

치주조직 유관세포에서의 Nitric Oxide 및 Nitric Oxide Synthetase의 생물학적 특성에 관한 연구

윤형진 · 윤동환 · 유형근 · 신형식

원광대학교 치과대학 치주과학교실

I. 서론

치주질환 같은 감염성 질환에서는 세균 및 그 대사산물이 숙주조직에 침범하여 다양한 염증 및 면역병리반응을 일으킨다. 치아표면과 치은열구내에 존재하는 세균과 숙주간의 상호작용에 의해 치은열구가 치주낭으로 전환되는 것이 치주질환의 특징적인 조직변화로서 치주낭 조직내에서 치태세균에 대한 조직파괴 기전과 파괴된 조직을 회복시키려는 기전이 동반되어 매우 복잡한 조직반응이 발생되고 있음이 밝혀졌다¹⁻³⁾.

고등동물의 탐식세포는 외부로부터 침입하는 이물질을 내부로 흡입하여 탐식한 후 분해하여 제거함으로써 자연 면역 반응에 중요한 기능을 수행한다. 이물질을 탐식할 때 산소 및 질소를 이용하는 대사가 촉진되어 산소의 소모가 급격히 증가하게 되고 이 과정에서 발생하는 과산화수소(H₂O₂)나 superoxide anion(O₂⁻), hydroxyl radical (OH), singlet oxygen(¹O₂)과 같은 여러 가지 반응 산소 중간 대사물(reactive oxygen intermediates; ROI)이나 nitric oxide(NO)같은 반응 질소 중간 대사물이 탐식세포내의 살균 작용 및 세포 독성 작용에 중요한 역할을 하는 것으로

최근 보고 되고 있다⁴⁻⁶⁾.

최근에는 반응 질소 중간 대사물중의 하나인 Nitric oxide(NO)가 작고 불안정하며 전하가 없는 free radical로서 신체 여러종류의 세포에서 분비되어 대부분의 조직세포에 영향을 미쳐 순환계에서는 혈관이완물질로⁷⁾, 중추신경계에서는 신경전달물질로⁸⁾, 면역계에서는 방어물질⁹⁾로 알려졌다. 소량의 NO가 표적세포의 guanyl cyclase를 활성화시켜 세포내 c-GMP를 높여 혈관의 이완등 효과를 나타낸다는 것이 순환계와 중추신경계에서 NO의 생리적 작용메커니즘으로 거론되고 있다¹⁰⁾. 면역계에서는, 면역전달물질인 cytokine의 영향으로 면역 세포로부터 많은 양의 NO가 생성되어 면역 염증반응 부위에 유리됨으로써 Fe-S를 함유하는 효소의 작용을 억제시키거나 DNA에 손상을 미쳐 항미생물작용 혹은 항암작용을 나타낸다고 알려졌다¹¹⁻¹²⁾.

NO가 최근 국소적인 골개조 형성에 관여한다고 연구되었는데¹³⁻¹⁴⁾, 파골세포 활성을 강력하게 억제할수 있다고 1991년 Hakkanen¹⁵⁾ 등, 1993년 Kasten¹⁶⁾이 보고하여 골대사와의 상관성이 입증되었다. 또한 NO는 골모세포¹⁷⁾와 관절연골들¹⁸⁾에서도 생산되고, 특히 Damoulis 와 Hauschka는¹⁷⁾ NO가 단독으로

autocrine기능을 하거나 골모세포를 통해 paracrine기능으로서 파골세포를 유도시킬 수 있다고 보고하여 다기능 신호전달인자 및 국소적 조절자로서 NO가 관심의 대상이 되고 있다¹⁹⁻²¹⁾.

Nitric oxide synthetase(NOS)는 L-arginine 으로부터 NO의 합성에 관여하는 효소로서 크게 두 종류로 대별되는데²²⁾, 한종류는 칼슘과 calmodulin에 의존적이며 혈관 내피세포 혹은 신경세포 등에 발현되는 것으로 NOS₁과 NOS₃이 해당된다. 또 다른 한 종류의 NO synthetase는 칼슘이나 calmodulin 등에 비의존적이며, 염증반응에 발현이 유도될 수 있는 효소로서 NOS₂가 속한다. 즉 신체의 대식세포 혹은 호중구들이 적절한 사이토카인으로 자극되면 자극된 세포들은 NOS₂를 많이 발현시켜 많은 양의 NO를 생산하게 된다²³⁾.

Cytokine은 활성화된 임프구 및 대식세포 등의 여러세포에서 분비되는 non-immunoglobulin substrate로서 세포성 면역반응 및 염증반응 등에 관여하여 다른 세포의 기능을 조절하는데, 특히 치주질환에 영향을 미치는 cytokine으로 Interleukin-1과 Interleukin-6, tumor necrosis factor(TNF)등이 알려져 있다²⁴⁻²⁵⁾. 그중 IL-1과 TNF- α 는 파골세포를 활성화시켜 골흡수를 일으키고 신생골의 생성을 억제하고, IL-1은 collagenase 합성을 유도한다고 보고되고 있다²⁵⁾. 또한 lipopolysaccharide(LPS)가 면역세포나 염증세포를 자극하여 만들어진 cytokine은 LPS가 섬유모세포를 자극할 때 IL-1을 생성할 수 있는 기폭제 역할을 하기때문에, cytokine은 치주조직에서 염증세포와 면역세포를 활성화시켜 치주골 파괴를 일으킬 수 있다²⁵⁻²⁹⁾.

골대사는 골흡수와 형성효과가 있는 호르몬과 cytokine에 의해 밀접하게 조절되어 정상적인 과정에서는 골형성이 흡수와 coupling 되어 있으나, 폐경기 골다공증, Paget 질환 및 치주질환을 비롯한 대사성 및 염증성 골질환

에서는 이런 과정이 uncoupled되어 있어 골상실을 가져온다. interleukin-1이나 TNF- α 같은 proinflammatory cytokine은 골흡수에 강력한 국소적 자극 signal로서 작용하는데³⁰⁻³¹⁾, 치주인대에는 섬유모세포, 조골세포, 파골세포, 조백악세포 및 그 전구세포들이 다양한 분화정도로 혼합되어 있고 치주질환에서의 NO가 다른 염증성 골질환처럼 중요한 역할을 할 것으로 사료되지만 치주인대 세포를 중심으로 이들의 역할에 대한 연구는 미미하고, 특히 면역조직화학적 및 단백질 수준에서의 연구는 거의 이루어진 바 없었다.

이에 본 연구의 목적은 치주질환의 활성기 동안 정상적인 숙주방어기전을 이해하기 위해 in vivo에서 임상적으로 건강치은 조직과 염증성 치은조직을 외과적으로 절제하여 NOS₁, NOS₂, NOS₃ 단백질의 면역조직학적 발현분포와 정도에 관해 알아보고, in vitro에서 치주인대세포 및 골모유사세포에 cytokine을 처리했을 때 NOS의 상대적인 발현효과를 비교하고자 하였다. 또한 치주인대 세포에 nitric oxide의 자극원과 억제제를 처리시 제1형 교원질 및 osteonectin의 translation level에서 up-regulation하는지 down-regulation하는지 밝히고자 하며 nitrate 생성 및 세포활성에 미치는 영향을 단백질 수준에서의 결과와 비교분석하고자 하였다.

II. 연구방법

1. 치은 조직 실험

(1) 치은 조직 채취

원광대학교 치과병원 치주과에 내원한 환자를 대상으로 건강치은군과 염증성 치은군으로 분류하였으며 건강조직은 다음의 임상적 기준을 만족하는 10명의 검체 부위에서 임상치관 확장술을 통해 치은을 절제 하였다.

1. 감지 할 수 있는 있는 세균성 치태축적

이 없는 경우.

2. 3mm 이하의 치주낭 탐침깊이.
3. 탐침시 출혈 또는 화농의 소견이 보이지 않는 경우.

또한 30명의 성인형 치주염 환자의 생검 조직은 임상적으로 심한 염증의 소견을 보였고, 방사선 사진상 명백한 골소실의 증거와 4mm 이상의 부착 소실을 보이는 부위의 조직을 modified Widman flap operation 도중에 절제하였으며 최근 6개월 이내에 치주치료를 받은 경험이 없는 환자를 대상으로 하였다. 염증성 치은근의 연령은 39세에서 62세(평균 48.5세)로 남성이 20명, 여성이 10명이었으며 건강한 치은근의 연령은 21세에서 33세(평균 25.8세)로 남성이 7명, 여성이 3명이었다.

(2) 면역조직화학적 염색

염증성 및 건강성 치은은 치간유두와 치주낭 직하부를 포함하여 최소 0.2×0.2cm 이상의 크기로 치근면에 수직으로 절제한 다음, 절제된 치은조직을 10% paraformaldehyde를 함유하고 있는 phosphate buffered saline (PBS)의 고정액에 담구어 24시간 실온에서 유지하였다. 이러한 고정단계를 거쳐 치은조직을 포함하고있는 표본들은 ethanol과 xylene의 graded solution에서 탈수시키고 통법에 따라 paraffin wax에 포매시켰다. Paraffin wax에 포매된 조직은 4-5 μ m 두께의 절편으로 잘라져서 Probe on plus slide 위에 놓고 사용할 때까지 4°C에서 보관하였다.

NOS₁(Santa Cruz, Polyclonal, USA), NOS₂(Santa Cruz, polyclonal, USA), NOS₃(Santa Cruz, Polyclonal, USA)은 각각 1/50로 희석하여 사용하였고 면역조직화학검사를 위하여 LSAB(labelled streptavidine biotin, Dako Co, Denmark) kit를 이용하였다.

이차항체로는 anti-mouse IgG를 사용하였고, 발색을 위하여 AEC(Aminoethyl

Carbazole, Zymed Co, USA)를 이용하였다. 박절하여 ProbeOn Plus슬라이드(Fisher Scientific, USA)에 부착시킨 후 충분히 건조시켜 사용하였는데 염색은 ProbeOn Plus 슬라이드를 맞대어서 생기는 capillary gap action의 원리를 이용한 Microprobe System(Fisher Scientific, USA)을 이용하여 실시하였다 4-5 μ m의 파라핀 절편을 탈파라핀화 및 수화시킨 후 일차항체를 적정 비율로 희석해 30분간 방치하고 이차항체를 10분간 부란시켰다. 그리고 streptavidine alkaline phosphatase로 10분간 처리하고 발색시킨 후, Meyer's hematoxylin으로 대조 염색하고 검경하였다.

(3) 조직학적 관찰 및 계측

염색된 조직표본에서 각각의 항체에 대한 양성반응을 상대적인 발현정도에 따라 세포들의 60%이상, 30-60%, 5-30%, 그리고 5%미만이 양성으로 염색되었을 때 각각 심도(+++), 중등도(++), 경도(+), 경미(\pm), 음성(-)으로 구분 하였으며, 양성판정 대상은 상피에서 기저층, 상기저층, 유극층, 천층의 4층으로 분류하였고, 혈관 내피층과 결합조직의 단핵세포를 대상으로 하였다.

2. 치주조직 유관세포 실험

(1) 골세포 및 치주인대세포의 배양

본 연구에 사용한 세포들은 한국 세포주 은행(서울대학교 암연구소)에서 분양받은 골모세포 유사 세포주인 HOS(TE 85,clone F-5, human)를 이용하였다.

또한 치주인대세포의 배양을 위해 본 연구에서의 결합조직은 교정 목적으로 발치를 시행한 소구치나 제3대구치의 건강한 치주인대를 절제하여 얻었다. 발치에 앞서 치은의 건강 상태는 임상 및 방사선적으로 평가되었는데, 임상적으로 치태지수, 치은지수 및 부착상실을 평가하여 치태 및 치은 지수가 1 이하이

고 부착상실이 3mm이하인 경우를 선택하였다. 한편 방사선 사진상으로 치조골의 소실이나 치근단병소가 없는 치아이며 치아우식 또한 없는 경우를 선택하였다. 발치한 치아로부터 절제한 치은조직과 치근의 중간 1/3부위에서 절제한 치주인대 조직을 40% 우태아혈청(fetal bovine serum, Gibco, USA)과 20% 항생제(penicillin G, streptomycin, amphotericin B 포함, Gibco, USA)를 가한 D-MEM(Minimal Essential Medium, Gibco, USA)로 3회 세척하였다. 치주인대 조직을 세척한 후 60mm 세포 배양용 배양접시(Nunc, USA)로 옮겨 약 1mm²로 세절하였다. 세절한 조직은 20 분간 37도 5% CO₂, 습도 100% 배양기(Bantex 1820IR, Shel-lab, USA)에서 배양접시에 고르게 부착이 되도록 배양시킨후, 각 배양접시당 2ml 의 10% 우태아혈청과 1% 항생제를 첨가한 D-MEM을 가하고 단일 세포층이 형성될 때까지 3일 간격으로 배양액을 교환하였다.

3일간 배양 후 배양접시 내의 배양액을 제거하고 HBSS(Hank's balanced salt solution, Gibco co. USA)로 2회 세척하여 부착되지 않은 세포를 제거하였다. 부착된 세포의 분리를 위해 HBSS를 제거한 후 0.25% trypsin/EDTA(10x, Gibco co., USA)를 배양접시당 2ml씩 넣고, 3 분간 bench 상에 방치한 후 피펫을 이용하여 배양접시에 부착된 부착세포를 분리시키고 5ml 원심분리용 시험관으로 옮겨서 1200rpm으로 10분간 원침하였다. 원침 후 상청액을 제거하고 HBSS를 가하여 세척한 후 Vortex mixer로 혼합하고 세포부유액을 만들어 60mm 배양접시에 분주하였다. 배양액은 세포의 충분한 증식이 명확히 나타날 때까지 2일 혹은 3일 간격으로 교환하였다. 모든 세포들은 섬유모세포의 형태 및 증식율을 보였고, 본 실험에서는 5회 내지 8회 계대배양한 치주인대세포를 이용하였다.

(2) Cytokine 투여 및 NOS억제제 처리

5-8회 계대 배양된 치주인대세포 및 HOS세포를 60mm dish에 분주하기 전 trypan-blue로 염색한후 hemocytometer에 옮겨 도립 현미경 상에서 세포수를 세어서 dish당 200,000개의 세포수로 부착이 되도록 분주하고 2일간 배양을 실시하였다.

cytokine에 의해 NOS가 유도되는지를 확인하기 위해 2일간 배양 후 치주인대세포 및 골모유사세포들에 recombinant-interleukin gamma(Sigma Co, USA, 100U/ml), TNF-alpha(Genzyme, USA, 1ng/ml), LPS(Sigma, USA, 1μg/ml) 단독 및 이들의 혼합투여를 한 후 1일간 배양하였다.

또한 NO의 치주인대세포에서 역할을 밝히기 위해 inhibitor 인 N-monoethyl- L-Arginine(이하 NMA, Calbiochem, USA)를 5, 50, 500μM/ml을 투여하고, NO의 기능을 밝히기 위해 1군은 interferon-gamma를 투여한 상태에서 NO donor인 L-arginine(Calbiochem, USA)을 0, 1, 3mM/ml로 나누어 복합투여하였고, 2군은 L-arginine 에 NMA를 100μm/ml를 동시에 투여하고 0, 6, 12, 24시간 배양한 후 단백질을 추출하였다.

세포활성 및 nitrate 생성변화를 관찰하기 위해 NMA 0.5nM/ml단독투여, L-arginine 0.5nM/ml단독투여, NMA 0.1, 0.5, 1nM/ml 과 L-arginine 0.5nM/ml과 혼합투여를 하였고 NMA 0.5nM/ml 과 NO 자극원인 sodium nitroprusside(이하 SNP, Calbiochem, USA) 0.01, 0.1, 0.2nM/ml을 혼합투여하여 3일간 배양하였는데 SNP는 배양 2일째 투여하였다.

(3) 세포 활성에 미치는 영향 평가

3일간 배양한 후, 세포활성을 측정하기 위해 생리식염수에 용해한 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide: No. M2128, Sigma co., USA) 용액 200μl를 각 well에 넣고 4시간동안 배양 후 MTT용액을 버리고, DMSO를 200μl씩 첨가하

여 formazan 결정을 용해시킨 후 세포활성도의 측정을 위해 96-well plate 상으로 옮겼다. plate를 잘 흔든 후 ELISA analyser(model ETY-96, Toyo instruments Inc., Japan)에 plate를 넣고 570nm에서 흡광도를 측정하였다. 매 실험마다 실험용액이 들어있지 않은 배양액을 대조군으로 하여 세포활성도는 대조군의 백분율로 산출하였다.

(4) 반응질소 중간물질의 측정

Reactive nitrogen intermediate(RNI)는 세포에서 여러 가지 cytokine이나 다른 미생물의 감염에 자극받아 L-arginine에 의존적으로 생성되며 이들은 특이적 또는 비특이적 면역반응에 중여한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. RNI는 NO₂⁻, NO₃⁻, NO-등이 있는데 이들은 세포배양액속에서 NO₂⁻와, NO₃⁻의 형태로 축적되어진다. NO₃⁻의 측정은 reducing enzyme으로 다시 환원시켜서 측정해야 되기 때문에 배양액 속에 축적된 NO₂⁻만을 발색시켜 ELISA reader로 측정하였다.

치주인대세포를 96well plate에 well당 1×10⁵개로 넣어준 다음 여러가지 cytokine 및 RNI생성 저해제를 1% BSA가 포함된 PBS에 녹여 각각의 농도에 따라 배양세포에 첨가하고 48시간동안 배양한 후에 각 well로부터 100μl씩의 배양액을 취하여 ELISA TiterTek plate에 옮긴 후 동량의 Griess Reagent(N-1-naphthylethylen diamine 0.1% in H₂O, sulfanilamide 1% in 5% H₃PO₄)를 첨가하고 10분간 실온에 두었다. 전체 RNI생성 정도는 EIZER Reader로 540nm에서 흡광도를 측정했다. 이때 RNI농도에 대한 standard curve는 NaNO₂를 serial dilution하여 얻었다.

(5) western blotting analysis

각각의 실험군 및 대조군에서 TRI reagent(Montgomery, USA)로 단백질을 추출한 후 Lowey 방법으로 단백질을 정량분석한

후 이를 취하여 SDS-page와 Western blotting에 사용하였다.

standard marker(Promega, USA)와 단백질에 동량의 loading buffer를 첨가하고, 95°C에서 denaturation시켜서 8% SDS-PAGE를 사용하여 전기영동한 후 Coomassie brilliant blue 염색을 시행하였다. 전기영동한 gel을 nitrocellulose membrane(Millipore, USA)에 transfer시켜서, 3% skim milk에 한 시간 동안 blocking 한후 NOS₁(Santa Cruz, Polyclonal, USA), NOS₂(Santa Cruz, Polyclonal, USA), NOS₃(Santa Cruz, Polyclonal, USA), type I collagen(Monosan, Netherlands), Osteonectin(Calbiochem, USA)을 각각 1:200으로 희석한 후 90분간 반응시켰다. 그후 이차항체(alkaline-phosphatase conjugated anti-rabbit Ig G, Sigma Co)를 1시간 반응시켜 ECL(Amersham, USA) chemiluminescence detection kit를 이용하여 detection하였다.

(6) 통계분석

각 농도와 시간에 따른 대조군에 대한 백분율로 환산된 세포활성 및 nitrate생성도의 평균과 표준편차를 구하고 일원분산분석법(ANOVA)을 이용하여 통계적 차이를 평가한다.

III. 연구결과

1. 치은조직내에서 NOS₁, NOS₂, NOS₃의 발현(그림 1, 표 1, 표 2, 표 3)

(1) 상피

건강한 치은에서의 NOS₁, NOS₂, NOS₃은 전반적으로 발현이 거의 되지 않았으나 기저층에서 NOS₁과 NOS₃에서는 약한 발현을 보이고 그 외의 다른 층에서는 관찰할 수 없었으며 NOS₁, NOS₂, NOS₃ 간의 차이를 보이지 않았다(그림 1 A, D, G). 또한 염증치은에서

표 1 The expression of NOS1 in healthy and inflamed gingiva

	Epithelium				Endothelium	Mononuclear cell
	BA	SU	SP	SF		
Healthy gingiva	-	±	-	-	±	±
Inflamed gingiva	±	±	-	-	+	+

BA : basal layer, SU : suprabasal layer, SP : spinous layer, SF : superficial layer
 - : negative, ± : rare, + : mild, ++ : moderate, +++ : intense

표 2 The expression of of NOS2 in healthy and inflamed gingiva

	Epithelium				Endothelium	Mononuclear cell
	BA	SU	SP	SF		
Healthy gingiva	-	-	-	-	±	±
Inflamed gingiva	-	-	-	-	+++	+

BA : basal layer, SU : suprabasal layer, SP : spinous layer, SF : superficial layer
 - : negative, ± : rare, + : mild, ++ : moderate, +++ : intense

표 3 The expression of immunostaining of NOS3 in healthy and inflamed gingiva

	Epithelium				Endothelium	Mononuclear cell
	BA	SU	SP	SF		
Healthy gingiva	±	±	-	-	±	±
Inflamed gingiva	++	+	+	-	++	++

BA : basal layer, SU : suprabasal layer, SP : spinous layer, SF : superficial layer
 - : negative, ± : rare, + : mild, ++ : moderate, +++ : intense

도 NOS₂ 는 건강치은과 거의 차이가 없었으며 NOS₁ 와 NOS₃만 건강치은과 비교해 기저층과 상기저층에서 상대적으로 많은 발현을 보였다(그림 1 B, E, H).

(2) 모세혈관 내피세포

임상적으로 건강 치은의 내피세포에서의 NOS₁, NOS₂, NOS₃의 발현은 대체적으로 경미하게 나타났으며 염증성 치은에서는 NOS₁, NOS₂, NOS₃ 모두 건강 치은보다 증가된 발현양상을 보였다. 염증성 치은의 혈관내피세

포와 혈관 내강에서는 NOS₃가 NOS₁, NOS₂보다 증가된 발현양상을 보였다(그림 1I).

(3) 단핵세포

건강치은에서 단핵세포의 NOS₁, NOS₂, NOS₃ 발현은 거의 미약하였으나(그림 1 A, D, G) 염증성 치은조직의 NOS₁, NOS₂, NOS₃ 발현 모두 크게 증가되었다(그림 1 C, F, G).

심한 성인형 치주염 치은에서는 그림 1 D에서처럼 모세혈관이나 혈관내피내강내의 염증세포에서 NOS₂ 발현이 나타났다. 단핵세포

그림 1 Comparison of NOS1(A, B, C), NOS2(D, E, F), NOS3(G, H, I) protein expression by immunohistochemistry in healthy gingiva(A X100, D X100, G X100) and adult periodontitis(B X200, C X200, E X200, F X400, H X200, I X400)

의 경우 NOS₃의 발현이 NOS₁, NOS₂ 보다 많았다.

(4) 결합조직

임상적으로 건강 치은의 결합조직에서 NOS₃의 발현은 비특이적인 경미한 반응을 보였지만 NOS₁, NOS₂, 는 거의 음성으로 나타났다(그림 1 G). 염증성 치은에서는 NOS₁에서만 섬유모세포에서 발현을 보였으나 NOS₂, NOS₃ 모두 건강 치은과 유사하게 음성으로 나타났다(그림 1, C).

2. Western blot analysis 에 의한 PDL과 HOS 세포에서 Cytokine처리에 따른 NOS₁, NOS₂, NOS₃ protein의 발현(그림 2, 그림 3, 그림 4, 그림 5)

치주인대세포와 HOS세포를 TNF- α (1ng/ml), IFN- γ (200U/ml), LPS(100 μ g/ml), cytokine 3가지의 combination을 투여한 후 1일 후 단백질을 분리한 후 Western blot analysis에 따른 NOS₁ 단백질 발현은 치주인대세포 및 HOS osteoblast-like cell line에서 cytokine을 처리하지 않은 대조군은 모두 170 kDa 의 단일 band로 관찰되었고(그림 2) cytokine을 처리한 실험 24시간군에서 대조군에 비해 큰 차이가 없었고, PDL과 HOS세포 간에도 유사한 발현을 보였다(그림 2).

NOS₂의 경우 cytokine자극을 하지 않은 세포에서도 117 kDa의 경미한 band가 관찰되었으며 TNF- α (1ng/ml), IFN- γ (200U/ml), LPS(100 μ g/ml)의 3가지 cytokine의 경우는 대조군에 비해 약간 증가하였으나 3가지의

그림 2 NOS₁ protein expression by Western blot analysis in PDL and HOS osteoblast-like cells by cytokine treatment. Cells are treated with TNF- α (1ng/ml), IFN- γ (200U/ml), LPS(10ng/ml), combination of TNF- α + IFN- γ + LPS

그림 3 NOS₂ protein expression by Western blot analysis in PDL and HOS osteoblast-like cells by cytokine treatment

그림 4 NCS₃ protein expression by Western blot analysis in PDL and HOS osteoblast-like cells by cytokine treatment

그림 5 Time course study on the effect of cytokine(combination of TNF- α + IFN- γ + LPS) on NOS₁, NOS₂, NOS₃ protein expression in PDL and HOS osteoblast-like cells by Western blot analysis

combination군에서는 synergistic effect를 보여 가장 많은 발현을 보였고 HOS 및 PDL 세포 모두에서 나타났지만 osteoblast-like cell인 HOS 세포에서 더 현저히 나타났다.

NOS₃ protein의 발현은 그림 4 처럼 대조군과 실험군에서 140 kDa의 단일 band를 보였으나 치주인대세포와 HOS세포 모두 실험 cytokine투여방법에 따라 큰 발현 차이를 보이지는 않았다.

치주인대세포와 HOS세포를 TNF- α , IFN- γ , LPS, cytokine 3가지의 combination을 투여하고 0, 6, 12, 24시간별로 배양한 후 단백질을 분리한 후 Western blot analysis에 따른 NOS₁, NOS₂, NOS₃ protein의 발현은 그림 5에서 처럼 NOS₁과 NOS₃는 각각 170 kDa와 140 kDa의 단일 band를 보였으나 치주인대세포와 HOS세포 모두 투여 시간대별로 큰 차이를 보이지는 않았다.

NOS₂의 경우 cytokine자극을 하지 않은 세포에서도 경미한 band가 관찰되었으며 시간 의존(time-dependant) 증가를 보여 24시간에서 가장 많은 발현을 보였고 HOS 및 PDL 세포 모두에서 나타났지만 osteoblast-like cell인 HOS 세포에서 더 현저히 나타났다.

3. NMA 및 Arginine 투여에 따른 제1형 교원질 및 osteonectin단백발현(그림 6, 7, 8)

치주인대세포에 NOS의 prototypic inhibitor activity를 보이는 NMA를 5, 50, 500 μ M/ml을 투여한 후 3일 배양 배양하여 단백질 추출 후 제1형 교원질(monoclonal, Monosan Co)과 osteonectin(polyclonal, Biodesign Co)에 대한 Western blotting을 한 결과 Fig. 6에서처럼 대조군의 경우 95 kDa, 47 kDa의 분자량을 보이는 band가 관찰되었다.

제1형 교원질단백의 경우 NMA 5, 50, 500 μ M/ml을 투여한군 간에 차이가 없이 유사한 정도의 발현을 보였으나, onestectin의 발현에서 NMA 5 μ M/ml군은 대조군과 차이가 없었으나 NMA 50, 500 μ M/ml군의 경우 현저히 발현감소가 관찰되었다(그림 6).

치주인대세포에 NOS의 자극원인 IFN- γ 10, 100, 1000U를 투여후 3일간 배양하여 단백질 추출을 하고 제1형 교원질, osteonectin 단백질에 대한 Western blot analysis결과 그림 7에서 처럼 95kDa, 47kDa의 약한 band가 관찰되었으나 각 군간에 따른 큰 차이는 보이지

그림 6 Dose dependant study of type I collagen and osteonectin protein expression of PDL cells after the addition of 10-1000U of IFN- γ for 72 hours by Western blot analysis

그림 7 Dose dependant study of type I collagen and osteonectin protein expression of PDL cells after the addition of inhibitor of NOS, NMA for 72 hours by Western blot analysis

않아 교원질 및 비교원단백의 tranlation level 에는 큰 영향을 주지 않았다.

치주인대세포에 NOS의 억제 및 자극원을 투여시 복합작용을 알아보기 위해 IFN- γ 200U/ml, 억제자인 NMA를 100 μ M/ml, NOS 공여자인 L-arginine을 0, 1, 3mM을 복합 투여한 경우에는 Fig. 8에서 처럼 제1형교원 단

백에는 실험군간의 차이가 없었으나 osteonectin tranlation level에서는 L-arginine 0 및 1mM/ml은 크게 감소되었으나 L-arginine 3mM/ml군에서는 발현이 대조군보다 유사한 정도로 증가되어 NMA의 osteonectin 발현억제효과가 L-arginine에 의해 농도의존적으로 역전됨을 알수 있었다.

그림 8 Dose dependant study of type I collagen and osteonectin protein expression of PDL cells after the addition of arginine, NMA, and IFN- γ for 72hours by Western blot analysis

3. NOS 억제자 NMA 및 공여자 Arginine 투여에 따른 Nitrate생성 및 세포활성 변화(그림 9, 10, 11, 12)

NMA는 치주인대세포에서 NMA를 단독으로 가한 경우, 실험 3일째에 NO생성은 대조군의 경우 141.5 ± 29 nM에 비해 0.1nM 농도에서는 120.5 ± 1.73 로 나타났으며 0.5nM에서는 113.75 ± 4.85 nM, 1.0nM 농도에서는 109.75 ± 1.70 nM로 농도의존적으로 nitrate의 생성을 저해하였으며 대조군에 비해 모두 유의한 감소를 보였다.

L-Arginine 0.5nM과 NMA 농도변화에 따른 혼합투여시 nitrate 형성변화는 그림 9에서

와 같이 NMA 0.1nM 및 L-Arginine 0.5nM과 혼합투여시는 142.25 ± 7.13 nM로 대조군과 큰 차이가 없었으나 NMA 0.5nM과 혼합시는 120 ± 5.33 , NMA 1nM혼합투여시는 118.25 nM로 나타나 Arginine투여에 관계없이 NMA 단독투여와 유사하게 농도의존적인 nitrate생성을 유의하게 감소시켰으며 NMA 0.5nM과 1nM과 Arginine혼합 투여시 대조군에 비해 유의하게 감소되어 NMA 농도가 낮을수록 Arginine과 혼합투여시 nitrate생성은 증가되었다(그림 9).

NMA 0.5nM과 NO 공여자인 SNP를 농도별로 혼합투여시 nitrate형성변화는 SNP를 투여하지 않은 NMA 단독군의 경우 $113.75 \pm$

표 4 Effect of L-arginine(0.5nM/ml) and Dose-dependant NOS inhibitor NMA on Nitrate production in PDL cells(nM/ml)

control	141.5 ± 1.29
Arginine 0.5nM only	$142.25 \pm 3.05^*$
NMA 0.5nM only	$113.75 \pm 4.85^*$
NMA 0.1nM+Arginine 0.5nM	142.25 ± 7.13
NMA 0.5nM+Arginine 0.5nM	120.00 ± 5.33
NMA 1.0nM+Arginine 0.5nM	$118.25 \pm 9.81^*$

* Significantly differently from control(P<0.05)

그림 9 Effect of L-arginine(0.5nM/ml) and Dose-dependant NOS inhibitor NMA on Nitrate production in PDL cells

표 5 Effect of L-arginine(0.5nM/ml) and Dose-dependant NOS inhibitor NMA on Cell Proliferation in PDL cells

control	100±7.51(%)
Arginine 0.5nM only	105.61±9.30
NMA 0.5nM+Arginine 0.5nM	73.74±6.80*
NMA 0.5nM+Arginine 0.5nM	109.35±10.25
NMA 0.5nM+Arginine 0.5nM	101.26±1.66
NMA 0.5nM+Arginine 0.5nM	87.60±4.90*

* Significantly differently from control(P<0.05)

그림 10 Effect of L-arginine(0.5nM/ml) and Dose-dependant NOS inhibitor NMA on Cell Proliferation in PDL cells

표 6 Effect of NMA(0.5nM) and Dose-dependant NO donor SNP on Nitrate production in PDL cells

control	141.5±1.29(nM)
SNP+NMA 0.5nM	11,375±4.85*
SNP 0.01nM+NMA 0.5nM	155.25±4.34
SNP 0.1nM+NMA 0.5nM	168.25±6.84*
SNP 0.2nM+NMA 0.5nM	191.75±2.62*

*Significantly differently from control(P<0.05)

그림 11. Effect of NMA(0.5nM) & Dose-dependant NO donor SNP on Nitrate production in PDL cells

표 7 Effect of NMA(0.5nM) & Dose-dependant NO donor SNP on Cell Proliferation in PDL cells

control	100±2.96(%)
SNP 0+NMA 0.5nM	73.74±4.54*
SNP 0.01nM+NMA 0.5nM	70.54±4.50*
SNP 0.1nM+NMA 0.5nM	76.99±5.02*
SNP 0.2nM+NMA 0.5nM	96.43±8.86

* Significantly differently from control(P<0.05)

4.85nM이었으나 SNP 0.01nM과 복합투여시는 155.25±4.34nM이었으나 SNP 0.1nM은 168.25±6.84nM, SNP 0.2nM과 혼합투여시는 191.75±2.62nM로 나타나 SNP 농도에 따라 NMA에 의한 NO억제효과가 사라지고 오히려 증가되는 경향을 보였으며 SNP 0.1nm 및

0.2nM혼합투여는 대조군보다 nitrate 생성이 유의하게 증가되었다(그림 11).

세포활성도의 변화를 알기위한 MTT assay 결과 NMA 0.5nM단독의 경우 73.74±6.80(%)으로 대조군에 비해 크게 감소되었으며 NOS 공여자인 Arginine 0.5nM을 단독 투

그림 12 Effect of NMA(0.5nM) & Dose-dependant NO donor SNP on Cell Proliferation in PDL cells

여시 128.99 ± 9.30 으로 증가되었으며, 이를 복합투여인 NMA 0.1nM 및 L-Arginine 0.5nM 과 혼합투여시는 109.35 ± 10.25 로 나타났으며, NMA 0.5nM 및 L-Arginine 0.5nM과 혼합투여시는 $101.26 \pm 1.66\%$ 로 대조군과 큰차이가 없었으나 없었으나 NMA 1nM과 Arginine혼합투여시는 $87.60 \pm 4.90\%$ 로 나타나 대조군보다 유의한 증가를 보여 NMA 단독투여에 비해 Arginine과 혼합 투여시 세포활성을 농도 의존적으로 증가시켰다(그림 10).

NMA 0.5nM과 NO 공여자인 SNP를 농도 별로 혼합투여시 세포활성 변화는 SNP를 투여하지 않은 NMA 단독군의 경우 $73.74 \pm 6.80(\%)$ 이었으나 SNP 0.01nM과 복합투여시는 $70.54 \pm 45.02\%$ 이었으나 SNP 0.1nM은 76.99 ± 5.02 으로 대조군과 유의한 감소를 보였고, SNP 0.2nM 과 혼합투여시는 96.43 ± 8.86 로 나타나 SNP 농도에 따라 NMA에 의한 세포증식억제효과가 사라지고 오히려 증가되는 경향을 보였다(그림 12)

IV. 총괄 및 고찰

치주낭상피는 비각화 편평상피로 이루어져

있으며 각화잠재성을 지니고 있고 세균침투에 대해 중요한 방어역할을 하고 있는데 성인형 치주염은 치주염중 가장 빈발하는 형태로 일정한 파괴 양상없이 전반적으로 대부분의 치아를 침범하며 치태와 치석의 침착이 직접적으로 관련이 있고 수년에서 수십년에 걸쳐 진행되며 치태침착부에 자주 발생한다. 이러한 치주질환은 조직을 손상시킬수 있는 물질들이 각화가 되어있지 않은 치은열구상피를 통해 치은결합조직내로 침투되어 치주조직의 파괴를 일으킨다고 알려져왔다⁶⁾.

치주조직에서도 골모세포, 골세포, 골수기질세포, 섬유모세포, 혈관 내피세포 및 면역관련세포들이 골재흡수와 골개조를 조절하는 중추적인 역할을 한다. 이런 세포들로부터 유래한 매개체들은 여러 가지 cytokine, prostaglandin같은 arachidonic acid 대사물, 라디칼과 기질 단백질과 함께 골재흡수에 작용하는 다핵 파골세포의 보충과 형성, 결합과 분화, 퇴화(degradation)시키는데³²⁻³³⁾, 이런 조절인자들은 또한 골형성을 하는 골아세포들의 발생과 작용에 영향을 미치고, 따라서 골개조 순환 과정의 형성과 퇴화 부분에 영향을 미치게 된다고 보고되었다.

치주인대에는 섬유모세포, 조골세포, 파골세포, 조백악세포 및 그 전구세포들이 다양한 분화도로 혼합되어 있고³⁴⁾, 치주질환도 염증성 골질환으로 골상실이 일어나는 질환이기 때문에 본 연구에서도 in vitro에서 치주인대세포와 in vivo에서 염증성치은조직인 성인형 치주염환자와 건강한 치은을 대조군으로 NO의 역할을 알아보고자 하였다.

NO synthase에 의해 생성된 NO는 반감기가 6-10초로 짧아 바로 산화되어 최종적으로 nitrite와 nitrate로 전환이 되기 때문에 NO를 직접 측정하기가 어려워 간접적으로 nitrite와 nitrate를 측정하며 배양액 속에는 약 70%정도가 nitrite형태로 존재하고 나머지는 nitrate로 존재하기 때문에 nitrate양을 측정하기 위하여는 reducing enzyme으로 다시 nitrite로 환원시켜 측정해야 하므로 저자들은 nitrite만을 발색시켜 측정하였다.

탐식세포는 세균을 탐식하거나 여러 cytokine의 자극을 받으면 반응산소중간대사물이나 반응 질소중간 대사물을 생산한다³⁵⁻³⁶⁾. 탐식기능을 왕성히 보이는 호중구나 단핵탐식 세포계(mononuclear phagocytic system) 세포들의 세포질에는 여러 가지 가수분해 효소 등을 함유하는 과립이 존재하여 탐식된 미생물을 사멸시키려 하지만 많은 병원성이 강한 미생물은 그러한 세포과립이 유해작용에도 불구하고 생존할 수 있게 저항성이 길러져 있다. 그러나 탐식세포를 활성화시킬 수 있는 T세포가 생산하는 림포카인의 영향을 탐식세포가 받으면 탐식세포는 superoxide나 hydrogen peroxide와 같은 반응산소중간물질(reactive oxygen intermediate:ROI)이나 NO와 같은 반응질소중간물질(reactive nitrogen intermediate:RNI)을 생성할 수 있게 됨으로써, 탐식된 세포내 산물을 효과적으로 사멸시키던가 아니면 번식을 지지할 수 있게 된다³⁷⁻³⁸⁾.

최근 nitric oxide(NO)가 신경세포에서는 신호전달물질로써 역할을 하고 순환기계에서는

endothelium derived relaxing factor(EDRF)로 알려졌으며, 면역계에서는 단핵탐식세포계로부터 생성되어 세포내 기생생물의 사멸작용이나 종양세포에 세포독성을 나타낸다고 보고되고 있다³⁷⁻⁴¹⁾. 신경계나 순환기계 세포에서의 NO생성과는 달리 면역계에서의 NO 생성은 언제나 생성되는 것이 아니고 적절한 세포활성물질의 영향하에 단핵탐식세포계에서 NO가 생성되는바 NO를 생성하려면 반드시 γ -IFN과 LPS 혹은 tumor necrosis factor(TNF)등이 연쇄적인 자극에 의하여 NO생성이 가능해진다^{40, 42)}.

개체내 방어기능중 가장 중요한 역할을 담당하는 면역계는 개체의 내부에서 돌연변이에 의하여 발생되었거나 외부에서 침입한 이물질을 특이적으로 인식하여 탐식세포로 하여금 체내에서 제거하여 내부환경의 항상성을 유지시킨다. 최근 방어 분자로써 NO가 각광받고 있는데 그 생성 기전은 먼저 항원이 개체내에 들어올 때 들어온 부위의 대식세포가 항원을 탐식하여 협력 T세포에 항원을 전달하면 협력 T세포는 활성화되고 분화되어 세포활성물질인 cytokine를 분비하게 된다. 이때 협력T세포에 의해 분비된 cytokine중 r-INF은 주위의 대식세포를 활성화시켜 tumor necrosis factor(TNF)와 같은 또 다른 cytokine을 분비하고 자기가 분비한 cytokine에 의해 대식세포는 더 활성화되어 반응산소중간물질이나 반응질소 중간물질같은 세포독성물질을 분비하여 미생물이나 암세포를 죽일 수 있게 된다. 활성화된 대식세포가 분비한 세포독성물질 중 가장 강력한 NO는 세포내에 C-GMP를 높이거나 ADP-ribosylation에 의해 생리적 작용을 나타내지만, 과량으로 분비되는 경우에는 미생물이나 암세포의 Fe-S를 함유하는 효소의 작용을 억제시키거나 DNA에 손상을 미쳐 항미생물 혹은 항종양 작용을 나타내게 된다^{9, 43)}.

최근 골개조에서 NO의 역할이 다양한 세

포, 조직배양, 동물실험에서 보고되기 시작해 NO가 생체내와 실험상 모두 파골세포의 매개에 의한 골재흡수가 억제된다고 알려져 있고^{45-46A}), 염증매개체(inflammatory mediator)가 많아짐에 따라 골모세포가 autocrine기능을 감소함으로써 NO생산을 하게 한다고 보고하였다⁴⁶⁾.

NO는 L-arginine이 nitric oxide synthetase (NOS) 다축매 동위효소들의 반응을 통해서 뿐 아니라, NO와 L-citrulline으로 화학변화시키는데 필요한 다양한 보조인자들의 산화반응에 의해 합성된다. 3가지의 표준 NOS isoform이 존재하는데 이중 두가지(endothelial and neuronal NOS isoform)는 calcium/calmodulin이 활성화된 효소들을 발현시키고, 반면에 NOS의 세 번째 isoform(induced NOS)는 염증자극에 반응하여 전사와 번역(translation)을 유도함으로써 두가지 NOS isoform과 구별된다. NOS는 L-arginine의 guanidino group에서 terminal nitrogen을 산화시켜서 NO와 citrulline을 생성시키는 바 그 과정에서 산소 뿐만 아니라 NADPH나 flavin 등이 관여한다고 알려졌고 NO는 peroxy-nitrite나 nitrosothiol과 같은 다른 종류의 RNI들을 생성시킨다⁴⁶⁾. NOS isoform은 Calcium 및 calmodulin 의존형인 NOS1과 NOS3로 나누어 지는데 NOS1은 neuron에서 처음 발견되어 12q24.2에 유전자가 위치하고, NOS1에 관해 면역조직화학적으로 보고된 연구가 거의 없어 비교할 수 없었으나 본연구에서는 건강한 치은에서의 NOS1은 전반적으로 발현이 거의 되지 않았으나 모세혈관과 염증세포에서도 그림 2-C에서처럼 경미한 발현양상을 보였다.

또한 in vitro에서 치주인대세포 및 HOS osteoblast-like cell line에서 NOS1은 170 kDa의 분자량을 Western blotting을 통해서 확인할 수 있었으나 대조군과 TNF- α , IFN- γ , LPS 단독 투여 및 이들 cytokine의 3가지 혼합투여군 모두 대조군보다 발현정도 차이가 없어

cytokine유도에 따른 translation level에서 변화를 보이지 않아 in vivo에서의 결과와 일치하지 않았는데 이러한 점은 향후 연구해야 될 것으로 사료되는데, 염증성 치주질환시 나타나는 국소적인 치조골의 파괴는 만성염증과 관련이 있고, 이러한 만성염증시 치주조직에서 신경전달물질이 방출되어 치주인대세포와 치주인대기질을 변형시켜, 치주인대기질은 신경섬유와 신경말단이 vasoactive peptide를 방출토록 유도하면서, 특히 신경전달물질은 골세포에 직접 작용하거나 혈관계를 통해 작용하는 것으로 보고되었기때문에⁴⁷⁾ 성인형 치은염에서 혈관을 중심으로 NOS1이 NOS3 및 NOS2 발현 증가보다는 적지만 in vivo에서 발현되었다고 생각된다.

NOS3는 혈관 내피세포에서 처음 발견되며 7q35-36에 위치하는데⁴⁸⁻⁴⁹⁾, NOS3는 칼슘에 의존적인 효소로써, 자극에 의하여 소량의 NO를 짧은 시간 분비하게 되며 이때 분비된 NO는 근육을 이완시켜 혈관을 확장시키는 역할을 한다. 이러한 NO의 생리적 작용은 NO가 목적세포의 cyclic GMP의 양을 증가시키기 때문인 바 cGMP의 양을 NO가 guanylyl cyclase의 heme group에 부착하여 guanylyl cyclase을 활성화시키기 때문임이 밝혀졌다¹⁰⁾. NOS3의 경우 내피성효소로써 acetylcholine, 5-HT, ADP, Vasopressin, estrogen, 또는 인산화, NO가 낮은 수준으로 방출되는 일시적 현상으로 증가된다고 보고하였다⁵⁰⁻⁵²⁾.

본 연구에서도 염증성 치은의 면역조직화적 소견에서 NOS3의 발현은 전반적으로 혈관을 중심으로 나타났고 건전 치은에서는 매우 미약하였으나 염증성 치은의 모세혈관에 주로 발현되었으며, 변연치은내의 NOS3와 혈관사이 에 밀접한 관계가 있음을 보여주는데 염증이 집중된 혈관분포가 풍부한 곳에 NOS3가 많이 출현하였다. 또한 치주인대세포 및 HOS osteoblast-like cell line에서 NOS3는 약 140 kDa의 분자량을 Western blotting을 통해서

확인할 수 있었으나 대조군과 cytokine 투여군은 단백질 수준의 발현정도에서 차이를 보이지 않았으며, cytokine 자극에 따른, NOS₃ 단백질 발현은 6, 12, 24시간의 시간증가에 따라 큰 차이가 없었다. 이러한 결과는, NOS₃가 내피성 효소로써 cytokine에 의해 골모유사세포나 치주인대세포에서 유도될 수 있는 것이 아님을 보여준다고 사료된다.

또한 두 종류의 NOS가 각각 다른 세포에 분포되어 있는 것이 아니라 동일세포에, NOS₃, NOS₂가 같이 존재함이 밝혀졌는데⁵³⁾, 본 연구에서도 모세혈관내피세포 및 염증세포에서 NOS₃, NOS₂가 모두 발현됨이 관찰되었고, 따라서 혈관내피세포같은 경우 NOS₁, NOS₃ 같은 constitutive한 효소를 가지고 있지만 NOS₂ 같은 inducible한 효소를 가질 수 있으며, 마찬가지로 대식세포는 inducible한 효소를 많이 발현시킬 수 있지만 calcium과 calmodulin에 의존적인 constitutive한 NOS 효소도 나타날 수 있다고 사료된다.

NOS₂는 Ca²⁺에 비의존적이며 NOS의 inducible form으로써 다양한 세포에서 발현되며 17cen-q12에 위치하고⁴⁸⁻⁴⁹⁾ 여러조직들에서 발현되지만, NOS 효소들은 다양한 기전에 의해 광범위하게 조절되고, 세포와 조직분포 등에 따라 기능적 역할이 다르다⁵¹⁻⁵³⁾. 본 연구의 염증성 치은조직에 나타나는 NOS₂ 변화는 건강치은 보다 성인형 치은염군에서 상대적으로 많은 발현을 보였는데 치주질환이 만성적 염증임을 고려할 때 염증의 항존효과는 신경전달 물질의 자극을 지속시켰을 것으로 사료되었다. 본 연구에서 변연치은 내의 염증부위에서 NOS₂의 발현이 많은 것을 보였다. 이러한 소견은 국소적인 염증반응시 치근부의 치주인대와 치수의 염증세포와 상호작용을 하는 것으로 사료되었다.

치주질환은 구강내에서 빈발하는 만성질환 중의 하나로써 치조골의 파괴를 동반하는 전형적인 임상증상을 나타내며, 치주질환의 경

우 나타나는 치조골의 파괴에 관여하는 많은 연구들이 진행되어 왔으나^{1, 64)}, 아직까지 정확한 원인물질이 밝혀져 있지않은 상태에서 그람 음성균의 세포막의 주성분인 lipopolysaccharide(LPS)를 비롯하여 prostaglandin E2 등이 작용하리라 추측된다⁶⁵⁻⁶⁶⁾ 이중 LPS는 polysaccharide, phospholipid 및 소량의 단백질로 구성되어 있으며⁶⁷⁾, 세균의 급속한 성장시기나 세균의 외막이 손상된 경우에 유리되며⁶⁸⁾ 치주질환시 조직파괴의 중요한 원인요소로 알려져 있다.

치주조직의 파괴는 골흡수의 유발과 골형성의 억제에 의하여 유발되고, cytokine중 interleukin(IL)과 tumor necrosis factor가 골흡수와 관련되는데, 이중 interleukin-1은 membrane-bound form으로 주로 존재하는 IL-1 α 과 secretory form으로 많이 존재하는 IL-1 β 가 보고 되었다. IL-1은 대식세포에서 분비되는 단백질로 림프구를 포함한 다양한 세포형에 작용하여 숙주반응을 증진시키고, 다형핵백혈구의 화학주성에 관여하여 염증변화를 유발하며, 골흡수와 관련이 있다고 보고 되었다⁶⁸⁾.

NOS₂ 합성은 IL-1 α or β , TNF- α , IFN- γ , bacterial LPS 같은 다양한 염증신호들이 단독 또는 복합적으로 반응하고 이러한 유도는 corticosteroid들 이나 IL-4, IL-8, IL-10, TGF- β 같은 cytokine들 같은 항염증물질에 의해 억제된다고 보고되었다⁵⁰⁻⁵²⁾.

본 연구에서도 치주인대세포와 HOS세포에서 NOS₂의 단백질 발현은 117 kDa의 분자량을 보였는데 TNF- α , IFN- γ , LPS단독 투여보다 3가지 혼합투여가 synergistic effect를 보였으며 cytokine 자극에 따른 NOS₂ 단백질 발현은 시간의존 증가를 보여 24시간에서 가장 많은 발현을 보였는데, cytokine을 복합처리했을 때 RC세포나 ROS17/2.8세포주에서 48시간에 가장 많은 발현을 보인 결과와 유사하였다⁶⁾.

Hukkanen¹⁶⁾ 등은 일차배양한 백서 골모세

포, ROS 17/2.8, MC3T3-E1, MG-63 세포주에서 모두 cytokine 자극 inducible NOS, 즉 NOS₂ 발현을 보고하였고 본 연구에서도 골모유사세포인 HOS 세포에서와 치주인대세포에서 다른 연구들과 같이 NOS₂ 발현이 관찰되었는데 이러한 점은 치주인대세포에는 골모세포를 비롯한 여러 미분화세포들이 포함되어 있기 때문에 NOS의 발현을 볼 수 있다고 여겨져, NO의 역할을 치주인대에서 중점적으로 연구하였다.

호중구나 대식세포 등의 염증세포 세포질 내에 존재하는 inducible NO synthase(iNOS)는 정상시에는 NOS 활성이 무시할만하나 사이토카인으로 자극되면 활성화된 대식세포에서는 핵에서 iNOS 유전자의 발현이 유도되어 iNOS mRNA를 통하여 NOS가 생성되고 생성된 NOS는 오랜 기간 동안 많은 양의 NO를 분비하여 분비된 NO는 DNA 복제에 필요한 ribonucleotide reductase나 mitochondrial respiration에서 전자 전달계의 complex I 과 II 등의 Fe-S를 함유한 효소들과 nitroxyliron sulfur complex를 이룸으로써 효소 활성을 억제시켜 암세포나 미생물에 대한 세포독성을 나타낸다⁵⁹⁻⁶¹).

본 연구에서는 치주인대세포에 NOS의 자극원인 IFN- γ 처리한 후 제1형 교원질, osteonectin 단백질에 대한 Western blot analysis 결과 대조군과 농도 증가에 따른 큰 차이는 보이지 않아 교원질 및 비교원단백의 translation level에는 영향을 주지 않았고, NOS의 inhibitor activity를 보이는 NMA를 투여한 후 제1형 교원질 단백질 발현은 NMA 농도 증가에 따른 차이가 없이 유사한 정도의 발현을 보였으나, osteonectin의 경우는 NMA 농도에 비례하여 발현 감소가 관찰되었다. 또한 NMA와 arginine을 동시투여의 경우 arginine 농도 증가에 따른 제1형 교원 단백질 발현은 차이가 없었으나 NMA의 osteonectin 발현 억제 효과가 L-arginine에 의해 dose-dependant하게

억제되었다.

NOS의 억제자(L-NMA)가 골모세포 증식을 감소시킨다는 연구가 있지만 NOS가 NO 생산과정에서 증가하고, autocrine 상태에서 골아세포 증식과 생존능력을 억제하는 라디칼을 유리함으로써 염증신호체로써 반응한다고도 보고되었다⁶²). 그러나 NO가 골모세포의 일반적인 세포안정/세포독성 반응에 영향을 주는 사실 이외에 골 형성 반응에 연관있는 골모세포의 특성에 영향을 주는 것이 NO라는 것은 아직 확실하지 않다. Riancho 등⁶²)에 따르면 L-NMA가 골모세포의 IL-6 분비와 alkaline phosphatase 반응을 감소시키는데, 이런 반응은 NOS 억제자들의 비특이적 반응 때문이라고 보고하였고 Hukkanen 등¹⁶)도 싸이토카인이 매개된 NO의 유도도 NMA가 ALP와 osteocalcin 생산을 감소시키는데 관계된다고 보고하였다.

본 연구의 치주인대세포에서 NMA에 의한 nitrate 생성 억제 및 세포활성 감소는 NMA와 NO donor인 SNP를 혼합투여시, NMA와 NOS stimulator인 Arginine의 혼합투여시 SNP와 Arginine 농도 증가에 따라 nitrate 생성 및 세포활성이 증가되었다. 따라서 L-arginine이나 SNP의 존재에 따라서 세포 증식 및 nitrate 생성 정도가 의존적이었는데 이러한 소견은 골모유사세포인 MG63이나 ROS 세포에서의 결과와 유사하였으나⁶³) 내인성 NO가 골과 관련된 세포에서 생리학적 역할을 할 것으로 사료되지만 in vivo model에서, target NOS gene을 blocking transcription이나 translation 이전에 대해 보다 명확한 연구가 이루어져야 하겠다.

골모세포는 염증 자극에 반응하여 NO를 합성하지만⁶²⁻⁶⁶), 이것이 기능적으로 골을 흡수하는 파골세포가 강력한 autocrine과 paracrine 반응을 하는 NO를 생성하는지는 명확하게 밝혀지지 않았다. 또한 다른 국소적 작용을 하는 골유도 요소들과 복잡한 신호전달과 관계있는 NO가 파골세포의 골재흡수 억제 효과

가 있다. 또한 NO가 골미세 환경내에 다른 파골세포, 혈관내피세포, 골수세포에서도 유리 가능하기 때문에 골모세포에 paracrine역할을 할수 있다고 여겨진다. 따라서 arginine NO pathway가 불충분한 골모세포활성 또는 골모세포가 Uncoupling되어서 생기는 대사성 골질환이나 치주질환같은 염증성 골질환에서 새로운 치료적 접근 가능한 잠재적 target이 될수 있다고 생각된다. 특히 최근 rat나 avian의 파골세포들에 대한 NOS₂ 연구가 많이 이루어지고 골아세포들에 의한 NO가 생산된다고 밝혀졌지만, 직접적으로 염증물질을 유도하고 합성하는지 또는 파골세포에서 NO가 유리되는지는 명확히 알려지지 않았다^{6, 67)}. 따라서 파골세포들이 O_2 의 조절자로서 확실히 밝혀지지 않았기 때문에 골을 재흡수하는 파골세포에서 유전자의 조절을 설명하기 위한 새로운 기전이 연구되어야 하며, 염증 자극에 대한 NO를 유리하는 파골세포의 정확한 기능은 아마도 osteopontin을 포함한 골기질의 효과와 관련이 있다고 생각되어지고 이에 대한 연구가 이루어져야 한다고 생각된다.

이상과 같은 결과로 치주인대세포에 외인성으로 가해지는 NO가 세포증식효과 및 단백질 수준에서 골의 구성성분인 비교원단백의 증가를 보이며, 면역조직학적으로 NOS가 치주질환과 같은 염증성 골질환과 밀접한 관련이 있음을 보여주어 치주질환에 의해 유도되는 cytokine에 NO가 조절역할을 하는 것으로 여겨져되어 본 연구는 치주조직에 의해 야기되는 치주조직의 파괴에 대해 치유를 촉진시키는 데 이용 가능할 것으로 여겨진다.

V. 결론

Nitric Oxide는 L-arginine으로부터 Nitric Oxide Synthetase에 의해 합성되며, 최근 국소적인 골개조 형성에 관여하여 다기능 신호 전달인자 및 국소적 조절자로서 관심의 대상

이 되고 있고, 염증성 cytokine은 골흡수에 강력한 국소적 자극 signal로써 작용하는데, 치주조직에서의 NO가 다른 염증성 골질환에서 처럼 중요한 역할을 할 것으로 사료되지만 치주인대 세포를 중심으로 이들의 역할에 대한 연구는 거의 이루어진 바 없었다.

이에 본연구는 치주질환에 대한 정상적인 숙주방어기전을 이해하기 위해 임상적으로 건강치은 조직과 염증성 치은조직에서 면역조직화학염색법으로 NOS₁, NOS₂, NOS₃ 단백질 발현분포와 정도에 관해 알아보고 치주인대세포 및 골모유사세포에 cytokine을 처리했을 때 NOS의 상대적인 발현효과를 Western blot으로 비교하고자 하였다. 또한 Nitric Oxide의 자극원 및 억제제를 투여하여 제1형 교원질 및 osteonectin의 translation level에서 변화 및 nitrate생성 및 세포활성에 미치는 영향을 연구하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 면역염색에 따른 건강한 치은상피에서 NOS₁, NOS₂, NOS₃ 발현은 거의 되지 않았으나 염증치은에서는 NOS₁와 NOS₃의 기저층과 상기저층에서 상대적으로 많은 발현을 보였다.
2. 염증성 치은의 혈관내피세포와 염증세포에서 NOS₁, NOS₂, NOS₃의 발현은 모두 건강 치은보다 증가된 발현양상을 보였다.
3. 치주인대세포 및 HOS 세포주에서 NOS₁은 170 kDa, NOS₃는 140 kDa의 분자량을 확인할 수 있었으며 대조군과 cytokine 투여군은 translation level에서 변화를 보이지 않았다.
4. 치주인대세포와 HOS세포에서 NOS₂의 단백질발현은 117 kDa의 분자량을 보였고 TNF- α , IFN- γ , LPS단독 투여보다 3가지 혼합투여가 synergistic effect를 보였다.
5. cytokine자극에 따른 NOS₁, NOS₃ 단백질 발현은 시간증가에 따라 큰 차이가 없었으

나 NOS₂의 단백발현은 시간에 따라 증가를 보여 24시간에서 가장 많은 발현을 보였다.

6. 치주인대세포에 NOS의 억제자인 NMA를 투여한 경우 제1형 교원질단백발현은 NMA농도 증가에 따른 차이가 없이 유사한 정도의 발현을 보였으나, osteonectin의 경우는 NMA 농도에 비례하여 발현이 감소되었다
7. NMA와 arginine을 동시투여의 경우 arginine 농도증가에 따른 제1형 교원단백 발현은 차이가 없었으며 NMA의 osteonectin 발현억제효과가 L-arginine에 의해 dose-dependant하게 역전되었다.
8. SNP를 혼합투여한 경우에는 NMA에 의한 nitrate 생성억제 및 세포활성이 감소되었고 NMA와 NOS 자극원인 Arginine의 혼합투여시 SNP와 Arginine 농도증가에 따라 nitrate 생성 및 세포활성이 증가되었다.

이상과 같은 결과로 치주인대세포에 외인성으로 가해지는 NO가 세포증식효과 및 단백질 수준에서 골의 구성성분인 비교원단백의 증가를 보이며, 면역조직학적으로 NOS가 치주질환과 같은 염증성 골질환과 밀접한 관련이 있음은 치주질환에 의해 유도되는 cytokine에 NO가 조절역할을 하는 것으로 사료된다.

VI. 참고문헌

1. Scherp HW. Discussion of bacterial factors in periodontal disease. J Dent Res 1962 ; 41 : 327-330.
2. Masada MP, Persoon R, Kenny JS, Lee SW, page RC, Allison AC. Measurement of interleukin 1 in gingival crevicular fluid: implications for the pathogenesis of periodontal disease. J Periodontal Res 1990 ; 25 : 156-163.
3. Takada H, Mihara J, Morisaki I, Hamada. Induction of interleukin-1 and -6 human gingival fibroblast cultures stimulated by Bacteroides lipopolysaccharides Infect Immun 1991 ; 59 : 295-301.
4. Allison AC. Macrophage activation and nonspecific immunity. Int Rev Exp Pathol 1978 ; 18 : 304-309.
5. Babior BM. Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes. N Eng J Med 1978 ; 9 : 659-668.
6. Klebanoff SJ. Phagocytic cells: Production of oxygen metabolism in "Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates" Ed. Gallin JI, Goldstein IM, Snyderman R New York : Raven Press 1988 : 391-444.
7. Palmer RM, Ferrige JAG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxant factor. Nature 1987 ; 327 : 524-526.
8. Fishnan PS, Savitt JM. Selective localization by neuroglia of immunoglobulin G in normal mice. J Neuropathol Exp Neurol 1989 ; 48 : 212-218.
9. Higuchi MM, Higashi N, Taki, and Osawa T. Cytolytic mechanisms of activated macrophages. Tumor necrosis factor and L-arginine-dependent mechanisms act synergistically as the major cytolytic mechanisms of activated macrophages. J Immunol 1990 ; 144 : 1425- 1431.
10. Snyder SH, Brecht DS. Biological roles of Nitric Oxide. Scientific American 1992 ; May : 28 -48.

11. Suther DJ, Marletta MA. Induction of nitrite/nitrate synthesis in murine macrophages by BCG infection lymphokines or interferon- γ . *J Immunol* 1987 ; 139 : 518- 527
12. Hhibbs JB, Taintor RR, Vavrin Z. Macrophage cytotoxicity: Role for L-arginine deiminase and Imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science* 1987 ; 235 : 473- 476.
13. Zaidi M, Alam AS, Bax BE, Shankar VS, Bax CM, Gill JS, Pazianas M, Huang CL, Sahinoglu T, Moonga BS, Stevens CR, Blake DR. Role of the endothelia cells in osteoclast control: New perspectives. *Bone* 1993 ; 14 : 97-102.
14. Collin-Osdoby P, Nickols A, Osdoby P. Bone cell function, regulation, and communication: A role for nitric oxide. *J Cell Biochem* 1995a ; 57 : 399-408.
15. Hukkanen M, Hughes FJ, Buttery LDK, Gross SS, Evans TJ, Seddon S, Riveros-Moreno V, MacIntyre I, Polak J. Cytokine-stimulated expression of inducible nitric oxide synthetase by mouse, rat, and human osteoblast-like cells and its functional role in osteoblast metabolic activity. *Endocrinol* 1995 ; 136 : 5445-5453.
16. Kasten TP, Collin-Osdoby P, Patel N, Osdoby P, Siegel NR, Misko TP, Currie MG, Nickols GA. Potentiation of chicken osteoclast bone resorption activity by inhibition of nitric oxide synthase. *J Bone Miner Res* 1993 ; 8(suppl. 1) : 188.(abstract)
17. Damoulis PD, Hauschka PV. Cytokines induces nitric oxide production in mouse osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 1994 ; 201 : 924-931.
18. Stadler J, Stefanovic-Racic M, Billiar TR, Curran RD, Mcintyre LA, Georgescu HI, Simmons RL, Evans CH. Articular chondrocytes synthesize nitric oxide in response to cytokines and lipopolysaccharide. *J Immunol* 1991 ; 147 : 3915-3920.
19. Hibbs JB Jr, Taintor RR, Vavrin Z, Rachlin C. Nitric oxide. A cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem Biophys Res Commun* 1988 ; 157 : 87- 97.
20. Stuehr DJ, Nathan CF. Nitric oxide A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. *J Exp Med* 1989 ; 169 : 1543- 1548.
21. Knowles RG, Palacios M, Palmer RMJ, Moncada S. Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system. A transduction mechanism for stimulation of soluble guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989 ; 86 : 5159- 5162.
22. Lowenstein CJ, Snyder SH. Nitric Oxide, A Novel Biologic messenger. *Cell* 1992 ; 70 : 705- 717.
23. Drapier JC, Wietzerbin J, Hibbs JB. Interferon- γ and tumor necrosis factor induce the L-arginine-dependent cytotoxic effector mechanism in murine macrophages. *Eur J Immunol* 1988 ; 141 : 2407-2403
24. Akira S, Hirano T, Taga T, Kishimoto T. Biology of multifunctional cytokines: IL-6 and related molecules(IL-1 and TNF). *FASEB J.* 1990 ; 4 : 2860-2867.

25. Kishimoto T, Hirano T. Molecular regulation of B lymphocytes response. *Annu Rev Immunol*. 1988 ; 6 : 485-512.
26. Huleihel M, Douvdevani A, Segal S, Apte RN. Regulation of interleukin-1 generation in immune-activated fibroblasts. *Eur J Immunol*. 1990 ; 20 : 731-738.
27. Huleihel M, Douvdevani A, Segal S, Apte RN. Regulation of fibroblasts. *Eur J Immunol*. 1990 ; 20 : 731-739.
28. Kamagata Y, Miyasaka N, Inoue H, Hashimoto J, Iida M. Study of cytokine production in inflamed human gingival tissue in periodontitis. Interleukin-1 and tumor necrosis factor. *Jpn J Periodontol*. 1989 ; 31 : 843-848.
29. Kamagata Y, Miyasaka N, Inoue H, Hashimoto J, Iida M. Cytokine production in inflamed human gingival tissues-IL-6. *Jpn J periodontol*. 31 : 1081-1087.
30. Gowen M, Wood DD, Ihrie EJ, McGuire MKB, Russel RGG. An interleukin-1 like factor stimulates bone resorption in vitro. *Nature* 1983 ; 306 : 378-380
31. Bertoloni DR, Nedwin G, Bringman D, Smith D, Mundy GR. Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation in vitro by human tumor necrosis factor. *Nature* 1986 ; 319 : 516-519,
32. Suda T, Takahashi N, Martin TJ. Modulation of osteoclast differentiation. *Endocrinol Rev* 1992 ; 13 : 66-80.
33. Suda T, Udagawa N, Nakamura I, Miyaura C, Takahashi N. Modulation of osteoclast differentiation by local factors. *Bone* 1995 ; 17(2 Suppl S) : S87-S91.
34. Melcher AH. Periodontal ligament. In: Bhaskar SN ed. *Orban's oral histology and embryology*. 10th ed. Toronto: Mosby, 1986 : 204-239.
35. Clark RA. The human neutrophil respiratory burst oxidase. *J Infect Dis* 1990 ; 161 : 1140-1146
36. Babior BM. Oxygen dependent microbial killing by phagocytes. *N Engl J Med* 1978 ; 9 : 569-668.
37. Moncada S, Palmer RJJ, Higgs EA. Biosynthesis of the regulation of cell function and communication. *Biochem Pharmacol* 1989 ; 38 : 1709-1715.
38. Nathan CF, Stuehr DJ. Editorial. Dose endothelium derived nitric oxide have a role in cytokine-induced hypotension? *J Natl Canc Invest* 1980 ; 82 : 726-728.
39. Murray H, Szuro-Sudol A, Wellher D, Oca J, Granger A. Role of tryptophan degradation in respiratory burst-independent antimicrobial activity of gamma interferon-stimulated human macrophages. *Infect Immun* 1989 ; 57 : 847-849.
40. Byrd T, Horwitz M. Interferon gamma-activated human monocytes down regulate transferrin receptors and inhibit the intracellular multiplication of *Legionella pneumophila* by limiting the availability of iron. *J Clin Invest* 1989 ; 83 : 1457-1465.
41. Nathan CF. Macrophage microbicidal mechanisms. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1983 ; 77 : 620-630.
42. Stuehr DJ, Marletta MA. Induction of nitrite/nitrate synthesis in murine macrophages by BCG infection,

- lymphokines, or interferon- γ . *J Immunol* 1987 ; 139 : 518-525.
43. Nathan C, Btukner L, Kaplan G, Unkeless J, Cohn JA. Role of activated macrophages in antibody-dependent lysis of tumor cell. *J Exp Med* 1979 ; 149 : 100-113.
 44. Drapier JC, Wietzerbin J, Hibbs JB Jr. Interferon- γ and tumor necrosis factor induce the L-arginine-dependent cytotoxic effector mechanism in murine macrophages. *Eur J Immunol* 1988 ; 18 : 1587-92.
 45. MacIntyre I, Zaidi M, Alam ASMT, Datta HK, Moonga BS, Lidbury PS, Hecker M, Vane JR. Osteoclastic inhibition: an action of nitric oxide not mediated by cGMP. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991 ; 88 : 2936-2940.
 46. Kasten T, Collin-Osdoby P, Patel N, Osdoby P, Krukowski M, Misko T, Settle S, Currie M, Nickols A. Potentiation of osteoclast bone resorptive activity by inhibition of nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994 ; 91 : 3569-3573.
 47. Davidovitch Z, Nicolay OF, Ngan PW, Shanfeld JL. Neurotransmitters, cytokines, and the control of alveolar bone remodeling in orthodontics. *Dental Clinics North Am* 1988 ; 32 : 411-435
 48. Marietta MA. Nitric oxide synthetase: aspects concerning structure and catalysis. *Cell* 1994 ; 78 : 927-930.
 49. Nathan C, Xie QW. Nitric oxide synthetase: roles , tools and conrols. *Cell* 1994 ; 78 : 915-918
 50. Lowenstein CJ, Dinerman JL, Snyder SH. Nitric oxide: A physiologic messenger: *Ann. Intern Med* 1994 ; 120 : 227-237.
 51. Griffith OW, Stuehr DJ. Nitric oxide synthases: Properties and catalytic mechanisms. *Ann Rev Physiol* 1995 ; 57 : 707-736.
 52. Rief DW, McCreedy SA. N-nitro-L-arginine and N-monomethyl- L-arginine exhibit a different pattern of inactivation toward the three nitric oxide synthases. *Arch Biochem Biophys* 1995 ; 320 : 170-176.
 53. Moncada S, Palmer R, Higgs EA. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Biol* 1991 ; 54 : 171-178.
 54. Horton JE, Raisz LG, Simmons HA, Oppenheim JJ, Mergenhagen SE. Bone resorbing activity in supernatant fluid from human peripheral blood leukocytes. *Science* 1972 ; 177 : 793-794.
 55. Rizzo AA, Mergenhagen SE. Histopathologic effects of endotoxin injected into rabbit oral mucosa. *Arch Oral Biol* 1964 ; 9 : 659-670.
 56. Klein DC, Raisz LC. Prostaglandin: Stimulation of bone resorption in tissue culture. *Endocrinology* 1970 ; 86 : 1436-1439.
 57. Morrison DC, Cuncan JJ, Goodman SA. In vitro biological activities of endotoxin. In *Bacterial Endotoxin*, pp., Alan R. Liss, Inc. 1985 ; 81-98.
 58. Morrison DC, Ulevitch R J. A Review- The interaction of bacterial endotoxins with cellular and humoral mediation system. *Am J Path* 1978 ; 93 : 527-618.
 59. Nathan CF, Hibbs JB. Role of nitric

- oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr Opin Immuno* 1991 ; 1 : 65-70.
60. Keller R. Cytostatic elimination of synergistic rat tumor cells in vitro by nonspecifically activated macrophages. *J Exp Med* 1973 ; 188 : 625-644
61. Granger DL, Taintor RR, Cook JL, Hibbs JB Jr. Injury of neoplastic cells by murine macrophages leads to inhibition of mitochondrial respiration. *J Clin Invest* 1980 ; 65 : 357-70.
62. Riancho JA, Salas E, Zarrabeitia MT, Olmos JM, Amado JA, Fernandez LJL, Gonzalez M J. Expression and functional role of nitric oxide synthase in osteoblast-like cells. *J Bone Min Res* 1995 ; 10 : 439-446.
63. 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 : 1465-1472.
64. Damoulis PD, Hauschka P. Cytokines induce nitric oxide production in mouse osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 1994 ; 201 : 924-931.
65. Ralston SH, Todd D, Helfrich M, Benjamin N, Grabowski PS. Human osteoblast-like cells produce nitric oxide and express nitric oxide synthase. *Endocrinol* 1994; 135 : 330-336.
66. Ralston SH, Ho L-P, Helfrich M, Grabowski PS, Johnston PW, Benjamin N. Nitric oxide: A cytokine-induced regulator of bone resorption. *J Bone Min Res* 1995 ; 10 : 1040-1049.
67. Sunyer T, Rothe L, Jiang X-S, Osdoby P, Collin-Osdoby P. Pro-inflammatory agents, IL-8 and IL-10 upregulate inducible nitric oxide synthase and nitric oxide production in avian osteoclast-like cells. *J Cell Biochem* 1996 ; 60 : 469-483.

An Experimental Study on the Biological Specificity of Nitric Oxide and Nitric Oxide Synthetase in Periodontium-Related Cells

Hyung-Jin Yoon, Dong-Whan Yoon, Hyung-Keun You, Hyung-Shik Shin
Dept. of Periodontology, College of Dentistry, Wonkwang University

Bone remodeling is characterized by the coupling of osteoclast-mediated bone resorption and osteoblast-mediated bone formation. The process is tightly regulated at the local level by an incompletely known network of peptide and non-peptide factors. Nitric oxide(NO), synthesized by nitric oxide synthetase(NOS) from L-arginine, is becoming recognized as an important bio-regulatory molecule in a variety of tissue, but little is known about its possible role in periodontal tissue.

The purpose of this study is to investigate the expression of nitric oxide synthetase(NOS) in inflamed gingiva and the effects of cytokine on the expression of NOS protein. The expression of NOS in gingival tissue was evaluated by immunohistochemical staining for NOS₁, NOS₂, NOS₃. The effect of cytokine on the expression of NOS in human periodontal ligament cells and osteoblast-like HOS cells by western blot analysis. Further, we studied that NO functions in periodontal ligament cells as a regulatory molecule. PDL cells incubated with NOS inhibitor and donor. The protein expression, type I collagen & non-collagenous protein, nitrate production and cell proliferation were evaluated

The results were as follows.

1. NOS₁, NOS₂, NOS₃ was rarely distributed in healthy gingiva, but stronger stained in gingival epithelium, endothelial cells, and mononuclear cells of inflamed gingiva. .
2. The cytokine stimulated NOS₁, and NOS₃ protein were not inducing or inhibitory effect to compared with control in PDL and HOS cells.
3. Incubation of cells with combination of TNF- α , IFN- γ , LPS result in a time dependant increase in NOS₂ expression, reaching a maximal level after 24 hours of stimulation.
4. The osteonectin protein inhibitory effect of NMA, inhibitor of NOS, was reversed by L-arginine in dose dependant manner.
5. NMA decreased cell proliferation and nitrate production, but the inhibitory effect of NMA was also prevented by the NO donor, sodium nitroprusside.

These results suggest that exogenously synthesized NO was playing a stimulating effect on cell

proliferation or on non-collagenous protein expression. Therefore NO have an important role in mediation of localized bone destruction associated inflammatory bone disease such as periodontitis