

## 미숙아 구루병의 병인에서 골흡수 Cytokine의 역할

연세대학교 의과대학 소아과학교실

남궁란 · 오창희 · 박민수 · 박국인 · 이 철 · 한동관

- Abstract -

### Bone Resorbing Cytokines in Rickets of Prematurity

Ran Namgung, Chang Hee Oh, Min Soo Park, Kook-In Park,  
Chul Lee, Dong Gwan Han

Department of Pediatrics, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Interleukin-6 (IL-6), produced by stromal-osteoblastic cells in response to interleukin-1 (IL-1), parathyroid hormone (PTH) and 1,25-dihydroxyvitamin D [1,25(OH)<sub>2</sub>D], stimulates early osteoclast formation and bone resorption cooperatively with IL-1 in vivo. In adult osteoporosis, serum IL-6 is increased related to the loss of gonadal function and bone loss. Possible role of bone resorbing cytokines in rickets of prematurity has not been studied. In rickets of prematurity, we showed high serum cross-linked carboxyterminal telopeptide of type I collagen (ICTP, bone resorption marker) and osteocalcin (bone turnover marker) vs. controls; and high serum PTH and 1,25(OH)<sub>2</sub>D (Pediatr Res 35:317A, 1993). We hypothesized that serum IL-6 and IL-1 $\beta$  would be high in preterm infants with rickets compared with infants without rickets; and bone turnover markers will be positively correlated with bone resorbing cytokines, reflecting increased osteoclastic activity by bone resorbing cytokines.

Radiographic rickets was diagnosed in 17 preterm infants aged  $37 \pm 12$  d (mean  $\pm$  SD) in Korea, gestational ages  $30.5 \pm 1.7$  wk and birth weight  $1333 \pm 135$  g. Fourteen controls ( $31.1 \pm 2.4$  wk and  $1360 \pm 172$  g) had normal bone x-rays and serum biochemistry at enrollment ( $43 \pm 15$  d). Serum IL-6 and IL-1 $\beta$  were measured by enzyme immunoassay (Genzyme, Cambridge, MA). In rickets vs. controls, serum IL-6 concentration was similar (median with ranges; 43.5 [3.91~120.1] vs. 37.8 [0.82~81.3] pg/mL, p=0.9); serum IL-1 $\beta$  was similar (8 [2.2~59.3] vs. 7.9 [0.72~17.6] pg/mL, p=0.8). In rickets, serum ICTP was positively correlated with serum IL-1 $\beta$  ( $r=0.677$ , p=0.03); serum osteocalcin was negatively correlated with serum IL-6 ( $r=-0.846$ , p=0.001). Serum IL-6 or IL-1 $\beta$  did not correlate with serum PTH or 1,25(OH)<sub>2</sub>D. Since serum ICTP positively correlated with serum IL-1 $\beta$ ; and serum osteocalcin negatively correlated with serum IL-6, we suggest that IL-6 and IL-1 $\beta$  may be involved in the high bone turnover in rickets of prematurity, but the relationships are complex.

**Key Words:** Interleukin-6, Interleukin-1 $\beta$ , Rickets, Preterm infants, Bone turnover

\*책임저자: 남궁란, 전화 361 5525, fax 393 9118

## 서 론

미숙아 구루병은 집중치료를 요하는 극히 출생체중아의 30~50%에서 발생되는 것으로 보고되고 있으며<sup>1,2)</sup>, 최근 과거에는 생존이 어려웠던 초미숙아의 생존율이 증가함에 따라 미숙아 구루병의 발생이 점차 증가되어 심각한 문제로 대두되고 있다. 미숙아 구루병의 발생에는 여러 요인이 복합적으로 관여되어 있으며, 출생체중, 수태 후 연령, 출생 후 무기질 섭취상태 및 vitamin D 영양상태 등이 관여되며, 이중 특히 출생 후 무기질 섭취의 부족이 구루병 발생에 일차적인 원인 요소로 생각된다<sup>3~5)</sup>.

저자 등의 예전 연구에서, 미숙아 구루병 환자의 혈청 인농도가 현저히 낮았고, 혈청 parathyroid hormone (PTH) 및 1,25-dihydroxyvitamin D [1, 25(OH)<sub>2</sub>D]의 농도가 증가되어 있어, 이는 체내 무기질 결핍상태를 반영하는 것으로 생각되었다<sup>6)</sup>. 미숙아 구루병에서 골대사의 변동에 칼슘조절호르몬의 변동 (증가된 PTH 및 1,25(OH)<sub>2</sub>D)이 관여될 것으로 보이며, 골 미세환경에서 생성되는 cytokine들의 영향으로 골 흡수 및 골형성에 변화가 있을 것으로 기대된다. 미숙아 구루병의 병인은 아직 명확히 밝혀지지 않았으나, 골무기질이 감소되어 있는 미숙아에서 골 흡수의 지표인 소변 pyridinium cross-links 배설이 만삭아에 비교하여 증가되어 있고<sup>7)</sup>, 혈청 cross-linked carboxyterminal telopeptide of type I collagen (ICTP)와 혈청 osteocalcin 농도가 증가되어 있어<sup>6)</sup>, 골대사회전이 증가되어 있는 상태가 미숙아 골감소증의 발생에 근간이 되리라 생각된다<sup>6,7)</sup>.

골세포 (조골세포와 파골세포)의 활성은 전신성 호르몬과 골 미세환경에서 형성되는 cytokine들의 조절하에 있다. 이들 요소들은 조골세포나 파골세포 및 이들의 전구세포에 직접적으로 작용하거나, 매개세포에 간접적으로 작용하여 골세포의 형성, 분화 및 기능을 조절하는 것으로 보인다<sup>8)</sup>. Interleukin(s)-1, -6, 및 -11 (IL-1, IL-6, IL-11) 등은 파골세포의 형성을 자극하여 골 흡수를 증가시킨다. 파골세포의 과도한 활성에 의한 골 흡수의 증가가 특징인 여러 질병의 병인에서 IL-6 생성의 upregulation 및 그 작용이 관여되어 있음이 밝혀지고 있다<sup>9)</sup>.

IL-6는 PTH, IL-1 및 tumor necrosis factor- $\alpha$

(TNF- $\alpha$ )에 의해 자극된 골수의 기질-조골세포에서 생성되며 파골세포의 형성을 자극하여 강력한 골 흡수의 증가를 일으킨다<sup>10)</sup>. PTH나 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, 및 IL-1의 골 흡수에 대한 영향은 아마도 부분적으로는 조골세포에 의한 IL-6 생성을 통하여 매개되는 것으로 보인다. IL-1은 단핵구/대식세포 및 조골세포에서 생성되며, IL-1의 기능은 일차적으로 국소적 (autocrine/paracrine)으로 작용하며, 뼈에 대한 영향은 복합적이어서 강력한 골 흡수작용이 있으며, 골형성을 억제하기도 하고, 어떤 경우에는 골형성을 자극하기도 한다<sup>11)</sup>. 골대사에 대한 IL-1의 영향으로 볼 때, 골질환의 병인에 IL-1이 관여되어 있을 것으로 보인다.

미숙아 구루병의 병인에서 골 흡수에 관련된 cytokine들의 역할에 대하여 현재까지 연구 보고된 바 없다. 본 연구에서는 미숙아 구루병에서 골 흡수 cytokine들 (IL-1 및 IL-6)의 변화가 있는지, 또한 골 흡수 cytokine들의 변화가 골 흡수의 생화학적 표지자와 관련되어 있는지 규명하고자 하였다.

## 연구대상 및 방법

연세의대 세브란스 병원 신생아 집중치료실에서 미숙아 구루병으로 진단된 17예의 미숙아 (체태주령 30.5±1.7주; 출생체중 1333±135 g)를 연구대상으로 선정하였다. 구루병의 진단은 생후 4~8주에 촬영한 손목 및 무릎 방사선 소견상 골단 (metaphysis)에 특징적인 구루병의 소견 (cupping, fraying, irregularity) 및 심한 골 무기질 감소의 소견이 골단이나 골간단에서 관찰된 경우로 하였다<sup>12)</sup>. 대조군은 구루병이 없고, 혈청 생화학 검사상 정상인 정상 미숙아 14예 (31.1±2.4주; 1360±172 g)로 선정하였다. 미숙아 구루병 환자의 진단시 나이는 37±12일 이었고, 대조군의 선정시 나이는 43±15일 이었다. 구루병 환자는 진단시에, 대조군은 생후 4~6주에 채혈하였고, 혈청을 분리 후 냉동고에 보관 후 검사하였다.

혈청 interleukin-6와 interleukin-1 $\beta$ 를 enzyme immunoassay (Genzyme, Cambridge, MA)로 측정하였다. 검사의 sensitivity는 IL-1 $\beta$ 는 3 pg/mL, IL-6는 18 pg/mL이고, intra-assay %CV는 각각 6.4~15.7%, 6~8.2%였고, inter-assay %CV는 각각 8.4~11%, 9.5~10.6%였다. 혈청 cross-linked carboxyterminal telopeptide of type I collagen (ICTP)와 osteocalcin

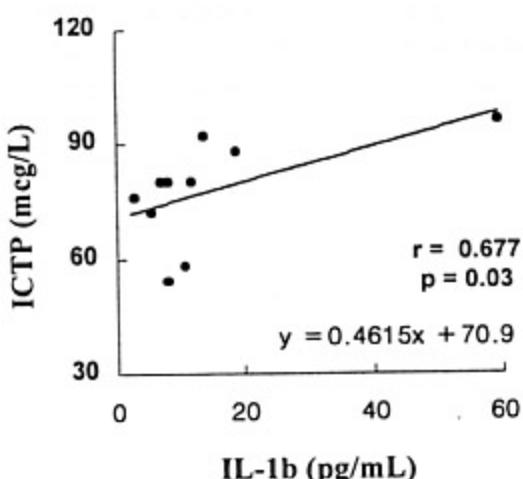


Figure 1. Relationship between serum ICTP and IL-1 $\beta$  in preterm infants with rickets. Serum ICTP correlated positively with serum IL-1 $\beta$  ( $r=0.677$ ,  $p=0.03$ ).

농도는 radioimmunoassay (Incstar, Stillwater, MN)으로 측정하였다. ICTP 검사의 sensitivity는 0.5 ng/mL이고, intra-assay %CV는 4.4%였다. Osteocalcin 검사의 sensitivity는 0.2  $\mu$ g/L, intra-, inter-assay %CV는 각각 5%, 8%였다.

통계: 측정값은 평균  $\pm$  표준편차 및 중앙값과 범위로 표시하였으며, SAS (version 6.0)를 이용하여 IL-6과 IL-1 $\beta$ 의 비교에는 Wilcoxon rank sum test를 시행하였고, osteocalcin과 ICTP의 비교에는 Student's t test를 시행하였으며, 골대사지표와 cytokine과의 상관관계 분석에는 Spearman correlation analysis 및 Analysis of variance를 이용하였다.  $p<0.05$ 인 경우를 통계적으로 유의하다고 판정하였다.

## 결 과

미숙아 구루병 환자와 정상 미숙아를 비교시 혈청 IL-6 농도에 유의한 차이가 없었으며 (중앙값과 범위: 미숙아 구루병 vs. 정상 미숙아; 43.5 [3.91~120.1] vs. 37.8 [0.82~81.3] pg/mL,  $p=0.9$ ), 혈청 IL-1 $\beta$  농도 (8 [2.2~59.3] vs. 7.9 [0.72~17.6] pg/mL,  $p=0.8$ )에도 유의한 차이가 없었다.

미숙아 구루병 환자에서 혈청 ICTP 농도 ( $77.8 \pm 12.9 \mu\text{g/L}$ )와 혈청 osteocalcin 농도 ( $23.2 \pm 9.3 \mu\text{g/L}$ )는 정상 미숙아에 비교하여 증가되어 있었다 ( $p<0.05$ ;  $p<0.05$ ).

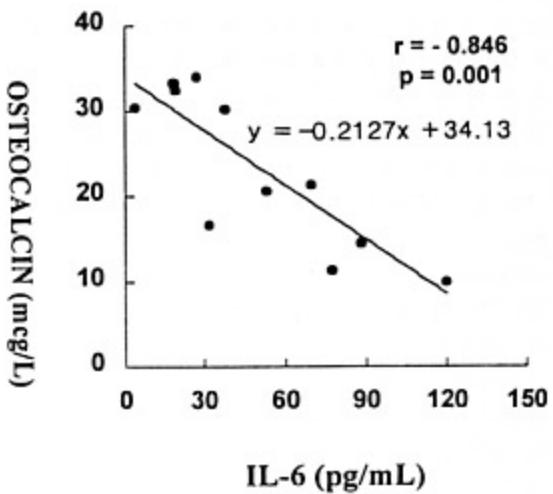


Figure 2. Relationship between serum osteocalcin and IL-6. Serum osteocalcin correlated negatively with serum IL-6 ( $r=-0.846$ ,  $p=0.001$ ).

미숙아 구루병 환자에서 혈청 ICTP 농도와 혈청 IL-1 $\beta$  농도 사이에 유의한 양의 상관관계 ( $\text{ICTP} = 0.46 \times \text{IL-1}\beta + 70.9$ ;  $r=0.677$ ,  $p=0.03$ ) (Figure 1)가 있었으며, 혈청 osteocalcin 농도는 혈청 IL-6와 음의 상관관계 ( $\text{osteocalcin} = 34.13 - 0.22 \times \text{IL-6}$ ;  $r=-0.846$ ,  $p=0.001$ ) (Figure 2)에 있었다. 혈청 IL-6나 IL-1 $\beta$ 는 혈청 PTH나  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ 와 상관관계가 없었다.

## 고 안

Cytokine들은 골격조직내에서 세포와 세포간의 상호작용을 매개하는데 중요한 역할을 하는 soluble factor이다<sup>13)</sup>. 일반적으로 cytokine들은 조직에서 국소적으로 분비되어 paracrine 및 autocrine 기전으로 생물학적 작용을 나타내는데, 일부 cytokine은 내분비적 기능을 보일 수 있으며, 염증이나 종양조직에서 생성된 IL-1이나 TNF 등이 전신으로 순환되어 뼈의 흡수를 증가시켜 혈중 칼슘 이 상승하는 것이 한 예이다<sup>13)</sup>.

Cytokine에 의해 조절되는 대부분의 생리적 과정들에서 cytokine들은 단독으로는 거의 생물학적 작용을 나타내지 않았다. 대체적으로 여러 다른 cytokine들과 함께 국소적으로 생성되며, 이러한 구조와 기능이 다른 cytokine들이 절서정연한 상호작용에 의해 cytokine network를 구성하고 궁극적으로 표적조직에 영향을 준다. Cytokine의 골격계에 대한 조절기능은 태생기 뿐만 아니라 태

생 후 성장이 끝난 후에도 정상적인 끌격계 및 뼈 조직의 기능을 유지하기 위하여 끌격의 발달, 성장 및 끌 재형성과정 동안에 cytokine network가 총체적 역할을 담당한다. 이러한 cytokine network를 통한 세포들간의 상호작용에 문제가 생기는 경우 끌격계의 기능 및 구조적 결함이 발생한다<sup>13)</sup>.

Cytokine의 끌 질환에서의 역할은 주로 폐경 후 골다공증에 관련하여 많이 연구되었으며<sup>9)</sup>, 류마치스관절염과 같은 염증성 질환에서 병변부위에 국한되어 관찰되는 골소실에도 관여하는 것으로 알려져 있다<sup>14)</sup>. 류마치스관절염 환자에서 골소실의 병인에 관여하는 중요한 요인은 염증과정에 의해 생성이 증가되는 IL-1, IL-6 및 TNF- $\alpha$  등이다<sup>15)</sup>. 염증성 장질환이 있는 환자에서 cytokine과 같은 혈청내 요소가 임상적 골감소증에 관여할 것으로 보인다. 염증성 장질환중 크론씨병환자에서 circulating IL-6 농도가 현저히 증가되어 있으나 (대조군에 비하여 20배), 골형성 및 골 흡수의 지표와는 상관성이 발견되지 않아, 염증성 장질환에서 cytokine의 영향은 과골세포의 자극에의 한 골 흡수나 골 교원질 합성의 저해 등이 아니라, 아마도 cytokine의 골무기질침착에 대한 직접적인 영향으로 골 무기질 감소에 이르리라 추론되었다<sup>16)</sup>.

PTH에 의해 유발된 골소실에서 cytokine의 역할이 중요하며, PTH에 의해 조골세포에서 IL-6의 생성이 증가된다. 일차성 부갑상선기능항진증 환자의 혈청에서 circulating IL-6와 TNF- $\alpha$  농도가 증가되어 있고 수술적 치료 후에 정상으로 감소되며, 이들 cytokine들은 골 흡수의 생화학적 지표인 혈청 ICTP와 유의한 양의 상관관계를 보여 일차성 부갑상선기능항진증 환자의 골소실의 병인에서 중요한 역할을 하는 것으로 보인다<sup>17)</sup>.

특별성 과칼슘뇨가 있는 Ca stone former 환자에서 골밀도 감소기전에 IL-1의 과도한 증가가 골소실의 병인에 관여되어 있는 것으로 알려져 있다. 특별성 과칼슘뇨 환자는 대조군보다 말초 단핵구의 활성화에 의한 IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ 가 유의하게 증가하였고, IL-6는 차이가 없었으며, 척수 골밀도와 IL-6 농도사이에 유의한 음의 상관관계를 보여 특별성 과칼슘뇨가 있는 Ca stone former에서 골소실에는 단핵구의 활성화가 관련되어 있으리라 추론되었다<sup>18)</sup>. Weisinger 등<sup>19)</sup>은 특별성 과칼슘뇨 환자에서 척수 골밀도는 basal IL-1 $\alpha$  생성과 유의한 음

의 상관관계가 있고, 노カル슘배설과 유의한 음의 상관관계가 있음을 보고하였다. 특별성 과칼슘뇨 환자에서 정상에 비교하여 Lipopolysaccharide (LPS)로 자극된 IL-6와 TNF $\alpha$ 의 생성이 증가되어 있었고, spontaneous IL-1 $\alpha$  mRNA transcription이 증가되어 있어, 이는 과칼슘뇨 환자에서 관찰되는 골 흡수 과정에 다른 cytokine들이 관여되고 있다고 추론되었다.

본 연구에서는 미숙아 구루병의 병인에서 골 흡수에 관련된 cytokine들이 미숙아 구루병의 골 대사변동에 관련되어 있는지 연구하였다. 미숙아 구루병 환자에서 골 흡수 cytokines (IL-1 $\beta$  및 IL-6)의 농도는 정상 미숙아와 비교하여 차이가 없었으나, 골 흡수의 지표인 ICTP와 circulating IL-1 $\beta$  사이에 유의한 양의 상관관계가 있고, osteocalcin과 IL-6 사이에 유의한 음의 상관관계가 있어, 미숙아 구루병에서 circulating cytokine들의 증가는 없었지만 골대사의 변동에 cytokine들이 복합적으로 관련되어 있음을 시사하는 소견으로 생각된다. 골 흡수의 생화학적 표지자와 circulating cytokine의 관련성만으로 미숙아 구루병의 병인에서 cytokine의 역할에 대하여 논할 수는 없으며, 이러한 cytokine의 역할은 뼈의 미세환경내에서 국소적으로 일어 나는 것이고, 측정된 IL-1 $\beta$  및 IL-6는 혈중에서의 농도이므로 뼈의 미세환경에서의 농도 및 그 작용을 반영한다고 할 수는 없다.

## 결 론

미숙아 구루병의 병인에서 골 흡수 cytokine인 IL-6와 IL-1 $\beta$ 는 증가된 골 대사회전에 복합적으로 관련되어 있는 것으로 보이며, 미숙아 구루병 환자에서 관찰되는 1,25-dihydroxyvitamin D 및 parathyroid hormone의 변화와는 관련되어 있지 않았다.

## 참 고 문 헌

- 1) Brooke OG, Lucas A. *Metabolic bone disease in preterm infants*. Arch Dis Child 60: 682-685, 1985
- 2) Kularni PB, Hall RT, Rhodes PG, Sheehan MB, Callenbach JC, Germann DR, Abramson SJ. *Rickets in very low birthweight infants*. J Pediatr 96: 249-252, 1980

- 3) Callenbach JC, Sheehan MB, Abramson SJ, Hall RT. *Etiologic factors in rickets of very low birthweight infants.* J Pediatr 98: 800-805, 1981
- 4) Lyon AJ, McIntosh N, Wheeler K, Williams JE. *Radiologic rickets in extremely low birthweight infants.* Pediatr Radiol 17: 56-58, 1987
- 5) 서승연, 이은경, 남궁란, 주혜정, 박민수, 박국인, 이철, 한동관, 김명준, 서진석. 미숙아 대사성골질환에 관한 임상 고찰. 소아과 38: 159-169, 1995
- 6) Namgung R, Park KI, Lee C, Han DG, Suh JS, Sierra RI, Specker BL, Tsang RC. *High serum osteocalcin and high serum cross-linked carboxy-terminal telopeptide of type I collagen (ICTP) in rickets of preterm infants: evidence of increased bone turnover.* Pediatr Res 35(4): 317A, 1994
- 7) Tsukahara H, Takeuchi M, Fujisawa K, Miura M, Hata K, Yamamoto K, Mayumi M. *High-turnover osteopenia in preterm infants: determination of urinary pyridinoline cross-links of collagen.* Metabolism 47: 333-335, 1998
- 8) Alsina M, Guise TA, Roodman GD. *Cytokine regulation of bone cell differentiation.* Vit Horm 52: 63-98, 1996
- 9) Monolagas SC. *Role of cytokines in bone resorption.* Bone 17: 63S-67S, 1995
- 10) Monolagas SC, Jilka RL. *Bone marrow, cytokines, and bone remodeling: emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis.* N Engl J Med 332: 305-311, 1995
- 11) Tatakis DN. *Interleukin-1 and bone metabolism: a review.* J Periodontol 64: 416-431, 1993
- 12) Koo WWK, Gupta JM, Nayananar VV, Wilkinson M, Posen S. *Skeletal changes in preterm infants.* Arch Dis Child 57: 447-452, 1982
- 13) Goldring SR, Goldring MB. *Cytokines and skeletal physiology.* Clin Orth Rel Res 324: 13-23, 1996
- 14) Deodhar AA, Woolf AD. *Bone mass measurement and bone metabolism in rheumatoid arthritis: a review.* Br J Rheumatol 35: 309, 1996
- 15) Arend WP, Dayer JM. *Cytokines and cytokine inhibitors or antagonists in rheumatoid arthritis.* Arthritis Rheumatol 33: 305-315, 1990
- 16) Hyams JS, Nancy W, Kreutzer DL, Justinich CJ, Gronowicz GA. *Alterations in bone metabolism in children with inflammatory bowel disease: an in vitro study.* J Pediatr Gastroenterol Nutr 24: 289-295, 1997
- 17) Grey A, Mitnick M, Shapses S, Ellison A, Gundberg C, Insogna K. *Circulating levels of interleukin-6 and tumor necrosis factor- $\alpha$  are elevated in primary hyperparathyroidism and correlate with markers of bone resorption: a clinical research center study.* J Clin Endocrinol Metab 81: 3450-3454, 1996
- 18) Ghazali A, Fuentes V, Desaint C, Bataille P, Westeel, Brazier M, Prin L, Fournier. *Low bone mineral density and peripheral blood monocyte activation profile in calcium stone formers with idiopathic hypercalciuria.* J Clin Endocrinol Metab 82: 32-38, 1997
- 19) Weisinger JR, Alonso E, Bellorin-Font E, Blasini AM, Rodriguez MA, Paz-Martinez V, Martinis R. *Possible role of cytokines on the bone mineral loss in idiopathic hypercalciuria.* Kid Int 49: 244-250, 1996