MC3T3-E1세포의 ALP activity에 대한 IGF-I의 영향

이후정* · 이재목* · 최병주** · 유현모*** · 서조영*

경북대학교 치과대학 치주과학교실*
경북대학교 치과대학 치과약리학교실**
경북대학교 치과대학 구강생화학교실***

I. 서론

치주질환의 치료는 골조직으로의 염증 진행과정을 차단, 방지하거나 염증의 결과로 파괴된 골조직을 포함한 치주조직을 재생시킬 목적으로 시행되어 왔다.

특히, 골조직은 교원질, 당단백과 같은 세포외기질과 조골세포, 파골세포, 골세포등 여러 종류의 세포들로 구성되어 있는 매우 복잡하고 활동적인 조직으로, 태생 후에도 계속적인 골흡수와 형성으로 이어지는 골 개조(remodeling)가 반복되는 동적인 조직이다[1]. 이러한 골조직의 성장과 개조는 조골세포, 파골세포 및 그 전구세포의 증식, 분화 및 활성에 영향을 미치는 여러 가지 전신적 조절물질과 국소 조절물질에 의해서 조절되고 있다[2]. 최근 분자생물학의 발전으로 조직의 치유에 국소적으로 관여하는 성장인자라는 여러 매개물질을 알아냄으로써 조직재생에 응용하게 되었다[3), 4)]. Terranova 및 Wikesjo[5)]는 세포의 성장, 형성 및 기능은 세포와 세포외 기질의 특이한 상호작용과 폴리펩타이드 성장인자가 치주조직 치유에 중요한 역할을 할 수 있을 것으로 시사한 바 있으며 최근 분자생물학의 발전으로 조직의 치유에 국소적으로 관여하는 성장인자라는 여러 매개물질을 알아냄으로써 조직재생에 응용하게 되었다. Graves 및 Cochran[6)]은 미분화된 중배엽성 세포의 분화에 관계하는 폴리펩타이드계 성장인자로써 변형성장인자(Transforming growth factor), 혈소판 유래성장인자(Platelet-derived growth factor), 섬유아세포성장인자(Fibroblast growth factor), 인슐린유사성장인자(Insulin-like growth factor : 이하 IGF라고 표기), 상피성장인자(Epidermal growth factor)등이 있다고 보고하였다. 이중 IGF는 실험관적 연구에서 nM 농도의 범주에서 세포 분열효과가 있고, 지방세포와 근육세포에 대한 효과와 구조가 인슐린과 유사하여 명명되었으며[7-9)], 약 7.5kDa의 단일쇄 펩타이드로서 각각의 특이한 수용체가 존재하는 IGF-I과 IGF-II가 있다고 밝혀졌다[10)]. 과거에는 IGF-I은 Somatomedin-C라고 알려져 왔고[11)], IGF-II는 multiplicating-stimulating activity라고 불리워 졌으며,[12), 13)] IGF-I은 insulin과 47%, IGF-II와는 62% DNA sequence homology를 갖고 있다고 알려져 있다[14)]. 그리고, 20-80 nM 농도로 혈액에서 발견되는 IGF는 주로 간에서 생성되어 호르몬과 같은 전신적 조절물질로 알려져 왔으나, 근래에는 연

골과 골조직을 포함한 여러 조직에서 생성 분비되어 국소적으로 작용한다고 보고되었으며[15), 16)], IGF-I은 70개의 아미노산[7)], IGF-II는 67개의 아미노산으로 구성되어있는 것으로 알려져 있다[8)]. IGF는 골조직에 존재하고 쥐의 골조직을 장기배양시 유리되며[17)], 조골세포에서 생성 분비되어 골조직대사에 국소적으로 작용하며, 골형성 및 흡수에 영향을 미치는 성장호르몬[18)], 부신피질호르몬, 부갑상선호르몬에 의해 골조직의 IGF의 합성과 유리가 촉진되어 호르몬의 골조직대사에 대한 작용의 국소적 중개물질임이 시사되고 있다[17), 19)].

골조직 및 골세포에 관한 IGF-I의 연구로는 Canalis등[20), 21)]이 IGF-1이 조골세포에서 DNA 합성을 증가시키고 조직배양에서 골기질형성을 촉진한다고 보고하였고, Linkhart 및 Mohan[19)]은 MC3T3-E1 세포에서 IGF는 교원합성은 촉진시키나 골세포증식은 오히려 억제시킨다고 보고하였으며, Schmid등[22)]은 IGF-1에 의해서 교원섬유의 mRNA 수준이 증가된다고 보고하였고, McCarthy등[23)]은 IGF-1이 조골세포의 기능을 촉진시킨다고 보고하였다. 또한 Spencer등[24)]은 쥐의 대퇴부에 IGF를 동맥주사한 결과 상당량의 피질골이 생성되었음을 관찰하여 IGF-I이 골생성에 관여하는 순수한 anabolic hormone이라고 시사하였다.

IGF-I의 세포 분화에 관한 연구를 살펴보면 Kurtz등[25)]은 IGF-I이 erythroid cell의 분화를 자극한다고 보고하였으며, Ewton 및 Florini[26)]는 IGF-I이 근아세포의 분화를, Kato등[27)]은 연골세포의 증식과 분화를 자극하는 등 IGF-I은 중배엽성 세포의 분화를 촉진한다고 보고하였다. 그리고, Schmid등[28)]은 쥐의 두개골세포에 IGF-I을 주입한결과 세포수는 약간 증가하나 알칼린인산효소(Alkaline phosphatase : 이하ALP로 표기)활성도는 상당히 증가되었다고 보고하였으며, Machwate등[29)]은 쥐에게 매일 IGF-I을 주입시 ALP와 osteocalcin이 증가되었다고 보고함으로써, IGF- I이 골세포의 성장을 자극할 뿐만 아니라 분화를 증진시킨다고 보고하였다. 이에 반해 Wergedal등[30)]은 쥐의 femoral head에서 IGF가 ALP 활성도에 별 효과가 없다고 보고하였으며, Fournier등[31)]은 오히려 ALP 활성도를 감소시켜, IGF의 주된 기능이 조골세포의 분화보다는 조골 세포의 증식을 촉진한다고 보고하고 있어 서로 상반된 견해를 보이고 있다. 이렇듯 골대사에 대한 IGF-I의 작용은 각 연구에 따라 상이한 실험결과가 보고되고 있어 아직 확실하게 규명되어 있지 않다.

이에 본인은 MC3T3-E1 세포를 이용하여 IGF-I이 bone nodule형성과 ALP 활성도등 조골세포의 분화에 미치는 영향을 관찰하여 아직 확실하게 밝혀지지 않고 있는 골조직에 대한 IGF-I의 영향을 밝혀 치주질환 및 매식치 주위염등으로 상실된 골조직의 재생을 위한 임상적 응용에 기초가 되고자 본 실험을 시행하였다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 재료(시약)

배양액은 alpha-modified eagle medium (Gibco사, 미국, 이하 α-MEM으로 표기)을 사용하였고, fetal bovine serum (Gibco사, 미국, 이하 FBS로 표기)을 성장 촉진제로 추가하였으며, 그 외 β-glycerophosphate, ascorbic acid(Sigma, 미국), 유전자재조합형 IGF-I (Genzyme사, 미국)을 사용하였다.

2. MC3T3-E1 세포의 배양

MC3T3-E1 세포를 취득하여 12 well plate에 한 well당 $1X10^5$ cells, 24 well plate에 한 well당 $1X10^4$ cells 접종한 후 10% fetal bovine serum, 10mM β-glycerophosphate, 50μ

g/ml의 ascorbic acid, 100U/ml penicilline, 100μg/ml streptomycin을 함유한 α-MEM 배양액에서 초기 배양하여 37℃, 5% CO_2함유 배양기에서 유지하였다. 이때 10% FBS 함유 배양액에서 계속 배양한 군을 대조군-1로, IGF-I을 주입하기 48시간전에 성장인자의 최대효과를 위해 serum free media로 교체한 군을 대조군-2로 하였으며, serum free media로 교체하고 24시간 경과후 0.1, 1, 10 ng/ml IGF-I을 첨가한 군을 실험군으로 하여 3일 간격으로 배양액을 교체하였다.

3. Histochemical analysis

bone nodule 형성 시간을 관찰하기 위해 12 well plate에 세포를 접종하여 28일간 배양하여 3, 7, 14, 21, 28일째의 세포를 ice-cold PBS로 2번 세척하고 2% PFA로 고정한 후 Alizarin Red로 염색하여 세포를 주위깊게 세척하고 3, 7, 14, 21, 28일째 광학현미경으로 관찰하였다.

4. Alkaline phosphatase(ALP) 활성도 측정

세포를 24 well plate에 접종하고 앞서 설명한 대로 배양하여 0.1, 1, 10ng/ml의 PDGF를 첨가하여 3일 간격으로 배양액을 교체해 주면서 3일, 7일, 14일, 21일, 28일에 ALP 활성을 p-nitrophenyl phosphate(Sigma, USA)를 기질로 이용한 방법으로 아래와 같이 측정하였다. 부착된 세포를 인산완충식염수(phosphate buffered saline, 이하 PBS)로 2회 씻어내고 0.02%의 Nonidet P-40(Sigma) 1ml에 녹인 후 ultrasonicator에서 15초간 sonication시켜 (Fischer, Rockville, MD) 12,000 g에서 15분간 원심분리하였다. 효소활성을 측정하기 전에 상층액을 -20℃에 두고 37℃에서 30분간 cell digestion buffer(1.5M Tris-HCL, 1mM $ZnCl_2$, 1mM $MgCl_2 \cdot 6H_2O$,pH 9.2, containing 1% Triton X-100)로 처리하며 7mM p-nitrophenyl phosphate(Sigma,USA)를 기질로써 이용하여 410nm에서 흡수도를 측정하였다. 단백질 농도는 BCA protein assay reagent(Pierce, USA)를 사용하여 측정하며, bovine serum albumin을 standard로 하였고, ALP활성도는 nmole/min/mg of protein으로 나타내었다. 대조군과 실험군의 통계학적 처리는 student t-test로 시행하였다.

III. 결과

1. bone nodule형성 관찰

bone nodule은 대조군과 모든 실험군에서 3, 7, 14일째는 전혀 관찰할 수 없었으며, 21일째 관찰되기 시작하여 그 이후 28일째까지 대조군과 모든 실험군에서 bone nodule수에 있어 공히 큰 변화가 없었다(그림 3 참조).

2. 시간 경과에 따른 MC3T3-E1세포의 ALP활성도에 대한 IGF-I의 영향

시간 경과에 따른 MC3T3-E1세포의 ALP 활성도에 미치는 IGF-I의 영향은 대조군 1과 비교시 IGF-I 0.1 ng/ml 군과 7일째 IGF-I 1 ng/ml군, 10 ng/ml군과 14일째 IGF-I 10 ng/ml 실험군을 제외한 모든 실험군에서 통계학적으로 유의한 ALP 활성 증가 양상을 보였으며, 대조군-2와 비교시 모든 실험군에서 14일까지 ALP 활성도의 감소 양상을 보이다가 21일 이후 1 ng/ml, 10 ng/ml 실험군에서 통계학적으로 유의한 증가 양상을 보였다($P < 0.01, 0.05$).

대조군-1에서 3일군 2.13±0.43 nmole/min/mg of protein에 비해 7일군 3.44±0.09 nmole/min/mg of protein에서 통계학적으로 유의성있는 증가를 보였으며, 대조군-2의 경우 3일군 3.76±0.61 nmole/min/mg of protein

에 비해 7일째군은 9.80±2.12 nmole/min/mg of protein, 21일째군은 2.07±0.05 nmole/min /mg of protein, 28일째군은 1.80±0.11 nmole/min/mg of protein으로 유의성있는 차이를 보였다($P<0.05$). IGF-I 0.1 ng/ml 적용군에서는 3일군 0.72±0.37 nM/min/mg of protein에 비해 14일째군은 1.98±0.08 nmole/min/mg of protein으로 통계학적으로 유의성있는 증가를 보였고, IGF-I 1 ng/ml 적용군에서는 14일째군은 4.66±0.23 nmole/min/mg of protein, 28일째군은 1.76±0.02 nmole/min/mg of protein으로 통계학적으로 유의성있는 차이를 보였으며, IGF-I 10 ng/ml 적용군에서는 21일째군은 2.82±0.07 nmole/min/mg of protein, 28일째군은 1.90±0.16 nmole/min/mg of protein으로 통계학적으로 유의성있는 차이를 보였다($P<0.01$)(표 1, 그림 1참조)

3. 농도 변화에 따른 MC3T3-E1세포의 ALP활성도에 대한 IGF-I의 영향

MC3T3-E1세포의 ALP활성도에 미치는 IGF-I의 효과는 대조군-1, -2와 비교시 감소하는 경향을 보이며, 각각의 농도를 비교시 1 ng/ml 농도까지는 농도 의존적으로 증가하다가 10 ng/ml의 농도에서는 약간 감소하는 경향을 보였으며, 모든 실험군에서 21일까지 1 ng/ml 실험군에서 가장 높은 ALP 활성도를 보였으며, 28일째는 10 ng/ml 실험군에서 가장 높은 ALP 활성도를 보였다.

3일군에서 IGF-I 0.1 ng/ml적용군은 0.72±0.37 nmole/min/mg of protein으로, 1 ng/ml적용군은 3.26±0.29 nmole/min/mg of protein으로, 10ng/ml적용군은 3.23±0.06 nmole/min/mg of protein으로 대조군-1의 2.13±0.43 nmole/min/mg of protein과 비교시 통계학적으로 유의성있는 감소를 보였으며, IGF-I 0.1ng/ml 적용군에서 0.72±0.37 nmole/min/mg of protein으로 대조군-2의 3.76±0.61 nmole/min/mg of protein와 비교시 통계학적으로 유의한 차이를 보였다($P<0.05$, $P<0.01$). 7일군에서는 IGF-I 0.1 ng/ml 적용군에서 1.37±0.03 nmole/min/mg of protein으로 대조군-1의 3.44±0.09 nmole/min/mg of protein에 비해 통계학적으로 유의한 차이를 보였으며, 대조군-2 9.80±2.12 nmole/min/mg of protein에 비교시 IGF-I 0.1 ng/ml적용군은 1.37±0.03 nmole/min/mg of protein으로, 1 ng/ml 적용군은 3.47±0.81 nmole/min/mg of protein으로, 10 ng/ml 적용군은 3.36±0.15 nmole/min/mg of protein으로 모든 실험군에서 통계학적으로 유의한 차이를 보였다($P<0.01$, $P<0.05$). 14일군에서는 IGF-I 0.1 ng/ml 적용군은 1.98±0.08 nmole/min/mg of protein으로, 1 ng/ml 적용군은 4.66±0.23 nmole/min/mg of protein으로 대조군-1의 2.97±0.34 nmole/min/mg of protein에 비해 통계학적으로 유의한 감소를 보이며, 대조군-2 5.07±1.06 nmole/min/mg of protein과 비교시는 0.1ng/ml 적용군에서 1.98±0.08 nmole/min /mg of protein으로 통계학적으로 유의한 차이를 보였다($P<0.05$, $P<0.01$). 21일군에서 1 ng/ml적용군은 3.09±0.07 nmole/min/mg of protein으로, 10ng/ml 적용군은 2.82±0.07 nmole/min/mg of protein으로 대조군-1의 1.87±0.33 nmole/min/mg of protein에 비해 통계학적으로 유의한 차이를 보이며, 0.1 ng/ml 적용군은 1.28±0.06 nmole/min/mg of protein으로, 10 ng/ml 적용군은 2.82±0.07 nmole/min/mg of protein으로 대조군-2의 2.07±0.05 nmole/min/mg of protein과 비교시 통계학적으로 유의한 감소를 보였으며, 28일군에서는 1ng/ml 적용군은 1.76±0.02 nmole/min/mg of protein으로, 10 ng/ml 적용군은 1.90±0.16 nmole/min/mg of protein으로 대조군-1의 1.57±0.04 nmole/min/mg of protein에 비해 통계학적으로 유의성있는 차이를 보였고, 0.1 ng/ml 적

표 1 Dose-response effect of Insulin-like growth factor-I on ALP activity by MC3Te-E1 cells cultured for 3, 7, 14, 21, 28 days

Conc.(ng/ml)	3 day	7 day	14 day	21 day	28 day
CON.-1	2.13±0.43	3.44±0.09	2.97±0.34	1.87±0.33	1.57±0.04
CON.-2	3.76±0.61	9.80±2.12	5.07±1.06	2.07±0.05	1.80±0.11
IGF-0.1	#0.72±0.37	#1.37±0.03#	1.98±0.08**	##1.28±0.06	1.49±0.09
IGF-1	##3.26±0.29*	##3.47±0.81**	##4.66±0.23	##3.09±0.07*	##1.76±0.02**
IGF-10	##3.23±0.06*	#3.36±0.15**	#3.43±0.13*	##2.82±0.07	##1.90±0.16

MC3T3-E1 cells were seeded at 1×104 cells/ml in alpha-modified Eagle medium containing 10% fetal bovine serum, 10 mM β-glycerophosphate and 50㎍/ml of ascorbic acid. Before 48 hours of indicated time, medium were changed with serum free medium. After 24 hours, indicated amounts of Insulin- like growth factor-I were added. Alkaline phosphatase activity were measured as materials and methods. Each value represents the mean and S.D.

* : significantly different from control-1 value in dose response effect ($P < 0.05$)
** : significantly different from control-1 value in dose response effect ($P < 0.01$)
# : significantly different from control-2 value in dose response effect ($P < 0.05$)
: significantly different from control-2 value in dose response effect ($P < 0.01$)

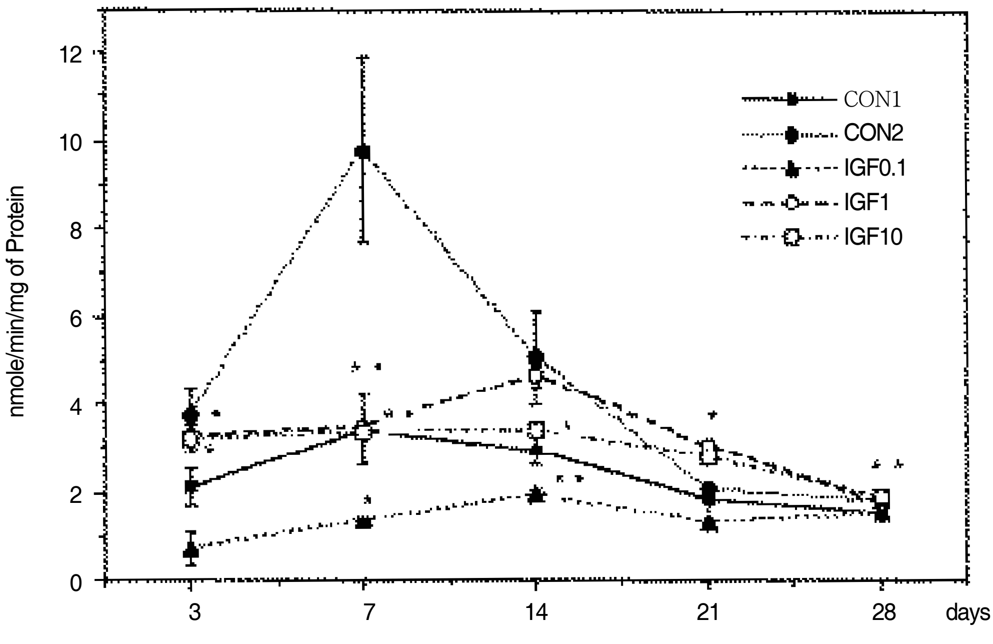

그림 1 Time-response effect of 0.1, 1, 10 ng/ml of Insulin-like Growth factor-I on alkaline phosphatase activity by MC3T3-E1 cells. The cells cultured for 3, 7, 14, 21, 28 days in the presence of 10% fetal bovine serum, 10 mM β-glycerophosphate and 50㎍/ml of ascorbic acid.

* : significantly different from value of day 3 group($P < 0.05$)
** : significantly different from value of day 3 group($P < 0.01$)

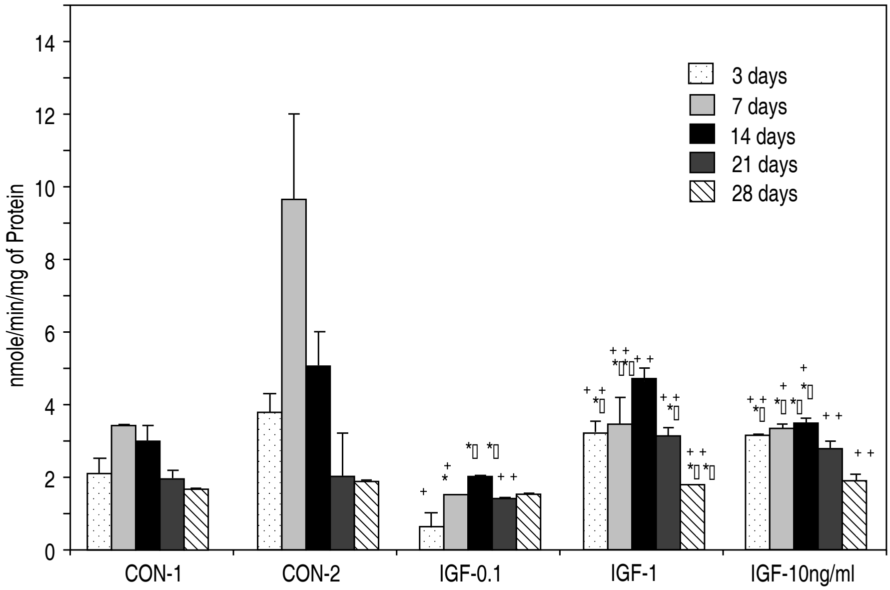

그림 2 Dose-response effect of 0.1, 1, 10 ng/ml of Insulin-like Growth factor-I on alkaline phosphatase activity by MC3T3-E1 cells. The cells cultured for 3, 7, 14, 21, 28 days in the presence of 10% fetal bovine serum, 10 mM β-glycerophosphate and 50㎍/ml of ascorbic acid

* : significantly different from control-1 value in dose response effect($P < 0.05$)

** : significantly different from control-1 value in dose response effect($P < 0.01$)

\+ : significantly different from control-2 value in dose response effect($P < 0.05$)

++ : significantly different from control-2 value in dose response effect($P < 0.01$)

용군에서 1.49±0.09 nmole/min/mg of protein으로 대조군-2 1.80±0.11 nmole/min/mg of protein에 비교시 통계학적으로 유의성 있는 감소를 보였다(P<0.01, P<0.05)(표 1, 그림 2 참조).

Ⅳ. 총괄 및 고찰

치주처치시 이상적인 치유는 치주질환에 이환된 부위에서 신생골, 신생백악질이 형성되고 새로운 치주인대섬유가 삽입, 재배열되는 재생의 형태이며, 치주치료는 이러한 재생의 치유 과정을 유도함으로서 치주조직의 구성 성분인 치은, 치주인대, 치조골과 백악질을 질환에 이환 되기 전의 상태로 회복시키는 것을 목적으로 한다[34-36].

골조직은 교원질, 당단백과 같은 세포외 기질과 조골세포, 파골세포, 골세포등 여러 종류의 세포들로 구성되어 있는 매우 복잡하고 활동적인 조직으로서 계속적으로 골개조가 일어나며, 골개조는 파골세포에 의한 골흡수와 조골세포의 골형성에 의하여 균형을 이루는 과정으로 순차적으로 진행된다. 이중 골기질의 성분을 주로 합성하는 조골세포는 미분화 간엽세포에서 유래된 전조골세포가 골표면에 도달하여, 성숙한 조골세포로 분화되고, 10-20%가 골세포로 되어 석회화 조직에 묻힌다고 알려져 왔다[37]. 그리고, 조골세포의 활성도를 연구하기 위하여 여러가지 방법들이 기술되었는데 이에는 골조직 배양, 골유도세포 혹은 조골세포 유사세포주의 일차배양등이

포함되며, 이러한 배양방법은 조골세포의 병리와 생리를 이해하는데 중요한 공헌을 하였고, 최근에는 정상 인간의 조골세포 배양방법도 여러 연구가들에 의하여 발전되었다[2), 38)].

요즘 치주질환에 의해 파괴된 치주조직의 재생에 폴리펩타이드계 성장인자가 보조적인 치료 방법으로 제시되고 있는데, 이러한 성장인자들은 골세포의 증식, 분화 등에 영향을 미치고 적절한 시기에 autocrine 또는 paracrine action에 의하여 골형성과 흡수에 관여함으로 중요하게 생각되어지고 있다. IGF는 proinsulin과 49% DNA sequence homology를 가지고 있는 단일쇄 단백질로 IGF-I과 IGF-II 두종류가 있으며,[10)] IGF-I과 IGF-II는 62%의 아미노산 배열 순서의 동성을 갖고 있으며[12)], 유사한 생물학적 활성을 가진다. IGF-I은 연골과 골의 성장을 촉진시키며, 조골세포에 의하여 생성되고[49)], 조골세포의 증식을 촉진시키며 골조직의 단백합성을 촉진시킨다는 보고들[15-17)]이 있어 IGF-I은 조골세포의 증식뿐 아니라 분화를 조절하는 것으로 알려져 있다.

MC3T3-E1 세포는 Kodama등[40)]에 의하여 신생쥐(C57BL/6)의 두개골에서 분리된 조골세포이며, 섬유아세포 형태를 보이다가 장기간 배양시 높은 ALP활성을 보이며, 조골세포와 골세포로 분화 가능하며 골기질의 석회화를 일으키는 세포로 알려져 있다[41), 37)]. ALP가 석회화과정에 관여하는 정확한 과정은 잘 알려져 있지 않지만, Krzysztof등[42)]은 칼슘과 인 대사에 관여하는 효소로 조골세포의 중요한 지표로서 생산, 분비되는 특징적인 생화학적 산물로 비교적 높은 pH인 8-10 정도에서 monoester phosphate를 가수분해해서 주로 뼈가 형성될 때 높은 농도로 발현된다고 보고하였으며[43)], Stein등[44)]은 높은 ALP활성은 골세포 분화의 표지인자라고 보고하였다

그리고 조골세포의 가장 중요한 기능인 bone nodule형성에 관한 직접적인 관찰을 위해 in vitro에서의 골형성에 관한 많은 연구가 진행되어 왔으나[20), 21), 45)], IGF-I이 MC3T3-E1세포의 분화와 증식에 서로 상이한 결과가 많이 보고되고 있어 이에 본 연구에서는 IGF-I이 MC3T3-E1세포의 bone nodule 형성을 관찰해본 결과, 대조군과 모든 실험군에서 14일까지는 bone nodule을 관찰할 수 없었고, 21일째 양군 공히 관찰되어 28일째까지 대조군과 모든 실험군에서 양군 공히 별차이가 없었다. 이는 쥐의 두개관에서 얻은 조골세포에 IGF-I을 첨가시 bone nodule수가 감소되었다는 이등[21)]의 연구와는 다르게 나타났으며, Choi등[20)]과 Sudo등[45)]은 MC3T3-E1세포에서 각각 16일, 21일경부터 bone nodule을 관찰할 수 있었다는 연구도 있어 bone nodule에 관한 IGF-I의 역할은 미미한 것으로 사료된다.

또한 골세포 분화에 중요한 표식 인자인 ALP 활성도를 측정해본 결과 본 연구에는 IGF-I의 적용농도에 따른 MC3T3-E1세포의 ALP활성은 모든 실험군에서1 ng/ml까지는 농도 의존적으로 증가하다가 10 ng/ml에서는 감소하는 경향을 보였고, 21일째 IGF-I 1 ng/ml, 10 ng/ml, 28일째 10 ng/ml 투여군을 제외하고는 대조군에 비해 오히려 감소하는 경향을 보였다. 이것은 Wergedal등[30)], Chenu등[46)]은 쥐의 조골세포에, Nakashima등[47)]은 소의 치수세포에 IGF-I을 주입시 ALP활성도에 변화가 없었다고 보고한 연구와, OHS-4세포에서 10, 100 nM 농도의 IGF-I을 첨가시 ALP활성도가 감소했다고 보고한 Fournier등[31)]의 결과와는 일치하지만, 쥐의 두개관 세포에 IGF-I을 주입시 농도의존적으로 ALP활성 증가를 보였다고 보고한 Schmid등[28)]과 이등[48)]의 연구와 쥐에게 매일 1.3, 2.1 mg/ml의 IGF-I을 주입하니 골분화의 표식 인자로 알려진 ALP와 osteocalcin이 증가되었다고 보고한 Machwate등[29)]의 연구와는 상반된 결과를 얻었다. 이는 적용된 세포의 종류, 세포 접종수에 의한 세포의 밀도, 세포배양기간과 실험에 사용된 배양액에 포함된 FBS의 농도등 실

험방법의 차이에 의한 것으로 사료된다[51), 52)].

그러나 1ng/ml의 농도에서 ALP활성도가 증가된 것으로 보아 이 농도가 ALP활성도를 증가시키는 적절한 농도로 사료되나 이에 대해서는 그 농도에 대한 집중적인 연구가 더 필요하리라 생각된다. 그리고 IGF-I 10ng/ml 농도에서 다시 감소 양상을 보이는 것은 Kawamoto[49)]의 연구에서 보고한 바와 같이 농도가 증가함에 따라 성장인자에 대한 새로운 수용체의 합성에 많은 양의 에너지가 소비됨에 의한 것으로 사료된다.

본 연구에서는 IGF-I의 적용시기에 따른 MC3T3E1세포의 ALP활성은 각각의 농도에 대해 14일까지는 증가하다가 그 이후에는 감소하는 경향을 보였으며, 이 결과는 bone nodule형성 전에 ALP활성도의 최고치가 나타난 Choi[50)], Nojima등[51)]의 논문과 일치하였으며, 이는 ALP가 bone nodule형성 초기에는 관여하는 중요한 인자로 작용하지만 bone nodule형성 이후에는 별영향이 없는 것으로 사료된다.

이상의 결과를 종합해 보면 IGF-I은 bone nodule형성에는 별 영향이 없었고, bone nodule형성까지는 ALP활성도를 증가시키다가 bone nodule형성 후에는 ALP 활성도를 감소시켜 조골세포의 분화에 큰 영향이 없는 것으로 사료되지만 이것이 단순히 ALP활성에 의한 영향인지 IGF-I이 다른 성장인자와 골기질단백질에 영향을 미친 결과인지는 알 수 없었으며, 향후 이에 대한 연구가 계속 필요하리라 생각된다.

V. 결론

치주조직의 재생을 위하여 다양한 방법이 제시되어 왔으나 최근에는 치주인대세포를 선택적으로 유도하여 증식시키는 방법으로 성장인자에 대한 연구가 진행되고 있으며, 이러한 폴리펩타이드계 성장인자중 골세포의 증식, 기질 합성을 촉진시킨다고 보고된 IGF-I을 이용하여 배양된 MC3T3-E1세포의 bone nodule형성과 ALP활성도를 알아봄으로써 IGF-I이 MC3T3-E1세포의 분화에 미치는 영향을 알아보고자 본 실험을 실시하였다.

이 연구는 MC3T3-E1 세포를 10% fetal bovine serum이 포함된 α-minimal essential medium(α-MEM)에서 배양한 군을 대조군-1로 하였으며, 해당일의 48시간 전에 serum free media로 대체한 후 IGF-I을 주입하지 않은 군을 대조군-2로 하고, 24시간 후 IGF-I을 각각 0.1, 1, 10 ng/ml를 주입한 군을 실험군으로 하여 3, 7, 14, 21, 28일간 배양하여 bone nodule형성과 ALP활성도를 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

Bone nodule형성은 대조군과 모든 실험군에서 21일째 관찰되었으며, 28일까지 양군 공히 큰 변화가 없었으며, 시간 경과에 따른 IGF-I의 MC3T3-E1세포의 ALP활성도에 미치는 영향은 대조군-1과 비교시 IGF-I 0.1 ng/ml 군과 7일째 IGF-I 1 ng/ml군, 10 ng/ml군과 14일째 IGF-I 10 ng/ml 실험군을 제외한 모든 실험군에서 통계학적으로 유의한 ALP 활성 증가 양상을 보였으며($P < 0.01, 0.05$), 대조군-2와 비교시 모든 실험군에서 14일까지 ALP 활성도의 감소 양상을 보이다가 21일 이후 1 ng/ml, 10 ng/ml 실험군에서 통계학적으로 유의한 증가 양상을 보였다.($P < 0.01, 0.05$)

IGF-I의 농도 변화에 따른 MC3T3-E1세포의 ALP 활성도는 모든 실험군에서 21일까지 1 ng/ml 실험군에서 가장 높은 ALP 활성도를 보였으며, 28일째는 10 ng/ml 실험군에서 가장 높은 ALP 활성도를 보였으며, 각 농도에 따른 ALP 활성도를 비교해 보면 대조군에서는 7일째, 모든 실험군에서는 14일째 높은 ALP 활성도를 나타내었으며, 1 ng/ml 실험군에서 가장 높은 ALP 활성도를 보였다.

Ⅵ. 참고문헌

1. Meghji, S. : Bone remodelling, Br. Dent. J., 172 : 235-242, 1992
2. Aufmkolk, B., Hauschka, P. V. and Schwartz, E. R : Characterization of human bone cells in culture, Calcif. Tissue. Int., 37 : 228-235, 1985.
3. Sporn, MB., Roberts, AB., Wakefield, LM. and Crombrugghe, BE. : Some recent advances in the chemistry & biology of transforming growth factors, J. Cell. Biology., 105 : 1039-1045, 1987.
4. Massague, J. : The transforming growth factors, TIBS, 9 : 237-239, 1985.
5. Terranova, V. P. and Wikesjo, U. M. E. : Extracellular matrices and polypeptide growth factors as mediators of functions of cell of the periodontium, J. Periodontol., 58 : 371-381, 1987.
6. Graves, D. T. and Cochran, D. L. : Mesenchymal cell growth factors, Crit. Rev. Oral Biol. Med, 1 : 17-36, 1990.
7. Rinderknecht, E. and Humbel, R. E. : The amino acid sequence of human insulin-like growth factor-I and its structural homology with proinsulin, J. Biol. Chem., 253 : 2769-2776, 1978.
8. Rinderknect, E. and Humber, R. E. : Primary structure of human insulin-like growth factor-II, FEBS Lett., 89 : 283-286, 1978.
9. Blundell, T. L., Bedarkar, S., Rinderknecht, E. and Humbel, R. E. : Insulin-like growth factor : A model for tertiary structure accounting for immunoreactivity and receptor binding, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 75 : 180-184, 1978.
10. Hollenberg, M. D. : Receptors for insulin and other growth factor : rationale for common and distinct mechanism of cell action, Clin. Invest. Med., 10 : 45-47, 1987
11. Daughaday, W. H., Hall, K., Salmon, W. D, Jr, van der Brande. J. L. and Van Wyk. J. J. :On the nomenclature of the somatomedins and insulin-like growth factors, J. Clin. Endocrinol. Metab., 65 : 1075-1976, 1987.
12. Klapper, D. G., Svoda, M. E. and Van, Wyk, J. J. : Sequence analysis of somatomedin-C: Confirmation of identify with insulin-like growth factor-I, endocrinology., 112 : 2215-2217, 1983.
13. Enberg,G., Carlquist, M., Jornvall, H. and Hall,K. : The characterization of somatomedin A, isolated by microcomputer-controlled chromatography, reveals an apparent identify to insulin-like growth factor-I, Eur. J. Biochem., 143 :117-124, 1984.
14. Roll, L. B., Scot, J. and Bell, G. I. : Human insulin-like growth factor I and II messenger RNA : Isolation of complimentary DNA and analysis of expression, Methods Enzymol., 146 : 239-243, 1987.
15. Canalis, E., McCarthy, T. and Centrella, M. : The role of growth factor in skeletal remodelling, Endocrinol. Met. Clin. N. Am., 18 : 903-918, 1989.
16. Canalis, E., McCarthy, T. and Centrella, M. : The regulation of bone formation by local factor, In bone and mineral research., Elservier Science Publishers B. V., Amsterdam, (1989) pp 27-56.

17. Stracke, H., Schulz, A., Moller, A., Rossol, S. and Schutz, H. : Effects of growth hormone on osteoblasts and demonstration of somatomsdin-C/ IGF-I in bone organ culture, Acta Endocrinol., 107 : 16-24, 1984.
18. Blom, S., Holmstrup, P. and Dabolsteen, E. : The effect of insulin-like growth factor-I and growth hormones on periodontal ligament fibroblast morphology, growth pattern, DNA synthesis and recent bindings, J. Periodontology., 63 : 960-968, 1992.
19. Linkhart, T. A. and S. Mohan : Parathyroid hormone stimulates release of IGF-I and IGF-II from neonatal mouse calvaria in organ culture, Endocrinology., 125 : 1484-1491, 1989.
20. Canalis, E., McCarthy. T. and Centrella, M. : Isolation and characterization of insulin-like growth factor I (somatomedin C) from cultures of fetal rat calvariae, Endocrinology., 122 : 22-27, 1988.
21. Canalis, E., Pash, J., Gabbitas, B., Rydziel, S. and Varghese, S. : Growth factor regulate the synthesis of insulin-like growth factor-I in bone cell culture, Endocrinology., 133 : 33-38, 1993..
22. Schmid, C., Steiner, T. and Froesch, E. R. : Preferential enhancement of myoblast differentiation by insulin-like growth factor (IGF-I and IGF-II) in primary cultures of chicken embryonic cells, FEBS., 161 : 117-121, 1983.
23. MaCarthy,T. L., Centrella, M. and Canalis, E. : Regulatory effects of insulin-like growth factor I and II on bone collagen synthesis in rat calvarial cultures, Endocrinology., 124 :301-309, 1989.
24. Spencer, E. M., Liu, C. C., Si, E. C. C. and Howard, G. A. : In vivo actions of insulin-like growth factor-I on bone formation and resorption in rat, Bone., 12 : 21-26, 1991.
25. Kurtz, A., Jelkmann, W. and Bauer, C. : A new candidate for the regulation of erythropoiesis. Insulin-like growth factor I, FEBS Lett., 149 : 105-108, 1982.
26. Ewton, D. Z and Florini, J. R. : Effects of the somatomedins and insulin on myoblast differentiation in vitro, Dev. Biol., 86: 31-39, 1981.
27. Kato, Y., Nasu, N., Takase, T., Daikuhara, Y. and Suzuki, F. : A serum-free medium supplemented with multiplication-stimulating activity(MSA) supports both proliferation and differentiation of chondrocytes in primary culturre, Exp. Cell RES., 125 : 167-174, 1980.
28. Schmid, C., Steiner, T. and Froesch, E. R. : Insulin-like growth factor I supports differtiation of cultured osteoblast-like cells, FEBS.,173:48-52, 1984.
29. Machwate, M., Zerath, E., Holy, X., Pastoureau, P. and Marie, P.J. : Insulin-like growth factor-I increase trabecular bone formation and osteoblastic cell proliferation in unloaded rats, Endocrinology., 134 : 1031-1038, 1994.
30. Wergedal, J. E., Mohun, S., Lundy, M. and Bayliak, D. J. : Skeletal growth factor and other growth factors known to bo present in bone matrix stimulate proliferation and protein synthesis in human bone cells, J. Bone. Min. Res., 5 : 179-186, 1990.

31. Fournier, B., Ferralli, J. M., Price, P.A. and Schlaeppi, J. M. : Comparison of the effects of insulin-like growth factor I and -II on the human osteosarcoma cell line OHS-4, J. Endocrinol., 136 : 173-180, 1993.
32. Bessay, O. A., Lowry, O. H., Brock, M. J. : A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with fibecubic millimeters of serum, J. Biol. Chem., 164 : 321-329, 1946.
33. Lowry, O. B., Rosenbrough, M. J., Farr, A. L., Rebar R. W. : Protein measurement with folin phenol reagent, J. Bone. Joint. Chem., 193 : 255-260, 1951.
34. Lindhe, L. : Textbook of clinical periodontology, 2nd ed., Munksguard, Copenhagen, p450, 1989.
35. 서조영외 : 치주과학, 지영문학사, 473-476, 1992.
36. The American academy of periodontology : Proceeding of the world workshop in clinical periodontitis v-20, 1989.
37. Zheng, M. H. : What's new in the role of cytokines on osteoblast proliferation and differentiation, Path. Res. Pract., 188 : 1104-1121, 1992.
38. Gehnon-Robey, P. and Termine, J. D. : Human bone cell in vitro, Calcif. Tissue. Int., 37 : 453-460, 1985.
39. Wong, G. L., D. Kotliar, D. Schlaeger and S. J. Brandes : IGF-I production by mouse osteoblasts. J. Bone Min. Res., 5 : 133-140, 1990.
40. Kodama, H., Amaga, Y., Sudo, H., Kasai, S., Yamamoto, S. : Establishment of a clonal osteogenic cell line from newborn mouse calvaria, Jpn. J. Oral. Biol., 23 : 899-910, 1981.
41. Kurihara, N., Ishizuka., Kiyoki, M., Haketa, Y., Ikeda, K., Kumegawa, M. : Effect of 1,25-dihydroxy vitamin D on osteogenic MC3T3-E1 cells, Endocrinology., 118 : 940-947, 1986.
42. Krzysztof, H. W., Reddi, A. M. : Alikaline phosphatase as a marker of osteoinductive cells, Calcif. Tissue. Int., 39 : 382-385, 1986.
43. Doty, S.B., Schofield, B. H. : Enzyme histochemistry of bone and cartilage cells, Prog. Histochem. Cytochem., 8 : 1-38, 1976.
44. Stein, G. S., Lian, J. B. and Owen, T. A. : Relationship of cell growth to the regulation of tissue-specific gene expression during osteoblast differentiation, FASER. J., 4 : 82-94, 1990.
45. Sudo, H., Kodama, H-A., Amagai, Y., Yamamoto, S., Kasai, S. : In vitro diffentiation and calcification in a new clonal osteogenic cell line derived from newborn mouse calvaria, J. Cell. Biol., 96 : 191-198, 1983.
46. Chenu, C., Valentin-Opran, A., Chavassieux, P., Saez, S., Meunier, P. J. : Insulin-like growth factor I hormonal regulation by growth hormone and by 1,25(OH)2D3 and activity on human osteoblast-like cells in short- term culture, Bone., 11: P81-86, 1990
47. Nakashima, M. : The effects of growth factors on DNA synthesis, proteoglycan synthesis and alkaline phosphatase activity in bovine dental pulp cells, Archs. Oral. Biol., 37 : 231-236, 1992.
48. 이재신 ,고성희, 김관식, 정동균 : Insulin-like growth factor-I이 조골세포

의 증식 및 세포활성에 미치는 영향, 서울대학교 치과대학논문집 15 : 69-79, 1991.

49. Kawamoto, T., Sato., J. D., Le, A., Polikoff, J., Sato, C. T. and Mendelsohn, J. : Growth stimulation of A431 cells by epidermal growth factor : Identification of high affinity anti-receptor monoclonal antibody, Proc. Nati. Acad. Sci. U. S. A., 80 : 1337-1341, 1983

50. Choi, J. Y., Lee, B. H., Song, K. B., Park, R. W., Kim, I. S., Sohn, K. Y., Jo, JS. and Ryoo, H. M. : Expression patterns of bone-related proteins during osteobalstic differentiation in MC3T3-E1 cells, J. of Cellular Biochemistry., 60 : 1-10, 1996.

51. Nojima, N., Kobayachi, M., Shionomo, H., Takanashi, N., Sudo, T. and Hasegawa, K. : Fibroblastic cells derived from boving periodontal ligaments have the phenotypes of osteoblast, J. Periodont. Res., 25 : 179-185, 1990.

52 Matsuyama, T., Lau, K. H. W. and Wergedal, J. E. : Monolayers cultures of normal bone cells contain multiple subpopulations of alkaline phosphatase positive cells, Calcif. Tissue. Inter., 47 : 276-283, 1990.

53. 김성진, 이재목, 서조영 : Insulin-like growth factor-I이 치주인대세포의 생물학적 활성도에 미치는 영향에 대한 연구, 대한치주과학회지., 24 : 219-237, 1994.

사진부도 설명

그림 3A & 3B 3 days for control & experiment groups. Photomicrograph shows no bone nodules(× 40).

그림 3C & 3D 7 days for control & experiment groups. Photomicrograph shows no evident bone nodules(× 40).

그림 3E & 3F 14 days for control & experiment groups. Photomicrograph shows no bone nodules(× 40).

그림 3G & 3H 21 days for control & experiment groups. Photomicrograph shows bone nodules both control and experiment groups but there are no difference between control and experiment groups(× 40).

그림 3I & 3J 28 days for control & experiment groups. Photomicrograph shows bone nodules but there are no difference between 21-day-groups and 28-day-groups(× 40)

사진부도(I)

사진부도(Ⅱ)

-Abstract-

The Effect of IGF-1 on ALP Activity of MC3T3-E1 Cell

Hu-Jung Lee*, Jae-Mok Lee*, Byung-Ju Choi**, Hyun-Mo Yu***, Jo-Young, Suh*
Department of Periodontology, School of Dentistry, Kyungpook National University Taegu, Korea*
Department of Dental Pharmacology, School of Dentistry, Kyungpook National University, Taegu, Korea**
Department of Oral Biochemistry, School of Dentistry, Kyungpook National University, Taegu, Korea***

Polypeptide growth factors belong to a class of potent biologic mediators which regulate cell differentiation, proliferation, migration and metabolism. IGF-I is polypeptides secreted by skeletal cells and is considered as regulators of bone formation. The purpose of this study is to evaluate the effects of IGF-I on bone nodule formation and alkaline phosphatase activity of MC3T3-E1 cells.

MC3T3-E1 cells were seeded at 1×10^4 cells/well, 1×10^5 cells/well in alpha-modified Eagle medium containing 10% fetal bovine serum, 10 mM β-glycerophosphate and 50㎍/ml of ascorbic acid. Before 48 hours of indicated time, medium were changed with serum free medium. After 24 hours, 0.1, 1, 10 ng/ml IGF-I were added to the cells and cultured for 3, 7, 14, 21, 28 days. And histochemical analysis was done and ALP activity was measured and was expressed as nmol/min/mg of protein.

The bone nodule formation in MC3T3-E1 cells of IGF-I was seen at 21, 28 days, but there were no difference between control group and experimental groups.

The ALP activity decreased when it is compare to control 2 group except for 1 ng/ml, 10 ng/ml IGF-I of 21-day-groups and 1 ng/ml IGF-I of 28-day-groups.

Dose response effects of IGF-I of ALP activity in MC3T3-E1 cells were seen the highest ALP activity at 1ng/ml until 21days and the highest ALP activity at 10 ng/ml of 28 day-groups.

The peak times were seen at 7-day group, 14-day group on control group and experimental group respectively, and 1 ng/ml group was the highest ALP activity.

From the above results, IGF-I was not seen notable effect on bone nodule formation and decreased ALP activity of MC3T3-E1 cells but the use of IGF-I to mediate biological stimulation of MC3T3-E1 cells shows promise for future therapeutic application.