골아세포의 IGF - I 유전자 발현 및 골기질 단백질에 대한 17β - estradiol의 영향

양원석 · 이재목 · 서조영

경북대학교 치과대학 치주과학교실

I. 서론

전신적인 성호르몬중의 하나인 estrogen은 폐경기 여성에게서 골다공증을 유발시키는 등 골조직의 대사에 관한 작용이 알려진[1,2] 이후, 치주과 영역에서도 부분적으로 이용[3]되고 있는 steroid로써 그 구조는 방향성 환인 페놀성 A환을 포함한 4개의 환으로 이루어지고 14개의 탄소로 구성되어 있다.[4] A환은 estrogen 수용체에 대해 선택적이며 친화력이 큰 결합력을 가지는데, A환에 alkyl기가 치환됨으로써 estrogen 수용체의 결합능이 상실됨이 밝혀져 있다.[4] 사람에서는 estrone, estradiol 및 estriol 등 3가지의 estrogen이 만들어지며 이 중 estradiol이 대표적 난소 호르몬으로써 생물학적 작용이 estrone보다 12배, estriol보다 80배나 강한데, 이 estradiol 중에서는 17β - estradiol이 가장 활성도가 높은 형태임이 알려져 있다.[5] Estrogen은 생체에서 여성의 2차 성징 발현 등 성호르몬의 기능이외에도 다양한 조절작용을 수행하는데 골아세포[6,7,8]와 파골세포[9]에서도 estrogen 수용체가 발견되는 등 골조직에도 영향을 미침이 밝혀져 있다. 또 estrogen은 생체 실험에서 고농도로 투여된 경우 망상골 형성을 증가시키고[10,11], 결핍시에는 비정상적인 발치와의 치유과정이 관찰되며[12,13], 더 많은 치조골 소실이 나타나는 등[14] 치조골에도 영향을 미침이 확인되고 있다.

Estrogen이 골세포에 미치는 영향에 대한 실험에서는, estrogen 투여에 의해 DNA 합성 및 세포의 증식[15,16], 교원질 합성, alkaline phos - phatase의 활성도[17] 등이 증가됨이 보고되었고, 세포의 증식과 함께 분화도 촉진시킨다는 보고[18]도 있었으나, estrogen의 첨가가 세포의 증식을 감소시킨다는 문헌[19]과 증식과 분화에 미치는 효과가 없음을 보고한 문헌[20,21]도 있어 서로 다른 견해를 보이고 있다.

Estrogen이 골세포에 미치는 작용을 설명하기 위해 많은 가설들이 대두되던 중 쥐의 두개골에서 유래된 골아세포유사세포에 Insulin - like growth factor - I(IGF - I) 길항제를 투여하면 estrogen 투여시에 나타나는 교원질 유전자 발현의 증가가 나타나지 않음이 발견[22]되었고, 골아세포에 17β - estradiol을 투여하면 IGF - I, IGF - II, Transforming growth fac - tor - β(TGF - β) 유전자의 발현이 증가됨이 보고[23]되었다. 이러한 결과에 대해 McCarthy 등[24]은 골아세포에 투여된 estrogen이 세포의 수용체와 복합체를 형성하여 target gene에 영향을 미침에 있어, IGF - I이나 TGF - β와 같은 성

장인자의 국소적인 합성에 의해 호르몬의 작용이 중재될 것이라 설명하였다. 이에 따라 estrogen과 estrogen 작용의 중개물질로 추측되는 IGF - I과의 상호작용에 대한 연구가 진행되었는데, estrogen이 골아세포의 배양액내 IGF - I의 농도를 증가시킨다는 보고[25]와 IGF - I mRNA의 발현이 증가된다는 보고[26]가 있는 반면, IGF - I 유전자나 골단백질의 증가를 가져오지 못했다는 보고[27]와 17β - estradiol이 IGF - I 유전자의 활성화를 억제한다고 하는 보고[28]가 있어 아직 이에 명확한 결론은 없는 상태이다.

IGF - I은 인슐린과 구조적, 기능적으로 관련이 있는[29] 단일쇄 단백질로 IGF - I과 IGF - II 두종류가 있으며 설치류의 골아세포에서는 주로 IGF - I이 나타나고 사람의 골아세포에서는 IGF - II가 우세하게 나타나 IGF 유전자의 발현은 골아세포 양상에 따라 양적, 질적으로 다양하게 나타남을 알 수 있다.[30]IGF - I이 골세포에 미치는 영향에 관한 시험관적 실험에서는 DNA합성능과 단백질 합성을 증가시키는 것으로 보고[31,32]되었다. 또한 Canalis 등[33,34]은 IGF - I이 설치류의 골아세포에서 type I collagen 발현을 증가시키고 collagen degradation을 감소시킴을 보고하였고 Fournier 등[35]은 IGF - I의 주된 기능이 골아세포의 증식을 촉진한다고 하였다. 그러나 이에 반해 IGF - I이 collagen 합성은 증가시키나 골세포의 증식은 오히려 억제시킨다는 보고[36]와 IGF - I이 세포의 성장을 자극할 뿐만 아니라 분화도 증진시킨다는 보고[37]도 있어 세포의 특성과 종류에 따라 조금씩 다른 결과가 나타남을 보이고 있다.

최근 IGF - I은 쥐의 간조직에서 alternative RNA splicing에 의해 696bp의 IGF - IA와 651bp의 IGF - IB로 존재함이 밝혀졌다.[38] 이들은 IGF - I의 COOH - terminal peptide의 크기와 배열에서 차이를 나타내는데, 쥐와 사람에게서 preproIGF - IA는 94%의 높은 동일성을 보이지만 preproIGF - IB는 COOH - terminal peptide에서 상당한 차이를 나타내었다. Nagaoka 등[39]은 사람의 hepatoma cell, macrophage - like cell, 섬유아세포 등에서 IGF - IA의 양이 IGF - IB의 양보다 10배 이상 많음을 발견하기도 하였다. IGF - IA와 IGF - IB의 발현에 대한 연구에서는 당뇨를 가진 쥐의 간, 신장 등의 조직에서 IGF - IA와 IGF - IB의 mRNA가 크게 감소되는 것이 관찰되었고[40], 또 굶긴 쥐의 간조직에서IGF - IA는 별로 변화가 없는 것에 비해 IGF - IB는 유의하게 감소하여 외부의 조건에 IGF - IA가 민감하게 반응한다고 하였다.[41] 그러나 최근까지도 골조직이나 골세포에서 이들 IGF - IA와 IGF - IB의 발현양상에 대해서는 보고되지 않고 있다.

이에 본인은 골전구세포인 MC3T3 - E1 세포에 17β estradiol을 사용하여 estrogen 작용의 중개물질로 여겨지는 IGF - I의 alternative splicing 형태인 IGF - IA와 IGF - IB 유전자의 발현 양상을 살펴보고, estrogen과 IGF - I이 단독 혹은 혼합 투여된 경우 골아세포의 DNA 합성능 및 type - I collagen과 osteopontin 유전자의 발현에 미치는 영향을 관찰하여 이들이 골조직에 미치는 상호작용을 이해하고자 본 실험을 시행하였다.

Ⅱ. 실험재료 및 방법

1. 실험재료

배양액은 alpha - minimum essential medium(α - MEM, Gibco사, 미국)을 사용하였고, fetal bovine serum(FBS, Gibco사, 미국)을 성장 촉진제로 추가하였으며, 그 외 17β - estradiol, 유전자재조합형 IGF - I(Genzyme사, 미국), IGF - I primer(바이오니아, 한국), human β - actin amplimer(Clontech Lab.사, 미국), [methyl - 3H] thymidine(New England Nuclear사, 미국) 등을 사용하였다.

2. 세포의 배양

MC3T3-E1세포를 취득하여 100mm 배양접시(Corning사, 미국)에 10% FBS, 100U/ml penicillin(근화제약, 한국), 100μg/ml streptomycin(동아제약, 한국)을 함유한 α-MEM 배양액에서 초기배양하여 37℃, 5% CO_2 공기 혼합배양기(Vision사, 한국)에서 유지하였다. 세포가 증식되어 단층밀생이 형성되면 0.05% trypsin/0.02% EDTA를 이용하여 세포를 분리시킨 후 계대배양하고, 사흘에 한번 배양액을 교체해주었다.

3. Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction(RT-PCR)

1) 세포의 배양

세포의 수가 5×10^5 cell/ml가 되도록 100mm culture plate에 접종하고 10% FBS를 함유한 α-MEM에서 2일간 배양한 후, 세포 배양액을 제거하고 5% FBS를 함유한 α-MEM으로 배양액을 교체하고 다시 1일간 배양하였다. 그후 10^{-8}M 17β-estradiol을 첨가한 군을 실험군으로 하고, 이를 첨가하지 않은 군을 대조군으로 하여 0, 6, 24, 48, 72시간에 3의 방법에 따라 총 RNA를 추출하였다.

2) 총 RNA의 추출

RNA를 Chomczynski와 Sacchi의 방법에 따라 다음과 같이 분리하였다. 100 mm dish의 세포층을 찬 PBS로 씻은 후 변성용액(GIT: guanidinium thiocyanate)을 각 dish당 600μℓ씩 넣어 세포를 완전히 녹인 다음, GIT 용액을 2ml의 미량원침관에 옮기고 1/10 용량의 2M sodium acetate(pH 4.0)를 첨가한 후 동량의 phenol액을 넣었다. GIT용액의 1/5 용량의 chloroform/isoamylalcohol(49:1)을 넣고 10초간 강하게 교반하여 15분 동안 얼음에 방치한 후, 미세원심분리기로 12000 rpm에서 20분간 원침하여 상층액을 다른 미량원침관에 옮기고 같은 양의 찬 isopropanol로 섞어 -20℃에서 1시간 이상 방치하였다. 그 후 다시 10분 동안 원침하여 침전물을 70% 찬 알콜로 씻고, 상온에서 15분 정도 방치하여 말린 후 물을 각각 50μℓ씩 넣어 녹였다. RNA양은 U.V 분광광도계로 260/280 nm에서 흡광도를 잰 후 양과 순도를 계산하였다.

3) Oligonucleotide primers

IGF-I primer는 IGF-IA와 IGF-IB가 모두 나타나도록 upstream과 down stream을(5'-GAC-TGG-AGA-TGT-ACT-GTG-CC-3', 5'-GCA-GGT-TGC-TCA-AGC-AA-3')으로 디자인하여 바이오니아(주, 한국)에 주문 제작하여 사용하였고, internal control marker로 사용된 β actin은(5'-ATG-GAT-GAT-GAT-ATC-GCC-GCG-3', 5'-CTA-GAA-GCA-TTT-GCG-GTG-GAC-GAT-GGA-GGG-GCC-3')의 배열을 가지는 Clontech Lab.사(미국) 제품을 구입 사용하였다.

4) 역전사(cDNA synthesis)

소독된 0.5-ml tube에 RNA/primer mixture를 준비하고 각 smaple을 70℃에 10분관 보관한 후 얼음에 최소 1분간 두었다. 10× PCR buffer, 25mM $MgCl_2$, 10mM dNTP mix, 0.1M DTT를 함유한 reaction mixture 7μℓ를 각 RNA/primer mixture에 넣고 잘 혼합시킨 후 짧은 시간동안 원심분리시키고 42℃에 5분간 보관하였다. 그후 1μℓ SuperScript II RT를 각 tube에 넣어 혼합시킨 후 42℃에 50분간 보관하고 70℃에 15분간 두어 반응을 종료시키고 얼음에 식혔다. 짧은 시간 원심분리기에 넣어 내용물을 모으고 1 μl의 RNase H를 각 tube에 넣은 다음 37℃에 20분간 보관하였다.

5) PCR amplication

Upstream과 downstream primer 각각 1㎕씩과 10×PCR buffer 5㎕, 25mM $MgCl_2$ 3㎕,10mM dNTP mix 1㎕, Taq DNA polymerase (Takara Shuzo사, 일본) 0.5㎕, cDNA 2㎕, 소독된 물 36.5㎕를 넣어 총 부피가 50㎕되게 한 후denaturation(94℃, 1분), annealing(55℃, 1분), extension(72℃, 1분) 과정을 30회 수행하도록 PTC-100TM(MJ inc.사, 한국)에 프로그램하여 시행하였다. PCR 생성물 10㎕를 1.5㎕의 loading buffer와 섞은 후 1% agarose gel에 100V로 40분간 전기영동하여 비교하였다.

5. Northern blot

1) 세포의 배양 및 총 RNA의 추출

세포의 수가 5×10^5 cell/ml가 되도록 100mm culture plate에 접종하고 10% FBS를 함유한 α-MEM에서 2일간 배양한 후, 세포 배양액을 제거하고 5% FBS를 함유한 α-MEM으로 배양액을 교체하고 다시 1일간 배양하였다. 그후 10^{-8}M 17β-estradiol을 투여한 군과 10^{-8}M estradiol과 10ng/ml IGF-I을 동시 투여한 군, 10ng/ml IGF-I을 투여한 군을 각각 실험군으로 하고 이들을 투여하지 않은 군을 대조군으로 하여 배양한 뒤 1일, 2일, 3일째에 Chomczynski와 Sacchi의 방법에 따라 상기에 기술한 방법과 같이 총 RNA를 추출하였다.

2) RNA 전기영동

10㎍ RNA, 1㎕ 10×running 완충액 [0.2 M sodium morpholinopropane sulfonate(MOPS, pH7.0), 80mM sodium acetate, 10mM EDTA(pH 8.0)], 3.5㎕ formaldehyde, 10㎕ formamide 그리고 재증류수로 총 20㎕가 되도록 하여 섞은 뒤 65℃에서 5분간 방치하였다. 얼음에서 식히고 2㎕의 gel loading 완충액 [50% glycerol, 1mM EDTA(pH 8.0), 0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol FF]을 넣어 formaldehyde agarose gel 전기영동을 Sambrook 등의 방법에 따라 시행하였다.

3) Northern blot

전기영동이 끝난후 전기영동조에서 gel을 꺼내어 재증류수에 몇 번 세척하여 formaldehyde를 제거하고, UV transilluminator에서 관찰하고 사진을 찍은 다음 다시 재증류수로 gel을 씻고 20x SSC에 담근 후 agarose gel 위에 nylon membrane을 덮어 피펫으로 기포를 제거하였다. 랩으로 gel 주위를 싸고 gel 크기와 동일한 3MM paper를 2x SSC에 적셔 덮고 3MM 종이보다 조금 작게 흡수지를 만들어 올려 놓았다.이렇게 층을 만든 후 맨 위에 유리판을 얹고 500g의 무게로 누른 상태로 12시간동안 방치하였다. 다음날 흡수지와 3MM 종이를 제거하고 연필로 gel slot를 표시하였다. Nylon membrane를 6x SSC에 5분 담그고 상온에서 30분간 말린후 12,000 J의 UV cross-link를 사용하여 RNA를 membrane에 부착시켰다.

4) cDNA labeling 및 분리

cDNA는 Feinberg 및 Vogelstein의 방법을 이용한 random primed DNA labeling kit를 사용하여 다음과 같이 label 하였다. 500㎕ 용량의 미량원침관에 변성시킨 25ng의 cDNA, 반응 혼합액 2㎕, 3㎕의 [α-^{32}P] dCTP 그리고 Klenow효소(2 units/㎕) 1㎕를 넣고 최종 용량이 20㎕ 되도록 재증류수로 채운 다음 37℃에서 30분간 반응시킨 후 0.5M EDTA(pH 8.0) 1㎕를 넣어 반응을 중지시켰다. 이 반응액을 Sephadex G-50이 채워져 있는 Nick-column을 이용하여 gel filtration chromatography를 시행하여 label된 cDNA와 유리 [α-^{32}P] dCTP를 분리하였다. Nick-column을 통과시킨 액 중에서 1㎕씩 취해 β counter로 측정한 후 labeling 정도와 specific activity를 계산하였다.

5) Hybridization과 자가방사법

Nylon membrane을 48℃의 prehybridization 용액 [50% formamide, 5x SSPE, 5x Denhardt`용액 (0.02% polyvinyl pyrrolidone (MW,4000), 0.02% BSA, 0.02% Ficoll 400), 1.5% SDS, 100μg/ml heat denatured salmon sperm DNA]을 10ml 넣고 2시간 이상 48℃에서 prehybridization을 시행하였다. prehybridization이 끝난 후 여기에 제조된 probe (1x10^{7}cpm)를 100℃에서 5분간 변성시킨 후 넣고 hybridization 용액에 넣어 48℃에서 하룻밤 동안 충분히 반응시켰다. Hybridization이 끝난 후 Nylon membrane을 꺼내어 200ml의 0.1%SDS가 포함된 2x SSC 용액으로 10분씩 3회 세척하였다. 그 후 0.1% SDS가 포함된1x SSC 용액으로 50℃에서 세척하였다. Nylon membrane를 Whatman 3MM 종이 위에서 건조시켜 랩으로 싼 후 intensifying screen이 붙은 X-ray cassette에 넣고, -70℃에서 며칠 둔 후 현상하였다.

6. DNA 합성능 측정

세포의 수가 2.5×10^{4}cell/ml가 되도록 24 well culture plate에 접종하고 10% FBS를 함유한 α-MEM에서 2일간 배양한 후, 세포 배양액을 제거하고 3% FBS를 함유한 α-MEM으로 배양액을 교체하고 다시 24시간 동안 배양하였다. 그후 10^{-8}M 17β-estradiol을 첨가한 군, 10^{-8}M 17β-estradiol과 10ng/ml IGF-I을 동시에 첨가한 군, 10ng/ml IGF-I을 첨가한 군을 각각 실험군으로 하고 이들을 첨가하지 않은 군을 대조군으로 하여 1일째와 3일째 2μCi/ml[^{3}H]-thymidine을 첨가한 후 DNA 합성능을 측정하였다.

[^{3}H]-thymidine이 DNA내로 편재되는 속도의 측정을 위해서 24 well culture plate내의 세포배양액을 제거한 후, 찬 PBS 1ml 씩으로 두 번 씻고, 5% TCA를 1ml 씩 넣은 후, 4℃에서 20분간 방치하였다. 다시 찬 5% TCA 1ml 씩으로 두 번 씻은 뒤 찬 absolute ethanol 1ml 씩으로 두 번 씻어서 실온에서 건조시켰다. 이상의 과정을 통해 세포내로 편재되지 않은 [^{3}H]-thymidine을 제거한 뒤, 500μℓ의 2% Na_2CO_3가 포함된 0.1N NaOH를 넣어 고정된 세포를 완전히 용해시킨 후, 4℃에서 30분간 방치하였다. 다시 이 용액을 counting vial로 옮긴 후, 5ml의 scintillation cocktail 용액을 넣어 혼합한 뒤 β-counter로 방사능활성도를 조사

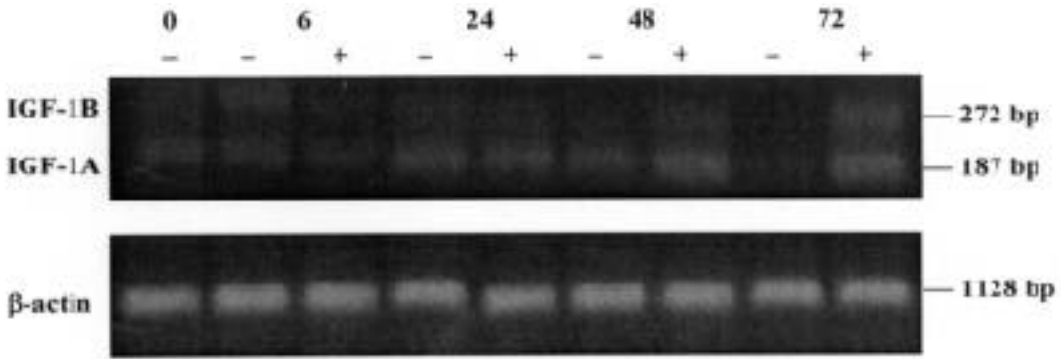

Figure 1. Effect of 17β-estradiol on expression of IGF-I mRNA in MC3T3-E1 cells. Cells were seeded 5×10^{5}cells at 100mm culture plate in alpha-modified Eaglemedium containing 10% fetal bovine serum. After 48 hours incubation period,medium were changed α-MEM containing 5% fetal bovine serum. After 24 hours, 10^{-8}M 17β-estradiol was added and total mRNA was extracted at 0, 6, 24, 48, 72 hours. PR-PCR method was

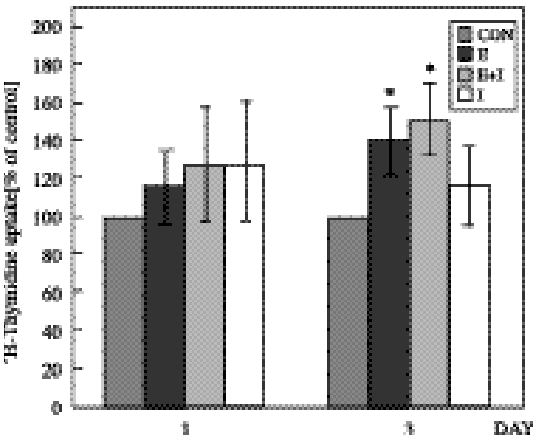

Figure 2. Effect of 17β - estradiol and IGF - I on DNA synthetic activity in MC3T3 - E1cells in the presence of 3% fetal bovine serum. [^{3}H] - thymidine incorporation in to DNA was measured 1 day and 3 days after application of 17β - estradiol and IGF - I, 2 μCi/ml [^{3}H] - thymidine was added for the last 24h of culture of each day.
* Significantly different from control value(P<0.005)

하여 그 값을 CPM(counter per minute)으로 나타내어 student t - test를 사용하여 실험군을 대조군과 통계학적으로 비교하였다.

III. 결과

1.17β - estradiol 투여시 시간경과에 따른 IGF - I 유전자 발현 양상

MC3T3 - E1세포에 10^{-8}M 17β - estradiol을 투여한 군과 대조군에서의 IGF - I mRNA 발현의 정도를 0, 6, 24, 48, 72시간에 RT - PCR의 방법으로 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다(Figure 1).

IGF - I 유전자는 대조군에서는 24시간 동안은 처음 수준을 유지하다가 이후 점차 감소하는 양상을 나타내었고, 실험군에서는 시간이 경과함에 따라 점차 증가하는 경향을 보였다.

대조군과 실험군 모두에서 IGF - IA와 IGF - IB 유전자의 발현이 관찰되었는데, 양 군 모두에서 IGF - IA의 발현 양상이 IGF - IB보다 더욱 증가된 양상을 보였으며 실험군에서는

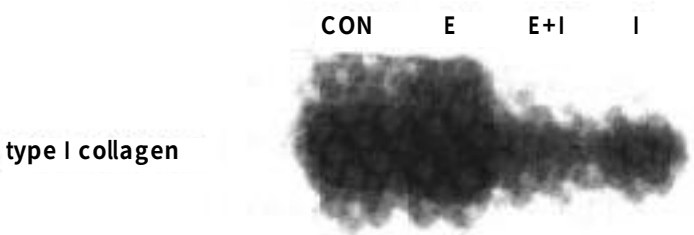

Figure 3. Effect of 17β - estradiol and IGF - I on expression of type I collagen mRNA in MC3T3 - E1 cells. Cells were seeded at 5×10^5cells in 10ml of α - MEM containing 10% fetal bovine serum, and cultured for 1 day. Before 48 hours of indicated time, media were changed α - MEM containing 3% fetal bovine serum. After incubation for 24 hours, 10^{-8}M 17β - estradiol and 10 ng/ml IGF - I were added separately or together.

Figure 4. Effect of 17β - estradiol and IGF - I on expression of osteopontin mRNA in MC3T3 - E1 cells. Cells were seeded at 5×10^5 cells in 10ml of α - MEM containing 10% fetal bovine serum, and cultured for 3 days. Before 48 hours of indicated time, media were changed α - MEM containing 3% fetal bovine serum. After incubation for 24 hours, 10^{-8}M 17β - estradiol and 10 ng/ml IGF - I were added separately or together. Northern blot

17β-estradiol에 의한 증가 양상이 IGF-IA보다 IGF-IB에서 더 뚜렷하게 나타났다.

2. DNA 합성능 측정에 대한 17β-estradiol과 IGF-I의 효과

17β-estradiol과 IGF-I을 단독 혹은 동시투여한 군을 실험군으로 하고 17β-estradiol이나 IGF-I을 투여하지 않은 군을 대조군으로 한 뒤 1일, 3일째에 DNA 합성능을 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다(Figure 2).

1일째에는 실험군 모두에서 대조군보다 미약한 DNA 합성능 증가의 경향을 보였으나 통계학적인 유의성은 없었다($p>0.05$). 실험군 사이에서는 17β estradiol과 IGF-I을 동시투여한 군과 IGF-I를 단독 투여한 군이 유사한 DNA 합성능을 나타내었고, 이는 17β-estradiol을 단독 투여한 군에 비해서는 다소 높은 경향을 보였다.

3일째에는 17β-estradiol을 투여한 군과 17β-estradiol과 IGF-I을 동시투여한 군에서 대조군보다 유의한 DNA 합성능 증가의 양상($p<0.005$, $p<0.005$)을 나타내었고 IGF-I을 단독 투여한 군에서는 유의한 DNA 합성능 증가가 나타나지 않았다($p>0.05$).

3. Type I collagen 유전자 발현 양상

10^{-8}M 17β-estradiol과 10ng/ml IGF-I의 단독 혹은 혼합 적용후 배양 1일째 총 RNA를 추출하여 type I collagen mRNA의 발현을 관찰하기 위한 Northern blot 실험에서 다음의 결과를 얻었다(Figure 3).

17β-estradiol 첨가군이 대조군보다 증가된 발현 양상을 나타내었고, IGF-I 첨가군에서는 대조군과 유사한 발현 양상을 나타내었으며, 두 약제의 동시 투여군에서는 이보다 약간 감소되는 경향의 발현 양상을 나타내었다.

4. Osteopontin 유전자 발현 양상

10^{-8}M 17β-estradiol과 10ng/ml IGF-I의 단독 혹은 혼합 적용후 배양 3일째 총 RNA를 추출하여 osteopontin mRNA의 발현을 관찰하기 위한 Northern blot 실험에서는 다음의 결과를 얻었다(Figure 4).

대조군과 실험군 모두에서 유사한 발현양상을 나타내었다.

IV. 고찰

골조직은 끊임없이 형성과 흡수과정이 반복되어 재형성이 일어나며 이 과정은 다양한 전신적, 국소적인 인자들에 의해 조절된다. 이들 중에서 성호르몬인 estrogen 역시 폐경기 여성에게서 골다공증을 유발시키는 등[2] 골조직에 많은 영향을 미침이 보고되고 있고 이는 치조골 등 치주조직에 관한 연구도 포함하고 있다. Estrogen이 생체 조직에 미치는 영향에 관한 연구에서 Tobias 등[10]과 Chow 등[11]은 estrogen이 고농도로 투여된 경우 망상골 형성을 증가시킴을 보고하였다. 난소절제술 등 estrogen의 결핍시에 나타나는 효과에 대한 보고에서 Johnson 등[14]은 치주염시 대조군보다 더 심한 치조골 소실 양상을 관찰하였고, Nishimura 등[13]은 발치후 더 심한 잔존치조제의 흡수 양상을 보고하였으며, Li 등[12]은 쥐를 사용한 연구에서 발치후 치유양상에서 연골로 채워지는 현상을 발견하여 estrogen의 결핍이 골아세포의 정상적인 분화를 변경시킨다고 하였다. 그러나 이러한 효과는 실험 동물이나 환자의 연령, 사용된 estrogen의 농도 등에 따라 다르게 나타나고 아직까지도 이에 관한 확실한 기전의 규명은 이루어지지 않았다.

Estrogen이 골세포에 미치는 영향에 관해서도 Ernst 등[15]이 쥐의 두개골에서 유래된 골아세포에서 세포의 증식과 교원질 합성의 증가를 보고하였고, Majeska 등[17]과 Masuyama 등[42]

은 MC3T3-E1 세포에서 DNA 합성능, alkaline phosphatase의 활성도의 증가를 보고하였다. 또한 Scheven 등[18]은 사람의 골아세포유사세포에서 estrogen의 투여가 세포의 증식을 증가시키고 분화도 촉진함을 보고한 바 있다. 그러나 Gray 등[19]은 쥐의 골육종에서 유래된 세포에서 이와 상반되는 결과를 보고하였으며, Keeting 등[20]과 김 등[21]은 estrogen의 첨가시 사람의 골아세포유사세포에서 증식과 분화에 별 영향을 미치지 못한다고 보고하였다. 이러한 estrogen이 골아세포에 미치는 영향은 Schmid 등[22], Slater 등[23]의 연구에 의해 국소적인 중개물질이 관여할 것이라는 의견이 제시되었고, Ernst 등[16]과 McCarthy 등[24]은 국소적인 인자들중 IGF-I이 이러한 중계 역할을 담당한다고 하였다.

이에 본 실험에서는 estrogen과 estrogen 작용의 중개물질로 여겨지는 IGF-I 사이의 상호작용을 알아보기 위해 골전구세포인 MC3T3-E1 세포에 estrogen을 투여하여 IGF-I의 발현 양상을 살펴보고, estrogen과 IGF-I을 단독 혹은 동시 투여하여 골조직의 증식과 분화에 미치는 효과에 대해 살펴보았다.

이 연구에서 사용된 MC3T3-E1 세포는 Kodama 등[43]에 의해 분리된 골아세포로써 생체내의 골형성과 유사한 분화양상을 보이며[44], IGF-I과 IGF-II 모두를 가지고 있으나, IGF-I이 더 많이 나타나므로[45] 골내의 IGF-I 조절과 역할을 연구하는 model로 사용되고 있다.

Estrogen 투여에 의한 IGF-I 유전자의 발현 양상을 살펴보기 위해 이 실험에서는 RT-PCR을 사용하였는데, 이 방법은 IGF-I mRNA의 절대적인 숫자를 측정하기 위한 것이라기 보다, IGF 유전자의 발현에 대한 estrogen의 상대적인 효과를 주로 측정하기 위해 사용되는 방법이다. 그러나 이 실험에서는 MC3T3-E1 세포의 IGF-IA mRNA와 IGF-IB mRNA가 85bp의 차이가 나도록 primer를 디자인하였는데, 이 정도의 bp 차이는 Nothern blot에 의해서 하나의 band로 나타나므로 이들의 양상을 모두 관찰하기 위해서 이 방법을 사용하였다.

세포의 증식에 영향을 미치는 17β-estradiol의 농도는 세포의 종류와 분화정도 등에 따라 다양한 것으로 나타났는데, 사람의 osteoblastic cell line에서는 10^{-7}M 농도가, 쥐의 골육종에서 유래된 UMR 106 세포에서는 10^{-11}M의 농도가 가장 큰 효과를 가졌지만[16,19] 본 실험에서는 Majeska 등[17]과 Mazuyama 등[45]이 MC3T3-E1 세포의 증식에 가장 높은 효과를 보이는 것으로 보고한 10^{-8}M의 농도를 사용하였다.

Estrogen을 투여한 MC3T3-E1 세포의 IGF-I mRNA 발현을 관찰하기 위한 RT-PCR 실험에서, 골전구세포인 MC3T3-E1 세포에서도 IGF-I의 alternative splicing 형태인 IGF-IA와 IGF-IB가 모두 발현됨을 알 수 있었다. Nagaoka 등[39]은 사람의 hepatoma cell, macrophage-like cell, 섬유아세포 등에서 IGF-IA가 IGF-IB보다 10배 정도 더 많다고 보고하였는데, 본 실험에 사용된 MC3T3-E1 세포에서도 IGF-IA mRNA가 IGF-IB mRNA보다 다소 많은 양이 발현되는 경향을 관찰할 수 있었다. 본 실험에서는 IGF-IB가 약제의 투여에 의해 증가하는 양상이 IGF-IA보다 더 뚜렷하게 나타났는데, 이는 Zhang 등[41]이 쥐의 간조직에서 보고한 IGF-IB가 IGF-IA보다 외부의 환경이나 약제에 더 민감하다는 결과와 유사한 것으로 이에 관해서는 IGF-I 유전자에 대한 정량적인 연구가 더 시행되어야 할 것으로 사료된다. 전체적인 IGF-I 유전자 발현 양상은 대조군에서24시간까지는 IGF-I mRNA의 유전자의 발현 양상에 별 변화가 없었으나 시간이 지남에 따라 점차 감소한 양상을 보인 반면, 17β-estradiol을 투여한 군에서는 IGF-I mRNA의 유전자 발현이 시간에 따라 증가하는 양상을 나타내었다. 이 결과는 estrogen 첨가에 의해 IGF-I 발현의 증가를 의미하므로

Kassem 등[26]이 human fetal osteoblastic cell에서 보고한 17β-estradiol 적용 후 IGF-I mRNA 유전자가 증가한 결과와 유사하게 나타났으나 본 연구의 대조군에서 6, 24시간에 측정한 IGF-I mRNA 발현 양상이 Kassem 등[26]의 연구에서보다는 더 높게 나타났는데, 이는 쥐의 세포와 사람의 세포간 차이에 의한 것이라 여겨진다.

Estrogen과 IGF-I을 단독 혹은 혼합 적용하여 DNA 합성능을 측정한 실험에서는1일째 실험군 모두에서 대조군보다 미약한 DNA 합성능 증가의 경향을 보였으나 통계학적인 유의성은 없었다($p>0.05$). 실험군 사이에도 유의성은 없었으나 17β-estradiol과 IGF-I을 동시투여한 군과 IGF-I을 투여한 군이 유사하게 증가된 DNA 합성능을 나타내었으며 이는 17β-estradiol 투여군보다는 다소 높은 경향을 나타내었다. 3일째에는 모든 군에서 1일째보다 DNA 합성능이 감소하였다. 1일째보다 3일째에서 DNA 합성능이 감소하였는데, 이는 밀생상태에 의해 세포자체의 증식능이 감소된 결과로 여겨지고 이러한 경향은 Kurose 등[49]이나 Ernst 등[15]의 문헌에서도 관찰된다. 3일째에는 17β-estradiol을 투여한 군과 17β-estradiol과 IGF-I을 동시투여한 군에서 대조군보다 통계학적으로 유의한 DNA 합성능 증가 양상을 나타내었다($p<0.005$). 이 17β-estradiol 투여군과 17β-estradiol과 IGF-I을 동시투여한 군에서 나타난 DNA 합성능의 증가량은 Majeska 등[17]이 MC3T3-E1 세포에서 17β-estradiol 투여 후에 보고한 100%의 증가치에는 미치지 못했지만, Ernst 등[19]이 쥐의 두개골유래 세포에서 보고한 20-60%의 증가치와 유사한 결과를 나타내었다. 3일째 IGF-I 투여군에서도 대조군에 비해 미약한 DNA 합성능 증가 양상을 나타내었지만 대조군에 대한 상대적인 비율은 1일째에 비해 작았다. 이는 Kurose 등[49]이 MC3T3-E1 세포에 10ng/ml의 IGF-I을 투여한 결과 1일째에 비해 3일째의 값이 작았다고 한 보고와 일치하는 내용으로써 이를 통해 IGF-I은 17β-estradiol에 비해 그 효과가 빨리 사라지는 경향을 가짐을 알 수 있었다. 17β-estradiol과 IGF-I을 동시 투여한 군에서는 1일째, 3일째에 통계학적 유의성은 없었지만 실험군중 가장 증가된 DNA 합성능을 관찰할 수 있었다. 그러나, Verhaar 등[50]은 정상 성인의 골형성세포에서 17β-estradiol과 IGF-I의 병용사용이 이들 약제의 단독사용에 비해 큰 차이가 없었다고 보고하였는데, 본 실험에서도 두 약제의 병용 사용시 나타난 DNA 합성능의 증가치가 17β-estradiol과 IGF-I 투여시 값의 합으로 나타나지는 않아 이들이 각각 독립적으로 작용하지 않는다는 사실을 알 수 있었다. 이러한 사실과 함께 3일째에 17β-estradiol이 투여된 군에서 대조군에 비해 유의하게 DNA 합성능이 증가한 것은 앞서 언급되었던 RT-PCR 실험에서 17β-estradiol 투여 후 3일째에 IGF-I mRNA 유전자 발현의 증가가 이루어진 것과 시간이 거의 일치하는 점 등으로 보아 estrogen의 작용에는 IGF-I 유전자의 발현이 관계하며 두 약제의 병용사용에 의한 세포증식의 증가는 약제의 단독 적용에 비해 크게 나타나지 않음을 알수 있었다.

Estrogen과 IGF-I이 단독 혹은 동시 투여된 경우 골아세포의 골기질단백질에 미치는 영향에 관한 보고로는 Rodan 등[16]이 쥐의 골아세포에서 17β-estradiol과 IGF-I의 첨가시 모두 α1(1) procollagen mRNA의 수준을 2-2.5배 정도 증가시킴을 보고하였으며, Benz 등[48]도 높은 수준의 estradiol 수용체를 가지는 사람의 골아세포인 GB 688 세포에서 17β-estradiol의 첨가가 α1(1) procollagen mRNA를 증가시킴을 보고한 바 있다. 그러나, Keeting 등[20]은 사람의 골아세포에서 17β-estradiol의 투여가 alkaline phosphatase나 collagen 합성을 증가시키지 못한다고 하였으며, Chen 등[52]은 쥐의 골아세포유사세포에서 17β-estradiol의 투여로 인한 IGF-I의 변화가 단백질의 총량이

나 collagen 합성의 변화와는 동반되지 않는다는 견해를 보인 바 있다. 본 실험에서는 MC3T3 - E1 세포에 17β - estradiol과 IGF - I을 투여하여, 총 RNA를 추출한 후 type I collagen mRNA의 발현 양상과 osteopontin mRNA의 발현 양상을 Nothern blot으로 관찰하였는데, type I collagen mRNA의 발현 양상을 관찰한 실험에서는 17β - estradiol을 첨가한 군에서 현저한 발현 증가 양상을 보여 Rodan 등[19]과 Benz 등[51]의 견해와 일치하였다. 또 osteopontin mRNA의 발현 양상을 관찰한 실험에서는 두 약제의 단독 혹은 동시 투여군 모두 대조군과 별 차이를 나타내지 못했으며 이는 17β - estradiol 투여시에 osteopontin의 증가를 관찰하지 못한 Majeska 등[17]의 견해와 일치하였다. 이 두 골기질단백질 세포의 분화에 미치는 영향에 대해 Owen 등[52]은 골아세포의 분화 동안은 type I collagen과 TGF - β의 합성이 감소된다고 하였고, Lian 등[54]은 골아세포의 분화 동안 osteopontin과 osteocalcin의 합성이 증가된다고 보고한 바 본 실험에서 나타난 estrogen과 IGF - I의 MC3T3 - E1 세포에 대한 작용으로 미루어 보아 estrogen과 IGF - I의 단독 투여 혹은 동시 투여 모두 골아세포의 분화에는 큰 영향을 미치지 않는 것으로 여겨진다.

이상의 결과를 종합해 볼 때, MC3T3 - E1 세포에 17β - estradiol을 투여시 IGF - I 유전자의 증가가 나타나는 시점과 DNA 합성능의 증가가 일어나는 시점이 일치하는 것으로 보아 estrogen의 작용에 IGF - I의 작용이 관련되는 것으로 여겨지며, 두 약제의 동시 투여시에는 단독 투여시보다 미약하지만 세포 증식을 증가시키는 효과가 나타났으나, type I collagen이나 osteopontin 유전자의 발현에는 큰 영향을 미치지 못하는 것으로 보아 세포 분화에 대한 효과는 미미하리라 사료되지만, 향후 alkaline phosphatase나 osteocalcin 등 다른 골기질단백질의 발현 양상 등에 따른 연구가 필요하리라 사료된다.

V. 결론

본 실험에서는 골전구세포인 MC3T3 - E1 세포에 17β - estradiol을 사용하여 estrogen 작용의 중개물질로 여겨지는 IGF - I 및 그 alternative slicing 형태인 IGF - IA와 IGF - IB 유전자의 발현 양상을 살펴보고, estrogen과 IGF - I이 단독 혹은 혼합 투여된 경우 골아세포의 DNA 합성능 및 type - I collagen과 osteopontin 유전자의 발현에 미치는 영향을 관찰하여 이들이 골아세포의 증식과 분화에 대한 상호작용을 관찰하여 다음의 결과를 얻었다.

17β - estradiol 투여시 시간경과에 따른 IGF - I 유전자 발현 양상 관찰을 위한 RT - PCR 실험에서는 대조군과 실험군 모두에서 IGF - I의 alternative splicing 형태인 IGF - IA와 IGF - IB 유전자의 발현이 관찰되었으며 이 중 IGF - IA 유전자의 발현이 우세하게 나타났다. 대조군에서 IGF - I 유전자의 발현이 24시간까지 처음 수준을 유지하다가 점차 약해지는 경향을 나타내었고, 실험군에서는 시간이 지남에 따라 점차 증가하는 경향을 나타내 었다.

17β - estradiol과 IGF - I의 단독 혹은 혼합 투여시 나타나는 DNA 합성능을 측정한 실험에서는 1일째 실험군 모두에서 대조군보다 미약한 합성능 증가의 경향을 보였으나 통계학적인 유의성은 없었고($p>0.01$), 3일째 17β - estradiol 투여군과 17β - estradiol과 IGF - I 동시 투여군에서 대조군보다 유의한 DNA 합성능 증가의 양상을 관찰하였다.($p<0.005$)

17β - estradiol과 IGF - I의 단독 혹은 혼합 투여시 Type I collagen 유전자 발현 양상을 관찰하기 위한 실험에서는 17β - estradiol 투여군이 대조군보다 증가된 발현 양상을 나타내었고, IGF - I 첨가군과 두 약제의 동시투여군에서는 별 차이가 없었다.

17β - estradiol과 IGF - I의 단독 혹은 혼합

투여시 osteopontin 유전자 발현 양상을 관찰하기 위한 실험에서는 대조군과 실험군에서 뚜렷한 차이가 나타나지 않았다.

이상의 결과를 종합해 볼 때, MC3T3 - E1 세포에 17β - estradiol을 투여시 IGF - I 유전자의 증가가 나타나는 시점과 DNA 합성능의 증가가 일어나는 시점이 일치하는 것으로 보아 estrogen의 작용에 IGF - I의 작용이 관련되는 것으로 여겨지며, 두 약제의 동시 투여시에는 단독 투여시보다 미약하지만 세포 증식을 증가시키는 효과가 나타났으나, type I collagen이나 osteopontin 유전자의 발현에는 큰 영향을 미치지 못하는 것으로 보아 세포 분화에 대한 효과는 미미하리라 사료된다.

VI. 참고문헌

1. Richelson, L. S., Heinz H.W., and Melton III, L. J. : Relative contributions of aging and estrogen deficiency to postmenopausal bone loss, N Engl J Med311:1273 - 1275, 1984
2. Ettinger, B., and Genant, H. K. : Long - term estrogen replacement therapy preventbone loss and fractures, Ann Intern Med, 102:319 - 324, 1985
3. Ola M. Norderyd, Sara G. Grossi, Eli E. Machtei, Joseph J. Zambon, ErnstHausmann, Robert G. Dunford, and Robert J. Cenco : Periodontal Status of WomenTaking Postmenopausal Estrogen Supplementation, J. Periodontol 64:957 - 962, 1993
4. O'Mally, B. W., and Strott, C. A. : Steroid hormones. Reproductive endocrinology, Saunders (1991), Philadelphia, pp.156 - 180
5. Goldfien, A. : The Gonadal hormones and inhibitors. In Katzung BG. ed, Basic and Clinical Pharmacology, Norwalk, Appleton & Lange (1992), pp.559 - 585,
6. Steven A. Harris : Estrogens and Progestins. In John P. Bilezikian ed, Principle ofBone Biology, Academic Press(1996), pp.507 - 520
7. Eriksen, E. F., and Colvard, D. S. : Evidence of estrogen receptors in normal human osteoblast - like cells, Science, 241:84 - 86, 1988
8. Komm, B. S, Terpening, C. M., and O'Mally, B.W. : Estrogen binding receptor mRNA, and biologic response in osteoblast - like osteosarcoma cells, Sciencs,241:81 - 84, 1988
9. Oursler, M. J. : Avian osteoclasts as estrogen target cells. Proc. Nat. Acad. Sci., 88:6613 - 6617, 1991
10. J. H. Tobias, J. Chow, K. W. Colston, and T. J. Chambers : High concentrations of 17β - estradiol stimulate trabecular bone formation in adult female rats, Endocrinol., 128:408 - 412, 1991
11. J. W. M. Chow, J. M. Lean, and T. J. Chambers : 17 β- estradiol stimulates cancellous bone formation in female rats, Endocrinol., 130:3025 - 3032, 1992
12. Xiahong Li, and Ichiro Nishimura : Altered bone remodeling pattern of the residualridge in ovariectomized rats, J Prosthet Dent., 72;324 - 330, 1994
13. Ichiro Nishimura, Ryuji Hosokawa, and Douglas A. Atwood : Animal model forevaluating the effect of systemic estrogen deficiency on residual ridge resorption, JProsthet Dent 73:304 - 10, 1995
14. R. B. Johnson, and J. A. Gilbert :

Alveolar bone loss one year following ovariectomy in sheep, J Periodontol. 68:864 - 871, 1997

15. Matthias Ernst, Joan K. Heath, and Gideon A. Rodan : Estradiol effects on proliferation, messenger ribonucleid acid for collagen and insulin - like growth factor - I, and parathyroid hormone - stimulated adenylate cyclase activity in osteoblastic cells from calvariae and long bones, Endocrinology, 125:825 - 833, 1989
16. Ernst, M., and Rodan G. A. : Estradiol regulation of insulin - like growth factor - Iexpression in osteoblastic cells ; Evidence for tran - scriptional control, Mol. Endocrinol., 5:1081 - 1089, 1991
17. Robert, J. Majeska, James T. Ryaby, and Thomas A. Einhorn : Direct modulation ofosteoblastic activity with estrogen, J Bone and Joint Surgery, 76A;713 - 721, 1994
18. Scheven, B. A. A., Damen, C. A., Hamilton, N. J., Verhaar, H. J. J., and Duursma S. A. : Stimulatory effects of estrogen and progensterone on prolifer - ation anddifferentiation of normal human osteoblast - like cells in vitro, Biochem Biophys Res Commun., 186:54 - 60, 1992
19. Gray, T. K., Flynn, T. C., Gray, K. M., and Nabell,L. M. : 17β - estradiol actsdirectly on the clonal osteoblastic cell line UMR 106, Proc Natl Acad Sci USA, 84:6267 - 6271, 1987
20. Keeting, P. E., Scott, R. E., Colvard, D. S., Han, I. K., and Riggs, B. L. : Lack of a direct effect of estrogen on proliferation and differentiation on nor - mal humanosteoblast - like cells, J Bone Miner Res, 6:297 - 304, 1991
21. Ghi Su Kim, Su - Li Cheng : Absence of a direct anabolic effect of 17 β- estradiol on normal human bone mar - row stromal cells, The Korean Journal of Internal Med., 9;14 - 19, 1994
22. Cristoph Schmid, Matthias Ernst, Jurgen Zarf, and E. Rudolf Froesch : Release of insulin - like growth factor carrier proteins by osteoblast : stimula - tion by estradiol and growth hormone, Biochemical and Biophysical Research Communications, 160:788 - 794, 1989
23. Slater, M., J. Patava, K. Kingham, and R. S. Mason : Modulation of growth factor incorporation into ECM of human osteoblast - like cells in vitro by 17 - β Esradiol,Am. J. Physiol. 267:E990 - E1001, 1994
24. Thomas L. McCarthy, Changhua Ji, Hong Shu, and Sandra Casinghion : 17 -β Estradiol potently suppresses cAMP - induced insulin - like growth factor - I gene activation in primary rat osteoblast cultures, J Biological Chem. 272;18132 - 18139, 1997
25. T. K. Gray, S. Mohan, T. A. Linkart and D. J. Baylink : Estradiol stimulate in vitro the secretion of insulin - like growth factors by the clonal osteoblastic cell line, UMR 106, Biochemical and Biophysical Research Communication, 158:407 - 412, 1988
26. M. Kassem, R. Okazaki, and S. A. Harris : Estrogen effects on insulin - like growthfacotor gene expression in a human osteoblastic cell line with high

levels of estrogen receptor, Calcif Tissue Int, 62;60 - 66, 1998
27. Daniel Lajeunesse : Effect of 17β - estradiol on the human osteosarcoma cell line MG - 63, Bone and Mineral, 24:1 - 16, 1994
28. Thomas L. McCarthy, Caanghua Ji, Kristina Crothers and Michael Centrella : 17β - estradiol potently suppresses cAMP - induced insulin - like growth fac - tor - I gene activation in primary rat osteoblast cultures, J. Biological Chem., 18:18132 - 18139, 1997
29. Daughaday, W. H., and Rotwein, P. : Insulin - like growth factors I and II. Peptides,messenger ribonucleic acid and gene structures, serum, and tissue con - centrations,Endocr. Rev. 10:69 - 90, 1989
30. Hollenberg, M. D. : Receptors for insulin and other growth factor : ratio - nale forcommon and distinct mechanism of cell action, Clin. Invest. Med., 10:45 - 47, 1987

31. Canalis, E., Pash, J., Gabbitas, B., and Varghese, S. : Growth factors regulate thesynthesis of insulin - like growth facotor - I in bone cell cultures, Endocrinology, 133:33 - 38, 1993
32. Jonsson KB, Ljunghall S, Karlstrom O, Johansson AG, Mallmin H, and Ljunggren O : Insulin - like growth factor I enhances the formation of type I collagen in hydrocortisone - treated human osteoblasts. Biosci. Rep. 13:297 - 302, 1993
33. Canalis, E., McCarthy, T. and Centrella, M. : The role of growth factor inskeletal remodelling, Endocrinol. Met. Clin. N. Am., 18:903 - 918, 1989.
34. Canalis, E., McCarthy, T. and Centrella, M. : The regulation of bone formation by local factor, In bone andmineral research., Elservier SciencePublishers(1989) B. V., Amsterdam, pp. 27 - 56
35. Fournier, B., Ferralli, J. M., Price, P.A. and Schlaeppi, J. M. : Comparison of theef - fects of insulin - like growth factor I and - II on the human osteosarcoma cell lineOHS - 4, J. Endocrinol., 136:173 - 180, 1993.
36. Linkhart, T. A. and S. Mohan : Parathyroid hormone stimulates release of IGF - I andIGF - II from neonatal mouse calvaria in organ culture, Endocrinology., 125 : 1484 - 1491, 1989.
37. Machwate, M., Zerath, E., Holy, X., Pastoureau, P. and Marie, P.J.: Insulin - likegrowth factor - I increase trabecular bone formation and osteoblastic cell proliferation in unloaded rats, Endocrinology., 134:1031 - 1038, 1994.
38. Graeme I. Bell, Michelle M. Stempien, and Leslie B. Rall : Sequences of liver cDNAencoding two different mouse insulin - like growth factor I precursors, Nucleic AcidsResearch, 7873 - 7882, 1986
39. Nagaoka, I., Someya, A., Iwabuchi, K., and Yamashita, T. : Expression ofinsulin - like growth factor - IA and factor - IB mRNA in human liver, hepatoma cells, macrophage - like cells and fibroblast,FEBS Lett, 11;280:79 - 83, 1991
40. Fagin, J. A., Roberts, C. T. and Jr, Brown, A. T. : Coordinate decrease of tissue insulin - like growth factor I posttranscriptional alternative mRNA transcripts in diabetes melitus, Diabetes, 38:428 - 434, 1989
41. Zhang, J., Whitehead, R. E., and Jr, Underwood, L. E. : Effect of fasting oninsulin - like growth factor - IA and IGF - IB messenger ribonucleic acids and prehormones in rat liver, Endocrinology, 138:3112 - 3118, 1997
42. Chomczynski, P. and Sacchi, N. : Single - step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate - phenol - chlorform extraction, Anal. Biochem., 162:156 - 159,1987
43. Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. : Molecular cloning : a laboratory man - ual, Cold spring habor laboratory(1989), pp.7.46 - 7.52
44. Feinberg, A. P. and Vogelstein, B. : A technique for radiolabeling DNA restrictio - nendonuclease fragments to high specific activity, Anal. Biochem., 132:6 - 13, 1983

45. Akihiro Masuyama, Yasuyoshi Ouchi, and Hajime Orimo : Characteristics of steroid hormone receptors in cultured MC3T3 - E1 osteoblastic cells and effect of steroid hormones on cell proliferations, Calcif Tissue Int. 51:376 - 381, 1992
46. Kodama, H., Amaga, Y., Sudo, H., Kasai, S., and Yamamoto, S. : Establishment of a clonal ost3eogenic cell line from newborn mouse calvaria, Jpn. J. Oral. Biol., 23:899 - 910, 1981
47. Je - Yong Choi, Byung - Heon Lee, Keun - Bae Song, Rang - Woon Park, In - San Kim, Kun - Yong Sohn, Jeon - Seoung Jo, and Hyun - Mo Ryoo : Expression pattern of bone - related proteins during osteoblastic differentia - tion in MC3T3 - E1 cells, J. Cell Biochem., 61:609 - 618, 1996
48. K. M. Krailkill, S. R. Siddhanti, J. L. Fowlkes, and L. D. Quarles : Differentiation of MC3T3 - E1 osteoblasts is associated with temporal changes in the expression of IGF - I and IGFBPs, Bone, 17;307 - 313, 1995
49. Kurose, H., Yamaoka, K., and Okada, S. : Vitamin D3 increase insulin - like growthfactor I receptors in clonal osteoblastic cells, Endocrinology, 126;2088 - 2094, 1990
50. H. J. J. Verhaar, C. A. Damen, S. A. Duursma, and B. A. A. Scheven : Comparisionof the action of 17β - estra - diol and progestins with insulin - like growth factors - I/ - IIand transforming factor - β1 on the growth of normal adult human bone - forming cells, Journal of the Climacteric & Postmenopause, 21:237 - 243, 1995
51. Benz, D. J., and Komm, B. S. : Estrogen binding and estrogenic responses in normal human osteoblast - like cells, J Bone Miner 6:531 - 540, 1991
52. Theresa L. Chen, Frances Liu, Rebecca L. Bates, and Raymond L. Hintz : Further Characterization of Insulin - like growth factor bindng proteins in rat osteoblast - like cell cultures : modulation by 17β - estradiol and human growth hormone, Endocrinology, 128:2489 - 2496, 1991
53. Owen, T. A., and Aronow M. : Progressive development of the rat osteoblastphenotype in vitro, J Cell Physiol 143:420 - 430, 1990
54. Lian, J. B., Coutts, M. C., and Canalis E. : Studies of hormonal regula - tion of osteocalcin synthesis in cultured rat calvariae, J Biol Chem 260:8706 - 8710, 1985

- Abstract -

The Effect of 17β - Estradiol on the Gene Expression of IGF - I and Bone Matrix Protein in the Osteoblast - Like Cell

Won - Suk Yang, Jae - Mok Lee, Jo - Young Suh

Department of Periodontology, School of Dentistry, Kyungpook National University

The purpose of this study is to evaluate the expression ofIGF - I, considered as the mediator of action of estrogen, and IGF - IA and IGF - IB, alternative slicing form of IGF - I, using 17β - estradiol in MC3T3 - E1 cells. We observed the effect on type I collagen and osteopontin gene expression and DNA synthetic activity of MC3T3 - E1 cells, added by estrogen, IGF - I and combination and the interaction on proliferation and differentiation of MC3T3 - E1 cells.

The results were as follows :

RT - PCR experiment for observing time - dependant IGF - I gene expression pattern - showed IGF - IA and IB gene expression in both of control and test group.

In these IGF - IA gene expression was appeared predominantly. In control, IGF - I geneexpression level was maintained until 24hr and then decreased gradually. In test group, IGF - I gene expression level increased as time goes by.

Experiment measuring DNA synthetic activity, as it is added by 17β - estradiol, IGF - I and combination, showed that first day , there was the tendency of more increase of synthetic activity in all test group than control but no statical significance($P>0.05$), and third day, there was more increase of DNA synthetic activity in 17β - estradiol group and combination group and it was statically significant. ($P<0.005$)

Experiment for observing type I collagen gene expression pattern showed more increase of expression in 17β - estradiol group than control and no significant difference in IGF - I group and combination group.

Experiment for observing osteopontin gene expression pattern showed no significant difference in control and test group.

In conclusion, 17β - estradiol in MC3T3 - E1 cells increased IGF - I gene and DNA synthetic activity simultaneously, therefore it appeared that IGF - I is related to the action of estrogen. Combination treatment of IGF - I and 17β - estradiol has effect on cell proliferation but this effect is lower than IGF - I or 17β - estradiol alone. However, combination treatment has not great effect on type I collagen or osteopontin gene expression thus little effect of cell differentiation.