

MG-63 세포주에서 Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) mRNA 발현에 대한 Insulin-like Growth Factor I (IGF-I)의 효과에 대한 연구

서제덕·명 훈*·강나라**·정필훈*

서울대학교 보라매병원 치과 구강악안면외과, *서울대학교 치과대학 구강악안면외과학교실,

**이화여자대학교 의과대학 구강악안면외과

Abstract (J. Kor. Oral Maxillofac. Surg. 2005;31:363-369)

THE EFFECTS OF INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR I (IGF-I) ON EXPRESSION OF VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR (VEGF) MRNA IN MG-63 OSTEOBLASTLIKE CELLS

Je-Duck Suh, Hoon Myung*, Nara Kang**, Pill-Hoon Choung*

Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Seoul National University Boramae Hospital

**Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Seoul National University, College of Dentistry*

***Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Ewha Womans University, College of Medicine*

Purpose: To determine the role of Insulin-like Growth Factor-I (IGF-I) in the regulation of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) expression in MG-63 cells and then to find the mechanism by which this regulation occurs.

Materials and methods: MG-63 cells were grown to confluence in 60-mm dishes. To determine the effects of IGF-I on expression of VEGF mRNA according to time and concentration, the cells were treated with 10 nM IGF-I, following isolation of total RNA and Northern blot analysis after 1, 2, 4, 8, 12, 24 hours and after 2 hours of treatment with 0.5, 2, 10, 25, 50 nM IGF-I respectively, isolation of total RNA and Northern blot analysis were followed. To determine the mechanism of action of IGF-I, inhibitors such as hydroxyurea (76.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$), actinomycin D (2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$), cycloheximide (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) were added 1 hour after treatment of 10 nM IGF-I.

Results: 1. the expression of VEGF mRNA was increased with treatment of IGF-I.

2. The expression of VEGF mRNA was increased according to time- and concentration dependent manner of IGF-I.

3. The effect of IGF-I was decreased by hydroxyurea, actinomycin D, but not by cycloheximide.

Conclusion: IGF-I regulate the expression of VEGF mRNA in the level of DNA synthesis and transcription. These results could suggest that IGF-I plays an important role in angiogenesis in the process of new bone formation and remodeling.

Key words: Osteogenesis, Angiogenesis, Vascular endothelial growth factor, Insulin-like growth factor I, MG-63 cell line

I. 서 론

신혈관 생성은 혈관 발육과 태아에서의 분화, 창상치유, 기관재생 등의 다양한 생물학적 과정에 매우 중요한 요소이다¹⁾. 이런 신혈관 생성은 정교하게 조절되고 계획된, 자체적으로 조절 기전을 가진 과정이며 이러한 조절기전은 혈관 생성 자극 요소와 억제 요소간의 균형활동의 결과이다²⁾. 실제적으로는 존재하지 않는 것처럼 보이며, 전체 기관 증식시에 나타나

는 모든 혈관 endothelial cells의 0.1% 미만 밖에는 되지 않는다³⁻⁶⁾. 그러나 류마티스성 관절염, 건선, retrorenal fibroplasias, 당뇨병성 망막병변, 혈관종, 장기 이식의 거부반응, 중앙 성장 및 전이 과정 등의 많은 병적 상태는 지속적인 혈관 생성에 의해 유도되며, 10% 이상의 vascular endothelial cell들이 활발하게 증식한다⁴⁻⁶⁾.

성장, 회복, 그리고 재형성 등의 골과 관련된 전체 반응들은 새로운 혈관의 형성을 필요로 한다. 새로운 골이 형성되는 부위에서는 조골세포 및 골세포 전구체 등이 혈관의 endothelial cell 주변에 위치하게 되며 이러한 사실로 혈관 재생과 골형성은 서로 연관을 가짐을 유추할 수 있다^{2,5)}. 연골내에서 골이 형성되는 것을 관찰하였을 때, 성장판의 골단 종말부(metaphyseal end)로 모세혈관이 자라들어가는 현상은 연골이 광화된 골로 대체되는데 매우 중요하다^{6,7)}. 골절의 치유과정에서 조골세포에 의한 골화과정은 가골내로의 모세혈관 투과와 공간적으로

정 필 훈

110-744 서울 종로구 연건동 28

서울대학교 치과대학 구강악안면외과학교실

Pill-Hoon Choung

Department of OMFS, College of Dentistry, Seoul National University,

Yeon-gun dong 28, Jongno-Gu, Seoul, 110-744, Korea

Tel: 82-2-2072-3477 Fax: 82-2-745-3477

E-mail: choungph@snu.ac.kr

서로 연관된다^{6,8)}.

다양한 성장인자들은 혈관 재생과 관련이 있으며 이러한 성장인자들로는 tumor necrosis factor (TNF), transforming growth factor- β (TGF- β), basic fibroblast growth factor (bFGF) 등이 거론된다¹⁾. 기존에 존재하던 모세혈관들로부터 새로운 혈관이 생성되는 과정은 angiogenic factor, 세포의 기질, 그리고 protease 등의 서로 복합적으로 작용하여 이루어진다. 혈관 재생과 관련된 요소들 중에서 가장 중요한 매개체 중의 하나가 Vascular Endothelial Growth Factor(VEGF)이며 이는 Vascular Permeability Factor(VPF) 또는 Vasculotropin이라고도 불린다. 대표적인 기능으로는 혈관의 투과성을 증가시키며, endothelial cell 증식을 유도한다. VEGF는 Platelet-derived Growth Factor(PDGF)와 동질성을 공유하는 glycoprotein이며 생체내에서 모세혈관 형성을 자극하는 가장 중요한 혈관형성 요소로 알려져 있다^{2,6)}. 또한 endothelial cell에 대해 제한적으로 유사분열(mitogenic)을 촉진하며 화학 주성을 가진다⁹⁾. 최소한 4가지의 VEGF-VEGF_{121,165,189,206}가 존재하지만 단일 유전자로부터 형성되어 선택적인 절편화(alternative splicing)에 의해 서로 다른 형태가 형성된다¹⁰⁾. 그러나 이중 VEGF 165가 가장 중요한 생물학적 활동력을 가지며 생체내에서 가장 많은 부분을 차지한다. VEGF 121도 정상 또는 병적 상황에서 발현되지만 VEGF 165에 비해 10~100배정도 약한 생물학적 특성을 갖는다¹⁾. VEGF는 2개의 tyrosine kinase receptors-Flk-1(KDR), Flt-1-와 결합하여 작용한다¹¹⁻¹³⁾. 이러한 수용체들은 주로 endothelial cell에 제한적으로 발현한다⁹⁾. 그러나, VEGF는 많은 세포로부터 분비되며 다양한 성장인자들과 cytokine에 의하여 분비가 조절된다. 또한 VEGF는 조골세포에서의 alkaline phosphatase 활동을 유도하며 parathyroid hormone에 대한 조골세포의 반응성을 강화시키는 것으로 보고되었다⁵⁾. 조골세포는 VEGF 수용체에 대해 가장 높은 친화성을 보이며 이는 조골세포내에 기능적인 VEGF 수용체들이 다수 존재함을 알려준다⁹⁾. 골반응에 대한 모세혈관의 본질적인 역할과 VEGF가 골세포에서 매우 조절되는 양태로 생산된다는 점을 고려하였을 때 VEGF와 같은 혈관 생성 인자들이 골의 성장과 수복에 매우 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다⁶⁾. 예를 들어 endogenous VEGF의 기능을 차단하면 골 생성과 흡수가 차단된다¹⁴⁾.

Insulin-like Growth Factor-I (IGF-I)은 insulin, insulin-like growth factor-II, relaxin 등과 동질성을 공유하며 인슐린 자체에 대한 세포적인 반응 등을 공유한다¹⁵⁾. IGF-I은 대다수의 조직에서 생산되거나 growth hormone에 의해 합성이 유도되어 주로 간세포에서 분비가 이루어진다^{1-3,6,7)}. IGF-I은 간엽조직의 성장에 중요한 매개체이며 혈장과 조직액에 insulin-like growth factor binding protein(IGFBP) 등과 함께 nanomolar 농도로 존재한다¹⁵⁾. 이러한 결합 단백질은 몇 가지의 복잡한 기전을 통하여 IGF의 작용을 조절하게 된다. Insulin 수용체와 유사한 membrane bound tyrosine kinase인 제1형 IGF 수용체와 IGF의 결합으로 유사분열이 시작된다¹⁵⁾. 또한 많은 형태의 세포에서 VEGF를 포함한 서로 다른 유전자의 발현을 유도한다¹⁾. IGF는 순환하는 혈액내에서와 세

포의 공간에서 IGFBP-I에서 -VI까지의 IGF 결합 단백질과 결합하는 것으로 알려져 있다¹⁶⁾. IGF는 골에서 가장 풍부한 성장인자들 중 하나이며 IGF 조절기전은 골 형성과 재형성에 중요하다. 또한 human osteoblast-like cell과 조골 세포 등에서 DNA, alkaline phosphatase 그리고 type I collagen 등의 합성을 유도하는 것으로 알려져 있다¹⁵⁾. IGF의 발현 및 조절기전은 세포의 생리학적 상태에 따라 매우 다를 수 있으며 또한 골세포의 성장 발육 조절에 매우 중요한 작용을 한다¹⁵⁾.

골에 대한 IGF의 뚜렷한 이화작용과 골 성장, 수복, 재형성에 있어서 모세혈관 형성 등을 통하여 본 저자 등은 IGF-I이 조골세포에서의 VEGF 발현을 증가시킬 수 있을 것이라고 유추할 수 있었다. 그리하여 저자 등은 조골세포와 유사한 기능을 갖는 것으로 알려진 MG-63 세포주를 이용하여 VEGF 발현에 대한 IGF-I의 역할 등을 알아보려고 하였으며 어떠한 기전을 통하여 작용하는 지에 대하여 알아보려고 한다.

II. 재료 및 방법

1. 세포배양

MG-63세포주를 95%의 공기와 5%의 이산화탄소로 이루어진 습기화된 대기 중에서 37°C에서 10%의 우태아혈청(fetal bovine serum) (Gibco, grand island, NY, USA)과 1% 항생제(100 unit/ml 페니실린, 스트렙토마이신)을 혼합한 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(Gibco, grand island, NY, USA)에서 배양하였고 60-mm 조직배양 접시에서 배양하였다.

2. RNA 분리 및 northern blot analysis

제조사의 설명에 따라 TRI-REAGENT[®] (Molecular Research Center, Cincinnati, OH, USA)를 이용하여 60-mm 조직 배양 접시에서 자라 밀생에 도달한 세포들로부터 total cellular RNA를 추출하였다.

세포들을 모은 후 1.0 ml의 TRI-REAGENT에 반복적인 피펫팅으로 분해시키고, 세포의 핵내 단백질 복합체(nucleoprotein complex)의 완전한 분해를 위해 실온에서 약 5분간 보관하였다. 그리고, 1.0 ml의 TRI-REAGENT당 0.2 ml의 chloroform과 15초간 강하게 흔들어 혼합하였다. 이후 실온에서 약 10분간 보관하고 4°C의 온도, 12,000 g의 조건으로 25분간 원심분리하였다. 이러한 원심분리를 거치면 3층으로 구별된다. 이중 RNA는 최상층인 aqueous phase에 존재하므로 이 층을 fresh tube로 옮긴 후 0.5 ml의 isopropanol로 처리하면 침전물이 형성된다. 얼음에서 약 10분간 보관하고 12,000 g로 8분 동안 원심분리하였다. 원심분리후 상층액은 제거하고, 남은 RNA pellet은 1.0 ml의 75% ethanol로 세척한 후 다시 5분간 원심 분리하였고 다시 에탄올로 세척하였다. 이러한 일련의 세척 과정을 거친 RNA를 DEPC(diethylpyrocarconate) - treated H₂O에 용해시켰다. 발생 가능한 DNA 오염을 제거하기 위하여 RNase-free DNase I

Table 1. The condition of PCR and sequences of each primer

primer	VEGF(all isoform)	G3PDH
		Forward: 5' - CCTGGTGGACATCTCCAGGAGTACC
	Forward: 5' - ACCACAGTCCATGCCATCAC	Reverse: 5' - TCCACCACCCTGTTGCTGTA
PCR product size(bp)	196	450
annealing temperature/time	60°C /30sec	60°C /30sec
number of cycle	35 cycle	35 cycle

(Amersham Pharmacia Biotech, 도시, IL, USA)으로 total RNA를 처리하였다. 정량화를 위해 260 nm에서 Ultraspec 2000 UV/Visible Spectrometer (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA)를 이용하였다. 20µg의 RNA 표본을 MOPS 완충액하에서 formaldehyde agarose gel electrophoresis로 용해시켰고, intactness를 검증하였다. 전기영동 이후에 12시간동안 capillary transfer를 이용하여 gel로부터 나일론 막 (Nytran®, Keene, NH, USA)으로 흡착하였고 UV irradiation (200 mJ/cm²)으로 cross-link시켰다. 이 Blots들은 random priming method에 의해 인지되는 적절한 probe에 12시간 동안 55°C에서 하이브리드화 하였고 cDNA는 DIG-dUTP를 이용, labelling하였다. Label된 cDNA probe는 DIG-detection kit(Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany)를 이용하여 관찰하였다. Northern blot은 이후 각 시편당 유사한 양의 RNA가 적절히 loading 및 transfer되었는지를 확인하기 위하여 G3PDH를 이용, reprobing을 시행하였다.

3. IGF-I 처리의 시간과 농도에 따른 VEGF mRNA 발현에 대한 연구

우선 MG-63 세포주에서 IGF-I이 VEGF mRNA 발현을 변화시키는지에 대한 실험을 시행하였다. 우선 대조군으로 설정된 밀생물을 이룬 해당 세포주에서 안정 수준의 VEGF mRNA를 RT-PCR을 이용, 측정하였다. 196 bp의 크기를 갖는 PCR 생산물이 urea-containing polyacrylamide gel상에 확인되었다. (Table 1, Fig. 1)

해당 세포주를 10 nM의 IGF-I으로 미리 설정된 시간-1,2,4,8,12,24 시간-동안 처리한 후 전체 RNA를 분리, 그 발현을 northern blot analysis를 통해 분석하였다.

IGF-I 농도에 따른 VEGF mRNA 발현 변화를 확인하기 위하여 2시간동안 서로 다른 농도-0.5, 2.0, 10.0, 25.0, 50.0 nm-로 처리한 후 분석을 시행하였다.

4. VEGF 발현에 대한 IGF-I 기전에 대한 연구

세포 분열 단계, RNA 합성 단계, 새로운 단백질 합성 등의 여러 단계에 대한 차단을 통하여 그 관여하는 기전을 알아보기 위하여 hydroxyurea (76.1 µg/ml), actinomycin D (2.5 µg/ml), 그리고

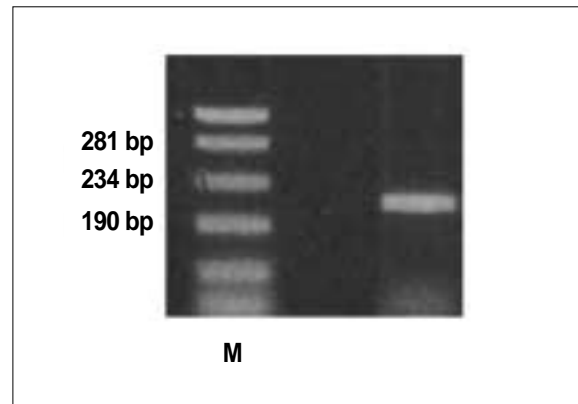


Fig. 1. mRNA expression of VEGF in RT-PCR. mRNA expressions of VEGF are shown at the expected location(196 bp) in the gel. (M: size marker)

cycloheximide (10.0 µg/ml) 등을 IGF-I으로 처리, 1시간 후에 밀생을 이루고 있는 세포주에 가하였다. 그리고 전체 RNA를 24시간 후에 분리하여 분석을 시행하였다.

III. 결 과

1. IGF-I 처리의 시간과 농도에 따른 VEGF mRNA 발현에 대한 연구

VEGF mRNA의 발현 정도는 처리된 mRNA의 농도와 시간에 따라 변화하는 양상을 보였다. 즉, IGF-I으로 처리된 시간 및 농도를 증가시킬수록 VEGF mRNA의 발현 정도는 증가하는 것으로 나타났다. IGF-I으로 처리한 군은 그렇지 않은 군에 비해 약 3.5배 정도 많은 VEGF mRNA 발현을 보였다. 그리고 VEGF mRNA의 발현은 IGF-I으로 24시간 동안 처리한 군에서 최대 발현을 나타냈다. IGF-I에 의한 VEGF mRNA 발현은 처리 시간에 따라 증가하는 것으로 나타났다. (Fig. 2)

VEGF mRNA의 발현은 처리된 IGF-I의 농도에 따라 달라지는데 실험된 세포주에서는 VEGF mRNA의 최대 발현은 사용된 최대 농도로 처리하였을 때 나타나는 것으로 나타났다. (50nM) (Fig. 3)

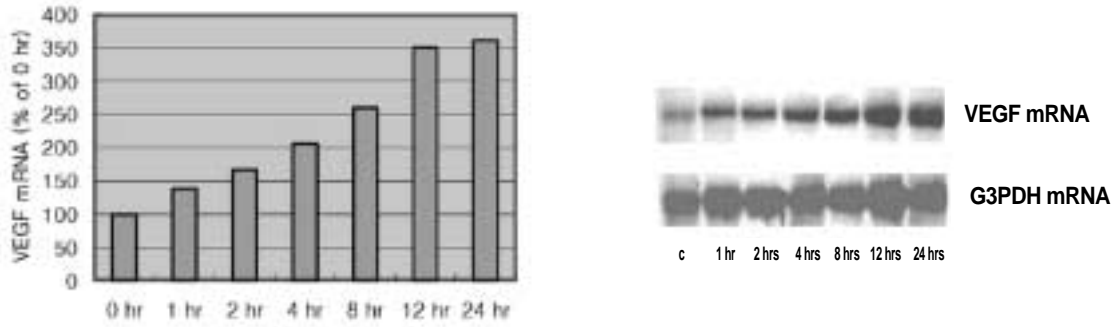


Fig. 2. Time course of IGF-I action on the abundance of VEGF mRNA in MG-63 osteoblast-like cells. The cells were treated for the indicated times - 1, 2, 4, 8, 12 and 24 hours with 10 nM IGF-I, the total RNA were isolated, an expression of VEGF was determined by Northern blot analysis.

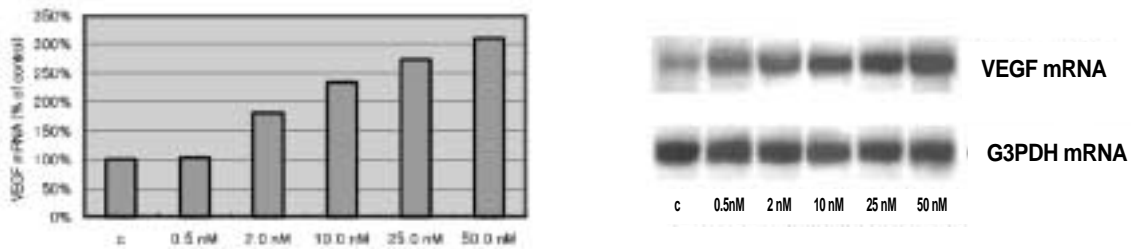


Fig. 3. Concentration dependence of IGF-I on the abundance of VEGF mRNA in MG-63 osteoblast-like cells. The cells were treated with different concentration of IGF-I, which was 0.5, 2.0, 10.0, 25.0 and 50.0 nM, for 2 hours.

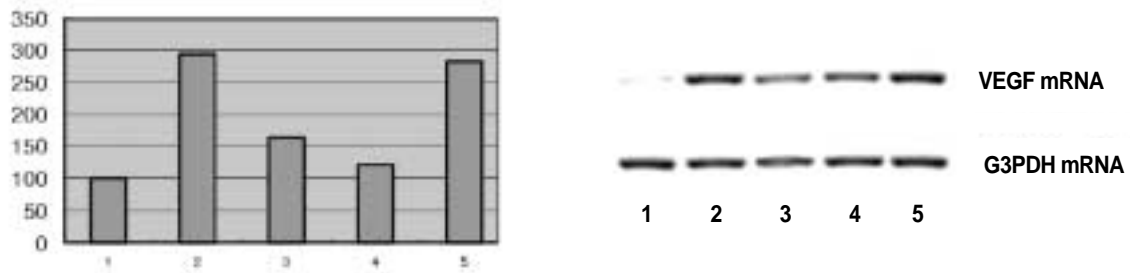


Fig. 4. The effects of different inhibitors on expression of VEGF mRNA. 1: none, 2: IGF-I only, 3: IGF-I → Hydroxyurea, 4: IGF-I → Actinomycin D, 5: IGF-I → Cycloheximide

2. VEGF 발현에 대한 IGF-I 기전에 대한 연구

해당 세포주에서 IGF-I에 의해 유도된 VEGF mRNA의 발현에 관련된 기전을 알아보기 위하여 서로 다른 단계에 작용하는 억제제(inhibitor)의 효과를 확인하였다.

DNA 합성 과정을 차단하는 hydroxyurea로 세포주를 처리하였을 때 VEGF mRNA 발현에 대한 IGF-I의 발현 자극 효과가 차단되었다. 또한 actinomycin D에 의한 transcription 차단은 아무

것도 처리하지 않은 세포주에서 VEGF transcription을 감소시켰으며 IGF-I에 의한 VEGF mRNA의 발현이 거의 완전히 차단되는 결과를 나타내었다. IGF-I의 VEGF mRNA에 대한 효과가 새로이 합성된 단백질에 의한 것인지를 확인하기 위하여 cycloheximide로 처리하였다. 이때 cycloheximide는 아무것도 처리하지 않은 대조군 세포주에서는 VEGF mRNA 발현을 증가시켰으나 IGF-I의 효과에 대해서는 거의 영향을 미치지 않았던 것으로 나타났다.(Fig. 4)

IV. 고 찰

아직까지 그 기전이 어떠한 방식으로 서로 연결되어 있는가에 대해서는 정확히 알려지지 않았으나 골에서 유래된 국소인자(local factors)들은 혈관형성을 자극할 수 있을 것이며 그 반대로 혈관내피세포에서 분비된 인자들이 골형성을 자극할 수 있을 것이다⁶⁾. 인간의 조골세포와 태줄 정맥 혈관세포를 같이 배양하여 실행한 연구에 의하면 조골세포에서 유래된 VEGF는 주변 endothelial cell들의 증식을 촉진하였다¹⁸⁾.

Endothelial cell들은 골의 분화와 성장에 영향을 미칠 수 있는 cytokine과 성장인자들을 발현한다¹⁷⁾. 조골세포 및 파골세포와 매우 밀접한 관계에 있는 endothelial cell들은 매우 다양한 cytokine이나 성장인자들-fibroblast growth factor, interleukin-I, -6, colony-stimulating factors, prostaglandin, endothelin-1, nitric oxide, oxygen radicals 등^{6,19,20)}과 같은 성장인자들을 생산한다.

골 내에 존재하는 혈관들은 오랫동안 골의 재형성과 성장에 중요한 본질적 요소로 인식되어 왔다. 그러나 혈관 세포와 골간의 정확한 분자적인 관계는 여전히 알려져 있지 않다⁶⁾.

다양한 성장인자들-tumor necrosis factor, transforming growth factor- β , basic fibroblast growth factor 등이 혈관 형성과 관련이 있음이 알려져 있다¹⁾. 그러나, 이러한 인자들은 직접적으로 혈관 형성에 관여하는 것이 아니라 간접적으로 작용하는 것으로 추측된다. 그러므로 비록 다양한 요소들이 잠재적으로 혈관 형성을 유도하는 것으로 알려져 있을 지라도 이 중 VEGF가 가장 분열을 촉진할 수 있고 운동성을 유도하는 분자이다⁷⁾. VEGF는 특별히 endothelial cell에만 선택적으로 그 기능을 수행하며, VEGF형질이 상실된 경우 embryo의 생존에 치명적이라는 결과로 인해 인간 태생 발육에 있어서 매우 중요한 역할을 함을 보고하는 연구 결과가 점점 늘어나고 있다^{17,21,22)}. VEGF는 순환하는 거대분자들(circulating macromolecule)에 대해 투과도가 증가하도록 하는 venule들을 만들어 내는 tumor에 의해 분비되는 단백질로 처음 알려졌고^{23,24)} endothelial mitogen으로써 pituitary follicular cell로부터 분리되었다²⁵⁾. VEGF는 다양한 혈관 생성 환경하에서 매우 중요한 역할을 수행한다. 즉, 순환기계(circulating system), embryonic development시의 기관들의 형성과 창상 치유, 당뇨병 신혈관화 등의 다양한 과정에 매우 중요한 역할을 수행하며, 신혈관 형성이라는 과정은 또한 종적 골 성장에 매우 중요한 성장판에서의 endochondral ossification²⁶⁾, tumor의 성장과 파생⁹⁾ 등의 과정에 중요한 역할을 수행한다.

다양한 자극들-저산소성 상태²⁸⁾, phorbol esters²⁹⁾, cAMP analogue²⁹⁾, 중금속 이온들(카드뮴, 코발트, 니켈 등)³⁰⁾, interleukin -1³¹⁾, -6³²⁾, transforming growth factor- β ³³⁾, platelet-derived growth factor- β ³⁴⁾, IGF³⁵⁾, H₂O₂, Ultraviolet B light irradiation³⁶⁾-로 세포들을 처리함으로써 VEGF mRNA는 발현된다.

본 연구에서 실행 대상으로 이용된 MG-63 세포주에서 세포들을 IGF-I으로 처리시 VEGF mRNA가 약 3.5배정도 증가되어 발현되었고, 이는 처리된 시간과 처리한 농도에 따라 발현이 조절될 수 있었다. 생리적 농도의 IGF-I은 인간 SaOS-2

osteoblast-like cell, murine osteoblast-like cell, non-malignant untransformed osteoblast-like cells-mouse preosteoblast-like cell line(KS483) 등에서 VEGF mRNA와 VEGF protein의 발현을 증가시키는 것으로 보고되었다⁶⁾. 또한, VEGF 및 그 수용체의 발현과 생산은 해당 세포의 분화 상태에 따라 다르다. VEGF-A의 발현은 분화 과정의 진행에 따라서 증가되며 이러한 발현, 생산과정은 세포의 분화 단계를 조절하는 인자들에 의해 조절될 수 있으며 외부에서 가해진 exogeneous VEGF-A를 가하는 경우 조골세포의 분화도가 증가하게 된다.

인슐린과 IGF-I에 의한 VEGF 발현 유도는 다양한 신호전달 과정에 의해 일어난다. 인슐린의 신호전달과정은 phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B를 포함하며, IGF-I의 신호전달과정은 MEK/mitogen-activated protein kinase를 포함한다¹⁾. VEGF 발현을 유도하는 자극의 기전은 매우 다른 요인에 의해 매우 다른 기전을 통한다.

VEGF mRNA 발현의 증가는 세포 복제와 new transcription에 따라 달라질 수 있음이 추측되고 있다. 그러나 새롭게 합성된 단백질은 VEGF mRNA의 증가에 큰 영향을 미치지 않는 듯하다.

IGF-I의 역할은 actinomycin D가 VEGF mRNA에 대한 IGF-I의 자극을 차단하는 것으로 보이기 때문에 VEGF 유전자, 또는 VEGF 전사과정을 조절하는 다른 유전자 등이 전사되는 과정에서 조절된다. 그러나 이러한 인자들이 VEGF promoter 또는 공통된 조절 전사 요인들에 대한 공통된 활성 요소들을 어떠한 방식으로 공유하는지에 대해서는 아직 알려져 있지 않다.

새로운 단백질의 합성은 fetal rat calvarial cells에 대한 IGF-I의 VEGF mRNA 발현 자극에 반드시 필수적인 요소는 아닌 것으로 나타났다. 그러나 cycloheximide는 prostaglandin E2에 의한 VEGF mRNA의 증가를 강화한다²⁵⁾.

골에서 IGF-I은 autocrine 또는 paracrine의 방식으로 pre-osteoblast의 증식을 촉진하며 분열과정과는 무관하게 분화된 조골세포에 의한 골 기질의 형성을 증진한다⁹⁾.

본 연구의 결과들로 MG-63 osteoblast-like cell 등은 VEGF를 발현한다는 것과 이러한 VEGF의 발현은 IGF-I에 의해 증가된다는 점을 알 수 있었다. 이러한 결과를 통해 재형성 및 재생 과정에 있어서 혈관들과 조골세포간의 상호 관계에 대한 한 모델을 추론할 수 있었다. 흡수과정중의 골 기질로부터 분비되거나 부갑상선 호르몬 또는 성장 인자 등의 systemic hormone에 대한 반응으로 조골 세포로부터 분비되는 IGF-I은 autocrine 또는 paracrine의 방식으로 조골세포를 자극하여 VEGF 발현을 증진시킨다. 이렇게 증가된 VEGF의 발현을 통하여 모세혈관들의 형성이 유도되고 이로 인해 골의 성장, 재생, 재형성 등이 진행된다.

이러한 결과들을 통하여 골 형성을 증가시키는 인자들은 부분적으로 조골세포에 의한 VEGF 생산을 증가시키며 그로 인해 혈관 형성을 증가시킨다. 본 저자 등은 골 형성은 생체 내에서 부분적으로 VEGF와 같은 endothelial growth factor 등을 통해 혈관 형성을 조절함으로써 골 형성 등도 조절할 수 있을 것이라는 가능성을 확인하였다.

V. 결 론

본 연구를 통하여 MG-63 조골세포유사세포주에서 VEGF mRNA의 발현은 IGF-I의 처리에 의하여 증가되며 IGF-I에 의한 조절 양상은 시간과 사용된 농도에 따라 그 발현이 조절된다. IGF-I에 의한 VEGF mRNA 발현 양상은 hydroxyurea와 actinomycin D의 추가 처치에 의하여 발현이 감소하지만 cycloheximide에 의하여는 발현 양상이 영향을 받지 않으므로 IGF-I에 의한 VEGF mRNA의 발현은 DNA 합성과 전사 단계에 작용하여 그 영향을 나타낸다는 결론을 도출해 낼 수 있었으며 이로 인하여 IGF-I은 신생골의 형성 및 재형성 과정에 중요한 신혈관생성과정에 있어서 매우 중요한 역할을 함을 알 수 있었다.

참고문헌

- Miel C, Rochford JJ, Filippa N, Giorgetti-Peraldi S, Van Obberghen E: Insulin and insulin-like growth factor-I induce vascular endothelial growth factor mRNA expression via different signaling pathways. *J Biol Chem* 2000;275:21695-21702.
- Yeh LCC, Lee JC: Osteogenic Protein - 1 increases gene expression of vascular endothelial growth factor in primary cultures of fetal rat calvaria cells. *Mol Cell Endocrinol* 1999;153:113-124.
- Trueta J: The role of the vessels in osteogenesis. *J Bone Joint Surg* 1963; 45B:402-418.
- Decker B, Bartels H, Decker S: Relationships between endothelial cells, pericytes, and osteoblasts during bone formation in the sheep femur following implantation of tricalciumphosphate ceramic. *Anat Rec* 1995;242:310-320.
- Deckers MM, Karperien M, Van der Bent C, Yamashita T, Papapoulos SE, Lowik CW: Expression of vascular endothelial growth factors and their receptors during osteoblast differentiation. *Endocrinol* 2000; 141:1667-1674.
- Goad DL, Rubin J, Wang H, Tashjian AH Jr, Patterson C: Enhanced expression of vascular endothelial growth factor in human SaOS-2 osteoblast-like cells and murine osteoblasts induced by Insulin-like growth factor I. *Endocrinol* 1996;137:2262-2268.
- Brighton CT: Structure and function of the growth plate. *Clin Orthop Rel Res* 1978;136:22-32.
- Brighton CT, Hunt RM: Early histological and ultrastructural changes in medullary fracture callus. *J Bone Joint Surg* 1991;73-A:832-847.
- Bermont L, Lamielle F, Fauconnet S, Esumi H, Weisz A, Adessi GL: Regulation of vascular endothelial growth factor expression by insulin-9 like growth factor-I in endometrial adenocarcinoma cells. *Int J Cancer* 2000;85:117-123.
- Houck KA, Ferrara N, Winer J, Cachianes G, Li B, Leung DW: The vascular endothelial growth factor family: Identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol Endocrinol* 1991;5:1806-1814.
- De Vries C, Escobedo JA, Ueno H, Houck K, Ferrara N, Williams LT: The fins-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science* 1992;255:989-991.
- Quinn TP, Peters KG, De Vries C, Ferrara N, Williams LT: Fetal liver kinase 1 is a receptor for vascular endothelial growth factor and is selectively expressed in vascular endothelium. *Proc Natl Acad Sci* 1993;90:7533-7537.
- Ferrara N, Davis-Smith T: The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 1997;18:4-25.
- 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;5:623-628.
- Hodgson DR: Free-ligand accelerated dissociation of insulin-like growth factor 1 (IGF-1) from the type I IGF receptor is reduced by insulin-like growth factor binding protein 3. *Regulatory Peptides* 2000;90:33-37.
- Yeh LCC, Adamo ML, Kitten AM, Olson MS, Lee JC: Osteogenic Protein-1-mediated IGF gene expression in primary cultures of rat osteoblastic cells. *Endocrinol* 1996;137:1921-1931.
- Garcia-Ramirez M, Toran N, Andaluz P, Carrascosa A, Audi L: Vascular endothelial growth factor is expressed in human fetal growth cartilage. *J Bone Miner Res* 2000;15:534-540.
- 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. *Endocrinol* 1997;138:2953-2963.
- Zaldi M, Alam ASMT, Bax BE, Shanker VS, Bax CMR, Gill JS, Pazianas M, Huang CLH, Sahinoglu T, Moonga BS, Stevens CR, Blake DR: Role of the endothelial cell in osteoblast control: new perspectives. *Bone* 1993;14:97-102.
- Collin-Osdoby P: Role of vascular endothelial cells in bone biology. *J Cell Biochem* 1994;55:304-309.
- Shifren JL, Doldi N, Ferrara N, Mesiano S, Jaffe R: In the human fetus, vascular endothelial growth factor is expressed in epithelial cells and myocytes, but not vascular endothelium: Implication for mode and action. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;79:316-322.
- Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gerstenstein M, Fahrig M, Vandenhoek A: Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 1996;380:435-439.
- Dvorak HF, Orenstein NS, Calvalgo AC, Churchill WH, Dvorak AM, Galli SJ, Feder J, Bitzer AM, Rypysc J, Giovinco P: Induction of a fibrin-gel 10 investment. An early event in line 10 hepatocarcinoma growth mediated by tumor-secreted products. *J Immunol* 1979;122: 166-174.
- Dvorak HF, Dvorak AM, Manseau EJ, Wiberg L, Churchill WH: Fibrin gel investment associated with line 1 and line 10 solid tumor growth, angiogenesis, and fibroplasias in guinea pigs. Role of cellular immunity, myofibroblast, microvascular damage, and infarction in line 1 tumor regression. *J Natl Cancer Inst* 1979;62:1459-1472.
- Ferrara N, Leung DW, Cachianes G, Winer J, Henzel WJ: Purification and cloning of vascular endothelial growth factor secreted by pituitary folliculosatellite cells. *Methods Enzymol* 1991;146: 391-405.
- Ando S, Nojima K, Majima H, Ishihara H, Suzuki M, Furusawa Y, Yamaguchi H, Koike S, Ando K, Yamauchi M, Kuriyama T: Evidence for mRNA expression of vascular endothelial growth factor by X-ray irradiation in a lung squamous carcinoma cell line. *Cancer Lett* 1998;23;132:75-80.
- Sugishita Y, Takahashi T, Shimizu T, Yao A, Kinugawa K, Sugishita K, Harada K, Matsui H, Nagai R: Expression of genes encoding vascular endothelial growth factor and its Flk-1 receptor in the chick embryonic heart. *J Mol Cell Cardiol* 2000;32:1039-1051.
- Schweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E: Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 1992;359:843-845.
- Claffey KP, Wilkinson WO, Spiegelman BM: Vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 1992;267:16317-16322.
- Eyssen-Hernandez R, Ladoux A, Frelin C: Differential regulation of cardiac heme oxygenase-1 and vascular endothelial growth factor mRNA expression by hemin, heavy metals heat shock and anoxia. *FEBS Lett* 1996;382:229-233.
- Li J, Perrella MA, Tsai JC, Yet SF, Hsieh CM, Yosizumi M, Patterson C, Endege WO, Zhou F, Lee ME: Induction of vascular endothelial growth factor gene expression by interleukin-1 β in rat aortic smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1995;270:308-312.
- Cohen T, Nahari D, Cerem LW, Neufeld G, Levi BZ: Interleukin-6 induces the expression of vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 1996;271:736-741.
- Pertovaara L, Kaipainen A, Mustonen T, Orpana A, Ferrara N, Saksela O, Alitalo K: Vascular endothelial growth factor is induced in

- response to transforming growth factor- β in fibroblastic and epithelial cells. *J Biol Chem* 1994;269:6271-6274.
34. Finkenzeller G, Marmé D, Weich HA, Hug H: Platelet-derived growth factor-induced transcription of the vascular endothelial growth factor gene is mediated by protein kinase C. *Cancer Res.* 1992; 52:4821-4823.
 35. Warren RS, Yuan H, Matli MR, Ferrara N, Donner DB: Induction of vascular endothelial growth factor by insulin-like growth factor1 in colorectal carcinoma. *J Biol Chem* 1996; 271:29483-29488.
 36. Brauchle M, Funk JO, Kind P, Werner S: Ultraviolet B and H₂O₂ are potent inducers of vascular endothelial growth factor expression in cultured 11 keratinocytes. *J Biol Chem* 1996;271:21793-21797.
 37. Ando S, Nojima K, Majima H, Ishihara H, Suzuki M, Furusawa Y, Yamaguchi H, Koike S, Ando K, Yamauchi M, Kuriyama T: Evidence for mRNA expression of vascular endothelial growth factor by X-ray irradiation in a lung squamous carcinoma cell line *Cancer Lett* 1998;23;132:75-80.