

산화스트레스가 사람 골수기질세포 유래 조골세포의 증식과 분화에 미치는 영향

미즈메디병원 내과, 가톨릭대학교 의과대학 내과학교실¹ 성균관대학교 의과대학 내과학교실²

오은숙 · 백기현¹ · 이원영² · 오기원² · 김혜수¹ · 한제호¹ · 이광우¹ · 손호영¹ · 강성구¹ · 강무일¹

The Effect of Oxidative Stress on the Proliferation and Differentiation of Human Bone Marrow Stromal Cell-Derived Osteoblasts

Eun Sook Oh, Ki Hyun Baek¹, Won Young Lee², Ki Won Oh², Hye Soo Kim¹, Je Ho Han¹, Kwang Woo Lee¹,
Ho Young Son¹, Sung Koo Kang¹, Moo Il Kang¹

Department of Internal Medicine, MizMedi Hospital;

Department of Internal Medicine¹, The Catholic University of Korea, College of Medicine; and

Department of Internal Medicine², Sungkyunkwan University School of Medicine

ABSTRACT

Background: The objectives of our study were to assess the effects of oxidative stress on the proliferation, differentiation and apoptosis of human bone marrow stromal cell (BMSC)-derived osteoblasts and to explore pathways by which osteoblast cell apoptosis was induced.

Methods: Mononuclear cells including BMSCs were cultured to osteoblastic lineage. Different doses of hydrogen peroxide (H₂O₂) were added to the culture media. The colony forming units-fibroblastic (CFU-Fs) were stained with crystal violet and alkaline phosphatase (ALP). The MTT assay was done to see the effect of H₂O₂ on cell viability. The effect of H₂O₂ on osteocalcin gene expression was determined by RT-PCR. The matrix calcification measurement was performed. FACS analysis was performed to determine the osteoblasts apoptosis. Caspase-3, -8 and 9 activity assay and cytochrome *c* release were measured.

Results: The size and number of ALP (+) CFU-Fs were also decreased by H₂O₂ treatment. When compared with the control group, H₂O₂ significantly decreased the total number of cells of each culture well during MTT assay. H₂O₂ significantly diminished expression of osteocalcin mRNA. N-acetylcysteine (NAC) blocked the diminution of cell viability and the inhibition of osteocalcin mRNA expression by H₂O₂. H₂O₂ reduced matrix calcification. FACS analysis revealed H₂O₂ increased percentage of apoptotic cells. Addition of H₂O₂ resulted in the increase of caspase-9 and -3 activity but not caspase-8, and release of cytochrome *c* to the cytosol.

Conclusion: These data suggest that, in primary human BMSCs, oxidative stress inhibits proliferation of stromal cells and inhibits the differentiation to osteoblastic lineage. In addition, oxidative stress induces apoptosis of human BMSC-derived osteoblasts and this may be mediated by mitochondrial pathway of apoptotic signal. (J Kor Soc Endocrinol 21:222~232, 2006)

Key Words: Apoptosis, Differentiation, Osteoblast, Oxidative stress, Proliferation

접수일자: 2005년 9월 7일

통과일자: 2006년 2월 20일

책임저자: 강무일, 가톨릭대학교 의과대학 내과학교실

서 론

Superoxide anion, hydrogen peroxide (H_2O_2), hydroxyl radicals 등의 활성화 산소(reactive oxygen species, ROS)는 산소의 환원 대사물질로서 미토콘드리아나 peroxisome 등의 정상 세포 내 대사과정이나 세포질 내 효소들의 작용으로 내 부로부터 형성되거나, 다양한 외부 요소에 의해 형성되는데, DNA, 단백질과 지방의 심한 손상을 일으킨다. 세포들은 ROS의 축적에 대항하기 위한 항산화방어기전들을 가지고 있으나, ROS의 발생이 세포 내 항산화능력을 초과하는 경우 산화스트레스에 노출된다. 산화스트레스는 뇌허혈, 동맥경화, 당뇨병, 폐섬유증, 관절염 및 치매 등의 여러 질환과, 노화의 중요 병인으로 알려져 있다[1,2].

성인의 골량은 파골세포에 의한 골흡수와 이에 따른 조골세포에 의한 골형성이 반복되는 골재형성 과정을 통하여 일정하게 유지된다[3,4]. 골소실은 파골세포에 의한 골흡수의 증가와 조골세포에서의 골형성의 감소로 인해 발생하는 데[5,6], 특히 나이가 많아짐에 따라 발생하는 노인성 골다공증은 조골세포 및 전구조골세포의 수 감소 및 기능 결핍에 의한 골형성의 감소가 더욱 중요한 요인으로 받아들여지고 있다[7]. 저자들은 선행 연구[8]에서 노화가 진행될수록 조골세포의 모세포가 되는 골수 내 기질세포의 수가 감소하고, 증식과 분화능이 젊은 사람에 비해 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

최근 들어 산화스트레스와 골다공증의 연관성에 대한 관심이 고조되고 있다. 임상연구에서 산화스트레스의 증가와 골밀도 간에는 유의한 음의 상관관계가 있었으며[9], 골다공증 여성에서 혈중 항산화제의 농도가 감소되어 있었으며[10], 항산화비타민을 섭취한 경우 골밀도가 높았다[11]. 또한 실험실적 연구에서도 ROS는 파골세포의 활성도를 증가시키고[12,13] 조골세포의 대사를 저해하였다. Mody 등[14]은 H_2O_2 를 이용한 연구에서 세포 내 산화스트레스의 증가는 전구조골세포주인 MC3T3-E1 세포와 골수기질세포주인 M2-10B4 세포의 조골세포로의 분화를 저해함을 밝혔고, Nicholson 등[15]도 H_2O_2 처리 후 조골세포의 수와 분화가 감소됨을 보고하였다. 이러한 산화스트레스로 인한 조골세포 대사의 저해는 항산화제의 투여로 차단되었다.

세포자멸사(apoptosis) 기전은 골격계의 발생과 재형성에 중요한 역할을 하는 것으로 알려지고 있다. 조골세포와 파골세포 모두 세포자멸사 기전을 통해 제거되며, 특히 조골세포의 세포자멸사 정도는 조골세포의 수명과 골형성의 양을 결정짓는 중요한 인자가 된다. H_2O_2 , superoxide 등의 ROS에의 직접적인 노출은 세포자멸사를 유발하는 것으로 알려져 있으나 관여된 기전은 잘 알려져 있지 않고, Kikuyama 등[16]의 보고에 의하면 H_2O_2 처리 시 caspase의 활성화 과정을 통하여 골세포가 세포자멸사된다고 하

였다.

본 연구에서는 H_2O_2 처리로 증가된 산화스트레스가 인체 조골세포의 전구세포인 골수기질세포로부터 조골세포로 증식 및 분화와 세포자멸사 과정에 미치는 영향을 관찰하여, 골다공증의 원인으로 알려진 조골세포의 활성 감소에 산화스트레스가 관여하는지를 살펴보고자 하였다. 또한 항산화제의 투여가 H_2O_2 처리로 유발된 산화스트레스에 미치는 영향도 관찰하였다.

대상 및 방법

1. 재료

3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, thiazolyl blue), caspase-3, caspase-8 kit 등은 Sigma Chemical사(USA)에서 구입하였고, TRIzol reagent는 Invitrogen사(USA), reverse transcriptase (AMV), 1st strand cDNA synthesis kit for RT-PCR (#1483 188)은 Roche사(USA), PCR premix는 Bioneer사(한국), Annexin V-FITC apoptosis detection kit는 BD bioscience사(USA), caspase-9 kit는 Oncogene사(USA), Mitochondria/cytosol Fractionation kit는 Biovision사(USA), mouse anti-cytochrome c 항체와 goat anti-mouse IgG (H+L) HRP conjugate는 Biotechnology사(USA)에서 구입하였다.

2. 인체 골수의 배양 및 실험 개요

20세부터 40세까지의 건강한 골수 공여자(남자 8명, 여자 11명)로부터 골수 채취 전 임상시험 동의서를 얻었으며, 모든 실험은 헬싱키 선언에서 명시된 원칙을 따랐다. 채취한 골수를 각각 Ficoll-Hypaque centrifugation을 이용하여 단핵구를 분리한 다음, 20% heat inactivated FBS와 100 unit/mL의 penicillin-streptomycin, 10^{-8} M vitamin-K가 포함된 α -MEM 배양액에 4×10^5 cell/mL 농도로 CO_2 incubator (5% CO_2 , humidified, $37^\circ C$)에서 배양하였다. 다음날 10^{-8} M dexamethasone과 당일 준비한 50 $\mu g/mL$ ascorbic acid를 첨가한 다음 골수 기질세포들이 배양용기에 부착하도록 4~5일 동안은 그대로 두었다. 이후 기질세포들이 부착된 것이 확인되면 배양액을 교환한 다음, 매 2일 마다 배양액을 교환하였다. 약 2주 후 세포가 80~90% 정도 배양용기 바닥에 자라게 되면 0.25% trypsin/1 mM EDTA로 처리하여 세포를 분리한 다음 5×10^4 cell/mL 농도로 다른 배양용기에 옮겨 계대 배양하였다. 이때부터의 배양액에는 FBS는 10%로, dexamethasone은 10^{-7} M 농도로 하고 β -glycerophosphate는 10 mM이 되도록 기존 배양액에 추가하였다.

3. Hydrogen Peroxide (H₂O₂) 및 항산화제 처리

일차배양에서는 4일째 첫 배양액 교환시 0.1 mM, 0.3 mM 농도의 H₂O₂를 첨가한 후 각 배양액 교환 시 H₂O₂를 함께 처리하였고, 12일째 Crystal Violet 염색과 알칼리성 포스파타제 염색을 시행하였다.

이차배양에서는 일차배양에서와 마찬가지로 대조군, 0.1 mM, 0.3 mM, 0.5 mM H₂O₂ 처리군과 항산화제로 5 mM N-acetylcystein (NAC)과 0.5 mM H₂O₂ 동시 처리군으로 나누어 배양하였다. 2일째 첫 배양액 교환 시 각 농도의 H₂O₂를 함께 처리하였다. 이후 매일 배양액을 교환하였고, 교환 시 마다 H₂O₂를 첨가하였으며, 80%의 세포가 자란 5~6일째에 분석을 하였다. 0.5 mM H₂O₂과 5 mM NAC를 동시 처리 시에는 NAC를 2시간동안 전처리 후 0.5 mM의 H₂O₂를 처리하였다.

4. 산화스트레스 생성의 측정

세포들을 10 cm dish에 분주, 배양 후 80~90% 자랐을 때, Kreb's Ringer buffer로 2차례 세척 후 원심분리(300 g, 10분)하였다. 이후 4 mL의 Kreb's Ringer buffer에 재부유하여 20 mM DCF 15 mL를 추가하고, 실온의 암실에서 20분간 유지하였다. 세포 내 산화스트레스는 Hitachi F-4010 (Tokyo, Japan)를 이용하여 480 nm의 excitation 파장, 522 nm의 emission 파장에서 세포 내 DCFH를 형광학적으로 측정하였다. 산화스트레스는 H₂O₂ 0.1 mM, 0.3 mM, 0.5 mM 처리군으로 나누어 처리하였고, 2시간에 걸쳐 10분마다 측정하였다. 총 5예에서 실험하였으며, 결과는 평균 ± 표준오차로 표시하였고, 각 실험은 2차례 반복하였다.

5. Crystal violet 및 알칼리성 포스파타제 조직 화학염색

일차배양에서 Crystal Violet 염색은 배양된 세포를 4°C phosphate-buffered saline (pH 7.4)로 세척한 후, 0.5% crystal violet (in ethanol)로 10분간 염색한 후 PBS로 씻어내고 육안 및 광학 현미경으로 세포 집락의 수 및 크기를 관찰하였다. 그리고 알칼리성 포스파타제 조직화학염색은 배양된 세포를 4°C PBS (pH 7.4)으로 세척한 후 4°C 2%

paraformaldehyde/0.1M cacodylic buffer로 고정하였다. 이후 20 mg/mL의 naphthol AS-MX phosphate disodium salt와 40 mg/mL의 Fast Red TR salt가 첨가된 Tris-maleate buffer (pH 8.4)에 37°C에서 30분간 배양하였다. 이후 0.1 M cacodylic buffer로 씻어낸 다음 육안 및 광학 현미경으로 관찰하였다. 총 9예에서 실험하였다.

6. MTT 측정

세포의 활성도를 관찰하기 위하여 이차배양 시 세포가 80% 자랐을 때 대조군, H₂O₂ 0.1 mM 처리군, 0.3 mM 처리군, 0.5 mM 처리군과 H₂O₂ 0.5 mM과 5 mM NAC 동시 처리군으로 나누고, 해당 농도의 H₂O₂를 2일간 처리 후 MTT측정을 시행하였다. 24-well plate에 5×10⁴ cells/well/0.5 mL의 농도로 분주하여 배양한 세포를 PBS로 세척한 후 MTT용액(5 mg/mL)을 50 µL씩 넣고 실온에서 2시간 동안 보관시켰다. 상층액을 버린 후 40 mM HCl-isopropanol을 2 mL씩 첨가한 후 ELISA reader (Bio-tek instrument, USA)로 470 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 총 8예에서 실험하였으며, 각 실험은 4회 반복하였다.

7. 반정량적 역전사 중합효소연쇄반응 (Semiquantitative reverse transcription-polymerase chain reaction)

6-well plate에 well당 1×10⁵ cells/mL로 세포를 분주 후 12일간 배양하였다. 이후 2일간 대조군, H₂O₂ 0.1 mM 처리군, 0.3 mM 처리군, 0.5 mM 처리군과 H₂O₂ 0.5 mM과 5 mM NAC 동시 처리군으로 나누어 배양하였다. cDNA 합성을 위해 total RNA 1 µg을 역전사 반응 완충용액(10 mM Tris, 50 mM KCl; pH 8.3), 5 mM MgCl₂, 1.6 µg oligo (dT), dNTP 혼합용액(dATP, dGTP, dCTP, dTTP 각각 1 mM), 20 unit AMV reverse transcriptase가 포함된 혼합용액에 넣고 diethylpyrocarbonate (DEPC)로 처리된 증류수를 가해 총 부피가 20 µL되게 하였다. 반응은 25°C에서 10분 동안과 42°C에서 60분 더 가온한 후 반응을 중지시켰고 반응물은 즉시 얼음으로 옮긴 후 -70°C에 보관하였다 [17]. 합성된 cDNA 반응물로부터 1 µL를 취하여 PCR pre-mix 를 사용하여 PCR 자동화장치(Perkin Elmer 9600, USA)에서 94°C 2분간 초기 변성시킨 후 94°C 1분 변성반

Table 1. Primers for semiquantitative reverse transcription polymerase chain reaction of the osteocalcin mRNA and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)

Sense primer of osteocalcin	5'-CCTGAAAGCCGATGTGGTC-3'
Antisense primer of osteocalcin	5'-CTCACACTCCTCGCCCTAT-3'
Sense primer of GAPDH	5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'
Antisense primer of GAPDH	5'-TCCACCACCTGTTGCTGTA-3'

응, 55℃ 1분의 결합반응, 72℃ 1분간의 연장반응의 순환과정을 30회 실시하였다. 마찬가지로 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)의 PCR 과정도 GAPDH의 sense primer 및 anti-sense primer (Table 1)를 이용하여 같은 순환과정을 25회 실시하였다. 생성된 PCR 산물은 1.5% agarose gel에서 전기영동한 후 ethidium bromide로 염색하여 300 nM UV-영상분석기(Vilber Lourmate, France)에서 분석하였다. 각 시료 중의 오스테오칼신 증폭산물을 GAPDH 증폭산물로 보정하여 비교하였다. 총 3예에서 실험하였다.

8. 칼슘 침착 측정

이차배양에서 24-well plate에 5×10^4 cells/well/0.5mL의 농도로 분주한 후, 세포가 80% 자랐을 때 대조군, H_2O_2 0.1 mM 처리군, 0.3 mM 처리군, 0.5 mM 처리군으로 나누어 해당 농도의 H_2O_2 를 2일간 처리하고 배양기를 PBS로 깨끗하게 세척한 다음 0.1 N HCl을 500 μ L 넣고 실온에서 하루 동안 보관 후 상층액을 수거하여 유리되어 나온 칼슘을 o-cresolphthalein complexone 방법으로 측정하였다. 배양기를 다시 PBS로 세척한 후 배양기에 0.1 N NaOH/0.1% sodium dodecyl sulfate를 1 mL 넣고 실온에서 하루 동안 보관 후 단백질을 측정하여 기 측정한 칼슘치를 보정하였다. 총 4예에서 실험하였으며, 각 실험은 2회 반복하였다.

9. 유세포 측정기(Flow cytometry)를 이용한 세포자멸사 측정

이차배양에서 5×10^4 cell/mL로 분주하여 80% 증식하였을 때 0.5 mM H_2O_2 를 가하여 4시간동안 처리 후, Annexin V-FITC apoptosis detection kit을 이용하여 flow cytometer (Becton Dickinson, USA)로 측정하였다. FITC+/PI- 인 세포를 세포자멸사된 세포로 하였다.

10. Caspase-3, caspase-8, caspase-9 활성화 측정

이차배양에서 10 cm dish에 세포를 분주 후 80% 정도 세포가 자라면 caspase-3, caspase-8 측정용 배양세포에는 0.5 mM의 H_2O_2 를 16시간동안 처리하였고, caspase 9은 0.5 mM의 H_2O_2 를 24시간동안 전 처리 후 측정하였다. 세포들을 400 μ L의 lysis buffer로 용해시켜 분주한 후 37℃에서 1 시간 동안 300 μ L의 반응 혼합액(200 mM HEPES, pH 7.4, 1% CHAPS, 50 mM DTT, 20 mM EDTA)에 섞인 50 μ M의 enzyme substrate (Ac-DEVD-AMC substrate for caspase-3, Ac-IETD-AMC substrate for caspase-8, LEHD AFC for caspase-9)와 반응시켰다. 유리된 AMC의 형광을 380 nm의 excitation 파장, 460 nm의 emission 파장에서,

유리된 AFC를 510 nm의 excitation 파장, 460 nm의 emission 파장에서 fluorometer (Hidex, Finland)로 측정하였다. 총 3예에서 실험하였으며, 각 실험은 3회 반복하였다.

11. Western blot 분석

세포들은 10 cm dish에 계대 배양후 0.5 mM H_2O_2 를 5 시간동안 처리하였다. Cytochrome c의 세포질로의 유출을 관찰하기 위하여 Mitochondria/cytosol Fractionation kit을 사용하여 세포질 분획과 미토콘드리아 분획으로 분리하였다. 세포용해질을 12% SDS-polyacrylamide 겔을 이용해 분리하였다. 이를 nitrocellulose membrane에 전기 이동시킨 후 PBS solution과 5% skim milk가 함유된 완충액에 일차항체로 anti-cytochrome c monoclonal antibody를 1:500으로 희석하여 4℃에서 밤새 반응시킨 후, 이차항체인 Goat anti-Mouse IgG (H+L) HRP conjugate를 1:2000으로 희석한 것을 넣어 2시간동안 반응시키고, enhanced chemiluminescence reagent (Amersham International, NJ)를 이용하여 관찰하였다.

12. 통계처리

결과는 평균 \pm 표준오차로 표시하였고, 유의성은 Student's t-test와 Wilcoxon signed rank test를 이용하여, P 값 0.05 이하를 의미 있게 판정하였다.

결 과

1. 인체골수기질세포에 H_2O_2 처리 후 산화스트레스의 증가

H_2O_2 처리 30분 후부터 0.3 mM과 0.5 mM 처리군에서 DCF 형광발현이 대조군에 비해 의미 있게 증가하였고 대조군: 17.43 ± 5.01 , 0.3 mM 처리군: 22.70 ± 4.91 , 0.5 mM 처리군: 23.08 ± 5.10 , $P < 0.05$, 처리 60분부터는 모든 농도에서 DCF 형광발현이 각 농도의 대조군에 비해 의미 있게 증가하였다($P < 0.05$)(Fig. 1).

2. 일차배양 후 CFU-Fs의 수 및 면적의 비교

일차배양 15일째, crystal-violet 염색 후 관찰한 CFU-F의 평균수는 0.3 mM 처리군에서 대조군에 비해 유의하게 감소되었으며(대조군: 77.9 ± 23.5 , 0.3 mM 처리군: 39.8 ± 15.1 , $P < 0.05$), CFU-F의 평균면적과 총면적도 0.3 mM 처리군에서 대조군에 비해 유의하게 감소되었다(평균면적: 대조군: $12.9 \pm 3.0 \text{ mm}^2$, 0.3 mM 처리군: $7.6 \pm 3.0 \text{ mm}^2$, $P < 0.05$, 총면적: 대조군: $767.4 \pm 238.5 \text{ mm}^2/\text{dish}$, 0.3 mM 처리군: $367.8 \pm 205.0 \text{ mm}^2/\text{dish}$, $P < 0.05$)(Fig. 2, 3).

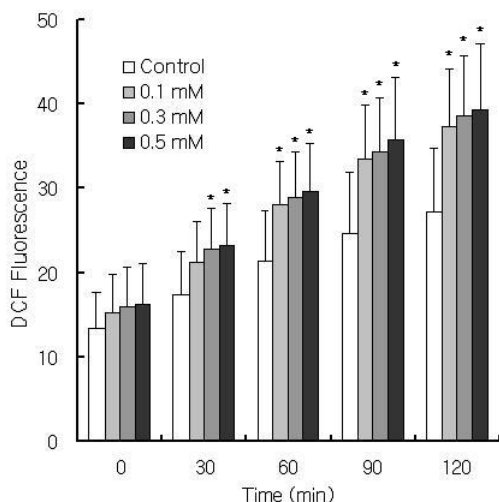


Fig. 1. Oxidative stress measurements. Increased accumulation of ROS in human bone marrow derived stromal cells stimulated by H_2O_2 . Even number of cells were loaded with 20 μ g/ml DCHF-DA for 20 minutes. The cells were then treated with 0.1 mM, 0.3 mM and 0.5 mM H_2O_2 . DCF fluorescence was monitored over the course of 2 hour. The results are presented as a mean \pm SEM, $n = 5$, each performed in duplicate.

* $P < 0.05$ compared with their control groups.

3. H_2O_2 처리 후 세포 활성도의 감소

이차배양에서 시행한 MTT측정에서, 0.3 mM과 0.5 mM의 H_2O_2 처리 시 세포의 활성도는 대조군에 비해 의미 있게 감소하였다(대조군: 0.270 ± 0.007 , 0.3 mM 처리군: 0.195 ± 0.006 , 0.5 mM 처리군: 0.142 ± 0.007 , $P < 0.01$). 또한 5 mM의 NAC를 0.5 mM H_2O_2 처리군에 병합 투여 시, 0.5 mM H_2O_2 단독 처리군에 비하여 활성도가 의미 있게 회복되었다(0.5 mM H_2O_2 단독처리군: 0.142 ± 0.007 , 0.5 mM H_2O_2 와 5 mM NAC 동시처리군: 0.218 ± 0.006 , $P < 0.05$) (Fig. 4).

4. H_2O_2 처리에 따른 오스테오칼신 mRNA의 발현

GAPDH의 발현 정도에 따라 보정한 오스테오칼신 mRNA의 발현은 0.5 mM H_2O_2 처리군에서 대조군에 비해 의미 있게 감소되었다(대조군: 0.80 ± 0.24 , 0.5 mM 처리군: 0.49 ± 0.22 , $P < 0.05$). 0.5 mM의 H_2O_2 와 5 mM의 NAC 동시처리 후 감소된 오스테오칼신 mRNA 발현이 회복되는 경향을 관찰할 수 있었다(0.5 mM H_2O_2 처리군: 0.49 ± 0.22 , 0.5 mM H_2O_2 와 5 mM NAC 동시 처리군: 0.69 ± 0.24) (Fig. 5).

5. H_2O_2 처리에 따른 기질 무기화의 변화

조골세포로의 분화 정도를 비교하기 위하여 이차배양 17

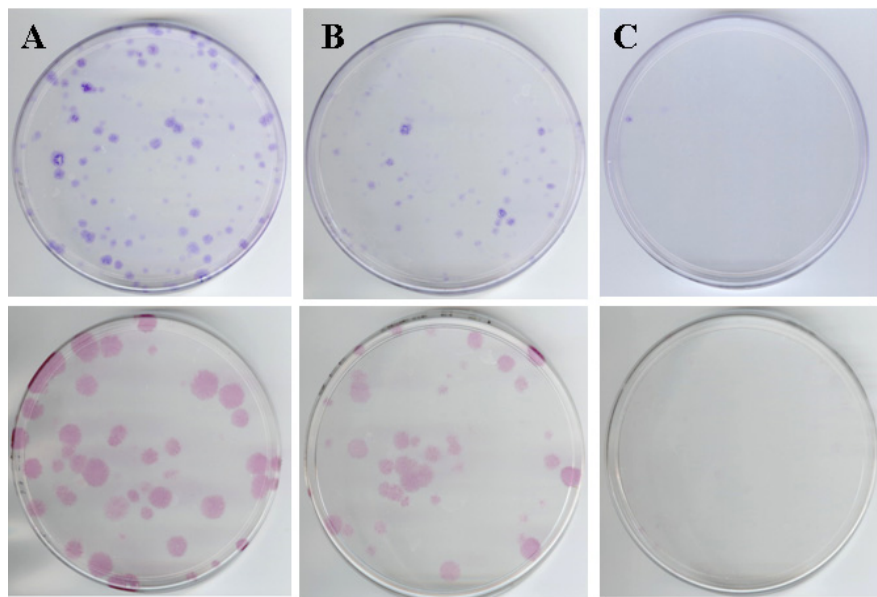


Fig. 2. Effects of H_2O_2 on CFU-Fs and ALP (+) CFU-Fs formation. CFU-F formation from human bone marrow cells of the same donor. 4×10^5 mononuclear cells, which were derived from the bone marrow aspirated from the iliac crest, were plated in 10 cm Petri dishes in α -MEM with 20% heat-inactivated FBS, 10 mM β -glycerophosphate and 50 μ g/mL ascorbic acid, and grown for 15 days in the control (A) and presence of 0.1 mM (B) or 0.3 mM (C) H_2O_2 . H_2O_2 was added after the attachment period (4 to 5 days). The colonies were fixed and stained with crystal violet (upper panel) and alkaline phosphatase (lower panel).

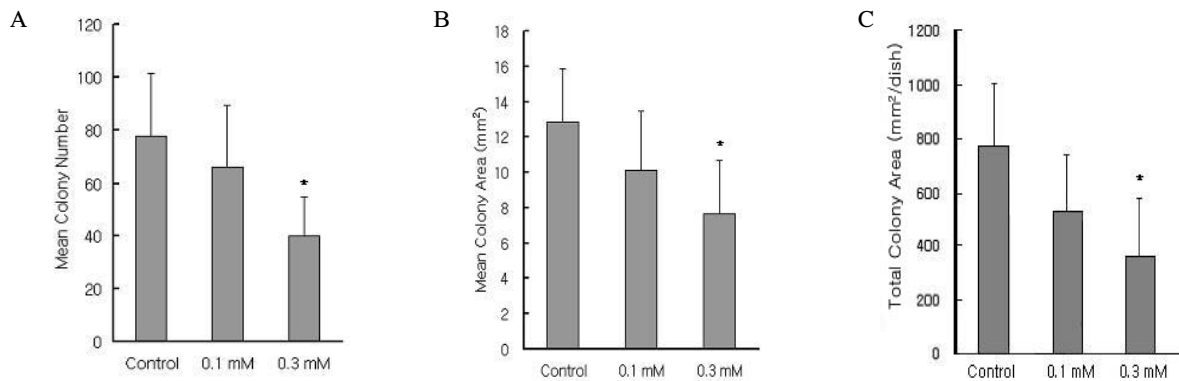


Fig. 3. Effects of H_2O_2 on CFU-Fs formation. Effects of H_2O_2 on the number (A), the mean colony area (B) and the total colony area of CFU-Fs (C). The bone marrow was aspirated from the iliac crest of 9 young donors. Mononuclear cells were seeded in 10 cm dishes. 0.1 mM or 0.3 mM H_2O_2 was added after the attachment period. After 15 days, the cultures were fixed, stained, and the number and size of the CFU-Fs were determined. The results are shown as a mean \pm SEM.

* $P < 0.05$ compared with its control group.

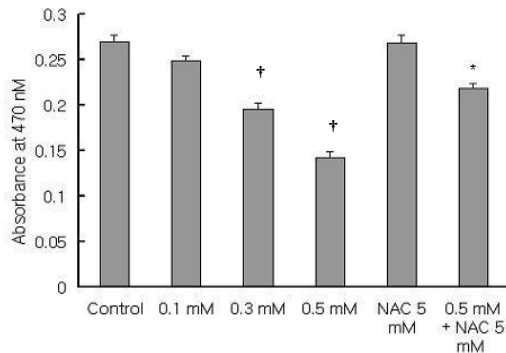


Fig. 4. Effect of H_2O_2 on cell viability in the secondary culture of human bone marrow derived stromal cells. The cells were treated with the vehicle or either doses (0.1 mM, 0.3 mM, 0.5 mM) of H_2O_2 or 5 mM N-acetylcysteine (NAC) or 5 mM NAC + 0.5 mM H_2O_2 for 48 hours. The MTT assay was done as described in the method. The results are presented as a mean \pm SEM, $n = 8$, each performed in quadruplicate.

* $P < 0.01$ compared with its control group.

† $P < 0.05$ compared with 0.5 mM H_2O_2 cultures.

일째에 단백질 양으로 보정한 기질 내 칼슘 침착을 측정하여 이를 대조군과 비교하였다. 후기 조골세포 분화 지표인 기질 내 칼슘양은 0.5 mM H_2O_2 투여 시 의미 있게 감소하였다(대조군: $100\% \pm 15\%$, 0.1 mM 처리군: $114.8 \pm 22\%$, 0.3 mM 처리군: $102.7 \pm 28\%$, 0.5 mM 처리군: $35.0 \pm 12\%$, $P < 0.05$)(Fig. 6).

6. H_2O_2 처리 후 FACS를 이용한 세포자멸사 관찰

H_2O_2 유발 세포자멸사를 관찰하기 위하여, FACS 분석을 시행하였다. 그 결과 H_2O_2 를 처리한 군에서 대조군보다 세포자멸사가 증가함을 관찰하였다(Fig. 7).

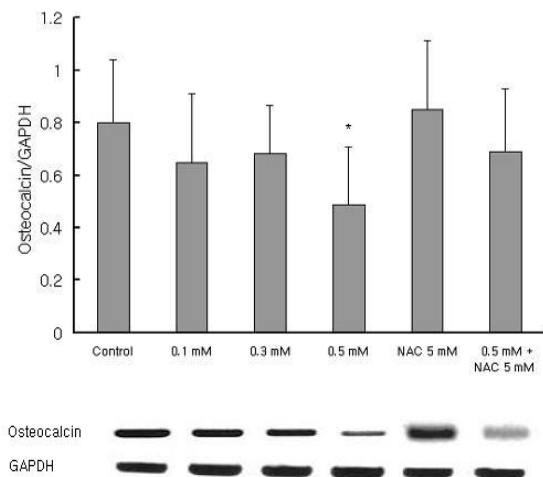


Fig. 5. Effect of H_2O_2 on osteocalcin gene expression determined by RT-PCR. The cells were seeded in 6 well culture plates at a density of 1×10^5 cells per well and grown for 12 days in secondary culture. The cells were then treated for 2 days with various dose of H_2O_2 . 1 μ g of the total RNA from each culture was reverse transcribed and subjected to PCR for osteocalcin analysis. GAPDH mRNA expression was also examined by RT-PCR as an internal reference. Representative PCR band and mean data of 3 experiments were shown. The results are presented as a mean \pm SEM.

* $P < 0.05$ compared with control.

7. H_2O 처리군에서 caspase-3과 caspase-9의 활성화

0.5 mM의 H_2O_2 를 16시간동안 반응시킨 후 관찰한 결과 caspase-3와 caspase-9의 활성도는 대조군에 비하여 의미 있게 증가하였지만(caspase-3 활성도; 대조군 67.6 ± 22 , 0.5 mM 처리군: 118.9 ± 38 (pmol of AMC), $P < 0.05$,

caspase-9 활성도: 대조군: 383.0 ± 43.4 , 0.5 mM 처리군: 558.0 ± 34.5 (pmol of AMC), $P < 0.05$], cytochrome *c* 비 의존적 세포자멸사 경로의 대표적 효소인 caspase-8의 활성도의 증가는 관찰할 수 없었다(Fig. 8).

8. H₂O₂ 처리 후 미토콘드리아 cytochrome *c*의 세포질 내로의 유출

H₂O₂ 처리 후 미토콘드리아 cytochrome *c*의 세포질 내로의 유출을 관찰하였다. H₂O₂를 처리하지 않은 경우 인체

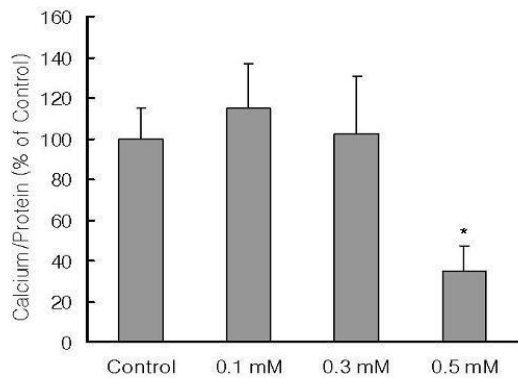


Fig. 6. Effect of H₂O₂ on matrix calcification. 5×10^4 mononuclear cells were plated in 24 well plates in α -MEM with 10% heat-inactivated FBS, 10 mM β -glycerophosphate, and 50 μ g/mL ascorbic acid in secondary culture. After the attachment period, the stromal cells were treated with H₂O₂. The calcium content of the matrix was determined and normalized to the protein content. The normalized value obtained from the cells incubated under the control conditions was set at 100%. The results are presented as a mean \pm SEM, $n = 4$, each performed in duplicate.
* $P < 0.05$ compared with control.

조골세포의 미토콘드리아로부터 세포질 내로의 cytochrome *c*의 유출은 거의 관찰되지 않았으나, 0.5 mM의 H₂O₂에 5 시간동안 처리 시 미토콘드리아로부터 세포질로 cytochrome *c*가 유출됨을 관찰할 수 있었다(Fig. 9).

고 찰

최근 활성산소가 노화의 주된 원인이며 나이가 많아짐에 따라 산화손상의 지표들이 증가되는 것으로 알려지고 있고 [18,19], 조기 노화의 쥐 모델에서 관찰되는 골다공증도 산화스트레스의 결과로 여겨지고 있다[20,21]. 또한 여러 임상 연구들에서도 산화스트레스가 골다공증과 밀접한 연관성이 있음이 보고 되고 있어[9~11] 산화스트레스와 노화 및 골다공증간의 연관성에 대한 관심이 증가되고 있다. 하지만 산화스트레스와 골다공증의 연관성에 대한 기존의 연구는 세포주를 이용한 실험실적 연구 또는 동물실험인 반면, 본 연구는 산화스트레스가 인체의 골수로부터 얻은 골수기질세포 유래 조골세포의 증식과 분화에 미치는 영향을 관찰한 첫 번째 실험이라는데 의의가 있다.

본 연구에서 골수기질세포의 증식능을 알아보기 위하여 일차배양에서는 CFU-F의 평균면적과 갯수를 관찰하였고 제대 배양 후 이차배양에서는 MTT측정을 하였다. 일차배양과 이차배양에서 모두 처리한 H₂O₂ 농도에 의존적으로 세포증식이 유의하게 감소하였다. 이는 산화스트레스가 증가할수록 골수기질세포의 증식능이 감소한다는 것을 시사한다. 또한 H₂O₂ 처리군에서 일차배양에서 알칼리성 포스파타제 염색에 양성인 CFU-F가 감소되었고, 이차배양에서도 조골세포 특이 분화 표지자인 오스테오칼신 mRNA의 발현과 칼슘의 침착이 감소된 것으로 보아 조골세포의 분화가 감소됨을 확인할 수 있었다.

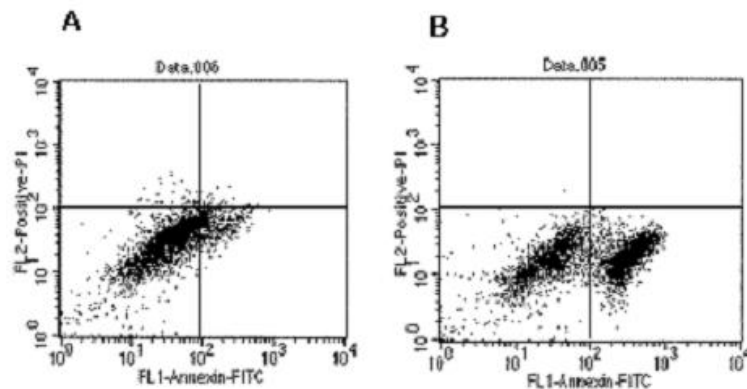


Fig. 7. Effect of H₂O₂ on apoptosis of human bone marrow stromal cell-derived osteoblasts. Cells were treated with or without 0.5 mM H₂O₂ for 4 hours, and apoptosis was measured by flow cytometric analysis after staining with annexin V-FITC and propidium iodide. Apoptotic cells were annexin V-positive and PI-negative (A, control; B, 0.5 mM H₂O₂).

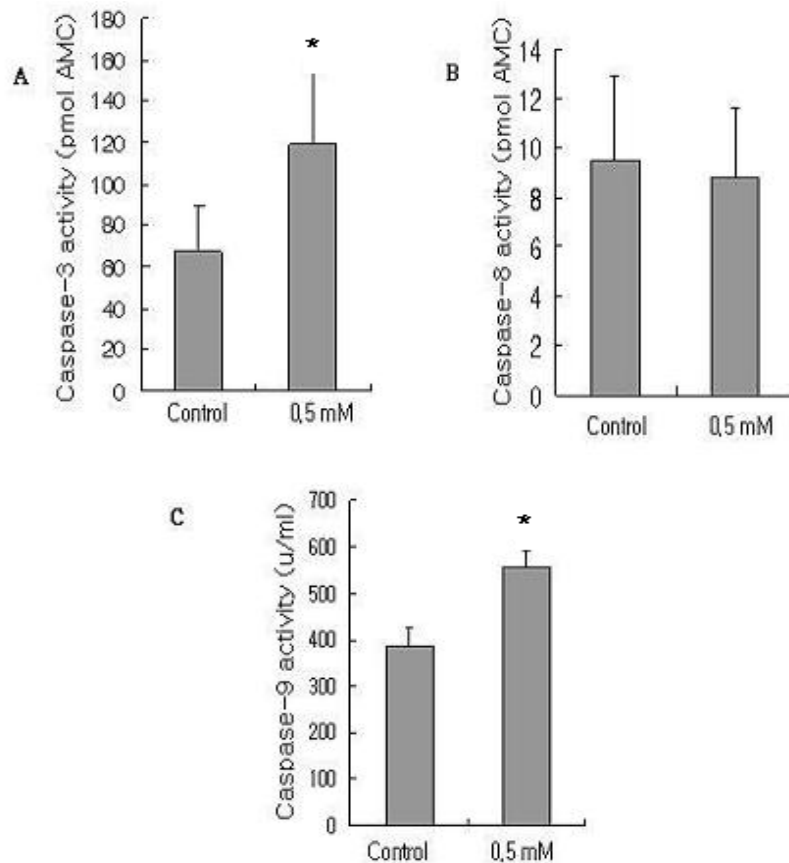


Fig. 8. Effects of H₂O₂ on casase-3, casase-8, and caspase-9 activity. Human bone marrow stromal cell-derived osteoblasts were treated for 16 hours with 0.5 mM H₂O₂. For each analysis, extracts were prepared from 1×10⁶ cells and incubated with caspase-3 (A), caspase-8 (B), or caspase-9 (C) fluorogenic substrates. Fluorescence was measured as released picomoles of AMC in a spectrofluorometer. Triplicated samples were compared with untreated cell lysates. * *P* < 0.05 compared with control.

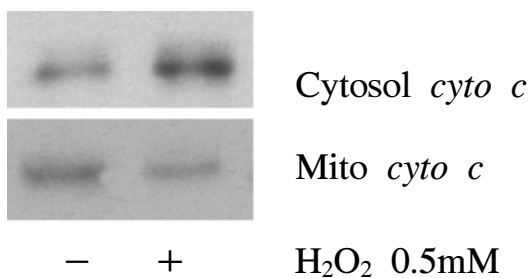


Fig. 9. Effects of H₂O₂ on cytochrome *c* release into cytoplasm. Mitochondrial and cytosolic fractions were prepared from cells treated with 0.5 mM H₂O₂ for 5 hours. Western blot analysis was carried out with mouse anti-cytochrome *c* antibody.

H₂O₂가 조골세포의 증식 및 분화에 미치는 영향에 관한 연구는 많지 않다. Bai 등[22]이 H₂O₂ 처리 시 토끼 골수 기질세포와 두개골 조골세포에서 조골세포의 분화가 감소됨을 보고하였고, 또한 쥐 두개골 조골세포의 분화의 감소

도 보고 되고 있다[23]. 또한 H₂O₂ 처리는 파골세포의 수를 증가시키고, 성숙한 파골세포의 활성을 증가시켜, 골흡수를 증가시키는 것으로 알려져 있다[12,13,24]. 즉 H₂O₂ 처리는 골흡수를 증가시키고, 조골세포의 분화를 저해하여 골감소를 유발시킬 수 있으리라 여겨진다.

여성호르몬과 bisphosphonate 등의 골흡수 저해제와 부갑상선호르몬 등의 골형성 촉진제의 기전이 밝혀지면서 골형성과 골흡수간의 균형을 매개하는 세포자멸사에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다[3,25,26].

H₂O₂가 조골세포의 세포자멸사에 미치는 영향에 대한 연구는 드물어서 chick 골세포의 세포자멸사 증가에 대한 보고가 있다[16]. 본 연구에서 Annexin V labeling을 이용한 FACS 결과 H₂O₂ 처리군에서 조골세포의 세포자멸사가 증가됨을 관찰할 수 있었고, 증가된 세포자멸사가 조골세포의 증식과 분화를 감소시키는데 일조함을 알 수 있었다. 또한 caspase-9와 caspase-3이 활성화되고 cytochrome *c*의 세포 질로의 유출이 증가되는 것으로 보아 미토콘드리아를 통한 세포자멸사 경로가 관여함을 확인할 수 있었다. H₂O₂ 등의

ROS는 파골세포[27], 인체 인대 섬유아세포[28] 및 연골세포[29,30]의 세포자멸사를 유발하는데, 역시 주된 세포자멸사 기전은 미토콘드리아 경로였다.

H₂O₂는 다양한 세포의 기능을 조절하는 것으로 알려져 있고, 0.01 mM - 5 mM의 농도범위에서 Jurkat cell, 심근 세포, 연골세포와 피부 섬유아세포 등의 세포자멸사를 유도한다[28]. Chen 등[31]에 의하면 쥐 두개골세포에 0.025 mM의 H₂O₂를 투여한 결과 1시간부터 세포 내 ROS의 증가가 발생하였으며, 세포활성도가 시간에 비례하여 감소되었다. Bai 등[32]에 의하면 쥐 조골세포와 MG-63 세포주에 0.05-0.5 mM의 H₂O₂ 투여 시 세포 내 ROS가 증가되었고, 0.5-1 mM을 투여하면 심한 세포사(cell death)를 일으켰다. 인체 골수기질세포에 대한 연구는 많지 않으나, HS-5 인체 골수기질세포주에 0.3 mM의 H₂O₂ 투여 시 세포 내 ROS 및 세포사가 증가됨이 보고된 바 있다[33]. H₂O₂농도에 따라 세포자멸사 또는 세포괴사(necrosis)를 야기할 수 있는데, Park 등[34]의 논문에 따르면 MC3T3-E1 쥐 조골세포주에 H₂O₂를 0.1-1 mM의 농도로 24시간 투여 후 관찰한 결과 0.5 mM의 농도에서 41%, 0.7 mM에서 54%의 세포활성도의 감소가 관찰되었고, 1 mM의 농도에서는 세포자멸사가 아닌, 전적으로 세포괴사에 의해 세포사가 발생되었다. 세포사중에서 0.5 mM에서 44%, 0.7 mM에서 56%가 세포자멸사에 의한 세포사였다. 하지만 골수기질세포를 조골세포로 직접 분화시키면서 H₂O₂를 처리하여 증식, 분화, 세포자멸사를 관찰한 논문은 없었다.

본 연구에서 2일간 H₂O₂ 처리 후 세포활성도를 관찰한 결과, 0.3 mM에서 28%, 0.5 mM에서 46%가 감소되었다. 0.3 mM 이상의 H₂O₂ 처리군에서 세포 증식이 감소되었으며, 0.5 mM 농도에서 분화가 감소되었다. 예비실험에서 세포자멸사의 초기 단계에 발생하며, 세포자멸사의 예민한 지표인 cytochrome c의 유출과, FACS로 관찰한 세포자멸사된 세포의 증가가 0.5 mM 처리군에서 명확해지기 시작하였다. 또한 2일간의 상대적으로 높은 농도의 H₂O₂처리가 인체 내에서 지속되는 저용량의 ROS와 견줄 수 있을 것으로 여겨 0.5 mM의 H₂O₂처리 후 세포자멸사에 대한 연구를 진행하였다. 향후 인체 조골세포에 대한 H₂O₂의 역할을 좀 더 명확히 규명하기 위하여는 다양한 농도와 처리시간에 따른 관찰이 필요하겠다. 또 세포자멸사에 각 caspase가 관여됨을 정확히 알기 위해서는 caspase 억제제를 이용한 실험이 도움이 될 수 있겠다.

본 실험에서 항산화제인 NAC를 H₂O₂와 동시에 처리시, MTT 분석으로 확인한 결과 산화스트레스로 인해 저하된 세포의 활성도가 회복되며, 성숙된 조골세포의 분화지표인 오스테오칼신 mRNA의 발현도 다시 증가되는 경향을 관찰할 수 있었다. 앞으로 항산화제 투여가 조골세포의 증식, 분화 및 세포자멸사에 미치는 영향에 대한 광범위한 연구가

뒷받침되어 골량 증가에 도움이 됨을 확인한다면 골다공증에 대한 미래의 치료 전략이 될 수 있겠다.

결론적으로 H₂O₂ 처리로 야기된 산화스트레스는 사람 조골세포의 증식과 분화를 저해하며 세포자멸사를 유발하였다. 세포자멸사 과정에는 caspase-8의 활성화 없이, 세포질 내로 유출된 cytochrome c가 caspase-9, caspase-3을 활성화시키는 미토콘드리아 경로가 관여되는 것으로 여겨진다. 나이가 많아짐에 따라 체내에 축적되는 산화스트레스와 골수기질세포의 조골세포로의 증식 및 분화에 미치는 영향에 관한 본 연구는 조골세포 증식과 분화 감소로 야기되는 골다공증의 예방과 새로운 치료 규명에 중요한 역할을 할 수 있으리라 생각된다.

요 약

연구배경: 최근 세포주와 동물실험에서 산화스트레스가 조골세포의 분화를 억제함이 보고 되고 있고, 사람연구에서도 증가된 산화스트레스가 골밀도의 감소와 연관됨이 보고 되고 있다. 이에 본 연구는 산화스트레스가 인체 골수에 존재하는 조골세포의 전구세포인 골수기질세포로부터 조골세포로 증식, 분화 및 세포자멸사에 미치는 영향을 살펴보고자 하였다.

방법: 정상 골수공여자로부터 골수를 채취, 단핵세포를 분리한 후 조골세포로 분화를 유도하는 배양 조건에서 다양한 농도의 H₂O₂ 및 항산화제인 N-acetylcystein (NAC)를 처리하였다. 일차배양에서는 CFU-Fs를 계수하여 골수 내 기질세포의 수를 추산하였고 알칼리성 포스파타제 염색을 통하여 조골세포로의 분화를 관찰하였다. 계대 배양 후 이차배양에서는 오스테오칼신 mRNA의 발현과 칼슘 침착을 관찰하여 H₂O₂ 농도에 따른 분화능 차이를 비교하였으며, MTT 측정을 하여 세포의 활성도를 관찰하였다. 또한 H₂O₂가 인체 골수기질세포의 세포자멸사에 관여하는지를 살펴보고자 FACS analysis를 시행하였고, 미토콘드리아 cytochrome c의 세포질 내로의 유출과 caspase-3, caspase-8, caspase-9의 활동도를 비교하였다.

결과: 일차배양 15일에 평균 CFU-F의 수, 평균 면적 및 총 면적은 0.3 mM H₂O₂ 처리군에서 대조군에 비하여 유의하게 감소되었다. 또한 알칼리성 포스파타제 염색 양성인 CFU-F의 평균 개수와 평균 크기도 0.3 mM H₂O₂ 처리군에서 의미 있게 감소되었다. 이차배양에서 시행한 MTT 검사에서 0.3 mM과 0.5 mM의 H₂O₂ 처리군에서 의미 있게 세포활성도가 감소되었다. 항산화제인 NAC와 동시에 처리한 경우 H₂O₂처리에 의해 감소된 세포활성도가 의미 있게 회복되었다. 이차배양 중에 계속된 오스테오칼신 mRNA의 발현은 0.5 mM의 H₂O₂ 처리군에서 의미 있게 감소되었다. 조골세포 분화의 후기 지표인 기질 무기화는 0.5 mM의

H₂O₂ 처리군에서 의미 있게 감소되었다. H₂O₂ 처리군에서 Annexin V-FITC와 PI 이중염색을 이용하여 FACS analysis로 관찰한 결과 세포자멸사된 세포의 비율이 증가되었다. Caspase-3과 caspase-9의 활성은 H₂O₂ 처리군에서 의미 있게 증가되었으나, caspase-8의 활성도에는 변화가 없었다. H₂O₂ 처리는 미토콘드리아 내 cytochrome c의 세포질 내로의 유출을 유도하였다.

결론: 산화스트레스는 인체 골수기질세포로부터 조골세포로의 증식과 분화를 저해하였고, 이와 같은 과정에는 미토콘드리아 경로를 통한 세포자멸사 기전이 관여하는 것으로 여겨진다.

참 고 문 헌

1. Finkel T, Holbrook NJ: Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408:239-247, 2000
2. Martindale JL, Holbrook NJ: Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J Cell Physiol* 192:1-15, 2002
3. Hughes DE, Dai A, Tiffée JC, Li HH, Mundy GR, Boyce BF: Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF-beta. *Nat Med* 2:1132-1136, 1996
4. Weinstein RS, Manolagas SC: Apoptosis and osteoporosis. *Am J Med* 108:153-164, 2000
5. Roholl PJ, Blauw E, Zurcher C, Dormans JA: Theuns HM. Evidence for a diminished maturation of preosteoblast during aging in rats: an ultrastructural analysis. *J Bone Miner Res* 9:355-366, 1994
6. Srivastava M, Deal C: Osteoporosis in elderly: prevention and treatment. *Clin Geriatr Med* 18:529-555, 2002
7. Inzerillo AM, Zaidi M: Osteoporosis; Trends and intervention. *Mt Sinai J Med* 69:220-231, 2002
8. Baek KH, Tae HJ, Oh KW, Lee WY, Cho CK, Kwon SY, Kang MI, Cha BY, Lee KW, Son HY, Kang SK, Kim CC: The effects of aging on the proliferation and differentiation of osteoblasts from human mesenchymal stem cells. *J Kor Soc Endocrinol* 18:296-305, 2003
9. Basu S, Michaelsson K, Olofsson H, Johansson S, Melhus H: Association between oxidative stress and bone mineral density. *Biochem Biophys Res Commun* 288:275-279, 2001
10. Maggio D, Barabani M, Pierandrei M, Polidori C, Catani M, Mecocci P, Senin U, Pacifici R, Cherubini A: Marked decrease in plasma antioxidants in aged osteoporotic women: results of a cross-sectional study. *J Clin Endocrinol Metab* 88:1523-1527, 2003
11. Morton D, Barrett-Connor EL, Schneider DL: Vitamin C supplement use and bone mineral density in postmenopausal women. *J Bone Miner Res* 16:135-140, 2001
12. Garrett IR, Boyce BF, Oreffo ROC, Bonewald L, Poser J, Mundy GR: Oxygen-derived free radicals stimulate osteoclastic bone resorption in rodent bone in vitro and in vivo. *J Clin Invest* 85:632-639, 1990
13. Fraser JHE, Helfrich MH, Wallace HM, Ralston SH: Hydrogen peroxide, but not superoxide, stimulates bone resorption in mouse calvariae. *Bone* 19:223-226, 1996
14. Mody L, Parhami F, Sarafian TA, Demer LL: Oxidative stress modulates osteoblastic differentiation of vascular and bone cells. *Free Radic Biol Med* 31:509-519, 2001
15. Nicholson NC, Ramp WK, Kneisl JS, Kaysinger KK: Hydrogen peroxide inhibits giant cell tumor and osteoblast metabolism in vitro. *Clin Orthop* 347:250-260, 1998
16. Kikuyama A, Fukuda K, Mori S, Okada M, Yamaguchi H, Hamanishi C: Hydrogen peroxide induces apoptosis of osteocytes: involvement of calcium ion and caspase activity. *Calcif Tiss Int* 71:243-248, 2002
17. Tintut Y, Parhami F, Bostrom K, Jackson SM, Demer LL: cAMP stimulates osteoblast-like differentiation of calcifying vascular cells. Potential signaling pathway for vascular calcification. *J Biol Chem* 273:7547-7553, 1998
18. Tolmasoff JM, Ono T, Cutler RG: Superoxide dismutase: correlation with life-span and specific metabolic rate in primate species. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:2777-2781, 1980
19. Sohal RS, Allen RG: Oxidative stress as a causal factor in differentiation and aging: a unifying hypothesis. *Exp Gerontol* 25:499-522, 1990
20. de Boer J, Andressoo JO, de Wit J, Huijmans J, Beems RB, van Steeg H, Weeda G, van der Horst GT, van Leeuwen W, Themmen AP, Meradji M, Hoeijmakers JH: Premature aging in mice deficient in DNA repair and transcription. *Science* 296:1276-1279, 2002

21. Tyner SD, Venkatachalam S, Choi J, Jones S, Ghebranious N, Igelmann H, Lu X, Soron G, Cooper B, Brayton C, Hee Park S, Thompson T, Karsenty G, Bradley A, Donehower LA: p53 mutant mice that display early ageing-associated phenotypes. *Nature* 415:45-53, 2002
22. Bai XC, Lu D, Bai J, Zheng H, Ke ZY, Li XM, Lo SQ: Oxidative stress inhibits osteoblastic differentiation of bone cells by ERK and NF-kappaB. *Biochem Biophys Res Commun* 314:197-207, 2004
23. Park YH, Han DW, Suh H, Ryu GH, Hyon SH, Cho BK, Park JC: Protective effects of green tea polyphenol against reactive oxygen species-induced oxidative stress in cultured rat calvarial osteoblast. *Cell Biol Toxicol* 19:325-337, 2003
24. Bax BE, Alam AS, Banerji B, Bax CM, Bevis PJ, Stevens CR, Monga BS, Bake DR, Zaidi M: Stimulation of osteoclastic bone resorption by hydrogen peroxide. *Biochem Biophys Res Commun* 183:1153-1158, 1992
25. Jilka RL, Weinstein RS, Bellido T, Roberson P, Parfitt AM, Manolagas SC: Increased bone formation by prevention of osteoblast apoptosis with parathyroid hormone. *J Clin Invest* 104:439-446, 1999
26. Weinstein RS, Chen JR, Powers CC, Stewart SA, Landes RD, Bellido T: Promotion of osteoclast survival and antagonism of bisphosphonate-induced osteoclast apoptosis by glucocorticoids. *J Clin Invest* 109:1041-1048, 2002
27. Oursler MJ, Bradley EW, Elfering SL, Giulivi C: Native, not nitrated, cytochrome c and mitochondria-derived hydrogen peroxide drive osteoclast apoptosis. *Am J Physiol Cell Physiol* 288:C156-168, 2005
28. Yuan J, Murrell AC, Trickett A, Wang M: Involvement of cytochrome c release and caspase-3 activation in the oxidative stress-induced apoptosis in human tendon fibroblast. *Biochim Biophys Acta* 1641:35-41, 2003
29. Lin HJ, Wang X, Shaffer KM, Sasaki Cy, Ma W: Characterization of H2O2-induced acute apoptosis in cultured neural stem/progenitor cells. *FEBS Lett* 570:102-106, 2004
30. Lo MY, Kim HT: Chondrocyte apoptosis induced by hydrogen peroxide requires caspase activation but not mitochondrial pore transition. *J Orthop Res* 22:1120-1125, 2004
31. Chen RM, Wu GJ, Chang HC, Chen JT, Chen TF, Lin YL, Chen TL: 2,6-diisopropylphenol protects osteoblasts from oxidative stress-induced apoptosis through suppression of caspase-3 activation. *Ann NY Acad Sci* 1042:448-459, 2005
32. Bai XC, Lu D, Liu AL, Zhang ZM, Li XM, Zou ZP, Zeng WS, CHeng BL, Luo SQ: Reactive oxygen species stimulates receptor activator of NF-kB ligand expression in osteoblast. *J Biol Chem* 280:17497-17506, 2005
33. Byun CH, Koh JM, Kim DK, Park SI, Lee KU, Kim KS: α -lipoic acid inhibits TNF- α induced apoptosis in human bone marrow stromal cells. *J Bone Miner Res* 20:1125-1135, 2005
34. Park BG, Yoo CI, Kim HT, Kwon CH, Kim YK: Role of mitogen-activated protein kinases in hydrogen peroxide-induced cell death in osteoblastic cells. *Toxicology* 215:115-125, 2005