

## 고용량의 Dexamethasone 존재하에서 골막기원세포에서 발현되는 혈관신생인자의 평가

박봉욱 · 최문정 · 류영모 · 이성균 · 하영술\* · 김덕룡\*\* · 조영철\*\*\* · 김종렬\*\*\*\* · 변준호

경상대학교 의과대학/의학전문대학원 구강악안면외과학교실, 경상대학교 건강과학연구원,

\*경상대학교병원 임상의학연구소,

\*\*경상대학교 의과대학/의학전문대학원 생화학교실, 경상대학교 건강과학연구원,

\*\*\*울산대학교 의과대학 구강악안면외과학교실, \*\*\*\*부산대학교 치의학전문대학원 구강악안면외과학교실

### Abstract

#### EVALUATION OF ANGIOGENIC PHENOTYPES IN CULTURED HUMAN PERIOSTEAL-DERIVED CELLS UNDER HIGH-DOSE DEXAMETHASONE

Bong-Wook Park, Mun-Jeong Choi, Young-Mo Ryu, Sung-Gyoon Lee, Young-Sool Hah\*,

Deok Ryong Kim\*\*, Yeong-Cheol Cho\*\*\*, Jong-Ryoul Kim\*\*\*\*, June-Ho Byun

*Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Gyeongsang National University*

*School of Medicine and Institute of Health Sciences,*

*\*Clinical Research Institute, Gyeongsang National University Hospital,*

*\*\*Department of Biochemistry, Gyeongsang National University School of Medicine and Institute of Health Sciences,*

*\*\*\*Department of Oral and Maxillofacial Surgery, College of Medicine, Ulsan University,*

*\*\*\*\*Department of Oral and Maxillofacial Surgery, School of Dentistry, Pusan National University*

Angiogenesis plays an important role in bone development and postnatal bone fracture repair. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and vascular endothelial growth factor receptors (VEGFRs) have been thought to be primarily involved in promoting angiogenesis. It is well known that VEGF and its receptors have been reported to play an important role in the regulation of the interaction between angiogenesis and osteogenesis during bone repair processes.

Dexamethasone, a potent synthetic glucocorticoid, promotes phenotype markers of osteoblast differentiation, such as ALP and osteocalcin. It stimulates in vitro osteogenesis of human bone marrow osteogenic stromal cells. Dexamethasone has been reported to suppress VEGF gene expression in some cells. However, our previous study demonstrated VEGF quantification increased in a time-dependent manner in periosteal-derived osteogenesis under dexamethasone.

So, the purpose of this study was to examine the angiogenic phenotypes in cultured human periosteal-derived cells under high-dose dexamethasone. Periosteal-derived cells were cultured using a technique previously described. After passage 3, the periosteal-derived cells were further cultured for 28 days in an osteogenic inductive culture medium containing ascorbic acid,  $\beta$ -glycerophosphate and high-dose dexamethasone. We evaluated the expression of VEGF isoforms, VEGFR-1, VEGFR-2, and neuropilin-1. ALL VEGF isoforms (VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>189</sub>, and VEGF<sub>206</sub>) expression was observed by RT-PCR analysis. VEGFR-1, VEGFR-2 and neuropilin-1 expression increased up to day 14, particularly during the early stage of mineralization. Our results suggest the involvement of direct VEGFs/VEGFRs system on periosteal-derived cells during early mineralization phase under high-dose of dexamethasone. These also suggest that VEGF might act as an autocrine growth molecule during osteoblastic differentiation of cultured human periosteal-derived cells.

**Key words:** Periosteal-derived cell, High-dose dexamethasone, VEGF, VEGFR, Autocrine growth molecule

## I. 서 론

최근 골조직공학의 급격한 발전으로 여러 가지 조직의 세포들로부터 골 기원세포를 추출할 수 있다. 이에 본 교실에서도 골막기원세포를 이용하여 이의 조골세포로의 분화과정과 골기질 형성정도를 시기별로 평가한 바 있다<sup>1)</sup>. 또한 혈관신생 (angiogenesis)과도 관련하여 골막기원세포로부터 조골세포로의 분화과정에서 골기질 형성도와 혈관내피세포성장인자 (vascular endothelial growth factor, VEGF)신호와의 상관관계도 관찰하였다<sup>2)</sup>. 이에 본 연구에서는 골막기원세포로부터 조골세포로의 분화과정에서 이전 실험에 사용했던 것보다 dexamethasone의 농도를 증가시킨 혈관내피세포성장인자 뿐 아니라 혈관내피세포성장인자 수용체 (vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR)의 발현을 관찰하고자 한다. 혈관신생과 골신생의 의존적인 상호작용을 통하여 혈관신생이 정상적인 골의 재형성 과정이나 골절 치유에서 중요한 역할을 한다는 점과 다양한 혈관신생인자중에서 혈관내피세포성장인자와 이의 수용체들이 가장 강력한 인자라는 점은 이미 주지의 사실이다<sup>3-5)</sup>. Gerber 등<sup>6)</sup>은 가용성 수용체 키메라 단백질 (soluble receptor chimeric protein)의 전신적인 적용을 통하여 내인성 혈관내피세포성장인자의 역할을 막을 경우 골형성이 저해된다고 보고하였다. 인간에서 혈관내피세포성장인자는 121, 165, 189, 그리고 206 (VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>189</sub>, and VEGF<sub>206</sub>) amino acid residues의 네가지 isoforms을 나타내며 혈관내피세포에 존재하는 두가지 수용체, 혈관내피세포성장인자수용체-1 (VEGFR-1)과 혈관내피세포성장인자수용체-2 (VEGFR-2)에 결합하여 그 역할을 수행한다. Semaphorins에 대한 수용체로 처음 알려진 neuropilin-1은 비교적 최근에 밝혀진 혈관내피세포성장인자수용체로써 혈관내피세포성장인자/혈관내피세포성장인자수용체-2 (VEGF/VEGFR-2)의 상호작용을 증가시키는 일종의 보조수용체 (co-receptor) 역할을 하는 것으로 알려져 있다<sup>4,7-9)</sup>.

한편 혈관내피세포에 이러한 수용체들이 존재한다는 것은 혈관내피세포성장인자가 주변분비 성장기전 (paracrine growth mechanism)을 통하여 그 역할을 담당하고 있다는 것을 의미한다. 그러나 최근에는 흑색종을 포함한 일부종양에서 혈관내피세포성장인자가 해당세포에 직접적으로 작용하여 성장기전을 나타내는 자가분비 성장인자 (autocrine growth factor)로서의 역할이 보고되고 있다<sup>10-12)</sup>. 성장인자 등에 대한 반응으로 개개의 세포들이 어떤 인자를 합성하거나 분비하게 되는 데 분비된 그 인자가 인접한 세포 혹은 다른 형태의 세포들에 작용하여 성장반응을 나타내는 경우가 주변분비 성장기전이며 분비된 그 인자가 원래의 세포에 작용하여 성장반응을 나타내는 것이 자가분비 성장기전이다.

일반적으로는 어떠한 세포가 특정 인자 및 이의 수용체를 동시에 발현하는 경우, 자가분비 성장기전을 나타낸다고 할 수 있다. 악성 종양세포들은 혈관내피세포성장인자등을 분비하고 이러한 인자들이 인접한 혈관내피세포에 있는 수용체들과 결합하여 혈관신생을 도모하여 결국 악성 종양세포들이 성장, 침습 및 전이를 나타내게 된다. 하지만 Masood 등<sup>12)</sup>은 다양한 세포주를 이용한 실험에서 흑색종, 난소암, 췌장암, 그리고 Kaposi's sarcoma에서 종양세포자체내에 혈관내피세포성장인자수용체가 발현됨을 보고하며 혈관내피세포성장인자는 혈관내피세포성장인자수용체를 발현하는 종양에 대하여 자가분비 성장인자 성장기전을 나타낸다고 주장하였다.

혈관신생과 골신생이 상호 밀접한 관계를 나타낸다고 하지만 현재까지도 골 전구세포들의 조골세포로의 분화과정에서 혈관내피세포성장인자와 이의 수용체들의 발현 및 자가분비 성장기전에 대해서는 사용된 세포의 종류, 평가방법 등에 따라 다소 논란을 나타내고 있다.

Cheng 등<sup>13)</sup>이 사람 골수기질 세포배양액에 dexamethasone을 첨가하면 알칼리성 인산분해효소 (Alkaline phosphatase, ALP) 활성도와 무기질 침착이 많이 증가하는 결과를 보고한 후, dexamethasone은 사람 골수기질 세포배양에서 ascorbic acid 및  $\beta$ -glycerophosphate와 함께 골형성을 유도하는 배양액의 조건으로 인정되고 있다. 골막기원 세포의 세포배양과 관련된 본 교실의 이전 연구에서도 dexamethasone 존재하에서 골막기원세포의 조골세포로의 분화과정동안 혈관내피세포성장인자가 시간 의존성으로 증가되는 것을 관찰하였다<sup>2)</sup>. 그러나 dexamethasone은 다양한 세포들에서 혈관신생과 관련된 여러 가지 전사인자 (transcriptional factors)를 방해하여 혈관신생을 억제한다고도 알려져 있다<sup>14,15)</sup>.

이에 본 연구에서는 고용량의 dexamethasone 존재하에서 골막기원세포로부터 조골세포로의 분화과정동안 혈관내피세포성장인자 isoforms, 혈관내피세포성장인자수용체-1, 혈관내피세포성장인자수용체-2, 그리고 neuropilin-1의 발현을 관찰하고 혈관내피세포성장인자의 자가분비 성장기전이 존재하는지를 관찰하고자 한다.

## II. 연구재료 및 방법

### 1. 골막기원세포의 추출 및 증식

골막기원세포를 추출하고 증식하는 과정은 이전 연구방법에 의하여 실시하였다<sup>1)</sup>. 간단히 요약하면, 경상대학교 병원의 윤리위원회를 따르고 환자 동의하에 매복된 하악 제3대구치의 발치과정에서 약 5 × 20 mm의 골막을 채취하여 100-mm culture dish에 넣은 후 넣은 후 10% fetal

bovine serum, 100 IU/mL penicillin, 그리고 100 µg/mL streptomycin이 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 배지에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기 (Model 3546, Forma Scientific Inc, OH, USA)를 통하여 배양한다. 약 90%의 세포군집 (confluence)을 나타내면 증식된 세포들을 5분간 트립신 (0.02% 트립신과 0.02% EDTA)처리하고 1,500 rpm에서 원심분리하여 계대배양을 실시한다.

## 2. 골막기원세포의 조골세포로의 분화

골막기원세포에서 조골세포로의 분화과정은 이전 연구방법에서 사용된 dexamethasone의 농도를 5배 증가시켜 분화시켰으며 4주동안 배양하였다<sup>2)</sup>. 골형성 유도 배지는 매 3일마다 교체해주며 4주동안 배양하였다.

## 3. 골막기원세포에서 조골세포로의 분화정도 평가

골형성 유도 배지에서 7, 14, 21 그리고 28일의 배양기간동안 골막기원세포의 조골세포로의 분화정도는 알칼리성 인산분해효소 (Alkaline phosphatase, ALP)에 대한 Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)을 통한 분석과 von kossa 염색을 통하여 시행하였다. 총 RNA를 각 주의 세포층에서 TRIzol reagent를 처리하여 추출하였고 oligo (dT) 시발체 (primer)와 Superscript First-Strand Synthesis System (Invitrogen Life Technologies, CA, USA)을 이용한 역전사반응으로 cDNA를 합성하였다. 적절한 시발체를 이용하여 합성된 cDNA로부터 알칼리성 인산분해효소, osteocalcin 및 GAPDH에 대한 PCR 증폭을 실시하였다. PCR을 위하여 사용체 시발체는 다음과 같다 (sense / antisense) :

5'-CCTCCTCGGAAGACACTCTG-3', 5'-AGACTGCGCCTGGTAGTTGT-3', ALP. 1.5% 아가로스겔을 사용하여 전기영동으로 RT-PCR 산물을 확인하였다. 그리고 이러한 유전인자들의 mRNA 발현은 음영계측 (Densitometry, Bio-Rad Laboratories, CA, USA)을 통하여 상대적으로 평가하였다. Von kossa 염색방법은 이전 연구방법대로 시행하였다<sup>1)</sup>.

## 4. 골막기원세포에서 조골세포로의 분화과정에서 혈관내피세포성장인자 및 수용체들의 발현 평가

골형성 유도 배지에서 7, 14, 21 그리고 28일의 배양기간동안 골막기원세포에서 혈관내피세포성장인자 및 그 수

용체들의 발현은 RT-PCR을 통하여 분석하였다. RT-PCR은 상기의 연구재료 및 방법에 언급된 방법대로 시행하였으며 PCR을 위하여 사용체 시발체는 다음과 같다 (sense / antisense) :

5'-CGCGGATCCCTTTCTGCTGTCTTGGGTGC-3', 5'-CGGAATTCTCACCGCCTCGGCTTGTCAC-3', exons 1-8 of VEGF isoforms, 5'-CGCGGATCCCTTTCTGCTGTCTTGGGTGC-3', 5'-CGGAATTCCTGTAGGAAGCTCATCTCTFC-3', exons 1-5 of VEGF isoforms, 5'-GAGATCAGGAAGCACCATAC-3', 5'-GAAGAGAGTCGCAGCCACAC-3', VEGFR-1, 5'-GATTCCTACCAGTACGGCAC-3', 5'-CAAACAGGTGTGGGCAACTC-3', VEGFR-2, 5'-ACGATGAATGTGGCGATACT-3', 5'-AGTGCATTCAAGGCTGTTGG-3', neuropilin-1. 이러한 유전인자들의 mRNA 발현도 음영계측 (Densitometry, Bio-Rad Laboratories, CA, USA)을 통하여 상대적으로 평가하였다.

## III. 연구결과

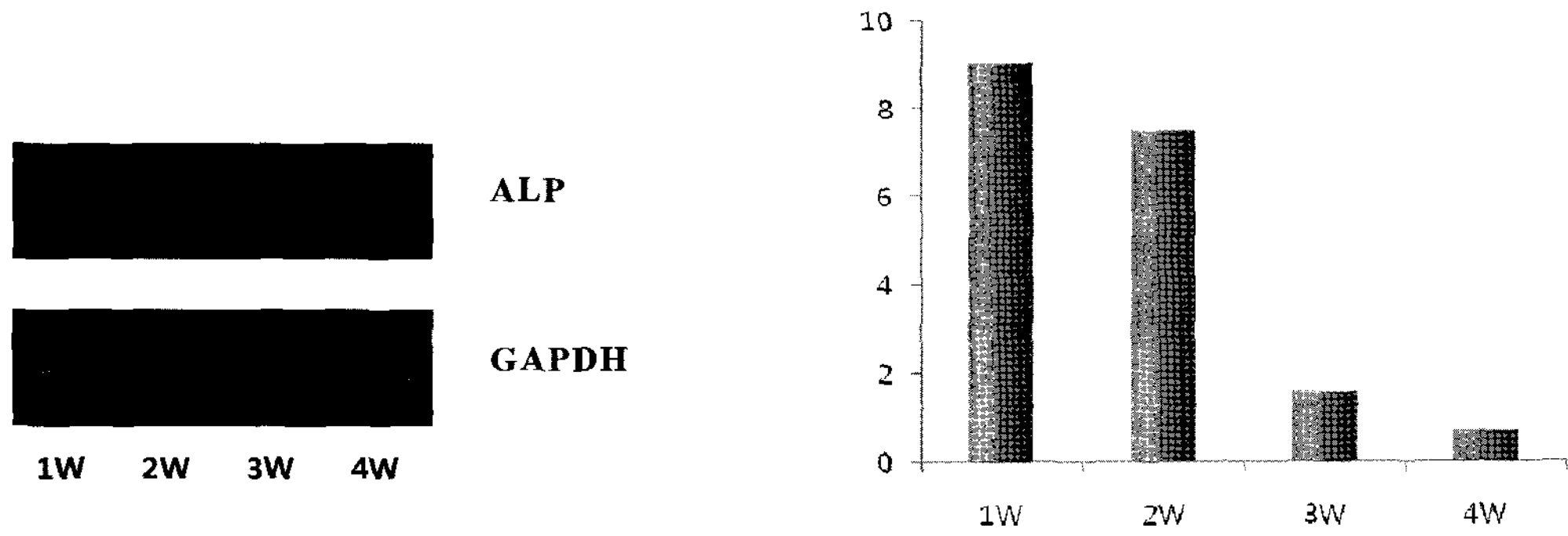
### 1. 골막기원세포에서 조골세포로의 분화정도 평가

기존의 연구방법에서 dexamethasone의 농도를 5배 증가시킨 상황에서 골막기원세포는 분화 1주에 알칼리성 인산분해효소의 발현이 가장 강하였으며 분화 2주에 약간의 감소를 나타내다가 3주부터 급격한 감소경향을 나타내었다 (Fig. 1).

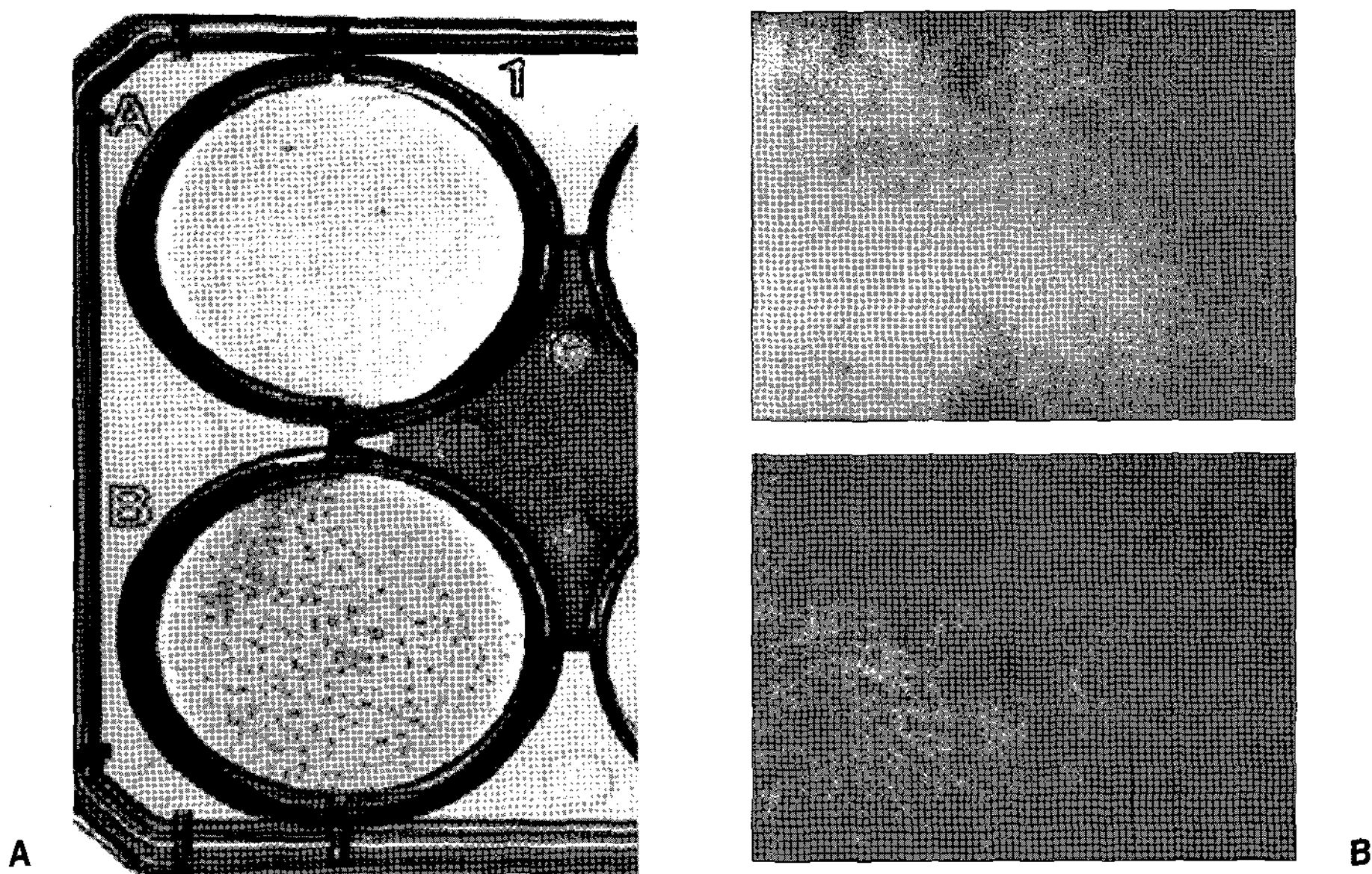
기존의 연구방법에서 dexamethasone의 농도를 5배 증가시킨 상황에서 골막기원세포는 분화 1주에서부터 von kossa 염색에 의하여 양성으로 반응하는 무기질 침착이 관찰되었으며 이는 분화기간동안 시간 의존성으로 지속적으로 증가되었다 (Figs. 2 and 3).

### 2. 골막기원세포에서 조골세포로의 분화과정에서 혈관내피세포성장인자의 발현

네가지 혈관내피세포성장인자 isoforms 모두가 발현되었다. 특히 혈관내피세포성장인자<sub>121</sub>과 혈관내피세포성장인자<sub>165</sub>의 발현이 뚜렷하였으며 혈관내피세포성장인자<sub>189</sub>와 혈관내피세포성장인자<sub>206</sub>의 발현도 나타났다. 발현은 von kossa 염색에서 골기질이 형성되는 초기 시기인 배양 2주까지 증가양상을 나타내다가 감소하는 경향을 보였다 (Fig. 4).



**Fig. 1.** ALP expression in periosteal-derived cells. Quantifications of ALP gene are expressed as relative mRNA levels by densitometry.

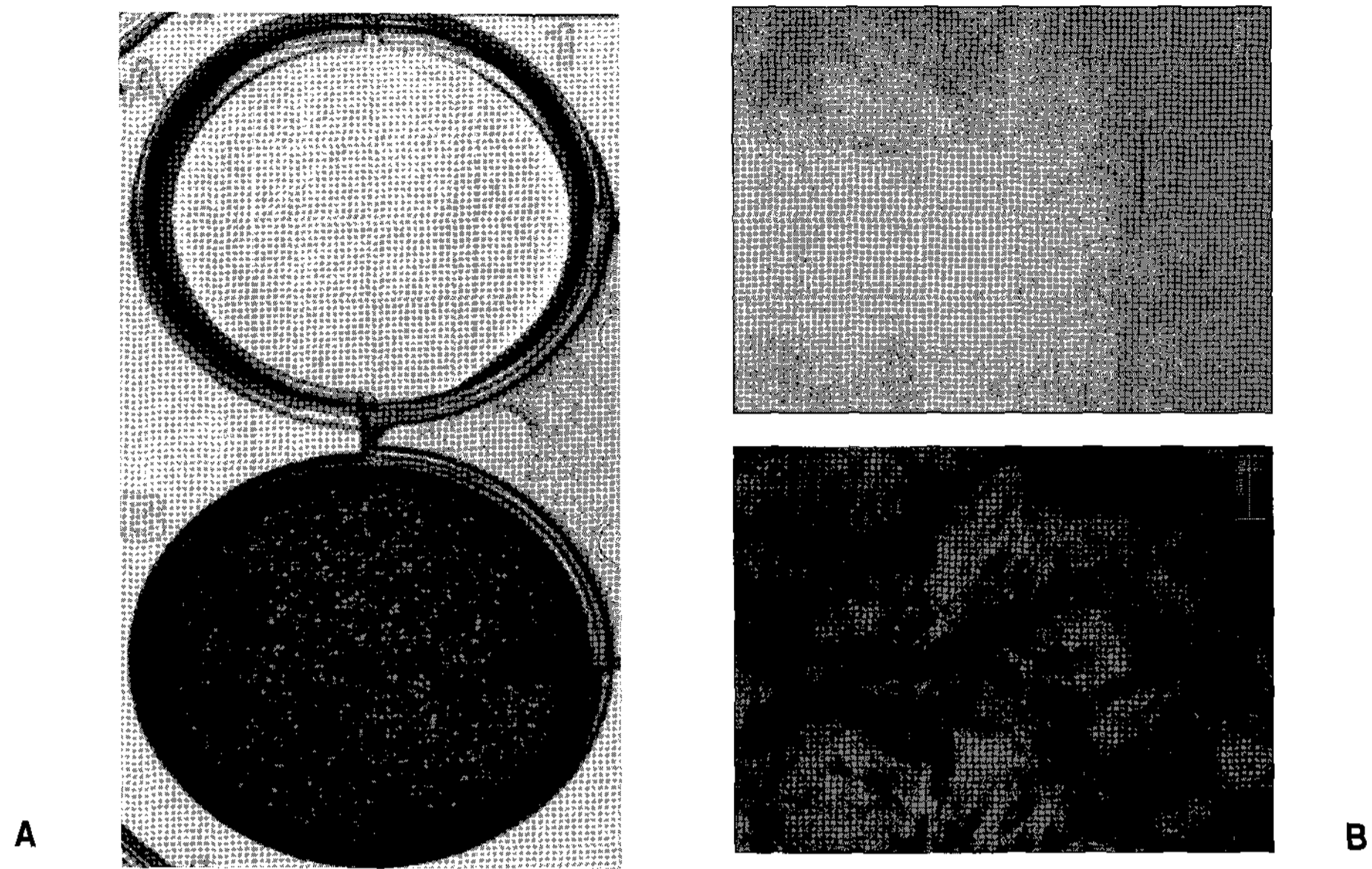


**Fig. 2.** Von Kossa staining for mineralized nodule formation during 1 week of osteoblastic differentiation of periosteal-derived cells. (A) Non-osteogenic inductive culture medium. (B) Osteogenic inductive culture medium.

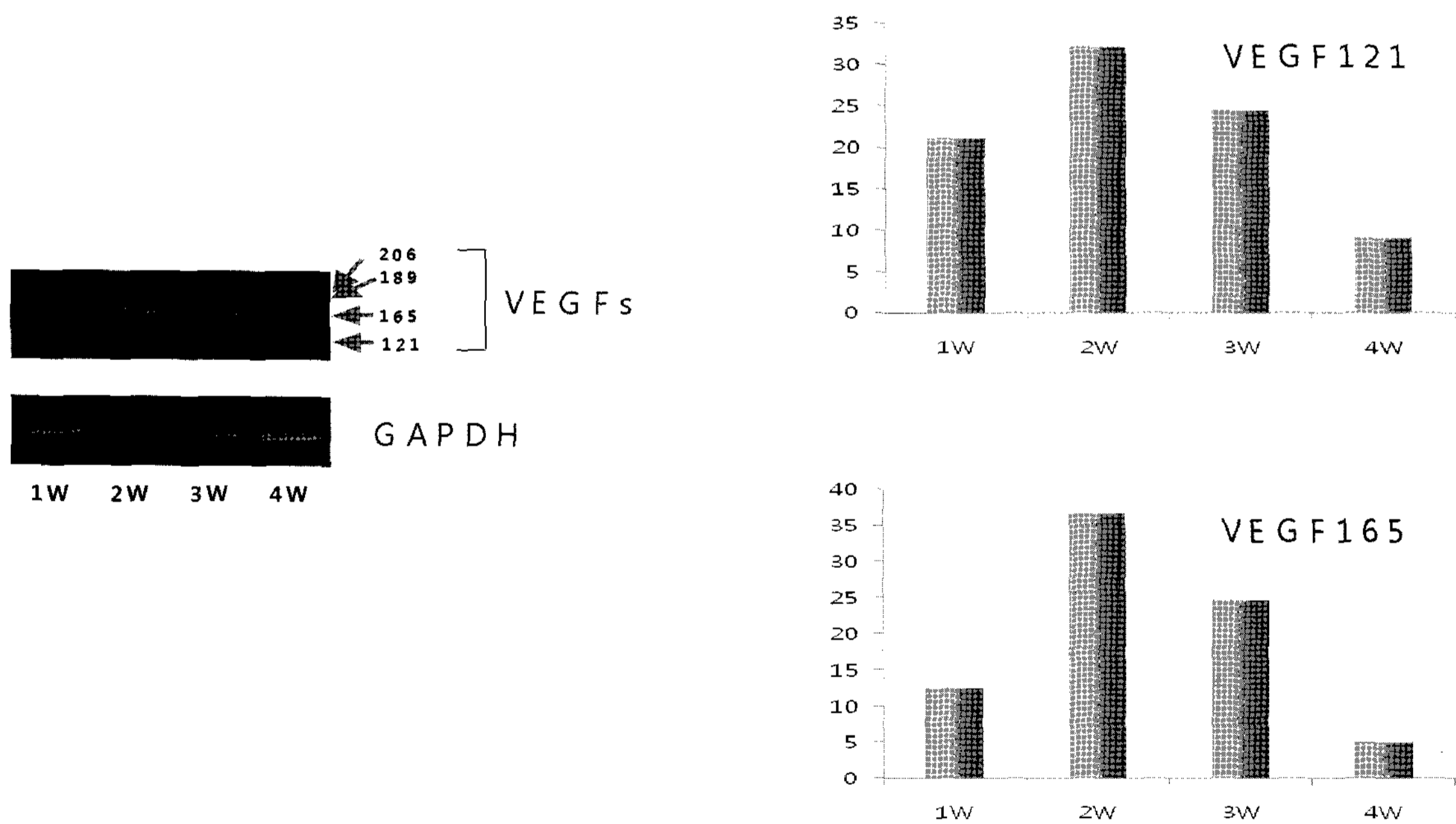
### 3. 골막기원세포에서 조골세포로의 분화과정에서 혈관내피세포성장인자수용체들의 발현

혈관내피세포성장인자수용체-1, 혈관내피세포성장인자수용체-2, 그리고 neuropilin-1이 모두 발현되었다. 혈관내피세포성장인자수용체들의 발현도 혈관내피세포성장인자의

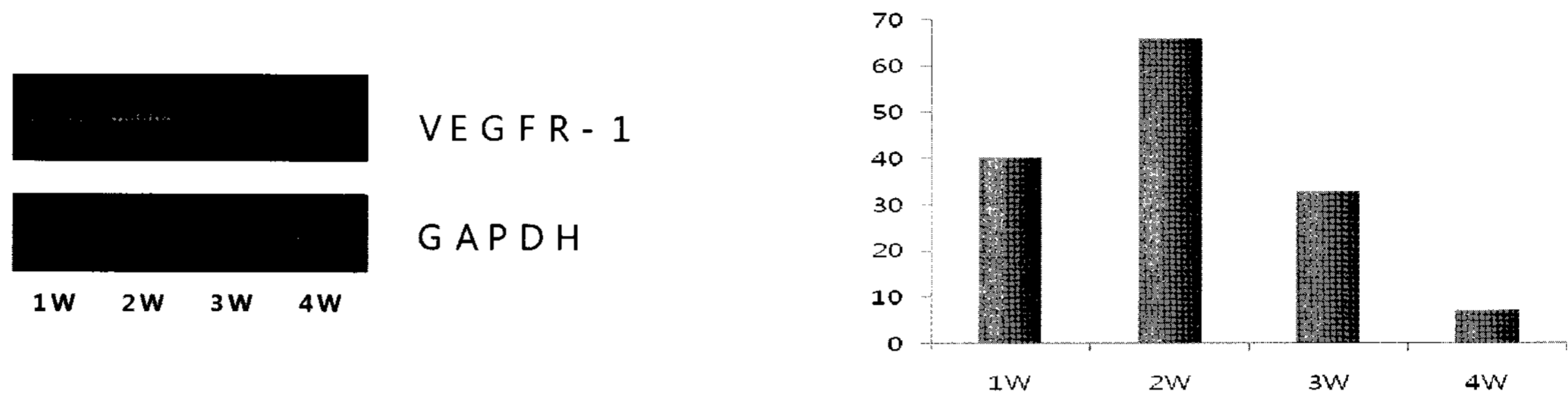
발현과 유사하게 관찰되어 배양 2주까지 증가양상을 나타내다가 이후 감소하는 경향을 나타내었다. 특히 혈관내피세포성장인자의 발현이 최대로 나타나는 시기에 평행하게 혈관내피세포성장인자수용체들의 발현도 관찰되었다 (Figs. 5, 6 and 7).



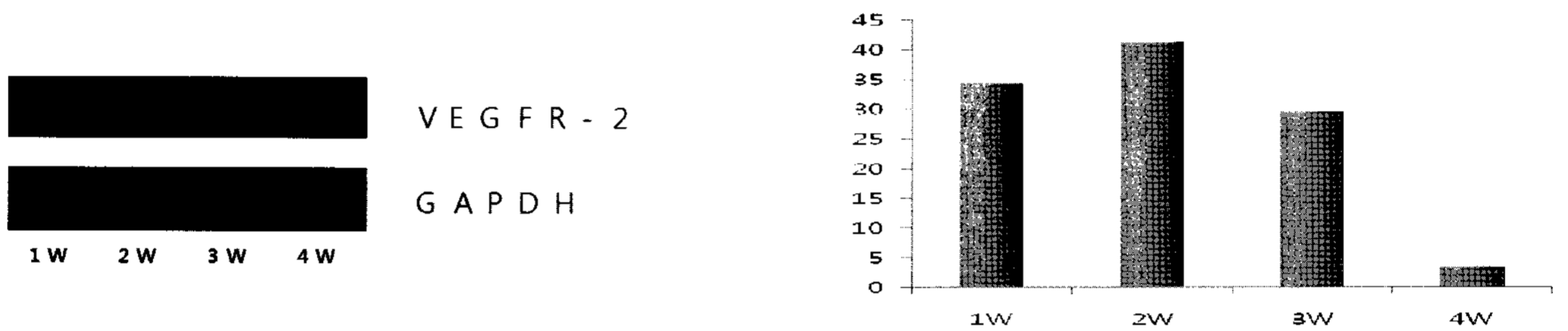
**Fig. 3.** Von Kossa staining for mineralized nodule formation during 4 week of osteoblastic differentiation of periosteal-derived cells. (A) Non-osteogenic inductive culture medium. (B) Osteogenic inductive culture medium.



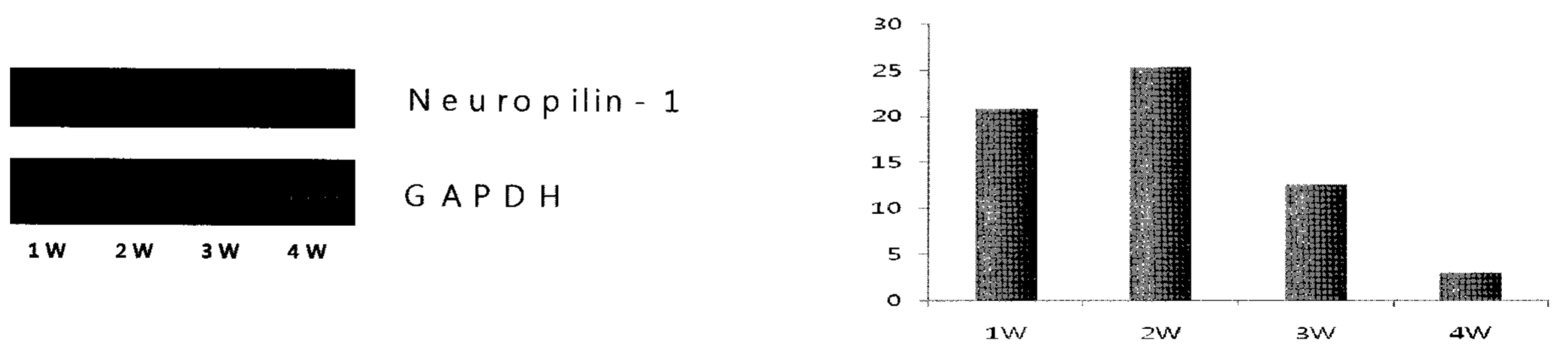
**Fig. 4.** VEGF isoforms expressions in periosteal-derived cells. Quantifications of VEGF121 and VEGF165 genes are expressed as relative mRNA levels by densitometry.



**Fig. 5.** VEGFR-1 expression in periosteal-derived cells. Quantifications of VEGFR-1 gene are expressed as relative mRNA levels by densitometry.



**Fig. 6.** VEGFR-2 expression in periosteal-derived cells. Quantifications of VEGFR-2 gene are expressed as relative mRNA levels by densitometry.



**Fig. 7.** Neuropilin-1 expression in periosteal-derived cells. Quantifications of neuropilin-1 gene are expressed as relative mRNA levels by densitometry.

#### IV. 총괄 및 고찰

골 전구세포를 이용하여 성숙한 조골세포로 분화시키는 과정을 응용하는 골 조직공학은 이제 어느덧 구강악안면 재건학의 중요한 한 축이 되고 있다. 여러 가지 골 전구세포가 응용되고 있으나 본 교실에서는 이전부터 하악골 제3대구치를 발치하는 과정에서 쉽게 추출할 수 있는 골막을 통한 골막기원세포를 이용하여 조골세포로의 분화과정에서 나타나는 여러 가지 특징들을 관찰하고 있다<sup>1,2)</sup>. 이번 연구에서는 dexamethasone의 농도를 증기시킨 상황에서 골막기원세포에서 조골세포로의 분화과정에서 골기질이 형성되는 시기 등과 관련하여 혈관내피세포성장인자와 이의 수용체들의 발현을 관찰하였다. 더불어 분화과정에서 혈관내피세포성장인자가 자가분비 성장기전을 나타내는지도 관찰하였다. 조골세포로의 분화 초기에 발현되는 인자로 알려진 알칼리성 인산분해효소에 대하여 이전의 연구에서는 배양 2주차에 가장 뚜렷한 발현 양상을 나타내었으나 dexamethasone을 5배 증가시킨 본 실험에서는 배양 1주에 강력한 발현 양상을 나타내어 dexamethasone이 증가된 상황에서 조골세포로의 분화가 더 빨리 이루어졌음을 알 수 있었다<sup>1)</sup>. 또한 무기질이 침착되어 석회화된 골기질을 평가하는데 가장 흔히 사용되는 방법인 von Kossa 염색에 대해서도 이전의 방법에서는 배양 2주에 처음으로 골기질이 형성되는 것이 관찰되었으나 본 연구에서는 배양 1주에 골기질이 형성되는 것이 관찰되었다<sup>1)</sup>. Dexamethasone이 다양한 세포들에서 혈관신생과 관련된 여러 가지 전사인자를 방해하여 혈관신생을 억제한다고도 알려진 상황에서, 본 연구의 결과들은 고용량의 dexamethasone이 골막기원세포의 조골세포로의 분화를 촉진시키는데 역할을 하는 것으로 나타났다. 향후 어느 정도까지의 농도가 분화에 긍정적으로 작용하는 지 부가적인 연구가 계속 진행되어야 할 것으로 사료된다.

일차 조골세포 (primary osteoblast)에서 혈관내피세포성장인자가 생성하여 이 인자가 발현된다는 사실은 일차 조골세포에 혈관내피세포성장인자가 기능할 수 있는 수용체가 존재한다고 생각할 수 있으며 이럴 경우 이 세포는 자가분비 성장기전을 가진다고 할 수 있으므로 이에 대한 연구는 큰 의미를 가지는 것이라 할 수 있다. 그러나 현재까지도 골 전구세포들의 조골세포로의 분화과정에서 혈관내피세포성장인자와 이의 수용체들의 발현에 대해서는 논란이 되고 있다. Furumatsu 등<sup>16)</sup>은 인간의 간엽줄기세포를 통한 조골화과정 (osteoblastogenesis)동안에 RT-PCR-Southern blot 분석에서 네 개의 혈관내피세포성장인자 isoforms과 neuropilin-1이 발현됨을 관찰하였으나 RT-PCR을 통한 분석에서는 혈관내피세포성장인자수용체-1과 혈관내피세포성장인자수용체-2는 발현되지 않았음을 보고하며 혈관내

피세포성장인자<sup>121</sup>이 인간의 골 전구세포의 조골화과정에서 주요한 혈관신생인자라고 주장하였다. Wang 등<sup>17,18)</sup>은 northern blot 분석을 통하여 해면골 조직편에서 추출한 인간 조골 유사 세포들 (human osteoblast-like cells)에서는 오직 혈관내피세포성장인자<sup>121</sup>만 발현된다고 하였고 혈관내피세포성장인자수용체들은 RT-PCR을 통한 분석에서 발현되지 않았다고 하였다. Villars 등<sup>19)</sup>은 RT-PCR을 통한 분석에서 골수간엽세포에서 추출한 골 전구세포에서 혈관내피세포성장인자<sup>121</sup>과 혈관내피세포성장인자<sup>165</sup> 및 혈관내피세포성장인자수용체-1과 혈관내피세포성장인자수용체-2의 발현이 나타났다고 하였다. Harper 등<sup>7)</sup>은 RT-PCR 및 northern blot 분석을 통하여 쥐의 조골세포주 MC3T3-E1에서는 혈관내피세포성장인자수용체-1과 혈관내피세포성장인자수용체-2는 발현되지 않았으나 neuropilin-1이 발현됨을 관찰하며 이 neuropilin-1이 조골세포 기능을 매개하는 것이라고 주장하였다. 이렇게 골 전구세포들에서 혈관내피세포성장인자와 관련된 인자들의 분비 및 발현에 대한 결과가 다른 이유는 실험한 세포, 분석방법 등에 의한 차이인 것으로 보인다. 본 연구에서는 골막기원세포의 조골세포화 과정에서 네 개의 혈관내피세포성장인자, 혈관내피세포성장인자수용체-1, 혈관내피세포성장인자수용체-2 및 neuropilin-1이 발현됨을 관찰하였다. 네 개의 isoforms중에서 혈관내피세포성장인자<sup>121</sup>과 혈관내피세포성장인자<sup>165</sup>가 혈관내피세포성장인자수용체들의 발현과 평행하게 나타났으며 특히 골기질 형성이 시작되고 증가되는 시기에 그 분비가 증가하는 것을 알 수 있었다. 이는 혈관내피세포성장인자가 골막기원세포의 조골세포화 과정에서 자가분비 성장기전을 나타내는 것이라 할 수 있다. 이러한 연구들을 바탕으로 외인성 혈관내피세포성장인자의 주입에 대한 연구, 그리고 각각의 수용체들에 대한 저해 항체 주입에 대한 연구등이 이어져야 할 것이다. 이러한 결과들을 통하여 향후에는 악안면영역의 골결손 치료에 구강내 시술을 통하여 쉽게 채취할 수 있는 골막으로부터 자가 골막기원세포의 획득과 이의 적절한 담체 (scaffold)와의 혼용에 덧붙여 혈관내피세포성장인자/혈관내피세포성장인자수용체 (VEGF/VEGFR)의 활용은 빠른 골 치유까지 도모할 수 있는 훌륭한 골이식재의 역할을 할 것으로 기대된다.

#### V. 결 론

경상대학교 병원의 윤리위원회를 따르고 환자 동의하에 매복된 하악 제3대구치의 발치과정에서 5 × 20 mm의 골막을 채취하여 일차배양 및 계대배양을 실시하고 passage 3을 거친 골막기원세포를 기존의 연구방법에서 dexamethasone의 농도를 5배 증가시키고 ascorbic acid 및 β-glycerophosphate이 포함된 DMEM 배지에서 4주동안 배

양하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 골막기원세포에서 28일간의 배양기간동안 알칼리성 인산분해효소 활성도가 나타났으며 배양 7일에 이의 활성도가 가장 뚜렷하였으며 이후 지속적으로 감소하였다.
2. 골막기원세포에서 von kossa 염색을 통한 골기질의 형성은 배양 7일째부터 나타나 이후 지속적으로 증가하였다.
3. 골막기원세포의 조골세포로의 분화과정에서 네 개의 혈관내피세포성장인자 isoforms의 발현이 나타났고 특히 혈관내피세포성장인자<sub>121</sub>과 혈관내피세포성장인자<sub>165</sub>의 발현이 뚜렷하였으며 배양 14일까지 증가양상을 나타내다가 이후 감소하였다.
4. 골막기원세포의 조골세포로의 분화과정에서 혈관내피세포성장인자수용체-1, 혈관내피세포성장인자수용체-2 및 neuropilin-1의 발현이 나타났으며 이 또한 혈관내피세포성장인자와 유사하게 배양 14일까지 그 발현양상이 증가하다가 이후 감소하였다.
5. 골막기원세포의 조골세포로의 분화과정에서 혈관내피세포성장인자 및 이의 수용체들의 발현은 골기질이 형성되는 시기에 뚜렷이 증가하였다.

상기의 결론을 통하여 골막기원세포의 조골세포화 과정에서 혈관내피세포성장인자/혈관내피세포성장인자수용체가 직접적으로 관여하며 이 과정에서 혈관내피세포성장인자는 자가분비 성장기전을 가지는 것이라고 할 수 있을 것이다.

### 참고문헌

1. Park BW, Byun JH, Lee SG, et al : Evaluation of osteogenic activity and mineralization of cultured human periosteal-derived cells. *J Kor Maxillofac Plast Reconstr Surg* 28 : 511, 2006.
2. Park BW, Byun JH, Ryu YM, et al : Correlation between vascular endothelial growth factor signaling and mineralization during osteoblastic differentiation of cultured human periosteal-derived cells. *J Kor Maxillofac Plast Reconstr Surg* 29 : 197, 2007.
3. Feng D, Nagy JA, Hipp J, et al : Vesiculo-vacuolar organelles and the regulation of venule permeability to macromolecules by vascular permeability factor, histamine, and serotonin. *J Exp Med* 183 : 1981, 1996.
4. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, et al : Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J* 13 : 9, 1999.
5. Dvorak HF : Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor

- angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *J Clin Oncol* 20 : 4368, 2002.
6. Gerber HP, Vu TH, Ryan AM, et al : VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat Med* 5 : 623, 1999.
7. Haper J, Gerstenfeld LC, Klagsbrun M : Neuropilin-1 expression in osteogenic cells: down-regulation during differentiation of osteoblasts into osteocytes. *J Cell Biochem* 81 : 82, 2001.
8. Tao O, Spring SC, Terman BI : Characterization of a new alternatively spliced neuropilin-1 isoform. *Angiogenesis* 6 : 39, 2003.
9. Mayer H, Bertram H, Lindenmaier W, et al : Vascular endothelial growth factor (VEGF-A) expression in human mesenchymal stem cells: autocrine and paracrine role on osteoblastic and endothelial differentiation. *J Cell Biochem* 95 : 827, 2005.
10. Strizzi L, Catalano A, Vianale G, et al : Vascular endothelial growth factor is an autocrine growth factor in human malignant mesothelioma. *J Pathol* 193 : 468, 2001.
11. Tian X, Song S, Wu J, et al : Vascular endothelial growth factor: acting as an autocrine growth factor for human gastric adenocarcinoma cell MGC803. *Biochem Biophys Res Commun* 286 : 505, 2001.
12. Masood R, Cai J, Zheng T, et al : Vascular endothelial growth factor (VEGF) is an autocrine growth factor for VEGF receptor-positive human tumors. *Blood* 98 : 1904, 2001.
13. Cheng SL, Yang JW, Rifas L, et al : Differentiation of human bone marrow osteogenic stromal cells in vitro: induction of the osteoblast phenotype by dexamethasone. *Endocrinology* 134 : 277, 1994.
14. Yano A, Fujii Y, Iwai A, et al : Glucocorticoids suppress tumor angiogenesis and in vivo growth of prostate cancer cells. *Clin Cancer Res* 12 : 3003, 2006.
15. Badrudoja MA, Krouwer HG, Rand SD, et al : Antiangiogenic effects of dexamethasone in 9L gliosarcoma assessed by MRI cerebral blood volume maps. *Neuro Oncol* 5 : 235, 2003.
16. Furumatsu T, Shen ZN, Kawai A, et al : Vascular endothelial growth factor principally acts as the main angiogenic factor in the early stage of human osteoblastogenesis. *J Biochem* 133 : 633, 2003.
17. Wang DS, Yamazaki K, Nohtomi K, et al : Increase of vascular endothelial growth factor mRNA expression by 1,25-dihydroxyvitamin D3 in human osteoblast-like cells. *J Bone Miner Res* 11 : 472, 1996.
18. Wang DS, Miura M, Demura H, et al : Anabolic effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on osteoblasts are enhanced by vascular endothelial growth factor produced by osteoblasts and by growth factors produced by endothelial cells. *Endocrinology* 138 : 2953, 1997.
19. Villars F, Bordenave L, Bareille R, et al : Effect of human endothelial cells on human bone marrow stromal cell phenotype: role of VEGF?. *J Cell Biochem* 79 : 672, 2000.

### 저자 연락처

우편번호 660-702  
경상남도 진주시 칠암동 90번지  
경상대학교 의과대학/의학전문대학원 구강악안면외과학교실  
변준호

원고 접수일 2008년 2월 20일  
게재 확정일 2008년 5월 13일

### Reprint Requests

#### June-Ho Byun

Dept. of OMFS, Gyeongsang National University School of Medicine,  
Institute of Health Sciences,  
90 Chilam-dong, Jinju-city, Gyeongsangnam-do, 660-702, South Korea  
Tel: 82-55-750-8258 Fax: 82-55-761-7024  
E-mail: surbyun@nongae.gsnu.ac.kr

Paper received 20 February 2008

Paper accepted 13 May 2008