

Cyclosporin A가 흰쥐 뼈끝연골관 성장에 미치는 영향

김현진, 김옥준, 황윤찬, 신주호, 박하옥,
김민석, 이은주, 김선현
전남대학교 치과대학 치의학연구소

간추림 : cyclosporin (CsA)은 11개의 아미노산으로 구성된 hydrophobic cyclic peptide로 T-cell 활성화를 조절하는 사이토카인의 생성을 억제하는 기능을 가지고 있어 여러 면역 질환을 치료하는데 이용되고 있다. CsA는 면역계에 영향을 미쳐 cytokine의 분비와 형성을 억제하기 때문에 이차적으로 골 대사와 골 개조에 영향을 미칠 수 있다. 현재까지 CsA의 뼈에 대한 작용에 대하여 대체적으로 일치하는 결과는 CsA가 뼈 흡수와 뼈 형성을 가속화하여 high turnover osteopenia를 유발한다는 것이다. 그러나 이는 결과적 현상을 설명할 뿐, 근간의 기초적 자료는 충분하지 못하다. 즉, 위의 결과와 달리 CsA는 in vitro에서 자극된 뼈파괴세포에 의한 뼈 흡수를 억제하며, 뼈모세포와 뼈파괴세포 모두를 억제하기도 한다. 이와 같이 CsA 작용 기전에 대한 불일치는 in vitro에서의 연구가 뼈 흡수의 관점에서만 다루어진 결과이며 뼈 형성에 관여하는 세포에 대한 영향이 충분히 구명되지 않았기 때문으로 생각된다. 본 연구는 CsA가 뼈 형성에 미치는 영향을 구명하기 위하여 MC3T3-E1 뼈모세포주에서의 세포증식 및 유전자 발현 변화와 흰쥐에서 뼈 형성 변화를 형태계측을 이용하여 측정된 결과 다음과 같은 결과를 얻었다. MC3T3-E1 세포주를 이용한 MTS 결과 1일과 3일 처리 후 CsA 1,000 ng/ml와 1,500 ng/ml 농도에서 흡광도가 대조군에 비해 감소하여 고농도에서 세포 증식을 억제함을 알 수 있었다. CsA 처리 후 alkaline phosphatase 유전자 발현은 큰 변화가 없었으나 type I collagen 유전자 발현은 농도 의존적으로 감소하였다. 흰쥐에서 CsA 투여 후 형태 계측 결과 투여 기간이 길어짐에 따라 증식연골세포대의 두께, 비대연골세포대의 두께, 이차뼈발생중심의 너비, 뼈끝연골관 아래쪽 해면뼈의 길이 등이 유의하게 감소하였다. 상기 결과는 CsA는 고농도에서 장기간 투여시 뼈모세포에 직접 영향을 미쳐 뼈 형성 장애를 초래할 수 있음을 시사하였다.

찾아보기 낱말 : Cyclosporin A, 뼈끝연골관, 뼈성장

서 론

cyclosporin (CsA)은 11개의 아미노산으로 구성된 hydrophobic cyclic peptide로 곰팡이 *Tolypocladium infratum*에서 추출된다(Laupacis 등 1982, Wenger, 1982). CsA는 비교적 안전하고 독성이 낮기 때문에 여러 면역 질환을 치료하는데 이용되고 있으며, T-cell 활성화를 조절하는 cytokine의 생성을 억제함으로써 장기 이식시 면역반응을 억제하는 효과를 갖

는다(Epstein 1996). CsA는 대표적인 부작용으로 치은증식, 콩팥 독성, 간 독성 외에 뼈형성장애인 osteopenia 또는 뼈형성증(osteoporosis)을 유발하는 것으로 알려져 있어 이식 후 삶의 질을 위하여 안전한 치료가 요망된다(Katz와 Epstein 1992, Withold 등 1996, Bonnin 등 1997).

CsA는 면역계에 영향을 미쳐 cytokine 분비와 형성을 억제하기 때문에 이차적으로 뼈 대사와 뼈 개조에 영향을 미칠 수 있다. CsA는 림프구에서 inomyacin-induced calcium influx를 억제하나(Matysus 등 1986) 간세포에서는 calcium influx를 증가시키며(Nicchitta 등 1985) 심장세포에서는 사립체 속막의

* 본 연구는 2003년도 성의기초과학연구비지원으로 수행되었음.
교신저자: 김선현 (전남치대 구강해부학교실)
전자우편: ksh@chonnam.ac.kr

calcium dependant pore를 억제한다(Crompton 등 1988). 이러한 사실로부터 CsA가 뼈를 생성하는 뼈모세포에서 calcium의 신호전달과 hydroxyapatite 침착에 영향을 미칠 수 있으며, 뼈 광화를 조절하는 osteoprogenitor 세포에도 영향을 미쳐 광화에 영향을 줄 것으로 예견된다.

현재까지 CsA의 뼈에 대한 작용은 여러 측면에서 일치하고 있지 않으나 대체적으로 일치하는 결과는 뼈 흡수와 뼈 형성을 모두 가속화하여 high turnover osteopenia를 유발한다는 것이다(Orcel 등 1989, Stein 등 1991, Kawana 등 1996, Sass 등 1997). 이러한 결과는 임상적으로 심장 이식 환자의 28~35%에서 osteopenia를 유발하는 것으로부터 확인되고 있다(Shane 등 1993). 그러나 상기 보고는 결과적 현상을 설명할 뿐 근간이 되는 기초적 자료는 충분하지 못하다. 또한 위의 보고와는 달리 CsA는 in vitro에서 뼈모세포와 뼈파괴세포 모두를 억제하여 뼈 흡수를 억제하며(Chowdhury 등 1991, McCauley 등 1992) 나아가 뼈 파괴보다는 뼈 형성 기능을 갖는 것으로 보고된 바도 있다(Klaushofer 등 1987, Orcel 등 1991). 또한 CsA는 이틀뼈에서 뼈파괴세포 수를 증가시키며, 뼈 형성을 감소시킨다(Fu 등 1999). 이와 같이 CsA 작용이 보고자마다 상이한 이유는 CsA 작용이 다양하고, in vitro에서의 연구가 뼈 흡수의 관점에서만 다루어진 결과이며 뼈 형성에 관여하는 세포에 대한 영향이 충분히 구명되지 않았기 때문으로 사료된다.

뼈모세포에 의한 뼈 형성에는 아교섬유, 뼈기질의 생성과 흡수에 관여하는 여러 효소, 예컨대 metalloproteinase, tissue inhibitor of metalloproteinase 등이 관여한다. CsA에 대한 많은 연구는 치은이나 콩팥 등 연조직에서 이루어졌을 뿐 CsA가 성장기 뼈에 미치는 영향에 관한 보고는 많지 않다. 다만 Fu 등(2001)이 CsA 투여 후 아래턱뼈 발육 장애에 의하여 비정상적인 얼굴의 발육을 보고한 바 있다.

긴뼈의 뼈끝연골판은 성장기에 뼈 성장에 중요한 역할을 하며 연골의 광화 과정은 성숙한 연골세포 세포막에 calcium의 축적과 관련이 있다(Wuthier 등 1993). 또한 사립체는 광화 과정에서 calcium의 유리에 관여하고, CsA가 사립체의 permeability transi-

tion pore를 억제하기 때문에(Petronilli 등 1994) CsA가 광화 및 뼈 형성에 영향을 미칠 수 있다. 뼈끝연골판은 성장 과정에서 예비연골세포대, 증식연골세포대, 비대연골세포대 및 metaphysis 등 여러 층을 형성하기 때문에 뼈의 성장을 연구하는데 좋은 모델이 된다.

본 연구에서는 CsA가 in vitro 뼈모세포에서 세포 증식, 뼈 흡수와 형성에 관여하는 유전자 발현 및 궁극적으로 in vivo에서 뼈 성장에 미치는 영향을 구명하고자 한다.

재료 및 방법

1. In vivo

1) Cyclosporin A 투여

실험동물은 출생 1일된 10마리의 Sprague-Dawley계 흰쥐와 출생 10일된 20마리의 동일 계 흰쥐를 대상으로 하였다. CsA(중근당, 한국)를 olive oil에 녹여 10 mg/kg 농도로 매일 목 뒤 피부밑에 주사하였다. 대조군으로 동일 연령의 흰쥐를 대상으로 olive oil만을 주사하였고, 이때 대조군과 실험군에 이용된 흰쥐는 같은 배에서 태어난 새끼를 이용하였다.

2) 광학현미경 관찰

약물투여 후 에테르 마취를 유도하고 주사 3일과 7일, 14일 후 희생하여 정강뼈와 넙다리뼈를 포함한 무릎관절 부분을 절취하여 10% 중성 완충 포르말린 용액에 24시간 동안 침윤 고정하였다. 고정 후 EDTA 용액(pH 7.4, 4°C) 혹은 5% nitric acid에서 약 1주에서 1달간 탈회하고, 알콜 탈수 과정을 거쳐 xylene에 투명한 후 파라핀 내에 포매하였다. 포매된 조직에서 4 μm 내외의 시상 연속절편으로 부터 무릎관절의 정중시상단면 표본을 얻어 hematoxylin-eosin 염색을 시행하고 광학현미경으로 관찰하였다.

3) 형태계측

정중 시상 연속절편 중 최대 단면적을 갖는 표본을 대상으로 하였다. 정강뼈와 넙다리뼈의 이차뼈발생중심을 50배 또는 100배 저배율 촬영 후 크기를

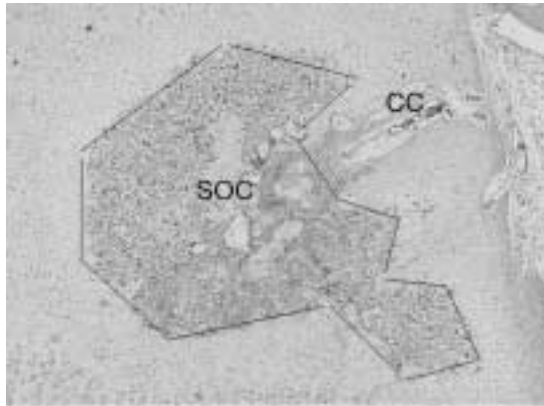


Fig. 1. Measurement of the secondary ossification center (SOC) in the tibial proximal and femoral distal epiphyses. CC : cartilage canal.

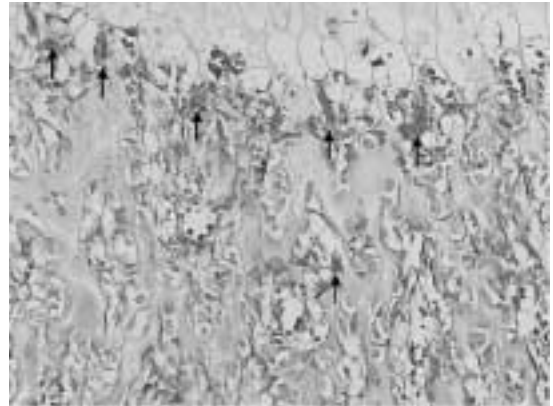


Fig. 3. Many chondroclasts are resorbing the hypertrophied cartilage.

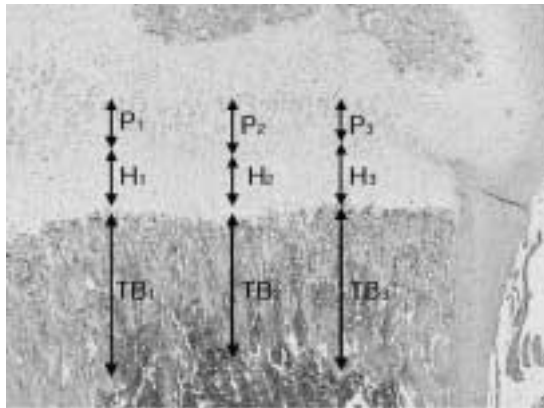


Fig. 2. Measurements of thickness of the proliferating cartilage (P) and hypertrophied cartilage layers (H) and trabecular bone length (TB). Anterior, middle and posterior length and thickness are measured and averaged in each layer.

in situ image analysis system (Carl Zeiss Vision Co., LTD, Germany)을 이용하여 화상을 얻은 후, KS Lite 프로그램을 이용하여 이차뼈발생중심의 면적을 각각 측정하였다(Fig. 1). 뼈끝연골판에서 증식연골세포대와 비대연골세포대 두께를 전방, 중간, 후방으로 구분하여 3곳에서 측정하여 평균치를 구하였으며, 뼈끝연골판 하방의 해면뼈의 길이를 동일한 방법으로

로 측정하였다(Fig. 2). 또한 정강뼈 위쪽뼈끝과 넓다리뼈 아래쪽뼈끝의 뼈끝연골판 직하부와 이차뼈발생중심의 중앙 부위를 200배 사진 촬영한 후, 뼈끝연골판 아래에 접하고 있는 연골과괴세포 수를 산정하였다(Fig. 3). 위에서 얻어진 결과는 mean \pm SD로 나타내었으며 unpaired t-검정을 시행, 분석하였다.

2. In vitro

1) 세포배양

MC3T3-E1 뼈모세포주를 10% 소태아혈청을 함유한 DMEM 배지에 배양하였으며 매 3~4일마다 배지를 교환하였다.

2) 세포 증식

CsA는 Dimethyl sulfoxide (DMSO)에 녹여 사용하였다. 동일 세대의 세포를 DMSO 대조군, 250 ng/ml, 500 ng/ml, 750 ng/ml, 1000 ng/ml, 1500 ng/ml CsA를 함유한 DMEM 배지에 재분배하여 96-well plate에 20,000 cells/cm² 밀도로 분주한 후 37°C에서 24시간, 3일, 7일간 각각 배양하였다. 이때 배지는 매일 동일 농도의 CsA를 함유한 배지로 교환하였다. 각 well에 살아있는 세포 수의 산정은 Cell Titer 96 AQuous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, Medi-

Table 1. Primer sequences to amplify each fragment of three genes

Genes	Oligonucleotide sequence	Size	Ref.*
GAPDH	5' CCA TGG AGA AGG CTG GGG 3' 5' CAA AGT TGT CAT GGA TGA CC 3'	195 bp	M33197
alkaline phosphatase	5' TCA TGT TCC TGG GAG ATG GTA TG 3' 5' GCA TTA GCT GAT AGG CGA TGT CC 3'	465 bp	NM000478
collagenI (α1)	5' CAA GGG TGA GAC AGG CGA AC 3' 5' CTC GAA CTG GAA TCC ATC GGT 3'	727 bp	NM000088

*References are from Gene bank accession number of NIH.

son WI)를 이용하였다. Cell Titer 96 AQuous One Solution을 각 well에 추가하고 37°C에서 4시간 배양 후, ELx 800 UV/Automated Microplate Reader (ETL TESTING Laboratories INC, Cortland, NY)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 흡광도는 배양액만의 흡광도를 감하여 비교하였다.

3) RT-PCR

동일 세대의 세포를 DMSO 대조군, 250 ng/ml, 500 ng/ml, 750 ng/ml, 1000 ng/ml, 1500 ng/ml CsA를 함유한 DMEM 배지에 동량 분주한 후 37°C에서 3일간 배양하였다. 이때 배지는 매일 동일 농도의 CsA를 함유한 배지로 교환하였다.

TRI REAGENT (Gibco BRL, USA)를 이용하여 지침에 따라 배지 세포로부터 전체 RNA를 추출하였다. 세포 추출물을 12,000 g, 10분간 원심분리한 후 전체 RNA를 포함한 수용성 층만을 분리하여 분리 용액의 0.5배 isopropanol과 혼합하였다. 상온에서 10분간 부치 후 12,000 g, 10분간 원심분리하여 전체 RNA를 수용성 층과 분리하여 75% ethanol을 거친 후, DEPC로 처리한 증류수에 녹여 -70°C에 보관하였다. RNA 농도는 optical density 260 nm에서 측정하였다. 2 µg RNA를 oligo (dT)₁₈ primer (Gibco-BRL)와 Superscript reverse transcriptase (GibcoBRL)를 이용하여 역전사 반응을 시행하였다. 각 특이 PCR primers는 NIH gene bank을 이용하여 흰쥐 cDNA 염기서열에 의거하여 제작하였다 (Table 1). 역전사 반응 산물을 specific primers, Accupower PCR PreMix (Bioneer, Daejeon, Korea) 및 물과 혼합한 후 Thermal Cycler (Perkin Elmer)를 이용하여 PCR을 시행하였다. PCR 반응 산물은 1.5% agarose

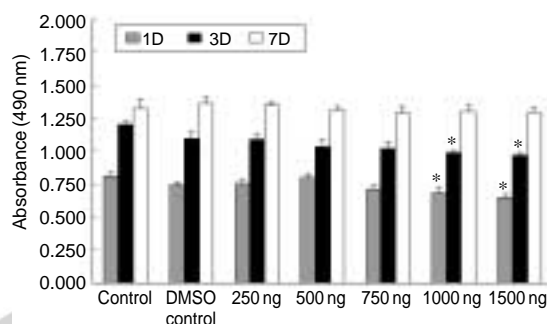


Fig. 4. Absorbances of cell proliferation assay. Treatment of 1000 ng and 1500 ng for 1 and 3 days show significant changes (*, $p < 0.05$).

gel에 전기영동을 시행하여 UV transilluminator로 관찰 및 사진을 제작하였다.

유전자의 상대적 발현 정도는 CsA 투여군과 대조군의 유전자 발현을 GAPDH 유전자 발현을 참고로 비교 평가하였다.

결 과

1. 세포증식분석

CsA 250 ng/ml, 500 ng/ml, 750 ng/ml, 1000 ng/ml, 1500 ng/ml 농도로 각각 1, 3, 7일간 처리 후 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 아무런 처치를 하지 않은 대조군과 DMSO를 처리한 대조군을 비교한 결과, 통계적 유의성은 없었으나 DMSO 대조군에서 흡광도 평균이 모두 작았다. 따라서 모든 CsA 투여군은 DMSO 대조군과 비교하였다. CsA 처리 1일과

— Cyclosporin A가 뼈골연골판 성장에 미치는 영향 —

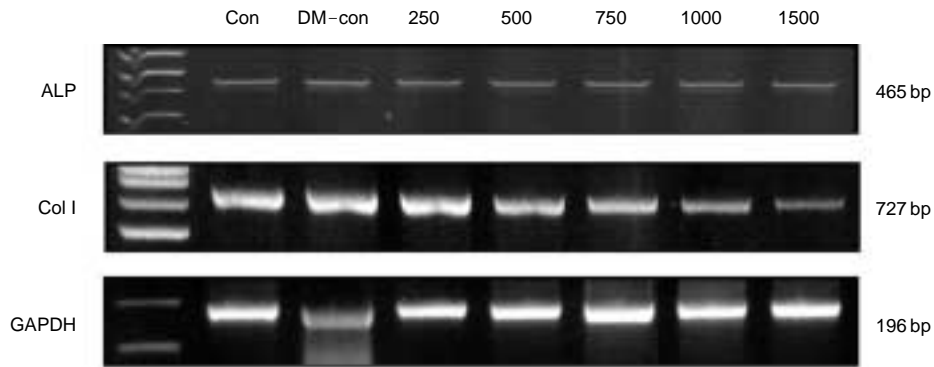


Fig. 5. Gel image of gene expression of ALP and collagen I (α 1) of MC3T3-E1 cells at 3 days after treatment of CsA at 250 ng/ml, 500 ng/ml, 750 ng/ml, 1000 ng/ml, 1500 ng/ml in concentration. ALP expression was not changed in any concentration, whereas collagen expression was decreased in a dose dependant manner. Con : Control, DM-con : DMSO-control.

3일에서 공히 DMSO 대조군과 750 ng/ml 이하 농도에서는 유의한 차이가 없었으나, 1000 ng/ml과 1500 ng/ml 농도에서는 유의하게 흡광도가 감소하여 CsA가 고농도에서 세포증식을 억제함을 알 수 있었다. 반면에 CsA 처리 7일 모든 군에서 대조군과 흡광도 차이를 보이지 않았다. 이러한 결과는 본 실험에서 96 well plate를 사용하였기 때문에 대조군에서 이미 세포 증식에 의하여 confluence에 도달함으로써 더 이상의 세포증식이 없었던 것으로 사료된다(Fig. 4).

2. 유전자 발현 변화

MC3T3-E1 뼈모세포주에서 시행한 유전자 발현은 뼈 유기기질의 대부분을 이루고 있는 collagen I (α 1)과 뼈 광화에 관여하는 것으로 알려진 alkaline phosphatase를 대상으로 하였다. 아무런 처치를 하지 않은 대조군과 DMSO를 처치한 대조군 간의 CsA 유전자 발현 변화는 없었으며 따라서 DMSO가 collagen I (α 1) 유전자 발현에 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다. CsA 처리에 의한 collagen I (α 1)의 유전자 발현은 250 ng/ml 투여 농도에서는 대조군과 차이를 보이지 않았으나 500 ng/ml 이상의 농도에서는 농도 의존적으로 유전자 발현이 감소하여 CsA가 뼈모세포의 교원섬유 합성을 억제함을 알 수 있었다. 또한 ALP의 유전자 발현은 전 농도에서 큰 변화를 보이지 않았다(Fig. 5).

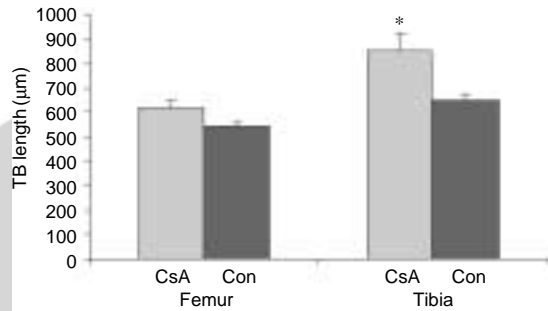


Fig. 6. Trabecular bone length (μ m) in the femur and the tibia after 3 days treatment of CsA in postnatal 4 days rat pups. The data values are represented as mean \pm SE from n = 4 in each group. * : p < 0.05.

3. 형태계측분석

1) 생후 4일, CsA 투여 3일

생후 1일부터 3일간 CsA를 투여한 군에서 뼈골연골판 아래 해면뼈 길이를 측정된 결과 넙다리뼈 실험군에서 $619 \pm 58 \mu$ m, 대조군에서 $539 \pm 37 \mu$ m, 정강뼈 실험군에서 $850 \pm 149 \mu$ m, 대조군에서 $649 \pm 49 \mu$ m로 넙다리뼈에서는 유의한 차이가 없었으나(p > 0.05) 정강뼈에서는 CsA 투여군에서 유의하게 증가되어 있었다(p < 0.05) (Fig. 6).

2) 생후 17일, CsA 투여 1주

넙다리뼈와 정강뼈의 해면뼈 길이, 비대연골세포

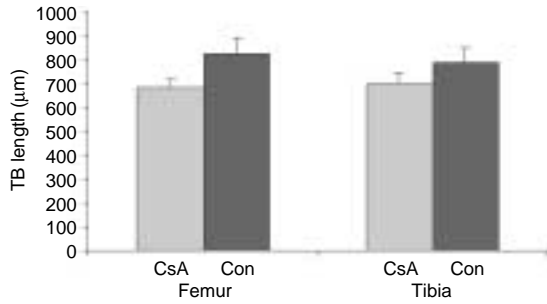


Fig. 7. Trabecular bone length (µm) in the femur and the tibia after 7 days treatment of CsA in postnatal 17 days rat pups. The data values are represented as mean ± SE from n=4 in each group.

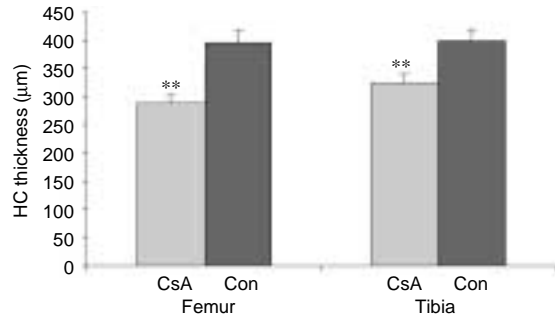


Fig. 8. Hypertrophied cartilage layer thickness (µm) in the femur and the tibia after 7 days treatment of CsA in postnatal 17 days rat pups. The data values are represented as mean ± SE. The thickness were significantly changed (**, p < 0.01) from n=4 in each group.

층 두께, 증식연골세포층 두께, 넓다리뼈에서 위쪽 연골관, 정강뼈에서 아래쪽 이차뼈형성중심의 너비, 뼈끝연골관에 접촉하고 있는 연골과피세포 수를 각각 측정하였다.

넓다리뼈 해면뼈 길이는 대조군에서 $820 \pm 118 \mu\text{m}$, CsA 투여군에서 $683 \pm 59 \mu\text{m}$ 로 CsA 투여군에서 평균 길이는 작았으나 통계적 유의성은 없었다. 대조군과 CsA 투여군에서 경골 해면뼈 길이는 각각 $790 \pm 100 \mu\text{m}$, $699 \pm 86 \mu\text{m}$ 로 역시 통계적 유의성은 없었다 (Fig. 7).

뼈끝연골관을 구성하고 있는 비대연골세포층 두께는 넓다리뼈의 CsA 투여 및 대조군에서 각각 $289 \pm 40 \mu\text{m}$, $395 \pm 35 \mu\text{m}$ 로 CsA 투여군에서 유의하게 감소하였으며 ($p < 0.01$), 정강뼈에서 또한 CsA 투여군과 대조군에서 각각 $322 \pm 24 \mu\text{m}$, $397 \pm 32 \mu\text{m}$ 로 유의한 감소를 보였다 ($p < 0.01$) (Fig. 8).

뼈끝연골관을 구성하고 있는 증식연골세포층 두께는 넓다리뼈의 CsA 투여 및 대조군에서 각각 $274 \pm 26 \mu\text{m}$, $305 \pm 47 \mu\text{m}$ 로 두 군간에 유의한 차이가 없었으며 ($p > 0.05$), 정강뼈에서 또한 CsA 투여군과 대조군에서 각각 $302 \pm 39 \mu\text{m}$, $315 \pm 32 \mu\text{m}$ 로 유의한 차이가 없었다 ($p > 0.05$) (Fig. 9).

뼈끝연골관 위쪽에 형성된 연골 흡수에 의하여 형성된 이차뼈발생중심 및 연골관의 크기는 넓다리뼈 CsA 투여군에서 $1,552,048 \pm 166,984 \mu\text{m}^2$, 대조군에서 $1,865,683 \pm 236,846 \mu\text{m}^2$ 로 유의한 차이가 없

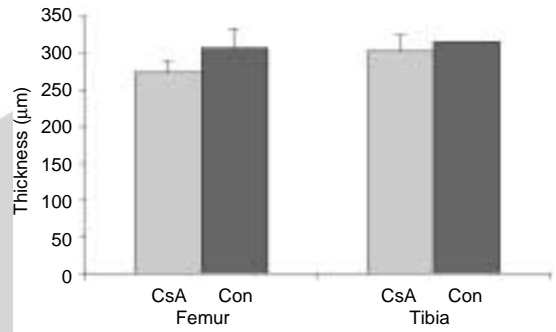


Fig. 9. Proliferating cartilage layer thickness (µm) in the femur and the tibia after 7 days treatment of CsA in postnatal 17 days rat pups. The data values are represented as mean ± SE from n=4 in each group.

었으나 ($p > 0.05$), 정강뼈 CsA 투여군에서 $1,106,761 \pm 281,935 \mu\text{m}^2$, 대조군에서 $1,657,156 \pm 234,722 \mu\text{m}^2$ 로 CsA 투여 후 정강뼈에서 유의하게 감소된 차이를 보였다 ($p < 0.05$) (Fig. 10).

뼈끝연골관의 뼈 몸통쪽에 출현한 연골과피세포의 수는 넓다리뼈 CsA 투여군에서 7.0 ± 2.1 개, 대조군에서 4.8 ± 2.4 개, 정강뼈 CsA 투여군에서 6.3 ± 1.2 , 대조군에서 4.3 ± 1.5 개로 모두 유의한 차이는 없었으나 ($p > 0.05$), 넓다리뼈와 정강뼈 모두에서 평균 연골과피세포 수가 CsA 투여군에서 많았다 (Fig. 11).

— Cyclosporin A가 뼈끝연골판 성장에 미치는 영향 —

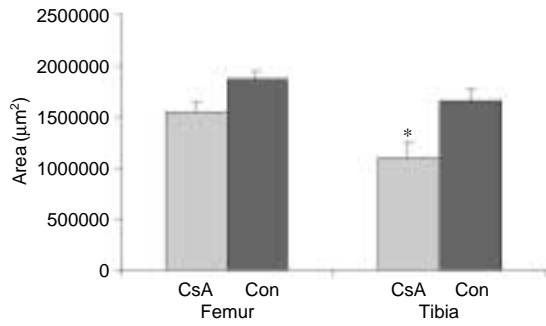


Fig. 10. Area of secondary ossification center (µm²) in the femur and the tibia after 7 days treatment of CsA in postnatal 17 days rat pups. The data values are represented as mean ± SE. CsA treatment inhibited trabecular bone growth in the tibia (*, p < 0.05) from n = 4 in each group.

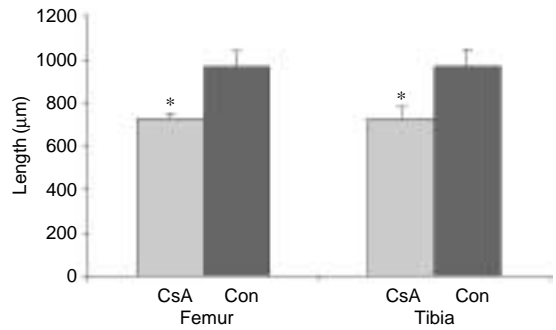


Fig. 12. Trabecular bone length (µm) in the femur and the tibia after 14 days treatment of CsA in postnatal 24 days rat pups. The length significantly decreased after CsA treatment in both bones (*, p < 0.05). The data values are represented as mean ± SE from n = 4 in each group.

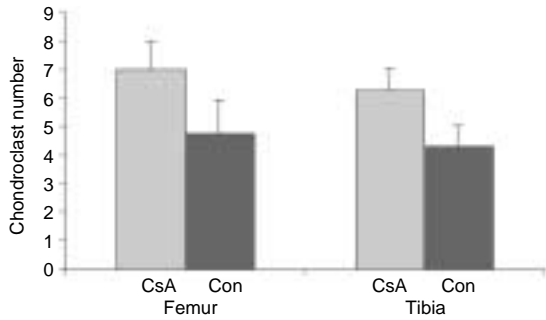


Fig. 11. Number of chondroclasts resorbing underneath the epiphyseal plate in the femur and the tibia after 7 days treatment of CsA in postnatal 17 days rat pups. The data values are represented as mean ± SE. Mean number in both bones decreased after CsA treatment from n = 4 in each group.

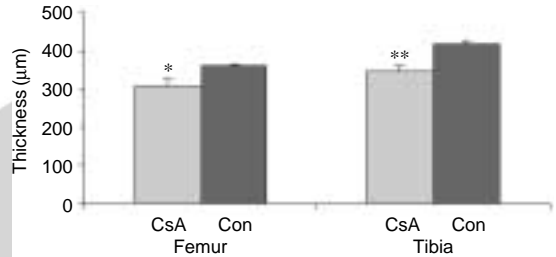


Fig. 13. Hypertrophied cartilage layer thickness (µm) in the femur and the tibia after 14 days treatment of CsA in postnatal 24 days rat pups. The thickness significantly decreased in both bones (*, p < 0.05; **, p < 0.01). The data values are represented as mean ± SE from n = 4 in each group.

3) 생후 24일, CsA 투여 2주

CsA 2주 투여군에서 넙다리뼈와 정강뼈의 해면뼈 길이, 비대연골세포층 두께, 증식연골세포층 두께, 넙다리뼈에서 위쪽 이차뼈발생중심, 정강뼈에서 아래쪽 이차뼈발생중심의 너비를 각각 측정하였다.

넙다리뼈 해면뼈 길이는 대조군에서 968 ± 140 µm, CsA 투여군에서 726 ± 47 µm였으며, 정강뼈 해면뼈 길이는 대조군과 CsA 투여군에서 각각 968 ± 159 µm, 728 ± 109 µm로 CsA 투여군에서 모두 유의하게 감소하였다 (p < 0.05) (Fig. 12).

뼈끝연골판을 구성하고 있는 비대연골세포층 두께는 넙다리뼈의 CsA 투여 및 대조군에서 각각 308 ± 34 µm, 361 ± 8 µm로 CsA 투여군에서 유의하게 감소하였으며 (p < 0.05), 정강뼈에서 또한 CsA 투여군과 대조군에서 각각 347 ± 24 µm, 417 ± 19 µm로 유의한 감소를 보였다 (p < 0.01) (Fig. 13).

뼈끝연골판을 구성하고 있는 증식연골세포층 두께는 넙다리뼈의 CsA 투여 및 대조군에서 각각 258 ± 40 µm, 317 ± 19 µm이었으며, 정강뼈에서는 CsA 투여군과 대조군에서 각각 252 ± 67 µm, 368 ± 33 µm로 CsA 투여군 모두에서 유의하게 감소하였다 (p < 0.05) (Fig. 14).

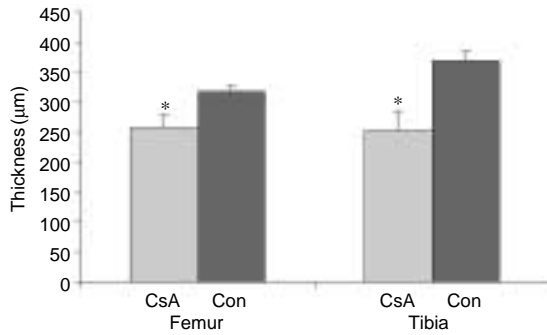


Fig. 14. Proliferating cartilage layer thickness (μm) in the femur and the tibia after 14 days treatment of CsA in postnatal 24 days rat pups. The thickness significantly decreased by CsA treatment (*, $p < 0.05$). The data values are represented as mean \pm SE from $n = 4$ in each group.

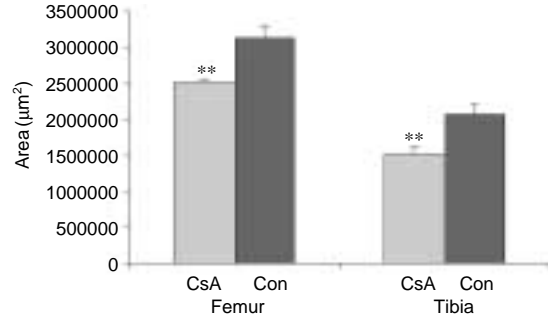


Fig. 15. Area of secondary ossification center (μm^2) in the femur and the tibia after 14 days treatment of CsA in postnatal 27 days rat pups. The area significantly decreased by CsA treatment (**, $p < 0.01$). The data values are represented as mean \pm SE from $n = 4$ in each group.

뼈끝연골판 위쪽에 연골 흡수에 의하여 형성된 이차뼈발생중심은 출생 17일군에 비하여 훨씬 증가되어 있었다. 넓다리뼈 CsA 투여군에서 $2,523,574 \pm 106,673 \mu\text{m}^2$, 대조군에서 $3,134,481 \pm 342,741 \mu\text{m}^2$ 이고 ($p < 0.05$) 정강뼈 CsA 투여군에서 $1,526,153 \pm 342,741 \mu\text{m}^2$, 대조군에서 $2,069,050 \pm 287,618 \mu\text{m}^2$ 로 CsA 투여 후 넓다리뼈와 정강뼈에서 유의하게 감소된 차이를 보였다 ($p < 0.01$) (Fig. 15).

고찰

본 연구의 예비 실험에서 생후 1일 흰쥐를 대상으로 2주까지 전 기간 CsA를 투여하였으나 CsA 투여 7일 이후 현저한 몸무게 감소를 보였다. 이는 출생 직후에는 흰쥐의 면역 체계가 충분히 발달하지 않은 이유로 생각되며, 따라서 생후 10일부터 7일간, 14일간 CsA를 투여하여 실험군과 대조군의 체중의 차이가 없도록 하였다. *in vivo* 실험에서 투여한 CsA 농도는 10mg/kg 이었다. 임상적으로 환자에서 동일 농도로 매일 CsA를 투여하면 대사 과정을 거쳐 혈장에서 확인되는 농도는 1000~750 ng/ml에 이르며, 최고조에 달하면 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에 이르기조차 하나 조직액에서는 농도를 알 수 없다(Wassef 등 1985). 본 연구에서는 *in vitro* CsA 투여 농도를 혈장 농도

에 해당하는 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 내외로 하였다.

*in vivo*에서 CsA가 뼈에 미치는 영향을 밝히는 많은 연구들은 성숙 동물을 대상으로 하거나 성인을 대상으로 하여 뼈 흡수에 관심을 가져왔기 때문에 뼈 형성에 미치는 영향은 밝히고자 하는 논문은 많지 않다. 본 연구에서 CsA가 *in vivo*에서 뼈 성장에 미치는 영향을 구명하기 위하여 뼈끝연골판을 이용하였다. 뼈끝연골판은 연골 골화 및 성장 과정을 겪게되므로 뼈 성장과 약물 작용 등을 구명하는데 이용될 수 있는 좋은 모델이 된다. 긴뼈의 형성 과정을 살펴보면, 미분화중간엽세포가 유리연골 모델을 형성 후 일차뼈발생중심으로부터 뼈몸통을 형성되게 되며 이어 이차뼈발생중심에서 뼈끝이 형성된다. 뼈끝연골판은 긴뼈의 발생 과정에서 일차뼈발생중심과 이차뼈발생중심 사이에 출현하는 일시적인 구조로 긴뼈의 길이 성장에 중요하다. 뼈끝연골판이 정상적으로 성장하는 동안에 연골세포는 뚜렷한 층 구조를 나타내게 된다. 연골세포가 증식하면 증식연골세포들을 형성하게 되며, 증식을 멈추게 되면 비대화를 겪게되어 비대연골세포의 형태를 갖게 된다. 비대연골세포는 X형 아교질, proteoglycan 및 chondrocalcin 등 연골기질 요소를 생산하고 세포 주위에서 광화가 시작됨에 따라 죽거나 뼈세포로 대체된다. 광화연골기질은 뼈파괴세포 또는 연골파괴세포에 의하여 흡수되고 해면뼈로 변화하게 된

다. 비대연골세포가 죽을 무렵 연골막 부위에 신생 혈관이 연골 중심에 침입하게 되며, 이 과정에서 연골과괴세포가 출현하여 광화연골기질을 흡수하게 되고 뼈가 형성될 수 있는 공간이 형성되게 된다. 연골내에 침투된 혈관은 미분화중간엽세포인 혈관 주위세포를 동반하게 되며 이 세포는 뼈모세포로 분화하여 뼈를 형성하게 된다(Hunziker 1994, Cancedda 등 1995, van der Eerden 등 2000).

In vitro에서 CsA가 뼈모세포에 미치는 영향에 관한 보고는 많으나 의견의 일치가 이루어지지 않고 있다. 즉, Chowdhury 등(1991)과 McCauley 등(1992)에 의하면 CsA는 뼈모세포의 증식, 부착, 분열, alkaline phosphatase의 농도를 감소시키나 in vivo에서는 뼈 대사를 증가시킨다고 하였다. 따라서 in vivo에서 CsA가 실제 뼈 형성을 증가시키는지에 대한 의문이 있어 왔다. 현재까지 CsA가 대체적으로 뼈 흡수를 유발한다는 점에서는 일치하고 있으나 뼈 생성에 대해서는 이견이 많다. 이러한 불일치는 연구 대상이 되는 뼈의 종류와 나이에 따라 다른 것으로 생각되고 있다. 즉, 뼈에서의 보고는 아니나 CsA에 의한 잇몸증식은 나이에 따라 다르며(Morisaki 1993), 해면뼈 소실은 어린 나이에 심하다(Katz 등 1994). 즉, 성장기에는 뼈 생성이 뼈 흡수보다 빠르나 흰쥐에서 CsA 투여 후 생성과 흡수율이 모두 감소한다. 이유기 흰쥐에서 CsA는 뼈 생성을 억제하며(Klein 등 1994b) 생후 9주 내지 10주에서는 뼈 대사율이 높아져 뼈 생성과 흡수가 모두 증가한다(Katz 등 1994, Fu 등 2001). 본 연구에서 CsA 투여 3일 후 뼈끝연골판 아래부분의 해면뼈 길이가 대조군에 비하여 짧고, 투여 1주 후에는 해면뼈의 길이와 비대연골세포층의 두께가 모두 작아지는 결과를 초래하였다. 또한 투여 2주 후에는 증식연골세포대, 이차뼈발생중심의 크기, 해면뼈 길이 등 여러 뼈 성장 지표들의 감소가 초래되었다. 이는 CsA가 뼈 형성 장애향을 시사하는 결과로 사료되며 이는 Klein 등(1994a)의 보고와 일치하는 소견이었다.

뼈 질환은 뼈 형성과 흡수에 관련된 인자들의 균형이 파괴됨으로서 유발된다. 뼈 흡수와 생성은 서로 밀접히 관련되어 있으며, 뼈 성장이 활발한 시기에는 뼈 형성 인자들의 발현이 뼈 흡수에 관련된

인자들의 발현보다 상대적으로 증가된다. osteopenia에서는 뼈 형성인자가 뼈 흡수인자에 비하여 적게 발현되고, 역으로 osteopetrosis에서는 뼈흡수인자가 적게 발현됨으로써 유발된다. 뼈형성인자는 서로 다른 분화시기에 있는 뼈모세포의 활동성을 반영한다(Kushida 등 1995). 예컨대, procollagen type I과 ALP는 뼈기질 형성과 중요하며, osteocalcin은 뼈기질 광화에 필요한 요소이다(Stein과 Lian 1993). 교원섬유는 뼈 유기기질의 대부분을 형성할 뿐 아니라 hydroxyapatite가 침착되는 주요 부분이기도 하다. 따라서 교원섬유의 형성억제는 뼈 형성 장애향을 초래할 뿐 아니라 광화에도 영향을 미치게 된다. ALP의 경조직 광화 과정에서의 역할은 뚜렷이 구명되어 있지 않으나, 뼈모세포 세포막과 경조직의 유기기질 및 기질세포 내에서 발견되며 혈액 내로 유리된다. 세포막에 위치한 ALP는 광화가 진행되는 부위로 phosphate ion을 공급하며, hydroxyapatite crystal이 성장하는 부위에서는 pyrophosphate를 분해하는 역할을 갖는다. MC3T3-E1 세포는 유전형질이 변환되지 않은 생쥐 뼈모세포주으로써 성숙과 분화의 관점에서 일차뼈모세포의 특성을 가지고 있다(Schiller 등 1999). 본 연구에서 CsA 처리 후 ALP는 전 농도에서 일정하였으나 교원섬유의 발현은 농도의존적으로 감소하였다. 이와 같은 결과는 CsA가 뼈 생성에 교원섬유의 발현을 억제함으로써 뼈 형성에 영향을 미침을 시사하는 소견이었다. 또한 CsA 처리 3일 후 처리 1일에 비하여 세포수가 증가하였으나 대조군에 비하여 농도 의존적으로 세포 수가 감소하는 경향을 보였다. 이는 본 연구에서 사용한 농도에서 CsA는 세포사를 초래하기 보다는 세포증식억제를 유도함을 의미한다. 이러한 결과는 흰쥐 osteosarcoma 세포를 이용한 McCauley 등(1992)과 MC3T3-E1 세포주를 이용한 Fornoni 등(2001)의 연구 결과와 일치하였다.

보고에 의하면 CsA-induced osteopenia는 뼈 개조 과정에서 뼈 생성보다도 뼈 흡수가 활발하기 때문이다. 이와 같은 결과는 CsA를 투여 받는 환자에서 bone marker로써 사용되는 osteocalcin과 alkaline phosphatase의 혈장내 농도가 높다는 사실로부터도 확인되고 있다(Withhold 1996, Bonnin 등 1997). 그

러나 CsA는 interleukin-1, 1, 25-dihydroxy-vitamin D3, parathyroid 호르몬 및 prostaglandin E2 등에 의해 유도된 뼈 흡수를 억제한다고 보고도 있어(Russel 등 1993) 그 작용 기전은 명확치 않다. CsA 작용 이전에 관하여는 면역억제제가 Osteoprotegerin (OPG)의 발현을 억제한다는 보고(Hofbauer 등 2001)를 감안하면 뼈모세포와 뼈파괴세포의 관계를 통하여 향후 더 추구되어야 할 과제로 생각된다.

참 고 문 헌

- Bonnin MR, Gonzalez MT, Grino JM, Cruzado JM, Bover J, Martinez JM, Navarro MA : Changes in serum osteocalcin levels in the follow-up of kidney transplantation. *Ann Clin Biochem* 34 : 651-655, 1997.
- Cancedda R, Descalzi Cancedda F, Castagnola P : Chondrocyte differentiation. *Int Rev Cytol* 159 : 265-358, 1995.
- Chowdhury MH, Shen V, Dempster DW : Effects of cyclosporin A chicken osteoclasts in vitro. *Calcif Tissue Int* 49 : 275-279, 1991.
- Crompton M, Costi A : Kinetic evidence for a heart mitochondrial pore activated by Ca^{2+} , inorganic phosphate and oxidative stress. A potential mechanism for mitochondrial dysfunction during cellular Ca^{2+} overload. *Eur J Biochem* 178 : 489-501, 1988.
- Crompton M, Ellinger H, Costi A : Inhibition by cyclosporin A of a Ca^{2+} -dependent pore in heart mitochondria activated by inorganic phosphate and oxidative stress. *Biochem J* 255 : 357-360, 1988.
- Epstein S : Post-transplantation bone disease: The role of immunosuppressive agents and the skeleton. *J Bone Miner Res* 11 : 1-7, 1996.
- Fornoni A, Cornacchia F, Howard GA, Roos BA, Striker GE, Striker LJ : Cyclosporin A affects extracellular matrix synthesis and degradation by mouse MC3T3-E1 osteoblastic in vitro. *Nephrol Dial Transplant* 16 : 500-505, 2001.
- Fu E, Hsieh YD, Nieh S, Wikesjo UM, Liu D : Effects of cyclosporin A on alveolar bone: an experimental study in the rat. *J Periodontol* 70 : 189-194, 1999.
- Hofbauer LC, Shui C, Riggers BL, Dunstan CR, Spelsberg TC, O'Brien T, Khosla S : Effects of immunosuppressants on receptor activator of NF- κ B ligand and osteoprotegerin production by human osteoblastic and coronary smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 280 : 334-339, 2001.
- Katz IA, LI M, Joffe I, Stein B, Jacobs T, Liang XG, Ke HZ, Jee W, Epstein S : Influence of age on cyclosporin A-induced alterations in bone mineral metabolism in the rat in vivo. *J Bone Miner Res* 9 : 59-67, 1994.
- Katz IA, Epstein S : Posttransplantation bone disease. *J Bone Miner Res* 7 : 123-126, 1992.
- Kawana K, Takahashi M, Kushida K, Hoshino H, Sakata S, Inoue T : The effect of cyclosporin A administration on bone metabolism in the rat evaluated by biochemical markers. *J Endocrinol Invest* 19 : 499-504, 1996.
- Klaushofer K, Hoffmann O, Stewart PJ, Czerwenka E, Koller K, Peterlik M, Stern PH : Cyclosporine A inhibits bone resorption in cultured neonatal mouse calvaria. *J Pharmacol Exp Ther* 243 : 584-590, 1987.
- Klein L, Lemel MS, Wolfe MS, Shaffer J : Cyclosporin A does not affect the absolute rate of cortical bone resorption at the organ level in the growing rat. *Calcif Tissue Int* 55 : 295-301, 1994a.
- Klein BY, Gal I, Segal D : Marrow stromal cell commitment to mineralization under the effect of a prolyl hydroxylase inhibitor. *J Cell Biochem* 54 : 354-364, 1994b.
- Klein BY, Gal I, Mosheiff R, Liebergall M, Ben-Bassat H : Cyclosporin A and its non-immunosuppressive derivative exhibit a differential effect on cell mediated mineralization in culture. *J Cell Biochem* 64 : 209-216, 1997.
- Kushida K, Takahashi M, Kawana K, Inoue T : Comparison of markers for bone formation and resorption in premenopausal and postmenopausal subjects, and osteoporosis patients. *J Clin Endocrinol Metab* 80 : 2447-2450, 1995.
- Laupacis A, Keown PA, Ulan RA, McKenzie N : Cyclosporin A : a powerful immunosuppressant. *Can Med Assoc J* 126 : 1041-1046, 1982.
- Matyus L, Balazs M, Aszalos A, Mulhern S, Damjonovich S : Cyclosporin A depolarizes cytoplasmic membrane potential and interacts with Ca^{2+} ionophores. *Biochim Biophys Acta* 886 : 353-360, 1986.
- McCauley LK, Rosol TJ, Capen CC : Effects of cyclosporin A on rat osteoblasts (ROS 17/2.8 cells) in vitro. *Calcif Tissue Int* 51 : 291-297, 1992.
- Morisaki I, Kitamura K, Kato K, Marukawa Y, Mihara J : Age dependency of cyclosporin A-induced gingival over-

- growth in rats. *Pediatr Dent* 15 : 414-417, 1993.
- Nicchitta C, Kamoun M, Williamson JR : Cyclosporin augments receptor-mediated cellular calcium fluxes in isolated hepatocytes. *J Biol Chem* 260 : 13613-13618, 1985.
- Orcel P, Bielakoff J, Modrowski D, Miravet L, de Vernejoul MC : Cyclosporin A induces in vivo inhibition of resorption and stimulation of formation in rat bone. *J Bone Miner Res* 4 : 387-391, 1989.
- Orcel P, Denne MA, de Vernejoul MC : Cyclosporin-A in vitro decreases bone resorption, osteoclast formation, and the fusion of cells of the monocyte-macrophage lineage. *Endocrinology* 128 : 1638-1646, 1991.
- Petronilli V, Nicolli A, Costantini P, Colonna R, Bernardi P : Regulation of the permeability transition pore, a voltage-dependent mitochondrial channel inhibited by cyclosporin A. *Biochim Biophys Acta* 1187 : 255-259, 1994.
- Russel RG, Graveley R, Skjodt H : The effects of cyclosporin A on bone and cartilage. *Br J Rheumatol* 32 Suppl 1 : 42-46, 1993.
- Sass D, Bowman A, Yuan Z, Ma Y, Jee WSS, Epstein S : Alendronate prevents cyclosporin A-induced osteopenia in the rat. *Bone* 21 : 65-70, 1997.
- Schiller PC, D'Ippolito G, Ross BA, Howard GA : Anabolic or catabolic responses of MC3T3-E1 osteoblastic cells to parathyroid hormone depend on time and duration of treatment. *J Bone Miner Res* 14 : 1504-1512, 1999.
- Shane E, Rivas MC, Silverberg SJ, Kim TS, Staron RB, Bilezikian ZP : Osteoporosis after cardiac transplantation. *Am J Med* 94 : 257-264, 1993.
- Stein B, Takizawa M, Katz I, Joffe I, Berlin J, Fallon M, Epstein S : Salmon calcitonin prevents cyclosporin A-induced high turnover bone loss. *Endocrinology* 129 : 92-98, 1991.
- Stein GS, Lian JB : Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype. *Endocrin Rev* 14 : 424-442, 1993.
- van der Eerden BC, Karperien M, Gevers EF, Lowik CW, Wit JM : Expression of Indian hedgehog, parathyroid hormone-related protein, and their receptors in the postnatal growth plate of the rat : evidence for a locally acting growth restraining feedback loop after birth. *J Bone Miner Res* 15 : 1045-1055, 2000.
- Wassef R, Cohen Z, Langer B : Pharmacokinetic profiles of cyclosporin in rats. *Transplantation* 40 : 489-493, 1985.
- Wenger R : Chemistry of cyclosporin. In: White D, ed. *CyclosporinA*. Amsterdam : Elsevier 19-26, 1982.
- Withold W, Wolf HH, Kollbach S, Heyll A, Schneider W, Reinauer H : Monitoring of bone metabolism after bone marrow transplantation by measuring two different markers of bone turnover. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 34 : 193-197, 1996.
- Wuthier RE : Involvement of cellular metabolism of calcium and phosphate in calcification of avian growth plate cartilage. *J Nutr* 123(2 Suppl) : 301-309, 1993.

Abstract

Effects of Cyclosporin A on the Epiphyseal Plate Growth in Rats

HJ Kim, OJ Kim, YC Hoang, JH Shin, HO Park, MS Kim, EJ Lee, SH Kim

Dental Science Research Institute, College of Dentistry

Cyclosporin A (CsA), hydrophobic cyclic peptide composed of 11 amino acids has been currently used in immunosuppression by its ability to inhibit cytokine release. The inhibition of cytokine release can secondarily affect on bone metabolism, modelling and remodelling. Current concept suggests that CsA can induce osteopenia by stimulating both bone formation and resorption. But many reports have not been coincident each other in respect of its action mechanism *in vivo* and *in vitro*.

The present study was performed to clarify CsA effects on bone growth using cell proliferation assay, gene expression *in vitro* using MC3T3 cell line. Histomorphometrical data were obtained from knee joint *in vivo* after 3, 7 and 14 days of each CsA treatment.

MC3T3-E1 cell proliferation was inhibited by the treatment of CsA 1,000 ng/ml and 1,500 ng/ml in concentration for 1 and 3 days. CollagenI (α 1) gene expression was decreased by the treatment in a dose dependant manner, whereas ALP expression was stable in every concentration of treatment. Histomorphometrical data analysis such as length of hypertrophied and proliferating cartilage layer, area of secondary ossification center, trabecular bone length underneath the epiphyseal plate and finally chondroclast number and size showed that most of the measurements were decreased especially after 2 weeks of CsA treatment.

These results suggested that CsA treatment can directly affect on osteoblasts, inhibiting normal bone growing processes.

Key words : Cyclosporin A, Rat, Endochondral ossification