불화나트륨이 조골세포의 생리적 활성에 미치는 영향

원광대학교 치과대학 소아치과학교실 · 원광치의학연구소

김 대 업

Abstract

THE EFFECT OF SODIUM FLUORIDE ON THE PHYSIOLOGICAL ROLE OF OSTEOBLASTIC CELL

Dae-Eop Kim, D.D.S., M.S.D.

Department of Pediatric Dentistry, Dental Research Institute, College of Dentistry, Wonkwang University

The clinical use of fluoride with a well known osteogenic action in osteoporotic patients is rational, because this condition is characterized by impaired bone formation. However, its anabolic effect has not been demonstrated well *in vitro*. The purpose of this study was to investigate the effects of sodium fluoride on the physiological role of osteoblastic cell. Osteoblastic cells were isolated from fetal rat calvaria.

The results were as follows :

1. Mineralized nodules were shown in osteoblastic cell cultures, which had been maintained in the presence of ascorbic acid and β-glycerophosphate up to 21 days. When cultures were treated with pulses of 48 hr duration before apparent mineralization was occurring, 2-fold increased in their number was detected.
2. Alkaline phosphatase activity of osteoblastic cells was inhibited by sodium fluoride in dose-dependent manner.
3. The effect of sodium fluoride on the osteoblastic cell proliferation was measured by the incorporation of [^{3}H]-thymidine into DNA. As a result, sodium fluoride at 1~100μM increased the [^{3}H]-thymidine incorporation into DNA in a dose dependent manner.
4. The signaling mechanism activated by sodium fluoride dose-dependently enhanced the tyrosine phosphorylation of the adaptor molecule Shc^{p66} and their association with Grb2, one of earlier events in a MAP kinase activation pathway cascade used by a sig-

* 이 논문은 1998년도 원광대학교의 교비지원에 의해서 연구됨

nificant subset of G protein-coupled receptors.
5. The phosphorylation of CREB(cAMP response element binding protein)was inhibited by the sodium fluoride in MC3T3E1 cells.

In conclusion, the results of this study suggested that the mitogenic effect of the sodium fluoride in MC3T3E1 cell was stimulated in a dose-dependent manner and suggested "an important role for the interaction between Shc and Grb2" in controlling the proliferation of osteoblasts.

Key words : Sodium fluoride, Alkaline phosphatase, Shc, Grb2, CREB

I. 서 론

골조직은 여러 종류의 세포들로 구성되어 있으며 이들 각 세포들의 기능을 연구하기 위하여 다양한 세포분리방법이 사용되고 있다[1,2]. 그 중 Peck 등[3]이 collagenase를 이용한 연속효소처리 방법으로 골세포를 분리할 수 있음을 처음 보고한 이래, collagenase와 trypsin-EDTA를 이용한 연속효소처리 방법이 골조직 대사의 연구를 위한 *in vitro* 실험에서 가장 널리 사용되고 있다[1,4]. 연속효소처리 시 Ⅳ, Ⅴ군으로 분류되는 세포는 조골세포 특유의 염기성 인산분해효소(alkaline phosphatase, ALP)반응 등에 양성을 나타내는 군으로 순수하지는 않지만 조골세포로 분류하며, Ⅰ, Ⅱ군은 tartrate-resistant acid phosphatase에 양성반응을 보이는 군으로 주로 파골세포와 파골세포 전구세포로 분류된다[5].

Ⅳ, Ⅴ군의 ALP 양성반응을 나타내는 조골세포는 골기질을 주로 합성하며, 미분화 간엽세포(undifferentiated mesenchymal cell)에서 유래된 전조골세포(preosteoblast)가 골표면에 도달하여 성숙한 조골세포로 분화된다고 알려져 있다. 이 염기성 인산분해효소는 칼슘과 인 대사에 관여하는 효소이자 조골세포의 중요한 지표로서 이는 비교적 높은 pH인 8~10정도에서 monoester phosphate를 가수분해하여 주로 골이 형성될 때 높은 농도로 발현된다고 한다. 석회화 과정에 중요한 역할을 하는 조골세포는 골표면에 근접한 세포질내 과립형질 내세망(rough endoplasmic reticulum, rER)이 발달해 있고 세포막에 이 염기성 인산분해효소를 갖고 있다. 염기성 인산분해효소는 아주 많은 양이 존재하고 있으며 그 역할이 확실히 알려져 있지는 않으나, 염기성 인산분해효소와 골 형성간에 관련이 있음이 보고되며, 이로써 석회화 과정에 어떤 역할을 하리라고 추정된다.

조골세포와 더불어 연속효소처리에서 Ⅰ, Ⅱ군으로 분류되는 파골세포는 1873년 Albert Kölliker가 처음 명명한 세포로 골의 개조에 관여하며 골흡수 작용을 하는 세포인데 골내막에 달라붙어 ruffled border를 형성하고 골 흡수와(bone resorption pit)를 형성한다. 또한 calcitonin 수용체가 파골세포에만 존재하는 것과 이 밖의 형태학적인 특징, carbonic anhydrase, tartrate-resistant acid phosphatase(TRAP)도 하나의 구별점이 된다[6].

Bellow등[7]이 효소처리에 의해 분리된 골세포들의 배양에서 ascorbic acid와 organic phosphate 첨가에 의해 석회화된 골조직 결절(mineralized bone nodule)이 형성됨을 보고한 이래, 분리된 골세포들을 이용한 시험관 내에서의 골 형성에 관한 연구에 널리 이용되고 있다.

불소는 인체의 필수 미량원소로서 골조직에 다양한 영향을 나타내는 것으로 알려져 있다[8]. 특히, 골다공증에서 가장 효과적인 제제로 인식되어 있고[9] 불소를 이용한 골의 조직형태학적인 연구결과는 불소가 조골세포의 수와 골 재형성시 골 형성 기간을 증가시키고 있슴을 보여준다[10,11]. 불소는 2차적으로 피질골의 강화를 증가시키며 조직 형태학적으로 골양 표면이 증가되고, 골 두께와 기질 침착 비율이 증가되며, 능동적인 조골세포의 증가를 보여준다[12]. 불소는 또한, 파골세포의 활동성을

저하시키고[13], 불화나트륨(Sodium fluoride) 투여시 치주인대의 압박측에 영향을 주며, 치조골의 흡수에도 영향을 준다[14]. 다량을 투여하면 파골세포가 감소하고 비활동성의 파골세포가 증가하며, 0.5~1.0mM 농도하의 *in vitro* 실험에서 각 파골세포 흡수면적과 흡수량이 감소된다[13]. Rich와 Ensinck는 지속적인 불소의 투여는 골조직 형성을 증가시키나, 부족시에는 성장이 지연되고 우식의 이환율이 높으며 골다공증이 유발된다고 하였다[15]. 최근 Susa등[16]은 MC3T3E1 세포에서 골 흡수와 골 형성의 매개 인자로서 PGE2와 PTH 자극에 의한 골흡수 기전에 관여하는 cAMP가 forskolin자극에 의해 촉진되는 cAMP 생성을 불화나트륨(10mM)이 억제한다고 보고하였다. 이같은 불소의 효과는 칼슘의 축적 및 석회화 촉진, 결정화(crystallinity)의 증가 등 골조직의 무기 성분에 대한 안정성을 증가시켜 골조직의 흡수를 억제하는 데에 기인되는 것으로 보고되어 있으며, 또한, 치아우식증, 골다공증 등에 중요한 치료 효과를 가지는 골형성 인자로 널리 알려져 있는데, 고농도로 투여하거나 장기 치료시 독작용을 나타낸다[17]. 불소는 생물학적인 면에서는 mitogenic agent로 작용하며, 물리화학적으로 골의 apatite에서 OH를 대체하는 불소의 *in vivo* 독작용을 볼 수 있는데, 새로운 골조직의 저광화, 골의 과광화, 풍토병인 불소증에서 볼 수 있는 woven bone의 형성 등을 들 수 있다[18]. 현재까지 불소가 골세포에서 mitogenic activity를 증가시키는 현상에 대한 분자생물학적인 규명이 확립되지는 않았지만, Jacques등은 골세포에서 성장인자가 수용체에 결합되면 이 결합체는 이합체화(dimerization)와 자기인산화(autophosphorylation)를 통해 수용체의 tyrosyl kinase를 활성화시키고, 이후 rasGAP, Raf, MEK kinase 등이 일련의 인산화 과정을 통해 DNA 합성과 세포증식의 과정으로 이어지는 것으로 보고하였다[19]. 또한, 불소는 골세포에서 직접 phosphotyrosyl protein phosphatase (PTPP)의 활성을 억제시켜 cellular tyrosyl phosphorylation이 증가되고 골세포 증식을 자극하게 되며[20] 전달체계 과정중에서 불소가 PTPP를 억제하여 탈인산화(dephosphorylation)를 억제시키므로 MAP kinase의 활성이 계속되어 세포증식을 증가시킨다[21]. 또 최근의 불소에 관한 여러 연구에서 골형성 세포 증식효과를 발현하는 물질은 fluoroaluminо complex(AlFx)로 밝혀졌으며[22], 이 AlFx의 protein tyrosine phosphorylation은 G-protein-coupled receptor를 통해서 활성화 되는 것으로 알려진 thrombin에서 나타나는 결과와 유사하며, tyrosine kinase receptor로 활성화되는 insulin-like growth factor등과는 다른 것으로 알려져 있다. 이러한 연구는 불소가 골형성 세포에서 G-protein-dependent tyrosine phosphorylation을 활성화시킬 수 있음을 시사해 주고 있다. G-protein-coupled receptor가 MAP kinase를 활성화시키는 기전은 수용체와 세포의 종류에 따라 다르며, MAP kinase 활성화는 pertussis toxin-sensitive 또는 insensitive G-protein의 매개로 일어나거나 protein kinase C(PKC) 혹은 Ras-dependent하게 일어난다는 보고가 있다[23]. G-protein coupled receptor(GPCR)작용제에 의한 Ras-dependent MAP kinase의 활성화는 Shc adaptor protein의 tyrosine 인산화의 증가와 연관이 있으며 Grb2를 매개로 하는 Ras guanine nucleotide exchange factor인 Sos-1의 보충작용이 되어야만 MAP kinase 활성화가 일어날 수 있다[24]. 또 다른 보고에서는 epidermal growth factor(EGF)가 tyrosine-kinase수용체(RTK)의 자극으로 수용체 자체와 Shc의 tyrosine phosphorylation이 증가됨을 밝히고 있으며 이 수용체를 말하는 Grb2의 SH2 영역은 tyrosine phosphorylation된 Shc에 결합하여 Shc-Grb2-Sos의 복합체 형성을 이룬다고 보고하고 있다[25]. Sos는 Ras guanine-nucleotide exchange를 촉매시키는 역할을 하며, Grb2-Sos의 결합은 Ras의 활성화 경로에 중요한 과정으로 알려져 있다[26]. 하지만 Grb2가 단순히 Sos를 세포막쪽으로 이동시키는데 돕는지 혹은 Grb2-Sos의 결합이 세포에서 nucleotide exchange활성도를 조정하는지 여부는 명확하게 알려져 있지 않다.

본 실험에서는 불화나트륨 투여시 농도에 따른 조골세포의 석회화 결절 형성 정도를 관찰하기 위해 ascorbic acid와 organic phosphate가 첨가된 배양액으로 조골세포를 배양하여 석회화된 골조직 결절(mineralized bone nodule)을 관찰하였으며, 염기성 인산분해효소 활성도와 [^{3}H]-thymidine incorporation을 통한 조골세포의 증식에 미치는 영향을 알아 보고자 하였다. 불화나트륨 투여에 따른

Shc과 Grb2의 인산화 양상을 관찰하였고, Shc과 Grb2 단백질의 양적 변화도 관찰하였으며, 또한 cAMP response element binding protein(p-CREB)의 인산화에 미치는 영향도 알아 봄으로써 불화나트륨이 조골세포의 생리적 활성에 미치는 영향을 규명하고자 하였다.

II. 연구재료 및 방법

1. 연구 재료

본 연구를 위한 재료로는, 35mm dish, 24 well multi dish는 Nunc(Delta, Denmark), alpha modified essential medium(α-MEM)을, trypsin-EDTA는 Flow Laboratories (ICN Biochemicals Inc., Costa Mesa, CA, U.S.A.)를, fetal calf serum(FCS)는 GIBCO(Life Technologies Ltd, Paisley, U.K.)를 사용하였다. sodium fluoride, aluminium chloride, 0.05% TCA, 50μg/ml ascorbic acid, 10mM의 β-glycerophosphate, bovine serum albumin과, ρ-nitrophenylphosphate는 Sigma(St. Louis, USA)를, [3H]-thymidine은 Amersham(Little Chalfont, Buckinghamshire)을, 또한 anti-phosphotyrosine(anti-Tyr(P)), anti-Shc, anti-p-CREB은 Upstate Biotechnology(Lake Placid, NY)의 것을 사용하였고, anti-Grb2와 2차 Ab는 Santa Cruz(Santa Cruz., CA)를 사용하였다.

2. 연구 방법

1) 골세포군의 분리 및 배양

태생 19일째의 백서(Sprague-Dawley rats) 태자 두개관을 무균적으로 적출한 다음, 0.1% collagenase, 0.05% trypsin및 0.5mM EDTA로 구성된 효소용액을 연속적으로 처리하여 조골세포군을 분리하였다. 분리한 조골세포군은 10% fetal bovine serum이 첨가된 minimum essential medium으로 1주일간 primary culture를 시행하였으며(Fig. 1.), culture후 trypsin-EDTA로 처리하여 세포들을 수집한 후 혈구계산반(Hemocytometer)으로 세포수를 측정하여 0.5~1×10^6 cells/35mm dish가 되도록 분주한 다음 세포를 dish 표면에 부착시켰다. 배양시 습도는 95%, 온도는 37를 유지하면서 95%의 공기와 5%의 CO_2를 공급하였다.

2) 골조직 결절 형성에 대한 불화나트륨의 효과

불화나트륨의 골조직 형성에 대한 효과를 관찰하기 위하여 35mm dish에 조골세포군을 분주한 후 골조직 결절의 형성을 관찰하기 위하여 대조군의 경우 15% FBS, 50μg/ml의 ascorbic acid와 10mM의 β-glycerophosphate가 첨가된 α-MEM으로, 실험군의 경우 위의 배양액에 10μM 농도의 불화나트륨을 첨가한 후 일정 시간동안 배양하고 신선한 배양액으로 교체하며 21일간 배양하였다.

모든 배양 세포군은 21일 후 중성 완충 포르말린으로 고정한 후 in situ로 von Kossa 염색을 시행하여 양성반응을 나타내는 결절의 수를 100배 확대하여 산정하였다(Fig. 2).

3) 염기성 인산분해효소 활성도 측정

0.5~1×10^6 cells/35mm dish 농도로 분주하여 10% FBS가 든 α-MEM으로 배양한 다음 불화나트륨이 염기성 인산분해효소 활성에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 불화나트륨을 처리하지 않은 군을 대조군으로 하고 1, 10, 100μM 불화나트륨을 첨가한 군을 실험군으로 하여, 신선한 α-MEM으로 교체한 후 7일 동안 배양하였다. 배양후 배양액을 제거하고 0.05% trypsin과 4mM EDTA로 처리하여 세포를 수집한 다음 200×g로 5분간 원침한 후 상층액을 제거하고 0.5ml의 탈이온증류수를 첨가하여 sonic dismembrator를 이용하여 30% 출력에서 30초간 sonication한 후 효소활성 측정에 사용하였다. 염기성 인산분해효소 활성을 측정하기 위한 완충액으로는 0.1M glycine-NaOH buffer(pH 10.3)를 사용하였고, 15mM의 ρ-nitrophenylphosphate 기질로 이용하여 37℃에서 30분간 반응시킨 후 효소의 작용에 의하여 기질로부터 분해, 유리된 p-nitrophenol의 농도를 spectrophotometer를 이용하여 비색정량함으로써 측정하였다. 단백질은 bovine-serum albumin(fraction V)을 표준용액으로 사용하여 Lowry 등(1951)의 방법에 의하여 정량하였다.

4) 조골세포증식 및 DNA 합성측정

불화나트륨이 조골세포 증식에 미치는 영향은 [^{3}H]-thymidine을 이용한 DNA합성율로써 관찰하였다. 배양한 조골세포군은 24 well multi dish에 분

주하고 serum-free MEM에서 24시간 배양후 신선한 serum-free MEM 또는 1~100μM 불화나트륨을 첨가한 배양액으로 교환하여 24시간 배양하였다. 배양기간중 마지막 4시간 동안 5μCi의 [3H]-thymidine(specific activity, 25Ci/mmol)을 첨가, 배양한 후 5% ice-cold TCA로 세포를 고정시킨 다음 4회 세척하고 침전분획을 0.5M NaOH로 용해하여 그 radioactivity를 liquid scintillation counter (Beckman, LS 5000 TA)로 측정하여 DNA합성율을 관찰하였다.

5) 면역 침전

면역 침전은 실험세포를 Triton X-100 extraction buffer(EB buffer, 1% Triton X-100, 10mM Tris, pH 7.6, 50mM NaCl, 0.1% BSA, 1mM PMSF, 1% aprotinin, 5mM EDTA, 50mM NaF, 0.1% 2-mercaptoethanol, 5μM phenylarsine oxide, 100μM vanadate)로 처리하여 lysate를 만든 후 12,000rpm, 4℃에서 30분간 원심분리하여 맑은 세포 부유액만을 얻었다. 이들 세포 부유액에 특정 단백질을 침전시키기 위한 각각의 항체를 부가하여 얼음에서 2시간동안 반응시킨 후에 pansorbin solution을 이용하여 항체-항원 복합체(immune complex)를 침전시켰다. 침전된 면역 복합체는 EB buffer로 3차례 세척하여 비특이적 반응을 제거하고 침전 면역 복합체만을 25μl의 1X Laminin buffer로 재현탁시키고 98℃에서 5분동안 중탕, 변성시켜서 SDS-PAGE를 시행하였다.

6) 전기영동 및 Immunoblotting

면역 침전체는 10% 또는 15%의 acrylamide, 0.193% bisacrylamide gel로 SDS-PAGE 하여 gel 상의 단백질은 semi-dry electrotransfer system(Ellard Inc., Seattle, WA)을 사용하여 nitrocellulose membrane(1mAh/cm^2)에 옮긴 후 blocking solution(10mM Tris-HCl, pH 7.5, 150mM NaCl, 5% powdered milk)으로 1시간동안 상온에서 blocking 시켰다. 비특이적 항체반응을 blocking 한 후 1차 항체로 anti-PY, anti-Shc, anti-Grb2를 상온에서 흔들어 주면서 2시간동안 반응시켰다. NC membrane은 세척용액(10mM Tris-HCl, pH 7.5, 150mM NaCl)으로 3번의 세척후에 enhanced chemiluminescence(ECL, Amersham Co., Arlington Heights, IL)반응을 위해서는 상온에서 1시간동안 horseradish peroxidase-conjugated 항체와 반응시키고 colorimetric 발색을 위해서는 alkaline phosphatase-conjugated 2차 항체와 반응시켜서 발색시켰다. Shc과 Grb2의 protein phosphorylation 양상을 관찰한 다음 Shc과 Grb2의 단백질량의 변화 양상을 보기 위하여 0.1M glycine(pH 2.5)으로 실온에서 30분동안 세척하여 NC membrane을 reprobing한 후에 다시 anti-Shc과 anti-Grb2 항체를 넣고 immunoblotting을 실시한 후 ECL이나 colorimetric 방법으로 측정하였다. Blot의 표식 정도는 densitometry(300Å computing densitometer; Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, U.S.A.)로 측정하였다.

III. 연구결과

1. 불화나트륨이 조골세포군에서 석회화 결절 형성에 미치는 영향

21일간 장기 배양하면서 위상차 현미경을 이용하여 조골세포군들을 계속 관찰한 결과 세포들은 방추형의 모양을 하였다. 세포들에 50μg/ml의 ascorbic acid와 10mM의 β-glycerophosphate를 함께 첨가하여 배양한 경우 배양 약 7일 후부터 결절이 형성되었고 21일간 배양한 경우 다수의 결절이 형성되었다.

결절이 석회화되기 이전 시기인 0, 7, 14 일째의 조골세포군 세포를 10μM 불화나트륨으로 48시간 동안만 처리하고 21일 후 관찰한 결과, 형성된 석회화 결절수는 대조군에 비해 약 2배 정도 유의하게 증가하였다. 전 배양기간 21일동안 배양액에 10μM 불화나트륨과 10μM 염화알루미늄(aluminium chloride)을 첨가한 군에서는 대조군에 비해 다소 증가하였으나 유의한 차이를 보이지는 않았다(Fig. 3).

2. 불화나트륨이 조골세포군에서 염기성 인산분해효소 활성에 미치는 영향

불화나트륨이 미치는 조골세포군의 염기성 인산분해효소의 활성을 검사하기 위해 각각 1, 10, 100μM의 불화나트륨을 첨가하고 7일 동안 배양한 결과, 염기성 인산분해효소 활성도는 불화나트륨의 농도가 증가함에따라 유의한 감소를 보였다(Table 1).

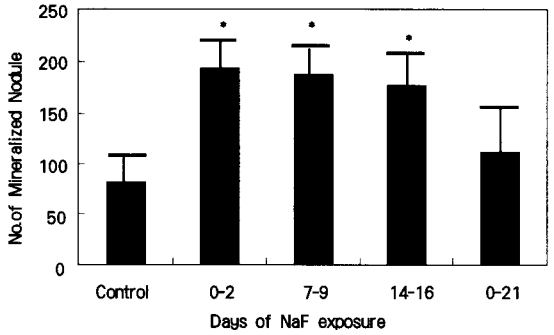

Fig. 3. Effect of continuous or pulsed exposure of fetal rat osteoblastic cells to 10μM NaF on mineralized bone nodule formation. Fetal rat calvarial cells were cultured in the presence of 50μg/ml ascorbic acid and values are means ± S.E. of 4 samples.
* Significantly different from control, $P < 0.05$

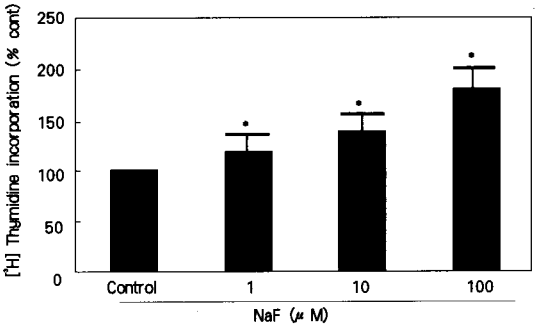

Fig. 4. Fluoride at micromolar doses stimulates [^{3}H]-thymidine incorporation into DNA in osteoblastic cells. [^{3}H]-thymidine incorporation was shown as a percentage of the control value. Results were shown as the mean ± S.E. of 4 samples.
* Significantly different from control, $P < 0.05$

Table. 1. The effect of sodium fluoride on the alkaline phosphatase activity in cultures of fetal rat osteoblastic cells.

Group	Alkaline phosphatase activity (nmol substrate cleaved/hr/mg protein)
Control	5,341 ± 196
NaF 1μM	5,091 ± 210
10μM	4,032 ± 89*
100μM	3,442 ± 109*

Values are means ± S.E. of 4 samples.
* Significantly different from control, $P < 0.05$

3. 불화나트륨이 [^{3}H]-thymidine incorporation에 미치는 영향

불화나트륨이 조골세포군의 증식에 미치는 영향을 관찰한 결과, 조골세포의 DNA 합성은 1, 10, 100μM 의 불화나트륨의 농도가 증가함에 따라 대조군에 비하여 유의하게 증가하였다(Fig. 4).

4. 불화나트륨이 Shc과 Grb2의 단백질 인산화 및 단백질량의 변화에 미치는 영향

불화나트륨의 조골세포 증식에 관한 기전을 규명하기 위하여 Shc과 Grb2의 인산화를 관찰하였다. 10, 100μM, 1, 10mM의 불화나트륨과 10μM의 염화알루미늄을 처리하여 α-Py로 immunoblotting을 시행한 결과, 불화나트륨의 농도가 증가함에 따라 Shc과 Grb2의 인산화가 증가하였다(Fig. 5, 6).

Shc과 Grb2 각각의 단백질 인산화 양상을 관찰한 후 Shc과 Grb2의 단백질량의 변화를 관찰하기 위하여 anti-Shc 항체와 anti-Grb2 항체로 immunoblotting한 결과, 불화나트륨 농도가 증가함에 따라 Shc에 결합하는 Grb2의 양과 Grb2에 결합되어 있는 Shc의 양이 증가하였다(Fig. 7, 8).

5. 불화나트륨이 CREB과 phospho-CREB 발현에 미치는 영향

불화나트륨이 CREB(cAMP response element binding protein)과 phospho-CREB 발현에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 5μM의 forskolin과 100μM, 1mM, 10mM의 불화나트륨과 10μM의 염화알루미늄을 투여한 후 anti-CREB과 anti-phospho-CREB으로 immunoblotting을 실시하여 관찰한 결과, CREB의 발현에는 영향이 없는 반면 phospho-CREB의 발현량은 불화나트륨의 농도가 증가함에 따라 감소하였다(Fig. 9).

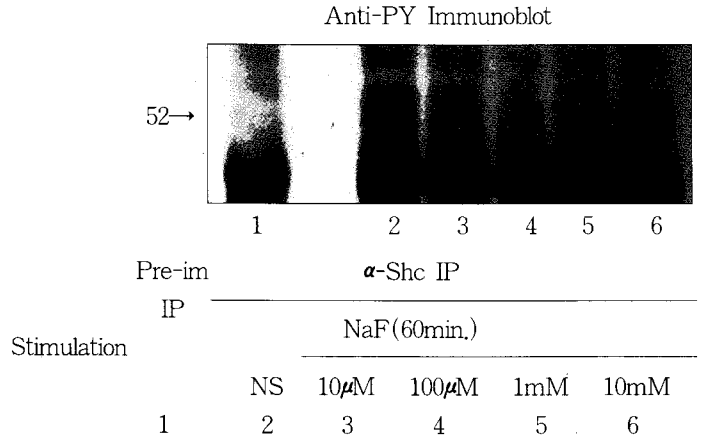

Fig. 5. The influence of sodium fluoride on phosphorylation of the Shc.

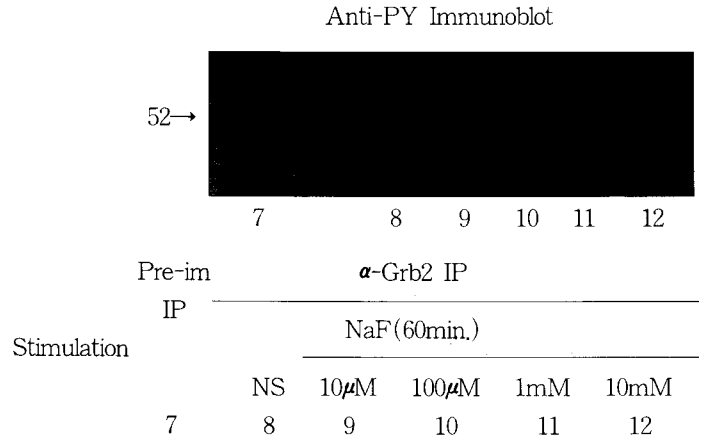

Fig. 6. The influence of sodium fluoride on phosphorylation of the Grb2.

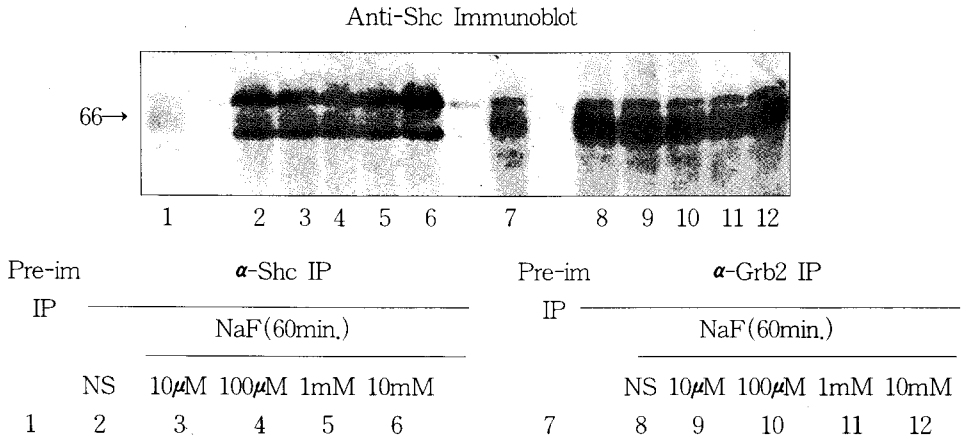

Fig. 7. The influence of sodium fluoride on the quantitative change of protein Shc.

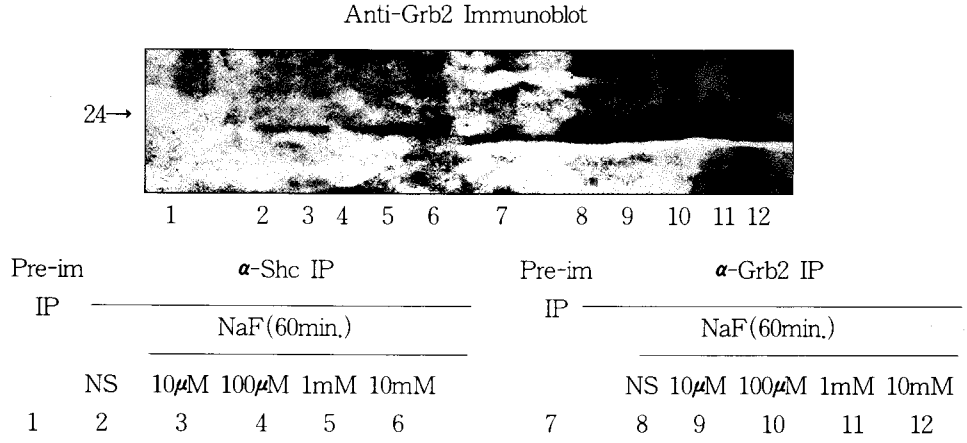

Fig. 8. The influence of sodium fluoride on the quantitative change of protein Grb2.

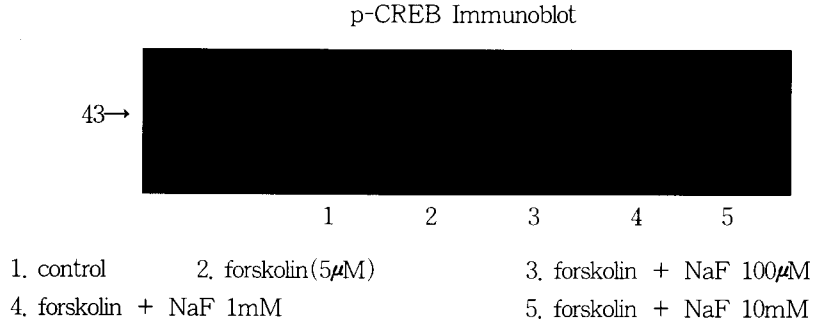

Fig. 9. The influence of sodium fluoride on the p-CREB formation.

IV. 총괄 및 고안

골조직 대사에 관한 연구는 과거 골조직의 장기배양(organ culture) 방법을 이용하여 많이 진행되어 왔으나 골조직을 구성하고 있는 세포가 매우 다양하기 때문에 특정 대사과정을 세포수준에서 연구하기 위하여는 세포배양 방법이 필수적이라 생각된다. 이에 따라 조골세포들을 분리하기 위한 다양한 방법이 시도되고 있으며 이중 collagenase와 Trypsin-EDTA를 이용한 연속효소처리방법은 골세포 분리방법 중 가장 널리 사용되고 있다[1,2]. 연속효소처리시 순수하지는 않지만 조골세포군으로 분류되는 Ⅳ, Ⅴ군의 골세포군의 골형성능에 관한 실험은 세포의 융모요막에의 이식[27], 근육내 inoculation[28], 조골세포군이 들어있는 diffusion chamber의 복강내 이식방법 등[8] 여러 가지 생체내 실험방법이 개발되어 있으나 재현성이 없거나 동일한 실험조건을 부여하기에 어려운 점이 있다. 따라서 분리한 골세포들을 이용하여 *in vitro*에서 골조직을 형성하려는 다양한 연구방법이 시도되고 있다.

골조직의 형성은 유리기질의 형성과 이의 석회화라는 골세포의 두가지 기능에 의한 것으로 특징지을 수 있으며, ascorbic acid는 기질의 대부분을 차지하고 있는 collagen의 형성과정중 collagen triple helix의 안정성을 부여해주는 hydroxyproline과 collagen분자간의 cross-link형성에 필수적인 hydroxylysine의 수산화 과정에 필수적인 cofactor로 작용함으로써 collagen합성에 관여하는 것으로 알려져 있다. 또한 *in vitro*에서 석회화시 organic phosphate의 역할에 관한 보고도 있으며[29], Binderman등[30]은 *in vitro*에서의 석회화시에 적당한 농도의 phosphate가 필요하다고 하였고 β-glycerophosphate 첨가없이 ascorbic acid만을 첨가하여 배양한 경우 결절의 형성은 관찰할 수 있었으나 석

회화는 관찰되지 않음을 보고한 바 있다.

세포 증식의 항진에 따른 결과로 조직학적으로 불소는 골모양상(osteoid) 표면 및 두께를 증가시키고 골기질 축적률을 증가시켜 골형성을 촉진시키는 것은 보편적인 사실이다. 그러나 정상적인 골세포의 생리현상인 파골세포에 의한 골흡수 진행 이후 조골세포에 의한 골형성이 일어나는 coupling 반응과는 달리, 불소는 골흡수의 작용없이 정상적인 조골세포를 자극하여 활성화된 조골세포 수를 증가시키고 그 기능도 증가시킨다고 한다[31]. 특히, 실험적으로 불소는 골 생성전의 중간엽 세포(preosteogenic mesenchymal cell)를 골생성(osteogenic)세포로 전환시킨다고 한다[32]. 즉, osteoprogenitor 세포수를 항진시켜 골형성을 촉진하는 것으로 알려져 있으며, 이러한 골 형성은 조골세포의 분화보다는 조골세포의 증식으로 인한 결과로 인식하고 있다[12]. Chamber[33]는 cAMP analogue인 DBcAMP와 cAMP phosphodiesterase inhibitor인 isobutyl methylxanthine에 의하여 조골세포에서 염기성 인산분해효소(alkaline phosphotase, ALP)가 증가하였다고 보고하여 조골세포의 염기성 인산분해효소 증가에 cAMP가 관여함을 시사한 바 있다. 불소는 골형성 세포에 대하여 제1형 교원질 생성의 증가를 유도하였으며, Dandona등[34]은 생체에서 불화나트륨 투여시 혈장내 osteocalcin의 농도와 혈장내 염기성 인산분해효소 활성도의 증가를 나타낸다고 보고한 바 있다. 또한, 불소는 파골세포의 활동성을 방해하고, 불화나트륨 투여시 치주인대의 압박측에 영향을 주며, 치조골의 흡수에도 영향을 주는 것으로 알려져 있으며, 다량 투여시 파골세포가 감소하고 비활동성의 파골세포가 증가하며, 시험관내에서는 0.5~1mM의 농도일 때 개개 파골세포당 흡수면적과 흡수량이 감소되는 것으로 보고하고 있다[13].

본 실험에서는 조골세포군을 50㎍/ml의 ascorbic acid와 10mM의 β-glycerophosphate가 첨가된 배양액에 임상적으로 골형성 효과가 뚜렷한 것으로 알려진 10㎛M 농도의 불화나트륨을 처리하여 21일간 장기 배양시, 대조군에 비하여 석회화 결절 형성에는 큰 차이가 없었으나 많은 결절이 석회화되기 이전 시기인 0, 7, 14일째의 조골세포군에 48시간동안 불화나트륨 10㎛M을 처리한 경우 21일의 배양기간 후에 형성된 석회화 결절수는 대조군에 비해 약 2배 정도 증가하였다(Fig. 3). 이는 불소가 석회화 결절을 증가시켜 골형성을 증가시키는 것으로 생각된다. 조골세포군의 염기성 인산분해효소 활성에 미치는 불소의 영향을 관찰하기 위하여 조골세포군에 불화나트륨을 1, 10, 100㎛M로 처리하여 7일간 배양시 염기성 인산분해효소 활성도가 감소하였으며, 이는 불소가 조골세포의 분화보다는 조골세포 증식 항진으로 골형성에 관여하는 것을 예측하게 한다. 또한, 1, 10, 100㎛M의 불화나트륨에 [^{3}H]-thymidine을 incorporation 시킨 결과, 불화나트륨의 농도가 증가함에 따라 조골세포의 증식이 촉진되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 4). 또, 여러 보고에서 mitogen-activated protein(MAP) kinase가 세포성장을 조절하는 nuclear transcription factor의 인산화 및 활성화를 중재함이 밝혀졌으며, intrinsic tyrosine kinase activity를 보이는 tyrosine-kinase(RTK) receptor의 자극이나 G-protein-coupled receptor(GPCR)의 자극으로 MAP kinase를 활성화 시킬 수 있음이 알려져 있다. 이 RTK-mediated mitogenic 신호는 tyrosine-phosphorylated receptor, Shc, Grb2와 Sos간의 상호작용에서 비롯되며 이로써 Ras-dependent MAP kinase활성화로 이어지게 된다[35,36]. 또한 heterotrimeric G protein의 βγsubunit(Gβγ)는 Ras-dependant MAP kinase activation을 조절하지만 정확한 기전은 밝혀져 있지 않은 상태이다. 반면, Tim등[24]은 Ras-dependent MAP kinase 활성에서 Gβγ매개의 Shc의 tyrosine phosphorylation이 가장 먼저 일어나고 이어서 Grb2, Sos 및 Ras로 진행되는 신호전달로 MAP kinase 활성으로 이어진다고 보고한 바 있다. Shc은 c-fos의 SH 영역을 probe로 한 사람의 cDNA library screening을 통하여 cloning되었으며 분자 크기에 따라 p46, p52, p66 세가지로 분류된다. Shc은 구조상 PTB(phosphotyrosine binding domain) 영역, collagen 유사영역(CH), 그리고 SH2 영역을 갖고 있으며 Shc의 세포의 형질 전환에서의 주요 기능은 Grb2의 SH2 영역과의 상호작용 및 이에 따른 Ras pathway의 활성화에 있다고 볼 수 있다[37]. Ras pathway를 활성화시키는 또 다른 증거로는 ras pathway를 활성화시키는 insulin, EGF, PDGH, NGF, antigen, interleukin2, 3, 5, 및 calcium 등에 의

해 Shc의 tyrosine phosphorylation되는 것에 관한 보고를 들 수 있다. Shc과의 상호작용으로 ras pathway를 활성화시키는 Grb2는 사람과 rat에서 cloning되었으며 1개의 SH2 영역과 2개의 SH3 영역을 갖고 있으며 모든 조직에서 발현된다. Grb2 단백질을 과발현시키거나 microinjection방법으로 세포내로 넣어 주는 경우, 세포의 형질전환된 현상을 뚜렷하게 관찰할 수는 없으나, DNA복제가 시작되는 것이 관찰되었다. 또한 Grb2의 antisense DNA를 세포내로 넣어주면 DNA복제가 억제되고 세포의 성장이 멈추는 것이 관찰되었다. 이러한 결과는 Grb2가 세포의 성장에 중요한 기능을 할 가능성을 제시한다. 성장인자, 사이토카인이나 항원 같은 ligand가 세포막에 있는 수용체와 결합하면 일련의 신호 전달 과정을 통하여 세포의 성장과 분화가 일어나며, 신호 전달 과정에 참여하는 단백질은 주로 인산화나 단백질-단백질 상호작용을 통하여 활성화된다. 이 신호 전달 단백질상에서 상호작용에 요구되는 기본 단위로는 SH2(src homology domain 2), SH3, PTB(phosphotyrosine binding domain) 영역 및 proline rich영역이 있으며 SH2영역은 phosphotyrosine을 인지하며, SH3영역은 proline rich영역을 인지하여 상대 단백질에 결합한다. 이러한 구조적 특징들을 갖고 있는 신호 전달 단백질들은 효소 활성능력의 보유여부에 따라 SH2와 SH3 영역을 갖고 있는 Src군의 tyrosine kinase 등과 단백질 자체는 효소활성을 갖고 있지 않지만 주요 기능이 단백질-단백질 상호작용인 adaptor기능을 하는 단백질등이 있다. 이 중에서 세포증식에 관여하는 onco-protein의 일종인 Grb2의 신호전달 기전을 연구한 결과, SH3영역을 통한 Sos와의 상호작용이 중요함을 관찰하였다. Grb2는 이 상호작용을 통하여 Sos를 세포막으로 끌어들이고 세포성장에 중요한 ras pathway를 활성화시키게 된다[38]. 본 연구에서는 MC3T3E1 조골세포 유사세포에서 불소의 mitogenic한 작용을 나타내는 분자인 fluoroalumino complex를 형성하기 위하여 염화알루미늄(10μM)과 불화나트륨(10μM, 100μM, 1mM, 10mM)을 처리하였을 때 불화나트륨의 농도가 증가함에 따라 Shc과 Grb2의 인산화가 증가함을 관찰하였으며, Shc의 인산화로 인한 Grb2 보충현상을 확인, 불화나트륨의 조골세포에 대한 증식효과는 Shc과 Grb2의 상호작용으로 인함을 확인할 수 있었다(Fig. 5, 6, 7, 8).

또한, 본 연구는 Shc, Grb2와 Sos 및 Ras, Raf와의 상호작용이 불화나트륨의 조골세포 증식 기전을 밝히는 데 도움이 될 것으로 사료된다. Susa등[16]은 MC3T3E1 세포에서 불화나트륨(10mM)이 세포막에 존재하는 adenylate cyclase를 활성화시키는 물질인 forskolin(5μM) 처리로 인하여 증가된 세포내 cAMP농도를 현저하게 감소시켰음을 보고한 바 있다. 세포내에서 증가된 cAMP는 cAMP-dependent protein kinase(PKA)를 활성화시키며 활성화된 PKA의 catalytic subunit는 핵막을 통과하여 cAMP response element binding protein(CREB)에 결합하여 CREB을 인산화시켜 다양한 생리적인 반응을 보이는 것으로 알려져 있다. 본 실험에서는 CREB과 CREB의 인산화에 불화나트륨(100μM, 1mM, 10mM)의 효과를 관찰한 결과, CREB의 발현에는 영향을 미치지 않는 반면 forskolin자극에 의해 증가된 phospho-CREB의 발현이 감소함을 관찰할 수 있었다(Fig. 9).

본 실험으로 불화나트륨의 골 형성 촉진작용이 조골세포 증식에 기인한다는 기전의 일부를 규명할 수 있었으며, 불화나트륨이 골 형성에 미치는 분자 생물학적 기전에 관한 연구는 골 질환, 특히 조골세포 이상으로 인한 골 질환 치료방법 개발에 도움이 될 수 있으리라 사료된다.

V. 결 론

본 실험을 통하여 ascorbic acid와 organic phosphate가 첨가된 배양액으로 조골세포를 배양하고 여기에 불화나트륨을 투여한 후 석회화된 골조직 결절(mineralized bone nodule) 형성을 관찰하였으며, 염기성 인산분해효소의 활성도를 측정하였다. [^{3}H]-thymidine incorporation을 통하여 조골세포의 증식에 미치는 불화나트륨의 영향을 알아 보았다. 불화나트륨 투여에 따른 Shc과 Grb2의 인산화 양상과 Shc과 Grb2 단백질의 양적 변화도 관찰하였으며, 아울러 cAMP response element binding protein(p-CREB)의 인산화에 미치는 불화나트륨의 영향을 관찰한 바, 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 불화나트륨이 조골세포군에서 석회화 결절 형성에 미치는 영향을 관찰한 바, 0, 7, 14 일째의 조골세포군 세포를 10μM 불화나트륨으로 48시간 동안 처리하였을 때, 21일의 배양기간 후 형성된 석회화 결절수는 대조군에 비해 약 2배 정도 유의하게 증가하였다($P<0.05$).
2. 불화나트륨이 조골세포군에서 염기성 인산분해효소 활성에 미치는 영향을 관찰한 바, 불화나트륨의 농도가 증가함에 따라 염기성 인산분해효소 활성도가 유의한 감소를 보였다($P<0.05$).
3. 불화나트륨이 조골세포군의 증식에 미치는 영향을 관찰한 바, 조골세포의 DNA 합성은 대조군에 비해 불화나트륨의 농도가 증가함에 따라 유의하게 증가하였다($P<0.05$).
4. 불화나트륨이 Shc과 Grb2의 단백질 인산화 및 단백질량의 변화에 미치는 영향을 관찰한 바, 불화나트륨의 농도가 증가함에 따라 Shc과 Grb2의 인산화가 증가하였다.
5. 불화나트륨이 CREB의 인산화에 미치는 영향을 관찰한 바, CREB의 발현에는 영향이 없었으나 phospho-CREB의 발현량은 불화나트륨의 농도가 증가함에 따라 감소하였다.

결론적으로, 본 연구를 통하여 골형성이 조골세포의 증식에 기인하고 불화나트륨이 이를 효과적으로 자극하였음을 입증하였으며 또한, 조골세포의 증식 조절에 중요한 Shc과 Grb2 사이의 상호신호 전달 과정을 규명할 수 있었다.

참고문헌

1. Wong GL, Cohn DV : Separation of parathyroid hormone and calcitoninsensitive cells from non-responsive bone cells. Nature 252:713-715, 1974.
2. Wong GL : Characterization of subpopulations of OC and OB bone cells obtained by sedimentation at unit gravity. Calcif Tissue Int 34:67-75, 1982.
3. Peck WA, Birge SJ, Fedak SA : Bone cells : Biochemical and biological studies after enzymatic isolation. Science 146:1476-1477, 1964.
4. Rao LG, Ng B, Brunette DM, Heersche JN : Parathyroid hormone and prostaglandin E1-response in a selected population of bone cells after repeated subculture and storage at -80°C. Endocrinology 100:1233-1241, 1977.
5. 안중진, 김관식, 정동균 : 백서 두개관 세포군의 골형성능에 관한 연구. 대한해부학회지 12:105-114, 1984.
6. Pharoah MJ, Heersche JN : 1,25-Dihydroxy vitamin D3 causes an increase in the number of osteoclastlike cells in cat bone marrow cultures. Calcif Tissue Int 37:276-281, 1985.
7. Bellows CG, Aubin JE, Heersche JN, Antosz ME : Mineralized bone nodules formed *in vitro* from enzymatically released rat calvaria cell populations. Calcif Tissue Int 38:143-154, 1986.
8. Moskalewski S, Boonekamp PM, Scherft JP : Bone formation by isolated calvarial osteoblasts in synergeneic and allogenic transplants : light microscopic observations. Am J Anat 167:249-263, 1983.
9. Briancon D, Meunier PJ : The treatment of osteoporosis with fluoride calcium and vitamin D. Orthop Clin North Am 12:629-648, 1981.
10. Burgener D, Bonjour JP, Caverzasio J : Fluoride increases tyrosine kinase activity in osteoblast-like cells : regulatory role for the stimulation of cell proliferation and Pi transport across the plasma membrane. J Bone and Mineral Research 10:164-171, 1995.
11. Farley JR, Wergedal JE, Baylink DJ : Fluoride directly stimulates proliferation and alkaline phosphotase activity of bone-forming cells. Science 222:330-332, 1983.
12. Bellows CG, Heersche JN, Aubin JE : The effects of fluoride on osteoblast progenitors *in vitro*. J Bone Miner Res 5(Suppl. 1):S101-S105, 1990.
13. Okuda A, Kanehsia J, Heershe JN : The effects of sodium fluoride on the resorptive activity of isolated osteolast. J Bone Miner Res 5(Suppl. 1):S115-S120, 1990.
14. Hellsing E, Hammarstrom L : The effects of

pregnancy and fluoride on orthodontic tooth movements in rats. Eur J Orthod 13:223-230, 1991.
15. Rich C, Ensinck J : Effect of sodium fluoride on calcium metabolism of human beings. Nature 191:184-187, 1961.
16. Susa M, Standke GJ, Jeschkle M, Rohner D. : Fluoroaluminate induces pertussis toxin-sensitive protein phosphorylation : Differences in MC3T3-E1 osteoblastic and NIH3T3 fibroblastic cells. Biochem Biophys Res Commun 235:680-684, 1997.
17. Chan MM, Rucker RB, Riggins RS : Effects of fluoride and ethane-1-hydroxy-1, 1-diphosphate on bone metabolism in the growing chick. J Nutr 106:802-811, 1976.
18. Bovine G, Meunier PJ : Fluoride and bone : toxicological and therapeutic aspect : The metabolic and molecular basis of acquired disease. Bailliere Tindal 1803-1823, 1990.
19. Pouyssegur J, Seuwen K : Transmembrane receptors and intracellular pathways that control cell proliferation. Annu Rev Physiol 54:195-210, 1992.
20. Lau KH, Farley JR, Freedman TK, Baylink DJ : 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.
21. Lau KH, Wu LW, Yoon HK, Baylink DJ : Inhibition of phosphotyrosine dephosphorylation (P-tyr) leads to increased P-tyr phosphorylation of MAP kinase (MAPK), MAPK activity, and human bone proliferation. Bone 16(Suppl):96S, abstract 58, 1995.
22. Caverzasio J, Imai T, Ammann P et al. : Aluminium potentiates the effect of fluoride on tyrosine phosphorylation and osteoblast replication *in vitro* and bone mass *in vivo*. J Bone Miner Res 11:46-55, 1996.
23. Post GR, Brown JH : G protein-coupled receptors and signalling pathways regulating growth responses. FASEB J 10:741-749, 1996.
24. Van Biesen T, Hawes BE, Luttrell DK et al. : Receptor-tyrosine-kinase- and G$\beta\gamma$-mediated MAP kinase activation by a common signalling pathway. Nature 376:781-784, 1995.
25. Pawson T : Protein modules and signaling networks. Nature 373: 573-580, 1995.
26. Sasaoka T, Rose DW, Jhun BH et al. : Evidence for a functional role of Shc proteins in mitogenic signaling induced by insulin, insuline-like growth factor-1, and epidermal growth factor. J Biol Chem 269, 13689-13694, 1994.
27. Lundy MW, Stauffer M, Wergedal JE et al. : Histomorphometric analysis of iliac crest bone biopsies in placebo-treated versus fluoride-treated subjects. Osteoporosis Int 5:115-129, 1995.
28. Nijweide PJ, van Iperen-van Gent AS, Kawilarang-de Hass EW et al. : Bone formation and calcification by isolated osteoblastlike cells. J Cell Biol 93:318-323, 1982.
29. Raisz LG, Dietrich JW, Canalis EM : Factors influencing bone formation in organ culture. Isr J Med Sci 12:108-114, 1976.
30. Binderman I, Greene RM, Pennypacker JP : Calcification of differenatiating skeletal mesenchyme *in vitro*. Science 206:222-225, 1979.
31. Parson V, Mitchell CJ, Reeve J, Hesp R : The use of sodium fluoride, vitamin D and calcium supplement in the treatment of patients with axial osteoporosis. Calcif Tissue Res 22:S236-240, 1977.
32. Hall BK : Sodium fluoride as an inhibitor of osteogenesis from embryonic mesenchyme *in vitro*. Bone 8:111-116, 1987.
33. Chamber TJ : The pathobiology of the osteoclast. J Clin Pathol 38:241-252, 1985.
34. Dandona P, Coumar A, Gill DS et al. : Sodium fluoride stimulates osteocalcin in normal subjects. Clin Endocrinol 29:437-441, 1988.
35. Faure M, Voyno-Yasenetskaya TA, Bourne HR : c-AMP and $\beta\gamma$subunits of heterotrimeric G proteins stimulate the mitogen-activated protein

proteins stimulate the mitogen-activated protein kinase in COS-7 cells. J Biol Chem 269:7851-7854, 1994.
36. Ito A, Satoh T, Kaziro Y, Itoh H : G protein beta gamma subunit activates Ras, Raf, and MAP kinase in HEK293 cells. FEBS Lett 368:183-187, 1995.
37. Schlaepfer DD, Hanks SK, Hunter T, van der Geer P : Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase. Nature 372:786-791, 1994.
38. Buddy L, Egan SE, Rodriguez Viciana P et al. : A complex of Grb2 adaptor protein, Sos exchange factor, and a 36-kDa membrane bound tyrosine phosphoprotein is implicated in Ras activation in T cells. J Biol Chem 269:9019-9023,

사진부도

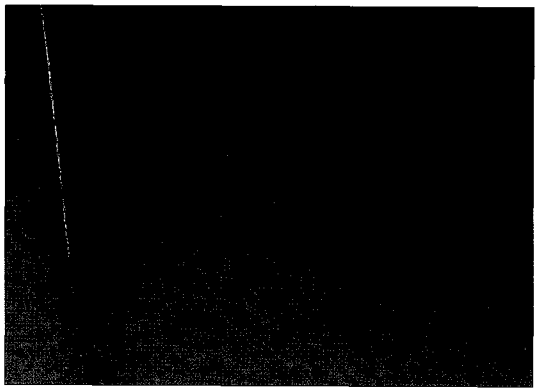

Fig. 1. Spindle shaped osteoblastic cells were shown after primary culture.

Fig. 2. In situ von Kossa stain after 21 days culture. Von Kossa-positive nodules were shown as black structures(×100).