

## 배양된 인간 골막기원세포의 조골활성에 대한 덱사메타손 농도의 효과

김종렬 · 박봉욱\* · 이창일\* · 하영술\*\* · 김덕룡\*\*\* · 조영철\*\*\*\* · 성일용\*\*\*\* · 변준호\*

부산대학교 치의학전문대학원 구강악안면외과학교실,

\*경상대학교 의학전문대학원 구강악안면외과학교실, 경상대학교 건강과학연구원,

\*\*경상대학교병원 임상의학연구소, \*\*\*경상대학교 의학전문대학원 생화학교실,

\*\*\*\*울산대학교 의과대학 구강악안면외과학교실

### Abstract

#### EFFECT OF DEXAMETHASONE CONCENTRATIONS ON OSTEOGENIC ACTIVITY OF CULTURED HUMAN PERIOSTEAL-DERIVED CELLS

Jong-Ryoul Kim, Bong-Wook Park\*, Chang-il Lee\*, Young-Sool Hah\*\*, Deok Ryong Kim\*\*\*, Yeong-Cheol Cho\*\*\*\*, Iel-Yong Sung\*\*\*\*, June-Ho Byun\*

*Department of Oral and Maxillofacial Surgery, School of Dentistry, Pusan National University*

*\*Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Gyeongsang National University School of Medicine and Institute of Health Sciences,*

*\*\*Clinical Research Institute, Gyeongsang National University Hospital,*

*\*\*\*Department of Biochemistry, Gyeongsang National University School of Medicine,*

*\*\*\*\*Department of Oral and Maxillofacial Surgery, College of Medicine, Ulsan University,*

Long-term treatment with glucocorticoid leads to the development of osteoporosis and osteonecrosis. In contrast to the marked inhibitory effect of pharmacological doses of glucocorticoids on bone formation, the relationship between physiological concentrations of glucocorticoids and osteoprogenitor cell proliferation and phenotypes has not been elucidated yet. In addition, the effects of dexamethasone treatment on the proliferation and osteoblastic differentiation of osteoprogenitor cells are also controversial. The purpose of this study was to examine the effects of dexamethasone on the proliferation and osteoblastic differentiation of periosteal-derived cells. Periosteal-derived cells were obtained from mandibular periosteums and introduced into the cell culture. After passage 3, the cells were further cultured for 21 days in the osteogenic induction medium with different dexamethasone concentrations of 0, 10, and 100 nM. The proliferation and osteoblastic phenotypes of periosteal-derived cells were promoted in dexamethasone-treated cells than in untreated cells. Among the dexamethasone-treated cells, cell proliferation was slightly greater in 10 nM dexamethasone-treated cells than in 100 nM dexamethasone-treated cells. Histochemical staining and the bioactivity of alkaline phosphatase (ALP) were higher in 100 nM dexamethasone-treated cells than in 10 nM dexamethasone-treated cells. Similarly, von Kossa-positive mineralization nodules and calcium content were also more evident in 100 nM dexamethasone-treated cells than in 10 nM dexamethasone-treated cells. These results suggest that dexamethasone enhances the in vitro osteoblastic differentiation of periosteal-derived cells. The present study also demonstrates that higher dexamethasone concentrations reduce the in vitro proliferation of periosteal-derived cells.

**Key words:** Periosteal-derived cell, Dexamethasone, Osteogenic activity

\* This work was supported for 2 years by Pusan National University Research Grant

## I. 서 론

합성 글루코코르티코이드인 덱사메타손 (dexamethasone)은 염증 질환이나 면역 질환등에 대표적으로 사용되고 있으며 골과 광물질 대사에 직접적 혹은 간접적으로 관여하게 된다. 여러 질환에 치료 목적으로 장기간 사용할 경우 골대사에는 골다공증 혹은 골괴사와 같은 골대사 질환을 일으킬 수 있다. 글루코코르티코이드-유래 골다공증 (glucocorticoid-induced osteoporosis)은 특징적으로 골의 양 및 밀도의 감소와 함께 골절 위험성의 증가를 나타낸다. 장기간 치료 목적으로 사용할 경우 골대사에 대한 부작용은 대략 첫 6개월동안 가장 빠르게 진행되지만, 그 효과는 치료기간 내내 나타날 수 있으며 치료 용량이나 치료 기간에 비례하여 나타난다<sup>1-5)</sup>. 주로 대퇴골두 (head of femur)가 가장 흔히 영향을 받으며 상완골두 (head of humerus)가 그 다음으로 영향을 받는다고 알려져 있으나 장골 어느 부위에서든 나타날 수 있다<sup>6,7)</sup>.

그람단위 등 치료 용량으로 적용되는 글루코코르티코이드가 골대사에 부정적인 영향을 미치는 것과는 반대로 주로 나노몰 (nanomole, nM) 단위의 생리학적 용량으로 적용되는 글루코코르티코이드의 골 전구세포들에 대한 효과는 아직도 논란의 대상이 된다. Leboy 등<sup>8)</sup>은 쥐의 골수기질세포의 세포배양동안 10 나노몰 (10 nM)의 덱사메타손을 적용하였을 경우, 세포의 증식은 감소되었으나 알칼리성 인산분해효소 (alkaline phosphatase, ALP), 제1형 콜라겐 (type I collagen), 그리고 osteopontin과 같은 조골세포 표지자 (osteoblastic markers)의 발현은 증가됨을 보고하였다. 그러나 Cui 등<sup>9)</sup>은 마우스의 골수기질에서 클로닝한 세포주인 D1을 통하여 덱사메타손은 골수기질세포에서 지방세포로의 증식 및 분화를 증가시키며 제1형 콜라겐이나 osteocalcin과 같은 조골세포 표지자의 발현은 감소시킨다고 보고하였다. 쥐의 골수기질세포를 이용한 연구에서 Atmani 등<sup>10)</sup>은 10 나노몰의 덱사메타손을 지속적으로 적용하였을 경우, 세포의 증식 뿐 아니라 조골세포 표현형 (osteoblastic phenotype)의 발현도 증가시킴을 보고하였다. 이러한 생리학적 용량으로 적용되는 글루코코르티코이드의 골 전구세포들에 미치는 영향은 아직 정확하게 확립되어 있지 않다.

자가골 이식의 대안으로 골 전구세포를 성숙한 조골세포로 분화시키는 과정을 응용하는 골 조직공학은 이제 어느덧 재건학의 중요한 한 축이 되고 있으며 다양한 원천으로부터의 골 전구세포와 여러 가지 담체 (scaffold)와의 융합이 보고되고 있다. 성공적인 조직공학적 골형성을 위하여 가장 중요한 요소로 여겨지는 것은 자가 골 전구세포를 쉽게 획득하는 것이다. 골수기원줄기세포 (bone marrow-derived mesenchymal stem cells), 골막기원세포 (periosteal-

derived cells), 그리고 지방기원세포 (adipose-derived cells)등이 현재 골 전구세포로 이용되고 있으나 골수기원줄기세포에 대한 연구가 가장 많이 진행되고 있다. 골수기원줄기세포는 다능성 세포로 조골세포, 연골세포 및 지방세포등으로 분화할 수 있는 능력을 가지고 있으며 이미 여러 연구에서 골수기원줄기세포를 통한 골 재생은 만족할 만한 결과를 산출하고 있다<sup>11-15)</sup>. 그러나 골결손 부위와 상대적으로 덜 관계된 부위에서 국소마취하에 적은양의 골관련 절편을 쉽게 채취하고 이를 통하여 관련 세포를 추출, 증식시켜 분화시키는 것이 골 조직공학의 본연의 장점임을 고려할 때, 흡입 (aspiration)방법을 통한 골수기원줄기세포의 채취는 임상적인 면에서 다소 불리한 것이 사실이다. 그리하여 골 전구세포를 가지며 치과적으로 국소마취하에 매복치 발치등을 포함한 일반적인 시술을 통하여 쉽게 채취할 수 있는 골막을 이용하는 것이 골 조직공학에서 상당히 유리한 장점을 제공할 수 있다. 또한 부가적인 장점으로, 골 결손을 나타내는 연령이 대개 고령임을 고려할 때, 골수에서 추출한 골수기원줄기세포가 조골세포로 분화되는 능력이 연령에 따라 감소된다는 보고가 있는 반면, 골막에서 추출한 골막기원세포는 공여자의 연령에 상관없이 조골세포로의 분화능력을 유지한다고도 알려져 있다<sup>16-22)</sup>.

골막기원세포의 증식과 조골세포로의 분화과정에서 덱사메타손 농도의 효과는 아직 잘 알려져 있지 않다. 이에 본 연구는 덱사메타손의 농도가 골막기원세포의 증식 및 조골세포로의 분화과정에 미치는 영향을 관찰하고자 한다.

## II. 연구재료 및 방법

### 1. 골막기원세포의 추출, 증식 및 조골세포로의 분화

경상대학교 병원의 윤리위원회를 따르고 환자 동의하에 매복된 하악 제3대구치의 발치과정에서 약 5 × 20 mm의 골막을 채취하여 몇조각으로 다시 자른다. 이를 100-mm culture dish에 넣은 후 넣은 후 10% fetal bovine serum, 100 IU/mL penicillin, 그리고 100 µg/mL streptomycin이 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 배지에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기를 통하여 배양한다. 약 90%의 세포군집 (confluence)을 나타내면 증식된 세포들을 0.02% 트립신과 0.02% EDTA로 5분간 트립신 처리시키고 1,500 rpm에서 원심분리하여 계대배양을 실시한다. Passage 3을 거친 후, 골막기원세포들은 3 × 10<sup>4</sup> cells/well의 밀도로 6-well plate에 주입하고 10% fetal calf serum, 50µg/ml L-ascorbic acid 2-phosphate, 10 mM β-glycerophosphate, 그리고 다른 농도 (0, 10, 100 nM)의 덱사메타손이 포함된 DMEM로 구성된 골형성 유도 배지에서 21일 동안 배양하였다. 골형성

유도 배지는 매 3일마다 교체해주며 21일동안 배양하였다.

## 2. 골막기원세포의 증식

다른 농도 (0, 10, 100 nM)의 덱사메타손이 포함된 골형성 유도 배지에서 골막기원세포의 증식은 CCK-8 kit (Dojindo, Gaithersburg, USA)를 이용하여 분석하였다. 골막기원세포들을  $5 \times 10^3$  cells/well의 밀도로 96-well plate에 주입하고 다른 농도 (0, 10, 100 nM)의 덱사메타손이 포함된 골형성 유도 배지에서 37°C에서 1시간동안 well당 10  $\mu$ l CCK-8 solution으로 처리하여 2, 4, 7, 10, 13, 16, 19 그리고 21일째 세포 증식 양상을 관찰하였다.

## 3. 알칼리성 인산분해효소에 대한 조직화학적 검사 (Histochemical detection of alkaline phosphatase, ALP)

인산염 식염수로 세포층을 세척한 후, 3.7% 포름알데히드와 90% 에탄올로 2분간 고정하고 10분간 TBS (Tris Buffer saline)에 세척하였다. 이후 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate와 nitroblue tetrazolium (BCIP/NBT, Amresco, Ohio, USA) 알칼리성 인산분해효소 기질로 실온에서 10분간 염색하였다.

## 4. 알칼리성 인산분해효소 활성도의 측정 (biochemical measurement of alkaline phosphatase (ALP) activity)

ALP 활성도는 pH 10.4의 Glycine-NaOH 완충액에서 p-nitrophenylphosphate (pNPP)를 기질로 이용하여 골막기원세포에서 유리되는 pNPP를 흡광도 410 nm에서 측정하였으며  $\mu$ mol/min/mg protein으로 표기하였다. 총단백량 측정은 Bradford protein assay를 이용하여 측정하였다.

## 5. Von Kossa 염색

무기질이 침착된 기질을 갈색으로 표현되게 하는 von kossa 염색을 통하여 골기질 형성정도를 평가하였다. 배양된 세포를 인산염 식염수로 세척하고 4% 포름알데히드로 10분간 고정하였다. 증류수로 세척한 후, 5% 질산은 용액으로 처리하고 30분간 암실에서 보관하였다. 과잉의 질산은 용액을 증류수로 여러번 세척하고 발색을 위하여 중탄산나트륨/포름알데히드 용액을 7분간 적용하였다. 5% 티오황산염나트륨으로 여분의 질산은을 중성화시켰다.

## 6. 칼슘량의 측정 (Quantification of calcium content)

24시간동안 관련 세포를 0.6 N HCl로 탈회시킨다. 이후 o-cresolphthalein 방법 (o-cresolphthalein method, calcium C-test Wako, Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan)을 이용하여 다양한 농도 (0, 10, 100 nM)의 dexamethasone이 포함된 골형성 유도 배지에서 골막기원세포에 의하여 형성된 칼슘에 대한 정량적 평가를 실시한다. 형성된 칼슘은 BCA protein assay kit (Pierce Chemical Co, Rockford, USA)를 이용하여 측정한다.

## III. 연구결과

### 1. 골막기원세포의 증식

다른 농도 (0, 10, 100 nM)의 덱사메타손 존재하에서 골막기원세포의 증식 양상을 배양 2, 4, 7, 10, 13, 16, 그리고 21일째 분석하였다. 골막기원세포는 덱사메타손이 존재하든, 존재하지 않든 배양 16일째까지 증식되는 양상을 나타내었으며 특히 100 nM의 덱사메타손의 존재하에서 보다 10 nM의 덱사메타손 존재하에서 그 증식 양상이 뚜렷함을 알 수 있었다. 그러나 배양 16일 이후, 골막기원세포는 덱사메타손이 존재하지 않는 경우에서 더 증식됨을 관찰하였다 (Fig. 1).

### 2. 알칼리성 인산분해효소의 조직화학적 검사 및 활성도의 측정

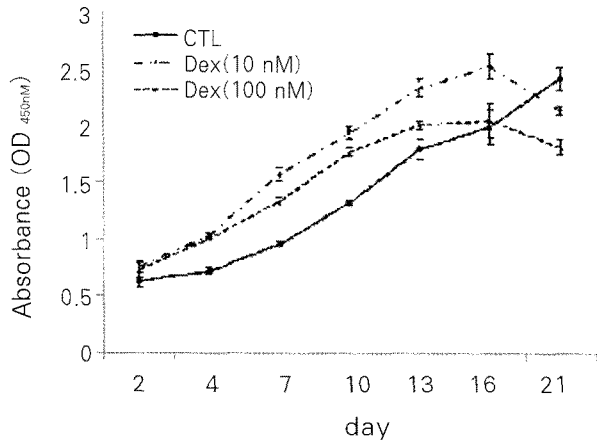
다른 농도 (0, 10, 100 nM)의 덱사메타손 존재하에서 골막기원세포에서 발견되는 알칼리성 인산분해효소의 양상 및 그 활성도를 배양 10일째 관찰하였다. 덱사메타손을 포함하는 골형성 유도 배지에서 알칼리성 인산분해효소의 발현은 나타났으며 10 nM의 덱사메타손의 존재하에서 보다 100 nM의 덱사메타손 존재하에서 알칼리성 인산분해효소는 골막기원세포에서 뚜렷하게 발현되었다 (Fig. 2).

알칼리성 인산분해효소의 조직화학적 발현양상과 유사하게, 골막기원세포에서 나타나는 알칼리성 인산분해효소의 활성도 또한 10 nM의 덱사메타손의 존재하에서 보다 100 nM의 덱사메타손 존재하에서 증가되었다 (Fig. 3).

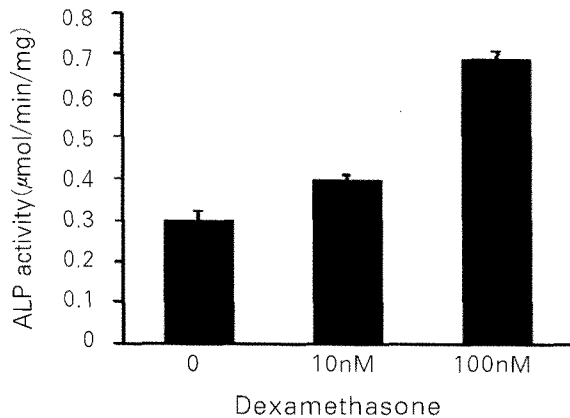
### 3. 배양된 골막기원세포의 골기질 형성정도

다른 농도 (0, 10, 100 nM)의 덱사메타손 존재하에서 골막기원세포에서 형성되는 골기질 정도는 von kossa 염색과 칼슘량의 측정을 통하여 배양 21일째에 정성적 및 정량적

으로 분석하였다. 무기질이 침착되어 갈색으로 인기되어 의미있는 골기질 형성을 나타내는 von kossa 양성 골기질은 10 nM의 덱사메타손의 존재하에서 보다 100 nM의 덱사메타손 존재하에서 뚜렷하였다 (Fig. 4).

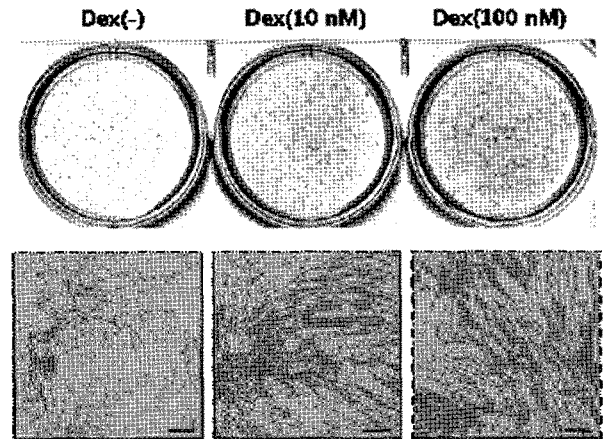


**Fig. 1.** Effects of dexamethasone concentration on the growth of periosteal-derived cells. Cell proliferation was higher in dexamethasone-treated cells (Dex) than in untreated cells (CTL) until day 16 of culture. In addition, cell proliferation was slightly higher in 10 nM dexamethasone-treated cells than in 100 nM dexamethasone-treated cells.

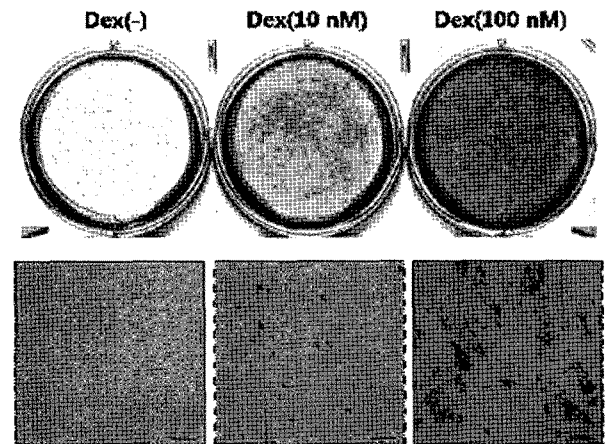


**Fig. 3.** ALP activities in periosteal-derived cells at day 10 of culture. ALP activity was clearly higher in 100 nM dexamethasone-treated cells than in 10 nM dexamethasone-treated cells.

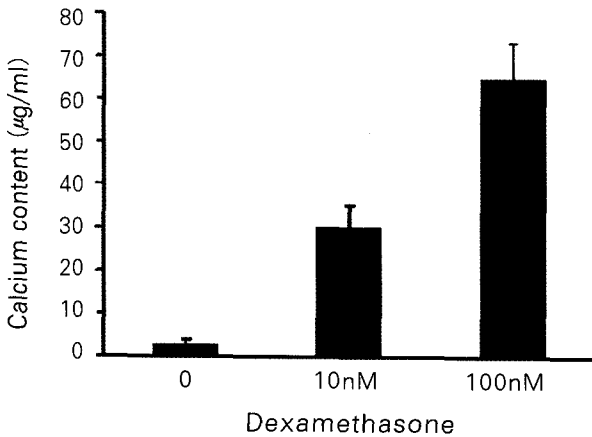
정량적인 칼슘량도 골형성 유도 배지에서 관찰되었으며 그 양상은 von kossa 염색과 유사하게 10 nM의 덱사메타손의 존재하에서 보다 100 nM의 덱사메타손 존재하에서 2.14배 정도 더 증가되었음을 관찰하였다 (Fig. 5).



**Fig. 2.** Histochemical analysis of ALP. ALP-positive periosteal cells are indicated by blue/purple staining. ALP staining was performed at day 10 of culture. ALP was more expressed in 100 nM dexamethasone-treated cells than in 10 nM dexamethasone-treated cells.



**Fig. 4.** *In vitro* mineralization of periosteal-derived cells. Von Kossa staining was performed at day 21 of culture. Von Kossa-positive mineralization nodules appear as dark brown deposits. Von Kossa-positive mineralization deposits were clearly greater in 100 nM dexamethasone-treated cells than in 10 nM dexamethasone-treated cells.



**Fig. 6.** Quantification of calcium content in periosteal-derive cells. Calcium content was examined at day 21 of culture. Calcium content was much higher in 100 nM dexamethasone-treated cells than in 10 nM dexamethasone-treated cells.

#### IV. 총괄 및 고찰

합성 글루코코르티코이드인 덱사메타손은 항염증 효과 및 면역억제 효과를 가지고 있어 관절염이나 피부염과 같은 다양한 염증 질환의 치료에 이용되는 대표적인 약물이다. 그러나 약제에 의하여 우리 신체에 글루코코르티코이드양이 과도할 경우, 골형성의 저하, 칼슘흡수의 억제, 그리고 창상 치유의 지연, 근육 약화, 그리고 감염의 가능성 증대와 같은 부작용을 나타낼 수 있다. 조골세포계통 (osteoblast lineage)은 글루코코르티코이드 수용체 (glucocorticoid receptors)를 가지고 있으므로 그램단위의 치료 용량으로 적용되는 글루코코르티코이드는 골의 흡수를 증가시키고 골형성을 저해하여 결국에는 골격계에서 골밀도의 저하를 가져오게 된다<sup>23-27</sup>. 치료 용량으로 장기간 적용되는 글루코코르티코이드에 의하여 골형성이 저해되는 것과 관련하여 Canalis<sup>4)</sup>는 간엽 줄기세포로부터 조골세포로의 분화는 저해되고, 성숙한 조골세포에서는 세포사 현상이 증가하기 때문이라고 하였다.

현재 조골세포 배양과 관련하여 많은 연구에서 글루코코르티코이드가 조골세포 관련 표현형의 발현에 긍정적인 영향을 미칠 뿐 아니라 골기질 형성 정도를 증가시키는 것으로 보고되고 있지만, 골 전구세포들의 증식과 분화에 미치는 글루코코르티코이드의 효과는 아직도 논란의 대상이 되고 있다. 생체의 배양과 관련하여 다른 결과를 제시하는 보고들이 경쟁적으로 잇따르고 있다. Pereira 등<sup>28)</sup>은 쥐의 두개관에서 채취한 골 전구세포들에 대한 글루코코르티코이드의 효과를 연구하였는데 그들은 골형성 유도 배지가 아닌 곳에서는 글루코코르티코이드가 골 전구세포들의 증식을 감소시켰

고 골형성 유도 배지에서는 골 전구세포들의 조골세포로의 분화를 방해하였다고 보고하였다. 쥐의 골수기질세포의 증식과 분화에 대하여 덱사메타손의 효과를 관찰한 Porter 등<sup>29)</sup>은 덱사메타손의 적용을 중지할 경우, 세포증식 효과를 나타내었으며 지속적인 적용은 조골세포로의 분화를 증진시킨다고 보고하였다. 쥐 두개관의 골 전구세포를 연구한 Igarashi 등<sup>30)</sup>에 의하면 덱사메타손이 적용되지 않을 경우보다 100 nM의 농도로 적용되었을 경우, 세포증식이 증가됨을 관찰하였으며 Runx2/core binding factor alpha 1, osterix, osteocalcin, 그리고 bone sialoprotein과 같은 조골세포 관련 표현형도 100 nM의 농도로 덱사메타손이 적용되었을 경우에 증가됨을 보고하였다. Li 등<sup>31)</sup>은 마우스의 골수기질에서 클로닝한 세포주인 D1의 배양시 덱사메타손의 적용은 골형성으로의 분화 저하 및 지방형성으로의 분화 촉진을 유발한다고 하였다. 특히 초기 조골세포의 표지자로 알려진 Runx2/core binding factor alpha 1의 발현이 고농도의 덱사메타손 존재하에서 매우 약하게 발현됨을 관찰하였다. 이와 같이 실험동물이 유사한 경우에도 상반되는 결과들이 보고되는 것은 덱사메타손이 적용되는 시간, 적용되는 양, 그리고 실험에 사용되는 해당 세포들의 밀도등 여러 가지 요인이 작용한다고 할 수 있을 것이다. 이는 오히려 적절하게 이용될 경우 골 전구세포의 조골세포로의 분화에 긍정적인 효과를 제시할 수 있음을 나타내는 것이라 할 수 있을 것이다<sup>4,9,28-31)</sup>.

골 전구세포를 성숙한 조골세포로 분화시키는 과정을 응용하는 골 조직공학이 지난 십여년 전부터 많이 보고되고 있다. 본 연구에서는 조골세포의 원천으로 치과적으로 국소 마취하에 매복치 발치등을 포함한 일반적인 기술을 통하여 쉽게 채취할 수 있는 골막에서 골막기원세포를 추출하여 분화시켰다. 외래 환자에서 골결손 부위와 상대적으로 덜 관계된 부위에서 국소마취하에 적은양의 골관련 절편을 쉽게 채취하고 이를 통하여 관련 세포를 추출하고 증식시켜며 분화시키는 것이 골조직공학의 본연의 장점을 고려할 때, 구강내 일반적인 기술을 통하여 쉽게 채취할 수 있는 골막에서 골막기원세포를 추출하여 조골세포로 분화시키는 작업은 분명 골 조직공학의 본연의 장점을 충분히 가진다고 할 수 있을 것이다. 조직공학적 방법을 통한 골형성에 있어서 골막기원세포가 가지는 또다른 장점으로는 공여자의 연령이 조골세포로의 기능적 분화에 크게 영향을 미치지 않는다는 점이다. 일반적으로 골결손을 나타내는 연령이 고연령임을 고려할 때, 골수에서 추출한 골수기원줄기세포가 조골세포로 분화되는 능력이 연령에 따라 감소된다는 보고가 있는 반면, 골막에서 추출한 골막기원세포는 공여자의 연령에 상관없이 조골세포로의 분화능력을 유지한다고 알려져 있다. 10 nM의 덱사메타손을 포함하는 골형성 유도 배지에서 골막기원세포가 활동성의 조골세포로 분화되는 과정은

이미 연구에 의하여 보고되었다<sup>9)</sup>.

일반적으로 미분화 간엽 줄기세포 상태에서 기능을 나타내는 활동성 조골세포로의 분화과정은 알칼리성 인산분해효소와 osteocalcin의 발현 및 무기질 침착과 같이 각각의 단계에서 특정 유전인자들이 관여하는 일련의 과정을 통하여 이루어진다. 알칼리성 인산분해효소의 발현은 조골세포로의 분화 초기에 주로 나타나며 osteocalcin의 분비 및 무기질 침착은 조골세포로의 분화 마지막 단계에서 이루어지므로 알칼리성 인산분해효소의 발현은 초기 조골세포 표지자로, osteocalcin의 분비 및 무기질 침착은 만기 조골세포 표지자로 알려져 있다. 여긴다. 무기질 침착과 관련하여서는 von kossa 양성 염색 및 기질내 칼슘의 정량적 측정이 관련된 세포에 의하여 형성된 무기질 정도를 평가하여준다. 본 연구에서도 이러한 점을 고려하여 알칼리성 인산분해효소의 발현은 배양 10일째, 그리고 von kossa 양성 염색 및 기질내 칼슘의 정량적 측정은 배양 21일째에 시행하였다.

본 연구에서는 골막기원세포의 증식 및 분화는 텍사메타손이 포함된 골형성 유도 배지에서 더 활성을 나타내었다. 텍사메타손이 포함된 골형성 유도 배지중에서는 골막기원세포의 증식은 100 nM의 텍사메타손 존재하에서 보다 10 nM의 텍사메타손 존재하에서 뚜렷하였으나 배양 후반기에서는 텍사메타손이 포함된 골형성 유도 배지에서보다 텍사메타손이 포함되지 않은 배지에서 더 증식되는 양상을 나타내었다. 골막기원세포의 조골세포로의 분화과정과 관련하여서는 10 nM의 텍사메타손의 존재하에서 보다 100 nM의 텍사메타손 존재하에서 알칼리성 인산분해효소의 발현 및 그 활성도가 증가되었다. Von kossa 양성 골기질 정도 및 기질내 형성된 칼슘량도 10 nM의 텍사메타손의 존재하에서 보다 100 nM의 텍사메타손 존재하에서 더 증가되었음을 관찰하였다.

나노몰 단위에서 더 다양한 농도의 텍사메타손이 적용되지는 않았지만, 본 연구를 통하여 세포배양과 관련된 일반적인 생리학적 용량으로 적용될 경우, 텍사메타손은 골막기원세포의 분화를 촉진시키는 촉매제로 작용할 수 있음을 관찰하였으며 골막기원세포의 증식은 텍사메타손의 농도에 비례하지 않는 것을 알 수 있다.

## V. 결 론

경상대학교 병원의 윤리위원회를 따르고 환자 동의하에 매복된 하악 제3대구치의 발치과정에서 5 × 20 mm의 골막을 채취하여 일차배양 및 계대배양을 실시하고 passage 3을 거친 골막기원세포를 50µg/ml L-ascorbic acid 2-phosphate, 10 mM β-glycerophosphate, 그리고 다양한 농도 (0, 10, 100 nM)의 텍사메타손이 포함된 골형성 유도 배지에서 21일간 배양하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 골막기원세포는 텍사메타손이 존재하던, 존재하지 않던 배양 16일째까지 증식되는 양상을 나타내었으며 특히 100 nM의 텍사메타손의 존재하에서 보다 10 nM의 텍사메타손 존재하에서 그 증식 양상이 증가되었다. 그러나 배양 16일 이후, 골막기원세포는 텍사메타손이 존재하지 않는 경우에서 더 증식되었다.
2. 10 nM의 텍사메타손의 존재하에서 보다 100 nM의 텍사메타손 존재하에서 골막기원세포에서 발현되는 알칼리성 인산분해효소 및 그 활성도가 증가되었다.
3. Von kossa 양성 골기질 정도 및 골막기원세포에 의하여 형성된 기질내 칼슘의 정량화 정도는 10 nM의 텍사메타손의 존재하에서 보다 100 nM의 텍사메타손 존재하에서 증가된 양상을 나타내었다.

## References

1. Lukert BP, Johnson BE, Robinson RG : Estrogen and progesterone replacement therapy reduces glucocorticoid-induced bone loss. *J Bone Miner Res* 7 : 1063, 1992.
2. Bijlsma JW : Prevention of glucocorticoid induced osteoporosis. *Ann Rheum Dis* 56 : 507, 1997.
3. Weinstein RS, Jilka RL, Parfitt AM *et al* : Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids. Potential mechanisms of their deleterious effects on bone. *J Clin Invest* 102 : 274, 1998.
4. Canalis E : Mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Curr Opin Rheumatol* 15 : 454, 2003.
5. Mikami Y, Omoteyama K, Kato S *et al* : Inductive effects of dexamethasone on the mineralization and the osteoblastic gene expressions in mature osteoblast-like ROS17/2.8 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 362 : 368, 2007.
6. Mankin HJ : Nontraumatic necrosis of bone (osteonecrosis). *N Engl J Med* 326 : 1473, 1992.
7. Weinstein RS, Nicholas RW, Manolagas SC : Apoptosis of osteocytes in glucocorticoid-induced osteonecrosis of the hip. *J Clin Endocrinol Metab* 85 : 2907, 2000.
8. Leboy PS, Beresford JN, Devlin C *et al* : Dexamethasone induction of osteoblast mRNAs in rat marrow stromal cell cultures. *J Cell Physiol* 146 : 370, 1991.
9. Cui Q, Wang GJ, Balian G : Steroid-induced adipogenesis in a pluripotential cell line from bone marrow. *J Bone Joint Surg Am* 79 : 1054, 1997.
10. Atmani H, Audrain C, Mercier L *et al* : Phenotypic effects of continuous or discontinuous treatment with dexamethasone and/or calcitriol on osteoblasts differentiated from rat bone marrow stromal cells. *J Cell Biochem* 85 : 640, 2002.
11. Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI *et al* : Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem* 64 : 295, 1997.
12. Shui C, Spelsberg TC, Riggs BL *et al* : Changes in Runx2/Cbfa1 expression and activity during osteoblastic differentiation of human bone marrow stromal cells. *J Bone Miner Res* 18 : 213, 2003.
13. Sugiyama F, Kitoh H, Ishiguro N : Osteogenic potential of rat mesenchymal stem cells after several passages. *Biochem Biophys Res Commun* 316 : 233, 2004.

14. Kotobuki N, Hirose M, Machida H *et al* : Viability and osteogenic potential of cryopreserved human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Tissue Eng* 11 : 663, 2005.
15. Mao X, Chu CL, Mao Z *et al* : The development and identification of constructing tissue engineered bone by seeding osteoblasts from differentiated rat marrow stromal stem cells onto three-dimensional porous nano-hydroxyapatite bone matrix in vitro. *Tissue Cell* 37 : 349, 2005.
16. Nakahara H, Goldberg VM, Caplan AI : Culture-expanded human periosteal-derived cells exhibit osteochondral potential in vivo. *J Orthop Sci* 9 : 465, 1991.
17. Breitbart AS, Grande DA, Kessler R *et al* : Tissue engineered bone repair of calvarial defects using cultured periosteal cells. *Plast Reconstr Surg* 101 : 567, 1998.
18. Hutmacher DW, Sittlinger M : Periosteal cells in bone tissue engineering. *Tissue Eng* 9(Suppl 1) : S45, 2003.
19. Park BW, Byun JH, Lee SG *et al* : Evaluation of osteogenic activity and mineralization of cultured human periosteal-derived cells. *J Kor Maxillofac Plast Reconstr Surg* 28 : 511, 2006.
20. Park BW, Byun JH, Ryu YM *et al* : Correlation between vascular endothelial growth factor signaling and mineralization during osteoblastic differentiation of cultured human periosteal-derived cells. *J Kor Maxillofac Plast Reconstr Surg* 29 : 197, 2007.
21. Park BW, Hah YS, Kim DR *et al* : Osteogenic phenotypes and mineralization of cultured human periosteal-derived cells. *Arch Oral Biol* 52 : 983, 2007.
22. Park BW, Hah YS, Kim DR *et al* : Vascular endothelial growth factor expression in cultured periosteal-derived cells. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 105 : 504, 2008.
23. Haussler MR, Manolagas SC, Deftos LJ : Glucocorticoid receptor in clonal osteosarcoma cell lines: a novel system for investigating bone active hormones. *Biochem Biophys Res Commun* 94 : 373, 1980.
24. Advani S, LaFrancis D, Bogdanovic E *et al* : Dexamethasone suppresses in vivo levels of bone collagen synthesis in neonatal mice. *Bone* 20 : 41, 1997.
25. Chavassieux P, Buffet A, Vergnaud P *et al* : Short-term effects of corticosteroids on trabecular bone remodeling in old ewes. *Bone* 20 : 451, 1997.
26. Abu EO, Horner A, Kusec V *et al* : The localization of the functional glucocorticoid receptor alpha in human bone. *J Clin Endocrinol Metab* 85 : 883, 2000.
27. Carbonare LD, Arlot ME, Chavassieux P *et al* : Comparison of trabecular bone microarchitecture and remodeling in glucocorticoid-induced and postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res* 16 : 97, 2001.
28. Pereira RM, Delany AM, Canalis E : Cortisol inhibits the differentiation and apoptosis of osteoblasts in culture. *Bone* 28 : 484, 2001.
29. Porter RM, Huckle WR, Goldstein AS : Effect of dexamethasone withdrawal on osteoblastic differentiation of bone marrow stromal cells. *J Cell Biochem* 90 : 13, 2003.
30. Igarashi M, Kamiya N, Hasegawa M *et al* : Inductive effects of dexamethasone on the gene expression of Cbfa1, Osterix and bone matrix proteins during differentiation of cultured primary rat osteoblasts. *J Mol Histol* 35 : 3, 2004.
31. Li X, Jin L, Cui Q *et al* : Steroid effects on osteogenesis through mesenchymal cell gene expression. *Osteoporos Int* 16 : 101, 2005.

#### 저자 연락처

우편번호 660-702  
 경상남도 진주시 칠암동 90번지  
 경상대학교 의학전문대학원 구강악안면외과학교실  
 변준호

원고 접수일 2009년 4월 8일  
 게재 확정일 2009년 7월 24일

#### Reprint Requests

**June-Ho Byun**  
 Dept. of OMFS, Gyeongsang National University School of Medicine, Institute of Health Sciences.  
 90 Chilam-dong, Jinju-city, Gyeongsangnam-do, 660-702, South Korea  
 Tel: 82-55-750-8258 Fax: 82-55-761-7024  
 E-mail : surbyun@gsnu.ac.kr

Paper received 8 April 2009  
 Paper accepted 24 July 2009