

Insulin-like growth factor-II가 방사선에 의한 MC3T3 조골세포의 세포사멸에 미치는 영향

박 경 록

고신대학교 의과대학 복음병원 치과

Abstract (J. Kor. Oral Maxillofac. Surg. 2007;33:617-624)

MODULATION OF IRRADIATION-INDUCED CELL DEATH BY INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR-II IN MC3T3 OSTEOBLASTS

Kyeong-Lok Park

Department of Dentistry, Kosin University Gospel Hospital, Busan, Korea

Insulin-like growth factor (IGF) is the most abundant growth factor in bone matrix. Recent studies have shown that it can sensitize apoptotic cell death of osteoblasts. Thus, this study investigated whether IGF-II aggravates irradiation-induced cell death of osteoblasts.

Cultured MC3T3 osteoblasts were irradiated and IGF-II was added at the concentration of 50 ng/ml immediately after the irradiation. Cell viability was measured by MTT assay. Changes in cell death and cell cycle were analyzed by flow cytometry. The expression of proapoptotic gene bax and antiapoptotic gene bcl-2 was quantified by real time RT-PCR and Western blot.

A dose of 30 Gy caused G2/M arrest and increased cell death through both necrosis and apoptosis, while irradiation from 4 to 10 Gy little affected cell cycle and death. IGF-II treatment reduced cell viability without stimulating cell proliferation and changing cell cycle. Combined treatment of IGF-II with irradiation decreased cell viability and proliferation and increased cell death along with G2/M arrest. These effects were not different from those of irradiation only. At transcriptional and protein levels, IGF-II treatment did not affect bax and bcl-2 expression, whereas irradiation increased the expression of bax without changes in bcl-2. IGF-II in combination with irradiation showed similar findings.

These results suggest that IGF-II could modulate apoptotic cell death through mechanisms other than an imbalance between bax and bcl-2 gene expression, although its effect was overridden by irradiation.

Key words: Osteoblast, Irradiation, Insulin-like growth factor, Apoptosis

I. 서 론

미국의 통계에 의하면 암 환자의 50%가 방사선 치료를 받고 있는데¹⁾ 두경부암의 경우 방사선 치료 후 하악골의 방사선골괴사증(osteoradionecrosis)은 심각한 합병증 중의 하나이다. 일반적으로 방사선 조사를 받은 골조직은 혈관과 세포의 수가 감소하여 저 산소 상태가 됨으로써 교원질이 분해되고 세포 사멸이 우세하게 되어 조직이 붕괴된다. 여기에 발치와 같은 외상이나 자발적 창상이 발생하면 만성적으로 치유가 일어나지 않는 방사선골괴사증으로 진행된다^{2,3)}.

방사선 조사에 의해 골의 기능 변화는 1) 조골세포의 apoptosis 또는 괴사, 2) 조골세포와 파골세포 간의 골 리모델링 평형의 실조, 3) 골 미세환경에서 성장인자의 발현 변화, 4) 골 기질의 구조적인 변화 등에 의해 발생할 수 있다. 물론 이러한 변화는 방사선량이나 방사선 조사 기간에 따라 단독적으로 또는 복합적으로 일어날 것이다. 조골세포를 비롯하여 여러 종류의 정상세포와 암세포가 방사선에 의해 apoptosis 과정을 거치는지 또는 손상된 DNA 복구 후 증식이 재개되는지의 결정은 p53 단백질에 의해 좌우됨이 널리 알려져 있다^{4,5)}. 일반적으로 암세포와 흉선세포, 골수세포처럼 증식속도가 빠른 세포는 방사선에 민감한 반면, 간세포와 조골세포는 상대적으로 덜 민감하며⁶⁾, 더욱이 조골세포의 경우 분화 정도에 따라서 방사선에 대한 민감도의 차이가 있다⁷⁾.

방사선에 의한 조골세포의 변화와 이에 따른 골 기질의 변화는 널리 연구된 반면^{8,10)}, 골 기질 성분이 조골세포에 미치는 영향에 대한 연구는 흔치 않다. 정상적인 골 리모델링 과정 이외에 방사선 조사 때처럼 파골세포의 활성화로 골 기질의 구조

박 경 록

602-703 부산시 서구 암남동 34

고신대학교 복음병원 치과

Kyeong-Lok Park

Dept. of Dentistry, Kosin University Gospel Hospital

34 Annam-dong, Seo-gu, Busan, 602-703, Korea

Tel: 82-51-990-5150 Fax: 82-51-990-3005

E-mail: pkl6801@lycos.co.kr

적 변화가 유도되고 이로 인해 조골세포의 기능적 변화가 초래될 수 있다^{11, 12}. Shu 등¹³에 의하면 hydroxyapatite는 조골세포의 성장을 억제시키고 분화를 증가시킨다. Adams 등¹⁴은 골 흡수가 일어나는 부위의 무기인산염 증가가 조골세포의 apoptosis를 촉진시킨다고 한다. 골 기질에는 이러한 무기질 성분 외에도 성장인자들이 풍부하게 함유되어 있는데, 이들 중 IGF(Insulin-like Growth Factor)가 가장 많이 함유되어 있다¹⁵. IGF는 IGF-I, IGF-II 두 종류의 아형이 존재하며, 골에 존재하는 IGF는 조골세포에서 자체 합성되거나 골 흡수가 일어나는 동안 골 기질로부터 유리되어 나온 것이다. IGF-I의 기능에 대해 비교적 많이 연구된 바 in vitro 실험에서 IGF-I은 조골세포의 증식과 분화를 촉진시키며 1형 콜라겐 합성을 증가시킨다. IGF-I이 knockout된 마우스에는 골의 형성과 발달이 저하되어 있고 IGF-I이 골조직에만 과발현된 마우스에는 골 밀도가 증가되어 있는 점 등은 IGF가 골 형성을 촉진하는(osteotropic) 요소임을 확인시켜 주었다^{16, 17}. IGF-II의 경우 IGF-I과 유사한 기능을 발휘할 것으로 추측하고 있다. 그러나 Granerus 등¹⁸은 IGF-I, II가 Wilms tumor cell의 세포사멸을 유도한다고 했으며, Fu 등¹⁹은 IGF-I, II가 Lim1215 대장암세포의 apoptosis를 유도한다고 보고 했으며, Gronowicz 등²⁰은 사람과 마우스의 조골세포에서 IGF-II가 apoptosis를 유도한다고 발표하였다. 만일 후자의 보고에 따른다면 골에 방사선을 조사할 경우 방사선 자체에 의한 조골세포의 영향과 더불어 골 흡수 증가로 유리된 IGF가 조골세포의 사망을 더욱 촉진시킬 가능성이 있다. 이에 저자는 마우스의 두개골 조골세포에서 유도된 MC3T3 세포주를 이용하여 방사선 조사 후 IGF-II를 처리할 경우 이 세포의 세포사멸이 어떠한 영향을 받는지, 그러한 영향이 세포 내 apoptosis 유전자의 발현과 관련이 있는지를 조사하였다.

II. 방 법

1. 세포 배양 및 방사선 조사

MC3T3-E1 조골세포주를 10% fetal bovine serum(FBS, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)과 100 unit/ml penicillin과 100 µg/ml streptomycin(Invitrogen)항생제가 포함된 α-minimum essential medium(α-MEM, Invitrogen)배지에 넣고 37°C, 5% CO₂로 유지되는 배양기에서 배양하였다. 세포가 완전히 자라면 방사선 조사기(Varian, Inc., Palo Alto, CA, USA)를 이용하여 실온에서 400 cGy/min의 선량률로 일회 조사한 직후 IGF-II를 50 ng/ml 처리하여 필요한 시간 동안 배양하였다.

2. 세포사멸과 세포주기 분석

세포사멸의 정량적 분석을 위해 세포를 12-well plate에 배양하고 방사선 조사와 약물처리 후 배지 내에 죽어있는 세포를 모두 버리고 well 바닥에 붙어있는 세포만을 측정 대상으로 하였다. Trypsin(Invitrogen)을 처리하여 세포를 떼어낸 다음

ApoAlert® Annexin V-FITC Apoptosis Kit(Clontech, Mountain View, CA, USA)를 사용하여 설명서에 기재된 순서에 따라 Annexin V-FITC와 Propidium Iodide(PI)를 세포와 반응시켰다. 세포괴사(necrosis)가 일어날 경우 PI에 염색되는 반면, apoptosis가 일어날 경우 Annexin V에 염색되므로 세포괴사와 apoptosis에 의한 세포사멸을 구분할 수 있다. 세포사멸의 정량은 세포괴사와 apoptosis를 구분하여 Flow Cytometer(Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA)를 이용하여 측정하였다. Apoptosis 분석이 끝난 후 남은 세포를 80% 에탄올에 현탁시켜 4°C 냉장고에서 overnight으로 고정시킨 후 원심분리하였다. 원심분리 후 상층액을 버리고 1% bovine serum albumin(BSA)이 포함된 phosphate-buffered saline(PBS)용액으로 두 번 세척하였다. 1% BSA가 포함된 PBS 500 µl, Propidium Iodide(1 mg/ml, Sigma, St. Louis, MO, USA) 10 µl, RNase A(100 mg/ml, Qiagen, Valencia, CA, USA) 5 µl를 각각 넣은 후, 37°C에서 30분 동안 반응시킨 후 Flow Cytometer로 측정한다. 다음 Multicycle 프로그램(Phoenix flow system, Inc., San Diego, CA, USA)을 이용하여 세포주기를 분석하였다.

3. 세포 생존력과 세포 증식의 분석

세포 생존력은 96-well plate에, 세포증식은 12-well plate에 각각 분주한 세포를 사용하였다. 세포 생존능은 3-[4,5-dimethyl-2-thiazolyl]-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide(MTT, Sigma)시약을 사용하여 측정하였는데, MTT는 dehydrogenase 효소와 반응하여 산화되기 때문에 불용성 formazan을 형성한다. 불용성 formazan의 생성은 미토콘드리아의 dehydrogenase 활성도와 비례하므로 세포 생존력이 감소하면 이와 비례하여 formazan의 생성도 감소한다. 방사선 혹은 약물 처리한 세포의 배지를 먼저 제거하고 새로운 배지 180 µl를 넣은 다음 MTT 용액(5 mg/ml) 20 µl를 첨가하고 배양기 내에서 2시간 동안 반응시켰다. 반응액을 제거하고 dimethyl sulfoxide(DMSO, Sigma) 100 µl를 넣은 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포증식은 살아있는 세포 수를 hemocytometer를 사용하여 측정하고 세포 수의 증감으로 판단하였다.

4. Real-Time RT-PCR

Total RNA는 TRI reagent(Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA)를 사용하여 분리하였다. cDNA 합성은 SuperScript™ II First-Strand Synthesis System for RT-PCR(Invitrogen)을 사용하였는데, total RNA 2 µg을 사용하여 제조사의 설명서에 따라 cDNA를 합성하였다. Real-Time PCR은 SYBR® Premix Ex Taq™(Takara Bio Inc., Shiga, Japan) 10 µl, cDNA 1 µl를 넣은 후 LightCycler®(Roche, Indianapolis, IN, USA)를 사용하여 수행하였다.

PCR 조건은 95°C에서 5초, 61°C에서 10초, 72°C에서 10초, 80°C에서 2초를 1주기로 하여 총 45주기를 시행하였다. 유전자의 상대적 발현은 LightCycler®에 내장된 프로그램(delta-delta 분석 방법임)으로 분석하였다. Primer는 primer3 프로그램(Whitehead

Institute for Biomedical Research, Cambridge, MD, USA)을 사용하여 각 유전자의 primer 사이에 적어도 하나의 exon이 포함되도록 설계하였다. Primer의 염기서열은 다음과 같다. β -actin: forward 5'-GACGGCCAGGTCATCACTAT-3', reverse 5'-CTTCTGCATCCTGTTCAGCAA-3', bax: forward 5'-TGCAGAGGATGAT-TGCTGAC-3', reverse 5'-GAGGACTCCAG CCACAAACA-3', bcl-2: forward 5'-GGTGGTGGAGGAAGCTCTTCA-3', reverse 5'-CAGGTATGCACCCAGAGTGA-3'.

5. Western blot

35-mm dish로부터 분리한 세포의 pellet을 얻고 여기에 세포 용해액(20 mM Tris-HCl(pH7.5), 150 mM NaCl, 0.02% sodium azide, 0.1% SDS, 1% Igapel 630, 0.5% sodium deoxycholate, 1 mM PMSF, 5 μ g/ml aprotinin, 1 μ g/ml pepstatin, 1 μ g/ml leupeptin) 100 μ l를 넣고 얼음에서 40분간 둔 후 4°C, 15,000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 protein lysate를 얻고, 30 μ g 단백질을 12% SDS-PAGE로 전기영동 시켰다. PVDF membrane으로 gel을 옮긴 후 5% fat-free dry milk-TBS-T(Tris buffered saline with 0.05% Tween-20)로 1시간 동안 비특이적 반응을 차단하였다. 동일한 용액에 1차 항체(Bcl-2, 1:1,000, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA; Bax, 1:1,000, Santa Cruz; β -actin, 1:2,000, Sigma)를 희석하여 4°C에서 하룻밤 동안 반응시키고 세척 한 후 2차 항체(HRP conjugated rabbit antimouse IgG, Santa Cruz)는 1:3,000으로 사용하였다. Band의 확인은 ECL kit(Amersham-Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK)를 사용하였다.

6. 통계처리

모든 자료는 평균 \pm 표준편차로 표기했다. 세 군 이상을 상호 비교하기 위해 one-way ANOVA를 사용하였으며 사후검정으로 Tukey 검정을 실시했다. 두 군간의 비교는 양측검정을 통한 unpaired t-test를 실시했으며 P값이 0.05이하일 때 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 판정했다.

Table 1. Effects of irradiation on cell cycle phases

	G1 (%)	G2/M (%)	S (%)
0 Gy	84.8 \pm 0.9	1.5 \pm 0.0	13.8 \pm 0.9
4 Gy	85.8 \pm 1.3	1.7 \pm 0.4	12.5 \pm 1.0
10 Gy	84.5 \pm 0.2	2.5 \pm 0.2*	13.1 \pm 0.2
30 Gy	69.5 \pm 2.2*	10.5 \pm 0.5*	19.9 \pm 2.2*
50 Gy	71.2 \pm 3.2*	10.0 \pm 0.7*	19.0 \pm 1.8*

Cell cycle was analyzed 48 hr after varying doses of irradiation. Data are mean \pm SD of 3 separate experiments. * p<0.05 vs. 0 Gy

III. 결 과

1. 방사선 조사선량에 따른 세포 주기와 세포사멸의 변화

Table 1은 MC3T3 세포를 confluence 상태로 배양한 다음 방사선 조사선량과 방사선 조사 48시간 후 각각 세포 주기의 변화를 나타낸 것이다. 방사선 조사 48시간 후 0 Gy와 비교하여 10 Gy까지는 세포 주기의 변화가 나타나지 않았지만 30 Gy 이상에서 G2/M기가 1.5%에서 10.5%로 7배 증가했다. 방사선 조사 5일 후의 세포 주기 변화는 48시간 후와 거의 일치하였다(자료는 표시하지 않음). Table 2는 방사선 조사 48시간 후 MC3T3 세포를 Annexin-V와 PI로 염색하여 세포사멸을 apoptosis와 necrosis로 구분하여 나타낸 것이다. 세포주기 변화를 일으키는 30 Gy에서 0 Gy에 비해 apoptosis는 0.9%에서 5.3%로 5.9배 증가했으며, 세포괴사는 2.9%에서 6.4%로 2.2배 증가하였다. 위의 결과로 미루어 10 Gy와 30 Gy 사이의 방사선량이 MC3T3 세포의 G2/M기를 증가시킴으로써 세포사멸, 특히 apoptosis를 크게 유도하는 임계선량으로 추정된다. 따라서 IGF-II를 사용한 이후의 실험에서는 30 Gy 선량으로 조사하고 48시간 후 모든 작업을 수행하였다.

2. 방사선 조사와 IGF-II에 의한 세포 생존력과 세포 증식의 영향

Fig. 1은 방사선 조사 직후 IGF-II를 50 ng/ml의 농도로 첨가하고 48시간 경과한 다음 MTT 분석을 통해 세포 생존력을 측정 한 것이다. 대조군(0 Gy + Vehicle)에 비해 IGF-II 처리 시 세포 생존력이 16% 감소하였고(p<0.01), 30 Gy에서 25% 감소하였다(p<0.01). 그러나 30 Gy+IGF-II의 경우 대조군 또는 IGF-II 처리에 비해 30% 감소하였지만(p<0.038), 30 Gy 단독 처리와는 유의한 차이를 보이지 않았다. 이러한 사실은 방사선 조사와 IGF-II는 서로 독립적으로 세포독성을 증가시키지만 방사선에 의한 세포독성이 IGF-II에 의해 상승 혹은 부가적으로 일어나지 않

Table 2. Percents of necrotic and apoptotic cell death after irradiation

	Necrosis (%)	Apoptosis (%)
0 Gy	2.9 \pm 1.1	0.9 \pm 0.2
4 Gy	2.6 \pm 0.5	1.3 \pm 0.2
10 Gy	3.3 \pm 0.5	1.3 \pm 0.8
30 Gy	6.4 \pm 1.4*	5.3 \pm 0.9*

After 48 hour irradiation, cells were stained with FITC-Annexin V and propidium iodide (PI) and analyzed by flow cytometry. Note that the percent of necrotic cells is PI positive and the percent of apoptotic cells is Annexin V positive and PI negative. Data are mean \pm SD of 3 separate experiments. * p<0.05 vs. 0 Gy

Table 3. Effects of irradiation and IGF-II on cell proliferation.

	Day 2	Day 5
0 Gy + Vehicle	20.3 ± 2.6 × 10 ⁴	31.5 ± 4.0 × 10 ⁴
0 Gy + IGF-II	20.5 ± 6.1 × 10 ⁴	32.5 ± 4.1 × 10 ⁴
30 Gy + Vehicle	4.3 ± 1.1 × 10 ⁴ **	6.8 ± 0.3 × 10 ⁴ **
30 Gy + IGF-II	4.3 ± 1.1 × 10 ⁴ **	2.0 ± 0.1 × 10 ⁴ **#

Cells were seeded in 12-well at a density of 5 × 10⁴ cells and cultured in the medium with 2% serum. Immediately after irradiation they were exposed to vehicle or IGF-II (50 ng/ml) and counted by hemocytometer 2 or 5 days after culture. Data are mean ± SD of 3 determinations.

* p < 0.05 vs. 0 Gy + vehicle. # p < 0.05 vs. 30 Gy + vehicle.

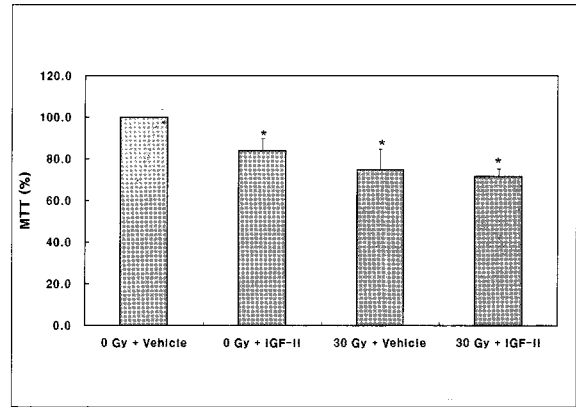


Fig. 1. Effects of irradiation and IGF-II on cell viability. Immediately after 30 Gy irradiation, cells were exposed to vehicle or IGF-II (50 ng/ml) and cultured for 48 hour in the medium with 2% serum. Cell viability was measured by MTT assay. Data are mean ± SD of 3 separate experiments. * p < 0.05 vs. 0 Gy + Vehicle.

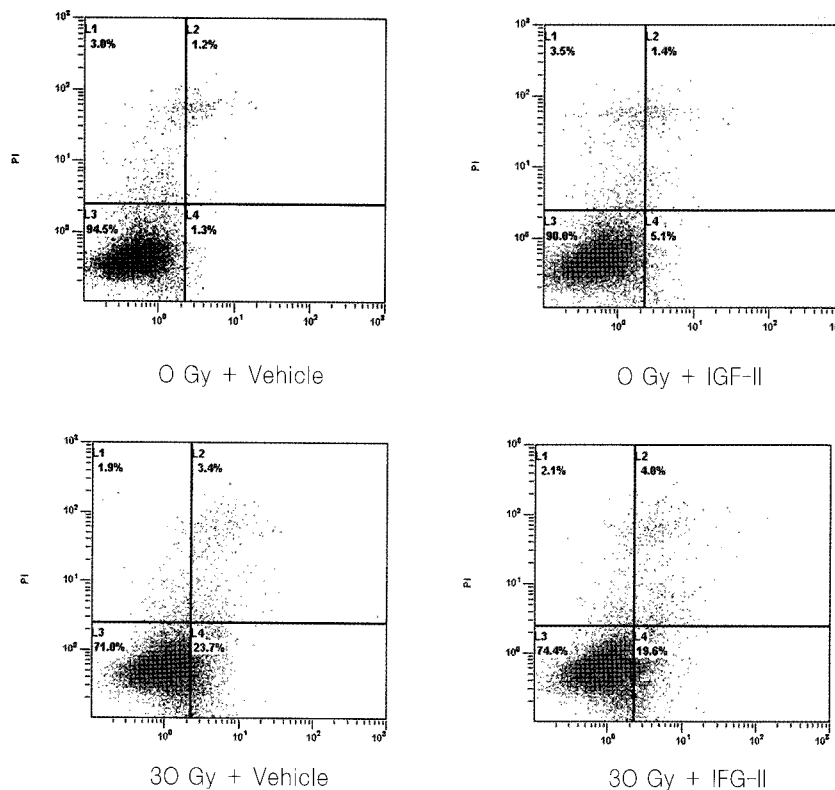


Fig. 2. Flow cytometric analysis of necrotic and apoptotic cell death by irradiation and IGF-II treatment. Immediately after irradiation, cells were exposed to vehicle or IGF-II (50 ng/ml) and cultured for 48 hour in the complete medium. Floating cells were discarded, and attached cells alone were saved and stained with Annexin V and PI. The two upper quadrants represent necrotic cells and the right lower quadrant represents apoptotic cells. The representative cytograms are shown. Note that the percent of apoptosis was greatly increased by irradiation.

음을 시사한다. Table 3은 Fig. 1과 동일한 조건에서 세포 증식의 변화를 조사한 것이다. IGF-II 처리 전과 비교하여 IGF-II 처리 48시간(2일) 세포 수는 각각 1.5배 증가되었지만 이는 대조군의 세포 증가와 동일하였다. 따라서 IGF-II 자체는 적어도 세포 증식을 유도하지 않음을 나타낸다. 그러나 방사선 조사 시 세포수가 대조군의 20% 수준으로 감소되었고 방사선과 IGF-II를 병용처리(30 Gy + IGF-II)한 경우에도 방사선 단독 조사와 동일한 결과를 나타내었다. 5일 후의 변화도 2일 후와 매우 유사하였다.

3. 방사선 조사와 IGF-II에 의한 세포 주기와 세포사멸의 영향

Fig. 2는 방사선 조사 직후 IGF-II를 첨가하고 48시간 지난 다음 세포사멸을 분석한 것이다. 각각의 Fig.에서 가운데 십자축을 기준으로 1, 2사분면은 세포괴사에 의한 비율을, 4사분면은 apoptosis에 의한 비율을, 3사분면은 살아있는 정상세포의 비율

을 표시한 것이다. 대조군(0 Gy+Vehicle)과 비교하여 IGF-II는 세포괴사에는 영향을 주지 않은 반면, apoptosis는 1.3%에서 5.1%로 증가시켰다. 방사선 조사 또한 세포괴사에는 영향을 거의 주지 않은 반면, apoptosis는 1.3%에서 23.7%로 크게 증가시켰다. 따라서 IGF-II와 방사선 조사는 주로 apoptosis를 통한 세포사멸을 일으킬 것으로 여겨진다. 30 Gy + IGF-II의 경우 방사선 단독 처리와 유사한 경향을 보였다.

Fig. 3은 Fig. 2에서 사용되고 남은 세포를 고정한 후 세포 주기를 분석한 것이다. 대조군과 비교하여 IGF-II 처리는 세포 주기를 전혀 변화시키지 않았으며, 방사선 조사 후 G2/M기가 3.7%에서 11.7%로 증가했다. 그러나 30 Gy + IGF-II의 경우 방사선 조사에 의한 G2/M기 증가와 유사하였다. 이상의 결과를 종합해 보면 IGF-II에 의해 세포 생존력이 감소되며 이것은 G2/M기의 증가에 의한 apoptosis의 증가가 아님을 시사한다. 반면 방사선에 의한 세포 생존력의 감소는 G2/M기의 증가에 의한 apoptosis의 증가를 강력히 시사한다.

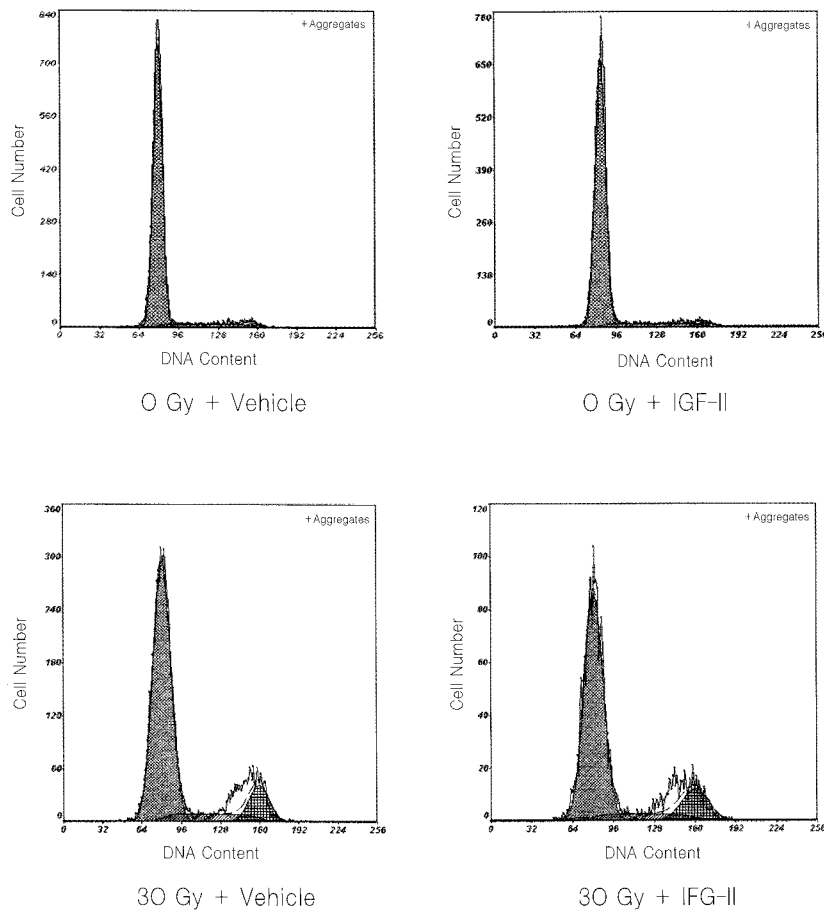


Fig. 3. Changes in cell cycle phases by irradiation and IGF-II treatment. After analysis of apoptotic and necrotic cell death, the remaining cells were fixed with ethanol and used for cell cycle. The representative cytograms are shown. Note that G2/M phase was greatly increased by irradiation.

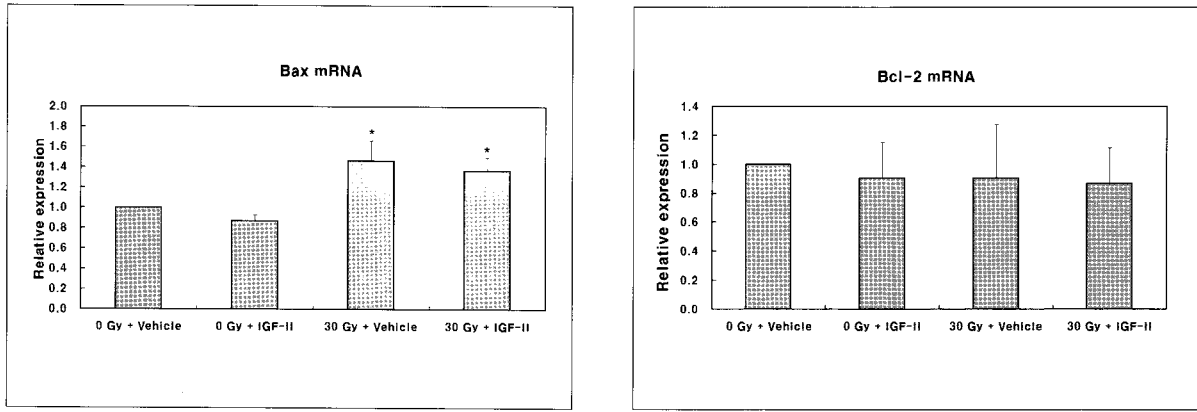


Fig. 4. Relative expression of bax and bcl-2 gene by irradiation and IGF-II. Immediately after irradiation, cells were exposed to vehicle or IGF-II (50 ng/ml) and cultured for 48 hour. Real-time RT-PCR was performed as described in Materials and Methods. The expression of bax and bcl-2 gene was first normalized over β -actin. Data are mean \pm SD of 3 separate experiments. * $p < 0.05$ vs. 0 Gy + Vehicle.

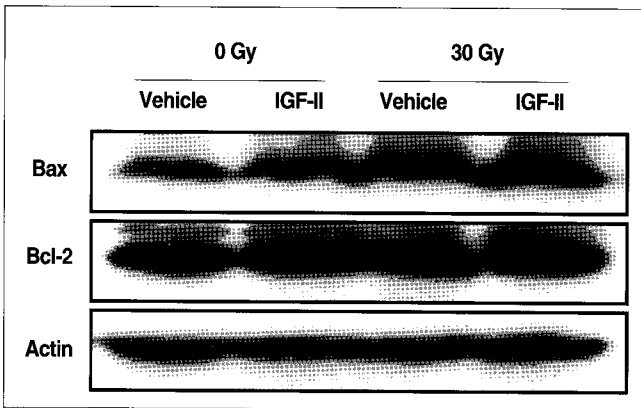


Fig. 5. Expression of bax and bcl-2 protein by irradiation and IGF-II. Immediately after irradiation MC3T3 osteoblasts were exposed to vehicle or IGF-II (50 ng/ml) and cultured for 48 hour. β -Actin was used as a loading control. Note, irradiation at 30 Gy compared with 0 Gy increased expression of bax protein.

4. 방사선 조사와 IGF-II가 apoptosis 관련 유전자에 미치는 영향

일반적으로 apoptosis에 의한 세포사멸은 apoptosis을 억제하는 유전자인 bcl-2와 apoptosis을 촉진하는 유전자인 bax의 발현 변화를 통해 확인 가능하다. Fig. 4는 real-time RT-PCR을 이용하여 두 유전자의 발현을 정량적으로 분석한 것인데, IGF-II에 의해 bcl-2와 bax의 발현은 전혀 영향을 받지 않았다. 그러나 방사선에 의해 bax는 증가한($p < 0.05$) 반면 bcl-2는 변화를 보이지 않았다. 30 Gy+IGF-II의 경우 방사선 단독 처리와 유사한 경향을 보였다. Fig. 5는 단백질의 발현을 조사한 것으로서 단백질의 발현은 mRNA 발현 양상과 정성적으로 일치하였다.

IV. 고찰

본 연구에서 얻은 결과는 1) IGF-II는 세포독성을 유발하며, apoptosis를 통해 세포사멸을 유발하지만 이것은 세포주기의 변화나 apoptosis 유전자의 발현과는 관련이 적으며, 2) 방사선은 IGF-II보다 세포독성을 크게 유발하며, apoptosis를 통해 세포사멸을 일으키는데 이것은 세포주기의 변화 즉, G2/M기의 증가에 기인되며 나아가 apoptosis를 유발하는 유전자의 발현을 증가시킴으로써 이루어지며, 3) 방사선 조사와 IGF-II의 병용 처리 시 방사선 효과가 월등히 크기 때문에 IGF-II의 효과가 부가적으로 나타나지 않는다.

Table 1에서 보듯 MC3T3 조골세포에 강도가 다른 방사선을 일회 조사했을 때 10 Gy까지 세포사멸의 변화가 미미한 반면 30 Gy에서 세포사멸이 현저하게 증가되었는데, 세포괴사와 apoptosis 모두 증가했다. 따라서 MC3T3 조골세포의 세포사멸을 유도하는 임계선량은 10 Gy 이상일 것으로 여겨진다. 한편 입과구, 갑상선세포, 희소돌기아교세포 등은 10 Gy 이하의 저선량에 의해서도 세포사멸이 일어난다. 세포주기를 분석한 결과 30 Gy에서 세포주기의 변화가 시작되는 것이 관찰되었고 이때 G2/M기에 속하는 세포의 비율이 현저히 증가되었다. 그러므로 본 연구에서 방사선에 의한 MC3T3 조골세포의 세포사멸 중 apoptosis에 의한 것은 G2/M arrest의 영향 때문인 것으로 생각된다. 이영미 등⁷⁾은 일차 배양한 조골세포의 증식기와 분화가 완료된 시기에 10 Gy와 20 Gy를 조사하면 G2 arrest는 증가하나 sub-G1의 변화가 없는 것으로 미루어 apoptosis를 증가시키지 않는다고 하며, Szymczyk 등²⁰⁾은 MC3T3 조골세포를 이용한 실험에서 15 Gy 이상의 방사선이 G2/M arrest를 증가시키며 apoptosis를 sensitization 시킨다고 보고하였다. 일반적으로 10 Gy 이하의 선량은 조골세포의 세포사멸에는 크게 영향을 주지 않는 대신 세포 분화를 촉진시키는 것으로 알려져 있다^{9,22)}.

V. 결 론

서론에서 언급하였듯이 IGF는 조골세포를 비롯하여 지방세포, 평활근세포, 내피세포, 암세포 등의 성장과 분화를 촉진시키는 요소로 널리 알려져 있다²³. IGF 뿐만 아니라 골의 미세환경에서 생성되는 TGF- β , BMP-2, IL-6, PDGF와 같은 성장요소와 사이토카인은 apoptosis를 억제하지만 다른 한편 BMP-2, PDGF, insulin, IGF 등은 apoptosis를 유도하는 것으로 밝혀졌다²⁴⁻²⁶. 이처럼 성장인자들의 상반된 작용은 세포의 종류, 실험조건 등에 기인할 것으로 추측되나 현재까지 이에 대한 정확한 기전은 알려져 있지 않다. 본 연구의 출발은 IGF-II에 의해 apoptosis가 유도된다는 최근의 보고에 근거하고 있다. 즉, Gmowitz 등²⁰은 일차 배양한 조골세포에 1.0 nM(~7.4 ng/ml)농도의 IGF-II를 48시간 이상 처리할 경우 apoptosis가 2배 이상 증가됨을 TUNEL 염색을 통해 확인한 바 있고, Fu 등¹⁹은 대장암 세포에 100 ng/ml의 IGF-I과 IGF-II를 처리한 후 Annexin V 염색을 통해 apoptosis가 14%에서 25%로 증가했음을 보고한 바 있다. 본 연구에서도 IGF-II는 세포증식에 영향을 미치지 않았으며, 세포 생존능을 감소시켰다(Table 3, Fig. 1). 뿐만 아니라 apoptosis를 1.3%에서 5.1%로 증가시켰다(Fig. 2). 이러한 결과는 적어도 IGF-II가 세포 증식을 촉진하는 인자라기보다 세포사멸을 촉진하는 즉, apoptosis를 유도하는 인자에 더 가깝다는 것을 시사한다.

방사선 조사는 세포 증식과 세포 생존력을 감소시켰지만, 방사선과 IGF-II를 병용 처리한 경우 세포 증식, 세포 생존력, 세포사멸(세포괴사+apoptosis), G2/M arrest 등이 방사선 단독 처리 때와 차이를 보이지 않았다(Table 3, Fig. 3). 이러한 결과는 IGF-II에 의해 apoptosis가 약하게 영향을 받든지, 아니면 방사선에 의한 영향이 IGF-II가 apoptosis에 미치는 영향보다 월등히 높음을 시사한다. 대체로 apoptosis 과정에 의한 세포사멸은 apoptosis를 유도하는(proapoptotic) bax 또는 bad 유전자와 apoptosis를 억제하는(anti-apoptotic) bcl-2유전자 발현 변화의 조절을 통해 이루어진다. 따라서 이들의 변화 측정함으로써 IGF-II 또는 방사선에 의한 apoptosis의 영향을 확인하는데 유리하다. 앞서 언급한 Fu 등¹⁹에 의하면 IGF-I 혹은 II에 의해 bad 발현은 증가하고 Bcl-2 발현은 변화가 없었으며, Gronowicz 등²⁰에 따르면 IGF-II에 의해 bax 발현은 차이가 없는 반면 bcl-2 발현은 감소하였다고 한다. 어느 경우이든 이들 연구에서는 bcl-2/bax 비율이 감소함으로써 apoptosis가 촉진되는 것으로 해석될 수 있다²⁷. 그러나 본 연구에서 IGF-II에 의해 bax와 bcl-2의 유전자 단백질 발현 모두 변화가 없었기 때문에(Fig. 4와 5) IGF-II에 의한 bax, bcl-2 의존성 apoptosis 가능성은 매우 적을 것으로 판단된다. 방사선 단독 조사 시 bcl-2의 변화 없이 bax만 증가하였는데 IGF-II+방사선 병용 처리 시에도 방사선 단독 조사 시와 동일한 결과를 보였다. 이것은 IGF-II 보다 방사선이 apoptosis에 미치는 효과가 월등히 커서 세포사멸의 실제적 결과는 방사선에 의한 효과만이 반영된 것으로 여겨진다.

MC3T3 조골세포는 30 Gy 방사선량에서 세포사멸이 증가하며 이는 세포주기의 G2/M arrest와 밀접한 관련이 있었다. IGF-II 처리는 세포 증식과 세포 주기 변화에 영향을 주지 않았지만 세포 생존능을 감소시키고 apoptosis를 증가시켰다. 방사선과 IGF-II 병용처리에 의한 apoptosis와 세포 주기 변화는 방사선 단독 처리 시와 유사한 결과를 보였기 때문에 방사선의 영향이 IGF-II의 영향보다 월등히 컸을 것으로 여겨진다. Apoptosis의 기전을 조사한 바 방사선에 의해 bax/bcl-2 비율이 증가했지만 IGF-II는 bax와 bcl-2 발현에 영향을 주지 않았다. 이로 미루어 IGF-II는 bax 또는 bcl-2 의존성 세포사멸 경로와는 다른 기전을 통해 세포 독성을 보일 것으로 사료된다.

참고문헌

- Garcia-Barros M, Paris F, Cordon-Cardo C, Lyden D, Rafii S, Haimovitz-Friedman A, et al: Tumor response to radiotherapy regulated by endothelial cell apoptosis. *Science* 2003;300:1155-1159.
- Marx RE: Osteoradionecrosis: a new concept of its pathophysiology. *J Oral Maxillofac Surg* 1983;41:283-288.
- Teng MS, Futran ND: Osteoradionecrosis of the mandible. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2005;13:217-221.
- Lane DP: p53, guardian of the genome. *Nature* 1992;358:15-16.
- Han Z, Chatterjee D, He DM, Early J, Pantazis P, Wyche JH, et al: Evidence for a G2 checkpoint in p53-independent apoptosis induction by X-irradiation. *Mol Cell Biol* 1995;15:5849-5857.
- Midgley CA, Owens B, T Briscoe CV, Homas DB, Lane DP, Hall PA: Coupling between gamma irradiation, p53 induction and the apoptotic response depends upon cell type in vivo. *J Cell Sci* 1995;108:1843-1848.
- 이영미, 최항문, 허민석, 이삼선, 최순철, 박태원: 방사선 조사가 배양된 조골세포의 apoptosis와 세포주기의 변화 및 석회화 결절 형성에 미치는 영향에 관한 연구. *대한구강악안면방사선학회지* 2000;30:189-198.
- Dudziak ME, Saadeh PB, Mehrara BJ, Steinbrech DS, Greenwald JA, Gittes GK, et al: The effects of ionizing radiation on osteoblast-like cells in vitro. *Plast Reconstr Surg* 2000;106:1049-1061.
- 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 59:307-308.
- 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;126:1124-1128.
- Lakshmi RJ, Alexander M: Osteoradionecrosis of the mandible: a laser Raman spectroscopic study. *Appl Spectrosc* 2003;57:1100-1116.
- Scheven BA, Burger EH, Kawilarang-de Haas EW, Wassenaar AM, Nijweide PJ: Effects of ionizing irradiation on formation and resorbing activity of osteoclasts in vitro. *Lab Invest* 1985;53:72-79.
- Shu R, McMullen R, Baumann MJ, McCabe LR: Hydroxyapatite accelerates differentiation and suppresses growth of MC3T3-E1 osteoblasts. *J Biomed Mater Res A* 2003;67:1196-1204.
- Adams CS: Matrix regulation of skeletal cell apoptosis. *J Biol Chem* 2001;276:20316-20322.
- Mohan S, Linkhart TA, Jennings JC, Baylink DJ: Identification and quantification of four distinct growth factors stored in human bone matrix. *J Bone Miner Res* 1987;2:44-47.

16. Burghardt AJ, Wang Y, Elalieh H, Thibault X, Bikle D, Peyrin F, et al: Evaluation of fetal bone structure and mineralization in IGF-I deficient mice using synchrotron radiation microtomography and Fourier transform infrared spectroscopy. *Bone* 2007;40:160-168.
17. Zhao G, Monier-Faugere MC, Langub MC, Geng Z, Nakayama T, Pike JW, et al: Targeted overexpression of insulin-like growth factor I to osteoblasts of transgenic mice: increased trabecular bone volume without increased osteoblast proliferation. *Endocrinology* 2000;141:2674-2682.
18. Granerus M, Johannisson A, Ekblom P, Engstrom W: Insulin-like growth factors I and II induce cell death in Wilms' s tumour cells. *Mol Pathol* 2001;54:30-35.
19. Fu P, Thompson JA, Leeding KS, Bach LA: Insulin-like growth factors induce apoptosis as well as proliferation in LIM 1215 colon cancer cells. *J Cell Biochem* 2007;100:58-68.
20. Gronowicz GA, McCarthy MB, Zhang HZ, Hang W: Insulin-like growth factor II induces apoptosis in osteoblasts. *Bone* 2004;35:621-628.
21. Szymczyk KH, Shapiro IM, Adams CS: Ionizing radiation sensitizes bone cells to apoptosis. *Bone* 2004;34:148-156.
22. Dare A, Hachisu R, Yamaguchi A, Yokose S, Yoshiki S, O T.: Effects of ionizing radiation on proliferation and differentiation of osteoblast-like cells. *J Dent Res* 1997;76:658-664.
23. Jones JJ, Clemmons DR: Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev* 1995;16:3-34.
24. Hay E, Lemonnier J, Fromiguc O, Marie PJ: Bone morphogenetic protein-2 promotes osteoblast apoptosis through a Smad-independent, protein kinase C-dependent signaling pathway. *J Biol Chem* 2001;276:29028-29036.
25. Kim HR, Upadhyay S, Li G, Palmer KC, Deuel TF: Platelet-derived growth factor induces apoptosis in growth-arrested murine fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:9500-9504.
26. Godbout JP, Cengel KA, Cheng SL, Minshall C, Kelley KW, Freund GG: Insulin activates caspase-3 by a phosphatidylinositol 3'-kinase-dependent pathway. *Cell Signal* 1999;11:15-23.
27. Wiren KM, Toombs AR, Semirale AA, Zhang X: Osteoblast and osteocyte apoptosis associated with androgen action in bone: requirement of increased Bax/Bcl-2 ratio. *Bone* 2006;38:637-651.