

# Endothelin-1이 HOS 세포의 증식과 활성화에 미치는 영향

단국대학교 치과대학 치과약리학교실<sup>1</sup> 및 구강생화학교실<sup>2</sup>

배문서<sup>1</sup> · 고선일<sup>2</sup> · 김정근<sup>2</sup> · 김세원<sup>1</sup>

## 목 차

- I. 서 론
- II. 연구재료 및 연구방법
- III. 연구결과
- IV. 총괄 및 고찰
- V. 결 론
- 참고문헌
- 영문초록

## I. 서 론

골조직대는 골형성과 골흡수에 의해 정교하게 조절되며 이러한 골조직 대사과정에는 조골세포, 파골세포 및 골조직세포 전구세포 등이 관여하고 있다<sup>1)</sup>. 골조직대사에 영향을 미치는 인자는 매우 다양하여 부갑상선 호르몬, 칼시토닌 등 전신적 호르몬에 관한 연구가 지속되어 왔으나, 최근 들어 이러한 전신적 인자 이외에도 autocrine 또는 paracrine 작용에 의하여 필요한 시기에 그 영향을 나타내는 국소적인 인자들도 매우 중요한 역할을 담당하고 있음이 밝혀졌다<sup>2)</sup>. 즉 골조직세포나 인접세포에서 생성되는 성장인자 (growth factors), cytokines, prostaglandins 및 국소적 조절물질들이 이에 해당되며, 이러한 인자들은 조골세포나 파골세포 및 골조직세포 전구세포들의 성장과 분화에 영향을 미침으로써 골조직대사를 조절하고 있다. 한편 골수조직에는 모세혈관이 풍부하게 분포되어 있으며 골수조직은 여러 골조직세포 특히 파골세포와 인접하여 밀접한 연관관계를 갖고 있다<sup>3)</sup>. 따라서 혈관내피세포도 골조직대사를 조절하는 물질로 널리 알려진 prostaglandin E<sub>2</sub> 이외에<sup>4)</sup>, 골조직대

사에 영향을 미치는 여러 인자들을 생성 및 분비함으로써 골조직대사의 조절에 중요한 역할을 할 것으로 추정된다<sup>5-7)</sup>.

Endothelin (ET)은 혈관내피세포에서 생성되는 물질로써 강력한 혈관수축작용을 나타내는 물질로 최초로 보고되었으며<sup>8)</sup>, 지금까지의 연구결과 ET-1, ET-2 및 ET-3 등 일련의 유사한 단백질군으로 이루어져 있음이 보고되어 있다<sup>9,10)</sup>. 이 중 ET-1은 21개의 아미노산으로 구성된 펩타이드로서 혈관내피세포에서 생성되나 혈관평활근 이외에 많은 조직 및 세포들이 ET 수용체를 갖고 있음이 확인된 바 있어 ET가 다양한 생물학적 작용을 갖고 있다고 추측된다<sup>11-15)</sup>. 즉 ET-1은 혈관, 기관지, 창자 및 자궁의 평활근을 수축시킬 뿐만 아니라<sup>8,16-18)</sup>, 심장에서 atrial natriuretic peptide의 생성을 촉진하고<sup>19)</sup> 신장에서 aldosterone과 corticosterone의 분비를 촉진하기도 한다<sup>20)</sup>.

한편 현재까지 알려진 3가지의 ET 중 ET-1만이 혈관내피세포에서 생성, 분비됨으로써 인접 조직이나 세포들에 영향을 미치는 것으로 알려져 있으며, 골조직대사도 ET-1의 조절을 받고 있는 것으로 추측된다. 최근의 연구결과 ET는 조골세포와 파골세포 모두에 영향을 미치는 것으로 보고되어 이러한 가설들을 뒷받침하고 있다<sup>21-23)</sup>. 즉, 조골세포의 특성을 갖고 있는 ROS 17/2 세포와 MC3T3-E1 세포 등이 ET-1 수용체를 발현하고 있으며<sup>24)</sup>, ET-1은 조골세포에 결합한 후 phospholipase C의 생성과 phospholipase D의 파괴를 촉진하고<sup>23,25)</sup> 세포내 calcium의 농도를 증가시키며<sup>23,26)</sup> 부갑상선 호르몬에 의한 cAMP의 생성을 억제시키는 등<sup>26)</sup> 다양한 세포내 반응을 활성화시킨다. 조골세포의 성장과 분화에 대한 효과도 매우 다양하게 보고되어 있으며 ET-1은 MC3T3-E1 세포의

증식을 촉진시킴이 알려져 있고<sup>14)</sup>, 조골세포로부터 osteopontin, osteocalcin 및 type I collagen의 mRNA의 합성을 증가시키고<sup>27)</sup>, 마우스의 두개관에서 분리한 조골세포로부터 교원질 및 비교원성 단백질의 합성을 증가시킬뿐 아니라<sup>21)</sup> interleukin-6의 생성을 증가시키는 등<sup>28)</sup> 조골세포의 기능을 변화시킬 수 있는 것으로 추측된다. 한편 ET-1의 골흡수에 대한 작용도 매우 다양하게 보고되어 있으며 Tatrai 등<sup>21)</sup>은 ET-1이 골조직 장기배양 (organ culture)시 골흡수와 collagen의 합성을 증가시킨다고 보고하였다. 그러나 Alam 등<sup>29)</sup>은 파골세포에 의한 골흡수가 ET-1에 의하여 농도의존적으로 억제된다고 보고하였으며 이러한 억제작용은 acid phosphatase의 유리에는 영향을 미치지 못하나 파골세포의 운동성을 억제함으로써 나타나는 것이라 주장하였다. 또한 이러한 억제작용이 혈관평활근의 작용을 억제하는데 필요한 소량의 농도에서도 나타남을 확인하여 혈관내피세포에서 생성, 유리되는 ET-1이 골수조직 내에서 파골세포의 기능을 조절하는 국소적 조절물질로 작용할 수 있으리라 시사하였다. 따라서 이러한 연구결과들을 종합해 보면 ET가 골조직대사에 다양한 영향을 미치는 것으로 추측되나 정확한 작용세포나 작용기전은 밝혀지지 않고 있는 실정이다.

본 연구는 ET-1이 조골세포의 성장과 활성화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 시행하였으며 사람의 osteosarcoma 세포주인 HOS 세포주를 조골세포의 실험모델로 이용하여 HOS 세포를 배양하면서 ET-1을 처리한 후 세포 수와 MTT reduction의 변화를 측정함으로써 세포 수의 변화의 지표로 삼았고, 염기성 인산 분해효소의 활성도, superoxide의 생성량, nitric oxide의 생성량 및 gelatinase 활성 등의 변화를 측정함으로써 조골세포의 활성도의 변화를 추정하였다.

## II. 연구재료 및 연구방법

### 1. 세포의 배양

조골세포의 실험모델로 사람의 osteosarcoma cell line인 HOS 세포주를 사용하였으며 통상적인 방법에 의해 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco, USA)과 항생제가 첨가된 Dulbecco's Modified Eagle medium (DMEM, Gibco, USA)으로 75 cm<sup>2</sup> 세포배양 플라스크에서 세포를 배양하였다. 배양액은 일주일에 2회 교환하여 주었으며 배양중인 세포가 단층을 이루

면 trypsin-EDTA로 처리하여 세포를 수집한 후 1 : 10으로 계대배양 하였고, 배양 중 37°C 온도와 95%의 습도를 유지하면서 계속하여 5% CO<sub>2</sub>와 95% 공기를 공급하였다. 이상의 방법으로 배양한 세포는 실험목적에 따라 24-well 또는 96-well culture plate에 분주하여 3-4일간 배양한 후 실험에 사용하였다.

### 2. 세포성장도 측정

HOS 세포를 24-well culture plate에 well 당 2×10<sup>4</sup>개의 세포가 들어가도록 분주하여 3일간 배양한 후 endothelin-1을 여러 가지 농도 (1, 5, 10, 50 및 100 nM)로 첨가하여 다시 2일간 배양하였다. 배양이 끝난 후 배양액을 제거하고 trypsin-EDTA 용액 (Gibco, USA)으로 처리하여 부착된 세포를 모아 인산 완충 생리식염수 (pH 7, Gibco, USA)로 1회 세척하였으며 이를 다시 인산 완충 생리식염수로 희석시켰다. 세포 수는 희석된 세포액을 광학현미경 (Nikon, Japan)하에서 hemocytometer (Sigma, USA)를 이용하여 100배의 배율로 측정하였으며, 이 때 trypan blue exclusion 방법으로 생세포 계측을 시행하였다.

### 3. MTT reduction assay

MTT reduction assay를 위해 HOS 세포를 96-well culture plate에 분주하여 배양하면서 각각의 농도로 endothelin-1을 48시간 동안 처리하였다. 배양을 끝내기 3시간 전에 배양액에 MTT (50 µg/well, Sigma, USA) 용액을 첨가하여 주었으며 최종 3시간의 배양기간 동안 세포의 작용에 의하여 생성된 formazan granule의 양을 측정함으로써 세포수의 변화여부를 평가하였다. 배양이 끝난 후 배양액을 제거하고 0.04 N HCl/isopropanol로 30분 동안 formazan granule을 용해시킨 다음 microplate reader (SLT 400 SFC, SLT Lab instruments, Austria)를 이용하여 550 nm에서 비색정량 하였다. 실험결과는 대조군의 흡광도에 대한 실험군의 흡광도의 비율로 표시하였다.

### 4. 염기성 인산 분해효소의 활성측정

조골세포 활성화의 지표로써 endothelin-1 처리 후 HOS 세포의 염기성 인산 분해효소 활성도를 측정하였다. HOS 세포를 24-well culture plate에 분주한 후

각각의 농도로 endothelin-1을 첨가하여 48시간 동안 배양하였으며 배양이 끝난 후 0.3 ml의 0.1% Triton X-100을 첨가하여 세포내의 염기성 인산 분해효소를 추출하였다. 추출액 중 일부를 효소활성 측정에, 일부를 단백질 정량에 각각 사용하였으며, 효소활성 측정은 일정량의 세포추출액을 glycine-NaOH buffer (pH 10.4)에 첨가하여 40 mM의 *p*-nitrophenyl phosphate (pNPP, Sigma, USA)와 37°C에서 30분간 반응시켰다. 반응과정 중 기질인 pNPP로부터 유리되어 나온 *p*-nitrophenol의 양을 흡광광도계 (spectrophotometer, Shimadzu, Japan)를 이용하여 405 nm에서 비색정량 하였다. 단백질 측정은 BCA protein assay reagent (Pierce, Rockford, USA)를 이용한 Lowry 방법<sup>30)</sup>으로 측정하였으며 효소활성은 nmol substrate cleaved/hr/mg protein으로 나타내었다.

#### 5. Nitric oxide 생성 측정

HOS 세포 배양시 생성되는 nitric oxide의 양은 배양액내의 nitric oxide 안정화 최종산물인 nitrite (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) 양을 측정함으로써 평가하였다. HOS 세포를 96-well culture plate에 분주하여 배양한 후 endothelin-1이 첨가된 phenol red-free 배양액으로 교환하여 48시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 후 새로운 96-well plate에 100 µl의 세포배양액을 옮긴 다음 동량의 Griess 용액 (1% sulfanilamide, 0.1% naphthylethylenediamine dihydrochloride, 2.5% phosphoric acid)과 혼합한 후 실온에서 15분간 반응시켰다. 반응 후 microplate reader (SLT 400 SFC, SLT Lab instruments, Austria)를 사용하여 530 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 6. Superoxide 생성 측정

HOS 세포 배양시 생성되는 superoxide의 양을 측정하기 위하여 NBT (nitro blue tetrazolium) reduction assay를 시행하였다. 세포를 96-well culture plate에 분주하여 배양하면서 세포가 단층을 이루기 전에 여러 농도의 endothelin-1을 48시간 동안 처리하였으며 최종 4시간 동안 NBT (10 mg/ml, Sigma, USA) 용액을 배양액 내에 첨가하여 배양하였다. 배양기간 동안 세포에서 생성된 superoxide에 의하여 NBT로부터 생성된 formazan granule을 dissolving solution (10% SDS in 0.01N HCl)으로 녹

인 후 microplate reader (SLT 400 SFC, SLT Lab instruments, Austria)를 이용하여 550 nm에서 비색정량 하였다. Superoxide 생성량의 변화는 대조군의 흡광도에 대한 실험군의 흡광도의 비로 나타내었다.

#### 7. Gelatinase 활성 측정

HOS 세포에서 생성되는 gelatinase의 활성측정을 위하여 세포를 24-well culture plate에 배양하면서 일정한 농도의 endothelin-1이 첨가된 serum-free 배양액으로 교환하여 48시간 동안 처리하였다. 배양이 끝난 후 각각의 배양액을 모아 원심분리하여 부유세포를 제거한 후 filter 형의 concentrator (Centricon<sup>TM</sup>, Amicon)을 이용하여 배양액을 약 5배정도 농축한 다음 gelatinase 활성측정에 사용하였다. 농축된 배양액은 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 배양액내에 존재하는 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 renaturing buffer (0.25% triton X-100)로 30분씩 2회 세척하여 gel내의 SDS를 제거한 다음 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 1회 세척한 후 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.

### III. 연구결과

#### 1. 세포성장도

HOS 세포를 endothelin-1으로 48시간 동안 처리하여 배양한 후 세포수를 측정한 결과 대조군에 비하여 실험군에서 세포수가 증가됨이 관찰되어 endothelin-1이 세포의 성장을 촉진시킴을 알 수 있었다 (Table 1). 소량의 endothelin-1 (1 nM)을 처리하여 배양한

경우 세포수가 약간 감소함을 보여 주었으나 통계적 유의성은 없었으며, 5 nM 이상으로 endothelin-1을 처리한 경우 농도의존적인 세포수의 증가가 관찰되었다. 또한 10, 50 및 100 nM의 endothelin-1을 처리한 경우 세포수가 대조군에 비하여 각각 17%, 22% 및 30% 증가되어 유의성있는 증가가 관찰되었다. 한편 배양기간 중 계속하여 세포를 관찰한 결과 모든 농도의 endothelin-1 처리시 세포독성은 나타나지 않는 것으로 생각되었다.

## 2. MTT reduction assay

HOS 세포를 배양하면서 48시간 동안 endothelin-1

Table 1. Effect of endothelin-1(Endo) on the proliferation of HOS cells (48hr. treatment)

Treatment	Cell number ( $\times 10^{-4}$ )
Control	27.2 $\pm$ 2.52
Endo 1 nM	25.8 $\pm$ 2.27
Endo 5 nM	31.2 $\pm$ 3.45
Endo 10 nM	31.8 $\pm$ 1.89*
Endo 50 nM	33.1 $\pm$ 3.81*
Endo 100 nM	35.4 $\pm$ 2.37**

Values are Mean  $\pm$  S.E. (n=8).

\*P<0.05, \*\* P<0.01, compared to control.

Table 2. Effect of endothelin-1(Endo) on the MTT reduction in the HOS cell culture (48hr. treatment)

Treatment	Absorbance ratio
Control	1.00 $\pm$ 0.02
Endo 1 nM	0.99 $\pm$ 0.01
Endo 5 nM	0.99 $\pm$ 0.02
Endo 10 nM	1.09 $\pm$ 0.02**
Endo 50 nM	1.09 $\pm$ 0.01**
Endo 100 nM	1.11 $\pm$ 0.02**

Data are expressed as a absorbance ratio of cultured control. Values are Mean  $\pm$  S.E.(n=10). \*\*P<0.01, compared to control.

을 처리한 후 MTT reduction assay를 시행한 결과는 Table 2와 같다. 1 및 5 nM의 endothelin-1을 처리하여 배양한 결과 MTT reduction 양은 대조군과 큰 차이를 보이지는 않았으나 고농도의 endothelin-1을 처리한 경우 MTT reduction이 농도의존적으로 증가되는 결과를 나타내었다. 즉, 10, 50 및 100 nM의 endothelin-1으로 처리하여 배양한 경우 각각 9%, 9% 및 11%의 유의한 증가가 관찰되었다. 특히 세포수의 측정과 유사하게 100 nM의 endothelin-1을 처리한 경우 가장 큰 증가효과가 관찰되었다.

## 3. 염기성 인산 분해효소의 활성화도

HOS 세포의 염기성 인산 분해효소의 활성화에 미치는 endothelin-1의 영향을 관찰한 결과 endothelin-1은 농도의존적으로 염기성 인산 분해효소의 활성을 억제하는 것으로 관찰되었다 (Table 3). 세포배양 중 48시간 동안 endothelin-1을 1 및 5 nM 농도로 첨가하여 배양한 경우 염기성 인산 분해효소의 활성이 약간 증가되는 양상을 보였으나 통계적 유의성은 없었으며 10, 50 및 100 nM의 endothelin-1을 첨가하여 배양한 경우 용량의존적으로 효소 활성이 억제되는 양상을 보였다. 특히 50 및 100 nM의 endothelin-1을 첨가하여 배양한 경우 효소활성이 대조군의 65.0 nmol substrate/hr/mg protein에 비하여 56.4 및 48.4 nmol substrate/hr/mg protein으로 유의성있는 억제효과가 관찰되었다.

Table 3. Effect of endothelin-1(Endo) on the alkaline phosphatase activity of HOS cells (48hr. treatment)

Treatment	ALP activity
Control	65.0 $\pm$ 1.64
Endo 1 nM	69.7 $\pm$ 2.11
Endo 5 nM	65.4 $\pm$ 1.76
Endo 10 nM	62.8 $\pm$ 2.16
Endo 50 nM	56.4 $\pm$ 1.22**
Endo 100 nM	48.4 $\pm$ 3.39**

ALP activity is expressed as nmol substrate cleaved/hr/mg protein.

Data are Mean  $\pm$  S.E. (n=6). \*\*P<0.01, compared to control.

Table 4. Effect of endothelin-1(Endo) on the NBT reduction in the HOS cell (48hr. treatment)

Treatment	Absorbance(OD <sub>550</sub> )
Control	0.244 ± 0.004
Endo 1 nM	0.246 ± 0.005
Endo 5 nM	0.246 ± 0.002
Endo 10 nM	0.268 ± 0.005**
Endo 50 nM	0.278 ± 0.004**
Endo 100 nM	0.294 ± 0.005**

Values are Mean ± S.E.(n=10).  
\*\*P<0.01, compared to control.

Table 5. Effect of endothelin-1(Endo) on the nitrite production in the HOS cell (48hr. treatment)

Treatment	Absorbance(OD <sub>530</sub> )
Control	0.020 ± 0.001
Endo 1 nM	0.028 ± 0.001
Endo 5 nM	0.015 ± 0.001
Endo 10 nM	0.013 ± 0.002
Endo 50 nM	0.013 ± 0.001
Endo 100 nM	0.028 ± 0.002

Values are Mean ± S.E.(n=10).

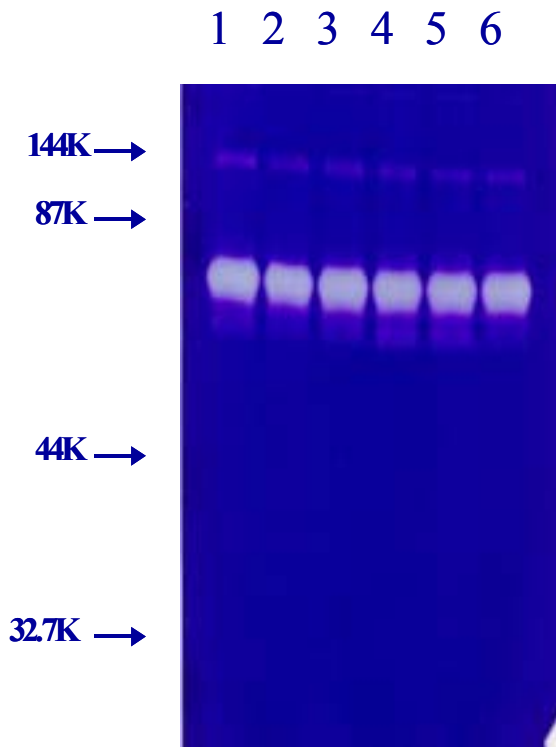


Fig. 1. Effect of endothelin-1 on the gelatinase activity of concentrated conditioned media of HOS cell culture. HOS cells were cultured in the presence or absence of endothelin-1 for 48 hrs. Concentrated conditioned media was resolved in 10% zymogram gel containing 1 mg/ml gelatin. Lane 1, control : lane 2-6, endothelin-1 1, 5, 10, 50 and 100 nM-treated group. Numerals are molecular weight standard.

#### 4. Superoxide 생성 측정

HOS 세포를 배양하면서 endothelin-1이 조골세포로부터 형성되는 superoxide의 양에 미치는 영향을 관찰하였다. Superoxide 생성의 지표로 NBT reduction 방법을 이용하였으며 세포배양시 endothelin-1을 첨가하여 48시간 동안 배양한 경우 사용한 전체 농도에서 농도의존적으로 NBT reduction이 증가됨이 관찰되었다 (Table 4). 특히 endothelin-1은 10, 50 및 100 nM의 농도에서 10%, 14% 및 20%의 유의한 증가를 나타내었으며 100 nM의 농도에서 가장 큰 증가가 관찰되었다. 이를 통하여 endothelin-1은 HOS 세포로부터 superoxide의 생성을 촉진시킴을 알 수 있었다.

#### 5. Nitric oxide 생성 측정

HOS 세포를 배양하면서 endothelin-1이 조골세포로부터 생성되는 nitric oxide의 양에 미치는 영향을 관찰하였으며 nitric oxide의 생성은 배양액내의 nitric oxide의 안정화 최종대사산물인 nitrite의 양을 측정함으로써 관찰하였다. HOS 세포배양시 endothelin-1을 첨가하여 48시간 동안 배양한 경우 배양액내의 nitrite의 양은 첨가된 endothelin-1의 농도에 따라 변화가 있었으나 생성량이 매우 적었으며 전체적으로 보아 의미있는 변화는 관찰할 수 없었다 (Table 5).

#### 6. Gelatinase 활성 측정

HOS 세포를 배양하면서 조골세포에서 생성되어

배양액내로 유리되는 gelatinase의 활성을 zymography 방법으로 측정하였다. 세포배양 중 48시간 동안 세포를 serum-free 배양액으로 처리한 후 각 배양액을 모아 농축한 다음 gelatin을 포함한 zymogram gel에 전기영동하였다. 이를 renaturing buffer 및 developing buffer에 incubation한 후 coomassie blue로 염색한 결과 분자량 약 65,000정도의 gelatinase A로 추정되는 밴드가 관찰되었다 (Fig. 1). 한편 endothelin-1로 처리한 배양액을 모아 동일한 방법으로 효소활성을 측정한 경우에도 동일한 분자량을 갖는 효소의 활성이 관찰되었으며 그 활성은 endothelin-1 처리시 거의 영향을 받지 않았다 (Fig. 1).

#### IV. 총괄 및 고찰

골조직 대사는 다양한 인자에 의해 조절되며 전신적 호르몬, 성장인자, cytokines들에 관한 연구가 진행되어 왔으나 autocrine 또는 paracrine 작용에 의하여 필요한 시기에 영향을 미치는 국소적 인자들도 골조직 대사에 중요한 역할을 담당하고 있으리라 생각된다<sup>2)</sup>. 골수조직에는 모세혈관이 풍부하게 분포되어 있으며 골수조직이 파골세포와 밀접한 연관관계를 갖고 있음을 고려해 보면<sup>3)</sup>, 혈관내피세포도 골조직 대사에 영향을 미치는 여러 인자들을 생성, 분비할 수 있으리라 추측된다. 혈관내피세포에서 생성되는 여러 물질 중 prostaglandin E<sub>2</sub>가 골조직 대사에 영향을 미치는 이미 잘 알려져 있으며<sup>4)</sup>, 최근들어 ET-1도 골조직 대사에 영향을 미칠 가능성이 제시되고 있다<sup>21-23)</sup>.

ET-1은 혈관내피세포에서 생성되는 강력한 혈관수축작용을 갖고 있는 펩타이드로써<sup>8)</sup> 혈관평활근의 수축 이외에도 renin의 유리억제<sup>31)</sup> 및 atrial natriuretic peptide 분비 등의 작용을 나타낸다<sup>19)</sup>. 지금까지의 연구결과 ET는 ET-1, ET-2 및 ET-3 등 일련의 유사한 단백질군으로 이루어져 있으나<sup>9,10)</sup>, 이 중 ET-1만이 혈관내피세포에서 생성되어 분비됨으로써 인접 조직이나 세포들에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 또한 혈관평활근 이외에 많은 조직 및 세포들이 ET 수용체를 갖고 있음이 확인된 바 있으며 이는 ET가 다양한 생물학적 작용을 갖고 있음을 시사한다고 생각된다<sup>11-14)</sup>. 본 연구는 ET-1이 조골세포의 성장과 활성화에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 시행하였으며, 사람의 osteosarcoma 세포주인 HOS 세포주를 조골세포의 실험모델로 이용하여 HOS 세

포를 배양하면서 여러 농도의 ET-1을 처리한 후 세포수, MTT reduction, 염기성 인산 분해효소의 활성도, superoxide의 생성량, nitric oxide의 생성량 및 gelatinase 활성 변화등을 측정하였다.

ET-1이 세포증식에 미치는 영향을 알아보기 위하여 세포수의 측정과 MTT reduction assay를 시행하였으며 ET-1을 48시간 처리한 후 세포수를 측정한 결과 세포수가 증가됨이 관찰되었다 (Table 1). 소량의 ET-1을 첨가하여 배양한 경우 세포수가 약간 감소하는 경향을 나타내었으나 통계적 유의성은 없었고 5 nM 농도 이상에서 세포수의 증가효과가 나타났으며 10, 50 및 100 nM 농도에서 유의한 증가효과가 관찰되었다. MTT reduction assay 결과에서도 ET는 저농도에서 MTT reduction을 감소시켰으나 유의성은 없었고, 10, 50 및 100 nM 농도에서 유의한 MTT reduction 증가가 관찰되었다 (Table 2). 이러한 연구결과는 ET-1이 melanocyte, fibroblast 및 MC3T3-E1세포의 증식을 촉진시켰다는 보고와 일치하는 것으로<sup>14,15,32)</sup> ET-1이 조골세포의 증식을 촉진할 수 있음을 시사하는 결과라 생각된다. 한편 ET-1은 쥐의 osteosarcoma cell line인 ROS17/2.8 세포의 성장도 촉진시키는 것으로 관찰되었으나 가장 큰 효과를 나타내는 ET-1의 농도에서는 차이가 있었으며, 이는 조골세포의 분화정도에 따라 ET-1의 효과가 약간 다른 것으로 추정된다.

염기성 인산 분해효소는 조골세포의 표지효소로 널리 이용되며 자세한 기전은 아직 알려져 있지 않지만 골조직 형성의 여러 단계에 관여할 것으로 추측된다<sup>33,34)</sup>. 본 연구에서 조골세포 활성화의 지표로 염기성 인산 분해효소의 활성도를 측정한 결과 ET-1은 HOS 세포의 염기성 인산 분해효소 활성을 억제하는 것으로 나타났다 (Table 3). 즉 세포배양시 ET-1을 첨가하여 48시간 동안 배양한 후 세포내의 염기성 인산 분해효소를 추출하여 활성을 측정한 결과 소량의 ET-1 첨가 시 효소활성이 약간 증가되었으나 유의성은 없었으며, 고농도의 ET-1을 첨가한 경우 첨가된 ET-1의 농도에 비례하여 효소의 활성이 억제되었으며 50 및 100 nM 농도에서 유의한 억제효과가 관찰되었다. ROS 세포 배양의 경우도 유사한 결과가 관찰되었으나 ROS 세포는 HOS 세포에 비하여 높은 효소 활성도를 갖고 있음이 차이점으로 관찰되었다. 이러한 결과는 ET-1이 또다른 조골세포주인 MC3T3-E1 세포의 염기성 인산 분해효소의 활성을 억제하였다는 Takuwa 등<sup>15)</sup>의 보고와 일치하는 것으

로 ET-1은 세포의 증식은 촉진시키지만 조골세포의 활성화는 억제함을 시사하는 결과라 생각된다.

또다른 조골세포 활성화의 지표로 superoxide와 nitric oxide의 생성에 미치는 ET-1의 영향을 측정하였다. 최근의 연구들에 의하면 골조직 세포에서 생성되는 reactive oxygen species들도 골흡수에 관여함이 알려져 있으며, 특히 파골세포의 형성이나 파골세포의 활성화에 관여할 것으로 추측된다<sup>35-37</sup>. Superoxide는 NADPH oxidase에 의해 형성되며<sup>38</sup> 세포를 phorbol myristate acetate (PMA) 등으로 자극하는 경우 superoxide의 생성이 증가된다. 또한 생성된 superoxide는 NBT dye를 불용성의 formazan granule로 변환시키며, 이러한 방법을 이용해 superoxide의 생성을 쉽게 확인할 수 있다. HOS 세포를 배양하면서 NBT reduction assay를 시행한 경우 대조군에서도 NBT reduction이 관찰되어 HOS 세포도 자발적으로 superoxide를 생성함을 알 수 있었다. 또한 HOS 세포에서 생성되는 superoxide의 양은 세포를 ET-1으로 처리한 경우 증가하는 양상을 보여 주었으며 특히 10, 50 및 100 nM 농도로 처리한 경우 유의한 증가양상이 관찰되었다 (Table 4). HOS 세포에서 생성되는 superoxide가 파골세포를 활성화시키거나 골흡수에 직접 관여하는지는 본 연구를 통하여 확인하기는 어려웠지만 ET-1이 superoxide 생성을 변화시킴으로써 골조직 대사에 영향을 미칠 가능성을 제시한 결과라 사료된다. 한편 reactive oxygen species이외에 nitric oxide (NO)도 시험관내 실험에서 파골세포의 활성을 억제함이 알려져 있어 골조직 대사를 조절하는 중요한 인자로 생각된다<sup>39</sup>. 본 연구에서 HOS 세포배양시 ET-1을 처리하여 48시간 동안 배양한 다음 NO의 생성량을 알아보기 위하여 세포배양액 내의 NO의 안정화 최종산물인 nitrite의 양을 측정하였다. HOS 세포배양시 대조군의 경우에도 nitric oxide의 생성을 확인할 수 있었으나 그 양은 매우 적었으며 ET-1 처리시 농도에 따른 변화를 관찰할 수 있었지만 그 생성량이 매우 미약하여 의미있는 변화는 나타나지 않았다 (Table 5). 최근에 조골세포가 NO를 생성하며<sup>40</sup>, 여러 cytokine 처리에 의하여 조골세포에서 생성되는 NO의 양이 조절을 받는다는 사실이 알려져 있어<sup>41</sup> 조골세포가 NO 생성량의 조절을 통하여 파골세포의 활성화나 골조직대사를 조절할 가능성이 시사되고 있다. 그러나 조골세포는 inducible 형태의 nitric oxide synthase를 갖고 있어 cytokine 처리없이 자발적으로 생성되는 NO의 양이

매우 적으며 본 연구에서도 의미있는 변화는 관찰되지 않았다. 이러한 연구결과는 ET-1이 superoxide의 생성은 증가시키나 nitric oxide의 생성에는 큰 영향을 미치지 못함을 시사하는 결과라 사료된다.

골흡수 과정에 관하여는 많은 논란이 있으나 무기질의 흡수는 파골세포에 의해 생성되는 산에 의하여, 유기질의 분해는 조골세포나 파골세포에서 생성되는 여러 종류의 단백분해효소에 의하여 이루어진다고 추측된다<sup>42,43</sup>. 골조직 분해에 관여하는 효소중 간질성 교원질 분해효소와 cathepsin등의 역할이 잘 알려져 있으나<sup>44</sup> 최근들어 gelatinase (type IV collagenase)도 골흡수에 관여할 가능성이 제기되고 있다. 본 연구에서 HOS 세포를 serum-free 배양액으로 48시간 배양한 후 이를 5배 정도 농축하여 zymography를 시행한 결과 분자량이 약 65,000 정도 되는 gelatinase 활성이 측정되었으나, 이러한 gelatinase의 활성화는 ET-1으로 처리한 경우 효소활성이 큰 차이를 나타내지 못하였다 (Fig. 1). Gelatinase는 분자량에 따라 gelatinase A 및 gelatinase B등 2가지로 구분되며 골조직에서는 조골세포가 주로 gelatinase A를 생성하는 반면 파골세포는 gelatinase A 및 B를 모두 합성, 분비할 수 있음이 보고되어 골조직대사에 gelatinase가 중요한 역할을 담당하고 있을 가능성이 시사된 바 있다<sup>45</sup>. 이러한 연구결과와 본 연구에서 관찰된 gelatinase의 분자량을 고려해 보면 HOS 세포도 gelatinase A로 추정되는 효소를 생성, 분비하는 것으로 추정되나 효소활성은 ET-1 처리에 의해 영향을 받지 않았다. ROS17/2.8 세포도 gelatinase A로 추정되는 효소를 분비하나 효소활성이 ET-1에 의해 증가됨이 관찰된 바 있으며, 이는 조골세포의 분화 정도에 따라 ET-1의 작용이 차이가 있음을 시사하는 결과라 사료된다.

이상의 연구를 종합해 보면 ET-1은 HOS 세포의 증식을 촉진시켰으나 세포의 활성화에는 다양한 영향을 미치는 것으로 나타났다. 즉, 염기성 인산 분해효소의 활성화는 억제시킨 반면 superoxide의 생성은 증가시켰으며 nitric oxide의 생성과 gelatinase 활성화에는 영향을 미치지 못하였다. 이러한 연구는 ET-1이 조골세포의 활성화지표에 대해 서로 다른 효과를 나타냄을 시사하고, 같은 조골세포주라 하더라도 세포의 분화 정도에 따라 효과가 약간의 차이를 보인다고 추정되며 ET-1의 정확한 작용기전을 확인하기 위하여 계속적인 연구가 필요하리라 사료된다.

## V. 결 론

Endothelin-1(ET-1)은 21개의 아미노산으로 구성된 펩타이드로써 혈관내피세포에서 생성되며 강력한 혈관수축작용을 나타는 물질로 알려져 있다. 지금까지의 연구결과 ET는 ET-1, ET-2 및 ET-3 등 일련의 유사한 단백질군으로 이루어져 있으나, 이 중 ET-1만이 혈관내피세포에서 생성, 분비됨으로써 인접 조직이나 세포들에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 사람의 osteosarcoma 세포주인 HOS 세포주를 조골세포의 실험모델로 이용하여 HOS 세포배양를 배양하면서 여러 농도의 ET-1을 처리한 후 세포수, MTT reduction, 염기성 인산 분해효소의 활성도, superoxide의 생성량, nitric oxide 생성량 및 gelatinase 활성 등의 변화를 측정함으로써 ET-1이 조골세포의 성장과 활성에 미치는 영향을 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. HOS 세포를 배양하면서 여러 농도의 ET-1을 처리한 후 세포수의 변화를 측정한 결과 ET-1은 10, 50 및 100 nM의 농도에서 유의한 세포증식 촉진효과를 나타내었다.
2. MTT reduction assay 결과 ET-1은 10, 50 및 100 nM 농도에서 HOS 세포에 의한 MTT reduction을 유의하게 증가시켰다.
3. HOS 세포배양시 ET-1을 첨가하여 세포를 배양한 후 세포내의 염기성 인산 분해효소를 추출하여 활성을 측정한 결과 ET-1의 농도가 증가함에 따라 효소의 활성이 억제되는 경향을 나타내었으며 50 및 100 nM 농도에서 유의한 억제효과가 관찰되었다.
4. HOS 세포를 배양하면서 ET-1을 처리한 경우 첨가된 ET-1의 농도가 증가함에 따라 NBT reduction이 증가되어 ET-1은 조골세포에서 생성되는 superoxide의 생성량을 증가시켰다.
5. ET-1은 조골세포로부터 생성되는 nitric oxide의 양을 변화시킬 수 있었으나 실험에 사용된 모든 농도에서 의미있는 변화는 관찰되지 않았다.
6. Gelatinase 활성측정 결과 HOS 세포는 gelatinase A로 추정되는 효소를 유리하는 것으로 나타났으며 ET-1은 조골세포로부터 생성, 유리되는 gelatinase의 활성에 영향을 미치지 못하였다.

이러한 실험결과는 ET-1이 조골세포의 증식과 활

성에 다양한 영향을 미치는 것을 시사하는 것으로 조골세포가 혈관내피세포나 다른 인접세포에서 생성되는 여러 조절물질들에 의하여 그 기능이 조절될 수 있음을 시사하는 결과라 사료된다.

## 참 고 문 헌

1. Nijweide, P.J., Burger, E.H. and Feyen, J.H.M. : Cells of bone : Proliferation, differentiation and hormonal regulation. *Physiol. Rev.* 66: 855, 1986.
2. Canalis, E., McCarthy, T. and Centrella, M. : The regulation of bone formation by local growth factors. In *Bone and Mineral Research*, Vol. 6, edited by Peck, W.A., pp.27-56, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, 1989.
3. Lewinson, D. and Silbermann, M. : Chondroblasts and endothelial cells collaborate in the process of cartilage resorption. *Anat. Rec.* 233 : 504, 1992.
4. Chambers, T.J., McSheehy, P.M.J., Thomson, B.M. and Fuller, K. : The effect of calcium-regulating hormones and prostaglandins on bone resorption by osteoclasts disaggregated from neonatal rat bones. *Endocrinology* 116 : 234, 1985.
5. Norioka, K., Hara, M., Harigai, M. et al. : Protection of B cell stimulatory factor-2/interleukin-6 activity by human endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153 : 1045, 1988.
6. May, L.T., Gabriella, T., Cozzolino, F. et al. : Interleukin-6 gene expression in human endothelial cells : RNA start sites, multiple IL-6 proteins and inhibition of proliferation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 159 : 991, 1989.
7. Zaidi, M., Alam, A.S.M.T., Bax, B.E. et al. : Role of the endothelial cell in osteoclast control. : *New perspectives.* *Bone* 14 : 97, 1993.
8. Yanagisawa, M., Kurihara, H., Kimura, S., Tomobe, Y., Kobayashi, M., Mitsui, Y., Yazaki, Y., Goto, K. and Masaki, T. : A novel vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 332 : 411, 1988.
9. Inoue, A., Yanagisawa, M., Kimura, S. et al. : The human endothelin family : three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 : 2863, 1989.
10. Kohan, D. : Endothelins in the kidney : Physiology and pathophysiology. *Kidney Int.* 22 : 493, 1993.
11. Kohzuki, M., Johnson, C.I., Chai, S.Y., Casley, D.J. and Mendelsohn, F.A.O. : Localization of endothelin



- receptors in rat kidney. *Eur. J. Pharmacol.* 160 : 193, 1989.
12. Koseki, C., Imai, M., Hirata, Y., Yanagisawa, M. and Masaki, T. : Autoradiographic distribution of binding sites for endothelin in rat tissues : a neuro-peptides? *Am. J. Physiol.* 256 : R858, 1989.
  13. Power, R.F., Wharton, J., Salas, S.P. et al. : Autoradiographic localisation of endothelin binding sites in human and porcine coronary arteries. *Eur. J. Pharmacol.* 160 : 199, 1989.
  14. Takuwa, N., Takuwa, Y., Yanagisawa, M., Yamashita, K. and Masaki, T. : A novel vasoactive peptide endothelin stimulates mitogenesis through inositol lipid turnover in Swiss 3T3 fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 264 : 7856, 1989a.
  15. Takuwa, Y., Ohue, Y., Takuwa, N. and Yamashita, K. : Endothelin-1 activates phospholipase C and mobilizes  $Ca^{++}$  from extra- and intracellular pools in osteoblastic cells. *Am. J. Physiol.* 257 : E797, 1989b.
  16. de Nucci, G., Thomas, R., D'orleans-Juste, P. et al. : Pressor effects of circulating endothelin are limited by its removal in the pulmonary circulation and by the release of prostacycline and endothelium-derived relaxing factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 : 9797, 1988.
  17. Uchida, Y., Nimomiya, H., Saotome, M. et al. : Endothelin, a novel vasoconstrictor peptide, as potent bronchoconstrictor. *Eur. J. Pharmacol.* 154 : 227, 1988.
  18. Eglen, R.M., Michel, A.D., Sharif, N.A. and Whiting, R.L. : The pharmacological properties of the peptide, endothelin. *Br. J. Pharmacol.* 97 : 1297, 1989.
  19. Fukuda, Y., Hirata, Y., Yoshimi, H. et al. : Endothelin is a potent secretagogue for arterial natriuretic peptide in cultured rat arterial myocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 155 : 167, 1988.
  20. Cozza, E.N., Gomes-Sanches, C.E., Foecking, M.F. and Chiou, S. : Endothelin binding to cultured calf adrenal zona glomerulosa cells and stimulation of aldosterone secretion. *J. Clin. Invest.* 84 : 1032, 1989.
  21. Tatrai, A., Foster, S., Lakatos, P., Shankar, G. and Stern P.H. : Endothelin-1 actions on resorption, collagen and noncollagen protein synthesis, and phosphoinositol turnover in bone organ cultures. *Endocrinology* 131 : 603, 1992.
  22. Towhidul, K., Alam A.S.M., Gallagher, A. et al. : Endothelin inhibits osteoclastic bone resorption by a direct effect on cell motility : implications for the vascular control of bone resorption. *Endocrinology* 130 : 3617, 1992.
  23. Stern, P.H., Tatrai, A., Semler, D. et al. : Endothelin receptors, second messengers, and actions in bone. *J. Nutr.* 125(Supp.) : 2028S, 1995.
  24. Sakurai, T., Yanagisawa, M., Takuwa, Y. et al. : Cloning of a cDNA encoding a nonisopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. *Nature* 348 : 732, 1990.
  25. Suzuki, A., Oiso, Y. and Kozawa, O. : Effect of endothelin-1 on phospholipase D activity in osteoblast-like cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 105 : 193, 1994.
  26. Lee, S.K. and Stern, P.S. : Endothelin B receptor activation enhances parathyroid hormone-induced calcium signals in UMR-106 cells. *J. Bone Min. Res.* 10 : 1343, 1995.
  27. Shiode, M. and Noda, M. : Endothelin modulates osteopontin and osteocalcin messenger ribonucleic acid expression in rat osteoblastic osteosarcoma cell line. *J. Cell. Endocrinol.* 105 : 176, 1993.
  28. Perkins, S.L., Sarraj, E., Kling, S.J. and Kohan, D. : Endothelin stimulates osteoblastic production of IL-6 but not macrophage colony-stimulating factor. *Am. J. Physiol.* 272 : E461, 1997.
  29. Alam A.S.M.T., Gallagher, A., Shanker, V. et al. : Endothelin inhibits osteoclastic bone resorption by a direct effect on cell motility L Implications for the vascular control of bone resorption. *Endocrinology* 130 : 3617, 1992.
  30. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. : Protein measurement with folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 : 265, 1951.
  31. Rakugi, H., Nakamura, M., Saito, H., Higaki, J. and Ogihara, T. : Endothelin inhibits renin release from isolated rat glomeruli. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 155 : 1244, 1988.
  32. Yada Y., Higuchi, K. and Imokawa, G. : Effects of endothelin on signal transduction and proliferation in human melanocytes. *J. Biol. Chem.* 266 : 18352, 1991.
  33. Siffert, R.S. : The role of alkaline phosphatase in osteogenesis. *J. Exp. Med.* 93 : 415, 1951.
  34. Farley, J.R. and Baylink, D. : Skeletal alkaline phosphatase activity as a bone formation index in vitro. *Metabolism* 35 : 563, 1986.
  35. Garrett, R.I., Boyce, B.F., Oreffo, R.O.C. et al. : Oxygen-derived free radicals stimulate osteoclastic bone resorption in rodent bone in vitro and in vivo. *J. Clin. Invest.* 85 : 632, 1990.
  36. Bax, B.E., Alam, A.S.M.T., Banerji, B. et al. : Stimulation of osteoclastic bone resorption by

- hydrogen peroxide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 183 : 1153, 1992.
37. Suda, N., Morita, I., Kuroda, T. and Murota, S. : Participation of oxidative stress in the process of osteoclast differentiation. *Biochim. Biophys. Acta* 1157 : 318, 1993.
38. Babior, B.M. : The respiratory burst oxidase. *Adv. Enzymol.* 65 : 45, 1992.
39. MacIntyre, I., Zaidi, M., Alam, A.S.M.T. et al. : Osteoclastic inhibition : An action of nitric oxide not mediated by cyclic GMP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 : 2936, 1991.
40. Ralston, S.H., Todd, D., Helfrich, M.H., Benjamin, N. and Grabowski, P.S. : Human osteoblast-like cells produce nitric oxide and express inducible nitric oxide synthase. *Endocrinology* 135 : 330, 1994.
41. Damoulis, P.D. and Hauschka, P.V. : Cytokines induce nitric oxide production in mouse osteoblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 201 : 924, 1994.
42. Wooley, D.E. : Mammalian collagenase. In *Extracellular matrix biochemistry*. edited by piez, K.A. and Reddi, A.H. pp.119-157, Elsevier, New York, 1984.
43. Maciewicz, R.A. and Etherington, D.L. : A comparison of four cathepsins(B, L, N, and S) with collagenolytic activity from rabbit spleen. *Biochem. J.* 256 : 433, 1988.
44. Woessner, J.F. : Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J.* 5 : 2145, 1991.
45. Wucherpfennig, A.L., Li, Y., Stetler-Stevenson, W.G., Rosenberg, A.E. and Stashenko, P. : Expression of 92KDa type IV collagenase/gelatinase B in human osteoclast. *J. Bone Min. Res.* 9 : 549, 1994.

---

Corresponding Author : Se-Won Kim, *Associate Professor, Department of Dental Pharmacology, School of Dentistry, Dankook University, San 7-1, Shinbudong, Cheonanm Choongnam 330-716 Korea*

- ABSTRACT -

### Effect of Endothelin-1 on the Proliferation and Activity of HOS Cells

Moon-Seo Bae<sup>1</sup>, D.D.S., Seon-Yle Ko<sup>2</sup>, D.D.S.,Ph.D., Jung-Keun Kim<sup>2</sup>, D.D.S.,Ph.D.,  
Se-Won Kim<sup>1</sup>, D.D.S.,Ph.D.

*Department of Dental Pharmacology<sup>1</sup> and Oral Biochemistry<sup>2</sup>, School of Dentistry, Dankook University*

Endothelin-1 (ET-1) is a recently discovered potent vasoconstrictive peptide. It was first identified in vascular endothelial cells. ET-1 is a 21-amino acid peptide and elicits systemic effects such as stimulation of the production of atrial natriuretic peptide and release of aldosterone and corticosterone. In this study, to examine the role of ET-1 in the bone metabolism, effect of ET-1 on the proliferation and activity of osteoblastic cells was studied using HOS cells as osteoblast model. ET-1 dose-dependently increased the cell proliferation as determined by cell counting and MTT reduction assay after 48hr treatment. Alkaline phosphatase activity was inhibited by ET-1 and showed significant inhibition by 50 and 100 nM ET-1. ET-1 increased NBT reduction by HOS cells dose-dependently showing that ET-1 may increase the superoxide production by osteoblasts. Nitrite concentration in the media of HOS cell culture without cytokine stimulation was negligible and unaffected by ET-1 after 48hr treatment. Finally, after collection and concentration of conditioned media, gelatinase activity produced by HOS cells was determined by zymography. HOS cells can produce and secrete the gelatinase (gelatinase A type as determined by molecular weight of about 65,000) into culture media, however, ET-1 had no effect on the gelatinase activity. These findings suggest that ET-1 may have diverse effects on the proliferation and differentiation of osteoblasts, therefore, it may play an important role in bone metabolism.

---

Key words : Endothelin-1, HOS cells, Osteoblasts