

B-2. 우골유도합성골(BBP®)이 염기성 인산분해효소 활성화에 미치는 영향

현하나*, 유형근, 신형식

원광대학교 치과대학 치주과학 교실

최근 국내에서 Bio-oss® 와 제조과정과 생물학적 성격이 유사한 BBP®가 개발되었기에 BBP®를 각 농도별로 hFOB1 세포주에 투약, 배양한 후 염기성 인산분해효소 활성화도 측정 및 bone nodule formation 을 이용한 계측을 통해 그 활성도를 알아보고, 이를 토대로 BBP®의 치주조직 재생의 임상적 효능을 가늠하기 위해 세포 단위의 생물학적 실험을 시행하였다. 배양한 단일 세포층의 hFOB1을 trypsinization 한 다음 혈구계수기로 세포수를 세어 24-well plate의 well당 1×10^4 cell이 되도록 세포를 분주한 후 10% FBS가 함유된 DMEM으로 24시간 세포배양 후 대조군에는 배양액만을 첨가하고, 실험군에는 0.1 mg/ml, 2 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml, 20 mg/ml 의 BBP®을 처리하고 2일, 4일 동안 배양한 후 혈구계수기를 이용하여 살아있는 세포수와 MTT를 측정하였다. 염기성 인산분해효소 측정은 hFOB1을 6-well plate에 1×10^5 cell/well이 되도록 분주한 후, 10% FBS가 첨가된 DMEM/F-12 1:1 Mixture에서 단일 밀생층 (mono layer)이 형성될 때까지 34°C, 100% 습도, 5% CO₂ 공기 혼합 배양기에서 배양하여 단일 밀생층이 형성된 후 배지를 제거하고 DMEM/F-12 1:1 Mixture으로 2회 세척 후, 10% FBS, G-418 항생제, 50 µg/ml ascorbic acid, 10 mM sodium β-glycerophosphate가 첨가된 DMEM/F-12 1:1 Mixture에 음성 대조군에는 BBP®를 첨가시키지 않고 분주하였으며, 양성 대조군에는 10⁻⁷ M의 dexamethasone을 첨가하였고, 실험군은 0.1mg/ml, 2 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml, 20 mg/ml 농도의 BBP®를 첨가하여 분주한 후 3일 동안 각각 배양하였다. 일정 배양시간이 지난 후 배지를 제거하고, trypsin-EDTA로 세포를 분리시키고 1,500 rpm에서 6분간 원심분리하였다. 상층액을 제거하고 0.2 ml의 멸균된 증류수를 첨가하여 초음파 분쇄기로 현탁하였다. 각 세포 현탁액 0.1 ml에 0.1 M glycine NaOH buffer (pH 10.4) 0.2 ml, 15 mM의 p-nitrophenyl phosphate (p NPP ; Sigma, USA) 0.1 ml, 0.1% triton X-100/saline 0.1 ml와 멸균된 증류수 0.1 ml를 잘 혼합하여, 이 반응물을 37°C에서 30분간 배양하였다. 0.1 N NaOH를 0.6 ml 첨가함으로써 이들 반응을 중지시켰다. p-NPP의 가수분해는 410 nm 파장의 ELISA reader에서 흡광도의 차이로 나타나며, p-nitrophenol (p-NP ; Sigma, USA)을 기준값으로 이용했다. 단백질 농도는 BCA protein assay reagent (Pierce, USA)를 사용하여 측정하며, bovine serum albumin을 standard로 하였고, ALP 활성도는 nM/min/mg of protein으로 나타내었다.