

세포 외 pH 변화가 인간 골수 기질세포의 증식 및 분화에 미치는 영향

울산대학교 의과대학 서울아산병원 정형외과학교실¹, 서울나누리병원²

임예현¹ · 남태석² · 김정화¹ · 이강식¹ · 이동호¹ · 윤준오¹ · 장재석^{1*}

= Abstract =

The Effects of Extracellular pH on Proliferation and Differentiation of human Bone Marrow Stem Cells

Yea Hyun Leem¹, Tae Suk Nam², Jung Hwa Kim¹, Kang Sik Lee¹,
Dong Ho Lee¹, Juno Yun¹, Jae Suk Chang^{1*}

Department of Orthopedic Surgery, Asan Medical Center, University of Ulsan, College of Medicine, Seoul, Korea¹
Nanoori Orthopedics Hospital, Seoul, Korea²

Objectives: The purpose of this study is to identify whether the change of pH affects the proliferation and the differentiation of human bone marrow stem cells (hBMSCs) and what mechanism is underlied.

Methods: To achieve objective of this study, hBMSCs were cultivated in the conditioned media adjusted to potential of hydrogen (pH) ranging from 6.4 to 8.0 using addition of hydrochloric acid (HCl) and sodium hydroxide (NaOH). The ratio of proliferation of hBMSCs according to the change of pH was measured for 24 h, 48 h, and 72 h using water-soluble tetrazolium salt (WST)-8 method. To elucidate the mechanism involved, hBMSCs was subjected to blocking extracellular signal-regulated kinases (ERK) and calcium sensing receptor (CaSR) activation. The Osteogenic-related genes and alkaline phosphatase (ALP) activity were tested under the conditioned media.

Results: The proliferation of hBMSCs was promoted under extracellular alkali conditions (pH 7.6~8.0) via CaSR/ERK pathway. On the other hand, the differentiation was inhibited/delayed via decreased ALP activity besides gene expression at pH 8.0.

Conclusion: Extracellular alkali or acidic surrounding according to pH alteration can play a crucial role in hBMSC behavior including the proliferation and the differentiation.

[Korean Journal of Bone Metabolism, 19(1): 35-46, 2012]

Key Words: Bone marrow cells, Cell differentiation, Cell proliferation, pH, Stem cells

Received: March 28, 2012, Revised: April 19, 2012, Accepted: April 30, 2012

*Address for Correspondence: Jae Suk Chang, Department of Orthopedic Surgery, Asan Medical Center, University of Ulsan, College of Medicine, 388-1 Pungnap-dong, Songpa-gu, Seoul 138-736, Korea.

Tel: +82-2-3010-3530, Fax: +82-2-488-7877, e-mail: jschang@amc.seoul.kr

**This work was supported by Korean Ministry of Health, Welfare, and Family Affairs (MHWFA grant A084697).

©This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>).

서론

혈류, 영양 공급, potential of hydrogen (pH) 변화와 같은 세포 외 미세환경은 조골세포 등을 포함한 다양한 세포에서 세포의 활성, 형태학적 변화 및 기능에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다.^{1,3}

조골세포의 대사 과정, 골절, 질환, 혹은 생체재료의 이식 등에 의한 세포 외 pH의 변화는 조골세포의 증식 및 분화 능력과 관련된 세포 내 조절 기전에 변화를 줄 수 있을 것이다. 이러한 세포 외 pH의 변화는 생체 내 산과 염기의 평형성 유지를 위해 엄격하게 조절되고 있다. 산-염기의 평형성의 붕괴는 과다한 산의 축적으로 발생하는 산증 (acidosis) 혹은 산의 소실로 인한 염기의 상대적 과다로 인해 발생하는 알칼리증 (alkalosis)를 유발할 수 있다.

산증과 관련하여 뼈 대사에 관련된 연구들을 살펴보면, 대사적 산증은 조골세포의 활성을 감소시키고, 세포 외 matrix의 콜라겐 축적 저해와 alkaline phosphatase (ALP)의 활성 및 유전자 발현을 감소시키며, 골 형성 관련 중요 전사인자인 osterix의 발현을 감소시킴으로서 뼈의 무기질화 (mineralization)를 억제 및 지연시키는 것으로 알려져 있다.^{4,5} 게다가, 지속적인 대사적 산증은 receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL)과 부갑상선 호르몬 수용체의 발현을 증가시킴으로서 잠재적으로 파골세포의 활성으로 인한 뼈 소실을 초래할 수 있을 가능성에 대해서도 언급되고 있다.^{5,6}

반면에 알칼리화 환경의 경우에는, 산증과는 달리 조골세포에 긍정적인 영향을 미치는 것으로 보고되고 있다. 알칼리화 환경에 노출된 경우, 골 형성 및 무기질화의 촉진과 함께 조골세포의 활성을 증가시키며, ALP 활성 및 콜라겐 합성 증가를 통한 골수 기질세포의 조골세포로의 분화 능력을 증진시킨 것으로 보고되고 있다.^{4,5,7}

그러나, pH 변화에 따른 세포 외 환경의 산성화와 알칼리화에 의한 골수 기질세포 및 조골세포에 대한 연구들에서 여전히 논쟁의 여지가 남아 있다. 골수 기질세포의 알칼리화 환경에의 노출에서 프로콜라겐과 osteocalcin (OCN)의 발현은 오히려 감소됨을 보였으며, 게다가 산성화 환경에서 runt-related transcription factor Runx2, OCN 및 Type 1 collagen의 발현이 현저히 증가됨을 보이는 등, 상반되는 연구 결과들이 보고되고 있다.^{5,8} 이처럼, 상반된 연구 결과들과 해석에 있어서 좀 더 명확한 설명과 이해를 위해 추가적인 기전 연구가 필요한 실정이다.

칼슘 감각수용체 (calcium sensing receptor, CaSR)는 G protein-coupled receptor (GPCR)의 일종으로서 주로 부갑상선과 신장에서 주로 발현되며, 혈액 내 Ca^{2+} 농도의 항상성을 조절하는 감각체 (sensor)로서 작용하는 것으로 밝혀졌다.^{9,10} CaSR는 Ca^{2+} 뿐만 아니라 다양한 2가 이온 (divalent ion)에 의해 활성화되며, 세포 내 G 단백질을 통한 phospholipase C (PLC), inositol 1,4,5-triphosphate (IP3) 및 mitogen activated protein kinases (MAPKs) 등을 포함한 다양한 하위 신호전달체계를 활성화시켜 세포 반응을 조절한다.^{9,11} 이러한 CaSR의 발현은 부갑상선과 신장뿐만 아니라 MC3T3-E1, SAOS-2, UMR-106 및 MG-62 cell과 같은 osteoblast-like cell line에서도 확인되었으며, mouse, rat, 뿐만 아니라 bovine의 뼈의 조골세포에서도 발현을 확인하였다.¹²⁻¹⁶

CaSR와 다양한 영역에서 상동성을 가지는 N-methyl-D-aspartate (NMDA) 수용체의 pH 변화에 따른 활성의 변화를 기초로, 산성과 알칼리화 환경에서의 CaSR 활성의 변화 관찰을 통해 세포 외 pH 변화에 대한 감각수용체로서 CaSR가 기능하는 것을 보였다.^{5,17}

이러한 선행연구들을 기초로 본 연구에서는 pH 변화에 따른 골수 기질세포의 증식과 조골세포로의 분화에 어떠한 영향을 미치며, 이러한 영향이 CaSR와 관련이 있는지를 알아보았다.

연구대상 및 방법

1. 사람 골수 기질세포 (human bone marrow stem cell, hBMSC) 배양

본 연구에 사용한 사람 골수 기질세포는 초대배양세포를 이용하였다. 인공 고관절 전치환술 시 대퇴 삽입물을 넣기 위하여 대퇴 골수관을 처리할 때 헤파린을 문힌 50 mL 주사기로 대퇴 골수액을 10~20 mL 채취하였다. 채취한 골수액을 50 mL conical tube에 담아 바로 세포 배양실로 옮겨 무균 조작 하에 alpha-minimum essential medium (α -MEM; Invitrogen, Grand Island, NY, USA) 배양액으로 희석하고, Ficoll Hypaque (Axis-Shield PoC AS, Oslo, Norway) 용액 위에 1:3으로 살며시 올려놓았다. 400 g에서 30분간 원심 분리하여 중간층의 단핵세포들을 모아 Hanks' balanced salt solution (HBSS) (Invitrogen, Grand Island, NY, USA) 용액으로 2회 세척한 후, 10% fetal bovine serum (FBS) (Invitrogen, Grand Island, NY, USA)가 포함된 α -MEM 배양액 10 mL로

잘 풀어 100 mM dish에 분주하고 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 세포들이 균일하게 단층으로 자라 배양용기를 채우면 0.25% trypsin/1mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)를 사용하여 계대배양을 실시하였으며, 실험은 2~3번 계대배양된 세포에서 시행하였다 (n = 8). 본 연구는 2011년 서울아산병원 임상연구심의위원회 (AMC institutional review board [IRB])의 승인을 받아 국제표준화추진회의 (International Conference on Harmonization, ICH) 및 의약품 임상시험관리기준 (Korea Good Clinical Practice, KGCP)에 준수하여 실시하였다.

2. pH 조건별 배양액 준비

α -MEM 배양액을 1 N hydrochloric acid (HCl) 용액과 1 N sodium hydroxide (NaOH) 용액을 이용하여 각각 pH 6.4, 6.7, 7.0, 7.3, 7.6, 8.0의 다양한 조건의 pH 배양액을 준비하였다. 이 때 pH의 변화를 최소화하기 위하여 HEPES 완충액 (Invitrogen, Grand Island, NY, U.S.A.)을 10 mM이 되게 첨가하였으며, 매일 pH를 조절한 새로운 배양액으로 교환하였다 (Fig. 1).

3. 세포 증식 측정

골수 기질세포를 96 well 배양용기에 5×10^3 (cells/well) 개씩 분주하였다. 24시간 배양 후 각 pH 조건별 배양액 (pH 6.4, 6.7, 7.0, 7.3, 7.6, 8.0)을 처리하고 24, 48, 72시간 후 세포 증식에 미치는 영향을 알아보았다. 또한 알칼리 조건 (pH 7.6, 8.0)에서의 세포 증식에 extracellular signal-regulated kinases (ERK) 활성화와 칼슘 감각수용체 (CaSR)가 관여하는지를 확인하기 위하여 각각의 저해제인 U0126 (Calbiochem, Darmstadt, Germany) 10 μ M과 Calhex231 (Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA, USA) 10 μ M을 알칼리 배양액 처리 전 2시간, 5시간 동안 전처리한 후 세포 증식을 측정하였다. 살아있는 세포의 미토콘드리아 탈수소 효소에 의해 water-soluble tetrazolium salt (WST)-8 (2[2-methoxy-4-nitrophenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-[2,4-disulphophenyl]-2H-tetrazolium, monosodium salt)이 formazan dye로 잘리면 색발생반응이 일어나는 cell counting kit (CCK)-8 (Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan) 측정법으로 관찰하였다. 각 시약 처리가 끝난 후 10 μ L의 CCK-8 용액을 첨가하고, 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 3시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝나면 microtiter plate (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) reader (SPECTRAMax 340 PC; Molecular Devices, Palo Alto,

CA, USA)로 450 nM의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

4. ALP 염색

골수 기질세포를 지름 13 mM의 cover slip이 담겨 있는 24 well 배양용기에 1×10^4 (cells/well)개씩 분주하였다. 2일 동안 10% FBS가 첨가된 α -MEM 배양액으로 2일간 배양한 후, 골분화 유도인자 (5 mM β -glycerophosphate [Sigma, St. Louis, MO, USA], 50 μ g/mL ascorbic acid [Merck, Darmstadt, FR, Germany], 10 nM dexamethasone [Sigma, St. Louis, MO, USA])가 첨가된 α -MEM 배양액 (2% FBS)으로 pH를 달리하여 (pH 6.4, 6.7, 7.0, 7.3, 7.6, 8.0) 교체하였다. 7일, 14일간 배양한 후, 세포가 자라고 있는 cover slip을 꺼내어 HBSS로 2회 세척하였다. Sodium nitrate 용액 50 μ L를 fast red violet (FRV)-ALP (Sigma, St. Louis, MO, USA) 용액 50 μ L와 혼합하여 diazonium salt 용액을 만들어 2분간 실온에서 보관한 후, 2.25 mL 증류수에 희석하고 naphthol AS-BI (Sigma, St. Louis, MO, USA) 용액 50 μ L를 추가하여 alkaline-dye 혼합물을 만들었다. HBSS로 세척한 세포들을 citrate-acetone-formaldehyde (Sigma, St. Louis, MO, USA) 고정액으로 30초간 고정한 후, 45초간 증류수로 씻은 다음, alkaline-dye 혼합물을 첨가하고, 37°C에서 20분간 반응시켰다. 2분간 증류수로 세척하고 건조시켰다.

5. ALP 활성 측정

골수 기질세포를 각각 4×10^4 (cells/well)개씩 12 well 배양용기에 분주하였다. 2일간 배양 후 골분화 유도인자가 첨가된 α -MEM 배양액 (2% FBS)으로 pH를 달리하여 (pH 6.4, 6.7, 7.3, 7.6, 8.0) 교체하였다. 7일, 14일간 배양한 후 ALP 활성을 측정하여 조골세포로의 분화를 비교 관찰하였다. 시약 처리가 끝난 세포를 HBSS로 2회 세척한 후, 각 well 당 500 μ L의 0.2% Triton X-100 (Sigma, St. Louis, MO, USA) 용액을 첨가하고 scraper로 cell을 잘 긁어 주었다. 세포 용해물을 E-tube에 옮겨 담고 얼음에 꽂아두고 초음파 분쇄기 (sonicator)로 30초간 세포를 파쇄하였다. 10 μ L의 세포 용해물과 90 μ L의 차갑게 냉장한 AMP buffer (H₂O에 2-amino-2-methyl-1-propanol 및 Sigma-104 phosphate substrate, 1 M magnesium chloride [MgCl₂] 혼합) (Sigma, St. Louis, MO, USA)를 혼합하여 37°C에서 30분간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 100 μ L의 0.5 N NaOH로 반응을 중지시키고, ELISA reader 기기를 이용하여 405 nM에서 흡광도를 측정하였다. ALP 작용의 반응 생성물인 para-nitrophenol을 표

준시료로 사용하여 표준곡선을 작성하고, 이 곡선에서 얻은 함수를 이용하여 각 샘플의 ALP 활성을 산출하였으며, 이를 총 단백질량으로 다시 보정하여 단위 단백질량당 ALP가 작용하여 생긴 생성물 양으로 표시하였다.

6. 역전사 중합효소 연쇄반응 (reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)

골세포 전사인자인 Runx2, 분화 초기 표지자인 ALP, 분화 후기 표지자인 OCN과 CaSR의 messenger ribonucleic acid (mRNA)의 발현을 역전사 중합효소 연쇄반응을 이용하여 관찰하였다.

1) Total RNA 분리

배양된 골수 기질세포를 60 mM dish 배양용기에 5×10^5 (cells/well)의 농도로 분주하고 24시간 후 각 pH 조건별 배양액 (pH 6.4, 6.7, 7.0, 7.3, 7.6, 8.0)으로 배양하였다. 48시간 후 TRIzol (Invitrogen, Grand Island, NY, USA)을 이용하여 RNA를 추출하고 Runx2, ALP, OCN에 대한 역전사 중합효소 연쇄반응을 실시하여 분화 관련 유전자의 발현 차이를 관찰하였다. Total RNA 분리는 배지에서 균일하게 단층으로 자란 세포를 HBSS로 씻어주고 TRIzol 1 mL을 넣고 scraper로 긁어 떼어 낸 후, 1.5 mL tube에 담아 세포들이 완전히 용해되도록 상온에서 5분간 방치해 두었다. 0.2 mL의 chloroform (Sigma, St. Louis, MO, USA)을 첨가하고 흔들어서 섞어준 후 상온에서 5분간 방치한 후에 4℃, 12,000 g에서 15분간 원심 분리하여 층을 분리하였다. 상층액을 취하

여 새 tube에 옮겨 담아 0.5 mL isopropyl alcohol (Sigma, St. Louis, MO, USA)을 넣고 혼합하여 -20℃에서 하루 동안 보관하였다. 그 후 이를 12,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 침전물을 얻었다. 여기에 75% ethanol을 1 mL 넣고 다시 원심 분리하여 RNA 내의 염을 제거하였다. 상온에서 ethanol을 완전히 제거하고 nuclease-free water 30 µL에 녹였다.

2) First strand complementary deoxyribonucleic acid (cDNA) 합성

First strand cDNA는 SuperScript III first strand synthesis kit (Invitrogen, Grand Island, NY, USA)를 이용하여 합성하였다. 먼저, 멸균한 0.5 mL tube에 2 µg의 total RNA, 300 ng의 random hexamer와 10 mM deoxynucleotide triphosphates (dNTPs) 1 µL를 넣은 후, 65℃에서 5분간 가열하고, 얼음에 1분간 꽂아두어 변성시켰다. 여기에 10 × RT Buffer, 25 mM MgCl₂, 0.1 M dithiothreitol (DTT), RNaseOUT, SuperScript III reverse transcriptase를 각각 2 µL, 4 µL, 2 µL, 1 µL, 1 µL씩 넣고, 25℃에서 10분간 반응시킨 후, 50℃에서 50분간 반응하여 상보적인 DNA의 합성을 유도하였다. 85℃에서 5분간 가열하여 반응을 멈춘 후, RNase H 1 µL를 넣고 37℃에서 20분간 반응하여 남아 있는 RNA를 제거하였다.

3) PCR

총 20 µL의 부피에 cDNA 1 µL, 10 × PCR buffer (+MgCl₂) 2 µL, 1 mM dNTPs 1 µL, 10 pmol primer 각 1 µL와 Taq DNA Polymerase (Takara Korea Biomedical Inc.) 0.2

Table 1. Primers used for reverse transcription polymerase chain reaction

Gene	Primer Sequence
GAPDH	Forward: CACCATCTTCCAGGAGCGAG
	Reverse: GGATTCTAATACGACTCACTATAGGCTCACGCCACAGTTTCCCGGA
Runx2	Forward: CTCCTACCTACCTACCTG
	Reverse: TCAATATGGTCGCCAAACAGATTC
ALP	Forward: AAGAGCTTCAAACCGAGATACAAG
	Reverse: CCGAGGTTGGCCCCGAT
OCN	Forward: CCCTCACACTCCTCGCCCTAT
	Reverse: TCAGCCAACCTCGTCACAGTCC
CaSR	Forward: GAGGTGGAGGACCCTGAAGA
	Reverse: GCATTCTCCCTAGCCCCAGTC

GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; Runx2, runt-related transcription factor 2; ALP, alkaline phosphatase; OCN, osteocalcin; CaSR, calcium sensing receptor

μL (1 unit)를 0.5 mL tube에 담고 혼합한 후, thermal cycler (Applied Biosystem 9700)에 넣고, 각 유전자에 대하여 PCR을 시행하였다. 각 primer는 Bioneer사에 의뢰 제작하였다 (Table 1). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)의 PCR 과정은 94℃에서 5분간 초기 변성시킨 후, 94℃ 1분의 변성반응, 59℃ 1분의 결합반응, 72℃ 1분 30초간의 연장반응의 순환 과정을 30회 실시하였다. Runx2, ALP, OCN와 CaSR에 대한 PCR 조건도 primer와 결합반응 온도만 달리하여 같은 순환 과정을 33회 실시하였다. 생성된 PCR 반응산물은 1.5% agarose gel에서 전기영동 후 ethidium bromide로 염색하여 Gel Doc 1000 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 영상분석기로 분석하였다. 각 유전자의 band 밀도를 측정하고 이를 house-keeping gene인 GAPDH의 band 밀도 값으로 나누어 보정하였다.

7. Western blot analysis

대표적 세포 증식 관련 신호전달체계인 MAPK에 속하는 ERK의 활성화, pH에 반응한다고 알려진 CaSR의 관련성을 확인하기 위하여 ERK와 CaSR에 대한 항체를 이용하여 western blot을 시행하였다.

2일간 배양한 골수 기질세포에 pH 7.6, pH 8.0의 배양액을 0, 15, 30, 60분간 처리하고 ERK를, 1, 4, 8, 24시간 동안 처리하고 CaSR을 다음과 같은 방법으로 관찰하였다. 배양액을 제거하고 세포를 차가운 HBSS 용액으로 2번 수세한 후 lysis buffer (50 mM tris-chlorine (Cl), pH 7.5, 150 mM sodium chloride (NaCl), 1% NP-40, 0.5% deoxycholic acid, 0.1% Sodium dodecylsulfate (SDS) 1mM sodium vanadate, 25 mM sodium fluoride (NaF) 1 μg/mL protease inhibitors) (Sigma, St. Louis, MO, USA)로 세포를 용해시키고, scraper로 긁어내어 얼음에 꽂아 20분간 반응시켰다. 13,000 rpm에서 15분간 원심 분리한 후 상층액을 취하고 Bradford assay법으로 단백질을 정량하고, 80℃에서 10분간 가열하여 변성시켰다. 각각의 단백질을 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)로 전기영동하여 사이즈 별로 분리한 후, polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Millipore, Bedford, MA, USA)으로 이동시키고, phospho-ERK (1:2,000, Cell Signaling Tech, Beverly, MA, USA), total ERK (1:1,000, Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA, USA)와 CaSR (1:600, Alomone labs, Jerusalem, Israel)에 대한 항체용액에 담가 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 뒤, membrane을 tris-buffered saline-tween (TBST) 용액으로 10분씩 6회 수세한

후, 각각 horseradish peroxidase (HRP)가 표지된 anti-mouse immunoglobulin G (IgG), anti-rabbit IgG (1:2,000, Jackson Immuno Research, West Grove, PA, USA) 용액에 담가 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 그 다음, membrane을 TBST 용액으로 10분씩 6회 수세한 후, enhance chemiluminescence reagent (Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA, USA)에 담귀 2분간 반응시키고, 즉시 X-ray 필름에 노출하여 현상하였다. 또한 ERK의 활성을 억제시키기 위하여, pH 7.6과 pH 8.0군에서 저해제로 알려진 U0126 (Calbiochem, Darmstadt, Germany)을 알칼리 배양액 처리 전 10 μM, 20 μM의 농도로 2시간 동안 전처리하고 phospho-ERK에 대한 항체를 이용하여 위와 같은 방법으로 western blot을 시행하여 실제로 ERK의 활성이 저해되는지 확인하였다.

8. 통계분석

통계분석은 일원배치 분산분석 (One-way analysis of variance, One-way ANOVA)을 시행하였으며, 사후 검정 방법 (Post Hoc test)인 S-N-K 다중 비교 (multiple comparison)를 통해 두 군 간의 차이를 분석하였다 (SPSS version 12.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA). *P* 값이 0.05 이하인 경우 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

결 과

1. 세포 외 pH 변화에 따른 골수 기질세포의 증식의 변화

먼저, pH 변화에 따른 골수 기질세포의 증식을 확인하기 위해, 배양액에 HCl과 NaOH 처리를 통해 pH 조건별 배양액 (pH 6.4~8.0)에서 24 h, 48 h, 72 h 동안 골수 기질세포를 배양하여 세포 증식을 확인하였다.

Figure 1에서 보는 바와 같이, 생리학적 기준인 pH 7.3에 비해 24 h, 48 h, 72 h 모든 시간대에서 pH 7.6과 pH 8.0의 조건에서 통계적으로 유의하게 높은 증식률을 보였다. 반면에 pH 7.3 보다 상대적으로 낮은 조건 (pH 6.4, 6.7, 7.0)에서는 현저하게 낮은 증식률을 보였다. 이러한 결과가 의미하는 것은 상대적으로 알칼리화 조건에서는 골수 기질세포의 증식을 촉진시키며, 반면에 상대적으로 산성화 조건에서는 골수 기질세포의 증식을 지연 혹은 억제시킴을 나타낸다.

2. 알칼리화에 따른 골수 기질세포의 CaSR mRNA 및 단백질 발현의 변화

앞서 결과에서 알칼리 환경이 골수 기질세포의 증식을 촉진

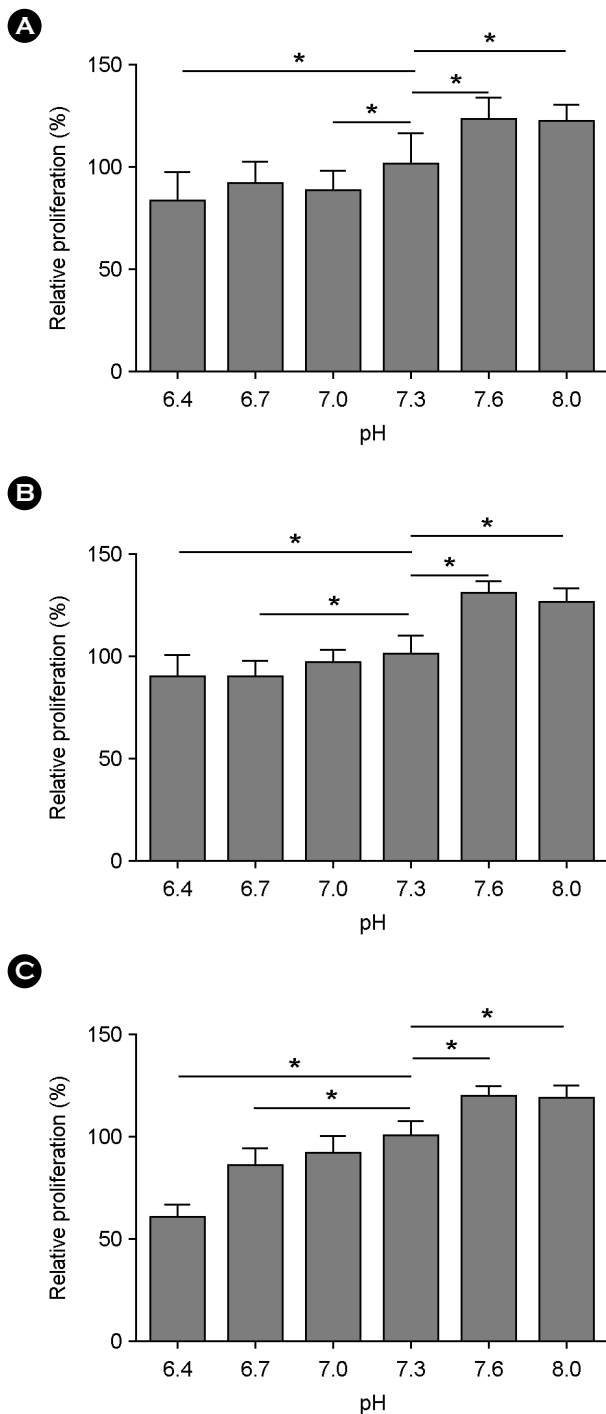


Fig. 1. The proliferation of human bone marrow stem cells (hBMSCs) according to medium potential of hydrogen in time-course dependent manner. (A) The proliferation of hBMSCs according to medium pH for 24 h incubation. (B) The proliferation of hBMSCs according to medium pH for 48 h incubation. (C) The proliferation of hBMSCs according to medium pH for 72 h incubation. The data are presented as means \pm standard error of mean (SEM). * denotes a difference at $P < 0.05$.

진시킴을 기초로 CaSR와의 관련성을 알아보기 위해 알칼리 환경 (pH 7.6, pH 8.0)에서의 골수 기질세포의 CaSR 발현의 변화를 확인하였다.

Figure 2에서 보는 바와 같이, pH 7.3과 pH 7.6에서의 CaSR mRNA 발현은 4 h에서 8 h까지 지속적으로 증가되고, 24 h 이후에는 발현을 보이지 않았다. 반면, pH 8.0의 경우에는 24 h에서 발현이 유도됨을 보였다. CaSR 단백질 발현 역시 mRNA 발현 양상과 일치함을 보였다. pH 7.3에 비해 pH 7.6과 pH 8.0에서의 발현 증가는 통계적으로 유의한 차이를 보였다. 이러한 결과가 나타내는 것은 알칼리화 환경에서 골수 기질세포의 CaSR 발현은 증가되며, 알칼리화 정도에 따른 CaSR 발현 유도는 시간적 차이가 있음을 시사한다.

3. 알칼리화에 따른 CaSR 의존적 골수 기질세포의 증식

다음으로, 알칼리화에 따른 CaSR의 활성 변화와 골수 기질세포의 증식의 직접적인 관련성을 알아보기 위해, CaSR 활성 저해제인 Calhex231을 처리하여 알칼리화에 따른 골수 기질세포의 증식의 변화를 확인하였다.

Figure 3에서 보는 바와 같이, pH 7.6과 pH 8.0에서 골수 기질세포의 증식은 pH 7.3에 비해 현저히 높음을 보였다. 그러나 CaSR 활성의 억제에 pH 변화에 관계없이 골수 기질세포의 증식은 pH 7.3에서의 증식률과 유사한 수준으로 낮아졌다. 이러한 결과는 세포 외 알칼리화 환경은 골수 기질세포의 증식을 유도하며, 이러한 증식은 CaSR 활성 변화에 직접적으로 영향을 받는 것으로 보인다.

4. 알칼리화에 따른 CaSR/ERK 신호전달체계를 통한 골수 기질세포의 증식

CaSR의 여러 하위 신호전달체계 중에서 ERK 신호전달체계의 관련성을 확인하기 위해, ERK 활성 저해제인 U0126을 처리하여 알칼리화에 따른 골수 기질세포의 증식의 변화를 확인하였다. Figure 4에서 보는 바와 같이, CaSR 활성 억제제의 결과와 마찬가지로, pH 7.6과 pH 8.0에서 골수 기질세포의 증식은 pH 7.3에 비해 현저히 높게 나타났으며, 이러한 증가는 U0126 처리에 의해 현저히 낮아져 pH 7.3 수준으로 낮아졌다. 이러한 결과로 비추어 볼 때, 다른 하위 신호전달체계들과의 관련성을 확인하지는 않았지만, CaSR의 여러 하위 신호전달체계 중에서 알칼리화와 관련된 골수 기질세포의 증식은 부분적으로 ERK 활성을 통해서 이루어짐을 알 수 있다.

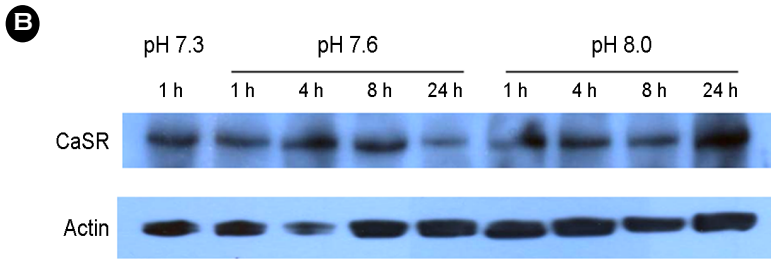
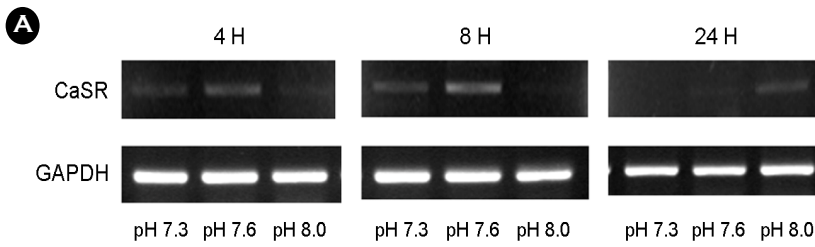


Fig. 2. The expression of calcium-sensing receptor (CaSR) messenger ribonucleic acid (mRNA) and protein according to medium potential of hydrogen (pH) in time-course dependent manner. (A) The expression levels of CaSR mRNA according to medium pH in time-course dependent manner. (B) The expression levels of CaSR protein according to medium pH in time-course dependent manner. (GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)

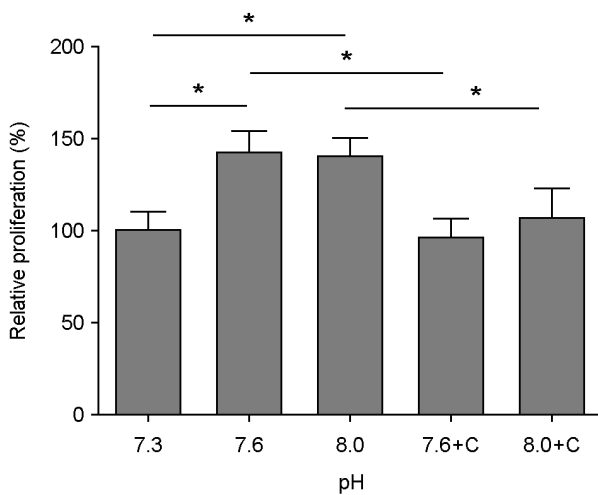


Fig. 3. The suppression of proliferation in human bone marrow stem cells (hBMSCs) exposed by calcium-sensing receptor (CaSR) inhibitor. The data are presented as means \pm standard error of mean (SEM). * denotes a difference at $P < 0.05$.

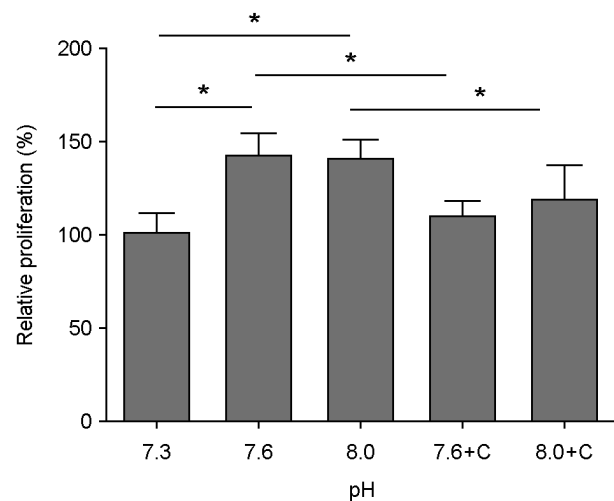


Fig. 4. The suppression of proliferation in human bone marrow stem cells (hBMSCs) exposed by extracellular signal-regulated kinases (ERK) inhibitor. The data are presented as means \pm standard error of mean (SEM). * denotes a difference at $P < 0.05$.

5. 세포 외 pH 변화에 따른 골수 기질세포의 뼈 형성 관련 유전자 (osteogenic-related genes)의 발현 변화

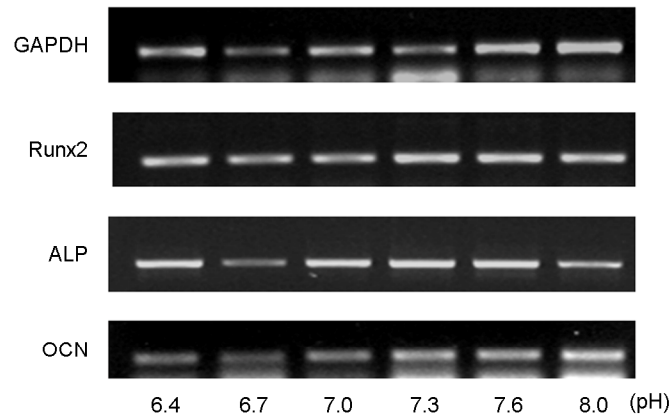
세포 외 환경의 산성화는 골수 기질세포의 증식을 억제시키는 반면, 알칼리화는 증식을 촉진시킴을 확인한 후, 이러한 pH 변화가 골수 기질세포의 조골세포로의 분화에는 어떠한 영향을 미치는지를 확인하기 위해, 먼저 중요한 뼈 형성 관련 유전자인 Runx2, ALP, OCN의 발현 변화를 알아보았다.

Figure 5에서 보는 바와 같이, 모든 pH 범위 (pH 6.4~8.0)에서 각 분화 단계의 marker인 Runx2 발현 변화는 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았으나, ALP의 경우는 pH 7.3에 비해 pH 7.6~8.0의 환경에서는 현저한 감소를 보였으며, OCN의 mRNA 발현 변화는 pH 7.3에 비해 pH 8.0에서 유의한 감소를 보였다.

6. 세포 외 pH 변화에 따른 ALP 활성의 변화

앞서 결과에서 pH 변화에 따른 골 형성 표현형 marker들

A



B

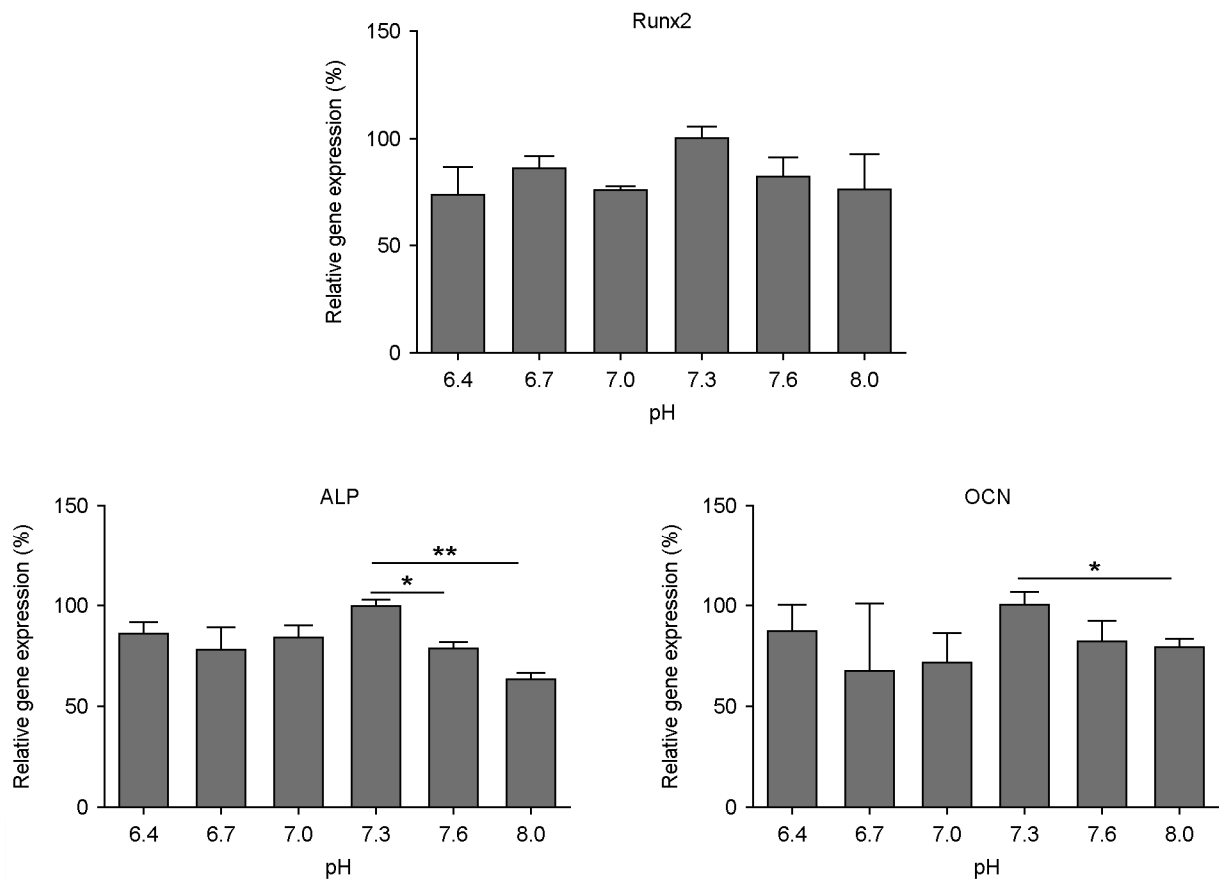


Fig. 5. The expression of osteogenic-related molecules according to medium potential of hydrogen (pH). (A) The expression levels of runt-related transcription factor Runx2, alkaline phosphatase (ALP), and osteocalcin (OCN) messenger ribonucleic acid (mRNA) according to medium pH. (B) Quantitative analysis of Runx2, ALP, and OCN mRNA according to medium pH (Y-axis is a normalized level). The data are presented as means \pm standard error of mean (SEM). * and ** denotes a difference at $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively. (GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)

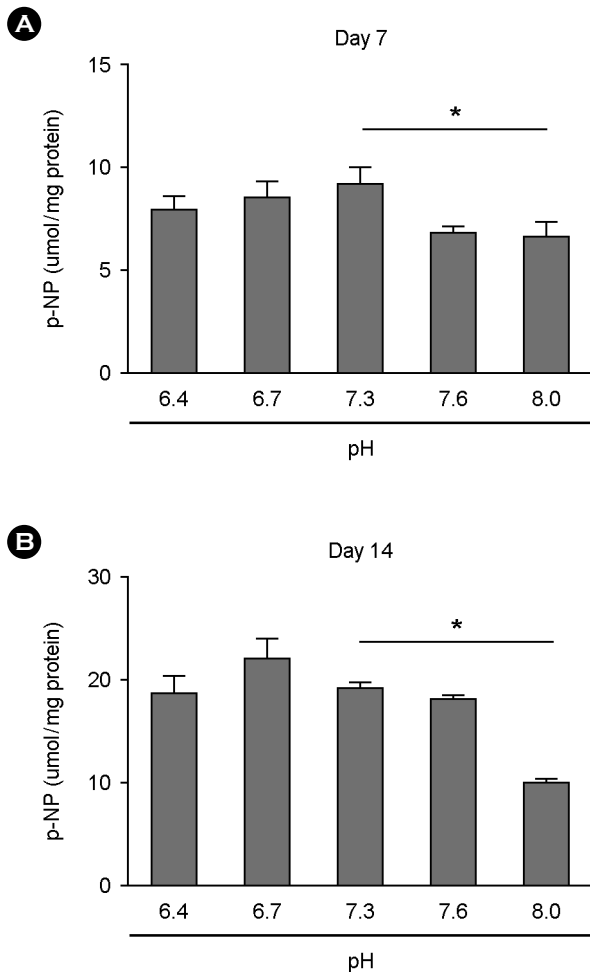


Fig. 6. The activities of alkaline phosphatase (ALP) according to medium potential of hydrogen (pH). (A) Quantitative analysis of ALP activities according to medium pH for 7 days incubation. (B) Quantitative analysis of ALP activities according to medium pH for 14 days incubation (Y-axis is a normalized level). The data are presented as means \pm standard error of mean (SEM). * denotes a difference at $P < 0.05$.

의 유전자 발현 변화에 차이가 없음을 확인한 후 좀 더 구체적인 기능적 변화를 확인하기 위해 골 형성 조건을 유도한 후 7일과 14일에 ALP 활성을 검사해 보았다.

Figure 6에서 보는 바와 같이, pH 7.3의 조건을 기준으로 다른 모든 pH 조건에서는 차이를 보이지 않았으나, pH 8.0에서는 통계적으로 유의하게 감소한 ALP 활성을 보였다. 이러한 결과는 유전자 발현과는 관계없이 알칼리화 조건은 조골세포로의 분화를 억제 혹은 지연시킴을 나타낸다.

고 찰

본 연구는 여러 다양한 세포 외 환경 중에서도 pH 변화에 따른 골수 기질세포의 증식과 조골세포로의 분화에 어떠한 영향을 미치는 지를 알아보았다. 이러한 목적을 달성하기 위해 생체 내 정상적인 pH 조건인 7.3을 기준으로 전·후의 pH 범위를 6.4에서 8.0의 조건하에서 골수 기질세포의 증식률과 조골세포로의 분화에 중요한 인자들인 Runx2, ALP 및 OCN 유전자 발현 변화 및 ALP 활성을 측정하였다.

먼저, 정상적인 생체 내 조건인 pH 7.3을 기준으로 24 h, 48 h 및 72 h 모두에서 산성화 조건 (pH 6.4~7.0)은 통계적으로 유의하게 낮은 증식률을 보였으며, 반면 알칼리화 조건 (pH 7.6~8.0)은 현저한 증가를 보였다. 이러한 결과가 의미하는 것은 조골세포의 전구세포인 골수 기질세포의 증식은 산성화 조건에서는 증식률을 감소시키는 반면, 알칼리화 조건에서 더 높은 증식률을 보이는 것을 나타낸다. 산성화 조건인 낮은 pH 범위에서 인간 골수 기질세포의 낮은 ALP 활성 및 collagen 합성 등 골 형성 표현형이 현저히 감소한 결과들을 보인 선행연구⁵에서 미루어 볼 때, 조골세포의 전구세포인 골수 기질세포의 상대적인 감소로 인해 낮은 골 형성 표현형을 보인 것으로 생각되며, 이러한 결과가 산성화 조건에서 낮은 증식률을 보이는 결과에 대한 부분적이고 간접적인 설명이 가능할 것으로 생각된다.

다음으로, pH 변화에 따른 골수 기질세포의 증식률의 차이와 관련된 기전을 알아보기 위해, 세포 내 신호전달체계의 변화를 확인하였다. 칼슘 (Ca^{2+})은 뼈 형성의 주요 구성 요소이면서 세포 내 신호전달에도 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다. 또한, 몇몇 연구들에서 세포 외 Ca^{2+} 농도의 증가는 mouse osteoblastic cell line인 MT3T3-E1에서 CaSR의 조절에 의해 DNA 합성을 증가시키는 것으로 보고되고 있다.^{18,19} CaSR은 다양한 세포에 존재하며 다양한 2가 이온 결합에 의해, 세포 내 여러 신호전달체계의 활성을 통해 세포의 기능에 영향을 주는 GPCR로 알려져 있다.⁹⁻¹⁶ 특히, 세포 외 pH 변화에 의해 CaSR의 활성 변화와 H^{+} 변화에 따른 GPCRs의 활성의 변화가 보고되고 있다.^{17,20} 이러한 선행연구들을 기초로 pH 변화에 따른 증식률과 CaSR의 기능과의 관련성을 알아보았다. CaSR mRNA와 단백질의 발현은 골수 기질세포에서의 발현이 확인되었으며, 발현 양상은 알칼리화 조건에 따라 약간의 차이는 있으나 정상적인 pH 조건인 7.3에 비해 발현이 유도됨을 보였다. 이러한 결과를

바탕으로 알칼리화 조건에서의 CaSR의 직접적인 관계를 알아보기 위해, CaSR 활성의 억제제를 통한 골수 기질세포의 증식을 확인한 결과, 알칼리화 조건에서의 골수 기질세포의 증식 증가는 CaSR 활성 억제에 의해 증식이 현저히 감소함을 보였다. 이러한 결과는 선행연구에서 외부 pH 증가에 따른 CaSR 활성의 증가와 일치하는 결과를 보였다.²⁰ 세포 외 pH 변화는 CaSR의 극성 (charge)의 변화를 초래하고 이로 인해 세포 내 CaSR agonists의 친화성 (affinity)을 변화시켜 CaSR의 활성이 증가된 것으로 생각된다. 세포 외 pH 변화는 CaSR의 산성 및 염기성 아미노산 잔기의 극성 변화를 통한 CaSR agonist의 sensor로서 작용할 수 있다는 선행연구 결과가 이러한 해석을 뒷받침해줄 수 있다.¹⁷ 즉, 골수 기질세포에서 세포 외 알칼리화는 CaSR 활성을 증가시키고, 이러한 증가를 통해 세포 내 Ca^{2+} 농도의 증가에 의한 유사분열 (mitosis)을 촉진시킴으로써 골수 기질세포의 증식을 높인 것으로 생각된다.

좀 더 구체적인 설명을 위해, MAPKs 신호전달체계와의 관련성을 알아보았다. ERK, p38, c-JUN N-terminal kinase (JNK)가 MAPK family에 속하며, 여러 내·외부적 자극에 대해 세포의 반응을 조절하는 것으로 알려져 있다.²¹⁻²³ 특히, MC3T3-E1 세포뿐만 아니라 MG-62 세포 등의 osteoblastic cell line에서 CaSR agonist에 의한 MAPKs 신호전달체계에서 증가된 활성을 보였다. 이러한 기초를 근거로 MAPKs의 억제제 (inhibitor)들의 처리 후 골수 기질세포의 증식을 확인한 결과, 알칼리화 조건 (pH 7.6~8.0)에서의 골수 기질세포의 증가된 증식률이 보인 반면, ERK 억제제인 U0126 (10 μ M)의 처리에 의해 현저한 골수 기질세포의 증식이 감소되는 것을 보였다. 이러한 결과들로 미루어 볼 때, CaSR의 여러 다양한 하위 신호전달체계 중에서도 알칼리화에 의한 골수 기질세포의 증식은 ERK 1/2 신호전달이 부분적으로 하나의 요인으로 작용하는 것으로 생각된다. 골수 기질세포의 pH 변화에 따른 세포 증식은 산성화 조건 (pH 6.4~7.0)에서는 지연 혹은 억제됨을 알 수 있었고, 알칼리화 조건 (pH 7.6~8.0)에서는 CaSR/ERK 신호전달을 통해 유사분열을 촉진시킴으로써 세포 증식이 증가됨을 알 수 있었다.

마지막으로, 골수 기질세포의 조골세포로의 분화에 pH 변화가 어떠한 영향을 미치는 지를 알아본 결과, 골 형성 표현형의 markers 중 Runx2 mRNA 발현은 본 실험에서 적용된 어떠한 pH 변화에도 차이를 보이지 않았다. 반면, ALP의 경우에는 pH 7.3에 비해 pH 7.6~8.0에서 현저한 감소를 보였으며, OCN의 mRNA 발현은 pH 8.0에서만 현저한 감소를

보였다. 또한, mRNA 발현의 변화와 부합되게, 세포 외 무기질화의 안정화에 중요한 인자 중의 하나인 ALP의 활성은 pH 8.0에서 pH 7.3에 비해 통계적으로 유의한 감소를 보였다. 이것이 의미하는 것은 알칼리화 환경은 골 형성 표현형의 중요 인자들의 유전자 발현에는 크게 영향을 주지 않는 반면, 초기 골 형성 유도 marker이자 세포 외 무기질화 환경의 안정화에 있어서 중요한 역할을 담당하는 ALP의 활성은 감소될 수 있음을 시사한다. 즉, 알칼리화 환경은 조골세포로의 분화 과정에서 유전자 발현 변화 보다는 기존에 존재하는 골 형성 유도인자들의 활성을 감소시킴으로써 분화가 지연 혹은 억제되는 것으로 생각된다.

이상의 내용으로 종합해 볼 때, 세포 외 pH 변화에 따른 골수 기질세포의 증식 및 분화는 산성화 조건의 경우, 증식을 지연 혹은 억제하는 반면, 알칼리화 조건의 경우에는 증식을 증가시킴을 보였으며, 다른 pH 조건에서는 분화에 어떠한 영향도 미치지 않는 반면, 높은 알칼리화 (pH 8.0)에서는 오히려 분화가 억제됨을 보였다.

결론

본 연구는 인간 골수 기질세포를 이용하여 pH 변화에 따른 증식과 조골세포로의 분화에 어떠한 영향을 미치는 지를 알아보았다. 정상적인 생체 내 pH 범위에 속하는 pH 7.3을 기준으로 산성화 상태 (pH 6.4~7.0)에서는 증식률이 유의하게 감소함을 보였고, 반면 알칼리화 상태 (pH 7.6~8.0)에서는 현저한 증가를 보였다. 이러한 현상에 대한 관련 기전은 CaSR/ERK 신호전달체계를 통한 유사분열의 촉진으로 이해된다. 조골세포로의 분화에 대해서는, 골 형성 관련 유전자들 (Runx2, ALP, OCN)의 발현은 본 연구의 실험 설계에서는 유의적인 차이를 보이지 않은 반면, ALP 활성에 있어서는 상대적으로 높은 알칼리화 (pH 8.0)에서 정상적인 pH 범위 내에 비해 현저한 감소를 보였다. 본 연구들의 내용을 종합해 볼 때, 조골세포로의 전구세포인 골수 기질세포의 증식에는 알칼리화 환경이 유의한 효과를 제공하며, 반면 분화단계에서는 오히려 역효과를 보여, 골수 기질세포의 세포 외 환경은 증식과 분화의 단계에서 적절한 환경 조성이 매우 중요한 요소임을 시사한다.

참 고 문 헌

1. Kaila K, Panula P, Karhunen T, Heinonen E. Fall in intracellular pH mediated by GABAA receptors in cultured rat astrocytes. *Neurosci Lett* 1991;126:9-12.
2. Ramp WK, Lenz LG, Kaysinger KK. Medium pH modulates matrix, mineral, and energy metabolism in cultured chick bones and osteoblast-like cells. *Bone Miner* 1994;24:59-73.
3. Reeve J, Arlot M, Wootton R, et al. Skeletal blood flow, iliac histomorphometry, and strontium kinetics in osteoporosis: a relationship between blood flow and corrected apposition rate. *J Clin Endocrinol Metab* 1988;66:1124-31.
4. Arnett TR. Extracellular pH regulates bone cell function. *J Nutr* 2008;138:415S-8S.
5. Kohn DH, Sarmadi M, Helman JJ, Krebsbach PH. Effects of pH on human bone marrow stromal cells in vitro: implications for tissue engineering of bone. *J Biomed Mater Res* 2002; 60:292-9.
6. Frick KK, Bushinsky DA. Metabolic acidosis stimulates RANKL RNA expression in bone through a cyclo-oxygenase-dependent mechanism. *J Bone Miner Res* 2003;18:1317-25.
7. Brandao-Burch A, Utting JC, Orriss IR, Arnett TR. Acidosis inhibits bone formation by osteoblasts in vitro by preventing mineralization. *Calcif Tissue Int* 2005;77:167-74.
8. Disthabanchong S, Radinahamed P, Stitchantrakul W, Hongeng S, Rajatanavin R. Chronic metabolic acidosis alters osteoblast differentiation from human mesenchymal stem cells. *Kidney Int* 2007;71:201-9.
9. Brown EM, Gamba G, Riccardi D, et al. Cloning and characterization of an extracellular Ca(2+)-sensing receptor from bovine parathyroid. *Nature* 1993;366:575-80.
10. Brown EM, MacLeod RJ. Extracellular calcium sensing and extracellular calcium signaling. *Physiol Rev* 2001;81:239-97.
11. Maiti A, Hait NC, Beckman MJ. Extracellular calcium-sensing receptor activation induces vitamin D receptor levels in proximal kidney HK-2G cells by a mechanism that requires phosphorylation of p38alpha MAPK. *J Biol Chem* 2008;283: 175-83.
12. Yamaguchi T, Chattopadhyay N, Kifor O, Butters RR, Jr., Sugimoto T, Brown EM. Mouse osteoblastic cell line (MC3T3-E1) expresses extracellular calcium (Ca2+o)-sensing receptor and its agonists stimulate chemotaxis and proliferation of MC3T3-E1 cells. *J Bone Miner Res* 1998;13:1530-8.
13. Yamaguchi T, Kifor O, Chattopadhyay N, Brown EM. Expression of extracellular calcium (Ca2+o)-sensing receptor in the clonal osteoblast-like cell lines, UMR-106 and SAOS-2. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;243:753-7.
14. Yamaguchi T, Chattopadhyay N, Kifor O, et al. Expression of extracellular calcium-sensing receptor in human osteoblastic MG-63 cell line. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001;280:C382 -93.
15. Chang W, Tu C, Chen TH, et al. Expression and signal transduction of calcium-sensing receptors in cartilage and bone. *Endocrinology* 1999;140:5883-93.
16. Traynelis SF, Hartley M, Heinemann SF. Control of proton sensitivity of the NMDA receptor by RNA splicing and polyamines. *Science* 1995;268:873-6.
17. Quinn SJ, Bai M, Brown EM. pH Sensing by the calcium-sensing receptor. *J Biol Chem* 2004;279:37241-9.
18. Sugimoto T, Kanatani M, Kano J, et al. Effects of high calcium concentration on the functions and interactions of osteoblastic cells and monocytes and on the formation of osteoclast-like cells. *J Bone Miner Res* 1993;8:1445-52.
19. Quarles LD, Hartle JE, 2nd, Siddhanti SR, Guo R, Hinson TK. A distinct cation-sensing mechanism in MC3T3-E1 osteoblasts functionally related to the calcium receptor. *J Bone Miner Res* 1997;12:393-402.
20. Ludwig MG, Vanek M, Guerini D, et al. Proton-sensing G-protein-coupled receptors. *Nature* 2003;425:93-8.
21. Nishida E, Gotoh Y. The MAP kinase cascade is essential for diverse signal transduction pathways. *Trends Biochem Sci* 1993;18:128-31.
22. Marshall CJ. MAP kinase kinase kinase, MAP kinase kinase and MAP kinase. *Curr Opin Genet Dev* 1994;4:82-9.
23. Davis RJ. MAPKs: new JNK expands the group. *Trends Biochem Sci* 1994;19:470-3.

=국문초록=

연구목적: 본 연구는 세포 외 pH 변화에 따른 골수 기질세포의 증식 및 분화에 어떠한 영향을 미치는 지와 그와 관련된 기전을 알아보았다.

연구방법: 본 연구의 가설을 검증하기 위해 HCl과 NaOH를 이용하여 배양액의 pH를 6.4에서 8.0의 다양한 범위를 유도하여 골수 기질세포의 증식 및 분화를 확인하였다. 또한, 관련 기전을 알아보기 위해 CaSR 및 ERK의 활성 억제를 통해 골수 기질세포의 증식을 관찰하였다. 또한, 분화능과 관련하여 골 형성 관련 유전자인 Runx2, ALP, 및 OCN의 mRNA 발현 양상과 ALP 활성을 관찰하였다.

결 과: 골수 기질세포의 증식은 pH 7.6~8.0에서 통계적으로 유의하게 증가함을 보였으며, 이러한 변화는 CaSR/ERK pathway와 관련이 있음을 보였다. 반면에, pH 7.6 혹은 8.0에서는 감소된 ALP 및 OCN mRNA 발현 감소와 ALP 활성의 감소가 관찰되었다.

결 론: 골수 기질세포의 증식 및 분화 능력은 다양한 요인에 의해 변화될 수 있는데, 그 중 세포 외 pH 변화에 따른 알칼리 및 산성 환경도 하나의 중요한 요인으로 작용될 수 있음을 시사한다.

중심단어: 골수세포, 세포분화, 세포증식, 폐하, 줄기세포