

Effects of Interleukin-1 β , Tumor Necrosis Factor- α and Interferon- γ on the Nitric Oxide Production and Osteoclast Generation in the Culture of Mouse Bone Marrow Cells

Young-Man Kwon, Se-Won Kim*, and Seon-Yle Ko

Dept. of Oral Biochemistry and *Dept. of Dental Pharmacology, Dankook University, Cheonan, Choongnam, Korea

(Received May 12, 2006 ; Accepted June 1, 2006)

Nitric oxide (NO) is a labile, uncharged, reactive radical that functions as a sensitive mediator of intercellular communication in diverse tissues. It has been reported that NO is produced by osteoblast and these results may suggest that NO is integrally involved in the regulation of osteoclast formation and osteoclast resorption activity by osteoblastic cells. We examined the effect of cytokines on NO release by mouse bone marrow cell. We also examined the effects of cytokines and sodium nitroprusside (SNP) on the formation of osteoclast-like cell from mouse bone marrow cells in culture. Cytokines stimulated NO production of mouse bone marrow cells, and N-nitro-L-arginine methyl ester, a specific inhibitor of NO synthase, suppressed the cytokine-induced NO production. SNP showed dual action in the generation of osteoclasts. The addition of 30 μ M SNP inhibited the formation of tartrate resistant acid phosphatase (TRAP)(+) multinucleated cell, whereas lower concentration (3 μ M) of SNP enhanced it. Although the precise action of NO remains to be elucidated in detail, the action of NO in osteoclast generation in our studies seems to be associated, at least in part, with bone metabolism and bone pathophysiology.

Key words : IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , NO, osteoclast

*Corresponding author: Seon-Yle Ko, Dept. of Oral Biochemistry, School of Dentistry, Dankook University, San 29-1, Anseo-dong, Cheonan, Choongnam, Korea. 330-716, Tel.: +82-41-550-1934; Fax.: +82-41-552-7648; e-mail: syko@dku.edu

서 론

골조직은 일생 동안 흡수와 형성이 연계되어 일어나는 골개조 (bone remodeling)가 계속되며, 골격계의 구조와 기능은 전신적으로는 호르몬에 의하여, 국소적으로는 물리적인 힘, 성장인자 및 cytokine 등에 의하여 미세하게 조절된다 (Raisz, 1988). 특히 파골세포는 전구세포로부터 성숙한 파골세포로의 분화과정 동안 이러한 cytokine에 의해 많은 영향을 받는다 (Mundy와 Roodman, 1987).

파골세포는 골수내의 단핵구/대식세포 계통의 세포로부터 유래하고, 이 단핵전구세포는 혈액내로 순환되며 골내 막층에서 전구세포들이 증식되어 다핵세포를 형성하기 위해 융합되고 (Scheven 등, 1986), 골을 흡수한다. 미분 화세포로부터 파골세포로 성숙하는 과정에는 macrophage colony-stimulating factor (M-CSF)와 receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL)와 같은 두 가지 물질에 의존하여 생성되며 (Suda 등, 1992; Anderson 등, 1997), osteoprotegerin (OPG)에 의해서 파골세포의 생성이 차단된다 (Romas 등, 2002). 골다공증 (osteoporosis), 골조직내 Paget씨 병, 류마티스 관절염과 골조직 암의 전이 (bone metastasis) 등이 일어나는 경우 파골세포의 활성 증가가 나타난다.

활성화된 radical인 nitric oxide (NO)는 심혈관계와 신경계 그리고 면역계의 신호전달물질로서의 생리적 역할과 연관되어 있다 (Lowenstein과 Snyder, 1992). NO는 확산으로 세포막을 쉽게 통과하여 작용을 나타낼 뿐 아니라 인접 세포내에 도달하여 다양한 기능을 가지는 물질로 알려져 있다 (Ignarro, 1990). NO는 NADPH 의존적 효소인 nitric oxide synthase (NOS)에 의해 생성되

며, 짧은 반감기를 갖고 있어 자신과 근접한 세포에서 활성을 나타내게 된다. NO생성은 대식세포 (Hibbs 등, 1988), 호중구 (McCall 등, 1989), 혈관간세포 (Nicholson 등, 1993), 간세포 (Nussler 등, 1992), 연골세포 (Palmer 등, 1992)와 골수세포 (Punjabi 등, 1992)와 같은 다양한 세포에 의해 생성되며, 조골세포에 의해 생성된다는 보고도 있다 (Lowik 등, 1994). NO의 작용은 guanylate cyclase의 활성화에 의존하기도 하며, nitroxylate가 단백질에 직접 결합하여 작용을 나타내기도 한다 (Barman, 2005). 또한 NO는 간엽세포에서 RANKL/OPG 비율을 감소시키는 작용을 하며 (Fan 등, 2004; Cohen, 2006), 기계적인 strain에 의하여 간엽세포에서 NOS의 유전자 발현이 증가되어 NO 생성이 증가된다고 보고된 바 있다 (Rubin 등, 2003).

많은 경우 NOS는 대식세포에서 interleukin-1 β (IL-1 β), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interferon- γ (IFN- γ)와 lipopolysaccharide (LPS)등과 같은 여러 염증성 자극에 의해 유도된다고 알려져 있으며 (Nussler 등, 1992), 또한 이들 세포에 여러 인자들을 복합 처리한 경우 NO의 형성이 현저하게 상승됨을 보고하였다 (Ding 등, 1988). IL-1 β 는 염증반응, 면역학적 반응과 조직손상에 대한 반응의 증가자 중 하나이고 다양한 기능을 가진다 (Tatakis, 1993). IL-1 β 는 매우 낮은 농도에서 파골세포의 활성을 촉진하여 골흡수를 초래하는 cytokine으로 알려져 있으며 (Dewhirst 등, 1985), 1,25-dihydroxyvitamin D₃ (1,25[OH]₂D₃)와 함께 골수세포 배양시 다핵세포 형성을 촉진시키는 물질로 알려져 있다. 주로 대식세포와 임파구에서 합성되는 단백질인 TNF- α 는 간엽세포 (Hofbauer, 1999), T임파구 (Cenci 등, 2000), B임파구 (Kanematsu 등, 2000) 및 내피세포로부터 (Collin-Osdoby 등, 2001) RANKL의 생성을 촉진함으로써 간접적으로 파골세포의 형성을 촉진한다는 보고와, 쥐와 사람의 간엽세포로부터 M-CSF의 생성을 촉진한다는 보고 (Srivastava 등, 2001)가 있는 반면, RANK 신호전달과정과 독립적으로 파골세포의 생성을 촉진한다는 보고 (Azuma 등, 2000; Kobayashi 등, 2000)가 있다.

NO가 시험관내에서 파골세포의 활성을 억제한다는 보고와 (MacIntyre 등, 1991), arginine 의존적 NO 합성경로(arginine-dependent NO pathway)가 조골세포 (Lowik 등, 1993)와 파골세포 (Kasten 등, 1994)에 존재한다고 보고된 바 있다. 본 연구에서는 NO의 공여물질, NOS의 억제제 및 IL-1 β , TNF- α , IFN- γ 와 같은 cytokine을 사용하여 마우스 골수세포가 NO의 생성을 유도하는지 확인하고, 생성된 NO가 파골세포의 형성에 관여하는지 조사하여 NO가 골개조현상과 같은 골대사의 조절과 관련되어 기능을 가지는지 알아보고자 하였다.

실험재료 및 방법

세포의 배양

마우스 골수세포를 분리하기 위해 7-9주 된 웅성 마우스를 경부염전으로 희생시킨 후 대퇴골과 경골을 무균적으로 적출하고 연조직을 제거하였으며 장골의 양끝을 절단한 후 26G 주사침을 이용하여 한쪽 끝의 골수강에 α -minimum essential medium (α -MEM, Gibco) 1 ml를 천천히 주사하여 골수세포를 모은 후 10% FBS가 포함된 α -MEM에 2시간 전 배양한 후 미부착세포들을 모아 10% FBS가 포함된 α -MEM으로 24-well plate에 1-2 \times 10⁶ cells/well이 되도록 분주하여 일주일간 배양하였다. 이 세포는 파골세포로 분화할 수 있는 파골세포 전구세포와 일부 골수 간엽세포를 포함하고 있다고 여겨진다. 7일간 배양하는 동안 10 nM 1,25[OH]₂D₃가 포함된 phenol red-free α -MEM으로 배양액을 교환한 후 NO의 공여물질인 sodium nitroprusside (SNP), NOS 억제제 및 수종의 cytokine을 2회 처리하여 배양하였다. 배양이 끝난 후 배양액내로 유리된 nitrite의 양을 측정하였으며, 파골세포의 분화를 검사하기 위하여 세포를 고정하여 tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) 염색을 시행하였다.

NO 생성량 측정

NO생성량은 세포를 2일간 배양하는 동안 SNP, NOS 억제제 및 여러 cytokine을 2회 처리하여 배양한 후 배양액 내로 유리된 nitrite (NO₂)양을 측정하였다. 96-well reading plate에 100 μ l의 세포배양액(phenol red-free)과 동량의 Griess 용액 (1% sulfanilamide, 0.1% naphthyl-ethylene-diamine-dihydrochloride, 2.5% phosphoric acid)을 혼합한 후 실온에서 15분간 반응시켰다. Nitrite의 농도는 sodium nitrite의 순차적인 희석 농도로 만든 표준 곡선을 이용하여 microplate reader (SLT 400 SFC, SLT Labinstruments, Austria)를 사용하여 530 nm에서 비색정량하였다.

TRAP 조직화학 검사

마우스 골수세포의 파골세포로의 분화를 검사하기 위하여 TRAP 조직화학 검사를 시행하였다. 즉 각각의 배양이 끝난 후 배양액을 제거하고 인산완충생리식염수 (D-PBS, pH 7, Gibco)로 세척 후 citrate-acetone-formaldehyde 용액으로 5분간 고정하였고, 37°C의 증류수로 세척한 후 tartrate-resistant acid phosphatase kit (Sigma)를 이용하여 TRAP 염색을 시행하였다.

TRAP 염색은 기질인 naphthol AS-BI phosphate (Sigma), 반응산물의 염색제인 fast garnet GBC base와 7 mM의 tartrate buffer (pH 5, Sigma)가 포함된 acetate buffer (pH 5, Sigma)로 37°C에서 1시간 반응시켜 효소 활성을 검사하였다.

염색된 세포는 광학현미경상에서 관찰하여 3개 이상의 핵을 포함한 TRAP 양성인 다핵세포의 수를 계수하였다.

결 과

Cytokine에 의해 유도된 NO 생성에 미치는 NOS 억제제의 영향

마우스 골수세포 배양시 NOS 억제제가 여러 cytokine에 의해 유도된 NO의 생성에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 10 mM의 N-nitro-L-arginine methyl ester (NAME)를 다양한 조합의 cytokine과 함께 일주일간 2회 처리하였다. NAME를 첨가하지 않고 각각의 cytokine을 단독으로 처리한 경우 대조군에 비해 1 ng/ml의 IL-1 β 와 500 U/ml의 IFN- γ 의 경우 NO의 유리량이 증가하지 않았으며, 20 ng/ml의 TNF- α 의 경우 대조군에 비해 유의성있는 증가를 나타내었다. 또한 cytokine을 복합 처리한 경우 중 IL-1 β 와 TNF- α , TNF- α 와 IFN- γ 그리고 IL-1 β , TNF- α 와 IFN- γ 을 모두 처리한 경우 대조군에 비해 배양액내로 NO의 유리량이 현저하게 증가되었다. 그러나 복합 처리한 경우 모두 TNF- α 를 단독으로 처리한 경우에 비해 유의한 차이를 나타내지 못하였다 (Fig. 1).

10 mM의 NAME와 각각의 cytokine을 처리한 경우, cytokine을 단독 처리한 경우와 복합 처리한 경우 모두 NAME를 처리하지 않은 경우에 비해 NO의 양이 감소하였으며, 대조군과 같은 정도의 NO 유리량을 나타냈다 (Fig. 1).

파골세포의 분화에 미치는 NO 공여물질의 영향

파골세포 생성을 유도하기 위하여 마우스 골수세포를 배양하면서 TNF- α 를 처리하였으며, TNF- α 에 의해 유도

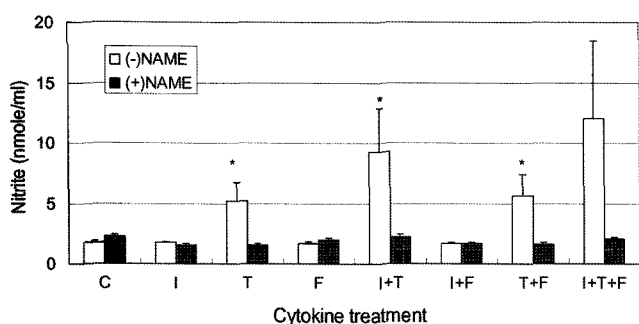


Fig. 1. Effect of cytokine and NAME on the nitric oxide production in culture of mouse bone marrow cell (C: control, I: 1ng/ml IL-1 β , T: 20 ng/ml TNF- α , F: 500 U/ml IFN- γ)

The mouse bone marrow cells were plated at a density of $1-2 \times 10^6$ cells/well in a 24-well plate and cultured for 7 days in the presence of 10 nM $1,25[\text{OH}]_2\text{D}_3$ and various concentrations of cytokines. After culturing, nitrite, a stable end-product of NO was measured by spectrophotometric method using Griess reagent. The data represent a mean \pm S.E. of 5 experiments. *: $P < 0.05$

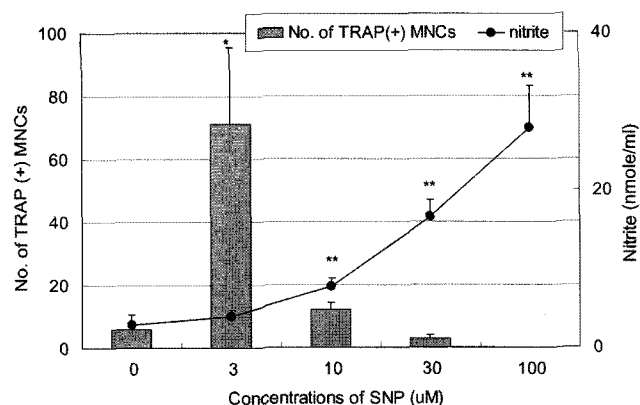


Fig. 2. Effect of SNP on the TNF- α -induced TRAP (+) MNCs formation in culture of mouse bone marrow cells.

The mouse bone marrow cells were plated at a density of $1-2 \times 10^6$ cells/well in a 24-well plate and cultured for 7 days in the presence of 20 ng/ml TNF- α and various concentrations of SNP. After culturing, nitrite, a stable end-product of NO was measured by spectro-photometric method using Griess reagent and the TRAP (+) multinucleated cells containing three or more nuclei were counted as osteoclasts. The data represent a mean \pm S.E. of 5 experiments. *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$.

된 파골세포의 분화에 미치는 NO 공여물질의 영향을 관찰하기 위하여 TNF- α 와 함께 여러 농도의 SNP를 처리하여 배양하였다. 5 ng/ml의 TNF- α 를 단독으로 처리한 대조군의 경우 TRAP 양성 다핵세포가 형성되었으며 3 μM 의 SNP를 처리한 경우 대조군에 비해 TRAP 양성 다핵세포의 수가 현저히 증가되었다. 그러나 SNP의 농도를 증가시켜 처리한 경우 TRAP 양성 다핵세포의 수가 감소하였으며 100 μM 의 SNP를 처리한 경우 TRAP 양성 다핵세포가 형성되지 않았다 (Fig. 2).

NO 생성과 TRAP 양성 다핵세포의 형성에 미치는 cytokine의 영향

마우스 골수세포를 배양하면서 cytokine이 NO의 생성과 TRAP 양성 다핵세포의 형성에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 $1,25[\text{OH}]_2\text{D}_3$ 로 파골세포의 생성을 유도하였으며, $1,25[\text{OH}]_2\text{D}_3$ 존재 하에 TNF- α 와 IFN- γ 를 단독 혹은 여러 농도로 복합 처리하여 배양한 후 배양액내로 유리된 NO의 양을 측정하고 TRAP 염색을 시행한 결과 TNF- α 를 처리한 경우 NO의 유리량이 대조군에 비해 유의성있는 증가를 나타내었다.

TNF- α 를 단독으로 처리한 경우 TRAP 양성 다핵세포의 형성은 대조군에 비해 증가하였으며, IFN- γ 를 단독으로 처리한 경우 현저한 감소를 나타내었다. 또한 두 cytokine을 여러 농도로 복합 처리한 경우 모두 TNF- α 를 단독으로 처리한 경우에 비해 TRAP 양성 다핵세포의 수가 증가하였으며 특히 TNF- α 와 5 U/ml의 IFN- γ 를 복합 처리한 경우 현저한 증가를 나타내었다 (Fig. 3).

그러나 cytokine에 의한 마우스 골수세포의 NO의 생

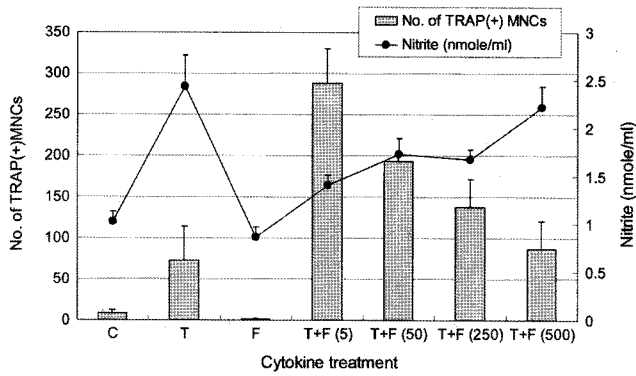


Fig. 3. Effect of cytokines on the nitric oxide production and 1,25[OH]₂D₃-induced TRAP (+) MNCs formation in culture of mouse bone marrow cells. (C: control, T: 20 ng/ml TNF- α , F: 5, 50, 250, 500 U/ml IFN- γ)

The mouse bone marrow cells were plated at a density of $1-2 \times 10^6$ cells/well in a 24-well plate and cultured for 7 days in the presence of 10 nM 1,25[OH]₂D₃ and various concentrations of cytokines. After culturing, nitrite, a stable end-product of NO was measured by spectrophotometric method using Griess reagent and the TRAP (+) multinucleated cells containing three or more nuclei were counted as osteoclasts. The data represent a mean \pm S.E. of 5 experiments.

성과 TRAP 양성 다핵세포의 형성 사이에는 뚜렷한 연계를 찾을 수 없었다.

고 찰

파골세포의 표지효소로 알려진 TRAP은 파골세포로부터 합성되어 유리되는 lysosomal acid hydrolase의 하나이다 (Minkin, 1982). 본 실험에서는 마우스 골수세포로부터 형성된 파골세포 유사세포를 확인하기 위하여 TRAP 조직화학검사를 시행하였다.

최근 NO는 조골세포와 연골세포에 의해 생성되고, 파골세포내에 NO/NOS계가 존재하며 파골세포의 골흡수 활성을 강력하게 억제한다고 알려져 있다. 골조직과 관련된 NO의 역할을 살펴보면, MacIntyre 등 (1991)은 30 μ M의 NO와 NO 공여물질인 SNP와 3-morpholino-sydnnonimine (SIN-1)이 분리된 흰쥐 파골세포의 세포질 확장을 감소시켜 세포의 골흡수 작용을 억제한다고 보고하였으며, Howard (1985)는 분리된 닭 파골세포에서 NO에 의해 cGMP가 증가되며 PTH에 의해 유도된 골흡수를 억제한다고 보고하였다. 또한 Stern과 Diamond (1992)는 SNP가 PTH와 1,25[OH]₂D₃에 의해 유도된 마우스 두개골의 골흡수를 억제시킨 반면, 기초적인 골흡수를 억제하지는 못하였다고 보고하였다. Kasten 등 (1994)은 SNP가 닭 파골세포에 의한 골흡수를 억제하며, NOS 억제제인 NAME가 직접 파골세포의 활성을 증가시킴을 보고하였다. Lowik 등 (1994)은 태생 마우스 장골을 이용한 실험

에서 NO가 파골세포의 활성화에 미치는 영향을 보고하였으며, TNF- α , IFN- γ 와 LPS를 복합 처리한 경우 NO의 양이 증가되며, 파골세포에 의한 골흡수가 억제됨을 보고하였다.

본 연구에서는 마우스 골수세포 배양시 TNF- α 를 단독으로 처리한 경우 NO의 생성량이 증가하였으며, IL-1 β 와 TNF- α , TNF- α 와 IFN- γ 그리고 IL-1 β , TNF- α 와 IFN- γ 를 모두 처리한 경우 NO 생성의 촉진 효과를 나타냈으나 TNF- α 를 단독으로 처리한 경우와 비교해 통계적 유의성을 가지지 않았다. 이러한 결과는 cytokine의 복합 처리가 단독 처리에 비해 NO 생성을 좀더 효과적으로 유도한다는 다른 연구들 (Nussler 등, 1992; Punjabi 등, 1992; Stefanovic-Racic 등, 1993; Nicholson 등, 1993)과 일치하지 않았다. 이러한 파골세포의 NO 생성은 두 가지의 기구에 의한다고 알려져 있다. 그 하나는 세포내의 Ca 농도의 변화에 의해 조절되는 constitutive NOS의 활성변화에 의한 것이고, 다른 하나는 염증성 cytokine을 포함하는 여러 인자에 노출된 파골세포의 inducible NOS의 발현의 변화에 의한 것으로 알려져 있다 (Collin-Osdoby 등, 1995; Van't Hof와 Ralston, 2001). 본 실험에서 10 mM의 NAME를 첨가하여 배양한 경우 NO의 생성이 현저하게 감소하였으므로, cytokine에 의해 유도된 NO는 NOS의 활성화에 의해 생성되는 것으로 여겨진다.

Zaidi 등 (1993)은 골개조시 내피세포에 의해 유도된 NO와 활성화된 oxygen의 상호작용이 paracrine으로 역할을 한다고 보고하였으며, 또한 파골세포에 inducible NOS가 존재하므로 NO는 파골세포의 골흡수를 조절하는 autocrine으로의 역할도 할 것으로 여겨지고 있다.

NO 생성을 촉진시키는 IL-1 β 와 TNF- α 와 같은 염증성 cytokine은 강력한 골흡수 촉진제이기도 하다 (Gowen 등, 1983; Bertolini 등, 1986; Kwak 등, 2005). 이러한 관점에서 볼 때 NO가 골흡수를 촉진시킬 가능성을 시사하고 있다. 또한 마우스 두개골 장기 배양 (organ culture) 시 IL-1과 TNF- α 가 NO 생성을 촉진시키고 NOS 억제제인 L-N^G-monomethyl arginine에 의한 NO의 생성 억제가 부분적으로 골흡수를 억제시킴이 보고된 바 있다 (Ralston 등, 1993). 이러한 결과 NO는 골흡수의 촉진 또는 억제 역할에 모두 관여할 것으로 생각되며, 파골세포에 의해 생성된 NO가 다른 주된 역할을 하리라는 보고도 있으므로 (Freeman, 1994) NO가 superoxide와 화학적으로 결합하여 좀 더 활성화되고 반감기가 긴 free radical로써 작용하여 기질 파괴에 관여하리라 여겨진다. 따라서 NO가 free radical을 생성함으로써 직접 골을 파괴할 것으로 생각된다.

마우스 골수세포 배양한 결과 TNF- α 단독에 비해 NO 생성은 감소하고 파골세포의 형성을 증가되었으나, NO 생성과 파골세포 형성간에 정확한 연계성은 보이지 않았다. 또한 SNP는 강력한 NO의 공여물질로 알려져 있으

므로 파골세포의 형성 실험에 SNP를 사용하였다. 흥미롭게 본 연구결과 30 μ M의 SNP를 첨가한 경우 TRAP 양성 다핵세포의 형성이 억제되었으며 낮은 농도 (3 μ M)의 SNP는 TRAP 양성 다핵세포의 형성이 증가되었다. 그러나 파골세포의 분화에 대한 SNP의 억제 또는 촉진 효과에 관여하는 기구는 분명하지 않다.

현재 파골세포의 활성을 조절하는데 파골세포에 의해 생성된 NO가 직접적으로 영향을 미치는지에 대해서는 아직 명확하지 않다. 그러나 파골세포의 골흡수 활성을 증가된 NO가 억제하는 반면, 감소된 NOS 활성은 세포의 활성을 촉진시킨다는 것은 명확하다 (Collin-Osdoby 등, 1995). 본 연구에서 cytokine을 사용하여 NO의 생성과 파골세포의 분화의 연계를 확인하고자 하였으나 cytokine은 세포내에서 매우 다양한 기능을 가지고 있으므로 그 연계가 명확히 보여지지 않는 것이다. 따라서 직접적인 NO의 공여물질을 좀더 낮은 농도까지 정밀하게 검사해봐야 할 것으로 생각된다.

본 연구 결과 proinflammatory cytokine들이 마우스 골수세포의 NO 생성을 촉진시키므로, 파골세포에 의해 생성된 NO가 골흡수 활성을 조절하는 물질로써 역할을 하리라 여겨진다. 또한 최근 고농도의 NO가 여러 자극에 의해 유도된 골흡수를 억제하는 반면 저농도의 NO가 IL-1 β 에 의해 유도된 골흡수를 증가시키는 바 있다 (Ralston 등, 1995). 이러한 결과는 TNF- α 와 NO등이 국소적으로 증가되는 류마티스 관절염과 같은 염증성 관절 질환의 골파괴의 병인을 규명하는데 중요한 관련이 있을 것으로 생각할 수 있다. 따라서 이러한 가능성을 확인할 수 있는 적합한 실험 모델이 요구되며, 골조직내에서 NO의 역할을 명확히 규명하기 위해서 지속적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

- Anderson, D.M., Maraskovsky, E., Billingsley, W.L., Dougall, W.C., Tometsko, M.E., Roux, E.R., Teepe, M.C., DuBose, R.F., Cosman, D. and Galibert, L.: A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature* 390:175-179, 1997.
- Azuma, Y., Kaji, K., Katogi, R., Takeshita, S. and Kudo, A.: Tumor necrosis factor- α induces differentiation of and bone resorption by osteoclasts. *J. Cell. Biol.* 275: 4858-4864, 2000.
- Barman, S.A.: Effect of nitric oxide on mitogen-activated protein kinases in neonatal pulmonary vascular smooth muscle. *Lung* 183: 325-335, 2005.
- Bertolini, D.R., Nedwin, G.E., Bringman, T.S., Smith, D.D. and Mundy, G.R.: Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation in vitro by human tumour necrosis factors. *Nature* 319: 516-518, 1986.
- Cenci, S., Weitzmann, M.N., Roggia, C., Namba, N., Novack, D., Woodring, J. and Pacifici, R.: Estrogen deficiency induces bone loss by enhancing T-cell production of TNF- α . *J. Clin. Invest.* 106: 1229-1237, 2000.
- Cohen, R.I., Wilson, D. and Liu, S.F.: Nitric oxide modifies the sarcoplasmic reticular calcium release channel in endotoxemia by both guanosine-3',5' (cyclic) phosphate-dependent and independent pathways. *Crit. Care. Med.* 34:173-181, 2006.
- Collin-Osdoby, P., Nickols, G.A. and Osdoby, P.: Bone cell function, regulation, and communication: A role for nitric oxide. *J. Cell. Biochem.* 57: 399-408, 1995.
- Collin-Osdoby, P., Rothe, L., Anderson, F., Nelson, M., Maloney, W. and Osdoby, P.: RANKL and OPG expression by human microvascular endothelial cells, regulation by inflammatory cytokines, and role in human osteoclastogenesis. *J. Biol. Chem.* 276: 20659-20672, 2001.
- Dewhirst, F.E., Stashenko, P.P., Mole, J.E. and Tsurumachi, T.: Purification and partial sequence of human osteoclast-activating factor: Identity with interleukin 1 β . *J. Immunol.* 135: 2562-2568, 1985.
- Ding, A., Nathan, C.F. and Stuehr, D.J.: Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediate from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J. Immunol.* 141: 2407, 1988.
- Fan, X., Roy, E., Zhu, L., Murphy, T.C., Ackert-Bicknell, C., Hart, C.M., Rosen, C., Nanes, M.S. and Rubin, J.: Nitric oxide regulates RANKL and OPG expression in bone stromal cells. *Endocrinology* 145: 1-9, 2004.
- Freeman, B.: Free radical chemistry of nitric oxide. *Chest* 105(suppl): 79s-84s, 1994.
- Gowen, M., Wood, D.D., Ihrie, E.J., McGuire, M.K.B. and Russel, R.G.G.: An interleukin-1 like factor stimulates bone resorption in vitro. *Nature* 306: 378-380, 1983.
- Hibbs, J.B., Traintor, R.R., Vavrin, Z. and Rachlin, E.M.: Nitric oxide: A cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 157: 87-94, 1988.
- Hofbauer, L.C.: Osteoprotegerin ligand and osteoprotegerin: novel implications for osteoclast biology and bone metabolism. *Eur. J. Endocrinol.* 141:195-210, 1999.
- Howard, G.A.: Basic and clinical research, in Normal and abnormal bone growth, edited by Dixon, A.D. and Sarnat, B.G., pp 67-76, New York, Alan R Liss, 1985.
- Ignarro, L.J.: Nitric oxide: A novel signal transduction mechanism for transcellular communication. *Hypertension* 16: 477-483, 1990.
- Kanematsu, M., Sato, T., Takai, H., Watanabe, K., Ikeda, K. and Yamada, Y.: Prostaglandin E2 induces expression of receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand on pre-B cells: implication for accelerated osteoclastogenesis in estrogen deficiency. *J. Bone Miner. Res.* 15: 1321-1329, 2000.
- Kasten, T.P., Collin-Osdoby, P., Patel, N., Osdoby, P., Siegel, N.R., Misko, T.P., Currie, M.G. and Nickols, G.A.: Potentiation of osteoclastic bone resorbing activity by inhibition of nitric oxide synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 3569-3573, 1994.

- Kobayashi, K., Takahashi, N., Jimi, E., Udagawa, N., Takami, m., Kotake, S., Nakagawa, N., Kinisaki, M., Yamaguchi, K., Shima, N., Yasuda, H., Morinaga, T., Higashino, K., Martin, T.J. and Suda, T.: Tumor necrosis factor alpha stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of the ODF/RANKL-RANK interaction. *J. Exp. Med.* 191:275-286, 2000.
- Kwak, H.J., Song, J.S., No, Z.S., Song, J.H., Yang, S.D. and Cheon, H.G.: The inhibitory effects of roflumilast on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in RAW 264.7 cells are mediated by heme oxygenase-1 and its product carbon monoxide. *Inflamm Res.* 54: 508-513, 2005.
- Lowenstein, C.J. and Snyder, S.H.: Nitric oxide, a novel biological messenger. *Cell* 70: 705-707, 1992.
- Lowik, W.G.M.C., Nibbering, P.H., Van der Ruit, M. and Papapoulos, S.E.: 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.* 93: 1465-1472, 1994.
- MacIntyre, I., Zaidi, M., Towhidul, Alam, A.S.M., Datta, H.K., Moonga, B.S., Kidbury, P.S., Hecker, M. and Vane, J.M.: Osteoclast inhibition: An action of nitric oxide not mediated by cyclic GMP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 2936-2940, 1991.
- McCall, T.B., Boughton-Smith, N.K., Palmer, R.M.J., Whittle, B.J.R. and Moncada, S.: Synthesis of nitric oxide from L-arginine by neutrophils. *Biochem. J.* 261: 293-296, 1989.
- Minkin, C.: Bone acid phosphatase: tartrate-resistant acid phosphatase as a marker of osteoclast function. *Calcif. Tissue Int.* 34:285-290, 1982.
- Mundy, G.R. and Roodman, G.D.: Osteoclast ontogeny and function, In *Bone and Mineral Research*, vol. 5, edited by Peck, W.A., pp 209-279, Elsevier, Amsterdam, 1987.
- Nicholson, A.G., Haites, N.E., McKay, N.G., Wilson, H.M., MacLeod, A.M. and Benjamin, N.: Induction of nitric oxide synthase in human mesangial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 193: 1269-1274, 1993.
- Nussler, A.K., DiSilvio, M., Billiar, T.R., Hoffman, R.A., Geller D.A., Selby, R., Madrigas, J. and Simmons, R.L.: Stimulation of the nitric oxide synthase pathway in human hepatocytes by cytokines and endotoxin. *J. Exp. Med.* 176: 261-264, 1992.
- Palmer, R.M.J., Andrews, T., Foxwell, N.A. and Moncada, S.: Glucocorticoids do not affect the induction of a novel calcium dependent nitric oxide synthase in rabbit chondrocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 188: 209-215, 1992.
- Punjabi, C.J., Laskin, D.L., Heck, D.E. and Laskin, J.D.: Production of nitric oxide by murine bone marrow cells. *J. Immunol.* 149: 2179-2184, 1992.
- Raisz, L.G.: Hormonal regulation of bone growth and remodeling. in *Cell and Molecular Biology of Vertebrate Hard Tissue CIBA Foundation Symposium* 136, pp 226-238, Wiley, New York, 1988.
- Ralston, S.H., Helfrich, M.H., Grabowski, P.S. and Benjamin, N.: A role for nitric oxide in the regulation of cytokine-induced bone resorption. *J. Bone Miner. Res. (Suppl 1)* 8: 383(abstract), 1993.
- Ralston, S.H., Ho, L.P., Helfrich, M.H., Grabowski, P.S., Johnston, P.W. and Benjamin, N.: Nitric oxide: A cytokine-induced regulator of bone resorption. *J. Bone Miner. Res.* 10: 1040-1049, 1995.
- Romas, E., Sims, N.A., Hards, D.K., Lindsay, M., Quinn, J.W., Ryan, P.F., Dunstan, C.R., Martin, T.J. and Gillespie, M.T.: Osteoprotegerin reduces osteoclast numbers and prevents bone erosion in collagen-induced arthritis. *Am. J. Pathol.* 161:1419-1427, 2002.
- Rubin, J., Murphy, T.C., Zhu, L., Roy, E., Nanes, M.S. and Fan, X.: Mechanical strain differentially regulates endothelial nitric-oxide synthase and receptor activator of nuclear kappa B ligand expression via ERK1/2 MAPK. *J. Biol. Chem.* 278: 34018-34025, 2003.
- Scheven, B.A.A., Visser, J.W.M. and Nijweide, P.J.: In vitro osteoclast generation from different bone marrow fractions, including a highly enriched hematopoietic stem cell population. *Nature* 321: 79-81, 1986.
- Srivastava, S., Toraldo, G., Weitzmann, M.N., Cenci, S., Ross, F.P. and Pacifici, R.: Estrogen decreases osteoclast formation by down-regulating receptor activator of NF-kappaB ligand(RANKL)-induced JNK activation. *J. Biol. Chem.* 276:8836-8840, 2001.
- Suda, T., Takahashi, N. and Martin, T.J.: Modulation of osteoclast differentiation. *Endocrine. Rev.* 13: 66-80, 1992.
- Stefanovic-Racic, M., Stadler, J. and Evans, C.H.: Nitric oxide and arthritis. *Arth. Rheum.* 36: 1036-1044, 1993.
- Stern, P.H. and Diamond, J.: Sodium nitroprusside increases cyclic GMP in fetal rat bone cells and inhibits resorption of fetal rat limb bone. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 75: 19-27, 1992.
- Tatakis, D.N.: Interleukin-1 bone metabolism: A review. *J. Periodontol.* 64: 416-431, 1993.
- Thompson, B.M., Mundy, G.R. and Chambers, T.J.: Tumor necrosis factors α and β induce osteoblastic cells to stimulate osteoclastic bone resorption. *J. Immunol.* 138: 775-779, 1987.
- Thomson, B.M., Saklatvala, J. and Chambers, T.J.: Osteoblasts mediate interleukin 1 stimulation of bone resorption by rat osteoclast. *J. Exp. Med.* 164: 104-112, 1986.
- van't Hof, R.J. and Ralston, S.H.: Nitric oxide and bone, *Immunology* 103:255-261, 2001.
- Zaidi, M., Alam, A.S., Bax, B.E., Shankar, V.S., Bax, C.M., Gill, J.S., Pazianas, M., Huang, C.L., Sahinoglu, T., Moonga, B.S., Stevens, C.R. and Blake, D.R.: Role of the endothelial cell in osteoclast control: New perspectives. *Bone* 14: 97-102, 1993.