

열충격에 의한 조골세포 사멸에 대한 인산염의 상승작용

박경록*, 안도환

고신대학교 의과대학 치과학교실*, 생리학교실

Phosphate potentiates heat stress-induced osteoblastic death

Kyenog-Lok Park*, Do-Whan Ahn

Departments of Dentistry and Physiology
Kosin University College of Medicine, Busan, Korea*

Abstract

Background : Heat and inorganic phosphate (Pi), a major component of bone matrix, are released during implant, where osteoblast survival plays a critical role for successful osseointegration of implant. Because Pi as well as heat stress are known to induce death of osteoblasts, the aim of this study is to investigate the effect of combined treatment of Pi with heat stress on osteoblast viability.

Methods : Confluent MC3T3 osteoblasts were exposed to various temperature and time points. They were also incubated with Pi at 37°C and 48°C. Cell viability was assayed by a MTT method and apoptotic cell death was observed through a TUNEL assay.

Results : Heat stress reduced osteoblast survival in a temperature- and time-dependent manner. Increasing Pi concentration did not change cell viability at 37°C, but when osteoblasts were treated at 48°C in combination with Pi, Pi caused a 4-fold reduction in viability than that by heat stress alone. TUNEL staining showed that some cells were found to die through apoptosis. Addition of phosphonoformic acid, an inhibitor of Pi transporter, completely reversed the Pi-induced cell death without affecting cell death caused by heat stress.

Conclusion : Pi potentiates heat stress-induced osteoblastic death, which may reduce the stability and osseointegration of implant.

Key words : heat stress, osseointegration, phosphate

서 론

임플란트의 식립을 위한 드릴링 과정에서 열의 발생은 필연적으로 동반된다. 물론 골의 국소적 온도는 골의 특성, 드릴 속도, 드릴 형태, 열을 내리기 위한 관주 방법에 따라 많은 편차를 보인다¹⁻³⁾. Eriksson 등⁴⁾은 연구에 의하

면 in vivo에서 사람의 대퇴골 피질을 20000 rpm의 속도로 천공하고 식염수로 열을 내렸을 때 천공 주변부의 온도가 89°C까지 상승하였다. 이러한 열충격은 골과 임플란트 경계면에서 골유착(osseointegration)을 방해하는 주요한 요인이다. 열충격에 의한 골유착의 장애는 일차적으로 조골세포의 기능 손상에서 비롯할 가능성이 높다. 조골세포에 적절한 강도의 열충격이 가해지면 이 세포는 세포자연사(apoptosis)의 과정 즉, 세포크기 축소, DNA 분절, caspase 경로의 활성화, 세포막 phosphatidylserine의 flipping 등의 변화를 일으키는데, Li 등⁵⁾에 의하면 조골

교신저자 : 안도환
주소: 602-702, 부산광역시 서구 암남동 34번지
고신대학교 의과대학 생리학교실
TEL: 051-990-6415 FAX: 051-990-3081
Email: dwahn@kosin.ac.kr

세포를 45°C에서 10분간 노출시킬 경우 세포괴사(necrosis)와 세포자연사에 전혀 영향을 주지 않지만 48°C에 노출시킬 경우 세포괴사와 세포자연사 모두 크게 증가하였다. 그러나 In vivo에서 열충격은 조골세포를 비롯한 골세포 외에도 골기질과 골의 미세환경에 영향을 미치므로 세포사멸(cell death)은 복잡한 형태를 띠게 된다.

골기질은 콜라젠과 당단백과 같은 유기물이 대부분을 차지하고 무기물 중에서는 칼슘과 무기인산염의 복합체로 구성된 hydroxyapatite가 주된 성분이다. 성장판이나 골절부위처럼 골의 리모델링 또는 turnover가 활발히 일어나는 곳에서는 골형성과 골흡수가 끊임없이 반복되면서 평형을 이루고 있다⁶⁾. 골흡수가 진행되는 동안 apatite 결정으로부터 칼슘과 무기인산염이 유리되어 나오며, apatite 자체도 골세포의 성장에 영향을 준다⁷⁾. 뿐만 아니라 apatite 결정으로부터 유리된 무기인산염은 조골세포와 연골모세포의 세포자연사를 유도하는 것으로 알려져 있다⁸⁻¹⁰⁾. 따라서 골의 천공 시 천공이 이루어지는 인접 부위의 골기질이 파괴되고 apatite결정이 분해됨으로써 다량의 무기인산염이 발생할 것이며 여기에 열충격이 첨가될 것이다.

그러므로 본 연구는 드릴링 조작에 의해 in vivo 상태에서 조골세포에 노출되는 환경을 가상하여 조골세포에 열충격과 무기인산염을 처리했을 때 이들 세포의 세포생존능이 어떻게 변하는지를 조사하고자 한다.

재료와 방법

1. 세포배양

MC3T3-E1 조골세포주를 10% fetal bovine serum (FBS, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)과 100 unit/ml penicillin과 100 µg/ml streptomycin (Invitrogen)항생제가 포함된 α-minimum essential medium (α-MEM, Invitrogen)배지에서 5% CO₂가 공급되는 37°C 세포배양기에서 배양하였다.

2. 열충격과 인산염의 처리

열충격을 주는 조건은 45°C, 48°C, 51°C로 설정된 항온수조에 세포를 키운 plate를 방치하는 형태로 시행하였다. 이때 대조군은 37°C로 유지한 것으로 설정하였다. 일

정시간 동안 열충격을 가한 후 즉시 필요한 약물을 처리하고 37°C에서 24시간 더 배양하였다. 인산염 처리의 경우 sodium phosphate를 첨가하여 배지 내 인산염의 최종 농도를 3 mM과 5 mM로 맞추었다. 모든 실험에서 약물 처리가 이루어지는 동안에는 무혈청(serum-free) 배지를 이용하였다.

3. MTT 분석

96-well plate에 분주하여 배양한 세포(2x10⁴cells/well)에 열충격과 약물을 처리하고, 일정 시간이 경과한 후 각 well에 3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT, 0.5 mg/ml, Sigma)를 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 4시간 동안 배양시켰다. 상층의 배지를 제거하고, MTT가 환원되어 형성된 불용성 formazan 결정을 용해시키기 위해 dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma) 100 µl를 넣고 실온에서 20분간 반응시킨 후 ELISA 판독기를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. formazan의 생성은 세포내 살아있는 미토콘드리아의 dehydrogenase 활성도와 비례하므로 formazan에 의한 흡광도 변화는 세포생존능의 변화로 해석할 수 있다. 결과 분석은 시료의 평균 흡광도를 구하여 대조군의 평균 흡광도에 대한 백분율로 산출하였다

4. TUNEL 분석

세포를 Lab-Tek® Chamber slide (Nunc, Rochester, NY, USA)에 배양하여 열충격과 인산염을 처리하고 24시간 후 TUNEL 분석을 시행하였다. TUNEL 분석은 DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System (Promega, Madison, WI, USA)을 사용하여 제조사에서 제시한 방법에 따라 시행하였다. 간략히 기술하면, 슬라이드에 부착되어 있는 세포를 4% methanol-free formaldehyde 용액에서 고정한 다음 phosphate-buffered saline(PBS)로 세척하였다. Triton X-100으로 세포막의 투과도를 증가시킨 후 PBS로 다시 세척하였다. Pre-equilibration 과정을 거친 후 fluorescein-12-dUTP을 DNA 가닥이 조각난 부위에 결합시켰다. 세척 과정 후 propidium iodide (Sigma)으로 염색하여 날개의 세포를 잘 관찰할 수 있도록 하였다. 형광은 공초점 현미경 (LSM 510, Carl-Zeiss, Germany)을 사용하여 관찰하였다.

5. 통계처리

자료의 결과는 평균±표준편차로 나타내었으며 세군 이상의 비교에는 one-way ANOVA를 시행하고 사후검정법으로 Turkey test를 시행하였다. 두 군간의 비교는 unpaired student's t-test를 시행하였다. p값이 0.05보다 작을 경우 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였다.

결 과

그림 1은 열충격 강도를 증가시켰을 때 조골세포의 생존능을 나타낸 것으로써 37°C(대조군), 45°C, 48°C, 51°C에서 10분간 열충격을 가하고 37°C에서 24시간 경과한 후 생존능을 분석한 것이다. 45°C에서 대조군의 82%, 48°C에서 38%, 51°C에서 25% 수준을 보여 열충격의 강도가 커질수록 이에 비례하여 세포생존능이 감소하였다. 그림 2는 48°C에서 열충격 시간을 증가시키에 따라 세포 생존능의 변화를 측정 한 것이다. 이 경우 48°C에서 10분간 열충격을 준 다음 37°C에서 12시간 배양 후 생존능을 분석하였다. 10분, 30분, 60분의 열충격 후 생존능은 대조군(0분)의 각각 72%, 65%, 24%로써 열충격 시간이 길어질수록 생존능은 감소하였다. 그림 1과 그림 2의 결과는 조골세포의 생존능이 열충격의 강도와 지속시간에 비례하여 감소함을 보여준다.

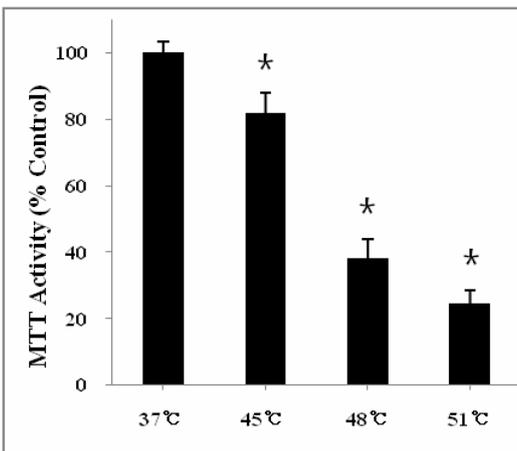


Fig. 1. Effect of heat stress of varying temperature on osteoblast viability. Cells were incubated at varying temperature for 10 min, and further incubated at 37°C for 24 hr. Viability was measured via MTT assay. Results are mean ± SD of 6-8 wells. *, p<0.05 vs. 37°C.

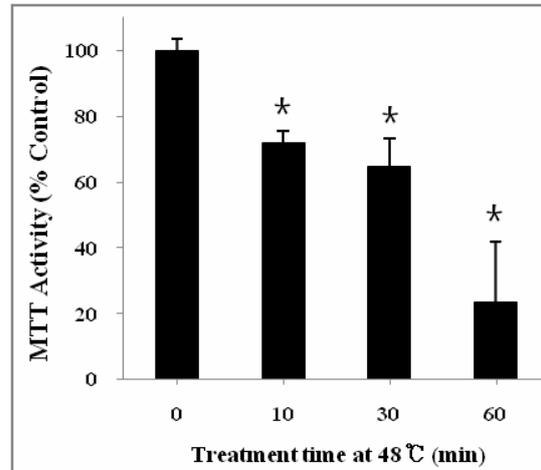


Fig. 2. Effect of duration of heat stress on osteoblast viability. Cells were incubated at 48°C for 10 to 60 min, and viability was assayed after 24-hr recovery period. Results are mean ± SD of 6-8 wells. *, p<0.05 vs. 37°C.

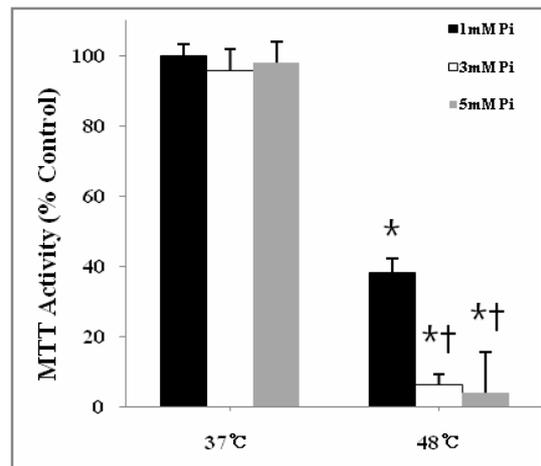


Fig. 3. Effect of Pi on heat stress-sensitized osteoblast viability. Cells were incubated at 37°C and 48°C for 10 min, with different concentration of Pi and viability was assayed after 12-hr recovery period. Results are mean ± SD of 6-8 wells. *, p<0.05 vs. 1 mM Pi at 37°C. †, p<0.05 vs. 1 mM Pi at 48°C

그림 3은 열충격에 의한 생존능의 감소가 인산염의 농도에 의해 어떻게 달라지는지를 조사한 것이다. 37°C와 48°C에서 10분간 열충격을 가한 직후 인산염의 농도를 원래 배지에 포함된 농도(1 mM)보다 각각 2 mM과 4 mM 증가시켜 최종농도를 3 mM, 5 mM로 맞추고 24시간 경과한 후 생존능을 관찰하였다. 37°C에서는 인산염의 농도를 증가시키더라도 생존능은 전혀 변화가 없는 반면

48°C에서는 1 mM 인산염 처리군의 생존능이 37°C에서 1 mM 인산염 처리군의 40% 수준인데 비해 3 mM과 5 mM 처리군에서는 4%와 6%로써 10배 정도의 급격한 생존능 감소를 보였다. 이러한 결과는 세포의 용액에 일정 농도 이상의 인산염이 존재할 경우 조골세포의 열 감수성이 증가됨을 시사한다.

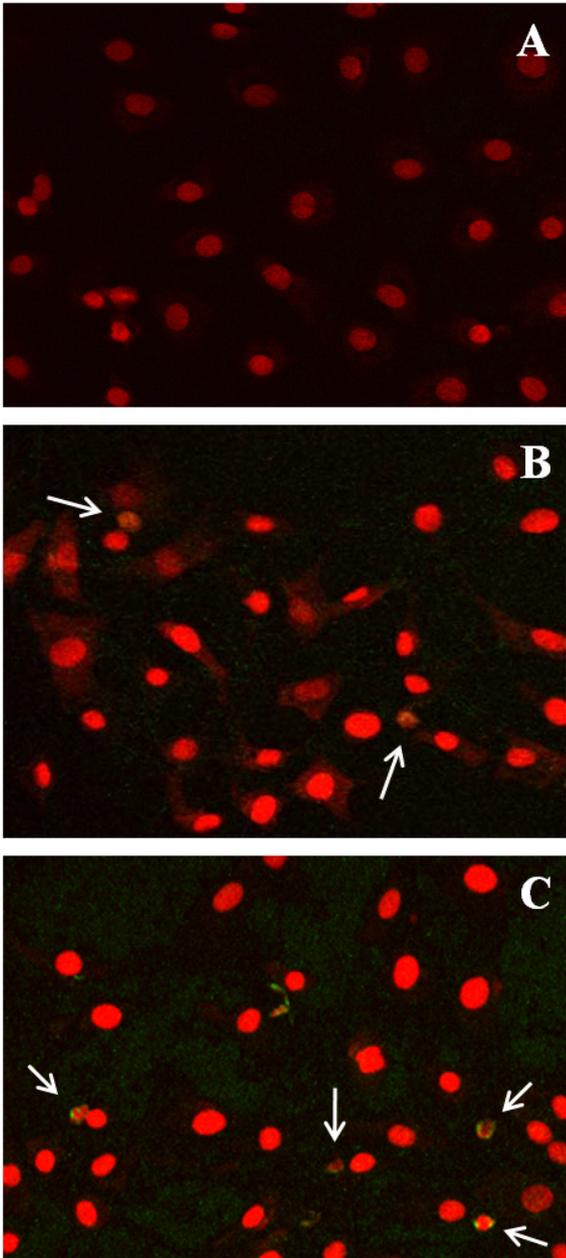


Fig. 4. TUNEL staining. Cells were incubated at 37°C or 48°C for 10 min, in the presence and absence of Pi. After 24 hr recovery period, cells were fixed and stained. (A) 37°C (B) 48°C (C) 48°C + 5 mM Pi. Arrows indicate TUNEL-positive cells. Magnification x 200.

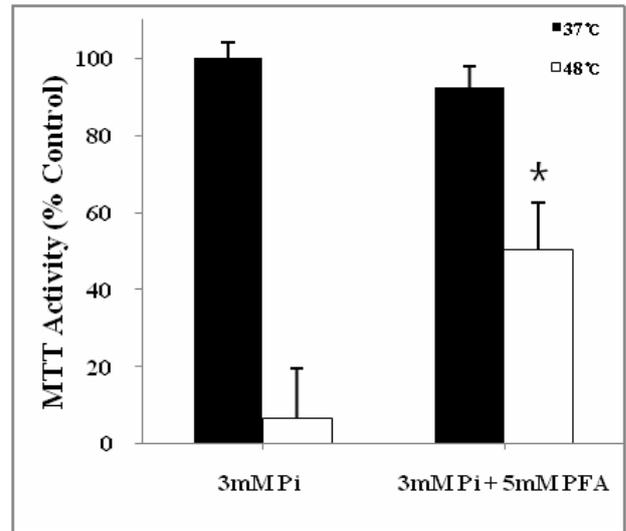


Fig. 5. Effect of phosphonoformic acid on Pi-mediated osteoblast death. Cells were incubated with 3 mM Pi in the presence or absence of PFA and viability was assayed after 24-hr recovery period. Results are mean \pm SD of 6-8 wells. *, $p < 0.05$ vs. the matched control (37°C).

그림 4는 세포생존능의 변화가 세포자연사의 형태로 일어났는지를 확인하기 위해 TUNEL 염색을 시행한 것이다. 37°C 대조군에서 세포자연사는 전혀 보이지 않는 반면 48°C 열충격 과 48°C + 5 mM Pi 조건에서는 세포자연사가 부분적으로 증가하였다.

그림 5는 인산염 운반체의 억제제인 phosphonoformic acid(PFA)가 열충격에 의해 세포사멸이 감작된 상태에서 인산염에 의한 생존능 감소의 상승작용을 막아 주는지를 조사한 것이다. 인산염 존재 시 48°C에서 생존능은 37°C 대조군의 8% 수준까지 감소하였지만 PFA를 첨가한 경우 대조군의 50% 수준으로 회복되었다. 즉, 48°C 열충격에 의해서만 이루어진 생존능 감소 부분을 제외하고 인산염에 의한 감소 부분은 PFA에 의해 완전히 회복되었다.

고찰

인공치아 매식을 위한 악골의 드릴링 과정은 골조직을 파괴시키는 물리적 손상뿐만 아니라 골의 온도를 상승시킴으로써 골세포에 열 스트레스를 가한다. 여기에 파괴된 골기질의 여러성분들이 골세포의 사멸을 촉진시키는 부가적인 역할을 수행할 수 있다. 본 연구로부터 얻은 새

로운 사실은 인산염 자체는 조골세포의 세포사멸에 영향을 주지 않으나 열충격에 의해 세포사멸의 과정에 감각된 세포는 인산염에 의해 세포사멸이 증폭된다는 점이다.

그림 1에서 보듯 열충격 강도에 비례하여 세포생존능이 감소하는 바 이는 Li 등⁵⁾의 결과와 유사하다. 그에 의하면 쥐의 두개골로부터 일차배양한 조골세포에 48°C에서 10분간 열충격을 가하고 12시간 지난 후 세포사멸이 급격히 증가하며 45°C에서 이러한 효과는 관찰되지 않았다. 본 연구에서 48°C 열충격을 10분, 30분, 60분 가한 직후 세포생존능은 차이가 없었지만(결과는 표시하지 않음) 이 기간동안의 열충격을 가하고 24시간 회복기간이 지났을 때 열충격 기간이 길수록 생존능이 떨어졌다(그림 2). 이 경우 생존능의 감소는 열충격에 의해 세포내에서 어떤 비가역적 변화가 일어나기까지 시간이 소요됨을 시사한다^{5,11)}. 한편 45°C 열충격에 의해서는 생존능의 감소가 미미하였는데 이처럼 비가역적 세포사멸을 유도하는 한계온도는 세포종류에 따라 다를 수 있다. 예컨대 내피세포는 48°C 열충격에 의해서 세포사멸이 유도되지 않는 반면 lymphoma 세포, 신경세포 등은 45°C에서 세포사멸을 일으킨다^{12,13)}.

골기질의 주요한 무기질 성분의 하나인 인산염에 의해 세포생존능은 달라진다. Adams 등⁸⁾은 MC3T3 조골세포에 3 mM 이상의 인산염을 37°C에서 24시간 처리한 경우 세포생존능이 심하게 감소함을 보고하였다. Meleti 등⁹⁾은 사람의 뼈로부터 분리한 조골세포에서 5 mM 이상의 인산염을 48시간 이상 처리한 경우 생존능이 감소하였다고 한다. 본 연구에서는 Admas 등⁸⁾이 사용한 것과 동일한 종류의 세포와 인산염 농도에도 불구하고 세포생존능의 차이는 전혀 관찰되지 않았다(그림 3). 그들의 연구와 한 가지 차이점은 그들은 DMEM 배지를 사용한 반면 본 연구에서는 α MEM 배지를 사용하였는데, DMEM 배지에는 0.9 mM의 인산염이 α MEM 배지에는 1.0 mM의 인산염이 포함되어 있으므로 기본적으로 배지 내 인산염 농도의 차이는 없다. 뿐만 아니라 α MEM 배지 내에 인산염을 중화시킬 수 있는 양이온들이 DMEM에 비해과다하게 포함되어 있지도 않았기 때문에 현재로서는 두 연구간의 차이를 설명하기 힘들다. 그러나 이러한 차이에도 불구하고 48°C 열충격을 가해졌을 경우 인산염은 생존능의

감소를 심하게 증폭시켰다. 즉, 열충격에 의해서 생존능이 60% 감소한 반면 인산염이 첨가된 경우 생존능이 90% 이하로 감소하였기 때문에 인산염이 열에 의한 세포사멸 효과에 상승적으로 작용하였음을 의미한다. Teixeira 등^{10,14)}은 인산염에 의해 연골세포가 죽을 때 이는 세포 내 미토콘드리아 막전압의 소실에 의한 cytochrome c의 활성화와 nitric oxide (NO) 생성으로 인한 caspase 증가 때문이라고 하였다. 또한 열충격에 의해서도 p53의 활성화와 caspase 함량이 증가한다⁵⁾. Caspase는 세포자연사에 대부분 관여한다고 알려져 있으므로 본 연구에서 열충격에 의해 caspase가 이미 감작된 상태에서 인산염의 첨가로 인해 caspase가 증폭되어 세포자연사가 일어난 것으로 추측된다. 그림 4에서 보듯 37°C에서 세포자연사가 전혀 없는 반면 48°C와 48°C+인산염의 조건에서는 세포자연사가 증가하는 경향을 나타내었다. 세포자연사의 정량적분석을 위해 annexin-V와 propidium iodide를 사용하여 유세포 분석을 시행하였지만 아쉽게도 측정이 불가능하였다. 왜냐하면 고농도 인산염과 배지 내 들어있는 칼슘(약 2 mM)이 불용성 염-아마도 인산칼슘염-을 형성하고 이들이세포와 강한 응집반응을 일으킴으로써 trypsin 처리 또는 scraping에 의해서도 하나하나의 세포로 분리되지 못하였기 때문이다. 유세포 분석에서 이들 세포의 forward scatter 값이 매우 크게 나타난 것이 이를 대변해 주었다(자료는 표시하지 않음).

열충격에 의해 세포사멸이 감작되어 있고 인산염에 의해 세포사멸이 상승적으로 증가하였으므로 세포내로 인산염 이동을 억제하면 생존능을 상당한 정도로 회복시킬 수 있을 것이다. PFA는 신장 상피세포나 조골세포의 원형질막에 존재하는 Na 의존성 인산염 운반체에 작용하여 인산염 이동을 억제하는 물질이다^{9,15,16)}. 그림 5에서 보듯 37°C에서는 PFA에 의해 85% 회복하였고 48°C에서도 50% 가까이 회복하였다. 이는 열충격에 의한 생존능의 저하가 필연적인 과정이라 하더라도 인산염 이동을 막음으로써 생존능을 적어도 50% 회복시킬 수 있음을 시사한다.

결론적으로 MC3T3 조골세포는 열충격의 강도와 지속 시간에 비례하여 세포생존능이 감소하지만 인산염 자체는 세포생존능에 영향을 주지 않는다. 그러나 열충격과 인산염이 동시에 주어지면 열충격에 의해서만 나타나는

생존능 감소는 인산염에 의해 상승적으로 작용하여 생존 능 감소가 증폭된다. 이때 인산염 이동을 억제시킬 경우 이 같은 상승작용은 사라지며 열충격에 의한 생존능 감소의 효과만 관찰된다. 따라서 임플란트 시술에서 나타나는 열충격과 인산염 같은 골기질 분해물질의 공동 존재는 조골세포의 사멸을 증폭시켜 임플란트의 초기 안정을 떨어뜨리는 요소로 작용할 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Benington IC, Biagioni PA, Crossey PJ, Hussey DL, Sheridan S, Lamey PJ: Temperature changes in bovine mandibular bone during implant site preparation: an assessment using infra-red thermography. *J Dent* 24:263-267, 1996
2. Benington IC, Biagioni PA, Briggs J, Sheridan S, Lamey PJ: Thermal changes observed at implant sites during internal and external irrigation. *Clin Oral Implants Res* 13:293-297, 2002
3. Chacon GE, Bower DL, Larsen PE, McGlumphy EA, Beck FM: Heat production by 3 implant drill systems after repeated drilling and sterilization. *J Oral Maxillofac Surg* 64:265-269, 2006
4. Eriksson AR, Albrektsson T, Albrektsson B: Heat caused by drilling cortical bone. Temperature measured in vivo in patients and animals. *Acta Orthop Scand* 55:629-631, 1984
5. Li S, Chien S, Branemark PI: Heat shock-induced necrosis and apoptosis in osteoblasts. *J Orthop Res* 17:891-899, 1999
6. Blair HC, Zaidi M, Schlesinger PH: Mechanisms balancing skeletal matrix synthesis and degradation. *Biochem J* 364:329-341, 2002
7. Shu R, McMullen R, Baumann MJ, McCabe LR: Hydroxyapatite accelerates differentiation and suppresses growth of MC3T3-E1 osteoblasts. *J Biomed Mater Res A* 67:1196-1204, 2003
8. Adams CS, Mansfield K, Perlot RL, Shapiro IM: Matrix regulation of skeletal cell apoptosis. Role of calcium and phosphate ions. *J Biol Chem* 276:20316-20322, 2001
9. Meleti Z, Shapiro IM, Adams CS: Inorganic phosphate induces apoptosis of osteoblast-like cells in culture. *Bone* 27:359-366, 2000
10. Teixeira CC, Mansfield K, Hertkorn C, Ischiropoulos H, Shapiro IM: Phosphate-induced chondrocyte apoptosis is linked to nitric oxide generation. *Am J Physiol Cell Physiol* 281:C833-839, 2001
11. Lindquist S: The heat-shock response. *Annu Rev Biochem* 55:1151-1191, 1986
12. VanderWaal R, Malyapa RS, Higashikubo R, Roti Roti JL: A comparison of the modes and kinetics of heat-induced cell killing in HeLa and L5178Y cells. *Radiat Res* 148:455-462, 1997
13. Vogel P, Dux E, Wiessner C: Evidence of apoptosis in primary neuronal cultures after heat shock. *Brain Res* 764:205-213, 1997
14. Teixeira CC, Costas AP, Nemelivsky Y: Apoptosis of growth plate chondrocytes occurs through a mitochondrial pathway. *Angle Orthod* 77:129-134, 2007
15. Ito M, Haito S, Furumoto M, Uehata Y, Sakurai A, Segawa H, Tatsumi S, Kuwahata M, Miyamoto K: Unique uptake and efflux systems of inorganic phosphate in osteoclast-like cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 292:C526-534, 2007
16. Hoppe A, Lin JT, Onsgard M, Knox FG, Dousa TP: Quantitation of the Na(+)-Pi cotransporter in renal cortical brush border membranes. [14C]phosphonoformic acid as a useful probe to determine the density and its change in response to parathyroid hormone. *J Biol Chem* 266:11528-11536, 1991