

Vasoactive Intestinal Peptide 와 Mechanical Loading 의 상호작용을 통한 뼈 형성

Bone Remodeling through Interaction of Vasoactive Intestinal Peptide and Mechanical Loading

곽지현¹, 김병관¹, 이상우¹, *김지현¹

J. H. Kwag¹, B. G. Kim¹, S. W. Lee¹, *C. H. Kim(chihyun@yonsei.ac.kr)¹

¹ 연세대학교 보건과학대학 의공학부

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

1. 서론

뼈 재형성 조절자로서 신경전달물질(neurotransmitter)는 면역조직화학적 방법을 통해 신경을 포함하는 다양한 조직에서 분비되어지는 물질인 neuropeptide 로서 알려지게 되었다. 특히, 뼈 조직의 골막(periostrum), 골수강(bone marrow cavity), 혈관(vascular canals) 등에 신경 조직이 존재하며, 이들이 곧 골격신경분포계(skeletal innervation system)를 이루어 neuropeptide 를 분비하게 된다 [1, 2]. 신경전달물질로서 알려진 neuropeptide 는 VIP(vasoactive intestinal peptide), CGRP(calcitonin gene related peptide) 등이 있다. 특히, VIP(vasoactive intestinal peptide)는 28 개의 아미노펩타이드로 구성되어 있는 신경전달물질로서 주로 소화기관, 뇌, 말초신경에서 비아드레날린성 혹은 비콜린성으로 작용한다. 장, 췌장, 폐, 관상, 심장, 뇌혈관 등의 혈관확장, 동맥혈압을 낮추고 심박출량을 감소시키며 ALP activity 와 calcium content 를 자극하는 등의 다양한 역할을 한다 [3]. 또한 뼈 조직의 골막(periostrum)에서 발견되었으며 뼈 형성 세포인 osteoblast 에서 VIP receptor 로 알려진 VIP-1, VIP-2, VIP/PACAP 를 확인하였으나 각각의 역할에 대해서는 아직 확실하지 못한 부분이 많다 [1, 4, 5, 6].

골밀도 향상성은 뼈를 형성하는 osteoblast 와 뼈를 흡수하는 osteoclast 의 생성비율이 엄격하게 조절되어짐으로 유지된다. 이들 세포는 서로 경쟁적 억제를 통해 특이하게 연관되어 있다. 대표적인 예로는 osteoblast 에서 분비하는 RANKL 과 OPG 의 유전자 발현이 있다. Osteoclast 로의 분화를 유도하는 receptor activator for NF-κB ligand(RANKL)는 osteoclastogenesis 를 시작하는 ligand 로서 preosteoclast 의 RANKL 에 결합되어 osteoclast 생성을 유도한다. 이와 반대로 osteoprotegerin(OPG)는 다양한 조직에 존재하는 glycoprotein 으로, TNF ligand superfamily 의 하나인 RANKL 의 decoy receptor 로 작용하여 골세포의 분화와 활성을 증강시키는 RANKL 에 RANKL 과 경쟁적으로 결합함으로써, 골소실을 억제하는 역할을 한다. 이러한 과정을 통해 osteoblast 와 osteoclast 의 세포 생성 및 기능이 조절되어 뼈 재형성을 유지하는 것이다. 이전 연구에 의하면 인간 골대사 질환의 변이성 중 70%가 유전적으로 결정되는 것으로 알려져 있다. 이러한 변이성을 설명하는 인자들은 수용체, 싸이토카인, 성장인자들과 기질단백질들로 나눌 수 있다 [7].

실제로 RANKL 이 결여된 경우의 대표적인 골질환으로 알려진 골화석증(osteopetrosis)이 발생한다. 실험적으로 RANKL 을 주입하게 되면 고칼슘혈증 및 골교체율이 증가하여 골소실이 유발된다[8]. OPG 유전자 결핍 쥐는 심한 골소실과 함께 대동맥 석회화와 연관성이 있으며, 혈관 석회화가 향후 골밀도 저하와 골다공증성 골절의 위험인자라는 것이 밝혀지고 있다. 이러한 병인들이 유전자 조작을 이용하여 OPG 를 생성할 수 있게 되었을 때 회복되었다는 연구가 있다[9]. 최근 들어 mechanical stimulation 을 통한 RANKL 과 OPG 유전자 발현 조절에 관한 연구에 의해 mechanical stimulation 이 뼈 생성을 유도하고 흡수를 억제하는 것으로 알려졌다. 이를 통하여 뼈 재형성에 관여하는

신경전달물질과 물리적인 신호와 연계하여 뼈 재형성의 조절 과정을 연구할 필요성이 있다 [10, 11, 12]. 본 연구에서는 뼈 형성 세포인 osteoblast 에 신경전달물질인 VIP 를 노출시킨 후 mechanical loading 을 가하였을 때의 뼈 재형성 관련 유전자 발현량을 확인하였다.

2. 재료 및 방법

세포배양 및 VIP 농도

본 연구에서는 MC3T3-E1 preosteoblast 세포를 5% CO₂, 37°C 의 incubator에서 농도가 89% α-MEM, 10% FBS, 1% P/S 인 배지를 넣고 배양하였다. VIP(Sigma-Aldrich)의 농도는 세포를 대상으로 시행된 이전의 실험을 통해 10⁻¹⁰M ~ 10⁻⁴M 중에서 10⁻⁶M에서 ALP activity와 calcium content를 자극하는 것으로 알려진 논문을 토대로 하여 10⁻⁶M의 농도로 subculture 후 세포부착이 되었을 때, 3일 뒤 총 2번 첨가하여 6일에 걸쳐 세포를 배양하였으며, 배지는 3일에 한번 갈아주었다 [6].

Mechanical loading

Subculture 후 5일 뒤에 mechanical loading 을 위해 slide subculture 가 이루어졌다. 5일간 VIP 에 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 1Pa 의 세기로 한 시간 동안 가해졌으며, control 그룹은 이러한 loading 이 가해지지 않았다 [10]. Loading 이 끝난 뒤, 바로 mRNA 의 추출이 이루어졌다.

mRNA isolation & cDNA synthesis

Slide subculture 24시간 뒤, 슬라이드에 부착된 세포를 PBS로 세척한 뒤 total RNA를 Tri-Reagent(Sigma-Aldrich)를 사용해 세포에서 추출해 내었다. 추출해 낸 RNA를 cDNA synthesis를 위해 TaqMan® Reverse Transcription Reagents Kit(Applied Biosystems)를 사용하여 pre-cDNA sample을 Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler에 의해 합성시켰다.

Real Time RT-PCR

cDNA sample을 Taqman® Universal PCR Master Mix 및 20X primer(Applied Biosystems)를 사용하여 Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR system으로 OPG, RANKL의 유전자 발현량을 Relative Quantitation(RQ) study software를 통해 확인하였다. 또한 각 유전자의 mRNA level을 housekeeping gene(18s)의 level로 normalization을 하였다.

3. 결과 및 고찰

RANKL의 발현량 실험결과에서는 mechanical loading만 가한 그룹(V-/L+)과 VIP(10⁻⁶M)만 처리한 그룹(V+/L-)을 control로 비교했을 때, 두 그래프 모두 60%미만의 감소율을 보였다. 뿐만아니라 VIP(10⁻⁶M)처리 후 mechanical loading을 가한 그룹(V+/L+)에서는 control과 비교했을 때

70% 이상의 감소율을 보였다. (Fig. 1)

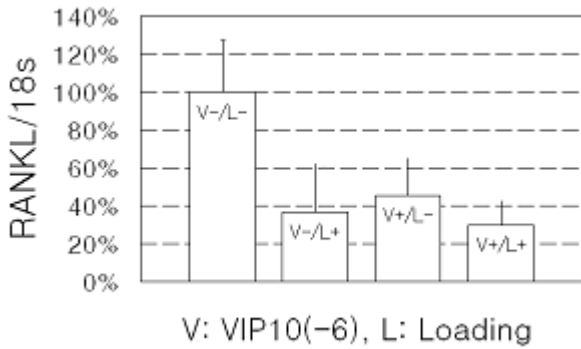


Fig. 1 RANKL gene expression of MC3T3-E1 cells treated with VIP(10⁻⁶M) and loading(1Pa). Error bars represent standard error. [N=4]

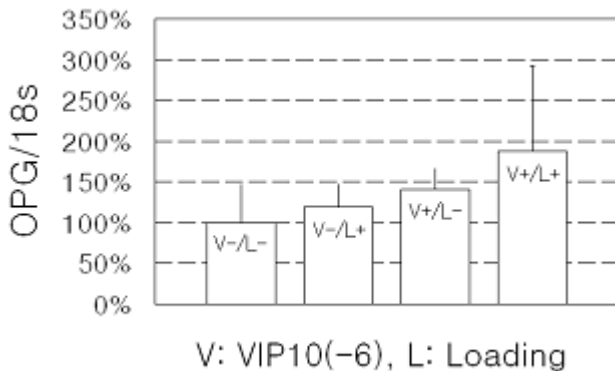


Fig. 2 OPG gene expression of MC3T3-E1 cells treated with VIP(10⁻⁶M) and loading(1Pa). Error bars represent standard error. [N=4]

OPG의 발현량 실험결과에서는 loading 및 VIP 그룹이 control과 비교했을 때 증가됨을 보였다. 그 중에서도 VIP(10⁻⁶M) 처리 후 mechanical loading을 가한 그룹(V+/L+)은 control과 비교하여 약 2배 증가하였다. (Fig. 2) 이와 더불어 RANKL 유전자 발현량을 OPG 유전자 발현량으로 나누어 그래프를 나타낸 결과 control과 비교하였을 때 RANKL의 유전자 발현량이 80% 이상 감소되었음을 확인하였다. (Fig. 3)

4. 결론

본 연구에서는 뼈 조직에 존재하는 신경전달물질의 노출과 mechanical loading의 자극이 뼈 형성세포인 osteoblast에 미치는 영향을 확인하였다. 그 결과 뼈 재형성 관련 유전자 발현조절을 통해 bone resorption이 억제됨을 알 수 있었다. 이러한 결과는 신경전달물질과 mechanical loading이 bone metabolism 조절에 관여함을 의미한다. 그러나 두 조절자가 각각 세포에 미치는 영향은 서로 다른 특이성을 가진 신호였으므로 흥미로운 부분이 아닐 수 없다. 신경전달물질은 뇌하수체에서 나오는 신경절이 뼈 조직속의 혈관과 골수 그리고 골막에 이르러 신경조직을 형성하여 뇌의 직간접적인 신호를 받아 나오는 과정의 물질이다 [1, 4, 5, 6].

이러한 신경전달물질은 화학적 신호 또는 몸의 환경적인 변화가 일어났을 때 분비된다고 추측된다. 다시 말해 뼈 재형성에 미치는 영향을 조절하기 위해 신경전달물질이 분비되어 뼈 형성을 유도함으로 보여진다. 이와 달리 mechanical loading은 운동 등의 물리적인 신호에 의한 것이다 [10, 11, 12]. 본 연구에서는 bone formation을 유도하는 mechanical loading에 신경전달물질을 함께 노출시킴으로 뼈

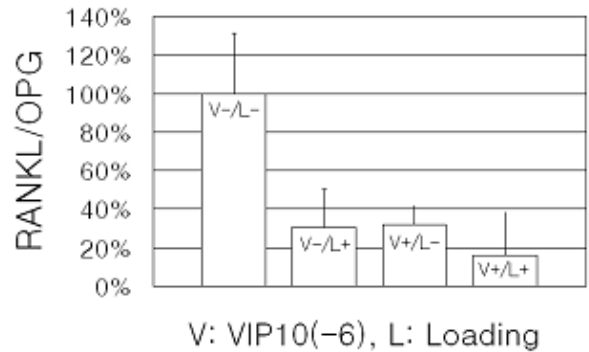


Fig. 3 RANKL/OPG gene expression of MC3T3-E1 cells treated with VIP(10⁻⁶M) and loading(1Pa). Error bars represent standard error. [N=4]

형성에 상호적인 영향을 미침을 알 수 있었다. 그러나 두 조절자가 뼈 재형성에 관여하는 과정 및 뼈 형성 관련 유전자 발현 증가에서 bone mass의 증가로 발전되어지는 과정 등의 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

참고문헌

- Lerner U. H, "Neuropeptidergic regulation of bone resorption and bone formation", J Musculoskel Neuron Interact., Vol. 2(5), pp. 440-447, 2002
- Elefteriou F, "Neuronal signaling and the regulation of bone remodeling", CMLS, Cell. Mol. Lif Sci., Vol. 62, pp. 2339-2349, 2005
- Bjorholm A, "Neuroendocrine peptides in bone", International Orthopaedics., Vol.15(14), pp. 325-329, 1991
- Lundberg P, Lerner U. H, "Expression and Regulatory Role of Receptors for Vasoactive Intestinal Peptide in Bone Cells", Microscopy Research and Techique., Vol. 58, pp. 98-103, 2002
- Bjorholm A, "Neuroendocrine peptides in bone", International Orthopaedics., Vol.15(14), pp. 325-329, 1991
- Lundberg P, Bostrom I and Mukohyama H, "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", Regulatory Peptides., Vol. 85, 1999
- Ducy P, Karsenty G, "Genetic control of cell differentiation in the skeleton", Curr Opin Cell Biol., Vol. 10(5), pp. 614-9, 1998
- Cristina S, Annalisa F and Matteo M, "Osteoclast-poor human osteopetrosis due to mutations in the gene encoding RANKL", Nature Genetics., Vol 39, pp.960 - 962, 2007
- Marie P, Halbout P, "OPG/ RANKL: role and therapeutic target in osteoporosis", Med Sci (Paris), Vol. 24(1), pp.105-10, 2008
- Kim C. H, You L and Yellowley C. E, "Ossillatory fluid flow-induced shear stress decreases osteoclastogenesis through RANKL and OPG signaling", Bone., Vol. 39, pp. 1043-1047, 2006
- Jacobs C. R, Yellowley C. E and Davis B. R, "Differential effect of steady versus oscillation flow on bone cells", Journal of Biomechanics., Vol. 31, pp. 969-976, 1998
- Kreja L, Liedert A and Hasni S, "Mechanical regulation of osteoclastic genes in human osteoblasts", BBRC., Vol. 368, pp. 582-587, 2008