

TNF- α Inhibitor Reduces Odontoclast Formation in Diabetes Rats with Ligature-Induced Periodontitis

Ji-Hye Kim^{1†}, Ae Ri Kim^{2,3,4†}, Yun Hui Choi², Dong-Eun Lee², Gye-Hyeong Woo⁵, Eun-Jung Bak^{2*} and Yun-Jung Yoo^{2,3*}

¹Department of Dental Hygiene, Jeonju kijeon College, Jeonju, Republic of Korea

²Department of Oral Biology, Yonsei University College of Dentistry, Seoul, Republic of Korea

³Department of Applied Life Science, The Graduate School, Yonsei University, Seoul, South Korea,

⁴BK21 PLUS Project, Yonsei University College of Dentistry, Seoul, Republic of Korea

⁵Department of Clinical Laboratory Science, Semyung University, Jecheon, Republic of Korea

(received August 16, 2017; revised September 12, 2017; accepted September 13, 2017)

To determine the effect of the tumor necrosis factor- α (TNF- α) in odontoclast formation, we administrated a TNF- α inhibitor in rats with diabetes rats with periodontitis. The rats included in the study were divided into three groups: control rats without diabetes or periodontitis (the C group), rats with periodontitis and diabetes (the PD group), and rats with periodontitis and diabetes treated by infliximab, the TNF inhibitor (the PD+infliximab group). The PD and PD+infliximab groups received intravenous administrations of streptozotocin (STZ, 50 mg/kg) to induce diabetes. After 7 days of STZ injections, the mandibular first molars were

ligatured to induce periodontitis. The PD+infliximab group was intraperitoneally administrated by infliximab (5 mg/kg). On days 3 and 20 after the ligature administration, odontoclast formation along root surfaces was evaluated by tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) staining and cathepsin K immunohistochemistry. On day 3, the number of TRAP- and cathepsin K-positive cells increased more so in the PD group than in the C group. The PD+infliximab group showed a lower number of positive cells than the PD group. There was no difference in all the groups on day 20. On day 3, the cathepsin-K positive multinucleated and mononucleated cells were higher in the PD group than in the C group. The number of cathepsin-K positive multinucleated cells was lower in the PD+infliximab group than in the PD group. The PD group showed more cathepsin K-positive cells in the furcation and distal surfaces than the C group. The Cathepsin K-positive cells of the PD+infliximab group were lower than that of the PD group in furcation. These results suggest that TNF- α stimulates odontoclast formation in diabetes with periodontitis.

Key words: TNF- α , odontoclasts, diabetes, periodontitis

[†] These authors contributed equally to this work.

*Correspondence to: Yun-Jung Yoo, Department of Oral Biology, Yonsei University College of Dentistry 134 Sinchon dong, Seodaemun-gu, Seoul 120-752, Republic of Korea
Tel: +82-2-2228-3060. Fax: +82-2-2227-7903
E-mail: yu618@yuhs.ac
ORCID : 0000-0002-0045-9597

*Correspondence to: Eun-Jung Bak, Department of Oral Biology, Yonsei University College of Dentistry 134 Sinchon dong, Seodaemun-gu, Seoul 120-752, Republic of Korea
Tel: +82-2-2228-3062. Fax: +82-2-2227-7903
E-mail: ejbak@yuhs.ac
ORCID : 0000-0002-7976-8594

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

서론

치주염은 세균에 의하여 야기되는 염증성 질환으로 골 흡수 증가와 골 형성 억제에 의한 치조골 소실이 주요한

특징으로 나타나며[1], 치조골소실 뿐 만 아니라 치근 흡수도 일어난다[2-4]. 파골세포는 뼈를, 파치세포는 치아를 흡수하는 세포로 모두 tartrate resistant acid phosphatase (TRAP)와 cathepsin K를 발현하는 다핵세포이다[5-7]. 골수의 조혈모세포로부터 형성된 파골세포 전구세포는 바로 골 표면으로 이동하거나 혈관을 거쳐 골 표면으로 이동한 후 TRAP 발현과 융합과정을 거쳐 다핵의 파골세포로 분화하며[8-10], 활성화 과정에서 clear zone과 ruffled border을 형성하고 수소이온과 단백분해효소를 분비하여 골을 파괴한다. 파치세포는 골수의 조혈모세포 또는 치주인대에 존재하는 세포로부터 분화하는 것으로 여겨지고 있다[11]. 파치세포의 분화 과정과 특성은 파골세포와 유사하나 파골세포 보다 일반적으로 크기가 작고, 핵 수가 적으며, 형성하는 흡수 와(resorption pit)의 크기가 작은 것으로 보고되어 있다[5-7,12,13].

Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand(RANKL)은 파골세포의 TRAP 발현, 융합과 활성화를 유도하는 주요한 파골세포 분화 유도인자이며 파골세포 전구세포와 파골세포는 RANKL에 대한 수용체인 RANK를 발현한다[8-10]. RANKL은 골에 존재하는 세포인 조골세포, 골세포와 파골세포, 면역세포인 T 세포와 B 세포, 치아 구성 세포인 치아모세포, 시멘트질모세포, 파치세포와 치주인대 섬유아세포와 같은 다양한 세포가 발현하며 RANK는 파치세포 전구세포와 파치세포가 발현한다[5,12-19]. RANK 과발현 유도 생쥐에서는 치근이 흡수되는 양상과 TRAP 양성 파치세포가 관찰되었고 RANKL의 작용을 억제하는 osteoprotegerin 결여 생쥐에서는 치근흡수와 파치세포의 수가 정상 생쥐보다 증가하였다. 이들 결과는 RANKL이 파치세포의 형성에 관여함을 시사한다[20,21].

Tumor necrosis factor- α (TNF- α)는 혈관내피세포의 부착 분자 발현을 유도하여 혈관 내 호중구, 단구와 림프구의 혈관 밖 이동을 유도하는 염증유도 사이토카인으로 파골세포 분화에도 관여한다[22,23]. 쥐 치아에 고정력을 가한 경우 치근 흡수와 파치세포가 관찰되었고 TNF- α 발현도 증가하였다. 또한 고정력이 가해지는 동안 TNF- α 억제제를 투여하는 경우 치근 흡수가 감소되는 것을 관찰하여 [24,25] TNF- α 가 고정력에 의한 치근 흡수에 관여할 수 있음이 제시되었다. 당뇨와 치주염을 유발한 쥐의 치은 열구에서 정상쥐보다 높은 TNF- α 수치를 보여 당뇨에 의한 치주염 악화에 TNF- α 의 관련성이 제시되었으나[26], 당뇨동반치주염에서 형성되는 파치세포와 TNF- α 의 연관성은 밝혀져 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 당뇨동반치주염 쥐에 TNF- α 억제제인 infliximab를 투여하여 파치세포 형성에 미치는 TNF- α 의 효과를 평가하였다.

재료 및 방법

쥐에서 당뇨와 치주염 유발

6주의 수컷 근교계 F344 쥐(오리엔트바이오, 성남)를 구입하고 1주일 간 순화시킨 후 동물실험을 진행하였다. 쥐는 대조군, 당뇨 및 치주염 유발군(당뇨치주염군), infliximab를 투여한 당뇨 및 치주염 유발군(억제제투여 당뇨치주염군)으로 분류하였다. 당뇨는 하룻밤 절식 후 0.1 M citrate buffer에 녹인 streptozotocin(STZ, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, 50 mg/kg)을 정맥내 투여하여 유도하였다. 대조군에는 citrate buffer 만을 투여하였다. STZ 또는 citrate buffer 투여 일주일 후, 쥐를 zoletil 50(Virbac, Carros, France)과 rompun (Bayer, Ansan, Korea)의 1:2 혼합액으로 마취한 후 치실을 양쪽 하악 제일 대구치에 묶어 치주염을 유발하였다. 쥐는 치주염 유발 3일과 20일째에 희생하였고 실험기간 동안 치실의 존재여부와 체중변화는 일정 시간 간격으로 확인하였다. Infliximab(5 mg/kg, Janssen Biologics B. V., Leiden, Netherlands)는 복강 내로 투여하였으며 3일째의 경우 치주염 유발 4시간 전에, 20일째의 경우 치주염 유발 7일과 14일에 투여하였다. 당뇨 유발의 확인을 위하여 치주염 유발 직전과 희생시키기 직전에 공복 혈당수치를 Accu-Check active system (Roche, Mannheim, Germany)으로 측정하였고 300 mg/dL 이상의 공복혈당을 나타내는 개체를 당뇨상태로 간주하였다. 본 실험은 연세대학교 실험동물윤리위원회의 승인(2014- 0393)을 받아 진행하였다.

파치세포 형성 평가

희생시킨 쥐의 하악을 적출한 후 10% 중성 완충 포르말린에서 이를 고정하고 10% EDTA 용액에서 2달간 탈회하였다. 탈회된 하악을 파라핀에 포매한 후 슬라이드 절편을 제작하였고 제일 대구치의 근심과 원심 치근의 치수가 잘 보이는 절편을 선택하여 TRAP과 cathepsin K에 대한 염색을 실시하였다. TRAP은 TRAP 염색 kit(Sigma-Aldrich)를 이용하여 염색하였고, cathepsin K에 대한 면역염색은 Immpress universal reagent(Vector, Burlingame, CA, USA)를 이용하여 이전 보고를 참고하여 시행하였다[27]. 슬라이드 절편을 cathepsin K 항체(희석농도 1:75; Santa Cruz Biotechnology Inc, CA, USA)로 4°C에서 하룻밤 반응시켰다. 그 후 이차항체와 streptavidin 처리 후 DAB로 발색하고 메틸 그린으로 대조염색하였다. 음성 대조 절편은 일차항체를 반응시키지 않았다. 제일 대구치 치근의 근심, 이개부와 원심면의 TRAP 또는 cathepsin K 양성 세포를 계수한 후 치근의 길이(mm)로 나누어 파치세포의 수를 계산하였다. 치근면의 거리는 viewpoint microscope slide viewer software(Precipoint, Freising,

Germany)을 이용하여 측정하였다.

통계학적 평가

SPSS software 프로그램을 모든 통계 평가에 사용하였고, one-way analysis of variance (ANOVA)로 군간의 통계학적 차이를 평가하였다. P 값이 0.05 이하인 경우 통계학적 유의차가 나는 것으로 간주하였다.

결 과

TNF 억제제에 의한 치근면의 TRAP 양성 파치세포 수의 변화

TNF- α 억제제가 파치세포의 형성에 미치는 영향을 평가하기 위하여 치주염 유발 3일과 20일째에 제일 대구치 치근면의 TRAP 양성 세포의 수를 측정하였다(Fig. 1). 3일째에 당뇨치주염군의 TRAP 양성 세포의 수는 대조군보다 증가하였으며, 억제제투여 당뇨치주염군의 TRAP 양성 세포 수는 당뇨치주염군보다 감소하였다. 20일째에는 대조군, 당뇨치주염군, 억제제투여 당뇨치주염군 모두

TRAP 양성 세포의 수의 차이를 나타내지 않았다.

TNF 억제제에 의한 치근면의 cathepsin K 양성 파치세포 수의 변화

파치세포 형성을 명확히 평가하기 위하여 cathepsin K에 대한 면역염색을 실시하여 치주염 유발 3일과 20일째에 제일 대구치 치근면의 cathepsin K 양성 세포의 수를 측정하였다(Fig. 2). 3일째에 당뇨치주염군의 cathepsin K 양성 세포의

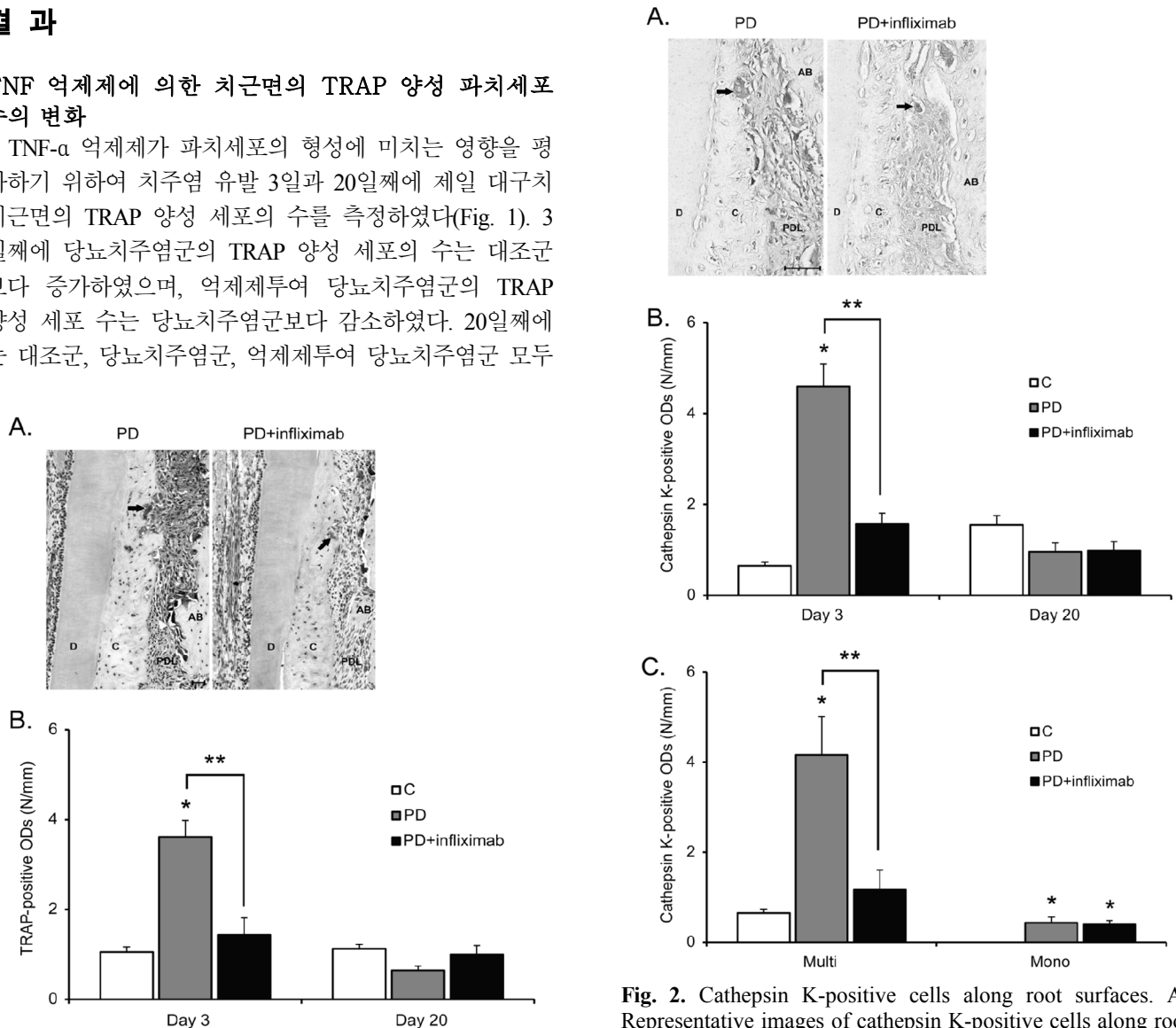


Fig. 1. TRAP-positive cells along root surfaces. A) Representative images of TRAP-positive cells along root surfaces (black arrow) in the PD and PD+infiximab groups on day 3 (TRAP stain; scale bar = 100 μ m). B) The number of TRAP-positive cells on days 3 and 20 in the C, PD, and PD+infiximab groups. * P < 0.05 compared with the C group. ** P < 0.05. AB; alveolar bone, C; cementum, D; dentin, PDL; periodontal ligament, N; number, ODs; odontoclasts.

Fig. 2. Cathepsin K-positive cells along root surfaces. A) Representative images of cathepsin K-positive cells along root surfaces (black arrow) in the PD and PD+infiximab groups (cathepsin K immunohistochemistry; scale bar = 100 μ m). B) The number of cathepsin K-positive cells on days 3 and 20 in the C, PD, and PD+infiximab groups. C) The number of cathepsin K-positive mononucleated cells and multinucleated cells on day 3 in all groups. * P < 0.05 compared with the C group. ** P < 0.05. AB; alveolar bone, C; cementum, D; dentin, PDL; periodontal ligament, N; number, ODs; odontoclasts.

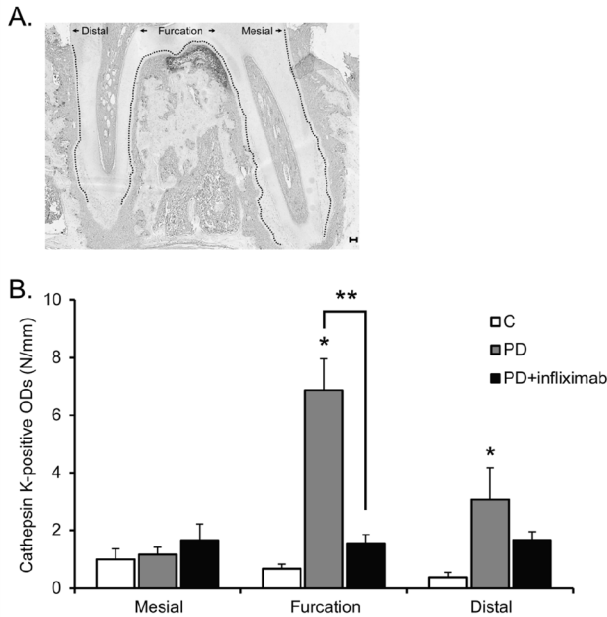


Fig. 3. Cathepsin K-positive cells along mesial, furcation, and distal root surfaces. A) Representative image of mesial, furcation, and distal root surfaces in mandibular first molar (black dotted lines; cathepsin K immunohistochemistry; scale bar = 100 μ m). B) The number of cathepsin K-positive cells in the C, PD, and PD+infiximab groups on day 3. * $P < 0.05$ compared with the C group. ** $P < 0.05$. N; number, ODs; odontoclasts.

수는 대조군보다 증가하였으며, 억제제투여 당뇨치주염군의 cathepsin K 양성 세포 수는 당뇨치주염군보다 감소하였다. 20일째에는 모든 군에서 차이를 나타내지 않았다. 또한 cathepsin K 양성 단핵과 다핵 세포를 분류하여 계수하였을 때 3일째의 당뇨치주염군에서 단핵과 다핵 세포의 수가 대조군과 비교하여 증가하였으며, 억제제투여 당뇨치주염군에서는 다핵 세포가 당뇨치주염군보다 감소하였다.

TNF 억제제에 의한 치근면 부위에 따른 cathepsin K 양성 파치세포 수의 변화

치근면 부위에 따른 파치세포 수의 변화를 확인하기 위하여 치근면을 근심, 이개, 원심으로 나누어 cathepsin K 양성 세포의 수를 계수하였다(Fig. 3). 3일째 이개면의 cathepsin K 양성 세포의 수는 당뇨치주염군에서 대조군과 비교하여 증가하였으며 억제제투여 당뇨치주염군에서는 당뇨치주염군과 비교하여 감소하였다. 원심면에서는 당뇨치주염군에서 대조군과 비교하여 증가하였으나 억제제투여 당뇨치주염군과는 유의적인 차이를 보이지 않았다.

고 찰

파치세포는 osteopontin과 bone sialoprotein의 탈인산화를

유도하는 TRAP과 collagen을 분해하는 cathepsin K 효소를 발현한다[11,28]. 따라서 본 연구에서는 파치세포의 형성을 명확히 파악하기 위하여 TRAP 양성 세포와 cathepsin K 양성 세포의 수를 함께 관찰하였으며, TRAP은 효소활성측정법으로, cathepsin K는 면역조직화학염색법으로 평가하였다. 이를 통해 당뇨동반치주염에서 TNF- α 억제제에 의한 치근면의 파치세포 형성 감소를 관찰할 수 있었다.

당뇨동반치주염군에서 파치세포 형성증가와 함께 치조골소실이 대조군보다 증가됨이 확인되었다(결과 제시하지 않음). 당뇨동반치주염군의 치근면 TRAP 양성 세포의 수는 이전 연구와 동일하게 대조군과 비교하여 3일째에 증가하였으나 20일째에는 차이를 보이지 않았다[29]. 치근면의 cathepsin K 양성 세포도 TRAP 양성 세포와 동일한 양상을 보였으며 이는 당뇨동반치주염의 초기에 파치세포 형성이 일시적으로 증가함을 시사한다. 당뇨동반치주염 쥐에서 파골세포도 파치세포와 동일하게 치주염 유발 3일째에 가장 많은 세포 수를 보였다[27]. 이는 당뇨동반치주염의 초기에 경조직을 흡수하는 파골세포와 파치세포 형성이 활발히 일어날 수 있음을 시사하는 것이다.

6개의 사람 유치에서 흡수 와를 형성한 총 242개의 TRAP 양성 세포 중 2.9%가 단핵세포임을 확인하여 TRAP 양성 단핵의 파치세포도 치근을 흡수할 수 있음이 제시되었다[30]. 당뇨치주염군에서도 3일째에 cathepsin K 양성 단핵과 다핵세포 모두 대조군에 비하여 증가하였다. 이는 당뇨동반치주염에서 단핵과 다핵의 파치세포 형성이 증가함을 나타내는 것이다.

치주염 때문에 발치한 사람 치아 중 치근단 1/3 부위에서 흡수를 보이는 치아는 71.2%, 중앙 1/3 부위에서 흡수를 보이는 치아는 53%, 치은 1/3 부위에서 흡수를 보이는 치아는 27.3%로 치근단의 치근흡수 빈도가 큼이 보고되었다[3]. 치주염 유발 쥐에서 파치세포의 수는 대조군과 비교하여 치근 근심과 이개면에서 증가하였으며 원심면에서는 변화를 보이지 않아 파치세포 형성이 치근면에 따라 차이가 있을 수 있음이 보고되었다[31]. 본 실험의 당뇨동반치주염군의 TRAP 또는 cathepsin-K 양성 세포는 주로 치근 중심 아래부위에서 관찰되었으며(결과 제시하지 않음) 이개면과 원심면에서 대조군 보다 증가하였다. 이는 당뇨동반치주염인 경우에도 파치세포 형성이 치근면의 위치에 따라 차이가 있음을 시사한다.

Gonçalves 등은 TNF- α 억제제인 infliximab를 5 mg/kg 농도로 치주염동물 모델에 투여하여 치조골 소실과 치은 조직의 TNF- α 수치가 감소함을 확인하였기에 본 연구에서도 infliximab의 투여농도를 5 mg/kg로 선택하였다[32]. 흥미롭게도 억제제투여 당뇨치주염군에서 당뇨치주염군보다 TRAP 양성 또는 cathepsin K 양성 세포의 수가 감소

하였다. 이전 연구의 당뇨치주염 동물모델에서 TNF- α 양성 세포의 수가 대조군보다 증가하였으며[29], 당뇨치주염군과 정상군에 LPS를 주입한 경우 당뇨치주염군의 혈중 TNF- α 수치가 정상군보다 높았다[33]. 이들 결과는 당뇨동반치주염에서 TNF- α 가 증가하며, 증가한 TNF- α 가 파치세포 형성에 관여할 수 있음을 제시하는 것이다. TNF- α 를 생쥐에 투여한 경우 골수 기질세포의 stromal cell-derived factor 1의 발현이 감소하였으며 혈액 내 파골세포 전구세포의 수가 증가하여, TNF- α 가 골수의 파골세포 전구세포의 혈관 내 이동에 관련될 수 있음이 제시되었다[34]. 또한 세포배양법을 통해 사람 내피세포에 TNF- α 를 처리하였을 때 부착분자인 ICAM-1과 CD44를 발현하며 이를 통해 CD14 양성 파골세포 전구세포의 이동이 유도됨을 관찰하여, 혈관 내 파골세포 전구세포의 혈관 밖 이동에 TNF- α 의 관련성이 제시되었다[35]. TNF- α 는 치주인대세포와 조골세포의 RANKL 발현과 파골세포 전구세포의 RANK 발현을 증가시켜 파골세포 형성을 촉진시킬 수 있음이 보고되었다[18,19,36,37]. 이는 TNF- α 가 다양한 기전을 통해 파골세포 형성을 증가시킬 수 있음을 나타내는 것이다. 당뇨동반치주염군에서 다핵의 파치세포 형성이 치주염 유발 3일째에 대조군에 비해 증가하나 20일째에는 증가함이 사라지며, 다른 부위에 비하여 치근 이개부위에서 많이 관찰되는 것은 당뇨와 치주염 유발 후 경과 시간 또는 치조골 위치에 따라 나타내는 TNF- α 발현의 차이와 관련성이 있을 수 있을 것으로 추정하며, 치조골 위치에 따른 TNF- α 발현의 차이가 TNF- α 억제제의 효과 차이로 연결될 수 있을 것으로 생각한다. 본 연구에서 TNF- α 억제제는 당뇨치주염군의 다핵 파치세포 수는 감소시켰으나 단핵 파치세포의 수는 감소시키지 않았다. 이러한 현상과 관련된 TNF- α 의 작용 기전에 대한 연구가 앞으로 필요할 것으로 판단된다.

종합하여 볼 때 당뇨동반치주염 쥐에 TNF- α 억제제를 투여한 경우 TRAP 양성과 cathepsin K 양성 파치세포의 수가 감소하였고, cathepsin K 양성세포의 수 감소는 치근 이개 부위에서 나타났으며, 주로 다핵의 파치세포 수를 감소시켰다. 이들 결과는 TNF- α 가 당뇨동반치주염에서 파치세포 형성을 증가시켜 치근 흡수에 관여할 수 있음을 시사한다.

감사의 글

본 연구는 2015년도 정부(미래창조과학부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임 (NRF-2014R1A2A1A11049412).

References

- Hienz SA, Paliwal S, Ivanovski S. Mechanisms of bone resorption in periodontitis. *J Immunol Res* 2015;2015: 615486. doi:10.1155/2015/615486.
- Harvey BL, Zander HA. Root surface resorption of periodontally diseased teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1959;12:1439-1443. doi:10.1016/0030-4220(59)90264-6.
- Rodriguez-Pato RB. Root resorption in chronic periodontitis: a morphometrical study. *J Periodontol* 2004;75:1027-1032. doi:10.1902/jop.2004.75.7.1027.
- Crespo Abelleira AC, Rodriguez Cobos MA, Fuentes Boquete IM, Castano Oreja MT, Jorge Barreiro FJ, Rodriguez Pato RB. Morphological study of root surfaces in teeth with adult periodontitis. *J Periodontol* 1999;70:1283-1291. doi:10.1902/jop.1999.70.11.1283.
- Kamat M, Puranik R, Vanaki S, Kamat S. An insight into the regulatory mechanisms of cells involved in resorption of dental hard tissues. *J Oral Maxillofac Pathol* 2013;17: 228-233. doi:10.4103/0973-029X.119736.
- Sahara N, Toyoki A, Ashizawa Y, Deguchi T, Suzuki K. Cytodifferentiation of the odontoclast prior to the shedding of human deciduous teeth: an ultrastructural and cytochemical study. *Anat Rec* 1996;244:33-49. doi:10.1002/(SICI)1097-0185(199601)244:1<33::AID-AR4>3.0.CO;2-G.
- Sasaki T. Differentiation and functions of osteoclasts and odontoclasts in mineralized tissue resorption. *Microsc Res Tech* 2003;61:483-495. doi:10.1002/jemt.10370.
- Boyce BF. Advances in the regulation of osteoclasts and osteoclast functions. *J Dent Res* 2013;92:860-867. doi:10.1177/0022034513500306.
- Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, Lacey DL, Boyle WJ, Riggs BL. The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. *J Bone Miner Res* 2000;15:2-12. doi:10.1359/jbmr.2000.15.1.2.
- Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT, Martin TJ. Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev* 1999;20:345-357. doi:10.1210/edrv.20.3.0367.
- Iglesias-Linares A, Hartsfield JK, Jr. Cellular and molecular pathways leading to external root resorption. *J Dent Res* 2017;96:145-152. doi:10.1177/0022034516677539.
- Harokopakis-Hajishengallis E. Physiologic root resorption in primary teeth: molecular and histological events. *J Oral Sci* 2007;49:1-12. doi:10.2334/josnusd.49.1.
- Oshiro T, Shibasaki Y, Martin TJ, Sasaki T. Immunolocalization of vacuolar-type H⁺-ATPase, cathepsin K, matrix metalloproteinase-9, and receptor activator of NF- κ B ligand in odontoclasts during physiological root resorption of human deciduous teeth. *Anat Rec* 2001;264:305-311. doi:10.1002/ar.1127.
- Lossdorfer S, Gotz W, Jager A. Immunohistochemical localization of receptor activator of nuclear factor kappaB (RANK) and its ligand (RANKL) in human deciduous teeth.

- Calcif Tissue Int 2002;71:45-52. doi:10.1007/s00223-001-2086-7.
15. Hasegawa T, Kikui T, Takeyama S, Yoshimura Y, Mitome M, Oguchi H, Shirakawa T. Human periodontal ligament cells derived from deciduous teeth induce osteoclastogenesis in vitro. *Tissue Cell* 2002;34:44-51. doi:10.1054/tice.2002.0223.
 16. Fukushima H, Kajiya H, Takada K, Okamoto F, Okabe K. Expression and role of RANKL in periodontal ligament cells during physiological root-resorption in human deciduous teeth. *Eur J Oral Sci* 2003;111:346-352. doi:10.1034/j.1600-0722.2003.00051.x.
 17. Kawai T, Matsuyama T, Hosokawa Y, Makihiro S, Seki M, Karimbux NY, Goncalves RB, Valverde P, Dibart S, Li YP, Miranda LA, Ernst CW, Izumi Y, Taubman MA. B and T lymphocytes are the primary sources of RANKL in the bone resorptive lesion of periodontal disease. *Am J Pathol* 2006;169:987-998. doi:10.2353/ajpath.2006.060180.
 18. Pacios S, Xiao W, Mattos M, Lim J, Tarapore RS, Alsadun S, Yu B, Wang CY, Graves DT. Osteoblast lineage cells play an essential role in periodontal bone loss through activation of nuclear factor-kappa B. *Sci Rep* 2015;5:16694. doi:10.1038/srep16694.
 19. Wada N, Maeda H, Yoshimine Y, Akamine A. Lipopolysaccharide stimulates expression of osteoprotegerin and receptor activator of NF-kappa B ligand in periodontal ligament fibroblasts through the induction of interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha. *Bone* 2004;35:629-635. doi:10.1016/j.bone.2004.04.023.
 20. Sojod B, Chateau D, Mueller CG, Babajko S, Berdal A, Lezot F, Castaneda B. RANK/RANKL/OPG signalization implication in periodontitis: new evidence from a RANK transgenic mouse model. *Front Physiol* 2017;8:338. doi:10.3389/fphys.2017.00338.
 21. Liu Y, Du H, Wang Y, Liu M, Deng S, Fan L, Zhang L, Sun Y, Zhang Q. Osteoprotegerin-knockout mice developed early onset root resorption. *J Endod* 2016;42:1516-1522. doi:10.1016/j.joen.2016.07.008.
 22. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and molecular immunology. 8th ed. Philadelphia: Elsevier; 2015.
 23. Algate K, Haynes DR, Bartold PM, Crotti TN, Cantley MD. The effects of tumour necrosis factor- α on bone cells involved in periodontal alveolar bone loss; osteoclasts, osteoblasts and osteocytes. *J Periodontal Res* 2016;51:549-566. doi:10.1111/jre.12339.
 24. Matsumoto Y, Sringkarnboriboon S, Ono T. Proinflammatory mediators related to orthodontically induced periapical root resorption in rat mandibular molars. *Eur J Orthod* 2017; doi:10.1093/ejo/cjx033. doi:10.1093/ejo/cjx033.
 25. He D, Kou X, Luo Q, Yang R, Liu D, Wang X, Song Y, Cao H, Zeng M, Gan Y, Zhou Y. Enhanced M1/M2 macrophage ratio promotes orthodontic root resorption. *J Dent Res* 2015;94:129-139. doi:10.1177/0022034514553817.
 26. Jiang ZL, Cui YQ, Gao R, Li Y, Fu ZC, Zhang B, Guan CC. Study of TNF- α , IL-1 β and LPS levels in the gingival crevicular fluid of a rat model of diabetes mellitus and periodontitis. *Dis Markers* 2013;34:295-304. doi:10.3233/DMA-130974.
 27. Kim JH, Lee DE, Woo GH, Cha JH, Bak EJ, Yoo YJ. Osteocytic sclerostin expression in alveolar bone in rats with diabetes mellitus and ligature-induced periodontitis. *J Periodontol* 2015;86:1005-1011. doi:10.1902/jop.2015.150083.
 28. Blumer MJ, Hausott B, Schwarzer C, Hayman AR, Stempel J, Fritsch H. Role of tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) in long bone development. *Mech Dev* 2012;129:162-176. doi:10.1016/j.mod.2012.04.003.
 29. Kim JH, Lee DE, Park JC, Kim YJ, Cha JH, Bak EJ, Yoo YJ. Root resorption in streptozotocin-induced diabetic rats with ligature-induced periodontitis. *Int J Oral Biol* 2015;40:111-116. doi:10.11620/IJOB.2015.40.3.111.
 30. Domon T, Osanai M, Yasuda M, Seki E, Takahashi S, Yamamoto T, Wakita M. Mononuclear odontoclast participation in tooth resorption: the distribution of nuclei in human odontoclasts. *Anat Rec* 1997;249:449-457. doi:10.1002/(SICI)1097-0185(199712)249:4<449::AID-AR4>3.0.CO;2-M.
 31. Lee DE, Kim JH, Shin DH, Cha JH, Bak EJ, Yoo YJ. Odontoclast and osteoclast formation in rats with ligature-induced periodontitis. *J Dent Hyg Sci* 2015;15:295-300. doi:10.17135/JDHS.2015.15.3.295.
 32. Gonçalves DC, Evangelista RC, da Silva RR, Santos MJ, Silva FS Jr, Aragão KS, Brito GA, Lucena HB, Leitão RC, Oriá RB. Infliximab attenuates inflammatory osteolysis in a model of periodontitis in Wistar rats. *Exp Biol Med* 2014;239:442-53. doi:10.1177/1535370213520114.
 33. Breivik T, Gundersen Y, Gjermo P, Opstad PK. Chronic treatment with the glucocorticoid receptor antagonist RU486 inhibits diabetes-induced enhancement of experimental periodontitis. *J Periodontal Res* 2014;49:36-44. doi:10.1111/jre.12076.
 34. Zhang Q, Guo R, Schwarz EM, Boyce BF, Xing L. TNF inhibits production of stromal cell-derived factor 1 by bone stromal cells and increases osteoclast precursor mobilization from bone marrow to peripheral blood. *Arthritis Res Ther* 2008;10:R37. doi:10.1186/ar2391.
 35. Kindle L, Rothe L, Kriss M, Osdoby P, Collin-Osdoby P. Human microvascular endothelial cell activation by IL-1 and TNF- α stimulates the adhesion and transendothelial migration of circulating human CD14⁺ monocytes that develop with RANKL into functional osteoclasts. *J Bone Miner Res* 2006;21:193-206. doi:10.1359/JBMR.051027.
 36. Kitaura H, Sands MS, Aya K, Zhou P, Hirayama T, Uthgenannt B, Wei S, Takeshita S, Novack DV, Silva MJ, Abu-Amer Y, Ross FP, Teitelbaum SL. Marrow stromal cells and osteoclast precursors differentially contribute to TNF- α -induced osteoclastogenesis in vivo. *J Immunol* 2004;173:4838-4846. doi:10.4049/jimmunol.173.8.4838.
 37. Yongchaitrakul T, Lertsirirangson K, Pavasant P. Human periodontal ligament cells secrete macrophage colony-stimulating factor in response to tumor necrosis factor-alpha in vitro. *J Periodontol* 2006;77:955-962. doi:10.1902/jop.2006.050338.