Angiopoietin-2가 조골세포와 파골세포의 성장과 활성에 미치는 영향

단국대학교 치과대학 구강생화학교실, 치의학연구소

고 선 일

혈관신생 (angiogenesis)은 골조직을 포함하는 모든 조직의 발생 및 개조 (remodeling) 과정에 필요하다. 본 연구는 혈관신생에 관여하는 단백질인 angiopoietin-2가 골대사에서 미치는 영향을 알아보기 위하여 세포수준에서 관찰하였다. 즉 조골세포에 미치는 영향을 알아보기위하여 세포생존률, 염기성인산분해효소 활성, gelatinase 활성 및 nitric oxide 생성을 관찰하였고, 파골세포에 미치는 영향을 알아보기 위하여 tartrate-저항성 인산분해효소 양성인 다핵세포의 형성 및 파골세포전구세포 배양 후 흡수면적을 측정함으로써 관찰하였다. Angiopoietin-2는 조골세포의 세포생존률 및 염기성 인산분해효소 활성을 증가시켰으며, gelatinase와 nitric oxide 생성의 증가시켰다. 또한 angiopoietin-2는 파골세포 생성 및 활성을 감소시켰다. 따라서 angiopoietin-2는 골수의 미세환경에서 세포의 조절작용을 하는 단백질로 여겨진다.

주제어: Angiopoietin-2, 조골세포, 파골세포

I. 서 론

골조직은 고등 척추동물에서 지지역할을 하는 특수하게 분화된 형태의 결합조직으로, 일생동안 재형성 (remodeling)이 일어나는 조직으로, 정상 성인에서는 파골세포에 의한 골흡수 양과 조골세포에 의한 골형성 양 사이에는 항상 균형이 유지되고 있다. 골재형성은 일정한 주기를 통해 일어나며 국소적으로 좁은 부위에서 일어남으로써 골격계의 구조가 유지되는데 이러한 골격계의 구조와 기능은 전신적인 호르몬과 국소적 인자 사이의 복잡한 상호작용에 의해 조절된다[1].

신생 혈관형성 (angiogenesis)은 골조직을 포함하는 많은 조직의 발생 및 개조과정에 필요하다. 골격계에서 파골세포와 파연골세포와 같이 뼈나 연골을 흡수하는 세포의 출현과 혈관의 분화는 동시에 일어나며, 신생 혈관의 형성과 석회화 기질의 흡수는 골조직의 형성과 성장에 필수적인 요소로 알려져 있다[2-4]. 이러한 골흡수와 혈관 신생의 밀접한 관계는 암의 골조직으로의 전이와 류마티스성 관절염과 같은 병적인 골조직 질환에서도 일어난다[5].

Vascular endothelial growth factor (VEGF)는 성장하는 뼈에서 발현되며, VEGF의 억제는 연골내골화의 장애와 유아 및 청년기의 동물에서 뼈 성장의 장애를 나타내는 결과를 보임으로 뼈 성장의 중요한 조정물질로 여기고 있다[2,6]. VEGF와 더불어 최근 연구에서는 endothelial tyrosine kinase receptor (Tie2)의 ligand가 혈관신생과 혈관의 성숙과정에 주요한 조절자로 알려져 있다[7,8]. Tie 2의 ligand는 angiopoietin -1과 angiopoietin-2의 두 종류가 알려져 있다[7,9]. Angiopoietin-2는 angiopoietin-1에 대한 자연계에서 발견되는 길항제이며, 신생혈관 형성과 암이 전이과정에서 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. 또한 proinflammatory cyotkine으로 잘 알려진 tumor necrosis factor-1 (TNF-a)는 angiopoietin 2의 발현을 증가시킨다고 알려져 있다[10].

교신저자 : 고선일
충청남도 천안시 안서동 산 29번지
단국대학교 치과대학 구강생화학교실
E-mail : syko@dku.edu

원고접수일: 2005-10-02
심사완료일: 2006-01-10

* 이 연구는 2004학년도 단국대학교 대학연구비의 지원으로 연구되었음

Angiopoietin-1과 angiopoietin-2는 높은 상동성을 가지는 분비형 단백질로써 약 75 kDa이며, Tie2에 결합한다[9]. Angiopoietin-1은 수용기에 결합함으로써 수용기의 autophosphorylation을 촉진하는 반면 Ang-2는 그러한 반응을 촉진하지 않는다[7]. Angiopoietin-1과 angiopoietin-2는 신혈관형성의 조절에 상반되는 역할을 한다고 알려져 있다[9]. 또한 Angiopoietin-1은 embryonic development동안 혈관의 성숙과정 동안 필요한 반면[11], angiopoietin-2는 Tie-2에 대한 angiopoietin-1의 활성을 상쇄시킴으로써 발생기의 태아의 혈관형성을 억제한다고 알려져 있다[9].

Angiopoietin은 많은 조직에서 혈관형성의 주요한 조절자로 알려져 있지만 뼈의 혈관성장의 조절 및 뼈세포에 대한 역할은 잘 알려져 있지 않다. 골조직은 간엽세포, 연골세포, 조골세포, 파골세포, 대식세포, 단핵세포, 내피세포와 골수세포 등 여러 종류의 세포로 구성된 결합조직이며 이들 모든 세포들은 순환하는 내분비 물질 뿐 아니라, 그들 스스로 분비하는 성장 조절인자에 반응하는 것으로 알려져 있다.

본 연구는 신 혈관형성에 관여하는 단백질인 angiopoietin-2가 골조직의 대표적인 세포인 조골세포와 파골세포에 미치는 영향을 세포수준에서 관찰하고자 하였다. 조골세포에 미치는 영향을 관찰하기 위하여, 실험 목적에 따라 사람의 골육종으로부터 유래한 HOS 세포와 마우스 두개관으로부터 유래한 MC3T3-E1 세포를 조골세포의 실험모델로 이용하여 세포생존률, 염기성 인산분해효소 활성, gelatinase 활성 및 nitric oxide (NO) 합성량을 측정하였다. 또한 미분화된 파골세포 전구세포로부터 파골세포의 생성 및 활성에 미치는 영향을 관찰하기 위하여, 마우스 골수세포를 분리하여 M-CSF와 receptor activator of NF-kB ligand (RANKL)을 처리하여 파골세포의 분화를 유도하였고, TRAP에 양성인 다핵세포의 형성을 관찰하여 파골세포의 생성에 미치는 영향을 알아보았으며, 흡수와를 측정함으로써 파골세포의 활성변화를 측정하여 angiopoietin-2가 골개조 현상과 같은 골대사의 조절과 관련되어 기능을 가지는지 세포수준에서 알아보고자 하였다.

Ⅱ. 연구 대상 및 방법

1. 연구 대상

Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM), α-minimum essential medium (α-MEM), fetal bovine serum (FBS), trypsin-EDTA 및 배양에 필요한 다른 시약들은 Gibco laboratories로부터 구입하였다 (Grand Island, NY, USA). 세포배양용기들은 Corning (Corning, NY, USA)사로부터 구입하였다. BCA 단백질 정량 시약은 Pierce사 (Rockford, IL, USA)로부터 구입하였다. 재조합 사람 angiopoietin-2는 R&D systems (USA)으로부터 구입하였다. 재조합 사람 M-CSF, 재조합 사람 RANKL과 재조합 사람 TGF-β는 PeproTech EC Ltd (USA)으로부터 구입하였다. 나머지 다른 시약은 Sigma chemical company (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. 연구에 사용된 동물은 6내지 8주된 웅성 ICR 마우스를 사용하였으며 다물 사이언스 (Korea)로부터 구입하였다.

2. 조골세포의 배양

조골세포의 실험모델로는 HOS 및 MC3T3/E1 세포주를 사용하였다. 통상적인 방법에 따라 조골세포를 10% FBS, 100 U/ml penicillin G, 100 ㎍/ml streptomycin sulfate 및 0.25 ㎍/ml amphotericin B가 첨가된 DMEM 및 α-MEM을 이용하여 75 ㎠ 배양플라스크에 배양하였다. 배양액을 일주일에 2번씩 교환해 주면서 세포가 단층을 이루면 trypsin-EDTA로 처리하여 세포를 수집한 후 1 : 10으로 계대배양을 시행하였다. 세포배양 시 37℃의 온도와 95% 습도를 유지하였으며 5% CO_2와 95% 공기를 공급하였다. 연구목적에 따라 세포를 24-well plate와 96-well plate에 분주하여 실험에 이용하였다.

3. 세포 생존률 측정

HOS 세포를 96-well plate에 well 당 5 x 10^3 개의 세포가 들어가도록 분주하여 3일간 배양하였다. 배양액을 제거하고 여러 농도의 angiopoietin-2가 첨가된 배양액으로 교환하여 준 후 2일간 세포배양을 시행하였다. 배양 마지막 4시간 동안 배양액에 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, 50 ㎍/well, Sigma)를 첨가하였으며, 배양기간 동안 생성된 formazan granule의 양을 측정함으로써 세포생존률을 평가하였다. 배양액을 제거하고 0.04 N HCl/isopropanol로 30분 동안 formazan granule을 용해시킨 후 microplate absorbance reader (SLT 400)를 이용하여 550 nm에서 비색정량 하였다.

4. 염기성 인산분해효소 활성측정

HOS 세포를 24-well 배양접시에 well 당 2 x 10^4 개의 세포가 들어가도록 분주하여 배양하면서 여러 농도의 angiopoietin-2를 배양액 내에 첨가하여 준 후 2일간 배양하였다. 배양이 끝난 후 0.1% Triton X-100/saline으로 처리하여 세포추출액을 만든 다음 염기성 인산분해효소의 활성을 측정하였다. 효소활성의 측정은 일정량의 세포추출액을 기질인 100 mM의 p-nitrophenyl phosphate (pNPP, Sigma)가 포함된 glycine-NaOH buffer (pH 10.4)에서 30분간 반응시킨 후 기질인 pNPP에서 분해된 p-nitrophenol의 양을 405 nm의 파장에서 microplate absorbance reader (SLT 400)를 이용하여 비색정량 하였다. 단백질 양은 BCA protein assay reagent를 이용하여 측정하였으며, 효소활성을 nmole substrate/h/mg protein으로 측정하였으며 대조군에 대한 백분율로 나타냈다.

5. Type IV collagenase/Gelatinase 활성 측정

HOS 세포를 24-well plate에 배양하면서 여러 농도의 angiopoietin-2가 첨가된 serum-free 배양액으로 교환하여 48시간동안 처리하였다. 배양이 끝나면 각각의 배양액을 모아 원심분리 함으로써 부유세포를 제거한 다음 필터형의 concentrator (Centricon TM, Amicon)을 이용하여 배양액을 약 5배 농축하였다. 농축된 배양액은 동량의 2X sample buffer로 혼합한 후 non-reducing 상태로 1 mg/ml의 gelatin이 첨가된 10% SES-PAGE gel (zymogram gel, Novex, USA)에 mini-gel electrophoresis system (Xcell Mini-Cell, Novex, USA)을 이용하여 전기영동을 시행하였다. 전기영동은 25 mA/gel의 조건으로 약 90분간 시행하며, 분자량 6,500-200,000인 pre-stained molecular weight standard (Kaleidoscope prestained standard, BioRad, USA)를 동일한 gel에 전기영동 함으로써 배양액 내에 존재하는 gelatinase의 분자량을 평가하였다. 전기영동이 끝난 후 renaturing buffer (0.25% triton X-100)으로 30분간 2회 세척하여 gel 내의 SDS를 제거한 다음 developing buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.3, 0.2 M NaCl, 6.7 mM $CaCl_2$, 및 0.02% Brij 35)로 1회 세척한 후 37℃에서 약 16시간 정도 incubation 하였다. 그 후 gel을 0.5% Coomassie brilliant blue R250으로 약 45분간 염색한 다음 탈색하여 gelatinase 밴드를 관찰하였다.

6. Nitric oxide 합성량 측정

MC3T3/E1 세포를 96-well plate에 well 당 5×10^3 개의 세포가 들어가도록 분주하여 배양하면서 여러 농도의 angiopoietin-2를 phenol-red가 없는 배양액 내에 첨가하여 준 후 2일간 배양하였다. NO의 양을 측정하기 위하여 배양액 내로 유리된 NO의 산화되어 안정한 형태인 nitrite 양을 측정하였다. 96-well reading plate에 100 ㎕의 세포배양액과 동량의 Griess 용액 (1% sulfanilamide, 0.1% naphthylethylene diamine dihydrochloride, 2.5% phosphoric acid)을 혼합한 후 실온에서 15분간 반응시켰다. Nitrite의 농도는 sodium nitrite의 순차적인 희석 농도로 만든 표준곡선을 이용하여 microplate absorbance reader (SLT 400)를 사용하여 530 nm에서 비색정량 했다.

7. M-CSF dependent bone marrow macrophage (MDBM) 세포 배양

마우스 골수세포를 분리하기 위해 마우스를 경부염전으로 희생시킨 후 대퇴골과 경골을 무균적으로 적출하고 연조직을 제거하였으며 장골의 양끝을 절단한 후 26G 주사침을 이용하여 한쪽 끝의 골수강에 0.01% collagenase, 0.05% trypsin 및 0.5 mM EDTA가 포함된 효소 용액 1 ml를 천천히 주사하여 골수세포를 모은 후 30분간 37℃에서 교반하여 골수세포를 모아 5초간 증류수로 처리하여 적혈구를 제거한 후 40 ㎛ nylon mesh (Cell strainer, Falcon, USA)로 여과하여 단일 세포가 되도록 분산시켰다. 10% FBS와 5 ng/ml M-CSF가 포함된 α-MEM으로 100 mm 배양접시에 6×10^6개 세포가 되도록 분주하여 24시간 전배양한 후 미부착세포들을 모았다. 파골세포의 전구세포가 되는 미부착세포를 10% FBS, 10 ng/ml M-CSF and 1 ng/ml TGF-β가 포함된 α-MEM으로 96-well plate 및 96-well OAAS™ plate (Oscotec Inc., Korea)에서 well당 5×10^4개의 세포가 되도록 분주하여 배양하였다. 8-9일간 배양하는 동안 10 ng/ml M-CSF, 1 ng/ml TGF-β 및 50 ng/ml RANKL과 여러 농도의 angiopoietin-2가 포함된 배양액으로 배양하였으며, 3일과 6일째 신선한 배양액으로 교환하였다. 배양이 끝난 후 파골세포의 생성을 검사하기 위하여 세포를 고정하여 TRAP 염색을 시행하고, 파골세포의 활성을 검사하기 위하여 세포를 떼어낸 후 흡수된 부위를 관찰하였다.

8. 파골세포의 생성측정

MDBM 세포의 배양이 끝난 후 인산완충 생리식염수로 세포를 세척한 다음 citrate-acetone-formaldehyde 용액으로 고정한 후 tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) 염색을 시행하여 파골세포의 생성정도를 평가하였다. TRAP 염색은 Sigma 사의 TRAP 염색용 kit를 구입하여 제조사의 지시에 따라 시행하였으며, 기질로 naphthol AS-BI phosphate를 이용하였고, 염색제로는 fast Garnet GBC 용액을 사용하였다. 염색이 끝난 후 광학현미경을 이용하여 핵이 3개 이상인 TRAP-양성 다핵세포를 계수하여 파골세포의 생성지표로 삼았다.

9. 파골세포의 흡수와 관찰

파골세포의 활성을 검사하기 위하여 수산화인회석으로 피막된 OAAS plate 에서 MDBM 세포를 배양 후 배양액을 제거하였다. 세포배양 후 붙어있는 세포를 제거하기 위하여 culture plate를 증류수로 세척한 후 5% sodium hypochlorite 용액을 넣어 5분간 방치한 후 다시 증류수로 깨끗이 세척한 후 말린 다음 흡수된 부위를 광학현미경상에서 관찰하여 image-pro plus (version 3.0, Media Cybernetics Inc., USA) 프로그램을 이용하여 전체 흡수와의 면적을 측정하였다.

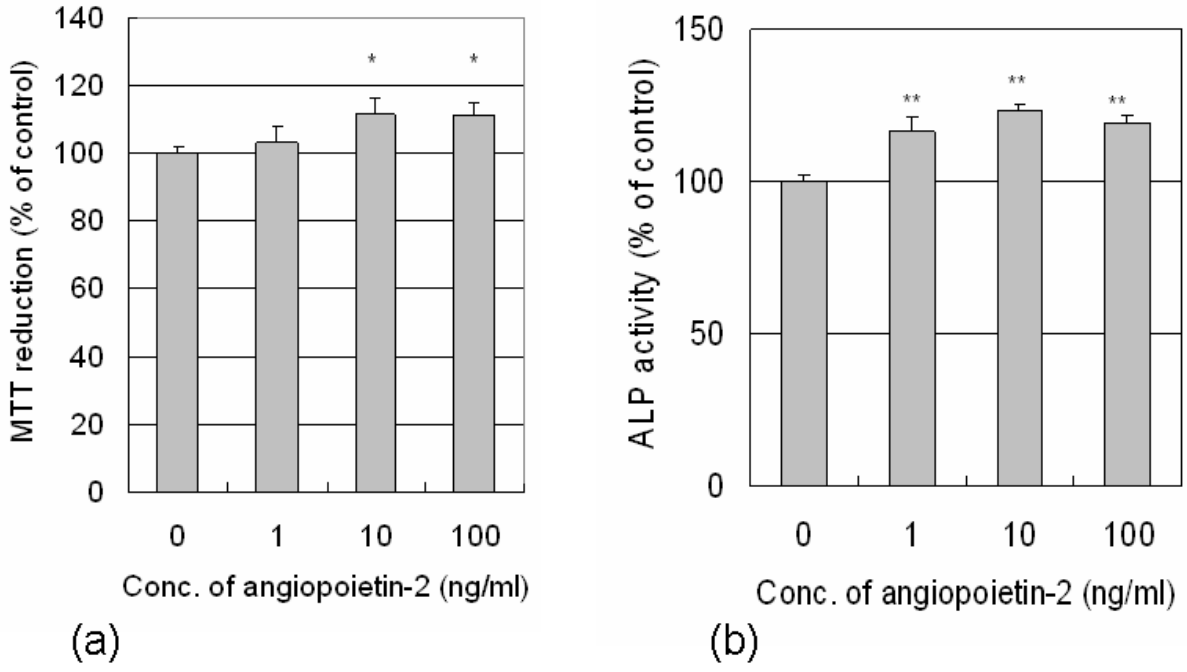

Fig. 1. Effects of angiopoietin-2 on the cell viability (a) and ALP activity(b) of osteoblastic cells.

(a) Osteoblasts were cultured in the presence or absence of angiopoietin-2 for 48 hours. Then cells were cultured in the presence of MTT for last 4 hours of culture. After culture, formazan granules were solubilized and optical density was measured with microplate reader. Values are Mean ± S.E. (n=5). $^{*}P<0.05$.

(b) Osteoblasts were cultured in the presence or absence of angiopoietin-2 for 48 hours. Enzyme activity was measured by spectrophotometric method using p-nitrophenyl phosphate as a substrate. The enzyme activity was calculated as nmole substrate cleaved/min/mg protein for HOS cells respectively. Values are Mean ± S.E. (n=5). $^{**}P<0.01$.

10. 통계처리방법

본 실험의 통계처리는 Student's t test 방법을 사용하였으며, 값은 평균과 표준 오차로 나타내었다.

Ⅲ. 연구 결과

Angiopoietin-2가 조골세포에 미치는 영향을 관찰하기 위하여, HOS 세포를 이용하여 세포 생존률, 염기성 인산분해효소 활성 및 gelatinase 활성을, MC3T3/E1 세포를 이용하여 NO 생성을 측정하였다. 또한 파골세포에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 마우스 골수세포를 분리하여 M-CSF와 RANKL을 처리하여 파골세포의 분화를 유도하였고, TRAP에 양성인 다핵세포의 형성을 관찰하여 파골세포의 생성에 미치는 영향을 알아보았으며, 흡수와를 측정함으로써 파골세포의 활성 변화를 측정하였다.

1. Angiopoietin-2가 조골세포의 성장 및 활성에 미치는 영향

Angiopoietin-2가 조골세포의 세포 생존률에 미치는 영향을 관찰한 결과, angiopoietin-2는 10 및 100 ng/ml의 농도에서 조골세포의 세포 생존률을 유의성 있게 증가시켰다 (Fig. 1a).

Angiopoietin-2가 조골세포의 활성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 조골세포의 표지 효소로 알려진 염기성 인산분해효소의 활성을 검사한 결과, angiopoietin-2는 1, 10, 100 ng/ml의 농도 모두에서 조골세포의 염기성 인산분해효소 활성을 증가시켰다 (Fig. 1b).

Angiopoietin-2가 조골세포의 유기기질 분해에 미치는 효과를 알아보기 위하여, gelatinase의 활성을 측정하였다. 72 KDa의 gelatin을 분해한 띠가 관찰되었으며, 1, 10, 및 100 ng/ml의 angiopoietin-2 처리에 의해 gelatinase의 활성이 현저히 증가됨을 관찰하였다 (Fig. 2).

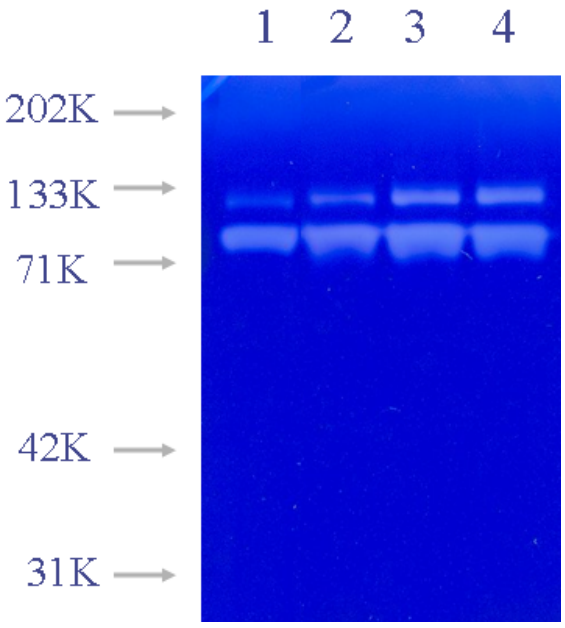

Fig. 2. Effect of angiopoietin-2 on the gelatinase activity. Concentrated conditioned media after culture with various concentrations of angiopoietin-2 was resolved in 10% zymogram gel containing 1 mg/ml gelatin. Numerals are molecular weight standard. Lane 1: control, lane 2-4: angiopoietin-2 1, 10 and 100 ng/ml.

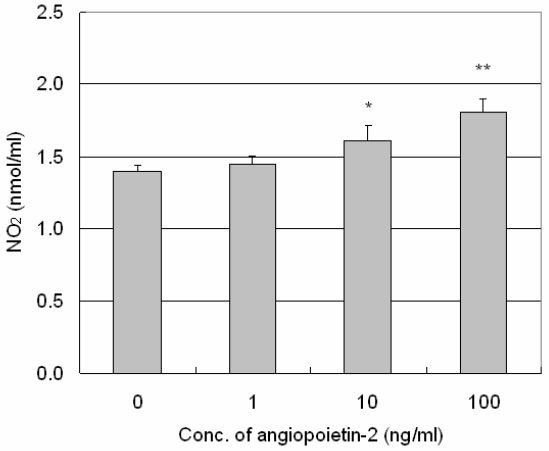

Fig. 3. Effect of angiopoietin-2 on the NO secretion of MC3T3/E1 cells. Osteoblasts were cultured in the presence or absence of angiopoietin-2 for 48 hours. Nitrite, a stable end-product of NO was measured by spectrophotometric method using Griess reagent. Values are Mean ± S.E. (n=5). *P<0.05, **P<0.01.

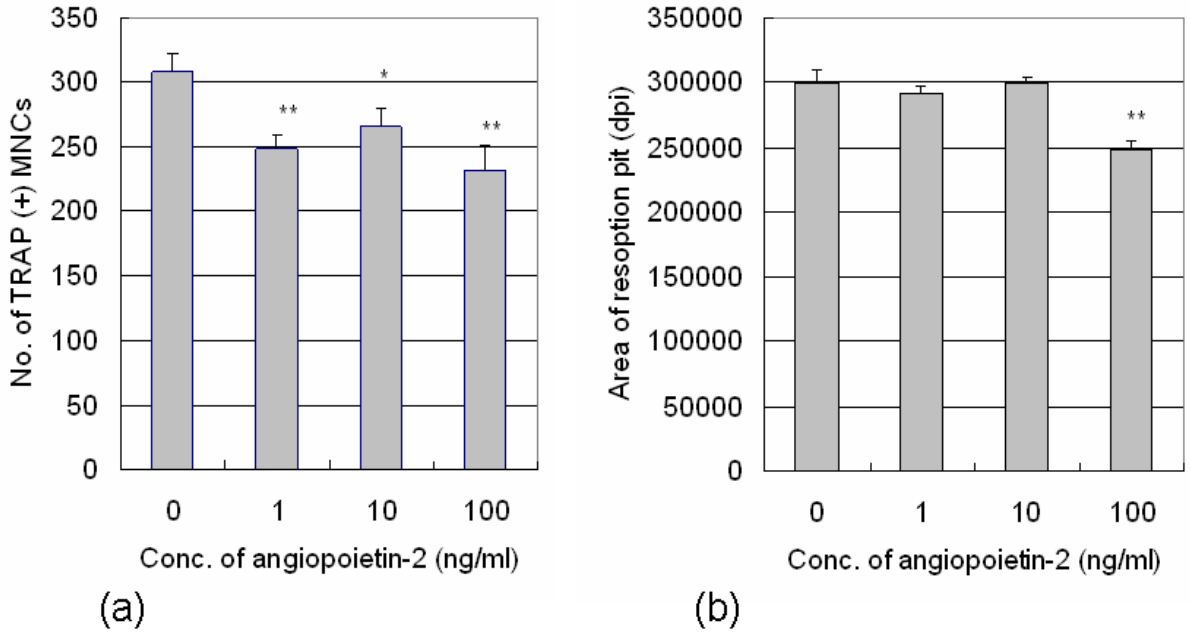

Fig. 4. Effect of angiopoietin-2 on the osteoclast generation(a) and osteoclastic activity(b) in culture of MDBM cells.

(a) MDBM cells were plated at a density 5 x 104 cells/well in a 96-well plate, cultured for 8 days in the presence of 10 ng/ml M-CSF, 30 ng/ml RANKL and various concentrations of angiopoietin-2. After culture, the TRAP (+) multinucleated cells containing three or more nuclei were counted as osteoclasts. Values are Mean ± S.E. (n=5). *P<0.05, **P<0.01.

(b) MDBM cells were plated at a density 5 x 104 cells/well in a 96-well OAAS plate, cultured for 8 days in the presence of 10 ng/ml M-CSF, 30 ng/ml RANKL and various concentrations of angiopoietin-2. After culture, the total area of the resorption pit was measured. Values are Mean ± S.E. (n=5). **P<0.01.

Angiopoietin-2가 조골세포의 NO의 생성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 배양액으로 유리된 NO의 산화되어 안정된 형태인 nitrite를 측정한 결과, 10 및 100 ng/ml의 angiopoietin-2는 NO의 생성을 유의성 있게 증가시켰다 (Fig. 3).

2. Angiopoietin-2가 파골세포의 성장 및 활성에 미치는 영향

Angiopoietin-2가 파골세포의 생성에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 파골세포 전구세포를 배양하여 M-CSF와 RANKL을 처리하여 TRAP 양성 다핵세포인 파골세포의 분화를 유도하였으며, angiopoietin-2는 TRAP 양성 다핵세포의 형성을 유의하게 감소시켰다 (Fig. 4a).

MDBM 세포를 OAAS™ plate에서 배양하면서 M-CSF와 RANKL을 처리하여 8일간 배양하였다. 배양이 끝난 후 세포를 제거하고, image 분석 프로그램을 이용하여 전체 흡수와를 측정한 결과 넓은 범위의 흡수와가 관찰되었다. 100 ng/ml의 angiopoietin-2를 처리한 경우 흡수와의 면적이 유의하게 감소하였다 (Fig. 4b).

Ⅳ. 총괄 및 고찰

골조직에서 angiopoietin-1, angiopoietin-2 및 VEGF는 주로 bone modeling과 remodeling site와 연골과 뼈의 경계면에서 주로 발견되며, angiopoietin-2는 연골세포에서 주로 발현되며, angiopoietin-1과 VEGF는 hypertrophic chondrocyte와 bone cell에서

주로 발현된다[9,12].

또한 angiopoietin-2은 조골세포와 파골세포에서 발현되며, remodeling이 일어나는 부위에서 혈관성장의 조절에 역할을 하리라 생각된다[13,14]. 최근 골조직과 관련된 생물학적 역할에 대한 연구도 진행되고 있다. 따라서 본 연구는 혈관형성 유도에 관여하는 단백질로 알려진 angiopoietin-2가 골조직의 대표적인 세포인 조골세포와 파골세포에 미치는 영향을 관찰하고자 하였다. 본 연구에서는 사람의 골육종에서 분리한 세포주인 HOS 세포주를 조골세포의 실험모델로 이용하였으며, 이 세포주는 염기성 인산 분해효소의 활성, 부갑상선 호르몬 처리에 의한 cyclic adenosine monophosphate 생성, 골조직 단백질의 형성 등 조골세포의 특징을 갖고 있어 조골세포의 실험모델로 널리 이용되는 세포주이다. 조골세포주를 배양하면서 angiopoietin-2를 배양액에 첨가한 경우 10 및 100 ng/ml의 농도에서 조골세포의 세포 생존률을 유의성 있게 증가시켰다. 염기성 인산분해효소는 조골세포의 표지효소로 이용되며 골조직 형성의 여러 단계에 관여할 것으로 추측되며[15,16], 본 연구에서는 angiopoietin-2가 조골세포의 활성에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 조골세포 활성의 지표로 염기성 인산분해효소의 활성을 측정한 결과, 실험에 사용한 모든 농도에서 조골세포의 염기성 인산분해효소 활성을 증가시켰다. Angiopoietin-2가 성장기 골조직내의 조골세포, 파골세포 및 골수강내의 세포에서 발현되며, 연골세포 분화와 함께 angiopoietin-2의 단백질과 mRNA 발현이 증가됨을 보고된 바 있다[14]. 따라서 본 연구 및 위의 결과에 의하면 angiopoietin-2가 autocrine 또는 paracrine 방법으로 조골세포에 작용하여 세포 생존률 및 세포 활성에 영향을 미치는 것으로 사료된다.

골조직은 교원질 및 비교원성 단백질 등과 같은 유기기질에 무기질이 침착되어 있는 구조를 갖고 있으며, 골조직의 분해과정도 무기질의 용해와 유기질의 분해과정에 의해 일어난다[17]. Matrix metalloproteinase (MMP)는 종양의 침윤과 전이에 중요한 역할을 하는 효소로 알려져 있으며, 특히 gelatinase A와 B (MMP-2와 MMP-9)가 중요한 역할을 나타낸다[18,19]. MMPs는 zinc 의존형 효소의 하나로 넓은 의미에서 발생기[20], 혈관염 및 혈관 손상 후[21]와 같은 과정 동안 세포 외 기질 단백질을 분해하는 효소이다. Angiopoietin-2가 조골세포의 유기기질 분해에 미치는 효과를 알아보기 위하여, gelatinase의 활성을 측정하였다. 본 실험에서 angiopoietin-2는 실험한 모든 농도 (1, 10, 및 100 ng/ml)에서 HOS 세포의 gelatinase의 활성을 증가시켰으며 특히 10 및 100 ng/ml의 농도에서 현저히 증가시켰으며, 이는 angiopoietin-2가 MMP-2의 활성을 조절한다는 보고[22]와 유사한 결과를 나타내었다. Das 등[23]은 angiopoietin-2가 배양중인 retinal endothelial cells에서 MMP-9의 발현을 증가시킴을 보고한 바 있다. 따라서 angiopoietin-2는 조골세포의 gelatinase 효소의 활성을 증가시킴으로 골조직 대사에 영향을 미치리라 생각된다.

다양한 기능을 가진 신호 전달물질인 NO가 조골세포의 증식 및 생존, 파골세포의 활성과 골개조 현상 등에 많은 영향을 미치며 골조직내의 중요한 신호 전달물질로 여겨지고 있으므로[24], angiopoietin-2가 조골세포로부터 NO의 생성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 MC3T3-E1 세포를 배양한 후 배양액으로 유리된 NO의 산화되어 안정된 형태인 nitrite를 측정하였다. 다른 실험에 이용한 HOS 세포주는 NO 생성양이 매우 낮아 검출이 어려우므로 MC3T3-E1 세포를 사용하였다. 그 결과 angiopoietin-2 10 및 100 ng/ml의 농도에서 NO 생성을 현저히 증가시켰다.

본 연구는 angiopoietin-2가 파골세포에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 파골세포 전구세포로부터 파골세포의 생성 및 활성에 미치는 영향을 관찰하였다. 파골세포가 조혈기관 기원인 것을 이용하여 다수의 파골세포 전구세포를 얻기 위하여 골수세포 배양이 널리 이용되고 있으며[25] 이러한 골수세포 배양시 관찰되는 다핵세포는 TRAP 양성 반응을 나타내고 CT 수용체[26]를 가지며 석회화된 상아질을 흡수할 때 주름변연을 형성하는[27]등의 파골세포의 특징을 나타내고 있으며, TPAP은 골조직내 다른 세포와 구별할 수 있는 파골세포의 세포화학적 표지효소로 이용된다[28]. 본 연구에서는 파골세포 전구세포를 배양하여, M-CSF와 RANKL을 처리하여 TRAP 양성 다핵세포인 파골세포의 분화를 유도하였으며, angiopoietin-2를 처리한 결과 TRAP 양성 다핵세포의 형성이 유의하게 감소되었다. 또한 angiopoietin-2를 처리하여 파골세포 전구 세포를 인회석으로 피막된 OAAS^{TM} plate에서 배양한 후 세포를 제거하고, 영상 분석 프로그램을 이용하여 전체 흡수와를 측정한 결과 넓은 범위의 흡수와가 관찰되었으며, 100 ng/ml의 angiopoietin-2를 처리한 경우 흡수와의 면적이 유의하게 감소하였다. 위의 결과로 angiopoietin-2가 파골

세포의 생성과 파골세포의 활성을 억제시킴을 알 수 있었다.

이상의 결과 angiopoietin-2가 조골세포의 성장과 활성 및 기질분해효소의 활성 및 NO 생성을 증가시키며, 파골세포의 생성과 파골세포의 활성을 감소시키는 결과를 나타내었으므로, angiopoietin-2가 골조직 대사의 조절에 영향을 미칠 것으로 생각되며, 정확한 작용기전의 규명이 필요하리라 사료된다.

참 고 문 헌

1. Canalis E, McCarthy T, Centrella M. Growth factors and the regulation of bone remodeling. J Clin Invest 1988;81:277-281.
2. Gerber HP, Vu TH, Ryan AM, Kowalski J, Werb Z, Ferrara N. VEGF couples hypertrophic cartilate remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral ossification. Nature Med 1999;5:623-628.
3. Horner A, Bishop NJ, Bord S, et al. Immunolocalisation of vascular endothelial growth factor (VEGF) in human neonatal growth plate cartilage. J Anat 1999;194:519-524.
4. Ryan AM, Eppler DB, Hagler KE, et al. Preclinical safety evaluation of rhuMabVEGF, an angiangiogenic humanized monoclonal antibody. Toxicol Pathol 1999;27:78-86.
5. Clavel G, Bessis N, Boissier MC. Recent data on the role for angiogenesis in rheumatoid arthritis. Joint Bone Spine 2003;70:321-326.
6. Harper J, Klagsbrun M. Cartilage to bone-angiogenesis leads the way. Nature Med 1999;5:617-618.
7. Davis S, Aldrich TH, Jones PF, et al. Isolation of agniopoietin-1, a ligand for the TIE1 receptor, by secretion-trap expression cloning. Cell 1996;87:1161-1169.
8. Asahara T, Chen DH, Takahashi T, et al. Tie-2 receptor ligands, angiopoietin-1 and angiopoietin-2 modulate VEGF-induced postnasal neovasculaisation. Circulation Res 1998;83:233-240.
9. Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, et al. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. Science 1997;277:55-60.
10. Kim I, Kim JH, Ryu YS, Liu M, Koh GY. Tumor necrosis factor-alpha upregulates angiopoietin-2 in human umbilical vein endothelial cells. Biochem Biophys Res Commun 2000;269:361-365.
11. Suri C, Jones PF, Patan S, et al. Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for Tie2 receptor, during embryonic angiogenesis. Cell 1996;87:1171-1180.
12. Papapetropoulos A, Garcia-Cardena G, Dengler TJ, Maisonpierre PC, Yancopoulos GD, Sessa WC. Direct actions of angiopoietin-1 on human endothelium: evidence for network stabilization, cell survival, and interaction with other angiogenic growth factors. Lab Invest 1999;79:213-223.
13. Yuan HT, Suri C, Yancopoulos GD, Woolf AS. Expression of angiopoietin-1, angiopoietin-2, and the tie2 receptor tyrosine kinase during mouse kidney maturation. J Am Soc Nephrol 1999;10:1722-1736.
14. Horner A, Bord S, Kelsall AW, Coleman N, Compston JE. Tie2 ligand angiopoietin-1 and angiopoietin-2 are coexpressed with vascular endothelial cell growth factor in growing human bone. Bone 2001;28:65-71.
15. Siffert RS. The role of alkaline phosphatase in osteogenesis. J Exp Med 1951;93:415-422.
16. Fauran-Clavel MJ, Oustrin J. Alkaline phosphatase and bone calcium parameters. Bone 1986;7:95-99.
17. Nijweide PJ, Burger EH, Feyen JHM. Cells of bone : Proliferation, differentiation, and hormonal regulation. Physiol Rev 1986;66:855-886.
18. Matrisian LM. The matrix-degrading metalloproteinases. Bioessays 1992;14:455-463.
19. Kleiner DE, Stetler-Stevenson WG. Matrix metalloproteinases and metastasis. Cancer Chemother Pharmacol 1999;43:S42-S51.
20. Galis ZS, Muszynski M, Sukhova GK, et al. Cytokine-stimulated human vascular smooth muscle cells synthesize a complement of enzyme required for extracellular matrix digestion. Circ Res 1994;75:181-189.
21. Johnson JL, van Eys GJ, Angelini GD, George SJ. Injury induces dedifferentiation of smooth muscle cells and increased matrix-degrading metalloproteinase activity in human saphenous vein. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2001;21:1146-1151.
22. Hu B, Guo P, Fang Q, et al. Angiopoietin-2 induces human glioma invasion through the activation of matrix metalloprotease-2. PNAS 2003;100:8904-8909.
23. Das A, Fanslow W, Cerretti D, Warren E, Talarico N, McGuire P. Angiopoietin/Tek interactions regulate mmp-9 expression and retinal neovascularization. Lab Invest 2003;83:1637-1645.
24. Danziger R, Zuckerbraun B, Pensler J. Role of nitric oxide in the regulation of osteoblast metabolism. Plastic and Reconstruc Surg 1997;100:670-673.

25. Takahashi N, Yamana H, Yoshiki S, et al. Osteoclast-like cell formation and its regulation by osteotropic hormones in mouse bone marrow cultures. Endocrinol 1988;122:1373-1382.
26. Takahashi N, Akastu T, Sasaki T, et al. Induction of calcitonin receptors by 1α,25-dihydroxyvitamin D_3 in osteoclast-like multinucleated cells formed from mouse bone marrow cells. Endocrinol 1988;123: 1504-1510.
27. Sasaki T, Takahashi N, Higashi S, Suda T. Multinucleated cells formed on calcified dentin from mouse bone marrow cells treated with 1 α,25-dihydroxyvitamin D_3 have ruffled borders and resorb dentin. Anat Rec 1989;224:379-391.
28. Minkin C. Bone acid phosphatase: Tartrate-resistant acid phosphatase as a marker of osteoclast function. Calcif Tissue Int 1982;34:285-290.

ABSTRACT

Effects of Angiopoietin-2 on the Proliferation and Activity of Ostoeblasts and Osteoclasts

Seon-Yle Ko, D.D.S.,M.S.D.,Ph.D.

Department of Oral Biochemistry, Dental Research Institute, School of Dentistry, Dankook University

The present study was undertaken to determine the possible cellular mechanism of action of angiopoietin-2 in bone metabolism. The effects on the osteoblasts were determined by measuring 1) cell viability, 2) alkaline phosphatase (ALP) activity, 3) gelatinase activity, and 4) nitric oxide production. The effects on the osteoclasts were investigated by measuring 1) tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP)(+) multinucleated cells (MNCs) formation, and 2) resorption areas after culturing osteoclast precursors. Angiopoietin-2 treatment showed a significant increase in both the viability and ALP activity of osteoblasts. Angiopoietin-2 increased the activity of gelatinase and nitric oxide production. In addition, angiopoietin-2 decreased the osteoclast generation induced by macrophage-colony stimulating factor (M-CSF) and receptor activator of NF-kB ligand (RANKL), and inhibited osteoclastic activity in (M-CSF)-dependent bone marrow macrophage (MDBM) cell cultures. Taken these results, angiopoietin-2 may be a regulatory protein within the bone marrow microenvironment.

Key words : Angiopoietin-2, Osteoblast, Osteoclast