

Phosphodiesterase 저해제 Pentoxifylline 이 파골세포 분화에 미치는 영향

김민혜 · 전윤나 · 임미정[#]

숙명여자대학교 약학대학

(Received May 12, 2004; Revised June 11, 2004)

Effect of Pentoxifylline, a Phosphodiesterase Inhibitor, on Osteoclast Formation

Minhye Kim, Yunna Chun and Mijung Yim[#]

College of Pharmacy, Sookmyung Women's University, Seoul 140-742, Korea

Abstract — Phosphodiesterases (PDEs) are enzymes that degrade intracellular cAMP. In the present study, pentoxifylline, a PDE inhibitor, induced osteoclast formation in co-cultures of mouse bone marrow cells and calvarial osteoblasts. To address the involvement of the osteoclast differentiation factor TNF-related activation-induced cytokine (TRANCE, identical to RANKL, ODF, and OPGL), mouse bone marrow cells and calvarial osteoblasts were co-cultured with pentoxifylline in the presence of OPG, a decoy receptor for TRANCE. The osteoclastogenic effect of pentoxifylline was completely blocked by addition of OPG, suggesting that TRANCE is involved in the osteoclast formation induced by pentoxifylline. Northern blot analysis revealed that pentoxifylline significantly induced TRANCE mRNA expression in calvarial osteoblasts. These results suggest that pentoxifylline regulates TRANCE expression in osteoblasts, which in turn controls osteoclast formation.

Keywords □ osteoblast, osteoclast, phosphodiesterase, TRANCE, pentoxifylline

인체에서 뼈는 신체지지의 골격을 제공하고, 각종 면역세포의 발달과 성숙의 장소가 되며, 칼슘과 같은 무기질의 저장소 역할을 하는 중추적 기관이다. 건강한 뼈는 일생동안 조골세포(osteoblast)와 파골세포(osteoclast)의 작용에 의해 뼈가 지속적으로 형성되고 파괴되는 뼈의 재형성 과정을 거치게 된다.

파골세포는 조혈모세포(hematopoietic cell)에서 분화된 것으로, 파골세포의 분화는 뼈 형성을 담당하는 조골세포에 의해 엄격하게 조절되고 있다.^{1,2)} 조골세포는 1,25-dihydroxyvitamin D₃[1,25(OH)₂D₃], 부갑상선 호르몬(PTH), Prostaglandin E₂(PGE₂) 등의 자극에 의해 파골세포 분화인자인 TRANCE(TNF-related activation-induced cytokine, OPGL, ODF, or RANKL)를 생성하는 한편, decoy receptor인 OPG(osteoprotogenin)를 분비하여 TRANCE를 억제함으로써 파골세포의 분화를 조절한다.²⁻⁶⁾

이러한 조골세포-파골세포 상호작용에 있어서, cAMP는 중요한 내부 신호전달자로 작용한다. PTH나 PGE₂ 등의 자극에 의

해 세포내 cAMP의 농도가 상승하면, protein kinase A(PKA)가 활성화되고 이를 통해 TRANCE의 발현이 증가된다고 알려져 있다.⁷⁻⁹⁾

세포내 cAMP의 농도는 2가지 효소에 의해 항상 일정하게 유지된다. adenylyl cyclase는 ATP를 기질로 cAMP를 합성하고, phosphodiesterase(PDE)는 cAMP를 5'-AMP로 분해시킨다.^{10,11)} 지금까지 PDE family는 PDE1에서 11까지의 isozyme이 존재하는 것으로 밝혀졌으며, 각각의 isozyme은 PDE1A, 1B, 1C와 같은 subtype을 가진다.¹¹⁾

Pentoxifylline은 폭 넓게 사용되는 PDE 저해제로, cAMP의 분해를 억제함으로써 세포내 cAMP 농도를 상승시킨다. 마우스를 사용한 *in vivo* 실험에서 pentoxifylline 및 타 PDE 억제제의 투여는 골밀도를 증가시킨다고 보고된 바 있고,¹²⁻¹⁴⁾ 이로 인해 PDE 저해제를 골다공증 치료제로 개발하려는 다양한 시도가 이루어지고 있다. 그러나 조골세포 및 파골세포에 대한 pentoxifylline의 효과와 이에 대한 기전 연구는 충분히 수행되지 않은 실정이다. 따라서 본 연구에서는 pentoxifylline의 효과를 초기 배양한 마우스 조골세포와 골수세포의 공배양계(co-culture)를 이용하여 검토하였다. 본 연구 결과 pentoxifylline은 공배양계에서 파골세포의 분화를 유도하였다. 이러한 pentoxifylline의

[#]본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 02-710-9572 (팩스) 02-715-9498
(E-mail) myim@sookmyung.ac.kr

파골 세포 유도 반응은 OPG의 첨가로 억제되어 TRANCE 분자의 관여를 시사하였다. 실제로 pentoxifylline은 TRANCE의 발현을 전사 수준에서 조절하고 있음이 Northern blot 방법에 의해 명확하게 밝혀졌다.

실험방법

마우스 조골세포의 초기 배양

생후 0~1일의 신생아 ddy mouse로부터 두개골 피부를 벗긴 후 두개골을 적출하였다. 이때 후두골 근육 부착부분은 제거하였다. 부착된 근육, 혈구 등을 제거한 후 minimum essential medium, alpha modification(α -MEM)으로 가볍게 세척하였다. 0.1% collagenase + 0.2% dispase 효소 용액에 넣어 37°C에서 5분간 진탕시킨 후 상등액을 버리고 새로운 효소 용액을 가하였다. 37°C에서 약 10분간 진탕하여 상등액을 모으는 조작을 4회 반복하였다. 원심 분리한 후 10% FBS 함유 α -MEM으로 약 $3 \sim 5 \times 10^4$ 세포/100 mm plastic dish가 되도록 집중하였다. 5% CO₂, 37°C에서 3~4일간 배양한 세포를 이후 조골세포로 실험에 사용하였다.

마우스 골수세포의 배양

ddy mouse(6~9주, 수컷)를 경추 탈골한 후 70% 에탄올로 소독하였다. 경골 부분의 피부를 절개하여 부착 근육을 떼어냈다. 경골 원심부를 절단하고 슬개골을 탈골시켜 경골을 적출하였다. 뼈 양끝을 조금 잘라 한 쪽 끝에 25G의 주사바늘을 꽂고 α -MEM을 흘려보내 골수세포를 시험관에 모았다. 원심 분리한 후 α -MEM에 현탁하고 2배의 Gey's solution을 가해 적혈구를 제거했다. 원심 분리한 후 10% FBS가 함유된 α -MEM으로 재현탁했다.

공배양(co-culture)법을 이용한 파골세포의 분화 유도

96 well plate에 초기 배양한 조골세포 5×10^3 cells/well, 골수세포 1×10^5 cells/well을 일정 농도의 pentoxifylline(Sigma-Aldrich) 존재하에서 10% FBS가 함유된 α -MEM으로 공배양했다. 배지는 3일에 한번씩 교환했다. 배양이 끝난 세포는 10% formalin으로 10분간 고정 후 ethanol-acetone(1:1)로 1분간 재고정하여 TRAP(tartrate-resistant acid phosphatase) staining을 했다. 3개 이상의 핵을 가진 TRAP+ 세포를 다핵 파골세포로 판정했다.

RT-PCR 분석

Total RNA 1 μ g을 Superscript II(Invitrogen, CA, USA)로 역전사하였다. 얻어진 cDNA의 일부를 Go Taq DNA polymerase(Promega)로 PCR 증폭하였다. PCR 증폭에 사용한 primer의 서

열은 다음과 같다.

calcitonin

receptor(CTR): 5'-tttcaagaaccttagctgccagag-3' (forward)
5'-caaggcacggacaatgttgagaag-3' (reverse)

cathepsin K: 5'-cttcaatacgtgcagcaga-3' (forward)

5'-acgcaccaatatcttgacc-3' (reverse)

GAPDH: 5'-gaaggtcggtgtgaacggatttggc-3' (forward)

5'-catgtaggccatgaggtccaccac-3' (reverse)

반응조건은 94°C에서 3분 초기 반응 후, 94°C에서 30초, 58°C에서 45초, 그리고 72°C에서 1분 간격으로 총 32주기(CTR과 cathepsin K) 또는 28주기(GAPDH)로 이루어졌다. 증폭된 PCR 산물들은 1% agarose gel에서 전기영동하여 분리하였다.

Northern blot 분석

초기배양 마우스 조골세포를 600 μ M pentoxifylline으로 처리하여 3시간 배양한 후, total RNA를 Trizol reagent(Invitrogen)로 회수하였다. Total RNA 20 μ g을 1.2% agarose-formaldehyde gel로 전기영동한 후 nylon membrane filter에 이동시켰다(Hybond N+, Amersham Biosciences). membrane을 ³²P로 표지한 cDNA probe와 반응시킨 후 세척액으로 세척하고, -70°C에서 x-ray 필름에 노출시켰다.

실험 결과 및 고찰

Pentoxifylline의 파골세포 분화 유도

TRAP+ 다핵 파골세포는 초기 배양한 마우스 조골세포와 골수세포의 공배양계(co-culture)에 1,25-dihydroxyvitamin D₃ [1,25(OH)₂D₃], 부갑상선 호르몬(PTH), Prostaglandin E₂(PGE₂), Interleukin-1(IL-1), lipopolysaccharide(LPS) 등의 자극제를 처리함으로써 분화 유도할 수 있다.¹⁾ 이러한 공배양계를 이용하여 pentoxifylline이 파골세포 분화에 미치는 억제 또는 유도 효과를 조사하였다. 먼저 pentoxifylline은 공배양계에서 1,25-dihydroxyvitamin D₃[1,25(OH)₂D₃]의 처리로 유도된 파골세포 분화에 아무런 억제 효과를 보이지 않았다(미발표 결과). 반면 공배양계에 pentoxifylline을 단독 처리하였을 때 TRAP+ 다핵세포의 수가 농도 의존적으로 증가되어, pentoxifylline이 파골세포의 분화를 촉진함을 시사하였다(Fig. 1A). Fig. 1B에서 pentoxifylline으로 유도된 TRAP+ 다핵 파골세포의 현미경 사진을 확인할 수 있다.

Pentoxifylline의 처리로 유도된 TRAP+ 다핵세포가 파골세포 특이적 유전자를 발현하는지 RT-PCR 방법으로 확인하였다(Fig. 2). pentoxifylline 무처리에 비해 pentoxifylline 처리시 파골세포 특이적 유전자인 calcitonin receptor(CTR), cathepsin K의 발현이 증가하여, pentoxifylline의 처리로 유도된 TRAP+ 다핵세포는 파골세포임이 입증되었다.

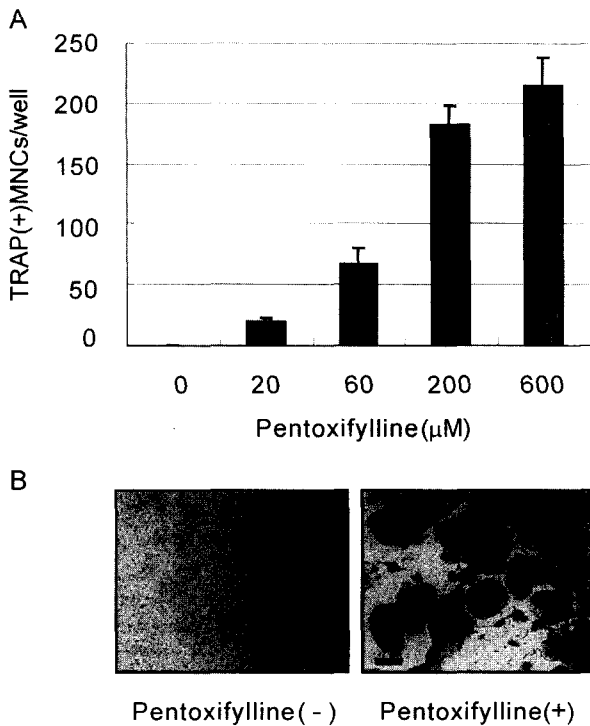


Fig. 1 – Effect of pentoxifylline on osteoclast formation. A, Dose-dependent effect of pentoxifylline on osteoclast formation in co-cultures. Mouse bone marrow cells and calvarial osteoblasts were co-cultured in the presence of the indicated concentrations of pentoxifylline for 6 days. Cells were then fixed and stained for TRAP. TRAP-positive (+) multinucleated cells (MNCs) were counted. Data are expressed as the mean ± SD of triplicate cultures. B, Photographs of co-cultures in which cells were co-cultured with (+) or without (-) 600 μM of pentoxifylline for 6 days. Cells were fixed and stained for TRAP, which appears as dark-stained cells. Bar = 200 μM.

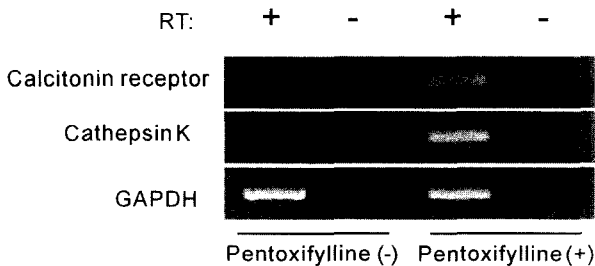


Fig. 2 – Expression of osteoclast marker genes in co-cultures. Bone marrow cells and calvarial osteoblasts were co-cultured for 6 days with (+) or without (-) 600 μM of pentoxifylline. Total RNA was then isolated from the cells and cDNA templates prepared with (+) or without (-) reverse transcriptase (RT). mRNA expression was determined by RT-PCR using specific primers designed for each gene.

Pentoxifylline의 TRANCE 발현 증가

조골세포내 cAMP의 증가는 파골 세포 분화 유도 인자인

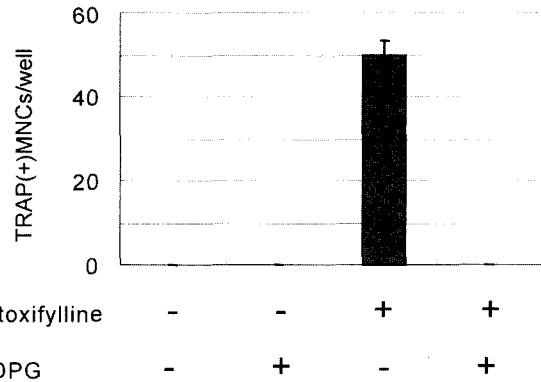


Fig. 3 – Requirement of TRANCE for osteoclast formation induced by pentoxifylline. Mouse bone marrow cells and calvarial osteoblasts were cultured with (+) or without (-) 600 μM of pentoxifylline on the presence (+) or absence (-) of OPG (100 μg/ml) for 6 days. The cells were then fixed and stained for TRAP, and the number of TRAP-positive multinucleated cells (MNCs) was counted. Data are expressed as the mean ± SD of triplicate cultures.

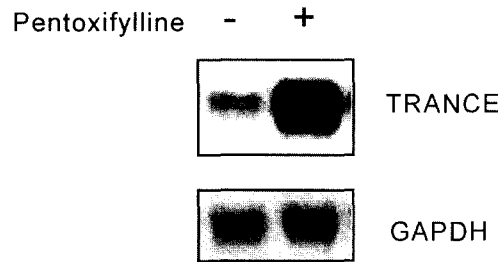


Fig. 4 – Effect of pentoxifylline on TRANCE mRNA expression induced by pentoxifylline in calvarial osteoblasts. Calvarial osteoblasts were treated with (+) or without (-) 600 μM of pentoxifylline for 3 hours. Total RNA was then extracted from the osteoblasts and the expression of TRANCE mRNA was examined by Northern blot analysis.

TRANCE의 발현 증가와 연관되어 있다고 알려져 있다.⁷⁻⁹⁾ pentoxifylline은 phosphodiesterase(PDE) 저해제로, cAMP의 분해를 억제하여 세포내 cAMP의 농도를 증가시킬 것으로 기대된다. 따라서 pentoxifylline의 파골세포 분화 유도가 TRANCE 발현 증가와 관련되어 있는지 조사하였다. 먼저 TRANCE와의 관련성을 알아보기 위해 공배양계에 pentoxifylline과 함께 TRANCE의 decoy receptor인 OPG를 처리하였다. pentoxifylline의 치료로 유도된 파골 세포 분화는 OPG의 첨가로 완벽하게 억제 되어, pentoxifylline이 TRANCE 발현에 작용함을 나타내었다(Fig. 3). pentoxifylline이 전사 수준에서 TRANCE 발현을 조절하는지 northern blotting으로 조사하였다. 대조군에 비해 pentoxifylline 처리시 TRANCE의 mRNA 발현이 크게 증가하는 것을 볼 수 있다(Fig. 4). 따라서 pentoxifylline은 TRANCE의 발현을 전사 수준에서 조절하고 있음이 밝혀졌다.

이는 지금까지 보고된 부갑상선 호르몬(PTH), Prostaglandin E₂(PGE₂) 등 세포내 cAMP 상승 물질의 TRANCE 발현 증가와 일치하는 결과로,¹⁾ pentoxifylline이 이들과 동일한 신호전달 경로를 매개하여 TRANCE 발현을 유도하는지에 대해 현재 연구가 진행 중이다.

기존의 동물 모델을 이용한 실험에서 pentoxifylline 및 기타 PDE 억제제들은 골밀도를 증가시킨다고 보고된 바 있다.¹²⁻¹⁴⁾ Pentoxifylline은 조골세포의 분화를 촉진시킨다는 보고도 있어¹⁵⁾ 뼈 형성에 촉진적으로 작용하는 것으로 생각되어져 왔다. 그러나 주지한 바와 같이 본 실험에서 pentoxifylline은 파골세포의 분화를 촉진시키는 효과도 가지는 것으로 나타났다. 이는 부갑상선 호르몬이 골 형성과 골 파괴의 양쪽 효과를 모두 가지는 것과 매우 유사하다.¹⁶⁾ 부갑상선 호르몬은 실험동물에 간헐적으로 투여시 골밀도 증가 효과를, 연속적으로 투여시 골밀도 감소 효과를 나타낸다고 알려져 있다.¹⁶⁾ 부갑상선 호르몬이 투여조건에 따라 골밀도에 대해 상반된 효과를 나타내는 원인은 아직 명확히 규명되지 않았으나, 간헐적인 부갑상선 호르몬의 투여는 현재 골다공증 치료제의 일환으로 널리 이용되고 있다. 이는 pentoxifylline 또한 골다공증 치료제로서 이용될 수 있는 가능성을 시사하는 것으로, pentoxifylline이 부갑상선 호르몬과 동일하게 골다공증 치료제로 개발되기 위해 향후 pentoxifylline의 효과 및 기전 연구가 지속적으로 이루어져야 할 것이다.

감사의 말씀

본 연구는 보건 장학회 연구지원으로 수행되었으므로 이에 감사드립니다.

문헌

- 1) Takahashi, N., Akatsu, T., Udagawa, N., Sasaki, T., Yamaguchi, A., Moseley, J. M., Martin, T. J. and Suda, T. : Osteoblastic cells are involved in osteoclast formation. *Endocrinology* **123**, 2600 (1988).
- 2) Suda, T., Takahashi, N., Udagawa, N., Jimi, E., Gillespie, M. T. and Martin, T. J. : Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr. Rev.* **20**, 345 (1999).
- 3) Wong, B. R., Rho, J., Arron, J., Robinson, E., Orlicki, J., Chao, M., Kalachikov, S., Cayani, E., Bartlett, F. S. 3rd, Frankel, W. N., Lee, S. Y. and Choi, Y. : TRANCE is a novel ligand of the tumor necrosis factor receptor family that activates c-Jun N-terminal kinase in T cells. *J. Biol. Chem.* **272**, 25190 (1997).
- 4) Yasuda, H., Shima, N., Nakagawa, N., Yamaguchi, K., Kinosaki, M., Mochizuki, S., Tomoyasu, A., Yano, K., Goto, M.,

- Murakami, A., Tsuda, E., Morinaga, T., Higashio, K., Udagawa, N., Takahashi, N. and Suda, T. : Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 3597 (1998).
- 5) Lacey, D. L., Timms, E., Tan, H. L., Kelley, M. J., Dunstan, C. R., Burgess, T., Elliott, R., Colombero, A., Elliott, G., Scully, S., Hsu, H., Sullivan, J., Hawkins, N., Davy, E., Capparelli, C., Eli, A., Qian, Y. X., Kaufman, S., Sarosi, I., Shalhoub, V., Senaldi, G., Guo, J., Delaney, J. and Boyle, W. J. : Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* **93**, 165 (1998).
- 6) Simonet, W. S., Lacey, D. L., Dunstan, C. R., Kelley, M., Chang, M. S., Luthy, R., Nguyen, H. Q., Wooden, S., Bennett, L., Boone, T., Shimamoto, G., DeRose, M., Elliott, R., Colombero, A., Tan, H. L., Trail, G., Sullivan, J., Davy, E., Bucay, N., Renshaw-Gegg, L., Hughes, T. M., Hill, D., Pattison, W., Campbell, P. and Boyle, W. J. : Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* **89**, 309 (1997).
- 7) Kondo, H., Guo, J. and Bringhurst, F. R. : Cyclic adenosine monophosphate/protein kinase A mediates parathyroid hormone/parathyroid hormone-related protein receptor regulation of osteoclastogenesis and expression of RANKL and osteoprotegerin mRNAs by marrow stromal cells. *J. Bone Miner. Res.* **17**, 1667 (2002).
- 8) Kaji, H., Sugimoto, T., Kanatani, M., Fukase, M., Kumegawa, M. and Chihara, K. : Prostaglandin E₂ stimulates osteoclast-like cell formation and bone-resorbing activity via osteoblasts: role of cAMP-dependent protein kinase. *J. Bone Miner. Res.* **11**, 62 (1996).
- 9) Fu, Q., Jilka, R. L., Manolagas, S. C. and O'Brien, C. A. : Parathyroid hormone stimulates receptor activator of NF- κ B ligand and inhibits osteoprotegerin expression via protein kinase A activation of cAMP-response element-binding protein. *J. Biol. Chem.* **277**, 48868 (2002).
- 10) Antoni, F. A. : Molecular diversity of cyclic AMP signaling. *Front Neuroendocrinol.* **21**, 103 (2000).
- 11) Essayan, D. M. : Cyclic nucleotide phosphodiesterases. *J. Allergy Clin. Immunol.* **108**, 671 (2001).
- 12) Kinoshita, T., Kobayashi, S., Ebara, S., Yoshimura, Y., Horiuchi, H., Tsutsumimoto, T., Wakabayashi, S. and Takaoka, K. : Phosphodiesterase inhibitors, pentoxifylline and rolipram, increase bone mass mainly by promoting bone formation in normal mice. *Bone* **27**, 811 (2000).
- 13) Waki, Y., Horita, T., Miyamoto, K., Ohya, K. and Kasugai, S. : Effects of XT-44, a phosphodiesterase 4 inhibitor, in osteoblastogenesis and osteoclastogenesis in culture and its therapeutic effects in rat osteopenia models. *Jpn. J. Pharmacol.*

- 79, 477 (1999).
- 14) Miyamoto, K., Waki, Y., Horita, T., Kasugai, S. and Ohya, K. : Reduction of bone loss by denbufylline, an inhibitor of phosphodiesterase 4. *Biochem. Pharmacol.* **54**, 613 (1997).
- 15) Rawadi, G., Ferrer, C., Spinella-Jaegle, S., Roman-Roman, S., Bouali, Y. and Baron, R. : 1-(5-oxohexyl)-3,7-Dimethylxanthine, a phosphodiesterase inhibitor, activates MAPK cascades and promotes osteoblast differentiation by a mechanism independent of PKA activation. *Endocrinology* **142**, 4673 (2001).
- 16) Tam, C. S., Heersche, J. N., Murray, T. M. and Parsons, J. A. : Parathyroid hormone stimulates the bone apposition rate independently of its resorptive action: differential effects of intermittent and continuous administration. *Endocrinology* **110**, 506 (1982).