creative commons

COMMONS DEED

저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.

변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer

dCollection

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

[UCI]I804:24011-200000265897

2017년 2월

박사학위논문

MC3T3-E1 골모유사세포의 분화에 대한 1,25-dihydroxyvitamin D_3의 효과

조 선 대 학 교 대 학 원

치 의 학 과

김 현 수

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

MC3T3-E1 골모유사세포의 분화에 대한 1,25-dihydroxyvitamin D_3의 효과

Effect of 1,25-dihydroxyvitamin D_3 on the differentiation of MC3T3-E1 osteoblast-like cells

2017년 2월

조 선 대 학 교 대 학 원

치 의 학 과

김 현 수

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

MC3T3-E1 골모유사세포의 분화에 대한 1,25-dihydroxyvitamin D_3의 효과

지도교수 김 병 옥

이 논문을 치의학 박사학위신청 논문으로 제출함

2016년 10월

조 선 대 학 교 대 학 원

치 의 학 과

김 현 수

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

김현수의 박사학위논문을 인준함

위원장 전남대학교 교 수 정 현 주 (인)

위 원 조선대학교 교 수 김 도 경 (인)

위 원 조선대학교 교 수 김 춘 성 (인)

위 원 조선대학교 교 수 유 상 준 (인)

위 원 조선대학교 교 수 김 병 옥 (인)

2016년 12월

조선대학교 대학원

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

목 차

ABSTRACT

I. 서 론 ····· 1

II. 실험 재료 및 방법 ····· 3

1. 실험 재료 ····· 3
2. 세포배양과 분화유도 ····· 3
3. MTT assay를 통한 세포 생존력 및 증식률 분석 ····· 4
4. Alkaline phosphatase 활성 측정 ····· 4
5. Total RNA 분리 및 정량 ····· 5
6. 역전사 중합효소연쇄반응 분석(RT-PCR) ····· 5
7. Alizarin red S 염색 ····· 7
8. 통계처리 ····· 7

III. 연구 결과 ····· 8

1. 세포 생존율 분석 결과 ····· 8
2. Alkaline phosphatase 활성도 분석 결과 ····· 10
3. 골형성 관련 유전자 발현 분석(RT-PCR) ····· 12
   3-1 Collagen type I mRNA 발현 ····· 12
   3-2 Alkaline phosphatase mRNA 발현 ····· 14

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

3-3 Osteocalcin mRNA 발현 ····· 16
3-4 Vitamin D 수용체 mRNA의 발현 ····· 18
4. 석회화 결절 형성 분석 ····· 20

IV. 총괄 및 고찰 ····· 22

참고문헌 ····· 26

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

도 목 차

Figure 1. Effect of 1,25-dihydydroxyvitamin D_3 on the proliferation of MC3T3-E1 cells. ····· 9

Figure 2. Effect of 1,25-dihydydroxyvitamin D_3 on ALP activity in MC3T3-E1 cells. ····· 11

Figure 3. Semi-quantitative RT-PCR analysis of collagen type I(Col-I) mRNA expression in MC3T3-E1 cells treat with 1,25-dihydydroxyvitamin D_3. ····· 13

Figure 4. Semi-quantitative RT-PCR analysis of alkaline phosphatase(ALP) mRNA expression in MC3T3-E1 cells treat with 1,25-dihydydroxyvitamin D_3. ····· 15

Figure 5. Semi-quantitative RT-PCR analysis of osteocalcin(OCN) mRNA expression in MC3T3-E1 cells treat with 1,25-dihydydroxyvitamin D_3. ····· 17

Figure 6. Semi-quantitative RT-PCR analysis of 1,25-dihydydroxyvitamin D_3 receptor(VDR) mRNA expression in MC3T3-E1 cells treat with 1,25-dihydydroxyvitamin D_3. ····· 19

Figure 7. Effect of 1,25-dihydydroxyvitamin D_3 on the formation of mineralized nodule in MC3T3-E1 cells. ····· 21

Figure 8. Effect of 1,25-dihydydroxyvitamin D_3 on the formation of mineralized nodule in MC3T3-E1 cells. ····· 21

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

표 목 차

Table 1. Primer sequences for RT-PCR. ····· 6

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

ABSTRACT

Effect of 1,25-dihydroxyvitamin D_3 on the differentiation of MC3T3-E1 osteoblast-like cells

Kim Hyun-Soo
Advisor: Prof. Kim Byung-Ock, D.D.S., Ph.D.
Department of Dentistry
Grauate School of Chosun University

Increasing in average life expectancy, implant surgery is regarded as a way to restore masticatory function of edentulous patients. After loss of teeth, bone resorption and atrophy is commonly occurred over time and therefore alveolar bone regenerative procedure is necessary for successful implant installation. There are various bone generative procedures, especially guided bone regeneration(GBR) is the most commonly used technique. Space maintenance for bone formation, rich cell sources and growth factors are important things for successful guided bone regeneration. Growth factors particularly activate cell signaling pathways, so that bone formation and bone regeneration process are activated. Among various factors, 1,25-dihydroxyvitamin D_3 is the one of the factors for calcium and phosphorus homeostasis in bone metabolism. Especially, 1,25-dihydroxyvitamin D_3 could play an important role in osteoblast cell proliferation and differenciation. Thus we studied the effects of 1,25-dihydroxyvitamin D_3 on proliferation, differentiation and matrix mineralization of MC3T3-E1 osteoblast-like cells via *in vitro* sutdy.

MTT assay showed that there was no inhibitory effect of 1,25-dihydroxyvitamin D_3 on cell growth and rate of cell proliferation was higher than positive control gro up in all concentrations. ALP activity was also measured higher than positive contr ol group in low concentration(10^{-10}, 10^{-12}, 10^{-14}M of 1,25-dihydroxyvitamin D_3). Resu lts of RT-PCR with low concentration of 1,25-dihydroxyvitamin D_3(10^{-12}M) showed that gene expression levels of ALP, collagen-I, Osteocalcin, Vitamin D receptor(VD

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

R) were increased. Alizarin red S assay on effects of 1,25-dihydroxyvitamin D_3 (10^{-12}M) on calcification showed that there were no significant differences in overall degree of calcification. Comparing with positive control group, formation of bone no dule was induced in early stage of cell differentiation.

These study suggest that 1,25-dihydroxyvitamin D_3 have positive effects on cell differentiation and matrix mineralization. Therefore it may function as a stimulating factor in osteoblastic bone fomation and could be used as a additive in bone regeneration treatment.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

I. 서 론

의학의 발전으로 인간의 평균 수명이 늘어남에 따라 삶의 질을 유지하기 위한 여러 방법이 강구되고 있다. 그 중에서 특히 건강한 치아는 고른 영양소 섭취를 위해 중요하므로 풍요로운 삶을 영위하기 위한 필수 조건이 되었다. 하지만 여러 원인에 의해 치아를 상실한 경우에는 치과 치료를 통해 상실치를 수복해야 하는데 최근 들어 임플란트 치료가 효과적인 해결책으로써 주목을 받게 되었고 그에 따라 성공적인 임플란트 치료를 위한 치조골 재생술의 필요성이 증가되었다.

Schropp 등의 보고에 의하면, 치아를 발치하고 나서 최초 3개월 동안 협, 설, 구개측 치조골의 폭경이 30% 정도 감소하고 12개월 후에 원래 너비의 50% 정도가 흡수되는 것으로 알려져 있다[1,2]. 또한 치주질환으로 인해 치아를 상실한 경우 잔존 골질이 불량하고 임플란트를 식립하기에 치조골이 양적으로 불리한 경우가 많다. 이러한 경우 성공적인 임플란트 치료를 위해서 술 전에 치조골 재생술을 통해 충분한 양의 치조골을 확보해야 한다. 치조골 재생술에는 여러 방법이 있는데, 그 중 골유도 재생술(guided bone regeneration)이 대표적인 술식 중 하나이다[3,4].

성공적인 골유도 재생술을 위한 3가지 중요한 인자는 골형성을 위한 세포(osteogenic cell)와 골전도 역할을 하는 세포외 기질(scaffold), 그리고 골재생을 자극하는 성장인자(growth factor) 등이다[5-7]. 이 중 골재생 효율을 높이기 위한 성장인자에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 성장인자는 골재생에 적합한 환경을 제공하고 세포신호전달 체계를 통해 이식골 주변으로 골형성 세포의 유입을 촉진하여 치조골 재생에 도움을 주는 중요한 요인이기 때문이다[8].

본 연구에서는 골형성과 관련된 여러 인자중에서 비타민 D의 활성형으로 알려진 1,25-dihydroxyvitamin D_3의 효과에 대해 알아보고자 하였다. 1,25-dihydroxyvitamin D_3는 비타민 D의 활성형으로서 체내의 칼슘과 인 대사의 항상성을 조절하는 역할을 하며 그 외에도 체내의 골대사를 비롯한 면역작용, 항암작용 등 여러 기능을 하는 것으로 알려져 있다[9]. 1,25-dihydroxyvitamin D_3가 활성화되는 과정을 살펴보면 우선 피부에서 합성된 7-dehydrocholesterol이 자외선을 받아 cholecalciferol(vitamin D_3)로 변환되고 간에 존재하는 마이크로솜 효소에 의해 25-hydroxycholecalciferol이 된다. 그리고 나서 신장의 미토콘드리아 효소에 의해 수화(hydroxylation)되어 최종적으로 1,25-dihy

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

droxycholecalciferol이 생성된다[10,11]. 최종 활성형인 1,25-dihydroxycholecalciferol은 부갑상선 호르몬 및 칼시토닌과 함께 체내의 칼슘,인 대사의 항상성 조절에 관여하게 된다. 비타민 D는 지용성 비타민 중의 하나로서 콜레스테롤로부터 생합성되고 핵내의 비타민 D 수용체와 결합하여 핵내의 유전자 발현을 조절하므로 일종의 호르몬으로 분류되고 있다. 비타민 D 수용체는 소장과 부갑상선, 신장 세포관 세포, 피부의 상피세포 등 여러 표적세포에서 발현되는데 골조직에서는 특히 골모세포계의 세포들에서 발현되며 osteocalcin, osteopontin, collagen type I과 같은 특이 단백질의 생성을 촉진한다[12,13]. 하지만 비타민 D가 골모세포에 직접 작용하여 골 조직의 석회화를 촉진하는지에 대해서는 명확히 밝혀진 바가 없는데, 그 이유는 체내의 복잡한 대사과정을 거쳐 일어나는 골형성 과정과 세포수준의 골형성 과정은 환경조건이 매우 다르기 때문이다.

따라서 본 연구에서는 쥐의 두개골에서 유래된 MC3T3-E1 골모유사세포를 이용하여 세포수준의 조건에서 1,25-dihydroxyvitamin D_3가 골형성 작용에 어떠한 효과를 나타내는지 알아보고자 *in vitro* 실험을 진행하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

II. 실험 재료 및 방법

1. 실험 재료

본 연구에 사용한 생쥐 두개관 조골세포주 MC3T3-E1(mouse calvaria에서 유래한 ostoblast-like cell line)은 American Type Culture Collection(ATCC, USA)에서 구입하여 실험하였다. 실험재료로 사용된 1,25-dihydroxyvitamin D_3(Bonky®)는 유유제약(Korea)에서 구매하여 사용하였다.

세포배양을 위해서 배양액 α-Minimum Essential Medium (α-MEM)은 Gibco(BRL, USA)로부터 구입하였고, 세포의 동결 보관을 위해 dimethylsulfoxide(DMSO)와 세포 계대 배양을 위한 trypsin-EDTA, 항생제 등도 Gibco(BRL, USA)로부터 구입하였다. 그리고 세포 증식검사에 사용된 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) 2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) 시약, 그리고 염색 실험을 위한 PFA(paraformaldehyde), alizarin red S 시약은 모두 Sigma(Sigma Co, USA)의 제품을 사용하였다. 그리고 ALP 실험은 ALP kit(Wako, Japan)를 구입해 실험하였다.

Polymerase chain reaction(PCR)에 사용된 primer는 Bioneer(Bioneer, Korea)사로부터, RNA 추출을 위하여 Trizol solution(Molecular Research Center, USA), chloroform(JUNSEI, Japan), 2-propanol(Sigma, USA)를 사용하였으며, Rnasin®plus RNAse inhibitor 및 dNTP는 Promega(Madison, USA)에서 구입하였다. cDNA 합성은 M-MLV cDNA synsthesis kit(Enzynomics, Korea), DNA ladder는 Nanohelix(Nanohelix, Korea)사의 제품을 사용하였다.

2. 세포배양과 분화유도

MC3T3-E1 세포는 10% heat-inactivated fetal bovine serum(FBS), 1% 항생제(100 u/mL penicillin, 100μg/mL streptomycin)를 함유한 α-minimum essential medium(BRL, USA) 배지로 37℃, 5% CO_2 이하에서 배양하며 세포 밀도가 70%정도 포화되면 0.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

02% EDTA-0.05% trypsin 용액을 사용하여 계대 배양하면서 실험에 사용하였다. 음성 대조군에는 10% FBS의 α-MEM 성장 배지를, 양성 대조군에는 성장배지에 10mM β-glycerophosphate와 50μg/mL ascorbic acid를 첨가한 분화유도배지를 그리고 실험군에는 분화배지와 함께 1,25-dihydroxyvitamin D_3를 농도별로 희석하여 사용하였고, 모든 세포는 5% CO_2, 95% 습도가 유지되는 항온 항습기에서 배양하였다.

3. MTT assay를 통한 세포 생존력 및 증식률 분석

10^{-4}, 10^{-6}, 10^{-8}, 10^{-10}, 10^{-12}, 10^{-14}M 농도의 1,25-dihydroxyvitamin D_3 처리에 따른 조골세포의 증식 정도는 3-(3,4-dimethylthiazolyl-2)-2, 5-disphenyl tetrazolium bromide(MTT) assay로 측정하였다[14,15]. 세포 내에서 생성된 formazan을 DMSO에 현탁 시킨 후 이에 대한 상대적인 흡광도로 세포증식률을 비교하였다. 먼저 96well plate에 1×10^4 cells/well의 MC3T3를 분주하여 3일간 배양한 후, 70% confluency의 포화도를 보일 때 실험군에는 각 농도별로 준비한 1,25-dihydroxyvitamin D_3를 첨가하여 배양하였고 대조군에는 성장배지만 넣고 다른 조건은 동일하게 배양하였다. 배양 1일, 3일 후 MTT 시약을 5 mg/mL 농도로 20 μL를 각 well에 첨가하였고, 4시간 더 배양한 후 배지를 제거하였다. 그리고 DMSO(dimethyl sulfoxide)를 200 μL씩 첨가하여 생성된 불용성의 formazan 결정을 용해시킨 뒤 15 min 상온에 둔 다음 microplate reader(Biotek Instruments, Korea)로 540 nm에서 흡광도 (optical density)를 측정하였다. 이 흡광도는 MTT가 세포의 의해 환원된 양을 나타내며 각 well에 존재하는 생존 세포수와 비례한다. 세포의 증식률은 시료의 흡광도를 대조군의 흡광도에 대한 백분율로 나타내었다.

4. Alkaline phosphatase 활성 측정

MC3T3-E1 세포를 2 × 10^4cells/well 농도로 12well plate에 분주한 후 세포가 70% 포화되게 키운 뒤 음성 대조군에는 10% FBS의 α-MEM 성장 배지를, 양성 대조군에는 10mM β-glycerophosphate와 50μg/mL ascorbic acid를 함유한 분화배지를 그리고 실험군에는 분화배지와 함께 1,25-dihydroxyvitamin D_3를 10^{-4}, 10^{-6}, 10^{-8}, 10^{-10}, 10^{-12}, 10^{-14}M의 농도로 희석하여 주입하였다[14,15]. 그리고 7일, 14일 후 배양액을 추출하여 A

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

LP kit(Wako, Japan)를 이용해 ALP 활성 정도를 측정하였다. 측정된 결과는 blank 값을 제외한 뒤 양성대조군의 결과에 대한 백분율로 나타내었다.

5. Total RNA 분리 및 정량

MC3T3-E1세포를 양성 대조군 및 실험군으로 나누었고 앞선 실험에서 ALP 활성도가 가장 높았던 10^{-12}M 농도의 1,25-dihydroxyvitamin D_3를 배양액에 처리한 뒤 7일, 14일 동안 배양하고 RNA를 추출하여, RT-PCR 분석을 통하여 골모세포가 분화과정에서 발현되는 collagen-type I(Col I)과 osteocalcin(OCN), alkaline phosphatase(ALP) 그리고 1,25-dihydroxyvitamin D_3의 분자적 기작을 확인하기 위한 vitamin D receptor (VDR)의 유전자 발현을 분석하였다. 우선 배양된 세포를 DEPC(diethyl pyrocarbonate) water로 세척한 후 TRIzol reagent (Invitrogen, USA) 1 mL에 넣어 RNA를 추출하였다. 분리한 RNA 용액에 200μL의 chloroform을 넣고 ice에서 반응시켰다가 12,000 rpm으로 원심분리하여 상층액 500μL를 분리하였다. 0.5mL isopropyl alcohol을 가하여 -20℃에서 12시간을 침전시킨 후 12,000rpm으로 10분간 원심 분리하였다. 상층액을 버린 후 80% 에탄올로 세척하고 자연 건조시켰다. 그리고 RNase free water 30μL에 RNA를 녹이고 60℃로 가온 후 260㎚에서 흡광도를 측정, 추출된 RNA를 정량한 뒤, -80℃에 저장하였다.

상층액과 동량의 2-propanol을 첨가하여 혼합한 다음 다시 12,000rpm에서 10분간 원심분리 하였다.상층액을 버리고 75% ethanol로 세척하고 pellet을 확인 후 자연 건조시켰다. RNase free water 30μL에 RNA를 녹이고 60℃로 가온 후 정량하고, -80℃에 보관하였다.

6. 역전사 중합효소연쇄반응 분석(RT-PCR)

RT-PCR을 위해 RT-PCR kit(Invitrogen, USA)를 구매하여 사용하였다. 위 RNA 추출 실험을 통해 대조군 및 실험군에서 각각 분리한 total RNA액 1μL(1㎍ RNA)에 dNTPs(deoxyribonucleoside triposphates) 2μL, DTT(dithiothreitol) 2μL, reaction buffer 4μL, reverse transcriptase enzyme 1 unit/μL, Rnase inhibitor 0.5μL diethyl pyrocarbonate(DEPC) 8.5μL을 넣은 후 혼합한 다음 37℃에서 1분간 정치하였다. 총 RNA를

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

역전사 하기 위해 무작위 primer가 annealing 하도록 4℃에서 약 5분간 방치한 다음, RT buffer, dNTP, RNase inhibitor, DTT(100nM), reverse transcriptase(M-MLV 200 unit/㎍)를 첨가하여 혼합한 후 42℃에서 90분간 역전사 반응을 시행하였다. 반응물을 95℃에서 5분간 처리한 후 합성된 cDNA를 정량 PCR을 위한 주형으로 사용하였다.

PCR은 total volume 20㎕에 10X PCR buffer, 10 mM dNTPs, 10 pmole의 GAPDH, ALP, Osteocalcin, Collagen Ⅰ, VDR primer를 각각 넣은 혼합액에 cDNA와 1 unit의 Taq polymerase(Promega, USA)을 넣어 PCR을 시행하였으며 각각의 유전자에 대한 primer 염기서열 및 반응 조건을 잡아 실험을 진행하였다. PCR 최종 조건은 pre-denaturation를 94°C에서 3min 진행한 뒤, 변성을 94°C에서 30sec, 결합을 58°C에서 42sec, 중합을 72°C에서 30sec 하였고 이 과정을 35 cycle 돌려서 최종적으로 마지막 중합반응을 72°C에서 10분간 하였다. 각 primer의 Tm 값을 고려하여 모든 primer의 결합반응 온도는 55℃로 디자인한 결과를 따랐다. 그리고 증폭된 PCR 산물은 6x DNA loading dye와 혼합하여 1.2% agarose gel 에서 전기영동 하였으며 EtBr로 염색 후 UV 촬영하였다. 촬영한 band는 Image J program(NIH, USA)을 사용하여 각각의 band density를 측정한 후 GAPDH 양을 기준으로 표준화하여 그래프로 표시하였다.

Table 1. Primer sequences for RT-PCR.

Target Genes	Primer sequence		NCBI gene Number
	Forward	Reverse	
Alkaline phosphatase	5'-AACCCAGACACAAGCATTCC-3'	5'-GCCTTTGAGGTTTTTGGTCA-3'	NM_007541
Collagen Ⅰ	5'-CCTAATGCTGCCTTTTCTGC-3'	5'-ATGTCCCAGCAGGATTTGAG-3'	NT_007743.2
Osteocalcin	5'-AAGCAGGAGGGCAATAAGGT-3'	5'-TTAGGGCAGCACAGGTCCTA-3'	NM_007541.2
Vitamin D receptor	5'-GCAGGACAACAAATGGAGGT-3'	5'-ACCTGCTTTCCTGGGTAGGT-3'	NM_009504.4
GAPDH	5'-AACTTTGGCATTGTGGAAGGGCTC-3'	5'-TGGAAGAGTGGGAGTTGCTGTTGA-3'	NM_039595.8

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

7. Alizarin red S 염색

골분화 정도를 확인해 볼 수 있는 alizarin red 염색 실험은 MC3T3-E1 세포를 2 × 10^4cells/well 농도로 12 well plate에 분주한 후 세포가 70% 포화되게 키운 뒤 음성 대조군에는 10% FBS의 α-MEM 성장 배지를, 양성 대조군에는 10mM β-glycerophosphate와 50μg/mL ascorbic acid를 함유한 분화배지를 처리하였다. 그리고 실험군에는 ALP 활성도가 가장 높았던 10^{-12}M 농도의 1,25-dihydroxyvitamin D_3를 배지에 희석하여 처리하였다. 이 조건을 3일 마다 배양액을 바꾸어 준 뒤 그리고 3주가 지난 뒤 염색실험을 하였다. 배양된 세포는 배양액을 제거한 뒤 DPBS 1㎖으로 5분씩 3회 반복하여 씻은 뒤, 4% paraformaldehyde로 상온에서 20분간 고정하였다. 고정 후 10분씩 2회 이상에 걸쳐 증류수로 고정액을 씻어 준 뒤 상온의 빛을 차단한 상태에서 2% alizarin red S(pH 4.2) 염색약을 10분 동안 염색시켰다. 염색된 세포는 다시 DPBS로 씻어 준 뒤 광학현미경을 통해 관찰하였다.

8. 통계처리

본 실험결과는 최소 5회의 반복 실험을 걸쳐 평균±표준편차로 표시하였다. 자료의 통계분석은 SPSS 20.0 software (SPSS, Chicago, USA)를 사용하였다. 각 군마다의 유의적 차이를 확인하기 위해서 Mann-Whitney test을 이용하였고, 유의수준 0.05, 신뢰수준 95%에서 검증하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

III. 연구 결과

1. 세포 생존율 분석 결과

1,25-dihydydroxyvitamin D_3가 MC3T3-E1 세포의 증식에 미치는 영향을 알아보기 위하여 MTT assay를 시행한 결과, 1일째에는 양성 대조군의 생존률 100.00±0.25와 비교하여 실험군에서 10^{-4}, 10^{-8}, 10^{-12}M을 제외하고 대부분의 농도에서 생존률이 약간 낮았으나 통계학적으로 유의적인 차이를 보이지 않았다. 3일째 실험결과에서는 양성 대조군의 100±0.031에 비해 실험군에서 9~12% 정도의 생존률 증가가 나타났으며 10^{-4}, 10^{-8}, 10^{-12}M의 농도에서 통계적으로 유의하게 높은 수치를 보였다 ($p<0.05$)(Fig. 1). 따라서, 실험군에서 설정한 농도에서 1,25-dihydydroxyvitamin D_3는 MC3T3-E1 osteoblast-like cell에 세포독성이 없음을 확인할 수 있었고, 3일째의 결과를 바탕으로 세포 증식에 긍정적인 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

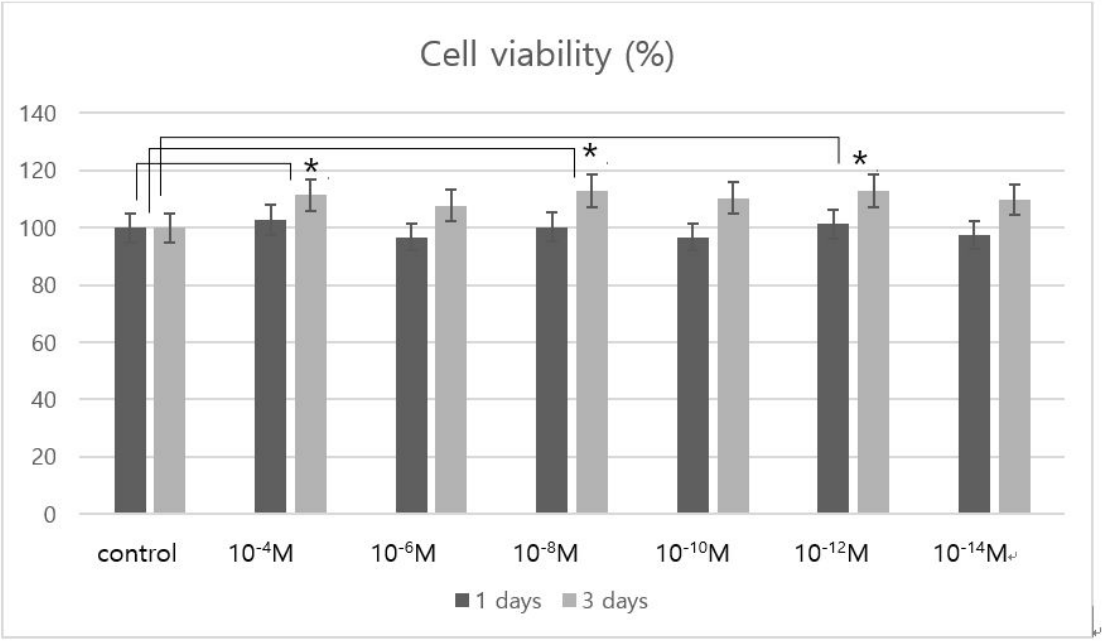


Fig. 1. Effect of 1,25-dihydydroxyvitamin D_3 on the proliferation of MC3T3-E1 cells. The cells were cultured in the presence of various concentration of 1,25-dihydydroxyvitamin D_3 for 1day and 3days. The cell viability was measured by MTT assay. Cells cultured in growth medium alone served as a control. Results were expressed as % of control and data were mean ± S.D of three independent experiments. ($^{*}p<0.05$ as compared with control)

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

2. Alkaline phosphatase 활성도 분석 결과

골모유사세포의 분화 정도를 알아보기 위해서 분화 지표인 ALP 활성도를 분석하였다. MC3T3-E1 세포에 1,25-dihydydroxyvitamin D_3를 10^{-4}, 10^{-6}, 10^{-8}, 10^{-10}, 10^{-12}, 10^{-14} M 농도로 각각 첨가하여 7일, 14일 배양한 후 ALP 활성도를 측정하였다. 분화 7일째 결과에서 실험군인 10^{-8}, 10^{-10}, 10^{-12}, 10^{-14}M 농도에서 양성 대조군에 비해 ALP 활성도 증가가 나타났다. 특히 낮은 농도인 10^{-10}, 10^{-12}, 10^{-14}M 농도에서 ALP 활성도의 증가가 크게 나타났고, 이는 양성 대조군에 비하여 통계적으로 유의하게 증가한 수치였다($p<0.05$). 분화 14일째 결과에서 실험군인 10^{-10}, 10^{-12}, 10^{-14}M 농도에서 양성 대조군에 비해 ALP 활성도가 통계적으로 유의하게 증가되어 관찰되었고($p<0.05$), 특히 10^{-12}M 농도에서 ALP 활성도가 가장 높게 나타남을 확인할 수 있었다(Fig. 2).

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

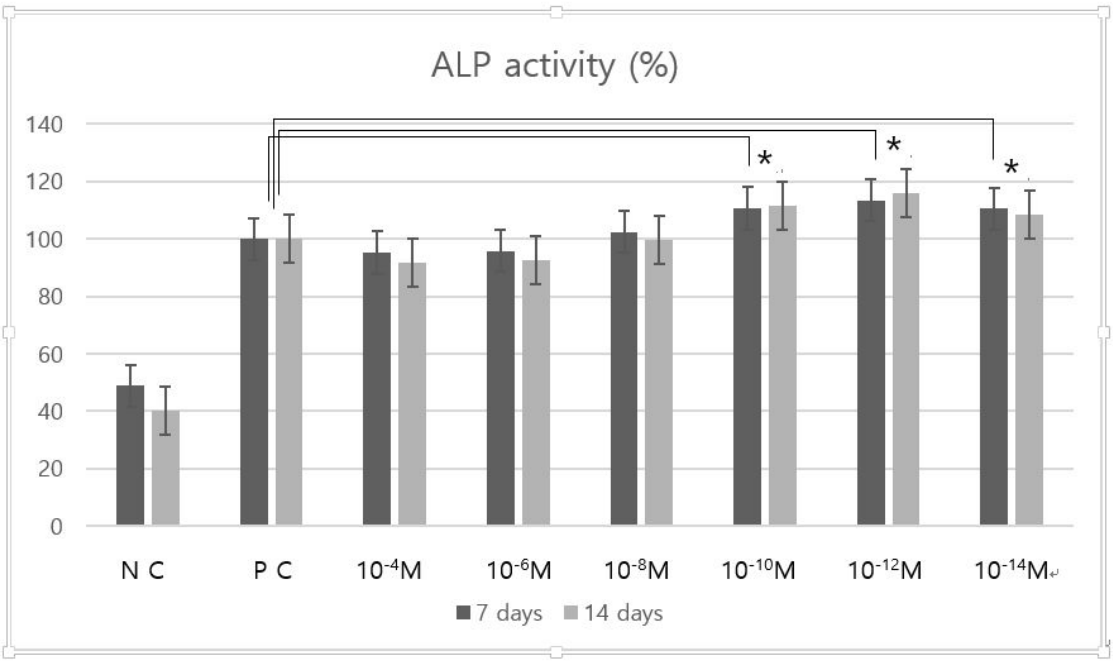


Fig. 2. Effect of 1,25-dihydydroxyvitamin D_3 on ALP activity in MC3T3-E1 cells. Cells were cultured in differentiation media(PC) or in 10^{-4},10^{-6},10^{-8},10^{-10},10^{-12},10^{-14}M of 1,25-dihydydroxyvitamin D_3 respectively. The Cell viability was measured by MTT assay. Cells cultured in growth medium alone served as a negative control(NC). Results were expressed as % of control and data were mean ±S.D of three independent experiments. ($^{*}p<0.05$ as compared with positive control)

dCollection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

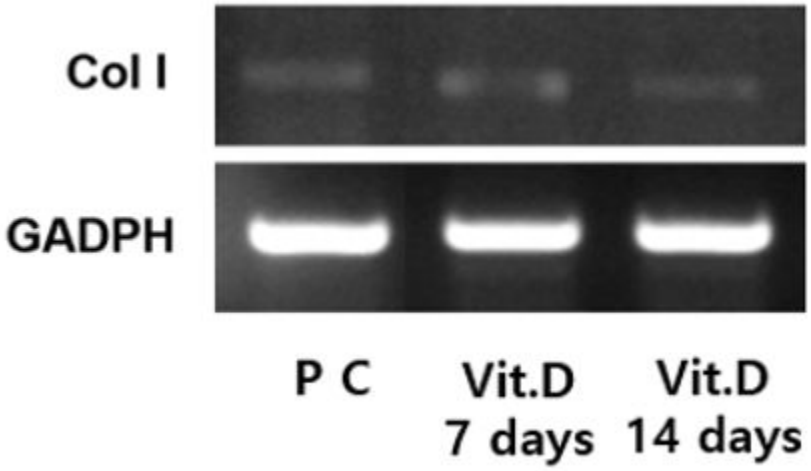
3. 골형성 관련 유전자 발현 분석(RT-PCR)

3-1. Collagen type I mRNA 발현

1,25-dihydydroxyvitamin D_3에 의한 Collagen type I mRNA 발현 정도를 RT-PCR을 통하여 측정하였다. 1,25-dihydydroxyvitamin D_3의 농도는 MTT assay 와 ALP test 결과를 바탕으로 세포의 증식 및 분화 정도가 가장 높게 나타난 실험군(1,25-dihydydroxyvitamin D_3를 10^{-12}M로 투여)을 대상으로 분화 7일, 14일째에 분석하였다. 분화 7일째에 양성대조군(100%)에 비해 1,25-dihydydroxyvitamin D_3 처리군에서 142%로 발현량이 증가되었다. 분화 14일째에는 발현량이 83%로 7일째보다 감소하였다. 따라서 1,25-dihydydroxyvitamin D_3 처리 시 Collagen type I mRNA 발현은 분화 초기에는 증가를 보이다가 시간 경과에 따라 발현량이 줄어드는 양상을 관찰할 수 있었다(Fig. 3).

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY



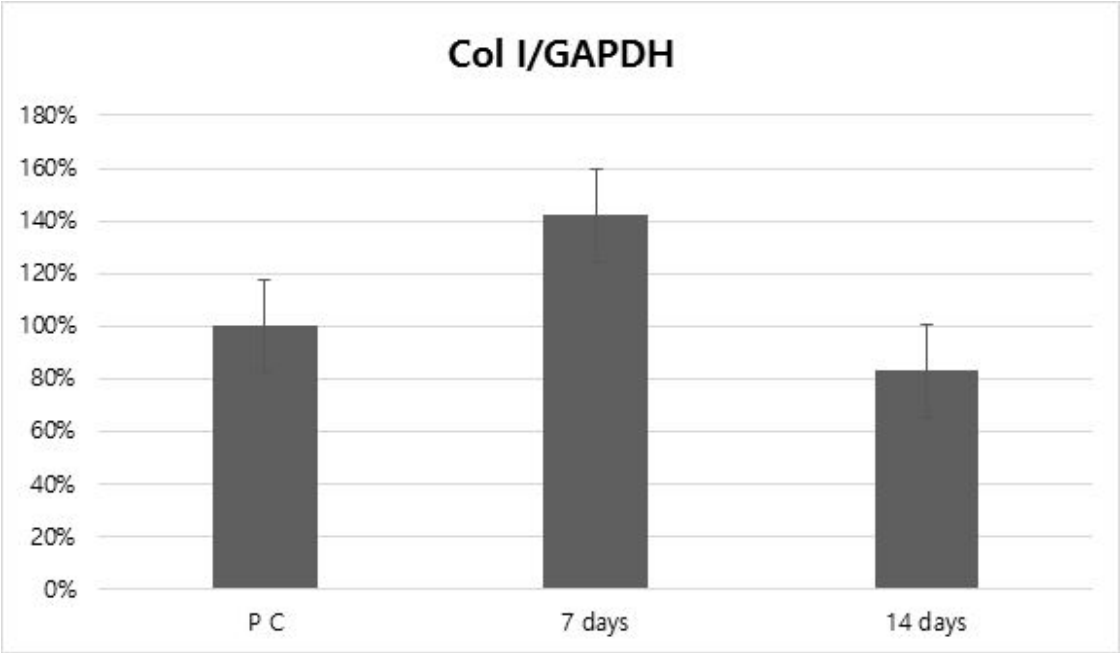


Fig. 3. Semi-quantitative RT-PCR analysis of collagen type I (Col-I) mRNA expression in MC3T3-E1 cells treat with 1,25-dihydydroxyvitamin D_3(10^{-12}M). Cells were cultured in differentiation media as a positive control. GAPDH was used as the internal control. The quantification of mRNA expression was measured by densitometric analysis using Image J software. The percentage of Col-I mRNA expression was calculated as a ratio of GAPDH band.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

3-2. Alkaline phosphatase mRNA 발현

Alkaline phosphatase(ALP) mRNA의 발현 정도는 분화 7일째에 양성 대조군(100%)에 비해 1,25-dihydydroxyvitamin D3 실험군에서 124%로 증가하였고 분화 14일째에는 실험군에서 148%로 값이 더 증가하였다. 따라서 ALP mRNA의 발현은 세포분화 후에 14일까지 지속적으로 증가하는 양상을 확인할 수 있었다(Fig. 4).

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

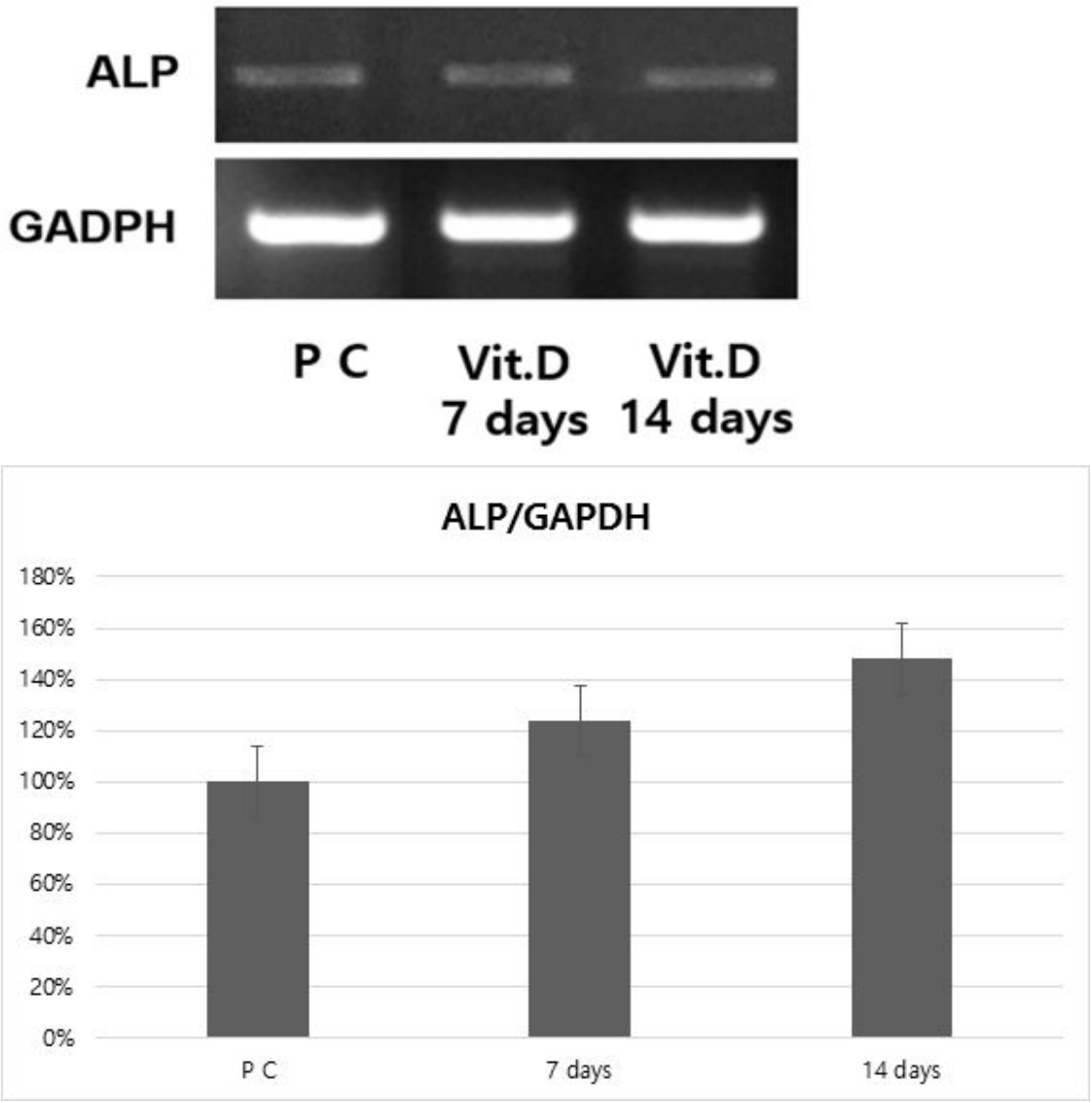


Fig. 4. Semi-quantitative RT-PCR analysis of alkaline phosphatase(ALP) mRNA expression in MC3T3-E1 cells treat with 1,25-dihydydroxyvitamin D_3(10^{-12}M). Cells were cultured in differentiation media as a positive control. GAPDH was used as the internal control. The quantification of mRNA expression was measured by densitometric analysis using Image J software. The percentage of ALP mRNA expression was calculated as a ratio of GAPDH band.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

3-3. Osteocalcin mRNA 발현

Osteocalcin mRNA의 발현 정도는 분화 7일째에 1,25-dihydydroxyvitamin D_3 실험군에서 122%로 약간 증가되어 나타났다. 그리고 분화 14일째에 실험군에서 발현정도가 118%로 7일째 결과에 비해 약간 감소되어 나타났지만 통계적인 유의성은 없었다. 따라서 osteocalcin mRNA는 양성 대조군과 실험군에서 유사한 정도로 발현되며 분화 후 14일째까지 시간경과에 따른 발현 정도의 변화가 크게 없음을 확인할 수 있었다 (Fig. 5).

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

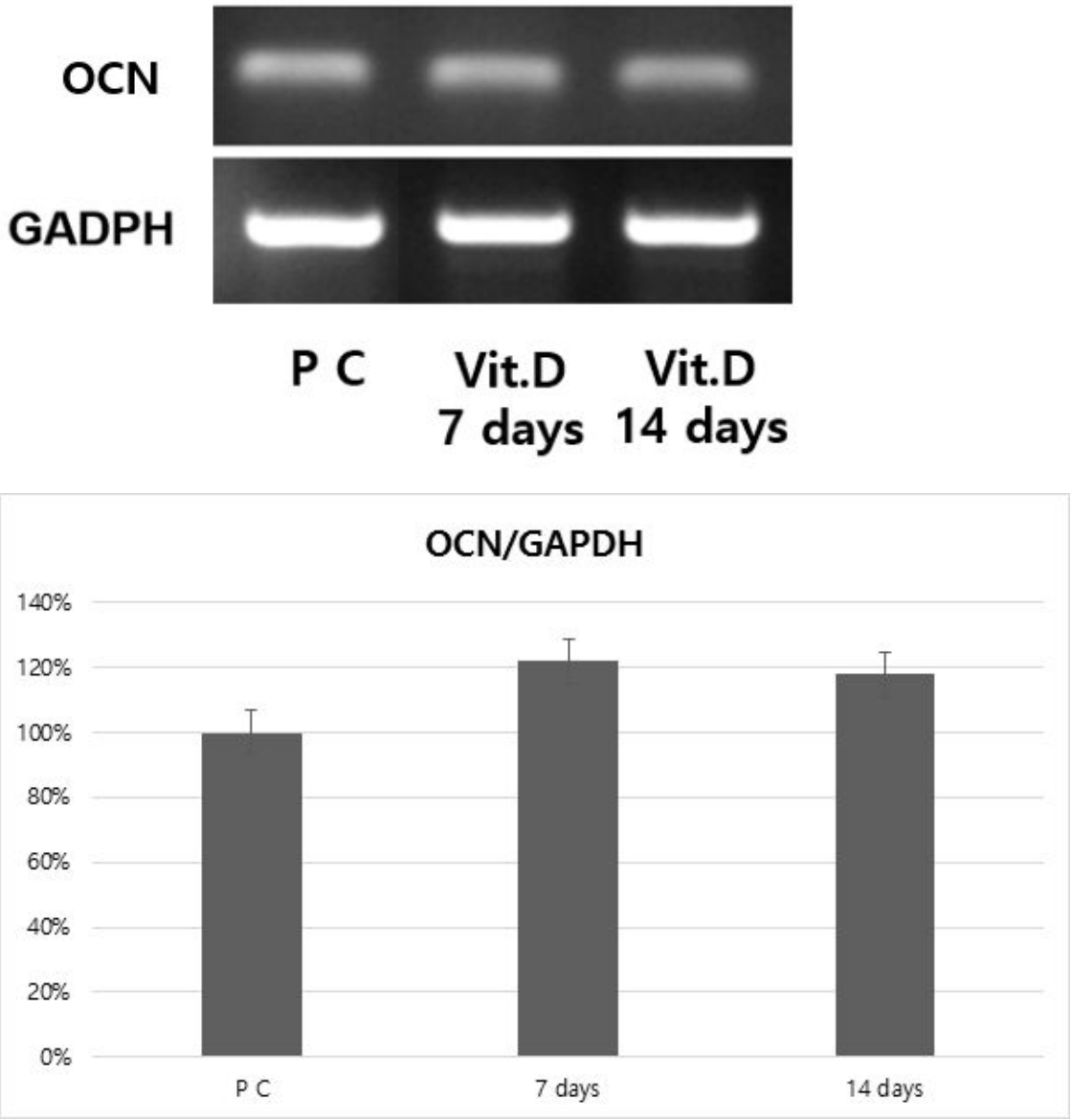


Fig. 5. Semi-quantitative RT-PCR analysis of osteocalcin(OCN) mRNA expression in MC3T3-E1 cells treat with 1,25-dihydydroxyvitamin D_3(10^{-12}M). Cells were cultured in differentiation media as a positive control. GAPDH was used as the internal control. The quantification of mRNA expression was measured by densitometric analysis using Image J software. The percentage of OCN mRNA expression was calculated as a ratio of GAPDH band.

dCollection @ chosun

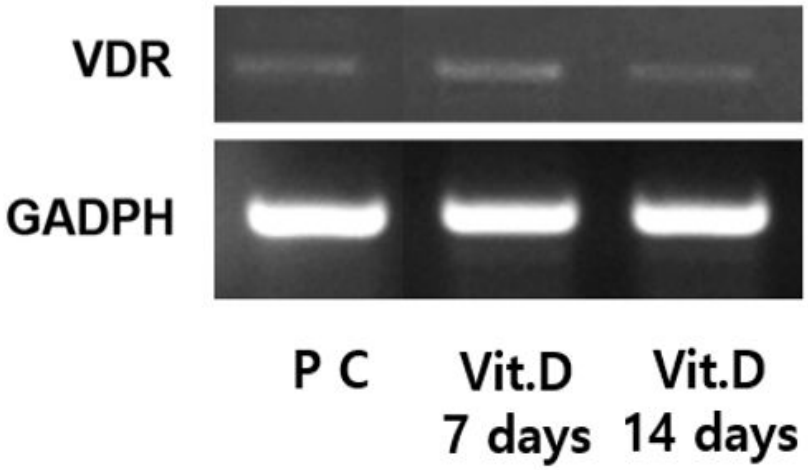
조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

3-4. Vitamin D 수용체(VDR) mRNA의 발현

Vitamin D 수용체 mRNA의 발현은 분화 7일째에 양성 대조군(100%)에 비해서 1,25-dihydydroxyvitamin D_3 실험군에서 199%로 2배 가까이 증가하였다. 분화 14일째에는 1,25-dihydydroxyvitamin D_3 실험군에서 VDR mRNA 발현값이 127%로 다시 감소하는 양상을 보였다. 따라서 분화 초기인 7일째에는 VDR의 발현량이 증가했다가 분화 중기 이후에는 VDR의 발현량이 감소함을 확인할 수 있었다(Fig. 6).

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY



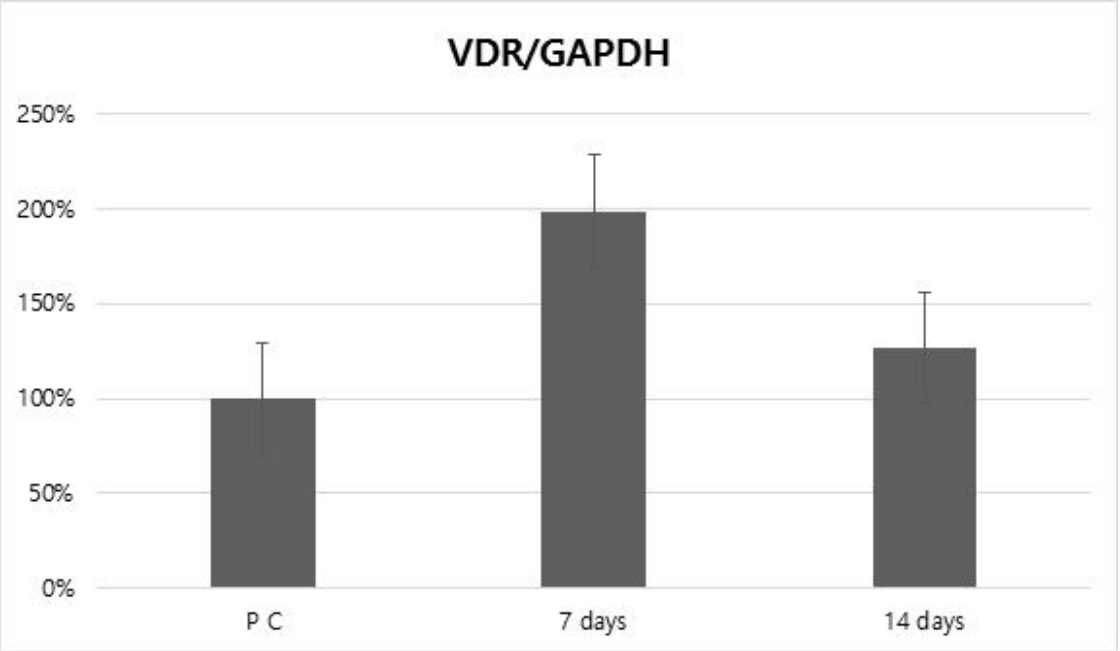


Fig. 6. Semi-quantitative RT-PCR analysis of 1,25-dihydydroxyvitamin D3 receptor(VDR) mRNA expression in MC3T3-E1 cells treat with 1,25-dihydydroxyvitamin D_3(10^{-12}M). Cells were cultured in differentiation media as a positive control. GAPDH was used as the internal control. The quantification of mRNA expression was measured by densitometric analysis using Image J software. The percentage of ALP mRNA expression was calculated as a ratio of GAPDH band.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

4. 석회화 결절 형성 분석

1,25-dihydydroxyvitamin D_3에 의한 MC3T3-E1 세포의 석회화 결절 형성 정도를 분석하기 위하여 alizarin red S 염색을 시행하였고 형성된 결절을 자세히 관찰하기 위하여 광학 현미경을 이용하였다. 육안으로 관찰 시에는 7일, 14일, 21일째에 음성 대조군에서는 염색이 거의 되지 않았지만, 양성 대조군 및 1,25-dihydydroxyvitamin D_3를 10^{-12}M 농도로 처리한 실험군에서는 염색 정도가 증가되어 나타났다. 육안적으로 양성 대조군과 실험군간의 차이는 크지 않았으며 두 군 모두 시간경과에 따라 염색의 정도가 증가하였다(Fig. 7).

40배율의 광학 현미경으로 관찰 시, 분화배지만 처리한 양성 대조군에 비해 1,25-dihydydroxyvitamin D_3를 10^{-12}M 농도로 처리한 실험군에서 분화 초기에 석회화 결절의 형성이 좀 더 우세하게 나타났다. 7일, 14일, 21일 후 시간경과에 따라 대조군과 실험군 모두에서 석회화 결절의 숫자와 크기가 증가하였으나, 육안적으로 두 군간의 차이는 크지 않았다. 하지만 양성대조군에 비해 실험군에서 좀 더 이른 시기에 석회화 결절이 나타나는 경향이 관찰되었다(Fig. 8).

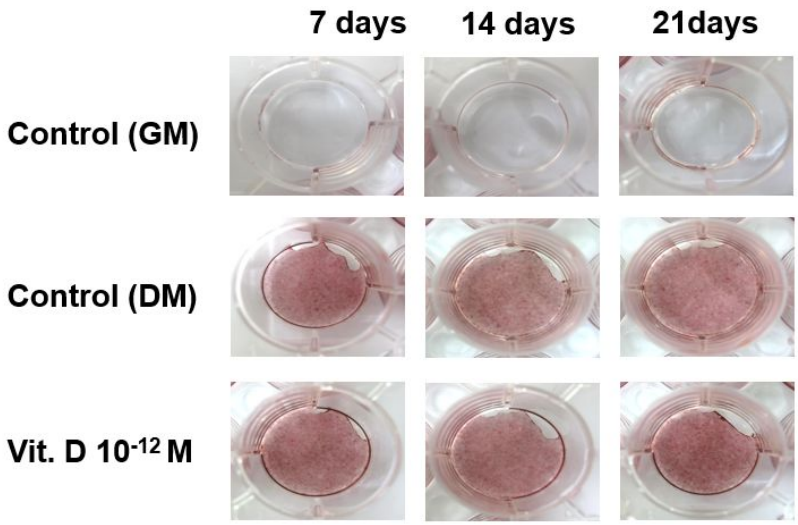


Fig. 7. Effect of 1,25-dihydydroxyvitamin D_3 on the formation of mineralized nodule in MC3T3-E1 cells. Cells were observed under macroscopic image. Cell were cultured for 7,14,21 days in the differentiation media (DM) or in 10^{-12}M of

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

1,25-dihydydroxyvitamin D_3(DM & 1,25-Vit D_3). Negative control cells were cultured in growth media(GM) alone.

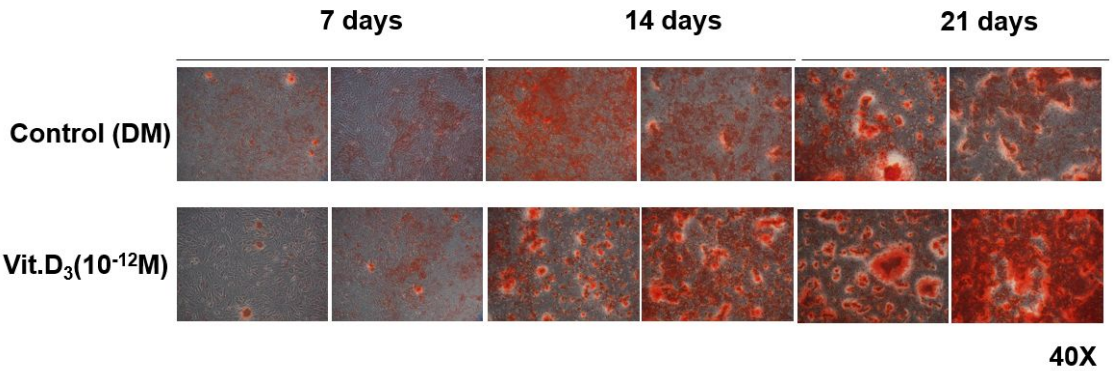


Fig. 8. Effect of 1,25-dihydydroxyvitamin D_3 on the formation of mineralized nodule in MC3T3-E1 cells. Cells were observed under microscopic image with 40X magnification. Cell were cultured for 7, 14, 21 days in the differentiation media(DM) or in 1pM of 1,25-dihydydroxyvitamin D_3 (DM & 1,25-Vit D_3)

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

IV. 총괄 및 고찰

인간의 수명이 연장됨에 따라 상실된 치아를 수복하기 위한 임플란트 치료에 대한 관심이 높아지고 있다. 하지만 만성적인 치주질환으로 인해 치조골이 흡수되거나 오랜 기간 의치 사용으로 인해 치조제가 위축되는 경우 임플란트 시술이 어려워지게 된다. 이러한 경우 상실된 치조골을 회복하기 위한 술식들이 필요한데 그 중 골유도 재생술(guided bone regeneration)은 효과적인 치조제 증대 방법으로서 이용되고 있다[16].

치조골의 재생을 위해서는 골형성을 위한 세포(osteogenic cell)와 골전도 역할을 하는 세포외 기질(scaffold), 그리고 골재생을 자극하는 성장인자(growth factor)들이 필요하다[17]. 골모세포의 성장 및 분화과정을 연구하기 위해서는 적합한 세포 실험 모델이 필요한데, 본 실험에서 사용한 MC3T3-E1 골모유사세포는 생쥐 두개골에서 유래된 골모전구세포주로서 골형성능을 가지고 있어서 골생물학 연구에 널리 사용되고 있다. 이 세포는 골형성의 과정 중에 나타나는 세포의 증식, 분화, 석회화 등 골모세포와 유사한 대사적 특성을 나타내므로 현재 골모세포의 분화와 관련된 연구에서 유용하게 사용되고 있다[21].

골의 재생과정은 크게 골모세포의 증식과 분화, 세포 외 기질의 형성, 무기질화의 세 가지 단계로 구분된다[22,23]. 우선 세포의 증식과 분화 단계에서는 histone, ribosomal protein과 같은 세포주기와 관련된 인자가 높은 농도로 나타난다. 그리고 세포 외 기질의 형성과 성숙 기간에는 두 가지 패턴의 세포 외 기질 단백질이 나타난다. 먼저 성숙 기간에는 collagen type I 과 alkaline phosphatase, TGF-β1 등이 높게 나타나며 무기질화 기간에는 fibronectin과 osteonectin, osteocalcin 등이 보다 높게 발현된다. 그 중 골의 분화과정에서 biomarker로 자주 사용되는 alkaline phosphatase의 활성은 세포 외 기질 형성단계의 초기에 높게 나타나며 그 이후에는 점차 감소하게 된다. 골기질의 광화(mineralization) 기간에는 bone nodule이 형성되고 osteoclacin이 높게 발현된다[24,25].

위의 같은 일련의 골모세포 성장 과정 중에서 성장인자는 골재생을 위한 환경을 조성하고 세포 수준의 신호전달 체계을 통하여 골모세포에 자극을 전달한다. 지금까지 BMP-2, PDGF, TGF-β, IGF, glucocorticoids 등을 비롯한 여러 가지 성장인자에 대한 연구가 진행되어 왔으며 성장인자가 골형성 과정에 긍정적인 효과가 있음을 확인한바

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

있다[26]. 본 연구에서는 체내의 골대사 과정 중 칼슘과 인의 항상성 조절에 관여하는 1,25-dihydydroxyvitamin D_3가 골모세포에 어떠한 영향을 주는지 알아보고자 하였다. 1,25-dihydydroxyvitamin D_3는 비타민 A, E, K와 함께 지용성 비타민에 속하며, 대사에 관한 연구를 통해 활성형 대사산물인 1,25-dihydydroxyvitamin D_3이 동정되었다. 1,25-dihydydroxyvitamin D_3는 콜레스테롤로부터 생합성되고 사이토크롬 P450효소가 생합성을 촉진하며 핵 내의 비타민D 수용체(vitamin D receptor, VDR)에 결합하여 핵 내의 전사과정을 조절한다는 점에서 스테로이드와 유사하기 때문에 일종의 호르몬으로 분류되었다[27,28]. 비타민D 수용체(VDR)는 작은창자와 부갑상선, 신장 세포관 세포, 피부의 상피세포 등 여러 표적세포에서 발현되는데 골조직에서는 특히 골모세포계에서 발현된다. 비타민D 수용체를 가지고 있는 골모세포나 골모유사세포에서 1,25-dihydydroxyvitamin D_3는 collagen, osteocalcin, osteopontin, matrix Gla 단백질과 같은 특이 단백질의 발현을 촉진하는 것으로 보고 되었다[29-33]. 1,25-dihydydroxyvitamin D_3의 작용기전을 간단히 살펴보면 1,25-dihydydroxyvitamin D_3가 비타민D 수용체(Vitamin D receptor, VDR)에 결합하여 복합체를 형성하고, 그 복합체가 핵 내 DNA상의 비타민D 반응요소(vitamin D responsive elements)를 인식하여 각종 유전자의 전사에 활력을 줌으로써 작용을 하게 한다[34,35].

비타민 D가 국소적인 환경에서 골모세포에 직접 작용하여 분화 및 광화를 촉진하는지에 대해서는 명확하게 밝혀진 바가 없다. 따라서 본 연구에서는 in vitro 실험을 통하여 골모세포 수준에서도 1,25-dihydydroxyvitamin D_3가 의한 골조직의 형성과 광화에 효과가 있는지 알아보고자 하였다.

이 연구에서는 먼저 Vit D가 골모세포의 증식에 어떠한 영향을 주는지 알아보기 위해 MTT test를 시행하였고, 실험 1일차와 3일차에 양성 대조군과 비교 시 1,25-dihydydroxyvitamin D_3를 투여한 실험군 모두 세포 증식에 저해효과를 나타내지 않았다. 3일차의 결과에서는 양성대조군에 비해 실험군 일부에서 약간의 세포 증식 효과가 관찰되었다. 양성 대조군의 측정치 100±0.031(%) 비해 모든 실험군에서 생존률 증가가 나타났으며 특히 10^{-4}, 10^{-8}, 10^{-12}M의 농도에서는 통계적으로 유의하게 높은 수치를 보였다($p<0.05$). 따라서 1,25-dihydydroxyvitamin D_3는 MC3T3-E1 골모유사세포의 증식에 위해한 효과를 나타내지 않으며 3일차 결과를 바탕으로 세포증식에 긍정적인 효과를 준다는 사실을 확인할 수 있었다.

다음으로 골모유사세포의 분화정도를 확인하기 위하여 ALP 활성도를 측정하였는데, 1,25-dihydroxyvitamin D_3를 처리하여 7일째, 14일째 경과 관찰한 결과, 낮은 농도인

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

10^{-10}, 10^{-12}, 10^{-14}M 농도에서 ALP 활성도의 증가가 나타났으며, 이는 양성 대조군에 비하여 통계적으로 유의하게 증가된 수치였다($p<0.05$). MC3T3-E1 세포가 분화하는 과정은 크게 두 단계로 나눌 수 있다. 첫 단계는 세포 분화 후 10~15일 동안에 일어나는데 이 때 ALP와 같은 특이 단백질이 발현되고 세포 외 기질의 성숙(matrix maturation)이 진행되며, 두 번째 단계에서는 분화 후 25~30일 동안에 osteocalcin과 같은 단백질의 발현과 함께 세포 외 기질의 광화(matrix mineralization)가 일어난다[36,37]. 본 연구에서도 7일과 14일 후 결과 모두 지속적으로 ALP 반응성은 증가하는 양상을 보여 골모유사세포가 정상적인 분화과정을 나타내고 있음을 확인할 수 있었다. 고농도군에서는 ALP 수치가 낮게 나타났는데, 2008년 Jones 등은 고농도의 1,25-dihydydroxy vitamin D_3에 의해 24,25$(OH)_2D_3$, 25,26$(OH)_2D_3$, 25$(OH)D_3$-26,23-lactone 등의 유사체가 다량 생성되어 1,25-dihydydroxyvitamin D_3와 경쟁함으로써 비타민 D가 수용체에 결합하는 것을 방해할 수 있다고 보고하였다[38]. 따라서 골모세포의 분화효율을 증가시키기 위해서는 적정농도의 1,25-dihydroxyvitamin D_3를 필요한 위치와 기간 동안 일정하게 유지할 수 있어야 하며 이런 기능을 할 수 있는 효율적인 운반체(carrier)에 대한 연구도 부가적으로 필요할 것으로 생각된다[39].

또한 1,25-dihydroxyvitamin D_3를 처리했을 때의 유전자 발현 차이를 알아보고자 RT-PCR 실험을 진행하였다. 분화 초기에 해당하는 7일 경과 후 결과를 살펴보면, 양성 대조군에 비해 1,25-dihydroxyvitamin D_3를 처리한 실험군에서 ALP, collagen-I, VDR, osteocalcin의 mRNA 발현량이 증가되어 나타났고, 분화 후기에 해당되는 14일 후에는 ALP 발현량은 좀 더 증가되는 양상을 보였지만 collagen-I, VDR은 감소되는 양상을 보였다. 1984년 Noryoshi 등은 1,25-dihydroxyvitamin D_3가 분화 초기 단계에서 MC3T3-E1에 자극효과를 주는데 특히 type I collagen과 ALP 수치를 증가시키며 이때 VDR이 작용하는 것으로 생각된다고 언급하였다[40]. 주목할만한 점은 1,25-dihydroxyvitamin D_3를 처리 후 7일째에 VDR 유전자의 발현이 큰 폭으로 증가한다는 점인데, 1,25-dihydydroxyvitamin D_3가 작용하여 골모세포에서 VDR의 발현이 증가되고 1,25-dihydydroxyvitamin D_3와 VDR이 복합체를 형성하여 핵 내의 여러 유전자의 전사과정을 활성화시키고 있음을 예측할 수 있다. Kurihara 등의 보고에 의하면, 분화의 초기에는 collagen-I의 합성이 활발하게 일어나 세포 외 기질을 형성하고 그 이후에 ALP가 세포 외 침착되어 기질의 성숙을 돕는 것으로 알려져 있는데, 본 실험 결과에서도 실험군에서 7일 후인 초기에 collagen-I의 발현량이 증가하였다가 14일째에는 감소되었고, ALP 발현량은 14일째까지 계속 증가되고 있음을 확인할 수 있었다[40,41].

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Osteoclacin의 발현량은 1,25-dihydroxyvitamin D_3를 처리한 실험군에서 7일, 14일 후 모두 증가되어 나타났지만 양성 대조군과 큰 차이는 없었다. MC3T3-E1 세포의 분화과정을 살펴보면, 분화 후 25~30일 기간 동안에 osteocalcin과 같은 단백질의 발현이 크게 증가되고 기질의 광화(matrix mineralization)가 일어남을 알 수 있다. 따라서 7일, 14일 경과시점은 아직은 세포의 분화 및 성숙 단계(matrix maturation)라고 보았을 때 osteocalcin의 발현량이 크게 증가될 시점은 아니었기 때문이라고 생각된다[42,43].

골형성 과정의 마지막 단계인 골기질의 광화(mineralization)에 대한 효과를 알아보기 위하여 alizarin red S 염색 실험을 진행하였다. 세포 외 기질에 존재하는 칼슘과 인은 골결절의 형성 및 광화에 중요하며 alizarin red S에 의해 염색되어 밝은 적색을 나타낸다. 침착된 칼슘과 인의 양은 시간경과에 비례하여 증가하며 염색된 골결절은 분화 14일 후부터 관찰되기 시작한다[44]. 본 실험에서도 염색된 골결절은 양성 대조군과 실험군 모두 분화 14일 시점부터 관찰되기 시작했으며 21일까지 증가하는 양상을 보였다. 결과적으로 전체적인 무기질화 정도는 실험군과 양성 대조군이 큰 차이를 보이지 않았으나 양성대조군에 비해 실험군에서 골결절(bone nodule)이 보다 이른 시기에 형성되는 경향을 보였다. 이는 성장인자를 투여 시 이른 시기에 골결절이 형성되는 결과를 보인 Wang 등의 연구결과와 유사하다[45]. 따라서 국소적인 골유도 재생술시 골이식재와 함께 1,25-dihydydroxyvitamin D_3를 함께 투여하여 보다 빠르게 골결절이 형성되도록 한다면, 불안정한 상태에 있는 초기의 골형성 과정을 촉진시킬 수 있고 전반적인 골형성의 효율도 높일 수 있을 것으로 생각된다.

본 연구를 통해서 세포수준에서 1,25-dihydydroxyvitamin D_3가 골모세포의 증식 및 분화, 그리고 광화에 어떠한 효과를 나타내는지 알아보았다. 1,25-dihydroxyvitamin D_3는 모든 농도에서 세포증식에 저해효과를 나타내지 않았으며 적정농도에서는 증식에 긍정적인 영향을 주는 것으로 확인되었다. 그리고 적정 농도의 1,25-dihydydroxyvitamin D_3를 적용시 양성 대조군에 비해 ALP의 반응성이 높게 측정되었으며, mRNA 발현량 조사결과 역시 양성대조군에 비해서 collagen type-I, ALP, VDR, osteocalcin 발현량이 전반적으로 증가되어 나타났다. alizarin red S assay를 통해서 1,25-dihydydroxyvitamin D_3적용 시 전반적인 골광화 정도에는 큰 차이가 없었으나 보다 이른 시기에 골결절이 형성되는 경향을 관찰할 수 있었다. 따라서 본 연구의 결과를 통해 1,25-dihydroxyvitamin D_3는 MC3T3-E1 세포의 증식 및 분화, 광화를 촉진시킬 수 있음을 확인할 수 있었다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

참고문헌

1. Hynes K, Menicanin D, Gronthos S, Bartold PM. Clinical utility of stem cells for periodontal regeneration. Periodontol 2000. 2012;59(1):203-227.

2. Schropp L, Wenzel A, Kostopoulos L, Karring T. Bone healing and soft tissue c ontour changes following single-tooth extraction: a clinical and radiographic 12-month prospective study. Int J Periodontics Restorative Dent. 2003;23(4):313-323.

3. Rosenberg E, Rose LF. Biologic and clinical considerations for autografts and all ografts in periodontal regeneration therapy. Dent Clin North Am. 1998;42(3):467-4 90.

4. Fiorellini JP, Kim DM, Nakajima Y, Weber HP. Osseointegration of titanium imp lants following guided bone regeneration using expanded polytetrafluoroethylene membrane and various bone fillers. Int J Periodontics Restorative Dent. 2007;27 (3):287-294.

5. Nakashima M. Bone morphogenetic proteins in dentin regeneration for potential u se in endodontic therapy. Cytokine Growth Factor Rev. 2005;16(3):369-376.

6. Nakashima M, Reddi AH. The application of bone morphogenetic proteins to dent al tissue engineering. Nat Biotechnol. 2003;21(9):1025-1032.

7. Srisuwan T, Tilkorn DJ, Wilson JL, Morrison WA, Messer HM, Thompson EW, Abberton KM. Molecular aspects of tissue engineering in the dental field. Period ontol 2000. 2006;41:88-108.

8. Anusaksathien O, Giannobile W. V. Growth factor delivery to re-engineer period ontal tissues. Current pharmaceutical biotechnology. 2002;3(2):129-139.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

9. Minghetti P. P, Norman A. W. L. 1,25-dihydroxy-vitamin D3 receptors: gene reg ulation and genetic circuitry. The FASEB Journal. 1988;2(15):3043-3053.

10. Henry HL, Norman AW. Studies on the mechanism of action of calciferol VII. Localization of 1,25-dihydroxy-vitamin D3 in chick parathyroid glands. Biochem Biophys Res Commun. 1975;62(4):781-788.

11. Minghetti PP, Norman AW. 1,25(OH)2-vitamin D3 receptors: gene regulation and genetic circuitry. FASEB J. 1988;2(15):3043-3053.

12. Norman, A. W. Vitamin D: the calcium homeostatic hormone. Nutrition: Basic and Applied Science. *1979*, Academic Press, New York.

13. Norman AW, Roth J, Orci L. The vitamin D endocrine system: steroid metaboli sm, hormone receptors, and biological response (calcium binding proteins). Endo cr Rev. 1982;3(4):331-366.

14. Haneji T, Kurihara N, Ikeda K, Kumegawa M. 1α,25-Dihydroxyvitamin D3 and analogues of vitamin D3 induce alkaline phosphatase activity in osteoblastic cells derived from newborn mouse calvaria. Journal of biochemistry. 1983;94(4): 1127-1132.

15. Matsumoto T, Igarashi C, Takeuchi Y, Harada S, Kikuchi T, Yamato H, Ogata E. Stimulation by 1, 25-dihydroxyvitamin D3 of in vitro mineralization induced by osteoblast-like MC3T3-E1 cells. Bone. 1991;12(1):27-32.

16. Seibert J, Nyman S. Localized ridge augmentation in dogs: a pilot study using membranes and hydroxyapatite. Journal of periodontology. 1990;61(3):157-165.

17. Petite H, Viateau V, Bensaïd W, Meunier A, de Pollak C, Bourguignon M, Oudi na K, Sedel L, Guillemin G. Tissue-engineered bone regeneration. Nat Biotechn

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

ol. 2000;18(9):959-963.

18. Kodama, H. A., Amagai, Y., Sudo, H., Kasai, S.,Yamamoto, S. Establishment of a clonal osteogenic cell line from newborn mouse calvaria. Jpn.J.Oral. Biol, 1981; 23(4):899-901.

19. Manolagas SC. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. Endocr Rev. 200 0;21(2):115-137.

20. Stein GS, Lian JB, Stein JL, Van Wijnen AJ, Montecino M. Transcriptional con trol of osteoblast growth and differentiation. Physiol Rev. 1996;76(2):593-629.

21. Choi, J. Y., Lee, B. H., Song, K. B., Park, R. W., Kim, I. S., Sohn, K. Y., Ryoo, H. M. Expression patterns of bone related proteins during osteoblastic different iation in MC3T3 E1 cells. Journal of cellular biochemistry, 1996;61(4):609-618.

22. Lian, J. B., Stein, G. S., Canalis, E., Robey, P. G., and Boskey, A. L. Bone form ation: osteoblast lineage cells, growth factors, matrix proteins and the mineraliza tion process. Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral m etabolism. 1999, 4th ed. (M. J. Favus, Ed. pp. 14 - 29, Lippincott Williams & Wil kins

23. Franceschi RT, Iyer BS. Relationship between collagen synthesis and expression of the osteoblast phenotype in MC3T3-E1 cells. J Bone Miner Res. 1992;7(2):23 5-246.

24. Zheng, M. Z., Lee, S. Y., Yu, S. J.,Kim, B. O. Effect of Cornus officinalis extrac t on the differentiation of MC3T3-E1 osteoblast-like cells. Tissue Engineering a nd Regenerative Medicine, 2015;12(2):113-121.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

25. Kim, J. H., Seong, J. M., Moon, H. J., Hwang, J. M., Hwang, K. S., Kwon, Y. D., Park, Y. D. Effects of pharbitidis semen extract on osteoblast differentiation in MC3T3-E1 cells. Tissue Engineering and Regenerative Medicine, 2010;7(2):230-236.

26. Spelsberg TC, Subramaniam M, Riggs BL, Khosla S. The actions and interactions of sex steroids and growth factors/cytokines on the skeleton. Mol Endocrinol. 1999;13(6):819-828.

27. Norman, A. W. Vitamin D: the calcium homeostatic hormone. Nutrition: Basic and Applied Science. 1979, Academic Press, New York.

28. Norman AW, Roth J, Orci L. The vitamin D endocrine system: steroid metabolism, hormone receptors, and biological response (calcium binding proteins). Endocr Rev. 1982;3(4):331-366.

29. Fraser JD, Otawara Y, Price PA. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 stimulates the synthesis of matrix gamma-carboxyglutamic acid protein by osteosarcoma cells. Mutually exclusive expression of vitamin K-dependent bone proteins by clonal osteoblastic cell lines. J Biol Chem. 1988;263(2):911-916.

30. Manolagas SC, Burton DW, Deftos LJ. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 stimulates the alkaline phosphatase activity of osteoblast-like cells. J Biol Chem. 1981;256(14):7115-7127.

31. Price PA, Baukol SA. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 increases synthesis of the vitamin K-dependent bone protein by osteosarcoma cells. J Biol Chem. 1980;255(24):11660-11673.

32. Rowe DW, Kream BE. Regulation of collagen synthesis in fetal rat calvaria by 1,25-dihydroxyvitamin D3. J Biol Chem. 1982;257(14):8009-8015.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

33. Haussler MR, Whitfield GK, Kaneko I, Haussler CA, Hsieh D, Hsieh JC, Jurutka PW. Molecular mechanisms of vitamin D action. Calcif Tissue Int. 2013;92(2):77-98.

34. Carlberg C, Campbell, M. J. Vitamin D receptor signaling mechanisms: integrated actions of a well-defined transcription factor. Steroids, 2013;78(2):127-136.

35. Nebel D, Svensson D, Arosenius K, Larsson E, Jönsson D, Nilsson BO. 1α,25-dihydroxyvitamin D3 promotes osteogenic activity and downregulates proinflammatory cytokine expression in human periodontal ligament cells. J Periodontal Res. 2015;50(5):666-673.

36. Franceschi RT, Ge C, Xiao G, Roca H, Jiang D. Transcriptional regulation of osteoblasts. Cells Tissues Organs. 2009;189(1):144-152.

37. Stein GS, Lian JB, Owen TA. Relationship of cell growth to the regulation of tissue-specific gene expression during osteoblast differentiation. FASEB J. 1990;4(13):3111-3123.

38. Jones G. Pharmacokinetics of vitamin D toxicity. Am J Clin Nutr. 2008;88(2):582-586.

39. Sigurdsson T. J, Nygaard L, Tatakis D. N, Fu E, Turek T. J, Jin L, Wikesjö U. M. (1996). Periodontal repair in dogs: evaluation of rhBMP-2 carriers. International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry. 1996;16(6).

40. Kurihara N, Ishizuka S, Kiyoki M, Haketa Y, Ikeda K, Kumegawa M. Effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on osteoblastic MC3T3-E1 cells. Endocrinology. 1986;118(3):940-947.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

41. Kurihara N, Ikeda K, Hakeda Y, Tsunoi M, Maeda N, Kumegawa M. Effect of 1, 25-dihydroxyvitamin D_3 on alkaline phosphatase activity and collagen synthes is in osteoblastic cells, clone MC3T3-El1. Biochemical and biophysical research communications. 1984;119(2):767-771.

42. Franceschi RT, Ge C, Xiao G, Roca H, Jiang D. Transcriptional regulation of os teoblasts. Cells Tissues Organs. 2009;189(1):144-152.

43. Stein GS, Lian JB, Owen TA. Relationship of cell growth to the regulation of ti ssue-specific gene expression during osteoblast differentiation. FASEB J. 1990;4 (13):3111-3123.

44. Lee SY, Kim SK, Lee SA, Kim CS, Cho KH, Kim DK. Influence of Carthamus tinctorius seed extract on proliferation and differentiation of MC3T3-E1 osteobla st cells. Oral Biology Research. 2013;37(2):73-81.

45. Wang W, Olson D, Cheng B, Guo X, Wang K. Sanguis Draconis resin stimulat es osteoblast alkaline phosphatase activity and mineralization in MC3T3-E1 cell s. J Ethnopharmacol. 2012;142(1):168-174.

Collection @ chosun