

기계적 자극이 MC3T3-E1 세포의 Alkaline Phosphatase Activity에 미치는 영향

배성민¹⁾ · 경희문²⁾ · 성재현³⁾

교정력은 치아이동과 악골성장을 조절하는 기계적 자극이며, 이러한 기계적 자극에 골세포가 반응하므로써 치조골과 악골의 개조가 일어난다. 이러한 기계적 자극은 크게 압축력과 인장력으로 대별된다. 따라서 본 연구는 인장력 및 압축력의 서로다른 기계적 자극이 세포활성에 미치는 차이를 알아보기 위하여 조골세포주 MC3T3-E1세포를 24well 배양접시에 well당 2×10^4 개의 세포를 넣어 배양한 후, 밀생상태가 되었을때 Diaphragm pump를 사용하여, 25g/cm² 및 300g/cm²의 압축력과 -25g/cm² 및 -300g/cm²의 인장력을 지속적으로 가하였다. 배양한 후 각각 4일, 6일, 10일, 14일, 18일, 20일째에 ALP활성을 측정 한 결과 같은 크기의 압력에서는 인장력에 비해 압축력을 가한 경우에서 ALP활성도가 증가되었으나, 세포는 기계적 자극의 양상 즉 압축력과 인장력을 구별하여 다르게 반응을 하지는 않는 것 같았다. 인장력과 압축력 모두에서 ALP활성도는 시간이 지남에 따라 대조군 수준으로 돌아왔다. 이는 기계적 자극은 세포의 증식과 분화가 왕성한 시기에 세포활성도에 더 크게 영향을 미치는 것으로 생각되며, 압축력과 인장력에 관계없이 기계적 자극의 양이 클수록 ALP활성도의 최고치 도달시간이 지연되어, 기계적 자극의 세기는 세포활성도에 영향을 미칠 것으로 사료된다.

(주요단어 : MC3T3-E1세포, 기계적 자극, Alkaline Phosphatase 활성도)

I. 서 론

교정력은 치아 이동과 악골 성장을 조절하기 위해 필요한 기계적 자극이라고 볼 수있고 이러한 기계적 자극에 의해 치조골과 악골의 개조가 일어나게된다

기계적 자극에 의한 골개조는 골주위 세포들의 활동을 매개로 이루어지므로 이러한 세포반응을 일으키는 기전을 밝힘으로써 치료기간의 단축과 치료시 부작용을 줄이고 보다 이상적인 치료결과를 이룰 수 있을 것이다.

골구조와 기계적인 힘 사이의 관련성에 대해서 오

랫동안 연구되어 왔다. 19세기 Meyer, Cullman은 인간의 대퇴골 근단부에서 해면골의 골소주의 주행방향이 주 응력선과 일치함을 발표하면서 이는 최소의 재료로 최대의 하중에 견디기 위한 구조임을 설명하였다. 그 후 Wolff에 의해서도 인용되었으나 이러한 Wolff's law에 대한 논란은 계속되어 왔다¹¹⁾. 그런 가운데 기계적 자극이 생물학적 활성으로 전환되는 기전에 관하여 의문이 제기되어 왔으며 많은 연구가 행하여졌다.

Liskova와 Hert²⁹⁾는 토끼의 경골에 압축력과 인장력을 가한 실험에서 두 힘이 모두 골형성을 야기시킨다고 하였으며, Lanyon과 Rubin²⁷⁾은 칠면조의 척골에서 간헐적인 기계적 자극이 지속적인 자극보다 더 많은 골침착을 야기시킨다고 보고하였다. Skerry 등^{39,40)}은 칠면조 척골에 기계적 자극을 가하였을때 골

¹⁾ 경북대학교 치과대학 교정학 교실, 정공의

²⁾ 경북대학교 치과대학 교정학 교실, 부교수

³⁾ 경북대학교 치과대학 교정학 교실, 교수

내의 proteoglycan의 재배열을 보고하였고, Morey와 Baylink³²⁾는 무중력상태에서는 실험용 쥐(Wistar)의 골형성이 억제된다고 하였으며, Duke¹²⁾는 과도한 중력(2.6G)에서 태생기 생쥐의 연골형성이 억제됨을 보고하였다. 이와같은 연구결과들은 기계적 자극은 골격계에 다양한 변화를 일으킬 수 있음을 시사하고 있다.

한편 근세기동안 교정학 분야에서 상악골의 성장을 조절하기 위하여 이모장치, 웨이스 마스크등의 악외교정 장치로 기계적인 힘을 가할 경우 골개조가 일어남을 조직학적 증거로 제시하였으며, 또한 치아이동시 치주조직 세포들의 기능 및 성장의 변화도 관찰하였다^{20,21)}. 이와같은 동물실험을 통한 조직형태학적 연구는 골개조에 대하여 생역학적 요인이 미치는 영향을 판단하는데는 좋은 자료가 되었으나 이들의 작용기전을 설명하기에는 여러가지 환경요인, 즉 근육, 혈관, 신경계등에 의해 복합적으로 나타나는 현상등, 어려운 문제점⁴⁷⁾이 있기 때문에 세포생물학적인 수준에서의 이해가 필요하게 되었고 많은 연구가 이루어졌다.

세포가 어떻게 기계적인 자극을 인지하고 분별할 수 있는지에 대한 의문이 제기되면서 여러가지 가설이 보고되었다. 기계적 자극에 대하여 인접 치조골이 휘어지거나 변형³⁴⁾이 일어나고 이에따른 전하의 변화에 의해 골개조가 일어날 수 있으며²⁾, 또한 전기자극이나 맥동자기장 하에서 치아이동속도가 증가하고⁴²⁾ 교원질합성이 증가됨³³⁾을 보고하였다. 그러나 Zengo⁵⁰⁾등은 다른 어떤 조직보다 상아질이 압전위가 가장 높고 단순한 전하의 변화만으로는 골개조를 설명하기 어렵다고 보고하였다. 한편 기계적자극이나 약제를 투여하여 세포형태 변화와 세포골격을 변화시킴으로써 세포대사가 달라질 수 있고 세포형태의 변화가 기계적자극을 인지할 수 있다는 연구가 많이 있었다^{1,16,19,45,49)}.

이와같은 기전을 통해 기계적 자극을 감지한 세포는 autocrine이나 paracrine을 통해 골개조를 직접 야기시키거나 골개조에 필요한 매개물질을 분비하므로써 골개조를 야기시키는 것으로 알려져 있다. 최근 세포배양실험에서 기계적 자극에 대한 골개조의 중요한 매개물질로서 PGs^{6,34,41)}, Ca¹⁷⁾, inositol phosphate³⁷⁾, IL-1 β ³⁶⁾등이 기계적 자극을 받은 조직이나 세포에서 증가됨이 알려져 있다. 이외에도 여러가지 세포에 기계적 자극을 가한 실험에서 DNA¹⁸⁾, type III collagen¹³⁾, metalloproteinase³¹⁾, noncollagenous protein¹⁸⁾ 등

의 합성이 증가됨이 보고되었고, Davidovitch 등¹⁰⁾은 치아이동에 따른 골개조 과정에서 신경 및 면역계가 관여할 수 있고 실제로 여러 종류의 neurotransmitter나 cytokine이 치아이동시 치조골과 치주인대 조직에서 증가됨을 보고하였다. Sandy등³⁸⁾은 이러한 물질 이외에도 알려지지 않은 많은 물질들이 기계적 자극에 의한 골개조에 관여할 수 있다고 하였다.

이러한 배양세포에 기계적 자극을 부여하는 방법으로서는 교정용 확장 나사⁴¹⁾, 볼록한 시계유리¹⁷⁾를 이용하여 배양접시 바닥을 확장하는 방법, 원심분리기나 diaphragm pump를 이용한 정수압을 가하는 방법^{47,35,36)}, 세포가 배양된 collagen ribbon을 확장하는 방법⁴⁸⁾등이 있으며, Kani 등²²⁾ 그리고 Kobayash²³⁾는 세포표층위에 바로 추를 올려 놓는 방법도 사용하였다. 이 중에서 diaphragm pump를 이용한 정수압은 보다 생리적이며 세포형태의 변화없이 압축력과 인장력을 구분하여 가할 수 있고 힘의 크기를 쉽게 조절할 수 있는 장점이 있다.

1923년 Robinson은 높은 pH에서 유기인을 수화절단 시켜서 무기인 이온을 분비시키는 alkaline phosphatase가 석회화장소에서 종종 발견되고 이 효소가 무기인 이온의 국소 농도를 증가시켜서 무기 이온들을 침착시킨다⁸⁾고 제안한 이래로 여러가지 연구가 행하여졌지만 아직도 alkaline phosphatase(ALP)의 정확한 기능은 밝혀지지 않고 있다. 현재까지 알려진 바로는 ALP는 골형성과 관계있고 간엽조직의 조골세포와 조연골세포로의 분화 및 골형성과 관련이 있는 것으로 알려져 있어서 조골세포와 조연골세포의 활성도를 나타내는 적절한 지표로 사용되어 왔다^{9,46)}.

Engström¹⁴⁾등은 치아이동시 압박측의 치주인대 및 치조골에서 ALP활성도가 감소됨을, Ozawa 등³⁵⁾은 지속적인 정수압(3atm)에 의하여 배양세포(MC3T3-E1)에서의 ALP활성이 억제됨을, Copray 등⁹⁾(condyle organ culture) 그리고 Kubota 등²⁵⁾(Ros 17/2.8)은 간헐적인 기계적 자극에 의해서만 ALP활성이 증가됨을 보고하였다. 반면, Kanai²²⁾는 치주인대 세포에서 지속적인 압축력에 의해 ALP 활성이 증가됨을 보고하였다. 현재까지 지속적인 정수압을 가할때 힘의 크기에 따른 세포반응의 차이나 압축력과 인장력을 세포가 구별할 수 있는지에 대한 연구는 미흡한 상태이다.

따라서 본연구는 조골세포주인 MC3T3-E1 세포에 지속적인 정수압을 압축 및 인장력의 형태로 각각 가한 후 골세포 분화의 지표효소로 알려진 ALP활성도

를 측정하여 이러한 물리적인 자극이 분화중인 골세포에 어떤 영향을 미치는 지를 알아보하고자 본 연구를 시행하였다.

II. 재료 및 방법

재 료

α -minimum essential medium(Gibco사, 미국), fetal bovine serum(Gibco사, 미국), trypsin, bovine serum albumin(Type V), sodium paranitro phey 1-2-phosphate, paranitrophenol, nonident F-40(이상 sigma사, 미국), 24well tissue culture plastic dishes(Costar사, 미국)을 사용하였다. 기타 시약들은 시판되는 일급 시약들을 구입하여 사용하였다.

방 법

1. 세포배양

본 연구에 사용된 세포는 조골 세포주 MC3T3-E1이었으며 Kodama²⁴⁾ 등에 의해 신생쥐(C57BL/6)의 두개골에서 분리되어 계대배양된 세포로서 염기성 인산분해효소(alkaline phosphatase, ALP)활성과 교원질 합성능이 있으며, 장기간 배양하면 골기질의 석회화 뿐 만 아니라 조골세포와 골세포로의 분화를 관찰할 수 있다.

세포들을 100mm 세포배양접시에 10% fetal bovine serum(FBS) penicilin 100U/ml, streptomycin 100 μ g/ml, fungizone 5 μ g/ml가 포함된 α -minimal essential medium(α -MEM) 10ml에 넣고 37°C, 95%의 습도, 5%의 CO₂ 배양기에서 배양하였다. 세포가 밀생상태를 이루면 1:3으로 계대배양하였고 일부는 5-10% dimethyl sulfoxide (DMSO)가 함유된 배양액에 분산하여 냉동후 액체질소 탱크에 보관하였다. 실험에 사용할 세포들은 24well plate에 2 \times 10⁴ cells/ml 농도로 부유시킨 후 세포배양액을 2일마다 교환해 주었다.

2. 기계적 자극방법

스테인레스 스틸로 120 \times 110 \times 200mm 크기의 압력 용기에 4개의 구멍을 뚫어 공기압 입구와 출구로 나누어 압력 용기를 제작하였다.

Digphragm pump로 정수압을 가하여 handy man-

ometer(Fujikura, Japan)를 이용하여 출구부위의 밸브를 조절하여 25g/cm²(P25), 300g/cm²(P300)의 압축력과 -25g/cm²(N25), -300g/cm²(N300)의 인장력을 가하였다. 정수압을 가하지 않은 군을 대조군으로 하였다. 세포가 육안적 밀생상태가 된 후 각각의 압력 용기에 24-well plate를 넣은 후 정수압을 가하였다. 배양 접시에 세포를 분주한 후 4일, 6일, 10일, 14일, 18일, 20일마다 각 군에서 4well plate씩 잘라내어 찬 phosphate buffered saline(PBS)으로 2회 씻어낸 후 ALP 측정을 위해 냉동고에 보관하였다.

3. 압축력과 인장력이 배양액 pH에 미치는 영향

10% FBS가 함유된 α -MEM 배양액 20ml를 100mm 세포배양 접시에 넣어 P300과 N300의 압력 용기에 나누어 넣고 6시간, 24시간, 48시간마다 automatic acid-base analyzer로 배양액의 pH를 측정하여 정수압이 배양액 자체에 미치는 영향을 알아보았다.

4. Alkaline phosphatase 활성도 측정

세포층의 alkaline phosphatase 활성도는 Bessay 등⁵⁾과 Burch 등⁷⁾의 방법을 이용하여 다음과 같이 측정하였다. 조건을 준 24well plate의 배양액을 제거한 후 찬 PBS로 3번 씻은 후 측정할 때까지 -20°C에 보관하였다. 얼음위에서 기질(PNPP:sodium paranitrophenyl-2-phosphate)을 준비하고 세포층에 lysis완충액(0.02% nonident F-40)을 1ml 넣어 30초간 초음파 마쇄기로 마쇄한 다음 300 μ l를 취하여 alkaline phosphatase의 활성도를 측정하였고 200 μ l를 취하여 Lowry³⁵⁾법으로 단백질의 양을 측정하였다. 표준용액으로는 paranitrophenol을 30nmol까지 되도록 하여 넣고 37°C에서 30분간 반응시킨 뒤 1N의 NaOH 250 μ l를 넣어 반응을 중단시켰다. 이것을 410nm에서 ELISA reader로 흡광도를 측정하였으며, alkaline phosphatase의 활성치는 nmole/ μ g protein/min 단위로 나타내었다.

III. 성 적

1. 지속적인 정수압이 배양액의 pH에 미치는 영향 (Fig. 1)

6시간, 24시간, 48시간동안 배양액의 pH 변화는 시

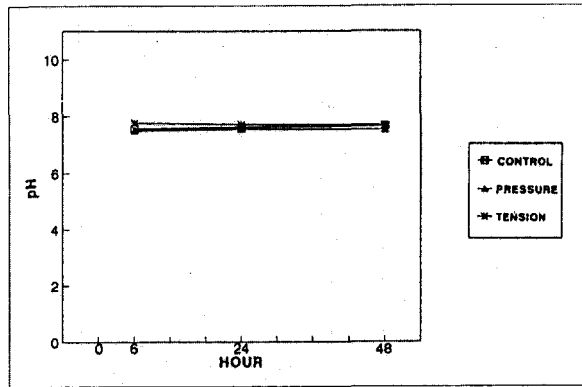


Fig. 1. Effect of continous hydrostatic pressure on the pH in the culture media.

간에 따라 각 군에서는 통계학적으로 유의한 차이는 없었으므로 pH변화로 인한 세포의 반응에 대한 영향을 배제하였다.

2. Alkaline Phosphatase(ALP)활성도(Table 1, Fig. 2,3 & 4)

압축력을 가하였을때 대조군에 비하여 ALP 활성도가 증가되는 경향을 나타내었고, 인장력을 가하였을 때는 ALP 활성도가 감소되는 경향을 나타내었다. 대조군, P25, N25군들은 ALP활성도가 10일째 최고치에 도달하였고 P300과 N300군은 14일째 최고치에 도달하였으며, 18일째 모든 군에서 대조군 수준으로

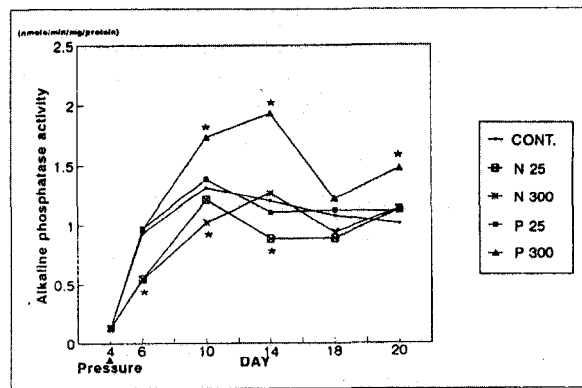


Fig. 2. Effects of continous hydrostatic pressure on ALP activity in MC3T3-E1 cells. * P<0.05

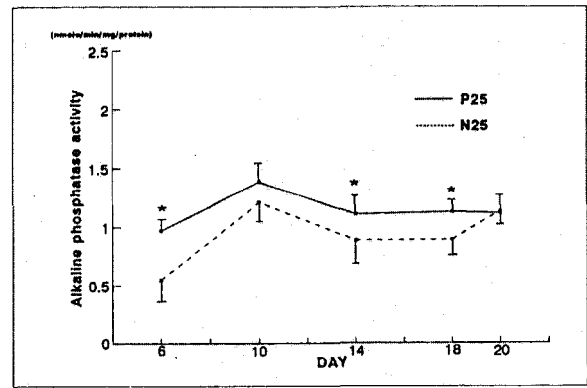


Fig. 3. Difference in ALP activity between P25 group and N25 group. * P<0.05

Table 1. Values of time-dependent alkaline phosphatase activity at each group

Day	CO (±S.D)	P25 (±S.D)	N25 (±S.D)	P300 (±S.D)	N300 (±S.D)
6	0.933 (0.140)	0.971 (0.049)	0.549 * (0.044)	0.965 (0.086)	0.541 * (0.191)
10	1.318 (0.013)	1.388 (0.123)	1.214 (0.026)	1.735 * (0.122)	1.024 * (0.133)
14	1.203 (0.081)	1.109 (0.141)	0.888 * (0.047)	1.932 * (0.043)	1.270 (0.027)
18	1.080 (0.214)	1.126 (0.041)	0.891 (0.036)	1.221 (0.074)	0.940 (0.036)
20	1.013 (0.130)	1.115 (0.060)	1.131 (0.110)	1.477 * (0.100)	1.143 (0.158)

CO : Control group. P25 : Pressure group by 25g/cm². N25 : Tension group by -25g/cm²
 P300 : Pressure group by 300g/cm² N300 : Tension group by -300g/cm²
 * p < 0.05, Statistically significant difference compared to control.

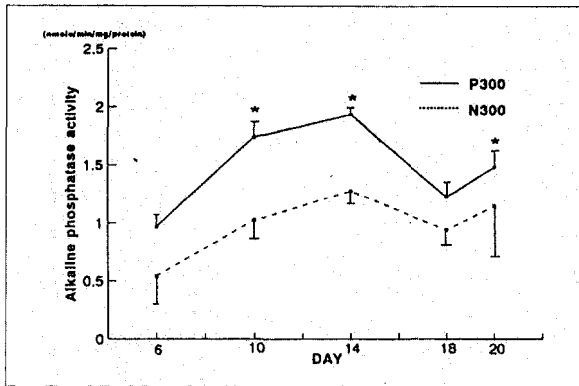


Fig. 4. Difference in ALP activity between P300 group and N300 group. * P<0.05

들어왔다. 같은 크기의 압축력과 인장력에 따른 ALP 활성도의 차이를 보면 P25와 N25, P300과 N300간에 차이를 나타냈으며, 압축력을 가한 모든 군이 인장력을 가한 모든 군보다 높은 ALP 활성도 수치를 나타내었다.

또한 압축력과 인장력에 관계없이 물리적 자극의 양이 클수록 ALP활성도의 최고치 도달시간이 지연되었다.

그러므로 압축력을 가했을때 ALP활성도가 증가되는 경향을 인장력을 가했을때 ALP활성도가 감소되는 경향을 나타내었다. 또한 압축력과 인장력에 관계없이 물리적 자극의 양이 클수록 ALP활성도의 최고치 도달시간이 지연되었다.

IV. 고 찰

본 연구에 사용한 세포들은 조골세포주 MC3T3-E1이며 Kodama 등²⁴⁾에 의해 신생쥐 두개골에서 분리한 계대배양되는 세포로써 ALP활성과 교원질 합성능이 있으며 장기간 배양하면 골기질의 석회화 뿐만 아니라 조골세포와 골세포로 분화된다. doubling time은 18시간이내이며 급속히 성장하여 4일정도에 모자이크 형태를 나타내는 단층의 밀생상태를 이루고 그 후에는 서서히 성장하면서 다층을 형성한다⁴³⁾. 이와같은 조골세포의 분화 및 활성도를 나타내는 지표로 사용되는 ALP는 경조직 내의 기질낭포(matrix vesicle)나 세포의 외측 세포막에 고농도로 존재한다²⁶⁾.

ALP는 다른 유전자(gene)에서 유래되는 3가지의 동종효소(isoenzyme)가 존재하는데 placenta, intes-

tine, liver-bone-kidney type이며 liver-bone-kidney type 동종효소(isoenzyme)는 동일한 유전자(gene)에서 유래되므로 동일한 단백질을 가지지만 탄수화물의 구조가 다르다⁴⁶⁾.

이 효소의 기능은 정확하게 알려져 있지 않지만 여러연구에서 보고된 바에 의하면 조골세포와 조골골세포로의 분화, fibrous protein과 pre-osseous matrix형성, 기저물질(ground substance)의 점액성다당류(mucopolysaccharide)형성, matrix내의 phosphate acceptor의 transphosphorylation, crystal growth에 방해되는 organic phosphate를 제거하는 기능이 있는 것으로 추정된다⁴⁴⁾.

Lian과 Stein²⁸⁾은 primary bone cell 배양 연구에서 미분화 세포에서 조골세포의 성장 및 분화 과정은 성장(proliferation), 골기질형성(matrix formation), 석회화(mineralization) 시기를 거치는데 ALP 활성도와 ALP mRNA가 증식(proliferation) 시기 직후부터 급속히 증가하다가 석회화 시기로 가면서 감소되기 시작한다고 보고한 바 있다. 본 연구에서도 대조군, N25, P25군은 10일경에 P300과 N300군은 14일경에 ALP활성도가 최고치에 도달한 후 18일경에 모든 실험군이 대조군 수준으로 돌아오는 것을 보면 석회화 시기에는 실험군과 대조군에서 별 차이가 없을 것으로 생각된다.

Lanyon과 Rubin²⁷⁾은 동물실험에서 간헐적인 힘이 지속적인 힘보다 골형성이 증가됨을, Kubota 등²⁵⁾은 세포배양 실험에서 간헐적인 힘에 의해 ALP활성이 증가됨을 보고하였다. 지속적 힘을 사용한 본 실험에서 초기에 ALP활성이 인장력을 가한 군에서는 대조군에 비해 감소되는 경향을, 압축력을 가한 군에서는 증가되는 경향을 나타내다가 시간이 지남에 따라 압축력과 인장력을 가한 군 모두 대조군 수준으로 돌아왔다. 이러한 현상은 지속적인 힘을 가했을때는 세포가 어느정도 환경에 적응하기 때문이라고 생각된다. 또한 P25군과 N25, P300군과 N300간에 시간에 따른 ALP 활성도의 변화가 유사한 경향을 나타내었는데 이는 힘의 크기에 따른 세포의 적응시간의 차이 때문에 이러한 경향을 나타내었다고 생각한다.

Ozawa 등³⁵⁾의 연구에서 약 2kg/cm²의 지속적인 정수압을 MC3T3-E1세포에 가할때 PGE₂의 증가에 의해 ALP활성이 감소되었고, PGE₂의 농도에 따른 ALP활성의 변화를 관찰한 세포배양 실험에서 비교적 낮은 농도(10⁻⁹M이하)에서는 오히려 PGE₂에 의해 ALP활성이 증가된 결과를 보고하였다. Ozawa등의

연구보다 약한 300g/cm² 압축력을 가한 본 연구에서 ALP 활성이 증가된 것은 기계적 자극에 의해 PGE₂의 농도변화가 낮은 농도에서 차이가 났기 때문이라고 사료된다.

일반적으로 치아 이동시 압박측에는 파골세포가 증가해서 골흡수가 일어나고 조골세포가 증가해서 골침착이 일어난다고 알려져 있다¹⁴⁾. 그러나 치주인대처럼 막으로 둘러싸인 치조골에 생역학적인 힘을 가할때와는 달리 골세포 간질(inter cellular matrix)에 힘을 가할때는 압박측에는 골침착, 인장측에는 골흡수가 발생된다¹⁵⁾. 이와같이 상충되는 점을 나름대로 해석한 Zengo⁵⁰⁾등의 보고를 보면 치아이동 방향으로 치조골이 휘어져서 압박측의 치근면쪽 치조골은 인장력을, 외측 치조골은 압축력을 받게된다. 오목한 외측치조골면은 음전하가 생겨서 조골세포의 활성이 증가되어 대상성 골형성이 일어나고 볼록한 치근면쪽 치조골은 양전하가 생겨서 파골세포의 활성이 증가되어 골흡수가 일어난다고 하였다.

볼록한 시계유리나 교정용 확장나사를 사용해서 배양접시 바닥을 확장한 세포배양 실험에서 골흡수를 야기시키는 인자들이 발견된 바 있고 Saito 등³⁶⁾도 간헐적인 음압을 MC3T3-E1세포에 가할때 PGE₂가 다소 증가된 것을 보고한 바 있다.

이러한 관점에 보면 인장력군보다 압축력을 가한 군에서 ALP활성이 증가된 본 연구 결과를 설명할 수 있을것이라 생각되며 정수압을 사용했을때 세포의 세포막은 반투막으로 구성되어서 정수압에 의해 세포형태의 변화가 초래되지 않기 때문에 배양접시로 변형시키는 기계적 방법에 의해 ALP활성의 증가를 보고한 Kubota 등²⁵⁾의 결과와는 비교하기 어려울 것이라 사료된다.

이상의 연구결과 인장력과 압축력은 공히 MC3T3-E1 세포의 ALP활성도에 영향을 미치므로 세포가 어떻게 두 종류의 자극을 구별하여 골흡수와 침착을 일으키는지, 그리고 어떠한 기전으로 기계적 자극을 전달 시키는지에 관하여서는 향후 분자생물학적 방법 등을 통한 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

요 약

조골세포주 MC3T3-E1세포에 지속적인 정수압을 가할때 힘의 크기 및 인장력과 압축력에 따른 ALP활성을 측정하여 여러가지 기계적 자극에 대한 세포활성의 차이를 알아보기 위하여 24well plate에 2×104

cell/well의 MC3T3-E1세포를 배양하여 밀생상태가 되면 Diaphragm pump를 사용하여 압축력 25g/cm², 300g/cm²과 인장력 -25g/cm², -300g/cm²을 가해서 4일, 6일, 10일, 14일, 18일, 20일마다 ALP활성을 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

- 인장력에 비해 압축력에서 ALP활성이 증가되었다.
- 인장력과 압축력 모두 ALP활성도가 시간이 지남에 따라 대조군 수준으로 돌아왔다.
- 압축력과 인장력에 관계없이 물리적 자극의 양이 클수록 ALP활성도의 최고치 도달시간이 지연되었다.

참 고 문 헌

1. Aggeler, J., Frisch, SM. and Werb, Z. : Changes in cell shape correlate with collagenase gene expression in rabbit synovial fibroblasts, *J.Cell Biol.*, 98:1662-71, 1984.
2. Bassett, CAL. and Becker, RO. : Generation of electrical potentials by bone in response to mechanical stress, *Science*, 137:1063-6, 1962.
3. Baumrind, S. and Buck, DL. : Rate changes in cell replication and protein synthesis in the periodontal ligament incident to tooth movement, *Am. J. Orthod.*, 57:109-31, 1970.
4. Baumrind, S. : A reconsideration of the propriety of the pressure-tension hypothesis, *Am.J.Orthod.*, 55:12-22, 1969.
5. Bessay, OA., Lowry, OH. and Brock, MJ. : A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with fibecubic millimeters of serum, *J.Biol.Chem.*, 164:321-29, 1946.
6. Binderman, I., Zor, U., Kaye, AM., Shimshoni, Z., Harell, A. and Somjen, D. : The transduction of mechanical force into biochemical events in bone cells may involve activation of phospholipase A₂ *Calcif Tissue Int*, 42:261-6, 1988
7. Burch, WM. and Levovitz, HE. : In vitro stimulation of alkaline phosphatase activity in immature embryonic chick pelvic cartilage by adenosine 3',5'-monophosphate, *J.Cell.Biol.*, 93-338-42, 1982.
8. Cole, As. and Eastoe, JE. : An early theory of mineralization-Alkaline phosphatase hypothesis, *Biochemistry and oral Biology 2nd Edition*, P.452-55,
9. Copray, UCV.M., Jansen, HWB. and Duterloo, HS. : Effect of compressive forces on phosphatase activity in mandibular condylar cartilage of the rat in vitro, *J. Anat.*, 140:479-89, 1985.
10. Davidovitch, Z., Nicolay, OF., Ngan, PW. and Shanfeld, JL. : Neurotransmitters, cytokines and the control of alveolar bone remodelling in orthodontics, *Dent. Clin.*

- North Am., 32:411-35, 1988.
11. Dibbets, Josm.H. One century of Wolff's law. In : Bone Biodynamics in orthodontic and orthopedic treatment D.S. Carlson, and S.A. Goldstein(eds.), Monograph 27, craniofacial growth series, The center for Human Growth and Development, University of Michigan, Ann Arbor, Michigan, 1992. pp.1-13.
 12. Duke, JC.: Suppression of morphogenesis in embryonic mouse limbs exposed in vitro to excessive gravity, *Teratology*, 27:427-36, 1983.
 13. Duncan, GW., Yen, EHK., Dritchard, ET. and Suga, DM. : Collagen and prostaglandin synthesis in force-stressed periodontal ligament in vitro, *Dent.Res.*, 63:665-9, 1984.
 14. Engström, C., Granström, G. and Thilander, B. : Effect of orthodontic force on periodontal tissue metabolism-A histologic and biochemical study in normal and hypocalcemic young rats, *Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.*, 93:486-95, 1988.
 15. Enlow, DH. : Hand book of facial growth 2nd Edition, P.138-139.
 16. Folkman, J. and Moscona, A. : Role of cell shape in-growth control *Nature* 273:345-9, 1978.
 17. Harell, A., Dekel, S. and Binderman, I. : Biochemical effect of mechanical stress on cultured bone cells, *Calcif Tissue Res(Suppl.)*, 22:202-7, 1977.
 18. Hasegawa, S., Sato, S., Saito, S., Suzuki, Y. and Brunette, DM. :Mechanical stretching increase the number of cultured bone cells synthesising DNA and alters their pattern of protein synthesis, *Calcif Tissue Int.*, 37:431-6, 1985.
 19. Hong, HL. and Brunette, DM. : Effect of cell shape on proteinase secretion by epithelial cells, *J. Cell Sci.*, 87:259-67, 1987.
- Immunohistochemical study of alkaline phosphatase in growth plate cartilage, bone and fetal calf isolated chondrocytes using monoclonal antibodies, *Acta histochem.*, 82:211-7, 1987.
20. Janzen, EK. and Bluher, JA. : The cephalometric, anatomic and histologic changes in *Macaca mulatta* after application of a continuous- acting retraction force on the mandible, *Am.J.Orthod.*, 51:823-55, 1965.
 21. Kambara, T. : Dentofacial changes produced by extraoral forward force in the *Macaca irus*, *Am. J. Orthod.*, 71:249-77, 1977.
 22. Kanai, K., Nohara, H. and Hanada, K.: Initial effects of continuously applied compressive stress to human periodontal ligament fibroblasts, *J.Jpn.Orthod.*
 23. Kobayashi, M. :Effects of continuously applied compressive stress on protein synthesis of human periodontal ligament fibroblast, *J.Jpn. Orthod.Soc.*, 52:372-78, 1993.
 24. Kodama, H., Amagai, Y., Sudo, H., Kasai, S. and Yamamoto, S. : Establishment of a clonal osteogenic cell line from newborn mouse calvaria, *Jpn. J. Oral. Biol.*, 23:899-901, 1981.
 25. Kubota, T., Yamauchi, M., Onozaki, J., Sato, S., Suzuki, Y. and Sodek, J.: Influence of an intermittent compressive force on matrix protein expression by ROS 17/2.8 cells, with Selective stimulation of osteopontin, *Archs Oral Biol.*, 23-30, 1992.
 26. Kubota, T., Yamauchi, M., Takeuchi, M., Kinoshida, I., Sato, S. and Suzuki, Y. : Physical stress increased alkaline phosphatase activity in cultured bone cells, *Bull of kanagawa dent. Col.*, 16:75-80, 1988.
 27. Lanyon, LE. and Rubin, CT. : Static vs dynamic loads as an influence on bone remodelling. *J. Biomech.*, 17:897-905, 1984.
 28. Lian, JB. and Stein, GS. : Concepts of osteoblast growth and differentiation : Basis for modulation of bone cell development and tissue formation, *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, 3:269-305, 1992.
 29. Liskova, M. and Hert, J. : Reaction of bone to mechanical stimuli Part 2. Periosteal and endosteal reaction of tibial diaphysis in rabbit to intermittent loading, *Folia Morphol.*, 19:301-17, 1971.
 30. Lowry, OB., Rosenbrough, MJ., Farr, AL. and Rebar, RW.:Protein measurement with Folin phenol reagent, *J.Biol.Chem.*, 193:255-60, 1951.
 31. Meikle, MC., Sellers, A. and Reynold, JJ.: Effect of tensile mechanical stress on the synthesis of metalloproteinases by rabbit coronal sutures in vitro, *Calcif Tissue Int.*, 30:77-82, 1980.
 32. Morey, ER. and Baylink, DJ., : Inhibition of bone formation during Space flight, *Science.*, 201:1138-141, 1978.
 33. Murray, JC. and Farndale, RW. : Modulation of collagen production in cultured fibroblasts by a low-frequency pulsed magnetic field, *Biochim Biophys Acta.*, 838:98-105, 1984.
 34. Ngan, PW., Crock, B., Vargheses, J., Lanese, R., Shanfeld, J. and Davidovitch, Z. : Immunohistochemical assessment of the effect of chemical and mechanical stimuli on cAMP and prostaglandin E levels in human gingival fibroblasts in vitro, *Archs oral Biol.*, 33:163-74, 1988.
 35. Ozawa, H, Imamura, K., Abe, E., Takahashi, N., Hiraide, T., Shibaski, Y., Fukuhara, T. and Suda, T., :Effect of a continously applied compressive pressure on mouse osteoblast-like cells CM(3T3-E1) in vitro, *J.Ce.Physiol.*, 142:177-185, 1990.
 36. Saito, M., Saito, S., Ngan, PW., Shanfeld, J. and Davidovitch, Z.: Interleukin 1 beta and prostaglandin E are involved in the response of periodontal cells to mechanical stress in vivo and in vitro, *Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.*, 99:226-40, 1991.
 37. Sandy, JR., Meghji, S., Farndale, RW. and Meikle, MC.

- : Dual elevation of cyclic AMP and inositol phosphates in response to mechanical deformation of murine osteoblasts, *Biochim Biophys Acta.*, 1010:265-9, 1989.
38. Sandy, JR., Meghji, S., Scatt, AM., Harvey, W., Harris, M. and Meikle, MC., : Murine osteoblasts release bone-resorbing factors of high and low molecular weights : stimulation by mechanical deformation, *Bone Miner.*, 5:155-68, 1989.
 39. Skerry, TM., Bitensky, L., Chayen, J. and Lanyon, LE. : Loading-Related Reorientation of Bone proteoglycan in vivo. Strain Memory in Bone Tissue? *J.Orthop.Res.*, 6:547-151, 1988.
 40. Skerry, TM., Suswillo, R., El Haj AJ., Ali NN., Dodds RA. and Lanyon LE., Load-induced proteoglycan orientation in Bone Tissue in vivo and in vitro. *Calcif Tissue Int.*, 46:318-26, 1990. *Soc.*, 51:153-63, 1992.
 41. Somjen, D., Binderman, I., Berger, E. and Harell, A. : Bone remodelling induced by physical stress in prostaglandin E mediated *Biochim Biophys Acta.*, 627:91-100, 1980.
 42. Stark, TM. and Sinclair, Pm. : Effect of pulsed electromagnetic fields on orthodontic tooth movement, *Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.*, 91: 91-104, 1987.
 43. Sudo, H., Kodama, HA., Amagai, Y., Yamamoto, S. and Kasai, S. : In vitro differentiation and Calcification in a new clonal osteogenic cell line derived from new born mouse calvaria, *J.Cell.Biol.*, 96:191-8, 1983.
 44. Teaford, ME. and White, AA.: Alakine phosphatase and osteogenesis in vitro, *P.S.E.B.M.*, 117-541-6, 1964.
 45. Unemori, EN. and Werb, Z.: Reorganization of polymerized actin : A possible trigger for induction of procollagenase in fibroblasts cultured in and on collagen gels, *J.Cell.Biol.*, 103:1021-31, 1986.
 46. Väänäne, K., Morris, D., Munoz, PA. and Parvinen, EK. :
 47. Yamamoto, TT., Soma, S., Nakagawa, K., Kobayashi, Y., Kawakami, M. and Sakuda, M. : Comparison of the effects of hydrostatic compressive force on glycosaminoglycan synthesis and proliferation in rabbit chondrocytes from mandibular condylar cartilage, nasal septum, and sphenoid-occipital synchondrosis in vitro, *Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.*, 99:448-55, 1991.
 48. Yeh, C-K. and Rodan, GA., : Tensile forces enhance prostaglandin E₂ synthesis in osteoblastic cells grown on collagen ribbon, *Calcif Tissue Int.*, 36:S67-S71, 1984.
 49. Yeh, C-K. and Rodan, GA.: Microtubule disruption enhances prostaglandin E production in osteoblastic cells, *Biochim. Biophys Acta.*, 927:315-23, 1987.
 50. Zengo, AN., Pawluk, RJ. and Bassett, CAL. : Stress-induced bioelectric potentials in the dento-alveolar complex, *Am.J.Orthod.*, 64:17-27, 1973.

-ABSTRACT-

The Effects of Mechanical Stress on Alkaline Phosphatase Activity of MC3T3-E1 Cells

Sung-Min BAE, D.D.S., **Hee-Moon KYUNG**, D.D.S., M.S.D., Ph.D.,
Jae-Hyun SUNG, D.D.S., M.S.D., Ph.D.

Department of Orthodontics, College of Dentistry, Kyungpook National University

Orthodontic force is a mechanical stress controlling both of tooth movement and skeletal growth. the mechanical stress stimulate bone cells that may exert some influence on bone remodelling

The purpose of this study was to evaluate the difference in cellular activity depending on mechanical stresses such as compressive and tensile force by determining the alkaline phosphatase(ALP) activity

A clonal osteogenic cell line MC3T3-E1 was seeded into a 24-well plate(2×10^4 /well). At the confluent phase, a continuous compressive hydrostatic pressure(25g/cm², 300g/cm²) and continuous tensile hydrostatic pressure(-25g/cm², -300g/cm²) were applied for 4, 6, 10, 14, 18, 20 days respectively by a diaphragm pump. At the end of the stimulation period, cell layers were prepared for ALP activity assay.

The ALP activity of the compressive group increased more than that of the tensile group at same force magnitude,

whereas the cells responded to a similar pattern regardless of the type of mechanical stress

The ALP activity of the compressive and tensile group turned into the level of the control group as the length of time increased. These results indicated that a mechanical stress may be more effective on cellular activity during active cellular proliferation and differentiation periods.

The time to achieve maximum ALP activity was delayed as the mechanical stress increased in both the compressive and the tensile group.

Accordingly, the magnitude of the stress rather than the type of mechanical stress may have more influence on cellular activity.

KOREA. J. ORTHOD. 1996 ; 26 : 291-299

※ Key words : MC3T3-E1, mechanical stress, alkaline phosphatase activity