

Interleukin-1 β 에 의하여 치주인대세포에서 유리된 cytokine이 파골세포형성에 미치는 영향

1. 연세대학교 치과대학 소아치과학교실
2. 연세대학교 치과대학 구강생물학교실

김태선¹ · 유윤정² · 곽월아² · 이승일² · 이종갑¹

Abstract

FORMATION OF OSTEOCLASTS BY CYTOKINES RELEASED FROM PERIODONTAL LIGAMENT CELLS IN RESPONSE TO INTERLEUKIN-1B

Tai-Sun Kim¹, Yun-Jung Yu², Wan-Ah Gwak², Sung-Il Lee², Jong-Gap Lee¹

1. Department of Pediatric Dentistry, College of Dentistry, Yonsei University

2. Department of Oral Biology, College of Dentistry, Yonsei University

Tooth movement is induced by bone remodeling during orthodontic treatment. Bone remodeling is regulated by various cytokines. Especially interleukin-1 (IL-1 β), a cytokine present in periodontal ligaments of experimentally moved teeth, elicits bone resorption. In these processes, IL-1-induced bone resorption is mediated by interleukin-6 (IL-6) and granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) secreted from osteoblasts. Periodontal ligament cells, which function as an anchorage for tooth, lie between alveolar bone and cementum. Therefore cytokines produced in the periodontal ligament (PDL) cells may also directly affect alveolar bone resorption in orthodontic tooth movement. Here I have examined whether PDL cells express IL-1 β , interleukin-6 (IL-6) and granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) mRNA and secrete those cytokines in response to IL-1 β . Finally I have investigated whether IL-6 produced from PDL cells induces osteoclast formation in mouse bone marrow cell cultures. The expression of mRNA was estimated by polymerase chain reaction (PCR). The concentration of cytokines was quantified using enzyme linked immunosorbent method and the osteoclasts in bone marrow cultures were identified by tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) stain.

As results of these studies, IL-1 β stimulated the expression of IL-1 β , IL-6 and GM-CSF mRNA in PDL cells. 0.05 ng/ml IL-1 β also induced maximum production of IL-6 and GM-CSF in these cells. After an addition of IL-1 β (0.05 ng/ml), IL-6 production increased

from 2 hours to 8 hours and GM-CSF production also increased from 4 hours to 8 hours. IL-6 (100 ng/ml) increased the number of TRAP positive multinucleated cells in the presence of soluble interleukin-6 receptor (sIL-6R, 100 ng/ml). These results suggest that IL-1 β may stimulate alveolar bone resorption by inducing IL-6 and GM-CSF production in PDL cells which enhance osteoclast differentiation and IL-6 enhances osteoclast formation in the presence of sIL-6R. And this process by IL-1 β may be closely associated with alveolar bone resorption induced by orthodontic force.

Key words : Interleukin-1 β , Interleukin-6, Granulocyte macrophage-colony stimulating factor, Soluble interleukin-6 receptor, Periodontal ligament cells, Osteoclast differentiation, Orthodontic force, Alveolar bone resorption.

I. 서 론

골조직은 골격을 구성하는 결체조직으로 교원섬유, proteoglycan과 같은 세포간 기질, 조골세포 (osteoblast), 파골세포 (osteoclast) 그리고 골세포 (osteocyte)로 구성되어 있다. 이는 매우 활동적인 조직으로서 계속적으로 골개조 (bone remodeling)가 일어난다 (Meghji, 1992). 골개조는 파골세포에 의한 골흡수와 조골세포의 골형성에 의하여 균형이 유지되는 과정으로, 순차적으로 진행된다. 즉 파골세포가 골에 부착하여 산화 및 단백질 분해과정에 의해 골을 계속적으로 흡수하면 조골세포가 그 부위에서 골기질을 구성하는 교원섬유 및 proteoglycan, osteonectin, osteopontin, sialoprotein 그리고 osteocalcin과 같은 단백질을 형성하여 골석회화가 일어난다 (Meghji, 1992). 특히 골흡수는 분화 및 활성화된 파골세포가 골조직의 세포간 기질을 제거하는 과정으로서 (Horowitz, 1993 ; Meghji, 1992) 파골세포의 분화 및 활성화는 조골세포로부터 생성되는 수용성물질에 의하여 매개되는 것으로 알려졌다 (Ishimi 등, 1990 ; Pfeilschifter 등, 1989 ; Jilka, 1986 ; Mcsheeey와 Chambers, 1986a, 1986b). 이러한 골흡수 과정은 lipopolysaccharide (LPS, Raiz, 1982 ; Hausmann 등, 1970)와 같은 세균의 구성성분, 부갑상선 호르몬 (Raiz, 1965), 1,25 dihydroxy vitamin

D3 (Roodman 등, 1985), eicosanoid (Klein와 Raiz, 1970) 및 cytokine과 같은 전신 또는 국소적 생성 인자들에 의하여 조절된다.

이와 같은 골흡수 유도 물질 중 Cytokine은 섬유아세포, 림프구 및 단핵세포를 비롯한 여러 세포에서 생성되는 수용성물질이다. 처음에는 단핵세포의 배양상층액에 골흡수 유도물질이 있는 것이 발견되어 이 물질을 파골세포활성화물질 (osteoclast activating factor)이라 명명 하였으나 (Horton 등, 1972), 그 이후 파골세포활성화물질이 단핵세포로부터 생성되는 interelukin-1 (IL-1 β)인 것으로 밝혀져 (De-whirst 등, 1985) IL-1 β 가 골흡수과정에 직접 관여하는 것으로 생각하였다. IL-1은 마우스 두개골의 골흡수를 유도하며 (Gowen와 Mundy, 1986 ; Heath 등, 1985 ; Gowen 등, 1983), 골수세포로부터 파골세포형성을 촉진하기 때문에 (Pfeilschifter 등, 1989) IL-1이 직접 파골세포에 작용하여 골흡수를 야기하는 것으로 받아들여졌다. 그러나 조골세포가 있는 경우에만 IL-1에 의한 골흡수가 일어나는 점으로 보아, 조골세포에서 유리되는 물질에 의하여 골흡수가 조절될 가능성이 제시되었다 (Thomson 등, 1986). 더욱이 IL-1으로 자극 받은 조골세포로부터 마우스 두개골이나 골수세포에서 파골세포의 분화를 촉진시키는 interleukin-6 (IL-6) 및 granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF)가 생성되는 것

으로 알려져 (Chaudhary 등, 1992 ; Girasole 등, 1992 ; Ishimi 등, 1990 ; Lowik 등, 1989 ; Macdonald 등, 1986 ; Sato 등, 1986), IL-6 및 GM-CSF와 같은 cytokine들이 IL-1에 의한 골흡수를 매개하는 것으로 생각하게 되었다.

이와 같이 여러 인자들의 작용에 의하여 야기되는 골흡수는 교정력에 의하여 치아가 이동하는 경우에도 동반되므로 교정력에 의한 치조골흡수 기전에 대해 많은 관심을 갖게 되었으며 이에 대한 연구가 진행되어 왔다 (Ngan 등, 1992 ; Yousefian 등, 1992). 일반적으로 교정력을 가하는 경우 초기에 염증반응이 일어나 치아주변의 혈관이 확장되고, 모세혈관으로부터 백혈구들이 이주해 나오므로 (Davidovitch 등, 1988) 이들 세포로부터 생성되는 cytokine이 직접 골세포에 작용하거나 간접적으로 단핵세포, 립프구 또는 섬유아세포등과 같은 주변세포들로부터 cytokine 및 prostaglandin과 같은 매개물질의 생성을 유도하여 골흡수를 유도할 수 있을 것으로 추측하였으며, 이를 확인하기 위하여 실험동물에 직접 교정력을 가한 후 12 시간, 24 시간, 7 일 후 치주인대조직의 IL-1 β 의 농도를 측정하였다 (Saito 등, 1991). 그 결과 교정력을 가한 경우 치조골주변의 치주인대조직의 IL-1 β 의 농도가 증가됨을 관찰할 수 있었으며 실제로 치주인대세포를 시험판내에서 배양하여 교정치료시 가해지는 자극과 유사한 기계적 자극 가한 경우에도 이들 세포로부터의 IL-1 β 의 생성이 증가되었다 (Saito 등, 1991 ; Meikle 등, 1989). 이러한 사실들은 교정력에 의한 치조골 주변의 IL-1 β 농도 증가가 치조골흡수와 관련이 있음을 시사해주나 IL-1 β 가 어떤 과정을 거쳐 치조골흡수를 야기시키는지 그 기전에 대해서는 확실히 밝혀져 있지 않다. 치조골은 치아를 둘러 싸고 있는 골조직으로 다른 골조직과는 달리 그 주변에 조골세포이외에 치주인대세포가 있다. 치주인대세포는 치조골과 인접해 있으므로 교정력 치료시 치주인대세포에서 골흡수 유도 물질이 생성된다면, 이들 물질은 치조골흡수를 조절하여 치아이동에 영향을 미칠 수 있다.

실제로 치주인대세포에 기계적 또는 IL-1 자극을 단독으로 가하거나 동시에 자극하여 얻은 치주인대세포배양액이 마우스 두개골의 흡수를 유도할 수 있음이 입증되었으며 (Saito 등, 1991), 이러한 치주인대세포 배양액에는 골흡수도물질로서 prostaglandin 이외에 다른 수용성물질이 있음이 알려졌으나 그 성분에 대해서는 정확히 밝혀져 있지 않다 (Saito 등, 1991 ; Ngan 등, 1990). 그러나 치주인대세포는 섬유아세포 및 조골세포와 유사한 형질을 지닌 다양한 세포로 구성되어 있으며, 피부로부터 분리한 섬유아세포는 IL-1 β 에 의하여 IL-6 및 GM-CSF를 생성하며 (Kaushansky 등, 1988 ; Damme 등, 1987), 조골세포도 IL-6 및 GM-CSF를 합성하므로 이러한 결과들은 치주인대세포로부터 골흡수와 관련이 있는 cytokine이 생성될 가능성이 있음을 시사해준다. 따라서 본 실험에서는 IL-1 β 가 치주인대세포의 골흡수 유도 cytokine 생성에 미치는 영향을 규명하고자 IL-1 β 가 치주인대세포의 1) IL-1 β , IL-6 및 GM-CSF mRNA 발현 및 2) IL-6 및 GM-CSF 생성에 미치는 영향을 관찰 하였으며, 3) IL-6가 마우스 골수세포의 파골세포 형성에 미치는 영향을 평가하였다.

II. 실험재료 및 방법

1. 실험재료

본 실험에서 사용한 치주인대세포는 연세대학교 치과대학 부속병원 악안면외과에 내원한 환자 중 교정을 목적으로 발치한 소구치로부터 분리 배양하였으며, 골수세포는 대한실험동물센터에서 구입한 ICR (Institute of Cancer Research) 마우스로부터 분리하여 사용하였다. 치주인대세포 및 골수세포를 자극하기 위한 recombinant human IL-1 β 및 recombinant human IL-6는 Genzyme 회사로부터, recombinant human sIL-6R는 R & D System 회사로부터 구입하여 사용하였다.

2. 실험방법

가. 치주인대세포의 분리 및 배양

발치한 소구치로부터 치주인대세포를 다음과 같이 분리 배양하였다. 치아를 발치한 후 치관부위를 5.25% sodium hypochlorite에 적셔 치관부위의 세균을 제거하였다. 멸균된 칼로 치근부위를 긁어 치근에 붙어 있는 치주인대조직을 분리한 후 조직을 300 unit/ml penicillin, 300 µg/ml streptomycin 및 0.75 µg/ml amphotericin B가 함유된 alpha MEM배지 (Gibco, Gaithersburg, MD, U.S.A.)에 다섯번 세척하였다. 세척한 조직면을 세포배양기 바닥에 부착시키고 20% 우태아혈청 (Gibco, Gaithersburg, MD, U.S.A.), 200 unit/ml penicillin, 200 µg/ml streptomycin 및 0.5 µg/ml amphotericin B가 함유된 alpha MEM 배지 (이하 치주인대세포 배양배지라 함)를 넣어 5% CO₂, 37°C, 95% 습도를 유지하는 항온기에서 배양하였다. 치주인대조직으로부터 치주인대섬유아세포가 자라나와 단층을 형성한 후, 0.05% trypsin-EDTA (Gibco, Gaithersburg, MD, U.S.A)로 처리하여 세포배양기 바닥으로부터 세포를 분리하여 세포배양기에 옮겼다. 이후 동일한 방법으로 계대배양을 실시하였으며 실험에는 5~9번 계대배양한 치주인대세포만을 사용하였다.

나. IL-1β, IL-6 및 GM-CSF mRNA의 발현 측정

1) IL-1β로 치주인대세포 자극

계대배양한 치주인대세포를 치주인대세포 배양배지 4 ml당 세포수가 2×10^6 개 되게 부유시킨 후 직경이 6 cm되는 세포배양기에 4 ml 분주하고 24시간 배양하였다. 그후 배양배지를 버리고 2% 우태아혈청, 200 unit/ml penicillin, 200 µg/ml streptomycin 및 0.5 µg/ml amphotericin B가 함유된 alpha MEM배지를 4 ml씩 넣고 배양기에 human recombinant IL-1β (Genzyme, Cambridge, MA, U.S.A)를 1 ng/ml되게 첨가하여 24시간 배양하여 IL-1β로 세포를 자극하였다. IL-1β를 첨가하지 않고 배양한 세포를 대조군으로 하였다. 배양 후 이들 세포로 부터 아래와 같이 mRNA를 분리하였다.

2) 치주인대세포로부터 mRNA 분리

치주인대세포에서 mRNA의 분리는 Quick Prep micro mRNA Purification Kit (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, U.S.A.)를 사용하여 분리하였다. 분리방법은 회사에서 추천하는 방법에 따라 시행하였다. 즉 배양한 치주인대세포에 extraction buffer (guanidium thiocyanate 및 N-lauroyl sarcosine)와 elution buffer (10 mM Tris-HCl 및 1 mM EDTA) 각각을 0.4 및 0.8 ml을 첨가하고 5,000×g로 원심분리하여 핵산이 함유된 상층액을 분리하였다. 분리한 핵산용액을 oligo(dT)-cellulose가 들어 있는 시험관에 옮겨 3분간 혼합하여 oligo(dT)-cellulose에 poly A tail RNA를 결합시켰다. poly A tail RNA 가 부착된 oligo(dT)-cellulose에 high salt buffer 와 low salt buffer를 첨가하여 16,000×g로 원심하여 세척한 후, 65 °C elution buffer를 첨가하여 oligo(dT)-cellulose로부터 poly A tail RNA를 분리하였으며, 분리한 RNA는 -70 °C에 보관하여 실험에 사용하였다.

3) 역전사 중합효소연쇄반응 (reverse transcriptase and polymerase chain reaction, RT-PCR)

역전사 중합효소연쇄반응은 유전자의 발현여부를 확인하기 위하여 시험관내에서 RNA의 특정 부분만을 증폭시키는 방법으로서 (Kawasaki 와 Wang, 1989), 아래와 같이 실시하였다.

(1) 역전사반응

cDNA는 random hexamer ($pd(N)_6$)를 이용하여 합성하였다. 치주인대세포로부터 분리한 총 세포 RNA에 random hexamer 2 A₂₆₀ unit (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, U.S.A.), dNTP 200 µM (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany), Tris-HCl 50 mM (pH 8.3), KCl 75 mM, MgCl₂ 3 mM (Gibco, Gaithersburg, MD, U.S.A.), 및 DTT 10 mM (Gibco, Gaithersburg, MD, U.S.A.)와 Moloney Murine Leukemia virus reverse transcriptase 400 units (Gibco, Gaithersburg, MD, U.S.A.)를 혼합한 후 42 °C에서 60분간 반응

시켰다.

(2) 중합효소연쇄반응

중합효소연쇄반응은 IL-1 β , IL-6 및 GM-CSF에 특이적인 primer를 제작하여 시행하였다 (Table 1). 중합효소연쇄반응은 cDNA 10 μ l, sense와 antisense primer 각각 20 pM (한국생공, 대전, 한국), dNTP 200 μ M, MgCl $_2$ 2 mM, KCL 50 mM, Tris-HCL 10 mM (pH=8.3) 및 ampli Taq polymerase 2.5 unit (Perkin Elmer, Branchburg, NJ, U.S.A.)를 혼합하여 실시하였다. PCR은 thermal cycler (Perkin Elmer, Branchburg, NJ, U.S.A.)를 이용하여 30 회 반응을 시켰으며, 각 cycle은 94 °C에서 30초간의 denaturation, 55 °C에서 30초간의 annealing 과 72 °C에서 60초간의 extension 과정으로 구성하였으며, 마지막 72 °C에서 10분간 연장처리하고 4 °C로 냉각하여 반응을 끝냈다. 중합효소연쇄반응산물 10 μ l를 취하여 1.5 % agarose gel에서 전기영동한 후 ethidium bromide로 염색하여 증폭된 DNA band를 관찰하였다.

다. 치주인대세포로부터 유리된 IL-6 및 GM-CSF의 정량 분석

1) 치주인대세포로부터 IL-6 및 GM-CSF생성 유도

치주인대세포를 치주인대세포배양배지 3 ml당 세포수가 8×10^5 개 되게 부유시킨 후 직경이 6 cm되는 세포배양기에 분주하였다. 이를 5 % CO $_2$ 존재하에서 37 °C에 24시간 배양한 후 배양배지를 버리고 2 % 우태아혈청, 200 unit/ml penicillin, 200 μ g/ml streptomycin 및

0.5 μ g/ml amphotericin B가 함유된 새 alpha MEM배지 8 ml을 배양기에 넣고 IL-1 β 를 최종농도가 0.05, 0.1, 1, 5 ng/ml되게 첨가하였다. 그 후 2시간, 4시간, 8시간 및 24시간 동안 치주인대세포를 배양 한 후 치주인대세포배양액을 200×g에서 10분간 원심분리하여 상층액을 얻고, 이를 -70 °C에 보관하였다.

2) 치주인대세포 배양 상층액의 cytokine 농도 측정

IL-6와 GM-CSF와 특이하게 반응하는 각 cytokine에 대한 항혈청을 이용한 효소면역흡착 검사 kit (Genzyme, Cambridge, MA, U.S. A.)로 배양액내의 IL-6 및 GM-CSF의 농도를 측정하였다. IL-6의 농도는 아래와 같이 측정하였다. 자극치주인대세포배양액 및 일정한 농도로 희석된 표준 IL-6 용액을 anti-human IL-6가 부착된 96 well plate에 각각 50 μ l씩 분주하고 37 °C에서 30분간 방치하였다. Buffer로 5 회 세척하고 100 μ l Biotinylated anti-human IL-6를 각 well에 가하여 37 °C에서 30분 동안 방치하였다. 다시 5회 세척한 후 100 μ l avidin-peroxidase를 첨가하여 15 분간 방치한 다음 Buffer (Genzyme, Cambridge, MA, U. S. A.)로 5 회 세척한 후 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) 용액을 각 well에 100 μ l 씩 떨어뜨려 실온에서 30 분간 반응시켰다. 발색 정도는 microplate reader (Dynatech, Alexandria, VA, U.S.A.)로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준 IL-6의 희석 농도와 흡광도로 표준방정식 (Figure 1) 을 구한 후 세포배양 액내의 IL-6의 농도를 계산하였으며 세포배양

Table 1. Synthetic oligonucleotide primers used for PCR

| primer | sequence | Length of PCR product(base pairs) |
|--------------|---|-----------------------------------|
| IL-1 β | 5'-ATGGCAGAAGTACCTGAGCTC-3' 5'-TTAGGAAGACACAAATTGCAT-3' | 810 |
| IL-6 | 5'-ATGAACTCCTCTCCACAAGC-3' 5'-CTACATTTGCCGAAGAGCCCTCAGGCTGGACTG-3' | 628 |
| GM-CSF | 5'-GCATCTCTGCACCCGCCGCTCGCC-3' 5'-CCTGCTTGTACAGCTCCAGGCGGGT-3' | 201 |

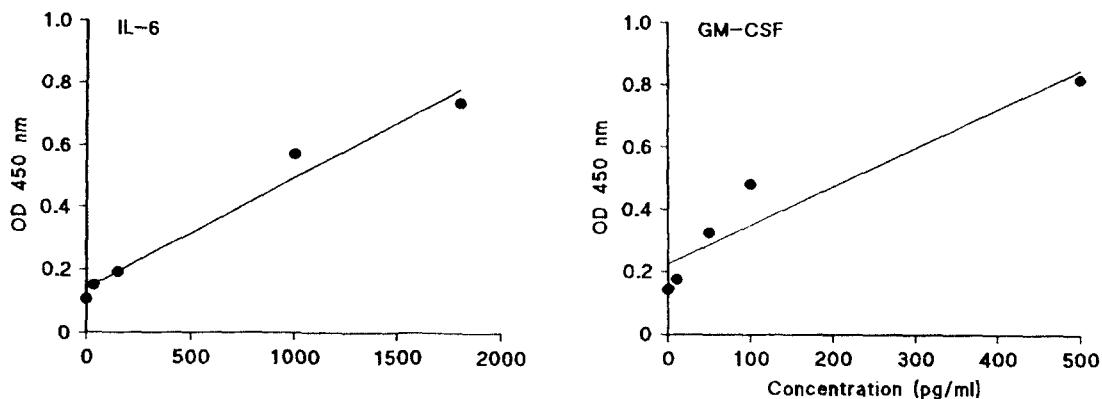


Figure 1. The standard curves of IL-6 and GM-CSF determined by enzyme-linked immunosorbent method. After Diluting the standard solutions of IL-6 and GM-CSF, the optical density (OD) for each diluted standard solution was measured. To determine the cytokine concentration of the samples, standard curves were constructed by plotting the OD of each standard on the Y-axis against the corresponding cytokine concentration on the X-axis. The standard curve equations and correlation coefficients of IL-6 and GM-CSF were respectively $y = 0.0003549x + 0.140336$ ($r = 0.986474$) and $y = 0.001245x + 0.224408$ ($r = 0.948868$).

액내의 GM-CSF의 농도도 같은 방법으로 측정하였다. IL-6 및 GM-CSF의 표준방정식 및 상관계수는 각각 $y = 0.0003549x + 0.140336$ ($r = 0.986474$)와 $y = 0.001245x + 0.224408$ ($r = 0.948868$) 이었다.

라. 파골세포형성능 측정 4-5 주된 ICR 마우스의 대퇴골을 분리한 후 연조직을 제거하고 골말단 부위를 절단하였다. 25 gauge 주사바늘로 αMEM배지 (Gibco, Gaithersburg, MD, U.S.A.)를 골수강내로 주입하여 골수세포를 뽑아낸 후 10 % 우태아혈청 (fetal calf serum; Gibco, Gaithersburg, MD, U.S.A.), penicillin G sodium (100 units/ml), streptomycin sulfate (100 µg/ml) 및 amphotericin B (0.25 µg/ml)가 함유된 αMEM배지 (이하 골수세포 배양배지라 함)에 0.5 ml당 세포수가 1.5×10^6 개 되도록 부유시켰다. 24 well 세포 배양용기 (Corning, NY, U.S.A.)의 각 well에 0.5 ml의 골수세포 부유액을 분주한 후 IL-6 (Genzyme, Cambridge, MA, U.S.A.)와 soluble IL-6 receptor (sIL-6R, R & D,

Minneapolis, MN, U.S.A.) 각각을 단독으로 또는 IL-6와 sIL-6R를 동시에 골수세포 배양배지에 첨가하였다. 이때 IL-6와 sIL-6R의 최종 농도는 각각 100 ng/ml 되게 하였다. 위의 골수세포를 5 % CO₂ 항온항습기 (37 °C)에서 7 일간 배양하였다. 한편 배양 3 일째에 0.25 ml의 골수세포 배양배지를 버리고 동량의 새 골수세포 배양배지를 첨가하였으며 처음과 같은 농도의 IL-6와 sIL-6R도 넣었다. 7 일 후에는 파골세포의 표지물질인 tartrate 저항성 산성인산분해효소 (tartrate resistant acid phosphatase, TRAP; Sigma, St Louis, MO, U.S.A.)를 염색하여 위상차현미경 (100 배)상에서 각 well 당 형성된 핵이 세 개 이상인 TRAP 양성 다핵세포 (파골세포)의 수를 세었다.

마. 실험자료의 분석

본 실험에서 얻은 모든 결과는 비모수 검정법의 연속형인 맨 휘트니 검정 (Mann-Whitney U test)법으로 분석하였으며, p < 0.05 이하를 통계적으로 유의한 수준으로 판정하였다.

III. 실험 결과

1. IL-1 β 에 의한 치주인대세포의 IL-1 β , IL-6 및 GM-CSF mRNA 발현

IL-1 β 가 치주인대세포의 IL-1 β , IL-6 및 GM-CSF mRNA 발현에 미치는 영향을 평가하고자 IL-1 β 로 24시간 자극한 치주인대세포와 자극하지 않은 치주인대세포로부터 mRNA를 분리하고, 이들 mRNA로부터 cDNA를 합성한 후, 합성한 cDNA를 이용하여 IL-1 β , IL-6 및 GM-CSF에 대한 중합효소연쇄반응 (PCR)을 실시하였다. 자극하지 않은 치주인대세포에서는 IL-6 mRNA만 적게 발현되었으나, IL-1 β 로 치주인대세포를 처리한 경우 IL-1 β 및 GM-CSF mRNA의 발현이 유도되었을 뿐만 아니라, IL-6 mRNA 발현도 증가되었다 (Figure 2). 이와

같은 결과로 IL-1 β 가 치주인대세포로부터 IL-1, IL-6 및 GM-CSF mRNA 발현을 유도할 수 있음을 확인하였다.

2. IL-1 β 농도에 따른 치주인대세포의 IL-6 및 GM-CSF 생성

여러농도의 IL-1 β 로 치주인대세포를 24시간 자극한 후 치주인대세포배양액내의 IL-6 및 GM-CSF의 농도를 면역효소측정법으로 측정하였다. 그 결과 IL-1 β 를 0.05, 0.1, 0.5 및 1 ng/ml 처치함에 따라 치주인대세포의 IL-6 생성은 각각 3167 ± 206 , 3230 ± 202 , 3436 ± 95 그리고 3401 ± 131 pg/ml로 나타나 IL-6는 0.05 ng/ml에서 최대로 생성되었으며 그이상의 농도에서는 생성량의 변화가 없었다 (Figure 3). 또한 GM-CSF의 생성은 IL-1 β 의 각 농도에서

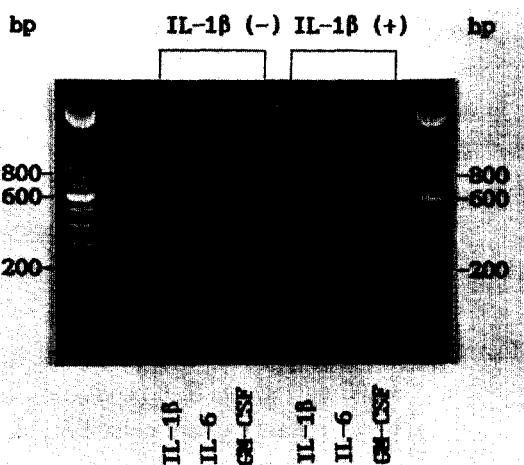


Figure 2. Effect of IL-1 β on the expression of IL-1 β , IL-6 and GM-CSF mRNA in periodontal ligament cells. Periodontal ligament cells (2×10^6) were incubated with or without IL-1 β (1 ng/ml). After 24 hours, RNA was extracted and used for reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis. Products were run on a 1.5 % agarose gel and stained with ethidium bromide.

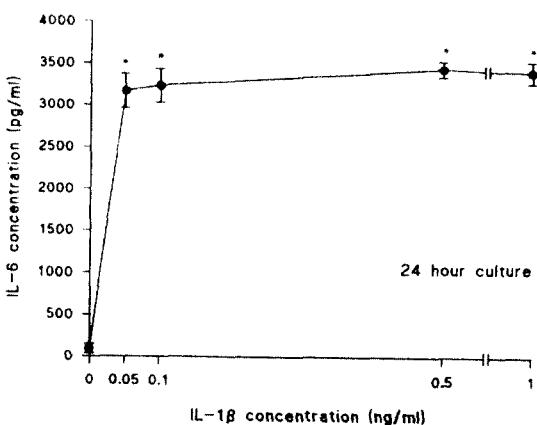


Figure 3. Effect of IL-1 β concentrations on the IL-6 production in periodontal ligament cells. periodontal ligament cells (8×10^6) were incubated in medium alone or in the presence of 0.05, 0.1, 0.5 and 1 ng/ml IL-1 β . After 24 hours, the concentration of IL-6 in the culture medium was determined by enzyme-linked immunosorbent method (ELISA). Data are expressed as the mean \pm S.E. of four experiments. * $p < 0.05$ compared to non-treated group.

126±52, 229±119, 252±138 그리고 267 113 pg/ml로서 GM-CSF도 IL-6와 마찬가지로 0.05 ng/ml에서 최대로 생성되며 그 이상의 농도에서는 증가하지 않았으나 생성되는 양은 IL-6에 비하여 적었다 (Figure 4). 이와 같은 결과는 IL-1 β 가 치주인대세포의 IL-6 및 GM-CSF의 mRNA발현 뿐만 아니라 생성도 유도할 수 있음을 시사해준다.

3. IL-1 β 자극시간에 따른 치주인대세포의 IL-6 및 GM-CSF 생성

위 실험에서 0.05 ng/ml의 IL-1 β 에 의하여 각 cytokine이 최대로 생성되었으므로 0.05 ng/ml IL-1 β 로 치주인대세포를 처치하여 IL-1

β 의 자극시간에 따른 치주인대세포의 IL-6 및 GM-CSF 생성을 비자극군과 비교 관찰하였다. IL-6의 농도는 2, 4, 8, 24 시간 후 비자극군에서는 각각 0, 11±22, 37±33 및 95±65 pg/ml, IL-1 β 처치군에서는 536±406, 990±166, 2500±241 및 3167±206 pg/ml로서 IL-6는 비자극군에서는 24시간 배양 후 측정되었으나, IL-1 처치군에서는 2시간 자극 후에도 생성되었으며, 생성량은 8시간 까지 계속 증가하였다 (Figure 5). GM-CSF의 농도는 2, 4, 8, 24 시간 후 비자극군에서는 각각 3±4, 2±3, 1±2 및 1±2 pg/ml이며, IL-1 β 로 처치군에서는 각각 13±13, 27±1, 73±17 및 126±48 pg/ml로서 GM-CSF는 비자극군에서

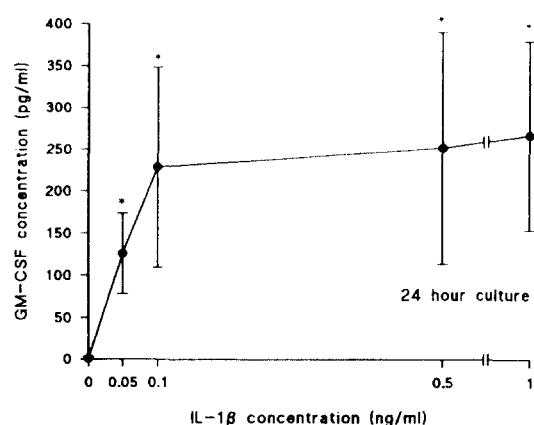


Figure 4. Effect of IL-1 β concentrations on GM-CSF production in periodontal ligament cells. periodontal ligament cells (8×10^5) were incubated in medium alone or in the presence of 0.05, 0.1, 0.5 and 1 ng/ml IL-1. After 24 hours, the concentration of GM-CSF in the culture medium was determined by enzyme-linked immunosorbent method (ELISA). Data are expressed as the mean±S.E. of 4 experiments. * p<0.05 compared to non-treated group.

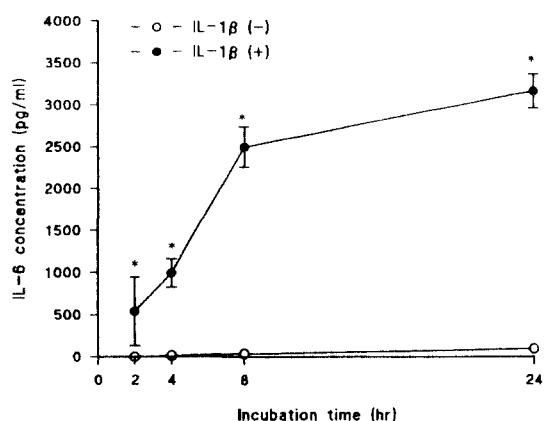


Figure 5. Time course of the effect of IL-1 β (0.05 ng/ml) on IL-6 production in periodontal ligament cells. Periodontal ligament cells (8×10^5) were incubated in medium alone or in the presence of 0.05 ng/ml IL-1. After 2, 4, 8 and 24 hours, the concentration of IL-6 in the culture medium was determined by enzyme-linked immunosorbent method (ELISA). Data are expressed as the mean±S.E. of four experiments. * p<0.05 compared to non-treated group corresponding to each treatment time.

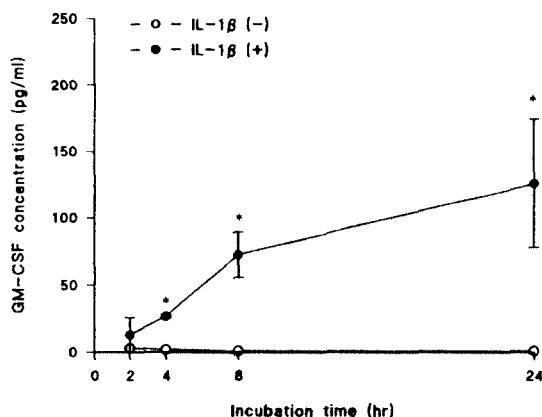


Figure 6. Time course of the Effect of IL-1 β (0.05 ng/ml) on the GM-CSF production in periodontal ligament cells. Periodontal ligament cells (8×10^5) were incubated in medium alone or in the presence of IL-1 β (0.05 ng/ml). After 2, 4, 8 and 24 hours, the concentration of GM-CSF in the culture medium was determined by enzyme-linked immunosorbent method (ELISA). Data are expressed as the mean \pm S.E. of 4 experiments. * $p < 0.05$ compared to non-treated group corresponding to each treatment time.

는 24시간 자극 후에도 측정되지 않았으나 IL-1 β 치치군에서는 4시간 자극 후 생성되었고 8시간 까지 생성량이 계속 증가하였다 (Figure 6).

4. IL-6가 마우스 골수세포의 파골세포형성에 미치는 영향

IL-6가 마우스 골수세포에 미치는 영향을 알아보기 위해 파골세포 전구세포가 존재하는 마우스 골수세포를 IL-6, soluble IL-6 receptor (sIL-6R) 또는 IL-6와 sIL-6R가 있는 배지에 7일간 배양한 후 핵이 세개 이상인 tartrate 저항성 산성인산분해효소 양성 다핵세포의 수를 세어 파골세포의 형성 정도를 관찰하였다 (Figure 7). IL-6로 자극하지 않은 경우, IL-6 또는 sIL-6R 단독으로 치치한 경우 그리고 IL-6와 sIL-6R를 동시에 치치한 경우 골수세포에서 형성된 TRAP양성 다핵세포수는 각각 1.9 ± 2.1 개, 2.6 ± 1.9 개, 2.2 ± 2.3 개 그리고 10.2 ± 2.9 개로서 TRAP 양성다핵세포는 IL-6와 sIL-6R로 동시에 자극한 경우에만 증가되었다 (Table 2).

Table 2. Effect of IL-6 on the formation of TRAP-positive multinucleated cells

| Stimulants | Number of TRAP-positive multinucleated cells(cells/well) |
|---------------------------------------|--|
| No | 1.9 ± 2.1 |
| IL-6 (100 ng/ml) | 2.6 ± 1.9 |
| sIL-6R (100 ng/ml) | 2.2 ± 2.3 |
| IL-6 (100 ng/ml) + sIL-6R (100 ng/ml) | $10.2 \pm 2.9^*$ |

Mouse bone marrow cells were cultured in the presence of IL-6, sIL-6R or sIL-6R and IL-6 simultaneously. After 7 days, cells were fixed and stained for TRAP. TRAP-positive multinucleated cells were counted. Data are expressed as mean \pm S.E. of 4 experiments.

* $p < 0.05$ compared to non-treated group, IL-6 or sIL-6R treated group.

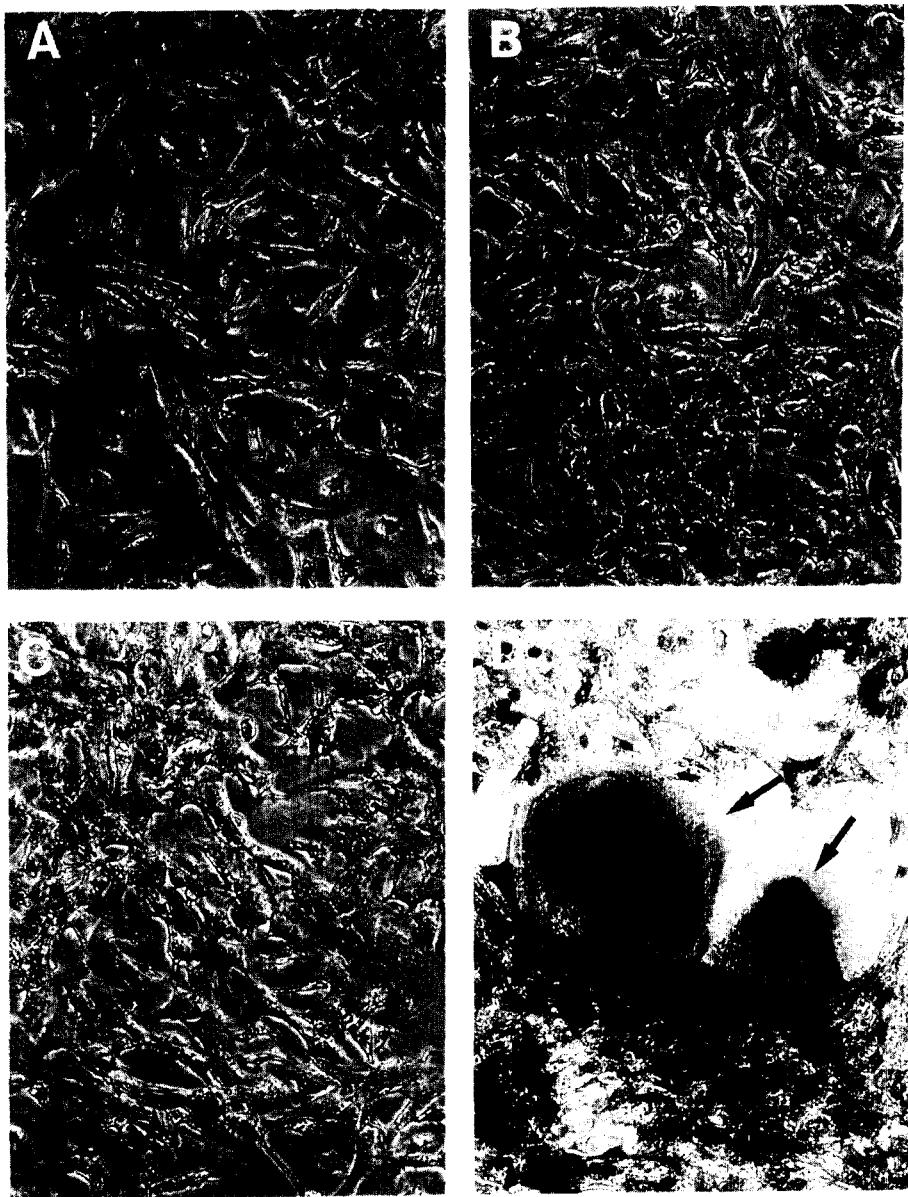


Figure 7. Effect of IL-6 on the formation of TRAP-positive multinucleated cells (X 100).
 Mouse bone marrow cells were cultured without stimulants (A), with IL-6 (100 ng/ml) (B), with sIL-6R (100 ng/ml) (C), or with IL-6 (100 ng/ml) and sIL-6R (100 ng/ml) (D). After 7 days, TRAP positive multinucleated cells were counted. The formation of TRAP-positive multinucleated cells (→) was induced in bone marrow cultures stimulated with IL-6 and sIL-6R simultaneously (D).

IV. 고 칠

교정력에 의한 치아 이동시 동반되는 치조골의 흡수 기전을 알아보고자 치조골에 인접하여 존재하는 치주인대세포를 IL-1 β 로 처치하여 골흡수관련 cytokine의 생성을 관찰하였다 (Figure 2, 3, 4). 어떤 물질이 외부로부터 자극을 받아 합성되어 세포 밖으로 유리되기 위해서는 유전자로 부터 mRNA가 만들어져야 하므로 이 실험에서는 적은 수의 세포로부터 mRNA의 발현을 확인할 수 있는 역전사 중합효소연쇄반응을 이용하여 IL-1 β 에 의한 치주인대세포의 골흡수 유도 cytokine mRNA 발현을 관찰하였다. 그 결과 비자극 치주인대세포에서는 IL-6 mRNA만 약하게 발현되었으며, IL-1 β 로 치주인대세포를 처치한 경우에는 IL-1 β 및 GM-CSF mRNA의 형성이 유도되었고 IL-6 mRNA의 발현도 증가되었다 (Figure 2). 따라서 골흡수과정에서 조골세포는 cytokine을 생성하여 파골세포에 의한 골흡수를 유도하므로 치주인대세포와 조골세포의 골흡수관련 cytokine의 mRNA 발현을 비교하는 것은 치주인대세포의 역할을 이해하는데 도움을 줄 수 있을 것으로 생각된다. 지금까지의 연구결과에 의하면 조골세포는 비자극시 IL-6 mRNA (Birch 등, 1993; Linkhart 등, 1991) 뿐만 아니라 IL-1 β 및 GM-CSF mRNA도 (Birch 등, 1993; Linkhart 등, 1991) 발현하며, IL-1 β 처치시 IL-6 mRNA (Linkhart 등, 1991) 및 IL-1 β mRNA 발현도 증가하는 것으로 알려졌다 (Linkhart 등, 1991). 즉 치주인대세포와 조골세포의 IL-1 β , GM-CSF 및 IL-6 mRNA의 발현을 비교해 볼 때 치주인대세포는 조골세포와는 달리 자극을 가하지 않은 상태에서는 IL-1 β 와 GM-CSF mRNA가 발현되지 않았으나, IL-1 β 로 자극한 경우에는 조골세포와 마찬가지로 IL-1 β , IL-6 및 GM-CSF mRNA를 형성하였다 (Figure 2).

이와 같이 치주인대세포는 IL-1 β 로 자극받은 경우 IL-1 β , IL-6 및 GM-CSF mRNA를 발현 하므로 이들 cytokine이 합성되어 세포 밖으로 유리될 것으로 추측되나, mRNA의 발현이 생

성과 일치하지 않는 경우가 있기 때문에 IL-1 β 로 처치한 치주인대세포의 IL-6 및 GM-CSF 생성을 확인하였다. 치주인대세포는 비자극시 저농도의 IL-6만을 합성하였으나, IL-1 β 로 처치했을 때는 IL-6 및 GM-CSF의 생성이 증가되었고, 같은 농도의 IL-1 β 로 자극한 경우 생성된 IL-6와 GM-CSF의 농도를 비교해 볼 때 IL-6가 GM-CSF에 비하여 10 배 정도 많이 생성되었다 (Figure 3, 4). 이는 조골세포에서 보고된 내용과 유사한 결과로서, 조골세포도 자극을 가하지 않은 상태에서는 소량의 IL-6만을 생성하며, IL-1에 의해서는 IL-6 및 GM-CSF의 생성이 증가되었지만, GM-CSF는 IL-6와는 달리 고농도의 IL-1 β 로 처치한 경우에만 생성되었다 (Lacey 등, 1993; Chaudary 등, 1992; Linkhart 등, 1991; Sato, 1986). 이와 같은 결과는 IL-1 β 가 치주인대세포의 IL-6 및 GM-CSF mRNA 발현 뿐만 아니라 생성도 유도할 수 있음을 시사해주며, 치주인대세포는 IL-1 β 자극시 조골세포와 유사한 양상으로 IL-6 및 GM-CSF를 생성하므로써 치주인대세포는 조골세포와 같이 치조골 흡수조절에 중요한 역할을 할 것으로 생각된다.

한편 이 실험에서 IL-1 β 에 의하여 IL-1 β mRNA가 발현되는 것은 관찰하였으나 실제로 생성되는지 확인하지 못하였다. 그러나 단핵세포 (Dinarello 등, 1987) 및 내피세포 (Warner 등, 1987)에서 IL-1 β 가 자신의 생성을 유도하는 점으로 미루어 보아, 치주인대세포에서도 IL-1 β 에 의하여 IL-1 β 가 생성될 가능성이 있을 것으로 추측된다. 따라서 만약 치주인대세포에서도 IL-1 β 에 의하여 자신의 생성이 촉진된다면, 이러한 작용이 치주인대세포로부터의 IL-6 및 GM-CSF의 생성을 촉진시킬 수 있을 것으로 본다. 이 실험결과에서도 IL-1 β 에 의하여 치주인대세포로부터 IL-6 및 GM-CSF가 유리되었다. 더욱이 IL-1 β 로 증가된 IL-6와 GM-CSF 중, 일반적으로 GM-CSF는 마우스 골수세포에서 파골세포 형성을 유도하며, 1,25-(OH)₂D₃가 GM-CSF의 작용을 촉진시킴이 입증되어 (Macdonald 등, 1986), GM-CSF가 파골세포의 분화 촉진인자로 인정받고 있다.

IL-6도 파골세포에 의한 골흡수에 중요한 역할을 한다는 보고들이 있으나 (Roodman, 1992), 일부 연구자들은 상반된 결과를 보고하고 있어 이에 대한 논란이 계속되고 있다. 즉 Al-Humidan 등과 (1991) Barton 등 (1990)은 마우스 두개골에서 IL-6에 의한 골흡수를 입증하지 못하였는데, 이와 관련하여 Al-Humidan 등 (1991)은 오히려 IL-6가 골흡수 억제물질로 작용할 가능성을 제시하였으며, Lowik 등 (1989)은 IL-6가 중수골 (metacarpal)에서는 골흡수를 유도하나, 장골에서는 그렇지 않음을 보고하였다. 이와 같이 IL-6가 골흡수에 미치는 영향에 대한 차이는 실험조건, 실험에 사용한 골조직의 세포 구성 및 골조직을 분리한 종간의 차이에 의한 것으로 설명되어 질 수 있으나, 아직 확실한 이유가 밝혀져 있지 않다. 특히 IL-6는 GM-CSF와는 달리 IL-6 receptor (IL-6R)과 130-KDa glycoprotein chain (gp130)으로 구성되어 있는 세포표면 수용체를 매개로 세포에 영향을 주며, 그 과정을 보면 IL-6가 sIL-6R에 부착한 다음 IL-6R가 gp130과 연결되어 gp130가 IL-6의 신호를 세포내에 전달하는 것으로 알려져 있다 (Taga 등, 1989). 최근에는 이러한 IL-6R가 세포막으로부터 유리되어 세포막과 원형질 부분이 없는 유리 형태로도 존재하는 것으로 밝혀져, 이를 soluble IL-6 receptor (sIL-6R)라 명명하게 되었으며, sIL-6R도 세포막에 있는 IL-6R와 마찬가지로 IL-6와 결합하여 gp130을 매개로 세포내에 신호를 전달한다는 새로운 가능성이 제시되고 있다 (Maciekiewicz 등, 1992 ; Saito 등, 1991 ; Yasukawa 등, 1990 ; Taga 등, 1989). 그럼에도 불구하고 Kurihara 등 (1990)은 IL-6가 단독으로도 파골세포형성을 유도할 수 있음을 관찰하였으나, Tamura 등 (1993)은 파골세포형성이 IL-6 단독에 의해서는 형성되지 않고 sIL-6R가 동시에 있어야만 형성됨을 보고하여, 아직도 이 문제에 대해서 연구자들 간의 상반된 견해 차이가 좁혀지지 않고 있다. 본 실험에서도 IL-6 단독에 의해서는 파골세포가 형성되지 않았으며, IL-6와 sIL-6R가 동시에 있어야만 파골세포형성이 유도되었다 (table 2, Figure 7).

이와 같이 IL-6에 의한 파골세포형성 결과가 다르게 나타나는 이유를 정확히 알 수 없으나 sIL-6R가 있어야만 IL-6가 파골세포의 형성을 유도하는 것으로 보아, 실험에 사용한 골수세포의 세포막 sIL-6R의 수나 배양액내의 sIL-6R의 농도에 차이가 있어 IL-6에 의한 결과가 다르게 나타났을 것으로 추측된다. 골수세포 배양액내 sIL-6R가 어느정도 있는지 아직 보고된 바 없으나 골수세포에 있는 파골세포 전구세포의 표면에 소량의 sIL-6R가 있는 것으로 알려져 있으므로 (Littlewood 등, 1991), 본 실험결과 IL-6가 sIL-6R가 있어야만 파골세포 형성을 나타내는 것은 파골세포 전구세포 표면에는 세포내 신호를 전달할 만큼 충분한 수의 sIL-6R가 없기 때문인 것으로 생각된다.

이런 sIL-6R는 정상인의 뇌 (Novick 등, 1989) 및 혈청 (Honda 등, 1992)에서 처음 분리되었으나, 교정력을 가한 치조골 주변에서도 sIL-6R가 생성되는지, 생성된다면 어느 세포로부터 유리되는 지에 대해서는 앞으로 연구해야 할 과제로 생각된다. Multiple myeloma 및 rheumatoid arthritis 환자에서도 골파괴가 일어나는데, multiple myeloma 환자의 혈청 (Gaillard 등, 1993 ; Klein 등, 1989 ; Kawano 등, 1988)이나 rheumatoid arthritis 환자의 윤활액 (synovial fluid)에서 (Hirano 등, 1988) sIL-6R와 IL-6의 농도가 증가되어 있으므로, 혈청 및 윤활액에서 IL-6와 sIL-6R가 복합체를 형성하여 이들 환자의 골파괴와 hypercalcemia를 유도할 것으로 추측되고 있다. 따라서 교정력에 의하여 치조골주변의 IL-6와 sIL-6R의 농도가 증가한다면, 이들의 결합에 의하여 파골세포의 분화가 촉진되어 치조골흡수가 일어날 수 있으리라 본다.

결론적으로 IL-1 β 가 치주인대포로부터 IL-1, IL-6 및 GM-CSF의 생성을 유도하며, IL-6는 sIL-6R 존재하에 파골세포형성을 유도하는 것으로 생각된다. 교정력을 가하는 경우 치주인대조직의 IL-1 β 의 농도가 증가되며 (Saito 등, 1991), 치주인대세포는 치조골 주변에 있고, GM-CSF는 파골세포의 형성을 유도하므로 (Macdonald 등, 1986) 이들 결과와 본 실험의

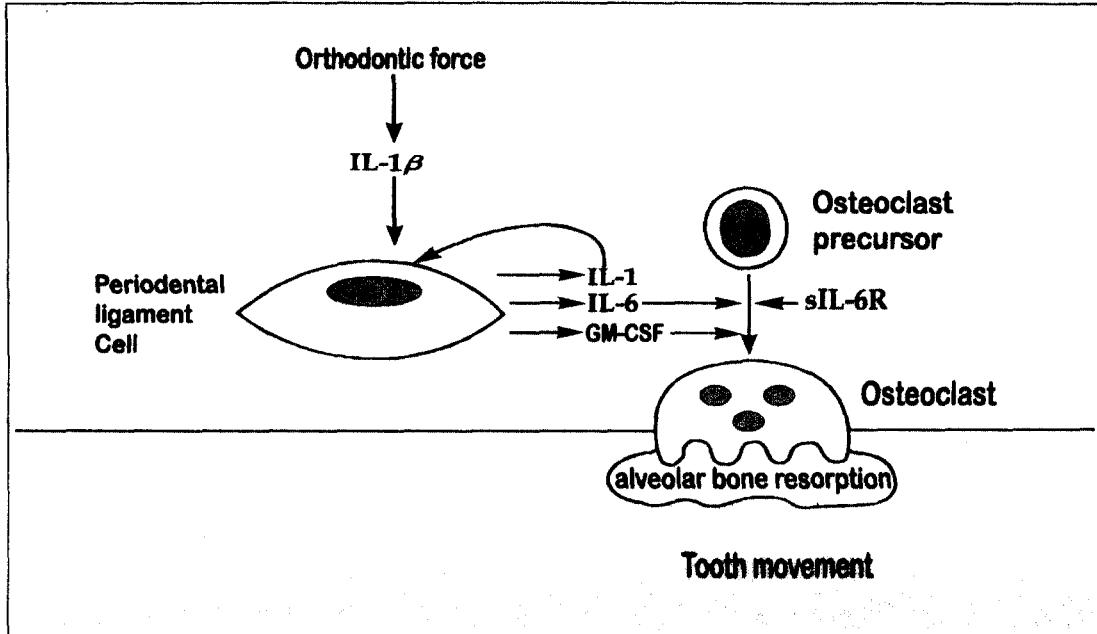


Figure 8. The possible mechanism of alveolar bone resorption during orthodontic tooth movement. IL-1 β produced by cells surrounding dental roots in response to orthodontic force elicits osteoclast formation via stimulating production of IL-6 and GM-CSF in periodontal ligament cells. In these processes, IL-6 only stimulates osteoclast formation in the presence of sIL-6R, and IL-1 β enhances IL-6 and GM-CSF synthesis by inducing self production.

결과들을 종합하여 볼 때 교정력에 의하여 생성된 IL-1 β 는 조골세포 뿐만 아니라 치주인대 세포로부터도 파골세포형성 촉진인자인 IL-6 및 GM-CSF의 생성을 유도하여 치조골 흡수를 야기시킬 것으로 생각된다. 또한 이러한 과정에서 IL-1 β 는 치주인대세포로부터 자신의 생성을 자극하여 위의 과정을 더욱 촉진시킬 수 있을 것으로 추측된다 (Figure 8). 그러나 교정력을 가하는 경우 어떤 과정에 의하여 IL-1 β 의 생성이 증가되는지 또한 IL-6에 의한 골흡수를 매개하는 sIL-6R생성도 교정력에 의하여 증가되는지, 증가된다면 IL-6와 마찬가지로 치주인대세포로부터도 생성되는지에 대해서는 연구가 더 진행되어야 할 것으로 전망된다.

V. 결 론

IL-1 β 가 치주인대세포의 골흡수 유도 cytokine 생성에 미치는 영향을 규명하고자 IL-1 β 가 치주인대세포의 1) IL-1 β , IL-6 및 GM-CSF mRNA 발현 및 2) IL-6 및 GM-CSF 생성에 미치는 영향을 관찰하였으며, 3) IL-6가 마우스 골수세포의 파골세포 형성에 미치는 영향을 평가하였다. mRNA의 발현은 역전사 중합효소 연쇄반응법으로 확인하였으며, cytokine의 농도는 면역효소흡착법으로 측정하였다. 또한 골수세포를 배양한다음, cytokine에 의하여 형성된 파골세포는 tartrate 저항성 산성 인산분해효소를 염색하여 확인하였으며 이들을 분석하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

- IL-1 β 는 치주인대세포로부터 IL-1 β , IL-6 및 GM-CSF mRNA의 발현을 유도하였다.
- 0.05 ng/ml의 IL-1 β 로 치주인대세포를 자극한 경우 IL-6 (3167 ± 246 pg/ml) 및 GM-CSF (126 ± 48 pg/ml)가 최대로 생성되었다.
- IL-1 β (10.05 ng/ml)로 치주인대세포를 자극한 경우 IL-6 및 GM-CSF는 각각 2 시간 및 4 시간 후 생성되었으며 8시간 까지 생성량이 계속 증가하였다.
- IL-6 (100 ng/ml)는 soluble IL-6 receptor (sIL-6R, 100 ng/ml)가 있는 경우에만 TRAP 양성다핵세포의 형성 (10.2 ± 2.9 개)을 증가시켰다.

이상의 결과로 미루어 IL-1 β 는 치주인대세포로부터 파골세포분화 촉진인자인 IL-1 β , IL-6 및 GM-CSF의 생성을 유도하여 골흡수를 야기시키며, 이 과정에서 치주인대세포로부터 유리된 IL-6는 sIL-6R에 의해서만 파골세포형성을 촉진하는 것으로 생각된다. 따라서 이와 같은 IL-1 β 에 의한 골흡수과정이 교정력에 의한 치조골 흡수와 밀접하게 연계되어 있을 것으로 추측된다.

참고문헌

- Al-Humidan A, Ralston SH, Hughes DE, Chapman K, Aarden L, Russell RGG and Gowen M : Parathyroid hormone (PTH) and PTH-like protein (PLP) stimulate interleukin-6 production by osteogenic cells : A possible role of interleukin-6 in osteoclastogenesis. *J Bone Miner Res* 6 : 3 – 8 1991.
- Birch MA, Ginty AF, Walsh CA, Fraser WD, Gallagher JA and Bible G : PCR detection of cytokines in normal human and Pagetic osteoblast-like cells. *J Bone Min Res* 8 : 1155 – 1162 1993.
- Chaudhary LR, Spelsberg TC and Riggs BL : Production of various cytokines by
- normal human osteoblast-like cells in response to interleukin-1 and tumor necrosis factor- ; lack of regulation by 17-estradiol. *Endocrinology* 130 : 2528 – 2534 1992.
- Damme JV, Cayphas S, Opdenakker G, Al-fons B and Snick JV : Interleukin1 and poly(rI). poly (rC) induce production of a hybridoma growth factor by human fibroblasts. *Eur J Immunol* 17 : 1 – 7 1987.
- Davidovitch Z, Nicolay O, Ngan PW and Shanfeld J : Neurotransmitters, cytokines and the control of alveolar bone remodelling in orthodontics. *Dent Clin Am* 32 : 411 – 435 1988.
- Dewhirst FE, Stashenko PP, Mole JE and Tsurumachi T : Purification and partial sequence of human osteoclast activating factor identify with interleukin-1 beta. *J Immunol* 135 : 2562 – 2568 1985.
- Dinarello CA, Ikejima T, Warner SJC, Orencole SF, Lonnemann G, Cannon JG and Libby P : Interleukin 1 induces interleukin 1 : I. Induction of circulating interleukin 1 in rabbits in vivo and in human mononuclear cells in vitro. *J Immunol* 139 : 1902 – 1910 1987.
- Gaillard JP, Bataille R, Brailly H, Zuber C, Yasukawa K, Attal M, Maruo N, Taga T, Kishimoto T and Kelin B : Increased and highly stable levels of functional soluble interleukin-6 receptor in sera of patients with monoclonal gammopathy. *Eur J Immunol* 23 : 820 – 824 1993.
- Girasole G, Jilka RL, Passeri G, Bosell S, boder G, Williams DC and Manolagas SC : 17 estradiol inhibits cytokine-induced IL-6 production by bone marrow stromal cells and osteoblasts. *J Clin Invest* 89 : 883 – 891 1992.
- Gowen M and Mundy GR : Actions of recombinant interleukin-1, interleukin-2, and interferon on bone resorption in vitro.

- J Immunol 136 : 2478–2482 1986.
11. Gowen M, Wood DD, Ihrie EJ, McGuire MKB and Russell RGG : An interleukin-1-like factor stimulates bone resorption in vitro. Nature 306 : 378–380 1983.
 12. Hausman E, Raisz LG, Miller WA : Endotoxin : Stimulation of bone resorption in tissue culture. Science 168 : 862–864 1970.
 13. Heath JK, Saklatvala J, Meikle MC, Atkinson SJ and Reynold JJ : Pig interleukin (catabolin) is a potent stimulator of bone resorption. Calcif Tissue Int 37 : 95–97 1985.
 14. Hirano T, Kishimoto T and Suda T : IL-6 is produced by osteoblasts and induce bone resorption. J Immunol 145 : 3297–3303 1990.
 15. Hirano T, Matsuda T, Turner M, Manini R, Feldmann M and Kishimoto T : Expressive production of interleukin-6/B cell stimulatory factor-2 in rheumatoid Arthritis. Eur J Immunol 18 : 1797–1801 1988.
 16. Honda M, Yamamoto S, Cheng M, Yasukawa K, Suzuki H, Saito T, Ohsugi Y, Tokunaga T and Kishimoto T : Human Soluble IL-6 Receptor : Its detection and enhanced release by HIV infection. J Immunol 148 : 2175–2180 1992.
 17. Horowitz MC : Cytokines and estrogen in bone : anti-osteoporotic effects. Science 260 : 626–627 1993.
 18. Horton JE, Raisz LG, Simmons HA, Oppenheim JJ, Mergenhagen E : Bone resorbing activity in supernatant fluid from cultured human peripheral blood leukocytes. Science 177 : 793–795 1972.
 19. Ishimi Y, Miaura C, Jin CH, Akatsu T, Abe E, Nakamura Y, Yamaguchi A, Yoshiki S, Matsuda T, Hirano T, Kishimoto T and Suda T : IL-6 is produced by osteoblasts and induce bone resorption. J Immunol 145 : 3297–3303 1990.
 20. Jilka RL : Are osteoblastic cells required for the control of osteoclast activity by parathyroid hormone. Bone Mineral 1 : 261–266 1986.
 21. Joseph Z, Yousefian JZ, Ngan PW, Miller B, Shanfeld J and Davidovitch : Effect of different types of stress on periodontal ligament cells in vitro. In Biological mechanisms of toothmovement and craniofacial adaptation. Alabama, The Ohio State University, College of Dentistry, 1992, pp 331–340.
 22. Kaushansky K, Lin N, Adamson JW : Interleukin 1 stimulates fibroblasts to synthesize granulocyte-macrophage and granulocyte colony-stimulating factors. J Clin Invest 81 : 92–97 1988.
 23. Kawano M, Hirano T, Matsuda t, Taga T, Horii Y, Iwamoto K, Asaoka H, Tang B, Tanabe O, Tanaka H, Kuramoto A and Kishimoto T : Autocrine generation and requirement of BSF-2/IL-6 for Human Multiple Myelomas. Nature 332 : 83–85 1988.
 24. Kawasaki ES and Wang AM : Detection of gene expression. In PCR technology : England, Stovkton Press, 1989, pp 89–98.
 25. Klein B, Zahng XG, Jourdan M, Content J, Houssiau A, Aarden L, PiechaczyK M and Bateille R : Paracrine rather than autocrine regulation of myeloma-cell growth and differentiation by interleukin-6. Blood 73 : 517–526 1989.
 26. Klein DC and Raisz LG : Prostagladins : stimulation of bone resorption in tissue culture. Endocrinology. 86 : 1436–1440 1970.
 27. Kurihara N, Bertolini D, Suda T, Akiyama Y and David Roodman G : IL-6 stimulates osteoclast-like multinucleated cell formation in long term human marrow cultures

- by inducing IL-1 β release. *J Immunol* 144 : 4226–4230 1990.
28. Lacey DL, Grosso LE, Moser SA, Erdmann J, Tan HL, Pacifici R and Villareal DT : IL-1-induced murine osteoblast IL-6 production is mediated by the type 1 IL-1 β receptor and is increased by 1, 25 dihydroxyvitamin D3. *J Clin Invest* 91 : 1731–1742 1993.
29. Littlewood AJ, Russell J, Harvey GR, Hughes DE, Russell RGG and Gowen M : The modulation of the expression of IL-6 and its receptor in human osteoblast in vitro. *Endocrinology* 129 : 1513–1520 1991.
30. Linkhart TA, Linkhart SG, MacCharles DC, Long DL and 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* 6 : 1285–1294 1991.
31. Lowik GM, van der Pluijim G, Bloys H, Hoekman K, Bijvoet OLM, Aarden LA and Papapoulos SE : Parathyroid hormone (PTH) and PTH-like protein (PLP) stimulate interleukin-6 production by osteogenic cells : a possible role of interleukin-6 in osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 162 : 1546–1552 1989.
32. Macdonald BR, Mundy GR, Clark S, Wang EA, Keuhl JJ, Stanley ER and Roodman GD : Effects of human recombinant GM-CSF and highly purified CSF-1 on the formation of multinucleated cells with osteoclast characteristics in long term bone marrow cultures. *J Bone Min Res* 1 : 227–233 1986.
33. Mackiewicz A, Schootink H, Heinrich PC and Rose-John S : Complex of soluble human IL-6 receptor/IL-6 up-regulates expression of acute-phase protein. *J Immunol* 149 : 2021–2027 1992.
34. McShee PMJ and Chambers TJ : Osteoblastic cells mediate osteoclastic responsiveness to PTH. *Endocrinology* 118 : 824–825 1986a.
35. McShee PMJ and Chambers TJ : Osteoblast-like cells in the presence of parathyroid hormone release soluble factor that stimulates osteoclastic bone resorption. *Endocrinology* 119 : 1654–1659 1986b.
36. Meghji S : Bone remodelling. *Br Dent J* 172 : 235–242 1992.
37. Meikle MC, Heath JK, Atkinson SJ, Hemmery RM and Reynolds JJ : In the biology of tooth movement. FL, CRC press, 1989, pp 71–85.
38. Ngan P, Kleeman B, Jordan F, Rosol T, Yousefian J, Shanfeld J and Davidovitch Z : Effect of intermittent pressure on periodontal ligament cell-mediated bone resorption in vitro. In Biological mechanisms of toothmovement and craniofacial adaptation. Alabama, The Ohio State University, College of Dentistry, 1992, pp 331–340.
39. Ngan P, Saito S, Saito M, Lanese R, Shanfeld J, Davidovitch Z : The interactive effects of mechanical stress and interleukin-1 on prostaglandin E and cyclic AMP production in human periodontal ligament fibroblasts in vitro : Comparision with cloned osteoblastic cells of mouse (MC 3T3-E1). *Arch Oral Biol* 15 : 717–725 1990.
40. Novic D, Engelmann H, Wallach D and Rubinstein M : Soluble cytokine receptors are present in normal human urine. *J Exp Med* 170 : 1409–1414 1989.
41. Pfeilschifter J, Chenu C, Bird A, Mundy GR and Roodman GD : Interleukin-1 and tumor necrosis factor stimulate the formulation of human osteoclast like cells in vitro. *J Bone Mineral Res* 4 : 113–118

- 1989.
42. Raiz LG, Alander C, Eilon G, Whitehead SP and Nuki K : Effects of two bacterial products, muramyl dipeptide and endotoxin, on bone resorption in organ culture. *Calcif Tissue Int* 34 : 365–369 1982.
 43. Raiz LG : Bone resorption in tissue culture, factors influencing the response to parathyroid hormone. *J Clin Invest* 44 : 103–116 1965.
 44. Roodman GD : Interleukin-6 : An osteotrophic factor. *J Bone Miner Res* 7 : 475–478 1992.
 45. Roodman GD, Ibbotson KJ and Macdonald BR : 1, 25-Dihydroxyvitamin D₃ causes formation of multinucleated cells with several osteoclast characteristics in cultures of primate marrow. *Proc Natl Acad Sci USA* 82 : 8213–8217 1985.
 46. Saito M, Saito S, Ngan PW, Shanfeld J and Davidovitch Z : Interleukin 1 beta and prostaglandin E are involved in the response of periodontal cells to mechanical stress in vivo and in vitro. *Orthod Dentofac Orthop* 99 : 226–240 1991.
 47. Saito T, Yasukawa K, Suzuki H, Futatsugi K, Fukuaga T, Yokomizo C, Koishihara Y, Fukui H, Ohsugi Y, Yawata H, Kobayashi I, Hirano T, Taga T and Kishimoto T : Preparation of soluble murine IL-6 receptor and anti-murine IL-6 receptor antibodies. *J Immunol* 147 : 168–173 1991.
 48. Sato K, Fujii Y, Asano S, Ohtsuki T, Kawakami M, Kasono K, Tsushima T and Shizume K : Recombinant human interleukin 1 alpha and beta stimulate mouse osteoblast-like cells (MC3T3-E1) to produce macrophage-colony stimulating activity and prostaglandin E2. *Biochem Biophys Res Commun* 141 : 285–291 1986.
 49. Taga T, Hibi M, Hirata Y, Yamasaki K, Yasukawa K, Matsuda T, Hirano T and Kishimoto T : Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130. *Cell* 58 : 573–581 1989.
 50. Taurma T, Udagawa N, Takahashi N, Miyaura C, Tanaka S, Yamada Y, Koishihara Y, Ohsugi Y, Kumaki k, TAGA T, Kishimoto T and Suda T : Soluble interleukin-6 receptor triggers osteoclast formation by interleukin 6. *Proc Natl Acad Sci USA* 90 : 11924–11928 1993.
 51. Thomson BM, Mundy GR and Chambers TJ : Tumor necrosis factors alpha and beta induce osteoblastic cells to stimulate osteoclastic bone resorption. *J Immunol* 138 : 775–779 1987.
 52. Thomson BM, Saklatvala J and Chambers TJ : Osteoblasts mediate interleukin-1 responsiveness of bone resorption by rat osteoclast. *J Exp Med* 164 : 104–112 1986.
 53. Warner SJC, Auger KR and Libby P : Recombinant human interleukin 1 induces interleukin 1 production by adult human vascular endothelial cells. *J Immunol* 139 : 1911–1917 1987.
 54. Yasukawa K, Saito T, Fukunaga T, Sekimori Y, Koishihara Y, Fukui H, Ohsugi Y, Matsuda T, Yawata H, Hirano T, Taga T and Kishimoto T : Purification and characterization of soluble human IL-6 receptor expressed in CHO Cells. *J Biochem* 108 : 673–676 1990.