

카페인과 칼슘이 골모 세포의 활성화에 미치는 영향

백 혜 정¹⁾ · 전 윤 식²⁾

사회적, 경제적 여건의 향상으로 성인들의 교정치료에 대한 관심이 커지고 있지만 폐경기 여성에 있어서 골다공증의 증가는 교정치료에 제한이 되며, 골다공증과 카페인과의 관련 여부는 최근까지 논란이 되고 있다. 따라서 본 연구의 목적은 생후 1일된 마우스의 골모세포를 *in vitro* 상에서 카페인과 칼슘 및 이 둘을 혼합 처리하여 골모세포의 활성화에 미치는 영향에 대해 알아보려고 하였다.

실험에 사용한 골모세포는 마우스의 두개관에서 얻었으며, 카페인 단독 처리, 칼슘 단독 처리, 카페인과 칼슘의 혼합 처리를 시행하였다. 카페인 처리를 한 경우 1일, 2일, 4일째 세포 독성 정도를 570 nm ELISA로 분석을 시행하였고, 카페인, 칼슘 및 혼합 처리시 배양 후 28일째 Von Kossa staining 후 영상분석기에 의해 광화된 골결절의 밀도를 측정하였으며, 염기성 인산분해효소 활성화도 변화를 배양 후 2일, 7일, 14일, 21일, 28일째 405 nm spectrophotometer로 측정하였고, IL-1 β 의 활성화도를 48시간 후 492 nm ELISA로 분석을 시행하였다. 얻어진 수치들은 ANOVA test로 통계 분석하였다.

1. 카페인에 대한 세포 독성은 카페인의 농도가 1.0 mM, 2.0 mM로 증가함에 따라, 2일, 4일로 배양 기간이 길어짐에 따라 유의하게 증가하였고, 세포수는 감소하였다.
2. 광화된 골결절의 밀도는 카페인을 단독 처리한 경우 0.2 mM에서, 칼슘 단독 처리시에는 1.2 mM에서, 혼합 처리한 경우 0.1 mM 카페인과 1.8 mM 칼슘에서 가장 크게 나타났다.
3. 염기성 인산분해효소 활성화도는 비처리시 칼슘과 같이 14일째 최대값을 보이는 반면, 카페인을 단독 처리한 경우 농도가 증가함에 따라 활성화도가 증가하였다. 카페인과 칼슘 혼합 처리시에는 칼슘 농도가 1.2 mM, 1.8 mM인 경우 배양 14일에 염기성 인산분해효소의 활성화도가 유의하게 증가하였으나, 2.5 mM인 경우 활성화도가 감소하였다.
4. IL-1 β 의 활성화도는 카페인을 단독 처리한 경우 0.2 mM, 1.0 mM에서, 칼슘 단독 처리시에는 1.8 mM에서, 혼합 처리시 0.1 mM 카페인과 1.8 mM 칼슘 혼합 처리한 경우 높게 나타났고, 고농도의 카페인, 칼슘 혼합 처리시에는 낮게 나타났다.

이러한 실험 결과를 통하여 칼슘이 1.2 mM, 1.8 mM 농도로 존재하는 경우 카페인에 의한 골모세포의 염기성 인산분해효소 활성화와 IL-1 β 의 활성화 억제 효과가 어느 정도 회복되나, 2.5 mM 고농도의 칼슘은 억제된 활성을 회복시키지 못함을 확인하였다.

(주요 단어 : 카페인, 칼슘, 골모세포, 염기성 인산분해효소, interleukin -1 β)

¹⁾ 인제대학교 일산백병원, 조교수.

²⁾ 이화여자대학교 치과학교실 교정과, 부교수.

교신저자 : 백혜정

경기도 고양시 일산구 대화동 2240

인제대학교 일산백병원 / 031-910-7114

bhj@ilsanpaik.ac.kr

I. 서 론

근래에 들어와 사회적, 경제적 여건이 향상되면서 성인들의 심미적, 사회적 활동욕구가 증가하고 있고, 이에 따른 교정치료에 대한 관심이 날로 높아지고 있

다. 이런 교정치료에 대한 예후 및 결과는 연령에 따라 다르다. 즉, 청소년기에 비해 성인은 치주 질환에 대한 이환률이 높으며, 콜라겐의 대사 비율이 느린 점 등 전신적 및 국소적으로 교정치료에 불리한 조건에 놓여 있다. 특히, 폐경기 여성에서 빈발하는 골다공증은 치조골에서 치아를 이동시키는 교정치료에 제한이 되고 있으며 골다공증의 원인들은 여러 가지로 논의가 되고 있다.

골다공증¹⁾은 폐경기 여성에서 나이에 따른 부갑상선 호르몬 (parathyroid hormone, PTH)의 증가와 에스트로젠 결핍으로 인해서 골 재형성 비율의 증가 및 골모세포와 파골세포의 활성 불균형으로 나타나는데, 흔히 섭취되는 커피, 탄산음료 등에 포함된 카페인과의 관련성에 대해서 많은 논란이 되고 있다. 최근의 많은 임상 증례 연구에 의하면 커피가 엉덩이나 손목 골절과는 무관하다고 하였으나²⁾, Framingham 연구³⁾에 의하면 한 잔의 커피도 10년 이상 장기간 체내 축적되면 엉덩이 뼈 골절이 일어날 확률이 69%나 된다고 보고 하였다.

먼저 카페인에 대해 살펴보면 Collin 등⁴⁾에 의하면 용량에 비례해 골흡수가 증가하는데 흉골 분절 (sternbral bone)에 영향을 많고 하악에는 다른 골에 비해 영향이 적다고 하였다. 따라서, 카페인을 이미 형성된 조직보다는 분화되어 가는 조직에 영향이 클 수 있었다. Wink 등⁵⁾은 성장하는 쥐에서 카페인 투여시 골세포와 골 발육을 살펴보았는데 골세포 수는 감소하며, 골 재형성은 늦고, 골모세포와 파골세포에서 미토콘드리아의 파괴를 보이나, 카페인을 파골세포보다 골모세포에 주로 영향을 미친다고 하였다. 따라서, 여기에 근거하여 파골세포보다 골모세포에 역점을 두었다. Nishimura, Fuji 등⁶⁾은 성장하는 태아의 연골내 골 형성에 영향을 주어 250 mg/kg의 농도 투여시 체중 감소와 골격 성장 장애를 보이나, 20-100 mg/kg의 농도에서는 별 영향을 미치지 않는다고 보고한 반면, Kamaguta-Kiyoura 등⁷⁾은 *in vitro* 실험에서 카페인을 고농도에서 골모세포와 골세포의 미토콘드리아 파괴와 골모유사세포의 증식을 억제한다고 보고 하였다. 또한, 카페인 처리군과 비처리군의 비교 실험에서 카페인 처리군은 8일에, 카페인 비처리군은 4일에 세포 수가 최대에 도달한다고 하였으며 카페인 처리군에서는 영구적인 억제 효과가 있어 카페인 전처리하는 정상적 골형성을 방해한다고 하였다. Zeroogian 등⁸⁾은 생화학적 분석을 통한 *in vitro* 실험에서 카페인을 막내 형성에 의한 기전보다

는 연골세포 수와 연골 형성을 억제하는 연골내 골 형성 기전에 의해 골형성을 억제하며 11일 정도에 염기성 인산분해효소 (alkaline phosphatase) 활성이 47%나 감소한다고 보고하였다.

한편, 칼슘은 골을 형성하는 중요한 성분으로서 연령이 증가하면서 부갑상선 호르몬의 증가로 신장과 소장에서의 흡수가 감소되어 골다공증의 비율이 증가하므로 노화에 따라 체내 칼슘 요구량이 많아지게 된다. 그런데, Akesson 등⁹⁾은 단기간 칼슘 섭취를 제한한 후 재섭취를 시킨 임상 실험에서 칼슘을 제한하면 콜라겐 합성에 관여하는 C-terminal type I procollagen peptide (PICP)는 감소하고 보상 작용으로 골모세포 수를 증가시키는 osteocalcin은 증가하나, 칼슘 재 투여시 곧바로 골모세포 수 및 활성은 증가하고 골이 생성되는 가역 반응을 보인다고 하였다. 한편, McLean과 Urist¹⁰⁾는 혈장 칼슘 농도에 대한 부갑상선 호르몬의 역할을 보기 위한 모델에서 7 mg/100 ml가 혈액과 조직액 간 물리화학적 균형을 이루는 농도라 하였다. Shirai 등¹¹⁾은 1.2 mM, 1.8 mM, 2.5 mM 농도의 세포외 칼슘 투여시 골모세포는 칼슘 농도에 반응하면서 저 농도시에는 파골세포의 활성을 돕고, 저 농도시에 분화된 골모세포는 골흡수 능력이 커진다고 하였다.

성인 특히 폐경기 이후의 여성에 있어서 체내 칼슘 요구량은 늘어나는데 카페인에 의해 억제된 골 관련 세포의 활성이 칼슘의 투여로 어느 정도 보상이 가능한 지에 대해 알아보기 위해 카페인과 칼슘과의 관계에 살펴보았다. Susan 등¹²⁾은 카페인이 뇨의 양에는 변화를 일으키지 않으나 신장에서의 칼슘 노내 분비를 증가시킴으로써 농도에 따른 칼슘의 배출량을 증가시키는데 인의 유리도 함께 증가하므로 칼슘뇨 (calciuria)가 골흡수에 관여한다고 하였다. 한편, Bergman 등¹³⁾은 *in vitro* 실험에서 카페인을 골자체 칼슘에는 영향을 주지 않고 주로 카페인의 신장에 대한 작용 결과라고 하였고, Kreiger²⁾에 의하면 저 칼슘 상태에서는 카페인이 칼슘 균형에 영향을 주나, 충분한 칼슘 농도 조건 즉 하루에 800 mg 정도를 섭취하면 카페인이 칼슘 균형에 거의 영향을 주지 않는다고 하였다.

한편, 교정치료 초기¹⁴⁾에 치근막에는 면역세포뿐만 아니라 골모세포, 섬유아세포가 나타나며, 이들은 cytokine, 성장 인자 (growth factor), colony stimulating factor (CSF), cell adhesion molecule 같은 다양한 신호전달물질을 만든다. Cytokine¹⁴⁾은 주로 단

핵 세포에서 분비되는 국소적, 생화학적 매개 물질로 직접 혹은 간접적으로 세포 반응을 조절한다. 골 대사에 영향을 주는 cytokine은 IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, TNF-(tumor necrotizing factor- α), IFN γ (gamma interferon) 등이 있으며, IL-1은 골 흡수 촉진이 가장 큰 cytokine이다. IL-1 β ¹⁵⁾은 골흡수에 관여하는 cytokine으로 α, β 형태가 있으며 같은 세포 표면의 수용기와 결합하나, 혈류에서의 IL-1활성은 IL-1 β 가 관여한다. IL-1은 파골세포의 활성화뿐만 아니라 골생성도 억제하고 *in vitro*상에서 PGE의 생성도 증가한다. Lynch¹⁵⁾등은 고양이 실험에서 초기 치아 이동 시기에 많은 치근막 세포들이 IL-1 β 에 염색되고, 특히 교정력을 가한 후 24시간 후에 IL-1 β 의 염색이 크게 증가되었다고 하였다. 이들의 변화는 골 생성이나 골흡수 기전을 이해하는데 많은 도움을 줄 것이다.

카페인, 칼슘에 관한 많은 연구 결과들이 보고되어 왔지만, *in vitro* 상에서 카페인과 칼슘을 혼합 처리하여 상호 작용을 보고한 연구가 미흡한 형편이다. 따라서, 본 연구의 목적은 생 후 1일된 쥐 (mouse)의 골모세포를 배양하여 *in vitro* 상에서 카페인, 칼슘 및 이들의 혼합 처리를 시행하여 골모세포의 활성화에 미치는 영향에 대해서 알아보려 함이다.

II. 연구재료 및 방법

A. 연구 재료

실험에 사용한 골모세포는 생 후 1일된 마우스 (ICR mouse : 한국 샘타코)의 두개관에서 얻었다. 카페인은 Sigma사에서 구입하였으며, Tassinari¹⁶⁾등이 설정한 농도에 근거를 두어 0.1 mM, 0.2 mM, 0.4 mM, 1.0 mM, 2.0 mM로, 칼슘은 Mclean과 Urist¹⁰⁾의 논문에 근거하여 1.2 mM, 1.8 mM, 2.5 mM 농도의 젯산 칼슘 (남양 유업)을 사용하였다.

B. 연구방법

1. 골모세포의 분리

골모세포는 생 후 1일된 마우스를 70 % 에탄올에 넣은 후 두개관 (calvarium)을 분리하였다(Fig. 1). 두개관에서 골모세포를 분리하기 위해 Phosphate buffered saline (PBS)과 -minimal essential medium (a-MEM, Gibco, USA)로 각각 2회 씻은 후 -MEM에 0.2 % collagenase (Wake)와 0.1 % dispase

(Gibco)가 첨가된 효소용액에 넣어 37 °C에서 10분간 water bath에서 진탕배양했다. 초기 상층액은 버리고, 다시 20 ml의 효소용액을 넣고 37 °C에서 45분 정도 water bath에서 진탕배양했다. Swinex holder와 20 μ m Millipore filter를 이용해 상층액을 여과시켜 불순물이나 큰 입자들을 제거하였다. 쥐의 두개관에서 얻은 골모세포¹⁷⁾는 염기성 인산분해효소의 발현이 조기에 나타나며, filter를 사용해서 여과를 시행한 후 계대배양 없이 그대로 배양하였다. 얻어진 골모세포 침전물은 30 mm 세포 배양 접시에 10 % fetal bovine serum (FBS, Gibco, USA), penicillin 100 U/ml, streptomycin 100 μ g/ml, amphotericin B 0.25 μ g/ml가 포함된 -MEM 2 ml에 넣고, NaHCO₃로 pH 6.8을 맞춘 후 37 °C, 95 % 습도, 5 % CO₂ 배양기에서 배양하였다. 분화를 돕기 위해 배지 1 ml 당 50 g/ml ascorbic acid (Sigma)와 10 mM β -glycerophosphate (Sigma)를 첨가하였다. 배지는 2-3일에 한번씩 교환해 주었다.

2. 세포 독성 검사 (MTT assay)

실험에 사용된 시약 각각의 농도에서 골모세포가 생존할 수 있는 지 확인하였다. 먼저 96 well plate에 well당 1 x 10⁴개의 세포를 넣은 후 1일이 지난 뒤 0.1 mM, 0.2 mM, 0.4 mM, 1.0 mM, 2.0 mM의 카페인을 해당 농도에 8 well씩 처리 후 1일, 2일, 4일에 걸쳐 50 μ l 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT)를 넣어 최종 농도가 1 mg/ml가 되도록 하고, 4시간 동안 37 °C 배양기에 배양시킨 후 200 μ l dimethyl sulfoxide (DMSO)를 첨가한 후 570 nm에서 ELISA로 분석하였다.

3. 골모세포 수의 측정

0.4 % trypan blue 0.5 ml, 0.3 ml saline, 0.2 ml 세포 부유물을 혼합하여 5-15분 상온 보관 후 12일, 18일, 25일, 30일에 다음과 같은 방법으로 세포 수를 계산하였다.

- 세포 수 (cell number) = 면적당 평균 세포 수 × 희석 요소 (dilution factor) × 10⁴ (cells/ml)
- 총 세포 수 (total cell number) = 세포 수 × 원래 부피 (original volume)

4. Von Kossa staining 후 광화된 골결절 밀도 측정
무기질화 정도를 평가하기 위하여 Von Kossa staining을 배양 시작 28일에 시행하였다. 세포 배양

접시에서 배지를 흡입해서 PBS에 행군 후 10 % pH 7.4 formalin 완충제에 2시간 고정하고 증류수로 세 번 행구었다. 상온에서 24시간 반응시킨 후 2.5 % silver nitrate 용액으로 30분간 염색하고 silver nitrate를 완전히 제거하기 위하여 증류수로 세 번 세척 후 sodium carbonate formaldehyde를 2-5분간 첨가하고 다시 이를 완전히 제거하기 위해 흐르는 물에 1시간 동안 그대로 두었다. 염색된 세포 배양 접시를 스캐닝한 후 (EPSON GT-9600) Image-pro program을 이용해 밀도를 측정하였다.

5. 염기성 인산분해효소 (alkaline phosphatase) 활성도 검사

30 mm 세포 배양 접시에 각 well당 0.5×10^5 개 세포를 넣은 후 0.1 mM, 0.2 mM, 0.4 mM의 카페인과 1.2 mM, 1.8 mM, 2.5 mM의 칼슘과 이 둘을 혼합 처리하였다. 2일, 7일, 14일, 21일, 28일째 배지를 제거하고, 1 ml의 효소용액을 10분 정도 항온배양시킨 후 Eppendorf tube에 세포를 모은 후 상층액에 풀어주었다. 37 °C 배양기에서 배양한 후 10000 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 얼음 위에 PBS를 준비하고 Eppendorf tube를 깨끗이 씻은 후 상층액을 제거하고 1 ml PBS로 씻은 후 10000 rpm에서 원심분리하는 과정을 2회 반복하였다. PBS를 제거하고 0.5 % Triton x-100 600 μ l를 넣고 용해시켜 1시간 동안 냉장 보관했다. 8000 rpm에서 5분간 원심분리한 후 상층액 500 μ l를 얼음위에서 모았다. 미리 37 °C water bath에 염기성 인산분해효소 용액을 1 ml씩 Eppendorf tube에 넣어 준비해 두고, sample 20 μ l를 염기성 인산분해효소 용액에 넣는 순간부터 30초 후 spectrophotometer 405 nm에서 흡광도를 측정하고 sample 0.5 ml는 2분 후에 흡광도 값을 측정했다. 염기성 인산분해효소 활성도는 다음과 같은 방법으로 구하였다.

- Δ 값 = (2분 후 흡광도 값 - 30초 후 흡광도 값) / 2
- 염기성 인산분해효소 활성도 = Δ 값 \times 2764 (U/L)

6. IL-1 β 활성도 검사

ELISA kit을 사용하여 지시서에 있는 방법대로 48 시간 후 IL-1 β 활성도 검사를 세 번 시행하였다. 표준용액 100 μ l를 지정된 well에 각각 넣고, 25 μ l의 희석된 rabbit anti-mouse IL-1 β polyclonal antibody를 각 well에 넣고 증발을 막기 위해 acetate plate 밀봉제로 밀봉하고 3시간 동안 실온에서 항온배양했다. 밀봉제를 제거하고 세척 완충제로 5회 plate

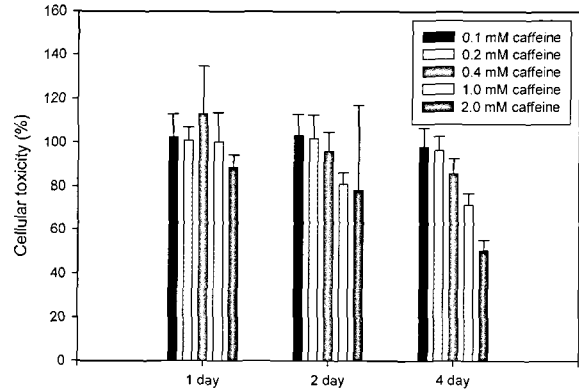


Fig. 1. Effects of various concentrations of caffeine on the cellular toxicity of the mouse osteoblastic cells. The cellular toxicity was assessed by MTT. The cellular toxicity was increased with caffeine concentration and time increase. Vertical bars represent mean \pm standard error.

를 씻은 후 희석된 세척 완충제 25 μ l를 각 well에 multichannel pipette으로 채운 후 plate를 기울여 세척 완충제를 제거해 주었다 (wash step 과정). 50 μ l의 희석된 goat anti-rabbit conjugate된 염기성 인산분해효소를 각 well에 넣고 실온에서 45분간 항온배양시키고 wash step 과정을 반복했다. 200 μ l 발색용액을 각 well에 넣어 재 밀봉하고 실온에서 15분간 항온배양시켰다. Standard #1의 흡광도 값이 1.6이면 0.5 M의 sulfuric acid인 정지용액을 50 μ l 넣고 492 nm ELISA에서 분석을 시행했다.

7. 자료의 분석

SPSS 통계 프로그램을 이용하여 ANOVA test를 시행하였으며, Duncan's multiple range test로 유의수준 5 %에서 사후 검정하였다.

III. 결 과

A. 카페인에 골모세포에 일으키는 독성 분석

카페인의 농도가 높을수록, 처리 시간이 길수록 골모세포에 대한 MTT 방법에 의한 세포 독성은 크게 나타났다. (Fig 1). 통계학적 분석 결과를 보면 카페인의 다양한 농도에 대해서 유의차를 보였는데, Duncan 방법에 의하면 4일째, 2일째, 1일째 순으로 나타났다. 시간에 따른 차이를 보면 카페인 처리 후 1일째

Table 1. Effects of various concentrations of caffeine and exposure time on the cellular toxicity of the mouse osteoblastic cells.

Caffeine concentrations (mM)	Cellular toxicity (%)	p value
0.1	101.3 ± 9.5	NS
0.2	95.9 ± 19.1	NS
0.4	97.7 ± 17.2	*
1.0	83.6 ± 14.5	***
2.0	71.8 ± 27.6	*

Exposure time (day)	Cellular toxicity (%)	p value
1	98.8 ± 18.5	NS
2	93.5 ± 19.3	*
4	83.8 ± 18.8	***

NS : not statistically significant,* : statistically significant (p<0.05),*** : statistically significant (p<0.001).

The cellular toxicity represents mean ± standard error.

에는 유의한 차이를 보이지 않았으나, 2일째, 4일째에는 유의한 차이를 보였으며, 2.0 mM, 1.0 mM 순이었다. (Table 1). 따라서, 염기성 인산분해효소 활성도 검사는 세포의 정상적인 생존이 어려운 1.0 mM, 2.0 mM 카페인 농도에서는 배제하고, 0.1 mM, 0.2 mM, 0.4 mM의 농도에서만 측정하였다.

B. 세포 수 변화 분석

카페인 처리군에서는 카페인 농도가 커질수록 세포 수가 감소하였으나, 칼슘 처리군에서는 농도에 따른 세포 수의 변화는 거의 없었고 2.5 mM에서만 세포 수가 약간 감소하였다.

통계학적 분석 결과를 보면 농도에 따른 유의차는 모든 군에서 크게 나타났다 (p < 0.05, p < 0.001). Duncan 사후 검정 결과 12일, 18일 순으로 유의차가 작게 나타났다. 시간에 따른 유의차는 카페인의 경우 12일을 제외하고 크게 나타났으며 (p < 0.001), Duncan 사후 검정 결과 카페인 농도 2.0 mM, 1.0 mM 순이었다. 칼슘의 경우 30일에서만 유의하게 차이를 나타냈고 (p < 0.01), 2.5 mM, 1.8 mM 순이었으며 다른 군에서는 유의한 차이를 보이지 않았다 (Table 2).

Table 2. Effects of various concentrations of caffeine and calcium and incubation time on the changes in number of mouse osteoblastic cell.

Treatment (mM)	Number of osteoblastic cell	p value
Control	2.6 ± 0.8	***
Caffeine 0.1	2.3 ± 0.7	***
0.2	1.8 ± 0.5	***
0.4	1.7 ± 0.6	***
1.0	1.1 ± 0.3	*
2.0	0.9 ± 0.2	*
Calcium 1.2	2.3 ± 0.7	***
1.8	2.3 ± 0.7	***
2.5	2.2 ± 0.6	***

Treatment (day)	Cell number	p value
Caffeine 12	1.1 ± 0.4	NS
18	1.8 ± 0.6	***
25	2.1 ± 0.8	***
30	2.1 ± 0.8	***
Calcium 12	1.2 ± 0.2	NS
18	2.6 ± 0.3	NS
25	2.9 ± 0.3	NS
30	2.8 ± 0.3	**

NS : not statistically significant, ** : statistically significant (p<0.01), *** : statistically significant (p<0.001). The cell number represents mean ± standard error.

C. Von Kossa staining 후 광화된 골결절의 밀도 분석

Von Kossa staining 후 영상분석기에 의한 광화된 골결절의 밀도 측정 결과 카페인 단독 처리군에서는 카페인 농도가 0.2 mM일때 밀도가 가장 크게 나타났으며, 0.4 mM과 1.0 mM에서는 대조군보다 밀도가 크지만 2.0 mM에서는 오히려 밀도가 낮게 나타났다. 칼슘 단독 처리군에서는 칼슘 농도가 1.2 mM일때 대조군에 비해 광화된 골결절의 밀도가 크게 나타났지만, 1.8

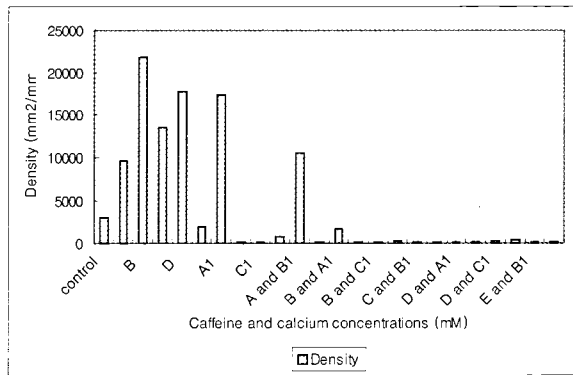


Fig. 2. The densities of the degree of the mineralization by treating various concentrations of caffeine and calcium.

A : 0.1 mM caffeine,
 B : 0.2 mM caffeine,
 C : 0.4 mM caffeine,
 D : 1.0 mM caffeine,
 E : 2.0 mM caffeine,
 A1 : 1.2 mM calcium,
 B1 : 1.8 mM calcium,
 C1 : 2.5 mM calcium concentrations

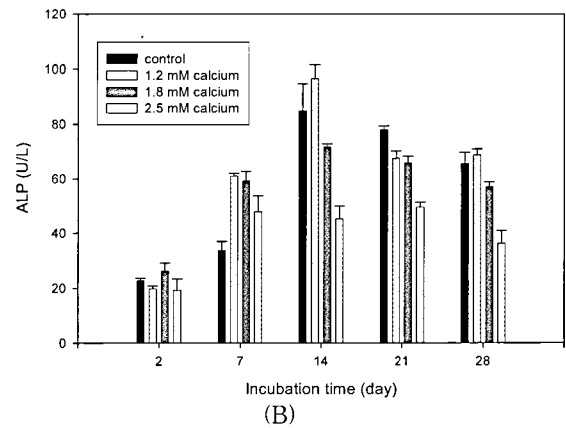
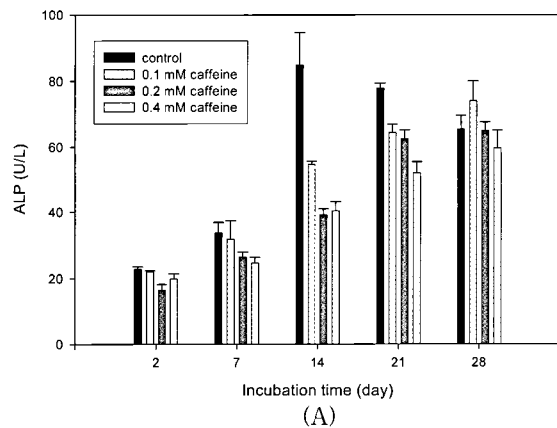


Fig. 3. Changes in ALP activities by various concentrations of caffeine (A) and calcium (B) in the mouse osteoblastic cells at 2, 7, 14, 21 and 28 days after treatment of calcium. Vertical bar represents mean \pm standard error.

mM, 2.5 mM에서는 오히려 대조군보다 낮게 나타났으며, 카페인과 칼슘 혼합 처리시에는 카페인이 0.1 mM, 칼슘이 1.8 mM일때만 비처리시에 비해 밀도가 크게 나타났다 (Fig. 2).

D. 염기성 인산분해효소의 활성화도 변화 분석

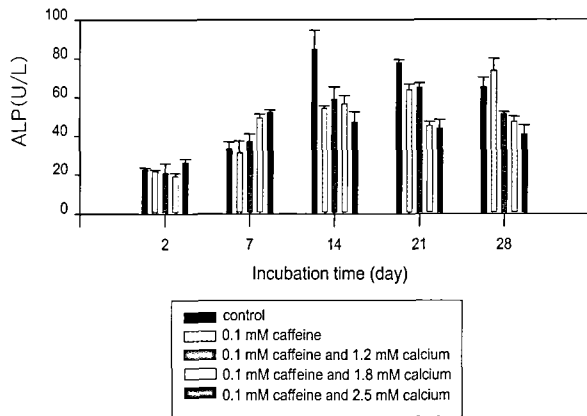
1. 카페인 단독 처리시 염기성 인산분해효소 활성화도 변화

아무런 처리를 하지 않은 경우 14일에 염기성 인산분해효소 활성화도 수치가 최대에 도달한 후 점차 감소하였으나, 카페인 처리시에는 농도에 관계 없이 시간이 지남에 따라 염기성 인산분해효소 활성화도 수치가 커졌다. 그러나, 동일한 시간에서는 카페인 농도가 클수록 염기성 인산분해효소 활성화도 수치가 감소하였

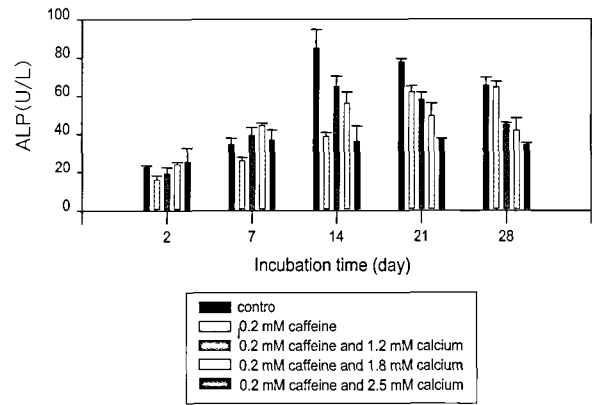
다 (Fig. 3A).

2. 칼슘 단독 처리시 염기성 인산 분해효소 활성화도 변화

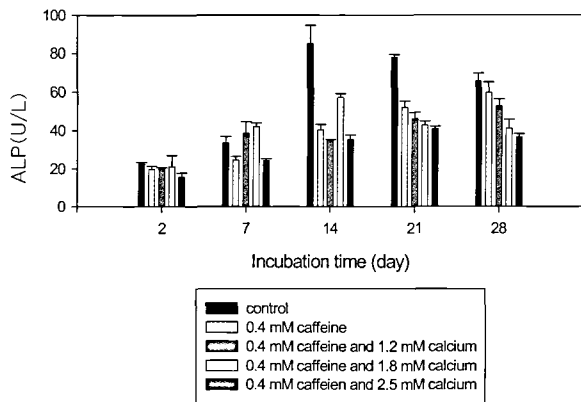
아무 처리도 하지 않은 경우와 유사하게 14일에 염기성 인산분해효소 활성화도가 최대에 도달하였지만, 비처리 경우와 달리 7일째의 수치가 상대적으로 커서 14일 이후에는 최대치와의 차이가 크지 않았고, 비처리 경우에 비해 수치가 크게 감소하는 양상을 보였다. 그러나 아무 처리 하지 않은 경우에 비해 칼슘 처리가 염기성 인산분해효소 활성화도를 크게 증가시키지는 못했고, 14일 이후에서는 칼슘 농도가 커질수록 염기성 인산분해효소 활성화는 감소하는 경향을 보였다 (Fig. 3B).



(A)



(B)



(C)

Fig. 4. ALP activities of various concentrations of caffeine and calcium in the mouse osteoblastic cells at 2, 7, 14, 21, 28 days after treatment of caffeine and calcium.

A : 0.1 mM caffeine.

B : 0.2 mM caffeine.

C : 0.4 mM caffeine and calcium combination

3. 카페인, 칼슘 혼합 처리시 염기성 인산분해효소 활성도 변화

0.1 mM 카페인과의 혼합 처리군에서는 비처리시와 0.1 mM 카페인 단독 처리시에 비해 7일까지는 혼합 처리시 염기성 인산분해효소 활성도가 크게 나타났고, 14일 이후에서는 칼슘과의 혼합 처리시 비처리시와 0.1 mM 카페인 단독 처리시보다 염기성 인산분해효소 활성도가 낮은 양상을 보였다.

0.2 mM 카페인과의 혼합 처리시에는 7일까지는 칼슘과의 혼합 처리시 비처리시와 0.2 mM 카페인 단독 처리시보다 염기성 인산분해효소 활성이 커지나, 14일에는 1.2 mM, 1.8 mM 칼슘과의 혼합 처리군이 비처리시보다는 염기성 인산분해효소 활성이 낮고, 0.2 mM 카페인 단독 처리시보다는 크게 나타났다. 21일 이후에는 염기성 인산분해효소 활성화에 있어 혼합 처리시 대조군과 0.2 mM 카페인 단독 처리군보다 낮게

나타났다.

0.4 mM 카페인과의 혼합 처리시 7일까지는 1.2 mM, 1.8 mM 칼슘과의 혼합 처리시 0.4 mM 카페인 단독 처리군보다 염기성 인산분해효소의 활성이 컸으나, 2.5 mM 칼슘과의 혼합 처리시 14일 이후에는 염기성 인산분해효소 활성도 수치가 오히려 감소하였다 (Fig. 4).

통계학적 분석결과 농도에 따른 변화를 보면 세 군 모두 유의차를 보였다 ($p < 0.05$, $p < 0.001$). Duncan 방법에 의하면 카페인 단독 처리시에는 2일, 7일, 14일, 21일, 28일 순으로, 칼슘을 단독 처리한 경우에는 2일, 7일, 28일 순으로 나타났으며 혼합 처리한 때에는 2일에서만 일치하고 나머지 기간은 혼합 방식에 따라 다양하게 나타났다. 시간에 따른 변화를 보면 세 군 모두 유의하게 차이를 보였다 ($p < 0.05$, $p < 0.001$) (Table 3).

Table 3. ALP activities of various concentrations of caffeine and calcium and exposure time (2,7,14,21, and 28 days) in the mouse osteoblastic cells.

Treatment (mM)	ALP activities (U/L)	p value
Control	56.9 ± 25.7	***
Caffeine 0.1 (A)	48.1 ± 22.9	***
0.2 (B)	41.9 ± 22.9	***
0.4 (C)	39.4 ± 16.1	***
Calcium 1.2 (A1)	62.9 ± 25.6	***
1.8 (B1)	55.9 ± 16.4	***
2.5 (C1)	39.6 ± 12.1	***
Combined A and A1	46.9 ± 16.8	***
A and B1	43.9 ± 13.3	***
A and C1	41.0 ± 10.1	***
B and A1	44.5 ± 16.8	***
B and B1	42.0 ± 13.2	***
B and C1	30.8 ± 10.5	*
C and A1	38.7 ± 11.7	***
C and B1	41.0 ± 12.4	***
C and C1	30.6 ± 9.6	***

Treatment (day)	ALP activities (U/L)	p value
Control	56.9 ± 25.7	***
Caffeine 2	20.4 ± 2.8	***
7	29.2 ± 4.8	*
14	54.8 ± 19.7	***
21	64.3 ± 9.8	***
28	66.1 ± 6.7	*
Calcium 2	22.1 ± 3.6	*
7	50.4 ± 11.8	***
14	74.5 ± 20.6	***
21	65.2 ± 10.8	***
28	57.1 ± 13.8	***
Combined 2	21.8 ± 4.2	*
7	39.9 ± 8.2	***
14	53.7 ± 15.7	***
21	50.6 ± 12.6	***
28	43.2 ± 11.1	***

* : statistically significant (p < 0.05), ** : statistically significant (p < 0.01), *** : statistically significant (p < 0.001). ALP activities represents mean ± standard error.

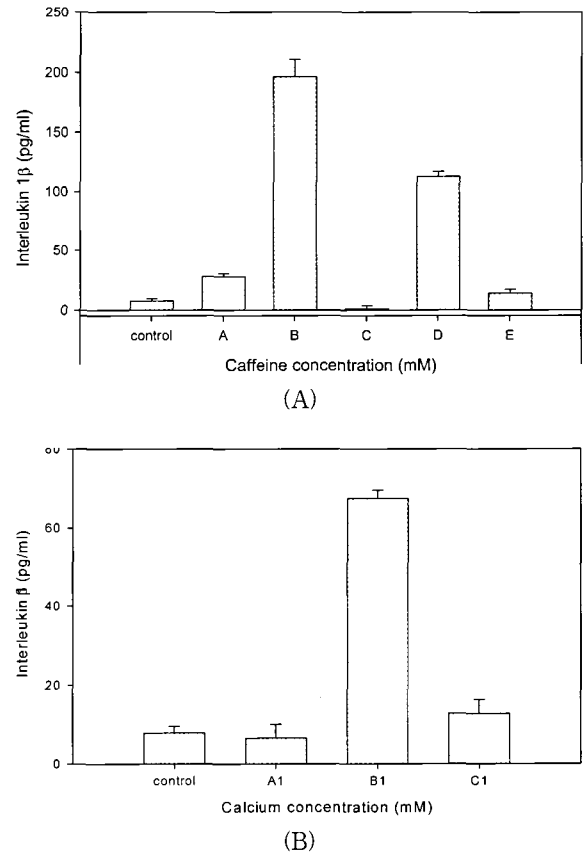


Fig. 5. IL-1 β activities in response to various concentrations of caffeine in the mouse osteoblastic cells at 48 hours after treatment of caffeine(A) and calcium(B). A : 0.1 mM caffeine, B : 0.2 mM caffeine, C : 0.4 mM caffeine, D : 1.0 mM caffeine, E : 2.0 mM caffeine, A1 : 1.2 mM calcium, B1 : 1.8 mM calcium, C1 : 2.5 mM calcium) Vertical bar represents mean ± standard error.

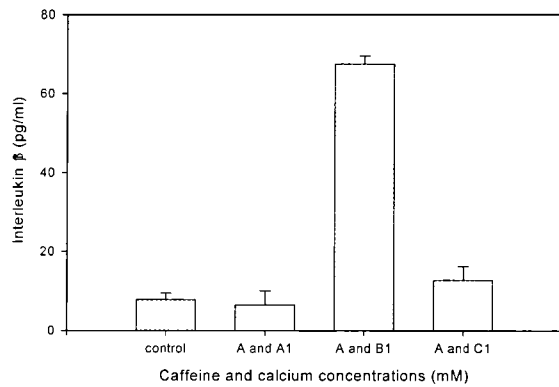
E. IL-1 β 활성도 변화 분석

1. 카페인 단독 처리시 IL-1 β 활성도의 변화

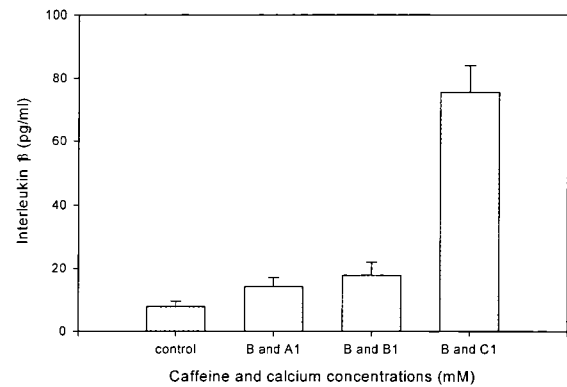
0.4 mM 카페인 단독 처리한 경우만 제외하고 비처리시보다 수치가 크게 나타났는데, 0.2 mM, 1.0 mM 카페인 단독 처리시 IL-1 β 의 활성이 크게 나타났다 (Fig. 5A).

2. 칼슘 단독 처리시 IL-1 β 활성도의 변화

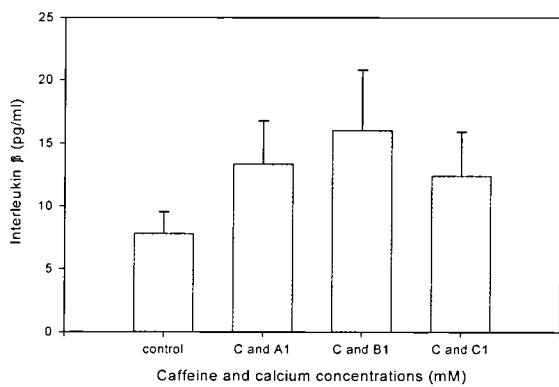
1.2 mM 칼슘 단독 처리한 경우만 제외하고 비처리시보다 수치가 크게 나타났는데, 1.8 mM 칼슘 단독 처리시 IL-1 β 의 활성이 가장 크게 나타났다 (Fig. 5B).



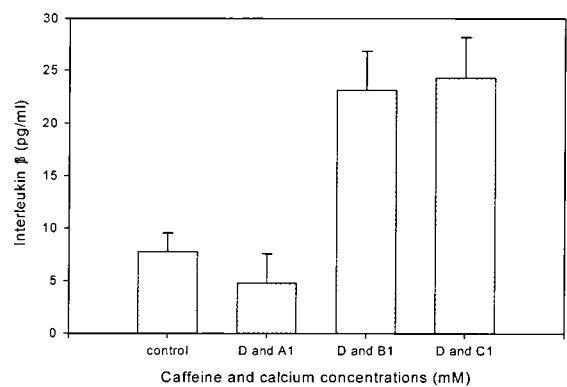
(6A)



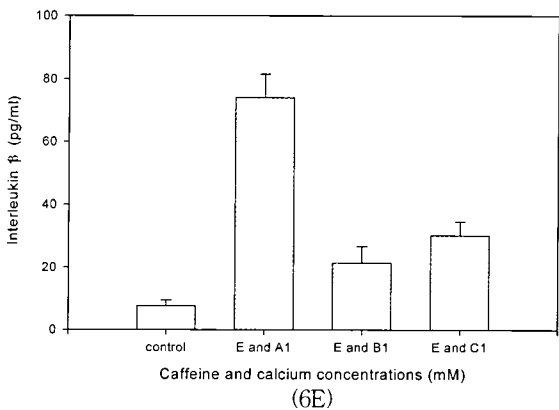
(6B)



(6C)



(6D)



(6E)

Fig. 6. IL-1 β activities of various concentrations of caffeine and calcium in the mouse osteoblastic cells at 48 hours after treatment of caffeine and calcium.

6A: 0.1 mM(A), 6B: 0.2 mM(B),
6C: 0.4 mM(C), 6D: 1.0 mM(D),
6E: 2.0 mM(E) caffeine and 1.2 mM(A1), 1.8 mM(B1),
2.5 mM(C1) calcium combination

3. 카페인과 칼슘의 혼합 처리한 경우 IL-1 β 의 활성화 변화

0.1 mM 카페인과 혼합 처리한 경우 1.2 mM 칼슘 처리시 IL-1 β 활성이 오히려 감소했고, 1.8 mM 칼슘 처리시에는 IL-1 β 활성이 크게 증가하였다 (Fig. 6A).

0.2 mM 카페인과 혼합 처리한 경우 1.2 mM, 1.8 mM 칼슘 처리시에는 IL-1 β 활성이 오히려 감소했고 2.5 mM 칼슘 혼합 처리시에는 IL-1 β 활성이 증가하였다 (Fig. 6B).

0.4 mM 카페인과의 혼합 처리한 경우에는 비처리시나 카페인 단독처리시보다는 IL-1 β 의 활성이 크나, 혼합 처리된 칼슘 농도가 증가할수록 IL-1 β 활성은 감소하는 경향을 보였으며 (Fig. 6C), 1.0 mM 카페인과 혼합 처리한 경우 혼합 처리된 칼슘 농도가 증가할수록 IL-1 β 활성이 증가하나, 카페인 단독 처리한 경우 보다는 IL-1 β 활성이 매우 낮게 나타났다 (Fig. 6D).

2.0 mM 카페인과 혼합 처리한 경우 비처리시나 카페인 단독 처리시보다는 IL-1 β 의 활성이 크나, 1.8 mM, 2.5 mM 칼슘 혼합 처리한 경우 보다는 1.2 mM 칼슘 처리시 IL-1 β 활성이 크게 나타났다 (Fig. 6E).

Table 4. IL-1 β activities of various concentrations of caffeine and calcium in the mouse osteoblastic cells at 48 hours after treatment of caffeine and calcium.

Treatment group	IL-1 β activities (pg/ml)	p value
Caffeine only	60.01 \pm 74.92	***
Calcium only	23.67 \pm 27.27	***
Combined	34.77 \pm 36.20	***

*** : statistically significant (p < 0.001). IL-1 β activities represents mean \pm standard error.

위의 결과를 요약해보면 카페인 단독 처리한 경우 0.2 mM, 1.0 mM에서, 칼슘 단독 처리시에는 1.8 mM에서, 혼합 처리군시에는 카페인 0.1 mM과 칼슘 1.8 mM, 카페인 0.1 mM과 칼슘 2.5 mM, 카페인 0.2 mM과 칼슘 2.5 mM, 카페인 2.0 mM과 칼슘 1.2 mM에서 IL-1 β 의 활성이 크게 나타났다.

통계학적 분석 결과를 보면 세 경우 모두 유의하게 차이를 보였는데 (p < 0.001), Duncan 방법에 의하면 카페인을 단독 처리한 경우는 0.4 mM, 2.0 mM, 0.1 mM에서, 칼슘 단독처리시에는 1.2 mM, 2.5 mM에서, 혼합 처리한 때에는 카페인 1.0 mM과 칼슘 1.2 mM, 카페인 0.4 mM과 칼슘 2.5 mM, 카페인 0.4 mM과 칼슘 1.2 mM, 카페인 0.2 mM과 칼슘 1.2 mM, 카페인 0.4 mM과 칼슘 1.8 mM 순으로 유의차를 나타냈다 (Table 4).

IV. 고 안

골다공증은 인종, 성별, 가족력 등의 유전적 요소와 낮은 칼슘 복용, 높은 알코올, 카페인, 나트륨, 단백질 등 영양적 요소와 담배, 운동 부족 등 생활 습관과 폐경기, 비만 등 내분비적인 문제가 복합적으로 작용하여 나타나는 질환이다¹⁾. 따라서, 폐경기 여성에게 있어서 골다공증은 커피, 차, 탄산 음료 등의 발달과 더불어 더 큰 문제가 되고 있다. *In vitro* 상에서 조건을 제한하면서 카페인, 칼슘 등 외부 요소가 골세포에 미치는 영향과 각 외부 요소간의 상호 작용을 밝혀낸다면 효율적인 치아 이동을 하는데 조금은 도움을 줄 수 있지 않을까 생각되어 본 연구를 실시하였다. 이와 관련하여 성인 여성의 교정치료시 치조골의 생물학적 반응에 미치는 영향에 대해 알아보고자 하였다.

본 실험에서 카페인에 대한 세포 독성 실험 결과를 보면 1 mM, 2 mM에서는 세포가 증식 억제되는 양상을 보였고, 세포 수도 감소하여 Tassinari 등¹⁸⁾이 *in vitro* 상에서 카페인의 골모세포의 성장과 세포의 무기질의 분화에 미치는 영향에 대해서 연구한 논문에 의하면 0.4 mM의 고농도의 카페인을 28일까지 만성적으로 노출시 세포 수나 세포 성장 비율에는 거의 영향을 미치지 않았으나 osteocalcin, 염기성 인산분해효소 활성, 총 칼슘량은 농도에 의존하면서 감소를 보였다고 하였고 특히 콜라겐의 감소가 17-21일 사이에 가장 뚜렷하게 나타나 카페인의 골분화에 대한 효과는 성인골의 대사 (turn-over)에 크게 영향을 끼친다고 보다는 골모세포 분화 중 세포의 기질 형성을 억제한다고 한 결과와 비슷하였다. Von Kossa staining을 실시한 후 영상분석기에 의한 광화된 골결절의 밀도 측정 결과를 보면 2.0 mM에서는 대조군보다 오히려 밀도가 낮았고, 0.2 mM, 0.4 mM, 1.0 mM에서는 밀도가 크게 나타났다. 또한, IL-1 β 의 활성은 카페인 단독 처리시 0.4 mM만 제외하고 비처리시보다 컷고 특히 0.2 mM, 1 mM에서는 크게 나타났는데, 이는 카페인 처리에 의한 interleukin의 파골 활동 등이 특정 농도에 예민하고, 어느 한계에 도달하면 interleukin 활동 자체가 억제되기 때문이라 생각된다. IL-1 β 의 활성 농도와 Von Kossa staining시 높은 밀도를 보이는 카페인 농도는 0.2 mM, 1.0 mM로 일치했다. 염기성 인산분해효소 활성도에 대한 결과를 보면 비처리시와는 달리 14일 이후에도 활성이 계속 증가하는 양상을 보였는데, Barone 등¹⁹⁾의 연구에 의하면 카페인을 간질 세포의 소집, 연골세포의 성장과 분화를 억제하지만 특히 fibroprogenitor cell을 연골세포로 유도하는 과정에 예민하며, 골모세포의 표현 시기에 따라 카페인이 선택적으로 다양하게 반응하여 6일 전후 초기에는 골모세포의 증식 감소와 I형 콜라겐 표현이 증가하며, 11-14일에는 골모세포의 I형 콜라겐, 염기성 인산분해효소, osteocalcin이 감소하는 비증식성 세포가 골모세포 표현 양식으로 성장하면서 14일 이후의 결과에 대해서는 본 실험과 다른 양상을 보였는데, 이는 저농도의 카페인에 세포 활성을 돕기 때문이라 생각된다.

칼슘 단독 처리시에는 Von Kossa staining 후 영상 분석기에 의한 밀도 측정 결과 1.2 mM에서만 비처리시보다 높았고 1.8 mM, 2.5 mM에서는 오히려 비처리시보다 낮게 나타났는데, 이는 적절한 농도의 세포의 칼슘은 무기질화를 돕지만 지나친 농도에서는 오히려 골모세포의 활동을 방해하는 것으로 추측된다.

또한, 염기성 인산분해효소 활성화 수치는 비처리시와 유사하게 14일에 최대에 도달했지만 수치간 차이가 크지 않았고, 비처리시에 비해 칼슘 단독 처리가 염기성 인산분해효소 활성화에 크게 영향을 끼치지 못하는 것을 보여 주었다. 그리고, 칼슘 농도가 커지면서 염기성 인산분해효소 활성화가 감소되는 것으로 보아 지나친 칼슘양은 오히려 염기성 인산분해효소의 활성을 감소시켜 골 형성을 방해하는 것으로 사료된다. 한편, IL-1 β 의 활성화는 1.2 mM만 제외하고는 크게 나타났는데, 특히 1.8 mM에서의 활성이 두드러졌다. Von Kossa staining 후 광화된 골결절의 밀도는 1.2 mM에서 크게 나타났으나 IL-1 β 의 활성화는 1.8 mM에서 두드러져 차이를 보였지만, 2.5 mM의 고농도에서는 골결절의 밀도와 IL-1 β 활성이 억제되는 점은 일치된 결과를 보여 주었다.

카페인과 칼슘의 혼합 처리시에는 Von Kossa staining 후 영상분석기에 의한 밀도 측정 결과 카페인이 0.1 mM, 칼슘이 1.8 mM일때에만 비처리시에 비해 밀도가 크게 나타났으나, 염기성 인산분해효소 활성 실험에서는 동일한 카페인 단독 처리시보다는 1.2 mM, 1.8 mM 칼슘 혼합 처리시 7일, 14일에서 염기성 인산분해효소의 활성도가 크게 나타났는데, 2.5 mM의 칼슘 농도와 14일 이후에는 오히려 염기성 인산분해효소의 활성이 감소하였다. 이는 14일 이후에는 배지내에서의 골모세포의 분화력 자체가 떨어진 것이 원인의 하나로 작용한 것 같고, 지나친 농도의 칼슘은 골모세포 자체에 독성으로 작용하는 것 같다. 한편, 0.1 mM 카페인과 1.8 mM 칼슘 처리시 IL-1 β 의 활성이 가장 크게 나타났는데 이 농도에서는 골모세포가 활동하기에 적합한 농도가 아닌가 사료된다. 다음으로 0.1 mM 카페인과 1.2 mM 칼슘, 0.2 mM 카페인과 2.5 mM 칼슘 처리시 IL-1 β 의 활성이 크게 나타났으며, IL-1 β 활성 역시 고농도의 카페인과 칼슘에서는 골모세포의 활성을 오히려 저해함을 보여주었다.

카페인의 작용 수용기²⁰⁾를 보면 중추신경계와 혈관, 혈소판 등 조직의 세포막에 있는 adenosine 수용기를 차단하는데, 카페인은 A1, A2 α 수용기와 관련이 있다. A2 α 수용기는 c-AMP 축적을 증가시키고 혈소판 응집을 감소시키며, 카페인의 만성적 투여시 A2 α 수용기의 상향 조절로 혈소판 응집이 감소된다.

세포내 칼슘 분비 기전²¹⁾은 ryanodine receptor (RyRs)와 inositol 1,4,5-triphosphate receptor (IP₃Rs)가 있다. Ryanodine 수용기에는 3가지 형태가 있는데, RyRs 2가 심장근에 존재하고 칼슘에 의해 유도되는

칼슘 유리에 관여한다. ryanodine 수용기²²⁾에는 칼슘 친화성이 높은 A 부위와 칼슘 불활성 부위인 I 부위가 있으며, protease 예민도가 높은 부위가 결합 부위로 ryanodine 결합 부위는 carboxy terminal 근처에 존재한다. 카페인에 민감한 세포내 칼슘 유리 통로²³⁾는 Ryr mRNA에서 나타난다. 따라서, 본 실험에서 Von Kossa staining 후 광화된 골결절의 밀도 측정 결과 칼슘 농도 변화에 대해서는 카페인과는 달리 큰 변화를 보이지 않았는데, 이는 칼슘과 친화성이 큰 ryanodine 수용기의 A 부위 역할이 상대적으로 적고, I 부위의 역할이 큰 몫을 하지 않았나 생각된다. Inositol triphosphate 수용기도 3가지 형태가 있으며, T cell signaling에 관여해 세포의 자가죽음 (apoptosis)을 조절하게 된다. 또한, 세포내 정보²⁴⁾가 세포의 공간으로 이동하는 데는 plasma-membrane Ca⁺⁺ ATPase가 관여하는데, 칼슘 이동에는 G-protein coupled, extracellular Ca⁺⁺-sensory receptor (CaRs)가 관여한다. 이는 0.5-10 mM의 칼슘 농도로 활성화되며 주변 세포의 칼슘 변화가 인접 세포의 칼슘 수용기를 활성화시켜 세포내 신호를 형성한다. 칼슘 수용기는 신경, 상피, 조직 세포 등 여러 세포에 퍼져 있으며, phosphoinositide/Ca⁺⁺ pathway에 결합된다. 카페인의 세포내 칼슘에 관여하는 기전²⁵⁾을 보면, ryanodine 수용기에 의한 카페인에 민감한 칼슘 유리가 유도를 하고, IP₃에 민감한 칼슘 유리에 의해 부가되는 기전을 갖게 된다. 그런데, Zhang 등²⁶⁾에 의하면 10 mM의 카페인이라도 단시간 세포 배양시에는 거의 영향을 주지 않는다고 하였다. 이는 저농도의 세포내 잔류 칼슘이 ryanodine 수용기에 대한 카페인 무감각을 야기하기 때문이다. 따라서, 본 실험에서 28일까지의 기간을 연장함으로써 세포내 잔류 칼슘에 의한 효과를 최대한 배제하였다. Pan 등³⁹⁾에 의하면 카페인이나 ryanodine receptor에 의한 ER 칼슘 감소는 자가죽음도 야기한다고 하였다. 본 실험에서도 1 mM 이상 카페인 투여시 세포 독성 검사 결과 강한 세포 파괴를 보였는데, ER 칼슘 감소가 큰 기여를 했으리라 생각된다. 본 연구에서는 세포의 칼슘 변화에 주로 초점을 두었는데 세포내 칼슘 변화⁴⁰⁾도 측정하였다면 칼슘의 이동 경로를 보다 정확히 추적할 수 있지 않았나 생각된다.

Ikeda 등²⁷⁾, Collins²⁸⁾의 연구에 의하면 커피, 차, 콜라 등 음료에서 섭취하는 카페인은 정제된 카페인보다 절대량이 훨씬 낮아 실제로 인체에서 미치는 영향이 훨씬 약하다고 하였다. K. Verani 등²⁰⁾은 카페인의

혈장내 농도가 12시간이 지난 후에는 $21 \pm 7 \mu\text{mol/L}$ 이고 60시간 후에는 $1 \mu\text{mol/L}$ 이하가 된다고 하였다. 본 실험에서는 조건을 제한키 위해 *in vitro* 상에서 물에 녹인 카페인을 직접 골모세포에 닿도록 하였기 때문에 농도를 절대적으로 인식하기 보다는 상대적으로 계산하여야 하며, 실험상의 농도에 도달키 위해서는 음료에서는 실제로 훨씬 더 높은 농도의 카페인이 섭취되어야 할 것이다. 그런데, 칼슘의 경우도 Heaney 등²⁹⁾에 의하면 섭취된 칼슘보다는 흡수된 칼슘이 다른 요소와의 관계에 더 정확하게 반응하므로 본 연구처럼 직접 칼슘제를 배지에 넣는 방법이 요소간의 관계를 확인하는데 효과적이라 생각된다. 한편 칼슘은 대개 이온 상태로 공급이 되는데, 염화칼슘 형태로 많이 공급된다. 그러나, 이는 배지에서 칼슘이 유리되는 동안 유리되는 양이 정확치 않고 변수가 많으므로 본 실험에서는 성분이 명확한 수용성 젖산을 사용하였다. 실험에 사용한 젖산은 칼슘을 13.4-14.5% 함유하고 있으며 철, 인, 마그네슘, sulfate, chloride를 10-200 ppm 정도 함유하고 있다.

염기성 인산분해효소³⁰⁾는 골모세포의 초기 분화를 보기 위한 인자 (marker)로 ascorbic acid나 $1,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ 가 염기성 인산분해효소의 정도를 높여 준다. 이 두 가지는 개별적인 기전을 가지게 되며 배지보다는 세포와 관련되어 효과가 크며 ascorbic acid 단독 보다는 $1,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ 존재하에 ascorbic acid나 -glycerol phosphate 첨가시 염기성 인산분해효소의 활성이 현저하게 증가된다. 본 연구에서도 카페인과 칼슘의 혼합 처리군에서 동일한 농도의 카페인 단독 처리시보다 14일 이전에 염기성 인산분해효소의 활성이 회복되는 양상을 보여 칼슘이 어느 정도 카페인의 억제 효과를 보완할 수 있다고 생각되나, 2.5 mM의 고농도 칼슘 처리시에는 오히려 염기성 인산분해효소 활성이 감소되었다.

한편, Manduca 등³¹⁾에 의하면 사람의 골모세포는 계대배양 횟수가 8-9회일 때 염기성 인산분해효소와 osteocalcin의 발현이 확실하고 12회를 넘으면 발현이 급격히 떨어지는 반면 osteonectin과 I형 콜라겐은 계대배양 횟수에 관계없다고 하였다. 그러나, 두개관에서 얻은 골모세포는 초기 osteoprogenitor cell이 작고 계대배양을 횟수를 넘길수록 급격히 그 수가 준다고 하여 본 실험에서는 filter를 사용해 불순물을 거르고 계대배양 없이 1차 배양세포를 사용하였다. 염기성 인산분해효소의 발현은 세포 밀도, 세포간 상호 작용, 기질의 절대적인 양, 효소 활성에 있어 초기 국소화에

영향을 받게 되므로 세심한 주의가 필요하게 된다.

또한, Tong 등³²⁾에 의하면 *in vitro* 실험에서 배지 교환 방법에는 over-flow 방법과 stop-flow 방법이 있는데, over-flow 방법이란 세포가 항상 잠기는 상태로 한쪽에서는 액을 첨가하고 다른 쪽에서는 제거하면서 원하는 약물 농도를 유지시키는 방법이고, stop-flow 방법이란 일시적으로 세포가 용액에 잠기지 않으면서 다른 용액으로 갈아주는 방법이라고 하였다. 본 실험에서도 배지 교환시 stop-flow 방법을 사용할 때 기계적 자극에 의한 칼슘 효과를 최대로 배제하기 위해서 over-flow 방법을 실시하였다.

성장 요소¹⁴⁾에는 TGF- β (transforming growth factor), PDGF (platelet-derived growth factor), FGF (fibroblast growth factor), IGF (insulin-like growth factor) 등이 있는데, 본 실험에서는 골 흡수시 많이 나타나는 IL-1 β 의 활성 변화만 살펴 보았다. 향후 골 흡수에 관여하는 cytokine뿐 아니라 골 생성이나 골 흡수를 억제시키는 성장 인자나 cytokine과의 연관성도 밝혀본다면 카페인의 작용을 조절하는데 더 많은 도움을 주지 않을까 생각된다. 또한, 골 기질³³⁾에는 콜라겐이 주 단백질원이고 비콜라겐 단백질로는 fibronectin, osteopontin, osteocalcin, osteonectin 등이 있다. Osteopontin³⁴⁾은 주로 골모세포에서 분비되나 파골세포에서도 발견되며, 골모세포의 초기 분화 시기에서 염기성 인산분해효소의 초기 유도에 관여해 염기성 인산분해효소의 mRNA 표현을 돕는다. Osteocalcin³⁵⁾은 칼슘과 특이하게 반응하는 골내의 비콜라겐 단백질로, 골내 칼슘 첨가 및 제거를 조절하여 단핵구의 chemotactic activity와 골내 Vit D 작용을 중재하는 역할을 한다고 추측된다. 아직도 비콜라겐 단백질에 대해 밝혀지지 않은 부분이 많은 데, 향후 카페인, 칼슘 처리와 연관시켜 이러한 물질과의 관련성도 연구가 된다면 기전을 밝히는데 도움이 되지 않을까 사료된다.

V. 결 론

생후 1일된 마우스의 두개관에서 얻은 골모세포를 *in vitro* 상에서 주어진 농도의 카페인, 칼슘 및 이 둘을 혼합 처리 배양하여 골모세포의 활성에 미치는 영향에 대해 살펴보았다. 카페인에 대한 세포 독성 검사, Von Kossa staining 후 광화된 골결절의 밀도 분석, 염기성 인산분해효소 활성도 및 IL-1 β 생성 변화를 검사한 후 통계학적 분석을 시행하여 다음의 결과를 얻었다.

1. 카페인에 대한 세포 독성은 카페인의 농도가 1.0 mM, 2.0 mM로 증가함에 따라, 2일, 4일로 배양 기간이 길어짐에 따라 유의하게 증가하였고, 세포수는 감소하였다.
2. 광화된 골결절의 밀도는 카페인을 단독 처리한 경우 0.2 mM에서, 칼슘 단독 처리시에는 1.2 mM에서, 혼합 처리한 경우 0.1 mM 카페인과 1.8 mM 칼슘에서 가장 크게 나타났다.
3. 염기성 인산분해효소 활성도는 비처리시 칼슘과 같이 14일째 최대값을 보이는 반면, 카페인을 단독 처리한 경우 농도가 증가함에 따라 활성도가 증가하였다. 카페인과 칼슘 혼합 처리시에는 칼슘 농도가 1.2 mM, 1.8 mM인 경우 배양 14일에 염기성 인산분해효소의 활성도가 유의하게 증가하였으나, 2.5 mM인 경우 활성도가 감소하였다.
4. IL-1 β 의 활성도는 카페인을 단독 처리한 경우 0.2 mM, 1.0 mM에서, 칼슘 단독 처리시에는 1.8 mM에서, 혼합 처리시 0.1 mM 카페인과 1.8 mM 칼슘 혼합 처리한 경우 높게 나타났고, 고농도의 카페인, 칼슘 혼합 처리시에는 낮게 나타났다.

이러한 실험 결과를 통하여 칼슘이 1.2 mM, 1.8 mM로 존재하는 경우 카페인에 의해 억제된 골모세포의 활성이 어느 정도 회복되었으나, 2.5 mM 고농도 칼슘에서는 억제된 골모세포의 활성을 회복하지 못함을 확인하였다.

참 고 문 헌

1. Richard E. Primer on the metabolic bone disease and disorders of mineral metabolism : An official publication of the American society for bone and mineral research. Lipincott Williams & Wilkins 1998 : 260-88.
2. Kreiger N, Gross A, and Hunter G. Dietary factors fracture in postmenopausal woman : a case-control study. *Int J Epidemiol* 1992 : 21 : 953-8.
3. Kiel DP, Felson DT, Hannan MT, Anderson JJ, Wilson PW. Caffeine and the risk of hip fracture : the Framingham study. *Am J Epidemiol* 1990 : 132 : 675-84.
4. Collins JF, Welsh JJ, Black TN, Whiteby KE, O'Donnell MW Jr. Potential reversibility of skeletal effects in rats exposed in utero to caffeine. *Food Chem Toxicol* 1987 : 25 : 647-62.
5. Wink CS, Rossowska MJ, Nakamoto T. Effects of caffeine on bone cells and bone development in fast-growing rats. *Anat Rec* 1996 : 246 : 30-8.
6. Fujii T, Nishimura H. Adverse administration of caffeine on rat fetus. *Toxicol Appl Pharmacol* 1972 : 22 : 449-57.
7. Kamagata-Kiyoura Y, Ohta M, Yazdani M et. al. Effect of caffeine on osteoblast-like cells *in vitro*. *J Dent Res (IADR Abstracts)* 1997 : 76 : 1778.
8. Zeroogian J, Lian JB, Tassinari MS. Caffeine inhibits endochondral bone development in demineralized bone implants. *J Bone Miner Res* 1988 : 3 : s176.
9. Akesson K, Lau KH, Johnston P, Imperio E, Baylink DJ. Effect of short-term calcium depletion and repletion on biochemical markers of bone turnover in young adult women. *J Clin Endocrinol Metab* 1998 : 83 : 1921-7.
10. Talmage RV, Grubb SA. A laboratory model demonstrating osteocyte-osteoblast control of plasma calcium concentrations. *Clin Orthop Rel Res* 1997 : 122 : 299-306.
11. Shirai Y, Yoshimura Y, Yawaka Y, et. al. Effect of extracellular calcium concentrations on osteoclast differentiation *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun* 1999 : 265 : 484-8.
12. Whiting SJ, Whitney HL. Effect of dietary caffeine and theophylline on urinary calcium excretion in the adult rat. *J Nutr* 1987 : 117 : 1224-8.
13. Bergman EA, Newbrey JW, Massey LK. Caffeine does not cause *in vitro* calcium loss from neonatal mouse calvaria. *Calcif Tissue Int* 1988 : 43 : 281-3.
14. Cillo JE Jr, Gassner R, Koepsel RR, Buckley MJ. Growth factor and cytokine gene expression in mechanically stained human osteoblast-like cells : implications for distraction osteogenesis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2000 : 90 : 147-54.
15. Lynch PB, Davidovitch Z, Shanfeld I. Interleukin-1 β at bone resorption sites : localization during tooth movement *in vivo*. 1998 : *J Dent Res* : 67 : 1474.
16. Tassinari MS, Stein GS, Lian JB. Caffeine affects osteoblast proliferation and mineralization. *J Bone Miner Res* 1998 : 176.
17. Bellows CG, Aubin JE. Determination of numbers of osteoprogenitors present in isolated fetal rat calvaria cells *in vitro*. *Dev Biol* 1989 : 133 : 8-13.
18. Tassinari MS, Gerstenfeld LC, Stein GS, Lian JB. Effect of caffeine on parameters of osteoblast growth and differentiation of a mineralized extracellular matrix *in vitro*. *J Bone Miner Res* 1991 : 6 : 1029-36.
19. Barone LM, Tassinari MS, Bortell R, et. al. Inhibition of induced endochondral bone development in caffeine-treated rats. *J Cell Biochem* 1993 : 52 : 171-82.
20. Varani K, Portaluppi F, Merighi S, et. al. Caffeine alters A2 α adenosine receptors and their function in human platelets. *Circulation* 1999 : 99 : 2499-502.
21. Dreja K, Hellstrand P. Differential modulation of caffeine- and IP $_3$ -induced calcium release in cultured arterial tissue. *Am J Physiol* 1999 : 276 : 1115-20.
22. Murayama T, Kurebayashi N, Ogawa Y. Role of Mg $^{2+}$ in Ca $^{2+}$ -induced Ca $^{2+}$ release through ryanodine receptors of frog skeletal muscle : modulations by adenosine nucleotides and caffeine. *Biophys J* 2000 : 78 : 1810-24.
23. Martin C, Hyvelin J, Chapman KE, et. al. Pregnant rat myometrial cells show heterogenous ryanodine- and caffeine-sensitive calcium stores. *Am J Physiol* 1999 : 277 : 243-52.
24. Hofer AM, Curci S, Doble MA, Brown EM, Soybel DI. Intercellular communication mediated by the extracellular calcium-sensing receptor. *Nature cell biology* 2000 : 2 : 392-8.
25. Kim YK, Cho HJ, Kim WT, Cho KS. Caffeine- and inositol 1,4,5-triphosphate-induced 45 Ca $^{2+}$ releases in the microsomes of tracheal epithelial cells : *Biochem Biophys Res Commun* 1997 : 230 : 247-50.
26. Zhang XH, Wu J, Shen MX, Zhn PH. Calcium release induced by high K $^{+}$ and caffeine in cultured skeletal muscle cells of embryo-

- nic chicken. Pflugers Arch 1999 : 438 : 827-36.
27. Ikeda GJ, Sapienza PP, McGinnins ML, et. al. Blood levels of caffeine and results of fetal examination after oral administration of caffeine to pregnant rats. J Appl Toxicol 1982 : 2 : 307-14.
 28. Collins TF, Welsh JJ, Black TN, Ruggles DI. A study of the teratogenic potential of caffeine ingested in drinking water. Food Chem Toxicol 1983 : 21 : 763-77.
 29. Heaney RP, Recher RR. Effects of nitrogen, phosphorus, and caffeine on calcium balance in women. J Lab Clin Med 1982 : 99 : 46-55.
 30. Franceschi RT, Young J. Regulation of alkaline phosphatase by 1,25-dihydroxyvitamine D₃ and ascorbic acid in bone-derived cells. J Bone Miner Res 1990 : 5 : 1157-67.
 31. Manduca P, Sanguineti C, Pistone M, et. al. Differential expression of alkaline phosphatase in clones of human osteoblast-like cells. J Bone Miner Res 1993 : 8 : 291-300.
 32. Tong J, Guang G, Chen SR, MacLennan DH. HEK-293 cells possess a carbachol- and thapsigargin-sensitive intracellular Ca²⁺ store that is responsive to stop-flow medium changes and insensitive to caffeine and ryanodine. Biochem J 1999 : 343 : 39-44.
 33. Heinegard, Oldberg A. Structure and biology of cartilage and bone matrix noncollagenous macromolecules. FASES J 1989 : 3 : 2042-51.
 34. Liu YK, Uemura T, Nemoto A, et. al. Osteopontin involvement in integrin-mediated cell signaling and regulation of expression of alkaline phosphatase during early differentiation of UMR cell. FEBS Lett 1997 : 420 : 112-6.
 35. Lian JB, Gundberg CM. Osteocalcin : Biochemical considerations and clinical applications. Clin Orthop 1988 : 226 : 267-91.

- ABSTRACT -

Effects of caffeine and calcium on the activities of the mouse osteoblastic cells

Hye-Jung Baik¹⁾, Youn-Sic Chun²⁾

¹⁾ Department of Dentistry, Ilsan paik hospital, Inje University

²⁾ Department of Orthodontics, Department of Dentistry, College of Medicine, Ewha Womans University

The purpose of this study was to evaluate the effects of caffeine and calcium on the activities of the osteoblastic cell from mouse calvaria. The author cultured osteoblastic cells obtained from the mouse calvaria and were divided into three groups : the caffeine-treated, the calcium-treated and the combine-treated group.

In caffeine-treated group, the cell toxicity was measured by MTT assay at 1, 2 and 4 days after treatment of caffeine. In all groups, the densities of the mineralized bone nodules were measured by imaging analyzer after Von Kossa staining. The alkaline phosphatase (ALP) activities were measured at 2, 7, 14, 21 and 28 days and the interleukin-1 β activities at 48 hours after treatment of caffeine and calcium. The measurements were statistically executed with ANOVA test and the results were as follows.

1. The cellular toxicity of the caffeine increased with the concentration of caffeine during the incubation period.
2. The maximum densities of mineralization were observed at 0.2 mM caffeine-treated group, 1.2 mM calcium-treated group, 0.1 mM caffeine and 1.8 mM calcium-treated group.
3. The activities of ALP were peaked at 14 days at calcium-treated group as no-treated. But, the activities of ALP increased with concentrations of caffeine at caffeine-treated group. At combine-treated group, the act of ALP were peaked at 24 days at 1.2 mM, 1.8 mM calcium-treated group, But decreased at 2.5 mM calcium-treated group.
4. The activities of the IL-1 β were increased significantly at 0.2 mM caffeine-treated group, 1.8 mM calcium-treated group and 0.1 mM caffeine and 1.8 mM calcium-treated group. But, they were decreased at all groups of high concentration.

KOREA. J. ORTHOD. 2002 : 32(2) : 129-42

※ Key words : Caffeine, Calcium, Osteoblast, ALP, Interleukin-1 β