작용기전이 상이한 스테로이드에 의해 초래된 마우스 골변화에 인간 부갑상선호르몬 [rhPTH(1-84)] 투여가 미치는 영향

연세대학교 대학원
의과학 사업단
최 성 희

작용기전이 상이한 스테로이드에 의해 초래된 마우스 골변화에 인간 부갑상선호르몬 [rhPTH(1-84)] 투여가 미치는 영향

지도 임 승 길 교수

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2001년 6월 일

연세대학교 대학원

의과학 사업단

최 성 희

최성희의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2001년 6월 일

감사의 글

레지던트 생활과 실험을 병용하는 것이 막연하고 어렵기만 했던 제가 여러 선생님들의 가르침으로 석사과정을 마치게 되었습니다. 언제나 지치지 않는 학구열로 저에게 자극을 주시고 연구에 대한 자세한 지도를 아끼지 않으신 임승길 교수님과 항상 연구의 중요성을 강조하시고 모범을 보이시는 허갑범, 이현철 교수님께 깊은 감사를 드립니다. 상세한 지도를 하여주신 신동환, 신규호 교수님과 육종인 교수님께도 감사 드립니다. 또한, 실질적인 실험과정에서 많은 도움을 주신 김형관, 이송철 선생님, 동료 박정엽 선생님께 감사드립니다. 언제나 사랑으로 저를 지켜주고 위로해주는 가족들과 모든 일을 이해하고 지원해주는 사랑하는 남편에게 이 논문을 바칩니다.

저 자 씀

차 례

그림 차례

표 차례

국문 요약

작용기전이 상이한 스테로이드에 의해 초래된 마우스 골변화에 인간 부갑상선호르몬 투여가 미치는 영향

최근 들어 다양한 질환군에서 장기간의 스테로이드 사용이 늘면서 이들 환자에서 골다공증이 심각한 문제로 대두되고 있다. 스테로이드 유발성 골다공증은 골형성 장애로 인한 골소실이 특징적이며 최근 들어 bisphosphanate 제제, 소량의 인간 부갑상선호르몬 치료 등이 시도되고 있으나 아직까지 뚜렷한 치료 및 예방법이 없는 실정이다. 다양한 종류의 당질코르티코이드(스테로이드)가 알려져 있으나 이제까지 알려진 스테로이드의 역가(potency)는 당질코르티코이드의 유전자적 작용(genomic action)에 근거한 것으로, 최근 당질코르티코이드의 비유전자적 작용(non-genomic action)이 알려지면서 이러한 비유전자적 작용의 임상적 의미에 대한 연구가 필요한 실정이다.

이에 본 연구에서는 작용기전이 상이한 스테로이드를 마우스에 장기간 투여하여 스테로이드의 유전자적, 비유전자적 작용의 차이가 마우스의 골변화에도 차이를 일으키는지 알아보고자 하였다. 또한 골형성을 촉진시키는 인간 부갑상선호르몬의 병용 투여가 작용기전이 다른 스테로이드로 인한 골변화에 어떤 영향을 미치는지 보고자 하였다.

실험 동물은 최대 골량을 보이는 생후 7-8주의 수컷 마우스를 사용하였고, 스테로이드는 유전자적 작용은 같고 비유전자적 작용의 차이가 6배 이상 나는 dexamethasone과 betamethasone(dexa > beta)을 사용하였다. 1군 : 대조군, 2군 : dexamethasone 투여군, 3군 : betamethasone 투여군, 4군 : dexamethasone + rhPTH(1-84) 투여군, 5군 : betamethasone + rhPTH(1-84) 투여군으로 나누었고, 마취 상태에서 골밀도를 측정한 뒤 희생하여 형태학적인 골변화를 관찰하였다.

1. 제 2군에서는 평균 체중이 증가하였음에도 다른 군과 비교하여 현저한 골밀도의 감소를 보였고, 3군에서는 뚜렷한 골밀도의 감소가 없었다.
2. 스테로이드 사용으로 인한 골밀도의 감소는 인간 부갑상선호르몬 투여에 의해 회복되는 양상을 보였는데, 4군의 경우에 골밀도의 회복 양상이 현저하였다.
3. 골수기질 간세포(mesenchymal cell)의 표시 인자인 CFU-Fs 집락수와 조기 조골세포(pre-osteoblast) 분화의 표지 인자인 ALP(alkaline phosphatase) 양성 집락수를 비교한 결과, 2군

에서는 ALP 양성 집락수의 현저한 감소를 보였으나 CFU-Fs 집락수의 감소는 없었다. 3군에서는 대조군과 유의한 차이가 없었다.

4. 제 4군의 경우 ALP 양성 집락수의 유의한 증가를 나타내었다.
5. 조골세포 분화에 따른 골질의 무기질화(mineralization)의 경우도 2군에서 유의하게 감소하고 4군과 5군에서 증가를 나타내었다.
6. 조직 형태학(histomorphometry) 분석 결과 2군에서 수질골(trabecular bone)의 양과 두께의 현저한 감소를 보였으며, 4군과 5군에서는 수질골의 양과 두께의 유의한 증가를 보였다.

이상의 결과로 수컷 마우스에서, 비유전자적 작용이 강력한 dexamethasone의 장기투여가 대조군과 betamethasone 투여군에 비하여 뚜렷한 골밀도의 감소를 가져온 것을 알 수 있다. 이러한 골밀도의 감소는 조골세포 분화의 초기 표지 인자인 ALP 양성 집락수와 mineralization의 감소로 미루어 골수기질 간세포(mesenchymal cell)에서 조기 조골세포(pre-osteoblast) 로의 분화를 강력하게 억제하는 것으로 보인다. 또한 조골세포로의 분화 과정을 억제함에 있어 in vivo 에서는 비유전자적 작용의 축적(accumulation)이 유전자적 작용보다 더욱 중요한 역할을 한다고 유추할 수 있겠다.

인간 부갑상선호르몬의 투여가 dexamethasone에 의한 골소실을 효과적으로 억제한 것으로 미루어, 그동안 밝혀진 조골세포와 골세포(osteocyte)의 세포고사(apoptosis)에 대한 억제뿐만 아니라 dexamethasone에 의한 골수기질 간세포에서 조기 조골세포로의 분화 과정 억제를 효과적으로 극복할 수 있을 것으로 생각된다. 따라서 향후 스테로이드의 사용에 있어 비유전자적 작용이 골에 미치는 영향을 고려한 스테로이드의 선택과 인간 부갑상선호르몬의 적절한 병용 투여가 스테로이드 유발성 골다공증의 예방에 중요한 역할을 할 수 있을 것으로 생각된다.

핵심되는 말 : 스테로이드, 비유전자적 작용, 골다공증, 인간 부갑상선호르몬, 조골세포

I. 서 론

스테로이드(당질코르티코이드)는 여러 가지 다양한 질환군에서 항염증(anti-inflammatory)약물 및 면역억제제로 활발히 사용되는 약물이다. 당질코르티코이드의 작용은 세포막을 통과하여 핵의 스테로이드 수용체에 결합하고 mRNA를 전사시켜 특정한 유전자의 발현, 또는 억제를 통해 작용하는 유전자적 작용(genomic action)과, 세포막에 있는 수용체에 결합하거나 직접적으로 세포내 칼슘의 유입을 감소시키는 등의 작용을 통한 비유전자적 작용(non-genomic action)으로 나눌 수 있다.[1]

Buttgereit 등이 백서의 흉선 세포를 이용한 실험에서 여러 종류의 당질코르티코이드를 가지고 작용의 차이를 비교하여 본 결과, 이미 알려진 스테로이드의 역가(potency)와는 별개로 유전자적 작용이 우세한 당질코르티코이드와 비유전자적 작용이 우세한 당질코르티코이드로 나눌 수 있었다.[2] 또 prednylidene는 prednisolone보다 약한 유전자적 작용을 가지고 있지만, prednisolone에 비해 8배 이상 큰 비유전자적 작용을 가지고 있으며, dexamethasone과 betamethasone은 동등한 유전자적 작용을 가지지만 비유전자적 작용은 dexamethasone 이 6배 이상 강하다고 보고하였다.

비유전자적 작용은 스테로이드 투여 초기(30초-1분)에 시작되고, 고용량의 스테로이드를 썼을 때 더욱 뚜렷이 관찰된다.[3-4] 임상적으로는 고용량의 스테로이드 충격 요법을 사용할 때 효과가 빠르게 나타나는 스테로이드군(예 : dexamethasone)에서 이러한 비유전자적 작용이 우세한 것을 볼 수 있다.

대다수의 스테로이드 효과는 유전자적 작용에 근거한다고 볼 수 있다. 그러나, 비유전자적 작용이 임상적으로 장기간 스테로이드를 투여했을 때, 유전자적 작용만큼의 의미를 가지고 있는지, 구체적으로 어떤 효과를 나타내는지에 대한 연구는 미흡한 실정이다.

당질코르티코이드가 골조직에 미치는 효과는 조골세포(osteoblast)와 성선 호르몬 등에 영향을 주어 골형성을 감소시키는 것이 특징적이고, 파골세포(osteoclast)의 활성화, 부갑상선호르몬의 작용 증가등을 통해 골흡수도 증가시켜 결과적으로 골량을 감소시키게 되는 것으로 널리 알려져 있다.[5-9] 특히 임상적으로 장기적인 스테로이드 사용을 하게 되는 천식이나 류마티스성 질환의 환자에서 이러한 골소실은 큰 문제로 대두되고 있다. [10-11]

Jilka 등은 마우스를 이용한 일련의 실험들을 통해 당질코르티코이드로 인한 골형성의 감소는 조골세포 형성(osteoblastogenesis) 장애와 조골세포 및 골세포의 조기 세포고사(early apoptosis) 및 세포고사

(apoptosis) 빈도를 증가시켜 발생한다고 보고하였다.[12-13] 골형성 증가의 목적으로 부갑상선호르몬(PTH)을 치료에 사용하는 경우도 증가하고 있는데, 1998년 Lane 등은 1년 이상 스테로이드 호르몬 치료를 받은 51명의 폐경 후 여성에서 1년간 400 U(25 μg)의 부갑상선호르몬을 투여한 후 측정한 골밀도 검사 결과, 요추골에서 11± 1.4 %(DXA)의 골밀도 증가, 골형성 지표로는 150 %의 증가를 가져오는 것을 보고하였다.[19-21]또한 Turner 등은 성선 절제를 시행한 백서에서 인간 부갑상선호르몬의 주기적인 투여가 조골세포 수의 증가 및 골형성의 증가를 가져오는 것을 보고하는 등[22] 동물실험을 통한 부갑상선호르몬 투여에 따른 긍정적 효과가 여러 곳에서 보고되고 있다.[23-24]

스테로이드 유발성 골다공증의 치료로는 스테로이드의 감량, 비타민 D 제제와 칼슘 제제, fluoride, bisphosphonates, thiazide, anabolic 스테로이드 등이 다양하게 사용되고 있으나 명백한 치료 및 예방에 대해 아직 정립된 것은 없는 실정이다. [14-18]

따라서 스테로이드 치료를 받는 환자에서 큰 문제로 대두되고 있는 골다공증 및 골절 등의 문제에 대한 효과적인 치료 및 예방이 매우 중요한 문제이며, 스테로이드 유발성 골다공증의 가장 중요한 기전인 골형성 장애를 개선할 수 있는 제제로서 부갑상선호르몬에 대한 더 많은 연구가 필요한 실정이다.

본 연구에서는 유전자적, 비유전자적 작용 기전의 차이가 뚜렷한 고용량의 스테로이드를 마우스에 투여하여, 골대사에 미치는 영향을 비교하여 보고자 한다. 골수기질 간세포(mesenchymal cell)에서 조골세포로의 분화 과정이나 조골세포와 골세포의 세포고사 과정이 작용기전이 다른 스테로이드 치료군간에 차이가 있는지 알아보고, 스테로이드와 동시에 인간 부갑상선호르몬 투여군을 설정하여 인간 부갑상선호르몬의 투여가 스테로이드 투여에 의한 골변화에 어떠한 영향을 주는지 알아보고자 한다.

스테로이드로 인한 골다공증을 동물에서 유발함에 있어 백서에서는 고용량의 스테로이드 투여시 오히려 역설적으로 골밀도 증가를 일으키는 실험들이 보고되고 있어[25] 실험 대상은 마우스로 정하였다. 스테로이드 투여는 유전자적, 비유전자적 작용의 차이를 최대화하기 위해 고용량(prednisolone 대비 2.1 ㎎/kg/d)을 투여하고[26] 작용기전이 다른 스테로이드를 3-4주간 투여하여 골변화의 차이를 조사하였다. 스테로이드의 선택은 유전자적 작용은 같고, 비유전자적 작용의 차이만을 가지고 있는 dexamethasone 과 betamethasone 을 선택하여 비유전자적 작용의 차이에 의한 골변화를 중점적으로 관찰하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험 동물군 및 식이

최대 골량 지수를 나타내는 7-8주(약 30-35g)의 수컷 ICR mouse 37마리를 대상으로 5개의 군으로 나누었다. 제 1군은 정상 대조군(control group, Control, n=5)으로 생리 식염수를 피하 주사하였으며, 제 2군은 dexamethasone 투여군(Dexa , n=8)으로 0.3 mg/kg의 용량으로 32일간 근육 주사하였고, 제 3군은 betamethasone 투여군으로(Beta , n=8)로 0.3 mg/kg 의 용량으로 32일간 근육 주사하였고, 제 4군은 2군과 동량의 dexamethasone을 투여하고, 인간 부갑상선호르몬 150 μg/kg를 동시에 투여하였으며(Dexa + PTH , n=8), 제 5군은 3군과 동량의 betamethasone을 투여하고 인간 부갑상선호르몬 150 μg/kg를 동시에 투여하였다. (Beta + PTH, n=8) 식이에는 특별한 제한을 두지 않고 일반 식이를 투여하였다.

2. 스테로이드 및 부갑상선호르몬 투여방법

1) 스테로이드는 32일간 근육 주사로 매일 한 차례씩, 주 5일간 투여하였다.
(betamethasone 21-phosphate 와, dexamethasone disodium-phosphate는 Sigma 에서 구입하였다.)
2) 4군과 5군에서 인간 부갑상선호르몬〔rhPTH(1-84)]은 32일간 매일 한 차례씩, 주 5일간 근육 주사로 스테로이드와 동시에 병용 투여하였다. (인간 부갑상선호르몬〔rhPTH(1-84)은 목암연구소에서 기증받은 것으로 사용하였다.)

3. 골밀도 측정

32일간 스테로이드 및 인간 부갑상선호르몬을 투여한 마우스에게 ketamine을 복강내 주사하여 마취한 후, 살아 있는 상태에서 골밀도를 측정하였다. 이중에너지 방사선 흡수법(dual energy X-ray absorptiometry, DXA, Hologic QDR-4500A, small animal program, Waltham, MA, U.S.A)을 이용하여 대조군과 스테로이드 투여군간과의 차이, 스테로이드 투여군내에서의 차이, 인간 부갑상선호르몬 병용 투여군과 스테로이드 투여군과의 차이를 비교하였다.

4. 골수기질 간세포의 분리 및 배양

각 군에서 임의적으로 2마리의 마우스를 선택하여 경추 도살법으로 희생 후 양쪽 대퇴골을 적출하였고 그 중 한쪽 대퇴골의 골수를 PBS로 수차례 세척하여 세척액을 모아 원심 분리한 후 골수기질 간세포를 얻었다. 세포 배양은 37°C, 5% CO2 incubator에서 10% fetal bovine serum(FBS)이 함유된 α-MEN으로 유지하면서 매주 2회 배지를 갈아주었고 2주간 배양하였다

5. CFU-Fs (colony forming unit-fibroblasts) 집락수

골수기질 간세포의 집락인 CFU-Fs를 확인하기 위해 배양 10일째 PBS로 수차례 세척 후 상온에서 2분간 ethanol로 고정하였다. 다시 PBS로 세척 후 crystal violet working solution(crystal violet(90-95%) : ethanol + ammonium oxalate(1%) 1: 10)을 첨가한 후 5분간 방치하였고, 광학 현미경상으로 CFU-Fs 집락수를 확인하여 수를 세었다. 양성 집락은 현미경 관찰에서 50개 이상의 세포수를 가진 집락으로 하였다.

6. ALP(alkaline phosphatase) 염색

ALP kit(No. 85L-1)는 Sigma에서 구입하였다. 먼저 citrate working solution을 희석하고 acetone과 2:3 비율로 섞어 30초간 세포를 고정하였다. 증류수로 수 차례 씻어 낸 후 Fast blue RR salt capsule를 48ml 증류수와 섞고 2ml Naphthol AS-MX phosphate alkaline solution을 diazonium salt solution 과 섞어 준비한 alkaline-dye mixture를 직사광선을 피하여 30분간 세포에 처리하였다. 증류수로 수 차례 씻어 낸 후 현미경 상에서 red violet nuclear staining된 세포 집락수를 세었다. 양성 집락은 현미경 관찰에서 50개 이상의 세포수를 가진 집락으로 하였다.

7. 무기질 침착

조골세포 분화의 후기 표지 인자인 무기질 침착은 von Kossa 염색으로 확인하였으며, 방법은 배양된 세포층을 PBS 로 여러 번 씻은 후 5분간 ethanol로 고정하고 1% AgNO3(1% AgNO3 : 1 g/100 ml)를 넣어 태양빛에 30분간 노출하였다. 이후 증류수로 다시 여러 번 씻은 후 2.5% sodium thiosulphate(2.5 g/100 ml)를 넣어 5분간 방치한 후 다시 증류수로 씻은 후 칼슘 침착에 의해 나타나는 흑색점을 관찰하였다.

8. 조직학 소견

마우스 대퇴골 원위부의 secondary spongiosa부위에서 통상적인 Hematoxylin & Eosin 염색을 시행하고 골변화를 관찰하였다.

9. 조직 형태계측학적 분석(Histomophometry)

조직학적 관찰 후 sample을 선택하여 사진으로 전환 후에 Pixel digital analysis program (연세대학교 컴퓨터공학과 제공)을 통하여 각각의 피질골과 수질골의 면적과 길이를 계산하였다. 면적내에 포함된 pixel의 수를 세어 1개 pixel 면적과 곱하여 면적을 계산하고, 1개 pixel의 길이와 계측된 pixel의 수를 곱하여 골길이를 측정하였다. 계측 방법은 1990년 Podenpahnt 등이 Denish Medical Bulletin에 발표한 방법을 따랐다.[27]

피질골(cortical bone)

전체 피질 면적, Cortical tissue area(cor area) : 직접 면적을 잰다.
피질골 면적, Cortical mineralized bone area(cor min area) : 전체 피질 면적 – 피질 조직 중 다공(pore)형성 부분을 제외한 면적
피질골 두께, Corrected cortical width(CCW) : 피질골 면적/세로 피질골 길이
피질골 다공성, Cortical porosity (Cor por) : 피질골 면적/전체 피질면적 x 100%

수질골(trabecular bone)

수질골 양, Trabecular bone volume(TBV) : 수질골 면적/전체 수질골 조직의 면적 x 100%
평균 수질골 두께, Mean trabecular plate thickness(MTPT) : 수질골 면적x2/수질골의 둘레

10. 통계처리

골밀도 결과는 평균 표준편차로 t-test를 이용하여 나타내고, 각 군간의 차이는 일원원산분석(ANOVA)를 이용하였다. 통계적 유의 수준은 p 값 0.05 미만으로 하였다.

III. 결 과

1. 각 군간의 골밀도 비교

스테로이드와 인간 부갑상선호르몬을 32일간 투여한 후 각 군간에 골밀도를 비교하여 보았을 때, 2군에서 현저하게 골밀도가 저하되는 것을 관찰할 수 있었다. 상기 결과는 2군의 몸무게가 정상 대조군에 비하여 증가된 것을 고려하였을 때 상당한 골밀도의 감소를 초래한 것을 알 수 있다. 그러나 3군에서는 2군에 비하여 골밀도 감소가 유의하지 않았다.

인간 부갑상선 투여군의 경우, 각각의 스테로이드 투여군에 비하여 유의한 골밀도 증가를 가져왔으며 이러한 골밀도 증가는 4군에서 더욱 뚜렷하였다.
(표 1, Figure 1).

표 1. 각 군의 체중과 골밀도 수치의 비교

Group	Initial Wt.(g)	Last Wt.(g)	Area(cm^2)	BMC(g)	BMD (cm^2/g)
1군 (Control)	31.95 ± 2.43	35.46 ± 1.61[a]	10.82 ± 0.68	0.87 ± 0.06	0.081 ± 0.013
2군 (Dexa)	31.86 ± 1.99	39.69 ± 1.81	11.09 ± 1.15	0.87 ± 0.1	0.078 ± 0.085[d]
3군 (Beta)	32.66 ± 1.78	37.42 ± 1.71[b]	10.59 ± 0.96	0.85 ± 0.07	0.080 ± 0.045
4군 (Dexa+PTH)	32.06 ± 1.78	40.89 ± 2.36	12.38 ± 1.25[c]	1.05 ±0.11	0.085 ± 0.01[e]
5군 (Beta+PTH)	31.89 ± 1.95	39.32 ± 1.39	11.76 ± 0.68	0.98 ± 0.12	0.082 ± 0.05

a: 2군,4군,5군과 비교시 $p<0.05$, b : 4군과 비교시 $p<0.05$
c : 1군,3군과 비교시 $p<0.05$, d : 1군,4군,5군과 비교시 $p<0.06$
e : 2군,3군과 비교시 $p<0.05$
BMC :Bone Mineral Content BMD : Bone Mineral Density

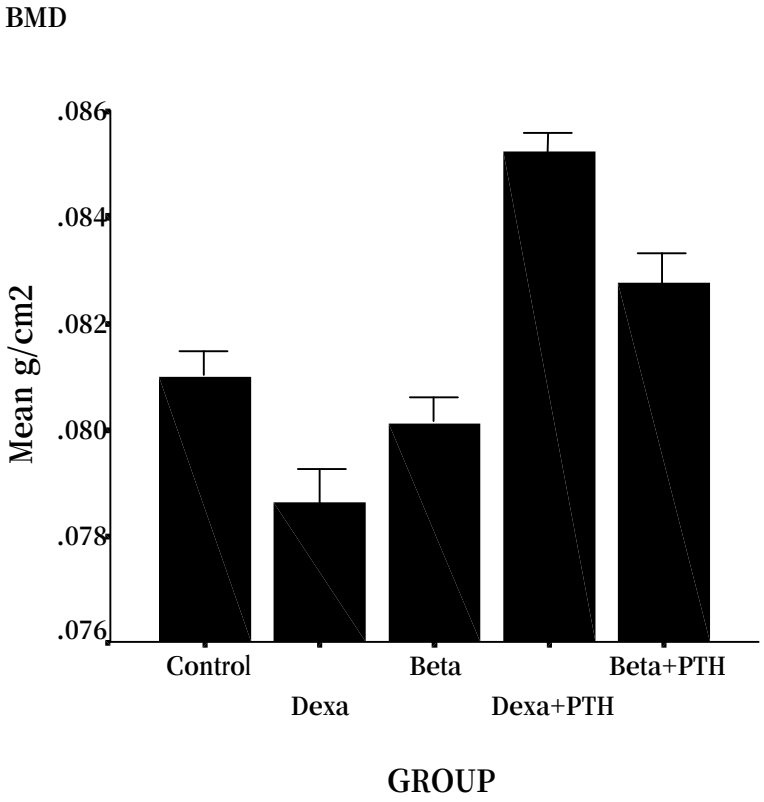

Figure 1. 스테로이드와 부갑상선호르몬 투여후
각 군간의 골밀도 비교

2. CFU-Fs 및 ALP 양성 집락수의 비교

골수기질 간세포(mesenchymal cell)를 나타내는 CFU-Fs 집락수와 조골세포 분화의 초기(pre-osteoblast) 표지 인자인 ALP 양성 집락수를 비교하여 보았다.

2군에서 CFU-Fs 집락수는 가장 많고(n=207 vs Control, n=158) ALP 양성 집락수는 가장 적었다.(n=164 vs Control, n=212) 제 4군의 경우 CFU-Fs 집락수는 다른 군과 통계학적인 차이가 없었고 ALP 양성 집락의 수는 유의하게 증가하였다.(n=318 vs Control, n=212) 3군에서는 2군에서와 같은 CFU-Fs 증가는 관찰되지 않았고 ALP 양성 집락수에서는 대조군과 통계학적으로 유의한 차이가 없었다.
(Figure 2, 3).

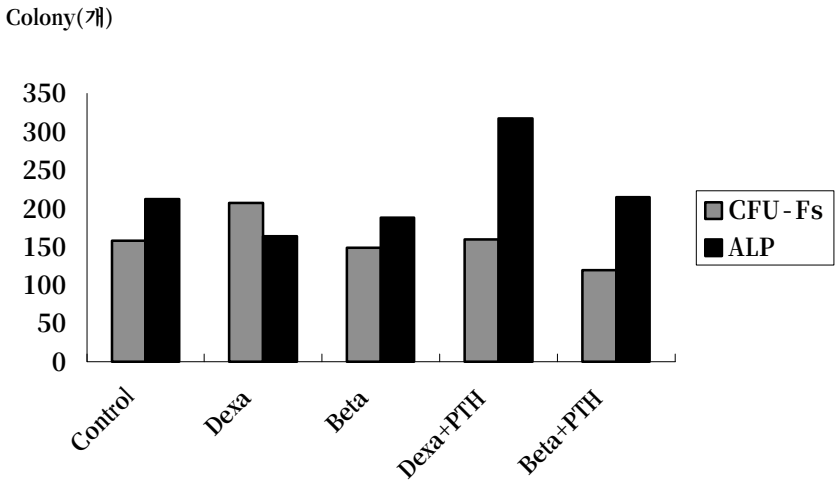

Figure 2. 각 군에서의 CFU-Fs 와 ALP 집락수

Figure 3. 각 군간의 CFU-Fs 와 ALP 집락수 비교

3. 무기질화

조골세포 분화로 인한 골질의 무기질화(mineralization)를 관찰하였다. 실험 당시 자외선양이 충분하지 않아 von Kossa 염색이 흐리게 되었지만, 대조군인 1군과 스테로이드 투여군인 2군과 3군에 비해 부갑상선 호르몬 투여군인 4군과 5군에서 무기질화가 증가함을 알 수 있었다. (Figure 4).

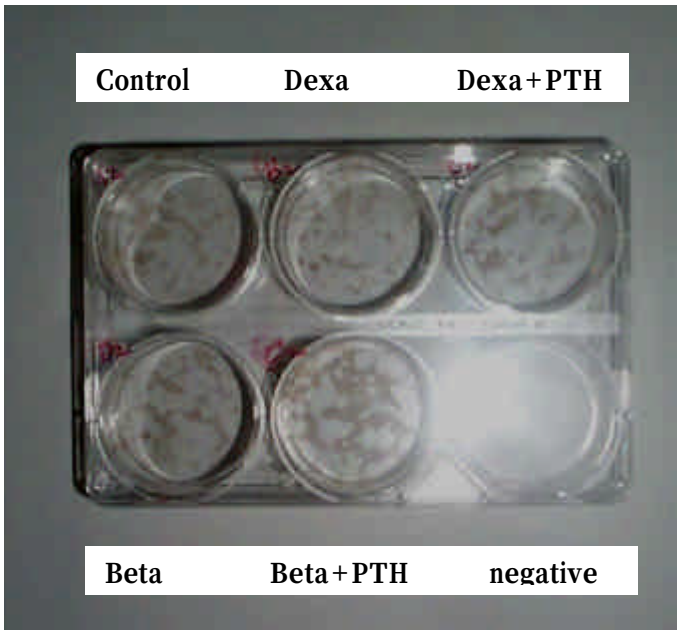

Fig 4. 각 군간의 무기질화 비교(von Kossa stain)

4. 조직학적 변화

Dexamethasone 투여군인 2군에서 수질골(trabecualr bone)의 현저한 감소가 관찰되었으며 인간 부갑상선 투여군인 4군과 5군에서 수질골의 뚜렷한 증가를 보이는 것을 관찰할 수 있다. (Fig 5).

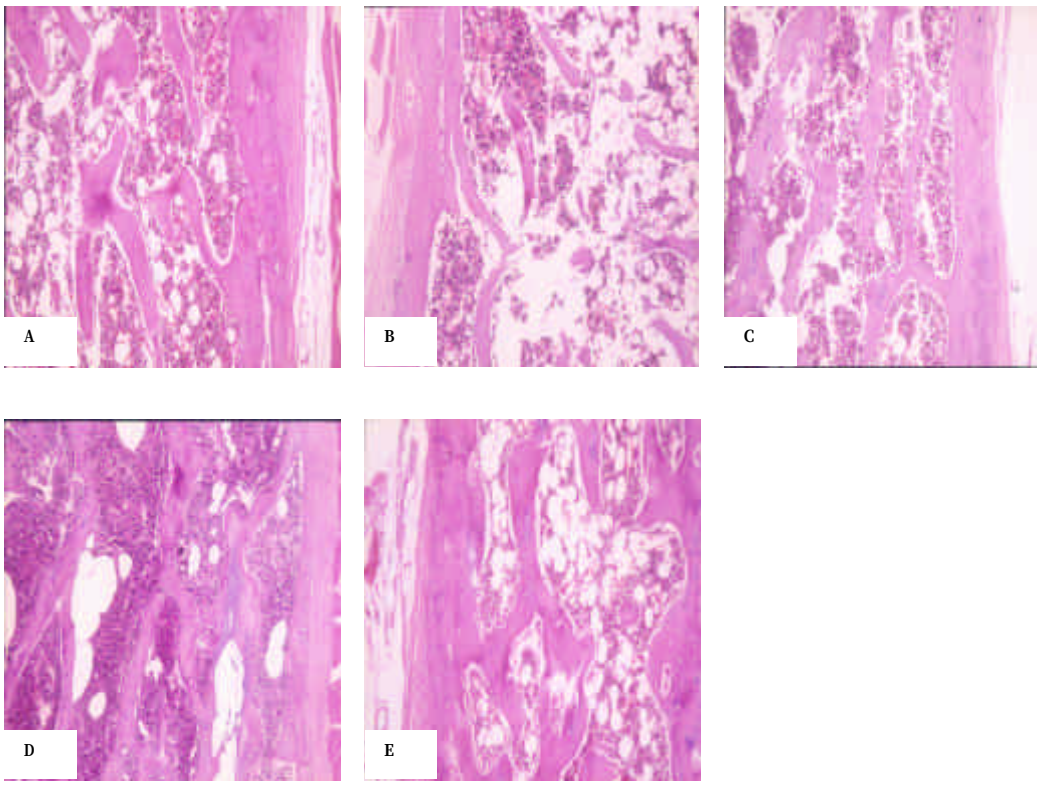

Fig 5. 각 군간의 조직학적 변화
(대퇴골 원위부의 secondary spongiosa부분, H&E stain, ×100)

A : 1군 (Control) B : 2군 (Dexa) C : 3군 (Beta)
D : 4군 (Dexa + PTH) E : 5군 (Beta + PTH)

5. 조직 형태 계측학적 분석

1군과 비교하여 steroid 투여군인 2군과 3군에서 수질골(trabecular bone)의 양과 두께에서 현저한 감소를 보였으며 피질골(cortical bone)은 큰 차이가 없었다. 4군과 5군에서는 수질골의 양과 두께가 현저하게 증가되었으며, 피질골에서는 두께는 약간 증가하나 다공성(porosity)은 증가하였다.

표 2. 각 군간의 피질골과 수질골의 면적 비교

	피질골		수질골	
	Cor por(%)	CCW@	TBV(%)	MTPT§
1군(control)	99.3	422.1	20.2	86.97
2군(Dexa)	98.3	424.6	14.9	76.65
3군(Beta)	96.9	427.2	18.8	84.72
4군(Dexa+PTH)	94.3	506.8	31.3	131.67
5군(Beta +PTH)	93.9	482.7	28.7	120.76

Cor por(cortical porosity), CCW(corrected cortical width)
TBV(trabecualr bone volume), MTPT(mean trabecular plate thickness)
@ CCW단위 : pixel(1 pixel 면적=4.92×10^{-5} ㎠)
§ MTPT 단위:pixel(1 pixel 길이=68 ㎛)

IV. 고 찰

다양한 질환군에서 스테로이드의 사용 빈도와 장기 사용 환자가 늘어나면서 스테로이드로 인한 전신적, 국소적 합병증이 큰 문제로 대두되고 있다. 특히 스테로이드 유발성 골다공증은 골형성 장애로 인한 골소실이 심하고, 장기간의 스테로이드 사용을 고려할 때, 초기 6개월에서 1년 사이에 골밀도 감소가 심한 특징을 가지고 있어 이의 예방 및 치료가 중요하다. 스테로이드의 작용은 핵 내 수용체 결합 후 표적 유전자 전사를 조절하는 유전자적 작용 외에, 핵 내의 수용체를 경유하지 않는 비유전자적 작용도 중요한 역할을 할 수 있는 것으로 제시되고 있다. 스테로이드의 비유전자적 작용은, 1940년 Hens 등이 progesterone의 마취효과가 핵 내 수용체의 결합과 무관하게 나타남을 보고한 이래로, estrogen의 혈관 내피세포에서 칼슘 유입과정, 고용량의 스테로이드 사용시 수분이내에 염증세포막의 안정화로 항아나필락시스(antianaphylaxis)효과를 나타내는 등이 알려져 있으나, 장기간의 스테로이드 사용시 골에 미치는 비유전자적 작용의 임상적인 의미에 대한 연구는 거의 밝혀진 바가 없다.

스테로이드 유발성 골다공증은 조골세포 형성의 억제와 조골세포의 세포 고사를 증가시켜 골형성 장애를 일으키는 것이 특징적이다. 한편 Lane등은 폐경기 여성에서[19], Turner 등은 백서에서 부갑상선호르몬 치료로 골밀도 및 골형성지표를 증가시키는 것을 보고하였다.[22] 하지만, 스테로이드 투여와 동시에 부갑상선호르몬을 병용 투여하여 스테로이드로 인한 골변화를 예방할 수 있는가에 대한 보고는 거의 없는 실정이다.

따라서 본 연구에서는 첫째, 유전자적 작용은 같으나 비유전자적 작용의 차이가 6배 이상 나는 dexamethasone 과 betamethasone을 장기적으로 투여한 마우스군에서 양군간 골변화의 차이가 있는지를 보려고 하였다. 스테로이드의 용량은 비유전자적 작용을 최대화 하기 위하여 고용량 (prednisolone 대비 2.5 ㎎/㎏)을 사용하였다. 둘째, 인간 부갑상선호르몬을 작용 기전이 다른 스테로이드와 동시에 투여하여 스테로이드로 인한 골변화에 미치는 영향을 보고자 하였다.

본 실험에서 작용 기전이 다른 스테로이드가 마우스의 골밀도에 미치는 영향을 보면, 비유전자적 작용이 강한 dexamethasone 투여군(2군)에서 betamethasone 투여군(3군) 및 정상 대조군에 비하여 유의한 골밀도의 감소를 보였다. ALP 양성 집락수는 초기 조골세포 분화를 나타내는 지표로서 dexamethsone(2군) 투여군에서 현저한 감소를 보였으며 betamethasone(3군) 투여군에서는 대조군보다는 감소하였으나, 2군에서와 같은 유의한 감소는 없었다. CFU-Fs는 골수기질 간세포의 수를 반영하는데 CFU-Fs 집락수는 dexamethasone 투여군에서 오히려 증가하

는 소견을 보였다. 따라서 dexamethasone 투여군의 경우 CFU-Fs 집락수의 감소없이 ALP 양성 집락수의 현저한 감소를 초래하였으며, ALP 양성 집락수의 감소가 betamethasone 투여군보다 뚜렷하였다. 조골세포 분화의 후기 인자인 무기질화를 비교하였을 때 스테로이드 투여군에서 감소하고, 인간 부갑상선호르몬 투여군에서 유의하게 증가하였다.

이러한 결과를 종합하여 보면, dexamethasone과 betamethasone이 유전자적 작용에서는 차이가 없는 약물인 것을 고려할 때, dexamethasone의 강력한 비유전자적 작용이 마우스의 골밀도 감소에 유전자적 작용보다 더 큰 영향을 미친 것으로 해석할 수 있겠다. 그리고 이러한 골밀도의 감소는 비유전자적 작용이 골수기질 간세포 자체의 억제에는 큰 영향이 없으나, 골수기질 간세포에서 조골세포로의 분화를 강력히 억제하여 골형성을 억제한 것으로 유추할 수 있겠다. 그러나, CFU-Fs 집락수의 증가가 조골세포 분화 억제로 인한 정체 현상(arrest)에 의한 것인지, 골수기질 간세포 자체의 자가 증식(self renewal)에 dexamethasone의 비유전자적 작용이 영향을 미친 것인지에 대해서는 본 실험만으로는 예측할 수 없었다. 또한 Manolagus[28], Welsh[29] 등의 in vitro 실험에서는 고용량의 스테로이드 처리가 골수기질 간세포의 수를 오히려 감소시킨 보고들이 있었는데, in vitro 상에서 단기간 동안 세포배양을 한 실험들로써 본 실험과 같이 in vivo 에서 장기간 스테로이드를 노출시킨 환경과는 차이가 있어 향후 in vivo 상에서의 연구가 필요할 것으로 생각된다.

인간 부갑상선호르몬 투여군의 경우, 각각의 스테로이드와 병용 투여한 군 모두에서 골밀도 증가와 ALP 양성 집락수의 증가를 가져왔다. 하지만 이러한 골밀도 증가와 ALP 양성 집락수의 증가는 dexamethasone과의 병용 투여군(4군)에서 betamethasone과 병용 투여한 군(5군)보다 유의하게 증가되었다. 인간 부갑상선호르몬의 투여에 의한 효과는 Jilka 등이 일련의 실험을 통해 조골세포로의 분화 촉진보다는 조골세포와 골세포의 세포고사를 강력하게 억제시켜 골형성을 증가시키는 것으로 알려져 왔다.[12-13] 그러나 ALP 양성 집락수와 무기질화의 현저한 증가를 가져온 본 실험의 결과로는, 인간 부갑상선호르몬의 병용 투여가 스테로이드로 인한 조골세포 분화 과정 억제를 효과적으로 극복할 수 있는 것으로 생각된다. 특히 dexamethasone과의 병용 투여군에서 더욱 큰 효과를 가져온 것은 부갑상선호르몬이 스테로이드의 비유전자적 작용을 더욱 강력히 억제하는 것으로 생각된다.

형태 계측학적으로는, 스테로이드 투여군에서 수질골의 양과 두께의 감소를 보였으며, 이러한 변화는 dexamethasone 투여군에서 뚜렷하였다. 인간 부갑상선호르몬과의 병용 투여군에서는 수질골의 양과 두께의 현저한 증가를 보였고, 피질골의 경우 두께는 증가하였으나 다공성이 커지는 것을 관찰하였다. Calvil 등은 최근 실험에서 부갑상선호르

몬 수용체의 지속적인 자극이 수질골의 양과 두께는 현저히 증가시키나, 피질골에서는 다공성의 증가와 두께의 감소를 가져온다고 보고하였다.[30] 따라서 부갑상선호르몬의 간헐적인 투여가 수질골의 증가에는 확실한 효과가 있는 것으로 생각되나, 주로 피질골로 구성되는 대퇴골경부등에서는 부갑상선호르몬의 투여로 인한 피질골의 다공성 증가로 오히려 골절을 유발할 수 있다는 우려도 있다.

결론적으로 마우스에서 비유전자적 작용이 강한 스테로이드의 장기투여는 조골세포 분화를 강력하게 억제하여 골밀도의 감소를 초래하며, 인간 부갑상선호르몬의 병용 투여가 이러한 스테로이드의 비유전자적 작용을 효과적으로 억제하여 골형성 장애를 극복할 수 있는 것으로 생각된다.

V. 결 론

최대 골량 지수를 나타내는 생후 7-8주의 수컷 마우스에서 작용기전이 상이한 스테로이드인 betamethasone과 dexamethasone을 32일간 장기투여한 군과 인간 부갑상선호르몬을 초기부터 병용 투여한 군에서 다음의 결과를 얻었다.

1. 비유전자적 작용이 강한 dexamethasone을 투여한 군에서 대조군과 비교해 유의한 골밀도의 감소를 보였다.
2. dexamethasone에 의한 골밀도의 감소는 조골세포 분화의 표지인자인 ALP 양성 집락수와 무기질화의 현저한 감소를 고려할 때 골수기질 간세포에서 조골세포로의 분화를 강력히 억제하여 골형성을 감소시킨다고 볼 수 있다.
3. 스테로이드 투여와 동시에 인간 부갑상선호르몬을 투여한 군에서는 골밀도가 증가하였고, ALP 양성 집락수와 무기질화의 유의한 증가를 나타냈다. 이러한 결과는 비유전자적 작용이 강한 dexamethasone과의 병용 투여군에서 현저하였다.

이상의 결과로, 스테로이드의 강력한 비유전자적 작용의 축적이 골형성 장애에 많은 영향을 미치고, 인간 부갑상선호르몬의 병용 투여는 스테로이드의 비유전자적 작용을 효과적으로 억제할 수 있는 것으로 생각된다. 향후 비유전자적 작용을 고려한 스테로이드의 선택과 부갑상선호르몬의 적절한 병용 투여가 스테로이드 유발성 골다공증의 치료에 중요한 역할을 할 것으로 생각된다.

참고문헌

1. Buttgerit F, Wehling M, Burmester GR. A new hypothesis of modular glucocorticoid actions : Steroid treatment of rheumatic diseases revisited. Arthritis Rheum 1998;41:761-767.
2. Buttgerit F, Brand MD, Burmester GR. Equivalent doses and relative drug potencies for non-genomic glucocorticoid effects : A novel glucocorticoid hierachy. Biochem Pharmacol 1999;58:363-368.
3. Berger C.E.M, Horrocks BR, Datta HK. Direct non-genomic effect of steroid hormones on superoxide anion generation in the bone resorbing osteoclasts. Mol Cell Endocrinol 1999;149:53-59.
4. Sanden S, Tripmacher R, Weltrich R. Glucocorticoid dose dependent downregulation of glucocorticoid receptors in patients with rhematic diseases. J Rheumatol 2000;27:1265-1270.
5. Dempster D. Bone histomorphometry in glucocorticoid-induced osteoporosis. J Bone Miner Res 1989;4:137-141.
6. Reid IR. Pathogenesis and treatment of steroid osteoporosis; Clin Endocrinol 1989;30:83-103.
7. Chyun YS, Kream BE, Raisz LG. Cortisol decreases bone formation by inhibiting periosteal cell proliferation. Endocrinology 1984;114:477-480.
8. Weinstein RS, Jilka RL, Parfitt MF. Inhibition of osteoporosis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids; Potential mechanisms of their deleterious effects on bone. J Clin Invest 1998;102:274-282.
9. Fitzpatrick LA. Glucocorticoid-induced osteoporosis. Osteoporosis Int 1994;202-226.
10. Adinoff AD, Hollister JR. Steroid-induced fractures and bone loss in patients with asthma. N Engl J Med 1983;309:265-268.
11. Cortet B, Flipo RM, Blanckaert F. Evaluation of bone mineral density in patients with rheumatoid arthritis: Influence of disease activity and glucocorticoid therapy. Revue Du Rhumatisme 1997;64:451-458.
12. Jilka RL, Weinstein RS, K. Takahashi. Linkage of decreased bone mass with impaired osteoblastogenesis in a murine model of accelerated senescence. J Clin Invest 1996;97:1732-1740.
13. Jilka RL, Weinstein RS, Bellido T. Osteoblast programmed cell death(apoptosis): modulation by growth factors and cytokines. J

Bone Miner Res 1998;13:793-802.
14. Aloia JF, Vaswani A, Neunier PJ. Coherence treatment of postmenopausal osteoporosis with growth hormone and calcitonin. Calcif Tissue Int 1987;40:253-259.
15. Aloia JF, Vaswani A, Kapoor A. Treatment of osteoporosis with calcitonin, with and without growth hormone. Metabolism 1985;34:124-128.
16. Eastell R, Reid DM, Compstone J. A UK consensus group on management of glucocorticoid-induced osteoporosis: an update. J Intern Med 1998;244:271-292.
17. Adachi JD, Bensen WG, Brown J. Intermittent etidronate therapy to prevent glucocorticoid-induced osteoporosis. N Engl J Med 1997;337: 382-387.
18. Reginster JY, Henrotin Y, Gosset C. Promising new agents in osteoporosis. Drugs RD 1999;1:195-201.
19. Lane NE, Sanchez S, Modin GW. Parathyroid hormone treatment can reverse corticosteroid-induced osteoporosis. J Clin Invest 1998;102:1627-1633.
20. Wunsch H. Parathyroid hormone may reverse corticosteroid bone effects. Lancet1998;352:1362.
21. Manolagas SC, Jilka RL, Weinstein RS. Parathyroid hormone and corticosteroid-induced osteoporosis. Lancet 1998;352:1940.
22. Turner RT, Evans GL, Cavolina JM. Programmed administration of parathyroid hormone increases bone formation and reduces bone loss in hindlimb-unloaded ovariectomized rats. Endocrinology 1998;139:4086-4091.
23. Jilka RL, Weinstein RS, Roberson P. PTH increases bone formation by postponing osteoblast apoptosis, not by increasing precursor proliferation. Bone 1998;23 Suppl:519.
24. Kroll MH. Parathyroid hormone temporal effects on bone formation and resorption. Bull Math Biol 2000;62:163-188.
25. King CS, Weir EC, Gundberg CW. Effects of continuous glucocorticoid infusion on bone metabolism in the rat. Calcif Tissue Int 1996;59:184-191.
26. Lipworth BJ. Therapeutic implications of non-genomic glucocorticoid activity. Lancet 2000;356:87-88.
27. Pidebohant J. Methodological problems in bone fistomorphometry and its application in postmenopausal osteopotosis. Denish Medical Bulletin 1990;37:424-433.

28. Manolagas SC, Weistein RS. New developments in the pathogenesis and treatment of steroid induced osteoporosis. J Bone Miner Res 1999:14:1061-1066.
29. Walsh S, Jordan R, Jefferiss C, Srewart K, Beresford JN. High concentrations of dexamethasone suppress the proliferation but not the differentiation or further maturation of human osteoblast precursors in vitro : relevance to glucocorticoid-induced osteoporosis. Rheumatology 2001;40:74-83.
30. Calvi LM, Sims NA, Hunzelman JL, Knight MC, Giovannetti A, Saxton JM. Activated parathyroid hormone/parathyroid hormone-related protein receptor in osteoblastic cells differentiation affects cortical and trabecular bone. J Clin Invest 2001;107:277-286.

Abstract

The Effects of Recombinant Human Parathyroid Hormone [rhPTH(1-84)] on Bone Change Induced by Glucocorticoids with Different Action Mechanisms in Mice

Seung Hee Choi

Division of Medical Sciences
The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Sung-Kil Lim)

The long-term use of steroids in treating patients with various diseases have been increasing, and the side effects of steroids, especially osteoporosis becomes a serious problem. Defects in bone formation, which cause significant bone loss, is a pathognomonic findings in steroid induced osteoporosis. Trabecular bone is affected more markedly than cortical bone. Many methods, such as replacement of calcium and active form Vit D, fluroride or anabolic steroids, bisphosphanates, low dose PTH administration, etc, were tried for the treatment. But, there was no clear consensus about treatment and prevention guidelines. Variable steroids have been known for their classical or genomic activity via glucocorticoid-

responsive elements on genomic DNA. There is no doubt that the therapeutic effects of glucocorticoids are mostly receptor-mediated. However, in recently, there is growing evidence that there is also non-genomic activity of glucocorticoids, via cytosolic receptor or via non-specific physicochemical activity. Therefore, It is necessary to verify a clinical significance of non-genomic action of glucocorticoid on bone.

In this experiment, we tried to find whether there was difference of genomic and non-genomic action in changes of mouse bones. We also tried to find the impact of combining human parathyroid hormone, which facilitates bone formation, on changes of bone induced by steroids with different mechanisms. We used 7-8 weeks old male mouse, which had maximal bone density at this stage. For the steroid, we have chosen dexamethasone and betamethasone. They have the same genomic action but have a 6-fold difference for non-genomic action. The bone density was measured under anesthetic condition and then changes of bone was analyzed by QDR 4500A(Hologic, Waltham, MA,USA). They were divided into 5 groups as ; group 1 : control, group 2 : dexamethasone for 32 days, group 3 : betamethasone for 32 days, group 4 : dexamethasone and rhPTH(1-84) for 32 days, group 5 : betamethasone and rhPTH(1-84) for 32 days.

1. In group 2, although the average weight was increased, the bone mineral density was decreased significantly, compared to other groups. The bone density reduction was not significant in group 3.
2. Such reduction of the bone density tended to be improved with human parathyroid hormone applied, particularly in group 4.
3. Comparision of the mesenchymal cell indicator, CFU-Fs colony, and the pre-osteoblast segmentation indicator, ALP (alkaline phosphatase) positive colony, suggested that in group 2, there was a marked reduction in the number of ALP positive colony while no change in CFU-Fs colony.
4. The number of the ALP positive colony increased significantly in group 4.
5. von Kossa stain, which shows mineralization, the late indicator of the differentiation of osteoblast, was decreased in group 2 and increased in group 4 and 5.
6. Histomorphometrical study demonstrated that the volume and thickness of the trabecular bone decreased in group 2 and increased in group 4 and 5.

From the above results, we have shown that a long-term treatment

with dexamethasone, which contains a strong non-genomic action, brought up marked reduction in the bone mineral density, compared to betamathasone treatment. Reduction of bone mineral density might be due to inhibition of differentiation from mesenchymal cell into osteoblast lineage, based on both the numbers of ALP positive colonies for early osteoblast and mineralization.

These findings suggested that the accumulation of the non-genomic action of glucocorticoids has a greater impact on bone than genomic action in vivo. Injecting human parathyroid hormone has successfully inhibited the loss of bone density by dexamethasone.

In conclusion, for the use of steroid in the future, non-genomic action for defects of bone formation in steroid induced osteoporosis should be considered, and the combined administration of parathyroid hormones might play an important role for prevention of bone loss.