

# 유체전단응력과 신경전달물질의 상관관계를 통한 뼈흡수의 억제 Suppression of Bone Resorption using Fluid Shear Stress and Neurotransmitter

\*곽지현<sup>1</sup>, 김병관<sup>1</sup>, 박수지<sup>1</sup>, #김지현(chihyun@yonsei.ac.kr)<sup>1</sup>  
\*J. H. Kwag<sup>1</sup>, B. G. Kim<sup>1</sup>, S. J. Park<sup>1</sup>, #C. H. Kim(chihyun@yonsei.ac.kr)<sup>1</sup>  
<sup>1</sup> 연세대학교 보건과학대학 의공학부

Key words : vasoactive intestinal peptide, mechanical loading, bone cell

## 1. 서론

성인의 뼈 조직은 뼈 생성과 뼈 흡수의 비율이 엄격하게 조절되어짐으로 골밀도 항상성을 유지한다. 이러한 뼈 생성과 흡수를 담당하는 세포를 조골세포(osteoblast)와 파골세포(osteoclast)라고 한다. 파골세포의 뼈 흡수(bone resorption)를 통해 뼈 조직이 분해되어 침식공간이 만들어지면 결합 조직으로부터 분화된 조골세포가 뼈 조직을 채우게 되는데 이를 뼈 생성(bone formation)이라고 한다[1].

이와 같은 뼈 흡수와 생성과정이 일생에 걸쳐 연속적으로 일어나게 되는데 이것을 ‘뼈 재형성(bone remodeling)’이라고 한다. 뼈 조직의 흡수와 생성의 조화가 깨어지게 되면 뼈 관련 질환을 초래하게 된다. 가장 흔한 질환으로는 골다공증(osteoporosis), 골화석증(osteopetrosis) 등이 있다.

이전 연구에 따르면 뼈 재형성을 적절히 유지하기 위해서는 조골세포와 파골세포의 균형을 유지하는 것도 중요하지만 이들의 분화 및 활성을 조절하는 요소들의 역할에 대한 연구가 중요시 되어지고 있다. 이러한 요소들을 ‘뼈 조절자(bone regulator)’라고 하며 물리적 자극(mechanical loading), 호르몬(hormone), 전사인자(transcription factors), 그리고 면역인자(cytokines) 등이 있다.

특히 대표적인 뼈 재형성 조절자로서 조골세포에서 분비되어지는 물질로 receptor activator for NF- $\kappa$ B ligand(RANKL)과 osteoprotegerin(OPG) 전사인자가 있다. 이들은 서로 경쟁적 억제를 통해 조골세포와 파골세포의 분화 및 생성에 영향을 직접적으로 미친다. RANKL은 ligand로서 pre-osteoclast의 RANK 수용체에 가서 결합함으로써 파골세포형성(osteoclastogenesis)를 유도하며, OPG는 osteoblast의 형성을 통해 뼈 형성으로 유도한다. 이들의 비율을 통해 뼈 형성 및 흡수가 적절히 조절되어진다.

최근 연구에 의하면 뇌에서 조절되어 분비되어지는 물질인 신경전달물질(Neurotransmitter)이 뼈 조직에서 발견됨으로 새로운 뼈 조절물질로서 추정되어지고 있다. 그러나 정확한 기전이 밝혀지지 않은 관계로 보다 활발한 연구가 진행되어야 할 필요성이 있다.

물리적인 자극(mechanical loading)은 뼈 재형성의 조절자(regulator)로서 뼈 조직 내부의 압력을 상승시켜 유체의 흐름(interstitial fluid flow)을 일으킨다. 이러한 유체의 움직임은 왕복 운동을 통해 세포에 유체전단응력(oscillatory fluid flow(OFF)-induced shear stress)을 가하게 된다. 유체전단응력은 조골세포의 뼈 생성 및 파골세포의 뼈 흡수에 영향을 주며 특히 뼈 흡수를 조절하는 전사인자(transcription factor)인 RANKL와 OPG 유전자 발현을 조절하여 뼈 흡수 기능을 저하시키는 것으로 알려졌다.

신경전달물질(neurotransmitter)은 면역조직화학적 방법을 통해 신경을 포함하는 다양한 조직에서 분비되어지는 물질로서 알려져 있다. 특히, 뼈 조직의 골막(periosteum), 골수강(bone marrow cavity), 혈관(vascular canals) 등에 신경 조직이 존재하며, 이들이 곧 골격신경분포계(skeletal innervation system)를 이루어 신경전달물질을 분비하게 된다.

신경전달물질로서 알려진 신경단백물질(neuropeptide)로는 vasoactive intestinal peptide(VIP), calcitonin gene related peptide(CGRP) 등이 있다. CGRP는 37개의 아미노산으로 칼시토닌(calcitonin), 아밀린(amylin), 아드레노메둘린(adrenomedullin)등을 포함하는 super family이다. 또한 뼈 조직의 골막(periosteum)과 골수강(bone marrow cavity)에서 발견되었으며, cAMP와 insulin-like growth factors(IGFs)을 조절함으로써 parathyroid hormone(PTH), 칼슘, 그리고 prostaglandin(PGE2) 등의 분비를 조절하는 것으로 알려졌다.

위의 내용들을 토대로 물리적 자극(유체전단응력)과 신경전달물질이 뼈 조직의 재형성과 관계가 있으며, 물리적 자극과 신경전달물질과의 상관관계 또한 뼈 재형성 조절자로서 RANKL과 OPG활성에 영향을 미칠 것으로 예측되어진다. 따라서 본 연구에서는 유체전단응력과 신경전달물질의 상관관계를 통해 뼈 질환을 일으킬 수 있는 뼈 흡수를 억제하고자 뼈 재형성 조절에 중요한 전사인자로서 알려진 RANKL과 OPG의 단백질 분비량을 확인하였으며, 동물실험을 통해 신경전달물질의 존재여부를 확인해보았다.

## 2. 재료 및 방법

### 세포배양 및 VIP 첨가

본 연구에서는 MC3T3-E1 preosteoblast 세포를 5% CO<sub>2</sub>, 37°C의 incubator에서 농도가 89%  $\alpha$ -MEM, 10% FBS, 1% P/S인 배지를 넣고 배양하였다. CGRP(Sigma-Aldrich)의 농도는 세포를 대상으로 시행된 이전의 실험을 통해 알려진 10<sup>-8</sup>M 농도로 subculture 후 세포부착이 되었을 때, 3일 뒤 총 2번 첨가하여 6일에 걸쳐 세포를 배양하였으며, 배지는 3일에 한번 갈아주었다.

### 물리적 자극(Oscillatory Fluid Flow)

Subculture 후 5일 뒤에 mechanical loading을 위해 slide subculture가 이루어졌다. 5일간 VIP에 노출된 MC3T3-E1(preosteoblastic cell)을 슬라이드(7.5cm×3.8cm, USA)위에 부착시킨 후 24시간 뒤에 전단응력을 가하였다. 본 연구의 모델에서는 전단응력(oscillatory fluid flow)을 1Pa의 세기로 한 시간 동안 가해졌으며, control 그룹은 이러한 loading이 가해지지 않았다. Loading이 끝난 뒤, 바로 단백질 추출이 이루어졌다.

### 단백질 추출 및 단백질 발현량 분석(immunoassay)

Slide subculture 24시간 뒤, 슬라이드에 부착된 세포를 PBS로 세척한 뒤, Lysis buffer(1% Triton X-100, 0.5% Nonidet P-40, 10mM Tris(pH7.4), 0.2mM PMSF, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 30mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>)로 단백질을 추출한 뒤, Quantikine Mouse RANKL Immunoassay와 Quantikine Mouse OPG Immunoassay(R&D system)을 이용하여 ELISA로 단백질 발현량을 확인하였다.

**면역조직화학분석(Immunohistochemistry)**

신경전달물질이 뼈 조직 내에 어느 정도 분포하고 있는지를 확인하기 위하여 CGRP 의 분포를 immunohistochemistry 를 통해 확인하였다. 쥐의 척골(ulna bone)로 알려진 뼈를 추출하여 10% formalin 에 넣고 고정을 시킨 뒤, 10% formic acid 에 넣고 5 일간 탈회를 한다. 파라핀 포매를 만들어 삭정한 뒤 슬라이드에 부착한다. 슬라이드에 부착된 조직을 permeabilizing solution 에 2 시간 배양하고 washing 과 blocking 과정을 거쳐 CGRP primary antibody 를 1:300 으로 처리 후 4°C 에서 24hr 간 반응시킨다. 24 시간 후에, washing 한 뒤, FITC secondary antibody 를 처리하고 형광현미경으로 확인하였다.

**3. 결과**

**단백질량 분석결과**

본 연구에서는 MC3T3-E1 preosteoblast 세포에 CGRP(10<sup>-8</sup>M)를 첨가하고, 물리적 자극을 함께 가하여 줌으로 신경전달물질과 물리적 자극을 통한 뼈 흡수 조절 전사인자인 RANKL 의 단백질 발현량을 확인하였다. 그 결과, 신경전달물질과 물리적 자극의 실험군(Load, CGRP, CGRP+Load)과 대조군(Control)을 비교했을 때 20% 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 실험군 간의 차이를 확인하지 못함에 따라 물리적 자극과 신경전달물질은 유사하게 RANKL 의 단백질 발현량을 억제하는 것으로 확인되었다 (Fig 1).

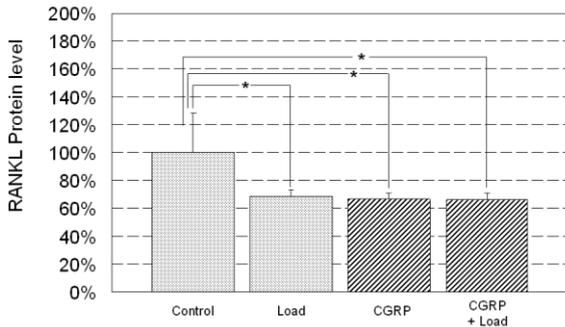


Fig. 1 RANKL Protein release of MC3T3-E1 cells treated with CGRP (10<sup>-8</sup>M) and loading (1Pa). (\*: P < 0.05, N=4)

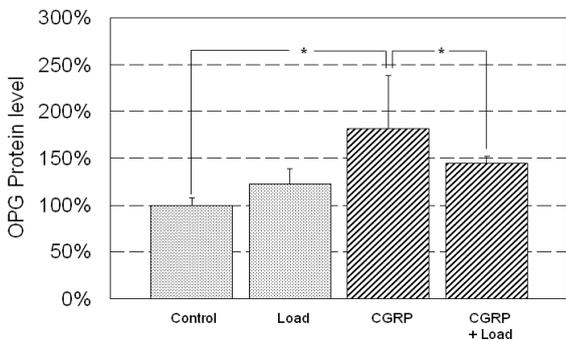


Fig. 2 OPG Protein release of MC3T3-E1 cells treated with CGRP (10<sup>-8</sup>M) and loading (1Pa). (\*: P < 0.05, N=4)

이와 더불어 OPG 단백질의 발현량에서는 실험군과 대조군을 비교했을 때, 물리적 자극(Load)그룹에서는 약 20% 정도 증가하였으며, 신경전달물질(CGRP)그룹에서는 약 80% 정도 증가하였다. 또한 물리적 자극과 신경전달물질을 함께 가한 (CGRP+Load) 그룹은 약 50% 가까이 증가함을 확인하였다 (Fig 2).

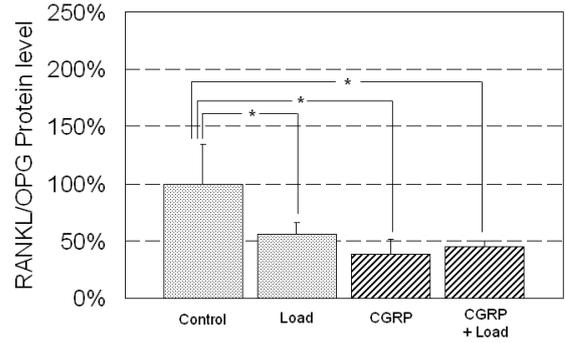


Fig. 3 RANKL/OPG Protein release of MC3T3-E1 cells treated with CGRP (10<sup>-8</sup>M) and loading (1Pa). (\*: P < 0.05, N=4)

RANKL/OPG 단백질 발현량에서는 실험군을 대조군과 비교했을 때 물리적 자극그룹은 40% 이상 감소하였으며, 신경전달물질그룹은 60% 이상 감소하였다. 또한 신경전달물질과 물리적 자극을 함께 가한 그룹은 50% 이상 감소함을 확인할 수 있었다. 그러나 각 실험군들을 서로 비교하였을 때는 큰 차이를 볼 수 없었다 (Fig 3).

**면역조직화학 분석결과**

뼈 조직에서 신경전달물질의 위치에 따른 분포 확인을 위해 면역조직화학분석을 통해 확인하였다. 쥐의 척골(ulna bone)을 추출하여 골단(epiphysis)과 골중양부(midshaft)의 단면을 잘라 CGRP 항체를 통해 형광현미경을 촬영하여 확인하였다. 그 결과 뼈 조직의 안쪽 부분인 골수강 쪽에 넓게 분포하는 것을 확인할 수 있었다.

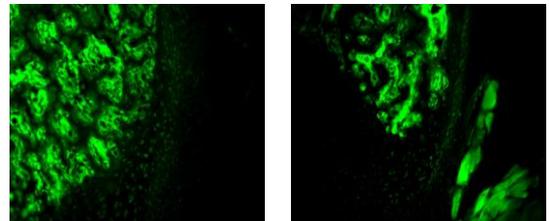


Fig. 4 CGRP exists in rat ulna bone. Epiphysis (left green) and midshaft (right green) treated with CGRP antibody (1:300)

**4. 결론**

본 연구를 통해 물리적 자극과 신경전달물질은 뼈 대사 조절에 중요한 요소로 알려진 RANKL 과 OPG 의 단백질 발현을 조절함을 확인할 수 있었다. 뿐만 아니라 물리적 자극과 신경전달물질을 함께 가했을 때 시너지 효과를 나타낼 것이라던 예측과는 달리 본 연구의 결과에서는 물리적 자극과 신경전달물질은 상보적으로 뼈 흡수를 강하게 억제할 수 있으며 이는 뼈의 조절과 뼈 재형성에서 볼 수 있는 항상성(homeostasis)에 기인한 것으로 생각되어진다.

결론적으로, CGRP 는 뼈 내부에서 물리적 자극과 상보적인 상관관계를 가지고 뼈 재형성에 관여하는 조절자임을 확인하였다. 그러나 세포단위의 실험으로는 확실한 기전을 제시하기 어려움으로 동물실험 등을 통해 보다 확실한 기전에 대한 연구가 진행되어야 할 것이다.

**참고문헌**

1. M.M. Cohen, Jr., "The New bone biology: pathologic, molecular, and clinical correlate," *Am J Med Genet A*, **140**, 2646-2706, 2006