

에스트로젠과 프로게스테론이 골모세포의 증식과 활성화에 미치는 영향

하 국 봉¹⁾ · 손 우 성²⁾ · 김 세 원³⁾

치아이동에 대한 생리학적인 반응은 골 형성과 재형성의 조합이라 할 수 있다. 골 형성과 흡수에는 국소적으로 작용하는 여러 부분비 인자가 관여한다. 대표적인 여성호르몬인 에스트로젠과 프로게스테론도 그 중의 한 인자로 성인 여성은 생리, 임신, 폐경 등 상태에 따라 체내 성호르몬 농도가 달라진다. 따라서 이러한 농도의 변화에 따라 골조직이 영향을 받을 수 있을 것으로 추정된다. 골모세포는 골흡수를 일으키는 호르몬인 PTH, Vit D₃ 등에 일차적으로 반응함으로써 골형성 뿐만 아니라 골흡수에도 일정한 역할을 하고 있어 파골 세포에 영향을 주는 부분비 인자도 추측해 볼 수 있다. 본 연구에서는 ROS17/2.8 및 HOS 세포주를 배양하면서 에스트로젠 및 프로게스테론 등 여성 호르몬을 처리한 후 골모세포의 증식과 활성화에 미치는 영향을 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 에스트로젠은 HOS 세포의 증식을 억제하였으며 ROS17/2.8 세포의 증식은 촉진하는 것으로 관찰되었다.
2. 에스트로젠은 HOS 세포의 alkaline phosphatase 활성을 증가시켰고 ROS 세포에서는 효소활성을 억제하는 것으로 나타났다.
3. 프로게스테론은 HOS 및 ROS17/2.8 세포 모두의 증식을 억제하였으며 골모세포의 alkaline phosphatase 활성화에는 영향을 미치지 못하였다.
4. 에스트로젠과 프로게스테론은 골모세포내에서 생성되는 superoxide, nitric oxide 및 gelatinase 활성 등 골모세포의 기능에는 유의한 변화를 일으키지 않았다.

(주요 단어 : 에스트로젠, 프로게스테론, 골모세포, MTT, alkaline phosphatase, nitrite, NBT, gelatinase)

I. 서 론

교정치료에서의 치아 이동은 대사기능에 의한 골의 형성과 재형성의 조합이라 할 수 있다. 골 형성은 흡수와 생성 부위가 독립적으로 존재하여 골 형태의 변화를 야기하고, 골 재형성은 기존의 골을 대체하는

흡수와 생성이 짝을 이루는 특이한 과정이다^{1,2)}.

교정학의 발달로 인해 성인의 교정 치료 수요는 급격히 증가하여 왔다. 성인환자의 교정 치료와 유년기 및 청소년기 교정 치료는 일정한 기계적인 힘에 대해서도 조직 반응이 다르기 때문에, 성인 환자의 교정 치료시 관련된 치료 목표와 치료 기법은 물론 교정력에 대한 골조직의 반응에 대해 더 잘 알아야 할 필요가 있다. 성인교정 환자의 상당부분을 차지하는 여성은 생리, 임신 등으로 성호르몬의 체내 농도가 변화하며 폐경기가 되거나 각종 산부인과 질환 때문에 조기에 난소를 적출하게 되는 경우 생리적인 에스트로젠의 분비량이 감소되어 대사성 골질환의 하나인 골다공증의 제반증상을 겪게 된다²⁻⁴⁾. 또한 임신중인 여성

¹⁾ 부산대학교 치과대학 교정학교실, 대학원생.

²⁾ 부산대학교 치과대학 교정학교실, 교수.

³⁾ 단국대학교 치과대학 치과약리학교실, 교수.

교신저자 : 손우성

부산 서구 아미동

부산대학교 치과대학 / 051-240-7447

wsson@hyowon.pusan.ac.kr

이 교정 치료를 받을 경우 치조골 흡수가 많은 것으로 보고되어 교정 치료를 받는 폐경기 여성에게 에스트로젠 투여의 필요성이 제시되었다^{2,5)}.

에스트로젠이 골모세포에 미치는 영향에 대해서는 여러 분야에서 많은 연구가 이루어 졌다. 초기 연구에서 골모세포에는 에스트로젠 수용체가 존재하지 않으며 에스트로젠은 단지 칼슘의 흡수와 칼시토닌 분비에 영향을 미친다고 알려졌다^{6,7)}. 그러나 흰쥐 골육종의 골모세포(ROS17/2.8)에서 최초로 에스트로젠 수용체가 구명되어 에스트로젠이 골세포에 직접적인 영향도 미친다는 사실이 알려졌다⁸⁾.

Oursler 등⁹⁾은 에스트로젠이 골흡수를 억제하는 것은 골모세포로부터 이환성장인자(transforming growth factor-beta)와 insulin-like growth factor 등의 분비를 촉진하고 이들이 파골세포에 영향을 미치기 때문이라고 하였다. 그러나 65세 이상의 여성으로 골절의 기왕력이 있는 이미 골다공증에 이환되어 골대사가 활발하지 않은 환자에게 에스트로젠을 투여한 결과 골밀도가 1년후 5-10% 증가함이 보고되어¹⁰⁾ 에스트로젠이 골흡수 억제 작용 뿐만 아니라 골형성을 촉진할 임상적 가능성이 제시되고 있으나 이를 뒷받침 할 수 있는 기초적인 연구 결과는 적다.

골모세포, 파골세포 및 그 전구세포들은 coupling factor라고 일컬어지는 화학적 신호를 통해 교통하고 있는 것으로 여겨진다¹¹⁾. 골모세포는 골흡수에는 직접적으로는 관여하지 않는 것으로 알고 있으나 골흡수에 관여하는 여러 인자를 분비하여 파골세포의 활성을 조절하는 것으로 밝혀졌으며 여러 부분비인자들이 관여한다. 대식세포가 박테리아를 파괴할 때 생성되는 superoxide나 골모세포가 염증전에 생성하는 nitric oxide, 골 성분 중 유기질을 분해하는 성분중의 하나인 gelatinase 등의 생성과 분해과정을 알아보면 파골세포와 골모세포 사이의 상호 작용에 대해서 알 수 있을 것이다.

치의학 분야에서는 에스트로젠이나 프로게스테론의 기능과 역할이 치주질환이나^{12,13)} 악관절질환과 연관지어 연구되었을 뿐^{14,15)} 골모세포에 대한 작용은 잘 알려져 있지 않다. 또한 골다공증의 예방 및 치료 목적으로 에스트로젠을 투여할 때 자궁내막암의 위험을 줄이기 위해 반드시 투여하는 프로게스테론이 골모세포에 미치는 영향에 대한 보고는 거의 없다. 이에 본 연구는 rat osteosarcoma (ROS 17/2.8) 세포주와 human osteosarcoma (HOS) 세포주를 골모세포의 실험 모델로 이용하여 에스트로젠, 프로게스테론

등의 여성 호르몬이 골모세포의 세포수, MTT reduction 양, alkaline phosphatase 활성 변화, superoxide와 nitric oxide의 생성 및 gelatinase의 활성 등에 미치는 영향을 측정함으로써 골모세포의 증식과 활성화에 미치는 영향을 알아보았다.

II. 연구재료 및 방법

가. 연구재료

1. 골모세포의 배양

본 연구에 사용된 세포는 골모세포의 실험모델로 흔히 이용되는 osteosarcoma cell line인 rat osteosarcoma cell(ROS 17/2.8)과 human osteosarcoma cell(HOS) 세포주를 사용하였다. 세포들은 통상적인 방법에 의하여 10% fetal bovine serum(FBS, Gibco)과 항생제가 첨가된 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM, Gibco)으로 75 cm² culture flask에서 배양되었다. 배양 시 37°C 온도, 95% 습도를 유지하면서 5% CO₂와 95% 공기를 계속 공급하였으며 배양액은 1주일에 2회 교환하여 주었다. 세포가 단층을 이루면 trypsin-EDTA(Gibco) 용액으로 처리하여 세포를 수집한 후 1 : 10의 비율로 계대배양을 시행하였다. 이렇게 배양한 세포는 실험목적에 따라 24-well 혹은 96-well의 배양 접시에 분주하여 실험에 사용하였다.

2. 세포처리

에스트로젠과 프로게스테론 각 세포를 24-well 혹은 96-well 배양접시에 분주하여 배양하면서 세포가 70% 정도 성장한 후 대조군은 ethanol만 첨가된 배양액으로, 실험군은 에스트로젠(17 β-estradiol, Sigma)이 1, 10 및 100 nM이 첨가된 배양액이나 프로게스테론(progesterone, Sigma)이 1, 5 및 10 nM이 첨가된 배양액으로 교환하여 준 후 48시간 배양한 다음 각각의 실험들을 시행하였다.

나. 연구방법

1. 세포 증식도 측정(Cell Proliferation Assay)

1) 골모세포 수 측정

골모세포들을 24-well 배양접시에 well 당 2 x 10⁴ 개의 세포가 들어가도록 분주하여 10% FBS가 첨가된 DMEM으로 배양하였으며, 배양이 끝난 뒤 배양접

시에 부착된 세포를 trypsin-EDTA로 처리하여 수집한 후 인산 완충 생리식염수로 1회 세척하였다. 수집한 세포는 다시 인산 완충 생리식염수로 희석시킨 후 광학현미경 하에서 hemocytometer를 이용하여 세포수를 측정하였으며 이 때 trypan blue exclusion 방법으로 염색한 후 생세포 계측을 시행하였다.

2) MTT reduction assay

골모세포들을 96-well 배양접시에 분주하여 배양하였다. 배양이 끝나기 3시간 전에 배양액에 MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide, 50 µg/well, Sigma) 용액을 첨가하여 주었으며, 최종 3시간의 배양기간 동안 세포의 활성에 의해 생성된 formazan granule의 양을 측정함으로써 세포수의 변화 여부를 평가하였다. 배양이 끝난 다음 배양액을 제거하고 0.04 N HCL/isopropanol로 30분 동안 formazan granule을 용해시킨 후 microplate reader(SLT 400 SFC, SLT Lab Instrument)를 이용하여 550 nm에서 비색정량하였다. 실험 결과는 대조군의 흡광도에 대한 실험군의 흡광도의 비율로 표시하였다.

2. 세포 활성도 측정(Cell activity Assay)

1) Alkaline phosphatase 활성도 측정

골모세포의 alkaline phosphatase 활성도를 측정하기 위하여 골모세포를 24-well 배양접시에 well 당 2×10^4 개의 세포가 들어가도록 분주한 후 배양하였다. 배양이 끝난 후 alkaline phosphatase를 0.1% Triton X-100/saline으로 추출한 다음 효소활성도를 측정하였다. 효소활성도는 일정량의 세포추출액을 glycine-NaOH 완충액(pH 10.4)에서 기질인 p-nitrophenyl phosphate(pNPP, 100 mM, Sigma)와 반응시킨 다음 효소의 작용에 의하여 기질로부터 유리된 p-nitrophenol의 양을 spectrophotometer로 계측하였다. 각 시료의 단백질 농도는 상용화된 BCA protein assay kit(Pierce)를 이용하여 측정하였으며 효소 활성도는 nmole substrate cleaved/mg protein for hour로 계산하였다.

2) Nitrite assay

골모세포 배양시 생성되는 nitric oxide의 양은 배양액내의 nitric oxide의 안정화 최종 산물인 nitrite를 측정함으로써 평가하였다. 골모세포들을 96-well 배

양접시에서 48시간 배양하였다. 배양이 끝난 후 100 µl의 세포 배양액을 새로운 96-well plate로 옮긴 다음 동량의 Griess 용액(1% sulphanilamide와 1% N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride in 2% phosphoric acid)과 혼합하여 15분간 반응시킨 후 nitrite의 양을 측정하였다. 흡광도는 530 nm의 파장에서 microplate reader(SLT 400 SFC, SLT Lab Instrument)를 이용하여 측정하였다.

3) Nitro blue tetrazolium (NBT) reduction assay

골모세포에 의한 superoxide의 생성을 알아보기 위해 NBT reduction assay를 시행하였다. 골모세포를 96-well 배양접시에서 48시간 배양하였다. 여기에 20 µl의 NBT solution(Grade III, 10 mg/ml, Sigma)을 첨가한 후 4시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 후 배양액을 제거한 다음 배양 중에 형성된 formazan granule을 200 µl의 dissolving solution(0.004 N HCL/isopropanol)으로 용해시킨 다음 550 nm에서 microplate reader(SLT 400 SFC, SLT Lab Instrument)를 사용하여 흡광도를 측정하였다. 실험결과는 대조군의 흡광도에 대한 실험군의 흡광도의 비로써 표시하였다.

4) Type IV collagenase/Gelatinase 활성도 측정

골모세포를 24-well 배양접시에 well 당 2×10^4 개의 세포가 들어가도록 분주한 후 48시간 동안 배양하였다. 배양 후 배양액을 모아 filter 형의 농축기(Centricon™, molecular weight cut-off 30,000, Amicon)를 이용하여 5배 정도 농축시켰다. gelatinase 활성도를 측정하기 위하여 0.1% gelatin이 첨가된 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel(SDS-PAGE gel, NOVEX)에 mini-gel apparatus를 이용하여 농축한 배양액을 전기영동하였다. 전기영동 후 gel을 renaturing buffer (2.5% Triton X-100)에 30분간, developing buffer (2.5% Triton X-100)에 30분간 2회 배양하였다. 그 후 37 °C에서 신선한 developing buffer에 gel을 16-20시간 동안 반응시킨 후 0.5% Coomassie brilliant blue R250으로 착색하고 10% methanol/10% acetic acid로 탈색하였다. 효소 활성도는 진청색 바탕에 투명띠로 나타났으며 그 정도에 의해 효소활성도를 비교하였다. 한편 표준분자량을 갖는 단백질들을 동일 gel에 전기영동 함으로써 나타나는 효소의 분자량을 기준으로 실험군과 비교 평가하였다.

Table 1. Effect of estrogen on the proliferation of HOS and ROS17/2.8 cells

Treatment	HOS	ROS17/2.8
Control	41.8±0.87	40.2±1.48
E 1 nM	39.3±1.65	43.1±1.82
E 10 nM	36.7±1.50**	43.4±1.76
E 100 nM	32.3±0.71**	47.1±1.70**

HOS and ROS17/2.8 cells were treated with different concentrations of estrogen for 48 hours. Cell numbers were expressed as $\times 10^4$. Values are Mean±S.E. (n=6). **P<0.01 compared to control. E: estrogen

Table 3. Effect of estrogen on the MTT reduction in the HOS and ROS17/2.8 cells

Treatment	HOS	ROS17/2.8
Control	1.00±0.02	1.00±0.01
E 1 nM	1.03±0.02	0.97±0.02
E 10 nM	1.00±0.02	0.99±0.02
E 100 nM	0.98±0.01	1.21±0.02**

HOS and ROS17/2.8 cells were treated with different concentrations of estrogen for 48 hours. Results were expressed as an absorbance ratio of cultured control. Values are Mean±S.E. (n=10). **P<0.01 compared to control.

III. 연구결과

1. 세포증식도

1. 골모세포 수 측정

2개의 골모세포주를 에스트로젠과 프로게스테론이 첨가된 배양액으로 48시간 배양한 후 세포수를 측정 한 결과 에스트로젠은 HOS세포의 세포 수를 감소시켰으며 ROS17/2.8 세포의 세포수를 증가시킴을 알 수 있었다(Table 1). HOS 세포의 경우 첨가된 에스트로젠의 농도에 비례하여 세포수가 감소하였으며, 10 및 100 nM의 농도에서 각각 12% 및 23%의 유의한 감소효과를 나타내었다. ROS17/2.8 세포의 경우 에스트로젠 처리에 의해 농도의존적인 세포수 증가가 관찰되었으며, 100 nM의 에스트로젠을 첨가하여 배양

Table 2. Effect of progesterone on the proliferation of HOS and ROS17/2.8 cells

Treatment	HOS	ROS17/2.8
Control	40.7±1.96	54.4±2.71
P 1 nM	37.5±2.32	45.7±1.13**
P 5 nM	31.3±2.32**	44.8±1.51**
P 10 nM	28.5±1.93**	46.9±2.06*

HOS and ROS17/2.8 cells were treated with different concentrations of progesterone for 48 hours. Cell numbers were expressed as $\times 10^4$. Values are Mean±S.E. (n=6). *P<0.05. **P<0.01 compared to control. P: progesterone

Table 4. Effect of progesterone on the MTT reduction in the HOS and ROS17/2.8 cells

Treatment	HOS	ROS17/2.8
Control	1.00±0.02	1.00±0.01
P 1nM	1.01±0.01	0.99±0.01
P 5nM	1.00±0.01	1.04±0.01
P 10nM	0.99±0.01	1.02±0.01

HOS and ROS17/2.8 cells were treated with different concentrations of progesterone for 48 hours. Results were expressed as an absorbance ratio of cultured control. Values are Mean±S.E. (n=10).

한 경우 17%의 유의한 증가효과를 나타내었다.

한편 프로게스테론은 HOS 및 ROS17/2.8 세포주 모두에서 세포증식을 억제하는 것으로 관찰되었다 (Table 2). 여러 농도의 프로게스테론이 첨가된 배양액으로 48시간 동안 배양한 경우 HOS 세포에서는 5 및 10 nM 농도에서 23% 및 30%의 유의한 세포증식 억제효과가 관찰되었다. ROS17/2.8 세포의 경우 1, 5 및 10 nM 농도 모두에서 각각 16%, 18% 및 14%의 유의한 억제효과가 관찰되었으며 5 nM의 프로게스테론으로 처리한 경우 가장 큰 억제효과가 관찰되었다.

2. MTT reduction assay

세포증식도를 측정하기 위한 또다른 방법으로 MTT reduction assay를 시행하였다. 에스트로젠이

Table 5. Effect of estrogen on the alkaline phosphatase activity of HOS and ROS17/2.8 cells

Treatment	HOS	ROS17/2.8
Control	47.4±3.14	1128.5±28.6
E 1 nM	49.6±2.03	930.5±30.7**
E 10 nM	52.4±2.32	871.0±40.4**
E 100 nM	56.8±2.46*	852.5±44.8**

HOS and ROS17/2.8 cells were treated with different concentrations of estrogen for 48 hours. Enzyme activity is expressed as nmol substrate cleaved/h/mg protein. Values are Mean±S.E. (n= 6). *P<0.05, **P<0.01 compared to control.

첨가된 배양액으로 배양한 경우 HOS 세포에서는 MTT reduction 양이 유의한 변화를 보이지 않은 반면 ROS17/2.8 세포에서는 세포 수 측정의 결과와 유사하게 MTT reduction 양이 증가되는 것으로 나타났다(Table 3). 한편 프로게스테론이 첨가된 배양액의 경우 세포수의 측정결과와는 다르게 유의한 MTT reduction 양의 변화를 관찰할 수 없었다(Table 4).

2. 세포 활성화 측정

1. Alkaline phosphatase 활성화 측정

골모세포 활성화의 지표로써 alkaline phosphatase 활성도를 측정하였다. HOS 세포와 ROS17/2.8 세포 모두 alkaline phosphatase 활성도를 나타내었으며 기초 활성도는 ROS17/2.8 세포의 경우 HOS 세포에 비하여 약 20배 정도 높게 관찰되었다. 골모세포주를 에스트로젠이 첨가된 배양액으로 48시간 동안 배양한 후 alkaline phosphatase 활성도의 변화를 측정한 결과 에스트로젠은 HOS 세포의 alkaline phosphatase 활성도를 농도의존적으로 증가시켰으며, 100 nM의 농도에서 19%의 유의한 증가가 관찰되었다. ROS17/2.8 세포의 경우 에스트로젠 처리시 alkaline phosphatase 활성도가 농도의존적으로 억제됨을 관찰할 수 있었으며 1, 10 및 100 nM 모두에서 각각 18%, 23% 및 25%의 유의한 억제효과가 관찰되었다(Table 5).

프로게스테론이 첨가된 배양액으로 골모세포주를 배양한 후 alkaline phosphatase 활성도를 측정한 결과 HOS 및 ROS17/2.8 세포주 모두에서 약간의 활성도 변화를 보였으나 유의한 변화를 관찰할 수는 없었

Table 6. Effect of progesterone on the alkaline phosphatase activity of HOS and ROS17 /2.8 cells

Treatment	HOS	ROS17/2.8
Control	53.3±2.92	976.5±28.4
P 1 nM	55.2±1.98	1005.0±49.6
P 5 nM	59.2±3.71	1041.1±39.6
P 10 nM	53.1±1.25	992.5±13.3

HOS and ROS17/2.8 cells were treated with different concentrations of progesterone for 48 hours. Enzyme activity is expressed as nmol substrate cleaved/h/mg protein. Values are Mean±S.E. (n=6).

다(Table 6).

2. Nitrite assay

골모세포주에서 생성되는 nitric oxide의 생성량을 알아보기 위하여 골모세포주를 배양한 후 배양액을 모아 nitrite assay를 시행하였다. HOS 및 ROS17/2.8 세포주 모두 배양액에서 nitrite가 검출되어 두 개의 골모세포가 nitric oxide를 생성함을 알 수 있었으나 그 양은 매우 적었으며 에스트로젠이나 프로게스테론을 첨가하여 배양한 경우 골모세포에서 생성되는 nitric oxide의 양은 의미있는 변화를 보이지 않았다(Table 7 및 Table 8).

3. Nitro blue tetrazolium (NBT) reduction assay

골모세포주를 배양하면서 골모세포에서 생성되는 superoxide의 생성량을 알아보기 위하여 NBT reduction assay를 시행하였다. 실험에 사용된 2개의 세포주 모두에서 NBT reduction이 관찰되어 두 세포주 모두 superoxide를 생성하는 것으로 생각되었으며 100 nM농도의 에스트로젠이 첨가된 배양액으로 배양한 경우 HOS 세포에서 유의한 감소효과가 관찰되었으나 그 차이는 크지 않았다. ROS 17/2.8 세포의 경우에는 에스트로젠 처리시 유의한 변화가 관찰되지 않았다(Table 9).

한편 프로게스테론이 첨가된 배양액으로 세포를 배양한 후 NBT reduction assay를 시행한 결과 HOS 및 ROS17/2.8 세포주 모두에서 유의한 NBT reduction의 변화가 관찰되지 않았다(Table 10).

Table 7. Effect of estrogen on the nitrite production in the HOS and ROS17/2.8 cells

Treatment	HOS	ROS17/2.8
Control	0.051±0.002	0.050±0.002
E 1 nM	0.049±0.002	0.052±0.003
E 10 nM	0.049±0.001	0.049±0.002
E 100 nM	0.050±0.002	0.050±0.002

HOS and ROS17/2.8 cells were treated with different concentrations of estrogen for 48 hours. Data are expressed as absorbance (OD₅₃₀). Values are Mean±S.E. (n=10).

Table 9. Effect of estrogen on the NBT reduction in the HOS and ROS17/2.8 cells

Treatment	HOS	ROS17/2.8
Control	1.00±0.02	1.00±0.03
E 1 nM	0.96±0.01	0.99±0.03
E 10 nM	0.96±0.02	1.03±0.02
E 100 nM	0.94±0.02**	0.99±0.04

HOS and ROS17/2.8 cells were treated with different concentrations of estrogen for 48 hours. Results were expressed as an absorbance ratio of cultured control. Values are Mean±S.E. (n=10). **P<0.01, compared to control.

Table 8. Effect of progesterone on the nitrite production in the HOS and ROS17/2.8 cells

Treatment	HOS	ROS17/2.8
control	0.051±0.002	0.050±0.002
P 1nM	0.050±0.002	0.050±0.002
P 5nM	0.050±0.001	0.051±0.003
P 10nM	0.049±0.002	0.051±0.002

HOS and ROS17/2.8 cells were treated with different concentrations of progesterone for 48 hours. Data are expressed as absorbance (OD₅₃₀). Values are Mean±S.E. (n=10).

Table 10. Effect of progesterone on the NBT reduction in the HOS and ROS17/2.8 cells

Treatment	HOS	ROS17/2.8
Control	1.00±0.02	1.00±0.03
P 1 nM	0.98±0.03	1.03±0.04
P 5 nM	1.00±0.02	1.03±0.04
P 10 nM	0.98±0.03	1.01±0.05

HOS and ROS17/2.8 cells were treated with different concentrations of progesterone for 48 hours. Results were expressed as an absorbance ratio of cultured control. Values are Mean±S.E. (n=10).

4. Type IV collagenase/Gelatinase 활성도 측정 (Zymography)

골모세포에서 생성, 분비되는 type IV collagenase /gelatinase의 활성을 측정하기 위하여 세포배양액을 모아 농축한 후 gelatin이 첨가된 zymogram gel을 이용하여 zymography를 시행하였으며, 그 결과 zymogram 상에서 gelatin을 분해한 gelatinase 밴드가 관찰되어 HOS 및 ROS17/2.8 세포 모두 gelatinase를 생성함을 알 수 있었다. 골모세포주에서 생성되는 gelatinase의 분자량은 표준분자량을 갖는 단백질과 비교하여 볼 때 약 65Kda 정도 되어 gelatinase A로 추정되었으며 이러한 gelatinase의 활성은 여러 농도의 에스트로젠이나 프로게스테론이 첨가된 배양액으로 배양한 경우 유의한 차이를 나타내지 않았다 (Figure 1 및 Figure 2).

IV. 고 찰

최근 수년동안 골생물학 분야의 연구에 많은 발전이 있어 왔으며 이를 통하여 골조직의 대사를 이해하는데 도움을 주어 왔다. 즉, 골조직 대사는 다양한 인자에 의해 조절되며 전신적 호르몬, 성장인자, cytokines 뿐만 아니라 골조직 내에서 생성되는 국소적 인자들도 골조직 대사에 중요한 역할을 담당하고 있다. 최근 들어 부갑상선 호르몬(parathyroid hormone, PTH), calcitonin, 1,25-dihydroxyvitamin D₃(Vit D₃)와 같은 물질들도 골조직을 구성하고 있는 세포들에 작용하여 다양한 paracrine 역할을 하고 있음이 알려져 있으며 여러 골조직 세포들이 골형성과 골흡수 과정에서 서로 상호작용을 하고 있음이 알려진 바 있다.

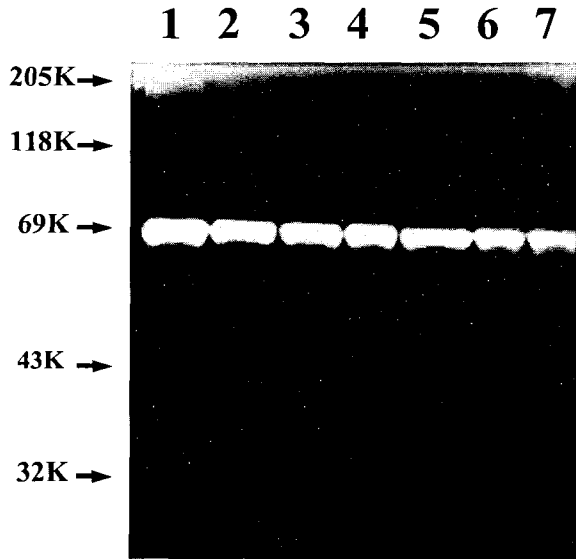


Figure 1. Zymogram of concentrated conditioned media obtained from HOS cell culture. After culturing with various concentrations of estrogen and progesterone concentrated conditioned media was resolved in 10% zymogram gel containing 1mg/ml gelatin. Numerals are M.W. standard. Lane 1, control: Lane 2-4, estrogen 1, 10 and 100 nM: Lane 5-7, progesterone 1, 5 and 10 nM.

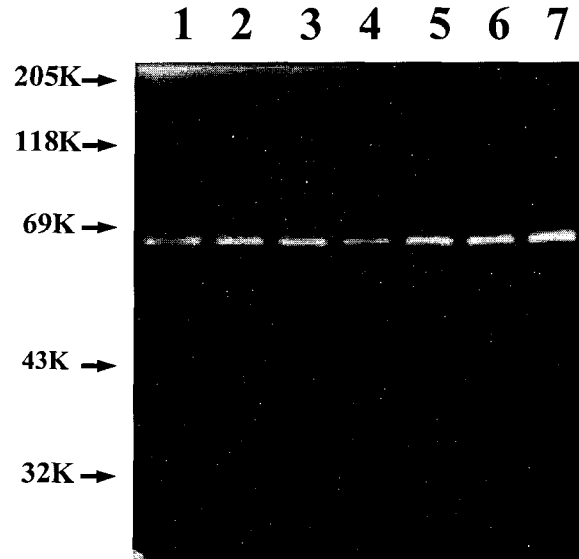


Figure 2. Zymogram of concentrated conditioned media obtained from ROS17/2.8 cell culture. After culturing with various concentrations of estrogen and progesterone concentrated conditioned media was resolved in 10% zymogram gel containing 1 mg/ml gelatin. Numerals are M.W. standard. Lane 1, control: Lane 2-4, estrogen 1, 10 and 100 nM: Lane 5-7, progesterone 1, 5 and 10 nM.

골모세포는 골 형성에 중심적인 역할을 하는 세포로서 주로 교원질으로 구성된 골기질을 형성하고 이를 광화시킴으로써 골조직을 완성시키는 세포이다. 한편 골모세포는 비광화된 유골을 제거함으로써 파골세포의 부착을 용이하게 하고, 골흡수를 일으키는 호르몬인 PTH나 Vit D₃ 등에 일차적으로 반응함으로써 골형성 뿐만 아니라 골흡수에도 일정한 역할을 하고 있는 것으로 추측된다. 골모세포는 골, 연골, 지방, 근육등을 만들어내는 중간엽세포에서 분화된다. 골모세포는 증식과 분화 과정을 거쳐 성숙되며 이 과정에서 증식과 분화는 서로 상호 억제작용이 있는 것으로 생각된다. 즉 골모세포 발달 초기에는 모든 세포들이 증식하나 세포가 어느 정도 증식하면 하향 조절에 의하여 증식은 억제되고 분화가 시작되어 성숙된 세포에서 무기질이 생성되어 새로운 골을 형성한다. 따라서 증식은 분화를, 그리고 분화는 증식을 서로 억제하고 있기 때문에 증식과 분화가 잘 조절되어야 효율적으로 골을 형성하게 된다¹⁶⁾.

에스트로젠과 프로그스테론 등 여성 호르몬도 골모세포의 증식과 분화를 조절하는 주요한 호르몬의 하나로 제시된 바 있다. 에스트로젠은 난소와 황체에 존재하는 과립막 세포에서 주로 생성되며, 성선자극 호르몬이 세포막에 존재하는 수용체를 통해 스테로이드호르몬 합성을 유발하는 신호를 보내게 된다. 성선자극호르몬은 분자량이 큰 당성코르티코이드로 되어 있어 세포 내로 확산되어 들어갈 수 없기 때문에 세포막에 존재하는 특이 수용체에 결합하여 adenylylate cyclase를 활성화시킴으로써 세포 내의 cAMP의 양을 증가시키고 이를 통하여 신호를 보내게 된다. 에스트로젠에는 3가지 형태가 있으며 이 중 17-β estradiol이 가장 활성이 높고 주된 생성물이다. 이것은 골 산화되어 estron으로 변환되고 수화되어 estriol이 된다. 폐경이 되어 에스트로젠이 결핍되면 골밀도가 감소하고 에스트로젠을 보충하면 골소실이 예방된다는 사실은 널리 알려져 있으며¹⁷⁾ 또한 임상적으로 에스트로젠 투여 후 골밀도가 10% 증가하여 골 형

성에도 일정한 역할을 할 것으로 추정된다¹⁸⁾.

프로게스테론은 임신 상태가 아닌 여성의 난소와 부신에서 분비되며, 임신 초기에 태아 음모막세포 침입에 대해 모체의 면역 반응을 억제하고 착상전 자궁 내막에 직접 작용하여 임신을 유지시키며 분만 과정에 관여한다. 또한 태아 부신에서 생성되는 당성코르티코이드나 광성코르티코이드 합성에도 이용된다. 프로게스테론의 골모세포에 대한 작용을 포함한 골조직 대사에 미치는 영향에 대하여는 아직 많은 연구가 되어 있지 않은 상태이다. 최근의 연구에 의하면 비록 무월경은 아니지만 배란장애가 있는 여성은 프로게스테론 결핍으로 골밀도 감소가 초래될 수 있으며¹⁹⁾ 다른 연구에서는 프로게스테론이 정상 성인의 골모세포를 증식시키고 분화를 촉진한다는 사실이 보고되었다²⁰⁾. Armstrong 등²¹⁾은 난소를 제거한 쥐를 이용해서 프로게스테론이 골소실을 예방함을 보고한 바 있으며 사람에서의 칼슘, 인, hydroxyproline 분비에 대해 프로게스테론이 미치는 영향 역시 에스트로젠과 유사할 것으로 추측하였다. Christiansen 등²²⁾은 프로게스테론은 에스트로젠과 독립적으로 골형성을 증가시킴으로써 골밀도를 증가시키며 이러한 효과는 골모세포에 존재하는 프로게스테론 수용기를 통해 직접 이루어진다고 하였다. Gallagher 등²³⁾은 폐경기 여성의 골밀도 감소의 원인은 프로게스테론의 결핍으로 인해 골세포에 대한 cortisol 활성이 증가하여 골흡수가 증가하기 때문이라 보고한 바 있다.

본 연구에 사용된 세포는 골모세포의 실험모델로 흔히 이용되는 osteosarcoma cell line인 ROS 17/2.8과 HOS 세포주를 사용하였다. 이들 세포들은 alkaline phosphatase 활성도, 부갑상선 호르몬에 의한 cAMP의 생성, osteocalcin을 비롯한 골조직-특이 단백질의 생성 등 골모세포의 특성을 갖고 있는 것으로 알려져 있다.

HOS 세포와 ROS17/2.8 세포를 배양하면서 에스트로젠을 48시간 처리한 후 세포수의 변화를 측정한 결과 에스트로젠은 HOS 세포의 증식을 억제한 반면 ROS17/2.8 세포의 증식을 촉진하는 등 상반된 결과를 나타내었다. 이는 골모세포의 증식이 에스트로젠에 의하여 영향을 받지 않았다는 Keeting 등²⁴⁾의 보고와는 차이를 나타내었다. 또한 Ernst 등²⁵⁾은 에스트로젠 처리에 의하여 골모세포의 증가효과를 보고한 바 있어 본 연구에 사용된 ROS17/2.8 세포의 경우 이와 유사한 연구결과가 관찰되었으나 HOS 세포의 경우 상반된 결과를 나타내었다. Davis 등²⁶⁾은 ROS17/

2.8 cell이 다른 골모세포들 보다 에스트로젠 수용체가 결합하는 장소가 2-3배 많고 에스트로젠에 특이한 반응이 더 크게 나타난다고 하였고 골모세포의 종류에 따라 호르몬에 대한 반응이 다르고 동일한 사람에서도 골모세포의 반응이 하악골, 장골 등 채취 부위에 따라 다르다고 한 Kasperk 등²⁷⁾의 연구 등을 고려해보면 이러한 연구결과는 실험에 사용된 골모세포의 기원이나 골모세포의 분화 정도에 따라 서로 다른 반응을 나타낼 수 시사하며 에스트로젠도 골모세포의 분화 정도에 따라 다양한 반응을 나타낼 가능성이 있다. 프로게스테론을 처리한 후 세포 수를 측정할 결과 HOS 세포나 ROS17/2.8 세포에서 모두 농도가 증가함에 따라 세포증식이 억제됨을 관찰하였다. 이러한 결과는 Scheven 등²⁰⁾과 Christiansen 등²²⁾의 보고와는 차이가 있으며 이는 정상 성인의 골모세포를 사용한 경우와 골육종 세포를 사용한 본 실험과의 골모세포의 차이 때문인 것으로 추정된다.

MTT reduction assay 결과 에스트로젠은 세포수 측정과 유사하게 ROS17/2.8 세포의 MTT reduction을 증가시키는 관찰되었다. 그러나 프로게스테론의 경우 세포수 측정과는 차이가 있어 골모세포의 MTT reduction 양에 유의한 영향을 미치지 못함을 알 수 있었다. 이러한 연구결과는 프로게스테론이 세포수의 변화뿐만 아니라 mitochondrial enzyme의 활성도에도 영향을 미칠 가능성을 시사한다.

alkaline phosphatase는 여러 세포에서 생성되나 골모세포, 전골모세포에서 가장 활성이 높으며²⁸⁾ 골조직 형성의 여러 단계에 관여하는 것으로 알려져 있어 골모세포의 표지효소로 널리 이용되고 있다. 본 연구에서도 골모세포의 활성 지표로 alkaline phosphatase 활성의 변화를 측정하였으며 기초활성을 비교한 결과 ROS17/2.8 세포의 활성도가 HOS 세포의 활성도보다 높은 값을 나타내어 ROS17/2.8 세포가 HOS 세포에 비하여 골모세포로의 분화가 더 진전된 세포임을 알 수 있었다. 에스트로젠을 첨가한 배양액으로 세포들을 처리한 경우 HOS 세포의 alkaline phosphatase 활성은 에스트로젠의 농도가 높아질수록 증가하였으며 ROS17/2.8 세포의 경우 효소활성이 감소됨을 알 수 있었다. 이러한 결과는 세포의 증식과 분화가 서로 상반된다는 여러 연구결과를 종합해 볼 때 의미 있는 연구결과라 생각되며 에스트로젠은 HOS 세포의 증식을 억제하고 분화를 촉진하는 반면 ROS17/2.8 세포의 증식을 촉진하고 분화를 억제할 수 있음을 시사한다. 한편 프로게스테론은 실험에 사용된 모든

농도에서 HOS 및 ROS17/2.8 세포의 alkaline phosphatase 활성화에 유의한 변화를 나타내지 못하였으며 이러한 연구결과는 프로게스테론은 골모세포의 분화 과정에 거의 영향을 미치지 못하는 것으로 볼 수 있다.

nitric oxide(NO)는 순간적으로 생성되었다가 소멸되는 자유기로 nitric oxide 합성 효소에 의해 생성된다. 공기중에서 nitric oxide는 안정된 화합물인 NO₃ 또는 NO₂로 쉽게 전환되며 생체 내에서 백혈구에서의 살균 작용, 혈관에서의 혈관확장 작용, 신경세포에서의 신경 전달 물질 기능 등을 나타내는 것으로 알려져 있으며 그밖에도 많은 종류의 세포가 nitric oxide의 영향을 받고 있다^{29,30}. nitric oxide의 골조직 세포에 대한 영향은 비교적 최근에 와서 연구가 진행되고 있으며 reactive oxygen species와는 달리 골흡수를 억제할 가능성이 제시되어 있다. 최근의 연구들을 보면 골모세포가 염증성 cytokine의 자극에 의해 nitric oxide를 생성한다고 알려져 있으며 이는 nitric oxide가 골모세포나 파골세포 활성화도 조절에 일정한 역할을 하고 있음을 시사하는 것이라 생각된다. nitric oxide의 농도가 높을 때는 파골세포의 활성도를 감소시켜 골 흡수를 저하시키고 파골세포의 형성을 억제하는 것으로 알려져 있으나³¹ 낮은 농도에서는 골흡수를 촉진한다³². 골 형성에 대한 nitric oxide의 효과는 골모세포의 증식에 필요하나 역치 이상으로 증가하면 억제 작용 또는 독소로 작용하게 되며³³ 에스트로젠의 투여시 내피세포에서는 nitric oxide가 증가되었고 골모세포에도 영향을 미칠 것이라는 보고도 있다³⁴. 본 연구에서도 HOS 세포나 ROS17/2.8 세포 모두 nitric oxide를 생성함을 알 수 있었으나 그 생성량이 매우 작았으며 에스트로젠이나 프로게스테론의 처리에 의해 생성량이 영향을 받지 않았다. 이러한 연구결과는 골모세포가 유도될수 있는 형태의 NOS를 갖고 있음으로써 cytokine 처리 없이 자발적으로 생성되는 nitric oxide의 양은 매우 적다는 보고들과 일치하는 결과이며 정확한 작용기전을 알아보기 위하여는 cytokines와의 복합처리에 의한 실험들을 더 진행할 필요가 있다고 생각된다. 최근의 연구들에 의하면 골조직 세포에서 생성되는 reactive oxygen species도 골흡수에 관여함이 알려져 있으며 특히 파골세포의 형성이나 활성화에 기여할 것으로 추측된다.

superoxide는 NADPH oxidase라는 multi-component enzymatic system에 의해 생성되며, 대식세

포가 식작용을 하면서 생성하는 superoxide는 가장 대표적인 기능이다. 또한 교원질에 대한 superoxide의 역할은 교원질의 구조를 바꾸거나 초기 분해를 하여 효소가 잘 활동할 수 있도록 하는 것으로 알려져 있으며³⁵, Key 등³⁶의 연구에 의하면 파골세포의 골흡수 부위에서 superoxide가 생성되는 것을 보고하여 superoxide가 골흡수에 관여할 것으로 추정하였다. 본 연구에서도 골모세포가 자발적으로 NBT reduction을 일으킴이 관찰되어 골모세포도 superoxide를 생성함을 알 수 있었으나 에스트로젠이나 프로게스테론을 처리한 경우 골모세포에서 생성되는 superoxide의 양은 변화를 보이지 않았다. 이러한 연구결과들은 에스트로젠이나 프로게스테론 등 여성 호르몬이 파골세포에 직접적인 영향을 미칠 가능성을 배제하지는 못하지만 최소한 골모세포를 통해 paracrine 효과를 나타낼 가능성은 적은 것으로 보인다.

골단백질은 교원질과 비교원성 단백질로 구성되어 있으며, 이들은 주로 골모세포의 합성분비에 의한 것이지만 혈장단백질의 일부가 수산화인회석에 의해 결합되어 골내에 첨가될 수도 있다. 골흡수는 골 구성 성분 중 무기질과 유기질의 두 부분 모두가 제거되는 것을 의미한다. 골흡수 과정에 대하여는 많은 논란이 있으나 무기질의 흡수는 파골세포에 의해 생성되는 산에 의해, 유기질의 분해는 골모세포나 파골세포에 의해 생성되는 여러 종류의 단백질에 의해 이루어진다고 알려져 있다. 최근까지 골 구성 성분 중 가장 주된 성분인 교원질의 분해 과정에는 논란이 있어 왔으며, cystein proteinase중 특히 cathepsin과 interstitial collagenase(MMP-1) 같은 metalloproteinase는 자연상태의 제I형 교원질을 분해할 수 있는 것으로 알려졌다^{37,38}. 다른 metalloproteinase 군의 한 종류인 type IV collagenase (gelatinase)는 여러 골세포에서 생성되는 것으로 알려져 있으며³⁹ 비록 골 재형성 과정에서의 진정한 gelatinase의 역할은 불분명하지만 교원질의 최종 분해에 관여하는 것으로 여겨진다. gelatinase는 분자량에 따라 gelatinase A 및 gelatinase B 등 2가지로 구분되며 현재까지 파골세포는 gelatinase A 및 B 모두를 합성 분비하는 반면, 골모세포는 gelatinase A 만을 생성하는 것으로 알려져 있으며 이러한 gelatinase는 골조직 대사에 다양한 영향을 미칠 것으로 추정된다. 본 연구에서는 골모세포를 배양하면서 배양액을 모아 농축한 후 zymography를 시행한 결과 HOS 세포 및 ROS17/2.8 세포 모두 분자량 약 65Kda 정도의 활성화된 gelatinase A를 합

성 분비하는 것으로 나타났으며, 이러한 gelatinase 활성은 에스트로젠이나 프로게스테론이 첨가된 배양액에 의해 의미있는 변화를 보이지는 않았다.

이상의 실험 결과로 보아 에스트로젠은 잘 분화된 골모세포에서는 증식을 촉진하고 활성도를 감소시키며 분화가 덜 된 세포에서는 증식을 억제하고 활성도는 증가시킴을 알 수 있었다. 한편 프로게스테론은 골모세포의 증식을 억제하고 활성도에는 별다른 영향을 미치지 않아 어느 정도의 길항 작용은 보이는 것으로 나타났다. 이는 에스트로젠이 골 형성을 촉진한다는 다른 연구자들의 결과와 유사한 결과를 보였다. 그러나 교정학적 관점에서 본다면 여성이 임신을 하는 경우 혈중 에스트로젠, 프로게스테론의 농도가 100 nM 이상으로 증가하게 되는데 이 때 이들 성호르몬은 미성숙 골모세포의 증식을 억제하는 것으로 보아 치아 이동시 인장측의 골 형성을 억제하는 것으로 볼 수 있으므로 임신 중에는 교정치료를 연기하는 것이 좋을 것으로 생각된다.

V. 결 론

본 연구에서는 ROS17/2.8 및 HOS 세포주를 배양하면서 에스트로젠 및 프로게스테론 등 여성 호르몬을 처리한 후 골모세포의 증식과 활성에 미치는 영향을 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 에스트로젠은 HOS 세포의 증식을 억제하였으며 ROS17/2.8 세포의 증식은 촉진하는 것으로 관찰되었다.
2. 에스트로젠은 HOS 세포의 alkaline phosphatase 활성을 증가시켰고 ROS 세포에서는 효소활성을 억제하는 것으로 나타났다.
3. 프로게스테론은 HOS 및 ROS17/2.8 세포 모두의 증식을 억제하였으며 골모세포의 alkaline phosphatase 활성에는 영향을 미치지 못하였다.
4. 에스트로젠과 프로게스테론은 골모세포내에서 생성되는 superoxide, nitric oxide 및 gelatinase 활성 등 골모세포의 기능에는 유의한 변화를 일으키지 않았다.

참 고 문 헌

1. Roberts WE, Garetto LP, Arbuckle GR, et al : Bone physiology : evaluation of bone metabolism. J Am Dent Assoc 1991 : 122 : 59-61.
2. Roberts WE, Simmons KE, Garetto LP, et al : Bone physiology and

- metabolism in dental implantology : risk factors for osteoporosis and other metabolic bone disease. Implant Dent 1992 : 1 : 11-21.
3. Gordan GS : Estrogen and bone. Clinical Orthopaedics and Related Res 1985 : 200 : 174-80.
4. Silverberg SJ, Lindsay R : Postmenopausal osteoporosis. Medical Clinics of North Am 1957 : 71 : 41-57.
5. Karsten J, Hellsing E, Hammarstrom L. : The effect of estrogen on orthodontic tooth movement in rats. Europ J Orthod 1992 : 14 : 323.
6. van Passen HC, Poortman J, Borgart-Creutzburg JH, et al : Estrogen binding protein in bone cell cytosol. Calcif Tissue Res 1978 : 25 : 249-54.
7. Chen TL, Feldman D. : Distinction between α -fetoprotein and intracellular estrogen receptors. evidence against the presence of estradiol receptors in rat bone. Endocrinology 1978 : 102 : 236-44.
8. Komm BS, Terpening CM, Benz DT, et al : Estrogen binding, receptor mRNA, and biological response in osteoblast-like osteosarcoma cells. Science 1988 : 24 : 81-4.
9. Oursler MJ, Cortese C, Keeting P, et al : Modulation of transforming growth factor beta production in normal human osteoblast-like cells by 17 beta estradiol and parathyroid hormone. Endocrinol 1990 : 129 : 3313-20.
10. Lindsay R, Tohme JF. : Estrogen treatment of patients with established postmenopausal osteoporosis. Obstet Gynecol 1990 : 76 : 290-5.
11. Mundy GR, Bonewald LF. : Transforming growth factor beta. In Gowen M, editor : Cytokine and bone metabolism, Boca Raton, Fla, pp. 93-113. CRC press, 1992.
12. Deasy MJ, Grota LJ, Kennedy JE. : The effect of estrogen, progesterone and cortisol on gingival inflammation. J Periodont Res 1972 : 7 : 111-24.
13. Brunsvold MA, Chaves ES, Kommman KS, et al : Effect of a bisphosphonate on experimental periodontitis in monkeys. J Periodont 1992 : 63 : 825-30.
14. Aufdemore TB, Van Sickels JE, Fanklin DM, et al : Estrogen receptors in the temporomandibular joint of the baboon (Papio cynocephalus). : An autoradiographic study. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1986 : 61 : 307-14.
15. Abubaker AO, Raslan WF, Sotereanos GC. : Estrogen and progesterone receptors in TMJ discs of symptomatic and asymptomatic persons. J Oral Maxillofac Surg 1993 : 51 : 1096-100.
16. Stein GS, Lian JB, Owen TA. : Relationship of cell growth to the regulation of tissue specific gene expression during osteoblast differentiation. FASEB J 1990 : 4 : 3111-23.
17. Ott SM. : Estrogen therapy for osteoporosis even in the elderly. Ann Intern Med 1992 : 117 : 85-6.
18. Holland EFN, Leather AT, Studd JWW. : Increase in bone mass of older postmenopausal women with low bone mineral density after one year of percutaneous oestradiol implants. 7th international congress of menopause, Stockholm, Sweden, Abstract No 231, 1993.
19. Prior JC : Progesterone as a bone trophic hormone. Endocrine Rev 1990 : 11 : 386-98.
20. Scheven BA, Damen CA, Hamilton NJ. : Stimulatory effects of estrogen and progesterone on proliferation and differentiation of normal human osteoblast like cells in vitro. Bioch Biophys Res Comm 1992 : 186 : 54-60.
21. Armstrong E, Anderson JB. : Osteoporosis after oophorectomy in the mature female rat and effect of estrogen and / or progesterone replacement therapy in its prevention. J Endocrinology 1972 : 55 : 79-87.

22. Christiansen C, Riis BJ, Nilas L. : Uncoupling of bone formation and resorption by combined estrogen and progesterone therapy in postmenopausal osteoporosis. *Lancet* 1985 : 2 : 800-1.
23. Gallagher JC. : Biochemical effects of estrogen and progesterone on calcium metabolism. *Univ Park Press* 1981 : 215-24.
24. Keeting PE, Scott RE, Colvard DS, et al : Lack of a direct effect of estrogen on proliferation and differentiation of normal human osteoblast-like cells. *J Bone Miner Res* 1991 : 6 : 297-304.
25. Ernst M, Heath JK, Rodan GA. : Estradiol effects on proliferation, messenger ribonucleic acid for collagen and insulin-like growth factor-I and parathyroid hormone-stimulated adenylate cyclase activity in osteoblastic cell from calvaria and long bones. *Endocrinol* 1989 : 125 : 825-33.
26. Davis VL, Couse JF, Gray TK, et al : Correlation between low levels of estrogen receptors and estrogen responsiveness in two rat osteoblast like cell lines. *J Bone Miner Res* 1994 : 9 : 983-91.
27. Kasperk C, Wergedal J, Strong D, et al : Human bone cell phenotype differ depending on their skeletal site of origin. *J Clin Endocrinol Metab* 1995 : 80 : 2511-7.
28. Farley JR, Ivey JL, Baylink DJ. : Human skeletal alkaline phosphatase: kinetic studies including pH dependence and inhibition by theophylline. *J Biol Chem* 1980 : 255 : 4680-6.
29. Sakuma I, Stuehr DJ, Gross SS, et al : Identification of arginine as a precursor of endothelium-derived relaxing factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988 : 85 : 8664-7.
30. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. : Nitric oxide : physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991 : 43 : 109-42.
31. MacIntyre I, Zaidi M, Alam AS, et al : Osteoclastic inhibition : an action of nitric oxide not mediated by cyclic GMP. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991 : 88 : 2936-40.
32. Ralston SH, Ho LP, Helfrich M, et al : Nitric oxide : a cytokine induced regulator of bone resorption. *J Bone Miner Res* 1995 : 10 : 1040-9.
33. Ralston SH, Todd D, Helfrich MH, et al : Human osteoblast-like cells produce nitric oxide and express inducible nitric oxide synthase. *Endocrinology* 1994 : 135 : 330-6.
34. Weiner CP, Lizasoain I, Bayliss S, et al : Induction of calcium dependent nitric oxide synthases by sex hormones. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994 : 91 : 5212-6.
35. Ramp WK, Arnold RR, Russel JE, et al : Hydrogen peroxide inhibits glucose metabolism and collagen synthesis in bone. *J Periodontol* 1987 : 58 : 340-4.
36. Key LL, Ries WL, Taylor RG, et al : Oxygen derived free radicals in osteoclasts : the specificity and localization of the nitroblue tetrazolium reaction. *Bone* 1990 : 11 : 115-9.
37. Wooley DE. : Mammalian collagenase. *Extracellular matrix biochemistry*, edited by Piez, K.A. and A.H. Reddi, pp.119-157, Elsevier, New York, 1984.
38. Delaisse JM, Ledent P, Vase G. : Collagenolytic cysteine proteinase of bone tissue. *Biochem J* 1991 : 279 : 167-74.
39. Lorenzo JA, Pilbeam CC, Kalinowski JF, et al : Production of both 92- and 72-kDa gelatinase by bone cells. *Matrix* 1992 : 12 : 282-90.

- ABSTRACT -

Effects of Estrogen and Progesterone on the Proliferation and Activity of Osteoblastic cells Abstract

Kook-Bong Ha · Woo-Sung Son¹⁾ · Se-Won Kim²⁾

¹⁾Department of Orthodontics, College of Dentistry, Pusan University

²⁾Department of Dental Pharmacology, College of Dentistry, Dan Kook University

Biomechanical reactions of tooth movement are the combination of bone formation and resorption, in which many paracrine factors are involved. The sex hormone is one of the paracrine factors and the sex hormonal level of an adult female varies according to the body condition, e.g. menstruation, pregnancy, postmenopause, etc. Although the exact mechanism is not clarified yet, estrogen and progesterone are known to regulate the function of osteoblast. Again osteoblast is reported to affect the function of osteoclast. The purpose of this study is to determine the influence of the female sex hormone, estrogen and progesterone, on the cell proliferation and activity of HOS and ROS17/2.8 cell line.

The observed results were as follows.

1. Estrogen inhibited HOS cell proliferation and promoted ROS17/2.8 cell proliferation.
2. Estrogen increased the activity of alkaline phosphatase of HOS cell and reduced the activity of alkaline phosphatase of ROS17/2.8 cell.
3. Progesterone inhibited the proliferation of HOS and ROS17/2.8 cell, but had no influence on the activity of alkaline phosphatase.
4. Estrogen and progesterone did not have any particular effects on the activity of super oxide, nitric oxide and gelatinase of HOS and ROS17/2.8 cell.

KOREA. J. ORTHOD. 2001 : 31(2) : 237-48

※ **Key words** : Progesterone, Estrogen, Osteoblast, MTT, Alkaline phosphatase, Nitrite NBT gelatinase