

망간이 백서 두개관세포의 골형성능에 미치는 영향

한용택¹ · 최득철² · 김영준^{1,3} · 정현주^{1,3} · 김옥수^{1,3}

¹전남대학교 치과대학 치주과학교실, ²전남대학교 대학원 치의학과 및 ³치의학연구소

I. 서론

망간은 인체에 필요한 필수 무기질로써 성장과 발달에 필요하다. 특히 망간은 생식, 결합조직과 뼈의 형성, 당과 지질대사 등 인체의 항상성 유지에 필요하며 특히 뇌의 정상적인 활동에 필요한 무기질이다^{1,2}. 체중 70 Kg의 성인은 약 10-20 mg의 망간이 체내에 존재하는데 이중 25%이상이 골 내에 있다³. 망간은 발생의 초기단계에서는 고농도로 존재하지만(백서의 뇌, 특히 striatum에 200 μ M이상), 성인이 되면 조직내의 망간농도는 3-20 μ M 정도이다⁴.

망간의 일일 권장 섭취량은 3-5 mg 이상이며 일반적으로 땅콩 종류와 과일 야채 등에 망간이 많이 함유되어 있다². 특히 해조류에는 많은 망간이 함유되어 있다. 망간은 효소활성과 항산화 작용 등 인체의 생물학적 기능에 중요한 필수 원소이나 고농도의 망간에 지속적으로 노출될 경우 친화조직인 뇌에 침착하여 망간증을 유발시킨다^{5,6}.

망간은 calcium channel을 통하여 세포내로 유입되며 세포내로 들어온 망간은 조면세포질 내망(rough endothelium reticulum; rER)등 소기관에 저장된 calcium의 세포질내 분비를 유도한다⁷. 특히

다양한 경로를 통해 세포내로 들어간 망간은 세포내 여러 소기관에 존재하는 calcium의 세포질내 유리를 촉진시키며⁸ 세포내에서 산소자유기(oxygen free radical)에 의하여 3가 이온(Mn^{3+})으로 산화되어 세포독성에 관여한다^{9,10}.

종지 않은 작업환경 하에서 망간의 지속적인 노출에 의한 Mn intoxication 또한 심각한 장애를 가져오며 이는 망간증이라고 알려져 있다. 만성적인 망간 노출은 파킨슨 질환(Parkinson's disease)과 유사한 extrapyramidal dysfunction이 나타난다^{11,12}. 만성적인 간 질환을 갖는 사람에서 망간 중독증의 위험성이 증가하는데 이는 금속이온의 혈중 및 뇌에서 그 level이 증가되고 이에 따라서 행동학적 결함 및 퇴행성 신경장애가 나타난다. 이는 망간이 담즙(bile) 내에서 대사되어 배출되지만 정상적인 간 기능을 방해하는 경우에는 망간의 과축적이 야기될 수 있기 때문이다³.

망간이 세포에 미치는 영향은 주로 신경세포에 집중되어 왔다. 저농도의 망간은 PC12 세포의 분화를 유도하며 이는 nerve growth factor와 유사한 신호 전달 경로를 따른다고 하였다⁴. 그러나 고농도의 망간은 PC12 세포의 세포사를 야기하며 이것은 시간과

교신 저자 : 김영준, 광주광역시 동구 학동 5 전남대학교 치과대학 치주과학교실, 우편번호: 501-757,
E-mail : youngjun@jnu.ac.kr

농도 의존성이며 여기에는 여러 가지 효소와 단백질이 관여한다고 하였다⁵⁾.

조골세포에 대한 망간의 영향을 관찰한 연구는 드문 편이다. Lampagnani 등¹⁶⁾은 MG63 osteosarcoma 세포에 망간을 투여했을 때 고농도에서는 세포 부착이 감소되었지만 저농도에서는 증진되었다고 하였다.

그러나 간 경화를 포함하여 만성 간 질환이 있는 사람에서는 망간증 뿐만 아니라 osteopenia의 위험성이 높으며 이는 망간의 과부하와 관련이 있을 수 있다^{3, 13)}. 즉 만성적인 간 질환에 의한 망간 대사 장애가 있는 환자나 골다공증 등 골 대사장애가 있는 경우, 그리고 망간이 과량 축적될 수 있는 환경에 노출되어 있는 작업자들에게는 지속적인 고농도의 망간 자극이 골 대사에 문제를 야기할 수 있다. 그러나 대부분의 망간 연구들이 뇌와 관련된 세포들에 관한 것으로, 망간 자극이 골세포에 미치는 영향을 연구한 것은 거의 없다.

이에 본 연구에서는 망간 자극이 골세포에 어떤 영향을 주는지를 골대사의 관점에서 알아보기 위하여 백서 두개관세포에 여러 농도의 망간으로 자극한 후, 골형성 능력을 관찰하고자 하였다.

II. 실험재료 및 방법

1. 백서 두개관세포의 분리 및 배양

백서 두개관세포는 McCarthy 등¹⁸⁾의 방법을 변형한 순차소화효소기법을 이용하여 분리 배양하였다. 태령 20-21일째의 백서 태자를 모체로부터 무균적으로 적출하고 태자의 두부로부터 두개관을 절제하여 골막과 연조직을 제거하였다. 절제한 두개관은 수술용 가위로 세절한 후 0.2% collagenase (GibcoBRL, U.S.A.)를 함유한 bone cell buffer(1 M NaCl, 0.3 M HEPES, 0.125 M CaCl₂, 0.5 M Mannitol, 0.1 M K₂HPO₄; pH 7.4) 1.5 ml와 함께 교반하면서 37°C에서 15분간 소화시켰다. 3번의 소화과정중에 얻어진 세포현탁액은 버리고 4번째와 5번째의 세포현탁액을 모아서 1000 xg에서 10분간 원심분리한 후 bone

cell buffer로 세척하고 다시 원심분리하여 분리된 세포를 수집하여 배양하였다. 수집된 세포들은 75 ml flask에 10% fetal bovine serum (FBS; GibcoBRL, U.S.A.) 및 1% antibiotic-antimycotic solution (GibcoBRL, U.S.A.)이 첨가된 BGJb media (GibcoBRL, U.S.A.)에 배양하였다. 배양액은 3일 간격으로 교환하였으며 배양시 습도는 100%, 온도는 37°C였으며 95%의 공기와 5%의 CO₂를 계속 공급하였다. 실험에는 계대배양 1번째와 2번째 것을 이용하였다.

2. 배양접시내 MnCl₂의 적용

MnCl₂ (Sigma, U.S.A.)는 3차 증류수에 녹여서 사용하였다. 사용된 MnCl₂의 농도는 여러 문헌을 참고하였으며 배지내 최종농도가 0, 10, 30, 60, 100, 300 μ M이 되도록 stock solution으로 준비하여 실험에 사용하였다. 대조군은 MnCl₂를 적용하지 않은 군을, 실험군은 해당 농도의 MnCl₂를 적용한 군으로 하였다.

3. Alkaline phosphatase (ALPase)활성도 측정

염기성 인산 분해 효소 활성도 측정은 Cho 등¹⁸⁾의 방법에 준하여 시행하였다. 백서 두개관세포를 배양한 후 12 well dish에 well당 1×10^5 cell을 분주하였다. 24시간 후 해당 농도의 MnCl₂를 적용하고 3일과 7일간 배양하였다. 배지를 제거한 후 1% Triton-X-100으로 세포를 용해시키고 초음파로 분쇄시켰다. 0.4 mM Tris HCl, 2 mM MgCl₂, 4 mM p-nitrophenol phosphate가 함유된 완충용액 50 μ l/well을 가한 후 30분간 반응시키고, 150 μ l의 1N NaOH를 가하여 반응을 중지시킨 후 분해된 p-nitrophenol을 405 nm에서 spectrophotometer (SmartSpec™, BioRad, CA, U.S.A.)로 비색 정량하였다.

4. 석회화 결절의 측정

석회화 결절 형성에 대한 망간의 영향을 알아보기 위하여 골아세포를 12 well plate에 1×10^5 cells가 되

게 분주한 후 10% FBS, 1% antibiotic-antimycotic solution, 50 $\mu\text{g/ml}$ ascorbic acid, 10 mM sodium β -glycerophosphate가 첨가된 BGJb solution에 MnCl_2 농도 10 μM , 30 μM , 60 μM , 100 μM 가 되도록 처리하고 3일마다 배지를 교환하면서 14일과 21일간 배양하였다. 배양 14일과 21일째에 cell을 4% formaldehyde에 1시간 고정한 후 1% Alizarin red S 염색 용액을 넣어 20분간 반응시켜 석회화 결절을 염색하였다. 염색된 표본들은 CCD camera (Sony, Japan)에서 촬영하고 Optimas image-processing program (Media cybernetics, Carlsbad, CA, U.S.A)을 이용하여 모니터 상에서 석회화 결절 부분의 면적을

계측하였다.

5. 총 RNA 추출

100 mm dish (Corning, U.S.A)에 백서 두개관세포를 분주하고 10% FBS가 함유된 BGJb 배지에 배양하였다. 배양액은 세포가 밀생에 도달할 때까지 3일 간격으로 교환하였다. 세포가 밀생에 도달하면 10% FBS, 1% antibiotic-antimycotic solution, 50 $\mu\text{g/ml}$ ascorbic acid, 10 mM sodium β -glycerophosphate가 첨가된 BGJb solution에 MnCl_2 농도 10 μM , 30 μM , 60 μM , 100 μM 가 되도록 처리하고 배양하였다.

PCR primers					
Primer	Expected base pairs		Sequence (5' -3')		
GAPDH-sense (+)	418		CACCATGGAGAAGGCCGGGG		
GAPDH-antisense (-)			GACGGACACATTGGGGGTAG		
COL I-sense (+)	250		TCTCCACTCTTCTAGGTTCT		
COL I-antisense (-)			TTGGGTCAITTCACATGC		
BSP-sense (+)	1068		AACAAATCCGTGCCACTCA		
BSP-antisense (-)			GGAGGGGGCTTCACTGAT		
OCN-sense (+)	198		TCTGACAAACCTTCATGTCC		
OCN-antisense (-)			AAATAGTGATACCGTAGATGC		

PCR programs					
GAPDH	94°C 1 min	94°C 1 min	60°C 2 min	72°C 1 min	72°C 10 min
	25 Cycles				
COL I	94°C 1 min	94°C 1 min	55°C 2 min	72°C 1 min	72°C 10 min
	30 Cycles				
BSP OCN	94°C 1 min	94°C 1 min	50°C 2 min	72°C 1 min	72°C 10 min
	30 Cycles				

Figure 1. Amplification primer sets and conditions used in polymerase chain reaction. GAPDH indicates glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; COL I, type 1 collagen; BSP, bone sialoprotein; and OCN, osteocalcin.

배양 7일째에 세포의 RNA를 추출하였다. RNA의 분리는 배양액을 제거하고 2.0 ml의 Trizol (Promega, U.S.A.)을 첨가하여 각각의 MnCl_2 농도에서 분리된 세포를 1.8 ml tube에 수집하였다. 200 μl 의 chloroform을 첨가하여 RNA를 용해시킨 후 4℃, 12,000 rpm에서 10분간 원심 분리하였다. 상층액을 취한 후 500 μl isoprophyl alcohol을 첨가하여 RNA를 침전시키고 4℃, 10,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 상층액을 제거하였다. 분리한 RNA는 Tris-EDTA buffer 40 μl 에 녹인 후 Spectrophotometer (SmartSpec™, BioRad, U.S.A.)로 그 양을 측정하였으며 -70℃ 냉동고에 보관하였다.

5. 역전사 중합효소연쇄반응 (Reverse transcriptase-polymerase chain reaction; RT-PCR)

추출된 총 RNA 중 5 μg 을 Superscript II(GIBCO-BRL, U.S.A.)를 이용하여 70℃에서 10분, 42℃에서 70분, 37℃에서 15분 동안 역전사 중합반응을 유도하여 cDNA를 합성하였다.

백서의 cDNA 염기서열에 의거하여 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), bone sialoprotein (BSP), type I collagen, osteocalcin (OCN) primer를 제작한 후(Figure 1), PCR 완충용액 (GibcoBRL, U.S.A.) 5 μl , 1.5 mM MgCl_2 3 μl , 10 mM dNTP mix 1 μl , 각각의 primer 2.5 μl , 5 unit Taq polymerase 0.2 μl , cDNA 2 μl 와 3차 증류수를 넣어 50 μl 가 되게 하여 Thermal cycler (Perkin Elmer, U.S.A.)를 이용하여 증폭하였다(Figure 1). 증

폭된 PCR 산물들을 1.5% agarose gel에서 전기영동을 시행하여 얻은 유전자 영상을 Gel Image Analysis System (QualityOne®, BioRad, U.S.A)에서 house keeping gene인 GAPDH의 발현을 기준으로 각 primer의 유전자 발현정도를 평가하였다.

6. 통계학적 분석

실험에서 얻어진 수치는 one-way ANOVA와 사후 검정에 Duncan 법을 시행하였다.

III. 결 과

1. 염기성 인산 분해 효소 활성도 검사

MnCl_2 를 넣지 않은 대조군과 각 해당농도의 MnCl_2 를 접종하고 배양한 실험군들의 염기성 인산 분해 효소 활성도를 측정하였다.

배양 3일에 대조군은 98.3 U였고, MnCl_2 농도 10-60 μM 에서는 100-65.9 U로 MnCl_2 농도 60 μM 에서 대조군에 비해 효소 활성도가 유의하게 낮게 나타났다 ($p < 0.05$, Table 1).

배양 7일에 대조군은 201.0 U였고, MnCl_2 농도 10-60 μM 에서는 99.2 - 192.8 U로 모든 군에서 배양 3일째에 비하여 효소 활성도가 증가하였다. MnCl_2 농도 30 μM 과 60 μM 에서는 대조군에 비해 효소 활성도가 유의하게 낮게 나타났다 ($p < 0.05$, Table 1).

2. 석회화 결절의 형성 평가

Table 1. Alkaline phosphatase activity of rat calvarial cells treated with MnCl_2

Conc. (μM)	Alkaline phosphatase activity (U/ 10^5 cells)	
	3 day	7 day
control	98.3 \pm 20.5	201.0 \pm 13.2
10	100 \pm 31.7	192.8 \pm 12.9
30	84.6 \pm 18.0	147.2 \pm 18.9*
60	65.9 \pm 12.0*	99.2 \pm 18.2*

*: indicates significant difference with control group ($p < 0.05$).

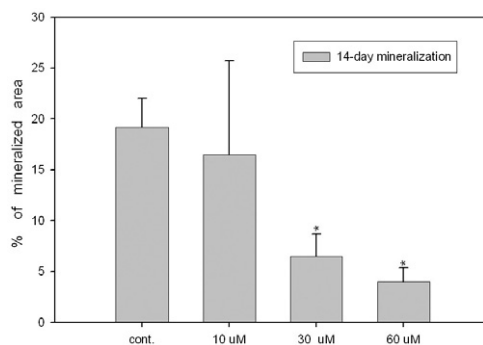
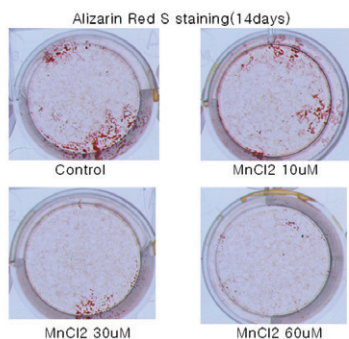


Figure 2. Representative in vitro mineralization data obtained from 14-day cultures of primary rat calvarial cells.
*: indicates significant difference from the control ($p < 0.01$).

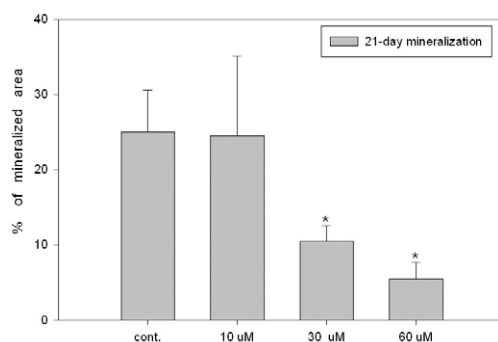
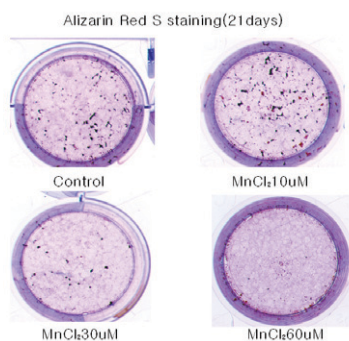


Figure 3. Representative in vitro mineralization data obtained from 21-day cultures of primary rat calvarial cells.
*: indicates significant difference from the control ($p < 0.01$).

백서 두개관세포를 석회화 결절 형성용 배지에서 배양하고 배양 14일과 21일에 Alizarin red S 염색을 실시하고 결절 수를 측정하였다. 결절은 원형으로 주위에 세포가 밀집되어 있었고 결절 중앙쪽으로 진한 적색으로 염색되어 있었다.

배양 14일째 대조군의 석회화 결절은 대조군과 MnCl_2 10 μM 에서 잘 관찰되었는데 그 양상이 세포 배양 용기 가장자리 주위로 현저하였다. 석회화 결절 면적은 전체 배양 용기 면적을 기준으로 대조군은 19%, MnCl_2 10 μM 은 16%, MnCl_2 30 μM 은 6.5%, MnCl_2 60 μM 은 4%였으며, 대조군과 MnCl_2 10 μM 에서 MnCl_2 30 μM 과 MnCl_2 60 μM 에 비해 통계학적으로 유의하게 높은 석회화 결절 형성율을 보였다 ($p < 0.01$, Figure 2).

배양 21 일째 대조군의 석회화 결절 수는 대조군에서 25%, MnCl_2 10 μM 에서 24.5%, MnCl_2 30 μM 은 10.5 %, MnCl_2 60 μM 은 5.5%로 14일째에 비하여 더 증가된 경향을 보였으며 MnCl_2 60 μM 군이 다른 군에 비하여 유의하게 낮았다($p < 0.01$, Figure 3).

3. RT-PCR 결과

10 μM 에서 60 μM 까지의 MnCl_2 가 함유된 배지에 백서 두개관세포를 7일간 배양한 후 RNA를 분리하여 type I collagen (COL-I), osteocalcin (OCN), bone sialoprotein (BSP)의 발현 정도를 관찰하였다. 그 결과 osteocalcin 유전자 발현은 모든 군에서 희미하게 관찰되었으며 bone sialoprotein은 대조군에서만 관찰

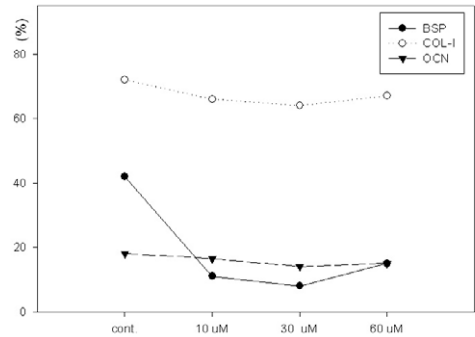
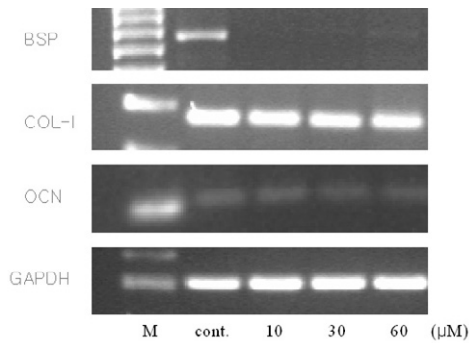


Figure 4. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis of type I collagen (COL-I), bone sialoprotein (BSP), osteocalcin (OCN), and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) messenger RNA expression in primary rat calvarial cells. M: molecular marker (100 bp); cont.: control

되었다. Type I collagen 유전자 발현은 망간 투여와 관계없이 모두 비슷한 정도로 발현되었다 (Figure 4).

IV. 고찰

망간은 회색의 금속으로서 토양 및 각종 생물체에 풍부하게 존재한다. 망간은 중추신경계 발달의 필수 요소로서 카테콜아민의 신진대사에 필요하며, 뇌에 분포한 망간의 80%를 함유하는 glutamine synthase, calmodulin-dependent phosphatase, calcineurin, pyruvate carboxylase 등과 같은 효소들의 구성성분으로서 필수 미량 원소이다¹⁻³⁾. 그러나 만성적으로 망간에 노출되거나 망간 대사가 일어나지 않아 혈청의 망간 농도가 증가하면 망간이 대뇌 기저핵에 우선적으로 축적되어 점진적으로 비가역적인 신경병리학적 변화를 일으킨다. 이러한 만성 망간중독은 운동기능의 감소 및 장애를 가져오며, 이러한 증상은 파킨슨씨 병과 유사한 것으로 알려져 있다^{4, 11-13)}.

망간에 의한 세포 손상 기전은 주로 신경세포에 대한 것이 알려져 있으며 여러 인자들이 복합적으로 작용하는 것으로 알려져 있다. 지금까지 알려진 손상의 기전은 Mn^{2+} 이 calcium channel을 통해 세포내로 들어가 세포내 세포질내망 등 소기관에 저장된 Ca^{2+} 의 분비를 유도하고^{7, 9, 19)}, 세포내 사립체에 우선적으로 Ca^{2+} 의 유입을 증가시켜^{8, 20)} 세포의 손상에 관여하는 것이다. 그외 기전으로는 도파민의 auto-

oxidation과 Mn^{2+} 이 활성 산소종(reactive oxygen species)의 생성을 자극하여 이들 반응성 산소종이 도파민 수용체나 도파민에 직접 작용하여²¹⁾ 손상을 초래한다고 알려져 있다. 또한 망간은 PC12 세포에서 세포자살과 관련된 단백질인 p38과 caspase-3의 활성을 자극하지만, caspase 활성화와 무관하게 PC12 세포의 세포사가 일어날 수 있다고 하는 등¹⁵⁾ 아직까지 망간에 의한 세포 손상기전은 확실하게 규명되지 못하고 있다. 지금까지 망간에 의한 독성은 대부분 신경세포에 국한된 연구로서 신체의 다른 장기에서의 생리적, 생화학적 영향에 대한 연구는 드물었다. 망간이 주로 담즙에 의해 배설이 되기 때문에 만성적인 간 질환으로 인해 혈청 및 뇌에서 비정상적으로 망간의 축적이 일어난다면 망간 독성에 의한 여러 가지 문제를 야기할 수 있다^{1, 13)}.

또한 망간의 과부하는 골에도 많은 영향을 줄 것으로 생각된다. 따라서 만성적인 간 질환에 의한 망간 배설 장애, 그리고 골다공증 등 골 대사 관련 질환이 있는 환자에서는 망간이 골 형성과 흡수에 영향을 미칠 것으로 생각되나 이에 대한 연구는 별로 없고 특히 세포 수준의 연구는 드물다. 이에 본 실험에서는 백서 두개관세포의 골기질 형성에 대한 망간의 억제효과를 관찰하고자 하였다.

실험에 앞서 본 실험실의 다른 연구 실험 결과 망간은 백서 두개관세포의 세포사를 유도하며 특히 농도 100 μM 이상에서는 대조군에 비하여 유의한 세포

활성도 억제제가 나타나, 본 실험에서는 망간의 농도를 0, 10, 30, 60 μM 로 하였다.

망간에 의한 백서 두개관세포의 조골세포로의 분화 영향을 관찰하기 위하여 염기성 인산 분해 효소 활성도를 측정하였다. 염기성 인산 분해 효소는 유기인산 에스테르를 가수분해하여 석회화가 이루어지는 부위에서 국소적으로 인산이온의 농도를 증가시키는 효소로서 세포외기질에 calcium phosphate를 침착시킴으로서 석회화를 유도하는 기능을 갖는다^{22, 23}. 그래서 염기성 인산 분해 효소의 활성도가 증가한다는 것은 석회화가 진행 중임을 의미한다. 망간 농도 10, 30, 60 μM 를 백서 두개관세포에 적용하였을 경우 배양 3일째에 10 μM 에서는 대조군과 차이가 없이 비슷한 정도의 효소 활성도를 보였으나 망간 농도 30, 60 μM 에서는 대조군에 비해 유의하게 활성이 낮았다($p < 0.05$). 배양 7일째에서 3일째에 비하여 활성도가 증가하였으나 3일째와 유사하게 망간 농도 30, 60 μM 에서는 대조군에 비해 유의하게 활성이 낮았다($p < 0.05$). 이는 배양 7일까지도 망간 농도 30, 60 μM 에서 백서 두개관세포의 석회화 과정이 지연되고 있음을 추정할 수 있다.

또한 망간 농도 10, 30, 60 μM 에서 14일과 21일째 석회화 결절 면적을 측정한 결과 망간 농도 10 μM 에서는 대조군과 비슷한 정도의 석회화 결절 면적을 보였으나 그 이상의 농도에서는 대조군보다 더 작은 결절 면적을 보였다. 이들 결과로 볼 때 망간 농도 30 μM 이상에서는 조골세포의 광물화를 억제시키는 것으로 추정되었다.

RT-PCR 결과 osteocalcin 유전자 발현은 모든 군에서 희미하게 관찰되었으며 bone sialoprotein은 대조군에서만 관찰되었다. Bone sialoprotein과 osteocalcin은 조골세포가 분비하는 비교원성 단백질로 골형성과 흡수에 중요한 단백질의 하나이다²⁴. 특히 bone sialoprotein은 골의 mineralization 초기에 잘 발현이 되며 crystal nucleator로 알려져 있다²⁵. Osteocalcin은 초기 골 형성시기에는 관찰되지 않지만 골이 형성되고 성숙되는 시기에 잘 발현된다. 또한 osteocalcin은 파골세포의 chemoattractant로 골형성과 흡수를 조절하는 단백질로 알려져 있다²⁵. 본

실험 결과 bone sialoprotein 유전자는 대조군에서는 발현이 관찰되었지만, 망간으로 자극한 모든 군에서 그 발현이 관찰되지 않아 망간이 백서 두개관세포의 분화를 억제시킨다고 추정할 수 있다. Type I collagen 유전자 발현은 망간 투여와 관계없이 모두 비슷한 정도로 발현되었다. Type I collagen은 치조골내에 가장 많이 분포하는 세포외기질로, 이 결과는 본 실험의 염기성 인산 활성도 측정 및 석회화 결절 형성의 결과와 일치하지 않았다. 그러나 type I collagen 유전자는 골아세포에서 비교적 빠른 시기에 발현이 시작되어 오랫동안 그 발현이 유지되는 점을 고려할 때, 본 실험은 세포가 밀생에 도달하고 배지를 mineralization solution으로 교환한 후 7일 후의 유전자 발현을 관찰하였기 때문에 모든 군에서 일정하게 발현되었을 것으로 추정된다. 그러나 망간자극에 의한 골 기질 형성억제가 type I collagen 유전자에는 영향을 미치지 않고 다른 유전자에만 영향을 주었을 가능성도 배제할 수 없어 더 많은 연구가 필요하리라 생각된다.

망간은 여러 가지 세포의 활성과 기능에 영향을 준다. 이번 연구결과 망간은 농도 30 μM 이상에서 백서 두개관세포의 기능을 변화시켜 골아세포로의 분화 및 광물화를 억제시키는 것으로 추정된다. 그러나 본 연구는 망간이 골세포에 미치는 영향을 관찰한 기초적인 실험으로 향후 망간에 의한 백서 두개관세포의 골기질 분비 억제 기전등 망간이 골세포에 미치는 영향을 규명하는 연구가 계속적으로 필요하리라 생각된다.

V. 결론

고농도의 망간에 지속적으로 노출되면 신경계의 손상을 가져와 망간중독증을 일으킨다. 망간의 주된 독성은 주로 그 신경계통의 손상에 대한 연구가 주로 되어왔다.

이번 연구에서는 백서 두개관세포를 이용하여 망간이 골아세포의 광물화에 미치는 영향을 평가하고자 하였다. 예비실험을 거쳐 골아세포의 세포증식에 영향을 미치지 않으면서 독성이 없는 농도를 10, 30,

60 μM 로 결정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 염기성 인산 분해 효소 활성도 측정 결과, 배양 3일에 대조군은 98.3 U였고, MnCl_2 농도 10-60 μM 에서는 100-65.9 U로 MnCl_2 농도 60 μM 에서 대조군에 비해 효소 활성도가 유의하게 낮게 나타났다($p < 0.05$). 배양 7일에 대조군은 201.0 U였고, MnCl_2 농도 10~60 μM 에서는 99.2~192.8 U로 모든 군에서 배양 3일째에 비하여 효소 활성도가 증가하였다. MnCl_2 농도 30 μM 과 60 μM 에서는 대조군에 비해 효소 활성도가 유의하게 낮게 나타났다($p < 0.05$).
2. 석회화 결절 면적율은 전체 배양 용기 면적을 기준으로 배양 14 일째에 대조군은 19%, MnCl_2 농도 10~60 μM 에서는 4~16%였으며, 대조군과 MnCl_2 10 μM 에서 MnCl_2 30 μM 과 MnCl_2 60 μM 에 비해 통계학적으로 유의하게 높은 석회화 결절 형성율을 보였다($p < 0.01$).
3. 배양 21 일째 대조군의 석회화 결절 면적율은 대조군에서 25%, MnCl_2 농도 10~60 μM 에서는 5.5~24.5%로 14일째에 비하여 더 증가된 경향을 보였으며 MnCl_2 60 μM 군이 다른 군에 비하여 유의하게 낮았다($p < 0.01$).
4. RT-PCR의 결과, osteocalcin 유전자 발현은 모든 군에서 희미하게 관찰되었으며 bone sialoprotein은 대조군에서만 관찰되었다. Type I collagen 유전자 발현은 망간 투여와 관계없이 모두 비슷한 정도로 발현되었다.

이상의 결과는 정상보다 높은 농도의 망간이 백서 두개관세포의 골기질단백질 분비를 저하시켜 골형성과정을 억제시키는 것으로 나타났다.

VI. 참고문헌

1. Underwood EJ: Trace metals in human and animal health, J Human Nutrition 1981;35:37-48.
2. WHO: Early detection of occupational disease, Genova, World health Organization, 1986:69.

3. Wilson JD, Braunwald E, Isselbacher KJ, Petersdorf RG: Harrison's principles of internal medicine. McGraw Hill, New York, 1991;443-445.
4. Chan AWK, Minski MJ, Lim L, Lai JCK: Changes in brain regional manganese and magnesium levels during postnatal development; modulation by chronic manganese administration, Metab Brain Dis 1992;7:21-33.
5. Barbeau A: Etiology of Parkinson's Disease; A research strategy. Can J Neurol Sci 1984;11:24-28.
6. NAS : Manganese. National Academy of science, III, 1973.
7. Anderson M: Mn ions pass through calcium channels; A possible explanation, J Gen Physiol 1983;81:805-827.
8. Gavin CE, Gunter KK, Gunter TE: Manganese and calcium efflux kinetics in brain mitochondria, Biochem J 1990;266:329-334.
9. Aschner M and Aschner JL: Manganese neurotoxicity: Cellular effects and blood-brain barrier transport, Neurosci Biobehav Rev 1991;15:333-340.
10. Verity MA: manganese neurotoxicity; A mechanism hypothesis, Neurotoxicol 1999;20:489-497.
11. Cotzias GC: Manganese, melanins and extrapyramidal system, J Neurosurg 1966;34(suppl):170-180.
12. Donaldson J: The physiopathologic significance of manganese in brain; its relation to schizophrenia and neurodegenerative disorders, Neurotoxicol 1987;8:451-462.
13. Burkhard PR, Delavelle J, Du pasquier R, Spahr L: Chronic parkinsonism associated with cirrhosis: a distinct subset of acquired hepatocerebral degeneration, Arch Neurol 2003;60:521-528.
14. Roth JA, Horbinski C, Higgins D, Lein P, Garrick MD: Mechanism of manganese-induced rat

- pheochromocytoma (PC12) cell death and cell differentiation, *Neurotoxicol* 2002;23:147-157.
15. Roth JA, Feng L, Walowitz J, Browne RW: Manganese-induced rat pheochromocytoma (PC12) cell death is independent of caspase activation, *J Neurosci Res* 2000;61:162-171.
 16. Lampugnani MG, Bernasconi S, Neri P, Lozzi L, Gavazzi I, Marchisio PC, Dejana E: Role of manganese in MG-63 osteosarcoma cell attachment to fibrinogen and von willebrand factor, *Lab Invest* 1991;65:96-103.
 17. McCarthy TL, Centrella M, Canalis E: Further biochemical and molecular characterization of primary rat parietal bone cell culture, *J Bone Min Res*, 1988;3:401-408.
 18. Cho MI, Matsuda N, Lin WL, Moshier A, Ramakrishnan PR: In vitro formation of mineralized nodules by periodontal ligament cells from the rat, *Calcif Tissue Int* 1992;50:459-467.
 19. Narita K, Kawasaki F, Kita H: Mn and Mg influxes through calcium channels of motor nerve terminals are prevented by verapamil in frogs, *Brain Res* 1990;510:289-295.
 20. Konji V, Montag A, Sandri G, Nordenbrand K, Ernster L: Transport of Ca^{2+} and Mn^{2+} by mitochondria from rat liver, brain, *Biochimie* 1985;67:1241-1250.
 21. Grahm DG: Catecholamine toxicity: A proposal for molecular pathogenesis of manganese neurotoxicity and Parkinson's disease, *Neurotoxicol* 1984;5:83-96.
 22. Beertsen W and Theo Van Den B: Calcification of dentinal collagen by cultured rabbit periodontium, The role of alkaline phosphatase, *Matrix* 1989;9:159-171.
 23. Anderson HC: Mechanism of mineral formation in bone, *Lab Invest* 1989;60:320-330.
 24. Roach HI: Why does bone matrix contain non-collagenous proteins? The possible roles of osteocalcin, osteonectin, osteopontin and bone sialoprotein in bone mineralization and resorption, *Cell Biol Internl* 1994;18: 617-628.
 25. Glowacki J, Rey C, Glimcher MJ, Cox KA, Lian J: A role for osteocalcin in osteoblast differentiation, *J Cell Biochem* 1991;45:292-302.

Effects of the MnCl_2 on bone formation in fetal rat calvarial cell

Woong-Taek Han¹, De-Zhe Cui², Young-Joon Kim^{1,3}, Hyun-Ju Chung^{1,3}, Ok-Su Kim^{1,3}

¹Dept. of Periodontology, ²Graduate school Dept. of Dental science and

³Dental Science Research Institute, Chonnam National University

Chronic exposure to high levels of manganese (Mn) leads a pronounced and debilitating disorder known as manganism. Research on the toxic manifestation of manganese have focused primarily on its neurological effects because exposure to high levels of the metal produces a distinct and irreversible extrapyramidal dysfunction resembling the dystonic movements associated with Parkinson's physiological and biochemical systems in the body.

The purpose of this study is to determine the effects of Mn on mineralization in primary rat calvarial cells. The experimental groups were in concentration of 0, 10, 30 and 60 μM .

The results were as follows:

1. ALP activity was decreased in concentration of 30 and 60 μM ($p < 0.01$).
2. Bone nodule formation was depressed in concentration of 30 and 60 μM at day 14 and 21 ($p < 0.01$).
3. RT-PCR results showed an altered expression of bone matrix proteins.

These result suggested that manganese might decrease or alter the expression of the osteoblast phenotype.