

백서 태자 두개관에서 유래된 조골세포의 증식 및 골결절 형성양상

경북대학교 치과대학 소아치과학 교실

김시형 · 남순현 · 신희인

Abstract

THE ASPECT OF PROLIFERATION AND BONE NODULE FORMATION IN OSTEOBLAST-LIKE CELLS DERIVED FROM FETAL RAT CALVARIA IN VITRO*

Shi-Hyeong Kim, Soon-Hyeun Nam, Hong-In Shin

Dept. of Pediatric Dentistry, School of Dentistry, Kyungpook National University, Taegu, Korea

The purpose of this study was to investigate the aspects of proliferation and bone nodule formation of osteogenic precursor cells. To determine the effects of ascorbic acid and dexamethasone upon capacity of osteoblast proliferation and bone nodule formation, cells were maintained in the presence of one or some of these additives for up to 30 days. Group I culture was maintained in standard medium(DMEM plus 10% plus antibiotics), group II was maintained in supplemented medium containing dexamethasone, group III was maintained in supplemented medium containing ascorbic acid and sodium- β -glycerophosphate, and group IV was maintained in supplemented containing ascorbic acid, sodium- β -glycerophosphate and dexamethasone. Morphology of bone nodules was observed with light microscope and electron microscope.

The results were as follows :

- Proliferation capacity of osteoblasts was not affected by single use of dexamethasone, but it was chiefly affected by ascorbic acid.
- Cellular morphology was fibroblastic appearance initially, but, it was gradually changed to polygonal shape accompanied by confluency stage.
- Pluripotent mesenchymal cells existed during primary culture, they were differentiated to adipocyte, chondrocyte, osteocyte according to culture condition.
- Dexamethasone increased bone nodule formation under the condition that the culture

was maintained with supplemented medium ascorbic acid and sodium- β -glycerophosphate.

- when the cultures were stained with alizarin red, the group supplemented with dexamethasone, ascorbic acid and sodium- β -glycerophosphate showed the marked increase of bone nodule formation, but the group supplemented with ascorbic acid and sodium- β -glycerophosphate revealed only small amounts of bone nodules. And the groups cultured without ascorbic acid showed no observed any of bone-like mass independent of dexamethasone addition.

* A thesis submitted to the Council of the Graduate School of Kyungpook National University in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science in Dentistry in December 1996.

I. 서 론

골조직은 생체내에서 계속적으로 골개조가 일어나는 조직으로, 섬유아세포, 연골세포, 미분화간엽세포, 골세포(bone cell) 등 다양한 세포들로 이루어져 있기에¹⁻³⁾, 골의 형성, 흡수, 대사 등에 관여하는 약제 및 성장인자가 어느 세포에 어떻게 작용하는지 알기 위해서는 각각의 골구성세포들을 분리하여 배양하는 방법들이 필수적이다.

지금까지 골조직에 혼재되어 있는 세포를 각기 분리하여 배양하려는 많은 노력들이 있어 왔으며, 현재는 collagenase나 protease 같은 효소를 사용하여 직접 골구성세포들을 분리해 내는 효소처리법^{1,4-10)}, 골조직 조각을 유리판 위에 위치시켰을시 고형기질위로 세포가 이동 부착하는 성질에 기초를 둔 explant법^{11,12)}, 그리고 골수강을 통하도록 주입한 배양액 내로 세포들이 유리되도록 하는 법¹³⁻¹⁹⁾ 등이 사용되고 있다.

특히, 1964년 Peck 등²⁰⁾에 의해 개발된 백서 태자 두개관의 효소처리법은 주로 조골세포 계통의 세포를 얻을 수 있는 방법으로, 분리된 이들 세포는 특징적으로 높은 alkaline phosphatase(이하 ALP) 활성도를 나타내고^{1,14,21,22)}, 부갑상선 호르몬에 노출되었을 때 세포내 cAMP가 증가되며^{2,23)}, 골기질의 주된 유기물

질인 type I 교원섬유²¹⁻²³⁾ 및 성숙된 조골세포의 표식인자인 osteocalcin^{21,24-27)} 등을 합성 분비하고, 특징적으로 골결절을 형성한다^{5,6,11,21,27,28)}.

이들 성장중 특히 골결절 형성은 조골세포를 확인할 수 있는 최종적인 확인자이며^{5,11,26,27)}, 시험관에서 조골세포를 배양시 골결절 형성능은 배양액에 첨가하는 여러 호르몬 및 약제에 의해 영향을 받는다.

배양 조골세포의 골결절 형성능에 영향을 주는 물질에 대하여 Grigoriadis 등²⁾은 골결절이 형성되기 위해서는 배양액에 ascorbic acid, Na- β -glycerophosphate, dexamethasone의 첨가가 필수적이라 하였고, Robey 등²⁷⁾은 분리한 골세포에 dexamethasone을 첨가하여 배양할시, dexamethasone이 첨가되지 않은 군에 비해 골결절 형성수와 크기가 현저히 증가한다고 하였다. Aronow 등²⁴⁾과 Bellow 등⁵⁾은 ascorbic acid가 첨가되지 않으면 기질 형성이 되지 않기 때문에 골결절이 형성되지 않는다고 하였고, Tenenbaum 등²⁹⁾은 형성된 골결절의 광화를 위해서는 유기인산이 필수적이라고 하였다.

골결절 형성에 영향을 미칠 수 있는 물질중 하나인 dexamethasone은 미분화전구세포로부터 조골세포로의 분화에 중요한 역할을 하며, ALP 활성도와 type I 교원섬유 합성 등에 중요한 영향을 미치는 것으로 알려져 왔다. 그러나 아직 골결절 형성에 대한 자세한 기전 및 dexa-

methasone이 세포의 증식능에 미치는 영향과 형성된 골결절의 조직학적 형태에 관한 연구는 잘 알려져 있지 않다.

이에 본 연구는 백서 태자 두개관을 효소처리법으로 처리하여 세포를 얻고, 이들의 증식능 및 골결절 형성에 미치는 dexamethasone의 영향과 형성된 골결절의 조직학적 양상을 주사전자현미경 및 투과전자현미경으로 관찰해 보고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

배양액은 Dulbecco's modified Eagle medium(DMEM, Gibco사, 미국, 이하 표준배양액)를 사용하였고, fetal bovine serum(Gibco사, 미국, 이하 FBS로 표기) 및 항생제로 streptomycin(동아제약, 한국), penicillin(근화제약, 한국), amphotericin(Sigma, 미국)을 첨가하였다. 기타 trypsin, TLCK, glucose, bovine serum albumin, alizarin red, ascorbic acid, Na-β-glycerophosphate, dexamethasone(이상 Sigma사, 미국)과 collagenase B(Boehringer Mannheim GmbH, 독일)를 구입하여 사용하였으며, 기타 시약은 시판되는 일급 시약들을 구입하여 사용하였다.

2. 방법

1) 조골세포의 분리 및 배양

골세포를 분리하기 위해 태생 21일 된 Sprague-Dawley계 백서를 사용하였다. 백서의 측두골을 무균적으로 분리하여 골편에 부착된 모든 연조직을 제거하였고, 25mM HEPES, 10 mM NaHCO₃, 3mM K₂HPO₄ · 3H₂O, 130mM NaCl, 1mM CaCl₂ · 2H₂O, 24mM KCl, 5mg/ml glucose, 2mg/ml albumin, collagen, TLCK로 구성된 효소용액에 침적시킨 후, 37℃로 맞춰둔 shaking water bath에서 20분간 항온처리하였다. 이 용액을 멸균된 필터(40 μm)가 부착된 주사기를 통해 여과하여 1st population을 얻었다.

용해되지 않고 남아 있는 골조각을 다시 효

소용액에 침적시켜 20분간 다시 incubation 하였으며, 위와 같은 과정을 반복하여 2nd, 3rd, 4th, 5th population을 얻은 후, 3rd, 4th, 5th population을 합하여 본 실험에 사용하였다.

일차분리한 세포를 100mm 세포배양 접시에 접종한 후, 배양액으로 10% FBS 및 100U/ml penicillin, 100μg/ml streptomycin, 0.3μg/ml amphotericin이 포함된 표준배양액을 첨가하고, 37℃, 100% 습도, 5% CO₂ 공기 혼합 배양기(Sanyo, 일본)에서 3일 간격으로 배양액을 교환하면서 밀생할 때까지 배양하였다. 세포가 밀생상태에 이르면, 배양액을 제거하고 phosphate buffered saline(이하 PBS)으로 세척하고 0.05% trypsin/0.02% EDTA로 처리하여 세포를 완전히 분리 수거한 후 이들을 실험에 이용하였다.

본 실험은 상기 사용된 배양액에 부가적으로 첨가된 첨가물에 의해 다음과 같이 분류하였다.

제1군 : 다른 첨가물 없이 표준배양액으로 배양한 군

제2군 : 표준배양액에 dexamethasone(10^{-8} M)을 첨가하여 배양한 군

제3군 : 표준배양액에 ascorbic acid(50μg/ml) 및 Na-β-glycerophosphate(10 mM)를 첨가하여 배양한 군

제4군 : 표준배양액에 ascorbic acid(50μg/ml), Na-β-glycerophosphate(10 mM), dexamethasone (10^{-8} M)을 첨가하여 배양한 군

2) 조골세포의 증식능 및 골결절 형성능

12 well 세포배양접시(Corning사, 미국)에 각 well당 4×10^4 개의 세포를 접종하였으며, 각 군에 따른 배양액을 첨가하여 배양하였다. 매 3일마다 배양액을 교환하였으며, 배양 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 17, 21, 25, 30일 후 세포를 수거하여 hemocytometer로 세포수를 산정하였다. 각 군간의 세포수의 차이를 비교하기 위해 각 계측항목의 평균 및 표준편차를 구한 후, SAS 통계 패키지의 반복측정 분석법(repeated measure ANOVA)을 사용하여 유의성을 검정하였다.

골결절 형성능의 관찰을 위해서 12 well 세

포배양접시를 사용하였으며, 각 well당 4×10^4 개의 세포를 넣어 각 군별에 따른 배양액을 첨가하여 배양하였다. 30일간 배양후 배양액을 제거하고 PBS로 3회 세척하였으며, 10% buffered formalin으로 고정된 후 alizarin red로 30분간 염색하였고, acetic acid로 세척한 후 관찰하였다.

3) 광학현미경 및 도립위상차현미경에 의한 세포형태 관찰

골세포 증식능의 측정과 병행하여 매 2일 간격으로 도립위상차현미경에 의한 세포의 형태학적 변화를 관찰하였다.

광학현미경에 의한 세포형태 관찰을 위하여 12 well 세포배양접시에 멸균된 cover slide를 위치시키고, 각 well당 4×10^4 개의 세포를 넣어 각 군별에 따른 배양액을 첨가하였다. 배양 9, 13, 20, 30일 후에 각각 배양액을 제거하고 PBS로 3회 세척후 10% buffered formalin으로 고정하였으며, 이를 H&E 염색하여 관찰하였다.

4) 투과전자현미경 및 주사전자현미경에 의한 골결절 형태 관찰

투과전자현미경 및 주사전자현미경적 관찰을 위해서 12 well 배양접시를 사용하였으며, 각 well당 4×10^4 개의 세포를 접종하였다. 배양액에 50 μ g/ml ascorbic acid, 10mM Na- β -glycerophosphate, 10nM dexamethasone을 첨가하였으며, 매 3일 간격으로 배양액을 교환하였고 30일간 배양하였다.

투과전자현미경으로 관찰하기 위해서는 배양액을 제거한 뒤, PBS로 3회 세척하였다. 여기에 2.5% glutaraldehyde 용액으로 30분간 전고정하고 1% OsO₄ 용액으로 1시간 후고정한 다음 계열알콜로 탈수한 후 Epon812에 포매하였다. 이를 초미세박절기를 이용하여 1 μ m 두께의 박절편을 형성하고 1% toluidine 용액으로 염색한 후 관찰부위를 설정한 다음 초미세박절기를 이용하여 60nm두께의 초박절편을 만들어 uranylacetate-lead citrate 이중염색하여 H-600 투과전자현미경(Hitachi, 일본)으로 관찰하였다.

주사전자현미경으로 관찰하기 위해서는 역시

2.5% glutaraldehyde로 30분간 전고정하고 1% OsO₄로 1시간 후고정한 후 PBS로 세정하였으며, 2% tannic acid로 전도염색하여 PBS로 세정한 다음, 1% OsO₄로 재고정하였다. 이를 PBS로 다시 세정하여 계열 알콜로 탈수한 다음 임계건조기로 건조시켜, 금으로 coating한 후 S-2300 주사전자현미경(Hitachi, 일본)으로 관찰하였다.

III. 성 적

1. 골세포 증식능에 대한 ascorbic acid와 dexamethasone의 효과(Fig. 1-2, Table 1)

모든 군에서 배양초기부터 급격한 세포의 증식을 나타내었으나, 표준배양액을 사용한 1군과 표준배양액에 dexamethasone을 첨가한 2군에서는 21일부터 세포의 증식이 중단되었고 ($p < 0.05$), 표준배양액에 ascorbic acid와 Na- β -glycerophosphate를 첨가한 3군과 ascorbic acid, Na- β -glycerophosphate 그리고 dexamethasone을 첨가한 4군에서는 배양 17일 이후에 세포증식이 중단되었을 뿐 아니라 시간경과에 따라 오히려 세포수가 감소되는 경향을 나타내었다($p < 0.05$).

Dexamethasone 첨가유무에 따른 세포 증식능에 있어 단순히 표준배양액으로 배양한 1군과 표준배양액에 dexamethasone을 첨가한 2군 사이에는 증식능의 차이가 나타나지 않았다($p < 0.05$).

Ascorbic acid에 의한 증식능에 있어 표준배양액으로 배양한 1군에 비해 표준배양액에 ascorbic acid와 Na- β -glycerophosphate를 첨가하여 배양한 3군에서 21일 이후 더 감소된 세포수를 나타내었다($p < 0.05$).

2. 배양 골세포의 광학현미경적 관찰

도립위상차현미경 소견에서 배양초기의 세포들은 주로 섬유아세포양을 나타냈으나, 밀생상태에 이르면서 점차 다각형 형태로 바뀌어졌다(Fig. 3, 4).

H&E 염색 광학현미경적 소견상 특이적으로 배양 9일째 dexamethasone을 첨가한 2군과 4

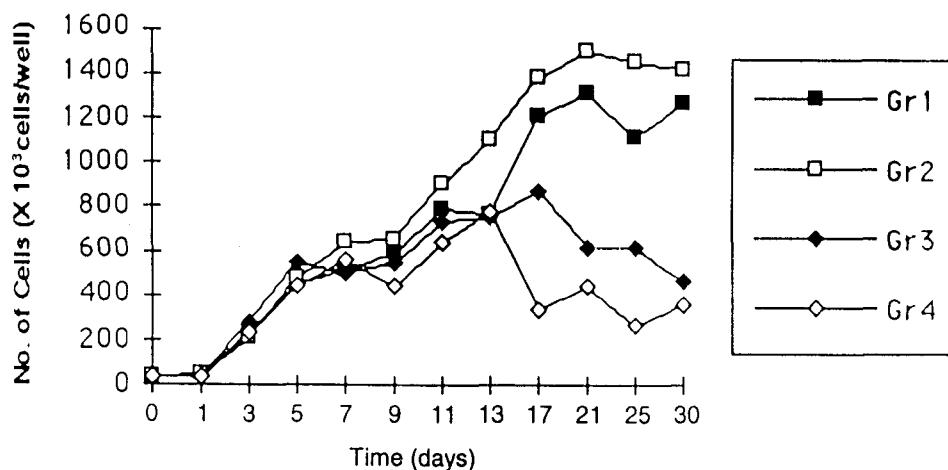


Fig. 1. Growth curves for first subcultured rat calvaria bone cells. Cell numbers were determined at total cells per well. Cells from population III-V were plated on 12 well culture plate at 4×10^4 cells/well. The cell populations were cultured in standard medium in Gr. I (■), supplemented medium containing dexamethasone in Gr. II (□), ascorbic acid and Na- β -glycerophosphate in Gr. III (◆) and ascorbic acid, Na- β -glycerophosphate and dexamethasone in Gr. IV (◇). Cells were counted with hemocytometer at 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 17, 21, 25, 30 days.

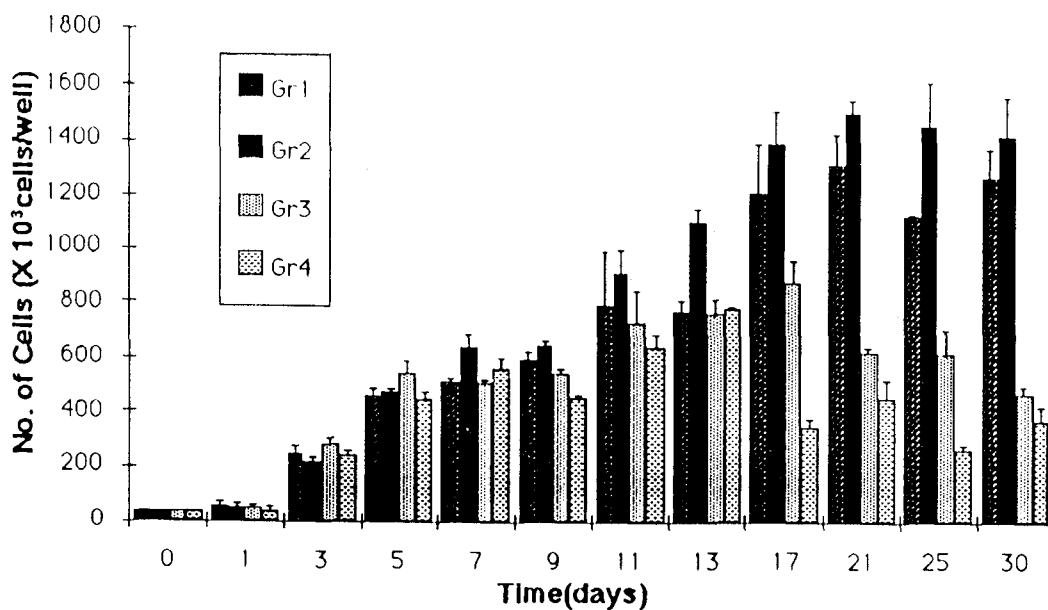


Fig. 2. Histograms of mean and standard deviation of cell number each time point. Rat calvaria cell populations were cultured under the same condition with Fig. 1.

Table 1. Comparison of cell number between each group using repeated measure ANOVA in 21-day fetal rat calvaria cell culture

day group	1	3	5	7	9	11	13	17	21	25	30
I&II	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
I&III	NS	NS	*	NS	**	NS	NS	NS	**	**	**
I&IV	NS	NS	NS	NS	**	NS	NS	**	**	**	**
II&III	NS	*	*	*	**	NS	**	**	**	**	**
II&IV	NS	NS	NS	NS	**	*	**	**	**	**	**
III&IV	NS	NS	*	NS	**	NS	NS	**	*	*	NS

Cells were seeded at 4×10^4 cells/well in 12well culture plate. Group I culture was maintained in standard medium(DMEM plus 10% FBS plus antibiotics), group II was maintained supplemented medium containing dexamethasone, group III supplemented medium containing ascorbic acid and sodium- β -glycerophosphate, group IV supplemented containing ascorbic acid, sodium- β -glycerophosphate and dexamethasone. Cultures were maintained for up to 30 days. Cell counting were performed by hemocytometer.

NS : Not significantly different from control value

* : significantly different from control value($P < 0.05$)

** : significantly different from control value($P < 0.01$)

군에서 지방적들을 함유한 지방세포와 연골기질을 형성한 연골세포를 관찰할 수 있었다(Fig. 5, 6).

3. 골결절 형성능

골결절은 3군과 4군에서만 배양 9일부터 나타났으나, 그 발현빈도는 4군에서 더 현저하게 많았다. Alizarin-red 염색에서 ascorbic acid, Na- β -glycerophosphate 그리고 dexamethasone을 첨가한 4군에서는 산재되어 있는 광화된 골결절의 수와 크기가 시간이 경과되면서 증가되었으나 dexamethasone을 첨가하지 않은 3군에서는 특기할 변화없이 소수만 관찰되었다(Fig. 7).

4. 주사전자현미경 및 투과전자현미경적 소견

주사전자현미경적 소견상, 4군은 골결절을 이루는 부위가 주변세포들과 분리되어 나타났고, 골결절 상층부는 많은 세포돌기를 가진 구형의 조골세포양의 세포들로 피개되어 있었

다. 골결절 부위를 제외한 부위는 섬유아세포양으로 판상을 이루고 있었다(Fig. 8, 9).

투과전자현미경 소견상, 4군은 골결절 내부에 침상의 돌기를 가진 광화물질들이 다발의 교원섬유들 사이에 현저히 많이 존재하였으며, 광화된 골결절 단면상 결절내부에 매몰된 골세포(osteocyte)양 세포들이 관찰되었다(Fig. 10, 11).

IV. 총괄 및 고찰

골조직은 지지결합조직으로 골세포(bone cell)들을 포함한 여러 세포들과 type I 교원섬유들이 glycosaminoglycans와 proteoglycans로 구성된 무형질의 기질내에 매몰되어 있다^{8,30}. 백서 두개관에서 추출된 세포들은 증식 및 분화도, 그리고 몇몇 형태학적, 조직학적 검사를 통해 조골세포의 특성을 가지고 있고, 또 형성된 결절이 골(bone)과 유사함을 알 수 있었다.

본 실험에서는 골조직세포들의 분리방법중 가장 보편적으로 사용되는 효소처리법으로 세

포들을 추출하였는데, 이는 일반적으로 첫번째 population은 섬유아세포, 두번째는 섬유아세포와 osteoprogenitor cells, 세번째는 osteoprogenitor cells, 네번째는 osteoprogenitor cells와 조골세포 그리고 다섯번째는 조골세포 순서로 분리되어 나온다는 Peck 등²⁰⁾의 연구를 참조하여 3-5번째 단계의 세포들만 본 실험에 사용하였다.

그러나 두개관에서 골세포만을 분리, 추출해 낸다는 것은 불가능하며, 효소처리법에 의해 분리한 골세포중에도 미분화세포가 많이 존재하는 것으로 알려져 있다. 이에 대해 Grigoriadis 등²⁾은 태생 21일된 백서 두개관에서 추출된 세포들은 ascorbic acid, Na- β -glycerophosphate 그리고 dexamethasone을 첨가한 배양액 내에서 9-10일이 되면 다핵근육세포, 12일경은 지방적을 함유하는 지방세포, 16일경은 연골세포 그리고 21일경이 되면 광화된 골결절 형성의 순서로 관찰된다고 하였고, Leboy 등²²⁾은 첨가된 dexamethasone은 지방세포들의 증식과 지방적 생성을 증가시킨다고 보고하였다. 이와 같은 선학들의 연구를 종합할 때, 두개관내에 존재하는 미분화세포들은 여러 세포들로 분화할 수 있으며, dexamethasone의 첨가가 지방세포와 연골세포의 증식과 분화를 촉진시킨다고 사료된다. 본 실험에서는 H&E 염색 소견에서 골세포 이외에도 지방세포와 연골세포들이 배양 9일 이후부터 dexamethasone이 함유된 II군과 IV군에서 다수 관찰된 바, 이는 dexamethasone에 의존적인 미분화 세포들로부터 유래되었다고 사료된다. 그러나 두 세포들을 확증하기 위해서는 H&E 염색보다 연골세포에는 alcian blue 또는 toluidine blue 염색과 지방세포에는 sudan 염색 등의 특수한 염색이 필요할 것으로 사료된다.

부신피질호르몬은 생체내에 과량존재시 조골세포의 활동을 직접적으로 억제하여 골형성을 감소시키고, 파골세포의 활동을 촉진시켜 골흡수를 증가시키므로 외부에서 과량투여시 골다공증이나 골절 등을 야기시킬 수 있다³⁴⁾. 반면에 골세포 배양시 첨가된 dexamethasone의 영향에 대해서 Hahn 등³⁵⁾과 Canalis 등³⁶⁾은 골

세포 배양시에 부신피질 호르몬인 glucocorticoid를 단기간(24-48시간)동안 첨가하면 type I 교원섬유 합성 및 ALP 활성도를 증가시키지만, 장기간(96시간 이상) 첨가시엔 억제효과가 나타난다고 하여 적용기간에 따라 효과가 다르다고 하였다. 또, glucocorticoid의 투여농도에 대한 연구에서 Suitt 등³⁷⁾은 10^{-10} - 10^{-9} M 농도에서는 세포군집수와 세포수를 최대화시키거나 PGE² 투여시 증가효과가 중단된다고 하였고, 10^{-6} - 10^{-5} M 농도에서는 세포군집수 및 세포수 모두 감소하나 PGE2 투여시 촉진된다고 보고하였다.

그리고, glucocorticoid의 골세포 활성억제 효과에 대한 보고도 있는데, Chyun 등³⁸⁾은 초기에는 골막에, 그후에는 중심골 부위에 작용하여 세포증식을 억제하고 DNA 합성을 감소시키며 세포소실을 야기한다고 하였는데, 이런 억제효과는 중심골보다 glucocorticoid에 민감한 세포들이 많은 골막으로부터 골세포 전구체의 소실에 기인한 것이라고 하였다. Gronowicz 등³⁾은 배양액에 glucocorticoid를 장기간 첨가하면 교원질과 fibronectin 합성을 모두 억제하고, 세포부착과 파골을 증가시키는 fibronectin의 부족으로 세포들은 다각형을 띠며 평면형태로 부착하는 대신, 불규칙한 형태를 띄게 되면서 세포들 사이의 부착부가 거의 없게 됨에 따라 조골세포들의 분비극성과 골의 osteoid seam 형성을 방해하므로, 지속적인 glucocorticoid의 적용은 골량과 골광화를 감소시킨다고 하였다.

그러나, Robey 등²⁷⁾, Bellow 등^{5,6)}, King 등³⁹⁾은 dexamethasone은 골세포의 증식능을 촉진시키고, 골결절을 형성하는 조골세포수를 증가시키며, 골결절 형성수 및 부피, 광화된 면적을 증가시킨다고 보고하였다. 그외에도 Grigoriadis 등²⁾은 dexamethasone에 대한 골결절 형성 세포들의 반응은 분화단계 동안 단지 특별한 단계에서만 일어난다고 하였다.

Martin 등⁴⁰⁾과 Henning 등⁴¹⁾에 따르면 백서의 혈중 corticosterone의 농도는 출생직전(태생 21일)에 최대가 되나, 출생후에는 급격히 감소한다고 하였으며, 태생 21일된 백서의 두개골에서 분리한 골세포(bone cell)들을 배양시 조

골세포의 분화 및 골결절 형성에 대해 최대 촉진반응을 야기하는 corticosterone의 농도가 출생직전의 혈중농도와 유사하였는데, Bellow 등⁶⁾은 이 농도가 10^{-8} M dexamethasone에 해당된다고 하였다. 그리고 dexamethasone을 배양액에 첨가하더라도 생리적인 농도로 항상 노출시켜야 최대효과를 나타낸다고 하였다. 그러므로 본 실험은 조골세포로의 증식 및 분화와 골결절 형성능을 최대화 시킬 수 있는 상태인 태생 21일된 백서의 두개관에서 세포를 분리하여 10^{-8} M dexamethasone을 30일간 계속 유지시켰다.

Ascorbic acid도 또한 골세포 증식 및 분화 그리고 골결절 형성에 영향을 미치는데, Arownow 등²⁴⁾은 배양시 첨가한 ascorbic acid는 기질의 주된 유기성분인 교원질을 합성하며 무기질이 침착할 수 있는 공간을 부여하고, osteocalcin 합성도 증가시켜 결절이 광화를 개시할 수 있게 한다고 하였고, Bellow 등⁵⁾은 ascorbic acid를 첨가하지 않은 경우, ALP 활성도가 감소하고, osteocalcin 합성이 현저히 감소하며, 어느 정도의 교원질 축적은 이루어지나 골결절이 형성되지 않는다고 하였다. 그리고 Owen 등²⁸⁾과 Lian 등³⁰⁾은 조골세포에 의해 형성된 세포외기질들은 골세포 증식을 억제시키지만 골세포로의 분화는 증가시킨다고 보고하였다. 이와 같은 선행들의 연구를 종합해 볼 때, 골세포 배양에서 ascorbic acid의 효과는 교원질의 proline과 lysin의 수산화과정동안 필수적인 co-factor로 작용하여 collagen triple helix의 안정성 부여와 분자간의 cross-linking 형성에 필요한 hydroxyproline과 hydroxylysin 형성을 도움으로써 교원질 합성을 촉진시킨다고 사료된다.

또, Tenenbaum 등²⁹⁾은 형성된 골기질은 유기인산 존재 하에서만 광화된다고 하였고, Bellow 등^{5,42)}도 유기인산은 세포증식능이나 ALP 활성도에는 영향을 미치지 않으나 광화개시 및 진행에 촉진적 영향을 나타낸다고 보고하였다. 즉, 배양액 내에 유기인산이 첨가되지 않은 경우에는 세포층내로의 Ca^{++} 침착개시가 아주 늦게 이루어진다고 하였다. Bellow 등^{6,7)}은 as-

corbic acid 없이는 골세포들이 골기질을 형성할 수 없고, 유기인산을 첨가해야지만 형성된 골결절이 광화된다고 하였으며, 골결절을 광화시키는데 기여하는 3가지 요소는 다중화를 만들 수 있는 세포의 능력, 교원질 형성과 hydroxylation을 촉진하는 ascorbic acid, 그리고 광화를 유도시키는 유기인산이라고 하였으며, 여기에 투여하는 dexamethasone은 조골세포의 수적 증가 및 활성도의 증가를 야기하고 ALP 활성도를 높여 골기질 형성을 촉진시킨다고 보고하였다. 본 실험의 세포증식 곡선에서 ascorbic acid를 첨가한 3군과 4군이 첨가하지 않은 1군과 2군에 비해 배양 13일 이후부터 세포수가 현저히 감소되었는데($p < 0.05$), 이는 ascorbic acid에 의해 조골세포들이 형성한 세포외기질들이 조골세포 증식을 억제시킴에 따라 ascorbic acid가 첨가된 군이 첨가되지 않은 군에 비해 세포증식곡선이 더 낮게 나타난 것으로 사료된다.

Dexamethasone 첨가유무에 따른 세포의 증식능에 있어서 표준배양액으로 배양한 1군과 dexamethasone만 첨가한 2군을 비교할 시, 두군 모두에서 배양 21일까지 급격한 세포수의 증식을 나타내었으나 그 이후부터는 plateau를 나타내었으며, 이때 2군이 1군에 비해 세포수가 다소 증가된 경향을 나타내었으나, 통계적인 유의성은 없었다($p < 0.05$). 따라서 dexamethasone 단독 사용으로는 골세포의 증식을 촉진시키지 않는다고 사료된다.

그리고 dexamethasone과 ascorbic acid를 모두 첨가한 4군과 dexamethasone만 사용한 2군을 비교하면 골결절 형성이 관찰되기 시작한 배양 9일부터 4군의 세포증식능이 현저하게 감소되어 나타났고($p < 0.05$), 또 4군과 ascorbic acid만 첨가한 3군과 비교시 배양 17일 이후부터 4군의 세포수가 적게 나타났고($p < 0.05$). 이는 ascorbic acid 단독 사용보다 dexamethasone을 함께 첨가하여 배양시, 세포의 증식은 현저히 감소되지만, dexamethasone의 단독 사용시에는 유의성 있는 영향을 미치지 않았다. 이러한 결과는 ascorbic acid와 dexamethasone을 동시 사용할 때 조골세포로의 분

화 및 조골세포의 기질 형성을 현저하게 촉진 시킴으로써 골세포의 증식을 억제시킨다고 볼 수 있는데, 이때 세포외기질 형성에 ascorbic acid가 필수적이고, dexamethasone은 ascorbic acid와 함께 사용시 기질형성을 극대화시켜 ascorbic acid 단독사용시보다 dexamethasone과 동시 사용할 경우 골세포 증식능이 최소화되는 것으로 사료된다.

Maniatiopoulos 등²⁶⁾은 골결절을 이루는 중심 부위의 세포들은 다각형을 이루지만, 주변부의 세포들은 섬유아세포양을 띤다고 하였고, Davis등⁸⁾은 생체내에서 골기질 합성과 분비와 광화작용을 하는 활동성의 조골세포는 일반적으로 다각형을 나타내며, 기존에 존재하는 골표면이나 골신생부위의 표면에 존재하여 세포외액과 골 사이에서 전해질의 이동을 담당한다고 알려져 있다. 본 실험 과정동안 도립위상차현미경으로 세포들의 형태 및 골결절 형성과정을 관찰해본 결과 골결절 부위의 세포들은 조골 세포들의 형태인 다각형 형태였고, 밀생상태로 다층화를 이루고 있는 것이 관찰되었으며, 결절부위는 인접부위에 비해 세포밀도가 높고, 부피감이 있으며 더욱 검게 나타났다. 결절 주변부의 세포들은 다각형뿐만 아니라 섬유아 세포양의 형태로도 나타났으며, 간혹 다층화를 이루면서 군집을 나타내었지만 결절은 형성되지 않았다. 본 실험에서는 ascorbic acid와 Na-β-glycerophosphate를 함유한 3군과 4군에서만 배양 9일 이후부터 결절이 관찰되기 시작했는데, 3군에서는 소수만 드문드문 발생되었으나, dexamethasone을 첨가한 4군에서는 다수의 골결절들이 넓은 면적으로 존재하는 것을 관찰할 수 있었다. 즉, ascorbic acid와 유기인산은 광화된 결절형성에 필수요소가 되며, 이때 dexamethasone의 역할은 결절형성에 걸리는 시간을 감소시키고 형성속도와 양을 증가시키는 것으로 나타났다.

조골세포의 주사전자현미경적 소견상 골결절 부위는 주변 골세포들과 분리되어 있고, 상층부는 구형의 조골세포에 의해 덮혀있는 것이 보이며 주변세포들은 평면상태로 존재하였다.

조골세포의 투과전자현미경적 소견에 관해

Abe 등¹⁾은 lacuna내의 세포들은 광화된 골결절내에서 collagen matrix로 둘러싸여 있고, 이때 세포내의 핵은 저명한 핵인을 가지며 세포질은 일부 길어지거나 둥근 미토콘드리아, 중등도로 발달된 RER, dense granule이 존재하며, 골결절의 기질은 많은 바늘모양의 광화된 spherules가 50-60nm의 apical periodicity를 가진 well-defined striation이 있는 교원섬유들 사이에 존재한다고 하였다. 본 실험에서도 광화된 골결절 부위내에는 난원형의 골세포(os-teocyte)들이 다층으로 존재하였고, 결절의 상층부엔 많은 돌기들을 내며, 미토콘드리아와 RER 등의 소기관들이 비교적 많은 다각형의 조골세포들이 관찰되었다. 그리고 조골세포의 기질 부위에는 교원섬유 다발들과 그 사이에 matrix vesicle들이 다량 존재하는 것이 관찰되었다.

본 실험에서는 ascorbic acid와 dexamethasone의 골세포 증식 및 골결절 형성능에 미치는 효과를 관찰하고자 한 바, Owen 등²⁸⁾의 Na-β-glycerophosphate는 골세포 증식 및 분화능에는 영향을 미치지 않고 단지 형성된 골기질을 광화시키는 효과만 있다는 보고에 근거하여 Na-β-glycerophosphate의 작용을 배제하였다.

본 실험에 사용된 ascorbic acid의 농도는 선학의 연구를 참조하여 골세포 증식 분화 및 골결절 형성에 최적의 상태로 알려진 10⁻⁸M의 dexamethasone, 50μg/ml ascorbic acid 그리고 10mM Na-β-glycerophosphate를 사용하였으나, 향후에는 dexamethasone 및 ascorbic acid의 적용용량 및 적용기간에 따른 관찰이 필요하다고 생각된다.

앞으로 조골세포들에 대하여 immunohistochemistry와 in situ hybridization등의 심화된 연구가 더 필요하고, 본 실험의 자료는 추후 심도있는 실험의 기초자료로써 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

V. 요 약

백서 태자 두개관을 효소처리하여 얻은 조골세포 유사세포군의 증식능 및 골결절의 형

성에 미치는 dexamethasone의 영향과 형성된 골결절의 조직학적 형태 관찰을 위하여, 12 well 배양접시의 각 well당 4×10^4 cell을 접종하였으며, 30일간 표준배양액으로만 배양한 군, 표준배양액에 ascorbic acid와 Na- β -glycerophosphate를 첨가한 군, 그리고 각각에 dexamethasone을 첨가한 군등 4군으로 분리 배양하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 골세포의 증식율은 표준용액으로 배양한 군에 비해 dexamethasone을 단독으로 투여한 군에서 약간 증가하는 경향을 보였으나 통계적인 유의성은 없었다($p < 0.05$).
2. 골세포의 증식율은 ascorbic acid에 의해 영향을 많이 받았으며, 특히 ascorbic acid와 dexamethasone을 동시에 투여했을 때 더욱 현저히 세포증식율이 감소됨을 볼 수 있었다 ($p < 0.05$).
3. 배양 초기에는 세포들이 주로 섬유아세포 양으로 나타났으나, 밀생상태에 이르면서 점차 다각형 형태로 바뀌었다.
4. 배양 9일후 지방세포와 연골세포들이 관찰되었으며, 이들은 모두 dexamethasone이 첨가된 군에서 발견되었다.
5. 골결절은 ascorbic acid와 Na- β -glycerophosphate가 첨가된 군에서만 형성되었으며, dexamethasone을 병용첨가한 군에서 광화된 골결절이 현저히 증가됨을 관찰할 수 있었다.
6. 골결절 형성이 되지 않은 부위의 세포들은 평면형상을 이루고 있었으나, 골결절 부위를 덮고있는 세포들은 많은 세포돌기를 가진 조골세포양 세포들로 나타났으며, ascorbic acid, Na- β -glycerophosphate 그리고 dexamethasone을 첨가한 군에서는 침상의 돌기를 가진 광화물질들이 다발의 교원섬유들 사이에 현저히 많이 존재하였으며, 골결절 내부에는 매몰된 골세포(osteocyte)양 세포들이 관찰되었다.

참 고 문 헌

1. Abe, Y., Akamine, A., Aida, Y. and Maeda, K. : Differentiation and mineralization in osteogenic precursor cells derived from fetal rat mandibular bone, *Calcif. Tissue Int.*, 52: 365-371, 1993
2. Grigoriadis, A. E., Heersche, H. N. M. and Aubin, J. E. : Differentiation of muscle, fat, cartilage and bone from progenitor cells present in a bone-derived clonal cell population: effect of dexamethasone, *J. Cell Biol.*, 106: 2139-2151, 1988
3. Gronowicz, G. A., Derome, M. E. and McCarthy, M. B. : Glucocorticoids inhibit fibronectin synthesis and messenger ribonucleic acid levels in cultured fetal rat parietal bones, *Endocrinology*, 128: 1107-1114, 1991
4. Antosz, M. E., Bellows, C. G. and Aubin, J. E. : Effects of transforming growth factor β and epidermal growth factor on cell proliferation and the formation of bone nodules in isolated fetal rat calvaria cells, *J. Cell. Physiol.*, 140: 386-395, 1989
5. Bellow, C. G., Aubin, J. E. and Heersche, J. N. M. : Physiological concentrations of glucocorticoids stimulate formation of bone nodules from isolated rat calvaria cells in vitro, *Endocrinology*, 121: 1985-1992, 1987
6. Bellow, C. G., Heersche, J. N. M. and Aubin, J. E. : Determination of the capacity for proliferation and differentiation of osteoprogenitor cells in the presence and absence of dexamethasone, *Developmental biology*, 140: 132-138, 1990
7. Bellow, C. G. and Aubin, J. E. : Determination of numbers of osteoprogenitors present in isolated fetal rat calvaria cells in vitro, *Developmental Biology*, 133: 8-13, 1989
8. Davis, W. L. : Oral histology-cell structure and function, W. B. Saunders Co., 1986. pp.73-87.

1. Abe, Y., Akamine, A., Aida, Y. and Maeda,

9. Otsuka, K., Yao, K. L., Wasi, S., Tung, P. S., Aubin, J. E., Sodek, J. and Termine, J. D. : Biosynthesis of osteonectin by fetal porcine calvaria cells in vitro, *J. Biol. Chem.*, 259(15): 9805–9812, 1984
10. Wrana, J. L., Maeno, M., Hawrylyshyn, B., Yao, K. L. and Domenicucci, C. : Differential effects of transforming growth factor- β and epidermal growth factor on cell proliferation and the formation of bone nodules in isolated fetal rat calvaria cells, *J. Cell. Biol.*, 106: 915–924, 1988
11. Ecarot-Charrier, B., Glorieux, F. H., Michel van der Rest and Pereira, G. : Osteoblasts isolated from mouse calvaria initiate matrix mineralization in culture, *J. Cell Biol.*, 96: 639–643, 1983
12. Jones, S. J. and Boyde, A. : The migration of osteoblasts, *Cell and Tissue Res.*, 184 (2): 179–193, 1977
13. Hughes, F. J. and McCulloch, C. A. G. : Stimulation of the differentiation of osteogenic rat bone marrow stromal cells by osteoblast cultures, *Lab. Invest.* 64(5): 617–622, 1991
14. Kamalia, N., McCulloch, C. A. G., Tenebaum, H. C. and Limeback, H. : Dexamethasone recruitment of self-renewing osteoprogenitor cells in chick bone marrow stromal cell cultures, *Blood*, 79: 320–326, 1992
15. Malaval, L., Modrowski, D., Gupta, A. K. and Aubin, J. E. : Cellular expression of bone-related proteins during in vitro osteogenesis in rat bone marrow stromal cell cultures, *J. Cell. Physiol.*, 158: 555–572, 1994
16. Marchisio, P. C., Cirillo, d., Naldini, L., Primavera, M. V., Teti, A. and Zamboni-Zalzone, A. : Cell-substratum interaction of cultured avian osteoclasts is mediated by specific adhesion structures, *J. Cell Biol.*, 99: 1696–1705, 1984
17. McCulloch, C. A. G., Strugurescu, M., Hughes, F., Melcher, A. H. and Aubin, J. E. : Osteogenic progenitor cells in rat bone marrow stromal populations exhibit self-renewal in culture, *Blood*, 77(9): 1906–1911, 1991
18. Ogiso, B., Hughes, F. J., Melcher, A. H. and McCulloch, C. A. G. : Fibroblasts inhibit mineralized bone nodule formation by rat bone marrow stromal cells in vitro, *J. Cell. Physiol.*, 146: 442–450, 1991
19. Whitson, S. W., Harrison, W., Dunlap, M. K., Bowers, D. E., Fisher, L. W., Robey, P. G. and Termine, J. D. : Fetal bovine bone cells synthesize bone-specific matrix proteins, *J. Cell Biol.*, 99: 607–614, 1984
20. Peck, W. A., Birge, Jr. S. J. and Fedak, S. A. : Bone cells-biochemical and biological studies after enzymatic isolation, *Science*, 146: 1476–1477, 1964
21. Domon, T. and Wakita, M. : Electron microscopic and histochemical studies of the mononuclear osteoclast of the mouse, *Am. J. Anat.*, 192: 35–44, 1991
22. Leboy, P. S., Beresford, J. N., Devlin, C. and Owen, M. E. : Dexamethasone induction of osteoblast mRNAs in rat marrow stromal cell cultures, *J. Cell. Physiol.*, 146: 370–378, 1995
23. Aubin, J. E., Heersche, H. N. M., Merri- lees, M. J. and Sodek, J. : Isolation of bone cell clones with differences in growth, hormone responses and extracellular matrix production, *J. Cell Biol.*, 92: 452–461, 1982
24. Aronow, M. A., Gerstenfeld, L. C., Owen, T. A., Tassinari, M. S., Stein, G. S. and Lian, J. B. : Factors that promote progressive development of the osteoblast phenotype in cultured fetal rat calvaria cells, *J. Cell. Physiol.*, 143: 213–221, 1990

25. Bellows, C. G., Ishida, H., Aubin, J. E. and Heersche, J. N. M. : Parathyroid hormone reversibly suppresses the differentiation of osteoprogenitor cells into functional osteoblasts, *Endocrinology*, 127: 3111–3116, 1990
26. Maniopoulos, C., Sodek, J. and Melcher, A. H. : Bone formation in vitro by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rat, *Cell Tissue Res.*, 254(2): 317–330, 1988
27. Robey, P. G. and Termine, J. D. : Human bone cells in vitro, *Calcif. Tissue Int.*, 37: 453–460, 1985
28. Owen, T. A., Aronow, M., Shalhoub, V., Barone, L. M. et al. : Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: Reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix, *J. Cell. Physiol.*, 143: 420–430, 1990
29. Tenenbaum, H. C. : Role of organic phosphate in mineralization of bone in vitro, *J. Dent. Res.*, 60: 1586–1589, 1981
30. Lian, J. B. and Stein, G. S. : Concepts of osteoblast growth and differentiation: basis for modulation of bone cell development and tissue formation, *Crit. rev. oral biol. med.*, 3: 269–305, 1992
31. Bellows, C. G., Wang, Y. H., Heersche, J. N. M. and Aubin, J. E. : 1,25-Dihydroxyvitamin D3 stimulates adipocyte differentiation in cultures of fetal rat calvaria cells: comparison with the effects of dexamethasone, *Endocrinology*, 134: 2221–2229, 1994
32. Nijwezde, P. J., Burger, E. H. and Feyen, J. H. M. : Physiological reviews-The American physiological society, 66(4): 855–886, 1986
33. Nilweide, P. J., A. S. van Iperen-van Gent, E. W. M. Kawilarang-de Haas, A. van der Plas and Wassenaar A. M. : Bone formation and calcification by isolated osteoblast like cells, *J. Cell Biol.*, 93: 318–323, 1982
34. 임 정규 : 약물치료 기초와 임상, 고려의학사, 1990. pp.1498–1530.
35. Hahn, T. J., Westbrook, S. L. and Halstead, L. R. : Cortisol modulation of osteoblast metabolic activity in cultured neonatal rat bone, *Endocrinology*, 114: 1864–1870, 1984
36. Canalis, E. : Effect of glucocorticoids on type I collagen synthesis, alkaline phosphatase activity and deoxyribonucleic acid content in cultured rat calvariae, *Endocrinology*, 112: 931–939, 1983
37. Suitt, A., Bertram, P. and Br utigam, M. : The rule of glucocorticoids and prostaglandin E2 in the recruitment of bone marrow mesenchymal cells to the osteoblastic lineage: positive and negative effects, *Calcif. Tissue Int.*, 59: 154–162, 1996
38. Chyun, Y. S., Kream, B. E. and Raisz, L. G. : Cortisol decreases bone formation by inhibiting periosteal cell proliferation, *Endocrinology*, 114: 477–480, 1984
39. King, C. S., Weir, E. C., Gundberg, C. W., Fox, J. and Insogna, K. L. : Effects of continuous glucocorticoid infusion on bone metabolism in the rat, *Calcif. Tissue Int.*, 59: 184–191, 1996
40. Martin, C. E., Cake, M. H., Hartman P. E. and Cook, I. F. : Relationship between foetal corticosteroids, maternal progesterone and parturition in the rat, *Acta. Endocrinol.*, 84: 167, 1977
41. Henning, S. J. : Plasma concentrations of total and free corticosterone during development in the rat, *Am. J. Physiol.* 235: E451–456, 1978
42. Bellows, C. G., Aubin, J. E. and Heersche, J. N. M. : Initiation and progression of

- mineralization of bone nodule formed in vitro: the role of alkaline phosphatase and organic phosphate, *Bone Miner.*, 14: 27–40, 1991
43. Bellow, C. G., Aubin, J. E., Heersche, J. N. M. and Antosz, M. E. : Mineralized bone nodules formed in vitro from enzymatically released rat calvaria cell populations, *Calcif. Tissue Int.*, 38: 143–154, 1986
 44. Beresford, J. N., Gallagher, J. A. and Russell, R. G. G. : 1,25–Dihydroxyvitamin D3 and human bone-derived cells in vitro: effects of alkaline phosphatase, type I collagen and proliferation, *Endocrinology*, 119: 1776–1785, 1986
 45. Bessey, O. A., Lowry, O. H. and Brock, M. J. : A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum, *J. Biol. Chem.*, 164: 321–329, 1946
 46. Cho, M. I., Matsuda, N., Lin, W. L., Moshier, A. and Ramakrishnan, P. R. : In vitro formation of mineralized nodules by periodontal ligament cells from the rat, *Calcif. Tissue Int.*, 50: 459–467, 1992
 47. Cochran, D. L. and Rouse, C. A. : The effect of conditioned medium from connective tissue fibroblasts and epithelium on calcium release from mouse calvarial organ culture, *Arch. Oral Biol.*, 38: 61–65, 1993
 48. Collin, P., Nefussi, J. R. and Wetterwald, A. : Expression of collagen, osteocalcin, and bone alkaline phosphatase in a mineralizing rat osteoblastic cell culture, *Calcif. Tissue Int.*, 50: 175–183, 1992
 49. Goseki, M., Oida, S., Takeda, K., Ogata, Y., Iimura, T., Maruka, Y. and Sasaki, S. : Identification of bone-type alkaline phosphatase mRNA from human periodontal ligament cells, *J. Dent. Res.*, 74: 319–322, 1995
 50. Hoerl, B. J. and Scott, R. E. : Nonterminally differentiated cells express decreased growth factor responsiveness, *J. Cell. Physiol.*, 139: 68–75, 1989
 51. Ishida, H., Bellows, C. G., Aubin, J. E. and Heersche, J. N. M. : Characterization of the 1,25–(OH)2D3–induced inhibition of bone nodule formation in long-term cultures of fetal rat calvaria cells, *Endocrinology*, 132: 61–66, 1993
 52. King, E. J. and Armstrong, A. R. : A convenient method for determining serum and bile phosphatase activity, *Can. Med. Assoc. J.*, 376–381, 1934
 53. Li, R. S. and DenBesten, P. K. : Expression of bone protein mRNA at physiological fluoride concentrations in rat osteoblast culture, *Bone Miner.*, 22: 187–196, 1993
 54. Nilweide, P. J., A. S. van Iperen-van Gent, E. W. M. Kawilarang-de Haas, A. van der Plas and Wassenaar, A. M. : Bone formation and calcification by isolated osteoblast like cells, *J. Cell Biol.*, 93: 318–323, 1982
 55. Osdoby, P. and Caplan, A. I. : A scanning electron microscopic investigation of in vitro osteogenesis, *Calcif. Tissue Int.*, 30: 43–50, 1980
 56. Bodansky, A., Hallman, L. F. and Bonoff, R. : Phosphatase studies: II. Determination of serum phosphatase factors influencing the accuracy of the determination, *J. Biol. Chem.*, 101: 93–104, 1933
 57. Ries, W. L., Gong, J. K. and Sholley, M. M. : A comparative study of osteoblasts: in situ versus isolated specimens, *Am. J. Anat.*, 172: 57–73, 1985
 58. Stein, G. S., Lian, J. B. and Owen, T. A. : Relationship of cell growth to the regulation of tissue-specific gene expression during osteoblast differentiation, *FASEB J.*, 4: 3111–3122, 1990

59. Takimoto, K., Deguchi, T. and Mori, M. : Histochemical detection of acid and alkaline phosphatases in periodontal tissues after experimental tooth movement, *J. Dent. Res.*, 47: 340, 1969
60. Tenenbaum, H. C. and Heersche, J. N. M. : Dexamethasone stimulates osteogenesis in chick periosteum in vitro, *Endocrinology*, 117: 2211-2217, 1985
61. Turksen, K. and Aubin, J. E. : Positive and negative immunoselection for enrichment of two classes of osteoprogenitor cells, *J. Cell Biol.*, 114: 373-384, 1991
62. Wesselink, P. R. and Beertsen, W. : Ankylosis of the mouse molar after systemic administration of 1-hydroxyethylidene-1,1-bisphosphonate(HEBP), *J. Clin. Periodontol.*, 21: 465-471, 1994
63. 김 장균, 김 관식, 정 동균 : Ascorbic acid가 골조직 세포군의 phosphatase에 미치는 영향, *대한구강생물학회지*, 11(2): 29-132, 1987

EXPLANATION OF FIGURES

- Fig. 3-4. Phase contrast micrographs of rat calvaria bone cells cultured in standard medium show typical appear fibroblast-like() appearance at day after primary seeding, while at confluency the cells form a layer of cuboidal or polygonal cells ()($\times 200$).
- Fig. 5-6. Light micrograph of adipocyte() and lipid drops() and chondrocyte() and chondroid() in supplemented medium with 10^{-8} M dexamethasone($\times 20$).
- Fig. 7. Photograph of bone nodules in 12-well culture dishes grown with ascorbic acid and Na- β -glycerophosphate(top row, Gr III) and ascorbic acid, Na- β -glycerophosphate and dexamethasone(bottom row, Gr IV) at 4×10^4 cells/well in the presence. The cultures were fixed in 10% formalin and then stained with the alizarin-red. Mineralized nodules() of different sizes are apparent.
- Fig. 8-9. Scanning electron micrographs showing osteoblast-like cells() and numerous cell processes() on surface of nodule() in a 30-day-old culture(Fig.8 $\times 200$, Fig.9 $\times 1,500$).
- Fig. 10. Transmission electron micrograph of uncalcified bone matrix(osteoid). Osteoblasts(B) are seen at upper and lower left. The matrix composed of mostly Type I collagen fibers(). Numerous calcified vesicles() scattered within them.
- Fig. 11. Transmission electron micrograph of osteocyte(C). Note that the cell is completely surrounded by calcified bone matrix(M). They show marked reduction of cytoplasmic organellae compared to osteoblasts.

사진부도 1

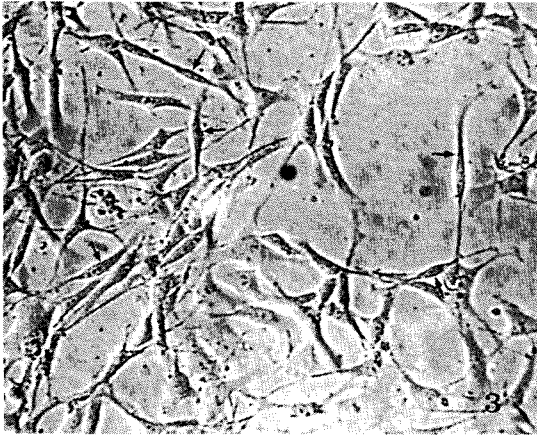


Fig. 3

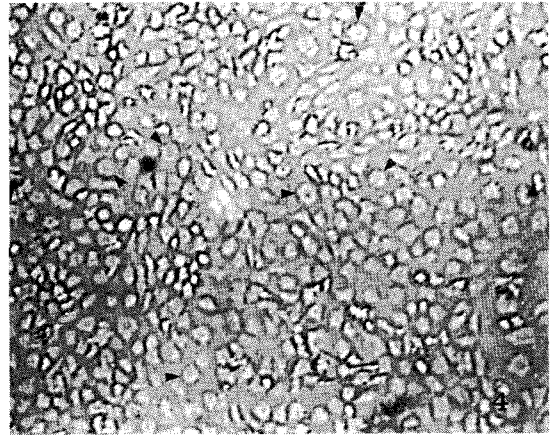


Fig. 4

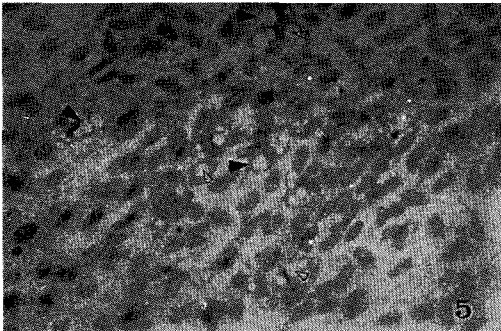


Fig. 5

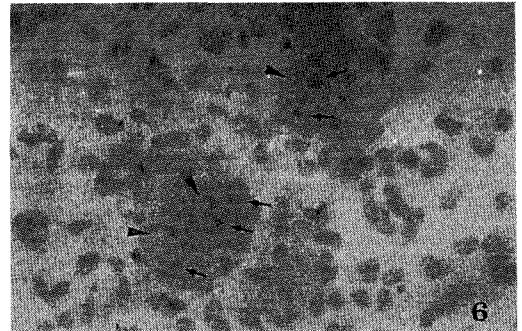


Fig. 6

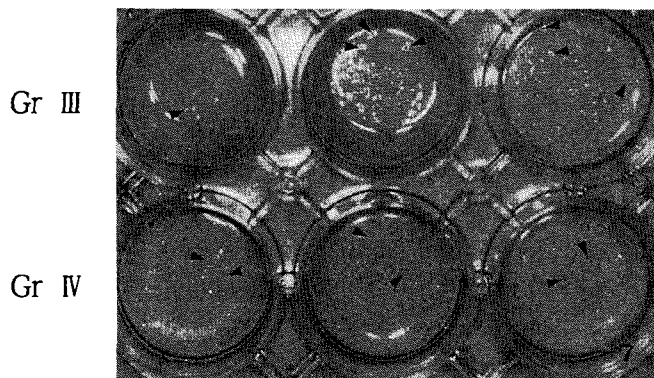


Fig. 7

사진부도 2

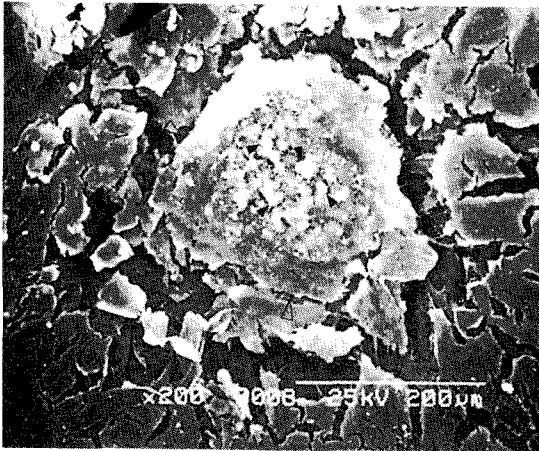


Fig. 8

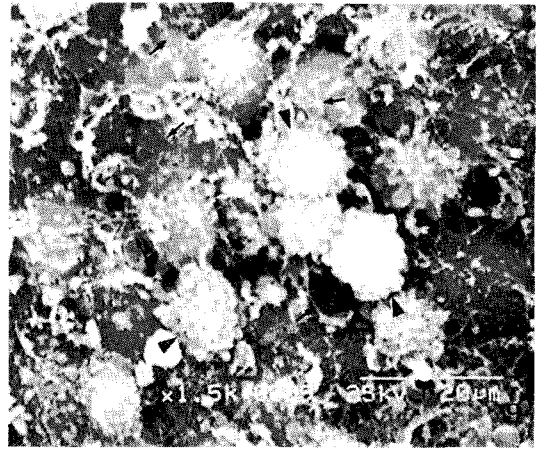


Fig. 9



Fig. 10

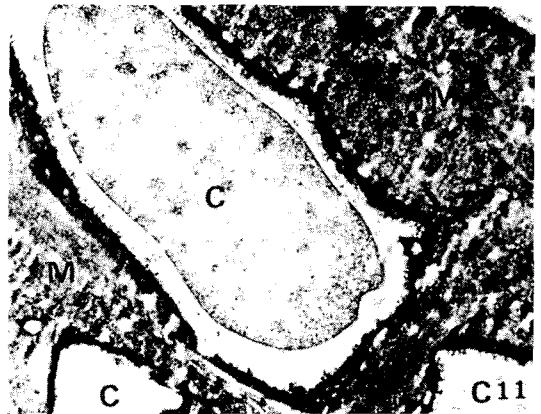


Fig. 11