

Cytochalasin D Regulates Retinoic Acid Induced COX-2 Expression but not Dedifferentiation via p38kinase Pathway in Rabbit Articular Chondrocytes

Seon Mi Yu and Song Ja Kim[†]

Department of Biological Sciences, College of Natural Sciences, Kongju National University,
Chungnam 314-701, Korea

Cytochalasin D (CD) is known as a disruptor of actin cytoskeleton architecture in chondrocytes. We have studied the role of CD in retinoic acid (RA) caused dedifferentiation and inflammation responses in rabbit articular chondrocytes. We have examined the effect of CD on RA induced dedifferentiation of chondrocytes. CD inhibited RA induced dedifferentiation determined by Western blot analysis and Alcian blue staining in rabbit articular chondrocytes. Also, CD additionally reduced inflammation response molecules such as cyclooxygenase-2 (COX-2) and prostaglandin E₂ (PGE₂) in RA treated cells. Treatment of CD reduced phosphorylation of p38 by treatment of RA. Inhibition of p38kinase with SB203580 reduced expression of COX-2 and production of PGE₂ by treatment of CD in RA treated cells. But, Inhibition of p38kinase with SB203580 did not any relationship with effect of CD on RA caused dedifferentiation. In summary, our results indicate that CD regulates RA reduced expression of COX-2 and production of PGE₂ via p38kinase pathway.

Key Words: Chondrocytes, Retinoic Acid (RA), Cyclooxygenase-2 (COX-2), Dedifferentiation

서 론

연골세포는 배발생 시기에 간충직 세포로부터 분화된 다 (Sandell and Adler, 1999; DeLise, 2000). 분화된 연골세포는 type II collagen과 proteoglycan과 같은 연골 특이적인 세포외기질 (extra cellular matrix, ECM)을 합성하게 된다. 이 세포외기질의 정상적인 합성, 분비, 유지, 균형적인 파괴는 연골세포의 항상성을 위해 중요한 요소이다 (Poole, 1999; Sandell and Adler, 2001). 이와 같은 항상성은 골 관절염 및 퇴행성 관절염과 같은 질병에 의해 파괴된다 (Sandell and Aigner, 2001). 분화된 연골세포는 세포 형태의 변화를 유도시키는 retinoic acid (RA)나 단층 계대 배양에 의해 탈분화가 유도된다 (Benya et al., 1988; Brown, 1988). 또한 Cytochalasin D (CD)에 의한 액틴 골격의 붕괴는 연골세포의 재분화를 촉진시키는 역할을 하기도 한

다. 이와 같이 연골세포의 표현형을 결정하는데 있어서 세포골격 구조는 중요한 역할을 한다 (Kim et al., 2003; Benya et al., 1988; Brown, 1988). Cyclooxygenase (COX)는 아라키돈산 (arachidonic acid)을 염증반응 물질인 프로스타글란딘 (prostaglandin)으로 바꾸는데 필요한 효소이다. Cyclooxygenase (COX)는 대표적으로 Cyclooxygenase-1 (COX-1)과 Cyclooxygenase-2 (COX-2)의 두 가지 종류가 존재한다 (Wu, 1995; Dubois et al., 1998; Smith et al., 2000). 다양한 환경 조건에서, COX-1은 일관되게 항상 발현하는 반면, COX-2은 다양한 자극원에 반응하여 일시적으로 발현하는 특성을 가지고 있다 (Wu, 1995; Dubois et al., 1998; Smith et al., 2000). 액틴의 재구성을 유도하는 Retinoic acid (RA)는 비타민 A의 이차 산물로서 연골의 발생에 주요한 조절자로 알려져 있다 (Underhill and Weston, 1998). RA는 nuclear hormone receptor superfamily인 nuclear retinoic acid receptors (RARs)와 retinoid X receptors (RXRs)에 달라 붙는 것에 의해서 생물학적 활성이 변하게 된다 (Li et al., 2004). RA는 배발생에 중요한 역할을 하며, 세포의 증식과 분화를 조절한다. 특히 연골세포의 분화 과정 동안 골격의 형성에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다 (Cashes et al., 1997; Weston et al., 2002a,b). 실제로, RA

*접수일: 2009년 12월 4일 / 수정일: 2009년 12월 17일
채택일: 2009년 12월 18일

[†]교신저자: 김송자, (우) 314-701 충남 공주시 신관동 182번지,
국립공주대학교 자연과학대학 생명과학과
Tel: 041-850-8507, Fax: 041-850-0927
e-mail: ksj85@kongju.ac.kr

는 간충직 세포의 연골세포로의 분화에 관여하여 분화된 연골세포 특이적인 단백질의 발현 저해를 유도한다 (Biddulph et al., 1988; Jiang et al., 1995; Weston et al., 2002a) 앞선 실험 수행 결과 RA는 연골세포의 MAPkinase 신호 전달 경로 중 p38과 PI3kinase 신호전달 경로 중 pAKT를 활성화 시킴으로써 연골세포의 세포사멸 및 탈분화를 유도한다는 결과가 밝혀진 바 있다. 반면에 CD는 연골세포의 액틴세포골격단백질의 중합 저해를 유도하여 세포사멸, 탈분화 및 염증반응을 억제한다는 결과가 보고된 바 있다 (Kim et al., 2003). 그러므로 본 연구에서는 RA가 유도하는 연골세포의 탈분화와 염증반응에 있어서 CD가 어떠한 영향을 주며, 이에 따른 신호전달 경로를 알아 보고자 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

1. Cell culture

2주된 New Zealand White 종의 토끼를 사용하여 무릎 관절에서 연골 조직을 분리해 낸 후, TESCA (50 mM TES, 0.36 mM CaCl₂) buffer에 0.2% collagenase 를 섞어 37°C로 유지되는 CO₂ incubator에서 7시간 동안 조직을 세포로 분리하는 작업을 시행한다. 조직이 모두 세포로 분리되었으면 원심분리 (1,000 rpm, 10분)하여 단세포만을 모은다. 모은 세포를 10%의 FBS (Fetal bovine serum), 50 µg/ml의 streptomycin, 50 units/ml의 penicillin이 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco-BRL, Gaithersburg, MD)에서 5×10⁴ cells/dish의 밀도로 배양한다. 배양액은 이틀에 한 번 교체를 했으며, 세포 밀도가 약 70~80% 정도 되었을 때, 시약을 처리하였다.

2. Western blot analysis

50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.1% Sodium dodecylsulfate를 포함한 buffer에 다양한 protease inhibitor [10 µg/ml leupeptin, 10 µg/ml pepstatin A, 10 µg/ml aprotinin, 1 mM 4-(2-aminoethyl) benzensulfonyl fluoride]와 phosphatase inhibitor (1 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄)를 첨가한 후 lysis buffer를 사용하여 단백질을 lysis 시킨다. 이 단백질을 SDS-polyacrylamide gel에 전기영동하여 Nitrocellulose 막으로 이동시켰다. 후에 항체 type II collagen, COX-2, pp38, actin과 secondary antibody를 붙인 후 X-ray film에 감광시킨다.

3. Determination of chondrocyte phenotype

연골세포의 분화 정도는 0.1% Alcian Blue 용액을 사용하여 sulfated proteoglycan의 축적량을 측정하였다. 세포를 PBS로 세 번 수세한 뒤, Kahle's solution에서 10분 동안 고정된 뒤 다시 PBS로 세 번 수세한다. 그 후 alcian blue staining solution으로 12시간 이상 염색한다. 0.1 N HCl로 두 번 수세한 뒤 4 M guanidine HCl을 넣고 약 12시간 정도 shaking한다. 96 well plate에 약 180 µl/well씩 넣어서 ELISA reader에서 600 nm로 흡광도 값을 측정한다.

4. PGE₂ assay

세포를 96 well plate에 2×10⁴ cells/well의 밀도로 세포를 배양한다. 약 3일 정도 배양한 뒤 시약을 처리한다. 시약 처리 후 24시간 뒤 PGE₂의 생성량을 PGE₂ assay kit를 사용하여 분비된 PGE₂의 양을 측정한다.

결 과

연골세포에서 CD는 RA에 의한 탈분화를 억제한다

이전 연구결과에서 CD는 actin 세포골격단백질의 중합을 억제하여 연골세포의 탈분화, 염증, 세포사멸에 영향을 주는 것으로 보고하였다 (Kim et al., 2003). 이에, 본 실험에서는 RA에 의해 유도되는 연골세포의 탈분화가 세포골격단백질 중합 저해에 의해 조절되는가를 조사하기로 하였다. 먼저, Retinoic acid (RA)를 토끼관절 연골세포에 처리하여 연골세포 탈분화에 미치는 영향을 알아보았다. RA 1 µM을 24시간 단독으로 처리하였을 때, 연골세포의 분화 표지인자인 type II collagen의 발현량이 대조군에 비해 현저히 감소하는 것을 확인하였다. 이는 RA가 연골세포의 탈분화를 유도한다는 기존의 연구 결과와 동일한 결과임을 확인할 수 있었다 (Cho et al., 2003). 이에, CD를 RA와 함께 처리하였을 때 RA에 의해 감소되는 type II collagen의 발현량이 회복되는 것을 확인할 수 있었으며 (Fig. 1A), 이러한 결과는 sulfated proteoglycan의 합성량을 측정한 Alcian blue staining을 통해서도 같은 결과를 얻을 수 있었다 (Fig. 1B). 이는 RA에 의해 유도되어진 연골세포의 탈분화가 actin 세포골격단백질의 중합 저해에 의해 억제되어짐을 보여 주는 것이라 하겠다.

연골세포에서 CD는 RA에 의한 염증반응을 감소시킨다

Actin의 중합 저해가 RA에 의해 유도된 연골세포의

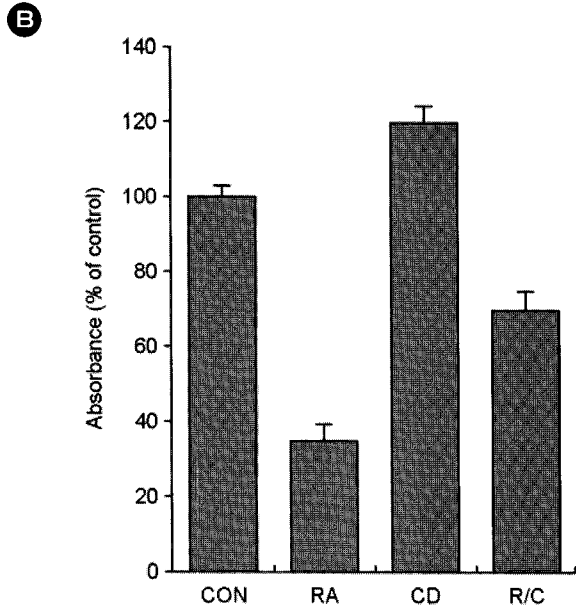
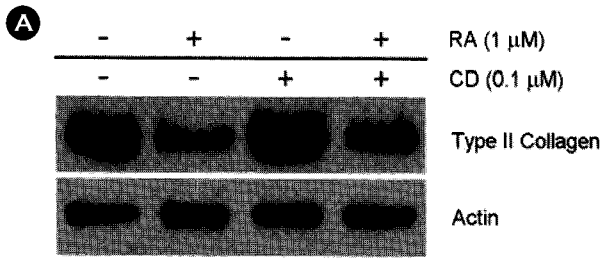


Fig. 1. CD inhibited RA induced dedifferentiation in rabbit articular chondrocytes. Chondrocytes were untreated or treated for 24 h with 1 μ M RA with or without 0.1 μ M CD. Expressions of type II collagen and actin were detected by Western blot analysis (A). Production of sulfated proteoglycan was determined by Alcian blue staining (B). The data present results of a typical experiment from at least four independent experiments.

염증반응도 조절하는 가를 알아보기로 하였다. RA를 단독으로 처리하였을 때, 염증반응의 주요 단백질인 COX-2의 발현량을 증가시키는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 CD를 함께 처리하였을 경우 COX-2의 발현이 억제되는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 2A). 이러한 결과는 COX-2의 대사산물인 prostaglandin E₂ (PGE₂)의 생성량을 통해서도 확인할 수 있었다 (Fig. 2B). 이는 RA에 의해 유도된 COX-2/PGE₂의 발현이 actin 세포골격단백질의 중합 저해에 의해 억제되어짐을 보여 주는 것이라 하겠다.

연골세포에서 CD는 RA에 의한 염증반응 유도를 p38 kinase를 통해 억제한다

위의 결과들을 종합해 볼 때, RA에 의해 유도된 연골세포의 탈분화 및 염증반응은 actin 세포골격단백질의 중

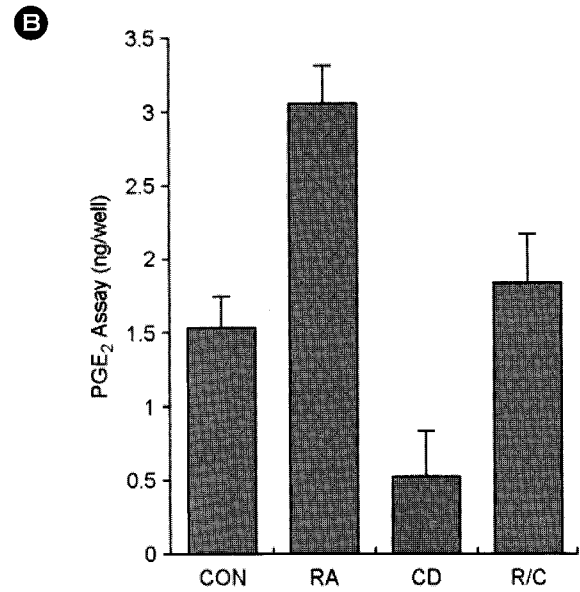
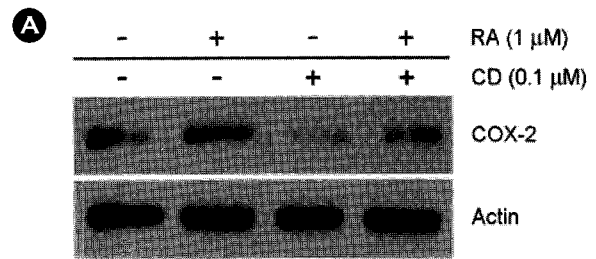


Fig. 2. CD inhibited RA induced expression of COX-2 and production of PGE₂ in chondrocytes. Cells were untreated or treated for 24 h with 1 μ M RA with or without 0.1 μ M CD. Expression of COX-2 and actin was detected by Western blot analysis (A). Level of cellular and secreted PGE₂ was determined by kit assay (B). Expression of actin was used by loading control of blot (A). The data in A and B present results of a typical experiment from at least four independent experiments.

합 저해에 의해 억제되어짐을 확인할 수 있었다. 이에, 연골세포의 탈분화와 염증반응에 관여하는 것으로 알려진 MAP kinase인 ERK-1/2와 p38 kinase의 활성을 Western blot analysis를 통해 확인하였다. RA를 처리한 세포군에 CD를 농도의존적으로 처리한 결과 ERK-1/2의 활성에는 변화가 없음을 확인하였으나 (data not shown) p38 kinase의 활성도는 농도의존적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 3). 이는 농도의존적으로 감소되어지는 p38 kinase의 활성이 농도의존적으로 증가되어지는 type II collagen 발현 및 COX-2의 발현 감소가 상관관계가 있음을 말해 주는 것이라 하겠다. 이에, RA와 CD에 의해 유도된 연골세포의 탈분화와 염증반응 억제효과가 p38-kinase 신호전달 경로를 통해 조절되는지에 관한 연구를 수행하였다. RA 및 CD를 처리하기 전에 p38 Kinase 저해

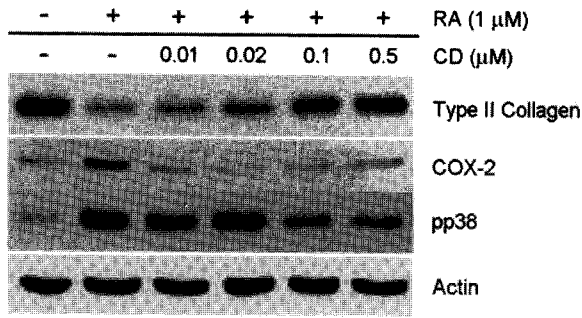


Fig. 3. CD reduced phosphorylation of p38 in primary cultured chondrocytes. Primary chondrocytes were treated with 1 μ M RA in the presence of the indicated concentrations of CD for 24 h. Expressions of type II collagen, COX-2, pp38 and actin were detected by Western blot analysis. Expression of actin was used by loading control. The data present results of a typical experiment from at least four independent experiments.

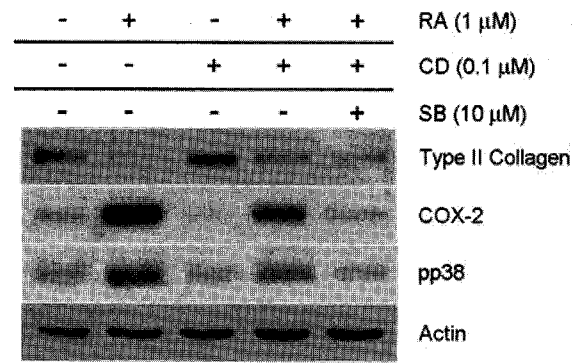


Fig. 4. CD regulated RA induced expression of COX-2 but not dedifferentiation via p38kinase pathway in chondrocytes. Articular chondrocytes were untreated or treated for 24 h with 0.1 μ M CD with 1 μ M RA with or without 10 μ M SB203580 (SB). Expressions of type II collagen, COX-2, pp38 and actin were detected by Western blot analysis. Expression of actin was used by loading control of blot. The data present results of a typical experiment from at least four independent experiments.

제인 SB203580 (SB)을 전 처리하였다. 그 결과 RA와 CD를 처리한 실험군 보다 SB를 전 처리한 후 RA와 CD를 처리한 실험군에서 COX-2의 발현이 현저하게 감소하는 양상을 확인할 수 있었다. 반면에 type II collagen은 SB를 처리해도 발현양상에는 변화가 없음을 확인할 수 있었다 (Fig. 4). 위의 결과를 종합해 볼 때, RA에 의한 염증반응 유도는 actin 세포골격단백질의 중합 저해에 의해 억제되어지며, 이는 p38 kinase 신호전달 경로를 통해 조절되어진다는 것을 확인할 수 있었다. 그러나, RA와 CD에 의한 연골세포의 탈분화 저해는 p38 kinase와는 다른 경로를 통해 조절된다는 것을 확인할 수 있었으며, 향후 이에 대한 연구가 수행되어야 할 것이다.

고 찰

Retinoic acid (RA)는 간충직 세포로부터의 precartilage condensation cartilage nodule 형성을 억제함으로써 연골형성을 억제하는 것으로 알려져 있으며, 이러한 과정에서 RA는 PKC α 와 ERK 신호전달 경로를 통해 N-cadherin, α -catenin, β -catenin과 같은 단백질의 발현을 조절하는 것으로 알려져 있다 (Biddulph et al., 1988; Jiang et al., 1995; Tsonis et al., 1996; Cash et al., 1995; Weston et al., 2002a). 이러한 과정 동안 세포골격의 변화는 중요한 요소로 작용한다. 이와 비슷하게 Cytochalasin D (CD)는 세포의 골격을 구성하는 단백질인 액틴 골격단백질의 중합 저해를 유도함으로써 연골세포의 탈분화, 염증반응, 세포사멸 등의 세포 내 다양한 반응을 조절하는 것으로 알려져 있다 (Kim et al., 2003). 따라서 본 연구는 세포의 골격구성

단백질인 액틴의 변화를 유도하는 CD와 함께 RA를 처리하였을 때, RA가 유도하는 연골세포의 탈분화와 염증반응에 미치는 CD의 영향에 대한 연구를 수행하였다. 그 결과 CD는 RA에 의한 탈분화를 억제하고 분화를 유도한다는 것을 연골세포 분화의 marker인 type II collagen의 발현량과 sulfated proteoglycan의 함성량을 각각 Western blot analysis와 Alcain blue staining을 확인함으로써 알 수 있었다 (Fig. 1). 또한 염증반응 관련 단백질인 cyclooxygenase-2 (COX-2)의 발현량과 COX-2의 대사산물인 prostaglandin E₂ (PGE₂)의 생성량을 Western blot analysis와 PGE₂ assay를 통해 확인해 본 결과 CD는 RA가 증가시킨 염증반응을 감소시킨다는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 2). 이와 같은 결과를 종합해 볼 때 CD는 RA에 의해 유도된 탈분화와 염증반응의 유도를 억제시킨다는 결과를 얻을 수 있다. 따라서, CD가 어떠한 신호전달 경로를 통해 RA가 유도하는 탈분화와 염증반응을 조절하는지 알기 위해 앞선 연구를 통해 밝혀진 결과를 바탕으로 연골세포의 세포반응을 조절하는데 중요한 신호전달 경로인 MAPkinase의 활성을 확인하였다. 그 결과 RA에 의해 유도되는 p38 kinase의 활성이 농도의존적으로 CD에 의해 억제되는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 3). 이에, p38kinase의 활성억제자인 SB203580을 처리하여 RA와 CD에 의한 염증반응 저해가 p38 kinase를 통해 조절되어지는가를 한 번 더 확인하였다. 그 결과, RA에 의한 염증반응 유도는 actin 세포골격단백질의 중합 저해에 의해 억제되며, 이는 p38 kinase 신호전달 경로를 통해 조

절된다는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 4). 그러나, RA가 유도하는 탈분화에 대한 actin 세포골격단백질 중합 저해에 의한 탈분화 억제에는 p38 kinase 신호전달 경로가 아닌 다른 경로의 조절에 의한 것으로 보인다. 앞으로 이에 관한 연구는 지속적으로 진행되어야 할 것이다.

Acknowledgements

This work was supported by the National Research Foundation of Korea (NRF) grant funded by the Korea Government (MEST) (2009-0071662 & 2009-0084569).

REFERENCES

- Benya PD, Brown PD, Padilla SR. Microfilament modification by dihydrocytochalasin B causes retinoic acid-modulated chondrocytes to reexpress the differentiated collagen phenotype without a change in shape. *J Cell Biol.* 1988. 106: 161-170.
- Biddulph DM, Dozier MM, Julian NC, Sawyer LM. Inhibition of chondrogenesis by retinoic acid in limb mesenchymal cells in vitro: effects on PGE2 and cyclic AMP concentrations. *Cell Differ Dev.* 1988. 25: 65-75.
- Brown PD, Benya PD. Alterations in chondrocyte cytoskeletal architecture during phenotypic modulation by retinoic acid and dihydrocytochalasin B-induced reexpression. *J Cell Biol.* 1988. 106: 171-179.
- Cash DE, Bock CB, Schughart K, Linney E, Underhill TM. Retinoic acid receptor alpha function in vertebrate limb skeletogenesis: a modulator of chondrogenesis. *J Cell Biol.* 1997. 136: 445-457.
- DeLise AM, Fischer L, Tuan RS. Cellular interactions and signaling in cartilage development. *Osteoarthritis Cartilage* 2000. 5: 345-351.
- Dubois RN, Abramson SB, Crofford L, Gupta RA, Simon LS, Van De Putte LB, Lipsky PE. Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J.* 1998. 12: 1063-1073.
- Jiang H, Soprano DR, Li SW, Soprano KJ, Penner JD, Gyda M 3rd, Kochhar DM. Modulation of limb bud chondrogenesis by retinoic acid and retinoic acid receptors. *Int J Dev Biol.* 1995. 39: 617-627.
- Kim SJ, Hwang SG, Kim IC, Chun JS. Actin cytoskeletal architecture regulates nitric oxide-induced apoptosis, dedifferentiation, and cyclooxygenase-2 expression in articular chondrocytes via mitogen-activated protein kinase and protein kinase C pathways. *J Biol Chem.* 2003. 278: 42448-42456.
- Li R, Faria TN, Boehm M, Nabel EG, Gudas LJ. Retinoic acid causes cell growth arrest and an increase in p27 in F9 wild type but not in F9 retinoic acid receptor beta2 knockout cells. *Exp Cell Res.* 2004. 294: 290-300.
- Poole S. An introduction to the pathophysiology of osteoarthritis. *Front Biosci.* 1999. 4: 662-670.
- Sandell LJ, Adler P. Developmental patterns of cartilage. *Front Biosci.* 1999. 15: D731-742.
- Sandell LJ, Aigner T. Articular cartilage and changes in arthritis. An introduction: cell biology of osteoarthritis. *Arthritis Res.* 2001. 3: 107-113.
- Smith WL, Garavito RM, DeWitt DL. Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenase)-1 and -2. *J Biol Chem.* 1996. 271: 33157-33160.
- Tsonis PA, Sargent MT, Del Rio-Tsonis K, Jung JC. 9-cis retinoic acid antagonizes the stimulatory effect of 1,25 dihydroxyvitamin D3 on chondrogenesis of chick limb bud mesenchymal cells: Interactions of their receptors. *Int J Dev Biol.* 40: 1053-1059.
- Underhill TM, Weston AD. Retinoids and their receptors in skeletal development. *Microsc Res Tech.* 1998. 43: 137-55.
- Weston AD, Chandraratna RA, Torchia J, Underhill TM. Requirement for RAR-mediated gene repression in skeletal progenitor differentiation. *J Cell Biol.* 2002b. 158: 39-51. *Epub* 2002 Jul 8.
- Weston AD, Rosen V, Chandraratna RA, Underhill TM. Regulation of skeletal progenitor differentiation by the BMP and retinoid signaling pathways. *J Cell Biol.* 2002a. 148: 679-690.
- Wu. Inducible cyclooxygenase and nitric oxide synthase. *Adv Pharmacol.* 1995. 33: 179-207.