

Vitamin D₃와 Dexamethasone의 복합 투여가 골모세포에 미치는 영향에 관한 연구

임 나 원¹⁾ · 김 상 철²⁾

치아 이동시 골개조에 관여하는 골모세포의 활성을 알아보기 위해 골조직 대사 물질인 vitamin D₃를 1, 10, 100nM/ml 농도로, dexamethasone을 10, 100nM/ml, 1μM/ml 농도로 단독 또는 복합 투여하여 세포 활성 및 염기성 인산분해효소의 활성도를 분석하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. dexamethasone을 단독 투여한 경우 배양 1일째에 1μM/ml 농도에서만 대조군에 비해 유의한 세포 활성 증가를 보였으며 이후에는 전반적으로 유의한 감소를 보였다. 반면에 염기성 인산분해효소의 활성도는 1μM/ml의 dexamethasone일 때 가장 높았으며 배양 기간이 길어질수록 유의한 증가를 보였다
2. vitamin D₃ 첨가시 배양 1일째에는 세포 활성이 증가하였으나 배양 2일째에는 100nM/ml에서 대조군과 비교해 크게 감소하여 농도의 증가에 따라 세포 활성이 크게 감소하는 경향을 보였으며 배양 3일째에는 다소 활성이 회복되었다. 염기성 인산분해효소의 활성도는 10nM/ml과 100nM/ml의 vitamin D₃에서 배양 2일째와 3일째에 대조군에 비해 유의하게 높았는데 100nM/ml에서 배양 3일째에 가장 높았다.
3. dexamethasone과 vitamin D₃를 복합 투여한 경우 배양 2일째에는 모든 vitamin D₃ 농도에서 세포 활성이 감소하였으나 3일째에는 세포 활성이 회복되어 대조군이나 dexamethasone 단독 투여 시에 비해 유의한 활성 증가를 보이는 경우가 있었다. 염기성 인산분해효소의 활성은 배양 1일째에 감소를 보였으나 배양 2일째에 10nM/ml나 100nM/ml의 dexamethasone에 100nM/ml의 vitamin D₃ 복합 투여의 경우 유의한 증가를 보였고 배양 3일째에 다시 감소를 보였다.

적절한 농도의 dexamethasone과 vitamin D₃의 복합 사용으로 골모세포의 활성 및 염기성 인산분해효소를 증가시키거나 조절하는 상승 효과를 얻을 수 있음을 알 수 있었다.

(주요단어 : 골모세포, vitamin D₃, glucocorticoid)

I. 서 론

골조직은 기질과 여러 종류의 세포들을 포함하고 있는 복잡한 조직으로서 일생 동안 흡수와 신생이 계속적으로 일어나는 동적인 조직이다. 교정치료시 치아이동은 치주인대 세포를 매개로 골조직의 개조

(bone remodeling)가 일어나는 과정으로서 그 과정에 관여하는 세포 즉, 골모세포, 파골세포 및 그 전구세포의 증식, 분화 및 활성에 영향을 미치는 호르몬 등의 전신적 인자와 cytokine과 같은 국소적 인자에 의하여 조절되고 있다고 한다^{1,2)}.

골개조에 관여하는 전신적 인자로는 parathyroid hormone, vitamin D₃[1,25-(OH)₂D₃], calcitonin, estrogen, glucocorticoid과 같은 호르몬 등이 있다^{3,4)}. Vitamin D₃는 cholecalciferol으로도 불리는 물질로서

¹⁾ 원광대학교 치과대학 교정학 교실, 박사 과정

²⁾ 원광대학교 치과대학 교정학 교실, 교수

음식물을 통해서 직접 흡수되기도 하지만 대부분은 7-dehydrocholesterol의 상태로 흡수되어 피부에 운반되면 자외선을 받아 vitamin D₃로 전환된다. vitamin D₃는 간에서 25-hydroxycholecalciferol로 전환되고, 신장을 순환하는 동안에 1,25-dihydroxycholecalciferol [1,25-(OH)₂D₃]로 전환된다. 신장에서 형성된 1,25-(OH)₂D₃는 생리적으로 활성이 큰 물질로서 장과 신장에서는 칼슘 흡수에 관여하여 체내 Ca²⁺과 HPO₄²⁻를 조절하는 기능을 갖고 있는 것으로 알려져 있다⁵⁻⁷. 또한 1,25-(OH)₂D₃는 vitamin D₃의 가장 강력한 대사 물질로서 골에서 칼슘과 인의 이동에 중요한 역할을 담당하고 있으며², 또한 혈청과 세포의액에서 Ca²⁺과 HPO₄²⁻의 적절한 농도를 유지하게 함으로써 정상적인 골형성이 일어나도록 유도하는 호르몬이다⁸. 그러나 고농도일 때는 장에서 칼슘과 인의 흡수를 촉진시켜 골흡수가 증가되어 골형성을 억제한다고 Raisz⁹가 보고하였다. Collins와 Sinclair¹⁰는 교정적 치아이동시 백서의 치주인대 내에 1,25-(OH)₂D₃를 국소적으로 투여한 결과 압박측에서 치조골 흡수가 많아지는 것을 관찰하여 교정적 치아이동시의 적용 가능성을 제시하였다. 또한 Beresford등¹¹은 1,25-(OH)₂D₃가 사람의 골세포에서 제1형 교원질과 alkaline phosphatase의 활성을 강력하게 증가시키고, Endo등¹²은 *in vitro*에서 1,25-(OH)₂D₃가 골형성을 억제한다고 하였다.

다른 전신적 인자인 glucocorticoid는 부신피질에서 분비되어 당 대사에 관계하는 호르몬으로서 일종의 스테로이드이며 대표적으로 cortisol 등이 있는데 골조직 대사에 매우 다양한 기능을 나타낸다. 즉, 생체내 투여시 골모세포의 기능을 억제하고 파골세포의 기능을 증가시킴으로써 골다공증을 일으키는 것으로 알려져 있으며^{13,14}, *in vitro*에서 골흡수는 억제시키지만^{15,16} 골형성에 있어서는 증가시킨다는 보고^{17,18}와 억제시킨다는 보고¹⁹가 공존하고 있다.

Dexamethasone은 합성 glucocorticoid의 하나로서, Tenenbaum과 Heersche²⁰에 의하면 dexamethasone이 골모 전구세포의 증식을 촉진함으로써 골형성을 증가시킬 수 있다고 주장하였고, Bellow등²¹도 석회화된 골조직 결절의 형성이 증가됨을 보고하였다. dexamethasone은 백서 골수 배양에서 광화된 조직을 형성시키며²², 닭의 두정골²⁰, fetal rat calvaria cells²³, 치주인대 세포²⁴, 백서 치수 세포²⁵와 같은 다른 배양계에서 광화 조직을 형성하는 것으로 보고되었다.

Dexamethasone과 다른 골 조절 인자와의 관계로서, transforming growth factor(TGF) β의 생성, TGF-β의 반응²⁶, insulin-like growth factor(IGF) I의 합성²⁷과 osteoblast-like cells의 IGF-I 수용기 농도를 조절하는 것으로 보고되었으며²⁸ 부갑상선 호르몬의 반응²⁹⁻³¹과, 1,25-dihydroxycholecalciferol 수용기도 glucocorticoid에 의해 조절된다고 보고되었다³²⁻³⁴. 또한 교원질 합성³⁵, osteopontin의 유전자 발현³⁶과 alkaline phosphatase의 활성³⁷에도 영향을 미친다고 한다.

치아이동시 골개조의 기전을 이해하기 위해서는 골모세포에 대한 이해가 필수적이며 골조직 대사 조절 물질인 vitamin D₃와 glucocorticoid가 이 과정에서 어떻게 영향을 끼치는 지도 중요한 탐구 사항이 될 것으로 보인다. 특히 이들 물질을 복합 투여했을 때의 효과는 아직 밝혀지지 않아서 본 연구에서는 골모세포주를 배양하여 dexamethasone과 vitamin D₃를 단독 혹은 복합 투여하여 이의 생물학적 영향을 세포 활성 및 염기성 인산분해효소의 활성도 면에서 분석하여 구명하였다.

II. 연구재료 및 방법

1. 연구 재료

- 1) vitamin D₃ (1,25-dihydroxycholecalciferol: [1,25-(OH)₂D₃], Calbiochem, USA)
1, 10, 100nM/ml의 농도로 준비하였다¹¹.
- 2) dexamethasone (Sigma Co, USA)
10nM/ml, 100nM/ml, 1 μM/ml의 농도로 준비하였다.
- 3) 세포 배양

본 연구에 사용된 세포들은 Kodama등³⁸에 의해 신생 쥐(C57BL/6)의 두개골에서 분리되어 계대 배양된 골모세포주 MC3T3-E1이다. 이 골모세포주는 염기성 인산분해효소(alkaline phosphatase, ALP) 활성과 교원질 합성능이 있으며 장기간 배양하면 골기질의 석회화를 관찰할 수 있고 부갑상선 호르몬에 의한 cAMP의 생성을 관찰할 수 있다. 10% fetal bovine serum(FBS)(Hyclone Lab. Inc.) 및 100U/ml의 penicillin, 100 μg/ml의 streptomycin이 포함된 α-minimal essential medium(α-MEM) 10ml가 담긴 25ml 플라스틱 culture flask(Flow Lab. Inc.)에서 37°C, 95%의 습도, 5%의 CO₂ 배양기의 조건으로 세포

배양하였다. 세포는 통상적인 방법에 의하여 일주일에 2회씩 계대 배양하였다. 실험에 사용할 세포는 5×10^4 cells/ml 농도로 부유시킨 후 사용하였다.

2. 연구 방법

1) 대조군과 실험군의 설정

어떤 조절 물질도 투여하지 않은 군을 대조군으로 하였으며 아래와 같은 5가지의 실험군을 설정하였다.

- 가. vitamin D₃ 단독 투여(1, 10, 100nM/ml의 농도),
- 나. dexamethasone 단독 투여(10nM/ml, 100nM/ml, 1 μ M/ml의 농도)
- 다. 1 μ M/ml dexamethasone과 1, 10, 100nM/ml의 vitamin D₃ 복합 투여
- 라. 100nM/ml dexamethasone과 1, 10, 100nM/ml의 vitamin D₃ 복합 투여
- 마. 10nM/ml dexamethasone과 1, 10, 100nM/ml의 vitamin D₃ 복합 투여

계대 배양한 골모세포를 선택하여 실험 전일 분주한 다음 1일간 배양하고 1, 10, 100nM/ml 농도의 1,25-(OH)₂D₃와 10nM/ml, 100nM/ml, 1 μ M/ml 농도의 dexamethasone을 실험군 설정 기준에 따라 가하여 1일간, 2일간 그리고 3일간 배양하였다. 각 군당 5개씩 배양 샘플을 구성하였다.

2) 골모세포 활성 측정

세포 활성도를 측정하기 위하여 생리식염수에 MTT(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma Co., USA) 용액 200 μ l를 각 well에 넣고 4시간 동안 배양한 후 MTT 용액을 버리고 dimethyl sulfoxide((CH₃)₂SO, DMSO)를 200 μ l씩 첨가하여 formazan 결정을 용해시킨 후 세포 활성도의 측정을 위해 96-well plate 상으로 옮겼다. plate를 잘 흔든 후 ELISA analyser(Model ETY-96, Toyo Instruments Inc., Japan)에 plate를 넣고 570nm에서 흡광도를 측정하였다. 매 실험마다 MTT 용액이 들어 있지 않은 배양액에서의 흡광도에 대한 백분율로 세포 활성도를 산출하였다.

3) 염기성 인산분해효소 활성도 측정

배양된 세포를 phosphate buffered saline로 3회 세척하고 1mM MgCl₂가 함유된 0.2% nonidet p-40 1ml을 넣은 후 세포를 plate로부터 분리해 내고 sonicator

(LAB-SPNIC1510, Karl Kolb)를 이용하여 얼음 속에서 75watt, 1분간 세포를 파괴시킨 후 3000 x g로 10분간 원심분리하였다. 원심분리 후 상층 액에 페닐인산나트륨을 첨가하여 alkaline phosphatase 활성도를 측정하였다.

4) 통계분석

vitamin D₃와 dexamethasone의 농도와 시간 경과에 따른 세포 활성도의 변화를 대조군에 대한 백분율로 측정하여 그 평균과 표준편차를 구하였고 일원분산분석법(ANOVA)을 이용하여 통계학적 유의성을 검정하였다.

III. 연구 성적

1. dexamethasone이 골모세포주 활성에 미치는 영향

골모세포 배양에서 dexamethasone의 영향을 관찰한 결과, 세포 배양 1일째에 1 μ M/ml 농도의 dexamethasone 첨가시 128.51 \pm 12.83%, 100nM/ml 농도에서는 87.72 \pm 11.38%, 10nM/ml에서는 104.44 \pm 12.31%로, 배양 1일째에는 1 μ M/ml 농도에서만 대조군에 비해 유의하게 높았으며(P<0.05), 100nM/ml, 10nM/ml에서는 활성도가 낮았다. 배양 2일째에는 1 μ M/ml 농도에서 78.26 \pm 7.29%, 100nM/ml 농도에서 41.1 \pm 10.22%로 대조군에 비해 크게 낮았으며 10nM/ml에서도 60.59 \pm 11.44%로 대조군과 비교해 유의하게 낮았다(P<0.05). 배양 3일째에는 1 μ M/ml 농도와 100nM/ml 농도에서 각각 62.05 \pm 10.51%, 57.84 \pm 13.35%로 유의하게 세포 활성도가 낮았고(P<0.05), 10nM/ml에서는 88.91 \pm 6.00%로 약간 낮았다(Table 1).

2. vitamin D₃가 골모세포주 활성에 미치는 영향

골모세포에 vitamin D₃를 첨가하여 배양한 결과, 1일째에는 1nM/ml 농도에서 74.75 \pm 3.70%, 10nM/ml 농도에서 131.63 \pm 2.13%, 100nM/ml에서 120.07 \pm 1.99%로 10nM/ml 농도 이상에서 대조군에 비해 유의하게 높은 활성도를 보였다. 배양 2일째에는 1nM/ml 농도에서 83.89 \pm 3.14%, 10nM/ml 농도에서 86.87 \pm 5.33%로 대조군에 비해 약간 낮았는데 100nM/ml에서는 38.86 \pm 9.9%로 대조군에 비교해 크게 낮아서(P<0.05), 농도의 증가에 따라 세포 활성이 크게 감소하는 경향

Table 1. The Effect of Dexamethasone on the Cellular Activity of MC3T3-E1 Osteoblasts (%)

	1 day	2 days	3 days
control (5)	100.00 ± 3.28	100.00 ± 5.83	100.00 ± 4.81
1 μM/ml (5)	128.51 ± 12.83*	78.26 ± 7.29	62.05 ± 10.51*
100nM/ml (5)	87.72 ± 11.38	41.10 ± 10.22*	57.84 ± 13.35*
10nM/ml (5)	104.44 ± 12.31	60.59 ± 11.44*	88.91 ± 6.00

* ; stastically significant from control(P<0.05)

Table 2. The Effect of the Vitamin D₃ on the Cellular Activity of MC3T3-E1 Osteoblasts (%)

	1 day	2 days	3 days
control (5)	100.00 ± 3.28	100.00 ± 5.83	100.00 ± 4.81
1nM/ml (5)	74.75 ± 3.70	38.86 ± 9.90*	112.67 ± 13.40
10nM/ml (5)	131.63 ± 2.14*	86.87 ± 5.33	115.24 ± 3.02
100nM/ml (5)	120.07 ± 5.98*	83.89 ± 3.14	92.39 ± 2.13

* ; stastically significant from control(P<0.05)

Table 3. The Effect of Vitamin D₃ and Dexamethasone(1 μ M/ml) on the Cellular Activity of MC3T3-E1 Osteoblasts (%)

	1 day	2 days	3 days
control (5)	100.00 ± 3.28	100.00 ± 5.83	100.00 ± 4.81
Dexa 1 μM/ml (5)	128.51 ± 12.83*	78.26 ± 7.29	62.05 ± 1.51*
Dexa+Vit 1nM/ml (5)	117.16 ± 12.63	66.73 ± 12.98*	91.72 ± 10.78
Dexa+Vit 10nM/ml (5)	93.75 ± 6.17	42.3 ± 5.91*	140.99 ± 8.25*@
Dexa+Vit100nM/ml (5)	76.62 ± 8.69	46.95 ± 8.88*	131.40 ± 8.21*@

* ; stastically significant from control(P<0.05)

@ ; stastically significant from dexamethasone only group(P<0.05)

을 보였다. 배양 3일째에는 1nM/ml 농도와 10nM/ml 농도에서 각각 112.67±13.4%, 115.24±3.02%로 약간의 세포 활성도가 높았으나 100nM/ml에서는 92.39±2.13으로 낮았다(Table 2).

3. dexamethasone과 vitamin D₃ 복합 투여가 골 모세포주 활성에 미치는 영향

1 μM/ml의 dexamethasone에 vitamin D₃를 복합 투여한 경우, 배양 1일째에는 1nM/ml의 vitamin D₃에서 117.16±12.63%, 10nM/ml에서 93.75±6.17%, 100nM/ml에서 76.62±8.69%로 1nM/ml의 vitamin D₃

복합 투여의 경우만 약간 높았을 뿐 10, 100nM/ml의 경우에는 대조군 및 dexamethasone(1 μM/ml) 단독 투여군에 비해 낮았으나 통계학적 유의성은 없었다. 배양 2일째에는 1nM/ml의 vitamin D₃에서 66.73±12.98%, 10nM/ml에서 42.3±5.91%로 크게 낮았으며 100nM/ml에서도 46.95±8.88%로 10nM/ml에서와 유사하게 낮아서 대조군과 유의한 차이를 보였다(P<0.05). 배양 3일째에는 1nM/ml의 vitamin D₃에서 91.72 ±10.78%로 2일째에 비해서 증가를 보였으며 10nM/ml에서는 140.99±8.25%, 100nM/ml에서는 131.40±8.21%로 2일째에 비해 3배 이상 증가되어 대조군이나 dexamethasone(1 μM/ml) 단독 투여군과

Table 4. The Effect of Vitamin D₃ and Dexamethasone(100nM/ml) on the Cellular Activity of MC3T3-E1 Osteoblasts (%)

	1 day	2 days	3 days
control (5)	100.00 ± 3.28	100.00 ± 5.83	100.00 ± 4.81
Dexa 100nM/ml (5)	87.72 ± 11.38	41.10 ± 10.22*	57.84 ± 13.35*
Dexa+Vit 1nM/ml (5)	117.16 ± 11.66	50.96 ± 9.94*	141.49 ± 14.22*@
Dexa+Vit 10nM/ml (5)	93.75 ± 9.55	47.31 ± 7.80*	118.08 ± 6.39@
Dexa+Vit 100nM/ml(5)	76.62 ± 9.79	75.32 ± 8.47	129.20 ± 11.57*@

* ; stastically significant from control(P<0.05)

@ ; stastically significant from dexamethasone only group(P<0.05)

Table 5. The Effect of Vitamin D₃ and Dexamethasone(10nM/ml) on the Cellular Activity of MC3T3-E1 Osteoblasts

	1 day	2 days	3 days
control	100.00 ± 3.28	100.00 ± 5.83	100.00 ± 4.81
Dexa 10nM/ml (5)	104.44 ± 12.31	60.59 ± 11.44*	88.91 ± 6.00
Dexa+Vit 1nM/ml (5)	78.21 ± 3.39	47.59 ± 14.83*	133.29 ± 9.18*@
Dexa+Vit 10nM/ml (5)	72.87 ± 9.41	41.42 ± 7.21*	77.61 ± 13.47
Dexa+Vit 100nM/m (5)	79.40 ± 3.39	44.73 ± 14.83*	79.14 ± 9.18

* ; stastically significant from control(P<0.05)

@ ; stastically significant from dexamethasone only group(P<0.05)

유의한 차이를 보였다(P<0.05) (Table 3).

100nM/ml의 dexamethasone에 vitamin D₃를 복합 투여한 경우, 배양 1일째에는 1nM/ml의 vitamin D₃에서 117.16±11.66%, 10nM/ml에서 93.75±9.55%로 약간 낮았으나 100ng/ml에서는 76.62±9.79%로 낮았지만 대조군과 유의한 차이는 보이지 않았다. 배양 2일째에는 1nM/ml의 vitamin D₃에서 50.96±9.94%, 10nM/ml에서 47.31±7.80%로 dexamethasone(100nM/ml) 단독 투여군과 같이 대조군에 비해 유의하게 낮았으며(P<0.05), 100nM/ml에서도 75.32±8.47%로 낮았으나 vitamin D₃의 농도가 증가함에 따라 dexamethasone 단독 투여군에 비해 높아지는 경향을 보였다. 배양 3일째에는 1nM/ml의 vitamin D₃에서 141.49±14.22%, 10nM/ml에서 118.08±6.39%, 100nM/ml에서 129.2±11.57%로 dexamethasone(100nM/ml) 단독 투여 시에 비해 유의하게 높았으며 1nM/ml의 경우에서 세포 활성이 가장 높았다(Table 4).

10nM/ml의 dexamethasone에 vitamin D₃를 복합 투여한 경우, 배양 1일째에는 1nM/ml의 vitamin D₃에

서 78.21±3.39%, 10nM/ml에서 72.87±9.41%, 100ng/ml에서도 79.4±3.39%로 낮았지만 대조군과의 차이가 유의하지는 않았다. 배양 2일째에는 1nM/ml의 vitamin D₃에서 47.59±14.83%, 10nM/ml에서 41.42±7.21%, 100nM/ml에서는 44.73±14.83%로 dexamethasone(10nM/ml) 단독 투여 시의 경우처럼 농도에 관계없이 대조군에 비해 유의하게 낮았다(P<0.05). 배양 3일째에는 1nM/ml의 vitamin D₃에서 133.29±9.18%로 대조군이나 dexamethasone(10nM/ml) 단독 투여 시에 비해 세포 활성도가 높았는데, 10nM/ml에서는 77.61±13.47%, 100nM/ml에서 79.14±9.18%로 대조군에 비해 세포 활성이 낮았고 통계적으로 유의하지는 않았다(Table 5).

4. Dexamethasone이 골모세포주 염기성 인산분해효소의 활성도에 미치는 영향

배양된 세포의 성숙도와 석회화 기능에 대한 영향을 알아보기 위하여 dexamethasone에 대한 염기성 인산분

Table 6. The Effect of the Dexamethasone on the ALP Activity of MC3T3-E1 Osteoblasts (KA unit/mg protein)

	1 day	2 days	3 days
control (5)	1.3201 ± 0.0756	1.2195 ± 0.0609	2.1706 ± 0.0606
1 μM/ml (5)	1.5016 ± 0.0571	2.0308 ± 0.2465*	7.3749 ± 0.2984*
100nM/ml (5)	1.3217 ± 0.1910	0.8123 ± 0.0352	1.9827 ± 0.0350
10nM/ml (5)	1.1056 ± 0.1022	1.2194 ± 0.0497	1.6913 ± 0.0474

* ; stastically significant from control(P<0.05)

Table 7. The Effect of Vitamin D₃ on the ALP Activity of MC3T3-E1 Osteoblasts (KA unit/mg protein)

	1 day	2 days	3 days
control (5)	1.3201 ± 0.0756	1.2195 ± 0.0609	2.1706 ± 0.0606
1nM/ml (5)	1.0891 ± 0.0257	1.4227 ± 0.0352	2.4547 ± 0.0587
10nM/ml (5)	1.2046 ± 0.0756	2.0325 ± 0.0931*	6.1316 ± 0.7431*
100nM/ml (5)	1.1122 ± 0.0199	6.0974 ± 0.0118*	8.1276 ± 0.1924*

* ; stastically significant from control(P<0.05)

Table 8. The Effect of Vitamin D₃ and Dexamethasone(1 μ M/ml) on the ALP Activity of MC3T3-E1 Osteoblasts (KA unit/mg protein)

	1 day	2 days	3 days
control	1.3201 ± 0.0756	1.2195 ± 0.0609	2.1706 ± 0.0606
Dexa 1 μM/ml (5)	1.5016 ± 0.0571	2.0308 ± 0.2465*	7.3749 ± 0.2984*
Dexa+Vit 1nM/ml (5)	0.9075 ± 0.0571	1.1980 ± 0.0685@	0.8040 ± 0.0662*@
Dexa+Vit 10nM/ml (5)	1.1930 ± 0.0626	1.1782 ± 0.0178@	1.1950 ± 0.0409*@
Dexa+Vit 100nM/ml(5)	1.4191 ± 0.1245	1.1395 ± 0.0700@	1.5097 ± 0.0579@

* ; stastically significant from control(P<0.05)

@ ; stastically significant from dexamethasone only group(P<0.05)

해효소의 활성도를 측정 한 결과는 Table 6과 같다. 염기성 인산분해효소의 활성도는 1 μM/ml의 dexamethasone일 때 가장 높았으며 배양 2일째에 대조군에 비해 약 1.7배, 배양 3일째에 약 3.5배 정도로 유의하게 높았다(P<0.05).

5. Vitamin D₃가 골모세포주 염기성 인산분해효소의 활성도에 미치는 영향

vitamin D₃에 대한 염기성 인산분해효소의 활성도를 측정 한 결과는 Table 7과 같다. 염기성 인산분해효소의 활성도는 10nM/ml과 100nM/ml의 vitamin

D₃에서 배양 2일째와 3일째에 대조군에 비해 유의하게 높았는데 100nM/ml에서 배양 3일째에 가장 높았다(P<0.05).

6. Dexamethasone과 vitamin D₃ 복합 투여가 골모세포주 염기성 인산분해효소의 활성도에 미치는 영향

1 μM/ml의 dexamethasone에 vitamin D₃를 복합 투여했을 경우 배양 1일째에는 염기성 인산분해효소의 활성도가 대조군 및 단독 투여군에 비해 큰 차이가 없었으며, 2일째에도 대조군과 큰 차이가 없었으

Table 9. The Effect of Vitamin D₃ and Dexamethasone(100nM/ml) on the ALP Activity of MC3T3-E1 Osteoblasts (KA unit/mg protein)

	1 day	2 days	3 days
control (5)	1.3201 ± 0.0756	1.2195 ± 0.0609	2.1706 ± 0.0606
Dexa 100nM/ml (5)	1.3217 ± 0.1910	0.8123 ± 0.0352	1.9827 ± 0.0350
Dexa+Vit 1nM/ml (5)	1.2046 ± 0.0314	1.8292 ± 0.0995 *	1.6003 ± 0.1132
Dexa+Vit 10nM/ml (5)	1.4851 ± 0.1069	3.4552 ± 0.2881* @	1.1585 ± 0.0286* @
Dexa+Vit 100nM/ml(5)	1.4851 ± 0.3465	3.0487 ± 0.1534* @	2.0123 ± 0.1104

* ; stastically significant from control(P<0.05)

@ ; stastically significant from dexamethasone only group(P<0.05)

Table 10. The Effect of Vitamin D₃ and Dexamethasone(10nM/ml) on the ALP Activity of MC3T3-E1 Osteoblasts (KA unit/mg protein)

	1 day	2 days	3 days
control (5)	1.3201 ± 0.0756	1.2195 ± 0.0609	2.1706 ± 0.0606
Dexa 10nM/ml (5)	1.1056 ± 0.1022	1.2194 ± 0.0497	1.6913 ± 0.0474
Dexa+Vit 1nM/ml (5)	0.9075 ± 0.0571	0.8129 ± 0.0352	0.8040 ± 0.0662* @
Dexa+Vit 10nM/ml (5)	1.1930 ± 0.0626	0.8129 ± 0.0352	1.1950 ± 0.0409*
Dexa+Vit 100nM/ml(5)	1.4191 ± 0.1254	2.1342 ± 0.1408* @	1.5090 ± 0.0579

* ; stastically significant from control(P<0.05)

@ ; stastically significant from dexamethasone only group(P<0.05)

나 dexamethasone 단독 투여군의 경우 증가되었던 것을 고려하면 복합 투여에 의해 염기성 인산분해효소의 활성도가 억제되었다고 볼 수 있다(P<0.05). 배양 3일째에도 dexamethasone 단독 투여의 경우 대조군에 비해 약 3.4배정도 증가된 반면에 1nM/ml의 vitamin D₃ 복합 투여의 경우 대조군의 약 0.4배로 감소되었으며 10nM/ml의 vitamin D₃ 복합 투여의 경우도 대조군의 약 0.6배 정도로 감소되어 유의한 차이를 보였다(P<0.05)(Table 8).

100nM/ml의 dexamethasone에 vitamin D₃ 복합 투여 시, 배양 1일째에는 vitamin D₃의 농도에 관계없이 대조군과 유의한 차이가 없었으나 배양 2일째에는 10nM/ml의 vitamin D₃ 복합 투여 시 3.4552±0.2881 (K.A. unit/mg protein), 100nM/ml의 vitamin D₃ 복합 투여 시 3.0487±0.1534로서, 100nM/ml의 dexamethasone 단독 투여 시 0.8123±0.0352 보다 약 3.7배 이상 증가되었다(P<0.05). 배양 3일째에는 10nM/ml의 vitamin D₃ 복합 투여 시 염기성 인산분해효소의 활성도가 대조군이나 100nM/ml의 dexamethasone 단독

투여 시보다 유의하게 감소되었다(P<0.05)(Table 9).

10nM/ml의 dexamethasone에 vitamin D₃ 복합 투여 시, 배양 1일째에 vitamin D₃의 농도에 관계없이 대조군과 유의한 차이가 없었으나 배양 2일째에는 100nM/ml의 vitamin D₃ 복합 투여 시 2.1342±0.1408로서, 대조군이나 10nM/ml의 dexamethasone 단독 투여 시 1.2194±0.0497에 비해 증가되었고, 배양 3일째에는 1nM/ml의 vitamin D₃ 복합 투여 시 0.8040±0.0662로서 10nM/ml의 dexamethasone 단독 투여의 1.6913±0.0474에 비해 유의한 억제 효과를 보였다(P<0.05)(Table 10).

IV. 총괄 및 고찰

골형성과 흡수로 대표되는 교정적 치아이동시의 골개조 현상은 골조직의 대표적인 대사 활동이라 할 수 있다. 이는 골모세포 또는 파골세포에 의한 것으로 여겨지고 있으며 이에 대한 이해가 필수적이다³⁹⁾. 골조직 대사에 관한 연구는 골조직의 장기 배양(organ

culture) 방법을 이용하여 주로 진행되어 왔으나 이러한 방법은 골조직의 구성 세포가 매우 다양하므로⁴⁰⁾ 특정 대사 과정이 어느 세포에서 기인하는지를 규명하는데 어려운 점이 있어 세포 배양법을 통해 세포 수준에서 연구하는 것이 필수적이라 생각된다. 여러 calcitropic hormones에 대한 골조직의 생화학적 반응, 이들 호르몬의 작용 기전 규명, 골흡수의 본태 연구 등 골조직 대사에 관한 세포 수준의 연구에는 매우 유용한 *in vitro* system으로 여겨지고 있다⁴¹⁻⁴³⁾.

골조직을 구성하고 있는 세포는 매우 다양하여 골흡수 시 파골세포 이외의 다른 여러 세포들도 관여하는 것으로 알려져 있다. 그 중에서도 골형성 기능을 담당하고 있는 골모세포가 파골세포를 활성화시킬 수 있는 coupling factor를 분비하여 골양조직을 분해시키는 교원분해효소를 유리함으로써 골흡수에도 관여한다고 보고되고 있다^{44,45)}. Chamber와 Fuller⁴⁶⁾는 모든 골 표면은 비석회화된 골양조직 또는 교원질에 의하여 덮여 있고 이것들은 파골세포의 작용을 방해하며 골흡수가 일어나기 위해서는 석회화된 골 표면이 노출되어야 하며 골양조직 또는 교원 분해에 필요한 교원분해효소가 골모세포에서 분비된다고 주장하였다.

골모세포는 간엽세포에서 기원하며, 호염기성 세포질과 많은 양의 ribosome을 가지며 golgi 기구 자체도 잘 발달되어 있다. 또한 석회화능과 높은 염기성 인산분해효소의 활성도와 교원질 합성능, osteocalcin 합성능 및 부갑상선 호르몬과 prostaglandin에 반응하는 adenylate cycle system과 1,25-(OH)₂D₃ 수용체를 갖고 있다. 골모세포의 세포막에는 중성, 산성, 염기성 인산분해효소 등이 많이 결합되어 있으며 이들 효소가 활성화되면 PO₄³⁻의 농도가 국소적으로 증가되어 결과적으로 calcium과 결합되어 불용성인 calcium phosphate가 형성되어 교원질 같은 결체조직에 침착되고, 여기에 Na, Mg, carbonate, citrate 등이 첨가되어 골을 형성한다. 그 후 골모세포는 골세포로 전환된다⁴⁷⁾.

이런 조건을 기준으로 현재 여러 종류의 골모세포가 분리되고 있는데 그중 Kodama등³⁸⁾에 의해 신생 쥐(C57BL/6) 두개골에서 얻은 MC3T3-E1을 본 연구에서 사용하였다. MC3T3-E1 세포는 신생 쥐(C57BL/6) 두개골에서 분리한 것으로 처음에는 섬유모세포의 형태를 보이고 4-5일 후에 충만된 한 개의 세포층을 형성하고 7일 이상 배양하면 교원질을 합성하고, 21일째에 전형적인 골모세포의 형태를 갖추며,

adult mouse calvaria에서 발견된 염기성 인산분해효소 (liver-bone-kidney type)와 같은 형태를 가지며^{48,49)}, 1주일간의 배양에서 교원 섬유질을 생산하고 3주일간의 배양에서 침강된 수산화인회석을 지닌 기질 낭포를 관찰할 수 있고 유사골 기저 물질을 광화시킬 수 있는 능력이 있다.

골형성을 자극시키는 약물로는 불소와 anabolic steroids등이 있고, 골흡수를 억제하는 약물로서는 calcitonin, bisphosphonates, progestational agent, ascorbic acid with Ca⁺⁺, vitamin D, Estrogen, 그리고 oral estradiol and norethisterone acetate (E2+NETA) 등이 있으며 이들은 골다공증의 임상적 치료제로 사용되고 있다. 또한 골다공증 예방법으로는 vitamin D와 vitamin D metabolites, calcium, fluoride, calcitonin 등을 사용한다⁵⁰⁾.

염기성 인산분해효소와 osteocalcin은 골모세포의 기능을 나타내는 지표⁵⁰⁾이며, 그중 염기성 인산분해효소는 석회화 과정과 관련되어 있는 효소로서 혈관과 경조직 형성 세포의 세포막에 널리 분포되어 있다. 염기성 인산분해효소는 비교적 강한 결체조직에서 기질 낭포와 관련하여 나타나고, 특히 석회화 조직에서 석회화 형성 초기에 현저히 증가된다⁵¹⁾. 이 효소는 alkaline pH에서 organic radical로부터 phosphate 이온을 가수분해하고 석회화 과정에 관여하며 세포막에서는 이온 이동을 담당하는 것으로 추정된다. 염기성 인산분해효소를 함유한 낭포들은 전이용액 (metastable solutions)으로부터 phosphate와 calcium을 축적시키는 능력을 가지고 있는 점으로 보아 염기성 인산분해효소는 기질 낭포 중재성 석회화 과정 (matrix-vesicle mediated mineralization)에 중요한 역할을 담당하는 것으로 추정된다⁵²⁾.

1,25-(OH)₂D₃는 vitamin D₃의 가장 강력한 대사 물질로서 골에서 칼슘과 인의 이동에 중요한 역할을 담당하고 있으며 골세포에서 ALP를 강력하게 자극하는 것으로 알려져 있다²⁾. Beresford등¹¹⁾은 1,25-(OH)₂D₃가 사람의 골세포에서 제1형 교원질과 ALP 활성을 증가시키고, Endo등¹²⁾은 *in vitro*에서 골형성을 촉진한다고 하였지만 Chen등⁷⁾은 생쥐와 백서의 골세포 증식에 억제 작용을 하는 것으로, Bikle등⁶⁾은 ALP 활성은 1,25-(OH)₂D₃에 의해서 조절되는데 1,25-(OH)₂D₃가 부족한 경우에는 골기질 합성과 연골 성장의 억제와 골형성이 지연된다고 상반된 보고를 하였으며, Erben등⁵³⁾과 Nakamura등⁵⁴⁾은 골세포 분화 시에는 생리적인 농도가 중요한데 vitamin D₃

대사물의 적정 농도는 동물 모델에서 골 소실을 예방할 수 있다고 하였다. 이와 같이 1,25-(OH)₂D₃가 골세포에서 매우 다양한 반응을 보이는 것은 실험 동물 종의 차이와 세포의 기원, 그리고 세포의 밀도와 1,25-(OH)₂D₃ 첨가 기간이나 농도 또는 배양 세포 계의 차이 등에 의한 것으로 생각된다.

인체의 칼슘 항상성 유지에 중요한 역할을 하는 vitamin D₃는 스테로이드 호르몬으로서 많은 표적 세포와 기관에 특이 수용기를 가진다. 특히 골흡수 과정에서 이용될 수 있는 단백질과 효소를 생산하기 위해 표적 세포 내에 DNA와 RNA를 활성화시키는 작용이 있는 것으로 알려져 있으며^{53,54}, 특히 vitamin D의 활성형인 1,25 dihydroxycholecalciferol은 파골세포의 활성화에 가장 잠재력 있는 자극원의 하나로 알려져 있고 혈장 내에서 반감기가 2-3시간이지만 세포 활성화 효과는 수일 정도 지속될 수 있다고 한다. 또한 단핵 전구세포로부터 파골세포의 형성에 관여하며 prostaglandin 같은 다른 호르몬보다 낮은 농도에서 이런 효과를 발휘할 수 있다고 하였다^{55,56}.

본 실험에서도 배양된 골모세포에 vitamin D₃를 투여하여 활성을 관찰한 결과 배양 1일째에는 세포 활성이 증가하였으나 배양 2일째에는 세포 활성이 크게 감소하는 경향을 보였다. vitamin D₃에 대한 염기성 인산분해효소의 활성도는 100nM/ml에서 배양 3일째에 가장 높았으며 10nM/ml과 100nM/ml의 배양 2일째와 3일째에도 대조군에 비해 유의한 증가를 보였다 (P<0.05). vitamin D₃가 골모세포의 증식과 표현형 발현을 촉진시켜 골조직 성장 및 개조에 중요한 조절 기능을 하는 것으로 생각되나 여러 실험 조건에 따라 그 효과가 다양하고 생체에서의 그 역할이 정확히 규명되지 않았기 때문에 이에 대한 vitamin D₃와 제1형 교원질, osteocalcin 활성도에 관한 계속적인 연구가 필요하리라 보인다.

골형성에서 dexamethasone의 작용은 in vitro에서 골형성계를 사용함으로써 연구되어 왔는데 dexamethasone은 태아, chick 골막의 기관 배양에서 골형성을 증가시키고⁵⁷, 자가방사선법, 조직화학법 및 최근의 in situ 연구로 기관 배양계⁵⁸⁻⁶⁰에서 dexamethasone에 의해 골 전구세포의 자극을 통한 증식⁶¹ 및 광화 결정 형성을 자극한다고⁶² 보고하였다.

in vivo 와 in vitro 에서 glucocorticoid의 효과는 일치하지 않는데 corticosteroids의 생리적 농도 이상이 오랫동안 지속되는 Cushing's syndrome은 심각한 골 상실을 동반하며^{63,64}, in vivo에서 gluco-

corticoid의 투여는 골의 실제적 손실을 유발한다고 보고되었다^{15,65,66}. 그러나 골의 총량 감소는 골조직에서 glucocorticoid의 직접적 작용뿐만 아니라, 증가된 부갑상선 호르몬의 수준⁶⁷과 골 내부로의 calcium의 흡수 억제^{65,68} 같은 간접적 작용에 의해서 기인된다. In vivo에서 glucocorticoid를 투여하면 골형성이 감소되고, 골의 재흡수가 증가되는 반면¹⁵ in vitro에서는 골의 재흡수를 방해한다고 보고하고 있다^{18,19,20,35}. 분리된 osteoblast-like cells의 배양에서 glucocorticoid가 세포 증식과 alkaline phosphatase의 활성을 감소시키지만¹², Millar등⁶⁷과 Majeska와 Rodan⁶⁸의 연구에서는 증가되는 것으로 보고되었다.

Glucocorticoid는 PTH에 대한 cAMP반응³², 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor의 증가^{32,33}, 1,25-dihydroxyvitamin D₃³¹의 반응을 증가시킨다고 하였으며 Majeska등³⁷은 glucocorticoid가 세포 복제를 방해하지 않으며 alkaline phosphatase의 활성을 자극한다고 하였는데 배양 1일까지는 alkaline phosphatase와 제1형 교원질 합성을 증가시키지만 3일 후에는 감소시켰는데 이는 곧 corticosteroids가 배양 1일째까지 골모세포의 분화 정도를 보존한다는 것을 의미한다.

Glucocorticoid는 생체 내에서 골과 광물질 대사에 영향을 미치고 골흡수 증가와 골형성 감소를 보이는 glucocorticoid 과다 분비 환자의 합병증으로 골다공증이 나타난다^{14,65}. 골흡수에 대한 glucocorticoid 효과는 PTH 분비와 관련이 있을 것이라 생각되고 있지만^{14,16,17,69}, 골형성에서의 복합적인 작용이 정확히 이해되고 있지 못한 실정이다.

glucocorticoid가 RNA와 단백질 합성, 골세포에서의 세포 복제를 억제한다는 것은 보고되었지만^{17,18,19,35}, 최근 두개관골의 기관 배양 연구에서 glucocorticoid는 단기 배양에서는 골 교원질 합성을 촉진하고 장기 배양에서는 억제한다는 결과를 보였다¹⁸. 다른 연구에서는, glucocorticoid가 두개관 교원질 합성에서의 insulin-like growth factor I과 bone-derived growth factor의 자극 효과를 증가시킨다고 보고하기도 하였다^{67,68}. 두개관골은 여러 세포를 포함하고 있는데 glucocorticoid는 섬유모세포나 골모세포에 작용함으로써 골 교원질에 영향을 준다. 골모세포가 골형성에 작용하는 세포이므로 glucocorticoid가 골모세포의 교원질 합성에 어떤 영향을 미치는 가에 대해 평가하는 것은 중요하다.

In vitro에서 fetal rat calvaria의 장기 배양에서

cortisol로 96시간 처리하면 교원질 합성 및 alkaline phosphatase 활성, DNA 양 등을 감소시켰다^{18,35}. Chyun등⁷⁰은 골막 조직에서 이런 소견이 선택적으로 발생한다고 주장했고 골형성에 대한 glucocorticoid의 억제 효과는 골 전구세포가 성숙한 골모세포로 분화 감소되기 때문에 발생한다고 하였다. 이와는 반대로 cortisol로 24시간 이내의 짧은 시간 처리하면 alkaline phosphatase 활성 및 [³H]-thymidine incorporation, total DNA, 교원질 합성 등을 증가시켰다^{18,35}. 또한 dexamethasone은 닭 골막의 기관 배양에서 골형성의 증가를 유도했는데 glucocorticoid가 골모세포로 분화하는 세포 집단의 증식을 자극하지만 덜 분화된 전구세포의 증식을 보다 억제하는 것으로 주장하였다^{58,59}.

White등은 닭 골막 세포 배양에서 10nM의 dexamethasone은 ornithine decarboxylase activity와 ³H-thymidine에 의한 DNA 증식이 유의하게 증가되었다고 보고하였다⁵⁸. 이러한 연구로 약리학적 농도에서의 glucocorticoid가 골 전구세포를 증식시킨다는 것을 알 수 있게 되었고, 골세포 및 골의 기관 배양에서 glucocorticoid 투여 시 골세포의 증식과 분화가 모두 이루어졌다고 보고하였다^{18,29,33,35}. 이러한 결과는 다양한 배양계에서 골 전구세포에 의해 발현되는 세포 분화 정도에 따라 glucocorticoid의 투여가 골 전구세포의 증식과 분화에 있어서 억제 효과 또는 자극 효과를 나타낸다고 하였는데 dexamethasone은 골모세포의 증식을 촉진하므로, 불소에 대한 염기성 인산 분해효소와 osteocalcin의 증가가 세포 자체에서 분비량 증가 라기 보다는 골모세포 수의 증가에 의한 이들의 증가를 반영한다고 할 수 있다. 본 연구에서 1 μ M/ml농도에서 염기성 인산분해효소의 활성도가 최대치를 나타내었고 김과 정⁷¹의 연구에서는 10 μ M/ml농도에서 DNA합성능이 가장 큰 증가를 나타냈다는 점에서 의미가 있다고 사료된다.

Glucocorticoid는 10nM/ml dexamethasone과 50nM/ml hydrocortisone에서 최대 반응을 가지는 생리적 범위 내에서의 농도에서 형성된 bone nodule의 수를 자극하고 증가시킨다²². Bellow등⁶⁴은 dexamethasone의 존재에서 형성된 부가적 nodule은 보다 성숙한 골모세포의 증식 능력의 증가로부터 온다고 주장하였다.

Canalis³⁵는 cortisol, corticosterone과 dexamethasone은 1형 교원질의 합성과 관련이 있다고 하였는데 24시간 후 cortisol(1-100nM/ml)의 생리적 농도

는 비처리 두개관의 24시간 배양과 비교하였을 때 1형 교원질의 합성에 대한 자극 효과를 보였다. 그러나, 3시간 동안 배양된 대조군과 비슷한 효과를 보였고 비처리 두개관에서는 cortisol이 교원질 합성의 감소를 억제시켜 교원질 합성에서 억제 효과는 용량 및 시간 의존적이었다고 보고하였으며 자극 효과는 일시적이고 저농도에서만 관찰되었다. 즉 12-24시간 후에는 alkaline phosphatase 활성에서 용량 의존적은 아닌 일시적 증가를 일으킨 반면 48-96시간 후에는 용량 의존적 억제 효과를 보였다. glucocorticoid 투여 후 DNA 양이나 세포 복제에는 영향을 주지 않았는데 cortisol이 24시간 후 DNA labeling을 억제시키기 때문에 두개관의 배양에서 세포 분열이 늦어질 수도 있기 때문으로 여겨졌다⁶⁷.

본 실험의 경우도 dexamethasone을 단독 투여하여 배양 1일째에는 대조군에 비해 1 μ M/ml 농도에서만 유의한 증가를 보였으나 배양 2일째에는 100nM/ml, 10nM/ml농도에서는 유의하게 감소하였으며, 배양 3일째에는 1 μ M/ml와 100nM/ml 농도에서 유의한 세포 활성 감소를 보였고, dexamethasone에 대한 염기성 인산분해효소의 활성도는 dexamethasone이 1 μ M/ml일 때가 가장 높았으며 대조군에 비해 배양 2일째에는 0.7배, 배양 3일째에 3.5배 정도로 농도 및 배양 기간 의존적으로 유의한 증가를 보여, Canalis등³⁵의 연구와 일치하였다.

PTH는 hyaluronic acid 합성과 lysosomal enzyme의 방출을 증가시키며, 교원질 형성, alkaline phosphatase 활성, citrate decarboxylation을 억제한다^{15,16,72-75}. PTH 유도 골흡수와 동반된 이러한 대사 과정은 약리적 양에 해당하는 1,25-(OH)₂D₃에 노출된 파골세포나 골모세포 내에서 골을 재생산하지만 1,25-(OH)₂D₃의 생리학적 양은 이러한 조골 및 파골 세포들에게 영향을 끼치지 않는다⁷⁶. 소량의 glucocorticoid는 골모세포 활성을 감소시키는 것이 아니라 기초 골모세포 활성을 감소시키는데 glucocorticoid에 의한 PTH의 주된 반응성 증가는 골모세포에서 관찰되었다⁷⁷.

1,25-(OH)₂D₃의 glucocorticoid 증폭 효과에 대한 연구로서 1,25-(OH)₂D₃는 높은 친화성을 지닌 cytosolic receptor와 결합함으로써 target cell과 작용하고 이러한 receptor는 fetal rat calvaria에서 동정되었고⁷⁸ 최근에는 glucocorticoid가 골조직의 1,25-(OH)₂D₃ receptor의 turn-over rate를 지연시킨다는 보고도 있었다⁷⁹.

glucocorticoid에 의해 1,25-(OH)₂D₃가 골모세포에 미치는 영향이 증가되는 현상은 생리학적 측면뿐만 아니라 분자학적 측면에서도 흥미 있는 것으로 이러한 결과는 in vivo에서 소량 증가한 1,25-(OH)₂D₃에 대한 glucocorticoid의 역할은 PTH에 대한 glucocorticoid의 역할과 동일하다고 Wong 등³¹⁾은 보고하였다. 따라서 glucocorticoid는 적어도 두 가지 종류의 골흡수 hormone에 반응하여 증폭을 일으키는 세포 반응의 복잡한 기구를 조절하는데, 하나는 세포 표면 수용기를 통한 adenylate cyclase를 활성화시키는 것이며, 나머지 하나는 세포내 세포질 수용체(intracellular receptor)에 부착하는 것이다. 호르몬 감수성은 세포 특이성에 대한 지표로서 사용되며, glucocorticoid는 골세포의 분화된 표현형의 발현을 증가시킨다고 할 수 있으며 in vivo에서 glucocorticoid는 골세포의 분화와 유지를 조절할 것이다.

본 연구에서 dexamethasone(1 μM/ml)과 vitamin D₃를 복합 투여하여 배양한 3일째에서 100nM/ml, 10nM/ml의 vitamin D₃에서는 dexamethasone 단독 투여에 비해 유의한 증가를 보였으며 100nM/ml의 dexamethasone에 vitamin D₃를 복합 투여한 경우, 배양 2, 3일째에 vitamin D₃농도가 증가함에 따라 dexamethasone 단독 투여군에 비해 세포 활성도가 유의하게 증가하였다. 10nM/ml 농도의 dexamethasone에 vitamin D₃를 복합 투여한 경우, 배양 2일째에는 vitamin D₃ 농도에 관계없이 세포 활성이 유의하게 감소하였다. 배양 3일째에는 vitamin D₃가 저농도일수록 세포 활성이 높았다. 100nM/ml의 dexamethasone과 vitamin D₃ 복합 투여 시 염기성 인산분해효소의 활성은 배양 2일째에 10nM/ml 및 100nM/ml의 vitamin D₃ 복합 투여의 경우 dexamethasone 100nM/ml 단독군에 비해 3배 이상 유의한 증가를 보였다.

본 실험에서 이들 vitamin D₃와 dexamethasone을 동시에 가할 경우 vitamin D₃ 혹은 dexamethasone을 단독으로 가한 경우보다 골모세포의 활성이 증가되며 교정력을 가했을 때 치주인대 부위에서의 치유 과정에 이들을 단독으로 사용할 때보다 더욱 유용할 것으로 여겨졌다. 이와 같은 dexamethasone의 단독 사용 및 복합 사용 시의 상반된 작용 때문에 vitamin D₃와 복합 사용 시 혹은 dexamethasone이나 vitamin D₃를 여러 농도에서 사용하였을 경우의 증식 효과를 결정하는 것이 필요하며, 이들 경우에서 치은 및 치주인대 섬유모세포에 미치는 영향에 관한 보다 자세한

평가가 요구되며 적절한 농도의 dexamethasone과 vitamin D₃의 복합 사용은 치주인대 세포를 매개로 골조직의 개조 과정인 교정치료시 치아의 이동을 촉진시킬 수 있는 보조적 수단이 될 것으로 사료된다.

V. 결 론

Vitamin D₃와 dexamethasone이 골모세포주에 미치는 영향을 규명하기 위하여 1, 10, 100nM/ml 농도의 vitamin D₃와 1 μM/ml, 100, 10nM/ml 농도의 dexamethasone을 단독 혹은 복합 투여하여 MTT assay를 통한 세포 활성도 평가와 염기성 인산분해효소의 활성을 평가하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. Dexamethasone을 단독 투여한 경우 배양 1일째에 1 μM/ml 농도에서만 대조군에 비해 유의한 세포 활성 증가를 보였으며 이후에는 전반적으로 유의한 감소를 보였다. 반면에 염기성 인산분해효소의 활성도는 1 μM/ml의 dexamethasone일 때 가장 높았으며 배양 기간이 길어질수록 유의한 증가를 보였다
2. Vitamin D₃ 첨가시 배양 1일째에는 세포 활성이 증가하였으나 배양 2일째에는 100nM/ml에서 대조군과 비교해 크게 감소하여 농도의 증가에 따라 세포 활성이 크게 감소하는 경향을 보였으며 배양 3일째에는 다소 활성이 회복되었다. 염기성 인산분해효소의 활성도는 10nM/ml과 100nM/ml의 vitamin D₃에서 배양 2일째와 3일째에 대조군에 비해 유의하게 높았는데 100nM/ml에서 배양 3일째에 가장 높았다
3. Dexamethasone과 vitamin D₃를 복합 투여한 경우 배양 2일째에는 모든 vitamin D₃ 농도에서 세포 활성이 감소하였으나 3일째에는 세포 활성이 회복되어 대조군이나 dexamethasone 단독 투여 시에 비해 유의한 활성 증가를 보이는 경우가 있었다. 염기성 인산분해효소의 활성은 배양 1일째에 감소를 보였으나 배양 2일째에 10nM/ml나 100nM/ml의 dexamethasone에 100nM/ml의 vitamin D₃ 복합 투여의 경우 유의한 증가를 보였고 배양 3일째에 다시 감소를 보였다.

적절한 농도의 dexamethasone과 vitamin D₃의 복합 사용으로 골모세포의 활성 및 염기성 인산분해효소를 증가시키거나 조절하는 상승 효과를 얻을 수 있

음을 알 수 있으며 이러한 인식은 임상적으로 신속한 치아이동을 위한 하나의 보조 수단으로 응용될 수 있을 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Reitan K. Tissue rearrangement during retention of orthodontically rotated teeth. *Angle Orthod* 1959 : 29 : 105-113.
2. Martin TJ, Ning KW, Suda T. Bone cell physiology. *Endocrinol Met Clin N Am* 1989 : 18 : 833-858.
3. Nijweide PJ, Burger EH, Feyen JHM. Cell of bones: Proliferation, Differentiation, and Hormonal Regulation. *Physiol Rev* 1986 : 66 : 855-886.
4. Canalis E, McCarthy TL, Centrella M. The role of growth factors in skeletal remodeling. *Endocrinol Metabol Clin N Am* 1989 : 18 : 903.
5. Raisz RZ. Hormonal regulation of bone growth and remodelling. *Ciba Foundation Symposium*, 1988 : 136 : 226-238.
6. Bikle DD, Morrissey RL, Zolock DT, Rasmussen H. The intestinal response to vitamin D. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1981 : 89 : 63.
7. Chen TL, Cone CM, Feldman D. Effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and glucocorticoids on the growth of rat and mouse osteoblast-like cells. *Calcif Tissue Int* 1983 : 35 : 806-811.
8. Eugene P. Lazzari. *Dental biochemistry*. Lea and Febiger. 1976 : USA 2nd : 102-103.
9. Raisz RZ. Recent advances in bone cell biology : Interactions of vitamin D with other local and systemic factors. *Bone Mineral* 1990 : 9 : 191-197.
10. Collins MK, Sinclair PM. The local use of vitamin D to increase the rate of orthodontic tooth movement. *Am J Orthod Dentofac Orthop* 1988 : 94 : 278-284.
11. Beresford JN, Gallagher JA, Russell RG. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ and human bone derived cells in vitro : Effects on alkaline phosphatase, type I collagen and proliferation. *Endocrinology* 1986 : 199 : 1776-1785.
12. Endo H, Kitoki M, Kawashima K, Naruchi T, Hashimoto Y. vitamin D₃ metabolites and PTH synergistically stimulate bone formation of chick embryonic femur in vitro. *Nature* 1980 : 286 : 262-264.
13. Jowsey J, BZ Riggs. Bone formation in hypercorticism. *Acta Endocrinol* 1970 : 63 : 21-28.
14. Jee WSS, Park HY, Roberto WE, Kenner GH. Corticosteroid and bone. *Am J Anat* 1970 : 129 : 477-479.
15. Stern P. Inhibition by steroid of parathyroid hormon-induced ⁴⁵Ca release from embryonic rat bone in vitro. *J. Phamarcol.Exp. Ther* 1996 : 168 : 211-217.
16. Raisz LG, Trummel CL, Wener JA, Simmons H. Effect of glucocorticoid on bone resorption. *Endocrinology* 1972 : 90 : 961-967.
17. Dietrich JW, Canalis E, Malina DM, Raisz LG. Effects of glucocorticoids on fetal rat bone collagen synthesis in vitro. *Endocrinology* 1979 : 104 : 715-721.
18. Hahn TJ, Westbrook SL, Halstead LR. Cortisol modulation of osteoblast metabolic activity in cultured neonatal rat bone. *Endocrinology* 1984 : 114 : 1864-1870.
19. Rath NC, Red AH. Influence of adrenalectomy and dexamethasone on matrix-induced endochondral bone differentiation *Endocrinology* 1979 : 104 : 1698-1704.
20. Tenenbaum HC, Heersche JNM. Differentiation of osteoblasts and formation of mineralized bone in vitro. *Calcif.Tissue Int* 1982 : 34 : 76-79.
21. Bellows CG, Aubin JE, Heerschw JNM, Antosz ME. Mineralized bone nodules formed in vitro from enzymatically released rat calvaria cell populations. *Calcif. Tissue Int* 1986 : 38 : 143-154.
22. Maniatopoulos C, Sodek J, Melcher AH. Bone formation in vitro by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats. *Cell Tissue Res* 1988 : 254 : 317-330.
23. Lee K, Aubin JE, Heersche JNM. β -glycerophosphate-induced mineralization of osteoid does not alter expression of extracellular matrix components in fetal rat calvarial cell culture. *J Bone Miner Res* 1992 : 7 : 1211-1219.
24. Arceo N, Sauk JJ, Moehring J, Foster RA., Somerman MJ. Human periodontal cells initiate mineral-like nodules in vitro. *J Periodont* 1991 : 62 : 499-503.
25. Kasugai S, Shibata S, Suzuki S, Susami T, Ogura H. Characterization of a system of mineralized-tissue formation by rat dental pulp cells in culture. *Arch Oral Biol* 1993 : 38 : 769-777.
26. Centrella M, MacCathy TL, Canalis E. glucocorticoid regulation of transforming growth factor β 1 activity and binding in osteoblast-enriched cultures from fetal rat bone. *Mol Cell Biol* 1990 : 11 : 4499-4496.
27. MacCathy TL, Centrella M, Canalis E. Cortisol inhibits the synthesis of insulin-like growth factor-I

- in skeletal cells. *Endocrinol* 1990 : 126 : 1569-1575.
28. Bennet A, chen T, Feldman D, Hintz RL, Rosenfeld RG. Characterization of insulin-like growth factor I receptors on cultured rat bone cells: Regulation of receptor concentration by glucocorticoids. *Endocrinol* 1984 : 115 : 1577-1583.
 29. Chen TL, Feldman D. Glucocorticoid potentiation of adenosin 3', 5'-monophosphate response to parathyroid hormone of bone in vitro. *Endocrinol* 1978 : 102 : 589-596.
 30. Ning B, Hekkelman JW, Heerche JNM. The effect of cortisol on the adenosin 3', 5'-monophosphate response to parathyroid hormone of bone in vitro. *Endocrinol* 1979 : 104 : 1130-1135.
 31. Wong GL, Lukert B.P, Adams JS. Glucocorticoid increase osteoblast-like bone cell response to 1,25-(OH)₂D₃. *Nature* 1980 : 285: 254-257.
 32. Chen TL, Cone CM, Morly-Holton E, Feldman D. 1,25-Dihydroxy-vitamin D₃ receptors in cultured rat osteoblast-like cells: glucocorticoid treatment increases receptor content. *J Biol Chem* 1983 : 258 : 4350-4355.
 33. Manolagas Sc, Abare J, Deftos LJ. Glucocorticoids increase the 1,25(OH)₂D₃ Receptor concentration in rat osteogenic sarcoma cells. *Calcif Tissue Int* 1984 : 36 : 153-157.
 34. Godschalk M, Levy JR, Downs RW. Glucocorticoid decrease vitamin D receptor number and gene expression in human osteosarcoma cells. *J Bone Mineral Res* 1992 : 7 : 21-27.
 35. Canalis C. Effect of glucocorticoids on type I collagen synthesis, alkaline phosphatase activity, and deoxyribonucleic acid content in cultured rat calvariae. *Endocrinol* 1983 : 112 : 931-939.
 36. Yoon K, Buenaga R, Rodan GA. Tissue specificity and developmental expression of rat osteopontin. *Biochem Biophys Res Commun* 1987 : 148 : 1129-1136.
 37. Majeska RJ, Nair BC, Rodan GA. Glucocorticoid regulation of alkaline phosphatase in the osteoblastic osteosarcoma cell line ROS17/2.8. *Endocrinol* 1985 : 116 : 170-179.
 38. Kodama H, Amagai, Y, Sudo H, Kasai S, Yamamoto S. Establishment of clonal osteogenic cell line from newborn mouse calvaria. *Jap J Oral Biol* 1981 : 23 : 899 - 981.
 39. Wong GL. A comparison of the PTH-dependent cAMP responses in osteoclastic and osteoblastic bone cell. *Mineral Electrolyte Metab.* 1984 : 10 : 77-83.
 40. Kahn AJ, Fallen MD, Titelbaum SL. Structure-function relationship in bone: An example of events at the cellular level. In *Bone and Mineral Research*. Vol.2, edited by Peck WA. pp.125-174, Elsevier, Amsterdam, 1984.
 41. Smith DM, Johnston CC, Severson AR. Studies of the metabolism of separated bone cells. *Calcif. Tissue Res.* 1973 : 11 : 56-69.
 42. Wong GL, Cohn DV. Separation of parathyroid hormone and calcitonin sensitive cells from non-responsive bone cell. *Nature* 1974 : 252 : 713-715.
 43. Puzas E, Vignery A, Rasmussen H. Isolation of specific bone cell types by freeflow electrophoresis. *Calcif. Tissue Int.* 1979 : 27 : 263-268.
 44. Wong GL, Cohn DV. Separation of parathyroid hormone and calcitonin sensitive cells from non-responsive bone cell. *Nature* 1974 : 252 : 713-715.
 45. Rodan GA, Martin TJ. Role of osteoblasts in hormonal control of bone resorption. A hypothesis. *Calcif. Tissue. Int.* 1981 : 33 : 349.
 46. Vaes G. Cellular biology and biochemical mechanism of bone resorption. *Clin Ortho Relat Res.* 1988 : 231 : 239.
 47. Chambers TJ, Fuller K. Bone cells predispose bone surfaces to resorption by exposure of mineral to osteoclastic contact. *J Cell Sci.* 1985 : 76 : 155.
 48. Roland B. Anatomy and ultrastructure bone. Primer on the metabolic bone disease and disorders of mineral metabolism 1st ed.
 49. Nakatani Y, Tsunoi M, Hakada Y, Kurihara N, Fujita K, Kumegawa M. Effect of parathyroid hormone on cAMP production and alkaline phosphatase activity in osteoblastic clone MC3T3-E1 cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1984 : 123 : 894-898.
 50. Kumegawa M, Ikeda M, Tanaka E, Haneji S, Yora T, Sakagishi T, Minami Y, Hiramatsu M. The effects of prostaglandin E₂, parathyroid hormone, 1,25 dihydroxycholecalciferol, and cyclic nucleotide analogs on alkaline phosphatase activity in osteoblastic cell, *Calcif. Tissue. Int.* 1984 : 36 : 72-76.
 51. Christiansen C. Prevention and Treatment of Osteoporosis : A review of Current, Modalities, Bone, 1992 : 13 : S35-S39.
 52. Curran G L, Azarnoff DL, Bolinger R.E. Effect of cholesterol synthesis inhibition in normocholesteremic young men. *J Clin Invest.*, 1959 : 38 : 1251-1261.
 53. Erben RG, Weister J, Sinowatz F, Rambeck WA, Zucker H. vitamin D metabolites prevent vertebral osteopenia in ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int*

- 1992 : 50 : 228-236.
54. Nakamura T, Nagai Y, Yamato H, Suzuki K, Orimo H. Regulation of bone turnover of prevention of bone atrophy in ovariectomized beagle dogs by the administration of 24,25 (OH)₂D₃. *Calcif Tissue Int* 1992 : 50 : 221-227.
 55. Norman AW. Actinomycin D and the response to vitamin DA. *Science* 1965 : 149-184.
 56. Norman AW. vitamin D: the calcium homeostatic hormone. New York; Academic Press 1979 : 199-245.
 57. Reynolds JJ, Hollick MF, Deluca HF. The role of vitamin D metabolites in bone resorption. *Calcif Tissue Res* 1973 : 12 : 295-301.
 58. White J, Lielain M, Helenus A. Membrane fusion proteins of enveloped animal virus. *Q Rev Biophys* 1983 : 151-195.
 59. Tenenbaum HC, Heersche JNM. Dexametason stimulates osteogenesis in chick periostium in vitro. *Endocrinol* 1985 : 117 : 2211-2217.
 60. Tenenbaum HC, McCulloch CAG, Palangio K. Simultaneous autoradiographic and histochemical analysis of bone formed in vitro. *J Histochem Cytochem* 1986 : 34 : 769-773.
 61. McCulloch Cag, Tenenbaum HC. Dexamethason induces proliferation and terminal differentiation of osteogenic cells in tissue culture. *Anat Rec* 1986 : 215 : 397-402.
 62. Briek C, Huang HZ, Briek P, Tenenbaum HC. C-fos oncogen expression in dexamethason stimulated osteogenic cells in chick embryo peristeal cultures. *Bone Mineral* 1991 : 15 : 193-208.
 63. Bellows CG, Heersch JMN, Aubin JE. Determination of the capacity for proliferation and differentiation of osteoprogenitor cells in the presence and absence of dexamethasone. *Develop Biol* 1990 : 140 : 132-138.
 64. Bellows CG, Aubin JE, Heersche JNM. Physiological concentration of glucocorticoid stimulate formation of bone nodules from isolated rat calvaria cells in vitro. *Endocrinol* 1987 : 121 : 1985-1994.
 65. Cushing H. The basophil adenomas of the pituitary body and their clinical manifestations. *Bullentin of John Hopkins Hospital* 1982 : 50 : 137-195.
 66. Howland WJ, Pugh DJ, Sparague RG. Roentgenologic changes of skeletal system in Cushing's syndrome. *Rdiol* 1968 : 71 : 69-78.
 67. Millar S, Heerche JNM, Aubin J. Regulation of alkaline phosphatase activity in cloned bone cell population. *J Dent Res* 1982 : 61 : 256.
 68. Majeska RJ, Rodan GA. Humoral regulation of alkaline phosphatase in an osteoblastic osteosarcoma line. *Calcif Tissue Int* 1981 : 33 : 297.
 69. Suzuki Y, Ichikawa, Y, Saito E, Honma M. Importance of patients under glucocorticoid therapy. *Metab* 1983 : 32 : 151-156.
 70. Chyun YS, Kream BE, Raisz LG. Cortisol decreases bone formation by inhibiting periosteal cell proliferation. *Endocrinology* 1984 : 114:477-480.
 71. 김원진, 정규림. Sodium fluoride와 orthovanadate가 조골세포주 MC3T3-E1에 미치는 영향에 관한 연구. *대치교정지* 1991 : 21 : 97-111.
 72. Majeska RJ, Nair BC, Rodan GA. Glucocorticoid regulation of alkaline phosphatase in the osteoblastic osteosarcoma cell line ROS 17/2.8. *Endocrinology* 1985 : 116 : 170.
 73. Jowsey J, Riggs BL. Bone formation in hypercortisolism. *Acta Endocrinol(Copenh)* 1970 : 68 : 21.
 74. Hahn TJ, Halsteal LR, Teitelbaum SL, Hahn BH. Altered mineral metabolism in glucocorticoid-induced osteopenia: effect of 25 hydroxyvitamine D administration. *J Clin Invest* 1979 : 64 : 655.
 75. Hahn TJ. Corticosteroid-induced osteopenia. *Arch Internal Med* 138:882-885, 1978.
 76. Au WY. Cortisol stimulation of parathyroid hormone secretion by rat parathyroid glands in organ culture. *Since 1976* : 193 : 1015.
 77. Peak WA, Brandt J, Miller I. Hydrocortisone-induced inhibition of protein synthesis and uridine incorporation in isolated bone cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1967 : 57 : 1599.
 78. Peak WA, Messinger K, Brandt J, Carpenter J. Impaired accumulation of ribonucleic acid precursors and depletion of ribonucleic acid in glucocorticoid-treated bone cells. *J Biol Chem* 1969 ; 244 : 4174.
 79. Chen TL, Aronow L, Feldman D. Glucocorticoid receptors and inhibition of bone cell growth in primary culture. *Endocrinology* 1977 : 100 : 619.

- ABSTRACT -

The effect of admixture of vitamin D₃ and dexamethasone on the activity of osteoblastic cells

Na-Won Lim, Young Joo Park, Sang-Cheol Kim

Department of Orthodontics, College of Dentistry, Wonkwang University

Bone is a dynamic tissue which is constantly remodelled by subsequent cycles of bone resorption and formation. Glucocorticoid and vitamin D₃ are known as regulating substances in bone metabolism. In vitro experiments using bone tissue, it was suggested that glucocorticoid inhibits bone resorption, whereas the effect of glucocorticoid on bone formation are complex- increasing or decreasing effect. The active form of vitamin D₃, 1,25-dihydroxycholecalciferol[1,25-(OH)₂D₃], has been reported to stimulate osteoblastic activities including the production of ALP, type I collagen, and osteoclastin.

The purpose of this study was to evaluate the effect of admixture of vitamin D₃ and dexamethasone, one of glucocorticoids, on osteoblastic cell line(MC3T3-E1). Alkaline phosphatase(ALP) and MTT assay were conducted in the cultivated cells with 1, 10, 100nM/ml of 1,25-(OH)₂D₃ and/or 10nM/ml, 100nM/ml, 1μM/ml of dexamethasone.

The observed results were as follows.

1. The activity of osteoblastic cells with 1μM/ml of dexamethasone was significantly increased at 1-day cultivation with comparison to control group, but was decreased afterwards. But the activity of ALP was greatest in 1μM/ml of dexamethasone and increased with time lapsed.
2. The activity of osteoblastic cells with vitamin D₃ was significantly increased dose-dependently at 1-day cultivation, but was significantly decreased in 100nM/ml at 2-day cultivation, and was a little increased again at 3-day cultivation. The activity of ALP was increased in 10nM/ml or 100nM/ml at 2-day or 3-day cultivation, and was greatest in 100nM/ml at 3-day cultivation.
3. In case of admixture of dexamethasone and vitamin D₃, the cellular activity was decreased in any concentration of vitamin D₃ at 2-day cultivation, but was increased again at 3-day cultivation, which was greater than that in control or dexamethasone only group. The activity of ALP was decreased at 1-day cultivation, but was increased in the admixture of 10nM/ml or 100nM/ml of dexamethasone with 100nM/ml of vitamin D₃ at 2-day cultivation, and was again decreased at 3-day cultivation.

KOREA. J. ORTHOD. 1998 ; 29 : 383-397

※ **Key words** : Osteoblast, vitamin D₃, dexamethasone