

저선량 방사선이 MC3T3-E1 골모세포주의 석회화결절 형성에 미치는 영향

전북대학교 치과대학 구강악안면방사선학교실 및 구강생체과학연구소
김경아 · 고광준

Effects of low dose irradiation on the calcific nodule formation in MC3T3-E1 osteoblastic cell line

Kyung-A Kim, Kwang-Joon Koh

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

ABSTRACT

Purpose : To investigate the effects of low dose irradiation on the calcium content and calcific nodule formation of the MC3T3-E1 osteoblastic cell line.

Materials and Methods : Cells were irradiated with a single dose of 0.2, 0.4 and 0.6 Gy at a dose rate of 5.38 Gy/min using Cs-137 irradiator. After irradiation, the calcium content and calcific nodule formation were examined on the 1st, 2nd, 3rd and 4th week.

Results : We did not find any significant difference of total calcium content after irradiation of 0.2, 0.4 and 0.6 Gy when compared with the unirradiated control group. There was no significant difference of total calcium content between 0.2, 0.4 and 0.6 Gy irradiated groups. We found an increased tendency of the calcific nodule formation after irradiation of 0.2, 0.4 and 0.6 Gy when compared with the unirradiated control group without significant difference of calcific nodule formation between 0.2, 0.4 and 0.6 Gy irradiated groups.

Conclusion : The results showed an increased tendency of the calcific nodule formation after low dose irradiation. However, this tendency did not increase with the increase of irradiation dose. (*Korean J Oral Maxillofac Radiol* 2004; 34 : 137-44)

KEY WORDS : Radiation; Low Dose; Osteoblastic Cell Line; Calcification

서 론

골은 석회화된 결합조직으로 67%의 무기질과 33%의 유기질로 구성되고, 유기질은 28%의 제I형 교원질과 5%의 비교원성 단백질로 구성된다.¹

골의 형성과 흡수는 정상적인 골 구조와 칼슘의 항상성을 유지하는데 필수적이며 골의 형성은 생리적인 작용 뿐만 아니라 골다공증, 대사성 골질환, 골절과 같은 병적인 상태에서 이를 회복하는데도 중요한 작용을 하는 것으로 알려져 있다.

골모세포는 골조직내 간엽의 전구체에서 기원하며, 파골

세포에 의해 제거된 골을 새로운 골로 대체시킨다.^{1,2} 이러한 골모세포의 기능과 분화과정을 밝히는 것은 골의 대사 과정을 이해하는 데 매우 중요하다.

골의 형성과정은 골모세포의 연속적인 발달단계 즉, 초기 세포증식기, 골 기질 형성 및 성숙기, 석회화기로 이루어진다. 세포증식기에는 DNA 합성이 활발하며 세포 수가 점차적으로 증가하는데, 이 때 세포의 형태는 방추상으로 미성숙 골모세포의 형태이지만 세포가 증식함에 따라 입방체 형태가 되고 세포가 근접되면서 그 성장율이 점차 감소된다. 세포증식이 감소되면서 세포분화기로 이행되며, 이 때 교원질 합성이 증가되어 세포외기질이 축적되고 여기에 다양한 비교원성 단백질 유전자가 작용하여 석회화가 개시되며 점차 hydroxyapatite [Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂]의 구조로 석회화된다. 골모세포의 분화시에는 골 관련 유전자인 type I collagen, alkaline phosphatase (ALP), osteopontin,

접수일 : 2004년 6월 15일, 심사일 : 2004년 6월 16일, 채택일 : 2004년 7월 28일
Correspondence to : Prof. Kwang-Joon KOH
Department of Oral and Maxillofacial Radiology, School of Dentistry, 634-18, Keum-Am Dong, Duk-Jin Gu, Jeon-Ju, Chonbuk, 561-712, South Korea
Tel) 82-63-250-2023, Fax) 82-63-250-2081
E-mail) radkoh@chonbuk.ac.kr

osteonectin, osteocalcin, bone sialoprotein 등의 형질표현 유전자들이 발현되는데, 이들은 시기별로 초기에는 세포증식에 관여하고 연속적으로 생합성, 조직화, 그리고 세포외기질의 석회화에 관여한다.³⁻¹¹

이와같은 골의 석회화 과정에서 대사성 질환, 염증, 육체적 피로와 같은 비정상적인 상태는 골 형성의 조절기전에 영향을 미쳐 골 손상을 야기시킨다. 또한 방사선은 골 성장장애를 일으키는 요인으로 보고되어 왔는데, 골모세포에 아치사손상(sublethal damage)을 일으켜 정상적인 골의 형성과 치유에 필요한 성장인자들의 발현에 변화를 야기시키며,¹² 이로 인하여 방사선조사 부위의 골절율이 증가되고 골이 위축되며, 정상적인 골모세포의 증식이 요구되는 골절 부위의 치유도 지연된다.⁴ 이러한 방사선의 세포에 대한 작용은 성숙된 골모세포보다 미성숙 골모세포에 더 큰 영향을 미치는 것으로 알려져 있다.¹³

지금까지 방사선이 골에 미치는 영향에 관한 연구는 많지만,¹⁴⁻²² 이의 기전은 명확하게 밝혀져 있지 않다. 이는 골이 골조직 뿐만 아니라 조혈조직, 지방조직, 혈관, 신경조직 등 다양한 조직들로 구성되어 있어 방사선이 골모세포에 직접적인 영향을 미치는 것인지, 또는 주위조직에 영향을 미쳐 이차적으로 골조직에 효과를 나타내는 것인지 구분하기 어렵고, 골모세포의 분화과정이 여러 단계를 거치므로 방사선의 직접적인 영향을 구명하는데에 어려움이 있기 때문인 것으로 사료된다.

한편, 저선량 방사선이 골에 미치는 영향에 관한 연구는 매우 드물지만 이들 저선량 방사선의 생물학적 영향에 관한 연구는 진단방사선 영역 특히 두경부 방사선촬영시 사용되는 저선량 방사선이 인체에 미치는 영향을 구명하는데에도 도움을 줄 수 있을 것으로 생각된다. 본 연구에서는 생쥐 두개골 골모세포주인 MC3T3-E1 세포를 이용하여 0.2, 0.4 및 0.6 Gy의 저선량 방사선이 골모세포의 최종분화 단계인 석회화기의 석회화결절 형성에 미치는 영향을 구명하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 세포배양 및 방사선조사

생쥐 두개골 골모세포주 MC3T3-E1 세포(ATCC, CRL-2593)를 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco)과 항생제가 포함된 α -minimum essential medium (α -MEM, Gibco) 배양액에서 배양하였다. 배양액은 일주일에 2회 교환하고 일주일 간격으로 1:10으로 계대배양하였다. 배양시 온도는 37°C, 습도는 95%를 유지하고 계속하여 5% CO₂와 95% 공기를 공급하였다. 세포를 35 mm 배양접시에 2 × 10⁴ cells/ml로 분주하여 배양하고 단층으로 자란 후 cesium-137 방사선조사기를 사용하여 실온에서 5.38 Gy/min의 선량률로 0.2, 0.4 및 0.6 Gy의

방사선을 조사한 후 1주, 2주, 3주 그리고 4주 후에 다음과 같은 검사를 시행하였다. 실험기간 동안 배양액은 50 µg/ml ascorbic acid (Sigma)와 10 mM β -glycerophosphate (Sigma)를 혼합한 신선한 배양액으로 2-3일마다 교환하였다.

2. 세포증식량 측정

MC3T3-E1 세포를 35 mm 배양접시에 2 × 10⁴ cells/ml로 분주하여 배양하고 단층으로 자란 후 0.2, 0.4 및 0.6 Gy의 방사선을 조사하여 1주, 2주, 3주 그리고 4주 후에 혈구계를 이용하여 세포를 계수하였다. 세포증식량은 대조군에 대한 백분율로 표기하였다.

3. 칼슘축적량 측정

MC3T3-E1 세포가 단층을 이룬 후 0.2, 0.4 및 0.6 Gy의 방사선을 조사하여 1, 2, 3 그리고 4주 후에 칼슘의 축적량을 측정하였다. 세포를 3 N HCl로 8-16시간동안 처리하여 칼슘을 추출하였으며, 세포 처리액의 일부를 증류수로 5배 희석하였다. 희석된 세포 처리액 10 µl를 96-well flat-bottom microtiter plate로 분주하고 시약 (0.012% o-cresophthalein complexone과 250 mM 2-amino-2-methyl-a, 3-propanediol, Sigma) 90 µl를 첨가하여 5분간 반응시킨 후 분광계를 이용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였고, 칼슘 표준용액 (5-80 ng/ml, Sigma)을 이용하여 표준곡선을 만들어 이로부터 칼슘량을 산출하였다.

4. 석회화결절 형성 측정

골모세포의 석회화결절 형성을 측정하기 위하여 MC3T3-E1 세포가 단층을 이룬 후 0.2, 0.4 및 0.6 Gy로 방사선을 조사하여 1주, 2주, 3주 그리고 4주 후에 von Kossa 염색을 시행하였다. 즉 세포를 3.7% formaldehyde로 고정하고, 3% silver nitrate 용액으로 직사광선하에서 15-30분간 석회화결절이 보일 때까지 반응시킨 후 광학현미경으로 석회화결절을 관찰하였다.

5. 통계분석

세포증식량과 칼슘축적량은 모두 3회 실험값의 평균과 표준오차를 구하였으며, 대조군과 방사선조사군 및 방사선조사군간의 비교평가지 SPSS 11.0.1 (SPSS Inc., U.S.A)을 이용하여 α 값 0.025 수준으로 paired t-test를 시행하여 평가하였다.

결 과

1. 방사선량에 따른 세포증식량

Table 1, Fig. 1은 방사선조사 후 배양기간에 따른 세포의

Table 1. The cell proliferation rate according to the duration of culture after low dose irradiation in MC3T3-E1 cells (% of control)

Radiation dose	Duration of culture after irradiation			
	W 1	W 2	W 3	W 4
Unirradiated control	100.00±0.10	100.00±3.25	100.00±5.66	100.00±5.66
0.2 Gy	143.86±2.34*	101.18±19.19	119.61±2.59	119.61±2.59
0.4 Gy	135.40±3.90*	66.53±0.92*	113.07±7.85	147.06±22.49
0.6 Gy	133.09±3.67*	90.48±12.40	69.28±2.85*	82.68±9.41

* : statistical significance $P < 0.05$
 Each value shows the mean ± SE of three samples

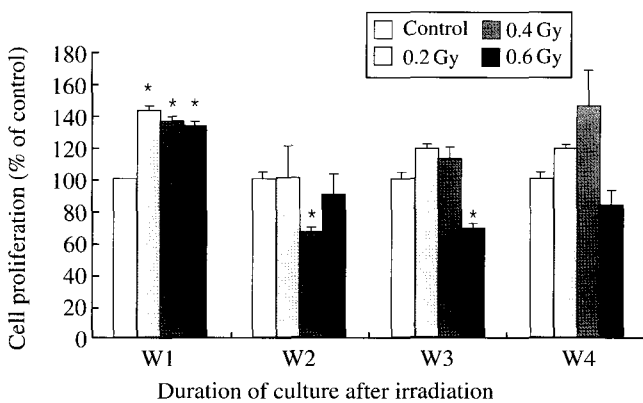


Fig. 1. The bargraph shows the cell proliferation rate according to the duration of culture after low dose irradiation in MC3T3-E1 cells.

증식량을 나타낸다. 방사선조사 1주 후 0.2, 0.4 및 0.6 Gy의 모든 조사군에서 세포의 증식이 대조군에 비하여 증가되었다 ($P < 0.05$). 그러나, 방사선조사 4주 후 0.2, 0.4 및 0.6 Gy의 모든 조사군에서 대조군과 유의한 차이가 없었으며 ($P > 0.05$), 방사선조사 2주 후 0.4 Gy와 3주 후 0.6 Gy 조사군에서는 세포의 증식이 감소되었다 ($P < 0.05$).

2. 방사선량에 따른 칼슘축적량

Table 2, Fig. 2는 방사선조사 후 배양기간에 따른 전체 칼슘축적량을 나타낸다. 방사선조사 1주, 2주, 3주 그리고 4주 후 0.2, 0.4 및 0.6 Gy의 모든 조사군에서 대조군과 유의한 차이가 없었다 ($P > 0.05$).

3. 석회화결절 형성

Fig. 3은 방사선조사 후 배양기간에 따른 석회화결절의 형성을 나타낸다. 방사선조사 1주 후에는 0.2, 0.4 및 0.6 Gy의 모든 조사군에서 석회화결절의 형성을 관찰하기 어려웠다. 한편 방사선조사 2주, 3주 및 4주 후 0.2, 0.4 그리고 0.6 Gy의 모든 조사군에서 석회화결절의 형성이 대조군에 비하여 증가하는 경향을 보였다 (Fig. 3 참조).

Table 2. The calcium content according to the duration of culture after low dose irradiation in MC3T3-E1 cells (µg/ml)

Radiation dose	Duration of culture after irradiation			
	W 1	W 2	W 3	W 4
Unirradiated control	2.65±0.33	4.42±0.49	5.78±0.76	6.67±1.40
0.2 Gy	3.22±1.21	5.27±0.37	6.46±0.29	6.18±0.67
0.4 Gy	4.87±1.06	3.56±0.57	6.71±0.90	6.99±0.91
0.6 Gy	3.84±0.11	3.42±0.45	8.46±1.08	5.67±0.51

Each value shows the mean ± SE of three samples

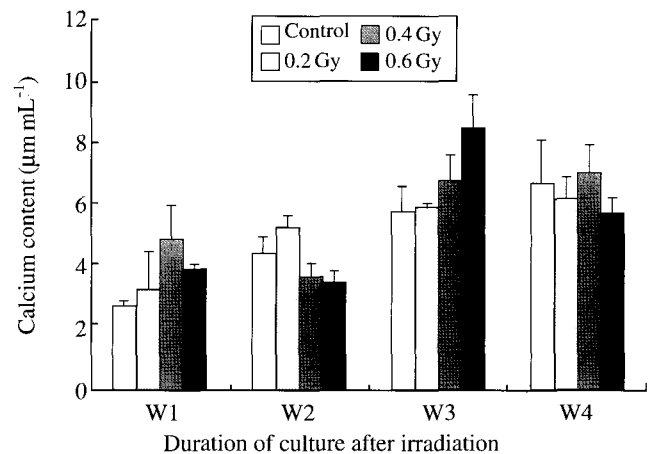


Fig. 2. The bargraph shows the calcium content according to the duration of culture after low dose irradiation in MC3T3-E1 cells.

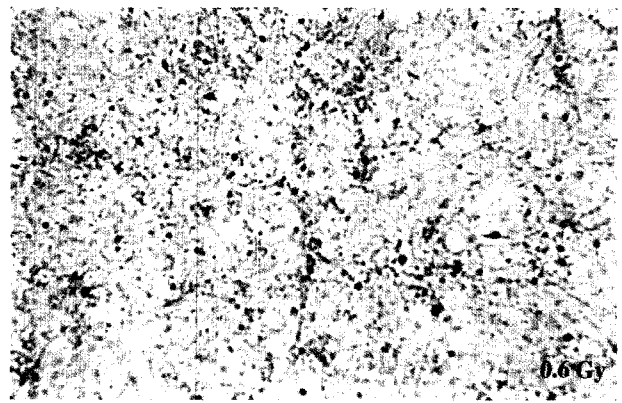
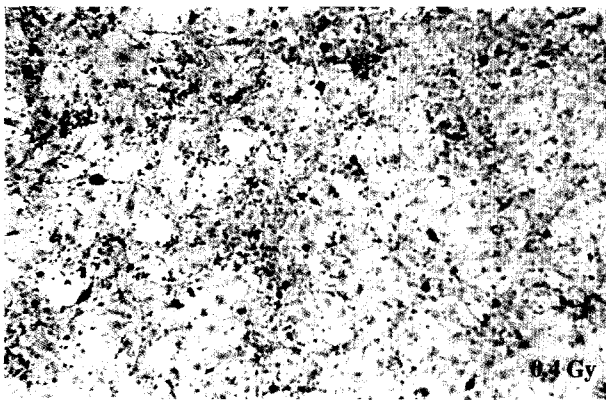
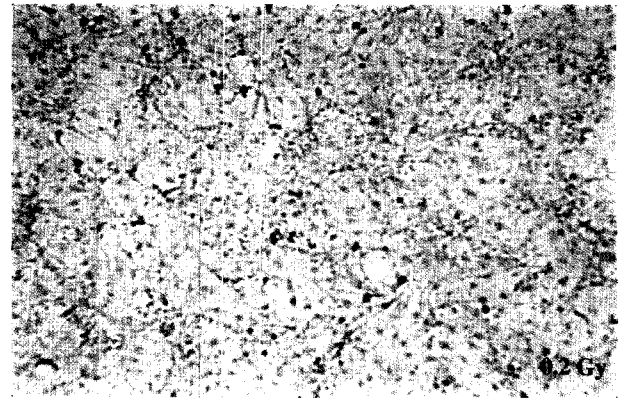
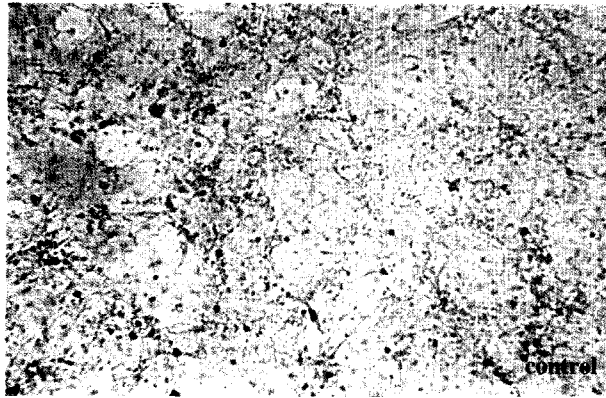
고 찰

골모세포는 골 형성과정에서 증식, 분화과정을 거쳐 세포외기질을 형성하고 이의 석회화를 유도하는데 이러한 일련의 과정은 유전형질의 연속적인 다단계 표현에 의하여 조절된다. 대체로 초기 4-10일의 세포증식기와 10-16일의 골 기질 형성 및 성숙기, 16-30일의 석회화기를 거치게 되며 이 시기는 배양체계와 배지 등의 영향으로 다소 차이를 보이기도 한다.^{3,5,6,23,24} 본 연구에 사용된 MC3T3-E1 세포는 ascorbic acid와 β-glycerophosphate가 공급되는 배지에서 계획된 단계에 따라 골모세포 형질의 발현 및 세포외기질의 석회화가 진행되는 세포로서, 골 기질의 형성, 석회화, 성장요소들에 대한 효과, 형태 및 대사의 변화 등을 연구하는 데 이용되고 있다.^{3,5,6,25-27}

석회화조직을 이루고 있는 대부분의 무기질은 칼슘과 인이며, 이외에 마그네슘과 불소 등이 있다. 칼슘은 체내에서 가장 많은 무기질로 주로 골격조직에 존재하나 유기물질과 결합되어 있는 칼슘은 쉽게 분리될 수 있어 대사과정에서 중요한 역할을 하며 1% 정도는 연조직이나 체액내에 존재한다. 성숙한 골조직은 인산칼슘의 약 30%가 무정형이고 70%는 hydroxyapatite 결정체로 되어 있다. 골조직

저선량 방사선이 MC3T3-E1 골모세포주의 석회화결절 형성에 미치는 영향

W1



W2

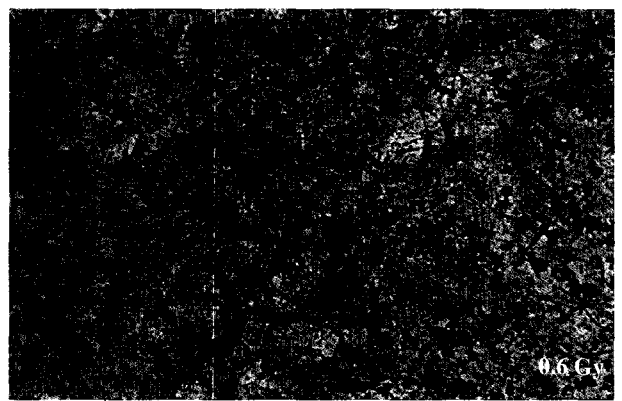
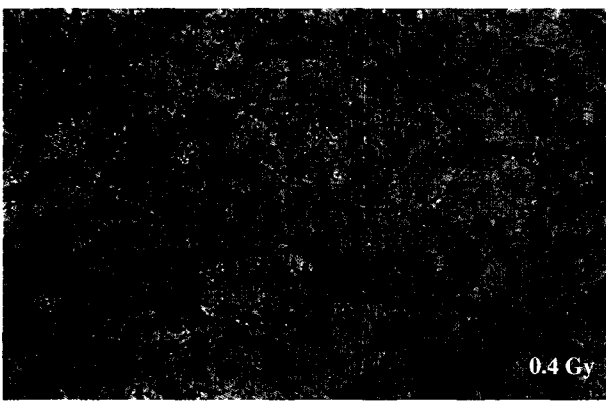
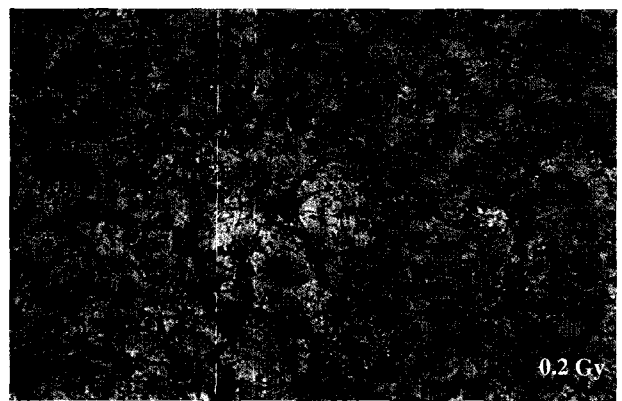
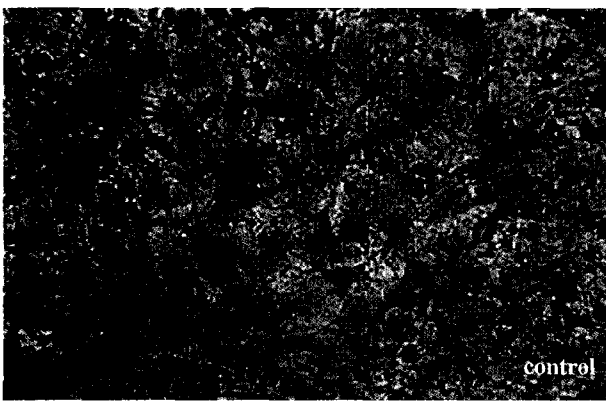


Fig. 3. The microphotographs show the calcific nodule according to the duration of culture after low dose irradiation in MC3T3-E1 cells ($\times 100$).

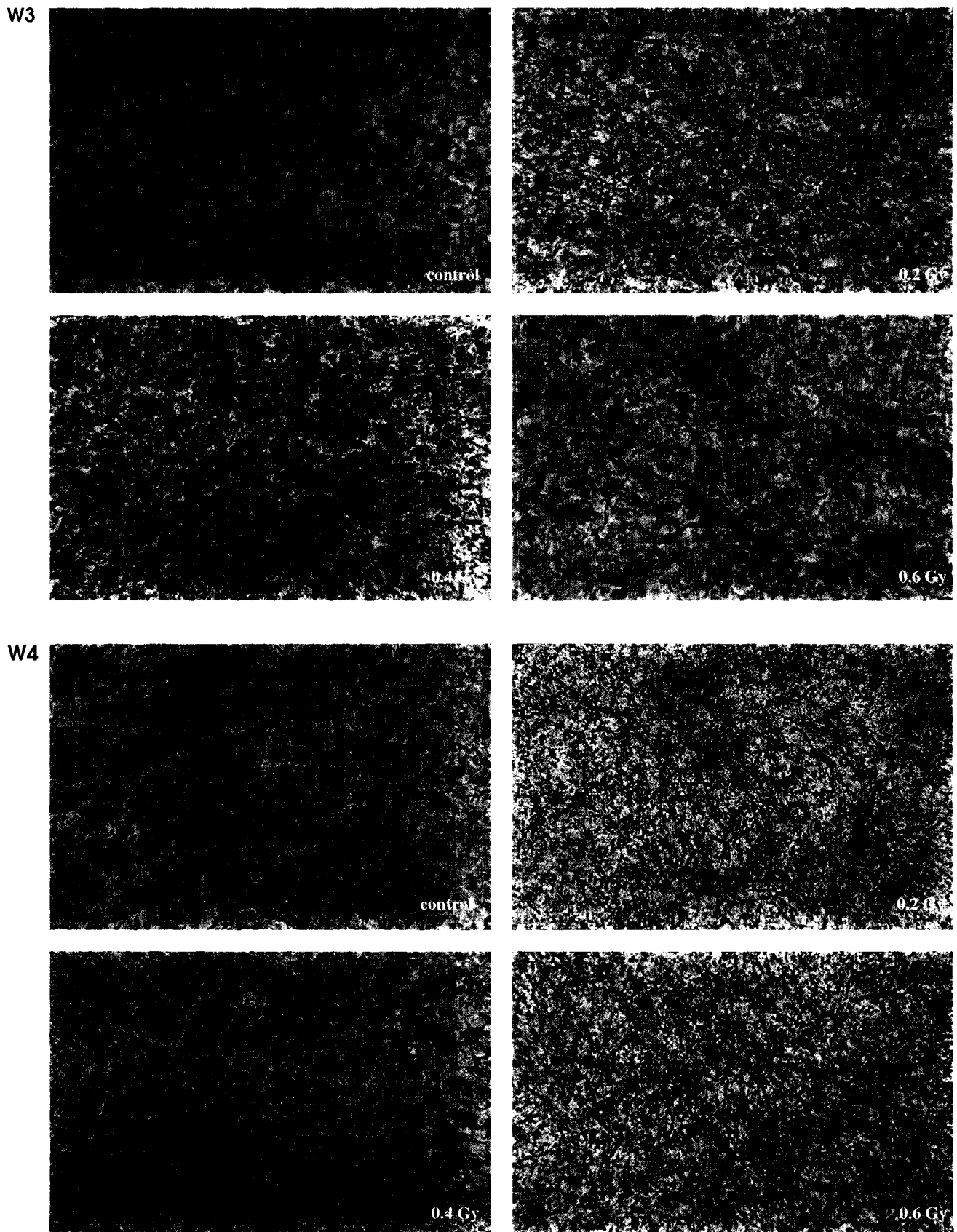


Fig. 3. Continued.

의 hydroxyapatite 결정체는 크기가 매우 작으나 결정체의 총 면적은 상당히 넓으며, 그 표면에 있는 수화층(hydration layer)에 존재하는 칼슘은 교환될 수 있어 골격칼슘 중 약 1%가 교환성 칼슘(exchangeable calcium)으로 구성되어 있다. 또한 골조직 결정체의 표면적은 수백 m^2 로 넓기 때문에 조직간질액과의 물질교환이 신속하게 이루어질 수 있고 혈장의 이온 농도가 약간만 변하여도 신속히 조절될 수 있다.²⁸

골조직의 석회화 기전에는 몇가지 가설이 있다. 첫째, "Alkaline phosphatase설"²⁸⁻³⁰은 ALP가 석회화 과정에서 무기인산 이온농도를 국소적으로 증가시켜 용해도적용 크게 함으로써 인산칼슘의 침전을 형성시키는 역할을 한다는 설이다. 둘째, "seeding설"²⁸로, 콜라겐섬유를 칼슘과 무기인산 이온으로 포화된 용액 속에 넣어 두면 콜라겐섬유에 결정체가 형성되는 것으로 보아 콜라겐 또는 이와 밀접한 관계를 가진 물질이 결정체를 형성하는 기본물질로 작용한다는 설로서, 이러한 역할을 할 가능성이 있는 물질로 콜라겐, 지방, 점액다당류, 인단백질 등이 있다. 셋째, "matrix vesicle설"²⁸로, 연골, 해면골, 상아질을 전자현미경으로 관찰하면 무기질의 침착이 처음 일어나는 것은 직경 $1.0\mu m$ 이하인 구형의 vesicle과 관련이 있다는 사실을 알 수 있으며 이 vesicle은 칼슘과 무기인을 내부로 끌어들여 농축시킴으로써 결정체의 형성을 유발한다는 설이다.

골모세포의 발현인자들 중 세포분화기의 초기에 발현되는 ALP는 골모세포에서 유도되는 석회화에 관여하는 것으로 보인다. Weiss 등³¹은 ALP 유전자의 손상으로 골석회화부전을 특징으로하는 저인산효소증이 초래된다고 보고하였고, Torii 등²⁹은 ALP가 유기인산염을 가수분해하고 국소적인 무기인산 이온농도를 증가시켜 석회화를 개시하며 MC3T3-E1 세포에서 ALP의 antisense RNA 복제로 ALP 활성이 감소되고 세포외기질의 석회화가 억제된다고 보고하여 ALP가 골모세포의 석회화에 관여하는 것을 입증한 바 있다. Fukayama와 Tashjian³²은 부갑상선 호르몬의 영향으로 ALP가 골모세포에서 칼슘섭취에 관여하는 것으로 보고하였고, Matsumura 등⁴은 MC3T3-E1 세포에 10 Gy의 방사선조사 후 ALP의 활성 증가가 석회화결절 형성과 밀접하게 연관되어 있다고 하였다. 또한 Collin 등²⁴은 ALP가 골의 석회화에 관여하는 것은 ALP의 pyrophosphatase로서의 역할 때문으로 여겨진다고 보고하였다. 한편, Bellows 등³⁰은 석회화의 개시와 진행은 분리된 과정으로 유기인산염과 ALP는 석회화의 개시에 결정적인 역할을 하지만 석회화의 진행에는 영향을 미치지 않는다고 하였다.

골의 비교원성 단백질의 10-20%를 구성하는 osteocalcin은 골, 상아질 및 석회화된 연골에서 발현되는 특이적인 유전자로서 골에서는 성숙된 골모세포에서만 발현되고, 골의 석회질 침착시기와 일치하여 나타난다.³³⁻³⁸ Owen 등⁸은 osteocalcin은 분화과정에서 순차적으로 발현되기도 하지

만 hydroxyapatite의 침착과 연관되어 발현되고, 골모세포는 석회질이 침착되지 않으면 석회화에 관련된 유전자도 발현되지 않는다고 보고하였다. 또한 osteocalcin은 4-carboxyglutamic acid (Gla)를 포함하여 칼슘이온에 친화성을 보이며, hydroxyapatite에 강하게 결합함으로써 칼슘의 이동과 침착 등에 관여한다.³³⁻³⁸ Lian 등³⁹은 골에서 Gla의 농도는 조직의 석회질이 증가함에 따라 함께 증가하고 석회질량에 관계없이 Gla/Ca 비율이 비교적 일정하게 유지되는 것은 osteocalcin이 석회화 개시에 특이적인 기능을 나타내기 때문이라고 하였다. 한편, osteocalcin은 hydroxyapatite에 강한 친화성을 지니는 반면 hydroxyapatite의 형성을 억제하는 기능도 보고된 바 있다. Ducy 등⁴⁰은 osteocalcin이 결핍된 쥐를 이용한 연구에서 골의 형성증가와 생물학적, 기계적 강도의 증가를 보고하였다. Matsumura 등⁴은 10 Gy의 방사선조사 후 osteocalcin의 발현이 억제되고 이로 인하여 칼슘 침착량이 증가되는 결과로 미루어 osteocalcin은 골형성 억제인자로 작용한다고 하였다.

골의 성장과 치유에 장애요인으로 보고되고 있는 방사선은 조직에 흡수된 흡수선량에 비례하여 조직손상이 야기되는데 낮은 연령에서 조직손상이 더 심한 것으로 보고되고 있으며,¹³ 성장골에서 황산염, 인산염 및 칼슘의 흡수를 감소시키기도 한다.¹⁸ Currey 등¹⁹은 골 이식 후의 방사선조사는 골의 기계적 강도를 약화시킨다고 보고하였고, Jacobsson 등²¹은 2.5 Gy의 방사선량에서는 골형성에 변화가 없으며 5 Gy의 방사선량에서는 골형성이 심하게 감소된다고 하였다.

Cohn과 Gong⁴¹은 성장중인 쥐의 경골에 2000 R의 방사선을 조사하여 방사선조사 7일 후 ALP 활성도와 칼슘 침착 속도가 현저히 감소된다고 하였는데, 이는 방사선에 의해 골모세포의 수가 감소되었음을 의미하는 것이라고 하였다. Rissanen 등⁴²은 성장중인 개와 성장완료된 개의 상완골과 대퇴골에 방사선을 조사한 결과 방사선량에 비례하여 골의 석회질량이 감소된다고 하였고, Matsumura 등⁴도 10 Gy의 방사선조사 후 골모세포의 수가 감소됨으로써 골모세포에서 DNA 양과 전체 칼슘량이 감소되었으며, 이 결과로서 방사선치료 후 야기되는 골형성 장애를 설명할 수 있다고 하였다. 또한 Hiranuma 등⁴³은 미성숙 연골세포에 10 Gy의 방사선조사 후 세포분화와 석회화가 현저히 억제되며 연골세포의 성숙단계가 진행될수록 그 영향은 감소된다고 보고하였다.

현재 골모세포에 미치는 저선량 방사선의 영향은 명확하게 밝혀져 있지 않다. 본 연구에서는 저선량 방사선조사 후 세포의 증식량을 관찰한 결과 방사선조사 1주 후에는 0.2, 0.4 및 0.6 Gy의 모든 조사군에서 세포의 증식이 대조군에 비하여 증가되었고, 방사선조사 4주 후에는 0.2, 0.4 및 0.6 Gy의 모든 조사군에서 대조군과 유의한 차이가 없었으며, 방사선조사 2주 후, 3주 후 각각 0.4 Gy와 0.6 Gy

조사군에서 세포의 증식이 감소되었다. 방사선조사 1주 후 모든 조사군에서 세포의 증식이 대조군에 비하여 증가되었는데 이 결과가 저선량 방사선에 의하여 세포의 증식이 자극된 결과인지는 명확하지 않다. 또한 방사선조사 2주 후, 3주 후 각각 0.4 Gy와 0.6 Gy 조사군에서 세포의 증식이 감소되었는데 이 결과는 명확히 계수할 수 있는 세포수의 감소 이외에 배양기간이 경과될수록 세포는 세포외기질의 형성과 더불어 그 형태가 점차 변화하기 때문에 세포 계수에 다소의 오차가 발생할 수 있음을 고려하여야 할 것으로 사료된다.

본 연구에서 저선량 방사선을 조사한 후 전체 칼슘축적량에 있어서는 방사선조사 1주, 2주, 3주 및 4주 후 0.2, 0.4 그리고 0.6 Gy의 모든 조사군에서 대조군과 유의한 차이가 없었다. 따라서 저선량의 방사선은 전체 칼슘축적량에 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다. 본 연구에서 방사선조사 후 석회화결절의 형성은 0.2, 0.4 및 0.6 Gy의 모든 조사군에서 대조군에 비하여 증가되는 경향을 보였으며 von Kossa 염색에 의해 염색된 석회질은 관찰할 수 있었지만 명확히 형성된 원형 또는 타원형의 석회화결절은 관찰할 수 없었다. 이는 세포의 배양기간을 연장하거나 방사선량을 증가시켜 관찰하여야 할 것으로 사료된다.

Gal 등¹²은 방사선량에 따라 골모세포주의 회복 정도와 손상의 정도에는 분명한 차이를 보인다고 하였는데, 2 Gy 이하의 선량에서는 대부분 DNA의 아치사 손상이 회복되어 방사선 비조사군과 유사한 결과를 보이지만, 6 Gy 이상의 선량에서는 상당한 세포의 퇴화와 치사를 보인다고 보고하였다. 한편 Jacobsson 등²¹은 2.5-5 Gy의 방사선량에 미성숙골과 치유중인 골이 손상되는 반면 성숙골은 영향을 받지 않는다고 하였다. 치과영역에서 임상검사와 골의 평가를 위한 방사선량은 촬영되는 방사선사진의 종류와 촬영법에 따라 다르지만 최대 0.4 Gy를 넘지 않는다.¹³ 따라서 본 연구에서는 0.2-0.6 Gy의 방사선량을 이용하였으며, 0.2, 0.4 및 0.6 Gy의 저선량 방사선량은 석회화결절 형성을 다소 증가시키는 경향을 보였으나 그 증가량은 미약하였고 각 선량군간의 차이도 없었다. 한편, Dare 등¹³은 신생쥐의 두개관 세포주인 ROB 세포와 MC3T3-E1 세포를 이용하여 0.04, 0.1, 0.4 및 4 Gy의 방사선량 중 0.4 Gy 이하의 저선량 방사선량은 골모세포의 성장과 분화에 영향을 미치지 않으므로 진단분야에서의 방사선량은 골모세포에 영향을 미치지 않는다고 하였으며, 또한 Gaissmaier 등⁴⁴도 저선량 방사선량은 골모세포의 분화와 석회화에 영향을 미치지 않는다고 보고한 바 있다. 본 연구의 결과는 선행들의 연구결과와 유사하나 다소의 차이가 있는 것은 실험조건에 기인한 것으로 생각된다.

치과영역에서 진단 및 수술 직후 그리고 치유과정에서의 방사선학적 평가는 매우 중요하다. 향 후 저선량 방사선량이 미치는 생물학적 영향에 대한 연구가 더욱 활발하

게 이루어져야 할 것으로 사료된다. 또한 본 연구에서는 0.2, 0.4 및 0.6 Gy의 방사선을 단회 조사하고 1-4주 동안 관찰하였는 데, 향 후 골모세포의 세포주기별로 방사선을 조사하여 이의 영향을 관찰하고, 세포 분화과정을 보다 세분화하여 저선량 방사선량 뿐만 아니라 고선량 방사선량에 대한 연구도 이루어져야 할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Ten Cate AR. Oral histology; development, structure, and function. 4th ed. St. Louis: Mosby; 1994. p. 120-46.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. Sudo H, Kodama HA, Amagai Y, Yamamoto S, Kasai S. In vitro differentiation and calcification in a new clonal osteogenic cell line derived from newborn mouse calvaria. *J Cell Biol* 1983; 96 : 191-8.
7. Gerstenfeld LC, Chipman SD, Kelly CM, Hodgens KJ, Lee DD, Landis WJ. Collagen expression, ultrastructural assembly, and mineralization in cultures of chicken embryo osteoblasts. *J Cell Bio* 1988; 106 : 979-89.
8. Owen TA, Aronow MA, 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.
9. Aronow MA, Gerstenfeld LC, Owen TA, Tassinari MS, Stein GS, Lian JB. Factors that promote progressive development of the osteoblast phenotype in cultured fetal rat calvaria cells. *J Cell Physiol* 1990; 143 : 213-21.
10. Ryoo HM, Hoffmann HM, Beumer T, Frenkel B, Towler DA, Stein GS, et al. Stage-specific expression of Dlx-5 during osteoblast differentiation: involvement in regulation of osteocalcin gene expression. *Mol Endocrinol* 1997; 11 : 1681-94.
11. Newberry EP, Latifi T, Towler DA. Reciprocal regulation of osteocalcin transcription by the homeodomain proteins Msx2 and Dlx5. *Biochemistry* 1998; 37 : 16360-8.
12. 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.
13. 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.
14. Fujii K, Miyashita T, Takanashi J, Sugita K, Kohno Y, Nishie H, et al. Gamma-irradiation deregulates cell cycle control and apoptosis in nevoid basal cell carcinoma syndrome-derived cells. *Jpn J Cancer Res* 1999; 90 : 1351-7.

15. Schoeters GE, Plaetse FV, Heuvel RL. High radiosensitivity of the mineralization capacity of adult murine bone marrow in vitro to continuous alpha-irradiation compared to acute X-irradiation. *Int J Radiat Biol* 1992; 61 : 675-83.
16. Evans HB, Brown S, Hurst LN. The effects of early postoperative radiation on vascularized bone grafts. *Ann Plast Surg* 1991; 26 : 505-10.
17. Edgar AT, Mildred P. Changes in the proliferative activity of young and old mouse skeletal tissue following Co⁶⁰ whole-body irradiation. *J Gerontol* 1970; 25 : 9-16.
18. Probert JC, Parker BR. The effects of radiation therapy on bone growth. *Radiology* 1975; 114 : 155-62.
19. Currey JD, Foreman J, Laketic I, Mitchell J, Pegg DE, Reilly GC. Effects of ionizing radiation on the mechanical properties of human bone. *J Orthop Res* 1997; 15 : 111-7.
20. Jacobsson M, Kalebo P, Albrektsson T, Turesson I. Provoked repetitive healing of mature bone tissue following irradiation. *Acta Radiol Oncol* 1986; 25 : 57-62.
21. Jacobsson M, Jonsson A, Albrektsson T, Turesson I. Alterations in bone regenerative capacity after low level gamma irradiation. *Scand J Plast Reconstr Surg* 1985; 19 : 231-6.
22. Melanotte PL, Follis RH. Early effects of x-irradiation on cartilage and bone. *Am J Path* 1961; 39 : 1-7.
23. 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.
24. Collin P, Nefussi JR, Wetterwald A, Nicolas V, Boy-Lefevre ML, Fleisch H, et al. Expression of collagen, osteocalcin, and bone alkaline phosphatase in a mineralizing rat osteoblastic cell culture. *Calcif Tissue Int* 1992; 50 : 175-83.
25. Franceschi RT, Iyer BS. Relationship between collagen synthesis and expression of the osteoblast phenotype in MC3T3-E1 cells. *J Bone Miner Res* 1992; 7 : 235-46.
26. Lin DL, Tarnowski CP, Zhang J, Dai J, Rohn E, Patel AH, et al. Bone metastatic LNCaP-derivative C4-2B prostate cancer cell line mineralizes in vitro. *Prostate* 2001; 47 : 212-21.
27. Lee YK, Song J, Lee SB, Kim KM, Choi SH, Kim CK, et al. Proliferation, differentiation, and calcification of preosteoblast-like MC3T3-E1 cells cultured onto noncrystalline calcium phosphate glass. *J Biomed Mater Res* 2004; 69 : 188-95.
28. 이종훈, 김중수. *구강생리학*. 제3판. 서울: 신광출판사; 1989. p. 262-85
29. Torii Y, Hitomi K, Yamagishi Y, Tsukagoshi N. Demonstration of alkaline phosphatase participation in the mineralization of osteoblasts by antisense RNA approach. *Cell Biol Int* 1996; 20 : 459-64.
30. Bellows CG, Aubin JE, Heersche JN. Initiation and progression of mineralization of bone nodules formed in vitro: the role of alkaline phosphatase and organic phosphate. *Bone Miner* 1991; 14 : 27-40.
31. Weiss MJ, Ray K, Fallon MD, Whyte MP, Fedde KN, Lafferty MA, et al. Analysis of liver/bone/kidney alkaline phosphatase mRNA, DNA, and enzymatic activity in cultured skin fibroblasts from 14 unrelated patients with severe hypophosphatasia. *Am J Hum Genet* 1989; 44 : 686-94.
32. Fukayama S, Tashjian AH. Stimulation by parathyroid hormone of ⁴⁵Ca²⁺ uptake in osteoblast-like cells: possible involvement of alkaline phosphatase. *Endocrinology* 1990; 126 : 1941-9.
33. Gundberg CM, Hauschka PV, Lian JB, Gallop PM. Osteocalcin: isolation, characterization, and detection. *Methods Enzymol* 1984; 107 : 516-44.
34. Owen TA, Bortell R, Yocum SA, Smock SL, Zhang M, Abate C, et al. Coordinate occupancy of AP-1 sites in the vitamin D-responsive-ness and CCAAT box elements by Fos-Jun in the osteocalcin gene: model for phenotype suppression of transcription. *Proc Natl Acad Sci* 1990; 87 : 9990-4.
35. Manuel PM, William TB, Charles WP, Richard DF, Jean VR. Developmental expression of 44-kDa bone phosphoprotein (osteopontin) and bone γ -carboxyglutamic acid (Gla)-containing protein (osteocalcin) in calcifying tissues of rat. *Differentiation* 1988; 37 : 123-36.
36. Towler DA, Rodan GA. Identification of a rat osteocalcin promoter 3', 5'-cyclic adenosine monophosphate response region containing two PuGGTCA steroid hormone receptor binding motifs. *Endocrinology* 1995; 136 : 1089-96.
37. Hauschka PV, Frenkel J, DeMuth R, Gundberg CM. Presence of osteocalcin and related higher molecular weight 4-carboxyglutamic acid-containing proteins in developing bone. *J Biol Chem* 1983; 258 : 176-82.
38. Lian JB, Coutts M, Canalis E. Studies of hormonal regulation of osteocalcin synthesis in cultured fetal rat calvariae. *J Biol Chem* 1985; 260 : 8706-10.
39. Lian JB, Roufosse AH, Reit B, Glimcher MJ. Concentrations of osteocalcin and phosphoprotein as a function of mineral content and age in cortical bone. *Calcif Tissue Int* 1982; 34 : 82-7.
40. 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.
41. Cohn SH, Gong JK. Effect of 2000 roentgens local X-irradiation on metabolism and alkaline phosphatase activity of rat bone. *Am J Physiol* 1953; 173 : 115-9.
42. Rissanen P, Kivimaki K, Paatsama S. Effect of Co⁶⁰ irradiation on the bone mineral content in dogs. *Strahlentherapie* 1969; 138 : 445-8.
43. Hiranuma H, Jikko A, Iwamoto M, Fuchihata H. Effects of X-ray irradiation on terminal differentiation and cartilage matrix calcification of rabbit growth plate chondrocytes in culture. *Bone* 1996; 18 : 233-8.
44. Gaissmaier C, Sell S, Fritz J, Esenwein S, Eingartner C, Weise K, et al. Osteogenesis in exposure to ionizing radiation in vitro. *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 1999; 137 : 528-35.