

골조직 세포에서 Estrogen의 효과에 대한 Nitric Oxide의 역할

단국대학교 치과대학 구강생화학교실
전임강사 고 선 일

ABSTRACT

Role of Nitric Oxide in Estrogen's Action on the Bone Cells

Dept. of Oral Biochemistry, School of Dentistry, Dankook University
Seon-Yle Ko, D.D.S., M.S., Ph.D.

Estrogen deficiency is one of the most important factors in the pathogenesis of osteoporosis, although the mechanisms by which estrogen prevents bone loss are poorly understood. Nitric oxide (NO), has been shown to serve as an important intercellular signal modulator in bone. Its production by both the constitutive and inducible isoforms of nitric oxide synthase (NOS) is affected by estrogen in several types of cell and tissues. Other reports showed that the protective effect of estrogen on ovariectomy-induced bone loss in rats was inhibited by the NOS inhibitor. Thus, this study performed to know whether estrogen effect on the bone metabolism involved NO-mediated signal transduction pathway. This studies investigated the effect of estrogen metabolite, 17β -estradiol on cell proliferation and alkaline phosphatase (ALP) activity of rat calvarial osteoblastic cells (RCCs), to determine potential role of estrogen in the regulation of osteoblastic function. 17β -estradiol increased cell proliferation and ALP activity of RCCs. 17β -estradiol decreased NO release in the culture medium of the RCCs. NOS inhibitor, nitro-L-arginine methylester induced a significant decrease of ALP activity without alteration of patterns of stimulation. Thus, these results indicated that NO is one of the signal in the osteogenesis of estrogen. To investigate whether estrogen-induced NO play roles in osteoclast generation, mouse bone marrow cells / mouse bone marrow cells and MG63 cells / macrophage-dependent bone marrow cells were isolated and cultured with the presence of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ ($1,25[\text{OH}]_2\text{D}_3$) or macrophage-colony stimulating factor and soluble osteoclast differentiation factor and with the treatment of 17β -estradiol. Histochemical staining for tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) was performed to identify the osteoclast. The number of TRAP-positive multinucleated cells were decreased by the addition of 17β -estradiol. But, treatment of 17β -estradiol had no effect on NO release in the culture medium of the bone marrow cells and MG63 cells. These results indicated that osteoclastogenesis by estrogen might not involved NO-mediated signal transduction pathway. However, these study suggested that estrogen might prevent bone loss through regulated osteoblastic activity and osteoclast generation.

Key Word : Estrogen, nitric oxide, osteoblast, osteoclast

이 연구는 2000년도 단국대학교 대학연구비의 지원으로 연구되었음

1. 서 론

골조직은 고등 척추동물의 지지역할을 하는 특수하게 분화된 형태의 결체조직으로, 일생동안 골개조가 일어나며, 정상 성인에서 파골세포에 의한 골흡수량과 조골세포에 의한 골형성 양 사이에는 항상 균형이 유지되고 있다. 이러한 골개조는 주기적이며 국소적으로 좁은 부위에서 일어나며, 이러한 골격계의 구조와 기능은 전신적인 호르몬과 국소적 인자 사이의 복잡한 상호작용에 의해 조절된다²⁾.

골조직은 간엽세포, 연골세포, 조골세포, 파골세포, 대식세포, 단핵세포, 내피세포와 골수세포 등 여러 종류의 세포로 구성된 결합조직이며, 이들 모든 세포들은 순환하는 내분비 물질 뿐 아니라, 그들 스스로 분비하는 성장 조절인자에 반응하는 것으로 알려져 있다. 그러나 이러한 조절인자에 의한 골조직의 조절이 평형을 잃은 경우 상대적으로 과다한 골흡수에 의하여 골다공증, 골조직내 Paget씨 병과 류마티스성 관절염 등이 일어난다.

특히 estrogen은 폐경 후 여성에게서 빈발하는 골다공증과 밀접한 관련을 가지고 있다. Estrogen의 분비가 저하되면 골의 형성보다 흡수가 더 많이 야기되어 골조직의 손실을 가져오며, estrogen 투여시 골소실이 방지되는 것으로 보고되어 estrogen 결핍이 골다공증의 병인의 주요한 인자로 알려져 있다³⁻⁵⁾. 그러나 모든 폐경 후 여성에서 골다공증의 변화를 보이지 않으므로, estrogen의 소실만으로 골다공증을 완전히 설명할 수는 없다.

따라서 estrogen이 다른 인자와 상호작용을 하며 골의 양을 유지하는 기전을 이해하는 것이 폐경 후 여성에서 호르몬 대체요법으로 증상을 개선하기 위해서 필요한 일이다.

Estrogen이 골조직에 미치는 주 효과는 골흡수가 일어나는 미세환경내에 cytokine 생성을 억제하며⁶⁾, 부갑상선호르몬 (parathyroid hormone, PTH)과 1,25-dihydroxyvitamin D₃ (1,25[OH]₂D₃)와 같은 전신적인 골흡수 호르몬을 조절함으로써⁷⁾ 파골세포에 의한 골흡수를 억제하는 것으로 알려져 있다⁸⁾.

최근 nitric oxide (NO)가 cytokine의 효과를 매개하는데 중요한 역할을 한다는 보고가 있으며, estrogen이 사람의 조골세포에서 constitutive nitric oxide synthase (NOS)의 발현을 촉진한다는 보고가 있다.

활성화된 radical인 NO는 심혈관계, 신경계 및 면역계의 전달물질로서 중요하게 여겨지고 있다. NO는 전하를 띠지 않는 작은 물질로 세포막을 통과하여 쉽게 인접한 세포로 확산되어 다양한 조직의 상호 신호 전달에 사용되는 등 매우 다양한 기능을 가지고 있다^{9,7)}.

또한 NO는 매우 짧은 반감기를 갖고 있어 근접한 세포에 의해 합성되어 활성을 나타내게 된다. NO는 NADPH 의존적 효소인 세 가지 형태의 NOS에 의해 L-arginine이 산화되어 citrulline으로 변환되는 과정에서 형성되는 중간생성물이다.

이들 NOS중 2가지 종류는 칼슘의 농도에 의존적이고, 자극에 대한 반응이 아닌 구성 성분으로써 일시적으로 소량 발현되고 (endothelial eNOS, neuronal nNOS), 다른 하나는 칼슘의 농도에 관계없이 염증 자극에 의해 지속적으로 고농도로 생성이 유도되는 형태 (inducible iNOS)이다^{8,9)}. 조골세포와 파골세포 모두 iNOS의 합성에 필요한 mRNA와 단백질을 발현하며, 세포의 활성을 조절할 정도의 충분한 양의 NO를 생성한다고 보고되었다^{10,11)}. 또한 골세포에서 estrogen¹²⁾과 interleukin-1, tumor necrosis factor- α 및 interferon- γ 와 같은 proinflammatory cytokine을 포함하는 여러 인자들이 NOS의 발현을 촉진함으로써 NO생성을 조절한다고 알려져 있다. 따라서 골조직내의 세포들이 NO를 생성할 뿐 아니라 그 표지세포가 될 것으로 여겨진다.

Wimalawansa 등¹³⁾은 NO donor를 투여한 경우 난소절제술에 의한 골소실이 완화됨으로써, NO가 난소절제술에 의해 유도된 골소실의 중요한 매개인자임을 보고한 바 있다. Lindsay와 Cossman¹⁴⁾ 또한 폐경 후 여성에서 골흡수가 증가함으로써, estrogen의 감소와 증가된 파골세포의 활성이 연관되었음을 보고한 바 있다.

Estrogen은 심장과 근 골격계 및 소뇌에서 NO의 생성을 증가시키는 반면¹⁵⁾, 간세포¹⁶⁾와 대식세포에서는 NO의 생성을 억제함이 보고된 바 있다. 골대사에 관한 estrogen의 보호작용은 알려져 있으나, 조골세포 및 파골세포의 기능을 조절하는 기전은 잘 알려져 있지 않다.

따라서 본 연구에서는 estrogen이 조골세포의 세포 증식 및 활성화와 NO 생성에 미치는 영향을 관찰하였으며, 또한 파골세포의 분리 및 배양을 여러 실험 모델로 나누어 파골세포의 전구세포로부터 파골세포의 생성에 미치는 영향도 관찰하고자 하였으며, NO가 골조직내에서 estrogen 작용의 매개역할을 하는지에 대하여도 알아보하고자 하였다.

II. 실험 재료 및 방법

조골세포 분리 및 배양

Wong과 Cohn¹⁷⁾의 방법을 이용하여 연속효소처리 방법에 의해 골세포를 분리하였다. 즉 태생 19일 된 흰쥐 (Sprague-Dawley)의 두개관을 무균적으로 적출하여 minimum essential medium (MEM, Gibco, USA)에 모은 후 0.1% collagenase (Gibco, NY, USA), 0.05% trypsin 및 0.5 mM EDTA (Gibco, NY, USA)가 포함된 효소용액으로 37°C에서 10분 (I), 10분 (II), 10분 (III), 20분 (IV) 및 20분 (V)간 교반하여 5군의 골세포군을 분리하여 조골세포의 표현형을 가지고 있는 IV군과 V군의 골세포군을 이용하였다.

분리한 골세포군에 효소용액과 동량의 fetal bovine serum (FBS, Gibco, NY, USA)을 첨가하고, 원심 분리하여 각 세포들을 모은 후 Hank's balanced salt solution (HBSS, Gibco, NY, USA)으로 세척하여 60 mm 조직 배양 접시에 10% FBS가 포함된 MEM으로 배양하였다.

배양액은 처음 24시간 후에, 그 다음은 매 48시간 마다 교환해주면서 7일간 배양하였다. 배양시 온도는 37°C, 습도는 95%를 유지하였으며, 계속하여 5% CO₂와 95% 공기를 공급하였다.

일주일간 전배양한 후 실험목적에 따라 24- 및 96-well plate에 분주하여 실험에 사용하였다.

세포증식 측정

흰쥐 두개관으로부터 얻은 조골세포를 24-well plate에 well 당 2×10⁴개의 세포가 되도록 분주하여 48시간동안 배양하면서 estrogen의 대사산물인 17β-estradiol (Sigma, USA)을 여러 가지 농도로 처리하였으며, 배양이 끝난 후에는 trypsin-EDTA 용액을 이용하여 부착된 세포를 모아 인산 완충 생리식염수 (D-PBS, pH 7, Gibco, NY, USA)로 희석시킨 후 광학현미경 (Nikon, Japan)하에서 hemocytometer를 이용하여 계수 하였다.

조골세포의 MTT 환원율 검사

17β-estradiol을 처리하여 96-well plate에서 5×10³개 세포가 되도록 분주하여 48시간 배양한 후 배양이 끝나기 3시간 전에 배양액에 3-[4,5-dimethylthiazol-2yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT : 50 μg/well, Sigma, USA) 용액을 첨가하였다. 그 후 상청액을 제거하고 0.04N HCl / isopropanol로 30분 동안 염색제를 녹인 후 562 nm에서 비색정량하였다. 측정된 흡광도는 대조군에 대한 백분율로 표시하였다.

염기성 인산분해효소 활성

세포내의 염기성 인산분해효소 활성 측정을 위해 흰쥐 두개관으로부터 얻은 세포를 96-well plate에 분주하여 배양한 후 0.4% FBS가 포함된 배양액내에 17β-estradiol을 48 시간 동안 처리하였다. 배양이 끝난 후 0.1% Triton X-100/saline으로 세포추출액을 만들어 효소 활성에 사용하였다.

염기성 인산분해 효소 활성은 100 mM의 p-nitrophenyl phosphate (pNPP, Sigma, USA)를 기질로 glycine-NaOH buffer(pH 10.4)와 함께 37°C에서 30분간 반응시켰으며 기질인 pNPP로부터 유리되어 나온 PNP의 양을 흡광광도계 (SLT 400 SFC, SLT Labinstruments, Austria)를 이용하여 405 nm

에서 비색정량하였다.

Nitric oxide 유리량 측정

NO의 양은 배양액 내로 유리된 nitrite (NO₂-)양을 측정하였다. 96-well reading plate에 100 μ l의 세포배양액 (phenol red-free)과 동량의 Griess 용액 (1% sulfanilamide, 0.1% naphthylethylene-diamine-dihydrochloride, 2.5% phosphoric acid)을 혼합한 후 실온에서 15분간 반응시켰다. Nitrite의 농도는 sodium nitrite의 순차적인 희석 농도로 만든 표준 곡선을 이용하였으며 microplate reader (SLT 400 SFC, SLT Labinstruments, Austria)를 사용하여 530 nm에서 비색정량하였다.

생쥐 골수 세포의 배양

생쥐 골수세포를 분리하기 위해 7-9주 된 웅성 생쥐를 경부염전으로 희생시킨 후 대퇴골과 경골을 무균적으로 적출하고 연조직을 제거하였으며 장골의 양끝을 절단한 후 26G 주사침을 이용하여 한쪽 끝의 골수강에 α -minimum essential medium (α -MEM, Gibco, NY, USA) 1 ml를 천천히 주사하여 골수세포를 모은 후 10% FBS가 포함된 α -MEM에 2시간 전 배양한 후 미부착세포들을 모아 파골세포의 전구 세포가 되는 미부착세포를 well당 5×10^5 개의 세포가 되도록 분주하여 96-well plate에서 배양하였다. 8일간 배양하는 동안 10 nM 1,25[OH]₂D₃이 포함된 phenol red-free α -MEM에 17 β -estradiol을 3일과 6일째 2회 첨가하며 배양하였다.

배양이 끝난 후 배양액내로 유리된 nitrite의 양을 측정하였으며, 파골세포의 생성을 검사하기 위하여 세포를 고정하여 TRAP 염색을 시행하였다.

생쥐 골수세포와 MG 63세포의 coculture

위의 방법과 같이 생쥐 골수세포를 분리 배양하면서 3일째 사람 조골세포주인 MG63 세포를 well 당 1000개의 세포가 되도록 분주하였으며 8일간 배양하는 동안 10 nM 1,25[OH]₂D₃이 포함된 phenol red-free α -MEM에 17 β -estradiol을 3일과 6일째 2회 첨

가하며 배양하였다.

M-CSF 의존형 골수세포 (M-CSF dependent bone marrow cell, MDBM) 배양

MDBM 세포를 분리 배양하기 위하여 7-9주 된 웅성 생쥐를 경부염전으로 희생시킨 후 대퇴골과 경골을 무균적으로 적출하고 연조직을 제거하였으며 장골의 양끝을 절단한 후 26G 주사침을 이용하여 한쪽 끝의 골수강에 0.1% collagenase, 0.05% Trypsin-EDTA 효소 용액을 주사하여 골수를 적출해 낸다.

그 후 30분간 37°C에서 골수를 효소용액으로 교반하여 세포를 모은 후 적혈구를 제거하고 5 ng/ml M-CSF와 10% FBS가 포함된 α -MEM으로 100 mm 배양접시에 전 배양한다. 24시간 후 미부착 세포를 모아 well당 5×10^5 개의 세포가 되도록 분주하여 96-well plate에서 배양하였다.

8일간 배양하는 동안 50 ng/ml의 osteoclast differentiation factor (ODF, Peprotech, UK), 10 ng/ml macrophage-colony stimulating factor (M-CSF, Peprotech, UK) 및 1ng/ml transforming growth factor- β (TGF- β , Peprotech, UK)가 포함된 α -MEM에 17 β -estradiol을 3일과 6일째 2회 첨가하며 배양하였다.

Tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) 조직화학 검사

마우스 골수세포로부터 파골세포의 생성을 검사하기 위하여 TRAP 조직화학 검사를 시행하였다. 배양이 끝난 후 배양액을 제거하고 인산완충생리식염수 (D-PBS, pH 7, Gibco, NY, USA)로 세척 후 citrate-acetone-formaldehyde 용액으로 5분간 고정하였고, 37°C의 증류수로 세척한 후 TRAP kit (Sigma, USA)를 이용하여 TRAP 염색을 시행하였다. TRAP 염색은 기질인 naphthol AS-BI phosphate, 반응산물의 염색제인 fast garnet GBC base와 7 mM의 tartrate buffer (pH 5)가 포함된 acetate buffer (pH 5)로 37°C에서 1시간 반응시켜 효소활성을 검사하였으며 염색된 세포는 광학현미경

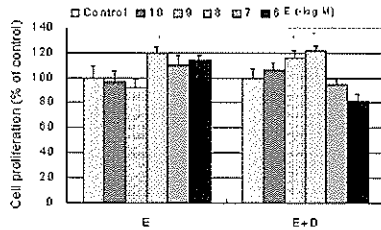


Fig.1 Effect of estrogen on cell proliferation of rat calvarial osteoblastic cells in culture. Data represent mean \pm S.E. of 5 replicates. E : 17 β -estradiol, D : 10⁻⁸M dexamethasone
* : Significantly different from corresponding control, p<0.05

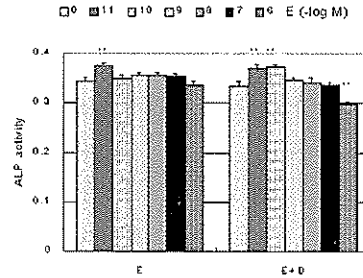


Fig.2 Effect of estrogen on ALP activity of rat calvarial osteoblastic cells in culture. Data represent mean \pm S.E. of 5 replicates. E : 17 β -estradiol, D : 10⁻⁸M dexamethasone
* : Significantly different from corresponding control, p<0.05
** : Significantly different from corresponding control, p<0.01

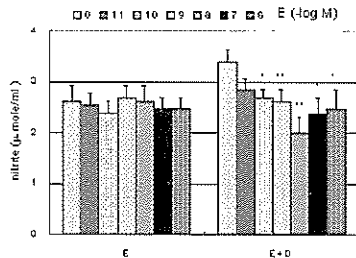


Fig.3 Effect of estrogen on the NO production of cultured medium of rat calvarial osteoblastic cells. Data represent mean \pm S.E. of 5 replicates. E : 17 β -estradiol, D : 10⁻⁸M dexamethasone
* : Significantly different from corresponding control, p<0.05
** : Significantly different from corresponding control, p<0.01

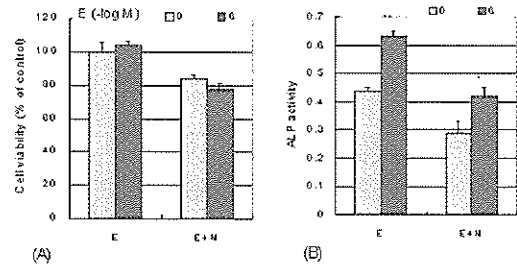


Fig.4 Effect of estrogen and NAME on cell viability (A) and ALP activity (B) of rat calvarial osteoblastic cells. Data represent mean \pm S.E. of 5 replicates. E : 17 β -estradiol, N : 10mM NAME
* : Significantly different from corresponding control, p<0.05
** : Significantly different from corresponding control, p<0.01

상에서 관찰하여 3개 이상의 핵을 포함한 TRAP 양성인 다핵세포의 수를 계수하였다.

통계처리방법

본 실험의 통계처리는 Student's *t* test 방법을 사용하였으며, 값은 평균과 표준 오차로 나타내었다.

III. 실험 결과

조골세포의 증식 및 활성화에 미치는 영향

17 β -estradiol이 조골세포의 세포증식에 미치는 영향을 관찰한 결과 10⁻¹⁰ 및 10⁻⁹M 농도에서는 흰쥐 두 개관으로부터 분리한 조골세포의 증식에 영향을 미치지 않았으나, 10⁻⁸M 농도에서는 조골세포의 세포증

식을 약 20% 정도 증가시켰다 (Fig. 1).

조골세포의 염기성 인산분해효소 활성화에 미치는 영향을 관찰한 결과 세포증식과는 달리 10⁻¹¹ 및 10⁻¹⁰M 농도에서 염기성 인산분해효소 활성을 증가시켰으며, 10⁻⁸M 농도에서는 대조군에 비하여 효소 활성을 감소시켰다 (Fig. 2).

17 β -estradiol이 조골세포의 NO 생성에 미치는 영향을 관찰한 결과, estrogen만을 처리한 경우에는 모든 농도에서 NO의 생성에 영향을 미치지 않았으나, 10⁻⁸M dexamethasone과 함께 처리한 경우 17 β -estradiol을 처리한 모든 농도에서 NO의 생성이 억제되었다 (Fig. 3).

NO가 estrogen의 효과를 매개하는지 확인하기 위하여 NOS 억제제인 N-nitro-L-arginine

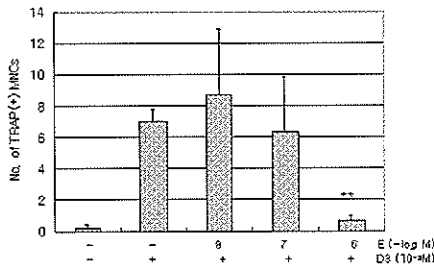


Fig.5 Effects of estrogen on the TRAP(+) MNCs formation of mouse bone marrow cells. Bone marrow cells were cultured with 1,25[OH]₂D₃ for 8 days. Data represent mean ±S.E. of 4 replicates. E : 17β-estradiol, D3 : 1,25[OH]₂D₃.

** : Significantly different from D3 +group, p<0.01

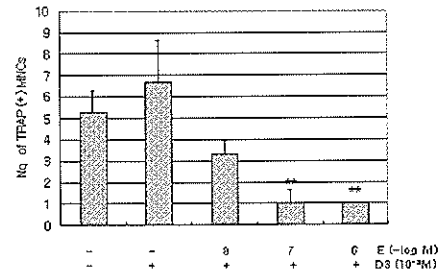


Fig.6 Effects of estrogen on the TRAP(+) MNCs formation of mouse bone marrow cells and MG63 cells. Bone marrow cells and MG63 cells were cocultured with 1,25[OH]₂D₃ for 5 days. Data represent mean ±S.E. of 4 replicates. E : 17β-estradiol, D3 : 1,25[OH]₂D₃.

** : Significantly different from D3 +group, p<0.01

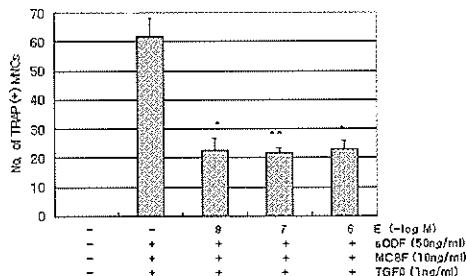


Fig.7 Effects of estrogen on the TRAP(+) MNCs formation of M-CSF dependent bone marrow cells. M-CSF dependent bone marrow cells were cultured with M-CSF, sODF and TGFβ for 8 days. Data represent mean ±S.E. of 4 replicates. E : 17β-estradiol.

* : Significantly different from M-CSF, sODF, TGFβ +group, p<0.05

** : Significantly different from M-CSF, sODF, TGFβ +group, p<0.01

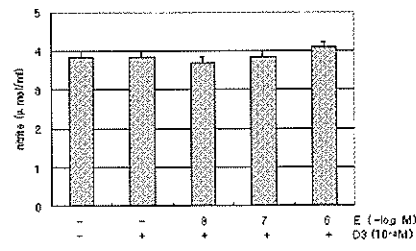


Fig.8 Effect of estrogen on the NO production of cultured medium of mouse bone marrow cells and MG63 cells. Data represent mean ±S.E. of 5 replicates. E : 17β-estradiol, D3 : 1,25[OH]₂D₃.

methylester (NAME)를 처리한 경우 세포 생존률 및 염기성인산분해효소의 활성이 감소되었으나, 10⁻⁸M 17β-estradiol에 의해 증가된 염기성인산분해효소의 활성이 감소되지는 않았다 (Fig. 4).

파골세포의 생성에 미치는 영향

Estrogen이 직접 혹은 간접적으로 파골세포의 생성에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 생쥐 골수세포 배양, 골수세포와 조골세포의 동시배양 및 MDBM 세포를 분리하여 배양하는 등의 여러 실험 모델을 이용하였다.

파골세포의 생성을 유도하기 위하여 생쥐 골수세포 및 골수세포와 조골세포의 동시배양의 경우 10⁻⁸M 1,25[OH]₂D₃를 사용하였으며, MDBM 세포로부터 파

골세포의 생성을 유도하기 위하여 M-CSF, sODF 및 TGF-β를 사용하였다.

골수세포 배양 결과 10⁻⁶M 17β-estradiol을 처리한 경우 1,25[OH]₂D₃에 의해 생성된 파골세포의 수가 감소되었으나 (Fig. 5), 조골세포와 동시에 배양한 경우에는 모든 농도에서 파골세포의 수가 감소되었으며, 17β-estradiol의 농도가 높아짐에 따라 그 수가 감소되었다 (Fig. 6).

반면 MDBM 세포를 배양한 결과 실험에 사용한 모든 농도의 17β-estradiol에 의해 파골세포의 수가 현저히 감소되었다 (Fig. 7).

Estrogen이 골수세포와 조골세포의 동시 배양시 NO의 생성에 미치는 영향을 관찰한 결과 모든 농도에서 대조군에 비해 변화를 나타내지 않았다 (Fig. 8).

이상의 결과로 estrogen이 조골세포의 NO 생성을 억제하고, 세포 증식 및 활성을 증가시키는 반면, 파골세포의 NO 생성에는 변화를 미치지 못하며, 파골세포의 생성을 억제함을 관찰할 수 있었다.

IV. 총괄 및 고찰

성 스테로이드 호르몬은 골격계의 양을 유지하는데 필수적이며, 난소절제술은 흰쥐와 원숭이에서 골밀도 (bone mineral density)를 감소시키고^{18,19)}, 이러한 변화는 치밀골의 골격조와 층판골의 흡수에 의하여 일어난다고 알려져 있다^{20,21)}.

1988년 두 연구 그룹은 사람의 조골세포 배양²²⁾과 흰쥐의 골육종 세포에서 유래한 조골세포주 배양실험에서²³⁾ 골조직에 estrogen의 수용기가 있음을 보고하였고, 그 이전의 연구에서는 estrogen이 PTH와 1,25[OH]₂D₃와 같은 골흡수 유도 호르몬에 의해 골조직에 간접적으로 작용한다고 보고되어 왔다²⁴⁾.

Estrogen은 직접 혹은 간접적으로 골조직세포에 영향을 미치며 골밀도를 증가시킨다고 알려져 있으나, 조골세포 및 파골세포의 기능을 조절하는 정확한 기전은 잘 알려져 있지 않다. 본 연구에서는 estrogen이 골조직내의 세포에 미치는 영향이 NO에 의해 매개되는지 알아보고자 하였다.

골조직내에서 골기질의 성분을 주로 합성하는 조골세포는 미분화간엽세포 및 간질을 이루는 세포로부터 유래하며²⁵⁾, 활발한 대사작용으로 석회화과정에 중요한 역할을 하며 과립형질내세망이 발달해 있고, 골지체, 사립체가 존재하며²⁶⁾, 세포막에 당단백효소인 염기성 인산분해효소를 갖고 있다.

본 연구에서는 estrogen이 조골세포의 증식과 활성화에 미치는 영향을 관찰하기 위하여, 흰쥐의 두개관으로부터 분리한 세포를 조골세포의 실험모델로 이용하였으며, 이는 염기성 인산분해효소, PTH에 의한 cAMP의 생성, 제1형 교원섬유 및 osteocalcin의 합성 등 조골세포의 표현형을 가지고 있다.

본 연구에서는 조골세포를 배양하면서 여러 농도의 estrogen을 처리한 후 세포수와 조골세포 활성의

지표로 염기성 인산분해효소의 활성을 측정하였다. 염기성 인산분해효소는 조골세포의 표지효소로 이용되며 골조직 형성의 여러 단계에 관여할 것으로 추측된다^{27,28)}.

연구 결과 17β-estradiol은 10⁻¹⁰ 및 10⁻⁹M 농도에서는 흰쥐 두개관으로부터 분리한 조골세포의 증식에 영향을 미치지 않았으나, 10⁻⁸M 농도에서는 조골세포의 세포증식을 약 20% 정도 증가시켰으며, 세포증식과는 달리 10⁻¹¹ 및 10⁻¹⁰M 농도에서 염기성 인산분해효소 활성을 증가시켰으며, 10⁻⁸M 농도에서는 대조군에 비하여 효소 활성을 감소시켰다. 이는 estrogen이 농도에 따라 조골세포의 증식 및 활성화에 영향을 나타냄을 알 수 있다.

조골세포는 소량의 NO를 생성하고, cytokine에 의해 NO의 생성이 촉진되며^{10,11)}, NO 생성을 나타내주는 혈장내 nitrate와 nitrite를 측정된 결과 estrogen에 의해 증가됨을 관찰한 바 있다^{29,30)}. Cytokine에 의해 iNOS의 발현이 촉진됨은 잘 알려져 있으나³¹⁾, 골조직내에서 발현되는 cNOS³²⁾의 역할은 잘 알려져 있지 않다. 이전의 연구에서 심혈관계에서 NO가 estrogen의 매개인자로 보고되어 왔으며, 동물실험에서 estrogen은 혈관조직, 근육 및 뇌에서 NOS의 활성을 촉진한다고 알려져 있다^{15,33)}.

본 연구에서 흰쥐 두개관에서 분리한 조골세포에서 소량의 NO를 생성하며 estrogen 단독을 처리한 경우 NO 생성에 별 영향을 미치지 못하였으나, dexamethasone을 처리하고 estrogen을 처리한 경우 NO의 생성을 감소시켰다.

NO가 estrogen의 효과를 매개하는지 확인하기 위하여 NOS 억제제인 NAME를 처리한 경우 조골세포의 생존률 및 염기성 인산분해효소의 활성이 모두 감소되었다. 따라서 NO가 estrogen의 효과를 매개하리라 여겨지나, 10⁻⁸M 17β-estradiol에 의해 증가된 염기성 인산분해효소의 활성의 양상은 변화되지 않았다. 이러한 결과는 생쥐에 17β-estradiol과 NAME 등을 투약하여 골밀도를 측정된 결과 estrogen에 의해 증가된 골밀도가 NAME에 의해 억제된 결과와 유사한 결과로 여겨진다³⁴⁾.

또한 골조직에 존재하는 유일한 다핵세포인 파골세포는 1873년 Kölliker³⁵⁾에 의해 처음 명명된 세포로, 주로 골내막에 위치하며 흡수가 일어나는 골표면에 근접하여 주름변연이 나타난다.

파골세포는 특징적으로 tartrate 저항성 산성인산분해 효소 (tartrate-resistant acid phosphatase, TRAP)와 풍부한 calcitonin 수용체를 가지며 산 생성이 활발하고 석회화조직에 흡수외를 형성한다^{36,37)}. 파골세포는 골수내의 단핵구/대식세포 계통의 세포로부터 유래하고, 이 단핵전구세포는 혈액내로 순환되며 골내막층에서 전구세포들이 증식되어 다핵세포를 형성하기 위해 융합된다고 믿어지고 있다³⁸⁾. 본 연구는 estrogen이 파골세포의 생성에 미치는 영향을 연구하기 위하여 파골세포 전구세포로부터 파골세포의 생성 및 활성화에 미치는 영향을 관찰하였다.

파골세포가 조혈기관 기원인 것을 이용하여 다수의 파골세포 전구세포를 얻기 위하여 골수세포 배양이 널리 이용되고 있으며³⁹⁾ 이러한 골수세포 배양시 관찰되는 다핵세포는 TRAP 양성 반응을 나타내고 CT 수용체⁴⁰⁾를 가지며 석회화된 상아질을 흡수할 때 주름변연을 형성하는⁴¹⁾ 등의 파골세포의 특징을 나타내고 있으며, 이 중 TRAP는 골조직내 다른 세포와 구별할 수 있는 파골세포의 세포화학적 표지효소로 이용된다⁴²⁾. 생쥐 골수세포를 배양하면서 TRAP 양성 다핵세포의 생성을 위해 1,25[OH]₂D₃ 또는 M-CSF와 sODF 등과 함께 estrogen을 여러 농도로 처리하여 8일간 배양한 결과 TRAP 양성 다핵세포의 생성을 관찰할 수 있었다.

전체 골수세포를 배양하면서 estrogen이 미분화된 파골세포의 전구세포에 미치는 영향을 관찰하고자 하였으며, 조골세포와 미분화된 파골세포의 전구세포를 동시에 배양하면서 estrogen이 간접적으로 작용하여 파골세포의 생성에 미치는 영향을 관찰하고자 하였다. 또한 직접 파골세포 전구세포에 estrogen이 미치는 영향을 관찰하기 위하여 MDBM 세포를 사용하였다. 여러 실험모델에서 estrogen을 처리한 결과 농도에 따라 감소 정도가 달랐으나 모두 TRAP 양성 다핵세포의 수가 현저히 감소되었다.

여러 보고에서 증가된 NO는 in vitro와 in vivo 실험 모두에서 강력하게 골흡수를 억제하였다⁴³⁾. 또한 조골세포의 배양과 골조직 장기배양시 염증자극에 의한 반응에 의해 유리된 NO도 파골세포의 골흡수를 억제함을 보고한 바 있으며⁴⁴⁾, 증가된 세포내 칼슘농도와 protein kinase C 활성화에 의하여 파골세포로부터 유리된 NO도 또한 파골세포의 활성을 억제한다고 하였다⁴⁵⁾.

또한 in vivo 실험에서, NO를 유리하는 물질에 의해 파골세포에 의한 골흡수가 억제되었으며, 난소절제시 estrogen의 부족으로 유도된 골손실을 방지함을 보고한 바 있다⁴³⁾. 반대로, in vitro와 in vivo 모두 여러 NOS 억제제들에 의해 NO가 억제되었을 때 파골세포에 의해 매개된 골흡수는 증가함을 보고하였다^{45,46)}. 그러나 본 연구에서는 파골세포 전구세포와 조골세포를 동시에 배양하면서 estrogen을 처리한 결과 NO 생성에는 유의성 있는 변화를 미치지 못하였다.

비록 estrogen의 골조직에 대한 활성화 기전을 모두 설명할 수 없지만, 본 연구 결과 estrogen이 조골세포에서 NO를 매개물질 중 하나로 이용하고, 파골세포에서는 NO를 매개물질로 이용하지 않으나 골형성 및 골흡수를 조절하며 골조직을 보호하는 물질이라 여겨진다.

V. 결 론

전체 골의 양은 전신적인 호르몬 중 혈중 Ca 양을 조절하는 호르몬에 의해 일생동안 균형을 이루게 되며, estrogen은 폐경 후 여성에게서 빈발하는 골다공증과 밀접한 관련을 가지고 있다. Estrogen의 분비가 저하되면 골의 형성보다 흡수가 더 많이 야기되어 골조직의 손실을 가져오며, estrogen 투여시 골소실이 방지되는 것으로 보고되어 estrogen 결핍이 골다공증의 병인의 주요한 인자로 알려져 있으나 estrogen이 골소실을 방지하는 기전에 대하여는 잘 알려지지 않고 있다. 최근 NO가 cytokine의 효과를 매개하는데 중요한 역할을 한다는 보고가 있으며 estrogen이 사

람의 조골세포에서 NOS의 발현을 촉진한다는 보고가 있다.

또한 cytokine들은 골다공증 및 Paget's disease와 같은 만성염증성 질환과 같이 흔히 볼 수 있는 골조직 파괴와 관련된 질환에 밀접하게 연관되어 있다. 따라서 본 연구에서는 estrogen이 조골세포의 NO 유리량과 세포증식, 염기성인산분해효소활성 및 파골세포의 생성을 측정함으로써, estrogen이 조골세포 및 파골세포의 활성화에 미치는 영향을 관찰하고자 하였다. 그 결과 estrogen은 조골세포의 세포 증식 및 염기성 인산분해효소 활성을 증가시키며 NO가 estrogen의 효과를 매개하는지 확인하기 위하여 NOS 억제제인 NAME를 처리한 경우 세포 생존률 및 염기성 인산분해효소의 활성이 감소되었다.

전체 골수세포를 배양하면서 estrogen이 미분화된 파골세포의 전구세포에 미치는 영향을 관찰하고자

하였으며, 조골세포와 미분화된 파골세포의 전구세포를 동시에 배양하면서 estrogen이 간접적으로 작용하여 파골세포의 생성에 미치는 영향을 관찰하고자 하였다.

또한 직접 파골세포 전구세포에 estrogen이 미치는 영향을 관찰하기 위하여 MDBM 세포를 사용하였다. 여러 실험모델에서 estrogen을 처리한 결과 농도에 따라 감소 정도가 달랐으나 모두 TRAP 양성 다핵세포의 수가 현저히 감소되었으나 NO의 생성은 모든 농도에서 변화를 나타내지 않았다.

이상의 결과 estrogen은 조골세포의 증식 및 활성을 촉진하고 파골세포의 생성을 억제하며, 조골세포에서는 NO가 estrogen의 효과를 매개하는 물질 중 하나라 여겨지나 파골세포에서는 NO가 estrogen의 매개물질로 사용되지 않음을 알 수 있다.

참 고 문 헌

1. Canalis E. Effect of growth factors on bone cell replication and differentiation, *Clin Orthop Rel Res* 1985;193:246-263
2. Raisz LG. Hormonal regulation of bone growth and remodeling, in *Cell and Molecular Biology of Vertebrate Hard Tissue* CIBA Foundation Symposium 136, Wiley, NY, 1988;226-238
3. Horowitz MC. Cytokines and estrogen in bone : anti-osteoporotic effects, *Science* 1993;260:626-627
4. Gallagher JC, Riggs BL, Deluca HF. Effect of estrogen on calcium metabolism and serum vitamin D metabolites in postmenopausal osteoporosis, *J Clin Endocrinol Metab* 1980;51:1359-1364
5. Oursler MJ, Landers JP, Riggs BJ, Spelsberg TC. Oestrogen effects on osteoblasts and osteoclasts, *Ann Med* 1993;23:361-371
6. Moncada S, Palmer SMJ, Higgs EA. Nitric oxide : Physiology, pathophysiology and pharmacology, *Pharmacol Rev* 1991;43:109-142
7. Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells, *FASEB J* 1992;6:3051-3064
8. Förstermann U, Pollock JS, Tracey R, Nakane M. Isoforms of nitric oxide synthase : Purification and regulation, in *Methods in enzymology : Catalysis in oxygen radical reactions*, vol 233, Academic Press NY, 1994;258-264
9. Bredt D, Snyder S. Nitric oxide, A physiologic messenger molecule, *Ann Rev Biochem* 1994;63:175-195
10. Damoulis PD, Hauschka PV. Cytokines induces nitric oxide production in mouse osteoblasts, *Biochem Biophys Res Commun* 1994;201:924-931
11. Ralston SH, Todd D, Helfrich M, Benjamin N, Grabowski PS. Human osteoblast-like cells produce nitric oxide and express inducible nitric oxide synthase, *Endocrinol* 1994;135:330-336
12. Armour KE, Ralston SH. Estrogen upregulates endothelial constitutive nitric oxide synthase expression in human osteoblast-like cells, *Endocrinology* 1998;139:799-802

참고 문헌

13. Wimalawansa SJ, De Marco G, Gangula P, et al. Nitric oxide donor alleviates ovariectomy-induced bone loss, *Bone* 1996;18:301-304
14. Lindsay R, Cossman F. Estrogen in prevention and treatment of osteoporosis, *Ann NY Acad Sci* 1990;592:326-345
15. Weiner CP, Lizasoain L, Baylis SA, et al. Induction of calcium-dependent nitric oxide synthases by sex hormones, *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:5212-5216
16. Pittner RA, Spitzer JA. Steroid hormones inhibit induction of spontaneous nitric oxide production in cultured hepatocytes without changes in arginase activity or urea production, *Proc Soc Exp Biol Med* 1993;202:499-504
17. Wong GL, Cohn DV. Target cells in bone for parathormone and calcitonin are different : enrichment for each cell type by sequential digestion of mouse calvaria and selective adhesion to polymeric surfaces, *Proc Natl Acad Sci USA* 1975;72:3167-3171
18. Jayo MJ, Weaver DS, Adams MR, Rankin SE. Effects on bone of surgical menopause and estrogen therapy with or without progesterone replacement in cynomolgus monkeys, *Am J Obstet Gynecol* 1990;194:614-618
19. Kalu DN, Salerno E, Liu CC, et al. A comparative study of the actions of tamoxifen, estrogen and progesterone in the ovariectomized rat, *Bone Miner* 1991;15:109-124
20. Turner RT, Vandersteenhoven JJ, Bell NH. The effects of ovariectomy and 17 β -estradiol on cortical bone histomorphometry in growing rats, *J Bone Miner Res* 1987;2:115-122
21. Wronski TJ, Cintron M, Dann LM. Temporal relationship between bone loss and increased bone turnover in ovariectomized rats, *Calcif Tissue Int* 1988;43:179-183
22. Eriksen EF, Clovard DS, Berg NJ, et al. Evidence of estrogen receptors in normal human osteoblast-like cells, *Science* 1988;241:84-86
23. Komm BS, Terpening CM, Benz DJ, et al. Estrogen binding, receptor mRNA and biologic response in osteoblast-like osteosarcoma cells, *Science* 1988;241:81-84
24. Canalis E. Effects of sex steroids on bone collagen synthesis in vitro, *Calcif Tissue Res* 1978;25:105-110
25. Owen ME. The origin of bone cells in the postnatal organisms, *Arthritis and Rheumatism* 1980;23:1073-1080
26. Martin JH, Matthews JL. Mitochondrial granules in chondrocytes, osteoblasts and osteocytes, An ultrastructural and microincineration study, *Clin Orthop* 1970;68:273-278
27. Siffert RS. The role of alkaline phosphatase in osteogenesis, *J Exp Med* 1951;93:415-422
28. Farley JR, Baylink D. Skeletal alkaline phosphatase activity as a bone formation index in vitro, *Metabolism* 1986;35:563-571
29. Rosselli M, Imthurn B, Macas E, Keller PJ, Dubey RK. Circulating nitrite/nitrate levels increase with follicular development: indirect evidence for oestradiol mediated NO release, *Biochem Biophys Res Commun* 1994;202:1543-1552
30. Ramsay B, Johnson M, Leone A, Steer P. The effect of exogenous oestrogen on nitric oxide production in women: a placebo controlled crossover study, *Brit J Obs Gynaecol* 1995;102:417-419
31. Evans C, Ralston R. Nitric oxide and bone, *J Bone Miner Res* 1996;11:300-305
32. Helfrich M, Evans D, Grabowski P, Ohshima H, Ralston S. Expression of nitric oxide synthase isoforms in bone and bone cell cultures, *J Bone Miner Res* 1997;12:1108-1115
33. Bell D, Rensberger H, Koritnik D, Koshy A. Estrogen pretreatment directly potentiates endothelium-dependent vasorelaxation of porcine coronary arteries, *Am J Physiol* 1995;258:H377-H383
34. Samuels A, Perry MJ, Gibson S, et al. : Role of endothelial nitric oxide synthase in estrogen-induced osteogenesis. *Bone* 2000;29: 24-29.

참 고 문 헌

35. Kölliker A. Die normale resorption des knochengewebes in ihre bedeutung fur die entstenung der typischen knochenformen, F.C.W. Vogel, Leipzig, 1873:83
36. Baron R, Neff L, Van P, Nefussi J, Vignery A. Kinetic and cytochemical identification of osteoclast precursors and their differentiation into multinucleated osteoclasts, *Am J Pathol* 1986;122:363-378
37. Mundy G, Roodman G. Osteoclast ontogeny and function, In *Bone and Mineral Research*, vol 5, edited by Peck WA, Elsevier, Amsterdam, 1987;209-279
38. Scheven, B.A.A., Visser, J.W.M. and Nijweide, P.J. : In vitro osteoclast generation from different bone marrow fractions, including a highly enriched hematopoietic stem cell population. *Nature* 1986;321:79-81
39. MacDonald B, Takahashi N, McManus L, Holahan J, Mundy G, Roodman G. Formation of multinucleated cells that respond to osteotropic hormones in long term human bone marrow cultures *Endocrinology* 1987;120:2326-2333
40. Takahashi N, Akatsu T, Sasaki T, et al. Induction of calcitonin receptors by $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D_3 in osteoclast-like multinucleated cells formed from mouse bone marrow cells *Endocrinology* 1988;123:1504-1510
41. Sasaki T, Takahashi N, Higashi S, Suda T. Multinucleated formed on calcified dentine from mouse bone marrow cells treated with $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D_3 have ruffled borders and resorb dentin, *Anat Rec* 1989;224:379-391
42. Minkin C. Bone acid phosphatase: Tartrate-resistant acid phosphatase as a marker of osteoclast function, *Calcif Tissue Int* 1982;34:285-290
43. Kasten T, Collin-Osdoby P, Patel N, et al. Potentiation of osteoclast bone-resorptive activity by inhibition of nitric oxide synthase, *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:3569-3573
44. Ralston S, Ho L, Helfrich M, et al. Nitric oxide: A cytokine-induced regulator of bone resorption, *J Bone Miner Res* 1995;10:1040-1049
45. Sunyer T, Rothe L, Kirsch D, et al. Ca^{2+} or phorbol ester but not inflammatory stimuli elevate inducible nitric oxide synthase messenger ribonucleic acid and nitric oxide (NO) release in avian osteoclasts: Autocrine NO mediates Ca^{2+} -inhibited bone resorption, *Endocrinol* 1997;138:2148-2162
46. Tsukahara H, Miura M, Tsuchida S, et al. Effect of nitric oxide synthase inhibitors on bone metabolism in growing rats, *Am J Physiol* 1996;270:E840-E845