

골막기원세포에서 strontium에 의한 조골세포 표현형의 활성화

김신원 · 김옥규 · 박봉욱¹ · 하영술² · 조희영² · 김정환² · 김덕룡³ · 김종렬⁴ · 주현호¹ · 변준호¹

부산대학교 치의학전문대학원 구강악안면외과,

¹경상대학교 의학전문대학원 구강악안면외과학교실, 경상대학교 건강과학연구원, 의생명과학사업단 (BK21),

²경상대학교병원 임상의학연구소, ³경상대학교 의학전문대학원 생화학교실, 경상대학교 건강과학연구원, 의생명과학사업단 (BK21), ⁴온종합병원 구강악안면외과

Abstract

STIMULATION OF OSTEOBLASTIC PHENOTYPES BY STRONTIUM IN PERIOSTEAL-DERIVED CELLS

Shin-Won Kim, Uk-Kyu Kim, Bong-Wook Park¹, Young-Sool Hah², Hee-Young Cho², Jung-Hwan Kim²,
Deok Ryong Kim³, Jong-Ryoul Kim⁴, Hyun-Ho Joo¹, June-Ho Byun¹

Department of Oral and Maxillofacial Surgery, School of Dentistry, Pusan National University, Yangsan, Korea

¹Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Gyeongsang National University School of Medicine and Institute of Health Sciences, Biomedical center (BK21), ²Clinical Research Institute, Gyeongsang National University Hospital,

³Department of Biochemistry, Gyeongsang National University School of Medicine and Institute of Health Sciences, Biomedical center (BK21), Jinju, Korea, ⁴Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Onhospital, Yangsan, Korea

This study investigated the effects of strontium on osteoblastic phenotypes of cultured human periosteal-derived cells. Periosteal tissues were harvested from mandible during surgical extraction of lower impacted third molar. Periosteal-derived cells were introduced into cell culture. After passage 3, the periosteal-derived cells were further cultured for 28 days in an osteogenic induction DMEM medium supplemented with fetal bovine serum, ascorbic acid 2-phosphate, dexamethasone and at a density of 3×10^4 cells/well in a 6-well plate. In this culture medium, strontium at different concentrations (1, 5, 10, and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was added. The medium was changed every 3 days during the incubation period. We examined the cellular proliferation, histochemical detection and biochemical measurements of alkaline phosphatase (ALP), the RT-PCR analysis for ALP and osteocalcin, and von Kossa staining and calcium contents in the periosteal-derived cells. Cell proliferation was not associated with the addition of strontium in periosteal-derived cells. The ALP activity in the periosteal-derived cells was higher in 5, 10, and 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ strontium-treated cells than in untreated cells at day 14 of culture. Among the strontium-treated cells, the ALP activity was appreciably higher in 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ strontium-treated cells than in 5 and 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ strontium-treated cells. The levels of ALP and osteocalcin mRNA in the periosteal-derived cells was also higher in strontium-treated cells than in untreated cells at day 14 of culture. Their levels were increased in a dose-dependent manner. Von Kossa-positive mineralization nodules were strongly observed in the 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ strontium-treated cells at day 21 and 28 of culture. The calcium content in the periosteal-derived cells was also higher in 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ strontium-treated cells at day 28 of culture. These results suggest that low concentration of strontium stimulates the osteoblastic phenotypes of more differentiated periosteal-derived cells, whereas high concentration of strontium stimulates the osteoblastic phenotypes of less differentiated periosteal-derived cells. The effects of strontium on osteoblastic phenotypes of periosteal-derived cells appear to be associated with differentiation-extent.

Key words: Periosteal-derived cells, Strontium, Osteoblastic phenotypes

*This work was supported by the National Research Foundation of Korea (NRF) grant funded by the Korea government (MEST, 331-2008-1-E00355).

I. 서 론

Strontium 관련약물(strontium ranelate)이 폐경기 이후 나타날 수 있는 여성 척추골절이나 골반골절 등의 위험요소를 감소시키고 골질은 향상시킨다는 보고가 나오면서 새로운 골 다공증 치료제로 각광받고 있다.¹⁻³⁾ Ranelate는 위, 장관 흡수를 도와주는 보조제로 strontium의 역할에는 직접적인 영향이 없다. 골 조직에 대한 결합력이 칼슘과 유사한 strontium은 골형성을 촉진시키고 동시에 골흡수를 방지하는 두가지 기능을 통하여 그 역할을 수행한다. Strontium의 골관련 세포들에 대한 정확한 기전은 현재까지 알려져 있지 않으나, 골형성과 관련하여서는 골 세포에서 발현된다고 알려진 칼슘 인지 수용체(calcium sensing receptor)를 strontium이 활성화시켜 골 전구세포를 조골세포로 분화시킴으로써 골형성을 촉진시킨다고 알려져 있다.^{4,5)} 또한 Core-binding factor alpha1 (Cbfa1) 라고도 불리우며 전구세포의 조골세포로의 분화 초기 단계에 중요한 역할을 하는 전사인자인 Runx2를 직접적으로 활성화시켜 골형성을 촉진시킨다는 보고도 있다.^{6,7)} 파골세포의 분화 및 활성화는 receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANKL)와 이의 수용체 receptor activator of nuclear factor kappa B (RANK) 체계(RANK/RANKL system), 그리고 osteoprotegerin (OPG)의 균형에 의하여 생리적으로 균형을 이루는데 strontium은 RANK/RANKL 체계의 억제를 통하여 파골세포의 분화를 저해하여 궁극적으로 골흡수를 방지한다고 알려져 있다. 또한 파골세포의 활성화 억제에 대해서는 직접적으로 파골세포의 세포 자멸(apoptosis)을 유도한다고도 알려져 있다.^{4,8)}

생체의 실험을 통하여 strontium의 골형성 효과는 몇몇 종류의 세포를 이용하여 이전부터 보고되고 있다. Marie 등⁹⁾은 난소절제된 쥐에서 strontium ranelate를 섭취시킬 경우, 골흡수가 방지되는 효과가 나타남을 보고하였다. 윈송 이를 이용한 실험에서는 Buehler 등¹⁰⁾은 치조골의 재형성 과정에서 strontium ranelate를 적용할 경우, 골생성은 저해없이 골흡수가 감소됨을 보고하였다. Delannoy 등¹¹⁾은 정상적인 쥐에서 strontium ranelate를 장기간 섭취시켜 척추골 대사를 관찰한 결과, strontium ranelate가 골의 광화에는 영향을 미치지 않은 상태에서 골형성을 촉진시키고 동시에 골흡수를 방지시킴을 관찰하였다. Hott 등¹²⁾은 후지 석고붕대고정(hind limb plaster casting)을 이용하여 쥐 운동억제 모델을 만들어 strontium ranelate의 효과를 연구하였는데 strontium ranelate는 운동억제에 의하여 나타날 수 있는 골흡수를 방지하는 효과가 있다고 보고하였다. 형성되거나 감소되는 골 조직자체에 대한 연구는 어느 정도 진행되고 있으나 배양된 골 전구세포의 분화과정에서 strontium의 역할은 많이 알려진 것이 없으며 적용

농도, 처리 시간등에 따라 다소 논란도 있다. 쥐의 두개골에서 분리한 골 전구세포를 이용한 실험에서 Verberckmoes 등⁶⁾은 0.5에서 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도, 2에서 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도, 그리고 20에서 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도의 strontium 처리시 그 효과가 농도에 따라 상반될 수 있음을 보고하였다.

배양된 인간 골막기원세포의 조골세포로의 분화과정에서 strontium의 적용에 대해서는 거의 알려진 것이 없는 관계로 본 연구에서는 여러 농도의 strontium을 적용하여 골막기원세포의 조골세포로의 분화과정에 미치는 효과를 연구하고자 한다.

II. 연구재료 및 방법

1. 골막기원세포의 추출 및 배양

골막기원세포를 추출하고 증식하는 과정은 이전 연구방법에 의하여 실시하였다.^{13,14)} 경상대학교 병원의 윤리위원회를 따르고 환자 동의하에 매복된 하악 제3대구치의 발치과정에서 약 5 × 20 mm의 골막을 채취하여 몇조각으로 다시 자른다. 이를 100-mm culture dish에 넣은 후 10% fetal bovine serum, 100 IU/mL penicillin, 그리고 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin이 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 배지에서 37°C, 5% CO₂ 배양기를 통하여 배양하였다. 약 90%의 세포군집(confluence)을 나타내면 증식된 세포들을 0.02% 트립신과 0.02% EDTA로 5분간 트립신 처리시키고 1,500 rpm에서 원심분리하여 계대배양을 실시하였다.

2. 골막기원세포의 조골세포로의 분화 및 strontium의 적용

Passage 3을 거친 후, 골막기원세포들은 3 × 10⁴ cells/well의 밀도로 6-well plate에 주입하고 10% fetal calf serum, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ L-ascorbic acid 2-phosphate, 10 mM β -glycerophosphate, 그리고 10nM dexamethasone이 포함된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 배지로 구성된 골형성 유도 배지에 다양한 농도(1, 5, 10, and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)의 strontium을 처리하여 4주 동안 배양하였다. 배지는 매 3일마다 교체하여 준다.

3. 골막기원세포의 증식

다양한 농도(1, 5, 10, and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)의 strontium이 포함된 골형성 유도 배지에서 골막기원세포의 증식은 CCK-8 kit (Dojindo, Gaithersburg, USA)를 이용하여 분석하였다. 골막기원세포들을 5 × 10³ cells/well의 밀도

로 96-well plate에 주입하고 strontium이 포함된 배지에서 37°C에서 1시간 동안 well당 10 µl CCK-8 solution으로 처리하여 1, 3, 6, 9, 12, 그리고 15일째 세포 증식 양상을 관찰하였다.

4. 알칼리성 인산분해효소의 조직화학적 검사 및 활성도의 측정(Histochemical detection and biochemical measurement of alkaline phosphatase (ALP) activity)

인산염 식염수로 세포층을 세척한 후, 3.7% 포르말데히드와 90% 에탄올로 2분간 고정하고 10분간 TBS (Tris Buffer saline)에 세척하였다. 이후 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate와 nitroblue tetrazolium (BCIP/NBT, Amresco, Ohio, USA) 알칼리성 인산분해효소 기질을 이용하여 실온에서 10분간 염색하여 알칼리성 인산분해효소의 조직화학적 검사를 시행하였다. 알칼리성 인산분해효소 활성도는 pH 10.4의 Glycine-NaOH 완충액에서 p-nitrophenylphosphate (pNPP)를 기질로 이용하여 골막기원세포에서 유리되는 pNPP를 흡광도 410 nm에서 측정하였다. 총단백량 측정은 Bradford protein assay를 이용하여 측정하였다.

5. 알칼리성 인산분해효소와 osteocalcin에 대한 Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) 분석

총 RNA를 각 주의 세포층에서 TRIzol reagent를 처리하여 추출하였고 oligo (dT) 시발체(primer)와 Superscript First-Strand Synthesis System (Invitrogen Life Technologies, CA, USA)을 이용한 역전사반응으로 cDNA를 합성하였다. 적절한 시발체를 이용하여 합성된 cDNA로부터 알칼리성 인산분해효소, osteocalcin 및 GAPDH에 대한 PCR 증폭을 실시하였다. PCR을 위하여 사용된 시발체는 다음과 같다(sense / antisense):

5'-AATGCATCCTGCACCACCAA-3', 5'-GTAGC-CATATTCATTGTCAT-3', 515 bp, GAPDH: 5'-CCTCGGAAGACACTCTG-3', 5'-AGACTGCGCCTG-GTAGTTGT-3', 238 bp, ALP: 5'-CCCTCACACT-CCTCGCCCTAT-3', 5'-TCAGCCAACTCGTCACA-GTCC-3' 246 bp, osteocalcin. RT-PCR 산물은 1.5% 아가로스겔을 사용하여 전기영동으로 확인하였다. 그리고 이러한 유전인자들의 mRNA 발현은 음영계측(Densitometry, Bio-Rad Laboratories, CA, USA)을 통하여 상대적으로 평가하였다.

6. Von kossa 염색

배양된 세포를 인산염 식염수로 세척하고 4% 포르말데히드로 10분간 고정하였다. 증류수로 세척한 후, 5% 질산은 용액으로 처리하고 30분간 암실에서 보관하였다. 과잉의 질산은 용액을 증류수로 여러번 세척하고 발색을 위하여 중탄산나트륨/포르말데히드 용액을 7분간 적용하였다. 5% 티오황산염나트륨으로 여분의 질산은을 중성화시켰다.

7. 칼슘량의 측정(Quantification of calcium content)

24시간동안 관련 세포를 0.6 N HCl로 탈회시킨다. 이후 o-cresolphthalein 방법(o-cresolphthalein method, calcium C-test Wako, Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan)을 이용하여 다양한 농도(1, 5, 10, and 100 µg/mL)의 strontium이 포함된 골형성 유도 배지에서 골막기원세포에 의하여 형성되는 칼슘에 대한 정량적 평가를 실시하였다.

III. 연구결과

1. 골막기원세포

Strontium의 처리 여부에 관계없이 골막기원세포는 다층 구조로 잘 증식되었으며 무기질 기질을 배양 2주째부터 형성하는 것으로 나타났다. Strontium의 처리 여부에 의하여 나타날 수 있는 골막기원세포의 명확한 형태학적 차이는 발견되지 않았다(Fig. 1).

2. 골막기원세포의 증식

다양한 농도(1, 5, 10, and 100 µg/mL)의 strontium 존재하에서 골막기원세포의 증식 양상을 배양 1, 3, 6, 9, 12, 그리고 15일째 관찰하였다. 골막기원세포의 증식에 대하여 strontium의 농도에 따른 효과는 없었다. Strontium의 처리 여부에 관계없이, 그리고 배지에 ascorbic acid, β-glycerophosphate, 그리고 dexamethasone으로 구성된 골형성 유도인자의 존재여부에 관계없이 골막기원세포는 배양 15일째까지 증가되는 양상을 나타내었다. 특히 strontium의 처리 여부에 관계없이 골형성 유도배지에서 배양될 경우, 골형성 유도인자가 포함되지 않은 배지에서 배양되는 경우보다 골막기원세포의 증식이 증가되어 나타남을 관찰하였다(Fig. 2).

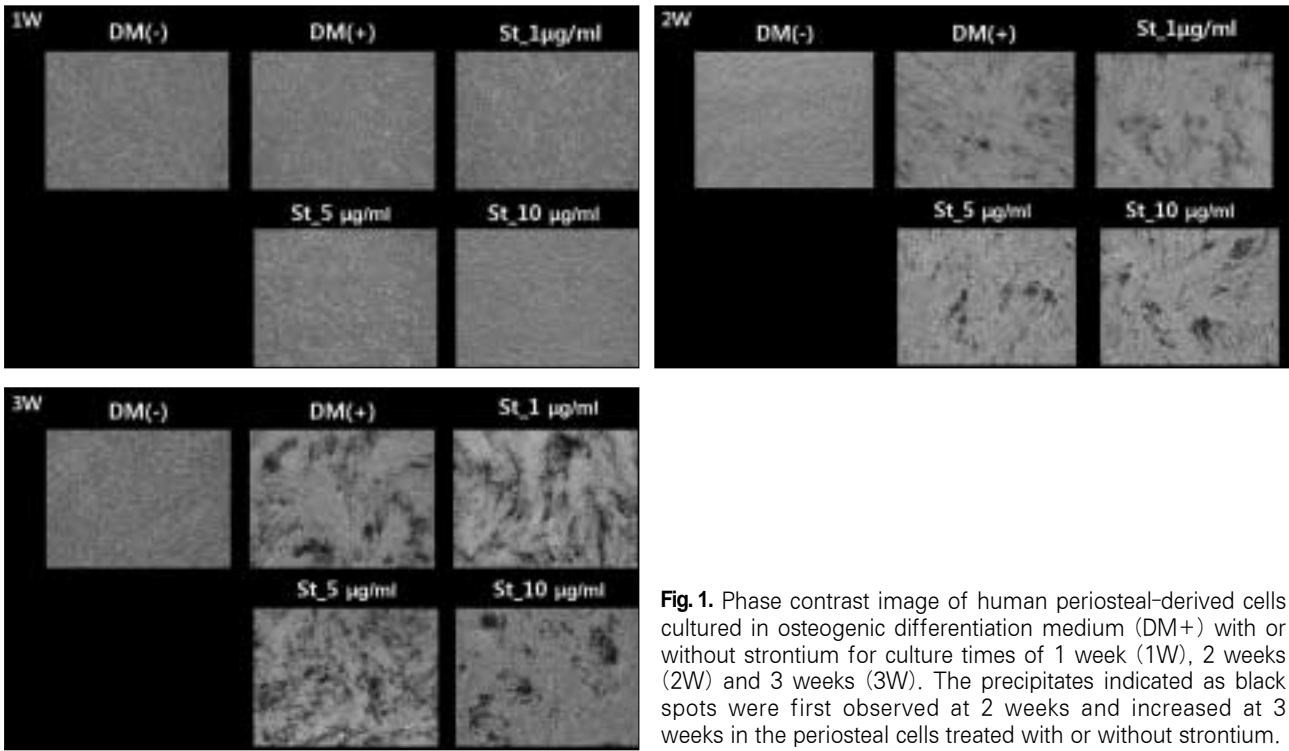


Fig. 1. Phase contrast image of human periosteal-derived cells cultured in osteogenic differentiation medium (DM+) with or without strontium for culture times of 1 week (1W), 2 weeks (2W) and 3 weeks (3W). The precipitates indicated as black spots were first observed at 2 weeks and increased at 3 weeks in the periosteal cells treated with or without strontium.

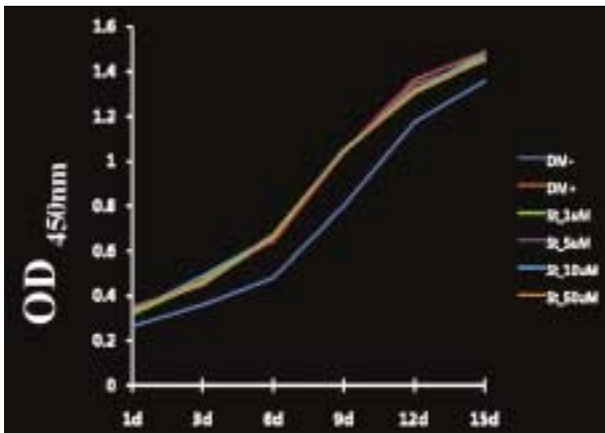


Fig. 2. Cell proliferation of periosteal-derived cells with or without strontium. Cell proliferation was not associated with the addition of strontium in periosteal-derived cells. Cell proliferation was higher in osteogenic differentiation medium (DM+) regardless of the addition of strontium.

3. 알칼리성 인산분해효소의 분석

알칼리성 인산분해효소는 조골세포에서 형성되는 외효소 (ectoenzyme)로, 무기성 피로인산염 (inorganic pyrophosphate)의 분해에 관여하여 무기질 침착을 위한

인산염 혹은 무기성 피로인산염의 국소적 증가를 이루게 하는 역할을 한다. 일반적으로 알칼리성 인산분해효소는 조골 세포의 분화 초기에 그 활성이 뚜렷하여 초기 조골세포의 특이 표지자로 알려져 있으므로 다양한 농도의 strontium 처리에 따라 골막기원세포에서 발현되는 알칼리성 인산분해효소의 조직화학적 평가는 배양 1주째와 2주째에, 그리고 알칼리성 인산분해효소의 활성도는 배양 2주째에 평가하였다. 알칼리성 인산분해효소의 발현은 strontium의 처리여부에 관계없이 배양 2주째까지 증가되는 양상을 나타내었다. 알칼리성 인산분해효소의 활성도는 strontium이 포함되었을 경우가 포함되지 않았을 경우보다 증가되었으며 특히 고농도(100 µg/ml)의 strontium을 처리하였을 경우가 가장 뚜렷하였다(Fig. 3).

4. RT-PCR 분석

배양 2주째에 관찰된 알칼리성 인산분해효소와 osteocalcin mRNA 발현 또한 strontium이 포함되었을 경우가 포함되지 않았을 경우보다 증가되었다. 알칼리성 인산분해효소와 osteocalcin의 mRNA 발현도 고농도(100 µg/ml)의 strontium이 포함되었을 경우에서 가장 강하게 나타났다 (Fig. 4).

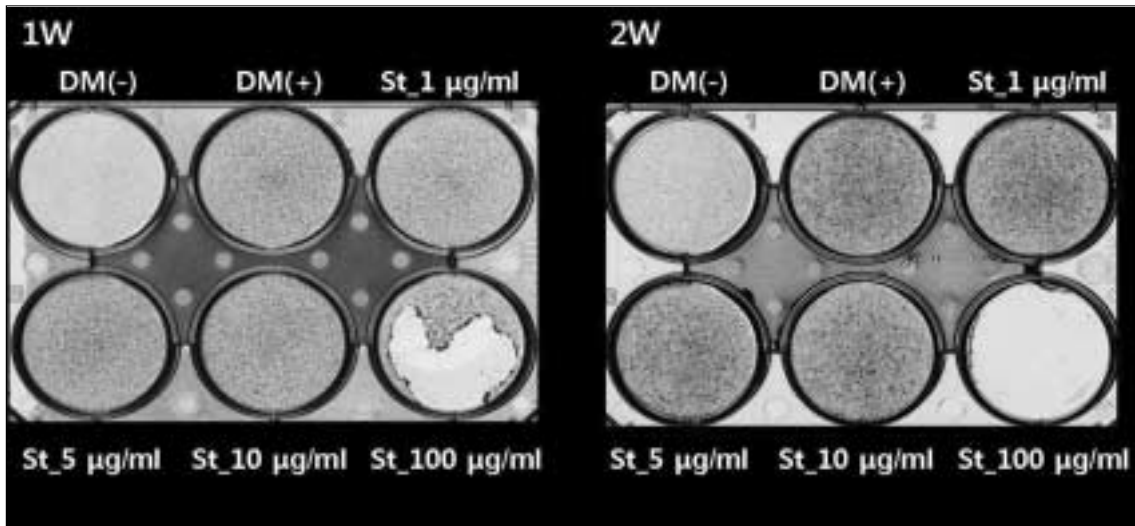


Fig. 3. Histochemical detection and biochemical activity of ALP. The ALP activity was increased in a dose-dependent manner in the strontium-treated periosteal-derived cells.

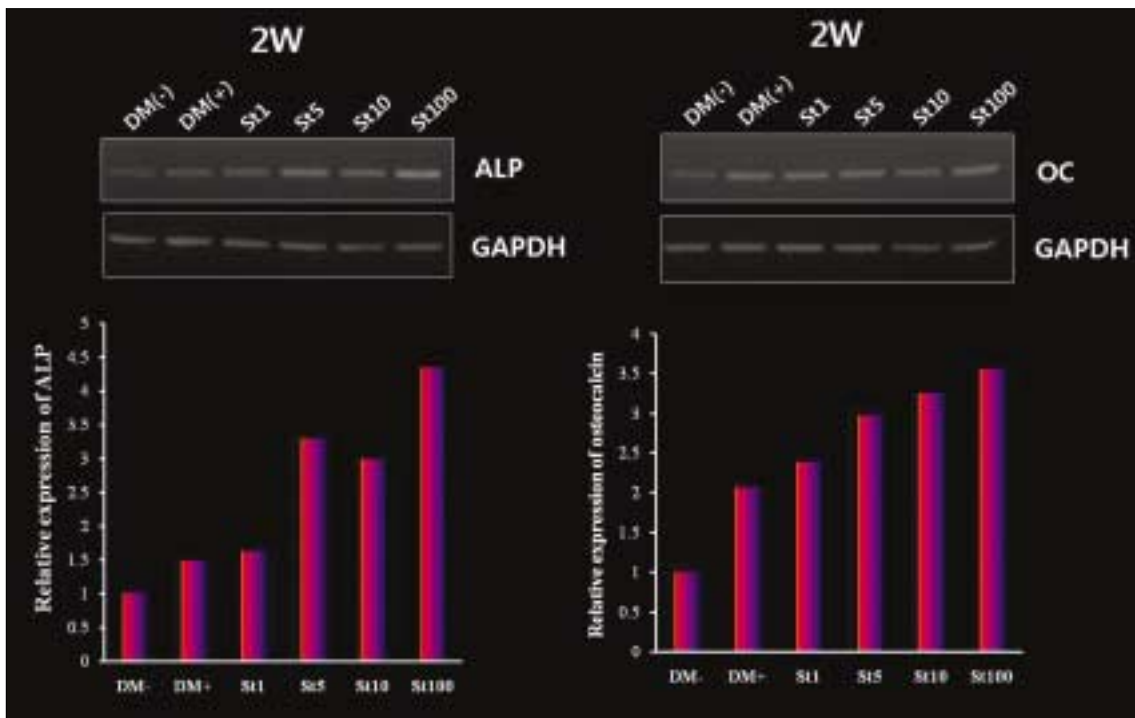


Fig. 4. ALP and osteocalcin expression in the periosteal-derived cells treated with or without strontium at 2 weeks (2W) of culture. ALP and osteocalcin mRNA levels tended to be increased in a dose-dependent manner in the strontium-treated periosteal-derived cells. Representative quantifications of genes were expressed as relative mRNA levels by densitometry. Bands with the lowest intensity were regarded as 1.

5. 골기질 형성 평가

Von Kossa 염색이나 생성되는 칼슘량의 정량학적 측정 방법이 일반적으로 석회화된 골기질을 평가하는데 가장 흔히 사용되는 방법이다. 석회화된 골기질 형성정도는 성숙한

조골세포의 표지자로 알려져 있으므로 다양한 농도의 strontium 처리에 따라 골막기원세포에서 발현되는 von Kossa 염색은 배양 3주째와 4주째에, 그리고 생성되는 칼슘량의 정량학적 평가는 배양 4주째에 실시하였다. Von Kossa 양성 골기질은 strontium의 처리 여부에 관계없이

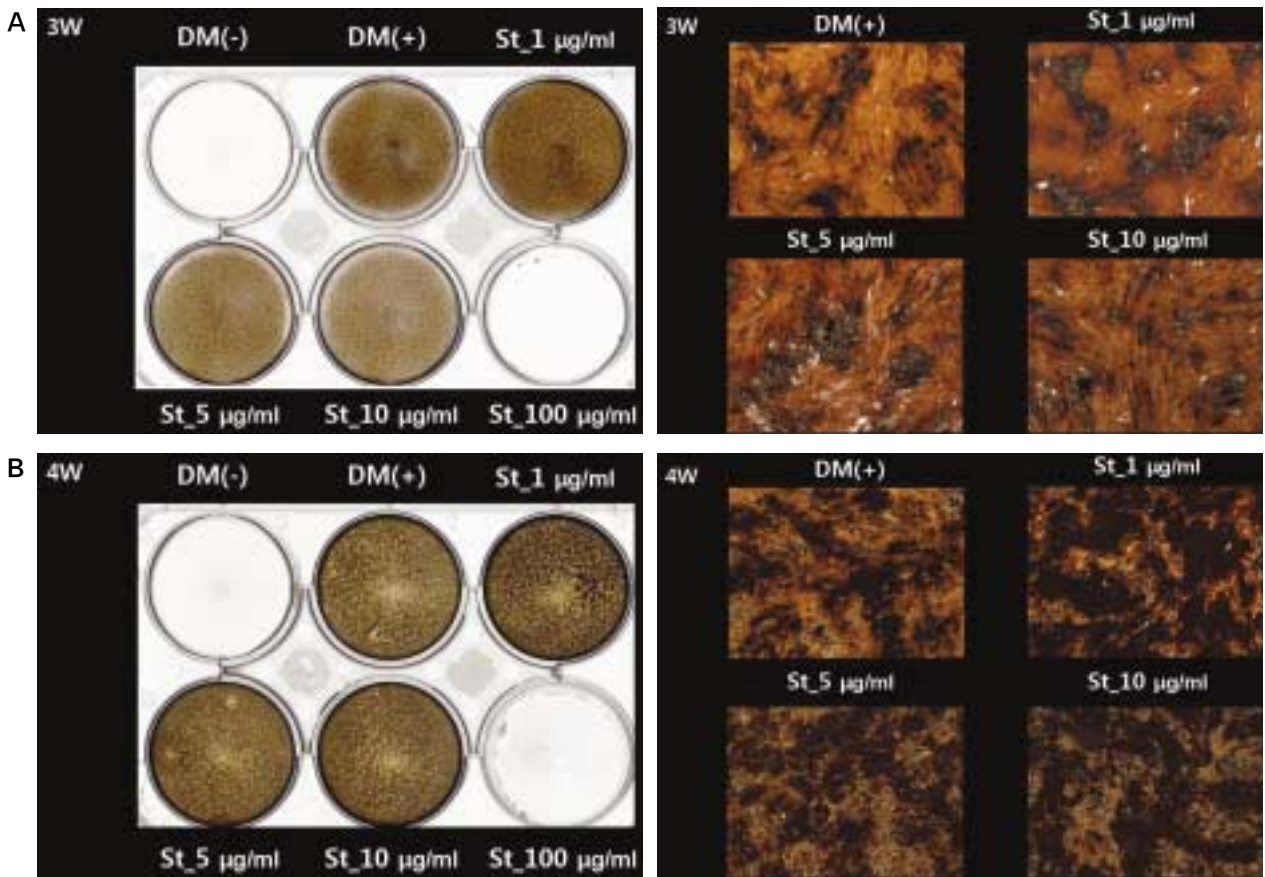


Fig. 5. Von Kossa staining and quantification of the calcium content in the periosteal-derive cells treated with or without strontium at 3 weeks (3W) and 4 weeks (4W) of culture. A, Von Kossa-positive mineralization was strongly observed in 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ strontium-treated cells; B, Calcium content was much higher in 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ strontium-treated cells than in 5 and 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ strontium-treated cells.

평가시기동안 뚜렷하게 관찰되었다. Strontium을 처리하였을 경우, 특히 저농도(1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)의 strontium을 처리하였을 경우, 그 발현이 뚜렷하였다. Strontium을 처리하지 않았을 경우, 골막기원세포에서 생성되는 칼슘량은 0.18 mg/ml였다. 1, 5, 그리고 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 strontium을 처리하였을 경우 골막기원세포에서 생성되는 칼슘량은 각각 0.21 mg/ml, 0.18 mg/ml, 그리고 0.17 mg/ml였다 (Fig. 5).

IV. 총괄 및 고찰

골 전구세포를 이용하여 성숙한 조골세포로 분화시키는 과정을 응용하는 골 조직공학은 이제 어느덧 재건학의 중요한 한 축이 되고 있다. 골 조직공학과 관련하여 최근의 경향은 단순하게 원천이 되는 전구세포에서 조골세포의 획득을 목표로 하지 않고 골 전구세포의 조골세포로의 분화를 촉진시킬 수 있는 방법에 대한 연구가 진행되고 있다. 그러나 골

수기원줄기세포(bone marrow-derived mesenchymal stem cells)의 조골세포로의 분화과정에서 분화 촉진제의 적용이 보고되고 있는 정도로 다른 성체줄기세포와 관련하여서는 관련된 보고가 그리 많지 않은 실정이다.

골흡수와 골생성이라는 균형적인 생리학적 현상이 폐경기 이후의 여성들에서는 골의 미세구조 손상, 골흡수 증가 등이 동반되는 골다공증으로 골반골절이나 척추골절등이 나타날 수 있다. 이러한 경우에 strontium 관련 약물이 폐경기 이후 나타나는 골다공증등의 치료제로 최근에 각광받고 있다. Strontium은 칼슘과 유사한 성질을 가지고 있어 골조직에 흡착률이 높은 것으로 알려져 있다. 이는 골흡수를 방지함과 동시에 골생성을 촉진시켜 골구조(bone geometry), 피질골 두께, 해면골 형태(trabecular bone morphology), 및 골조직의 내부 성분을 향상시켜 전체적으로 골재생에 유리한 방향으로 골대사를 유지하게 한다. 더욱이 이러한 골재생 효과를 나타낼 때 골광화에는 어떠한 악화를 나타내지 않는다고 알려져 있다.^{1,2,4,6)}

다양한 생체의 실험을 통하여 strontium의 골형성 효과는 일부 보고되고 있으나 배양된 골 전구세포의 분화과정에서 strontium의 역할은 많이 알려진 것이 없으며 여러 가지 면에서 다소 논란도 있다. Strontium의 처리 농도, 처리 기간, 제공되는 세포의 종 및 생리학적 상태, 그리고 해당 세포의 성숙정도 등이 이에 관여할 수 있다. Atkins 등¹⁵⁾은 골반 수술을 받은 성인 여성환자들에서 채취한 해면골로부터 획득한 조골세포의 골기질 형성과정과 strontium의 농도와와의 관련성을 연구한 보고에서 5 mM 이상의 strontium의 적용될 경우, 생체의 환경에서 골기질 형성이 뚜렷하게 증가됨을 보고하였다. Barbara 등¹⁶⁾은 쥐의 조골세포인 MC3T3-E1 세포를 이용한 실험에서 0.1에서 1 mmol/L의 strontium 농도에서 알칼리성 인산분해효소와 콜라겐 생성을 증가시키는 것을 관찰하였다. Strontium과 관련하여 주목할 만한 것은 Zhu 등⁷⁾의 연구결과이다. 다른 연구들이 골 전구세포에 strontium의 적용이 조골세포로의 분화에는 긍정적인 효과를 미치며 다만 적용되는 농도 등에 따라 효과가 다를 수 있다는 것에 반하여, Zhu 등⁷⁾은 쥐의 대퇴골과 경골 골수에서 채취한 골수기질세포, U-33 골 전구세포(U-33 pre-osteoblastic cells), 그리고 성숙한 조골형 OB-6 세포(mature osteoblastic OB-6 cells)를 이용한 연구에서 strontium은 이러한 세포들의 조골세포로의 분화를 전반적으로는 촉진시키지만 조골세포 인자의 세밀한 발현은 세포 특이성을 나타낸다고 하였다.

Strontium의 효과가 세포 특이성을 나타낼 수 있음을 고려하여 본 연구에서는 다양한 농도(1, 5, 10, and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)의 strontium이 골막기원세포의 조골세포로의 분화에 미치는 영향을 관찰하고자 하였다. 골막기원세포의 증식과 관련하여서는 strontium의 특이적인 효과는 관찰되지 않았다. 골 전구세포의 조골세포로의 분화시 초기 조골세포 특이 표지자로 알려진 알칼리성 인산분해효소의 활성화도에 대해서는 strontium은 농도의존성 경향을 나타내어 고농도(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)의 strontium을 처리하였을 경우가 가장 뚜렷한 효과를 나타내었다. 배양 2주째에 관찰한 알칼리성 인산분해효소와 osteocalcin의 mRNA 발현도 고농도(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)의 strontium이 포함되었을 경우에서 가장 강하게 발현되었다. 배양 3주와 배양 4주째 관찰한 von Kossa 양성 골기질 정도는 저농도(1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)의 strontium을 처리하였을 경우, 그 발현 양상이 뚜렷하였다. 배양 4주째에 관찰한 골막기원세포에서 생성되는 칼슘량도 5, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 strontium을 처리하였을 경우에는 조골세포로의 분화에 효과가 없었으나 저농도(1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)의 strontium을 처리하였을 경우에 생성되는 칼슘량이 증가됨을 관찰하였다.

골막기원세포의 조골세포로의 분화를 연구한 이전의 연구 결과에서 골막기원세포는 배양 2주째에서부터 골기질을 형성하며 점차 성숙한 조골세포로 분화되는 것을 관찰하였

다.^{13,14)} 이러한 점을 고려할 때, 본 연구 결과로 고농도의 strontium은 덜 분화된 골막기원세포의 조골세포 표현형에 더 영향을 미치며, 저농도의 strontium은 좀 더 분화된 골막기원세포의 조골세포 표현형에 더 영향을 미친다고 할 수 있으리라 여겨진다. 향후 좀 더 세분화된 연구방법과 정량화적 방법이 고려되어야 할 것으로 생각된다.

V. 결 론

경상대학교 병원의 윤리위원회를 따르고 환자 동의하에 매복된 하악 제3대구치의 발치과정에서 5×20 mm의 골막을 채취하여 일차배양 및 계대배양을 실시하고 passage 3을 거친 골막기원세포를 다양한 농도의 strontium으로 처리하여 골형성 유도 배지에서 4주 동안 배양한 후, 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. Strontium은 골막기원세포의 증식에는 특이적인 효과를 나타내지 않았다.
2. Strontium을 처리한 후, 골막기원세포에서 나타내는 알칼리성 인산분해효소의 활성도는 strontium의 농도에 따라 증가되는 경향을 나타내어 특히, 고농도(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)의 strontium을 처리하였을 경우가 가장 뚜렷한 효과를 나타내었다.
3. 배양 2주째에 골막기원세포에서 발현되는 알칼리성 인산분해효소와 osteocalcin의 mRNA 발현도 고농도(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)의 strontium이 포함되었을 경우에서 가장 강하게 발현되었다.
4. 배양 3주와 배양 4주째 관찰한 von Kossa 양성 골기질 정도는 저농도(1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)의 strontium을 처리하였을 경우, 그 발현 양상이 뚜렷하였다.
5. 배양 4주째에 관찰한 골막기원세포에서 생성되는 칼슘량도 5, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 strontium을 처리하였을 경우에는 조골세포로의 분화에 효과가 없었으나 저농도(1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)의 strontium을 처리하였을 경우에 생성되는 칼슘량이 증가됨을 관찰하였다.

References

1. Meunier PJ, Roux C, Seeman E *et al* : The effects of strontium ranelate on the risk of vertebral fracture in women with postmenopausal osteoporosis. *N Engl J Med* 350 : 459, 2004.
2. Reginster JY, Seeman E, De Vernejoul MC *et al* : Strontium ranelate reduces the risk of nonvertebral fractures in postmenopausal women with osteoporosis : Treatment of Peripheral Osteoporosis (TROPOS) study. *J Clin Endocrinol Metab* 90 : 2816, 2005.
3. Lindsay R, Gallagher JC, Kleerekoper M *et al* : Bone response to treatment with lower doses of conjugated estrogens with and without medroxyprogesterone acetate

- in early postmenopausal women. *Osteoporos Int* 16 : 372, 2005.
4. Caverzasio J : Strontium ranelate promotes osteoblastic cell replication through at least two different mechanisms. *Bone* 42 : 1131, 2008.
 5. Chattopadhyay N, Quinn SJ, Kifor O *et al* : The calcium-sensing receptor (CaR) is involved in strontium ranelate-induced osteoblast proliferation. *Biochem Pharmacol* 74 : 438, 2007.
 6. Verberckmoes SC, De Broe ME, D'Haese PC : Dose-dependent effects of strontium on osteoblast function and mineralization. *Kidney Int* 64 : 534, 2003.
 7. Zhu LL, Zaidi S, Peng Y *et al* : Induction of a program gene expression during osteoblast differentiation with strontium ranelate. *Biochem Biophys Res Commun* 355 : 307, 2007.
 8. Canalis E, Hott M, Deloffre P *et al* : The divalent strontium salt S12911 enhances bone cell replication and bone formation *in vitro*. *Bone* 18 : 517, 1996.
 9. Marie PJ, Hott M, Modrowski D *et al* : An uncoupling agent containing strontium prevents bone loss by depressing bone resorption and maintaining bone formation in estrogen-deficient rats. *J Bone Miner Res* 8 : 607, 1993.
 10. Buehler J, Chappuis P, Saffar JL *et al* : Strontium ranelate inhibits bone resorption while maintaining bone formation in alveolar bone in monkeys (*Macaca fascicularis*). *Bone* 29 : 176, 2001.
 11. Delannoy P, Bazot D, Marie PJ : Long-term treatment with strontium ranelate increases vertebral bone mass without deleterious effect in mice. *Metabolism* 51 : 906, 2002.
 12. Hott M, Deloffre P, Tsouderos Y *et al* : S12911-2 reduces bone loss induced by short-term immobilization in rats. *Bone* 33 : 115, 2003.
 13. Park BW, Byun JH, Lee SG *et al* : Evaluation of osteogenic activity and mineralization of cultured human periosteal-derived cells. *J Kor Maxillofac Plast Reconstr Surg* 28 : 511, 2006.
 14. Park BW, Byun JH, Ryu YM *et al* : Correlation between vascular endothelial growth factor signaling and mineralization during osteoblastic differentiation of cultured human periosteal-derived cells. *J Kor Maxillofac Plast Reconstr Surg* 29 : 197, 2007.
 15. Atkins GJ, Welldon KJ, Halbout P *et al* : Strontium ranelate treatment of human primary osteoblasts promotes an osteocyte-like phenotype while eliciting an osteoprotegerin response. *Osteoporos Int* 20 : 653, 2009.
 16. Barbara A, Delannoy P, Denis BG *et al* : Normal matrix mineralization induced by strontium ranelate in MC3T3-E1 osteogenic cells. *Metabolism* 53 : 532, 2004.

저자 연락처

우편번호 660-702
경상남도 진주시 칠암동 90번지
경상대학교 의학전문대학원 구강악안면외과학교실
변준호

원고 접수일 2010년 03월 30일
게재 확정일 2010년 05월 06일

Reprint Requests

June-Ho Byun

Department of Oral and Maxillofacial Surgery,
Gyeongsang National University School of Medicine,
Institute of Health Sciences, Biomedical center (BK21)
90 Chilamdong, Jinju, Gyeongnam, 660-702, Korea
Tel: +82-55-750-8258 Fax: +82-55-761-7024
E-mail: surbyun@snu.ac.kr

Paper received 30 March 2010

Paper accepted 6 May 2010