

# Sodium Fluoride가 조골세포주 MC3T3-E1의 제 I 형 $\alpha 2$ 교원질 mRNA에 미치는 영향에 관한 연구

황정빈<sup>1)</sup> · 정규립<sup>2)</sup> · 박영국<sup>3)</sup>

## I. 서 론

교정 치료시 기계적 치료법에 대한 치아 주위조직의 반응은 매우 중요하다. 1900년대 초기 Sandstedt<sup>1)</sup>에 의해 교정력과 관련된 조직변화에 대한 언급 이래로 압박의 결과로 파골세포에 의한 치조골의 파괴와 인장력에 대한 반응으로 조골세포적 골침착등에 의한 골개조에 의해 치아의 이동이 일어남을 조직학적 연구<sup>2)</sup>에서 꾸준히 밝혀왔다. 골개조는 조골세포와 파골세포의 상호작용에 의해 일어나며 교정적 치아이동에 관련한 골대사 연구에는 조골세포와 파골세포에 대한 이해가 필수적이라고 본다.

임상적으로, 치아 이동시 치아이동의 속도는 개인차가 많으며<sup>3)</sup> 이는 영양상태, Hormones, vitamins, 미량원소등 많은 인자들이 관련되어 있다<sup>4)</sup>.

최근 이들 다양한 인자들과 관련된 치아 이동에 관한 연구로서 Yamasaki<sup>5)</sup>는 prostaglandin E<sub>1</sub>을 투여하여 교정적 치아 이동을 가속화시켰고, Hellsing<sup>6)</sup>은 쥐에게 NaF를 투여하였을 때 치아의 이동량이 현저히 감소하

였음을 보고하였다.

많은 미량원소중 불소는 인체에 있어서 필수미량원소로서<sup>6)</sup> 강력한 골형성 물질로 알려져 있으며, 부족시 성장이 지연되고 충치의 이환율이 높아지며 골다공증이 유발되고, 사람에게는 하루 1.5~4.0mg 정도가 필요한 것으로 알려져 있다<sup>7)</sup>.

불소는 골세포의 증식과 단백질합성을 증가시키며<sup>8)</sup> 골형성을 자극하고 골성숙을 증가시켜 2차적으로 피질골의 광화를 증가시킨다. 조직형태학적으로 골양표면이 증가되고 골두께와 기질침착 비율이 증가되고 능동적인 조골세포의 수효 증가를 보여준다<sup>9)</sup>.

불소는 파골세포의 활동성을 방해하고<sup>10)</sup> NaF 투여시 치주인대의 압박측에 영향을 주며 치조골의 흡수에도 영향을 준다<sup>11)</sup>. 다량투여시 파골세포가 감소하고 비활동성의 파골세포가 증가하며 in vitro에서는 0.5~1.0mM 농도일때 개개 파골세포당 흡수면적과 흡수량이 감소되었다<sup>10)</sup>. 또한 골 형성세포에 대해서 cAMP를 증가시키고<sup>12)</sup> 제 I 형 교원질 생성의 증가를 나타내었으며 염기성 인산분해효소 활성도의 증가를 나타내었다. In vivo에서 NaF 투여시 혈장내 osteocalcin의 농도와 혈장내 염기성 인산분해효소 활성도의 증가를 나타내었다<sup>13)</sup>. Osteocalcin은 조골세포에 의해 분비되는 비교원성 단백질이며 이의 증가는 조골세포 활성도의 증가를 의미한다<sup>14)</sup>.

접수일: 1993년 6월 1일

1): 경희대학교 치과대학 치과교정학교실

2): 경희대학교 치과대학 교정학교실, 교수

3): 경희대학교 치과대학 교정학교실, 조교수

In vivo에서 불소에 장기간 노출된 하악 과두부의 연골층 두께가 증가되었는데 lower hypertrophiczone에 있는 세포의 수와 크기가 증가된 조직학적 소견을 나타내었다<sup>15)</sup>. 김과 정<sup>16)</sup>의 연구에서 조골세포주 MC3T3-E1세포에 대하여 Sodium fluoride는 2 $\mu$ M에서 10 $\mu$ M까지 농도가 증가함에 따라 DNA합성을 증가시켰으며, 교원질합성도 촉진시켰다.

이상에서와 같이 불소는 골대사에 많은 영향을 주며 조골세포에 대한 불소의 영향을 연구하기 위해 조골세포주 MC3T3-E1세포를 이용하여 염기성 인산분해효소의 활성도(Alkaline phosphatase activity)와 부갑상선 호르몬(Parathormone, PTH)에 대한 cAMP의 생산, 제 I 형  $\alpha$ 2 교원질 m-RNA 합성등에 미치는 불소의 효과를 실험하였다.

## II. 연구재료 및 방법

### 1. 세포 배양

본 연구에 사용된 세포들은 조골세포주 MC3T3-E1이며 Kodama<sup>16)</sup> 등에 의해 신생쥐(C57 BL/6)의 두개골에서 분리되어 계대배양되는 세포로서 염기성 인산분해효소(Alkaline phosphatase, ALP) 활성과 교원질 합성능이 있으며, 장기간 배양하면 골기질의 석회화를 관찰할 수 있고 부갑상선 호르몬에 의한 cAMP의 생성을 관찰할 수 있다. 세포들은 25 ml 플라스틱 culture flask(Flow Lab. Inc.)에 10% fetal bovine serum(FBS)(Hyclone Lab. Inc.) 및 penicilin 100U/ml에 넣고 streptomycin 100 $\mu$ g/ml가 포함된  $\alpha$ -minimal essential medium( $\alpha$ -MEM) 10ml에 넣고 37 $^{\circ}$ C, 95%의 습도, 5%의 CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다. 세포들은 통상적인 방법에 의하여 일주일에 2회씩 계대배양하였다. 실험에 사용할 세포들은 5 $\times$ 10<sup>4</sup> cells/ml 농도로 부유시킨 후 사용하였다.

### 2. 염기성 인산분해효소 활성도 측정

5 $\times$ 10<sup>4</sup> cells/ml 농도로 2ml/well씩 6 well 플라스틱 culture flask(Flow Lab. Inc.)에 분주하여 10% FBS가 든  $\alpha$ -MEM에서 5일간 배양하고 sodium fluoride(Sigma, Mol wt 41.99)를 넣지 않은 군을 대조군으로 하고 2,4,6,8, 10 $\mu$ M의 농도로 Sodium fluoride를 첨가한 군을 실험군으로 하여 0.1% FBS가 든  $\alpha$ -MEM으로 교체하여 3일간 배양하였다. 배양된 세포를 PBS로 3회 세척하고 1mM MgCl<sub>2</sub>가 함유된 0.2% nonidet p-40 1ml을 넣은 후 세포를 plate로부터 분리해내고 sonicator(LAB-SONIC1510, KARL KOLB)를 이용하여 얼음속에서 75watt, 1분간 세포를 파괴시킨 후 3000G로 10분간 원심분리하였다. 원심분리 후 상층액에 페닐인산나트륨을 첨가하여 alkaline phosphatase 활성도를 측정하였다(아산제약, ALP 아산셋트). 단백질 함량은 Lowry법으로 측정하였다.

### 3. 부갑상선 호르몬에 대한 cyclic AMP의 반응 측정

2 $\times$ 10<sup>4</sup> cell/well로 분주하고 10% FBS가 든  $\alpha$ -MEM에서 2일간 배양하고 sodium fluoride(Sigma, Mol wt 41.99)를 넣지 않은 군을 대조군으로 하고 5, 10 $\mu$ M 농도로 Sodium fluoride를 첨가한 군을 실험군으로 하여 0.1% FBS가 든  $\alpha$ -MEM으로 교체시킨 후 3일간 더 배양하였다. 5일째에 0.3% bovine serum albumin(BSA)이 든  $\alpha$ -MEM 1ml로 교환하여 1일간 더 배양하였다. 1mM isobutyl methyl xanthine(IBMx),  $\alpha$ -MEM 1ml로 교환하여 37 $^{\circ}$ C에서 15분간 배양하고 50nM PTH(SIGMA chemical CO.), 0.3% BSA, 1mM IBMx가 든  $\alpha$ -MEM으로 교환하고 5분간 배양하였다. 배양된 세포에서 상층액을 버리고 HCl과 ethanol을 넣어 -20 $^{\circ}$ C 냉장고에서 24시간 방치한 후 꺼내어 ethanol을 증발시켰다. 증발된 후 남은 침전물을 sodium acetate buffer로 용해

시키고 cAMP를 측정하였다. cAMP는 방사면역방법(Radioimmuno assay, RIA)으로 측정하였다.

#### 4. RNA 추출

배양된 조골세포에 sodium fluoride(Sigma, Mol wt 41.99)를 넣지 않은 군을 대조군으로 하고 Sodium fluoride 5,10,15,20 $\mu$ M 농도로 Sodium fluoride를 첨가한 군을 실험군으로 하여 0.1% FBS가든  $\alpha$ -MEM으로 교체하여 2일간 배양한 뒤 PBS로 2회 세척 후 바닥의 세포층을 모아서 원심분리 후 Chomczynski<sup>17)</sup>의 single step method를 수정하여 RNA를 추출하였다. 세포를 4M guanidium solution에 녹이고 2M sodium acetate(pH 4.0), phenol (water saturated), chloroform-isoamyl alcohol (49:1)를 첨가하여 혼합 후 3000G에서 20분간 원심분리하였다. 상층액을 추출하여 다시 동량의 isopropanol과 혼합 후 -20 $^{\circ}$ C에서 최소 1시간 침전시켰다. 다시 20분간 원심분리후 pellet만 guanidium용액에 녹이고 동량의 isopropanol과 같이 혼합하여 -20 $^{\circ}$ C에 방치 후 10분간 원심분리한 뒤 75% ethanol로 세척 후 pellet을 diethyl pyrocabonate로 처리한 물에 용해시켰다.

#### 5. Northern blot analysis

추출된 total RNA를 1% agarose gel/formaldehyde(0.44M)에서 전기 영동후 ethidium bromide로 염색하여 UV로 28S, 18S를 확인하고 흡착지(nylon membrane)에 7.5mN NaOH 완충액을 이용하여 이전시켰다.

이전 완료된 흡착지에 2M Na-P/EDTA, 30% BSA, 5mg/ml SSDNA, 20% SDS, 100% formamide등을 첨가하여 50 $^{\circ}$ C에서 2시간동안 water bath한 후 소식자(probe),  $\alpha$ [<sup>32</sup>P]dCTP, Klenow, OLB등을 첨가한 후 16~18시간동안 50 $^{\circ}$ C에서 water bath 하여 보합결합(Hybridization)시킨다. 소식자는 3.5kb의 type I  $\alpha$ 2

collagen을 사용하였다. 이는 ATCC(57322)에서 구입한 소식자를 large scale method를 이용하여 증폭하고 정제하였다. 소식자는 random hexamer법을 이용하여 동위원소 표지를 하여 보합결합 시킨 후 흡착지를 2 $\times$ SSC, 1% SDS로 실온에서 30분간 세척 후 0.1% SDS, 0.1 $\times$ SSC로 65 $^{\circ}$ C에서 30분간 2회 세척하였다. 흡착지를 건조시킨 후 X-ray film(Eastman Kodak)에 intensifying screen과 함께 -70 $^{\circ}$ C에서 자기방사기록을 실시했고 film에 나타난 band를 densitometer(Clini Scan2)로 scanning하였다.

#### 6. 통계

통계자료는 평균  $\pm$  표준 편차로 표시하였으며 SPSS/PC<sup>+</sup>를 이용하여 ANOVA와 Kruskal-Wallis 검정을 통하여 평균치 유의성을 검정하였다.

### III. 연구결과

#### 1. Sodium fluoride의 염기성 인산분해효소의 활성도에 대한 영향

대조군에서  $0.2517 \pm 0.0087$ , 2 $\mu$ M에서  $0.2961 \pm 0.0128$ , 4 $\mu$ M에서  $0.3958 \pm 0.0590$ , 6 $\mu$ M에서  $0.1824 \pm 0.0099$ , 8 $\mu$ M에서  $0.1629 \pm 0.0091$ , 10 $\mu$ M에서  $0.4235 \pm 0.0229$ 을 나타내었다(P<0.01)(Table 1, Fig. 1).

#### 2. 부갑상선 호르몬에 대한 cyclic AMP의 반응 측정

대조군에서  $46.11 \pm 8.17$ , 5 $\mu$ M에서  $36.60 \pm 6.54$ , 10 $\mu$ M에서  $37.81 \pm 8.84$ nmol/L/mg protein 5min을 나타내었다. PTH를 첨가하지 않은 군에서는  $1.82$ nmol/L/mg protein 5min을 나타내었다(Table 2, Fig. 2).

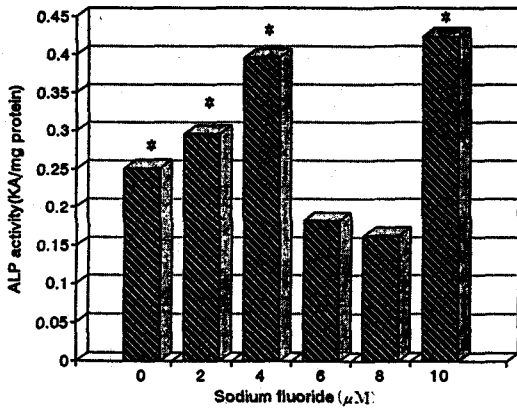


Fig 1. The effects of sodium fluoride on alkaline phosphatase activity in osteoblast(MC3T3-E1 cells). MC3T3-E1 cells cultured 5 days and treated with sodium fluoride for 3 days. The ALP activity was assayed by the method of Lowry with disodium phenyl phosphate as substrate. Significance level was calculated with Kruskal-Wallis 1-way ANOVA( $p < 0.01$ ). (\*) denotes pairs of groups significantly different at the 0.001 level.

Table 1. The effects of sodium fluoride on alkaline phosphatase activity in osteoblast(MC3T3-E1 cells)

Sodium fluoride (μM)	Alkaline phosphatase activity (KA/mg protein)
No addition	0.2517 ± 0.0087*
2	0.2961 ± 0.0128*
4	0.3958 ± 0.0590*
6	0.1824 ± 0.0099
8	0.1629 ± 0.0091
10	0.4235 ± 0.0229*

Effects are shown as mean ± SD of 6 replicates. MC3T3-E1 cells cultured 5 days and treated with sodium fluoride for 3 days. The ALP activity was assayed by the method of Lowry with disodium phenyl phosphate as substrate. Significance level was calculated with Kruskal-Wallis 1-way ANOVA ( $p < 0.01$ ). (\*) denotes pairs of groups significantly different at the 0.001 level.

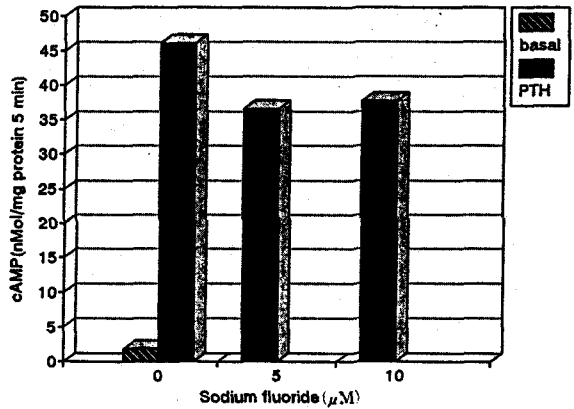


Fig 2. The effects of sodium fluoride on PTH stimulation of adenylate cyclase in osteoblast(MC3T3-E1 cells). MC3T3-E1 cells cultured 2 days and treated with sodium fluoride for 3 days. cAMP formation was measured by Radioimmuno Assay(RIA). Significance level was calculated with Kruskal-Wallis 1-way ANOVA( $p = 0.3527$ ).

Table 2. The effects of sodium fluoride on PTH stimulation of adenylate cyclase in osteoblast(MC3T3-E1 cells)

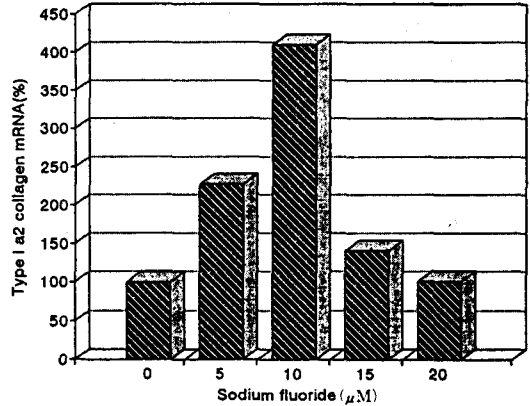
Sodium fluoride (μM)	Cyclic AMP(nmol/L/mg protein 5 min)	
	Basal	PTH(50nM)
No addition	1.82	46.11 ± 8.17
5	1.82	36.60 ± 6.54
10	1.82	37.81 ± 8.84

Effects are shown as mean ± SD of 6 replicates. MC3T3-E1 cells cultured 2 days and treated with sodium fluoride for 3 days. cAMP formation was measured by Radioimmuno Assay(RIA). Significance level was calculated with Kruskal-Wallis 1-way ANOVA.

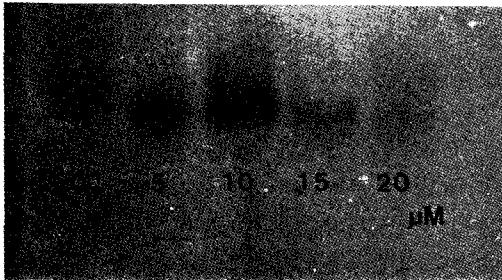
**Table 3.** The effects of sodium fluoride on type I  $\alpha 2$  collagen mRNA in osteoblast(MC3T3-E1 cells)

Sodium fluoride ( $\mu$ M)	Type I $\alpha 2$ collagen mRNA(% of control)
No addition	100.00
5	227.45
10	410.78
15	141.16
20	100.98

MC3T3-E1 cells cultured 5 days and treated with sodium fluoride for 2 days. Type I  $\alpha 2$  collagen ribonucleic acid(mRNA) expression was studied by Northern blot analysis. Effects are shown as % of control.



**Fig 3.** The effects of sodium fluoride on type I  $\alpha 2$  collagen mRNA level in osteoblast(MC3T3-E1 cells). MC3T3-E1 cells cultured 5 days and treated with sodium fluoride for 2 days. Type I  $\alpha 2$  collagen ribonucleic acid (mRNA) expression was studied by Northern blot analysis. Effects are shown as % of control.



**Fig 4.** Representative Northern blot analysis of type I  $\alpha 2$  collagen mRNA according to the effects of various concentration of Sodium fluoride in MC3T3-E1 cells.

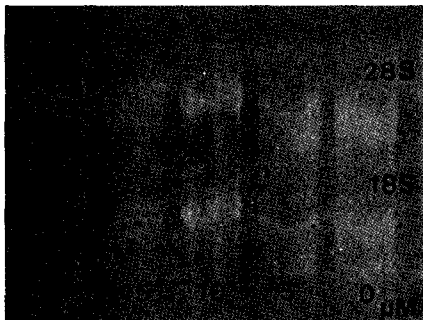
### 3. Northern blot 분석에 의한 제 I 형 교원질의 mRNA 발현능

대조군에서 5 $\mu$ M에서 227.45%, 10 $\mu$ M에서 410.78%, 15 $\mu$ M에서 141.16%, 20 $\mu$ M에서 100.98%를 나타내었다(Table 3, Fig. 3, Fig. 4, Fig. 5).

## IV. 총괄 및 고안

교정적 치아이동시 골개조의 기전을 이해하기 위해서는 조골세포에 대한 이해가 필수적이다. 본 연구에서는 조골세포의 다양한 기능을 규명하기 위하여 조골세포를 따로 분리하여 사용하였다.

조골세포는 간엽세포에서 기원하며, 호염기성 세포질과 많은 양의 ribosome을 가지며 Golgi기구 자체도 잘 발달되어 있다. 또한 석회화능과 높은 염기성 인산분해효소의 활성도와 교원질 합성능, ostocalcin합성능 및 부갑상선 호르몬과 Prostaglandine에 반응하



**Fig 5.** Expression of 18S, 28S rRNA with Et. Br. under UV light.

는 adenylate cycle system과  $1,25-(OH)_2D_3$  수용체의 존재등을 특징으로 한다. 조골세포의 세포막에는 중성, 산성, 염기성 인산분해효소들이 많이 결합되어 있으며 이들 효소가 활성화되면  $PO_4^{3-}$ 의 농도가 국소적으로 증가되어 결과적으로 calcium과 더불어 불용성인 calcium phosphate가 형성되어 교원질같은 결합조직에 침착되고 여기에 Na, Mg, Carbonate, citrate등이 첨가되어 골을 형성한다. 그 후 조골세포는 골세포로 전환된다<sup>19)</sup>.

이런 조건을 기준으로 현재 여러 종류의 조골세포가 분리되고 있는데 그중 Kodama 등에 의해 신생쥐(C57BL/6) 두개골에서 얻은 MC3T3-E1를 본 연구에 사용하였다. MC3T3-E1 세포는 섬유아세포와 유사한 형태를 가지며 4~5일 후에 단층의 세포층을 형성하고 7일 이상 배양하면 교원질을 합성하고, 3주 이상 배양하면 골기질의 석회화를 관찰할 수 있다.

골형성을 자극시키는 약물로는 불소와 anabolic steroids등이 있고, 골 흡수를 억제하는 약물로서는 calcitonin, bisphosphonates, progestational agent, ascorbic with  $Ca^{++}$ , Vitamin D<sup>3</sup>, Estrogen, 그리고 oral estradiol and norethisterone acetate( $E_2 + NETA$ )등이 있으며 이들은 골다공증의 임상적 치료제로 사용되고 있다. 또한 골다공증 예방법으로는 Vitamin D와 Vitamin D metabolites, Calcium, Fluoride, calcitonin등을 사용한다<sup>20)</sup>.

이들중 불소는 가장 강력한 골형성 물질로서 in vivo에서 세포 증식의 증가, 염기성 인산분해효소(ALP)활성도 증가, 골세포의 증가를 나타내고 신생쥐 두개골에서 부갑상선 호르몬(PTH)에 대한 adenosine 3,5-monophosphate의 생산 증가를 나타내었다<sup>11)</sup>.

염기성 인산분해효소와 osteocalcin은 조골세포의 기능을 나타내는 지표<sup>21)</sup>이며, 그중 염기성 인산분해효소는 석회화 과정과 관련되어 있는 효소로서 혈관과 경조직 형성세포의 세포막에 널리 분포되어 있다.

염기성 인산분해효소는 비교적 강한 결합

조직에서 기질낭포와 관련하여 나타나고, 특히 석회화 조직에서 석회화 형성 초기에 현저히 증가된다<sup>22)</sup>. 이 효소는 alkaline pH에서 organic radical로부터 phosphate이온을 가수분해하고 석회화 과정에 관여하며 세포막에서는 이온이동을 담당하는 것으로 추정된다. 염기성 인산분해효소를 함유한 낭포들은 전이용액(metastable solutions)으로부터 phosphate와 calcium을 축적시키는 능력을 가지고 있는 점에서 볼 때 염기성 인산 분해효소는 기질-낭포 증재성 석회화 과정(matrix-vesicle mediated mineralization)에 중요한 역할을 담당하는 것으로 추정된다<sup>23)</sup>.

대부분의 골다공증 환자에서 fluoride therapy에 대해 혈청 염기성 인산분해효소(Serum ALP, SALP)가 증가했으므로 혈청 염기성 인산분해효소(SALP)의 측정이 불소에 대한 골격의 반응을 측정하는데 매우 유용한 가치를 가진다고 할 수 있다. 또한 혈청 염기성 인산 분해효소(SALP)가 불소의 골에 대한 반응의 측정에 매우 유용한 이유는 혈청 염기성 인산 분해효소(SALP)가 골형성과 가장 유의한 비율변화를 나타내기 때문이다. In vitro에서는, 다른 골격성 인자없이, Sodium fluoride(NaF)에 대한 골격성 교원질 침착과 혈청 염기성 인산분해효소 분비량간의 상관성을 보여주었다<sup>24)</sup>.

본 연구에서 Sodium fluoride의 염기성 인산분해효소 활성화도에 대한 영향은  $2\mu M$ ,  $4\mu M$  농도에서는 증가를 보이다가  $6\mu M$ ,  $8\mu M$  농도에서는 오히려 감소하였고,  $10\mu M$  농도에서는 다시 증가하였다(Table 3, Fig. 4).

통계적으로는 대조군과  $2\mu M$ ,  $4\mu M$ , 그리고  $10\mu M$  농도군에서 통계적으로 유의성 있는 증가를 나타내었다( $p < 0.001$ ).

불소는 잘 알려진 Phosphatase 억제제(inhibitor)이고 불소가 고농도에서 약간의 phosphatase activity의 증가를 가져 온다고 보고하고 있다<sup>25)</sup>. 본 연구에서  $6\mu M$ ,  $8\mu M$  농도에서 염기성 인산분해효소 활성화도의 감소는 아마 이 효소에 대한 불소의 억제 효과

때문일 것으로 추정되는데 NaF의 염기성 인산분해효소에 대한 자극효과가 적은 것은, 세포차원에서 볼 때 관찰된 것보다 더 큰양의 염기성 인산분해효소에 대한 억제제가 나타난 것으로 본다<sup>26)</sup>. 반대로 저농도인 2 $\mu$ M, 4 $\mu$ M 농도에서는 염기성 인산분해효소의 활성도가 증가되어, 불소의 이 효소에 대한 억제효과보다 관찰된 효소의 양이 더 많았다고 볼 수 있다. NaF는 10 $\mu$ M농도에서 DNA합성과 교원질 합성을 크게 증가시키는데<sup>18)</sup>, 염기성 인산분해효소 활성도 역시 10 $\mu$ M농도에서 가장 큰 증가를 나타내었다.

불소는 조골세포의 증식을 촉진하므로, 불소에 대한 염기성 인산분해효소와 osteocalcin의 증가가 세포차체에서의 분비량 증가라기 보다는 조골세포 수의 증가에 의한 이들의 증가를 반영한다고<sup>29)</sup>할 수 있다. 본 연구에서 10 $\mu$ M농도에서 염기성 인산분해효소의 활성도가 최대치를 나타내었고 김과 정<sup>18)</sup>의 연구에서는 10 $\mu$ M농도에서 DNA합성능의 가장 큰 증가를 나타낸 점에서 위의 가설은 어느 정도 의미가 있다고 추정된다.

생체내의 칼슘평형을 유지하기 위해 골형성과 골흡수는 서로 밀접한 연관 관계를 가지고 있으며, 조골세포는 여러가지 호르몬과 성장인자, 국소인자에 의해 조절되고 있다.

이 중 부갑상선 호르몬(PTH)은 골조직에서 파골세포, 조골세포, 골세포등의 adenylyl cyclase를 활성화시켜 cAMP의 농도를 증가시킨다. 골세포의 세포막에서는 증가된 cAMP에 의해 lysosomal enzyme의 분비가 촉진되어 골용해(osteolysis)를 가속화시킨다. 파골세포에 있어서는 cAMP가 골흡수작용에 중요한 조절자로서 작용한다<sup>5)</sup>. 그외 PTH는 혈장내 citrate농도와 lactate등 여러가지 유기산 생산을 증가시켜 골조직의 pH를 낮추며, 골조직으로부터  $Ca^{++}$ 를 유리하는 효소의 활성도를 증가시켜 골흡수와 골연화를 유도하는 작용을 하는 것으로 알려져 있다<sup>28)</sup>.

Sutherland등이 발견한 cAMP는 adenylyl cyclase라는 효소에 의해 ATP로부터 형성되며

혈액을 따라 순환하는 호르몬중 thyroxine과 steroid 호르몬을 제외한 호르몬들은 세포막을 통과하지 못하므로 세포막의 receptor들과 결합하여 adenylyl cyclase를 활성화시켜 cAMP를 생성하여 세포내에서 호르몬 작용을 나타나게 한다. 세포내에서 cAMP는 단백질 합성, DNA합성과분화, RNA합성등의 활소(kinase)를 활성화시킨다.

Human fetal bone cell에서 불소는 cAMP의 증가를 나타내었고 type I collagen의 생성을 나타내었다<sup>12)</sup>.

부갑상선 호르몬은 쥐의 두개골 조직에서 교원질 합성을 저하시키고 cAMP생성을 촉진시킴으로써 칼슘분비를 증가시킨다<sup>29)</sup>.

본 연구에서 사용한 MC3T3-E1 세포에서 PTH에 대한 cAMP의 생성이 기저치 1.82 nMol/protein 5min에 비해 대조군에서 46.11  $\pm$  8.17nMol/protein 5min로 현저히 증가되었다. 이로써 MC3T3-E1세포가 조골세포의 특성을 나타내며 조골세포의 기능이 잘 유지되고 있음을 알 수가 있었다. 조골세포에 있어서 Sodium fluoride의 부갑상선 호르몬에 의한 cAMP생성에서의 영향은 대조군에서 46.11  $\pm$  8.17 nMol/protein 5min, 5 $\mu$ M에서는 36.60  $\pm$  6.54 nMol/protein 5min, 10 $\mu$ M에서는 37.81  $\pm$  8.84 nMol/protein 5min(P=0.3527)로 나타나 불소가 조골세포의 부갑상선 호르몬에 대한 adenylyl cycle system을 차단하는 경향을 보여 주었다.

골에 있는 유기물중 collagen이 약 88~89%를 차지하고 골 전체에 대한 collagen의 무게비는 19.5%에 달한다<sup>30)</sup>.

인체내에 존재하는 13개형 교원질중 I형 교원질은 피부, 골 및 인대에 가장 풍부하며 골형성에 중요한 역할을 하고 건, 상아질, 근막, 동맥, 자궁등에 널리 분포하며 골에서는 제 I형 교원질이 대부분을 차지하고 있다<sup>30)</sup>.

교원질은 처음에 조골세포에서 비교적 긴 분자구조이며 pro-peptides를 함유한 전구 교원질(procollagen)의 형태로 형성된다. 형성된 전구 교원질은 기질내로 분비된 후 다음 단

계를 거쳐 교원질이 되고, 원섬유가 된 다음 교원섬유질이 된다. 전구교원질은 양쪽끝에 pro  $\alpha$  chains라고 알려진 peptides가 존재하며 제 I 형교원질에서는 pro  $\alpha 1(I)$ 과 pro  $\alpha 2(I)$ 의 두종류가 알려져 있다. pro  $\alpha 1(I)$ 은 분자량이 약 2000dalton이며 globular aminoterminal domain과 central collagen domain, short globular domain 등 3개의 다른 구조적 영역으로 구성되어 있다.<sup>30)</sup>

$\alpha$ -chains에는 약 1000여개의 amino acids가 있으며 매 3번째 마다 glycine이 존재하는 (X-Y-Gly)<sub>n</sub>이 반복되는 구조로서 glycine, alanine, proline, hydroxyproline 등 20개 정도의 amino acids가 발견되며 proline과 hydroxyproline이 다량 함유되어 있다. X와 Y 위치에는 glycine 이외의 amino acids가 위치하게 된다.<sup>30)</sup>

X와 Y position의 amino acids들은 각기 다른 유전자(genes)에 의해 생성되며 제 I 형 교원질의 유전자는 17과 7 염색체(chromosome)에 위치한다.<sup>31)</sup>

m-RNA는 한가닥으로 구성된 분자로서 DNA가 가지고 있는 단백질 합성에 관한 정보를 전사하는 수단으로 세포내의 소포체에서 합성되는 단백질의 1차 구조인 염기서열을 정하는 역할을 한다.

m-RNA로부터 전사된 전구교원질의 pro $\alpha$ -chains은 O<sub>2</sub>, Fe<sup>2+</sup>, Ascorbic acid,  $\alpha$ -Ketoglutarate 등에 의하여 hydroxylated 되어 완전한 3차원적 구조를 가지게 되면 신속하게 세포외로 방출된다. 세포외로 방출된 pro-collagen은 procollagen aminoprotease(amino peptides)와 procollagen carboxy-protease(carboxy propeptides) 등에 의하여 교원질로 전환된다. 이후 교원질은 섬유질을 이루어 골기질을 형성하게 된다.<sup>31)</sup> 본 연구에서 Northern blot분석으로 확인된 Type I  $\alpha 2$  교원질 mRNA는 6.4kb이었고 Type I  $\alpha 2$  collagen 소식자를 사용한 이유는 사람과 쥐의 mRNA중 Type I  $\alpha 2$  collagen이 거의 유사하기 때문이다. Sodium fluoride에 대한 제 I 형  $\alpha 2$  교원질 mRNA합성능은 대조군에 비하여 5

$\mu\text{M}$ 에서 227.45%, 10 $\mu\text{M}$ 에서 410.78%, 15 $\mu\text{M}$ 에서 141.16%, 20 $\mu\text{M}$ 에서 100.98%를 나타내어 10 $\mu\text{M}$ 에서 가장 많은 증가를 나타내었다. 이는 DNA합성, 염기성 인산분해활성도, 교원질 합성능등을 촉진시키는 농도와 상관성이 있는 듯 하다. 즉, 시험관내에서 불소가 조골세포의 활성과 기능에 가장 효과적으로 영향을 줄 수 있는 농도는 10 $\mu\text{M}$ 이라고 사료된다.

이상에서와 같이 불소는 조골세포의 부갑상선 호르몬에 대한 cAMP생산을 억제하는 경향을 보였으며, DNA합성과 교원질 및 비교원성 단백질의 합성과 염기성 인산분해효소의 활성도, Type I  $\alpha 2$  mRNA의 생성을 촉진하였다. 이로써 불소는 골형성 세포인 조골세포의 광화능, 증식능, 활성도등에 영향을 미치며, 차후 in vivo에서 불소의 골대사에 미치는 영향과 골조직에 대한 연구가 더 필요하다.

## V. 결 론

불소는 생체에서 골형성을 자극하는 약물들중에서 가장 강력한 물질중의 하나로 알려져 있으나 조골세포에 대한 불소의 직접적인 효과에 관해서는 명확하게 알려져 있지 않은 실정이므로 조골세포에 대한 불소의 영향을 알아보기 위하여 조골세포주 MC3T3-E1을 사용하여 본 연구를 시행하였다. 본 연구는 조골세포주 MC3T3-E1에서 염기성 인산분해효소의 활성도와 부갑상선 호르몬(PTH)에 대한 cAMP생성능, 그리고 제 I 형  $\alpha 2$  교원질 messenger ribonucleic acid (mRNA) level에 대한 Sodium fluoride의 효과에 대하여 시험관내의 실험으로 시행하였으며 이를 분석하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. MC3T3-E1세포에서 부갑상선 호르몬에 대한 cAMP생성 반응은 증가되었다.
2. Sodium fluoride는 PTH에 대한 조골세포의 cAMP생성을 억제시키는 경향을 나타



내었다.

3. Sodium fluoride는 염기성 인산분해효소의 활성도를 2μM, 4μM, 10μM 농도에서 통계적으로 유의성 있게 증가시켰고, 10μM 농도에서 최대치를 나타내었다(p<0.001).

4. sodium fluoride는 제 I 형 교원질의 mRNA의 합성을 10μM에서 대조군에 비해 현저히 증가시켰다.

이상의 결과 Sodium fluoride는 조골세포주 MC3T3-E1 세포의 제 I 형 α2 교원질 mRNA의 생성을 촉진하였으며 일부 농도에서 염기성 인산 분해효소의 증가를 나타내었고, 부갑상선 호르몬에 대한 adenylyate cycle system을 차단하는 경향을 나타내어 조골세포의 활성과 성숙, 기능, 골기질 합성등에 영향을 미친다고 사료된다.

REFERENCE

1. Sandstedt, C. : Einige Beitrage zur Theorie der Zahregulierung, Nord. Tandl. T. 5 : 236-1904 ; 6 : 1, 1905.
2. Vincent DeAngelis. : Observations on the response of alveolar bone to orthodontic force. Am. J. Orthod. Vol. 58, No. 3, 284-294, 1970.
3. Diaz E. A. : Periodontal ligament collagen response to tooth movement. Histochemical and autoradiographic reactions. Am. J. Orthod. 73 : 443-457, 1978.
4. Eva Hellsing, Lars Hammarstrom. : The effects of pregnancy and fluoride on orthodontic tooth movements in rats. EJO, 13, 223-230, 1991.
5. Kenici Yamasaki, Yasunori Shibata, Satoshi Imai, Yuji Tani, Yoshinobu Shibasaki, Tatsuo Fukuhara. : Clinical application of prostaglandin E<sub>1</sub>(PGE<sub>1</sub>) upon orthodontic tooth movement. Am. J. Orthod. 85 : 508-518, 1984.
6. Mertz, W. : The essential trace elements, Science, 213 : 332-1338, 1981.
7. Growth Effects of Vanadium in the Rat, Science. Vol. 174, 426-428.
8. J. B. Kopp, P. Gehron Robey. : Sodium Fluoride Dose Not Increase Human Bone Cell Proliferation or Protein Synthesis In Vitro. Calcif Tissue Int 47 : 221-229, 1990.
9. C. G. Bellows, J. N. M. Heersche, J. E. Aubin. : The effects of Fluoride on Osteoblast Progenitors in Vitro. J. Bone Mine. Res. Vol. 5 Suppl 1 : S101-S105, 1990.
10. A. Okuda, J. Kanehsia, J. N. M. Heershe. : The Effects

- of Sodium Fluoride on the Resorptive Activity of Isolated Osteolasts. J. Bone Mine. Res. Vol. 5, Suppl. 1, S115-S120, 1990.
11. Farley, J. R., Wededal, J. E. and Baylink, D. J. : Fluoride directly stimulates proliferation and Alkaline phosphatase activity of bone forming cell, Science. 222 : 330-332, 1983.
12. Gehron Robey P, Termine JD, : Human bone cells in vitro. Calcif Tiss Int 37 : 453-460, 1985.
13. John R, Farley, Nanine Tarbaux, Susan Hall, David J. Baylink. Evidence That Fuluoride-Stimulated <sup>8</sup>[H]-Thymidine Incorporation in Embryonic Chick Calvarial Cell Cultures is Dependent on the Presence of a Bone Cell Mitogen, Sensitive to Changes in the Phosphate Concentration, and Modulated by Systemic Skeletal effectors. Metabolism, Vol. 37, No. 10 : 988-995, 1988.
14. Dandona, P., Coumar, A., Gill, D. S., Bell, J. and Thomas, M. : Sodium fuluoride stimulate osteocalcin in normal subjects, Clin. Endocrinology. 29 : 437-441, 1988.
15. D. J. Harbrow, M. G. Robinson, P. A. Monsour. : The effect of chronic fluoride administration on rat condylar cartilage. Australian Dental Journal 37(1) : 55-62, 1992.
16. Kodama H., Amagai Y., Sudo H., Kasai S., Yamamoto S. : Establishment of clonal osteogenic cell line from newborn mouth calvaria. Jap. J. Oral. Biol. 23 : 899-. 1981.
17. Piotr C., Nicoletta S. : Single step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Analytical Biochemistry 16 : 156, 1987.
18. 김원진, 정규립 : Sodium fluoride와 Sodium orthovanadate가 조골세포주 MC3T3-E1에 미치는 영향에 관한 연구. 대한치과교정학회지. Vol. 21, No. 1, 97-111, 1991.
19. Roland, B. : Anatomy and ultrastructure bone. Primer on the metabolic bone disease and disorders of mineral metabolism 1st ed. : 3)
20. C. Christiansen. Prevention and Treatment of Osteoporosis : A Review of Current Modalities, Bone, 13, S35-S39, 1992.
21. C. Christiansen. Prevention and treatment of osteoporosis : A review of current modalities. Bone, 13, S35-S39, 1992.
22. Curran G. L., Azarnonoff D. L., Bolinger R. E. : Effect of cholesterol synthesis inhibition in normcholesteremic young men. J. Clin. Invest., 38 : 1251-1261, 1959.
23. Thomas C. Resister, Roy E. Wuthier. : Effects of Vanadate, a potent alkaline phosphatase inhibitor, on <sup>45</sup>Ca and <sup>32</sup>Pi uptake by matrix vesicle enriched fractions from chicken epiphyseal cartilage. J. Biol. Chem. Vol. 259, No. 6. 3511-3518, 1984.
24. Sally M. G. Farley, Jon E. Wergedal, Lynna C. Smith,

- Mark W. Lundy, John R. Farley, David J. Baylink : Fluoride Therapy for Osteoporosis : Characterization of the Skeletal Response by Serial Measurements of Serum Alkaline Phosphatase activity. *Metabolism*, Vol. 36, No. 3, 211-218, 1987.
25. Jones, T. R. and Reid, T. W. : Sodium orthovanadate stimulation of DNA synthesis in Nakano mouse lens epithelial cells in serum free medium, *J. Cell. Physiol.* 121 : 199-205, 1984.
26. Canalis, E. : Effects of sodium vanadate on deoxyribonucleic acid and protein synthesis in cultured rat calvariae, *Endocrinology*. 116(3)855-856, 1985.
27. R. N. Srivastava, D. S. Gill, A. Moudgil, R. K. Menon, M. Thomas, P. Dandona. : Normal ionized calcium, parathyroid hypersecretion, and elevated osteocalcin in a family with fluorosis. *Metabolism*, Vol. 38, No. 2, 120-124, 1989.
28. 姜斗熙, 생리학, 改訂 3版, 1988, 신광출판사.
29. M. Kumegawa, E. Ikeda, S. Tanaka, T. Haneji, T. Yora, Y. Sakagishi, N. Minami, M. Hiramatsu. : The effects of prostaglandin E<sub>2</sub>, parathyroid hormone, 1,25 Dihydroxycholecalciferol, and cyclic nucleotide analogs on alkaline phosphatase activity in osteoblastic cells. *Calcif Tissue Int*, 36 : 72-76, 1984.
30. Janet Vaughan, DM, FRS. : *The physiology of BONE*, 3rd Ed. Clarendon press. Oxford, 1981.
31. Wilson F. : *Metabolic bone disease. Test book of Endocrinology*. 7th ed. : 1218.

## - ABSTRACT -

**THE EFFECTS OF SODIUM FLUORIDE ON TYPE I  $\alpha$  2 COLLAGEN RIBONUCLEIC ACID (mRNA) LEVEL IN MURIN OSTEOBLAST LIKE (MC3T3-E1) CELLS**

Jeung-Bin Hwang, D.M.D., M.S.D., Kyu-Rhim Chung, D.M.D., M.S.D., Ph.D.,  
Young-Guk Park, D.M.D., M.S.D., Ph.D.

*Department of Orthodontics, Division of Dentistry, Graduate School, KyungHee University*

Fluoride is one of the most potent stimulators of bone formation in vivo. But its direct effects on osteoblast is not yet clear. This study was to investigate the effects of Sodium fluoride on alkaline phosphatase(ALP) activity, cAMP formation responsive to parathormone(PTH) and type I  $\alpha$  2 collagen ribonucleic acid (mRNA) level in Murin osteoblast-like (MC3T3-E1) cells. The cells were cultured in  $\alpha$ -Minimal essential medium ( $\alpha$ -MEM) supplemente with 10% fetal bovine serum (FBS) and then changed to 0.1% FBS with various concentration of Sodium fluoride. The ALP activity was assayed by the method of Lowry with disodium phenyl phosphated as substrate. cAMP formation was measured by Radioimmuno Assay(RIA). Type I  $\alpha$  2 collagen ribonucleic acid(mRNA) expression was studied by Nothern blot analysis.

The results were as follows :

1. cAMP level was increased by PTH in MC3T3-E1 cells.
2. Sodium fluoride showed the tendency of inhibitory effects on cAMP responsiveness to PTH in MC3T3-E1 cells.
3. Sodium fluoride increased ALP activity at cocentration of 2 $\mu$ M, 4 $\mu$ M, and 10 $\mu$ M significantly different from control at the 0.001 level. ALP activity revealed maximum value at 10 $\mu$ M in this study.
4. Nothern blot analysis of Sodium fluoride treated cells, using Type I  $\alpha$  2 collagen prove, revealed significant increase at 10 $\mu$ M in MC3T3-E1 cells.

KOREA J. ORTHOD 1993 ; 23(3) : 415-425.

Key words : Fluoride, Alkaline phosphatase, Type I  $\alpha$ 2 collagen