MC3T3 - E1 세포증식 및 골기질 단백질 발현에 대한 인슐린유사성장인자 - I의 효과

이동식 · 이재목 · 서조영

경북대학교 치과대학 치주과학교실

I. 서론

치주치료의 궁극적인 목적은 치주질환에 의해 상실된 치주조직의 재생과 기능회복에 있다. 치은염증, 치주낭 형성 및 치아주위의 지지골과 결합조직의 파괴를 야기하는 치주질환에 대한 치료개념은 새로운 이론의 도입과 분자생물학의 발전 등으로 많은 변천을 하여왔다. 다양한 치주치료와 함께 상실된 골조직을 재생시키기 위한 시도들은 골조직이식술[1], 골유도재생술[2], 그리고 여러 가지 성장인자의 적용[3,4]과 같은 방법들이 실험적으로 제시되어 왔다.

골의 재형성은 매우 복잡한 과정으로서 골형성과 골흡수가 연결되어 일어나게 되고 여러 가지 국소적 조절인자에 의해 미세하게 조절되고 있는데 이 중 하나인 성장인자는 골격세포와 비골격세포의 성장 및 분화와 기능에 영향을 미치는 폴리펩타이드로서 골세포에 의해 생성되고 분비되는 것으로 밝혀졌고[5 - 8] 골기질 내에 존재하며[9] 배양시킨 골세포의 세포외기질에 존재한다는 보고[10]도 있다.

이러한 성장인자는 변형성장인자(trans - forming growth factor)[11], 혈소판유래성장인자(platelet derived growth factor)[12,13], 인슐린유사성장인자(insuline - like growth factor, IGF)[14] 등이 있는데 이들은 다양한 골아세포계열의 세포의 증식과 골아세포분화의 지표라고 여겨지는 알칼린인산효소함량을 증가시키는 것으로 보고되었으며[15 - 17], 이 중 IGF - I과 - Ⅱ가 골아세포에 가장 많이 존재하는 성장인자중 하나이다[18]. IGF - I과 - Ⅱ는 분자량 약 7.6 kDa의 폴리펩타이드로서 다양한 골격세포와 비골격세포의 대사기능을 조절하고[19] 골세포에서 IGF - I은 IGF - Ⅱ보다 약간 더 강력하기는 하지만 거의 유사한 생물학적 활성을 가지며 구조적, 그리고 기능적으로 인슐린과 연관되어있는 펩타이드로서 골세포에 의해 새로이 합성되거나 골기질에 저장되어 있는 펩타이드의 형태로 방출되어 골조직에 사용되고 골세포 기능을 조절하는 것으로 알려져 있다[20].

골아세포에 대한 IGF의 효과를 살펴보면, 골아세포들의 DNA 합성을 증가시키며 성숙한 골아세포의 분화를 촉진시키는 주된 역할을 하며[21], 인간의 골세포, 태내백서의 두개골세포의 배양시 세포증식을 촉진시킨다고 보고되었고[22], 제 I형 교원질의 발현을 증가시키고 분해를 감소시킨다고 보고되었다[23]. 또한 IGF - I은 골전구세포인 태내백서두개골세포에 대해 유사분열을 촉진시켰다고 보고[24]되었으며, 골전구세포의 분화시 IGF 분비는 감소되나, 골기질

이 형성되고 석회화되는 후기에 다시 증가한다고 보고되었으며[25] 신생 파골세포의 형성과 기존의 파골세포의 활성을 촉진한다는 보고[26]도 있다.

골아세포는 복잡한 발생과정을 거치는데 초기의 골전구세포의 집결과 증식 후 성숙한 골아세포로 분화되어 일시적인 표현형의 발현이 나타난다고 알려져 있으며, 백서두개골에서 유래된 골전구세포인 MC3T3 - E1 세포는 생체에서의 골형성과 비슷한 성장과정을 거치게 되어, 골기질침착, 광화, 성장인자의 영향, 형태의 변화와 대사에 관해서 MC3T3 - E1 세포가 실험 모델로 많이 사용되어왔으며[27,28] Choi 등[29]의 연구에서 MC3T3 - E1세포의 골아세포로 분화시 골기질단백질의 발현 양상에 대해 밝힌 바 있다.

골의 생성시 필요한 골기질은 제 I형 교원질뿐 아니라 여러 종류의 골기질단백질을 포함하고 있는데 이것이 다른 결체조직과 구별되는 특징이라 할 수 있으며[30] 골형성은 복잡한 생물학적 과정으로 엄격하게 조정되는 몇 가지 골기질 단백질의 유전자 발현 양상을 포함하고 있고 골기질 단백질의 표현양상은 시간에 따라 다르다고 보고[31]되고 있다. 예를 들면 세포주기나 성장에 관련된 유전자(histone, c - fos, c - myc)와 세포외기질유전자(type I collagen, fibronectin)가 먼저 증가한 후 osteopontin, bone sialoprotein, osteocalcin과 같은 골형성관련유전자가 증가하므로 이들은 골아세포 분화의 표지인자로 사용되고 있다[32,33]. 골기질단백질 중 제 I형 교원질은 MC3T3 - E1 세포와 같은 골전구세포가 골아세포적인 표현형을 발현하는데 반드시 필요하며 골기질의 골격을 제공하고[34] osteopontin, osteocalcin과 같은 골형성관련유전자보다 초기에 발현된다고 보고되고 있으며[35], osteopontin은 골형성초기과정에서 형성중인 세포외기질에 골아세포를 부착시키고 골흡수시 파골세포를 부착시키며 골의 석회화에 관여하여 성장중인 결정에 결합하여 결정의 크기를 조절하는 역할을 한다는 보고[36]도 있다.

이상의 연구들에서 골아세포의 증식과 분화에 영향을 미친다고 알려져 있는 성장인자인 IGF - I이, 골전구세포인 MC3T3 - E1 세포의 초기 증식능과 분화과정에서 골기질 단백질 중 특히 비교적 초기에 발현되고, 대부분의 골기질을 이루는 제 I형 교원질과 석회화 과정 초기에 발현된다고 알려져 있는 osteopontin 유전자의 발현양상에 어떠한 영향을 주는지를 관찰하고자 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, 유전자재조합형 IGF - I(Genzyme사, 미국), trypsin, phosphate buffered saline(PBS), ethylene - diamine - tetraacetic acid(EDTA), trichloroacetic acid(TCA), [methyl - ^{3}H] thymidine(New England Nuclear사, 미국), absolute ethanol, β - glycerophosphate 등을 사용하였다

2. MC3T3 - E1 세포의 배양

MC3T3 - E1세포를 취득하여 100mm 배양접시(Corning사, 미국)에 10% FBS, 100U/ml penicilline(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 단층밀생 상태가 되면 0.05% trypsin /0.02% EDTA를 이용하여 세포를 분리시킨 후 계대배양하고, 일주일에 두 번 배양

약을 교체해주었다.

3. MC3T3-E1 세포의 증식 및 DNA 합성능 측정

세포의 수가 2.5×10^4cells/ml가 되도록 24 well 배양기에 접종하고 10% FBS를 함유한 α-MEM에서 2일간 배양한 후, 세포 배양액을 제거하고 3% FBS를 함유한 α-MEM으로 배양액을 교체하고 다시 1일간 배양하였다. 그 후 IGF-I을 적용하지 않은 군을 대조군으로 하고 1, 10, 100ng/ml 농도의 IGF-I을 첨가한 군을 실험군으로 하여 측정 24시간전에 2μCi/ml [^{3}H]-thymidine을 첨가하여 세포의 DNA 합성능을 측정하였다.

[^{3}H]-thymidine이 DNA내로 편재되는 속도의 측정을 위해서 24 well 배양기 내의 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 세척 후 찬 absolute ethanol 1ml씩으로 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 방사능 활성도를 조사하여 그 값을 cpm(counter per minute)으로 나타낸 후, student t-test를 시행하여 통계학적 처리를 하였다.

4. 총 RNA의 추출 및 Northern blot hybridization

1) 세포 배양

세포의 수가 5×10^5 cells/ml가 되도록 100mm 배양접시에 접종하고 상기에 기술한 방법과 같이 배양한 후 제 I형 교원질을 위한 실험에서는 5, 10일, 그리고 osteopontin을 위한 실험에서는 5, 15, 20일의 48시간 전에 세포배양액을 제거한 세포층을 PBS로 2회 세척하였다. 이때 성장인자의 최대의 효과를 위해 배양액을 FBS가 첨가되지 않은 α-MEM으로 교체하여 24시간 동안 배양한 후 1, 10ng/ml IGF-I을 첨가한 군을 제 I형 교원질의 실험군으로, 0.1, 1, 10ng/ml IGF-I을 첨가한 군을 osteopontin의 실험군으로 하고 첨가하지 않은 군을 대조군으로 하여 24시간 동안 배양하였다.

2) 총 RNA의 추출

RNA를 Chomczynski와 Sacchi[37]의 방법에 따라 다음과 같이 분리하였다. 100 mm dish의 세포층을 찬 PBS로 씻은 후 변성용액 (GIT: guanidinium thiocyanate)을 각 dish당 600μℓ씩 넣어 세포를 완전히 녹였다. GIT 용액을 2ml의 미량원침관에 옮기고 1/10 용량의 2M sodium acetate(pH 4.0)를 첨가한 후 동량의 phenol액을 넣는다. GIT용액의 1/5 용량의 chloroform/isoamylalcohol(49:1)을 넣고 10초간 강하게 교반하여 15분 동안 얼음에 방치한 후, 미세원심분리기로 15000 rpm에서 20분간 원침하여 상층액 약 650μℓ를 다른 미량원침관에 옮기고 같은 양의 찬 isopropanol로 섞어 -20℃에서 1시간 이상 방치하였다. 그 후 Proteinase K 처리를 시행한 다음 2M sodium acetate(pH 4.0)를 첨가한 후 동량의 phenol액을 넣는 상기의 추출 방법을 한번 더 시행한 다음 침전물을 찬 알콜(70%)로 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) RNA 전기영동

총 RNA는 10μg, 2μℓ의 10 x running 완충액 [0.2 M sodium morpholino-propane sul-

fonate(MOPS, pH7.0), 80mM sodium acetate, 10mM EDTA(pH 8.0)], 3.5㎕의 formamide, 그리고 재증류수로 총 20㎕가 되도록 하여 섞은 뒤 65℃에서 15분간 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 시행하였다.

4) Northern blot 실험

전기영동이 끝나면 전기영동조에서 gel을 꺼내어 재증류수에 몇 번 세척하여 formaldehyde를 제거하고, UV transilluminator에서 관찰하고 사진을 찍은 다음 RNA의 이동을 증진시키기 위해 0.05 N NaOH에 20분간 gel을 담구어 RNA의 부분적인 수화절단을 하였다. 다시 재증류수로 gel을 씻고 45분간 20x SSC에 52분간 담군 후 agarose gel 위를 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 하룻밤동안 방치한 후, 다음날 흡수지와 3MM 종이를 제거하고 볼펜으로 gel slot를 표시하였다. NC membrane를 6x SCC에 5분 담그고 상온에서 30분간 말렸다. 3MM 종이 사이에 NC membrane를 넣고 80℃ 건조기에서 2시간 동안 진공 건조시킨 후 hybridization을 시행할 때까지 dessicator에 보관한다. Gel 중의 RNA가 완전히 NC membrane으로 옮겨갔는지 확인하기 위하여 위의 gel을 염색용액(0.5μg/ml of ethidium bromide in 0.1 N ammonium acetate)에 넣어 45분간 흔들어 준 후 UV transilluminator로 gel 중의 RNA가 남아 있는지의 여부를 판정하였다.

5) cDNA labeling 및 분리

cDNA는 random primed DNA labeling kit를 사용하여 다음과 같이 label 하였다. 500㎕ 용량의 미량원침관에 변성시킨 25ng의 cDNA, 반응 혼합액 2㎕, 5㎕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 중지 시킨다. 이 반응액을 Sephadex G-50이 채워져 있는 spun-column을 이용하여 gel filtration chromatography를 시행하여 label된 cDNA와 유리 [α-^{32}P] dCTP를 다음과 같이 분리하였다. 1ml 용량의 1회용 주사기의 앞부분을 Whatman 종이와 실리콘 처리된 glass wool로 막고, 상온에서 STE 용액(0.1 M NaCL, 10 mM Tris-Cl, 1mM Edta, pH8.0)에 미리 팽창시켜 놓은 Sephadex G-50을 주사기에 넣어 1,600x g로 4분간 원침하였다. Gel의 부피가 0.9 ml될 때까지 Sephadex G-50을 반복 충진하였다. 마지막으로 100㎕의 STE용액으로 column을 통과시켜 같은 양이 나오는지를 확인한다. 이렇게 준비한 column이 위와 같이 반응시킨 cDNA 혼합액을 붓고 같은 속도로 원침해서 통과된 cDNA를 얻는다. Spun-column을 통과시키기 전후의 액 중에서 2㎕씩 취해 β counter로 측정한 후 labeling 정도와 specific activity를 계산한다.

6) Hybridization과 자가방사법

Table 1. Effect of IGF-I on DNA synthetic activity by MC3T3-E1 cells in the presence of 3% fetal bovine serum

IGF-I (ng/ml)	DNA Synthetic Activity(CPM×10^5)
0	2.5±0.06
1	5.9±0.36*
10	5.6±0.36*
100	6.6±0.22*

NC membrane을 prehybridization 하기전에 한 번 더 80℃에서 2시간 동안 진공상태에서 건조시킨다. NC membrane을 42℃의 prehybridization 용액 [50% formamide, 2x SSC, 0.05 M sodium phosphate 완충액(pH 6.5), Denhardt`용액(0.02% polyvinyl pyrrolidone (MW,4000), 0.02% BSA, 0.02% Ficoll 400), 1% SDS, 100μg/ml heat denatured salmon sperm DNA]을 NC cm^2 당 0.2 ml를 넣고 1시간 동안 42℃에서 prehybridization을 시행한다. prehybridization이 끝난 후 여기에 제조된 probe (1x10^9cpm/μg cDNA)를 100℃에서 5분간 변성시킨 후 넣고 넣고 재 봉합한 후 42℃에서 하룻밤 동안 충분히 반응시킨다. Hybridization이 끝난 후 NC membrane을 꺼내어 200ml의 0.1% SDS가 포함된 2x SSC 용액으로 10분씩 3회 세척한다. 그 후 500ml의 0.1% SDS가 포함된 1x SSC 용액으로 65℃에서 15분마다 NC membrane을 뒤집어 주면서 45분 동안 세척한다.

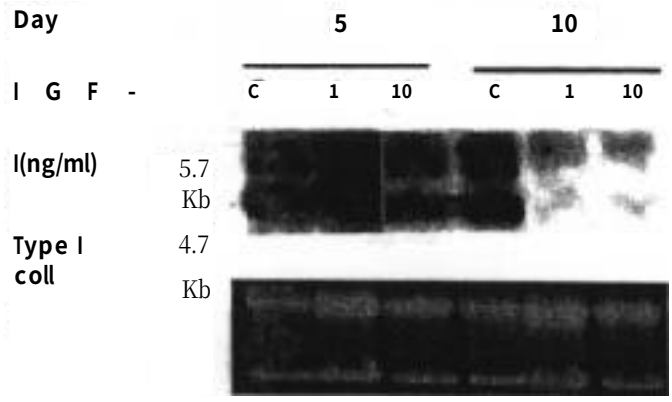

Figure 1. Time - and dose - response effect of 1, 10 ng/ml of Insulin - like growth factor - I on the expression of type I collagen mRNA in MC3T3 - E1 cell culture. Cells were seeded at 5×10^5 cells in 10 ml of α - MEM containing 10% fetal bovine serum, 10 mM β - glycerophosphate and cultured for 5, 10 days. Before 48 hours of indicated time, media were changed to serum free media. After incubation for 24 hours, indicated amount of IGF - I were added. Northern blot analysis were performed as described in materials and methods.

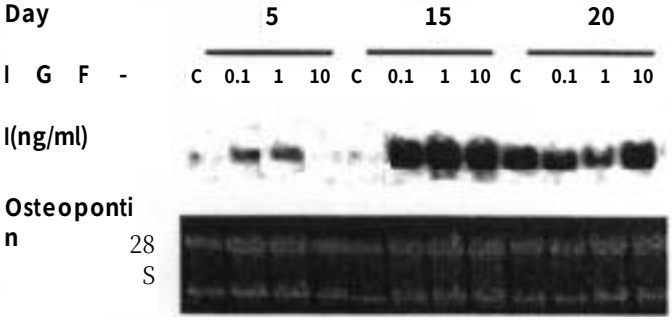

Figure 2. Time - and dose - response effect of 0.1, 1, 10 ng/ml of insulin - like grwoth factor - I on the expression of osteopontin mRNA in MC3T3 - E1 cell culture. Cells were seeded at 5×10^5 cells in 10ml of α - MEM containing 10% fetal bovine serum, 10 mM β - glycerophosphate and cultured for 5, 15, 20 days. Before 48 hours of indicated time, media were changed to serum free media. After incubation for 24 hours, indicated amount of IGF - I were added. Northern blot analysis were performed as described in materials and methods.

NC membrane를 Whatman 3MM 종이 위에서 건조시켜 랩으로 싼 후 intensifying screen이 붙은 X - ray cassette에 넣고, - 70℃에서 며칠 둔 후 현상한다.

III. 결과

1) DNA 합성능에 미치는 효과

전반적으로 MC3T3 - E1 세포의 DNA 합성능이 대조군에 비해 실험군인 IGF - I 적용군에서는 증가한 양상을 보였고, IGF - I의 농도별 투여시 1ng/ml IGF - I 적용군보다 10ng/ml IGF - I 적용군이 약간의 감소 경향을 보이며 100ng/ml IGF - I 적용군이 가장 증가한 양상을 나타내었다. 각 실험군은 대조군에 비해 통계학적 유의성을 나타내었다($p<0.05$)(Table 1).

2) 제 I형 교원질 mRNA 발현에 대한 효과

시간의 경과에 따라 대조군에서는 제 I형 교원질 mRNA의 발현이 5일째와 10일째에서 비슷한 발현 양상을 보였으나, 실험군에서는 5일째가 10일째보다 다소 높은 발현 양상을 보였다.

IGF - I의 농도 변화에 따른 발현양상은 5일째의 경우 대조군에 비해 1ng/ml IGF - I의 투여시 증가한 발현양상을, 10ng/ml IGF - I 투여시 약간의 감소된 양상을 보였고, 10일째의 경우 대조군에 비해 실험군이 모두 낮은 발현양상을 나타내었고 IGF - I의 농도에 따라서는 별 차이가 없었다(Figure 1).

3) osteopontin mRNA 발현에 대한 효과

osteopontin mRNA 발현이 시간경과에 따라 대조군에서는 5일째에도 발현이 있었으나 20일군에서 가장 증가된 양상을 보였고, 실험군에서는 전반적으로 5일째보다 15일째에서 증가하여 가장 높은 발현양상을 보였으며 20일째에서 감소하였으나 5일째보다는 여전히 높은 발현양상을 보였다.

실험군에서 IGF - I의 농도변화에 따른 발현양상은 각 해당일에서 전반적으로 별 차이가 없었다(Figure 2).

IV. 고찰

치주치료는 파괴된 연조직과 경조직을 파괴전 원상태로 재건시키고 복원시키는 것이라 할 수 있으며 치주조직의 재생은 치주질환으로 인해 상실된 부착기구들이 신생골, 신생백악질과 함께 새로운 치주인대 섬유가 기능적으로 삽입, 배열되어 재형성된 상태를 말하는데 이 중 치주질환으로 상실된 골조직을 재생시키기 위해 성장인자의 적용 등을 비롯한 여러가지 방법들이 제시되어왔다. 본 실험은 폴리펩타이드계 성장인자 중 하나인 IGF - I이 골전구세포인 MC3T3 - E1 세포의 초기 성장과정중 DNA 합성능과 골기질단백질인 제 I형 교원질 및 osteopontin 표현형의 발현에 어떤 영향을 주는가 알아보기 위해 IGF - I을 투여한 후 DNA 합성능을 관찰하고, 제 I 형 교원질과 osteopontin cDNA를 사용하여 northern blot analysis를 시행하였다.

MC3T3 - E1 세포의 성장과 분화과정중 골아세포적인 표현형의 발현에 대한 연구[29]에서 골기질 단백질의 발현양상은 일련의 성장 과정중, 4 - 10일의 성장기에는 histone H3, H4, ribosomal protein S6과 같은 세포주기관련유전자가 증가하며 10 - 16일의 골기질단백질 형성 및 성숙기에는 제 I형 교원질의 발현과 생합성, fibronectin, TGF - β_1, osteonectin의 발현이 높으며 16일에 최대치를 나타낸다고 보고하였으며 16 - 30일의 석회화기에는 nodule의 형성과 osteocalcin의 발현이 높으며 osteocalcin은 28일경까지 그 발현양상이 증가한다고 보고하였다. Quarles 등[38]은 MC3T3 - E1 세포는 생체에서의 골형성과 비슷한 골아세포의 성장과정을 거치게 되는데 골전구세포의 증식기인

1일 - 10일 이후에 성장은 중지되고 성숙한 골아세포의 특징적인 일련의 발현양상이 나타나며 10일 이후의 인산효소활성과 14일에서 21일사이에 일어나는 골기질축적, 21일 이후 나타나는 osteocalcin의 발현, 25일 이후 결과적인 석회화현상이 일어난다고 보고하였다. 이와 같이 MC3T3 - E1세포는 골과 유사한 광화된 세포외기질을 합성하면서 정상적인 일련의 골아세포 성장과 분화과정을 거치게 되어 생체에서 야기되는 골형성 과정과 유사한 과정을 나타내므로 MC3T3 - E1 세포를 본 실험에 사용하였다.

골의 재형성은 골흡수와 신생골 합성과정이 합쳐져서 일어나는 과정으로 골기질에 포함되어 있거나 골흡수중 방출되는 폴리펩타이드계 성장인자가 부분적으로 관여하며[5,6] 이 중 IGF - I과 - Ⅱ가 여러 성장인자중의 하나이다.[36] 그런데 IGF의 정확한 기능은 아직 명확하게 밝혀져 있지 않으나다양한 골격세포와 비골격세포의 대사기능을 조절하고[19], 골전구세포들의 증식을 촉진시키고 교원질 합성과 골기질 축적을 증가시키며[20], 골체적의 유지와 골아세포적 표지인자의 발현에 중요하다는 보고[39]들을 살펴보면 IGF - I은 골조직의 세포활동에 중요한 역할을 하며 골의 재형성에 중요한 조절인자로 작용할 것으로 사료된다.

IGF - I은 Spencer 등[40]의 실험에서 쥐에게 14일동안 지속적으로 주입했을 때 피질골과 망상골형성이 증가되었고, Amman 등[41]은 IGF - I을 6주간 투여하여 쥐의 골광밀도가 증가함을 관찰하였고, Kalu 등[42]은 5주간 쥐에게 매일 IGF - I을 피하주사한 결과 장골에서 칼슘과 골체적의 소실을 부분적으로 방지할 수 있음을 관찰함으로서 IGF - I의 시험관적 실험과 일치한다고 보고하였고, Linkhart 등[43]은 IGF - I이 생체실험에서 골형성에 대해 촉진효과를 가지는 것이라고 보고하였다. Hurley 등[44]의 보고에 의하면 외부에서 투여한 IGF - I만으로는 MC3T3 - E1세포의 증식을 촉진하지 못했으며 이와 비슷한 결과가 Hakeda 등[45]에 의해서도 보고되었는바 그 원인은 내인성 IGF - I의 생성양이 너무 크기 때문에 외인성 IGF - I의 투여가 더 이상의 효과를 나타내지 못하기 때문인 것으로 설명하였다. 이와는 대조적으로 외인성으로 투여된 IGF - I이 골아세포의 증식을 직접적으로 자극했고[46], 시험관적 실험에서 분화된 골아세포의 기능의 발현을 촉진했다는 보고[11,47]도 있어 서로 상반된 견해를 보였다.

IGF의 세포증식에 관한 연구에 대해 살펴보면, Canalis 등[14]은 쥐의 두개골세포배양에 IGF - I을 투여하여 DNA 합성을 측정해 본 결과 0.1 - 100nM의 농도에서 DNA 합성이 증가하였다고 보고하였고, Hock 등[48]은 백서 두개골세포 배양시 IGF - I은 골아세포보다 골전구세포에서 더 많은 증식 효과를 나타내어 분화도가 미미할수록 IGF - I의 효과가 크다고 보고하였고, McCarthy 등[23]은 백서두개골의 배양에서 10 - 100nM의 IGF - I의 투여시 농도가 증가함에 따라 DNA 합성능이 증가되었으나 골아세포의 배양시에는 유의할만한 DNA 합성능의 증가를 나타내지 않았다고 보고하였고, Wergedal 등[49]은 인간의 골아세포에 1, 10, 100ng/ml의 IGF - I의 투여시 농도가 증가함에 따라 DNA 합성능이 증가한다고 보고하였다. 본 실험에서는 MC3T3 - E1 세포의 초기 성장과정중 1, 10, 100ng/ml IGF - I이 농도별로 세포증식에 미치는 영향을 DNA 합성능을 측정해본 결과, 대조군에 비해 모든 IGF - I 적용 실험군에서 DNA 합성능이 상당히 증가한 양상을 보였는데 이는 앞서 서술한 연구들과 유사한 결과를 나타내며, 궁극적인 골의 형성은 골아세포의 증식, 분화, 그리고 석회화되는 일련의 과정이지만 MC3T3 - E1세포의 활발한 초기 증식기에 IGF - I의 투여가 DNA 합성능을 증가시킴은 IGF - I이 골아세포의 초기 증식과정을 촉진시킴으로서 궁극적인 골형성에 많은 영향을 끼칠 것으로 사료된다.

골조직에는 대부분의 골기질을 제공하는 제 I

형 교원질 이외에도 많은 비교원성 단백질이 포함되어 있어서 다른 결체조직과 구분된다[26]. 골아세포의 특징적인 유전자 발현 양상은 높은 알카린인산효소, osteopontin, osteocalcin의 발현인데 이들이 골아세포의 분화시 나타나기 때문에 골아세포적인 표현형의 분화지표라고 알려져 있다[32]. Marcus 등[50]은 골아세포를 배양했을 때 특징적인 일련의 기능적 활성을 나타내는 골형성의 지표를 제시했는데, 먼저 *fos - Jun*과 같은 유전자가 나타난 후 제 I 교원질이 출현하며, 알카린 인산효소의 출현 후, osteopontin과 같은 여러 골기질 단백질이 나타나고 그 중 osteocalcin이 가장 늦게 나타나므로 골아세포의 최종 분화를 의미한다고 보고하였다. 이중 osteopontin은 칼슘, hydroxyapatite 및 교원질에 강하게 결합하는 44kD의 인산화된 당단백질인데 그 기능은 아직 잘 모르지만 섬유아세포와 골아세포의 부착을 촉진한다고 보고되고 있고[51], 골전구세포에 의해 합성되는 것으로 밝혀졌다[52].

Hock 등[48]은 백서두개골배양시 1 - 100 nM의 IGF - I을 투여시 골기질과 교원성 단백질 합성을 45 - 50% 증가시켰다고 하였고, McCarthy 등[23]의 백서두개골 배양시 10 nM IGF - I 투여에서 최대의 교원질 합성 증가를 보인 결과와 골아세포배양시 100 nM에서 최대의 교원질 합성 증가를 보인 결과를 보고하였고, Pfeilschifter 등[11]의 백서두개골 배양시 1, 10 nM IGF - I 투여시 골기질축적을 증가시켰다는 결과를 보였다. Wakisaka 등[53]은 쥐의 장골에 14일간 매일 50ng의 IGF - I의 투여가 제 I형 교원질의 합성을 증가시켰다고 보고했으며, Chihara 등[54]은 MC3T3 - E1세포를 모델로 골의 형성과 흡수시 성장호르몬이 IGF - I과 IGF binding protein의 생성을 촉진시켜 알칼린인산효소와 제 I형 교원질의 합성을 증가시킨다고 보고하였고, Jonsson 등[55]은 인간의 골아세포 배양시 0.1ng/ml IGF - I 이상의 농도에서 제 I형 교원질의 합성을 증가시켰다고 보고하였다. 이상의 연구들을 바탕으로 IGF - I은 여러조직 및 세포의 다양한 농도에서 골 형성 과정의 초기에 대부분의 기질로서 제공되는 제 I형 교원질 합성을 증가시키는 것으로 알려져 있으나, 본 실험에서는 MC3T3 - E1 세포의 성장 과정중 IGF - I의 제 I형 교원질 mRNA의 발현 증가는 미미한 것으로 나타났는데 이는 조직배양과 세포배양, 세포 종류, 실험방법, 세포배양의 시기등 여러 가지 차이로 인한 결과로 사료되며, Hock 등[48]은 백서두개골 조직배양에서 IGF - I이 직접적으로 골아세포의 분화를 촉진함으로서 골기질 합성의 증가가 이루어진다고 하였고, Choi 등[29]은 MC3T3 - E1세포는 성장과 분화과정에서 제 I형 교원질의 발현이 전반적으로 높게 나타난다고 하였고 특히 11일째에 많이 발현되고 그 이후에는 초기 배양시와 유사하게 나타난다고 보고하였다. 이상의 연구 결과로 미루어볼 때 세포의 배양기간이 5일과 10일째의 세포 증식기에 국한시켜 세포의 분화과정의 시작전에서는 외부 투여한 IGF - I만의 효과를 살펴보았을 때 제 I형 교원질 mRNA의 발현 증가는 미미한 것으로 나타나 향후 세포의 더 오랜 기간의 배양을 통하여 어느 시기에 제 I형 교원질 mRNA의 증가가 나타나는 가는 더 많은 연구가 필요하리라고 사료된다.

Osteopontin은 그 펩티드 구조상으로 Gly - Arg - Gly - Asp - Ser(GRGDS)의 독특한 염기배열을 가지는데 이것은 세포 표면의 Integrin과 상호작용하여 세포 부착, 세포 이주, 세포 상호간 신호 전달을 매개하는 것으로 알려져 있고, Roach 등[56]은 석회화 되기전에 osteopontin과 Bone sialoprotein이 발견되는데 이는 골의 석회화 개시에 필수적이며 Bone sialoprotein이 crystal nucleator로 작용한다고 보고하였다. 본 실험에서 osteopontin mRNA의 발현양상은 대조군에서 5일째에 비해 20일째 최대의 발현양상을 보이는데 이는 Stein 등[31]의 보고와 일치하고, IGF - I의 농도

에 따른 osteopontin mRNA의 발현양상은 15일째에 대조군에 비해 모든 실험군에서 mRNA 발현이 증가된 양상을 보였다. MC3T3 - E1세포에서의 골의 형성은 골아세포의 성장을 거쳐 그 분화의 과정을 반드시 거쳐야하는데 이때 여러 골기질 단백질의 출현과 25일경에서부터 궁극적인 석회화가 시작된다. 이세포의 정상적인 분화과정에서는 내인성 IGF - I의 분비가 서서히 증가하여 25일경에 최대로 증가한 양상을 보고한 연구[57]에서 IGF - I은 MC3T3 - E1세포의 분화과정에서 이 시기에 어떤한 역할을 하리라고 생각된다. 본 실험에서는 세포증식과정인 5일째에도 osteopontin mRNA의 발현이 약간의 증가를 보여 IGF - I이 세포의 분화를 더 촉진시킬 수 있다는 결과를 보이며 특히 15일째에는 대조군에 비해 IGF - I에 대한 osteopontin mRNA 발현의 효과가 상당히 증가한 양상을 보이며 20일째에는 오히려 약간 감소한 것으로 나타나, 외부 투여한 IGF - I이 osteopontin mRNA의 발현 시기를 더 단축시키는 것으로 사료된다.

생체실험에서 rat femur내에 매일 25ng의 IGF - I 투여시와, 시험관실험에서 50ng/ml IGF - I이 bone marrow stromal cell에 대해 알칼린인산효소, osteopontin mRNA의 발현을 증가시킴으로서 외인성 IGF - I의 효과에 대한 보고[58]와 함께, Wakisaka 등[53]도 이와 유사한 결과를 얻었으며 IGF - I의 국소적 발현의 감소로 인해 osteopontin과 같은 골기질단백질의 발현 감소로 인해 골의 생성이 감소할수 있다고 보고하였고, Tanaka 등[59]은 골의 외상 후와 골흡수의 증가시 IGF - I 농도의 감소로 보아 IGF - I은 골아세포의 발육과 골형성에 밀접한 연관이 있다고 하였다. Suva 등[60]은 쥐의 장골에 대한 외상후 골의 재형성시 나타나는 유전자 발현의 연구에서 4 - 10일째 제 I형 교원질, 6일째 알칼린인산효소, 5 - 10일째 IGF - I이 최고로 발현되며, osteopontin은 전반적로 높게 나타났으며, osteocalcin은 6 - 8일 전까지는 매우 미미하게 발현된다고 보고하였다.

본 실험은 MC3T3 - E1세포의 성장과 분화과정에서 IGF - I의 영향을 알아본 결과 초기 증식과정에서 외부 투여한 IGF - I의 DNA 합성능 증가 효과를 보였고, 세포의 배양기간 5, 10일째에 제 I형 교원질 mRNA의 발현은 세포의 분화과정 전에는 외부 투여한 IGF - I만의 효과를 살펴보았을 때 제 I형 교원질 mRNA의 발현 증가는 미미한 것으로 나타났으며, osteopontin mRNA의 발현은 15일째에 IGF - I에 대한 osteopontin mRNA 발현의 효과가 상당히 증가한 양상을 보이며 20일째에는 오히려 약간 감소한 것으로 나타나, IGF - I은 MC3T3 - E1 세포의 증식과 분화 과정에 많은 영향을 미치며 향후 더 자세한 기전을 밝히기 위해서는 세포내에서 자체적으로 분비되는 IGF - I과 병행하여 향후 더 많은 연구가 뒷받침되어야 할 것으로 사료된다.

V. 결론

치주질환으로 상실된 치주조직을 재생시키기 위한 방법으로 폴리펩타이드계 성장인자의 적용이 실험적으로 최근 많이 시도되고 있는데 이 중 하나인 IGF - I을 이용하여 배양된 MC3T3 - E1 세포에 농도별, 시간별로 주입하여 IGF - I이 이들 세포의 초기 성장과정에서 DNA 합성능과 대부분의 골기질로 제공되는 제 I 형 교원질, 그리고 석회화 과정 초기에 중요하다고 알려진 osteopontin mRNA의 발현에 어떠한 영향을 미치는지 알아보고자 본 실험을 시행하였다.

골아세포인 MC3T3 - E1세포의 분화 주기라고 알려져 있는 약 1개월의 기간 중 3일간 배양한 세포에 1, 10, 100ng/ml IGF - I을 투여하여 세포의 DNA 합성능을 측정하고, 5, 10일간 배양한 세포에 1, 10ng/ml의 IGF - I을 투여하여 제 I형 교원질 cDNA 및 5, 15 15일간 배양한 세포에 01, 1, 10ng/ml의 IGF - I을 투여하여 osteopontin cDNA을 사용하여 northern blot

hybridization을 시행하였으며 각각의 기간동안 배양한 세포에서 IGF - I을 투여하지 않은 군을 대조군으로 하고 IGF - I을 투여한 군을 실험군으로 하여 IGF - I의 투여 후 24시간동안 배양하여 아래와 같은 결과를 얻었다.

세포의 DNA 합성능 측정 실험에서는 대조군에 비해 모든 IGF - I 적용군에서 상당히 증가한 DNA 합성능을 보였으며, IGF - I의 투여 농도별 비교시 1ng/ml IGF - I 적용군보다 10ng/ml IGF - I 적용군에서 약간의 감소된 양상을, 그리고 100ng/ml IGF - I 적용군에서 가장 높은 DNA 합성능을 보였고, 대조군에 비해 모든 실험군에서 통계학적 유의성을 보였다.

제 I형 교원질 mRNA 발현 실험에서는 시간의 경과에 따라 대조군에서는 5일째과 10일째에서 비슷하게 강한 발현 양상을 보였으나, 실험군에서는 5일째가 10일째보다 다소 높은 발현 양상을 보였다. IGF - I의 농도 변화에 따른 발현양상은 5일째의 경우 대조군에 비해 1ng/ml IGF - I의 투여시 약간 증가한 발현양상을, 10nM IGF - I 투여시 약간의 감소된 양상을 보였고, 10일군의 경우 대조군에 비해 실험군이 모두 낮은 발현양상을 나타내었고 두 농도간 발현양상의 차이는 미미하였다.

Osteopontin mRNA 발현이 시간경과에 따라 대조군에서는 5일째에도 발현이 있었으나 20일군에서 가장 증가된 양상을 보였고, 실험군에서는 전반적으로 5일째보다 15일째에서 증가하여 가장 높은 발현양상을 보였으며 20일째에서 감소하였으나 5일째보다는 여전히 높은 발현양상을 보였다. 각 실험군에서 IGF - I의 농도변화에 따른 발현양상은 각 해당일에서 전반적으로 별 차이가 없었다.

결과적으로 IGF - I은 MC3T3 - E1 세포의 성장과 분화과정중 초기 성장과정에서 DNA 합성능을 증가시키는 경향을 나타내었고, 제 I형 교원질 mRNA의 발현 증가에는 미미한 영향을 보였으며, osteopontin mRNA의 발현에는 15일째에 높은 발현을 나타내어 그 발현 시기를 단축시켰다.

VI. 참고문헌

1. Cobi, J. L., Ayala, G. and Miron, W. : Clinical and biologic observation of demineralized freeze - dried bone allo - grafts in augmentation procedures around dental implants, Int. J. Oral Maxillofac. Implants, 9: 586 - 592, 1994.
2. Michael, E. F., Jay, M., David, K., Marjorie, J., Ross, H., Laura, D. B. and Jack L. : The use of guided bone regen - eration to fill large mandibular defects in monkeys ; A pilot study, Int. J., Oral Maxillofac. Implants, 9: 644 - 652, 1994.
3. Lynch, S. E., Buser, D., Hernandes, R. A., Weber, H. P., Stich, H., Fox, C. H. and Williams, R. C. : Effects of the platelet derived growth factor/insulin like growth factor - I combination on bone regeneration around titanium dental implants. Results of a pilot study in bea - gle dogs, J. Periodontol., 62: 710 - 716, 1991.
4. Cochran, D. L., Rouse, C. A., Lynch, S. E. and Graves, D. T. : Effects of platelet derived growth factor isoforms on calci - um release from neonatal mouse cal - variae, Bone, 14: 53 - 58, 1993.
5. Canalis, E., McCarthy, T. and Centrella, M. : Growth factors and the regulation of bone remodeling, J. Clin Invest., 81: 277 - 281, 1988.
6. Robey, P. G., Young, M. F., Flanders, K. C., Roche, N. S., Kondaiah, P., ReddiA. H., Termine, J. D., Sporn, M. B. and Roberts, A. B. : Osteoblasts synthesize and respond to transforming growth

factor type β(TGF β) in vitro, J. Cell Biol., 105: 457 - 463, 1987.
7. Wergedal, J. E., Mohan, S., Taylor, A. K. and Baylink, D. J. : Skeletal growth fac - tor is produced by human osteoblast like cells in culture, Biochem. Biophy. Acta, 889: 163 - 170, 1986.
8. Zapf, J., Froesch, E. R. : Insulin - like growth factor somatomedins, structure, secretion, biological actions and physo - logical role, Horm. Res., 24: 121 - 130, 1986.
9. Hauschka, P. V., Mavrakos, A. E., Iafrati, M. D., Doleman, S. E. and Klagsbrun, M. : Growth factors in bon ematrix, J. Biol Chem., 261: 65 - 74, 1986.
10. Globus, R. K., Plouet, J. and Gospodarowicz, D. : Culttured bovine bone cells synthesize basic fibroblast growth factor and store it in their extra - cellular matrix, Endocrinology, 124: 1539 - 1547, 1989.
11. Pfeilschifter, J., Oechsner, M., Naumann, A., Gronwald, R. G. K., Minne, H. W. and Ziegler, R. : Stimulation of bone matrix apposition in vitro by local growth factors : a comparison between insulin - like growth factor I, platelet - derived growth factor I, platelet - derived growth factor, and transforming growth factor β, Endocrinol., 127: 69 - 75, 1990.
12. Canalis, E. : Effect of platelet - derived growth factors on DNA and protein synthesis in cultured rat calvaria, Metabolism, 30: 970 - 975, 1981.
13. Matsuda, N., Lin, W - L, Kumar, M. M., Cho, M. I. and Genco, R. J. : Mitogenic, chemotactic, and synthetic response of rat periodontal ligament fibroblastic cells to polypeptide growth factors in vitro, J. Periodontol., 63: 515 - 525, 1992.
14. Canalis, E. : Effect of Insulin - like growth factor I on DNA and protein synthesis in cultured rat calvaria, J. Clin. Invest., 66: 709 - 719, 1980.
15. Howes, R., Bowness, J. M., Grotendorst, G. R., Martin, G. R. and Reddi, A. H. : Platelet - derived growth factor enhances demineralized bone matrix - induced cartilage and bone for - mation, Calcif. Tissue Int., 42: 34 - 38, 1988.
16. Froesch, E. R., Schimid, Cj., Zangger, I., Schoenle, E., Eigenmann, E. and Zapf, J. : Effects of IGF/somatomedins on growth and dif - ferentiation of muscle and bone, J. Anim. Sci., 63: 57 - 75, 1986.
17. Canalis, E., Raisz, L. G. : Effect of fibroblast growth factor on cultured fetal rat calvaria, Metabolism, 29: 108 - 114, 1980.
18. Canalis, E., McCarthy, Tl L., and Centrella, M. : Growth factors and cytokines in bone cell metabolism, Annu. Rev. Med., 42: 17 - 24, 1991.
19. Daughaday, W. L., Rotwein, P. : Insulin - like growth factors - I and - II, Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum, and tissue con - centrations, Endocr. Rev., 10: 68 - 91, 1989.
20. Bilezikian, J. P., Raisz, L. Z. and Rodan, G. A. : The role of Insulin - like growth factors and binding proteins in bone cell biology, 1st ed., Principles of Bone Biology, Academic press,

Sandiego, (1996), pp 607 - 618
21. Canalis, E. : Insulin like growth factors and the local regulation of bone formation, Bone, 14: 273 - 276, 1993.
22. Mohan, S., Baylink, D. J. : The role of insulin - like growth factor - II in the coupling of bone formation to resorption, Spencer EM(ed) Modern Concepts of Insulin - like Growth Factors, New York, (1991), pp169 - 184,
23. McCarthy, T. L., Centrella, M. and Canalis, E. : Regulatory effects of insulin like growth factor - I and - II on bone collagen synthesis in rat calvarial cul - tures, Endocrinology, 124: 301 - 309, 1989.
24. Strong, D. D., Merriman, H. L., Landale, E. C., Baylink, D. J. and Mohan, S. : The effects of the insulin - like growth factors and transforming growth factor - β on the Jun proto - oncogene family in MC3T3 - E1 cells, Calcif. Tissue Int., 55 : 311 - 315, 1994.
25. Birnbaum, R. S., Bowsher, R. R. and Wiren, K. M. : Changes in IGF - I and - II expression and secretion during the proliferation and differentiation of normal rat osteoblasts, J. Endocrinol., 144: 251 - 259, 1995.
26. Mockizuki, H., Hakeda, Y., Wakatsuki, N., Usui, N., Akashi, S., Sato, T., Tanaka, K. and Kumegawa, M. : Insulin like growth factor - I supports formation and activation of osteoclasts, Endocrinololgy, 131: 1075 - 1080, 1992.
27. Kumegawa, M., Hiramatsu, M., Hatakeyama, K., Yajima, T., Kodama, H., Osaki, T. and Kurisu, K. : Effects of epi - dermal growth factor on osteoblastic cells in vitro, Calcif. Tissue Int., 35: 542 - 548, 1983.
28. Hurley, M. M., Abreu, C., Harrison, J. R., Lichtler, A. C., Raiaz, L. G. and Kream, B. E. : Basic fibroblast growth factor inhibits type I collagen gene expression in osteoblastic MC3T3 - E1 cells, J. Biol. Chem., 268: 5588 - 5593, 1993.
29. Choe, J.Y., Lee, B. H., Song, K. B., Park, R. W., Kim, J. S., Sohn, K. Y., Jo, J. S. and Ryoo, H. M. : Expression patterns of bone related proteins during osteoblastic differentiation in MC3T3 - E1 cells, J. Cell. Biochem., 61: 609 - 618, 1996.
30. Sommer, B., Bickel, B., Hofstetter, W. and Wetterwald, A. : Expression of Matrix Proteins During the development of mineralized tissues, Bone, 19: 371 - 380, 1996.
31. Stein, G. S., Lian, J. B. : Molecular mechanisms mediating developmental and hormone regulated expression of genes in osteoblasts ; An integrated relationship of cell growth and differen - tiation, Cellular and Molecular Biology of Bone, Academic Press, San Diego, (1993) pp47 - 95
32. Phoebe, S. : Dexamethasone induction of osteoblast mRNA in rat marrow stromal cell culture, J. of Cell. Physiol., 146: 370 - 378, 1991.
33. Kasperk, C. H., Wergedal, J. E., Mohan, S., Long, D. L., Lau, W. and Baylink, D. J. : Interactions of growth factors present in bone matrix with bone cells : Effects on DNA synthesis and alkaline phosphatase, Growth factors, 3:

147 - 158, 1990.
34. Franceschi, R. T., Lyer, B. S. : Relationship between collagen synthesis and expression of the osteoblast phenotype in MC3T3 - E1 cells, J. Bone Mineral Res., 7: 235 - 246, 1992.
35. Reinholt, F. P., Hultenby, K., Oldberg, A. and Heinengard, D. : Osteopontin - apossible anchor of osteoclasts to bone, Proc. Natl. Acad. Sci., 83: 4473 - 4475, 1990.
36. Oldberg, A., Franzen, A. and Heinegard, D. : Cloning and sequence analysis of rat bone sialoprotein(osteopontin) cDNA reveals an Arg - Gly - Asp cell binding sequence, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 83: 8819 - 8823, 1986.
37. Chomczynski P., Sacchi N. :

Single - step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate - phenol - chloro - form extraction, Anal Biochem., 162: 156 - 159, 1987

38. Quarles, L. D., Yohay, D. A., Lever, L. W., Caton, R. and Wenstrup, R. J. : Distinct proliferative and differentiated stagges of murine MC3T3 - E1 cells in culture: An in vitro model of osteoblast development, J. Bone Miner Res., 7: 683 - 692, 1992.
39. Rosen, C. J., Donahue, L. R. and Hunter, S. J. : Insulin - like growth factors and bone : The osteoporosis connection, PSEBM, 206 : 83 - 101, 1994.
40. Spencer, E. M., Liu, C. C., Si, E. C. and Howard, G. A. : In vivo actions of insulin - like growth factor - I on bone formation and resorption in rats, Bone, 12: 21 - 26, 1991
41. Ammann P., Rizzoli, R. and Bonjour, J. P. : Chronic infusion of IGF - I increases bone mineral density evaluated sequentially by dual energy x - ray absorptiometry in ovariec - tomized osteopenic rats, J. Bone Min. Res., 6: 537, 1991.
42. Kalu, D. L., Liu, C. C., Salerno, E., Salih, M., Echon, R., Ray, M. and Hollis, B. W. : Insulin - like growth factor - I partially prevents ovariectomy indeced bone loss: A com - parative study with human parathyroid hormone, J. Bone Min. Res., 6: 548, 1991.
43. Linkhart, T. A., Mohan, S. and Baylink, D. J. : Growth factors for bone growth and repair : IGF, TGF βand BMP, Bone, 19: 1S - 12S, 1996.
44. Hurley, M. M., Abreu, C. and Hakeda, Y. : Basic fibroblast growth factor regulates IGF - I binding proteins in the clonal osteoblastic cell line MC3T3 - E1, J. Bone Mineral Res., 10: 222 - 230, 1995.
45. Hakeda, Y, Harada, S., Matsumoto, T., Tezuka, K., Higashino, K., Kodama, H., Hashimoto - Goto, T., Ogata, E. and Kumegawa, M. : Prostaglandin, F2 α stimulates prolif - eration of clonal osteoblstic MC3T3 - E1 cells by up - regulation of insulin - like growth factor I receptors, J. Biol Chem., 266: 21044 - 21050, 1991.
46. McCarthy, T. L., Centrella, M. and Canalis, E. : Parathyroid hormone enhances the transcript and polypeptide lelvels of insulin - like growth factor I in osteoblast - enriched cultures from fetal rat bone, Endocrinology, 124: 1247 - 1253, 1989.
47. Jonsson, K. B., Frost, A., Larsson, R., Ljunghall, S. and Ljunggren, O. : A new fluo - rometric assay for determination of osteoblastic proliferation ; Effects of glucocorticoids and insulin - like growth factor - I, Calcif. Tissue Int., 60: 30 - 36, 1997.
48. Hock, J. M., Centrella, M. and Canalis, E. : Insulin - like growth factor I has indepen - dent effects on bone matrix formation and cell replication, Endocrinology, 122: 254 - 260, 1988.
49. Wergedal, J. E., Mohan, S., Lundy, M. and Baylink, D. J. : Skeletal growth factor and other growth factors known to be present in bone matrix proliferation and protein syn - thesis in human bone cells, J. Bone Mineral Res., 5 : 179 - 186, 1990.
50. R. Marcus : Biochemical Assessment of bone resorption and formation, Bone, sup - plement, 18(1): 155 - 165, 1996.
51. Craig, A. M. : Osteopontin, a transformation associated cell adhesion phosphoprotein,

is induced by 12 - O - tetrade - canoylphorbol 13 - acetate in mouse epidermis, J. Biol. Chem., 264(16): 9682 - 9689, 1989.

52. Prince, C. W., Oosawa, T., Butler, W. T., Tomana, M., Bhown, A. S., Bhown, M. and Schrohenloher, R. E. : Isolation, characterization and biosyn - thesis of a phosphorylated glycoprotein from rat bone, J. Biol. Chem., 262(6);2900 - 2907, 1987.

53. Wakisaka A., Tanaka H., Barnes J. and Liang CT : Effect of locally infused IGF - I on femoral gene expression and bone turnover activity in old rats, J. Bone Miner. Res., 13(1):13 - 19, 1998

54. Chihara K, Sugimoto T : The action of GH/IGF - I/IGF - BP in osteoblasts and osteoclasts, Horm Res, suppl 5:45 - 49, 1997

55. Jonsson, K. B., Ljunghall, S., Karlstrom, O., Johansson, A. G., Mallmin, H. and Ljunggern, O. : Insulin - like growth factor I enhances the formation of type I collagen in hydrocortisone - treated human osteoblasts, Biosci. Rep., 13(5): 297 - 302, 1993.

56. Roach, H. I. : Why does bone matrix contain non - collagenous pro - teins? The possible roles of osteocalcin, osteonectin, osteopontin and bone sialo - protein in bone mineralization and resorption, Cell Biol. Int., 18(6): 617 - 628, 1994

57. Thrailkill, K. M., Fowlkes, J. L. and Quarles, L. D. : Differentiation of MC3T3 - E1 osteoblasts is associated with temporal changes in the expression of IGF - I and IGF - BPS, Bone, 17: 307 - 313, 1995

58. Tanaka, H., Quarto, R., Williams, S., Barnes, J. and Liang. C. T. : In vivo and in vitro effects of insulin - like growth factor - I (IGF - I) on femoral mRNA expression in old rats, Bone, 15(6) : 647 - 653, 1994.

59. Tanaka, H., Barnes, J. and Liang C. T. : Effect of age on the expression of insulin - like growth factor - I, inter - leukin - 6, and transforming growth fac - tor - beta mRNAs in rat femurs following marrow ablation, Bone, 18(5): 473 - 478, 1996

60. Suva, L. J., Seedor, J. G., Endo, N., Quartuccio, H. A., Thompson, D. D., Bab, I. and Rodan, G. A. : Pattern of gene expression following rat tibial marrow ablation, J. Bone Miner. Res., 8(3): 379 - 388, 1993

- Abstract -

Insulin - Like Growth Fac - tor - I Effects on the Pro - liferation and Bone Matrix Protein Gene Expression of MC3T3 - E1 Cell

Dong - Sik Lee, Jae - Mok Lee, Jo - Young Suh

Department of Periodontology, School of Dentistry, Kyungpook National University

The purpose of this study is to evaluate the effect of IGF - I for DNA synthetic activity and the mRNA expression of bone matrix protein, type I collagen and osteo - pontin in prolifetation and differentiation of MC3T3 - E1 cells. To evaluate DNA syn - thetic activity, cells were seeded at 2 x 10^4 cells/ml in 24 well plates and to evaluate mRNA of type I collagen and osteopontin cells were seeded at 5 x 10^5 cells/ml in 100mm culture dishes. These cells were cultured in alpha - minimum essential medi - um(α- MEM) containing 10% fetal bovine serum at 37℃, 5% CO_2 incubator. For DNA synthetic activity test 1, 10, 100ng/ml IGF - I were added to the cells which had been cultured for 3 days before 24 hours. For type I collagen mRNA expression 1, 10ng/ml IGF - I were added to the cells which had been cultured for 5, 10 days and for osteopontin mRNA expression 0.1, 1, 10ng/ml IGF - I were added to the cells which had been cultured for 5, 15, 20 days. Cell proliferaton was measured by the incorporation of [^{3}H] - thymidine into DNA and expression for type I collagen and osteopontin were measured by northern blot analysis.

The results were as follows :

DNA synthetic activity were generally higher in experimental group than control group. Expressions of type I collagen mRNA were higher at 5 day group and much lower at 10 day group in the control groups. In the experimental groups, mRNA expressions were slightly increased when 1 ng/ml IGF - I were added to 5 day group and decreased in all experimental 10 day groups. Expressions of osteopontin mRNA were higher at 20 day groups and lower at 15 day groups than the control groups. In the experimental groups, mRNA expres - sions were incereased when 0.1, 1 ng/ml IGF - I were added to 5 day group and in all the 15 day groups, but decreased when 0.1, 1, 10 ng/ml IGF - I were added to 20 day groups.

IGF - I stimulated DNA synthetic activity of MC3T3 - E1 cells during proliferation stage significantly, did not greatly changed effects on type I collagen mRNA expression and stimulated osteopontin mRNA expres - sion at 15 day especially.

In conclusion, we suggests that IGF - I have a tendency of stimulation effect of DNA synthetic activity but do not stimulate type I collagen mRNA in proliferation stage of MC3T3 - E1 cell cultures, and stimulate osteopontin mRNA in differentiation stage

of MC3T3 - E1 cell cultures.