

칼슘이 결여된 배양액에서 배양된 태자 골성장에 미치는 Ascorbic Acid의 영향

부산대학교 의과대학 정형외과학교실

서 근 택 · 유 총 일

=Abstract=

The Effects of Ascorbic Acid on the Growth of the Fetal Rat Bone in Ca⁺⁺-free Culture Medium

Kuen Tak Suh, M.D. and Chong Ill Yoo, M.D.

*Department of Orthopedic Surgery, College of Medicine, Pusan National University,
Pusan, Korea*

In order to study the effect of ascorbic acid on the growth of the fetal rat long bones in calcium free culture medium, fetal femurs from rat fetus on 19th day of gestation were cultured for 1, 3, 5, 7 and 9 days in medium described below. Culture media used were MEM, Ca⁺⁺-free MEM, Ca⁺⁺-free MEM supplemented with 100ug/ml ascorbic acid and Ca⁺⁺-free MEM supplemented with 400ug/ml ascorbic acid. The fetal femurs were obtained by separating from the rat fetuses and were washed with sterilized Ca⁺⁺, K⁺-free buffer solution. The bones were transferred to Millipore filters cemented to stainless steel grids that were placed in culture dishes. The media were pipetted into the culture dishes until it just wetted the Millipore filters so that the bones were maintained at the medium-air interface.

For the light microscopy, the cultured bones were washed with phosphate buffer and fixed in 10% neutral buffered formalin and embedded in paraplast. They were sectioned at a thickness of 6-8um without decalcification, and were stained with hematoxylin-eosin, van Gieson, and von Kossa method.

For the electron microscopy, the bone tissues were prefixed in mixture of 2% paraformaldehyde and 2.5% glutaraldehyde and postfixed in 1% osmium tetroxide solution. They were dehydrated in graded alcohol, transferred to acetone, and then dried with liquid CO₂ by critical point dryer(Ladd, Burlington, Vermont). These dried tissues were coated with gold and observed with JSM-35C scanning electron microscope.

The result were as follows :

1. The fetal rat femurs cultured in Ca⁺⁺-free MEM showed that the differentiation of chondrocytes was delayed, the ossification of the cartilage was not obvious and the formation of periosteum was poor, as compared to those of the control group.
2. The chondrocytes of the bones cultured in Ca⁺⁺-free MEM with 100ug/ml ascorbic acid revealed the pictures of progressive differentiation similar to those seen in the control group. The length of bone marrow and the thickness of the periosteum increased.
3. The bone tissues cultured in Ca⁺⁺-free MEM with 400ug/ml ascorbic acid showed active formation of new osteoid, increased bone matrix and abundant collagen fibers

본 논문의 요지는 1988년 11월 4일 대한정형외과학회 제32차 추계학술대회에서 발표되었음.

distributed extensively.

4. The bone trabeculae of diaphysis showed the similar pictures to those of the epiphysis and metaphysis. In Ca^{++} -free MEM with ascorbic acid, the collagen fibrils increased and numerous spherules were formed.
5. The spherules were noted to be 2 types. One was the calcospherite associated with collagen fibrils, and the other was spherical cytoplasmic outgrowth covered by collagen fibrils.

Key Words : Ascorbic Acid, Fetal Rat Bone, Ca^{++} -free Culture Medium.

I. 서 론

살아 있는 생체에서의 광화(mineralization)란 무기화합물의 침전을 말한다. 표유동물의 경우 광화와 석회화(calcification)는 동의어로 쓰이며 주된 무기화합물은 칼슘복합물들(calcium compounds)이다. 생물학적인 석회화 과정을 이해하기 위해서는 칼슘복합물들이 조직내에서 어떻게 침전되며, 세포외기질(extracellular matrix)과 세포들과는 어떤 관계를 가지는지를 이해하여야 한다.

세포외 교원기질(extracellular collagenous matrix)은 골화되고 있는 조직에서 무기물들을 지지해 주는 역할을 하는 것으로 알려져 있어^{9, 17)}, 골화고정에 있어 교원섬유의 역할이 광범위하에 연구되어 왔다^{4, 16, 39)}. 그와 함께 교원 합성에 영향을 주는 ascorbic acid의 기능도 다각도로 연구되어 왔다. Ascorbic acid는 1939년 레몬주스에서 항괴혈제(antiscorbutic agent)로 알려진 이후 성장, 창상치유, 모세혈관의 유지, 추위에 대한 내성등 여러가지 생리적 기능에 관여되어 있음이 밝혀졌고 섬유아세포와 연골세포²⁸⁾, 골세포²⁷⁾, 치모세포와 에나멜모세포(ameloblast)^{5, 34)}등에서 proline의 hydroxylation에 필요함이 밝혀졌다. 따라서 ascorbic acid의 국소적인 농도에 반응하여 교원질의 생합성 속도가 빨라지거나 느려지게 된다^{10, 24, 30)}.

또한 ascorbic acid는 연골세포에 의한 glycosaminoglycan 합성에 깊은 관계가 있으며 그 농도가 증가함에 따라, glycosaminoglycan의 합성량이 증가되었다고 보고된 바 있다^{18, 25)}. 정상적인 세포의 기질이 유지되어야 세포의 분화상태가 지속되는데 이는 적정량의 ascorbic acid의 농도를 인위적으로 변화시켜 그에 따른 골성장과 분화에 미치는 영향을 알아보고자 많은 실험들이 행하여졌다^{5, 18, 23, 25, 27, 34)}.

In vitro system은 골형성과 발달과정을 연구하는데 효과적인 것으로, bone culture system은 Fell¹³⁾에 의해 처음으로 개발되었고, 그 뒤 Raisz³²⁾에 의해 개량되면서 많은 연구자들이 이용하게 되었다. 그러나 골모세포(osteoblast)를 분리하여 배양할 경우, Simmons³⁷⁾들의 실험처럼 골모세포를 diffusion chamber에 넣고 다시 쥐의 복강내로 이식하여 배양한 경우를 제외하고는, 배양중 골을 형성하지는 못하였다. 그러므로, 골의 발생(development), 유도(induction), 형성(formation)과정에 필요한 intrinsic factor를 분석하기 위해서는 골의 기관배양(organ culture)방법이 요구되어지게 되었다. Silbermann과 Frommer^{35, 36)}는 태생기 하악골을 기관배양 방법으로 배양하여 생체에서와 같은 연골내 골화(endochondral ossification)를 나타내고 있음을 관찰한 바 있다. 기관배양의 또하나 장점은 다른 인자들은 일정하게 유지하면서 하나의 측정인자만을 변화시킬 수 있어 골대사에 미치는 영향을 관찰하기에 용이하다는 것이다. 이에 따라 특정 인자가 결여된 한정 배양액(defined medium)의 개발도 추진되어왔다. Hall¹⁹⁾은 ascorbic acid가 결여된 배양액에서 생쥐의 quadratojugal cartilage를 기관배양하여 골양조직이 아닌 chondroid bone으로 대체됨을 관찰한 바 있다. 배양액내에 ascorbic acid가 없을 경우 교원의 합성률이 변화되고 교원이 변성됨으로 전체 형태가 변형되었다^{5, 29, 34)}는 등의 일련의 보고가 있었다.

또한 ascorbic acid와 함께 이온 환경(ionic environment)에도 변화를 주어 그 영향을 관찰하였는데 Chen과 Raisz⁵⁾는 calcium, Jones와 Keeler²²⁾는 sulfite를 첨가해 주어 ascorbic acid와 이온농도 변화에 따른 복합효과를 관찰하였다. 이가 양이온(divalent cation)중 특히 calcium은 invitro에서의 특이성이 연구되어 왔는데 송아지의 견갑골의 연골⁸⁾, bovine cortical

bone⁴⁰⁾ 등에서 관찰되었으며, in vivo에서의 calcium-binding 효과와 비교 고찰된 바⁷⁾ 있다.

이상에서 예시한 바와 같이 생물학적인 골화 작용에 관련되는 여러 기전을 밝히기 위한 연구가 지속되어 왔으나, 교원 합성능과 관련된 것으로 알려진 ascorbic acid의 작용을 고찰한 많은 문헌에서 ascorbic acid의 결여상태를 위주로 하여 고찰하였으므로, ascorbic acid를 소량 혹은 과량을 첨가하여 주었을 때의 농도에 따른 효과를 관찰한 연구가 적은 실정이다. 그리고 이온환경을 변화시키는 실험의 경우 calcium-free 상태에서 ascorbic acid의 작용을 관찰한 연구는 거의 없는 실정이다. 따라서 본 실험은 태자의 장골을 재료로 하여 칼슘이 결여된 상태에서 배양한 골조직의 변화와, 칼슘이 결여된 상태에서 ascorbic acid를 첨가해서 배양했을 때 ascorbic acid의 첨가량에 따른 연골 및 골조직의 성장상태를 관찰하였다.

II. 재료 및 방법

1. 기관 배양(organ culture)

본 실험에 사용된 동물은 Sprague-Dawley계의 흰쥐로, 건강한 암컷과 수컷을 일정기간 합사시켜 암컷의 임신율 유도하였다. 임신의 확인은 매일 정해진 시간에 암컷에서 vaginal plug의 형성을 관찰하여 vaginal plug가 발견된 암컷을 임신 0일로 하여 분리 사육하였다. 임신 19일째 되는 날 흰쥐를 경추탈구(cervical dislocation)의 방법으로 희생시켰는데 이때 몸무게는 300~320g이었다. 복강을 절개하고 자궁을 재빨리 분리하여 phosphate buffered solution에 담아서 무균 작업대로 운반 하였다. 멸균한 가위와 포셉을 이용하여 자궁벽과 양막을 절개한 뒤 태자들을 분리하였는데, 평균 태자의 수는 12.6마리였으며, 태자의 평균 몸무게는 2.88g이었다. 태자는 단두(decapitation)하여 사지를 절단한 뒤 골막을 제외한 연조직을 거의 다 제거하여 대퇴골을 분리하였다. 분리한 대퇴골들은 멸균한 Ca^{++} , K^{+} -free buffer로 씻어준 뒤, plastic dish(55mm : Corning)에 steel grid를 놓고 그 위에 Millipore filter(0.22 μ m : Millipore Corp., Bedford, MA)를 얹은 다음, 대퇴골을 올려 놓았다. 피펫으로 filter가 적셔질 만큼의 높이까지 배양액을 넣어주어 대퇴골들을 배양액과 공기의 중간층에 놓이게 한 뒤 1, 3, 5,

7 및 9일간, 다음과 같은 군으로 나누어 배양을 하였다.

(1) 세포배양에 일반적으로 쓰이고 있는 Eagle's minimum essential medium(MEM)(Gibco, grand Island, NY)에서 배양한 대조군.

(2) Ca^{++} -free MEM 으로 배양한 군.

(3) Ca^{++} -free MEM에 ascorbic acid 100 μ g/ml을 첨가하여 배양한 군.

(4) Ca^{++} -free MEM에 ascorbic acid 400 μ g/ml을 첨가하여 배양한 군.

모든 배양은 포화습도가 유지된 5% CO_2 incubator에서 시행하였으며, 배양액은 48시간마다 교환하였다.

2. 광학현미경 표본 작성

배양하고 있는 골조직을 각 실험군 별로 수거하여 phosphate buffer로 수세한 다음 10% 중성 포르말린에 고정하였다. 그 뒤 탈회 과정을 거치지 않고 탈수한 후 paraplast에 표매하였다. 연골부위를 6~8 μ m의 두께로 절편을 만들어 hematoxylin-eosin염색과 교원섬유를 보기 위한 van Gieson염색, 칼슘의 침착을 볼 수 있는 von Kossa염색을 시행한 뒤, 광학현미경으로 관찰하였다.

3. 주사전자현미경 표본작성

배양한 장골을 각 실험군 별로 수거하여 종단으로 자른 뒤 2% paraformaldehyde와 2.5% glutaraldehyde의 혼합액(phosphate buffer, pH7.4)에 전고정한 뒤, 1% 오스뮴산용액에 후고정 하였다. Phosphate buffer로 수세한 뒤 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 100%의 알콜에 15분씩 탈수시킨 다음, 이어서 아세톤으로 대체시켜 주었다. 아세톤에 들어 있는 조직은 임계점건조기(critical point dryer : Ladd, Burlington, Vermont)를 이용하여 액체 탄산으로 건조시켰다. 건조된 표면을 절단면이 위로 오도록 specimen stand에 놓고 vacuum evaporator(Ladd, Burlington, Vermont)에서 표면을 금으로 coating한 후에 골기질 부분을 JSM-35C 주사전자현미경(scanning electron microscope)으로 관찰하였다.

III. 성 적

1. 광학 현미경적 관찰

배양군에 대한 대조의 목적으로 임신 19일째

Fig. 1. Nineteen-day fetal rat bone before culture shows its general architecture and organization($\times 25$).

Fig. 2. Cartilage matrix of fetal rat bone grown in Eagle's minimum essential medium(MEM) for 3 day. The septa between hypertrophic chondrocytes show positive reaction for the von Kossa staining($\times 200$).

Fig. 3. Bone matrix of fetal bone cultured in calcium-free MEM with $400\mu\text{g/ml}$ of ascorbic acid for 5 days. Well developed bone matrix shows positive reaction for the von Kossa staining ($\times 200$).

Fig. 4. Cultured bone in calcium-free MEM with $400\mu\text{g/ml}$ of ascorbic acid for 7 days. Cartilaginous matrix between degenerating chondrocytes exhibits a pattern of mineralization. Note the increase in the thickness of periosteum(Pr) ($\times 200$).

Fig. 5. Cultured bone tissue in calcium-free MEM with $400\mu\text{g/ml}$ of ascorbic acid for 9 day. Longitudinal bundles of collagen fiber are well shown by van Gieson staining($\times 200$).

Fig. 6. Cultured bone tissue in MEM for one day. A group of newly forming cells (arrow) and round osteoblast (Ob) on the trabeculae are seen. Osteoblasts on the bone matrix surface are mostly flat ($\times 1800$).

Fig. 7. Cultured in MEM for one day. There are many chondrocytes, which show various stages of development. The upper portion shows degenerated chondrocytes and calcified cartilage matrix ($\times 2000$).

Fig. 8. Cultured in MEM for 9 days. Chondrocytes are degenerated and the lacunar spaces are empty ($\times 5000$).

의 태자 대퇴골을 조직학적으로 관찰하였고, 그 결과는 그림 1과 같다. 골화되고 있는 양상은 Dodds¹¹⁾에 의해 기술된 바 있는 전형적인 연골 내 골화(endochondral ossification)과정을 나타내고 있었다. 즉 연골기질내에서 연골원세포(chondroprogenitor cells), 연골모세포(chondroblasts)와 연골세포(chondrocytes)가 관찰되었고, 성장하고 있는 연골세포는 종주(longitudinal column)로 배열되며 비후기로 진행되고 있었다. 골간단 가까이 있는 연골세포들은 퇴화단계를 나타내었으며, 퇴화되고 있는 퇴화단계를 나타내었으며, 퇴화되고 있는 연골세포 사이의 기질내에서 석회화가 일어났음을 관찰하였다. 골수강에는 H-E염색에 염기호성을 나타내는 골수성 세포들이 덩어리를 형성해 있는 것을 볼 수 있었다.

Fig. 9. Cultured bone tissue in MEM for 5 days. A : There are numerous bead-like structures on the newly formed cells ($\times 10000$). B : Bone matrix is composed of the collagen fibrils (CF) and calcospherites (arrow) ($\times 21500$).

Fig. 10. Cultured bone tissue in MEM for 7 days. Abundant collagen fibrils clearly associating with calcospherites (CS) are noted. These are much more numerous than those seen in the bone tissue cultured in MEM for 5 days ($\times 15000$).

일반적인 세포배양액인 MEM으로 배양한 군의 소견은 다음과 같았다. 배양후 1일과 3일군에서 골단판의 길이와 크기가 약간 증가되었으며(그림 2) 비후대내에 칼슘이 침착되고 있음을 von Kossa염색으로 관찰하였다. 7일에는 골수강의 길이가 증가되었고 van Gieson염색으로 교원섬유의 형성이 중정도로 진행되어 종축으로 다발을 이루고 있음과 새로이 형성된 골양조직 등을 관찰하였다. 9일에는 연골기질에서 연골모세포는 거의 찾아보기 힘들었고 대부분 비후기에 들어선 연골세포들만 관찰되었다. 골수강의 길이, 교원섬유의 양과 기질등은 7일군의 표본과 큰 차이는 없었으나, 칼슘의 침착을 나타내는 von Kossa의 염색성은 강하게 나타났다.

칼슘이 결여된 배양액으로 키운 장골의 조직적 변화는 다음과 같았다. 배양 1일과 3일군에

Fig. 11. Cultured boen tissue in calcium-free MEM for 5 days. There are small numbers of new cells in the bone marrow and bone matrix. An osteoblast-like cell (Ob) is seen in the center of this picture($\times 1500$).

Fig. 12. Cultured bone tissue in calcium-free MEM for 9 days. Newly formed cells (NF) are seen in the bone marrow space, and a few cells (arrow) are seen on the surface of the bone matrix (BM). Bone resorption (BR) is also noted($\times 1500$).

서는 전체적으로 대조군과 큰 차이를 나타내지 않았으나, 골막의 형성이 미약하였으며 연골세포의 분화과정이 대조군에 비해 다소 느리고 골화양상이 그리 뚜렷하지 않았다. 7일군에서는 대조군에서 볼 수 없는 많은 변화가 있었는데, 연골기질에서는 여전히 많은 세포가 연골모세포의 형태로 나타나며, 비후기에 있는 연골세포보다 퇴화과정에 있는 세포가 더 많이 관찰되었고, 골수강내의 세포수도 감소되었다. 골막은 현저한 변화를 보여서 위축되어 있었고, 파괴된 곳도 관찰되었다. 9일군에서는 장골의 전체 길이가 짧아져 있었고, 교원섬유의 형성은 대체로 미약하였고, von Kossa염색에 대한 반응도 약하게 나타났다. 기질의 형성이 미약하여 대체로 골화중심(ossification center)부에서 휘어진 상태로 나타났다. 연골부위에서는 피사되어있는

Fig. 13. Cultured bone tissue in calcium-free MEM for 9 days. Spherules (Sp) and collagen fibrils(SF) in the lacunar wall(LW) of the bone matrix are shown($\times 5000$).

Fig. 14. Cultured bone tissue in calcium-free MEM with $100\mu\text{g/ml}$ of ascorbic acid for 5 days. Newly formed cells, abundant collagen fivrils increased, and greatly increased numbers of calcospherites (CS) and spherules (Sp) are shown($\times 6500$).

세포들이 관찰되었는데 골단부위로 갈수록 증가되었다.

칼슘이 결여된 배양액에 ascorbic acid $100\mu\text{g/ml}$ 를 첨가하여 배양한 군의 소견은 다음과 같았다. 3일과 5일의 배양군에서는 대조군과 거의 유사한 수준으로 분화되는 연골세포와 산호성을 나타내는 골양조직 등이 관찰되었고, 골수강의 길이가 칼슘이 결여된 군에서, 보다 길어져 있음을 알 수 있었다. 골수강내의 세포들은 흩어져 있었으며 H-E염색에서 염기호성과 산호성을 나타내었다. 7일과 9일군에서는 교원섬유의 형성과 골화된 기질위의 칼슘침착이 대조군과 유사한 수준으로 나타났었다. 골막의 두께는 칼슘 결여군에 비해 두꺼웠으며 van Gieson염색으로 활발히 형성된 교원섬유를 관찰하였다.

칼슘이 결여된 배양액에 ascorbic acid $400\mu\text{g/ml}$ 를 첨가하여 배양한 군의 소견은 다음과 같

Fig. 15. Cultured in calcium-free MEM with $100\mu\text{g}/\text{ml}$ of ascorbic acid for 5 days. Newly formed cells (NFC) are seen in the upper left, and there are abundant collagen fibrils (CF). A calcospherite (1) with collagen fibrils congregate (2) to form a spherules (3) which compact to form bone matrix (4).

Fig. 16. Cultured in calcium-free MEM with $100\mu\text{g}/\text{ml}$ of ascorbic acid for 7 days. A : Collagen fibrils increase and become compact, and the number of calcospherite (arrow) increase ($\times 10000$). B : Two types of spherules are shown. One (Sp) if formed by calcospherite and collagen fibrils, and the other (Ce) is formed by spherical cellular outgrowth and collagen fibrils.

다. 3일 배양군에서는 우선 골수강의 길이가 다른 군에 비해 증가되었고 연골세포의 활발한 증식을 관찰할 수 있었다. 5일의 배양군에서는 새로이 형성된 골양조직과 골기질을 관찰할 수 있었다(그림 3). 7일 배양군에서는 골막이 한층 더 두꺼워져 있었고(그림 4) 골수강내의 세포들도 잘 관찰되었다. von Kossa염색에 의한 칼슘 침착반응시, 연골기질내에서 비후기의 연골세포 사이에서 부터 반응을 나타내었는데, 주로 중축의 중격을 따라 석회화되고 있음을 알 수 있었다. 9일 배양군을 살펴보면 넓은 부위에 걸쳐 원섬유속이 형성되고 있음이 관찰되었고(그림 5

Fig. 17. Cultured bone tissue in calcium-free MEM with $400\mu\text{g}/\text{ml}$ of ascorbic acid for 5 days. A : Numerous spherical cytoplasmic outgrowth are formed. Some of them (arrow) are associated with collagen fibrils. B : Collagen fibrils mainly associated with cellular component to form spherules in this picture ($\times 6500$). C : Calcospherites (CS) unite with collagen fibril (CF) to make the spherule (arrows) ($\times 45000$).

), 장골의 중축 전 길이로 골수강이 형성되었음을 관찰하였다. 골기질의 형성도 활발하여 전 길이에 걸쳐 기질이 생성되었음을 von Kossa 염색으로 확인하였다.

2. 골기질 부위의 주사전자현미경적 관찰

주사전자현미경으로 골소주(bony trabeculae)를 주로 관찰하였다. 일반적인 세포 배양액인 MEM으로 배양한 골조직에서는 골기질위에 새로운 세포들이 형성되기 시작하였는데(그림 6), 이들 세포들은 시일이 경과할수록 증가하였다. 그러나 이들중에서 대부분이 골세포 계통이라기 보다는 골수성 세포성분으로 생각되었다. 한편 골기질을 구성하는 교원원섬유들도 활발히 증식하는 양상을 보여 주었는데 (그림 9, 10), 특히 7일군에서는 교원원섬유에 칼슘의 침착으로

Fig. 18. Cultured bone tissue in calcium-free MEM with 400 μ g/ml of ascorbic acid for 7 days. A cell in the center has bead-like outgrowths and beaded cell processes covered by collagen fibrils (arrows) ($\times 13500$).

Fig. 19. Cultured in calcium-free MEM with 400 μ g/ml of ascorbic acid for 9 days. **A :** Platelet-like structures (PL) which seem to be detached from cell body are seen in the upper left. The spherules (Sp) in the right are formed by calcospherites and collagen fibrils, while the left ones are formed by cellular components and collagen fibrils ($\times 23500$). **B :** Increased cells and their granular surface are noted. Numerous bead-like outgrowths from the cell surfaces are shown ($\times 15000$).

보여지는 calcospherite들이 교원원섬유들과 결합되는 양상이 현저히 관찰되었다(그림 10). 골단의 연골 세포들은 1일군에서는 비교적 충실하며, 연골소강내에서 많은 돌기들을 내고 있었고, 골간단에 가까울수록 위축되고 점차 괴사되는 형상을 보였고, 배양 시간이 경과할수록 괴사상태에 빠지면서 골조직이 변화하는 양상을 나타내었다(그림 7, 8).

칼슘이 결여된 배양액으로 배양한 것에는 골기질의 표면과 골수에서 형성되는 세포의 수가 정상적인 배양액에서보다 감소하였다(그림 11,

12). 골기질의 형성도 미약하여 교원원섬유들이 치밀하지 않았었고, calcospherite가 교원원섬유와 결합되어 있는 것도 숫적으로 감소하였다. 골기질의 골소강에서 배양전에 형성된 것으로 보여지는 spherule이 관찰되기도 하며, 9일군에서는 골조직의 표면이 흡수 또는 용해되면서 spherule이 관찰되기도 하였다(그림 12, 13).

칼슘이 결여된 배양액에 100 μ g/ml의 ascorbic acid를 첨가하여 배양한 군에서는 세포들의 증식이 활발하였고, 골기질의 형성도 왕성하였다(그림 14, 15, 16). 세포성분들을 정확히 구분할 수는 없었으나, 대부분이 골수성 세포들의 증식인 것 같았으며, 특이한 것은 세포의 표면이 둥근 과립모양으로 구획이 되어 있었고, 이 위를 교원원섬유들이 둘러싸면서 spherule을 형성하였다(그림 16B, 17B). 또 한가지의 spherule의 형성은 calcospherite들이 교원원섬유들과 결합하여, 하나의 spherule을 형성하는 양상이었다(그림 15). 그래서 배양한 골조직에서의 spherule형성은 두 가지가 관찰되었는데 칼슘이 결여되고, ascorbic acid가 첨가된 상태에서 배양한 고기질의 형성에는 세포의 부분인 둥근 과립상의 구조물에 교원원섬유가 얹혀서 spherule을 형성하는 양상이 더 많이 관찰되었고, 이 spherule들이 많이 모여서 치밀한 골조직이 되었다(그림 15). 그러나 calcospherite의 수는 정상 배양액에서 배양한 골조직에서 보다는 적은 것 같았고, 교원섬유의 형성능력은 더 증가한 듯하여 더 치밀하게 형성되어 있었다(그림 16A).

끝으로, 칼슘이 결여되고 400 μ g/ml의 ascorbic acid를 첨가한 배양액에서는 새로운 세포가 형성되는 양상이 매우 증가하였는데(그림 17A, 19A), 5일군과 7일군에서 가장 많이 증식하였다. 골기질에서는 교원원섬유가 현저하게 증식되었고(그림 17B, 17C, 18), spherule의 형성은 두가지 type을 모두 볼 수 있었으나, 특히 세포 성분중의 과립상의 구조물 또는 세포돌기에서 일정하게 과립상의 구조물로 분리된 후에 교원원섬유가 둘러싸서 spherule을 형성하는 경우가 더 많이 관찰되었다(그림 17B, 18, 19A). 교원원섬유의 직경은 33~36 μ m로서 투과전자현미경에서 보다는, 수축되어 적은 편이었다. Calcospherite의 크기는 직경이 200~400nm이었고, spherule의 크기는 1~1.5 μ g/ml로서 calcospherite로서 구성된 것과 세포 성분으로 구성된 것과는 같은 범위의 크기였다.

IV. 고 찰

Ascorbic acid는 교원의 prolyl잔기와 lysyl잔기의 hydroxylation을 위한 조효소이다²¹⁾. Ascorbic acid가 없는 상태에서 기관을 배양하면 교원 합성율이 변화되고, 교원자체의 이상으로 기관의 전체형태에 이상이 오며, 실질 hydroxyproline의 양이 감소된 것을 관찰한 보고도 있다²⁾. 3T3 fibroblast와 chick embryo fibroblast를 재료로 한 실험에서도, 최대 proline hydroxylation과 적정 교원 합성이 ascorbic acid에 의존적임을 밝힌 바 있다³¹⁾.

그와는 달리 ascorbic acid를 배양액에 첨가하여 배양하면 교원의 양이 증가되는 것이 chick embryo에서 관찰되었고, 특이하게 교원성 세포외기질(collagenous extracellular matrix)을 형성하는 등 세포외기질을 변형시킨다 하였는데¹⁹⁾, 이와 유사한 결과가 사람의 악관절(temporomandibular joint)을 재료로 한 실험에서도 관찰되었다⁴¹⁾. Vertel과 Dorfman³⁸⁾은 embryo의 체지아(limb bud)를 배양하면서 ascorbic acid를 첨가시킨 결과, 분화되고 있는 연골세포가 세포외기질에 섬유성교원(fibrillar collagen)을 형성하는 것을 관찰하였다. 이 교원은 생체에서의 골조직의 것과 같은 type I collagen으로 밝혀져, 배양기에서 자란 연골세포가 생체에서와 마찬가지로 교원을 합성함을 알 수 있게 하였다. 이는 본 실험에서도 ascorbic acid를 첨가한 군에서 칼슘이 결여되어 세포외기질이 악조건이었는데도, ascorbic acid의 영향으로 교원합성에 적합한 조건으로 되어서 교원섬유들이 증가하였다는 사실과 일치하였으며, 이때 증가된 교원섬유들은 생체에서의 골조직의 것과 같은 형의 교원섬유일 것으로 생각된다.

골조직의 성장에 있어 석회화는 골세포에 의해 분비되어지는 세포외 유기성기질(extracellular organic matrix)의 형성으로 진행되어 간다. 골형성 세포들은 세포외기질의 합성을 조절하며, 세포외액에 있는 ion교환을 조절하게 된다. 최근의 보고에 의하면 골세포와 칼슘 항상성과의 관계가 골세포의 기능에 기본이 된다고 하였다²⁶⁾. 대사적으로 활동적인 골세포들은 배양액내 calcitonin의 존재에 의존적으로 칼슘의 흡수율이 증가되므로, 칼슘의 흡수율에 따라 골화과정의 여러단계에 있는 세포들을 동정할 수

있게 되었다. 배양액내에 칼슘농도가 증가되면 성장하고 있는 골조직내에서 칼슘이 소실되는 양상이 감소되는 반면, chelating agent를 사용하여 배양액내 칼슘의 농도를 감소시키면 골조직으로부터 미네랄(mineral)과 기질이 소실되는 실험의 결과로 보아 칼슘농도의 변화가 세포활성을 조절하는 것으로 고찰된 바 있다³⁾. 본 실험에서 칼슘이 결여된 배양액에서 자란 골조직을 관찰해 보면 골기질의 표면과 골수에서 형성되는 세포의 수가 정상적인 일반 배양액에서보다 감소하였고, 골기질의 형성이 미약함을 알 수 있어 칼슘의 결여가 골조직의 성장에 미치는 영향을 관찰하였다. 칼슘이 결여된 상태에서 ascorbic acid를 첨가하였을 때, 교원섬유의 형성과 기질의 형성이 증가된 것을 관찰하였는데, 이는 ascorbic acid가 활발한 교원합성에 필요하며, 기질의 축적과 기질형성을 증가시킨다고 한 Lavietes²⁴⁾의 실험결과와 유사하다. 이때 골막의 형성이 증가하며, 골막의 두께가 두꺼워진 사실인데, 이것은 골조직의 형성이 활발해짐을 의미한다. 배양액내의 ascorbic acid의 증가로 인한 골막의 증가에 대한 관찰보고는 거의 없는 것으로 생각되며 이번 실험에서 처음으로 관찰 보고되는 것으로 생각된다.

또한 연골세포의 분화과정에 미치는 ascorbic acid의 영향이 여러 저자들에 의해 연구되었는데, ascorbic acid는 연골세포의 성장율을 증가시키고¹⁴⁾, 세포분열에도 중요한 역할을 하며³¹⁾, 교원분비를 촉진시킨다⁶⁾는 일련의 보고가 있었다. 본 실험에서 ascorbic acid를 두가지 농도(100 μ g/ml, 400 μ g/ml)로 첨가하였을 때, 연골세포의 크기와 비후기에 들어선 연골세포의 수를 관찰한 결과, 100 μ g/ml의 ascorbic acid를 첨가한 군의 세포증식율은 유사한 수준을 나타내었고, 400 μ g/ml의 ascorbic acid를 첨가한 군에서는 더 활발한 연골세포의 증식율을 나타내었다. 따라서 칼슘이 결여된 배양액에서 농도에 따른 차이를 살펴보면, 고농도(400 μ g/ml)의 ascorbic acid를 첨가해 주었을 때, 연골세포의 증식과 분화, 그리고 교원섬유의 형성이 다소 증가됨을 알 수 있었다.

한편, 토끼의 연골세포만을 분리하여 단층배양을 한 실험의 경우, 배양액에 ascorbic acid를 첨가하지 않으면 교원의 합성은 일어나지 않았으나 50 μ g/ml의 농도로 ascorbic acid를 첨가해 주었을 때 교원을 합성하였다고 보고된 바

있다²⁷⁾. 골원성 세포주인 MC 3T3-E1을 재료로 한 실험에서도 배양액내 ascorbic acid가 결핍되면 교원섬유성의 기질 합성이 억제되고 세포의 증식과 분화도 유의하게 억제됨을 관찰하였고, ascorbic acid를 배양액에 첨가시키면 생체의 골모세포와 같은 기능을 MC 3T3-E1세포가 나타내어 새로이 골조직을 형성함을 관찰한 바 있다¹⁾. 이때 사용한 ascorbic acid의 농도는 1, 10, 50, 100 그리고 200 μ g/ml이었는데 교원질의 형성량이 10~100 μ g/ml에서는 증가하였으나, 200 μ g/ml의 농도에서는 감소된다 하였다. 그러나 본 실험에서는 400 μ g/ml의 농도에서도 그러한 상태를 관찰할 수 없었는데, 이는 위 실험들과의 배양환경 차이에서 오는 것이라 생각된다. 우선 위의 실험들은 세포만을 배양한 실험이었음에 비하여 본 실험은 장골 전체를 배양한 기관배양이었으며, 위의 실험에서는 10% fetal calf serum을 첨가해 준 상태이었으나, 본 실험의 배양액에는 혈청은 물론 칼슘도 결여된 상태이었음을 그 이유로 들 수 있다.

Binderman³¹⁾의 실험결과에 의하면 골조직 형성의 초기단계에서 미세한 mineral crystalites가 교원원섬유 위에 coating되어 있었는데, 이는 교원성기질(collagenous matrix)이 calcium phosphate의 침착장소라는 것을 보여주는 증거라 하였다. 이와 유사한 실험결과가 조류의 태생기골을 배양한 실험¹⁵⁾과 구루병때 골조직의 치유실험³³⁾, 골화되고 있는 turkey leg tendon³⁹⁾ 등을 재료로 한 실험에서도 나타난 바 있다. 골형성이 진행되므로 후기단계로 들어서면 완전히 골화된 지역이 나타나는데, 점진적인 골화과정이 존재하므로 완전히 골화된 기질은 골세포로부터 가장멀리 떨어져 있게 된다. 그러나 골세포가 주변부 기질의 광화를 조절한다는 것과, 특히 광화의 초기단계 및 골흡수 과정에 관여한다고 하였다¹⁴⁾. 본 실험에서, 칼슘이 결여된 상태에서의 골조직 형성에는, 이러한 골세포들의 조직 기능이 발휘되어, 기관배양 전에 이미 축적된 칼슘을 용해하여 새로운 골조직에 이용했을 가능성이 있다고 볼 수 있고, 또 한편으로는 충분한 칼슘의 침착이 없이 세포외기질만이 왕성하게 합성되어졌다고도 볼 수 있다. 그리고 배양중에 골세포에 의해 형성된 교원의 화학적 분석결과 생체에서 골세포에 의해 만들어진 교원과 비교 할 때, 아미노산의 교차결합(cross-link)과 aldehyde등이 유사함을 밝힌 바 있는

데^{5, 24, 34)}, 본 실험에서는 주사전자현미경으로 관찰하였기 때문에 이러한 분자차원의 현상을 비교할 수 없었다.

주사전자현미경으로 관찰하였을 때 본 실험에서는 2가지 종류의 spherule이 구별되었다. 첫번째 종류로는 calcospherite가 교원원섬유와 연합해서 형성된 것이었고, 두번째로 세포가 전체적으로 편평해지면서 과립상으로 분리되고, 여기에 교원원섬유가 덮힌 spherule이었다. 첫번째 종류의 것은 보고가 있으나¹²⁾, 두번째 것은 이번의 연구에서 처음 관찰된 것으로 생각되는데, 다만 이것이 첫번째 종류와는 달리 칼슘 같은 무기질이 침착된 것으로 확인된 것은 아니어서, 칼슘 결여시에 이러한 양상이 나타나는 것으로 생각할 수도 있다

V. 결 론

태자의 장골을 재료로 하여, 칼슘이 결여된 배양액에서 자랄때 골조직에 미치는 ascorbic acid의 영향을 관찰하기 위하여, 배양군을 MEM군, Ca⁺⁺-free MEM군, Ca⁺⁺-free MEM에 100 μ g/ml의 ascorbic acid를 첨가하여 준 군과 Ca⁺⁺-free MEM에 400 μ g/ml의 ascorbic acid를 첨가하여 준 군 4군으로 세분하였다. 각 실험군을 1, 3, 5, 7 및 9일 배양한 뒤 광학현미경과 주사전자현미경으로 관찰하였다.

결과는 다음과 같다.

1. 칼슘이 결여된 배양액으로 키운 장골은 대조군에 비해 연골세포의 분화과정이 느리고 골화양상이 뚜렷하지 않았으며 골막의 형성이 매우 저조하였다.

2. 칼슘이 결여된 배양액에 100 μ g/ml의 ascorbic acid를 첨가하여 키운 골조직에서는 연골세포가 대조군과 유사한 수준으로 분화되었으며, 칼슘이 결여된 군에 비해 골수강의 길이와 골막의 두께가 증가하였다.

3. 칼슘이 결여된 배양액에 400 μ g/ml의 ascorbic acid를 첨가하여 키운 골조직에서는 새로이 형성된 골양조직, 골기질 그리고 넓은 부위에 걸쳐 교원섬유가 다발을 형성하였다.

4. 골소주(bone trabeculae)부분의 관찰에서도 연골부위의 관찰과 비슷한 결과를 얻었다. 칼슘이 결여된 배양액에서 ascorbic acid를 첨가하면 교원원섬유가 증가하였고, spherule의 형성이 왕성하였다.

5. Spherule의 형성은 2가지 종류이었다. 하나는 calcospherite가 교원원섬유와 결합해서 형성하는 것이고, 다른 하나는 세포질의 일부가 둥근 형태로 되고 여기에 교원원섬유들이 연합해서 되는 형태였다.

REFERENCES

- 1) 順藤博子 : 石灰化に 對する アスコルゼン 酸의 效果. 第92回 日本 解剖學會 總會, 1A-015, p.116, 1972.
- 2) Bates, C., Prynne, C. and Levine, C. : Ascorbate-dependent differences in the hydroxylation of proline and lysine in collagen synthesized by 3T6 fibroblasts in culture. *Biochem. Acta, biophys.* 278 : 610-616, 1972.
- 3) Binderman, I., Duksin, D., Harell, A. and Sachs, L. : Formation of bone tissue in culture from isolated bone cells. *J. Cell Biol.*, 61 : 427-439, 1974.
- 4) Bond, P. J., Hosemann, R. and Newsely, H. : Collagen mineralization. *J. Dent. Res.*, 58B : 991, 1979.
- 5) Chen, T.L. and Raisz, L.G. : The effects of ascorbic acid deficiency on calcium and collagen metabolism in cultured fetal rat bones. *Calcif. Tiss. Res.*, 17 : 113-128, 1975.
- 6) Cutronea, K.R., Guzman, N.A. and Shara-way, M.M. : Evidence for a subcellular vesicular site of collagen prolyl hydroxylation. *J. Biol. Chem.*, 249 : 5989-5994, 1974.
- 7) Czarniecki, M.F. and Thornton, E.R. : ^{13}C -NMR chemical shift titration of metal ion-carbohydrate complexes. An unexpected dichotomy for Ca^{+2} binding between anomeric derivatives of N-acetylneuraminic acid. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 74 : 553, 1977.
- 8) de Bernard, B. and Vittur, F. : Isolation of a glycoprotein with Ca^{++} binding properties from calf scapula cartilage. *Colloques Int. du Center Natnl de la Recherche Scientifique*, 193, 1975.
- 9) Degens, E. T. : Molecular mechanisms of carbonate, phosphate and silica deposition in the living cell. *Topics Curr. Chem.*, 64 : 1, 1976.
- 10) Diegelmann, R.F. and Peterkofsky, B. : Collagen biosynthesis during connective tissue development in chick embryo. *Devl. Biol.*, 28 : 443-610, 1972.
- 11) Dodds, G.S. : Osteoclasts and cartilage removal in endochondral ossification of certain mammals. *Am. J. Anat.*, 50 : 97, 1932.
- 12) Egli, P.S. et al. : Matrix compartments in the growth plate of the proximal tibia rats. *Anat. Rec.*, 211 : 246-257, 1985.
- 13) Fell, H.B. : Experiments of differentiation in vitro of cartilage and bone. *Arch. F. Exper. Zellforsch.*, 7 : 390-412, 1928.
- 14) Fitton-Jackson, S. : In Bone as a Tissue. K. Todahl, J.T. Nicholson, and E.M. Brown, editors. McGraw-Hill Book Company, New York, 165, 1960.
- 15) Fitton-Jackson, S. and Randall, J.T. : In Bone structure and Metabolism G.E.W. Wolstenholme and C.M. O'connor, editors. Churchill Ltd., London, Ciba Found. Symp. 47, 1956.
- 16) Glimcher, M.J. : Molecular biology of mineralized tissues with particular reference to bone. *Rev. Mod. Physiol.*, 31 : 369, 1959.
- 17) Grant, P.R. : An electron microscopic study of the crystal-matrix relationship in the teeth of the dogfish *Squalus acanthias*. *L.J. Ultrastr. Res.*, 30 : 441, 1970.
- 18) Hajek, A.S. and Solursh, M. : The effect of ascorbic acid on growth and synthesis of matrix components by cultured chick embryo chondrocyte. *J. exp. Zool.*, 200 : 377-388, 1977.
- 19) Hall, B.K. : Modulation of chondrocyte activity in vitro in response to ascorbic acid. *Acta Anat.*, 109 : 51-63, 1981.
- 20) Hodges, G.M. and Melcher, A.H. : Chemically defined medium for growth and differentiation of mixed epithelial and connective tissues in organ culture. *In Vitro*, 12 : 450-459, 1976.
- 21) Hutton, J.J., Tappel, A.L. and Udenfriend, S. : Cofactor and substrate requirements

- of collagen proline hydroxylase. *Archs Biochem. Biophys.*, 118 : 231-240, 1967.
- 22) Jones, H.H. and Keeler, B.A. : Effects of vitamin C and sulfite on embryonic mouse radii grown in organ culture. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, 74 : 279-300, 1971.
 - 23) Jones, H.H. and Keeler, D. : Organ culture method using a modified Grobstein raft technic. *Clin. Orthop.*, 74 : 273-278, 1971.
 - 24) Lavietes, B.B. : Kinetics of matrix synthesis in cartilage cell culture. *Expl. Cell Res.*, 68 : 43-48, 1971.
 - 25) Lavietes, B.B. : Cellular interaction and chondrogenesis in vitro. *Dev. Biol.*, 21 : 584-610, 1979.
 - 26) Lawrence, G.R. and Niemann, I. : Effect of phosphate, calcium and magnesium and bone resorption and bone resorption and hormonal responses in tissue culture. *Endocrinology*, 85 : 446-452, 1969.
 - 27) Layman, D.L., Sokoloff, L. and Miller, E. J. : Collagen synthesis by articular chondrocytes. *Expl. Cell Res.*, 73 : 107-112, 1972.
 - 28) Levene, C.I., Shoshan, S. and Bates, C.J. : The effect of ascorbic acid on the cross-linking of collagen during its synthesis by cultured 3T6 fibroblasts. *Biochem. biophys. Acta*, 257 : 384-388, 1972.
 - 29) Levenson, G.E. : Effect of ascorbic acid deficiency on mouse second molar tooth germs cultivated in vitro. *J. Embryol. exp. Morph.*, 36 : 73-85, 1976.
 - 30) Nevo, Z., Horwiths, A.L. and Dorfmann, A. : Synthesis of chondromucoprotein by chondrocytes in suspension culture. *Dev. Biol.*, 28 : 219-228, 1972.
 - 31) Peterkofsky, B. : The effect of ascorbic acid on collagen polypeptide syntesis and proline hydroxylation during the growth of cultured fibroblasts. *Archs Biochem. Biophys.*, 152 : 318-328, 1972.
 - 32) Raisz, L.G. : Bone resorption in tissue culture factors influencing the response to parathyroid hormoe. *J. Clin. Invest.*, 46 : 103-116, 1965.
 - 33) Robinson, R.A. and H. Sheldon : Calcification in biological systems. *Am. Assoc. Adv. Sci. Publ.*, 64 : 261, 1960.
 - 34) Schilts, J.R., Rosenbloom, J. and Levenson, G.E. : The effect of ascorbic acid deficiency on collagen synthesis by mouse molar tooth germs in organ culture. *J. Embryol. Exp. Morph.*, 37 : 49-57, 1977.
 - 35) Silbermann, M. and Frommer, J. : The specific nature of endochondral ossification in the mandibular condyle of the mouse. *Anat. Rec.*, 172 : 659-668, 1972.
 - 36) Silbermann, M. and Frommer, J. : Electron microscopy of the secondary cartilage in mandibular condyle in the mouse. *Acta Anat.*, 90 : 330-340, 1974.
 - 37) Simmons, D.D., Kent, G.N., Jilka, R.L., Scott, D.M., Falcon, M. and Cohn, D.V. : Formation of bone by isolated, cultured osteoblasts in millipore diffusion chambers. *Calcif. Tissue Int.*, 34 : 291-294, 1982.
 - 38) Vertel, B.M. and Dorfmann, A. : Coordinate synthesis of extracellular matrix by developing limb bud cultures. *J. Cell Sci.*, 79 : EM 824, 1978.
 - 39) White, S.W., Hulmes, D.J.S., Miller, A, et al. : Collagen-mineral axial relationship in calcified turkey leg tendon by X-ray and neutron diffraction. *Nature*, 266 : 421, 1977.
 - 40) Williams, P.A. and Peacocke, A.R. : The binding of calcium and yttrium ions to glycoprotein from bovine cortical bone. *Biochem. J.*, 105 : 1177, 1967.
 - 41) Wright, D.M. and Moffett, B.C., Jr. : The post-natal development of the human temporomandibular joint. *Am. J. Anat.*, 141 : 223-250, 1974.