https://doi.org/10.14368/jdras.2024.40.1.13
ISSN 2384-4353 eISSN 2384-4272

Original Article

# A study of growth factors, chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells and cell response by needle size differences *in vitro*

Jeongyun Park, Yu Jeong Hwang, Joseph Junesirk Choi, Jin Young Chon, Suk Won Lee*
*Department of Biomaterials & Prosthodontics, Kyung Hee University Hospital at Gangdong, School of Dentistry, Kyung Hee University, Seoul, Republic of Korea*

**Purpose:** This aim of this study was to demonstrate growth factors that differentiate human mesenchymal stem cells into chondrocytes and to evaluate cell proliferation enhancement by needle size differences. **Materials and Methods:** Human mesenchymal stem cells were cultured in chondrogenic medium supplemented with BMP-2, BMP-4, BMP-6, BMP-7, BMP-13, FGF-2, FGF-18, IGF-1, TGF-β1, TGF-β2, TGF-β3 and without growth factors for 14, 21, and 28 days. Then, the expression levels of SOX-5, SOX-6, SOX-9 and FOXO1A were comparatively analyzed. Human mesenchymal stem cells were inoculated into culture dishes using 18, 21, and 26 gauge (G) needles, and cell proliferation was measured after 24, 48, and 72 hours, respectively. **Results:** In addition to the previously known FGF, IGF-1, and TGFβ1,the BMP family growth factors such as BMP-2, BMP-4, BMP-6, and BMP-7 increased the expression of chondrocyte differentiation genes SOX-5, SOX-6, SOX-9, and FOXO1A. At 48 hours, the 26G group, the smallest needle, showed significant cell proliferation improvement compared to the control group and the 18G group. At 72 hours, the 26G group, the smallest needle, showed significant increase in cell proliferation compared to the control group. **Conclusion:** Through this study, growth factors with the ability to induce chondrocyte differentiation of human mesenchymal stem cells were investigated, and cell proliferation changes by needle size differences were determined. **(J Dent Rehabil Appl Sci 2024;40(1):13-23)**

**Key words:** human mesenchymal stem cells; chondrocytes; growth factors; needles; cell proliferation

## 서론

턱관절질환은 대표적인 만성질환으로 근육장애와 관절장애로 나뉘며 원인으로는 외상, 부정교합, 스트레스 등과 연관되어 있다. 또한 턱관절질환은 치료 후에 재발이 종종 일어나는 대표적인 만성질환이다. 이 중 턱관절 내장증은 궁극적으로 중증병리와 더불어 관절표면의 마모로 대표되는 퇴행성골관절염(degenerative osteoarthritis)으로 발전하며, 턱관절질환 환자들의 54.2%가 턱관절 골관절염을 보인다고 보고되고 있다.[1] 현재 사용되고 있는 턱관절질환의 치료방법으로는 스플린트(splint), 약물치료, 물리치료, 심리치료와 같은 비침습적 치료와, 관절강천자술의 최소침습치료가 있다. 관절강천자술은 간단하고, 비침습적이며, 저렴하다는 장점들이 있다. 특히, 관절내 히알루론산(hyaluronic acid) 주사를 하는 경우 급성 개구장애에서의 통증개선에 효과적이지만 관절 공간내 짧은 시간동안 존재한다는 문제점이 있고 히알루론산의 효능을 뒷받침하는 결정적 증거가 보고되어 있지 않다.[2] 최근 파괴된 관절조직을 근본적으로 복구 및 재생하기 위해 줄기세포를 이용하여 연골세포 분화를 유

*Correspondence to: Suk Won Lee
Professor, Department of Biomaterials & Prosthodontics, Kyung Hee University Hospital at Gangdong, School of Dentistry, Kyung Hee University, 892 Dongnam-ro, Gangdong-gu, Seoul, 06278, Republic Korea
Tel: +82-2-440-7519, Fax: +82-2-440-7549, E-mail: ysprosth@hanmail.net
Received: December 6, 2023/Last Revision: January 4, 2024/Accepted: January 23, 2024

Copyright© 2024 The Korean Academy of Stomatognathic Function and Occlusion.
©It is identical to Creative Commons Non-Commercial License.

도하는 연구들이 많이 이루어지고 있다. 줄기세포는 관절의 복원 및 재생을 위한 유능한 세포원으로 그 중 간엽줄기세포는 다양한 조직으로부터 채취가 가능하며 높은 증식력과 연골세포로의 분화능력을 가지고 있기 때문에 연골재생의 세포원으로 널리 선택된다.[3] 간엽줄기세포를 연골세포로 분화시키기 위해서는 많은 요인들이 관여하고 있으며, 생물학적, 생화학적, 기계적 요인들이 포함되어 있다. 특히, 본 연구에서는 연골분화 및 증식에 생화학적으로 관여한다고 알려진 fibroblast growth factors (FGF), insulin-like growth factor-1 (IGF-1), transforming growth factor β (TGF-β), bone morphogenetic proteins (BMP) 성장인자들의 역할을 고찰하고자 한다.[4]

TGF-β는 최근 연골세포로의 분화 과정에서 가장 핵심적인 요소로 알려져 있다. TGF-β 수용체가 활성화된 후, TGF-β는 Suppressor of mothers against decapentaplegic (Smad)와 mitogen-activated protein kinase (MAPK) 신호전달 경로를 통해 연골세포 형성을 유도한다.[5] 또한, TGF-β는 연골분화 전사인사인 sex determining region Y boxes-5 (SOX-5), SOX-6, SOX-9, forkhead O class transcription factors 1A (FOXO1A) 발현을 유도한다. 이 중 SOX-5, SOX-6, SOX-9 전사인자는 연골분화를 조절하고 세포외기질 형성을 조절한다.[6] TGF-β1과 platelet-derived growth factor (PDGF)는 유리질과 콜라젠(collagen)환경 모두에서 콜라젠과 글리코사미노글리칸(glycosaminoglycan)의 생성을 촉진하며, 턱관절조직 재생의 매우 강력한 생화학적 자극이다.[7] BMP는 연골형성과 골 형성을 조절하는 유전자로 연골세포 성숙에서 마지막 분화의 조절까지 연골세포 분화의 다양한 단계에 포함되어 있다.[8] BMP는 Smad 또는 non-Smad 신호를 통해 신호전달이 진행되는데 Smad-dependent pathway는 세포 비대 및 골 생성을 유도하고, Smad-independent pathway를 통한 신호전달 경로는 extracellular signal-regulated kinase (ERKs)와 p38 kinase를 포함한 몇몇 MAPK를 활성화시켜 연골세포 형성을 조절한다.[9] p38은 SOX-9 발현을 상향조절하여 연골 형성을 직접적으로 증가시키거나 Wnt7a/beta catenin (Wnt: 초파리 날개 형성에 관여하는 것으로 알려진 Wingless 유전자와 종양형성 유전자로 알려졌던 int-1의 혼성어) 신호전달을 억제하여 연골 형성을 간접적으로 증가시킨다.[10] FGF는 세포활동에서 증식, 분화, 운동성에서 다양한 역할을 한다. FGF-2는 간엽줄기세포의 세포증식을 촉진하고 프로테오글리칸(proteoglycan) 생산을 향상시키는 역할을 하며 FGF-18은 간엽줄기세포의 세포증식을 억제하며 연골분화를 유도하는 역할을 한다.[11] IGF-1은 관절 연골 내에서 연골항상성, 프로테오글리칸 합성 및 연골세포에 의한 분해에 필요한 주요 동화 작용 성장인자이며, 피브린(fibrin)이 있는 연골세포 형태를 안정적으로 유지시키고 상당한 연골합성을 야기하는 역할을 한다.[12] bFGF와 IGF-1은 동반작용을 통해 관절세포의 증식을 증진시키고, 미성숙과 성숙 연골에서 연골세포 물질대사에 각각 다른 생화학 및 생물리학적으로 영향을 준다.[13] 본 연구에서는, 연골세포 합성 및 분화에 관여하는 위 성장인자들에 대한 반응으로 연골세포로의 분화를 나타내는 표지전사인자들(marker transcription factors)인 SOX-5, SOX-6, SOX-9 및 FOXO1A의 발현을 분석하여 턱관절 조직의 자가재생에 필요한 성장인자들에 대해 알아보고자 하였다.

세포와 조직에 미치는 기계적 응력의 영향은 기계생물학을 통하여 오랜 기간 연구되어져 왔다. 분화되지 않은 줄기세포에 기계적 자극이 가해지면 줄기세포에 세포와 핵의 변형에 의한 직접적 영향과 삼투압, 정수압, 유체흐름에 의한 간접적인 영향을 끼칠 수 있다.[14] 기계적 힘은 세포 생리학의 중요한 조절자이며 세포의 생합성 활성을 증가시켜 조직 재생을 개선하거나 가속화할 수 있다. 분화능을 가진 간엽줄기세포가 받는 기계적 자극에 따라 세포 모양, 유전자 발현, 증식의 차이가 나타나며, 간엽줄기세포의 모양, 크기, 배열이 변형될 수 있다. 간엽줄기세포에 주기적 신전, 주기적 압력, 전단응력의 기계적 자극에 대한 세포 반응의 차이를 연구한 논문에서 전단응력의 힘이 클수록 세포들이 방추형 세포가 많이 나타났고, 주기적 압력이 있을 때 세포 밀도가 높게 나타나는 결과가 보고되었다.[15] 이를 통해, 압력은 간엽줄기세포의 세포형태 및 핵 형태의 변화를 일으킬 수 있으며 세포증식 및 연골세포의 분화에 영향을 미칠 수 있다는 것을 알 수 있다. 또한, 미세한 기계적 신호만을 간엽줄기세포에 적용한 실험에서는 기계적 자극을 가하지 않은 대조군보다 세포 총량이 증가되는 결과가 보고되었다.[16] 콜라젠-글리코사미노글리칸 스캐폴드(scaffold)에서 기계적 응력에 따른 간엽줄기세포의 증식을 연구한 논문에서도 스캐폴드에 가해지는 힘에 의해 간엽줄기세포의 증식 및 다양한 세포로의 분화가 영향을 받으면서, 높은 유속과 낮은 전단 변형은 연골세포의 성장을 촉진한다는 시사점이 제시되었다.[17] 디스크 활막관절인 턱관절에서는, 그 연골 내 연골세포가 점탄성과 동적변형거동(deformation behav-

ior)을 보이므로 더욱 기계생물학 의존적이다. 간엽줄기세포가 포함된 구조물의 압축력 및 변형 하중은 연골 재생 및 복구를 위한 생합성 반응을 유도한다.[14] 연골세포의 동적 변형 하중 또는 전단은 글리코사미노글리칸 합성을 자극하고, 생성된 조직의 기계적 특성을 증가시킨다.[18] 기계적 자극이 다양한 세포행동을 변화시킨다는 사실은, 주사침의 단면직경 차이가 간엽줄기세포의 증진에 영향을 미칠 수 있다는 가설 제시를 가능하게 한다.

본 연구에서는 간엽줄기세포의 연골세포분화 유도 성장인자들을 고찰하고, 주사침 크기에 따른 세포증식 증진의 차이 변화를 규명하고자 하였다.

## 연구 재료 및 방법

인간 골수-유래 간엽줄기세포를 Lonza사로부터 구입하였다. 인간간엽줄기세포는 37.8°C에서 5% $CO_2$로 채워진 간엽줄기세포 성장배지(mesenchymal stem cells growth medium) (MSCGM; Lonza, Walkersville, USA)에서 배양하였고 10% fetal bovine serum (FBS; Invitrogen, Carlsbad, USA)와 1% antibiotic-antimycotic 용액이 포함된 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; WelGene, Daegu, Korea)에 보관하였다. 본 연구에서는 계대배양 후 3 - 5세대에 해당하는 세포를 이용하였다. 트립신 처리 후 $2.5 \times 10^5$ 세포를 포함하는 샘플을 원심분리 튜브에 주입 후 500 × g에서 5분 동안 원심분리하였다. 연골아세포분화를 유도하기 위하여, 연골분화 배지인 1 ml DMEM - high glucose (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), ascorbate-2-phosphate (100 mM, Sigma-Aldrich), dexamethasone $10^{-7}$ M (Sigma-Aldrich), 1% internal transcribed spacer+1 (ITS+1) (Sigma-Aldrich)로 대체되었고 37°C, 5%, $CO_2$에서 배양하였다. 성장인자는 다음과 같이 첨가하였다: 10 ng/ml의 BMP-2, BMP-4, BMP-6, BMP-7, BMP-13, FGF-2, FGF-18, IGF-1, TGF-β1, TGF-β2, TGF-β3 (Sigma-Aldrich)(Fig. 1). 배지와 성장인자는 21일 동안 4일마다 교체하였다. 성장인자를 투입하지 않은 세포는 대조군으로 사용하였다. 연골분화 배지 내 인간간엽줄기세포는 배양 14일, 21일, 28일 후 각각 트립신-에틸렌다이아민테트라아세트산(ethylene-diamine-tetracetic acid; EDTA) (Gibco BRL, Gaithersburg, USA)를 사용하여 분리하였다. 각 샘플의 total RNA는 Trizol (Invitrogen)을 사용하여 추출하였다. Total RNA의 농도는 260 nm에서의 흡광도에 의해 추정되었다. 총 RNA 샘플 1mg을 역전사 효소(Promega Co., Madison, USA)를 사용하여 cDNA로 전환하였다. 중합효소연쇄반응은 Taq 중합효소(Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), 25 mM $MgCl_2$, 25 mM dNTPs (dGTP, dCTP, dATP 및 dTTP)를 사용하여 시행하였다. 연골세포로의 분화를 나타내는 표지전사인자들인 SOX-5, SOX-6, SOX-9, FOXO1A 유전자의 발현을 중합효소연쇄반응을 통해 분석하였다. 유전자 특이적(gene-specific) 프라이머(primer)는 PRIMER3 소프트웨어(Primer3 Input, 버전 0.4.0, DNA STAR, Madison, USA)로 디자인하였고, Table 1에 정리하였다. 하우스키핑유전자는 베타-액틴의 중합효소연쇄반응 프라이머를

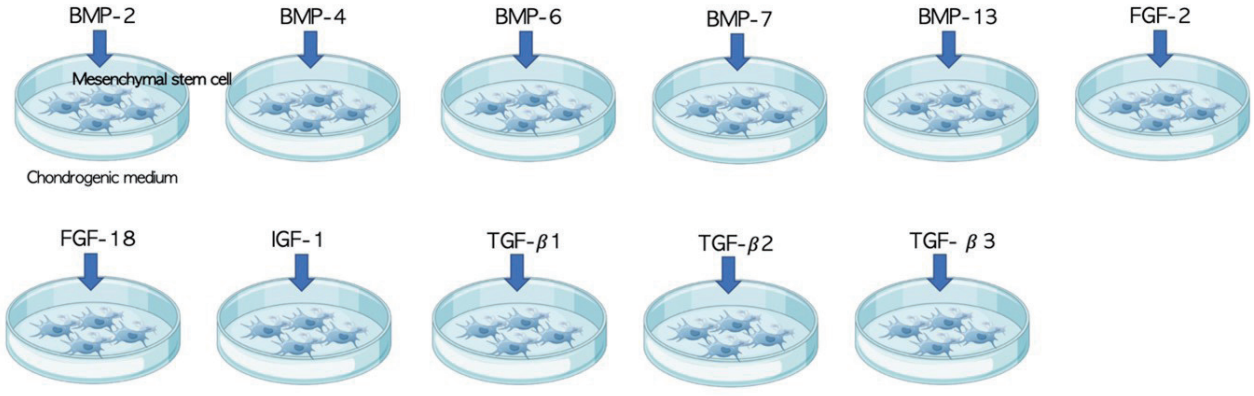


**Fig. 1.** Human mesenchymal stem cells were cultured in a chondrogenic medium supplemented with BMP-2, BMP-4, BMP-6, BMP-7, BMP-13, FGF-2, FGF-18, IGF-1, TGF-β1, TGF-β2, TGF-β3.

**Table 1.** Gene-specific primers (SOX5, SOX6, SOX9, FOXO1A, β-actin) used in RT-PCR

| Gene | Primer | |
|---|---|---|
| SOX-5 | Forward | 5' TGTAAAACGACGGCCAGT |
| | Reverse | 5' CAGGAAACAGCTATGACC |
| SOX-6 | Forward | 5' TGTAAAACGACGGCCAGT |
| | Reverse | 5' CAGGAAACAGCTATGACC |
| SOX-9 | Forward | 5' TGTAAAACGACGGCCAGT |
| | Reverse | 5' CAGGAAACAGCTATGACC |
| FOXO1A | Forward | 5' TGTAAAACGACGGCCAGT |
| | Reverse | 5' CAGGAAACAGCTATGACC |
| β-actin | Forward | 5' TGTAAAACGACGGCCAGT |
| | Reverse | 5' CAGGAAACAGCTATGACC |

사용하였다. 증폭은 중합효소연쇄반응 열 순환기(Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA)에서 94°C에서 30초, 58°C에서 45초, 72°C에서 30초로 35주기 시행하였다. 증폭물질을 2% 한전젤에서 전기영동하고 브로민화 에티듐(Ethidium bromide, Sigma-Aldrich)으로 염색하였다.

단면직경이 다른 주사침을 이용한 세포 증식 변화를 알아보고자, 인간간엽줄기세포를 역시 계대배양 후 3 - 5세대에 해당하는 세포를 사용하였다. 세포밀도가 well 당 $1 \times 10^4$개가 되도록 간엽줄기세포 성장배지(MSCGM; Lonza)의 24-well 배양접시(Nunc, Rochester, USA)에 주사침 18G, 21G, 26G (Shin Chang Medical, Gumi, Korea)를 이용하여 인간간엽줄기세포를 접종하였고, 주사침이 아닌 10 μl 피펫을 이용하여 간엽줄기세포를 접종한 군을 대조군으로 사용하여, 37°C, 5%, $CO_2$하에서 24시간, 48시간, 72시간동안 배양하였다(Fig. 2). 96-well 배양접시(Nunc)에 세포 현탁액(100 μl/well)을 접종하였고 각 well에 Cell Count Kit-8 reagent (CCK-8; Dojindo, Kumamoto, Japan) 용액 10 μl를 각각 추가한 후 2시간 더 배양하였다. Microplate reader (Bio-Rad Laboratories Inc.)를 이용하여 450 nm에서 formazan product의 흡광도를 측정하였다. 대조군, 18G군, 21G군, 26G군 간의 평균값을 비교하기 위해 일원배치분산분석(one-way ANOVA)을 사용하였다. 일원배치분산분석 후 Bonferroni 사후 검정을 이용하였다. 모든 통계분석에는 SPSS 18.0 (Chicago, USA)을 사용하였다.

## 결과

본 연구에서는 인간간엽세포의 연골세포 분화 및 증식에 관련된 11개 성장인자들이 선택되었고, 연골세포 분화와 관련된 전사인자인 SOX-5, SOX-6, SOX-9, FOXO1A의 유전자 발현량을 중합효소연쇄반응을 통해 분석하였다. 실험 14일, 21일, 28일 후 중합효소연쇄반응을 통해 유전자 발현량을 확인하였다(Fig. 3). 실험군에 투입된 11개 성장인자들은 BMP-2, BMP-4, BMP-6, BMP-7, BMP-13, FGF-2, FGF-18, IGF-1, TGF-β1, TGF-β2, TGF-β3 이다. BMP-2, BMP-4, BMP-6, BMP-7의 경우 14일, 21일, 28일 모두 대조군과 비교 시 SOX-5, SOX-6, SOX-9, FOXO1A의 유전자 발현이 높게 나타났다. BMP-13 투입군의 경우 대조군과 비교 시 28일 SOX-6의 발현량이 높게 나타났으나 전체적으로

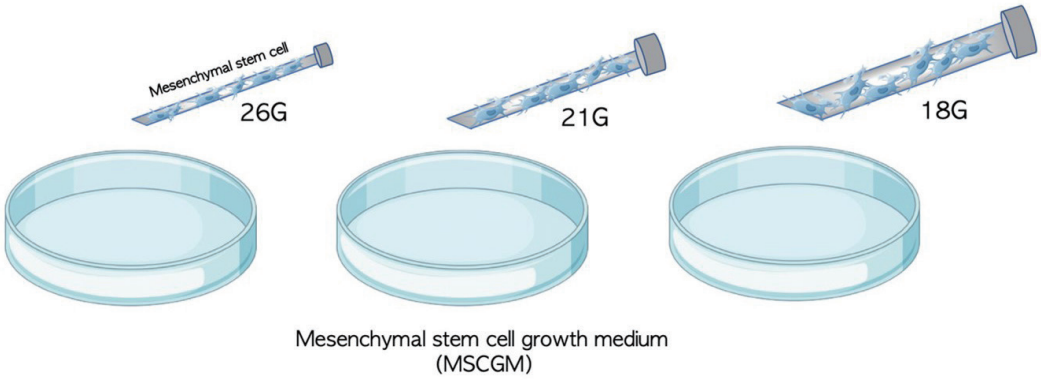


**Fig. 2.** Human mesenchymal stem cells were inoculated into mesenchymal stem cell growth medium using 18, 21, and 26 gauge (G) needles.

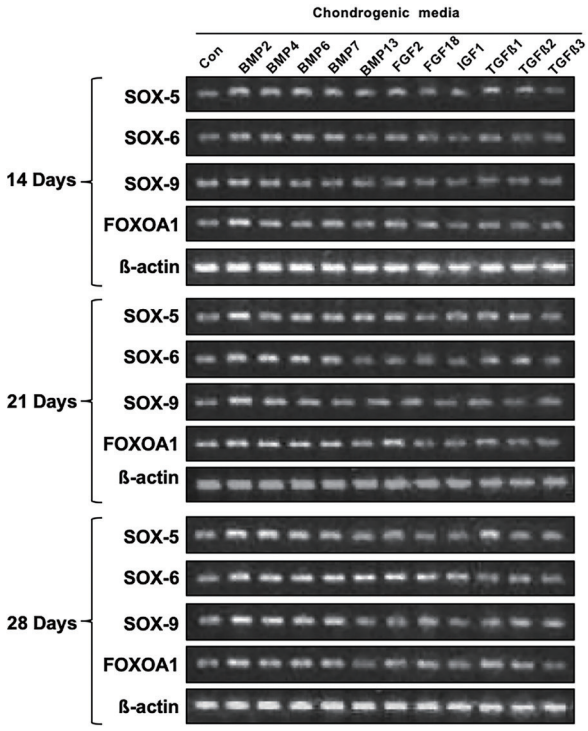


**Fig. 3.** Effect of growth factors (BMP-2, BMP-4, BMP-6, BMP-7, BMP-13, FGF-2, FGF-18, IGF-1, TGFβ1. TGFβ2, TGFβ3) on SOX-5, SOX-6, Sox9 and β-actin DNA expression after 14, 21, 28 days of mesenchymal stem cell culture.

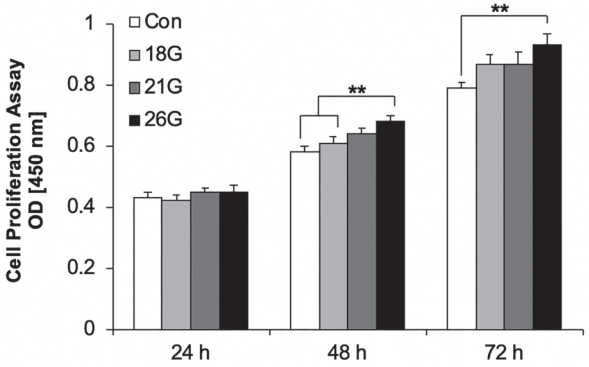


**Fig. 4.** Result from the proliferation assay using ethidium bromide incorporation after 24, 48 and 72 h of mesenchymal stem cell culture.
Note that only significant differences between the highest OD levels and other OD levels are presented. One-way ANOVA (n = 5).
**: significant difference ($P < 0.01$).
Note that only significant differences between the highest gene expression levels and other gene expression levels are presented.

대조군과 발현량이 비슷하게 나타났다. FGF-2 투입군의 경우 21일 FOXO1A와 28일 SOX-6의 발현량이 높게 나타났으나 전체적으로 대조군과 발현량이 비슷하게 나타났다. FGF-18 투입군의 경우 28일 SOX-6의 발현량이 높게 나타났으나 전체적으로 대조군과 발현량이 비슷하게 나타났다. IGF-1투입군의 경우 대조군과 비교 시 28일 SOX-6 투입군의 발현량이 높게 나타났으나 전체적으로 대조군과 발현량이 비슷하게 나타났다. TGF-β1 투입군의 경우 대조군과 비교시 14일 SOX-1의 발현량이 높게 나타났고 21일 SOX-5, SOX-6의 발현이 높게 나타났고 28일 SOX-5, FOXOA1의 발현량이 높게 나타났다. TGF-β2 투입군의 경우 대조군과 비교시 21일 SOX-5, SOX-6의 발현량이 높게 나타났고, 28일 FOXOA1의 발현이 높게 나타났다. TGF-β3 투입군의 경우 전체적으로 발현량이 대조군과 비슷하게 나타났다.

18G, 21G, 26G 주사침을 사용하여 배양접시에 인간 간엽줄기세포를 접종하고 24, 48, 72시간 후 각각 흡광도를 측정하였다(Fig. 4). 그래프에서 흡광도가 높을수록 세포증식의 증진이 많다는 것을 의미한다. 24시간에서 48시간 72시간으로 시간이 경과함에 따라 대조군, 18G, 21G, 26G 모두 세포증식의 증가를 나타냈다. 시간대별로 분석해보면 24시간에서는 대조군, 18G, 21G, 26G에서 비슷한 세포증식을 나타냈다. 48시간에서는 26G에서 가장 높은 세포증식을 보였고 대조군과 18G군에서는 비슷한 세포증식을 나타냈다. 가장 작은 주사침인 26G군이 대조군 및 18G군에 비하여 높은 세포증식을 나타냈다. 대조군에서 가장 낮은 세포증식을 나타냈으며 18G군과 21G군에서 대조군보다는 높은 세포증식을 나타냈으나 18G, 21G 두 군 사이에는 유사한 세포증식을 나타냈다. 26G군에서 가장 높은 세포증식이 나타났으며 대조군보다 높은 세포증식을 나타냈다. 결과적으로 48시간, 72시간에서 가장 작은 주사침인 26G군이 가장 높은 세포증식 증진이 있었으며 48시간에서는 26G 군이 대조군과 18G군보다 더 높은 세포증식의 증진을 보였고 72시간에서는 26G 군이 대조군에 비하여 유의한 세포증식 증진이 있었음을 알 수 있었다.

## 고찰

BMP-2, BMP-4, BMP-6, BMP-7의 경우 14일, 21일, 28일 모두 대조군과 비교 시 SOX-5, SOX-6, SOX-9, FOXO1A의 유전자 발현이 높게 나타났다. BMP 성장인자군은 생체 내에서 연골 형성 및 골 형성 과정에서 중요한 역할을 하는 유전자로 연골 분화의 다양한 단계에서 연골세포 형성을 조절하는 역할을 한다.[8] 이 중 BMP-2는 간엽줄기세포에서 연골 세포외기질 생성을 증진시키며 효과적인 연골 형성인자이다. 이전 연구에서 BMP-2 처리한 간엽줄기세포가 다른 간엽줄기세포에 비해 더 강력한 연골 응집체를 생성하였다는 연구결과가 보고되었으며[19] 이는 본 연구에서의 BMP-2 투입군 결과를 뒷받침하는 보고이다. BMP-4는 배아 발생과정에 관여하는 중요한 신호분자이며 생체 내에서 골 형성 및 연골 형성 가능성을 나타내고, 간엽줄기세포를 연골전구체로 유도하여 성숙한 연골세포로의 분화를 촉진한다.[4] BMP-7은 연골세포에서 합성되며 관절 연골재생에 중요한 역할을 하며 손상된 연골을 보호하는 동화 활성을 가지고 있다.[4] 따라서 BMP 성장인자 군에서 SOX-5, SOX-6, SOX-9, FOXO1A의 발현량 증가는 BMP 성장인자군의 골 형성 및 연골 형성 역할과 관련이 있다. 또한 간엽줄기세포에 연골 형성을 유발하는 BMP-2, 연골세포로의 분화를 촉진하는 BMP-4, 손상된 연골을 보호하며 동화 활성을 가지는 BMP-7의 선행연구결과와 일치한다. 따라서, 본 연구에서는, 연골세포분화에서의 역할이 잘 알려져 있지 않은 BMP-6를 포함한 BMP family가 간엽줄기세포의 연골세포 분화에 유의미한 영향을 미치고 있음을 규명하였다. FGF-2 투입군의 경우 21일 FOXO1A와 28일 SOX-6의 발현량이 높게 나타났으나 전체적으로 대조군과 비교 시 발현량이 비슷하게 나타났다. FGF-18 투입군의 경우 28일 SOX-6의 발현량이 높게 나타났으나 전체적으로 대조군과 비교 시 발현량이 비슷하게 나타났다. 분화되지 않은 간엽줄기세포에서 FGF receptor 1 (FGFR-1)의 전사인자가 매우 약하게 발현되었으며 분화 도중에도 낮은 양을 보였다. 하지만, FGFR의 신호전달을 억제했을 때 연골세포 분화량은 대조군에 비해 감소되었다. 따라서, FGF signaling의 부재시 연골세포 분화는 일어나지만 신호전달을 억제했을 때 연골세포 분화량이 감소되었기 때문에 FGF는 연골세포 분화에 중요한 성장인자라고 할 수 있다.[20] FGF 성장인자군 중 FGF-2와 관련된 이전 연구에서는 간엽줄기세포에 대한 FGF-2의 연골형성능 가능성과 함께, 간엽줄기세포에 FGF-2 처리를 했을 때 세포증식을 촉진하고 프로테오글리칸 생산을 향상시키며 다분화능 유지에 대해 긍정적 효과를 나타내는 결과가 보고되었다.[11] 다른 연구에서는, FGF-2를 함유한 배지에서 대조군 배지보다 연골 형성 가능성이 증가했다는 결과가 보고되었다.[21] 또한, FGF-2가 처리된 간엽줄기세포를 접종한 하이드로겔에서 글리코사미노글리칸과 콜라겐 유형 II의 생산이 증가되었으며, FGF-2를 처리하지 않은 대조군에 비해 더 조밀한 연골 조직이 형성되었다는 연구결과가 보고되었다.[22] FGF-18와 관련된 연구에서는, 골관절염이 발생한 쥐에 FGF-18을 관절 내 투여했을 때 관절 손상을 감소시킨 결과가 보고되었다.[23] 간엽줄기세포를 사용한 실험에서는 FGF-18이 세포 증식을 억제하고 연골세포로의 분화 및 연골생성을 촉진한다는 결과가 보고되었다.[24] 본 연구 결과 FGF의 경우 대조군과 비교 시 비슷한 발현량이 나타났는데, 이는 FGF가 연골분화 및 형성에 중요한 성장인자임을 나타내는 여러 연구결과들과 대비되지만, 한편으로는 분화되지 않은 간엽줄기세포에서 FGFR 전사인자가 약하게 발현된다는 다른 연구 결과들과는 일치한다. 이러한 결과는 스캐폴드 및 배지 환경이 이전 연구들과 차이점이 크기 때문인 것으로 생각된다.

IGF-1투입군의 경우 대조군과 비교 시 28일 SOX-6 투입군의 발현량이 높게 나타났으나 전체적으로 대조군과 비교 시 발현량이 비슷하게 나타났다. IGF-1은 세포증식을 자극하고 세포사멸을 조절하며 연골세포의 발현을 유도함으로써 간엽줄기세포의 연골 형성을 조절한다.[25] 이전 연구에서는 간엽줄기세포에 IGF-1를 처리했을 때 TGF-β1, BMP-2 및 BMP-7의 다른 성장인자와 같이 연골 기질 합성의 상당한 증가가 보고되었다.[26] 본 연구에서, IGF-1 투입군의 결과로 SOX-5, SOX-6, SOX-9, FOXO1A의 발현량이 대조군과 비슷하게 나타났다는 결과는 IGF-1이 다른 성장인자들과 함께 작용했을 때에 연골 형성에 더 긍정적인 효과를 보인다는 이전 연구 결과와 일치한다. IGF-1이 간엽줄기세포에서 연골세포의 발현을 유도하는 역할을 하지만 본 연구에서는 그 효과가 나타나지는 않았다. 따라서 본 연구의 결과에 따라, IGF-1 성장인자는 배양 환경에 따라 연골세포 분화 및 성장에 영향이 다르게 나타날 수 있음을 알 수 있다. TGF-β1 투입군의 경우 14일 SOX-1의 발현량이 높게 나타났고 21일 SOX-5, SOX-6의 발현이 높게 나타났으며, 28일 SOX-5, FOXOA1의 발현량이 높게 나타났

다. TGF-β2 투입군의 경우 21일 SOX-5, SOX-6의 발현량이 높게 나타났고, 28일 FOXOA1의 발현이 높게 나타났다. TGF-β3 투입군의 경우 전체적으로 발현량이 대조군과 비슷하게 나타났다. TGF-β가 간엽줄기세포의 분화에 미치는 영향을 보고한 연구에서 actin-like receptor kinase-5 (ALK-5) 매개 TGF-β 신호전달을 억제하였을 때 지방형성 및 골 형성 분화는 강화하는 반면 연골분화는 완전 결여했다는 결과가 보고되었다.[20] TGF-β군 중, TGF-β1은 연골세포의 각종 단백질 합성활성을 자극한다. 간엽줄기세포에 TGF-β1을 처리한 실험에서는 유리질 연골 형성에 필요한 콜라겐 유형II 및 아그리칸(aggrecan) 유전자 발현의 상향 조절을 유도하였다는 결과가 보고되었다.[24] 본 연구에서 TGF-β1, TGF-β2에 의한 SOX-5, SOX-6 발현량 증가의 결과는 TGF-β가 간엽줄기세포를 연골세포로 분화에 영향을 미친다는 이전 연구결과와 일치한다. 또한 TGF-β가 연골 형성에 필요한 콜라겐 유형II 및 아그리칸(aggrecan) 유전자 발현을 상향조절하였다는 또 다른 연구결과와도 일치한다.

단면적이 가장 작은 26G 주사침을 사용한 경우의 가장 많은 세포증식 증가는, 단면적이 작을수록 세포에 가해지는 기계적 힘이 증가되며 이로 인해 세포형태 및 핵의 변형이 일어나 세포증식에 영향을 미칠 수 있음을 시사한다. 골수유래전구세포를 이용한 기존 연구에서는 주기적 압력을 골수유래전구세포에 가했을 때 세포증식이 대조군의 두 배로 증가하였으며, 세포형태를 관찰했을 때 모양이 더 둥근 형태를 나타냈다는 결과가 보고되었다.[15] 또 다른 논문에서는 내피세포에 주기적 압력이 가해졌을 때 여러 혈관형성 연관 분자들인 bFGF, integrin-αv, vascular endothelial growth factor (VEGF), interleukin-8 (IL-8), C-X-C chemokine receptor type 4 (CXCR-4)가 내피세포의 증식에 관여를 한다는 결과가 보고되었다.[27] 따라서 골수유래전구세포와 혈관내피세포로 연구한 이전 논문과 마찬가지로 간엽줄기세포에 단면적이 가장 작은 주사침을 사용하였을 때 가장 많은 기계적 힘이 세포에 작용하여 그 결과 세포수의 증가가 있었다고 추정된다. 분화되지 않은 줄기세포에 기계적 자극이 가해지면 세포분화 및 증식에 영향을 끼칠 수 있다.[14] 또한 여러 가지 방향의 기계적 자극은 각기 다른 방향 및 힘에 따라 간엽줄기세포의 형태, 증식의 양이 다르게 나타난다. 여러 종류의 기계적 힘 중에서 압력이 세포 증식의 증진에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다.[15] 유체흐름이 간엽줄기세포의 증식에 미치는 영향을 연구한 논문에서 인간 간엽줄기세포가 있는 콜라젠-글리코사미노글리칸 스캐폴드에 1 - 5% 압축력을 가했을 때 적당한 스캐폴드 변형 및 유체의 흐름이 발생하였고 그 결과 세포 수가 증가했다는 결과가 보고되었다.[17]

간엽줄기세포는 다양한 기계적 힘에 의해 세포증식 뿐만 아니라 다른 세포로의 분화도 일어날 수 있다. 간엽줄기세포는 기계적 자극에 의해 연골세포로 분화하며, 무릎 관절 연골을 치유할 때 기계적 부하가 도움이 된다. 이는 간엽줄기세포와 함께 다른 국소적 기계적 자극을 가했을 때 수복 부위에 연골 형성이 일어날 수 있음을 시사한다. 압축력은 유형 II 콜라겐, 아그리칸 및 SOX-9와 같은 연골 형성 특이적 전사 인자의 발현을 유도하는 것으로 알려져 있다.[28] 또한, 압축하중 및 TGF-β1 유전자 처리에 의한 간엽줄기세포의 연골 형성 마커(유형II 콜라겐과 아그리칸)의 발현량을 연구한 실험에서 압축하중에 의한 연골 형성 마커의 발현량이 TGF-β1투입군과 압축하중과 TGF-β1투입을 같이 진행한 군과 비슷하다는 연구결과가 보고되었다.[29] 이런 결과로부터 기계적 자극이 줄기세포의 증식 뿐만 아니라 분화에도 영향을 미친다는 것을 알 수 있다.

본 연구 결과, 여러 성장인자들 중 BMP 성장인자 군이 연골세포 분화에 가장 긍정적인 효과를 보였고, FGF, IGF-1, TGF-β도 연골세포 분화에 긍정적인 효과를 보였다. 성장인자들은 연골세포 분화 및 성장에 각기 다른 역할을 하지만 결과적으로 본 연구에 사용된 성장인자들은 간엽줄기세포를 연골세포로 분화 및 증식시키는데 중요한 성장인자들임이 규명되었다. 또한, 주사침의 단면적 직경 차이에 의한 세포증식 증진의 변화를 알 수 있었는데, 가장 작은 단면적이란 가장 큰 압축력이 작용하였다는 뜻이고, 이것이 세포증식에 영향요인으로 작용하였음이 규명되었다. 여러 문헌을 통해 압축력이 세포의 증식뿐만 아니라 분화에도 영향을 끼칠 수 있음을 알 수 있었다. Subramony 등은 인간간엽줄기세포(hMSC)를 polylactide-co-glycolide (PLGA) 나노섬유 기반 스캐폴드에서 basic fibroblast growth factor (bFGF)로 프라이밍한 후 인장력을 통한 물리적인 자극을 가했을 때, 성장인자만 단독 투여한 군보다 인간 간엽줄기세포의 증식이 증가되었고, 유형 I과 유형 III 콜라겐 생성도 증가하였다고 보고하였다.[30] 다른 논문에서는, 골수기질 세포(bone marrow stromal cells, BMSCs)에 basic fibroblast growth factor (bFGF)와 epidermal growth factor (EGF)를 투여한 후 5일간 배양 및 물리적인 자극

을 가했고, 그 결과 골수 기질 세포의 증식 향상과 matrix의 성장, 유형 I 콜라겐의 생성 증가가 나타났다.[31] 연골세포 분화 배지에서 인간 지방유래 간엽줄기세포(Human adipose-derived mesenchymal stem cells, hASCs)의 연골 분화 정도를 측정한 연구에 따르면, 간엽줄기세포에 성장인자를 투여하고 간헐적인 정수압을 가했을 때, 정수압 혹은 성장인자만 투여한 군에 비해 연골세포의 분화가 유의미하게 크게 나타났다.[32] 이는 조직공학 분야에서 성장인자 투여 및 기계적 자극을 부여하였을 때 간엽줄기세포의 성장과 분화에 긍정적인 영향을 미친다는 위 결과들은 본 연구의 결과와도 일치한다. 본 연구에서는, 성장인자의 투여와 기계적 자극을 독립적으로 시행하였으나 향후 추가적인 연구에서는 연골세포 분화 유도 성장인자 투여 후 기계적 자극을 부여하는 후속 연구가 필요할 것으로 사료된다. 본 연구의 최종목표는, 턱관절의 연골 및 준연골 치유와 자가재생을 유도할 수 있는 간엽줄기세포와 성장인자 기반 관절강천자술 주사제 물질의 개발 및 중증 턱관절질환 치료이며 이를 위해는 여러 추가적인 연구들이 필요할 것이다.

## 결론

본 연구에서는 인간간엽줄기세포에서 연골세포분화로의 유도능을 가진 성장인자들을 고찰할 수 있었고, 특히 BMP family의 역할을 규명할 수 있었다. 다양한 크기의 주사침을 이용한 비교결과에서는, 기계적 자극이 세포의 증식 변화에 미치는 영향을 규명할 수 있었다. 따라서, 간엽줄기세포에 가해지는 생화학적 및 기계적 자극으로 연골세포의 증식 및 분화가 가능하다는 결론을 내릴 수 있었으며, 이는 향후 턱관절 자가재생을 위한 주사제 개발의 추가적인 연구를 위한 기초자료로 활용될 수 있다.

## ORCID

**Jeongyun Park** https://orcid.org/0009-0009-9407-3748
**Yu Jeong Hwang** https://orcid.org/0000-0001-8055-1168
**Joseph Junesirk Choi** https://orcid.org/0000-0001-6186-5735
**Jin Young Chon** https://orcid.org/0009-0000-1074-8109
**Suk Won Lee** https://orcid.org/0000-0003-2726-3567

## References

1. Kai S, Kai H, Tabata O, Shiratsuchi Y, Ohishi M. Long-term outcomes of nonsurgical treatment in nonreducing anteriorly displaced disk of the temporomandibular joint. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 1998;85:258-67.
2. Monje-Gil F, Nitzan G, González-Garcia R. Temporomandibular joint arthrocentesis. Review of the literature. Med Oral Patol Oral Cir Bucal 2012;17:e575-81.
3. Wang L, Tran I, Seshareddy K, Weiss ML, Detamore MS. A comparison of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells for cartilage tissue engineering. Tissue Eng Part A 2009;15:2259-66.
4. Danišovič L, Varga I, Polák S. Growth factors and chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells. Tissue Cell 2012;44:69-73.
5. Li J, Zhao Z, Liu J, Huang N, Long D, Wang J, Li X, Liu Y. MEK/ERK and p38 MAPK regulate chondrogenesis of rat bone marrow mesenchymal stem cells through delicate interaction with TGF-β1/Smads pathway. Cell Prolif 2010;43:333-43.
6. Lefebvre V, Smits P. Transcriptional control of chondrocyte fate and differentiation. Birth Defects Res C Embryo Today 2005;75:200-12.
7. Kalpakci KN, Kim EJ, Athanasiou KA. Assessment of growth factor treatment on fibrochondrocyte and chondrocyte co-cultures for TMJ fibrocartilage engineering. Acta Biomater 2011;7:1710-8.
8. Pizette S, Niswander L. BMPs are required at two steps of limb chondrogenesis: formation of prechondrogenic condensations and their differentiation into chondrocytes. Dev Biol 2000;219:237-49.
9. Hassel S, Schmitt S, Hartung A, Roth M, Nohe A, Petersen N, Ehrlich M, Henis YI, Sebald W, Knaus P. Initiation of Smad-dependent and Smad-independent signaling via distinct BMP-receptor complexes. J Bone Joint Surg Am 2003;85-A Suppl 3:44-51.
10. Jin EJ, Lee SY, Choi YA, Jung JC, Bang OS, Kang SS. BMP-2-enhanced chondrogenesis involves p38 MAPK-mediated down-regulation of Wnt-7a path-

way. Mol Cells 2006;22:353-9.
11. Tang X, Fan L, Pei M, Zeng L, Ge Z. Evolving concepts of chondrogenic differentiation: history, state-of-the art and future perspect ives. Eur Cell Mater 2015;30:12-27.
12. Fortier LA, Lust G, Mohammed HO, Nixon AJ. Coordinate upregulation of cartilage matrix synthesis in fibrin cultures supplemented with exogenous insulin-like growth factor-I. J Orthop Res 1999;17:467-74.
13. Sah RL, Chen AC, Grodzinsky AJ, Trippel SB. Differential effects of bFGF and IGF-I on matrix metabolism in calf and adult bovine cartilage explants. Arch Biochem Biophys 1994;308:137-47.
14. O'Conor CJ, Case N, Guilak F. Mechanical regulation of chondrogenesis. Stem Cell Res Ther 2013;4:61.
15. Maul TM, Chew DW, Nieponice A, Vorp DA. Mechanical stimuli differentially control stem cell behavior: morphology, proliferation, and differentiation. Biomech Model Mechanobiol 2011;10:939-53.
16. Luu YK, Capilla E, Rosen CJ, Gilsanz V, Pessin JE, Judex S, Rubin CT. Mechanical Stimulation of Mesenchymal Stem Cell Proliferation and Differentiation Promotes Osteogenesis While Preventing Dietary-Induced Obesity. J Bone Miner Res 2009;24:50-61.
17. Stops AJ, Heraty KB, Browne M, O'Brien FJ, McHugh PE. A prediction of cell differentiation and proliferation within a collagen-glycosaminoglycan scaffold subjected to mechanical strain and perfusive fluid flow. J Biomech 2010;43:618-26.
18. Davisson T, Kunig S, Chen A, Sah R, Ratcliffe A. Static and dynamic compression modulate matrix metabolism in tissue engineered cartilage. J Orthop Res 2002;20:842-8.
19. Sekiya I, Larson BL, Vuoristo JT, Reger RL, Prockop DJ. Comparison of effect of BMP-2, -4, and -6 on in vitro cartilage formation of human adult stem cells from bone marrow stroma. Cell Tissue Res 2005;320:269-76.
20. Ng F, Boucher S, Koh S, Sastry KS, Chase L, Lakshmipathy U, Choong C, Yang Z, Vemuri MC, Rao MS, Tanavde V. PDGF, TGF-β, and FGF signaling is important for differentiation and growth of mesenchymal stem cells (MSCs): transcriptional profiling can identify markers and signaling pathways important in differentiation of MSCs into adipogenic, chondrogenic, and osteogenic lineages. Blood 2008;112:295-307.
21. Solchaga LA, Penick K, Porter JD, Goldberg VM, Caplan AI, Welter JF. FGF-2 enhances the mitotic and chondrogenic potentials of human adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells. J Cell Physiol 2005;203:398-409.
22. Park KH, Na K. Effect of growth factors on chondrogenic differentiation of rabbit mesenchymal cells embedded in injectable hydrogels. J Biosci Bioeng 2008;106:74-9.
23. Moore EE, Bendele AM, Thompson DL, Littau A, Waggie KS, Reardon B, Ellsworth JL. Fibroblast growth factor-18 stimulates chondrogenesis and cartilage repair in a rat model of injury-induced osteoarthritis. Osteoarthritis Cartilage 2005;13:623-31.
24. Blaney Davidson EN, van der Kraan PM, van den Berg WB. TGF-beta and osteoarthritis. Osteoarthritis Cartilage 2007;15:597-604.
25. Longobardi L, O'Rear L, Aakula S, Johnstone B, Shimer K, Chytil A, Horton WA, Moses HL, Spagnoli A. Effect of IGF-I in the chondrogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells in the presence or absence of TGF-beta signaling. J Bone Miner Res 2006;21:626-36.
26. An C, Cheng Y, Yuan Q, Li J. IGF-1 and BMP-2 induces differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells into chondrocytes-like cells. Ann Biomed Eng 2010;38:1647-54.
27. Shin HY, Smith ML, Toy KJ, Williams PM, Bizios R, Gerritsen ME. VEGF-C mediates cyclic pressure-induced endothelial cell proliferation. Physiol Genomics 2002;11:245-51.
28. Takahashi I, Nuckolls GH, Takahashi K, Tanaka O, Semba I, Dashner R, Shum L, Slavkin HC. Compressive force promotes sox9, type II collagen and aggrecan and inhibits IL-1beta expression resulting in chondrogenesis in mouse embryonic limb bud mesenchymal cells. J Cell Sci 1998;111:2067-76.
29. Huang CY, Hagar KL, Frost LE, Sun Y, Cheung

HS. Effects of cyclic compressive loading on chondrogenesis of rabbit bone-marrow derived mesenchymal stem cells. Stem Cells 2004;22:313-23.
30. Subramony SD, Su A, Yeager K, Lu HH. Combined effects of chemical priming and mechanical stimulation on mesenchymal stem cell differentiation on nanofiber scaffolds. J Biomech 2014;47:2189-96.
31. Moreau JE, Bramono DS, Horan RL, Kaplan DL, Altman GH. Sequential biochemical and mechanical stimulation in the development of tissue-engineered ligaments. Tissue Eng Part A 2008;14:1161-72.
32. Safshekan F, Tafazzoli-Shadpour M, Shokrgozar MA, Haghighipour N, Mahdian R, Hemmati A. Intermittent hydrostatic pressure enhances growth factor-induced chondroinduction of human adipose-derived mesenchymal stem cells. Artif Organs 2012;36:1065-71.

# 인간간엽줄기세포의 연골세포 분화 유도 성장인자 및 주사침 크기 차이에 따른 세포반응에 대한 *in vitro* 연구

**박정윤** 전공의, **황유정** 전공의, **최조셉준석** 전공의, **전진영** 전공의, **이석원*** 교수
강동경희대학교치과병원 치과보철과 경희대학교 치과대학 치과보철학교실

**목적:** 인간간엽줄기세포를 연골세포로 분화유도하는 성장인자 규명 및 주사침 크기 차이에 따른 세포증식 증진 비교이다.
**연구 재료 및 방법:** 인간간엽줄기세포를 연골세포유도배지에서 14, 21, 28일 배양하여 BMP-2, BMP-4, BMP-6, BMP-7, BMP-13, FGF-2, FGF-18, IGF-1, TGF-β1. TGF-β2, TGF-β3를 투여한 군들과 대조군에서 SOX-5, SOX-6, SOX-9 및 FOXO1A의 발현량을 분석하였다. 18, 21, 26 게이지(G) 주사침을 사용하여 배양접시에 인간간엽줄기세포를 접종하고 24, 48, 72시간 후 각각 세포증식을 측정하였다.
**결과:** 기존에 알려진 FGF, IGF-1, TGFβ1와 함께, BMP-2, BMP-4, BMP-6, BMP-7 등 BMP family 성장인자들에 의하여 연골세포분화 전사인자 유전자들인 SOX-5, SOX-6, SOX-9, FOXO1A의 유전자발현이 증가하였다. 48시간에서는 가장 작은 주사침인 26G군이 대조군 및 18G군에 비하여 유의한 세포증식 증진을 보였으며, 72시간에서도 가장 작은 주사침인 26G군이 대조군에 비하여 유의한 세포증식 증진을 보였다.
**결론:** 인간간엽줄기세포의 연골세포분화 유도능을 가진 성장인자들을 고찰할 수 있었고 주사침 크기에 따른 세포증식 변화를 규명할 수 있었다.

(구강회복응용과학지 2024;40(1):13-23)

**주요어:** 인간간엽줄기세포; 연골세포; 성장인자; 주사침; 세포증식

*교신저자: 이석원
(05278)서울특별시 강동구 동남로 892 강동경희대학교치과병원 치과보철과
Tel: 02-440-7519 | Fax: 02-440-7549 | E-mail: ysprosth@hanmail.net
접수일: 2023년 12월 6일 | 수정일: 2024년 1월 4일 | 채택일: 2024년 1월 23일