

백서 두개관세포에서 Ipriflavone이 골조직 개조에 미치는 영향

이용승^a · 김영준^b · 이기현^c · 황현식^d

본 연구는 ipriflavone (isopropoxyisoflavone)의 투여가 백서 두개관세포의 증식과 골조직 개조에 미치는 영향을 알아보려 시도되었다. 태령 20-21일째의 백서 두개관세포를 분리 배양한 후, 10^{-9} M부터 10^{-5} M까지 농도의 ipriflavone을 투여하고 1일째와 3일째에 MTT 분석을 시행하여 흡광도를 평가한 결과, 모든 농도에서 백서 두개관세포의 증식을 보이지 않았다. 한편 골조직 개조에 미치는 영향을 알아보기 위하여 14일째에 alizarin red 염색을 시행하여, 형성된 석회화 결절 면적을 측정하였을 때, 10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M 농도를 투여한 경우 석회화 결절 형성이 유의하게 증가하였다. 골아세포의 분화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 ipriflavone을 투여하고 7일째와 14일째에 추출한 RNA를 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR)을 시켜 bone sialoprotein (BSP), type I collagen (COL I), osteocalcin (OCN) 유전자 발현을 관찰한 결과 BSP와 COL I 유전자는 배양 7일째 높은 발현을 보였고, OCN 유전자는 배양 14일째 높은 발현을 보였다. 이상의 연구결과 ipriflavone이 백서 두개관세포에서 석회화를 촉진시키고 골아세포의 분화에 관여하는 BSP, COL I 및 OCN 유전자 발현을 증가시켜 골조직의 개조를 빠르게 할 수 있음을 시사하였다.

(주요 단어: ipriflavone, 두개관세포, 골조직 개조)

서 론

효율적인 교정치료를 위해서는 치아에 힘을 가하는 물리적, 기계적 측면 뿐 아니라 교정력에 의한 치아주위조직의 반응인 생물학적 반응기전에 대한 고려가 필요하다. 치아에 교정력이 가해지면 교정력에

의해 새로운 위치로 움직이는 반면 교정력이 제거될 경우 새로운 위치에서의 재고정이 나타나는데 이러한 치아이동이나 재고정은 치아주위조직의 세포수준의 생물학적 반응인 골개조에 의해 이루어지고 있다.¹⁻³

그동안 여러 선행들에 의해 치아이동 시 또는 보정기간 중 일어나는 생물학적 반응기전에 대한 세포 및 세포작용과 관련된 연구가 진행되어 치아이동 시나, 보정기간 동안 치아주위조직의 생물학적 반응기전에 대한 많은 이해가 이루어졌다. 즉 압박측에서는 파골세포에 의한 골흡수가, 인장측에서는 골아세포에 의한 골침착이 일어나 교정력을 받는 일정한 방향으로 골개조가 발생하여 치아가 움직이게 된다.^{4,5} 이러한 교정적 치아이동 시 나타나는 치아주위조직의 반응

^a 대학원생, 전남대학교 치과대학 교정학교실.

^b 부교수, 전남대학교 치의학연구소, 치과대학 치주과학교실.

^c 조교수, ^d 교수, 전남대학교 치의학연구소, 치과대학 교정학교실.

교신저자: 황현식

광주광역시 동구 학동 8번지

전남대학교 치과대학 교정학교실 / 062-220-5486

hhwang@chonnam.ac.kr

원고접수일: 2004년 6월 15일 / 원고최종수정일: 2004년 11월

26일 / 원고채택일: 2004년 11월 28일

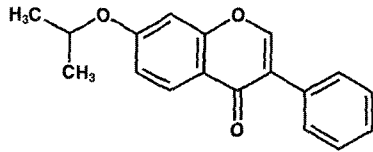


Fig 1. Chemical structure of ipriflavone (7-isopropoxy-3-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one).

은 일반적으로 치근막과 치조골의 충혈과 동통이 수반되는 백혈구와 임파구로부터 유리되는 염증성 물질에 대한 비감염성 염증현상으로⁶ 교정력에 의한 치아주위조직의 반응을 임의로 조절하여 교정치료 시에 적용하려는 시도들이 이루어지고 있다. 즉 교정치료 시 치아이동을 조절할 목적으로 프로스타글란딘을 억제하는 약물이나 골다공증에 사용되는 비스포스포네이트 등의 약물에 대한 연구들이 시도되었다.⁷⁻¹⁵ 이들 프로스타글란딘에 영향을 미치는 약물이나 골대사 질환에 사용되는 약물들은 주로 파골세포의 골흡수를 억제하는 기전에 영향을 주어 치아이동을 억제하는 것으로 알려져 있다.

한편 ipriflavone은 콩과식물, 과일, 야채 등의 식물물에 존재하는 혼한 식물 대사물의 하나인 flavonoid 중에서 estrogen 성질을 가지고 있는 soy isoflavone diazein으로부터 합성된 isoflavone의 일종으로 골다공증과 골대사 질환치환에 사용되고 있는 약물이다.¹⁶⁻¹⁸ Ipriflavone은 파골세포의 기능을 억제하고 골아세포의 활성을 향진시켜 골개조에 효과적이며 부작용이 상대적으로 적어 인체에서도 장기간 투여할 수 있는 비교적 안전한 약물로 알려져 있다.^{16,19}

골대사 연구에는 연구목적에 맞게 유전적으로 변형된 MC3T3-E1, stromal cell, osteosarcoma cell line, 백서 두개관세포 등이 사용될 수 있으며,²⁰⁻²³ 특히 McCarthy 등²⁴은 백서 두개관세포가 정상적인 골대사 연구에 유용하다고 보고하였다. 이에 본 연구는 ipriflavone이 백서 두개관세포의 증식과 석회화 결절 형성 및 골형성 유전자 발현에 미치는 효과를 관찰하여 ipriflavone이 골조직 개조에 미치는 영향을 알아보기 위하여 시도하였다.

연구재료 및 방법

연구재료

본 연구에 사용된 ipriflavone (7-isopropoxy-3-

phenyl-4H-1-benzopyran-4-one)은 국제약품공업주식회사에서 건조분말 형태로 제공 받았으며 구조식은 C₁₈H₁₆O₃로 분자량은 280.33이다 (Fig 1).

Ipriflavone은 dimethyl sulfoxide (DMSO) 용액에 녹여서 최종농도가 각각 10⁻⁹ M, 10⁻⁸ M, 10⁻⁷ M, 10⁻⁶ M, 10⁻⁵ M이 되도록 준비하여 실험에 사용하였다.

연구방법

McCarthy 등²⁴의 방법을 변형한 순차소화효소기법을 이용하여 백서 태자의 두개관세포를 분리 배양하였다. 태령 20-21일째의 백서 태자에서 두개관세포를 채취하여 수술용 가위로 세절하고 0.2% collagenase (GibcoBRL, U.S.A.)를 함유한 bone cell buffer (1 M NaCl, 0.3 M HEPES, 0.125 M CaCl₂, 0.5 M Mannitol, 0.1 M K₂HPO₄; pH 7.4) 용액 1.5 ml를 넣어 교반하면서 15분간 소화시켰다. 3회의 소화과정 중에 얻어진 세포현탁액은 버리고 네번째와 다섯번째의 세포현탁액을 원심분리하여 세포를 수집하였다. 수집된 세포들은 75mm flask에 10% fetal bovine serum (FBS; GibcoBRL, U.S.A.)과 1% antibiotic-antimycotic solution (GibcoBRL, U.S.A.)이 첨가된 BGJb 배지 (GibcoBRL, U.S.A.)에서 배양하였다. 배양 시 95%의 공기과 5%의 CO₂를 계속 공급하면서 습도는 100%, 온도는 37°C로 유지하였고, 배양액은 3일 간격으로 교환하였다. 본 실험에서는 계대배양 첫번째와 두번째의 세포를 이용하였다.

세포증식 평가

백서 두개관세포의 증식에 대한 ipriflavone의 영향을 알아보기 위하여 MTT 분석을 시행하여 흡광도를 평가하였다. 배양한 세포를 96-well plate에 10,000 cell/well로 분주 배양한 후 세포가 70% 밀생에 도달되었을 때 2% FBS를 첨가한 BGJb 배지로 교환하고, 이 배지에 DMSO 용액에 녹여서 만든 10⁻⁹ M부터 10⁻⁵ M 농도의 ipriflavone을 투여한 경우와 DMSO 용액만 투여한 경우를 관찰하였다. 배양 1일째와 3일째에 CellTiter 96 AQueous[®] Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega, U.S.A.) kit를 이용하여 MTT 분석을 시행하여 ELISA plate reader (Microplate Manager[®], BioRad, U.S.A.)로 파장 490 nm에서 흡광도를 측정하고, DMSO 용액만 투여한 경우의 흡광도에 대한 백분율로 표시하였다.

PCR primers					
Primer	Expected base pairs		Sequence		
GAPDH-sense (+)	418		5'-CACCATGGAGAAGGCCGGGG-3'		
GAPDH-antisense (-)			GACGGACACATTGGGGGTAG		
COL I-sense (+)	250		TCTCCACTCTTCTAGGTTCT		
COL I-antisense (-)			TTGGGTCATTTCCACATGC		
BSP-sense (+)	1068		AACAATCCGTGCCACTCA		
BSP-antisense (-)			GGAGGGGGCTTCACTGAT		
OCN-sense (+)	198		TCTGACAAACCTTCATGTCC		
OCN-antisense (-)			AAATAGTGATACCGTAGATGCG		

PCR programs					
GAPDH	94°C	94°C	60°C	72°C	72°C
	1 min	1 min	2 min	1 min	10 min
			25 Cycles		
COL I	94°C	94°C	55°C	72°C	72°C
	1 min	1 min	2 min	1 min	10 min
			30 Cycles		
BSP OCN	94°C	94°C	50°C	72°C	72°C
	1 min	1 min	2 min	1 min	10 min
			30 Cycles		

Fig 2. Amplification primer sets and conditions used in polymerase chain reaction. GAPDH indicates glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; COL I, type 1 collagen; BSP, bone sialoprotein; and OCN, osteocalcin.

석회화 결절 형성을 평가

석회화 결절 형성에 대한 ipriflavone의 영향을 알아보기 위하여 배양된 백서 두개관세포를 12-well plate에 100,000 cell/well이 되도록 분주한 후 10% FBS, 1% antibiotic-antimycotic solution, 50 µg/ml ascorbic acid, 10 mM sodium β-glycerophosphate를 첨가한 BGJb 배지에 ipriflavone을 10⁻⁹ M부터 10⁻⁵ M 농도로 투여한 경우와 DMSO 용액만 투여한 경우로 나누어 관찰하였다. 배지는 3일 간격으로 교환하였으며 배양 14일째에 alizarin red (Sigma, U.S.A.)로 염색하여 Image Analyzer (Media Cybernetics, U.S.A.)에서 석회화 결절면적을 측정하였으며, 전체 배양용기 면적에 대한 석회화 결절면적의 백분율로 표시하였다.

유전자 발현 측정

Ipriflavone이 유전자 발현에 미치는 영향을 알아보기 위하여 100 mm 크기의 배양접시에 배양된 백서 두개관세포를 분주하고 10% FBS가 첨가된 BGJb 배지에 ipriflavone을 투여한 경우와 DMSO 용액만 투여한 경우를 관찰하였다. 배양 7일째와 14일째에 각각 배양액을 제거하고 2.0 ml의 TRIzol (Promega, U.S.A.)을 첨가하여 2개의 1.8 ml 시험관에 각각 1 ml 씩 수집하였다. 200 µl의 chloroform을 첨가하여 RNA를 용해시키고 12,000 rpm에서 10분간 원심분리 후 상층액을 취하여 500 µl isopropyl alcohol을 첨가하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 Tris-EDTA buffer 40 µl에 녹인 후 -70°C 냉동고에 보관하였다. RNA 5 µg을 Superscript II (GibcoBRL,

Table 1. Effect of ipriflavone on the proliferation of rat calvarial cells

	Cell proliferation (%)	
	1 day	3 day
Control	100.00 (0.00)	100.00 (0.00)
10 ⁻⁹ M	91.00 (6.11)	102.00 (4.04)
10 ⁻⁸ M	95.00 (2.33)	98.00 (6.23)
10 ⁻⁷ M	91.00 (6.51)	97.00 (3.76)
10 ⁻⁶ M	99.00 (5.51)	100.00 (4.58)
10 ⁻⁵ M	94.00 (4.16)	101.00 (5.49)

Values are median (standard error). Statistical significance of differences were not observed between each concentration of ipriflavone and control (n = 3).

U.S.A.)를 이용하여 70℃에서 10분, 42℃에서 70분, 37℃에서 15분 동안 역전사 중합효소 연쇄반응 (Reverse transcription-polymerase chain reaction; RT-PCR)을 유도하여 cDNA를 합성하였다.

백서의 cDNA 염기서열에 의거하여 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), bone sialoprotein (BSP), type I collagen (COL I), osteocalcin (OCN) primer를 제작한 후, PCR 완충용액 (GibcoBRL, U.S.A.) 5 µl, 1.5 mM MgCl₂ 3 µl, 10 mM dNTP mix 1 µl, 각각의 primer 2.5 µl, 5 unit Taq polymerase 0.2 µl, cDNA 2 µl와 3차 증류수를 넣어 50 µl가 되게 하여 Thermal Cycler (Perkin Elmer, U.S.A.)를 이용하여 증폭하였다 (Fig 2).

증폭된 PCR 산물들을 1.5% agarose gel에서 전기영동을 하여 얻은 유전자 영상을 Gel Image Analysis System (QualityOne®, BioRad, U.S.A)에서 house keeping gene인 GAPDH의 발현을 기준으로 각 primer의 유전자 발현정도를 평가하였다.

통계처리

백서 두개관세포에서 ipriflavone이 세포증식과 석회화 결절 형성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 ipriflavone을 투여한 경우와 DMSO 용액만 투여한 경우 각각의 흡광도와 석회화 결절 면적을 측정하여 중앙값과 표준오차를 구하고 Mann-Whitney 검정을 시행하여 이를 비교하였으며, 통계분석은 SPSS (Statistical Package for the Social Science) 10.0 통

Table 2. Effect of ipriflavone on the formation of mineralized nodules in rat calvarial cells at 14 day cultures

	Mineralized nodule (% area)
Control	9.70 (1.17)
10 ⁻⁹ M	12.25 (3.14)
10 ⁻⁸ M	20.47 (3.27) *
10 ⁻⁷ M	24.99 (2.53) *
10 ⁻⁶ M	22.29 (5.93) *
10 ⁻⁵ M	11.63 (1.32)

Values are median (standard error). In concentrations of 10⁻⁸ M, 10⁻⁷ M and 10⁻⁶ M ipriflavone, statistical significance of differences were observed between each concentration of ipriflavone and control (* p < 0.05, n = 3).

계프로그램을 이용하였다.

연구성적

세포증식에 미치는 효과

백서 두개관세포의 증식에 대한 ipriflavone의 영향을 알아보기 위하여 MTT 분석을 시행하여 흡광도를 측정된 결과, ipriflavone을 투여한 모든 농도에서 DMSO 용액만 투여한 경우에 비하여 유의한 차이를 보이지 않았다 (Table 1).

석회화 결절 형성에 미치는 효과

Ipriflavone이 백서 두개관세포의 석회화 결절 형성에 미치는 효과를 알아보기 위하여 배양 14일째에 alizarin red 염색을 시행한 결과, 형성된 결절은 원형 또는 타원형으로 세포가 밀집되어 있었고 결절 중앙 부위는 진한 적색으로, 주위는 연한 적색으로 염색되었다. 형성된 석회화 결절의 면적을 전체 배양용기 면적에 대한 백분율로 환산한 결과 ipriflavone을 10⁻⁹ M과 10⁻⁵ M 농도로 투여한 경우에 각각 12.25%, 11.63%로 나타나 DMSO 용액만 투여한 경우의 9.7%와 유사한 결과를 보였으나, 10⁻⁸ M, 10⁻⁷ M, 10⁻⁶ M 농도에서는 각각 20.47%, 24.99%, 22.29%로 나타나 DMSO 용액만 투여한 경우에 비하여 통계적으로 유의하게 높게 나타났다 (Fig 3, Table 2).

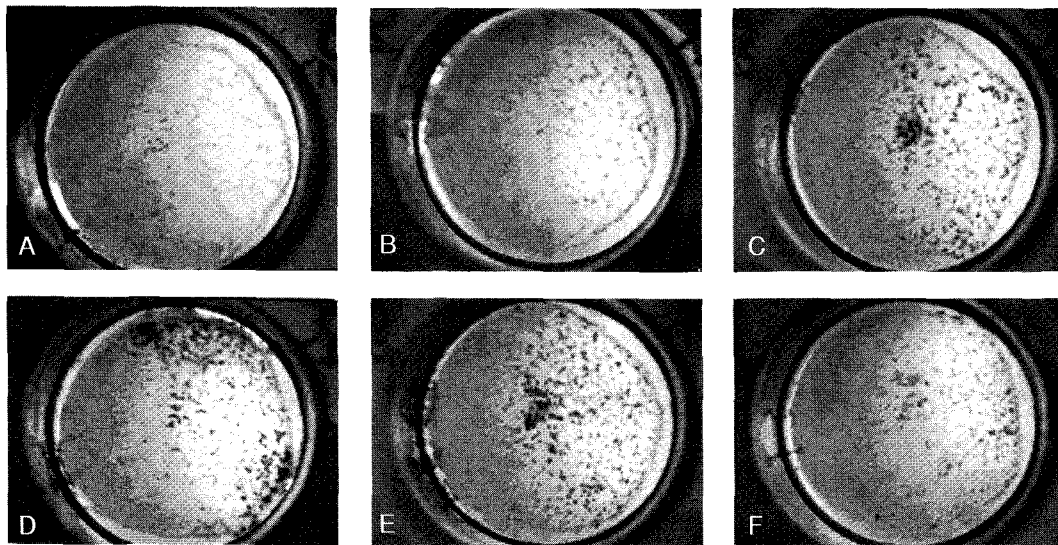


Fig 3. Culture dishes containing alizarin red stained nodules after rat calvarian cells were cultured for 14 days in the control (A) and ipriflavone groups (B~F). Many larger mineralized nodules are seen in the ipriflavone groups (C~E). A, Control; B, 10^{-9} M; C, 10^{-8} M; D, 10^{-7} M; E, 10^{-6} M; F, 10^{-5} M.

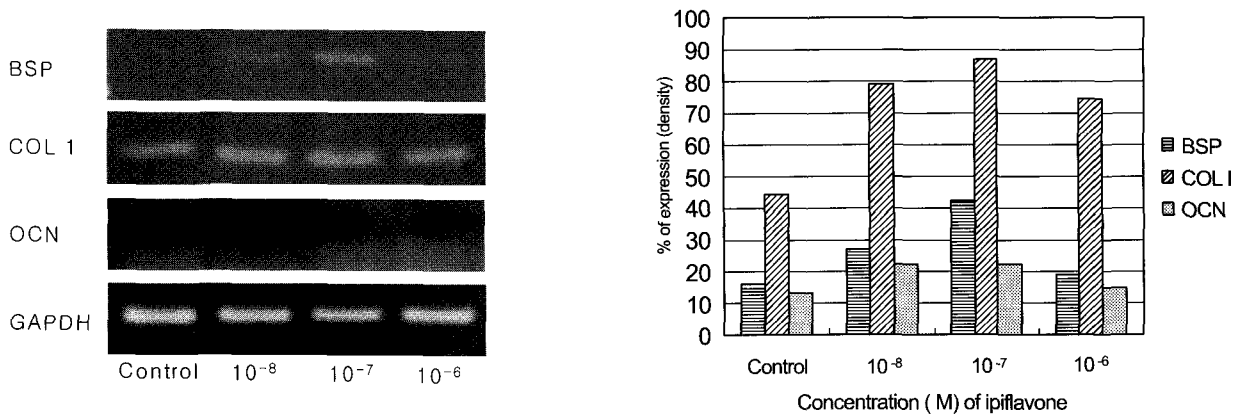


Fig 4. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis of bone sialoprotein (BSP), type I collagen (COL I), osteocalcin (OCN), and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) messenger RNA expression in rat calvarial cells after 7 days treatment of ipriflavone. The RT-PCR specific products for BSP, COL I, OCN and GAPDH were analyzed by agarose gel electrophoresis and Gel Image Analysis System.

세포 활성을 나타내는 유전자 발현에 미치는 영향

Ipriflavone이 골아세포의 분화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 ipriflavone을 투여하고 배양 7일째와 14일째에 추출한 RNA를 역전사 중합효소 연쇄반응 (RT-PCR)을 시켜 BSP, COL I, OCN 유전자 발현을

관찰한 결과, ipriflavone을 투여한 경우 BSP 유전자는 배양 7일째에 높은 발현을 보였으나, DMSO 용액만 투여한 경우는 발현을 보이지 않았으며, 배양 14일째에는 DMSO 용액만 투여한 경우에 비해 오히려 낮은 발현을 보였다.

한편 COL I 유전자는 배양 7일째에 DMSO 용액만

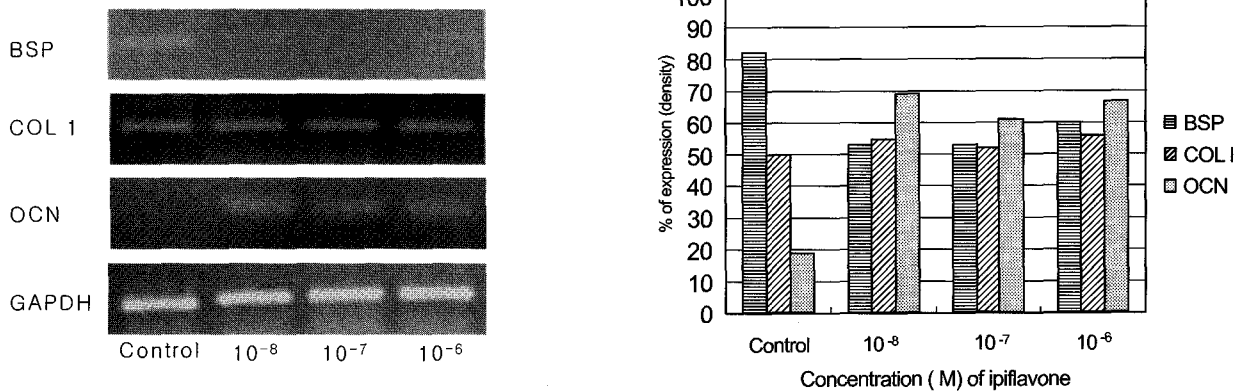


Fig 5. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis of bone sialoprotein (*BSP*), type I collagen (*COL 1*), osteocalcin (*OCN*), and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) messenger RNA expression in rat calvarial cells after 14 days treatment of ipriflavone. The RT-PCR specific products for *BSP*, *COL 1*, *OCN* and *GAPDH* were analyzed by agarose gel electrophoresis and Gel Image Analysis System.

투여한 경우보다 높은 발현을 보였으며, 배양 14일째는 DMSO 용액만 투여한 경우와 비슷한 정도의 발현을 보였다.

OCN 유전자는 배양 7일째에 ipriflavone을 투여한 경우와 DMSO 용액만 투여한 경우 모두 발현을 보이지 않았으며, 배양 14일째에 DMSO 용액만 투여한 경우는 발현을 보이지 않았으나, ipriflavone을 투여한 경우 높은 발현을 보였다 (Fig 4, 5).

총괄 및 고찰

교정치료 동안 고정된 치아의 원하지 않은 이동과 교정치료 후 유지기간 동안에 나타나는 치아의 재발이 교정치료 실패의 주된 요인인 바, 교정치료 후 이동된 치아의 위치를 그대로 유지하여 재발을 최소화하는 것은 교정치료의 중요한 목표의 하나이다.^{1,4,25,26} 치아에 교정력이 가해지면 기계적인 힘에 대한 생물학적인 반응에 의해 치조골 압박부의 골흡수와 인장부의 골형성과 같은 일련의 골개조 과정을 통해 치아가 이동된다.^{2,3} 치아이동 동안 치조골의 흡수로 치주인대강이 넓어지고 치주인대가 변형되어 치아의 동요도가 증가하게 되었다가, 교정력이 제거되면 치주인대강에 골개조가 일어나면서 동요도가 감소된다. 이 기간 동안 주위 조직의 인장력에 의한 재발을 방지하기 위해 기계적인 보정장치^{1,27,28}나, 과잉개선 (overcorrection),⁴ 상치조 주위섬유 절단술,²⁹ 치은돌

기 절제술³⁰ 등이 임상적으로 필요한 경우가 있다. 대부분의 교정환자에서 교정치료 후 재발을 억제하기 위해 장기간의 보정장치 장착이 필요하며 또한 이는 전적으로 환자의 협조에 의존해야 하므로 가능하면 보정기간이 짧아야 한다. 아울러 재발은 치아이동으로 인해 불안정해진 치주조직이 재형성되는 보정기간 초기에 많이 나타나므로 치아이동으로 인해 변형되었던 치주섬유의 재배열과 치조골의 골개조가 빠른 시간 내에 일어날 수 있도록 해야 한다.³¹

치아이동에 관련된 골조직의 개조에 영향을 줄 수 있는 여러 가지 약물을 사용하여 교정치료에 이용하고자 하는 연구가 있었다. Adachi 등⁷이 risedronate를 백서의 구치에 국소투여하여 관찰한 결과 risedronate가 파골세포에 의한 치조골의 흡수를 억제하여 고정원의 보강과 교정치료 후 유지에 도움이 된다고 보고하였다. 그러나 한과 김³²은 비스포스포네이트는 골연화증이 발생할 수 있어 장기간 사용을 주의해야 하며 심한 위장장애, 성장기 치아의 발생지연과 맹출지연 등의 부작용이 있어 임상적인 적용에 주의가 필요하다고 하였다.

한편 1970년 식물에서 추출한 천연 flavonoid에서 합성된 ipriflavone은 폐경기 후 골다공증에 투여하여 골밀도의 증가와 골 교체율의 감소 그리고 골흡수 억제를 통한 치료효과를 보이며 약간의 위장장애가 있을 수 있으나 장기간의 투여에도 비교적 안전한 약물로 보고되고 있다.¹⁶⁻¹⁹ 선학들의 연구에 의하면

ipriflavone은 파골세포의 분화와 성장에 작용하여 골 흡수를 억제하는 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다.³³⁻³⁶ 한편 ipriflavone은 미분화 간엽세포의 분화를 촉진시키며 석회화를 향상시키는 등 골아세포에도 영향을 미친다고 보고되고 있다.³⁷⁻³⁹ 또한 Martini 등⁴⁰은 백서의 하악골에 골결손을 형성한 후 ipriflavone의 투여 시 골형성이 촉진되며 특히 인접한 치주인대와 가까운 부위에서 새로운 골이 생성되었음을 보고하였다. 또한 치과영역에서 치조골 주위에 형성된 골결손부의 재생과정에 대한 ipriflavone의 효과⁴⁰와 치주낭 내로의 ipriflavone의 적용방법에 대한 연구⁴¹ 등이 보고되었다. 그러나 ipriflavone이 백서 두개관세포의 증식과 골조직의 개조에 미치는 영향에 대한 세포수준이나 분자생물학적인 연구는 전무한 실정인바 본 연구는 백서 두개관세포에 ipriflavone을 적용하여 세포증식과 석회화 결절 형성 및 BSP, COL I, OCN 유전자의 발현을 살펴보았다.

골대사 연구에서는 MC3T3-E1, stromal cell, osteosarcoma cell line 등의 세포가 사용되는데²⁰⁻²³ 이런 세포들은 연구목적에 맞게 유전적으로 변형된 세포로 정상적인 세포의 골대사 반응과 다소 차이가 있을 수 있어, 본 연구에서는 정상적인 골대사 연구에 유용하다고 보고된 백서 두개관세포²⁴를 분리 배양하여 사용하였다.

Ipriflavone에 의한 백서 두개관세포의 증식여부를 MTT 분석을 시행하여 흡광도로 평가하였다. MTT 분석법은 살아있는 세포의 증식여부나 세포독성을 측정할 때 많이 사용되고 있는 방법으로 세포의 수를 직접 세지는 않지만 대사적으로 활성을 가지고 있는 세포내 미토콘드리아의 활성을 측정하여 세포의 생존여부를 정량적으로 측정하는 방법이다. 살아있는 세포는 미토콘드리아의 탈수소 효소작용에 의하여 노란색의 수용성 MTT tetrazolium을 자주색을 띠는 비수용성의 MTT formazan으로 환원시키는데, MTT formazan의 흡광도는 490 nm에서 파장이 최대가 되는 특성을 가지고 있기 때문에 이 파장에서 측정된 흡광도는 대사적으로 활발한 세포의 농도를 반영하게 된다. 따라서 측정된 흡광도를 통해 세포 수의 증식이나 감소를 간접적으로 알 수 있게 된다.⁴² 본 연구에서 ipriflavone의 투여가 백서 두개관세포의 증식에 미치는 효과를 알아보기 위하여 10^{-9} M부터 10^{-5} M까지 농도의 ipriflavone을 투여한 경우 모든 농도에서 DMSO 용액만 투여한 경우의 흡광도와 차이가 없는 것으로 나타나 ipriflavone이 백서 두개관세포의

증식에는 영향을 주지 않는 것으로 나타났다. MC3T3-E1 골아세포주를 이용하여 실험한 김의 연구⁴³에서도 사용한 세포의 차이는 있었지만 ipriflavone의 투여에 의한 세포의 증식이나 감소는 관찰되지 않아 본 연구와 유사한 결과를 보였다. 한편 본 실험에 앞선 예비실험에서 ipriflavone 10^{-4} M 농도로 처리한 경우 세포의 초기 부착과 증식이 현저히 감소하여 본 연구에서는 10^{-9} M부터 10^{-5} M까지 농도의 ipriflavone을 사용하였다.

섬유아세포나 간엽세포를 대상으로 석회화 결절 형성을 살펴본 연구에서^{37,44,45} ascorbic acid와 sodium β -glycerophosphate를 사용한 바 백서 두개관세포를 대상으로 한 본 연구에서도 ascorbic acid와 sodium β -glycerophosphate를 투여하여 석회화 결절 형성을 유도하였다. 그리고 Notoya 등^{37,46}이 백서 장골의 골수에서 채취한 간엽세포를 대상으로 한 연구에서 배양 14일 이후부터 석회화 결절이 형성된다고 보고하여 본 연구에서도 배양 14일째에 석회화 결절 형성을 관찰하였다.

배양 14일째에 10^{-9} M과 10^{-5} M 농도의 ipriflavone을 투여한 경우 DMSO 용액만 투여한 경우와 유사한 석회화 결절 형성율을 보였으나, 10^{-8} M부터 10^{-6} M 농도의 ipriflavone을 투여한 경우 DMSO 용액만 투여한 경우에 비해 석회화 결절 형성율이 약 2.5배 증가하였다. 이것은 Shibano 등⁴⁷이 간엽세포에서 ipriflavone이 세포내 Ca^{++} 유리를 증가시켜 유골조직의 석회화를 증진시킨다는 보고와 일치되는 내용이 었다. 그러나 백서 장골의 골수에서 채취한 간엽세포를 대상으로 β -glycerophosphate와 dexamethasone으로 처리한 후 10^{-5} M 농도의 ipriflavone을 투여하여 석회화 결절 형성을 관찰한 Notoya 등³⁷의 연구에서는 배양 21일째에 대조군에 비해 석회화 결절 형성율이 약 4배 증가된다고 보고하여 본 연구의 결과와는 약간 다르게 나왔다. 그러나 본 연구의 배양 14일째의 결과보다 긴 배양 21일째에 관찰한 결과였기 때문에 본 연구의 10^{-5} M 농도의 ipriflavone을 투여한 경우의 결과와는 차이가 있으며 사용된 실험세포와 결절 형성 유도물질도 달라 정확한 비교는 어려웠다. Hagiwara 등²¹은 10^{-5} M 농도의 ipriflavone을 투여한 경우가 대조군이나 10^{-7} M 농도의 ipriflavone을 투여한 경우보다 석회화 결절이 더 많이 형성되었다고 하여 본 연구의 결과와 다소 차이가 있었지만, 본 연구에 비해 관찰기간이 짧고 ipriflavone의 투여 시기와 빈도 등의 차이가 있어 직접적인 비교는 어려웠다. 아

직까지 석회화 결절 형성을 통해 살펴본 골아세포 활성에 가장 유효한 ipriflavone 농도에 대해서는 이견이 있어 이에 대한 더 많은 연구가 필요하리라 사료되었다.

Ipriflavone이 백서 두개관세포의 골조직 개조에 미치는 영향을 알아보기 위하여 세포외기질 형성에 관여하는 COL I, OCN, BSP 유전자 발현을 역전사 중합효소 연쇄반응을 통하여 관찰하였으며, 석회화 결절 형성이 크게 나타난 10^{-8} M부터 10^{-6} M 농도의 ipriflavone을 투여하여 실험을 하였다. 본 실험에 이용된 백서 두개관세포는 주변에 존재하는 성장인자나 싸이토카인(cytokines) 등의 적절한 자극에 의하여 골아세포로 분화된다. Li 등⁴⁸에 의하면 백서 태자 두개관세포는 골형태형성 단백질-7(recombinant human bone morphogenetic protein-7; rh BMP-7) 존재 하에서 배양 8일째 조골세포의 분화 표식자(marker)인 COL I, alkaline phosphatase, BSP의 발현이 증가하며 배양 10일 이후에는 OCN의 증가가 나타나며 골세포의 광물화 과정이 진행된다고 하였다. COL I 유전자는 골아세포가 분비하는 교원성 단백질로서 골 유기질의 주된 구성성분이므로 골형성에 있어 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.⁴⁹ 본 연구결과 COL I 유전자는 ipriflavone 투여 유무에 관계없이 발현되었으며 특히 배양 7일째 DMSO 용액만 투여한 경우보다 유전자 발현이 높게 나타났으나, 배양 14일째는 DMSO 용액만 투여한 경우와 차이를 보이지 않았다. Notoya 등³⁷은 ipriflavone에 의해 형성된 석회화 결절 주위로 collagenous fibrous network가 증가한다고 보고하였는데, 이는 ipriflavone이 골아세포의 교원질을 형성시켜 유사 골조직을 형성시킨 결과라고 하였다. 본 연구에서도 배양 7일째 DMSO 용액만 투여한 경우에 비해 COL I 유전자의 높은 발현을 보였는데, 이는 ipriflavone이 백서 두개관세포에서 골아세포로 분화되는 과정을 촉진시켜 골형성 초기에 관여하는 COL I 유전자 발현을 증가시킨 것으로 사료되었다. 그러나 배양 14일째 COL I 유전자의 발현은 모든 군에서 비슷한 발현을 보였는데, 이는 COL I은 전골아세포에서 골아세포로의 분화 초기에 많이 발현되며 이후 감소한다는 Franceschi⁵⁰의 보고로 보아 ipriflavone이 백서 두개관세포에서 골아세포로의 분화를 자극하는 초기에는 COL I의 발현을 증가시키지만 골의 광물화가 진행되는 시기에는 영향을 주지 않았기 때문으로 생각된다.

BSP와 OCN 유전자는 골아세포가 분비하는 비교

원성 단백질로서 골형성에 중요한 역할을 하는 단백질이다.⁵¹ 특히 BSP 유전자는 골의 석회화 초기에 발현되며 골세포의 유지에 중요한 역할을 하고 또한 hydroxyapatite crystal 침착 시 결정핵 역할을 한다고 알려져 있다.⁵² 본 연구결과 BSP 유전자는 배양 7일째 높은 발현을 보인 반면, 배양 14일째에는 DMSO 용액만 투여한 경우보다 낮은 발현을 보였다. 이는 ipriflavone이 골아세포로의 분화를 촉진하여 BSP 유전자를 빨리 발현시켜 골조직 형성에 영향을 미칠 수 있을 것으로 사료되었다. Cheng 등³⁸의 bone marrow stromal osteoprogenitor cells (BMC)를 대상으로 ipriflavone을 투여한 연구에서 배양 7일째에 BSP의 높은 발현을 보고하였으며, ipriflavone이 osteoprogenitor cell의 분화 과정을 촉진시키고 석회화된 골기질의 침착을 향상시킨다고 보고하여 본 연구의 결과와 유사하였다.

OCN 유전자는 골아세포 뿐만 아니라 골기질에 풍부하게 존재하며 특히 장차 석회화가 될 부위와 성장 중인 골조직에서 많이 발현되며 골의 석회화와 turnover 과정에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.⁵¹ 본 연구에서 OCN 유전자는 배양 7일째에 발현되지 않았으나, 배양 14일째에는 DMSO 용액만 투여한 경우에 비해 높은 발현을 보였는데 이는 OCN 유전자가 골형성 초기에는 발현되지 않고 골이 성숙되는 과정에서 발현된다는 보고⁵³와 일치하였다. 한편 BMC를 대상으로 ipriflavone을 투여하여 실험한 Cheng 등³⁸의 연구에서 배양 7일째 OCN 유전자가 발현되지 않았으나, 백서의 장골 간엽세포를 대상으로 ipriflavone을 투여하고 OCN 유전자의 발현을 radioimmunoassay를 통해 관찰한 Notoya 등⁴⁶의 연구에서는 배양 14일에서 17일 사이에 대조군에 비해 5.4배 증가함을 보고한 바 있어 본 연구의 결과와 유사하였다.

본 연구에서는 ipriflavone에 의한 백서 두개관세포의 분화기전을 직접 규명하지는 않았지만, 실험결과 골아세포로의 분화를 빠르게 하여 골형성과 관련된 유전자 발현과 석회화 결절 형성을 증가시켜 골조직의 개조를 빠르게 할 수 있음을 관찰하였다. 그러므로 ipriflavone을 이용하여 교정치료 후 빠른 골형성을 유도하여 치아의 보정에 도움을 줄 수 있을 것으로 사료된다.

본 연구에서는 백서 두개관세포에서 ipriflavone이 골개조에 미치는 영향을 살펴보았으므로 향후 인간의 치주인대세포나 치조골에서의 ipriflavone의 효과

와 적절한 농도 등에 대한 연구가 필요할 것으로 생각된다. 또한 ipriflavone은 성장호르몬, 비타민 D, 스테로이드 등 실험조건에 따라 다양한 효과가 보고되고 있어^{37,43,46,54} ipriflavone의 작용기전에 대한 더 많은 연구가 필요할 것으로 사료된다. 아울러 교정영역에서 치아이동 시 또는 치아이동 후 보정기간 동안 ipriflavone이 치조골의 재형성과 재발에 미치는 효과에 대한 조직학적, 임상적 연구도 필요할 것으로 생각된다.

결 론

태령 20-21일째의 백서 두개관세포를 분리 배양한 후, ipriflavone이 세포증식에 미치는 영향을 알아보기 위하여 10⁻⁹ M부터 10⁻⁵ M까지 농도의 ipriflavone을 투여하고 1일째와 3일째에 MTT 분석을 시행하여 흡광도를 평가하는 한편, 골조직 개조에 미치는 영향을 알아보기 위하여 14일째에 alizarin red 염색을 시행하여, 형성된 석회화 결절 면적을 측정하였다. 아울러 골아세포의 분화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 ipriflavone을 투여하고 7일째와 14일째에 추출한 RNA를 역전사 중합효소 연쇄반응을 시켜 BSP, COL I, OCN 유전자 발현을 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. Ipriflavone 투여 시 모든 농도에서 백서 두개관세포의 증식을 보이지 않았다.
2. 본 연구에서 사용한 ipriflavone 농도 중 10⁻⁸ M, 10⁻⁷ M, 10⁻⁶ M 농도를 투여한 경우 석회화 결절 형성이 유의하게 증가하였다 (p < 0.05).
3. Ipriflavone을 투여한 경우 BSP와 COL I 유전자는 배양 7일째 높은 발현을 보였다.
4. Ipriflavone을 투여한 경우 OCN 유전자는 배양 14일째 높은 발현을 보였다.

이상의 연구결과 ipriflavone이 백서 두개관세포에서 석회화를 촉진시키고 골아세포의 분화에 관여하는 BSP, COL I 및 OCN 유전자 발현을 증가시켜 골조직의 개조를 빠르게 할 수 있음을 시사하였다.

참 고 문 헌

1. Proffit WR. Retention. In: Proffit WR, Fields HW ed. Contemporary Orthodontics. 3rd ed. St. Louis: Mosby-Year Book; 2000:597-614.
2. Baumrind S. A reconsideration of the propriety of the pressure-

- tension hypothesis. Am J Orthod 1969;55:12-22.
3. Davidovitch Z, Finkelson MD, Steigman S, Shanfeld JL, Montgomery PC, Korostoff E. Electric currents, bone remodeling, and orthodontic tooth movement II. Increase in rate of tooth movement and periodontal cyclic nucleotide levels by combined force and electric current. Am J Orthod 1980;77:33-47.
4. Reitan K. Principles of retention and avoidance of posttreatment relapse. Am J Orthod 1969;55:776-89.
5. Reitan K. Tissue behavior during orthodontic tooth movement. Am J Orthod 1960;46:881-900.
6. Proffit WR. The biological basis of orthodontic therapy. In: Proffit WR, Fields HW ed. Contemporary Orthodontics. 3rd ed. St. Louis: Mosby-Year Book; 2000:296-325.
7. Adachi H, Igarashi K, Mitani H, Shinoda H. Effects of topical administration of a bisphosphonate (Risedronate) on orthodontic tooth movements in rats. J Dent Res 1994;73:1478-84.
8. Seifi M, Eslami B, Saffar AS. The effect of prostaglandin E₂ and calcium gluconate on orthodontic tooth movement and root resorption in rats. Eur J Orthod 2003;25:199-204.
9. Giunta D, Keller J, Nielsen FF, Melsen B. Influence of indomethacin on bone turnover related to orthodontic tooth movement in miniature pigs. Am J Orthod Dentofacial Orthop 1995;108:361-6.
10. Kehoe MJ, Cohen SM, Zarrinnia K, Cowan A. The effect of acetaminophen, ibuprofen, and misoprostol on prostaglandin E₂ synthesis and the degree and rate of orthodontic tooth movement. Angle Orthod 1996;66:339-49.
11. Collins MK, Sinclair PM. The local use of vitamin D to increase the rate of orthodontic tooth movement. Am J Orthod Dentofacial Orthop 1988;94:278-84.
12. Lee W. Experimental study of the effect of prostaglandin administration on tooth movement-with particular emphasis on the relationship to the method of PGE₁ administration. Am J Orthod Dentofacial Orthop 1990;98:231-41.
13. Leiker BJ, Nanda RS, Currier GF, Howes RI, Sinha PK. The effects of exogenous prostaglandins on orthodontic tooth movement in rats. Am J Orthod Dentofacial Orthop 1995;108:380-8.
14. Ashcraft MB, Southard KA, Tolley EA. The effect of corticosteroid-induced osteoporosis on orthodontic tooth movement. Am J Orthod Dentofacial Orthop 1992;102:310-9.
15. Wong A, Reynolds EC, West VC. The effect of acetylsalicylic acid on orthodontic tooth movement in the guinea pig. Am J Orthod Dentofacial Orthop 1992;102:360-5.
16. Agnusdei D, Bufalino L. Efficacy of ipriflavone in established osteoporosis and long-term safety. Calcif Tissue Int 1997;61:S23-7.
17. Kovacs AB. Efficacy of ipriflavone in the prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis. Agents Actions 1994;41:86-7.
18. Reginster JY. Ipriflavone: pharmacological properties and usefulness in postmenopausal osteoporosis. Bone Miner 1993;23:223-32.
19. Gennari C. Ipriflavone: Background. Calcif Tissue Int 1997;61:S3-4.
20. Kakai Y, Kawase T, Nakano T, Mikuni-Takagaki Y, Saito S. Effect of ipriflavone and estrogen on the differentiation and proliferation of osteogenic cells. Calcif Tissue Int 1992;51:S11-5.
21. Hagiwara H, Naruse M, Adachi C, Inoue A, Hiruma Y, Otsuka E, Naruse K, Demura H, Hirose S. Ipriflavone down-regulates endothelin receptor levels during differentiation of rat calvarial osteoblast-like cells. J Biochem 1999;126:168-73.
22. Robey PG, Termine JD. Human bone cells in vitro. Calcif Tissue Int 1985;37:453-60.
23. Majeska RJ, Rodan SB, Rodan GA. Parathyroid hormone-responsive

- clonal cell lines from rat osteosarcoma. *Endocrinology* 1980;107:1494-503.
24. McCarthy TL, Centrella M, Canalis E. Further biochemical and molecular characterization of primary rat parietal bone cell cultures. *J Bone Miner Res* 1988;3:401-8.
 25. Joondeph DR, Riedel RA. Retention and Relapse. In: Graber TM, Vanarsdall RL ed. *Orthodontics: Current Principles and Techniques*. St Louis: Mosby-Year Book 1994;908-50.
 26. Riedel RA. A review of the retention problem. *Am J Orthod* 1960 ;30:179-94.
 27. Zachrisson BU. Clinical experience with direct-bonded orthodontic retainers. *Am J Orthod* 1977;71:440-8.
 28. Zachrisson BU. Bonding in orthodontics. In Graber TM, Vanarsdall RL. ed. *Orthodontics: Current Principles and Techniques*. 2nd ed. St. Louis: Mosby-Year Book 1994;542-626.
 29. Edwards JG. A long-term prospective evaluation of the circumferential supracrestal fiberotomy in alleviating orthodontic relapse. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1988;93:380-7.
 30. Ahrens DG, Shapira Y, Kufnec MM, Stom D. An approach to rotational relapse. *Am J Dentofac Orthod* 1981;80:83-91.
 31. Sharpe W, Reed B, Subtelny JD, Polson A. Orthodontic relapse, apical root resorption, and crestal alveolar bone levels. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1987;91:252-8.
 32. 한정우, 김선현. 약안면 경조직 발육에 미치는 Bisphosphonate의 영향. *구강과학* 2001;13:194-210.
 33. Wong GL, Kocour BA. Differential sensitivity of osteoclasts and osteoblasts suggests that prostaglandin E₁ effects on bone may be mediated primarily through the osteoclasts. *Arch Biochem Biophys* 1983;22:29-35.
 34. Morita I, Sakaguchi K, Kurachi T, Murota S. Ipriflavone inhibits murine osteoclast formation in vitro. *Calcif Tissue Int* 1992;51:S7-10.
 35. Bonucci E, Ballanti P, Martelli A, Mereto E, Brambilla G, Bianco P, Bufalino L. Ipriflavone inhibits osteoclast differentiation in parathyroid transplanted parietal bone of rats. *Calcif Tissue Int* 1992;50:314-9.
 36. Benvenuti S, Petilli M, Frediani U, Tanini A, Fiorelli G, Bianchi S, Bernabei PA, Albanese C, Brandi ML. Binding and bioeffects of ipriflavone on a human preosteoclastic cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;201:1084-9.
 37. Notoya K, Tsukuda R, Yoshida K, Taketomi S. Stimulatory effect of ipriflavone on formation of bone-like tissue in rat bone marrow stromal cell culture. *Calcif Tissue Int* 1992;51:S16-20.
 38. Cheng SL, Zhang SF, Nelson TL, Warlow PM, Civitelli R. Stimulation of human osteoblast differentiation and function by ipriflavone and its metabolites. *Calcif Tissue Int* 1994;55:356-62.
 39. Civitelli R. In vitro and in vivo effects of ipriflavone on bone formation and bone biomechanics. *Calcif Tissue Int* 1997;61:S12-4.
 40. Martini M, Formigli L, Tonelli P, Giannelli M, Amunni F, Naldi D, et al. Effects of ipriflavone on perialveolar bone formation. *Calcif Tissue Int* 1998;63:312-9.
 41. Perugini P, Genta I, Conti B, Modena T, Pavanetto F. Periodontal delivery of ipriflavone: new chitosan/PLGA film delivery system for a lipophilic drug. *Int J Pharm* 2003;252:1-9.
 42. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;65:55-63.
 43. 김대윤. Ipriflavone의 원위 뼈 결손부 재생 효과. 전남대학교 석사학위논문 2003.
 44. Nojima N, Kobayashi M, Shionome M, Takahashi N, Suda T, Hasegawa K. Fibroblastic cells derived from bovine periodontal ligaments have the phenotypes of osteoblasts. *J Periodontol Res* 1990;25:179-85.
 45. Arceo N, Sauk JJ, Moehring J, Foster RA, Somerman MJ. Human periodontal cells initiate mineral-like nodules in vitro. *J Periodontol* 1991;62:499-503.
 46. Notoya K, Yoshida K, Tsukuda R, Taketomi S. Effect of ipriflavone on expression of markers characteristic of the osteoblast phenotype in rat bone marrow stromal cell culture. *J Bone Miner Res* 1994;9:395-400.
 47. Shibano K, Watanabe J, Iwamoto M, Ogawa R, Kanamura S. Culture of stromal cells derived from medullary cavity of human long bone in the presence of 1,25-dihydroxyvitamin D₃, recombinant human bone morphogenetic protein-2, or ipriflavone. *Bone* 1998;22:251-8.
 48. Li WS, Cheifetz S, McCulloch CAG, Sampath K, Sodek J. Effects of osteogenic protein-1 on bone matrix protein expression by fetal rat calvarial cell are differentiation stage specific. *J Cell Physiol* 1996;169: 115-25.
 49. Prockop DJ, Kivirikko KI. Collagens: Molecular biology, diseases, and potentials for therapy. *Annu Rev Biochem* 1995;64:403-34.
 50. Franceschi RT. The developmental control of osteoblast-specific gene expression: Role of specific transcription factors and the extracellular matrix environment. *Crit Rev Oral Biol Med* 1999;10:40-57.
 51. Young MF, Kerr JM, Ibaraki K, Heegaard AM, Robey PG. Structure, expression, and regulation of the major noncollagenous matrix proteins of bone. *Clin Orthop* 1992;281:275-94.
 52. Roach HI. Why does bone matrix contain non-collagenous proteins? The possible roles of osteocalcin, osteonectin, osteopontin and bone sialoprotein in bone mineralisation and resorption. *Cell Biol Int* 1994;18:617-28.
 53. Glowacki J, Rey C, Glimcher MJ, Cox KA, Lian J. A role for osteocalcin in osteoclast differentiation. *J Cell Biochem* 1991;45:292-302.
 54. Notoya K, Yoshida K, Tsukuda R, Taketomi S, Tsuda M. Increase in femoral bone mass by ipriflavone alone and in combination with 1 alpha-hydroxyvitamin D₃ in growing rats with skeletal unloading. *Calcif Tissue Int* 1996;58:88-94.

- ORIGINAL ARTICLE -

Effects of Ipriflavone on bone remodeling in the rat calvarial cell

Yong-Seung Lee, DDS, MSD,^a Young-Jun Kim, DDS, MSD, PhD,^b
Ki-Heon Lee, DDS, MSD, PhD,^c Hyeon-Shik Hwang, DDS, MSD, PhD^d

Ipriflavone (isoproxyisoflavone), a synthetic derivative from soy isoflavone diazein, has been shown to inhibit bone resorption and perhaps stimulate bone formation. This study was performed to examine the effects of ipriflavone on the proliferation and bone remodeling in rat calvarial cells *in vitro*. The rat calvarial cells were isolated from fetus aged 20 to 21 days and cultured in BGJb media. The graded concentration of ipriflavone (10^{-9} - 10^{-5} M) was administered into cultured cells. When the cell proliferation was estimated through the measurement of MTT assay, there was no increase in cellular proliferation of the rat calvarial cell at any ipriflavone concentration. The cellular activity was evaluated through the formation of mineralized nodules stained by alizarin red. The formation of mineralized nodules significantly increased at concentrations of 10^{-8} M, 10^{-7} M and 10^{-6} M ipriflavone. Reverse transcription-polymerase chain reaction analyses (RT-PCR) were done at 7 and 14 days after culture to detect the expression of Bone Sialoprotein (BSP), Type I Collagen (COL I) and Osteocalcin (OCN). As a result, the expressions of BSP and COL I increased on the 7th day of culture and the expression of OCN increased on the 14th day of culture. These results indicate that ipriflavone facilitates the bone remodeling process by promoting rat calvarial cell differentiation and stimulating mineralization through increased expression of extracellular matrix genes, such as BSP, COL I and OCN.

Korean J Orthod 2005;35(4):275-85

※ **Key words:** Ipriflavone, Calvarial cell, Bone remodeling

^a Graduate Student, Department of Orthodontics, School of Dentistry, Chonnam National University

^b Associate Professor, Department of Periodontology, School of Dentistry, Dental Science Research Institute, Chonnam National University

^c Assistant Professor, ^d Professor, Department of Orthodontics, School of Dentistry, Dental Science Research Institute, Chonnam National University

Reprint requests: **Hyeon-Shik Hwang**

Department of Orthodontics, Chonnam National University Hospital, Hak-Dong 8, Dong-Gu, Gwangju 501-757, Korea
+82 62 220 5486

hhwang@chonnam.ac.kr

Received June 15, 2004; Last Revision November 26, 2004; Accepted November 28, 2004