

PDE 저해제에 의한 PGE₂의 파골세포 분화 유도 증강효과

노아롱새미 · 임미정[#]

숙명여자대학교 약학대학

(Received April 10, 2007; Revised May 21, 2007)

The Stimulatory Effect of PDE Inhibitors on PGE₂-Induced Osteoclastogenesis

A Long Sae Mi No and Mijung Yim[#]

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

Abstract — To determine the regulatory roles of phosphodiesterase (PDE) inhibitors on PGE₂-induced osteoclastogenesis, we investigated the effect of PDE inhibitors on osteoclast formation in the presence of PGE₂. Among PDE isozyme specific inhibitors, milrinone, a selective PDE3 inhibitor, and rolipram, a specific PDE4 inhibitor, increased PGE₂-induced osteoclast formation in cocultures of mouse bone marrow cells and osteoblasts. To verify that whether the PDE3 and PDE4 inhibitors act indirectly on osteoblasts, we measured the concentration of intracellular cAMP in osteoblasts. Treatment of milrinone or rolipram increased PGE₂-stimulated cAMP levels in osteoblasts. Furthermore, northern blot analysis revealed that the PDE3 and PDE4 inhibitors works synergistically with PGE₂ to increase the expression of TRANCE mRNA in osteoblasts. On the contrary, the PDE3 and PDE4 inhibitors did not augment the number of osteoclasts differentiated from bone marrow cells by PGE₂. In conclusion, the stimulation of PGE₂-induced osteoclast formation by the PDE3 and PDE4 inhibitors are attributable to their indirect effect on osteoblasts, not to their direct effect on bone marrow-derived osteoclast precursors.

Keywords □ phosphodiesterase, osteoblast, osteoclast

건강한 뼈는 일생동안 조골세포(osteoblast)와 파골세포(osteoclast)의 작용에 의해 뼈가 지속적으로 형성되고 파괴되는 뼈의 재형성 과정을 거치게 된다.¹⁾ 파골세포는 조혈모세포(hematopoietic cell)로부터 분화된 다핵세포로, 조골세포에 의해 그 분화가 엄격하게 조절된다.^{1,2)} 즉, 조골세포는 파골세포 분화 인자인 M-CSF(macrophage colony-stimulating factor, or CSF-1) 및 TRANCE(TNF-related activation-induced cytokine, OPG, ODF, or RANKL)를 통해 파골세포의 분화를 조절함으로써 체내 골형성과 골파괴의 동적인 평형을 유지한다.²⁻⁵⁾

Prostaglandin E₂(PGE₂)는 골형성의 중요한 조절자로 작용한다. PGE₂는 조골세포 표면의 수용체 EP2/4를 통해 adenylate cyclase를 활성화한다. 세포내 cAMP의 농도가 상승하면, protein kinase A(PKA)가 활성화되고 이를 통해 TRANCE의 발현이 증가된다.⁶⁾ 한편, PGE₂는 골수유래 파골세포 전구세포에도 직접적으로 작용해 cAMP-PKA 활성화를 통해 파골세포 분화를 조

절한다.⁷⁻⁹⁾ 따라서 PGE₂는 1) 조골세포의 TRANCE 발현 조절 2) 파골세포 전구세포 분화 조절 등 2개의 서로 다른 경로를 통해 파골세포 형성을 조절한다.

이와 같이 cAMP-PKA 경로는 파골세포 분화에 중요한 조절자로 작용하는데, 세포내 cAMP의 농도는 2가지 효소에 의해 결정된다. Adenylate cyclase는 ATP를 기질로 cAMP를 합성하고, phosphodiesterase(PDE)는 cAMP를 5'-AMP로 분해시킨다.^{10,11)} 지금까지 PDE family는 PDE1에서 11까지의 isozyme이 존재하는 것으로 밝혀졌으며, PDE의 역할이 점차 규명됨에 따라 PDE 활성을 저해하는 PDE 저해제의 생리·병리학적 활성에 대해 많은 연구가 이뤄졌다.^{11,12)}

본 연구자는 PDE4 저해제 rolipram이 조골세포내 cAMP-PKA 경로 활성화를 통해 TRANCE 발현을 유도한다고 보고한 바 있다.¹³⁾ 그러나 PDE 저해제의 조골세포-파골세포 상호작용에 관한 연구는 아직 충분치 않은 실정이다. 따라서 본 연구자는 PDE isozyme 특이적 저해제를 사용해 파골세포 분화에 대한 영향을 조사하였으며, PDE3와 PDE4 저해제가 PGE₂에 의해 유도된 파골세포 분화에 상승적 영향을 미치는 것으로 밝혀졌기에 보고하는 바이다.

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

실험 방법

마우스 조골세포의 초기 배양

생후 0~1일의 신생아 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% collagenase+0.2% dispase 효소 용액에 넣어 37°C에서 5분간 진탕시킨 후 상등액을 버리고 새로운 효소 용액을 가하였다. 37°C에서 약 15분간 진탕하여 상등액을 모으는 조작을 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.

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

파골세포의 분화유도

초기 배양한 조골세포 5×10^3 cells/well와 골수세포 1×10^5 cells/well을 10% FBS가 함유된 α -MEM으로 공배양했다. 또는 골수세포를 M-CSF 10 ng/ml로 하룻밤 배양한 후 부유세포를 M-CSF 30 ng/ml로 3일간 추가 배양했다. 접착 세포를 회수후 TRANCE 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.

cAMP 측정

초기배양 마우스 조골세포를 시약으로 1시간 처리한 후 회수하여 세포내 cAMP의 양을 cAMP Biotrak Enzyme immunoassay(Amersham Biosciences, USA)로 측정하였다.

Northern blot 분석

초기배양 마우스 조골세포를 일정 시약으로 처리하여 3시간 배양한 후, total RNA를 Trizol reagent(Invitrogen)로 회수하였

다. Total RNA 20 μ g을 1.2% agarose-formaldehyde gel로 전기영동한 후 nylon membrane filter에 이동시켰다(Hybond N+, Amersham Biosciences). Membrane을 ³²P로 표지한 cDNA probe와 반응시킨 후 세척액으로 세척하고, -70°C에서 x-ray 필름에 노출시켰다.

통계처리

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

실험 결과 및 고찰

PGE₂의 파골세포 형성에 미치는 PDE3와 PDE4 저해제의 효능

PGE₂는 초기 배양한 마우스 조골세포와 골수세포의 공배양계에서 TRAP+ 다핵 파골세포를 분화 유도하는 것으로 알려져 있다.¹⁾ 공배양계를 이용하여 PDE isozyme 특이적인 저해제가 PGE₂에 의한 파골세포 분화에 미치는 효과를 조사하였다. PDE isozyme 특이적인 저해제로는 vinpocetin(PDE1), EHNA(PDE2), milrinone(PDE3), rolipram(PDE4), dipyridamole(PDE5와 PDE8), zaprinast(PDE5와 PDE9)을 사용하였다. 보고된 바와 같이 PGE₂(0.1 μ M)는 공배양계에서 파골세포를 다수 형성하였으며, PDE3 저해제인 milrinone과 PDE4 저해제인 rolipram이 PGE₂의 파골세포 형성을 증강시켰다(Fig. 1). 그 이외의 저해제는 PGE₂의 파골세포 형성에 상승적 영향을 미치지 않았다(미발표 결과).

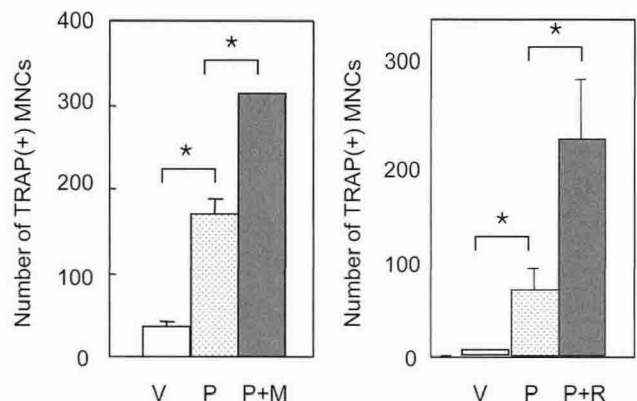


Fig. 1 - Effects of milrinone and rolipram on PGE₂-induced osteoclast formation in coculture system. Mouse bone marrow cells and calvarial osteoblasts were co-cultured in the presence or absence of 0.1 μ M PGE₂ with/without 10 μ M milrinone or 5 μ M rolipram for 6 days. Cells were then fixed and stained for TRAP. TRAP-positive (+) multinucleated cells (MNCs) were counted. Data are expressed as the mean+SD of triplicate cultures. V: Vehicle, P: PGE₂, M: Milrinone, R: Rolipram., *: p<0.05.

PDE3 저해제 및 PDE4 저해제의 작용세포 규명

PGE₂는 조골세포에 대한 간접적인 작용과 파골세포 전구세포에 대한 직접적인 작용을 통해 파골세포 분화를 조절한다.⁷⁻⁹⁾ PDE3 저해제인 milrinone과 PDE4 저해제인 rolipram 또한 파골세포 분화에 대해 간접적 또는 직접적으로 작용할 가능성이 있다. 공배양계에는 조골세포와 골수세포가 모두 존재하므로, PGE₂에 대한 milrinone과 rolipram의 상승적 효과가 어느 세포에 대한 작용에서 기인한 것인지 알아보았다. 먼저 milrinone과 rolipram의 조골세포에 대한 작용을 조사하였다. Milrinone과 rolipram은 각각 PDE3와 PDE4에 의한 cAMP의 분해를 억제함으로써 세포내 cAMP의 농도를 증가시킬 것으로 기대된다. 실제로 조골세포내 cAMP 농도를 측정된 결과 PGE₂는 조골세포내 cAMP 농도를 상승시켰으며, 이 효과는 각각 milrinone과 rolipram 처리에 의해 증강되었다(Fig. 2A).

조골세포내 cAMP의 증가는 파골 세포 분화 유도 인자인 TRANCE의 발현 증가와 연관되어 있다.^{14,15)} 따라서 milrinone과 rolipram에 의한 cAMP 농도 증가가 TRANCE 발현에 영향을 미치는지 조사하였다. Northern blot 분석 결과 PGE₂에 의한 TRANCE 발현이 milrinone과 rolipram에 의해 모두 크게 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 2B). 이로써 milrinone과 rolipram은 조골세포에서 각각 PDE3와 PDE4를 저해함으로써 PGE₂에 의한 cAMP-TRANCE 경로의 활성화에 상승적으로 작용하는 것으로 밝혀졌다.

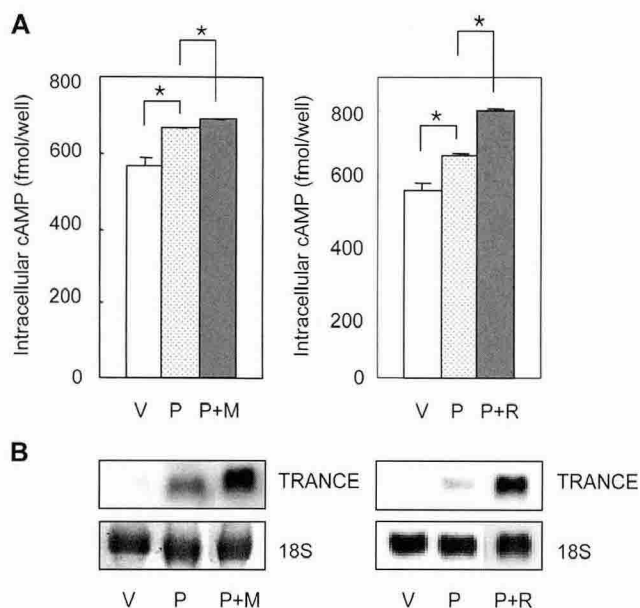


Fig. 2 – Effects of milrinone and rolipram on osteoblasts. calvarial osteoblasts were incubated in the presence or absence of 0.1 μM PGE₂ with/without 10 μM milrinone or 5 μM rolipram, and the concentration of intracellular cAMP (A) or the expression of TRANCE mRNA (B) were measured. V: Vehicle, P: PGE₂, M: Milrinone, R: Rolipram., *: p<0.05.

다음으로 milrinone과 rolipram이 파골세포 전구세포에 미치는 영향을 조사하였다. 파골세포 전구세포는 골수세포를 M-CSF 존재하에서 4일간 배양해 얻었다. 전구세포는 M-CSF와 TRANCE의 처리로 파골세포로 분화하였다. PGE₂(0.1 μM)는 파골세포 전구세포의 분화를 약간 억제하였으며 milrinone과 rolipram 역시 같은 정도의 억제를 보였다(Fig. 3). 그러나 PGE₂의 전구세포에 대한 효과는 milrinone이나 rolipram에 의해 변화하지 않는 것으로 나타났다. 이는 공배양계에서 보인 milrinone

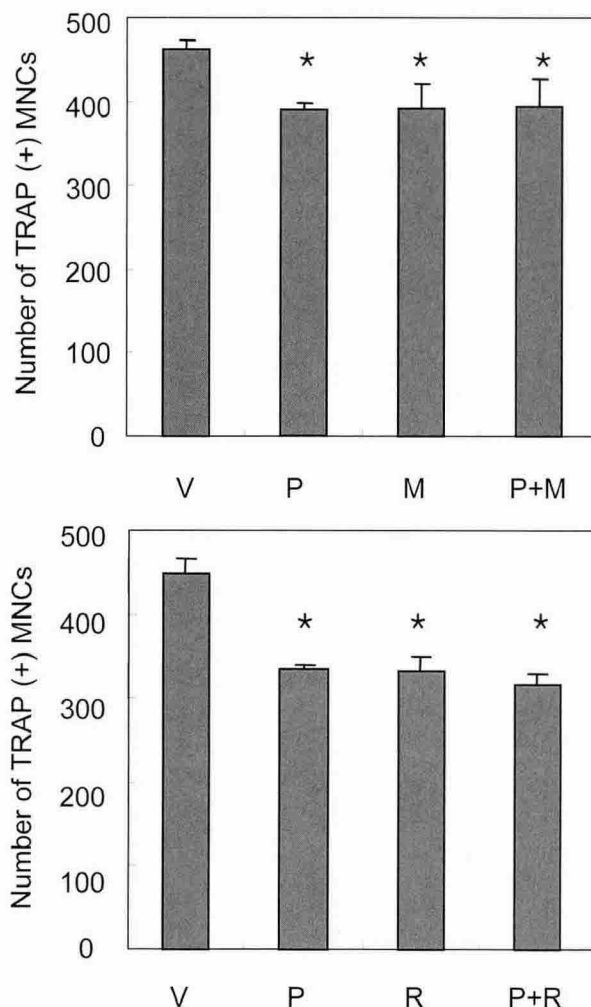


Fig. 3 – Effects of milrinone and rolipram on PGE₂-induced osteoclast formation in bone marrow cultures. Mouse bone marrow cells were cultured with M-CSF for 12 h and the nonadherent cells were then harvested and cultured with M-CSF. After 3 days of culturing, the cells were further added with TRANCE and incubated in the presence or absence of 0.1 μM PGE₂ with/without 10 μM milrinone or 5 μM rolipram for an additional 4 days. The cells were fixed and stained for TRAP. TRAP-positive cells with more than three nuclei were counted as MNCs. Data are expressed as the mean+SD of triplicate cultures. V: Vehicle, P: PGE₂, M: Milrinone, R: Rolipram., *: p<0.05 compared with the vehicle.

과 rolipram의 PGE₂에 의한 파골세포 형성 촉진이 전구세포에 대한 직접적 작용에서 기인하지 않는 것을 시사하는 것으로, milrinone과 rolipram은 조골세포에 간접적으로 작용함으로써 PGE₂에 의한 파골세포 형성을 증강시키는 것으로 사료된다.

결 론

본 연구에서는 PDE3 저해제인 milrinone과 PDE4 저해제인 rolipram을 사용하여 PGE₂에 의한 파골세포 분화 유도에 미치는 효과를 알아보았다. 본 연구 결과, milrinone과 rolipram은 공배양계에서 PGE₂에 의한 파골세포 형성을 촉진하는 것으로 나타났다. 이는 milrinone과 rolipram이 PGE₂의 조골세포내 cAMP 생성과 TRANCE 발현을 증강시킨 결과로, 파골세포 전구세포에 대한 직접적인 작용은 기여하지 않는 것으로 밝혀졌다.

감사의 말씀

본 연구는 숙명여자대학교 약학연구소의 지원에 의해 수행되었으므로 이에 감사드립니다.

문 헌

- 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., 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) Kaji, H., Sugimoto, T., Kanatani, M., Fukase, M., Kumegawa, M. and Chihara, K. : Prostaglandin E₂ stimulates osteoclast-like cell formation and bone-resorbing activity via osteoblasts: role of cAMP-dependent protein kinase. *J. Bone Miner. Res.* **11**, 62 (1996).
- 7) Wani, M. R., Fuller, K., Kim, N. S., Choi, Y. and Chambers, T. : Prostaglandin E₂ cooperates with TRANCE in osteoclast induction from hemopoietic precursors: synergistic activation of differentiation, cell spreading, and fusion. *Endocrinology* **140**, 1927 (1999).
- 8) Take, I., Kobayashi, Y., Yamamoto, Y., Tsuboi, H., Ochi, T., Uematsu, S., Okafuji, N., Kurihara, S., Udagawa, N. and Takahashi, N. : Prostaglandin E₂ strongly inhibits human osteoclast formation. *Endocrinology* **146**, 5204 (2005).
- 9) Li, L., Pettit, A. R., Gregory, L. S. and Forwood, M. R. : Regulation of bone biology by prostaglandin endoperoxide H synthases (PGHS): a rose by any other name. *Cytokine Growth Factor Rev.* **17**, 203 (2006).
- 10) Antoni, F. A. : Molecular diversity of cyclic AMP signaling. *Front Neuroendocrinol.* **21**, 103 (2000).
- 11) Essayan, D. M. : Cyclic nucleotide phosphodiesterases. *J. Allergy Clin. Immunol.* **108**, 671 (2001).
- 12) Bender, A. T. and Beavo, J. A. : Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. *Pharmacol. Rev.* **58**, 488 (2006).
- 13) Park, H., Young Lee, S., Lee, D. S. and Yim, M. : Phosphodiesterase 4 inhibitor regulates the TRANCE/OPG ratio via COX-2 expression in a manner similar to PTH in osteoblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **354**, 178 (2007).
- 14) Kondo, H., Guo, J. and Bringhurst, F. R. : Cyclic adenosine monophosphate/protein kinase A mediates parathyroid hormone/parathyroid hormone-related protein receptor regulation of osteoclastogenesis and expression of RANKL and osteoprotegerin mRNAs by marrow stromal cells. *J. Bone Miner. Res.* **17**, 1667 (2002).
- 15) Fu, Q., Jilka, R. L., Manolagas, S. C. and O'Brien, C. A. : Parathyroid hormone stimulates receptor activator of NF- κ B ligand and inhibits osteoprotegerin expression via protein kinase A activation of cAMP-response element-binding protein. *J. Biol. Chem.* **277**, 48868 (2002).