

MC3T3-E1 조골세포주의 osteonectin과 bone sialoprotein mRNA 발현에 미치는 방사선의 영향

전북대학교 치과대학 구강악안면방사선학교실 및 구강생체과학연구소
*경희대학교 치과대학 구강악안면방사선학교실
하쌍용 · 강기현 · 이상래* · 권기정 · 고광준

Effects of irradiation on the mRNA expression of osteonectin and bone sialoprotein in MC3T3-E1 osteoblastic cell line

Ssang-Yong Ha, Ki-Hyun Kang, Sang-Rae Lee*, Ki-Jeong Kwon, 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, especially on the osteonectin and bone sialoprotein.

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 Cs-137 irradiator. After specimens were harvested, total RNA was extracted on the 3rd, 7th, 14th, 21st day after irradiation. The total RNA was reverse-transcribed and the resulting cDNAs were subjected to amplification by PCR with a pair of primers.

Results : The irradiated cells showed a dose-dependent increase in osteonectin mRNA expression when compared with the unirradiated control group. The irradiated cells showed no difference in bone sialoprotein mRNA expression when compared with the unirradiated control group. In accordance with the duration of culture period after irradiation, the level of osteonectin mRNA expression showed no difference, but it increased a little at the 21st day in the 4 and 8 Gy exposure groups. In the case of bone sialoprotein, however, the level of mRNA expression increased significantly at the 3rd and 7th day after irradiation, but it showed no difference at the 14th and 21st day when compared with the control group.

Conclusion : These results showed that each single dose of 0.5, 1, 4 and 8 Gy influenced the mRNA expression of osteonectin and bone sialoprotein at the calcification stage of osteoblastic cells, suggesting that single dose of irradiation affected the osteoblastic bone formation at the cell level. (*Korean J Oral Maxillofac Radiol* 2004; 34 : 99-106)

KEY WORDS : MC3T3-E1 Osteoblastic Cell Line; Radiation; Osteonectin; Bone Sialoprotein

서 론

골은 다양한 세포와 풍부한 세포외기질로 구성되는데, 유기질 중 95%는 제 I 형 교원질이며 5%는 비교원성 단백질이다.¹ 골의 형성과 흡수는 정상적인 골의 구조 및 인체의

칼슘 항상성을 유지하는데 기본이 되는 과정이며, 또한 골의 항상성 유지는 조골세포와 파골세포의 상호작용에 의해 이루어지는데, 조골세포는 다양하게 분화하는 간엽세포로부터 골세포로 분화하고, 파골세포는 단핵세포로부터 형성된 조혈전구세포에서 유래된다.

간엽세포로부터 일련의 분화과정을 거친 조골세포는 골을 형성하기까지 증식, 세포외기질 형성 및 석회화 과정의 3가지 단계를 거쳐 성숙된다.² 이와 같은 골형성 과정은 복잡한 생물학적 과정에 의하여 이루어지며, 골과 관련된 여

접수일: 2004년 3월 2일; 심사일: 2004년 3월 3일; 채택일: 2004년 4월 22일
Correspondence to: Kwang-Joon Koh
Department of Oral and Maxillofacial Radiology, School of Dentistry, 634-18, Keum-Am Dong, Duk-Jin Gu, Chon-Ju, Chonbuk, 561-712, South Korea
Tel) 82-63-250-2023, Fax) 82-63-250-2081
E-mai) radkoh@chonbuk.ac.kr

러 유전자의 발현에 의하여 조절된다. 골형성 과정의 초기에 교원질이 침착되어 세포외기질을 형성한 후 비교원성 단백질을 침착시키고 수산화인회석으로 석회화된다. 이 과정에 관여하는 유전자발현 단백질은 세포의 β -glycerophosphate를 분리하는 alkaline phosphatase, 조골세포 및 기질세포로 칼슘이온을 유입시키는 amexin V, 석회화를 기시하는 bone sialoprotein (BSP), 교원질을 교차결합시키는 procollagen lysyl hydroxylase-2 (PLOD-2), 결정형성을 조절시키는 osteonectin (ON), osteocalcin (OC), osteopontin (OP) 등이 있다.

ON은 칼슘결합 기질세포성 당단백질로서 세포와 세포외기질과의 상호작용을 조절하는데, 이 유전자는 성장기의 골, 치아, 배아의 조골세포, 조상아세포, 연골주위 섬유아세포 및 분화기의 연골세포 등에서 고농도로 발현된다. 또한 이는 조직의 재형성, 창상치유, 형태발생, 세포분열, 세포이동 및 혈관형성 시에 세포와 기질 간 상호작용을 조절한다. ON 유전자는 Termine 등³이 처음으로 소의 골에서 추출하였으며, Rochet 등⁴은 인간의 정상 골화세포와 골육종세포에서 ON 유전자의 발현을 보고하였고, Rolf 등⁵은 ON 유전자가 결핍된 종양세포가 빠르게 성장한다고 보고하였다.

한편, BSP는 인결합 당단백질로서 다글루타민산 아미노산서열(sequence)에 의해 수산화인회석에 결합할 수 있으며, Arg-Gly-Asp (RGD) 아미노산서열에 의해 세포부착을 중재할 수 있는 단백질로서,⁶ 이 유전자의 발현은 기본적으로 석회화 결합조직에 제한적으로 발현한다. BSP 유전자는 골, 상아질, 백악질의 초기 석회화에 중요한 역할을 하며, BSP 유전자의 발현은 골, 치아 및 백악질 형성의 초기에 높게 나타나고 세포외기질에 축적되며 수산화인회석 결정의 형성을 유해화한다. Hultenby⁷와 Ingram⁸은 대부분의 골세포에서 발현하는 BSP 유전자는 골 관련 종양에서도 발현되고 골 전이의 발병기전에도 영향을 미칠 수 있으므로, BSP 유전자 발현의 조절은 조골세포의 분화, 골기질의 석회화 및 종양의 전이에 영향을 줄 수 있다고 보고하였다.

지금까지 방사선이 인체에 미치는 분자생물학적 연구가

진행되어 왔으나 방사선에 의한 세포의 손상 인지 기전은 명확히 밝혀지지 않았다. 단지 방사선을 인체에 조사하면 방사선이 물과 반응하여 유리기를 생성하고, 이 유리기는 세포막의 지질이나 핵산에 손상을 유발하여 세포가 이를 인지함으로써, 방사선에 의해 유도된 신호전달이 개시되는 것으로 추정하고 있다. Gal 등⁹은 2 Gy 이하와 6 Gy 이상의 방사선량에서 조골세포의 손상 정도를 비교하였으며, Aitasalo¹⁰는 10 Gy의 방사선량에서 치밀골의 골세포 수의 감소와 조골세포의 손상을 보고한 바 있다. Matsumura 등¹¹은 조골세포주에 방사선조사 후 ON 유전자의 발현에는 변화가 없었다고 보고하였으며, 조 등¹²은 조골세포에 8 Gy 이하의 방사선조사 후 OC 유전자의 발현량이 선량의존적으로 증가되었고, OP 유전자의 발현량은 선량의존적으로 감소되었다고 하였다.

그러나 현재까지 방사선이 조골세포의 ON 유전자와 BSP 유전자의 발현에 미치는 영향에 대한 연구는 매우 드물다. 따라서 본 연구에서는 생쥐 두개관 조골세포주 MC3T3-E1을 이용하여 방사선이 조골세포의 석회화와 연관된 ON 유전자 및 BSP 유전자의 발현에 미치는 영향을 구명하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 세포배양 및 방사선조사

본 실험에 사용된 세포는 생쥐 두개관 조골세포주 MC3T3-E1으로서 (Fig. 1), 세포배양은 10% fetal bovine serum (FBS)이 포함된 alpha-minimum essential medium (α -MEM) 배지에서 행해졌다. 이들 세포는 10 mM β -glycerophosphate와 50 μ g/ml ascorbic acid를 첨가하여 37°C에서 배양하였고, 3일 간격으로 배양 배지를 교환하였다. 100 Φ 조직배양 접시에 5×10^5 cells이 되게 접종하여 24시간 배양한 후, Cs-137 방사선조사기를 사용하여 실온에서 5.38 Gy/min의 선량률로 0.5, 1, 4, 8 Gy를 단회조사하고, 방

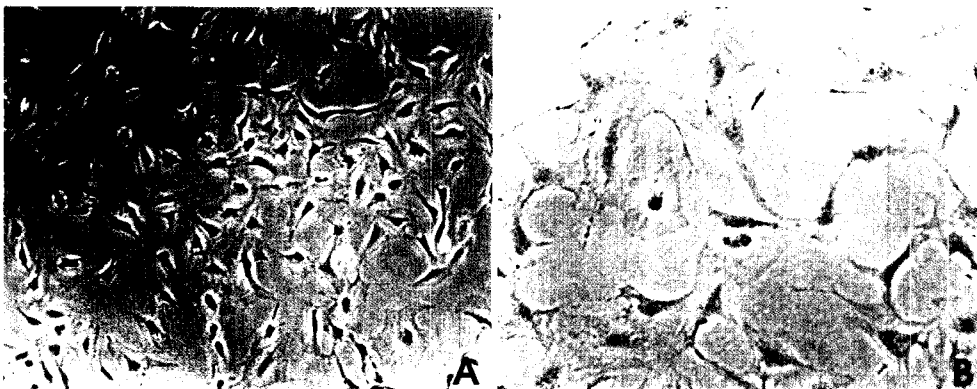


Fig. 1. Microphotographs show MC3T3-E1 osteoblastic cells; A ($\times 40$), B ($\times 100$).

Table 1. The rate of the mRNA expression of osteonectin and bone sialoprotein immediately after irradiation in MC3T3-E1 cells

Radiation dose (Gy)	Bone protein	
	ON	BSP
Unirradiated control	100	100
0.5 Gy	108 ^a	102
1 Gy	110	98
4 Gy	120	103
8 Gy	123	101

a : percent to the unirradiated control

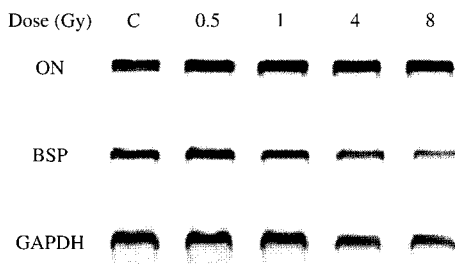


Fig. 2. The bands show the amount of mRNA expression of osteonectin and bone sialoprotein immediately after irradiation in MC3T3-E1 cells.

사선조사 후 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 µl 첨가하여 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 µg, SuperScript II RT (Invitrogen, USA) 200U, 0.5 µg oligo dT, 0.5 mM dNTP를 첨가하여 42°C에서 90분간 반응시킨 후 70°C에서 10분간 최종 반응시켰다.

Table 2. The rate of the mRNA expression of osteonectin (ON) and bone sialoprotein (BSP) in accordance with the duration of culture period in MC3T3-E1 cells

Bone protein	Duration of culture period				
	D0	D3	D7	D14	D21
ON	100	90 ^a	132	224	79
BSP	100	93	81	104	96

a : percent to the day 0 control

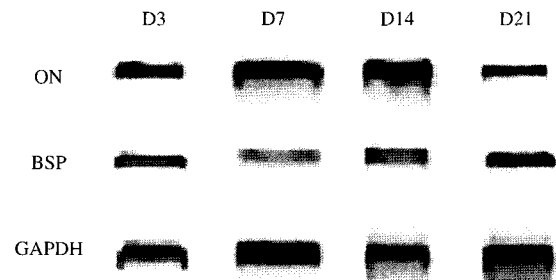


Fig. 3. The bands show osteonectin (ON) and bone sialoprotein (BSP) mRNA amplified by RT-PCR at various culture period in MC3T3-E1 cells.

Table 3. The rate of the mRNA expression of osteonectin in accordance with the duration of culture period after irradiation in MC3T3-E1 cells

Radiation dose (Gy)	Duration of culture period				
	D0	D3	D7	D14	D21
0.5 Gy	100	93 ^a	104	93	100
1 Gy	100	89	106	100	102
4 Gy	100	96	106	99	118
8 Gy	100	97	106	105	116

D0 : the day immediately after irradiation

a : percent to the D0 control

Total RNA는 역전사되고, 결과물인 cDNA는 시발체 (primer)들을 이용한 PCR의 방법으로 증폭시켰다. PCR은 2.5U TaKaRa Ex Taq polymerase, 2 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP를 첨가하여 각각 지정한 조건에 맞게 실시하였다. 증폭의 목적으로 사용된 시발체는 bone sialoprotein sense, 5'-ACGGCGATAGTCCGAA-3'; bone sialoprotein antisense, 5'-GCTGAAACCCGTTTCAGA-3'; osteonectin sense, 5'-GAATTTGAGGACGGTGCA-3'; osteonectin antisense, 5'-TTCTGCTTCTCAGTGAGGA-3'; GAPDH sense, 5'-TGGTGTCTTCACCACCA-3'; GAPDH antisense, 5'-TCAGTGGGCCCTCAGA-3'를 사용하였다.

3. Total RNA 전기영동

DEPC처리된 증류수 34 ml에 agarose 0.4 g을 첨가하여

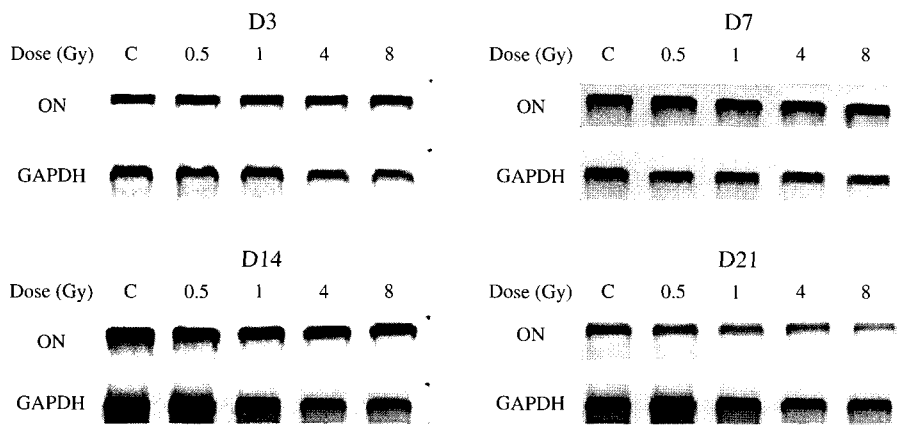


Fig. 4. The bands show amount of mRNA expression of osteonectin in accordance with the duration of culture period after irradiation in MC3T3-E1 cells.

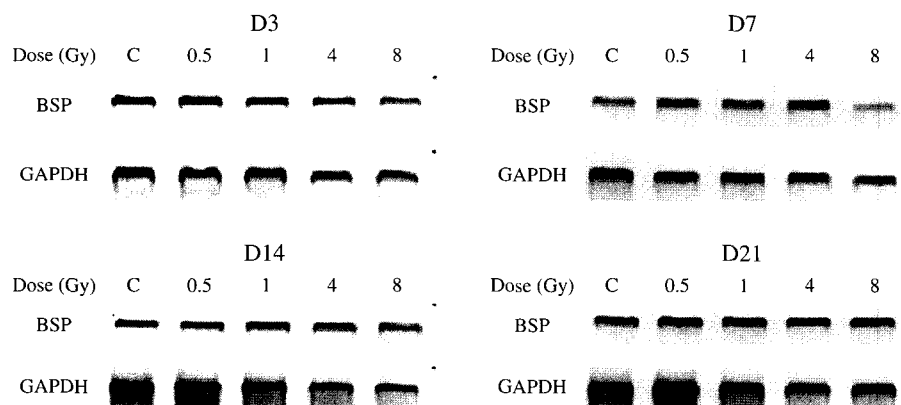


Fig. 5. The bands show amount of mRNA expression of bone sialoprotein in accordance with the duration of culture period after irradiation in MC3T3-E1 cells.

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, gel 홈에 loading하여 1×MOPS buffer상에 100 V로 1시간 전 개시킨 후 LAS-1000 (Fuji film)으로 mRNA band를 관찰하였다.

결 과

1. 방사선조사선량에 따른 골 단백질 유전자의 발현량

MC3T3-E1 세포주에서 ON 유전자의 발현량은 대조군에 비하여 선량의존적으로 완만하게 증가하였다. 한편 BSP 유전자의 발현량은 대조군에 비하여 0.5, 1, 4, 8 Gy 모든 선량군에서 차이가 없었다(Table 1, Fig. 2).

2. 배양기간에 따른 조골세포주의 골단백질 유전자의 발현량

MC3T3-E1 세포주에서 ON 유전자의 발현량은 배양 7일

Table 4. The rate of the mRNA expression of bone sialoprotein in accordance with the duration of culture period after irradiation in MC3T3-E1 cells

Radiation dose (Gy)	Duration of culture period				
	D0	D3	D7	D14	D21
0.5 Gy	100	107 ^a	115	90	96
1 Gy	100	115	115	103	103
4 Gy	100	116	124	97	108
8 Gy	100	116	119	108	116

a : percent to the D0 control

째까지는 완만하게 증가하였으며, 배양 14일째에 최대치에 이른 다음 배양 21일째에는 급격히 감소하였다. 또한, BSP 유전자의 발현량은 시간 경과에 따라 전반적으로 다소 감소하는 경향을 보였다(Table 2, Fig. 3).

3. 방사선조사 후 배양기간에 따른 osteonectin 유전자의 발현량

MC3T3-E1 세포주에 방사선조사 후 배양기간에 따라 ON 유전자 발현량의 차이를 관찰한 결과, 시간이 경과함에 따라 방사선조사에 의한 ON 유전자의 발현량은 대조군에 비

하여 0.5, 1 Gy 선량에서는 배양 3일째에 다소 감소하였으나 그 이후에는 방사선조사 직후와 차이가 없었다. 또한, 4 Gy와 8 Gy의 선량에서는 배양 21일째에 방사선조사 직후에 비해 이의 발현량이 다소 증가하는 양상을 나타내었다 (Table 3, Fig. 4).

4. 방사선조사 후 배양기간에 따른 bone sialoprotein 유전자의 발현량

MC3T3-E1 세포주에 방사선조사 후 배양기간에 따라 BSP 유전자의 발현량은 배양 후 3일째와 7일째에는 증가하는 경향을 보였으나, 초기 배양시기인 3일째와 7일째에 비교하여 14일째와 21일째에는 이의 발현량이 감소하는 경향을 보였다 (Table 4, Fig. 5).

고 찰

방사선에 의해 조직이 손상되면 대식세포나 단핵세포 및 혈소판 등이 활성화되고, 활성화된 이들 세포로부터 여러 가지 세포활성물질 (cytokine)이나 성장인자들이 분비되어 국소적인 염증반응을 유도하며, 염증과정에서 분비된 세포활성물질 및 성장인자들이 세포를 자극하면 세포들이 세포외기질의 생성을 촉진하게 되고 동시에 세포외기질의 분해는 감소하게 된다.¹³ 방사선에 의한 정상조직의 염증 및 변성과정은 그 형태학적인 요인, 병리학적 소견, 임상적인 경과 등이 비교적 잘 알려져 있으나 분자생물학적인 기전은 아직까지 명확히 밝혀져 있지 않다. 그러나 최근 급속히 발전하고 있는 분자생물학적 기법을 이용하여 방사선조사 후 발현되는 분자생물학적인 변화에 대한 지식의 축적은 기존의 방사선생물학의 지식 및 가설을 더욱 명확하게 이해 및 구명할 수 있게 하였다.

골의 발생 및 분화시에는 수많은 유전자가 발현되며, 이때 발현되는 유전자는 세포내와 세포외의 기원 모두와 관련된 신호에 의해 골의 발생 및 분화 과정을 조절한다.¹⁴ 이러한 유전자에는 Cbfa1과 OC와 같은 초기 및 말기에 발현하는 유전자, bone morphogenetic proteins (BMPs)와 tumor growth factors- β (TGF- β)와 같은 성장인자 등이 있으며, 골 발생에 중요한 역할을 하는 다수의 유전자가 있다. 본 연구에서는 골 발생 및 석회화 과정에 중요한 역할을 하는 ON 유전자와 BSP 유전자를 대상으로 하였다.

ON은 비교원성 성분으로서 세포외기질과 세포 상호작용을 조절하는 부착 억제 당단백질로 알려져 있으며, 성장인자 활동성의 조절기능과 세포주기 억제 기능이 있다.^{15,16} 또한, ON은 세포외기질에 상주하는 제 I, III, V형 교원질 및 제 IV형 교원질, vitronectin, laminin-I (LN I) 등의 많은 단백질과 결합할 수 있다. 기저막내의 ON은 칼슘 및 수산화인

회석과 높은 결합 친화성을 보이지만 조직의 석회화 보다는 재형성에 관여하는 것으로 알려져 있다.¹⁷

Rochet 등⁴은 인간의 정상 골화 세포군과 골육종 세포주군에서 ON 유전자의 발현량이 유사하게 관찰되었다고 보고하였다. Rolf 등⁵은 ON 유전자가 결핍된 종양세포에서는 빠른 성장이 있었고, 교원질과 LN I의 생성 및 조직화도 변화되었으며 대식세포의 침윤이 감소되었음을 보고하였다. 종양세포에서 ON 유전자의 발현 양상은 시험관내 및 생체내 실험에서 다양하게 관찰되었는데, 이는 종양이 서로 다른 다양한 단계의 발암성 경로를 통해 성장하는데 있어 ON 유전자가 조직에 특이적인 역할을 한 것으로 사료된다.

BSP 유전자는 무기질 결정 형성을 조절할 수 있는 골석회화와 분화의 대표적인 표지유전자로 여겨져 왔다.⁶ BSP는 골의 총 비교원성 단백질 중에서 15%를 차지하고 있으며, 골석회화 및 재형성과 관련이 있는 것으로 알려져 있다.¹⁸ 또한 이는 골에 매우 특이적인 단백질로써 RGD의 세포부착 아미노산서열을 가지고 있으며, vitronectin 수용체를 통하여 파골세포가 골기질에 부착되는 것과 관련되어 있어 골 석회화 및 골 흡수의 초기과정에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.¹⁹

Hultenby⁷와 Ingram⁸은 BSP 유전자가 대부분의 골세포에서 발현되며 석회화된 골기질에서 가장 높은 발현량을 보이는 부위는 새롭게 골이 합성되거나 재형성되는 부위라고 보고하였다. BSP 유전자 발현은 골격 외에서도 발견되었는데, Bianco 등²⁰은 태반 영양세포 (trophoblast)에서, Chen 등²¹은 혈소판에서 발견되었다고 하였다. 또한 Bellahcene²²은 BSP가 내피세포의 부착과 화학주성이동 (chemotactic migration)을 증대하며, 혈관형성을 촉진하고, 죽상경화증 (atherosclerosis)의 기시에 중요한 요소라고 보고하였다.

세포외기질의 성분과 세포의 상호 부착은 세포분열과 이동에 필수적이다. 이와 같은 기질과 세포의 부착은 이질이량체성 (heterodimeric) 부착수용체의 수많은 integrin family에 의해서 증대된다. Bellahcene 등²²은 대부분 integrin에 대한 일반적인 인지아미노산서열인 RGD를 포함하는 BSP는 내피세포 내의 $\alpha_v\beta_3$ 와 결합하고 이 세포의 이동을 증대한다고 보고하였다. 또한 Bellahcene 등²²은 다른 integrin $\alpha_v\beta_3$ 는 BSP와 결합하지 않는데, 이는 BSP와 $\alpha_v\beta_3$ 사이의 상호작용에 어느 정도 특이성이 존재하기 때문이라고 주장하였다. Ross 등²³은 시험관내 실험에서 BSP는 발현량에 의존하여 골흡수를 촉진하고 골 변성에도 관여한다고 보고하였으며, Oldberg 등²⁴은 골육종 세포주에 대한 연구에서 glucocorticoid 호르몬이 BSP 유전자의 발현량을 증가시킨다고 하였다. 또한 Chen²¹과 Cowles²⁵ 등은 BSP가 수산화인회석과 매우 높은 친화성을 보이며, 수산화인회석의 유해화를 기시하는 기능이 있음을 보고하였다. 따라서 BSP는 골의 석회화 과정과 관련되는 것으로 추정할 수 있고 BSP가 골

형성 및 골흡수 모두와 관련되어 있는지, 혹은 단지 이중 하나만이 생체내에서 관련되어 있는지는 아직 분명하지 않다. Hipskind 등²⁶은 BSP 유전자 결핍 생쥐는 태생 6주에 골격의 이상이 관찰되었다고 하였다. Woitge 등²⁷은 대사성 및 악성 골 질환을 보이는 환자에서 BSP 유전자 발현량의 증가가 관찰되어 BSP 유전자가 골 재형성시의 표지유전자로 이용될 수 있다고 보고하였다. 이와 같이 종양 세포에서 BSP 유전자 발현량의 증가는 암종이 골조직으로 전이할 위험성이 증가한다는 것¹⁷과 관련이 있으며, 이는 BSP에 의해 혈관형성이 증가되고 종양세포의 이동과 석회화가 촉진되기 때문인 것으로 알려져 있다. Bellahcene 등²⁸은 BSP 유전자의 발현량은 질환의 심한 정도와 관련된다고 보고하였다. 즉 유방암 환자의 추적검사에서 골전이 비율은 BSP 유전자의 발현을 보이지 않는 종양에서는 7%, BSP 유전자의 발현을 보이는 종양에서는 22%로 높게 나타났다고 하였다. Withold 등²⁹은 골전이를 보이는 종양환자에서 전이를 보이지 않는 종양 환자에서보다 혈청 BSP의 양이 더 많았다고 보고하였으며, Yang 등³⁰은 부갑상선호르몬이 배아 조골세포의 BSP 유전자의 발현량을 2-4배 증가시켰다고 각각 보고한 바 있다. 또한 Lekic 등³¹은 bisphosphonate 투여 후 치주인대 세포의 BSP는 골화를 촉진하고 치주인대 강직을 유도한다고 하였다.

본 연구에서는 정상 MC3T3-E1 세포주를 대상으로 세포 배양 후 3, 7, 14, 21일째 ON 유전자와 BSP 유전자의 발현량을 비교하였다. ON 유전자의 발현량은 배양 3일, 7일 후 완만하게 증가하였으며, 배양 후 14일째 최대치에 이른 다음 배양 21일째에는 급격히 감소하였고, BSP 유전자의 발현량은 대조군에 비해 전반적으로 감소하였으나 배양 14일째는 약간 증가하였다.

Yamamoto 등³²은 glucocorticoid 호르몬인 dexamethasone으로 처리된 배양에서 BSP 유전자의 발현을 배양 후 3일째부터 관찰할 수 있었다고 하였으며, Zur Nieden 등³³은 생쥐 배아 줄기세포가 석회화 조골세포로 분화하기까지 BSP 유전자의 발현량은 배양 4주째 발현이 관찰되었고, ON 유전자는 2주째 초기에 관찰되기 시작하여 3주째는 대조값의 3, 4배로 발현량이 증가되었다고 하였다. Cowles 등²⁵은 쥐 두개골의 생체내 실험에서 ON 유전자와 BSP 유전자의 발현은 배양 17일째 관찰되었으며, BSP 유전자는 21일째 최대 발현량을 보였다고 하였다. 또한 Choi 등³⁴은 MC3T3-E1 조골세포 분화 시의 골 단백질 발현에 관한 연구에서 분화기(4-10일), 골기질형성 및 성숙기(10-16일) 그리고 성장기(16-30일)시 골 단백질의 발현 양상이 시간에 따라 조절됨을 보고하였는데, ON 유전자의 발현은 16일 경에 최대값을 보였다고 하였다. 본 연구에서도 선행들의 연구결과와 유사한 결과를 보였다.

방사선조사에 의한 세포손상과 재생과정에 관한 연구는

대부분 신호전달기전, 세포고사(apoptosis) 및 cytokines과의 연관성을 밝힌 것들이다. 방사선에 노출된 세포는 DNA 회복 유전자에 의하여 영향을 받거나 손상정도가 심한 경우 세포사멸 경로를 활성화 시켜서 세포사멸에 이르게 된다.³⁵ 이러한 과정을 거쳐 발현된 대부분의 유전자는 신호전달, 복제, 전사, 해독, 세포주기 정지, 증식 및 혈관형성에 영향을 주며, 방사선에 의한 조기 유전자 발현의 산물은 TNF, basic fibroblast growth factor, IL-1, 그리고 TGF- β 등의 이차반응 유전자를 발현시켜 각종 성장인자, cytokine을 분비시키고, 결국 손상된 DNA 회복, 세포주기 교란, 세포사멸 또는 세포사멸을 유도한다.³⁶

일반적으로 방사선에 의하여 유도된 유전자의 발현은 서로 다른 기원과 조직에서 유래한 세포주에 따라 다양하게 나타나는데, 이는 세포의 종류에 따라 방사선감수성이 다르기 때문이다.¹ 지금까지 시험관내 또는 생체내 연구에서 방사선조사가 ON 유전자와 BSP 유전자의 발현에 미치는 영향에 대하여 종양세포를 이용한 연구가 있었으나 정상 조골세포주를 이용한 연구는 드물다.

본 연구는 MC3T3-E1 세포주에 0.5, 1, 4, 8 Gy의 방사선량을 조사한 후 3, 7, 14, 21일째 ON 유전자와 BSP 유전자의 발현량을 조사함으로써, 방사선조사가 ON 유전자와 BSP 유전자에 미치는 영향을 구명하고자 하였다. Gal 등⁹은 방사선조사선량에 따라 조골세포주의 회복 정도와 손상의 정도에는 분명한 차이를 보이는데, 2 Gy 이하의 낮은 선량에서는 DNA의 아치사 손상이 대부분 회복되는 것으로 보고하였고, 6 Gy 이상에서는 상당한 세포주의 퇴화와 치사를 보인다고 하였다. Aitasalo¹⁰는 10 Gy 조사선량에서 치밀골의 골세포 수가 감소되고 조골세포가 손상됨을 보고하였다. Matsumura 등¹¹은 MC3T3-E1 세포에 10 Gy의 방사선을 조사한 후 ON 유전자의 발현량은 대조군과 비교하여 변화가 없었다고 보고하였다. 본 연구에서도 방사선조사 후 세포배양 기간에 따른 ON 유전자의 발현량의 차이는 없었으나, 4 Gy와 8 Gy의 선량에서 배양 21일째에 다소 증가하였다. 한편 방사선조사 후 배양 3일째 BSP 유전자의 발현량은 대조군과 차이가 없어 방사선에 대한 영향은 미약한 것으로 사료된다.

본 연구는 방사선조사 후 배양 3, 7, 14, 21일째에 ON 유전자와 BSP 유전자의 발현량을 조사하였으며, 향후 분화시기가 보다 더 세분화되고 세포배양기간을 더 연장하여야 할 것으로 사료된다. 또한 조골작용에 관여하는 유전자 발현 인자들에 대한 방사선의 영향에 대해서도 지속적인 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Liu W, Toyosawa S, Furuichi T, Kanatani N, Yoshida C, Liu Y, et al.

- Overexpression of Cbfa1 in osteoblasts inhibits osteoblast maturation and causes osteopenia with multiple fractures. *J Cell Biol* 2001; 155 : 157-66.
2. Yanaka N, Imai Y, Kawai E, Akatsuka H, Wakimoto K, Nogusa Y. Novel membrane protein containing glycerophosphodiester phosphodiesterase motif is transiently expressed during osteoblast differentiation. *J Biol Chem* 2003 Aug 20 [Manuscript ahead of print].
 3. Termine JD, Kleinman HK, Whitson SW, Conn KM, McGarvey ML, Martin GR. Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen. *Cell* 1981; 26 : 99-105.
 4. Rochet N, Loubat A, Laugier JP, Hofman P, Bouler JM, Daculsi G, et al. Modification of gene expression induced in human osteogenic and osteosarcoma cells by culture on a biphasic calcium phosphate bone substitute. *Bone* 2003; 32 : 602-10.
 5. Rolf AB, Puolakkainen P, Graves DC, Workman G, Lubkin SR, Sage EH. Enhanced growth of tumors in SPARC null mice is associated with changes in the ECM. *J Clin Invest* 2003; 111 : 487-95.
 6. Shimizu-Sasaki E, Yamazaki M, Furuyama S, Sugiyama H, Sodek J, Ogata Y. Identification of a novel response element in the rat bone sialoprotein (BSP) gene promoter that mediates constitutive and fibroblast growth factor 2-induced expression of BSP. *J Biol Chem* 2001; 276 : 5459-66.
 7. Hultenby K, Reinholdt FP, Norgard M, Oldberg A, Wendel M, Heinegard D. Distribution and synthesis of bone sialoprotein in metaphyseal bone of young rats show a distinctly different pattern from that of osteopontin. *Eur J Cell Biol* 1994; 63 : 230-9.
 8. Ingram RT, Clarke BL, Fisher LW, Fitzpatrick LA. Distribution of noncollagenous proteins in the matrix of adult human bone. *J Bone Miner Res* 1993; 8 : 1019-29.
 9. 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.
 10. Aitasalo K. Bone tissue response to irradiation and treatment model of mandibular irradiation injury. An experimental and clinical study. *Acta Otolaryngol* 1986; 428 : 1-54.
 11. 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.
 12. 조수범, 이상래, 고광준. MC3T3-E1 조골세포주의 osteocalcin과 osteopontin mRNA 발현에 미치는 방사선의 영향. *대한구강악안면 방사선학회지* 2003; 33 : 179-85.
 13. Burns FJ, Chen S, Xu G, Wu F, Tang MS. The action of a dietary retinoid on gene expression and cancer induction in electron-irradiated rat skin. *J Radiat Res* 2002; 43 : 229-32.
 14. Lee KS, Kim HJ, Li QL, Chi XZ, Ueta C, Komori T, et al. Runx2 is a common target of transforming growth factor beta1 and bone morphogenetic protein 2, and cooperation between Runx2 and Smad5 induces osteoblast-specific gene expression in the pluripotent mesenchymal precursor cell line C2C12. *Mol Cell Biol* 2000; 20 : 8783-92.
 15. Gilmour DT, Lyon GJ, Carlton MB, Sanes JR, Cunningham JM, Anderson JR, et al. Mice deficient for the secreted glycoprotein SPARC/osteonectin/BM40 develop normally but show severe age-onset cataract formation and disruption of the lens. *EMBO J* 1998; 17 : 1860-70.
 16. Brekken RA, Puolakkainen P, Graves DC, Workman G, Lubkin SR, Sage EH. Enhanced growth of tumors in SPARC null mice is associated with changes in the ECM. *J Clin Invest* 2003; 111 : 487-95.
 17. Kim YW, Park YK, Lee J, Ko SW, Yang MH. Expression of osteopontin and osteonectin in breast cancer. *J Korean Med Sci* 1998; 13 : 652-7.
 18. Wuttke M, Muller S, Nitsche DP, Paulsson M, Hanisch FG, Maurer P. Structural characterization of human recombinant and bone-derived bone sialoprotein. Functional implications for cell attachment and hydroxyapatite binding. *J Biol Chem* 2001; 276 : 36839-48.
 19. Dong C, Goldschmidt-Clermont PJ. Bone sialoprotein and the paradox of angiogenesis versus atherosclerosis. *Circ Res* 2000; 86 : 827-8.
 20. Bianco P, Fisher LW, Young MF, Termine JD, Robey PG. Expression of bone sialoprotein (BSP) in developing human tissues. *Calcif Tissue Int* 1991; 49 : 421-6.
 21. Chen, Y, Bal BS, Gorski JP. Expression of bone sialoprotein (BSP) in developing human tissues. *J Biol Chem* 1992; 267 : 24871-8.
 22. Bellahcene A, Bonjean K, Fohr B, Fedarko NS, Robey FA, Young MF, et al. Bone sialoprotein mediates human endothelial cell attachment and migration and promotes angiogenesis. *Circ Res* 2000; 86 : 885-91.
 23. Ross FP, Chappel J, Alvarez JL, Sander D, Butler WT, Farach-Carson MC, et al. Interactions between the bone matrix proteins osteopontin and bone sialoprotein and the osteoclast integrin alpha v beta 3 potentiate bone resorption. *J Biol Chem* 1993; 268 : 9901-7.
 24. Oldberg A, Jirskog-Hed B, Axelsson S, Heinegard D. Regulation of bone sialoprotein mRNA by steroid hormones. *J Biol Chem* 1989; 109 : 3183-6.
 25. Cowles EA, DeRome ME, Pastizzo G, Brailey LL, Gronowicz GA. Mineralization and the expression of matrix proteins during in vivo bone development. *Calcif Tissue Int* 1998; 62 : 74-82.
 26. Hipskind RA, Halleux C, Susa M, Evans D, Bilbe G. Multiple signaling pathways are implicated in LIF induction of c-fos in human osteoblast-like cells. *Bone* 1995; 17 : 558.
 27. Woitge HW, Pecherstorfer M, Horn E, Keck AV, Diel IJ, Bayer P, et al. Serum bone sialoprotein as a marker of tumour burden and neoplastic bone involvement and as a prognostic factor in multiple myeloma. *Br J Cancer* 2001; 84 : 344-51.
 28. Bellahcene A, Menard S, Bufalino R, Moreau L, Castronovo V. Expression of bone sialoprotein in primary human breast cancer is associated with poor survival. *Int J Cancer* 1996; 69 : 350-3.
 29. Withold W, Armbruster FP, Karmatschek M, Reinauer H. Bone sialoprotein in serum of patients with malignant bone diseases. *Clin Chem* 1997; 43 : 85-91.
 30. Yang R, Gerstenfeld LC. Signal transduction pathways mediating parathyroid hormone stimulation of bone sialoprotein gene expression in osteoblasts. *J Biol Chem* 1996; 271 : 29839-46.
 31. Lekic P, Sodek J, McCulloch CA. Relationship of cellular proliferation to expression of osteopontin and bone sialoprotein in regenerating rat periodontium. *Cell Tissue Res* 1996; 285 : 491-500.
 32. Yamamoto N, Furuya K, Hanada K. Progressive development of the osteoblast phenotype during differentiation of osteoprogenitor cells derived from fetal rat calvaria: model for in vitro bone formation. *Biol Pharm Bull* 2002; 25 : 509-15.
 33. Zur Nieden NI, Kempka G, Ahr HJ. Differentiation. In vitro differentiation of embryonic stem cells into mineralized osteoblasts. *Differentiation* 2003; 71 : 18-27.
 34. 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.
 35. Chan JY, Chen LK, Chang JF, Ting HM, Goy C, Chen JL, et al.

Differential gene expression in a DNA double-strand-break repair mutant XRS-5 defective in Ku80: analysis by cDNA microarray. *J Radiat Res* 2001; 42 : 371-85.

36. Hallahan DE, Haimovitz-Friedman A, Kufe DW, Fuks Z, Weichselbaum RR. The role of cytokines in radiation oncology. *Important Adv Oncol* 1993; 9 : 71-80.