

스트론튬(Strontium)이 도핑된 다공성 BCP 뼈 이식제가 조골세포에 미치는 영향

변인선 · Swapan Kumar Sarkar* · 서형석** · 이병택* · 송호연†
순천향대학교 의과대학 면역학교실, *의공학교실, **건양대학교 운동처방학과

Effect of Strontium Doped Porous BCP as Bone Graft Substitutes on Osteoblast

In-Seon Byun, Swapan Kumar Sarkar*, Hyung-Seok Seo**,
Byong-Taek Lee* and Ho-Yeon Song†

Dept. of Immunology, Biomedical engineering, *Medical School, SoonChunHyang University, 366-1,
Ssangyong-dong, Cheonan, Chungnam, Korea

**Dept. of Exercise Prescription, Konyang University, 119, Daehakro, Nonsan, Chungnam, Korea

(2010년 2월 10일 접수 : 2010년 3월 15일 최종수정 : 2010년 3월 16일 채택)

Abstract In this study, we investigated primary biocompatibility and osteogenic gene expression of porous granular BCP bone substitutes with or without strontium (Sr) doping. In vitro biocompatibility was investigated on fibroblasts like L929 cells and osteoblasts like MG-63 cells using a cell viability assay (MTT) and one cell morphological observation by SEM, respectively. MTT results showed a cell viability percent of L929 fibroblasts, which was higher in Sr-BCP granules (98-101%) than in the non-doped granules (92-96%, $p < 0.05$). Osteoblasts like MG-63 cells were also found to proliferate better on Sr-doped BCP granules (01-111%) than on the non-doped ones (92-99%, $p < 0.05$) using an MTT assay. As compared with pure BCP granules, SEM images of MG-63 cells grown on sample surfaces confirmed that cellular spreading, adhesion and proliferation were facilitated by Sr doping on BCP. Active filopodial growth of MG-63 cells was also observed on Sr-doped BCP granules. The cells on Sr-doped BCP granules were well attached and spread out. Gene expression of osteonectin, osteopontin and osteoprotegrin were also evaluated using reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR), which showed that the mRNA phenotypes of these genes were well maintained and expressed in Sr-doped BCP granules. These results suggest that Sr doping in a porous BCP granule can potentially enhance the biocompatibility and bone ingrowth capability of BCP biomaterials.

Key words BCP, strontium doping, porous bone substitute, biocompatibility.

1. 서 론

골절, 종양, 교통사고 등으로 인한 골조직의 손실 또는 결손부위의 효과적인 재생을 위하여 골이식이 흔히 사용되고 있다. 이러한 이식에는 자가골, 동종골, 이종골, 인공골 이식이 일반적이거나 자가골 이식의 경우 골 수급의 제한 등과 같은 문제가 있으며, 동종 및 이종골 이식의 경우 면역 거부반응을 비롯하여 공여자가 가지고 있는 에이즈(AIDS) 또는 크로이츠펠트-야콥병(Creutzfeldt-Jakob disease), 광우병 등과 같은 질병의 전염 문제가 발생할 수 있다.^{1,2)} 최근 HAp (hydroxyapatite), α/β -TCP (tricalcium phosphate), BCP (biphasic calcium phosphate)

와 같은 실제 뼈와 비슷한 인공뼈가 대두되고 있다. 기계적 강도가 강하고, 생분해성이 뛰어난 BCP 세라믹은 최근 정형외과나 치과에서 많이 이용되고 있다.^{3,4)} 인공뼈의 개발에 있어서는 일정한 기계적 강도, 미세구조 제어, 생분해 속도 제어, 세포에 대한 무독성 뿐만 아니라 화학적 형상, 구조학적 성상이 세포와 인공물 간의 상호작용을 증진시키는 것 또한 중요한 요소이다. 최근에는 단순한 골조직의 대체가 아닌 골형성을 유도하고, 다양한 기능을 부여하여 자연적인 인체의 뼈와 같이 뼈의 체기능을 완전히 복구하는데 더 큰 비중을 두고 있다.

뼈 이식체를 만들 때 고려해야 할 부분은 바로 기질의 다공성이다. 구멍의 크기나 다공성은 뼈의 석회화와 조골세포의 성장에서 중요한 역할을 한다. 서로 연결되어 있는 구멍들은 세포의 증식에 크게 영향을 미치나 다공성이 클수록 기계적 강도는 감소하는 단점이 있다. 따

†Corresponding author
E-Mail : songmic@sch.ac.kr (H. -Y. Song)

라서 과립형 뼈 이식체의 경우 다공성과 기계적 강도를 적절히 조절하는 것이 중요하다.

뼈의 재생은 조골세포에 의한 뼈의 형성과 파골세포에 의한 뼈의 흡수의 균형에 의해 이루어진다. 조골세포는 뼈 형성 과정에서 세포의 이동과 부착, 증식에 있어서 뼈와 이식물 사이에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.⁵⁻⁷⁾ 사람의 뼈의 세포 외 기질은 약 90%를 차지하고 있는 콜라겐성 단백질(type I collagen 97%, type V collagen 3%)과 비콜라겐성 단백질이(osteocalcin 20%, osteonectin 20%, bone sialoproteins 12%, proteoglycans 10%, osteopontin, bronectin, growth factors, bone morphogenetic proteins 등) 약 10% 정도로 구성되어 있다. 이러한 단백질은 조골세포에서 합성되며 대부분 세포의 부착에 관여한다. a2HS glycoprotein, albumin, immunoglobulin, transferrin과 같은 단백질도 뼈의 석회화에 관여하는 것으로 알려져 있다.⁸⁾

낮은 농도의 안정적인 Sr은 반세기 이전부터 경구투여하여 골다공증의 치료에 사용되어 왔다. Sr은 세포의 증식과 더욱 성숙한 조골세포로의 분화를 증가시킬 뿐만 아니라 *in-vitro*, *in-vivo* 상에서 뼈의 형성과 석회화를 증가시킨다고 알려져 있다.⁹⁻¹³⁾ 고농도의 Sr이 인체에 나타내는 독성은 아직 보고 된 바 없다.^{14,15)} Strontium ranelate (di Strontium (di Strontium-5- [bis (2-oxido-2-oxoethyl) amino] -4-cyano-3-(2-oxido-2-oxoethyl)thiophene-2-carboxylate)는 뼈의 부피를 증가시키고, 뼈의 강도를 증가시켜 저항성을 향상시킨다.^{16,17)} 또한 파골세포의 형성과 뼈 흡수를 직접적으로 억제한다고 알려져 있다. Strontium ranelate는 조골전구세포인 U-33, OB-6세포 등에서 Runx-2와 osteocalcin, BSP (bone sialoprotein) 유전자를 증가시키고,¹⁸⁾ ERK (extracellular signal-regulated kinase) pathway를 통해 COX-2 (cyclooxygenase-2), PGE2 (prostaglandin E2)의 생성을 증가시킨다.¹⁹⁾

본 연구에서는 fibrous monolithic process를^{20,21)} 사용하여 제작된 Sr이 도핑된 다공성 BCP 이식체(이하 Sr-BCP)의 생체적합성을 평가하였다. MTT 용출법을 사용하여 세포독성을 평가하고, 제작된 이식체가 조골세포의 증식에 미치는 영향을 관찰하였으며, 조골세포가 뼈 이식체에 부착하고 퍼지는 과정을 및 세포가 성장하는 양상을 살펴보았다. 또한 RT-PCR을 통해 이식체가 조골세포의 유전자 발현에 미치는 영향을 확인하고자 하였다.

2. 실험 방법

2.1 나노 분말 합성 및 지지체의 제조

Ca(NO₃)₂·4H₂O, (NH₄)₂HPO₄를 각각 증류수에 녹여 초음파 수조에서 혼합하였다. Sr(NO₃)₂를 Sr dopant로 사

용하여 1.5 wt%로 도핑하였다. 4시간 동안 초음파에 노출 시킨 후 현탁액을 4번 수세한 후 여과하여 건조하였다. 건조된 분말을 750°C에서 1시간 하소한 후 FM (Fibrous Monolithic) 공정^{20,21)}을 통해 다공성의 과립형 지지체를 제작하였다.

2.2 세포의 배양

Sr-BCP에서의 세포의 부착과 퍼짐, 성장거동 양상을 확인하기 위해 human osteoblast-like cell인 MG-63세포를 사용하였다. 세포는 10% 우태혈청(FBS; Gibco), 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 0.25 µg/ml fungizone (Bio-Whittaker)을 포함한 Dulbecco's modification of Eagle's MEM (DMEM; HyClone, Logan, UT)를 사용하여 5% CO₂, 37°C 세포 배양기에서 배양하였다.

2.3 SEM 관찰

Sr-BCP와 Sr이 도핑되지 않은 BCP 이식체, 세포배양 접시에 세포를 파종한 후 20분, 60분 후의 세포 부착, 퍼짐 양상을 살펴보았다. 또한 각 이식체에 세포를 파종한 후 2주 후에 이식체 표면과 이식체의 내강에서의 성장 거동양상을 주사전자현미경을 사용하여 관찰하였다. 먼저 2% glutaraldehyde로 세포를 고정한 후 탈수(50-100% 에탄올), 건조(hexamethyldisilazane) 과정을 거쳐 Au로 코팅한 후 주사전자현미경(JSM-5410LV JEOL)으로 관찰하였다.

2.4 MTT 분석

ISO 10993에 따라 MTT 추출법을 사용하여 각 이식체에서의 L-929(배지:RPMI-1640; HyClone, Logan, UT) 세포를 사용하여 세포 독성을 측정하였고, MG-63(배지:DMEM; HyClone, Logan, UT) 세포를 사용하여 각각의 이식체가 조골세포의 증식에 미치는 영향을 살펴보았다. 각각의 이식체를 세포 배양 배지를 사용하여 72시간동안 37°C, 100 rpm 조건 하에서 용출하였다. 24-웰 플레이트에 1 × 10⁴/well로 세포를 파종하여 용출한 배지에서 5% CO₂, 37°C 세포배양기에서 72시간 배양한 후 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide solution (100 µl of 0.5 mg/ml)를 첨가하고, 4시간 동안 배양하여 formazan이 형성되면 100 µl dimethyl sulfoxide (DMSO)를 넣고 교반하여 용해하였다. 용해된 용액을 96 웰 플레이트에 100 µl씩 분주하여 ELISA (EL 312e, Bio-Tek)를 사용하여 595 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.5 RNA isolation 및 RT-PCR

각 뼈 이식체에 의해 조골세포의 유전자 발현 양상을

Table 1. Primer sequences for RT-PCR.

Gene	Forward primer	Reverse primer
Osteonectin	ACATGGGTGGACACGG	CCAACAGCCTAATGTGAA
Osteoprotegrin	TGCTGTTCTACAAAGITTTACG	CTTTGAGTGCTTTAGTGCGTG
Osteopontin	TGACCTCTGTGAAAACAGCGT	TGTACATTGTGAAGCTGTGAA
GAPDH	CTGCACCACCAACTGCTTAG	AGGTCCACCACTGACACGTT

Table 2. ICP results of BCP and Sr-doped BCP powder. (wt %)

	P	Ca	Sr
BCP	18.6	34.7	-
Sr-BCP	18.4	34.3	1.5

확인하기 위하여 RT-PCR을 수행하였다. 뼈 이식체의 용출액에 MG-63세포를 4, 24시간 배양한 후 RNeasy kit (Qiagen Inc. Valencia, CA)를 사용하여 RNA를 분리하고, RNA 젤-전기영동을 수행하여 RNA의 깨짐 정도를 확인하였다. 분리된 RNA 1-2 μg 을 역전사효소(M-MLV reverse transcriptase)와 oligo-dT를 사용하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA를 사용하여 94°C에서 1분, 55~65°C에서 1분, 72°C에서 1분의 조건하에 RT-PCR을 수행하였다. 사용된 프라이머는 Primer 3 프로그램²²⁾을 사용하여 합성하였으며, 각 프라이머의 염기서열은 Table 1에 나타내었다.

3. 결과 및 고찰

3.1 지지체의 제조 및 특성

합성된 BCP와 Sr-BCP 분말의 ICP 결과를 Table 2에 나타내었다. 결과에서 보는 바와 같이 Sr의 농도는 1.5%

임을 확인하였다. Fig. 1은 Sr-BCP를 실체현미경과 주사전자현미경으로 관찰한 사진이다. Fig. 1(a)는 BCP, 1(e)는 Sr-BCP 이식체의 실제 현미경 사진이다. 제조된 지지체는 원통형이며 각 과립은 직경이 약 1였다. Fig. 1(b-d)는 Sr 도핑이 안된 지지체의, 1(f-h)는 Sr이 도핑된 지지체의 주사전자현미경이다. Sr도핑의 유무와 상관없이 채널은 매우 거칠고 불규칙하며, Fig. 1(d)에서 보는 바와 같이 프레임의 두께는 80-120 μm 로 치밀하였으며, 소결된 입자크기는 약 4-8 μm 였다. Fig. 1(d, h)는 채널 안쪽 표면의 주사전자현미경 사진이다. 표면은 매우 거칠고, 조직이 매우 불규칙하였다. 생체 재료의 표면이 세포의 부착과 증식, 분화 등에 영향을 미치는 사실은 잘 알려져 있으며,²⁶⁻²⁶⁾ Bigerelle 등은 titanium과 titanium-based alloys의 표면 거칠기와 조골세포의 부착 및 증식이 연관이 있음을 보여주었다.²⁶⁾ Fig. 1에서 보는 바와 같이 제작된 지지체의 거친 표면은 세포의 부착률을 증가시키고, 증식을 쉽게 하며, 세포가 채널 안쪽 공간에 증식함으로써 기계적 강도를 증가시키고, 세포와 이식체 간의 상호작용을 증가시키는 것으로 사료된다.

3.2 세포의 독성 평가 및 조골세포 증식을 평가

Fig. 2에 MTT 용출법을 사용하여 이식체의 독성을 평

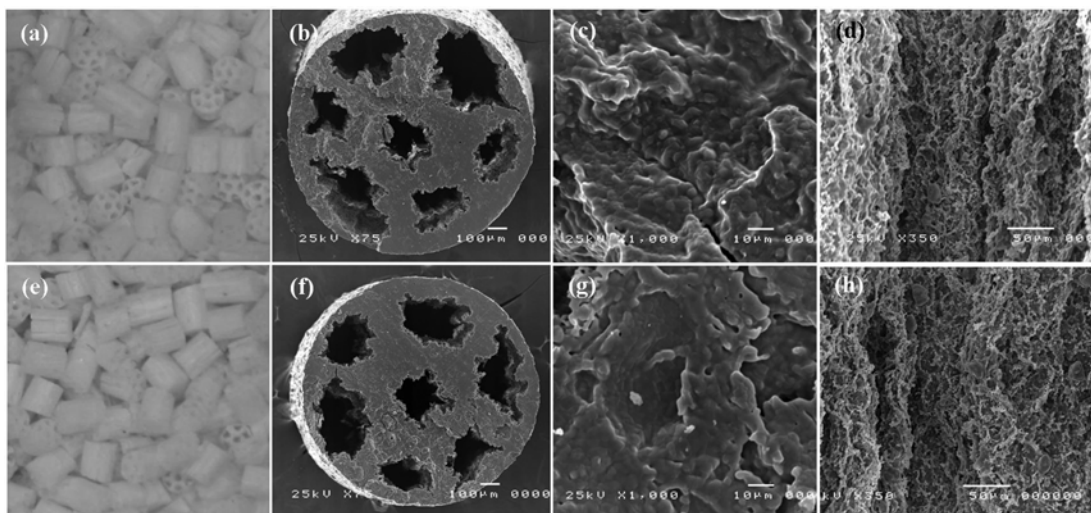


Fig. 1. Stereoscopic (a,e) and SEM images (b-d, f-h) of the BCP without (a-d) and with (e-h) strontium doping. (b,f) Cross sectional image, (c,g) enlarged image of the frame region of granules. (d,h) Longitudinal section of the channel and frame of the BCP and Sr-doped granules.

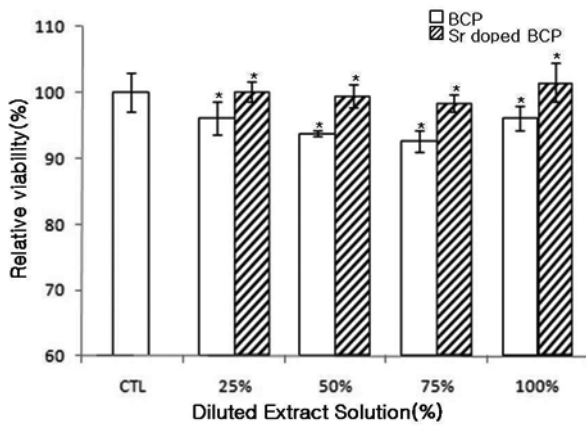


Fig. 2. Cell viabilities of diluted extract of pure BCP and Strontium doped BCP bone graft substitutes against L929 ($p < 0.05$).

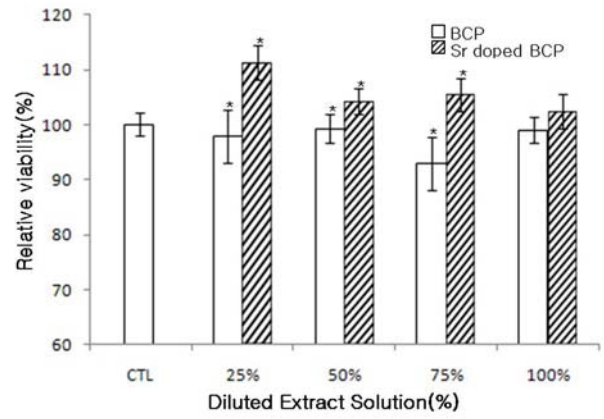


Fig. 3. Cell viabilities of diluted extract of pure BCP and Strontium doped BCP bone graft substitutes against MG-63 ($p < 0.05$).

가한 결과를 나타내었다. 섬유아세포인 L-929 세포를 다양한 농도의 이식제 용출액에 3일 동안 배양한 결과 용출액의 농도가 높아도 95% 이상의 생존률을 보여 세포 독성이 없음을 확인하였으며, 특히 Sr-BCP의 경우 일반 BCP보다 약 5% 정도 더 높아 거의 세포가 죽지 않음을 확인하였다. Fig. 3은 각 이식제가 조골세포의 증식에 미치는 영향을 나타내었다. BCP가 조골세포의 증식에는 거의 영향을 미치지 못했으나, Sr-BCP의 경우 약 10%

정도 조골세포의 증식을 증가시켰다.

3.3 세포의 부착과 퍼짐양상

Sr-BCP 위에서의 MG-63세포의 초기 부착과 퍼짐양상을 관찰하였다. MG-63 세포를 대조군인 coverslip과 Sr-BCP 위에 파종하여 20분, 60분 후에 SEM으로 관찰하였다(Fig. 4). 파종 후 20분 후에 기질의 접촉에 의해 자극되어 둥근 세포의 표면에 미세용모와 같은 돌기가 형

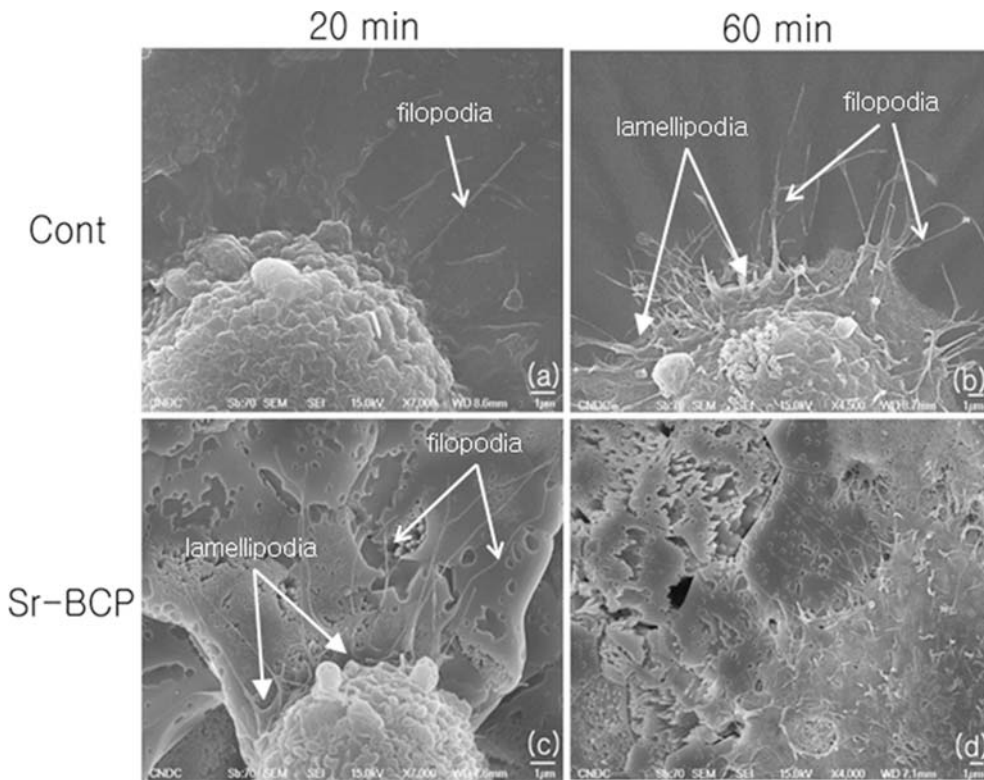


Fig. 4. SEM micrographs of MG-63 osteoblast cells on the surface of the cover slip (a, b), Strontium doped BCP bone graft substitute (c, d) at 20mins and 60mins after layering.

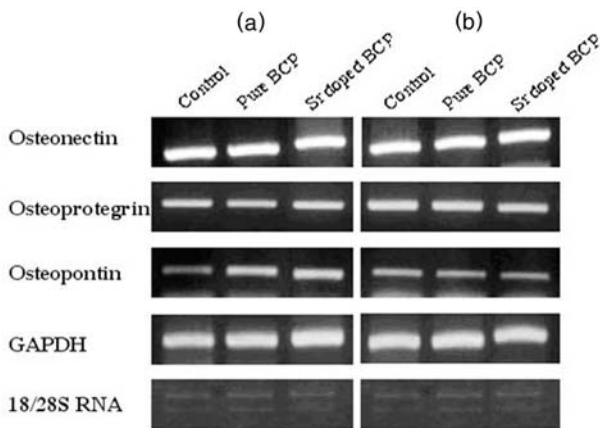


Fig. 5. Osteonectin, osteoprotegrin, and osteopontin gene expression of the MG-63 cells. (a) 4Hrs and (b) 24Hrs.

성되었으며, 세포와 기질이 맞닿은 표면에 filopodia가 형성되었고, Sr-BCP의 filopodia가 세포 주위로 더 길게 뻗어나가는 것을 관찰할 수 있었다. 파종 60분 후 coverslip에 파종된 세포가 어느 정도 납작해졌으며 filopodia가 더욱 많이 생겨났고, lamellipodia도 관찰되었다. 반면 Sr-BCP에 파종된 세포는 60분 후 이식체의 표면에 부착과 퍼짐이 이미 완료된 것을 관찰할 수 있었다. Rajarman et al.²⁸⁾은 세포의 부착과 퍼짐을 크게 4단계로 나누었는데 Fig. 4(a, c)가 filopodial growth 단계에 속하며, Fig. 4(c)는 초기 cytoplasmic webbing 단계에 속하고, Fig. 4(d)는 세포의 부착과 퍼짐의 마지막 단계에 속한다. 따라서 Sr이 세포의 증식을 증가시키고, 분화를 촉진할 뿐 아니라 세포의 초기 부착과 퍼짐을 향상시키는 것으로 확인되었다. 또한 이식체의 표면 형태, 전하, 화학적 성질, 표면 에너지 등의 표면 성질은 조골세포의 부착, 증식, 분화 등 생리학적 및 생물학적 반응에 중요한 역할을 하는데,^{23,24,29)} Fig. 1에서 볼 수 있듯 본 연구에 사용된 Sr-BCP의 표면은 매우 거칠어 세포의 부착과 퍼짐에 긍정적 영향을 미쳤다고 사료된다.

3.4 Sr-BCP에 의한 유전자 발현도 확인

Osteonectin, osteoprotegrin, osteopontin 등은 조골세포에서 발현되는 유전자들이다. Osteonectin은 SPARC로도 알려져 있으며, 뼈의 형성 과정에서 칼슘과 결합하여 뼈의 석회화 과정을 자극하고,^{30,31)} Osteoprotegrin은 마크로 파지가 파골세포로 분화되는 것을 저해하며 파골세포의 뼈 흡수 과정을 조절한다고 알려져 있다. Osteopontin은 골세포의 부착과 석회화를 조절하고, 파골세포의 기능에 영향을 미친다.³²⁾ 본 연구에서는 osteonectin은 큰 변화가 없었다. Osteoprotegrin과 osteopontin의 경우 4시간 후에 Sr-BCP에서 발현양이 증가하였으나, 24시간에는 오히려 대조군과 BCP에서의 발현양보다 감소하는 경향을

보였다. 특히 osteopontin은 조골세포의 분화 과정 중 약 25% 정도가 세포의 증식기에 나타나는데 Sr에 노출 후 매우 빠른 시간에 과발현이 일어난 것으로 보아 최대 발현 시기 전에 더 많은 양의 발현을 유도함으로써 세포의 부착과 퍼짐 과정에도 중요한 역할을 한다고 사료된다.

4. 결 론

본 연구에서는 초음파 에너지법을 사용하여 Sr이 도핑된 BCP 분말을 제조한 후 FM (Fibrous Monolithic)과정을 거쳐 제조된 Sr이 도핑된 다공성 BCP 이식체(Sr-BCP)가 조골세포에 미치는 영향을 살펴보았다. MTT 결과 세포 독성이 없으며, Sr이 L929뿐 아니라 조골세포인 MG-63세포의 증식을 증가시켰다. 제조된 Sr-BCP의 표면은 매우 거칠었으며, 이로 인해 초기 세포의 부착과 퍼짐이 세포의 부착, 증식, 배양에 적합하다고 알려진 coverslip보다 세포의 부착과 퍼짐이 빠른 속도로 일어났다. Sr에 노출된 조골세포가 분화 후 4시간에 osteoprotegrin과 osteopontin 유전자가 과발현 되었으며, 세포의 부착과 퍼짐 과정에도 관여할 것으로 사료된다. 추후 연구를 통해 이식체에 도핑된 Sr의 방출 시간과 양을 제어한다면 세포의 부착과 퍼짐 뿐 아니라 분화의 속도를 증진시킬 수 있는 기능성 Sr-BCP 뼈 이식체 개발이 가능할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. A. Schwarz, F. Hoffmann, J. L'age-Stehr, A. M. Teqzess and G. Offermann, *Transplantation*, **44**(1), 21 (1987).
2. A. Crange, F. Gray, P. Cesaro, H. Adle-Biassette, C. Duvoux, J. Bell, P. Parchi, P. Gambetti and J. D. Degos, *Ann. Neuro.*, **38**(2), 269 (1995).
3. O. Gauthier, E. Goyenvall, J. M. Bouler, J. Guicheux, P. Pilet, P. Weiss and G. Daculsi, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, **12**(5), 385 (2001).
4. H. Yuan, Z. Yang, J. D. Bruijn, K. De Groot and X. Zhang, *Biomaterials*, **22**(19), 2617 (2001).
5. K. Anselme, Osteoblast adhesion on biomaterials, *Biomaterials*, **21**, 667 (2000).
6. A. Okumura, M. Goto, T. Goto, M. Yoshinari, S. Masuko, T. Katsuki and T. Tanaka, *Biomaterials*, **22**, 2263 (2001).
7. D. A. Puleo and A. Nanci, *Biomaterials*, **20**, 2311 (1999).
8. K. Anselme, *Biomaterials*, **21**(7), 667 (2000).
9. E. Canalis, M. Hott, P. Deloffre, Y. Tsouderos and P. J. Marie, *Bone*, **18**(6), 517 (1996).
10. N. Chattopadhyay, S. J. Quinn, O. Kifor, C. Ye and E. M. Brown, *Biochem. Pharmacol.*, **74**(3), 438 (2007).
11. E. Bonnelye, A. Chabadel, F. Saltel and P. Jurdic, *Bone*, **42**(1), 129 (2008).
12. M. D. Grynpas and P. J. Marie, *Bone*, **11**(5), 313 (1990).

13. A. Barbara, P. Delannoy, B. G. Denis and P. J. Marie, *Metabolism*, **53**(4), 532 (2004).
14. T. Morohashi, T. Sano and S. Yamada, *Jpn. J. Pharmacol.*, **64**(3), 155 (1994).
15. C. V. Steven, E. DeB Marc and C. D. Patrick, *Kidney Int.*, **64**, 534 (2003).
16. P. Ammann, V. Shen, B. Robin, Y. Mauras, J. P. Bonjour and R. Rizzole, *J. Bone Miner. Res.*, **19**(12), 2012 (2004).
17. S. Tournis and J. Musculoskelet Neuronal Interact, **7**(3), 266 (2007).
18. L. L. Zhu, S. Zaidi, Y. Peng, H. Zhou, B. S. Moonga, A. BlesiusA, I. Dupin-Roger, M. Zaidi and L. Sun, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **355**(2), 307 (2007).
19. S. Choudhary, S. Wadhwa, L. G Raisz, C. Alander and C. C. Pibeam, *J. Bone Miner. Res.*, **18**(10), 1813 (2003).
20. A. K. Gain and B. T. Lee, *Materials Science and Engineering: A*, **419**, 269 (2006).
21. B. T. Lee, I. C. Kang, A. K. Gain, K. H. Kim and H. Y. Song, *J. of the European Ceramic Society*, **26**, 3525 (2006).
22. Primer3 (v. 0.4.0) Pick primers from a DNA sequence, <http://frodo.wi.mit.edu/primer3>. Retrieved July 22, 2009.
23. A. Nanci, J. D. Wuest, L. Peru, P. Brunet, V. Sharma, S. Zalzal and M. D. McKee, *J. Biomed. Mater. Res.*, **40**, 324 (1998).
24. K. Webb, V. Hlady and P. A. Tresco, *J. Biomed. Mater. Res.*, **49**(3), 362 (2000).
25. M. Hott, B. Noel, D. Bernache-Assolant, C. Rey and P. J. Marie, *J. Biomed. Mater. Res.*, **37**, 508 (1997).
26. D. P. Pioletti, J. Muller and L. R. Rakotomanana, *Biomechanics*, **36**, 131 (2003).
27. M. Bigerelle, K. Anselme and E. Dufresne, *Biomol. Eng.*, **19**, 79 (2002).
28. R. Rajaraman, D. E. Rounds, S. P. Yen and A. Rembaum, *Exp. Cell Res.*, **88**, 327 (1974).
29. J. M. Schakenraad, H. J. Buscher, C. R. Wildevuur and J. Arends, *J. Biomed. Mater. Res.*, **20**, 773 (1986).
30. G. S. Stein and J. B. Lian, *Endocr. Rev.*, **14**(4), 424 (1993).
31. J. Y. Choi, B. H. Lee, K. B. Song, R. W. Park, I. S. Kim, K. Y. Sohn, J. S. Jo and H. M. Ryoo, *J. Cell Biochem.*, **61**(4), 609 (1996).
32. C. M. Giachelli and S. Steitz, *Matrix Biology*, **19**, 615 (2000).