

## Interleukin-10 이 interleukin-1 $\beta$ 로 유도되는 골흡수에 미치는 효과

연세대학교 치과대학 구강생물학교실  
유윤정 · 강윤선 · 이승일

### 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, 순서적으로 진행된다. 즉 파골세포가 골에 부착하여 산화 및 단백질 분해과정에 의해 골을 계속적으로 흡수하면 조골세포가 그 부위에서 골기질을 구성하는 교원섬유 및 proteoglycan, osteonectin, osteopontin, saialoprotein 그리고 osteocalcin과 같은 단백질을 형성하여 골석회화가 일어난다 (Meghji, 1992). 그러나 이러한 골형성 및 흡수과정에 균형이 깨지면 병리적인 골흡수가 유발되는데, 특히 폐경기 이후에는 estrogen 결핍에 의하여 tumor necrosis foactor(TNF), interleukin-1(IL-1) 및 granulocyte macrophage-colony stimulating factor(GM-CSF)가 과다하게 생성되어, 골다공증이 야기된다 (Horowitz 1993). 더욱이 치주질환에서 염증시 생성되는 IL-1 $\beta$ (Honig등, 1989; Masada등, 1990; Jandinskii등, 1991)가 세균감염에 의한 치조골 흡수에 직접적으로 관여할 것이라고 알려져 있어 골흡수기전에 관한 관심이 높아지고 있다.

골흡수는 분화 및 활성화된 파골세포가 골조직의 세포간 기질을 제거하는 과정으로서 (Meghji, 1992; Horowitz, 1993) 이러한 골흡수 과정은 lipopolysaccharide(LPS, Hausmann등, 1970)와 같은 세균의 구성성분, 부갑상선 호르몬(Raiz, 1965), 1, 25 dihydroxy vitamin D<sub>3</sub> (Roodman등, 1985), eicosanoid (Klein와 Raiz, 1970) 및 cytokine과 같은 전신 또는 국소적 생성 인자들에 의하여 조절된다. 이와 같이 골흡수는 생체내에서 생성되는 인자들로 자극을 받은 파골세포에 의해서만 유도되는 것으로 생각하였으나 파골세포는 조골세포, 혹은 조골세포를 배양한 배지가 있는 경우에만 골흡수를 일으켜, 파골세포의 분화 및 활성화는 조골세포로부터 생성되는 수용성 물질(cytokine)에 의해 매개되는 것으로 알려졌다 (Jilka, 1986; McSheehy와 Chambers, 1986a, 1986b, 1987; Thomson 등, 1987, 1986; Pfeilshifter등, 1989; Ishimi등, 1990).

Cytokine은 염증 및 면역반응시 섬유아세포, 림프구 및 단핵세포를 비롯한 여러 세포에서 생성되는 수용성물질이다. 처음에는 단핵세포의 배양상층액에 골흡수 유도물질이 있는 것이 발견되어 이 물질을 파골세포활성화물질(osteoclast activating factor)이라 명명하였으나 (Horton 등, 1972), 그 이후 파골세포활성화물질이 단핵세포로부터 생성되는 IL-1 $\beta$ 인 것으로 밝혀져(Dewhirst 등 1985) IL-1 $\beta$ 인 것을 밝혀져(Dewhirst등, 1985) IL-1 $\beta$ 가 골흡수

과정에 직접 관여하는 것으로 생각하였다. IL-1은 마우스 두개골의 골흡수를 유도하며(Gowen등, 1983; Heath등, 1985; Gowen와 Mundy, 1986) 골수세포로부터 파골세포형성을 촉진하기 때문에(Pfeilschifter등, 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(Thomson등, 1986). 더욱이 IL-1으로 자극받은 조골세포로부터 마우스 두개골이나 골수세포에서 파골세포의 분화를 촉진시키는 IL-6, GM-CSF 및 TNF- $\alpha$ 가 생성되는 것으로 알려져(Machdonald등, 1986; Sato등, 1986; Ishimi등, 1990; Lowik등, 1989; Chaudhary등, 1992; Girasole등, 1992), IL-6, GM-CSF 및 TNF- $\alpha$ 와 같은 cytokine들이 IL-1에 의한 골흡수를 매개하는 것으로 생각하게 되었다. IL-6, GM-CSF 및 TNF- $\alpha$ 가 골흡수를 일으키는 것과는 달리 IFN- $\gamma$ 는 IL-2에 의한 파골세포형성(Takahashi등, 1986) 및 골흡수를 억제하지만(Gowen등, 1986), 이에 대한 명확한 기전은 모르고 있다. 다만 IFN- $\gamma$ 가 phytohemagglutinin(PHA)로 자극받은 백혈구로부터 colony stimulating factor(CSF)의 생성을 억제한다는 결과로 미루어 IFN- $\gamma$ 에 의한 골흡수 억제과정 역시 IFN- $\gamma$ 가 조골세포로부터 CSF의 생성을 차단하여 나타난 결과로 해석하고 있다(Kanz등, 1984)

이와 같이 골흡수는 조골세포로부터 생성되는 수용성 물질에 의하여 분화 및 활성화된 파골세포에 의하여 유도되는데 단핵세포에서 생성된 IL-1 $\beta$ (Dinarello, 1984)에 의한 골흡수는 조골세포로부터 생성되는 파골세포분화 촉진인자인 IL-6, GM-CSF 및 TNF- $\alpha$ 에 의하여 매개된다. 최근에 단핵세포로부터 IL-1 $\beta$ 뿐만 아니라 IL-10도 생성되는 것으로 보고되었다(de Wasl-Malefyt등, 1991) IL-10은 비만세포(mast cell, Thompson-Snipes등, 1991), T 및 B 림프구(Go등, 1990; MacNeil등, 1990), 단핵세포(de Waal-Malefyt등, 1991)에

다양한 작용을 나타낸다. 특히 단핵세포에서는 세포의 형태와 부착능 변화, nitrogen oxide 및 IL-1 receptor antagonist 생성의 변화를 유도할 뿐만 아니라(Howard와 O'Garra, 1992) cytokine 생성에도 영향을 미친다. LPS로 자극받은 단핵세포에서 IL-1 $\alpha$ , IL-6, IL-8, GM-CSF, G-CSF 및 TNF- $\alpha$ 가 생성되는데 IL-10와 LPS로 동시에 자극한 경우에 이들 cytokine의 분비가 감소되어 IL-10이 단핵세포의 cytokine 생성을 억제할 수 있는 것으로 밝혀졌다(Bogdan등, 1991; de Waal-Malefyt등, 1991; Fiorentino등, 1991). 이와같은 사실로 미루어 IL-10이 조골세포의 cytokine 생성에도 영향을 미칠 가능성이 있을 것으로 생각된다. 즉 IL-10은 IL-1으로 자극받은 조골세포로부터 파골세포분화 촉진인자인 IL-6, GM-CSF 및 TNF- $\alpha$ 의 생성을 감소시켜 IL-1 $\beta$ 에 의한 골흡수과정을 억제할 것으로 추측된다(그림 1).

이에 본 연구에서는 IL-10이 IL-1 $\beta$ 로 유도된 골흡수에 미치는 영향을 규명하고자 1)  $^{45}\text{Ca}$ 로 표지된 마우스 두개골에서 IL-1 $\beta$ 에 의한 골흡수정도를 IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$  및 IL-8과 비교 관찰하였으며, 2) IL-1 $\beta$ 로 유도된 마우스 두개골 흡수, 파골세포 형성 그리고 두개골세포로부터의 IL-6, TNF- $\alpha$  및 GM-CSF 생성에 IL-10이 미치는 영향을 평가하였다. 각 cytokine의 농도는 효소면역흡착법(enzyme linked immunosorbent method)으로 정량분석하였고 골수세포에서 형성되는 파골세포는 tartrate저항성 산성인산분해효소를 염색하여 확인하였다.

## II. 실험재료 및 방법

### 1. 실험재료

#### 가. 실험동물

실험동물로 대한실험동물센터에서 구입한 ICR(Institute of Cancer Research) 마우스를 사용하였다. LPS 및 cytokine에 의한 골흡수 정도는 각각 16-17일된 태자 마우스(fetal embryo) 10마리 및 176마리로부터 분리한 두개

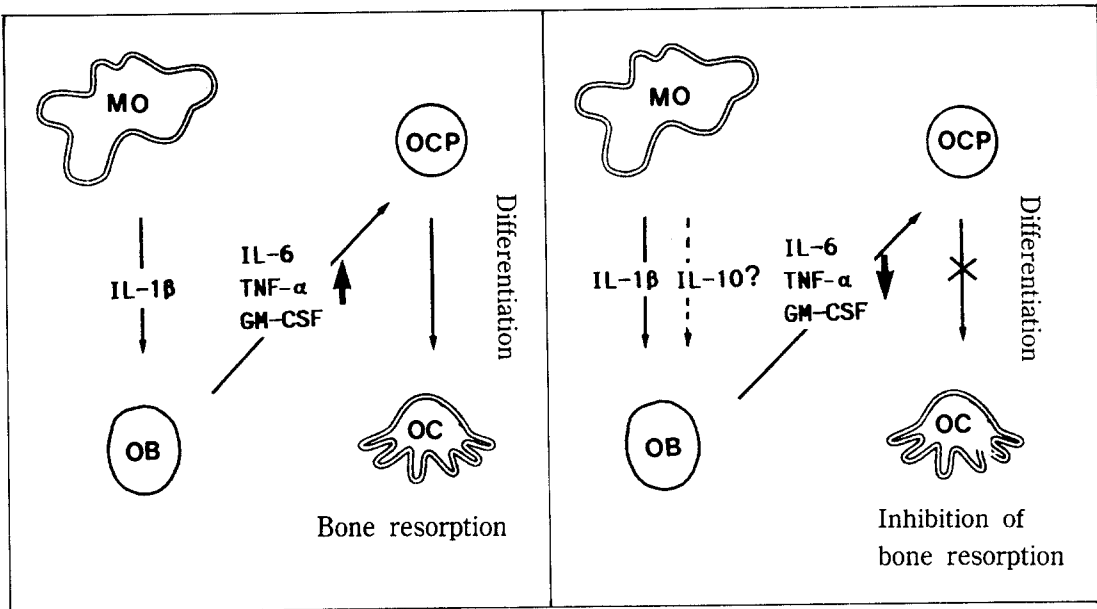


그림 1. 골흡수를 일으키는 조골세포의 역할과 이에 관여하는 cytokine. 좌측 그림 : 단핵세포(monocyte : MO)에서 생성된 interleukin-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )가 조골세포(osteoblast : OB)를 자극하면 이들 세포로부터 interleukin-6, granulocyte macrophage-colony stimulating factor(GM-CSF) 및 tumor necrosis factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )가 생성되며, 이들 cytokine은 파골세포 전구세포(osteoclast precursor : OCP)의 분화를 촉진시켜 골조직의 흡수를 유도한다. 우측 그림 : 단핵세포로부터 IL-1 $\beta$ 와 IL-10이 생성되고 이때 IL-10은 조골세포에 작용하여 IL-1 $\beta$ 로 유리되는 IL-6, GM-CSF 및 TNF- $\alpha$ 의 양을 감소시켜, 파골세포 전구세포의 분화와 파골세포에 의한 골흡수를 억제할 것이라는 가상의 모식도.

→ 촉진작용    - - - → 억제작용    ✕ → 억제    ↑ 증가    ↓ 감소

골을 이용하여 측정하였으며, 파골세포형성능은 4-5주 된 25마리의 마우스에서 골수세포를 분리하여 평가하였다. 또한 조골세포로부터 cytokine의 생성능은 16-17일된 27마리의 태자 마우스의 두개골로부터 분리한 세포에서 측정하였다.

#### 나. 골흡수 유도 및 억제 물질

골흡수 유도 및 억제물질로 *Escherichia coli* (serotype 055 : B5)로부터 분리한 LPS(Sigma, St Louis, MO, U.S.A.)를 마우스 두개골에 처치하였으며, 이 외에 recombinant mouse IL-1 $\alpha$ (Genzyme, Cambridge MA, U.S.A.), recombinant mouse IL-1 $\beta$ (Genzyme, Camb-

ridge, MA, U.S.A.), recombinant mouse IL-6 (Genzyme, Cambridge, MA, U.S.A.), recombinant human IL-8(Genzyme, Cambridge, MA, U.S.A.), recombinant mouse IL-10(Genzyme, Cambridge, MA, U.S.A.), recombinant mouse IFN- $\gamma$ (Genzyme, Cambridge, MA, U.S.A.), 그리고 recombinant mouse TNF- $\alpha$  (Genzyme, Cambridge, MA, U.S.A.)와 같은 cytokine을 구입하여 사용하였다.

#### 다. 동위원소

골조직으로 유리되는  $^{45}\text{Ca}$  양을 측정하기 위하여  $^{45}\text{CaCl}_2$  (specific activity, 18.68 mC/mg Ca : Dupont New England Nuclear, Boston,

MA, U.S.A.)로 마우스 두개골의  $Ca^{2+}$ 을 표시하였다.

## 2. 실험방법

가. 마우스 두개골의 흡수정도 측정

0.15ml  $^{45}CaCl_2$  (25 $\mu$ Ci)을 임신 16-17일 되는 ICR 마우스에 피하 주사하고, 1일 후에 희생시켰다. 태아 두개골을 무균적으로 분리한 후, 이를 예리한 칼로 정중분합선을 따라 두 부분으로 절단하였다. 절단된 두개골을 즉시 배양용 용기에 옮기고 각각에 1mg/ml bovine serum albumin (BSA : Sigma, St Louis, MO, U.S.A.), 100 units/ml penicillin G sodium, 100 $\mu$ g/ml streptomycin sulfate 및 0.1 ug/ml amphotericin B가 함유된 BGJ<sub>6</sub>(Biggers-Gwatkin-Judah-bone : Gibco, Gaithersburg MD, U.S.A., 이하 두개골 배양배지라 함)를 0.5ml씩 첨가한다. 이를 5% CO<sub>2</sub> 존재하에서 37°C에 24시간 동안 배양하였다. 24시간 배양한 후 각 반쪽의 두개골을 골흡수 유도 및 억제 물질이 첨가된 두개골 배양배지(실험군) 및 자극물질이 함유되지 않은 두개골 배양배지(대조군)에서 3일간 배양하였다. 이어 두개골 배양배지 0.3ml을 2.7 ml aquasol용액(Dupont New England Nuclear Products, Boston, MA, U.S.A.)과 혼합하여 두개골로부터 배지내 유리탄  $^{45}Ca$ 의 비방사능(cpm)을 측정하였으며, 배양한 두개골은 scintillation vial(Kimble, McGaw, IL, U.S.A.)에 옮겨 0.5ml의 5% trichloroacetic acid로 1시간 처리하여 두개골내  $^{45}Ca$ 을 추출한 후 4.5ml의 aquasol 용액을 부어 두개골 내부에 잔존하는  $^{45}Ca$ 의 비방사능을 계측하였다.  $^{45}Ca$ 의 비방사능은 liquid scintillation counter(Beckman, Fullerton, CA, U.S.A.)로 측정하여 대조군에 대한 실험군의  $^{45}Ca$ 유리율을 아래와 같이 계산하여 골흡수 정도를 상대적으로 비교하였다.

배지된 유리된  $^{45}Ca$ 의 백분율(%)

$$= \frac{\text{배지내 } ^{45}Ca(\text{cpm})}{\text{배지내 } ^{45}Ca(\text{cpm}) + \text{골내 } ^{45}Ca(\text{cpm})} \times 100$$

대조군에 대한 실험군의  $^{45}Ca$  유리율

$$= \frac{\text{실험군 } ^{45}Ca \text{ 유리량}(\%)}{\text{대조군의 } ^{45}Ca \text{ 유리량}(\%)}$$

LPS가 두개골흡수에 미치는 영향을 알아보기 위하여 LPS(0.1, 1.0, 10 $\mu$ g/ml)로 두개골을 자극하였으며, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8 및 TNF- $\alpha$ 에 의한 두개골 흡수정도를 비교하기 위해서는 두개골 배양배지에 이들을 최종 농도가 각각 1, 10, 50 그리고 ng/ml되도록 첨가하였다. 또한 두개골 배양배지에 IL-1 $\beta$ (10 ng/ml) 단독, IL-1 $\beta$ (10 ng/ml)와 IFN- $\gamma$ (0.1, 1, 10, 100, 200, 400 ng/ml) 또는 IL-1 $\beta$ (10 ng/ml)와 IL-10(0.1, 1, 10, 100, 200, 400 ng/ml)을 동시에 첨가하여 이들(IL-10과 INF- $\gamma$ )이 IL-1 $\beta$ 에 의하여 유도된 마우스 두개골흡수에 미치는 영향을 분석하였다.

나. 파골세포형성능 측정

4-5 주된 ICR 마우스의 대퇴골을 분리한 후 연조직을 제거하고 골말단 부위를 절단하였다. 25 gauge 주사바늘로  $\alpha$  MEM배지(Gibco, Gaithersburg, MD, U.S.A.)를 골수강내로 주입하여 골수세포를 뽑아낸 후 56°C에서 열비동화시킨 10% 우태아혈청(fetal calf serum : Gibco, Gaithersburg, MD, U.S.A.), penicillin G sodium(200 units/ml), streptomycin sulfate(200  $\mu$ g/ml) 및 amphotericin B(0.5  $\mu$ g/ml)가 함유된  $\alpha$  MEM배지(이하 골수세포 배양배지라 함)에 0.5 ml당 세포수가  $1 \times 10^6$ 개 되도록 부유시켰다. 24 well 세포 배양용기(Corning, NY, U.S.A.)의 각 well에 0.5ml의 골수세포 부유액을 분주한 후 5% CO<sub>2</sub> 항온항습기(37°C)에서 9일간 배양하였다. 배양 후 1일 및 5일째에 IL-1 $\beta$ (10 ng/ml) 단독 또는 IL-1 $\beta$ (10 ng/ml)와 IL-10(400 ng/ml)을 골수세포 배양배지에 함께 넣었다. 한편 배양 5일째에 0.2ml의 골수세포 배양배지를 버리고 동량의 새골수세포 배양배지를 첨가하였으며, 9일 후에는 파골세포의 표지물질인 tartrate저항성 산성인산분해효소(tartrate resistant acid phosphatase, TRAP :

Sigma, St Louis, MO, U.S.A.)를 염색하여 위상차현미경(160배)상에서 각 well 당 형성된 핵이 세개 이상인 TRAP 양성 다핵세포(파골세포)의 수를 세었다.

다. 마우스 골조직세포로부터 유리된 cytokine의 정량 분석

1) 순차효소화기법(sequential enzymatic digestion)에 의한 골조직세포의 분리 및 배양  
순차효소기법은 Luben등(1976)의 방법에 의하여 시행하였다. 즉 16-17일된 태자 ICR 마우스 두개골을 무균적으로 적출한 후 이를 penicillin G sodium(1,000 units/ml), streptomycin sulfate(1,000 µg/ml) 및 amphotericin B (10 µg/ml)가 포함된 Hank's balanced salt 용액(HBSS: Gibco, Gaithersburg, MD, U.S.A.)으로 2회 세척하였다. 효소용액은 0.1% 교원분해효소(Gibco, Gaithersburg, MD, U.S.A.), 0.05% trypsin(Gibco, Gaithersburg, MD, U.S.A.), 4mM EDTA를 포함한 HBSS용액으로서 10개의 두개골 당 1.5ml를 사용하였다. 두개골과 효소용액을 35mm조직배양기에 넣은후 5% CO<sub>2</sub> 항온 항습기(37°C)내에서 자성교반기로 저속을 유지하면서 20분 간격으로 5회 반응 시켰다. 이런 과정에 의하여 분리된 골세포 현탁액을 스테인레스 스틸망(세공의 직경 50µm)으로 여과한 후, 동량의 우태아혈청이 들어 있는 원심분리관에 넣고 200g에서 5분간(4°C) 원심분리하여(Beckman, Fullerton, CA, U.S.A.) 골조직세포를 수집하였다.

2) 마우스 골조직세포로부터 cytokine 생성 유도

골조직세포는 열비동화시킨 우태아혈청(10%), penicillin G sodium(250 units/ml), streptomycin sulfate (250µg/ml) 및 amphotericin B(0.75 µg/ml)가 함유된 α MEM 1ml 당 세포수가 4×10<sup>4</sup>개 되도록 부유시킨 후, 24 well 세포 배양용기의 각 well에 1ml씩 분주하여 72시간 배양하였다. 배양 후 처음 24시간에 배양배지를 갈아주었으며 72시간 후에는 각 well의 배지를 완전히 제거하고 IL-1β 또는

IL-1β와 IL-10이 같이 함유된 배양배지(열비동화시킨 우태아혈청(1%), penicillin G sodium(100 units/ml), streptomycin sulfate(100 µg/ml) 및 amphotericin B(0.3 µg/ml)가 함유된 α MEM배지)를 각 well에 1ml씩 분주하였다. 72시간후 각 well의 배양액을 200g에서, 10분간 원심분리하여 상층액을 얻어 -70°C에 보관하였다. 조골세포의 표지물질인 alkaline phosphatase(Sigma, St Louis, MO, U.S.A.)로 배양한 세포를 염색하여 마우스 두개골분리세포내 조골세포의 수(55-65%)를 확인하였다.

3) 마우스 골조직세포 배양 상층액의 cytokine 농도 측정

TNF-α, GM-CSF 및 IL-6와 특이하게 반응하는 각 cytokine에 대한 항혈청을 이용한 효소면역흡착검사 kit(Genzyme, Cambridge, MA, U.S.A.)로 배양 상층액내의 각 cytokine의 농도를 측정하였다. 두개골세포배양 상층액 및 일정한 농도로 표준 cytokine 용액을 anti-murine IL-6가 부착된 96 well plate에 각각 50µl씩 분주하고 37°C에서 두 시간 동안 방치하였다. Buffer(Genzyme, Cambridge, MA, U.S.A.)로 5회 세척한 후 100µl anti-murine IL-6 peroxidase conjugate를 각 well에 가하여 37°C에서 1시간 동안 방치하였다. 다시 5회 세척한 후 3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine(TMB) 용액을 각 well에 100µl씩 떨어뜨려 실온에서 30분간 반응시켰다. 발색정도는 microplate reader(Dynatech, Alexandria, VA, U.S.A.)로 450nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준 IL-6의 희석 농도와 흡광도로 표준방정식을 구한 후 세포배양액내의 IL-6의 농도를 계산하였으며 세포배양액내의 GM-CSF와 TNF-α의 농도도 같은 방법으로 측정하였다(그림 2).

다. 실험자료의 분석

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

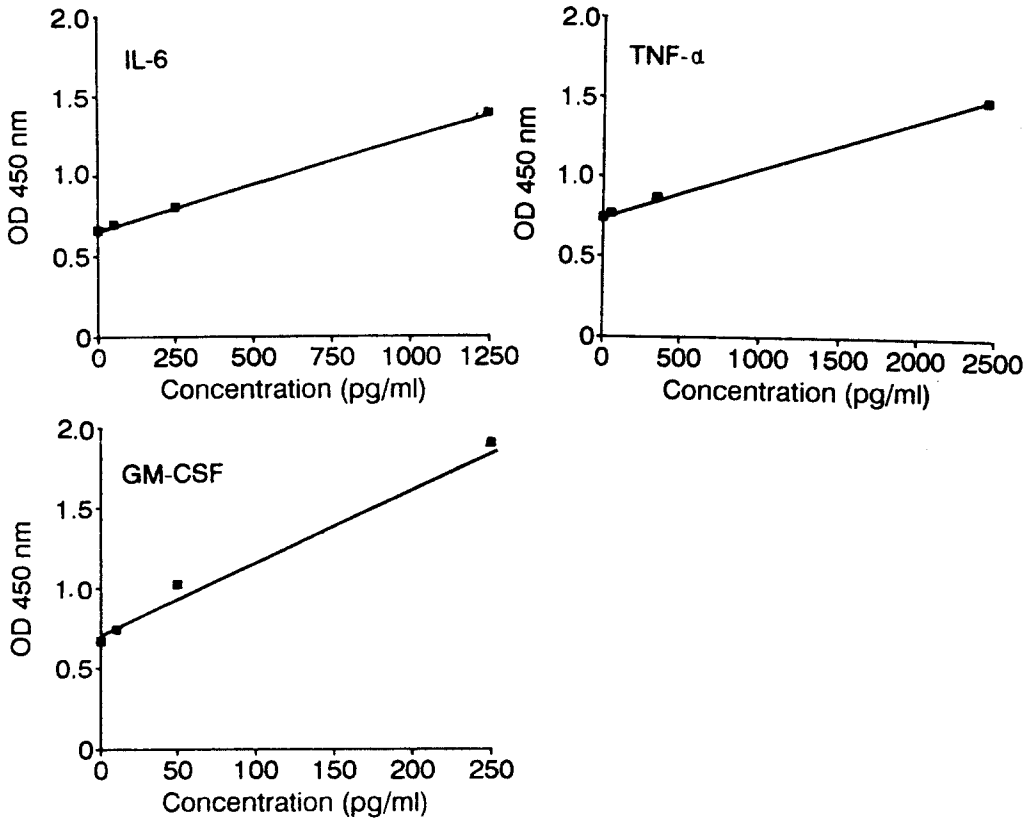


그림 2. 효소면역흡착법으로 측정된 IL-6, TNF- $\alpha$  및 GM-CSF의 표준곡선. IL-6, TNF- $\alpha$  및 GM-CSF의 표준 용액을 각각 일정한 농도로 희석하여 효소면역흡착법으로 흡광도(OD : optical density)를 측정된 다음, 각 cytokine의 농도에 대한 흡광도로 표준곡선 방정식을 구하고 이로부터 두개골세포의 배양액내의 cytokine의 농도를 계산하였다. IL-6, TNF- $\alpha$  그리고 GM-CSF의 표준곡선 방정식 및 상관계수( $r$ )는 각각  $y=0.6626+0.0006 \times (r=1.000)$ ,  $y=0.7320+0.0006 \times (r=0.999)$ ,  $y=0.7086+0.0048 \times (r=0.992)$ 이었다.

### III. 실험결과

#### 1. LPS 농도에 따른 두개골 흡수의 변화

$^{45}\text{Ca}$ 로 표지된 마우스의 두개골에서 IL-10이 골흡수에 미치는 영향을 분석하기에 앞서 본 실험방법에 의한 골흡수 반응의 재현성(reproducibility)을 확인하였다. 이미 골흡수를 야기시키는 것으로 알려진 LPS(0.1, 1 그리고 10 ng/ml)로 마우스 두개골을 자극하여(Haus-

mann 등, 1970) 골흡수정도를 측정하였으며(그림 3), 골흡수정도는 LPS로 자극하지 않은 두개골의  $^{45}\text{Ca}$  유리량에 대한 LPS 처치군의  $^{45}\text{Ca}$  유리량의 비 ( $^{45}\text{Ca}$  유리율)로 나타내었다. 실험결과 마우스 두개골에 LPS를 0.1, 1.0, 10ng/ml 처치함에 따라  $^{45}\text{Ca}$  유리율은 각각  $0.97 \pm 0.08$ ,  $1.14 \pm 0.07$  그리고  $1.32 \pm 0.07$  그리고  $1.32 \pm 0.07$ 을 나타내, 골흡수 정도는 LPS 농도에 비례하여 증가하였다. 이는 다른 연구자(Haus-

mann등, 1970 : Raisz등 1982 : Yoshiko등, 1986)의 실험결과와 같은 용량 반응(dose response)관계를 얻은 것으로서 본 실험방법상의 재현성을 입증한 것으로 간주하였다. 따라서 이 후의 실험에서는  $^{45}\text{Ca}$ 로 표지된 마우스 두개골을 사용하여 IL-10이 골흡수에 미치는 영향을 분석하였다.

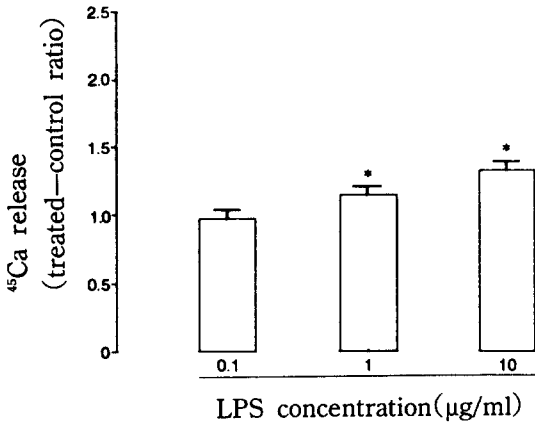


그림 3. Lipopolysaccharide(LPS) 농도에 따른 마우스 두개골 흡수의 변화.  $^{45}\text{Ca}$ 로 표지된 마우스 두개골을 LPS(0.1, 1 및  $10\mu\text{g/ml}$ )로 3일간 자극한 후 두개골의 흡수정도를 측정하였다. 막대 및 수직선의 크기는 각각 골흡수량의 상대적 비율에 대한 평균과 표준오차로 4회 실험하여 얻은 결과이다. \*는 LPS를 처리하지 않은 결과와 비교하여  $p < 0.05$ 을 의미한다.

2. IL- $\beta$ , IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$  및 IL-8에 의한 마우스 두개골 흡수의 변화

IL-1 $\beta$ 가 마우스 두개골흡수에 미치는 영향을 IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$  및 IL-8와 비교하였다 (그림 4, 5). 그 결과 IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$  및 TNF- $\alpha$ 는 마우스 두개골 흡수를 유도하였으나, IL-8에 의해서는 두개골의 흡수가 일어나지 않았다. 즉 TNF- $\alpha$ 의  $^{45}\text{Ca}$  유리율은 1 ng/ml에서 각각  $1.20 \pm 0.15$  및  $1.61 \pm 0.28$ 로서, TNF- $\alpha$ 는 1ng/ml에서 골흡수를 유도하기 시작하였으며 10 ng/ml에서 최대의 골흡수를 나타냈다. 그러나 IL-8의  $^{45}\text{Ca}$  유리율은 100

ng/ml에서  $0.93 \pm 0.12$ 로 골흡수를 일으키지 않았다 ( $p < 0.05$ ). 한편 IL-1 $\alpha$  및 IL-1 $\beta$  1ng/ml에서  $^{45}\text{Ca}$  유리율은 각각  $1.61 \pm 0.26$  및  $1.77 \pm 0.30$ 을 보여 이들은 1ng/ml 농도에서 최대의 골흡수를 나타냈지만, 10, 50, 100 ng/ml에서는 그 이상의 골흡수가 없었다. 이와같이 IL-1 $\beta$ 는 농도 1ng/ml 10ng/ml에서 골흡수의 차이를 보이지 않았으나 일부 보고자들이 2-10ng/ml IL-1으로 골흡수를 유도하였으므로(Heath 등, 1985 : Hoffman등, 1987 : Takuhiko등, 1991) 이를 감안하여 이후의 실험에서는 10ng/ml의 IL-1 $\beta$ 로 골흡수를 야기시켰다.

3. IL-10 및 IFN- $\gamma$ 가 IL-1 $\beta$ 에 의하여 유도된 두개골 흡수에 미치는 영향

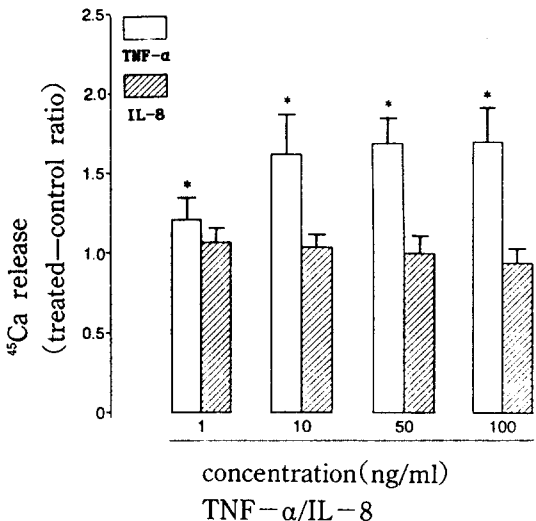


그림 4. TNF- $\alpha$  및 IL-8에 의한 마우스 두개골 흡수의 변화.  $^{45}\text{Ca}$ 로 표지된 마우스 두개골을 TNN- $\alpha$  및 IL-8(각각 1, 10, 50 및 100ng/ml)로 3일간 자극한 후 두개골에서 유리되는  $^{45}\text{Ca}$ 의 방사능을 측정하였다. 각 막대 및 수직선의 크기는 각각 골수흡수량의 상대적 비율에 대한 평균과 표준오차로서 5-12회 실험하여 얻은 결과이다. \*는 cytokine으로 처리하지 않은 대조군과 비교하여  $p < 0.05$ 을 의미한다.

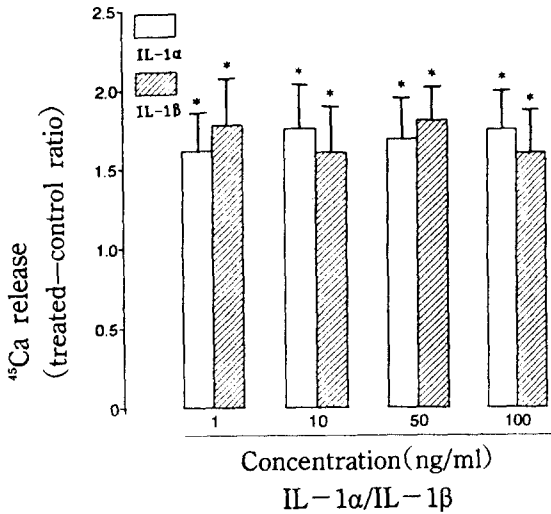


그림 5. IL-1 $\alpha$  및 IL-1 $\beta$ 에 의한 마우스 두개골 흡수의 변화.  $^{45}\text{Ca}$ 로 표지된 마우스 두개골을 IL-1 $\alpha$  또는 IL-1 $\beta$ (각각 1, 10, 50 및 100ng/ml)로 3일간 자극하여 두개골에서 유리된  $^{45}\text{Ca}$ 의 방사능을 측정하였다. 각 막대 및 수직선의 크기는 각각 골흡수량의 상대적 비율에 대한 평균과 표준오차로서 5-12회 실험하여 얻은 결과로이다. \*는 cytokine으로 처리하지 않은 대조군과 비교하여  $p < 0.05$ 을 의미한다.

골흡수에 대한 IL-10의 영향을 평가하기 위하여,  $^{45}\text{Ca}$ 로 표지된 마우스 두개골을 IL-1 $\beta$  (10ng/ml)와 IL-10(0.1, 1, 100, 200, 400ng/ml)으로 동시에 처리하여  $^{45}\text{Ca}$  유리량을 측정하였고, 이때 IL-10이 IL-1 $\beta$ 에 의한 두개골 흡수에 미치는 영향을 IFN- $\gamma$ 와 비교하였다 (그림 6, 7). IL-1 $\beta$ 로 유리된  $^{45}\text{Ca}$  유리율은  $1.65 \pm 0.24$ 이었으나, IL-1 $\beta$ (10ng/ml)와 IFN- $\gamma$ (100ng/ml, 200ng/ml 그리고 400ng/ml)를 동시에 첨가한 경우  $^{45}\text{Ca}$  유리율은 각각  $1.24 \pm 0.12$ ,  $1.19 \pm 0.17$  그리고  $1.08 \pm 0.05$ 로서, IFN- $\gamma$ 는 IL-1 $\beta$ 에 의한 마우스 두개골흡수를 억제하였다. 또한 IL-1 $\beta$ 와 IL-10(400ng/ml)을 함께 처리한 조건에서도  $^{45}\text{Ca}$  유리율은  $1.08 \pm 0.04$ 를 나타내어 IL-10(400ng/ml)역시 IL-1 $\beta$ 에 의한 마우스 두개골흡수를 감소시켰다. 이

와같이 IFN- $\gamma$ 와 IL-10은 IL-1 $\beta$ 에 의하여 유도된 마우스 두개골흡수를 억제하였으나, 이들이 골흡수억제에 미치는 정도는 서로다른 것으로 생각된다.

#### 4. IL-1 $\beta$ 와 IL-10이 마우스 골수세포의 파골세포 형성에 미치는 영향

IL-10이 IL-1 $\beta$ 에 의하여 유도되는 파골세포의 형성에 미치는 영향을 알아보기로 파골세포의 전구세포가 존재하는 마우스 골수세포를 IL-1 $\beta$ , 또는 IL-1 $\beta$ 와 IL-10이 있는 배지에서 8일간 배양한 후, 핵이 세개 이상인 tartrate 저항성 산성인산분해효소(tartrate resistant acid phosphatase : TRAP) 양성 다핵세포의 수를 세어 파골세포의 형성정도를 관찰

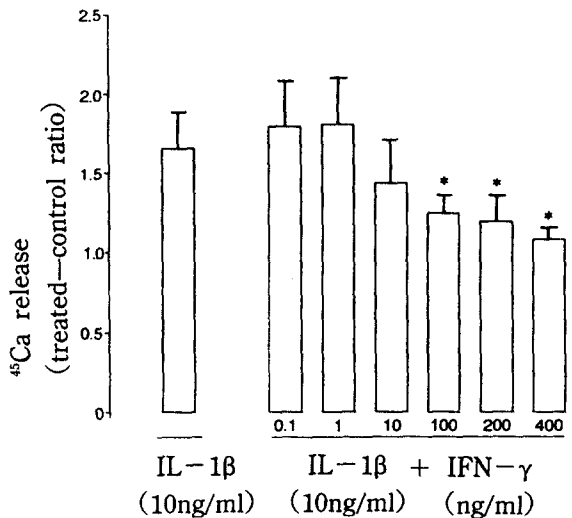


그림 6. IFN- $\gamma$ 가 IL-1 $\beta$ 에 의한 골흡수에 미치는 영향.  $^{45}\text{Ca}$ 로 표지된 마우스 두개골을 IL-1 $\beta$ (10ng/ml) 단독 또는 IL-1 $\beta$ (10ng/ml)와 IFN- $\gamma$ (0.1, 1, 10, 100, 200 및 400ng/ml)로 3일간 자극하여 두개골에서 유리된  $^{45}\text{Ca}$ 의 방사능을 측정하였다. 각 막대 및 수직선의 크기는 각각 골흡수량의 상대적 비율에 대한 평균과 표준오차로서 4-14회 실험하여 얻은 결과이다. \*는 IL-1 $\beta$ 로 자극한 효과와 비교하여  $p < 0.05$ 임을 의미한다.



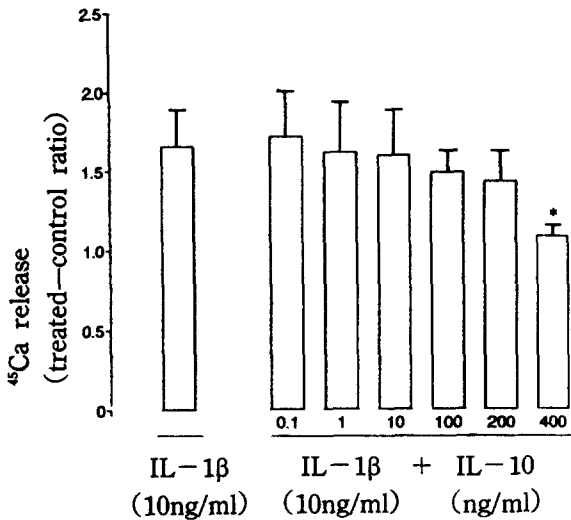


그림 7. IL-10이 IL-1β에 의한 골흡수에 미치는 영향. <sup>45</sup>Ca로 표지된 마우스 두개골을 IL-1β(10 ng/ml) 단독 또는 IL-1β(10 ng/ml)와 IL-10(0.1, 1, 10, 100, 200 및 ng/ml)으로 3일간 자극하여 두개골에서 유리된 <sup>45</sup>Ca의 방사능을 측정하였다. 각 막대 및 수직선의 크기는 각각 골흡수량의 상대적 비율에 대한 평균과 표준오차로서 4-14회 실험하여 얻은 결과이다. \*는 IL-1β로 자극한 효과와 비교하여 p < 0.005임을 의미한다.

하였다(표1, 그림8). IL-1β로 자극하지 않은 골수세포에서 TRAP양성 다핵세포는 1±1개 관찰되었다. IL-1β가 첨가된 배지에서 골수세포를 배양하여 형성된 TRAP 양성 다핵세포수는 20±11개, IL-1β와 IL-10으로 동시에 자극한 조건에서 형성된 다핵세포수는 2±2개로 IL-10은 IL-1β에 의한 파골세포 형성을 억제하였다.

#### 5. IL-10이 IL-1β에 의하여 유도된 마우스 두개골 분리세포의 cytokine 생성에 미치는 영향

조골세포로부터 생성되는 IL-6, GM-CSF 및 TNF-α가 파골세포의 분화와 관련이 있으므로 두개골 분리세포를 IL-1β, 또는 IL-1

β와 IL-10이 첨가된 배지에서 3일간 배양한 후 배양배지내의 IL-6, GM-CSF 및 TNF-α의 농도를 효소면역흡착법으로 측정하였다(표 2). 배양배지내의 각 cytokine의 농도는 표준 cytokine 용액의 농도에 대한 흡광도로 표준방정식을 구하여 이로부터 계산하였는데, IL-6, GM-CSF 및 TNF-α의 표준곡선 방정식 및 상관계수(r)는 각각  $y=0.6626+0.0006 \times (r=1.000)$ ,  $y=0.7330+0.0006 \times (r=0.999)$ ,  $y=0.7086+0.0048 \times (r=0.992)$ 이었다(그림 2). Cytokine으로 자극하지 않은 조건에서 세포배양배지내 IL-6, GM-CSF 및 TNF-α의 농도는 각각  $23.4 \pm 11.8$  pg/ml,  $1 \pm 0$  pg/ml 및 0pg/ml이었고, IL-1β로 자극한 경우 이들 cytokine의 농도는 각각  $3280.0 \pm 108.7$  pg/ml,  $2.6 \pm 1.3$ pg/ml 및 0pg/ml로 IL-1β는 마우스 두개골세포로부터 IL-6의 생성을 증가시켰다. GM-CSF생성도 IL-1β에 의하여 유도되는 경향을 보이나 통계적으로 유의성이 없다. IL-1β와 IL-10으로 동시에 세포를 자극한 경우 세포배양배지내 IL-6의 농도는  $3260.3 \pm 178.2$ pg/ml를 나타내 IL-10과 IL-1β로 동시에 세포를 자극하여도 IL-6의 생성은 감소되지 않았다. 따라서 IL-10은 IL-1β에 의하여 유리되는 골흡수촉진 인자인 IL-6의 생성을 억제하지 못하는 것을 생각된다.

표1. IL-10이 IL-1β에 의하여 유도된 tartarate 저항성 산성인산분해효소 양성 다핵세포형성에 미치는 영향

Treatment (Concentration)	Number of Tartrate resistant resistant acid Phosphatase positive multinucleated cells
Control	1±1*
IL-1β (10ng/ml)	20±10
IL-1β (10ng/ml) + IL-10(400ng/ml)	2±1*

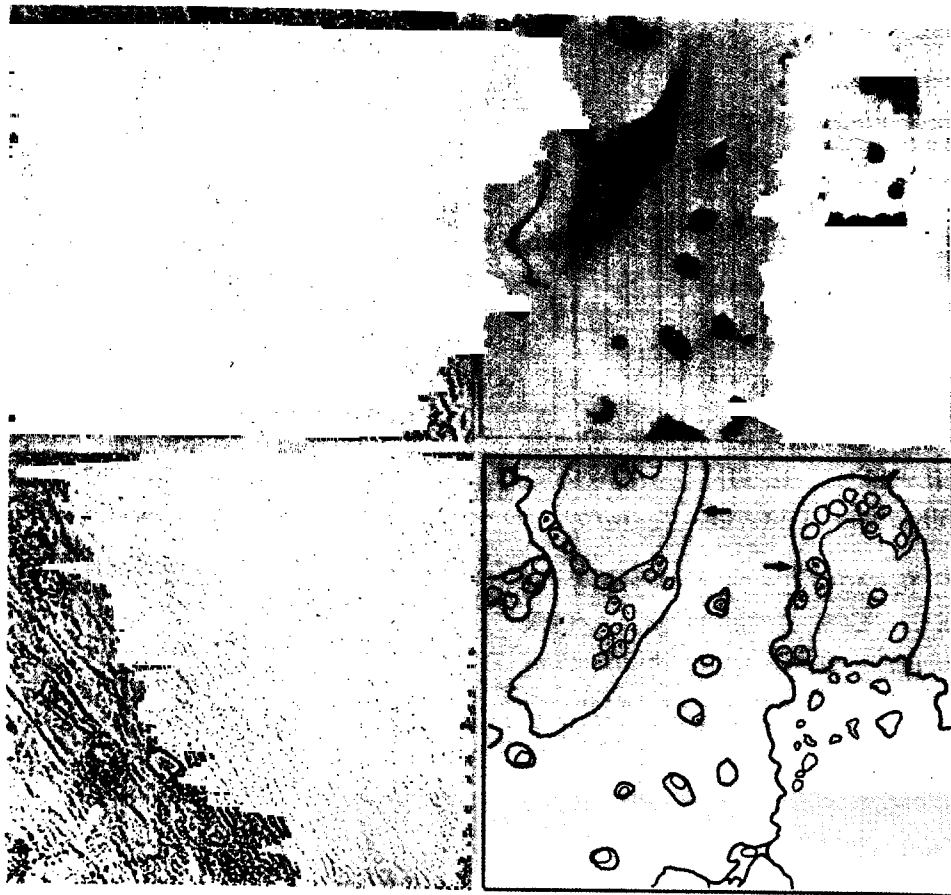


그림 8. IL-10이 IL-1 $\beta$ 에 의하여 유도된 tartrate 저항성 산성인산분해효소(tartrate resistant acid phosphatase : TRAP) 양성 다핵세포형성에 미치는 영향. 이는 골수세포의 위상차 현미경 사진( $\times 160$ )으로 IL-1 $\beta$ 로 자극하지 않은 골수세포(A)에서는 TRAP 양성 다핵세포가 관찰되지 않았다. IL-1 $\beta$ 로 자극하지 않은 골수세포(A)에서는 TRAP 양성 다핵세포가 관찰되지 않았다. IL-1 $\beta$  (B)에 의하여 TRAP 양성 다핵세포가 형성되었으나 IL-10과 IL-1 $\beta$ 로 동시에 자극한 조건(C)에서는 형성되지 않았다. D는 사진 B를 모식적으로 나타낸 것으로 핵이 세개 이상인 TRAP 양성 다핵세포(화살표)를 관찰할 수 있다.

마우스 골수세포를 24 well 세포 배양용기의 각 well에 세포수가  $1 \times 10^6$ 개 되도록 분주한 후 IL-1 $\beta$ , 또는 IL-1 $\beta$ 와 IL-10이 같이 함유된 배지에서 8일간 배양하였다.

배양후 tartrate 저항성 산성인산분해효소 염색을 실시하여 위상차 현미경상에서 tartrate 저항성 산성인산분해효소 양성 다핵(핵이 세개

이상) 세포의 수를 세었다. 각 수치(평균  $\pm$  표준오차)는 24 well 세포배양용기의 각 well당 형성된 tartrate 저항성 산성인산분해효소 양성 다핵세포수이며, 각각은 5회 실험하여 얻은 결과이다. \*는 IL-1 $\beta$ 로 자극받은 군에 대한  $p < 0.05$ 임을 의미한다.

표2. IL-10이 IL-1 $\beta$ 에 의하여 유도된 마우스 두개골세포의 IL-6, GM-CSF 및 TNF- $\alpha$ 생성에 미치는 영향

Treatment (ng/ml)	cytokines produced (pg/ml)		
	IL-6	GM-CSF	TNF- $\alpha$
Control	23.4 $\pm$ 11.8*	0	0
IL-1 $\beta$ (1ng/ml)	3280.0 $\pm$ 108.7	2.6 $\pm$ 1.3	0
IL-1 $\beta$ (1ng/ml)	3260.0 $\pm$ 178.2	3.8 $\pm$ 2.9	0

마우스 두개골로부터 분리한 세포를 24well 세포배양기의 각 well당 세포수가  $4 \times 10^4$  되도록 분주하여 세포가 배양기 바닥에 단층으로 자랄때까지(3일간) 배양하였다. 세포가 단층으로 자란 후 배양배지를 제거하고 IL-1 $\beta$ (10ng/ml)와 IL-10(400ng/ml)로 세포를 3일간 자극하여 세포배양액내의 IL-6, GM-CSF 및 TNF- $\alpha$ 의 농도를 효소면역흡착법으로 측정하였으며, 각각의 수치는 평균 및 표준오차로 3회 실험하여 얻은 결과이다. \*는 IL-1 $\beta$ 만을 처치하였을 때와 비교하고 p값이 0.05이하임을 의미한다.

#### IV. 고 찰

단핵세포는 LPS에 의하여 IL-1을 유리하는데(Dinarello, 1984), IL-1은 조골 세포로부터 파골세포분화 촉진인자인 IL-6, GM-CSF 및 TNF- $\alpha$ 를 생성시켜 파골세포에 의한 골흡수를 야기시킨다. 이와같이 LPS는 단핵세포에서 IL-1의 생성을 자극할 뿐만 아니라 IL-10이라는 cytokine의 생성도 촉진시킨다(de Waal-Malefyt 등, 1991). IL-10은 단핵세포로부터 IL-10, GM-CSF 및 TNF- $\alpha$  비롯한 각종 cytokine의 유리를 억제하여 이들 cytokine에 의한 작용을 조절하는 것으로 생각되지만(de Waal-Malefyt 등, 1991) 아직 IL-10과 골흡수와의 관계에 대하여 알려진 바 없다. 그러나 IL-10이 단핵세포의 cytokine 생성을 감소시키는 점으로 미루어, IL-1으로 자극 받은 조골세포로부터 cytokine 생성도 억

제하여 골흡수 조절에 관여할 것으로 짐작된다.

이와 같이 IL-1 및 조골세포에서 유리되는 cytokine(IL-6, GM-CSF 및 TNF- $\alpha$ ) 그리고 IL-10의 복잡한 작용에 의하여 골흡수가 일어나는 것으로 추측된다. 지금까지 알려진 바에 의하면 IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ (IL-1은 등전점에 따라 IL-1 $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$ 로 분류된다: Oppenheim, 1986) 및 TNF- $\alpha$ 는 골흡수를 촉진시키며(Gowen 등, 1983; Bertolini 등, 1986; Gwen과 Mundy, 1986; Lorenzo 등, 1988), IL-8은 골흡수와 관련이 있을 것으로 추측되고 있으나(Chaudhary 등, 1992), 이들에 의한 골흡수 정도는 다른 것으로 생각하고 있다(Stashenko 등, 1987). 따라서 본 실험에서는 IL-10이 IL-1으로 유도된 골흡수에 미치는 영향을 관찰하기에 앞서, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  및 IL-8이 골흡수를 일으키는 정도를 비교하였다(그림 4, 5). 그 결과 IL-1 $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$ 의 골흡수 능력이 TNF- $\alpha$ 보다 큰 것으로 나타났으나(그림 4, 5), IL-1 $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$ 의 골흡수 정도에는 차이가 없었다(그림 5). Stashenko 등(1987)도 장골에서 IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  및 TNF- $\alpha$ 에 의한 골흡수 정도를 비교하여 IL-1 $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$ 가 TNF- $\alpha$ 보다 골흡수 능력이 크다고 하였으나, IL-1 $\beta$  및 IL-1 $\alpha$ 의 능력에 대한 비교에서는 본 실험 결과와는 달리 IL-1 $\beta$ 가 IL-1 $\alpha$ 보다 골흡수를 더욱 촉진함을 관찰하였다. 이러한 IL-1 $\beta$ 와 IL-1 $\alpha$ 에 의한 골흡수 정도의 차이가 무엇때문에 발생했는지 그 이유를 정확히 제시하기 어려우나, 두개골에서 IL-1 $\alpha$  및 IL-1 $\beta$ 가 골흡수를 일으키는 정도에 차이가 없는 것으로 보아(Jandinskii, 1988) 이는 사용한 골조직의 조직학적 구성의 차이에 의한 것으로도 생각된다. 한편 IL-1 $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$ 가 골흡수를 촉진하는 것과는 달리 본 실험 결과에서 IL-8은 골흡수를 유도하지 못하였다(그림 4). 따라서 IL-8이 골흡수와 무관한 것으로 생각되나 실제 IL-1 $\beta$ 로 자극받은 조골세포에서 IL-6 및 GM-CSF와 함께 생성되는 점을 감안한다면(Chaudhary 등, 1992) IL-8이 IL-6와 GM-CSF와 같이 존재하는 조건에서는 골흡수에 영향을 미칠 수 있는 것으로 추측된다.

앞에서 언급한 바와같이 IL-1 $\beta$ 와 IL-1 $\alpha$ 가 TNF- $\alpha$ 와 IL-8보다 골흡수 능력이 크며 IL-1 $\beta$ 와 IL-1 $\alpha$ 의 골흡수 정도간에 차이가 없는 것으로 나타나지만 IL-1 $\beta$ 가 치주염시 치조골 파괴와 관련이 있으므로(Stashenko등, 1991) 본 실험에서는 IL-1 $\beta$ 를 골흡수를 유도물질로 선택하여 IL-10이 IL-1 $\beta$ 에 의한 골흡수에 미치는 영향을 관찰하였다. 그 결과 IL-10은 그림 7에서와 같이 IL-1 $\beta$ 에 의한 마우스 두개골흡수를 억제하였는데 이는 IL-10이 IL-1 $\beta$ 에 의한 골흡수를 조절할 수 있음을 의미하는 결과로 풀이된다. 그렇지만 IL-10은 IFN $\gamma$  100ng/ml보다 높은 농도(400ng/ml)에서 IL-1 $\beta$ 에 의한 골흡수를 억제함으로(그림 6), IL-10의 골흡수 억제 능력은 IFN- $\gamma$ 보다 적은 것으로 생각된다. 물론 이같은 실험결과는 시험관내에서는 얻은 것이 때문에 이를 생체내에서 일어나는 반응에 직접 적용하기 어렵다. 그러나 체내에서는 일부 cytokine이 단독으로 골흡수를 일으킬 수 없는 저농도에서도, 다른 cytokine과 함께 작용하여 골흡수에 영향을 미칠 수 있으므로 (Stashenko등, 1987 : Pfeilschifter등, 1989) IL-10과 IFN- $\gamma$ 의 농도가 낮다 할찌라도 실제 골흡수억제에 대한 상승작용을 나타낼 수 있을 것으로 여겨진다.

그렇다면 IL-10의 골흡수 억제는 어떠한 과정으로 일어나는가? 골흡수는 분화된 파골세포에 의하여 유도되며, 파골세포의 분화는 조골세포에서 생성되는 cytokine에 의하여 매개되므로, IL-10에 의한 골흡수 억제는(1) 파골세포 전구 세포의 분화의 억제 또는(2) 조골세포로부터 파골세포의 분화와 관련된 cytokine생성의 감소에 의하여 나타날 수 있을 것으로 생각된다. 첫째 IL-10이 파골세포형성에 미치는 영향을 평가하기 위하여 파골세포 전구세포가 존재하는(Mundy와 Roodman, 1987) 골수세포를 장기간 배양하여 다핵세포 형성여부를 관찰하였다(Testa 등, 1981 : Roodman등, 1985, 1987 : Takahashi, 1986 : Macdonald등, 1987). 그 결과 IL-1 $\beta$ 로 자극한 경우 형성된 tartrate 저항성 산성인산분해 효소 양성 다핵세포는 20 $\pm$  10개로 IL-1 $\beta$ 는 파골세

포의 형성을 촉진시켰으나 IL-10와 IL-1 $\beta$ 을 함께 처치한 경우 형성된 다핵세포수는 2 $\pm$  2개로서, IL-10은 IL-1 $\beta$ 에 의한 파골세포의 형성을 감소시켰다.(표1, 그림8). 이는 IL-10이 IL-1 $\beta$ 로 유도되는 파골세포의 분화를 차단하여 골흡수 억제효과를 나타냄을 시사한다. 이와같이 IL-10에 의한 파골세포 분화의 억제가 어떤 과정에 의하여 유도되는지, 본 실험에서는 알 수 없으나, 파골세포 분화가 분화가 파골세포 전구세포의 증식 또는 전구세포의 융합과 같은 두가지 가능성에 의하여 야기될 수 있으므로(Takahashi등, 1986), IL-10에 의한 파골세포 분화의 억제도 전구세포 증식의 감소 또는 세포간 융합의 억제에 의하여 유도될 수 있을 것으로 생각된다.

둘째 파골세포의 분화는 조골세포로부터 생성되는 IL-6, GM-CSF 및 TNF- $\alpha$ 에 의하여 유도되므로(Macdonald등, 1986 : Sato, 1986 : Pfeilschifter등, 1989 : Gowen등, 1990 : Ishimi등, 1990 : Chaudhary등, 1992 : Girasole등, 1992) IL-10이 IL-1 $\beta$ 로 자극 받은 조골세포의 cytokine 생성을 억제할 수도 있다. 이에 이 IL-1 $\beta$ 로 자극받은 조골세포로부터 유리되는 cytokine의 생성에 미치는 영향을 관찰하기 위하여, IL-1 $\beta$ (10ng/ml) 단독 또는 IL-1 $\beta$ (10ng/ml) 및 IL-10으로 동시에 마우스 두개골세포를 자극하여 배양액내의 IL-6, GM-CSF 및 TNF- $\alpha$ 의 농도를 효소면역측량법으로 측정하였다. 마우스 두개골세포를 IL-1 $\beta$ 로 자극한 결과 IL-6는 생성되었으나 GM-CSF와 TNF- $\alpha$ 는 유리되지 않은 점으로 보아(표2)본 실험결과 나타난 파골세포의 분화는 IL-6만에 의하여 유도된 것으로 생각되며 IL-10에 의한 IL-1 $\beta$ 유도 파골세포분화의 억제는 IL-6 생성억제와 관련이 있을 것으로 추정할 수 있다. 그러나 IL-6의 생성이 IL-10을 첨가한 경우 감소되지 않아(표2) IL-10에 의한 IL-1 $\beta$ 유도 파골세포분화 억제는 조골세포로부터의 IL-6의 생성 감소와 무관한 것으로 여겨진다. 앞에서 언급한 바와 같이 GM-CSF와 TNF- $\alpha$ 가 생성되지 않았는데, 이에 대한 설명으로 다음과 같은 이유를 들 수 있다.

즉 GM-CSF는 고농도(86ng/ml)의 IL-1 $\beta$ 로 자극하는 경우에만 조골세포에서 생성되기 때문에(Chaudhary등, 1992) 저농도(10ng/ml : 골흡수를 유도한 농도)와 IL-1 $\beta$ 로 세포를 자극한 본 실험에서는 GM-CSF가 생성되지 않았을 것으로 여겨진다. 한편 TNF- $\alpha$ 는 생물학적 방법(bioassay)으로 측정할 실험에서는 생성되지 않지만(Gowen등, 1990), 효소면역흡착법으로 측정할 실험에서는 유리되지 않는 것으로 보고되(Chaudhary등, 1992) TNF- $\alpha$ 의 생성 여부는 측정방법에 따라 다르게 나타나는 것으로 추측되고 있다. 따라서 본 실험에서 TNF- $\alpha$ 가 생성되지 않은 것은 효소면역흡착법으로 cytokine의 농도를 측정하였기 때문인 것으로 생각된다.

이상의 실험결과로 볼때 IL-10이 IL-1 $\beta$ 로 유도되는 골흡수 및 파골세포의 형성을 감소시켰으므로 IL-10은 IL-1 $\beta$ 에 의한 파골세포의 형성을 억제하여 골흡수를 감소시키는 것으로 생각된다. 그러나 IL-1 $\beta$ 로 자극받은 마우스 두개골세포로부터 IL-6는 생성되었으나 GM-CSF 및 TNF- $\alpha$ 가 생성되지 않았고 IL-10이 IL-1 $\beta$ 로 자극 받은 마우스 두개골세포로부터 유리되는 IL-6 생성에 영향을 미치지 않은 것으로 보아, IL-10에 의한 IL-1 $\beta$ 유도 파골세포형성의 억제는 조골세포로부터의 IL-6, GM-CSF 및 TNF- $\alpha$ 의 생성 억제가 아닌 다른 기전에 의해 야기된 것으로 생각된다.

그렇지만 IL-10에 의한 파골세포 형성억제가 IL-10이 직접 파골세포전구세포에 작용하여 나타난 결과인지 아니면 조골세포로부터 IL-6, GM-CSF, TNF- $\alpha$ 가 아닌 다른 물질의 생성을 감소시켜 나타난 현상인지에 대해서는 앞으로 연구되어야할 과제로 본다.

## V. 결 론

IL-10이 골흡수에 미치는 영향을 규명하고자  $^{45}\text{Ca}$ 로 표지된 마우스 두개골에서 1) LPS, TNF- $\alpha$ , IL-8, IL- $\beta$  및 IL- $\alpha$ 에 의한 골흡수정도를 비교하였으며, 2) IL-10과 IFN- $\beta$ 에 의한 마우스 두개골 흡수에 미치는 영향

그리고 3) IL-10에 의한 IL- $\beta$ 로 유도한 골수세포의 파골세포형성 및 골세포의 IL-6, TNF- $\alpha$ , GM-CSF생성의 변화를 평가하였다. 골흡수정도는 대조군(cytokine 비처리군)에 대한 실험군(cytokine 처리군)의  $^{45}\text{Ca}$ 유리율로 나타내었다. 또한 골수세포를 배양하여 형성되는 파골세포는 tartrate 저항성 산성인산분해효소를 염색하여 확인하였고, 각 cytokine의 농도는 효소면역흡착법으로 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. LPS 1ng/ml에서  $^{45}\text{Ca}$  유리율은  $1.14 \pm 0.07$ 로서 이는 골흡수를 유도하였으며, 이의 농도에 따라 마우스 두개골로부터  $^{45}\text{Ca}$  유리율이 증가하였다.
2. IL- $\alpha$ , IL- $\beta$  및 TNF- $\alpha$  1ng/ml에서  $^{45}\text{Ca}$  유리율은 각각  $1.61 \pm 0.26$ ,  $1.77 \pm 0.30$  및  $1.20 \pm 0.15$ 로서 이들 cytokine은 골흡수를 촉진하였으나, IL-8에 의한  $^{45}\text{Ca}$  유리율은  $0.93 \pm 0.12$ 로 이는 골흡수를 일으키지 않았다.
3. IL-10(400ng/ml) 및 IFN- $\gamma$ (100ng/ml)의  $^{45}\text{Ca}$  유리율은 각각  $1.24 \pm 0.12$  및  $1.08 \pm 0.04$ 로서 이들 cytokine은 IL- $\beta$ (10ng/ml)에 의하여 유도된 골흡수를 감소시켰다 ( $^{45}\text{Ca}$  유리율  $1.65 \pm 0.24$ ).
4. IL- $\beta$ (10ng/ml)는 골수세포에서 tartrate 저항성 산성인산분해효소 양성 다핵세포의 수를 증가시켰으나( $20 \pm 11$ 개), IL-10(400ng/ml)을 IL- $\beta$ (10ng/ml)와 함께 처리한 경우에는 이들 세포의 수가 감소하였다 ( $2 \pm 2$ 개).
5. IL-10(400ng/ml)은 IL- $\beta$ (10ng/ml)로 자극한 마우스 두개골세포에서 생성되는 IL-6, GM-CSF 및 TNF- $\alpha$ 양에 영향을 주지 않았다.

이상의 실험결과로 볼 때 IL-10은 IL- $\beta$ 에 의한 파골세포의 분화를 차단하여 골흡수를 억제하는 것으로 생각되며, 이러한 현상은 적어도 IL-10에 의한 조골세포로부터의 IL-6, GM-CSF 및 TNF- $\alpha$ 의 생성 억제가 아닌 다른 기전에 의한 것으로 생각된다.

## 참고문헌

- Bertolini DR, Nedwin GE, Bringman TS, Smith DD, Mundy GR : Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation in vitro by human necrosis factors. *Nature* 319 : 516-518, 1986.
- Bogdan C, Vodovotz Y, Nathan C : Macrophage deactivation by interleukin 10, *J. Exp. Med.* 174 : 1549-1555, 1991.
- Chaudhary LR, Spelsberg TC, Riggs BL : Production of various cytokines by normal human osteoblast-like cells in response to interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  : lack of regulation by 17 $\beta$ -estradiol, *Endocrinology* 130 : 2528-2534, 1992.
- de Waal-Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE : Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes : An autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes, *J. Exp. Med.* 174 : 1209-1220, 1991.
- Dewhirst FE, Stashenko PP, Mole JE, Tsurumachi T : Purification and partial sequence of human osteoclast activating factor : identify with interleukin-1 $\beta$ . *J. Immunol.* 135 : 2562-2568, 1985.
- Dinarello CA : Interleukin-1. *Rev. Infect. Dis.* 6 : 51-95, 1984.
- Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M, O'Garra A : IL-10 inhibits Cytokine production by activated macrophages, *J. Immunol.* 147 : 3815-3822, 1991.
- Girasole G, Jilka RL, Passeri G, Bosell S, Boder G, Williams DC, Manolagas SC : 17 $\beta$ -estradiol inhibits cytokine-induced IL-6 production by bone marrow stromal cells and osteoblasts. *J. Clin. Invest.* 89 : 883-891, 1992.
- Go NF, Castle BE, Barrett R, Kastelein R, Dang W, Mosmann TR, Moore KW, Howard M : Interleukin 10(IL-10), a novel B cell stimulatory factor : unresponsiveness of X chromosome-linked immunodeficiency B cells. *J. Exp. Med.* 172 : 1625-1631, 1990.
- Gowen M, Nedwin GF, Mundy GR : Preferential inhibition of cytokine-stimulated bone resorption by recombinant interferon gamma, *J Bone Mineral Res.* 1 : 469-474, 1986.
- Gowen M and Mundy GR : Actions of recombinant interleukin-1, interleukin-2, and interferon  $\gamma$  on bone resorption in vitro. *J. Immunol.* 136 : 2478-2482, 1986.
- Gowen M, Wood DD, Ihrie EJ, Mcguire MKB, Russell RGG : An interleukin-1-like factor stimulates bone resorption in vitro, *Nature* 306 : 378-380, 1983.
- Gowen M, Chapman K, Littlewood A, Hughes D, Evans D, Russell G : Production of tumor necrosis factor by human osteoblasts in modulate by other cytokines, but not by osteotrophic hormones. *Endocrinology* 126 : 1250-1255, 1990.
- Hausmann E, Raisz LG, Miller WA : Endotoxin : Stimulation of bone resorption in tissue culture, *Science* 168 : 862-864, 1970.
- Heath JK, Saklatvala J, Meikle MC, Atkinson SJ, Reynold JJ : Pig interleukin(catabolin) is a potent stimulator of bone resorption. *Calcif Tissue Int.* 37 : 95-97, 1985.
- Hoffman O, Klaushofer K, Gleispach H, Leis HJ, Luger T, Koller K, Peterlik M : Gamma interferon inhibits basal and interleukin-1 induced prostaglandin production and bone resorption in neonatal mouse calvaria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 27 : 38-43, 1987.
- Honig J, Rordorf-Adam C, Siegmund C, Wiedemann W, Erard F : Increased interleu-

- kin-1 beta(IL- $\beta$ ) concentration in gingival tissue from periodontitis patients. *J. Periodont. Res.* 24 : 362-367, 1989.
- Horton JE, Raize LG, Simmons HA, Oppenheim JJ, Mergenhagen E : Bone resorbing activity in supernatant fluid from cultured human peripheral blood leukocytes. *Science* 177 : 793-795, 1972.
- Horowitz MC : Cytokines and estrogen in bone : anti-osteoporotic effects. *Science* 260 : 626-627, 1993.
- Howard M, O'Garra A : Biological properties of interleukin 10. *Immunol. Today* 13 : 198-200, 1992.
- Ishimi Y, Miyaura C, Jin CH, Akatsu T, Abe E, Nakamura Y, Yamaguchi A, Matsuda T, Hirano T, Kishimoto T, Suda T : IL-6 is produced by osteoblasts and induce bone resorption. *J. Immunol.* 145 : 3297-3303, 1990.
- Jandinskii JJ : Osteoclast activating factor in now interleukin-1 beta : histological perspective and biological implications. *J. Oral Pathol.* 17 : 145-152, 1988.
- Jandinskii JJ, Stashenko P, Feder LS : Localization of interleukin- $\beta$  in human periodontal tissue. *J. Periodontol.* 62 : 36-43, 1991.
- Jilka RL : Are osteoblastic cells required for the control of osteoclast activity by parathyroid hormone. *Bone mineral* 1 : 261-266, 1986.
- Kanz L, Lohr GW, Fauser AA : Interference of a human leukocyte interferon preparation with stimulatory activities in leukocyte-conditioned medium for human haematopoietic stem cells. *Int. J. Cell Cloning* 2 : 286-295, 1984.
- Klein DC, Raisz LG : Prostaglandins : stimulation of bone resorption in tissue culture. *endocrinology.* 86 : 1436-1440, 1970.
- Lorenzo JA, Sosal SL, Centralla M : Interleukin-1 in combination with transforming growth factor- $\alpha$  produce enhanced bone resorption in vitro. *Endocrinology* 123 : 2194-2200, 1988.
- Lowik CWGM, van der Pluijm G, Bloys H, Hoekman K, Bijvoet OLM, Aarden LA, 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.
- Luben RA, Wong GL, Cohn DV : Biochemical characterization with parathormone and calcitonin of isolated bone cells : provisional identification of osteoclasts and osteoblasts. *Endocrinology* 99 : 526-534, 1976.
- Macdonald BR, Mundy GR, Clark S, Wang EA, Keuhl JJ, Stanley ER, 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 Mineral Res.* 1 : 227-233, 1986.
- Macdonald BR, Takahashi N, McManus LM, Holahan J, Mundy GR, Roodman GD : Formation of multinucleated cells which respond to osteotropic hormones in long-term marrow cultures. *Endocrinology* 120 : 2326-2333, 1987.
- MacNeil I, Suda T, Moore KW, Mosmann TR, Zlotnik A : A novel cytokine growth cofactor for mature and immature T cells. *J. Immunol.* 145 : 4167-4173, 1990.
- Masada MP, kPersson R, Kenney JS, Lee SW, Page RC, Allison AC : Measurement of interleukin-1 $\alpha$  and interleukin-1 $\beta$  in gingival crevicular fluid : Implications for pathogenesis of periodontal disease. *J. Pe-*

- riodont. Res. 25 : 156–63, 1990.
- McShee PMJ, Chambers TJ : Osteoblastic cells mediate osteoclastic responsiveness to PTH. *Endocrinology* 118 : 824–825, 1986a.
- McShee PMJ, Chambers TJ : Osteoblast-like cells in the presence of parathyroid hormone release soluble factor that stimulates osteoclastic bone resorption. *Endocrinology* 119 : 1654–1659, 1986b.
- McShee PMJ, Chambers TJ : 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> stimulates rat osteoblastic cells to release a soluble factor that increase osteoclastic bone resorption. *J. Clin. Invest.* 80 : 425–429, 1987.
- Meghji S : Bone remodelling. *Br. Dent. J.* 172 : 235–242, 1992.
- Mundy GR and Roodman GD : In *Bone and mineral research* 5th ed. Washington Peck, 1987, pp 209–280.
- Oppenheim JJ, Kovacs EJ, matsushima K, Drum SK : There is more than one interleukin 1. *Immunol. Today* 7 : 45–56, 1986.
- Pfeilschifter J, Chenu C, Bird A, Mundy GR, Roodman GD : Interleukin-1 and tumor necrosis factor stimulate the formation of human osteoclast like cells in vitro. *J. Bone Mineral Res.* 4 : 113–118, 1989.
- Raiz LG : Bone resorption in tissue culture, Factors influencing the response to parathyroid hormone. *J. Clin. Invest.* 44 : 103–116, 1965.
- Raiz LG, Alander C, Eilon G, Whitehead SP, Nuki K : Effects of two bacterial products, muramyl dipeptide and endotoxin, on bone resorption in organ culture. *Calcif. Tissue Int.* 34 : 365–369, 1982.
- Roodman GD, Ibbotson KJ, Macdonald BR : 1, 25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> causes formation of multinucleated cells with several osteoclast characteristics in cultures of primat marrow. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82 : 8213–8217, 1985.
- Sato K, Fujii Y, Asano S, Ohtsuki T, Kawakami M, Kasono K, Tsushima T, Shizume K : Recombinant human inteleukin 1 alpha and beta stimulate mouse osteoblast-like cells (MC3T3–E1) to produce macrophage-colony stimulating activity and prostaglandin E<sub>2</sub>. *Biochem Biophys. Res. Commun.* 141 : 285–291, 1986.
- Stashenko P, Dewhirst FE, Peros WJ, Kent RL, Ago JM : Synergistic interactions between interleukin 1, tumor necrosis factor and lymphotoxin in bone resorption. *J. Immunol.* 138 : 1464–1468, 1987.
- Stashenko P, Fujiyoshi P, Obernesser MS, Prostak L, Haffajee AD, Socransky SS. : Levels of interleukin 1 $\beta$  in tissue from sites of active periodontal disease. *J. Clin. Periodontol.* 18 : 548–554, 1991.
- Takahashi N, Mundy GR, and Rooman GD : Recombinant human interferon- $\gamma$  inhibits formation of human osteoclast-like cells. *J. Immunol.* 137 : 3544–3549, 1986.
- Takuhiko A, Naoyuki T, NObuyuki U, Kazunobu I, Akira Y, Kanji S, Naokazu N, Tatsuo S : Role of prostaglandins in interleukin-1-induced bone resorption in mice in vitro. *J. Bone Mineral Res.* 6 : 183–190, 1991.
- Testa NG, Allen TD, Lajtha LG, Onion D, Jarret O : Generation of osteoclast in vitro. *J. Cell Science* 47 : 127–137, 1981.
- Thompson–Snipes L, Dhar V, Bond MW, Moshman TR, Moore KW, Rennick D : Interleukin-10 : a novel stimulatory factor for mast cells and their progenitors. *J. Exp. Med.* 173 : 507–510, 1991.
- Thomson BM, Mundy GR, Chambers TJ : Tumor necrosis factors alpha and beta induce osteoblastic cells to stimulate osteoclastic



- bone resorption. *J. Immunol.* 138 : 775–779, 1987.
- Thomson BM, Saklatvala J, Chambers TJ : Osteoblasts mediate interleukin 1 responsiveness of bone resorption by rat osteoclasts, *J. Exp. Med.* 164 : 104–112, 1986.
- Yoshiko S, Akira Y, Hiromi Y, Etsuko A, Shusaku Y, Tatsuo S : Comparison of the mechanisms of bone resorption induced by  $\alpha$ , 25–Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and lipopolysaccharides. *Calcif, Tissue Int.* 39 : 28–34, 1986.

## EFFECT OF INTERLEUKIN-10 ON THE BONE RESORPTION INDUCED BY INTERLEUKIN-1 $\beta$

Yun-Jung Yu, Yun-Sun Kang, Syng-Il Lee

*Dept. of oral Biology, School of Dentistry, Yonsei University*

The cytokines released by osteoblasts induce bone resorption via the differentiation of osteoclast precursors. In this process, interleukin-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )-induced bone resorption is mediated by granulocyte macrophage-colony stimulation factor(GM-CSF), interleukin-6(IL-6), and tumor necrosis factor  $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) released from osteoblasts. Since these cytokines (GM-CSF, IL-6, TNF- $\alpha$ ) are produced by not only osteoblasts but also monocytes, and interleukin-10(IL-10) inhibits the secretion of these cytokines from monocytes, it may be speculated that IL-10 could modulate the production of GM-CSF, IL-6, and TNF- $\alpha$  by osteoblasts, then control IL-1 $\beta$ -induced bone resorption. Therefore, the aims of the present study were to examine the effects of IL-10 on bone resorption.

The sixteen or seventeen-day pregnant ICR mice were injected with <sup>45</sup>Ca and sacrificed one day after injection. Then fetal mouse calvaria prelabeled with <sup>45</sup>Ca were dissected out. In order to confirm the degree of bone resorption, mouse calvaria were treated with Lipopolysaccharide(LPS), TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-8, IL-1 $\beta$ , and IL- $\alpha$ . Then, IL-10 and interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) were added to calvarial medium, in an attempt to evaluate the effect of IL-1 $\beta$ -induced bone resorption. In addition, osteoclasts formation in bone marrow cell cultures, and the concentration of IL-6, TNF- $\alpha$ , and GM-CSF produced from mouse calvarial cells were investigated in response to IL-1 $\beta$  alone and simultaneously adding f IL-1 $\beta$  and IL-10.

The degree of bone resorption was expressed as the ratio of <sup>45</sup>Ca release(the treated/the control). The osteoclasts in bone marrow cultures were indentified by tartrate resistant acid phosphatase(TRAP) stain and the concentration of the cytokines was quantified using enzyme linked immunosorbent method.

As results of these studies, bone resorption was induced by LPS(1 ng/ml ; the ratio of <sup>45</sup>Ca release,  $1.14 \pm 0.07$ ). Also IL-1 $\beta$ (1 ng/ml), IL-1 $\alpha$ (1 ng/ml), and TNF- $\alpha$ (1 ng/ml) resulted in bone resorption(the ratios of <sup>45</sup>Ca release,  $1.61 \pm 0.26$ ,  $1.77 \pm 0.03$ ,  $1.20 \pm 0.15$  respectively), but IL-8 did not(the ratio of <sup>45</sup>Ca release,  $0.93 \pm 0.12$ ). The ratios of <sup>45</sup>Ca release in response to IL-10(400 ng/ml) and IFN- $\gamma$ (100 ng/ml) were  $1.24 \pm 0.12$  and  $1.08 \pm 0.04$  respectively, hence these cytokines inhibited IL-1 $\beta$ (1 ng/ml)-induced bone resorption(the ratio of <sup>45</sup>Ca release  $1.65 \pm 0.24$ ). While IL-1 $\beta$ (1 ng/ml) increased the number of TRAP positive multinucleated cells in bone marrow cultures( $20 \pm 11$ ), simultaneou-

sly adding IL-1 $\beta$  (1 ng/ml) and IL-10 (400 ng/ml) decreased the number of these cells (2 $\pm$  2). Nevertheless, IL-10 (400 ng/ml) did not affect the IL-6, GM-CSF, and TNF- $\alpha$  secretion from IL-1 $\beta$  (1 ng/ml)-activated mouse calvarial cells.

From the above results, it may be suggested that IL-10 inhibites IL- $\beta$ -induced osteoclast differentiation and bone resorption. However, the inhibitory effect of IL-10 on the osteoclast formation seems to be mediated not by the reduction of IL-6, GM-CSF, and TNF- $\alpha$  production, but by other mechanisms.

**Key words :** Interleukin-10, Interleukin-1 $\beta$ , Osteoblast, Osteoclast differentiation, Inhibition of bone resorption, Interleukin-6, Tumor necrosis factor  $\alpha$ , Granulocyte macrophage-colony stimulating factor