



저작자표시-비영리-동일조건변경허락 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



동일조건변경허락. 귀하가 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공했을 경우에는, 이 저작물과 동일한 이용허락조건하에서만 배포할 수 있습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

치의학석사 학위논문

조골세포 분화에서 cAMP 증가의
효과

The effect of cAMP elevation in osteoblast
differentiation

2013 년 2 월

서울대학교 치의학대학원

치 의 학 과

채종균

조골세포 분화에서 cAMP 증가의 효과

The effect of cAMP elevation in osteoblast
differentiation

지도교수 김 홍 희

이 논문을 치의학 석사 학위논문으로 제출함
2012 년 10 월

서울대학교 치의학대학원
치 의 학 과
채종균

채종균의 석사 학위논문을 인준함
2012 년 11 월

위 원 장 _____ 이 장 희 (인)

부위원장 _____ 김 홍 희 (인)

위 원 _____ 박 주 철 (인)

국문초록

조골세포 (osteoblast)는 중배엽 기원 (mesenchymal origin)의 세포로써, osteocalcin, alkaline phosphatase 그리고 type I collagen 등의 뼈-기질 단백질 (bone-matrix proteins)을 분비함으로써 광물화 (mineralization)를 증진한다. 조골세포의 분화에서 중요한 것으로 알려진 전사 인자 (transcription factor)는 Runx2와 osterix이다.

Forskolin은 세포 생리학 연구에서 cyclic AMP (cAMP)의 수준을 올려주기 위해서 흔히 사용되어 왔고, adenylyl cyclase를 활성화시켜서 세포 내 cAMP의 수준을 증가 시킨다. cAMP는 중요한 신호 전달자로써, 호르몬과 다른 세포의 신호에 대한 세포의 생물학적 반응에 필수적이다.

조골세포 분화에 있어서 cAMP 수준의 증가가 분화를 가속할 것으로 예상되나, 아직까지 cAMP 자체로 분화에 어떠한 영향을 주는지에 대한 연구는 많이 부족하다. 본 연구에서, 우리는 cAMP 수준의 증가가 조골세포의 분화에 직접적으로 미치는 영향에 대해서 알아보고자 하였다. Forskolin이 ALP의 활성을 증가시키는 것을 ALP 염색을 통해 확인하였고, ALP mRNA의 발현을 증가시키는 것을 PCR을 통해서 확인하였다. 이것을 토대로 forskolin에 의한 cAMP의 증가 단독으로 조골세포 분화를 효과적으로 증진시킬 수 있다는 결론을 내렸다.

.....
주요어 : cAMP, 조골세포, forskolin, C2C12

학 번 : 2009-22735

목 차

I. 서론	3
II. 재료 및 방법	5
III. 결과	7
IV. 고찰	12
V. 참고 문헌	14

I. 서론

뼈는 계속적으로 형성되고 흡수된다. 이러한 동적인 과정은 두 가지 세포의 유기적이고 정확한 조화에 의해서 조절된다. 조골세포 (osteoblast)는 석회화된 뼈 기질을 침착하고, 파골세포 (osteoclast)는 뼈 기질을 탈회하고 분해한다 (Boyle, Simonet, & Lacey, 2003).

조골세포는 중배엽 기원 (mesenchymal origin)의 세포로써, 뼈-기질 단백질 (bone-matrix proteins)을 분비하고, 광물화 (mineralization)를 증진한다. 뼈-기질 단백질로는 osteocalcin, alkaline phosphatase 그리고 type I collagen 등이 있다. type 1 collagen이 풍부한 세포의 기질은 osteoid라고 알려져 있고, hydroxyapatite의 형태로 인산칼슘을 축적해감에 따라 광화된다. 조골세포의 분화에는 두개의 전사 인자 (transcription factor)가 절대적으로 중요하다 (Kobayashi & Kronenberg, 2005; Takayanagi, 2007). 하나는 runt domain을 포함하는 runx2이고, 나머지 하나는 zinc-finger motif를 가진 osterix이다. Runx2에 의해서 조골세포 분화의 여러 과정이 상당히 복잡하게 조절된다. Runx2는 인산화 (phosphorylation)에 의해서 조절되고, 또한 Smads 1,3,5 와 같은 전사 인자 (transcription factors)나 신호 전달자 (signal transducer)와 상호작용한다. Runx2 목표 유전자 (target gene)는 성숙한 조골세포 (mature osteoblast)에서 발현되는 osteocalcin, bone-sialoprotein, osteopontin, 그리고 type I collagen이다. Osterix는 runx2에 의해서 조절되는 전사 인자로써, 전구세포 (precursor cells)가 chondrocyte lineage로부터 멀어지고 osteoblast lineage로 향하게 하는데 중요하다 (Long 2012).

Forskolin은 세포 생리학 연구에서 cyclic AMP (cAMP)의 수준을 올려주는 것으로 알려져 있다. Forskolin은 adenylyl cyclase의 활성화시키고 cAMP의 세포내 수준을 증가시킴으로써 세포 수용체를 재민감화 (resensitization) 시킨다. cAMP는 중요한 신호 전달자로써, 호르몬과 다른 세포의 신호에 대한 세포의 생물학적 반응에 필수적이다 (Insel & Ostrom, 2003).

조골세포 (osteoblast) 분화에 있어서 cAMP 수준의 증가가 분화를 가속할 것으로 예상되나, 아직까지 그에 대한 연구는 많이 부족하다. 이번 연구에서, 우리는 조골세포의 분화에서 cAMP 수준의 증가가 미치는 영향에 대해서 알아보려고 한다. C2C12 라는 myoblast precursor cell에 forskolin을 처리한 후, ALP 염색, western blot, PCR 의 기법을 통해서 osteoblast로 분화에 어떤 영향을 미치는지 조사하였다.

II. 재료 및 방법

Reagents

Forskolin과 dexamethasone은 Sigma Aldrich (St. Louis, MO)에서 구입하였고 hBMP-2는 R&D Systems (Minneapolis, MN)에서 구입하였다. Runx2 와 β -actin에 대한 항체는 Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA)에서 구입하였다.

Cell culture

C2C12 세포를 37°C, 5% CO₂의 환경에서 Dulbecco's Modified Eagle medium (DMEM)을 배양액으로 사용해서 배양하였다. 다음날, C2C12가 plate에 붙으면 배양액에 dexamethasone 10nM이 존재하거나 존재하지 않는 조건에서 forskolin 0, 5, 10 μ M의 α -MEM을 처리하여 2일간 배양하였다.

Alkaline phosphatase (ALP) 염색

ALP 염색을 위해 배양된 세포들을 25% citrate, 65% acetone, 3% formaldehyde로 구성된 고정액으로 15초 동안 고정하였다. 고정된 세포들을 증류수로 두 번 씻어낸 후 털어냈다. 염색용 용액을 처리하고 실온의 어두운 환경에서 15분 동안 염색한 뒤에 증류수로 두 번 씻어낸 후 말렸다.

Polymerase chain reaction (PCR)

세포에서 Trizol을 사용하여 전체 세포를 용해시킨 뒤 chloroform으로 RNA 층을 얻었다. 이어서 isopropanol로 RNA를 침전시킨 후, 75% 에탄올로 씻어내고 molecular grade water에 용해시켰다. 3 mg의 RNA를 가지고 reverse transcription을 통해 cDNA를 합성하고 PCR 반응은 열

순환기 (thermal cycler)에서 수행되었다. ALP의 발현을 확인하기 위해서, 개시 단계로 95°C에서 5분간 변성(denaturation)이 시행되었다. 이어서 일어나는 반응의 과정은 먼저 95°C에서 30초간 변성, 두 번째로 60°C에서 30초간 annealing, 세 번째로 72°C에서 30초간 extension이다. 이 반응들이 31 번 반복되었고, 72°C에서 5분간 extension 되었다. PCR 생성물은 아가로오스 겔 전기영동 (agarose gel electrophoresis)에 의해서 분석되고, ethidium bromide를 처리하여서 관찰하였다.

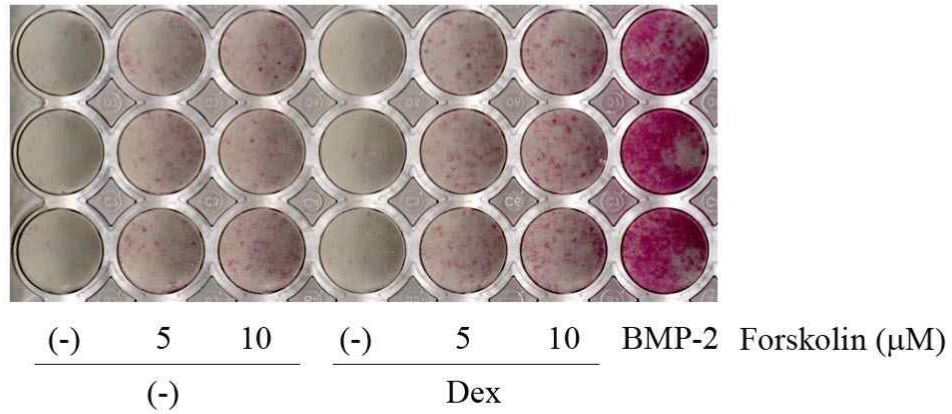
Western blot

세포들을 lysis buffer (20 mM Tris-HCl (pH7.5), 150 mM NaCl, 1mM Na₂EDTA, 1mM Na₃VO₄, 1mM NaF, 10 μM PMSF, 1 μg/ml aprotinin, 1% NP-40)를 이용하여 용해한 뒤, 단백질을 정량하고 같은 양이 되도록 보정해주었다. SDS polyacrylamide gel을 사용한 전기영동을 통해 단백질을 분리하였고, nitrocellulose (NC) membrane으로 옮겼다. 그 후 NC membrane은 5% skim milk 로 실온에서 1시간 동안 blocking 하여 비특이적인 항체 반응을 최소한으로 줄였다. 일차 항체를 부착하기 위해 PVDF 막을 항체가 포함된 TBST buffer에 담근 후 4°C에서 하룻밤 동안 배양하였다. 각각의 단백질을 HRP와 결합된 이차 항체들과 부착하였다. 부착된 이차 항체는 기질 (substrate)을 이용해서 빛을 내고 이를 필름을 이용하여 현상하였다.

III. 결과

C2C12 근육 모세포주는 BMP-2의 존재 하에서 조골세포로의 분화가 진행된다는 사실이 잘 알려져 있다 (Katagiri et al., 1994). 보고된 바에 의하면, PTH에 의한 조골세포 분화에 cAMP signaling이 관련되어 있다 (Isogai et al., 1996). 그렇지만 cAMP 단독으로의 효과는 잘 알려지지 않았다. 이에 우리는 C2C12 세포가 조골세포로 분화되는 과정에서 cAMP 활성화인자인 forskolin의 역할을 조사하였다. 2일 동안 C2C12를 여러 농도의 forskolin과 dexamethasone과 함께 배양한 후, ALP 단백질을 염색하였다. forskolin의 농도가 0, 5, 10 μ M 으로 높아질수록 더 많은 ALP 단백질이 염색되었고, 이를 image J 프로그램을 사용해서 정량화하였다 (Fig 1A and 1B). Dexamethasone 10nM 을 처리하였을 때 염색 정도가 증가된 것으로 보이나 그 효과는 크지 않았고 통계적으로 유의하지 않았다. 비록 모든 실험군에서 forskolin을 처리한 샘플이 양성 대조군인 BMP-2 100ng/ml 을 처리한 것보다 염색이 약하게 되었지만 농도에 따라 유의한 수준으로 ALP 활성을 높임을 확인 할 수 있었다.

A



B

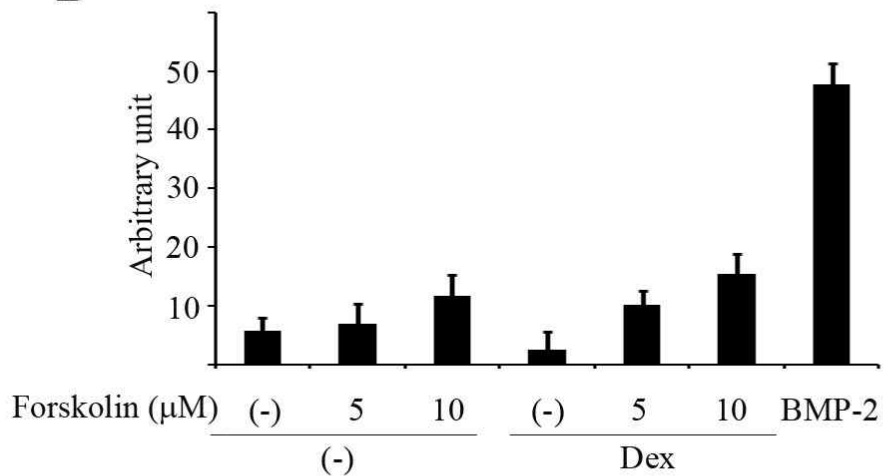


Figure 1

Figure 1. Forskolin은 C2C12 cell의 조골세포화를 농도 의존적으로 촉진시킨다. C2C12 cell을 α -MEM 배지에서 48 well (5×10^3 /well) 플레이트에서 배양함에 있어서 표시된 농도의 forskolin 단독, 혹은 dexamethasone과 조합하여 조골세포로의 분화를 유도하였다. (A) C2C12 cell을 dexamethasone 10nM이 존재하거나 존재하지 않을 때 forskolin을 0 μM , 5 μM , 10 μM 농도로 2일 동안 배양한 후, 조골세포로의 분화를 확인하기 위해서 ALP 염색을 시행하였다. (B) 각각의 well의 염색정도를 정량하기 위해서 image J 프로그램을 사용하여 측정하고 그 평균값과 오차막대로 나타냈다.

Forskolin은 ALP mRNA의 발현을 증가시킨다.

앞선 실험에서 forskolin이 C2C12의 조골세포화를 촉진시켰으므로, 우리는 ALP의 mRNA 수준에서의 발현을 확인하였다. C2C12를 여러 농도의 forskolin과 dexamethasone을 처리하여 배양한 후, 각각의 RNA를 추출하고 PCR을 이용하여 증폭시켜 전기 영동법으로 분리하였다. Forskolin의 농도가 0, 5, 10 μM 으로 높아질수록 ALP mRNA 발현이 증진되었다 (Fig 2). 하지만, dexamethasone 10nM을 함께 처리하였을 때는 별다른 시너지 효과를 보이지는 않았다.

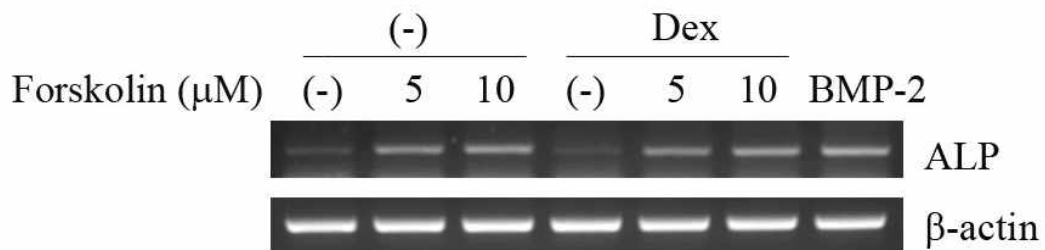


Figure 2

Figure 2. Forskolin은 농도 의존적으로 ALP의 mRNA 발현을 증가시킨다. C2C12 cell을 여러 농도의 forskolin과 dexamethasone를 포함한 α -MEM 배지에 60mm dish (1×10^5 /dish)에서 배양하였다. 2일 후에, mRNA를 추출하고 RT-PCR을 이용하여 ALP의 mRNA 발현을 분석하였다.

Forskolin과 dexamethasone은 Runx2 단백질의 생성에는 영향을 미치지 않는다.

Runx2 단백질은 조골세포 분화에 가장 중요한 전사인자 중 하나로 알려져 있다 (Kobayashi & Kronenberg, 2005). Runx2는 분화 및 석회화에 중요한 여러 가지 단백질의 발현을 유도한다. 예를 들어, osteocalcin, bonesialoprotein, osteopontin, 그리고 type I collagen 등이 여기에 해당된다. 그러므로 우리는 forskolin이 Runx2 발현에 어떠한 역할을 하는지를 실험하였다. C2C12를 여러 농도의 forskolin과 dexamethasone을 처리하여 2일 동안 배양한 후, 각각의 단백질을 추출하여 western blotting으로 확인하였다. 하지만, Runx2 단백질의 발현은 forskolin과 dexamethasone의 농도와는 상관관계를 나타내지 않았다 (Fig 3).

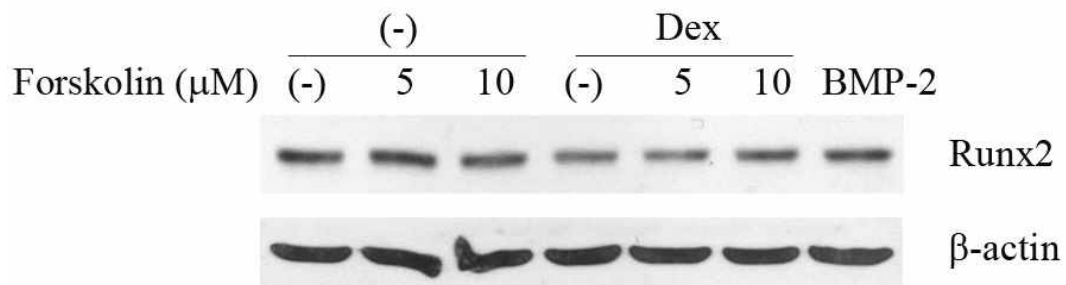


Figure 3

Figure 3. Forskolin은 Runx2 단백질 발현에는 영향을 미치지 않았다. C2C12 cell을 여러 농도의 forskolin과 dexamethasone이 처리된 α -MEM 배지에 60mm dish (1×10^5 /dish)에서 배양하였다. 2일 후에, RIPA 버퍼를 이용하여 전체 단백질을 추출한 후에 western blotting을 이용하여 Runx2 단백질 발현을 분석하였다.

Forskolin과 dexamethasone은 세포독성을 나타내지 않는다.

마지막으로, 우리는 실험에 사용된 forskolin의 농도가 세포 독성을 나타내는지 조사하였다. 앞선 배양 조건과 마찬가지로 C2C12를 여러 농도의 forskolin과 dexamethasone을 처리하여 20시간 동안 배양한 후에 CCK assay Kit을 이용하여 세포 독성을 확인하였다. 그 결과 forskolin과 dexamethasone을 처리한 세포와 처리하지 않은 세포 사이에 광밀도 차이는 보이지 않았다 (Fig 4). 이와 같은 결과는 forskolin이 나타낸 조골세포화 유도 효과가 세포 독성에 의한 side effect 때문이 아님을 의미한다.

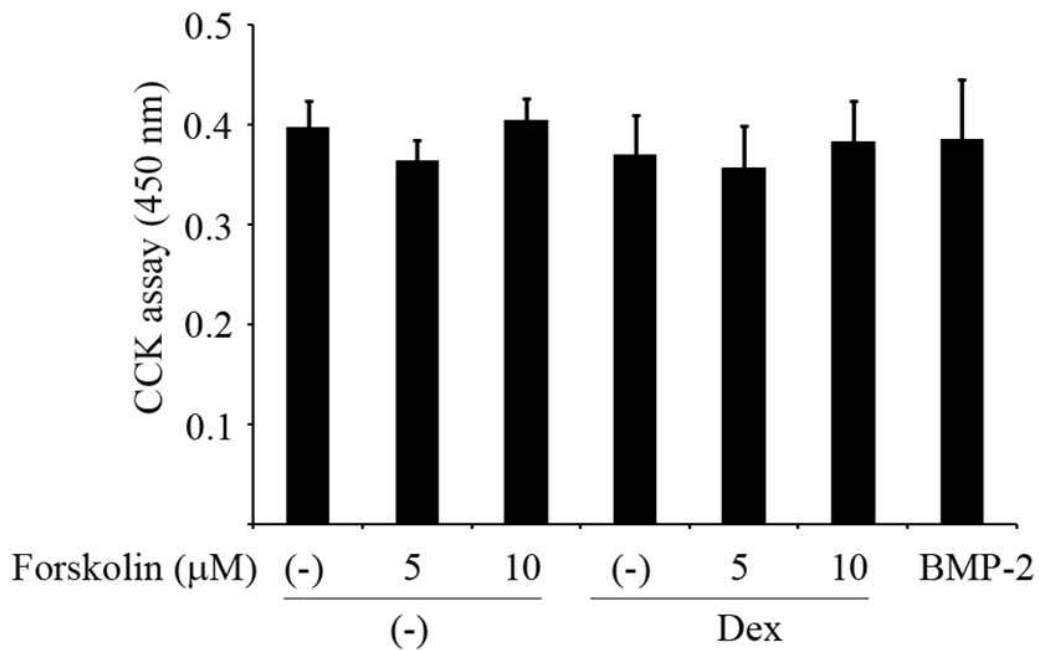


Figure 4

Figure 4. Forskolin은 사용된 농도 내에서 세포 독성을 나타내지는 않았다. C2C12를 여러 농도의 forskolin과 dexamethasone를 포함한 α -MEM에 60mm dish (1×10^5 /dish)에서 배양하였다. Forskolin을 처리하고 20 시간 후에 CCK assay를 통해서 측정된 상대적인 광밀도 값을 오차막대와 함께 나타내었다.

IV. 고찰

cAMP는 포유류 세포 어디서나 발견되고, 다양한 호르몬, 사이토카인, 신경전달물질의 세포내 활동에 영향을 미치는 2차 전달자 (second messenger)로 작용한다. 조골세포 분화에서 PTH의 효과에 관한 Isogai 등의 연구는 PTH의 지속적인 노출은 미성숙 조골세포에서 조골세포 분화를 유발하고, cAMP 경로는 이러한 메카니즘의 중요한 요소라고 밝혔다. 또한, Tintut 등은 혈관 석회화에서 cAMP 경로의 역할에 대해서 연구하였고, cAMP 증강 물질이 석회화하는 혈관 세포가 조골세포 유사 분화를 하는 것을 유발한다고 하였다 (Isogai et al., 1996; Koh, Beecher, Rosol, & McCauley, 1999). 하지만, cAMP 단독으로의 조골세포 분화 효과는 잘 밝혀지지 않았다 (Tintut, Parhami, Bostrom, Jackson, & Demer, 1998). 이에 우리는 C2C12 세포가 조골세포로 분화되는 과정에서 cAMP 활성인자인 forskolin를 가지고 그 역할을 연구하였고 BMP-2가 없는 상태에서 forskolin 단독으로도 농도의존적으로 ALP 발현을 증가시킴을 확인하였다.

본 연구의 결과, forskolin이 ALP의 활성을 증가시키고, mRNA의 발현을 증가시켰다. 하지만 runx2 단백질의 양적 변화에는 관여하지 않았다. runx2 단백질은 forskolin 처리에 의한 변화가 없는데, 이것은 runx2의 경우에 발현도 중요하지만 인산화에 의한 활성화 또한 중요한 것으로 알려져 있다. 그러므로 이 실험 결과를 조금 더 지지하기 위해서는 인산화된 runx2가 증가했는지를 확인해 볼 필요가 있다. *in vitro* 뿐만 아니라 *in vivo* 유사 상황을 만들어서 확인해 보는 것도 중요하다. 기전이 명확히 밝혀져 있지는 않지만 cAMP가 파골세포의 분화에 중요한 역할을 한다고 알려져 있는데, 조골세포와 파골세포 전구체 사이의 coculture 실험이 수행되어서 실제 *in vivo* 상황을 모방한 경우 cAMP가 어떠한 효과를 내는지 알아보는 실험이 추가로 시행 되어야 할 것이다.

우리는 위와 같은 결과를 토대로 forskolin에 의한 cAMP의 증가가 단독으로도 조골세포 분화를 효과적으로 증진시킬 수 있다는 것으로 결론

을 내릴 수 있었다. cAMP의 증가가 어떠한 신호전달 경로를 통하여 조골세포 분화를 유도하는지는 그 기전에 대해서 추가적인 신호 전달 분석 및 연구가 필요할 것이다.

V. 참고 문헌

W. J. Boyle, W. S. Simonet, and D. L. Lacey, 'Osteoclast Differentiation and Activation', *Nature*, 423 (2003), 337-42.

P. A. Insel, and R. S. Ostrom, 'Forskolin as a Tool for Examining Adenylyl Cyclase Expression, Regulation, and G Protein Signaling', *Cell Mol Neurobiol*, 23 (2003), 305-14.

Y. Isogai, T. Akatsu, T. Ishizuya, A. Yamaguchi, M. Hori, N. Takahashi, and T. Suda, 'Parathyroid Hormone Regulates Osteoblast Differentiation Positively or Negatively Depending on the Differentiation Stages', *J Bone Miner Res*, 11 (1996), 1384-93.

T. Katagiri, A. Yamaguchi, M. Komaki, E. Abe, N. Takahashi, T. Ikeda, V. Rosen, J. M. Wozney, A. Fujisawa-Sehara, and T. Suda, 'Bone Morphogenetic Protein-2 Converts the Differentiation Pathway of C2c12 Myoblasts into the Osteoblast Lineage', *J Cell Biol*, 127 (1994), 1755-66.

T. Kobayashi, and H. Kronenberg, 'Minireview: Transcriptional Regulation in Development of Bone', *Endocrinology*, 146 (2005), 1012-7.

A. J. Koh, C. A. Beecher, T. J. Rosol, and L. K. McCauley, '3',5'-Cyclic Adenosine Monophosphate Activation in Osteoblastic Cells: Effects on Parathyroid Hormone-1 Receptors and Osteoblastic Differentiation in Vitro', *Endocrinology*, 140 (1999), 3154-62.

F. Long, 'Building Strong Bones: Molecular Regulation of the

Osteoblast Lineage', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13 (2012), 27-38.

H. Takayanagi, 'Osteoimmunology: Shared Mechanisms and Crosstalk between the Immune and Bone Systems', *Nat Rev Immunol*, 7 (2007), 292-304.

Y. Tintut, F. Parhami, K. Bostrom, S. M. Jackson, and L. L. Demer, 'Camp Stimulates Osteoblast-Like Differentiation of Calcifying Vascular Cells. Potential Signaling Pathway for Vascular Calcification', *J Biol Chem*, 273 (1998), 7547-53.

Abstract

The effect of cAMP elevation in osteoblast differentiation

Chae Jongkyun

Department of Dentistry

School of Dentistry

Seoul National University

Osteoblasts are cells of mesenchymal origin that secrete bone-matrix proteins including osteocalcin, alkaline phosphatase and a large amount of type I collagen, and promote mineralization. Transcription factors necessary for differentiation of osteoblast are Runx2 and osterix.

Forskolin is generally used to increase levels of cyclic AMP (cAMP) in the research of cell physiology. Forskolin activates the enzyme adenylyl cyclase and raises the intracellular levels of cAMP. cAMP is an important signaling molecule essential for the proper biological response of cells to hormones and other extracellular signals.

It is suspected that increasing levels of cAMP activates osteoblast differentiation, but the effect of cAMP alone on osteoblast differentiation are poorly understood. In this study, we have investigated direct effect of cAMP elevation on osteoblast

differentiation. It is confirmed that forskolin activates ALP by ALP staining and increases mRNA expression of ALP by PCR. Based on our data, we conclude that cAMP elevation by forskolin increase osteoblast differentiation alone.

.....
keywords : cAMP, osteoblast, forskolin, C2C12
Student Number : 2009-22735