

# 마우스의 중추신경계에서 osteopontin의 발현

박 준 우<sup>1</sup>, 안 미 정<sup>2</sup>

<sup>1</sup>제주대학교 수의과대학 수의해부학교실, <sup>2</sup>제주대학교 의학전문대학원 해부학교실

## Abstract

### Expression of osteopontin in the central nervous system of BALB/c mice

Junwoo Park<sup>1</sup>, Meejung Ahn<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Veterinary Anatomy, Jeju National University college of Veterinary Medicine,

<sup>2</sup>Department of Anatomy, Jeju National University School of Medicine, Jeju, Korea

Osteopontin (OPN) is an integrin and calcium-binding phosphoprotein that is produced by mineralized tissue cells, many epithelial cells, and activated immune system cells. The aim of this study was to examine the expression and cellular localization of OPN in the central nervous system, including the cerebrum, cerebellum and spinal cord. Female BALB/c mice (25g, 8 weeks old) tissues were collected and used for Western blot analysis and immunohistochemistry. Western blot analysis showed that OPN was detected 55- (upper) and 29-kDa (lower) in the central nervous system. OPN immunoreactivity was low in the cerebrum; moderate in the cerebellum; and high in the spinal cord. Immunohistochemical study showed that the expression of OPN was immunostained neuron and astrocytes in central nervous system. In the olfactory bulb, OPN immunoreactivity was found in mitral cell layer and glomerular layer, but not in external plexiform layer. In the hippocampus, OPN expression was observed in the periterminal area but not CA regions. In the cerebellum, OPN immunoreactivity was found in purkinje cell layer and molecular layer, but not in granule cell layer. In spinal cord, OPN immunoreactivity was weakly found in neuron and some astrocyte. The present study is the first to report that OPN is variably expressed in CNS tissue. This finding suggests that OPN may play an important role in neurons and astrocytes in the normal central nervous system. Further study is needed to elucidate the functional role of OPN in central nervous system. (J Med Life Sci 2010;7:117-121)

**Key Words :** Osteopontin, immunohistochemistry, Balb/c mouse, central nervous system

## 서 론

Osteopontin(OPN)은 고유한 Arg-Gly-Asp (RGD) 세포부착 서열을 포함하고 있는 인단백질(phosphoprotein)로, 무기물화된 소의 뼈에서 처음으로 발견되었고<sup>1)</sup>, 그 후 사람의 뼈<sup>2)</sup>, 생쥐의 신장 등에서 확인되었다<sup>3)</sup>. OPN은 뼈모세포와 뼈파괴세포에서 분비되어 일종의 가교 역할을 하며, 세포들을 기질에 부착시키는 역할을 한다<sup>4)</sup>. 그러나 많은 연구자들은 OPN이 뼈 외에도 신장을 비롯한 속귀, 동맥의 평활근육, 태반, 내이, 중앙조직, 그리고 소화관, 태반, 혈관 등을 포함하는 다양한 상피표면에서도 발견되었고<sup>4, 5)</sup>, 그 기능 또한 매우 다름 것이라는 의견을 제시하고 있다<sup>6, 7)</sup>.

뼈에서 파골세포는 자신의 세포막에 있는 접착분자인 인테그

린을 이용해 골 매트릭스에 존재하는 OPN 등의 RGD 배열을 인식함으로 골 흡수 기능을 한다<sup>8)</sup>. 이 외에도 OPN은 RGD를 매개로 몇몇 인테그린과 상호 작용하여 다른 종류의 세포에 부착할 수 있는 부착인자로 보고되며, RGD를 매개하지 않더라도 CD44,  $\alpha 8 \beta 1$ ,  $\alpha 9 \beta 1$  인테그린과 상호작용하여 다른 종류의 세포에 부착할 수 있는 것으로 알려져 있다<sup>9)</sup>.

이와 같은 OPN의 파골세포에서의 기능 이외에도 신경계에서의 염증세포 및 신경세포에서 발현하며 다른 기능을 나타낸다는 보고들이 있다. OPN은 발달중인 생쥐 뇌에서 신경세포의 분화와 성숙에 관여하고<sup>10)</sup>, pro-inflammatory mediator로 알려져 있으며, 척수손상<sup>11)</sup>, Theiler 바이러스로 유도된 뇌척수염<sup>12)</sup>, 자가면역성 뇌척수염<sup>13)</sup>을 포함하는 다양한 중추신경계 질병 상태에서 증가된 발현양상을 나타낸다. 이러한 신경계에서 pro-inflammatory mediator로서의 OPN의 기능은 자가면역성 뇌척수염에서는 별아교세포의 활성화시키며<sup>14)</sup>, 류마티스 관절염에서 inducible nitric oxide synthase의 역할을 통해 염증의 본질적인 억제자로서의 역할을 한다<sup>15)</sup>.

OPN은 발생 과정 및 병리생물학적 상태에서 골에서의 세포

Address for correspondence : Meejung Ahn  
Department of Anatomy, Jeju National University School of  
Medicine, 66 Jejudaehakno, 690-756, Jeju, Korea  
E-mail : healthy@jejunu.ac.kr

접착 단백질의 역할과 면역계에서의 세포 접착, 이주 등에 중요한 역할을 담당하는 것으로 연구된 바가 있으나, 정상 마우스의 중추 신경계에서의 발현 및 분포 세포에 관해서는 연구된 바가 거의 없다. 따라서 본 연구에서는 정상 마우스의 중추 신경계에서 OPN의 발현을 면역조직화학기법을 이용하여 확인하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험동물

BALB/c 마우스를 중앙실험동물에서 구입 후, 제주대학교 실험동물 관리 규정에 의거하여 사육하였다. 본 실험에서는 25g, 8주령의 BALB/c 마우스 암컷 5마리를 사용하였다.

### 2. 조직표본 준비와 조직검사

실험동물은 CO<sub>2</sub>로 마취하여 방혈하였고, 대뇌, 소뇌, 척수를 적출하여, 각 조직의 일부는 단백질 발현을 보기위한 웨스턴 샘플로 급속 냉동하여 사용까지 -70℃의 deep freezer에 보관하였다. 면역조직화학염색용 조직은 4% 파라포름알데히드 조직고정액에 고정하고, 에탄올과 자일렌으로 탈수와 투명화 과정을 거쳐 파라핀에 포맷한 후 5µm의 두께로 조직절편을 만들어 hematoxylin-eosin 염색 및 면역염색을 실시하였다.

### 3. Western blotting

적출한 장기 조직은 leupeptin (0.5 µg/ml), PMSF (1 mM), aprotinin (5 µg/ml)등의 protein inhibitor가 포함된 40 mM Tris-HCl, pH 7.4, 120 mM NaCl, 0.1% Nonidet P-40 (polyoxyethylene [9] p-t-octyl phenol)의 buffer에서 넣은 후, 완전히 파쇄한 후, 14,000 g로 30분간 원심분리하여 상층액을 회수한다. 이들을 단백질 정량하여 변성시킨 후 동량 (20µg/20ul)으로 sodium dodecyl sulfate- polyacrylamide gel에서 전기영동하고, gel 상의 단백질 밴드를 다시 nitrocellulos membrane에 100V에서 2시간 동안 이동시켰다. 옮겨진 membrane을 5% skim milk로 blocking한 후, 1차 항체로 mouse anti-osteopontin (1:200) (BD Biosciences, San jose, CA, U.S.A)을 실온에서 1시간 반응시킨 후 2차 항체로는 horseradish peroxidase-conjugated horse anti-mouse IgG (Vector Laboratories, Burlingame, CA)로 실온에서 60분간 반응시킨다. 면역반응이 끝난 membrane은 Amersham ECL reagents (Amersham Life Science, Buckinghamshire, UK)로 반응시켜, X-ray 필름에 노출시키고, 그 결과를 densitometer (M GS-700 Imaging Densitometer, Bio-Rad laboratories, Hercules, CA)로 측정하였다.

### 4. 면역조직화학

슬라이드 준비된 조직의 파라핀을 제거하고 내재성 peroxidase를 제거하기 위해 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 포함된 메탄올에 20분

간 반응시켰다. 비특이적 반응을 방지하기 위해 10% normal goat serum으로 1시간 반응시켰다. 1차 항체로 mouse anti-osteopontin (1:200) (BD Biosciences, San jose, CA, U. S. A)을 실온에서 1시간 반응시킨 후 biotinylated goat anti-mouse IgG (1:200)(Vector Laboratories, Burlingame, CA)(Vector Laboratories, Burlingame, CA)로 45분간 반응시켰다. 이어 avidin-biotin peroxidase complex Elite kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA)로 실온에서 45분간 반응시켰다. 각 단계가 끝나고 PBS (pH 7.4)로 5분간 3회 충분히 세척했으며, 면역반응이 끝난 조직절편은 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) (Sigma, St. Louis, MO, USA) 용액으로 발색했다. 그리고 hematoxylin 용액으로 대조염색을 한 후, 에탄올과 자일렌으로 탈수와 투명화 과정을 거쳐 봉입하여 광학현미경으로 관찰하였다.

### 5. 면역반응세포의 평가

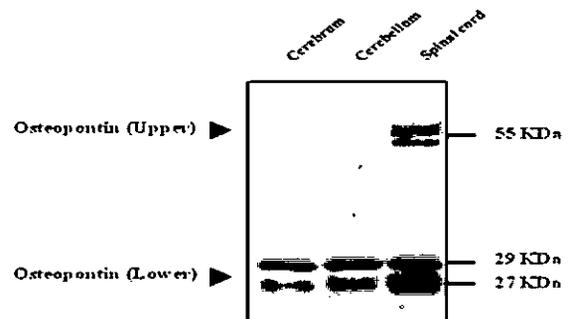
Calveolin-1의 면역반응의 결과는 염색의 강도에 따라, 염색이 안된 경우(-), 약함(+), 보통(++), 강함(+++)으로 평가하였다.

## 결 과

### 1. Osteopontin의 Western blotting 결과

정상 마우스의 중추신경계에서의 OPN의 발현 양상을 알아보기 위해 Western blot analysis를 통해서 마우스의 대뇌, 소뇌, 척수의 OPN 단백질의 변화를 관찰하였다. OPN은 55 kDa과 27 kDa에서 발현하였으며, 약 60 과 30 kDa의 크기로 발현한다는 Luedtke등의 보고와 일치하였다<sup>16)</sup>. OPN의 발현을 조직에 따라 확인한 결과, 55kDa과 27 kDa에서 모두 대뇌에서 가장 약하게 발현하였고, 소뇌는 대뇌에 비해 강하게 발현하였으며, 척수에서 가장 강하게 발현하였다(Fig. 1).

Figure 1. Western blot analysis of Osteopontin in the central nervous system of mouse. Protein (20ug) from cerebrum, cerebellum and spinal cord of adult mice were separated by SDS-PAGE (12%), and then immunoblotted with osteopontin antibodies. Blots are representative of data from a series of three different animals identical results.



2. Osteopontin의 면역조직화학 결과

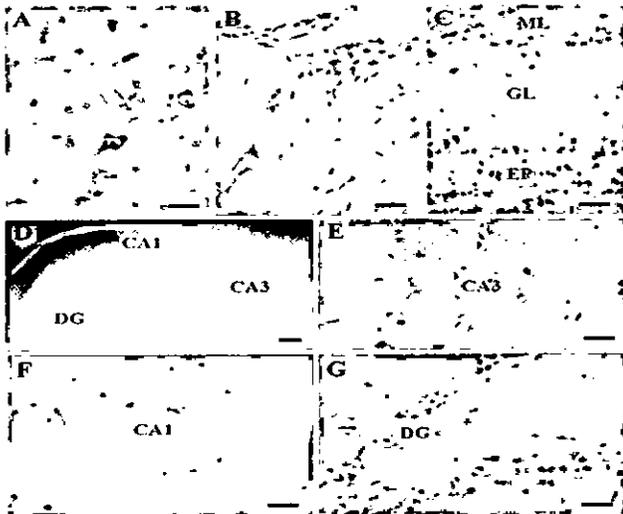
중추신경계 조직에 따라 osteopontin의 발현을 면역조직화학 염색법을 이용하여 확인한 결과, 주로 발현하는 세포는 별아교세포(astrocyte)와 신경원 세포(neurons)였다.

대뇌에서는 분자층(molecular layer)과 과립층(granular layer)에서 신경원(neuron)과 신경아세포(neuroglia)에서 강하게 발현하였다(Fig. 2A, 2B). Choroid plexus의 뇌실막세포(ependymal cells)에서 강하게 발현하였으며, Olfactory bulb 부위에서 OPN의 발현은 승모세포층(mitral cell layer)과 사구체층(glomerular layer)에서 발현하였으나, 바깥그물층(external plexiform layer)에서는 발현하지 않았다(Fig. 2C). Hippocampus에서는 CA1, CA2, dentate gyrus의 신경원에서 발현하였다(Fig. 2D-2G). 소뇌에서 OPN의 발현은 연질막(pia mater)에서 강하게 발현하였고, 조롱박신경세포층(purkinje cell layer)의 신경세포에서도 강하게 발현하였다. 분자층(molecular layer)에서 다소 약하게 발현하였으나, 과립세포층(granule cell layer)에서는 발현하지 않았다(Fig. 3A-3D). 척수에서 OPN의 발현은 뇌실막세포(ependymal cells)에서 아주 강하게 발현하였고, 운동신경원(motor neurons)과 신경아세포(neuroglial cells)에서 강하게 발현하였고 일부 환관내피세포에서도 발현이 확인되었다(Fig. 4A-4D). 중추신경계의 조직에 따른 osteopontin의 발현양상은 Table 1에 요약하여 정리하였다.

고 찰

신경계에서 OPN이 가지는 분포학적, 기능적 의미에 관해 연구된 바는 많지 않으며, 그 연구대상도 소수의 동물 종에 한정되어

Figure 2. Immunohistochemical localization of osteopontin in the cerebrum (A, B), olfactory bulb (C), hippocampus (D,E,F,G) of mouse. ML, mitral cell layer; GL, glomerular layer; EP, external plexiform layer; DG, dantate gyrus. E-G: high magnification of D. Scale bar in A-C, 25  $\mu$ m; D, 200  $\mu$ m; E-G, 25  $\mu$ m.



있었다. 본 연구에서는 정상 마우스의 중추신경계에서 조직에 따른 OPN의 발현 양상을 확인하였고, 조직에 따라 발현 정도와 발현 하는 세포가 다르다는 것을 확인하였다. 웨스턴 블롯 결과에서는 대뇌보다는 소뇌가, 소뇌보다는 척수에서 강한 발현양상을 확인하였고, 면역염색 결과에서는 신경원과 신경아교세포의 대부분에서 OPN이 발현됨을 확인하였다. 특히 척수 조직에서 운동 신경원에서 강한 발현을 나타낸 것은 랫트에서 OPN의 발현을 확인한 이전 보고와도 일치하였다<sup>17)</sup>. 그러나 정상 랫트의 척수 조직과는 다르게 마우스의 척수 조직에서는 뇌실막 세포와 신경아교세포에서도 강하게 발현했다는 것이 랫트와는 다른

Figure 3. Immunohistochemical localization of osteopontin in the cerebellum of mouse. GL, granular layer; ML, molecular layer. Scale bar in A and C, 100 $\mu$ m; B and D, 25  $\mu$ m.

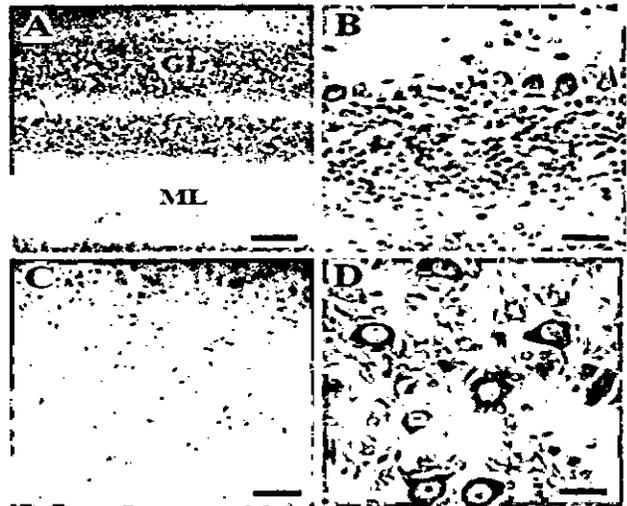
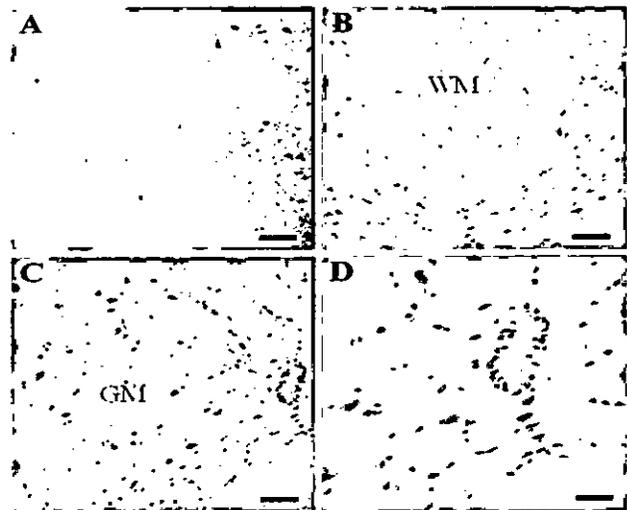


Figure 4. Immunohistochemical localization of osteopontin in the spinal cord of mouse. WM, white matter; GM, grey matter. Scale bar in A, 100  $\mu$ m; B and C, 50  $\mu$ m; D, 25  $\mu$ m.



차이를 보인다.

OPN은 뇌에서 합성된다는 보고 후에<sup>18)</sup>, 사람의 중추신경계 및 말초신경에서 OPN의 세포에 따른 발현 및 분포에 대해 보고 되었다<sup>19)</sup>. OPN은 대뇌, 소뇌, 척수 및 여러 신경조직에 분포하였고, 신경원에서 강한 발현을 보였고, 신경아교세포에서도 다양하게 발현하였다<sup>19)</sup>. 본 연구에서도 이미 보고된 사람의 신경계에서의 발현과 유사한 양상을 확인하였다.

발달중인 랫트에서는 신경계통이 분화하는 동안 초기 척삭과 후뇌에서 OPN의 발현이 관찰되었다는 보고가 있고<sup>20)</sup>, 마우스에서 OPN의 발현은 태아기에 관찰되고, 출생 후 점차 증가하다가 60일령에는 감소하는 경향을 나타냈고, 뇌에서는 카잘간질핵(interstitial nucleus Cajal)과 흑색질 그물부분핵의 신경원에서 OPN이 발현하였고, 그 외 다양한 대뇌부위의 신경원에서 OPN이 발현하였다<sup>19)</sup>. 발생과정중의 OPN의 발현은 마우스의 뇌에서 OPN이 특정한 신경원 집단의 분화와 성숙을 포함하는 발달과정

에 기여하고<sup>10)</sup>, 정상 조직의 중추신경계의 발현은 발생 과정 중에 발현하는 것과 마찬가지로 성숙된 신경세포에서 세포 이주 및 세포 정착 분자로서 중요하다고 사료된다.

이와 더불어 신경퇴보와 관련된 질병 중 알츠하이머병에서의 OPN의 발현은 신경원에서 그 발현이 증가되었고<sup>21)</sup>, 파킨슨병에서는 신경아교세포에서 발현이 증가되었다<sup>22)</sup>. 신경계에서 OPN이 가지고 있는 생물학적 의미는 생체 병리학적 상태에서 정확하게 설명되어야 하고, 앞으로 연구하여야 할 중요한 부분이다.

이상의 결과를 종합해 볼 때, 본 연구에서는 마우스 중추신경계의 다양한 조직에서 OPN의 발현을 처음으로 확인하였고, OPN은 신경원 및 신경아교세포에서 중요한 역할을 할 것으로 사료되며, 마우스 중추 신경계에서의 OPN의 기능적인 역할에 대한 추가적인 연구가 이루어져야 할 것이다.

참 고 문 헌

**Table 1.** Immunohistochemical localization of osteopontin in the central nervous system of mouse

Tissue	Cells or layer type	Osteopontin
Cerebrum	Pia mater	++
	Molecular layer	-
	Granular layer	++
	Pyramidal cells, cytoplasm	++
	Pyramidal cells, neucleus	-
	Neuroglial cells	++
Choroid plexus	Epithelium	-
	Ependymal cells	++
Olfactory bulb	Mitral cell layer	++
	External plexiform layer	-
	Glomerular layer	++
Hippocampus	Neurons of CA1	+
	Neurons of CA2	+
	Dentate gyrus	+
Cerebellum	Pia mater	++
	Molecular layer	+
	Purkinje cells	++
	Granular layer	-
Spinal cord	Ependymal cells	+++
	Motor neurons	++
	Neuroglial cells	++
	Vascular endothelial cells	+

Stained sections were scored for the density of positive cells per field. -, negative; +, weak; ++, moderate; +++, intense.

- 1) Franzen A, Heinegard D. Isolation and characterization of two sialoproteins present only in bone calcified matrix. *Biochem J* 1985;232: 715-24.
- 2) Fisher LW, Hawkins GR, Tuross N, Termine JD. Purification and partial characterization of small proteoglycans I and II, bone sialoproteins I and II, and osteonectin from the mineral compartment of developing human bone. *J Biol Chem* 1987;262:9702-8.
- 3) Xie Y, Sakatsume M, Nishi S, Narita I, Arakawa M, Gejyo F. Expression, roles, receptors, and regulation of osteopontin in the kidney. *Kidney Int* 2001;60:1645-57.
- 4) Reinholt FP, Hulthenby K, Oldberg A, Heinegård D. Osteopontin—a possible anchor of osteoclasts to bone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:4473-5.
- 5) Davis RL, Lopez CA, Mou K. Expression of osteopontin in the inner ear. *Ann N Y Acad Sci* 1995;760:279-95.
- 6) Brown LF, Berse B, Van de Water L, Papadopoulos-Sergiou A, Perruzzi CA, Manseau EJ, et al., Expression and distribution of osteopontin in human tissues: widespread association with luminal epithelial surfaces. *Mol Biol Cell* 1992;3:1169-80.
- 7) Denhardt DT, Guo X. Osteopontin: a protein with diverse functions. *FASEB J* 1993;7:1475-82.
- 8) Nakamura I, Rodan GA, Duong le T. Regulatory mechanism of osteoclast activation. *J Electron Microsc* 2003;52:527-33.
- 9) Chellaiah MA, Hruska KA. The integrin alpha(v)beta(3) and CD44 regulate the actions of osteopontin on osteoclast motility. *Calcif Tissue Int* 2003;72:197-205.
- 10) Kim GB, Hwang IS, Moon C, Shin T, Son H, Jee YH. Expression of osteopontin in developing mouse brain. *Korean J Vet Res* 2004;44: 335-41.

- 11) Hashimoto M, Koda M, Ino H, Murakami M, Yamazaki M, Moriya H. Upregulation of osteopontin expression in rat spinal cord microglia after traumatic injury. *J Neurotrauma* 2003;20:287-96.
- 12) Shin T, Koh CS. Immunohistochemical detection of osteopontin in the spinal cords of mice with Theiler's murine encephalomyelitis virus-induced demyelinating disease. *Neurosci Lett* 2004;356:72-4.
- 13) Kim MD, Cho HJ, Shin T. Expression of osteopontin and its ligand, CD44, in the spinal cords of Lewis rats with experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 2004;151:78-84.
- 14) Chabas D, Baranzini SE, Mitchell D, Bernard CC, Rittling SR, Denhardt DT, et al., The influence of the proinflammatory cytokine, osteopontin, on autoimmune demyelinating disease. *Science* 2001;294:1731-5.
- 15) Attur MG, Dave MN, Stuchin S, Kowalski AJ, Steiner G, Abramson SB, et al., Osteopontin: an intrinsic inhibitor of inflammation in cartilage. *Arthritis Rheum* 2001;44:578-845.
- 16) Luedtke CC, McKee MD, Cyr DG, Gregory M, Kaartinen MT, Mui J, et al., Osteopontin expression and regulation in the testis, efferent ducts, and epididymis of rats during postnatal development through to adulthood. *Biol Reprod* 2002;66:1437-48.
- 17) Jeon YS, Kim IB, Lee EJ, Moon SH, Lim YG, Chun MH. Changes in Osteopontin Expression in the Rat Lumbar Spinal Cord Following the Avulsion of Lumbar Nerve Roots. *The Korean J Anat* 2004;37:89-101.
- 18) Butler WT. The nature and significance of osteopontin. *Connect Tissue Res* 1989;23:123-36.
- 19) Künii Y, Niwa S, Hagiwara Y, Maeda M, Seitoh T, Suzuki T. The immunohistochemical expression profile of osteopontin in normal human tissues using two site-specific antibodies reveals a wide distribution of positive cells and extensive expression in the central and peripheral nervous systems. *Med Mol Morphol* 2009;42:155-61.
- 20) Thayer JM, Schoenwolf GC. Early expression of Osteopontin in the chick is restricted to rhombomeres 5 and 6 and to a subpopulation of neural crest cells that arise from these segments. *Anat Rec* 1998;250:199-209.
- 21) Wung JK, Perry G, Kowalski A, Harris PL, Bishop GM, Trivedi MA, et al. Increased expression of the remodeling- and tumorigenic-associated factor osteopontin in pyramidal neurons of the Alzheimer's disease brain. *Curr Alzheimer Res* 2007;4:67-72.
- 22) Maetzler W, Berg D, Schalamberidze N, Melms A, Schott K, Mueller JC, et al., Osteopontin is elevated in Parkinson's disease and its absence leads to reduced neurodegeneration in the MPTP model. *Neurobiol Dis* 2007;25:473-82.