

흰쥐에서 난소절제술 시행후 대퇴 골밀도와 말초혈액 및 골수 TNF- α 의 변화에 관한 연구

포항성모병원 산부인과

김 성 한

=Abstract=

Changes of Femur Bone Mineral Density and Levels of TNF- α in the Culture Media of Peripheral Blood and Bone Marrow Monocytes after Ovariectomy in Rats

Sung Han Kim, M.D.

Department of Obstetrics and Gynecology, Phohang Mary's Hospital, Phohang, Korea

Although the mechanism of the increase in bone resorption induced by estrogen deficiency is still controversial, recent studies have suggested that estrogen may modulate the secretion of bone resorption cytokines that are produced in the bone microenvironment and influence bone remodeling. Among them, TNF- α promotes bone resorption by stimulating the activity of mature osteoclasts and osteoclastogenesis, and the production of this cytokine is mediated by estrogen. We performed this study to evaluate the effect of ovariectomy on femur bone mineral density and levels of TNF- α in the culture media of bone marrow monocytes.

The experimental animals were 15 female *Sprague-Dawley* rats that were 6 weeks of age and weighed an average of 172.8 gm at the beginning of the study. Bilateral ovariectomy were performed in all rats from a ventral approach. Bone mineral density(BMD) of femur and levels of TNF- α of culture media of peripheral blood and bone marrow monocytes were measured before and 8 weeks after operation with using DPX-L and ELISA assay, respectively. Serum levels of LH, FSH, E2 were measured by RIA assay.

BMD of femur was lower after ovariectomy(0.20 ± 0.03 g/cm²) than before ovariectomy(0.25 ± 0.06 g/cm²)($p < 0.05$). Serum levels of LH, FSH were higher after ovariectomy(0.71 ± 0.29 mIU/ml, 10.27 ± 1.21 mIU/ml) than before ovariectomy(0.17 ± 0.04 mIU/ml, 2.79 ± 0.61 mIU/ml) ($p < 0.01$) and serum level of E2 was lower after ovariectomy(6.37 ± 4.75 pg/ml) than before ovariectomy(7159.16 ± 385.82 pg/ml)($p < 0.01$), respectively. Levels of TNF- α in culture media of bone marrow monocytes were higher after ovariectomy(59.26 ± 5.65 pg/ml) than before ovariectomy(23.37 ± 4.13 pg/ml)($p < 0.01$), but there were no statistically significant differences

in culture media of the peripheral blood monocytes(before ovariectomy: 22.96 ± 3.62 pg/ml ; after ovariectomy: 23.55 ± 2.98 pg/ml)($p>0.05$).

It is possible that increased production of TNF- α in estrogen deficiency induced by ovariectomy occurs in the bone microenvironment and this cytokine may play a critical causal role in inducing bone loss.

Key Words: Ovariectomy, TNF- α , BMD

서 론

에스트로겐 결핍에 의한 골손실은 골교체율의 증가와 밀접한 연관이 있으며 이러한 현상은 골수의 미세환경에 존재하는 세포에 의해 생성되는 사이토카인에 영향을 미쳐 골손실에 관여하는 것으로 알려져 있으나(Raisz et al, 1988 ; Horowitz et al, 1993) 정확한 기전은 아직 불분명하다. 이러한 사이토카인 중에서 interleukin-1(IL-1), interleukin-6(IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α) 등이 파골세포의 형성과 골흡수 활동도를 증가시키는 것으로 알려져 있다(Gowen et al, 1983 ; Lorenzo et al, 1987 ; Konig et al, 1988 ; Boyce et al, 1989 ; Ralston et al, 1990 ; Rickard et al, 1992).

이에 저자는 흰쥐에서 양측 난소 절제술에 의한 에스트로겐 결핍이 대퇴 골밀도와 말초혈액 및 골수 단핵구에서 분리 배양하여 측정한 TNF- α 에 미치는 영향을 알아보고자 이 연구를 시행하였다.

대상 및 방법

1. 대상

실험대상은 6주된 Sprague Dawley 백서 암컷(평균 몸무게=172.8gm, 평균 신장=18.7cm) 15마리를 양측 난소 절제술 시행전과 시행 8주후에 대퇴 골밀도를 측정하였고, 말초혈액과 대퇴 골수로 부터 채취한 단핵

구를 분리 배양하여 TNF- α 를 측정하였고, 동시에 말초혈액에서 LH, FSH, 그리고 E₂를 측정하였다.

2. 방법

난소 절제술은 배측으로 접근하여 entobar®(Pentobarbital sodium) 0.06ml/100gm 을 복강내로 주사하여 마취후 시행하였다. 흰쥐의 서혜부를 절개한 후 대퇴동맥을 노출시켜 말초 혈액 1ml를 채취하고 대퇴골수에 22gauge 주사기로 골수혈액 0.5ml를 채취하였다. 대퇴골수에서 얻은 혈액과 말초 혈액을 각각 15ml 시험관에 Lymphoprep™ (Nycomed Pharma As, Oslo, Norway)용액 2ml를 혼합하여 2,000rpm에서 5분간, 3,000rpm에서 20분간 원심분리하여 중간층에서 단핵구만 분리한 다음 HBSS(Gibco사)용액으로 1회 세척후 다시 RPMI 1640(Gibco Lab. N.Y., USA)용액으로 1회 세척하여 cell count를 시행하였다. 단핵구는 평균 4×10^6 cells/ml로 맞추어 60mm/culture dish에 15%FBS와 함께 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양후 media만 tube로 옮겨 2,000rpm에서 5분간 원심한 다음 상층액을 분리하여 ELISA법으로(Amersham Life Science, UK) TNF- α 를 측정하였다. 대퇴 골밀도의 측정은 Dual energy X-ray bone densitometer(DPX-LUNAR)를 이용하여 측정하였다. 난소 절제술이 적절하게 되었는지 알기위해 난소 절제술 시행 8주후에 흰쥐의 서혜부 대퇴동맥에서 FSH, LH, 그리고 E₂를 측정하였다.

3. 통계방법

통계처리 및 자료의 분석은 SPSS/PC+ 통계 package를 이용하였으며 유의성 검정은 Student's t-test로 p value를 산출하여 p value<0.05인 경우에 통계학적 유의성을 인정하였다.

결과

대퇴 골밀도는 난소절제술 시행전 $0.25 \pm 0.06 \text{ g/cm}^2$ 에서 시행후 $0.20 \pm 0.03 \text{ g/cm}^2$ 로 통계학적으로 유의한 감소($p<0.05$)를 보였다 (Fig 1).

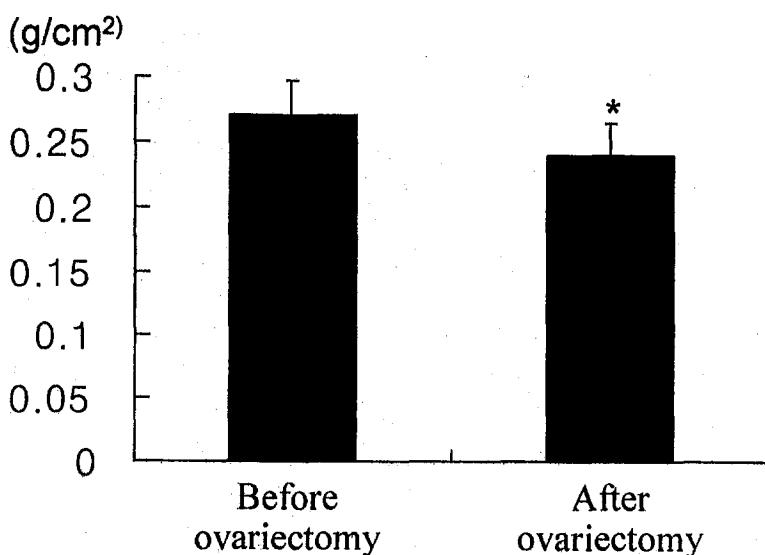


Fig 1. Changes of total and spine BMD between before and after ovariectomy.

* $P<0.05$ vs before ovariectomy

혈청 LH, FSH, E₂는 난소절제술을 시행전 LH, FSH, E₂는 각각 $0.17 \pm 0.04 \text{ mIU/ml}$, $2.79 \pm 0.61 \text{ mIU/ml}$, $7159.16 \pm 385.82 \text{ pg/ml}$ 에서 시행후 각각 $0.71 \pm 0.29 \text{ mIU/ml}$, $10.27 \pm 1.21 \text{ mIU/ml}$, $6.37 \pm 4.75 \text{ pg/ml}$ 로 통계학적으로 유의한 증가와 감소($p<0.01$)를 보여 난소절제가 성공적으로 이루어졌음을 알 수 있었다(Fig 2, Fig 3).

말초혈액 단핵구를 분리 배양하여 측정한

TNF- α 치는 난소 절제술 시행전 $22.96 \pm 3.62 \text{ pg/ml}$ 에서 시행후 $23.55 \pm 2.97 \text{ pg/ml}$ 로 통계학적 유의성을 보이지 않았고($p>0.05$) (Fig 4), 대퇴 골수 단핵구를 분리 배양하여 측정한 TNF- α 치는 난소절제술을 시행전 $23.37 \pm 4.13 \text{ pg/ml}$ 에서 시행후 $59.26 \pm 5.65 \text{ pg/ml}$ 로 통계학적으로 유의한 증가($p<0.01$)를 보였다(Fig 4).

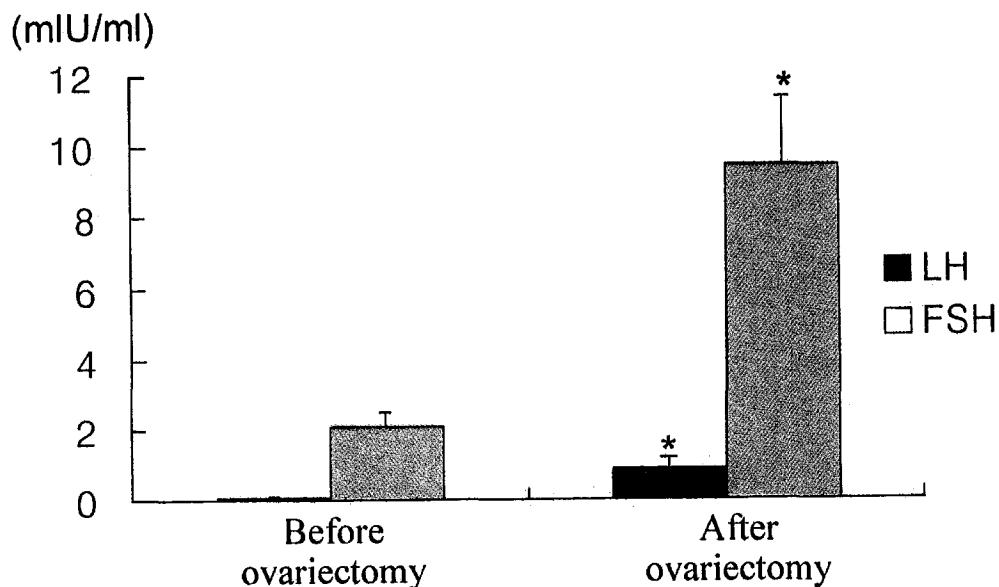


Fig. 2. Changes of LH & FSH levels between before and after ovariectomy.
* $P<0.01$ vs before ovariectomy.

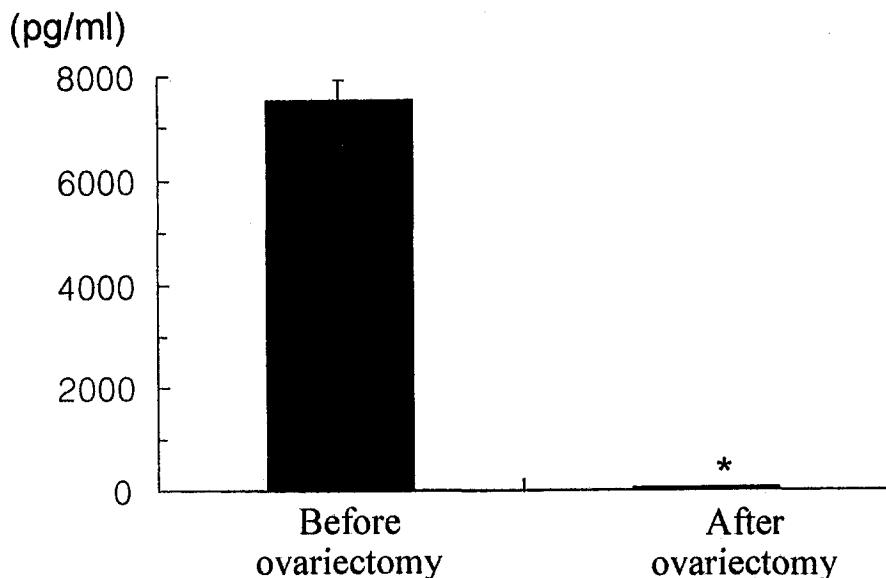


Fig. 3. Changes of estradiol levels between before and after ovariectomy.
* $P<0.01$ vs before ovariectomy.

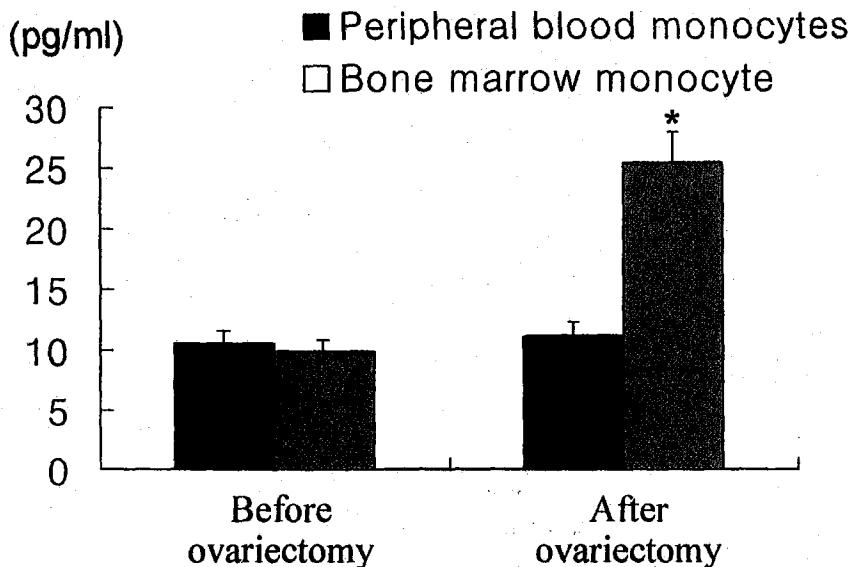


Fig 4. IL-6 levels in culture media of peripheral blood and bone marrow monocytes between before and after ovariectomy.

*P<0.05 vs before ovariectomy.

고찰

최근의 연구에 의하면 에스트로겐 결핍에 의한 골흡수는 골흡수에 관여하는 사이토카인의 paracrine production의 증가에 의해 매개되는 것으로 알려져 있으나(Horowitz et al, 1983 ; Zarabietia et al, 1991 ; Pacifici et al, 1993 ; Khosla et al, 1994). 에스트로겐에 의한 골흡수 방지에 대한 정확한 기전은 아직 불분명하다.

TNF- α 는 osteoclastogenesis와 성숙한 파골세포의 활동도를 자극하고 골형성을 억제하며, IL-1과 같이 IL-11, macrophage colony-stimulating factor와 같은 osteoclastogenesis를 조절하는 다른 시토킨과 IL-6의 분비를 유발하는 것으로 알려져 있다(Vander & Pluijim et al, 1991 ; Hustmyer et al, 1993 ; Kitazawa et al, 1994). 또한 IL-1과 TNF- α 는 많은 세포에서 서로 상승작용을 나타내고, TNF- α 는 IL-1, IL-6, IL-11 등과 달리 해면골의 손실에는 관

여 하지 않는 것으로 알려져 있다(Parfitt et al, 1988 ; Konig et al, 1988 ; Boyce et al, 1989 ; Felix et al, 1989 ; Pfeilschifter et al, 1989 ; Waiiach et al, 1993). 또한 TNF- α 는 IL-1과 함께 쥐와 인간에서 에스트로겐에 의해 생성이 조절되는 것으로 알려져 있다(Chaplin et al, 1992 ; Kitazawa et al, 1994). Kimble 등(1995)은 난소절제술을 시행한 쥐에서 2주후에 골수세포 배양에서 측정한 TNF- α 치가 통계학적으로 유의한 증가를 보여 난소절제술후 초기의 골손실에 중요한 역할을 한다고 보고하였다. 저자의 연구에서도 난소절제술을 시행한 8주후에 골수 단핵구에서 측정한 TNF- α 치가 증가되어 Kimble 등(1995)과 유사한 결과를 보였다. 그리고 Zarabietia 등(1991)과 Hustmyer 등(1993)은 폐경기골다공증 환자에서 폐경전 정상여성과 비교하여 말초혈액 단핵구에서 측정한 TNF- α 는 증가를 보이지 않았다고 보고하여 저자의 연구와 유사한 결과를 보였다. 따라서 이들의 연구와 저자의 연구결

과에서 볼 때 TNF- α 는 골수의 미세환경에 국한하여 작용하여 난소절제술에 의한 에스트로겐 결핍상태에서 TNF- α 가 파골세포에 의한 골흡수증가에 중요한 역할을 할 것으로 사료되며, 해면골로 주로 이루어진 척추 골밀도와 피질골로 이루어진 장골과 TNF- α 와의 상관관계에 관한 추시가 필요할 것으로 생각된다.

요 약

에스트로겐 결핍에 의해 야기되는 골손실에 대한 정확한 기전은 잘 알려져 있지 않으나 에스트로겐이 골의 미세환경에서 골재형성에 관여하는 사이토카인의 생성에 관여하는 것으로 알려져 있다. 이러한 사이토카인 중에서 TNF- α 가 성숙된 파골세포의 활동도와 osteoclastogenesis를 촉진시켜 골흡수에 관여하는 것으로 알려져 있으며, TNF- α 의 생성이 에스트로겐에 의해 조절된다는 보고가 있었다. 이에 저자는 난소절제술에 의한 에스트로겐 결핍이 백서에서 대퇴 골밀도와 TNF- α 에 미치는 영향을 알아보고자 이 연구를 시행하였다.

6주된 Sprague Dawley 암컷을 대상으로 난소절제술 시행전과 시행 8주후에 각각 DPX-L을 이용하여 대퇴 골밀도를 측정하였고, 난소절제술의 성공여부를 알기 위하여 혈청 LH, FSH, E₂를 측정하였다. 난소절제술 시행전후에 말초혈액과 대퇴 골수에서 단핵구를 분리 배양하여 ELISA법으로 TNF- α 를 측정 비교하였다.

난소절제술 시행 8주후 측정한 대퇴 골밀도는 시행전보다 통계학적으로 유의하게 낮았다($p<0.05$). 혈청 LH 및 FSH는 난소절제술 시행 8주후에 통계학적으로 유의하게 높았고($p<0.01$), E₂는 난소절제술 시행 8주후에 통계학적으로 유의하게 낮게 나타났다($p<0.01$). 골수 단핵구의 배양액에서 측정한 TNF- α 치는 난소절제술 시행 8주후에 통계학적으로 유의한 증가를 보였으나($p<0.01$), 말초 혈액 단핵구의 배양액에서 측정한 TNF- α

치는 통계학적으로 유의한 차이를 보이지 않았다.

난소절제술 시행후 야기되는 TNF- α 의 증가는 에스트로겐 결핍에 의해 초래되는 골손실에 중요한 인자로 작용할 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

- Bertolini DR, Nedwin GE, Bringman TS, Smith DD, Mundy GR : Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation in vitro by human tumor necrosis factor. *Nature* 1986 ; 319 : 516-518.
- Boyce BF, Aufdemorte TB, Garrett IR, Yates AJP, Mundy GR : Effects of interleukin-1 on bone turnover in normal mice. *Endocrinology* 1989 ; 125 : 1142-1150.
- Chaplin Dd, Hogquist K : Interactions between TNF- α and interleukin-1. In: Beutler B (ed) Tumor Necrosis Factors. The Molecules and Their Emerging Role in Medicine. Raven Press, New York, pp 197-200, 1992.
- Felix R, Fleish H, Elford PR : Bone-resorbing cytokines enhance release of macrophage colony-stimulating activity by osteoblastic cell MC3T3-E1. *Calcif Tissue Int* 1989 ; 44 : 356-360.
- Gowen M, Wood DD, Ihrie EJ, McGuire MKB, Russell RGG : An interleukin-like factor stimulates bone resorption in vitro. *Nature* 1983 ; 306 : 378-380.
- Horowitz MC : Cytokines and estrogen in bone : anti-osteoporotic effects. *Science* 1993 ; 260 : 626-627.
- Hustmyer FG, Walker E, Yu X-P, et al : Cytokine production and surface antigen expression by peripheral blood mononuclear cells in postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res* 1993 ; 8 :

- 51-59.
- Khosla S, Peterson JM, Egan K, Jones JD, Riggs BL : Circulating cytokine levels in osteoporotic and normal women. *J Clin Endocrinol Metab* 1994 ; 79 : 707-711.
- Kimble RB, Matayoshi AB, Vannice JL, Kung VT, Williams C, Pacifici R : Simultaneous block of interleukin-1 and tumor necrosis factor is required to completely prevent bone loss in the early postovariectomy period. *Endocrinology* 1995 ; 136 : 3054-3061.
- Kitazawa R, Kimble RB, Vannice JL, Kung VT, Pacifici R : Interleukin-1 receptor antagonist and tumor necrosis factor binding protein decrease osteoclast formation and bone resorption in ovariectomized mice. *J Clin Invest* 1994 : 2397-2406.
- Konig A, Muhlbauer RC, Fleisch H : Tumor necrosis factor- α and interleukin-1 stimulate bone resorption in vivo as measured by urinary (3H) tetracycline excretion from prelabeled mice. *J Bone Miner Res* 1988 ; 3 : 621-627.
- Lorenzo JA, Sousa SL, Alander C, Raisz LG, Dinarello CA : Comparison of the bone-resorbing activity in the supernatants from phytohemagglutinin-stimulated human peripheral blood mononuclear cells with that of cytokines through the use of an antiserum to interleukin - 1. *Endocrinology* 1987 ; 121 : 1164-1170.
- Pacifici R, Vannice JL, Rifas L, Kimble RB : Monocytic secretion of interleukin-1 receptor antagonist in normal and osteoporotic women : effects of menopause and estrogen/progesterone therapy. *J Clin Endocrinol Metab* 1993 ; 77 : 1135-1141.
- Parfitt AM : 1988 Bone remodeling : relationship to the amount and structure of bone, and the pathogenesis and prevention of fractures. In : Riggs BL(ed) *Osteoporosis*. Raven Press, New York, pp 45-93.
- Pfeilschifter J, Chenu C, Bird A, Mundy GR, Roodman GD : Interleukin-1 and tumor necrosis factor stimulate the formation of human osteoclast-like cells in vitro. *J Bone Miner Res* 1989 ; 4 : 113-118.
- Ralston SH, Russell RGG, Gowen M : Estrogen inhibits release of tumor necrosis factor from peripheral blood mononuclear cells in postmenopausal women. *J Bone Miner Res* 1990 ; 5 : 983-988.
- Raisz LG : Local and systemic factors in the pathogenesis of osteoporosis. *N Engl J Med* 1988 ; 318 : 818-828.
- Rickard D, Russsell G, Gowen M : Oestradiol inhibits the release of tumor necrosis factor but not interleukin - 6 from adult human osteoblasts in vitro. *Osteoporosis Int* 1992 ; 2 : 94-102.
- Thomson BM, Mundy GR, Chambers TJ : Tumor necrosis factor α and β induce osteoblastic cells to stimulate osteoclastic bone resorption. *J Immunol* 1987 ; 138 : 775-779.
- Van der Pluijm G, Most W, van der Weepals L, de Groot H, Papapoulos S, Lowik C : Two distinct effects of recombinant human tumor necrosis factor-alpha on osteoclast development : and subsequent resorption of mineralized matrix. *Endocrinology* 1991 ; 129 : 1596-1604.
- Waiach S, Avioli LV, Feinblatt JD, Carsten JH : Cytokines and bone metabolism. *Calcif Tissue Int* 1993 ; 53 : 293-296.
- Zarrabeitia MT, Riancho JA, Amado JA, Napal J, Gonzalez-macias J : Cytokine production by peripheral blood cells in postmenopausal osteoporosis. *Bone Miner* 1993 ; 14 : 161-167.