

각종 호르몬이 체외배양 골아세포(MC3T3 cell)에 미치는 영향에 관한 연구

경희대학교 의과대학 정형외과학교실
*우신향병원 정형외과 · **제일병원 내과

유명철 · 한정수 · 장성근* · 한인권**

=Abstract=

The Effects of the Several Hormones on the MC3T3 Osteoblast Cells - In Vitro Study -

Myung Chul Yoo, M.D., Chung Soo Han, M.D., Seong Geun Jang*, M.D.
and In Kwon Han**, M.D.

Department of Orthopaedic Surg., College of Medicine, Kyung Hee Univ., Seoul, Korea

**Department of Orthopaedic Surg., Woo Shin Hyang Hospital, Seoul, Korea*

***Department of Internal Med., Cheil General Hospital, Seoul, Korea*

The cause of osteoporosis are multifactorial ; these include aging, immobilization, genetic factor, initial bone mass, nulliparity, postmenopause, cigarette, etc. Among them the hormonal factors are very important. It is worthwhile to study the effects of various hormones on bone cells. Authors evaluated the effects of TGF- β , 17- β estradiol, insulin, and human growth hormone as a stimulatory factors, and r-interferon as a inhibitory factor on the MC3T3 osteoblast cells with measurement of cell numbers, osteocalcin and 3[H]-thymidine incorporation.

1. TGF- β was a potent stimulator on osteoblast with increased change in cell morphology (number, size, shape), osteocalcin level and 3[H]-thymidine incorporation in dose dependant fashion.
2. 17- β estradiol was also a potent stimulator on osteoblast activity as well as TGF- β except osteocalcin level which was not shown in dose dependant fashion.
3. There were little changes on osteoblast with insulin, growth hormone, and r-interferon.

Through this study it is confirmed that TGF- β and 17- β estradiol showed marked stimulatory effect on osteoblast cell in vitro.

Key Words : Hormonal effect, Osteoblast, Osteoporosis.

서 론

골조송증(osteoporosis)은 골대사의 불균형으로 일어나며 골아세포(osteoblast)활성도의 약화로 골형성이 감소되거나 파골세포(osteoclast)의 활성도가 강화되어 골의 흡수가 증가되는 경우, 또는 두가지 요소가 동시에 작용되는 경우

에 생긴다. 이같은 골대사의 불균형은 일차적으로 골아세포의 기능저하에 의한 것인지, 또는 골흡수가 증가된 즉 파골세포의 활성도 강화가 일차적인 원인인지에 대하여는 여러가지 이론과 주장이 있다. 골조송증을 일으키는 원인은 연령의 증가, 영양결핍, 운동부족, Calcium 섭취의 부족, 유전적 요소, 약물복용, 호르몬의 영향을 들 수 있으며 이중에서 호르몬의 영향은 매우 중요하다.

그러나 이들 영향에 의한 골조송증이 직접적인 골아세포의 활성화억제로 인한 것인지는 단정하기 어렵다. 특히 이들 홀몬작용에 의해 나타나는 골아세포의 반응에 대한 실험적 관찰과 임상적으로 나타나는 현상과는 차이가 있는 경우가 많다. 실험적으로 골아세포를 이용하여 골아세포의 활성화 강화 및 억압에 관여하는 인자를 규명하는 것은 임상적 골대사 변화의 연구에 중요한 자료가 되며 또한 골조송증의 병태생리를 규명할 수 있을 뿐 아니라 치료에도 응용할 수 있다. 이에 저자는 골아세포 자극인자로 보고되고 있는 Estrogen, Insulin, Growth hormone과 억제 인자로 추정되는 Interferon, 그리고 골세포간의 기능과 정보를 조절하는 연계인자(Coupling factor) 중의 하나로 알려진 Transforming growth factor(TGF)- β 를 체외에서 배양된 골아세포(MC3T3 cell)에 각각 주어 골아세포에서 일어나는 변화를 봄으로써 이들 홀몬이 골아세포에 미치는 영향을 관찰하였다.

재료 및 방법

출생 2일 내지 3일된 mice의 두개골을 여러 개 채취한 후 무균 조작하에서 50-80개의 조각을 얻는다. 채취된 두개골편들을 type II bacterial collagenase가 3mg/ml들어있는 5ml Eagles minimal essential medium(MEM)에 넣어 37°C 수조내에서 소화시킨다. 30분, 60분 후에 상층액을 각각 버리고 fresh MEM/collagenase을 새로 넣는다. 180분 경과후 반응을 중단하고 제1분획(0-30분) 제3분획(60-180분)의 세포를 Eagles MEM에 배양한다¹⁰⁾. 24시간후에 배지를 바꿔주고 3일간 더 배양한다. 그후에 0.1% collagenase/0.05% trypsin으로 처리한 후, Coulter 계수기로 세포수를 계수한다.

이상의 방법으로 배양된 세포에서 alkaline phosphatase¹²⁾과 PTH에 의한 cAMP생성³⁾을 측정하여 골아세포임을 확인한 후 확인된 골아세포를 α -MEM 배지에 계속적으로 계대 배양한다. 이상의 방법으로 계대 배양된 골아세포(MC3T3 cell; 이하 골아세포라 함은 이를 지칭함)에 골대사에 영향을 미치는 홀몬을 각각 넣어 골아세포의 형태학적 변화(morphologic change), 골아세포의 대사회전율(turnover rate), 골아세포의 증식도(proliferation index)를 조사하였다. 먼저 세포수, 모양, 크기를 보고 골아

세포의 형태학적 변화를, 다음에 세포내에서 생성된 osteocalcin치를 측정하여 골아세포의 대사회전율을 마지막으로 DNA의 합성정도를 나타내는 3[H]-thymidine incorporation의 변화를 측정하여 골아세포의 증식도를 비교관찰하였다. 또한 이들 각 홀몬을 각기 다른 조건으로 만들어 농도에 따른 영향도 연구하였다.

1. 골아세포 MC3T3 cell의 체외배양 방법

골아세포를 liquid nitrogen tank(-200°C)에 보관하였다가 37°C의 수조에서 세포를 α -MEM media로 세번 세척한 후에 이것이 담겨있는 culture flask에 심었다. 이 flask를 CO₂ incubator(37°C, 5% CO₂, 95% air)에 넣고 3일마다 media를 교환하며 계대배양 하였다.

충분한 세포를 얻은 후 계속 배양하면서 남은 세포는 liquid nitrogen tank에 저장하였다. 각각의 media에는 10% humn serum이 들어 있으며 각각의 홀몬들을 투입하기 24시간 전에는 1% human serum으로 바꾸었다.

2. 실험 및 각종 홀몬 투입방법

골아세포에 서로 역으로 작용하는 2 group의 홀몬을 택하여 다음과 같은 실험을 하였다. 즉 자극적 성질을 가진 Estradiol, TGF- β , Insulin, Growth hormone과 억제적 성질을 가진 Interferon을 대상으로 하였으며 이들 홀몬의 농도에 따른 골아세포의 반응을 관찰하기 위해 각기 다른 농도를 선정하였다. 각 홀몬의 투입방법과 농도의 변화는 다음과 같은 방법으로 시행하였다.

1) 17- β Estradiol(Amersham, England)

17- β estradiol을 95% ethanol에 녹인 후, st. alk solution으로 농도를 맞추었다. 농도변화는 배란시의 생리적 농도인 1 nM/ml을 기준으로 하여 이보다 희석된 농도와 농축된 농도에서의 반응을 관찰하기 위해 0.1 nM/ml, 1 nM/ml, 10 nM/ml, 100nM/ml의 농도투입군으로 구분하고 대조군은 17- β estradiol을 전혀 투입하지 않았다. 400,000개의 골아세포가 각각 담겨 있는 well속에 전술한 각기 다른 농도의 17- β estradiol을 투입하여 CO₂ incubator속에서 24시간 배양하였다.

2) Human Transforming Growth Factor- β (from R & D Sytemic Inc. Minnesota)

TGF- β 는 2ng/ml에서 강한 자극을 나타낸다는 Centrella등의 발표⁶⁾를 참고하여 0, 0.2ng/ml,

20ng/ml, 200ng/ml의 농도군으로 구분하고 전향과 동일한 방법으로 배양하였다.

3) Insulin(monocomponent regular insulin, from Nordisk, Denmark)

Insulin은 0.1 μ M/ml의 농도에서 glycogen 합성을 증가시킨다는 실험결과¹⁷⁾를 참고하여 0, 0.1 μ M/ml, 1 μ M/ml, 10 μ M/ml, 100 μ M/ml의 농도군으로 나누어 같은 방법으로 배양하였다.

4) Human Growth Hormone(hGH, from Eli Lilly, Indianapolis)

성장기의 hGH 생리적 농도는 0.0mU/ml에서 0.04mU/ml임을 감안하여 0.04mU/ml을 기준으로 10배씩 농축한 농도인 0.04mU/ml, 0.4mU/ml, 4mU/ml, 40mU/ml, 400mU/ml군과 0mU/ml군으로 나누어 동일하게 배양하였다.

5) r-interferon(rINF, Lucky)

rINF은 0, 0.1kU/ml, 1kU/ml, 10kU/ml, 100kU/ml, 1000kU/ml의 농도군으로 구분하였는데 이는 interferon의 효과에 대하여 아직 명확히 알려진 바가 없으므로 저자임의로 각각의 농도군을 선정하였다.

3. 세포 수거 및 관찰방법

골아세포의 doubling time은 약 15시간 내외가 소요되므로 여러가지 홀몬의 영향을 보기 위해서는 20시간 이상의 배양이 필요하여 본 연구에서는 모든 예에서 24시간으로 배양 조건을 균열히 하였다.

1) 세포 수거 및 관찰방법

각각의 홀몬을 농도별로 넣고 24시간 배양한 4후 세포를 수거하기전에 현미경으로 세포의 모

양 및 크기를 관찰한다. 그후 0.3% trypsin으로 처리한 후에 세포를 수거하고 hemocytometer chamber를 이용하여 세포수를 측정한다. 동시에 세포를 trypsin blue로 염색하여 viable cell 구하고 살아있는 세포수를 계산하였다.

2) 골아세포의 대사 회전을 측정

골아세포에서 생성되는 osteocalcin은 alkaline phosphatase보다 여 예민하게 골아세포의 대사 회전을 나타내므로 저자는 osteocalcin을 골아세포 대사회전율의 index로 채택하였고 이를 측정하는 방법으로는 방사면역 측정법(Radio-immunoassay)을 이용하였다⁴⁾. 홀몬들과 함께 24시간 배양후 수거한 세포를 원심분리하고 상층액을 버려 1ml를 만든 다음 이것을 ultrasonicator(Beckman, USA)로 세포를 깨뜨리고 측정할 때까지 -20°C 냉장고에 보관한다.

Osteocalcin 측정에 이용된 radioimmunoassay kit는 I.N.C.(Immuno Nuclear Corporation, USA)회사 것을 사용하였으며 double antibody 법으로 분리한 후 r-counter로 측정하였다.

3) 골아세포의 증식도 측정

40만개의 세포와 홀몬을 24개 well에 각각 넣고, 3[H]-thymidine(R & D systems, Inc, USA)을 0.5 μ Ci씩 각각 집어넣는다. 이를 20시간 배양한 후 media를 제거하기 위해 PBS(phosphate buffer solution)로 3번 씻은 후에 10% trichloroacetic acid를 넣고 4°C에 30분간 세워 놓는다. 그후 침전물을 1% SDS로 60°C에서 2시간 동안 녹인다. 이것을 0.5ml만 따서 4.5ml의 cocktail에 섞고 흔든 후에 beta-counter에서 계수하였다.

Fig. 1. Photographs of MC3T3 cells. Cells were cultured in α -MEM media containing insulin of 0 μ /ml(A), 0.1 μ M/ml(B), 1 μ M/ml(C), 10 μ M/ml(D), for 24 hours. No changes in cell numbers, size and shape were noted.

결 과

1. MC3T3 osteoblast cell의 형태학적 변화

400,000개의 세포를 각각 24 well에 집어넣고 각기 농도를 달리한 TGF- β , 17- β estradiol, insulin, growth hormone, r-interferon을 각각 넣어 24시간 배양한 후, 현미경 하에서 배양된 세포를 관찰한 후 세포수를 측정하였다. Insulin, human growth hormone, r-interferon을 넣은 well에서는 세포의 모양과 크기 및 숫적인 변화등 형태학적 변화는 관찰할 수 없었다(Fig. 1, 2, 3). TGF- β 는 세포의 증식을 강력하게 자극하여 농도증가에 따라 많은 숫적인 증가를 보였다. 즉 0.2ng/ml의 농도에서는 세포수가 614,000개로 control에 비해 1.5배로 증가되었고 2ng/

ml의 농도에서는 1,078,000개로 2.7배를, 20ng/ml의 농도에서는 1,366,000개로 2.4배를 증가시켰다. 농도가 증가 될수록 세포의 배열은 밀집되면서 선상으로 배열되며 세포의 크기는 정확한 세포의 지름을 측정하기 힘들어 구체적으로 판단하기가 어려웠으나 세포의 모양은 보다 더 방추형태를 띄었다(Fig. 4).

17- β estradiol도 세포증식을 증가시켰다. 즉 0.1nM/ml의 농도에서는 762,000개로 control에 비해 1.9배로, 10nM/ml의 농도에서는 878,000개의 2.2배로, 100nM/ml의 농도에서는 2.8배로의 증가를 보였다. 세포의 크기는 TGF- β 와 마찬가지로 특별한 변화가 없었다(Fig. 5).

2. 골아세포 대사회전율의 변화

각각의 홀몬들과 함께 배양한 후에 세포를 수

Fig. 2. Photographs of MC3T3 cells cultured with h-GH of 0mU/ml(A), 0.04mU/ml(B), 0.4mU/ml(C), 4mU/ml(D), No changes in cell morphology were noticed.

Fig. 3. Photographs of MC3T3 cells cultured with r-Interferon of 0kU/ml(A), 0.1kU/ml(B), 1kU/ml(C), 10kU/ml(D), No changes in cell morphology were noticed.

Fig. 4. Photographs of MC3T3 cells cultured in α -MEM media containing TGF- β of 0ng/ml (A), 0.2ng/ml(B), 2ng/ml(C), 20ng/ml(D) for 24 hours. Marked increase in cell numbers was noticed in dose dependant fashion.

Fig. 5. Photographs of MC3T3 cells cultured with 17- β estradiol of 0nM/ml(A), 0.1nM/ml(B), 10nM/ml(C), 100nM/ml(D), showed increased cell numbers in dose dependant fashion.

Table 1. Effects of various hormones on osteocalcin in MC3T3 cells

TGF- β		Estradiol		r-interferon		Insulin		Growth hormone	
Concent- ration (ng/ml)	Osteo- calcin (pg/ml)	Concent- ration (nM/ml)	Osteo- calcin (pg/ml)	Concent- ration (kU/ml)	Osteo- calcin (pg/ml)	Concent- ration (μ M/ml)	Osteo- calcin (pg/ml)	Concent- ration (mU/ml)	Osteo- calcin (pg/ml)
control	0.18	control	0.15	control	0.24	control	0.17	control	0.22
0.2	1.64	0.1	1.61	0.1	0.22	0.1	0.19	0.04	0.21
2	1.96	1	1.38	1	0.37	1	0.22	0.4	0.26
20	2.25	10	1.28	10	0.12	10	0.35	4	0.18
200	2.62	100	1.51	100	0.09	100	0.21	40	0.23
2,000	2.23	1,000	1.29	1,000	0.01	1,000	0.26	400	0.19

거한 다음, 5,000r.p.m.으로 원심분리하여 상층액을 버리고 침전물과 함께 1ml로 만든 후 ultrasonicator로 세포를 깨뜨린 후에 radioimmunoas-

say kit로 osteocalcin치를 측정하였다.

Table 1에서 보는바와 같이 17- β estradiol과 TGF- β 에서는 농도증가에 따라 osteocalcin치는

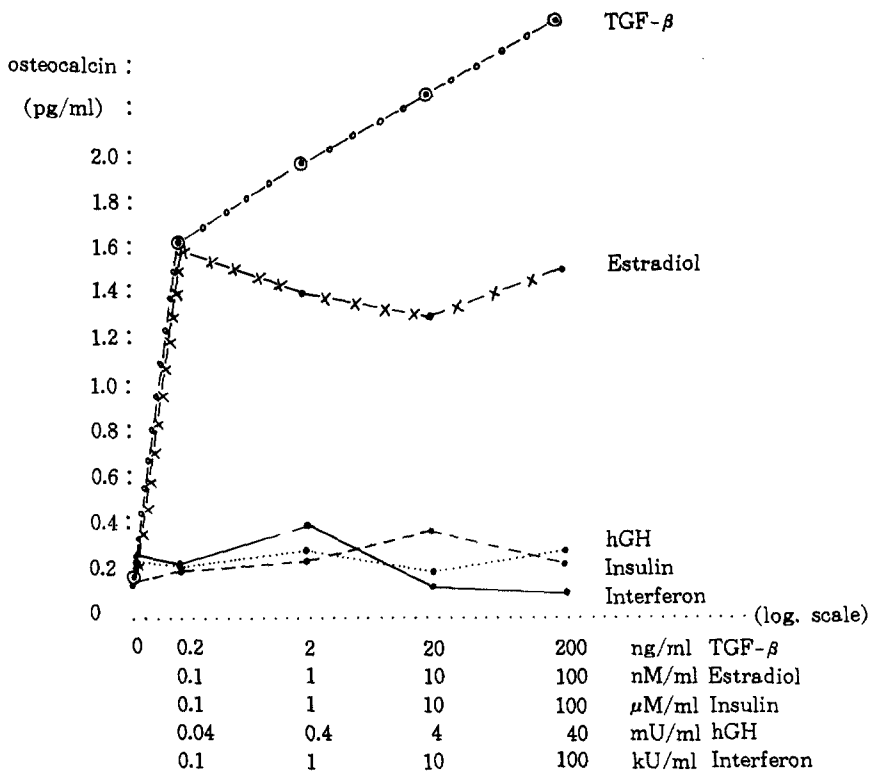


Fig. 6. Effect of various hormones on osteocalcin concentration in MC3T3 cells.

Table 2. Effects of hormones on 3H-thymidine incorporation in MC3T3 cells

TGF- β		Estradiol		Insulin		Growth hormone		r-interferon	
Condition	DPM*	Condition	DPM	Condition	DPM	Condition	DPM	Condition	DPM
control	1,853	control	2,796	control	4,598	control	3,042	control	2,105
0.2 ng/ml	5,310	0.1 nM/ml	2,085	0.1 μ M/ml	9,135	0.4 mU/ml	4,776	1 kU/ml	2,841
2 ng/ml	9,639	1 nM/ml	16,251	1 μ M/ml	3,472	4 mU/ml	5,139	10 kU/ml	1,995
20 ng/ml	12,340	10 nM/ml	19,307	10 μ M/ml	4,285	40 mU/ml	4,638	100 kU/ml	2,473

증가를 보였으나, 나머지 세 홀몬에서는 osteocalcin치가 낮으며 농도변화에 따른 어떤 증감도 보여주지 않았다(Table 1, Fig. 6 참조).

3. 골아세포 증식도의 변화

홀몬들과 함께 3[H]-thymidine을 골아세포에 넣어 20시간 배양한 후, 이를 수거하여 측정할 결과 17- β estradiol과 TGF- β 에서는 농도증가에 따라 수치의 증가를 보였으나 나머지 세 홀몬에서는 수치가 낮으며 농도변화에 따른 의미 있는 변화를 보이지 않았다(Table 2, Fig. 7).

골형성(bone formation)과 골흡수(bone resorption)는 각각 독립적으로 일어나는 것이 아니고, basic remodeling unit라 불리는 분리된 장소에서 일어난 순서를 따라 반복되는 주기를 계속한다²⁰. 우선 파골세포(osteoclast)는 비활동성 골표면에 나타나 2주안에 걸쳐 피질골(compact bone)에 tunnel을 형성하거나, 해면골(trabecular bone)의 골소강에 골흡수를 일으킨다^{8, 13, 21}. 파골세포가 집단적으로 모이면 골양(quantum of bone)이 재흡수를 일으켜 구멍을 형성하며, 그 크기가 100에서 400 μ m의 넓이에 해당된다^{21, 32}. 이 과정이 끝나며 골형성이 시작되는데 새로운 basic multicellular unit(BMU)

DPM* : Disintegration per Minute
DPM 20000 :

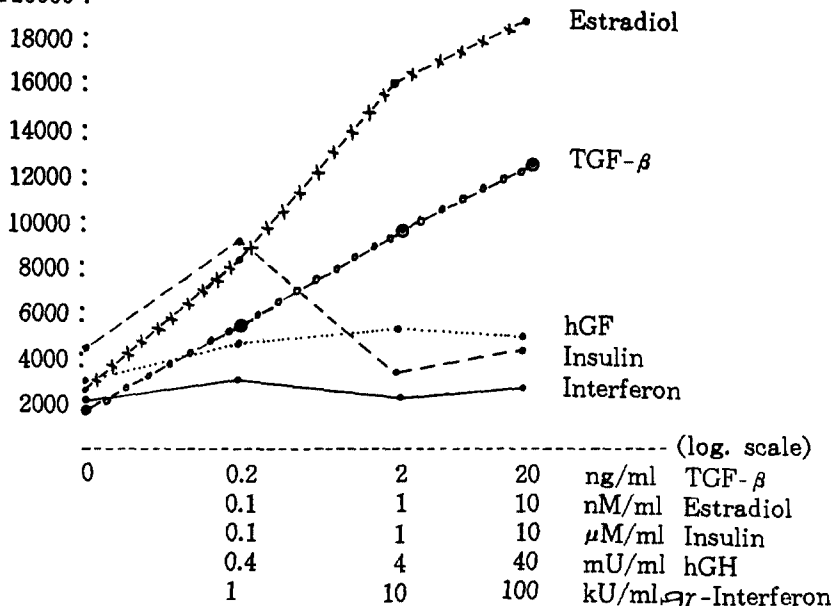


Fig. 7. Effects of hormones on 3H-thymidine incorporation in MC3T3 cells.

가 형성될 때까지 계속된다²²⁾. 골흡수가 많아지면 골형성이 많아지고, 골흡수가 적어지면 골형성도 적어져 균형을 이루게 된다. 이러한 현상을 연계현상(coupling phenomenon)이라고 하며, 여기에 관여하는 인자를 연계인자(coupling factors)라고 한다. 나이가 젊고 정상적인 활동을 할때는 이러한 현상이 잘 유지되어 골흡수의 양과 골형성의 양이 같아 균형을 이루어 골밀도가 감소하지 않는다. 그러나 어떤 원인인지는 골형성의 양이 골흡수의 양보다 적으며 골조송증이 생기는 것이다.

골조송증의 원인은 매우 많다. 즉 고형, 부동, 우전적 요소, 갑상선 또는 부갑상선질환, 위장관 수술, 만성질환, steroid 및 항경련제의 장기복용, 술, 담배, calcium대사에 미치는 질환, 약물복용, 영양결핍, 폐경기 호르몬의 영향 등이다^{5,9,14,23,29)}. 이러한 요소들이 단독 또는 복합적으로 작용하여 골흡수를 강화하거나, 골형성을 약화시키는 것이다. 특히 호르몬과 성장요소들은 많은 관심과 연구의 대상이 되고있다. 이들의 역할과 영향을 고찰하여 보면, 첫째로 골아세포와 파골세포 사이를 조절하는 연계인자의 역할이다. 골, 연골, 골수세포에서 생산되는 인자들은 12개 이상 확인되고 있다⁵⁾. 즉 skeletal growth factor (SGF), bone derived growth factor(BDGF),

macrophage derived growth factor(MDGF), prostaglandin E_2 (PGE₂)등이다. 연령에 따른 골밀도의 감소는 이들중에 한두가지의 결핍으로 비연계 현상이 생겨 나타나는 현상으로 설명하고 있다¹⁸⁾. 이러한 여러 인자들의 감소는 골아세포의 기능을 감소시킨다. 이중에서 특히 TGF-β는 간엽기원(mesenchymal origin) 세포의 증식, 분화, 기능 등에 영향을 미치는 것으로 밝혀져 있다^{16,27)}. TGF-β는 처음에 섬유아세포를 배양하는 도중 형태적 변화를 시키는 물질로 발견되어 그 이름이 명명되었다²⁷⁾. 이것은 사람에서 뿐 아니라 소, 돼지 등에서도 같은 구조를 보여 어떤 특정한 생물(the organism)의 종(species)에 관계없이 작용할 것으로 생각되어지고 있다³¹⁾. TGF-β는 혈소판²⁾과 골에 높은 농도로 존재한다. 특히 골에 있는 농도는 태반이나 신장에 비해 100배나 높다²⁴⁾. 이는 TGF-β가 골조직 형성에 매우 중요한 역할을 하고 있음을 시사해주고 있다. 골아세포는 자체에서 TGF-β를 생성할 뿐 아니라 세포표면에는 풍부한 고친화력 수용체(high affinity receptor)를 가지고 있어 TGF-β에 의해서 증식되기도 한다²⁵⁾. 그러나 rat osteosarcoma cell line인 ROS 17/2와 UMR 106에서 오히려 억제작용을 보이는 것은 MC3T3 cell과 다르게 다른 phenotype의 수용체를 갖고 있기

때문이라 생각된다²⁴⁾. TGF- β 가 골아세포의 증식작용을 갖는 것도 골아세포 밀도에 따라 다르다. 즉 골아세포 밀도가 높을 때는 TGF- β 의 농도에 따라 증식작용이 증가되나 골아세포 밀도가 낮을 때는 TGF- β 의 농도가 높을 수록 오히려 억제 작용을 나타낸다⁶⁾. TGF- β 는 또한 파골세포도 자극하며 부갑상선 호르몬이 파골세포에 작용할 수 있도록 도와준다. 따라서 TGF- β 는 균형된 연계현상을 유지하는 연계인자로 생각하고 있다⁶⁾.

저자의 실험결과에서도 TGF- β 의 농도에 따른 세포수의 증식, osteocalcin치의 증가 및 3[H]-thymidine incorporation의 증가현상이 관찰되어 TGF- β 의 체외 골아세포에 대한 직접작용은 농도증가에 비례하는 골아세포 반응현상으로 풀이 된다.

Estrogen결핍에 골조송증을 유발시키는 현상은 여러 방향의 연구와 보고가 있다^{7,23)}. 1940년 Albright가 골조송증의 원인이 Estrogen이라는 것을 증명하였으며 이는 그후 많은 연구발표에서도 인정되었다³⁰⁾. 이러한 사실은 수술적으로 난소를 제거한 젊은 여성에서 빠른 골량 감소를 볼 수 있으며 Estrogen을 투여하면 이의 예방 및 치료를 할 수 있다³⁰⁾는 여러 임상연구 결과에서도 뒷받침되고 있다.

1987년 Aalborg에서 열린 "International Symposium on Osteoporosis"에서 Ernst등은 17- β estradiol이 골아세포에 작용하여 collagen type I의 mRNA를 증가시킨 것을 처음으로 증명하였으며, Eriksen등도 osteoblast like cell에서 estrogen receptor가 존재함을 증명하였다¹¹⁾. 이는 estrogen이 골아세포에 직접 작용한다는 중요한 사실을 입증한 것이다. 최근 Gray등은 17- β estradiol이 rat osteogenic sarcoma(UMR-106) cell에 직접적으로 작용하여 증식과 분화를 시키는 것을 보고하였다. 골아세포에 있는 estrogen receptor수는 자궁내막세포에 있는 숫자보다 적다. 그러나 gene transcription에 필요한 숫자보다는 2.5배 정도로 많다¹¹⁾. 따라서 골아세포가 estrogen의 표적세포인 것이 분명하고 estrogen이 골아세포에 직접적으로 작용한다고 볼 수 있다. 저자의 실험결과에서도 estrogen의 MC3T3 cell에 대한 직접적인 영향은 골아세포의 활성화 증가로 나타나 estrogen의 골형성 촉진효과를 규명할 수 있었다.

이는 estrogen이 골조송증의 병인과 치료에

중요한 역할을 하고 있다는 이론적 근거를 뒷받침 해주고 있다.

Insulin은 골세포에 작용하여 collagen, non-collagen protein 및 nucleic acid synthesis를 증가시킨다는 많은 보고가 있다¹⁷⁾. 그러나 저자의 실험결과에서는 insulin의 농도에 따른 세포수의 증가, osteocalcin 및 3[H]-thymidine incorporation의 증가는 볼 수 없었는데 이같은 상이한 결과에 대하여는 확실히 규명할 수 없으나 insulin 농도차의 변화에 따른 insulin의 효과가 각기 다르게 작용할 수 있다는 가능성과 실험에 사용된 배양 골아세포 cell line의 차이가 하나의 원인으로 작용되었다고 여겨지는 바 이에 대하여는 다른 측면의 세부적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

성장호르몬은 성장판이 폐쇄되기 전 골의 linear growth를 시키는 중요한 물질이다. 또한 골형성에 관여하여 골조송증의 치료에도 시도되고 있다^{1,15)}. 저자의 실험결과에서는 24시간만으로는 성장호르몬의 결정적인 효과를 관찰할 수 없었다. 그러나 성장호르몬의 골형성 자극에 대한 성질을 감안할때 배양 골아세포에 대하여도 긍정적인 효과를 기대할수는 있으므로 배양시간의 연장 내지 농도의 증감 등 좀더 다양한 실험조건하에서 성장호르몬의 골아세포 영향에 대한 규명이 필요하다 하겠다.

r-interferon은 collagen합성을 억제하며 DNA의 합성도 억제한다²⁶⁾. 그러나 파골세포의 형성도 억제하여²⁸⁾ 골조송증에 미치는 영향에 대하여는 확실한 보고가 아직 없다. 저자의 결과는 r-interferon의 골아세포 활성화에 대한 효능은 별의미 없는 것으로 나타났다.

배양 골아세포를 이용한 활성화 측정 실험에서는 무엇보다도 배양 cell line의 선정이 중요한데 본 실험에 사용된 MC3T3 cell은 1976년 Luben등이 처음 기술한 것을¹⁹⁾ 변형하여 얻은 세포로 α -MEM media에서 잘 배양되며 이 세포는 alkaline phosphatase, osteocalcin, macrophage stimulating factor등을 세포내에서 합성하고 분비하여 세포활성도 측정검사에 아주 적합한 cell line임을 측정검사에 아주 적합한 cell line은 아주 유용할 것으로 사료된다.

결 론

저자는 골아세포 MC3T3를 이용하여 TGF- β ,

17- β estradiol, insulin, human growth hormone 및 interferon 등 5가지 홀몬을 각각 배양된 골아세포에 투입하여 이들 홀몬이 골아세포에 미치는 영향을 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. TGF- β 는 강력한 골아세포 자극제로서, 농도변화에 비례하여 세포의 형태학적 변화(수, 모양 및 크기), osteocalcin치의 증가 및 3[H]-thymidine incorporation의 증가를 나타냈다.

2. 17- β estradiol도 농도변화에 비례하여 세포의 형태학적 변화 및 3[H]-thymidine incorporation의 증가를 보였으나, osteocalcin치의 증가를 보였으나, osteocalcin치의 증가는 농도에 따라 비례하지 않았다.

3. Insulin, human growth hormone, r-interferon은 MC3T3 골아세포에 의미있는 변화를 보이지 않았다.

이상으로 TGF- β 와 17- β estradiol은 골아세포에 직접적으로 작용하여 강력하게 세포를 증식시키고 골아세포의 대사회전을 및 세포내 DNA 합성을 촉진하는 것을 관찰할 수 있었다. 따라서 골아세포를 이용한 이러한 in vitro 실험은 골조송증 및 골대사 질환의 병태생리를 밝히며 이들이 치료제로서의 가능성을 규명하는 기초 자료로 유용할 것으로 생각된다.

REFERENCES

- 1) Aloia, J.F., A. Vaswani, P.J. Menuier, C.M. Edouard, M.E. Arot, J.K. Yeh and S.H. Cohn : *Coherence Treatment of Postmenopausal Osteoporosis with Growth hormone and calcitonin*. *Calcif Tissue Int* 40 : 253-259, 1987.
- 2) Assouline, R.K., Komoria, A. Meyers, C.A., Miller, D.M. and Sporn, M.B. : *Transforming growth factor- β in human platelets*. *J. Biol. Chem.* 258 : 7155-7160, 1983.
- 3) Brown, B.L., Albano, J., Ekins, R., Sgherzi, A. and Tampio, W. : *A simple and sensitive saturation assay method for the measurement of adenosin 3', 5'-cyclic monophosphate*. *Biochem. J.* 121 : 561-562, 1971.
- 4) Brown, J.P., Delmas, P.D., Malaval, L., Edouard, C., Chapuy, M.C. and Meunier, P.J. : *Serum bone gla protein : a specific marker for bone formation in postmenopausal osteoporosis*. *Lancet* 1 : 1091-1093, 1984.
- 5) Centrella, M. and Canalis, E. : *Local regulators of skeletal growth : a perspective*. *Endocr Rev.* 6 : 544-551, 1985.
- 6) Centrella, M., McCarthy, T.M. and Canalis, E. : *Transforming growth factor- β is a bifunctional regulator of replication and collagen synthesis in osteoblast-enriched cell cultures from rat bone*. *J. Bio. Chem.* 262 : 2869-2874, 1987.
- 7) Chesnut, III C.H. : *An appraisal of the role of estrogens in the treatment of postmenopausal osteoporosis*. *J. Am. Geriatr Soc.* 32 : 604-408, 1984.
- 8) Dempster, D.W., Shames, E. Horbert, W. and Lindsay, R. : *A simple method for correlative light and scanning electron microscopy of human iliac crest biopsies : Qualitative observation in normal and osteoporotic subject*. *J. Bone. Mineral. Res.* 1 : 15-21, 1986.
- 9) Donardson, C.L., Hallay, S.B., vogal, J.M., Hattner, R.S., Bayers, J.H., and Mac Millan, D.E. : *Effect of prolonged bed rest on bone mineral*. *Metabolism.* 19 : 1071-1084, 1970.
- 10) Elford, P.R., Felix, R., Cecchini, M., Trenchsel, U. and Fleish, H. : *Murine osteoblast like cells and the osteogenic cell MC3T3-E1 release a macrophage stimulating activity in culture* *Calcif tissue Int.* 41 : 151-156, 1987.
- 11) Eriksen, E.F., Colvard, D., Berg, N.J., Graham, M.L., Mann, K.G., Spelsberg, T.C. and Riggs, B.L. : *Evidence of estrogen receptors in normal human osteoblast like cell* *Science.* 241 : 84-86, 1988.
- 12) Felix, R. and Fleish, H. : *Increase in alkaline phosphatase activity in calvaria cells cultured with diphosphatase activity in calvaria cells cultured with diphosphate*. *Biochem J.* 183 : 73-81, 1976.
- 13) Frost, H.M. : *The pathomechanics of osteoporosis*. *Clin. Orthop.* 200 : 198-225, 1985.

- 14) Gallagher, J.C., Riggs, B.L., Eisman, J., Hamstra, A., Araud, S.B. and DeLuca, H.F. : *Intestinal calcium absorption and serum vitamin D metabolites in normal subjects and osteoporotic patients: effect of age and dietary calcium.* *J. Clin. Invest.* 64 : 729-736, 1979.
- 15) Haas, H.G., Dambacher, M.A., Goschke, H., Guncaga, J. and Lauffenburger, T. : *Growth hormone in osteoporosis.* *Calci Tissue Res.* 21(suppl) : 467-468, 1976.
- 16) Heine, U.I., Munoz, E.F., Flanders, K.C., Ellingsworth, L.R., Lam, H.-YP, Thompson, N.L., Robert, A.B. and Sporn, M.B. : *Role of transforming growth factor- β in the development of the mouse embryo.* *J. Cell. Bio.* 105 : 2861-2876, 1987.
- 17) Ituarte, E.A., Ituarte, H.G. and Hahn, T.J. : *Insulin and Glucose Regulation of Glycogen Synthase in Rat Calvarial Osteoblastlike Cells* *Calci Tissue Int.* 42 : 351-357, 1988.
- 18) Ivey, J.L. and Baylink, D.J. : *Postmenopausal osteoporosis: proposed roles of defective coupling and estrogen deficiency.* *Metab. Bone. Dis. Res.* 33-7, 1981.
- 19) Luben, R.A., Wong, G.L., Cohn, D.V. : *Biochemical characterization with parathormone and clacitonin of isolated bone cells: provisional identigication of osteoclasts and osteoblasts.* *Endocrinology*, 99 : 526-534, 1976.
- 20) Parfitt, A.M. : *Quantum concept of bone remodeling and turn over: Implication for the pathogenesis of osteoporosis.* *Calci Tissue Int.* 28 : 1-5, 1978.
- 21) Parfitt, A.M. : *Trabecular bone architecture in the pathogenesis and prevention of fracture.* *Am. J. Med.* 82(Suppl 1B) : 68-72, 1987.
- 22) Riggs, B.L., Melton, III, L.J. : *Involutional osteoporosis.* *N. Engl. J. Med.* 314 : 1676-1686, 1986.
- 23) Riggs, B.L., Wahner, H.W. and Melton, L.J. III, Richelson, L.S., Judd, H.L. and Offord, K.P. : *Rates of bone loss in the axial and appendicular skeletons of woman: evidence of substantial vertebral bone loss prior to menopause.* *J. Clin. Invest.* 77 : 1487-91, 1986.
- 24) Roberts, A.M., Anzano, M.A., Meyers, C.A. Meyers, J. Wideman, R. Blacher, Y.C.E. Pan, S. Stein, R. Lehman. J.M., Smith, L.C. Lam and Sporn, M.B. : *Purification and properties of type beta transforming growth factor from bovine kidney.* *Biochemistry*, 22 : 5692-5698, 1983.
- 25) Robey, P.G., Young, M.F., Flanders, K.C., Roche, N.S., Kondaiah, P., Reddi, A.H., Tdrmine, J.D., Sporn, M.B. and Roberts, A.B. : *Osteoblasts synthesize and respond to transforming growth factor- β (TGF- β) in vitro.* *J. Cell Bio.* 105 : 457-463, 1987.
- 26) Smith, D.D., Gowen, M., Mundy, G.R. : *Effects of interferon-r and other cytokine on collagen synthesis in fetal rat bone cultures.* *Endocrinology* 120 : 2494-9, 1987.
- 27) Sporn, M.B., Roberts, A.B., Wakefield, L.M. and Assoian, R.K. : *Transforming growth factor- β : biologic function and chemical structure.* *Science(Wash. D.C)* 233 : 532-534, 1986.
- 28) Takahashi, N., Mundy, G.R., Roodman, G.D. : *Recombinant human interferon-r inhibits formantion of human osteoclast-like cells.* *J. Immunol.* 137 : 3544-9, 1986.
- 29) Tsai K-S, Heath, H. III, Kumar, R., Riggs, B.L. : *Impaired vitamin D metabolism with aging women: possible role in pathogenesis of senile osteoporosis.* *J. Clin. Invest.* 73 : 1668-72, 1984.
- 30) Upton, G.V. : *Therapeutic consideration in the management of the climacteric.* *J. Repro. Med.* 29 : 71-80, 1984.
- 31) Van Obberghen-Schilling, E., Kondaiah, P., Ludwig, R.L., Sporn, M.B. and Baker, C.C. : *Complementary deoxyribonucleic acid cloning of boving transforming growth factor- β .* *Mole. Endocrinol.* 1: 693-698, 1987.
- 32) Villanueva, A.R., Qui, M.C., Parfitt, A.M.. *Mean wall thickness in galocyanine stained sections.* *Bone.* 6 : 412, 1985.