

골절 치유 과정에서 HIF-1 α 와 VEGF의 발현

김정재 · 손현철* · 장재석 · 김정화 · 이강식 · 김석원*

울산대학교 의과대학 정형외과학교실, 충북대학교 의과대학 정형외과학교실*

HIF-1 α and VEGF Expression in Fracture Healing

Jung-Jae Kim, M.D., Hyun-Chul Shon, M.D.*, Jae-Suk Chang, M.D.,
Jung-Hwa Kim, Kang-Sik Lee, and Seok-Won Kim, M.D.*

Department of Orthopedic Surgery, Asan Medical Center, Ulsan University College of Medicine, Seoul,
Department of Orthopedic Surgery, Chungbuk National University College of Medicine*, Cheongju, Korea

Purpose: To elucidate the relation between fracture healing and angiogenesis, we checked expression of Hypoxia-inducible factor (HIF) and Vascular endothelial growth factor (VEGF) in hypoxic cell cultures and the callus from a rat femur fracture model.

Materials and Methods: Human osteoblasts, chondrocytes, and rat ST2 cells were cultured in DME/F12 media with 10% FBS. Hypoxic DME/F12 media ($PO_2 < 60$ mmHg) was generated by bubbling with 95% N_2 and 5% CO_2 and added to cells. After 2, 6, and 24 hours, RNA and proteins were collected for reverse transcription - polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot. In addition, immunocytochemistry and siRNA treatment for HIF-1 α were performed. Next, femurs from 9-week SD rats were fractured after fixation with needles. The rats were sacrificed at post-fracture day (PFD) 3, 5, 7, 10, 14, 21 and calluses were collected for RT-PCR and Western blot.

Results: HIF-1 α and HIF-2 α expression were not increased in RT-PCR but protein levels were increased. VEGF expression in RT-PCR was increased. Treatment with siRNA directed towards HIF inhibited VEGF expression. In the rat fracture callus, HIF-1 α and VEGF expression peaked between PFD 5 and 7 and decreased after PFD 10. In contrast to cell culture, mRNA expression of HIF-1 α was increased at PFD 7.

Conclusion: HIF-1 α and VEGF peaked early in fracture healing. With expression decreasing as O_2 tension increased. Further study is needed to identify other factors affecting chondrogenic differentiation.

Key Words: HIF-1 α , VEGF, Fracture healing

서 론

외상으로 골절이 발생하는 경우에는 골절 부위의 혈관이 손상되어 출혈이 발생하고, 혈액 공급의 차단이 발생하여 산소 분압은 매우 낮은 상태가 된다. 정상 피질골의 산소 분압은 약 100 mmHg인데 반해, 골절이 발생하고 난 후 3일째에는 골절 부위의 산소 분압은 8 mmHg 밖에 되지 않으며 서서히 골절 치유가 진행되면서 증가하기 시

작해 골절 후 6주째에는 46 mmHg 정도로 증가한다고 한다³⁾. 골절이 치유되는 과정에는 초기 염증 반응 부위의 변두리에서 연골을 거치지 않고 직접 골이 형성되는 막내 골화(intramembranous ossification)와 저산소 분압인 가골의 중심 부위에서는 연골을 거쳐 골로 바뀌는 연골내 골화(endochondral ossification)가 모두 일어나며, 간엽 줄기세포가 중요한 역할을 한다. 이와 함께 신생 혈관이

통신저자 : 손 현 철

충북 청주시 흥덕구 개신동 62

충북대학교병원 정형외과

Tel: 043-269-6077 • Fax: 043-274-8719

E-mail: hyunchuls@chungbuk.ac.kr

*본 연구는 아산생명과학연구소 신진과제(No. 2002-175)의 지원으로 이루어졌음.

Address reprint requests to

Hyun-Chul Shon, M.D.

Department of Orthopedic Surgery, Chungbuk National University College of Medicine, 62, Gaeshin-dong, Heungdeock-gu, Cheongju, Chungbuk 360-711, Korea

Tel: +82.43-269-6077, Fax: +82.43-274-8719

E-mail: hyunchuls@chungbuk.ac.kr

형성되어야 골절 부위에 산소 공급 및 영양 공급이 이루어질 것이다. 따라서 혈관 생성이 골절 치유와 밀접한 연관이 있다는 것은 잘 알려져 있으며, 특히 가골에서 연골이 골로 대체될 때 혈관 생성이 중요하다고 한다³⁾. 그러므로 골절 부위는 FGF, TGF- β , TNF- α , PDGF, IL-8, BMP, VEGF 등 신생 혈관 형성에 관여하는 여러 인자의 발현이 증가될 것으로 여겨지고, 저산소증은 이러한 인자들의 발현을 촉진할 것이라고 가정할 수 있다.

여러 혈관 생성 인자들 가운데 Vascular endothelial growth factor (VEGF)는 특히 연골 조직에서의 혈관 생성에 중요한 인자로 알려져 있으며, 혈관 내피세포의 분화 및 기능을 촉진하여 혈관 형성에 중요한 역할을 할 뿐만 아니라, 조골세포 및 파골세포에도 직접 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 또한 파골세포의 골흡수에도 VEGF가 필요하여 정상 골재형성에 VEGF는 중요한 인자로 작용한다. 연골에 대하여 VEGF는 연골의 성숙과 연골의 흡수에 관여하는 것으로 알려져 있다. 따라서 VEGF가 억제되면 성장판에서 연골이 사멸되는 것이 억제된다²²⁾. 최근 VEGF의 발현에 작용하는 중요한 전사 인자(Transcription factor)로 Hypoxia inducible factor (HIF)가 밝혀졌다. HIF는 저산소증에 의하여 발현되고 VEGF의 발현에도 영향을 미치는 것으로 알려져 있으며, 그 외의 hypoxia inducible gene들의 발현에도 중요한 역할을 한다. HIF는 정상 산소 분압 하에서는 degradation 되는 α -unit 과 산소 분압에 영향을 받지 않는 β -unit 으로 이루어진 heterodimer 이다. HIF-1 α 및 HIF-2 α 는 Hypoxia response element (HRE)와 작용하여 전사 작용을 하며, HIF-3 α 는 HIF system에 대해 길항 작용(antagonist)을 하는 것으로 알려져 있다. HIF-1 α 및 HIF-2 α 는 전사 인자이지만 전사에 의한 mRNA 뿐 아니라 전사 후 post-translational modification에 많은 영향을 받아 조절된다고 한다¹⁶⁾.

골절 치유 과정은 저산소 상태이므로 HIF가 중요하게 작용할 것으로 여겨지나, 이에 대한 연구는 거의 이루어지지 않았다. 이에 본 연구는 저산소 분압 상태에서 혈관 생성에 중요한 HIF-1 α , HIF-2 α 및 VEGF의 발현에 중점을 두었다. 골절 후 가골에서는 HIF가 증가할 것이며, 특히 저산소 상태에서는 막내 골화보다 연골내 골화가 일어나는 것으로 알려져 있으므로 연골내 골화에 관여하는 연골세포에서 HIF의 발현이 조골세포보다 중요하

다는 가설을 세우고 연구를 시작하였다. 연구를 크게 두 부분으로 나누어 시행하였는데, 세포 배양 실험이 첫 번째이고 실제 골절 모델을 이용한 실험이 두 번째이다. 먼저 Mouse의 골수 기질 세포(ST-2 cell)와 인공 관절 치환술시 얻을 수 있는 사람 연골 세포, 사람 조골세포를 저산소 분압에서 세포 배양하면서 HIF-1 α , HIF-2 α 및 VEGF의 발현은 어떤지 알아보려고 하였다. 이와 함께 VEGF의 발현이 실제로 HIF에 의해 조절이 되는지도 밝혀보고자 하였다. 그리고 두 번째는 인위적으로 유도한 골절부의 가골에서도 HIF-1 α , HIF-2 α 및 VEGF의 발현과 기전은 어떤지 살펴보고자 하였다.

대상 및 방법

1. In-vitro 실험

사람의 뼈와 관절연골에서 추출한 조골세포와 연골세포를 10% FBS가 첨가된 DME/F12 배양액에서 배양하여 조골세포는 2회, 연골세포는 1회 계대배양하였다. 백서의 골수기질유래세포인 ST2세포는 일본 RIKEN 세포주 은행으로부터 분양받아 10% FBS가 첨가된 α -MEM 배양액에서 배양하였다. DME/F12와 α -MEM 배양액을 95% N₂와 5% CO₂ 조성의 혼합가스로 1시간 동안 bubbling한 후 산소분압을 60 mmHg로 유지하면서 이를 배양중인 조골세포, 연골세포, ST2세포에 첨가하였다. 2, 6시간 후 total RNA와 단백질을 추출하여 HIF-1 α , HIF-2 α , VEGF의 변화를 Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 및 Western blot analysis를 통하여 확인하였고 면역조직화학 염색도 일부 시행하였다. 또한 HIF 유전자를 knock down시킨 후 VEGF의 발현변화를 알아보려고 HIF에 대한 siRNA를 처리하였다. HIF-1 α 에 대한 small interfering RNA (siRNA)의 염기순서는 5'-AAU UCA CAC AUA CAA UGC ACU GUG G-3'이며 Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)사에 의뢰하여 제작하였다. 인간 조골세포와 연골세포를 분주하고 24시간 배양하여 30-50% 정도로 자란 세포에, Opti-MEM에 100 nM되게 희석시킨 siRNA를 Lipofectamin (GibcoBRL, Grand Island, NY, USA)과 함께 transfection시켰다. 6시간 뒤에 10% FBS가 첨가된 배양액으로 교체해주고 48시간 후, 저산소 분압상태에 4시간 노출시킨 뒤 total RNA와 핵단백질을 추출하여 HIF-1 α 에 대하여 RT-PCR과

Western blot analysis를, VEGF에 대하여는 RT-PCR을 실시하였다.

2. In-vivo 실험

9주된 SD백서 24마리를 마취시키고 대퇴골 원위부에서 골수강에 21 Gauge 주사바늘을 삽입한 후 골절기로 골절시켰다. 3, 5, 7, 10, 14, 21일째 각 4마리씩 CO₂가 스톱에 넣어 안락사 시킨 후 무균 조작 하에 골절 부위를 노출시키고 가골을 채취하였다. 채취한 가골은 차가운 HBSS에 담아 세포배양실로 옮기고, 주위의 연부 조직을 제거하고 total RNA와 핵단백질을 추출하여 HIF-1 α 에 대하여 RT-PCR과 Western blot analysis를, VEGF에 대하여는 RT-PCR을 실시하였다.

3. 분석

RT-PCR분석을 위해서 2, 6, 24시간동안 저산소에 노출시킨 인간 조골세포, 연골세포, ST2 세포와 siRNA를 처리한 후 4시간동안 저산소에 노출시킨 인간 조골세포와 연골세포, 날짜별로 채취한 백서의 가골에서 TRIzol을 이용하여 total RNA를 추출하고 SuperScript Preamplification Kit (GibcoBRL, Grand Island, NY, U.S.A.)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 이와 같이 합성된 cDNA는 HIF-1 α , HIF-2 α , VEGF에 대하여 PCR (중합효소 연쇄반응)을 시행하기 위해 사용되었다. 생성된 반응산물을 ethidium-bromide가 함유된 1.5% agarose gel에서 전기영동한 후 Molecular Analyst (GS-670 Imaging Densitometer, Bio-Rad)를 이용해 ethidium으로 염색된 band의 정도를 정량분석 하였다. 이때 GAPDH (glyceraldehydes 3-phosphate dehydrogenase)나 actin의 정량치로 보정하였다.

Western blot 분석을 위해서 실험군과 대조군의 세포는 HBSS로 두 번 씻어주고, 골절 후 날짜별로 채취한 백서의 가골은 막자사발에 넣고 액체질소로 급냉시켜 잘게 부순 후, buffer A (50 mM KCl, 25 mM HEPES, 0.5% Igepal CA-630, 1 mM PMSF, 2 uM leupeptin, 1X Aprotinin, 100 uM DTT)와 buffer B (500 mM KCl, 25 mM HEPES, 10% glycerol, 1 mM PMSF, 2 uM leupeptin, 1X Aprotinin, 100 uM DTT)를 이용하여 핵단백질을 분리하고 정량(Bio-Rad assay)하였다. 40-50 μ g의 핵단백질을 8% SDS-Polyacrylamide gel

에서 분리하고 PVDF membrane에 옮긴 후 HIF-1 α (NOVUS, 1;2000), HIF-2 α (NOVUS, 1;1000)에 대한 항체와 반응시키고 그 발현량을 측정하였다.

Immunocytochemistry 분석을 위해서 인간 연골세포와 ST2 세포를 직경 13 mm cover slip에 10⁴개씩 분주하고 2일 후 저산소분압 상태에 6시간 동안 노출시킨 후, DAKO LSAB 2 Kit (DAKO, Carpinteria, CA, U.S.A.)를 이용하여 면역 세포 염색을 실시하였다. 세포를 4% paraformaldehyde로 고정하고 PBS로 씻은 후, 3% Hydrogen peroxide 용액에 5분간 반응시켜 비특이 반응을 제거하였다. HIF-1 α (1;250, NOVUS), HIF-2 α (1;100, NOVUS) 및 VEGF (1;25, SantaCruz) 항체가 각각 포함된 일차항체 용액에 넣고 상온에서 20분간 반응시켰다. 반응이 끝난 세포를 PBS로 수세하고 biotin이 부착된 이차항체 용액을 가하여 상온에서 10분 동안 반응시켰다. 다시 PBS로 수세한 후, streptavidin peroxidase를 10분간 반응시키고 Substrate-chromogen (AEC) 용액을 이용하여 발색시킨 후, hematoxylin으로 대조염색을 실시하고 현미경으로 관찰하였다.

결 과

1. 배양 세포에서 HIF 및 VEGF의 발현

ST2 세포와 인간 연골세포를 배양한 후 시행한 western blot에서는 저산소 분압 상태에서 HIF-1 α 의 발현이 증가함을 알 수 있었다. 하지만 RT-PCR에서는 큰 변화가 없었다(Fig. 1). HIF-2 α 도 비슷하게 western blot에서는 증가하였지만 RT-PCR에서는 큰 변화가 없어 mRNA의 증가는 없음을 알 수 있었다(Fig. 2). 반면

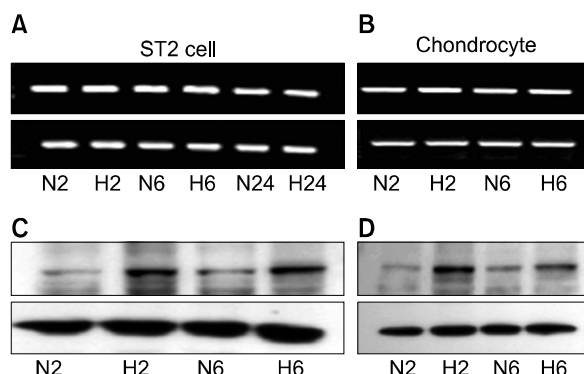


Fig. 1. Hypoxia does not induce HIF-1 α mRNA expression (A, B) but increases protein levels (C, D). N, normoxia; H, hypoxia.

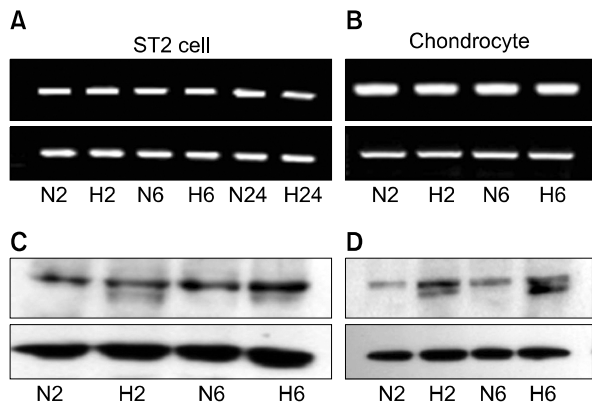


Fig. 2. Hypoxia does not induce HIF-2 α mRNA expression (A, B) but increases protein levels (C, D).

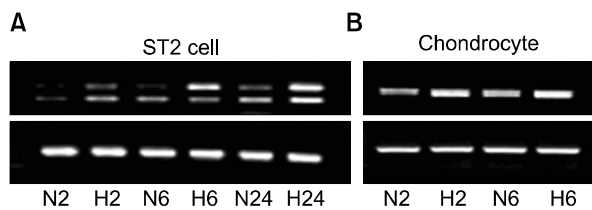


Fig. 3. Hypoxia increases VEGF mRNA expression in ST2 cells (A) and chondrocytes (B).

VEGF는 RT-PCR에서 발현의 증가를 볼 수 있었다(Fig. 3).

인간 조골세포에 대한 실험에서도 HIF-1 α 와 HIF-2 α 는 RT-PCR에서 큰 변화 없이 western blot에서만 발현이 증가하였지만, VEGF는 RT-PCR에서 발현의 증가를 볼 수 있었다(Fig. 4). 인간 연골세포에 대한 immuno-

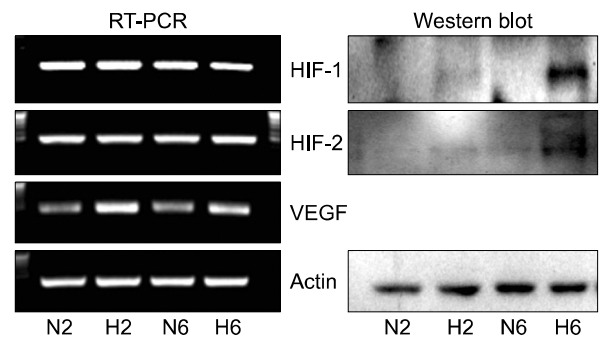


Fig. 4. Hypoxia does not induce HIF-1 α and HIF-2 α mRNA expression but increases protein levels. HIF-1 α , HIF-2 α and VEGF expression in human osteoblasts shows similar expression patterns to ST2 cells and chondrocytes.

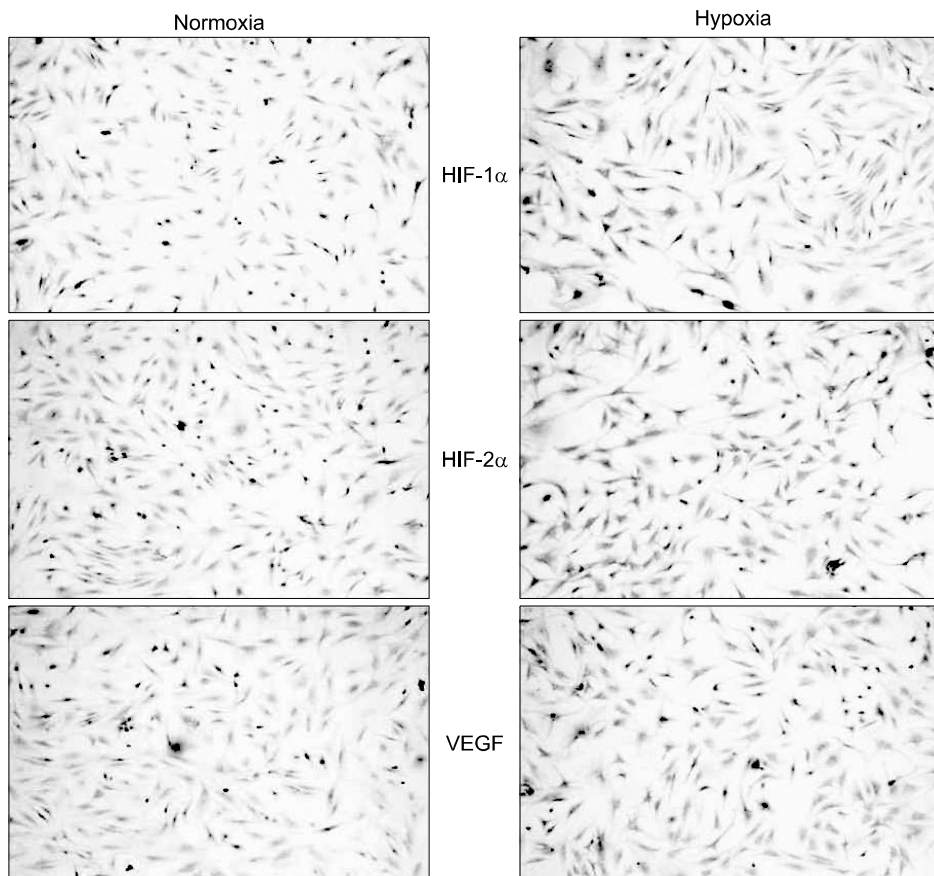


Fig. 5. Human chondrocyte immunocytochemistry shows increased expression of HIF and VEGF in hypoxia.

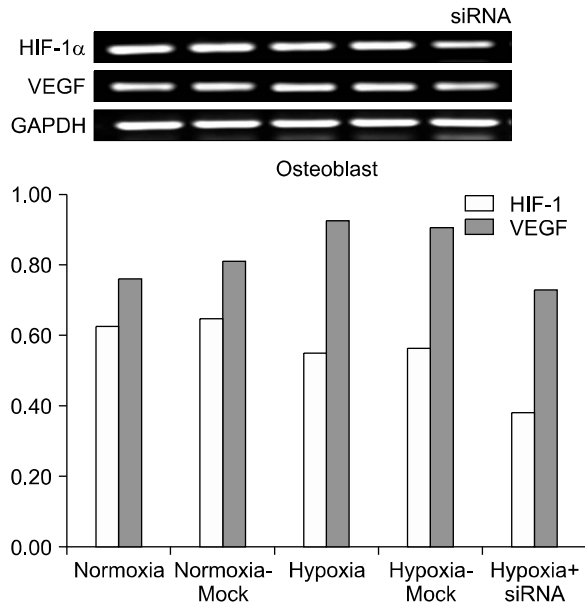


Fig. 6. VEGF expression was decreased by treatment with siRNA for HIF-1 α in human osteoblasts. Mock, transfection control.

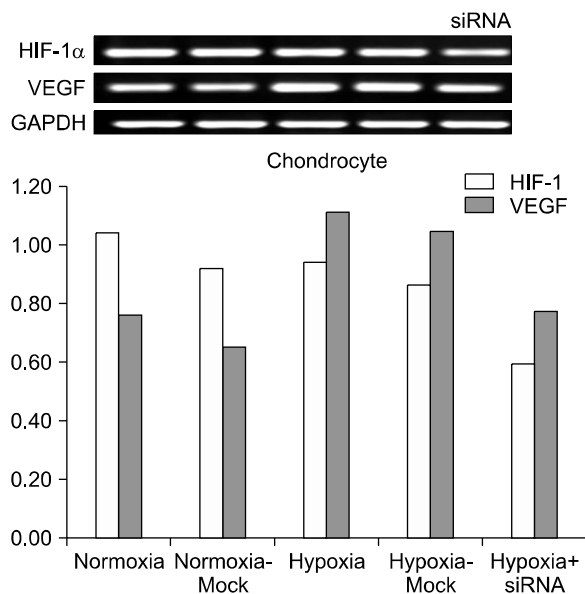


Fig. 7. VEGF expression was decreased by treatment with siRNA for HIF-1 α in human chondrocytes. Mock, transfection control.

HIF-2 α , VEGF의 발현이 증가함을 알 수 있었다(Fig. 5).

인간 조골세포에 HIF-1 α 를 억제하는 siRNA를 처리한 다음 VEGF의 발현을 측정한 결과 저산소 분압 상태임에도 불구하고 VEGF의 발현이 감소함을 알 수 있었다(Fig. 6). 인간 연골세포에 대한 실험에서도 HIF-1 α 를

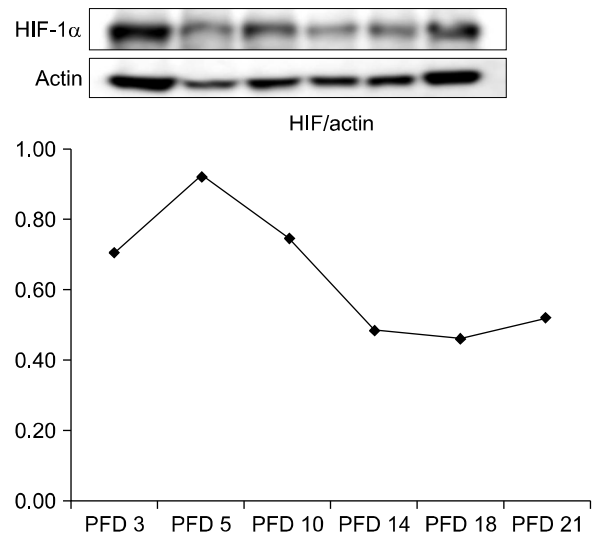


Fig. 8. Western blot for HIF-1 α in callus shows elevation at early stages of fracture healing (peak at PFD 5) and decreases after PFD 10.

억제하면 VEGF의 mRNA 발현이 감소함을 알 수 있었다(Fig. 7). 따라서 VEGF의 발현이 HIF-1 α 에 의해 조절된다는 것을 확인할 수 있었다.

2. 백서 가골에서 HIF 및 VEGF의 발현

백서 대퇴골 골절 모델을 이용하여 각 시기별로 가골을 모아서 HIF-1 α 에 대한 western blot을 시행한 결과, 세포 배양 실험과 유사하게 골절 후 5일째에 최고조를 보이고 10일 후에는 감소하는 양상을 보였다(Fig. 8). HIF-1 α 에 대해서 RT-PCR을 시행한 결과에서는 세포 배양 실험과 다르게 mRNA의 발현이 골절 후 7일째 최고조로 증가하는 양상을 보였다(Fig. 9). 이는 골절 후 가골에서는 배지에 배양한 세포와는 달리 여러 성장 인자들이 함께 작용하여 HIF-1 α 의 전사를 증가시키는 것으로 생각된다. VEGF에 대한 RT-PCR에서는 골절 후 5일째 최대치를 보이고 점차 감소하는 양상을 보였다(Fig. 10).

고 찰

최초에 골절이 발생하면 혈관 또한 손상을 당하게 되고 이에 따라 혈액 응고 반응이 활성화 되면서 혈종(hematoma)이 형성된다. 혈종은 골절 부위를 감싸게 되고 골절의 치유에 아주 중요한 역할을 하는데, 혈종을 제거하면 골절 치유가 잘 되지 않고 혈종을 이식할 경우에는 혈종의 혈관 생성력과 일치하게 새로운 골이 형성된다는

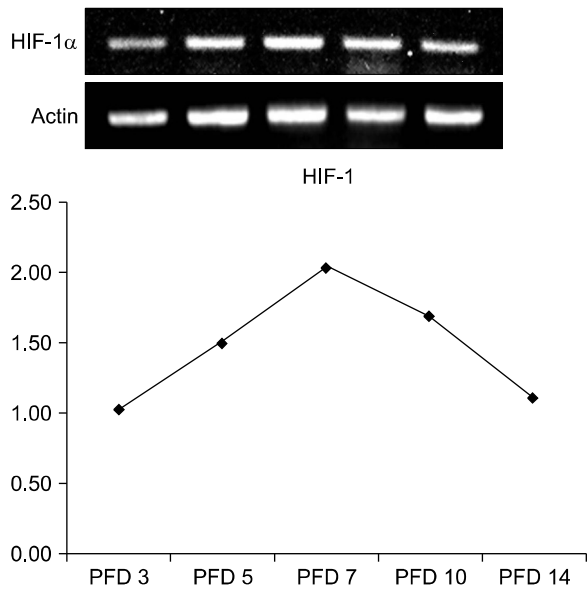


Fig. 9. RT-PCR for HIF-1 α in callus shows elevation at early stages of fracture healing (peak at PFD 7).

보고도 있다^{9,18)}. 염증 세포들과 섬유아세포, 줄기 세포 (stem cell) 등이 골절부로 동원되고 새로운 혈관들이 이미 존재하는 혈관에서부터 생성된다. 염증 반응은 통증, 발열, 종창과 연관이 있고 골절 치유에 중요한 역할을 하는 여러 성장 인자들 -FGF, PDGF, TGF- β , VEGF, BMP, IGF-과 cytokine들이 유리된다.

가골과 피질골에 새롭게 형성된 혈관들은 골수강내 혈관이 완전히 재생될 때까지 지속적으로 혈액 공급을 한다²⁾. 따라서 골절 치유에 새로운 혈관 생성이 반드시 필요하며 골절 후에 이러한 혈관 형성의 다양성이 정상 골유합과 불유합의 이유를 설명하는데 도움이 된다¹⁷⁾. 골절 치유에 중요한 역할을 하는 여러 성장 인자 가운데에도 혈관 생성에 필수적인 VEGF가 중요하다. VEGF는 특히 연골 내 골화에 중요한 역할을 하며, 쥐에서는 태생기에 혈관이 생성되기 이전부터 발현된다. 골절 치유의 초기 단계에서 혈관 생성과 연골 조직의 흡수, 연성 가골의 경성 가골로의 전환에 중요한 역할을 할 뿐만 아니라 골재형성에도 필수적이다^{6,18,22)}. Komatsu와 Hadjiargyrou¹²⁾는 백서의 골절 모델에서 골절 후 10일째에 HIF와 VEGF가 최고조에 달한다고 보고하였으나, 이보다는 더 초기에 최고조에 달한다는 보고가 더 많다. Pufe 등¹⁹⁾은 골절 후 5일에, Uchida 등²⁴⁾도 골절 후 3-7일에 VEGF의 발현이 최고조에 달한다고 하였다. 본 연구에서도 후자들

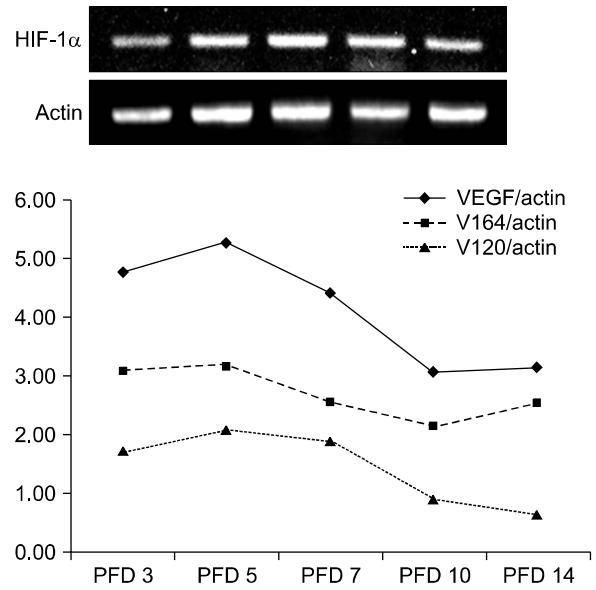


Fig. 10. RT-PCR for VEGF in callus shows elevation at early stages of fracture healing (peak at PFD 5) and decreases after PFD 10.

처럼 HIF와 VEGF의 발현이 골절 후 5일에서 7일째에 최고조에 달했다가 10일 이후에는 감소함을 알 수 있었다.

고등 동물이 될 수록 조직내 산소 요구량을 유지하는 데에 단순 확산(diffusion)이외의 다른 체계가 필요하게 될 것이다. 이런 체계에 대한 연구는 80여년 전부터 이루어져 왔는데, 최초의 연구는 근육 내의 모세혈관 분포에 대한 것이었다. 움직이지 않을 경우에는 근육의 모세혈관 밀도가 낮아지는데 반해 지속적인 신경 자극은 모세혈관 밀도를 높이게 된다²⁰⁾. 이후에는 혈관 질환 및 종양의 병태 생리학적 연구에서도 이런 가설을 바탕으로 하였다. 조산아에서 고농도의 산소 치료를 받을 경우 망막 혈관의 발달이 저하되고 이에 따라 수정체 후방의 섬유화가 이루어져 시력을 잃게 된다고 하였다¹⁾. 이에 반해 종양에서는 그 크기가 증가함에 따라 산소 요구량이 증가하게 되고 혈관 생성에 필요한 인자가 분비될 것이라고 하였다^{4,23)}. 1990년대에 조직 배양 실험으로 저산소증이 있을 경우 PDGF¹³⁾, VEGF mRNA²¹⁾의 발현이 증가함이 밝혀졌고 종양에서도 종양 피사부의 변연부에서 VEGF가 높게 발현됨이 증명되었다. 따라서 산소 이용도가 혈관 생성의 중요한 조절 인자라는 것을 알게 되었다. 하지만 혈관 생성이 산소 자체에 의한 것인지 아니면 저산소증에 대한 다른 체계가 있는지는 밝히기 어려웠다. 산소 농도에 반

응하는 신호의 기원이 어딘지 알기 어려웠던 이유는 in vivo에서 혈관생성 반응이 상당히 느리게 진행된다는 데 있었다. 이는 erythropoietin과는 확연히 다른데, erythropoietin은 저산소 분압에서 수 시간 내에 급격히 증가한다. 또한 mitochondrial inhibitor에 의한 대사성 중독의 경우에는 erythropoietin이 활성화되지 않았다¹¹⁾. 여기에서 erythropoietin의 조절과 혈관 생성 인자를 공통적으로 조절하는 산소 감지 체계가 있음을 알게 되었고 그것이 HIF system으로 밝혀졌다^{5,7,8)}.

HIF-1은 산소 농도에 의해 조절되는 유전자들의 'master regulator'로 알려져 있으며, 60가지 이상의 유전자 발현에 관여하고 있다. 먼저 혈관 생성에 대한 중요한 역할을 한다. 그 중 VEGF가 주된 표적 유전자의 하나로 본 연구에서도 HIF-1 α 에 대해 siRNA로 억제하였을 때 HIF-1 α 뿐만 아니라 VEGF의 발현도 감소함을 볼 수 있어 HIF-1 α 에 의해 VEGF가 조절됨을 알 수 있었다¹⁶⁾. HIF-1은 세포의 증식과 생존에도 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 잘 알려진 인자들이 IGF2, TGF- α 등인데 세포의 성장과 세포 사멸(apoptosis)의 억제를 조절한다고 한다¹⁴⁾. 또한 당의 대사에도 관여하는 것으로 알려져 있다. 저산소 상태에서 세포는 산소와 상관 없이 일차적인 ATP 생성에 glycolysis를 사용하게 되는데 HIF-1은 glucose transporter (GLUT1, GLUT2) 뿐만 아니라 glycolytic pathway의 모든 효소의 발현을 조절한다고 한다²⁵⁾. 끝으로 조혈 작용과 연관되어 iron transport도 증가시키는 것으로 알려져 있다. 이러한 작용과 더불어 악성 종양에서 HIF-1 α 의 발현이 과다하게 되는 경우가 있다. HIF-1 α 의 과다 발현과 환자의 사망률의 관계는 종양의 유형에 따라 다른데, 뇌종양, 유방암, 난소암, 자궁암 등에서는 HIF-1 α 의 과다 발현으로 인해 사망률이 증가하는 것으로 알려져 있고, 이와 반대로 두경부 종양과 비소엽 세포성 폐암에서는 사망률이 감소하는 것으로 밝혀졌다¹⁶⁾. 또한 HIF-1 α 가 악성 종양의 항암 치료나 방사선 치료에 내성을 갖게 한다는 보고도 있어, HIF-1 α 를 억제하면 종양의 산소나 영양 공급을 저하시키고 면역 치료에 상승 작용을 할 것이므로 이에 대한 연구들도 진행되고 있다¹⁵⁾.

본 연구를 할 때 최초에는 저산소 분압 상태를 만드는 것이 어려워 많은 시행착오를 겪었다. 대기와 차단된 물에 잘 봉합된 통을 넣고 질소를 흘려주어도 저산소 분압

이 잘 되지 않았다. 이는 배지에 질소로 거품을 일으켜 용존 산소를 제거함으로써 해결할 수 있었다. 또한 저산소 분압 상태에서 세포 배양을 한 후에도 HIF-1 α 에 대한 RT-PCR에서 발현이 증가되지 않아 실험이 실패한 것으로 생각하였다. 다시 저산소 분압 상태를 확인하고 PCR 상태를 점검하였으나 문제는 없었고 수차례 다시 시도하였다. 하지만 역시 HIF-1 α 에 대한 mRNA는 증가되지 않았고 western blot에서 protein만 증가되는 것을 관찰할 수 있었다. 이는 HIF-1 α 가 전사 인자이지만 전사에 의한 mRNA 뿐 아니라 전사된 후의 post-translational ubiquitination으로 영향을 받아 조절된다는 사실을 간과한 결과였다. 세포에게 있어 저산소증은 위급한 상황이고 이런 상황에 대비하기 위해서 이미 HIF는 세포내에 언제나 존재하고 있는 것으로 밝혀졌다. 정상 산소 분압에서는 두 개의 prolyl residues (Pro402, Pro564)가 hydroxylation되어 pVHL (von Hippel-Lindau tumor suppressor protein)이 이를 인식하여 결합하게 되고 proteasome 내에서 HIF가 파괴되지만 저산소 분압에서는 pVHL이 prolyl에 결합하지 못해 HIF가 핵내로 들어가 전사가 촉진된다고 한다. 또한 asparaginyl residue (Asn803)도 FIH (factor inhibiting HIF)에 의해 hydroxylation되어 p300 coactivator와 작용을 할 수 없어 전사가 차단된다고 한다^{10,16,19)}. 따라서 본 연구에서도 western blot에서만 발현이 증가하는 소견을 보인 것이다. 이와는 다르게 본 연구의 골절 모델의 가골에서는 HIF에 대한 RT-PCR 및 western blot에서 모두 발현 증가를 보였는데 이는 HIF를 생성하는 데에 성장 인자가 관여하는 다른 경로가 있기 때문이다. 세포막에 있는 receptor tyrosine kinase에 결합한 성장 인자는 PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase)와 MAPK (mitogen activated protein kinase) 경로를 활성화시키고 이에 따라 저산소증과 상관 없이 HIF의 합성을 증가시킨다고 한다^{16,19)}.

아직까지 골절 모델 실험에서 한 시기별로 4개의 백서 대퇴골 밖에 모으지 못한 문제점이 있으며, 각각의 가골이 연골의 양이나 골절 양상, 고정 강도 등이 동일하지 못하다는 문제점도 있다. 본 연구를 시작할 때에는 골절 치유 과정에서 가골의 중심부는 연골을 거치는 연골내 골화가 일어나고 골막에 가까운 변연부에서는 막내 골화가 주로 일어나므로 저산소증이 있을 경우는 골형성 세포보

다는 연골 형성 세포의 생존력이 뛰어나고 저산소증에서 세포의 생존에 중요한 HIF는 연골 형성 세포에서 발현이 많이 될 것이라고 예측했었다. 하지만 세포 배양 실험 결과 두 세포간에 HIF 발현의 차이는 크게 없었다. 가골 중심부에서처럼 저산소증에서 뼈보다 연골의 형성이 많아지는 기전에 대해서는 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

결론

HIF-1 α 와 VEGF의 발현은 골절 치유 과정 중 골절 후 5-7일에 최고조를 보이고 산소 분압이 다시 높아지면 서 감소하는 양상을 보였다. 골모세포와 연골세포는 저산소 상태에서 HIF 단백질의 발현이 증가하는데 이는 post-translational modification에 의하여 이루어지는 반면, 골절 치유 과정에서는 저산소 및 성장 인자 등으로 조절 받아 HIF mRNA의 발현도 증가된다고 판단된다. 향후 가골에서 저산소 이외에 작용하는 인자들을 밝히는 연구가 필요할 것으로 생각된다.

참고문헌

1. Ashton N, Ward B, Serpell G: Effect of oxygen on developing retinal vessels with particular reference to the problem of retrolental fibroplasia. *Br J Ophthalmol*, 38: 397-432, 1954.
2. Brighton CT, Hunt RM: Early histological and ultra-structural changes in medullary fracture callus. *J Bone Joint Surg Am*, 73: 832-847, 1991.
3. Choi P, Ogilvie C, Thompson Z, Miclau T, Helms JA: Cellular and molecular characterization of murine non-union model. *J Orthop Res*, 22: 1100-1101, 2004.
4. Folkman J, Merler E, Abernathy C, Williams G: Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *J Exp Med*, 133: 275-288, 1971.
5. Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, et al: Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol*, 16: 4604-4613, 1996.
6. Gerstenfeld LC, Cullinane DM, Barnes GL, Graves DT, Einhorn TA: Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. *J Cell Biochem*, 88: 873-884, 2003.
7. Gleadle JM, Ebert BL, Firth J, Ratcliffe PJ: Regulation of angiogenic growth factor expression by hypoxia, transition metals, and chelating agents. *Am J Physiol*, 268: C1362-C1368, 1995.
8. Goldberg MA, Schneider TJ: Similarities between the oxygen-sensing mechanisms regulating the expression of vascular endothelial growth factor and erythropoietin. *J Biol Chem*, 269: 4355-4359, 1994.
9. Grundnes A, Reikerås O: The importance of the hematoma for fracture healing in rats. *Acta Orthop Scand*, 64: 340-342, 1993.
10. Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, et al: Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science*, 292: 468-472, 2001.
11. Jelkmann W: Erythropoietin: structure, control of production, and function. *Physiol Rev*, 72: 449-489, 1992.
12. Komatsu DE, Hadjiargyrou M: Activation of the transcription factor HIF-1 and its target genes, VEGF, HO-1, iNOS, during fracture repair. *Bone*, 34: 680-688, 2004.
13. Kourembanas S, Hannan RL, Faller DV: Oxygen tension regulates the expression of the platelet-derived growth factor- β chain gene in human endothelial cells. *J Clin Invest*, 86: 670-674, 1990.
14. Krishnamachary B, Berg-Dixon S, Kelly B, et al: Regulation of colon carcinoma cell invasion by hypoxia-inducible factor 1. *Cancer Res*, 63: 1138-1143, 2003.
15. Lando D, Peet DJ, Gorman JJ, Whelan DA, Whitelaw ML, Bruick RK: FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes Dev*, 16: 1466-1471, 2002.
16. Lee JW, Bae SH, Jeong JW, Kim SH, Lim KW: Hypoxia-inducible factor (HIF-1) α : its protein stability and biological functions. *Exp Mol Med*, 36: 1-12, 2004.
17. Marsh D: Concepts of fracture union, delayed union, and nonunion. *Clin Orthop Relat Res*, 355(Suppl 355): S22-S30, 1998.
18. Mizuno K, Mieno K, Tachibana T, Sumi M, Hirohata K: The osteogenetic potential of fracture hematoma. Subperiosteal and intramuscular transplantation of the hematoma.

- J Bone Joint Surg Br*, 72: 822-829, 1990.
19. **Pufe T, Wildemann B, Petersen W, Mentlein R, Raschke M, Schmidmaier G:** Quantitative measurement of the splice variants 120 and 164 of the angiogenic peptide vascular endothelial growth factor in the time flow of fracture healing: a study in the rat. *Cell Tissue Res*, 309: 382-392, 2002.
 20. **Pugh CW, Ratcliffe PJ:** Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat Med*, 9: 677-684, 2003.
 21. **Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E:** Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature*, 359: 843-845, 1992.
 22. **Street J, Bao M, deGuzman L, et al:** Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proc natl Acad Sci USA*, 99: 9656-9661, 2002.
 23. **Thomlinson RH, Gray LH:** The histological structure of some human lung cancers and the possible implications for radiotherapy. *Br J Cancer*, 9: 539-549, 1955.
 24. **Uchida S, Sakai A, Kudo H, et al:** Vascular endothelial growth factor is expressed along with its receptors during the healing process of bone and bone marrow after drill-hole injury in rats. *Bone*, 32: 491-501, 2003.
 25. **Wenger RH:** Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression. *FASEB J*, 16: 1151-1162, 2002.

= 국문초록 =

목 적: 저산소 분압에서의 세포 배양과 백서 골절 모델을 통하여 연골세포와 조골세포의 HIF-1 α 와 HIF-2 α 및 VEGF의 발현과 기전에 대해서 알아보려고 하였다.

재료 및 방법: DME/F12 배양액을 95% N₂와 5% CO₂의 혼합가스처리로 산소분압을 60 mmHg 이하로 만들고, 이를 사람의 뼈와 관절연골에서 추출해서 배양중인 조골세포와 연골세포 그리고 백서의 골수기질세포인 ST2세포에 첨가하였다. 2, 6, 24시간 후 total RNA와 단백질을 추출하여 HIF-1 α , HIF-2 α , VEGF의 발현에 대해 RT-PCR 및 Western blot analysis를 통하여 확인하였다. 백서의 대퇴골을 골절시키고 3, 5, 7, 10, 14, 21일 경과 후 가골을 채취하여 Western blot analysis와 RT-PCR를 통해 HIF-1 α 와 VEGF의 발현을 관찰하였다.

결 과: 저산소 분압 상태의 조골세포와 연골세포에 대해 RT-PCR을 실시한 결과, HIF-1 α , HIF-2 α 는 정상군과 큰 차이가 없었으나, VEGF는 정상군보다 현저히 증가되었다. Western blot analysis에서는 저산소 분압 상태에서 정상군보다 HIF-1 α , HIF-2 α 의 발현이 크게 증가하였다. siRNA로 HIF를 억제한 결과 HIF뿐 아니라 VEGF의 발현도 감소하였다. 백서의 가골에서 HIF-1 α 와 VEGF의 발현을 분석한 결과 골절 후 5일에서 7일까지 최대치를 보이다가 10일 이후 급격하게 감소하였다.

결 론: 골모세포와 연골세포는 저산소 상태에서 HIF 단백질이 증가하였는데 이는 post-translational modification에 의하여 이루어지는 반면, 가골에서는 저산소증 뿐만 아니라 성장 인자와 같은 다른 인자에 의해 조절받아 HIF의 mRNA 발현이 증가된다고 판단된다. 향후 가골에서 저산소 이외에 작용하는 인자들을 밝히는 연구가 필요할 것으로 생각된다.

색인 단어: HIF-1 α , VEGF, 골절 치유