

혈관 플라그 형성 저해단백질에 대한 아연의 기능*

신미영 · 권인숙†

안동대학교 생활과학대학 식품영양학과

Role of zinc for calcification inhibitor protein in vascular smooth muscle cell plaque formation*

Shin, Mee-Young · Kwun, In-Sook†

Department of Food science and Nutrition, Andong National University, Andong 36729, Korea

ABSTRACT

Purpose: Zinc, a biomineral present within and outside cells, manages various cellular mechanisms. In this study, we examined whether zinc was involved in vascular smooth muscle cell (VSMC) calcification via regulation of calcification inhibitor protein, osteopontin (OPN). **Methods:** Rat aorta cell line (A7r5 cells) and primary vascular smooth muscle cells (pVSMCs) from rat aorta were cultured with phosphate (1–5 mM) and zinc (0–15 μ M) as appropriate, along with osteoblasts (MC3T3–E1) as control. The cells were then stained for Ca and P deposition for calcification examination as well as osteopontin expression as calcification inhibitor protein was measured. **Results:** Both Ca and phosphate deposition increased as the addition of phosphate increased. In the same manner, the expression of osteopontin was upregulated as the addition of phosphate increased in both cell types. When zinc was added, Ca and P deposition decreased in VSMCs, while it increased in osteoblasts. **Conclusion:** The results imply that zinc may prevent VSMC calcification by stimulating calcification inhibitor protein OPN synthesis in VSMCs.

KEY WORDS: vascular smooth muscle cells, calcification, osteopontin, osteoblasts

서 론

아연은 우리 신체내에 존재하는 바이오미네랄로서 세포의 안팎에 존재하면서 수많은 세포 작용에 관여하고 있다. 신체가 필요한 단백질 합성 과정에서 DNA로부터 mRNA가 만들어지는 전사과정에 참여하는 전사인자(transcription factor)는 세포가 필요로 하는 수많은 단백질을 만드는데 관여한다. 특히 전사인자 단백질 중 구성 성분으로 아연을 함유하며 모양이 손가락 같다 하여 zinc-finger transcription factor라고 불리는 전사인자가 있는데 이 전사인자들 구성에서 아연은 중요한 역할을 한다.^{1,2}

생체 아연은 뼈의 형성을 도와준다는 연구 보고들이 있으며,^{3,4} 그 형성을 도우는 메커니즘은 경조직인 뼈의 칼슘화를 촉진시킨다는 연구결과들이 보고되고 있다.^{5,6} 보통 경조직인 뼈 조직의 칼슘화는 조골세포의 세포외 기질

(extracellular matrix)에 Ca과 P이 쌓여서 인산화합물의 일종인 딱딱한 하이드록시아파타이트(hydroxyapatite, HA)를 형성하게 되며, 이 HA 성분이 딱딱한 뼈의 조직을 형성하게 되는 것이다. 그러나 혈관 같은 연조직에서는 Ca이나 P의 침착 같은 칼슘화는 혈관의 플라그를 형성하게 되고 혈관 경화증을 유발하게 되므로, 연조직에서는 오히려 이러한 비정상적인 칼슘화가 생기면 이 칼슘화를 저지하기 위한 단백질들이 세포에서 만들어져서 세포 밖으로 분비하게 되며, 이러한 단백질들이 딱딱해진 칼슘화를 용해하는 작용을 하면서 정상적인 연조직을 유지하고자 하는 기전이 있다.⁷

단백질 osteopontin은 산성을 띠는 인단백질로서 딱딱해진 부분을 용해시키는 작용이 있다.^{8,9} 즉, 뼈조직에서는 조직의 빠른 재생을 위해서인데, 연조직에서는 경화를 방지하기 위해서이다. 따라서 보통 연조직에서는 경화를

Received: February 1, 2016 / Revised: February 16, 2016 / Accepted: February 17, 2016

*This work was supported by 2012 ANU Industry-Academic Research Grant from Andong National University.

†To whom correspondence should be addressed.

tel: +82-54-820-5917, e-mail: iskwn@andong.ac.kr

© 2016 The Korean Nutrition Society

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/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

방지하고자 할 때는 osteopontin의 분비가 높아지는 것이다.⁹ 본 연구는 아연이 혈관평활근세포에 칼슘화가 생길 때 osteopontin과 관련성이 있는지에 대해서 알아보고자 하였다.

연구방법

세포배양

혈관평활근세포 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 모델로는 두 가지 형태의 모델을 사용하였는데 쥐의 대동맥 내벽으로부터 채취한 primary vascular smooth muscle cells (pVSMCs)과 세포 라인에 속하는 A7r5 cells (rat aortic vascular smooth muscle cell line, ATCC, CRL-1444)을 사용하였다. pVSMCs 채취에 대한 내용은 기 보고되어 있는 방법에 근거하였다.⁵ 칼슘화 현상을 보기 위한 대조군 세포모델로서는 생쥐 유래의 조골세포 라인 (MC3T3-E1 cell line, ATCC, CRL-2593)을 사용하였다. 평활근세포에서 칼슘화에 따른 Ca 및 P 침착 정도와 osteopontin 단백질의 발현을 보기 위해서 세포에 인을 공급하면서 배양하였는데 (beta-glycerophosphate 형태, 0~5 mM P, 12일 동안), 이는 인이 칼슘과 결합하면서 hydroxyapatite를 만들기 위한 핵심물질이기 때문이다. 보

통 조골세포는 인의 농도를 10 mM 이상 처리하는 경우가 있다. 또 다른 실험에서는 인의 공급과 더불어 아연을 수준 별로 처리하면서 배양하였다 (혈관평활근세포에서 아연 수준 0~15 μ M, 12일 동안).

칼슘화 (Ca 및 P 침착 정도)

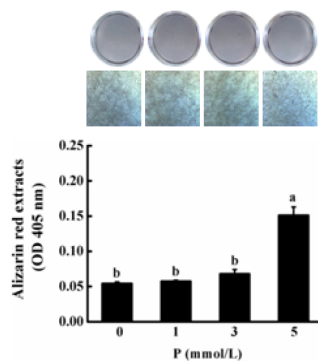
혈관평활근 세포와 조골세포에서 칼슘화의 정도를 나타내는 Ca 및 P의 침착을 이들 이온들과 결합하는 염색법을 이용하여 측정하였다. Alizarin 염색법은 이 붉은 염색 시약이 세포내외 기질의 Ca 이온과 결합하는 성격을 이용하여 염색하였다. Alizarin 염색액은 정량평가를 위해서 10 (w/v) cetylpyridinium chloride (CPC) : 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0)로 용해해서 562 nm에서 분광분석하였다. von Kossa 염색법은 시약 silver nitrate이 인산 (PO_4) 음이온과 결합하는 성격을 이용하여 P의 침착을 측정할 수 있으며, silver nitrate과 인산 음이온의 결합 부분이 짙은 회색으로 염색이 된다.⁵

Western blot

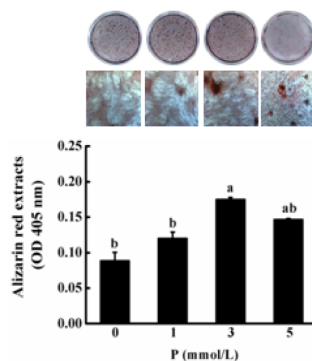
세포내의 단백질 osteopontin의 발현은 Western blot을 이용하여 측정하였다. 세포라인 A7r5 (혈관평활근세포) 및 MC3T3-E1 (조골세포) 세포들을 파쇄하여 단백질을 채취

A. Ca deposits

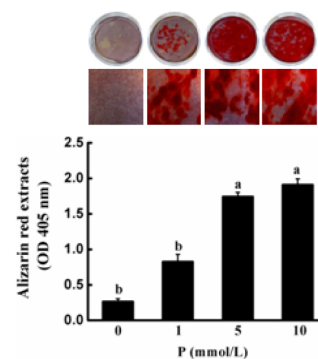
a. pVSMCs



b. A7r5 cells

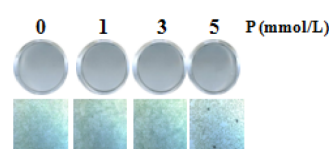


c. MC3T3-E1 cells

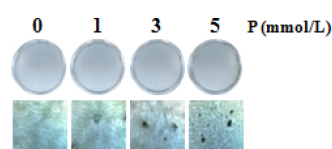


B. P deposits

a. pVSMCs



b. A7r5 cells



c. MC3T3-E1 cells

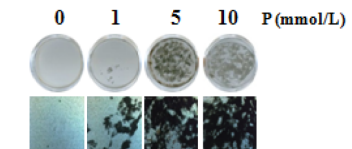


Fig. 1. The addition of phosphate induced Ca (A) and P (B) deposition in vascular smooth muscle cells (pVSMCs and A7r5 cells) as well as in osteoblasts (MC3T3-E1 cells). Cells were cultured with the designated phosphate levels for 12 days and stained for Ca (A, in red) and P (B, in black) deposition.

한 뒤, osteopontin 단백질을 1차 및 2차 항체 결합 방식으로 측정하였다 (osteopontin 1차 항체; OPN (Akm2A1)-SC 21742, Santa Cruz, Europe).

결과 및 고찰

혈관평활근세포에 인을 첨가하면 세포칼슘화가 일어남.

Fig. 1은 혈관평활근 세포 (pVSMC 및 A7r5) 및 조골세포 (MC3T3-E1)에 인을 첨가해서 12일 동안 배양 한 후, 세포기질에 침착 된 Ca 및 P의 양을 염색한 결과이다. Ca 침착은 인의 첨가가 증가할수록 두 세포 모델 모두에서 증가하였는데, 세포외기질에 침착된 염색 정도 (붉은색 부분) 뿐만 아니라, 칼슘과 결합된 Alizarin red 시약을 녹여 내서 측정한 정량적 결과 (그래프 부분)에서도 같은 양상을 보였다 (Fig. 1A). 세포외기질 칼슘화를 유발하는데 핵심 물질이 되는 무기인산 (inorganic phosphate)의 침착도 두 세포 모델 모두에서 첨가 인의 농도와 비례해서 나타났다 (Fig. 1B). 즉 인의 첨가는 혈관평활근세포 및 조골세포 모두에서 칼슘의 침착을 유발했으며, 첨가된 인 농도가 높아질수록 칼슘 침착도 많아졌다.

이러한 결과는 정상적인 경조직에서 뿐만 아니라, 연조직인 혈관평활근세포 칼슘화도 인이 있으면 일어날 수 있음을 제시한다. 즉 혈관평활근세포와 조골세포 모두 칼슘화에는 인이 필요하다는 뜻이다.¹⁰ 이는 조직 경화증은 칼슘화이며, 이 때 가장 잘 만들어지는 물질이 인화합물인 하이드록시아파타이트 (hydroxyapatite, HA)인데, 이 HA는 무기인산만 공급되면 거기에 Ca이 붙어서 형성될 수 있을

을 의미한다.¹¹ 따라서 연조직에서도 인이 주어지면 경화증이 유발될 수 있음을 의미한다.

세포칼슘화 저해단백질인 osteopontin의 발현은 혈관평활근세포에서 인의 첨가가 높아질수록 더 많이 발현되었음.

Fig. 2는 혈관평활근세포 (A7r5)와 조골세포 (MC3T3-E1)에 인을 첨가하고, 이에 따른 세포 osteopontin 단백질의 발현 정도를 제시한 그림이다. 두 세포 유형 모두에서 인의 첨가가 증가할수록 (칼슘화 현상이 심해질수록) 이를 저지

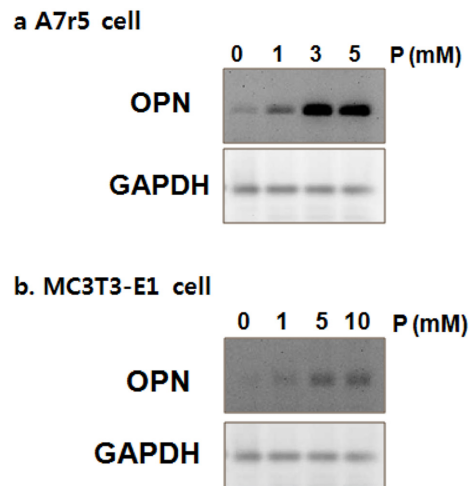


Fig. 2. Calcification inhibitor protein, osteopontin, upregulated as the addition of P in created in both VSMCs (A, A7r5) and osteoblasts (B, MC3T3-E1). Cells were cultured with the designated P level for 12 days.

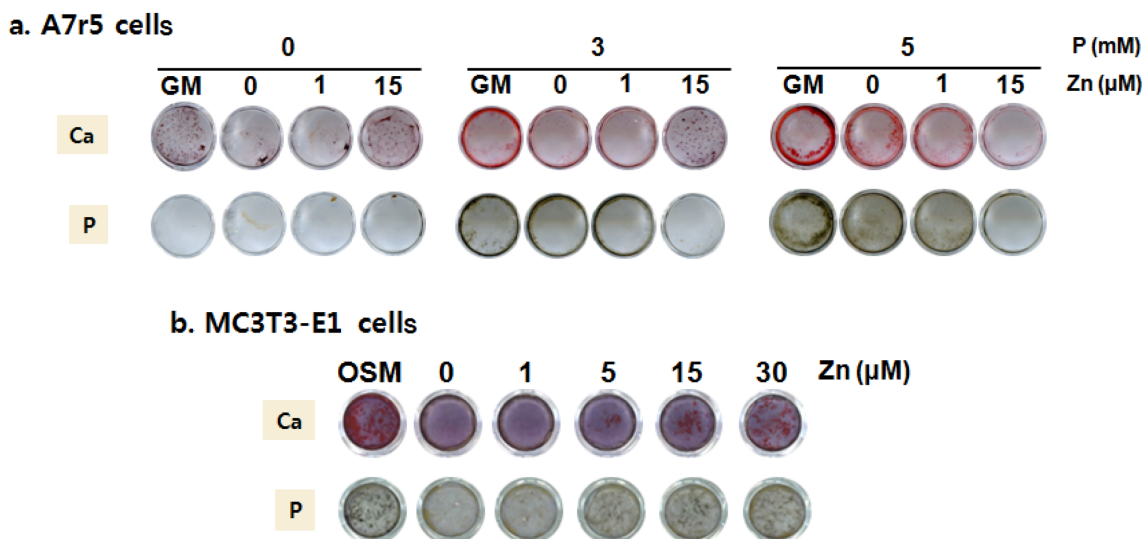


Fig. 3. The addition of zinc prevented Ca and P accumulation in vascular smooth muscle cell A7r5 under calcified condition (A, at 3 and 5 mM P addition), while zinc stimulated Ca and P accumulation in osteoblasts. Cells were cultured with the designated Zn and phosphate level for 12 days.

하고자 하는 osteopontin 단백질의 발현이 증가되었다. 이러한 결과는 위 Fig. 1A의 칼슘화 결과와 일치하는 것으로, 혈관평활근세포 (연조직)이든 조골세포 (경조직)이든 칼슘화가 진행되면 osteopontin 단백질의 발현 및 합성도 증가될 수 있음을 의미한다.^{8,9} 이 결과의 의미는 연조직 혈관평활근세포에서 칼슘화가 진행되면 (P의 첨가수준이 높아지면), 칼슘화를 저지하기 위해서 osteopontin이 많이 분비되지만, 뼈같은 경조직에서 칼슘화가 진행되면 osteopontin은 새로운 뼈 형성 촉진을 위해서, 기 형성된 단단한 칼슘화 부분을 용해시키기 위해서 발현됨을 유추할 수 있다.

아연은 혈관평활근세포에서 인 첨가에 의한 칼슘화를 저해하였음.

혈관평활근세포에 칼슘화가 생길 수 있는 상황에서 (3, 5 mM P 첨가) 아연을 첨가하였더니, 아연 농도가 높아질수록 Ca 및 P의 침착이 낮아졌다 (Fig. 3A). 이는 아연이 혈관 칼슘화를 지연시킬 수 있음을 의미한다. 조골세포에서 아연은 정상적인 경조직세포 칼슘화를 도와주는 것으로 나타났다 (Fig 3B).

위 칼슘화 저해단백질인 osteopontin 발현 결과와 아연 처리한 뒤의 Ca 및 P의 침착을 나타낸 결과에서 유추해 보면, 연조직인 혈관에서 아연이 부족하면 칼슘화가 유발될 수 있고 (Fig. 3) 이러한 아연 부족에 의한 칼슘화는 칼슘화 저해단백질인 osteopontin이 적게 만들어져서 생기는 현상일 수 있음을 암시하고 있다 (Fig. 2). 따라서 아연은 경조직 뼈와 연조직인 혈관에서의 칼슘화에 차별적으로 조절하고 있음을 암시한다.

References

1. Cousins RJ. A role of zinc in the regulation of gene expression. *Proc Nutr Soc* 1998; 57(2): 307-311.
2. MacDonald RS. The role of zinc in growth and cell proliferation. *J Nutr* 2000; 130(5S Suppl): 1500S-1508S.
3. Ovesen J, Møller-Madsen B, Thomsen JS, Danscher G, Mosekilde L. The positive effects of zinc on skeletal strength in growing rats. *Bone* 2001; 29(6): 565-570.
4. Lowe NM, Lowe NM, Fraser WD, Jackson MJ. Is there a potential therapeutic value of copper and zinc for osteoporosis? *Proc Nutr Soc* 2002; 61(2): 181-185.
5. Kwon IS, Cho YE, Lomeda RA, Shin HI, Choi JY, Kang YH, Beattie JH. Zinc deficiency suppresses matrix mineralization and retards osteogenesis transiently with catch-up possibly through Runx 2 modulation. *Bone* 2010; 46(3): 732-741.
6. Alcantara EH, Lomeda RA, Feldmann J, Nixon GF, Beattie JH, Kwon IS. Zinc deprivation inhibits extracellular matrix calcification through decreased synthesis of matrix proteins in osteoblasts. *Mol Nutr Food Res* 2011; 55(10): 1552-1560.
7. Wu M, Rementer C, Giachelli CM. Vascular calcification: an update on mechanisms and challenges in treatment. *Calcif Tissue Int* 2013; 93(4): 365-373.
8. Steitz SA, Speer MY, McKee MD, Liaw L, Almeida M, Yang H, Giachelli CM. Regulation of cardiovascular calcification. *Am J Pathol* 2002; 161(6): 2035-2046.
9. Wesson JA, Johnson RJ, Mazzali M, Beshensky AM, Stietz S, Giachelli C, Liaw L, Alpers CE, Couser WG, Kleinman JG, Hughes J. Osteopontin is a critical inhibitor of calcium oxalate crystal formation and retention in renal tubules. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14(1): 139-147.
10. Speer MY, Giachelli CM. Regulation of cardiovascular calcification. *Cardiovasc Pathol* 2004; 13(2): 63-70.
11. Villa-Bellosta R, Wang X, Millán JL, Dubyak GR, O'Neill WC. Extracellular pyrophosphate metabolism and calcification in vascular smooth muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011; 301(1): H61-H68.