

# 방사선조사가 MC3T3-E1 골모세포주의 TGF-β<sub>1</sub> mRNA 발현과 석회화결절 형성에 미치는 영향

전북대학교 치의학전문대학원 구강악안면방사선학교실 및 구강생체과학연구소  
송주섭 · 김경아 · 고광준

## Effects of irradiation on TGF-β<sub>1</sub> mRNA expression and calcific nodule formation in MC3T3-E1 osteoblastic cell line

Ju-Seop Song, Kyoung-A Kim, Kwang-Joon Koh

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

### ABSTRACT

**Purpose** : To investigate the effects of irradiation on transforming growth factor β<sub>1</sub> (TGF-β<sub>1</sub>) mRNA expression and calcific nodule formation in MC3T3-E1 osteoblastic cell line.

**Materials and Methods** : Cells were cultured in alpha-minimum essential medium (α-MEM) supplemented with 10% fetal bovine serum and antibiotics. When the cells reached the level of 70-80% confluence, culture media were changed with α-MEM supplemented with 10% FBS, 5 mM β-glycerol phosphate, and 50 μg/mL ascorbic acid. Thereafter the cells were irradiated with a single dose of 2, 4, 6, 8 Gy at a dose rate of 1.5 Gy/min. The expression pattern of TGF-β<sub>1</sub> mRNA, calcium content and calcific nodule formation were examined on day 3, 7, 14, 21, 28, respectively, after the irradiation.

**Results** : The amount of TGF-β<sub>1</sub> mRNA expression decreased significantly on day 7 after irradiation of 4, 6, 8 Gy. It also decreased on day 14 after irradiation of 6, 8 Gy, and decreased on day 21 after irradiation of 8 Gy. The amount of calcium deposition decreased significantly on day 7 after irradiation of 4, 8 Gy (P<0.01) and showed a decreased tendency on day 14, 21 after irradiation of 4, 6, 8 Gy. The number of calcific nodules was decreased on day 7 after irradiation of 4, 8 Gy.

**Conclusion** : Irradiation with a single dose of 4, 6, 8 Gy influences negatively the bone formation at the molecular level by affecting the TGF-β<sub>1</sub> mRNA expression that was associated with proliferation and the production of extra-cellular matrix in MC3T3-E1 osteoblastic cell line. (*Korean J Oral Maxillofac Radiol* 2008; 38 : 125-32)

**KEY WORDS** : TGF-β<sub>1</sub>; MC3T3-E1 osteoblastic cell line; Irradiation

### 서 론

골은 석회화된 결합조직으로 무기질과 유기질로 구성되어 있으며, 유기질은 주로 I형 교원질과 비교원성 단백질로 구성되어 있다. 골조직의 형성, 침착은 중간엽 전구체 세포로부터 분화된 골모세포에 의해 이루어지며, 일생을 통하여 골의 흡수와 생성은 평형을 이루며 지속적으로 재

형성 (remodeling)이 이루어지고 있다.

일반적으로 방사선은 골 성장과 치유의 장애요인으로 알려져 있는데, 방사선조사는 골생성과 관련되는 cytokine의 발현양상에 변화를 유발시키고 골모세포의 분화과정에도 변화를 야기시켜 성공적인 골치유를 저해한다고 알려져 있다.<sup>1,2</sup>

Transforming growth factor-β (TGF-β)는 인간의 골에서 가장 풍부하게 존재하는 성장인자로서 세포의 증식과 분화, 운동 그리고 세포의 자멸사를 조절하는 기능이 있다. 이 TGF-β 중 혈소판으로부터 정제하여 얻은 형태를 TGF-β<sub>1</sub>이라 하는데, 이는 골모세포의 증식과 분화를 조절하며

접수일 (2008년 7월 25일), 수정일 (2008년 8월 20일), 채택일 (2008년 8월 25일)  
Correspondence to : Prof. Kwang-Joon Koh  
Department of Oral and Maxillofacial Radiology, School of Dentistry, 634-18, Keumam-Dong, Dukjin-Gu, Jeonju, Jeonbuk 561-712, Korea  
Tel) 82-63-250-2023, Fax) 82-63-250-2081, E-mail) kkj1512@chonbuk.ac.kr

세포외기질의 합성과 침착, 분해에 관여하는 단백질이다. TGF- $\beta_1$ 은 골의 미세환경에서 국소적으로 생성되며 alkaline phosphatase (ALPase)나 I형 교원질의 발현에도 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. TGF- $\beta_1$ 은 골흡수가 활발하게 진행되는 골에서 골모세포와 파골세포 모두에 영향을 미치기 때문에 골환경의 유지에 있어 가장 중요한 인자 중 하나이다. 이 TGF- $\beta_1$ 은 골의 재형성에 중요한 역할을 수행하지만 TGF- $\beta_1$ 은 골모세포의 최종적인 분화과정을 억제함으로써 골모세포의 분화에 대한 강력한 조절인자로서의 역할도 하는 것으로 알려져 있다.<sup>3</sup>

일반적으로 MC3T3-E1 골모세포에 방사선을 조사하면 세포의 증식은 선량의존적으로 감소하나 세포의 분화가 촉진되고 석회화도 증가하며, TGF- $\beta_1$ 의 생성은 선량의존적으로 감소한다고 보고되고 있다.<sup>3,4</sup> TGF- $\beta_1$ 은 많은 연구에서 골형성을 촉진한다고 보고되고 있지만 분화 후기단계에 접어들면서 석회화과정을 억제하거나 차단시킨다는 보고도 있다. 그러나 그 정확한 역할에 대해서는 많은 논란이 있다.<sup>2,4-7</sup> 지금까지 TGF- $\beta_1$ 의 정확한 효과를 구명하려는 여러 연구들이 있어 왔음에도 불구하고 현실적으로 미세 실험조건이 달라지게 되면 그 결과 또한 달라져서 TGF- $\beta_1$ 의 정확한 효과를 구명하기 어려웠다.

본 연구에서는 뚜렷한 분화과정을 보이는 MC3T3-E1 골모세포의 증식과 분화, 석회화 및 각 분화과정에서의 cytokine 생성에 대한 방사선의 영향을 알아보려고 하였으며, 특히 이때 다양한 선량의 방사선이 TGF- $\beta_1$ 의 발현, 세포내 칼슘침착량 및 석회화결절 형성에 미치는 영향을 구명해 보고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 연구재료

이 연구에 이용된 세포는 생쥐 두개관으로부터 유래된 MC3T3-E1 골모세포(ATCC, CRL-2593)였으며, 방사선조사는 linear accelerator (Mevapimus, Germany) X선조사기를 이용하였다.

### 2. 연구방법

#### 1) 세포배양

MC3T3-E1 세포를 10% fetal bovine serum (FBS; Hyclon, Logan, UT, USA)과 항생제가 함유된  $\alpha$ -minimum essential medium ( $\alpha$ -MEM) 배양액에서 배양하였다. 배양시 온도는 37°C를 유지하였고, 5% CO<sub>2</sub>와 95% 공기를 공급하였으며 배양액은 1주일에 2회 신선한 동일 배양액으로 교환하였다.

#### 2) 방사선조사와 분화유도

MC3T3-E1 세포를 배양접시에  $5 \times 10^5$  cells/mL로 분주하

여 배양하고 세포수가 배양접시에 70-80% confluence에 도달했을 때, 10% FBS가 포함된  $\alpha$ -MEM 배양액에 5 mM  $\beta$ -glycerol phosphate와 50  $\mu$ g/mL ascorbic acid를 첨가한 배양액으로 교환하였다. 이후 1.5 Gy/min 선량률로 2, 4, 6, 8 Gy의 방사선을 조사하였다. 실험목적에 따라 3일 간격으로 신선한 배양액으로 교환하였다. 방사선조사 후 3, 7, 14, 21 일째에 세포의 증식과 TGF- $\beta_1$  유전자 발현, 석회화결절 형성에 대해 조사하였다.

#### 3) RNA preparation과 RT-PCR

(reverse transcription-polymerase chain reaction)

방사선조사 후 3, 7, 14, 21일째에 배양된 세포로부터 제조회사 (SV Total RNA Isolation System, Promega, Madison, WI, USA)의 지시에 따라 total RNA를 채취하였다. RNase-free deoxyribonuclease I으로 처리한 후, 1  $\mu$ g의 total RNA를 RNA PCR kit를 이용하여 제조회사 매뉴얼 (the Access RT-PCR System, Promega)에 따라 reverse-transcription시켰다. 반응시간은 42°C에서 30분이었다. 이렇게 획득한 complementary DNA (cDNA) pool을 PCR에 적용시키고 Taq polymerase를 이용한 20  $\mu$ L reaction mixture로 증폭시켰다. 증폭은 DNA thermal cycler (Peltiel Thermal Cycler -100, MJ Research, Watertown, MA)를 이용하였다. TGF- $\beta_1$  cDNA에 특수한 증폭반응을 수행하였으며, PCR 산물을 1-2% agarose gel에서 전기영동한 후 ethidium bromide 염색을 하여 증폭된 DNA fragments를 자외선하에서 관찰하였다. TGF- $\beta_1$ 의 PCR primer sequence는 다음과 같다.

TGF- $\beta_1$  (~699 bps)

Forward primer: 5'-CTCTCCACCTGCAAGACCAT-3'

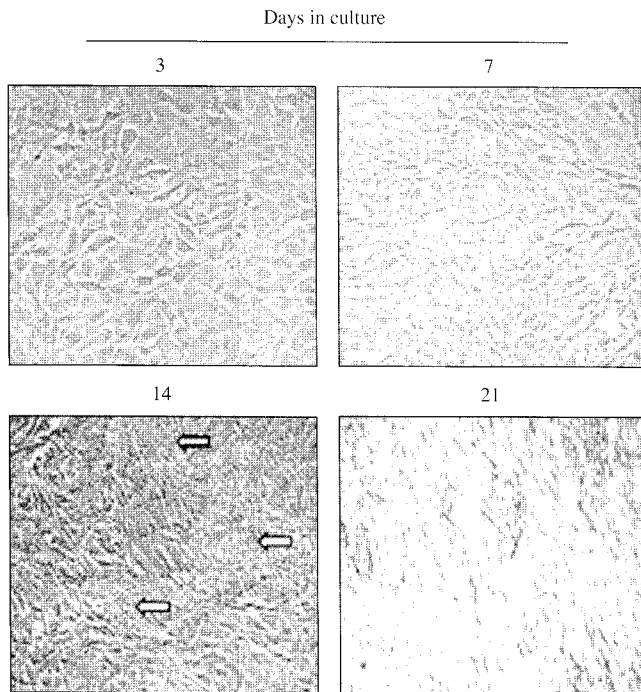
Reverse primer: 5'-CTGCCGTACAATTCCAGTGA-3'

#### 4) TGF- $\beta_1$ level 측정

대조군 MC3T3-E1 세포와 방사선조사된 MC3T3-E1 세포에 의해 생성된 TGF- $\beta_1$ 을 ELISA (van Cott et al., 1996) 분석을 통해 측정하였다. TGF- $\beta_1$  level은 2, 4, 6, 8 Gy 선량의 다양한 방사선에 노출된 MC3T3-E1 세포에 대해서 3, 7, 14, 21일째 각각의 시료를 채취하여 62°C에서 10분간 가열하여 latent TGF- $\beta_1$ 을 활성화시킨 다음 각각의 시료에서 TGF- $\beta_1$  생성을 측정하였으며 crystal violet 염색을 통해 세포수를 correction시켜 pg/mL 단위로 표현하였다.

#### 5) 세포내 칼슘축적량 측정

MC3T3-E1 세포가 70-80% confluence에 도달한 후 2, 4, 6, 8 Gy 선량의 방사선을 조사하여 3, 7, 14, 21일째 칼슘의 축적량을 측정하였다. 세포를 인산염 완충 식염수 (phosphate buffered saline, PBS)로 부드럽게 세척한 후 2N HCl로 8-16시간 처리하여 세포내부에 축적된 칼슘의 양을 측정하였다. 1  $\mu$ g/mL의 칼슘 이온까지 측정가능한 Calcium C kit (Wako)와 o-cresolphthalein complexone 방법을 이용하여



**Fig. 1.** Morphological changes according to the differentiation. Arrows represent calcium accumulation by MC3T3-E1 cells that were incubated in osteoblast differentiation medium. The number of MC3T3-E1 cells was decreased according to the differentiation.

시료의 칼슘이온량을 정량하였고, 칼슘 표준용액 (5-80 µg/mL, Sigma)을 이용하여 표준곡선을 만들어 이를 통해 전체 칼슘축적량을 계산하였다.

6) 석회화결절 관찰

MC3T3-E1 골모세포의 석회화결절 형성을 측정하기 위하여 단층을 이룬 후 2, 4, 6, 8 Gy 선량의 방사선을 조사하여 3, 7, 14, 21일째 von Kossa 염색을 시행하였다. 즉 세포를 실온에서 10% formaldehyde로 30분간 고정하고 pH 7.3 인 10 mM Tris-HCl로 10시간 동안 세척하고 고정된 세포를 5% silver nitrate로 직사광선하에서 처리한 후 증류수로 2번 세척하고 현미경으로 석회화결절을 관찰하였다.

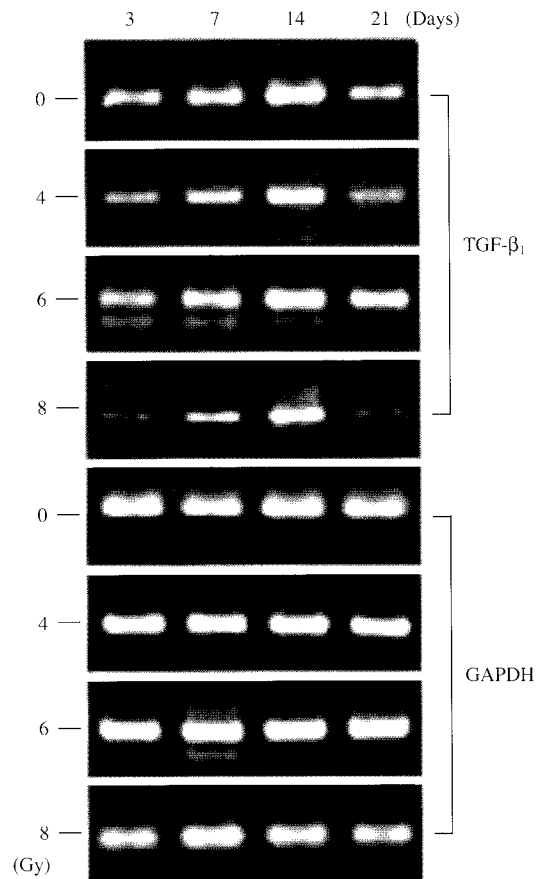
7) 통계분석

TGF-β<sub>1</sub> 측정량과 칼슘축적량은 모두 3회 분석하여 얻은 data의 평균과 표준오차를 구하여, 대조군과 방사선조사군 및 방사선조사군간의 비교를 위해 α값 0.025 수준으로 ANOVA분석을 시행하여 비교 분석하였다.

**결 과**

1. 세포배양

Fig. 1은 MC3T3-E1세포의 증식과 분화과정, 광화과정

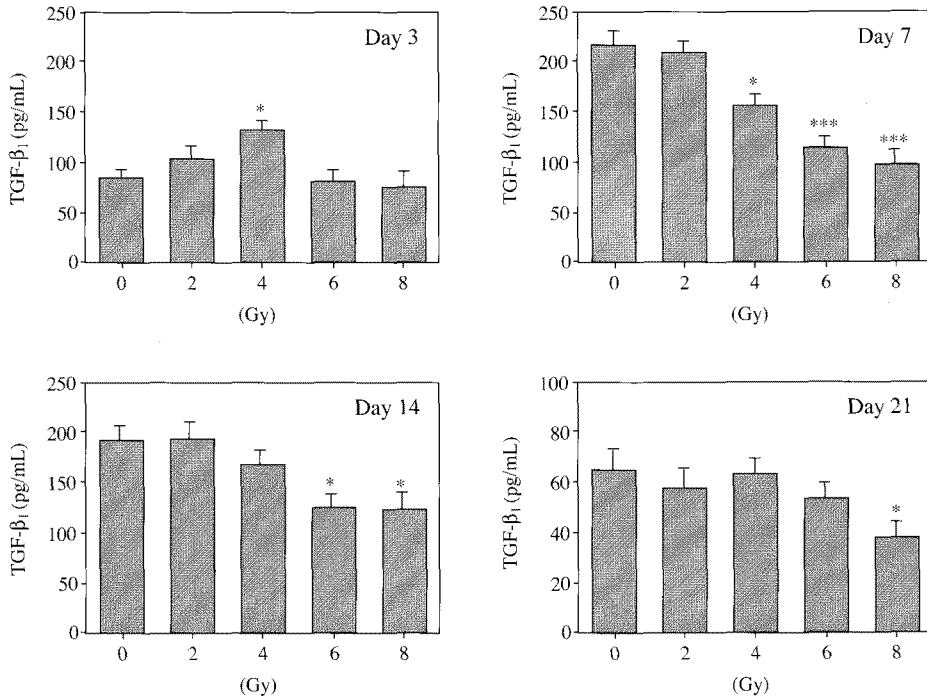


**Fig. 2.** Analysis of TGF-β<sub>1</sub> mRNA expression by RT-PCR. MC3T3-E1 osteoblastic cells were incubated in the differentiation medium containing 10% FBS, 5 mM β-glycerol phosphate, and 50 µg/mL ascorbic acid. Thereafter, the cells were exposed to the indicated doses (Gy) of irradiation, and at various times (3, 7, 14, 21, 28 days), TGF-β<sub>1</sub> mRNA levels were analyzed by RT-PCR, as described in materials and methods.

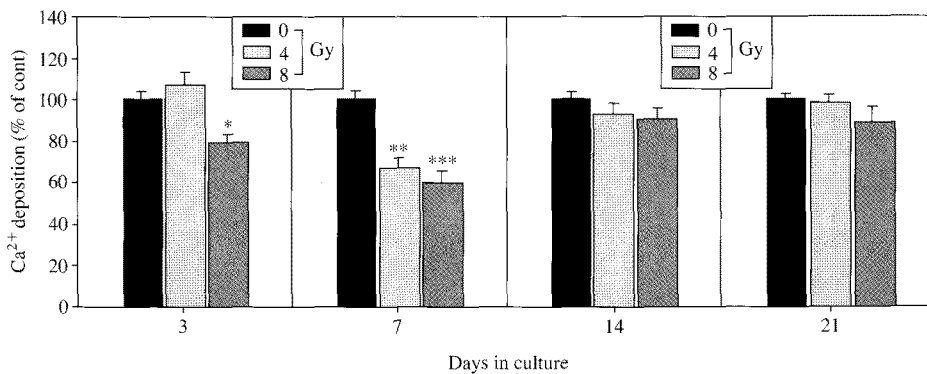
및 형태의 변화를 보여주는 광학현미경사진으로서, 실험 14일째에 광화된 세포의 형성 (화살표)이 관찰되고, 세포의 증식은 실험기일이 경과함에 따라 감소하였다. 또한 분화 일령에 따라 배양세포의 석회화가 나타남을 알 수 있었으며, 배양 21일령째에는 대부분의 세포가 골세포화됨을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 본 실험이 정상적인 골모세포주 및 분화유도 시스템하에서 수행되었음을 의미한다 하겠다.

2. 방사선조사 후 RT-PCR에 의한 TGF-β<sub>1</sub> 유전자 발현 분석

Fig. 2는 방사선조사 실험세포주의 분화과정 동안에 생성된 TGF-β<sub>1</sub>의 RT-PCR로서 실험 제3, 7, 14, 21일째에 4, 6, 8 Gy 선량의 조사군에서 TGF-β<sub>1</sub> 유전자의 발현량이 감소하였다.



**Fig. 3.** Effect of irradiation on the production of TGF- $\beta_1$  during the differentiation of MC3T3-E1 osteoblastic cells. The cells were incubated in the differentiation medium and then exposed to the indicated doses of irradiation. At the various times (3-21 days), after the irradiation, the supernatants from the cultures were collected and processed for the analysis of TGF- $\beta_1$  at protein level using ELISA. The results were calculated from the data obtained from three independent experiments. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  and \*\*\* $P < 0.001$  represent significant differences between control and experimental values (ANOVA, Scheffe's test).



**Fig. 4.** Calcium deposition of irradiated MC3T3-E1 cells. The amount of calcium deposition decreased significantly on day 7. It showed a decreased tendency on day 14, 21, but there were no differences between groups. Each bar represents the mean  $\pm$  SD of three separate experiments.

### 3. 방사선조사 후 TGF- $\beta_1$ 단백질의 생성량

Fig. 3은 MC3T3-E1 골모세포주의 분화과정 동안 방사선이 TGF- $\beta_1$ 의 단백질 생성에 미치는 효과를 보여주고 있다. 실험 3일째에 4 Gy 선량의 방사선조사군에서 대조군에 비해 TGF- $\beta_1$  단백질의 생성량이 증가하였고, 7일째에 4, 6, 8 Gy 선량의 방사선조사군에서 대조군에 비해 그 생성량이 감소하였으며, 14일째에 6, 8 Gy 선량의 방사선조사군에서 대조군에 비해 TGF- $\beta_1$  단백질의 생성량이 감소하였고, 21일째에 8 Gy 선량의 방사선조사군에서 대조군에 비해 TGF- $\beta_1$  단백질의 생성량이 감소하였다 (ANOVA, Scheffe's test) (Table 1 참조).

### 4. 방사선조사 후 총 칼슘 축적량

Fig. 4는 실험기일에 따른 방사선조사 MC3T3-E1 골모세포

**Table 1.** The amount of TGF- $\beta_1$  production in the control and irradiated MC3T3-E1 osteoblastic cells

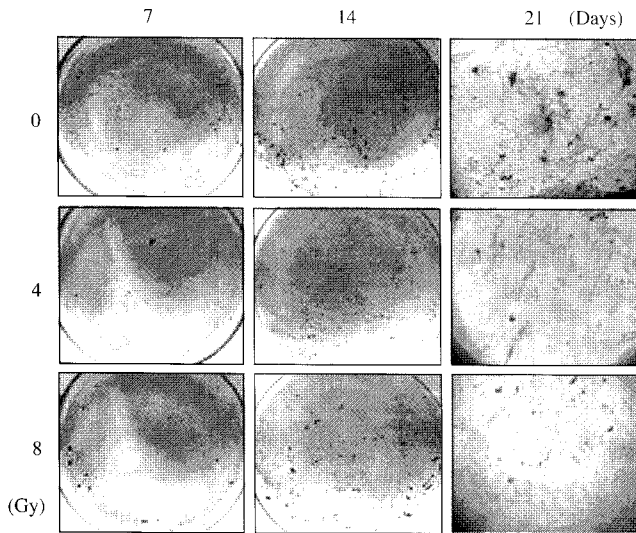
Radiation dose (Gy)	Days in culture (Mean $\pm$ SD)			
	Day 3	Day 7	Day 14	Day 21
0	81 $\pm$ 7.5	216 $\pm$ 15.0	190 $\pm$ 16.0	63 $\pm$ 9.0
2	103 $\pm$ 10.0	208 $\pm$ 12.0	192 $\pm$ 17.0	56 $\pm$ 8.5
4	130 $\pm$ 7.8*	155 $\pm$ 12.5*	145 $\pm$ 16.0	62 $\pm$ 7.0
6	77 $\pm$ 9.0	120 $\pm$ 11.0***	127 $\pm$ 15.0*	53 $\pm$ 7.0
8	75 $\pm$ 14.0	97 $\pm$ 16.0***	125 $\pm$ 18.0*	36 $\pm$ 8.0*

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  and \*\*\* $P < 0.001$  represent significant differences between control and experimental values (ANOVA, Scheffe's test).

의 총 칼슘 축적량을 보여주고 있다. 방사선조사 후 3일째 8 Gy 선량의 방사선조사군에서 대조군과 유의한 차이를 보였으며, 7일째 4, 8 Gy 선량의 방사선조사군에서 대조군과 유의한 차이를 보였으나 14, 21일째는 방사선조사군과 대

**Table 2.** The amount of calcium deposition of MC3T3-E1 cells on day 3, 7, 14, 21 after irradiation

Radiation dose (Gy)	Days in culture (Mean ± SD)			
	Day 3	Day 7	Day 14	Day 21
0	100 ± 5.0	100 ± 4.3	100 ± 4.0	100 ± 2.5
2	112 ± 9.0	102 ± 8.0	98 ± 6.0	107 ± 11.0
4	108 ± 6.0	67 ± 5.0**	93 ± 5.5	98 ± 4.0
6	89 ± 7.0	62 ± 6.0***	92 ± 8.0	94 ± 10.0
8	80 ± 3.0*	60 ± 6.0***	90 ± 6.0	89 ± 8.0



**Fig. 5.** Calcific nodule formation of irradiated MC3T3-E1 cells. The cell cultured in the differentiation medium were irradiated to a single dose of 4 and 8 Gy, and at the indicated times, the formation of calcific nodule was determined by von Kossa staining as described in the materials and methods.

조군에 통계학적으로 유의한 차이를 보이지 않았다 (Table 2 참조).

5. 방사선조사 후 석회화 결절 형성

Fig. 5는 방사선조사 MC3T3-E1 골모세포의 실험기일에 따른 석회화결절 형성을 관찰하기 위한 von Kossa 염색 사진으로서, 석회화결절 수를 광학현미경으로 관찰한 결과, 실험 7일째에는 4, 8 Gy 선량의 방사선조사군에서 대조군에 비해 석회화결절 형성이 감소하였으나 14, 21일째는 4, 8 Gy 선량의 방사선조사군과 대조군에서 석회화결절 형성에 있어 차이를 보이지 않았다.

고 찰

MC3T3-E1 골모세포주는 골조직에 존재하는 골모세포와 유사하여 골기질의 침착, 석회화, 성장인자들의 효과, 형태

와 대사 변화 등을 연구하는 데 많이 이용되고 있다. MC3T3-E1 골모세포주의 배양은 ascorbic acid를 이용하여 골모세포의 형질발현이나 석회화 시기에 세포외기질의 형성을 유도한 후, 이 배양액에 β-glycerol phosphate를 첨가하여 ALPase 활성화와 세포외기질의 석회화 평가에 많이 이용하고 있다. 이때 ascorbic acid는 I형 교원질 발현을 직접 자극하지는 않지만 세포외기질에서 교원질의 침착에 반드시 필요한 배양액으로 ALPase 활성을 증가시키는 역할을 하고, β-glycerol phosphate는 ascorbic acid에 대해 상승효과를 보여 분화된 골모세포에서 교원질의 축적이나 ALPase 활성을 더욱 증가시킨다.<sup>8-12</sup> 본 연구에서도 MC3T3-E1 골모세포주의 배양 시 ascorbic acid와 β-glycerol phosphate가 첨가된 α-MEM 배양액을 사용하였다.

Owen 등<sup>13</sup>은 골형성 과정을 첫 번째 DNA합성이 활발하고 세포의 수가 증가하는 세포 증식기 (4-10일), 두 번째 세포의 증식은 억제되고 세포외기질이 형성되고 축적되는 성숙기 (10-16일), 마지막으로 세포외기질의 석회화가 진행되는 석회화기 (16-30일)로 구분하였는데, 본 실험에서는 증식이 이미 70-80%에 이른 상태에서 분화유도하였으므로 방사선조사 후 3일째는 세포증식기로, 7일째는 분화성숙기로, 14일과 21일째는 석회화기로 분류할 수 있다.

골형성 과정에는 I형 교원질, ALPase, osteopontin, osteonectin, osteocalcin 등의 형질발현 유전자가 관여하며, 이외에도 parathyroid hormone, 1,25-dihydroxy cholecalciferol, bone morphogenetic proteins, TGF-β, fibroblast growth factor 등의 전신적, 국소적 인자들이 영향을 미치는 것으로 알려져 있다.<sup>2,10-12</sup> 본 연구에서는 세포증식기에 발현되어 골형성 과정에 영향을 주는 TGF-β의 발현양상과 석회화결절의 형성과정에 미치는 방사선의 영향을 알아보려고 하였다.

방사선조사는 정상적인 골의 형성과 치유에 필요한 성장인자들의 발현에 변화를 야기시킴으로써 골형성에 장애를 일으키는 요인으로 보고되어 왔다. Gal 등<sup>14</sup>은 방사선조사 선량에 따라 골모세포주의 회복정도와 손상 정도에는 분명한 차이가 있는데, 2 Gy 이하의 저선량에서는 DNA의 아치사손상이 일어나지만 시간이 경과함에 따라 대부분 회복되며, 6 Gy 이상의 고선량에서는 상당한 세포주의 퇴화와 치사가 발생한다고 보고하였다. Currey 등<sup>15</sup>은 방사선조사 부위에서 골절율이 증가하고 골의 위축, 골절 부위 치유 지연 등이 유발되는 것으로 보고하였으며, Probert와 Bruce<sup>16</sup>는 가장 왕성한 골성장이 이루어지는 시기인 6세 미만과 사춘기에 방사선을 조사받은 소아에서 척추의 성장 지연이 관찰된다고 보고하였다.

방사선은 골형성 과정에 관여하는 cytokine의 발현을 변화시켜 골모세포의 분화에 관여한다는 사실이 밝혀지고 있는데, ALPase는 calcium phosphate의 형성을 억제하는 pyrophosphate를 제거하는 역할을 수행하여 석회화를 촉진

하는 cytokine으로 알려져 있다. 또한 많은 연구를 통해 방사선조사 후 선량의존적으로 골모세포의 증식은 억제되며 ALPase의 활성은 증가한다고 보고된 바 있다.<sup>1,3,17,18</sup> Dudziak 등<sup>3</sup>은 0.4-8 Gy 선량의 방사선에 MC3T3-E1 골모세포를 노출 시 선량의존적으로 세포증식이 감소하며 ALPase의 생성이 증가하고 골모세포의 분화가 증가한다고 보고하였다. Dare 등<sup>1</sup>은 4 Gy 이상의 방사선조사 시 MC3T3-E1 골모세포주에서 세포의 증식은 감소하였으나 분화와 석회화도는 증가한다고 하였다. Matsumura 등<sup>17</sup>은 MC3T3-E1 골모세포에 대한 5-10 Gy의 방사선을 조사한 후 세포의 증식은 억제되나 ALPase의 활성은 증가하고 세포당 칼슘량은 증가하게 되어 방사선조사가 MC3T3-E1 세포의 분화와 석회화를 강화시킨다고 하였다. 그러나 이후 진행된 연구에서는 MC3T3-E1 골모세포에 10 Gy 선량의 방사선을 조사한 경우 ALPase 활성이 증가하고 osteocalcin의 발현은 억제되어 세포당 평균칼슘치는 증가하나 배양된 세포의 총 DNA양과 총 칼슘축적량은 감소하고 전체적인 골기질의 석회화도 감소한다고 보고한 바 있다.<sup>18</sup> 이 연구<sup>18</sup>를 통하여 방사선이 cytokine의 발현에 영향을 미쳐 골모세포의 증식이 감소하고 그 영향으로 석회화된 골기질이 감소될 수 있음을 알게 되었고 이를 통해 비로소 방사선치료 후 염증없이 유발되는 골형성 기전의 손상이나 방사선골피사의 원인에 대해서 설명할 수 있었다. 또한 강 등<sup>19</sup>은 4 Gy와 8 Gy 선량의 방사선조사 시 세포의 증식이 감소하고 석회화결절 형성이 감소한다고 보고한 바 있으며, Jacobsen 등<sup>20</sup>은 2.5 Gy 선량의 방사선은 골형성 변화를 야기하지 않으나 5 Gy의 방사선은 골형성을 심하게 감소시킨다고 보고하였다. 또한 Gal 등<sup>14</sup>은 MC3T3-E1 골모세포주에 0-6 Gy의 방사선을 조사하여 교원질 합성이 선량의존적으로 감소하였으며 골의 석회화도 감소한다고 보고하였다. 한편 Harris 등<sup>2</sup>과 Matsumura 등<sup>17</sup>은 세포외기질이 축적되고 성숙기에 접어든 세포 분화 후기에 방사선에 노출될수록 골모세포의 석회화결절 형성에 미치는 영향이 적다고 하였다.

TGF- $\beta_1$ 은 골기질내에 저장되는 성장조절인자로 가장 풍부하게 존재하며 다양한 세포의 증식과 이동 및 분화에 관여하고, 연골과 골의 대사에 있어 그 형성과 유지에 중요한 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다.<sup>6,21-23</sup> 또한 TGF- $\beta_1$ 은 골모세포의 증식과 분화에 관여함으로써 골의 재구성에 직접적인 영향을 주며 파골세포 전구체의 형성과 골흡수를 억제한다고 알려져 있다. TGF- $\beta_1$ 은 골세포에 의해 잠재형태로 분비되어 세포외기질 내에 저장되며, 골이 활발하게 흡수될 때 활성 형태로 방출되어 강력한 골형성 촉진제로써 작용한다고 보고되었다.<sup>7,24-27</sup> Katrien 등<sup>26</sup>은 TGF- $\beta_1$ 은 골모세포 전구체를 화학주성흡인(chemotactic attraction)하고 골모세포의 증식 및 분화를 촉진하는 역할을 하지만, 분화 후기 단계에 이르면 세포외기질의 석회화

를 억제하며 이후에는 BMP-2의 작용에 의해 석회화가 진행된다고 하였다. 그리고 Harris 등<sup>2</sup>은 TGF- $\beta_1$ 에 의한 골형성은 분화된 골모세포의 석회화를 직접 증가시켜 나타나는 결과가 아니라 골모세포의 전구체에 대한 화학주성 및 증식 촉진 작용에 의한 이차적인 결과이므로 TGF- $\beta_1$ 은 직접적으로는 석회화기전에 참여하지 않는다고 보고하였다.

TGF- $\beta_1$  mRNA는 골모세포뿐 아니라 골막하 섬유모세포, 파골세포 등에서도 나타나는데, 다만 골모세포가 파골세포보다 훨씬 많이 존재하기 때문에 골내에서 TGF- $\beta_1$ 의 생성에 골모세포만이 관여하는 것처럼 보이지만, 실제로는 파골세포에 의해서도 TGF- $\beta_1$ 의 생성이 이루어지고 있어 골흡수와 골형성 모두에 영향을 미침으로써 골의 재구성, 더 나아가 골환경의 균형 유지에 중요한 역할을 수행하는 것으로 여겨지고 있다.<sup>21,26</sup>

또한 TGF- $\beta_1$ 은 ALPase나 I형 교원질의 발현에도 영향을 주며, 골모세포의 증식정도나 세포배양 조건에 따라서는 성장억제 인자로도 작용할 수 있다고 보고되고 있다.<sup>28,29</sup> 정상적으로 골모세포를 배양하는 경우 석회화결절은 8일째에 관찰되거나 confluent시기에 TGF- $\beta_1$ 을 첨가하게 되면 석회화결절 형성이 억제되는데, Harris 등<sup>2</sup>은 TGF- $\beta_1$ 에 의해 석회화결절 형성이 억제되었다고 하였으며, 더불어 골모세포의 분화와 관련된 I형 교원질, ALPase, osteopontin, osteocalcin 등의 발현도 억제되거나 방해된다고 하였다. 또한 여러 연구<sup>6,7,27</sup>결과 MC3T3-E1 골모세포에서 TGF- $\beta_1$ 은 ALPase와 osteocalcin의 발현을 억제하여 칼슘축적량을 감소시킨다고 하였다. Centrella 등<sup>4,5</sup>은 MC3T3-E1에서 TGF- $\beta_1$ 은 골모세포의 증식은 촉진하나 ALPase의 발현은 억제한다고 하였으며, Pfeilschifter 등<sup>24</sup>은 ROS17/2.8 골육종세포에서 TGF- $\beta_1$ 은 골모세포의 증식은 억제하나 I형 교원질과 ALPase의 발현은 촉진시킨다고 하였고, Bonewald 등<sup>27</sup>은 MG-63 골육종세포에서 TGF- $\beta_1$ 에 의해 골모세포의 증식과 ALPase의 발현 모두 촉진된다고 보고하였으며, Noda 등<sup>7</sup>은 MC3T3-E1 골모세포주에 대해 TGF- $\beta_1$ 은 골모세포의 증식과 ALPase의 발현 모두 억제시킨다고 하였다.

한편 여러 연구<sup>3,24,30</sup>에서 고선량 방사선에 노출된 골모세포에서 TGF- $\beta_1$ 의 생성은 감소하며 ALPase의 활성은 증가한다고 보고한 바 있다. 따라서 TGF- $\beta_1$ 은 실험에 이용된 조직의 기원이나 그 분화정도에 따라 분화과정에서 세포기능의 발현을 증대시키거나 억제할 수 있어 세포의 복제, 증식 및 분화를 조절하는 데 있어 중요한 역할을 수행할 수 있는 다기능성 성장 인자(multifunctional growth factor)로 사료된다. TGF- $\beta_1$ 에 의해 세포가 노출될 경우 골모세포의 복제가 증가하는 경우도 있고, 또는 골모세포의 분화 후기에서는 특정 clone에 대해서 그 복제를 억제하거나 어떠한 효과도 보이지 않는 두가지 기능을 모두 가진 특성을 나타내기 때문이다.<sup>5</sup>

본 연구에서는 대조군에 비해 4, 6, 8 Gy 선량의 방사선 조사군에서 7일째에 TGF- $\beta_1$ 의 발현량이 감소하였으며 칼슘축적량도 감소하였다. 한편 14일째에 6, 8 Gy 선량의 방사선조사군과 21일째에 8 Gy 선량의 방사선조사군에서 대조군에 비해 TGF- $\beta_1$ 의 발현량은 감소하였으나 칼슘축적량은 유의한 차이를 보이지 않았다. 이러한 결과는 분화 성숙기에 해당되는 7일째에 방사선조사에 의해 세포의 증식이 감소하였고 세포당 TGF- $\beta_1$ 에 의한 생물학적 활성이 감소한 데 따른 이차적인 결과로 사료된다. 즉, 7일째에 4, 6, 8 Gy의 방사선조사군에서 TGF- $\beta_1$ 의 발현량의 감소가 골모세포의 세포증식을 억제하였고, 이후 성숙기에 이르러 방사선조사의 영향으로 인해 ALPase의 활성이 증가하여 석회화가 촉진됨으로써 세포내 칼슘축적량은 증가하였지만, 골모세포의 증식감소로 인해 총 칼슘축적량은 감소하였으며 결국 석회화결절의 형성도 감소한 것으로 생각된다. 한편 4, 6, 8 Gy 선량에서 14일째와 21일째에 방사선조사군에서 대조군에 비해 칼슘축적량의 유의한 변화가 없었는데, 이는 세포분화 후기에 이르면 세포분화에 대한 방사선의 영향이 크게 감소하고, TGF- $\beta_1$ 에 의한 석회화 억제의 영향이 적기 때문인 것으로 사료된다. 본 연구에서 석회화결절 형성은 7일째에 방사선조사군에서 대조군에 비해 감소하였으나 14일째와 21일째에 방사선조사군과 대조군 사이에 차이를 보이지 않았다. 이러한 결과는 MC3T3-E1 골모세포의 칼슘축적량의 형성 변화와 유사한 양상을 보이는 것으로 해석할 수 있다. 즉, 7일째에 4, 8 Gy의 방사선조사군에서 칼슘축적량이 감소됨에 따라 석회화결절 형성도 감소하였고, 분화 후기인 14일째와 21일째에 방사선조사군에서는 대조군에 비해 칼슘축적량에 있어서 유의한 차이를 보이지 않았다. 따라서 석회화결절 형성도 큰 차이를 보이지 않은 것으로 사료된다. 이러한 골모세포의 최종적인 분화 결과는 방사선조사에 의한 직접효과라기보다는 방사선조사에 의한 cytokine 발현의 변화에 의한 것이라 사료되며, 방사선조사는 골모세포에 의한 TGF- $\beta_1$  등의 cytokine 생성에 중요한 역할을 하고, 이때 TGF- $\beta_1$ 이 최종적인 분화과정에 영향을 주어 전체적인 골모세포의 분화에 대한 조절인자 역할을 하는 것으로 사료된다.

따라서 본 연구결과를 종합해보면, 방사선조사는 방사선량 의존적으로 TGF- $\beta_1$ 을 유전자 및 단백질 수준에서 억제하며, 이는 석회화결절 및 세포내 칼슘침착의 감소와도 밀접한 관련이 있는 것으로 여겨진다. 비록 기존 연구결과와 비교할 때 칼슘침착에 대한 결과에서 상이한 부분이 발견되나 이는 실험환경, 즉 방사선조사원(source), 방사선조사 방법, 사용된 세포, 방사선조사 시 세포의 증식 정도 및 상태 등에 의해 발생될 수 있는 특성에 기인된다고 사료된다. 그러나 방사선조사에 대한 TGF- $\beta_1$ 과 칼슘침착간의 상관관계의 구명을 위해서는 TGF- $\beta_1$ 의 과다발현 또는 미발현 골모세포주를 이용한 심도있는 연구가 이루어져야 할

것으로 생각된다.

### 참 고 문 헌

1. 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.
2. Harris SE, Bonewald LF, Harris MA, Sabatini M, Dallas S, Feng JQ, et al. Effects of transforming growth factor  $\beta$  on bone nodule formation and expression of bone morphogenetic protein 2, osteocalcin, osteopontin, alkaline phosphatase, and type I collagen mRNA in long-term cultures of fetal rat calvarial osteoblasts. *J Bone Min Res* 1994; 9 : 855-63.
3. 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 : 1049-61.
4. Centrella M, Thomas LM, Canalis E. Transforming growth factor  $\beta$  is a bifunctional regulator of replication and collagen synthesis in osteoblast-rich cell cultures from fetal rat bone. *J Biol Chem* 1987; 262 : 2869-74.
5. Centrella M, Thomas LM, Canalis E. Skeletal tissue and transforming growth factor  $\beta$ . *FASEB J* 1988; 2 : 3066-73.
6. Hauschka PV, Mavrakos AE, Iafrazi MD, Susan ED, Klagsbrun M. Growth factors in bone matrix. *J Biol Chem* 1986; 261 : 12665-74.
7. Noda M, Rodan G. Type  $\beta$  transforming growth factor inhibits proliferation and expression of alkaline phosphatase in murine osteoblast-like cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1986; 140 : 56-65.
8. Sudo H, Kodama HA, Amagai Y, Yamamoto S, Kasai S. In vitro differentiation and calcification in a new clonal osteogenic cell line derived from newborn mouse calvaria. *J Cell Biol* 1983; 96 : 191-8.
9. 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.
10. 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.
11. Aronow MA, Gerstenfeld LC, Owen TA, Tassinari MS, Stein GS, Lian JB. Factors that promote progressive development of the osteoblastic phenotype in cultured fetal rat calvaria cells. *J Cell Physiol* 1990; 143 : 213-21.
12. Quarles LD, Daniel AY, Laura WL, Rashmi C, Richard JW. 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.
13. Owen TA, Aronow M, Victoria S, Leesa AB, Laurens W, Melissa ST, 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.
14. Gal TJ, Teresita MA, Carlos AMC, Douglas WK. Radiation effects on osteoblasts in vitro. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2000; 126 : 1124-8.
15. Currey JD, Foreman J, Laketić I, Julie M, David EP, Gwendolen CR. Effects of ionizing radiation on the mechanical properties of human bone. *J Orthop Res* 1997; 15 : 111-7.
16. Probert JC, Bruce RP. The effects of radiation therapy on bone growth. *Radiology* 1975; 114 : 155-62.

17. 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.
18. Matsumura S, Hiranuma H, Deguchi A, Maeda T, Jikko A, Fuchihata H. Changes in phenotypic expression of osteoblasts after X-irradiation. *Radiation Res* 1998; 149 : 463-71.
19. Kang KH, Lee SR, Kwon KJ, Koh KJ. Effects of irradiation on the calcific nodule formation in MC3T3-E1 osteoblastic cell line. *Korean J Oral Maxillofac Radiol* 2005; 35 : 1-8.
20. Jacobsson M, Kälebo P, Albrektsson T, Turesson I. Provoked repetitive healing of mature bone tissue following irradiation. *Acta Radiol Oncol* 1986; 25 : 57-62.
21. Bonewald LF, Mundy GR. Basic science and pathology: Role of transforming growth factor-beta in bone remodeling. *Clin Orthop Relat Res* 1990; 250 : 261-73.
22. Reem AK, Lema AK. Transforming growth factor  $\beta_1$ , bone connection. *Med Sci Monit* 2006; 12 : 164-9.
23. Sowa H, Kaji H, Yamaguchi T, Sugimoto T, Chihara K. Activations of ERK1/2 and JNK by transforming growth factor  $\beta$  negatively regulate Smad3-induced alkaline phosphatase activity and mineralization in mouse osteoblastic cells. *J Biol Chem* 2002; 277(39) : 36024-31.
24. Pfeilschifter J, D'Souza SM, Mundy GR. Effects of transforming growth factor beta on osteoblastic osteosarcoma cells. *Endocrinology* 1987; 121 : 212-8.
25. Pfeilschifter J, Wolf O, Naumann A, Minne HW, Mundy GR, Ziegler R. Chemotactic response of osteoblast-like cells to TGF- $\beta$ . *J Bone Miner Res* 1990; 5 : 825-30.
26. Katrien J, Peter TD, Sophie J, Wim VH. Transforming growth factor- $\beta_1$  to the bone. *Endocrine Reviews* 2005; 26 : 743-74.
27. Bonewald LF, Kester MB, Schwartz Z, Swain LD, Khare A, Teresa LJ, et al. Effects of combining transforming growth factor  $\beta$  and 1,25-dihydroxyvitamin D3 on differentiation of a human osteosarcoma (MG-63). *J Biol Chem* 1992; 267(13) : 8943-9.
28. Alliston T, Choy L, Ducey P, Karsenty G, Derynck R. TGF- $\beta$ -induced repression of CBFA1 by Smad3 decreases cbfa1 and osteocalcin expression and inhibits osteoblast differentiation. *J EMBO* 2001; 20 : 2254-72.
29. Chang DJ, Changhua J, Kenneth KK, Sandra C, Thomas LM, Centrella M. Reduction in transforming growth factor  $\beta$  receptor I expression and transcription factor CBFA1 on bone cells by glucocorticoid. *J Biol Chem* 1997; 273 : 4892-6.
30. Pfeilschifter J, Mundy GR. Modulation of type  $\beta$  transforming growth factor activity in bone cultures by osteotropic hormones. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84 : 2024-8.