

Sodium fluoride와 Sodium orthovanadate가 조골세포주 MC3T3-E1에 미치는 영향에 관한 연구

경희대학교 치과대학 교정학교실

김 원 진 · 정 규 립

목 차

- I. 서 론
- II. 연구재료 및 방법
- III. 연구결과
- IV. 총괄 및 고안
- V. 결 론
- 참고 문헌
- 영문 초록

I. 서 론

교정적 치아이동은 압박측에서는 파골세포가 나타나서 치조골을 흡수시키고 장력측에서는 조골세포가 나타나서 신생골을 첨가시키면서 골내에서 치아가 이동하며 골개조가 일어난다¹⁻³⁾. 골개조의 능력은 초기에 유전자에 의하여 결정되지만 그 정도는 후천성 또는 환경적인 요인에 의하여 영향을 받게되므로^{4,5)} 교정 영역에서 이들세포의 성장, 분화및 대사에 관한 연구는 필수적이라고 할수 있다.

불소는 치아와 골격성장에 필수적인 미량원소로써⁶⁾ 골 다공증 환자에서 골량을 증가시키고⁷⁻⁹⁾, 골밀도를 증가시키며¹⁰⁻¹²⁾, 골절 빈도

를 감소시키는¹³⁻¹⁴⁾ 약물로 알려져 왔으며, 동물실험에서 불소는 조골세포의 능력을 증가시키며 조골세포의 유사분열 촉진 효과가 있고^{15,16)}, 골형성의 기시물(initiator)로써 작용한다고 하였다¹⁷⁾.

실험관내 실험에서 Farley등^{18,19)}은 불소가 embryonic chick 골세포를 직접적으로 증식하는 효과가 있으며 염기성 인산 분해효소의 활성을 촉진한다고 하였고, 인체 골격 성장인자와 상승효과가 있다고 하였다. Wergedal등²⁰⁾은 불소가 인체 골세포와 chick 골세포의 증식을 촉진하고 염기성 인산 분해효소의 활성을 촉진하나 인체 표피 세포, 근육, 간, 신장 세포는 촉진시키지 않아 불소가 골세포에만 특이적으로 작용한다고 하였다. 그러나 Kopp등²¹⁾은 인체 태아 골세포를 이용한 실험에서 불소가 이 세포의 증식을 촉진하는 효과가 없다고 하였으며, Okuda등²²⁾은 불소가 조골세포 뿐아니라 파골세포에 영향을 미쳐 골흡수를 직접적으로 억제한다고 보고하였다.

Vanadium은 결핍시에 동물에서 신체의 성장지연을 야기시키는 미량원소로써⁶⁾ 이를 회복시켜주는 가장 효과적인 형태가 orthovanadate이다²³⁾. Vanadium은 phospholyration과 dephospholyration에 관련된 여러가지

효소, 예를들어 $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$ ^{24~26}, 염기성 인산 분해효소^{27~30}, 산성 인산 분해효소, phosphofructokinase와 adenylate kinase의 활성을 억제시키며²⁷ adenylate cyclase의 활성을 촉진시키는 것³¹으로 알려져있다. Vanadate는 insulin mimic effect를 갖으며^{28,32,33,34}, Nakano mouse의 lens epithelial cell^{24,34}, mouse의 mammary tissue cell³⁵, 인체의 섬유아세포³⁶, Swiss mouse의 fibroblastic 3T3, 3T6세포³⁷등에서 DNA합성을 촉진시키는 것으로 알려져있으며, 근육의 분화에도 관여하는것³⁸으로 보고된바 있다.

Krieger등²⁷은 vanadate가 신생쥐 두개골에서 부갑상선 호르몬, prostaglandin E₂, 1, 25-dihydroxyvitamin D₃등의 촉진제에 의한 골 흡수를 억제한다고 하였으며, Canalís³⁹는 쥐의 두개골을 이용한 실험에서 vanadate가 DNA, 교원질 및 비교원성 단백질의 합성을 촉진한다고 하였고, Lau등⁴⁰은 orthovanadate가 embryonic chick 두개골 세포의 증식을 직접적으로 촉진하는 것이 아니라 배지내의 유사분열 촉진 인자의 존재에 의존하며 유사분열 촉진 작용을 연장 혹은 상승시킴으로써 세포의 증식을 촉진시킨다고 하였다.

이와같이 불소와 vanadate가 골세포의 증식과 활성 및 분화에 영향을 미친다는 사실은 확인되었지만 순수한 조골세포에서의 연구는 미흡하였기 때문에 조골세포 주 MC3T3-E1 세포의 증식과 활성에 이러한 약물이 어떠한 영향을 미치는가를 알아보기 위하여 DNA합성능 검사와 교원질 합성능 검사를 시행하였다.

II. 연구 재료 및 방법

1. 연구재료

본 연구에 사용된 세포는 MC3T3-E1 세포이다. 이는 Kodama등이 신생쥐 (C57BL/6) 두개골에서 분리한 것으로 처음에는 섬유아세포의 형태를 보이고 4-5일 후에 증만된 한개의 세포층을 형성하고 21일째에 전형적인 조골세포의 형태를 갖추며, adult mouse calvaria에

서 발견된 염기성 인산 분해효소 (liver-bone-kidney type)와 같은 형태를 가지며^{41,42}, 1주일간의 배양에서 교원 섬유질을 생산하고 3주일간의 배양에서 침강된 수산화 인회석을 지닌 기질 낭포를 관찰할 수 있어 유사골 기저물질을 광화 시킬수 있는 능력이 있기 때문에^{43,44} 조골세포의 연구에 유용하리라고 생각되어 본 연구의 실험재료로 사용하였다.

2. 세포배양

냉동보관된 MC3T3-E1 세포를 25ml 플라스틱 culture flask (FLOW Lab. Inc)에 10% fetal bovine serum(FBS) (Hyclone Lab. Inc) 및 penicillin 100U/ml와 streptomycin 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 가 포함된 α -minimal essential medium(α -MEM) 10ml에 넣고 37°C 5% CO₂ 배양기에서 3일간 배양하였다. 0.25% trypsin으로 처리하여 세포를 분리 시킨후 hemocytometer를 이용하여 세포수를 확인하여, 분리된 세포를 DNA 합성능 검사에서는 10% FBS가 든 α -MEM에 2×10^4 cells/ml의 농도로 부유시킨후 24well plate(Flow Lab. Inc)에 1ml씩 분주하여 2×10^4 cells/ml가 되도록하였고, 교원질 합성능 검사에서는 10⁵ cells/well의 농도로 6well plate에 분주하였다.

3. DNA 합성능 검사

48시간후에 혈청이 없는 상태에서 sodium fluoride(Sigma, Mol wt 41.99)와 sodium orthovanadate(Sigma, Mol wt 183.9)를 넣지 않은 군을 대조군으로 하고 2, 4, 6, 8, 10 μM 을 각각 첨가한 군을 실험군으로 하여 [³H] thymidine 2 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ (Amersham Co.)를 반응시켰다. 24시간후에 Ca-Mg free phosphate buffered saline (PBS)으로 3회 씻어냈다. 100% methanol 1ml로 1회 고정하고, 증류수로 3회 세척한 후에, 5% trichloroacetic acid(TCA) 0.5ml를 넣고 4°C에서 5분간 보관하였다. 이를 버린후에 공기중에서 건조시키고

1N NaOH 5ml로 세포를 용해시키고 용해액에 scintillation fluid 5ml를 넣고 β -counter (LS 5000, BECKMAN)로 cpm을 측정하였고 이를 14회 반복 시행하였다.

4. 교원질 합성능 검사

10% FBS을 포함한 α -MEM에 5일간 배양 후에 혈청이 없는 상태에서 sodium fluoride와 sodium orthovanadate를 넣지 않은 군을 대조군으로 하고 5, 10 μ M을 각각 첨가한 군을 실험군으로 하여 24시간 후에 3 μ Ci/ml [³H] proline (Amersham Co.)과 sodium ascorbate와 β -aminopropionitrile이 각각 50 μ g 포함된 1ml α -MEM 내에 3시간 동안 반응시켰다. 세포를 긁어 모은 후 세포내의 단백질을 10% TCA와 1% tannic acid를 넣고 3500rpm으로 10분간 원심분리하여 단백질을 침전시킨 후에 상층을 버리고 다시 반복하였다. 냉각된 acetone으로 2회 세척하였다. 침전물을 0.1N NaOH로 용해시키고 10mM CaCl₂ 과 20mM N-ethylmaleimide가 포함된 0.1M Tris-buffer (Ph=7.6) 내에서 37°C에서 1시간 동안 bacterial collagenase (type unspecified, Worthington Co. 100 μ /ml)로 반응시켰다. 다시 10% TCA와 1% tannic acid를 넣고 상층과 하층으로 나뉘면 β -counter로 각각의 cpm을 측정하고 이를 7회 반복 시행하였다.

5. 통계처리

DNA합성능 검사에서의 측정치는 대조군에 대하여 percent로 환산하였고, 교원질합성의 percent는 Peterkofsky 방법에 의해⁴⁵⁾ 비교도수로 환산하였다. 모든 측정치는 SAS package program 중 Student t-test를 이용하여 대조군에 대하여 평균치 차이와 이의 유의성을 검정하였다.

III. 연구 결과

1. DNA 합성능 검사

Sodium fluoride는 대조군에 비하여 2 μ M에서 127.61 \pm 27.46% (P<0.005), 4 μ M에서 150.63 \pm 50.43% (P<0.005), 6 μ M에서 159.15 \pm 63.65% (P<0.005), 8 μ M에서 179.66 \pm 96.89% (P<0.005), 10 μ M에서 192.00 \pm 95.27% (P<0.005)를 나타내어 10 μ M까지 농도가 증가함에 따라 DNA 합성도 증가하였고, 10 μ M에서 최대의 합성 촉진 효과를 나타내었으며 (Table 1, Fig. 1.), sodium orthovanadate는 대조군에 비하여 2 μ M에서 157.57 \pm 48.13% (P<0.001), 4 μ M에서 170.84 \pm 48.98% (P<0.001), 6 μ M에서 185.03 \pm 59.47% (P<0.001), 8 μ M에서 202.26 \pm 66.15% (P<0.001), 10 μ M에서 179.48 \pm 42.35% (P<0.001)를 나타내어 8 μ M까지는 농도가 증가함에 따라 DNA 합성도 증가하였으며, 8 μ M에서 최대의 합성 촉진 효과를 나타내었고 10 μ M에서는 감소하였다 (Table 2, Fig. 2.)

Table 1. The effects of sodium fluoride on the stimulation of DNA synthesis in osteoblast (MC3T3-E1) cells

Sodium fluoride (μ M)	[³ H] Thymidine incorporation (% of control)	P
No addition	100.00 \pm 00	
2	127.61 \pm 27.46	< 0.005
4	150.63 \pm 50.43	< 0.005
6	159.15 \pm 63.65	< 0.005
8	179.66 \pm 96.89	< 0.005
10	192.00 \pm 95.27	< 0.005

Each data represents the means \pm SD of fourteen replicates. MC3T3-E1 cells were cultured 2 days and treated with 2, 4, 6, 8, 10 μ M sodium fluoride. Cells were pulsed with [³H] thymidine for the last 24h of the culture period. Significance level was calculated from comparison with control.

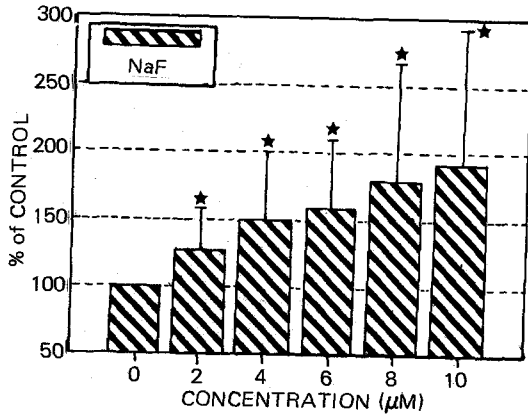


Fig. 1. The effects of sodium fluoride on the incorporation of [³H] thymidine into DNA in osteoblast (MC3T3-E1 cells). Vertical lines represent the SD of fourteen replicates. MC3T3-E1 cells cultured 2 days and treated with sodium fluoride. Cells were pulsed with [³H] thymidine for the last 24h of the culture period.

* Significantly different from control (p < 0.005).

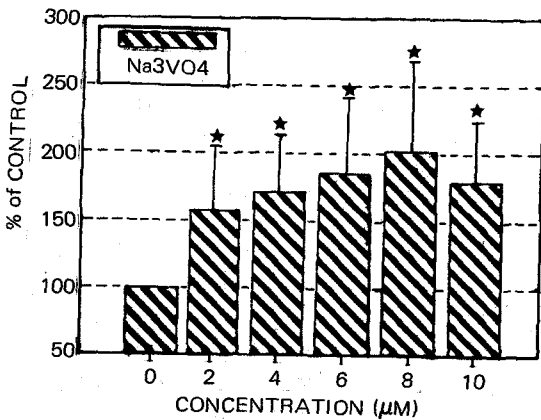


Fig. 2. The effects of sodium orthovanadate on the incorporation of [³H] thymidine into DNA in osteoblast (MC3T3-E1 cells). Vertical lines represent the SD of fourteen replicates. MC3T3-E1 cells cultured 2 days and treated with sodium orthovanadate. Cells were pulsed with [³H] thymidine for the last 24h of culture period.

* Significantly different from control (P < 0.001).

Table 2. The effects of sodium orthovanadate on the stimulation of DNA synthesis in osteoblast (MC3T3-E1 cells)

Sodium orthovanadate (μM)	[³ H] Thymidine incorporation (% of control)	P
No addition	100.00 ± 00	
2	157.57 ± 48.13	< 0.001
4	170.84 ± 48.98	< 0.001
6	185.03 ± 59.47	< 0.001
8	202.26 ± 66.15	< 0.001
10	179.48 ± 42.35	< 0.001

Each data represents the means ± SD of fourteen replicates. MC3T3-E1 cells were cultured 2 days and treated with 2, 4, 6, 8, 10 μM sodium orthovanadate. Cells were pulsed with [³H] thymidine for the last 24h of the culture period. Significance level was calculated from comparison with control.

2. 교원질 합성능 검사

총 단백질 생성량중 sodium fluoride의 교원질 합성 비율은 대조군에서 10.96 ± 3%, 5 μM에서 12.17 ± 4% (P < 0.001), 10 μM에서 14.41 ± 5% (P < 0.001)를 나타내어 10 μM까지 농도가 증가 함에 따라 교원질 합성도 촉진 되었으며, 10 μM에서 최대의 합성 촉진을 나타내었다 (Table 3, Fig. 3.). 총 단백질 생성량중 sodium orthovanadate의 교원질 합성 비율은 대조군에서 10.96 ± 3%, 5 μM에서 12.19 ± 3% (P < 0.001), 10 μM에서 13.87 ± 5% (P < 0.001)를 나타내어 10 μM까지 농도가 증가함에 따라 교원질 합성도 촉진 되었으며, 10 μM에서 최대의 합성 촉진을 보였다 (Table 4, Fig. 4.).

Sodium fluoride의 비 교원성 단백질의 합성은 대조군에 비하여 5 μM에서 213.96 ± 9.24% (P < 0.001), 10 μM에서 264.45 ± 5.92% (P < 0.001)를 나타내어 10 μM까지 농도가 증가함에 따라 비교원성 단백질의 합성도 증가 하였으며 (Fig. 5.), sodium orthovanadate의 비 교원성 단백질의 합성은 대조군에 비하여 5

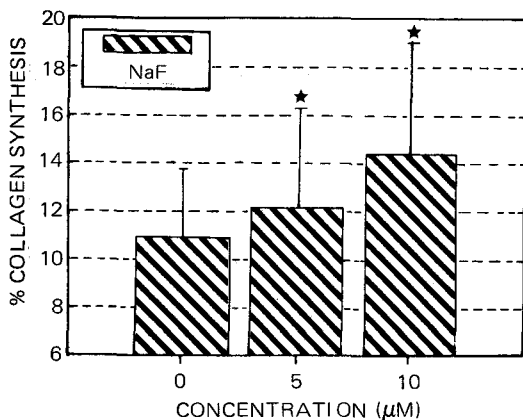


Fig. 3. The effects of sodium fluoride on the stimulation of percent collagen synthesis in osteoblast (MC3T3-E1 cells). Vertical lines represent the SD of seven replicates. MC3T3-E1 cells were cultured 5 days and treated with sodium fluoride. Cells were pulsed with [³H] proline for the last 3h of the culture period. Percent collagen synthesis were corrected for the relative abundance of proline in CDP and NCP. * Significantly different from control (P < 0.001).

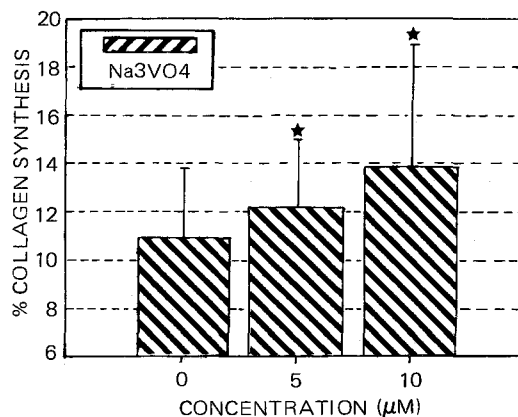


Fig. 4. The effects of sodium orthovanadate on the stimulation of percent collagen synthesis in osteoblast (MC3T3-E1 cells). Vertical lines represent the SD of seven replicates. MC3T3-E1 cells were cultured 5 days and treated with sodium orthovanadate. Cells were pulsed with [³H] proline for the last 3h of the culture period. Percent collagen synthesis were corrected for the relative abundance of proline in CDP and NCP. * Significantly different from control (P < 0.001).

Table 3. The effects of sodium fluoride on the stimulation of collagen synthesis in osteoblast (MC3T3-E1 cells)

Sodium fluoride (µM)	CDP (cpm/well)	NCP (cpm/well)	PCS (%)
No addition	1349.43 ± 18.57	2030.86 ± 61.90	10.96 ± 3.00
5	3249.86 ± 136.14*	4345.14 ± 187.70*	12.17 ± 4.00*
10	4892.71 ± 218.81*	5370.57 ± 120.28*	14.41 ± 5.00*

Each data represents the means ± SD of seven replicates. MC3T3-E1 cells cultured 5 days and treated with 5, 10 µM sodium fluoride. Cells were pulsed with [³H] proline for the last 3h of the culture period. The percent collagen synthesis were corrected for the relative abundance of proline in CDP and NCP.

CDP : collagenase digestible protein

NCP : noncollagen protein

PCS : percent collagen synthesis

* Significantly different from control (P < 0.001).

Table 4. The effects of sodium orthovanadate on the stimulation of collagen synthesis in osteoblast (MC3T3-E1 cells)

Sodium orthovanadate (μM)	CDP (cpm/well)	NCP (cpm/well)	PCS (%)
No addition	1349.43 \pm 18.57	2030.86 \pm 61.90	10.96 \pm 3.00
5	3232.29 \pm 213.57*	4313.86 \pm 239.82*	12.19 \pm 3.00*
10	4768.71 \pm 466.95*	5491.86 \pm 366.91*	13.87 \pm 5.00*

Each data represents the means \pm SD of seven replicates. MC3T3-E1 cells cultured 5 days and treated with 5, 10 μM sodium orthovanadate. Cells were pulsed with [^3H] proline for the last 3h of the culture period. The percent collagen synthesis were corrected for the relative abundance of proline in CDP and NCP.

CDP : collagenase digestible protein

NCP : noncollagen protein

PCS : percent collagen synthesis

* Significantly different from control ($P < 0.001$).

μM 에서 $212.42 \pm 11.8\%$ ($P < 0.001$), $10 \mu\text{M}$ 에서 $270.42 \pm 18.07\%$ ($P < 0.001$)를 나타내어 $10 \mu\text{M}$ 까지 농도가 증가함에 따라 비교원성 단백질의 합성도 증가하였다 (Fig. 6.).

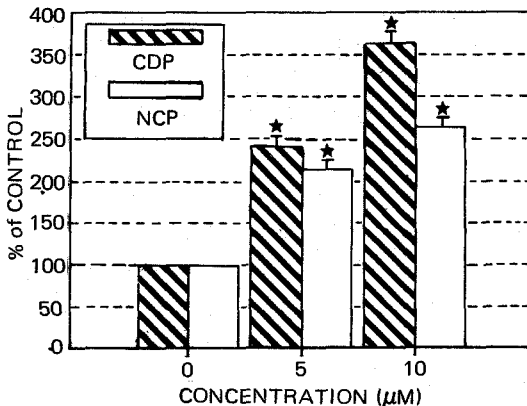


Fig. 5. The effects of sodium fluoride on the incorporation of [^3H] proline into CDP and NCP in osteoblast (MC3T3-E1 cells). Vertical lines represent the SD of seven replicates. MC3T3-E1 cells were cultured 5 days and treated with sodium fluoride. Cells were pulsed with [^3H] proline for the last 3h of the culture period.

* Significantly different from control ($P < 0.001$).

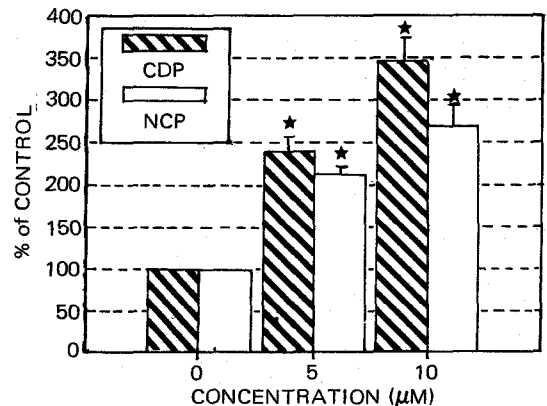


Fig. 6. The effects of sodium orthovanadate on the incorporation of [^3H] proline into CDP and NCP in osteoblast (MC3T3-E1 cells). Vertical lines represent the SD of seven replicates. MC3T3-E1 cells were cultured 5 days and treated with sodium orthovanadate. Cells were pulsed with [^3H] proline for the last 3h of the culture period.

* Significantly different from control ($P < 0.001$).

IV. 총괄 및 고안

골기질의 합성과 광화에 의해 이루어지는 골형성은 많은 세포들이 관여하는 복잡한 과정이며, 골형성과 흡수는 이들 세포의 능력과 수의 변화에 의하여 결정된다.

골대사에 영향을 미치는 물질에는 전신적 호르몬으로 부갑상선 호르몬⁴⁶⁾, 비타민 D⁴⁷⁾, estrogen and androgen⁴⁸⁾, insulin⁴⁹⁾, 갑상선 호르몬⁵⁰⁾과 glucocorticoid⁵¹⁾ 등이 있으며, 국소적 성장인자에는 transforming growth factor β ⁵²⁾, bone derived growth factor⁵³⁾, insulin like growth factor⁵⁴⁾, cartilage derived growth factor⁵⁵⁾, bone morphogenic protein⁵⁶⁾, epidermal growth factor⁵⁷⁾, skeletal growth factor^{58,59)}, interleukine 1⁶⁰⁾, prostaglandin⁶¹⁾와 platelet-derived growth factor⁶²⁾ 등이 있고, 칼슘 통로 차단제⁶³⁾, 불소와 vanadate 등의 여러가지 약물들이 영향을 미치는 것으로 알려져 왔다.

본 실험에서는 sodium fluoride와 sodium orthovanadate가 조골세포의 증식에 어떠한 영향을 미치는가를 알아보기 위하여 DNA 합성 촉진에 의한 성장촉진능 검사를 시행하였다.

Farley 등¹⁸⁾은 분리된 embryonic chick 두개골 세포와 조직 배양을 이용한 실험에서 불소가 임상적으로 유용한 농도에서 [³H] thymidine incorporation, 세포수와 염기성 인산 분해효소의 활성을 증가시킨다고 보고하였다. 그러나 Kopp 등²¹⁾은 불소가 사람 태아 골세포에 대해 혈청 혹은 혈청이 없는 여러가지 배양 조건에서 이들 세포의 증식 비율을 변화시키지 못한다고 하였다. 본 실험에서는 sodium fluoride가 MC3T3-E1 세포의 DNA 합성을 촉진시켜주었는데 이와같이 Kopp 등²¹⁾의 연구와 다른 결과를 나타낸 이유는 다른 종류의 세포를 사용하였기 때문이라고 사료된다. 즉 Farley 등¹⁹⁾은 불소가 골막이 없는 골에서 분리한 골세포보다는 골막의 세포에서 훨씬 많은 [³H] thymidine incorporation의 증가를 보였기 때문에 불소가 분화된 세포 보다는 미

분화 골전구세포에 더 많은 효과를 나타낸 것이라고 하였으며, Bellow 등⁶⁴⁾은 불소가 태생 쥐 두개골을 이용한 실험에서 골전구세포의 증식을 촉진한다고 하였기 때문에 Kopp 등²¹⁾이 골막이 없는 골에서 분리한 세포를 이용한 실험에서는 분화된 조골세포가 많았기 때문에 증식의 촉진을 볼수없다고 사료되며, 본 연구에서 사용한 세포 역시 성숙된 조골세포라기 보다는 미분화된 조골세포가 많이 포함되어 있기 때문에 이러한 결과가 나왔다고 사료된다.

또한 Farley 등⁶⁵⁾은 embryonic chick 두개골 세포를 이용한 실험에서 신선한 배지내에서는 불소가 [³H] thymidine incorporation의 증가를 보여주지 못하였으나 overnight cell incubation에 의해 얻어진 조건배지 내에서는 10 μ M에서 대조군에 비하여 200% 이상의 증가를 보였고, 다른 skeletal effector 즉, insulin, insulin like growth factor-1, calcitonin, 부갑상선 호르몬등과의 반응에서 상승 작용을 한다고 하였으며, 1, 25(OH)₂D와 의 반응에서 억제 작용을 한다고 보고하였고, 인산이온 농도 증가에 따라서 [³H] thymidine incorporation의 증가를 보여줌으로써 불소가 직접적으로 골세포에 증식 효과를 나타내기 보다는 여러가지 전신적, 국소적 인자의 존재에 의존하여 이들 골세포 유사분열 촉진인자의 활성을 증가시킴으로써 골세포의 증식을 촉진시킨다고 하였다. 그러나 본 연구에서는 혈청내의 다른인자들의 영향을 최대한 배제하고자 배양액 내에서 혈청을 완전히 제거한후 실험을 한 결과 Farley 등⁶⁵⁾의 연구와는 달리 신선한 배지에서도 sodium fluoride가 조골세포의 DNA 합성을 촉진시켰으므로 불소가 조골세포의 증식에 다른인자와 상호작용없이도 증식을 촉진하는 효과가 있다고 사료된다. Farley 등^{7,10)}은 불소가 대부분의 환자에서는 반응하였으나 개인차이를 보였으며, axial skeleton에만 반응하고 요골(radial bone)의 양은 증가하지 않는다고 하였으나, Schulz 등⁶⁶⁾은 불소가 하중을 받는 골격뿐 아니라 부수적인 골격에도 효과를 보인다고 하였다. 즉 골에 대한 불소의 효과는 선천성 혹은 후천성에 기인한 개인차이

와 어떤 골로 부터 분리된세포를 사용하였으나
에 의존한다고 사료된다.

Krieger 등²⁷⁾은 신생쥐 두개골을 이용한 실험에서 vanadate가 부 갑상선 호르몬, prostaglandin E₂, 1,25-dihydroxyvitamine 등에 의한 촉진된 골흡수를 억제시킨다고 하였으며, vanadate를 처음에 첨가하거나 골흡수 촉진제 첨가후 24시간에 첨가하더라도 촉진된 칼슘 유리는 완전히 방해된다고 하였고, 칼슘 유리의 억제는 Na⁺/K⁺ ATPase, Ca ATPase의 억제에 의한 결과라고 하였다. Canalis³⁹⁾는 태생 쥐 두개골을 이용한 실험에서 sodium orthovanadate가 10 μ M에서 골막이 없는 두개골보다 섬유아세포나 전구세포가 풍부한 골막이 있는 두개골에서 보다 많은 [³H] thymidine incorporation의 증가를 보여줌으로써 골전구세포의 증식이 2차적으로 조골세포의 수를 증가시킬 수 있다고 하였다. Lau 등⁴⁰⁾은 embryonic chick 두개골 세포를 이용한 실험에서 orthovanadate가 신선한 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) 내에서는 [³H] thymidine incorporation의 증가를 보여주지 않고 오히려 10 μ M에서는 감소하였으나 overnight cell incubation에 의해 얻어진 조건 배지 내에서는 증가를 보여줌으로써 orthovanadate가 조건배지 내의 골세포 유사분열 촉진인자의 존재에 의존하여 골세포의 증식에 관여하며, 이러한 골세포 유사분열 촉진인자의 작용을 연장 혹은 상승 시킨다고 하였다.

본 실험에서는 sodium orthovanadate가 MC3T3-E1세포의 DNA 합성을 촉진시킴으로써 sodium orthovanadate도 역시 분화가 많이 된 조골세포 보다는 미분화된 조골세포의 증식에 영향을 미친다는 것을 알수 있었으며, Lau 등⁴⁰⁾의 연구와는 달리 혈청이 없는 신선한 배지내에서도 [³H] thymidine incorporation의 증가를 보여줌으로써 sodium orthovanadate가 골세포 유사분열 촉진인자와의 상호 작용없이 조골세포의 증식을 촉진 할수 있다고 사료된다.

불소와 vanadate의 골 세포 증식에 대한 자세한 작용기전은 명백히 알려져 있지 않지만

여러가지 성장인자가 직접 세포막의 수용기에 작용해서 단백질 카이네이스를 촉진 시키면서 세포의 증식을 촉진하는 반면에 불소는 osteoblastic acid phosphatase like phosphotyrosyl protein phosphatase를 억제 시킴으로써^{67,68)} 골세포의 증식을 촉진시키며, vanadate는 phosphotyrosyl protein phosphatase를 억제시킴으로써 골세포의 증식을 촉진한다고 알려져 왔다^{69~71)}. 이렇게 불소와 vanadate의 골세포의 증식을 촉진시키는 기전은 유사하나 불소는 골세포에 특이적이지만 vanadate는 골세포에만 특이적으로 작용하는 것이 아니라는 것을 알수 있다.

골은 광화된 특수결합조직으로 유기기질의 대부분은 교원질로 구성되어 있으며, 특히 2개의 α_1 (I) 사슬과 1개의 α_2 (I) 사슬로 구성된 제 1형 교원질이 대부분을 차지하며⁷²⁾, 나머지는 osteocalcin, osteonectin 등의 비교원성 단백질로 구성되어 있어 이들의 합성 촉진은 골기질의 증가를 의미한다고 할수 있다.

본 실험에서는 sodium fluoride와 sodium orthovanadate가 교원질 합성을 촉진하는가를 알아보기 위하여 collagenase digestible protein과 비교원성 단백질에 [³H] proline incorporation을 시행하였다.

Farley 등¹⁸⁾은 embryonic chick 두개골을 이용한 실험에서 불소가 [³H] hydroxyproline incorporation을 증가시킨다는 것을 보고하였으며, Dandona 등⁷³⁾은 정상인에서 불소가 조골세포에 의해 분비되는 주요 비 교원성 단백질인 osteocalcin의 농도를 단기간에 증가 시킴으로써 조골세포의 활성을 증가시킨다고 하였고, Slivastava 등⁷⁴⁾은 fluorosis 환자에서 osteocalcin의 농도가 현저히 증가됨을 보고하였다. Lau 등⁴⁰⁾은 embryonic chick 두개골 세포를 이용한 실험에서 [³H] proline incorporation과 [³H] hydroxyproline incorporation의 비율을 통해서 sodium fluoride가 10 μ M에서 교원질 합성을 촉진한다고 하였다. 본 실험에서는 sodium fluoride가 10 μ M까지 농도가 증가함에 따라 총 단백질의 합성중 교원질의 합성비율을 증가시키고 비교원성 단백질의 합성을 촉

진 시킴으로써 sodium fluoride가 유사분열 촉진농도에서 조골세포의 교원질 및 비교원성 단백질의 합성을 촉진시킴을 알 수 있었다.

Lau 등⁴⁰⁾은 두개골 배양에서 골형성에 대한 vanadate의 효과를 보기 위하여 [³H] proline incorporation이 [³H] hydroxyproline incorporation으로 전환되는 비율을 평가하여 10 μM에서 현저한 증가를 보여 vanadate의 유사분열 촉진 농도에서 골 교원질 합성을 촉진한다고 하였으며, Canalis³⁹⁾는 태생 쥐 두개골을 이용한 실험에서 sodium vanadate가 비교원성 단백질, collagenase digestible protein과 교원질 합성비율을 증가시키며 고농도(100 μM)에서는 비가역적 억제 효과를 갖는다고 하였으며, sodium vanadate는 선택적으로 제 1형 교원질 합성을 한다고 하였다. 본 실험에서는 sodium orthovanadate가 10 μM까지 농도가 증가함에 따라 총 단백질의 합성 중 교원질의 합성비율을 증가시키고 비교원성 단백질의 합성을 촉진시킴으로써 sodium orthovanadate가 유사분열 촉진농도에서 조골세포의 교원질 및 비교원성 단백질의 합성을 촉진시킴을 알 수 있었다. 선학들의 연구에서는 불소와 vanadate가 교원질 합성에 영향을 미치는지를 알아보기 위하여 조직배양을 이용하였으며 순수한 조골세포에 직접적인 영향을 미치는지는 연구가 미흡하였다. 본 연구에서는 sodium fluoride와 sodium orthovanadate가 순수한 조골세포에서 10 μM까지 농도가 증가함에 따라 교원질 및 비교원성 단백질의 합성이 증가하였으며 10 μM에서 최대의 합성 촉진효과를 보여줌으로써 sodium fluoride와 sodium orthovanadate가 조골세포의 활성화에 영향을 미친다는 것을 알 수 있었다.

결론적으로 sodium fluoride와 sodium orthovanadate가 조골세포의 DNA 합성과 교원질 및 비교원성 단백질의 합성을 촉진시킴으로써 조골세포의 증식과 활성화에 영향을 미친다는 것을 알 수 있었다.

임상적으로 골 다공증의 치료제로 알려져 있던 불소는 골량은 증가시키지만 fluorapatite crystal의 형성에 의해 광화가 연기되

며⁷⁵⁾ torsion resistance를 감소시키고⁷⁶⁾ 기계적 강도가 감소되는⁷⁷⁾ 골 연화증을 야기시킬 수 있다는 점이 보고되고 있어^{78~82)} 불소가 골의 광화에 어떠한 영향을 미치는지와 조골세포의 분화에 미치는 영향에 대한 연구가 더 필요하다고 생각되며, vanadate는 골세포 증식에 대한 효과적인 양의 범위가 좁고 고농도에서는 세포의 독작용 때문에^{39,40)} 임상적 적용은 매우 제한되어져왔기 때문에 이의 안정된 유도체의 개발이 필요하며 in vivo에서의 연구가 더 필요하다고 사료된다.

V. 결 론

Sodium fluoride와 sodium orthovanadate가 조골세포 (MC3T3-E1)의 증식과 활성화에 어떠한 영향을 미치는지를 알아보기 위하여 MC3T3-E1 세포를 10% fetal bovine serum이 포함된 α-minimal essential medium에서 배양 후에 혈청이 없는 상태에서 sodium fluoride와 sodium orthovanadate를 첨가하지 않은 군을 대조군으로 하고 여러가지 농도의 sodium fluoride와 sodium orthovanadate를 첨가한 군을 실험군으로 하여 DNA에 [³H] thymidine incorporation을 시행하여 DNA 합성능 검사를 하였고, collagenase digestible protein과 비교원성 단백질에 [³H] proline incorporation을 시행하여 교원질 합성능 검사를 하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. Sodium fluoride는 2 μM에서 10 μM까지 농도가 증가함에 따라 DNA 합성을 유의성 있게 촉진시켰다 (P<0.005).
2. Sodium orthovanadate는 2 μM에서 8 μM까지는 농도가 증가함에 따라 DNA 합성을 유의성 있게 촉진시키나 10 μM에서는 감소하였다 (P<0.001).
3. Sodium fluoride와 sodium orthovanadate는 10 μM까지 농도가 증가함에 따라 유의성 있게 교원질 합성을 촉진시켰다 (P<0.001).
4. Sodium fluoride와 sodium ortho

ovanadate는 10 μ M까지 농도가 증가함에 따라 유의성 있게 비 교원성 단백질의 합성을 촉진시켰다 (P<0.001).

결론적으로 sodium fluoride와 sodium orthovanadate는 실험관 내에서 조골세포의 DNA 합성과 교원질 합성 및 비 교원성 단백질의 합성을 촉진시킴으로써 조골세포의 증식과 활성화에 영향을 미친다고 사료된다.

REFERENCES

1. Reitan, K.: Tissue behavior during orthodontic tooth movement, *Am. J. Orthod.* 46:881-900, 1960.
2. Kvam, E.: Scanning electron microscopy of tissue changes in the pressure surface of human premolar following tooth movement, *Scan. J. Dent. Res.*, 80:357-368, 1972.
3. Reitan, K.: Biomechanical principle and reactions. In current orthodontic principles and techniques. ed by Graber, T.M., W.B. Saunders, Philadelphia, pp. 56-159, 1969.
4. Miller, S.C.: Hormonal regulation of osteogenesis, in *The biological mechanism of tooth eruption and root resorption.* ed by Davidovich, Z., EBSCO Media, Birmingham, pp. 71-79, 1988.
5. Canalis, E., McCarthy T., Centrella M.: The regulation of bone formation by local growth factors, *Bone. Min. Res.* /6. ed. by Peck, W.A., Elsevier Science Publishers B.V., pp. 27-56, 1989.
6. Mertz, W.: The essential trace elements, *Science*, 213:1332-1338, 1981.
7. Farley, S.M.G., Wergedal, J.E., Smith, L.C., Lundy, M.W., Farley, J.R. and Baylink, D.J.: Fluoride therapy for osteoporosis: Characterization of the skeletal response by serial measurement of serum alkaline phosphatase activity, *Metabolism.* 36(3): 211-218, 1987.
8. Lawrence, B., Hodgson, S.F., Hoffman, D.L., Kelly, P.J., Johnson, K.A. and Taves, D.: Treatment of primary osteoporosis with fluoride and calcium, *JAMA.* 243:446-449, 1980.
9. Baylink, D.J. and Bernstein, D.S.: The effect of fluoride therapy on metabolic bone disease, *Clin. Orthop. Rel. Res.*, 55: 51-85, 1967.
10. Baylink, D.J., Farley, S.M. and Smith, L.: Characterization of skeletal response to fluoride in osteoporosis, *Clin. Res.* 31: 543A, 1983.
11. Rich, C. and Ensinok, J.: Effect of sodium fluoride on calcium metabolism of human beings, *Nature.* 191:184-185, 1961.
12. Farley, S.M.G., Libanati, C.R., Marianomenz, M.R., Tadtud-Hans, L.A., Schulz, E.E. and Baylink, D.J.: Fluoride therapy for osteoporosis promotes a progressive increase in spinal bone density, *J. Bone. Min. Res.*, 5 [Suppl 1]: S37-S42, 1990.
13. Riggs, B.L., Seeman, E., Hodgson, S.F., Taves, D.R. and O'Fallon, W.M.: Effect of the fluoride calcium regimen on vertebral fracture occurrence in postmenopausal osteoporosis, *N. Engl. J. Med.* 306:446-450, 1982.
14. Briancon, D. and Meunier, P.J.: Treatment of osteoporosis with fluoride, calcium and Vitamin D, *Orthop. Clin. North. Am.* 12: 629-648, 1981.
15. Turner, R.T., Francis, R., Brown, D., Garand, J., Hannon, K. and Bell, N.H.: The effect of fluoride on bone and implant histomorphometry in growing rats, *J. Bone.*

- Min. Res. 4(4):477-484, 1989.
16. Chavassieux, P.: Bone effect of fluoride in animal models in vitro, *J. Bone. Min. Res.* 5 (Suppl 1): S95-S100, 1990.
 17. Hall, B.K.: Sodium fluoride as an initiator of osteogenesis from embryonic mesenchyme in vitro, *Bone.* 8(2):111-116, 1987. (Abstract)
 18. Farley, J.R., Wergedal, J.E. and Baylink, D.J.: Fluoride directly stimulates proliferation and Alkaline phosphatase activity of bone forming cells, *Science.* 222:330-332, 1983.
 19. Farley, J.R., Tarbaux, N.M., Vermeiden, J.P.W. and Baylink, D.J.: In vitro evidence that local and systemic skeletal effectors can regulate [³H]-thymidine incorporation in chick calvarial cell cultures and modulate the stimulatory action(s) of embryonic chick bone extract, *Calcif. Tissue. Int.* 42: 23-33, 1988.
 20. Wergedal, J.E., Lau, K.H.W. and Baylink, D.J.: Fluoride and bovine bone extract influence cell proliferation and alkaline phosphatase activities in human bone cell cultures, *Clin. Orthop. Rel. Res.*, 233: 274-282, 1988.
 21. Kopp, J.B. and Gheron Robey, P.: Sodium fluoride lacks mitogenic activity for fetal human bone cells in vitro, *J. Bone. Min. Res.*, 5 (Suppl 1): S137-S142, 1990.
 22. Okuda, A., Kanehisa, J., and Heersch, J.N.M.: The effect of sodium fluoride on the resorptive activity of isolated osteoclasts, *J. Bone. Min. Res.* 5 (Suppl 1): S115-S120, 1990.
 23. Schwarz, K. and Milne, D.B.: Growth effects of vanadium in the rats, *Science*, 174:426-428, 1971.
 24. Jones, T.R. and Reid, T.W.: Sodium ortho-vanadate stimulation of DNA synthesis in Nakano mouse lens epithelial cells in serum free medium, *J. Cell. Physiol.* 121: 199-205, 1984.
 25. Macara, I.G.: Vanadium-an element in search of a role, *Trends. Biochem. Sci.* 5:92-94, 1980.
 26. Dubyak, G.R. and Kleinzeller, A.: The insulin-mimetic effects of vanadate in isolated rat adipocytes, *J. Biol. Chem.* 255: 5306-5312, 1980.
 27. Krieger, N.S., and Tashjian, A.H.: Inhibition of stimulates bone resorption by vanadate. *Endocrinology.* 113:324-328, 1983.
 28. Simon, T.J.B.: Vanadate-a new tool for biologist, *Nature.* 281:337-338, 1979.
 29. Cantley, L.C. and Aisen, P.: The fate of cytoplasmic vanadium, *J. Biol. Chem.* 254 (6):1781-1784, 1979.
 30. Register, T.C. and Wuther, R.E.: Effect of vanadate a potent alkaline phosphatase inhibitor, on ⁴⁵Ca and ³²Pi uptake by matrix vesicle-enriched fractions from chicken epiphyseal cartilage, *J. Biol. Chem.* 259(6):3511-3518, 1984.
 31. Schwabe, U., Puchstein, C., Hannemann, H. and Sochtig, E.: Activation of adenylate cyclase by vanadate, *Nature.* 277:143-145, 1979.
 32. Degani, H., Gochin, M., Karlsh, S.T.D. and Shechter, Y.: Electron paramagnetic resonance studies and insulin like effects of vanadium in rat adipocytes, *Biochemistry.* 20:795-5799, 1981.
 33. Shechter, Y. and Karlsh, S.T.D.: Insulin-like stimulation of glucose oxidation in rat adipocytes by vanadyl ions, *Nature.* 284: 556-558, 1980.
 34. Gentlman, S., Reid, T.W. and Martensen,

- T.M.: Vanadate stimulation of phosphotyrosine protein levels in quiescent Nakano mouse lens cells, *Ep. eye. Res.* 44:587-594, 1987.
35. Hori, C. and Oka, T.: Vanadate enhances the stimulatory action of insulin on DNA synthesis in cultured mouse mammary gland, *Biochem. Biophys. Acta.* 610:235-240, 1980.
 36. Carpenter, G.: Vanadate epidermal growth factor and the stimulation of DNA synthesis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 102:1115-1121, 1981.
 37. Smith, J.B.: Vanadium ions stimulate DNA synthesis in Swiss mouse 3T3 and 3T6 cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80:6162-6166, 1983.
 38. Wice, B., Milbraudt, J. and Glaser, L.: Control of muscle differentiation in BC3H1 cells by fibroblast growth factor and vanadate, *J. Biol. Chem.* 262:1810-1817, 1987.
 39. Canalis, E.: Effects of sodium vanadate on deoxyribonucleic acid and protein synthesis in cultured rat calvariae, *Endocrinology.* 116(3) 855-856, 1985.
 40. Lau, K.H.W., Tanimoto, H. and Baylink, D.J.: Vanadate stimulate bone cell proliferation and bone collagen synthesis in Vitro, *Endocrinology,* 123:2858-2867, 1988.
 41. Nakatani, Y., Tsunoi, M., Hakeda, Y., Kurihara, N., Fujita, K. and Kumegawa, M.: Effect of parathyroid hormone on cAMP production and alkaline phosphatase activity in osteoblastic clone MC3T3-E1 cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 123(3): 894-898, 1984.
 42. Kumegawa, M., Ikeda, E., Tanaka, S., Haneji, T., Yora, T., Sakagishi, Y., Minami, N. and Hiramatsu, M.: The effects of prostaglandin E₂, parathyroid hormone, 1, 25 dihydroxycholecalciferol, and cyclic nucleotide analogs on alkaline phosphatase activity in osteoblastic cell, *Calcif. Tissue. Int.* 36:72-76, 1984.
 43. Shima, M., Seino, Y., Tanaka, H., Kurose, H., Ishida, M., Yabuuchi, H. and Kodama, H.: Microcarrier facilitate mineralization in MC3T3-E1 cells, *Calcif. Tissue. Int.* 43: 19-25, 1988.
 44. Sudo, H., Kodama, H.A., Amagai, Y., Yamamoto, S. and Kasai, S.: In vitro differentiation and calcification in a new clonal osteogenic cell line derived from newborn mouse calvaria, *J. Cell. Biol.* 96(1):191-198, 1983.
 45. Peterkofsky, B.: The effect of ascorbic acid collagen polypeptide synthesis and proline hydroxylation during the growth of cultured fibroblasts, *Arch. Biochem. Biophys.* 152: 318-328, 1972.
 46. McDonald, B.R., Gallagher, J.A. and Russel, R.G.G.: Parathyroid hormone stimulates the proliferation of cells derived from human bone, *Endocrinology.* 118(6):2445-2449, 1986.
 47. Marie, P.T., Hott, M. and Garba, M.T.: Contrasting effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on bone matrix and mineral appositional rates in the mouse, *Metabolism.* 34(8):777-783, 1985.
 48. Eriksen, E.F., Colvard, D.S., Berg, N.J., Grahmann, M.L., Mann, K.G., Spelsberg, T.C. and Riggs, B.L.: Evidence of estrogen receptors in normal human osteoblast like cells, *Science.* 241:84-86, 1988.
 49. Foley, T.P., Nissley, S.P., Stevens, R.L., King, G.L., Hascall, V.C., Humbel, Short, P.A. and Rechler, M.M.: Demonstration of receptors for insulin and insulin like growth factors on awarm rat chondrosar-

- coma chondrocyte, *J. Biol. Chem.* 257(2): 663-669, 1982.
50. Burch, W.M. and Levobitz, H.E.: Triiodothyronine stimulation of in vitro growth and maturation of embryonic chick cartilage, *Endocrinology*. 111(2):462-468, 1982.
 51. Yasumura, S.: Effect of adrenal steroids on bone resorption in rats, *Am. J. Physiol.* 230(1): 90-93, 1976.
 52. Centrella, M., McCarthy, T. and Canalis, E.: Transforming growth factor β is a bifunctional regulator of replication and collagen synthesis in osteoblast - enriched cell cultures from fetal rat bone, *J. Biol. Chem.* 262(6):2869-2874, 1987.
 53. Canalis, E., McCarthy, T. and Centrella, M.: A bone derived growth factor isolated from rat calvariae is beta₂ microglobulin, *Endocrinology*. 121(3):1198-1200, 1987.
 54. Canalis, E.: Effect of insulin like growth factor I on DNA and protein synthesis in cultured rat calvaria., *J. Clin. Invest.* 66: 709-719, 1980.
 55. Kato, Y., Nomura, Y., Tsuji, M., Kinoshita, M., Ohmae, H. and Suzuki, F.: Somatomedin - like peptides isolated from fetal bovine cartilage (cartilage-derived factor). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78(11):6831-6835, 1981.
 56. Urist, M.R., DeLange, R.J. and Finerman, G.A.M.: Bone cell differentiation and growth factors, *Science*. 220:680-686, 1983.
 57. Cohen, S.: Epidermal growth factor-receptor-protein kinase interaction, *J. Biol. Chem.* 255:4834-4842, 1980.
 58. Farley, J.R. and Baylink, D.J.: Purification of a skeletal growth factor from human bone, *Biochemistry*. 21:3502-3507, 1982.
 59. Farley, J.R., Masuda, T., Wergedal, J.E. and Baylink, D.J.: Human skeletal growth factor; Characterization of the mitogenic effect on bone cells in vitro, *Biochemistry*. 21:3508-3513, 1982.
 60. Canalis, E.: Interleukin - 1 has independent effects on deoxyribonucleic acid and collagen synthesis in cultures of rat calvariae, *Endocrinology*. 118(1): 74-81, 1986.
 61. Chyun, Y.S. and Raisz, L.G.: Stimulation of bone formation by prostaglandin E₂. *Prostaglandins*. 27(1):97-103, 1984.
 62. Deuel, T.F. and Huang, J.S.: Platelet-derived growth factor, structure, function and roles in normal and transformed cells, *J. Clin. Invest.* 74:669-676, 1984.
 63. Dietrich, J.W. and Duffield, R.: Effects of the calcium antagonist verapamil on in vitro synthesis of skeletal collagen and non-collagen protein, *Endocrinology*. 105(5): 1168-1172, 1979.
 64. Bellows, C.G., Heersche, J.N.M. and Aubin, J.E.: The effect of fluoride on osteoblast progenitors in vitro, *J. Bone. Min. Res.* 5 (Suppl 1): S101-S106, 1990.
 65. Farley, J.R., Tarbaux, N., Hall, S. and Baylink, D.J.: Mitogenic action(s) of fluoride on osteoblast line cells; Determinant of the response in vitro, *J. Bone. Min. Res.* 5 (Suppl 1): S107-S114, 1990.
 66. Schulz, E.E., Libanati, C.R., Farley, S.M., Kirk, G.A. and Baylink, D.J.: Skeletal scintigraphic change in osteoporosis treated with sodium fluoride: concise communication, *J. Nucl. Med.* 25(6): 651-655, 1984.
 67. Lau, K.H.W., Farley, J.R., Freeman, T.K. and Baylink, D.J.: A proposed mechanism of the mitogenic action of fluoride on bone cells: inhibition of the activity of an osteoblastic acid phosphatase. *Metabolism*. 38(9): 858-868, 1989. (Abstract)

68. Lau, K.H.W., Farley, J.R. and Baylink, D.J.: Molecular mechanism of mitogenic action of fluoride on osteoblast, *J. Bone. Min. Res.* [Suppl] 2:232, 1987 (Abstract).
69. Brautigam, D.L., Bornstein, D. and Gallis, B.: Phosphotyrosyl protein phosphatase, *J. Biol. Chem.* 256:6519-6522, 1981.
70. Swarup, G., Speeg, K.V., Cohen, S. and Garber, D.L.: Phosphotyrosyl protein phosphatase of TCRC-2 cells, *J. Biol. Chem.* 257:7298-7301, 1982.
71. Swarup, G., Cohen, S. and Garbers, D.L.: Inhibition of membrane phosphotyrosyl-protein phosphatase activity by vanadate, *Biochem. Biophys. Res. Com.* 107:1104-1109, 1982.
72. Miller, E.J.: A review of biomechanical studies on the genetically distinct collagens of the skeletal system, *Clin. Orthop. Rel. Res.* 92:260-280, 1973.
73. Dandona, P., Coumar, A., Gill, D.S., Bell, J. and Thomas, M.: Sodium fluoride stimulate osteocalcin in normal subjects, *Clin. Endocrinology.* 29:437-441, 1988.
74. Slivastava, R.K., Gill, D.S., Moudgil, A., Menon, R.K., Thomas, M. and Dandona, P.: Normal ionised calcium, parathyroid hypersecretion and elevated osteocalcin in a family with fluorosis, *Metabolism.* 38(2): 120-124, 1989.
75. Grynbas, M.D.: Fluoride effect on bone crystal, *J. Bone. Min. Res.* 5 (Suppl 1): S169-S176, 1990.
76. Carter, D.R. and Beaupre, G.S.: Effect of fluoride treatment on bone strength, *J. Bone. Min. Res.* 5 (Suppl 1): S177-S184, 1990.
77. Wolinsky, I., Simkin, A. and Guggenheim, K.: Effects of fluoride on metabolism and mechanical properties of rat bone, *Am. J. Physiol.* 223(1):46-50, 1972.
78. Wires, B.H., Francis, M.D., Hovancik, K., Ritchie, C.K. and Baylink, D.J.: Theoretical physical chemical studies of the cause of fluoride-induced osteomalacia, *J. Bone. Min. Res.* 5(Suppl 1): S63-S70, 1990.
79. Harrison, J.E., Hitchman, A.J.W., Hitchman, A. and Holtrop, M.E.: The effect of fluoride on ectopic bone formation, *J. Bone. Min. Res.* 5 (Suppl 1): S81-S86, 1990.
80. Boivin, G., Chavassieux, P., Chapuy, M.C., Baud, C.A. and Meunier, P.J.: Skeletal fluorosis: Histomorphometric findings, *J. Bone. Min. Res.* 5 (Suppl 1): S185-S190, 1990.
81. Orcel, P.H., Vernejoul, M.C., Prier, A., Kuntz, D. and Kaplan, G.: Stress fracture of the lower limbs in osteoporotic treated with fluoride, *J. Bone. Min. Res.* 5 (Suppl 1): S191-S194, 1990.
82. Schnitzler, C.M., Wing, J.R., Mesquita, J.M., Gear, A.K., Robson, H.J. and Smyth, A.E.: Risk factors for the development of stress fractures during fluoride therapy for osteoporosis, *J. Bone. Min. Res.* 5 (Suppl 1): S195-S200, 1990.

– ABSTRACT –

THE EFFECT OF SODIUM FLUORIDE AND SODIUM ORTHOVANADATE ON OSTEOBLASTIC CELL LINE MC3T3-E1 CELLS

Won-Jin Kim, Kyu-Rhim Chung

Department of Orthodontics, College of Dentistry, Kyung Hee University

It is the aim of this study to investigate the effects of sodium fluoride and sodium orthovanadate upon the proliferation and activity of the osteoblast (MC3T3-E1 cells). MC3T3-E1 cells were cultured in α -MEM containing 10% FBS and various concentration of sodium fluoride and sodium orthovanadate was appended to serum free media. DNA synthesis was examined through the [3 H] thymidine incorporation into DNA. Collagen synthesis was examined through the [3 H] proline incorporation into collagenase digestible protein and noncollagen protein. The following results were drawn;

1. Sodium fluoride stimulated the DNA synthesis of osteoblast significantly in dose-dependent manner within the concentration from $2\mu\text{M}$ to $10\mu\text{M}$ ($P < 0.005$).
2. Sodium orthovanadate stimulated the DNA synthesis of osteoblast significantly in dose-dependent manner within the concentration from $2\mu\text{M}$ to $8\mu\text{M}$, however showed diminution at $10\mu\text{M}$ ($P < 0.001$).
3. Sodium fluoride and sodium orthovanadate stimulated the percent collagen synthesis of osteoblast significantly in dose-dependent manner within the concentration from $5\mu\text{M}$ to $10\mu\text{M}$ ($P < 0.001$).
4. Sodium fluoride and sodium orthovanadate stimulated the noncollagen synthesis of osteoblast significantly in dose-dependent manner within the concentration from $5\mu\text{M}$ to $10\mu\text{M}$ ($P < 0.001$).

In conclusion, sodium fluoride and sodium orthovanadate stimulate the proliferation and activity of osteoblast by stimulation of DNA synthesis and collagen and noncollagen synthesis in osteoblast.