

성장 인자가 배양된 토끼의 심부 굴곡 건 세포에서 제1형 교원질 합성에 미치는 영향

신동은* · 강호정 · 김현우 · 강응식 · 한수봉 · 김성재 · 한창동 · 이우석†

포천중문 의과대학교 분당차병원 정형외과학교실*, 연세대학교 의과대학 정형외과학교실, 건양대학교 의과대학 정형외과학교실†

목적 : 토끼의 굴곡 건 세포를 분리 배양한 다음 네가지 종류의 성장인자(TGF- β , IGF-I, EGF, PDGF)를 단독 또는 복합 투여 후 제 1형 교원질의 mRNA의 표현 변화와 교원질의 형성정도를 분석하여, 건 조직에 대한 성장인자의 효과를 규명하고, 건의 치유에 이용될 수 있는 성장인자를 알아 보고자 함이다.

대상 및 방법 : 토끼의 굴곡 건 세포를 분리하여 0.5% 우태 혈청이 함유된 배양액과 함께 배양하였다. 네 가지 종류의 성장인자를 10 ng/mL씩 단독 또는 복합 투여하여 배양하고, 대조군은 성장인자를 투여하지 않고 배양하였다. 배양 5일, 10일, 15일에 제 1형 교원질 mRNA 발현 정도는 Northern blot 분석법으로, 배양액에서의 제 1형 교원질 생성 정도는 Western blot 분석법으로 분석 하였다.

결과 : 제 1형 교원질 mRNA의 발현은 IGF, PDGF 단독 투여군과 PDGF/EGF, PDGF/IGF 복합 투여군에서 대조군에 비하여 통계학적으로 의미 있게 증가 하였다(p<0.05). 세포 배양액에서의 제 1형 교원질 생성 정도도 단독 투여군 및 복합 투여군 모두 제1형 교원질 mRNA의 발현과 비슷한 양상을 보였다.

결론 : 성장인자 중 PDGF와 IGF 단독 투여와 PDGF/IGF, PDGF/EGF 복합 투여가 토끼 굴곡건의 치유과정에서 가장 효과적인 성장인자로 사료되었다.

색인 단어 : 건 세포 배양, 성장 인자, 제 1형 교원질, 토끼 굴곡 건

서 론

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^{4,11)}. 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 있다⁶⁾.

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 알아보고자 함이다.

대상 및 방법

생후 6개월 이상 경과된 New Zealand산 흰 토끼(2.2-2.5 kg)의 앞발을 채취한 다음 털을 자르고 소독 후에 무균적 방법으로 심부 굴곡 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 흔들어 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.

토끼의 심부 굴곡 건에서 분리 배양한 건 세포를 0.5% 우태 혈청이 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

통신저자: 강 호 정
서울시 강남구 도곡동 146-92
영동세브란스병원 정형외과
TEL: 02-3497-3410 · FAX: 02-573-5393
E-mail: os3410@yumc.yonsei.ac.kr

*본 논문은 보건 의료 기술 연구 개발 사업부의 HMP-99-E-05-0001의 지원 하에 이루어졌음.

- FBS군: 10% 우태혈청만 함유된 배양액에서 배양한 군
- 단독 투여군
- EGF군: 우태혈청과 EGF가 10 ng/mL 함유된 배양액으로 배양한 군
- IGF군: 우태혈청과 IGF-I이 10 ng/mL 함유된 배양액으로 배양한 군
- PDGF군: 우태혈청과 PDGF가 10 ng/mL 함유된 배양액으로 배양한 군
- TGF군: 우태혈청과 TGF- β 가 10 ng/mL 함유된 배양액으로 배양한 군

복합 투여군

- PDGF+EGF군: 우태혈청과 PDGF 10 ng/mL와 EGF 10 ng/mL 함유된 배양액으로 배양한 군
- PDGF+IGF군: 우태혈청과 PDGF 10 ng/mL와 IGF-I 10 ng/mL 함유된 배양액으로 배양한 군
- PDGF+TGF군: 우태혈청과 PDGF 10 ng/mL와 TGF- β 10 ng/mL 함유된 배양액으로 배양한 군
- IGF+EGF군: 우태혈청과 IGF-I 10 ng/mL와 EGF 10 ng/mL 함유된 배양액으로 배양한 군
- TGF+EGF군: 우태혈청과 TGF- β 10 ng/mL와 EGF 10 ng/mL 함유된 배양액으로 배양한 군
- TGF+IGF군: 우태혈청과 TGF- β 10 ng/mL와 IGF-I 10 ng/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°C에서 보관하였다가 추후 실험에 사용하였고, 각 군마다 3회 반복 하였다.

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)를 이용하여 각 배지 내의 세포의 증식 정도를 분석하였다. 20 μ L의 MTS/PMS 용액을 well에 넣어준 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 4시간 배양 후 ELISA plate reader로 490 nm의 흡광도를 측정하였다.

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% 아가로스 겔(agarose gel)에서 전기영동을 실시하였다. 전기영동된 아가로스 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 1형 교원질 cDNA 소식자(probe)는 토끼의 제 1형 교원질의 α 2 chain의 mRNA를 기초로 하여 역전사 증합 효소 연쇄 반응을 통하여 제작하였으며, 이는 cDNA 배열 순서(sequencing)를 통하여 확인하였다. 제작된 cDNA 소식자를 Rediprime kit (Amersham, UK)를 이용하여 ³²P 방사선 동위원소로 표지(labeling)를 실시한 다음 준비된 나일론 막에 보합 결합을 하고, 나일론 막을 세척한 후 phosphoimager로 정량 분석을 하였다.

각 군의 배양 세포를 배양 5, 10, 15일에 세포배양액을 분리한 후 Bradford방법을 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°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 전기영동하였다. 전기이동 완충액(20 mM Tris-HCl, 150 mM glycine, 20% Methanol, pH 8.3)을 이용하여 전기이동 장치(transfer system)를 만든 다음 4°C 저온실에서 전기영동이 끝난 겔을 나이트로 셀룰로즈 흡착지와 겹친 후 전기이동 단위(transfer unit)에 장착하고, 일정한 전압(40 V)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 3시간 이상 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 1:7,500으로 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.

자료는 SAS Ver 6.12 (SAS Institute Inc., Cary, NC)를 이용하여 ANOVA (Schaffe F-test)로 수행하였다. p값이 0.05 이하를 통계적으로 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

결 과

1. 세포 증식률

성장인자의 단독 투여시 세포 증식률은 IGF군, PDGF군에서

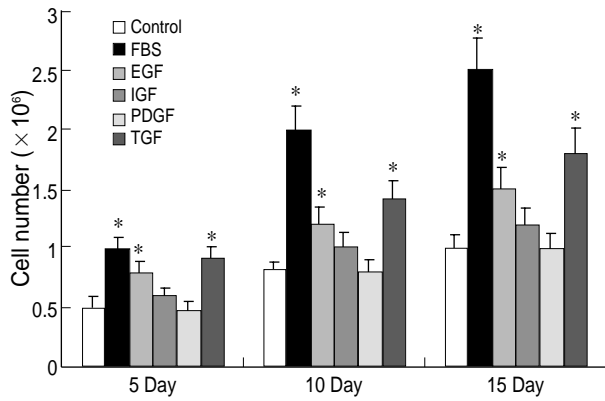


Fig. 1. Cell proliferation assay in single growth factor groups. The 10% FBS group showed the highest cell proliferation. The EGF and TGF groups showed increased cell proliferation through the test period comparing to the control, IGF and PDGF groups. *: statistical significance.

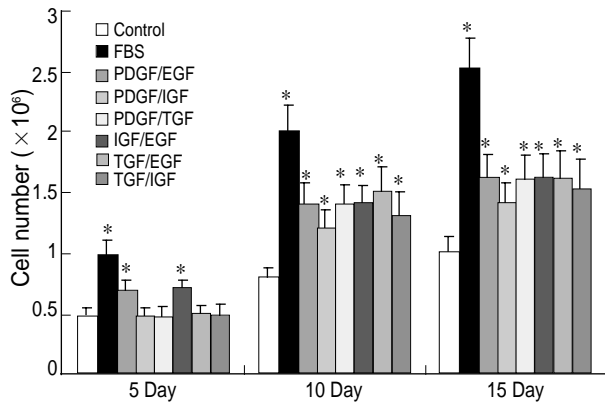


Fig. 2. Cell proliferation assay in combination growth factor groups. The 10% FBS group showed the highest cell proliferation. On the 5th day, the PDGF/EGF and IGF/EGF groups showed increased cell proliferation comparing to the control group. On the 10th and 15th days, all groups showed increased cell proliferation compared to the control group. *: statistical significance.

는 5일, 10일, 15일째 모두 대조군에 비하여 차이가 없었으나, 10% 우태혈청군의 경우 세포 증식률은 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 증식률을 보였다(Fig. 1). 성장인자 복합 투여 5일째는 10% 우태혈청군과 PDGF/EGF, IGF/EGF군에서 대조군에 비해 세포 증식률이 의미있게 증가하였고, 10일과 15일째는 10% 우태혈청군을 비롯하여 성장인자를 복합적으로 투여한 모든 군에서 대조군에 비하여 세포 증식률이 통계적으로 의미 있게 증가하였다($p < 0.05$)(Fig. 2).

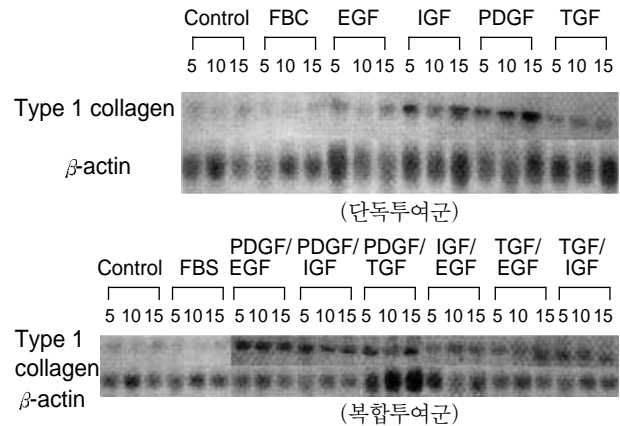


Fig. 3. Northern Blot Analysis for type I collagen mRNA expression in single and combination growth factor groups.

2. 제 1형 교원질 mRNA의 발현

성장 인자 단독 투여 5일 후 제 1형 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 제 1형 교원질 mRNA의 발현은 보이지 않았다(Fig. 3). 성장 인자 복합 투여 5일 후 제 1형 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 조건을 보였으며, TGF/EGF군에서는 대조군과 통계학적으로 의미 있는 차이가 없었다. PDGF/IGF군에서 가장 높은 제 1형 교원질 mRNA의 발현을 보였다(Fig. 3, 4).

성장 인자 단독 투여 10일 후에는 IGF군과 PDGF군의 경우 제 1형 교원질 mRNA의 발현이 더욱 증가하여 대조군에 비하여 각각 $350 \pm 23\%$, $540 \pm 28\%$ 증가하였으며($p < 0.05$), PDGF군에서 가장 높은 제 1형 교원질 mRNA의 발현을 보였다(Fig. 5). 성장 인자 복합 투여 10일 후에는 PDGF/EGF군과 PDGF/IGF군에서만 대조군에 비하여 각각 $200 \pm 17\%$, $170 \pm 11\%$ 로 제 1형 교원질 mRNA의 발현이 증가하였다($p < 0.05$).

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 감소 하였다. 15일째도 PDGF군에서 가장 높은 제 1형 교원질 mRNA의 발현을 보였다(Fig. 6). 성장 인자 복합 투여 15일 후에도 PDGF/EGF군과 PDGF/IGF군에서 대조군에 비하여 각각 $150 \pm 8\%$, $140 \pm 13\%$ 로 제 1형 교원질 mRNA의 발현이 증가하였으며($p < 0.05$), 5일째와 10일째 대조군에 비해 제 1형 교원질 mRNA의 발현이 적었던 IGF/EGF군에서 15일째는 대조군에 비하여 제 1형 교원질

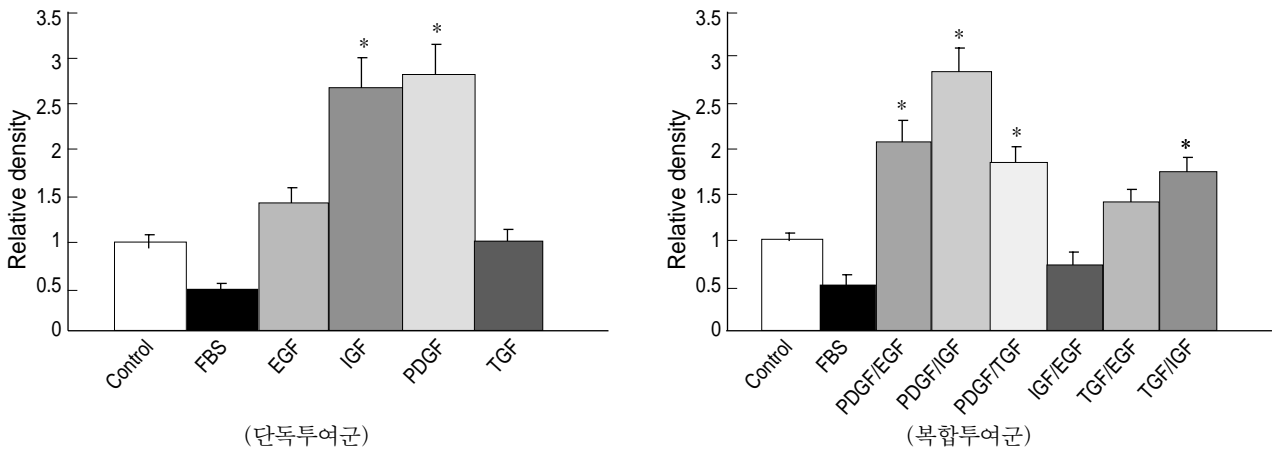


Fig. 4. Type I collagen mRNA expression on the 5th day for the single and the combination growth factor groups. IGF, PDGF, PDGF/IGF, PDGF/EGF, PDGF/TGF and TGF/IGF showed a significant increase in type I collagen mRNA expression comparing to the control group. *: statistical significance.

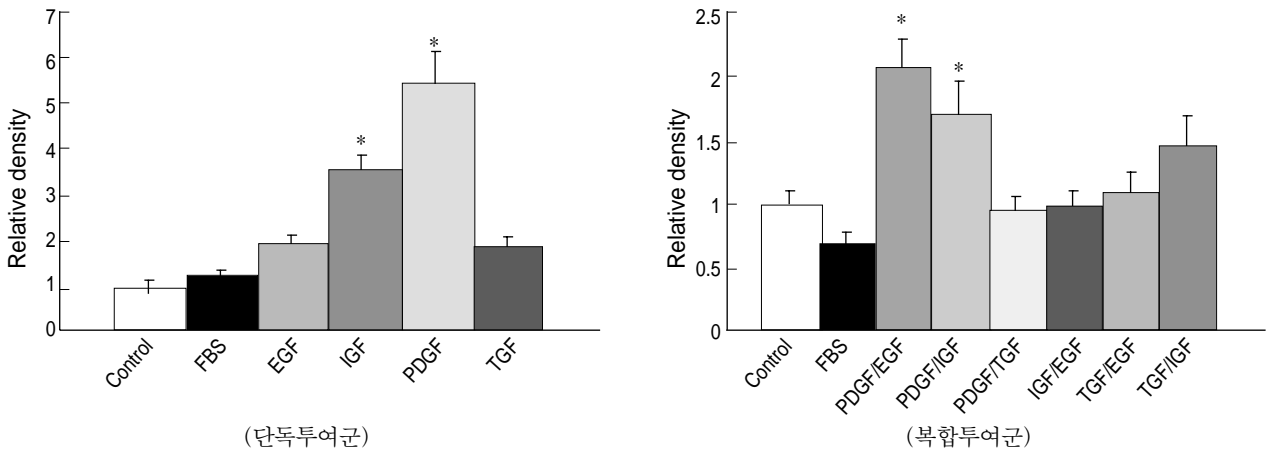


Fig. 5. Type I collagen mRNA expression on the 10th day for the single and the combination growth factor groups. IGF, PDGF, PDGF/EGF and PDGF/IGF showed a significant increase in type I collagen mRNA expression comparing to the control group. *: statistical significance.

mRNA의 발현이 $140 \pm 14\%$ 로 의미있게 증가하였다($p < 0.05$) (Fig. 6).

3. 세포 배양액에서의 제 1형 교원질 생성

성장 인자 단독 투여 5일 후 세포 배양액내의 제 1형 교원질 생성 정도는 IGF군과 PDGF군이 대조군에 비하여 $140 \pm 9\%$ 증가하여 통계학적으로 의미가 있었으나($p < 0.05$), 그 이외의 군에서는 의미 있는 제 1형 교원질 생성은 보이지 않았다. 10일째와 15일째에도 세포 배양액내의 제 1형 교원질 생성 정도는 5일째와 비슷 하였다(Fig. 7). 성장 인자 복합 투여 5일 후 세포 배양액 내의 제 1형 교원질 생성은 앞에서 관찰 하였던 5일째 제 1형 교원질 mRNA의 발현과는 달리 PDGF/IGF군만이 대조군에 비하여 $140 \pm 13\%$ 로 의미 있게 제 1형 교원질 생성이

증가하였다($p < 0.05$). 10일째에는 5일째와 다르게 PDGF/EGF군과 PDGF/IGF군이 대조군에 비하여 각각 $140 \pm 13\%$, $140 \pm 11\%$ 로 세포 배양액에서의 제 1형 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 제 1형 교원질 생성이 의미 있게 증가하였다($p < 0.05$) (Fig. 7).

고 찰

손상된 건의 내적 치유과정에서 건 세포에서 분비되는 몇 가지 성장인자가 건의 치유과정에서 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다⁶⁾. 현재까지 많이 알려진 성장 인자는 epidermal

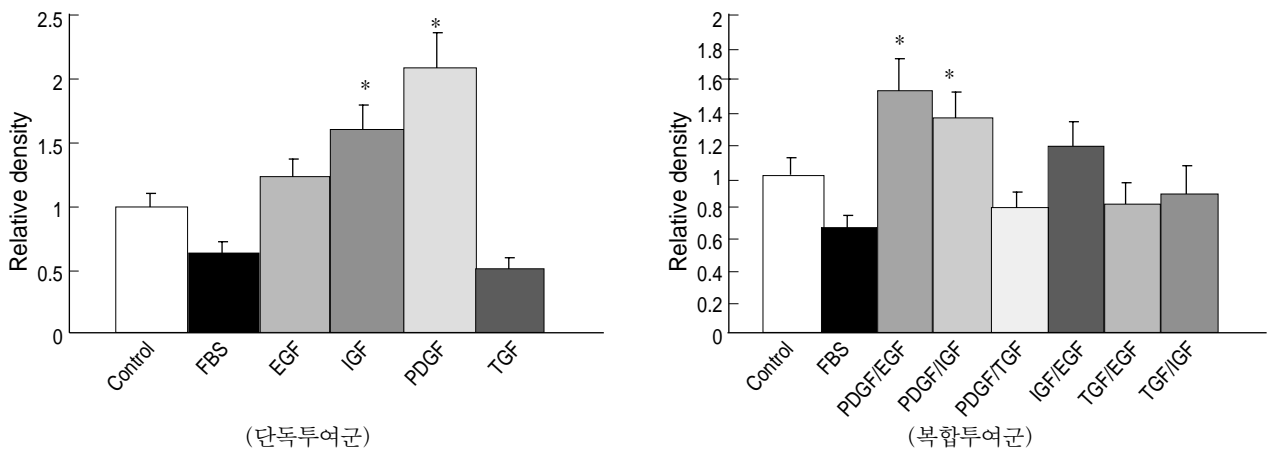


Fig. 6. Type I collagen mRNA expression on the 15th day for the single and the combination growth factor groups. IGF, PDGF, PDGF/EGF and PDGF/IGF groups showed a significant increase in type I collagen mRNA expression comparing to the control group. *: statistical significance.

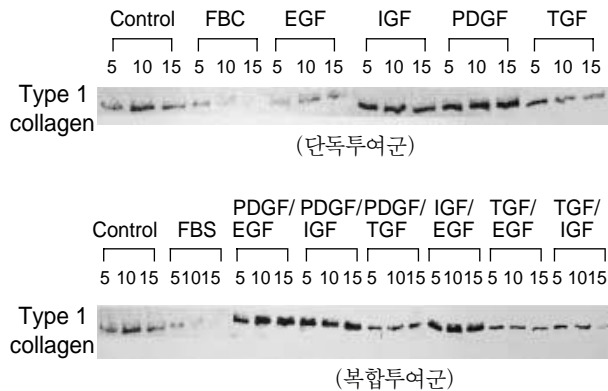


Fig. 7. Western Blot Analysis to determine the extent of type I collagen synthesis in culture media of the single and combination growth factor groups.

growth factor (EGF), platelet-derived growth factor (PDGF), transforming growth factor- β (TGF- β), insulin-like growth factor-I (IGF-I) 등이 있다. 건의 치유 과정 중 염증기와 증식기인 손상 후 2일-2주 동안 대식 세포와 혈소판 등에서 분비되는 다단백 성장인자는 세포간의 신호전달에 중요한 역할을 수행하는 단백질이다^{6,9}. 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 있다³. 본 연구에서는 토끼의 심부 굴곡 건 세포 배양 후 5일, 10일, 15일째 여러 가지 성장 인자를 단독 또는 복합 투여 후 세포 증식률, 제 1형 교원질 mRNA 변화와 배양액 내의 제 1형 교원질 mRNA 생성을 분석 하였다.

우태혈청은 구성성분뿐만 아니라 생체내에서의 작용도 정확히 알려지지 않은 것이 많으므로, 성장인자의 효과를 알아보는 실험에서는 우태혈청을 사용하지 않거나 세포의 최소한의 생존

을 위해 미량의 우태혈청을 사용하고 있는데¹⁰, 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 증식률을 보였다.

성장 인자 단독 투여군에서 성장 인자에 따른 세포 증식률은 EGF와 TGF 투여군은 대조군에 비해 세포 증식률이 의미 있게 증가한 반면에 제 1형 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 있다⁶. 특히 EGF의 경우 상처 치유의 생체내 실험에서 많이 연구된 성장 인자로 절개 상처에서 인장 강도를 증가시키며, 섬유아세포의 증식을 촉진시켜 세포의 기질을 촉진시키는 것으로 알려져 있다^{5,7,8}. 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 세포의 기질 형성을 촉진할 수 있으나, 생체에서는 세포의 증식을 주로 촉진할 뿐 기질형성에 별 도움을 주지 않았다.

IGF-I과 PDGF는 대조군에 비하여 세포 증식률에는 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, 세포의 기질의 형성을 촉진할 수 있는 가장 중요한 성장인자로 사료된다. IGF-I에 대한 결과는 Abrahamsson 등^{1,2}이 굴곡 건 조직배양에서 IGF-I을 단독 투여하여 건 치유를 효과적으로 촉진하였다고 발표한 내용과 같은 결과를 얻었다.

성장 인자를 복합 투여 한 모든 군에서 대조군에 비해 세포 증식률이 의미있게 증가 하였는데, 이는 성장 인자 본래의 기능

인 세포 증식 효과가 서로 복합적으로 작용된 것으로 사료된다. 그러나 제 1형 단백질 mRNA 발현은 시간이 경과함에 따라 PDGF/EGF군과 PDGF/IGF군에서 의미 있는 증가를 보였다. 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 보였다.

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 조직공학적 개발에도 적용할 수 있을 것으로 생각된다. 건의 조직공학적 개발 시에 10% FBS에서 세포를 대량 증식 시킨 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 제한점이 있다. 이점은 추후 실험을 통하여 세포의 기질의 형성을 촉진할 수 있는 가장 이상적인 성장인자의 농도에 대한 연구와 생체내에서와 생체외에서의 세포환경 차이에 대한 연구가 뒤따라야 될 것으로 사료된다.

결 론

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. Anderson PA, West SG, O'Dell JR, Via CS, Claypool RG and Kotzin BL: Weekly pulse methotrexate in rheumatoid arthritis; clinical and immunologic effects in a randomized, double blind study. *Ann Intern Med*, 103: 489-496, 1985.
2. Degraw JJ, Colwell WT, Crase J, Smith RL, Piper JR and Sirotiak FM: Analogues of methotrexate in rheumatoid arthritis. Effect of 10-Deazaaminopterin analogues on type II collagen-induced arthritis in mice. *J Med Chem*, 40: 370-376, 1997.

3. Hirata S, Matsubara T, Saura R, Tateishi H and Hirohata K: Inhibition of in vitro vascular endothelial cell proliferation and in vivo neovascularization by low dose methotrexate. *Arthritis Rheum*, 32: 1065-1073, 1989.
4. Joosten L, Lubberts E, Durez P, Hetsen M and Van den Berg WB: Role of interleukin1 and interleukin 10 in murine collagen induced arthritis, protective effect of interleukin-1 and interleukin 10 treatment on cartilage destruction. *Arthritis Rheum*, 40: 219-220, 1997.
5. Koch AE: Angiogenesis. Implication for rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 41: 951-962, 1998.
6. Kremer JM and Phelps CT: Long-term prospective study of the use of methotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis. update after mean of 90 months. *Arthritis Rheum*, 35: 138-145, 1992.
7. Schiff M: Emerging treatments for rheumatoid arthritis. *Am J Med*, 102: 11S-15S, 1997.
8. Sugita T, Ueno M, Furukawa O, Murakami T, Takata I and Tosa T: Effect of a novel anti-rheumatic drug, TA-383, on type II collagen induced arthritis; suppressive effect of TA-383 on interleukin 6 production. *Int J Immunopharmacol*, 15: 515-519, 1993.
9. Trentham DE, Townes AS and Kang AH: Autoimmunity to type II collagen an experimental model of arthritis. *J Exp Med*, 1: 857-868, 1977.
10. Weinblatt ME, Coblyn JS, Fox DA, Holdsworth DE, Glass DN and Trentham DE: Efficacy of low-dose methotrexate in rheumatoid arthritis. *N Eng J Med*, 312: 818-822, 1985.
11. Weinblatt ME and Maier AL: Long term experience with low dose weekly methotrexate in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol Suppl*, 22: 33-38, 1990.
12. Weinblatt ME, Trentham DE, Fraser PA and Coblyn JS: Long-term prospective trial of low dose methotrexate in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 31: 167-175, 1988.
13. Weinblatt ME, Weissman BN, Holdsworth DE, Maier AL, Palchuk KR and Coblyn JS: Long-term prospective study of methotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis. 84-month update. *Arthritis Rheum*, 35: 129-137, 1992.
14. Williams JH, Willkens RF, Samuelson CO, et al: Comparison of low-dose oral pulse methotrexate and placebo in the treatment of rheumatoid arthritis; a controlled clinical trial. *Arthritis Rheum*, 28: 721-730, 1985.
15. Zachariae H, Kragballe K and Sogard H: Methotrexate induced liver cirrosis. Studies including serial liver biopsies during continued treatment. *Br J Dermatol*, 102: 407-412, 1980.

Effect of Growth Factors on Type I Collagen Synthesis in Cultured Rabbit's Deep Flexor Tendon Cell

Dong-Eun Shin, M.D.*, Ho-Jung Kang, M.D., Hyun Woo Kim, M.D., Eung-Shick Kang, M.D., Soo-Bong Hahn, M.D., Sung-Jae Kim, M.D., Chang-Dong Han, M.D., and Woo-Suk Lee, M.D.†

Department of Orthopaedic Surgery, Pochon CHA Medical College*, Yonsei University College of Medicine, Konyang University College of Medicine†, Seoul, Korea

Purpose : This study focuses on the change of the expression of type-I collagen mRNA and extent of collagen synthesis caused by four kinds of growth factors (TGF- β , IGF-I, EGF, PDGF) and their combinations to elucidate the effects of growth factors on rabbit's flexor tendon.

Materials and Methods : Cells were isolated from rabbit's flexor tendons and cultured with DMEM containing 0.5% fetal bovine serum. Growth factors were then given either independently or in combination. On the 5th, 10th, and 15th day, the cells were collected and the cell proliferation rate was analyzed. The expression of type-I collagen mRNA was analyzed by Northern blot.

Results : The expression of type-I collagen mRNA increased significantly in the IGF, PDGF, PDGF/EGF, and PDGF/IGF groups ($p < 0.05$). Western blot analysis showed that the extent of type-I collagen synthesis in culture media was similar to the type-I collagen mRNA expression.

Conclusion : Based on this study, we conclude that PDGF and IGF individually, and the combinations PDGF/IGF and PDGF/EGF were most effective at aiding the healing process in rabbit's flexor tendon.

Key Words : *Tendon cell culture, Growth factor, Type-I collagen, Rabbit flexor tendon*

Address reprint requests to

Ho-Jung Kang, M.D.

Department of Orthopedic Surgery, Yonsei University College of Medicine, Youngdong Severance Hospital

146-92 Dokok-dong, Kangnam-gu, Seoul 135-720, Korea

Tel : +82.2-3497-3410, FAX : +82.2-573-5393

E-mail : os3410@yumc.yonsei.ac.kr