

공초점 현미경을 이용한 Bone Resorption Pit 의 삼차원적 분석 3D Analysis of Bone Resorption Pit using Confocal Microscope

*전옥희¹, 이승학¹, 윤대성¹, #김지현¹

*O.H. Jeon¹, S.H. Lee¹, D.S. Yoon¹, #C.H. Kim(chihyun@yonsei.ac.kr)¹

¹연세대학교 보건과학대학 의공학부

Key words : Bone resorption pit, Osteoclast, Volume, Confocal microscope

1. 서론

우리 몸 안에서 골은 생체 내 칼슘 항상성을 유지하고 골 내 미세손상을 치유하기 위해 파골세포(osteoclast)에 의해 오래된 골 조직이 흡수, 제거되고 이후 조골세포(osteoblast)에 의해 연속적으로 새로운 골 기질이 생성되는 과정을 거치면서 유지된다. 파골세포의 골 흡수 능력이 과도하게 증가함에 따라 발생하는 골 재형성 과정의 불균형은 골 손실, 골 강성의 감소, 골절 위험성의 증가시킴에 따라 골다공증과 같은 골 관련 질환이 발생한다. 그러므로 골 관련 질환의 효과적인 치료를 위해서는 파골세포의 골 흡수에 따른 골에 나타나는 구조적 변화에 대한 연구가 필요하다.

파골세포는 다핵을 가진 대식세포(macrophage)의 일종으로 골과 교원질 조직을 흡수하는 기능을 가진다. 파골세포가 resorptive site 에 흡착하면 카텡신 K(cathepsin K)와 금속분해효소(metalloproteinase enzyme)를 분비하여 골을 구성하는 type I 교원질과 칼슘과 인과 같은 비교원질을 분해한다 [1]. 이 과정에서 골 표면에 삼차원적 구멍이 형성되는데 이를 *in vitro* 에서는 “resorption lacunae” 또는 “pit”이라고 부른다 [2].

현재 파골세포에 의한 골 흡수 정도를 분석하기 위해 tartrate resistant acid phosphatase (TRAP activity), multinucleated cell morphology, 그리고 toluidine blue staining 을 이용한 pit 의 개수와 같은 이차원 정성적 분석방법을 사용해왔다. 그러나 *in vivo* 에서 골은 삼차원적인 구조를 가지고 있다. Pit 깊이의 증가는 피질골 내의 microcrack 형성과 골절의 위험성을 증가시키고 골이 부서지기 쉬운 성질로 변하게 되어 골의 물리적 성질을 변화시키게 된다. 따라서 pit 의 넓이, 깊이, 부피를 삼차원적으로 정량화하는 접근방법이 중요하다.

현재까지 파골세포에 의한 뼈 흡수율을 삼차원적인 측면에서 분석한 연구는 아직 보고되지 않고 있다. 따라서 본 연구는 공초점 현미경(confocal microscope)을 이용하여 시간에 따른 파골세포에 의해 생성된 pit 을 이미지화하는 방법을 제시하고 상아 시편의 흡수율을 깊이와 부피의 정량화를 통해 구하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

Isolation and culture of osteoclasts

쥐에서 채취한 대퇴골의 골강(bone cavity)으로부터 파골세포로 분화가 가능한 골수세포(bone marrow cells)를 분리해낸다. 골수세포를 37°C, 5% CO₂ 의 인큐베이터에서 α-MEM, 10% FBS, 1% P/S, 50ng/ml macrophage colony-stimulating factor (M-CSF)을 포함한 배지를 넣고 약 2~3 일 동안 배양한다 [3]. 그 후, 다핵의 파골세포로 분화시키기 위해 골수세포에 50ng/ml soluble receptor activator for nuclear factor κB ligand (sRANKL)을 추가로 넣고 배지와 함께 6 일 동안 배양하였으며 배지는 약 2~3 일에 한번씩 갈아주었다.

2D analysis of bone resorption

상아시편에 심기 전, TRAP staining 을 사용하여 다핵의 파골세포의 생성을 확인함. 파골세포가 배양되는 culture dish 에 0.02% EDTA 와 인산완충용액(PBS)을 넣어 cell scraper 을 이용하여 파골세포만을 분리한다. 상아 시편(dentine disc)을 50ng/ml M-CSF, 50ng/ml sRANKL, 100μL α-MEM 가 포함된 96-well plate 에 넣는다. 그리고 분리한 파골세포를 상아 시편에 심은 후 3 주 동안 37°C, 5% CO₂ 의 인큐베이터에서 배양한다. 파골세포를 상아 시편에 심은 날을 기준으로 7, 14, 21 일이 지남에 따라 변화된 pit 의 개수와 면적을 toluidine staining 을 사용하여 이차원적으로 분석한다.

3D analysis of osteoclastic resorption pit by confocal microscope

본 연구에서는 상아 시편 표면에 존재하는 pit 의 삼차원적 이미지화와 깊이와 부피의 정량화를 위해 공초점 현미경 (LSM 5 PASCAL, Carl Zeiss)을 사용하였다. Pit 의 부피를 정량화 하기 위해 흡수가 일어나지 않은 상아 시편의 부피를 구하고, 흡수가 일어난 상아시편의 부피를 빼주어서 pit 부피를 구할 수 있었다.

3. 결과 및 고찰

2D analysis of bone resorption

파골세포만을 분리해 낸 후 상아 시편에 심고 TRAP staining 을 통해 붉게 염색한 모습이다 (Fig 1).



Fig. 1 Multinucleated osteoclast (circle) on dentine disc cultured for 7 days in presence of 50µg/ml M-CSF and 50µg/ml RANKL.

파골세포에 의해 흡수된 상아시편 표면의 pit 을 toluidine staining 을 이용하여 분석한 결과이다 (Fig 2). 같은 배율 (10x)의 면적에서 시간이 경과함에 따라 pit 의 숫자가 감소해지나 면적은 증가함을 볼 수 있다. 이차원적인 분석 방법으로는 깊이와 부피를 측정하여 정량화 할 수 없기 때문에 시간에 따른 파골세포에 의한 상아시편의 흡수율 또한 수치화 할 수 없었다. 그러므로 공초점 현미경으로 pit 의 깊이와 부피를 분석해 보았다.

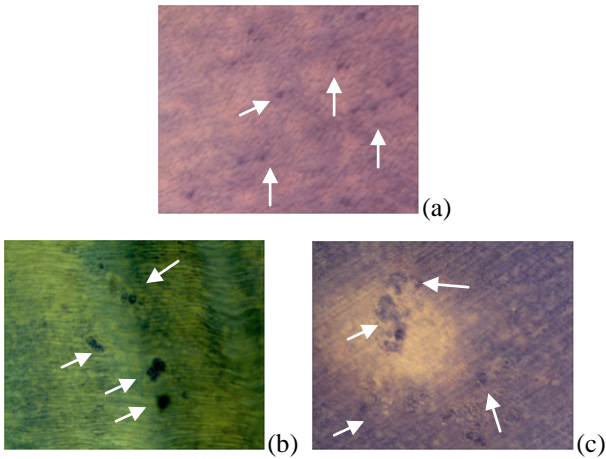


Fig. 2 Resorption pit (arrow) on dentine discs cultured with osteoclasts for (a) 7, (b) 14, (c) 21 days were stained with toluidine blue.

3D analysis of osteoclastic resorption pits by confocal microscope

시간에 따른 파골세포에 의해 흡수된 상아 표면을 공초점 현미경을 이용하여 3 차원적으로 이미지화하였다 (Fig 3).

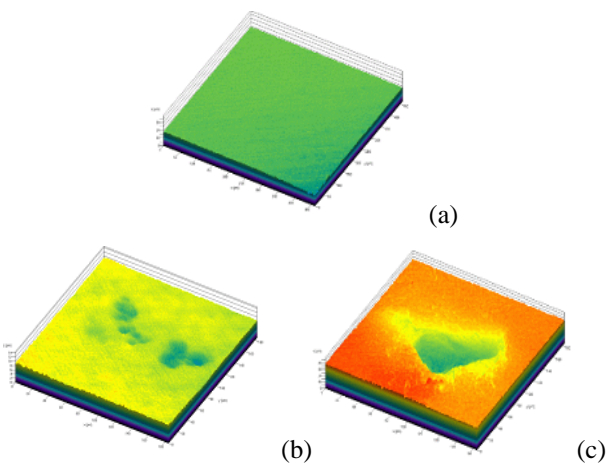


Fig. 3 3D images of resorption pit on dentine discs cultured with osteoclasts for (a) control, (b) 7 days, (c) 14 days by using confocal microscope (20x).

공초점 현미경을 이용하여 시간에 따른 상아시편이 흡수된 부피를 측정할 수 있었다. 일차 별로 7 일차에 형성된 pit 은 평균 약 176754 μm^3 , 14 일차에는 약 580892 μm^3 , 그리고 21 일차에는 약 888106 μm^3 의 부피가 측정되었다. 또한 pit 의 평균 깊이는 7, 14 그리고 21 일차 별로 각각 평균 2.42 μm^3 , 10.43 μm^3 , 14.16 μm^3 으로 측정되었다 (Fig 4).

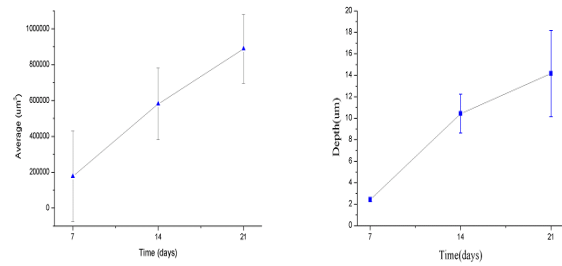


Fig. 4 The volume and depth of resorption pit on 7, 14, and 21 day.

4. 결론

본 연구의 최종 목적은 파골세포에 의해 생성된 pit 의 삼차원적 이미지를 얻고 파골세포의 골 흡수율을 정량화하는 데에 있다. 시간에 따른 pit 부피와 깊이의 변화를 살펴볼 때 파골세포가 상아 시편에 심은 이후부터 7 일차까지는 7 일차에서 14 일차까지 보다 더 적은 양의 상아질이 흡수되었다는 것을 알 수 있었다. 이는 처음 파골세포가 골을 흡수하기 시작하기까지의 resting 기간이 포함되어있기 때문인 것으로 생각된다. 7 일차부터 14 일차까지는 파골세포의 골 흡수 작용이 가장 활발했던 것으로 나타났으며, 14 일차부터 21 일차까지는 골 흡수율이 감소한 것을 알 수 있었다. 이는 시간이 지남에 따라 파골세포의 골 흡수능이 감소하고 있는 것을 의미한다.

이 연구는 공초점 현미경을 이용하여 골 관련 질환에서의 골의 흡수 정도를 3 차원적으로 분석하고 부피와 깊이를 정량화함으로써 골질 위험성을 예측할 수 있는 새로운 시도로써 의미를 가진다.

참고문헌

1. Zhenpeng Li, Kangmei Kong, Weili Qi., "Osteoclast and its roles in calcium metabolism and bone development and remodeling", Biochemical and Biophysical Research Communication, 343, 345-350, 2006.
2. Laurent Bozec et al., "Atomic force microscopy of collagen structure in bone and dentine revealed by osteoclastic resorption", Ultramicroscopy, 1-5, 79-89, 2005
3. Naoyuki Takahashi et al., "Generating murine osteoclasts from bone marrow", Methods Mol Med, 80, 129-144, 2003.