

뼈세포의 세포사멸이 뼈조직세포의 증식과 이동에 미치는 영향

강릉원주대학교 치과대학 구강해부학교실¹, 약리학교실² 및 구강과학연구소

이희수¹, 고성희^{2*}

서 론

뼈개조에서 뼈흡수 및 뼈형성을 조절하는 데는 세포간 상호 작용(cell to cell interaction)이 중요한 역할을 하고 있다. 뼈모세포(osteoblast) 및 뼈수기질세포(marrow stromal cell)가 뼈파괴세포(osteoclast)의 형성에 결정적인 역할을 하는 것으로 알려져 왔으며, 뼈모세포에서 발현되는 RANK-ligand (RANKL)와 그 decoy receptor인 osteoprotegerin (OPG)이 이러한 뼈파괴세포의 분화를 담당하고 있다^{1,2)}. 그러나 어떤 기전에 의하여 특정 부위에서 뼈파괴세포가 분화되어 뼈흡수가 시작되고 뼈개조(bone remodeling)가 일어나는 지에 대해서는 아직 잘 알려져 있지 않다.

뼈세포(osteocyte)는 뼈모세포로부터 분화된다. 뼈모세포는 bone lining cell로 되거나 신생된 osteoid에 파묻힌 뼈전구세포(pre-osteocyte)가 되며, 뼈전구세포가 석회화된 뼈에 싸이게 되면 뼈세포로 분화된다. 성숙한 뼈세포는 별모양의 세포로 많은 수의 가늘고 긴 cytoplasmic process를 사방으로 내고 있으며 뼈세관(canalliculi)라 불리는 가는 관(canal)를 통해 뼈조직을 관통하여 다른 뼈세포와 또는 뼈표면의 뼈모세포, 뼈파괴세포와 연결되어 있다. Kamioka 등 (2001)에 의하면 뼈수에도 뼈세포의 돌기(process)가 연결되어 있어 뼈수에 존재하는 뼈파괴세포 전구세포에도 뼈세포가 신호를 전달할 수 있을 것이라 생각되어진다³⁾.

최근에 여러 연구에서 뼈세포가 뼈개조 조절을 담당할 것이라는 가능성이 제시되고 있다. 뼈개조의 큰 기능중 하나는 손상 입은 뼈조직을 새 뼈조직으로

* 교신저자 : 고성희
강릉원주대학교 치과대학 약리학교실 및 구강과학연구소
E-mail : shko@gwnu.ac.kr

대체하여 기계적 성질(mechanical property)를 유지하는 것이다. 미세한 손상(microdamage)는 뼈조직에 계속 장력이 가해져서 생긴 미세한 금(microcrack)이 모인 것이라 정의 할 수 있으며 미세한 손상이 있는 뼈조직은 제거되고 새로운 뼈로 대체된다. 만일 뼈의 제거와 대체에 불균형으로 미세한 손상이 축적되게 되면 뼈의 기계적 성질이 손상되어 골절에 이르게 된다. 미세한 손상으로부터 회복하는 능력이 뼈세포의 생존과 관계가 있으며⁴⁾ 미세한 금부위에 세포사멸(apoptosis) 상태의 뼈세포가 존재하고 이 부위가 연속적으로 뼈파괴세포에 의해 제거됨이 보고되어⁵⁾ 뼈조직이 미세한 손상에서 회복하는데 뼈세포가 관여할 것으로 여겨지며, 특히 미세한 손상에 의한 뼈세포의 세포사멸이 뼈흡수에 영향을 줄 것이라 생각된다. 또한 뼈세포 세포주인 MLO-Y4 세포가 뼈파괴세포의 형성과 활성을 유도할 수 있고, macrophage colony stimulating factor (M-CSF)와 RANK-ligand (RANKL)을 생성하며⁶⁾, 사람과 생쥐 뼈조직 표본에서 뼈세포에 새로운 bone morphogenetic protein(BMP) 길항제인 SOST가 강하게 발현됨이 보고되었다⁷⁾. 뼈세포가 석회화 기질 내에 고르게 분포된 점, 긴 process로 서로 연결된 모양, 여러 선행 연구들에서 보고된 뼈세포와 다른 뼈조직내의 세포들과의 상호작용들을 고려할 때, 뼈개조에서

의 중심 조절 세포일 것이라 가정할 수 있다.

그러므로 본 연구에서는 뼈세포가 뼈파괴세포 전구세포와 뼈모세포의 증식과 이동에 미치는 영향을 조사하고 뼈세포의 세포사멸이 뼈개조에 미치는 영향을 알아내어 뼈개조에서의 뼈세포의 역할을 밝혀내고자 하였다.

재료 및 방법

1) 세포배양

뼈세포 배양

뼈세포의 *in vitro* model로 MLO-Y4 세포주를 사용하였다. MLO-Y4 세포는 생쥐 장뼈에서 분리된 별모양의 세포로서 긴 process를 가지고 있고 뼈기질을 형성하지 않으며 뼈모세포보다 alkaline phosphatase의 활성도는 낮고 osteocalcin, CD44 및 connexin 43발현은 높은 일차배양 뼈세포의 특성을 가지고 있으며 osteocyte-specific E11 antigen을 발현한다⁸⁾. MLO-Y4 세포는 collagen (rat tail collagen type I, Becton Dickinson Laboratories, Bedford, MA, USA)이 도포된 배양접시위에서 2.5% fetal bovine serum (FBS, Hyclone Laboratories, Inc. Logan, UT, USA), 2.5% calf serum (CS, Hyclone Laboratories, Inc)이 포함된 α -MEM (Gibco BRL, Grand Island,

NY, USA)으로 배양하며 세포밀도가 70%일 때 새 배양액으로 바꾸고 24시간 후에 배양액을 모아 여과(filtering) 한 후 조건배양액(conditioned medium, CM)으로 사용하였다.

뼈파괴세포 전구세포 배양

뼈파괴세포 전구세포의 *in vitro* model로는 RAW 264.7 세포주를 사용하였다. RAW 264.7 세포는 배양액에 RANKL 첨가시 TRAP(+) multinucleated cell로 분화하며 뼈절편(bone slices)에서 배양할 경우 resorption pit를 형성하는 것으로 보고되었다⁹⁾. RAW 264.7 세포주는 10% FBS가 포함된 DMEM (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)에서 배양하였다.

뼈모세포 배양

뼈모세포는 생쥐두개뼈에서 분리되었으며, 일차 배양된 뼈모세포와 같이 뼈결절(bone nodule)을 형성하는 것으로 알려진 2T3 세포주를 사용하였다¹⁰⁾. 2T3 세포주는 10% FBS가 포함된 α -MEM에서 배양하였다.

2) 세포증식 측정(proliferation assay)

RAW 264.7 세포는 48 well plate에 well당 2,000개 세포로 분주하고, 2T3 세포는 12 well plate에 well당 20,000개의 세포로 분주하여 6시간 배

양한 후 대조배양액(control media)과 여러 가지 농도(%) MLO-Y4 CM으로 배양액을 바꾸어 배양하였다. 건강한 MLO-Y4 배양액이 RAW 264.7 세포 증식에 미치는 영향을 관찰한 실험에서는 각각 배양 1, 3, 5, 7, 8 일째 배양을 중단하고 hemocytometer를 사용하여 세포수를 측정하였다. 이때 배양액을 3일마다 교환하였다. 건강한 MLO-Y4 배양액이 2T3 세포증식에 미치는 영향에 관한 실험과 세포사멸 유도된 뼈세포의 배양액이 RAW 264.7 세포, 2T3 세포 증식에 미치는 영향에 관한 실험에서는 배양 3일 째에 배양을 중단하고 세포수를 측정하였다.

3) 세포이동 측정(chemotaxis assay)

뼈파괴세포 전구세포 및 뼈모세포의 이동은 polycarbonate membrane (8 μ m pore size)으로 만들어진 transwell (Costar, Corning incorporated, NY, USA)을 사용하여 측정하였다. 대조배양액이나 여러 가지 농도(%)의 MLO-Y4 CM을 lower well에 넣고 5x10⁴개의 뼈파괴세포 전구세포를 transwell (upper well)에 넣은 후 37°C, 5% CO₂에서 4시간 동안 배양하였다. 배양 후 transwell upper surface에 남아 있는 세포는 면봉(cotton swab)으로 제거하고 transwell bottom surface로 이동한 세포는 2% glutaraldehyde로 고정 후 crystal violet으로 염색하고

반사현미경(reflection microscope)과 이미지분석(image analysis)을 이용하여 transwell bottom surface의 5개의 영역(fields)의 세포수를 측정하였다.

4) 뼈세포사멸(apoptotic osteocyte)가 뼈모세포 및 뼈파괴세포에 미치는 영향 조사

MLO-Y4 cell의 세포사멸을 유도하기 위하여 세포사멸유도 물질로 알려진 100 μ M etoposide를 6시간 처리하였다¹¹⁾. 세포사멸 여부는 Apo-One™ homogeneous caspase-3 assay kit (Promega Corp. Madison, WI, USA)을 이용한 Caspase-3 활성화 측정과 Trypan-blue로 염색 후 세포수를 측정하여 확인하였다.

MLO-Y4 cell의 세포사멸을 유도한 후 새 배양액으로 바꾸어 24시간 배양하면서 조건배양액을 모은 후 뼈파괴세포 전구세포의 성장, 이동, 뼈모세포 성장, 이동에 미치는 영향은 위와 동일한

방법으로 측정하였다.

결 과

건강한 뼈세포는 뼈파괴세포 전구세포의 세포증식을 증가시켰으며 그 증가는 5일 동안 배양하였을 때 가장 크게 나타났다 (Fig. 1A). 뼈세포의 조건배양액에 의하여 뼈파괴세포 전구세포의 이동이 유의하게 증가되었다 (Fig. 1B). 또한 건강한 뼈세포가 뼈모세포 증식 및 이동을 억제하였다 (Fig. 2A, B).

MLO-Y4 세포를 etoposide로 처리하고 세포사멸이 유도되었는지 확인하였다. Caspase-3 활성화도는 etoposide 처리 후 대조군에 비해 2.8배 증가하였으며 trypan blue 염색으로 확인한 염색된 세포의 숫자도 처리 군에서 증가하였다 (Table 1).

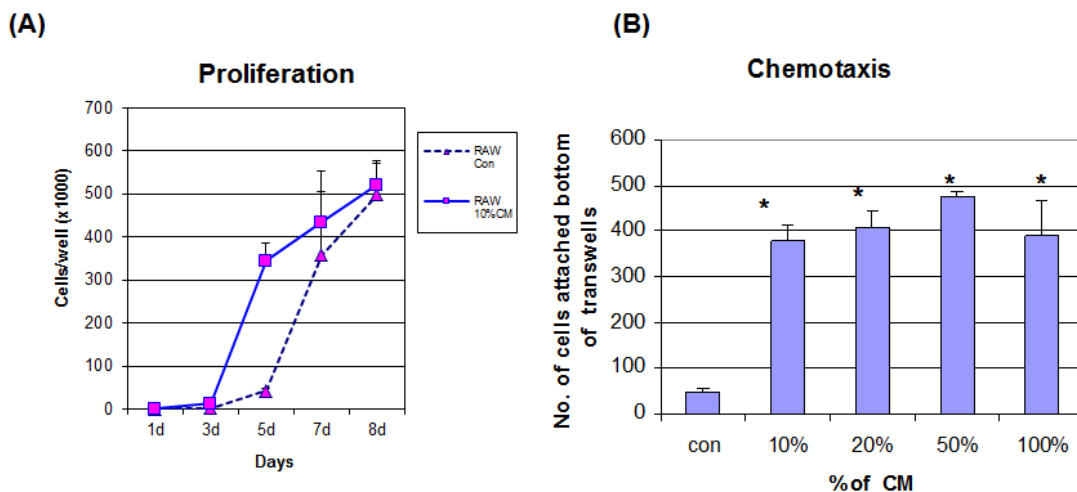
MLO-Y4 세포의 세포사멸을 유도한 후 24시간 동안 모은 조건배양액을 가지고 뼈파괴세포 전구세포인 RAW 264.7 세포의 세포증식을 관찰한 결과

Table 1. The induction of MLO-Y4 cell apoptosis with etoposide

	Control	Etoposide
Dead cell (%)	22.9 ± 9.9	32.2 ± 8.3
Caspase-3 activity (pmol pNA liberated 1hr/ μ g protein)	0.68 ± 0.02	1.92 ± 0.09

For induction of MLO-Y4 cell apoptosis, MLO-Y4 cells were treated with 100 μ M etoposide for 6 hours. Apoptosis of MLO-Y4 cells was determined with assay of caspase-3 activity and ratio of trypan blue staining cells.

Results were presented with mean ± S.E. (N=3)



* P< 0.05 compared to control

Fig. 1. The effect of MLO-Y4 conditioned medium (CM) on proliferation (A) and transmigration (B) of RAW 264.7 cells.

(A) Proliferation assay; RAW 264.7 cells were seeded 2000 cells/well in 48 well plates. After 6hrs, control media or MLO-Y4 CM was added. Cultures were stopped after 1,3,5,7,8 days and cell number was counted.

(B) Chemotaxis assay; The migration of RAW 264.7 cells was assayed using transwell. The control media or MLO-Y4 CM were placed in the lower wells. RAW 264.7 cells (50,000) were placed in the transwell (upper well). The plates were incubated for 4 hrs, and cells attached bottom of the transwell were fixed and stained with crystal violet. The migrating cells were counted using reflection microscope and image analysis

Results were presented with mean ± S.E. (N=4) and statistical differences were analyzed using the Student t-test. *p<0.05, compared to control (0% CM)

의 건강한 뼈세포에 비하여 세포 증식을 증가시켰다. 그러나 세포이동은 건강한 뼈세포의 조건배양액에 비하여 50% 조건배양액 첨가 시에 감소하는 경향을 보였다 (Fig. 3A, B). 세포사멸을 유도한 뼈세포에 의하여 뼈모세포주인 2T3 증식이 증가하였으며 이동에는 영향을

주지 못하였다 (Fig. 4A, B).

총괄 및 고안

뼈조직에 피로가 가해지고 연속적인 미세한 금(microcrack)이 생성되면 미세한 손상(microdamage)이 되고, 이

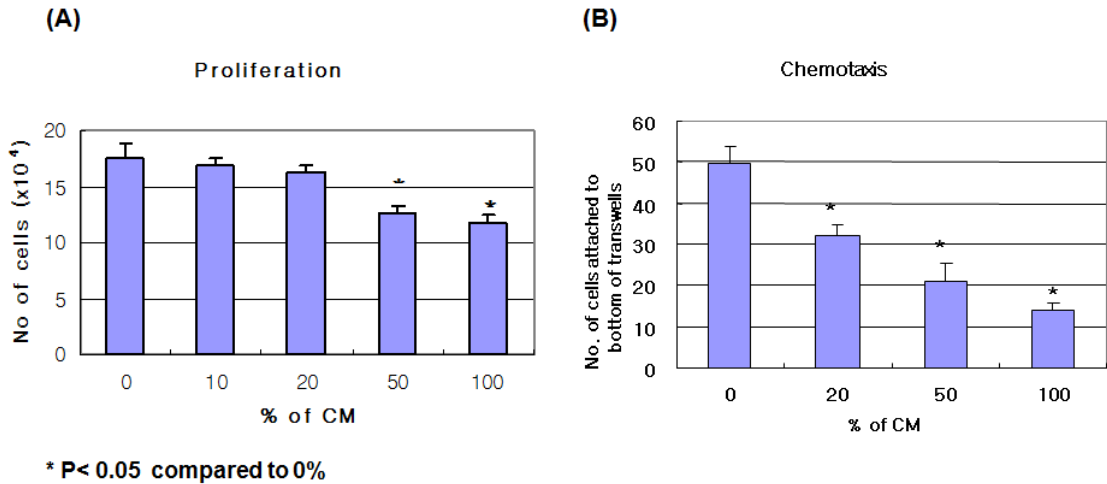


Fig. 2. The effect of MLO-Y4 conditioned medium (CM) on proliferation (A) and transmigration (B) of 2T3 cells.

- (A) Proliferation assay; 2T3 cells were seeded 20,000 cells/well in 12 well plates. After 6hrs, control media or MLO-Y4 CM was added. Cultures were stopped after 3 days and cell number was counted.
- (B) Chemotaxis assay; The migration of 2T3 cells was assayed using transwell. The control media or MLO-Y4 CM were placed in the lower wells. 2T3 cells (50,000) were placed in the transwell (upper well). The plates were incubated for 4 hrs, and cells attached bottom of the transwell were fixed and stained with crystal violet. The migrating cells were counted using reflection microscope and image analysis

Results were presented with mean \pm S.E. (N=4). * $p < 0.05$, compared to control (0% CM)

러한 미세한 손상의 회복은 뼈세포의 생존과 관계가 있어, 상처입거나 세포사멸 뼈세포가 미세한 손상의 회복신호로 뼈흡수를 시작하는 신호를 보내며 *in vitro* 실험에서 세포사멸 뼈세포가 뼈파괴세포 생성을 증가시켰다는 보고들이 있다^{12,13}. 본 연구에서는 정상 뼈세포는 뼈파괴세포 전구세포의 증식과 이동을 증가시킬 수 있었다. 또한 세포사멸 상태의 뼈세포의 조건배양액을 사용한 결과 건

강한 뼈세포의 조건배양액에 비하여 뼈파괴세포 전구세포의 증식을 증가시켰다. 이는 뼈세포의 세포사멸이 뼈파괴세포를 활성화하여 뼈흡수를 증가시켰다는 보고와 일치하였다^{14,15}. 그러나 세포사멸이 유도된 뼈세포가 뼈파괴세포의 이동을 증가시킨다는 보고¹⁴와는 다르게 본 연구에서는 건강한 뼈세포에 의한 뼈파괴세포 전구세포의 이동에 비하여 세포사멸 뼈세포에 의한 뼈파괴세포 전구

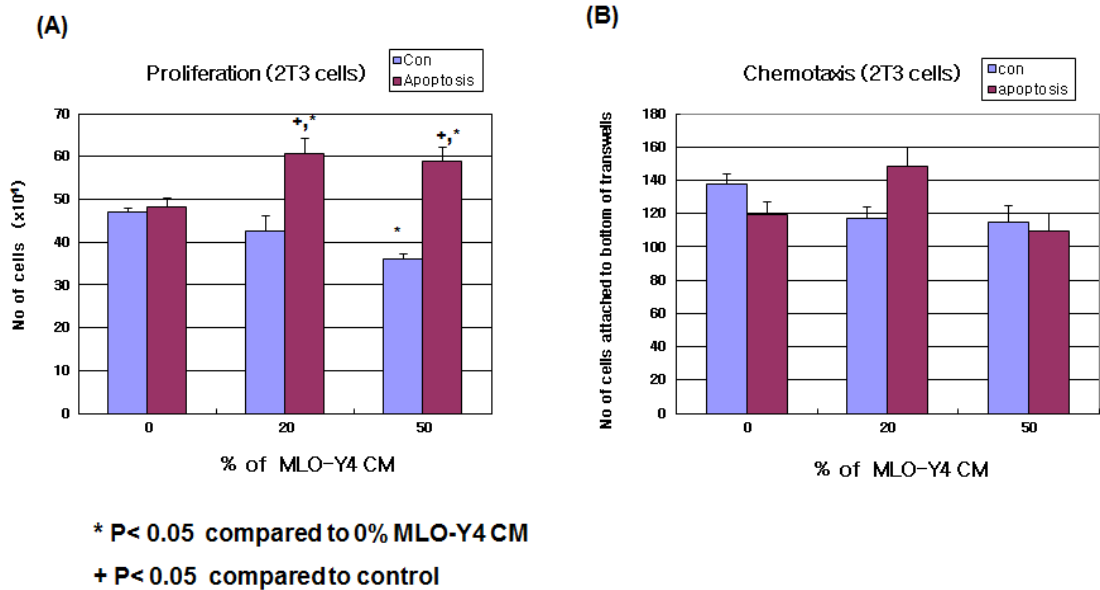


Fig. 4. The effect of apoptotic MLO-Y4 – conditioned medium on cell proliferation (A) and migration (B) of 2T3cells

Apoptotic MLO-Y4 conditioned medium (Y4-CM) was collected for 24h culture after apoptosis induction. Control Y4-CM was collected without etoposide treatment. The proliferation assay and chemotaxis assay were done with control (healthy) and apoptotic MLO-Y4 CM

For proliferation assay, 2T3 cells were seeded 20,000 cells/well in 12 well plates. After 6hrs, control or Apoptotic MLO-Y4 CM was added. Cultures were stopped after 3 days and cell number was counted.

The migration of 2T3 cells was assayed using transwell. The control or apoptotic MLO-Y4 CM were placed in the lower wells. 2T3 cells (50,000) were placed in the transwell (upper well). The plates were incubated for 4 hrs, and cells attached bottom of the transwell were fixed and stained with crystal violet. The migrating cells were counted using reflection microscope and image analysis.

Results were presented with mean ± S.E. (N=4). *P < 0.05 compared to 0% MLO-Y4 CM, + P < 0.05 compared to control MLO-Y4 CM

세포 이동이 감소되는 경향을 보였다. 미세한 손상부위의 뼈흡수와 뼈생성은 공간적 및 시간적으로 여러 세포들의 긴밀한 상호 영향에 의해 조절되고 있는

며, 세포파멸된 뼈세포에 의해 주위의 건강한 뼈세포가 여러 신호를 받아 다른 뼈조직 세포에 영향을 주어 뼈흡수와 뼈생성에 영향을 줄 수 있으므로 *in vitro*

실험으로 세포만 이용한 본 실험의 결과가 생체 내 상황을 모두 설명할 수 없다고 생각되며, 이를 보완하기 위한 실험이 계속 진행되어야 할 것이다. Gu 등은 쥐 머리덮개뼈 조직배양(rat calvaria organ culture)을 이용한 연구에서 건강한 상태의 뼈세포가 뼈파괴세포에 의한 뼈흡수를 억제하고 있으며 뼈세포가 손상(damage)을 받아 세포사멸상태가 되면 뼈조직내 세포들간 연결(network)이 깨지고, 뼈세포에 의한 뼈파괴세포 억제가 없어지면서 뼈파괴세포가 활성화되어 뼈흡수가 일어난다고 보고하였다¹⁶⁾. 이 보고에 의하면 뼈세포 사멸에 의한 뼈흡수의 증가가 뼈파괴세포의 이동이나 분화를 촉진하는 물질의 분비가 증가에 의해서가 아니라 뼈파괴세포를 억제하는 물질의 감소에 의한 것이라고 볼 수 있으며, 뼈세포의 세포사멸과 뼈흡수에 관한 연구에서 뼈세포의 뼈파괴세포 분화, 이동 억제에 대한 역할도 고려되어야 할 것으로 생각된다.

본 실험에서는 건강한 뼈세포에 의하여 뼈모세포주인 2T3세포의 이동과 증식이 모두 감소하였다. 그러나 세포사멸을 유도한 뼈세포에 의하여 뼈모세포주인 2T3 증식이 증가하였으며 이동에는 영향을 주지 못하였다. 피로골절(stress fracture)후 뼈세포의 세포사멸이 일어나고 뼈세포의 COX-2, IL-5, sclerostin 등의 유전자 발현이 변화하여 뼈조직 회복에 영향을 준다는 Wu등의 보고¹⁷⁾에

서 보듯이 세포사멸된 뼈세포가 뼈파괴세포뿐 아니라 뼈모세포에도 변화된 신호를 보내어 뼈생성에 관여할 것이라 생각된다. 본 실험에서는 뼈모세포의 증식을 증가시켜 뼈세포의 세포사멸이 뼈생성을 증가시킬 수 있음을 알 수 있었다.

이상의 결과로 뼈세포가 뼈파괴세포 전구세포 및 뼈모세포에 여러 신호를 보내 증식 및 분화를 조절할 수 있으며 뼈조직 손상에 의하여 세포사멸된 뼈세포는 건강한 뼈세포와 다른 신호를 뼈조직의 세포에 보냄으로 뼈개조를 조절할 것으로 생각된다.

결론

뼈세포와 뼈세포의 세포사멸이 뼈개조에 미치는 영향을 밝히기 위하여 뼈세포 세포주인 MLO-Y4 세포의 세포사멸을 유도하여 뼈파괴세포 전구세포와 뼈모세포의 증식과 이동에 미치는 영향을 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

- 1) 건강한 MLO-Y4 세포 조건배양액은 뼈파괴세포 전구세포의 세포증식과 이동을 유의하게 증가시켰다.
- 2) 건강한 MLO-Y4 세포 조건배양액은 뼈모세포 증식과 이동을 억제하였다.
- 3) 세포사멸이 유도된 MLO-Y4 세포 조건배양액은 건강한 MLO-Y4 세포 조건배양액보다 뼈파괴세포 전구세포의 세포증식을 증가시켰다. 그러

나 세포이동은 건강한 뼈세포의 조건 배양액에 비하여 50% 조건배양액 첨가 시에 감소하는 경향을 보였다.

- 4) 세포사멸이 유도된 MLO-Y4 세포 조건배양액은 뼈모세포 증식을 증가시켰으나 이동에는 영향을 주지 못하였다.
- 5) 이상의 결과로 뼈세포가 뼈파괴세포 전구세포 및 뼈모세포에 여러 신호를 보내 증식 및 분화를 조절할 수 있으며 뼈조직 손상(damage)에 의하여 세포사멸된 뼈세포는 건강한 뼈세포와 다른 신호를 뼈조직의 세포에 보냄으로 뼈개조를 조절할 것으로 생각된다.

참고문헌

1. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Masahiko K, Mochizuki S, Tomoyasu A, Yano K, Goto M, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T, Higashio, K, Udagawa N, Takahashi N, Suda T: Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. Proc Natl Acad Sci USA. 95: 3597-3602, 1998
2. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R, Nguyen HQ, Wooden S: Osteoprotegerin : a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. Cell . 89:309-319, 1997
3. Kamioka H, Honjo T, Takano-Yamamoto T: A three-dimensional distribution of osteocyte processes revealed by the combination of confocal laser scanning microscopy and differential interference contrast microscopy. Bone. 28:145-149, 2001
4. Tomkinson A, Reeve J, Shaw RW, Noble BS: The death of osteocytes via apoptosis accompanies estrogen withdrawal in human bone. J Clin Endocrinol Met. 1997; 82(9):3128-3135.
5. Verborgt O, Gibson GJ, Schffler MB: Loss of osteocyte integrity in association with microdamage and bone remodeling after fatigue in vivo J Bone Min Res. 15(1): 1-8. 1999
6. Zhao S, Kato Y, Zhang Y, Harris S, Ahuja S, Bonewald LF: MLO-Y4 osteocyte-like cells support osteoclast formation and activation without the addition of 1,25(OH) 2D3. J Bone Miner Res. 17:2068-2079, 2002
7. Winkler DG, Surtherland MK, Geoghegan JC, Yu C, Hayes T, Skonier JE: Osteocyte control of bone formation via sclerostin, a novel BMP antagonist. EMBO J. 22: 6227-6276, 2003

8. Kato Y, Windle JJ, Koop BA, Mundy GR, Bonewald LF: Establishment of an osteocyte-like cell line, MLO-Y4. *J Bone Miner Res.* 12:2014-2023, 1997
9. Hsu H, Lacey DL, Dunstan CR, Solovyev I, Colombero A, Timms E, Tan HL, Elliott G, Kelley MJ, Sarosi I, Wang L, Xia XZ, Elliott R, Chiu L, Black T, Scully S, Capparelli C, Morony S, Shimamoto G, Bass MB, Boyle WJ: Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96:3540-3545, 1999
10. Ghosh-Choudhury N, Windle JJ, Koop BA, Harris MA, Guerrero DL, Wozney, JM, Mundy GR, Harris SE: Immortalized murine osteoblasts derived from BMP-2-T-antigen expressing transgenic mice. *Endocrinology.* 137(1):331-339, 1996
11. Plotkin LI, Weinstein RS, parfitt AM, Roberson PK, Manolagas SC, Bellido T: Prevention of osteocyte and osteoblast apoptosis by bisphosphonates and calcitonin. *J Clin Invest.* 104:1363-1374, 1999
12. Lanyon LE: Osteocytes, strain detection, bone modeling and remodeling. *Calicf Tissue Int.* 53 (Suppl 1): S102-S106, 1993
13. Al-Dujaili SA, Lau E, Al-dujaili H, Tsang K, Guenther A, You L: Apoptotic osteocytes regulate osteoclast precursor recruitment and differentiation in vitro. *J Cell Biochem.* 112: 2412-2423, 2011
14. Cardoso L, herman BC, Verbougt O, Laudier D, Majeska RJ, Schaffler MB: osteocyte apoptosis controls activation of intracortical resorption in response to bone fatigue. *J Bone Miner Res.* 24: 597-605, 2009
15. Emerton KB, Hu B, Woo AA, Sinfonsky A, hermandez C Majeska RJ, Jepsen KJ, Schaffler MB: Osteocyte apoptosis and control of bone resorption following ovariectomy in mice. *Bone.* 46:577-583, 2010
16. Gu G, Mulari M, Peng Z, Hentunen TA, Vaananen HK: Death of osteocytes turns off the inhibition of osteoclasts and triggers local bone resorption. *Biochem Biophys Res Commun.* 335:1095-1101, 2005
17. Wu AC, Kidd LJ, Cowling NR, Kelly WL, Forwood MR: osteocyte expression of caspase-3 COX-2, IL-6 and Sclerostin are spatially and temporally associated following stress fracture initiation. *Bonekey rep.* 3: 571, 2014

ABSTRACT**Effects of Osteocyte Apoptosis on Bone Cell Proliferation and Recruitment**Hee Su Lee¹, Seong-Hee Ko²

*Department of Oral anatomy¹, Department of Pharmacology²,
College of Dentistry and Research Institute of Oral Science,
Gangneung-Wonju National University*

Osteocytes are the most abundant cells in bone and communicate with other bone surface cells like osteoblasts, osteoclasts, osteoclast precursors and bone lining cells through their networking in canaliculi. Osteocyte apoptosis by microcracks has been suggested the leading step in targeted bone remodeling. Therefore, to determine the role for osteocyte apoptosis in bone remodeling, we examined the effect of apoptotic osteocytes on osteoclast precursors and osteoblasts proliferation and recruitment. We used the MLO-Y4 cells as *in vitro* model for osteocytes, RAW264.7 cells as osteoclast precursors and 2T3 cells as osteoblasts. For induction of MLO-Y4 cell apoptosis, MLO-Y4 cells were treated with 100 μ M etoposide for 6 hours and apoptosis was determined with increase of casapase-3 activity and ratio of trypan blue straining cells. MLO-Y4 cells conditioned medium (Y4-CM) was collected for 24h culture after apoptosis induction.

For proliferation assay, RAW 264.7 cells and 2T3 cells were cultured with 0, 20, 50% healthy or apoptotic Y4 CM. Cultures were stopped after 3 days and cell number was counted. The migration of RAW 264.7 and 2T3 cells was assayed using transwells with healthy or apoptotic 20, 50% Y4 -CM. Healthy Y4-CM increased osteoclast precursor proliferation and migration. Healthy Y4-CM decreased 2T3 cell proliferation and migration. However apoptotic Y4-CM induced by etoposide increased the proliferation of 2T3 cells compared to control (healthy) Y4-CM. Apoptotic Y4 CM increased RAW 264.7 cell

proliferation and had no effect on migration of RAW 264.7 cells and 2T3 cells. These results suggest that osteocyte apoptosis may play a role in bone remodeling by changes in signals linked to other bone cells.

Key words : Osteocyte apoptosis, Proliferation of osteoblast and osteoclast precursors, Migration of osteoblast and osteoclast precursors