

Rosiglitazone이 마우스의 골조직 Collagen 생성에 미치는 영향 - 연구노트 -

김 유 경

경북대학교 가정교육과

The Effects of Rosiglitazone on *in vivo* Synthesis of Bone Collagen in Mice

Yoo Kyeong Kim

Dept. of Home Economics Education, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

Abstract

This study was performed to investigate the effect of rosiglitazone, a new antidiabetic agent, on *in vivo* synthesis of bone collagen. The mice were divided into low-fat diet group (LF), high-fat diet group (HF), and high-fat diet with rosiglitazone (6.3 µg/kcal diet) group (HF-Rosi). The synthesis of bone collagen was measured by stable isotope-mass spectrometric technique using $^2\text{H}_2\text{O}$ as a tracer. The $^2\text{H}_2\text{O}$ labeling protocol consisted of an initial intraperitoneal injection of 99.9% $^2\text{H}_2\text{O}$, to achieve approximately 2.5% body water enrichment followed by administration of 4% $^2\text{H}_2\text{O}$ in drinking water for 3 weeks. Although body weight gain and daily diet intake were not significantly different between groups, HF-Rosi had slightly higher body weight gain and daily diet intake than LF and HF. In addition, HF-Rosi showed significantly higher body fat content than LF and HF. Bone collagen synthesis was reduced in HF than LF and further decreased by the treatment of rosiglitazone. These results suggest rosiglitazone affect body fat content and bone turnover in mice.

Key words: rosiglitazone, bone collagen synthesis, body weight gain, body fat content, daily diet intake

서 론

Rosiglitazone은 지방조직이나 근육 등의 말초조직에서 인슐린 감수성을 증가시켜 포도당의 흡수 및 소모를 촉진하고, 간에서 포도당의 신생을 감소시키는 thiazolidinedione(TZD) 계열의 경구용 혈당강하제이다(1-3). TZD 제제는 Zucker rat, ob/ob mouse 등 인슐린 저항성 실험동물모델 및 제 2형 당뇨병 환자에서 뚜렷한 혈당강하효과를 보이며(2,4-6), 그 작용기전은 인슐린의 표적장기인 근육, 간 및 지방조직에서 인슐린 작용을 증가시키는데 있다. TZD 제제의 수용체는 세포핵 내에 위치하는 peroxisome proliferator-activated receptor-gamma(PPAR γ)이며, TZD 제제와 그 수용체가 결합한 후 이 결합체는 전사인자(transcription factor)로 작용하여 인슐린에 반응하는 여러 종류의 단백질뿐만 아니라 지질 및 탄수화물 대사에 관련된 수십가지의 단백질 발현에 영향을 미치는 것으로 보고되고 있다(7,8).

Rosiglitazone은 PPAR- γ 의 ligand로서 PPAR- γ 를 활성화시켜 지방세포의 분화를 촉진한다(7). 그리고 PPAR- γ 는 지방세포 분화 초기에 나타나기 시작하여 다른 섬유아세포에 비해 전지방세포(pre-adipocyte)에 매우 높은 수준으로 발현되며, 다양한 지방 특이 유전자를 직접 조절하는 인자일 뿐 아니라 지방분화 프로그램을 시작할 수 있는 master 조절

인자로서 지방조직의 분화 및 대사기능을 조절하는데 중요한 역할을 한다(8).

골수에서는 지방세포, 조골세포, 연골세포, 근원세포, 섬유아세포 등이 모두 간엽세포(mesenchymal stem cells)로부터 분화되는데(9) 조골세포와 지방세포의 분화는 부(-)의 상관관계가 있음이 관찰되었다(10). PPAR- γ 는 지방세포분화에 중요한 전사인자로 작용하는데 유전자 전사조절이 지방세포 분화가 우세한 쪽으로 치우치면 조골세포의 생성은 억제될 수 있다(10,11). 더우기 골수에서도 PPAR- γ 가 발현되므로 rosiglitazone이 골수세포의 분화에 영향을 줄 수 있다는 가설이 제기되었고, Gimble 등(12)은 TZD처리가 생쥐 골수세포의 지방세포분화를 촉진하였다고 보고하였다. Okazaki 등(13)은 TZD처리한 생쥐 골수세포의 파골세포생성 및 골흡수가 감소되었다고 보고하였으며 Lecka-Czernik 등(14)은 U-33/ γ 2 세포(murine marrow-derived mesenchymal progenitor cell line)에서 rosiglitazone이 지방세포의 분화를 촉진하는 반면 조골세포의 분화는 억제한다고 보고하였다. 또한 troglitazone이 제2형 당뇨병환자의 골대사지표에 영향을 주고 골손실을 감소시켰다는 임상보고도 있다(15).

당뇨병환자들은 폐경기여성이나 노인에게서 흔히 관찰되는 골손실과 골다공증 위험요인이 증가하는 임상증세를 보인다. 따라서 당뇨병환자들의 인슐린 저항성을 개선하기 위

해 주로 사용되는 rosiglitazone이 골격조직의 대사에 미치는 영향을 규명하는 것은 의미 있는 작업이라 할 수 있다. 따라서 본 연구에서는 $^2\text{H}_2\text{O}$ 를 추적자로 이용하는 안정동위원소 비 질량분석법을 적용하여 rosiglitazone이 *in vivo* 골대사에 미치는 영향을 알아보았다.

재료 및 방법

시약

$^2\text{H}_2\text{O}$ 는 Isotec, Inc.(Miamisburg, USA)에서 구입하여 사용하였고, 그 외 시약들은 Sigma, Inc.(St. Louis, USA) 제품을 사용하였다.

실험동물

5주령의 C57BL/6J 수컷 마우스(Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME)를 공급받아 일반고형사료와 물을 자유로이 섭취할 수 있도록 하면서 온도 $23\pm 2^\circ\text{C}$, 습도 $55\pm 10\%$, 12시간 조명주기의 조건에서 사육하였다. 일주일간 적응시킨 후 생후 6주부터 실험식이(Table 1)와 rosiglitazone을 제공하였다. 구체적으로 저지방식이군(AIN-D12450B)은 총 열량의 10%를 지방으로 공급하였고, 고지방식이군(AIN-D12451)은 총열량의 45%를 지방으로 공급하였다. Rosiglitazone은 식이 1 kcal당 6.3 μg 으로 조절하여 식이에 혼합하여 공급하였다.

생후 9주에 99.9% $^2\text{H}_2\text{O}$ 를 일시 복강주입하여 실험동물 체액의 $^2\text{H}_2\text{O}$ 수준을 2.0~2.5%에 도달시킨 후 4% $^2\text{H}_2\text{O}$ 를 음용으로 3주 동안 계속 공급하였다.

체지방 함량 측정

마우스를 ethyl ether로 마취시켜 개복한 후 간중조직, 후복막, 부고환 및 서혜부의 지방조직을 적출하여 무게를 측정하였다.

Table 1. Composition of experimental diets (g/kg diet)

Ingredients	LF ¹⁾	HF ²⁾
Casein	200	200
L-Cystein	3	3
Corn starch	315	72.8
Maltodextrin	35	100
Sucrose	350	172.8
Cellulose, BW200	50	50
Soybean oil	25	25
Lard	20	177.5
Mineral mix S10026	10	10
DiCalcium phosphate	13	13
Calcium carbonate	5.5	5.5
Potassium citrate	16.5	16.5
Vitamin mix V1001	10	10
Choline bitartrate	2	2
Fat % (calories)	10	45
Total calories (kcal)	3845	3845

¹⁾LF: low fat diet, AIN-D12450B diet.

²⁾HF: high fat diet, AIN-D12451 diet.

경골 collagen의 분리 및 가수분해

왼쪽 뒷다리 대퇴골을 적출한 후 연조직, 골수, 결체조직 등을 모두 제거하였다. 물로 수세한 대퇴골을 질소가스하에 마쇄하고 chloroform:methanol(1:1)에 침수하여 지방을 제거한 후 건조하였다. 건조된 뼈가루를 6 N HCl에 넣고 110°C에서 24시간 가열하여 가수분해하였다.

아미노산의 안정동위원소비 측정

상기의 방법으로 얻은 유리아미노산을 N-acetyl butyl ester법으로 유도체를 만들어 GC/MS를 이용하여 안정동위원소비를 측정하였다.

통계처리

모든 측정치들은 SAS package를 이용하여 실험결과를 평균±표준오차로 나타내었다. 분석항목별 유의성 검정은 $p<0.05$ 수준에서 one-way ANOVA test를 실시하였고, 유의성이 관찰된 경우 각 실험군간의 유의성은 Duncan's multiple range test를 실시하여 평가하였다.

결과 및 고찰

체중증가량, 체지방비율 및 식이섭취량

Table 2에서 보는 바와 같이 실험기간 6주 동안 저지방식이군과 고지방식이군의 체중변화는 각각 8.02 ± 0.69 g과 7.57 ± 0.76 g으로 차이가 거의 없었는데, 이는 식이 지방함량은 다르지만 총 열량은 동일하게 공급하였기 때문으로 생각된다. 저지방식이군과 고지방식이군의 체지방함량은 각각 4.12 ± 0.18 g과 4.95 ± 0.31 g, 식이섭취량은 각각 10.83 ± 0.11 kcal과 10.57 ± 0.32 kcal으로 유의한 차이를 보이지 않았다. 반면 고지방식이에 rosiglitazone을 첨가한 군의 체중은 11.16 ± 0.53 g, 체지방함량은 7.24 ± 0.24 g, 식이섭취량은 11.46 ± 0.24 kcal로 식이만 공급한 군보다 높았다. 특히 체지방함량은 고지방식에 rosiglitazone을 첨가한 군이 다른 군에 비하여 유의한 증가를 보였다. 이것은 TZD제제가 동물실험에서 식이섭취량 뿐만 아니라 식이섭취효율을 증가시켜 체지방함량 및 체중을 증가시킨다는 Burkey 등(16)과 de Souza 등

Table 2. Body weight gain, body fat content, and food intake of mice

Groups ¹⁾	Body weight gain (g)	Body fat (g/100 g body weight)	Food intake (kcal/d)
LF	$8.02\pm 0.69^{2)}$	$4.12\pm 0.18^{a3)}$	10.83 ± 0.11
HF	7.57 ± 0.76	4.95 ± 0.31^a	10.57 ± 0.32
HF Rosi	11.16 ± 0.53	7.24 ± 0.24^b	11.46 ± 0.24

¹⁾LF: low fat diet group, HF: high fat diet group, HF-Rosi: high fat diet + rosiglitazone (6.3 $\mu\text{g}/\text{kcal}$ diet) group.

²⁾Values are mean \pm SD (n=7).

³⁾Means with different letters within a column are significantly different from each other at $p<0.05$ by Duncan's multiple range test.

(17)의 연구결과와 일치한다.

Rosiglitazone이 PPAR- γ 를 자극하여 섬유아세포를 지방세포로 분화시키고(7) 전지방세포(preadipocyte)로부터 지방세포(adipocyte)로의 분화를 촉진한다는 것이 여러 *in vitro* 연구에서 관찰되었다(3,7). 또한 PPAR- γ 유전자를 제거한 동물모델을 이용한 실험에서 갈색지방세포와 흰색지방세포의 분화는 PPAR- γ 를 매개로 한다는 작용기전도 밝혀졌다(18,19). 게다가 TZD의 구강투여는 혈당을 정상수치로 유지시킬 뿐만 아니라 지방세포와 체중을 증가시킨다는 *in vivo* 실험결과도 보고되었다(20-22). 그러나 TZD는 단순히 지방함량을 증가시키는 것이 아니라 큰 지방세포를 파괴하고 작은 지방세포를 증가시켜 체지방을 remodeling하는 효과가 있으며 TZD투여가 가지지방함량은 감소시킨 반면 피하지방함량은 증가시켰다는 인체실험결과도 보고되었다(3,17).

본 연구결과와 선행연구결과들을 종합해 볼 때 TZD가 지방세포의 분화, 체지방의 증가 및 remodeling에 중요한 역할을 한다는 것은 분명하지만 이 과정에 관여하는 구체적인 전사인자 및 관련 단백질 등을 규명하는 작업을 통하여 TZD의 작용기전을 밝히는 연구가 계속 되어야겠다.

골조직 collagen 신생과정에서 아미노산에 혼입된 ^2H 함량

Collagen에 혼입된 ^2H 함량은 생체에서 새로이 합성된 collagen의 함량을 의미한다. 대퇴골을 구성하는 collagen을 가수분해하여 나온 유리아미노산의 ^2H 함량을 GC/MS로 측정하였다. Collagen을 구성하는 alanine, glutamine, OH-proline에 혼입된 ^2H 함량의 차이는 각 아미노산이 $^2\text{H}_2\text{O}$ 로부터 ^2H 를 치환할 수 있는 C-H결합의 수를 반영하는데 alanine, glutamine, OH-proline은 각각 4개, 7개, 그리고 1개의 ^2H 를 $^2\text{H}_2\text{O}$ 로부터 치환할 수 있다. 아미노산의 C-H에 결합된 수소는 단백질합성에 관여하는 효소반응에 의해서만 $^2\text{H}_2\text{O}$ 의 수소와 치환될 수 있다. 따라서 아미노산의 C-H결합의 H는 단백질 신생과정에서 아미노산에 혼입된 ^2H 함량을 GC/MS로 측정하는데 사용할 수 있는 유일한 수소원자이다. 반면 펩타이드와 단백질의 O-H 혹은 N-H에 결합된 수소는 단백질 신생과정과 무관하게 유리 아미노산 상태에서 $^2\text{H}_2\text{O}$ 로부터 치환된 것이다. 따라서 단백질의 신생량을 GC/MS를 이용하여 측정할 때, 유도체를 만드는 과정에서 O-H 혹은 N-H에 결합된 H를 제거하는 방법을 택해야 한다. Collagen을 구성하는 각 아미노산의 동위원소 혼입량은 다르지만 이로부터 계산할 수 있는 collagen의 대사율은 동일하다(16).

Fig. 1에서 보는 바와 같이 각 실험군간에 통계적인 유의성은 관찰되지 않았지만 고지방식이군이 저지방식이군보다 골조직 collagen의 신생율이 낮았고 rosiglitazone의 첨가는 신생율을 더욱 감소시키는 경향을 보였다. 이 결과는 골수세포에 TZD를 처리하면 유전자 전사흐름이 지방세포의 분화가 우세한 쪽으로 치우쳐서 조골세포의 분화를 억제한다는 *in vitro* 연구결과(12-14)를 뒷받침한다. Rosiglitazone이 *in vivo* 골대사에 미치는 영향에 대한 선행연구가 없어 본 연구

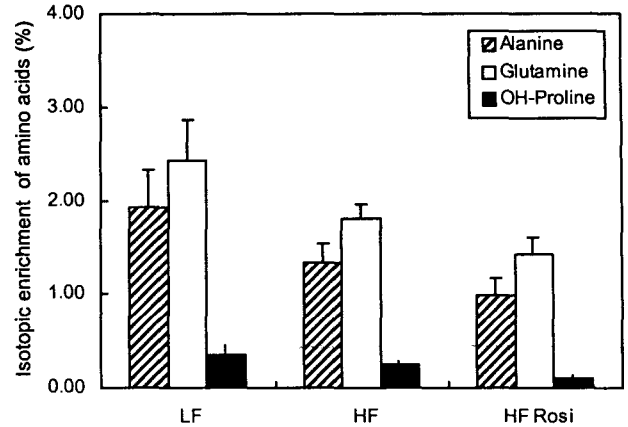


Fig. 1. Isotopic enrichment of alanine, glutamine and hydroxy-proline isolated from bone collagen in mice.

LF: low fat diet group, HF: high fat diet group, HF-Rosi: high fat diet + rosiglitazone (6.3 $\mu\text{g}/\text{kcal}$ diet) group. Values are mean + SE (n=7).

결과를 다른 연구결과와 비교분석할 수 없고, 이 결과를 통하여 조골세포의 생성이 증가했는지 혹은 골수조직의 지방세포 분화가 촉진되었는지는 알 수 없지만 본 연구결과는 rosiglitazone이 *in vivo* 골대사에 영향을 미친다는 것을 시사한다.

당뇨병환자들은 폐경기여성이나 노인에게서 흔히 관찰되는 골손실과 골다공증 위험요인이 증가하는 임상증세를 보인다. 특히 노화가 진행됨에 따라 골수의 지방함량이 증가하고 골손실이 증가한다는 관찰결과(9)는 PPAR- γ 를 매개로 하는 지방세포와 조골세포의 분화사이에 상관관계가 있다는 것을 시사한다. 따라서 당뇨병환자들의 인슐린 저항성을 개선하기 위해 주로 사용되는 rosiglitazone이 골격조직의 대사에 미치는 영향을 규명하는 체계적인 연구가 이루어져야 하겠다.

요 약

본 연구는 인슐린비의존성 당뇨병환자의 경구용 혈당강하제로 사용되는 rosiglitazone이 *in vivo* 골조직 collagen의 신생율에 미치는 영향을 측정하기 위해 수행되었다. 저지방식이군과 고지방식이군은 각각 총열량의 10%와 45%를 지방으로 공급하였고 rosiglitazone 첨가군은 고지방식에 rosiglitazone을 6.3 $\mu\text{g}/\text{kcal}$ 로 조절하여 공급하였다. 또한 collagen의 신생율을 안정동위원소비 질량분석법으로 측정하기 위하여 99.9% $^2\text{H}_2\text{O}$ 를 일시 복강주입하여 실험동물 체액의 $^2\text{H}_2\text{O}$ 수준을 2.0~2.5%에 도달시킨 후 4% $^2\text{H}_2\text{O}$ 를 음용으로 3주 동안 계속 공급하였다. 체중증가량 및 식이섭취량은 각 실험군간에 유의한 차이가 없었으나 rosiglitazone첨가군이 다른 실험군에 비하여 높은 경향을 보였고, 체지방함량은 고지방식에 rosiglitazone를 첨가한 군이 다른 군에 비하여 유의한 증가를 보였다. 고지방식이군이 저지방식이군보다 골조직 collagen의 신생율이 낮았고 rosiglitazone의 첨가는

collagen의 신생율을 더욱 감소시켰으나 유의한 차이를 보이지는 않았다.

문 헌

- Otto C, Lehrke M, Goke B. 2002. Novel insulin sensitizers: pharmacogenomic aspects. *Pharmacogenomics* 3: 99-116.
- Fujiwara T, Horikoshi H. 2000. Troglitazone and related compounds: therapeutic potential beyond diabetes. *Life Sci* 67: 2405-2416.
- Furnsinn C, Waldhausl W. 2002. Thiazolidinediones: metabolic actions in vitro. *Diabetologia* 45: 1211-1223.
- Kramer D, Shapiro R, Adler A, Bush E, Rondinone CM. 2001. Insulin-sensitizing effect of rosiglitazone (BRL 49653) by regulation of glucose transporters in muscle and fat of Zucker rats. *Metabolism* 50: 1294-1300.
- Murakami K, Tobe K, Ide T, Mochizuki T, Ohashi M, Akanuma Y, Yazaki Y, Kadowaki T. 1998. A novel insulin sensitizer acts as a coligand for peroxisome proliferator-activated receptor-alpha (PPAR-alpha) and PPAR-gamma: effect of PPAR-alpha activation on abnormal lipid metabolism in liver of Zucker fatty rats. *Diabetes* 47: 1841-1847.
- Rieusset J, Touri F, Michalik L, Escher P, Desvergne B, Niesor E, Wahli W. 2002. A new selective peroxisome proliferator-activated receptor gamma antagonist with anti-obesity and antidiabetic activity. *Mol Endocrinol* 16: 2628-2644.
- Hauer H. 2002. The mode of action of thiazolidinediones. *Diabetes Metab Res Rev* 18 Suppl 2: S10-15.
- Escher P, Wahli W. 2000. Peroxisome proliferator activated receptors: insight into multiple cellular functions. *Mutat Res* 448: 121-138.
- Robey PG, Bianco P. 1999. Cellular mechanisms of age-related bone loss. In *The aging skeleton*. Rosen C, Glowacki J, Bilezikian JP, eds. Academic Press, San Diego. p 145-157.
- Lecka-Czernik B, Gubrij I, Moerman EJ, Kajkenova O, Lipschitz DA, Manolagas SC, Jilka RL. 1999. Inhibition of Osf2/Cbfa1 expression and terminal osteoblast differentiation by PPAR2. *J Cell Biochem* 74: 357-371.
- Johnson TE, Vogel R, Rutledge SJ, Rodan G, Schmidt A. 1999. Thiazolidinedione effects on glucocorticoid receptor-mediated gene transcription and differentiation in osteoblastic cells. *Endocrinology* 140: 3245-3254.
- Gimble JM, Robinson CE, Wu X, Kelly KA, Rodriguez BR, Kliewer SA, Lehmann JM, Morris DC. 1996. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation by thiazolidinediones induces adipogenesis in bone marrow stromal cells. *Mol Pharmacol* 50: 1087-1094.
- Okazaki R, Toriumi M, Fukumoto S, Miyamoto M, Fujita T, Tanaka K, Takeuchi Y. 1999. Thiazolidinediones inhibit osteoclast-like cell formation and bone resorption *in vitro*. *Endocrinology* 140: 5060-5065.
- Lecka-Czernik B, Moerman EJ, Grant DF, Lehmann JM, Manolagas SC, Jilka RL. 2002. Divergent effects of selective peroxisome proliferator-activated receptor-gamma 2 ligands on adipocyte versus osteoblast differentiation. *Endocrinology* 143: 2376-2384.
- Okazaki R, Miura M, Toriumi M, Taguchi M, Hirota Y, Fukumoto S, Fujita T, Tanaka K, Takeuchi A. 1999. Short-term treatment with troglitazone decreases bone turnover in patients with type 2 diabetes mellitus. *Endocrinology J* 46: 795-801.
- Burkey BF, Dong M, Gagen K, Eckhardt M, Dragonas N, Chen W, Grosenstein P, Argentieri G, de Souza CJ. 2000. Effects of pioglitazone on promoting energy storage, not expenditure, in brown adipose tissue of obese fa/fa Zucker rats: comparison to CL 316,243. *Metabolism* 49: 1301-1308.
- de Souza CJ, Eckhardt M, Gagen K, Dong M, Chen W, Laurent D, Burkey BF. 2001. Effects of pioglitazone on adipose tissue remodeling within the setting of obesity and insulin resistance. *Diabetes* 50: 1863-1871.
- Barak Y, Nelson MC, Ong ES, Jones YZ, Ruiz-Lozano P, Chien KR, Koder A, Evans RM. 1999. PPAR-gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Mol Cell* 4: 585-595.
- Rosen ED, Sarraf P, Troy AE, Bradwin G, Moore K, Milstone DS, Spiegelman BM, Mortensen RM. 1999. PPAR-gamma is required for the differentiation of adipose tissue *in vivo* and *in vitro*. *Mol Cell* 4: 611-617.
- Hallakou S, Doare L, Foufelle F, Kergoat M, Guerre-Millo M, Berthault MF, Dugail I, Morin J, Auwerx J, Ferre P. 1997. Pioglitazone induces *in vivo* adipocyte differentiation in the obese Zucker fa/fa rat. *Diabetes* 46: 1393-1399.
- De Vos P, Lefebvre AM, Miller SG, Guerre-Millo M, Wong K, Saladin R, Hamann LG, Staels B, Briggs MR, Auwerx J. 1996. Thiazolidinediones repress ob gene expression in rodents via activation of peroxisome proliferator-activated receptor. *J Clin Invest* 98: 1004-1009.
- Schwartz S, Raskin P, Fonseca V, Graveline JF. 1998. Effect of troglitazone in insulin-treated patients with type II diabetes mellitus. *N Engl J Med* 338: 861-866.

(2003년 8월 11일 접수; 2003년 11월 10일 채택)