

뼈흡수유도호르몬이 ROS17/2.8세포로부터 Nitric Oxide 형성에 미치는 영향

단국대학교 치과대학 생화학교실, *단국대학교 치과대학 구강악안면방사선학교실,
**단국대학교 치과대학 약리학교실

고선일 · 김민성 · 한원정* · 김세원** · 김정근

Effects of osteotropic hormones on the nitric oxide production in culture of ROS17/2.8 cells

Seon-Yle Ko, Min-Sung Kim, Won-Jeong Han*, Se-Won Kim**, Jung-Keun Kim

Department of Oral Biochemistry, School of Dentistry, Dankook University

*Department of Oral and Maxillofacial Radiology, School of Dentistry, Dankook University

**Department of Dental Pharmacology, School of Dentistry, Dankook University

ABSTRACT

Purpose : We performed the present study to investigate whether osteotropic hormones play roles on the nitric oxide (NO) production in culture of ROS17/2.8 osteoblastic cells.

Materials and Methods : The osteoblastic cell line ROS17/2.8 cells were cultured in F12 medium supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS) at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air. ROS17/2.8 cells were plated in 96-well plates at a density of 2-3 × 10³ cells/well and grown to confluence. Then the cells were pretreated with osteotropic hormones (parathyroid hormone (PTH) 20-500 ng/mL, 1, 25-dihydroxycholecalciferol (1, 25[OH]₂D₃) 1-100 nM; prostaglandin E₂ (PGE₂) 20-500 ng/mL) in the medium supplemented with 0.4% FBS for 72 hours and the cells were treated with cytokines (TNFα and IFNγ) in phenol red-free F12 medium for an additional 48 hours. NO synthesis was assessed by measuring the nitrite anion concentration, the reaction product of NO, in the cell culture medium using Griess reagent.

Results : PTH and 1, 25[OH]₂D₃ pretreatment induced a significant increase in NO production in the presence of TNFα and IFNγ. PGE₂ slightly induced NO production compared to the control group. But, PGE₂ pretreatment did not affect in NO production in the presence of TNFα and IFNγ.

Conclusions : These results suggest that the actions of osteotropic hormones in bone metabolism may be partially mediated by NO in the presence of cytokines. (*Korean J Oral Maxillofac Radiol* 2005; 35 : 127-31)

KEY WORDS : Nitric Oxide; Osteotropic Hormones; Cytokines; Osteoblasts

서론

뼈조직의 발달과 유지는 척추동물의 발생기간뿐 아니라 일생동안 매우 복잡한 과정에 의해 일어나며, 뼈형성과 뼈흡수사이의 지속적인 연계작용은 전신적 호르몬에서부터 cytokine과 같은 국소적 조절인자 등과 같은 다양한 인자들에 의해 조절된다.^{1,2}

내인성 혈관확장인자로 밝혀진 nitric oxide (NO)는 매우 작은 물질로 생물학적 방어막을 통과하여 쉽게 확산되며, 이웃 세포내에 도달하여 다양한 기능을 가지며,^{3,4} 주로 전달물질로 알려져 있다.⁵ NO는 짧은 반감기를 갖고 있어 근접한 세포에 의해 합성되어 활성을 나타내게 되며 guanylate cyclase에 결합하여 cGMP의 형성을 유도 하고 평활근의 이완에도 관여하는 물질로 알려져 있다.⁶ NO는 살균 작용에 관여하는 대식세포에 의해 생성되므로 면역 기능에 관여하리라 생각 되어진다.^{7,8} 또한 조골세포에 의해 생성된다는 보고⁹가 있으며 골격계의 대사과 관련된 NO의 역할에 대하여 보고된 바가 적다.

접수일 : 2005년 7월 1일; 심사일 : 2005년 7월 4일; 채택일 : 2005년 8월 2일
Correspondence to: Prof. Seon-Yle Ko
Department of Oral Biochemistry, School of Dentistry, Dankook University, San 29, Anseo-dong, Cheonan, Choongnam, Korea 330-716
Tel) 82-41-550-1934, Fax) 82-41-555-7648, E-mail) syko@dku.edu

뼈조직은 네 종류의 세포로 구성되어 있으며 조골세포, 파골세포, 뼈조직 표면에 존재하는 뼈이장세포 (bone lining cell) 및 석회화된 뼈조직내에 존재하는 골세포 (osteocyte) 가 있다. 조골세포, 골세포와 뼈이장세포는 간엽세포로부터 유래하는 반면 파골세포는 조혈기관으로부터 유래한 단핵 전구세포의 융합에 의해 생성된다. 이중 조골세포는 골기질을 생성하는 완전히 분화된 세포로, 활성화된 조골세포는 골기질내에 1형 교원섬유, osteocalcin, osteopontin과 bone sialoprotein^{10,11}과 같은 비교원성 단백질을 합성하며 석회화과정에 중요한 역할을 한다고 알려져 왔으며 석회화의 기전은 완전히 밝혀지지 않고 있다. 조골세포 유사세포가 NO를 생성한다는 보고¹²가 있으며 NO가 시험관내 실험에서 파골세포의 활성을 억제한다는 보고가 있다.¹³ NO를 생성하는 효소인 nitric oxide synthase (NOS)는 interleukin-17, interleukin-1 β (IL-1 β), tumor necrosis factor- α (TNF α)와 interferon- γ (IFN γ)와 같은 cytokine에 의해 유도된다.¹³⁻¹⁵ IL-1 β 와 TNF α 와 같은 cytokine은 염증성 골과괴의 매개자로 알려져 있으며,¹⁶ 이러한 cytokine에 의해 유도된 골흡수는 조골세포에 의해 매개된다고 알려져 있다. Prostaglandin E₂ (PGE₂)와 같은 PG는 이러한 기구의 중요한 역할을 한다.¹⁷ IFN γ 와 같은 cytokine은 조골세포의 기능에 중요한 영향을 미친다고 보고되어 있으며, 교원섬유의 합성을 억제하는 반면 교원섬유분해효소의 활성을 증진시키는 물질로 알려져 있다.¹⁸ 또한 NO가 시험관내에서 파골세포의 활성을 억제한다는 보고^{13,19}와, arginine의 존적 NO 합성경로 (arginine-dependent NO pathway)가 조골세포⁹와 파골세포²⁰에 존재한다는 보고가 있다.

본 연구에서는 조골세포주인 ROS17/2.8세포의 배양 중 여러 뼈흡수유도호르몬인 parathyroid hormone (PTH), 1, 25-dihydroxyvitamin D₃ (1, 25[OH]₂D₃)와 PGE₂와 cytokine을 처리하여, 뼈흡수유도호르몬이 단독으로 조골세포의 NO 형성에 영향을 미치는지와 cytokine에 의해 유도된 NO의 형성에 어떠한 영향을 미치는지 관찰하여 골대사에 관여하는 뼈흡수유도호르몬의 역할을 부분적으로 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 백서 조골세포의 배양

백서 조골세포주인 ROS17/2.8 세포를 통상적인 방법에 의해 5% fetal bovine serum (FBS)과 항생제가 포함된 F12 배양액에서 배양하였다. 배양액은 일주일에 2회 교환하고 일주일 간격으로 1:10으로 계대배양하였다. 배양시 온도는 37°C, 습도는 95%를 유지하였고 계속하여 5% CO₂와 95% 공기를 공급하였다. 세포배양은 96-well plate에 5 × 10³ cells/well이 되도록 분주하여 일주일간 배양하여 세포가 단층을 이룬 후 실험목적에 따라 배양액내에 여러 농도의

뼈흡수유도호르몬과 cytokine을 처리하였다.

2. 배양중인 조골세포의 뼈흡수유도호르몬 (ostetropic hormone) 전 처리

배양중인 ROS17/2.8 세포가 단층을 이룬 후 세 가지 뼈흡수유도호르몬을 다음과 같은 농도로 전처리하여 72시간 동안 배양하였다. 이때 배양액은 0.4% FBS가 포함된 F12 배양액을 사용하였다.

1) PTH의 전 처리

PTH 1 : 20 ng/mL

PTH 2 : 100 ng/mL

PTH 3 : 500 ng/mL

2) 1,25[OH]₂D₃의 전 처리

VD 1 : 1 nM

VD 2 : 10 nM

VD 3 : 100 nM

3) PGE₂의 전 처리

PG 1 : 20 ng/mL

PG 2 : 100 ng/mL

PG 3 : 500 ng/mL

3. 조골세포의 cytokine 처리

배양중인 ROS17/2.8세포에 72시간 동안 위와 같은 농도의 세 가지 뼈흡수유도호르몬을 전 처리한 후 모든 군에 50 ng/mL의 TNF α 와 300 U/mL의 IFN γ 를 처리하여 NO의 형성을 유도하였다. 이때 배양액은 0.4% FBS가 포함된 phenol red가 없는 F12 배양액을 사용하며 48시간 배양하였다.

4. Nitric Oxide 합성량 측정

NO의 생성량은 Griess용액을 사용하여 NO의 산화되어 안정한 형태인 nitrite양으로 측정하였다. 세 가지 뼈흡수유도호르몬을 72시간 전 처리하고 cytokine을 처리하여 48시간 배양한 후 100 μ L의 배양액과 동량의 Griess 용액 (1% sulfanilamide, 0.1% naphthylethylene-diamine-dihydrochloride, 2.5% phosphoric acid)을 실온에서 15분간 반응시킨 후 비색정량하였다. Nitrite의 농도는 sodium nitrite의 순차적인 희석 농도로 만든 표준 곡선을 가지고 microplate reader (SLT 400 SFC, SLT Labinstruments, Austria)를 사용하여 530 nm에서 비색정량하였다.

5. 통계처리방법

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

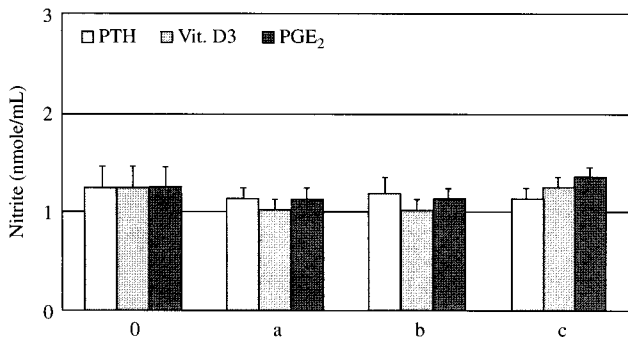


Fig. 1. Effects of osteotropic hormones on the NO production in ROS17/2.8 cells. Osteotropic hormone conc. : a: PTH 20 ng/mL, Vit. D3 1 nM, PGE₂ 20 ng/mL, b: PTH 100 ng/mL, Vit. D3 10 nM, PGE₂ 100 ng/mL, c: PTH 500 ng/mL, Vit. D3 100 nM, PGE₂ 500 ng/mL.

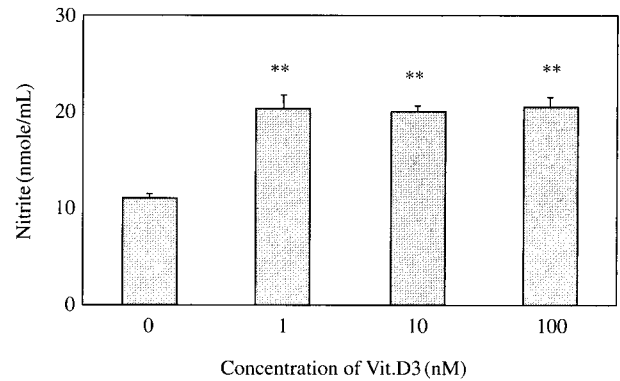


Fig. 3. Effect of 1, 25[OH]₂D₃ on the NO production induced by 50 ng/mL TNF α and 300 U/mL IFN γ in ROS17/2.8 cells. **: Significantly different from control, p<0.01.

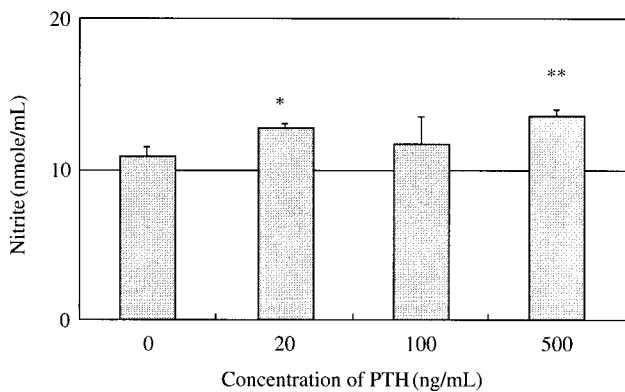


Fig. 2. Effect of PTH on the NO production induced by 50 ng/mL TNF α and 300 U/mL IFN γ in ROS17/2.8 cells. *: Significantly different from control, p<0.05. **: Significantly different from control, p<0.01.

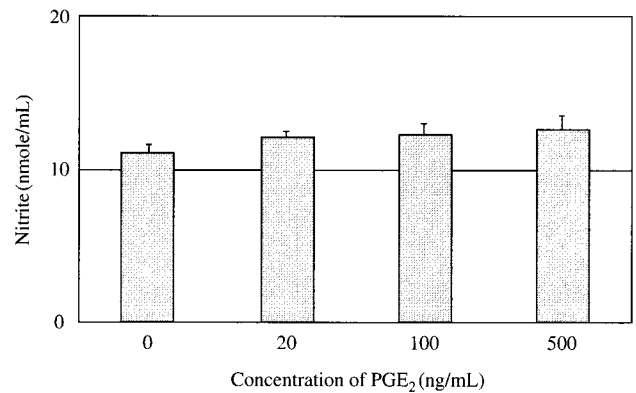


Fig. 4. Effect of PGE₂ on the NO production induced by 50 ng/mL TNF α and 300 U/mL IFN γ in ROS17/2.8 cells.

결 과

1. 뼈흡수유도호르몬 (Osteotropic hormone) 처리시 NO 생성

조골세포주인 ROS17/2.8세포를 배양하면서 특정한 cytokine을 처리하지 않고, PTH, 1, 25[OH]₂D₃와 PGE₂를 각각 세 가지 농도(PTH: 20, 100, 500 ng/mL; 1, 25[OH]₂D₃: 1, 10, 100 nM; PGE₂: 20, 100, 500 ng/mL)로 phenol red가 없는 F12/0.4% FBS 배양액 내에 72시간동안 처리하고 Griess 방법으로 nitrite의 양을 측정하고 배양액내로 유리된 nitrite의 양은 대조군에 비해 큰 차이를 보이지 않았다(Fig. 1).

2. Cytokine에 의해 유도된 NO 생성에 미치는 뼈흡수유도호르몬의 영향

뼈흡수유도호르몬의 전 처리에 의한 nitrite의 생성의 변

화를 관찰하기 위하여 배양중인 ROS17/2.8세포에 72시간 동안 F12/0.4% FBS 배양액내에 뼈흡수유도호르몬(PTH, 1, 25[OH]₂D₃와 PGE₂)을 위와 동일한 세 가지 농도로 전 처리하고, phenol red가 없는 F12/0.4% FBS 배양액에 48시간 동안 50 ng/mL의 TNF α 와 300 U/mL의 IFN γ 를 처리하여 배양액내로 유리된 nitrite의 양을 측정하였다.

PTH와 1, 25[OH]₂D₃를 처리하였을 경우 100 ng/mL의 PTH를 제외한 모든 농도에서 ROS17/2.8 세포로부터 NO의 생성이 유의성 있게 증가하였으며(Fig. 2 및 3), PGE₂를 처리한 경우 세 가지 농도 모두 대조군에 비해 NO의 생성이 증가하는 경향을 나타냈으나 유의성은 보이지 않았다(Fig. 4).

고 찰

활성화된 radical인 NO는 심혈관계와 신경계 및 면역계의 전달물질로서 매우 다양한 기능을 가지는 물질로 알려져 있다.^{5,21} NO는 NADPH 의존적 효소인 세가지 형태의

nitric oxide synthase (NOS)에 의해 L-arginine이 산화되어 citrulline으로 변환되는 과정에서 형성되는 중간생성물이다. 이들 NOS중 endothelial NOS (eNOS)와 neuronal NOS (nNOS)는 칼슘의 농도에 의존적이고, 자극에 대한 반응이 아닌 구성 성분으로써 일시적으로 소량 발현된다. 다른 하나는 inducible NOS (iNOS)로 칼슘의 농도에 관계없이 염증 자극에 의해 지속적으로 고농도로 생성이 유도되는 형태이다.^{22,23} 조골세포와 파골세포 모두 iNOS의 합성에 필요한 mRNA와 단백질을 발현하며, 세포의 활성을 조절할 정도의 충분한 양의 NO를 생성한다고 보고되었다.^{24,25}

많은 경우 NOS는 대식세포에서 IL-1 β , TNF α , IFN γ 와 LPS 등과 같은 여러 염증성 자극에 의해 유도된다고 알려져 있으며,¹⁴ 또한 이들 세포에 여러 인자들을 복합 처리한 경우 NO의 형성이 현저하게 상승됨을 보고하였다.²⁶ Hauschildt 등²⁷은 대식세포에서 LPS 또는 세균의 lipopeptide를 처리한 경우 NO의 생성이 증가한다고 보고하였다.

NO가 조골세포²⁴와 관절의 연골세포²⁸로부터 생성된다는 보고가 있으며 이러한 연구결과는 조골세포와 연골세포로부터 생성된 NO가 인접세포의 활성을 조절할 것을 시사하는 것이다. 또한 Löwik 등⁹은 조골세포에 의해 생성된 NO가 병적 상태의 파골세포의 활성을 조절하는데 관여할 것을 보고한 바 있다. 이는 NO가 뼈개조의 조절에 관여할 것을 시사한다.

PTH는 뼈개조의 과정에 관여하여 뼈에서 칼슘을 유리시키며 혈중 칼슘 농도를 유지하는데 관여하고, 파골세포의 활성에 의해 간접적으로 뼈 표면으로부터 칼슘을 유리시키는 것으로 알려져 있다. PTH에 의해 유도된 뼈흡수를 조절하는 cytokine의 역할은 혼합 세포군에서는 측정하기가 어렵다. Cyclooxygenase와 5-lipoxygenase의 활성을 억제하는 강력한 cytokine 억제제는 PTH, TNF α 와 1, 25[OH]₂D₃에 의해 유도된 골흡수를 억제한다.²⁹ 또한 강력한 뼈흡수 물질로 알려진 1, 25[OH]₂D₃는 장기배양에서 뼈흡수를 촉진시키고 파골세포의 수와 활성을 증가시키며 최근 1, 25[OH]₂D₃는 baboon 골수세포 배양에서 골수 단핵세포의 용해를 증가시켜, 몇몇 파골세포의 특성을 갖는 세포를 형성하였고, 이 때 전구세포의 증식에는 영향이 없음이 보고된 바 있다.

PGE₂는 국소적으로 활성화되는 물질로, 태생 백서 장골의 장기배양에서 뼈흡수에 관여함이 보고된 이래 PGE₂가 뼈흡수에 관여함이 증명되었으며, PGE₂는 prostaglandin analogue 중 가장 강력한 뼈흡수능을 가진 것으로 알려져 있다.³⁰ 또한 골의 교원섬유합성에 대한 PGE₂의 영향은 교원섬유의 합성을 촉진하기도 하고 억제하기도 한다.³¹

조골세포는 세포표면에 PTH의 수용기를 가지며, I형 교원섬유와 여러 가지 비교원성 단백질을 합성하는 세포이며,^{10,11} 염기성인산분해효소와 osteocalcin은 조골세포 표현형의 전형적인 표지물질로 알려져 있다.

본 실험에서 ROS17/2.8세포를 배양하면서 cytokine 처리 없이 여러 가지 농도의 PTH, 1, 25[OH]₂D₃ 및 PGE₂를 처리한 경우 대조군에 비해 배양액내로 유리된 NO의 양이 변화를 보이지 않았다. 이러한 결과로 뼈흡수유도호르몬 단독으로는 iNOS를 발현시키지 않는 것으로 사료된다. van Bezooijen 등¹⁵은 estrogen의 경우 MC3T3/E1세포에서 cytokine 처리 없이 basal NO 생성을 증가시킴을 보고한 바 있으며 이는 본 실험의 결과와는 상이한 결과로 볼 수 있다.

그러나 뼈흡수유도호르몬 전 처리 후 cytokine에 의해 유도된 NO의 양의 변화를 알아보기 위하여 본 실험에서 ROS17/2.8세포를 배양하면서 여러 농도의 뼈흡수유도호르몬을 72시간 전 처리한 후 50 ng/mL의 TNF α 와 300 U/mL의 IFN γ 를 처리하여 NO의 양을 측정하였으며, 그 결과 PTH와 1, 25[OH]₂D₃를 처리한 경우 ROS17/2.8세포로부터 NO의 생성이 유의성 있게 증가하였다. 특히 1, 25[OH]₂D₃를 처리한 경우는 NO의 생성이 2배 증가되었다. 그러나 PGE₂를 처리한 경우 NO의 생성은 유의성은 보이지 않으나 증가하는 경향을 나타냈다.

NO 생성을 촉진시키는 염증성 cytokine은 강력한 뼈흡수 촉진제이므로,^{16,17} NO가 뼈흡수를 촉진시킬 가능성을 시사하고 있다. 또한 마우스 두개관 장기배양시 NOS 억제제인 L-N^G-monomethyl arginine (L-NMMA)에 의해 억제된 NO가 부분적으로 뼈흡수를 억제시킴이 보고된 바 있다.³² 또한 Hukkanen 등³³은 estrogen 결여로 골감소증(osteopenia)이 나타난 동물실험모델에서 NO 공여자인 nitroglycerin을 처리한 경우 파골세포의 활성을 억제함을 보고하였다. 이러한 결과 NO는 뼈흡수의 촉진 또는 억제 역할에 모두 관여할 것으로 생각되어진다. 파골세포에 의해 생성된 NO가 superoxide와 결합하여 좀 더 활성화되고 반감기가 긴 free radical로써 작용하여 기질 파괴에 관여한다는 보고³⁴가 있으므로 NO가 free radical을 생성함으로써 직접 뼈를 파괴할 것으로 생각되어진다.

본 실험의 결과는 뼈흡수유도호르몬이 iNOS의 발현을 증가시키거나 TNF α 와 IFN γ 에 대한 세포수용체의 발현을 촉진시켰을 것으로 사료된다. 이러한 점을 관찰하기 위하여 추후 분자 생물학적 접근이 필요할 것이며 조직화학적 방법을 이용한 확인작업이 이루어져야 할 것으로 보인다. 이러한 결과는 뼈대사에 관여하는 뼈흡수유도호르몬의 활성이 cytokine 존재 시 NO에 의해 부분적으로 매개된다는 것을 시사한다.

참 고 문 헌

1. Canalis E, McCarthy T, Centrella M. Growth factors and the regulation of bone remodeling. *J Clin Invest* 1988; 81 : 277-81.
2. Raisz LG. Hormonal regulation of bone growth and remodeling. In: *Cell and Molecular Biology of Vertebrate Hard Tissue* CIBA Foundation Symposium 136, New York: Wiley; 1988. p. 226-38.

3. Ignarro LJ. Experimental evidences of nitric oxide-dependent vasodilatory activity of nebivolol, a third-generation beta-blocker. *Blood Press Suppl* 2004; 1 : 2-16.
4. Ignarro LJ. Nitric oxide: A novel signal transduction mechanism for transcellular communication. *Hypertension* 1990; 16 : 477-83.
5. Moncada S, Palmer SMJ, Higgs EA. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43 : 109-42.
6. Wimalawansa SM, Shankar VS, Simmins DJ, Wimalawansa SJ. The mechanism of bone resorption by cyclosporin: involvement of the NO-cGMP pathway. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2000; 1 : 141-3.
7. Nathan C, Shiloh MU. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97 : 8841-8.
8. Nathan C, Hibbs Jr JB. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr Opin Immunol* 1991; 3 : 65-70.
9. Lowik CW, Nibbering PH, van de Ruit M, Papapoulos SE. Inducible production of nitric oxide in osteoblast-like cells and in fetal mouse bone explants is associated with suppression of osteoclastic bone resorption. *J Clin Invest* 1994; 93 : 1465-72.
10. Hauschka PV, Lian JB, Cole DEC, Gundberg CM. Osteocalcin and matrix gla protein : Vitamin K-dependent proteins in bone *Physiol Rev* 1989; 69 : 990-1046.
11. Sodek J, Chen JK, Kasugai S, Nagata T, Zhang Q, McKee MD, et al. Elucidating the functions of bone sialoprotein and osteopontin in bone formation. In: Slavkin H, Price P. *Chemistry and Biology of Mineralized Tissues*. Amsterdam: Excerpta Medica; 1992. p. 297-306.
12. Helfrich MH, Evans DE, Grabowski PS, Pollock JS, Ohshima H, Ralston SH. Expression of nitric oxide synthase isoforms in bone and bone cell cultures. *J Bone Miner Res* 1997; 12 : 1108-15.
13. Van Bezooijen RL, Papapoulos SE, Lowik CW. Effect of interleukin-17 on nitric oxide production and osteoclastic bone resorption: is there dependency on nuclear factor-kappaB and receptor activator of nuclear factor kappaB (RANK)/RANK ligand signaling? *Bone* 2001; 28 : 378-86.
14. Nussler AK, DiSilvio M, Billiar TR, Hoffman RA, Geller DA, Selby R, et al. Stimulation of the nitric oxide synthase pathway in human hepatocytes by cytokines and endotoxin. *J Exp Med* 1992; 176 : 261-4
15. Van Bezooijen RL, Van der Bent C, Papapoulos SE, Lowik CW. Oestrogenic compounds modulate cytokine-induced nitric oxide production in mouse osteoblast-like cells. *J Pharm Pharmacol* 1999; 51 : 1409-14.
16. Bertolini DR, Nedwin GE, Bringman TS, Smith DD, Mundy GR. Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation in vitro by human tumour necrosis factors. *Nature* 1986; 319 : 516-8.
17. Stashenko P, Dewhirst FE, Peros WJ, Kent RL, Ago JM. Synergistic interactions between interleukin-1, tumor necrosis factor, and lymphotoxin in bone resorption. *J Immunol* 1987; 138 : 1464-8.
18. Shen V, Kohler G, Jeffrey JJ, Peck WA. Bone resorbing agents promote and interferon- γ inhibits bone cell collagenase production. *J Bone Miner Res* 1988; 3 : 657-66.
19. MacIntyre I, Zaidi M, Alam A, Datta H, Moonga B, Lidbury P, et al. Osteoclast inhibition : An action of nitric oxide not mediated by cyclic GMP. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88 : 2936-40.
20. Kasten TP, Collin-Osdoby P, Patel N, Osdoby P, Siegel NR, Misko TP, et al. Potentiation of osteoclastic bone resorbing activity by inhibition of nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91 : 3569-73.
21. Lowenstein CJ, Snyder SH. Nitric oxide, a novel biological messenger. *Cell* 1992; 70 : 705-7.
22. Bredt D, Snyder S. Nitric oxide: A physiologic messenger molecule. *Ann Rev Biochem* 1994; 63 : 175-95.
23. Griffith O, Steuhr D. Nitric oxide synthases: Properties and catalytic mechanisms. *Ann Rev Physiol* 1995; 57 : 707-36.
24. Damoulis PD, Hauschka PV. Cytokines induces nitric oxide production in mouse osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 201 : 924-31.
25. Sunyer T, Rothe L, Kirsch D, Jiang X, Anderson F, Osdoby P, 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 : 2148-62.
26. Ding A, Nathan CF, Stuehr DJ. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediate from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J Immunol* 1988; 141 : 2407.
27. Hauschildt S, Bassenge E, Bessler W, Busse R, Mulsch A. L-arginine-dependent nitric oxide formation and nitrite release in bone marrow-derived macrophages stimulated with bacterial lipopeptide and lipopolysaccharide. *Immunology* 1990; 70 : 332.
28. Stadler J, Stefanovic-Racic M, Billiar TR, Curran RD, McIntyre LA, Georgescu HI, et al. Articular chondrocytes synthesize nitric oxide in response to cytokines and lipopolysaccharide. *J Immunol* 1991; 147 : 3915-20.
29. Votta BJ, Bertolini DR. Cytokine suppressive anti-inflammatory compounds inhibit bone resorption in vitro. *Bone* 1994; 15 : 533-8.
30. Kawaguchi H, Pilbeam CC, Harrison Jr, Raisz LG. The role of prostaglandins in the regulation of bone metabolism. *Clin Orthop* 1995; 313 : 36-46.
31. Blumenkrantz N, Sondergaard J. Effect of prostaglandin E1 and F2 α on biosynthesis of collagen. *Nature New Biol* 1972; 239 : 246-51.
32. Ralston SH, Ho LP, Helfrich MH, Grabowski PS, Johnston PW, Benjamin N. Nitric oxide : A cytokine-induced regulator of bone resorption. *J Bone Miner Res* 1995; 10 : 1040-9.
33. Hukkanen M, Platts LA, Lawes T, Girgis SI, Kontinen YT, Goodship AE, et al. Effect of nitric oxide donor nitroglycerin on bone mineral density in a rat model of estrogen deficiency-induced osteopenia. *Bone* 2003; 32 : 142-9.
34. Freeman B. Free radical chemistry of nitric oxide. *Chest* 1994; 105 (suppl): 79s-84s.