골막기원세포에서 발현되는 혈관내피세포성장인자 관련 자가성장

박봉욱 · 이성균 · 하영술* · 김덕룡** · 조영철*** · 성일용*** · 김욱규**** · 김종렬**** · 변준호

경상대학교 의학전문대학원 구강악안면외과학교실, 경상대학교 건강과학연구원, 의생명과학사업단 (BK21),
*경상대학교병원 임상의학연구소,
**경상대학교 의학전문대학원 생화학교실, 경상대학교 건강과학연구원, 의생명과학사업단 (BK21),
***울산대학교 의과대학 구강악안면외과학교실,
****부산대학교 치의학전문대학원 구강악안면외과학교실

Abstract (J. Kor. Oral Maxillofac. Surg. 2009;35:294-298)

VEGF-RELATED AUTOCRINE GROWTH IN PERIOSTEAL-DERIVED CELLS

Bong-Wook Park, Seong-Gyun Lee, Young-Sool Hah*, Deok-Ryong Kim**, Yeong-Cheol Cho***, Iel-Yong Sung***, Uk-Kyu Kim****, Jong-Ryoul Kim****, June-Ho Byun

*Department of Oral and Maxillofacial Surgery, *Clinical Research Institute, Gyeongsang National University Hospital, **Department of Biochemistry, Gyeongsang National University School of Medicine and Institute of Health Sciences, Biomedical Center (BK21), ***Department of Oral and Maxillofacial Surgery, College of Medicine, Ulsan University, ****Department of Oral and Maxillofacial Surgery, School of Dentistry, Pusan National University*

Purpose: The development of a microvascularization is important for the homeostasis of normal bone. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is one of the most important factors in vessel formation. The purpose of this study was to examine VEGF-related autocrine growth in periosteal-derived cells.

Materials and methods: Periosteal-derived cells were obtained from mandibular periosteums and introduced into the cell culture. After passage 3, the periosteal-derived cells were further cultured for 21 days in an osteogenic inductive culture medium containing dexamethasone, ascorbic acid, and β-glycerophosphate.

Results: The expression of four VEGF isoforms and VEGFRs was observed in periosteal-derived cells. Treatment with cultures with VEGFR-1 and VEGFR-2 Kinase Inhibitor inhibited osteoblastic differentiation and alkaline phosphatase (ALP) activity of periosteal-derived cells. In addition, exogenous VEGF treatment increased calcium content in the periosteal-derived cells.

Conclusion: These results suggest that VEGF might act as an autocrine growth molecule during osteoblastic differentiation of cultured human periosteal-derived cells.

Key words: Periosteal-derived cells, Vascular endothelial growth factor, Autocrine growth

〔원고접수일 2009. 9. 16 / 1차수정일 2009. 9. 22 / 2차수정일 2009. 9. 28 / 게재확정일 2009. 9. 30〕

Ⅰ. 서 론

골 조직의 성장과 이와 관련하여 나타나는 적절한 혈류공급이 밀접한 관련이 있다는 것은 주지의 사실이다. 적절한 혈류공급을 위한 혈관신생인자로 가장 잘 알려진 것은 혈관내피세포성장인자 (vascular endothelial growth factor, VEGF)이다. 혈관내피세포성장인자는 혈소판유래성장인자(platelet-derived growth factor, PDGF)류에 속하고 헤파린 결합형 다기능 이합체 당단백이며 혈관내피세포에 특이적인 유사분열 촉진제로 주로 두가지 수용체, 혈관내피세포성장인자수용체-1 (vascular endothelial growth factor receptor-1, VEGFR-1 or Flt-1)과 혈관내피세포성장인자수용체-2 (vascular endothelial growth factor receptor-2, VEGFR-2 or Flk-1/KDR)에 결합하여 혈관신생의 성장, 분화, 그리고 성숙등의 다단계를 거쳐 결과적으로 미세혈관밀도의 증가를 가져오게 되며 또 다른 수용체인 혈관내피세포성장인자수용체-3 (vascular endothelial growth factor-3, VEGFR-3 or Flt-

변 준 호
660-702 경상남도 진주시 칠암동 90번지
경상대학교 의학전문대학원 구강악안면외과학교실, 경상대학교 건강과학연구원, 의생명과학사업단(BK21)
June-Ho Byun
Dept. of OMFS, Gyeongsang National University School of Medicine. Institute of Health Sciences, Biomedical center (BK21).
90 Chilam-dong, Jinju-city, Gyeongsangnam-do, 660-702, South Korea
Tel: 82-55-750-8258 Fax: 82-55-761-7024
E-mail: surbyun@gsnu.ac.kr

4)와의 반응을 통해서는 혈관성장 뿐 아니라 암의 전이와 관련있는 림프관의 성장에도 큰 역할을 하는 것으로 알려져 있다[1-3].

조골세포 및 조골유사세포등의 골 전구세포들에서 혈관내피세포성장인자의 발현은 보고되고 있지만 혈관내피세포성장인자수용체의 발현과 관련하여서는 아직도 논란이 많다. 일반적으로 혈관내피세포에 이러한 혈관내피세포성장인자수용체들이 존재한다는 것은 혈관내피세포성장인자가 어떠한 상황에서 주변분비 성장기전 (paracrine growth mechanism)을 통하여 그 역할을 담당하고 있다고 할 수 있을 것이다. 그러나 최근에는 세포 배양과정에서 특정 골 전구세포에서 혈관내피세포성장인자 뿐 아니라 혈관내피세포성장인자수용체들의 발현이 함께 보고되면서 자가분비 성장기전 (autocrine growth mechanism)이 보고되고 있다. 성장인자등에 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. 자가분비 성장기전과 관련하여서는 종양등에서 잘 보고되고 있다. 흑색종을 포함한 일부종양에서 혈관내피세포성장인자수용체가 해당세포 자체에 존재함이 밝혀지면서 혈관내피세포성장인자가 주변의 혈관내피세포가 존재하지 않는 상황에서도 저산소에 의한 성장 저하없이 직접적으로 그 해당세포에 작용하여 성장기전을 나타낸다고 보고되고 있다[4-7].

이에 본 연구에서는 치과적으로 매복된 제3대구치의 발치과정에서 쉽게 채취할 수 있는 골막에서 골막기원세포를 추출하여 조골세포로 분화시키는 과정에서 혈관내피세포성장인자 isoforms 및 혈관내피세포성장인자수용체들의 발현을 관찰한다. 그리고 혈관내피세포성장인자수용체 저해제 및 외인성 재조합 인간 혈관내피세포성장인자의 적용이 골막기원세포의 조골 활성 정도에 미치는 영향을 관찰하여 골막기원세포의 조골세포로의 분화과정에서 혈관내피세포성장인자에 의한 자가분비 성장기전이 있는 지를 관찰하고자 한다.

Ⅱ. 연구재료 및 방법

1. 골막기원세포의 추출, 증식 및 조골세포로의 분화

골막기원세포를 추출하고 증식하는 과정은 이전 연구방법에 의하여 실시하였다[3,8]. 환자 동의하에 매복된 하악 제3대구치의 발치과정에서 약 5×20 mm의 골막을 채취하여 몇조각으로 자르고 100-mm culture dish에 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℃, 5% CO_2 배양기를 통하여 배양하였다. 약 90%의 세포군집 (confluence)을 나타내면 증식된 세포들을 0.02% 트립신과 0.02% EDTA로 5분간 트립신 처리시키고 1,500 rpm에서 원심분리하여 계대배양을 실시하였다. Passage 3을 거친 후, 골막기원세포는 3×10^4 cells/well의 밀도로 6-well plate에 주입하고 골형성 유도인자인 50μg/ml $_L$-ascorbic acid 2-phosphate, 10 nM dexamethasone, 그리고 10 mM β-glycerophosphate이 포함되고 10% fetal bovine serum (FBS)이 포함된 DMEM로 구성된 골형성 유도 배지에서 21일동안 배양하였다.

2. 혈관내피세포성장인자 및 혈관내피세포성장인자수용체에 대한 Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) 분석

두 군의 골막기원세포에서 발현되는 혈관내피세포성장인자 및 혈관내피세포성장인자수용체를 reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)을 통하여 배양 10일째에 분석하였다. 이들의 발현은 골형성 유도인자인 ascorbic acid, dexamethasone, 그리고 β-glycerophosphate이 포함되지 않은 배지에서도 관찰하였다. 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'-aatgcatcctgcaccaccaa-3', 5'-gtagccatattcattgtcat-3' 515 bp for the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH); 5'-gggcagaatcatcacgaagt-3', 5'-tcaccgcctcggcttgtcaca-3' for the VEGF; 5'-ggctctgtggaaagttcagc-3', 5'-gctcacactgctcatccaaa-3' 223 bp for the VEGFR-1; 5'-gtgaccaacatggagtcgtg-3', 5'-tgcttcacagaagaccatgc-3' 218 bp for the VEGFR-2; 5'-caacgataaatgtggcgatact-3', 5'-tatactgggaagaagctgtgat-3' 820 bp for the neuropilin-1. RT-PCR 산물은 1.5% 아가로스겔을 사용하여 전기영동으로 확인하였다.

3. 혈관내피세포성장인자수용체 저해제 처리 (Treatment of periosteal-derived cells with VEGFR inhibitors)

골막기원세포의 조골세포로의 분화과정에서 혈관내피세포성장인자수용체 저해체를 처리하여 그 영향을 분석하였다. 혈관내피세포성장인자수용체-1과 혈관내피세포성장인자수용체-2에 동시에 작용하는 저해제로 혈관내피세포성장인자수용체-1과 혈관내피세포성장인자수용체-2에 대하여 각각 IC50 (half maximal inhibitory concentration) 값

이 각각 170 nM, 160 nM인 KRN633 (EMD Chemicals Inc, Darmstadt, Germany)과 혈관내피세포성장인자수용체-2에 대한 저해제로 IC50값이 19 nM인 VEGFR2 Kinase Inhibitor IV (EMD Chemicals Inc, Darmstadt, Germany)을 이용하여 골막기원세포의 조골세포로의 분화과정에서 이들의 처치가 조골 활성 정도에 영향을 미치는 지를 배양 21일째에 배지 자체에서와 배양 9일째에 알칼리성 인산분해효소에 대한 조직화학적 검사를 통하여 분석하였다. 알칼리성 인산분해효소에 대한 조직화학적 검사를 위하여 인산염 식염수로 세포층을 세척한 후, 3.7% 포름알데히드와 90%에탄올로 2분간 고정하고 10분간 TBS (Tris Buffer saline)에 세척하였다. 이후 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate와 nitroblue tetrazolium (BCIP/NBT, Amresco, Ohio, USA) 알칼리성 인산분해효소 기질로 처리하여 실온에서 10분간 염색하였다.

4. 외인성 재조합 인간 혈관내피세포성장인자 처리 (Treatment of periosteal-derived cells with recombinant human VEGF)

골막기원세포의 조골세포로의 분화과정에서 외인성 혈관내피세포성장인자 처리를 통하여 조골 활성에 미치는 영향을 칼슘량을 통하여 분석하였다. 골막기원세포의 조골세포로의 분화과정에서 외인성으로 100 ng/ml의 재조합 인간 혈관내피세포성장인자 (recombinant human VEGF 165, R & D Systems, Mineapolis, USA)을 배양 21일째에 적용하여 그 효과를 칼슘량을 통하여 분석하였다. 생성되는 칼슘량에 대한 측정은, 24시간동안 관련 세포를 0.6 N HCl로 탈회시키고 o-cresolphthalein 방법 (o-cresolphthalein method, calcium C-test Wako, Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan)을 이용하여 형성된 칼슘에 대한 정량적 평가를 실시하였다.

Ⅲ. 연구결과

1. RT-PCR 분석

네가지 혈관내피세포성장인자 isoforms과 혈관내피세포성장인자수용체들의 발현이 배양 10일째에 발현되었다. 골형성 유도인자인 ascorbic acid, dexamethasone, 그리고 β-glycerophosphate이 포함되지 않은 배지에서 배양된 골막기원세포에서도 이들의 발현은 관찰되었다 (Fig. 1).

2. 혈관내피세포성장인자수용체 저해제 처리효과

골막기원세포의 조골세포로의 분화과정에서 혈관내피세포성장인자수용체의 저해제를 처리하고 배양 21일째에 배지 자체에서와 배양 9일째에 알칼리성 인산분해효소에 대한 조직화학적 검사를 통하여 그 효과를 관찰하였다. 혈관내피세포성장인자수용체-2에 대한 저해제인 VEGFR2 Kinase Inhibitor IV를 처리하였을 경우에는 골막기원세포의 조골세포로의 분화과정에 의미있는 영향을 미친다고 할 수 없었으나 혈관내피세포성장인자수용체-1과 혈관내피세포성장인자수용체-2에 동시에 저해제로 작용하는 KRN633을 처리하였을 경우에는 배지에서와 알칼리성 인산분해효소에 대한 조직화학적 검사에서 골막기원세포의 조골세포로의 조골 활성을 저해하는 것으로 나타났다 (Figs. 2, 3).

3. 외인성 재조합 인간 혈관내피세포성장인자 처리효과

골막기원세포의 조골세포로의 분화과정에서 100 ng/ml의 외인성 혈관내피세포성장인자를 처리하여 배양 21일째에 생성되는 칼슘량을 통하여 그 효과를 관찰하였다. 외인성 혈관내피세포성장인자를 처리하였을 경우에 골막기원세포가 조골세포로 분화되면서 생성되는 칼슘량이 증가되는 양상을 나타내었다 (Fig. 4).

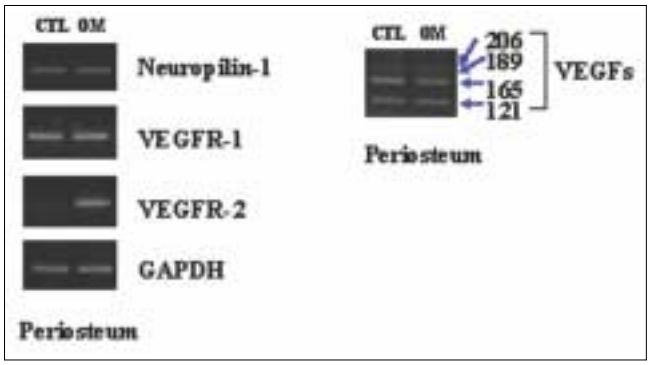

Fig. 1. The expression of four VEGF isoforms and VEGFRs in periosteal-derived cells was observed in osteogenic inductive medium (OM) at day of 10 culture. The expression of four VEGF isoforms and VEGFRs in periosteal-derived cells was also observed in non-osteogenic inductive medium (CTL).

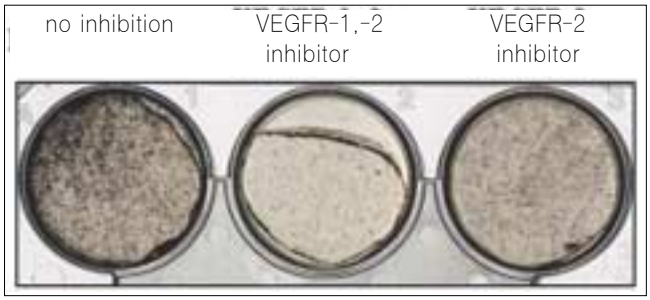

Fig. 2. Effects of inhibiting VEGFRs on osteoblastic differentiation. Treatment with cultures with VEGFR2 Kinase Inhibitor IV did not have an obvious effect on osteoblastic differentiation of periosteal-derived cells at day 21 of culture. However, KRN633 diminished osteoblastic differentiation of periosteal-derived cells at day 21 of culture.

Fig. 3. ALP activity in the periosteal-derived cells was examined at day 9 of culture. Treatment with cultures with VEGFR2 Kinase Inhibitor IV did not have an effect on ALP activity of periosteal-derived cells. However, treatment of periosteal-derived cells with KRN633 diminished ALP activity of periosteal-derived cells.

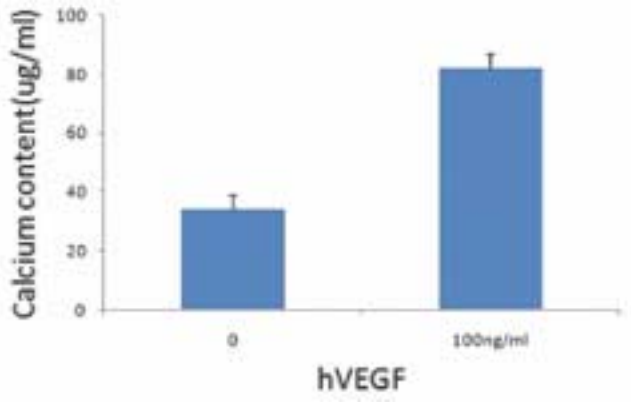

Fig. 4. Exogenous treatment of periosteal-derived cells with recombinant human VEGF (hVEGF) increased calcium content in the periosteal-derived cells.

Ⅳ. 총괄 및 고찰

여러 가지 동물 모델을 통한 연구를 포함하여 골신생과 혈관신생사이의 긍정적인 상호작용과 관련하여 많은 연구들이 진행되고 있다. 그러나 골절등의 치유과정에서 중요한 역할을 한다고 알려진 혈관내피세포성장인자-매개 혈관신생이 세포 배양과 관련하여서는 아직도 많은 논란이 있다[9-12]. 이에 본 저자들도 세포 배양 과정에서 나타나는 조골활성과 그 과정에서 반응하는 혈관신생인자에 대한 연구를 지속적으로 진행하고 있다. 본 연구에서는 하악골 골막에서 골막기원세포를 추출하여 조골세포로 분화시키는 과정에서 혈관내피세포성장인자 isoforms 및 혈관내피세포성장인자수용체들의 발현을 관찰하고 혈관내피세포성장인자수용체 저해제 및 외인성 혈관내피세포성장인자의 적용을 통하여 골막기원세포의 조골 활성 과정에서 혈관내피세포성장인자에 의한 자가분비 성장기전이 존재하는지를 관찰하고자 하는 것이다.

혈관내피세포성장인자와 관련된 자가분비 성장기전은 암등에서 많이 알려져 있다. 정상조직과 유사하게 종양은 종양세포로 이루어진 실질조직과 염증세포, 혈관내피세포 및 섬유모세포 등의 비종양 지지조직으로 이루어진 간질조직으로 구성되어 있으며 산소와 영양소를 제공하는 새로운 혈관의 공급이 없을 경우 저산소상태를 야기하며 1-2 mm 이상도 성장할 수가 없다. 종양의 크기가 증가함에 따라 가장 가까이 있는 혈관사이 거리의 증가로 팽창하는 종양내의 세포들은 산소가 부족하게 되고 이에 종양내 저산소 지역이 초래되어 종양세포들은 이에 대한 반응으로 혈관내피세포성장인자를 생성하게 된다. 특히 괴사부위의 저산소지역에 혈관내피세포성장인자의 발현 수준이 증가하게 되는 것이다. 그러면 이러한 인자들이 인접한 혈관내피세포에 존재하는 혈관내피세포성장인자수용체에 작용하여 일련의 기전을 통하여 혈관증식을 통하여 증가된 산소를 공급받아 종양이 더 커질 수 있게 된다. 그리하여 혈관내피세포에 존재하는 혈관내피세포성장인자수용체의 작용을 억제하는 치료를 통하여 암의 괴사를 이루고자 하였으나 일부의 암에서 암세포 자체내에 혈관내피세포성장인자수용체가 발현되면서 스스로 자가 성장을 이루는 것이 발견되었다. Masood 등[5]은 다양한 세포주를 이용한 실험에서 흑생종, 난소암, 췌장암, 그리고 Kaposi's sarcoma에서 종양세포자체에 혈관내피세포성장인자수용체가 발현됨을 보고하며 혈관내피세포성장인자는 혈관내피세포성장인자수용체를 발현하는 종양에 대하여 자가분비 성장인자 역할을 한다고 주장하였다[6,7,13-15].

일반적으로 미분화 간엽 줄기세포 상태에서 기능을 나타내는 활동성 조골세포로의 분화과정은 알칼리성 인산분해효소의 발현 및 무기질 침착과 같이 각각의 단계에서 특정 유전인자들이 관여하는 일련의 과정을 통하여 이루어진다. 알칼리성 인산분해효소의 발현은 조골세포로의 분화 초기에 주로 나타나며 무기질 침착은 조골세포로의 분화 마지막 단계에서 이루어지므로 알칼리성 인산분해효소의 발현은 초기 조골세포 표지자로, 무기질 침착은 만기 조골세포 표지자로 알려져 있다. 무기질 침착과 관련하여서는 기질내 칼슘의 정량적 측정이 관련된 세포에 의하여 형성된 무기질 정도를 평가하여 준다. 본 연구에서도 이러한 점을 고려하여 알칼리성 인산분해효소의 발현은 배양 9일째, 그리고 칼슘의 정량적 측정은 배양 21일째에 시행하였다[4,16].

본 연구에서는 인간 골막기원세포가 조골세포로 분화되는 과정에서 네가지 isoforms의 혈관내피세포성장인자와 혈관내피세포성장인자수용체-1, 혈관내피세포성장인자수용체-2 및 neuropilin-1의 발현을 나타내었다. Semaphorins

에 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[17,18]. 그리고 혈관내피세포성장인자수용체-2에 대한 저해제를 처리하였을 경우에는 골막기원세포의 조골세포로의 분화과정에 의미있는 변화는 없었으나 혈관내피세포성장인자수용체-1과 혈관내피세포성장인자수용체-2에 동시에 저해제로 작용하는 KRN633을 처리하였을 경우에는 골막기원세포의 조골세포로의 조골 활성을 저해하는 것으로 나타났다. 또한 외인성 혈관내피세포성장인자를 주입하였을 경우, 배양과정에서 생성되는 칼슘량이 증가되는 것을 나타내어 외인성 혈관내피세포성장인자의 주입은 골막기원세포가 조골세포로의 분화를 촉진시킨다고 할 수 있다. 이러한 결과들을 통하여 골막기원세포에서 조골세포로 분화되는 과정에서 혈관내피세포성장인자 관련 자가분비 성장기전이 존재한다고 할 수 있으며 이러한 기전은 혈관내피세포성장인자/혈관내피세포성장인자수용체-1,2가 관여한다고 할 수 있을 것이다. 향후에는 수용체 개개인자에 대한 항 혈관내피세포성장인자수용체 (antihuman VEGFR neutralizing antibody) 적용을 통하여 더 면밀한 고찰이 있어야 할 것으로 사료된다.

Ⅴ. 결 론

상기 실험을 통하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 네가지 혈관내피세포성장인자 isoforms과 혈관내피세포성장인자수용체들의 발현이 배양 10일째에 발현되었다.
2. 혈관내피세포성장인자수용체-2에 대한 저해제인 VEGFR2 Kinase Inhibitor IV를 처리하였을 경우에는 골막기원세포의 조골세포로의 분화과정에 의미있는 변화는 없었으나 혈관내피세포성장인자수용체-1과 혈관내피세포성장인자수용체-2에 동시에 저해제로 작용하는 KRN633을 처리하였을 경우에는 골막기원세포에서의 알칼리성 인산분해효소 발현을 저해하였다.
3. 골막기원세포의 조골세포로의 분화과정에서 외인성 혈관내피세포성장인자를 처리하였을 경우, 골막기원세포가 조골세포로 분화되면서 생성되는 칼슘량이 증가되었다.

참고문헌

1. Mayer H, Bertram H, Lindenmaier W, Korff T, Weber H, Weich H. Vascular endothelial growth factor (VEGF-A) expression in human mesenchymal stem cells: autocrine and paracrine role on osteoblastic and endothelial differentiation. J Cell Biochem 2005;95:827-39.
2. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. FASEB J 1999;13:9-22.
3. Park BW, Byun JH, Ryu YM, Hah YS, Kim DR, Cho YC et al. Correlation between vascular endothelial growth factor signaling and mineralization during osteoblastic differentiation of cultured human periosteal-derived cells. J Korean Assoc Maxillofac Plast Reconstr Surg 2007;29:197-205.
4. Park BW, Choi MJ, Ryu YM, Lee SG, Hah YS, Kim DR et al. Evaluation of angiogenic phenotypes in cultured human periosteal-derived cells under high-dose dexamethasone. J Korean Assoc Maxillofac Plast Reconstr Surg 2008;30:217-24.
5. Masood R, Cai J, Zheng T, Smith DL, Hinton DR, Gill PS. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is an autocrine growth factor for VEGF receptor-positive human tumors. Blood 2001;98:1904-13.
6. Strizzi L, Catalano A, Vianale G, Orecchia S, Casalini A, Tassi G et al. Vascular endothelial growth factor is an autocrine growth factor in human malignant mesothelioma. J Pathol 2001;193:468-75.
7. Tian X, Song S, Wu J, Meng L, Dong Z, Shou C. Vascular endothelial growth factor: acting as an autocrine growth factor for human gastric adenocarcinoma cell MGC803. Biochem Biophys Res Commun 2001;286:505-12.
8. Park BW, Byun JH, Lee SG, Hah YS, Kim DR, Cho YC et al. Evaluation of osteogenic activity and mineralization of cultured human periosteal-derived cells. J Korean Assoc Maxillofac Plast Reconstr Surg 2006;28:511-9.
9. Furumatsu T, Shen ZN, Kawai A, Nishida K, Manabe H, Oohashi T et al. Vascular endothelial growh factor prinicipally acts as the main angiogenic factor in the early stage of human osteoblastogenesis. J Biochem (Tokyo) 2003;133:633-9.
10. Gerber HP, Vu TH, Ryan AM, Kowalski J, Werb Z, Ferrara N. VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. Nat Med 1999;5:623-8.
11. Maes C, Carmeliet P, Moermans K, Stockmans I, Smets N, Collen D et al. Impaired angiogenesis and endochondral bone formation in mice lacking the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF164 and VEGF188. Mech Dev 2002;111:61-73.
12. Wang DS, Miura M, Demura H, Sato K. 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 1997;138:2953-62.
13. Gee MF, Tsuchida R, Eichler-Jonsson C, Das B, Baruchel S, Malkin D. Vascular endothelial growth factor acts in an autocrine manner in rhabdomyosarcoma cell lines and can be inhibited with all-trans-retinoic acid. Oncogene 2005;24:8025-37.
14. Millanta F, Silvestri G, Vaselli C, Citi S, Pisani G, Lorenzi D et al. The role of vascular endothelial growth factor and its receptor Flk-1/KDR in promoting tumour angiogenesis in feline and canine mammary carcinomas: a preliminary study of autocrine and paracrine loops. Res Vet Sci 2006;81:350-7.
15. Weigand M, Hantel P, Kreienberg R, Waltenberger J. Autocrine vascular endothelial growth factor signalling in breast cancer. Evidence from cell lines and primary breast cancer cultures in vitro. Angiogenesis 2005;8:197-204.
16. Kim JR, Park, BW, Lee CI, Hah YS, Kim DR, Cho YC et al. Effect of dexamethasone concentrations on osteogenic activity of cultured human periosteal-derived cells. J Korean Assoc Maxillofac Plast Reconstr Surg 2009;31:287-93.
17. Haper J, Gerstenfeld LC, Klagsbrun M. Neuropilin-1 expression in osteogenic cells: down-regulation during differentiation of osteoblasts into osteocytes. J Cell Biochem 2001;81:82-92.
18. Tao O, Spring SC, Terman BI. Characterization of a new alternatively spliced neuropilin-1 isoform. Angiogenesis 2003;6:39-45.