

MC3T3-E1 골모세포주의 석회화결절 형성에 방사선이 미치는 영향

전북대학교 치과대학 구강악안면방사선학교실 및 구강생체과학연구소
*경희대학교 치과대학 구강악안면방사선학교실
강기현 · 이상래* · 권기정 · 고광준

Effects of irradiation on the calcific nodule formation in MC3T3-E1 osteoblastic cell line

Ki-Hyun Kang, Sang-Rae Lee*, Ki-Jeong Kwon, Kwang-Joon Koh

Department of Oral and Maxillofacial Radiology, School of Dentistry, and Institute of Oral Bio Science, Chonbuk National University
*Department of Oral and Maxillofacial Radiology, College of Dentistry, Kyung Hee University

ABSTRACT

Purpose : To investigate the effects of irradiation on the calcium content and calcific nodule formation in the MC3T3-E1 osteoblastic cell line.

Materials and Methods : Cells were irradiated with a single dose of 2, 4 and 8 Gy at a dose rate of 5.38 Gy/min using a Cs-137 irradiator. After irradiation, the calcium content and calcific nodule formation were examined on the 1st, 2nd, 3rd and 4th week.

Results : A decreasing dose-dependent tendency of the cell proliferation rate was found in all irradiated groups of this experiment when compared with the unirradiated control group. In accordance with the duration of culture, there was no significant difference in the cell proliferation rate after irradiation of 2 Gy when compared with the unirradiated group, however a decreasing tendency was found in 4 Gy- and 8 Gy-irradiated groups. While an increase in total calcium content after irradiation of 2 Gy was found at week 1, week 2, and week 4, there was a decrease in calcium content at week 1 through 4 in the 8 Gy- irradiated group. Calcific nodule formation was increased in irradiated experimental groups when compared with the unirradiated control group in the 2 Gy-irradiated group, but decreased in the 4 Gy- and 8 Gy-irradiated groups at the same stage.

Conclusion : The results showed a mild increasing tendency of the calcific nodule formation after irradiation of 2 Gy. However, a decreased calcific nodule formation in 4 Gy- and 8 Gy-irradiated groups was found. Taken together, the irradiation of 2 Gy mildly activated bone formation, however 4 Gy or 8 Gy suppressed bone formation by decreasing cell numbers in the MC3T3-E1 osteoblastic cell line. (*Korean J Oral Maxillofac Radiol* 2005; 35 : 1-8)

KEY WORDS : MC3T3-E1 Osteoblastic Cell Line; Radiation; Calcific Nodule

서 론

골모세포는 골조직내 간엽의 전구체에서 기원하며, 세포의 증식과 분화, 세포외기질 형성 및 석회화 과정을 거쳐 골을 형성한다.^{1,2}

골조직은 교원질이 침착되어 세포외기질이 형성된 후 비교원성 단백질이 침착되고 수산화인회석으로 석회화된다.

이 과정에서 여러 가지 형질발현 유전자가 관여한다. 즉 세포외기질 중 가장 풍부한 단백질로서 무기질 침착의 뼈대를 제공하는 type I collagen (Col I), 세포외 β-glycerol phosphate를 가수분해하고 국소적으로 PO₄⁻² 농도를 증가시켜 석회화의 촉발제 역할을 하는 alkaline phosphatase (ALP), 골모세포 및 기질세포로 칼슘이온을 유입시키는 amexin V, 석회화의 기시에 관여하고 수산화인회석 결정의 형성을 유해화하는 bone sialoprotein (BSP), 교원질을 교차결합시키는 procollagen lysyl hydroxylase-2, 결정형성을 선택적으로 조절하는 osteopontin (OP), 세포와 세포 기질의 상호작용을 조절하는 osteonectin (ON) 그리고 골조직의 석

접수일 : 2005년 1월 5일; 심사일 : 2005년 1월 6일; 채택일 : 2005년 2월 3일
Correspondence to : Prof. Kwang-Joon Koh
Department of Oral and Maxillofacial Radiology, School of Dentistry, 634-18, Keum-Am Dong, Duk-Jin Gu, Jeon-Ju, Chonbuk 561-712, Korea
Tel) 82-63-250-2023, Fax) 82-63-250-2081, E-mail) radkoh@chonbuk.ac.kr

회화를 촉진하는 osteocalcin (OC) 등이 이에 해당한다. 또한 이러한 일련의 유전자 발현은 parathyroid hormone (PTH), 1,25-dihydroxy cholecalciferol (1,25-DHCC), bone morphogenetic proteins (BMPs), transforming growth factor- β (TGF- β), fibroblast growth factor (FGF) 등의 전신적 요인 및 국소적 요인에 의해 영향을 받는다.³⁻¹¹ 석회화조직을 이루고 있는 무기질은 대부분 칼슘과 인이며 칼슘은 주로 골조직에 존재하나 유기질과 결합되어 있는 칼슘은 쉽게 분리될 수 있어 대사과정에서 골의 항상성을 유지하는데 중요한 역할을 한다.

골의 석회화과정에서 대사성 질환, 염증, 생리적인 스트레스, 방사선 등은 골 형성의 조절기능에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 지금까지 방사선은 골치유와 골개조 등에 장애요인으로 보고되어 왔지만 아직까지 방사선이 골모세포에 미치는 손상 인지 기전에 대하여는 명확하게 밝혀져 있지 않다. 이는 세포주의 기원이 다양하고, 골모세포의 분화과정이 여러 단계를 거치며, 분화과정에서 발현되는 여러 유전자에 의해 영향을 받고, 세포주기에 따른 방사선감수성의 차이에 의해서도 영향을 받기 때문인 것으로 사료된다.

지금까지 골모세포에 대한 방사선의 영향을 구명하기 위하여 이용된 방사선량은 0.04-10 Gy로 보고^{13,14}되고 있다. 일반적으로 진단영역에서 이용되는 방사선량은 0.4 Gy 이하의 저선량¹³이며, 2 Gy 이하의 방사선량은 세포의 아치사손상(sublethal damage)으로부터 회복 가능한 선량¹²이고, 10 Gy 이상의 방사선량은 골모세포의 세포사를 다량 발생시킬 수 있는 방사선량¹⁴이다. Dare 등¹³은 골모세포주를 이용한 연구에서 0.04, 0.1, 0.4, 4 Gy의 방사선량 중 0.4 Gy 이하의 저선량 방사선은 골모세포의 증식과 분화에 영향을 미치지 않는다고 하였고, Gaissmaier 등¹⁴도 저선량 방사선은 골모세포의 분화와 석회화에 영향을 미치지 않는다고 하였다. 또한 김과 고¹⁵는 0.2, 0.4, 0.6 Gy의 방사선량은 석회화결절 형성을 미약하게 증가시킬 수 있으나 각 선량군간의 차이는 없다고 하였다. 한편 Jacobsson 등¹⁶은 2.5 Gy의 방사선량은 골형성에 변화를 미치지 않지만 5 Gy의 방사선량은 골형성을 심하게 감소시킨다고 보고하였다. Gal 등¹²은 2 Gy 이하의 방사선량에서는 대부분 DNA의 아치사손상이 회복되며 6 Gy 이상의 방사선량에서는 상당한 세포의 퇴화와 치사를 나타낸다고 하였다. 한편 Matsumura 등¹⁷은 골모세포주에 10 Gy의 방사선을 조사한 후 ALP의 활성 증가가 석회화결절 형성과 밀접하게 연관되어 있다고 하였으며, 방사선에 의해 OC의 발현이 억제된다고 하였다.

본 연구에서는 0.2, 0.4, 0.6 Gy의 저방사선량을 이용한 김과 고¹⁵의 연구에 이어, 2, 4, 8 Gy의 비교적 고선량의 방사선이 골모세포의 석회화결절 형성에 미치는 영향을 밝힘으로써, 궁극적으로 방사선조사와 골형성 과정과의 관계를 구명하는데 기여하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 세포배양 및 방사선조사

생쥐 두개관 골모세포주 MC3T3-E1 세포(ATCC, CRL-2593)를 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco)과 항생제가 포함된 α -minimum essential medium (α -MEM, Gibco) 배양액에서 배양하였다. 배양액은 일주일에 2회 교환하고 일주일 간격으로 1:10으로 계대배양하였다. 또한 세포는 온도 37°C가 유지되는 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 세포를 35 mm 배양접시에 2 × 10⁴ cells/ml로 분주하여 배양하고 단층으로 자란 후 cesium-137 방사선조사기(프랑스)를 사용하여 실온에서 5.38 Gy/min의 선량률로 2, 4, 8 Gy의 방사선을 조사한 후 1주, 2주, 3주, 4주 후에 다음과 같은 검사를 시행하였다. 실험기간 동안 배양액은 50 μ g/ml ascorbic acid (Sigma)와 10 mM β -glycerol phosphate (Sigma)를 혼합한 신선한 배양액으로 2, 3일마다 교환하였다.

2. 세포증식량 측정

MC3T3-E1 세포를 35 mm 배양접시에 2 × 10⁴ cells/ml로 분주하여 배양하고 이들 세포들이 단층으로 자란 후 2, 4, 8 Gy의 방사선을 조사하여 1주, 2주, 3주, 4주 후에 혈구계로 세포를 계수하였다. 세포증식량은 대조군에 대한 백분율로 표기하였다.

3. 칼슘축적량 측정

MC3T3-E1 세포가 단층을 이룬 후 2, 4, 8 Gy의 방사선을 조사하여 1주, 2주, 3주, 4주 후에 칼슘의 축적량을 측정하였다. 세포를 3 N HCl로 12 시간동안 처리하여 칼슘을 추출하였으며, 세포 처리액의 일부를 증류수로 5배 희석하였다. 희석된 세포 처리액 10 μ l를 96-well flat-bottom microtiter plate로 분주하고 시약(0.012% o-cresophtalein complexone과 250 mM 2-amino-2-methyl- α , 3-propanediol, Sigma) 90 μ l를 첨가하여 5분간 반응시킨 후 분광계를 이용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였고, 칼슘 표준용액(5-80 ng/ml, Sigma)을 이용하여 표준곡선을 만들어 이로부터 칼슘량을 산출하였다.

4. 석회화결절 형성 측정

골모세포의 석회화결절 형성을 측정하기 위하여 MC3T3-E1 세포가 단층을 이룬 후 2, 4, 8 Gy의 방사선을 각각 조사하여 1주, 2주, 3주, 4주 후에 von Kossa 염색을 시행하였다. 즉 세포를 3.7% formaldehyde로 고정하고, 3% silver nitrate 용액으로 직사광선하에서 15-30분간 석회화결절이 보일 때까지 반응시킨 후 광학현미경으로 석회화결절을 관찰하였다.

Table 1. The cell proliferation rate according to the duration of culture after irradiation in MC3T3-E1 cells (% of control)

Radiation dose	Duration of culture after irradiation			
	W1	W2	W3	W4
Unirradiated control	100.00 ± 0.10	100.00 ± 3.25	100.00 ± 5.66	100.00 ± 5.66
2 Gy	99.24 ± 0.67	101.76 ± 7.49	91.50 ± 1.31	93.39 ± 3.63
4 Gy	77.31 ± 2.31*	90.40 ± 9.85	19.90 ± 1.38**	4.03 ± 3.38**
8 Gy	35.39 ± 1.68**	6.19 ± 4.70**	5.01 ± 8.75**	31.41 ± 0.66**

*P < 0.05, ** P < 0.005 : significant difference when compared with unirradiated control (W : week)

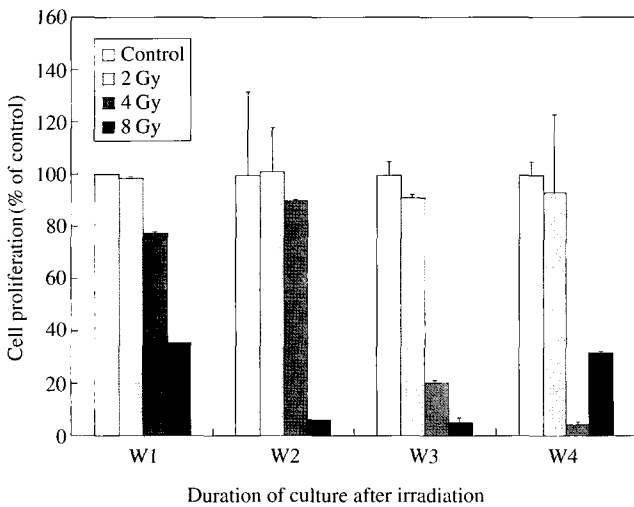


Fig. 1. The bargraph shows the cell proliferation rate according to the duration of culture after irradiation in MC3T3-E1 cells.

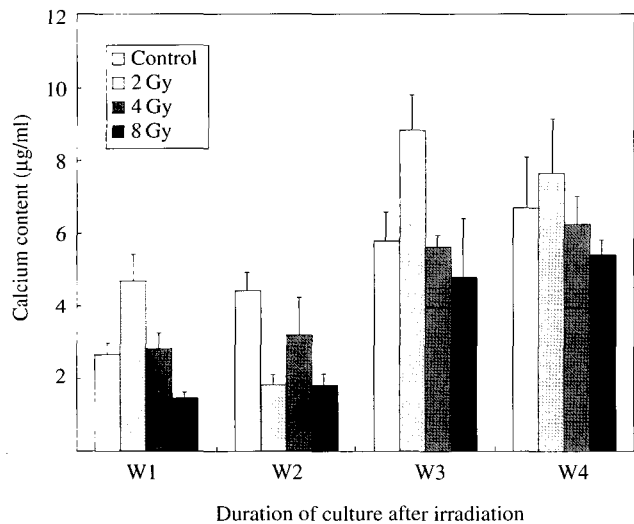


Fig. 2. The bargraph shows the calcium content according to the duration of culture after irradiation in MC3T3-E1 cells.

Table 2. The calcium content according to the duration of culture after irradiation in MC3T3-E1 cells (µg/ml)

Radiation dose	Duration of culture after irradiation			
	W1	W2	W3	W4
Unirradiated control	2.65 ± 0.33	4.42 ± 0.49	5.78 ± 0.76	6.67 ± 1.40
2 Gy	4.68 ± 0.72*	1.82 ± 0.30	8.80 ± 0.97*	7.66 ± 1.46
4 Gy	2.79 ± 0.52	3.19 ± 1.02	5.60 ± 0.32	6.21 ± 0.78
8 Gy	1.44 ± 0.16	1.81 ± 0.32	4.77 ± 1.60	5.41 ± 0.39

조사군간의 비교는 SPSS 11.0.1 (SPSS Inc., U.S.A)을 이용하여 α 값 0.025 수준으로 paired *t*-test를 시행하여 평가하였다.

결 과

1. 방사선량과 배양기간에 따른 세포증식량

Table 1, Fig. 1은 방사선조사 후 방사선량과 배양기간에 따른 세포의 증식량을 나타낸다. 방사선량에 따른 세포의 증식은 2, 4, 8 Gy의 모든 선량군에서 선량의존적으로 감소되는 경향을 보였다. 한편, 배양기간에 따른 세포의 증식은 2 Gy의 선량군에서는 1주, 2주, 3주, 4주 후 모든 선량군에서 대조군과 차이가 없었으나 4 Gy와 8 Gy의 선량군에서는 대조군에 비하여 감소되는 경향을 보였다.

2. 방사선량에 따른 칼슘축적량

Table 2, Fig. 2는 방사선조사 후 배양기간에 따른 전체 칼슘축적량을 나타낸다. 2 Gy의 방사선조사 1주, 3주, 4주 후 칼슘축적량은 증가되었지만 8 Gy의 방사선조사군에서는 1주, 2주, 3주, 4주의 모든 선량군에서 칼슘축적량이 감소되는 경향을 보였다.

3. 석회화결절 형성

Fig. 3은 방사선조사 후 배양기간에 따른 석회화결절의 형성을 나타낸다. 2 Gy의 선량군에서는 1주, 2주, 3주, 4주 후 석회화결절 형성이 증가되었으나 4 Gy와 8 Gy군에서는 1주, 2주, 3주, 4주 후 석회화결절 형성이 감소되었다.

5. 통계분석

세포증식량과 칼슘축적량은 모두 3회 실험값의 평균과 표준오차를 구하였으며, 대조군과 방사선조사군 및 방사선

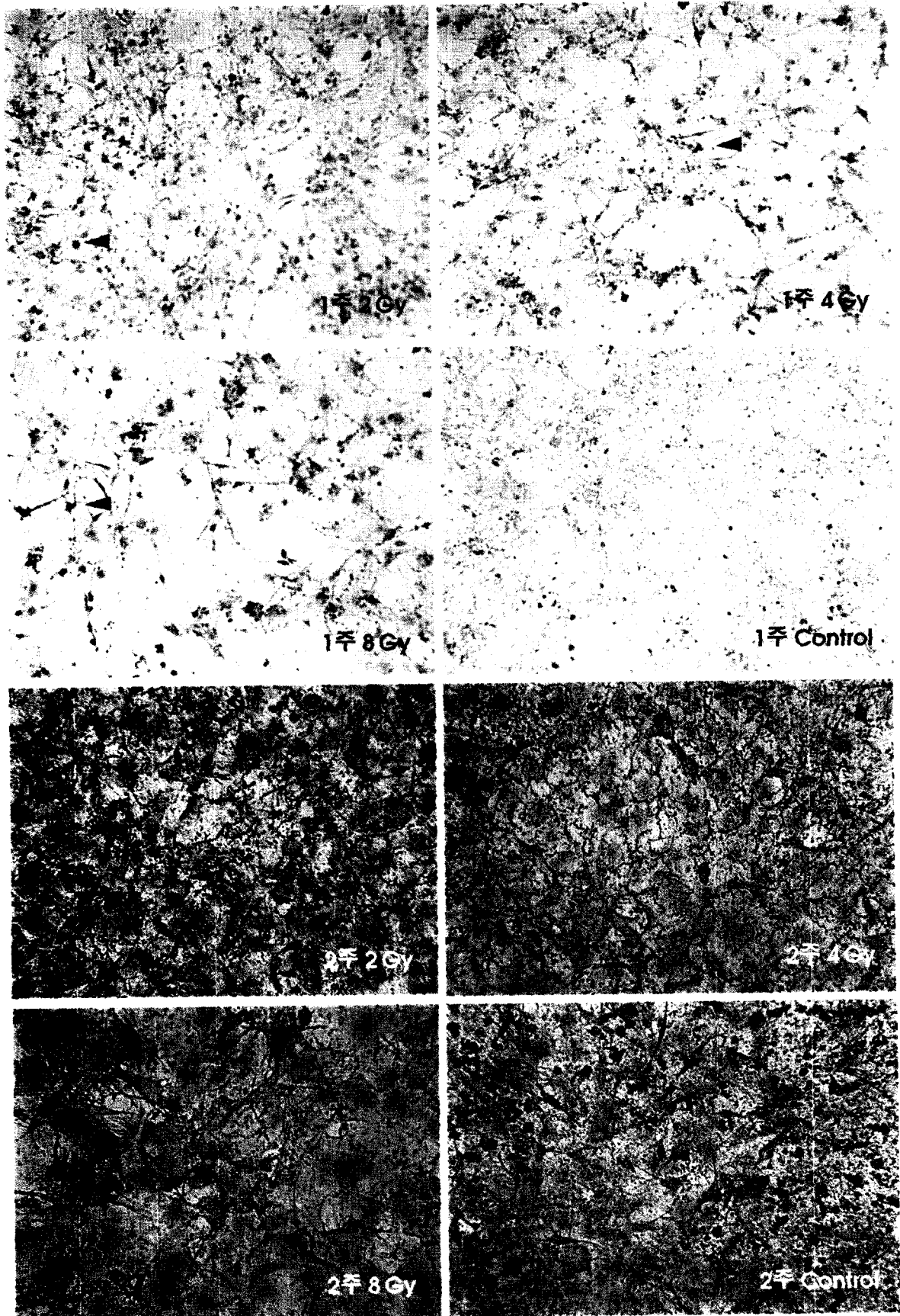


Fig. 3. The microphotographs show the calcific nodule according to the duration of culture after irradiation in MC3T3-E1 cells ($\times 100$).

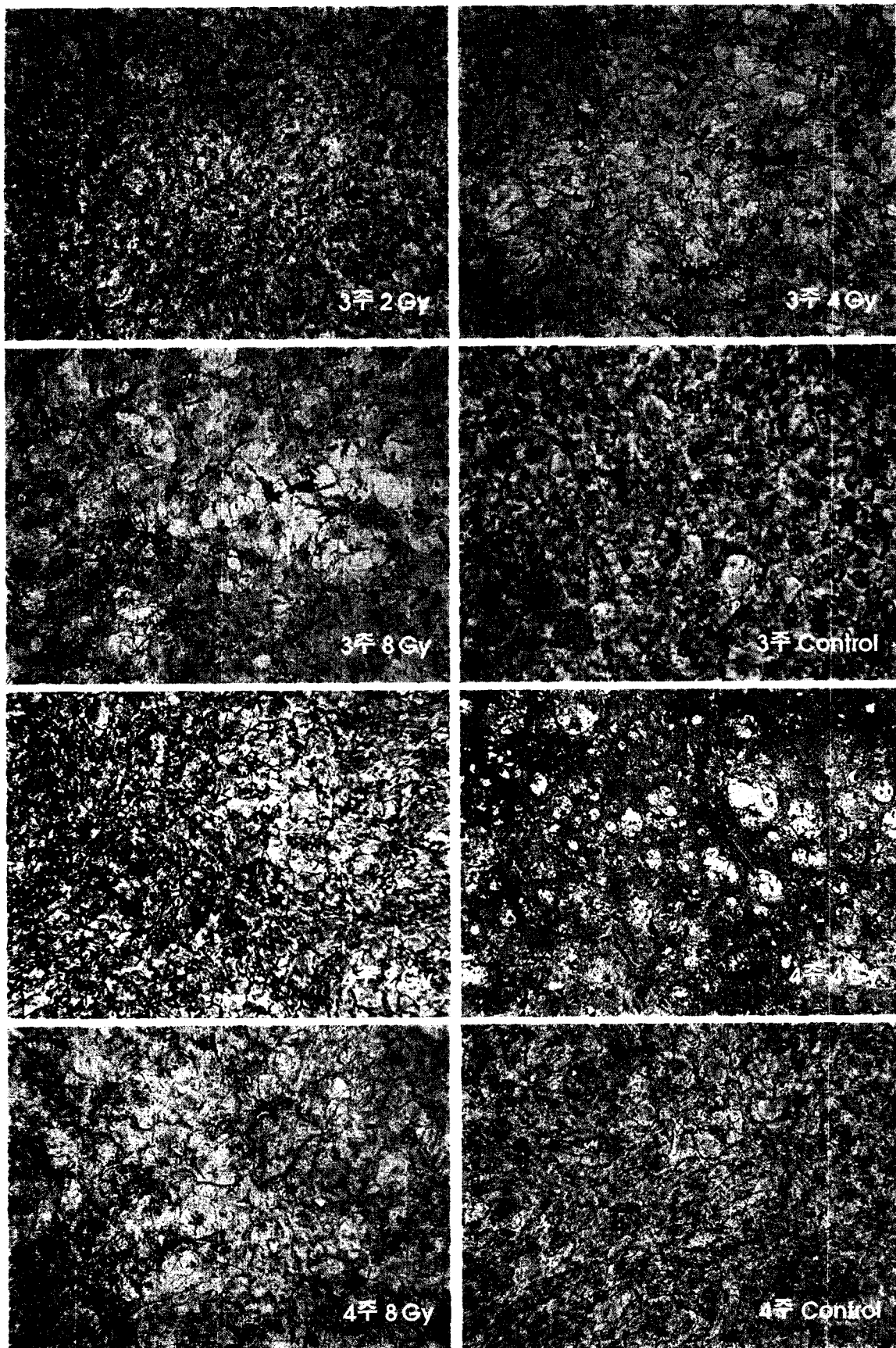


Fig. 3. Continued.

고 찰

방사선은 골의 성장과 치유에 장애를 일으키는 요인 중 하나로 알려져 있다.

골에 대한 방사선의 효과에 대하여는 많은 연구¹⁸⁻²⁵가 이루어졌으나 이에 대한 분자생물학적 기전은 아직까지 명확하게 밝혀져 있지 않다. 또한 생체 또는 시험관 내 세포주를 대상으로 한 방사선량간의 명확한 관계도 보고된 바 없지만 저산소증이나 세포간 접촉 등의 차이에 의해 방사선 효과의 차이가 발생할 수 있다는 보고¹²는 있다. Probert 등²⁶은 사람에서 가장 왕성한 골 성장 시기에 35 Gy 이상의 방사선조사는 척추 성장을 현저히 저해시킨다고 하였다. 또한 Cohn과 Gong²⁷은 성장 중인 쥐의 경골에 20 Gy의 방사선을 조사하고 7일 후 ALP의 활성도와 칼슘의 침착 속도가 현저히 감소되었으며, 이는 방사선에 의해 골모세포의 수가 감소되기 때문이라고 하였다. Rissanen 등²⁸은 성장중인 개와 성장이 종료된 개의 상완골과 대퇴골에서는 방사선량에 비례하여 골의 석회질량이 감소된다고 보고하였다. Matsumura 등¹⁷은 5 Gy와 10 Gy의 방사선조사는 골모세포의 증식을 억제하고 세포내 ALP와 칼슘량을 증가시키지만 세포의 수가 감소됨으로써 세포의 DNA 양과 전체 칼슘량은 감소된다고 하였다. Hiranuma 등²⁹은 미성숙 연골세포에서 10 Gy의 방사선량은 세포분화와 석회화를 현저히 억제시킨다고 하였다. 또한 Gal 등¹²은 방사선이 세포의 증식과 교원질합성을 감소시킨다고 하였으며, Jacobsson 등¹⁶은 5 Gy의 방사선량은 골형성을 현저히 감소시키지만, 2.5 Gy의 방사선량은 골형성에 영향을 미치지 않는다고 보고한 바 있다.

방사선조사에 의한 세포손상과 회복과정에 관한 연구는 대부분 신호전달기전, 세포고사(apoptosis) 및 세포활성물질(cytokine)과의 연관성을 밝힌 것들이다. 방사선에 노출된 세포는 DNA 회복 유전자의 영향을 받는데, 손상정도가 심한 경우 방사선에 노출된 세포는 세포사 경로를 활성화시켜 세포사를 유도한다. 이러한 과정을 거쳐 발현된 대부분의 유전자는 신호전달, 복제, 전사, 해독, 세포주기의 정지, 세포의 증식 및 혈관형성에 영향을 주고, 방사선에 의한 초기 유전자 발현의 산물은 tumor necrosis factor (TNF), basic FGF, interleukin I (IL-I), 그리고 TGF- β 등의 이차반응 유전자를 발현시켜 각종 성장인자와 세포활성물질을 분비시키며, 손상된 DNA의 회복, 세포주기의 교란, 세포생존 또는 세포사가 유도되는 것으로³⁰ 보고되고 있다. 일반적으로 방사선에 의하여 유도된 유전자의 발현은 서로 다른 기원과 조직에서 유래한 세포주에 따라 다양하게 나타나는데, 이는 세포의 종류와 세포의 주기에 따라 방사선감수성이 다르기 때문으로 알려져 있다.

골의 형성과정에서 MC3T3-E1 골모세포의 분화시기 중 세포의 증식이 일어나는 4-10일 경에는 histone H3, H4와

같은 세포주기 관련 유전자와 ribosomal protein S6 등이 발현되고, Col I 유전자의 합성이 증가된다. 또한 골기질 형성 및 성숙기인 10-16일 경에는 fibronectin (FN), TGF- β_1 , OP 유전자 등이 발현되며, ALP 유전자의 활성도가 증가되고 석회화기인 20일 경에는 OC와 OP 유전자 등이 높게 발현된다. 한편 OC와 OP 유전자는 발현양식의 차이를 보이는데, OC 유전자는 12일 이전에는 검출되지 않고 16-20일 경까지는 유의한 수준에 이르지 않지만 석회화가 시작되면서 이의 발현이 급격히 증가되며, OP 유전자는 석회화되기 이전 증식기인 5-7일 경에도 최대치의 25% 정도가 발현되는 것으로 보고되고 있다.³¹ 또한 Sudo 등³²은 골모세포 배양의 경우 ascorbic acid와 β -glycerol phosphate를 첨가하지 않은 배지에서는 세포배양 후 21일째 석회화결절 형성이 전자현미경으로 관찰된다고 하였으며, Yamamoto 등³³은 ascorbic acid와 β -glycerol phosphate를 첨가한 배지에서 세포배양 10-14일 후 석회화결절이 관찰된다고 하였다. ascorbic acid는 배양 골모세포에서 Col I의 발현을 자극하지는 않지만 세포외기질에서 교원질 침착에 반드시 필요한 첨가물질로서 성숙세포에서 ALP의 활성을 유도하는 것으로 알려져 있으며, β -glycerol phosphate는 ascorbic acid가 존재하는 경우 ascorbic acid의 효과를 상승시키고 골모세포의 분화를 촉진시키며 세포외기질에서 교원질 축적이나 ALP의 활성도를 더욱 증가시키는 것으로 알려져 있다.⁴

본 실험에서도 세포배양액에 ascorbic acid와 β -glycerol phosphate를 배지 첨가물로 사용하였다.

지금까지 방사선이 종양세포의 유전자 발현에 미치는 영향에 관한 연구³⁴⁻³⁶는 많았으나 골모세포주를 이용한 연구는 많지 않았다. 방사선은 골모세포의 증식을 선량 의존적으로 억제하고 세포분화를 야기시키며 석회화를 촉진시킨다고 보고되고 있다. Dudziak 등³⁷은 골모세포주에 0.4-8 Gy의 방사선을 조사하였을 경우 선량 의존적으로 세포증식은 감소되고 ALP의 활성도는 증가되지만 0.4 Gy의 방사선량에서는 대조군과 유의한 차이가 없다고 하였다. Dare 등¹³은 골모세포주에 방사선을 조사하였을 경우 0.04-0.4 Gy의 방사선량은 세포의 증식과 분화에는 영향을 미치지 않는다고 하였다. Gal 등¹²은 골모세포주에 0-6 Gy의 방사선 조사 시 교원질합성이 선량에 비례하여 감소되며 TGF- β_1 receptor의 발현은 증가된다고 보고하였다. Matsumura 등¹⁷은 골모세포주에 10 Gy의 방사선을 조사하였을 경우 4일 후 Col I 합성과 ALP의 합성은 증가되고 OC 유전자는 감소되어 세포당 평균 칼슘치가 증가된다고 하였다. 그러나 배양된 세포의 총 DNA양과 총 칼슘량은 감소되었는데, 이는 골모세포의 수가 감소되어 전체적인 기질 석회화가 감소된 것을 의미한다고 하였다. 또한 석회화결절 형성은 세포배양 20일 후 시작되어 30일 후 다량 관찰된다고 하였으나 ON 유전자와 OP 유전자의 발현량은 변화되지 않는

다고 보고하였다. BSP 유전자는 골형성의 초기에 높게 나타나고 세포외기질에 축적되며 수산화인회석 결정 형성을 유해화한다.³⁸ 그러나 BSP가 골형성 및 골흡수 모두와 관련되어 있는지, 또는 이 중 하나만이 관련이 있는지는 확실하지 않다. 조 등³⁹은 골모세포주에 0.5-8 Gy의 방사선을 조사하였을 경우 OC 유전자는 선량의존적으로 증가되나 OP 유전자는 선량의존적으로 감소된다고 하였다. 하 등⁴⁰은 골모세포주에 0.5-8 Gy의 방사선을 조사하였을 경우 BSP 유전자 발현에 대한 영향은 미약하다고 보고한 바 있다. 또한 김과 고¹⁵는 골모세포주에 방사선을 조사하였을 경우 0.2, 0.4, 0.6 Gy의 방사선량은 전체 칼슘축적량에 영향을 미치지 않으며, 석회화결절 형성을 다소 증가시킬 수 있으나 그 증가량은 미약하다고 하였다.

본 연구에서는 골모세포주에 2, 4, 8 Gy의 방사선을 조사하였을 경우 모든 선량에서 선량의존적으로 세포의 수가 감소되는 경향을 보였으며, 배양기간에 따른 세포의 증식은 2 Gy의 방사선량에서는 대조군과 차이가 없으나 4 Gy와 8 Gy 방사선량에서는 세포의 증식량이 감소되었다. 또한 배양기간에 따른 전체 칼슘축적량은 2 Gy 방사선량에서는 증가되었으나 8 Gy 방사선량에서는 감소되었다. 배양기간에 따른 석회화결절 형성은 2 Gy의 방사선량에서 석회화결절 형성이 증가되었으나 4 Gy와 8 Gy의 방사선량에서는 감소되었다.

이상의 결과로부터, 2 Gy의 방사선량은 세포의 증식량에 영향을 미치지 않았으나 골모세포의 석회화를 증가시켜 석회화결절 형성을 미약하게 증가시켰으며, 4 Gy와 8 Gy의 방사선량에서는 세포의 증식이 억제되어 전체 칼슘축적량이 감소되었고 석회화결절 형성도 감소된 것으로 생각된다. 본 연구는 골모세포주에 방사선을 조사한 후 배양기간에 따른 전체 칼슘축적량과 석회화결절 형성을 관찰한 것으로서, 향후 배양기간을 연장하고 세포내 또는 세포외 석회화결절 형성을 보다 자세히 관찰하여야 할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- 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.
- Stein GS, Lian JB, Stein JL, van Wijnen AJ, Montecino M. Transcriptional control of osteoblast growth and differentiation. *Physiol Rev* 1996; 76 : 593-629.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Suda T, Takahashi N, Martin TJ. Modulation of osteoclast differentiation. *Endocr Rev* 1992; 13 : 66-80.
- Manolagas SC. Editorial: Cell number versus cell vigor - what really matters to a regenerating skeleton? *Endocrinology* 1999; 140 : 4377-81.
- Liu W, Toyosawa S, Furuichi T, Kanatani N, Yoshida C, Liu Y, et al. Overexpression of Cbfa1 in osteoblasts inhibits osteoblast maturation and causes osteopenia with multiple fractures. *J Cell Biol* 2001; 155 : 157-66.
- Yanaka N, Imai Y, Kawai E, Akatsuka H, Wakimoto K, Nogusa Y, et al. Novel membrane protein containing glycerophosphodiester phosphodiesterase motif is transiently expressed during osteoblast differentiation. *J Biol Chem* 2003; 278 : 43595-602.
- 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.
- 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.
- Gaissmaier C, Sell S, Fritz J, Esenwein S, Eingartner C, Weise K, et al. Osteogenesis in exposure to ionizing radiation in vitro. *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 1999; 137 : 528-35.
- 김경아, 고희준. 저선량 방사선이 MC3T3-E1 골모세포주의 석회화결절 형성에 미치는 영향. *대한구강악안면방사선학회지* 2004; 34 : 137-44.
- Jacobsson M, Jonsson A, Albrektsson T, Turesson I. Alterations in bone regenerative capacity after low level gamma irradiation. *Scand J Plast Reconstr Surg* 1985; 19 : 231-6.
- 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.
- Fujii K, Miyashita T, Takanashi J, Sugita K, Kohno Y, Nishie H, et al. Gamma-irradiation deregulates cell cycle control and apoptosis in nevoid basal cell carcinoma syndrome-derived cells. *Jpn J Cancer Res* 1999; 90 : 1351-7.
- Schoeters GE, Plaetse FV, Heuvel RL. High radiosensitivity of the mineralization capacity of adult murine bone marrow in vitro to continuous alpha-irradiation compared to acute X-irradiation. *Int J Radiat Biol* 1992; 61 : 675-83.
- Evans HB, Brown S, Hurst LN. The effects of early postoperative radiation on vascularized bone grafts. *Ann Plast Surg* 1991; 26 : 505-10.
- Edgar AT, Mildred P. Changes in the proliferative activity of young and old mouse skeletal tissue following Co⁶⁰ whole-body irradiation. *J Gerontol* 1970; 25 : 9-16.

MC3T3-E1 골모세포주의 석회화결절 형성에 방사선이 미치는 영향

22. Cruess RL. Osteonecrosis of bone. Current concepts as to etiology and pathogenesis. *Clin Orthop* 1986; 208 : 30-9.
23. 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.
24. Jacobsson M, Kalebo P, Albrektsson T, Turesson I. Provoked repetitive healing of mature bone tissue following irradiation. *Acta Radiol Oncol* 1986; 25 : 57-62.
25. Melanotte PL, Follis RH. Early effects of x-irradiation on cartilage and bone. *Am J Path* 1961; 39 : 1-7.
26. Probert JC, Parker BR. The effects of radiation therapy on bone growth. *Radiology* 1975; 114 : 155-62.
27. Cohn SH, Gong JK. Effect of 2000 roentgens local X-irradiation on metabolism and alkaline phosphatase activity of rat bone. *Am J Physiol* 1953; 173 : 115-9.
28. Rissanen P, Kivimaki K, Paatsama S. Effect of Co⁶⁰ irradiation on the bone mineral content in dogs. *Strahlentherapie* 1969; 138 : 445-8.
29. Hiranuma H, Jikko A, Iwamoto M, Fuchihata H. Effects of X-ray irradiation on terminal differentiation and cartilage matrix calcification of rabbit growth plate chondrocytes in culture. *Bone* 1996; 18 : 233-8.
30. Aitasalo K. Bone tissue response to irradiation and treatment model of mandibular irradiation injury. An experimental and clinical study. *Acta Otolaryngol* 1986; 428 : 1-54.
31. Cowles EA, DeRome ME, Pastizzo G, Brailey LL, Gronowicz GA. Mineralization and the expression of matrix proteins during in vivo bone development. *Calcif Tissue Int* 1998; 62 : 74-82.
32. 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.
33. Yamamoto N, Furuya K, Hanada K. Progressive development of the osteoblast phenotype during differentiation of osteoprogenitor cells derived from fetal rat calvaria: model for in vitro bone formation. *Biol Pharm Bull* 2002; 25 : 509-15.
34. 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.
35. Lara PC, Russell NS, Smolders IJ, Bartelink H, Begg AC, Coco-Martin JM. Radiation-induced differentiation of human skin fibroblasts: Relationship with cell survival and collagen production. *Int J Radiat Biol* 1996; 70 : 683-92.
36. 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.
37. 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.
38. Chen, Y, Bal BS, Gorski JP. Expression of bone sialoprotein (BSP) in developing human tissues. *J Biol Chem* 1992; 267 : 24871-8.
39. 조수범, 이상래, 고광준. MC3T3-E1 조골세포주의 osteocalcin과 osteopontin mRNA 발현에 미치는 방사선의 영향. *대한구강악안면 방사선학회지* 2003; 33 : 179-85.
40. 하쌍용, 강기현, 이상래, 권기정, 고광준. MC3T3-E1 조골세포주의 osteonectin과 bone sialoprotein mRNA 발현에 미치는 방사선의 영향. *대한구강악안면방사선학회지* 2004; 34 : 99-106.