

2-deoxy-D-glucose와 quercetin이 방사선조사 MC3T3-E1 골모세포주의 분화시 bone sialoprotein과 osteocalcin 유전자의 발현에 미치는 영향

전북대학교 치의학전문대학원 구강악안면방사선학교실 및 구강생체과학연구소
이지운 · 김경아 · 고광준

Effects of 2-deoxy-D-glucose and quercetin on the gene expression of bone sialoprotein and osteocalcin during the differentiation in irradiated MC3T3-E1 osteoblastic cells

Ji-Un Lee, Kyoung-A Kim, Kwang-Joon Koh

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

ABSTRACT

Purpose : To investigate the effects of 2-deoxy-D-glucose (2-DG) and quercetin (QCT) on gene expression of bone sialoprotein (BSP) and osteocalcin (OC) during the differentiation in irradiated MC3T3-E1 osteoblastic cells.

Materials and Methods : When MC3T3-E1 osteoblastic cells had reached 70-80% confluence, cultures were transferred to a differentiating medium supplemented with 5 mM 2-DG or 10 μM QCT, and then irradiated with 2, 4, 6, and 8 Gy. At various times after irradiation, the cells were analyzed for the synthesis of type I collagen, and expression of BSP and OC.

Results : The synthesis of type I collagen in cells exposed to 2 Gy of radiation in the presence of 2-DG or QCT showed no significant difference compared with the control group within 15 days post-irradiation. When the cells were irradiated with 8 Gy, 2-DG facilitated the irradiation mediated decrease of type I collagen synthesis, whereas such decrease was inhibited by treating with QCT. During MC3T3-E1 osteoblastic cell differentiation, the mRNA expression of BSP and OC showed the peak value at 14 days and 21 days, respectively. 2-DG or QCT treatment alone decreased the level of BSP mRNA, but increased the OC mRNA level only at early time of differentiation (day 7). In the cells irradiated with 2, 4, 8 Gy, the mRNA expression of BSP and OC decreased at 7 days after the irradiation. The cells were treated with various dose of radiation in the presence of 2-DG or QCT, the mRNA level of both BSP and OC increased although this increase was observed at low dose of radiation (2 Gy) and at the early stage of differentiation. However, when the cells were exposed to 4, 6, or 8 Gy, the increase of BSP and OC mRNAs was detected only in cells co-incubated with QCT.

Conclusion : This study demonstrates that 2-DG and QCT affect differently the expression of bone formation related factors, type I collagen, BSP, and OC in the irradiated MC3T3-E1 osteoblastic cells, according to the dose of radiation and the times of differentiation. Overall, the present findings suggest that 2-DG and QCT could have the regulatory roles as radiation-sensitizer and -protector, respectively. (*Korean J Oral Maxillofac Radiol* 2009; 39 : 121-32)

KEY WORDS : 2-deoxy-D-glucose; Quercetin; MC3T3-E1 osteoblastic cells; Irradiation

서 론

접수일 (2009년 6월 22일), 수정일 (2009년 7월 8일), 채택일 (2009년 7월 13일)

Correspondence to : Prof. Kwang-Joon Koh

Department of Oral and Maxillofacial Radiology, School of Dentistry, 634-18, Keumam-dong, Duckjin-gu, Jeonju, Jeonbuk 561-712, Korea
Tel) 82-63-250-2023, Fax) 82-63-250-2081, E-mail) kkj1512@chonbuk.ac.kr

두경부 악성 종양의 치료에 사용되는 고선량의 전리방사선은 그 치료적 가치에도 불구하고 골형성장애나 골괴사, 골절부의 치유지연, 골위축, 골절위험도 증가 등을 나타

낼 수 있다.^{1,5} 따라서 성공적인 방사선치료를 하기 위해서는 정상조직에 큰 손상없이 종양세포만 선택적으로 제거하는 것이 중요하다. 특히 청소년기에 시행되는 방사선치료는 골성장을 억제할 수 있기 때문에 이를 보호하기 위한 연구도 활발히 진행되고 있다.^{6,7} Denys 등⁸과 Paulino 등⁹은 청소년에 대한 두경부 방사선치료시 생존자 66%에서 두경부의 골성장이 지연될 수 있다고 보고한 바 있다. 또한 방사선치료시 일반적으로 50 Gy의 흡수선량에 일차적으로 치주조직 및 치밀골의 혈관계가 손상될 수 있다.²

방사선치료의 부작용은 조직학적으로 골세포수의 감소, 골모세포의 활성억제, 혈관분포의 감소 등으로 나타나는데^{3,10} 이를 관찰하기 위해 세포역학(cell kinetics)에 대한 연구가 이루어지고 있다.

세포수준에서 전리방사선은 골모세포의 증식을 억제하고¹¹⁻¹³ 골모세포의 표현형 관련 유전자의 발현을 억제시킬 수 있으며¹⁴ 골모세포의 석회화를 촉진하는 것으로 보고되었다.^{12,14} 그러나 전리방사선의 세포에 대한 효과는 방사선을 조사받은 개체의 총 흡수선량, 선량률, 방사선의 종류 등의 조사요인, 세포의 종류, 세포의 분화정도 등의 생물학적 요인, 조사환경요인 및 방사선민감제(radiosensitizer), 방사선보호제(radioprotector) 등의 약물요인에 의해 영향을 받는다. 이 중 총 흡수선량 4 Gy 이하의 저선량, 특히 임상적 진단 목적으로 사용되는 0.4 Gy 이하의 방사선은 골모세포의 증식과 분화에 큰 영향이 없는 것으로 보고된 바 있다.^{5,15} Matsumura 등¹²은 5, 10 Gy의 전리방사선이 골모세포의 증식을 억제한다고 하였고, Gal 등¹은 6 Gy 이상의 전리방사선이 세포독성을 나타내며 4 Gy의 전리방사선이 골개조, 상처치유와 연관된 요소를 변화시켜 골괴사에 잠재적인 역할을 한다고 하였다. 또한 전리방사선은 표적세포가 아닌 주위세포에 영향을 주거나^{16,17} 세포의 유전자 불안정을 야기할 수도 있어¹⁸ 전리방사선이 세포에 미치는 영향이 표적세포에 대한 직접적인 영향인지 아니면 주위조직에 대한 영향으로 인한 이차적인 결과인지는 명확하지 않다.

골모세포는 분화시 다양한 단백질을 발현시키는데 Matsumura 등¹⁴은 전리방사선에 의해 osteocalcin(OC) 유전자의 발현이 하향조절(down-regulation) 된다고 하였다. 한편 전리방사선이 bone sialoprotein(BSP) 유전자의 발현에 미치는 영향은 미약한 것으로 보고된 바 있다.¹⁹

이와 같이 많은 연구에도 불구하고 세포수준에서 전리방사선이 골형성에 미치는 영향에 대해서는 여전히 많은 논란이 있다. Tamurian 등⁶과 Damron 등⁷은 쥐 뒷다리에서 방사선으로 유도된 성장지연의 보호에 방사선보호성 물질인 amifostine이 효과적이라고 하였다. Gevorgyan 등²⁰은 MC3T3-E1 골모세포주에 대한 γ 선조사시 선량의존적으로 골모세포주의 생존률과 그 기능이 억제되었고 OC 유전자의 발현량이 감소되었으며, amifostine 처리시에는 배양된 정상 골모세포주가 γ 선의 영향으로부터 보호된다고 하였다.

지금까지는 종양세포의 방사선보호에 관한 연구가 이루어져 왔으나 최근에는 정상세포뿐 아니라²¹ 성장중인 골에 대한 방사선조절제의 사용에 관한 연구가 이루어지고 있다. 이러한 방사선의 영향을 조절하는 물질 중 하나로 알려진 2-deoxy-D-glucose(2-DG)는 대사의 변화로 해당작용(glycolysis)을 억제함으로써 높은 2-DG 농도에서 방사선의 암세포에 대한 손상을 증가시킬 수 있는 물질로 보고된 바 있다.²² 또한 채소와 야채에 풍부하게 포함된 플라보노이드(flavonoid) 중 하나인 quercetin(QCT)은 항산화효과를 가진 물질로²³⁻²⁵ 알려져 있으며 간암 세포에 대해서는 방사선으로 유도된 세포사를 더욱 증가시키는 물질로 보고되었다.²⁶

이 연구는 방사선을 조사받은 MC3T3-E1 골모세포의 분화 과정에서 발현되는 OC와 BSP 유전자에 대한 2-DG와 QCT의 영향을 구명함으로써 향후 두경부암의 방사선치료시 2-DG 또는 QCT가 방사선치료 보조제로서의 사용 가능성 여부를 알아보려고 하였다.

재료 및 방법

1. 연구재료

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

2. 연구방법

1) 세포배양

MC3T3-E1 세포를 10% fetal bovine serum(FBS; Hyclon, Logan, UT, USA)과 항생제가 함유된 α -minimum essential medium(α -MEM) 배양액에서 배양하였다. 배양시 온도는 37°C를 유지하였고, 5% CO₂와 95% 공기를 공급하였다. 2차배양은 Ca²⁺, Mg²⁺ 자유인산염 완충식염수내 0.05% trypsin-0.02% EDTA(DPBS; Gibco BRL Co., USA)로 시행하였고 10⁶ cells/mL의 세포를 2 mL 혹은 100 μ L 배지에 각각 다시 부유시켰다. 배양액은 1주일에 2회 신선한 동일 배양액으로 교환하였다.

2) 방사선조사와 분화유도

MC3T3-E1 세포를 배양접시에 5 \times 10⁵ cells/mL로 분주하여 배양하고 세포수가 배양접시에 70-80% confluence에 도달했을 때, 10% FBS가 포함된 α -MEM 배양액에 5 mM β -glycerol phosphate와 50 μ g/mL ascorbic acid를 첨가한 배양액으로 교환하였다. 이후 1.5 Gy/min 선량률로 2, 4, 6, 8 Gy의 방사선을 조사하였는데, 실험목적에 따라 3일 간격으로 신선한 배양액으로 교환하였다. 방사선조사 후 7, 14, 21일째에 collagen 합성, BSP와 OC의 유전자 발현에 대해 조사

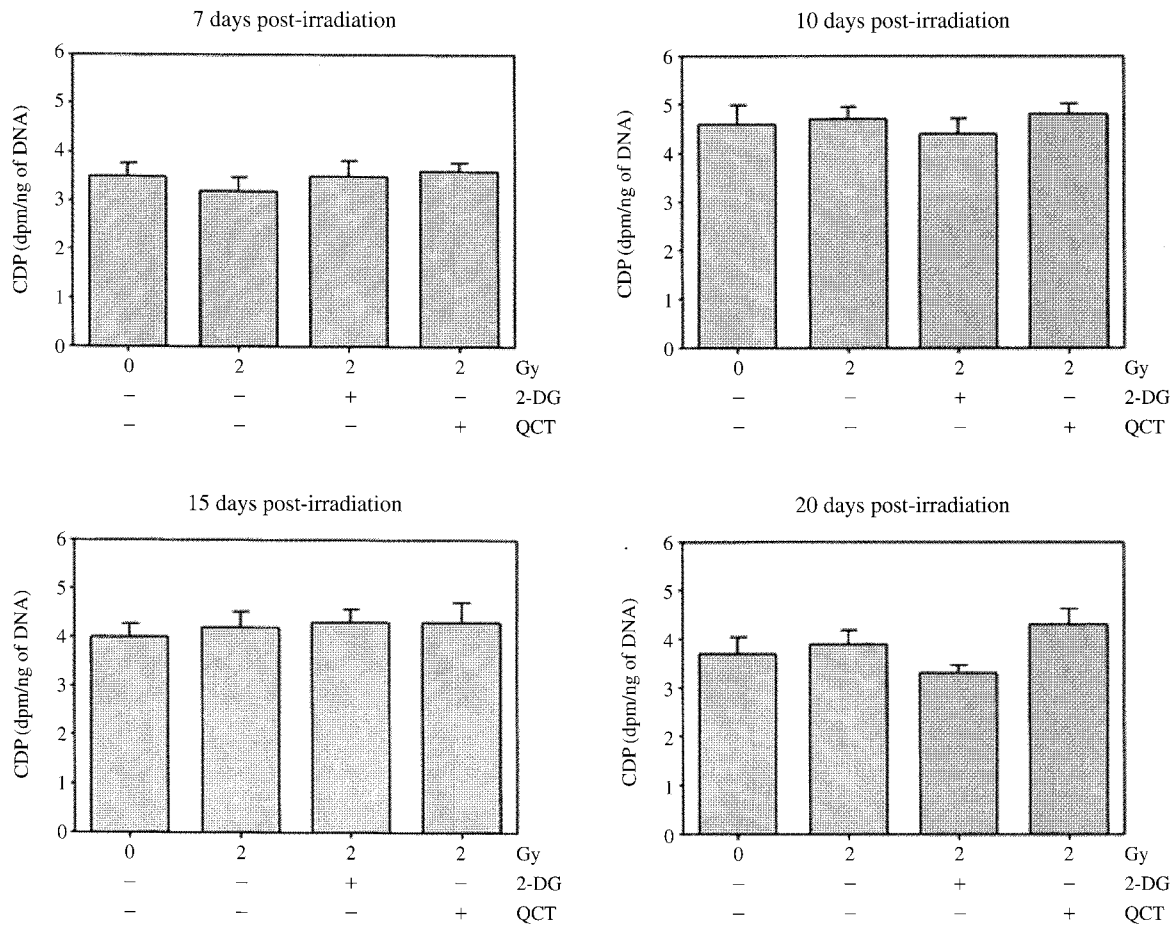


Fig. 1. The bar graphs show the effects of 2-DG and quercetin on the collagen protein synthesis in MC3T3-E1 cells irradiated with 2 Gy.

하였다.

3) Collagen 생성 분석

Collagen 단백질 합성의 정량화 과정은 약간 변형을 한 이전 방법²⁷을 따랐다. 즉, 6-well 조직 배양접시에서 자란 세포수가 70-80% confluence에 도달했을 때 배양배지를 5 mM 2-DG 혹은 10 μM QCT을 첨가한 배지로 교환하였고 이후 1.5 Gy/min 선량률로 2, 4, 6, 8 Gy의 X선을 조사하였다. Collagen 합성을 측정하기 위해, X선 조사 7, 10, 15, 20 일째에 1% FBS, 5 mM β-glycerol phosphate, 50 μg/mL ascorbic acid, [³H] proline 2 μCi/mL를 첨가한 배지로 교환하였고 세포를 하루 더 배양하였다. 방사선표지 proline으로 세포를 배양한 후 배양용기를 얼음으로 옮겨 배지를 제거하였다. 세포를 0.11 M NaCl, 0.05 M Tris-HCl, pH 7.4, 10 mM proline을 함유한 완충액에서 추출하였고 원심분리를 이용하여 수집하였다.

세포 과립은 0.05 M tris-HCl, pH 7.6, 10 mM proline에 부유되었고 음파처리로 분열시켰다. 세포분획에서 단백질은 trichloroacetic acid (TCA)로 침전시켰고, 20 μg/mL의 정제된 bacterial collagenase를 넣거나 넣지 않고 배양시켰다.

Table 1. Relative intensity of gene expression of the collagen protein synthesis during the differentiation of irradiated MC3T3-E1 cells with 2 Gy and in the presence or absence of 2-DG and QCT

Radiation dose	Days of culture (Mean ± S.D.)			
	7	10	15	20
0	3.5 ± 0.26	4.6 ± 0.38	4.0 ± 0.26	3.7 ± 0.33
2	3.2 ± 0.28	4.7 ± 0.25	4.2 ± 0.31	3.8 ± 0.28
2 ^a	3.5 ± 0.31	4.4 ± 0.31	4.3 ± 0.28	3.3 ± 0.16
2 ^b	3.6 ± 0.18	4.8 ± 0.23	4.3 ± 0.41	4.3 ± 0.32

a: irradiation with 2-DG, b: irradiation with QCT

Significant difference between 2^a and 2^b (p < 0.05) at 20 days post-irradiation

방사성콜라겐 분해단백 (collagen-digestible protein, CDP)은 액체 신틸레이션 계수기 (Packard Instrument Co.)를 이용해서 측정하였다. 단백질 농도는 Bradford 법²⁸으로 측정하였고 DNA 양은 Lavarca와 Paigen 법²⁹으로 측정하였으며 데이터는 DNA의 d.p.m./ng과 평균±표준편차로 표시하였다.

4) RNA preparation과 RT-PCR

(reverse transcription-polymerase chain reaction)

X선조사 후 7, 14, 21일째에 배양된 세포로부터 제조회

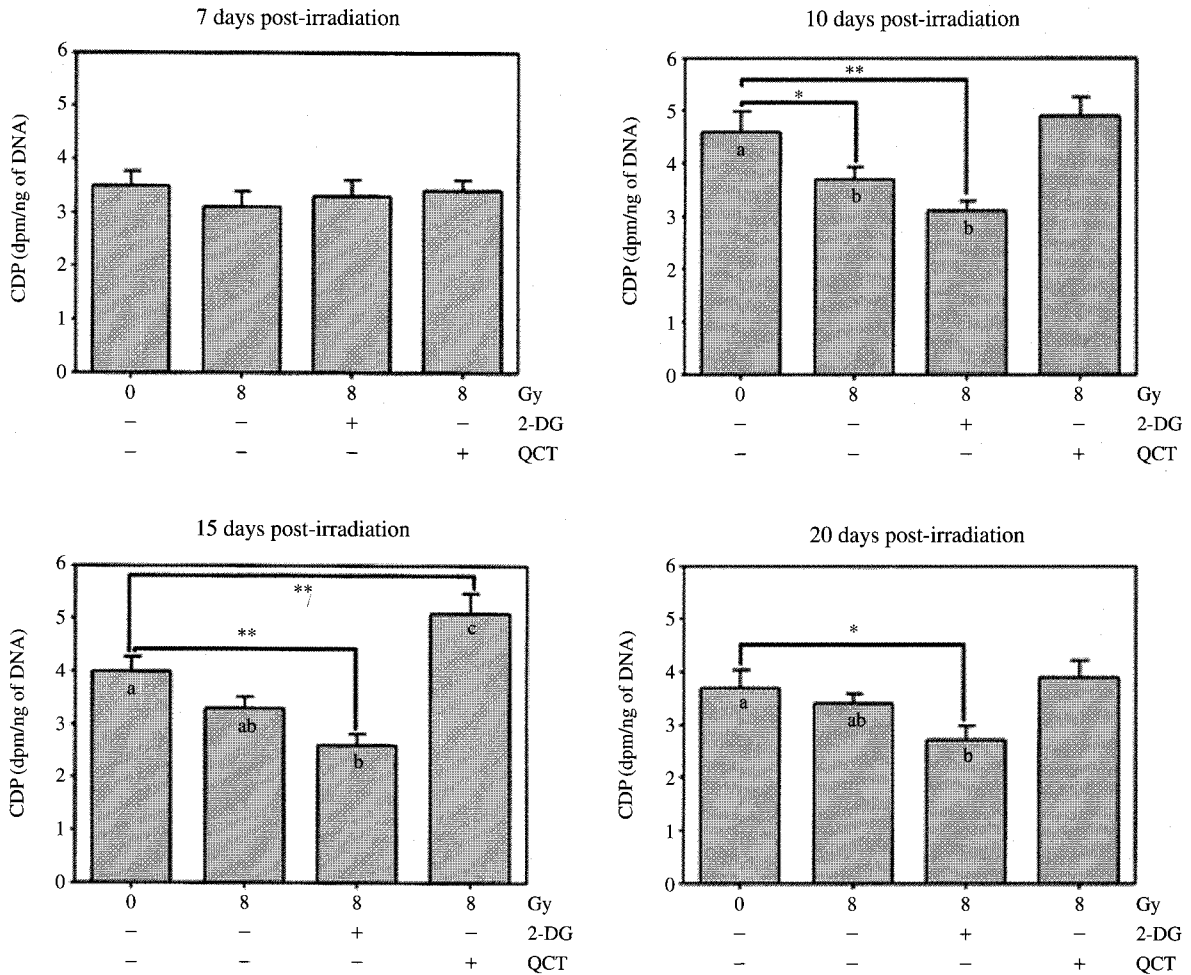


Fig. 2. The bar graphs show the effects of 2-DG and quercetin on the collagen protein synthesis in MC3T3-E1 cells irradiated with 8 Gy (* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ represent significant differences between the experimental and control values).

사 (SV Total RNA Isolation System, Promega, Madison, WI, USA)의 지시에 따라 total RNA를 채취하였다. RNase-free deoxyribonuclease I으로 처리한 후, 1 μ g의 total RNA를 RNA PCR kit를 이용하여 제조회사 (the Access RT-PCR System, Promega)의 지시에 따라 역전사시켰다. 반응시간은 42°C에서 30분이었다. 이렇게 획득한 complementary DNA (cDNA) pool을 PCR에 적용시키고 Taq polymerase를 이용한 20 μ L reaction mixture로 증폭시켰다. 증폭은 DNA thermal cycler (Peltiel Thermal Cycler-100, MJ Research, Watertown, MA)를 이용하였다.

제I형 교원질, OC, BPS cDNA에 특수한 증폭반응을 수행하였으며, PCR 산물을 1-2% agarose gel에서 전기영동한 후 ethidium bromide 염색을 하여 증폭된 DNA 가닥을 자외선 하에서 관찰하였다. PCR primer sequence는 다음과 같다.

Osteocalcin (~260 bps)

Forward primer: 5'-TCTCTGCTCACTCTGCTGG-3'

Reverse primer: 5'-ACCGTATAGCGTTTGTAGGCG-3'

Table 2. Relative intensity of gene expression of the collagen protein synthesis during the differentiation of irradiated MC3T3-E1 cells with 8 Gy and in the presence or absence of 2-DG and QCT

Radiation dose	Days of culture (Mean \pm S.D.)			
	7	10	15	20
0	3.5 \pm 0.26	4.6 \pm 0.38	4.0 \pm 0.26	3.7 \pm 0.33
8	3.1 \pm 0.28	3.7 \pm 0.23*	3.3 \pm 0.21	3.4 \pm 0.18
8 ^a	3.3 \pm 0.31	3.0 \pm 0.18**	2.6 \pm 0.22**	2.7 \pm 0.28*
8 ^b	3.4 \pm 0.21	4.9 \pm 0.36	5.1 \pm 0.37**	3.9 \pm 0.31

a: irradiation with 2-DG, b: irradiation with QCT

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$

Bone sialoprotein (~210 bps)

Forward primer: 5'-ACGGCGATAGTTCGGAA-3'

Reverse primer: 5'-GCTGAAACCCGTTTCAGA-3'

GAPDH (~450 bps)

Forward primer: 5'-CACCACCATGGAGAAGGCCG-3'

Reverse primer: 5'-GAACACGGAAGGCCATGCCA-3'

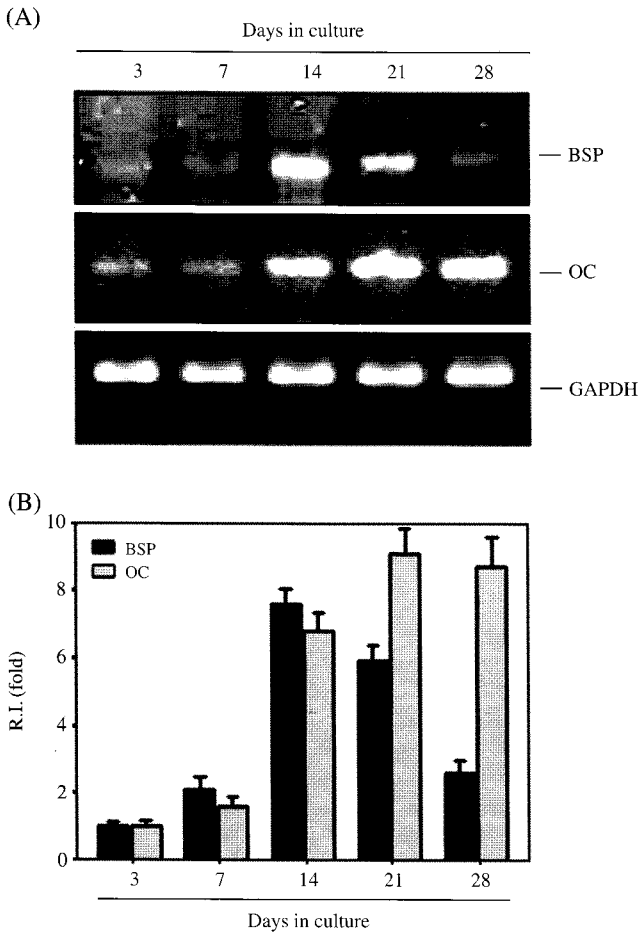


Fig. 3. RT-PCR analysis of bone sialoprotein and osteocalcin during the differentiation of MC3T3-E1 osteoblastic cells. RT-PCR was expressed as the mean \pm S.D. relative to control of triplicate experiments (relative intensity=1.0) after normalization of the bands based on GAPDH. BSP, bone sialoprotein; OC, osteocalcin; R.I., relative intensity.

5) 통계분석

데이터는 평균 \pm 표준편차로 나타내었고 α 값 0.025 수준으로 ANOVA분석을 시행하였다.

결 과

1. 방사선조사된 MC3T3-E1세포에서 제I형 교원질 합성에 대한 2-DG와 QCT의 영향

2 Gy의 방사선이 조사된 MC3T3-E1 세포에서 제I형 교원질 합성은 방사선만 조사한 경우 7일째만 미약하게 감소하였고 10, 15, 20일째에는 증가하였지만 유의한 차이는 나타내지 않았다. 방사선조사와 함께 2-DG를 처리한 경우, 7, 15일째 방사선만 조사한 경우보다 미약한 증가를 보였고 10, 20일째에는 방사선만 조사한 군보다 미약한 감소를 보였다. 그러나 대조군과 유의성있는 차이는 보이지 않았

Table 3. Relative level of BSP and OC mRNA expression during the differentiation of MC3T3-E1 osteoblastic cells

Days of culture	BSP (Mean \pm S.D.)	OC (Mean \pm S.D.)
3	1.00 \pm 0.13	1.00 \pm 0.08
7	2.10 \pm 0.36	1.60 \pm 0.28
14	7.60 \pm 0.46	6.80 \pm 0.55
21	5.90 \pm 0.47	9.10 \pm 0.74
28	2.60 \pm 0.36	8.70 \pm 0.88

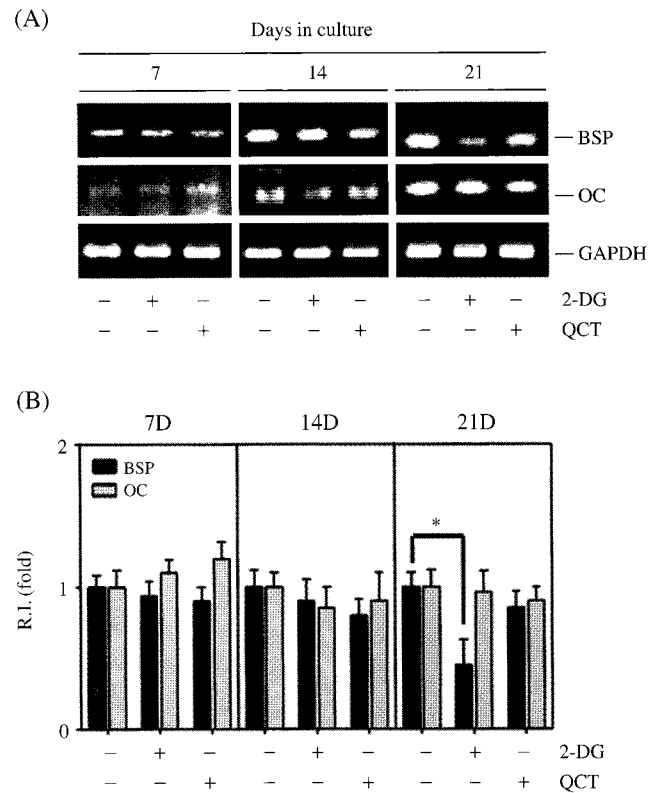


Fig. 4. Effects of 2-DG and quercetin on gene expression of bone sialoprotein and osteocalcin during the differentiation of MC3T3-E1 osteoblastic cells (* p <0.05 represents significant difference between experimental and control values).

다. 2 Gy의 방사선과 함께 QC를 처리한 경우 모두 방사선만 처리한 경우보다 미약한 증가를 보였다. 한편 배양 20일째 2-DG를 처리한 군과 QCT를 처리한 군 간에 유의한 차이를 나타내었다. (p <0.05, Fig. 1, Table 1)

8 Gy의 방사선만 조사한 경우에는 10일째 대조군에 비해 유의성있는 감소가 관찰되었으며 7, 15, 20일째에는 미약하게 감소하였다. 방사선조사와 함께 2-DG를 처리한 경우에는 10, 15, 20일째 현저히 감소하여 2-DG가 방사선효과를 더욱 증가시켰다. 방사선조사와 함께 QCT를 첨가한 경우에는 7일째를 제외하고 10, 15, 20일째 방사선만 조사한 경우보다 합성이 증대되어 방사선효과가 억제되었다 (Fig. 2, Table 2).

Table 4. Relative level of BSP and OC mRNA expression during the differentiation of MC3T3-E1 osteoblastic cells in the presence or absence of 2-DG and QCT

Days of culture	BSP (Mean ± S.D.)			OC (Mean ± S.D.)		
	No addition	2-DG	QCT	No addition	2-DG	QCT
7	1.00 ± 0.08	0.94 ± 0.10	0.90 ± 0.10	1.00 ± 0.12	1.10 ± 0.09	1.20 ± 0.12
14	1.00 ± 0.12	0.90 ± 0.15	0.80 ± 0.11	1.00 ± 0.10	0.85 ± 0.15	0.90 ± 0.20
21	1.00 ± 0.10	0.45 ± 0.18	0.85 ± 0.12	1.00 ± 0.12	0.96 ± 0.15	0.90 ± 0.10

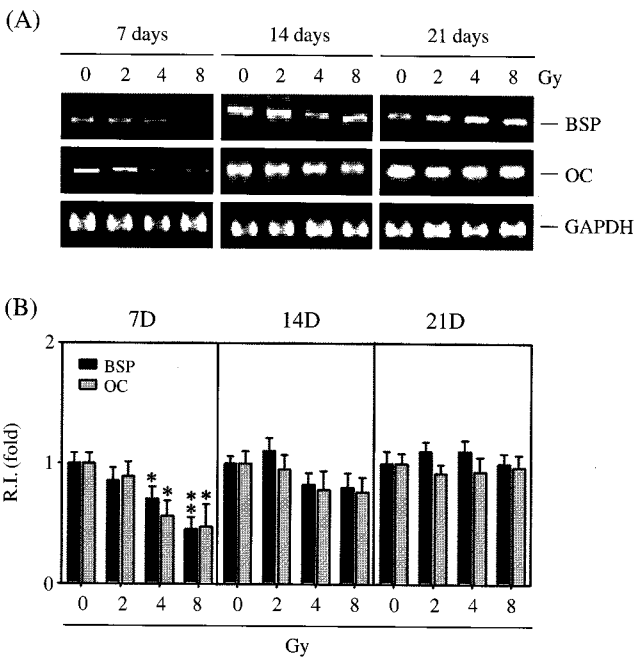


Fig. 5. RT-PCR analysis of bone sialoprotein and osteocalcin during the differentiation of irradiated MC3T3-E1 osteoblastic cells (*p < 0.05 and **p < 0.01 vs non-irradiated control values).

2. MC3T3-E1 골모세포의 분화시 BSP와 OC의 발현 양상

Fig. 3과 Table 3은 MC3T3-E1 골모세포의 분화과정 동안에 발현되는 BSP와 OC의 RT-PCR과 이를 정량적으로 표현한 것으로서, BSP는 배양 14일째에, OC는 배양 21일째에 각각 최대치를 나타내었다.

3. MC3T3-E1 골모세포의 분화시 BSP와 OC의 유전자 발현에 대한 2DG와 QCT의 영향

Fig. 4와 Table 4는 방사선이 조사되지 않은 MC3T3-E1 골모세포의 분화기간 동안 BSP와 OC mRNA의 발현과 2-DG와 QCT 처리시 BSP와 OC mRNA 발현에 미치는 영향을 나타낸다. BSP의 경우 2-DG 처리시 발현량이 감소하는 양상을 보였고 특히 21일째에 유의성있게 감소하였다. QCT 처리시에도 유의성은 나타내지 않았지만 발현량이 미약하게 감소하였다. OC의 경우 2-DG와 QCT 처리군 모두

Table 5. Relative level of expression patterns of BSP and OC 7 days after irradiation of MC3T3-E1 osteoblastic cells

Radiation dose (Gy)	BSP (Mean ± S.D.)	OC (Mean ± S.D.)
0	1.00 ± 0.08	1.00 ± 0.08
2	0.85 ± 0.11	0.89 ± 0.12
4	0.70 ± 0.10*	0.56 ± 0.13*
8	0.45 ± 0.10**	0.47 ± 0.19*

*: p < 0.05, **: p < 0.01

Table 6. Relative level of expression patterns of BSP and OC 14 days after irradiation of MC3T3-E1 osteoblastic cells

Radiation dose (Gy)	BSP (Mean ± S.D.)	OC (Mean ± S.D.)
0	1.00 ± 0.06	1.00 ± 0.10
2	1.10 ± 0.11	0.95 ± 0.12
4	0.82 ± 0.10	0.78 ± 0.16
8	0.80 ± 0.12	0.76 ± 0.12

Table 7. Relative level of expression patterns of BSP and OC 21 days after irradiation of MC3T3-E1 osteoblastic cells

Radiation dose (Gy)	BSP (Mean ± S.D.)	OC (Mean ± S.D.)
0	1.00 ± 0.10	1.00 ± 0.08
2	1.10 ± 0.08	0.92 ± 0.07
4	1.10 ± 0.09	0.93 ± 0.12
8	1.00 ± 0.08	0.97 ± 0.10

에서 배양 초기인 7일째에 미약한 증가를 보였지만 14일과 21일째에는 대조군과 유사하였다.

4. 방사선조사된 MC3T3-E1 골모세포 분화시 BSP와 OC의 발현 양상

Fig. 5와 Tables 5, 6, 7은 방사선조사를 받은 MC3T3-E1 골모세포의 분화기 동안 BSP와 OC mRNA 발현 양상을 나타낸 것으로서 BSP의 경우 2 Gy에서는 7일째 미약한 감소를 보였고 14, 21일에는 미약한 증가를 나타내었다. 4 Gy 조사시에는 7일째 유의성있게 감소하였으며 14일과 21일째에는 점차 증가하는 양상을 보였다. 또한 8 Gy를 조사

받은 경우 배양일수에 상관없이 전반적으로 감소하였으며 특히 배양초기인 7일째에는 유의성있게 감소하였다. OC의 경우 2, 4, 8 Gy에서 배양 7, 14, 21일째 모두 감소하였지만 특히 배양 7일째 4, 8 Gy를 조사받은 군에서 유의성있는 감소를 보였다.

5. 방사선조사된 MC3T3-E1 골모세포의 분화시 BSP와 OC의 유전자 발현에 대한 2-DG와 QCT의 영향

Fig. 6과 Table 8은 방사선조사된 MC3T3-E1 골모세포

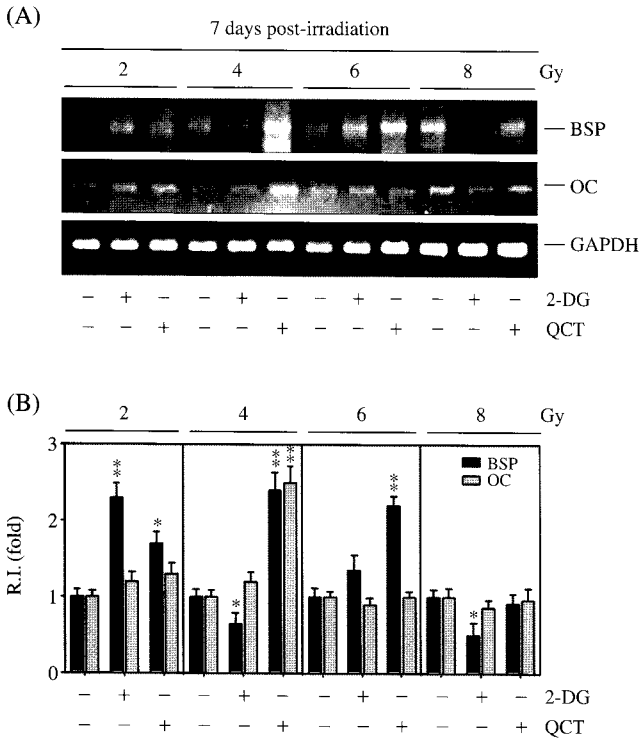


Fig. 6. Expression patterns of bone sialoprotein and osteocalcin 7 days post-irradiation in 2-DG and quercetin-treated MC3T3-E1 osteoblastic cells (*p<0.05 and **p<0.01 vs non-irradiated control values).

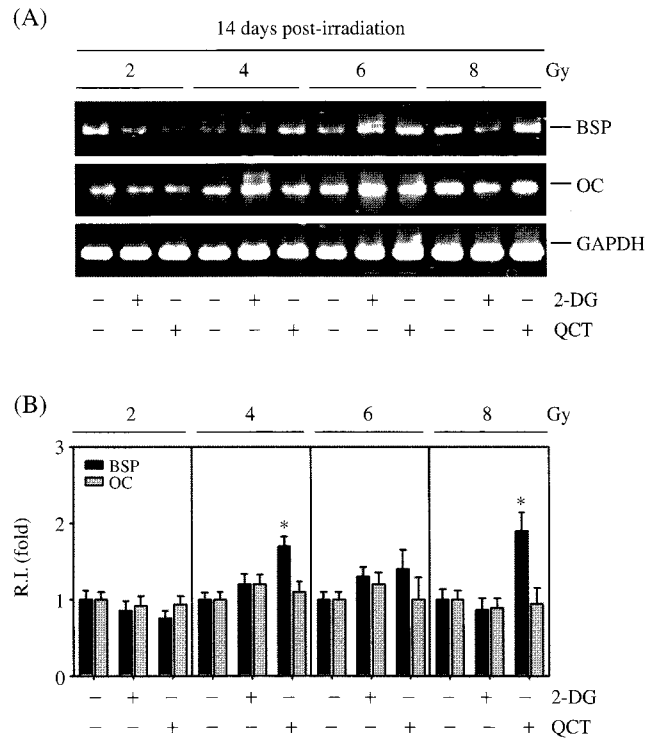


Fig. 7. Expression patterns of bone sialoprotein and osteocalcin at 14 days post-irradiation in 2-DG and quercetin-treated MC3T3-E1 osteoblastic cells (*p<0.05 represents significant difference between experimental and control values).

Table 8. Relative level of BSP and OC mRNA expression 7 days after irradiation in 2-DG- or QCT-treated MC3T3-E1 osteoblastic cells

Radiation dose (Gy)	BSP (Mean ± S.D.)			OC (Mean ± S.D.)		
	RA	RA+2-DG	RA+QCT	RA	RA+2-DG	RA+QCT
2	1.00 ± 0.10	2.30 ± 0.19**	1.70 ± 0.15*	1.00 ± 0.08	1.20 ± 0.12	1.30 ± 0.14
4	1.00 ± 0.10	0.64 ± 0.15*	2.40 ± 0.23**	1.00 ± 0.09	1.20 ± 0.12	2.50 ± 0.21**
6	1.00 ± 0.12	1.35 ± 0.20	2.20 ± 0.12**	1.00 ± 0.07	0.90 ± 0.09	1.00 ± 0.07
8	1.00 ± 0.10	0.50 ± 0.16*	0.92 ± 0.12	1.00 ± 0.12	0.86 ± 0.10	0.96 ± 0.16

*: p < 0.05, **: p < 0.01, RA: irradiation, RA+2-DG: irradiation with 2-DG, RA+QCT: irradiation with QCT

Table 9. Relative level of BSP and OC mRNA expression 14 days after irradiation in 2-DG- or QCT-treated MC3T3-E1 osteoblastic cells

Radiation dose (Gy)	BSP (Mean ± S.D.)			OC (Mean ± S.D.)		
	RA	RA+2-DG	RA+QCT	RA	RA+2-DG	RA+QCT
2	1.00 ± 0.12	0.85 ± 0.13	0.75 ± 0.10	1.00 ± 0.10	0.92 ± 0.12	0.93 ± 0.11
4	1.00 ± 0.09	1.20 ± 0.13	1.70 ± 0.12*	1.00 ± 0.10	1.20 ± 0.12	1.10 ± 0.13
6	1.00 ± 0.10	1.30 ± 0.12	1.40 ± 0.25	1.00 ± 0.10	1.20 ± 0.15	1.00 ± 0.29
8	1.00 ± 0.13	0.86 ± 0.16	1.90 ± 0.24*	1.00 ± 0.12	0.89 ± 0.13	0.94 ± 0.21

*: p < 0.05

분화시 배양 7일째 BSP와 OC의 mRNA 유전자 발현에 미치는 2-DG와 QCT의 영향을 나타낸 것이다. 2-DG를 처리한 경우 BSP는 2, 6Gy에서 방사선만 조사한 군에 비해 발현량이 증가하였고 4, 8Gy에서는 유의성있게 감소하였다. QCT를 처리한 군에서는 방사선만 조사한 군에 비해 2, 4, 6Gy에서 모두 유의성있게 발현량이 증가하였고 8Gy 조사군에서는 미약한 감소를 보였다. 2-DG를 처리한 경우 OC는 2, 4Gy에서 발현량이 미약하게 증가하였고 6, 8Gy에서는 미약하게 감소하였으나 유의성은 없었다. QCT를 처리한 경우 OC는 2, 4Gy에서 증가하였고 8Gy에서 미약한 감소를 보였다.

배양 14일째에는 전반적으로 유의성있는 차이를 보이지 않았으나 BSP 유전자의 발현량은 2-DG를 첨가한 경우 2,

8Gy에서는 미약하게 감소, 4, 6Gy에서는 미약한 증가를 나타내었고 QCT를 첨가한 경우에는 2Gy에서만 미약하게 감소하였으며 2, 4, 6Gy에서는 증가하였다. OC 유전자의 발현량은 2-DG와 QCT를 첨가한 경우 모두에서 2, 8Gy에서는 미약한 감소, 4, 6Gy에서는 미약한 증가를 보였다(Fig. 7, Table 9).

배양 21일째 BSP 유전자의 발현량은 2-DG 처리시 2, 4, 6Gy에서 전반적인 증가를 보였고 8Gy에서 미약한 감소를 나타내었다. QCT를 처리한 군에서는 2Gy에서는 별다른 변화를 보이지 않았고 4, 6, 8Gy에서 발현량이 증가하였다. OC의 발현량은 2-DG 처리시 2, 4, 8Gy에서 감소하였고 QCT 첨가시 2, 6Gy에서는 증가하고, 4, 8Gy에서는 감소하는 양상을 보였으나 유의성있는 차이는 없었다(Fig. 8, Table 10).

7, 14, 21일째 BSP와 OC 유전자의 발현량에 대한 2-DG와 QCT의 영향은 배양 7일째에 그 발현량이 유의성있게 크게 나타났으며 14일째와 21일째로 배양일이 증가할수록 그 영향은 적었다. 또한 OC보다 BSP가 2-DG와 QCT에 대한 영향이 더욱 컸으며 2-DG와 QCT은 모두 발현량을 전반적으로 증가시켰고, OC의 경우 2-DG에 대해 7, 14일째 2, 4Gy의 적은 선량에서 발현량이 미약하게 증가하였고 21일째에는 전반적으로 발현량이 감소하였다. 또한 QCT를 처리하였을 때 8Gy에서 감소를 보였고 14, 21일째에는 미약한 증가를 보였다.

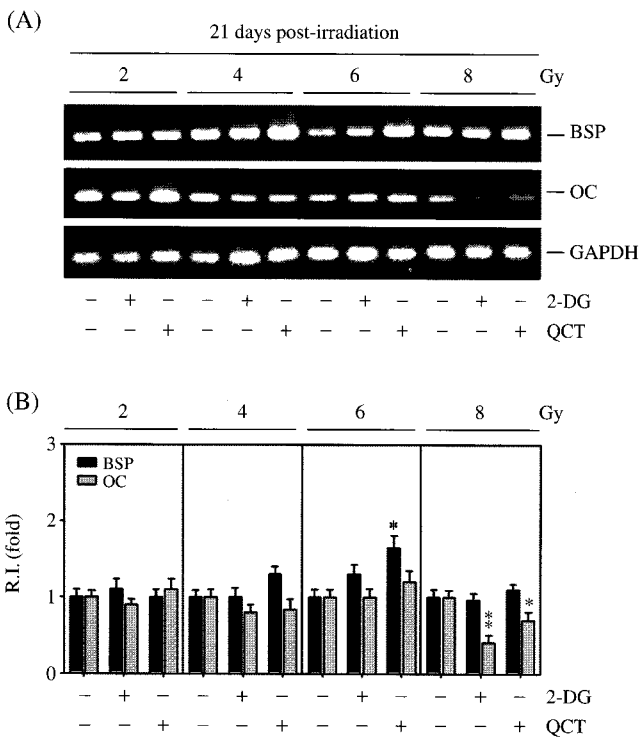


Fig. 8. Expression patterns of bone sialoprotein and osteocalcin at 21 days post-irradiation in 2-DG and quercetin-treated MC3T3-E1 osteoblastic cells (*p<0.05 and **p<0.01 represent significant difference between experimental and control values).

고찰

골은 세포의 칼슘의 저장소로서 무기질과 유기질로 구성된 특화된 결합조직이며 다양한 세포와 풍부한 세포외기질로 구성되어 있다. 골조직은 부갑상선호르몬(PTH), 1,25(OH)₂ vitamin D3 등의 호르몬 등에 의해 조절되어 신체 내 골항상성을 유지한다.³⁰ 또한 골조직은 골 무게의 67%가 무기질, 그리고 33%가 유기질로 구성되어 있으며³¹ 이중 유기질은 95%가 제I형 교원질이고 5%는 비교원성 단백질로 이루어져 있다.

비교원성 단백질은 Ca²⁺의 세포부착과 수산화인회석의 결합, 골조직의 광화에 중요한 기능을 하는 것으로 알려져

Table 10. Relative levels of BSP and OC mRNA expression 21 days after irradiation in 2-DG- or QCT-treated MC3T3-E1 osteoblastic cells

Radiation dose (Gy)	BSP (Mean ± S.D.)			OC (Mean ± S.D.)		
	RA	RA+2-DG	RA+QCT	RA	RA+2-DG	RA+QCT
2	1.00 ± 0.10	1.10 ± 0.13	1.00 ± 0.10	1.00 ± 0.08	0.90 ± 0.07	1.10 ± 0.13
4	1.00 ± 0.09	1.00 ± 0.12	1.30 ± 0.10	1.00 ± 0.10	0.80 ± 0.10	0.83 ± 0.14
6	1.00 ± 0.10	1.30 ± 0.12	1.65 ± 0.16*	1.00 ± 0.10	1.00 ± 0.11	1.20 ± 0.14
8	1.00 ± 0.10	0.96 ± 0.09	1.10 ± 0.07	1.00 ± 0.09	0.41 ± 0.10**	0.70 ± 0.11*

*: p<0.05, **: p<0.01

있다.^{32,33} 골형성은 간엽세포에서 기원한 골모세포의 증식, 분화, 성숙, 석회화의 단계를 거쳐 이루어지며 이 과정에서 복잡하고 다양한 호르몬과 조절인자의 영향을 받는다.³¹ 또한 골형성의 주를 이루는 골모세포의 분화시 이용할 수 있는 표지자에는 여러 가지가 있으며 이들이 골형성을 자극한 후 배양 시에는 상향조절(up-regulation)된다.³³

골관련 단백질의 발현 양상은 MC3T3-E1 골모세포주가 분화하는 동안 시간 순서로 조절된다.^{14,34} 골형성 과정은 크게 세 가지 시기로 나누어 볼 수 있는데^{35,37} 초기에 DNA 합성이 활발히 일어나고 세포의 수가 증가하는 세포증식기(4-10일), 점차 세포의 증식은 억제되고 세포외기질이 형성되며 침착되는 성숙기(10-16일), 세포외기질의 석회화가 진행되는 석회화기(16-30일)로 구분된다. 이 연구에서는 세포의 증식이 70-80% 정도 이루어진 상태에서 세포의 분화를 유도하였으므로 방사선조사 후 3일째를 세포증식기, 7일째를 분화성숙기, 14일과 21일째를 석회화기로 볼 수 있다.

골모세포는 섬유모세포가 발현하는 유전자 외에도 골조직, 치아 등 광화조직에 특이적인 BSP와 in vivo에서 골모세포에 특이적인 OC를 발현한다.³⁰

BSP는 광화개시와 수산화인회석의 부착, 증양의 전이에 중요한 역할을 하는 등 여러 가지 기능을 가지는³⁸ 골기질의 인 결합 당단백질이다. BSP는 다글루타민산 아미노산(polyglutamic acid amino acid sequence) 서열에 의해 수산화인회석에 결합할 수 있으며 Arg-Gly-Asp(RGD) 아미노산 서열에 의해 수산화인회석의 세포부착을 중재하고^{33,39} 초기 석회화에 중요한 역할을 한다. 또한 BSP는 골의 총 비교원성 단백질 중 15%를 차지하며 골석회화 및 재형성과 관련이 있고⁴⁰ 치주인대 재형성에도 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 따라서 BSP는 신경결합조직과 신생치조골을 형성하는 등 치주재생에도 긍정적인 영향을 미칠 수 있다.³⁸ BSP 유전자는 특히 무기질 결정 형성을 조절할 수 있는 골석회화와 분화의 대표적인 표지유전자로서⁴¹ 골, 치아 및 백악질 형성의 초기에 높게 발현되고 세포외기질에 축적되며 수산화인회석 결정의 형성을 유해화한다. BSP 유전자의 전사는 호르몬과 성장인자, cytokine에 의해 조절되며 유발암에서 나타나는 미세석회화는 이러한 BSP의 발현이 중요한 역할을 하는 것으로 보고된 바 있다.³⁸

따라서 BSP의 조절은 골모세포의 분화, 골기질의 광화, 증양의 전이에 중요한 역할을 하며³⁸ 증양의 예후를 판단하는데 긍정적인 표지자로 사용되기도 한다.^{42,43}

BSP의 발현 시기에 대해서도 다양한 연구가 진행되어 왔다. Yamamoto 등⁴⁴은 쥐 두개관 osteoprogenitor cell을 dexamethasone으로 처리하여 배양시 BSP 유전자의 발현이 배양 3일째부터 나타난다고 하였고, Cowles 등⁴⁵은 쥐 두개관의 골모세포에서 BSP 유전자의 발현이 배양 17일째 관찰되었으며 21일째 최대 발현량을 보였다고 하였다. Ha 등¹⁹

은 생쥐 두 개관으로부터 유래한 MC3T3-E1 골모세포에서 BSP 유전자의 발현량이 배양 14일째 최대치를 보였고 21일째 급격한 감소를 나타낸 것으로 보고하였다.

이 연구에서는 MC3T3-E1 골모세포의 배양시 BSP는 배양 14일째 최고치를 보였으며 이후 점차 그 발현량이 감소됨으로써 Ha 등¹⁹의 연구 결과와 유사한 결과를 얻었다. 또한 2, 4, 6, 8 Gy의 방사선조사 후 배양 7, 14, 21일째 BSP의 발현량은 전반적으로 감소하였는데, 특히 배양 7일째 유의성있는 감소를 보였다. 즉, 2 Gy의 방사선조사시 7일째에만 BSP의 발현량이 미약하게 감소하였고 이후 14, 21일째에는 이의 발현량이 증가하는 경향을 보였다. 4 Gy에서는 21일째가 되어서야 비로소 발현량이 미세하게 증가하였고, 8 Gy에서는 전반적으로 감소하였다. 따라서 배양 초기에 BSP의 발현량에 미치는 영향이 더욱 큰 것을 알 수 있었다.

OC는 골기질의 비교원성 단백질의 주성분으로, 49개의 아미노산으로 이루어진 작은 단백질이며 성숙한 골모세포에 의해 합성된다. 그 기전과 기능은 명확하게 알려져 있지 않으나 골형성의 특이적 표지자로 사용되고 있다. OC는 칼슘과 수산화인회석의 결합과 관련이 있는 세 개의 γ -carboxyglutamic acid residue (Gla)를 가지고 있다.^{46,47}

사람의 골모세포에서 발현되는 OC는 vitamin K에 의해 카르복실화(carboxylation)가 일어나고^{46,48} vitamin D3가 그 생성을 촉진한다.^{46,49} OC 유전자의 발현은 골이 석회화 되는 시기에 매우 높게 나타나는데 이는 OC가 골기질의 석회화를 촉진시키는 요인으로 작용한다는 것을 보여준다.^{50,51} 따라서 OC는 골모세포 발달에 중요한 조절인자라고 볼 수 있으며⁵² OC가 발현되면 미분화된 간엽세포가 골모세포로 증식하도록 자극하고 골모세포의 성숙과 광화를 조절하며⁵³ 파골세포의 활성을 촉진하여 골흡수를 유도하기도 한다.⁵⁴ 또한 이소골화 환자에서는 OC가 발현되지 않는데 이것은 골모세포와 파골세포의 균형이 상실됨으로써 이소성 골이 형성되는 주요 기전이라는 보고도 있다.⁵⁵ OC는 골모세포의 배양 7일 이전에는 거의 발견되지 않으며 10일 경부터 발현을 시작하는 것으로 보고되고 있다.^{35,37} 또한 28일경에는 발현 초기보다 7배 정도로 높게 발현되고 이러한 OC의 발현이 가장 활발한 시기는 골석회화가 일어나는 후기이며 이는 OC가 골세포 광화에 중요한 표지자임을 말해준다.

Cho 등⁵⁰과 Yamamoto 등⁴⁴은 OC의 발현은 배양 14일에 최대치를 나타내었으며 21일경 미세하게 감소한다고 하였다. 이 연구에서 OC의 발현량은 배양 후 21일째에 최대치를 보였고 28일째 급격히 감소하였다. 이는 OC가 MC3T3-E1 골모세포의 석회화기인 배양후기에 가장 높게 발현된다는 이전의 연구와 일치하는 결과라고 볼 수 있다. 방사선이 OC에 미치는 영향을 보면 전반적으로 OC의 발현량은 감소시켰는데 특히 배양 초기인 7일째 방사선이 OC의 발현

량에 미치는 영향이 컸다. 이는 OC가 배양 초기에는 그 발현양이 적기 때문에 방사선이 미치는 영향이 컸으며, 이후에는 발현량들이 증가한 것으로 보아 방사선에 대한 영향이 점차 감소된 것으로 사료된다.

2-DG는 glucose의 대사길항제 (antimetabolite)로서 glucose 이동과 해당작용을 억제하는데⁵⁶, 중앙세포처럼 해당작용이 높은 비율로 일어나는 세포에서는 방사선조사 후 일어나는 재생 과정을 억제하여 방사선에 의한 중앙세포의 손상을 높일 수 있다.^{57,59} 2-DG는 일차적으로 해당작용을 차단하고 단백질의 당화 (glycosylation)를 억제함으로써 항암효과와 항생효과를 가지며 치료에 적용 가능하다고 보고되고 있다.⁵⁹⁻⁶¹ 그러나 Song 등⁶²은 2-DG가 정상 골모세포에 대한 방사선조사시 유의성있는 방사선조절 효과를 나타내지는 않는다고 하였다.

이 연구에서 MC3T3-E1 골모세포 배양시 2-DG를 처리한 경우 BSP의 발현량은 전반적으로 미약하게 감소했으며 21일경에만 유의성있는 감소를 보였다. 한편 OC의 경우 발현이 거의 되지 않는 7일경에만 BSP가 미약한 증가를 보였고 이후에는 전반적으로 감소하는 경향을 나타내었다.

QCT는 다가페놀 (polyphenolic) 물질의 일종으로 전형적인 플라보놀 (flavonol)형의 플라보노이드이다. 플라보노이드는 Shimoi 등⁶³에 의해 방사선보호 효과를 보인다고 보고된 바 있다. 항산화 작용을 통해 만성질환과 연관된 산화 스트레스 (oxidative stress) 예방에 영향을 미친다.⁶⁴ 또한 자외선에 대한 보호작용이 있다고 보고된 바 있으며⁶⁵⁻⁶⁷ 항암제에 의한 심장세포 독성을 완화하는 효과⁶⁸도 보고된 바 있다. Notoya 등⁶⁹은 in vitro에서 QCT가 골모세포의 분열 과정에서 세포를 G1기에 정지시킴으로써 골모세포의 증식을 현저히 억제하고 histone H1의 인산화를 억제한다고 하였다. 또한 이들은 세포의 증식이 멈춘 후 alkaline phosphatase의 활성을 억제하고 OC 유전자의 발현수준과 Ca^{2+} 침착률, 석회화 결절, 골모세포 분화의 표지자를 모두 억제함으로써 골모세포의 증식, 분화, 광화를 억제한다고 보고하였다. 그러나 QCT가 골모세포의 고사를 유도하고 세포 이동을 억제한다는 보고도 있다.⁷⁰

골모세포의 세포이동은 골생리학에서 근본적으로 다양한 과정을 포함하며 상처 치유, 파절부의 재생, 섬유화, 중앙전이 등에도 중요한 역할을 하는 것으로서 이러한 QCT의 영향은 골모세포의 정상 증식, 분화에 영향을 미치는 것으로 사료된다. Kim 등⁶⁴은 ROS 17/2.8 cell을 이용한 연구에서 QCT가 BSP 유전자 발현량을 증가시킨다고 보고하였다.

이 연구에서 MC3T3-E1 골모세포의 분화시 2-DG와 QCT를 처리한 경우 BSP와 OC 유전자 발현량은 전반적으로 감소하였으나 유의성있는 변화는 없었다. 또한 OC는 BSP에 비해 2-DG와 QCT의 영향은 적었으나 BSP와 마찬가지로 2-DG보다 QCT의 방사선억제작용이 더욱 컸다. 이러한 연구의 결과는 QCT가 BSP 유전자 발현량을 증가시

킨다는 Kim 등⁶⁴의 결과와 차이가 있는데 이는 연구대상 세포 및 실험실의 미세환경의 차이에 기인한 결과라고 사료된다.

Gevorgyan 등²⁰은 amifostine의 방사선 보호작용이 2Gy 일 때 가장 높았기 때문에 방사선치료시 조사해야 하는 방사선량을 낮은 선량 특히 방사선에 대한 보호작용을 받을 수 있는 2Gy로 분할하여 조사하면 정상세포에 대한 방사선의 유해한 효과를 더욱 낮출 수 있다고 주장한 바 있다.

이 연구에서는 저선량일 때 QCT의 방사선보호작용이 더욱 컸으며 특히 배양 초기인 7일째에 그 역할이 더욱 크게 나타나 Gevorgyan 등²⁰의 연구결과를 뒷받침해주는 결과로 사료된다. 또한 이 연구에서 2-DG는 골모세포의 유전자 특히 BSP와 OC에 대해 별다른 영향을 미치지 못하였으나 QCT의 경우 방사선에 대한 보호작용이 관찰되었다.

결론적으로 방사선조사를 받은 MC3T3-E1 골모세포의 제I형 교원질과 BSP와 OC의 유전자 발현에 특히 8Gy 이하의 선량조사시, 배양 초기에 QCT는 방사선보호작용을 하는 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- 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.
- Mitchell MJ, Logan PM. Radiation-induced changes in bone. Radiographics. 1998; 18 : 1125-36.
- Green N, Frehch S, Rodriguez G, Hays M, Fingerhut A. Radiation-induced delayed union of fractures. Radiology 1969; 93 : 635-41.
- Baxter NN, Habermann EB, Tepper JE, Durham SB, Virnig BA. Risk of pelvic fractures in older women following pelvic irradiation. JAMA 2005; 294 : 2587-93.
- Willey JS, Lloyd SA, Robbins ME, Bourland JD, Smith-Sielicki H, Bowman LC, et al. Early increase in osteoclast number in mice after whole-body irradiation with 2 Gy X rays. Radiat Res 2008; 170 : 388-92.
- Tamurian RM, Damron TA, Spadaro JA. Sparing radiation-induced damage to the physis by radioprotectant drugs: laboratory analysis in a rat model. J Orthop Res 1999; 17 : 286-92.
- Damron TA, Spadaro JA, Margulies B, Damron LA. Dose response of amifostine in protection of growth plate function from irradiation effects. Int J Cancer 2000; 90 : 73-9.
- Denys D, Kaste SC, Kun LE, Chaudhary MA, Bowman LC, Robbins KT. The effects of radiation on craniofacial skeletal growth: a quantitative study. Int J Pediatr Otorhinolaryngol 1998; 45 : 7-13.
- Paulino AC, Simon JH, Zhen W, Wen BC. Long-term effects in children treated with radiotherapy for head and neck rhabdomyosarcoma. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2000; 48 : 1489-95.
- Evans HB, Brown S, Hurst LN. The effects of early postoperative radiation on vascularized bone grafts. Ann Plast Surg 1991; 26 : 505-10.
- 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.
- 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.
13. Szymczyk KH, Shapiro IM, Adams CS. Ionizing radiation sensitizes bone cells to apoptosis. *Bone* 2004; 34 : 148-56.
 14. 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.
 15. 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.
 16. Wright EG, Coates PJ. Untargeted effects of ionizing radiation: implications for radiation pathology. *Mutat Res* 2006; 597 : 119-32.
 17. Coates PJ, Lorimore SA, Wright EG. Damaging and protective cell signalling in the untargeted effects of ionizing radiation. *Mutat Res* 2004; 568 : 5-20.
 18. Lorimore SA, Coates PJ, Wright EG. Radiation-induced genomic instability and bystander effects: inter-related nontargeted effects of exposure to ionizing radiation. *Oncogene* 2003; 22 : 7058-69.
 19. Ha SY, Kang KH, Lee SR, Kwon KJ, Koh KJ. Effects of irradiation on the mRNA expression of osteonectin and bone sialoprotein in MC3T3-E1 osteoblastic cell line. *Korean J Oral Maxillofac Radiol* 2004; 34 : 99-106.
 20. Gevorgyan A, Sukhu B, Alman BA, Bristow RG, Pang CY, Forrest CR. Radiation effects and radioprotection in MC3T3-E1 mouse calvarial osteoblastic cells. *Plast Reconstr Surg* 2008; 122 : 1025-35.
 21. Grdina DJ, Murley JS, Kataoka Y. Radioprotectants: current status and new directions. *Oncology* 2002; 63 : 2-10.
 22. Latz D, Thonke A, Jüling-Pohlitz L, Pohlitz W. Tumor response to ionizing radiation and combined 2-deoxy-D-glucose application in EATC tumor bearing mice: monitoring of tumor size and microscopic observations. *Strahlenther Onkol* 1993; 169 : 405-11.
 23. Wattenberg LW. Chemoprevention of cancer. *Cancer Res* 1985; 45: 1-8.
 24. Deschner EE, Ruperto J, Wong G, Newmark HL. Quercetin and rutin as inhibitors of azoxymethanol-induced colonic neoplasia. *Carcinogenesis* 1991; 12 : 1193-6.
 25. Robak J, Gryglewski RJ. Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochem Pharmacol* 1988; 37 : 837-41.
 26. van Rijn J, van den Berg J. Flavonoids as enhancers of x-ray-induced cell damage in hepatoma cells. *Clin Cancer Res* 1997; 3 : 1775-9.
 27. Peterkofsky B, Haralson MA, Dimari SJ, Miller EJ. Types I, III, and V collagen and total collagen from cultured cells and tissues. Oxford University Press; 1995. p. 31-71.
 28. Bradford MM. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Anal Biochem* 1976; 72 : 248-54.
 29. Lavarca C, Paigen K. A simple rapid and sensitive DNA assay procedure. *Anal Biochem* 1980; 102 : 344-52.
 30. Karsenty G. The genetic transformation of bone biology. *Genes Dev* 1999; 13 : 3037-51.
 31. Hill PA. Bone remodelling. *Br J Orthod* 1998; 25 : 101-7.
 32. Young MF, Kerr JM, Ibaraki K, Heegaard AM, Robey PG. Structure, expression, and regulation of the major noncollagenous matrix proteins of bone. *Clin Orthop Relat Res* 1992; 281 : 275-94.
 33. Ganss B, Kim RH, Sodek J. Bone sialoprotein. *Crit Rev Oral Biol Med* 1999; 10 : 79-98.
 34. Stains JP, Civitelli R. Genomic approaches to identifying transcriptional regulators of osteoblast differentiation. *Genome Biol* 2003; 4 : 222.
 35. 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.
 36. 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.
 37. 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.
 38. Ogata Y. Bone sialoprotein and its transcriptional regulatory mechanism. *J Periodontol Res* 2008; 43 : 127-35.
 39. Harris NL, Rattray KR, Tye CE, Underhill TM, Somerman MJ, D'Errico JA, et al. Functional analysis of bone sialoprotein: identification of the hydroxyapatite-nucleating and cell-binding domains by recombinant peptide expression and site-directed mutagenesis. *Bone* 2000; 27 : 795-802.
 40. Wuttke M, Müller 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.
 41. 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.
 42. Fedarko NS, Fohr B, Robey PG, Young MF, Fisher LW. Factor H binding to bone sialoprotein and osteopontin enables tumor cell evasion of complement-mediated attack. *J Biol Chem* 2000; 275 : 16666-72.
 43. Withold W, Armbruster FP, Karmatschek M, Reinauer H. Bone sialoprotein in serum of patients with malignant bone diseases. *Clin Chem* 1997; 43 : 85-91.
 44. 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.
 45. 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.
 46. Pagani F, Francucci CM, Moro L. Markers of bone turnover: biochemical and clinical perspectives. *J Endocrinol Invest* 2005; 28 : 8-13.
 47. Camozzi V, Tossi A, Simoni E, Pagani F, Francucci CM, Moro L. Role of biochemical markers of bone remodeling in clinical practice. *J Endocrinol Invest* 2007; 30 : 13-7.
 48. Ryan-Harshman M, Aldoori W. Bone health. New role for vitamin K? *Can Fam Physician* 2004; 50 : 993-7.
 49. Varga F, Rumpler M, Spitzer S, Karlic H, Klaushofer K. Osteocalcin attenuates T3- and increases vitamin D3-induced expression of MMP-13 in mouse osteoblasts. *Endocr J* 2009; 56 : 441-50.
 50. Cho SB, Ha SY, Lee SR, Koh KJ. Effects of irradiation on the mRNA expression of the osteocalcin and osteopontin in MC3T3-E1 osteoblastic cell line. *Korean J Oral Maxillofac Radiol* 2003; 33 : 179-85.
 51. Mehrara BJ, Rowe NM, Steinbrech DS, Dudziak ME, Saadeh PB, McCarthy JG, et al. Rat mandibular distraction osteogenesis: II. Molecular analysis of transforming growth factor beta-1 and osteocalcin gene expression. *Plast Reconstr Surg* 1999; 103 : 536-47.
 52. Ducy P, Desbois C, Boyce B, Pinero G, Story B, Dunstan C, et al. Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature* 1996; 382 : 448-52.

53. Lian JB, Stein GS, Stein JL, van Wijnen AJ. Osteocalcin gene promoter: unlocking the secrets for regulation of osteoblast growth and differentiation. *J Cell Biochem Suppl* 1998; 30-31 : 62-72.
54. Chenu C, Colucci S, Grano M, Zigrino P, Barattolo R, Zamboni G, et al. Osteocalcin induces chemotaxis, secretion of matrix proteins, and calcium-mediated intracellular signaling in human osteoclast-like cells. *J Cell Biol* 1994; 127 : 1149-58.
55. Handschin AE, Egermann M, Wedler V, Trentz O, Hemmi S, Trentz OA. A comparative analysis of phenotype expression in human osteoblasts from heterotopic ossification and normal bone. *Langenbecks Arch Surg* 2006; 391 : 376-82.
56. Wick AN, Drury DR, Nakada HI, Wolfe JB. Localization of the primary metabolic block produced by 2-deoxyglucose. *J Biol Chem* 1957; 224 : 963-9.
57. Jain VK, Kalia VK, Sharma R, Maharajan V, Menon M. Effects of 2-deoxy-D-glucose on glycolysis, proliferation kinetics and radiation response of human cancer cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1985; 11 : 943-50.
58. Dwarakanath BS, Jain V. In vitro radiation responses of human intracranial meningiomas & their modifications by 2-deoxy-D-glucose. *Indian J Med Res* 1990; 92 : 183-8.
59. Dwarakanath BS, Adhikari JS, Jain V. Hematoporphyrin derivatives potentiate the radiosensitizing effects of 2-deoxy-D-glucose in cancer cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1999; 43 : 1125-33.
60. Kang HT, Hwang ES. 2-Deoxyglucose: an anticancer and antiviral therapeutic, but not any more a low glucose mimetic. *Life Sci* 2006; 78 : 1392-9.
61. Aft RL, Zhang FW, Gius D. Evaluation of 2-deoxy-D-glucose as a chemotherapeutic agent: mechanism of cell death. *Br J Cancer* 2002; 87 : 805-12.
62. Song HE, Ahn HS, Lee SR, Koh KJ. Effects of 2-deoxy-D-glucose and quercetin on cytokine secretion and gene expression of type I collagen during osteoblastic differentiation in irradiated MC3T3-E1 cells. *Korean J Oral Maxillofac Radiol* 2005; 35 : 191-8.
63. Shimoi K, Masuda S, Furugori M, Esaki S, Kinane N. Radioprotective effect of antioxidative flavonoids in gamma-ray irradiated mice. *Carcinogenesis* 1994; 15 : 2669-72.
64. Kim DS, Takai H, Arai M, Araki S, Mezawa M, Kawai Y, et al. Effects of quercetin and quercetin 3-glucuronide on the expression of bone sialoprotein gene. *J Cell Biochem* 2007; 101 : 790-800.
65. Erden Inal M, Kahraman A. The protective effect of flavonol quercetin against ultraviolet a induced oxidative stress in rats. *Toxicology* 2000; 154: 21-9.
66. Mirossay A, Onderková H, Mirossay L, Sarisský M, Mojzisz J. The effect of quercetin on light-induced cytotoxicity of hypericin. *Physiol Res* 2001; 50 : 635-7.
67. Kahraman A, Inal ME. Protective effects of quercetin on ultraviolet A light-induced oxidative stress in the blood of rat. *J Appl Toxicol* 2002; 22 : 303-9.
68. Guzy J, Kusnir J, Mareková M, Chavková Z, Dubayová K, Mojziszová G, et al. Effect of quercetin on daunorubicin-induced heart mitochondria changes in rats. *Physiol Res* 2003; 52 : 773-80.
69. Notoya M, Tsukamoto Y, Nishimura H, Woo JT, Nagai K, Lee IS, et al. Quercetin, a flavonoid, inhibits the proliferation, differentiation, and mineralization of osteoblasts in vitro. *Eur J Pharmacol* 2004; 485 : 89-96.
70. Nam TW, Yoo CI, Kim HT, Kwon CH, Park JY, Kim YK. The flavonoid quercetin induces apoptosis and inhibits migration through a MAPK-dependent mechanism in osteoblasts. *J Bone Miner Metab* 2008; 26 : 551-60.