

# 일산화질소가 파골세포 유사세포의 gelatinase/type IV collagenase 활성에 미치는 영향

단국대학교 치과대학 치과약리학교실 부교수 김세원

\*이 연구는 "1998년도 단국대학교 대학연구비 지원으로 연구되었음"

## ABSTRACT

Effects of nitric oxide on the gelatinase/type IV collagenase activity of osteoclast-like cells

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

Se-Won Kim, D.D.S., M.S., Ph.D.

Nitric oxide(NO) and the activated oxygen species are some of the local factors that several recent studies have suggested to have an effect on bone resorption. NO is known to have functions in at least three systems, as a mediator of bactericidal effects in white blood cells, as a endothelium-derived relaxing factor in blood vessels, and as a neurotransmitter in nervous system. HD-11 cells, a *U-937*-transformed myelomonocytic cell line from chicken bone marrow, is known to differentiate into cells with osteoclastic phenotype *in vitro* when induced. In this study, we observed the effect of nitric oxide on the gelatinase/type IV collagenase activity, one of the phenotypical marker of osteoclasts using HD-11 cells. Concentrated conditioned medium obtained from HD-11 cell cultures showed the gelatinolytic activity of approximate molecular weight 85-90 KDa, using zymography. Gelatinolytic activity was also observed in the conditioned medium of osteoblastic cells, however, the molecular weight of this enzyme is different from that of osteoclasts. Gelatinase activity was inhibited by MMP inhibitor such as EDTA, but not by serine protease inhibitor, PMSF, or cysteine protease inhibitor, E-64. Western blot analysis showed that osteoblast produced gelatinase A, while osteoclastic cells produced both gelatinase A and B. NO donors such as SNP, SNG, SNAP or SIN-1 inhibited gelatinase activity in the HD-11 cell conditioned media. Vit. D<sub>3</sub> increased gelatinase activity and NO donors inhibited Vit. D<sub>3</sub>-induced gelatinase activity in the HD-11 cells. These results showed that nitric oxide can inhibit osteoclast activity, and this effect is at least partly expressed by the regulation of gelatinase.

Key words : Gelatinase, Nitric oxide, Osteoclast, Zymogram.

## I. 서론

골흡수는 유기조직과 무기질의 흡수로 이루어지는 복합적인 과정이며<sup>1)</sup>, 이 중 유기질의 분해과정에 관여하는 아직까지도 많은 논란이 있으나 조골세포 및 파골세포에 의하여 생성되는 여러 종류의 단백분해효소에 의하여 이루어진다고 추측된다<sup>2)</sup>. 골조직분해에 관여하는 효소들은 matrix metalloproteinase(MMP)와 cystein proteinase등 두 가지로 대별할 수 있으며 MMP 집단은 다시 interstitial collagenase, gelatinase 및 stromelysin등 3가지의 소집단으로 분류할 수 있다<sup>3)</sup>. 골조직 분해에 관여하는 MMP들은 공동으로 결합조직의 기질분해과정에 참여하며, 일반적으로 이러한 MMP들은 잠복성의 전효소(latent proenzyme) 형태로 유리된 후 다른 효소나 pH의 변화 등에 따라 활성화되는 공통점을 가지고 있다<sup>4)</sup>. 골조직의 유기질 분해과정에 관여하는 여러 단백분해효소의 기원과 작용기전에 관하여 아직도 많은 부분이 밝혀지지 않고 있으며 최근 들어 이러한 효소들 이외에 gelatinase(type IV collagenase)도 골흡수에 관여할 가능성이 제기되어 이에 관하여 많은 연구가 진행되고 있다. Gelatinase는 MMP 집단의 일원으로 기저막을 구성하는 제 IV형 교원질의 분해를 일으킬 뿐만 아니라 제 V형, 제 VII형 교원질 및 교원질 세편의 분해도 일으키는 단백분해효소로 약 72KDa의 분자량을 갖는 gelatinase A와 약 92KDa의 분자량을 갖는 gelatinase B로 구별된다. 이 중 gelatinase A는 주로 섬유모세포 또는 간엽세포 등에서 생성, 분비되며 골조직세포의 경우 조골세포가 주로 gelatinase A를 생성하는 반면 파골세포는 gelatinase A 및 B등을 모두 합성, 분비할 수 있음이 보고되어 골조직대사에 gelatinase가 중요한 역할을 담당할 가능성

이 시사된 바 있다<sup>9)</sup>.

골조직대사는 전신적 및 국소적 호르몬, 성장인자, cytokines 등 다양한 물질들에 의하여 조절을 받으며 이에 관한 많은 연구들이 진행되어 왔다. 최근 들어 일산화질소(nitric oxide, NO)가 여러 조직에서 다양한 기능을 나타내는 조절물질로 밝혀진 이후 골조직대사에 있어 일산화질소의 역할에 관한 연구가 일부 진행된 바 있으며<sup>6-9)</sup>, 그 결과 일산화질소가 파골세포의 기능을 억제하여 골흡수를 감소시킬 가능성이 있으며 조골세포에도 영향을 미칠 수 있음이 밝혀져 있다<sup>10)</sup>.

본 연구에 사용된 HD-11 세포주는 myelomonocytic 세포주로서 vitamin D<sub>3</sub> 처리시 높은 tartrate-resistant acid phosphatase(TRAP) 활성을 보이며, TRAP(+)-다핵세포를 형성하고, superoxide를 생성하며, 상아질의 superficial excavation을 일으키는 등 여러 가지 파골세포의 특성을 보이는 세포주로 이 세포들을 subcloning한 경우 호르몬처리 없이도 자발적으로 다핵세포를 형성할 수 있는 epithelioid/multinuclear(EM) type의 세포주가 파골세포유사세포의 가장 근접한 특징을 나타낸다<sup>11)</sup>. 본 연구는 파골세포의 성질을 갖고 있는 HD-11 세포주를 이용하여 파골세포의 활성화에 미치는 일산화질소의 영향을 규명하고자 하였으며, 그 첫 단계로 일산화질소가 파골세포로부터 유리되는 gelatinase/type IV collagenase의 활성화에 미치는 효과를 알아보려고 시행하였다.

## II. 연구재료 및 방법

### 1. 세포 및 세포배양

본 연구를 위하여 파골세포 유사세포로서 HD-11 세포주를 사용하였으며, 파골세포와 조골세포에서 생성되는 효소의 차이점을 알아보기 위하여 닭 태자의 두개골을 연속효소 처리하여 분리한 조골세포군 및 마우스 조골세포의 세포주인 MC3T3-E1 등을 비교군으로 사용하였다. HD-11 세포주는 10% fetal bovine serum(FBS, Gibco)이 첨가된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium and Ham's Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12, 1:1 mixture, Biowhittaker)로 배양하였으며, 닭 태자의 두개골에서 분리한 조골세포군 및 MC3T3-E1 세포주는 10% FBS가 첨가된 DMEM 배

양액(Gibco)으로 세포배양을 시행하였다. 각 세포들을 일정기간마다 계대배양 하면서 필요시 24-well culture plate에 분주하여 실험에 사용하였다. 대조군으로는 혈청이 첨가되지 않은 신선한 배양액을 사용하였고, 실험군으로는 일산화질소의 효과를 측정하기 위하여 일산화질소 donor인 sodium nitroprusside(SNP), s-nitrosoglutathion(SNG), s-nitroso-N-acetylpenicillamine(SNAP) 또는 3-morpholinisydnonimine(SIN-1)을 100 μM의 농도가 되도록 첨가하여 배양하였다. 일부의 실험에는 대표적인 골흡수 촉진물질인 1,25-dihydroxy vit. D<sub>3</sub>의 효과를 알아보기 위하여 vit. D<sub>3</sub>를 10<sup>-8</sup> M의 농도로 첨가하여 주었으며, HD-11 세포로부터의 일산화질소 생성량의 변화를 알아보기 위하여 nitric oxide synthase(NOS) 억제제인 L-N<sup>G</sup>-Nitroarginine methyl ester(NAME, Biomol)를 1 mM 농도로 첨가하여 배양하였다. Zymography 및 western blot analysis를 위해 혈청이 첨가되지 않은 배양액으로 교환한 다음 8시간 또는 24시간 후 배양액을 모아 이를 filter concentrator(Centricon™, molecular weight cut-off 30,000, Amicon)를 이용하여 약 25배정도 농축시킨 후 실험에 사용하였다. 배양액내의 효소활성이 어떠한 효소억제제에 의하여 억제되는가를 알아보기 위하여 HD-11 세포주 및 조골세포의 배양액을 모아 농축한 다음 이들을 MMP 억제제인 EDTA (Sigma Chemical Co.), serine protease 억제제인 phenylmethyl sulfonyl fluoride(PMSF, Sigma Chemical Co.), cysteine protease 억제제인 E-64(Boehringer Mannheim) 등과 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 후 zymography에 이용하였다.

### 2. Zymography

#### (Substrate-gel electrophoresis)

각각의 배양액을 모아 농축한 다음 이들을 동량의 2X sample buffer로 혼합한 후 non-reducing 상태로 1 mg/ml의 gelatin이 첨가된 10% SDS-PAGE gel(Zymogram gel, Novex)에 mini-gel electrophoresis system(Xcell Mini-Cell, Novex)을 이용하여 전기영동을 시행하였다. 전기영동은 25 mA/gel의 조건으로 약 90분간 시행하였으며 활성화되는 gelatinase의 분자량을 알아보기 위하여 분자량 6,500-200,000인 pre-stained molecular weight standard(Kaleidoscope

prestained standard, BioRad)를 전기영동시에 함께 이용하였다. 전기영동이 끝난 후 gel내의 SDS를 제거하기 위하여 renaturing buffer(0.25% triton X-100)로 30분씩 2회 세척 후 developing buffer(50 mM Tris-HCl, pH 8.3, 0.2 M NaCl, 6.7 mM CaCl<sub>2</sub>, 및 0.02% Brij 35)로 37°C에서 약 16시간 정도 incubation하였다. 그 후 gel을 0.5% Coomassie brilliant blue R250으로 약 45분간 염색한 다음 destaining하여 청색 바탕 위에 투명하게 나타나는 gelatinolytic 밴드를 관찰하였다.

### 3. Western blot analysis

각각의 배양액을 모아 농축시킨 다음 10% SDS-PAGE gel(Novex)을 이용하여 전기영동을 시행하였다. 전기영동후 semi-dry transfer unit(TE 70 Semiphor™, Hoefer)를 이용하여 PVDF membrane(Millipore)에 blotting을 시행하였고, 항-gelatinase A 및 B 항체(from Dr. Philip Stashenko)를 이용하여 immunoblot analysis를 시행하였다. 사용된 항-gelatinase 항체로는 proenzyme region 또는 proenzyme cleavage site의 18-20 amino acid로 만든 두 종류의 항-human 항-gelatinase A 항체(Ab 31 및 Ab 45)와 18개의 amino acid로부터 만든 항-mouse 항-gelatinase B 항체를 사용하였다. PVDF membrane을 blocking buffer에 약 16시간동안 incubation한 후 1차 항체(primary antibody)로 45분간 반응시킨 다음 blocking buffer로 2회 세척하였으며, 그 후 biotinylated 2차 항체(second antibody)로 30분간 반응시킨 후 다시 blocking buffer로 2회 세척하였다. 마지막으로 Avidx-AP conjugate와 20분간 반응시킨 후 alkaline phosphatase 기질인 CSPD chemiluminescent substrate(Tropix)를 가하고 chemiluminescence를 약 20분간 X-ray 필름에 노출시킨 다음 필름을 현상하여 gelatinolytic 밴드를 찾았다.

## III. 연구 성적

Zymography로 gelatinase 활성을 측정한 결과 HD-11 세포주를 배양한 경우 배양액 내에 분자량 약 85-

90 KDa의 gelatinase 활성이 관찰되었고, 그 활성도는 유기수은제재인 aminophenyl mercuricacetate(APMA)에 의하여 증가되었다(Fig 1). 한편 닭 태자로부터 분리한 조골세포군과 마우스 조골세포인 MC3T3-E1 세포주를 배양한 경우에도 배양액내에서 gelatinase 활성이 관찰되었으나 그 분자량은 HD-11 세포주의 배양액 내에서 확인된 gelatinase의 분자량과는 차이가 있었다(Fig 1). 이러한 배양액내의 gelatinase 분해활성은 MMP 억제제인 EDTA에 의하여는 억제되었으나 serine protease 억제제인 PMSF 또는 cysteine protease 억제제인 E-64등에 의하여는 영향을 받지 않아 이러한 효소활성이 gelatinase/type IV collagenase에 의해 나타나는 것으로 생각된다(Fig 2). 각각의 배양액 내에 존재하는 gelatinase를 확인하기 위하여 3개의 gelatinase 항체를 이용하여 western blot analysis를 시행하였으며, 그 결과 조골세포에서 유리되는 gelatinase는 항-gelatinase A 항체인 Ab 45에만 반응하였으나, HD-11 세포주의 배양액은 Ab 45 및 항-gelatinase B 항체와도 반응성을 나타내어 조골세포는 gelatinase A만을 생성하지만 HD-11 세포주는 gelatinase A와 B 모두를 생성 및 분비하는 것으로 추측된다(Fig 3).

HD-11 세포를 배양하면서 일산화질소 donor로 알려진 SNP, SNG, SNAP 또는 SIN-1을 첨가한 경우 배양액내의 gelatinase 활성도는 모두 억제되었으며 또한 vit. D<sub>3</sub>로 세포를 처리한 결과 gelatinase의 활성이 증가되었으며 일산화질소 donor들로 함께 처리한 경우 vit. D<sub>3</sub>에 의해 증가된 gelatinase의 활성도 일산화질소 donor들에 의하여 억제되는 양상을 나타내었다(Fig 4). 한편 NOS 억제제인 NAME는 HD-11 세포주로부터 생성되는 gelatinase의 활성에 영향을 미치지 못하였다(Fig 4).

## IV. 총괄 및 고찰

정상적인 골조직 대사에 있어 골조직의 흡수와 형성은 긴밀하게 연관되어 있으며(coupling phenomenon) 조골세포 및 파골세포에 의하여 생성되는 여러 물질들이 coupling process를 조절하는데 중요한 기능을 담당하고 있으리라고 생각된다. 오래 전부터 골조직대사를 조절하는 물질들에 대한 연구가 진행되어 왔으며 전신

적 호르몬뿐만 아니라 전신적 및 국소적 성장인자와 여러 cytokine들에 대한 연구가 광범위하게 이루어져 왔다. 최근 들어 이러한 물질들 이외에 골조직세포나 인접세포에서 생성되는 여러 reactive oxygen species (ROS) 또는 reactive nitrogen species(RNS)들도 골조직 대사에 중요한 역할을 담당하고 있음이 일부 밝혀졌으며 이에 대한 연구가 광범위하게 시도되고 있다<sup>11)</sup>. 일산화질소는 유해한 free radical gas로써 1) 백혈구에서의 살균작용, 2) 혈관에서의 혈관확장 작용, 3) 신경세포에서의 신경전달물질 기능 등을 나타내는 것으로 알려져 있으며 그밖에도 많은 종류의 세포가 일산화질소의 영향을 받고 있다<sup>12,13)</sup>. 일산화질소는 nitric oxide synthase(NOS)라는 효소의 작용에 의하여 L-arginine으로부터 형성되며 골조직에도 다양한 영향을 나타낸다. 일산화질소의 골조직세포에 대한 영향은 비교적 최근에 와서 연구가 진행되고 있으며 ROS와는 달리 골흡수를 억제할 가능성이 제시되어 있다. 즉, 일산화질소 donor인 SNP에 의하여 파골세포의 운동성이 감소되고<sup>6)</sup>, 골조직 장기배양(organ culture)시 일산화질소의 생성을 억제하는 경우 골흡수가 증가됨이 보고된 바 있다<sup>7)</sup>.

골조직대사를 연구하는데 가장 큰 어려움 중의 하나는 많은 수의 파골세포를 분리하기가 어려울 뿐 아니라 유용한 파골세포 또는 파골세포 전구세포의 세포주를 얻기 힘들다는데 있다. 본 실험에 사용된 HD-11 세포주는 닭의 골수로부터 만들어진 *v-myc* transformed myelomonocytic cell line으로 골조직대에 중요한 역할을 담당하는 vitamin D<sub>3</sub>의 수용체를 갖고 있으며 이 세포가 vitamin D<sub>3</sub>를 생성할 수 있음이 알려져 있다<sup>14-16)</sup>. 또한 이 세포주는 TRAP-양성 다핵세포를 형성할 수 있으며 phorbol myristate acetate (PMA) 처리시 NBT reduction을 일으킬 뿐만 아니라 파골세포에 대한 단일클론성 항체인 121F에 대하여 양성반응을 나타내며, 상아질 절편의 superficial excavation을 일으키는 등 파골세포의 특성을 갖고 있는 세포주이다. 이러한 HD-11 세포들을 subcloning한 경우 광학현미경하에서 크게 3가지 형태, 즉 1) 섬유모세포 형태(fibroblast-like cell, F type) 2) 원형세포 형태(round type, R type) 3) 유상피세포 및 다핵세포 형태(epithelioid/multinucleated type, EM type) 등으로 구별이 되었다(Hsia등, 1996). 이 중 EM type

의 세포의 경우 다른 세포에 비하여 TRAP 활성도가 가장 높았으며, vitamin D<sub>3</sub>등과 같은 호르몬 처리 없이도 많은 수의 다핵세포를 형성함이 관찰되어 파골세포의 전구세포를 포함하고 있는 세포주로서 파골세포에 대한 여러 실험에 유용하게 이용될 수 있으리라 생각된다<sup>17)</sup>. 본 연구는 파골세포의 실험모델로 HD-11 세포주를 이용하여 이 세포에 미치는 일산화질소의 영향을 관찰하고자 하였으며 파골세포 활성을 나타내는 지표중의 하나인 gelatinase를 그 기준으로 사용하였다.

HD-11 세포주를 배양하는 동안 배양액 내로 gelatinase가 유리됨을 zymography 방법으로 확인할 수 있었으며 효소의 분자량은 약 85-90 KDa이었다(Fig. 1). 조골세포 배양시에도 배양액 내에서 gelatinase 활성이 측정되어 조골세포도 gelatinase를 생성, 분비할 수 있다고 생각되나 그 분자량은 HD-11 세포로부터 생성되는 것과 차이가 있어 조골세포와 파골세포는 서로 다른 형태의 gelatinase를 생성하는 것으로 추측된다. 또한 이러한 gelatinase 활성도는 PMSF 및 E-64에 의해서는 억제되지 않았으나 MMP 억제제인 EDTA에 의해서만 억제되었으며(Fig. 2), 이는 HD-11 세포주로부터 유리되는 gelatinolytic activity가 serine protease 또는 cysteine protease등이 아닌 gelatinase/type IV collagenase임을 시사하는 결과라 사료된다.

조골세포와 파골세포 배양시 유리되는 gelatinase의 본태를 규명하기 위하여 각 배양액을 3종류의 항-gelatinase 항체를 이용하여 western blot analysis를 시행하였으며 그 결과는 그림 3과 같다. 사용된 항체는 2종류의 항-gelatinase A 항체(Ab 31 및 Ab 45)와 1종류의 항-gelatinase B 항체이었으며 조골세포 배양액은 Ab 45에만 반응성을 나타낸 반면 HD-11 세포의 배양액은 Ab 45 및 항-gelatinase B 항체 모두에 반응성을 나타내어 조골세포는 gelatinase A, 파골세포는 gelatinase A 및 B 모두를 생성함을 확인할 수 있었다(Fig 3).

HD-11 세포주의 gelatinase 활성에 미치는 일산화질소의 영향을 측정하기 위하여 세포배양시 일산화질소 donor인 SNP, SNG, SNAP, SIN-1등을 100  $\mu$ M의 농도로 첨가하여 배양한 후 그 배양액을 모아 농축시킨 다음 동일한 방법으로 zymography를 시행하였다. 실험에 사용된 일산화질소 donor는 모두 gelatinase의

활성을 억제하였으며 vit. D<sub>3</sub>에 의해 증가된 gelatinase 활성도도 억제하는 것으로 나타났다(Fig 4).

이상의 실험결과를 종합하면 일산화질소는 파골세포의 활성을 억제함으로써 골조직 대사과정에 참여할 가능성이 있으며 최소한 부분적으로는 gelatinase 활성조절이 그 기전의 일단이 될 것으로 추측된다. 그러나

NO는 superoxide와 결합하여 강력한 세포독성 물질인 peroxynitrite를 생성할 수 있으며<sup>18,19</sup>, 여러 종류의 ROS는 그 생성과정이 서로 연계되어 있어 각 물질들의 파골세포에 대한 정확한 작용기전을 밝히기 위하여는 지속적인 연구가 필요하리라 사료된다.

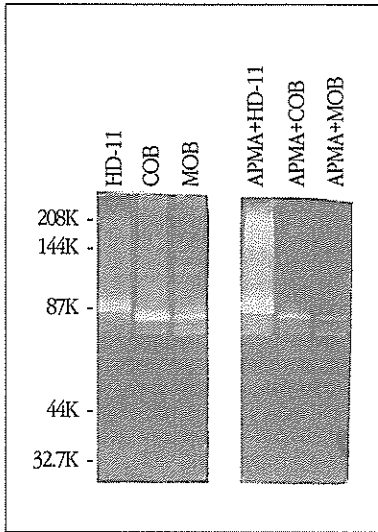


Fig 1. Zymogram of concentrated conditioned media obtained from HD-11 cells, primary osteoblastic cells from fetal chicken calvaria(COB), and MC3T3-E1 cells(MOB). Concentrated media was resolved in 10% zymogram gel containing 1 mg/ml gelatin after incubation with or without aminophenyl mercuricacetate(APMA). Numerals are molecular weight standard.

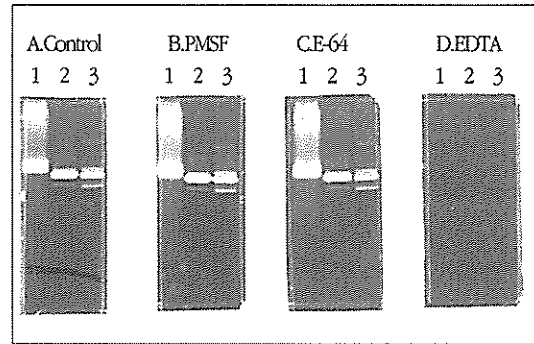


Fig 2. Effects of PMSF, E-64 and EDTA on the gelatinase activity of conditioned media. Concentrated conditioned media was incubated with or without PMSF, E-64 and EDTA for 1 hr at 37°C and resolved in zymogram gel. Lane 1, HD-11 cells ; lane 2, chicken osteoblastic cells ; lane 3, MC3T3-E1 cells.

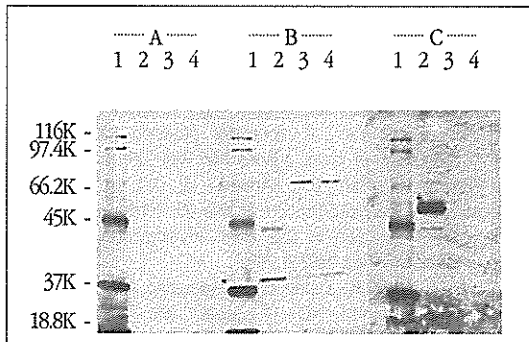


Fig 3. Western blot analysis of concentrated conditioned media. After blotting, PVDF membrane was probed with anti-gelatinase A antibody(Ab 31 ; group I, Ab 45 ; group II) or anti-gelatinase B antibody (group III). Lane 1, biotinylated molecular weight standard ; lane 2, HD-11 cells ; lane 3, chicken osteoblastic cells ; lane 4, MC3T3-E1 cells.

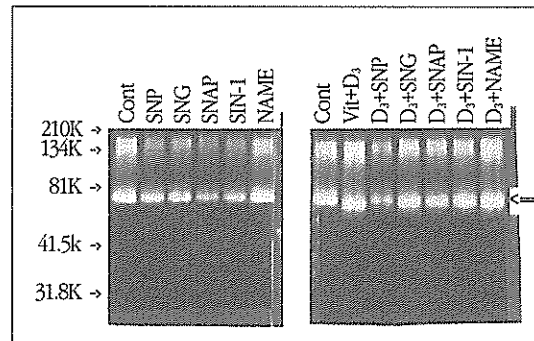


Fig 4. Effects of NO donors on the gelatinase activity of HD-11 cell culture. HD-11 cells were cultured with NO donors in the presence or absence of 10<sup>-8</sup> M vit. D<sub>3</sub> for 48 hrs. Concentrated conditioned media was resolved by a zymogram gel containing 1mg/ml gelatin. SNP ; sodium nitroprusside, SNAP ; s-nitroso-N-acetylpenicillamine, SNG ; s-nitrosoglutathion, SIN-1 ; 3-morpholinosydnonimine, vit. D<sub>3</sub> ; 1,25-dihydroxycholecalciferol. Bands containing gelatinolytic activity show up as a clear zone(==).

## V. 결 론

최근 들어 골조직 대사에 중요한 역할을 담당하고 있음이 일부 알려진 일산화질소가 파골세포의 활성화에 어떠한 영향을 미치는가를 알아보기 위하여 파골세포의 특성을 갖고 있는 HD-11 세포주로부터 생성되는 gelatinase 활성에 미치는 일산화질소의 영향을 관찰하였다. Gelatinase 활성을 측정하기 위하여 zymography 방법을 이용하였으며 배양액내의 gelatinolytic activity가 MMP 억제제, serine protease 억제제 또는 cysteine protease 억제제 등에 의하여 억제되는가를 비교하였고, HD-11 세포주 및 조골세포 배양시 생성되는 gelatinase의 본태를 3종류의 항-gelatinase 항체를 이용한 western blot analysis를 통하여 확인하였다. 또한 HD-11 세포주 배양시 배양액 내에 일산화질소 donor들과 *vit. D<sub>3</sub>*를 첨가한 후 배양액내의 gelatinase/type IV collagenase 활성의 변화를 측정함으로써 이들에 의한 gelatinase 활성변화를 관찰하였으며 이러한 실험을 통하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. Zymography 방법을 이용하여 HD-11 세포주로부터 배양액 내로 유리된 gelatinolytic 밴드를 확인할 수 있었으며 그 분자량은 약 85-90 KDa이었고 조골세포의 배양액에서도 gelatinolytic 밴드가 관찰되었으나 그 분자량은 다르게 관찰되었다.
2. 효소활성은 MMP 억제제인 EDTA에 의하여만 억제되었으며 serine protease 억제제인 PMSF나 cysteine protease 억제제인 E-64등에 의하여는 영향을 받지 않았다.
3. Western blot analysis 결과 조골세포는 gelatinase A만을 생성함이 관찰되었으나, HD-11 세포주의 경우 gelatinase A 및 B 모두를 생성함을 확인할 수 있었다.
4. 일산화질소 donor들인 SNP, SNG, SNAP, SIN-1는 모두 HD-11 세포주에서 생성되는 gelatinase의 활성을 억제하였고 *vit. D<sub>3</sub>*는 gelatinase 활성을 증가시켰으나 증가된 gelatinase 활성은 일산화질소 donor들에 의하여 모두 억제되었다.

이상의 결과를 종합하면 일산화질소는 골흡수를 억제하는 효과가 있으며 최소한 부분적으로는 파골세포에서의 gelatinase/type IV collagenase의 생성과 활성조절을 통하여 그 효과를 나타낸다고 추측된다.

## 참고문헌

1. Vaes G. Cellular biology and biochemical mechanism of bone resorption. A review of recent developments on the formation, activation, and mode of action of osteoclasts. *Clin Orthop Rel Res* 1988;231:239.
2. Wooley DE. Mammalian collagenase. In *Extracellular matrix biochemistry*, edited by Piez KA. and Reddi AH. Elsevier, New York, 1984;119-157.
3. Murphy G, Reynolds JJ. Extracellular matrix degradation. In *Connective tissue and its heritable disorders*, edited by Rocoye, PM. and Steinmann B. Wiley-Liss, New York, 1993;287-316.
4. Sellers A, Reynolds JJ, Meikle MC. Neutral metalloproteinases of rabbit bone. Separation in latent form of distinct enzymes that when activated degrade collagen, gelatin and proteoglycan. *Biochem J* 1978;171:493.
5. Wucherpfennig AL, Li Y, Stetler-Stevenson WG, et al. Expression of 92kD type IV collagenase/gelatinase B in human osteoclast. *J Bone Min Res* 1994;9:549.
6. MacIntyre I, Zaidi M, Alam ASMT, et al. Osteoclastic inhibition: An action of nitric oxide not mediated by cyclic GMP. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:2936.
7. Kasten TP, Collin-Osdoby P, Patel N, et al. Potentiation of osteoclast bone-resorption activity by inhibition of nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:3569.
8. Brandt ML, Hukkanen M, Umeda T, et al. Bidirectional regulation of osteoclast function by nitric oxide synthase isoforms. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:2954.
9. Evans DM, Ralston SH. Nitric oxide and Bone. *J Bone Min Res* 1996;11:300.
10. Damoulis PD, Hauschka PV. Cytokines induce nitric oxide production in mouse osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;201:924.
11. Greenwald RA, Rifkin BR. Reactive oxygen species as potential mediators of osteoclast action. in *Biology and physiology of the osteoclast*, edited by Rifkin BR. and Gay CV. Academic Press, New York, 1996;315-335.
12. Sakuma I, Stuehr DJ, Gross SS, et al. Identification of arginine as a precursor of endothelium-derived relaxing factor(EDRF). *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:664.
13. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991;43:109.
14. Beug H, von Kirchbach A, Doderlein G, et al. Chicken hematopoietic cells transformed by seven strains of defective avian leukemia viruses display three distinct phenotypes of differentiation. *Cell* 1979;18:375.
15. Adams JS, Beeker TG, Hongo T, Clemens TL. Constitutive expression of vitamin D 1-hydroxylase in a myelomonocytic cell line: A model for studying 1,25-dihydroxy vitamin D production in vitro. *J Bone Min Res* 1990;5:1256.
16. Shany S, Ren SY, Arbelle JE, et al. Subcellular localization and partial purification of the 25-hydroxy vitamin D 1-hydroxylation reaction in the chick myelomonocytic cell line HD-11. *J Bone Min Res* 1993;8:269.
17. Hsia Y, Kim JK, Damoulis P, Hauschka PV. Osteoclastic properties of clonal HD-11 cells are regulated by 1,25(OH)<sub>2</sub>-vitamin D<sub>3</sub>. *J Bone Min Res* 1995;10(Suppl. 1):S424.
18. Blough NV, Zafiriou OC. Reaction of superoxide with nitric oxide to form peroxynitrite in alkaline aqueous solution. *Inorg Chem* 1985;24:3502.
19. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, et al. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: Implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:1620.