

신경전달물질 및 물리적 자극에 대한 뼈 세포의 반응

곽지현, 김병관, 김경환, 김지현

연세대학교 보건과학대학 의공학과

Bone Cell Response to Neurotransmitters and Mechanical Loading

J. H. Kwag, B. G. Kim, K. H. Kim, and C. H. Kim

Department of Biomedical Engineering, Yonsei University, Wonju, Korea

(Received December 15, 2008. Accepted February 16, 2009)

Abstract

Bone remodeling is a continuous process of skeletal renewal during which bone formation is tightly coupled to bone resorption. Mechanical loading is an important regulator of bone formation and resorption. In recent studies, neurotransmitters such as vasoactive intestinal peptide (VIP) were found to be present inside bone tissue and have been suggested to potentially regulate bone remodeling. In this study, our objective was to use a pre-established in vitro oscillatory fluid flow-induced shear stress mechanical loading system to quantify the effect of VIP on bone resorptive activity and investigate its combined effect with mechanical loading. VIP decreased osteoclastogenesis significantly decreased RANKL/OPG mRNA ratio by approximately 90%. Combined VIP and mechanical loading further decreased RANKL/OPG ratio to approximately 95%. These results suggest that VIP present in bone tissue may synergistically act with mechanical loading to regulate bone remodeling via suppression of bone resorptive activities.

Key words : bone cell, mechanical loading, neurotransmitter, vasoactive intestinal peptide (VIP), receptor activator for NF- κ B ligand (RANKL), osteoprotegerin (OPG)

1. 서론

정 상적인 성인의 뼈는 지속적인 뼈 생성과 흡수과정의 반복이 적절히 균형을 이루며 새로운 뼈로 대체되는 뼈 재형성(bone remodeling)을 통해 견고한 구조를 유지하게 된다. 이러한 뼈 생성과 흡수에 관여하는 세포로는 크게 뼈 조직을 생성하는 조골세포(osteoblast)와 뼈 조직을 흡수하는 파골세포(osteoclast)를 들 수 있다. 이들 세포의 분화 및 이와 관련된 유전자 발현 그리고 세포의 기능 조절을 통해 정상인의 뼈 재형성 균형 유지 및 뼈 질환자의 치료에 중요한 지표가 될 수 있다[1].

물리적인 자극(mechanical loading)은 뼈 재형성의 조절자(regulator)로 알려져 있다. 외부의 물리적인 자극은 뼈 조직 내부의 압력을 상승시켜 유체의 흐름(interstitial fluid flow)을 일으킨다. 이러한 유체의 움직임은 왕복 운동을 하며 이에 의해 세포는 유체전단응력(oscillatory fluid flow (OFF)-induced shear stress)

을 받게 된다[2,3]. 유체전단응력은 조골세포의 뼈 생성 및 파골세포의 뼈 흡수에 영향을 주며 특히 뼈 흡수를 조절하는 전사인자(transcription factor)로 잘 알려진 receptor activator for NF- κ B ligand (RANKL)와 osteoprotegerin (OPG) 유전자 발현을 조절하여 뼈 흡수 기능을 저하시킨다[4].

골밀도 항상성(homeostasis)은 조골세포와 파골세포의 생성 균형이 서로 엄격하게 유지되어야 한다. 조골세포의 주된 역할은 뼈 조직의 생성이지만 파골세포 분화에 필수적인 전사인자인 RANKL과 파골세포의 활성을 경쟁적으로 억제할 수 있는 soluble decoy receptor인 OPG 전사인자를 조절함으로써 뼈 조직의 흡수에도 관여한다[5]. 파골세포는 조혈모세포(hematopoietic cell)에서 분화되어 분화되기 전의 파골세포(pre-osteoclast)로 존재하고 있다. 조골세포에서 분비되어지는 RANKL이 세포막에 있는 RANKL receptor와 결합됨으로써 세포 내의 신호에 의해 거대 핵 세포인 파골세포로 성숙되어진다. 성숙된 파골세포는 뼈 흡수를 시작하고 뼈 재형성의 시발점이 되어 새로운 뼈 형성을 유도함으로써 뼈 대사가 조절되어진다[6]. 인체에서 뼈는 재형성과 같은 항상성의 성격을 지니는 매우 민감한 영역이므로 뼈 대사를 조절하는 다양한 뼈

Corresponding Author : 김지현

강원도 원주시 흥업면 매지리 234번지 연세대학교 원주캠퍼스 의공학과

Tel : +82-33-760-2785 / Fax : +82-33-760-2898

E-Mail : chihyun@yonsei.ac.kr

이 논문은 2007년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국과학재단의 지원을 받아 수행된 연구임.(No. R01-2007-000-11012-0)

조절자에 대한 연구의 역할이 크게 중요시 되고 있다.

최근 연구에 의하면 뇌의 조절을 받아 신경조직에서 분비되어지는 신경전달물질 (neurotransmitter)이 뼈 조직 내에서 발견되었다[5]. 뼈 조직의 골막(periostrum), 골수강(bone marrow cavity), 혈관(vascular canals) 등에 신경 조직이 존재하며, 이들은 골격신경분포계(skeletal innervation system)를 이루어 신경단백물질(neuropeptide)을 분비하게 된다. 뼈 조절자의 역할을 담당할 수 있는 주요 신경전달물질 후보로는 vasoactive intestinal peptide (VIP), somatostatin, substance P, calcitonin gene-related peptide 등이 있다[7,8]. VIP는 28개의 아미노펩타이드(aminopeptide)로 구성되어 있는 신경전달물질로서 주로 소화기관, 뇌, 말초신경에서 비아드레날린성(non-adrenergic) 혹은 비콜린성(non-cholinergic)으로 작용한다. 장, 위장, 폐, 관상, 심장, 뇌혈관 등의 혈관확장, 동맥혈압을 낮추고 심박출량을 감소시키며 알칼리성 포스파타아제 활성(alkaline phosphatase activity, ALP)과 칼슘양(calcium content)을 자극하는 등의 다양한 역할을 한다. 뼈 조직에서는 골막, 골수강 등에서 발견되었으며 조골세포에는 VIP-1, VIP-2, VIP/PACAP 등의 VIP receptor가 발견되었으나 뼈에 대한 역할은 아직 정확하게 알려져 있지 않다[9].

본 연구는 뼈 조절자로 유력한 신경전달물질이 뼈 대사에 미치는 영향을 보기 위하여 in vitro 실험인 세포배양 시에 적용되는 세포주에 수용체가 존재하는 신경전달물질로 VIP를 적용하였으며, 뼈 재형성에 미치는 영향을 파골세포 활성의 관점에서 확인하였다. 또한, VIP 및 물리적인 자극을 가하였을 때의 뼈 흡수 관련 효과를 RANKL과 OPG 발현량을 통해 확인하였다.

II. 재료 및 방법

A. 파골세포 생성(Osteoclastogenesis)

1) 세포배양

본 연구에서는 파골세포 생성(osteoclastogenesis)을 위하여 Raw 264.7 murine monocytic macrophage 세포와 MC3T3-E1

pre-osteoblast 세포를 6-well tissue culture plate에 5% CO₂, 37°C 조건에서 배양(co-culture)하였다. Raw 264.7 세포는 대식세포군으로 파골세포로의 분화가 가능한 세포이며, MC3T3-E1은 조골세포로 분화가 가능한 활성화 전 조골세포이다. 배지는 89% α-MEM, 10% FBS, 1% P/S인 배지를 사용하였다. 대조군 그룹과 VIP 그룹으로 나누어 (N=각5개) VIP 그룹에는 10⁻⁶M VIP (Sigma-Aldrich, USA) [10], 1α,25-dihydroxyvitamin D₃ (Fluka, Switzerland), M-CSF (Peprotech, USA)를 함께 첨가시켜주었다[11]. 시약처리는 co-culture가 시작된 시점을 포함하여 9일간 총 5회 첨가되었다.

2) 파골세포 활성(TRAP Assay)

세포배양 9일째 되는 날 분화된 파골세포의 활성을 확인하기 위하여 각 그룹의 파골세포를 TRAP assay kit (Sigma, St. Louis, USA)를 사용하여 TRAP 염색을 하였다. 세포핵이 3개 이상이며 tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP)-positive로 염색된 세포를 파골세포로 간주하였으며 3명의 관찰자에 의해 20X objective 광학현미경으로 세포 수를 확인하였다 (Fig. 2).

B. RANKL & OPG Gene Expression

1) 세포배양

MC3T3-E1 pre-osteoblast 세포를 5% CO₂, 37°C의 인큐베이터에서 농도가 89% α-MEM, 10% FBS, 1% P/S인 배지를 넣고 5일간 배양하였다. 10⁻⁶M VIP (Sigma-Aldrich, USA), 1α,25-dihydroxyvitamin D₃ (Fluka, Switzerland)를 총 2회 첨가시켰다. 대조군, VIP, VIP+loading의 총 3개 그룹으로 구성되었다.

2) 물리적인 자극(Mechanical Loading)

세포배양 5일 후에 물리적인 자극을 위해 슬라이드 계대배양이 이루어졌다. 5일간 VIP에 노출된 MC3T3-E1 세포를 유리 슬라이드 (75mm×38mm) 위에 부착시킨 후 자체 제작된 장비를 이용하여 24시간 뒤에 유체전단응력(OFF-induced shear stress)을 가하였다[4]. 유체전단응력은 1Pa의 peak shear stress로 한 시간 동

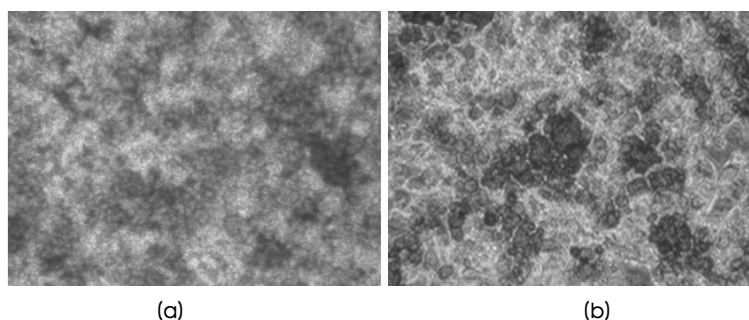
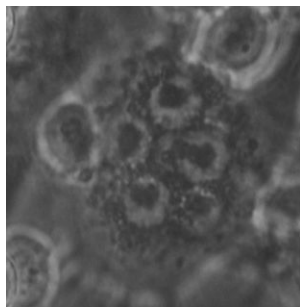


그림 1. 활성화 전 조골세포와 대식세포의 세포배양 (co-culture)에서 파골세포의 활성 분석.

Fig. 1. Osteoclast activity analyzed by TRAP staining in the co-culture system of MC3T3-E1 pre-osteoblast and Raw 264.7 macrophage cells. TRAP-positive cells are stained red. Control (A) and VIP treated (B) groups.



(a)

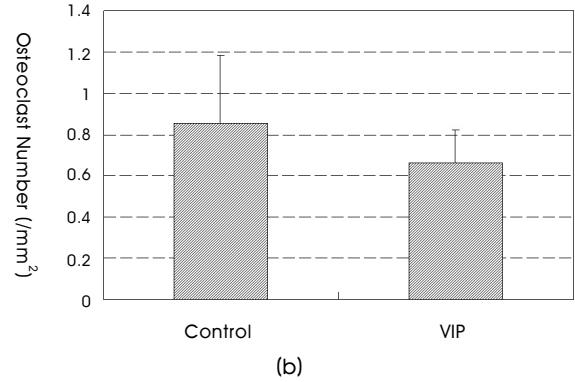


그림 2. TRAP-positive 인 핵을 3 개 가진 파골세포 생성 확인(A). VIP처리 후 형성된 파골세포(B).

Fig. 2. TRAP-positive cells with 3+ nuclei were considered to be osteoclasts (A). Changes in newly formed osteoclast number after VIP treatment (B). (Number/mm², N=5 each)

안 가했으며, 대조군 그룹 및 VIP 그룹은 같은 조건하에서 물리적인 자극만 가해지지 않았다. 자극이 끝난 뒤 유전자 발현양 차이를 확인하기 위하여 즉시 RNA의 추출이 이루어졌다.

3) mRNA 추출과 유전자 발현

(mRNA Isolation & Real Time RT-PCR)

물리적인 자극이 완료된과 동시에 슬라이드에 부착된 모든 그룹의 세포를 인산염완충액(PBS)으로 세척한 뒤 Tri-Reagent (Sigma-Aldrich, USA)를 사용해 총 RNA를 세포에서 추출해 내었다. cDNA 합성을 위해 TaqMan® Reverse Transcription Reagents Kit (Applied Biosystems, USA)를 사용하여 pre-cDNA 샘플을 Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler에 의해 합성시켰다. cDNA 샘플을 Taqman® Universal PCR Master Mix 및 20X primer (Applied Biosystems, USA)를 사용하여 Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR system으로 RANKL과 OPG의 유전자 발현량을 Relative Quantitation (RQ) study software를 통해 확인하였다.

III. 결과

A. 파골세포 생성(Osteoclastogenesis)

VIP 10⁻⁶M에 노출된 Raw 264.7 macrophage cell과 MC3T3-E1 pre-osteoblastic cell의 세포배양(co-culture) 결과에 의하면 파골세포의 분화에 신경전달물질이 영향을 주는 것으로 나타났다. 파골세포를 TRAP assay로 염색하게 되면 TRAP positive된 세포가 붉게 염색되어 파골세포 활성의 차이를 대조군 그룹과 비교하여 확인할 수 있다. 이에 따라 VIP에 노출된 그룹을 대조군 그룹과 비교하였을 때, 파골세포의 활성이 현저히 낮아짐을 TRAP 염색을 통해 확인하였다(Fig. 1). 또한, 통계학적으로 유의한 결과를 얻지는 못하였으나 VIP 첨가 시 파골세포의 생성량 역시 대조군 그룹과 비교해 감소(20%)하는 추세를 보였다(Fig. 2).

B. RANKL and OPG 유전자 발현량(Gene Expression)

신경전달물질 VIP를 처리한 그룹에서는 MC3T3-E1 pre-osteoblastic cell에서 발현되는 RANKL/OPG mRNA 비율이 대조

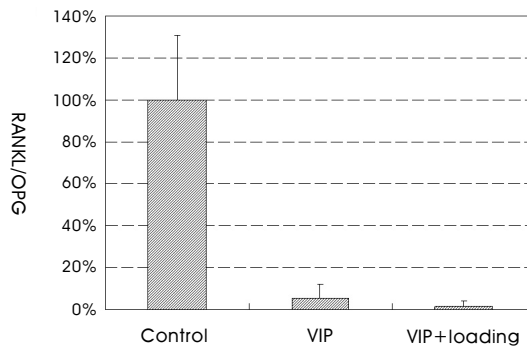


그림 3. VIP처리, VIP처리 및 물리적 자극을 가한 후의 RANKL/OPG mRNA 변화.

Fig. 3. Changes in RANKL/OPG mRNA ratio after VIP treatment and VIP+loading treatment normalized to Control group. (*: p<0.05 vs. Control; Student's t-test; N=5 each)

군 그룹에 비해 약 90% 감소하였다(Fig. 3). 또한, VIP와 mechanical loading을 함께 가한 그룹에서는 RANKL/OPG mRNA 비율이 약 95% 감소하였다.

IV. 토 론

본 연구에서는 신경전달물질인 VIP가 파골세포 생성(osteoclastogenesis)에 미치는 영향을 통해 VIP가 뼈 세포에 미치는 효과를 알아보았으며 더 나아가 VIP의 노출과 물리적인 자극이 뼈 흡수 관련 유전자 발현에 미치는 영향에 대한 연구를 수행하였다.

수행된 파골세포 생성 실험결과에 의하면 VIP가 직접적으로 활성화 전의 조골세포(pre-osteoblast)에 영향을 미쳐 활성화된 파골세포에서만 분비되어지는 tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP)-positive 세포를 염색함으로써 파골세포의 생성 및 활성 억제제를 확인할 수 있었다. 유전자 발현 결과에서도 VIP 노출 시 RANKL/OPG 비율이 급격히 감소함을 보였다. RANKL과 OPG는 서로를 견제하는 경쟁적인 억제자로서 조골세포에서 발현되어 분비되어진다.

조골세포에서 분비되어지는 RANKL은 활성화 되지 않은 파골세포 표면에 있는 RANKL 수용체에 결합하여 활성화 된 세포로서 뼈 흡수의 기능을 가지는 파골세포로 분화되어지게 된다. RANKL의 분비가 많아지면 상대적으로 OPG의 분비가 적어지고, 이는 조골세포의 활성이 약해지는 것을 의미하나 서로 경쟁적 억제로 균형을 이루어 골밀도를 유지시킨다. 이러한 두 유전자의 발현 및 분비는 뼈 재형성의 균형(balance)에 있어 중요한 부분으로 두 유전자의 발현량 비율을 통해 뼈 형성 및 흡수에 대한 중요한 지표로서 뼈 관련 연구에 많이 적용되어진다. 더불어 두 유전자의 발현 및 분비에 심각한 차이를 보이게 된다면 이는 뼈 재형성의 불균형이 일어나게 되어 뼈 관련 질환이 유발될 수 있음을 시사한다.

본 연구의 유전자 발현 결과는 VIP가 활성화 전의 조골세포의 RANKL 발현을 감소시키고 OPG 발현을 증가시킴으로써 대식세포(macrophage)가 뼈 흡수를 담당하는 활성화 된 파골세포(mature osteoclast)로의 분화를 억제하였음을 제시한다[12].

이전 연구 결과에 의하면 2시간 동안 1Pa로 활성화 전의 조골세포에 물리적인 자극(OFF)을 주었을 때 RANKL/OPG mRNA 비율이 대조군 그룹에 비해 95% 이상 큰 폭으로 감소함을 나타내었다[4]. 이를 현 연구의 물리적 자극이 함께 가해진 유전자 실험과 비교하면 RANKL/OPG mRNA 조절에 있어서 신경전달물질 VIP와 물리적인 자극(OFF)간의 시너지 효과보다는 VIP와 물리적인 자극이 유사한 세포신호로서 영향을 미침을 확인하였다. 이는 다양한 신호경로를 통해 조골세포와 파골세포의 활성 및 억제에 관여함을 의미한다.

물리적 자극은 뼈 대사를 조절하는데 중요한 전사인자들의 활성을 돕는 대표적인 물질로 알려진 비타민 D, 프로스타글란딘(prostaglandin E2), cAMP, 세포 내 칼슘양(intracellular calcium content)등을 조절하는 것으로 알려졌다. 특히, 비타민 D는 파골

세포 생성에 가장 중요한 인자로서 조골세포에서 분비되어지는 RANKL의 생성에 필수적인 요소이며 뼈 생성 및 흡수의 기능을 조절하는데 필요한 요소로 cAMP, protein kinase A, ALP 활성 등이 프로스타글란딘과 함께 연계되어 물리적인 자극을 주었을 때 영향을 받는 것으로 나타났다[13]. 뿐만 아니라 VIP에 관한 연구 결과에 따르면 뼈 형성하는데 관여하는 물질로 알려진 cAMP, ALP와 뼈 흡수에 관여하는 케모카인(NF-kB, IL-6) 등의 작용에 자극을 주는 것으로 알려져 있다. NF-kB, IL-6는 파골세포 생성(osteoclastogenesis)[14]과 관련되어 있는 RANKL의 발현에 영향을 미치며 조골세포 생성에 중요한 cAMP, ALP의 조절에 관여하는 것으로 알려졌다[15]. 이러한 연구 결과를 토대로 신경전달물질인 VIP가 NF-kB, IL-6를 조절하여 RANKL의 분비를 억제시키며 cAMP와 ALP를 자극하므로 OPG발현에 영향을 미칠 것으로 생각되어진다.

신경전달물질은 뇌의 조절 하에 신경 조직에서 분비되어지는 물질로서 호르몬으로도 불리워지며 많은 호르몬들과 마찬가지로 이들은 항상성에 기여한다. 이와 같은 신경조직이 뼈 내부에 존재한다는 것은 뼈의 항상성 유지와 밀접한 관계가 있을 수 있음을 추측할 수 있다[8]. 본 연구 결과에 비추어 볼 때 신경전달물질인 VIP는 뼈 재형성 과정에서 RANKL/OPG mRNA 조절을 통해 뼈 흡수를 억제하는 물질임을 확인할 수 있었으며, 물리적 자극에 의한 뼈 흡수 억제와 밀접한 관계가 있음을 확인할 수 있었다.

결론적으로, VIP는 뼈 내부에서 뼈 재형성에 관여하는 조절자로서 물리적인 자극과 유사한 기능이 있음을 확인함에 따라 뼈 관련 질환 및 이에 대한 메커니즘을 이해함에 있어 본 연구는 큰 의미를 갖는다. 그러나 신경전달물질은 뇌에서 조절되며 다른 조직에도 분비되어 다양한 역할을 하는 물질로써 세포실험으로는 확실한 기전을 제시하기는 어렵다. 따라서 동물실험 등을 통해 보다 확실한 기전 및 뼈에 미치는 영향을 연구하여야 할 것이다.

참고문헌

- [1] M.M. Cohen, Jr., "The new bone biology: pathologic, molecular, and clinical correlates," *Am J Med Genet A*, vol.140, pp.2646-2706, 2006.
- [2] C.T. Rubin and L.E. Lanyon, "Regulation of bone formation by applied dynamic loads," *J Bone Joint Surg Am*, vol.66, pp.397-402, 1984.
- [3] I. Owan, D.B. Burr, C.H. Turner, J. Qiu, Y. Tu, J.E. Onyia, and R.L. Duncan, "Mechanotransduction in bone: osteoblasts are more responsive to fluid forces than mechanical strain," *Am J Physiol*, vol.273, pp.C810-815, 1997.
- [4] C.H. Kim, L. You, C.E. Yellowley, and C.R. Jacobs, "Oscillatory fluid flow-induced shear stress decreases osteoclastogenesis through RANKL and OPG signaling," *Bone*, vol.39, pp.1043-1047, 2006.
- [5] S. Harada and G.A. Rodan, "Control of osteoblast function and regulation of bone mass," *Nature*, vol.423, pp.349-355, 2003.
- [6] M. Asagiri and H. Takayanagi, "The molecular understanding of

- osteoclast differentiation,” *Bone*, vol.40, pp.251-264, 2007.
- [7] U.H. Lerner, “Neuropeptidergic regulation of bone resorption and bone formation,” *J Musculoskelet Neuronal Interact*, vol.2, pp.440-447, 2002.
- [8] F. Elefteriou, “Neuronal signaling and the regulation of bone remodeling,” *Cell Mol Life Sci*, vol.62, pp.2339-2349, 2005.
- [9] P. Lundberg and U.H. Lerner, “Expression and regulatory role of receptors for vasoactive intestinal peptide in bone cells,” *Microsc Res Tech*, vol.58, pp.98-103, 2002.
- [10] P. Lundberg, I. Bostrom, H. Mukohyama, A. Bjurholm, K. Smans, and U.H. Lerner, “Neuro-hormonal control of bone metabolism: vasoactive intestinal peptide stimulates alkaline phosphatase activity and mRNA expression in mouse calvarial osteoblasts as well as calcium accumulation mineralized bone nodules,” *Regul Pept*, vol.85, pp.47-58, 1999.
- [11] H. Takayanagi, “Inflammatory bone destruction and osteoimmunology,” *J Periodontal Res*, vol.40, pp.287-293, 2005.
- [12] W.J. Boyle, W.S. Simonet, and D.L. Lacey, “Osteoclast differentiation and activation,” *Nature*, vol.423, pp.337-342, 2003.
- [13] N.N. Batra, Y.J. Li, C.E. Yellowley, L. You, A.M. Malone, C.H. Kim, and C.R. Jacobs, “Effects of short-term recovery periods on fluid-induced signaling in osteoblastic cells,” *J Biomech*, vol.38, pp.1909-1917, 2005.
- [14] T. Suda, N. Takahashi, N. Udagawa, E. Jimi, M.T. Gillespie, and T.J. Martin, “Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families,” *Endocr Rev*, vol.20, pp.345-357, 1999.
- [15] E.L. Hohmann, L. Levine, and A.H. Tashjian, Jr., “Vasoactive intestinal peptide stimulates bone resorption via a cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent mechanism,” *Endocrinology*, vol.112, pp.1233-1239, 1983.