

## Chenodeoxycholic Acid에 의한 파골전구세포의 증식 조절

노아롱새미 · 임미정<sup>#</sup>

숙명여자대학교 약학대학

(Received February 13, 2014; Revised April 15, 2014; Accepted April 28, 2014)

### The Regulatory Role of Chenodeoxycholic Acid on the Proliferation of Osteoclast Precursor Cells

A Long Sae Mi Noh and Mijung Yim<sup>#</sup>

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

**Abstract** — We investigated the effect of Chenodeoxycholic acid (CDCA) on the proliferation of osteoclast precursor cells. CDCA decreased the proliferation of osteoclast precursor cells through the control of cell cycle regulators such as cyclin D1, p21 and p27. When we checked the signaling pathway, CDCA decreased Erk activation in osteoclast precursor cells. Furthermore, two bile acid receptors, FXR and TGR5, were involved in the suppressive effect of CDCA. Taken together, this study suggested that bile acid plays an important role in the proliferation of osteoclast precursor cells.

**Keywords** □ CDCA, osteoclast precursor cells, proliferation

건강한 골은 평생 동안 골이 지속적으로 형성되고 파괴되며, 이를 골의 재형성이라 한다.<sup>1)</sup> 골을 구성하는 두 가지 세포 중 조골세포는 골을 구성하는 기질성분을 분비하고 합성하며 골 표면 사이의 무기질 이동에 관여하는 골세포로 중요한 역할을 수행한다. 한편, 파골세포는 골의 기질 성분을 용해시켜 칼슘염과 인산염을 유리시키는 골 흡수 분해를 담당함으로써 골의 농도를 유지시키는 기능을 수행한다.<sup>1,2)</sup> 파골세포는 크게 3단계 과정을 거쳐 골 흡수(bone resorption) 활성을 가지는 성체 파골세포로 분화된다. 첫 번째 단계는 조혈줄기세포(hematopoietic stem cell)로부터 파골전구세포(precursor)로 분화하는 과정이고, 두 번째는 파골전구세포가 단핵 파골세포를 거쳐 다핵거대세포(multinuclear giant cell)인 성체 파골세포(mature osteoclast)를 형성하는 단계, 마지막 3번째 단계는 융합된 다핵거대세포가 골을 흡수하는 단계이다.<sup>3)</sup> 조골세포와 골수기질세포에서 발현되는 사이토카인인 M-CSF(macrophage colony-stimulating factor)는 조혈줄기세포 표면의 CSF-1R(colony stimulating factor 1

receptor) 수용체에 결합하는 당단백질로, 조혈줄기세포를 세포 내 신호전달계를 통하여 활성화시킴으로써 파골전구세포로 분화, 증식시키며, 생존에 필수인자로 작용한다.<sup>4)</sup>

담즙산은 담즙(bile juice)을 구성하는 주요 유기물질로서 간세포에서 콜레스테롤로부터 합성되며 생체 내에서 지질의 흡수를 돕는다. 하지만, 일부 불용성 담즙산은 간과 장에서 세포의 세포사멸(apoptosis) 및 괴사(necrosis)를 유발하는 병리 현상에도 중요한 역할을 담당하는 것으로 여겨지고 있다. 담즙산은 화학적으로 산성을 띠는 steroid 구조인데 모핵에 결합하는 치환기에 따라 상이한 구조의 담즙산류로 변하고 고유한 생리적, 병리적, 약리적 활성을 나타낸다.<sup>5)</sup> 담즙산은 간에서 cholesterol을 원료로 다양한 효소가 관여 하는 세 가지 경로를 통하여 주로 choleic acid(CA)와 chenodeoxycholic acid(CDCA) 같은 1차 담즙산으로 생합성되며, CA와 CDCA는 장내 세균에 의하여 deoxycholic acid(DCA)와 lithocholic acid(LCA) 같은 2차 담즙산으로 변화된다.<sup>6,7)</sup> 담즙산은 최근 대사질환의 치료 후보물질로 관심을 끌고 있다. 담즙산의 신호를 전달하는 수용체로 farnesoid X receptor (FXR)과 G protein-coupled receptor 5(TGR5)의 2종이 알려져 있다. FXR은 글루코스과 지질 대사와 연관되어있다. 즉, FXR의 활성화는 지질합성을 억제하고 triglyceride의 제거를 증가시킴으로써 혈장 triglyceride 레벨을 감소시킨다. 이와 일치하게 FXR 결손 마우스는 당뇨와 고triglyceride혈증을 보인다. 또한 FXR은

#### <sup>#</sup>Corresponding Author

Mijung Yim

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

Tel.: 02-710-9572 Fax.: 02-710-9871

E-mail: myim@sookmyung.ac.kr

인슐린 저항성이나 공복시 저혈당증의 예방, 간 글리코겐의 생성 및 지방세포의 분화에도 중요한 역할을 담당한다.<sup>8,9)</sup> 한편 TGR5는 체내 글루코스 조절과 체중감소와 연관되어 있다고 생각되어진다. 모든 담즙산이 TGR5를 활성화시키는 것은 아니나, 1차 담즙산인 CDCA는 FXR과 TGR5 양쪽에 모두 작용할 수 있다. 최근의 연구결과에서는 담즙산 수용체 중 하나인 FXR이 양성적으로 골 대사를 조절함이 보고되었고,<sup>10)</sup> 뼈의 병리적 변화의 진행을 감소시켜주는 대증요법 약제인 비스포스포네이트 제제에 담즙산을 함유시킨 새로운 물질을 합성하여 생물학적 활성을 확인 한 결과 비스포스포네이트 제제의 결점은 보완되고, 더 우수한 생물활성을 보였다.<sup>11)</sup>

담즙산이 골대사에 미치는 영향에 대해서 충분히 밝혀지지 않았으므로, 본 연구에서는 CDCA를 사용하여 담즙산이 생리활성 물질로서 파골전구세포에 미치는 영향을 조사하였기에 보고하는 바이다.

## 실험방법

### 시약

별도로 언급하지 않은 한 실험에 사용한 모든 시약은 Sigma Aldrich(St. Louis, MO)에서 구입하였다.

### 마우스 파골전구세포의 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  $\alpha$ -minimum essential medium(MEM)을 흘려보내 골수세포를 시험관에 모았다. 1200 rpm에서 5분 원심 분리한 후 10% fetal bovine serum(FBS)가 함유된  $\alpha$ -MEM으로 재현탁하여 골수세포를 M-CSF 10 ng/ml로 하룻밤 배양한 후 부유세포를 M-CSF 30 ng/ml로 3일간 추가 배양했다. 이를 회수하여 파골전구세포로 사용하였다. 모든 실험은 숙명여자대학교 동물윤리심의 위원회의 승인하에 수행되었다(승인번호 SMU-IACUC-2011-0915-019호).

### MTT 분석

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 정량은 Mosmann의 방법을 변형하여 실시하였다.  $1 \times 10^4$  cells/well 농도로 96 well plate에 분주한 세포에 시료를 처리하고 일정 시간 동안 배양하였다. 배양액을 버리고 PBS로 wash한 후, MTT 용액(0.5 mg/ml)을 100  $\mu$ l/well 첨가하여 호일로 씌운 상태에서 5시간 동안 배양하고, Solubilization buffer(10% SDS in 0.01 M HCl)를 100  $\mu$ l/well 첨가하고 다시 호일로 씌웠다. 16~17

시간 동안 배양한 후, 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### Cell apoptosis 측정

평균 한 cover glass를 24 well plate에 넣고 적당량의 media를 넣은 후 tip으로 눌러 기포를 제거하였다.  $0.3 \times 10^6$  cells/ml의 농도로 분주한 후 하룻밤 동안 배양하였다. 배양액을 버리고 -/+ media로 3회 wash한 후, CDCA 100  $\mu$ M이 첨가된 배지로 교체하여 48 h 동안 배양하였다. 배양액을 제거하고, MeOH 1 ml를 첨가하여 -20°C에서 20분간 고정하였다. MeOH를 제거하고, PBS를 1 ml 첨가하여 실온에서 10분간 안정화하였다. PBS를 제거하고, cover glass를 꺼내 뚜껑 위에 올려두고 PBS-BT를 200  $\mu$ l 첨가하여 실온에서 30분간 배양하였다. PBS-BT를 제거한 후 DAPI를 1  $\mu$ g/ml로 처리 후 차광한 상태로 1분간 처리하고, PBS-BT로 90초간 3회 washing하였다. Slide glass에 mounting solution을 한 방울 떨어뜨린 후 cell이 붙어 있는 부분을 당겨하여 cover glass를 올려놓고 1시간 동안 말려준다. Apoptosis의 유무는 형광현미경으로 관찰하였다.

### Western blot 분석

시료를 처리 한 세포를 lysis buffer로 용해하고 원심분리하였다. 여기서 얻은 상등액을 10% SDS-PAGE를 이용해 전기영동하고 이를 nitrocellulose membrane으로 이전시켰다. 이를 5% skim milk가 함유된 PBST 용액으로 blocking하고, 1차 항체로서 anti-Cyclin D1(1:1000, Cell signaling), anti-p21(1:1000, Cell signaling), anti-p27(1:1000, Cell signaling), anti-p-Erk(1:1000, Cell signaling), anti-p-AKT(1:1000, Cell signaling), anti-Cyclin D1(1:1000, Cell signaling), anti-Erk(1:1000, Cell signaling), anti- $\beta$ -actin(1:4000, Cell signaling) 항체와 각각 반응시켰다. PBST로 5회 wash하고 HRP(horseradish peroxidase)가 결합된 2차 항체와 반응시킨 후 ECL Select(Amersham. CO)로 발색시켜 LAS-3000으로 측정된 후 Scion image 프로그램을 사용하여 분석하였다.

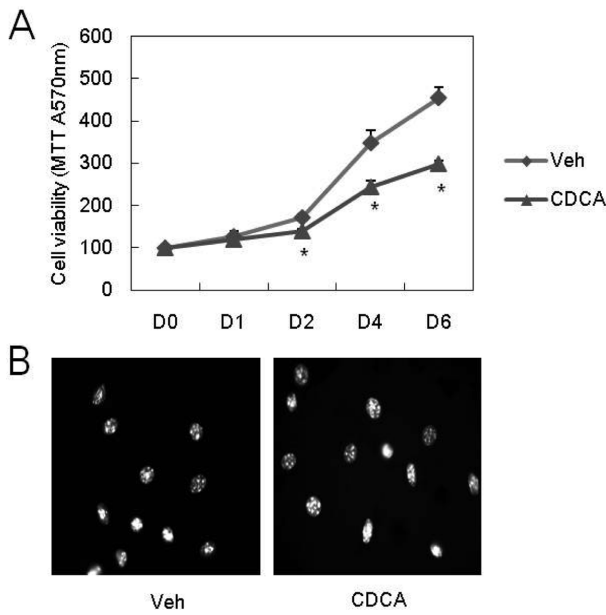
### 통계처리

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

## 실험결과 및 고찰

### 파골전구세포 증식에 대한 CDCA의 효과

본 연구에서는 파골전구세포에 대한 담즙산의 생리적 활성 기능을 규명하기 위하여 1차적 담즙산인 CDCA를 실험에 사용하였다. 먼저, 마우스 골수세포를 M-CSF로 3일간 처리하여 파골



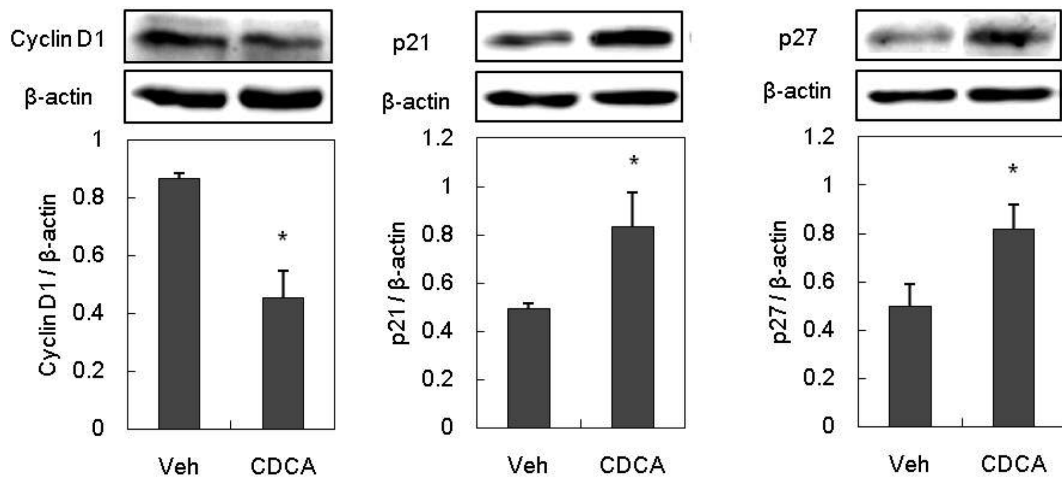
**Fig. 1** – The effects of CDCA on the growth of osteoclast precursor cells. (A) osteoclast precursor cells were cultured with or without the CDCA (100  $\mu$ M) in the presence of M-CSF (30 ng/ml) for various times. The growth was assessed using MTT assay. (B) osteoclast precursor cells were treated with or with out CDCA (100  $\mu$ M) in the presence of M-CSF (30 ng/ml) for 48 h. The apoptosis of cells was assessed using DAPI assay. All data are expressed as mean  $\pm$  SD of three independent experiments. D, Day; Veh, Vehicle; CDCA, chenodeoxycholic acid.

의 증식 억제에 세포사(apoptosis)에 기인한 것인지 확인하였다. 파골전구세포를 M-CSF 존재하에서 CDCA로 48시간 처리한 후 DAPI 염색하고 형광으로 관찰한 결과 대조군과 CDCA 처리군 사이에 염색체의 응축과 분절의 차이가 거의 없는 것으로 보아 CDCA의 처리는 파골전구세포의 세포사를 증가시키지 않는 것으로 나타났다(Fig. 1B). 이에 따라 CDCA에 의한 파골전구세포의 증식 억제는 세포사와는 무관한 것으로 추정되었다. 다음은 CDCA와 세포주기와의 연관성을 밝히고자, CDCA에 의해 세포주기에 관여하는 인자들이 변화하는지 여부를 조사하였다. p21은 세포주기를 정지시키는 기능과 세포주기로부터 세포노화 혹은 분화를 유도하는 제어인자로서 중요한 역할을 수행하고, p27은 다양한 세포 외부의 증식유도 혹은 정지신호들에 의해 조절되어 세포수가 증가되어 세포밀도가 높아지면 발현이 증가하는 등 세포주기의 음의 조절자로 작용하며, cyclin D1은 일시적으로 분자 브레이크를 제거하여 세포분열을 위해 더 많은 DNA의 생산을 가능하게 하는 것으로 세포주기의 양의 조절자로 작용한다.<sup>12-14</sup> 이들 분자의 발현 정도를 각각의 항체를 이용한 western blot 분석법으로 조사하였다. 그 결과, M-CSF 존재하에서 CDCA의 처리는 cyclin D1의 발현을 유의성 있게 감소시키는 한편, p21과 p27의 발현을 유의성 있게 증가시키는 것으로 나타났다(Fig. 2). 이는 CDCA가 파골세포의 증식을 억제하는 것과 일치하는 것으로, CDCA는 세포주기 관련인자의 발현을 조절함으로써 파골전구세포 증식을 억제하는 것으로 생각되었다.

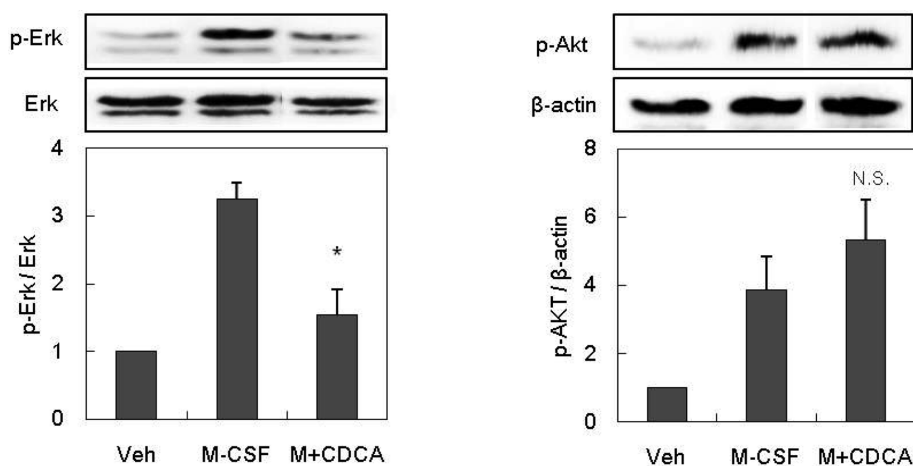
전구세포를 생성한 후, M-CSF 존재하에서 CDCA를 각 날짜별로 처리하여 세포 증식에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과 시간이 지남에 따라 CDCA에 의해 세포의 증식률이 유의하게 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 1A). CDCA에 의한 파골전구세포

**CDCA의 세포증식 억제에 관여하는 신호전달기전 규명**

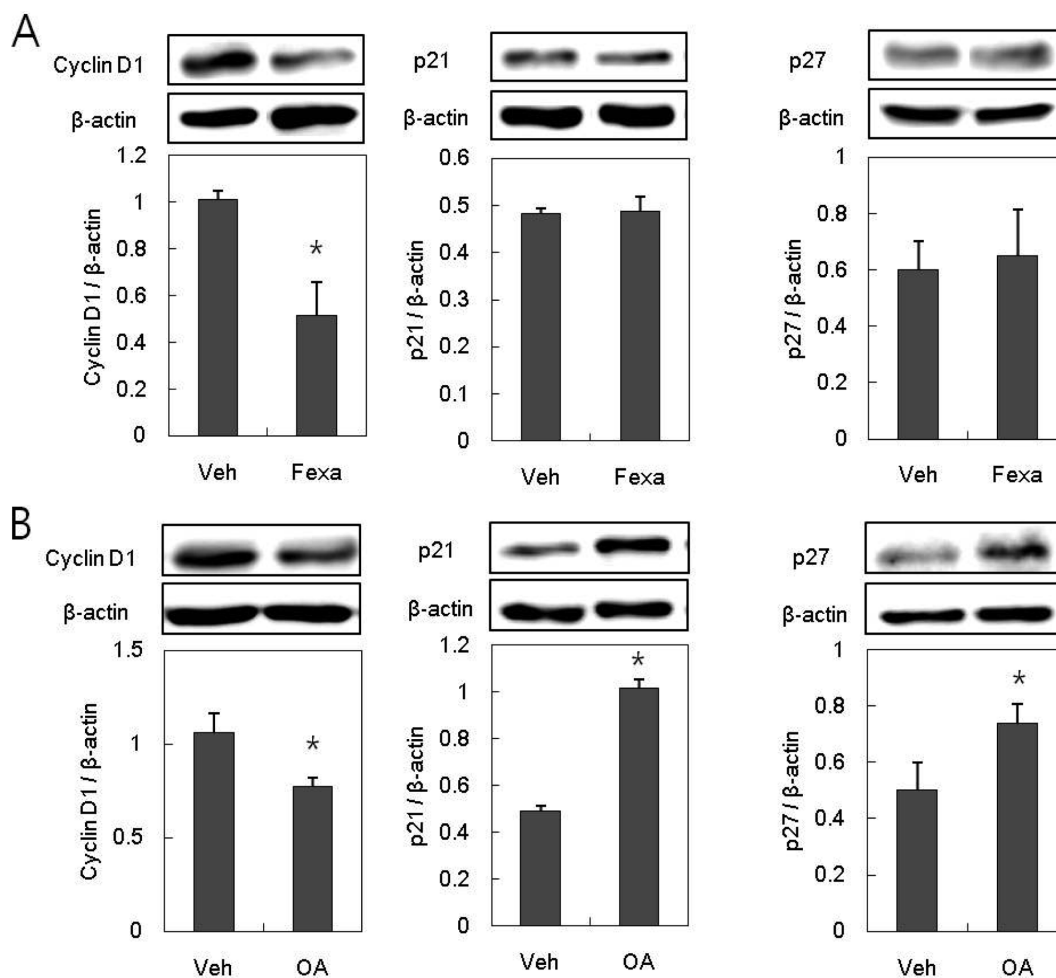
다음으로 CDCA가 파골전구세포의 증식을 억제하는 신호전달기전을 규명하고자 하였다. M-CSF는 파골전구세포의 증식을 촉진하고, 세포사로부터 보호하는 역할을 한다. Akt와 Erk 신호전



**Fig. 2** – The effects of CDCA on cell cycle-related molecules. Osteoclast precursor cells were cultured with or without the CDCA (100  $\mu$ M) in the presence of M-CSF (30 ng/ml) for 24 h. Western blotting was performed with indicated antibodies.  $\beta$ -Actin served as an internal control. All data are expressed as mean  $\pm$  SD of three independent experiments. Veh, Vehicle; CDCA, chenodeoxycholic acid.



**Fig. 3** – The effects of CDCA on Erk and Akt signaling pathways. Osteoclast precursor cells were starved without M-CSF for 12 hrs. CDCA (100  $\mu$ M) was pretreated for 30 min and then treated with or without M-CSF (30 ng/ml) for 15 min. Western blotting was performed with indicated antibodies.  $\beta$ -Actin served as an internal control. All data are expressed as mean $\pm$ SD of three independent experiments. Veh, Vehicle; CDCA, chenodeoxycholic acid; M, M-CSF; N.S., not significant.



**Fig. 4** – The effects of agonists for bile acid receptors on cell cycle-related molecules. Osteoclast precursor cells were cultured with or without fexaramine (10  $\mu$ M, A) or oleanolic acid (10  $\mu$ M, B) in the presence of M-CSF (30 ng/ml) for 24 h. Western blotting was performed with indicated antibodies.  $\beta$ -Actin served as an internal control. All data are expressed as mean $\pm$ SD of three independent experiments. Veh, Vehicle; Fexa, fexaramine; OA, oleanolic acid.

달계가 M-CSF의 작용을 매개하는데,<sup>15,16)</sup> Akt는 세포사를 억제하여 세포 생존을 조절하는 한편, Erk는 세포의 증식을 매개하는 인자로 알려져 있다. 먼저 CDCA가 파골전구세포의 증식을 억제하였으므로, CDCA가 M-CSF로 유도된 Erk의 활성화에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과 파골전구세포에서 M-CSF로 유도된 Erk의 인산화는 CDCA에 의해 유의하게 억제됨을 확인할 수 있었다. 한편, CDCA는 파골전구세포에서 M-CSF로 유도된 Akt의 인산화는 억제하지 않았으며, 이는 CDCA가 파골전구세포의 세포사를 유발하지 않는 것과 일치하는 결과라 할 수 있다(Fig. 3). 이상의 결과로부터 CDCA가 파골전구세포의 증식을 억제하는 것은 M-CSF에 의한 Erk 신호전달기전의 활성화를 차단하기 때문으로 추정되었다.

#### CDCA의 세포증식 억제에 관여하는 담즙산 수용체의 규명

CDCA는 FXR와 TGR5 2종의 담즙산 수용체를 모두 활성화시키는 것으로 알려져 있다. CDCA는 파골전구세포에서 cyclin D1의 발현 증가와, p21 및 p27의 발현 감소를 통해 증식을 억제하는 것으로 나타났으므로, 이를 매개하는 수용체를 규명하고자 하였다. 각각 FXR 활성화제(fexaramine) 또는 TGR5 활성화제(oleanolic acid)를 사용하여 세포주기 관련 인자의 변화를 살펴본 결과, FXR의 활성화는 cyclin D1의 발현을 감소시키는 반면 p21 및 p27의 발현에는 아무 영향이 없었다(Fig. 4A). TGR5 활성화제는 cyclin D1의 발현 감소와 함께 p21 및 p27의 발현을 증가시키는 것으로 나타났(Fig. 4B). 이는 CDCA의 cyclin D1의 발현증가는 FXR과 TGR5를 매개한 것이며, p21 및 p27의 발현 감소는 TGR5를 매개한 것임을 시사하는 것으로, CDCA는 FXR과 TGR5 모두의 활성화를 통해 세포주기 관련인자를 조절하는 것으로 추정할 수 있다.

## 결 론

담즙산인 CDCA가 파골전구세포에 미치는 영향을 조사한 결과, M-CSF 존재하에서 CDCA는 파골전구세포의 증식을 억제하는 것으로 나타났다. 이는 파골전구세포의 세포사 유발과는 무관하며, 세포주기 조절 분자인 cyclin D1, p21 및 p27의 발현 조절에 기인한 것으로 밝혀졌다. 또한 CDCA는 담즙산 수용체인 FXR과 TGR5를 매개하여 파골전구세포의 세포주기를 조절하는 것으로 추정되었다. 파골전구세포는 M-CSF에 의한 Erk 신호전달 경로를 통해 증식하는 것으로 알려져 있으며, CDCA는 이 경로를 차단하는 것으로 밝혀졌다. 최근 담즙산 수용체가 만성간 질환, 간암, 감염 및 대사성 질환의 새로운 약물 표적 분자로 주목을 받고 있으며, 이에 따라 다양한 담즙산 유도체가 개발되어 지고 있다. 본 연구는 담즙산의 파골전구세포에 미치는 영향을 분석하였으며, 이는 향후 담즙산과 골대사와의 연관성을 밝히는

데 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

## References

- 1) Takayanagi H. : Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immun and bone systems. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 292 (2007).
- 2) 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).
- 3) 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).
- 4) Humphrey, M. B., Lanier, L. L. and Nakamura, M. C. : Role of ITAM-containing adaptor proteins and their receptors in the immune system and bone. *Immunol. Rev.* **208**, 50 (2005).
- 5) Thomas, C., Pellicciari, R., Pruzanski, M., Auwerx, J. and Schoonjans, K. : Targeting bile acid signalling for metabolic diseases. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **7**, 678 (2008).
- 6) Huang, L., Sun, Y., Zhu, H., Zhang, Y., Xu, J. and Shen, Y. M. : Synthesis and antimicrobial evaluation of bile acid tridentate conjugates. *Steroids* **74**, 701 (2009).
- 7) Parks, D. J., Blanchard, S. G., Bledsoe, R. K., Chandra, G., Consler, T. G., Kliewer, S. A., Stimmel, J. B., Willson, T. M., Zavacki, A. M., Moore, D. D. and Lehmann, J. M. : Bile acids: natural ligands for an orphan nuclear receptor. *Science* **284**, 1365 (1999).
- 8) Masishima, M., Okamoto, A. Y., Repa, J. J., Tu, H., Learned, R. M., Luk, A., Hull, M. V., Lustig, K. D., Mangelsdorf, D. J. and Shan, B. : Identification of a nuclear receptor for bile acid. *Science* **284**, 1362 (1999).
- 9) Lefebvre, P., Cariou, B., Lien, F., Kuipers, F. and Steals, B. : Role of bile acids and bile acid receptors in metabolic regulation. *Physiol. Rev.* **89**, 147 (2009).
- 10) Cho, S. W., An, J. H., Park, H., Yang, J. Y., Choi, H. J., Kim, S. W., Park, Y. J., Kim, S. Y., Yim, M., Baek, W. Y., Kim, J. E. and Shin, C. S. : Positive regulation of osteogenesis by bile acid through FXR. *J. Bone. Miner. Res.* **28**, 2109 (2013).
- 11) Bortolini, O., Fantin, G., Fogagnolo, M., Rossetti, S., Maiuolo, L., Di Pompo, G., Avnet, S. and Granchi, D. : Synthesis, characterization and biological activity of hydroxyl-bisphosphonic analogs of bile acids. *Eur. J. Med. Chem.* **52**, 221 (2012).
- 12) Wong, S. C., Chan, J. K., Lee, K. C. and Hsiao, W. L. : Differential expression of p16/p21/p27 and cyclin D1/D3, and their relationships to cell proliferation, apoptosis, and tumour progression in invasive ductal carcinoma of the breast. *J. Pathol.* **194**, 35 (2001).

- 13) Stacey, D. W. : Cyclin D1 serves as a cell cycle regulatory switch in actively proliferating cells. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **15**, 158 (2003).
- 14) Coqueret, O. : New roles for p21 and p27 cell-cycle inhibitors: a function for each cell compartment? *Trends Cell. Biol.* **13**, 65 (2003).
- 15) Thomas, F. F., Christoph, P. H., Lisa, S., Grigoriy, A. S. and Chizuru, S. : PI3K/Akt and apoptosis: size matters. *Oncogene* **22**, 8983 (2003).
- 16) Jennifer, M. C., Tim, D. E., Ryan, D. R., Yijie, W., Nabendu, P., Amit, M. and Clay, B. M. : M-CSF Signals through the MAPK/ERK pathway via Sp1 to induce VEGF production and induces angiogenesis in vivo. *PLoS ONE* **3**, e3405 (2008).