

## 백서에서 난소절제술 시행후 전신골밀도와 말초혈액 및 골수 단핵구의 IL-1치의 변화에 관한 연구

포항성모병원 산부인과

김 성 한

=Abstract=

### Changes of Bone Mineral Density of Total Body and IL-1 levels in the Culture Media of Bone Marrow and Peripheral Blood 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 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, IL-1 promotes bone resorption by stimulating the activity of mature osteoclasts and the differentiation of osteoclast precursors and the production of cytokines are mediated by estrogen. The purpose of the this study was to evaluate the effect of ovariectomy on bone mineral density and levels of IL-1 in the culture media of bone marrow and peripheral blood monocytes.

The experimental animals were 16 female *Sprague-Dawley* rats that were 8 weeks of age and weighed an average of 186.8gm at the beginning of the study. Bilateral ovariectomy was performed from a ventral approach in all rats. Bone mineral density(BMD) of the total body and IL-1 levels in culture media of bone marrow and peripheral blood monocytes were measured before and 8 weeks after ovariectomy with DPX-L and ELISA assay, respectively. Serum levels of LH, FSH and E<sub>2</sub> were measured by RIA assay.

BMD of total body was lower after ovariectomy( $0.24 \pm 0.04$  g/cm<sup>2</sup>) than before ovariectomy ( $0.27 \pm 0.03$  g/cm<sup>2</sup>)( $p < 0.05$ ). Serum levels of LH, FSH were higher after ovariectomy( $0.87 \pm 0.36$  mIU/ml,  $9.47 \pm 1.26$  mIU/ml) than before ovariectomy( $0.10 \pm 0.06$  mIU/ml,  $2.09 \pm 0.41$  mIU/ml)( $p < 0.01$ ) and serum level of E<sub>2</sub> was lower after ovariectomy( $10.98 \pm 8.71$  pg/ml) than before ovariectomy( $7350.77 \pm 417.29$  pg/ml)( $0.01$ ), respectively. Levels of IL-1 in culture media of

bone marrow monocytes were higher after ovariectomy( $25.47 \pm 3.54$  pg/ml) than before ovariectomy( $9.83 \pm 1.10$  pg/ml)( $p < 0.01$ ), but there were no statistically significant differences in culture media of the peripheral blood monocytes(before ovariectomy:  $10.59 \pm 1.03$  pg/ml ; after ovariectomy:  $11.17 \pm 1.29$  pg/ml)

It is possible that the increased production of IL-1 in estrogen deficiency induced by ovariectomy occurs in the bone microenvironment and this cytokine may play a critical role in inducing bone loss.

**Key words:** Ovariectomy, IL-1, 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- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 등이 파골세포의 형성과 골흡수 활동도를 증가시키는 것으로 알려져 있으며 (Gowen et al, 1983 ; Lorenzo et al, 1987 ; Boyce et al, 1989) 이러한 사이토카인 중에서 IL-1은 osteoclastogenesis를 자극하고 동시에 골흡수에 관여하는 다른 사이토카인의 분비를 자극 하는 것으로 알려져 있다(Konig et al, 1988 ; Ralston et al, 1990 ; Rickard et al, 1992). 이에 저자는 백서에서 양측 난소 절제술에 의한 에스트로겐 결핍이 전신골밀도와 말초혈액 및 골수 단핵구를 분리 배양하여 측정한 IL-1치에 미치는 영향을 알아보고자 이 연구를 시행하였다.

## 재료 및 방법

실험대상은 8주된 *Sprague Dawley* 백서 암컷(평균 몸무게=186.8gm, 평균 신장=21.

7cm) 16마리를 양측 난소 절제술을 시행하기 전과 시행 8주후에 골밀도를 측정하였고, 말초혈액과 대퇴 골수로부터 채취한 단핵구를 분리 배양하여 IL-1을 측정하였고, 동시에 말초혈액에서 LH, FSH, 및 E<sub>2</sub>를 측정하였다.

난소 절제술은 배측으로 접근하여 entobar®(Pentobarbital sodium) 0.06ml/100gm을 복강내로 주사하여 마취후 시행하였다. 백서의 서혜부를 절개한 후 대퇴동맥을 노출시켜 말초 혈액 1ml를 채취하고 대퇴골수에 22 gauge 주사기로 골수혈액 0.5 ml를 채취하였다. 대퇴골수에서 얻은 혈액과 말초 혈액을 각각 15 ml 시험관에 Lymphoprep™ (Nycomed Pharma As, Oslo, Norway)용액 2 ml를 혼합하여 2,000 rpm에서 5분간, 3,000 rpm서 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  $4 \times 10^6$  cells/ml로 맞추어 60 mm/culture dish에 15% FBS와 함께 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 24시간 배양후 media만 tube로 옮겨 2,000 rpm에서 5분간 원심한 다음 상층액을 분리하여 ELISA(Amersham Life Science, UK)법으로 IL-1을 측정하였다. 골밀도의 측정은 Dual energy X-ray bone densitometer(DPX-L LUNAR)를 이용하여 전신골밀도를 측정하였다. 난소 절제술이 적절하게 되었는지 알기위해 난소 절제술 시

행 8주후에 백서의 서혜부 대퇴동맥에서 FSH, LH, 및 E<sub>2</sub>를 측정하였다.

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.

### 결 과

전신골밀도는 난소절제술 시행전 0.27±0.03 g/cm<sup>2</sup>에서 시행후 0.24±0.04 g/cm<sup>2</sup>로 통계학적으로 유의한 감소(p<0.05)를 보였다 (Fig 1).

혈청 LH, FSH, 및 E<sub>2</sub>는 난소절제술 시행전 각각 0.10±0.06 mIU/ml, 2.09±0.41 mIU/ml, 7350.77±417.29 pg/ml에서 시행후 각각 0.87±0.36 mIU/ml, 9.47±1.26 mIU/ml, 10.98±8.71 pg/ml로 통계학적으로 유의한 증감(p 0.01)을 보여 난소절제가 성공적으로 이루어졌음을 알 수 있었다(Fig 2).

말초혈액 단핵구를 분리 배양하여 측정한 IL-1은 난소절제술 시행전 10.59±1.03 pg/ml에서 시행후 11.17±1.29 pg/ml로 통계학적 유의성을 보이지 않았고(p>0.05), 대퇴골 수 단핵구를 분리 배양하여 측정한 IL-1은 난소절제술 시행전 9.83±1.10 pg/ml에서 시행후 25.47±3.54 pg/ml로 통계학적으로 유의한 증가(p<0.01)를 보였다(Fig 4).

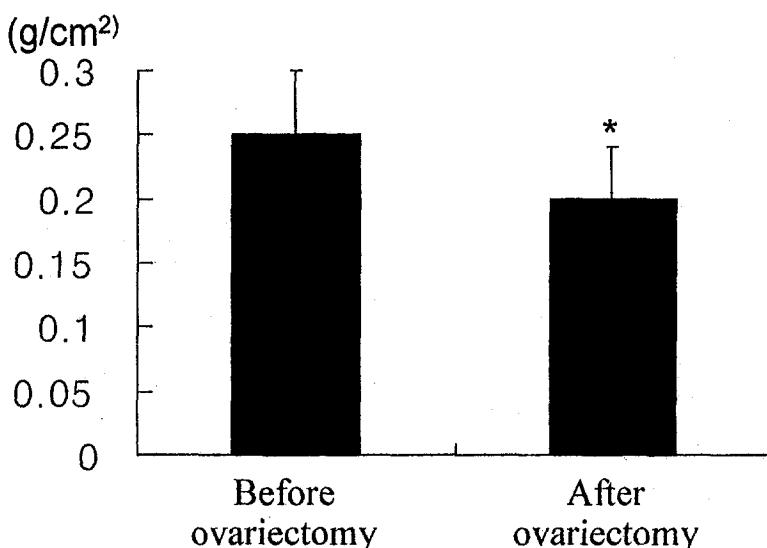


Fig 1. Changes of total and spine BMD between before and after ovariectomy.  
\* P<0.05 vs before ovariectomy

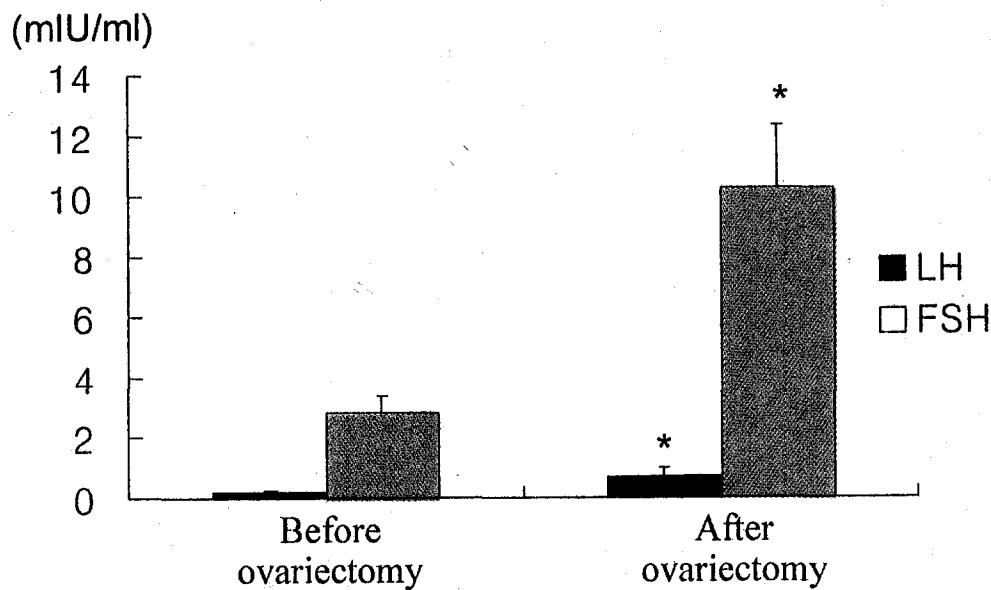


Fig. 2. Changes of LH & FSH levels between before and after ovariectomy.  
\* P<0.01 vs before ovariectomy.

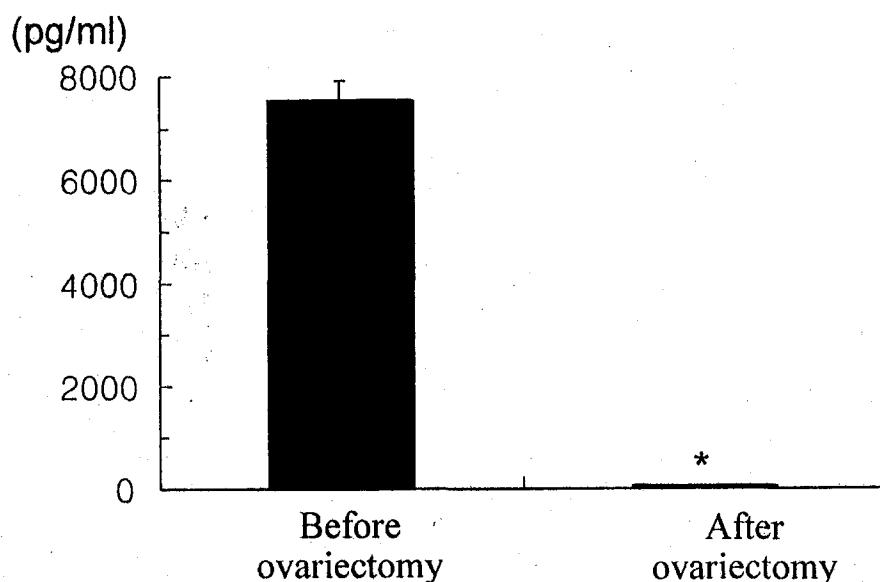


Fig. 3. Changes of estradiol levels between before and after ovariectomy.  
\*P<0.01 vs before ovariectomy.

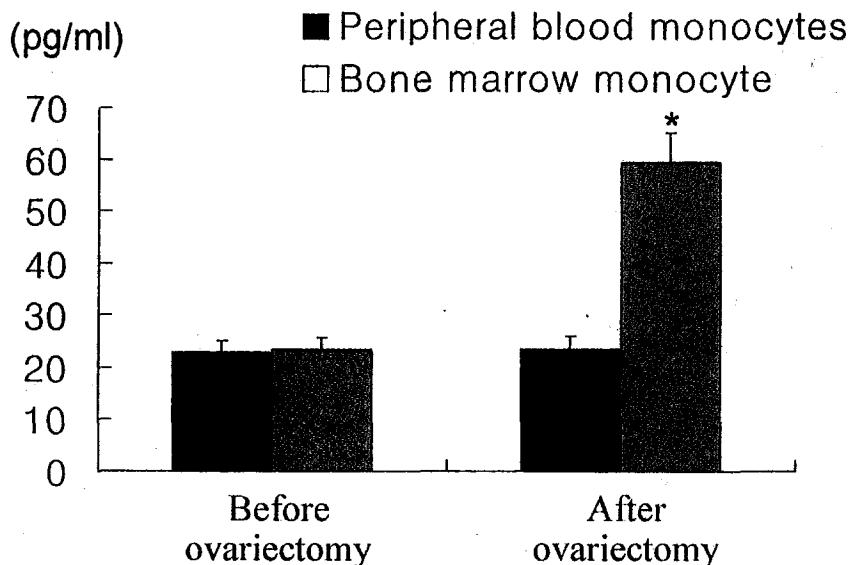


Fig 4. IL-6 levels in culture media of peripheral blood and bone marrow monocytes between before and after ovariectomy.

\* $P<0.05$  vs before ovariectomy.

### 고 칠

최근의 연구에 의하면 에스트로겐 결핍에 의한 골흡수는 골흡수에 관여하는 사이토카인의 paracrine production의 증가에 의해 매개되는 것으로 알려져 있으나(Horwitz et al, 1993 ; Pacifici et al, 1993 ; Zarrabeitia et al, 1993 ; Khosla et al, 1994) 에스트로겐에 의한 골흡수 방지에 대한 정확한 기전은 아직 불분명하다. Pacifici 외(1995)는 에스트로겐이 IL-1과 IL-1 receptor antagonist에 대한 특정한 억제제의 분비를 조절한다고 보고하였다.

IL-1은 성숙한 파골세포의 활동도와 파골세포의 전구세포의 분화를 자극하여 골흡수를 자극하는 것으로 알려져있고, IL-1의 효과를 강화시키는 IL-6, IL-11, macrophage colony-stimulating factor와 같은 사이토카인의 분비도 골세포에서 유발하는 것으로 알려져 있다(Konig et al, 1988 ; Boyce et al, 1989 ; Pfeilschifter et al, 1989 ; Felix et al, 1989). Kimble 외(1995)은 난소절제술을 시행

한 쥐에서 sham-operation을 시행한 쥐에서 보다 2주후에 골수세포 배양에서 측정한 IL-1치가 통계학적으로 유의한 증가를 보여 난소절제술후 초기의 골손실에 IL-1이 중요한 역할을 있다고 보고하였다. 저자의 연구에서도 난소절제술 시행전후에서 대퇴골수 단핵구를 분리 배양하여 측정한 IL-1치가 증가되어 Kimble 외(1995)와 유사한 결과를 보였다. 그러나 Stock 외(1989)는 폐경기 여성에서 에스트로겐 치료후에도 말초혈액 단핵구에서 IL-1 생성의 변화가 없었다고 보고하였고, Zarrabeitia 외(1993)와 Hustmyer 외(1993)도 폐경기 골다공증 환자에서 폐경 전 정상여성과 비교하여 말초혈액 단핵구에서 측정한 IL-1치의 증가를 보이지 않았다고 보고하여, 저자가 말초혈액 단핵구를 분리 배양하여 측정한 IL-1의 연구 결과와 유사하였다. 따라서 이들의 연구와 저자의 연구결과에서 볼때 IL-1은 말초혈액에서 보다 골수의 미세환경에 국한하여 작용하여 난소절제술에 의한 에스트로겐 결핍상태에서 IL-1이 골손실을 초래하는 중요한 요인으로

작용할 것으로 생각되며 IL-1에 대한 중화 항체가 IL-1에 의한 골손실을 예방할 수 있을지에 대한 추시가 필요할 것으로 사료된다.

## 요약

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 IL-1이 성숙된 파골세포의 활동도와 파골세포의 전구세포 분화를 촉진시켜 골흡수에 관여하는 것으로 알려져 있으며, 이들 사이토카인 생성이 에스트로겐에 의해 조절 된다는 보고가 있었다. 이에 저자는 난소절제술에 의한 에스트로겐 결핍이 백서에서 전신골밀도와 IL-1에 미치는 영향을 알아보기자 이 연구를 시행하였다.

8주된 Sprague Dawley 암컷을 대상으로 난소절제술 시행전후에서 DPX-L을 이용하여 전신골밀도를 측정하였고, 난소절제술의 성공여부를 알기 위하여 혈청 LH, FSH, E<sub>2</sub>를 측정하였다. 난소절제술 시행전후에서 말초혈액과 대퇴골수에서 단핵구를 분리배양하여 ELISA법으로 IL-1을 측정비교하였다.

난소절제술 시행 8주후 측정한 전신골밀도는 통계학적으로 유의하게 낮았고( $p<0.05$ ), 혈청 LH 및 FSH는 난소절제술 시행 8주 후에 통계학적으로 유의하게 높았고( $p<0.01$ ), E<sub>2</sub>는 난소절제술 시행 8주후에 통계학적으로 유의하게 낮았다( $p<0.01$ ). 골수 단핵구의 배양액에서 측정한 IL-1은 난소절제술 시행 8주후에 통계학적으로 유의한 증가를 보였고( $p<0.05$ ), 말초혈액 단핵구의 배양액에서 측정한 IL-1은 통계학적으로 유의한 차이를 보이지 않았다.

난소절제술 시행후 야기되는 골수 단핵구에서 IL-1의 분비 증가는 에스트로겐 결핍에 의해 초래되는 골손실에 중요한 인자로 작용할 것으로 사료된다.

## 참고문헌

- 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.
- 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.
- Konig A, Muhlbauer RC, Fleisch H : Tumor necrosis factor- $\alpha$  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, Rifas L, McCracken R, et al : Ovarian steroid treatment blocks a postmenopausal increase in blood monocyte interleukin 1 release. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995 ; 86 : 2398-2402.
- 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.
- 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.
- Stock JL, Coderre JA, McDonald B, Rosenwasser LJ : Effects of estrogen in vivo and in vitro on spontaneous interleukin-1 release by monocytes from postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 1989 ; 68 : 364-368.
- 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.