

## Dexamethasone에 의한 RANKL 유도성 파골세포 분화 촉진 효과

노아롱새미 · 천링 · 박효정 · 양미혜\* · 이정민 · 임미정#  
숙명여자대학교 약학대학, \*경북대학교 자연과학대학 생명공학부  
(Received January 8, 2009; Revised March 10, 2009; Accepted April 6, 2009)

### The Stimulatory Effect of Dexamethasone on RANKL-induced Osteoclastogenesis

A Long Sae Mi No, Ling Chen, Hyojung Park, Mihye Yang\*, Jung Min Lee and Mijung Yim#

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

\*College of Natural Sciences, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

**Abstract** — We explored the effects of dexamethasone on osteoclast precursors using BMMs. Dexamethasone inhibited the proliferation of BMMs. Furthermore, it stimulated the osteoclast formation via NFATc1 activation in the presence of RANKL. Since dexamethasone targeted the early stage of osteoclast formation, we investigated its effect on mRNA expression of GR and IFN- $\beta$ . Whereas dexamethasone had no effects on GR expression in the presence of RANKL, it reduced the expression of IFN- $\beta$ , suggesting that dexamethasone increased RANKL-induced osteoclast formation by modulating IFN- $\beta$ .

**Keywords** □ glucocorticoid, dexamethasone, osteoclast, IFN- $\beta$

골량이 감소함으로써 나타나는 골다공증은 척추가 굽어 키가 작아지거나 골절을 유발하여 삶을 질을 저하시킨다. 국민건강영양조사에 따르면 1998년 2.8명이던 골다공증 유병률은 2002년 11.5명으로 무려 4배나 증가하였으며, 고령화에 따라 골다공증 환자는 점차 증가하는 추세이다. 건강한 뼈는 일생동안 뼈가 지속적으로 형성되고 파괴되며, 이를 뼈의 재형성이라 한다.<sup>1)</sup> 뼈의 재형성은 새로운 뼈를 만드는 조골세포(osteoblast)와 오래된 뼈를 파괴하는 파골세포(osteoclast)에 의해 평형을 유지한다. 조골 및 파골세포는 밀접한 관계를 맺고 있어, 파골세포의 분화는 조골세포에 의해 엄격하게 조절된다.<sup>1,2)</sup> 즉, 조골세포는 파골세포 분화인자인 M-CSF(Macrophage Colony-Stimulating Factor, or CSF-1) 및 RANKL(Receptor Activator of Nuclear Factor-kappaB Ligand, OPGL, ODF, or TRANCE)을 통해 파골세포의 분화를 조절함으로써 체내 골형성과 골파괴의 동적인 평형을 유지한다.<sup>2-5)</sup>

Glucocorticoid(GC)는 치료목적으로 투여되었을 때 체내에서 소염 또는 면역 억제와 같은 다양한 면역반응을 유발하는 것이

알려져 있다.<sup>6-8)</sup> 따라서 GC는 염증 및 면역부전 질환에 빈번하게 사용되고 있다. 그러나 장기간의 GC 투여는 골다공증을 유발하는 것이 널리 알려져 있으며, 이러한 골손실의 부작용으로 인해 GC의 사용이 제한되고 있는 실정이다.<sup>9-12)</sup>

GC에 의한 골다공증 유발은 골형성 부전에서 기인하는 것으로 생각되어왔다. 실제로 조골세포에 대한 GC의 영향은 *in vitro* 및 *in vivo*에서 많이 보고되었으며, *in vitro*에서는 GC가 조골세포의 분화와 기능에 중요한 역할을 담당하는 Runx2와 collagen I의 발현을 차단하는 것으로 나타났다.<sup>13)</sup> 또한 GC는 조골세포 표면의 RANKL과 M-CSF 발현을 증가시키며, RANKL의 decoy receptor인 osteoprotegerin(OPG)의 발현을 감소시킨다.<sup>14,15)</sup> GC의 장기 투여 모델 동물을 사용한 *in vivo* 실험에서는 GC에 의한 조골세포의 아포토시스가 가속화된다는 것이 밝혀졌다.<sup>10,16)</sup> 이상 다수의 연구결과는 GC 사용에 의한 골손실의 발병기전으로 오랫동안 인지되어 왔다. 그러나 최근 들어 GC가 파골세포의 수명을 증가시키는 것으로 나타나는 등<sup>17)</sup> 파골세포에 직접적으로 미치는 영향이 보고되기 시작하였다. 이는 GC에 의한 골손실이 조골세포에 의한 골형성 부전뿐 아니라 파골세포에 의한 골파괴 이상과도 연관되어 있음을 시사하는 것이다. 그러나 GC의 파골세포에 대한 직접적인 영향은 아직 충분히 밝혀지지 않았고, 특히 파골세포 분화에 대한 GC의 효과는 보고

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로  
(전화) 02-710-9572 (팩스) 02-710-9871  
(E-mail) myim@sookmyung.ac.kr

된 바가 거의 없다. 이에 본 연구자는 마우스 골수세포를 이용해 GC가 파골세포 분화에 미치는 영향을 조사하였기에 보고하는 바이다.

## 실험 방법

### 마우스 골수세포의 배양

ICR 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  $\alpha$ -MEM을 흘려보내 골수세포를 시험관에 모았다. 원심 분리한 후  $\alpha$ -MEM에 현탁하고 2배의 Gey's solution을 가해 적혈구를 제거했다. 원심 분리한 후 10% FBS가 함유된  $\alpha$ -MEM으로 재현탁했다.

### 파골세포의 분화유도

초기 배양한 골수세포를 M-CSF 10 ng/ml로 하룻밤 배양한 후 부유세포를 M-CSF 30 ng/ml로 3일간 추가 배양했다. 집착 세포를 회수 후  $1 \times 10^5$  cells/well에 RANKL 50 ng/ml과 M-CSF 30 ng/ml 존재하에서 4일간 배양했다. 배양이 끝난 세포는 10% formalin으로 10분간 고정한 후 ethanol-aceton(1:1)로 1분간 재고정하여 TRAP(tartrate-resistant acid phosphatase) staining을 했다. 3개 이상의 핵을 가진 TRAP+ 세포를 다핵 파골세포로 판정했다.

### Western blot 분석

시료를 처리한 세포를 lysate buffer로 용해하고 원심분리하였다. 여기서 얻은 상등액을 10% SDS-PAGE를 이용해 전기영동하고 이를 nitrocellulose membrane으로 이전시켰다. 이를 5% skim milk가 함유된 TBS 용액으로 blocking하고, 1차 항체로서 anti-NF $\kappa$ B(1:1000, Santa cruz) 또는  $\beta$ -actin(1:4000, Sigma) 항체와 각각 반응시켰다. PBST로 5회 세정하고 HRP(Horseradish peroxidase)가 결합된 2차 항체와 반응시킨 후 ECL Advance (Amersham. CO.)로 발색시켜 분석하였다.

### RNA 분리 및 RT-PCR 분석

Total RNA 추출은 Easy-blue(Intron, Biochemistry. INC.)를 이용하였다. cDNA는 1  $\mu$ g의 total RNA를 oligodT primer, 10 mM dNTP, 1 unit RNase inhibitor 그리고 4 unit Script reverse transcriptase(Fermentas, Life science)로 42°C에서 60분 처리하여 합성한 후, 70°C에서 10분 가열함으로써 반응을 중지 시켰다. Polymerase chain reaction(PCR)의 조건과 사용한 primer(5'  $\rightarrow$  3')의 서열은 다음과 같다.

	Primer 서열	PCR 조건	Cycle
GR	F: CGCTCAGTGTTTCTAATGG R: ATCAGGAGCAAAGCATAGCA	94°C 30초, 55°C 30초, 72°C 30초	28 cycle
IFN- $\beta$	F: CTTCTCCACCACAGCCCTCTC R: CCCACGTCAATCTTTCCTCTT	94°C 30초, 53°C 30초, 72°C 30초	35 cycle
$\beta$ -actin	F: TGTGATGGTGGGAATGGGTCAG R: TTTGATGTCACGCACGATTCC	94°C 30초, 58°C 30초, 72°C 1분	22 cycle

### 세포증식 측정

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 정량은 Mosmann의 방법을 변형하여 실시하였다.  $1 \times 10^4$  cells/well 농도로 96 well plate에 분주한 세포에 시료를 처리하고 일정 시간 동안 배양하였다. 배양액을 버리고 PBS로 wash한 후, MTT 용액(0.5 mg/ml)을 100  $\mu$ l/well 첨가하여 호일로 싼 상태에서 5시간 동안 배양하고, Solubilization buffer(10% SDS in 0.01 M HCl)를 100  $\mu$ l/well 첨가하고 다시 호일로 싼다. 16~17 시간 동안 배양한 후, 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

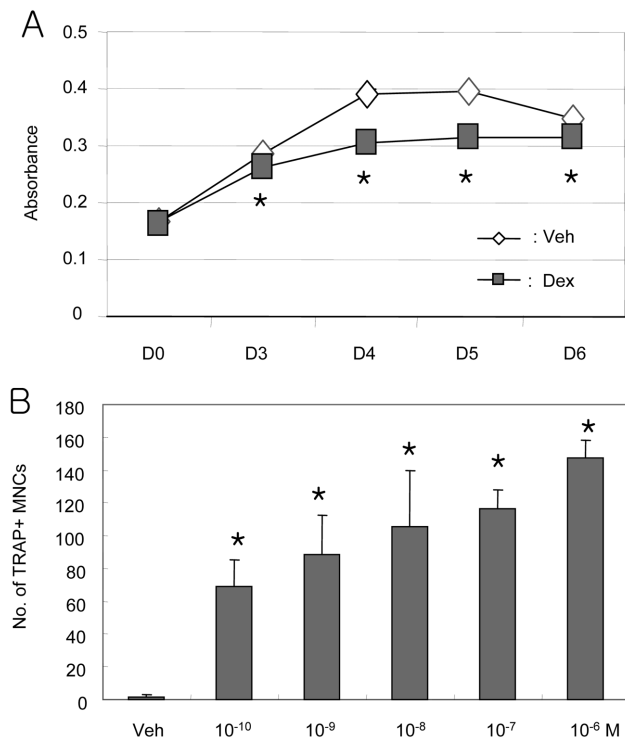
### 통계처리

실험결과는 평균  $\pm$  표준편차로 표기하였고, Student's *t*-test로 분석하여 *p* 값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의하다고 판단하였다.

## 실험 결과 및 고찰

### 파골세포 분화에 미치는 dexamethasone의 촉진적 효과

마우스 골수세포를 M-CSF로 처리하여 3일간 배양하면 Bone Marrow Macrophages(BMM)가 생성되며, 이는 M-CSF와 RANKL 존재하에서 파골세포로 분화한다. Dexamethasone이 파골세포 분화에 직접적으로 미치는 영향을 조사하기 위해 먼저 BMM의 증식에 미치는 영향을 조사하였다. BMM을 M-CSF 존재하에서 dexamethasone으로 처리하여 최대 6일간 배양하고, day 0, 3, 4, 5, 6에 그 증식 정도를 MTT assay로 측정하였다. Dexamethasone은 측정된 시점에서 BMM의 증식을 모두 유의 있게 감소시켰다(Fig. 1A). 이 결과는 dexamethasone이 BMM의 증식을 억제하고 분화를 촉진할 가능성을 제시하는 것이므로, 다음은 dexamethasone이 파골세포의 분화에 미치는 영향을 조사하였다. 이를 위해 골수세포를 M-CSF와 RANKL 존재하에서  $10^{-10}$  M~ $10^{-6}$  M의 dexamethasone으로 농도별로 처리한 후 4일간 배양하였다. Dexamethasone은 골수세포로부터 파골세포로의 분화를 농도 의존적으로 촉진하는 것을 알 수 있다(Fig. 1B). 이상의 결과로 dexamethasone은 BMM의 증식을 억제하고 파골세포로의 분화를 촉진하는 것으로 밝혀졌다.

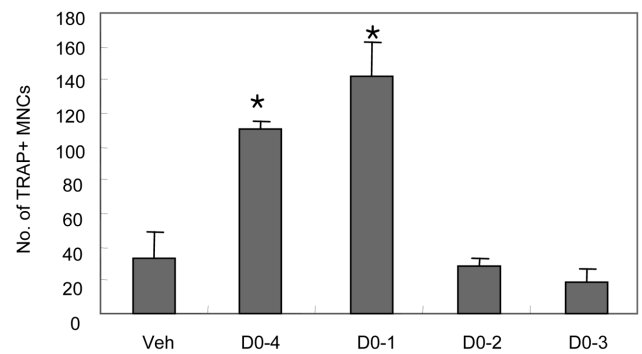


**Fig. 1** – Effects of dexamethasone on the proliferation of mouse bone-marrow macrophage (BMM) cells. A, BMM cells were cultured with 30 ng/ml M-CSF in the absence or presence of dexamethasone (100 nM) for indicated times. Cell proliferation was determined by MTT assay as described in materials and methods. B, BMM cells were cultured with 30 ng/ml M-CSF and 50 ng/ml RANKL in the presence of various concentration of dexamethasone for 4 days. Cells were then fixed and stained for TRAP. TRAP-positive (+) multinucleated cells (MNCs) were counted. The experiments were performed 3 times, and the reproducibility was confirmed. Values are the mean±SD of triplicate cultures in a representative experiment. Veh: vehicle, \*:  $p < 0.05$ , significantly different from vehicle.

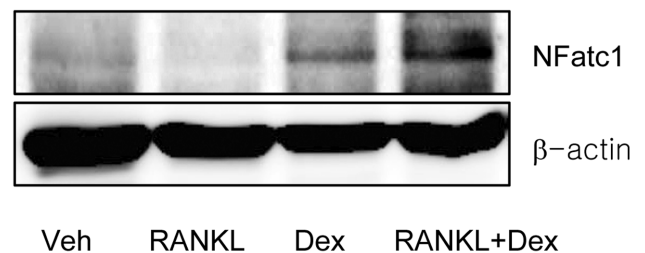
Dexamethasone이 파골세포 분화의 어느 단계를 촉진하는지 조사하기 위해 골수세포의 M-CSF와 RANKL 배양액에 dexamethasone을 day 0~4까지 날짜별로 처리하였다. Dexamethasone은 4일간의 배양기간 중 day1까지 처리되었을 때(D0-1) 가장 효율적으로 파골세포 분화를 촉진하였으며, 이는 dexamethasone이 4일간 처리되었을 때(D0~4)와 유사한 정도를 보였다(Fig. 2). 그러나 dexamethasone의 파골세포 분화에 대한 촉진적 효과는 day 2(D0~2)와 day 3(D0~3)까지 처리되었을 때 소멸하였다. 이에 대한 원인은 현재로서는 알 수 없으며, 추후 추가적인 실험을 통해 밝혀지기를 기대한다.

#### 파골세포 분화 촉진에 관여하는 dexamethasone의 작용기전 규명

파골세포 분화에 관여하는 다양한 유전자가 밝혀졌으며, 그 중



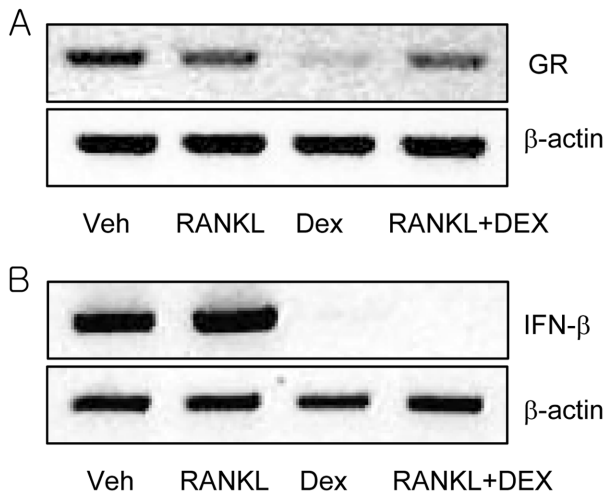
**Fig. 2** – Stage-specific effects of dexamethasone on osteoclast formation. BMM cells were cultured with 30 ng/ml M-CSF and 50 ng/ml RANKL for 4 days. Dexamethasone (100 nM) was added during the indicated times. Cells were then fixed and stained for TRAP. TRAP-positive (+) multinucleated cells (MNCs) were counted. The experiments were performed 3 times, and the reproducibility was confirmed. Values are the mean±SD of triplicate cultures in a representative experiment. Veh: vehicle, \*:  $p < 0.05$ , significantly different from vehicle.



**Fig. 3** – Effects of dexamethasone on the expression of NFATc1. BMM cells were cultured for 48 hrs and the expression of NFATc1 was determined by western blotting assay. The experiments were performed 3 times, and the reproducibility was confirmed.

에서 특히 Nuclear Factor of Activated T cells(NFAT)c1은 파골세포의 분화를 조절하는 중요한 전사인자로 알려져 있다. Dexamethasone이 파골세포 분화를 촉진하였으므로, dexamethasone의 처리가 NFATc1의 발현을 변화시키는 지 여부를 향 NFATc1 항체를 이용한 western blotting assay로 조사하였다. BMM을 48시간 처리하였을 때 dexamethasone은 RANKL 존재 하에서 NFATc1의 발현을 유의성 있게 증가시켰으며(Fig. 3), 이는 dexamethasone이 파골세포로의 분화를 촉진하는 것과 일치하는 결과이다. 따라서 dexamethasone은 NFATc1을 매개한 파골세포 분화를 촉진하는 것으로 생각되었다.

Dexamethasone은 glucocorticoid receptor(GR)를 통해 신호를 전달하며, GR은 nuclear receptor superfamily of ligand-dependent transcription factors에 속하는 것으로 알려져 있다.<sup>18)</sup> Dexamethasone에 의한 파골세포로의 분화 촉진이 GR 발현과 연관되어 있는지 알아보기 위해 GR 특이적 서열을 이용해 RT-



**Fig. 4** – Effects of dexamethasone on the mRNA expression of GR and IFN- $\beta$ . BMM cells were cultured for 48 hrs and the mRNA expression of GR (A) or IFN- $\beta$  (B) was determined by RT-PCR assay. The experiments were performed 3 times, and the reproducibility was confirmed.

PCR assay를 수행하였다.

BMM은 GR mRNA를 발현하며, 발현 정도는 dexamethasone을 48시간 처리하였을 때 큰 폭으로 감소하였다. 그러나 RANKL 존재하에서 dexamethasone 처리는 GR 발현에 큰 영향을 미치지 않았다(Fig. 4A). 이상의 결과로, 파골세포에 대한 dexamethasone의 분화 촉진효과는 GR 발현과 밀접하게 연관되지 않음을 알 수 있다.

파골세포의 분화를 조절하는 다양한 분자 중 interferon- $\beta$ (IFN- $\beta$ )는 파골세포의 분화 초기에 억제적 효과를 나타낸다고 알려져 있다.<sup>19)</sup> Dexamethasone을 BMM 초기에 처리하였을 때 파골세포의 분화를 촉진하는 효과를 보였으므로, 이에 IFN- $\beta$ 의 발현이 관여하는 것은 아닌지 조사하고자 IFN- $\beta$  특이적 서열로 RT-PCR assay를 수행하였다. BMM을 RANKL로 처리하였을 때 기존에 알려진 바와 같이 IFN- $\beta$ 의 발현은 증가하였다(Fig. 4B). 그러나 dexamethasone 또는 RANKL과 dexamethasone의 처리는 IFN- $\beta$ 의 발현을 현저하게 감소시켰다. 이상의 결과는 dexamethasone이 RANKL에 의한 IFN- $\beta$ 의 발현을 감소시킴으로써 파골세포의 분화를 촉진시키는 것을 의미한다. 본 연구는 마우스 골수세포에 dexamethasone을 단독 처리하였을 때 파골세포 분화에 미치는 영향과 그 작용기전을 분석하였으며, 이는 기존의 논문<sup>20-22)</sup>과는 다른 차별성을 가진다고 할 수 있다.

## 결론

Dexamethasone은 마우스 골수세포의 파골세포로의 분화를 농도 의존적으로 촉진하였으며, 이는 분화에 필수적인 전사인자

NFATc1의 활성화를 매개하는 것으로 밝혀졌다. Dexamethasone의 파골세포 분화 촉진은 분화 초기에 작용하였으며, 이의 작용기전으로 dexamethasone에 의한 마우스 골수세포의 증식 억제와 IFN- $\beta$ 의 발현 억제가 제시되었다.

## 감사의 말씀

본 연구는 숙명여자대학교 2008학년도 교내연구비 지원에 의해 수행되었으므로 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

- 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., Orlinick, 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) Pitzalis, C., Pipitone, N. and Perretti, M. : Regulation of leukocyte-endothelial interactions by glucocorticoids. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **966**, 108 (2002).
- 7) Langenegger, T. and Michel, B. A. : Drug treatment for rheumatoid arthritis. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **366**, 22 (1999).
- 8) Riccardi, C., Zollo, O., Nocentini, G., Bruscoli, S., Bartoli, A., D'Adamio, F., Cannarile, L., Delfino, D., Ayroldi, E. and Migliorati, G. : Glucocorticoid hormones in the regulation of cell death. *Therapie* **55**, 165 (2000).

- 9) Canalis, E. and Delany, A. M. : Mechanisms of glucocorticoid action in bone. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **966**, 73 (2002).
- 10) Weinstein, R. S. : Glucocorticoid-induced osteoporosis. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* **2**, 65 (2001).
- 11) Patschan, D., Lodenkemper, K. and Buttgerit, F. : Molecular mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Bone.* **29**, 498 (2001).
- 12) Manolagas, S. C. and Weinstein, R. S. : New developments in the pathogenesis and treatment of steroid-induced osteoporosis. *J. Bone. Miner. Res.* **14**, 1061 (1999).
- 13) Pereira, R. M., Delany, A. M. and Canalis, E. : Cortisol inhibits the differentiation and apoptosis of osteoblasts in culture. *Bone.* **28**, 484 (2001).
- 14) Hofbauer, L. C., Gori, F., Riggs, B. L., Lacey, D. L., Dunstan, C. R., Spelsberg, T. C. and Khosla, S. : Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Endocrinology* **140**, 4382 (1999).
- 15) Rubin, J., Biskobing, D. M., Jadhav, L., Fan, D., Nanes, M. S., Perkins, S. and Fan, X. : Dexamethasone promotes expression of membrane-bound macrophage colony-stimulating factor in murine osteoblast-like cells. *Endocrinology* **139**, 1006 (1998).
- 16) Weinstein, R. S., Jilka, R. L., Parfitt, A. M. and Manolagas, S. C. : Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids. *J. Clin. Invest.* **102**, 274 (1998).
- 17) Jia, D., O'Brien, C. A., Stewart, S. A., Manolagas, S. C. and Weinstein, R. S. : Glucocorticoids act directly on osteoclasts to increase their life span and reduce bone density. *Endocrinology* **147**, 5592 (2006).
- 18) Dovic, A., Micossi, I., Bianco, E. and Angeli, A. : Determinants of glucocorticoid action in the bone microenvironment. *J. Endocrinol. Invest.* **31**, 7 (2008).
- 19) Takaoka, A. and Taniguchi, T. : New aspects of IFN-alpha/beta signalling in immunity, oncogenesis and bone metabolism. *Cancer Sci.* **94**, 405 (2003).
- 20) Sivagurunathan, S., Muir, M. M., Brennan, T. C., Seale, J. P. and Mason, R. S. : Influence of glucocorticoids on human osteoclast generation and activity. *J. Bone. Miner. Res.* **20**, 390 (2005).
- 21) Hirayama, T., Sabokbar, A. and Athanasou, N. A. : Effect of corticosteroids on human osteoclast formation and activity. *J. Endocrinol.* **175**, 155 (2002).
- 22) Takuma, A., Kaneda, T., Sato, T., Ninomiya, S., Kumegawa, M. and Hakeda, Y. : Dexamethasone enhances osteoclast formation synergistically with transforming growth factor-beta by stimulating the priming of osteoclast progenitors for differentiation into osteoclasts. *J. Biol. Chem.* **278**, 44667 (2003).