

## 저산소증이 파골세포 분화에 미치는 영향에 관한 연구

심혜영<sup>1</sup> · 정다운<sup>2</sup> · 채창훈<sup>3</sup> · 이영<sup>4</sup> · 장은식<sup>4</sup> · 최미라<sup>5</sup> · 홍순민<sup>6</sup> · 박준우<sup>6</sup>

서울시립보라매병원 <sup>1</sup>교정과, <sup>2</sup>보철과, <sup>3</sup>나노큐어텍

한림대학교 <sup>4</sup>의학과 대학원생, <sup>5</sup>의과대학 강동성심병원 보철과, <sup>6</sup>의과대학 강동성심병원 구강악안면외과

### Abstract

#### EFFECTS OF HYPOXIA ON THE FORMATION OF OSTEOCLAST

Hye-Young Sim<sup>1</sup>, DDS, MSD, PhD, Da-Un Jung<sup>2</sup>, DDS, MSD, Chang-Hoon Chae<sup>3</sup>, PhD, Young Lee<sup>4</sup>, DDS, MSD, Eun-Sik Jang<sup>4</sup>, DDS, MSD, Mee-Ra Choi<sup>5</sup>, DDS, MSD, Soon-Min Hong<sup>6</sup>, DDS, MSD, PhD, Jun-Woo Park<sup>6</sup>, DDS, MSD, PhD

<sup>1</sup>Department of orthodontics, <sup>2</sup>Department of Prosthodontics, Seoul Municipal Boramae Hospital, <sup>3</sup>NanoCureTech Inc, <sup>4</sup>Graduate Student of Hallym University, <sup>5</sup>Department of Prosthodontics, <sup>6</sup>Department of Oral & Maxillofacial Surgery, KangDong Sacred Heart Hospital, College of Medicine, Hallym University

The vascular changes in periodontal tissues cause local hypoxia which seems to affect the periodontal tissue cells. Abrupt changes in oxygen availability within the periodontium have been suggested to have a regulatory role in alveolar bone remodeling during tooth movement, bone growth or fracture healing. The purpose of this study was to study the effects of hypoxia on formation of osteoclast responsible for bone resorption, *in vitro*. Primary mouse bone marrow cells were cultured in normoxic (20% O<sub>2</sub>) and hypoxic (1% O<sub>2</sub>) conditions and assayed for cellular proliferation. The results obtained were as follows :

1. Reducing oxygen tension increased the formation of multinucleated osteoclasts.
2. Hypoxic stimulus increased the size of mature osteoclasts.

**Key words:** Osteoclast, Hypoxia

### 1. 서 론

산소는 ATP생산과정에서 전자 공여체로 작용하기 때문에 포유동물의 생존에 필수적인 요소이다. 산소농도의 변화는 특이한 방식으로 모든 조직에 영향을 주는 생리적 자극을 주게 된다. 산소농도 변화에 대한 세포들의 반응은 복잡적이며, 스트레스 관련 유전자들과 항상성 유지에 필요한 단백질 유전자들의 발현을 특징적으로 변화시키게 된다. 복잡적이고 상호작용적인 피드백 관계 또한 나타나게 되는데 산소 농도 변화에 따라 조절된 유전자 산물들이 또한 그 신호 메커니즘을 조절하게 된다.

생체 외 실험에서 산소 농도의 변화가 세포에 미치는 영향은 특히 유전자의 발현차이에 의해 생리적인 때로는 병적인 결과를 가져온다.<sup>1,2)</sup> 산소의 부족은 세포 기능에 필수적인

ATP를 충분히 생산하지 못하는 결과를 가져오게 되고, 반면 산소의 과잉은 유해 활성 산소 중간산물을 만들어내는 결과를 가져올 수 있다. 따라서, 세포의 산소 농도는 생리적 범위에서 세밀히 조절되어야 한다. 산소 반응 유전자 발현은 hypoxia inducible transcription factor (HIF)에 의해 조절되는데, 이는  $\alpha$ 와  $\beta$  서브유닛으로 구성된 이량체이다.<sup>3)</sup> 산소가 존재하는 경우 HIF- $\alpha$ 는 HIF prolyl hydroxylases에 의해 분해되어 기능을 하지 못하나 산소가 부족한 경우 HIF- $\alpha$ 와  $\beta$  서브유닛이 안정적으로 결합하여 대상 유전자의 발현에 영향을 미치게 된다.<sup>4)</sup>

골절 부위나 치아에 교정력이 가해졌을 때 압박측의 치주 인대는 혈류가 감소하며 저산소증이 발생한다. 저산소증 상태에서 일정 기간이 경과하면 파골세포가 치조골벽을 따라 분화하게 되고 인근 치조골의 흡수가 시작된다.<sup>5)</sup> 골절 부위

의 치유 과정이나 교정적인 치아 이동이 일어나는 동안, 치주 조직은 광범위한 재개조가 일어나며 산소 농도에 민감하게 된다.<sup>6)</sup>

파골세포는 macrophage-monocyte lineage progenitors에서 유래한 다핵세포로 골을 흡수하는 기능을 가지고 있다.<sup>7)</sup> 저산소증은 monocyte-macrophage lineage를 비롯하여 marrow precursors에서 유래한 세포들의 형성 및 활성화에 영향을 주는 것으로 알려져 있다. 또한 이러한 세포들은 파골세포와 밀접한 관련이 있는 세포들이다.<sup>8)</sup>

다양한 세포들에 대한 저산소증의 영향이 연구되었으나, 파골세포에 대한 영향은 알려진 바가 적다. 초기의 한 연구에서,<sup>1)</sup> 다양한 산소 농도가 골조직의 콜라겐의 합성 및 분해에 미치는 영향을 통해 파골세포에 대한 영향을 조사하였다. 이 연구에 의하면 저산소증은 콜라겐의 합성 속도를 분해 속도보다 빠르게 만들었다. 고농도의 산소에서는 합성 속도와 분해 속도가 모두 증가하였다. 50%의 산소 농도에서 합성 속도와 분해 속도는 거의 동일하였다. 그러나, 최근의 연구<sup>2)</sup>에서는 저산소증이 파골세포의 형성을 촉진하는 역할을 하였으며, 저산소증에 의해 파골세포의 수와 크기가 증가하였다고 보고되었다. 이 연구의 목적은 저산소증이 파골세포의 형성에 미치는 영향을 조사하는 것이다.

## II. 연구 재료 및 방법

6주된 백서의 경골로부터 골수 세포를 채취하였다. 경골을 제거하여 골단을 자른 후 골수를 HBBS로 세척하였다. 얻어진 골수 세포를 배양접시에 담고 하룻밤 배양하여 기질 세포와 다른 빠르게 부착하는 세포들이 배양접시 바닥에 붙도록 하였다. 바닥에 붙지 않은 골수 세포를 모아 박테리아 배양접시에 담은 후 M-CSF (50 ng/ml) 존재 하에 3일간 배양하였다. 배양 후 바닥에 붙지 않는 세포들은 제거하고 바닥에 붙은 세포들을 모았으며 이 세포들은 골수대식세포임을 확인하였다.

파골세포는 이 골수대식세포를 배양하여 얻었다.  $4 \times 10^4$ /ml 골수대식세포를 M-CSF (30 ng/ml)와 RANKL (100 ng/ml)의 존재 하에 24 well plate에 배양하여 파골세포가 분화되도록 하였다. 배양시 실험군은 저산소 세포배양기를 이용하여 5% 산소농도와 1% 산소농도에서 배양하였고 산소농도를 조절하기 위해서 질소가스를 이용하였다. 대조군은 대기중의 산소농도에서 배양하였다.

저산소증이 파골세포 분화에 미치는 영향을 보기 위하여 저산소증 혹은 정상산소농도에서 총 10일간 배양하였으며 실험군과 대조군 모두 37°C에서 배양하였다. 각각의 배양 접시에는 약  $4 \times 10^4$ 개의 대식세포를 넣어 배양을 시작하였으며, 배양이 끝난 후 10% 포름알데히드로 고정을 하고, TRAP 염색을 하여 파골세포의 수를 조사하였다.

저산소증이 파골세포의 기능에 미치는 영향을 보기 위하여서는, 배양접시를 정상산소농도에서 11일간 배양하여 분화된 파골세포를 얻은 후 이를 각각의 저산소배양기에서 1일간 더 배양한 후 TRAP염색을 시행하여 정상산소농도에서 1일간 더 배양한 군과 비교하였다.

## III. 결 과

백서의 골수대식세포를 M-CSF와 RANKL 존재 하에 10일간 배양하였을 때, 골수 대식세포는 단핵 파골세포와 성숙한 파골세포로 분화하였다. 파골세포의 형태를 띤 세포는 9일째 관찰되었다 (Fig. 1). 일부 세포들은 일반적으로 3개 이상의 핵을 가진 파골세포로 분화하였으며 일부 세포들은 골수대식세포나 단핵세포로 남아있었다. 저산소증이 TRAP 염색이 특징적인 다핵의 파골세포로 분화하는 세포수에 미치는 영향을 보기 위하여 산소농도를 조절할 수 있는 배양기를 사용하였다. 그 결과 산소농도의 감소는 다핵의 파골세포로 분화된 세포의 수를 30% 증가시켰다 (Fig. 2). 산소농도의 감소가 파골세포의 기능에 미치는 영향을 보기 위해 11일간 정상산소 농도에서 배양한 후 1일간 저산소증에 노출시 파골세포의 형성이 증가하지는 않았으나 파골세포의 크기가 명확히 커지는 것이 관찰되었다 (Fig. 3). 이러한 결과는 저산소증이 파골세포의 형성과 기능을 증가시키는 역할을 한다는 것을 보여준다.

## IV. 고 찰

정상적인 조직에서, 간질의  $pO_2$ 는 약 4-8%로 예를 들면, 정상적인 골수의 경우 약 6% 정도로 보고되었다.<sup>9,10)</sup> 그러나 염증조직, 종양, 창상이나 골절 부위의 경우  $pO_2$ 가 상당히 낮아서 토끼에서 골절 4일 후 상처부위에서 0.8%로 보고되기도 하였다.<sup>11)</sup>

저산소증은 심혈관계, 혈액성, 그리고 호흡계질환이나 염증반응이나 섬유화 과정에서 발생하게 된다.<sup>12)</sup> 종양에서 산소농도가 낮아지는 것은 종양의 증식, 전이, 치료에 대한 저항과 관계가 있다.

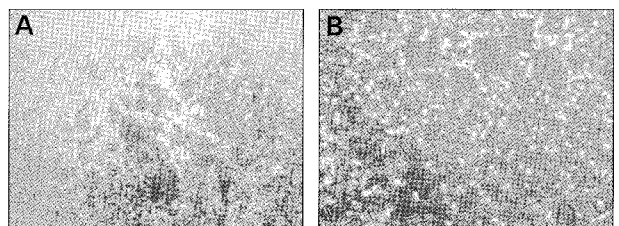
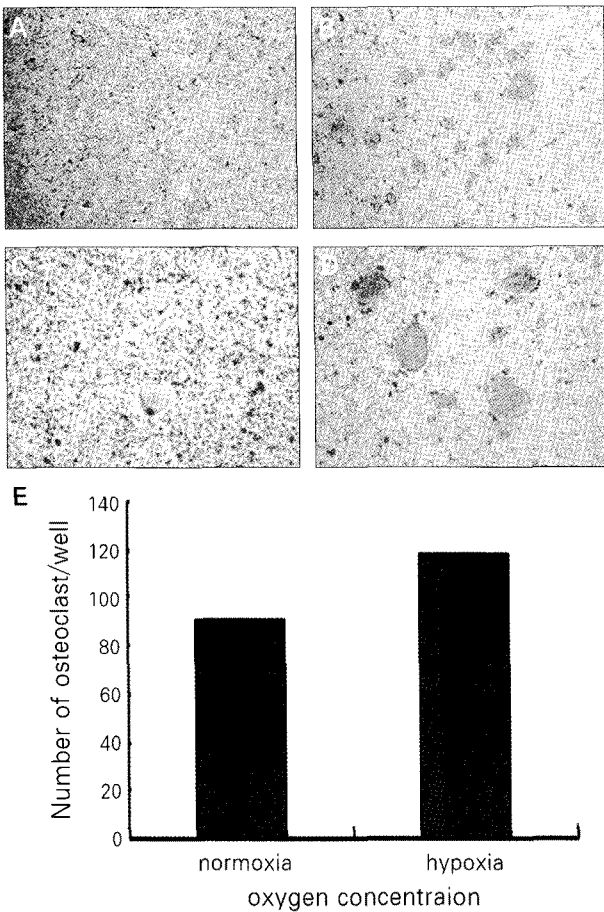


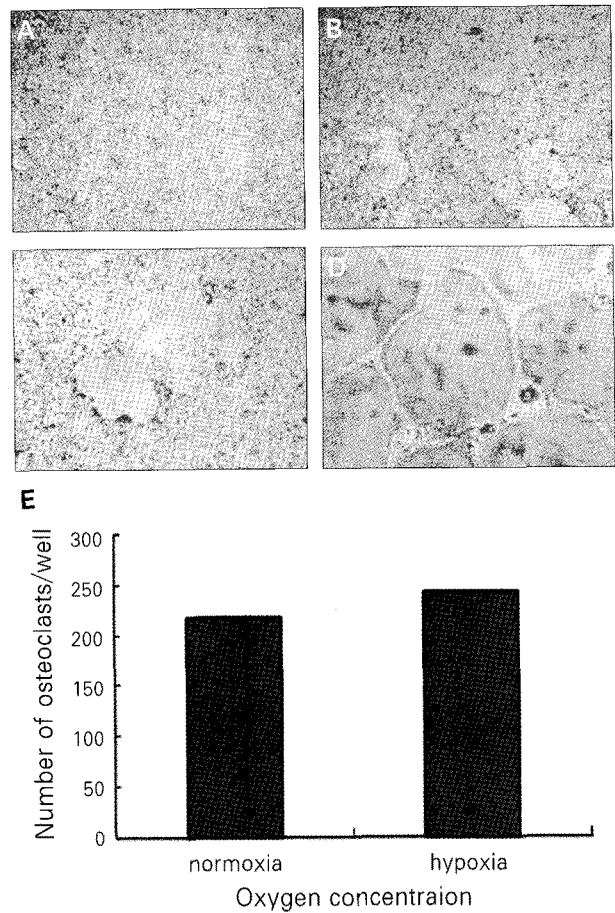
Fig. 1. Osteoclasts formed after 9 days culture in normoxia. A, 40 x; B, 100 x.



**Fig. 2.** 10 days culture TRAP assay. A, normoxia 40 x; B, hypoxia (1% O<sub>2</sub>) 40 x; C, normoxia 100 x; D, hypoxia (1% O<sub>2</sub>) 100 x; E, comparison of the number of osteoclasts.

저산소증이 특정 유전자의 발현을 조절하는 데 있어 중요한 환경적 자극이 된다는 것은 잘 알려져 있다. 그러나, 파골세포에 대한 저산소증의 영향에 대해서는 이루어진 연구가 많지 않다. 이 연구에서는 저산소증이 파골세포의 분화에 미치는 영향을 조사하였다. 백서의 골수세포를 M-CSF와 RANKL의 존재하에 분화시켰는데, M-CSF와 RANKL은 골수세포가 파골세포로 분화하도록 유도하는 역할을 한다. 이 때 산소농도를 1%와 정상농도로 나누어 분화시켰다.

10일간 배양시 정상농도에 비해 1% 저산소증시 파골세포의 수가 30% 증가하였다. 저산소증이 파골세포의 분화를 증가시키는지에 대한 상반된 결과들이 보고되어왔다. 대부분의 연구들에서는 저산소증이 파골세포 형성을 자극하여 파골세포의 수와 크기가 증가한다고 보고하였다. 그러나, Muzylak *et al.*<sup>13)</sup>는 고양이의 말초혈액단핵세포로부터



**Fig. 3.** 1 day culture TRAP assay. Osteoclasts after 11 days normoxia culture and 1 day normoxia or hypoxia culture. A, normoxia 40 x; B, 1% hypoxia (1% O<sub>2</sub>) 40 x; C, normoxia 100 x; D, hypoxia (1% O<sub>2</sub>) 100 x; E, comparison of the number of osteoclasts.

파골세포를 분화시킬 때 저산소증이 파골세포의 수는 감소시키고 크기는 증가시킨다고 보고하였다.

이러한 연구결과와의 차이는 세포 종류 (골수와 말초혈액), 실험동물의 종 (mouse, rat과 고양이), 저산소증 농도 (0.02%부터 10%), 그리고 배양기간 (24시간부터 14일) 등의 차이에 기인하는 것으로 사료된다. Muzylak *et al.*<sup>13)</sup>은 파골세포를 고양이의 혈액에서부터 분화시켰으나 이번 연구를 비롯한 다른 연구들에서는 백서의 골수세포를 이용하여 파골세포를 분화시켰다.

많은 연구들에서 저산소증이 파골세포의 수와 크기를 증가시키므로써 골흡수를 증가시킨다고 하였다. 그러나 저산소증이 파골세포의 흡수활성도 자체를 증가시키는지는 명확하지 않다. 이번 연구에서 성숙한 파골세포에 단기간 저산소증의 자극을 주었을 때 파골세포의 크기가 증가하였다. 이는 파골세포의 크기 증가가 기능의 증가에 기여할 수 있

음을 암시한다.

이 실험에서 우리는 백서의 골수세포를 M-CSF와 RANKL의 존재하에 배양하여 대부분의 세포를 파골세포로 분화시켰다. 그러나, 많은 세포들은 TRAP 양성의 단핵세포나 대식세포까지만 분화되었고 다핵의 파골세포는 기대하였던 것보다 적게 형성되었다. 이것이 우리 실험이 다른 실험들보다 파골세포형성에 대한 저산소증의 효과가 더 적게 보이는 이유인 것 같다. 그러나, 우리 실험에서도 역시 저산소증에 의한 파골세포의 증가를 볼 수 있었다.

### V. 결 론

파골세포는 골흡수에 중요한 역할을 하며 골절부위의 치유 및 교정적인 치아이동에서도 중요한 역할을 한다. 이 연구에서는 저산소증이 파골세포의 분화에 미치는 영향을 조사하였다. 파골세포는 백서의 골수세포에서 분화시켰으며 배양 조건은 저산소증 (1% 산소농도)과 정상산소농도로 나누어 분화시켰다. 그 결과 저산소증은 다핵의 파골세포의 형성을 증가시켰는데, 분화초기부터 저산소증에 노출시 파골세포의 수가 증가하였으며, 분화된 파골세포가 저산소증에 노출시 파골세포의 크기가 증가하였다.

### References

1. Stern B, Glimcher MJ, Goldhaber P. The effect of various oxygen tensions on the synthesis and degradation of bone

- collagen in tissue culture. *Proc Soc Exp Biol Med* 1966;121:869-872.
2. Arnett TR, Gibbons DC, Utting JC, Orriss IR, Hoebertz A, Rosendaal M, Meghji S. Hypoxia is a major stimulator of osteoclast formation and bone resorption. *J Cell Physiol*. 2003;196:2-8.
3. Gerritsen ME, Bloor CM. Endothelial cell gene expression in response to injury. *FASEB J* 1993;7:523-532.
4. Halliwell B, Gutteridge JM. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol* 1990;186:1-85
5. Graber TM, Vanarsdall RL, Vig KWL. Orthodontics: current principles and techniques, 4th ed. Elsevier mosby 2005:156-168.
6. Tuncay OC, Ho D, Barker MK. Oxygen tension regulates osteoblast function. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1994;105:457-463.
7. Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. *Science* 2000;289: 1504-1508.
8. Bradley TR, Hodgson GS, Rosendaal M. The effect of oxygen tension on haemopoietic and fibroblast cell proliferation in vitro. *J Cell Physiol* 1978;97:517-522.
9. Ishikawa Y, Ito T. Kinetics of hemopoietic stem cells in a hypoxic culture. *Eur J Haematol* 1988;40:126-129.
10. Harrison JS, Rameshwar P, Chang V, Bandari P. Oxygen saturation in the bone marrow of healthy volunteers. *Blood* 2002;99:394.
11. Brighton CT, Krebs AG. Oxygen tension of healing fractures in the rabbit. *J Bone Jt Surg Am* 1972;54:323-332.
12. Lungu GF, Li ML, Xie X, Wang LV, Stoica G. In vivo imaging and characterization of hypoxia-induced neovascularization and tumor invasion. *Int J Oncol* 2007;30:45-54.
13. Muzylak M, Price JS, Horton MA. Hypoxia induces giant osteoclast formation and extensive bone resorption in the cat. *Calcif Tissue Int* 2006;79:301-309.

### 저자 연락처

우편번호 134-010  
서울특별시 강동구 길동 445  
한림대학교 의과대학 강동성심병원 구강악안면외과  
박준우

원고 접수일 2009년 11월 30일  
게재 확정일 2010년 01월 12일

### Reprint Requests

**Jun-Woo Park**  
Dept. of Oral & Maxillofacial Surgery, Kangdong Sacred Heart Hospital, College of Medicine, Hallym University  
445 Gil-dong, Gangdong-gu, Seoul, Korea  
Tel: 82-2-2224-2332 Fax: 82-2-483-9647  
E-mail: junpark@hanafos.com

Paper received 30 November 2009  
Paper accepted 12 January 2010