

백서에서 난소절제술 시행후 골밀도와 골수 시토킨의 변화에 관한 연구

계명대학교 의과대학 내과학교실

박근용

Changes of Bone Mineral Density and Levels of Cytokines in the Culture Media of Bone Marrow Monocytes after Ovariectomy in Rats

Keun Yong Park, M.D.

Department of Internal Medicine, Keimyung University, School of Medicine, Taegu, Korea

ABSTRACT

Background: 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, IL-1 and TNF- α promote bone resorption by stimulating the activity of mature osteoclasts and the differentiation of osteoclast precursors and the production of these cytokines are mediated by estrogen. We performed this study to evaluate the effect of ovariectomy on bone mineral density and levels of cytokines in the culture media of bone marrow monocytes.

Methods: The experimental animals were 23 female Sprague-Dawley rats that were 8 weeks of age and weighed an average of 176.8 gm at the beginning of the study. Bilateral ovariectomy ($n=13$) and sham-operation($n=10$) were performed in all rats from a ventral approach.

Bone mineral density(BMD) of the total body and levels of IL-1 and TNF- α of culture media of 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.

Results: BMD of total body was lower after ovriectomy($0.24 \pm 0.04 \text{ g/cm}^2$) than before ovariectomy($0.27 \pm 0.03 \text{ g/cm}^2$), but there was no statistically significant difference in sham-operation group. Serum levels of LH, FSH were higher after ovariectomy($0.87 \pm 0.36 \text{ mIU/mL}$, $9.47 \pm 1.26 \text{ mIU/mL}$) than before ovariectomy($0.10 \pm 0.06 \text{ mIU/mL}$, $2.09 \pm 0.41 \text{ mIU/mL}$)($p < 0.01$) and serum level of E₂ was lower after ovariectomy($10.98 \pm 8.71 \text{ pg/mL}$) than before ovariectomy($7350.77 \pm$

*본 연구는 1996년 계명대학교 비사연구기금으로 이루어졌음.

417.29 pg/mL)($p < 0.01$), respectively.

Levels of IL-1 and TNF- α in culture media of bone marrow monocytes were higher after ovariectomy(23.48 ± 3.98 pg/mL, 52.64 ± 5.31 pg/mL) than before ovariectomy(9.72 ± 0.94 pg/mL, 24.37 ± 3.39 pg/mL)($p < 0.01$), but there were no statistically significant differences in the sham-operation group.

Conclusion: It is possible that increased production of IL-1 and TNF- α in estrogen deficiency induced by ovariectomy occurs in the bone microenvironment and these cytokines may play a critical causal role in inducing bone loss. (J Kor Soc Endocrinol 12:215-221, 1997)

Key Words: Ovariectomy, IL-1, TNF- α

서 론

에스트로겐 결핍에 의한 골손실은 골교체율의 증가와 밀접한 연관이 있으며, 이러한 현상은 골수의 미세환경에 존재하는 세포에 의해 생성되는 시토킨에 영향을 미쳐 골손실에 관여하는 것으로 알려져 있으나[1~3] 정확한 기전은 아직 불분명하다. 이러한 시토킨 중에서 interleukin-1(IL-1), interleukin-6(IL-6), tumor necrosis factor(TNF- α) 등이 파골세포의 형성과 골흡수 활동도를 증가시키는 것으로 알려져 있다[4~9]. 이에 저자는 백서에서 양측 난소 절제술에 의한 에스트로겐 결핍이 골밀도와 골수 단핵구에서 분리 배양하여 측정한 IL-1, TNF- α 등과 같은 시토킨에 미치는 영향을 알아보고자 이 연구를 시행하였다.

대상 및 방법

1. 대상

실험대상은 8주된 Sprague Dawley 백서 암컷(평균 몸무게=176.8gm, 평균 신장=21.7cm) 23마리를 양측 난소 절제술을 시행한 군 13마리와 shma-operation을 시행한 10마리 두군으로 나누어 8주후에 골밀도를 측정하였고, 대퇴 골수로 부터 채취한 단핵구를 분리 배양하여 IL-1, TNF- α 를 측정하였고, 동시에 말초혈액에 서 LH, FSH, 그리고 E₂를 측정하였다.

2. 방법

난소 절제술은 배측으로 접근하여 entobar[®](Pento-

barbital sodium) 0.06mL/100gm을 복강내로 주사하여 마취 후 시행하였다. 백서의 서혜부를 절개한 후 대퇴동맥을 노출시켜 말초 혈액 1mL를 채취하고 대퇴골수에 22gauge 주사기로 골수혈액 0.5mL를 채취하였다. 대퇴골수에서 얻은 혈액과 말초혈액을 각각 15mL 시험관에 LymphoprepTM(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% (FBS)와 함께 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양후 media만 tube로 옮겨 2,000rpm에서 5분간 원심한 다음 상층액을 분리하여 ELISA법으로(Amersham Life Science, UK) IL-1과 TNF- α 를 측정하였다. 골밀도의 측정은 Dual energy X-ray bone densitometer (LUNAR[®] DPX-L)를 이용하여 측정하였다. 난소 절제술이 적절하게 되었는지 알기위해 난소 절제술 시행 8주후에 백서의 서혜부 대퇴동맥에서 FSH, LH, 그리고 E₂를 측정하였다.

3. 통계방법

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

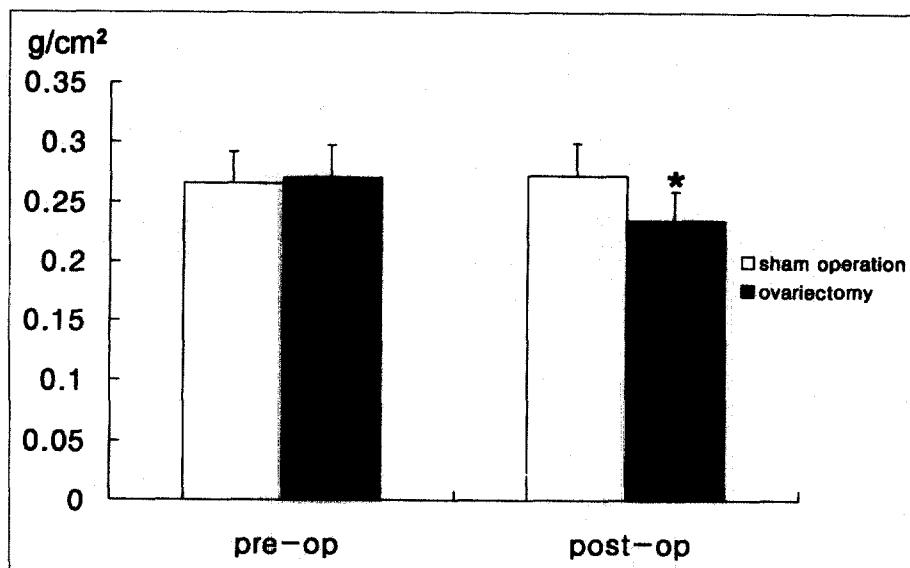


Fig. 1. Changes of total body BMD between before and after ovariectomy and sham-operation.
* $p<0.05$ vs pre-operation

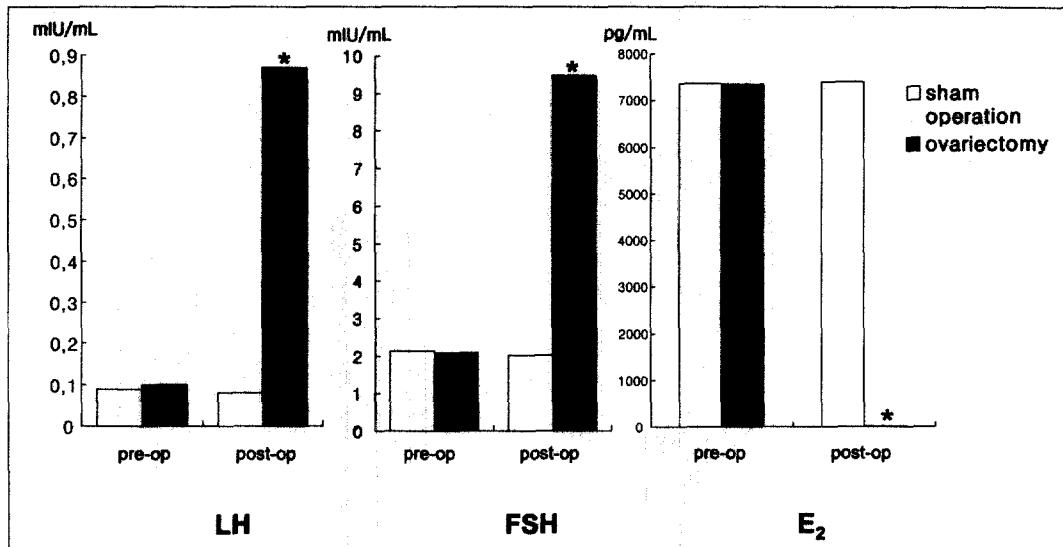


Fig. 2. Changes of serum levels of LH, FSH and E₂ between before and after ovariectomy and sham-operation.
* $p<0.01$ vs pre-operation

결과

전신골밀도는 sham-operation을 시행한 군에서 시행 전 $0.26 \pm 0.04 \text{ g/cm}^2$ 에서 시행 후 $0.27 \pm 0.04 \text{ g/cm}^2$ 로 통

계학적 유의성을 보이지 않았고($p>0.05$), 난소절제술을 시행한 군에서는 시행전 $0.27 \pm 0.03 \text{ g/cm}^2$ 에서 시행 후 $0.24 \pm 0.04 \text{ g/cm}^2$ 로 통계학적으로 유의한 감소($p>0.05$)를 보였다(Fig. 1).

혈청 LH, FSH, E₂는 sham-operation을 시행한 군에

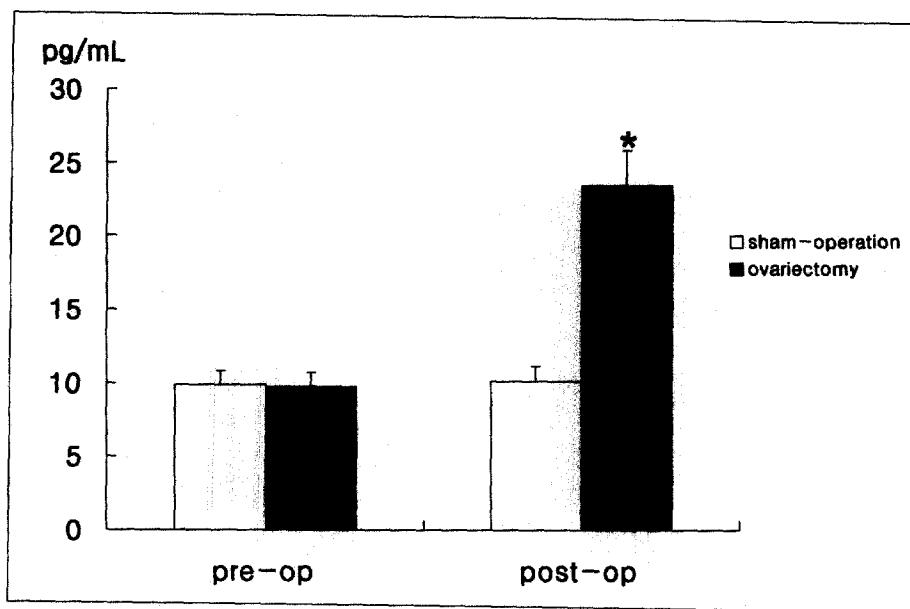


Fig. 3. Changes of IL-1 levels in the culture media of bone marrow monocytes between before and after ovariectomy and sham-operation.

* $p < 0.01$ vs pre-operation

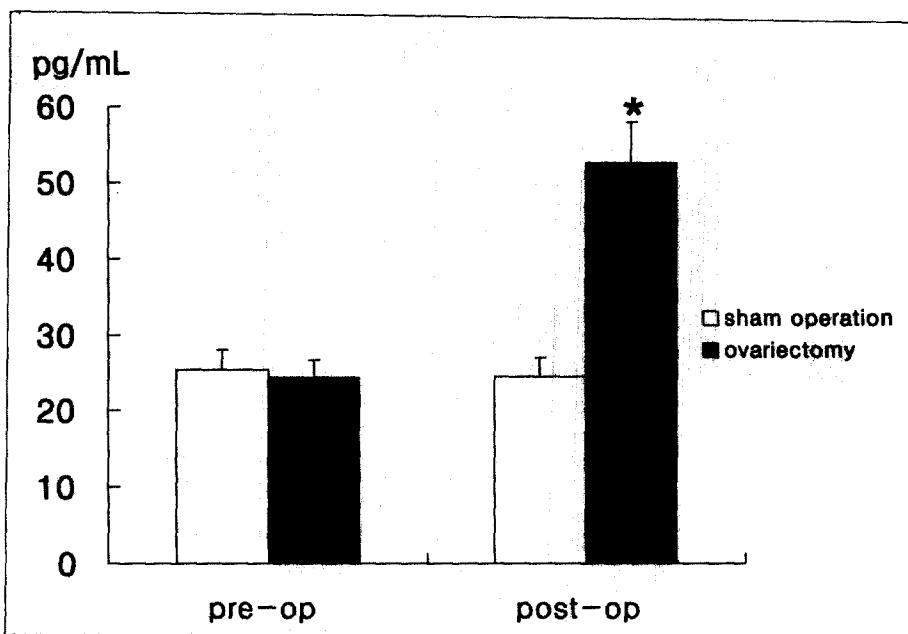


Fig. 4. Changes of TNF- α levels in the culture media of the bone marrow monocytes between before and after ovariectomy and sham-operation.

* $p < 0.01$ vs pre-operation

서 시행전 각각 0.09 ± 0.03 mIU/mL, 2.12 ± 0.73 mIU/mL, 7364.26 ± 498.53 pg/mL에서 시행후 각각 0.80 ± 0.01 mIU/mL, 2.01 ± 0.69 mIU/mL, 7401.93 ± 504.68 pg/mL로 통계학적 유의성을 보이지 않았고($p > 0.05$), 난소절제술을 시행한 군에서는 시행전 LH, FSH, E₂는 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 감소($p < 0.01$)를 보여 난소절제가 성공적으로 이루어졌음을 알 수 있었다(Fig. 2).

대퇴골수 단핵구를 분리 배양하여 측정한 IL-1은 sham-operation을 시행한 군에서 시행전 9.83 ± 1.33 pg/mL에서 시행후 10.12 ± 1.41 pg/mL로 통계학적 유의성을 보이지 않았고($p > 0.05$), 난소절제술을 시행한 군에서는 시행전 9.72 ± 0.94 pg/mL에서 시행후 23.48 ± 3.98 pg/mL로 통계학적으로 유의한 증가($p < 0.01$)를 보였다(Fig. 3).

대퇴골수 단핵구를 분리 배양하여 측정한 TNF- α 치는 sham-operation을 시행한 군에서 시행전 25.46 ± 3.18 pg/mL에서 시행후 24.52 ± 3.29 pg/mL로 통계학적 유의성을 보이지 않았고($p > 0.05$), 난소절제술을 시행한 군에서는 시행전 24.37 ± 3.39 pg/mL에서 시행후 52.64 ± 5.31 pg/mL로 통계학적으로 유의한 증가($p < 0.01$)를 보였다(Fig. 4).

고 찰

최근의 연구에 의하면 에스트로겐 결핍에 의한 골흡수는 골흡수에 관여하는 시토킨의 paracrine production의 증가에 의해 매개되는 것으로 알려져 있으나[3, 10~12] 에스트로겐에 의한 골흡수 방지에 대한 정확한 기전은 아직 불분명하다. Pacifici 등[13]은 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 시토킨의 분비도 골세포에서 유발하는 것으로 알려져 있다[6,

7,14,15]. Kimble 등[16]은 난소절제술을 시행한 쥐에서 sham-operation을 시행한 쥐에서보다 2주후에 골수 세포 배양에서 측정한 IL-1치가 통계학적으로 유의한 증가를 보여 난소절제술 후 초기의 골손실에 중요한 역할을 한다고 보고하였다. 저자의 연구에서도 난소절제술을 시행한 군에서 sham-operation을 시행한 군보다 8주후에 골수 단핵구에서 측정한 IL-1치가 증가되어 Kimble 등[16]과 유사한 결과를 보였다. 그러나 Stock 등[17]은 폐경기 여성에서 에스트로겐 치료후에도 말초 혈액 단핵구에서 IL-6생성의 변화가 없었다고 보고하였고, Zarabeitia 등[11]과 Hustmyer 등[18]도 폐경기 골다공증 환자에서 폐경전 정상여성과 비교하여 말초 혈액 단핵구에서 측정한 IL-1의 증가를 보이지 않았다고 보고하여 저자의 연구와 상이한 결과를 보였다. 그러나 이들의 연구에서는 골수단핵구가 아니라 말초혈액 단핵구에서 측정한 것으로 저자와 Kimble 등[16]의 연구결과와 상이한 점을 보인 것으로 볼 때 IL-1이 골수의 미세환경에 국한하여 작용할 것으로 사료된다.

IL-1외에 TNF- α 도 osteoclastogenesis와 성숙된 파골 세포의 활동도를 자극시켜 골형성을 억제시키는 것으로 알려져 있고, IL-1과 같이 IL-11, macrophage colony-stimulating factor와 같은 osteoclastogenesis를 조절하는 다른 시토킨과 IL-6의 분비를 유발하는 것으로 알려져 있다[18~20]. 또한, IL-1과 TNF- α 는 많은 세포에서 서로 상승작용을 나타내며, 이 두가지 시토킨의 생성은 인체와 쥐에서 에스트로겐에 의해서 조절되는 것으로 알려져 있다[22,23]. 저자의 연구에서는 난소절제술을 시행한 군에서 sham-operation을 시행한 군보다 8주후에 골수 단핵구에서 측정한 TNF- α 치가 증가되어 IL-1과 같이 Kimble 등[16]의 결과와 유사하였다.

이상의 결과에서 볼 때 난소절제술에 의한 에스트로겐 결핍상태에서 IL-1과 TNF- α 가 골손실을 초래하는 중요한 요인으로 작용할 것으로 사료되며 이들에 대한 중화항체가 이들 시토킨에 의한 골손실을 예방할 수 있을지에 대한 추시가 필요할 것으로 사료된다.

요 약

연구배경: 에스트로겐 결핍에 의해 야기되는 골손실에 대한 정확한 기전은 잘 알려져 있지 않으나 에스트로겐이 골의 미세환경에서 골재형성에 관여하는 시토킨의 생성에 관여하는 것으로 알려져 있다. 이러한 시토킨 중에서 IL-1과 TNF- α 가 성숙된 파골세포의 활동도와 파골세포의 전구세포 분화를 촉진시켜 골흡수에 관여하는 것으로 알려져 있으며, 이들 시토킨 생성이 에스트로겐에 의해 조절된다는 보고가 있었다. 이에 저자는 난소절제술에 의한 에스트로겐 결핍이 백서에서 골밀도와 이들 시토킨에 미치는 영향을 알아보고자 이 연구를 시행하였다.

연구방법: 8주된 Sprague Dawley 암컷을 대상으로 난소절제술과 sham-operation 시행 전후에서 DPX-L을 이용하여 전신골밀도를 측정하였고, 난소절제술의 성공여부를 알기 위하여 혈청 LH, FSH, E₂를 측정하였다. 난소절제술과 sham-operation 시행전후에 대퇴골수에서 단핵구를 분리배양하여 ELISA법으로 IL-1과 TNF- α 를 측정비교 하였다.

결과: 난소절제술을 시행한 군에서 8주후 측정한 골밀도는 통계학적으로 유의하게 낮았고($p < 0.05$), sham-operation을 시행한 군에서는 통계학적으로 유의한 차이를 보이지 않았다. 혈청 LH 및 FSH는 난소절제술을 시행한 군에서 통계학적으로 유의하게 높았고($p < 0.01$), E₂는 난소절제술을 시행한 군에서 통계학적으로 유의하게 낮게 나타났다($p < 0.01$). 골수 단핵구의 배양액에서 측정한 IL-1과 TNF- α 는 난소절제술을 시행한 군에서 통계학적으로 유의한 증가를 보였고($p < 0.05$), sham-operation을 시행한 군에서는 통계학적으로 유의한 차이를 보이지 않았다.

결론: 난소절제술 시행후 야기되는 IL-1과 TNF- α 의 증가는 에스트로겐 결핍에 의해 초래되는 골손실에 중요한 인자로 작용할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- Raisz LG: Local and systemic factors in the

pathogenesis of osteoporosis. *N Engl J Med* 318:818-828, 1988

- Horowitz M: Cytokines and estrogen in bone: anti-osteoporotic effects. *Science* 260:626-627, 1993
- Horowitz MC: Cytokines and estrogen in bone: anti-osteoporotic effects. *Science* 260:626-627, 1993
- Gowen M, Wood DD, Ihrie EJ, McGuire MKB, Russell RGG: An interleukin-like factor stimulates bone resorption in vitro. *Nature* 306: 378-380, 1983
- 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* 121:1164-1170, 1987
- Boyce BF, Aufdemorte TB, Garrett IR, Yates AJP, Mundy GR: Effects of interleukin-1 on bone turnover in normal mice. *Endocrinology* 125: 1142-1150, 1989
- 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* 3:621-627, 1988
- 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* 5:983-988, 1990
- 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* 2:94-102, 1992
- Pacifci 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* 77:1135-1141, 1993
11. Zarabeitia MT, Riancho JA, Amado JA, Napal J, Gonzalez-macias J: Cytokine production by peripheral blood cells in postmenopausal osteoporosis. *Bone Miner* 14:161-167, 1991
12. Khosla S, Peterson JM, Egan K, Jones JD, Riggs BL: Circulating Cytokine Levels in Osteoporotic and Normal Women. *J Clin Endocrinol Metab* 79:707-711, 1994
13. 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* 86:2398-2402
14. 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* 4:113-118, 1989
15. Felix R, Fleish H, Elford PR: Bone-resorbing cytokines enhance release of macrophage colony-stimulating activity by osteoblastic cell MC3T3-E1. *Calcif Tissue Int* 44:356-360, 1989
16. 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* 136:3054-3061, 1995
17. 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* 68:364-368, 1989
18. 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* 8:51-59, 1993
19. van der Pluijm G, Most W, van der Wee-pals 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* 129:1596-1604, 1991
20. Thomson BM, Mundy GR, Chambers TJ: Tumor necrosis factor α and β induce osteoblastic cells to stimulate osteoclastic bone resorption. *J Immunol* 138:775-779, 1987
21. 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* 319:516-518, 1986
22. Chaplin Dd, Hogquist K: Interactions between TNF 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
23. 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* 94:2397-2406