골아세포의 IGF - I 유전자 발현 및 세포증식에 대한 1,25 - dihydroxyvitamin D_3의 영향

최희동 · 이재목 · 서조영

경북대학교 치과대학 치주과학교실

I. 서론

골조직은 형성과 흡수에 의한 재형성이 끊임없이 일어나고 이러한 형성과 흡수는 칼슘과 인의 농도를 조절하는 전신적인 호르몬과 다양한 국소적인 조절작용에 의해 그 항상성이 유지된다. 골조직의 구성과 재형성에 관여하는 세포로는 골전구세포, 골아세포, 골세포, 파골세포, bone - lining cell 등이 있으며[1] 이 중, 골아세포는 골형성세포로서 석회화 되지 않은 골기질인 osteoid의 합성과 골 석회화 과정에 참여하며 marrow stromal cell lineage에서 유래한 골전구세포에서 분화[2]하는 것으로 여겨지고 있다. 골아세포는 골유도세포의 표식인자인 알칼리 인산효소를 다량 함유하고 있으며 그 외에 제 I형 교원질과 골기질 단백질인 osteo - pontin, osteocalcin 등을 합성, 분비한다[3]. 골조직의 형성과 흡수는 골관련 세포들에 의해 조절되며, 이러한 세포들의 성장과 분화는 성장호르몬[4,5], 부갑상선 호르몬[6], 다양한 폴리펩타이드계 성장인자[7,8], 1,25 - dihydroxyvitamin D_3[9,10] 등에 의해 조절되는 것으로 알려져 있다. 이 중 1,25 - dihydroxyvitamin D_3는 피부에서 합성되거나 장관으로부터 흡수된 vitamin D_3가 간과 신장에서 가장 활성화된 대사물로 전환된 것이며[11] 이것의 주요 기능은 골조직의 정상적인 석회화 과정을 위해 장관에서 광물이온의 흡수를 촉진시키고 골조직으로부터 칼슘이온을 유리시켜 혈중 칼슘과 인의 농도를 증가시키는 동화작용을 담당[12,13]하는 것으로 알려져 있다.

다양한 생체실험과 시험관적 실험을 통해 1,25 - dihydroxyvitamin D_3가 골형성 과정에 미치는 영향에 대한 연구가 진행되었는데, Vitamin D_3가 결핍된 경우 골유도능력이 현저히 감소하는 것으로 나타났고[14], Vitamin D_3의 결핍에서 나타나는 골의 조직학적 이상은 칼슘과 인의 주입으로 완전히 회복되는 것으로 보고되었다[15]. 또한 골아세포는 1,25 - dihydroxyvitamin D_3에 대한 수용체를 가지며[10,16] 1,25 - dihydroxyvitamin D_3 적용 시 DNA 합성능의 감소[17,18]와 제 1형 교원질 합성의 증가[17,19,20]가 나타났으며, 골아세포 분화의 표식인자인 알카라인 인산효소의 증가[10,21], osteo - pontin mRNA 발현의 증가 및 osteocacin mRNA 발현의 감소[22] 등이 보고되었다. 이러한 골아세포 분화의 표식인자인 골기질 단백질의 역할로 볼 때, 1,25 - dihydroxyvitamin D_3가 골아세포의 분화와 골광화에 대한 효과는 수용체를 통한 일련의 신호 전달체계에 의해

일어나는 것으로 여겨진다.

Insulin - like growth factor - I(IGF - I), IGF - II, transforming growth factor β(TGF β)와 같은 성장인자들은 골세포로부터 분비되어 paracrine 또는 autocrine 기능으로 골대사를 국소적으로 조절하는 것으로 알려져 있고[23,24] 이러한 성장인자들의 분비는 부갑상선 호르몬, 1,25 - dihydroxyvitamin D_3, interluekin - 1 등에 의해 조절되는 것으로 보고되어[25,26], 골대사에 관여하는 호르몬들의 작용이 어떠한 중간물질에 의해 매개되어 일어날 수 있다는 가능성이 제시되었다. 이 중 IGF - I은 70개 아미노산기(7.7 kd)를 가진 단일쇄 폴리펩타이드의 형태로 사람의 혈청에서 처음으로 분리되었으며[27] somatomedin C와 동일한 것으로 확인되었고[28] 유전자 재조합형 IGF - I의 성공적인 발현으로 대사성 골질환의 치료제로도 사용이 가능하게 되었다. 사람의 골기질에는 IGF - I을 함유하지만 상대적인 농도는 IGF - II에 비해 10배 - 15배 정도 적으며 골세포가 분비하는 양도 IGF - I이 IGF - II에 비해 50 - 100배 정도 적은 것으로 알려져 있다[29,30]. IGF - I은 골아세포의 증식과 분화를 촉진시키는 인자로 알려져 있는데[30,31], Merriman 등[32]은 MC3T3 - E1 세포에 IGF - I을 적용하는 경우 골아세포의 증식기에 발현되는 c - fos 유전자 발현의 증가를 보고하였고, Scheven 등[33]도 인간의 골아유사세포에서 IGF - I이 세포의 성장을 촉진시킴을 보고하였다. 이러한 증식작용 외에 IGF - I은 교원성 및 비교원성 단백질의 합성을 증가시킨다고 알려져 있는데, 제 1형 교원질합성을 증가시키고[34,35] 분화된 골아세포의 표식인자인 알카라인 인산효소의 활성을 촉진하며[36], osteocalcin 합성을 증가[37]시키는 것으로 보고되고 있다. IGF - I의 alternative splicing에 대한 연구에서, IGF - I은 alternative splicing에 의해 IGF - IA와 IGF - IB의 두 가지 mRNA가 나타나며 다양한 조건들에 따라 두 mRNA 발현에 차이가 있는 것으로 보고되었다[38,39].

1,25 - dihydroxyvitamin D_3가 IGF - I에 미치는 영향에 대한 연구에 대해 살펴보면, mouse의 골아세포에 1,25 - dihydroxyvitamin D_3 적용시 Insulin - like Growth Factor - I (IGF - I) 분비의 감소[40,26]가 보고되었으며, Chenu 등[3]은 인간의 골세포에 1,25 - dihydroxyvitamin D_3를 투여한 경우 IGF - I의 분비가 증가함을, Kurose 등[40]은 mouse 세포에서 1,25 - dihydroxyvitamin D_3가 IGF - I의 분비에 영향을 미치지 않음을 보고하였다. 이와 함께 1,25 - dihydroxyvitamin D_3는 IGF의 기능을 억제하는 IGF binding protein(IGFBP)의 합성을 증가시키고[41,42], IGF - I binding site를 증가[43]시킨다고 보고되었다. 이러한 결과들로 보아 IGF - I과 1,25 - dihydroxyvitamin D_3의 상호관계는 그 작용기전이 명백하게 밝혀지지는 않았지만, 1,25 - dihydroxyvitamin D_3의 효과가 IGF - I에 의해 매개될 수 있다는 가능성을 제시하였다.

이러한 연구들을 바탕으로 하여, 골전구세포의 특징을 가지는 MC3T3 - E1 세포에서 1,25 - Dihydroxy vitamin D_3에 의한 IGF - I의 유전자 발현양상을 관찰한 후, 1,25 - dihydroxyvitamin D_3와 IGF - I의 단독 또는 혼합투여 시 나타나는 DNA 합성능을 파악하여 골아세포의 분화를 유도하는 1,25 - dihydroxyvitamin D_3와 IGF - I의 상호작용을 알아보고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 실험재료

배양액은 alpha - minimum essential medium(α - MEM Gibco사, 미국)을 사용하였고, fetal bovine serum(FBS Gibco사, 미국)을 성장 촉진제로 추가하였으며, 그 외, 1,25 - dihydroxyvitamin D_3, 유전자재조합형 IGF - I

(Genzyme사, 미국), trypsin, phosphate buffered saline(이하 PBS로 표기), ethyl-enediamine-tetraacetic acid(이하 EDTA로 표기), trichloroacetic acid(이하 TCA로 표기), [methyl-^{3}H] thymidine (New England Nuclear사, 미국), absolute ethanol 등을 사용하였다

2. 세포의 배양

MC3T3-E1 세포를 100mm 배양접시(Corning사, 미국)에 10% FBS, 100U/ml penicilline(근화제약, 한국), 100μg/ml streptomycin(동아제약, 한국)을 함유한 α-MEM 배양액에서 초기배양하여 37℃, 5% CO_2 공기 혼합배양기(Vision사, 한국)에서 유지하였다. 세포가 증식되어 단층밀생이 형성되면 0.05% trypsin/0.02% EDTA를 이용하여 세포를 분리시킨 후 계대배양하고, 일주일에 두 번 배양액을 교체해주었다.

3. Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction(RT-PCR)

1) 세포 배양

세포의 수가 5×10^5 cells/ml가 되도록 100mm 배양접시에 접종하고 10% FBS를 함유한 α-MEM에서 2일간 배양한 후, 세포 배양액을 제거하고 5% FBS를 함유한 α-MEM으로 배 양액을 교체하고 다시 24시간 배양하였다. 그후 1,25-dihydroxyvitamin D_3를 투여하지 않은 군을 대조군으로 하고, 10^{-9}M 1,25-dihydroxyvitamin D_3을 첨가한 군을 실험군으로 하여 0, 6, 24, 48, 72시간에 RNA를 추출하였다.

2) 총 RNA의 추출

RNA를 Chomczynski와 Sacchi[44]의 방법에 따라 다음과 같이 분리하였다. 100 mm dish의 세포층을 찬 PBS로 씻은 후 변성용액 (GIT: guanidinium thiocyanate)을 각 배양접시당 600μℓ씩 넣어 세포를 완전히 녹인다음, GIT 용액을 2ml의 미량원침관에 옮기고 1/10 용량의 2M sodium acetate(pH 4.0)를 첨가한 후 동량의 phenol액을 넣었다. GIT용액의 1/5 용량의 chloroform/isoamylalcohol(49:1)을 넣고 10초간 강하게 교반하여 15분 동안 얼음에 방치한 후, 미세원심분리기로 12000 rpm에서 20분간 원침하여 상층액을 다른 미량원침관에 옮기고 같은 양의 찬 isopropanol로 섞어 -20℃에서 1시간 이상 방치하였다. 그 후 다시 10분동안 원침하여 침전물 형성을 관찰한 후 침전물을 찬 알콜(70%)로 씻고, 상온에서 15분 정도 방치하여 말린 후 물을 각각 50μℓ씩 넣어 녹였다. RNA양은 U.V 분광광도계로 260/280 nm에서 흡광도를 잰 후 양과 순도를 계산하였다.

3) Oligonucleotide primers

: Internal control marker로 사용된 human β-actin은(5‘-ATG-GAT-GAT-GAT-ATC-GCC-GCG-3', 5'-CTA-GAA-GCA-TTT-GCG-GTG-GAC-GAT-GGA-GGG-GCC-3')의 배열을 가지는 primer를 Clontech Lab. 사(미국)로부터 구입 사용하였고, IGF-I primer는 IGF-IA와 IGF-IB가 모두 나타나도록 upstream과 down stream을(5'-GAC-TGG-AGA-TGT-ACT-GTG-CC-3', 5'-GCA-GGT-TGC-TCA-AGC-AA-3')의 배열이 되게 설계하여 바이오니아 사(한국)에 주문 제작하여 사용하였다.

4) 역전사(cDNA synthesis)

소독된 0.5ml tube에 각 표본당 5μg의 총 RNA와 oligo$(dt)_{12-18}$ primer를 혼합하여 70℃에 10분간 보관한 후 얼음에 최소 1분간 두고, 10×PCR buffer, 25mM $MgCl_2$, 10mM dNTP mix, 0.1M DTT를 주입하여 42℃에 5

분간 보관하였다. 그런 다음 1㎕ SuperScript II RT를 각 tube에 넣어 혼합시킨 후 42℃에 50분간 보관하고 70℃에 15분간 두어 반응을 종료시키고 얼음에 식혔다. 짧은 시간 원심분리기에 넣어 내용물을 모으고 1㎕의 RNase H를 각 tube에 넣은 다음 37℃에 20분간 보관하였다.

5) PCR amplication

위에서 준비한 DNA 2㎕ , upstream과 downstream primer 각각 1㎕ 와 0.5㎕의 Taq DNA polymerase(Takara shuzo사, 일본)를 완충용액[100mM Tris - HCL(pH 8.3), 50mM KCl, 25mM $MgCl_2$]에 넣어 총 부피가 50㎕가 되게 한 후, Denaturation(94℃, 1분), Annealing(55℃, 1분), Extension(72℃, 1분) 과정을 30회 반복 되도록 PTC - 100™(MJ inc.한국)에 프로그램 하였다. PCR 생성물 10㎕를 1.5㎕의 loading buffer와 섞은 후 1% agarose gel에 100V로 40분간 전기영동 하여 비교하였다.

5. 세포의 DNA 합성능 측정

세포의 수가 2.5×10^4cells/ml가 되도록 24 well culture plate에 접종하고 10% FBS를 함유한 α - MEM에서 2일간 배양한 후, 세포 배양액을 제거하고 3% FBS를 함유한 α - MEM으로 배양액을 교체하고 다시 24시간 배양하였다. 그후 1,25 - dihydroxyvitamin D_3를 투여하지 않은 군을 대조군으로 하고 10^{-9}M 1,25 - dihydroxyvitamin D_3와 10ng/ml IGF - I을 단독 또는 혼합 투여한 군을 실험군으로 하여, 1일째와 3일째 DNA 합성능측정 24시간전에 2㎕ Ci/ml [^{3}H] - thymidine을 첨가한 후 세포의 DNA 합성능을 측정하였다.

[^{3}H] - thymidine이 DNA내로 편재되는 속도의 측정을 위해서 24 well culture plate내의 세포배양액을 제거한 후, 찬 PBS 1ml 씩으로 두 번 씻고, 5% TCA를 1ml 씩 넣은 후, 4℃에서 20분간 방치하였다. 다시 찬 5% TCA 1ml 씩으로 두 번 씻은 뒤 찬 absolute ethanol 1ml 씩으로 두 번 씻어서 실온에서 건조시켰다. 이상의 과정을 통해 세포내로 편재되지 않은 [^{3}H] - thymidine을 제거한 뒤, 500㎕의 2% Na_2CO_3가 포함된 0.1N NaOH를 넣어 고정된 세포를 완전히 용해시킨 후, 4℃에서 30분간 방치하였다. 다시 이 용액을 counting vial로 옮긴 후, 5ml의 scintillation cocktail 용액을 넣어 혼합한 뒤 β - counter로 방사능 활성도를 조사하여 그 값을 CPM(counter per minute)으로 나타내었고 student t - test를 사용하여 실험군

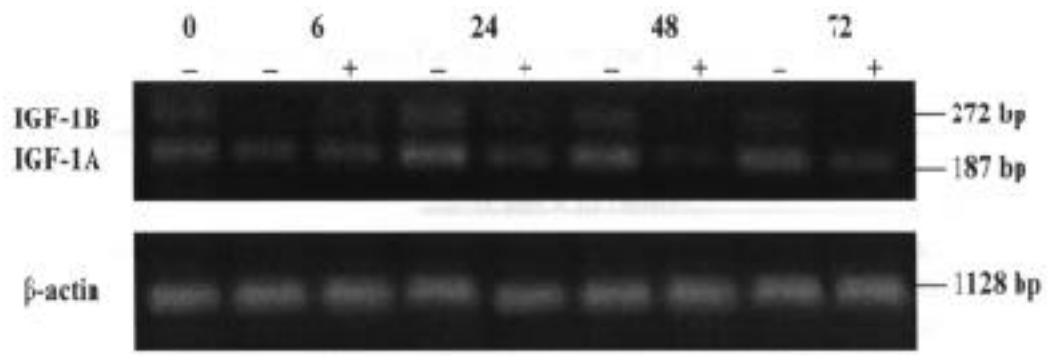

Figure 1. Effect of 1,25 - dihydroxyvitamin D3 on expression of IGF - I mRNA in MC3T3 - E1 cells. Cells were seeded 5×10^5 cells at 100mm culture plate in α - MEM 10% fetal bovine serum. After 48hour incubation period, media were changed α - MEM containing 5% fetal bovine serum. After 24 hour, 10 - 9M 1,25 - dihydroxyvitamin D3 added and total mRNA was extracted at 0, 6, 24, 48, 72 hours.

Table 1. Effect of 1,25 - dihydroxyvitamin D_3 and IGF - I on DNA synthetic activity in MC3T3 - E1 cells in the presence of 3% fetal bovine serum

	DNA Synthetic activity (CPM×105/well)	
	1day	3day
Cont.	6.6±0.5	5.9±0.6
D_3	5.0±0.3**	1.9±0.1**
D_3+IGF - I	5.4±0.1*	1.6±0.3**
IGF - I	6.0±0.3	5.6±0.3

Cells were seeded 2.5×10^4cells/ml at 24well plate in α - MEM containing 10% fetal bovine serum. After 48 hour incubation period, medium were changed α - MEM containing 3% fetal bovine serum. After 24 hours, 10^{-9}M 1,25 - dihydroxyvitamin D_3 and 10 ng/ml IGF - I were added separately or together. Cell were cultured for 1 and 3 days, 2μCi/ml [^{3}H] - thymidine was added for the last 24h of culture of each days. [^{3}H] - thymidine incorporation in to DNA was measured and expressed counter per minute(CPM). Each value represents the mean and S.D

* Significantly different from control value($P<0.05$)

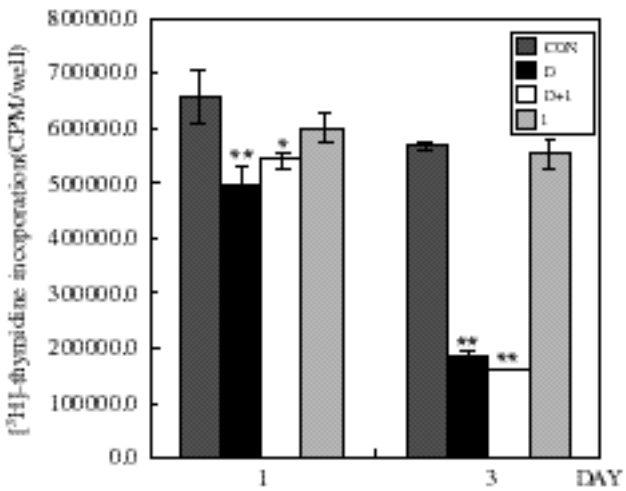

Figure 2. Effect of 1,25 - dihydroxyvitamin D_3 and IGF - I on DNA synthesis by MC3T3 - E1 cells in the presence of 3% fetal bovine serum. [^{3}H] - thymidine incorporation in to DNA was measured 1 day and 3 day after application of 1,25 - dihydroxyvitamin D3 and IGF - I, 2 μ Ci/ml [3H] - thymidine was added for the last 24h of culture of each day.
* Significantly different from control value($P<0.05$)

과 대조군을 통계학적으로 비교하였다.

III. 결과

1. 1,25 - dihydroxyvitamin D_3를 투여시 시간경과에 따른 IGF - I 유전자 발현 양상

10^{-9}M 1,25 - dihydroxyvitamin D_3를 투여한 군과 투여하지 않은 군 모두에서 IGF - I의 alternative splicing 형태인 IGF - IA와 IGF - IB이 모두 발현되었다. 대조군과 실험군 모두

에서 IGF - IA가 IGF - IB보다 많이 발현되었으며, 대조군의 경우 24시간 까지는 처음의 수준을 유지하다가 이후 서서히 감소하는 경향을 나타내었다. 1,25 - dihydroxyvitamin D_3를 투여한 경우 시간이 경과함에 따라 IGF - I의 발현이 감소하는 경향을 보였고 그 양은 대조군에 비해 감소된 양상을 나타내었다(Figure 1).

2. DNA 합성능에 대한 1,25 - dihydroxyvitamin D_3와 IGF - I의 효과

1일째 10^{-9}M 1,25 - dihydroxyvitamin D_3와 10ng/ml IGF - I을 단독($P<0.01$) 또는 혼합 투여한 군($P<0.05$)에서 대조군에 비해 DNA 합성능이 유의한 감소를 보였고 1,25 - dihydroxyvitamin D_3를 단독 투여한 군에서 대조군에 비해 현저한 감소를 나타내었다($P<0.01$). IGF - I과 1,25 - dihydroxyvitamin D_3를 혼합 적용시 1,25 - dihydroxyvitamin D_3 단독 적용군 보다는 높게 나타났고, IGF - I 단독 적용군에 비해서는 낮게 나타났다.

3일째 1,25 - dihydroxyvitamin D_3와 IGF - I 혼합 적용군 및 1,25 - dihydroxyvitamin D_3 단독 적용군에서 현저하게 큰 감소를 보였고($P<0.01$) IGF - I 단독 적용군에서는 대조군에 비해 유의한 차이가 없었다($P>0.05$).

IV. 고찰

Vitamin D 는 스테로이드 호르몬의 일종으로, 정상적인 칼슘 및 인의 농도 유지뿐 아니라 골의 발육과 유지에 필수적인 인자이다. Vitamin D가 광물질대사에 영향을 미치기 위해서는 활동성 있는 형태로의 전환이 필요한데, 음식물을 통해 섭취되거나 자외선에 의해 피부에서 생성된 vitamin D가 vitamin D 결합단백질에 의해 간으로 전달되고, 간에서 vitamin D는 C - 25의 hydroxylation에 의해 25 - dihydroxyvitamin D_3로 전환된 후 신장으로 이동하여 A ring에 위치한 1번 탄소의 α 위치에서 다시 hydroxylation이 일어나 호르몬으로서 활동성을 가진 1,25 - dihydroxyvitamin D_3로 전환된다.[1] 신장에서는 vitamin D의 다른 활동성 형태인 24,25 - dihydroxyvitamin D_3가 생성되지만 1,25 - dihydroxyvitamin D_3에 비해 상대적으로 활동성은 약한 것으로 알려져 있고, 이러한 vitamin D 유도체의 생성은 엄격한 조절하에서 이루어지며 혈중 칼슘과 인의 농도 및 부갑상선 호르몬이 영향을 미치는 것으로 보고되고 있다[45].

다양한 골전구세포를 대상으로 한 시험관적 연구에서 골관련 단백질의 발현양상은 일정한 시간적 순서에 따라 나타난다고 알려져 있는데, 예를 들면 세포의 성장과 관련된 유전자(histone, c - fos and c - myc) 및 세포의 기질과 관련된 유전자(type - I collagen, fibronectin, TGF - β1)가 먼저 발현되고, 뒤이어서 osteopontin, bone sialoprotein, osteocalcin 등과 같은 골광화 유전자들의 발현이 나타나는 것으로 보고되고 있다[3]. 이 중MC3T3 - E1 세포는 Kodama 등에 의해 신생쥐의 두개골에서 분리된 골전구세포이며[46], 섬유아세포 형태를 보이다가 장기간 배양시 높은 알칼린 인산효소 활성을 보이며, 골아세포와 골세포로 분화가 가능하고 다양한 골아세포 표식인자를 발현하며[47] 석회화된 세포외기질을 형성한다고 알려져 있으며[48] 폴리펩타이드계 성장인자 및 부갑상선 호르몬, 1,25 - dihydroxyvitamin D_3등에 의해 성장과 분화가 조절됨이 밝혀졌다[19,49]. 일반적으로 1,25 - dihydroxyvitamin D_3는 골아세포의 분화를 촉진시키는 것으로 알려져 있고[17 - 21] vitamin D의 수용체는 파골세포에는 존재하지 않는 반면 골아전구세포와 성숙한 골아세포에 존재하기 때문에 골아세포내에 존재하는 다양한 유전자는 1,25 - dihydroxyvitamin D_3의 영향을 받는 것으로 보고되고 있다.[1] Walters 등[16]은 mouse 세포에 대한 연구에서 1,25 - dihydroxyvitamin D_3에 대한 수용체는 세포질과 핵에 존재하며 수용체의 수는 세포층의 밀

생도에 따라서 다른 양상으로 나타나는데, 일반적으로 완전히 밀생상태에 도달한 경우 수용체의 농도가 최저에 이른다고 보고하였다. 1,25-dihydroxyvitamin D_3에 의한 골아세포의 분화를 나타내 주는 기준으로는 제 1형 교원질 합성의 증가, 알칼린 인산효소 활성도의 증가, osteopontin, osteocalcin 합성의 증가 등이 포함된다[3].

골아세포에 대한 연구들에서, 이러한 성장인자들의 작용이 단독으로 일어나지 않고 서로가 영향을 미치는 복잡한 양상으로 일어남이 밝혀졌는데, Linkhart 등[25]은 부갑상선 호르몬이 neonatal mouse calvarial cell에서 IGF-I과 IGF-II의 분비를 증가시킨다고 보고하였고, Linkhart와 Keffer[26]는 TGF-β가 IGF-I과 IGF-II의 분비를 촉진시켰으며, 1,25-dihydroxyvitamin D_3는 IGF-II의 분비를 촉진시킨 반면 IGF-I의 분비는 감소시킨다고 보고하였다. Zhang 등[50]은 osteocalcin 발현에 대한 연구에서, rat과 인간의 골아세포에 1,25-dihydroxyvitamin D_3 투여시 osteocalcin의 발현이 증가하는 반면, mouse의 골아세포에서는 osteocalcin 발현이 오히려 감소함을 보고하였는데, 다양한 종에서 동일한 유전자에 대한 작용이 서로 다르게 나타나는 것으로 보고하여 1,25-dihydroxyvitamin D_3의 골아세포에 대한 작용이 간접적인 기전에 의해 일어날수 있음을 시사하였다.

Bell 등[51]은 mouse의 간에서 분리한 IGF-I이 alternative RNA splicing에 의해 COOH-terminal 펩타이드에서 염기배열의 차이를 보이는 IGF-IA와 -IB의 존재를 보고하였고, mouse의 IGF-IA의 배열은 사람과 94%의 유사성을 가진다고 하였다. 또한 Zhang 등[38]은 rat에서 E domain coding region에서의 52-bp insert의 존재 유무에 따라 IGF-IA와 IGF-IB mRNA 발현에 차이가 나타나며, 쥐를 굶기는 경우 IGF-IA mRNA 발현은 감소하지 않는 반면 IGF-IB mRNA 발현의 감소를 보고하였고, Fagin 등[39]은 당뇨병을 가진 쥐에서 IGF-IA와 IGF-IB의 현저한 감소를, Nagaoka 등[52]은 사람의 간세포와 섬유아세포 등에서 IGF-IA가 IGF-IB보다 많이 발현되는 것으로 보고되어, 여러 가지 환경에 따라 IGF-IA와 IGF-IB의 발현에 차이가 있는 것으로 나타났다. 본 연구에서, MC3T3-E1 세포에 10^{-9}M의 1,25-dihydroxyvitamin D_3 투여 시 대조군과 실험군 모두에서 IGF-IA, IGF-IB가 발현되었고 IGF-IA의 발현이 IGF-IB보다 많았으며 1,25-dihydroxyvitamin D_3를 투여한 군에서 시간이 경과함에 따라 IGF-I의 발현이 감소된 경향을 보였고, 대조군에 비해서도 감소된 양상을 보였다. 이러한 결과는 1,25-dihydroxyvitamin D_3 투여후 24시간경 IGF-I mRNA level의 현저한 감소를 보고한 Scharla 등[15]의 결과와 일치하며 1,25-dihydroxyvitamin D_3의 골아세포에 대한 효과가 IGF-I에 의해 매개될 수 있음을 시사하는 것으로 사료된다.

1,25-dihydroxyvitamin D_3가 IGF-I의 발현에 미치는 영향에 대한 연구로는, Chenu 등[53]이 정상적인 인간의 골아세포에서 1,25-dihydroxyvitamin D_3가 IGF-I의 분비를 촉진시켰다고 보고한 반면, Kurose 등[41]은 MC3T3-E1 세포에서 1,25-dihydroxyvitamin D_3가 IGF-I의 분비에 영향을 미치지 않는다고 보고하였고, Schalar 등[18]은 MC3T3-E1 세포에 1,25-dihydroxyvitamin D_3 투여시 IGF-I의 분비가 감소하였음을 보고하였다. 본 연구에서는 MC3T3-E1 세포에 10^{-9}M의 1,25-dihydroxyvitamin D_3를 적용한 결과 IGF-I의 발현이 현저히 감소하였는데, 이는 Chenu 등[53]과 Kurose 등[41]의 결과와는 상이한 결과를 나타내는 것이다. 그 원인으로는, Chenu 등[53]의 연구에서는 사람의 골세포를 대상으로 한 것이기 때문에 종간 차이와 분화단계의 차이를 반영한 것으로 여겨지며, 1,25-dihydroxyvitamin D_3가 IGF-I의 분비에 영향

을 미치지 않은 Kurose 등[41]의 결과는 상이한 실험방법에 기인한 것으로 사료되는데, 세포가 밀생상태에 도달한 경우 IGF - I 발현이 감소하는 것으로 보고한 Tremollieres 등[54]의 연구로 미루어보아, 5일간의 초기배양에서 세포가 이미 밀생상태에 도달한 것으로 여겨지며, 다른 원인으로는 1,25 - dihydroxyvitamin D_3가 용량의존적으로(10^{-12}M - 10^{-8}M) IGF - I의 분비를 억제하는 것으로 보고되고 있어[18], 저농도의 1,25 - dihydroxyvitamin D_3(5×10^{-11}M)를 투여한 결과 IGF - I 분비에 영향을 미치지 않았을 것으로 사료된다. 본 연구에서는 IGF - I의 발현에 충분히 영향을 줄 수 있는 10^{-9}M 1,25 - dihydroxyvitamin D_3를 사용하였으며, MC3T3 - E1 세포에서 1,25 - dihydroxyvitamin D_3에 의한 IGF - I의 분비 감소를 보고한 Scharla 등[18]의 연구와 유사한 결과를 얻었다.

1,25 - dihydroxyvitamin D_3가 DNA 합성능에 미치는 영향에 대한 연구로는, Matsumoto 등[12]이 MC3T3 - E1 세포에 1,25 - dihydroxyvitamin D_3를 투여한 결과 용량의존적(10^{-11}M - 10^{-9}M)으로 DNA 양이 감소함을 보고하였고, Lian 등[22]도 MC3T3 - E1 세포에 10^{-8}M 1,25 - dihydroxyvitamin D_3 투여 시 세포의 증식과 관련된 유전자인 histone mRNA level의 감소를 보고하였다. 본 연구의 경우, 1,25 - dihydroxyvitamin D_3의 단독 적용군에서 1일, 3일군 모두에서 DNA 합성능이 현저하게 감소하였고 1,25 - dihydroxyvitamin D_3와 IGF - I의 혼합 적용군에서도 유의한 감소를 보였는데 이는 mouse 세포에서 1,25 - dihydroxyvitamin D_3에 의한 DNA 합성능의 감소를 보고한 Matsumoto 등[12] 과 Lian 등[22]의 결과와 일치하며, IGF - I 단독 적용군에서는 대조군에 비해 유의한 감소는 없었는데, 이는 MC3T3 - E1 세포에 13×10^{-9}M IGF - I 적용시 DNA 합성능의 증가를 보고한 Kurose 등[17]의 연구와는 다른 결과를 보였다. 1,25 - dihydroxyvitamin D_3를 단독으로 투여한 경우의 DNA 합성능 감소와 1,25 - dihydroxyvitamin D_3와 IGF - I을 혼합 투여한 경우의 DNA 합성능 감소양상이 서로 유사한 것으로 보아 1,25 - dihydroxyvitamin D_3가 DNA 합성능 감소에 주된 작용을 하는 것으로 추측되며, 1,25 - dihydroxyvitamin D_3와 IGF - I을 혼합 투여한 경우에서 IGF - I에 의해 DNA 합성능이 증가하지 않은 점은, 골전구세포에 1,25 - dihydroxyvitamin D_3 투여시 IGFBP의 현저한 증가를 보고한 Scharla 등[42], Schmid 등[43]의 연구결과로 미루어, 투여한 IGF - I이 IGFBP에 의해 그 활성도를 상실한 것으로 추측된다. 1,25 - dihydroxyvitamin D_3 투여후 시간경과에 따라 IGF - I 발현의 감소를 보인 RT - PCR 결과와 시점이 일치하는 것으로 보아 DNA 합성능의 감소는 IGF - I 발현의 감소와 밀접한 관련이 있을 것으로 사료되며, 1,25 - dihydroxyvitamin D_3의 세포증식억제 효과가 IGF - I 분비 감소에 기인하며 이러한 작용이 골아세포로의 분화를 위한 전제조건임을 보고한 Schalar 등[18]의 연구와도 일치하는 것이다. 1일째에 비해 3일째에 DNA 합성능이 보다 더 감소하였는데, 이는 밀생상태에 의해 세포 자체의 증식능이 감소된 결과로 사료된다.

이상의 결과를 종합해 보면, 골아세포의 증식을 억제하고 분화를 유도하는 것으로 알려져 있는 1,25 - dihydroxyvitamin D_3의 효과는 IGF - I을 그 중간 매개체로 일어나는 것으로 여겨지며, MC3T3 - E1 세포에서 1,25 - dihydroxyvitamin D_3는 IGF - I 유전자의 발현을 감소시킴으로써 골아세포의 증식을 감소시킬 것으로 사료된다. 그러나, 향후 1,25 - dihydroxyvitamin D_3의 효과를 매개하는 또 다른 기전에 대한 연구가 필요하리라 사료된다.

V. 결론

1,25 - dihydroxyvitamin D_3는 스테로이드 호르몬의 일종으로 골조직의 항상성을 유지하

는데 중요한 역할을 담당하며 배양된 골아세포에서 다양한 반응을 조절한다. 일반적으로 1,25 - dihydroxyvitamin D_3는 골아세포의 분화를 촉진시키는 것으로 알려져 있고 vitamin D의 수용체는 파골세포가 아닌 골아세포에 존재하기 때문에 골아세포내에 존재하는 다양한 유전자는 1,25 - dihydroxyvitamin D_3의 영향을 받는 것으로 보고되고 있다.

골아세포의 특징을 가지는 MC3T3 - E1 세포에 1,25 - dihydroxyvitamin D_3 적용시 IGF - I mRNA 발현 양상을 관찰하고, 1,25 - dihydroxyvitamin D_3와 IGF - I의 단독 또는 혼합 투여시 나타나는 DNA 합성능을 파악하여 골아세포의 분화를 유도하는 1,25 - dihydroxyvitamin D_3가 IGF - I의 작용과 어떠한 상관관계를 나타내는지 알아보고자 본 실험을 실시하였다.

10^{-9}M 1,25 - dihydroxyvitamin D_3 투여 시 나타나는 IGF - I 유전자의 발현양상은, 1,25 - dihydroxyvitamin D_3를 투여한 군과 투여하지 않은 군 모두에서 alternative splicing 형태인 IGF - IA와 IGF - IB이 모두 발현되었다. 대조군의 경우 IGF - IA가 IGF - IB보다 많이 발현되었으며 24시간 까지는 처음의 수준을 유지하다가 이후 서서히 감소하는 경향을 나타내었다. 1,25 - dihydroxyvitamin D_3를 투여한 경우 시간이 경과함에 따라 IGF - I의 발현이 감소하는 경향을 보였고 그 양은 대조군에 비해 감소된 양상을 나타내었다.

10^{-9}M 1,25 - dihydroxyvitamin D_3와 10ng/ml IGF - I 투여후 세포의 DNA 합성능에 대한 결과를 살펴보면, 1일째, 10^{-9}M 1,25 - dihydroxyvitamin D_3와 10ng/ml IGF - I을 단독($P<0.01$) 또는 혼합 투여한 군($P<0.05$)에서 대조군에 비해 유의한 감소를 보였고 1,25 - dihydroxyvitamin D_3를 단독 투여한 군에서 대조군에 비해 현저한 감소를 나타내었다($P<0.01$). IGF - I을 단독 투여군에서는 대조군에 비해 유의한 차이는 없었다($P>0.05$). 3일째, 1,25 - dihydroxyvitamin D_3와 IGF - I 혼합 적용군 및 1,25 - dihydroxyvitamin D_3 단독 적용군에서 대조군에 비해 현저한 감소를 보였고($P<0.01$) IGF - I 단독 적용군에서는 대조군에 비해 유의한 차이가 없었다($P>0.05$).

결론적으로, 골전구세포의 증식을 억제하고 분화를 유도하는 것으로 알려져 있는 1,25 - dihydroxyvitamin D_3의 효과는 IGF - I을 그 중간 매개체로 일어나는 것으로 여겨지며, MC3T3 - E1 세포에서 1,25 - dihydroxyvitamin D_3는 IGF - I 유전자의 발현을 감소시킴으로써 세포의 증식을 감소시킬 것으로 사료된다.

VI. 참고문헌

1. Bilezikian J.P., Raisz L.G., Rodan G.A. : Principle of Bone Biology, 1st ed., Academic press,(San Diego)(1996) pp51 - 446
2. Franceschi and Iyer : Relationship between collagen synthesis and expression of the osteoblast phenotype in MC3T3 - E1 cells, J Bone Min Res, 7:235 - 246,1992
3. Stein. G. S., Lian. J. B. : Molecular mechanisms mediating in osteoblast: An integrated relationship of cell growth and differentiation. In Noda, M(ed) : "Cellular and Molecular Biology of Bone" San Diego: Academic press;47 - 95, 1993
4. Chenu C., Valentin - Opran A., Chavassieux P., Saez S.,, Meunier P.J., Delmas P.D.: Insulin like growth factor - I hormonal regulation by growth hormone and by 1,25 - dihydroxyvitamin D_3 and activity on human osteoblast - like cells in short - term culture, Bone,11:81 - 86,1990
5. Brixen K., Kassem M., Nielsen

H.K., Gitteloft A., Flyvbjerg A., Mosekilde L.: Short - term treatment with growth hormone stimulates osteoblastic and osteoclastic activity in osteopenic postmenopausal women: A dose response study, J Bone Miner Res,10:1865 - 1874,1995

6. Torring O., Firek A.F., Health III H., Conover C.A. : Parathyroid hormone and prathyroid hormone - related peptide stimulate insulin - like growth factor - binding protein secretion by rat osteoblast - like cells through a adeno - sine 3',5' - monophosphate - dependent mechanism, Endocrinology, 128:1006 - 1014,1991
7. Hock, J.M., Centrella M., Canalis E. : Insulin - like growth factor I has inde - pendent effects on bone matrix forma - tion and cell replication, Endicrinology, 122:254 - 260,1988
8. Mohan S., Wergedal J.E., Taylor A.K., Baylink D.J.: IGF - I and II are pro - duced by human osteoblast like cell in culture, FASEB J, 2:A842,1988
9. Owen T.A., Aronow M.S., Shalhoub V., Barone L.M., Wilming L., Tassinari M., Kennedy M.B., Pockwinse S., Lian J.B., Stein G.S. :Progressive develop - ment of the rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relationships in expres - sion of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix, J Cell Physio, 143:420 - 430,1990
10. Franceschi R.T., Romano P.R., Park K.Y.: Regulation of Type I collagen synthesis by 1,25 - dihydroxyvitamin D_3 in human osteosarcoma cells, J Biol. Chem, 263:35:18938 - 18945,1988
11. Reichel H., Koeffler P., Norman A.W.: The role of the vitamin D endocrine system in health and disease, N Engl J Med, 15:980 - 991,1989
12. Matsumoto T., Igarashi C., Takeuchi Y., Harada S., Kikuchi T., Yamato H. and Ogata E,.: Stimulation by 1,25 - dihydroxyvitamin D_3 of in vitro mineralization induced by osteoblast - like MC3T3 - E1 cells, Bone, 12:27 - 32,1991
13. Cherk S. T., Heersche J.N.M., Jones G., Murray T.M., and Rasmussen H. : The effect of vitamine D on bone in vivo, Endocrinology, 118:2217 - 2224, 1986
14. Sampath T. K., Wientroub S., Reddi A. H. : Extracellular matrix pro - teins involved in bone induction are vit - amin D dependent. Biochem Biophys Res Commun, 124:829 - 835, 1984
15. Weinstein R. S., Underwood L., Hutson M. S., DeLuca H. F. : Bone his - tomorphometry in vitamin D - deficient rats infused with calcium and phospho - rus, Am J Physiol, 245:E499 - E505,1984
16. Walters M. R., Rosen D. M., Norman A. W., Luben R. A. : 1,25 - dihydroxyvitamin D_3 receptor in an established bone cell line, J Biol Chem, 257:7481 - 7484,1982
17. Kurose H., Seino Y., Yamaoka K., Tanaka H., Shima M., Yabuuch H. :Cooperation of synthetic insulin - like growth factor I/somatomedin C and 1,25 - dihydroxyvitamin D_3 on regulation

of function in clonal osteoblastic cells, Bone and Mineral 5:335 - 345,1989

18. Scharla S. H., Strong D. D., Mohan S., Baylink D. J., Linkhart T. : 1,25 - dihydroxyvitamin D_3 differentially regu - lates the production of Insulin - Like Growth Factor I(IGF - I) and IGF - bind - ing protein - 4 in mouse osteoblasts, Endicrinology, 129:3139 - 3146, 1991
19. Kurihara N., Ishizuka S., Kiyoki M., Haketa Y., Ikeda K., Kumegawa M.: Effect of 1,25 - dihydroxyvitamin D_3 on osteoblastic MC3T3 - E1 cells, Endocrinology, 118:940 - 947, 1986
20. Franceschi R.T., Romano P.R., and Park K.Y. : Regulation of type I collagen synthesis by 1,25 - dihydroxyvitamin D_3 in human osteosarcima cells, J Biol Chem, 263:18938 - 18945:1988
21. Manolagas S. C., Burton D. W., Deftos L. J.: 1,25 - dihydroxyvitamin D_3 stimulate the alkaline phosphatase activity of osteoblast - like cells, J Biol Chem 256:7115 - 7117,1981
22. Lian J. B., Shalhoub V., Aslam F., Frenkel B., Green J., Hamrah M., Stein G.S.: Species - specific glucocorticoid and 1,25 - dihydroxyvitamin D_3 respon - siveness in mouse MC3T3 - E1 osteoblasts: dexamethasone inhibits osteoblast differentiation and vitamin D down regulate osteocalcin gene expres - sion, Endocrinology, 138:2117 - 2127, 1997
23. Canalis E., McCarthy T., Centrella M.: Growth factor and the regulation of bone remodeling, J Clin Invest, 81:277 - 281, 1988b
24. McCarthy T.L., Centrella M., Canalis E. : Parathyroid hormone enhances the transcript and polypeptide levels of insulin - like growth factor I in osteoblast - enriched cultures from fetal rat bone, Endocrinology, 124:1247 - 1253, 1989
25. Linkhart T.A., Mohan S. : Parathyroid hormone stimulates release of insulin - like growth factor - I(IGF - I) and IGF - II from neonatal mouse calvaria in organ culture, Endocrinology, 125:1484 - 1491,1989
26. Linkhart T.A. and Keffer M.J. : Differential regulationof Insulin - Like Growth Factor - I(IGF - I) and IGF - II release form cultured neonatal mouse calvaria by parathyroid hormone, Transforming Growth Factor - β, and 1,25 - dihydroxyvitamin D_3, Endocrinology, 128:1511 - 1518,1991
27. Rinderknecht E, Humbel R.E. : Amino - terminal sequenceof two polypeptides form human serum with nonsuppressible insulin - like and cell growth - promoting activities: Evidence for structural homology with insulin B chain, Proc. Natl Acad Sci USA 73:4379,1976
28. Peter M.A., Lau E.P., Snitman D.L., van Wyk J.J., Underwood L.E., Russel W.E., Svoboda M.E. : Expression of a biologically active analogue of somatomedin - C/insulin - like growth factor - I, Gene, 35:83 - 89,1985
29. Rutanen E.M., Pekonen F., Makinen T. : Soluble 34K binding protein inhibits the binding of insulin - like growth factor I to its cell receptor in human secretory phase endimetrium:

Evidence for autocrine/paracrine regulation of growth factor action, J Clin Endocrinol Metab, 66:173 - 180,1988
30. Underwood L.E., D'Ercole A.J., Clemmons D.R., van Wyk J.J. : Paracrine functions of somatomedins, Clin Endocrinol Metab, 15:59 - 77, 1986
31. Canalis E. : Effect of insulin - like growth factor I on DNA and protein synthesis in cultured rat calvaria, J Clin Invest, 66:709 - 719, 1980
32. Merriman H.L., LaTour D., Linkhart T.A., Mohan S., Baylink D.J., Strong D.D.: IGF - I and IGF - II induce c - fos in mouse osteoblastic cells, Calcif Tissue Int, 46;258 - 262,1990
33. Scheven B.A., Hamilton N.J., Fakkeldij T.M., Duursma S.A.: Effects of rh IGF - I and IGF - II on the growth of normal adult human osteoblast - like cells and human osteogenic sarcoma cells, Growth Regul, 1:160 - 167,1989
34. Hock J.M., Centrella M., Canalis E. : IGF - I has independent effects on bone matrix formation and cell replication, Endocrinology, 122;254 - 260,1988
35. Canalis E. : Effect of hormones and growth factors on alkaline phosphatase activity and collagen synthesis in cultured rat calvariae, Metabolism, 32:14 - 20,1983
36. Schimid C., Steiner T., Froesch E.R. : Insulin - like growth factor I supports differenti - ation of cultured osteoblast - like cells, FEBS Lett, 173:48 - 52, 1984
37. Canalis E., Lian J.B. : Effects of bone associated growth factors on DNA, collagen and osteocalcin synthesis in cultured fetal rat calvariae, Bone, 9:243 - 246,1988
38. Zhang J., Whitehead R.E. Jr, Underwood L.E. : Effect of fasting on insulin - like growth factor(IGF) - IA and IGF - IB messenger ribonucleic acids and prehormones in rat liver, Endocrinology, 138(8):3112 - 3118, 1997
39. Fagin J.A., Robert C.T. Jr, LeRoith D., Brown A.T. : Coordinate decrease of tissue insulin - like growth factor I posttranscriptional alternative mRNA transcripts in diabetes mellitus, Diabetes, 38(4):428 - 434, 1989
40. Kurose H., Yamaoka K., Okada S., Nakajima S., and Seino Y. : 1,25 - dihydroxyvita - min D_3 [1,25 - $(OH)_2D_3$] increase Insulin - Like Growth Factor I(IGF - I) receptor in clonal osteoblastic cells. Study on interaction of IGF - I and 1,25 - $(OH)_2D_3$, Endocrinology, 126:2088 - 2094,1990
41. Scharla S.H., Strong D.D., Rosen C., Mohan S., Holick M., Baylink D.J., and Linkhart T.A. : 1,25 - Dihydroxy vitamin D_3 increase secretion of insulin - like growth factor binding protein - 4(IGFBP - 4) by human osteoblast - like cells invitro and elevates IGFBP - 4 serum levels in vivo, J Clin Endocrinol Metab, 77:1190 - 1197,1993
42. Schmid C., Schlapfer I., Gosteli - Peter M.A., Hauri C., Froesch E.R., Zapf J.: 1,25 - Dihydroxy vitamin D_3 increase IGF binding protein - 5 expression in cultured osteoblasts, FEBS Letters, 392:21 - 24, 1996
43. Kurose H., Yamaoka K., Okada S., Nakajima S., and Seino Y. : 1,25 - dihydroxyvita - min D_3 [1,25 - $(OH)_2D_3$] increase Insulin - Like Growth Factor - I(IGF - I) receptor in clonal osteoblastic cells. Study on interaction of IGF - I and 1,25 - $(OH)_2D_3$, Endocrinology,

126:2088 - 2094,1990
44. Chomczynski P., Sacchi N. : Single - step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate - phenol - chloroform extraction, Anal Biochem, 162:156 - 159,1990
45. Henry H.L., Norman A.W. Vitamin D: metabolism and biological action. Annu Rev Nutr, 4:493 - 520,1984
46. Kodama H., Amaga Y., Sudo H., Kasai S., Yamamoto S.: Establishment of a clonal osteogenic cell line from new - born mouse calvaria, Jpn J Oral Biol 23:899 - 910,1981
47. Zheng M.H.: What's new in the role of cytokines on osteoblast proliferation and differentiation, Path Res Pract 188:1104 - 1121,1992
48. Sudo H., Kodamd H., Amagai Y., Yamamoto S., Kasai S.: In vitro differ - entiation and calcification in a new clonal ostogenic cell line derived from newborn mouse calvaria, J Cell Biol 96:191 - 198,1983
49. Nakatani Y., Tsunoi M., Hakeda Y., Kurihara N., Fujita K., Kumegawa M.: Effect of parathyroid hormone on cAMP production and alkaline phosphatase activity in osteoblastic clone MC3T3 - E1 cells. Biochem Biophys Res Commun 123:894 - 898,1984
50. Zhang R., Ducy P., Karsenty G.: 1,25 - dihydroxyvitamin D_3 inhibits osteocalcin expression in mouse through an indirect mechanism, J Biologic Chemistry, 272:1:110 - 116, 1997
51. Bell G., Stempien M.M., Fong N.M., Rall L.B.: Sequence of liver cDNA encoding two different mouse insulin - like growth factor I precursor, Nucleic Acid Research 20:7873 - 7882,1986
52. Nagaoka I., Someya A., Iwabuchi K., Yamashita T.: Expression of insulin - like growth factor - IA and factor - IB mRNA in human liver, hepatoma cells, macrophage - like cells and fibroblasts, FEBS Lett, 11:280(1):79 - 83,1991
53. Chenu C., Valentin - Opran A., Chavassieux P., Saez S., Meunier P.J., Delmas P.D.: Insulin - like growth factor I hormonal regulation by growth hormone and by 1,25 - dihydroxyvitamin D_3 and activity on human osteoblst - like cells in short term cultures, Bone, 11:81 - 86,1990
54. Tremollieres F., Baylink D.J., Mohan S.: Growth factors regulate the secretion of IGF - I in mouse bone cells, J Bone Min Res, 5:S145,1990

- Abstract -

The Effects of 1,25 - Dihydroxyvitamin D_3 on Expression of IGF - I Gene and Cellular Proliferation in MC3T3 - E1 Cells

Hee - Dong Choi, Jae - Mok Lee, Jo - Young Suh

Department of Periodontology, School of Dentistry, Kyungpook National University

Polypeptide growth factor belong to a class of potent biologic mediator which regulate cell differentiation, proliferation, migration and metabolism. 1,25 - dihydroxyvitamin D_3 decrease cell proliferation, and stimulate alkaline phosphatase activity which express in osteoblast during cell differentiation period. IGF - I is known to stimulate cell proliferation and differentiation too. 1,25 - dihydroxyvitamin D_3 is known to increase IGF - I binding sites and IGF binding protein which inhibite the effect of IGF. The purpose of this study is to evaluate potential role of IGF - I as mediator that control the action of 1,25 - dihydroxyvitamin D_3.

MC3T3 - E1 cell were seeded 5×10^5/ml at 100mm culture plate in α - MEM containing 10% fetal bovine serum. After 48 hour incubation period, medium were changed α - MEM containing 5% fetal bovine serum. After 24 hours, 10^{-9}M 1,25 - dihydroxyvitamin D_3 added. Total mRNA was extracted at 0, 6, 24, 48, 72 hour. PR - PCR method was programed for the detection of IGF - I mRNA. In the both groups of 1,25 - dihydroxy vitamin D_3 treated and control, alternative splicing form of IGF - I, IGF - IA and IGF - IB were expressed. In the 1,25 - dihydroxyvitamin D_3 treated group, IGF - I mRNA expression was matained until 24 hour, there after expression was decresed.

MC3T3 - E1 cell were seeded 2.5×10^4/ml at 24well plate in α - MEM containing 10% fetal bovine serum. After 48 hour incubation period, medium were changed α - MEM containing 3% fetal bovine serum. After 24 hours, 10^{-9}M 1,25 - dihydroxyvitamin D_3 and 10 ng/ml IGF - I were added separately or together. Cell were cultured for 1 and 3 days, 2 μCi/ml [^{3}H] - thymidine was added for the last 24h of culture of each days. [^{3}H] - thymidine incorporation in to DNA was measured and expressed counter per minute(CPM).

DNA synthetic activity was significantly decreased by 1,25 - dihydroxyvitamin D_3 both at 1 day and 3 day, and in the combination group of 1,25 - dihydroxyvitamin D_3 and IGF - I, DNA synthetic activity was also decreased both at 1 day and 3 days. IGF - I did not affect the DNA synthetic activity compared to control group both at 1 day and 3 day.

From the above results, 1,25 - dihydroxyvitamin D_3 was potent inhibitor of cell proliferaton in MC3T3 - E1 cells. It assumed that the effect of 1,25 - dihydroxyvitamin D_3 on osteoblast proliferation may be mediated in part by decreased level of IGF - I.