

유체전단응력이 3차원 골 흡수에 미치는 영향 Effects of Fluid shear stress on 3D osteoclastic resorption

*전옥희¹, 정수호¹, 윤대성¹, #김지현¹

*O. H. Jeon¹, S. H. Jeong¹, D. S. Yoon¹, #C. H. Kim (chihyun@yonsei.ac.kr)¹

¹연세대학교 보건과학대학 의공학부

Key words : Bone resorption pit, Osteoclast, Volume, Fluid shear stress, Confocal microscopy

1. 서론

우리 몸 안의 골 조직은 파골세포에 의해 골이 흡수, 제거되고 이후 조골세포에 의해 새로운 골이 형성되는 골 재형성 과정을 거치면서 유지된다. 특히 파골세포의 골 흡수 시, 골을 구성하고 있는 기질이 분해되어 “resorption pit” 이라고 부르는 3 차원의 구멍을 형성하게 된다. 따라서 파골세포의 골 흡수 능력이 과도한 증가함에 따라 발생하는 골 재형성 과정의 불균형은 resorption pit 형성의 증가로 인한 골 손실, 골 강성의 감소, 골절 위험성의 증가시킨다. 결국 이는 골다공증과 같은 골 관련 질환을 유발하게 된다 [1]. 그러므로 골 관련 질환의 효과적인 치료를 위해서는 파골세포의 골 흡수에 따른 골에 나타나는 구조적 변화에 대한 연구가 필요하다.

유체전단응력(fluid flow-induced shear stress)은 골 흡수에 관여하는 유전자 발현 억제에 매우 효과적인 물리적 신호이다. 현재까지 진행된 파골세포와 물리적 자극의 관계에 대한 연구에 의하면, 유체전단응력은 파골세포 생성에 직접적인 영향을 주는 RANKL/OPG 의 비를 감소시킴으로써 파골세포의 생성 및 활동을 감소시킨다고 알려져 있다 [2]. 하지만 물리적 자극에 의해 조절되는 파골세포의 활성화에 따른 골 흡수량의 관계에 대한 연구는 아직 보고되지 않고 있다.

따라서 본 연구는 공초점 현미경(confocal microscopy)을 이용하여 유체전단응력에 반응한 파골세포가 이식된 상아질에 생성된 resorption pit 부피를 정량화함으로써 물리적 자극이 파골세포에 의한 골 흡수율에 미치는 영향을 3 차원적인 측면에서 살펴보았다.

2. 재료 및 방법

Isolation and culture of osteoclasts

쥐에서 채취한 대퇴골의 골강으로부터 분리한 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 3 일 동안 배양한다. 그 후, 다핵의 파골세포로 분화시키기 위해 골수세포에 100ng/ml soluble receptor activator for nuclear factor κB ligand (sRANKL)을 추가로 넣고 배지와 함께 6 일 동안 배양하였다. 파골세포만을 분리한 후 상아 시편에 심고 7 일동안 위와 같은 조건 아래 배양하였다.

Fluid flow-induced shear stress

파골세포를 상아질에 이식한 시점을 기준으로 7 일 후, 파골세포가 이식된 상아질을 anodized aluminum 슬라이드에 부착시킨 후, 자체 제작한 parallel plate flow chamber 에 장착하고 본 연구를 위해 개조한 세포자극기를 이용하여 최대 1Pa, 1Hz, 1 시간 동안 유체전단응력을 가하였다.

Pit formation assay (2D analysis)

유체전단응력을 가한 후 (Day 0) 21 일 동안 파골세포가 이식된 상아질에 TRAP(tartrate resistant acid phosphatase) 그리고 Toluidine blue 염색을 이용하여 시간이 지남에 따라 변화하는 파골세포의 수와 resorption pit 수를 이차원적으로 분석하였다.

Pit formation quantification by confocal microscopy (3D analysis)

상아 시편 표면의 pit 삼차원적 이미지화와 부피의 정량화를 위해 공초점 현미경 (LSM 5 PASCAL, Carl Zeiss)을 사용하였다. Pit 을 포함한 가로 512 개 그리고 세로 512 개의 픽셀로 나눈 전체 상아질 표면의 각 픽셀에 대한 3 차원적 높이에 대한 데이터를 얻었다. 이 후, 하나의

상아질 표면에 생성된 resorption pit 의 전체 부피를 정량화하기 위해 필요한 MATLAB 코드를 구현하였다. 이를 이용하여 각 일차별 샘플에 대한 날짜별 부피를 정량화하였다.

3. 결과 및 고찰

2D analysis of bone resorption

Day 7 의 파골세포를 2 차원적으로 관찰한 결과 유체전단응력을 가한 Flow 그룹에서는 유체전단응력을 가하지 않은 Control 그룹과 비교할 때, 파골세포의 ruffle border 가 대체로 작은 것을 관찰할 수 있었다 (Fig 1).

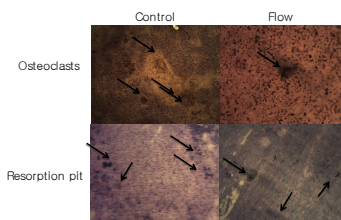


Fig. 1 Osteoclasts and resorption pits (black arrow) on dentine slices were stained with TRAP and toluidine blue, respectively, in Control and Flow group at Day 7.

3D analysis of bone resorption

공초점 현미경을 이용하여 Control 과 Flow 그룹의 resorption pit 의 3 차원적 이미지를 얻은 결과이다 (Fig 2).

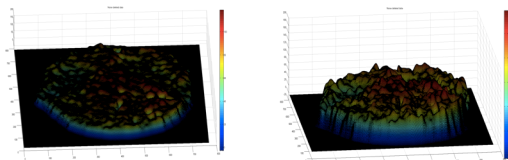


Fig. 2 3D image of dentine slices with osteoclastic resorption pits in Control (left) and Flow (right) group at Day 7.

유체전단응력 유무에 따른 전체 상아질의 부피 변화를 linear fit 으로 비교해 보면, Control 그룹의 경우 전체 상아질 부피가 줄어드는 정도가 Flow 그룹과 비교하여 더 큰 것으로 분석되었다 (Fig 3). 또한 Control 그룹의 경우 Flow 그룹과 비교하여 파골세포가 상아질에 이식한 후 초기에 (Day 0~Day 4) 전체 상아질의 부피가 $1.80e^{-008} \sim 6.35e^{-009}$ 로 다양한

것으로 보아 짧은 시간 내에 파골세포의 골 흡수 능력이 증가하여 골 양을 감소하는 것임을 알 수 있었다.

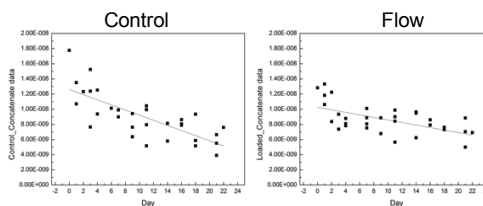


Fig. 3 Scatter plots of individual total volume of dentine slices during 22 days (Day 22) after fluid flow (Day 0). (n=3 dentine slices)

4. 결론

2 차원 분석 결과 유체전단응력은 다른 파골세포와의 fusion 을 저하시켜 파골세포의 골 흡수능을 나타내는 ruffle border 크기를 감소시키는 것을 알 수 있었다. 3 차원적 분석 결과 Flow 그룹에서 전체 상아질의 부피의 감소율이 작아지는 것은 파골세포에 의해 흡수된 Pit 의 부피의 감소에 따른 것으로 보이고 이는 유체전단응력에 따른 파골세포의 골 흡수능의 저하가 그 이유인 것으로 보인다.

이 연구는 공초점 현미경을 이용하여 물리적 자극이 골 관련 질환에서의 골의 흡수 정도에 미치는 영향을 3 차원적으로 분석하고 부피를 정량화함으로써 골 흡수를 조절할 수 있는 치료방법의 개발 방향으로 진행할 수 있는 새로운 시도로써 의미를 가진다.

후기

본 연구는 한국과학재단 기본연구지원사업의 지원에 의하여 이루어진 것임. (No. 2011-0004271)

참고문헌

1. Laurent Bozec et al., "Atomic force microscopy of collagen structure in bone and dentine revealed by osteoclastic resorption", Ultramicroscopy, 1-5, 79-89, 2005
2. Kim CH et al., "Oscillatory fluid flow-induced shear stress decreases osteoclastogenesis through RANKL and OPG signaling", Bone, 39(5), 1043-7, 2006