

# 17 $\beta$ -Estradiol 및 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>가 치주인대세포의 Interleukin-6의 생성에 미치는 영향

곽월아 · 최봉규 · 이현정 · 유윤정

연세대학교 치과대학 구강생물학 교실

## 1. 서론

단핵세포 및 대식세포로부터 생성되는 cytokine 및 전신 호르몬인 부갑상선 호르몬(parathyroid hormone, PTH), 그리고 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>(1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>)는 지질세포 및 조골세포로부터 여러 cytokine의 합성을 유도하여 파골세포의 분화를 촉진시킨다. 이들 cytokine에는 파골세포의 분화인자로 알려진 ODF(Osteoclast differentiation factor)<sup>1)</sup>, macrophage-colonystimulating factor(M-CSF), Granulocyte/monocyte-colony stimulating factor(GM-CSF), interleukin-11(IL-11) 및 interleukin-6(IL-6)가 있다<sup>2,3,4,5)</sup>. 이중 IL-6는 조골세포에 존재하는 수용체에 결합하여 조골세포에 의한 파골세포의 분화를 유도한다<sup>6)</sup>. 또한 여성호르몬인 17 $\beta$ -estradiol은 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>와는 반대로 골흡수를 억제하는 호르몬으로서, 특히 폐경기 이후의 골다공증 환자에서는 17 $\beta$ -estradiol의 결핍에 의하여 혈청내 IL-6의 농도가 증가하며<sup>7,8)</sup>, 실제로 17 $\beta$ -estradiol이 조골세포에서 IL-1에 의한 IL-6의 생성을 감소시켜 17 $\beta$ -estradiol에 의한 골흡수 억제는 조골세포에서 17 $\beta$ -estradiol에 의한 IL-6 생성 억제작용에 의하여 야기되는 것으로 생각되고 있다<sup>9,10)</sup>. 이와 같이 조골세포는 파골세포

의 분화를 매개하는데 중요한 역할을 하며, 17 $\beta$ -estradiol 및 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>는 조골세포로부터 파골세포의 분화에 관여하는 cytokine의 합성을 자극 또는 억제하여 파골세포의 분화를 조절한다.

치주인대세포는 치근과 치조골 사이에 존재하는 세포로서 조골세포의 분화 표식인자인 alkaline phosphatase(ALP)와 osteocalcin을 발현할 뿐만 아니라, 실제로 석회화 결절을 형성하며<sup>11)</sup>, 골흡수 유도 cytokine인 IL-1 $\beta$ 에 의하여 파골세포 분화 유도인자인 IL-6를 생성하는 것으로 보고되었다<sup>12,13)</sup> 이와 같은 결과들은 치주인대세포가 조골세포와 유사한 특성을 지니고 있음을 시사한다. 즉, 치주인대세포가 골형성 및 흡수를 매개하여 교정력에 의한 치아 이동 및 치주염시 나타나는 치조골 개조 및 파괴에 관여할 가능성을 제시한다. 골대사 조절 물질 중 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>는 치주인대 세포의 ALP 발현을 증가시켜<sup>11)</sup> 치주인대세포가 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>에 의하여 조골세포로 분화될 가능성이 제시되었으며, IL-1 $\beta$ 는 치주인대세포로부터 파골세포 분화 유도인자인 IL-6의 생성을 증가시키는 것으로 보고되었으나 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 및 17 $\beta$ -estradiol이 치주인대세포의 cytokine의 생성에 어떤 영향을 미치는지에 대해서는 밝혀진 바 없다. 따라서 본 연구에서는 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 및 17 $\beta$ -estradiol

\* 본 연구는 1996년 연세대학교 치과대학 학술연구비로 이루어졌음

이 치주인대세포의 IL-6 생성에 미치는 영향을 평가하였으며, 이들 호르몬이 IL-6 생성에 미치는 효과는 IL-6 유도체인 IL-1 $\beta$ 이 있는 조건에서도 관찰하였다.

## II. 연구재료 및 방법

### 1. 연구재료

IL-6 면역효소흡착법(Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) kit는 Endogen사로부터 구입하여 사용하였으며, 1,25-(OH) $_2$ D $_3$  및 17 $\beta$ -estradiol은 Sigma사에서, IL-1 $\beta$ 는 Genzyme사에서 구입하여 사용하였다.

### 2. 치주인대세포의 분리 및 배양

발치한 소구치로부터 다음과 같이 분리 배양하였다. 치아를 발치한 후 치관 부위를 5.25% sodium hypochlorite에 적서 치관 부위의 세균을 제거하였다. 치근 부위를 끊어 치근에 붙어 있는 치주인대 조직을 분리한 후 조직을 300 unit/ml penicillin, 300 ug/ml streptomycin 및 0.75 ug/ml amphotericin B가 함유된  $\alpha$ MEM 배지(Gibco, USA)에 5회 세척하였다. 세척한 조직편을 세포배양기 바닥에 부착시킨 후 20% 우태아 혈청(Gibco, USA), 200 unit/ml penicillin, 200 ug/ml streptomycin 및 0.25 ug/ml amphotericin B가 함유된  $\alpha$ MEM배지(이하 세포배양 배지라 함)를 넣어 5% CO $_2$ , 37  $^{\circ}$ C, 95% 습도가 유지되는 항온기에서 배양하였다. 치주인대 조직으로부터 세포가 자라나와 단층을 형성한 후, 0.05% trypsin-EDTA(Gibco, USA)로 처리하여 계대 배양하였으며, 실험에는 5-9번 계대 배양한 치주인대세포를 사용하였다.

### 3. 치주인대세포로부터 IL-6 생성유도

치주인대세포를 24 well 세포배양기의 각 well에 세포수가  $1 \times 10^5$  되게 분주 한 후 이를 37 $^{\circ}$ C, 5% CO $_2$  항온기에서 배양하였다. 세포가 단층을 형성한 후 배지를 제거하고 일정한 농도의 1,25-(OH) $_2$ D $_3$ , 17 $\beta$ -

estradiol 또는 IL-1 $\beta$ 가 함유된 배양배지를 1ml 첨가하여 1일 및 2일 배양하여 IL-6의 생성을 유도하였다. 1일 및 2일 후 세포 배양액을 200 xg에서 10분간 원심분리하여 상층액을 얻고, 이를 -70 $^{\circ}$ C에 보관하여 실험에 사용하였으며, IL-6의 생성을 유도할 때는 2% 우태아 혈청이 함유된 세포배양 배지를 사용하였다. 17 $\beta$ -estradiol 및 1,25-(OH) $_2$ D $_3$ 가 IL-1 $\beta$ 에 의한 IL-6 생성에 미치는 영향을 평가하기 위해서는 IL-1 $\beta$  단독 또는 IL-1 $\beta$  및 일정한 농도의 1,25-(OH) $_2$ D $_3$  또는 17 $\beta$ -estradiol이 함유된 배지에서 치주인대세포를 배양하여 IL-6의 생성을 비교하였다.

### 4. 치주인대세포 배양액 내 IL-6 농도 측정

IL-6와 특이하게 반응하는 항혈청을 이용한 면역효소흡착법으로 배양액 내 IL-6의 농도를 측정하였다. 치주인대세포 배양액 또는 일정한 농도로 희석된 표준 IL-6 용액과 50  $\mu$ l의 biotinylated anti-human IL-6를 anti-human IL-6가 부착된 96 well plate에 분주하고 실온에서 2시간 방치하였다. 2시간 후 buffer로 3회 세척하고 100  $\mu$ l avidin-peroxidase를 첨가하여 30 분간 방치한뒤 buffer로 3회 세척하였으며, 마지막으로 3,3',5,5'-tetramethylben-zidine(TMB)용액을 각 well에 100  $\mu$ l씩 떨어뜨려 실온에서 30 분간 반응시킨 후 microplate reader(Dynatech Co.)로 450nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준 IL-6의 희석 농도와 흡광도로 표준방정식을 구한 후 세포 배양액 내의 IL-6의 농도를 계산하였다.

### 5. 통계 분석

각 군들 사이에 유의성 있는 차이가 있는지 알아보기 위하여 비모수 검정법인 Mann and Whitney test를 이용하여 통계분석을 하였다.

## III. 연구결과

### 1. 17 $\beta$ -estradiol이 치주인대세포의 IL-6 생성에 미치는 영향

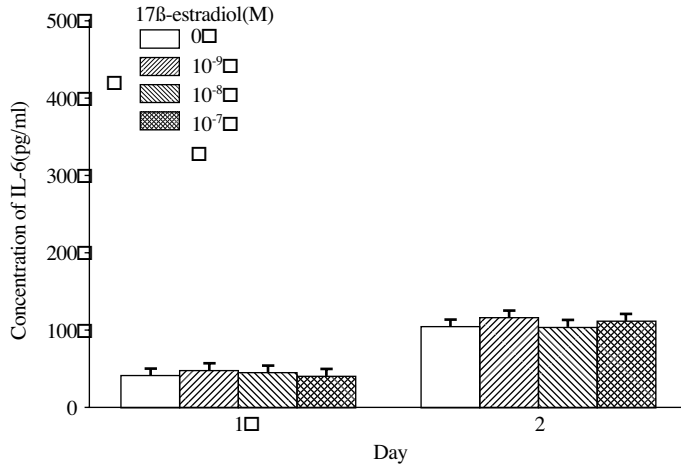


Figure 1. Effect of 17 $\beta$ -estradiol on induction of IL-6 in periodontal ligament(PDL) cells. PDL cells were treated for 1 day and 2 days by various concentrations of 17 $\beta$ -estradiol( $10^{-9}$ - $10^{-7}$  M). The conditioned media were assessed for the production of IL-6 by an ELISA specific IL-6 antibody. Data are mean $\pm$ SE. \* Significant differences from non-treated group p<0,05

Figure 1에서 보는 바와 같이 자극을 받지 않은 치주인대세포 배양액 내 IL-6농도는 1일 및 2일 후 각각  $42\pm 12$  pg/ml 및  $106\pm 24$  pg/ml로서 치주인대세포는 비자극시 소량의 IL-6를 생성하였으며, 17 $\beta$ -estradiol은  $10^{-9}$ - $10^{-7}$  M 농도 범위에서 1일 및 2일 후 치주인대세포의 IL-6 생성을 억제 또는 증가시키지 않았다(Figure 1).

## 2. 17 $\beta$ -estradiol이 IL-1 $\beta$ 에 의한 치주인대세포의 IL-6 생성에 미치는 영향

치주인대세포를 0.05 ng/ml의 IL-1 $\beta$ 로 처리한 경우 1일 및 2일 후 생성된 IL-6의 농도는 각각  $6109\pm 1318$  pg/ml 및  $14071\pm 1740$  pg/ml 로서 IL-1 $\beta$ 에 의하여 치주인대세포의 IL-6 생성이 증가하였으나, 동

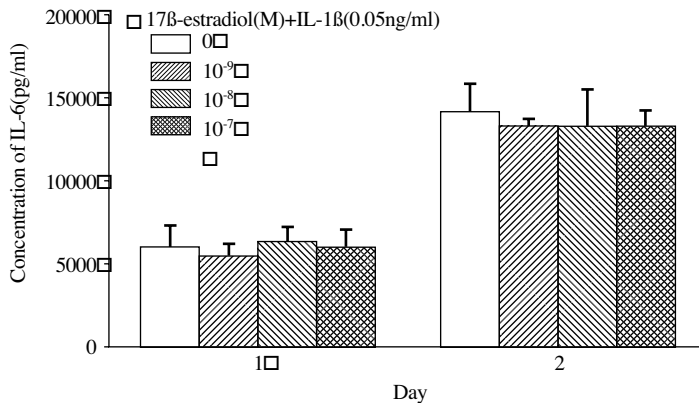


Figure 2. Effect of 17 $\beta$ -estradiol on IL-1 $\beta$ -induced IL-6 production in periodontal ligament(PDL) cells. PDL cells were treated for 1 day and 2 days by various concentrations of 17 $\beta$ -estradiol( $10^{-9}$ - $10^{-7}$  M) in the presence of IL-1 $\beta$ (0.05 ng/ml). The conditioned media were assessed for the production of IL-6 by an ELISA specific IL-6 antibody. Data are mean $\pm$ SE. \* Significant differences from IL-1 $\beta$ -treated group p<0,05.

일한 농도의 IL-1 $\beta$ 와 10<sup>-9</sup>-10<sup>-7</sup> M 농도 범위의 17 $\beta$ -estradiol을 동시에 처리한 경우 1일 및 2일 후 17 $\beta$ -estradiol에 의하여 IL-1 $\beta$ 에 의한 IL-6의 생성은 억제되지 않았다(Figure 2).

### 3. 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>가 치주인대세포의 IL-6 생성

### 에 미치는 영향

10<sup>-10</sup>부터 10<sup>-8</sup> M 농도 범위의 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>로 치주인대세포를 처리한 경우 비처리군과 비교하여 1일 후 IL-6의 생성에는 변화가 없었으며, 2일 후 비처리군 및 10<sup>-8</sup> M 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>에 의하여 생성된 IL-6의

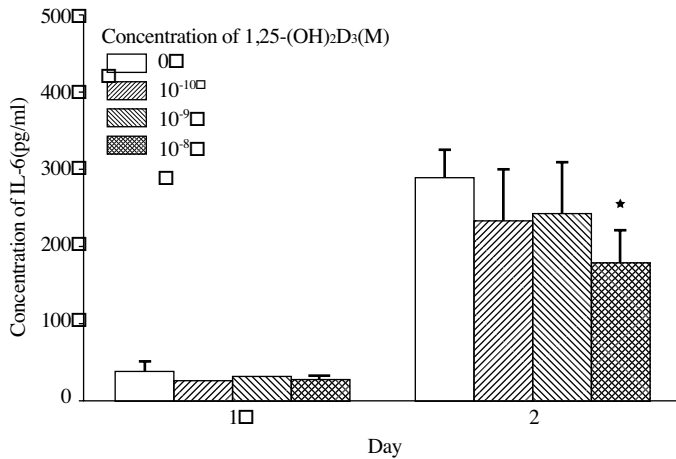


Figure 3. Effect of 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> on IL-6 production in periodontal ligament(PDL) cells. PDL cells were treated for 1 day and 2 days by various concentrations of 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>(10<sup>-10</sup>-10<sup>-8</sup> M). The conditioned media were assessed for the production of IL-6 by an ELISA specific IL-6 antibody. Data are mean±SE. \* Significant differences from non-treated group p<0.05.

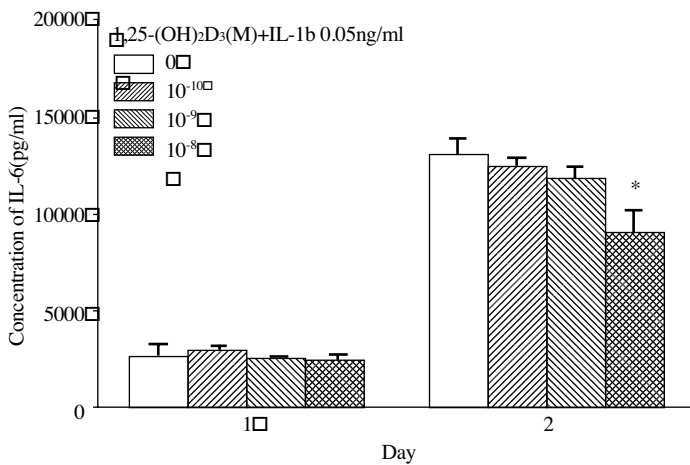


Figure 4. Effect of 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> on IL-1 $\beta$ -induced IL-6 production in periodontal ligament(PDL) cells. PDL cells were treated for 1 day and 2 days by various concentrations of 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>(10<sup>-9</sup>-10<sup>-10</sup> M) in the presence of IL-1 $\beta$ (0.05 ng/ml). The conditioned media were assessed for the production of IL-6 by an ELISA specific IL-6 antibody. Data are mean±SE. \* Significant differences from IL-1 $\beta$ -treated group p<0.05.

농도는 각각  $290 \pm 36$  pg/ml 및  $180 \pm 43$  pg/ml로서 2일 후  $10^{-8}$  M의  $1,25-(OH)_2D_3$ 에 의하여 치주인대세포의 IL-6 분비량이 감소하였다(Figure 3).

#### 4. $1,25-(OH)_2D_3$ 가 IL-1 $\beta$ 에 의한 IL-6 생성에 미치는 영향

Figure 4에서 보는 바와 같이 0.05 ng/ml IL-1 $\beta$ 로 치주인대세포를 1일 및 2일간 처리한 경우 IL-1 $\beta$ 에 의하여 IL-6의 생성이 증가하였으며, 0.05 ng/ml IL-1 $\beta$  및  $10^{-10}$ - $10^{-8}$  M  $1,25-(OH)_2D_3$ 로 동시에 처리한 경우 1일 후  $1,25-(OH)_2D_3$ 는 각 농도에서 IL-1 $\beta$ 에 의한 IL-6의 생성을 억제하지 않았으며, 2일 후 IL-1 $\beta$  처리군 및  $10^{-8}$  M  $1,25-(OH)_2D_3$  처리군에서의 IL-6 농도는 각각  $13114 \pm 696$  pg/ml 및  $9031 \pm 1169$  pg/ml로서  $1,25-(OH)_2D_3$ 는  $10^{-8}$  M에서 IL-1 $\beta$ 에 의한 IL-6의 생성을 감소시켰다.

### IV. 총괄 및 고찰

본 연구에서  $17\beta$ -estradiol은 치주인대세포의 IL-1 $\beta$ 에 의한 IL-6 생성에 영향을 미치지 않았으며,  $1,25-(OH)_2D_3$ 는 치주인대세포의 IL-6의 생성 뿐만 아니라 IL-1 $\beta$ 에 의한 IL-6의 생성도 억제하였다. IL-6는 마우스 두개골에서  $Ca^{2+}$ 을 유리시키며<sup>14)</sup>, 파골세포의 형성을 유도하는<sup>15)</sup> 골흡수 유도 cytokine이다. 사람 및 쥐의 골조직으로부터 분리한 조골세포는 자극을 받지 않는 경우에도 IL-6를 소량으로 합성하며, IL-1 $\beta$ 은 이들 세포의 IL-6의 분비량을 200-2000 배정도 증가시키므로 조골세포로부터 생성되는 IL-6가 IL-1 $\beta$ 에 의한 파골세포의 분화에 관여하는 것으로 보고되었다.<sup>9,16)</sup> 본 연구에서 치주인대세포도 비자극시 IL-6를 생성하였으며(Figure 1), IL-1 $\beta$ 에 의해서 IL-6의 분비량은 45-127배로 증가하였다(Figure 2, 4). Shimizu 등은 7시간 동안 IL-1 $\beta$ 가 치주인대세포의 IL-6 생성에 미치는 영향을 평가하여 치주인대세포의 IL-1 $\beta$ 에 의한 IL-6 생성량이 IL-1 $\beta$ 의 농도 및 자극 시간에 따라 증가함을 보고하였다<sup>12)</sup>. 이와 같은 결과들은 치주인대세포가 조골세포와 동일하게 IL-1 $\beta$ 에 반응하여

IL-6를 생성함을 시사한다. IL-1 $\beta$ 는 치은염 및 치주염 환자의 치주조직과<sup>17)</sup> 교정력에 의한 치아 이동시 장력측(tension side) 및 압축측(compression side)에서 발현되며<sup>18)</sup>, 기계적인 자극을 받은 치주인대세포로부터 생성된다<sup>9)</sup>. 이러한 결과들은 IL-1 $\beta$ 가 치주인대세포를 자극하여 IL-6의 생성을 유도하며, 이렇게 치주인대세포로부터 생성된 IL-6는 파골세포의 분화를 유도하여 치주염 및 교정시 나타나는 치조골 흡수를 매개하는 중요한 인자로 작용할 가능성을 제시한다. 여성 호르몬인  $17\beta$ -estradiol은 IL-1 $\beta$ 에 의한 조골세포의 IL-6 생성을 억제하며, 이러한 작용이  $17\beta$ -estradiol에 의한 골흡수 억제 기전과 관련이 있는 것으로 보고되었다<sup>9)</sup>.  $17\beta$ -estradiol은  $10^{-8}$  M 농도에서 IL-1 $\beta$ 에 의한 조골세포의 IL-6 생성을 억제하였으나<sup>9)</sup>, 동일한 농도에서 치주인대세포의 IL-6의 생성에는 영향을 미치지 않았으며(Figure 1), IL-1 $\beta$ 에 의한 IL-6의 생성도 억제하지 않았다(Figure 2). 이는  $17\beta$ -estradiol이 조골세포와는 달리 치주인대 세포의 IL-1 $\beta$ 에 의한 IL-6 생성을 조절하지 못함을 시사한다.

$1,25-(OH)_2D_3$ 는 Vitamin D의 활성화 형태로서, 체액 내 칼슘의 농도를 높게 유지할 수 있도록 소장에서는 칼슘의 흡수를 골조직으로부터는 칼슘 유리를 증가시키며, 특히 골조직으로부터 칼슘의 유리는  $1,25-(OH)_2D_3$ 에 의한 파골세포의 분화에 의하여 유도된다<sup>20)</sup>.  $1,25-(OH)_2D_3$ 는  $10^{-8}$  M 농도에서 마우스 골수세포의 IL-6의 생성을 증가시키고, anti-IL-6 antibody는  $1,25-(OH)_2D_3$ 에 의한 파골세포의 형성을 일부 억제하므로 IL-6가  $1,25-(OH)_2D_3$ 에 의한 파골세포의 분화에 관여하는 것으로 생각되고 있다<sup>21)</sup>. 이와 같이 마우스 두개골 세포에서  $10^{-8}$  M의  $1,25-(OH)_2D_3$ 가 IL-6의 합성을 증가시키는 것으로 보고되었으나 치주인대세포에서는 반대로 억제하는 것으로 나타났다(Figure 3). Lacey<sup>22)</sup> 등은 마우스로부터 분리한 전조골세포(preosteoblast)인 MC3T3에서  $1,25-(OH)_2D_3$ 가 IL-1 수용체의 발현을 증가시키며, 동시에 IL-1에 의한 IL-6의 생성을 증가시키는 것으로 보고하였으며, Schiller 등은<sup>21)</sup> 마우스 골수세포에서  $17\beta$ -estradiol이  $1,25-(OH)_2D_3$ 에 의한 IL-6 생성 및 파골세포의 분화를 억제하는 것으로 보고하였다. 이와

같은 결과들은 치주인대세포에 대한 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>의 작용이 다른 요인 즉, IL-1β 및 17β-estradiol에 의하여 영향을 받을 가능성을 제시한다. 본 연구에서 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>가 치주인대세포의 IL-1β에 의한 IL-6의 생성에 미치는 영향을 평가한 결과 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>가 IL-1β에 의한 IL-6의 생성을 억제하는 것으로 나타났다(Figure 4). Harant 등<sup>23)</sup>은 사람 배자(embryo)의 폐에서 분리한 섬유아세포에서 조골세포에서 오는 달리 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>가 IL-1β에 의한 IL-6mRNA 발현을 감소시키는 것으로 보고하였다. 이와 같은 결과들은 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>가 조골세포에서는 IL-1β에 의한 IL-6의 생성을 증가시키며 섬유아세포 및 치주인대세포에서는 IL-6의 생성을 억제하여 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>가 IL-6의 생성에 미치는 영향이 세포마다 다름을 시사한다. 본 연구에서 17β-estradiol은 치주인대세포의 IL-1β에 의한 IL-6의 생성에 영향을 미치지 않았으나 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>는 치주인대세포의 IL-1β에 의한 IL-6의 생성을 감소시켰으며 이와 같은 결과는 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>가 치주인대세포의 IL-1β에 의한 IL-6 생성을 억제하여 IL-1β에 의한 파골세포의 분화를 조절할 가능성을 제시한다.

## V. 결론

17β-estradiol, 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 및 IL-1β는 조골세포로부터 파골세포 분화 유도인자인 IL-6의 생성을 억제 또는 증가시켜 파골세포의 분화를 조절한다. 본 연구에서는 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 및 17β-estradiol이 조골세포와 유사한 특징을 지닌 치주인대세포의 IL-6 생성에 미치는 영향을 평가하였다. 17β-estradiol 및 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>가 치주인대세포의 IL-6의 생성에 미치는 영향을 평가하기 위하여 치주인대세포를 17β-estradiol 또는 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 각각으로 처리하거나 IL-1β와 함께 처리하여 1일 및 2일 후 상층액 내 IL-6의 농도를 면역효소흡착법으로 측정하였다. 치주인대세포는 자극을 받지 않은 상태에서 1일 및 2일 후 저농도의 IL-6를 분비하였으며 IL-1β(0.05 ng/ml)는 치주인대세포의 IL-6 합성을 증가시켰다. 17β-estradiol(10<sup>-9</sup>-10<sup>-7</sup> M)은 IL-6의 생성에 영향을 주지 않았으며, IL-

1β(0.05 ng/ml)에 의한 IL-6 생성도 억제하지 않았다. 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>(10<sup>-8</sup> M)는 2일 후 치주인대세포의 IL-6의 생성을 억제하였으며, IL-1β(0.05 ng/ml)에 의한 IL-6 생성도 억제하였다. 이와 같은 결과는 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>가 치주인대세포에서 IL-1β에 의한 IL-6의 생성을 감소시켜 IL-1β에 의한 파골세포의 분화를 조절할 가능성을 시사한다.

## VI. 참고문헌

1. Ammann P, Rizzoli R, Bonjour JP, Bourrin S, Meyer JM, Vassalli P, Garcia I. Transgenic mice expressing soluble tumor necrosis factor-receptor are protected against bone loss caused by estrogen deficiency. *J Clin Invest* 1997; 99: 1699-1703.
2. Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliott R, Colombero A, Elliott G, Scully S, Hsu H, Sullivan J, Hawkins N, Davy E, Capparelli C, Eli A, Qian YX, Kaufman S, Sarosi I, Shalhoub V, Senaldi G, Guo J, Delaney J and Boyle WJ. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation activation. *Cell* 1998; 93: 165-176.
3. Suda T, Udagawa N, Takahashi N. Cells of bone: Osteoclast generation. In: Bilezikian JP, Raisz L, Rodan GA, Eds. *Principals of Bone Biology*. San Diego, CA:Academic; 1996; 87-102.
4. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinoshaki M, Mochizuki S, Tomoyasu A, Yano K, Goto M, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K, Udagawa N, Takahashi N, Suda T. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/ osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci* 1998; 95: 3597-3602.
5. Jilka RL. Cytokines, bone remodeling, and estrogen deficiency: A 1998 Update *Bone* 1998; 23: 75-81.

6. Udagawa N, Takahashi N, Katagiri T, Tamura T, Wada S, Findlay DM, Martin TJ, Hirota H, Tada T, Kishimoto T, Suda T. Interleukin(IL)-6 induction of osteoclast differentiation depends on IL-6 receptors expressed on osteoblastic cells but not on osteoclast progenitors. *J Exp Med* 1995; 182: 1461-1468.
7. Pacifici R, Estrogen, cytokines and pathogenesis of postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res* 1996; 11: 1043-1051.
8. Manolagas SC, Jilka RL. Bone marrow, cytokines, and bone remodeling. *N Engl J Med* 1995; 332:305-311
9. Girasole G, Jilka RL, Passeri G, Boswell S, Boder G, Williams DC, Manolagas SC.  $17\beta$ -estradiol inhibits interleukin-6 production by bone marrow-derived stromal cells and osteoblasts invitro: A potential mechanism for the antiosteoporotic effect of estrogens. *J Clin Invest* 1992; 89: 883-891.
10. Koka S, Petro TM, Reinhardt RA. Estrogen inhibits interleukin-1beta-induced interleukin-6 production by human osteoblast-like cells. *J Interf Cyto Res* 1998; 18: 479-483.
11. Basdra EK, Komposch G. Osteoblast-like properties of human periodontal ligament cells: an *in vitro* analysis. *Eur J Orthod* 1997; 19: 615-621.
12. Shimizu N, Ogura M, Yamaguchi M, Goseki T, Shibata Y, Abiko Y, Iwasawa T, Takiguchi H. Stimulation by interleukin-1 of interleukin-6 production by human periodontal ligament cells. *Archs Oral Biol* 1992; 37: 743-748.
13. Okada N, Kobayashi M, Mugikura K, Okamatsu Y, Hanazawa S, Kitano S, Hasegawa K. Interleukin-6 production in human fibroblasts derived from periodontal tissues is differentially regulated by cytokines and a glucocorticoid. *J Periodont Res* 1997; 32: 559-569
14. Ishimi Y, Miyaura C, Jin CH, Akatsu T, Abe E, Nakamura Y, Yamaguchi A, Yoshiki S, Matsuda T, Hirano T, Kishimoto T, Suda T. IL-6 is produced by osteoblasts and induces bone resorption. *J Immunol* 1990; 145: 3297-3303.
15. Kurihara N, Bertolini D, Suda T, Akiyama Y, Roodman GD. IL-6 stimulates osteoclast-like multinucleated cell formation in long term human marrow cultures by inducing IL-1 release. *J Immun* 1990; 144: 4226-4230.
16. Linkhart TA, Linkhart SG, MacCharles DC, Long DL, Strong DD. Interleukin-6 messenger RNA expression and interleukin-6 protein secretion in cells isolated from normal human bone: regulation by interleukin-1. *J Bone Min Res* 1991; 6: 1285-1294.
17. Hönig J, Rordorf-Adam C, Siegmund C, Wiedemann W, and Erard F. Interleukin-1 beta(IL-1 $\beta$ ) concentration in gingival tissue from periodontitis patients and healthy control subjects. *J Periodont Res* 1989; 24: 362-367.
18. Davidovitch Z, Nicolay OF, Ngan PW, Shanfeld JL. Neurotransmitters, cytokines and the control of alveolar bone remodeling in orthodontics. *Dent Clin N Am* 1988; 32: 411-435.
19. Meikle MC, Heath JK, Atkinson SJ, Hembry RM, Reynolds JJ. The biology of tooth movement(Eds Norton L.A. and Burstone C.J.) 1989; 71-86 CRC press, Boca Raton FL.
20. Suda T, Jimi E, Nakamura I, Takahashi N. Role of  $1\alpha, 25$ -Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in osteoclast differentiation and function. *Methods enzymol* 1997; 282: 223-235.
21. Schiller C, Gruber R, Redlich K, Ho GM, Katzgraber F, Willheim M, Pietschmann P, Peterlik M.  $17\beta$ -estradiol antagonizes effects of  $1\alpha, 25$ -dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> on interleukin-6 production and osteoclast-like cell formation in mouse bone marrow primary cultures. *Endocrinology* 1997; 138: 4567-4571.

22. Lacey DL, Grosso LE, Moser SA, Erdmann J, Tan HL, Pacifici R, Villareal DT. IL-1-induced murin osteoblast IL-6 production is mediated by the type 1 IL-1 receptor and is increased by 1,25 dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *J Clin Invest* 1993; 91: 1731-1742.
23. Harant H, Wolff B, Lindley IJ. 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> decreases DNA binding of nuclear factor-kappaB in human fibroblasts. *FEBS Lett* 1998; 436: 329-334.



## Effect of $17\beta$ -Estradiol and $1,25$ -Dihydroxyvitamin $D_3$ on Interleukin-6 Production of Periodontal Ligament Cells

Wall-Ah Kwak, Bong-Kyu Choi, Hyun-Jung Lee, Yun-Jung Yoo  
Department of Oral Biology, Yonsei University, College of Dentistry

Interleukin-6(IL-6) stimulate osteoclast differentiation,  $17\beta$ -estradiol,  $1,25$ -dihydroxyvitamin  $D_3$ ( $1,25$ -(OH) $_2D_3$ ) and interleukin- $1\beta$  inhibit or stimulate osteoclast differentiation by decreasing or increasing the synthesis of interleukin-6(IL-6) from stromal/osteoblastic cells, respectively. Periodontal ligament(PDL) cells reside between the alveolar bone and the cementum and have osteoblastic characteristics. To estimate the effect of  $17\beta$ -estradiol and  $1,25$ -(OH) $_2D_3$  on IL-6 production of PDL cells, PDL cells were treated with  $17\beta$ -estradiol or  $1,25$ -(OH) $_2D_3$  in the absence or the presence of IL- $1\beta$ . The concentration of IL-6 produced from PDL cells was determined by enzym linked immunosorbent assay(ELISA). In unstimulated PDL cells, we detected constitutive production of IL-6 at 1st and 2nd day. IL- $1\beta$  increased IL-6 synthesis at 1st day and 2nd day.  $17\beta$ -estradiol had no significant effect on the secretion of this cytokine, either constitutively or after stimulation with IL- $1\beta$ ( $0.05$  ng/ml).  $1,25$ -(OH) $_2D_3$ ( $10^{-8}$ M) decreased not only constitutive IL-6 production but also IL- $1\beta$ -induced IL-6 production at 2nd day. These results suggest that  $1,25$ -(OH) $_2D_3$  may control IL- $1\beta$ -induced osteoclast differentiation by decreasing IL- $1\beta$ -induced IL-6 secretion of PDL cells.

---

Key words:  $17\beta$ -estradiol,  $1,25$ -Dihydroxyvitamin  $D_3$ , Interleukin-6, Interleukin- $1\beta$ , Periodontal ligament cells, Osteoclast differentiation.