

골손실을 조절하는 활성산소종의 역할 규명

양미혜*[†] · 박효정[†] · 이동석* · 임미정[#]

숙명여자대학교 약학대학, *경북대학교 자연과학대학 생명공학부
(Received March 25, 2009; Revised May 11, 2009; Accepted May 21, 2009)

The Function of Reactive Oxygen Species in Bone Loss

Mihye Yang*, Hyojung Park, Dong-Seok 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 role of reactive oxygen species (ROS) in LPS-induced bone loss. LPS was shown to increase the concentration of ROS in osteoclast precursors. The antioxidant decreased osteoclast formation by LPS. Furthermore, the antioxidant decreased NFATc1 expression by LPS, suggesting that ROS mediates NFATc1 expression in the regulation of LPS-induced osteoclast formation. Finally, the antioxidant decreased LPS-induced RANKL mRNA expression in osteoblasts. Taken together, these data indicate that LPS mediates ROS to induce bone loss.

Keywords □ ROS, LPS, osteoclast, osteoblast, bone loss

최근 인구 고령화에 따라 노인성 질환이 급증하고 있으며, 이로 인해 노인 의료비도 지난 10년간 8배 이상 폭발적으로 증가하고 있다. 노화에 따른 질환 중 대표적인 것이 골격계 질환으로, 특히 염증성 골손실은 류마티스 관절염, 치주염, 골다공증 등을 유발하여 삶의 질을 저하시킨다.

건강한 뼈는 일생동안 뼈가 지속적으로 형성되고 파괴되며, 이를 뼈의 재형성이라 한다.¹⁾ 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.^{1,2)} 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.²⁻⁵⁾

염증성 골파괴의 병인인자로 lipopolysaccharide(LPS)를 들 수 있다.⁶⁾ LPS 감염에 의한 골파괴에는 Toll-Like Receptor(TLR)를 매개한 자연면역계가 중요하다고 생각되고 있다. TLR는 지

금까지 사람에게서 11종류, 마우스에서는 13종류가 보고된바 있다.⁷⁾ LPS는 TLR family 중 TLR4에 결합하여 IL-6, IL-12, TNF- α 등의 염증성 사이토카인이나 케모카인의 발현을 유도한다. TLR4의 세포내 도메인에는 Toll/IL-1R 상동영역(TIR도메인)이 존재하여, TLR4가 LPS와 결합하면 TIR에 MyD88, TIRAP, TRIF, TRAM, SARM의 adaptor 분자가 결합해 세포내에 신호를 전달한다. 특히 MyD88은 TLR4 신호전달계에 있어서 매우 중요한 역할을 담당하고 있다.⁸⁾

조골 및 파골세포도 표면에 TLR4를 발현하고 있다.⁹⁾ 조골세포에서 LPS는 TLR4에 결합해 MyD88를 매개해 Ca²⁺/PKC, ERK 의존적으로 파골세포 분화인자인 RANKL 발현을 유도한다.¹⁰⁾ 또한 COX-2를 활성화해 PGE₂ 생성을 촉진하고 그의 autocrine/paracrine 작용에 의해 파골세포 분화억제 인자인 OPG 발현을 억제함이 알려져 있다.¹¹⁾ 이 기전에 있어서 MyD88-/-유래의 세포에서 LPS는 RANKL 발현을 유도하지 않는 것으로부터, TLR4의 세포내 adaptor 분자 MyD88이 RANKL 생성에 중요함이 밝혀졌다.¹²⁾ 한편 LPS는 성숙한 파골세포에 직접 작용해 MyD88를 매개해 골흡수 기능 및 생존을 촉진하며, 파골세포 전구세포에 작용해 파골세포로의 분화를 촉진함이 알려져 있다.¹³⁾

그러나 이러한 일련의 보고에도 불구하고, LPS가 골손실을 유발하는 기전은 아직 충분히 밝혀지지 않았고, 이는 치료제 개발에 필요한 타겟 분자의 발굴을 어렵게 하고 있다. 이에 따라 염

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

[†]양미혜와 박효정은 본 논문에 대해 동일하게 기여하였습니다.

증성 골손실은 높은 발병률에도 불구하고 소염진통제 이외에는 뚜렷한 치료제가 없는 실정이다. 이에 본 연구자는 항산화제를 이용해 활성산소종(Reactive Oxygen Species, ROS)이 LPS에 의한 골세포 조절에 미치는 영향을 조사하였기에 보고하는 바이다.

실험 방법

파골세포의 분화유도

마우스 macrophage cell line인 Raw 264.7 세포 2×10^3 cells/well을 RANKL 50 ng/ml(peprotech) 존재하에서 36시간 배양하여 파골 전구세포를 생성하였다. 파골세포 형성을 위해 추가적으로 300 ng/ml LPS(Sigma, Germany)와 표기된 양의 N-Acetyl-L-cysteine(NAC, Fluka, Germany)을 처리하여 5일간 배양하였다. 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

파골전구세포를 LPS(1 μ g/ml)와 NAC(20 mM)을 처리하여 일정시간 배양 후, lysate buffer로 용해하고 원심분리 하였다. 단백질 농도는 BSA(bovine serum albumin)을 표준화하여 protein assay kit(Bio-Rad)를 사용하여 정량하였다. 20 μ g의 단백질을 SDS-PAGE(poly acrylamide gel electrophoresis)로 변성 분리하고, 이를 80 v에서 1시간 45분 처리하여 PVDF membrane에 이 전시켰다. 이를 5% skim milk가 함유된 PBST 용액으로 blocking하고, 1차 항체로서 anti-NFATc1(1:1000, Santa cruz), COX-2(1:2000, R&D systems), I κ B(1:2000, Cell signaling), 또는 β -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.

마우스 조골세포의 초기 배양

생후 0~1일의 ICR mouse로부터 두개골 피부를 벗긴 후 두개골을 적출하였다. 이때 후두골 근육 부착부분은 제거하였다. 부착된 근육, 혈구 등을 제거한 후 α -MEM으로 가볍게 세척하였다. 0.1% collagenase와 0.2% dispase 혼합효소 용액에 넣어 37°C에서 5분간 진탕시킨 후 상등액을 버리고 새로운 효소 용액을 가하였다. 37°C에서 약 10분간 진탕하여 상등액을 모으는 작업을 4회 반복하였다. 원심 분리한 후 10% FBS 함유 α -MEM으로 약 $3 \sim 5 \times 10^4$ 세포/100 mm plastic dish가 되도록 접종하였다. 5% CO₂, 37°C에서 3~4일간 배양한 세포를 이후 조골세포로 실험에 사용하였다.

RNA 분리 및 RT-PCR 분석

Total RNA 추출은 easy-Blue(iNtRON Bio technology co., Ltd, Korea)를 이용하였다. cDNA는 1 μ 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)은 RANKL에 특이적인 서열(forward: 5'-ccagccattgcacacctc-3', reverse: 5'-agcagggagggttgaca-3')을 사용하여 94°C 3분간 처리한 후, 94°C 30초, 58°C 45초 72°C 1분의 과정을 32회 반복하였다. PCR 결과물은 전기영동으로 확인하였다.

ROS 생성능 측정(DCF 법)

ROS 생성능을 측정하기 위해 DCFH-DA(2',7'-dichlorofluorescein diacetate)를 사용하였다. Raw 264.7 세포를 RANKL이 포함된 배지에서 36시간 동안 배양하고, 0.5% FBS가 포함된 배지에서 12시간 동안 배양하였다. 0.05 mM DCFH-DA를 30분 동안 처리하고, PBS로 washing한 후 시간대별로 LPS(300 ng/ml)를 처리하였다. 생성된 DCF 형광의 변화는 excitation, 488 nm 및 emission, 515~540 nm에서 Fluorescence Microplate Reader로 측정하였다.

통계처리

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

실험 결과 및 고찰

LPS에 의한 파골전구세포내 활성산소종의 증가

먼저 LPS에 의한 파골세포 분화에 관여하는 활성산소종의 역할을 규명하기 위해, 파골전구세포를 LPS로 처리하였을 때 세포내 활성산소종의 변화를 시간대별로 조사하였다. 파골전구세포로는 마우스 macrophage cell line인 Raw 264.7 세포를 파골세포 필수 분화인자인 RANKL로 36시간 처리하여 형성된 세포를 사용하였다. 파골전구세포는 LPS로 처리하여 5일간 배양하면 다핵의 성숙 파골세포로 분화한다(data not shown). 파골전구세포내 활성산소종의 농도는 300 ng/ml의 LPS 처리 후 10분부터 유의적으로 증가하였으며 2시간에서 최고치를 나타냈다(Fig. 1). 그 후 점차적으로 감소하였으나, 처리 후 6시간에서도 비교적 높은 세포내 활성산소종 농도를 유지하였다. 이상의 결과로 LPS가 파골전구세포내에서 활성산소종 농도를 증가시킴을 알 수 있으며, 이는 활성산소종이 LPS에 의한 파골세포 분화에 관여할 가능성을 보여주는 것이라 할 수 있다.

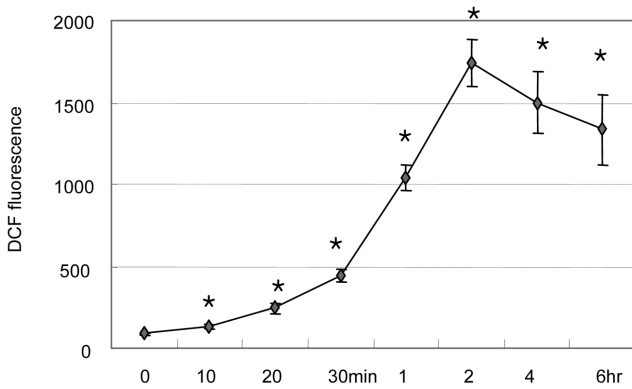


Fig. 1 – Effects of LPS on the concentration of ROS in osteoclast precursor cells. Raw 264.7 cells were cultured with 50 ng/ml RANKL for 36 hrs to produce osteoclast precursor cells. After starvation with 0.5% FBS for 12 hrs, cells were treated with 300 ng/ml LPS for indicated times. The concentration of ROS were measured as described in Materials and methods. The experiments were performed 3 times, and the reproducibility was confirmed. Values are the mean±SD of triplicate cultures in a representative experiment. *: $p < 0.05$, significantly different from 0 hr.

항산화제에 의한 LPS 유도성 파골세포 분화의 억제

LPS 유도성 파골세포 분화에 있어서 활성산소종의 기능을 규명하기 위해, LPS와 항산화제를 함께 처리하였을 때 파골세포로의 분화 변화를 추적하였다. 항산화제로는 N-Acetyl-L-cysteine (NAC)을 사용하였다. 파골전구세포는 300 ng/ml의 LPS 처리로 TRAP+ 다핵 파골세포로 분화되었으며, 이는 10 mM NAC 처리로 유의성 있게 억제되었다(Fig. 2A). 이로써 LPS는 파골전구세포내 활성산소종을 매개하여 파골세포로의 분화를 촉진함이 밝혀졌다.

파골세포 분화에 관여하는 많은 유전자가 밝혀졌으며, 그 중에서 특히 Nuclear Factor of Activated T cells(NFAT)c1은 파골세포의 분화를 조절하는 중요한 전사인자로 알려져 있다.¹⁴⁾ 항산화제의 처리가 LPS에 의한 NFATc1의 발현을 변화시키는지 여부를 항 NFATc1 항체를 이용한 western blotting assay로 조사하였다. 파골전구세포를 LPS로 48시간 처리하였을 때 NFATc1의 발현은 증가하였으며, 이는 NAC 처리로 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 2B), 이는 항산화제가 LPS에 의한 파골세포 분화를 억제하는 것과 일치하는 결과로, 활성산소종은 NFATc1 발현을 조절함으로써 LPS에 의한 파골세포 분화를 매개하는 것으로 추정되었다.

LPS에 의한 파골세포 분화에 cyclooxygenase-2(COX-2)¹⁵⁾와 nuclear factor kappa B(NF-κB)¹⁶⁾가 관여함이 보고된 바 있다. 따라서 LPS에 의해 유발된 활성산소종이 COX-2와 NF-κB를 조절하는지의 여부를 항산화제 처리에 의한 western blotting assay로 조사하였다. LPS는 파골전구세포에서 COX-2 발현을 증가시

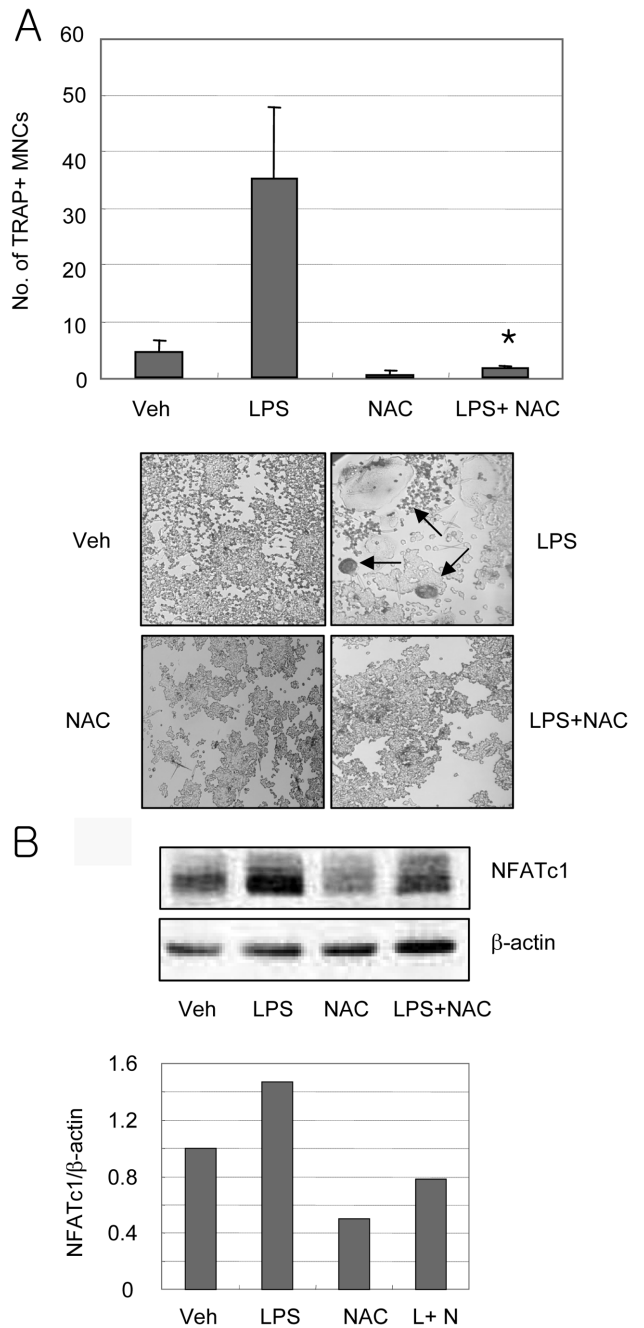


Fig. 2 – The involvement of ROS in LPS-induced osteoclast formation. A, Osteoclast precursor cells were further cultured with 300 ng/ml LPS for 5 days in the absence or presence of 10 mM NAC pretreatment. Cells were then fixed and stained for TRAP. TRAP-positive (+) multinucleated cells (MNCs) were counted. 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 LPS. B, Osteoclast precursor cells were cultured with 300 ng/ml LPS for 2 days in the absence or presence of 20 mM NAC pretreatment. The expression of NFATc1 was determined by western blotting assay. Western blot images are representative of 3 experiments with similar results.

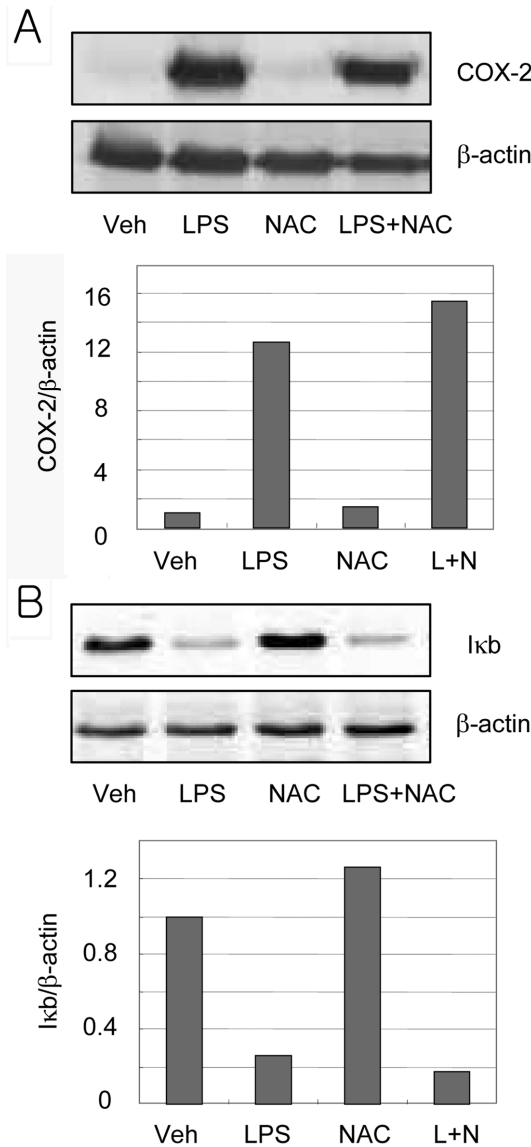


Fig. 3 – The involvement of ROS in LPS-activated signaling pathways. Osteoclast precursor cells were cultured with 300 ng/ml LPS for 24 hrs (COX-2) or 30 min (IκB) in the absence or presence of 20 mM NAC pretreatment. The expression of COX-2 (A) or IκB (B) was determined by western blotting assay. Western blot images are representative of 3 experiments with similar results.

켰으나, 항산화제 처리는 아무런 변화를 보이지 않았다(Fig. 3A). 또한 LPS는 IκB 분해를 촉진하여 NF-κB를 활성화시키는 것으로 나타났으나, 항산화제는 이에 대해 아무 영향을 미치지 않았다(Fig. 3B). 이상의 결과는 LPS에 의해 증가된 활성산소종이 COX-2 또는 NF-κB의 신호전달경로와는 무관하게 파골세포 분화를 조절함을 시사한다. 향후 추가적인 실험을 통해 활성산소종이 매개하는 LPS 유도성 파골세포 분화 기전이 보다 명확하게 규명되기를 기대한다.

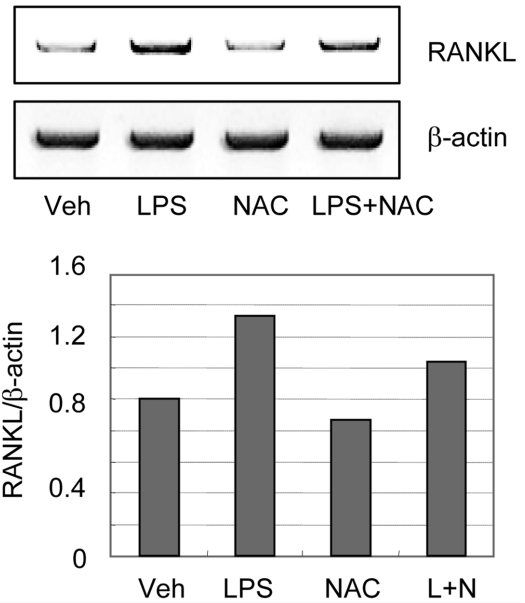


Fig. 4 – The involvement of ROS in LPS-induced RANKL expression. Mouse calvarial osteoblasts were treated with 300 ng/ml LPS in the absence or presence of 20 mM NAC pretreatment for 3 hrs. The mRNA expression of RANKL were determined by RT-PCR. Band images are representative of 3 experiments with similar results.

항산화제에 의한 LPS 유도성 RANKL 발현의 억제

LPS는 파골전구세포에 직접 작용하여 파골세포 분화를 촉진할 뿐 아니라, 조골세포내 RANKL 발현을 유도함으로써 파골세포 분화를 간접적으로도 촉진하는 것이 알려져 있다.¹⁶⁾ 따라서 LPS에 의한 조골세포내 RANKL 발현이 활성산소종을 매개하는지 규명하고자 하였다. 이를 위해 항산화제 처리에 의한 조골세포내 RANKL 발현 변화를 RT-PCR로 조사하였다. 조골세포로는 마우스의 두개관에서 분리한 초기배양 조골세포를 사용하였다. LPS 처리는 조골세포내 RANKL 발현을 촉진하였으며, 그 발현 촉진 효과는 항산화제 처리로 다소 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 4). 따라서 활성산소종은 LPS의 파골전구세포에 대한 직접적인 작용뿐 아니라 조골세포에 대한 간접적인 작용도 매개하는 것으로 밝혀졌다. 본 연구를 통해 LPS에 의한 파골세포 분화 촉진을 매개하는 활성산소종의 기능이 처음으로 밝혀졌으며, 이는 체내 LPS에 의한 염증성 골손실의 새로운 발병기전을 밝히는 것과 동시에, 항산화제의 염증성 골손실 치료제로서의 가능성을 제시해주는 것이라 할 수 있다.

결론

LPS는 파골전구세포내 활성산소종의 농도를 증가시켰으며, 활성산소종은 LPS에 의한 파골세포 분화 촉진을 매개함이 밝혀졌다. 활성산소종은 파골세포 분화에 필수적인 전사인자 NFATc1

을 조절함으로써 LPS의 작용을 매개하는 한편, COX-2와 NF- κ B의 조절과는 무관한 것으로 밝혀졌다. 또한 활성산소종은 LPS에 의한 조골세포내 RANKL 발현도 매개하는 것으로 나타나, 파골전구 및 조골세포에 대한 LPS의 작용에 모두 관여하는 것으로 추정되었다.

감사의 말씀

본 연구는 보건장학회의 지원으로 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., 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., Kinoshita, 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) Nair, S. P., Meghji, S., Wilson, M., Reddi, K., White, P. and Henderson, B. : Bacterially induced bone destruction: mechanisms and misconceptions. *Infect. Immun.* **64**, 2371 (1996).
- 7) Erard, F. and Ryffel, B. : Toll like receptor - potential drug targets in infectious disease. *Infect. Disord. Drug. Targets.* **8**, 221 (2008).
- 8) Pålsson-McDermott, E. M. and O'Neill, L. A. : Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4. *Immunology* **113**, 153 (2004).
- 9) Itoh, K., Udagawa, N., Kobayashi, K., Suda, K., Li, X., Takami, M., Okahashi, N., Nishihara, T. and Takahashi, N. : Lipopolysaccharide promotes the survival of osteoclasts via Toll-like receptor 4, but cytokine production of osteoclasts in response to lipopolysaccharide is different from that of macrophages. *J. Immunol.* **170**, 3688 (2003).
- 10) Kikuchi, T., Matsuguchi, T., Tsuboi, N., Mitani, A., Tanaka, S., Matsuoka, M., Yamamoto, G., Hishikawa, T., Noguchi, T. and Yoshikai, Y. : Gene expression of osteoclast differentiation factor is induced by lipopolysaccharide in mouse osteoblasts via Toll-like receptors. *J. Immunol.* **166**, 3574 (2001).
- 11) Coon, D., Gulati, A., Cowan, C. and He, J. : The role of cyclooxygenase-2 (COX-2) in inflammatory bone resorption. *J. Endod.* **33**, 432 (2007).
- 12) Sato, N., Takahashi, N., Suda, K., Nakamura, M., Yamaki, M., Ninomiya, T., Kobayashi, Y., Takada, H., Shibata, K., Yamamoto, M., Takeda, K., Akira, S., Noguchi, T. and Udagawa, N. : MyD88 but not TRIF is essential for osteoclastogenesis induced by lipopolysaccharide, diacyl lipopeptide, and IL-1 α . *J. Exp. Med.* **200**, 601 (2004).
- 13) Suda, K., Woo, J. T., Takami, M., Sexton, P. M. and Nagai, K. : Lipopolysaccharide supports survival and fusion of preosteoclasts independent of TNF- α , IL-1, and RANKL. *J. Cell. Physiol.* **190**, 101 (2002).
- 14) Takayanagi, H. : The role of NFAT in osteoclast formation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1116**, 227 (2007).
- 15) Kaneko, H., Mehrotra, M., Alander, C., Lerner, U., Pilbeam, C. and Raisz, L. : Effects of prostaglandin E2 and lipopolysaccharide on osteoclastogenesis in RAW 264.7 cells. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.* **77**, 181 (2007).
- 16) Zou, W. and Bar-Shavit, Z. : Dual modulation of osteoclast differentiation by lipopolysaccharide. *J. Bone Miner. Res.* **17**, 1211 (2002).