

## Vanadium 화합물이 조골세포주 MC3T3-E1에 미치는 영향에 관한 연구

권기열<sup>1)</sup> · 정규림<sup>2)</sup>

### I . 서 론

교정력에 의한 치아의 이동은 치아 주위에 존재하는 전구세포가 활성화되어 나타내는 골 개조의 과정에 의해 이루어진다고 알려져 왔다. 치아 주위의 골을 이루고 있는 세포에는 골세포, 조골세포, 파골세포, 조섬유세포, 단핵구, 그리고 치주인대세포 등이 있다. 골 개조와 골 개조후 골의 안정성은 치아주위를 이루고 있는 이들 세포의 상호작용과 기타 전신적, 국소적 인자의 영향을 받게 된다. 골 개조는 골 흡수와 골 형성으로 대별하여 생각 할 수 있다. 골 흡수에는 파골세포와 조섬유세포, 그리고 치주인대세포 등의 세포적 요소와 부갑상선 호르몬 등 전신적, 국소적 인자가 관련되어 있다<sup>1)</sup>

교정력에 의한 골 개조의 연구는 치조골의 흡수와 침착으로 나타나는 치조골의 외형적 변화, 치주조직 소견을 통한 세포의 역할 규명<sup>2,3)</sup>, 그리고 세포수준에서 관찰되는 세포내 구조적 변화 또는 생화학적 반응의 변화에 관한 연구<sup>4,5)</sup> 등으로 진행되어 왔다.

세포수준에서 골 개조 기전을 밝히고자 하는 시도에서 세포내 생화학적 반응의 매개체로서

이차전령물질인 adenosine 3',5'-monophosphate (cAMP) 의 역할에 관해 많은 연구들이 있으며 골 개조에 관련된 세포내 생화학적 변화를 야기시키는 인자로는 전신적 인자와 국소적 인자로 구분 지적되어 왔다. 교정력에 의한 치아의 이동과 같은 국소적인 골 대사에는 전신적 인자보다는 국소적 인자의 중요성이 강조되고 있다<sup>6,7,8)</sup>.

교정력에 의한 골 개조 과정에서 작용되는 것으로 알려진 국소인자 중에서 arachidonic acid 대사물질인 prostaglandin 은 파골세포의 출현을 자극시켜 치아이동을 촉진<sup>9)</sup>시키는 반면 치아와 골격성장에 필수 미량원소로 알려진 불소 (fluoride) 는 파골세포의 출현을 감소시켜 치아이동이 억제됨이 실험적 연구를 통하여 관찰된 바 있다<sup>10)</sup>. 교정치료의 궁극적 목표가 생리적 치아이동에 있고 교정시술시 기계적인 힘만을 가하는 것에 더하여 치아이동을 가능하게 하는 조골세포와 파골세포의 기능에 영향을 주는 요소들에 대한 이해는 교정학 분야에서 필요하다.

Vanadium 은 원자번호 23, 원자량 50.94, 질량수 48 ~ 52 의 회백색의 희금속 원소이다. vanadium 은 인체에 있어서 필수 미량원소로서 중요한 생물학적인 효과를 가지며 성장을 촉진시키고 골 대사에도 중요한 생리학적 역할을 수행하는 미량원소로 알려져 있다<sup>11)</sup>. Vanadium 은 부족시 성장이 억제되며 지방대사에 변화를 가

접수일 : 1994년 1월 1일

<sup>1)</sup> : 경희대학교 치과대학 교정학교실, 박사과정생

<sup>2)</sup> : 경희대학교 치과대학 교정학교실, 교수

저으며 당대사에도 부조화를 가져오는 것으로 보고되고 있으며, 성인의 균형있는 식사 중에 하루에 2mg정도가 필요하다고 한다<sup>13)</sup>. Vanadium은 바다, 흙, 식물, 동물 등에 다양한 형태로 존재하며 세포를 증식 시키는 원소로 알려져 있으며<sup>14)</sup> 동물실험에서는 Vanadium섭취를 제한했을 경우 40%의 신체성장의 감소를 가져왔다<sup>15)</sup>.

Vanadium은 경구 투여시 정상인에서 serum cholesterol을 감소 시키고<sup>16)</sup> 세포내로 들어가서 vanadyl [ $VO^{2+}$ ]이온으로 환원되어 염기성 인산 분해효소의 강력한 억제제로서 작용한다고 알려져 있다. Vanadium은 vanadate라는 산화 형태로써 glucose의 대사에 대하여 insulin 유사 효과가 있으며 ribonuclease, acid phosphatase, alkaline phosphatase, Na,K-ATPase ( $Na^+$ -and  $K^+$  stimulated ATPase) 등의 phosphate ester bond를 가수분해시키는 효소에 대하여 억제작용이 있으며<sup>19)</sup>, phosphofructokinase와 adenylatekinase에도 억제 작용이 있으며 adenylcyclase에 대해서는 활성화 작용이 있다 했다<sup>18)</sup>. Vanadium의 결핍시 Vanadium 화합물 중에서 orthovanadate가 가장 효과적인 화학적 형태로 알려져 있다<sup>14)</sup>. Orthovanadate는  $5\mu M$ 에서  $15\mu M$  농도 범위 까지 투여 용량 증가에 비례하여 염기성 인산 분해 효소와 조골세포의 수를 증가시키므로써 골 형성을 자극 한다<sup>16)</sup>.

또한 phosphotyrosine phosphatase를 억제하여 세포증식과 DNA합성을 촉진하고 세포 성장을 촉진하며 형태전환을 유도하고<sup>19)</sup> 쥐의 두개관 조직 배양 실험에서 교원질 합성을 촉진 시켰다<sup>11)</sup>. 또한 시험관 실험에서 세포형질막내 Na,K-ATPase에 대해 강력한 억제효과의 결과로 PTH, Prostaglandin  $E_2$ , 1,25-dihydroxycholecalciferol 등의 골 흡수 촉진을 방해한다<sup>18)</sup>.

세포운동학 (cell kinetics)에서 세포 복제율의 변화는 DNA 생산율을 분석함으로써 추정할 수 있으며 일반적 대사능의 변화는 RNA 생산율을 분석함으로써, 섬유 생산을 변화는 교원질 합성율의 변화를 분석함으로써 추적할 수 있다. 따라서 본 연구의 목표는 생체에 다양한 영향을 주는 Vanadium이 조골세포의 골 대사능력에 어떠한

영향을 나타내는가를 알아보기 위하여 Vanadium 화합물인 Vanadium oxide [ $V_2O_3$ ]와 sodium orthovanadate [ $Na_3VO_4$ ]를 이용하여 조골세포주 MC3T3-E1세포의 DNA 합성능, 염기성 인산 분해 효소 활성도, PTH에 의한 cAMP의 합성능, 그리고 제I형  $\alpha 2$  교원질의 m-RNA 합성등에 미치는 Vanadium의 효과를 실험하였다.

## II. 연구 재료 및 방법

### 1. 세포 배양

본 연구에 사용된 세포들은 조골세포주 MC3T3-E1이며 Kodama등<sup>21)</sup>에 의해 신생쥐(C57BL/6)의 두개골에서 분리되어 계대배양되는 세포로서 염기성 인산분해 효소(Alkaline phosphatase, ALP) 활성과 교원질 합성능이 있으며, 장기간 배양하면 골기질의 석회화를 관찰할 수 있고 부갑상선 호르몬에 의한 cAMP의 생성을 관찰할 수 있다. 세포들은 25ml 플라스틱 culture flask(Flow Lab Inc.)에 10% fetal bovine serum (FBS) (Hyclone Lab.Inc) 및 penicilin 100U/ml와 streptomycin  $100\mu g/ml$ 가 포함된  $\alpha$ -minimal essential medium( $\alpha$ -MEM) 10ml에 넣고  $37^\circ C$ , 95%의 습도, 5%의  $CO_2$  배양기에서 배양하였다. 세포들은 통상적인 방법에 의하여 일주일에 2회씩 계대 배양하였다. 실험에 사용할 세포들은  $5 \times 10^4$  cells/ml 농도로 부유시킨 후 사용하였다.

### 2. Vanadium oxide의 DNA 합성능 검사

$5 \times 10^4$  cells/ml 농도로 12 well 플라스틱 culture flask(Flow Lab Inc.)에 분주하여 10% FBS가 든  $\alpha$ -MEM에서 2일간 배양하고, 0.1% FBS가 포함된  $\alpha$ -MEM으로 교체하여 Vanadium oxide(Sigma Co.)로 처리하지 않은 군을 대조군으로 하고, 2,5,10,15,20  $\mu M$ 의 농도로 Vanadium oxide를 각각 첨가한 군을 실험군으로 하여 [ $^3H$ ] Thymidine  $2\mu Ci/ml$ (Amersham Co.)를 반응시켰다. 24시간 후에 Ca-Mg free phosphate buffered saline (PBS)으로 3회 씻어냈다. 100%

methanol 1ml로 1회 고정하고, 증류수로 3회 세척한 후에, 5% trichloroacetic acid(TCA) 0.5ml를 넣고 4°C에서 5분간 보관하였다. 이를 버린 후에 공기중에서 건조시키고 1N NaOH 5ml로 세포를 용해시키고 용해액에 scintillation fluid 5ml를 넣고  $\beta$ -counter (LS 9000, Beckman Co.)로 counts per minute (cpm)을 측정하였다.

### 3. 염기성 인산분해효소 활성화도 측정

$5 \times 10^4$  cells/ml 농도로 2ml/well씩 6 well 플라스크 culture flask(Flow Lab Inc.)에 분주하여 10% FBS가 든  $\alpha$ -MEM에서 5일간 배양하고, Vanadium oxide와 sodium orthovanadate로 처리하지 않은 군을 대조군으로 하고, 2,4,6,8,10  $\mu$ M의 농도로 Vanadium oxide와 sodium orthovanadate를 각각 첨가한 군을 실험군으로 하여, 0.1% FBS가 든  $\alpha$ -MEM으로 교체한 후 Vanadium oxide군은 3일간 그리고 sodium orthovanadate군은 2일간 배양하였다. 배양된 세포를 PBS로 3회 세척하고 1mM MgCl<sub>2</sub>가 함유된 0.2%의 nonidet p-40 1ml을 넣은 후, 세포를 plate로부터 분리해내고 sonicator (Labsonic 1510, Karl Kolb Co.)를 이용하여 얼음속에서 75 watt로 1분간 세포를 파괴시킨 후 3000G로 10분간 원심분리하였다. 원심분리 후 상층액에 페닐인산나트륨을 첨가하여 alkaline phosphatase 활성도를 측정하였다 (아산제약. ALP 아산셋트). 단백질 함량은 Lowry<sup>22)</sup> 방법으로 측정하였다.

### 4. 부갑상선 호르몬에 대한 cyclic AMP의 합성능 측정

$2 \times 10^4$  cells/well로 분주하고 10% FBS가 든  $\alpha$ -MEM에서 2일간 배양하고 Vanadium oxide와 sodium orthovanadate로 처리하지 않은 군을 대조군으로 하고, Vanadium oxide 5,10  $\mu$ M 농도 sodium orthovanadate 5,8  $\mu$ M 농도로 각각 첨가한 군을 실험군으로 하여, 0.1% FBS가 포함된  $\alpha$ -MEM으로 교체시킨 후 3일간 더 배양하였다. 5일째에 0.3% bovine serum albumin(BSA)이 든  $\alpha$ -MEM 1ml로 교환하여 1일간 더 배양하였다. 1mM isobutyl methyl xanthine

(IBMX),  $\alpha$ -MEM 1ml로 교환하여 37°C에서 15분간 배양하고 50nM PTH(Sigma chemical Co.), 0.3% BSA, 1mM IBMX가 든  $\alpha$ -MEM으로 교환하고 5분간 배양하였다. 배양된 세포에서 상층액을 버리고 염산과 ethanol을 넣어 -20°C 냉장고에서 24시간 보관한 후 꺼내어 ethanol을 증발시켰다. 증발된 후 남은 침전물을 sodium acetate buffer로 용해시키고 cAMP를 측정하였다. cAMP는 방사면역법(Radioimmunoassay, RIA)으로 측정하였다.

### 5. 총 RNA 추출

배양된 조골세포에 Vanadium oxide와 sodium orthovanadate로 처리하지 않은 군을 대조군으로 하고 Vanadium oxide 10, 20  $\mu$ M, sodium orthovanadate 5,10  $\mu$ M 농도로 각각 첨가한 군을 실험군으로 하여 0.1% FBS가 포함된  $\alpha$ -MEM으로 교체하여 24시간 배양한 뒤 PBS로 2회 세척 후 바닥의 세포층을 모아서 원심 분리 후 Chomczynski<sup>22)</sup>의 single step method를 응용하여 RNA를 추출하였다. 세포를 4M guanidinium solution에 녹이고 2M sodium acetate (PH 4.0), phenol(water saturated), chloroform-isoamyl alcohol(49:1)를 첨가하여 혼합 후 3000G에서 20분간 원심분리하였다. 상층액을 추출하여 다시 동량의 isopropanol과 혼합 후 -20°C에서 최소 1시간 침전시켰다. 다시 20분간 원심분리 후 pellet만 guanidium용액에 녹이고 동량의 isopropanol과 같이 혼합하여 -20°C에 방치 후 10분간 원심분리한 뒤 75% ethanol로 세척 후 pellet을 diethyl pyrocabonate로 처리한 물에 용해시켰다.

### 6. Northern blot analysis

추출된 총 RNA를 1% agarose gel/formaldehyde(0.44M)에서 전기 영동 후 ethidium bromide로 염색하여 UV light상에서 28S, 18S의 rRNA를 확인하고 7.5mN NaOH 완충액을 이용하여 흡착지(nylon membrane)에 전이시켰다.

전이 완료된 흡착지에 2M Na-P/EDTA, 30% BSA, 5mg/ml SSDNA, 20% SDS, 100% fom-

amide 등을 첨가하여 50 °C 에서 2시간 동안 water bath 한 후 소식자(probe),  $\alpha$ -[<sup>32</sup>P]dCTP, Klenow, OLB를 첨가한 후 16-18시간 50 °C 에서 water bath 하여 보합결합(Hybridization)을 시행 했다. 소식자는 3.5kb의 type I  $\alpha$ 2 collagen 을 이용 했으며 이는 ATCC (American Type Culture Colection, 57322)에서 구입한 소식자를 large scale method를 이용하여 증폭하고 정제하였다. random hexamer 법으로 소식자에 동위원소를 표지하고 보합결합시킨 후 흡착지를 2×SSC, 1% SDS로 실온에서 30분간 세척 후 0.1% SDS, 0.1×SSC 로 65 °C에서 30분간 2회 세척하였다. 흡착지를 건조시킨 후 X-ray film( Eas-tman Kodak)에 intensifying screen과 함께-70 °C에서 자가방사기록을 실시했고 film에 나타난 band를 densitometer(Clini Scan2)로 scanning 하였다.

#### 10. 통계

통계자료는 평균  $\pm$  표준편차로 표시하였으며 SPSS/PC\*를 이용하여 ANOVA와 Kruskal-Wallis 검정을 통하여 평균치의 유의성을 검정하였다.

### III . 연구결과

#### 1. Vanadium oxide군의 조골세포주 MC3T3-E1 세포에 대한 DNA합성능.

배양된 세포에 Vanadium oxide의 농도를 달리하여 Vanadium oxide의 조골세포주 MC3T3-E1에 대한 성장촉진 효과에 대하여 알아 보았다. 혈청에 의한 효과를 최대한 배제하기 위하여 혈청의 농도를 0.1%로 낮추어 배양 하였다.

Vanadium oxide의 조골세포주 MC3T3-E1에 대한 성장촉진 효과는 대조군에서는 4010  $\pm$  434 cpm/well , 2  $\mu$ M에서는 4695  $\pm$  76 cpm/well, 5  $\mu$ M에서는 5186  $\pm$  799 cpm/well, 10  $\mu$ M에서는 5564  $\pm$  753 cpm/well, 15  $\mu$ M에서는 6590  $\pm$  1348 cpm/well, 20  $\mu$ M에서는 8068  $\pm$  1305 cpm/well 을 나타내었다. (P<0.001),(Table 1, Fig. 3) 각각

의 결과는 0.050 수준에서 통계적인 유의성을 나타내었다.

#### 2. Vanadium oxide군의 염기성 인산분해효소의 활성도에 대한 영향

배양된 세포의 성숙도와 석회화기능에 대한 영향을 알아보기 위하여 염기성 인산분해효소의 활성도를 측정된 결과는 Table 2, Fig. 4와 같다. 염기성 인산분해효소의 활성도는 Vanadium oxide의 농도가 2  $\mu$ M 일때가 가장 높았으며 대조군에 비해 6  $\mu$ M 에서 약간의 증가를 나타냈을 뿐 억제된 양상을 나타내었다. 각각의 결과는 0.050 수준에서 통계적인 유의성을 나타내었다.

#### 3. Sodium orthovanadate군의 염기성 인산분해효소의 활성도에 대한 영향

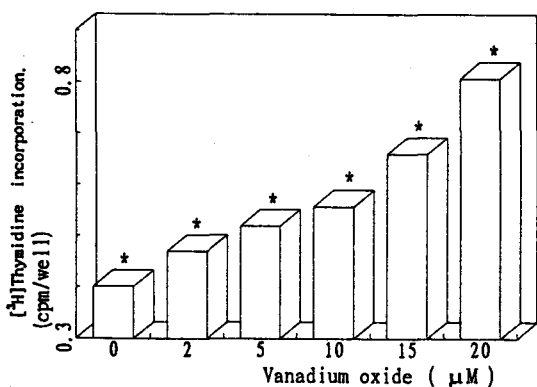
배양된 세포의 성숙도와 석회화기능에 대한 영향을 알아보기 위하여 염기성 인산분해효소의 활성도를 측정된 결과는 Table 3, Fig. 5와 같다. 염기성 인산분해효소의 활성도는 sodium orthovanadate의 농도가 4  $\mu$ M 일때가 가장 높았으며 대조군에 비해 실험한 모든 농도에서 증가를 나타내었다. 대조군과 2, 4, 6, 8  $\mu$ M의 농도의 결과에서 0.050 수준에서 통계적인 유의성을 나타내었다.

#### 4. Vanadium oxide군의 부갑상선 호르몬에 의한 cyclic AMP의 합성능 측정

세포 기능시 이차 messenger로 작용하는 c-AMP의 합성능을 알아보기 위하여 조골세포에 중요한 호르몬인 부갑상선 호르몬(PTH)에 의한 c-AMP생성능에 Vanadium oxide가 미치는 효과를 관찰한 결과는 Table 4, Fig. 6과 같다. vanadium oxide와 PTH를 첨가하지 않은 군에서는 1.82 nmol/L/mg protein 5min을 나타내었고 PTH만 첨가한 군에서는 46.11  $\pm$  8.17 nmol/L/mg protein 5min을 나타내었다. Vanadium oxide를 첨가 하였을때 5  $\mu$ M에서 25.28  $\pm$  5.95 , 10  $\mu$ M에서 12.54  $\pm$  2.29nmol/L/mg protein 5min 을 나타내어 조골세포에서 PTH에 대한 c-AMP 생성이 억제되는 양상을 나타내었다. 각각의 결

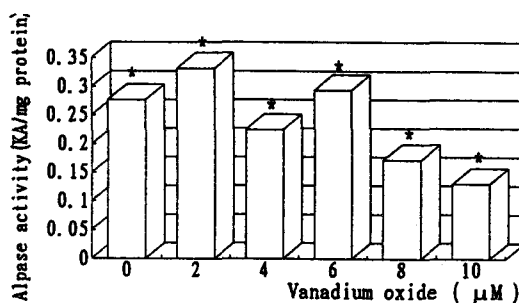
**Table 1.** Effects of vanadium oxide on [<sup>3</sup>H]Thymidine incorporation in osteoblast( MC3T3-E1 cells).

Vanadium oxide (μM)	[ <sup>3</sup> H]Thymidine incorporation (cpm/well) ( p<0.001)
0	4010 ± 434
2	4695 ± 76
5	5186 ± 799
10	5564 ± 753
15	6590 ± 1348
20	8068 ± 1305



**Fig. 3.** The effects of vanadium oxide on [<sup>3</sup>H] Thymidine incorporation in osteoblast (MC3TC-E1 cells). MC3TC-E1 cells cultured 2 days and treated with vanadium oxide for 1 day. DNA synthesis was assayed with [<sup>3</sup>H]Thymidine incorporation. Significance level was calculated with Kruskal-Wallis 1-way ANOVA (P<0.001).

\* denotes groups significantly different at the .050 level.



**Fig. 4.** The effects of vanadium Oxide on alkaline phosphatase activity in osteoblasts (MC3T3-E1 cells). MC3T3-E1 cells cultured 5 days and treated with vanadium oxide for 3 days. The ALP activity was assayed by the method of Lowry with disodium phenyl phosphate as substrate. Significance level was calculated with Kruskal-Wallis 1-way ANOVA (P<0.001).

\* denotes groups significantly different at the .050 level.

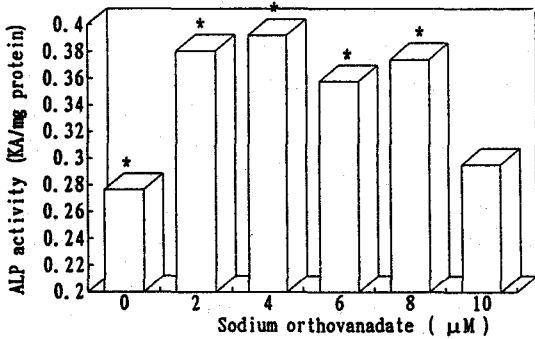
**Table 2.** The effects of Vanadium oxide on alkaline phosphatase activity in osteoblast( MC 3T3-E1 cells)

Vanadium oxide (μM)	Alkaline phosphatase activity ( KA/mg protein)
0	0.2766 ± 0.0320
2	0.3313 ± 0.0412
4	0.2252 ± 0.0323
6	0.2937 ± 0.0473
8	0.1722 ± 0.0321
10	0.1310 ± 0.0402

**Table 3.** The effects of Sodium orthovanadate on alkaline phosphatase activity in osteoblast(MC 3T3-E1 cells)

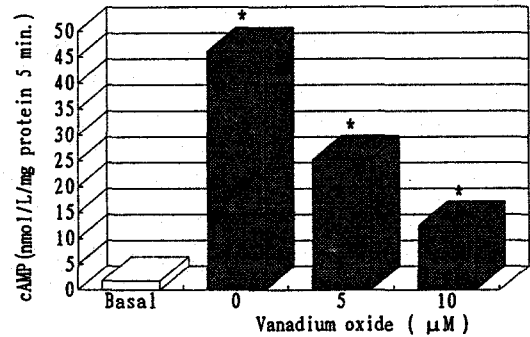
Sodium orthovanadate ( $\mu$ M)	Alkaline phosphatase activity ( KA/mg protein)
0	0.2763 $\pm$ 0.0323*
2	0.3804 $\pm$ 0.0104*
4	0.3919 $\pm$ 0.0142*
6	0.3577 $\pm$ 0.0071*
8	0.3741 $\pm$ 0.0201*
10	0.2952 $\pm$ 0.0222

Effects are shown as mean  $\pm$  SD of 6 replicates. MC3T3-E1 cells cultured 5 days and treated with sodium orthovanadate for 2 days. The ALP activity was assayed by the method of Lowry with disodium phenyl phosphate as substrate. Significance level was calculated with Kruskal-Wallis 1-way ANOVA ( $P < 0.001$ ). Sodium orthovanadate increased alkaline phosphatase content in MC3T3-E1 cells at all concentration ; the greatest response occurred at 4  $\mu$ M. \* denotes groups significantly different at the 0.050 level.



**Fig. 5.** The effects of sodium orthovanadate on alkaline phosphatase activity in osteoblast ( MC3T3 -E1 cells ). MC3T3-E1 cells cultured 5 days and treated with sodium orthovanadate for 2 day2. The ALP activity was assayed by the method of Lowry with disodium phenyl phosphate as substrates. Significance level was calculated with Kruskal-Wallis 1-way ANOVA ( $P < 0.001$ ).

\* denotes groups significantly different at the .050 level.



**Fig. 6.** The effects of vanadium oxide on PTH stimulation of adenylate cyclase in osteoblast (MC3T3 -E1 cells). MC3T3-E1 cells cultured 2 days and treated with vanadium oxide for 3 days. cAMP formation was measured by Radioimmuno Assay (RIA). Significance level was calculated with Kruskal-Wallis 1-way ANOVA ( $P < 0.01$ ).

\* denotes groups significantly different at the .050 level.

**Table 4.** The effects of Vanadium oxide on PTH stimulation of adenylate cyclase in osteoblast(MC3T3-E1 cells)

Vanadium oxide ( $\mu$ M)	Cyclic AMP (nmol/L/mg protein 5 min)	
	Basal	PTH (50 nM)
0	1.82	46.11 $\pm$ 8.17
5		25.28 $\pm$ 5.95
10		12.54 $\pm$ 2.29

Effects are shown as mean $\pm$ SD of 6 replicates. MC3T3-E1 cells cultured 2 days and treated with vanadium oxide for 3days. cAMP formation was measured by Radioimmuno Assay(RIA). Significance level was calculated with Kruskal-Wallis 1-way ANOVA (P<0.01). Vanadium oxide showed the tendency of inhibitory effects on cAMP responsiveness to PTH in MC3T3-E1 cells. Each group significantly different at the 0.050 level.

과는 0.050 수준에서 통계적인 유의성을 나타내었다.

5. Sodium orthovanadate군의 부갑상선 호르몬에 의한 cyclic AMP의 합성능 측정

조골세포에서 부갑상선 호르몬(PTH)에 의한 c-AMP 합성능에 sodium orthovanadate가 미치는 효과를 관찰한 결과는 Table 5, Fig. 7과 같다. sodium orthovanadate와 PTH를 첨가하지 않은 군에서는 1.82 nmol/L/mg protein 5min을 나타내었고 PTH만 첨가한 군에서는 46.10 $\pm$ 8.17 nmol/L/mg protein 5min을 나타내었다. sodium orthovanadate를 첨가 하였을때 5 $\mu$ M에서 36.20 $\pm$ 10.34, 8 $\mu$ M에서 26.69 $\pm$ 4.82nmol/L/mg protein 5min을 나타내어 조골세포에서 PTH에 대한 c-AMP생성이 억제되는 양상을 나타내었다. 대조군과 8 $\mu$ M의 농도의 결과에서 0.050 수준에서 통계적인 유의성을 나타내었다.

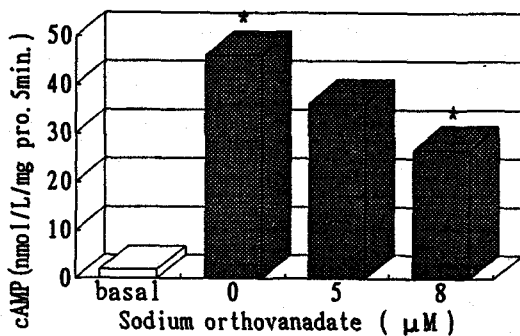
6. Vanadium oxide군의 Northern blot 분석에 의한 제 I형  $\alpha$ 2 교원질의 mRNA발현능  
조골세포의 가장 중요한 기능인 교원질 합성을 위한 m-RNA생성능에 대한 vanadium oxide의 영향에 대한 실험 결과는 Table 6, Fig.8, Fig.9, Fig.10과 같다.vanadium oxide는 10 $\mu$ M, 20 $\mu$ M농도에서 조골세포의 제I형  $\alpha$ 2 m-RNA의 발현량을 감소 시켰다.

7. Sodium orthovanadate군의 Northern blot 분석에 의한 제 I형  $\alpha$ 2 교원질의 mRNA발현능  
조골세포의 가장 중요한 기능인 교원질 합성을 위한 m-RNA생성능에 대한 sodium orthovanadate의 영향에 대한 실험 결과는 Table 7, Fig.11, Fig.12, Fig.13 과 같다. sodium orthovanadate는 5 $\mu$ M, 10 $\mu$ M농도에서 조골세포의 제I형  $\alpha$ 2 m-RNA의 발현을 약간 증가 시켰다.

**Table 5.** The effects of Sodium orthovanadate on PTH stimulation of adenylate cyclase in osteoblast(MC 3T3-E1 cells)

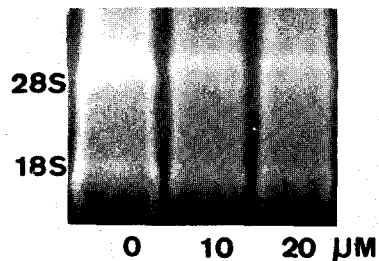
Sodium orthovanadate ( $\mu$ M)	Cyclic AMP (nmol/L/mg protein 5 min)	
	Basal	PTH (50 nM)
0	1.82	46.10 $\pm$ 8.17*
5		36.20 $\pm$ 10.34
8		26.69 $\pm$ 4.82*

Effects are shown as mean $\pm$ SD of 6 replicates. MC3T3-E1 cells cultured 2 days and treated with sodium orthovanadate for 3days. cAMP formation was measured by Radioimmuno Assay(RIA). Significance level was calculated with Kruskal-Wallis 1-way ANOVA (P<0.01). Sodium orthovanadate showed the tendency of inhibitory effects on cAMP responsiveness to PTH in MC3T3-E1 cells. \* denotes groups significantly different at the 0.050 level.

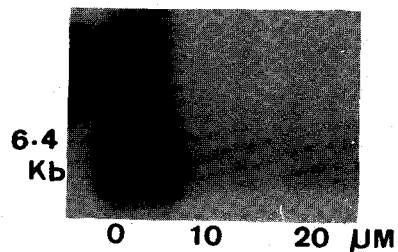


**Fig. 7.** The effects of sodium orthovanadate on PTH stimulation of adenylate cyclase in osteoblast (MC3T3-E1 cells). MC3T3-E1 cells cultured 2 days and treated with sodium orthovanadate for 3 days. cAMP formation was measured by Radioimmuno Assay (RIA). Significance level was calculated with Kruskal-Wallis 1-way ANOVA (P<0.01).

\* denotes groups significantly different at the .050 level.



**Fig. 8.** Expression of 18S, 28S rRNA with Et. Br. under UV light.



**Fig. 9.** Representative Northern blot analysis of type I  $\alpha$  2 collagen mRNA according to the effects of various concentration of Vanadium oxide in MC3T3-E1 cells.



**Table 6 .** The effects of vanadium oxide on type I  $\alpha 2$  collagen mRNA in osteoblast( MC3T3-E1 cells)

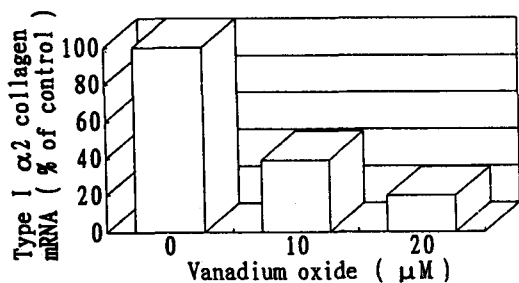
Vanadium oxide ( $\mu\text{M}$ )	Type I $\alpha 2$ collagen mRNA (% of control)
0	100.00
10	38.9
20	19.5

MC3T3-E1 cells cultured 5 days and treated with vanadium oxide for 1 day. Type I  $\alpha 2$  collagen ribonucleic acid (mRNA) expression was studied by Northern blot analysis. Effects are shown as % of control.

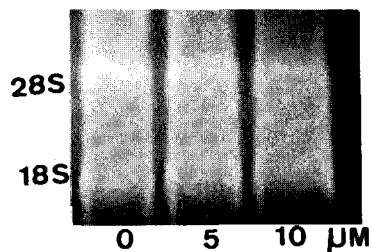
**Table 7 .** The effects of Sodium orthovanadate on type I  $\alpha 2$  collagen mRNA in osteoblast(MC 3T3-E1 cells)

Sodium orthovanadate ( $\mu\text{M}$ )	Type I $\alpha 2$ collagen mRNA (% of control)
0	100.00
5	117.22
10	111.92

MC3T3-E1 cells cultured 5 days and treated with sodium orthovanadate for 1day. Type I  $\alpha 2$  collagen ribonucleic acid (mRNA) expression was studied by Northern blot analysis. Effects are shown as % of control.



**Fig.10.** The effects of vanadium oxide on type I  $\alpha 2$  collagen mRNA in osteoblast (MC3T3-E1 cells). MC3T3-E1 cells cultured 5 days and treated with vanadium oxide for 1 day.



**Fig.11.** Expression of 18S, 28S rRNA with Et. Br. under UV light.

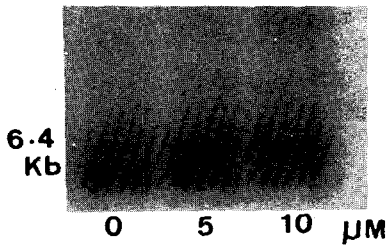


Fig.12. Representative Northern blot analysis of type I  $\alpha$  2 collagen mRNA according to the effects of various concentration of sodium orthovanadate in MC3T3-E1 cells.

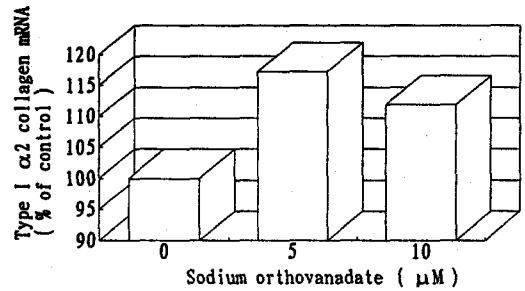


Fig.13. The effects of sodium orthovanadate on type I  $\alpha$ 2 collagen mRNA in osteoblast (MC3T3-E1 cells). MC3T3-E1 cells cultured 5 days and treated with vanadium oxide for 1 day. Type I  $\alpha$  2 collagen ribonucleic acid (mRNA) expression was studied by Northern blot analysis. Effects are shown as % of control.

IV. 총괄 및 고안

조골세포에 관한 연구는 조직 화학적, 생화학적, 분자생물학적 그리고 전자현미경적 방법으로 시행되고 있는데 본 연구는 생화학적 방법과 분자생물학적 방법에 의한 조골세포의 활성도를 실험한 것이다.

최근 급속한 발전을 보이고 있는 세포 생물학의 연구들에 의하면 골 개조에 관련된 세포는 전신적 인자 및 국소적 인자에 의해 영향을 받아 해당 세포의 유전자 발현이 조절됨으로서 골 개조가 이루어 진다는 사실을 지적하여 왔다.

골 개조에 관한 세포내 생화학적 변화를 야기시키는 인자로는 전신적 인자와 국소적 인자로 구분되어 지적되어 왔다. 전신적 인자로는 여러 종류의 호르몬과 vitamin 이 관계되나 교정력에 의한 치아의 이동과 같은 국소적 골대사에는 그 부위에서 생성되는 국소인자의 중요성이 강조되고 있다. 국소적 인자에 관한 연구에서 Mostafa<sup>7)</sup> 등, Davidovitch<sup>9)</sup> 등 그리고 Ngan<sup>8)</sup> 등은 세포내 이차전령물질인 cAMP 의 역할에 관해 논하였으며, Prostaglandin 의 투여는 파골세포의 출현을 자극시켜 치아이동을 촉진시키고<sup>24)</sup> fluoride 의 투여는 파골세포의 출현이 감소되어 치아이동이 느려짐이 관찰되었다<sup>10)</sup>. 그 결과 치아이동과 관련된 골 개조에서 나타나는 세포내 생화학적 변화의 이해와 연구가 교정학 분야에서 증가

되고 있으며 교정력과 관련된 세포운동학 (cell kinetics) 에 관한 연구가 시행되어 왔다.

골대사와 관련된 미량원소에는 불소(Fluoride, F)<sup>26,27)</sup>, Magnesium, Silicon, Copper, Iron, Manganese, Nickel, Zinc 등이 있으며 이중 불소는 골구성 무기성분중의 하나인 불소인회석(Fluorapatite) 합성에 필수성분이며 조골세포의 증식과 DNA 합성을 촉진하며 파골세포의 활동을 억제하여 골 흡수를 억제하며 골교원질의 합성도 촉진하는 것으로 알려져 있다. Silicon은 Apatite가 골기질에 침착되는 것을 도와주며 Nickel과 Zinc는 핵산과 단백질구조를 안정화 시키는 작용을 하는 것으로 알려져 있다<sup>1)</sup>.

임상적으로 골다공증과 관련하여 골 형성을 자극 시키는 약물로써 불소와 anabolic steroids 등이 있고 골 흡수 억제 약물로써 Calcitonin, ascorbic acid with Ca<sup>++</sup>, Vitamin D, Estrogen 등이 있으며 골다공증 예방법으로써 Vitamin D 와 Vitamin D 대사물질, Calcium, Fluoride, Calcitonin 등이 사용된다. K. H. William<sup>15)</sup> 등은 강력한 골 형성물질인 불소는 조골세포의 유사-산성인산분해효소인 phosphotylosyl protein phosphatase의 활동성을 억제하여 조골세포의 증식을 자극함으로써 골 형성을 촉진한다고 하였다.

인체에 필요한 미량원소중 vanadium도 phosphotylosyl protein phosphatase 에 대한 억제효과를 나타내어 골세포의 증식을 나타내는것으로 알려져 있다. 그리고 vanadium은 성장을 촉진하며 조골세포의 증식을 촉진하고 파골세포의 활동성을 감소시키며 골조직으로부터의 calcium유리를 억제하여 골파괴를 억제하는 효과를 가지고 있다.

vanadium은 필수 미량원소로써 성장과 골대사에 중요한 생물학적 효과를 가지고 있으며 성인에있어 하루 약 2mg이 필요하며 평균섭취량은 17-43mg정도로 알려져 있다<sup>13)</sup>.

본 연구는 vanadium이 골대사에 미치는 영향을 연구하기 위하여 시행하였으며 vanadium이 조골세포의 증식능과 기능에 주는 효과를 실험하였다. 본 연구에서는 여러종류의 조골세포중 Kodama등<sup>21)</sup>에 의해 신생쥐 (C57BL/6) 두개골에서 얻은 MC3T3-E1세포를 사용하였다. MC3T3-E1 세포는 섬유아세포와 유사한 형태를 가지며 배양 4-5일 후에 단층의 세포층을 형성하고, 7일 이상 배양하면 교원질을 합성하고, 3주 이상 배양하면 골기질의 석회화를 관찰할 수 있다.

조골세포의 석회화능과 관련하여 본연구를 시행함에 앞서 MC3T3-E1 cell 을 장기 배양하여 그 석회화능을 관찰 하였다. 일차 배양시의 완전 배양액상에서 25일 이상 배양한후 Von Kossa 염색<sup>27)</sup>을 시행하여 광학 현미경 하에서 석회화를 관찰 하였으나 현저한 석회화상은 관찰 할수 없었다( Fig.14 a, b ).

그러나 본세포는 PTH에 의한 cAMP 반응 실험에서 기저치 1.82nmol/L/mg protein 5min에 비해 50nM의 PTH로 처리한 군에서 현저한 cAMP의 증가( 46.11 nmol/L/mg protein 5min )를 나타내 조골세포의 특성을 갖춘 세포로서 조골세포연구에 유용한 세포로 판단 되었다.

본 연구에서 vanadium oxide는 농도증가에 비례하여 조골세포주 MC3T3-E1세포의 DNA합성능을 증가시켰다( Table 1, Fig.3). 혈청의 효과를 최대한 배제한후 24시간동안 vanadium에 노출시켰으며 2μM에서 200μM까지 농도를 증가 시킴에 따라 <sup>3</sup>H Thymidine incorporation이 비

례적으로 증가되었다. 김과 정 등<sup>28)</sup>은 sodium orthovanadate가 조골 세포주 MC3T3-E1의 DNA 합성을 증가시켰으며 2μM에서 8μM까지 농도가 증가 함에따라 유의성있는 증가를 관찰 하였다. 그러나 10μM농도에서는 최고치를 나타낸 8μM농도보다는 적지만 역시 대조군에 비하여 현저한 DNA합성 증가를 나타내고 있다.

Canalis E<sup>11)</sup> 는 쥐의 두개골조직에 대하여 sodium orthovanadate는 0.1-10μM 농도, 96시간 배양에서 <sup>3</sup>H Thymidine incorporation이 29-38%가량 증가된것을 보고하였고, 시행한 실험의 80%에서 이같은 결과를 나타내었다. sodium orthovanadate에 노출된 시간을 달리하였을 때는 24시간 배양시 최대의 <sup>3</sup>H Thymidine incorporation 증가를 관찰 하였다. 즉 DNA생성을 증가시켜 세포증식을 촉진 시키는 것을 알수 있다. 10μM 농도 이상에서는 DNA합성, 단백질 합성등에 비가역적인 억제효과를 나타내었고, sodium orthovanadate는 두개골조직의 DNA합성능과 교원질합성능, 비교원성단백질의 합성능을 촉진시켰고 염기성인산분해효소에 대하여는 자극효과가 적었다고 하였다.

이상으로 미루어 보아 vanadium oxide나 sodium orthovanadate등의 화합물 형태에 관계없이 vanadium 은 조골 세포에 대하여 <sup>3</sup>H Thymidine incorporation을 증가 시킴으로써 DNA 합성을 촉진하고 세포의 증식을 촉진함을 알수 있었다.

sodium orthovanadate의 형태로써의 vanadium은 저농도(0.1 μM)에서 고농도 ( 10 μM )까지 DNA 합성을 증가 시키지만 10 μM 이상의 농도에서는 비가역적인 억제효과를 나타냄으로써 10 μM 이상에서는 sodium orthovanadate가 오히려 세포증식을 억제 하는 것을 알수 있다. 이에 반해 vanadium oxide는 저농도에서 고농도 (20 μM )에 이르기까지 <sup>3</sup>H Thymidine incorporation을 증가시켜 비교적 넓은 범위에서 DNA 합성을 촉진하고 세포의 증식을 촉진함을 알수 있었다. 즉 세포 증식을 위한 vanadium투여시 과량투여에 의한 억제작용을 방지하기 위해서는 vanadium oxide형태가 유용할것으로 보

이다. 그러나 그 효율성에 관한 연구는 더욱 진행되어야 할 것으로 생각된다.

조골세포의 증식에 대한 기전은 명확하지는 않지만 성장인자는 세포막에 존재하는 고유 수용체와 결합하여 intrinsic tyrosyl protein kinase를 활성화 시켜 주요단백질의 tyrosyl protein phosphorylation을 촉진하여 조골세포의 증식을 촉진하며 vanadium은 phosphotyrosyl protein phosphatase의 활성을 억제하여 주요인산단백질의 dephosphorylation을 감소시켜 지속적인 보다 강력한 세포증식효과를 가져온다는 가설이 제시되고 있다.<sup>16)</sup>

염기성 인산분해효소는 인과 Calcium을 축적시키는 기능을 가지며 석회화가 일어나는 곳에 현저히 증가되는 효소이다. Thomas C. R.<sup>29)</sup>는 chicken epiphyseal cartilage에서 vanadate가 염기성 인산분해효소를 억제함으로써 calcium과 인의 흡수가 억제되었다고 하였다.

염기성 인산분해효소는 조골세포의 기능을 나타내는 지표이며 골의 석회화 과정과 관련되어 있는 효소로서 혈관과 경조직 형성세포의 세포막에 널리 분포되어 있다.

염기성 인산분해효소는 비교적 강한 결합조직에서 기질낭포와 관련하여 나타나고, 특히 석회화 조직에서 석회화 형성 초기에 현저히 증가되며, 이 효소는 phosphate이온을 가수 분해하고 석회화 과정에 관여하며 세포막에서는 이온이동을 담당하는 것으로 추정된다.<sup>31)</sup>

vanadium은 염기성인산분해효소에 대하여 억제효과를 가지는데 이는 조골세포의 활동성의 저하를 반영한다.

본 연구에서 나타난 vanadium oxide의 조골세포에서 염기성 인산분해효소의 활성도에 대한 영향은 2 $\mu$ M과 6 $\mu$ M에서 약간 증가를 나타냈을 뿐 대체로 억제된 양상을 나타내었다.

sodium orthovanadate의 조골세포에서의 염기성 인산분해효소의 활성도에 대한 영향은 실험한 모든 농도에서 활성도가 증가하였으며 4 $\mu$ M농도에서 최고치를 나타내었으나 6 $\mu$ M농도와 10 $\mu$ M농도에서는 그 증가정도가 다소 둔화된 양상을 나타내었다.

즉 6 $\mu$ M농도에서 둔화되었던 증가량이 다시 8 $\mu$ M농도에서 회복되었다가 10 $\mu$ M농도에서 다시 둔화되는 양상을 나타내었다.

K. H. William<sup>15)</sup>은 chicken embryos의 두개관 세포를 이용한 배양 실험에서 sodium orthovanadate가 bone cell alkaline phosphatase를 증가시켰으며 2 $\mu$ M에서 10 $\mu$ M까지 vanadate의 농도 증가에 따라 alkaline phosphatase활성도 증가를 나타내어 본연구와 다소 상이한 결과를 나타내고 있다.

Yamaguchi<sup>31)</sup>는 vanadium pentoxide(1.0-20.0  $\mu$ mol V/100g b.wt)를 경구 투여한 쥐에서 serum calcium 농도가 현저히 증가하였음을 관찰하였다. Bone ALP의 활성도는 (1.0-20.0  $\mu$ mol V/100g b.wt) 현저히 증가하였으나 bone acid phosphatase 활성도에는 큰 변화를 주지 못하였으며, bone DNA합성은 (1.0-10.0  $\mu$ mol V/100g b.wt) 현저히 증가함을 관찰하였다. Bone calcium의 양은 vanadium 투여시 큰 변화를 주지 못하였다. 그러나 serum calcium이 현저히 증가함으로써 (20.0  $\mu$ mol V/100g b.wt) vanadium이 고농도에서 오히려 골을 흡수하는 경향을 나타내었다.

그러나 zinc와 vanadium을 복합 투여하였을 때 bone ALP, DNA, calcium의 양이 현저히 증가함을 관찰하였다. 즉 쥐에서 vanadium이 저농도에서 골 형성에 영향을 주는 역할을 하였고, 고농도 투여시 골 형성을 억제하는 등의 독작용이 발생하는데 이러한 부작용을 Zinc의 투여로 예방할 수 있음을 증명하였다.

본연구에서도 vanadium이 ALP자체에 대한 억제작용을 나타내었으나 저농도의 vanadium에서는 오히려 대조군에 비하여 높은 ALP활성도를 나타냄으로써 vanadium이 ALP자체에 대한 억제 작용은 있으나 세포증식을 촉진 하는 농도에서 세포수 증가에 의한 염기성인산분해효소의 활성이 증가된 결과를 나타내었다.

Canalis, E.<sup>11)</sup>는 vanadium이 염기성인산분해효소에 대하여 억제효과를 가지는데 이는 조골세포의 활동성의 저하를 반영하며 농도에 따라 vanadium의 염기성인산분해효소 자체에 대한

억제능보다 세포수 증가에 의한 염기성인산분해효소의 활성이 더 클 경우에는 효소활성도가 증가된 결과를 나타내기도 하지만 vanadate의 염기성인산분해효소에 대한 자극효과는 매우 적다고 하였다.

vanadate는  $Na^+$ -and  $K^+$ -stimulated ATP( $Na, K$ -ATPase)와 염기성인산분해효소등의 인산가수분해효소에 대하여 억제효과를 가지고 있다. vanadate의  $Na, K$ -ATPase에 대한 억제효과가 골 흡수를 억제하는 효과를 나타낸다. 즉 골조직으로부터  $Ca^{++}$ 이 유리되려면 sodium과 calcium의 교환이 필요하고 이과정에서 부갑상선호르몬등이 sodium의 이동에 보조적 역할을 담당하여 골 흡수를 촉진 시키게 된다. 이과정에서 필요한  $Na, K$ -dependant adenosin triphosphate( $Na, K$ -ATPase)가 vanadium에 의하여 억제되어 골 흡수촉진이 억제되는 것이다.

Nancy<sup>19)</sup> 등은 4-6일된 신생쥐의 두개골조직을 이용한 실험에서 vanadate를  $10 \mu M$  농도로 첨가한군과 첨가하지 않은 군에 prostaglandin  $E_2$ 와  $1,25(OH)_2D_3$ , 부갑상선 호르몬등을 각각 첨가하여 media로 유리되는 calcium의 양을 측정 한 결과 vanadate로 처리한 모든 군에서 Calcium의 유리가 감소 되는것을 관찰 하였다. 즉 vanadate의  $Na, K$ -ATPase에 대한 억제의 2차적 효과에 의하여 calcium유리가 감소되어 골 흡수가 억제되었다. 그러나 vanadate의 골 흡수 억제 기능이 특정 호르몬에 특이성을 나타내는 수용체에 대한 차단작용인지 아닌지 확실하지는 않다.

부갑상선 호르몬은 쥐의 두개골 조직에서 교원질 합성을 저하시키고 cAMP생성을 촉진시킴으로써 칼슘분비를 증가시키는데<sup>32,33)</sup>, prostaglandin 또한 fetal rat 의 장골이나 두개관 세포 배양시 같은 효과가 나타나며<sup>34,35)</sup> Vitamin  $D_3$ 역시 교원질 합성을 방해하고 골의 흡수를 유도한다<sup>36)</sup>.

부갑상선 호르몬(PTH)은 골조직에서 파골세포, 조골세포, 골세포등의 adenylyl cyclase를 활성화 시켜 cAMP의 농도를 증가시키며 골세포의 세포막에서는 증가된 cAMP에 의해 lysosomal

enzyme의 분비가 촉진되어 골용해를 가속화시킨다. 파골세포에 있어서는 cAMP가 골 흡수작용에 중요한 조절자로서 작용한다<sup>19)</sup>.

cAMP는 adenylyl cyclase라는 효소에 의해 ATP로부터 형성되며 혈액을 따라 순환하는 호르몬중 thyroxine과 steroid 호르몬을 제외한 호르몬들은 세포막을 통과하지 못하므로 세포막의 receptor들과 결합하여 adenylyl cyclase를 활성화시켜 cAMP를 생성하여 세포내에서 호르몬 작용을 나타나게 한다.

본 연구에서 세포내 이차 messenger인 cAMP의 생성반응에서는 기저치  $1.82nmol/mg$  protein 5min에 비해 부갑상선 호르몬을 첨가한 경우  $46.11 \pm 8.17nmol/mg$  protein 5min을 나타내어 부갑상선 호르몬에 대한 adenylyl cyclase의 생성촉진을 확인 할 수 있었다.

vanadium oxide로 처리한 군에서는  $5 \mu M$ 농도에서  $25.28 \pm 5.95nmol/mg$  protein 5min,  $10 \mu M$ 농도에서  $12.54 \pm 2.29nmol/mg$  protein 5min을 나타내어 vanadium이 조골세포에서 부갑상선 호르몬에 대한 adenylyl cyclase 합성을 억제하는 것으로 나타났다.

또한 sodium orthovanadate로 처리한 군에서는  $5 \mu M$ 농도에서  $36.20 \pm 8.17 nmol/mg$  protein 5min,  $8 \mu M$ 농도에서  $26.69 \pm 4.82 nmol/mg$  protein 5min를 나타내어 sodium orthovanadate가 조골세포에서 부갑상선 호르몬에 대한 adenylyl cyclase system을 차단하는 경향을 보여 주었다.

즉 vanadium은 조골세포주 MC3T3-E1세포의 PTH receptor에 손상을 주어서 부갑상선 호르몬에 대한 조골 세포의 반응을 감소 시키는데 이러한 작용에 대한 기전은 아직 확실하지 않다<sup>37)</sup>.

조골세포가 생산하는 교원질은 제I형 교원질이 대부분을 차지하고 있으며  $\alpha 1(I)$ 형과  $\alpha 2(I)$ 형의 두종류가 알려져 있다. 골 형성 과정은 I형 교원질이 세포내에서 합성된 후 세포외로 분비되어 섬유질로 합성된 다음 교원질을 형성하고, 이를 기질로 하여 여기에 수산화 인회석등의 무기질이 침착되는 순서로 이루어 지는데 교원질

은 처음에 조골세포에서 전구 교원질의 형태로 형성된다.

형성된 전구 교원질은 기질내로 분비된 후 다음 단계를 거쳐 교원질이 되고, 원섬유가 된 다음 교원 섬유질이 된다. 전구교원질은 양쪽 끝에 pro  $\alpha$  chains라고 알려진 peptides가 존재하며 제I형 교원질에서는 pro  $\alpha$ 1(I)과 pro  $\alpha$ 2(I)의 두 종류가 알려져 있다. pro  $\alpha$ 1(I)은 분자량이 약 2000dalton이며 globular amino terminal domain과 central collagen domain, short globular domain등 3개의 다른 구조적 영역으로 구성되어 있다<sup>1)</sup>.

$\alpha$ -chains에는 약 1000여개의 아미노산이 있으며 매 3번째 마다 glycine이 존재하는 (X-Y-Gly)<sub>n</sub>이 반복되는 구조로서 X와Y 위치에는 glycine이외의 amino acids가 위치하게 된다<sup>38,39,40,41)</sup>. 이들 아미노산들의 종류에는 glycine, alanine, proline, hydroxyproline등 20개 정도의 아미노산이 발견되었으며 proline과 hydroxyproline이 다량 함유되어 있다.

이들 X와Y 위치의 아미노산들은 각기 다른 유전자(genes)에 의해 생성되며 제I형 교원질의  $\alpha$ 1(I)형과  $\alpha$ 2(I)형 교원질의 유전자는 각각 17번과 7번 염색체(chromosome)에 위치하는 것으로 알려져 있다<sup>42)</sup>.

m-RNA는 한가닥으로 구성된 분자로서 DNA가 가지고있는 단백질 합성에 관한 정보를 전사하는 수단으로 세포내의 소포체에서 합성되는 단백질의 1차 구조인 염기서열을 정하는 역할을 한다.

m-RNA로부터 전사된 전구교원질의 pro  $\alpha$  chains은 O<sub>2</sub>, Fe<sup>2+</sup>, Ascorbic acid,  $\alpha$ -ketoglutarate 등에 의하여 hydroxylated 되어 완전한 3차원적 구조를 가지게 되면 신속하게 세포외로 방출된다. 세포외로 방출된 전구 교원질은 procollagen aminoprotease (amino peptides)와 procollagen carboxyprotease (carboxy propeptides) 등에 의하여 교원질로 전환된후 섬유질을 이루어 골기질을 형성하게 된다<sup>42)</sup>.

본연구에서는  $\alpha$ 2(I)형의 mRNA를 Northern blot 분석을 통하여 확인 하였는데, 이는 본연구

에 사용된 세포가 쥐의 두개관 조직에서 채취한 세포이고 쥐의 collagen  $\alpha$ 2(I)형 mRNA구조와 사람의 collagen  $\alpha$ 2(I)형 mRNA구조가 매우 유사한 것으로 알려져 있기 때문이었다.

본 연구에서 Northern blot분석으로 확인된 Type I  $\alpha$ 2 교원질 mRNA는 vanadium oxide를 넣지 않은 군을 기준으로하여 vanadium oxide를 10 $\mu$ M농도로 첨가한 군에서는 38.9%, 20 $\mu$ M농도로 첨가한 군에서는 19.5%로 현저히 감소하는 양상을 나타내었다.

반면에 sodium orthovanadate를 넣지 않은 군을 기준으로 하여 sodium orthovanadate를 5 $\mu$ M농도로 첨가한 군에서는 117.22%, 10 $\mu$ M 농도로 첨가한 군에서는 111.92%로 증가하였다.

김과 정<sup>28)</sup>은 sodium orthovanadate가 조골세포의 교원질 합성에 미치는 영향에 관한 연구에서 대조군에 대하여 sodium orthovanadate의 5 $\mu$ M, 10 $\mu$ M 농도에서 농도가 증가함에 따라 교원질 합성과 총단백질 합성의 증가를 관찰 하였으며 총단백질중 교원질이 차지하는 비율도 증가를 나타내어 vanadate가 조골세포의 교원질 합성을 촉진 시킨다고 하였다<sup>28)</sup>.

본연구에서는 sodium orthovanadate가 조골세포에 대하여 총 RNA에서 Type I  $\alpha$ 2 collagen mRNA이 차지하는 비율을 크게 변화 시키지는 못하였으나 약간의 증가를 나타 내었으며 vanadium oxide로처리한 군에서는 오히려 감소를 나타내었는데 이는 vanadium oxide가 비록 DNA 합성을 촉진 시키는 농도 이지만 고농도(10 $\mu$ M 이상)에서는 mRNA합성 비율이 낮아짐을 보여 주었다. 그러나 vanadium oxide가 10 $\mu$ M이하의 저농도 특히 2 $\mu$ M과 6 $\mu$ M농도에서의 조골세포의 교원질 mRNA의 합성을 증가 시키는 여부를 본연구에서는 밝히지 못하였으므로 이에 대한 연구는 더욱 진행 되어야 할 것으로 생각된다.

Canalis E.<sup>12)</sup>는 쥐의 calvariae의 배양시 sodium orthovanadate를 첨가하여 교원질 합성의 증가를 관찰 하였다. 그는 vanadate의 교원질합성에 대한 효과가 일차적으로는 조골세포의 증가에 의한 것이고 이차적으로는 전구조골세포의 복제를 자극한 결과라고 주장하였으나 이를 뒷

받침 할만한 증거는 없다고 하였다. 본 연구에서는 비교적 고농도의 vanadium oxide가 조골세포의 제I형  $\alpha 2$  교원질 mRNA의 생성을 억제하였고 sodium orthovanadate는 제I형  $\alpha 2$  교원질 mRNA의 생성을 약간 증가시켰다. Canalis의 주장과 이 결과를 비교할때 vanadium은 교원질의 세포자체 생산을 증가시킨다기 보다는 세포수 증가에 따른 교원질 총량의 증가를 통하여 조직내 교원질의 증가를 나타낼것으로 추정된다.

이상의 결과로 미루어 볼때 vanadium은 조골세포의 DNA 합성을 촉진하고 세포증식을 촉진한다. 세포내 광화능과 관련된 염기성 인산분해효소에는 효소자체에 대한 vanadium의 억제작용이 있으나 sodium orthovanadate의 경우 조골세포에서 염기성 인산 분해 효소의 생성을 증가 시켜 골광화에 도움을 주는 것으로 추측된다. 그러나 세포내 2차 messenger 역할을 하는 cAMP의 부갑상선 호르몬에 대한 생성은 억제되는 양상을 나타 내었다. 또한 조골세포의 중요한 기능인 교원질 합성을 위한  $\alpha 2(I)$  mRNA의 생성능 에서는 sodium orthovanadate의 경우  $10 \mu M$  이하의 농도에서 제I형  $\alpha 2$  교원질 mRNA의 생성의 증가를 가져 왔으나 vanadium oxide의 경우  $10 \mu M$  이상의 농도에서 오히려 제I형  $\alpha 2$  교원질 mRNA의 합성 비율을 낮추는 결과를 가져왔다.

위의 결과들은 혈청의 영향을 배제하여 vanadium 자체의 조골세포에 대한 영향만을 실험한 결과이므로 생체내에서도 동일한 결과를 나타낼 것인가는 의문시 된다.

그러므로 향후 실험동물을 이용하여 vanadium 이 조골세포의 활성화도에 미치는 영향을 규명하는 생체연구가 요청된다. 상악골의 열성장에 기인된 부정교합자에서 구개골 급속 확장술과 상악골 전방 견인술은 널리 이용되는 치료 방법 중의 하나이다. 이 장치들의 이론적 배경은 생역학적인 방법에 의해 조골세포를 자극하여 악골의 성장을 유도해 내고자 하는 것이다. 이러한 술식이 사용될 때 조골세포의 활성을 극대화시키는 국소적 인자가 첨가된다면 상악골의 성장 촉진에 기여할 수 있을 것이라는 가능성의 제시

와 치아이동후 치조골의 신속한 재형성을 통한 재발방지 효과에 본 연구의 결과가 응용될 수 있을 것으로 사료된다.

### V. 결 론

골 개조는 골 형성과 골 파괴를 통하여 일어나는 일련의 과정이다. 특히 골 형성은 조골세포가 증식, 분화되어 골기질을 형성한 후에 석회화물질의 침착과정을 통해 이루어진다. 이과정 중에는 여러 호르몬, 성장인자, 그외 미량원소들이 관여하는데 본 연구에서는 vanadium oxide와 sodium orthovanadate의 조골세포주의 DNA 합성능, 염기성 인산분해효소 활성화도, 부갑상선 호르몬에 의한 cyclic AMP의 합성능, 그리고 Northern blot 분석에 의한 제 I 형  $\alpha 2$  교원질의 mRNA 발현능등을 측정하였다.

연구결과는 다음과 같다.

1. vanadium oxide는 조골세포주 MC3T3-E1 세포의 DNA 합성능을 증가시켰으며 vanadium oxide의 농도가 증가함에 따라 성장촉진효과도 비례하여 증가하였다. 본 연구에서 vanadium oxide가  $20 \mu M$  농도일때 최대의 성장 촉진 효과를 나타내었다.
2. vanadium oxide의 조골세포의 성숙도와 석회화기능에 대한 영향을 알아보기 위하여 염기성 인산분해효소의 활성화도를 측정한 결과 vanadium oxide의 농도가  $2 \mu M$  일때가  $0.3313 \pm 0.0412$  (KA/mg protein)으로 가장 높았으며 대조군  $0.2766 \pm 0.0320$  (KA/mg protein)에 비해  $6 \mu M$  에서  $0.2937 \pm 0.0473$  (KA/mg protein)로 약간의 증가를 나타냄으로서  $2 \mu M$  과  $6 \mu M$  농도에서 증가를 나타 냈을뿐 그외의 농도에서는 억제된 양상을 나타내었다( $P < 0.01$ ).
3. sodium orthovanadate의 조골세포에 대한 염기성 인산 분해효소의 활성화도에 미치는 영향을 측정한 결과 실험한 모든 농도에서 대조군에 비해 높은 활성을 나타내었으며  $4 \mu M$  농도

- 에서 최고의 활성치를 나타내었다( $P < 0.001$ ).
4. vanadium oxide는 조골세포에 중요한 영향을 미치는 부갑상선 호르몬에 의한 cAMP생성능은 대조군에서  $46.11 \pm 8.17$ ,  $5 \mu\text{M}$ 에서  $25.28 \pm 5.95$ ,  $10 \mu\text{M}$ 에서  $12.54 \pm 2.29$  (nmol/L/mg protein 5min)을 나타내어 조골세포에서 PTH에 의한 c-AMP생성이 억제되는 양상을 나타내었다( $P < 0.01$ ).
  5. sodium orthovanadate가 조골세포에서 부갑상선 호르몬에 의한 cAMP생성능에 미치는 영향은 대조군에서  $46.11 \pm 8.17$ ,  $5 \mu\text{M}$ 에서  $36.20 \pm 10.34$ ,  $8 \mu\text{M}$ 에서  $26.69 \pm 4.82$  (nmol/L/mg protein 5min)을 나타내어 조골세포에서 PTH에 의한 c-AMP생성이 억제되는 양상을 나타내었다( $P < 0.01$ ).
  6. 조골세포의 가장 중요한 기능인 교원질 합성을 위한 m-RNA생성능에 대한 vanadium oxide의 영향은 대조군을 기준으로  $10 \mu\text{M}$  농도에서 38.9%로,  $20 \mu\text{M}$  농도에서는 19.5%로 각각 감소 하였다.
  7. 조골세포의 가장 중요한 기능인 교원질 합성을 위한 m-RNA생성능에 대한 sodium orthovanadate의 영향은 대조군을 기준으로  $5 \mu\text{M}$  농도에서 117.22%로,  $10 \mu\text{M}$ 농도에서는 111.92%로 각각 증가하였다.

이상의 결과로 보아 vanadate는 조골세포에 대하여 기본적인 세포증식과 복제기능을 촉진시키며 조골세포의 기능과 분화에도 적지 않은 영향을 미친다고 생각된다.

## REFERENCES

1. Janet V. : The Physiology of BONE : 3rd Ed., Clarendon Press, Oxford, 1981.
2. Takimoto K. et al : Histochemical detection of acid and alkaline phosphatases in periodontal tissue after experimental tooth movement. J. Dent. Res. 47:340, 1968.
3. Storey E. : The nature of tooth movement. Am. J. Ortho. 63:292, 1973.
4. Arendorf T. M. and Smith, C. J. : The effect of prostaglandin  $E_2$  on the alveolar bone and tooth root surface of mature hamster. J. Dent. REs. 58 (special issue C): 1245, Abstract No. 100, 1979.
5. Binderman I. and Cox, J. C. : Effect of mechanical stress on cultured periosteum cells : Stimulation of DNA synthesis. J. Dent. Res. 56(special issue B): B73, AADR Abstract No. 86, 1977.
6. 안대식, 이종훈, 양원식 : 교정력에 의한 치조골의 cyclic AMP에 관한 연구. 대치교지 : Vol. 11, No. 1, 7-15.
7. Mostafa Y. A., et al : Orchestration of tooth movement. Am. J. Orthod., 83, 245-250, 1983.
8. Ngan P. W., et al : Immunohistochemical assessment of mRNA levels in periodontal ligament fibroblasts in vitro. J. Dent. Res. 66, 357, 1987.
9. Davidovitch Z., 이기수, Zwilling B.S., Lanese R.R., Schanfeld J.L. : 교정적 치아이동시 부갑상선 홀몬이 긴장측 치주세포의 cAMP 농도에 미치는 영향, 대치교지 Vol 16:(1) 51-70, 1986.
10. Eva Helsing, Lars Hammarström. The effects of pregnancy and fluoride on orthodontic tooth movements in rats. EJO,13,223-230,1991.
11. Canalis,E.:Effects of sodium vanadate on deoxyribonucleic acid and protein synthesis in cultured rat calvariae, Endocrinology. 116(3)855-856, 1985.
12. Mertz,W.:The essential trace elements, Science, 213: 332-1338,1981.
13. Klaus Schwarz, David B. Milne : Growth effects of vanadium in the rat, Science, Vol.174: 426-428,1971.
14. Jones T .R. and Reid T.W.:sodium orthovanadate stimulation of DNA synthesis in Nakano mouse lens epithelial cells in serum free medium, J. Cell. Physiol. 121:199-205,1984.
15. Lau,K.H.W., Tanimoto,H. and Baylink,D.J.:vanadate stimulates bone cell proliferation and bone collagen synthesis in vitro, Endocrinology, 123 : 2858-2867, 1988.
16. Kathleen G. Mountjoy, Jefferey S. Flier : vanadate Regulates Glucose Transporter (Glut-1) Expression in NIH3T3 Mouse Fibroblasts. Endo.Vol 127. No4. 20 25-2034,1990.
17. Swarup,G., Speeg,K.V., Cohen,S. and Garber,D.L. : Phosphotyrosyl proteinphosphatase of TCRC-2 cells, J. Biol. Chem. 257:7298-7301, 1982.
18. Simon,T.J.B. : vanadate-a new tool for biologist, Nature. 281:337-338, 1979.
19. Nancy S. K., A.H.Tashjian,Jr. : Inhibition of stimulated bone resorption by vanadate. Endo.Vol.113 No. 1, 324-328,1983.
20. Krieger,N.S. and Tashjian,A.H. : Inhibition of stimulates bone resorption by vanadate. Endocrinology.



- 113:324-328,1983.
21. Kodama H., Amagai Y., Sudo H., Kasai S., Yamamoto S., : Establishment of clonal osteogenic cell line from newborn mouth calvaria. *Jap. J. Oral. Biol.* 23: 899- , 1981.
  22. Lowry, O. B., et al : Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 255-260, 1951.
  23. Piotr C., Nicoletta S.: Single step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 16:156, 1987.
  24. Kenici Yamasaki, Yasunori Shibata, Satoshi Imai, Yuji Tani, Yoshinobu Shibasaki, Tatsuo Fukuhara. : Clinical application of prostaglandin E<sub>1</sub> (PGE<sub>1</sub>) upon orthodontic tooth movement. *Am. J. Orthod.* 85:508 - 518, 1984.
  25. 황정빈, 정규립 : sodium fluoride가 조골세포주 MC3T3-E1의 제 I형 교원질 mRNA에 미치는 영향에 관한 연구. *대한치과교정학회지*. Vol. 23, No. 3, 415-426, 1993.
  26. Farley, J.R., Wedgedal, J.E. and Baylink, D.J.: Fluoride directly stimulates proliferation and Alkaline phosphatase activity of bone forming cell, *Science*. 222:330-332, 1983.
  27. Masaaki S., et al : Microcarriers facilitate mineralization in MC3T3-E1 cells. *Calcif. Tissue Int.* 43:19-25, 1988.
  28. 김원진, 정규립 : sodium fluoride 와 sodium orthovanadate 가 조골세포주 MC3T3-E1 에 미치는 영향에 관한 연구. *대치교지* : Vol. 21, No. 1. 97-110, 1991.
  29. Register, T.C. and Wuther, R.E. : Effect of vanadate a potent alkaline phosphatase inhibitor, on <sup>45</sup>Ca and <sup>32</sup>Pi uptake by matrix vesicle-enriched fractions from chicken epiphyseal cartilage, *J. Biol. Chem.* 259(6):3511-3518, 1984.
  30. Curran G. L., Azaronoff D. L., Bolinger R.E. : Effect of cholesterol synthesis inhibition in normocholesteremic young men. *J. Clin. Invest.*, 38 : 1251-1261, 1959.
  31. Yamaguchi M., et al : Effect of vanadium on bone metabolism in weanling rats : Zinc prevents the toxic effect of vanadium, *Res. Exp. Med. (Berl)*; 189(1); 47-53, 1989.
  32. Dietrich J. W., et al : Hormonal control of bone collagen synthesis in vitro : effects of parathyroid hormone and calcitonin. *Endocrinology* 98 : 943-949, 1976.
  33. Bringhurst F. R., and Potts J. T. : Bone collagen synthesis in vitro : structure/activity relations among parathyroid hormone fragments and analogs. *Endocrinology* 108:103-108, 1981.
  34. Raisz L. G., et al : Effect of prostaglandin endoperoxides and metabolites on bone resorption in vitro. *Nature* 267:532-534, 1977.
  35. Tashjian A. H. et al : Biological activities of prostaglandin analogues and metabolites on bone in organ culture. *Nature* 266:645-647, 1977.
  36. Raisz L. G. et al : Comparison of the effects of vitamin D metabolites on collagen synthesis and resorption of fetal rat bone in organ culture. *Calcif. Tissue Int.* 32:135-138.
  37. M.Kumegawa, E.Ikeda, S.Tanaka, T.Haneji, T.Yora, Y. Sakagishi, N.Minami, M.Hiramatsu. The effects of prostaglandin E<sub>2</sub>, parathyroid hormone, 1,25 Dihydroxycholecalciferol, and cyclic nucleotide analogs on alkaline phosphatase activity in osteoblastic cells. *Calcif Tissue Int*, 36 :72-76, 1984.
  38. John W., et al : Structure of the pro α<sub>2</sub>(I) collagen gene : *Nature* Vol 294 12 129-139, Nov 1981.
  39. Joan C. M., et al : Human and Chick α<sub>2</sub>(I) Collagen mRNA : Comparison of the 5' End in Osteoblasts and Fibroblasts : *Biochemistry* 27 3351 - 3356, 1988.
  40. Helena K., et al : Structure of a full-length cDNA clone for the proα<sub>2</sub>(I) chain of human type I procollagen. : *Biochem. J.* 252, 633-640, 1988.
  41. Jeanne C. M. et al : Analysis of the 3' End of the Human Pro-α<sub>2</sub>(I) Collagen Gene. : *J. Biol. Chem.* Vol. 258 No. 16. Issue of Aug. 25, 10128-10135, 1983.
  42. Wilson F. : Metabolic bone disease. *Text book of Endocrinology*. 7th ed. :1218.

- ABSTRACT -

## THE EFFECTS OF VANADIUM OXIDE & SODIUM ORTHOVANADATE ON MURIN OSTEOBLAST-LIKE (MC3T3-E1) CELLS

Ki-Youl Kwon, D.M.D., Kyu-Rhim Chung, D.M.D., M.S.D., Ph. D.

*Department of Orthodontics, College of Dentistry, Kyung Hee University*

Vanadium is an essential trace element but has not been identified with a specific biological role.

To study the direct effects of vanadium on osteoblast, we incubated murin osteoblast-like (MC3T3-E1) cells with various concentration of vanadium oxide & sodium orthovanadate.

This study was designed to investigate the effect of vanadium on DNA synthesis, alkaline phosphatase (ALP) activity, cAMP formation responsive to parathormone(PTH) and type I  $\alpha$  2 collagen ribonucleic acid (mRNA) level in murin osteoblast-like (MC3T3-E1) cells.

The cells were cultured in  $\alpha$ -minimal essential medium( $\alpha$ -MEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and then changed to 0.1% FBS with various concentration of vanadium oxide & sodium orthovanadate.

Quiescent cultured MC3T3-E1 cells incubated for 24 hours with 2,5,10,15,20  $\mu$ M vanadium oxide incorporated [<sup>3</sup>H]Thymidine; every concentration showed increases in [<sup>3</sup>H]Thymidine incorporations dose dependant manner, the greatest response occurred at 20  $\mu$ M.

Quiescent cultured MC3T3-E1 cells incubated for 3days with 2,5,10,15,20  $\mu$ M vanadium oxide, for 2days with sodium orthovanadate and alkaline phosphatase was assayed with disodium phenyl phosphate as substrate. Vanadium oxide increased the alkaline phosphatase content in MC3T3-E1 cells at 2  $\mu$ M & 6  $\mu$ M; the greatest response occurred at 2  $\mu$ M. But decreased at other content.

sodium orthovanadate increased alkaline phosphatase content in MC3T3-E1 cells at all concentration; the greatest response occurred at 4  $\mu$ M.

Quiescent cultured MC3T3-E1 cells incubated for 3days with 5,10  $\mu$ M vanadium oxide, with 5,8  $\mu$ M sodium orthovanadate and cAMP formation was measured by Radioimmunoassay(RIA). Vanadium oxide & sodium orthovanadate showed the tendency of inhibitory effects on cAMP responsiveness to PTH in MC3T3-E1 cells.

Quiescent cultured MC3T3-E1 cells incubated for 24hours with 10,20  $\mu$ M vanadium oxide, with 5,10  $\mu$ M sodium orthovanadate and Type I  $\alpha$  2 collagen ribonucleic acid (mRNA) expression was studied by Northern blot analysis. Northern blot analysis of vanadium oxide treated cells showed decreasing effects 0& sodium orthovanadate revealed increasing effects in type I  $\alpha$  2 collagen ribonucleic acid (mRNA) level.

KOREA J. ORTHOD 1994 ; 24(1) : 17-35.

**Key words** : Vanadate, Osteoblast

## 논문 사진부도

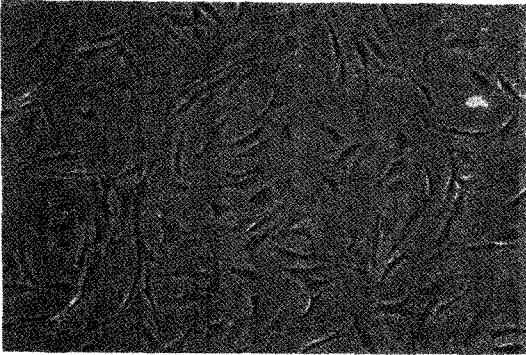


Fig. 1. Growth pattern of MC3T3-E1 osteoblast cell line in condition of primary cell culture medium on 10 hours. Note scattered spindle-shaped MC3T3-E1 cells. ( X 200)

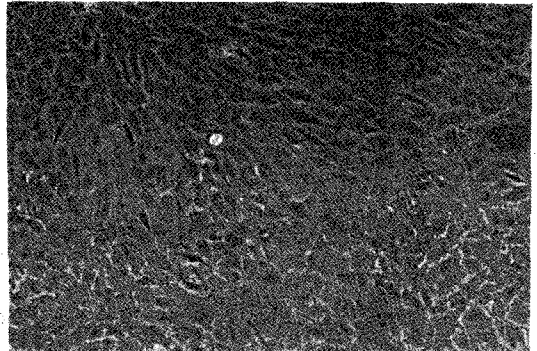


Fig. 2. Growth pattern of MC3T3-E1 osteoblast cell line in  $\alpha$ -minimal essential medium( $\alpha$ -MEM) with 10% fetal bovine serum(FBS) on 3-5 days. Note colonized osteoblasts and rounded polygonal shaped MC3T3-E1 cells. (X200)

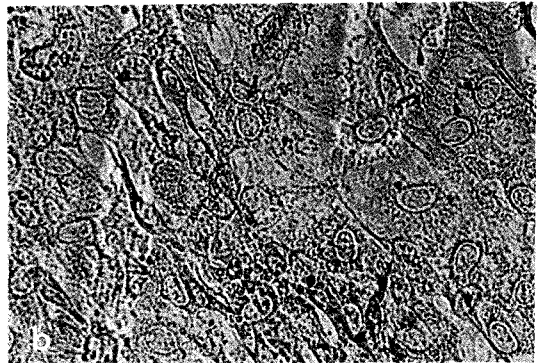


Fig. 14 Staining pattern at Ca using von Kossa's method in 25 days of culture in MC3T3-E1 cells. MC3T3-E1 cells cultured  $\alpha$ -minimal essential medium( $\alpha$ -MEM) with 10% fetal bovine serum(FBS) . MC3T3-E1 cells were stained not significantly by von Kossa's method. [(a) X200],[(b) X400]