

## 다양한 세포외기질이 배양 골아세포의 이동에 미치는 영향

박병운<sup>1</sup> · 서상우<sup>1</sup> · 이원재<sup>1</sup> · 류창우<sup>1</sup> · 나동균<sup>1</sup> · 손현주<sup>2</sup> · 박종철<sup>2</sup>

연세대학교 의과대학 성형외과학교실 인체조직복원연구소<sup>1</sup>, 의학공학교실, BK21 의과학사업단<sup>2</sup>

### The Effects of Various Extracellular Matrices on Motility of Cultured MC3T3-E1 Cell

Beoyoung Yun Park, M.D.<sup>1</sup>, Sang Woo Seo, M.D.<sup>1</sup>,  
Won Jai Lee, M.D.<sup>1</sup>, Chang Woo Ryu, M.D.<sup>1</sup>,  
Dong Kyun Rah, M.D.<sup>1</sup>, Hyun Joo Son, Ph.D.<sup>2</sup>,  
Jong Chul Park, Ph.D.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institute for Human Tissue Restoration, Department of Plastic and Reconstructive Surgery, <sup>2</sup>Brain Korea 21 Project for Medical Science, Medical Engineering, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Chemotactic migration of bone forming cell, osteoblast, is an important event during bone formation, bone remodeling, and fracture healing. Migration of cells is mediated by adhesion receptors, such as integrins, that link the cell to extracellular matrix ligands, type I collagen, fibronectin, laminin and depend on interaction between integrin and extracellular ligand.

Our study was designed to investigate the effect of extracellular matrix like fibronectin, laminin, type I collagen on migration of osteoblast. Migration distance and speed of MC3T3-E1 cell on extracellular matrix-coated glass were measured for 24 hours using 0.01% type I collagen, 0.01% fibronectin, 100 µl/ml laminin. The migration distance and speed of MC3T3-E1 cell was compared using a video-microscopy system. To determine migration speed, cells were viewed with a 4 phase-contrast lens and video recorded. Images were captured using a color CCD camera and saved in 8-bit full-color mode.

The migration distance on 0.01% type I collagen or 0.01% fibronectin was longer than that on 100 µl/ml laminin-coated glass. The migration speed on fibronectin-coated glass was 68 µm/hour which was fastest. The migration speed on type I collagen-coated glass was similar with that on fibronectin-coated glass. The latter

two migration speeds were faster than that on no-coated glass. On the other hand, the average migration speed on laminin-coated glass was 37 µm/hour and not different from that of control group.

In conclusion, the extracellular matrix ligands such as type I collagen and fibronectin seem to play an important role in cell migration. The type I collagen or fibronectin coated scaffold is more effective for migration of osteoblast in tissue engineering process.

**Key Words:** Osteoblast, Migration, Collagen, Fibronectin, Laminin

## I. 서 론

세포의 이동성은 태자 발생, 혈관신생, 염증반응, 상처 치유 및 종양 전이 등의 정상 생체 반응이나 생체의 병인적인 측면에서 중요한 역할을 하며, 특히 골 형성, 골재형성(bone remodeling) 및 골절 치유에 골 형성 세포의 이동(migration)이 중요한 역할을 한다. 골은 다른 조직에 비해 성장, 재생, 재형성(remodeling)에 있어 광범위한 능력을 가지고 있다. 이러한 능력은 골 형성 부위에 유도되는 골아세포(osteoblast)에 의해 일어난다. 이러한 골아세포의 유도는 세포외기질(extracellular matrix)과의 상호작용에 의해 일어나는 것으로 알려져 있으며,<sup>1</sup> 세포외기질의 변화는 세포 골격의 구조화(organization) 및 조성(composition)의 변화에 기인한다.

세포의 이동 과정은 세포의 세포막에서의 확장(extension), 유착(adhesion), 전치(translocation), 유착분리(de-adhesion) 등의 여러 가지 단계로 이루어지게 되며 이동속도는 세포 표면의 유착 단백질(adhesive protein)인 인테그린(integrin)과 인테그린의 배위자(ligand)인 제 1형 교원질(type I collagen), fibronectin, laminin 등과 같은 세포외기질 사이의 상호작용(interaction)이 중요한 요인으로 작용하게 된다. 세포의 이동에는 세포의 배양시기, 세포밀도(confluency), 배지의 입체적인 구조, 세포의 표현형(phenotype of cells) 등이 영향을 미치며, basic fibroblast growth factor(bFGF), transforming growth factor-β(TGF-β), vascular endothelial growth factor(VEGF), bone mor-

Received November 9, 2004

Revised December 22, 2004

**Address Correspondence :** Dong Kyun Rah, M.D., Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Yonsei University College of Medicine, 134 Sinchon-dong, Seodaemun-gu, Seoul 120-752, Korea. Tel: (02) 361-5697 / Fax: (02) 393-6947 / E-mail: dkrah@yumc.yonsei.ac.kr

\* 본 논문은 제57차 대한성형외과학회 추계학술대회에서 포스터 발표되었음.

phogenic proteins(BMPs) 등의 성장인자가 세포의 이동을 촉진시키는 역할을 하는 것으로 알려져 있으나, 세포외기질도 중요한 역할을 한다고 생각된다.

제 1형 교원질과 fibronectin은 골아세포 인테그린의 배위자로서 골 발생과정 단계에 표현된다.<sup>2,3</sup> 세포 표면 인테그린은 골 세포외기질 단백질에 골아세포가 유착하는데 있어 핵심적인 역할을 하는 것으로 알려져 있으며<sup>4,5</sup> laminin은 기저막에 주로 위치한 세포외기질 단백질로서 세포의 유착, 이동, 성장 및 분화를 촉진한다.<sup>6,8</sup>

골 형성에 필수적인 세포외기질 유착 단백질들이 골아세포의 이동에 미치는 영향을 평가하는 것은 임상적으로 매우 의의가 있으며 최근 결손된 인체조직복원 및 재건에 필요한 조직공학(tissue engineering)의 필요성이 절실한바, 인공 피부, 골, 연골 등의 생성에 관한 연구가 활발히 진행되고 있어 생체재료 내의 골아세포의 이동을 촉진시켜 골 형성을 촉진시키려는 노력에도 골아세포의 이동에 영향을 미치는 미세 환경의 연구가 도움이 될 수 있을 것으로 생각되며 인공골 제조에도 응용될 수 있을 것이다. 본 저자들은 골아세포의 이동에 있어 필수적인 세포외기질 유착 단백질인 fibronectin, laminin, 제 1형 교원질 등이 골아세포의 이동에 어떠한 영향을 미치는 가를 알아보고자 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 가. 연구재료

위상차 광학 현미경(Olympus Optical Co. Ltd, Tokyo, Japan)과 color charged-coupled device camera(CCD; model VCC-3974, SANYO Co, Ltd, Osaka, Japan)를 사용하였으며, 세포의 이동 관찰을 위해 Intel Pentium III processor(CPU clock speed: 933 MHz)와 512 MB main memory, 40 GB hard disk driver(HDD), 17" color display monitor(model SyncMaster 750 NF)를 구비한 컴퓨터 시스템과 color line monitor(SAMSUNG Electronics Co. Ltd., Seoul, Korea)를 사용하였다. 온도 조절기(model DX-4, Hanyoung Co. Ltd., Seoul, Korea)와 온도 감지기를 사용하여 mini-incubator의 온도 조건을 감지하였다. 실험에 사용된 모든 시약은 Sigma사(Sigma-Aldrich Co. Ltd)로부터 구입한 것을 사용하였으며, 세포배양을 위한 T-75 flask와 세포의 이동을 보기 위한 4-well plate는 Nalge Nunc International Corp. (Naperville, IL, USA)로부터 구입하였다.

### 나. 세포배양

골아세포 이동성을 보기 위해 MC3T3-E1 세포(mouse

osteoblast cell line)를 사용하였다. 세포는 T-75 flask에 4 mM L-glutamine, 1.5 g/L sodium bicarbonate, 4.5 g/L glucose, 1.0 mM sodium pyruvate, 그리고 10% fetal bovine serum(FBS)와 1% antibiotic antimycotic solution 을 포함하는 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 을 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다.

### 다. CO<sub>2</sub> mini-incubator

위상차 광학현미경 위에서 세포를 배양하기 위하여 가로 150 mm, 세로 130 mm, 높이 40 mm의 CO<sub>2</sub> mini-incubator를 제작하였으며, 이 위에 두께 5 mm의 이중막 아크릴 판이 덮이도록 하였다. 열 감지기와 heating-tape이 있어 mini-incubator의 온도를 36 ± 1°C로 유지하였다. CO<sub>2</sub> mini-incubator는 본 CO<sub>2</sub> incubator (MCO-15AC)와 mini-pump(model MP-603T)와 연결하여 CO<sub>2</sub>가 정상적으로 공급되도록 하였다.

### 라. 컴퓨터를 이용한 시간대별 video-microscopy system

Color CCD 카메라가 부착된 위상차 광학 현미경이 mini-incubator의 동영상을 컴퓨터로 전달하면 컴퓨터의 frame grabber card가 이 동영상을 일정한 시간 간격으로 포착하여 디지털 이미지 사진으로 저장시킨다. 본 실험에서는 이를 5분 간격으로 시행되도록 조작하였다. 이미지 processing 소프트웨어는 MATLAB V5.3(The MathWork Inc., USA)와 Visual Basic V6.0 language(Microsoft, USA)을 이용하여 제작하였다. 세포 이동 속도와 이동 거리를 분석을 위해 4 배 확대된 8-bit full-color mode의 이미지를 얻었으며, 이미지의 크기는 640 × 480 픽셀로 하였다. 이미지 processing 과정은 저장된 8-bit color 이미지를 MATLAB 과 Visual BASIC 언어를 통해 회색 scale 이미지로 변환시키고, canny 방법에 따라 이미지 내 각 세포들의 가장자리를 인식하도록 하였다. 인식한 가장자리를 바탕으로 그것의 중심을 찾아 중심의 움직임을 기록하여 이동 속도와 누적 이동거리를 그래프로 나타내도록 조작하였다.

### 마. 세포 이동 assays

세포외기질이 도포된 유리 위에서 골아세포의 이동 정도를 보기 위하여 제 1형 교원질(from calf skin), fibronectin(from human plasma), laminin(from basement membrane of Engelbreth-Holm-Swarm mouse sarcoma)을 사용하였다. 냉장 보관된 제 1형 교원질과 fibronectin은 0.01% 농도로 4-well plate에 도포한 후 상온에서 2시간 가량 배양한 후, PBS로 두 번 세척하고 상온에서 약 2시간 동안 건조시켰다. Laminin은 냉동 보관된 것을 100 µl/ml 의 농

도로 하여 위와 같은 과정으로 준비하였고, 대조군은 아무 것도 도포하지 않은 4-well plate를 사용하였다.

위와 같이 준비된 4-well plate에 MC3T3-E1 suspension을  $2 \times 10^3$  cells/well 농도로 분주하고 mini-incubator에 4-well plate를 고정시켰다. Mini-incubator 가장자리에 진공(vacuum) 그리스를 바르고 이중막 아크릴 판을 덮어 mini-incubator 내부를 외부로부터 차단시켜 24시간 동안 배양하였다.

**바. 통계학적 방법**

모든 실험 결과는 평균  $\pm$  표준 편차로 표시하였으며 Student's t-test로 검정하였다. p값이 0.05 미만인 경우를 통계학적으로 유의한 것으로 평가하였다.

**III. 결 과**

**가. 여러 가지 세포외기질 위에서 본 MC3T3-E1의 누적 이동 거리**

각 세포외기질이 도포된 유리 위에서 배양한 MC3T3-E1의 이미지를 5분 간격으로 포착한 후 같은 이미지에서 세 개의 세포를 추적하여 시간에 따른 누적 이동거리를 분석한 그래프를 얻었다. 24시간 동안 fibronectin에서 배양한 세포는 약 1400 - 1600  $\mu\text{m}$ 를 이동하였으며(Fig. 1), 제 1형 교원질에서 약 1300 - 1600  $\mu\text{m}$ (Fig. 2), laminin 위에서 약 700 - 900  $\mu\text{m}$ 를 이동하였다(Fig. 3). 이렇게 얻어진 세 그래프의 누적 이동거리를 한 눈에 비교하기 위해, 각각 하나의 세포에 대한 그래프를 선택하여 한 그래프로 나타내었다(Fig. 4).

그 결과 fibronectin 위에서 MC3T3-E1의 이동 정도가

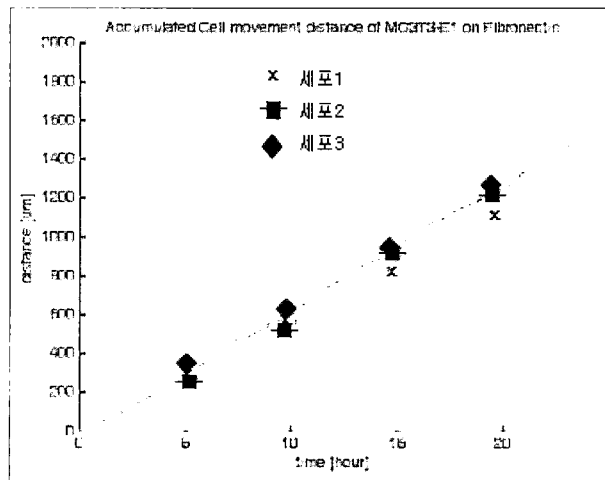


Fig. 1. Accumulated cell movement distance of MC3T3-E1 on fibronectin.

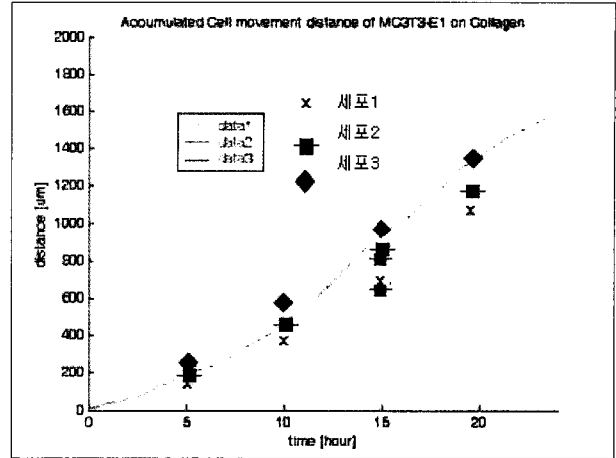


Fig. 2. Accumulated cell movement distance of MC3T3-E1 on type I collagen.

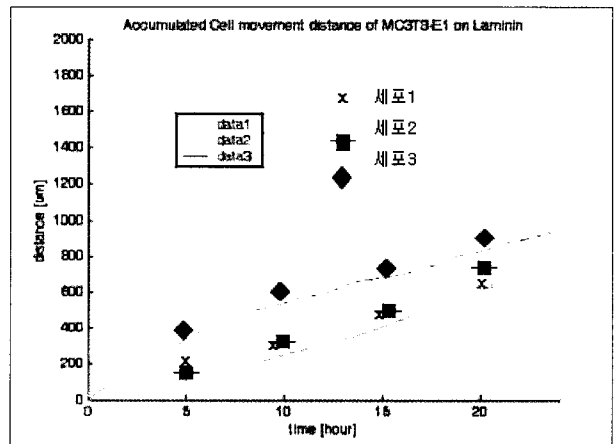


Fig. 3. Accumulated cell movement distance of MC3T3-E1 on laminin.

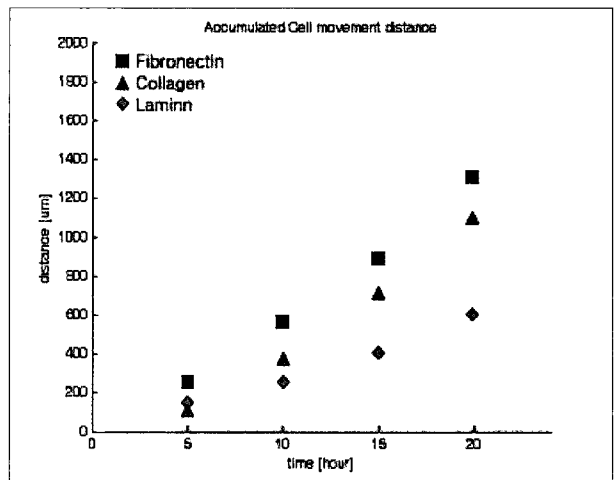


Fig. 4. Accumulated cell movement distance.

가장 컸으며, 제 1형 교원질, laminin 순으로 누적 이동거리가 크다는 것을 관찰할 수 있었다. 또한 같은 세포외기질이 도포된 유리 위에서 각각의 세포들은 모두 비슷한 이동 정도를 보이고 있으므로 이러한 세포의 이동 정도는 개별적인 차이기보다는 세포외기질의 영향에 따른 결과임을 알 수 있었다.

**나. 여러 가지 세포외기질 위에서 본 MC3T3-E1의 이동 속도의 비교**

배양 후 3시간까지의 이동속도는 세가지 세포외기질에서 차이가 거의 없었으나 배양 후 5시간에서 10시간 사이 fibronectin 의 이동속도가 급증한 반면 제 1형 교원질에서는 이동속도가 서서히 증가하여 배양 후 15시간이 되었을 때 약 70  $\mu\text{m}/\text{hour}$ 로 fibronectin과 비슷해지는 양상을 관찰할 수 있었다(Fig. 5). Laminin의 경우 약 7시간 후까지는 이동속도가 서서히 증가하지만 배양 24시간 후에는 40  $\mu\text{m}/\text{hour}$  이동에 그쳤다. 이 결과 MC3T3-E1의 이동 정도

가 배양 후 5시간에서 10시간 사이는 fibronectin에서 가장 좋았으며 그 후로는 시간이 지날수록 fibronectin과 제 1형 교원질에서의 이동속도가 비슷해지는 양상을 볼 수 있었다. Laminin에서는 다른 두 세포외기질과 비교해 볼 때 세포의 이동속도가 뚜렷이 작은 것을 확인할 수 있었다(Fig. 5).

**다. MC3T3-E1의 평균 이동 속도**

아무것도 도포하지 않은 4-well plate 위에 MC3T3-E1을 배양한 대조군과 세 종류의 세포외기질이 도포된 유리 위에서 24시간 배양한 실험군을 비교하였다. 이렇게 얻어진 이미지에서 각각 세 개의 세포들을 추적하여 그들의 평균 이동속도를 막대그래프로 비교해 보았다. 그 결과 fibronectin 위에서 배양한 세포의 경우 평균 이동속도가 약 68  $\mu\text{m}/\text{hour}$ 로 가장 컸으며, 제 1형 교원질 위에서 배양한 세포의 평균 이동속도는 약 62  $\mu\text{m}/\text{hour}$ 로 fibronectin의 결과와 비슷하였으며, 두 경우 모두 대조군보다 이동속도가 빨랐다( $p < 0.05$ ). 반면, laminin 위에서 배양한 세포의 평균 이동속도는 약 37  $\mu\text{m}/\text{hour}$ 로 대조군과 큰 차이를 보이지 않았다(Fig. 6).

**IV. 고 찰**

골 형성(osteogenesis)은 골아세포 계열의 간질 세포들이(mesenchymal cells) 유도되어 점진적인 분화를 통해 무기화된 세포외기질을 형성함으로써 이루어진다. 이렇게 형성된 세포외기질은 특정 단백질을 포함하고 있어 이 단백질에 골아세포 등이 유착되는데 이 과정에 골아세포 표면의 인테그린이 핵심적 역할을 하게 된다. 인테그린은 두 개의 아단위(subunit),  $\alpha$ -chain과  $\beta$ -chain으로 구성된 경막 단백질(transmembrane proteins)로서 세포외기질의 특정 단백질에 골아세포가 결합하는 과정을 중재한다. 이러한 골아세포 인테그린의 배위자들이 골 형성 단계별로 표현되는데 여기에는 제 1형 교원질, fibronectin, vitronectin 등이 알려져 있다.<sup>2,9-11</sup> Laminin은 기저막에 주로 존재하는 세포외기질 단백질로서 세포 유착 및 이동 등을 촉진시키는 것으로 알려져 있다.

위와 같은 요소들이 세포 유착에 관여하는 정도를 비교한 보고가 있어왔지만<sup>12,13</sup> 골 형성에 있어서는 세포외기질과의 상호작용에 의한 골아세포의 유도가 발생하고 이에 핵심적 역할을 하는 것은 세포 골격의 구조화이다. 따라서 세포 골격의 구조화를 위한 골아세포의 확산 및 이동이 골 형성에 있어 핵심적 단계임을 알 수 있다. 이에 본 저자들은 여러 가지 세포외기질 단백질들과 골아세포 이동과의 관계를 알아보기 위해 각 세포외기질 단백질을 도포한 유

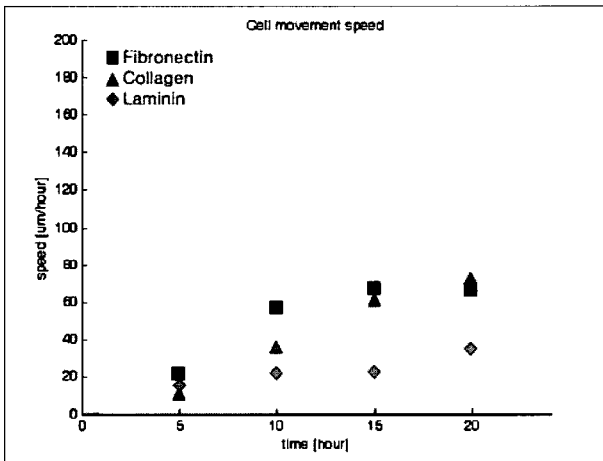


Fig. 5. Cell movement speed.

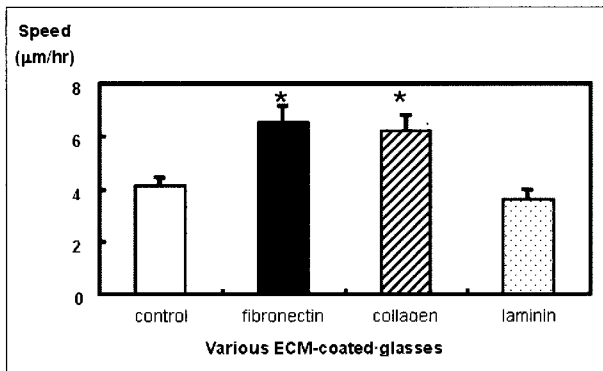


Fig. 6. Cell movement speed on the various extracellular matrix coated glasses(\*:p<0.05).

리 위에서 골아세포의 이동정도를 시간대별 video-microscopy system을 이용하여 측정하였다. 기존의 Boyden chamber, wound healing, micro-carrier bead, fence assays를 이용한 방법들은 세포 고유의 이동과 더불어 세포의 증식활동이 함께 측정되기 때문에 실험 데이터의 해석에 어려움이 있었다. 반면 이 실험과 같은 time-lapse video-microscopy system을 이용하면 시작 단계에서 인식된 세포의 중심을 추적하기 때문에 세포가 증식하더라도 모세포의 중심을 계속 추적하기 때문에 세포증식과의 혼란이 배제되어 하나의 세포의 위치와 형태의 변화를 동태적으로 관찰할 수 있어 보다 정량적으로 세포의 이동현상을 분석할 수 있었다.

예비 실험에서 본 연구에 사용된 MC3T3-E1 cell의 경우 48시간이 경과하면 세포 파편(debris)들이 증가하여 세포의 이동을 방해하고 본 실험의 특성상 실시간으로 세포의 이동을 관찰하기 위해 현미경의 대물대에 소형 배양기를 설치하고, 소형 배양기 안에서 세포를 배양하면서 실험을 해야 하기 때문에 현미경의 조명이 계속적으로 세포에 조사되어 내부 온도가 증가되어 이동속도의 차이를 유발할 수 있을 것으로 사료되어 배양 시간을 24시간으로 설정하였다.

본 연구에서는 제 1형 교원질과 fibronectin의 경우에 누적 이동거리에 있어 fibronectin이 제 1형 교원질에 비해 약간 크게 나타났다. 이는 이동속도에 있어 5시간에서 10시간 사이에 fibronectin의 이동속도가 제1형 교원질에 비해 높는데 기인한 것으로 보인다. 그러나 이동속도에 있어서 15시간이 되면 두 세포외기질에서 골아세포의 이동속도가 70  $\mu\text{m}/\text{hour}$ 로 비슷해진다. 평균 이동속도에 있어서도 두 세포외기질 사이에서는 유사한 양상을 보인다.

시간대별 이동속도의 차이는 골아세포와의 유착도 면에서의 차이에 의한 것으로 생각된다. 골 형성 과정에서 생성된 세포외기질은 특정 단백질을 표현하고 있고 이 단백질에 골아세포가 유착되는데 세포외기질 별로 유착도에 있어 차이를 보이게 된다. Lacouture 등<sup>12</sup>은 기계적으로 신장된 골아세포(mechanically strained osteoblast)에서 골아세포 인테그린의 배위자인 제1형 교원질, fibronectin, vitronectin과의 관계를 비교하였다. 그들의 연구 결과에서도 제1형 교원질과 fibronectin이 시간대별 유착도에서 차이를 보이지만 24시간 경과 후에는 유사한 유착도를 보이게 된다. 이러한 각 세포외기질의 유착도의 차이가 결과적으로 세포외기질 내에서 골아세포의 이동 속도의 차이를 유발하게 된다고 유추해 볼 수 있다.

제 1형 교원질과 fibronectin의 경우 기본 구조는  $\alpha$ -chain과  $\beta$ -chain으로 구성되어 있으나 제 1형 교원질의 경우 작용하는 인테그린은  $\alpha_1\beta_1$ -,  $\alpha_2\beta_1$ -,  $\alpha_3\beta_1$ -,  $\alpha_4\beta_1$ -,  $\alpha_5\beta_3$ -, fibronectin

의 경우  $\alpha_3\beta_1$ -,  $\alpha_4\beta_1$ -,  $\alpha_5\beta_1$ -,  $\alpha_6\beta_1$ -,  $\alpha_6\beta_3$ -,  $\alpha_6\beta_6$ -로 차이를 보이는데 이러한 작용의 차이가 시간대별 이동속도에 있어서 차이를 유발하는 한 원인으로 추정해 볼 수 있다.<sup>12</sup>

본 연구에서 laminin의 경우 누적 이동거리, 시간대별 이동속도, 평균 이동속도의 모든 면에서 제 1형 교원질, fibronectin과 유의한 차이를 보였다. 이는 일단 구조적 차이에 의한 것으로 생각해 볼 수 있다. Laminin은 삼중 구조로  $\alpha$ -chain,  $\beta$ -chain,  $\gamma$ -chain으로 구성되어 있다.<sup>13</sup> 구조적으로 유착의 유착분리 단계가 지연되는 등 확연히 다르기 때문에  $\alpha$ -chain과  $\beta$ -chain으로 구성되어 있는 제 1형 교원질과 fibronectin과는 골아세포의 이동에 있어 유의한 차이를 보이게 된 것으로 생각된다.

Carvalho 등<sup>14</sup>은 osteopontin 유전자 표현 정도의 차이를 알아보기 위해 여러 인테그린 배위자들의 배아기의 계(chicken) 골아세포에 있어 선택적인 유착도 차이를 조사하였는데 골아세포는 fibronectin, 제 1형 교원질, gelatin, laminin에 선택적으로 유착하는 결과를 보였다. 이들간의 세포 유착도 비율을 1.0 g 농도로 비교하였는데 laminin의 경우 64.5로 fibronectin(14.5), 제 1형 교원질(16.1)에 비해 높은 유착능을 보였다. 골아세포에 높은 유착도를 가지는 laminin이 세포 이동에 있어 fibronectin, 제 1형 교원질 보다 이동속도가 느리게 나타난 것에 대해서는 앞으로 더 연구가 필요할 것으로 생각된다. 또한 유착도와 세포의 이동속도에 대한 연구가 함께 이루어져야 할 것으로 생각된다.

인테그린의 아단위 중 골아세포의 유착에 주요한 작용을 하는 것은  $\beta_1$ 과 상호작용하는 배위자로 알려져 있다. 전술한 Carvalho 등<sup>14</sup>의 연구에서도 제 1형 교원질, fibronectin, laminin의 경우  $\beta_1$ 을 포함하고 있는 인테그린에 배아기의 계(chicken) 골아세포가 선택적으로 유착하는 것을 관찰할 수 있었다고 보고하고 있다. 본 연구에서 사용된 MC3T3-E1 세포의 경우도 Pavalko 등<sup>17</sup>의 보고에 따르면 기계적으로 신장된 골형성에 있어 배양 MC3T3-E1 세포의 대사적 활성도와 유전자 표현을 증가시키는데 있어  $\beta_1$ 을 포함하고 있는 인테그린의 선택적인 유착을 통해 수축성 액틴신장 섬유(contractile stress actin fibers)의 발생을 통한 세포골격의 구조화가 주요한 역할을 한다고 보고된 바 있다.

Takeuchi 등<sup>18</sup>은 MC3T3-E1 세포를 배양하면서 골아세포의 초기 분화에 있어 나타나는 제 1형 교원질의 형성인 항  $\alpha_2\beta_1$  인테그린 항체에 의해 억제되는 것을 관찰하고 골아세포의 분화에 있어  $\alpha_2\beta_1$  인테그린이 중요한 역할을 한다고 보고하였는데 흥미로운 점은 이러한 현상이 제 1형 교원질을 도포한 접시에서 배양될 때는 나타나지 않았다는 것이다.

이는 골형성에 있어 인테그린과 세포외기질의 상호 작

용이 특정 아단위 뿐만 아니라 세포외기질에 의해 제공되는 위치적 변수도 중요한 역할을 하며 따라서 세포골격의 구조화에 있어 세포의 이동성에 대한 연구의 필요성을 시사한다 하겠다.

Fibronectin, 제 1형 교원질, laminin은 세포 확산에 작용하는 대표적인 유착 단백질로서 세포 골격의 구조 및 조성의 변화에 주요한 작용을 하게 된다.<sup>15,16</sup> 따라서 본 연구에서 세포외기질로서 이들 단백질과 골아세포 이동성과의 상관관계를 알아본 결과 제 1형 교원질과 fibronectin이 laminin에 비해 골아세포의 이동을 더 용이하게 하는 세포외기질임을 알 수 있었다. 이는 단백질의 구조적 차이에 기인한 것으로 생각된다. 평균 이동속도에 있어 laminin이 대조군과 유의한 차이를 보이지 않는데 이는 세포 확산에 있어 세포 유형에 따라 작용하는 세포외기질 단백질이 차이가 있기 때문일 것이다.

골아세포의 이동에 있어서 골아세포 표면의 인테그린의 배위자인 제 1형 교원질, fibronectin이 주요한 역할을 함을 확인할 수 있었으며 작용하는 인테그린의 구조적 차이가 시간대별 이동 속도에 있어 차이를 나타냄을 추론해 볼 수 있었다. 구조적으로 차이가 큰 laminin의 경우 대조군과 유의한 차이를 보이지 않았으며 이는 구조적 차이에 일차적으로 기인한 것으로 보이지만 세포외기질 단백질이 각 세포 유형에 따라 작용하는 정도에 차이를 보인다는 점도 배제할 수 없었다. 골 형성에 있어 제 1형 교원질이나 fibronectin과 같은 인테그린의 배위자들이 주요한 역할을 할 것으로 추정할 수 있으며 골조직 재생을 위한 조직공학에서 제 1형 교원질이나 fibronectin을 도포한 지지체가 골아세포의 이동성 측면에서 볼 때 더 효과적일 것으로 생각된다.

## V. 결 론

세포 유착 단백질인 제 1형 교원질, fibronectin, laminin을 세포외기질로 사용하여 골아세포의 이동성을 시간대별 video-microscopy system을 이용하여 측정된 결과 이를 수치화하여 보다 객관적으로 이동속도를 비교할 수 있었다. 평균 이동속도는 fibronectin 위에서 배양한 세포의 경우 약 68  $\mu\text{m}/\text{hour}$ 로 가장 컸으며, 제 1형 교원질 위에서 배양한 경우 약 62  $\mu\text{m}/\text{hour}$ 로 fibronectin의 결과와 비슷하였다. 두 경우 모두 대조군보다 이동속도가 빨랐다. 반면, laminin 위에서 배양한 세포의 평균 이동속도는 약 37  $\mu\text{m}/\text{hour}$ 로 대조군과 유의한 차이를 보이지 않았다.

## REFERENCES

1. Imai S, Kaksonen M, Raulo E, Kinnunen T, Fages C, Meng X, Lakso M, Rauvala H: Osteoblast recruitment and bone formation enhanced by cell matrix-associated heparin-binding growth-associated molecule(HB-GAM). *J Cell Biol* 143: 1113, 1998
2. Grzesik WJ, Gehron-Robey P: Bone matrix RGD glycoproteins: immunolocalization and interaction with primary osteoblastic bone cells *in vitro*. *J Bone Miner Res* 9: 487, 1997
3. Gehron-Robey P: The biochemistry of bone. *Endocrinol Metab Clin North Am* 18: 858, 1989
4. Damsky CH, Werb Z: Signal transduction by integrin receptors for extracellular matrix: cooperative processing of extracellular information. *Curr Opin Cell Biol* 4: 772, 1992
5. Sastry SK, Horwitz AF: Integrin cytoplasmic domains: mediators of cytoskeletal linkage and extra- and intracellular initiated transmembrane signaling. *Curr Opin Cell Biol* 5: 819, 1993
6. Beck K, Hunter I, Engel J: Structures and function of laminin: anatomy of a multidomain glycoprotein. *FASEB J* 4: 148, 1990
7. Engel J: Laminins and other strange proteins. *Biochemistry* 31: 10643, 1992
8. Timpl R, Brown JC: The laminins. *Matrix Biol* 14: 275, 1994
9. Clover J, Gowen M: Are MG-63 and HOS TE 85 human osteosarcoma cell lines representative models of the osteoblastic phenotype? *Bone* 15: 585, 1994
10. Gronthos S, Stewart K, Graves SE, Hay S, Simmons PJ: Integrin expression and function on human osteoblast-like cells. *J Bone Miner Res* 12: 1189, 1997
11. Saito T, Albelda SM, Brighton CT: Identification of integrin receptors on cultured human bone cells. *J Orthop Res* 12: 384, 1994
12. Lacouture ME, Schaffer JL, Klickstein LB: A comparison of type I collagen, fibronectin, and vitronectin in supporting adhesion of mechanically strained osteoblasts. *J Bone Miner Res* 17: 481, 2002
13. Roche P, Rousselle P, Lissitzky JC, Delmas PD, Malaval L: Isoform-specific attachment of osteoprogenitors to laminins: mapping to the short arms of laminin-1. *Exp Cell Res* 250: 465, 1999
14. Carvalho RS, Kostenuik PJ, Salih E, Bumann A, Gerstenfeld LC: Selective adhesion of osteoblastic cells to different integrin ligands induces osteopontin gene expression. *Matrix Biol* 22: 241, 2003
15. Stossel TP: On the crawling of animal cells. *Science* 260: 1086, 1993
16. McCarthy J, Turley EA: Effects of extracellular matrix components on cell locomotion. *Crit. Rev. Oral Biol Med* 4: 619, 1993
17. Pavalko FM, Chen NX, Turner CH, Burr DB, Atkinson S, Hsieh YF, Qiu J, Duncan RL: Fluid shear-induced mechanical signaling in MC3T3-E1 osteoblasts requires cytoskeleton-integrin interactions. *Am J Physiol* 275: 1591, 1998
18. Takeuchi Y, Nakayama K, Matsumoto T: Differentiation and cell surface expression of transforming growth factor-beta receptors are regulated by interaction with matrix collagen in murine osteoblastic cells. *J Biol Chem* 271: 3938, 1996