

# MC3T3-E1 조골세포주의 osteocalcin과 osteopontin mRNA 발현에 미치는 방사선의 영향

전북대학교 치과대학 구강악안면방사선학교실 및 구강생체과학연구소  
\*경희대학교 치과대학 구강악안면방사선학교실

조수범 · 이상래\* · 고광준

## Effects of irradiation on the mRNA expression of the osteocalcin and osteopontin in MC3T3-E1 osteoblastic cell line

Su-Beom Cho, Sang-Rae Lee\*, Kwang-Joon Koh

Department of Oral and Maxillofacial Radiology, School of Dentistry, and  
Institute of Oral Bio Science, Chonbuk National University

\*Department of Oral and Maxillofacial Radiology, College of Dentistry, Kyung Hee University

### ABSTRACT

**Purpose :** To investigate the effects of irradiation on the phenotypic expression of the MC3T3-E1 osteoblastic cell line, particularly on the expression of osteocalcin and osteopontin.

**Materials and Methods :** Cells were irradiated with a single dose of 0.5, 1, 4, and 8 Gy at a dose rate of 5.38 Gy/min using a cesium 137 irradiator. After the specimens were harvested, RNA was extracted on the 3rd, 7th, 14th, and 21st day after irradiation. The RNA strands were reverse-transcribed and the resulting cDNAs were subjected to amplification by PCR.

**Results :** The irradiated cells demonstrated a dose-dependent increase in osteocalcin and a dose-dependent decrease in osteopontin mRNA expression compared with the non-irradiated control group. The amount of osteocalcin mRNA expression decreased significantly at the 3rd day after irradiation of 0.5, 1, 4, and 8 Gy, and also decreased significantly at the 3rd, 14th, and 21st day after irradiation in the 8 Gy exposed group compared with the control group. The degree of osteopontin mRNA expression increased significantly at the 7th day after irradiation of 0.5, 1, 4, and 8 Gy.

**Conclusion :** These results showed that each single dose of 0.5, 1, 4, and 8 Gy influenced the mRNA expression of osteocalcin and osteopontin associated with the calcification stage of osteoblastic cells, suggesting that each single dose affected bone formation at the cell level. (*Korean J Oral Maxillofac Radiol* 2003; 33 : 179-85)

**KEY WORDS :** MC3T3-E1 osteoblastic cell line; radiation; osteocalcin; osteopontin

### 서 론

골은 같은 부위에서 오래된 골이 주기적으로 새로운 골로 대체되는 재형성과정을 거치는데, 골의 재형성과정에서 골형성과 골흡수의 불균형이 이루어지면 골경화증 또는 골다공증과 같은 대사성 골질환이 유발될 수 있다.<sup>1,2</sup>

골형성은 복잡한 생물학적 과정에 의하여 이루어지며

골과 관련된 여러 유전자의 발현에 의하여 조절된다. 즉 조골세포의 증식기, 골기질형성기, 석회화기의 골형성과정에서 type I collagen (Col I), alkaline phosphatase (ALP), osteopontin (OP), osteonectin (ON), osteocalcin (OC) 등과 같은 골 관련 유전자의 연속적인 발현이 이들 과정에 관여한다.<sup>3-5</sup> 이러한 연속적인 유전자 발현은 parathyroid hormone (PTH), 1, 25-dihydroxy vitamin D<sub>3</sub> (calcitriol), bone morphogenetic protein 등의 전신적 요인과 염증이나 물리적 손상과 같은 국소적 요인에 의하여 영향을 받아 골형성이 조절된다.

골 관련 유전자의 발현양상은 생체내, 실험실내 연구를 통하여 다양한 방법으로 연구되었다. Aronow 등<sup>6</sup>은 쥐 두

접수일 : 2003년 6월 17일; 심사일 : 2003년 6월 18일; 채택일 : 2003년 7월 28일  
Correspondence to : Prof. Kwang-Joon Koh  
Department of Oral and Maxillofacial Radiology, School of Dentistry, Chonbuk National University 634-18, Keum-Am Dong, Duk-Jin Gu, Chon-Ju, Chonbuk, 561-712, KOREA  
(Tel) 82-63-250-2063, (Fax) 82-63-250-2081  
E-mail) radkoh@moak.chonbuk.ac.kr

개관의 조골세포에서 OC 유전자의 발현이 ALP 유전자의 발현보다 더 늦게 나타나지만, 닭의 조골세포에서는 비슷한 시기에 나타난 것을 보고하였으며, Owen<sup>5</sup>은 석회화시기와 관련하여 OC와 OP 유전자의 발현량이 증가된다고 하였다. 그러나 Ducey<sup>7</sup>는 OC 유전자의 부족이 골 석회화에 영향을 미치지 않으며, OC 유전자는 골흡수 또는 석회화에 장애를 주지 않으면서 골형성을 제한시킨다고 하였다. 한편 Kitahara 등<sup>8</sup>은 OP 유전자가 결핍되면 PTH의 활성화가 유도된다고 하였다.

Estrogen, thyroid hormone (TH), PTH, calcitriol, cAMP는 OC 유전자의 발현량에 영향을 미친다. Towler와 Rodan<sup>9</sup>은 MC3T3-E1 생쥐 조골세포에서 adenylate cyclase activator forskolin이 OC 유전자의 발현량을 증가시킨다고 하였고, Morrison 등<sup>10</sup>은 calcitriol의 OC 유전자에 대한 효과를 연구한 바 있다. Ross<sup>11</sup>는 골기질 단백질인 OP 유전자와 bone sialoprotein (BS) 유전자 그리고 파골세포의 integrin  $\alpha_v\beta_3$ 간의 상호작용에 의하여 파골세포의 부착과 골흡수가 야기된다고 하였다.

방사선은 골형성장애를 나타내는 요인 중의 하나로 알려져 있다. 악성 종양의 치료를 위해서는 40-60 Gy의 고선량 방사선이 조사되며, 골에 대한 방사선의 효과에 대하여는 많은 연구가 이루어졌다.<sup>12-14</sup> Probert 등<sup>14</sup>은 사람에서 가장 왕성한 골 성장 시기에 35 Gy 이상의 방사선조사는 척추성장을 현저히 저해시킨다고 하였다. 또한 Gal 등<sup>15</sup>은 방사선조사는 세포의 증식과 교원질합성을 감소시키고, transforming growth factor (TGF)- $\beta$  type I과 II receptor를 증가시킨다고 하였다. Matsumura 등<sup>16</sup>은 방사선조사 후 모든 시기에서 OC 유전자의 발현량은 감소되었고, OP 유전자의 발현량은 변화되지 않았다고 보고하였다.

본 연구는 방사선조사가 조골세포의 석회화기와 관련된 골관련 단백질인 OC와 OP 유전자의 발현에 미치는 영향을 구명하기 위하여 이루어졌다.

## 재료 및 방법

### 1. 세포배양 및 방사선조사

본 실험에 사용된 생쥐 두개관 조골세포주 MC3T3-E1

의 광학현미경사진은 아래와 같다(Fig. 1).

세포배양은 10% fetal bovine serum (FBS)에 포함된 alpha-minimum essential medium ( $\alpha$ -MEM) 배지에서 행해졌다. 세포가 배양접시에서 충분하게 자란 다음, 10 mM  $\beta$ -glycerophosphate와 50  $\mu$ g/ml ascorbic acid를 첨가하여 37°C에서 배양하였고 3일 간격으로 신선한 배양 배지로 교환하였다. 100 $\Phi$  조직배양 접시에  $5 \times 10^5$  cells이 되게 접종하여 3일간 배양한 후 cesium 137 방사선조사기를 사용하여 실온에서 5.38 Gy/min의 선량률로 0.5, 1, 4, 8 Gy를 단회조사하고 3, 7, 14, 21일간 배양한 다음 각각 선량군별로 total RNA를 분리하였다.

### 2. Total RNA 분리 및 reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

Total RNA는 TRI reagent (Molecular Research Center, INC.)를 사용하여 제조사의 지침에 따라 분리하였다. 배양된 세포에서 배지를 제거하고 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4) 10 ml로 두 번 세척한 후 TRI reagent를 첨가하였다. 이것을 1.5 ml tube에 1 ml씩 담고 1-bromo-3-chloropropane을 200  $\mu$ l 첨가하고 30초간 강하게 와동시킨 후 원심분리 (13,000 rpm, 15분, 4°C)하여 상층액을 취해 새로운 tube에 옮겼다. 여기에 동량의 isopropanol을 첨가하여 -20°C에서 2시간 이상 방치한 후 원심분리 (13,000 rpm, 15분, 4°C)하여 상층액을 제거하였다. 침전물에 75% 에탄올 1 ml를 첨가하여 다시 원심분리 (13,000 rpm, 15분, 4°C)하고 에탄올을 제거한 후 diethyl pyrocarbonate (DEPC) 처리된 증류수를 첨가하여 65°C 수조에서 10분간 반응시켜 침전물을 녹였다.

분리된 RNA는 spectrophotometer와 1% formaldehyde agarose gel 전기영동을 이용하여 정량하고 확인하였다. 분리된 total RNA 4  $\mu$ g, SuperScript II RT 200U, 0.5  $\mu$ g Oligo dT, 0.5 mM dNTP를 첨가하여 42°C에서 90분간 반응시킨 후 70°C에서 10분간 최종 반응시켰다.

Total RNA는 역전사되고 결과물인 cDNA는 시발체 (primer)들을 이용한 PCR의 방법으로 증폭되었다. PCR은 2.5 U TaKaRa Ex Taq polymerase, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTP를 첨가하여 각각 지정한 조건에 맞게 실시하였다. 증폭의

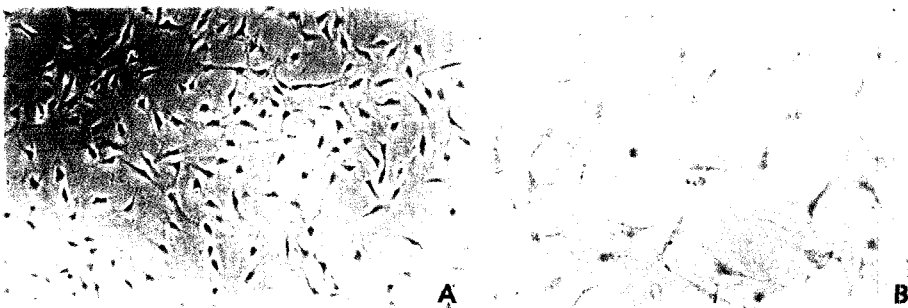


Fig. 1. Microphotographs show MC3T3-E1 osteoblastic cells; A ( $\times 40$ ), B ( $\times 100$ ).

목적으로 사용된 시발체는 OC sense, 5'-TCCTCCTGGTTC ATTTCTTTG-3'; OC antisense, 5'-CCTTATTGCCCTCCTG CTTGG-3'; OP sense, 5'-GTG- CCTGACCCATCTCA-3'; OP antisense, 5'-TCCAGCTGACT-TGACTCA-3'; GAPDH sense, 5'-TGGGTCTTACCACCA-3'; GAPDH antisense, 5'-TCAGTGGGCCCTCAGA-3'이다.

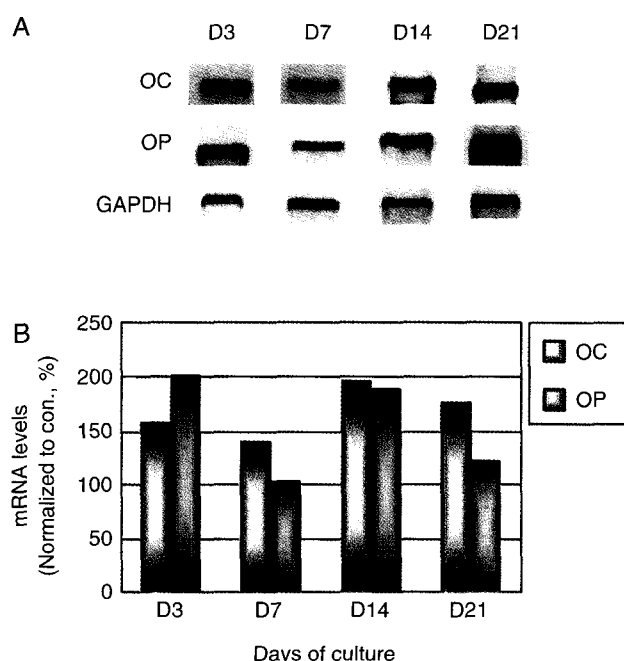
### 3. Total RNA 전기영동

DEPC처리된 증류수 34 ml에 agarose 0.4 g을 첨가하여 녹인 다음 10×MOPS buffer 4 ml와 formaldehyde 2 ml를 첨가하여 gel을 만들어 사용하였다. Total RNA에 RNA loading dye를 첨가하고 여기에 Ethidium bromide (EtBr)를 0.5 µg/ml되게 첨가하여 65°C에서 15분간 반응시킨 후 gel홈에 loading하여 1×MOPS buffer상에 100 V로 1시간 전개시킨 후 LAS-1000 (Fuji film)으로 mRNA band를 관찰하였다.

**Table 1.** The rate of the mRNA expression of osteocalcin and osteopontin according to the days of culture in MC3T3-E1 cells

Bone protein	Days of culture				
	D 0	D 3	D 7	D 14	D 21
Osteocalcin	100	157 <sup>a</sup>	138	194	175
Osteopontin	100	201	103	188	121

a : percent to the day 0 control



**Fig. 2.** The mRNA bands (A) and bargraph (B) show the rate of mRNA expression of osteocalcin and osteopontin according to the days of culture in MC3T3-E1 cells.

## 결 과

### 1. 배양시간에 따른 조골세포주의 bone protein의 mRNA 발현량

Table 1, Fig. 2는 배양시간에 따른 조골세포주의 bone protein의 mRNA 발현량을 나타낸다. OC mRNA 발현량은 배양 14일 후 최대치에 이른 다음 배양 21일에는 감소하는 경향을 보였고, OP mRNA 발현량은 배양 3일 후에 최대치를 보였으며 7일 후 급속히 감소한 다음 배양 14일 후에 다시 증가되었다.

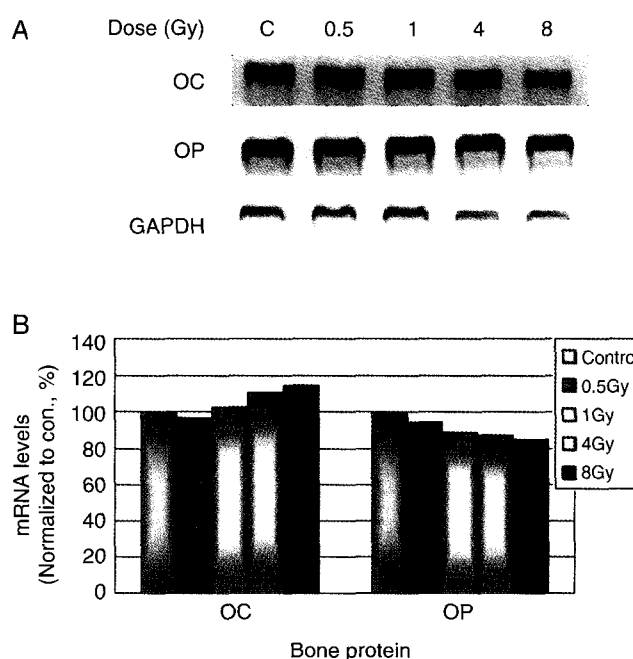
### 2. 방사선 조사선량에 따른 bone protein의 mRNA 발현량

Table 2, Fig. 3은 방사선 조사선량에 따른 bone protein의

**Table 2.** The rate of the mRNA expression of osteocalcin and osteopontin after irradiation in MC3T3-E1 cells

Radiation dose	Bone protein	
	Osteocalcin	Osteopontin
Unirradiated control	100	100
0.5 Gy	97 <sup>a</sup>	94
1 Gy	102	89
4 Gy	111	87
8 Gy	115	85

a : percent to the unirradiated control



**Fig. 3.** The mRNA bands (A) and bargraph (B) show the rate of mRNA expression of osteocalcin and osteopontin after irradiation in MC3T3-E1 cells.

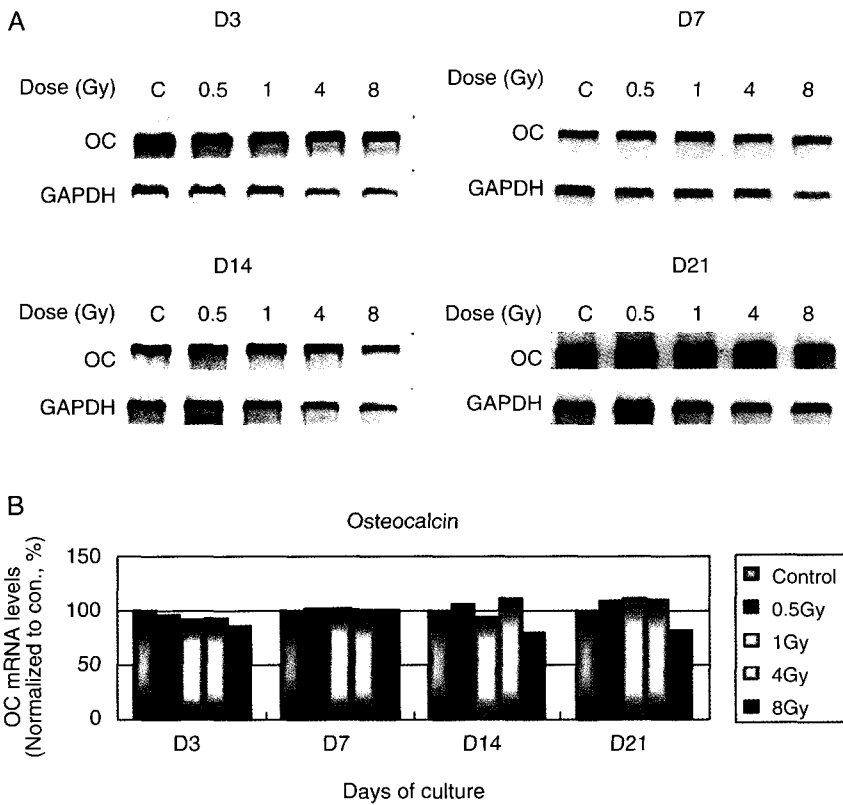


Fig. 4. The mRNA bands (A) and bargraph (B) show the rate of mRNA expression of osteocalcin according to the days of culture after irradiation in MC3T3-E1 cells.

Table 3. The rate of the mRNA expression of osteocalcin according to the days of culture after irradiation in MC3T3-E1 cells

Radiation dose	Days of culture			
	D 3	D 7	D 14	D 21
Unirradiated control	100	100	100	100
0.5 Gy	96 <sup>a</sup>	102	106	109
1 Gy	92	102	94	111
4 Gy	93	101	111	110
8 Gy	86	101	80	82

mRNA 발현량을 나타낸다. OC mRNA 발현량은 1 Gy 이상에서는 대조군에 비하여 선량의존적으로 증가되었다. 한편 OP mRNA 발현량은 선량이 증가함에 따라 대조군에 비하여 점차 감소되는 경향을 보였다.

3. 방사선조사 후 배양시간에 따른 osteocalcin의 mRNA 발현량

Table 3, Fig. 4는 방사선조사 후 배양시간에 따른 osteocalcin의 mRNA 발현량을 나타낸다. 0.5, 1, 4, 8 Gy 전 조사군에서 OC mRNA 발현량은 방사선조사 3일 후 대조군에 비하여 감소되었으며 특히 8 Gy 조사군에서는 대조군에 비하여 3, 14, 21일 후 현저히 감소되었다.

Table 4. The rate of the mRNA expression of osteopontin according to the days of culture after irradiation in MC3T3-E1 cells

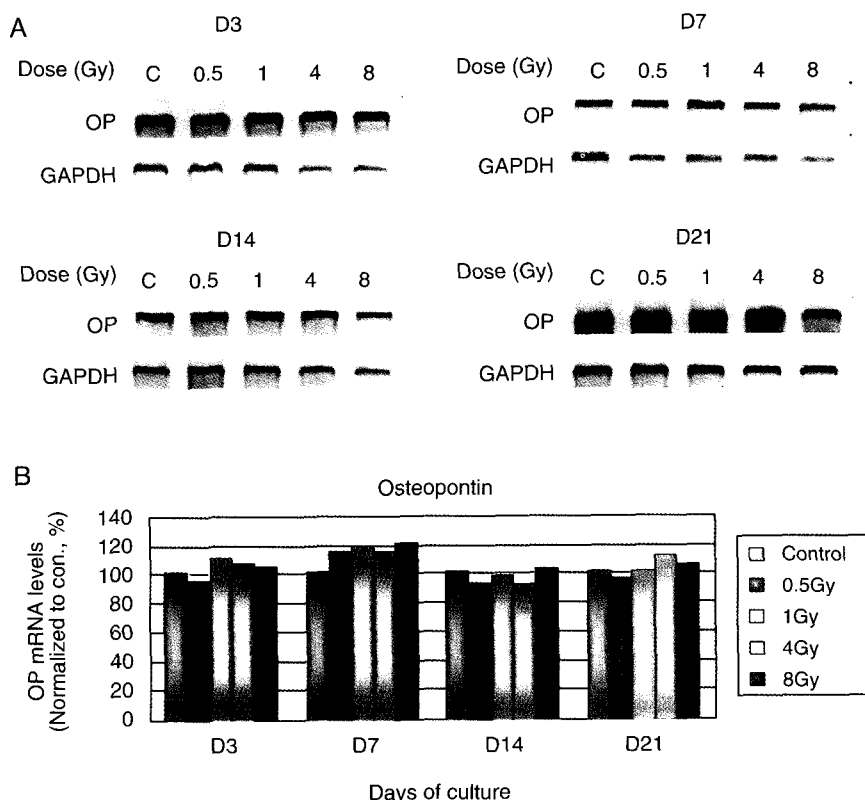
Radiation dose	Days of culture			
	D 3	D 7	D 14	D 21
Unirradiated control	100	100	100	100
0.5 Gy	95 <sup>a</sup>	114	93	96
1 Gy	110	118	98	100
4 Gy	106	114	92	111
8 Gy	104	120	102	105

4. 방사선조사 후 배양시간에 따른 osteopontin의 mRNA 발현량

Table 4, Fig. 5는 방사선조사 후 배양시간에 따른 osteopontin의 mRNA 발현량을 나타낸다. 0.5, 1, 4, 8 Gy 전 조사군에서 OP mRNA 발현량은 7일 후 대조군에 비하여 증가되었다.

고찰

조골세포는 골화와 골의 재형성 및 치유시 세포외기질을 형성함으로써 골의 형성에 관여할 뿐만 아니라, 조골세포 표면단백질이 파골전구세포로부터 파골세포로 분화하는 데에도 관여한다.<sup>17</sup>



**Fig. 5.** The mRNA bands (A) and bar-graph (B) show the rate of mRNA expression of osteopontin according to the days of culture after irradiation in MC3T3-E1 cells.

파골세포는 두 가지 변형된 세포표면인 투명대 (clear zone)와 주름변연 (ruffled border area)이 있으며, 후자는 활발한 골흡수를 보이는 부위에 한정되고, 전자는 골과 밀접하게 결합되는 부위이다.<sup>18</sup> Hiura<sup>19</sup>는 파골세포형성에 조골세포가 영향을 미친다고 하였다. 또한 Takahashi 등<sup>20</sup>도 생쥐 비장세포와 초기 조골세포에 calcitriol을 투여한 다음 공동배양한 경우 파골세포가 형성되었지만, 분리배양한 경우에는 파골세포가 형성되지 않았으며, 이러한 결과는 파골세포의 형성에 조골세포가 관여하는 것을 의미한다고 하였다.

골의 형성과정에서 조골세포의 분화는 유전형질의 연속적인 다단계 표현에 의해 조절되며, 골관련 단백질의 발현양식은 골형성의 시기별로 나타나고, 배양방법에 따라 고유의 발현양식을 가지고 있다. 즉, ① 조골세포의 증식이 일어나는 4-10일 경에는 histone H3 및 H4와 같은 세포주기 관련 유전자와 ribosomal protein S6 등이 발현되며, Col I mRNA의 합성이 증가된다. ② 골기질 형성 및 성숙기인 10-16일 경에는 fibronectin (FN), TGF- $\beta$ 1, OP mRNA 등이 발현되고, ALP mRNA의 활성도가 증가되며, ③ 석회화기인 20일 경에는 OC과 OP 등의 유전자가 높게 발현된다.<sup>3-6</sup> OC과 OP mRNA는 발현양식의 차이를 보이는데, OC mRNA는 12일 이전에는 검출되지 않으며, 16-20일 경까지는 유의한 수준까지 이르지 않지만 석회화가 시작되면서 이의 발현이 급격하게 증가된다. 한편 OP mRNA는 석회화

되기 이전의 증식기인 5-7일 경에도 최대치의 25%가 발현되는 것으로 알려져 있다.<sup>5</sup>

OC mRNA는 조골세포에 의해 생성된 세포외기질의 비교원질 단백질 중 가장 풍부하고, 칼슘과 hydroxyapatite의 결합과 관련이 있는 세 개의 gamma-carboxyglutamic acid residue를 가지고 있다.<sup>21</sup> OC mRNA는 골, 상아질 및 석회화된 연골에서 발현되는 매우 특이적인 유전자로서, 골에서는 성숙된 조골세포에서만 발현된다. OC mRNA의 발현은 골이 석회화되어 결절을 형성하는 시기와 일치하며, 이는 골기질의 석회화를 촉진시키는 요인으로 작용한다. 한편 OC mRNA가 hydroxyapatite에 대한 강한 친화성을 보인다고 할지라도 OC mRNA의 생물학적 특징 중의 하나는 hydroxyapatite의 결정형성을 방해하는 것으로 알려져 있다. Ducy 등<sup>7</sup>은 OC mRNA가 부족한 생쥐를 이용한 연구에서 OC의 결핍이 해면질골과 피질골의 형성을 증가시키며 골의 생물학적 및 기계적 강도를 증가시킨다고 하였다.

한편 OP mRNA는 조골세포에 의해 생성되며, o-phosphoserine을 가지고 있는 60 kD acidic glycoprotein이다.<sup>18</sup> OP mRNA는 조골세포 분화과정 중에서 biphasic pattern을 보이며 골에서 조골세포의 증식과 세포외기질의 석회화에 중요한 역할을 한다. 따라서 OP mRNA는 OC mRNA와 달리 조골세포 분화의 초기와 석회화기에 나타나며 선택적으로 조절되는 것으로 알려져 있다.<sup>5</sup> 골과피 시에는 골표면의 무기질과 파골세포의 결합이 중요한데, 이러한 작용

을 OP mRNA가 증계한다. OP mRNA는 파골세포가 결합된 골표면에서 풍부하게 관찰되는데, 파골세포의 원형질막에 OP mRNA에 특이적인 vitronectin receptor가 존재하며, 이는 골기질의 무기질과 OP mRNA에 의해 결합되어 있다.

본 연구에서는 조골세포의 분화인자 중 OC과 OP mRNA의 발현 양상을 구명하고자 하였다. OC mRNA 발현량은 배양 14일 후 최대치를 보였다. 한편 OP mRNA는 배양 3일 후 최대치에 이른후 감소하였으나 배양 14일 후 다시 증가하였다. 이는 3주경에 석회화와 관련하여 발현량이 최대에 이르렀다는 보고<sup>3,6</sup>보다는 이의 발현이 다소 빠른 양상을 보였는데 이러한 결과는 배양체계와 배지 등의 영향에 기인한 것으로 사료된다.

방사선조사가 조골세포의 증식을 선량의존적으로 억제하고 분화를 야기하며 석회화를 촉진시킨다고 보고된 바 있다.<sup>22-24</sup> 그러나 골은 다양한 종류의 조직으로 이루어져 있기 때문에 생체내 연구에서는 방사선의 효과가 조골세포에 대한 방사선조사의 직접적인 결과인지 주위 조직에 대한 방사선손상으로 인한 이차적인 결과인지 구명하기 어려운 점이 있다. 또한 조골세포는 여러 단계의 분화과정을 거치는데, 각각의 분화 시기에 대한 방사선조사의 직접적인 효과를 연구하기에는 한계가 있다.<sup>16</sup> 조골세포 분화에 대한 연구에서 clonal 조골세포주의 배양체계는 세포들이 포착된 분화시기만을 반영하여 조골세포 형질을 한정적으로 표현한다.<sup>5</sup>

방사선이 조골세포에 미치는 영향의 연구에서 조사선량은 정상적인 골형성과 골치유에 필수적인 성장요인의 변화를 초래하는 아치사 손상(sublethal damage)을 유도할 정도의 선량이어야 하며 세포사를 야기시킬 수 있는 조사선량이어서는 안된다고 알려져 있다.<sup>16,22</sup> 즉 10 Gy 이상의 선량에서는 조골세포의 ALP활성이 증가하고 석회화된 결절이 관찰되지 않는다고 하였다. Dare 등<sup>23</sup>은 4 Gy의 방사선조사시 세포성장과 분화에 있어서 유의한 차이를 보인다고 하였다. 또한 Matsumura 등<sup>22</sup>은 1, 5, 10 Gy의 방사선조사가 조골세포의 최종 분화와 석회화를 유도한다고 보고하였다.

방사선치료선량에 대한 정상조직과 종양조직 간의 반응을 알아보고자 시도된 몇몇 연구<sup>25-27</sup>에서는 방사선이 세포의 분화를 유도하는 것으로 밝혀졌다. 즉 치료선량의 방사선에 의해 신경모세포종, 횡문근육종, 적백혈병 세포의 분화가 유도되고, 정상세포에서는 섬유모세포와 적혈구 전구세포의 분화가 유도된다고 하였다. 방사선조사로 인한 손상으로부터 회복하기 위해서는 새로운 세포를 필요로 하지만 방사선은 조골세포의 증식을 억제하고, 분화를 유도하여 이의 회복에 부정적인 영향을 미친다. Dare<sup>23</sup>는 0.4 Gy 이하의 저선량에서는 세포성장과 조골세포의 분화에 유의한 차이를 일으키지 않으므로, 진단분야에서의 방사선

조사선량은 조골세포의 증식과 분화에 영향을 미치지 않는다고 하였다. 한편 Jacobsson 등<sup>12</sup>은 5 Gy의 전리방사선에 의하여 골형성장애가 유발되었지만 2.5 Gy에서는 골형성장애가 유발되지 않았다고 하였다.

Morrison 등<sup>10</sup>은 혈청 OC mRNA 발현량이 glucocorticoid로 치료받은 사람에서 감소된다고 하였다. 또한 Lian 등<sup>28</sup>은 OC mRNA의 합성에 대한 호르몬의 조절에 대하여 연구한 바 있으며 Price와 Baukol<sup>29</sup>은 골육종 세포를 배양하였을 때, calcitriol에 반응하여 OC mRNA가 합성된다고 하였다. 이러한 연구가 OC mRNA 합성에 대한 직접적인 자극의 결과인지, 골대사를 조절하는 다른 호르몬이 합성에 영향을 미치는지는 명확하지 않다.

한편 방사선조사가 조골세포의 발현인자에 미치는 영향에 대하여 Matsumura 등<sup>16</sup>은 성숙기에서의 방사선조사는 Col I mRNA의 축적이 촉진되었으며, 모든 시기에서 OC mRNA의 발현이 감소되었다고 하였으나, OP mRNA의 발현은 변화되지 않았다고 하였다. 한편 DNA량과 전체 칼슘량이 방사선조사에 의하여 감소되는데, 방사선조사에 의하여 조골세포의 수가 감소되어 전체 기질의 석회화 감소를 초래하게 되며 이러한 조골세포의 감소는 방사선치료 후 골형성장애를 설명해 준다고 하였다.

본 연구에서 방사선조사 3일 후 OC mRNA 발현량은 선량의존적으로 증가되었으나 OP mRNA 발현량은 실험 14일까지 점차 감소되었다. 한편 방사선조사 후 세포 배양시간에 따른 발현량은 OC mRNA의 경우 3일째에 모든 군에서 감소되었으며, 선량에 따른 발현량은 변화가 심하였다. OP mRNA는 7일 후 모든 군에서 대조군에 비해 증가되었으며 선량증가에 따른 발현량의 차이는 없었다. 이러한 결과는 10 Gy 방사선조사에 의해 OC mRNA의 발현량은 감소되고, OP mRNA 발현량은 변화되지 않았다는 이전의 보고<sup>16</sup>와 차이를 보인다. 이러한 차이는 세포배양시 미세환경의 차이와 방사선조사시 조골세포의 분화단계의 차이에 기인한 것으로 생각할 수 있다. 또한 본 연구에서는 배양 3, 7, 14, 21일 후 방사선을 조사하였으나 향후 분화시기가 보다 세분화되고 연구기간도 연장되어야 할 것으로 사료된다.

## 참 고 문 헌

1. Manolagas SC. Birth and death of bone cells: Basic regulatory mechanism and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev* 2000; 21 : 115-37.
2. Manolagas SC. Editorial: Cell number versus cell vigor-what really matters to a regenerating skeleton? *Endocrinology* 1999; 140 : 4377-81.
3. Choi JY, Lee BH, Song KB, Park RW, Kim IS, Sohn KY, et al. Expression patterns of bone-related proteins during osteoblastic differentiation in MC3T3-E1 cells. *J Cell Biochem* 1996; 61 : 609-18.
4. Quarles LD, Yohay DA, Lever LW, Caton R, Wenstrup RJ. Distinct

- proliferative and differentiated stages of murine MC3T3-E1 cells in culture: An in vitro model of osteoblast development. *J Bone Miner Res* 1992; 7 : 683-92.
5. Owen TA, Aronow M, Shalhoub V, Barone LM, Wilming L, Tassinari MS, et al. Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: Reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. *J Cell Physiol* 1990; 143 : 420-30.
  6. Aronow MA, Gerstenfeld LC, Owen TA, Tassinari MS, Stein GS, Lian JB. Factors that promote progressive development of the osteoblast phenotype in cultured fetal rat calvaria cells. *J Cell Physiol* 1990; 143 : 213-21.
  7. Ducy P, Desbois C, Boyce B, Pinero G, Story B, Dunsta C, et al. Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature* 1996; 382 : 448-52.
  8. Kitahara K, Ishijima M, Rittling SR, Tsuii K, Kurosawa H, Nifuji A, et al. Osteopontin deficiency induces parathyroid hormone enhancement of cortical bone formation. *Endocrinology* 2003; 144 : 2132-40.
  9. Towler DA, Rodan GA. Identification of a rat osteocalcin promoter 3', 5'-cyclic adenosine monophosphate response region containing two PuGGTCA steroid hormone receptor binding motifs. *Endocrinology* 1995; 136 : 1089-96.
  10. Morrison NA, Shine J, Fragonas JC, Verkest V, Mcmenemy ML, Eisman JA. 1, 25-dihydroxy vitamin D<sub>3</sub>-responsive element and glucocorticoid expression in the osteocalcin gene. *Science* 1989; 246 : 1158-61.
  11. Ross FP, Chappel J, Alvarez JI, Sander D, Butler WT, Farach-Carson MC, et al. Interactions between the bone matrix proteins osteopontin and bone sialoprotein and osteoclast integrin  $\alpha_v\beta_3$  potentiate bone resorption. *J Biol Chem* 1993; 268 : 9901-7.
  12. Jacobsson M, Jönsson A, Albrektsson T, Turesson I. Alterations in bone regenerative capacity after low level gamma irradiation. A quantitative study. *Scand J Plast Reconstr Surg* 1985; 19 : 231-6.
  13. Currey JD, Foreman J, Laketic I, Mitchell J, Pegg DE, Reilly GC. Effects of ionizing radiation on the mechanical properties of human bone. *J Orthop Res* 1997; 15 : 111-7.
  14. Probert JC, Parker BR. The effects of radiation therapy on bone growth. *Radiology* 1975; 114 : 155-62.
  15. Gal TJ, Munoz-Antonia T, Muro-Cacho CA, Klotch DW. Radiation effects on osteoblasts in vitro: A potential role in osteoradionecrosis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2000; 126 : 1124-8.
  16. Matsumura S, Hiranuma H, Deguchi A, Maeda T, Jikko A, Fuchihata H. Changes in phenotypic expression of osteoblasts after X irradiation. *Radiat Res* 1998; 149 : 463-71.
  17. Suda T, Takahashi N, Martin TJ. Modulation of osteoclast differentiation. *Endocr Rev* 1992; 13 : 66-80.
  18. Reinholt FP, Hulthenby K, Oldberg Å, Heinegard D. Osteopontin-a possible anchor of osteoclasts to bone. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87 : 4473-5.
  19. Hiura K, Sumitani K, Kawata T, Higashino K, Okawa M, Sato T, et al. Mouse osteoblastic cells (MC3T3-E1) at different stages of differentiation have opposite effects on osteoclastic cell formation. *Endocrinology* 1991; 128 : 1630-7.
  20. Takahashi N, Akatsu T, Udagawa N, Sasaki T, Yamaguchi A, Moseley JM, et al. Osteoblastic cells are involved in osteoclast formation. *Endocrinology* 1998; 123 : 2600-2.
  21. Hauschka PV, Lian JB, Cole DEC, Gundberg CM. Osteocalcin and matrix Gla protein: vitamin K-dependent proteins in bone. *Physiol Rev* 1989; 69 : 990-1047.
  22. Matsumura S, Jikko A, Hiranuma H, Deguchi A, Fuchihata H. Effect of X-ray irradiation on proliferation and differentiation of osteoblast. *Calcif Tissue Int* 1996; 59 : 307-8.
  23. Dare A, Hachisu R, Yamaguchi A, Yokose S, Yoshiki S, Okano T. Effects of ionizing radiation on proliferation and differentiation of osteoblast-like cells. *J Dent Res* 1997; 76 : 658-64.
  24. Dudziak ME, Saadeh PB, Mehrara BJ, Steinbrech DS, Greenwald JA, Gittes GK, et al. The effects of ionizing radiation on osteoblast-like cells in vitro. *Plast Reconstr Surg* 2000; 106 : 1949-61.
  25. Nicoletti G, de Giovanni C, Landuzzi L, Simone G, Rocchi P, Nanni P, et al. Induction of myogenic differentiation in human rhabdomyosarcoma cells by ionizing radiation, N,N-dimethylformamide and their combination. *Br J Cancer* 1992; 65 : 519-22.
  26. Lara PC, Russell NS, Smolders IJ, Bartelink H, Begg AC, Coco-Martin JM. Radiation-induced differentiation of human skin fibroblasts: Relationship with cell survival and collagen production. *Int J Radiat Biol* 1996; 70 : 683-92.
  27. Schwenke K, Peterson HP, von Wangenheim KH, Feinendegen LE. Radiation-enhanced differentiation of erythroid progenitor cells and its relation to reproductive cell death. *Int J Radiat Biol* 1996; 69 : 309-17.
  28. Lian JB, Coutts M, Canalis E. Studies of hormonal regulation of osteocalcin synthesis in cultured fetal rat calvariae. *J Biol Chem* 1985; 260 : 8706-10.
  29. Pirce PA, Baukol SA. 1, 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> increases synthesis of the vitamin K-dependent bone protein by osteosarcoma cells. *J Biol Chem* 1980; 255 : 11160-3.