

임신상태에서의 유체전단응력에 대한 뼈 세포의 반응 Response of Primary Bone Cell of Pregnant Mouse to Oscillatory Fluid Flow

이헌구¹, 박지현¹, 김병관¹, *김지현¹
H. G. Lee¹, J. H. Kwag¹, B. K. Kim¹, *C. H. Kim(chihyun@yonsei.ac.kr)¹
¹ 연세대학교 의공학과

Key words : Pregnancy, Bone resorption, Oscillatory fluid flow

1. 서론

임신은 여성에게 일어나는 하나의 생리적 현상으로서 뼈에 큰 영향을 미친다. 임신은 뼈의 강도의 감소와 밀도의 변화를 일으키는데, 이는 모체의 칼슘량이 태아에게 필요한 칼슘에 따라 변하기 때문이다.[4] 그 결과, 골연화증이나 골다공증과 같은 질병이 임신 여성의 위협적인 건강문제로 떠오르고 있다. 이러한 질병들의 원인은 주로 뼈 흡수와 뼈 형성의 불균형에서 일어난다.

뼈 밀도는 여러 요소에 의해 영향을 받는데 크게 두 가지로 나뉘보면, 호르몬이나 비타민 D 와 같이 칼슘을 조절하는 호르몬에 의해 systemic 적으로 영향을 받기도 하며, 중력과 같은 기계적인 요소에 의해 영향을 받기도 한다. 임신과 같은 생리적 변화나 나이가 들어감에 따라 호르몬의 변화에 의해 뼈 밀도의 변화가 일어나기도 하지만, 동시에 운동의 부족으로 인한 mechanical strain 의 감소 역시 뼈 밀도 감소에 큰 영향을 미치고 있다. 그러므로 뼈는 mechanical strain 과 호르몬에 의해 큰 영향을 받는다는 것을 알 수 있다. 뼈 세포가 전단응력을 받게 되면, 뼈에서 조골세포와 파골세포에 영향을 미친다. 조골세포와 파골세포의 활동은 서로 밀접하게 연관되어 있으며, 이 세포들의 활동과 반응을 다양한 유전자 발현을 통하여 알아볼 수 있다. 조골세포는 뼈 형성에 영향을 미치는 세포로서 collagen 을 통해 그 분화를 알아볼 수 있다. 파골 세포는 뼈 흡수에 관여하는 세포로서 RANKL 과 OPG 의 변화량을 통해 그 활동을 알아볼 수 있다.[7] 또한 alkaline phosphatase (ALP) 는 뼈 세포의 세포막에 존재하며, osteoblast 에서 발현되는 것으로서 뼈 형성의 주요 marker 로서 사용되어진다.

많은 연구들이 전단응력이 뼈에 미치는 영향에 대해 진행되었던 반면에, 임신상태에서 유체전단응력이 뼈에 미치는 영향에 대한 연구는 매우 드물다. 따라서 이번 연구의 목적은 임신과 물리적 신호인 전단응력과의 관계에 대해 알아보는 것이다.

2. 방법

Primary cell culture

Primary bone 세포들은 11 주 된 ICR 쥐의 대퇴부 뼈에서 추출되어 실험에 이용되었다. 우선적으로, 쥐의 다리를 분리한 뒤, 메스를 이용하여 근육들을 제거하였다. 그 뒤, 뼈의 양쪽 끝을 가위로 잘라낸 뒤, PBS가 든 주사기를 이용하여 골수를 모두 제거하였다. 뼈에 붙어있는 나머지 근육조직이나 세포들을 제거하기 위해 4mL의 collagenase solution 안에 뼈들을 함께 넣어 water bath안에서 한 시간 반 동안 보관하였다. 그 뒤, 모든 뼈들을 DMEM으로 세 번 씻은 뒤, 잘게 부수어 complete culture medium (DMEM with 10% FBS, 1% of penicillin/streptomycin, gentamycin, fungizone and ascorbate)과 함께 배양 dish의 80% 정도까지 자랄 때까지 배양 시켰다. 세포들은 37 °C, 5% CO₂ 의 환경의 인큐베이터 안에서 배양되었다. 전단응력 실험을 하기 48 시간 전에 세포들을 glass slides로 옮겨 심은 뒤, RANKL 발현을 위해 vitamin D3 를 10mL의 complete culture medium와 함께 넣어주었다.

Oscillatory fluid flow

전단응력은 자체 제작된 flow chamber와 actuator를 이용하여 1Hz와 1Pa의 peak stress의 세기로 한 시간 동안 발생시켰다.

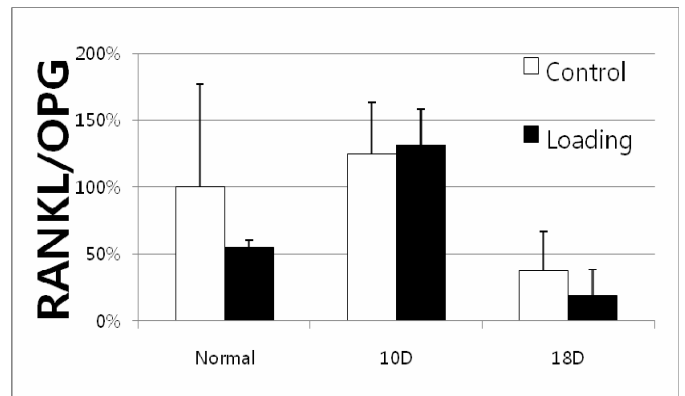
Gene expression

한 시간의 전단응력을 가한 뒤, 전단응력이 가해진 세포들과 Control 세포들에서 바로 RNA를 추출하여 real time RT-PCR을 이용하여 RANKL, OPG, 그리고 collagen의 mRNA양을 분석하였다.

ALP quantification

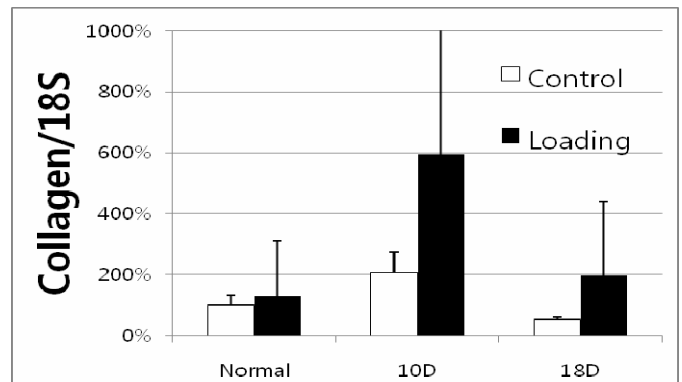
전단응력을 가한 후, 각 실험 군에서 한 샘플씩 추출하여서 ALP의 변화량을 colorimetric kinetic method를 이용하여 분석하였다.

3. 결과



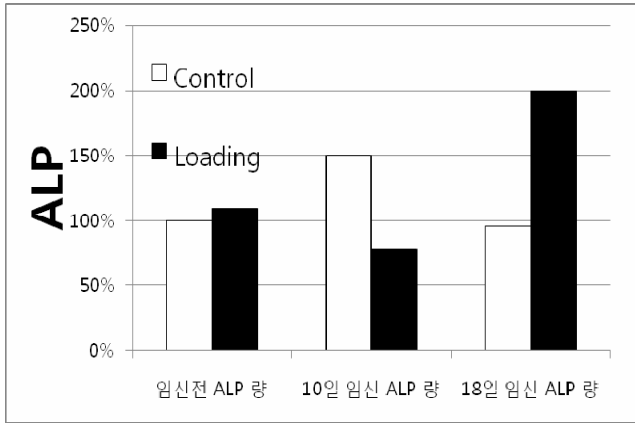
<Fig 1> RANKL/OPG 의 실험군별 변화량

뼈 흡수의 변화는 RANKL/OPG 의 변화를 통해 알 수 있었는데, Fig. 1 을 확인해 보면, Normal 쥐에 비해 임신 18 일 때 RANKL/OPG ratio 가 50% 이상 감소했다. Loading 을 가한 경우, Normal 과 임신 18 일에서는 감소량이 더욱 커짐을 알 수 있었다. 임신 10 일에서는 Loading 에 의한 RANKL/OPG ratio 의 감소가 없었다.



<Fig 2> Collagen/18S 의 실험군별 변화량

참고문헌



<Fig 3> ALP의 실험군별 변화량

뼈 형성의 측면에서 볼 때, collagen의 경우 세 실험군 모두 Loading을 가했을 때 Control에 비해 크게 증가하는 것을 볼 수 있었다. (Fig. 2)

Osteoblast의 분화를 나타내는 주요 marker인 ALP는 Fig. 3에서 볼 수 있듯이, 임신 전, 임신 18일에서는 loading을 가했을 때 증가하였고, 임신 중기인 임신 10일째에서는, 다른 실험군들과는 달리, ALP 양이 떨어지는 것을 볼 수 있었다.

4. 결론

이번 연구에서는 임신과 전단응력의 관계에 중점을 두어 전단응력이 뼈에 미치는 영향을 알아보았다. Loading에 대한 임신의 단계별 반응을 알아보기 위해 임신 전, 임신 10일 (임신 second trimester에 해당) 그리고 임신 18일 (임신 third trimester에 해당)인 쥐의 primary bone cell을 이용하여 실험을 진행하였다.

본 실험에서 임신 전 그리고 임신 18일째의 뼈 세포들에 oscillatory fluid flow를 가하면 뼈 흡수가 줄어든다는 것을 RANKL/OPG ratio를 통해 알 수 있었다. RANKL은 M-CSF와 함께 대식세포들이 파골세포로 분화할 때 필수적인 단백질이며 OPG는 RANKL과 결합하여 파골세포의 형성을 막을 뿐 아니라, 전에 존재하던 파골세포를 줄이기도 한다. 따라서 RANKL/OPG ratio가 감소한다는 것은 뼈 흡수의 감소가 일어난다는 것을 의미한다. 이 사실들을 종합해보면 임신상태에서도 전단응력은 뼈 형성에 도움이 된다는 것을 알 수 있다. 또한 뼈 형성의 측면에서 볼 때, 세 실험군 모두 oscillatory fluid flow를 가했을 때 collagen이 크게 증가하는 것을 볼 수 있었다. 이는 loading을 가하면 임신 여부를 떠나 뼈 형성이 더욱 활발해 질 수 있다는 것을 의미한다.

흥미롭게도 임신 18일 쥐의 bone cell에서는 RANKL/OPG ratio가 임신 전 쥐의 bone cell에 비해 큰 폭으로 감소하였다. 이는 임신 중에 적은 운동량으로도 뼈 흡수를 보다 효과적으로 감소시킴으로써 모체의 항상성을 유지시키기 위한 것으로 판단되어진다.

RANKL/OPG ratio 결과를 통하여 second trimester에서는 loading을 가하여도 뼈 흡수의 억제에 큰 변화가 없을 수도 있다는 사실을 확인할 수 있었다. 또한 ALP의 변화량도 second trimester에서는 loading을 가했을 때, Control 그룹에 비해 감소하였다. 이는 임신 second trimester부터 뼈 흡수가 진행된다는 기존 연구 내용과 유사한 결과이며 임신 중이더라도 second trimester와 third trimester에서 loading에 대해 뼈 세포가 다르게 반응할 수도 있다는 것을 의미한다.[4] 임신 단계별로 loading에 대한 뼈 세포의 반응을 명확하게 규명하기 위해서는 추가 연구가 필수적이다.

- Chellaiam M.A., Alvarez, U., Strauss-Schoenberger, J., Rifas, L., Rittling, S., Denhardt, D. T., and Hruska, K. A.(2000). "The molecular mechanisms of osteoclast dysfunction associated with OPN deficiency, the failure of rho stimulation of mDia1" J. Bone Miner. Res 15(Suppl.), s396
- Ducy P, Karsenty G "Two distinct osteoblast-specific cis-acting elements control expression of a mouse osteocalcin gene" Mol Cell Biol. 15(4): 1858-69, 1995.
- Ducy, P., Starbuck, M., Preimel, M., Shen, J., Pinero, G., Geoffroy, V., Amling, M., and Karsenty, G(1999). "A Cbfa1-dependent genetic pathway controls bone formation beyond embryonic development" Genes. Dec.13, 1025-1036
- Naylor, K.E., Iqbal, P., Fledelius, C. et al.(2000) "effects of pregnancy on bone density and bone turn over." J. Bone Miner. Res. 15, 129-137
- Owen TA, Aronow M, Shalhoub V, Barone LM, Wilming L, Tassinari MS, Kennedy MB et al. (1990) "Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix" J Cell Physiol. 143:420-430
- Prince, C.W., and Butler, W.T(1987) "1,23-Dihydroxyvitamin D3 regulates the biosynthesis of OPN, a bone-derived cell attachment protein, in clonal osteoblast-osteosarcoma cells" Collagen Rel. Res 7, 305-313
- Rittling, S. R., and Denhardt, D. T.(1999) "OPN function in pathology: Lessons from OPN-deficient mice" Exp, Nephrol. 7, 103-113
- Stein GS, Lian JB (1993) "Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype" Endocrinol. Rev 14:424-442
- Weiss, M. J., Rat, K., Henthorn, P. s., Lamb, b., Kadesch, T., Harris, H. et al.(1988). "structure of the human liver/bone/kidney alkaline phosphatase gene. J.Biol. Chem. 263,12002-12010
- Yao KL, Todescan R, Jr, Sodek J (1994) "Temporal changes in matrix protein synthesis and mRNA expression during mineralized tissue formation by adult rat bone marrow cells in culture." J Bone Miner. Res 9:231-240
- Zeni. S. N, Di Gregorio S. and Mautalena C. "Bone mass changes during pregnancy and lactation in the rat" Bone. Volume 25 , Issue 6 , Pages 681 - 685