

Interferon- γ 가 마우스 조골세포의 생물학적 활성에 미치는 영향에 관한 연구

이관훈 · 김정근 · 정진형

단국대학교 치과대학 치주과학교실

I. 서 론

조골세포(osteoblast)는 골기질을 합성하는 간엽세포로서 bone marrow colony forming units, 조상골세포(osteoprogenitor cell), 전조골세포(preosteoblast)에서 생성된다. 조골세포 계통세포(osteoblast lineage cell)에서 염기성 인산 분해효소(alkaline phosphatase, ALP)는 세포분화에 어느 정도 영향을 미친다. 조골세포의 기능과 분화가 전신적인 호르몬에 의하여 조절된다는 것은 정립되었으나, cytokines의 중요한 조절 역할은 명확히 평가되지 않았다. 생리 및 병리학적 조건에서 조골세포의 활동성을 연구하기 위한 여러 가지 방법이 기술되었는데, 이에는 골조직배양과 골생성세포 혹은 조골세포 유사세포계통이 포함되며 이들 세포는 쥐와 백서의 배골세포에서 생성되었거나 ROS/17과 UMR106과 같은 변형 세포주(transformed cell line)와 비변형 세포주(nontransformed cell line)로부터 형성되었다. 대부분 이런 계통의 세포들은 배양이 중단된 후에 미성숙증식세포나, 성숙된 조골세포유사세포로 되는 능력이 있다. 최근에는 정상인간 조골세포 배양방법이 여러 학자들에 의하여 발전되어 왔다.²⁾

조골세포는 골형성의 주된 세포 성분으로서 혹은 파골세포에 의한 골흡수의 조절자로서

작용한다.¹⁾ 최근까지는 파골세포양 골흡수에서 조골세포의 역할이 여러 연구논문의 주된 주제였다. 조골세포의 골기질 합성은 증식과 분화를 조절하는 여러 인자들에 달려있다. Osteopontin, osteonectin, alkaline phosphatase, osteocalcin, Type I procollagen 같은 조골세포 생산물은 골기질 합성에 중요한 역할을 한다. 많은 전신적 호르몬들이 조골세포의 증식과 분화, 기능을 조절하며 이에 osteopetric 호르몬, 스테로이드 호르몬, 성호르몬, 성장호르몬 등이 포함된다. 호르몬은 특수 수용체를 경유하여 직접적으로 조골세포에 영향을 주거나 cytokine에 의하여 간접적으로 영향을 미칠 수 있다.

Cytokine은 대식세포나 임파구에 의하여 생성되어 유리되고 여러 가지 세포활동을 조절하는 분자물질로 알려져 있다. 또한 성장인자는 세포분열이나 분화를 자극하거나 억제하는 세포에 의해서 생성된 단백질을 의미한다. Cytokines과 성장인자 모두 일반적인 생물학적 작용과 기전은 유사하나 cytokine이 생물학적 활동성을 좀더 정확하게 반영하고 성장인자로 분류되는 단백질을 포함하여 사용할 수 있다.³⁾

Cytokines은 한개 혹은 다수의 같거나 다른 폴리펩티드 사슬의 subunits로 구성되고 결합 단백질 혹은 다른 성장 인자와 연관되어 가끔

발견된다. Cytokines이 세포활동에 영향을 주는 기전으로는 paracrine effect, autocrine effect⁴⁾, endocrine effect, juxtacrine effect 등이 있고 더욱 더 많은 cytokine이 현재까지 발견되고 있다.

Interferon(IFN)은 바이러스 감염에 대해 세포저항을 유도하는 다기능의 cytokine이다⁵⁾. 즉 바이러스에 감염된 후에 세포내에서 생성되는 반응산물이며 신생 바이러스의 핵산합성을 방해함으로써 바이러스 증식을 억제하는 작용을 가진 인자이다. 또한 산(pH 2.0)에 안정되고 트립신에 잘 분해되며 투석되지 않는 염기성 단백질이다. 수년동안 항바이러스 작용은 IFN에 대하여 유일하게 인식되어온 생물학적 기능이었다. 현재는 IFN의 항바이러스 기능 뿐 아니라 세포의 성장과 분화에 대한 작용과 수많은 면역조절기능에 대하여 평가되고 있다. IFN은 Isaacs과 Lindenmann⁶⁾에 의하여 동종 혹은 이형의 바이러스 감염에 대하여 저항성을 유도할 수 있는 세포의 생산물로 처음 언급되었고, 오늘날 IFN- γ 라고 불리는 기능적으로 관련된 바이러스 억제 단백질이란 용어는 mitogen-activated T 임파구에 의해 생성된 IFN 유사물질로서 Wheelock⁷⁾에 의해 묘사되었다. Clemens⁸⁾은 IFN에 의한 세포의 증식과 분화의 조절에 대하여, Smith⁹⁾은 IFN-c가 교원질 합성에 미치는 영향에 대하여 보고하였다.

IFN- γ 는 활성화된 임파구, 단핵구, 섬유아세포에 의하여 생성된 당단백질이며 항바이러스, 면역방어효과가 있고, 여러 형태의 세포에도 영향을 준다. Amento¹⁰⁾은 synovial fibroblastlike cell에 대한 IFN- γ 의 영향에 대하여, Kuosmann¹¹⁾은 IFN- γ 에 의한 세포독성 능력의 유도에 대하여, Epstein¹³⁾은 IFN- γ 의 중요성에 대하여, Fujii¹²⁾은 골흡수에 대한 IFN- γ 의 장기간 억제효과에 대하여 연구 보고한 바 있다. IFN- γ 는 인간의 조골세포와 배서 조골세포에서 단백질 합성을 감소시킨다.

또한 이것은 인간과 배서두개관 조골세포배양에서 교원질 합성과 비타민 D에 의한 osteocalcin 합성을 억제하며 사람의 조골세포에서 염기성 인산분해효소 활성도를 증가시킨다. 그러나 조골세포가 IFN을 생산한다는 증거는 없다. 대부분의 환경에서 T 임파구는 IFN- γ 의 주요 근원이 된다.¹²⁾ Helper T cells은 suppressor T cell보다 IFN- γ 의 근원으로서 좀더 중요한 역할을 하는 것 같다. 수년동안 다른 IFN으로부터 IFN- γ 를 구별할 수 있게 한 유일한 특성은 pH 2에서 안정성의 결여⁷⁾와 명백한 항원적 특수성¹⁴⁾이었다. IFN- α/β (type I IFN) superfamily는 고전적인 IFN을 나타내며, type I IFN의 형성에 대한 첫번째 명확한 적용은 항원적으로 구분이 되는 인간의 백혈구와 섬유아세포로부터 유래된 IFN에 대해 시행한 연구였고¹⁵⁾, 백혈구와 섬유아세포 IFN을 IFN- α 와 β 로 표시하였다. 많은 서로 다른 형태의 세포들이 IFN- α 와 IFN- β 를 생산할 수 있다.

IFN의 중요한 형태는 백혈구에 의하여 생산되며 가끔 비조혈세포가 IFN- β 와 함께 여러 IFN- α subtypes의 혼합물을 생산하는 일도 흔하다.^{15, 16)}

Bacteria, mycoplasma, protozoa등의 구성성분은 단핵백혈구에서 IFN 생산을 자극할 수 있다. IFN- γ 는 임파구 활동성을 유도하는 여러 가지 처리방법에 의해 유도된 lymphokine이다.¹⁷⁾ IFN- γ 는 보통 Interleukin-2(IL-2)와 함께 협동적으로 유도되고, IL-2는 단핵구에서 유래된 IL-1과 같이 IFN- γ 의 생성에 긍정적인 조절 영향을 나타낸다.¹⁸⁾ IFN의 생물학적 특성 중에서 가장 광범위하게 연구된 것은 항 바이러스 효과와 관련된 것들이며, 최근에는 세포의 성장과 분화에 대한 IFN의 효과에 초점이 맞추어 지고 있다. 비록 세포 성장 억제효과가 IFN에서 가장 흔하게 나타나는 역할이지만 세포자극 효과에 대해서도 보고된 바 있다.¹⁹⁾

Recombinant human IFN- γ 로 처리한 인간의 synovial 혹은 피부 섬유아세포 배양에서 세포증식이 증가됨을 나타냈다.^{20, 21)} 다른 연구는 IFN- γ 가 mitogen-activated normal human B cell의 증식을 증가시켰음을 보고하였다.²²⁾ 이 작용은 면역글로브린 합성에 대한 IFN- γ 의 조절 기능과 연관된 것으로 보인다.²³⁾ 또한 건강한 개개의 세포와 조직에서 소량의 IFN- γ 가 생산된다는 증거도 있다. 이상과 같이 IFN이 다른 여러가지 조직과 세포에 미치는 영향에 대하여 그동안 수많은 연구가 진행되어 왔으며, 최근까지도 파골세포에 대한 IFN을 포함한 여러 cytokines의 국소적 인자로서의 역할에 대하여 학자들의 많은 연구가 있었다. 그러나 조골세포의 기능에 IFN- γ 가 어떤 영향을 미치는가에 대한 연구는 미진한 실정이다. 이에 저자는 IFN- γ 가 조골세포의 생물학적 활성에 미치는 영향을 알아보고자 본 연구를 시행하였다.

I. 실험 재료 및 방법

1. 조골세포의 배양

본 실험에 사용한 MC3T3/E1 세포(마우스 조골세포주)는 하버드 치과대학의 Hauschka 교수로부터 제공받았다. MC3T3/E1 세포가 60mm 조직 배양 접시에서 단층을 이룬 후 0.05% trypsin*과 0.5mM EDTA*를 첨가하고 15ml 원심분리용 용기에 세포를 모아 원심분리하여 세포를 모은 후 Hank's balanced salt solution(HBSS)*으로 세척하였고 약 $2-5 \times 10^5$ cells/dish가 되도록 60mm 조직 배양 접시에 분주하여 일주일 간격으로 계대배양하였다. 배양액은 10% fetal bovine serum(FBS)*, 100U/ml penicillin G*, 100 μ g/ml streptomycin sulfate*, 0.25 μ g/ml amphotericin B*가 포함된 -minimum essential medium(α -MEM)*을 사용하였고, 매 2-3일마다 교환하였다. 배양시

온도는 37°C, 습도는 95%를 유지하였고 계속하여 5% CO₂와 95% 공기를 공급하였다. 계대 배양을 하면서 실험목적에 따라 24 혹은 96-well plate** 또는 35mm 조직 배양 접시에 분주하여 실험에 이용하였다.

2. 조골세포의 생존률 측정

MC3T3/E1 세포를 96-well plate에 분주하여 단층으로 배양한 후 배양액내에 IFN- γ ***를 50, 500, 2500, 10000U/ml의 농도로 각각 처리하여 48시간 후 0.4% trypan blue*를 넣어 염색하였다. 광학현미경상에서 각 well의 특정 영역을 무작위로 선택하여, 전체 세포와 trypan blue에 염색되지 않고 생존하는 세포를 계수하여 그 비를 계산하는 방법으로 조골세포의 생존률을 구하였다.

3. 조골세포의 염기성 인산분해효소 활성도 측정

세포내의 염기성 인산분해효소 활성 측정을 위해 MC3T3/E1 세포를 96-well plate에 분주하고 단층으로 배양한 후 배양액내에 IFN- γ 를 농도별로 처리하거나 IFN- γ 와 2 μ g/ml의 cycloheximide****를 복합 처리하여 0.4% FBS가 포함된 α -MEM으로 96-well plate에서 48시간 혹은 일정시간에 따라 배양하였다. 배양이 끝난 후 배양액을 제거하고 인산완충생리 식염수(Dulbecco's phosphate buffered saline, D-PBS, pH 7)*로 2회 세척 후 0.1% Triton X-100/saline으로 상온에서 1시간동안 처리하였다.

세포처리액의 일정량을 염기성 인산분해효소의 기질인 무색의 PNPP(p-nitro-phenylphosphate)****와 pH 10.4의 glycine-NaOH buffer****와 함께 37°C에서 30분간 반응시켜 PNPP로부터 유리되어 나온 PNP(p-nitrophenol)의 흡광도를 spectrophotometer

(SLT Labinstyment)로 405nm에서 비색정량하였다. 세포처리액의 일부는 0.3mg/ml의 Bovine serum albumin(BSA)****을 표준용액으로 사용하여 Lowry 방법에 따라 단백질 양을 540nm에서 비색정량하였다.

4. 조골세포의 시험관내 석회화결절 형성 측정

MC3T3/E1 세포를 96-well plate에 분주하여 세포를 단층으로 배양한 후 매 2-3일마다 ascorbic acid(50 M)****와 β -glycerophosphate (10mM)****를 혼합한 신선한 배양액으로 교환하며 IFN- γ 를 50, 250, 500U/ml의 농도로 처리하여 21일간 배양하였다 배양이 끝난 후 배양액을 제거하고 D-PBS*로 2회 세척 후 D-PBS로 희석된 3.7% formalin을 넣어 5-10분간 세포를 고정하고 다시 D-PBS로 2회 세척한 후 von Kossa 염색을 시행하였다. 이를 위해 여과된 3% silver nitrate 용액을 넣어 직사광선에서 석회화결절이 보일 때까지 15-30분간 반응시켜 석회화결절을 염색하였다. 염색이 끝난 후 흐르는 물로 세척한 후 0.1% toluidine blue를 이용하여 짧게 대조염색을 시행하였다. 염색이 완료된 후 광학현미경상에서 석회화결절을 계수하였다.

5. 통계처리

염기성 인산분해효소 활성화도 실험과 von Kossa 염색을 이용한 대조군과 실험군간의 염기성 인산분해효소 활성화도 차이와 석회화결절수의 차이를 검증하기 위하여 Student's t-test를 이용하여 통계적 유의성을 평가하였다.

* Gibco/BRL, Grand Island, NY, USA

** Costar, CA, USA

*** Genzyme, Cambridge, MA, USA

**** Sigma, St. Louis, MO, USA

III. 실험 결과

1. 세포생존률

MC3T3/E1 세포를 96-well plate에 분주하고 IFN- γ 를 대조군을 0, 실험군은 50, 500, 2500, 10000U/ml의 농도로 각각 처리하여 세포 생존률을 검사한 결과 대조군에서는 세포생존율이 $94.3 \pm 1.3\%$ 였고 50, 500, 2500, 5000, 10000U/ml의 농도로 IFN- γ 를 처리한 실험군에서는 세포생존율이 $94.0 \pm 0.9\%$, $95.5 \pm 1.3\%$, $92.1 \pm 1.4\%$, $91.1 \pm 1.6\%$, $90.8 \pm 1.6\%$ 로 모든 농도에서 통계적으로 대조군에 비해 차이를 보이지 않아 세포생존률에는 영향을 미치지 않았다(Table 1).

Table 1. Effect of Interferon- γ on the viability of MC3T3/E1 cells in culture

Treatment(IFN- γ , U/ml)	% of viable cell
0	94.3 ± 1.3
50	94.0 ± 0.9
500	95.5 ± 1.3
2500	92.1 ± 1.4
5000	91.1 ± 1.6
10000	90.8 ± 1.6

Data represent Mean \pm SE (N = 6)

Table 2. Effect of interferon- γ on the alkaline phosphatase activity of MC3T3/E1 cells in culture

Treatment(IFN- γ , U/ml)	Alkaline phosphatase (μ M PNP/h/mg protein)
0(Control)	1.434 ± 0.137
5	1.556 ± 0.038
50	1.746 ± 0.070
500	$2.608 \pm 0.180^{**}$
2500	$3.011 \pm 0.056^{**}$

Data represent Mean \pm SE (N = 4)

** Significantly different from control, $p < 0.01$

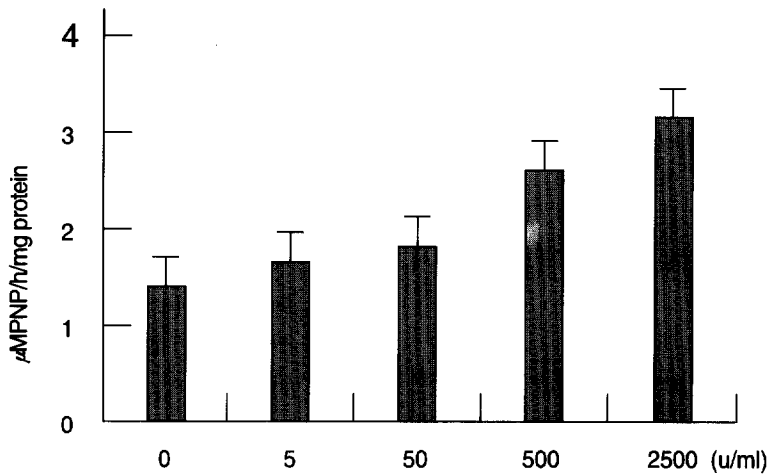


Figure 1. Effect of Interferon- γ on the alkaline phosphatase activity of MC3T3/E1 cells in culture.

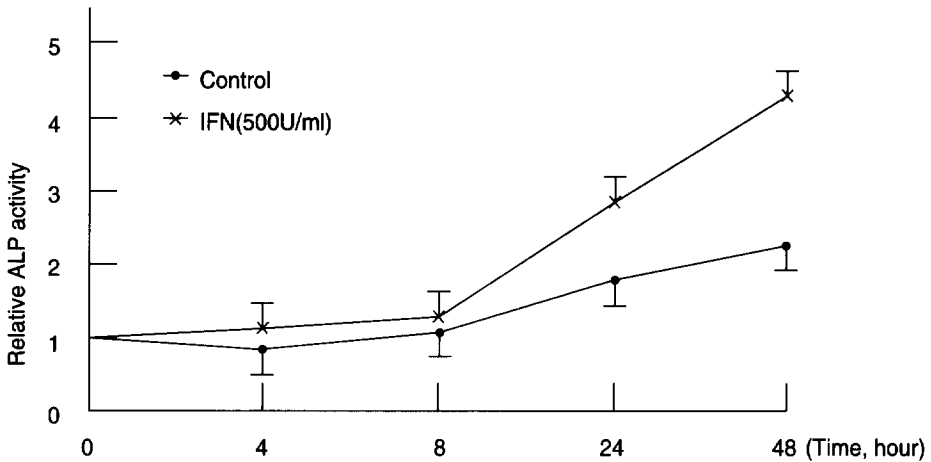


Figure 2. Time-course of the alkaline phosphatase activity of MC3T3/E1 cells in culture.

2. 염기성 인산분해효소 활성도에 미치는 IFN- γ 의 영향

세포내의 염기성 인산분해효소 활성 측정을 위해 MC3T3/E1 세포를 96-well plate에 분주하여 IFN- γ 를 농도별로 처리한 경우 5 및 50U/ml의 농도에서는 대조군에 비해 염기성 인산분해효소 활성도가 1.08배, 1.21배로 유의성 있는 차이가 관찰되지 않았으나, 500U/ml과 2500U/ml의 IFN- γ 농도에서는 염기성 인

산분해효소 활성도가 대조군에 비해 유의성있게 증가되었다(Table 2 및 Figure 1).

또한 대조군과 IFN- γ (500U/ml)를 처리한 군의 시간에 따른 염기성 인산분해효소의 상대적 활성도를 측정된 결과 8시간까지는 별 차이를 보이지 않았으나, 24 및 48시간에서는 IFN- γ 의 처리에 의한 활성도가 대조군의 활성도에 비해 더욱 많은 증가를 나타냈다(Figure 2).

Table 3. Effect of Interferon- γ on the calcified nodule formation in cultures of MC3T3/E1 cells.

Treatment (IFN- γ , U/ml)	No. of calcified nodule	Remarks
0(Control)	26 \pm 5	Small, Particulated
50	26 \pm 5	Small, Particulated
250	29 \pm 4	Moderate, Particulated
500	45 \pm 7	Large, Dense

Data represent Mean \pm SE (N = 6)

3. IFN- γ 에 의해 유도된 염기성 인산분해효소에 대한 cycloheximide의 영향

IFN- γ 와 cycloheximide를 단독 혹은 복합처리하여 염기성 인산분해효소 활성도를 측정 한 결과 24시간(p<0.05) 및 48시간(p<0.01) 모두 IFN- γ 를 단독으로 처리한 경우에 염기성 인산분해효소 활성도가 유의성 있게 증가되었다. IFN- γ 와 cycloheximide를 복합처리한 경우 IFN- γ 에 의해 증가된 염기성 인산분해효소

Figure 3. Effect of cycloheximide on the Interferon- γ induced alkaline phosphatase.

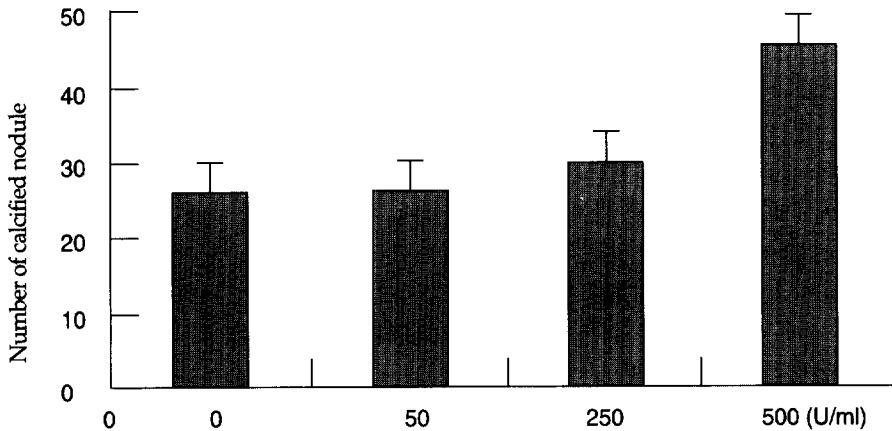


Figure 4. Effect of Interferon- γ on the calcified nodule formation in cultures of MC3T3/E cells.

활성도가 cycloheximide에 의해 시간이 경과함에 따라 유의성있게 감소하였다(Figure 3).

4. MC3T3/E1 세포의 장기배양(long-term culture)시 석회화 결절 형성에 미치는 IFN- γ 의 영향

MC3T3/E1 세포를 21일간 배양하여 von Kossa 염색 후 광학현미경으로 관찰한 결과 대조군과 50U/ml의 IFN- γ 를 처치한 실험군에서 작고 과립형인 석회화결절이 26 ± 5 개 관찰되었으며 250U/ml의 IFN- γ 를 처치한 경우 중간 크기의 과립형 석회화결절이 29 ± 4 개 관찰되었다. 특히 500U/ml의 IFN- γ 를 처치한 군에서는 크고 농축된 형태로 염색된 석회화결절이 45 ± 7 개 관찰되었다(Table 3 및 Figure 4).

IV. 총괄 및 고안

골조직은 여러가지 세포를 내포하고 있으며 그 중에서도 조골세포는 골기질을 합성하는 간엽세포로 명확한 조골세포의 특징은 일반적으로 골세포에서 나타나며, 조상골세포와 골형성간세포가 조직학적으로 구분되지는 않는다. 그러나 골수 섬유아세포와 유사망상세포를 조상골세포로 가정하였으며, 이 세포는 염기성 인산분해효소에 양성이고 보편적으로 커다란 핵을 갖고 있다.¹⁾ 조골세포의 활성도를 연구하기 위하여 여러가지 방법들이 기술되었는데 이에선 골조직 배양, 골유도세포 혹은 조골세포 유사세포주의 일차배양등이 포함된다. 대부분 이런 계통의 세포는 배양이 중단된 후에 미성숙된 증식세포나 성숙된 조골세포 유사세포로 되는 능력이 있다. 이들 세포들은 부갑상선 호르몬같은 골유발 호르몬에 대한 반응, 세포와 기질의 교원성과 비교원성 단백질의 합성과 염기성 인산분해효소에 대한 양성반응등을 포함한 조골세포 표현형을 나타낸다. 이러

한 배양방법들은 조골세포의 병리와 생리를 이해하는데 중요한 공헌을 하였다. 최근에는 정상 인간의 조골세포 배양방법이 여러 연구가들에 의하여 발전되었다.^{2, 24, 25)}

Cytokine은 임파구나 대식세포등에 의하여 생성되어 유리되는 폴리펩티드로서 여러가지 세포활성도와 골개조에 영향을 주며 광범위한 생물학적 기능을 나타낸다. 생체내에서나 시험관내에서 조골세포에 강력한 효과를 나타내기도 하며 Cytokine에대한 여러가지 연구가 현재까지 이루어지고 있다.²⁶⁾

ALP는 세포막에 붙어있는 조골세포의 밑에 관한 표시인자로서 광화작용과 오랫동안 관련된 효소로 세포의 외막과 석회화 조직의 기질 세포내에서 높은 수준으로 나타난다. 그러나 ALP 활성도가 있는 효소들은 고도로 분화가 되고 석회화된 조직에서 나타나는데 급속한 이온수송과 관련이 있다. 이것은 ALP가 광화작용과 관련이 없는 기능들을 갖고 있음을 의미한다. 광화작용에서 ALP의 여러가지 가능한 작용들에 대하여 제안되었는데 그 예로는 inorganic phosphate(Pi)의 국소적 농도 증가, mineral crystal growth inhibitors의 phosphohydrolase activity를 경유한 국소적 파괴, Pi-transporter로서의 작용, 칼슘이온 결합 단백질로서의 작용, 세포와 세포막에서 칼슘이온 펌프로서의 작용, 세포분열과 분화의 조절 역할등이있다.⁵⁶⁾ ALP activity가 있는 단백질은 광화와 비광화 조직에서 여러가지 역할을 하는 것으로 보인다. 1923년 Robinson이 발견한 ALP는 calcium salts와 organic phosphate esters를 함께 배양하였을때 Calcium phosphate 침착을 일으키는 것이었다. 곧이어 척추동물의 조직에 대한 연구가 뒤따랐으나 성공하지는 못하였고 ALP의 Level이 골과 연골내에서 초기 광화작용 위치에서 상당히 증가되어서 발견되는 동안 그 효소가 광화작용이 일어나지 않는 조직내에서 광범위하게 분포한다는 사실은 ALP와 석회화과정 사이에 특수관계에 대하여

의문점이 증가되었다. 반면에, ALP activity가 유전적으로 결핍된 hypophosphatasia 환자들이 심한 rickets나 osteomalacia로 고통받는다라는 사실은 효소와 정상적 광화작용의 상호관계를 다시 한번 시사하였다. 이 개념은 matrix vesicles(MV)을 발견함으로써 강조되었는데 이것은 연골과 다른 조직내에서 광화작용시에 나타나는 세포의 미세포체 구조물로서 높은 수준의 ALP를 포함한다. 그리고 ALP의 특수 억제 인자는 MV가 유도한 석회화 과정을 선택적으로 차단하였다.

IFN은 바이러스 감염에 대하여 세포저항을 유도하는 다기능 cytokine으로 활성화된 임파구 단핵구에 의하여 유리되는 당단백질로 항바이러스 효과와 면역방어 효과를 나타내며 광범위한 세포형에 영향을 미치며 골의 형성과 흡수에 영향을 줄 수 있다고 여러 학자들에 의하여 보고된 바 있다.^{25, 42)} 이런 의미에서 IFN은 폴리펩티드 호르몬과 유사하다. 또한 IFN이 여러가지 방법으로 세포의 생리와 활성화에 영향을 준다는 것은 명확하다. 그 효과에는 세포의 성장과 증식억제, 특수 유전인자의 표현조절, 세포 분화조절 면역 시스템에서 대식세포나 natural killer cell의 활성화등이 포함된다. IFN의 항바이러스 작용에 기초가 되는 기전은 광범위하게 연구되었고 재검토되어 왔다. 생화학적으로 면역학적으로 때로는 기능적으로 구분이 될 수 있는 다수의 IFN형이 있으며 이들은 분자량 15,000-30,000Da이며 다소간 유전자 생산과 관련된 가계를 나타내고 아미노산 순서와 유전자 부호가 서로 다른 단백질로서 사람의 IFN인 경우에 가장 잘 특징지어 질 수 있다. 현재의 명명 방법으로는 IFN등의 3가지로 분류하여 구분한다. 와 형은 바이러스 감염에 대한 반응으로 합성되며 보편적으로 이전의 분류법인 백혈구 유도형 IFN과 섬유아세포 유도형 IFN과 유사하다. 이 종류는 공식적으로 Type I IFN으로 알려져 있다.³¹⁾ 이와는 대조적으로 IFN- γ 는 항원 자극

에 의해 T 임파구에 의하여 생산되며 공식적으로는 Type II IFN으로 알려져 있다. 사람에게서는 12가지 이상의 많은 종류의 IFN- α 가 있으나 IFN- β 와 IFN- γ 는 한 종류만 있다. IFN- γ 보다는 IFN- α 와 β 가 서로 밀접하게 관련되어 있다. IFN은 세포 배양에서 항바이러스 활성도에 의하여 일반적으로 측정되며, 많은 항바이러스 분석 방법이 있으며 IFN에 대한 단일 항체(monoclonal antibody)의 확인 방법, 여러가지 IFN에 대한 방사선과 효소 면역분석 방법등이 현재 이용되고 있다.

Takahashi등⁵⁹⁾은 장기간의 사람의 골수배양 방법으로 IFN- γ 의 다핵세포 형성에 미치는 효과를 실험한 결과 IFN- γ 가 다핵세포 형성을 억제하였다고 보고하였다. Harju등⁶⁰⁾은 두가지 사람의 종양세포(human osteosarcoma cell line SAOS-2와 U2-OS)에 IFN- α 와 IFN- γ 를 이용한 시험관내에서 실험을 통해 두 IFNs이 두가지 표현형적으로 유사한 종양 세포주에 대한 효과가 서로 다르다는 것을 보고하였다.

IFN- γ 가 사람과 쥐의 조골세포에서 DNA 합성을 감소시킨다고 Harju등⁶⁰⁾과 Smith등⁵²⁾이 보고하였고, Gowen등³¹⁾은 사람과 쥐의 조골세포 배양에서 교원질 합성과 osteocalcin 생산을 억제하며 사람의 조골세포에서 염기성 인산분해효소를 증가시켰다고 보고하였다. Browning등⁶¹⁾은 IFN이 human peripheral monocyte로부터 IL-1 induced prostaglandin 유리를 차단시킨다고 하였으며, Mond등³³⁾은 IFN- γ 가 B cell stimulation factor를 억제한다고 보고한 바 있다.

이와같이 IFN은 골흡수의 강력한 억제자로서 골개조에 영향을 미친다. 현재에는 IFN의 항바이러스 기능뿐만 아니라 세포의 성장과 분화에 미치는 효과에 대하여 연구되어 왔고 또한 진행중이다. 그외에도 Amento등⁴¹⁾ IFN- γ 가 synovial fibroblast like cell에 미치는 영향에 대하여, Gowen등⁶²⁾은 cytokine에 의한 골흡

수 억제작용에 대하여 연구 보고한 바 있다. IFN- γ 가 다른 여러가지 조직과 세포에 미치는 영향에 대하여 그동안 수많은 연구가 진행되어 왔으며, 최근까지 파골세포에 대한 IFN- γ 의 국소적 인자로서의 역할에 대하여 학자들의 많은 연구가 있었다. 그러나 조골세포의 기능에 IFN이 어떤 영향을 미치는가에 대한 연구는 미진한 실정이다. 따라서 본 연구는 IFN- γ 가 조골세포의 생물학적 활성에 미치는 영향을 알아보고자 시행하였다.

본 실험에서는 세포배양을 위하여 마우스 조골세포를 배양접시에 분주하여 단층으로 증만될 때까지 배양하고 이세포를 다시 분주하여 배양시키는 계대배양 방법을 이용하여 실험에 이용하였다. 본 연구에서 첫번째 실험은 IFN- γ 가 MC3T3/E1세포의 세포생존율에 미치는 영향을 알아보고자 MC3T3/E1 세포를 96-well plate에 분주하여 단층으로 배양한 후 IFN- γ 를 농도별로 처리하여 2일째 trypan blue로 염색하였고 결과를 광학현미경상에서 무작위 영역을 선택하여 전체세포수와 생존하는 세포수를 계수하여 세포생존율을 측정하였다. 대조군에서는 세포생존율이 $94.3 \pm 1.3\%$ 였고 50, 500, 2500, 5000, 10000U/ml의 농도로 IFN- γ 를 처리한 실험군에서는 세포생존율이 $94.0 \pm 0.9\%$, $95.5 \pm 1.3\%$, $92 \pm 1.4\%$, $91.1 \pm 1.6\%$, $90.8 \pm 1.6\%$ 로서 대조군에 비하여 실험군에서 세포생존율에는 통계적으로 영향을 미치지 않았다(Table 1). 이는 본 실험에서 사용된 농도의 IFN- γ 가 세포에 독성작용을 일으키지 않은 것으로 사료되며 통계적으로 유의하지는 않았지만 IFN- γ (500U/ml)로 처리한 경우에 세포생존율이 가장 높게 나타났으며 IFN-의 농도가 증가함에 따라 세포생존율이 약간 감소하는 경향을 나타내었다.

본 연구에서 두번째 실시한 실험은 세포내의 염기성 인산분해효소 활성 측정으로서 MC3T3/E1 세포를 96-well plate에 분주하고 단층으로 배양한 후 IFN- γ 를 농도별로 처리

하거나 IFN- γ 와 cycloheximide(2 g/ml)를 복합 처리하여 48시간 혹은 일정시간별로 배양한 후 유리되어 나온 PNP의 양을 분광광도계(spectrophotometer)로 405nm에서 비색정량한 결과 IFN- γ 를 농도별로 처리한 경우 5 및 50U/ml의 농도에서는 대조군에 비해 염기성 인산분해효소 활성도가 1.08배, 1.21배로 유의성 있는 차이가 관찰되지 않았으나, 500U/ml과 2500U/ml의 IFN- γ 로 처리한 경우 MC3T3/E1 세포의 염기성 인산분해효소 활성도가 1.86배, 2.09배로 대조군에 비해 유의성있게 증가되었다(Table 2 및 Figure 1). 또한 대조군과 IFN- γ (500U/ml)를 처리한 군에서 시간별로 염기성 인산분해효소 활성도를 측정할 경우 8시간까지는 별 차이를 보이지 않았고, 24 및 48시간에서는 IFN- γ 를 처리한 경우 효소 활성도가 증가되었다(Figure 2).

이는 500U/ml 이상의 농도로 IFN- γ 의 처리에 의해 염기성 인산분해효소 활성도가 가장 높다는 것을 의미하며, 사람의 골세포에 염기성 인산분해효소 활성도에 대한 IFN- γ 의 효과를 분석한 Gowen등⁶³⁾의 연구결과와 일치하였다. 염기성 인산분해효소 활성도를 시간별로 측정할 경우 24 및 48시간에서 대조군에 비해 실험군에서 증가하는 경향을 나타내었는데 이는 IFN- γ 가 48시간 정도 되어서 염기성 인산분해효소 활성도의 효과를 잘 나타내는 것으로 사료된다.

IFN-와 cycloheximide를 단독 혹은 복합처리하여 염기성 인산분해효소 활성도를 측정할 결과 24시간($p < 0.05$) 및 48시간($p < 0.01$) 모두 IFN- γ 를 단독으로 처리한 경우에 염기성 인산분해효소 활성도가 유의성있게 증가되었다. IFN- γ 와 cycloheximide를 복합처리한 경우 IFN- γ 에 의해 증가된 염기성 인산분해효소 활성도가 시간이 경과함에 따라 유의성있게 감소하였는데, 이는 DNA에서 mRNA로의 전사단계에 cycloheximide가 효과를 나타내었음을 의미하며 반대로 IFN- γ 가 염기성 인산분해

효소 증가에 직접적으로 영향을 준 것으로 사료된다.

최종적으로 실험한 조골세포의 시험관내에서 석회화결절 형성 측정은 MC3T3/E1 세포를 96-well plate에 분주하여 세포가 단층으로 증식한 후 매 2-3일마다 ascorbic acid(50 M)와 β -glycerophosphate(10mM)를 혼합한 신선한 배양액으로 교환하며 IFN- γ 를 농도별로 처리하여 21일간 배양하였다. 배양한 세포를 3.7% formalin으로 고정하고 von Kossa 염색을 시행하였으며 toluidine blue를 이용하여 대조염색을 거쳐서 염색이 완료된 후 광학현미경상에서 석회화결절을 계수하여 석회화결절 형성을 관찰한 결과, 대조군과 50U/ml의 IFN- γ 를 처리한 실험군에서 작고 과립형인 석회화결절이 26 ± 5 개 관찰되었으며 250u/ml의 IFN- γ 를 처리한 군에서는 중간크기의 과립형 석회화결절이 29 ± 4 개 관찰되었다.

특히 500U/ml의 IFN- γ 를 처리한 군에서는 크고 농축 형태로 염색된 석회화결절이 관찰되었다. 이결과는 통계적으로는 유의하지는 않았으나 전체적으로는 IFN- γ 의 농도가 증가함에 따라서 석회화결절 형성이 증가하는 경향을 나타내었다. 500U/ml의 농도로 IFN- γ 를 처리한 실험군에서 크고 농축된 형태로 염색된 석회화결절이 관찰되었는바 상당히 긍정적인 실험결과로 사료된다.

이상과 같은 결과로 볼 때 IFN- γ 는 조골세포의 기능을 활성화시켜서 골형성과정에 영향을 줄것으로 사료되며 앞으로 이에 대한 지속적인 연구와 골재형성이 필요한 임상술식에 적용하는 등의 검토가 이루어져야 된다고 사료된다.

V. 결 론

IFN이 파골세포등 여러 조직과 세포에 미치는 영향에 대하여 많은 연구가 진행되었으나 조골세포에 어떤 영향을 주는가에 대한 연구

는 미진한 실정이다. 따라서 본 연구는 IFN- γ 가 조골세포에 미치는 생물학적 영향을 알아보고자 시행하였다. 연구방법으로 MC3T3/E1 세포(마우스 조골세포주)를 배양접시에서 계대배양 하면서 실험 목적에 따라 분주하여 실험에 이용하였다. MC3T3/E1 세포에 IFN- γ 를 농도별로 처리하여 trypan blue 로 염색하고 광학현미경상에서 전체세포수와 생존하는 세포수를 계수하여 세포 생존율을 측정하였고, IFN- γ 단독으로 혹은 IFN- γ 와 cycloheximide를 복합처리하여 MC3T3/E1세포를 일정시간 별로 배양한 후 비색정량하여 조골세포의 염기성 인산분해효소 활성도를 측정하였다.

또한 MC3T3/E1세포에 IFN- γ 를 각각의 농도별로 처리하고 장기간 배양한 후 von Kossa 염색을 하고 광학현미경상에서 석회화 결절을 계수하여 석회화 결절 형성정도를 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 세포 생존율의 측정 결과 대조군과 50-10000U/ml의 IFN- γ 를 처리한 실험군에서 조골세포의 생존율에는 영향을 주지 않았다.
2. 염기성 인산분해효소 활성도는 IFN- γ 의 저농도(5-50U/ml)보다 고농도(500-2500U/ml)에서 유의성있게 증가되었으며 ($P < 0.01$), 처리시간별로는 24-48시간에서 활성도의 증가를 보였다.
3. IFN- γ 와 cycloheximide를 단독 혹은 복합 처리하여 염기성 인산분해효소 활성도를 측정한 결과, cycloheximide를 복합 처리한 경우 IFN- γ 에 의하여 증가된 염기성 인산분해효소 활성도가 시간이 경과함에 따라 유의성있게 감소하였다.
4. 조골세포의 장기배양(long-term culture)시 석회화결절 형성정도를 측정한 결과 대조군과 50, 250, 500U/ml의 IFN- γ 로 처리한 실험군에서 석회화결절이 관찰되었으며, 특히 500U/ml의 처리군에서 크

고 농축된 형태로 염색된 석회화결절을 관찰할 수 있었다.

이상과 같은 결과로 볼때 IFN- γ 는 조골세포의 기능을 활성화시킴으로써 골형성과정에 영향을 줄 것으로 사료되며 앞으로 이에 대한 지속적인 연구와 골재형성이 필요한 임상술식에 적용하는 등의 검토가 이루어져야 된다고 생각된다.

참고문헌

1. Zheng, M.H.: What's new in the role of cytokines on osteoblast proliferation and differentiation Path. Res. Pract.188 : 1104 - 1121, 1992.
2. Aufmkolk, B. Hauschka P.V., and Schwarz, E.R.: Characterization of human bone cells in culture. Calcif. Tissue Int. 37 : 228 - 235, 1985.
3. Nathan, C. and Sporn, M.: Cytokines in context. J. Cell. Biol. 113 : 981 - 986, 1991.
4. Sporn, M.B. and Todaro, G.J: Autocrine secretion and malignant transformation of cells Engl. N., Med, J. 303 : 878 - 880, 1980.
5. De Maeyer, E., De Maeyre - Guignard, J.: Interferons and other regulatory cytokines. Wiley., New York, 1988.
6. Isaacs, A. and Lindenmann, J.: Virus interference. I. The interferon. Proc R Soc Lond Biol. 147 : 258 - 267, 1957.
7. Wheelock, E.F.: Interferon - like virus - inhibitor induced in human leukocytes by phytohemagglutinin. Science 149 : 310 - 311, 1965.
8. Clemens, M.J. and McNurlan, M.A.: Regulation of cell proliferation and differentiation by interferons. J. Biochem. 226 : 345 - 360, 1985.
9. Smith, D.D., Gowen, M. and Mundy, G.R.: Effects of interferon- γ and other cytokines on collagen synthesis in fetal rat bone cultures. Endocrinology 120 : 2494 - 2499, 1987.
10. Amento, E.P., Bhan, A.K., McCullagh, K.G., and Krane, S.M.: Influence of gamma interferon on synovial fibroblastlike cells: Ia induction and inhibition of collagen synthesis. J. Clin. Invest. 76 : 837 - 848, 1985.
11. Kuosmanen, M., Sarelin, H. and Anderson, L.C.: Induction of cytotoxic capacity by recombinant gamma interferon in human myelomonocytic leukaemia cell lines. Scand. J. Immunol. 25 : 219 - 223, 1987.
12. Fujii, Y., Satoh, T. and Fujii, T.: Prolonged and ubiquitous inhibition by interferon- γ of bone resorption induced by parathyroid hormone - related protein 1, 25 - dihydroxyvitamin D₃, and interleukin 1 in fetal mouse forearm bones. Calcif. Tissue Int. 47 : 178 - 182, 1990.
13. Epstein, L.B.: The special significance of interferon gamma. In: Vilcek J, De Maeyer E (eds) Interferon.vol 2. Elsevier. Amsterdam. pp185 - 220, 1984.
14. Youngner, J.S. and Salvin, S.B.: Production and properties of migration inhibitory factor and interferon in the circulation of mice with delayed hypersensitivity. J. Immunol. 111 : 1914 - 1922, 1973.
15. Havell, E.A., Berman, B., Ogburn, C., Berg, K., Paucker, K. and Vilcek, J.: Two antigenically distinct species of human interferon. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 72 : 2185 - 2189, 1975.

16. Hayes, T.G., Yip, Y.K. and Vilcek, J.: Le interferon production by human fibroblasts. *Virology* 98 : 351-363, 1979.
17. Bockman, R. S., and Repo, M.A.: Lymphokine-mediated bone resorption requires endogenous prostaglandin synthesis. *J. Exp. Med.* 154 : 529, 1981.
18. Farrar, W.L., Johnson, H.M. and Farrar, J.J.: Regulation of the production of immune interferon and cytotoxic T lymphocytes by interleukin 2. *J. Immunol.* 126 : 1120-1125, 1981.
19. Bradley, E.C. and, Ruscetti, F.W.: Effect of fibroblast, lymphoid and myeloid interferons on human tumor colony formation in vitro. *Cancer Res.* 41 : 244-249, 1981.
20. Brinckerhoff, C.E. and Guyre, P.M.: Increased proliferation of human synovial fibroblasts treated with recombinant immune interferon. *J. Immunol.* 134 : 3142-3146, 1985.
21. Hauschka, P.V., Mavrakos, A.E., Iafrazi, M.D., Doleman, S.E. and Klagsbrun, M. : Growth factors in bone matrix. *J. Biochem.* 261 : 12665-12674, 1986.
22. Kehrl, J.H., Miller, A. and Fauci, A.S.: Effect of tumor necrosis factor alpha on mitogen-activated human B cells. *J. Exp. Med.* 166 : 786-791, 1987.
22. Kehrl, J.H., Miller, A. and Fauci, A.S.: Effect of tumor necrosis factor alpha on mitogen-activated human B cells. *J. Exp. Med.* 166 : 786-791, 1987
23. Snapper, C.M. and Paul, W.E.: Interferon- γ and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production. *Science* 236 : 944-947, 1987.
24. Gehron-Robey, P. and Termine, J.D.: Human bone cell in vitro. *Calcif. Tissue. Int.* 37 : 453-460, 1985.
25. Toshikatsu Matshyama, K.H., Lau, W. and Wergedal, J.E.: Monolayer cultures of normal human bone cells contain multiple subpopulations of alkaline phosphatase positive cells, *Calcif Tissue Int.* 47 : 276-283, 1990
26. MacDonald, B.B. and Gowen, M.: Cytokines and bone. *British journal of rheumatology.* 31 : 149-155, 1992.
27. Wuthier, R.E. and Register, T.C.: Role of alkaline phosphatase, a polyfunctional enzyme in mineralizing tissues. *The chemistry and Biology of Mineralized Tissues.* 113-124, 1970.
28. Gowen, M., Hughes, D., Ralston, S., Chapman, K. and Russell, R.G.G.: Production of IL-1 and TNF by human bone-like cells and resorbing mouse calvariae. *Lymphokine Res.* 7 : S 268, 1988.
30. Takahashi, N., Mundy, G.R. and Roodman, G.D.: Recombinant human interferon- γ inhibits formation of human osteoclast like cells. *J. Immunol.* 137 : 3544-3549, 1986.
30. Takahashi, N., Mundy, G.R. and Roodman, G.D.: Recombinant human interferon-gamma inhibits formation of human osteocalst like cells. *J. Immunol.* 137 : 3544-3549, 1986.
31. Harju, V.T., Alitalo, R. and Andersson, L.C.: Divergent in vitro Effects of Recombinant Interferons on Human Osteosarcoma Cells. *Bone* 11 : 247-251, 1990.
32. Browning, J. L. And Ribolini, A.: Interferon blocks interleukine 1-Induced

- prostaglandin release from human peripheral monocytes. *J. Immunol.* 138 : 2857-2863, 1987.
33. Mond, J.J., Carman, J., Sarma, C., Ohara, J. and Finkelman, F.D.: Interferon- γ suppresses B cell stimulation factor (BSF-1) induction of class II MHC determinants on B cells. *J. Immunol.* 137 : 3534-3537, 1986.
34. Gowen, M. and Mundy, G.R.: Actions of recombinant interleukin 1, interleukin 2, and interferon gamma on bone resorption in vitro. *J. Immunol.* 136 : 2478-82, 1986.
35. Gowen, M. and Macdonald, B.R.: Actions of recombinant human γ -interferon and TNF-2 on the proliferation and osteoblastic characteristics of human trabecular bone cells in vitro. *Arthritis and Rheumatism.* 31 : 1500-1507, 1988.

Effects Of Interferon - γ On The Biological Activity Of Mouse Osteoblast MC3T3/E1 Cells In Culture

Kwan - Hoon Lee, Jung - Geun Kim, Chin - Hyung Chung
Dept. of Periodontology, College of Dentistry, Dan - kook University

Interferon(IFN) is a sort of glycoproteins that are produced by activated lymphocyte, monocyte and fibroblast. IFN has anti - viral effects, immuno - defensive mechanism and regulating properties to the several kinds of cells that includes affect on the bone formation and resorption. The effect of IFN on the osteoclast & other tissue cells has been studied in a number of researchers with the limited reports on the osteoblast. The purpose of this study was to evaluate the effects of IFN on the osteoblastic function. The MC3T3/E1 cell(Mouse osteoblast) was incubated in α -minimum essential medium containing 10% FBS. To detect the cytotoxic effect of IFN - γ on osteoblast, the cells were cultured in 96 - well plate to which IFN - γ of various concentrations were added for 2 days. After staining with trypan blue, total cells and living cells were counted under microscope. To determine the activity of alkaline phosphatase(ALP), various concentrations of IFN - γ were treated to culture medium, and biochemical assay was performed. IFN - γ and IFN - γ plus cycloheximide were added to culture medium separately and then ALP activity were determined. To detect the effect of the IFN - γ on the bone formation of osteoblast, long - term culture was performed, and calcified nodule formation were observed using von Kossa's staining. After the addition of IFN - γ with various concentrations to the medium, no cytotoxic effect of IFN - γ was detected at any concentration. The significant increase in ALP activity of osteoblast were found the concentration of IFN - γ 500 - 2500U/ml and the culture time of 24 - 48 hours respectively. The enhancement of ALP activity by IFN - γ of osteoblast was decreased significantly by the treatment of cycloheximide. After long - term culture of osteoblast, the nodule formation was found to be increased in number and density by the addition of 500 U/ml IFN - γ . These results suggest that IFN - γ was affected on the bone formation of osteoblast. Forthemore this kind of study or IFN - γ to osteoblast will be held continuously.

Key word : Interferon, Interferon - γ , Alkaline phosphotase.