

방사선조사가 MC3T3-E1 조골세포주의 type I collagen과 alkaline phosphatase mRNA 발현에 미치는 영향

전북대학교 치과대학 구강악안면방사선학교실 및 구강생체과학연구소
최선영 · 고광준

The effects of irradiation on the mRNA expression of type I collagen and alkaline phosphatase in the MC3T3-E1 osteoblastic cell line

Sun-Young Choi, Kwang-Joon Koh

Department of Oral & Maxillofacial Radiology, School of Dentistry,
and Institute of Oral Bio Science, Chonbuk National University

ABSTRACT

Purpose : To investigate the effects of irradiation on the phenotypic expression of the MC3T3-E1 osteoblastic cell line, particularly an the expression of type I collagen and alkaline phosphatase mRNA.

Materials and Methods : Cells were irradiated with a single dose of 0.5, 1, 2, 4, and 8 Gy at a dose rate of 5.38 Gy/min using a cesium 137 irradiator. The specimens were then harvested and RNA extraction was carried out at 1 and 3 days after irradiation. The extracted RNA strands were reverse-transcribed and the resulting cDNA fragments were amplified by PCR.

Results : The irradiated cells demonstrated a dose-dependent increase in type I collagen mRNA expression relative to the control group, with a maximum level of type I collagen mRNA expression occurring at 8 Gy. The degree of type I collagen mRNA expression increased significantly at 1 day after irradiation, but little differences were found between the control group and at the 3rd day. The amount of alkaline phosphatase mRNA expression increased significantly at 1 and 3 days after irradiation in the 1 Gy exposed group compared with the control group.

Conclusion : The amount of type I collagen and alkaline phosphatase mRNA expression increased significantly 1 day after irradiation when compared with the control group. (*Korean J Oral Maxillofac Radiol* 2003; 33 : 51-7)

KEY WORDS : irradiation; collagen type I; alkaline phosphatase; osteoblasts

서 론

골은 형성과 흡수 과정에 의해 끊임없이 변화하는 역동적인 조직이다. 골의 형성은 조골세포 전구체의 유사분열 증식과 조골세포의 분화, 그리고 최종적으로 석회화 세포 외기질을 형성하는 단계를 거쳐 진행되며, 정확히 조절되는 골 관련 단백질의 발현과정을 포함하는 복잡한 생물학적 과정에 의하여 이루어진다.^{1,2}

조골세포는 골화와 골의 재형성 및 치유시 세포외기질을 형성함으로써 골의 형성에 관여할 뿐만 아니라 조골세포

포 표면단백질이 파골전구세포를 파골세포로 분화시키는 데도 관여한다. 골의 형성과정에서 조골세포의 분화는 유전형질의 연속적인 다단계 표현에 의해 조절되며, 골관련 단백질의 표현양식은 시기별로 나타나고, 배양방법에 따라 고유의 발현양식을 가지고 있다. 즉 증식, 분화, 세포외기질의 석회화 유도 등의 과정을 거치면서 type I collagen (Col I), alkaline phosphatase (ALP), osteopontin, osteonectin, osteocalcin 등의 형질표현 유전자가 발현된다. 시기별로 초기에는 세포증식에 관여하고 연속적으로 생합성, 조직화, 그리고 골세포외기질의 석회화와 관련된 유전자들이 발현된다.¹⁻⁵ 골의 형성과 흡수에 관련된 세포들은 성장요인, cytokine, adhesion-molecule 등의 활동과 생성을 조절하는 호르몬 뿐만 아니라 국소적인 미세환경에 의해서도 영향을 받는다.^{1,2,6-9}

접수일 : 2002년 11월 14일; 심사일 : 2002년 11월 15일; 채택일 : 2002년 12월 16일
Correspondence to : Prof. Kwang-Joon Koh
Department of Oral and Maxillofacial Radiology, School of Dentistry, 634-18,
Keum-Am Dong, Duk-Jin Gu, Chon-Ju, Chonbuk, 561-712, Korea
Tel) 82-63-250-2063, Fax) 82-63-250-2081
E-mail) radkoh@moak.chonbuk.ac.kr

일반적으로 방사선은 골형성의 장애를 일으키는 요인으로 보고되고 있다. 즉 방사선은 골세포 수의 감소, 조골세포 활성도의 약화, 혈관위축 등을 일으켜 골절부의 골재생 능력을 떨어뜨리고, 방사선골괴사도 유발시킬 수 있다.¹⁰⁻¹⁷ 또한 방사선은 조골세포 분화시 cytokine 발현에도 영향을 미쳐 조골세포 증식과 세포외기질의 석회화에도 변화를 일으킨다.¹⁸⁻²¹ 이러한 변화는 방사선에 의해 유발된 조골세포의 아치사 손상(sublethal damage)에 의해 나타나는데, 아치사 손상은 정상적인 골형성이나 치유에 필요한 성장인자들의 발현에 변화가 초래됨으로써 야기될 수 있다. 방사선을 조사받은 골조직의 조직학적 변화를 뒷받침해 줄 분자수준의 기전에 관한 연구는 아직 미미하다.

본 연구의 목적은 생쥐 두개관 조골세포주 MC3T3-E1을 이용하여, 조골세포에 대한 방사선의 영향, 특히 세포분화시 발현되는 형질표현 유전자 중 Col I의 형성과 ALP의 활성도 변화에 대한 방사선 효과를 구명하는데 있다.

재료 및 방법

1. 세포배양 및 방사선조사

본 실험에 사용된 세포는 생쥐 두개관 조골세포주 MC3T3-E1으로서, 세포배양은 10% fetal bovine serum (FBS)이 포함된 alpha-minimum essential medium (α -MEM) 배지에서 행해졌다. 세포가 배양접시에서 충분히 자란 다음, 10 mM β -glycerophosphate와 50 μ g/ml ascorbic acid를 첨가하여 37°C에서 배양하였고, 3일 간격으로 신선한 배지로 교환하여 배양하였다. 25 cm² tissue culture flask에 4 × 10⁴ cells이 되게 접종하여 3일간 배양한 후 cesium 137 방사선조사기를 사용하여 실온에서 5.38 Gy/min의 선량률로 0.5, 1, 2, 4, 8 Gy를 단회조사하여 1일과 3일간 배양한 다음 선량군별로 total RNA를 분리하였다.

2. Total RNA 분리 및 reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

Total RNA는 TRI reagent (Molecular Research Center, INC, 제조국가명)를 사용하여 제조사의 지침에 따라 분리하였다. 배양된 세포에서 배지를 제거하고 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4) 10 ml로 두 번 세척한 후 TRI reagent를 첨가하였다. 이것을 1.5 ml tube에 1 ml씩 담고 1-bromo-3-chloropropane을 200 μ l 첨가하여 30초간 강하게 와동(vortex)시킨 후 원심분리 (13,000 rpm, 15분, 4°C)하여 상층액을 취해 새로운 tube에 옮겼다. 여기에 동량의 isopropanol을 첨가하여 -20°C에서 2시간 이상 방치하고 나서 원심분리 (13,000 rpm, 15분, 4°C)한 후 상층액을 제거하였다. 침전물에 75% 에탄올 1 ml를 첨가하여 다시 원심분

리 (13,000 rpm, 15분, 4°C)하고 에탄올을 제거한 후 diethyl pyrocarbonate (DEPC)처리된 증류수를 첨가하여 65°C 수조에서 10분간 반응시켜 침전물을 녹였다. 분리된 RNA는 spectrophotometer와 1% formaldehyde agarose gel 전기영동을 이용하여 정량하고 확인하였다. 분리된 total RNA 4 μ g, SuperScript II RT 200 U, 0.5 μ g Oligo dT, 0.5 mM dNTP를 첨가하여 42°C에서 90분간 반응시킨 후 70°C에서 10분간 반응을 종결시켰다.

Total RNA는 역전사되고 결과물인 cDNA는 시발체(primer)들을 이용한 PCR의 방법으로 증폭되었다. PCR은 2.5 U TaKaRa Ex Taq polymerase, 2 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP를 첨가하여 각각 지정한 조건에 맞게 실시하였다. 증폭의 목적으로 사용된 시발체는 Col I sense, TCTCCACTCTTC-TAGTTCCT; Col I antisense, TTGGGTCATTTCCACATG; ALP sense, ACCTTAGGCCTCTAACCA; ALP antisense, GCTTGCGTCTTCACTCA, GAPDH sense, TGGTGTCTT-CACCACCA; GAPDH antisense, TCAGTGGCCCTCAGA이다.

3. Total RNA 전기영동

DEPC처리된 증류수 34 ml에 agarose 0.4 g을 첨가하여 녹인 다음 10 × MOPS buffer 4 ml와 formaldehyde 2 ml를 첨가하여 gel을 만들어 사용하였다. Total RNA에 RNA loading dye를 첨가하고 여기에 Ethidium Bromide (EtBr)를 0.5 μ g/ml되게 첨가하여 65°C에서 15분간 반응시킨 후 gel 홈에 loading하여 1 × MOPS buffer상에 100 V로 1시간 전 개시킨 후 mRNA band를 관찰하였다.

결 과

Figure 1은 본 실험에 사용된 생쥐 두개관 조골세포주 MC3T3-E1세포의 사진이다. Figure 2는 MC3T3-E1 세포의 배양시간에 따른 분화인자 mRNA 발현량을 나타낸 것으로 1일, 3일간 세포배양시 Col I mRNA의 경우 유전자 변화는 보이지 않았고, ALP의 유전자의 경우는 3일간 배양시 약간 증가하는 경향을 보였다.

Figure 3과 4는 방사선을 조사하지 않은 대조군 세포와 방사선을 0.5, 1, 2, 4, 8 Gy를 각각 조사한 후 1일과 3일간 배양된 세포에서 분리된 total RNA를 나타낸 것으로, EtBr 염색시 28S와 18S rRNA를 보임으로써 RNA의 보전상태가 좋음이 확인되었다.

Figure 5와 6, Table 1은 방사선조사 선량과 세포 배양시간에 따른 조골세포 분화인자들의 mRNA 발현량을 비교한 것으로, 방사선조사시 Col I mRNA은 선량 의존적으로 증가하는 경향을 보였으며, 특히 방사선량을 8 Gy 조사했을 때 가장 많이 발현하였다. Col I mRNA은 방사선조사



Fig. 1. MC3T3-E1 osteoblastic cells; A ($\times 40$), B ($\times 100$).

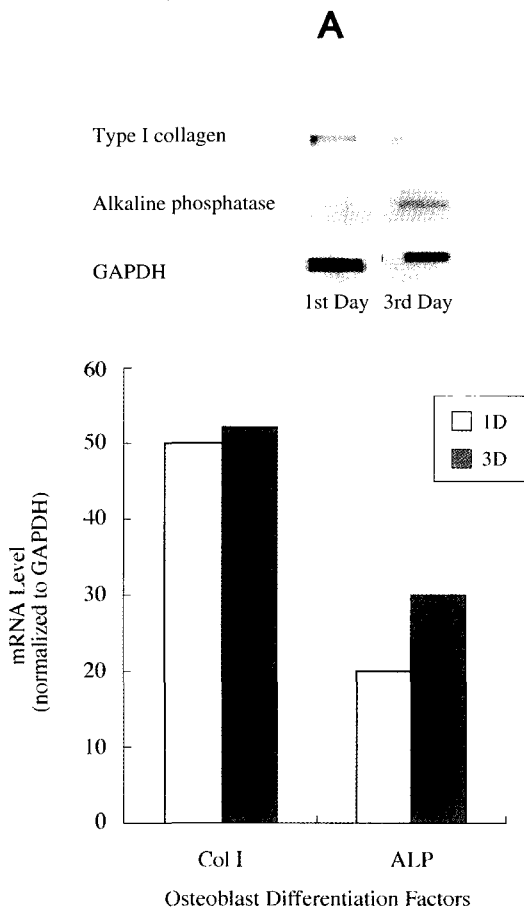


Fig. 2. The expression of mRNA at the 1st and 3rd day after MC3T3-E1 cell culture.

Table 1. The amount of the mRNA expression of the type I collagen and alkaline phosphatase after irradiation in MC3T3-E1 cell line

Radiation Dose (Gy)	Type I collagen		Alkaline phosphatase	
	1st Day	3rd Day	1st Day	3rd Day
Control	100	100	100	100
0.5	132	99	92	42
1	150	104	174	365
2	125	107	136	30
4	158	102	93	2
8	201	104	142	0

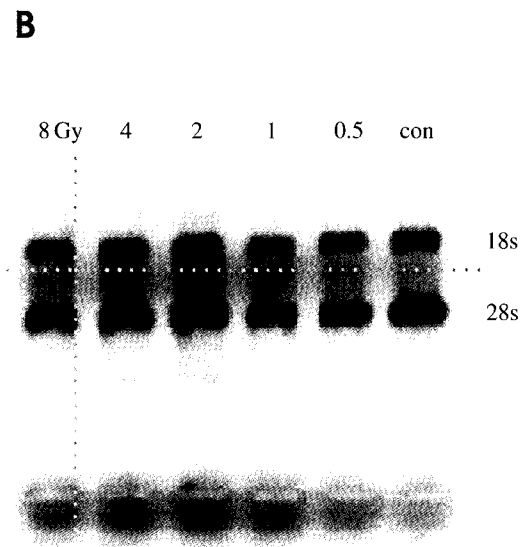


Fig. 3. Total RNAs at the 1st day after irradiation in MC3T3-E1 cell

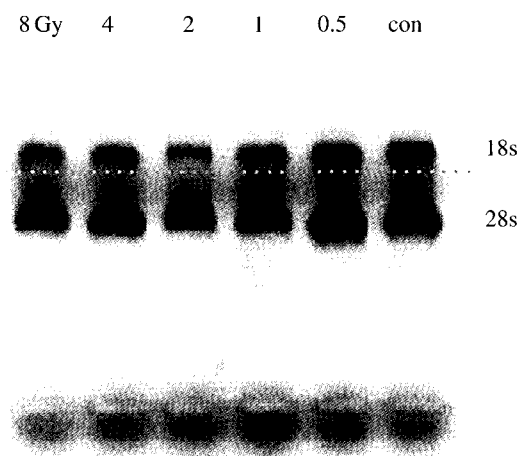


Fig. 4. Total RNAs at the 3rd day after irradiation in MC3T3-E1 cell

후 배양 1일 째에는 방사선을 조사한 세포에서 높은 발현량을 보였지만 3일간 배양 후에는 대조군과 차이가 없었

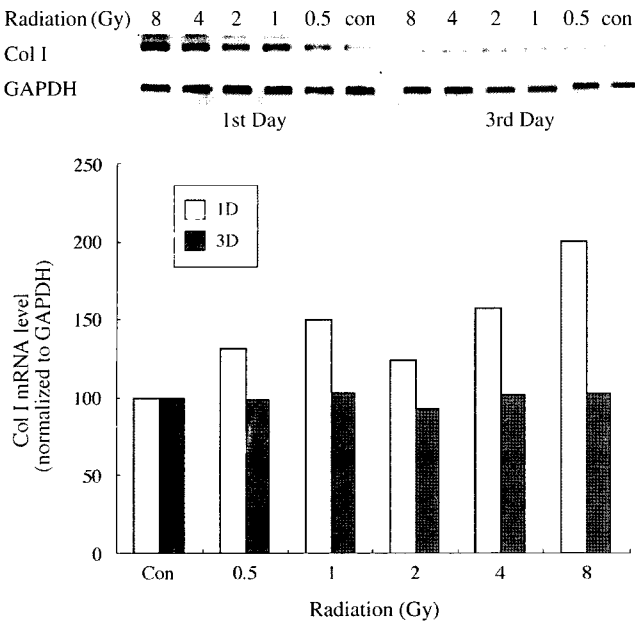


Fig. 5. The expression of Col I mRNA at the 1st and 3rd day after irradiation of 0.5, 1, 2, 4, 8 Gy.

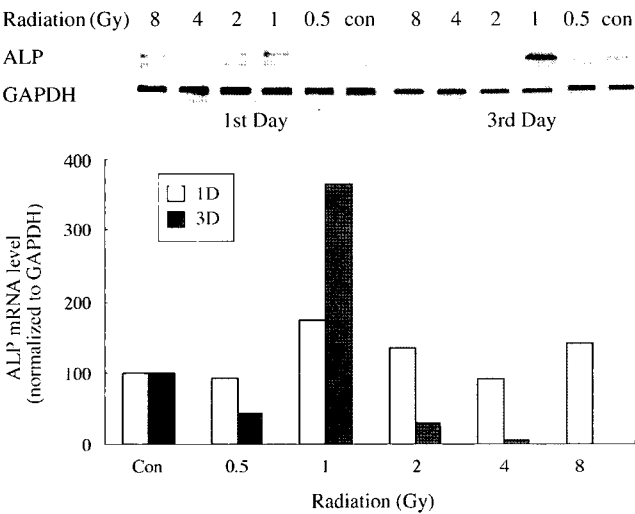


Fig. 6. The expression of ALP mRNA at the 1st and 3rd day after irradiation of 0.5, 1, 2, 4, 8 Gy.

다. ALP는 1일과 3일 후 모두 방사선을 1 Gy로 조사했을 때 대조군에 비해 높게 발현하였다.

고 찰

골의 성장과 치유에 장애요인으로 보고되고 있는 방사선은 조직에 흡수된 흡수선량에 비례하여 성장기 골성장을 저해하며 골절부의 유합을 지연시키고 섬유성 결합조직을 증가시킨다. Probert 등¹³은 사람에서 가장 왕성한 골

성장 시기인 6세 이하의 어린이와 사춘기에 35 Gy 이상의 방사선을 조사받은 경우 척추 성장이 현저히 저해됨을 보고하였다. Savostin-Asling과 Silverman¹⁴은 사람의 하악골에 방사선치료 목적으로 외부조사한 경우 정량적인 조직학적 측정을 통하여 골의 형성은 초기에 부전을 보이고 파골세포에 의한 골의 흡수는 어느 정도 지속되다가 멈추어 골의 재형성 과정에서 불균형을 초래함으로써 골다공이 증가한다고 하였다. Melanotte와 Follis²²는 쥐 경골의 골단연골과 조골세포에 4-18 Gy의 방사선을 조사한 결과, 연골은 성장을 멈추고 조골세포 활성도는 증가하여 기질 생성이 증가하면서 증식된다고 보고하였다. 특히 조골세포 활성도의 증가는 조직화학적으로 ALP 활성도의 증가와 관련이 있음을 밝혔다.

세포분화에 대한 방사선효과는 방사선치료시 방사선에 대한 정상조직과 종양세포의 반응을 구명할 목적으로 연구되어 왔다. Nicoletti²³는 2-5 Gy의 방사선량에 의해 황문근육종세포들의 세포분화가 유도되었다고 보고하였다. 또한 Lara 등²⁴은 2-8 Gy의 방사선량에 의해 사람의 피부 섬유모세포가, 그리고 Schwenke 등²⁵은 적색 전구세포가 1-30 Gy의 방사선에 의해 세포분화가 증폭되었다고 하였다. 방사선에 의한 조골세포의 분화 관련 유전자들의 증가는 증식 관련 유전자들의 감소와 상관관계가 있는 것으로 보고된 바 있다.^{18,19} 방사선에 의한 조골세포의 분화증진은 방사선손상으로부터의 회복시 새로운 세포를 필요로 한다는 점에서 불리한 효과로 간주된다.

시험관 내 선량과 생체의 선량간의 명확한 관계는 성립된 바 없으나 저산소증이나 세포간 접촉 등의 차이가 시험관내와 생체에서의 방사선조사 효과 차이를 가져오는 원인으로 알려진 바 있다.²⁶

Gal 등²⁶은 방사선 조사선량에 따라 조골세포주의 회복 정도와 손상의 정도에는 분명한 차이를 보이는 데, 2 Gy 이하의 낮은 선량에서는 DNA의 아치사 손상이 대부분 회복되는 것으로 보고하였고, 6 Gy 이상의 방사선량에서는 상당한 세포주의 퇴화와 치사를 보인다고 하였다. Tonna와 Palvec²⁷은 쥐 경골에 대하여 8 Gy의 선량을 1회 조사하였을 때 조골세포들의 증식이 억제됨을 보고하였다. 따라서 본 실험에서는 조골세포의 치사율보다는 방사선효과를 관찰하고자 하였으므로 8 Gy 이하의 선량을 각각, 1회 조사하였다.

시험관 내 배양체계를 이용하여 조골세포 분화에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 이의 연구방법으로는 크게 두가지 방법이 사용된다. 첫째, clonal 조골세포주의 배양체계는 비교적 균일한 조골세포들로 구성되어 있어 유용하게 사용되지만, 세포들이 포착된 분화시기만을 반영함으로써 조골세포 형질을 한정적으로 표현한다는 단점이 있다. 둘째, 연속적인 효소의 digestion에 의해 분리된 본래의 조골세포양 세포를 사용하는 배양체계로서 비록 이 세포

들은 조골세포 이외에도 다른 세포가 섞인 이중 세포군이 지만, ALP 활성도의 증가, 부갑상선호르몬에 대한 반응성, 다양한 골기질 단백질의 생성 등의 조골세포의 형질들을 역시 보여준다. 이 배양체계 또한 조골세포가 분화하는 동안 연속적인 형질변화를 조사하는데 적절한 모델이다.²⁰

본 실험에서 사용된 MC3T3-E1 세포주는 골조직에 존재하는 조골세포와 유사하다. MC3T3-E1 세포주는 골기질의 축적, 석회화, 성장요소들에 대한 효과, 형태와 대사의 변화 등을 연구하는데 이용되고 있다. Ascorbic acid가 공급된 배지에서 MC3T3-E1 세포는 계획된 단계에 따라 조골세포 형질의 발현 및 석회화 세포외기질 형성을 보인다. 연속적인 발달단계에서, 초기 4-10일간은 증식기, 10-16일은 골기질 형성 및 성숙기, 16-30일은 석회화기로, 증식기에서는 histone H3와 H4와 같은 세포주기 관련 유전자와 ribosomal protein S6 등이 발현되며, 골기질형성 및 성숙기에서는 Col I, fibronectin, transforming growth factor (TGF)- β 1, osteonectin 등이 나타나고, ALP의 활성도도 증가한다. 석회화기에는 결질의 수가 증가하며 osteocalcin 등이 높게 나타난다.^{3, 4, 18-21, 26, 28}

본 실험에서 세포배양시 배지 첨가물로 사용한 ascorbic acid와 β -glycerol phosphate는 ALP와 세포외기질의 석회화를 평가하고자 할 때 사용하는 첨가물이다. ascorbic acid는 MC3T3-E1 세포에서 Col I 발현을 자극하지는 않지만 세포외기질에서 collagen 침착에는 반드시 필요하며 성숙 세포에서 ALP의 활성을 유도한다. β -glycerol phosphate는 ascorbic acid에 대해 상승효과를 보이며, 분화된 조골세포에서 collagen축적이나 ALP의 활성도를 더욱 증가시킨다.

Quarles 등⁴은 MC3T3-E1 세포의 분화시 ascorbic acid와 β -glycerol phosphate의 영향에 대하여 연구한 바, ascorbic acid가 없을 때에는 MC3T3-E1 세포의 성장이 거의 정지되었고, 충분히 분화하지 못하여 세포외기질 형성이나 석회화는 이루어지지 못했다고 하였다. 또한 ascorbic acid는 세포의 성숙시기에 영향을 미치지 않으면서 조골세포 형질발현은 촉진하는 것으로 보고하였다. 그러나 ascorbic acid의 첨가가 어떻게 MC3T3-E1 기질에 collagen 축적을 허용하는지는 분명하지 않다고 하였다. 한편 β -glycerol phosphate 단독으로는 분화과정의 시간적 연속성에는 전혀 효과를 미치지 못하여 ascorbic acid가 없을 때에는 세포 성장, ALP의 활성도, collagen 축적 또는 석회화에 영향을 미치지 못했고 ascorbic acid가 존재시 조골세포 분화에 상당한 상승효과를 보였다. β -glycerol phosphate의 공급은 성숙된 배양에서 ALP의 활성도와 collagen 기질 축적에 ascorbic acid의 효과를 증폭시켰다. β -glycerol phosphate는 ascorbic acid 처리된 배양시 석회화에는 반드시 필요한 시약으로서 석회화 증진은 β -glycerol phosphate catabolism으로 인한 inorganic phosphate의 방출과 관련이 있다.

Frabceschi와 Iyer²⁹는 MC3T3-E1 세포에서 조골세포

marker 유전자 발현시 ascorbic acid의 첨가는 24시간 후 collagen 합성과 48-72시간 후 ALP의 활성도에 선량 의존적 관계를 보인다고 하였다.

Col I은 골 세포외기질 중 가장 풍부한 단백질로 뼈 단백질 총량의 60-70%를 구성한다. 이는 생리학적으로, 뼈의 구조에 대한 단백질 기초를 제공하고 무기질이 침착하는 뼈대를 제공한다.³⁰ 견고한 구조유지와 뼈의 적절한 석회화를 유지하는데 있어 Col I의 중요성은 pro α 2(I)의 carboxyl propeptide에서 특정 frame shift mutation이 일어나 심각한 사지기형과 다발성 골절, 골다공증 등을 보이는 유전질환인 골형성부전증에서 잘 반증해준다. Col I의 생성은 조골세포의 분화와 연관되어 초기에 생성되는 것으로서, 골의 흡수를 촉진하는 요소인 부갑상선호르몬과 1, 25-dihydroxy vitamin D₃는 교원질합성을 방해하고, insulin과 같은 성장촉진요소는 교원질 성장을 자극하는 것으로 알려져있다.^{30, 31} Lynch 등³²은 Col I의 막 위에 배양된 조골세포가 ALP 활성과 골조직양 세포외기질의 석회화를 증가시키고 MC3T3-E1 세포를 collagen 합성방해인자인 anti- α 2 β 1 integrin이나 DEGA peptide와 함께 배양했을 때에는 ALP의 활성 증가가 차단된다고 하였다. 따라서 Col I은 석회화 인접부위에 존재할 뿐만 아니라 기질 collagen과 세포 표면의 integrin 사이의 상호작용에 의해 조골세포의 분화가 조절됨을 보고하였다. Masi 등³³은 bovine Col I이 사람의 조골세포주인 SaOS-2에서 ALP와 osteocalcin의 생성을 유도하며, 조골세포주의 부착, 성장과 기능 향상에 유리한 효과가 있다고 하였다.

ALP의 발현은 조골세포 분화과정 중 중요한 역할을 하며 그 활성정도는 종종 조골세포의 분화단계를 상대적으로 평가하는 수단으로 사용되어 왔다. 조골세포에 의한 석회화과정에서 이 효소의 정확한 기능은 분명하지는 않지만, organic phosphate를 가수분해하고 국소적으로 PO₄ 농도를 증가시킴으로써 석회화의 촉발제 역할을 하는 것으로 보고되었다.³⁴ ALP가 조골세포가 유도하는 석회화에 관여됨을 제시하는 많은 보고들이 있다. Torii 등³⁵은 antisense RNA를 이용하여 ALP가 조골세포의 석회화에 관여하는 것을 입증하였다. Weiss 등³⁶은 liver/bone/kidney type ALP 유전자의 선천적 결핍으로 인한 저인산효소증에서 골조직 석회화부전을 보고하였다. Fukayama와 Tashjian³⁷은 ALP가 몇몇 조골양세포주들에서 칼슘섭취에 관여하는 것으로 보고하였으며, 부갑상선호르몬의 신호전달의 조절에도 관여한다고 하였다.

Dudziak 등²¹은 방사선에 조골세포를 노출시켰을 때 선량의존적으로 세포증식은 감소했으며, ALP 생성은 증가하는 등 세포분화는 증가했음을 보고하였다. 즉 MC3T3-E1 세포에 0.4-8 Gy를 단회조사시 세포증식율이 선량에 비례하여 감소하였고 ALP의 활성도가 선량에 비례하여 증가하였으나 0.4 Gy 조사군에서는 대조군과 유의한 차이가 인

정되지 않아 방사선에 대한 역치효과가 있음을 시사한다고 하였다. 한편 Dare 등²⁰은 MC3T3-E1 세포주에 0.04-0.4 Gy의 저선량 방사선을 1회 조사하였을 때 MC3T3-E1 세포의 증식과 분화에 어떠한 유의한 변화도 미치지 않았다고 보고한 바 있다. Gal 등²⁶은 MC3T3-E1 세포주에 0-6 Gy의 방사선을 조사한 후 collagen 합성이 선량에 비례하여 감소하였으며, TGF- β_1 type I과 II receptor의 발현은 증가하였다고 보고하였다. 특히 collagen 합성은 4, 6 Gy군에서 유의하게 감소하였고, 시간이 경과함에 따라 그 폭은 감소한다고 하였다.

Matsumura 등¹⁹은 MC3T3-E1 세포에 10 Gy의 방사선조사시 4일 후 Col I 합성과 ALP의 활성도는 증가하고, osteocalcin mRNA는 감소하여 방사선조사 후 세포당 평균 칼슘치를 증가시키는 결과를 초래하였다고 하였다. 그러나 배양된 세포의 총 DNA양과 총 칼슘량은 방사선조사에 의해 감소되었는데, 이는 조골세포의 수가 감소하여 전체적인 기질 석회화를 감소시킨 것을 의미한다고 하였다. 또한 칼슘농도를 증감시키는 데에 관련된 요인들은 세포가 어느 단계에서 방사선에 조사되었는지에 따라 각기 다른 기전에 관련되었을 것으로 보고하였다. 조골세포 수의 감소로 인한 골의 석회화 기질 감소는 방사선치료 후 골형성 부전과 관련이 있을 것으로 사료된다.

본 연구에서 0.5-8 Gy의 방사선조사시 Col I 합성은 선량에 비례하여 증가하는 경향을 보였고, ALP는 1 Gy로 조사했을 때 특이하게 증가하였는데 이러한 결과들은 실험조건 즉, 세포배양시 미세환경의 차이와 방사선조사시 세포 분화단계의 차이에 기인한 것으로 생각된다. 본 연구는 방사선조사 1일과 3일 후 평가한 것으로써 향후 세포의 배양기간을 좀 더 연장해야 할 것으로 사료되며 1 Gy 전후의 보다 세분화한 방사선량에 대한 평가도 이루어져야 할 것으로 생각된다. 또한 향후 조골작용에 관여하는 다른 분화 인자들에 대한 방사선의 영향에 대해서도 지속적인 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Manolagas SC. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanism and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev* 2000; 21 : 115-37.
2. Stein GS, Lian JB, Stein JL, van Wijnen AJ, Montecino M. Transcriptional control of osteoblast growth and differentiation. *Physiol Rev* 1996; 76 : 593-629.
3. Choi JY, Lee BH, Song KB, Park RW, Kim IS, Sohn KY, et al. Expression patterns of bone-related proteins during osteoblastic differentiation in MC3T3-E1 cells. *J Cell Biochem* 1996; 61 : 609-18.
4. Quarles LD, Yohay DA, Lever LW, Caton R, Wenstrup RJ. Distinct proliferative and differentiated stages of murine MC3T3-E1 cells in culture: an in vitro model of osteoblast development. *J Bone Miner Res* 1992; 7 : 683-92.
5. Owen TA, Aronow M, Shalhoub V, Barone LM, Wilming L, Tassinari

- MS, et al. Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. *J Cell Physiol* 1990; 143 : 420-30.
6. Aronow MA, Gerstenfeld LC, Owen TA, Tassinari MS, Stein GS, Lian JB. Factors that promote progressive development of the osteoblast phenotype in cultured fetal rat calvaria cells. *J Cell Physiol* 1990; 143 : 213-21.
7. Hiura K, Sumitani K, Kawata T, Higashino K, Okawa M, Sato T, et al. Mouse osteoblastic cells (MC3T3-E1) at different stages of differentiation have opposite effects on osteoclastic cell formation. *Endocrinology* 1991; 128 : 1630-7.
8. Suda T, Takahashi N, Martin TJ. Modulation of osteoclast differentiation. *Endocr Rev* 1992; 13 : 66-80.
9. Manolagas SC. Editorial: Cell number versus cell vigor- what really matters to a regenerating skeleton? *Endocrinology* 1999; 140 : 4377-81.
10. Jacobsson M, Jönsson A, Albrektsson T, Turesson I. Alterations in bone regenerative capacity after low level gamma irradiation. A quantitative study. *Scand J Plast Reconstr Surg* 1985; 19 : 231-6.
11. Currey JD, Foreman J, Laketic I, Mitchell J, Pegg DE, Reilly GC. Effects of ionizing radiation on the mechanical properties of human bone. *J Orthop Res* 1997; 15 : 111-7.
12. Cruess RL. Osteonecrosis of bone. Current concepts as to etiology and pathogenesis. *Clin Orthop* 1986; 208 : 30-9.
13. Probert JC, Parker BR. The effects of radiation therapy on bone growth. *Radiology* 1975; 114 : 155-62.
14. Savostin-Asling I, Silverman S Jr. Effects of therapeutic radiation on microstructure of the human mandible. *Am J Anat* 1978; 151 : 295-305.
15. Evans HB, Brown S, Hurst LN. The effects of early postoperative radiation on vascularized bone grafts. *Ann Plast Surg* 1991; 26 : 505-10.
16. Finston RA, Woodard HQ, Laughlin JS. Effects of external irradiation on mineral metabolism in the bones of adult dogs. *Clin Orthop* 1966; 46 : 183-201.
17. Maeda M, Bryant MH, Yamagata M, Li G, Earle JD, Chao EY. Effects of irradiation on cortical bone and their time-related changes. A biomechanical and histomorphological study. *J Bone Joint Surg Am* 1988; 70 : 392-9.
18. Matsumura S, Jikko A, Hiranuma H, Deguchi A, Fuchihata H. Effect of x-ray irradiation on proliferation and differentiation of osteoblast. *Calcif Tissue Int* 1996; 59 : 307-8.
19. Matsumura S, Hiranuma H, Deguchi A, Maeda T, Jikko A, Fuchihata H. Changes in phenotypic expression of osteoblasts after x-irradiation. *Radiat Res* 1998; 149 : 463-71.
20. Dare A, Hachisu R, Yamaguchi A, Yokose S, Yoshiki S, Okano T. Effects of ionizing radiation on proliferation and differentiation of osteoblast-like cells. *J Dent Res* 1997; 76 : 658-64.
21. Dudziak ME, Saadeh PB, Mehrara BJ, Steinbrech DS, Greenwald JA, Gittes GK, et al. The effects of ionizing radiation on osteoblast-like cells in vitro. *Plast Reconstr Surg* 2000; 106 : 1949-61.
22. Melanotte PL, Follis RH. Early effects of x-irradiation on cartilage and bone. *Am J Pathol* 1961; 39 : 1-7.
23. Nicoletti G, De Giovanni C, Landuzzi L, Simone G, Rocchi P, Nanni P, et al. Induction of myogenic differentiation in human rhabdomyosarcoma cells by ionizing radiation, N, N-dimethylformamide and their combination. *Br J Cancer* 1992; 65 : 519-22.
24. Lara PC, Russell NS, Smolders IJ, Bartelink H, Begg AC. Coco-Mar-

- tin JM. Radiation-induced differentiation of human skin fibroblasts: relationship with cell survival and collagen production. *Int J Radiat Biol* 1996; 70 : 683-92.
25. Schwenke K, Peterson HP, von Wangenheim KH, Feinendegen LE. Radiation-enhanced differentiation of erythroid progenitor cells and its relation to reproductive cell death. *Int J Radiat Biol* 1996; 69 : 309-17.
26. Gal TJ, Munoz-Antonia T, Muro-Cacho CA, Klotch DW. Radiation effects on osteoblasts in vitro: a potential role in osteoradionecrosis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2000; 126 : 1124-8.
27. Tonna EA, Pavelec M. Changes in the proliferative activity of young and old mouse skeletal tissues following ^{60}Co whole-body irradiation. *J Gerontol* 1970; 25 : 9-16.
28. Sudo H, Kodama HA, Amagai Y, Yamamoto S, Kasai S. In vitro differentiation and calcification in a new clonal osteogenic cell line derived from newborn mouse calvaria. *J Cell Biol* 1983; 96 : 191-8.
29. Franceschi RT, Iyer BS. Relationship between collagen synthesis and expression of the osteoblast phenotype in MC3T3-E1 cells. *J Bone Miner Res* 1992; 7 : 235-46.
30. Gerstenfeld LC, Chipman SD, Kelly CM, Hodgens KJ, Lee DD, Landis WJ. Collagen expression, ultrastructural assembly, and mineralization in cultures of chicken embryo osteoblasts. *J Cell Biol* 1988; 106 : 979-89.
31. Andrianrivo AG, Robinson JA, Mann KG, Tracy RP. Growth on type I collagen promotes expression of the osteoblastic phenotype in human osteosarcoma MG-63 cells. *J Cell Physiol* 1992; 153 : 256-65.
32. Lynch MP, Nawaz S, Gerschenson LE. Evidence for soluble factors regulating cell death and cell proliferation in primary cultures of rabbit endometrial cells grown on collagen. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83 : 4784-8.
33. Masi L, Franchi A, Santucci M, Danielli D, Arganini L, Giannone V, et al. Adhesion, growth, and matrix production by osteoblasts on collagen substrata. *Calcif Tissue Int* 1992; 51 : 202-12.
34. Harrison G, Shapiro IM, Golub EE. The phosphatidylinositol-glycolipid anchor on alkaline phosphatase facilitates mineralization initiation in vitro. *J Bone Miner Res* 1995; 10 : 568-73.
35. Torii Y, Hitomi K, Yamagishi Y, Tsukagoshi N. Demonstration of alkaline phosphatase participation in the mineralization of osteoblasts by antisense RNA approach. *Cell Biol Int* 1996; 20 : 459-64.
36. Weiss MJ, Ray K, Fallon MD, Whyte MP, Fedde KN, Lafferty MA, et al. Analysis of liver/bone/kidney phosphatase mRNA, DNA and enzymatic activity in cultured skin fibroblasts from 14 unrelated patients with severe hypophosphatasia. *Am J Hum Genet* 1989; 44 : 686-94.
37. Fukayama S, Tashjian AH Jr. Stimulation by parathyroid hormone of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake in osteoblast-like cells: possible involvement of alkaline phosphatase. *Endocrinology* 1990; 126 : 1941-9.