

백서에서 양측 난소절제술이 골밀도 및 IL-6치에 미치는 영향

계명대학교 의과대학 내과학교실, 포항성모병원 내과¹⁾

한승엽 · 김성한¹⁾ · 박근용

서 론

에스트로겐 결핍의 초기단계에서 골소실은 골교체율의 증가와 밀접한 연관이 있으며¹⁾, 이러한 현상은 인체^{2, 3)}뿐만 아니라 백서⁴⁻⁶⁾에서도 나타나는 것으로 알려져 있다.

에스트로겐 결핍에 의해 초래되는 폐경기 골소실에 대한 에스트로겐의 방어 효과는 골교체율을 억제시키고 시토킨 분비를 조절하여 골재형성에 관여하는 것으로 알려져 있으나 아직 정확한 기전은 밝혀져 있지 않다⁷⁻¹¹⁾.

파골세포는 CFU-GM(colony forming unit for granulocytes and macrophage)에서 분화되어 생성되며, 이 분화단계에 Interleukin-6(IL-6)가 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다¹²⁾. 즉 에스트로겐 결핍상태가 되면 조골세포에서 IL-6의 생성이 증가되어 파골세포의 발현 및 활성이 증가되고 따라서 이러한 활성화된 파골세포에 의해서 골소실이 증가되는 것으로 알려져 있다^{13, 14)}. 그러나 아직도 인체내에서 IL-6와 에스트로겐 사이의 상관관계에 대해서는 상반된 연구결과를 보고하고 있다^{15, 16)}.

이에 저자들은 양측 난소절제술 시행 후 초래되는 에스트로겐 결핍이 백서에서 골밀도의 변화와 말초혈액 및 골수 단핵구를 분리 배양하여 측정한 IL-6치에 미치는 영향을 알아보고자 이 연구를 시행하였다.

대상 및 방법

실험대상은 8주된 *Sprague Dawley* 백서 암컷(평

균 몸무게=188.5±7.4gm, 평균 신장=23.2±1.5cm) 13마리로 하였다. 양측 난소절제술을 시행하기 전과 시행 8주 후에 골밀도를 측정하였으며, 대퇴 골수와 말초혈액으로부터 채취한 단핵구를 분리 배양하여 IL-6치를 측정하였고, 동시에 말초혈액에서 황체형성호르몬(Luteinizing hormone, LH), 난포자극호르몬(Follicle stimulating hormone, FSH), 그리고 estradiol(E₂)을 측정하였다.

난소 절제술은 배측으로 접근하여 Entobar®(Pentobarbital sodium) 0.06ml/100gm을 복강내로 주사하여 마취후 시행하였다. 백서의 서혜부를 절개한 후 대퇴동맥을 노출시켜 말초혈액 1ml를 채취하고 대퇴골수에 22gauge 1회용 주사기로 골수혈액 0.5ml를 채취하였다. 대퇴골수에서 얻은 혈액과 말초혈액을 각각 15ml 시험관에 Lymphoprep™(Nycomed Pharma AS, Oslo, Norway)용액 2ml를 혼합하여 2,000rpm에서 5분간, 3,000rpm에서 20분간 원심분리하여 중간층에서 단핵구만 분리한 다음 Hauk's Balanced Salt Solution(HBSS, Gibco Lab. N.Y., USA)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 배지만 시험관에 옮겨 2,000rpm에서 5분간 원심한 다음 상층액을 분리하여 mouse cytokine ELISA assay(Amersham Life Science, UK)를 이용하여 IL-6치를 측정하였다. 골밀도의 측정은 Dual energy X-ray bone densitometer(DPX-L, Lunar®)를 이용하여 전신골밀도 및 척추골밀도를 측정하였다. 난소 절제술이 적절하게 되었는지 알기위해 수술 전후에 백서의 서혜부 대퇴동맥에서 LH, FSH, 그리고 E2를 측정하였다.

접 수 : 1996년 7월 19일
통 과 : 1996년 11월 29일

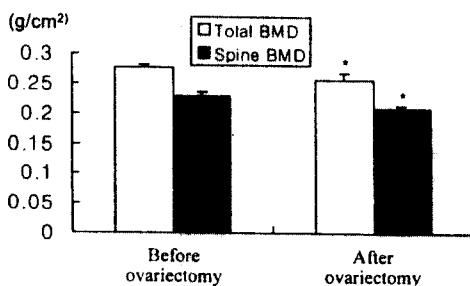


Fig. 1. Changes of total and spine BMD between before and after ovariectomy.
*: $P < 0.05$ vs. before ovariectomy.

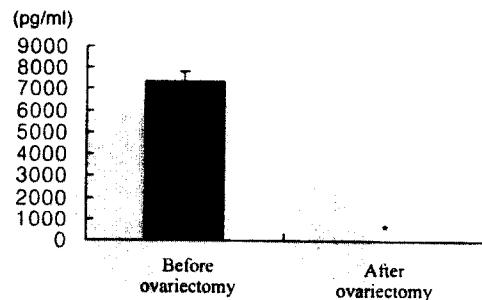


Fig. 3. Changes of estradiol levels between before and after ovariectomy.
*: $P < 0.05$ vs. before ovariectomy.

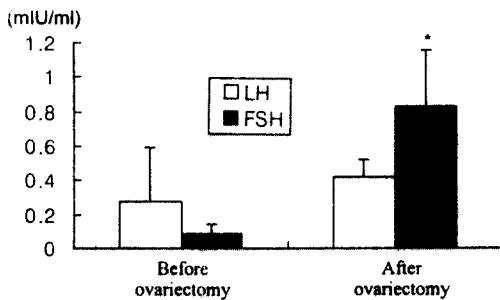


Fig. 2. Changes of LH & FSH levels between before and after ovariectomy.
*: $p < 0.05$ vs. before ovariectomy.

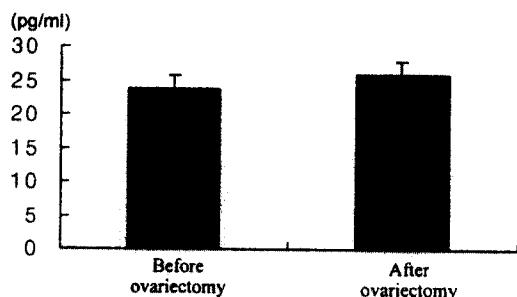


Fig. 4. IL-6 levels in mononuclear cell culture of peripheral blood between before and after ovariectomy.

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

결 과

1. 난소절제술 전후의 골밀도 변화

전신 및 척추 골밀도는 난소절제술 시행전 $0.276 \pm 0.005 \text{ g/cm}^2$, $0.229 \pm 0.011 \text{ g/cm}^2$ 에서 시행후 $0.257 \pm 0.069 \text{ g/cm}^2$, $0.208 \pm 0.005 \text{ g/cm}^2$ 로 각각 통계학적으로 유의한 감소($P < 0.01$)를 보였다(Fig. 1).

2. 난소절제술 전후의 FSH, E₂치의 변화

난소절제술 전보다 시행후에 FSH는 $0.09 \pm 0.05 \text{ mIU/ml}$ 에서 $0.83 \pm 0.32 \text{ mIU/ml}$ 로 통계학적으로 유의한 증가를 보였고($p < 0.001$), E₂도 $7337.26 \pm 490.5 \text{ pg/ml}$ 에서 $11.5 \pm 8.21 \text{ pg/ml}$ 로 통계학적으로 유의한

감소를 보여($P < 0.001$), 난소가 완전히 절제되었음을 확인하였다(Fig. 2, 3).

3. 난소절제술 전후의 IL-6치의 변화

말초혈액 단핵구를 분리 배양하여 측정한 IL-6치는 난소절제술 시행전 $23.79 \pm 7.89 \text{ pg/ml}$ 에서 난소절제술 시행후 $25.86 \pm 16.85 \text{ pg/ml}$ 로 다소 증가하는 경향을 보였으나, 통계학적 유의성은 없었다($P > 0.05$)(Fig. 4)

대퇴골수 단핵구를 분리 배양하여 측정한 IL-6치는 난소 절제술 전에 $48.85 \pm 2.42 \text{ pg/ml}$ 에서 $82.78 \pm 4.99 \text{ pg/ml}$ 로 통계학적으로 유의한 증가($P < 0.05$)를 보였다(Fig. 5).

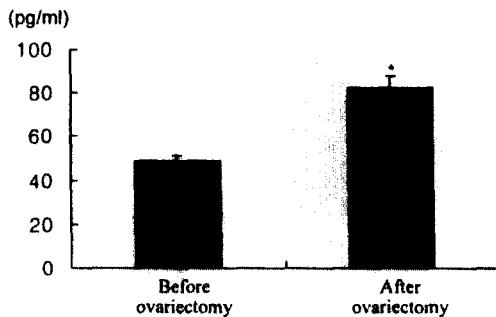


Fig. 5. Interleukin-6 levels in mononuclear cell culture of bone marrow between before and after ovariectomy.

* : $p < 0.05$ vs. before ovariectomy.

고 안

에스트로겐은 골대사에 주요한 조절인자로 작용하며, 백서에서도 골교체율을 억제시키는 것으로 알려져 있다⁷⁾. 따라서 에스트로겐 결핍 상태에서는 골교체율이 증가되어 골소실이 일어나게 된다. 그러나 에스트로겐 결핍이 골소실을 유발하게 되는 정확한 기전은 알려져 있지 않으나 최근의 연구에 의하면 에스트로겐 결핍시 여러가지 시토킨의 변화가 수반되며 이러한 시토킨의 상호작용에 의해서 골소실이 유발되는 것으로 알려져 있다¹²⁻¹⁴⁾.

골대사에 관여하는 대표적인 시토킨은 Tumor necrosis factor- α (TNF- α)¹⁷⁾, Interleukin-1 β ¹⁸⁾, IL-6 등¹⁹⁾이 알려져 있다.

IL-6는 임파구 또는 비임파구세포(단핵세포, 섬유아세포, 골아세포, 혈관내피세포)에서 분비되는 시토킨의 일종으로 21-28kDa 분자량의 당단백으로 IL-6는 acute phase protein의 간합성을 자극시키고, B세포의 분화를 촉진하여 면역글로부린 생성 및 분비를 자극하고 조혈세포의 분화를 촉진시키며²⁰⁻²⁴⁾, 특히 조골아세포에서 분비되어 과골세포를 자극하여 골흡수를 증가시키는 것으로 알려져 있다²⁵⁻²⁶⁾.

Pacifci 등²⁷⁾은 Interleukin-1(IL-1)이 골흡수에 있어서 중추적인 역할을 하며, 특히 폐경기 여성의 단핵구로부터 생성 및 분비가 증가되어 TNF- α 와 함께 조골아세포를 자극하여 IL-6의 분비를 촉진한다고 보고하였다.

Jilka 등¹³⁾은 난소절제술을 시행한 백서와 난소절제술을 시행치 않은 백서의 대퇴골에서 CFU-GM 및 과골세포를 측정한 결과 난소절제술을 받은 군에서 CFU-GM 및 과골세포의 수가 증가하였고, IL-6 증화항체를 사용하여 난소절제술을 시행한 백서에서 과골세포의 수적감소 및 기능저하를 보고하면서 에스트로겐 부족시 발생되는 골다공증의 병인에 IL-6가 중요한 역할을 한다고 하였다. 그러나 IL-6는 혈중농도가 매우 낮아 측정 자체의 어려움이 있으며, Chaudhary 등²⁶⁾과 Richard 등²⁸⁾은 IL-6의 분비가 에스트로겐의 매개를 받지 않는다고 보고하여 아직도 에스트로겐과 IL-6간의 상호관계는 정확히 알려져 있지 않는 실정이다. 또한 Khosla 등¹¹⁾은 40명의 폐경기 골다공증 여성과 같은 연령의 대조군 여성의 말초혈액에서 IL-6치를 측정한 결과 두군에서 통계학적으로 유의한 차이가 없었다고 보고하였다.

저자들의 연구에서도 난소 절제술을 시행한 백서의 말초혈액 단핵구를 분리 배양하여 측정한 IL-6치는 난소절제술 시행전과 차이를 보이지 않아 Khosla 등¹¹⁾과 같이 백서에서도 유사한 결과를 보였다. 그러나 저자들은 난소절제술 시행 전후에 백서의 골수에서 채취한 골수 단핵구를 분리 배양하여 IL-6치를 측정한 결과 난소절제술 시행후에 시행전보다 통계학적으로 유의한 증가를 보였고, 전신 골밀도 및 척추 골밀도도 난소절제술 시행후 통계학적으로 유의한 감소를 보였다. 따라서 이러한 말초혈액 단핵구와 골수 단핵구의 IL-6 분비의 차이는 시토킨이 주로 국소적 환경에서 측분비적 역할을 하는 것을 시사하며, 초기분화단계의 조골아세포가 에스트로겐의 감소에 민감한 반응을 보여 IL-6를 생산 및 분비하는 것으로 생각된다.

이상의 결과로 미루어 볼 때 난소절제술에 의한 에스트로겐 분비의 감소는 말초혈액보다 골수내에서 IL-6의 분비를 증가시켜 골밀도 감소를 초래하는 것으로 사료된다.

요약

목적 : 에스트로겐은 골대사에 중요한 조절인자로 작용하며 결핍상태에서는 골교체율이 증가되어 골손실이 일어나게 된다. 그러나 에스트로겐 결핍이 골손실을 유발하게 되는 정확한 기전은 알려져 있지 않으나

— 한승업 외 2인 : 백서에서 양측 난소절제술이 골밀도 및 IL-6치에 미치는 영향 —

최근의 연구에 의하면 에스트로겐 결핍시 여러가지 시토킨의 변화가 수반되며 이러한 시토킨의 상호작용에 의해서 골손실이 유발되는 것으로 알려져 있다. 시토킨 중에서 IL-6는 에스트로겐 결핍시 조골아세포에서 분비되어 파골세포를 자극하여 골흡수를 증가시키는 것으로 알려져 있다. 양측 난소절제술이 백서에서 골밀도의 변화와 말초혈액 및 골수 단핵구를 배양하여 측정한 IL-6치에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

방법 : 8주된 *Sprague Dawley* 백서 암컷 13마리를 대상으로 양측 난소를 절제하기 전과 절제후 8주에 전신 골밀도 및 척추 골밀도와 대퇴골수 및 말초혈액에서 채취한 단핵구를 분리배양하여 IL-6치를 측정하였다.

결과 :

1) 전신 및 척추골밀도는 난소절제술 시행전 $0.276 \pm 0.005\text{g/cm}^2$, $0.229 \pm 0.011\text{g/cm}^2$ 에서 시행 후 $0.257 \pm 0.069\text{g/cm}^2$, $0.208 \pm 0.005\text{g/cm}^2$ 로 각각 통계학적으로 유의한 감소($P<0.01$)를 보였다.

2) 말초혈액 단핵구를 분리 배양하여 측정한 IL-6치는 난소절제술 후 다소 증가하는 경향을 보였으나 통계학적 유의성은 없었다($P>0.05$).

3) 대퇴골수 단핵구를 분리 배양하여 측정한 IL-6치는 난소절제술 전에 $48.85 \pm 2.42\text{pg/ml}$ 에서 난소절제술 시행후 $82.78 \pm 4.99\text{pg/ml}$ 로 통계학적으로 유의한 증가($P<0.05$)를 보였다.

결론 : 난소절제술에 의한 에스트로겐의 분비 감소는 말초혈액에서보다 골수내에서 IL-6 분비를 증가시켜 골흡수에 관여할 것으로 사료된다.

= Abstract =

Changes of Bone Mineral Density and IL-6 Levels after Bilateral Ovariectomies in Rats

Seung Yeup Han, M.D., Sung Han Kim, M.D.¹⁾
and Keun Yong Park, M.D.

Department of Internal Medicine, School of Medicine, Keimyung University, Taegu, Korea
Department of Obstetrics & Gynecology, Phohang St. Mary's Hospital, Phohang¹⁾, Korea

Objective : Estrogen is a major regulator/modulator of bone metabolism, and bone loss in estrogen deficiency is associated with increased bone

turnover. But the mechanism for estrogen action on bone metabolism is still unknown.

Recent studies have suggested that the increase in bone loss induced by estrogen deficiency is mediated by increased paracrine production of bone resorbing cytokines.

Among cytokines, Interleukin-6(IL-6) is released from osteoblasts in estrogen deficiency and increases bone resorption by stimulation of osteoclastic activities and recruitment. Thus we performed this study to evaluate the effect of ovariectomies on bone mineral density and IL-6 in cultured monocytes of peripheral blood and bone marrow.

Methods : The experimental animals were 13 female *Sprague-Dawley* rats that were 8 weeks of age and weighed an average of 188.5 gram at the beginning of the study.

Bilateral ovariectomies were performed in all rats from a ventral approach.

Bone mineral density(BMD) of the total body, spine and level of IL-6 of cultured monocytes of peripheral blood and bone marrow were measured before and 8 weeks after ovariectomy.

Results :

1) BMD of total body and spine were lower after ovariectomy($0.257 \pm 0.069\text{g/cm}^2$, $0.208 \pm 0.005\text{g/cm}^2$) than before ovariectomy ($0.276 \pm 0.005\text{g/cm}^2$, $0.229 \pm 0.011\text{g/cm}^2$), respectively ($P<0.01$).

2) Although IL-6 level of cultured monocytes in peripheral blood tended to be higher after ovariectomy than before ovariectomy, this difference was not statistically significant ($P>0.05$).

3) IL-6 level of cultured monocytes in bone marrow was higher after ovariectomy($82.78 \pm 4.99\text{pg/ml}$) than before ovariectomy($48.85 \pm 2.42\text{pg/ml}$)($P<0.05$).

Conclusion : It is possible that increased production of IL-6 in estrogen deficiency induced by ovariectomy occurs in the local environment of bone or bone marrow rather than in the peripheral blood and stimulates bone resorption.

Key Words : Bone mineral density, IL-6, Ovariectomies, Rat

REFERENCES

- Wronski TJ, Dann LM, Scott KS Crooke LR : *Endocrine and pharmacological suppressors of bone turnover protect against osteopenia in ovariectomized rats*. *Endocrinology* 125:810, 1989
- Heaney RP, Recker RR, Saville PD : *Menopausal*

- changes in bone remodeling. *J Lab Clin Med* 92:964, 1978
- 3) Nordin BEC, Need AC, Chatterton BE: Relative contributions of age and years since menopause to postmenopausal bone loss. *J Clin Endocrinol Metab* 70:83, 1990
 - 4) Wronski TJ, Walsh CC, Ignaszewski LA: Histologic evidence for osteopenia and increased bone turnover in ovariectomized rats. *Bone* 7: 119, 1986
 - 5) Turner RT, Wakley GK, Hannon KS, Bell NH: The effects of ovariectomy and 17 β -estradiol on cortical bone histomorphometry in growing rats. *J Bone Mineral Res* 2:115, 1987
 - 6) Ismail F, Epstein S, Fallon MD, Thomas SB, Reinhardt TA: Serum bone gla protein and the vitamin D endocrine system in the oophorectomized rat. *Endocrinology* 122:624, 1988
 - 7) Wronski TJ, Cintron M, Doherty AL, Dann LM: Estrogen treatment prevents osteopenia and depresses bone turnover in ovariectomized rats. *Endocrinology* 123:681, 1988
 - 8) Horowitz MC: Cytokines and estrogen in bone: anti-osteoporotic effects. *Science* 260:626, 1983
 - 9) 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* 77: 1135, 1993
 - 10) Hustmyer FG, Walker E, Yu XP: Cytokine production and surface antigen expression by peripheral blood mononuclear cells in postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res* 8:51, 1993
 - 11) Khosa S, Peterson JM, Egan K, Jones JD, Riggs BL: Circulating cytokine levels in osteoporotic and normal women. *J Clin Endocrinol Metab* 79: 707, 1994
 - 12) Jilka RL, Passeri G, Girasole G, Cooper S, Abrams J, Graxmeyer H, Manolagas SC: Estrogen loss upregulates hematopoiesis in the mouse: a mediating role of IL-6. *Exp Hematol* 23:500, 1995
 - 13) Jilka RL, Hangoc G, Girasole G: Increased osteoclast development after estrogen loss: Mediation by interleukin-6. *Science* 257:88, 1992
 - 14) Ishimi Y, Miyaure C, Jin CH, Akatsu T, Abe E, Nakamura Y, Yamaguchi A, Yoshiki S, Matsuda T, Hirano T, Kishimoto T, Suda T: IL-6 is produced by osteoblasts and induces bone resorption. *J Immunol* 145:3297, 1990
 - 15) Eastell R: Cytokine receptors, receptor antagonists, and postmenopausal bone loss. *J Bone Mineral Res* 8(suppl 1):S152, 1993
 - 16) Rifas L, Marcelli M, Kenney JS, Dawson L, Avioli LV: IL-6 is not regulated by ovarian steroids in human bone marrow stromal cells and human osteoblasts with functional estrogen receptors. *J Bone Mineral Res* 8(suppl 1):S361, 1993
 - 17) Smith DD, Gowen M, Mundy GR: Effects of interferon- α and other cytokines on collagen synthesis in fetal rat bone culture. *Endocrinology* 120:2494, 1987
 - 18) Gowen M, Chapman K, Littlewood A, Hughes D, Evans D, Russell G: Production of tumor necrosis factor by human osteoblasts is modulated by other cytokines, but not by osteotropic hormones. *Endocrinology* 126:1250, 1990
 - 19) Keeting PE, Rifas L, Harris SA, Colvard DS, Spelsberg TC, Peck WA, Riggs BL: Evidence of interleukin-1 β production by cultured normal human osteoblast-like cells. *J Bone Mineral Res* 6:827, 1991
 - 20) Girasole G, Sakagami Y, Hustmyer F, Yu X, Derrigs H, Boswells, Peacock M, Boder G, Manolagas S: 17 β -estradiol inhibits cytokine induced IL-6 production by bone marrow stromal cells and osteoblasts. *J Bone Mineral Res* (suppl 2) 5:273, 1990
 - 21) Hirano T, Kishimoto T: In handbook of experimental pharmacology. 2nd p633, Berlin, Springer, 1990
 - 22) Thomson A: The cytokine hand book. 2nd. p 145 New York, Academic press limited, 1994
 - 23) Le J, Vilcek J: Interleukin-6: A multifunctional cytokine regulation immune reactions and the acute phase protein response. *Lab Invest* 61:588, 1989
 - 24) Heinrich PC, Castell JV, Titus T: Interleukin-6, the acute phase response. *Biochem J* 265:621, 1990
 - 25) Bartanella L, Hammond GL, Fasetti A, Flink IL, Robbins J: Interleukin-6 inhibits corticosteroid-binding protein synthesis by human hepatoblastoma derived cells. *Endocrinology* 133:291, 1993.
 - 26) Girasole G, Jilka RL, Passeri G: 17 β -Estradiol inhibits interleukin-6 production by bone marrow-derived stromal cells and osteoblasts in vitro: a potential mechanism for the antosteoporotic effect of estrogens. *J Clin Invest*: 89:883,

— Seung Yeup Han, et al.: Changes of Bone Mineral Density and IL-6 Levels after Bilateral Ovariectomies in rats —

1990

- 27) Balena R, Costrantini F, Yamamoto M: *Mice with IL-6 gene knock-out do not lose cancellous bone after ovariectomy.* *J Bone Miner Res* 8 (suppl 1):130, 1990
- 28) Pacifi R, Rifas L, McCracken R: *Ovarian steroid treatment blocks a postmenopausal increase in blood monocyte interleukin 1 release.* *Proc. Natl Acad. Sci USA*: 86:2398, 1989
- 29) Rickard D, Russell G, Gowen M: *Oestradiol inhibits the release of tumor necrosis factor but not interleukin 6 from adult human osteoblasts.* *Osteoporos Int* 2:94, 1992
- 30) Chaudhary LR, Spelsberg TC, Tiggs BL: *Production of various cytokines by normal human osteoblast-like cells in response to interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α : lack of regulation by 17 β -estradiol.* *Endocrinology* 130:2528, 1992.