

A Study on the Mechanism of Oxidative Stress, Screening of Protective Agents and Signal Transduction of Cell Differentiation in Cultured Osteoblast and Osteoclast Damaged by Reactive Oxygen Species

Seung-Taeck Park[†] and Seung-Ho Jeon

Department of Anatomy, School of Medicine, Wonkwang University, Jeonbuk 570-749, Korea

It is well known that oxidative stress of reactive oxygen species (ROS) may be a causative factor in the pathogenesis of bone disorder on osteoblast or osteoclast. The purpose of this study was to evaluate the cytotoxicity of oxidative stress, protective effect of glutamate receptor antagonist against ROS-induced osteotoxicity, secretion of tumor necrosis factor (TNF)- α and the expression of c-fos gene in the cultured rat osteoblasts and osteoclasts. Cell viability by MTS assay or INT assay, activity of glutathione peroxidase (GPx), lipid peroxidation (LPO) activity, protein synthesis by sulforhodamine B (SRB) assay, alkaline phosphatase (ALP) activity, lactate dehydrogenase (LDH) activity, MTS assay for NMDA (N-methyl-D-aspartate) receptor antagonist or AMPA/kainate receptor antagonist, measurement for TNF- α , and c-fos gene expression were performed after these cells were treated with or without various concentrations of xanthine oxidase (XO), hypoxanthine (HX), D-2-amino-5-phosphonovaleric acid (APV), 7-chlorokynurenic acid (CKA), 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX) and 6,7-dinitroquinoxaline-2,3-dione (DNQX), respectively. In this study, XO/HX showed decreased cell viability and glutathione peroxidase (GPx) activity, but it showed increased LPO activity, TNF- α secretion and c-fos expression. APV and CKA increased protein synthesis and ALP activity. While, CNQX or DNQX did not show any protective effect in LDH activity or cell viability. From these results, XO/HX showed cytotoxic effect in cultured rat osteoblast or osteoclast, and also NMDA receptor antagonist such as APV or CKA was effective in blocking XO/HX-induced osteotoxicity in these cultures.

Key Words: Reactive oxygen species, Osteoblast, Osteoclast

서 론

골아세포와 파골세포는 골조직에서 골형성과 파괴에 관여하는 세포로서 골대사의 주된 역할을 하고 있으며 만일 이들의 대사에 균형이 깨뜨려지면 골형성이나 골흡수에 불균형이 일어나 결국 골다공증이나 골절, 골비대과 같은 현상을 유발하게 된다 (Takahashi et al., 1988; Hong et al., 2002). 최근 의학의 발달로 노인인구가 크게 증가하였으며 이로 인해 골다공증이나 노인성 치매와 같은 질환발병의 빈도를 증가시킴으로서 노인성 질환은 사회적 문제를 야기하게 되었으며 또한 서구식 생활의 습관은 오히려 대장암이나 당뇨와 같은 만성난치성 질환의 발병을 증가를 초래시킨 결과를 낳게

되었다 (McCall, 1992; Camerone et al., 1993). 이중 골다공증은 노인들에서 뿐만 아니라 폐경기 여성에 있어서도 골밀도의 감소로 인한 골다공증의 증가추세에 있어 세계 각국은 이의 예방이나 치료에 있어 정책적으로 막대한 비용을 지원하고 있다 (Mosmann, 1983; Hong et al., 2002). 최근 골다공증의 병인의 하나로 활성산소가 제시되면서 활성산소의 산화적 측면에서 골다공증의 치료적 접근을 시도하고 있다 (Takahashi et al., 1988; Pellegrini-Giampietro et al., 1990). 특히, 골다공증은 다양한 인자들이 관여하고 있기 때문에 이의 예방이나 치료 또한 어려움이 따르는데 지금까지 알려진 이의 병리적 요인으로 알콜과 같은 유기용매를 비롯하여 호르몬의 대사 이상, 코카인, 독성물질, 중금속 등이 알려져 있다 (Borenfreund et al., 1988; Hong et al., 2002). 활성산소는 산소라디칼을 매개로 세포막의 지질과산화반응을 비롯하여 세포내 항산화제인 glutathione을 비롯하여 catalase, superoxide dismutase (SOD)의 활성감소를 비롯하여 (Kim et al., 1991; Park, 1995), 세포에 존재하고 있는 N-methyl-D-aspartate (NMDA) 수용체의 과활성을 비롯하여 (Dumuis et al., 1988; Park, 1995), 이와

* 논문 접수: 2005년 8월 12일
수정재접수: 2005년 9월 25일

[†] 교신저자: 박승택, (우) 570-749 전북 익산시 신룡동 344-2,
원광대학교 의과대학 해부학교실
Tel: 063-850-6859, Fax: 063-255-2874
e-mail: stpark@wonkwang.ac.kr

연관된 세포내 칼슘유입, Ca^{2+} -dependent protein kinase C (PKC) 활성화, c-fos나 cAMP, cGMP, G-protein과 같은 신호전달체계의 활성화, 세포의 성장이나 분화에 관여하는 효소활성 및 cytokine의 분비와 대사 등에 영향을 줌으로서 결국 세포의 고사나 사멸을 초래한다고 한다 (Kontos et al., 1985; Jain, 1989; Uemura et al., 1991). 따라서 활성산소의 산화적 손상은 흥분성아미노산과 함께 세포사멸의 기전으로 밝혀졌으며 이의 방어를 위하여 항산화제를 비롯하여 칼슘저해제, 산소라디칼제거제, 성장인자 등이 효과적인 것으로 보고된 바 있다 (Halliwell, 1992; Jang et al., 1995). 근래에 세포 배양기술이 널리 보급되면서 각종 세포를 시험관 내에서 대량으로 배양하면서 실험목적에 부합된 배양세포를 이용하여 병변의 손상모델을 제작한 다음 이들의 병리적 요인이나 작용현상 등에 대한 기전규명은 물론 이를 이용한 병변의 치료적 접근을 시도함으로써 효과적인 치료약제의 개발과 획기적인 치료방법의 확립을 위하여 꾸준히 연구를 시도하고 있다 (Mosmann, 1983; Niki et al., 1984; Hohman et al., 1989; Bracco et al., 1991). 본 연구는 활성산소가 골아세포와 파골세포에 미치는 영향과 활성산소의 산화적 손상과 이에 대한 glutamate 수용체 길항제의 영향을 조사하기 위하여, 백서의 골아세포와 파골세포를 배양한 후 xanthine oxidase (XO)와 hypoxanthine (HX)의 독성효과에 대하여 정량적 분석을 비롯하여 TNF- α , c-fos 발현을 조사하였으며 동시에 XO/HX의 세포독성에 대한 NMDA 수용체와 AMPA/kainate 수용체 길항제에 대한 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 세포배양

골아세포와 파골세포의 분리는 변형된 Takahashi et al. (1988)의 방법에 따라 시행하였다. 생후 3 일된 백서에서 적출한 태퇴골을 0.25% trypsin이 포함된 phosphate buffered saline (PBS)으로 처리한 후 36°C, 5% CO₂/95% air로 조절된 항온기 내에서 배양하였다. 배양 완료 후 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco)이 포함된 Eagle's minimum essential medium (EMEM, Gibco)으로 3 회 세척 후 Pasteur 피펫으로 세포를 분리시켰다. 분리된 세포들은 poly-L-lysine (Sigma)으로 전 처리된 96-multiwell에 3×10⁶ cells/well의 밀도로 세포를 분주하였다. 분주된 세포는 3 일 간격으로 새로운 배양액으로 교환하여 주었으며 10 일 동안 배양 후 본 실험에 사용하였다.

2. 약제제조

본 실험에서 사용한 약제인 xanthine oxidase (XO, Sigma)는 1 U/ml, 100 mU/ml, 10 mU/ml 및 1 M, 100 mM, 10 mM의 저장액을, hypoxanthine (HX, Sigma), D-2-amino-5-phosphono-

valeric acid (APV, Sigma), 7-chlorokynurenic acid (CKA, Sigma), 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX, Sigma, St. Louis, MO) 및 6,7-dinitroquinoxaline-2,3-dione (DNQX, Sigma, St. Louis, MO)는 각각 1 M, 100 mM, 10 mM의 저장액을 만들어 냉암소에 보관 후 실험당일 최종 농도로 희석하여 사용하거나 직접 필요한 양을 배양액에 첨가하여 사용하였다.

3. XO/HX의 노출

XO/HX가 골아세포와 파골세포에 미치는 영향을 조사하기 위하여 일정 시간 배양중인 세포를 0.6% D-glucose가 포함된 minimum essential medium (MEM, Gibco)으로 3 회 세척 후 0.1 mM HX에 여러 농도의 XO가 포함된 배양액 내에서 신경세포를 1~7 시간 동안 배양한 후 XO/HX가 세포에 미치는 독성효과를 조사하였다.

4. Glutamate 수용체 길항제의 처리

일정 시간 동안 배양이 완료된 골아세포와 파골세포를 PBS로 3 회 세척한 다음 20~50 μ M의 농도로 각각 포함된 APV, CKA, CNQX, DNQX에서 각각 2 시간 동안 전처리한 다음 이를 20 mU/ml XO/0.1 mM HX에 5 시간 동안 노출시킨 후 이의 영향을 조사하였다.

5. 세포생존을 분석

2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTS, Sigma, St. Louis, Mo) 분석과 INT (p-iodonitrotetrazolium violet (INT, Sigma, St. Louis, Mo) 분석은 골아세포와 파골세포를 일정 시간 배양 후 PBS로 3 회 수세한 다음 well당 최종 농도가 50 μ l 씩 되도록 MTS나 INT를 넣어 각각 3 시간과 4 시간 동안 항온기에서 배양하였다. 배양 완료 후 ELISA reader를 이용하여 각각 203 nm와 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

6. Glutathione peroxidase (GPx) 활성 측정

1 mM EDTA가 함유된 0.1 M 인산완충액에 100 μ l glutathione reductase와 시료, 10 mM GSH을 넣은 후 Na₂S₂O₈를 첨가하여 37°C에서 반응시켰다. 반응 완료 후 흡광도계로 340 nm에서 3 분 동안 NADPH의 농도변화를 측정하였다. 단위는 분당 산화된 NADPH 1 μ mole을 1 unit의 효소활성으로 하였다.

7. 지질과산화물 (LPO) 함양 측정

지질과산화물의 함량은 thiobabutaric acid (TBA)법에 의하여 측정하였다. 즉, 배양액의 균질액인 0.1 ml에 0.1% sodium dodecylsulfate 용액 0.2 ml, 20% acetic acid와 tribabutaric acid를 동량으로 섞어 잘 혼합한 후 95°C에서 1 시간 동안 반응시켰다. 반응 완료 후 n-butanol과 pyridine에 다시 반응시킨

Table 1. Effect of xanthine oxidase (XO)/hypoxanthine (HX) on glutathione peroxidase (GPx) activity

XO/HX (mU/ml/mM)	Glutathione peroxidase (U/mg/protein)	
	Osteoblast	Osteoclast
Control	3.12±0.09	2.36±0.06
20	2.23±0.05*	1.73±0.02*

Cells were incubated with 20 mU/ml xanthine oxidase (XO) and 0.1 mM hypoxanthine (HX) for 5 hours. These results indicate the mean ± SD for 6 experiments. **P*<0.05

다음 800 x g에서 원침시킨 다음 분광광도계로 532 nm에서 흡광도를 측정하였다.

8. SRB (sulfohodamine B) 측정

일정 시간 동안 배양한 골아세포나 파골세포를 PBS로 3~4 회 세척 후 0.4% SRB를 well당 200 µl 씩 첨가하여 실온에서 1 시간 동안 방치한 다음 10 mM Tris buffer로 결합된 protein stain을 녹인 다음 ELISA reader로 측정하여 대조군과 비교 조사하였다.

9. ALP 활성 분석

ALP의 활성 분석은 Sigma kit를 사용하여 측정하였다. 즉, 배양중인 골아세포나 파골세포 20 µl를 4 mM Mg²⁺, man-nitol 274 µM, buffer (pH 10.2)가 함유된 Sigma 용액에 잘 혼합하여 30°C에서 1~2분 동안 반응시킨 다음 흡광광도계를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 단백질의 측정은 Sigma kit로 측정하였으며 이 때 ALP 활성은 nmol/min/mg protein으로 표시하였으며 이를 백분율로 환산하였다.

10. LDH 활성 분석

세포를 일정 시간 약제에 처리한 후 배양액 내의 LDH 활성을 LDH kit (Atron lab, Japan)에 의하여 측정하였다. 즉, LDH kit의 효소기질액 1.0 ml와 검액인 용액을 넣어 37°C에서 잘 혼합하였다. 혼합 10 분 후에 3.0 ml 회색반응정지액을 넣어 반응을 멈춘 다음 분광광도계로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소활성은 환원된 nicotinamide adenine dinucleotide (NADH)로 표시하였으며 백분율로 환산하였다.

11. TNF-α 활성 측정

TNF-α의 분석은 변형된 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)에 의하여 분석한다. 즉, 세포를 PBS로 3~4회 세척 후 rabbit anti-TNF-α와 phosphatase-conjugated goat anti-rabbit IgG (Cambridge, MA)와 반응시킨 다음 405 nm에서 흡광도를 측정한다.

Table 2. Effect of xanthine oxidase (XO)/hypoxanthine (HX) on the content of lipid peroxidation (LPO)

XO/HX (mU/ml/mM)	MDA content (nmole/g)	
	Osteoblast	Osteoclast
Control	47.3±0.64	41.6±0.54
20	83.4±0.98**	68.7±0.72*

Cells were incubated with 20 mU/ml xanthine oxidase (XO) and 0.1 mM hypoxanthine (HX) for 5 hours. These results indicate the mean ± SD for 6 experiments. **P*<0.05; ***P*<0.01

12. c-fos 측정

세포를 분쇄하여 단백질을 추출한 후 이를 정량하였으며 정량 완료 후 well당 50 µg 씩 loading한 다음 SDS gel에 용출시켜 이를 blocking 하였다. NC membrane은 monoclonal anti-c-fos (Oncogene Science)로 1 시간 동안 실온에서 방치시킨 후 이를 다시 biotinylated된 이차항체에 반응시키고 난 다음 NC membrane은 enhanced chemiluminescence kit를 이용하여 반응시키고 X-ray 필름에 감광한 후 관찰하였다.

결 과

1. Glutathione peroxidase (GPx) 활성 조사

20 mU/ml XO/0.1 mM HX가 포함된 배양액에서 백서의 골아세포와 파골세포를 5 시간 동안 노출시킨 후 GPx의 활성을 분석한 결과 골아세포에서는 대조군인 100% (3.12±0.09 U/mg/protein)에 비하여 XO/HX 처리에서는 71.5% (2.23±0.05 U/mg/protein) (*P*<0.05)로 나타났으며 파골세포에서는 GPx 활성이 대조군인 100% (2.36±0.06 U/mg/protein)에 비하여 73.3% (1.73±0.02 U/mg/protein) (*P*<0.05)로 나타났다 (Table 1).

2. 지질과산화물 (LPO) 함량 측정

20 mU/ml XO/0.1 mM HX가 포함된 배양액에서 백서의 골아세포와 파골세포를 5 시간 동안 노출시킨 후 LPO의 함량을 분석한 결과 골아세포에서는 대조군인 100% (47.3±0.64 nmol/g)에 비하여 XO/HX 처리에서는 176.3% (83.4±0.98 nmol/g) (*P*<0.01)로 나타났으며 파골세포에서는 LPO의 함량이 대조군인 100% (41.6±0.54 nmol/g)에 비하여 165.1% (68.7±0.72 nmol/g) (*P*<0.05)로 나타났다 (Table 2).

3. 세포생존율 측정

1) MTS 정량

XO/HX에 대한 세포생존율을 조사하기 위하여 0.1 mM HX에 XO가 5~40 mU/ml의 농도로 각각 포함된 배양액에서 골아세포를 5 시간 동안 배양한 결과 세포생존율이 5 mU/

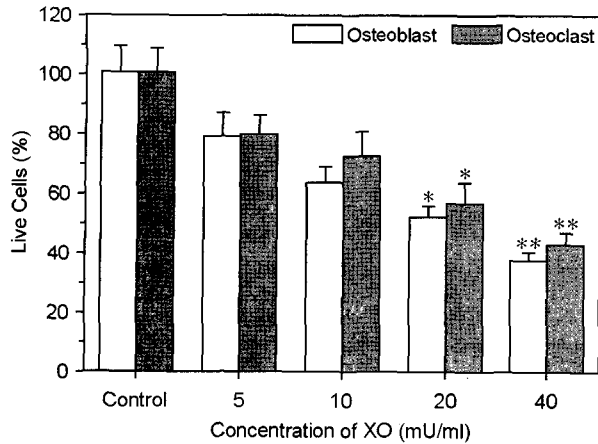


Fig. 1. Dose-dependent response relationship of xanthine oxidase (XO) in cultured osteoblasts and osteoclast of rat. Cytotoxicity was measured by MTS assay. The results indicate the mean \pm SD for 6 experiments. * $P<0.05$; ** $P<0.01$

m에서 처리한 경우 대조군에 비하여 78%로 나타났으며 10 mU/ml XO시간 배양에서는 63%로 나타났다. 또한 20 mU/ml와 40 mU/ml XO 처리에서는 각각 51% ($P<0.05$) 및 37% ($P<0.01$)로 나타났다. 한편, 파골세포의 경우 세포생존율이 5 mU/ml에서 처리한 경우 대조군에 비하여 79%로 나타났으며 10 mU/ml XO시간 배양에서는 72%로 나타났다. 또한 20 mU/ml와 40 mU/ml XO 처리에서는 각각 56% ($P<0.05$) 및 42% ($P<0.01$)로 나타났다 (Fig. 1).

2) INT 정량

XO/HX에 대한 세포생존율을 조사하기 위하여 0.1 mM HX에 XO가 10~60 mU/ml의 농도로 각각 포함된 배양액에서 골아세포를 5 시간 동안 배양한 결과 세포생존율이 10 mU/ml에서 처리한 경우 대조군에 비하여 83%로 나타났으며 20 mU/ml XO시간 배양에서는 72%로 나타났다. 또한 40 mU/ml와 60 mU/ml XO 처리에서는 각각 47% ($P<0.05$) 및 25% ($P<0.01$)로 나타났다. 한편, 파골세포의 경우 세포생존율이 10 mU/ml에서 처리한 경우 대조군에 비하여 75%로 나타났으며 20 mU/ml XO시간 배양에서는 62%로 나타났다. 또한 40 mU/ml와 60 mU/ml XO 처리에서는 각각 52% ($P<0.05$) 및 31% ($P<0.01$)로 나타났다 (Fig. 2).

4. 단백질합성 측정

파골세포와 골아세포를 각각 20 mU/ml XO/0.1 mM HX에 5 시간 동안 처리하기 전에 NMDA 수용체 길항제인 APV와 CKA를 20 μ M 농도에서 각각 2 시간 동안 전처리한 후 SRB assay에 의해 각각 단백질합성에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과 골아세포의 경우 XO/HX만의 처리에서는 단백질합성이 대조군에 비하여 37.4%로 나타났는데 비하여 APV 처리에서는 79.6%로 나타나 이는 XO/HX만의 처리에

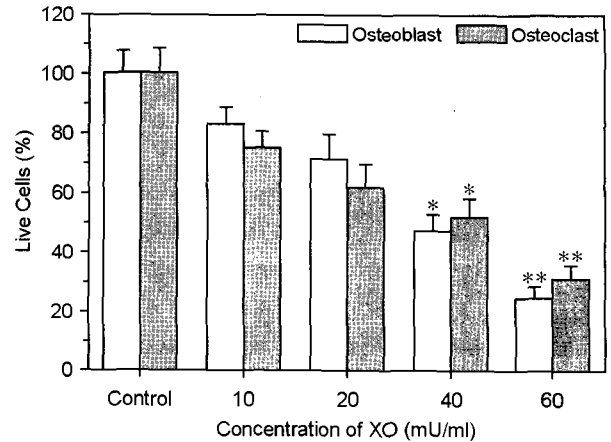


Fig. 2. Time-dependent response relationship of xanthine oxidase (XO) in cultured osteoblasts and osteoclast of rat. Cytotoxicity was measured by INT assay. The results indicate the mean \pm SD for 6 experiments. * $P<0.05$; ** $P<0.01$

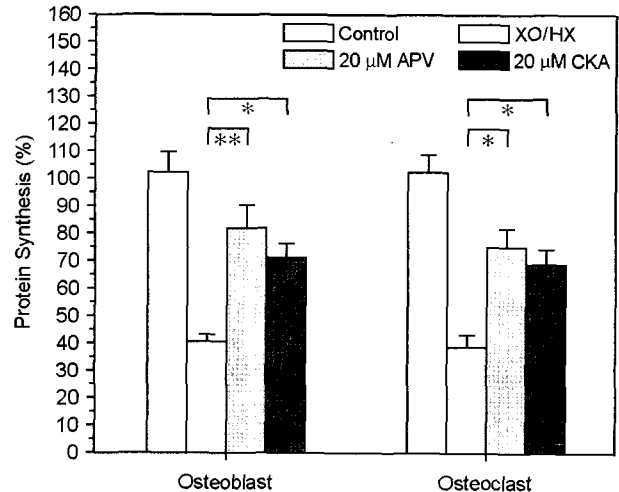


Fig. 3. Dose-dependent response relationship of NMDA receptor antagonists in protein synthesis. Cells were treated with 20 μ M APV or 20 μ M CKA before treatment of 20 mU/ml xanthine oxidase (XO)/0.1 mM hypoxanthine (HX) for 5 hours. The results indicate the mean \pm SD for 6 experiments. * $P<0.05$; ** $P<0.01$

비하여 유의한 증가를 나타냈으며 ($P<0.01$), CKA의 처리에서는 68.5%로 나타나 이 역시 XO/HX만의 처리에 비하여 유의한 증가를 나타냈다 ($P<0.05$). 한편, 파골세포에 있어서는 XO/HX만의 처리에서는 단백질합성이 대조군에 비하여 34.7%로 나타났는데 비하여 APV 처리에서는 72.1%로 나타나는 XO/HX만의 처리에 비하여 유의한 증가를 나타냈다 ($P<0.05$). 또한 CKA의 처리에서는 65.9%로 나타남으로서 XO/HX만의 처리에 비하여 유의한 증가를 나타냈다 ($P<0.05$) (Fig. 3).

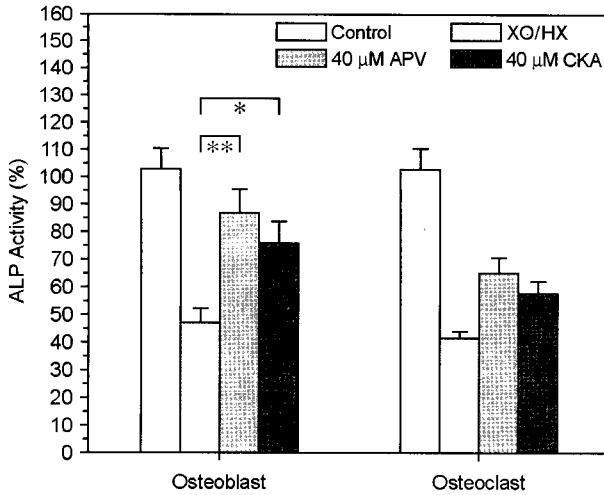


Fig. 4. Dose-dependent response relationship of NMDA receptor antagonists in ALP activity. Cells were treated with 40 μM APV or 40 μM CKA before treatment of 20 mU/ml xanthine oxidase (XO)/0.1 mM hypoxanthine (HX) for 5 hours. The results indicate the mean ± SD for 6 experiments. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

5. ALP 활성 측정

파골세포와 골아세포를 각각 20 mU/ml XO/0.1 mM HX에 5 시간 동안 처리하기 전에 NMDA 수용체 길항제인 APV와 CKA를 40 μM 농도에서 각각 2 시간 동안 전처리한 후 ALP 활성에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과 골아세포의 경우 XO/HX만의 처리에서는 ALP 활성이 대조군에 비하여 41.4%로 나타났는데 비하여 APV 처리에서는 82.8%로 나타나 이는 XO/HX만의 처리에 비하여 유의한 증가를 나타냈으며 ($P < 0.01$), CKA의 처리에서는 71.9%로 나타나 이 역시 XO/HX만의 처리에 비하여 유의한 증가를 나타냈다 ($P < 0.05$). 한편, 파골세포에 있어서는 XO/HX만의 처리에서는 단백질 합성이 대조군에 비하여 35.6%로 나타났는데 비하여 APV 처리에서는 60.6%로 나타났는데 비하여 CKA의 처리에서는 53.0%로, APV와 CKA 처리에서는 XO/HX만의 처리에 비하여 다소 증가하였으나 유의성은 없었다 (Fig. 4).

6. LDH 활성 측정

파골세포와 골아세포를 각각 20 mU/ml XO/0.1 mM HX에 5 시간 동안 처리하기 전에 AMPA/kainate 수용체 길항제인 CNQX와 DNQX를 30 μM 농도에서 각각 2 시간 동안 전처리한 후 LDH 활성에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과 골아세포의 경우 XO/HX만의 처리에서는 LDH 활성이 대조군에 비하여 145.8%로 나타났는데 비하여 CNQX 처리에서는 121.2%로 나타났으며, DNQX의 처리에서는 134.6%로 나타났다. 한편, 파골세포에 있어서는 XO/HX만의 처리에서는 LDH 활성이 대조군에 비하여 151.3%로 나타났는데 비하여

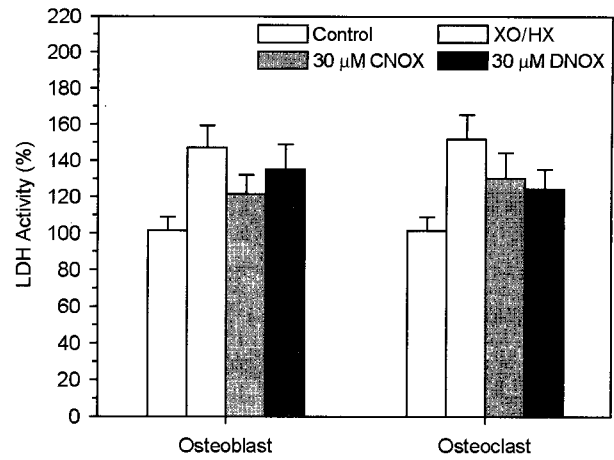


Fig. 5. Dose-dependent response relationship of AMPA/kainate receptor antagonists in LDH activity. Cells were treated with 30 μM APV or 30 μM CKA before treatment of 20 mU/ml xanthine oxidase (XO)/0.1 mM hypoxanthine (HX) for 5 hours. The results indicate the mean ± SD for 6 experiments.

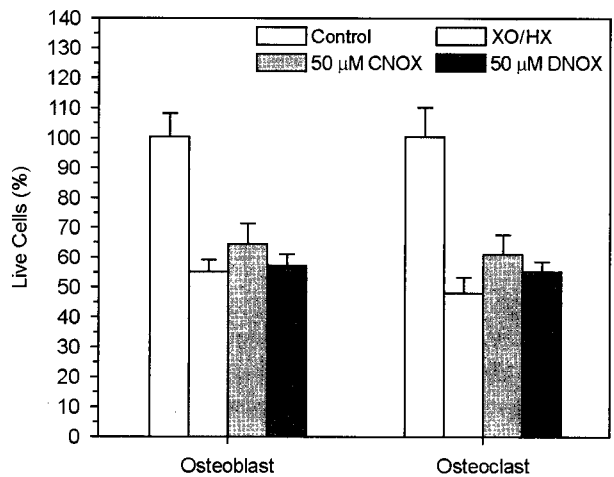


Fig. 6. Dose-dependent response relationship of AMPA/kainate receptor antagonists in cell viability by MTS assay. Cells were treated with 50 μM CNQX or 50 μM DNQX before treatment of 20 mU/ml xanthine oxidase (XO)/0.1 mM hypoxanthine (HX) for 5 hours. The results indicate the mean ± SD for 6 experiments.

CNQX 처리에서는 130.1%로, DNQX의 처리에서는 123.3%로 각각 나타났다 (Fig. 5).

7. 세포생존율 측정

XO/HX에 대한 세포생존율을 MTS assay에 의하여 조사하기 위하여 0.1 mM HX에 20 mU/ml XO가 포함된 배양액에서 골아세포를 5 시간 동안 처리하기 전에 CNQX나 DNQX 50 μM을 2 시간 동안 각각 전처리한 결과 XO/HX만의 처리에서는 세포생존율이 대조군에 비하여 53.5%로 나타났는데

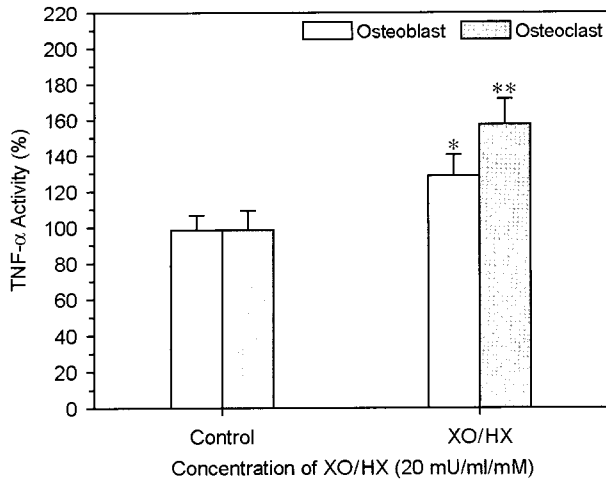


Fig. 7. Dose-dependent response relationship of xanthine oxidase (XO) and hypoxanthine (HX) in TNF- α activity. Cells were treated with 20 μ U/ml XO/0.1 mM HX for 2 hours. The results indicate the mean \pm SD for 6 experiments. * P <0.05; ** P <0.01

비하여 CNQX를 처리한 경우 62.4%로 나타났으며 또한 DNQX의 경우 세포생존율이 55.4%로 나타났다. 한편, 파골세포의 경우 XO/HX만의 처리에서는 세포생존율이 대조군에 비하여 46.2%로 나타났는데 비하여 CNQX를 처리한 경우 59.4%로 나타났으며 또한 DNQX의 경우 세포생존율이 53.1%로 나타났다 (Fig. 6).

8. TNF- α 활성 측정

XO/HX가 골아세포와 파골세포에서 TNF- α 의 활성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 20 μ U/ml XO/0.1 mM HX를 5 시간 동안 처리한 후 TNF- α 의 양적변화를 측정된 결과 골아세포에서는 대조군에 비하여 TNF- α 의 양적변화가 130.2%로 나타나 유의한 증가를 나타냈다 (P <0.05). 또한 파골세포에 있어서는 TNF- α 의 양적변화가 157.6%로 나타나 이 역시 대조군에 비하여 유의하게 증가하였다 (P <0.01) (Fig. 7).

9. c-fos 발현

XO/HX가 골아세포와 파골세포의 c-fos의 발현에 미치는 영향을 조사하기 위하여 각각의 세포에 20 μ U/ml XO/0.1 mM HX를 2 시간 동안 처리한 후 c-fos의 발현을 조사한 결과 골아세포와 파골세포에서 모두 c-fos의 발현이 나타났다 (Fig. 8).

고 찰

활성산소는 치매를 비롯하여 당뇨나 뇌졸중과 같은 각종 난치성 질환의 병인으로 밝혀지고 있다 (Cameron et al., 1993; Jang et al., 1995). 또한 활성산소와 골세포간의 연구에

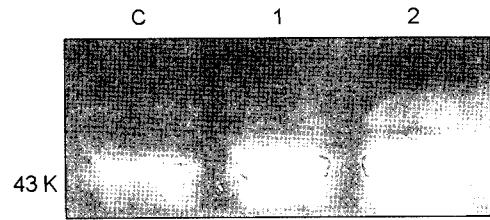


Fig. 8. c-fos expression in osteoblast and osteoclast. Cells were treated with 20 μ U/ml XO/0.1 mM HX for 2 hours. Lane 1 indicate control, lane 2, osteoblast and lane 3, osteoclast, respectively.

서 활성산소가 골다공증의 병인으로 밝혀지면서 골세포에 있어서 활성산소의 산화적 손상에 대한 연구가 진행되고 있다 (Takahashi et al., 1988; Hong et al., 2002). 따라서 본 연구에서는 활성산소가 골세포에 미치는 독성효과를 조사하기 위하여 백서의 골아세포와 파골세포에 0.1 mM hypoxanthine (HX)에 xanthine oxidase (XO)가 5~60 μ U/ml의 농도로 각각 포함된 배양액에서 5 시간 동안 배양한 결과 처리농도에 비례하여 골세포 모두에서 세포생존율을 유의하게 감소시켰다.

본 실험의 이 같은 결과는 XO/HX가 백서의 골세포에 독성효과를 가지고 있음을 증명하고 있으며 (Takahashi et al., 1988; Halliwell, 1992), 이러한 현상은 아마도 XO/HX가 골세포의 항산화계의 효소에 영향을 주어 효소의 활성저하에 의한 세포손상을 초래하였을 가능성이 클 것으로 생각된다 (Niki et al., 1984; Kim et al., 1991). 따라서 본 연구에서는 항산화효소의 하나인 glutathione peroxidase (GPx)의 활성에 미치는 XO/HX의 영향을 조사한 결과 20 μ U/ml XO/0.1 mM HX에서 5 시간 동안 처리한 결과 GPx의 활성을 감소한 것으로 나타났다. 이는 활성산소의 산화적 손상이 항산화계와 밀접한 관련이 있음을 증명하고 있다 (Jain, 1989). 한편, XO/HX가 골세포의 지질과산화물 (LPO)의 함량에 미치는 영향을 조사하기 위하여 20 μ U/ml XO/0.1 mM HX에서 골아세포와 파골세포를 5 시간 동안 처리한 결과 대조군에 비하여 골세포 모두에서 LPO의 함량이 현저히 증가하였다. 이는 산화적 손상이 지질과산화반응을 유도한다는 타 연구자의 결과와 일치함을 알 수 있었다 (Jain, 1989). 한편, NMDA 수용체 길항제인 APV와 CKA가 XO/HX의 산화적 손상에 대한 영향을 골세포를 대상으로 단백질합성과 ALP 활성에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과 20 μ M APV와 20 μ M CKA를 XO/HX의 처리전 2 시간 동안 전처리 한 결과 골세포 모두에서 XO/HX만을 처리하여 준 실험군에 비하여 유의한 단백질합성율의 증가를 보였다. 그러나, ALP 활성에 있어서는 파골세포보다 골아세포에 있어서 APV와 CKA가 유의한 ALP 활성의 증가를 나타냈다. 이러한 실험 결과는 XO/HX가 골세포의 단백질합성계와 ALP에 영향을 미침으로서 세포독성을 나타낸 것을 알 수 있었다 (Kontos et al., 1985; Borenfreund et

al., 1988). 또한 NMDA 수용체 길항제들은 XO/HX의 산화적 손상을 방어하는 약리활성을 가지고 있어 XO/HX의 손상으로 부터 세포를 보호한 것으로 생각된다 (Dumuis et al., 1988). 한편, AMPA/kainate 수용체 길항제가 XO/HX에 의해 손상되는 세포막에 대한 영향을 조사하기 위하여 30 μ M CNQX와 30 μ M DNQX를 20 mU/ml XO/0.1 mM HX를 골세포에 처리하기 2 시간 전에 전처리한 다음 이들이 LDH 활성에 미치는 영향을 조사한 바 골아세포와 파골세포 모두에서 XO/HX만의 처리에 비하여 다소 LDH의 활성을 감소하였으나 유의성은 나타나지 않았다. 따라서 본 실험의 결과는 세포막의 지질과산화작용에 NMDA 수용체가 AMPA/kainate 수용체보다 더욱 밀접한 관련이 있음을 제시하고 있다 (Dumuis et al., 1988; Jain, 1989). MTS assay에 의한 AMPA/kainate 수용체 길항제에 대한 세포생존율 조사에 있어서는 골아세포의 경우 XO/HX만의 처리가 대조군에 비하여 53.5%로 나타났는데 비하여 50 μ M CNQX와 DNQX에서 각각 62.4%와 55.4%로 나타나 다소 증가하였으나 유의성은 없었다. 또한 파골세포의 경우에서도 XO/HX만의 처리인 46.2%에 비하여 50 μ M CNQX와 DNQX에서 각각 59.4%와 53.1%로 나타나 다소 증가하였으나 유의성은 나타나지 않았다. 이러한 결과는 AMPA/kainate 수용체 길항제가 NMDA 수용체 길항제에 비하여 골아세포와 파골세포의 활성산소의 산화적 손상에 대한 방어효과가 동일하지 않음을 의미하고 있다. 한편, TNF- α 의 정량 분석에 있어서 20 mU XO/0.1 mM HX의 처리에서는 대조군에 비하여 골아세포와 파골세포에서 각각 130.2% ($P<0.05$)와 157.6% ($P<0.01$)로 유의하게 증가한 것으로 나타났다. 또한, c-fos 발현 조사에서 XO/HX로 처리된 골아세포와 파골세포에서 모두 발현이 나타났다. 본 실험결과는 XO/HX가 TNF- α 와 같은 cytokine이나 c-fos와 같은 세포내 신호 전달체계에 영향을 미친다는 것을 제시하고 있다 (Hohman et al., 1989; Uemura et al., 1991). 이상의 실험결과는 산화적 손상이 백서의 골세포에 세포독성을 가지고 있으며 또한 NMDA 수용체 길항제가 산화적 손상에 대한 방어효과를 나타냈음을 알 수 있었다.

감사의 글

이 논문은 2002년도 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구되었음 (KRF-2002-041-E00160).

REFERENCES

Borenfreund E, Babich H, Martin-Alguacil N. Comparisons of two in vitro cytotoxicity assays-the neutral red and tetrazolium MTT tests. *Toxic in Vitro*. 1988. 2: 1-6.
 Bracco F, Scarpa M, Rigo A, Battistin L. Determination of superoxide

dismutase activity by the polarographic method of catalytic currents in the cerebrospinal fluid of aging brain and neurologic degenerative diseases. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1991. 196: 36-41.
 Cameron NE, Cotter MA, Maxfield EK. Antioxidant treatment prevents the development of peripheral nerve dysfunction in streptozotocin-diabetic rats. *Diabetologia* 1993. 36: 299-304.
 Dumuis A, Sebben M, Haynes L, Pin J-P, Bockaert J. NMDA receptors activate the arachidonic acid cascade system in striatal neurons. *Nature* 1988. 336: 68-70.
 Halliwell B. Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem*. 1992. 59: 1609-1623.
 Hohman FM, Hinton DR, Johnson K, Merrill JE. Tumor necrosis factor identified in multiple sclerosis brain. *J Exp Med*. 1989. 170: 607-612.
 Hong GY, Park ST, Jeon BH, Seo EA. Effect of Ginseng Radix Against Osteoblasts Damaged by Endocrine Disrupting Chemicals. *Korean J Oriental Physicol Pathol*. 2002. 16: 338-342.
 Jain SK. Hyperglycemic can cause membrane lipid peroxidation and osmotic fragility in human red blood cells. *J Biol Chem*. 1989. 264: 21340-21345.
 Jang YJ, Park H, Kim HS, Hong HN, Kim MK. The role of increased oxidative stress in the development of diabetic nephropathy. *Korean J Pharmacol*. 1995. 31: 95-102.
 Kim YS, Kim SU. Oligodendroglial cell death induced by oxygen radicals and its protection by catalase. *J Neurosci Res*. 1991. 29: 100-106.
 Kontos H, Wei E, Ellis E, Jenkins L, Povlishock J, Rowe G, Hess M. Appearance of superoxide anion radical in cerebral extracellular space during increased prostaglandin synthesis in cat. *Cir Res*. 1985. 57: 142-151.
 McCall AL. The impact of diabetes on the CNS. *Diabetes* 1992. 41: 557-570.
 Mosmann T. Rapid colorimetric assay for the cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxic assays. *J Immun Methods* 1983. 65: 55-63.
 Niki E, Saito T, Kawakami A, Kamiya Y. Inhibition of oxidation of methyl linoleate in solution by vitamin E and vitamin C. *J Biol Chem*. 1984. 259: 4177-4182.
 Park ST. Study on the effect of iron-chelator on oxygen radical-induced neurotoxicity. *Korean J Phys Anthropol*. 1995. 8: 113-121.
 Pellegrini-Giampietro DE, Cherici G, Alesiani M, Carra V, Moroni F. Excitatory amino acid and free radical formation may

cooperate in the genesis of ischemia-induced neuronal damage. *J Neurosci.* 1990. 10: 1035-1041.

Takahashi N, Suda T. Osteoclast-like cell formation and its regulation by osteotropic hormones in mouse bone marrow cultures. *Endocrinology* 1988. 122: 1373-1382.

Uemura Y, Kowall NM, Moskowitz MA. Focal ischemia in rats causes time-dependent expression of c-fos protein immunoreactivity in widespread regions of ipsilateral cortex. *Brain Res.* 1991. 552: 99-105.
