

성장기 흰쥐의 골조직 Collagen 생성속도 측정

김 유 경

경북대학교 가정교육과

Measuring *in vivo* Rate of Bone Collagen Synthesis in Growing Rats

Yoo Kyeong Kim

Dept. of Home Economics Education, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

Abstract

Measuring *in vivo* rate of bone collagen synthesis has so far been technically difficult and often subject to quite large errors. In the present study, bone collagen synthesis rate was measured using a precursor-product method, based on the exchange of $^2\text{H}_2\text{O}$ into amino acids. Mass isotopomer abundance in hydroxyproline from bone collagen was analyzed by gas chromatography/mass spectrometry. The $^2\text{H}_2\text{O}$ labeling protocol consisted of an initial intraperitoneal injection of 99.9% $^2\text{H}_2\text{O}$, to achieve approximately 2.5% body water enrichment followed by administration of 4% $^2\text{H}_2\text{O}$ in drinking water for 9 weeks. Body $^2\text{H}_2\text{O}$ enrichments were stable at 2.7~3.0% over labeling period. In growing rats, the fractional synthesis rate (k_s) of bone collagen was $0.066 \pm 0.049 \text{ wk}^{-1}$. The unique features of stable $^2\text{H}_2\text{O}$ pools and label incorporation allowed the precursor-product approach to be used for measuring bone collagen synthesis rate.

Key words: collagen, synthesis rate, $^2\text{H}_2\text{O}$, precursor-product approach

서 론

Collagen은 체조직을 구성하는 주요 단백질로서, 특히 골조직을 구성하는 유기물의 약 95%가 collagen으로 구성되어 있다. Collagen은 모든 체조직의 성장, 발달 및 재형성 과정에 중요한 역할을 하고, collagen의 합성 및 분해속도의 균형이 깨어지면 여러 가지 병리현상으로 동맥경화, 간경화, 폐경색, 류마치스 관절염, 골다공증 등이 야기될 수 있다(1). 따라서, collagen의 합성 및 분해속도-교체율(turnover rate)-는 병리상태 및 진행과정에 대한 정보를 제공한다.

골교체율(bone turnover rate)을 나타내기 위하여 가장 많이 사용하는 방법은 생화학적 지표를 이용하는 것이다. 생화학적 지표는 골형성 및 골흡수시기 동안에 혈중으로 유리되거나 소변으로 배설되는 물질로서, 이를 측정함으로써 골형성 및 골흡수의 진행정도를 예측할 수 있다(2). 골형성 지표에는 alkaline phosphatase, osteocalcin 등이 있고, 골손실 지표로는 OH-proline, pyridinoline(Pyd), deoxypyridonoline(Dpd), tartarate-resistant acid phosphatase(TRAP) 등이 사용된다. 이와 같은 지표는 치료를 시작한 후 2~3개월의 짧은 기간동안에도 변화를 관찰할 수 있기 때문에 치료에 대한 반응을 조기에 알아볼 수 있는 유용한 방법이다(3). 그러나 생화학적 지표는 골대사 특이성 및 예민도가 낮아 결과해석

에 어려움이 있고, 때로는 일부 생화학적 지표의 측정결과가 상충되기도 한다(4,5). 따라서 골대사 특이성이 높은 새로운 생화학적 지표를 개발하려는 연구들이 계속되어왔고, 이와 더불어 동위원소를 이용하여 골구성 단백질인 collagen의 분해 및 생성과정을 추적함으로써 보다 직접적인 방법으로 골전환율을 측정하고자 하는 연구도 있었다(6,7).

동위원소 추적법은 단백질 생성·분해 등의 역동적인 대사과정을 추적하는 가장 직접적인 방법이다(8). 주로 동위원소가 함유된 아미노산을 공급하고 이것이 특정 단백질에 혼입된 정도를 측정한다. 동위원소 추적법은 전구체 공급원의 비균일성 및 복잡한 대사경로로 인한 해석상의 제한점을 극복하기 위하여 동위원소를 함유한 전구체를 지속적으로 투여하여 동위원소함량(isotopic enrichment)의 항상성을 유지해야 한다. 그러나 동위원소 추적자의 가격 및 투여된 동위원소물의 짧은 반감기 등으로 인하여 동위원소함량의 항상성을 유지하기 위한 비용을 감당하기 어렵다(9).

동위원소 추적법의 이런 한계점을 극복하기 위하여 많은 연구들이 이루어졌고, 특히 최근에 $^2\text{H}_2\text{O}$ 를 안정동위원소 추적자로 사용하여 사람과 동물을 대상으로 세포증식속도를 효과적으로 측정한 연구결과가 발표되었다(10).

$^2\text{H}_2\text{O}$ 는 저렴한 안정동위원소 추적자로서 독성이나 부작용 없이 장기간 공급 가능하고 공급방법 또한 간단하다. 따라

서 $^2\text{H}_2\text{O}$ 추적자는 전환속도가 느린 대사물인 골구성 단백질, 근육단백질, 지방세포, 상피세포 등의 전환속도를 측정하기 위한 rise-to-plateau kinetics 모델을 구축하는데 효과적으로 사용될 수 있다. 그러므로 본 연구에서는 생체내 골조직 collagen의 생성속도를 측정하기 위하여 $^2\text{H}_2\text{O}$ 추적자를 이용한 rise-to-plateau kinetics를 활용하였다.

재료 및 방법

시약

$^2\text{H}_2\text{O}$ 는 Isotec, Inc. (Miamisburg, USA)에서 구입하여 사용하였고, 그 외 시약들은 Sigma, Inc.(St. Louis, USA) 제품을 사용하였다.

실험동물

Sprague-Dawley 수컷 흰쥐(Simonsen, Inc., USA)를 공급받아 온도 $23 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도 $55 \pm 10\%$, 12시간 조명주기의 조건에서 사육하였으며, 사료(Purina rodent chow)와 물은 자유로이 섭취할 수 있도록 하였다. 실험동물의 체중을 $207 \pm 16 \text{ g}$ 으로 조절하고, 생후 7주에 99.9% $^2\text{H}_2\text{O}$ 를 일시 복강주입하여 실험동물 체액의 $^2\text{H}_2\text{O}$ 수준을 2.0~2.5%에 도달시킨 후 4% $^2\text{H}_2\text{O}$ 를 음용으로 9주 동안 계속 공급하였으며, 4% $^2\text{H}_2\text{O}$ 공급 1, 3, 5, 7, 9 후에 동물을 4마리씩 희생시켜 분석하였다.

경골 collagen의 분리 및 가수분해

왼쪽 뒷다리 대퇴골을 적출한 후 연조직, 골수, 결체조직 등을 모두 제거하였다. 물로 수세한 대퇴골을 질소가스하에 마쇄하고 chloroform : methanol(1 : 1)에 침수하여 지방을 제거한 후 건조하였다. 건조된 뼈가루를 6 N HCl에 넣고 110°C 에서 24시간 가열하여 가수분해하였다.

체액의 $^2\text{H}_2\text{O}$ 함량 측정

$^2\text{H}_2\text{O}$ 공급기간 중 1주 간격으로 채취한 쥐의 소변을 acet-ylene법으로 유도체를 만들어 gas chromatography/mass spectrometer(Hewlette-Packard, Palo Alto, USA)를 이용하여 안정동위원소비를 측정하였다(10).

아미노산의 안정동위원소비 측정

상기의 방법으로 얻은 유리아미노산을 N-acetyl, n-butyl ester법으로 유도체를 만들어 GC/MS를 이용하여 안정동위원소비를 측정하였다.

Fractional Replacement Rates (k_s) 계산법

$$\text{공식: } k_s(\text{d}^{-1}) = -[\ln\{1 - \langle \text{AA}(\text{protein})_t(\text{I.E.}) / \text{A}^\infty(\text{I.E.}) \rangle\}] / \text{time (d)} \quad (9)$$

A^∞ : AA(amino acid)의 동위원소함량(isotopic enrichment)이 정체기에 도달한 값.

$\text{AA}(\text{protein})_t(\text{I.E.})$: 시간 t에서 단백질을 구성하는 AA의 I.E.(isotopic enrichment).

결과 및 고찰

흰쥐 체액의 $^2\text{H}_2\text{O}$ 함량

99.9% $^2\text{H}_2\text{O}$ 를 일시 복강주입하여 체액의 $^2\text{H}_2\text{O}$ 함량을 약 2.5%에 도달하게(체중의 65%를 체액으로 계산) 한 후, 4% $^2\text{H}_2\text{O}$ 를 식수로 계속 공급하였다. 체중변화 추이를 통하여 흰쥐의 성장이 정상적임을 확인하였다(Table 1). 흰쥐 체액의 $^2\text{H}_2\text{O}$ 함량은 식수형태로 $^2\text{H}_2\text{O}$ 를 공급한 9주 동안 2.7~3.0%를 유지하였다(Table 2). 이 결과는 체액의 $^2\text{H}_2\text{O}$ 수준이 전 실험기간동안 일정하게 유지되었음을 나타내고, 따라서 골조직의 collagen을 신생하는데 사용될 아미노산에 치환되는 ^2H 가 일정한 속도로 공급되고 있음을 나타낸다. 식수와 체액의 $^2\text{H}_2\text{O}$ 함량의 차이는 식이에 함유된 수분과 연소과정에서 생성된 대사수에 의하여 4% $^2\text{H}_2\text{O}$ 가 희석된 결과인 것 같다. 동위원소를 이용하여 collagen과 같이 대사속도가 느린 단백질의 합성속도를 측정할 때, 가장 중요한 점은 전구체 공급원의 비균일성 및 복잡한 대사경로로 인한 해석상의 제한점을 극복하기 위하여 동위원소를 함유한 전구체를 지속적으로 투여함으로써 동위원소함량(isotopic enrichment)의 항상성을 유지하는 것이다. 이 경우 rise-to-plateau(precursor-product) kinetics를 적용하여 K_s 값을 정확하게 측정할 수 있고, 이로 인하여 tRNA-AA(단백질합성의 전구체) 공급원이 희석되는 것이 방지되고, tRNA-AA에 함유된 동위원소함량을

Table 1. Weight gains of growing rats

Weeks	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Body weight (g)	226.02 $\pm 10.65^{1)}$	259.06 ± 0.91	309.86 ± 7.24	334.86 ± 4.75	363.95 ± 4.51	373.96 ± 5.33	395.74 ± 6.07	408.78 ± 2.02	417.63 ± 2.80	429.70 ± 6.50

Animals were administered with 4% $^2\text{H}_2\text{O}$ in drinking water for 9 weeks after baseline priming bolus.

¹⁾Means \pm SE (n=4).

Table 2. Time course of body $^2\text{H}_2\text{O}$ enrichment in rats

Weeks	1	3	5	7	9
$^2\text{H}_2\text{O}$ enrichment (%)	$2.83 \pm 0.12^{1)}$	3.00 ± 0.12	2.89 ± 0.14	2.88 ± 0.21	2.85 ± 0.14

Animals were killed after 1, 3, 5, 7, and 9 weeks of 4% $^2\text{H}_2\text{O}$ administration after baseline priming bolus.

¹⁾Means \pm SE (n=4).

측정함으로써 기존의 연구방법에서 제기된 문제점들을 해결할 수 있다. 동위원소를 이용한 생체대사연구에서 제기되는 다른 문제점은, 동위원소 추적자의 가격이 비싸고 또한 투여된 동위원소물의 짧은 반감기로 인하여 동위원소함량의 항상성을 유지하기 위한 비용을 감당하기 어렵다는 것이다(9). 본 연구에서는 저렴하고 안정한 $^2\text{H}_2\text{O}$ 를 추적자로 사용하여 전구체 pool을 일정하게 유지함으로써 상기의 문제들을 해결할 수 있었다.

골조직 collagen 신생과정에서 아미노산에 혼입된 ^2H 함량

아미노산의 C-H에 결합된 수소는 단백질합성에 관여하는 효소반응에 의해서만 $^2\text{H}_2\text{O}$ 의 수소와 치환될 수 있다. 따라서 C-H결합의 H는 단백질 신생과정에서 아미노산에 혼입된 ^2H 함량을 GC/MS로 측정하는데 사용할 수 있는 유일한 수소원자이다. 반면 펩타이드와 단백질의 O-H 혹은 N-H에 결합된 수소는 단백질 신생과정과 무관하게 유리 아미노산 상태에서 $^2\text{H}_2\text{O}$ 로부터 치환된 것이다. 따라서 단백질의 신생량을 GC/MS를 이용하여 측정할 때, 유도체를 만드는 과정에서 O-H 혹은 N-H에 결합된 H를 제거하는 방법을 택해야 한다. 세포내에 있는 유리 아미노산은 중간대사과정을 통하여 $^2\text{H}_2\text{O}$ 의 ^2H 를 치환할 수 있지만, 펩티드결합을 형성한 아미노산이나 tRNA에 결합된 아미노산은 $^2\text{H}_2\text{O}$ 로부터 ^2H 를 치환할 수 없다.

골조직의 collagen을 구성하는 아미노산이 $^2\text{H}_2\text{O}$ 로부터 치환한 ^2H 양을 측정하여 rise-to-plateau kinetics의 속도상수를 측정하였다. 골조직의 collagen의 합성속도는 다음과 같다. $k_{s(\text{OH-pro})} = 0.066 \pm 0.049 \text{ wk}^{-1}$ (Fig. 1).

동위원소 추적자를 이용한 접근법은 역동적인 단백질 교체율을 측정할 수 있는 가장 직접적인 방법이다. 생체내 collagen 합성속도를 측정하기 위하여 동위원소를 함유한 아미노산을 추적자로 사용하는 방법을 많이 활용한다. 그러나, 기존의 방법들은 아미노산 공급원의 다양성 및 불균일성으로

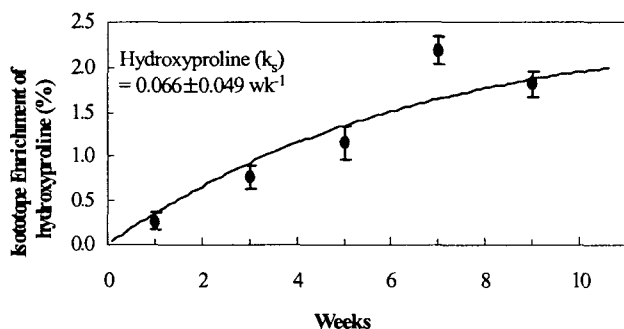


Fig. 1. Isotopic enrichment curve of hydroxyproline isolated from bone collagen in rats.

Calculated rate constant for hydroxyproline isolated from bone collagen is shown as an inset. Animals ($n = 4$ per time point) were killed after 1, 3, 5, 7, and 9 weeks of $^2\text{H}_2\text{O}$ administration after baseline priming bolus. Data of each time point are shown as means \pm SE.

인하여 결과해석에 어려움이 있다. El-Harake 등(7)과 Perez와 Reeds(11)는 각각 L-[1- ^{13}C]proline과 [U- ^{13}C]glycine을 사용하여 collagen 교체율을 측정하였는데, 이 방법들은 단백질분해물로부터 나온 동위원소가 단백질합성에 다시 사용됨으로써 교체율이 과소평가되었다고 지적되었다. 이 문제를 해결하기 위하여 단백질의 post-translational modification반응으로 생성되고 collagen에 특히 많이 함유되어 있는 hydroxyproline을 이용한 연구들이 이어졌다. Rucklidge 등(6)은 $^{18}\text{O}_2$ 가스에 동물을 노출시키고 hydroxyproline에 함유된 $^{18}\text{O}_2$ 비율을 측정함으로써 골전환율을 측정하고자 하였고, Jackson & Heininger(12)는 $^{18}\text{O}_2$ 가 결합된 hydroxyproline을 사용함으로써 아미노산이 재사용되는 문제를 해결하였다. 그러나, 이 방법은 $^{18}\text{O}_2$ abundance를 정확하게 측정하는데 다량의 동위원소가 필요하다는 단점이 있다.

본 연구에서는 독성이나 부작용 없이 장기간 공급 가능하고 저렴한 $^2\text{H}_2\text{O}$ 를 이용하여 골조직 collagen 합성속도를 측정함으로써 위에서 제기된 문제점들을 해결할 수 있었다. 즉, 실험기간동안 체액의 $^2\text{H}_2\text{O}$ 을 2.5~3.0% 수준으로 일정하게 유지함으로써 전구체 공급속도를 일정하게 유지할 수 있었고, 따라서 rise-to-plateau kinetics를 적용하여 골조직의 collagen 생성속도를 측정하였다. 흰쥐의 골조직 collagen 생성속도를 측정된 선행연구가 제한적이므로 수치를 직접적으로 비교할 수 없는 아쉬움이 있지만, $^2\text{H}_2\text{O}$ 를 이용한 안정동위원소비 질량분석법은 생리적으로 중요한 단백질의 대사과정을 연구하는 방법론으로서 뿐만 아니라 다양한 임상치료제 및 생리활성물질의 생리적 효용성 및 작용기전을 탐색하는 도구로 활용할 수 있을 것이다.

요 약

동위원소를 이용하여 골조직 collagen과 같이 대사속도가 느린 단백질의 합성속도를 측정할 때 가장 중요한 점은 전구체 공급원의 비균일성 및 복잡한 대사경로로 인한 해석상의 제한점을 극복하기 위하여 동위원소가 함유된 전구체를 지속적으로 투여하여 동위원소공급원의 항상성을 유지하는 것이다. 이 경우 precursor-product kinetics를 적용하여 k_s 값을 정확하게 측정할 수 있다. $^2\text{H}_2\text{O}$ 는 저렴한 안정동위원소 추적자로서 독성이나 부작용 없이 장기간 공급 가능하고 공급방법 또한 간단하다. 본 연구에서는 골조직 collagen 합성속도를 아미노산에 $^2\text{H}_2\text{O}$ 를 치환하는 precursor-product 방법으로 측정하였으며, 골조직 collagen으로부터 분리한 아미노산의 동위원소함량을 GC/MS로 분석하였다. 실험기간동안 체액의 $^2\text{H}_2\text{O}$ 는 2.7~3.0% 수준으로 일정하게 유지되었고 성장기 흰쥐 골조직의 collagen 합성속도는 $k_{s(\text{OH-pro})} = 0.066 \pm 0.049 \text{ wk}^{-1}$ 였다. 동위원소를 연속적으로 공급해야 하는 precursor-product 방법은 교체율이 느린 단백질에 적용하는데 기술적인 어려움이 있었지만, 안정하고 저렴한 $^2\text{H}_2\text{O}$ 특성으로 인하여

여 precursor-product 방법을 교체율이 느린 단백질에 적용하는 것이 가능하게 되었다.

문 헌

1. Batge B, Diehold J, Stein H, Bodo M, Muller PK. 1992. Compositional analysis of the collagenous bone matrix. A study on adult normal and osteopenic bone tissue. *Eur J Clin Invest* 22: 805-812.
2. Eyre DR. 1997. Bone biomarkers as tools in osteoporosis management. *Spine* 22 (24 Suppl): 17S-24S.
3. Arnaud CD. 1996. Osteoporosis: using 'bone markers' for diagnosis and monitoring. *Geriatrics* 51: 24-30.
4. Eriksen EF, Brixen K, Charles P. 1995. New markers of bone metabolism: clinical use in metabolic bone disease. *Eur J Endocrinol* 132: 251-263.
5. Delmas PD. 1992. Clinical use of biochemical markers of bone remodeling in osteoporosis. *Bone* 13: 517-521.
6. Rucklidge GJ, Milne G, McGaw BA, Milne E, Robins SP. 1992. Turnover rates of different collagen types measured by isotope ratio mass spectrometry. *Biochim Biophys Acta* 1156: 57-61.
7. El-Harake WA, Furman MA, Cook B, Nair KS, Kukowski J, Brodsky IG. 1998. Measurement of dermal collagen synthesis rate in vivo in humans. *Am J Physiol* 274: E586-E591.
8. Schoenheimer R. 1942. *The dynamic state of body constituents*. Harvard Univ. Press, Cambridge, MA.
9. Wolfe RR. 1992. *Stable isotope tracers in biomedicine*. John Wiley & Sons, Inc., New York.
10. Neese RA, Siler SQ, Cesar D, Antelo F, Lee D, Misell L, Patel K, Tehrani S, Shah P, Hellerstein MK. 2001. Advances in the stable isotope-mass spectrometric measurement of DNA synthesis and cell proliferation. *Anal Biochem* 298: 189-195.
11. Perez JF, Reeds PJ. 1998. A new stable isotope method enables the simultaneous measurement of nucleic acid and protein synthesis in vivo in mice. *J Nutr* 128: 1562-1569.
12. Jackson SH, Heininger JA. 1975. Proline recycling during collagen metabolism as determined by concurrent $^{18}\text{O}_2$ - and ^3H -labeling. *Biochim Biophys Acta* 381: 359-367.

(2003년 3월 21일 접수; 2003년 6월 24일 채택)