

## Prostaglandin과 Dibutyryl cAMP가 조골세포의 활성과 파골세포 형성에 미치는 영향

목성규 · 유형근 · 신형식

원광대학교 치과대학 치주과학교실

### I. 서 론

치주질환은 구강상주균에 의해 발생된 치은 염증이 점차 진행되면서 하부조직인 치은 결합조직의 파괴로 치주낭이 형성되고 치주인대 및 치조골이 소실되는 질환이다. 따라서 치주질환의 치료는 염증의 진행과정을 차단, 방지하거나 염증의 결과로 초래된 파괴상을 재생시킬 목적으로 시행되어 왔다.

골조직은 교원질, 당단백과 같은 세포외기질과 조골세포, 파골세포, 골세포 등 여러종류의 세포들로 구성되어 있는 매우 복잡하고 활동적인 조직으로서 계속적으로 골개조<sup>1)</sup>가 일어나며, 골개조는 파골세포에 의한 골흡수와 조골세포의 골형성에 의하여 균형을 이루는 과정으로 순서적으로 진행된다.

파골세포는 골내막에 위치하며, 골조직에 존재하는 유일한 다핵세포이고 흡수가 일어나는 골면에 근접하여 주름변연이 나타난다. 또한 파골세포는 tartrate-resistant acid phosphatase(TRAP)와 풍부한 calcitonin(CT) 수용체를 가지는 특성이 있으며 산 생성이 활발하고 흡수와(howship's lacuna)를 형성한다. 파골세포는 골수내의 조혈 단핵세포로부터 유래하고, 이 단핵전구세포는 혈액내로 순환되

며 골내막층에서 전구세포들이 증식되어 다핵세포를 형성하기 위해 융합되고 골을 흡수한다고 알려져 있다<sup>1)</sup>.

골기질의 성분을 주로 합성하는 조골세포는 미분화 간엽세포에서 유래된 전조골세포(pre-osteoblast)가 골표면에 도달하여, 성숙한 조골세포로 분화되고, 10~20%가 골세포로 되어 석회화 조직에 묻힌다고 알려져 왔다. 활발한 대사작용으로 석회화 과정에 중요한 역할을 하는 조골세포는 골표면에 근접한 세포질내에 과립형질내세망(rough endoplasmic reticulum, RER)이 발달해 있고, 세포막에 염기성 인산 분해 효소를 갖고 있다.

파골세포가 골에 부착하여 산화 및 단백질 분해과정에 의해 골을 계속적으로 흡수하면 조골세포가 그부위에서 골기질을 구성하는 교원섬유 및 proteoglycan, osteonectin, osteopontin, sialoprotein 그리고 osteocalcin과 같은 단백질을 형성하여 골석회화가 일어나는 것으로 알려져 있다<sup>1)</sup>. 포유류 세포막의 phospholipid에 있는 지방산인 arachidonic acid는 calcium-dependent phospholipase A2나 phosphatidyl inositol-specific phospholipase C에 의해서 생성된다<sup>2,3)</sup>.

Prostaglandin(PG)은 arachidonic acid의

cyclooxygenase 산물로서 생체내 autacoid의 하나로 여러 조직에 존재해서 다양한 생물학적 작용을 나타내는데 치주질환에 있어서 혈관투과성 증대, 혈관확장, 염증세포공급, 부종, 동통, 골흡수, 교원질파괴 등에 관여하고 있으며<sup>4)</sup> 그외에 다형핵 백혈구, 대식세포, 호염구, 호산구, 파골세포, 임파구, 평활근을 포함하는 표적세포의 기능을 조절하고 국소적 염증반응을 증가시킨다<sup>5)</sup>. Rifkin과 Tai(1981)<sup>6)</sup> 등이 정상조직보다 염증치은에 있어서 PG의 농도가 증가되는 것을 관찰보고함으로써 PG이 치주질환의 병인요소로서 중심적인 역할을 하는 것으로 추측되어 왔다. 특히 PGE<sub>2</sub>는 다른 PG에 비하여 가장 강력한 골흡수능을 가진 것으로 알려져 있으며 골조직 장기배양(organ culture) 시 골흡수를 촉진시켜 <sup>45</sup>Ca이 표지된 골조직으로부터 <sup>45</sup>Ca 유리를 촉진시키는 것으로 알려져 있다<sup>7-13)</sup>.

골흡수는 분화 및 활성화된 파골세포가 골조직의 세포간 기질을 제거하는 과정으로서<sup>14)</sup> 이러한 골흡수 과정은 세균의 구성성분인 lipopolysaccharide<sup>15)</sup>, 전신적 조절인자인 부갑상선호르몬<sup>16)</sup>, 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub><sup>17)</sup> 및 국소적 조절인자인 PG<sup>11)</sup>와 cytokine 들에 의해서 조절된다. 이와 같이 골흡수는 생체내에서 생성되는 인자들로 자극을 받은 파골세포에 의해서만 유도되는 것으로 생각하였으나 파골세포는 조골세포, 혹은 조골세포를 배양한 배지가 있는 경우에만 골흡수를 일으켜, 파골세포의 분화 및 활성화는 조골세포로부터 생성 유리되는 인자 즉 파골세포와 조골세포 사이를 연결해주는 연결인자(coupling factor)에 의해서 이루어지는 것으로 알려져 있다<sup>18-24)</sup>.

또한 골흡수능을 가진 국소적 인자인 epidermal growth factor<sup>25)</sup>, transforming growth factor<sup>26)</sup>, platelet-derived growth factor<sup>27)</sup> 및 tumor necrosis factor<sup>28)</sup>도 PGE<sub>2</sub>의 생성을 증가시킴으로 골흡수를 촉진한다는 보고가 있어 PGE<sub>2</sub>가 이들 인자의 매개물질로 작용함을 시

사한바 있다.

PGE<sub>2</sub>의 파골세포에 대한 영향은 많은 연구가 행하여져서 Vanderwiel과 Talmage(1979)<sup>7)</sup>는 파골세포의 수와 활성이 PGE<sub>2</sub>에 의하여 증가됨을 보고하였고 박과 고(1982)<sup>29)</sup>도 파골세포의 주름변연과 투명대의 증가를 보고한 반면 PGE<sub>2</sub>가 파골세포의 운동성을 감소시켜 골흡수를 억제한다는 상반된 보고도 있다<sup>30, 31)</sup>.

최근 여러 연구들에서 선천성 심장질환을 가지고 있는 소아에게 장기적으로 PG를 투여한 경우에 새로운 골막이 형성되는 것을 관찰하였으며<sup>32-39)</sup>, 개와 쥐에서도 PGE<sub>1</sub> 혹은 PGE<sub>2</sub>를 전신적 혹은 국소적으로 투여했을때에도 새로운 골막이 형성되는 것이 관찰되었고<sup>40-50)</sup>, 또한 cyclooxygenase 경로 차단제인 indomethacin이 골절치유를 지연<sup>51)</sup>시킨다고 알려져 있다.

Chyun과 Raisz<sup>52)</sup>(1984)는 PGE<sub>2</sub>(10<sup>-7</sup>M)가 골장기배양에서 DNA와 교원질 합성을 증가시킨다고 하였고, Feyen등(1985)은<sup>53)</sup> 조골세포 유사세포의 증식을 증가시킨다고 하였으며 또한 McCarthy(1991)<sup>54)</sup>등은 쥐의 두개골세포에서 PGE<sub>2</sub>가 골형성을 조절한다고 하였고, 교원질 합성을 증가시키는 insulin-like growth factor-I 발현을 증가시킨다는 다수의 보고가 있다<sup>55-57)</sup>.

최근에는 파골세포가 조혈기관 기원인 것을 이용하여 다수의 파골세포 전구세포를 얻기 위하여 골수세포배양이 널리 이용되고 있다. 이러한 골수세포 배양시 관찰되는 다핵세포는 TRAP양성반응을 나타내고 CT수용체를 가지며 석회화 상아질을 흡수할 때 주름변연을 형성하는 등의 파골세포의 특징을 나타내고 있으며 이중 TRAP는 다른 골조직세포와 구별할 수 있는 파골세포의 세포화학적 표지효소로 이용된다.

본 연구는 치주질환시 형성되는 생체내 autacoid의 하나로 골흡수 및 골형성에 관여하는 PGE<sub>2</sub>와 dibutyryl cAMP가 조골세포주

MC3T3E1세포에 미치는 활성 및 조골세포가 파골세포의 형성에 미치는 영향을 규명하기 위해 조골세포는 조골세포주 MC3T3E1세포를 사용하고 파골세포의 전구세포는 생쥐 골수세포를 사용하여 coculture 한 후 일부는 PGE<sub>2</sub>가 조골세포와 생쥐 골수세포의 coculture시 파골세포형성에 미치는 영향을 관찰하였으며 파골세포 표지효소로 알려진 TRAP양성인 다핵세포를 계수하여 파골세포의 분화정도를 측정하였다.

## II. 연구재료 및 방법

### 1. 조골세포의 활성에 미치는 영향

#### ① 세포 배양

본 연구에서는 조골세포주 MC3T3E1을 이용하였는데, 세포들은 100mm배양접시에 10% fetal bovine serum(FBS : Hyclone Lab. Inc) 및 Penicillin 100U/ml와 Streptomycin 100 $\mu$ g/ml가 포함된  $\alpha$ -minimal essential medium( $\alpha$ -MEM) 10ml에 넣고 37°C, 95% 습도, 95% 공기와 5% CO<sub>2</sub> 조건하에서 배양하였다. 세포들은 통상적인 방법에 의하여 일주일에 2회씩 계대 배양하였고 배양후 0.05% trypsin과 4mM EDTA로 처리하여 수집한 세포를 trypan blue로 염색하여 혈구계산판(Hemocytometer)으로 생세포계측(viability test)을 시행하여 1 $\times$ 10<sup>5</sup>cells/35mm dish가 되도록 분주한후 24시간 동안 세포를 dish표면에 부착시켜 실험에 사용하였다.

### 2. 염기성 인산분해효소 활성도 측정.

#### ① PGE<sub>2</sub>와 DBcAMP가 염기성 인산분해효소 활성에 미치는 영향

1 $\times$ 10<sup>5</sup> cells/35mm dish 농도로 분주하여 10%FBS가 든  $\alpha$ -MEM에서 confluent하게 배양한 다음 PGE<sub>2</sub>와 DBcAMP를 처리하지 않은

군을 대조군으로 하고 PGE<sub>2</sub>가 생리적 활성을 보이는 농도인 10, 100, 500ng/ml의 농도로 PGE<sub>2</sub> 및 0.01, 0.1, 0.5mM의 농도로 DBcAMP를 각각 첨가한 군을 실험군으로 하여 0.4% FBS가 든  $\alpha$ -MEM으로 교체한 후 48시간 동안 배양하였다.

#### ② Cycloheximide(2 $\mu$ g/ml)가 PGE<sub>2</sub>와 DBcAMP에 의한 염기성 인산분해효소 활성에 미치는 영향

단백합성 억제제인 cycloheximide(2 $\mu$ g/ml)가 PGE<sub>2</sub>와 DBcAMP에 의한 염기성 인산분해효소 활성에 미치는 영향을 관찰하기 위해서 PGE<sub>2</sub> 및 DBcAMP를 각각 투여한 군을 대조군으로 하고 cycloheximide를 PGE<sub>2</sub> 및 DBcAMP와 복합 첨가한 군을 실험군으로 하여 0.4% FBS가 든  $\alpha$ -MEM으로 교체한 후 48시간 동안 배양하였다.

배양시간 후 배양액을 제거하고 0.05% trypsin과 4mM EDTA로 처리하여 세포를 수집한 다음 200 $\times$ g로 5분간 원침한후 상청액을 제거하고 0.5ml의 탈이온 증류수를 첨가하여 sonic dismembrator를 이용하여 30% 출력에서 30초간 sonication 한 후 효소활성 측정에 사용하였다.

염기성 인산분해효소활성을 측정하기 위한 완충액으로는 0.1M glycine-NaOH buffer(pH 10.3)를 사용하였고, 15mM의 p-nitrophenylphosphate(Sigma)를 기질로 이용하여 37°C의 수조에서 30분간 반응시킨 후 효소의 작용에 의하여 기질로부터 분해, 유리된 p-nitrophenol의 농도를 분광기를 이용하여 비색정량함으로써 측정하였다.

#### ③ MTT assay를 이용한 세포의 활성도 측정.

Mosmann(1983)<sup>39)</sup>의 방법에 따라 실험 전일 24 well plate에 분주한 MC3T3E1 세포에 10, 100, 500ng/ml 농도의 PGE<sub>2</sub> 및 0.01, 0.1, 0.5mM 농도의 DBcAMP를 각각 가하여 48시

간 동안 배양하였다. 각군의 세포 활성을 보기 위해 식염수에 용해한 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide : No. M2128, Sigma Co., USA) 용액 50 $\mu$ l를 각 well에 넣고 3시간 동안 배양후 MTT 용액을 버리고, DMSO를 50 $\mu$ l씩 첨가하여 Formazan 결정을 용해시킨 후 세포 활성도를 측정하기 위해 96well plate 상으로 옮겼다.

Plate를 잘 흔든 후 ELISA analyser(Model EYT-96, Tokyo instruments Inc., Japan)에 plate를 넣은 다음 570nm에서 흡광도를 측정하였다. 실험은 각 군마다 5배수로 시행하였으며, 매 실험마다 실험 용액이 들어 있지 않은 배양액을 대조군으로 하여 모든 실험 결과는 다음과 같이 대조군의 백분율로 산출하였다.

세포 활성도 (%)

= 실험 well의 흡광도/대조 well의 흡광도  $\times$  100

#### ④ PGE<sub>2</sub>에 대한 cyclic AMP의 합성능 측정.

1  $\times$  10<sup>6</sup> cells/35mm dish로 분주하고 10% FBS가 첨가된  $\alpha$ -MEM에서 2일간 배양한 다음 0.4% FBS가 든  $\alpha$ -MEM으로 교체시킨 후 PGE<sub>2</sub>을 넣지 않은 군을 대조군으로 하고 10, 100, 500ng/ml농도의 PGE<sub>2</sub>를 첨가한 군을 실험군으로 하여 5분간 배양하였다. 그후 배양액을 제거 하고 1ml의 6%-trichloroacetic acid를 첨가하여 rubber policeman으로 수집한 세포를 sonication하고 1,800  $\times$  g로 25분간 원침하여 얻은 상청액을 5ml water-saturated diethyl ether로 4회 추출한후 냉동건조 시켰다.

Cyclic AMP 는 냉동건조시킨 시료를 sodium acetate buffer (pH 6.2)에 용해시킨 다음 [<sup>125</sup>I] cAMP RIA kit(New England Nuclear)를 사용하여 방사성 면역법(Radioimmunoassay, RIA)으로 정량분석하였다.

## 2. 파골세포 형성에 미치는 영향

### ① 생쥐 골수세포 분리 및 배양

생쥐 골수세포를 분리하기 위해 생후 7~8주 된 웅성생쥐를 경부염전으로 희생시킨 후 대퇴골과 경골을 무균적으로 적출하였다. 장골의 양끝을 가위로 절단한 후 26G의 주사침을 이용하여 한쪽 끝의 골수강에 1ml의  $\alpha$ -minimum essential medium( $\alpha$ -MEM)을 천천히 주사하여 골수세포를 모은 후 10% fetal bovine serum(FBS)이 포함된  $\alpha$ -MEM으로 24-well plate에 1.5~2  $\times$  10<sup>6</sup> cells/well이 되도록 분주하여 8일 동안 배양하였다. 배양액은 매 3일마다 0.4ml를 교체하였다.

실험군의 경우 조골세포주 MC3T3E1를 2  $\times$  10<sup>4</sup> cells/cm<sup>2</sup>가 되도록 분주하여 생쥐 골수세포와 coculture를 시행하였고, 이때 일부는 10<sup>-5</sup>M, 10<sup>-6</sup>M의 PGE<sub>2</sub> 첨가하여 배양하였다.

### ② Tartrate-resistant acid phosphatase 조직화학적 활성검색

TRAP 반응을 관찰하기 위해 일정시간 배양 후 well내에 붙은 세포를 인산완충 생리식염수(PBS, pH7)로 한 번 세척 후 ethanol-acetone(50 : 50, vol/vol)으로 1분간 고정시키고 상온에서 10분동안 말린후 TRAP염색을 시행하고 hematoxyline으로 대조염색을 시행하였다.

TRAP염색은 고정된 세포를 기질인 naphthol AS-MX phosphate, 반응산물의 염색제인 fast red violet LB salt와 10mM의 sodium tartrate가 포함된 acetate buffer(0.1M sodium acetate, pH 5.0)로 상온에서 20분간 반응시켜서 효소활성을 검색하였으며 기질을 제거한 동일 반응조건에서 반응시켜 음성대조군으로 하였다. 염색된 세포는 광학현미경상에서 관찰하여 3개이상의 핵을 포함한 세포를 다핵세포로 하여 TRAP양성인 다핵세포의 수를 측정하였다.

### 3. 통계분석

각농도에 따른 대조군에 대한 백분율로 환산된 평균과 표준편차를 구하고 이들의 통계학적인 유의성은 일원분산 분석법(ANOVA)과 Duncan's multiple range test를 이용하여 통계분석하였다.

## III. 연구결과

### 1. 조골세포의 활성화에 미치는 영향

#### ① PGE<sub>2</sub>와 DBcAMP 가 조골세포주 MC3T3E1의 염기성 인산분해효소 활성화에 미치는 영향.

PGE<sub>2</sub>와 DBcAMP가 조골세포주 MC3T3E1 세포의 염기성 인산분해효소 활성을 검사한 결과 PGE<sub>2</sub>의 약물농도 (10, 100, 500ng/ml)가 증가함에 따라 대조군 (1.75±0.04μmol)에 비해 1.82±0.04μmol, 2.13±0.24μmol, 2.23±0.22μmol로 증가하였으며, DBcAMP의 경우도 약물농도(0.01, 0.1, 0.5mM)가 증가함에 따라 1.84±0.06μmol, 2.14±0.26μmol, 2.26±0.31μmol로 증가하였다. (P<0.05), (표 1, 2, 그림 1)

#### ② PGE<sub>2</sub>(500ng/ml), DBcAMP(0.5mM) 및 Cycloheximide (2μg/ml) 이 염기성 인산분해효소 활성화에 미치는 영향.

PGE<sub>2</sub>, DBcAMP 단독 혹은 단백질 합성억제제인 Cycloheximide와 복합투여시 조골세포주 MC3T3E1 세포의 alkaline phosphatase 활성화에 미치는 영향을 관찰한 결과 대조군(1.76±0.09μmol)에 비해 각각 2.25±0.21μmol, 2.19±0.29μmol이고 PGE<sub>2</sub>(500ng/ml)와 DBcAMP(0.5mM)을 복합 첨가시에는 2.32±0.21μmol 이었다.

단백 합성 억제제인 Cycloheximide(2μg/ml)을 투여한 경우 대조군 (1.76±0.09μmol)에 비해 PGE<sub>2</sub>(500ng/ml)인 경우는 1.08±0.08μmol, DBcAMP(0.5mM)인 경우는 1.12±0.14μmol로

염기성 인산분해효소가 현저히 감소되었다.(P<0.05) (표 3, 그림 2)

#### ③ PGE<sub>2</sub> 와 DBcAMP가 MTTassay를 이용한 세포의 활성화에 미치는 영향

PGE<sub>2</sub>와 DBcAMP가 조골세포주 MC3T3E3 세포의 활성화에 미치는 영향을 관찰한 결과 PGE<sub>2</sub>의 약물학적 농도(10, 100, 500ng/ml)가 증가함에 따라 대조군 (99.95±6.19%)에 비해 110.70±8.74%, 124.68±6.24%, 136.82±7.43%로 증가하였으며, DBcAMP의 경우도 약물농도(0.01, 0.1, 0.5mM)가 증가함에 따라 112.04±9.16%, 129.76±8.42%, 140.28±9.12%로 증가하였다. (P<0.05) (Table 4, 5, Fig 3)

#### ④ PGE<sub>2</sub>가 MC3T3E1의 cyclic AMP 농도에 미치는 영향.

10, 100, 500ng/ml의 PGE<sub>2</sub> 첨가로 인한 cyclic AMP농도는 대조군의 6.44±0.76 nmol에 비해 각각 7.92±0.78 nmol, 12.21±1.84 nmol, 18.67±0.83 nmol로 현저히 증가 하였다. (P<0.05)(표 6, 그림 4)

### 2. 파골세포 형성에 미치는 영향

생쥐 골수세포를 8일간 배양시 대조군에서 TRAP양성인 단핵세포는 관찰되었으나 TRAP양성인 다핵세포는 관찰되지 않았다.(Photo 2) 조골세포가 파골세포의 형성에 미치는 영향을 관찰하기 위해 생쥐의 골수세포와 조골세포주 MC3T3E1를 coculture시 대조군에서 관찰되지 않은 TRAP양성인 다핵세포가 관찰되었다.(표 7, Photo 5) 생쥐 골수세포 단독배양시 10<sup>-5</sup>M, 10<sup>-6</sup>M의 PGE<sub>2</sub>를 첨가하여 배양한 경우, TRAP양성인 다핵세포의 형성이 대조군에 비해 유의성 있는 증가를 나타내었고 특징적으로 거대한 다핵세포를 관찰할 수 있었다.(표 7, Photo 4) 또한 생쥐 골수세포와 조골세포주 MC3T3E1의 coculture시 PGE<sub>2</sub>를 첨가하여 배양한 경우에서

**II 1. Effect of PGE<sub>2</sub> on alkaline phosphatase activity in osteoblastic clone MC3T3E1 cell.**

Group	Alkaline phosphatase activity ( $\mu$ mol substrate cleaved/hr)
Control	1.75 $\pm$ 0.04
PGE <sub>2</sub> (10ng/ml)	1.82 $\pm$ 0.04
PGE <sub>2</sub> (100ng/ml)	2.13 $\pm$ 0.24*
PGE <sub>2</sub> (500ng/ml)	2.23 $\pm$ 0.22*

Values are means  $\pm$  S.D.

\* Statistically different from control. (P<0.05)

**II 2. Effect of DBcAMP on alkaline phosphatase activity in osteoblastic clone MC3T3E1 cells**

Group	Alkaline phosphatase activity ( $\mu$ mol substrate cleaved/hr)
Control	1.75 $\pm$ 0.04
DBcAMP(0.01mM)	1.84 $\pm$ 0.06
DBcAMP(0.1mM)	2.14 $\pm$ 0.26*
DBcAMP(0.5mM)	2.26 $\pm$ 0.31*

Values are means  $\pm$  S.D.

\* Statistically different from control.(P<0.05)

**II 3. Effects of PGE<sub>2</sub>, DBcAMP, and cycloheximide on alkaline phosphatase activity in osteoblastic clone MC3T3E1 cells**

Group	Alkaline phosphatase activity ( $\mu$ mol substrate cleaved/hr)
Control	1.79 $\pm$ 0.09
PGE <sub>2</sub> (500ng/ml)	2.25 $\pm$ 0.21*
DBcAMP(0.5mM)	2.19 $\pm$ 0.29*
PGE <sub>2</sub> (500ng/ml)+DBcAMP(0.5mM)	2.32 $\pm$ 0.21*
PGE <sub>2</sub> (500ng/ml)+Cycloheximide(2 $\mu$ g/ml)	1.08 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>
DBcAMP(0.5mM)+Cycloheximide (2 $\mu$ g/ml)	1.12 $\pm$ 0.14 <sup>b</sup>

Values are means  $\pm$  S.D.

\* Statistically different from control. (P<0.05)

a Statistically different from PGE<sub>2</sub>(500ng/ml)(P<0.05)

b Statistically different from DBcAMP(0.5mM)(P<0.05)

**II 4. Cellular activity of PGE<sub>2</sub> on osteoblastic clone MC3T3E1 cells. (% By MTT Assay)**

Group	(% By MTT Assay)
Control	99.95 $\pm$ 6.19
PGE <sub>2</sub> (10ng/ml)	110.70 $\pm$ 8.74
PGE <sub>2</sub> (100ng/ml)	124.68 $\pm$ 6.24*
PGE <sub>2</sub> (500ng/ml)	136.82 $\pm$ 7.43*

Values are means  $\pm$  S.D.

\* Statistically different from control. (P<0.05)

**II 5. Cellular activity of DBcAMP on osteoblastic clone MC3T3E1 cells.(% By MTT Assay)**

Group	(% By MTT Assay)
Control	99.95 $\pm$ 6.19
DBcAMP(0.01mM)	112.04 $\pm$ 9.16
DBcAMP(0.1mM)	129.76 $\pm$ 8.42*
DBcAMP(0.5mM)	140.28 $\pm$ 9.12*

Values are means  $\pm$  S.D.

\*Statistically different from control. (P<0.05)

**II 6. Effect of PGE<sub>2</sub> on cyclic AMP levels in osteoblastic clone MC3T3E1 cells**

Group	cAMP (nmol/dish)
control	6.44 $\pm$ 0.76
PGE <sub>2</sub> (10ng/ml)	7.92 $\pm$ 0.78
PGE <sub>2</sub> (100ng/ml)	12.21 $\pm$ 1.84*
PGE <sub>2</sub> (500ng/ml)	18.67 $\pm$ 0.83*

Values are means  $\pm$  S.D.

\* Statistically different from control.(P<0.05)

**II 7. Effects of PGE<sub>2</sub> and osteoblastic MC3T3E1 cells on the formation of TRAP(+) multinucleated cells (MNCs)**

Group	Number of TRAP(+) MNCs/well
Control	0
PGE <sub>2</sub> 10 <sup>-6</sup> M	53.6 $\pm$ 6.43*
PGE <sub>2</sub> 10 <sup>-5</sup> M	80.2 $\pm$ 9.14*
Coculture with MC3T3E1 cells	6.41 $\pm$ 1.92*

Values are means  $\pm$  S. D.

\* Statistically different from control. (P<0.05)

표 8. Effect of PGE<sub>2</sub> on the formation of TRAP (+) MNCs in the coculture system

Group	Number of TRAP(+) MNCs/well
Coculture	6.41±1.92
Coculture + PGE <sub>2</sub> 10 <sup>-6</sup> M	21.44±5.86*

values are Mean ± S. D.

\* Statistically different from coculture (P<0.05)

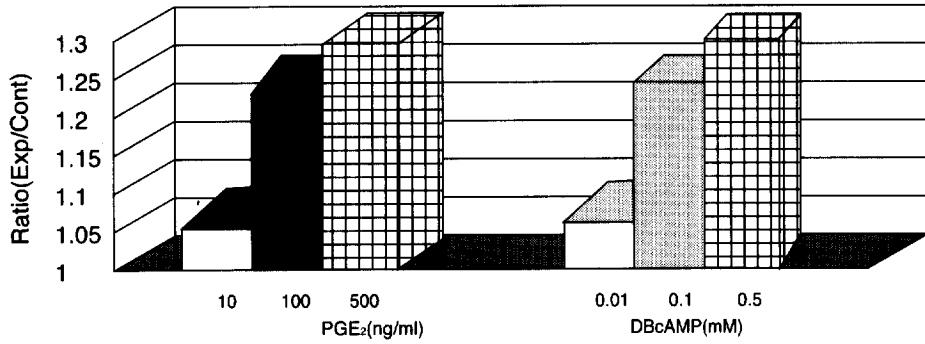


그림 1 Effects of PGE<sub>2</sub> and DBcAMP on alkaline phosphatase activity in clone MC3T3E1 cells

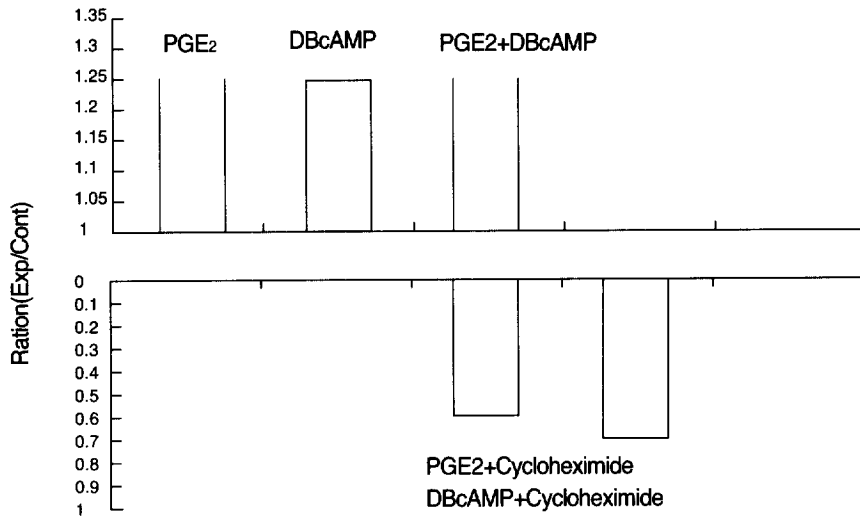


그림 2 Effects of PGE<sub>2</sub>, DBcAMP, and Cyclohexamide on alkaline phosphatase in clone MC3T3E1 cells

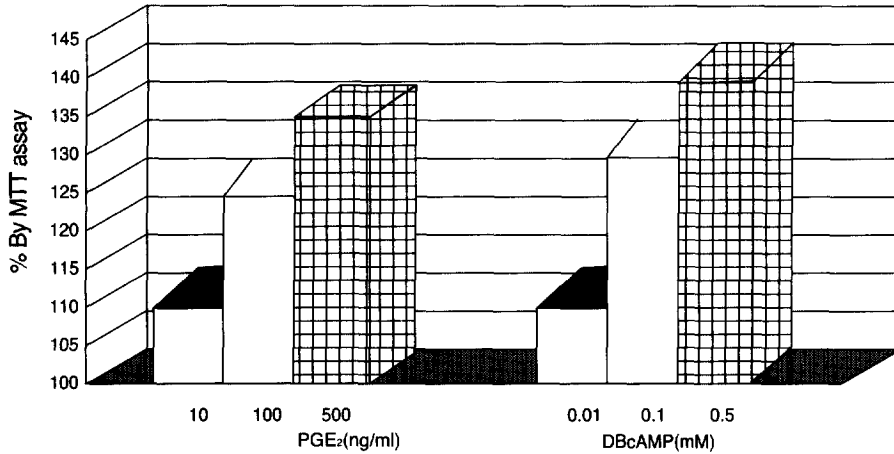


그림 3 Effects of PGE<sub>2</sub> and DBcAMP on clone MC3T3E1 cells

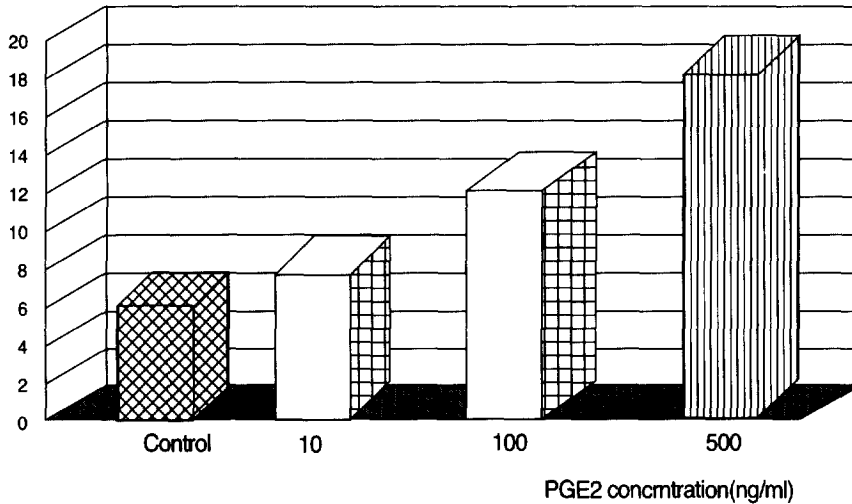


그림 4 Effects of PGE<sub>2</sub> on cyclic AMP levels in clone MC3T3E1 cells

조골세포주 MC3T3E1를 단독으로 coculture한 경우에 비해 TRAP양성인 다핵세포의 수가 증가하였다.(Table 8, Photo 6).

#### IV. 총괄 및 고찰

치주조직의 염증반응으로 숙주에서 생성되는 생물학적 활성물질에 관한 규명은 감염에 의한 지지결합조직이나 골의 파괴기전을 이해함에 있어 직접적인 수단이 된다.

골조직은 태생후에도 계속적인 골흡수와 형성으로 이어지는 개조가 반복되는 동적인 조직이며 이러한 골조직의 성장과 개조는 조골세포, 파골세포 및 그 전구세포의 증식, 분화 및 활성화에 영향을 미치는 여러 가지 전신적 조절물질과 국소조절물질에 의하여 조절되고 있다.

Arachidonic acid의 cyclooxygenase 산물인 prostaglandin(PG)은 생체내 autacoid의 하나로써 여러 조직에 존재하며 다양한 생물학적 작



용을 나타낸다. 골조직에 대한 PG의 작용에 관하여는 외인성 PG가 골조직 장기배양시 골조직 흡수를 촉진시킨다는 Klein과 Raisz<sup>11)</sup>(1970)의 보고가 있는 이래 많은 연구가 진행되어 왔다.

PG는 부갑상선 호르몬이나 Vitamin D<sub>3</sub>와 마찬가지로 골조직 장기배양시 <sup>45</sup>Ca의 유리 및 용해소체 효소의 유리를 증가시키며 여러 종류의 PG중 PGE<sub>2</sub>군 특히 PGE<sub>2</sub>에 의한 효과가 가장 큰 것으로 보고되어 있다.

골조직에 대한 연구를 위하여 골조직의 장기배양을 이용한 방법이 널리 이용되어 왔으나 골조직은 서로 다른 기능을 갖는 다양한 세포들로 이루어져 있으므로 골흡수촉진, 또는 억제물질이 어느 세포에 직접 작용하여 기능을 나타내는지를 규명하기 위하여는 각각의 골세포를 분리 배양하거나 osteoblastic clonal cell line이나 osteosarcoma cell line을 이용한 골세포 배양방법이 필수적이라 생각된다. 이러한 골조직 장기배양 및 골세포배양을 이용한 많은 연구결과 PGE<sub>2</sub>는 파골세포의 활성화 이외에도 골조직의 흡수와 밀접한 관계가 있는 유산 형성 및 용해소체의 유리를 촉진시키며 교원섬유의 합성도 억제시킴이 규명되었다.<sup>(6)</sup>  
<sup>61)</sup> 또한 PGE<sub>2</sub>는 생리적 골흡수의 유도체이며 치아 이동시의 골 재구성 같은 생리적 과정이 외에도 골수염, 류마티스성관절염, 악성종양에서의 골용해 또는 과칼슘혈증 같은 병적조건<sup>62</sup>  
<sup>63)</sup>에 있어서도 골흡수에 관여한다.

한편 PG에 의한 골흡수 촉진작용에는 cyclic AMP (cAMP)가 관여하는 것으로 생각되고<sup>64)</sup>  
<sup>64)</sup> 있으나 골흡수 촉진효과가 비교적 느리게 나타나며<sup>10)</sup> 짧은 시간 작용시킨후 지속적인 골흡수 촉진효과가 나타나지 않는 등 다른 골흡수 촉진 물질과 다른 효과를 나타낸다. 또한 Klein과 Raisz(1971)<sup>11)</sup>는 cAMP analogue인 dibutyryl cyclic AMP (DBcAMP)가 직접 골흡수를 촉진시키며, cAMP phosphodiesterase inhibitor인 theophylline은 낮은 농도의 PTH에

의한 골흡수촉진 효과를 증가시킨다고 보고하는 등 cAMP가 골흡수에 관여하는 것으로 알려져 있다.

반면 Chamber등(1984)<sup>30)</sup>은 PG가 골흡수를 촉진시키는 작용이외에 파골세포를 직접적으로 억제하여 골흡수를 감소시키고 조골세포의 증식을 야기하기도 한다고 보고하였으며 또한 DBcAMP와 cAMP phosphodiesterase inhibitor인 isobutyl methylxanthine에 의하여 조골세포에서 염기성 인산분해효소가 증가되었다고 보고하여 조골세포의 염기성 인산분해효소 증가에 cAMP가 관여한다고 시사하였다.

최근 여러 연구<sup>32-39)</sup>에서 사람과 개에 있어서 전신적으로 PGE<sub>2</sub>를 투여한 경우에 골표면에 새로운 골형성이 유발되었으며, Mori등(1990)은<sup>45)</sup> estrogen이 결핍된 osteopenic rat에서도 cancellous bone mass와 trabecular number가 증가하였다고 보고하였고 ovariectomized rat에서도 골 형성이 증가되었다고 하였다.

MC3T3E1 세포는 Kodama등(1981)에<sup>38)</sup> 의하여 신생쥐(C57BL/6)의 두개골에서 분리한 조골세포인데, 주로 높은 염기성 인산분해효소 활성, type I collagen 합성능, 장기간 배양시 골기질의 석회화를 일으키는 세포로 알려져 있다<sup>65-67)</sup>. 염기성 인산분해효소는 칼슘과 인 대사에 관여하는 효소로 조골세포의 중요한 지표<sup>68)</sup>로서 생산, 분비하는 특징적인 생화학적 산물로서 비교적 높은 pH인 8~10 정도에서 monoester phosphate를 가수분해해서 주로 뼈가 형성될때 높은 농도로 발현된다<sup>69)</sup>.

본 실험에서는 조골세포주 MC3T3E1을 PGE<sub>2</sub> 10, 100, 500ng/ml와 DBcAMP 0.01, 0.1, 0.5mM을 첨가한 배양액으로 48시간 동안 배양한 경우 대조군에 비해 PGE<sub>2</sub>와 DBcAMP의 경우 약물농도 의존성으로 유의성있는 alkaline phosphatase의 증가가 관찰되었으며 이는 PG가 파골세포에 작용하여 골흡수를 증가시킬 뿐만 아니라 조골세포에 작용함으로써 골형성에도 관여하고 있음을 반영하는 결과로

사료된다.

cAMP analogue인 DBcAMP(0.5mM)을 단독으로 배양액내에 첨가한 경우  $2.19 \pm 0.29 \mu\text{mol}$ 로 유의성 있는 염기성 인산분해효소 증가가 관찰되었고 PGE<sub>2</sub>(500ng/ml)을 단독으로 배양액내에 첨가한 경우에는  $2.25 \pm 0.21 \mu\text{mol}$ 로 유의성 있는 alkaline phosphatase 증가가 관찰되었고 DBcAMP(0.5mM)과 PGE<sub>2</sub>(500ng/ml)을 복합하여 배양액내에 첨가한 경우  $2.32 \pm 0.21$ 로 유의성 있는 증가가 관찰되었다.

단백질 합성 억제제인 cycloheximide(2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )을 투여한 경우 대조군에 비해 PGE<sub>2</sub>(100ng/ml)와 DBcAMP(0.5mM)의 경우 염기성 인산분해효소의 유의성 있는 감소를 보였는데, 이는 PGE<sub>2</sub>와 DBcAMP가 새로운 염기성 인산분해 효소의 형성을 증가시키는 결과로 사료된다.

PGE<sub>2</sub>와 DBcAMP가 세포의 활성화에 미치는 영향을 관찰하기 위해 PGE<sub>2</sub> 10, 100, 500ng/ml 및 DBcAMP 0.01, 0.1, 0.5mM을 배양액내에 첨가하여 MTT assay를 시행한 결과 대조군에 비해 약물농도 의존적으로 증가하였으며 DBcAMP의 경우도 약물농도(0.01, 0.1, 0.5mM)가 증가함에 따라 약물농도 의존성으로 세포 활성화의 증가를 관찰하였다.

한편 PGE<sub>2</sub>가 세포내 cAMP농도에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 PGE<sub>2</sub> 10, 100, 500ng/ml을 배양액에 첨가하여 세포내 cAMP 농도를 측정된 결과 대조군에 비하여 약물농도 의존성으로 세포내 cAMP 농도가 증가하는 것을 관찰하였는데 PGE<sub>2</sub>에 의한 염기성 인산분해효소 활성화의 증가는 세포내 cAMP 농도를 증가시켜서 나타난 결과로 사료되며 cAMP가 조골세포의 분화와 밀접한 관련이 있는 것으로 생각된다.

파골세포의 연구를 위해 여러 생체 및 시험관 실험 등이 개발되어 왔으나, 파골세포의 형태학적 특징이 부족하거나 파골세포의 생화학적 특성을 규명하기에는 그 수가 충분하지

못한 단점이 있어서, 최근에는 파골세포가 조혈기관 기원<sup>70), 71)</sup>임을 이용하여, 다수의 파골세포 전구세포를 얻기 위하여 고양이, 생쥐, 원숭이와 사람등의 골수세포를 이용한 배양방법<sup>72)</sup>이 널리 이용되고 있다. 이러한 배양방법은 골흡수를 촉진시키는 호르몬들이 파골세포 전구세포의 증식과 융합을 촉진하는지와 다핵세포에 어떤 영향을 미치는가를 연구하는데 유용하게 이용될 수 있으며, 또한 다른 종류의 세포가 파골세포의 형성과 활동에 영향을 미치는지 연구하는데 이용될 수 있다. 본 실험은 조골세포가 파골세포의 형성에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 파골세포의 전구세포가 존재하는 생쥐 골수세포와 조골세포주 MC3T3E1를 coculture하였다.

PGE<sub>2</sub>는 prostaglandin analogue 중 가장 강력한 골흡수능을 가진 것으로 알려져 있다. 또한 PGE<sub>2</sub>는 파골세포의 크기와 핵의 수 증가뿐 아니라 특징적으로 주름변연의 영역도 증가시키는 등 형태의 변화에도 영향을 주고 있으며<sup>73)</sup>, 이러한 영향은 미리 존재하는 파골세포의 활성화와 전구세포의 분화에 모두 해당하는 것이라고 사료된다.

본 실험에서 생쥐 골수세포 배양시 PGE<sub>2</sub>를 첨가한 경우 TRAP양성인 다핵세포가 관찰되어 PGE<sub>2</sub>가 PTH와는 달리 파골세포의 수에는 영향을 주지 못한다는 Mundy와 Roodman<sup>74)</sup>(1987)의 보고와는 상반된 결과를 나타냈으나, PGE<sub>2</sub>가 파골세포의 수를 증가시킨다는 Vanderviel과 Talmage<sup>7)</sup>(1979)의 보고와 일치하였으며, 생쥐 골수세포 배양시 파골세포 유사세포의 생성을 증가시켰다는 Akatsu등(1989)<sup>75)</sup>의 보고와도 일치하였다. 이와 같은 결과는 PGE<sub>2</sub>가 전구세포의 분화를 촉진한 결과로 생각되며 PGE<sub>2</sub>가 파골세포의 분화에 영향을 미쳐 골흡수를 촉진시키리라 생각된다.

골조직 배양 및 골세포 배양을 이용한 최근의 연구결과 지금까지 알려진 골흡수기전에 대하여 많은 의문점이 제기되고 있다. 즉 Slive

## V. 결론

등 (1982)<sup>76)</sup>은 골흡수를 일으키는 대표적인 물질인 부갑상선 호르몬의 수용체가 조골세포에 존재한다고 보고하였으며, 조골세포가 파골세포에 의한 골흡수를 조절하고 Sakamoto, S와 Sakamoto, M (1982)<sup>77)</sup>는 조골세포로부터 골기질분해효소인 교원질 분해효소가 합성된다고 보고하는등 조골세포가 골형성뿐만 아니라 골흡수에도 관여한다는 보고가 늘고 있다.

또한 조골세포가 파골세포의 형성에 관여한다는 개념이 Rodan과 Martin(1981)<sup>78)</sup>에 의해 처음 제안된 이래, Takahashi등 (1988c)<sup>79)</sup>은 미분획 생쥐 골수세포 배양을 이용하여 조골세포가 세포와 세포간 접촉을 통하여 파골세포 형성에 관여함을 보고한 바 있으며 Suda등 (1992)<sup>80)</sup>은 마우스 골수세포 배양시 파골세포가 주로 염기성 인산분해효소 양성인 세포집락 근처에서 형성됨을 보고하였다.

본 실험에서는 조골세포주 MC3T3E1과 생쥐 골수세포를 coculture하여 조골세포가 파골세포의 분화에 관여할 가능성 여부를 규명하고자 하였는데, 골수세포 단독배양시 PGE<sub>2</sub> 10<sup>-5</sup>M, 10<sup>-6</sup>M를 첨가한 경우 다핵의 파골세포가 형성되었으며 조골세포주 MC3T3E1과 coculture하면서 PGE<sub>2</sub>를 첨가한 경우 그수가 증가 되었다. 이는 조골세포에 의해 형성된 물질이 생쥐 골수세포 배양시 파골세포의 수를 증가시킨다는 보고<sup>81, 82)</sup>와도 유사한 결과를 나타내었다. 따라서 조골세포로부터 파골세포의 분화를 촉진시키는 물질이 생성될것으로 사료된다.

본 실험의 결과를 종합해볼때 PGE<sub>2</sub>가 골형성과 흡수에 모두 관여하고 조골세포가 내인성 PGE<sub>2</sub>를 형성한다는 Rodan과 Martin(1981)<sup>78)</sup>등의 보고와 더불어 골의 흡수와 이에 뒤따르는 골형성이 수반되는 골의 개조(remodelling)시 조골세포와 파골세포간의 상호작용의 국소적인 중개물질로 PGE<sub>2</sub>가 작용할수 있음을 시사하여 주는 실험적 근거로 사료된다.

생체내 국소적 조절물질인 prostaglandin이 조골세포의 활성화에 미치는 영향을 알아보기와 조골세포주 MC3T3E1세포를 10% fetal bovine serum이 포함된  $\alpha$ -minimal essential medium( $\alpha$ -MEM)에서 배양한 후 0.4% fetal bovine serum만으로 배양한 군을 대조군으로, Prostaglandin 및 DBcAMP가 첨가된 군을 실험군으로 하여 각 군의 염기성 인산분해효소 활성화도, MTT assay, 세포내 cyclic AMP 농도를 측정하였다. prostaglandin이 파골세포 형성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 7-8주된 웅성생쥐의 대퇴골과 경골을 무균적으로 적출하고 골수강내에 1ml의  $\alpha$ -MEM을 천천히 주사하여 골수세포를 모은 다음 24-well plate에 1.5-2 $\times$ 10<sup>6</sup>cells/well이 되도록 분주하고 8일 동안 배양한 군을 대조군으로, PGE<sub>2</sub>(10<sup>-5</sup>M, 10<sup>-6</sup>M)를 첨가하여 배양한 군을 실험군으로 하여 TRAP 염색을 실시하고 파골세포의 형성을 관찰한 결과 다음의 결과를 얻었다.

1. PGE<sub>2</sub>의 약물농도(10, 100, 500ng/ml) 및 DBcAMP(0.01, 0.1, 0.5mM)의 농도가 증가함에 따라 염기성 인산분해효소 활성화도가 증가하였고(P<0.05), 단백질 합성 억제제인 cycloheximide(2 $\mu$ g/ml)에 의해서 PGE<sub>2</sub>(500ng/ml)나 DBcAMP(0.5mM)에 의해서 증가된 염기성 인산분해효소 활성화도가 유의성 있게 감소되었다 (P<0.05).
2. PGE<sub>2</sub>(10, 100, 500ng/ml)와 DBcAMP(0.01, 0.1, 0.5mM)농도가 증가함에 따라 MC3T3E1세포의 활성화가 유의성 있게 증가하였고 (P<0.05), PGE<sub>2</sub>의 약물농도(10, 100, 500ng/ml)가 증가함에 따라 세포내 cAMP 농도가 유의성 있게 증가 하였다 (P<0.05).
3. 생쥐 골수세포를 단독으로 배양한 경우 TRAP 양성인 단핵세포는 관찰되었으나

TRAP 양 성인 다핵세포는 거의 관찰되지 않았으며, 조골세포주 MC3T3E1과 coculture시 다핵의 파골 세포가 다수 관찰되었다.

4. 생쥐 골수세포의 단독 배양시 PGE<sub>2</sub>(10<sup>-5</sup>, 10<sup>-6</sup>M)을 첨가하여 배양한 경우 다핵의 파골세포의 형성이 관찰되었다.
5. 생쥐 골수세포를 조골세포주 MC3T3E1과 coculture하면서 PGE<sub>2</sub>를 첨가하여 배양한 경우 파골세포가 생쥐 골수세포를 조골세포주 MC3T3E1과 coculture한 경우보다 다수 관찰 되었다.

이상의 실험 결과를 종합해 볼 때 PGE<sub>2</sub>가 골형성과 흡수에 모두 관여하고, 골의 흡수와 골형성이 수반되는 골개조시 조골세포와 파골세포간의 국소적인 중개물질로 상호작용하는 것으로 사료된다.

### 참고문헌

1. Meghji, S. : Bone remodelling. Br. Dent. J. 172 : 235-242, 1992.
2. Chapman, D. : Lipid dynamics in cell membranes. In Cell Membranes, ed. Weissman, G. l Clairborne, R., New York : HP Publishing Company, 13-23, 1975.
3. Kuehi, F. A. Jr & Egan, R. W. : Prostaglandins, Arachidonic acid, and inflammation, Science, 210: 978-984, 1980.
4. Solomon, L. N., Julhin, L, Kirschenbaum, M. B. : Prostaglandin on cutaneous vasculature, J, of Invest. Dermatol., 51 : 280-282, 1968.
5. Collier, J. G., Karim, S. M. M., Robinson, B, Somers, K. : Action of prostaglandins A<sub>2</sub>, E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub> and F<sub>2</sub> on superficial hand veins of man, Br. J. of Pharmacol. 44 : 374-375, 1972.
6. Rifkin, B. R. & Tai, H. H : Elevated thromboxane B<sub>2</sub> levels in periodontal disease, J. Periodont. Res. 16 : 194-198, 1981.
7. Vanderwiel, C., & Talmage. R. V. : Comparison of the effects of prostaglandin E<sub>2</sub> and parathyroid hormone on plasma calcium concentration and osteoclast function. Endocrinology 105: 588-598, 1979.
8. Dietrich, J.W., Goodson J.M., Raisz. L.G. : Stimulation of bone resorption by various prostaglandins in organ culture. Prostaglandins 10:232-240, 1975.
9. Nefussi, J. R., & Baron, R. : PGE<sub>2</sub> stimulates both resorption and formation of bone in vitro : differential responses of the periosteum and the endosteum in fetal rat long bone cultures. Anat. Rec. 211 : 9-16, 1985.
10. Eilon, G., & Raisz. L.G. : Comparison of the effect of stimulators and inhibitors of resorption on the release of lysosomal enzymes and radioactive calcium from fetal bone in organ culture. Endocrinology 103: 1969-1976, 1978.
11. Klein, D.C., & Raisz L.G. : Prostaglandins: Stimulation of bone resorption in tissue culture. Endocrinology 86 : 1436-1443, 1970.
12. Raisz, L.G., & Martin. T.J. : Prostaglandins in bone and mineral metabolism, In Bone and Mineral Research 2, edited by Peck, W. A., p286, Elsevier Amsterdam, 1984.
13. Voelkel EF, Tashjian AH Jr, Levine L : Cyclooxygenase products of arachidonic acid metabolism by mouse bone in organ culture. Biochim Biophys Acta 620: 418-28, 1980.

14. Horowitz. MC. : Cytokines and estrogen in bone : anti-osteoporotic effects. *Science* 260: 626-627, 1993.
15. Hausmann. E., Raisz. L.G., Miller WA : Endotoxin : Stimulation of bone resorption in tissue culture, *Science* 168: 862-864, 1970.
16. Raisz. L.G : Bone resorption in tissue culture, Factors influencing the response to parathyroid hormone. *J. Clin. Invest.* 44: 103-116, 1965.
17. Roodman. G. D., Ibbotson. K. J., Macdonald. B. R. : 1.25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> causes formation of multinucleated cells with several osteoclast characteristics in cultures of primate marrow. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 82. 8213-8217, 1985.
18. McSheehy, P.M.J., & Chambers. T.J. : Osteoblastic cells mediate osteoclastic responsiveness to parathyroid hormone. *Endocrinology* 118 : 824-832, 1986a.
19. McSheehy, P.M.J., & Chambers. T.J. : Osteoblast-like cells in the presence of parathyroid hormone release soluble factor that stimulates osteoclastic bone resorption. *Endocrinology* 119 : 1654-1662, 1986b.
20. Mcsheeey. P. M. J., & Chambers. T. J. : 1.25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> stimulates rat osteoblastic cells to release a soluble factor that increase osteoclastic bone resorption. *J. Clin. Invest.* 80. 425-429, 1987.
21. Thomson. B. M., Mundy. G. R., Chambers. T. J. : Tumor necrosis factors alpha and beta induce osteoblastic cells to stimulate osteoclastec bone resorption. *J. Immunol.* 138: 775-779, 1987.
22. Thomson. B. M., Saklatvala. J., Chambers. T.J. : Osteoblasts mediate interleukin I responsiveness of bone resorption by rat osteoclasts. *J. Exp. Med.* 164 : 104-112, 1986.
23. Pfeilschifter. J., Chenu. C., Bird. A., Mundy. G. R., Roodman. G. D. : Interleukin-I and tumor necrosis factor stimulate the formation of human osteoclast like cells in vitro. *J. Bone. Mineral. Res.* 4 : 113-118, 1989.
24. Ishimi. Y., Miyaura. C., Jin. C.H., Akatsu. T., Abe. E., Nadamura. Y., Yamaguchi. A., Matsuda. T., Hirano. T., Kishimoto. T., Suda. T : IL-6 is produced by osteoblasts and induce bone resorption. *J. Immunol.* 145 : 3297-3303, 1990.
25. Tashjian, Jr., A.H., levine. L. : Epidermal growth factor stimulates prostaglandin production and bone resorption in cultured mouse calvaria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 85: 966-974, 1978.
26. Tashjian, Jr., A. H., E. F. Voelkel, M. Lazzaro, F.R. Singer, A.B. Roberts, R. Derynck, M. E. Winkler., Levine. L. :  $\alpha$  and  $\beta$  human transforming growth factors stimulte prostaglandin production and bone resorption in cultured mouse calvaria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:4535-4542, 1985.
27. Tashjian, Jr., A. H., E. L. Hohmann, H. N. Antoniades., Levne. L. : Platelet-derived growth factor stimulates bone resorption via a prostaglandin-mediated mechanism. *Endocrinology* 111 : 118-126, 1982.
28. Tashjian, Jr., A. H., E. F. Voelkel, M. Lazzaro, D. Gold, T. Bosma., Levine. L. : Tumor necrosis factor- $\alpha$  (cachectin) stimulates bone resorption in mouse calvaria via a prostaglandin-mediated mechanism. *Endocrinology* 120 : 2029-2038, 1987.
29. Park. K.S., Ko. J.S. : Effects of prostaglandin E<sub>2</sub> on osteoclast of fetal rat

- calvaria in vitro. 서울 치대 논문집. 6 : 31-42, 1982.
30. Chambers, T.J., K. Fuller., Athanasou. N.A. : The effect of prostaglandins I<sub>2</sub>, I<sub>1</sub>, E<sub>2</sub> and dibutyryl cyclic AMP on the cytoplasmic spreading of rat osteoclasts. Br. J. Exp. Path. 65 : 557-572, 1984
  31. Chambers, T. J. : The pathobiology of the osteoclast. J. Clin. Pathol. 38 : 241-252, 1985.
  32. Ringel, R. E., Brenner, J. I., Hancy, P. J., Moulton, A. L., Berman, M. A. : Prostaglandin-induced periostitis : a complication of long term PGE<sub>1</sub> infusion in an Infant with congenital heart disease. Radiology 142 : 657-668, 1982
  33. Ueda, K., Satio, A., Nskano, H., Aosgima, M., Yokota, M., Muraoka, R., Iwaya. : Cortical hyperostosis following long-term administration of prostaglandin E<sub>1</sub> in infants with cyanotic congenital heart disease. J Pediatr 97 : 834-836, 1980.
  34. Ringel, RE., Brenner, JI., Haney, PJ., Burns, JE., Mouton, AL. : Prostaglandin-induced periostitis. A complication of long-term PGE infusion in an infant with congenital heart disease. Radiology 142 : 657-658, 1982.
  35. Kimmel, DB., Jee, WSS.: A quantitative histologic analysis of the growing long bone metaphysis. Calcif Tissue Int 32 : 113-122, 1980.
  36. Jorgensen, HRI., Svanholm, H., Host, A. : Bone formation induced in an infant by systemic prostaglandin E<sub>2</sub> administration. Acta Orthop Scand 59 : 464-466, 1988.
  37. Chao, CF., Shih, C., Wang, TM., Lo. TH. : Effects of prostaglandin E<sub>2</sub> on alveolar bone resorption during orthodontic tooth movement. Acta Anat 132 : 304-309, 1988.
  38. Marks, SC Jr., Miller, SC. : Local infusion of prostaglandin E<sub>1</sub> stimulates mandibular bone formation in vivo. J Oral Pathol 17 : 500-505, 1988.
  39. Sone, K., Tashiro, M., Fujinaga, T., Romomasu, T., Tokayama, K., Kurome, T. : Long-term low-dose prostaglandin E administration, J Pediatr 97 : 866-867, 1980.
  40. Jee, W., S. S., Ueno, K., Haba, T., Deng, Y, P., : Prostaglandin E<sub>2</sub>-induced bone changes in growth rats. Calcif. Tissue Int. 36, Suppl. 2 : S37, 1984 (abstract)
  41. Martin, T, J., Livesey, S, A., Partridge, N. C., Zajac, J. D., NG, K. W. In : Endocrine control of bone and calcium metabolism(D. V. Cohn, T. Fujita, J. T. potts(jr.) and Talmage V. eds.) Elsevier Science Publishers B. V.(Amsterdam), pg 159, 1984.
  42. Shih, MS., Norrdin, RW. : Effects of prostaglandins on regional remodeling changes during tibial healing in beagles. Calcif Tissue Int 39 : 191-197, 1986.
  43. Kimmel, DB., Jee, WSS. : Bone cell kinetics during longitudinal bone growth in the rat. Calcif Tissue Int 39 : 191-197, 1980.
  44. Li XJ., Jee WSS., Li YL., Patterson-Buckendahl, P. : Transient effects of subcutaneously administered prostaglandin E<sub>2</sub> on cancellous and cortical bone in young adult dogs. Bone 11 : 353-364, 1990
  45. Mori, S., Jee, WSS., Li XJ., Chan, S., Kimmel, DB. : Effects of prostaglandins E<sub>2</sub> in production of new cancellous bone in the axial skeleton of ovariectomized rats. Bone 11 : 103-113, 1990.

46. Jee, WSS., Ke, HZ., Li, XJ. : Long-term anabolic effects of prostaglandin E<sub>2</sub> on tibia diaphyseal bone in male rats. *Bone Miner* 15 : 33-35, 1991.
47. Mori, S., Jee, WSS., Li, XH. : Production of new trabecular bone in osteopenic ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int* 50 : 80-87, 1992.
48. Ke, HZ., Jee, WSS., Mori, S., Li, XJ., Xiao, J., Kimmel, DB. : Effects of long-term daily administration of Prostaglandin E<sub>2</sub> on maintaining elevated proximal tibial metaphyseal cancellous bone mass in male rats. *Calcif Tissue Int* 50 : 245-252, 1992.
49. Shih, MS., Norrdin, RW. : Effect of PGE<sub>2</sub> on regional cortico-endosteal remodeling in beagles with fractured ribs : a histomorphometric study. *Bone Miner* 3 : 27-34, 1987.
50. Risto, O., Wahlstrom, O., Abdiu, A., Walz, T. : Effect of platelet-derived growth factor on heterotopic bone formation in rats. *Acta Orthop Scand* 62 : 49-51, 1991.
51. Ro, J., Sudmann, E., Marton, P. F. : Effects of indomethacin on fracture healing in rats. *Acta Orthop. Scand.* 47 : 588-599, 1976.
52. Chyun, Y. S., Raisz, L. G. : Stimulation of bone formation by Prostaglandin E<sub>2</sub>. *Prostaglandins* 27 : 96-102, 1984.
53. Feyen, J. H. M., A. D. Bon, A. can der Plas, C. W. G. Lowik., Nijweide, P. J. : Effect of exogenous prostanoids on the proliferation of osteoblast-like cells in vitro *Prostaglandins* 30 : 827-838, 1985.
54. McCarthy, TL., Centrella, M., Raisz, LG., Canalis, E. : Prostaglandin E<sub>2</sub> stimulates insulin-like growth factor I synthesis in osteoblast-enriched cultures from fetal rat bone. *Endocrinology* 128 : 2895-2900, 1991.
55. Canalis, E. : Effect of insulin like growth factor I on DNA and protein synthesis in cultured rat calvaria. *J Clin Invest* 66 : 706-719, 1980.
56. Hock, JM., Centrella, M., Canalis, E. : Insulin-like growth factor has independent effects on bone matrix formation and cell replication. *Endocrinology* 122 : 254-260, 1988.
57. Schmed, C., Guler, HP., Rowe, D., Froesch, ER. : Insulin-like growth factor I regulates type I procollagen mRNA steady state levels in bone of rats. *Endocrinology* 125 : 1575-1580, 1989.
58. 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 : 899-901, 1981.
59. Mosmann, T. : Rapid colorimetric assays for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol Methods.* 65 : 55-62, 1983.
60. Lerner, U., Gustafson, G.T. : Inhibitory effect of dibutyryl cyclic AMP on the release of calcium, inorganic phosphate and lysosomal enzymes from calvarial bones cultured for 24 hours. *Acta Endocrine.* 91 : 730-742, 1979.
61. Lerner, U. : The effect of dibutyryl cyclic AMP and PGE<sub>2</sub> on lysosomal enzyme release and lactate production in relation to bone resorption in vitro. *Acta Physiol. Scand.* 110 : 123-132, 1980.
62. Tashjian, A.H., Voelkel, E. F., Levine, L., Goldhaber, P. : Evidence that the bone resorption-stimulating factor produced by mouse fibrosarcoma cells is prostaglandin E<sub>2</sub>

- : A new model for the hypercalcemia of cancer. *J. Exp. Med.* 136 : 1329-1343, 1972
63. Leonhardt, A., Timmermanns, G., Roth, B., Seyberth, H. W. : Calcium homeostasis and hypercalcuria in hyperprostaglandin E syndrome *J. Pediatrics.* 120 : 546-554, 1992.
  64. Marcus, R., Ormer. F. B. : Cyclic AMP production in rat calvaria in vitro : Interaction of prostaglandins with parathyroid hormone. *Endocrinology* 101 : 1570-1582, 1977.
  65. Kurihara, N., Ishizuka, S., Kiyoki, M., Haketa, Y., Ikeda, K., Kumegawa, M. : Effects of 1,25-dihydroxyvitamin D on osteoblastic MC3T3E1 cells. *Endocrinology* 118 : 940-947, 1986.
  66. Nakatani, Y., Tsunoi, M., Hakeda Ym Kurihara, N., Fujita, K., Kumegawa, M. : Effects of parathyroid hormone on cAMP production and alkaline phosphatase activity in osteoblastic clone MC3T3E1 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 123 : 894-898, 1984.
  67. Sudo, H., Kodama, H-A., Amagai, Y., Yamamoto, S., Kasai, S. : In vitro differentiation and calcification in a new clonal osteogenic cell line derived from newborn mouse calvaria. *J Cell Biol* 96 : 191-198, 1983.
  68. Krzyzstof. H. W., Reddi. A. H. : Alkaline phosphatase as a Marker of osteoinductive cells *Calcif. Tissue. Int.* 39 : 382-385, 1986.
  69. Doty. S. B., Schofield. B. H. : Enzyme histochemistry of bone and cartilage cells. *Prog. Histochem. Cytochem.* 8 : 1-38, 1976.
  70. Ko, J. S., Bernard, G. W. : Osteoclast formation in vitro from bone marrow mononuclear cells in osteoclase-free bone. *Am. J. Anat.* 161 : 415-428, 1981.
  71. Scheven, B. A. A., Visser, J. W. M., Nijweide, P. J. : In vitro osteoclast generation from different bone marrow fractions, including a highly enriched hematopoietic stem cell population. *Nature* 321 : 79-81, 1986.
  72. Takahashi, N., Yamana, H., Yoshikii, S., Roodman, G. D., Mundy, G. R., Jones, S. J., Boyde, A., Suda, T. : Osteoclast-like cell formation and its regulation by osteotropic hormones in mouse bone marrow cultures. *Endocrinology* 122 : 1373-1382, 1988a.
  73. Holtrop, M. E., King, G. J., Raisz, L. G. : Factors influencing osteoclast activity as measured by ultrastructural morphometry, In *Endocrinology of Calcium Metabolism*, edited by Copp, D. H. and Talmage, A. R., pp 91-96, Excerpta Medica, Amsterdam, 1978.
  74. Mundy, G. R., Roodman, G. D. : Osteoclast ontogeny and function, In *Bone and Mineral Research*, vol. 5, edited by Peck, W. A., pp 209-279, Elsevier, Amsterdam, 1987.
  75. Akatsu, T., Takahashi, N., Debari, K., Morita, I., Murota, S., Nagata, N., Takatani, O., Suda, T. : Prostaglandins promote osteoclast-like cell formation by a mechanism involving cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate in mouse bone marrow cell cultures. *J. Bone Min. Res.* 4 : 29-35, 1989.
  76. Silve, C.M., G.T. Hradek, A.L. Jones., Arnaud, C.D. : Parathyroid hormone receptor in intact embryonic chicken bone : Characterization and cellular localization. *J. Cell Biol.* 94 : 379-389, 1982.
  77. Sakamoto, S., Sakamoto, M. : Biochemical and immunohistochemical studies on collagenase in resorbing bone in tissue



- culture. *J. Periodontal Res.* 17 : 523-536, 1982.
78. Rodan, G. A., Martin, T. J. : Role of osteoblasts in hormonal control of bone resorption. A hypothesis. *Calcif. Tissue. Int.* 33 : 349-358, 1981.
79. Takahashi, N., Akatsu, T., Udagawa, N., Sasaki, T., Yamaguchi, A., Moseley, J. M., Martin, T. J., Suda, T. : Osteoblastic cells are involved in osteoclast formation. *Endocrinology* 123 : 2600-2602, 1988c.
80. Suda, T., Takahashi, N., Martin, T. J. : Modulation of osteoclast differentiation. *Endocrine. Rev.* 13 : 66-80, 1992.
81. Abe, E., Ishimi, Y., Takahashi, N., Akatsu, T., Ozawa, H., Yamana, H., Yoshiki, S., Suda, T. : A differentiation-inducing factor produced by the osteoblastic cell line MC3T3E1 stimulates bone resorption by promoting osteoclast formation. *J. Bone Min. Res.* 3 : 635-645, 1988.
82. Hiura, K., Sumitani, K., Kawata, T., Higashino, K., Okawa, M., Sato, T., Hakeda, Y., Kumegawa, M. : Mouse osteoblastic cells (MC3T3E1) at different stages of differentiation have opposite effects on osteoclastic cell formation. *Endocrinology* 128 : 1630-1637, 1991.

### Explanation for Photo

Photo 1. An inverted photomicrograph of osteoblastic clone MC3T3E1(×100)

Photo 2. TRAP stain of mouse bone marrow cells cultured with vehicle for 8days. TRAP(+) MNCs were not observed.(×100)

Photo 3. TRAP stain of mouse bone marrow cells cultured with PGE2 for 8days. Large TRAP(+) MNCs were shown.(×40)

Photo 4. TRAP stain of mouse bone marrow cells cultured with PGE2 for 8days. Large TRAP(+) MNCs were shown.(×100)

Photo 5. TRAP stain of mouse bone marrow cells and osteoblastic clone MC3T3E1 cells for 8days. (×100)

Photo 6. TRAP stain of mouse bone marrow cells and osteoblastic clone MC3T3E1 cells cultured with PGE2 for 8days.(×100)

## 목성규 논문 사진 부도(1)

Photo 1

Photo 2

Photo 3

Photo 4

Photo 5

Photo 6

## The Effects of Prostaglandin and Dibutyl cAMP on Osteoblastic Cell Activity and Osteoclast Generation

Sung-Kyu Mok, Hyung-Keun You, Hyung-Shik Shin

Department of Periodontology, College of Dentistry, Wonkwang University

To maintain its functional integrity, bone is continuously remodelled by a process involving resorption by osteoclasts and formation by osteoblasts. In order to respond to changes in the physical environment or to trauma with the relevant action, this process is strictly regulated by locally synthesized or systemic factors. Prostaglandin E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>) is perhaps one of the best studied factors, having been known to affect bone cell function for several decades.

PGE<sub>2</sub> has both anabolic and catabolic activities. Excess of PGE<sub>2</sub> has been implicated in a number of pathological states associated with bone loss in a number of chronic inflammatory conditions such as periodontal disease and rheumatoid arthritis. PGE<sub>2</sub> and other arachidonic acid metabolites have been shown to be potent stimulators of osteoclastic bone resorption in organ culture.

The anabolic effects of PGE<sub>2</sub> were first noticed when an increase in periosteal woven bone formation was seen after the infusion of PGE<sub>2</sub> into infants in order to prevent closure of the ductus arteriosus. The cellular basis for the catabolic actions of PGE<sub>2</sub> has been well characterized. PGE<sub>2</sub> increases osteoclast recruitment in bone marrow cell cultures. Also PGE<sub>2</sub> has a direct action on osteoclast serving to inhibit activity and can also indirectly activate osteoclast via other cells in the vicinity, presumably osteoblast.

The cellular mechanisms for the anabolic actions of PGE<sub>2</sub> are not nearly so well understood. The purpose of this paper was to study the effects of PGE<sub>2</sub> and dibutyl(DB)cAMP on osteoblastic clone MC3T3E1 cells and on the generation of osteoclasts from their precursor cells.

The effect of PGE<sub>2</sub> and DBcAMP on the induction of alkaline phosphatase(ALP) was investigated in osteoblastic clone MC3T3E1 cells cultured in medium containing 0.4% fetal bovine serum.

PGE<sub>2</sub> and DBcAMP stimulated ALP activity and MTT assay in the cells in a dose-dependent manner at concentrations of 10-500ng/ml. Cycloheximide, protein synthesis inhibitor, inhibited the stimulative effect of PGE<sub>2</sub> and DBcAMP on ALP activity in the cells.

PGE<sub>2</sub> also increased the intracellular cAMP content in a dose-dependent fashion with a maximal effect at 500ng/ml.

The effect of PGE<sub>2</sub> on the generation of osteoclasts was investigated in a coculture system of mouse bone marrow cells with primary osteoblastic cells cultured in media containing 10% fetal bovine serum.

After cultures, staining for tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP)-marker enzyme of osteoclast was performed. The TRAP(+) multinucleated cells (MNCs), which have 3 or more nuclei, were counted. More TRAP(+) MNCs were formed in coculture system than in control group. PGE<sub>2</sub> (10<sup>-5</sup>–10<sup>-6</sup>M) stimulated the formation of osteoclast cells from mouse bone marrow cells in culture. PGE<sub>2</sub> (10<sup>-6</sup>M) stimulated the formation of osteoclast cells from mouse bone marrow cells in coculture of osteoblastic clone MC3T3E1 cells.

This results suggest that PGE<sub>2</sub> stimulates the differentiation of osteoblasts and generation of osteoclast, and are involved in bone formation, as well as in bone resorption.