic acid: RNA)을 분리하였다. 분리한 총 RNA 1 μ g에 Oligo d(T)₁₆ primer 2.5mM(Invitrogen, Grand Island, NY, USA)을 첨가하여 70 $^{\circ}$ C 에서 5분간 천천히 식힌 (annealing) 후, RT premix(Bioneer, 대전, 한국)를 이용하여 42 $^{\circ}$ C 에서 1시간, 95 $^{\circ}$ C에서 5분, 4 $^{\circ}$ C에서 5분간 반응하여 상보 디옥시리보핵산(complementary deoxynucleic acid: cDNA)을 합성하였다. 합성한 cDNA 1 μ l를 각각의 primer 10pmol/ μ l씩을 첨가하여 최종 부피가 20 μ l가 되도록 한 후 중합 효소 연쇄 반응(polymerase chain reaction: PCR)을 실시하였다. RT-PCR에 대한 내부 대조군으로 β -actin을 사용하였으며, 유전자 발현 정도를 TINA program(Raytest, Straubenhardt, Germany)을 이용하여 비교 분석하였다.

8. Alkaline phosphatase, von Kossa 염색

ALP 염색은 배양 2주째 4개의 각 세포를 citrate buffered acetone (Sigma, St. Louis, MO, USA)이 들어 있는 고정액을 사용하여 30초 동안 고정시킨 후, 증류수로 45초 동안 씻어 내고 미리 준비해 둔 alkaline-dye mixture(Sigma, St Louis, MO, USA)를 각 well에 적용하였다. 상온에서 빛을 차단 한 채 30분 동안 반응시켰다. 반응시킨 세포를 2분 동안 증류수로 씻어낸 후 Mayer's Hematoxylin(Sigma, St Louis, MO, USA) 용액에서 10분간 반응시켰다. 다시 한 번 증류수로 1분간 씻어 내어 관찰하였다.

von Kossa 염색은 4주간 배양한 세포를 증류수로 한차례 씻어 내고, 3%의

새로 준비한 질산은(silver nitrate) 용액을 적용하여 상온에서 빛을 차단 한 채 30분 동안 반응시켰다. 증류수로 한차례 씻어 내고 증류수가 있는 상태에서 불빛에 노출시켰다. 2시간이 지나 색을 확인하고 증류수를 제거한 후 관찰하였다. 염색 후 Metamorph 프로그램(Universal-imaging, Downingtown, PA, USA)을 이용하여 염색 정도를 정량화하여 비교하였다.

9. In Vivo 실험

동물 실험의 선행 실험으로 탈회골기질(paste 형) 단독 또는 BMP-2(50 μ g/ml)를 포함한 탈회골기질을 누드마우스의 피하에 삽입하여 4주 후 조직학적 검사를 시행하였다. 이후 본격적인 실험으로 실험군은 배양 세포(2×10^6 개)를 포함하는 배양액 1cc를 100 μ l의 탈회골기질과 혼합한 후 누드마우스의 피하 층에 삽입함으로써 세포를 직접적으로 임상에 적용이 가능한 지를 알아보고 세포의 골형성 정도를 평가하고자 하였다. 비교를 위해 탈회골기질에 배양액만 혼합한 군을 대조군으로 하여 실험을 진행하였다. 결과 분석을 위해서는 시술 후 4주 및 8주째 세포의 골성분화 정도 및 골형성 정도를 알아보기 위해 단순 방사선 촬영과 Hematoxylin and Eosin(H&E), ALP, von Kossa 염색을 시행하였으며, 각 세포가 골모세포로 분화되었는지를 직접 확인하기 위하여 면역 염색(Osteocalcin, Bone sialoprotein)을 추가로 시행하였다.

III. 결과

1. 골형성단백-2 추출

탈회골기질 내 BMP-2 용량을 알아보기 위한 검사로 guanidine HCL 방법을 사용하였다. 탈회골기질은 본 연구에서 사용한 상품화된 Regeneration™ Technologies INC의 제품뿐만 아니라 대한민국 내 Korea bone bank사의 서로 다른 처리방법으로 만들어진 아직 상품화되지 않은 제품 2가지(K-6, K-3)를 비교군으로 검사를 시행하였다. 결과는 아래 그림 1과 같았다. 검사에서 본 연구에서 사용한 탈회골기질은 그림 1에서 R로 표시되어 있으며, BMP-2의 함유량을 DBM 1g 당 함유량으로 환산하면 1.0667 μ g/g의 소량만이 포함되어 있었다. 이를 비교군인 타사 제품과 비교 시 K-6제품 보다는 약간 많은 함유량을 보이긴 하였지만 K-3 제품에 비하여는 적은 량의 BMP-2를 함유하고 있었으며, 이처럼 제품마다 함유량이 서로 다른 다양성을 보였다.

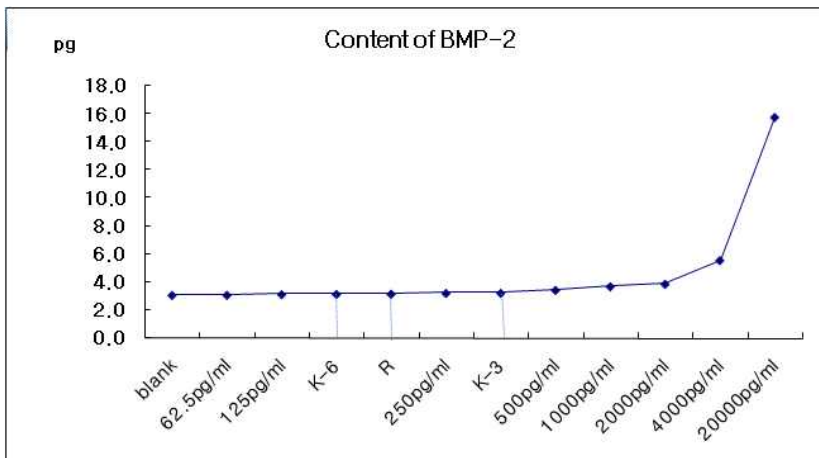


그림 1. The content of bone morphogenetic protein-2 in demineralized bone matrix. The "R" label represents the DBM that was used for this study. Labels "K-3" and "K-6" represent the control DBM used for BMP-2 detection in DBM, both of which are manufactured by the Korea Bone Bank in Korea. We analyzed the content of BMP-2 in DBM by ELISA technique. This graph shows that the amount of BMP-2 in the "R" sample is in 1.0667 microgram in 1 gram of DBM. The value was noted to be in between the amounts detected in the "K-6" and "K-3" samples. DBM: demineralized bone matrix, BMP: bone morphogenetic protein, ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay.

2. 골원성 분화

가. 황색인대세포

(1) 세포 증식 검사

그림 2에서 Cyquant 녹색 염료를 이용한 Cyquant 분석 결과는 3일째 및 7일째에 대조군에 비하여 실험군에서 의미 있는 세포수 증가를 확인할 수 있었다($p < 0.05$). 또한 탈회골기질 삽입 유무와 상관없이 3일에 비하여 7일째 세포 독성 없이 점차 세포수가 증가한 것을 확인할 수 있었다($p < 0.05$).

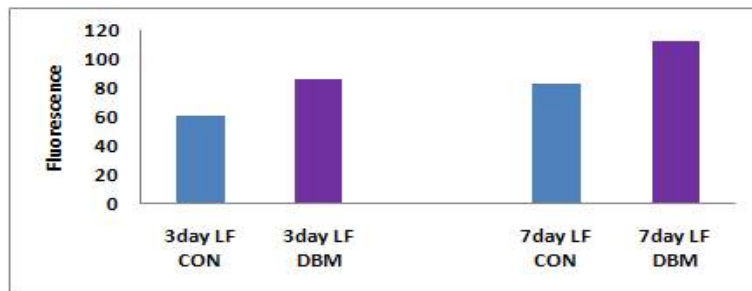


그림 2. Proliferation result of ligamentum flavum cell.

Cyquant assay of ligamentum flavum cells was performed. 5mg/ml of demineralized bone matrix was administrated to the cultures and cultured for 3 and 7 days. Results showed an increase in fluorescence in experimental group at 3 and 7 days respectively ($p < 0.05$). LF CON: ligamentum flavum only group, LF DBM: liagementum flavum + demineralized bone matrix group.

(2) 골형성 표지자 측정

골형성의 각 단계에서 나타날 수 있는 표지자로 Collagen type I, Osteocalcin, Osterix, MSX2, Dlx5, Bone sialoprotein(BSP)을 RT-PCR 방법을 이용하여 측정하였다. 측정 결과는 그림 3과 같았다. 그래프에서 볼 수 있듯이 배양 초기 7일까지는 골형성 배지만을 포함한 대조군과 비교하여 실험군에서 골형성 표지자의 변화는 나타나지 않았다.

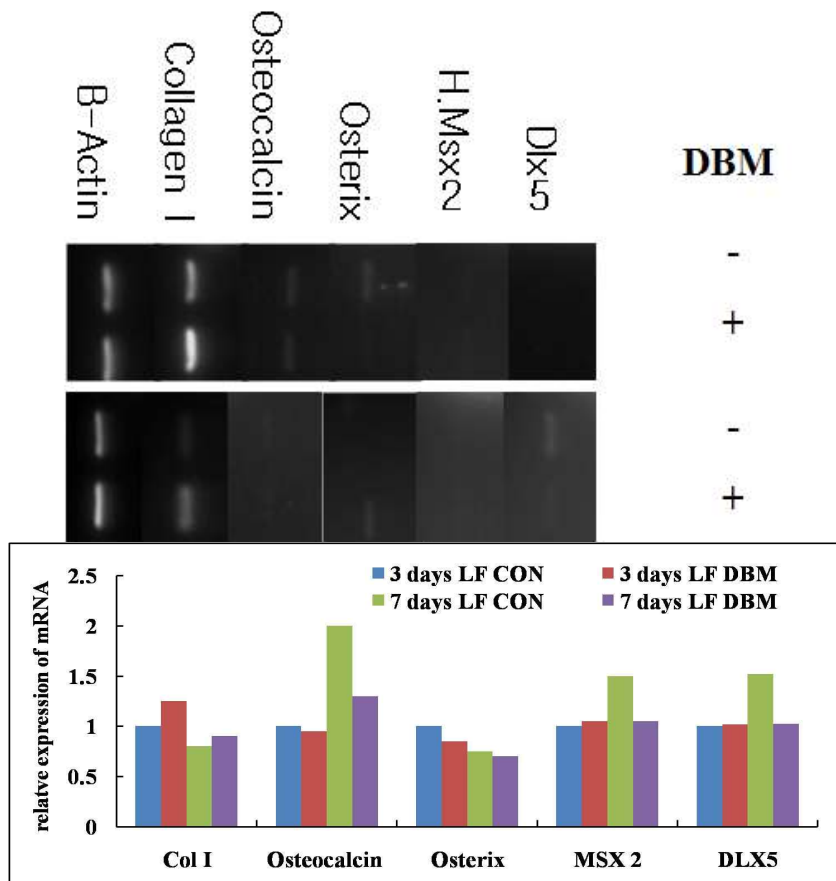


그림 3. RT-PCR and densitometry of ligamentum flavum cell. 5mg/ml of demineralized bone matrix was administrated to the cultures and the cell were cultured for 3 and 7days. RT-PCR: reverse transcriptase polymerase chain reaction, DBM: demineralized bone matrix, Col 1: collagen type 1, LF CON: ligamentum flavum only

3 Alkaline phosphatase, von Kossa 염색

배양 2주째 탈회골기질에 의한 골형성 정도 평가를 위해 세포내 ALP의 존재를 확인하는 ALP 염색²⁵을 시행하였으며, Metamorph 프로그램을 이용하여 염색 결과에 대한 정량적 분석을 시행하였다. 그림 4에서 알 수 있듯이 대조군과 실험군 모두에서 ALP 염색에 양성 소견을 보였다. 또한 염색 정도 비교에서는 실험군에서 대조군에 비하여 오차범위 이상 의미 있게 증가된 염색 결과를 나타내었다.

배양 4주째 골형성 정도를 알아보기 위한 한 방법으로 세포 내 칼슘 정도를 확인하기 위해 von Kossa 염색을 시행하였으며, 이 염색에서도 대조군과 실험군 모두에서 염색 양성을 보였다. 염색 정도 비교에서는 실험군에서 대조군에 비하여 의미 있게 증가된 소견이 관찰되었다(그림 5).

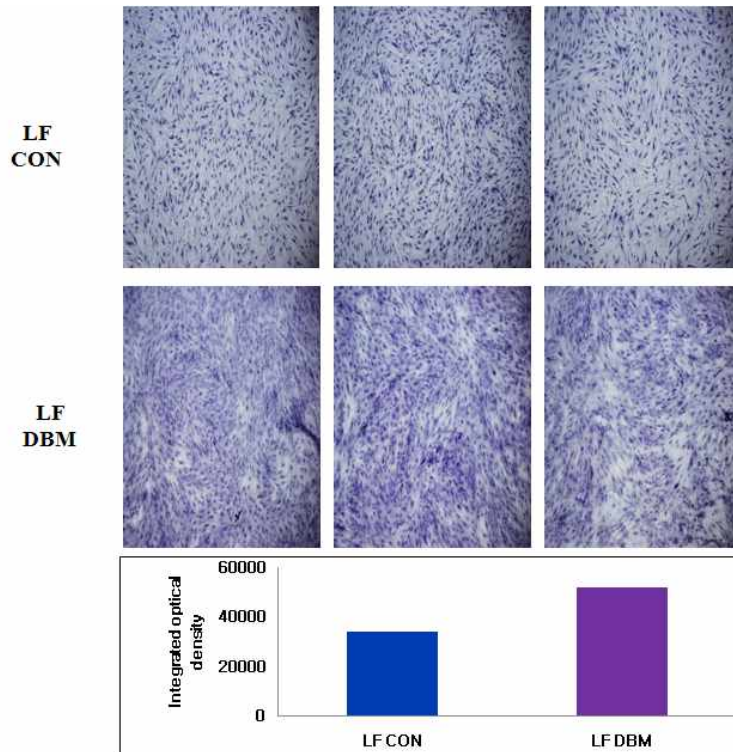


그림 4. Alkaline phosphatase staining of ligamentum flavum cell. The cells were cultured for 2 weeks(x100). The histogram represents the staining extent with metamorph. Results show an increase in staining density of the experimental group ($p < 0.05$). LF CON: ligamentum flavum only group, LF DBM: liagmentum flavum + demineralized bone matrix group.

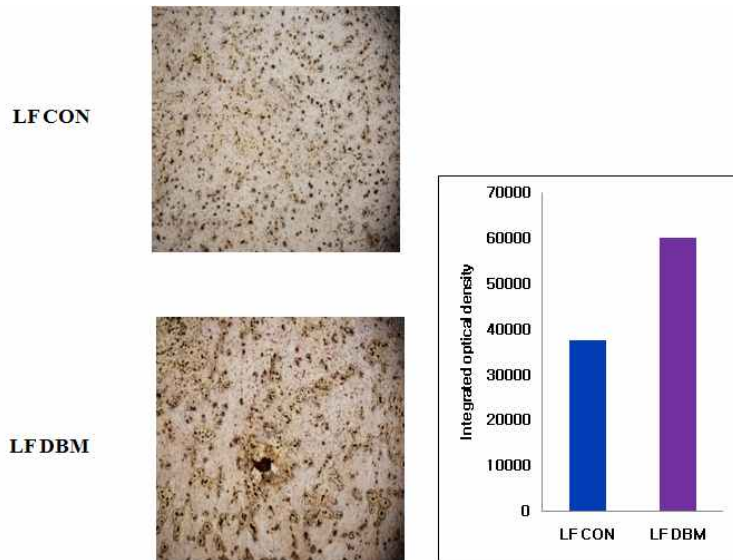


그림 5. von Kossa staining of ligamentum flavum cell.

The cells were cultured for 4 weeks(x100). The histogram represents the staining extent with metamorph. Results show an increase in staining density of the experimental group ($p < 0.05$). LF CON: ligamentum flavum only group, LF DBM: liagamentum flavum + demineralized bone matrix group.

나. 근모세포

(1) 세포 증식 검사

그림 6에서 세포 증식 검사로 시행한 Cyquant 분석 결과는 3일째 및 7일째에 대조군에 비하여 실험군에서 세포수의 증가를 확인할 수 있었다($p < 0.05$).

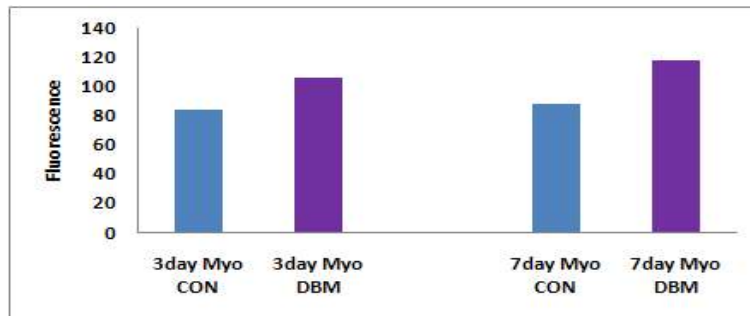


그림 6. Proliferation result of myoblast.

Results showed an increase in fluorescence in experimental group at 3 and 7 days respectively ($p < 0.05$). Myo CON: myoblast only group, Myo DBM: myoblast + demineralized bone matrix group.

(2) 골형성 표지자 측정

근모세포에서는 각 골형성 표지자가 3일에 비하여 7일째 증가하는 소견을 보였으며, 이는 Collagen 1에서 특히 두드러졌다. 그러나 탈회골 기질에 의한 증가 소견은 관찰되지 않았다(그림 7). 그리고 밀도 계측 분석에서 다른 세포와 비교에서 모든 골형성 표지자가 높게 나타났다.

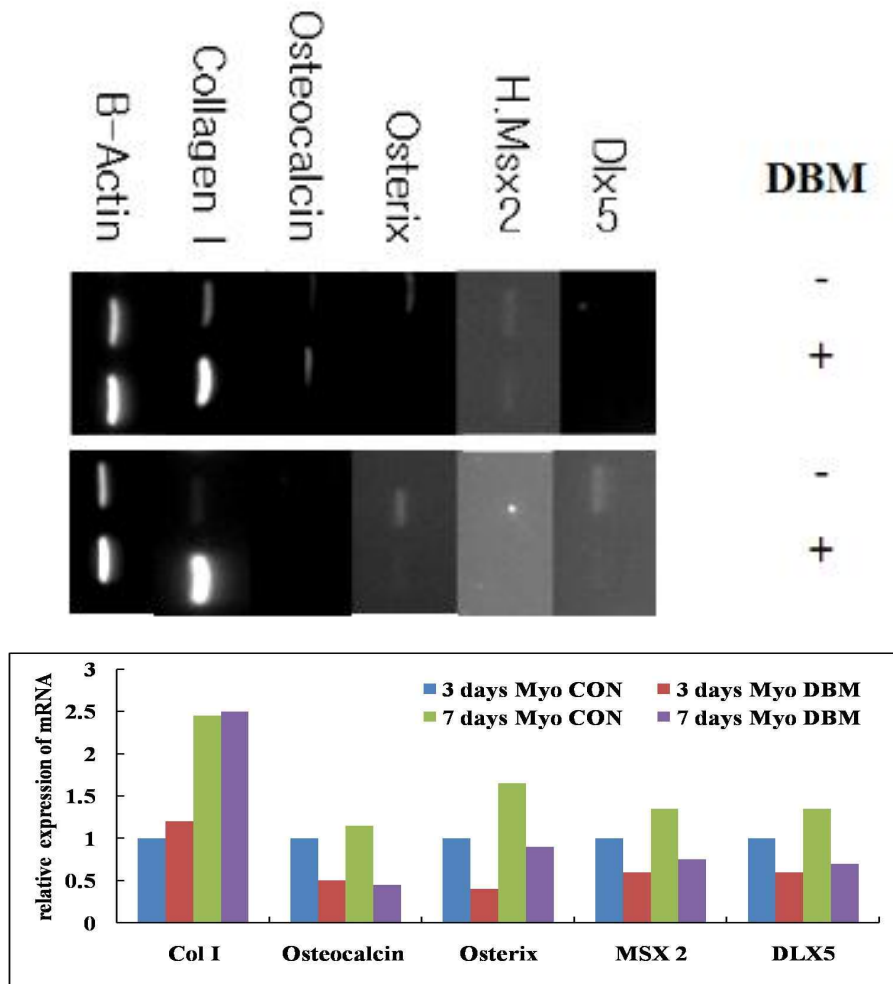


그림 7. RT-PCR and densitometry of myoblast.

5mg/ml of demineralized bone matrix was administrated to the cultures and the cell were cultured for 3 and 7 days. RT-PCR: reverse transcriptase polymerase chain reaction, Col1: collagen type 1, Myo CON: myoblast only group, Myo DBM: myoblast + demineralized bone matrix group.

(3) Alkaline phosphatase, von Kossa 염색

배양 2주 및 4주에 각각 시행한 ALP 염색과 von Kossa 염색에서 대조군과 실험군 모두에서 양성 소견을 보였으며, 정량 분석에서는 대조군에 비하여 오차 범위 이상 의미 있게 증가된 염색결과를 보였다(그림 8, 9).

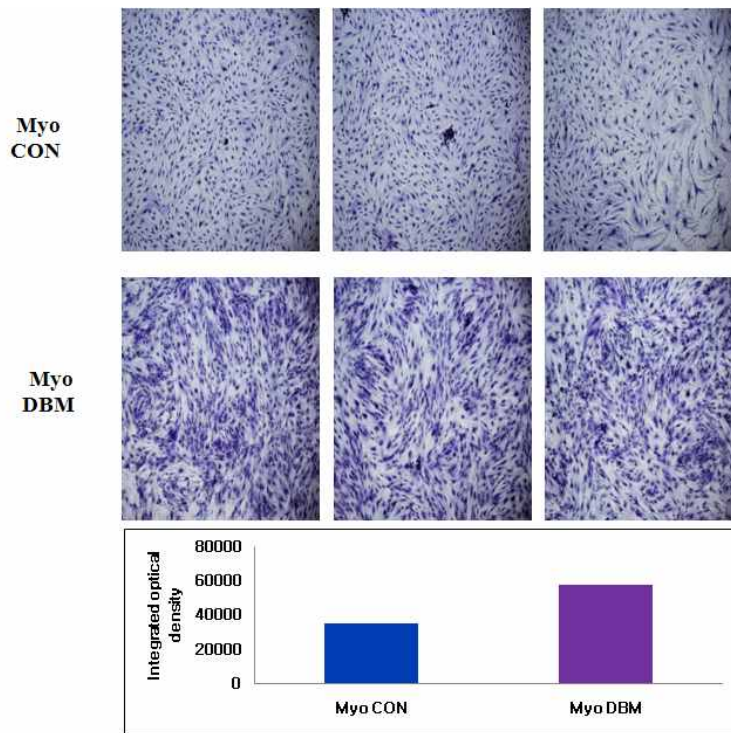


그림 8. Alkaline phosphatase staining of myoblast.

The cells were cultured for 2 weeks(x100). The histogram represents the staining extent with metamorph. Results show an increase in staining density of the experimental group ($p < 0.05$). Myo CON: myoblast only group, Myo DBM: myoblast + demineralized bone matrix group.

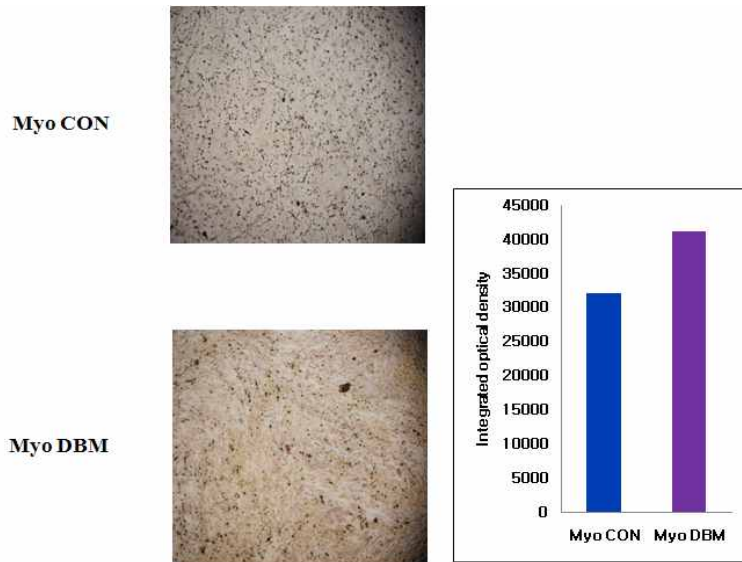


그림 9. von Kossa staining of myoblast.

The cells were cultured for 4 weeks(x100). The histogram represents the staining extent with metamorph. Results show an increase in staining density of the experimental group ($p<0.05$). Myo CON: myoblast only group, Myo DBM: myoblast + demineralized bone matrix group.

다. 골모세포

(1) 세포 증식 검사

그림 10에서 세포 증식 검사로 시행한 Cyquant 분석 결과는 3일째 및 7일째에 대조군에 비하여 실험군에서 세포수가 증가하는 것을 확인할 수 있었다($p<0.05$).

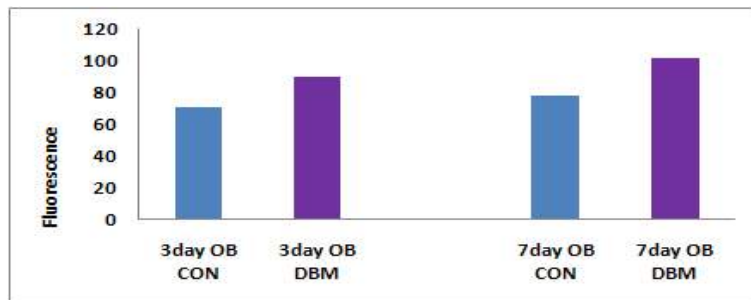


그림 10. Proliferation result of osteoblast.

Results showed an increase in fluorescence in experimental group at 3 and 7 days respectively ($p<0.05$). OB CON: osteoblast only group, OB DBM: osteoblast + demineralized bone matrix group.

(2) 골형성 표지자 측정

그림 11를 통해 알 수 있듯이 배양 초기 7일까지는 골형성 배지만을 포함한 대조군과 비교하여 실험군에서 골형성 표지자의 변화는 나타나지 않았다. 각 군내에서는 오히려 3일째에 비하여 7일째 오차범위 이내에서 모든 형성 표지자의 감소를 보였다.

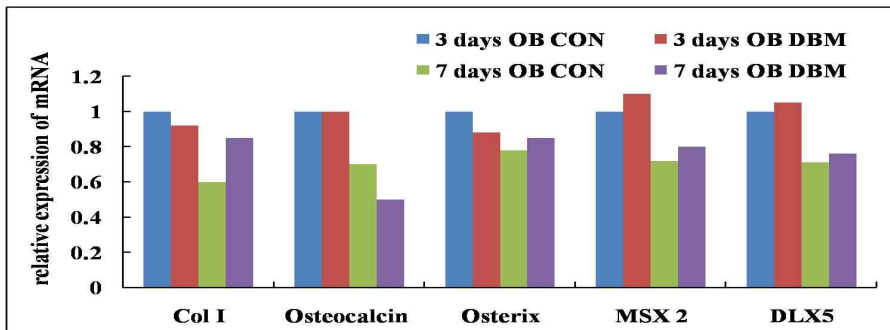
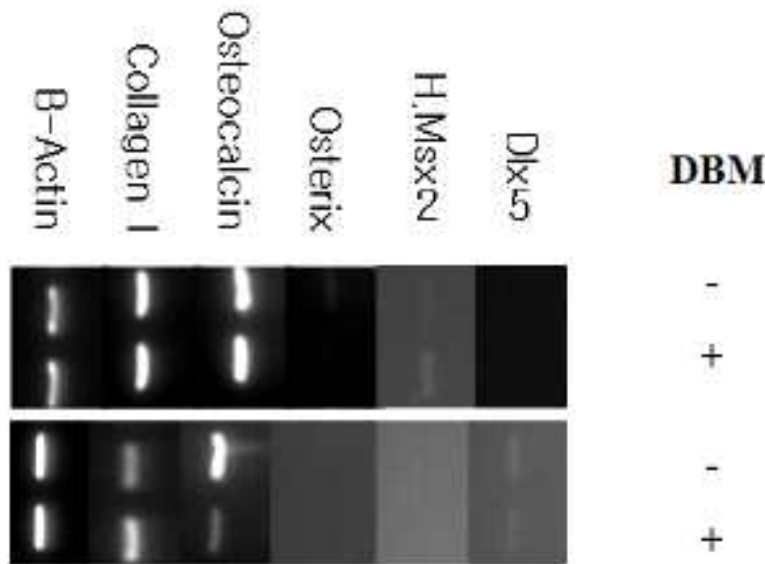


그림 11. RT-PCR and densitometry of osteoblast.

5mg/ml of demineralized bone matrix was administrated to the cultures and the cell were cultured for 3 and 7 days. RT-PCR: reverse transcriptase polymerase chain reaction, Col1: collagen type 1, OB CON: osteoblast only group, OB DBM: osteoblast + demineralized bone matrix group.

(3) Alkaline phosphatase, von Kossa 염색

ALP 염색과 von Kossa 염색에서 대조군과 실험군 모두에서 양성 소견을 보였다. 그러나 염색 양상은 탈회골기질이 포함되지 않은 대조군에서 오히려 더 강하거나 비슷한 정도의 염색 소견을 보였다. 정량 분석에서도 동일한 소견을 보였으나, 그 정도는 오차 범위 이내로 의미 있는 차이는 아니었다(그림 12, 13).

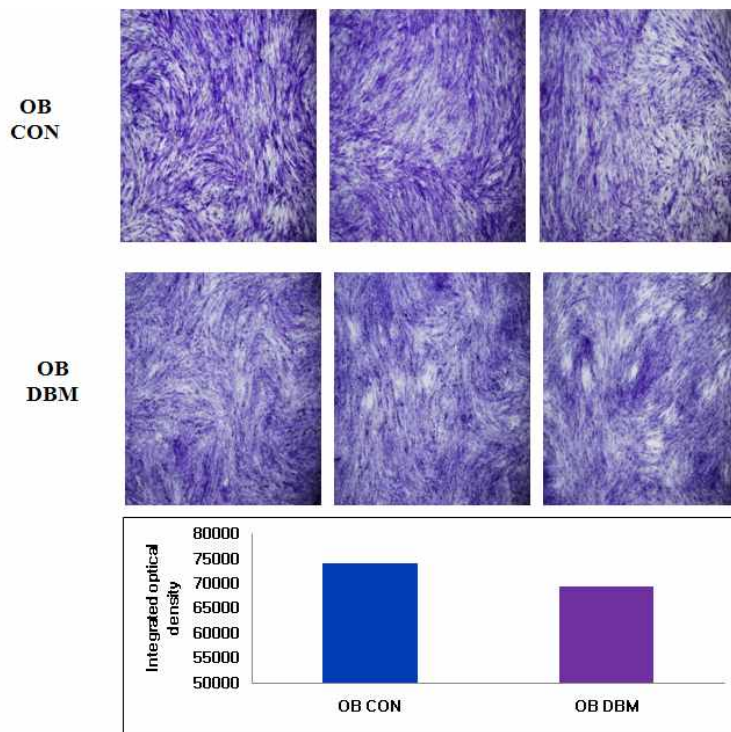


그림 12. Alkaline phosphatase staining of osteoblast. The cells were cultured for 2 weeks(x100). The histogram represents the staining extent with metamorph. Results show no significant difference between control and experimental groups ($p>0.05$). OB CON: osteoblast only group, OB DBM: osteoblast + demineralized bone matrix group.

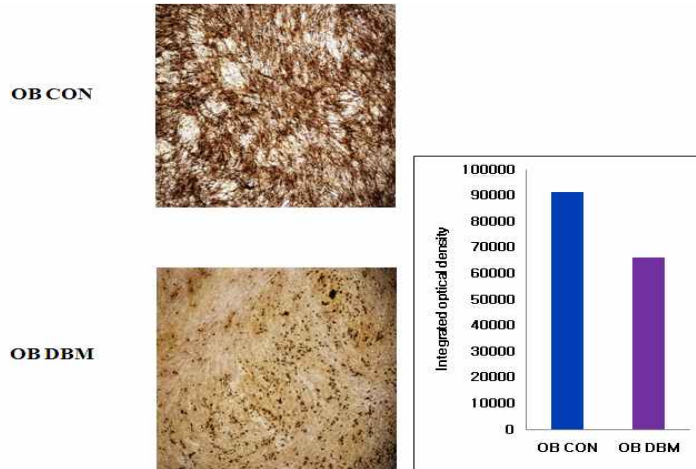


그림 13. von Kossa staining of osteoblast.

The cells were cultured for 4 weeks(x100). The histogram represents the staining extent with metamorph. Results show no significant difference between control and experimental groups ($p>0.05$). OB CON: osteoblast only group, OB DBM: osteoblast + demineralized bone matrix group.

라. 간엽줄기세포

(1) 세포 증식 검사

그림 14에서 세포 증식 검사로 시행한 Cyquant 분석 결과는 탈회골기질 삽입 유무와 상관없이 3일에 비하여 7일째 세포 독성 없이 점차 세포수가 증가한 것을 확인할 수 있었다($p<0.05$). 그러나 3일째 및 7일째 모두에서 대조군에 비하여 실험군에서 탈회골기질에 의한 추가적인 세포수의 증가는 관찰되지 않았다($p>0.05$).

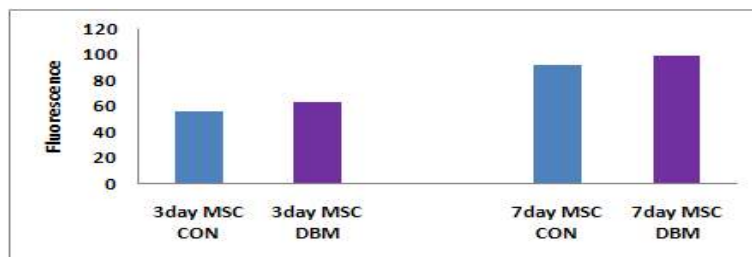


그림 14. Proliferation result of mesenchymal stem cell

Results show no significant differences in fluorescence between experimental and control groups at Day 3 or Day 7 respectively($p>0.05$). MSC CON: mesenchymal stem cell only group, MSC DBM: mesenchymal stem cell + demineralized bone matrix group.

(2) 골형성 표지자 측정

그림 15를 통해 알 수 있듯이 배양 초기 7일까지는 골형성 배지만을 포함한 대조군과 비교하여 실험군에서 골형성 표지자의 증가 소견은 관찰되지 않았다. 골형성 표지자에 대한 동일군 내에서의 비교 시 대조군에서는 3일째에 비하여 7일째 약간의 감소 소견과 실험군에서는 약간의 증가 소견을 보이거나 오차범위 이내로 의미 있는 소견은 아니었다.

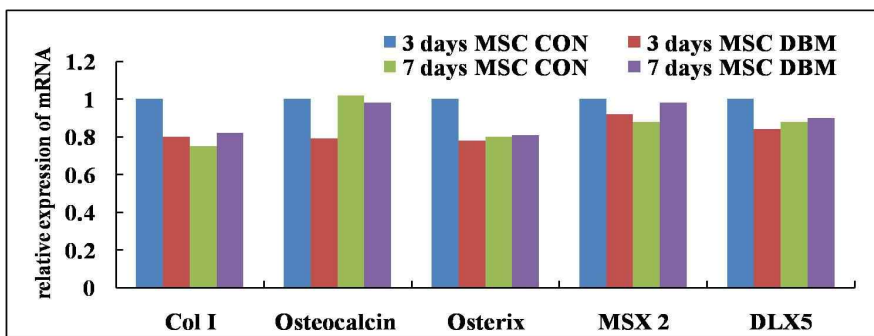
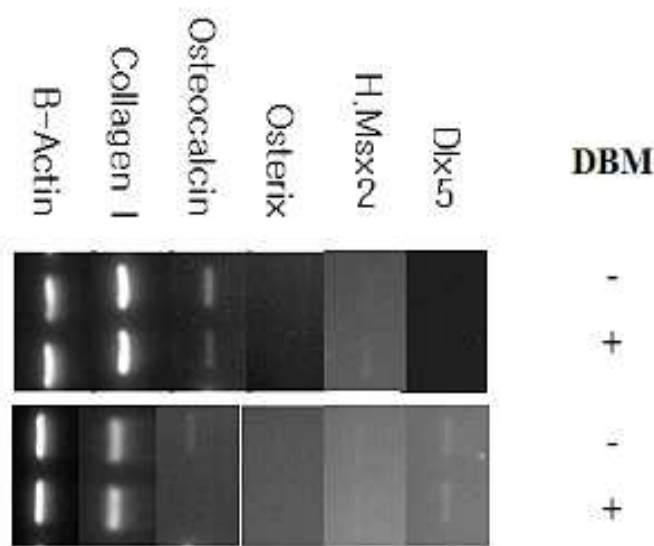


그림 15. RT-PCR and densitometry of mesenchymal stem cell. 5mg/ml of demineralized bone matrix was administrated to the cultures and the cell were cultured for 3 and 7 days. RT-PCR: reverse transcriptase polymerase chain reaction, Col1: collagen type 1, MSC CON: mesenchymal stem cell only group, MSC DBM: mesenchymal stem cell + demineralized bone matrix group.

(3) Alkaline phosphatase, von Kossa 염색

ALP 염색과 von Kossa 염색에서 대조군과 실험군 모두에서 양성 소견을 보였다. 그러나 염색 양상은 골모세포와 비슷하게 탈회골기질이 포함되지 않은 대조군에서 오히려 더 강하거나 비슷한 정도의 염색 소견을 보였다. 정량 분석에서도 동일한 소견을 보였으나, 그 정도는 오차범위 이내로 의미 있는 차이는 아니었다(그림 16, 17).

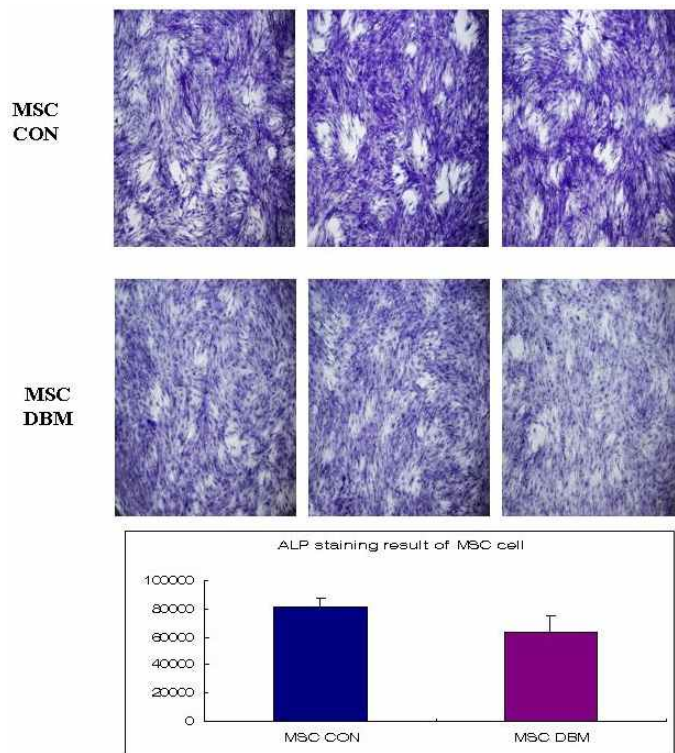


그림 16. Alkaline phosphatase staining of mesenchymal stem cell.

The cells were cultured for 2 weeks(x100). The histogram represents the staining extent with metamorph. Results show no significant difference between control and experimental groups ($p>0.05$). MSC CON: mesenchymal stem cell only group, MSC DBM: mesenchymal stem cell + demineralized bone matrix group.

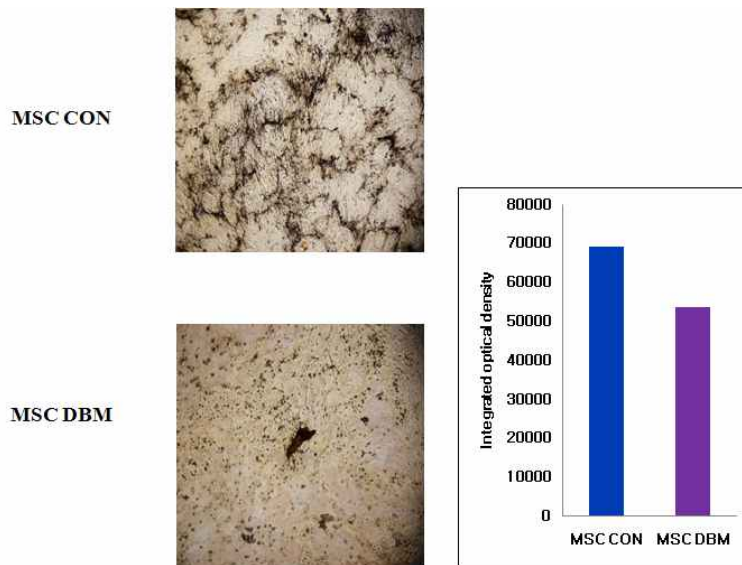
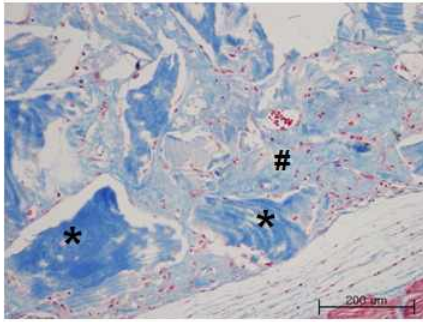


그림 17. von Kossa staining of mesenchymal stem cell.
 The cells were cultured for 4 weeks(x100). The histogram represents the staining extent with metamorph. Results show no significant difference between control and experiemntal groups ($p>0.05$). MSC CON: mesenchymal stem cell only group, MSC DBM: mesenchymal stem cell + demineralized bone matrix group.

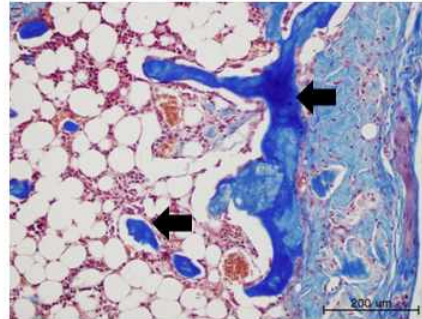
3. In vivo 실험

가. 탈회골기질 단독 또는 골형성단백-2를 포함한 탈회골기질

세포를 사용하지 않고 탈회골기질 단독 또는 50 μ g/ml의 BMP-2를 포함한 탈회골기질을 누드마우스의 피하에 삽입한 후 4주째 조직검사를 시행하였다. 탈회골기질은 반죽 형태로 삽입하였으며, 이는 향후 실험에서 세포 삽입 시 접촉 면적을 넓히고, 세포와 혼합을 비교적 골고루 용이하게 할 수 있는 형태라고 판단하였기 때문이었다. 4주째 시행한 조직 염색 결과에서는 탈회골기질 군에서 새로운 세포외기질 생성을 확인할 수 있었으며, BMP-2를 포함한 탈회골기질군에서는 신생골 형성까지 확인할 수 있었다(그림 18).



DBM paste



BMP2-DBM paste

그림 18. DBM or BMP2 + DBM.

The DBM and rhBMP-2 + DBM were implanted into subcutaneous space of nude mouse for 4 weeks (Trichrome stain, x200). DBM: demineralized bone matrix, BMP: bone morphogenetic protein, *: DBM, #: newly synthesized extracellular matrix, arrow: new bone formation.

나. 세포를 포함한 탈회골기질

(1) 단순 방사선 촬영

4주째 및 8주째 시행한 단순 방사선 촬영에서 대조군 및 세포를 포함한 두개의 실험군 모두에서 방사선 음영 증가 소견을 보였다. 그러나 이 음영 증가는 각 군 간의 뚜렷한 차이가 보이지 않았으며, 4주 및 8주간에도 큰 차이는 보이지 않았다. 그러므로 음영 증가 소견은 삽입한 탈회골기질 자체에 의한 효과로 판단된다.

(2) Hematoxylin and Eosin 염색

탈회골기질만을 삽입한 군에서는 삽입한 탈회골기질 사이사이에 성긴 육아조직과 더불어 많은 혈관이 생성되어 있어 간격이 세포를 삽입한 군에 비하여 넓어져 있는 소견을 관찰할 수 있었으며, 삽입한 탈회골기질의 흡수가 두드러지게 나타났고, 이러한 소견은 8주째로 갈수록 더 증가하는 소견을 보였다(그림 19).

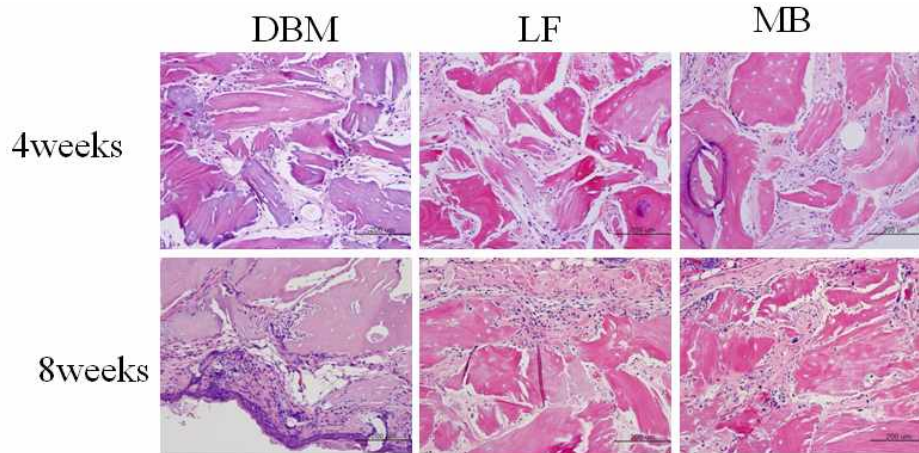


그림 19. Hematoxylin and Eosin staining of in vivo specimen.

The DBM with or without cells were implanted into subcutaneous space of nude mouse for 4 and 8 weeks (x200). DBM: demineralized bone matrix only group, LF: ligamentum flavum cell + demineralized bone matrix group, MB: myoblast + demineralized bone matrix group.

세포를 삽입한 두 군 모두에서 4주째 공통적으로 탈회골기질 사이에 방추상 세포가 풍부하게 분포하고 있어 세포외기질을 형성하고 있었다. 8주째에는 4주째 소견과 큰 차이는 보이지 않았다. 일부에서는 탈회골기질을 따라 세포가 분포하는 것을 볼 수 있었다. 뚜렷한 신생골 형성 부위는 관찰되지 않았다. 본 염색을 통해서도 세포를 삽입한 군에서 탈회골기질 사이에 보다 더 풍부한 세포들이 분포되어 있으며, 탈회골기질 간격이 좁을수록 세포는 더 풍부하였다. 이러한 소견은 8주째까지 유지됨을 알 수 있었다. 그러나 두 실험군 모두에서 뚜렷한 새로운 골형성 부위는 확인 할 수 없었다.

(3) Alkaline phosphatase 염색

H&E 염색에서 탈회골기질 사이에 풍부하게 존재하던 실험군의 세포질 내에는 골성 분화를 보이는 세포에서 나타나는 효소를 확인하는 ALP 염색에서 대조군에 비하여 염색 증가 부분이 많은 것을 확인할 수 있었다. 이런 경향은 두 가지 세포 모두에서 비슷하였다(그림 20).

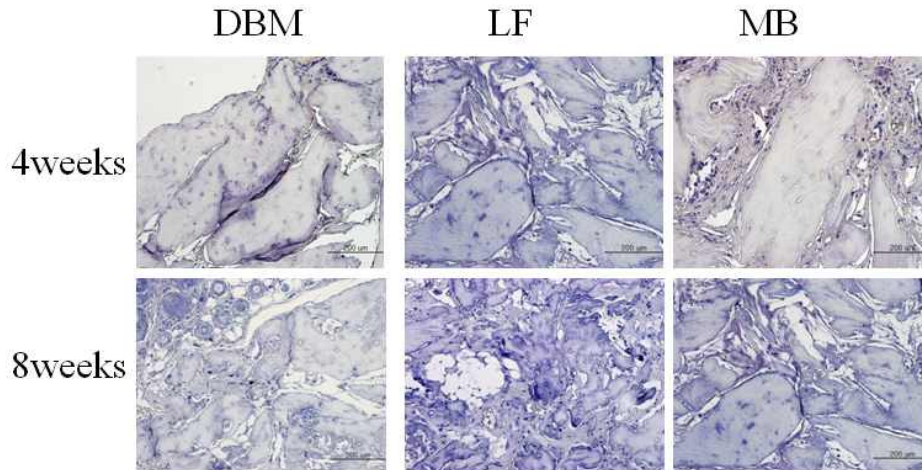


그림 20. Alkaline phosphatase staining of in vivo specimen.

The DBM with or without cells were implanted into subcutaneous space of nude mouse for 4 and 8 weeks (x200). DBM: demineralized bone matrix only group, LF: ligamentum flavum cell + demineralized bone matrix group, MB: myoblast + demineralized bone matrix group.

(4) von Kossa 염색

골성 분화된 세포에 의해 세포외기질에 침착되는 칼슘을 알아보기 위한 von Kossa 염색 소견에서 4주째에는 염색 정도가 열어 결과해석에 어려움이 있었다(그림 21). 그러나 8주째에는 염색 정도가 열긴 하지만 세포를 삽입한 실험군에서 대조군에 비하여 염색이 증가된 소견을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 2가지 세포 모두에서 동일하였다(그림 21).

(5) Osteocalcin 염색

골모세포에만 존재하는 비콜라겐성 단백질인 osteocalcin에 대한 특이 항체를 이용하여 면역염색을 시행함으로써 탈회골기질 사이의 세포가 골모세포로 분화되었는지 여부를 확인하였다. 염색 결과에서 4주째에는 대조군에서 음성을 보였지만, 두 실험군 모두에서 강한 양성을 보였다. 8주째에는 대조군에도 양성을 보였으며, 두실험군 모두에서 양성 염색결과는 지속되었다(그림 22).

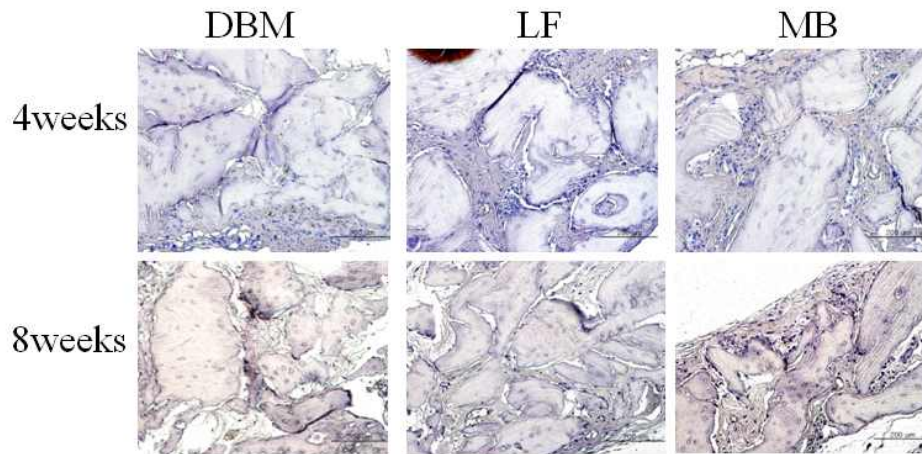


그림 21. von Kossa staining of in vivo specimen.

The DBM with or without cells were implanted into subcutaneous space of nude mouse for 4 and 8 weeks (x200). DBM: demineralized bone matrix only group, LF: ligamentum flavum cell + demineralized bone matrix group, MB: myoblast + demineralized bone matrix group.

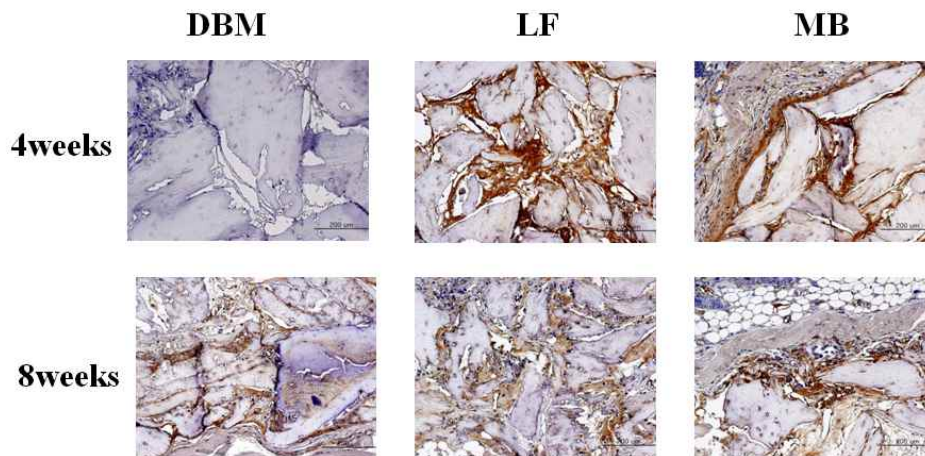


그림 22. Osteocalcin staining of in vivo specimen.

The DBM with or without cells were implanted into subcutaneous space of nude mouse for 4 and 8 weeks(x200). DBM: demineralized bone matrix only group, LF: ligamentum flavum cell + demineralized bone matrix group, MB: myoblast + demineralized bone matrix group.

(6) Bone sialoprotein 염색

무기질화된 세포에서만 그리고 골성 분화의 비교적 후기에 나타나는 칼슘 결합 단백질 중 하나인 Bone sialoprotein(BSP)에 대한 특이 항체를 이용하여 면역 염색을 시행함으로써 세포의 무기질화 정도를 판단하고자 하였다. 염색 결과에서 4주째에는 대조군에서 음성을 보였지만, 두 실험군 모두에서 강한 양성을 보였다. 8주째에는 대조군에도 양성을 보였으며, 두 실험군 모두에서 양성 염색결과는 지속되었다(그림 23).

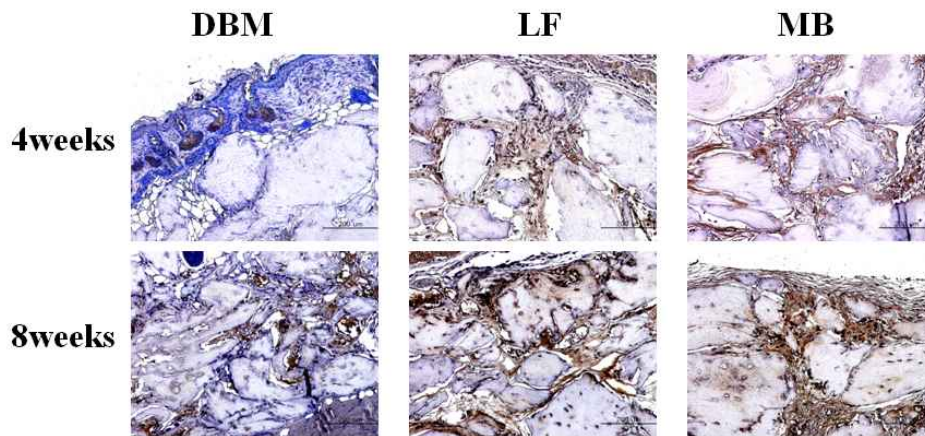


그림 23. Bone sialoprotein staining of in vivo specimen.

The DBM with or without cells were implanted into subcutaneous space of nude mouse for 4 and 8 weeks(x200). DBM: demineralized bone matrix only group, LF: ligamentum flavum cell + demineralized bone matrix group, MB: myoblast + demineralized bone matrix group.

IV. 고찰

자가골은 골형성 세포와 해면골이라는 골전도 지지체 및 골형성 단백질과 같은 골유도 물질을 가진 가장 이상적인 골이식재이다. 그러나 골채취와 연관된 합병증은 물론, 골채취량의 한계 및 골 채취를 위해 추가적인 수술이 요하며 골다공증이 있는 경우는 채취량 및 골질이 떨어져 사용할 수 없다는 단점이 있다.

이러한 이유로 탈회골기질이 자가골의 부분 대체 또는 보충재로서 널리 사용되고 있다. 탈회골기질은 동종골을 산(acid) 처리를 통해서 대부분의 무기질을 제거한 후 얻게 되는 물질로서 여기에는 골형성 단백을 포함한 여러 골유도 단백질과 콜라겐이나 비콜라겐성 단백질을 포함하고 있다^{18,19,26-28}. 그러나 여기에는 골형성 세포는 함유하고 있지 않다. 그러므로 탈회골기질에 골형성 세포를 동시 이식할 수 있다면 이는 자가골의 장점을 모두 포함하고 있어 자가골의 대체재로서의 역할을 할 수 있을 것이다.

골 조직 공학 분야에서 가장 많은 연구가 진행된 골형성 전구세포는 간엽줄기세포이다. 간엽줄기세포는 자가 재생 능력뿐만 아니라 골, 연골, 지방 및 근육 조직으로 분화될 수 있는 다양한 능력을 가진 세포이다. 이런 간엽줄기세포에 골 형성 단백들을 추가함으로써 골형성 분화를 촉진한다는 *in vitro*, *in vivo* 연구들이 보고되었으며^{29,30}, 더 나아가 BMP-2 유전자 조합을 통한 간엽줄기세포의 골형성 유도를 촉진하는 동물실험 보고도 있다³¹⁻³³.

퇴화된 황색인대에서 BMP-2와 BMP-2 수용체가 발견되었다³⁴. 이후 *in vitro*는 물론 *in vivo* 연구에서 황색인대세포에 BMP-2를 첨가함으로써 골형성 자극을 통해 신생골 형성이 보고되었고³⁵, 황색인대에 BMP-2 유전자 과표현을 통해 골형성을 유도하기도 하였다^{23,24,36-38}. 이상의 결과들은 척추관협착증 수술 과정에서 풍부히 얻을 수 있는 황색인대의 자가골 골유합 대체재로서의 가능성을 보여주었다.

근육세포에 BMP를 이용하여 골형성 기전을 알아보기 위한 실험들도 있었다^{18,39,40-45}. 이러한 연구에서 대표적으로 이용되었던 근세포는 생쥐의 허

벽지 근육으로부터 채취한 C2C12 근모세포주로서 BMP-2에 의해 성숙 근육세포로의 분화 과정이 차단되는 것을 확인하였고³⁹, 오히려 전형적인 골모세포의 특징적인 외형을 보이는 분화를 거치는 것을 알 수 있었다⁴⁰. 또한 탈회골기질에 의한 C2C12 근모세포주에서의 골형성도를 알아보기 위한 *in vitro* 및 *in vivo* 실험에서 탈회골기질 성분 중 BMP-2와 BMP-7이 근모세포주에서 골모세포주로의 분화에 관여하며, 정량 분석에서는 탈회골기질의 양에 비례하여 골형성도가 증가함을 보고하였다^{18,41,42}. 본 실험에서 탈회골기질 용량은 각 분석을 위해 well 당 5mg의 양으로 1ml씩 넣어주었는데, 이는 Han 등¹⁸의 연구에서 C2C12 세포에서 가장 높은 골형성 반응을 보였던 용량으로 본 실험에 이를 참고하였다. 그러나 이런 여러 연구에도 불구하고 아직까지는 사람의 허리 근육세포를 이용한 근모세포의 골형성 정도에 대한 보고는 없는 실정이다.

저자는 본 교실에서의 실험이 있기까지 아직까지 골대체물로 전혀 고려되지 않았던 황색인대 뿐만 아니라 수술장에서 자가 채취가 가능한 허리 근육을 이용하여 골대체재 연구를 진행하였다.

골대체재 연구에서 다수를 이룬 BMP-2의 경우는 가격이 비싸고, 골유합 시까지 다량 BMP-2가 필요하며, 또한 골유합을 이룰 때까지 지속적인 제공에 어려움이 있다. 이러한 단점을 극복하기 위해 유전자 조작 연구들이 진행되고 있지만, 아직까지는 그 안정성이 확립되지 않은 상태이다. 그러나 탈회골기질 안에는 BMP-2, BMP-4, BMP-7을 비롯한 다양한 골 성장 인자를 포함하고 있으며^{19,46-48}, 탈회골기질 안의 콜라겐 구조는 골형성 세포의 증식 및 분화를 위한 지지체를 제공할 뿐만 아니라 골유도 성장 인자의 유리를 조절해 주는 역할을 하게 된다⁴⁹. 이러한 탈회골기질의 특징은 골 성장 인자의 지속적인 저장고 역할을 함으로써 골유합을 위한 임상적 적용에 좋은 재료가 될 수 있다. 탈회골기질은 이미 임상에서 골확장재로서 또는 골대체재로서의 유용성이 보고되고 있으며^{20-22,50-52}, 여기에 골형성 세포를 추가하여 사용할 수 있다면 보다 효과적인 골대체재로서 역할을 담당할 수 있을 것으로 판단하였다.

그러나 최근 많은 상품화된 탈회골기질이 있지만 제품에 따라 골형성 능력이 서로 다르고, 함유하고 있는 골형성 인자도 차이가 있다는 보고가 있다^{16,19,47,53,54}. 그러므로 저자는 본 연구에 사용한 상품화된 탈회골기질 내의 BMP-2 용량을 추출 측정하였으며, 그 BMP-2의 함유량은 최근 Wildemann 등¹⁹의 다양한 탈회골기질의 함유량 분석 결과에 비하여 소량이었다 ($3.6 \pm 1.2 \mu\text{g/g}$ vs $1.0667 \mu\text{g/g}$).

4가지 세포는 환자로부터 획득한 재료를 통해 앞서 기술한 방법에 따라 분리 동정 후 2계대 배양까지 시행하여 냉동 보관하였다. 계대 배양하는 과정에서 근모세포는 다른 3가지 세포에 비하여 증식 속도가 늦어 1계대 당 2-3일 정도 추가 일수가 필요하였다.

저자는 4 가지 골형성 전구세포 즉, 황색인대, 근모세포, 골모세포 및 간엽줄기세포에 탈회골기질을 첨가하여 배양하는 과정에서 각 세포의 골형성 능력을 알아보았다. 본 연구의 목적이 골형성도를 알아보는 것이므로, 실험 과정에서 세포가 사멸되지 않고 잘 유지되면서 증식되는지 여부를 확인하는 것이 1차적으로 중요하며, 이를 알아보기 위하여 Cyquant 분석을 시행하였다. Cyquant 분석은 배양 과정의 세포의 밀도를 측정하는데 비교적 간편하고 빠르고 예민한 검사법이다. 본 검사는 염료에 의한 세포내 핵산의 형광 증대를 측정하는 검사법으로, 선형 검출 범위는 2ml당 작게는 50이하에서 200,000개 세포까지 분석이 가능하며 세포 증식 검사는 물론 세포수 계수에도 매우 유용한 검사법이다. 본 실험의 전체 과정동안 시간이 흐름에 따라 세포가 사멸되지 않고 증식되는 것을 확인 할 수 있었으며, 이는 탈회골기질의 첨가에도 같은 결과를 보임으로써, 세포 증식 과정에 탈회골기질이 독성으로 작용하지 않음을 확인할 수 있었다. 또한 동일한 시기에 대조군에 비하여 실험군에서 오히려 세포증식이 모든 세포에서 증가된 소견을 보였는데, 이는 탈회골기질 내에 세포 성장에 관여하는 여러 인자들이 포함되어 있기 때문으로 생각된다¹⁷⁻¹⁹.

본 실험에서 세포에서 골형성도를 알아보기 위해 여러 가지 골형성

표지자에 대한 검사를 시행하였다. Owen 등⁵⁶은 골형성 과정을 증식, 기질 성숙, 그리고 기질 무기질화의 세단계로 나누어 기술하였다. 1단계 증식단계는 세포의 분열 성장 및 성숙과 세포의 기질의 발달 단계로서 제1형 콜라겐이 세포외기질을 형성한다. 2단계인 기질 성숙 단계에서는 ALP, osteopontin(OP), osteonectin(ON)과 같은 초기 골형성 표지자 들이 나타난다. ALP는 골형성 초기에 풍부한 세포막 부착 효소이며⁵⁷, 이 효소의 증가는 조직학적으로 골형성의 증가와 밀접한 상관관계가 있음이 밝혀졌다⁵⁸. 반면에 OP과 ON은 초기 골형성 표지자로서는 비특이적이다⁵⁹. 마지막 단계는 기질의 무기질화 단계로서 이 단계에 특이적인 많은 표지자들이 있으며, von Kossa 염색, BSP II, 그리고 osteocalcin(OC) 등으로 확인이 가능하다. 그 중에 von Kossa 염색은 석회화된 세포외 기질에 특이적인 검사이다⁶⁰. BSP와 OC은 후기 골형성 표지자이다⁶¹. BSP은 무기질화 과정의 세포에서 생성되며, OC은 골모세포에서만 분비된다. Osterix 는 내연골 골형성 과정에 요구되는 전사 인자이다^{62,63}. Miyama 등⁶⁴은 Dlx5가 연골형성에 이어 생성되는 모든 골격 형성 과정과 골모세포의 분화 과정에 관여하는 전사 인자라고 보고하였으며, Cheng 등⁶⁵은 MSX-2도 Dlx5와 더불어 골격 형성 과정뿐만 아니라 골모세포의 분화 과정에 관여하는 전사 인자라고 보고하였다. 그러므로 골형성 정도를 알아보기 위해 1단계의 제1형 콜라겐에 대하여 RT-PCR로 측정하였으며, 2단계 골형성 특이 인자인 ALP에 대하여는 염색검사를 시행하였다. 3단계 골형성 표지자로 OC, osterix, MSX2, Dlx5에 대하여 RT-PCR을 시행하였으며, von Kossa 염색을 더불어 시행하였다.

세포별로 골원성 분화 결과를 살펴보면 황색인대와 근모세포가 비슷한 경향을 보이고, 골모세포와 간엽줄기세포가 또한 비슷한 경향을 보였다. 먼저 황색인대세포와 근모세포에서는 배양 1주일 이내 세포내 골형성 표지자 검사인 RT-PCR 결과에서는 모든 표지자에서 탈회 골기질에 의한 증가 등의 반응을 보이지 않았다. 단지 근모세포에서

는 모든 골형성 표지자에서 3일에 비하여 7일째 증가되는 경향을 보였다. 2주째 및 4주째 시행한 각각의 염색 결과에서는 탈회골기질 군에서 증가된 골형성능을 보였다. 비록 RT-PCR 결과는 의미 있는 결과를 보이지 않았지만, RT-PCR 검사항목이 골형성 단계 중 제1형 콜라겐을 제외하고는 모두 3단계인 기질 무기질화 단계에서 발현되는 골형성 표지자로서 7일까지는 발현이 적었을 것으로 판단된다. Puleo 등⁶⁶은 rhBMP-2를 1 μ g/ml를 첨가하고 줄기세포를 배양한 실험 결과에서 2주 이내에서 OC의 의미 있는 증가를 나타내지 않았다고 보고한 바 있다. 본 실험에 사용한 탈회골기질 5mg내에 포함된 BMP-2를 계산하면 5.335ng의 매우 적은 양이 포함되어 있었기 때문에 이와 같은 RT-PCR 결과를 보인 것으로 생각한다. 그러나 이처럼 적은 양의 BMP-2 함유량에도 불구하고 2주째 및 4주째의 골형성능을 평가한 ALP 염색 및 von Kossa 염색에서 실험군에서의 의미 있게 증가된 골형성능을 보여주었다. 이러한 결과는 황색인대세포 및 사람의 근모세포가 탈회골기질과 더불어 사용 시 골대체제로 사용 가능성이 있음을 보여준다.

그러나 위 두 세포와는 달리 골모세포 및 간엽줄기 세포에서는 다른 결과를 보였다. 골모세포 및 간엽줄기세포의 RT-PCR 결과는 탈회골기질을 첨가한 실험군에서 골형성 표지자의 증가는 관찰되지 않았으며, 실험군과 대조군 모두에서 3일째에 비하여 7일째 오히려 감소하는 경향을 보였다. 배양 2주 및 4주째 ALP 염색 및 von Kossa 염색에서 골형성 배지만을 사용한 대조군에서 풍부한 골형성능을 보여주었고, 이에 비하여 탈회골기질을 첨가한 군에서 골형성능은 비슷하거나, 통계학적으로 의미 있는 정도까지는 아니었지만 오히려 떨어지는 경향을 보였다. 이처럼 간엽줄기세포와 골모세포에서 대조군과 실험군간에 차이가 없었던 것은 세포 자체가 풍부한 골형성능을 가지고 있고, 골형성 배지만으로도 골형성 세포로의 분화가 촉진되는 데서 그 한 원인이 있다고 생각된다. 또한 BMP-2를 이용하였던 여러 문헌 실험²⁹⁻³³ 결과와

달리 본 실험 결과에서 골형성능의 증가를 보이지 않은 것은 본 실험에서 사용한 탈회골기질 내에 함유된 BMP-2의 함유량이 소량으로 골형성 배지에 의한 결과에 추가적인 골형성능을 가질 정도로 충분한 양이 되지 못한 데서 또 다른 원인을 찾을 수 있을 것이다.

탈회골기질의 골형성 능력은 기증자의 나이, 성별, 생리적 조건 및 건강 상태에 따라 달라질 수 있으며, 제품 처리 과정, 탈회 시간, 입자의 크기, 최종 소독 과정 및 운반체(carrier)의 종류에 따라서도 다양한 정도를 보인다는 단점이 있다^{16,19,47,53,54}. 실제로 탈회골기질은 제품에 따라 포함하고 있는 성장 인자의 성분에 많은 차이가 있다고 보고되고 있으며, BMP-2의 양에 대한 보고는 본 실험의 결과를 비롯하여 매우 다양하게 보고되고 있다^{19,47,55}. 다양한 범위를 가진 성장 인자의 함유량은 실험에서의 골형성 능력의 차이는 물론 실제 골유합의 결과에도 많은 차이를 나타낼 것이다¹⁶. 실제 탈회골기질을 이용한 유합 효과에 대한 보고에서도 다양한 결과가 보고되고 있는데^{67,68}, 이 또한 탈회골기질의 다양한 골형성능의 분포 때문으로 생각되며, 이러한 사실은 탈회골기질이 자가골과 함께 쓰는 골확장재로서는 좋지만, 자가골을 대체하는 골대체재로서의 효과를 얻기에는 아직까지는 제한점이 있음을 말해준다.

세포 실험에서 탈회골기질에 의해 골형성능 향상을 보였던 황색인대세포와 근모세포에 대하여 동물 실험을 진행하였다. 탈회골기질의 삽입 형태는 반죽형태를 선택하였다. 동물 실험에서 세포 삽입하지 않고 탈회골기질과 BMP-2(50 μ g/ml)를 삽입한 군에서 4주째 신생골 형성을 확인할 수 있었으며, 이를 통해 BMP-2의 높은 골형성능을 확인할 수 있었다. 탈회골기질과 세포를 골형성 배양액과 혼합하여 누드마우스 피하에 삽입한 후 4주 및 8주째 시행한 조직 검사 소견에서 대조군에 비하여 실험 군에서 탈회골기질 사이에서 증식된 세포 기질을 포함한 많은 세포의 증식을 확인할 수 있었으며, ALP 및 von Kossa 염색을 통해 골형성능의 유지 및 무기질화를 확인할 수 있었다. OC 염색을 통해 탈회골기질 사이의 세포가 골모세포라는 것과 BSP 염색을 통해 이 세포들이 무기질화

과정을 거치고 있음을 다시 확인할 수 있었다. 또한 세포를 동시에 삽입하였던 실험군에서 대조군에 비하여 조기에 무기질화 과정을 거침을 확인할 수 있었다. 그러나 아쉽게도 확실한 신생골 형성 여부는 확인할 수 없었는데, 이는 앞서 언급한 것처럼 탈회골기질 내에 소량의 **BMP-2**가 함유된데 원인이 있다고 생각한다.

저자는 본 연구를 통해서 아직까지 사용하지 않았던 사람 척추 기립근의 근육세포로부터 추출한 근모세포도 골 조직 공학의 골형성 전구세포 중 하나로서 이용될 수 있다는 점을 확인한 것과, 탈회골기질과 세포를 직접 삽입하는 방법으로도 세포의 증식 및 골모세포로의 분화를 확인함으로써 세포를 직접 탈회골기질과 더불어 골 조직 공학적으로 임상에 사용할 수 있다는 점을 확인한데 큰 의의가 있다고 본다.

본 실험을 통해 골형성 전구세포의 확장과 세포의 직접 사용이라는 의의를 얻긴 했지만, 탈회골기질의 단점으로 인해 신생골 형성을 직접 확인하지 못하였고, 이는 처음 실험 시 구상하였던 탈회골기질과 골형성 전구세포를 통한 골대체재의 확보라는 목표를 얻는 데까지는 도달하지 못하였다. 그렇다면 앞서 기술하였던 탈회골기질의 장점인 골전도 기능, 골유도 기능 및 골유도 물질의 지속적인 분비와 같은 장점을 살리면서 골형성 전구세포와 더불어 사용하여 자가골의 대체 효과를 얻기 위해서는 탈회골기질 내 다양한 골유도물질 함유량의 정량화에 대한 보완이 필요하다. 그 하나는 탈회골기질의 제조 과정 및 보관 등에 대한 개선이 있을 수 있으며, 또 하나는 본 연구를 통해 확인하였던 4가지 골형성 전구세포들에 **BMP-2** 등의 골유도 성장인자 및 국소인자를 과잉으로 표현시킬 수 있는 유전자 전달 운반체를 사용한다면 탈회골기질의 단점을 어느 정도 보완할 수 있을 것으로 생각하며 이에 대한 향후 지속적인 연구들이 필요할 것으로 생각한다.

V. 결론

본 연구는 황색인대, 근모세포, 골모세포 및 간엽줄기세포를 탈회골기질과 더불어 사용함으로써 자가골의 대체재로서의 활용 가능성에 대하여 연구하였다.

탈회골기질은 위 4가지 세포의 증식 과정에 세포독성이 없음을 확인하였고, 4가지 세포 모두 탈회골기질과 동시 배양 시 골형성도를 나타내었으며 그 중 황색인대와 근모세포는 탈회골기질에 의한 골형성도가 증가함을 확인할 수 있었다. 이 두 세포 각각과 탈회골기질의 혼합물을 동물 피하에 직접 삽입하는 실험에서도 비록 신생골 형성은 확인하지 못하였지만 세포의 증식, 골모세포로의 분화 및 세포의 무기질화를 확인할 수 있었다. 본 실험을 통해 저자는 골형성 전구세포 연구에 아직까지 사용하지 않았던 사람 척추 기립근의 근육세포로부터 추출한 근모세포도 골 조직 공학의 골형성 전구세포의 새로운 후보자로 사용 될 수 있음을 확인하였고, 골형성능을 가진 전구세포를 직접 탈회골기질과 혼합하여 임상에 적용할 수 있는 가능성을 또한 확인하였다. 그러나 탈회골기질 내 다양한 골형성 인자들의 함유량이 정량화되지 못해 아직까지는 자가골 대체 효과를 얻기에는 제한점이 있음을 알 수 있었다.

참고 문헌

1. Arrington ED, Smith WJ, Cambers HG, Bucknell AL, Davino NA. Complications of iliac crest bone graft harvesting. Clin Orthop Relat Res 1996;329:300-9.
2. Banwart JC, Asher MA, Hassanein RS. Iliac crest bone graft harvest donor site morbidity. A statistical evaluation. Spine 1995;20:1055-60.
3. Younger EM, Chapman MW. Morbidity at bone graft donor sites. J Orthop Trauma 1989;3:192-5.
4. Kurz LT, Garfin SR, Booth JE Jr. Harvesting autogenous iliac bone grafts. A review of complications and techniques. Spine 1989;14:1324-31.
5. Fernyhough JC, Schimandle JJ, Weigel MC. Chronic donor site pain complicating bone graft harvesting from the posterior iliac crest for spinal fusion. Spine 1992;17:1474-80.
6. Mankin HJ, Gebhardt MC. Long term results of allograft replacement in the management of bone tumors. Clin Orthop Relat Res 1996;324:86-97.
7. Simonds RJ, Holmberg SD, Hurwitz RL, Coleman TR, Bottenfield S, Conley LJ, et al. Transmission of human immunodeficiency virus type 1 from a seronegative organ and tissue donor. N Engl J Med 1992;326:726-32.
8. Dai LY, Jiang LS. Single-level instrumented posterolateral fusion of lumbar spine with beta-tricalcium phosphate versus autograft: a prospective, randomized study with 3-year follow-up. Spine 2008;33:1299-304.
9. Moore WR, Graves SE, Bain GI. Synthetic bone graft substitutes.

- ANZ J Surg 2001;71:354-61.
10. Bruder SP, Fox BS. Tissue engineering of bone. Cell based strategies. Clin Orthop Relat Res 1999;367:S68-83.
 11. Bucholz RW. Nonallograft osteoconductive bone graft substitutes. Clin Orthop Relat Res 2002;395:44-52.
 12. Finkemeier CG. Bone-grafting and bone-graft substitutes. J Bone Joint Surg Am 2002;84:454-64.
 13. Lane JM, Tomin E, Bostrom MP. Biosynthetic bone grafting. Clin Orthop Relat Res 1999;367:S107-17.
 14. Price CT, Connolly JF, Carantzas AC, Ilyas I. Comparison of bone grafts for posterior spinal fusion in adolescent idiopathic scoliosis. Spine 2003;28:793-8.
 15. Berven S, Tay BK, Kleinstueck FS, Bradford DS. Clinical applications of bone graft substitutes in spine surgery: consideration of mineralized and demineralized preparations and growth factor supplementation. Eur Spine J 2001;10:S169-77.
 16. Peterson B, Whang PG, Iglesias R, Wang JC, Lieberman JR. Osteoinductivity of commercially available demineralized bone matrix. J Bone Joing Surg Am 2004;86:2243-50.
 17. Adkisson HD, Strauss-Schoenberger J, Gillis M, Wikins R, Jackson M, Hruska KA. Rapid quantitative bioassay of osteoinduction. J Orthop Res 2000;18:508-11.
 18. Han B, Tang B, Nimni ME. Quantitative and sensitive in vitro assay for osteoinductive activity of demineralized bone matrix. J Orthop Res 2003;21:648-54.
 - 19 Wildemann B, Kadow-Romacker A, Haas NP, Schmidmaier G. Quantification of various growth factors in different demineralized bone matrix preparations. J Biomed Mater Res A 2007;81:437-42.

20. Cobos JA, Lindsey RW, Gugala Z. The cylindrical titanium mesh cage for treatment of a long bone segmental defect: description of a new technique and report of two cases. *J Orthop Trauma* 2000;14: 54-59.
21. Martin GJ Jr, Boden SD, Titus L, Scarborough NL. New formulations of demineralized bone matrix as a more effective graft alternative in experimental posterolateral lumbar spine arthrodesis. *Spine* 1999;24:637-45.
22. Norone MA, Boden SD. Experimental posterolateral lumbar spine fusion with a demineralized bone matrix gel. *Spine* 1998;23:159-67.
23. Moon SH, Park SR, Kim H, Kwon UH, Kim KH, Kim HS, et al. Biologic modification of ligamentum flavum cells by marker gene transfer and recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Spine* 2004;29:960-5.
24. Yang IH, Kim H, Kwon UH, Lee KI, Jun JA, Kim JH, et al. De novo osteogenesis from human ligamentum flavum by adenovirus-mediated bone morphogenetic protein-2 gene transfer. *Spine* 2005;24: 2749-54.
25. Diduch DR, Coe MR, Joyner C, Owen ME, Balian G. Two cell lines from bone marrow that differ in terms of collagen synthesis, osteogenic characteristics and matrix mineralization. *J Bone Joint Surg Am* 1993;75:92-105.
26. Russell JL, Block JE. Clinical utility of demineralized bone matrix for osseous defects, arthrodesis, and reconstruction: impact of precessing techniques and study methodology. *Orthopedics* 1999;22:524-31, quiz 532-3.
27. Urist MR. A morphogenetic matrix for differentiation of bone tissue. *Calcif Tissue Res* 1970;Suppl:98-101.

28. Urist MR. Bone: formation by autoinduction. *Science* 1965;150:893-9.
29. Malaval L, Modrowski D, Gupta AK, Aubin JE. Cellular expression of bone-related proteins during in vitro osteogenesis in rat bone marrow stromal cell cultures. *J Cell Physiol* 1994;158:555-72.
30. Friedman MS, Long MW, Hankenson KD. Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells is regulated by bone morphogenetic protein-6. *J Cell Biochem* 2006;98:538-54.
31. Zachos TA, Shields KM, Bertone AL. Gene-mediated osteogenic differentiation of stem cells by one morphogenetic proteins-2 or - 6. *J Orthop Res* 2006;24:1279-91.
32. Meinel L, Hofmann S, Betz O, Fajardo R, Merkle HP, Langer R, et al. Osteogenesis by human mesenchymal stem cells cultured on silk biomaterials: Comparison of adenovirus mediated gene transfer and protein delivery of BMP-2. *Biomaterials* 2006;27:4993-5002.
33. Cheng SL, Lou J, Wright NM, Lai CF, Avioli LV, Riew KD. In vitro and in vivo induction of bone formation using a recombinant adenoviral vector carrying the human BMP-2 gene. *Calcif Tissue Int* 2001;68:87-94.
34. Hayashi K, Ishidou Y, Yonemori K, Nagamine T, Origuchi N, Maeda S, et al. Expression and localization of bone morphogenetic proteins and BMP receptors in ossification of the ligamentum flavum. *Bone* 1997;21:23-30.
35. Specchia N, pagnotta A, Gigante A, Logroscino G, Toesca A. Characterization of cultured human ligamentum flavum cells in lumbar spine stenosis. *J Orthop Res* 2001;19:294-300.
36. Mimatsu K, Kishi S, Hashizume Y. Experimental chronic compression on the spinal cord of the rabbit by ectopic bone formation in the ligamentum flavum with bone morphogenetic protein. *Spinal Cord*

- 1997;35:740-6.
37. Saito H, Mimatsu K, Sato K, Hashizume Y. Histopathologic and morphometric study of spinal cord lesion in a chronic cord compression model using bone morphogenetic protein in rabbits. *Spine* 1992;17:1368-74.
 38. Tanaka H, Nagai E, Murata H, Tsubone T, Shirakura Y, Sugiyama T, et al. Involvement of bone morphogenetic protein-2(BMP-2) in the pathological ossification process of the spinal ligament. *Rheumatology* 2001;40:1163-8.
 39. Katagiri T, Yamaguchi A, Komaki M, Abe E, Takahashi N, Ikeda T, et al. Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblast into the osteoblast lineage. *J Cell Biol* 1994;127:1755-66.
 40. Katagiri T, Akiyama S, Namiki M, Komaki M, Yamaguchi A, Rosen V, et al. Bone morphogenetic protein-2 inhibits terminal differentiation of myogenic cells by suppressing the transcriptional activity of MyoD and Myogenin. *Exp Cell Res* 1997;230:342-51.
 41. Behnam K, Murray SS, Brochmann EJ. BMP stimulation of alkaline phosphatase activity in pluripotent mouse C2C12 cells is inhibited by dermatopontin, one of the most abundant low molecular weight proteins in demineralized bone matrix. *Connect Tiss Res* 2006;47:271-7.
 42. Gersbach CA, Guldborg RE, Garcia AJ. In vitro and in vivo osteoblastic differentiation of BMP-2- and Runx2-Engineered skeletal myoblasts. *J Cell Biochem* 2007;100:1324-36.
 43. Yamashita M, Otsuka F, Mukai T, Otani H, Inagaki K, Miyoshi T, et al. Simvastatin antagonizes tumor necrosis factor-alpha inhibition of bone morphogenetic protein-2-induced osteoblast differentiation by

- regulating Smad signaling and Ras/Rho-mitogen-activated protein kinase pathway. *J Endocrinol* 2008;196:601-12.
44. Yang S, Zhao L, Yang J, Chai D, Zhang M, Zhang J, et al. δ EF1 represses BMP-2-induced differentiation of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage. *J Biomed Sci* 2007;14:663-79.
 45. Chen Y, Luk KD, Cheung KM, Xu R, Lin MC, Lu WW, et al. Gene therapy for new bone formation using adeno associated viral bone morphogenetic protein-2 vectors. *Gene Ther* 2003;10:1345-53.
 46. Adkisson HD, Stauss-Schoenberger J, Gillis M, Wikins R, Jackson M, Hruska KA. Rapid quantitative bioassay of osteoinduction. *J Orthop Res* 2001;18:503-11.
 47. Pietrzak WS, Woodell-May J, McDonald N. Assay of bone morphogenetic protein-2,-4, and -7 in human demineralized bone matrix. *J Craniofac Surg* 2006;17:84-90.
 48. Liu G, Shu C, Cui L, Liu W, Cao Y. Tissue-engineered bone formation with cryopreserved human bone marrow mesenchymal stem cells. *Cryobiology* 2008;56:209-15.
 49. Han B, Yang Z, Nimni M. Effects of moisture and temperature on the osteoinductivity of demineralized bone matrix. *J Orthop Res* 2005;23:855-61.
 50. Glassman SD, Carreon L, Djurasovic M, Campbell MJ, Puno RM, Johnson JR, et al. Posterolateral lumbar spine fusion with INFUSE bone graft. *Spine J* 2007;7:44-9.
 51. Schizas C, Triantafyllopoulos D, Kosmopoulos V, Tzinieris N, Stafylas K. Posterolateral lumbar spine fusion using a novel demineralized bone matrix: a controlled case pilot study. *Arch Orthop Trauma Surg* 2008;128:621-5.
 52. Weinzapfel B, Son-Hing JP, Armstrong DG, Blakemore LC,

- Poe-Kochert C, Thompson GH. Fusion rates after thoracoscopic release and bone graft substitutes in idiopathic scoliosis. *Spine* 2008;33:1078-83.
53. Wang JC, Alanay A, Mark D, Kanim LE, Campbell PA, Dawson EG, et al. A comparison of commercially available demineralized bone matrix for spinal fusion. *Eur Spine J* 2007;16:1233-40.
54. Bae HW, Zhao L, Kanim LE, Wong P, Delamarter RB, Dawson EG. Intersubject and intrasubject variability of bone morphogenetic proteins in commercially available demineralized bone matrix products. *Spine* 2006;31:1299-306.
55. Blum B, Moseley J, Miller L, Richelsoph K, Haggard W. Measurement of bone morphogenetic proteins and other growth factors in demineralized bone matrix. *Orthopedics* 2004;27:S161-5.
56. Owen TA, Aronow M, Shalhoub V, Barone LM, Wilming L, Tassinari MS, et al. Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. *J Cell Physiol* 1990;143:420-30.
57. Rodan GA, Noda M. Gene expression in osteoblastic cells. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 1991;1:85-98.
58. Ljunghall S, Lindh E. Assessment of bone turnover with biochemical markers. *J Int Med* 1989;225:219-20.
59. Yao KL, Todescan R Jr, Sodek J. Temporal changes in matrix protein synthesis and mRNA expression during mineralized tissue formation by adult rat bone marrow cells in culture. *J Bone Miner Res* 1994;9:231-40.
60. Puchtler H, Meloy SN. Demonstration of phosphates in calcium

- deposits: a modification of von Kossa's reaction. *Histochemistry* 1978;56:177-85.
61. Malaval L, Modrowski D, Gupta AK, Aubin JE. Cellular expression of bone-related proteins during in vitro osteogenesis in rat bone marrow stromal cell cultures. *J Cell Physiol* 1994;158:555-72.
 62. Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, et al. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* 2002;108:17-29.
 63. Lee MH, Kwon TG, Park HS, Wozney JM, Ryoo HM. BMP-2 induced Osterix expression is mediated by Dlx5 but is independent of Runx2. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;309:689-94.
 64. Miyama K, Yamada G, Yamamoto TS, Takagi C, Miyado K, Sakai M, et al. A BMP-inducible gene, dlx5, regulates osteoblast differentiation and mesoderm induction. *Dev Biol* 1999;208:123-33.
 65. Cheng SL, Shao JS, Charlton-Kachigian N, Loewy AP, Towler DA. MSX2 promotes osteogenesis and suppresses adipogenic differentiation of multipotent mesenchymal progenitors. *J Biol Chem* 2003;278:45969-77.
 66. Puleo DA. Dependence of mesenchymal cell responses on duration of exposure to bone morphogenetic protein-2 in-vitro. *J Cell Physiol* 1997;173:93-101.
 67. Picetti GD, Pang D, Bueff HU. Thoracoscopic techniques for the treatment of scoliosis: early results in procedure development. *Neurosurgery* 2002;51:978-84.
 68. Price CT, Connolly JF, Carantzas AC, Ilyas I. Comparison of bone grafts for posterior spinal fusion in adolescent idiopathic scoliosis. *Spine* 2003;15:793-8.

Abstract

Osteogenic effect of human ligamentum flavum, myoblast, osteoblast and mesenchymal stem cell by demineralized bone matrix

Eun Su Moon

*Department of Medicine
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Hui Wan Park)

An ideal bone substitute should have three important properties, namely: osteogenetic potential, osteoinductive nature and osteoconduction to provide scaffold for bone formation. Demineralized bone matrix(DBM) has both osteoinductive, as well as an additional capability to release these osteoinductive factors in a controlled and timely manner. If we are able to use the osteoprogenitor cells with DBM together, then we can have a combination which can be an ideal bone graft substitute.

Commercially available DBM was used in our study and we analyzed the content of BMP-2 in DBM. Tissue for cell culture was obtained during operative spinal procedures with the informed consent of the patients. Each cell obtained from the tissue was cultured primarily up to two phase and then cryopreserved. The cultured cells were divided into two groups for osteogenic differentiation. The control group used an osteogenic media only while the experimental group used an osteogenic media supplemented with DBM. Cellular proliferation was assessed by Cyquant assay. The Reverse Transcription- Polymerase Chain Reaction(RT-PCR) for collagen type I, osteocalcin, osterix, MSX2, and Dlx5 were performed on third and seventh day of osteogenic cellular culture. Alkaline phosphatase(ALP) staining at 2 weeks and von Kossa staining at 4 weeks, including quantification of staining

results using Metamorph, were performed for the evaluation of osteogenesis effect.

The content of BMP-2 in DBM was extremely small amount of 1.0667 μ g/g. Results of cyquant assay showed that there was no cytotoxic effect on various cell types and that there was an increase in cell number with time. Results of RT-PCR showed that there was no increase in number of various osteogenic markers in the experimental group as compared to the control group. The results of ALP and von Kossa staining showed that there was a statistically significant increase in the number of ligamentum flavum cells and myoblasts in the experimental group. Although there was an adequate osteogenic potential in the osteoblasts and mesenchymal stem cells of both control and experimental group, but still a lower tendency of osteogenesis was found in the experimental group(no statistically significant).

We also have an additional animal study with ligamentum flavum cells and myoblast which had good results in vitro. We inserted the mixture-culture media with cells and DBM into the subcutaneous space of nude mouse. Hematoxylin and Eosin (H&E) stain, ALP stain and von-Kossa stain were performed in order to quantify the degree of mineralization at four and eight weeks. Additionally, immunostain for osteocalcin and bone sialoprotein were performed to confirm whether the cells would differentiate into osteoblasts. Our results showed a proliferation of cells with osteogenic potential in both cells. Immunostaining results showed that the experimental group treated together with DBM showed proliferated cell osteoblasts, which had earlier osteogenic differentiation than the control group.

In conclusion, there was no evidence of any cytotoxicity during the co-culture of DBM with all four cells and a good osteogenic potential was seen in all four cells during co-culture with DBM. We could also see a significant increase in osteogenic potential of ligamentum flavum cells and osteoblast in spite of a small content of BMP-2 in DBM. Direct cell implantation by ligamentum flavum cells and myoblasts showed cellular proliferation and increased early osteogenic potential

This finding gives us the myoblast of human erector muscle as a new

candidate of osteoprogenitor cell in bone tissue engineering These also open up the possibility of direct cell implantation with DBM as a bone substitute clinically, but may prove also to be a limitation in terms its use with DBM as an autobone substitute due to its variable content of osteogenic protein.

Key Words : demineralized bone matrix, ligamentum flavum, myoblast, osteoblast, mesenchymal stem cell, osteogenesis.