

# 골조직대사에 있어 superoxide와 nitric oxide의 역할

부교수 김세원/단국대학교 치과대학 치과약리학교실

부교수 김정근/단국대학교 치과대학 구강생화학교실

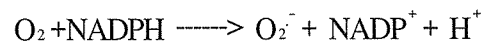
Peter V. Hauschka/Department of Oral Biology,  
Harvard School of Dental Medicine, Boston, USA

골조직 대사는 골형성을 담당하고 있는 조골세포와 골흡수를 일으키는 파골세포에 의하여 조절되며 여러 물질들이 골조직 대사에 관여하고 있다. 골조직 대사를 조절하는 물질중 osteotropic hormones(부갑상선 호르몬, calcitonin 등), cytokines(IL-1, IL-6, TNF, Interferon 등), 및 전식적 또는 국소적 성장인자(growth factors) 등에 관한 광범위한 연구가 진행되어 왔다. 최근들어 이러한 여러 인자들 이외에 superoxide 또는 hydrogen peroxide등을 비롯한 reactive oxygen species와 nitric oxide와 같은 reactive nitrogen species 등도 골조직세포의 성장 및 분화와 세포의 활성화에 다양한 영향을 미칠 수 있음이 보고되어 골조직 대사를 조절할 수 있는 중요한 인자라 여겨지며 골조직대사 과정을 이해할 수 있는 새로운 분야라 생각된다.

## 1. Superoxide(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)

생체가 microbial infection에 대항하는 수단으로 neutrophil, eosinophil 및 mononuclear phagocytes들이 respiratory burst라 불리는 oxygen-dependent microbicidal system을 이용하고 있음은 널리 알려진 사실이다. 이러한 respiratory burst는 membrane-bound NADPH

oxidase의 활성화에 의하여 일어나며 oxygen의 one-electron reduction 과정을 통하여 superoxide를 생성하게 된다.



파골세포는 여러 가지 면에서 mononuclear phagocytes와 유사점을 갖고 있으며, 파골세포도 NADPH oxidase system을 갖고 있으리라 추측되어 왔다. Neutrophil에서 superoxide의 생성이 결여된 실험동물의 경우 osteopetrosis가 발생할 수 있음이 알려져 있고, 최근들어 면역조직화학적 방법을 이용하여 백서 파골세포에 NADPH oxidase가 존재함이 보고된 바 있어 파골세포도 외부의 여러 자극에 의하여 superoxide를 생성할 수 있으며 파골세포로부터 생성된 superoxide는 골조직 세포의 성장 및 분화 뿐만 아니라 골흡수 과정에도 직접 참여할 가능성이 있을 것으로 추측된다.

## 2. 일산화 질소(Nitric oxide, NO·)

일산화질소는 유해한 free radical gas로써 1) 백혈구에서의 bactericidal effect, 2) 혈관에서의 혈관확장 작용 3) 신경세포에

서의 neurotransmitter 기능 등을 나타내는 것으로 알려져 있으며 그 밖에도 많은 종류의 세포가 일산화질소의 영향을 받고 있는 등 다양한 생물학적 작용을 나타낸다. 일산화질소는 nitric oxide synthase(NOS)라는 효소의 작용에 의하여 L-arginine으로부터 형성되며 이러한 과정은 nitro-arginine methyl ester(NAME) 등과 같은 arginine 유사물질에 의하여 억제되며 형성된 일산화질소는 매우 불안정하여 안정화 상태의 최종산물인 nitrite(NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) 나 nitrate(NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) 등으로 쉽게 전환되거나 superoxide와 결합하여 강력한 세포독성을 나타내는 peroxynitrite(ONOO<sup>-</sup>)로 전환된다(그림 1).

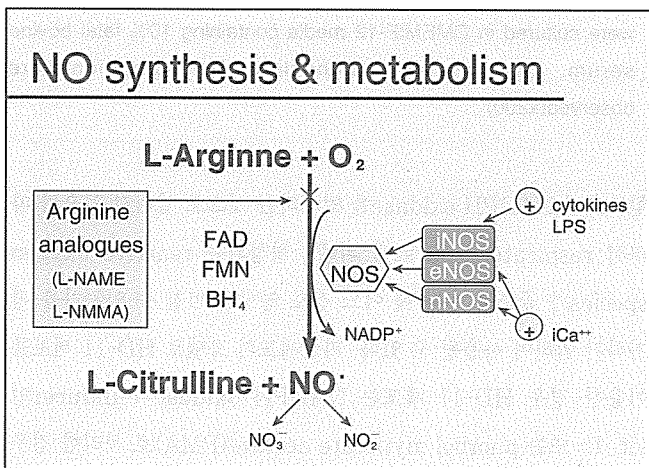


그림 1. Synthesis and metabolism of nitric oxide.  
 FAD ; flavin adenine dinucleotide, FMN ; flavin mononucleotide, BH<sub>4</sub>; tetrahydrobiopterin, NADP ; nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NOS ; nitric oxide synthase (endothelial ; eNOS, neuronal ; nNOS, inducible ; iNOS).

일산화질소는 다른 조직에서와 마찬가지로 조골세포를 여러 종류의 cytokines 또는 세포내독소 등으로 자극하는 경우 많은 양이 형성되며 이렇게 형성된 일산화질소는 골조직 대사에 중요한 영향을 미칠 것으로 생각된다. 일산화질소의 골조직 대사에 미치는 영향은 비교적 최근에 와서 연구가 진행되었으며 reactive oxygen species와는 달리 골흡수를 억제할 가능성이 제기되어 왔다. 즉 일산화질소의 공여물질(donor)인 sodium nitroprusside에 의하여 파골세포의 운동성이 감소되고, 골조직 장기배양(organ culture)

시 일산화질소의 생성을 억제하는 경우 골흡수가 증가됨이 보고된 바 있다.

### 3. 파골세포 실험모델 : Osteoclast-like cell

골조직 대사의 연구시 가장 어려운 문제점중의 하나는 많은 수의 파골세포를 분리하기가 어려울 뿐 아니라 유용한 파골세포 또는 파골세포 전구세포의 세포주(cell line)를 얻기 힘들다는데 있다. 즉, 파골세포는 완전히 분화된 세포로써 골수세포 분리 후 여러 정제과정을 거쳐 비교적 순수한 파골세포들을 얻을 수 있으나 여러 생화학적 실험에 사용할 수 있을 정도의 충분한 수를 얻기가 매우 힘들며 장기간 배양하기가 어렵다는 단점을 가지고 있다. 또한 파골세포 전구세포를 포함하고 있는 골수세포를 배양하면서 vitamin D<sub>3</sub> 등을 처리함으로써 비교적 많은 수의 파골세포들을 형성시킬 수 있으나 파골세포외에 다른 여러 종류의 세포들을 포함하고 있어 골조직대사 조절물질의 파골세포에 대한 직접적인 영향을 평가하기에 많은 어려움이 있다.

최근에는 이러한 단점을 극복하기 위하여 파골세포 전구세포들을 포함하고 있으리라 생각되는 여러 세포주들을 이용하여 이들을 파골세포로 분화시키고자 하는 노력들이 시도되고 있다. 이와 같이 골수세포의 배양이나 파골세포 전구세포의 세포주로부터 분화된 파골세포 또는 파골세포 유사세포를 확인하는 방법으로는 파골세포의 표지효소로 널리 알려진 tartrate-resistant acid phosphatase(TRAP)의 높은 활성을 나타내고, TRAP-양성 다핵세포를 형성하며, tartrate-resistant acid ATPase (TrATPase)와 Type IV collagenase/gelatinase 활성을 갖고 있고, calcitonin 수용체를 발현하며, 골편 또는 상아질편위에 배양시 이들 세포에 의해 흡수와(resorption pit)가 형성되는 경우 이들을 파골세포라 인정하고 있다.

HD-11 세포주는 닭의 골수로부터 만들어진 v-myc-transformed myelomonocytic cell line으로 골조직 대사에 중요한 역할을 담당하고 있는 vit. D<sub>3</sub> 수용체를 갖고 있으며 이 세포가 vit. D<sub>3</sub>를 생성할 수 있음이 알려져 있다. 또한 이 세포주를 vit D<sub>3</sub>로 처리하여 배양하는 경우 TRAP-양성 다핵세포를 형성하며 PMA-induced NBT reduction, TrATPase 활성, 파골세포

에 대한 monoclonal antibody인 121F에 대한 양성반응. 상아질 절편의 superficial excavation 등 여러가지 파골세포의 표현형을 나타낸다(그림 2).

### Properties of HD-11 cells

- ◆ High TRAP activity
- ◆ TRAP(+)-MNC formation
- ◆ PMA-induced NBT reduction
- ◆ Histochemical TrATPase activity
- ◆ Expression of mRNA for TRAP and type IV collagenase
- ◆ Reaction with monoclonal Ab, 121F
- ◆ Superficial excavation of dentin slices

그림 2. Biological characteristics of HD-11 cells. TRAP ; tartrate-resistant acid phosphatase, MNC ; multinucleated cell, PMA ; phorbol myristate acetate, TrATPase ; tartrate-resistant acid ATPase

한편 이 HD-11 세포들을 subcloning한 경우 광학현미경하에서 크게 3가지 형태, 즉 1) fibroblast-like cell(F type) 2) round type(R type) 및 3) epithelioid/multinucleated cell type(EM type)등으로 구별되며 이 중 EM type의 세포들은 vit D<sub>3</sub>등의 호르몬 처리없이도 스스로 다핵세포를 형성할 수 있다(그림 3). 따라서 HD-11 세포주, 그중에서도 EM type의 세포들은 경우 비록 상아질 절편을 이용한 실험에서 흡수능을 형성하지는 못하였지만 파골세포의 전구세포를 포함하고 있는 세포주으로써 파골세포에 대한 여러가지 실험에 유용하게 이용될 수 있으리라 생각된다.

#### 4. 파골세포의 형성 및 골흡수에 대한 superoxide의 영향

Diphenylene iodonium(DPEI)은 NADPH oxidase system중 분자량 45KDa의 membrane flavoprotein에 결합

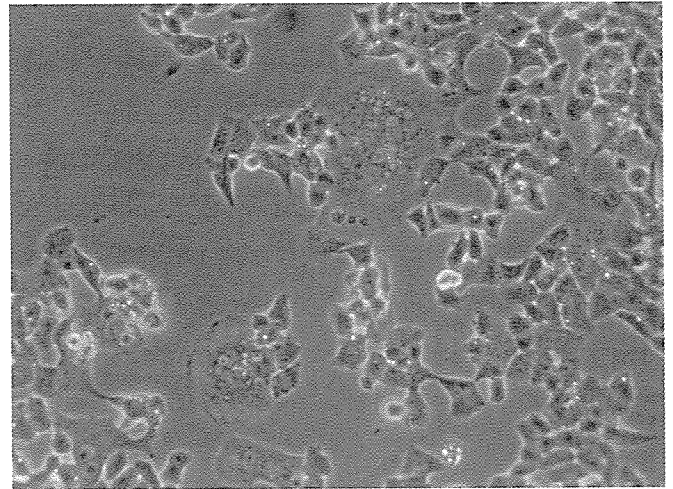


그림 3. Phase contrast micrograph of HD-11 cells(EM type). Cells were cultured in DMEM/F-12 media containing 10% fetal bovine serum. Spontaneous multinucleated cell formation were observed(x200)

함으로써 NADPH oxidase를 억제하는 것으로 알려져 있으며 따라서 respiratory burst에 의해 형성되는 reactive oxygen species가 골조직 대사에 어느 정도 영향을 미칠 수 있는가를 평가하기 위하여 사용될 수 있다. 파골세포의 모델로 HD-11 세포를 이용한 경우 HD-11 세포는 NADPH oxidase의 inducer인 vit. D<sub>3</sub> 또는 phorbol myristate acetate(PMA)로 처리한 경우 nitroblue tetrazolium(NBT)을 환원시킴으로써 HD-11 세포가 superoxide를 형성할 수 있음을 알 수 있었고 백서 또는 닭의 tibia로부터 분리한 파골세포를 NBT staining한 경우 superoxide의 형성이 주로 골조직과 인접한 파골세포의 세포막에서 주로 형성됨이 관찰되어 파골세포에서 형성되는 superoxide가 골흡수 과정에 중요한 기능을 담당하고 있으리라 추측된다.

한편 DPEI는 HD-11 세포의 TRAP 활성도를 감소시켰으며, 골수세포로부터의 TRAP-양성 다핵세포의 형성과 분화된 파골세포에 의한 상아질절편 흡수능을 억제하였다(그림 4). 이러한 결과는 파골세포의 형성 뿐만 아니라 분화된 파골세포에 의한 골흡수 과정에 superoxide가 중요한 기능을 담당하고 있음을 시사하는 것이라 생각된다.

#### 5. 파골세포 유사세포에 대한 일산화질소의 영향

Effect of DPEI on osteoclast-like cells	
◆ NBT reduction by cells	: decrease
◆ TRAP activity	: decrease
◆ TRAP(+) cell formation	: decrease
◆ TRAP(+)-MNC formation	: decrease
◆ Resorption of dentin slices	: decrease

그림 4. Effect of DPEI on the osteoclast-like cells.  
DPEI ; diphenylene iodonium.

파골세포의 전구세포를 포함하고 있으리라 생각되는 HD-11 세포주를 파골세포의 실험 모델로 이용하여 HD-11 세포의 성장과 활성화에 미치는 일산화질소의 영향을 측정하여 보았다. 일산화질소의 source로는 sodium nitroprusside를 비롯한 4개의 일산화질소 공여물질을 이용하였으며 세포배양시 이들 공여물질을 일정 시간 첨가하여 배양한 후 세포의 성장속도, 활성 및 세포내 second messenger로 사용되리라 추측되는 cGMP의 변화등을 측정하였으며 그 결과는 그림 5에 요약되어 있다.

일산화질소는 HD-11 세포의 성장을 억제하는 경향을 나타내었으며 파골세포의 표지효소인 TRAP의 활성과 TRAP-양성 다핵세포의 형성을 감소시켰으며 또다른 표지효소인 TrATPase의 활성 역시 감소되었다. 또한 일산화질소는 type IV collagenase/gelatinase의 활성을 억제하였고, 세포에 의한 superoxide 생성을 억제함을 알 수 있었고(NBT reduction의 감소) 이는 일산화질소가 파골세포의 기능도 직접 억제함을 나타내는 결과라 생각된다. 한편 HD-11 세포를 일산화질소 공여물질로 자극한 경우 세포내의 cGMP가 단시간내에 증가함이 관찰되어 일산화질소의 파골세포에 대한 영향은 다른 세포에서와 마찬가지로 세포내 cGMP를 second messenger로 이용하여 그 효과를 나타낼 것으로 추측된다.

Effects of NO on HD-11 cells	
◆ TRAP(+)-MNC formation	: decrease
◆ TRAP activity	: decrease
◆ TrATPase activity	: decrease
◆ Type IV collagenase / gelatinase activity	: decrease
◆ NBT reduction by cells	: decrease
◆ Cell proliferation	: decrease
◆ cGMP production	: increase

그림 5. Effect of nitric oxide on the biological activity of HD-11 cells.

골조직대사는 골형성과 골흡수과정에 의하여 정교하게 조절되며 이러한 조절과정에 이상이 생긴 경우 류마티스 관절염, 치주질환 및 골다공증과 같은 여러 골조직질환이 발생된다. 골조직대사의 기전을 밝히고 골조직질환의 진단 및 치료방법을 개발하기 위한 연구가 오랫동안 진행되어 왔으며 최근들어 여러 *in vitro* 또는 *in vivo* 실험모델과 새로운 연구방법들이 개발됨으로써 골조직대사의 연구에 많은 진전이 이루어져 왔다. 현재까지 여러 osteotropic hormones, cytokines, growth factors 등이 골조직대사의 조절물질로 많은 연구의 대상이 되어 왔다. 지난 수년간 일산화질소는 vascular tone, platelet function, neurotransmission 및 immune function 등에 영향을 미칠수 있는 중요한 인자로 작용함이 밝혀지고 있으며 다른 여러 조직에서와 마찬가지로 골조직을 구성하고 있는 골조직 세포에도 다양한 생물학적 기능을 나타냄이 알려지고 있다.

또한 superoxide나 hydrogen peroxide 등을 비롯한 reactive oxygen species 등도 파골세포의 형성을 조절하거나 파골세포에 의한 골흡수과정에 직접 참여함으로써 골조직대사를 조절하는데 중요한 기능을 담당하고 있으리라 생각된다. 이러한 reactive oxygen species 및 reactive nitrogen species는 골조직대사를 조절할 수 있는 새로운 분야로써 이들의 역할을 규명하는 일은 골조직대사를 이해하고 그 기전을 밝히는데 도움이 될 수 있으리라 생각된다.

## 6. 결론