

Tumor Necrosis Factor- α 가 골대사에 미치는 영향

김상섭 · 이수종

원광대학교 치과대학 보존학교실

ABSTRACT

EFFECT OF TUMOR NECROSIS FACTOR- α ON THE BONE METABOLISM

Sang-Sub Kim, Su-Jong Lee

Department of Conservative Dentistry, School of dentistry, Wonkwang University

Bone remodeling is characterized by the continuing processes of osteoblast-mediated bone formation and osteoclast-mediated bone resorption. Bone metabolism is tightly regulated at the local level by networks of hormones, cytokines, and other factors. In pathological conditions of bone remodeling, including osteoporosis and periodontal diseases, inflammatory cytokines and local mediators are responsible for enhancement of osteoclast resorption and inhibition of repair at the sites of bone resorption.

TNF- α is a pleiotropic hormone with actions on the differentiation, growth, and functional activities of normal and malignant cells from numerous tissues. TNF- α has been proposed as a local mediator of the control of bone turnover in situations of chronic inflammation, and it has been assumed that the local source of TNF- α is the monocyte in the adjacent bone marrow or the local circulation. TNF- α is a potent inducer of bone resorption. TNF- α is known to induce the activation of apoptotic signaling pathway, which leads to the apoptosis of bone cells.

We demonstrated that treatment of murine osteoblastic MC3T3E1 cells with TNF- α decreases proliferation as well as alkaline phosphatase (ALP) activity in a dose dependent manner. In addition, TNF- α increases osteoclast-like cell formation in 1 α , 25(OH) $_2$ D $_3$ or PGE $_2$ -treated bone marrow cell culture. When cells were cultured in TNF- α free α -MEM, this inhibitory effect of ALP activity was reversible up to 10 ng/ml TNF- α , in contrast, at the 20 ng/ml TNF- α , irreversible. In this concentration, TNF- α may induce apoptosis in MC3T3E1 cells. In this study, TNF- α induces apoptosis resulting in chromosomal DNA fragmentation, preceded by JNK/SAPKs and caspase-3 activation. Our present results show that JNK/SAPKs and caspase-3 are activated by TNF- α , suggesting that the JNK/SAPKs and caspase-3 participate in the bone resorption, associated with apoptosis.

I. 서 론

치조골조직은 석회화된 세포외 기질과 여러 종류의 세포들을 포함하고 있는 복잡한 조직으로서 태생 후에도 지속적인 골흡수와 형성으로 이어지는 개조 (remodeling)가 반복되는 동적인 조직이다. 골조직의 성장과 개조는 골형성과 골흡수의 동적인 평형에 기인하며 조골세포, 파골세포 및 그 전구세포의 증식, 분화 및 활성에 영향을 미치는 여러 가

지 전신적, 국소적 조절인자들의 영향을 받아 조절되고 있다¹⁻⁴⁾. 골조직 대사에 관여하는 대표적인 전신적 조절물질인 부갑상선 호르몬, 칼시토닌, Vitamin D의 활성형인 1 α ,25(OH) $_2$ D $_3$ 등에 대하여 많은 연구가 행하여져 왔으나 최근에는 bone-derived growth factor, skeletal growth factor, insulin-like growth factor I, transforming growth factor- β , platelet-derived growth factor 등 여러 성장인자들과 interleukin-6, tumor necrosis factor- α

(TNF- α) 및 nitric oxide 등이 골조직에서 합성, 분비되어 보고되어 이들 국소인자들이 적절한 시기에 autocrine 또는 paracrine 작용을 통하여 골조직 대사에 더욱 중요한 영향을 미칠 것으로 여겨지고 있다^{3,5)}.

이중 TNF- α 는 lipopolysaccharide나 phorbol-12-myristate-13-acetate 등에 의해 macrophage나 monocyte 등으로부터 분비되는 대표적인 proinflammatory cytokine이다^{6,9)}. TNF- α 는 생성된 종양세포를 괴사시키는 항종양 물질로 알려져 있었으나, 최근에는 많은 질환들에서 TNF- α 의 병리적 역할이 증명되면서, 알려지나 염증반응의 주요 매개물질로 이해되고 있다. TNF- α 의 대표적인 병리 작용은 천식이나 아토피성 피부염 등과 같은 알러지성 염증 질환에서부터^{7,9)} 그람음성균의 내독소에 의해 야기되는 패혈증이나^{10,11)} 면역성 간 질환¹²⁾ 등과 같은 급성질환들, 전신 홍반성 낭창, 장기이식 및 류마티스성 관절염 등과 같은 자가면역성^{8,9,13)} 질환에서 확인되고 있다. 또한 최근에는 TNF- α 가 human immunodeficiency virus의 DNA 복제를 촉진시키고, 암세포 전이시 필수적인 혈관신생에도 관여하는 것으로 보고되고 있다³⁾.

골세포에서 TNF- α 는 골개조의 국소적 조절인자로서 중요한 역할을 담당한다. Sato 등¹⁴⁾은 MC3T3E1 세포를 TNF- α 로 처리했을 때 alkaline phosphatase 활성은 감소하였으며 세포 증식은 약간 감소하였다고 보고한 바 있다. 치근단 부위 및 치주조직에 심한 염증시 면역세포에 의하여 과대 형성된 TNF- α 에 의해 조골세포가 심하게 손상을 받아 비정상적인 골개조를 자극한다고 알려져 있다¹⁵⁾.

또한 여러 보고에서 TNF- α 는 조골세포 기능에 강력한 억제효과를 보이기 때문에 osteoporosis의 병태생리학¹⁶⁾, 암 질환시 hypercalcemia, rheumatoid arthritis에 있어서 periarticular bone loss에 관여하며¹⁷⁾ 1,25(OH)₂D₃ 자극에 의한 gla protein (BGP)¹⁸⁾ 생성억제 및 조골세포에서 파골세포에 의한 골흡수 촉진제로 알려진 IL-1 β 유리를 촉진한다고 하였다⁹⁾. Thomson 등²⁰⁾은 조골세포 배양액에 TNF- α 를 첨가하여 배양한 조골세포-conditioned 배양액을 조골세포와 파골세포의 공생배양에서 이용하였을 때 정상 배양액에서 보다 골흡수 능력이 증가하였음을 보고하여 TNF- α 가 조골세포에 의한 파골세포의 골흡수 작용을 유도한다고 보고하였다.

세포고사 (apoptosis)는 plasma-membrane blebbing, nuclear condensation, nucleosomal DNA fragmentation으로 특징 지워지는 일련의 과정으로 조직의 발달과 항상성 유지뿐만 아니라 세포증식의 down regulation에 있어서 필수적인 것으로 알려져 있다²¹⁾. Wright 등²²⁾은 파골세포의 세포고사가 파골세포의 수의 감소 및 골형성에 매우 중요한 역할을 하여 골개조 (bone remodeling) 과정을 담당한다고 보고한 바 있다.

최근 TNF- α 가 human leukemia cell line인 HL-60²³⁾과 U937²⁴⁾ 세포 및 murine fibrosarcoma cell line인 L292²⁵⁾와 WEHI²⁶⁾ 세포에서 세포고사와 DNA fragmentation을 야기한다고 보는 많은 보고들이 있으며 Alnemri 등²⁷⁾은 세포고사 과정에 10개 이상의 interleukin-1 β -converting enzyme (ICE)와 유사한 여러 시스테인계 프로티아제들, 즉 caspase 들이 관여한다고 보고하였으며 caspase들의 생체 내에서의 역할을 규명하고자 최근 이들 caspase들에 대한 많은 실험을 한 결과, CPP32/Yama, 혹은 Apopain으로 명하는 caspase-3이 세포의 고사기에 관여하는 중요한 caspase로서의 역할이 대두되고 있다^{28,29)}.

c-Jun의 serine 63, 73 아미노산을 인산화시키는 c-Jun N-terminal kinase (JNK) 혹은 stress-activated protein kinase (SAPK)는 mitogen-activated protein kinase (MAPK) family에 속하며 이들은 여러 자극 즉 세포성장인자, 사이토카인, 단백질 합성억제제, 자외선 조사 등으로 활성화되어 세포의 고사를 매개한다는 보고가 있다³⁰⁾.

본 연구에서는 치근단 및 치주조직의 심한 염증시 염증부위에서 여러 면역세포들에 의해 과대 생산되는 TNF- α 가 골대사에 미치는 영향을 관찰하고자 골수세포를 이용한 파골세포 형성 실험, 조골세포의 분화 및 증식에 관한 실험, DNA fragmentation에 미치는 영향, caspase 활성 측정, JNK/SAPK 활성화에 미치는 효과를 관찰하였다.

II. 실험재료 및 방법

1. 실험동물

실험동물로는 생후 7 - 9주된 ICR 마우스 (Jackson Lab, Bar Harbor, Me)를 구입하여 사용하였으며 원광대학교 동물사육장에서 사육하였다.

2. 시약

TNF- α (5 \times 10⁷ U/mg)은 Genzyme Co. (Munich, Germany)로부터 구입하였으며, Triton X-100, p-nitrophenylphosphate, p-nitrophenol 및 일반적인 시약들은 Sigma chemical Co. (St. Louis, Mo)에서 구입하였다. In vitro kinase 분석에 필요한 anti-JNK/SAPK 항체는 Santa Cruz Co. (Santa Cruz, CA)에서, c-Jun N-terminal kinase assay kit은 Stratagene사에서, [γ -³²P] ATP는 Amersham Radiochemical Center (Amersham, England)에서 구입하여 사용하였다. 세포배양에 필요한 물질들은 Nunc Inc. (North Aurora Road, IL)에서, L-

arginine (84mg/L)이 함유된 alpha-minimal essential medium (α -MEM), Hank's Balanced salt solution (HBSS), fetal bovine serum (FBS) 및 다른 조직배양 시약들은 Gibco Co. (Gaithersburg, MD)에서 구입하였다.

3. 세포배양

마우스 조골세포주인 MC3T3E1을 배양시키기 위해 10cm² 배양dish 상에서 10% FBS와 penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 μ g/ml)을 함유한 α -MEM을 사용하였고 95% 공기와 5% CO₂가 유지되는 37 $^{\circ}$ C 정온기에서 배양하였다.

4. 염기성 인산분해효소 활성도 측정

MC3T3E1 세포를 0.5~1 \times 10⁵ cells/35mm dish 농도로 분주하여 10% FBS가 든 α -MEM으로 배양한 다음 TNF- α 의 염기성 인산분해효소 활성도 (alkaline phosphatase)에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 배양액을 0.4% FBS가 든 α -MEM으로 교환한 다음 TNF- α 를 처리하지 않은 군을 대조군으로 하고 1~20ng/ml TNF- α 를 첨가한 군을 실험군으로 하여, 신선한 α -MEM으로 교체한 후 48시간 동안 배양하였다.

배양후 Dulbecco's phosphate buffered saline으로 세척을 하고 30분 동안 0.1% Triton X-100/saline으로 처리하였다. Alkaline phosphatase 활성을 결정하기 위해 세포부유액을 37 $^{\circ}$ C에서 10분 동안 100mM p-nitrophenylphosphate가 함유된 0.1M glycine-NaOH buffer로 배양시켰다. 반응산물인 p-nitrophenol의 optical density는 ELISA reader (SLT Lab instruments, SF)를 이용하여 405 nm에서 측정하였다.

5. 세포성장 측정

TNF- α 가 MC3T3E1 세포 성장에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 MC3T3E1 세포를 0.5~1 \times 10⁵ cells/35mm dish에 분주한 후 배양한 다음 TNF- α 를 처리하지 않은 군을 대조군으로 하고 0.1~10ng/ml의 TNF- α 를 처리한 군을 실험군으로 하여 시행하였다. 일정기간 세포를 배양후 배양액을 제거하고 단층 (monolayer)으로 고르게 증식한 세포를 trypsinization시켜 세포수를 hemocytometer를 이용하여 산출하였다.

6. 골수세포 배양

마우스를 에테르로 마취하여 경부염전으로 희생시킨 후

대퇴골을 무균적으로 적출 하였다. 골말단을 제거, 골수강을 1 ml의 α -MEM으로 세척하여 골수세포를 모은 다음, α -MEM으로 2회 세척하여 24 well plate에 3 \times 10⁶ cells/well 농도로 분주하였다. TNF- α (10ng/ml)을 10⁻⁷ M 1 α ,25(OH)₂D₃ 혹은 10⁻⁶ M PGE₂와 같이 처음과 배양액 교환시에 첨가하였으며 95% 공기와 5% CO₂가 유지되는 37 $^{\circ}$ C 정온기에서 배양하였다.

7. 효소 조직화학법

세포배양 후 부착된 세포는 10분 동안 phosphate buffered saline상에 10% formalin으로 고정하였으며 1분 동안 ethanol-acetone (50:50, vol/vol)으로 처리하였다. 세포를 건조, 50mM sodium tartrate상에서 red violet LB salt와 0.1M sodium acetate buffer로 tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP)로 염색하였고 3개 혹은 그 이상의 핵을 포함하는 TRAP-양성세포를 osteoclast-like 다핵세포로 계수하였다.

8. DNA fragmentation 분석

MC3T3E1 세포를 2 \times 10⁵ cells/60mm dish 농도로 분주 후 TNF- α 로 처리하지 않은 대조군, TNF- α (10ng/ml) 처리군, TNF- α (20ng/ml) 처리군, TNF- α (40ng/ml) 처리군으로 분류하여 실험하였다.

DNA fragmentation 양상은 Maciejewski 등³¹⁾의 방법에 준하여 agarose gel 전기영동으로 분석하였다. MC3T3E1의 genomic DNA는 Wizard TM Genomic DNA purification kit를 이용하여 순수정제하였다. Ethanol 침전 후 agarose gel의 각각 lane에 시료 5 μ g을 loading하여 1.4% agarose, 50V에서 3시간 전기영동을 실시하였다. DNA는 ethidium bromide로 염색하여 U.V. illuminator하에서 DNA fragmentation를 관찰하였다.

9. Caspase 효소활성 측정

MC3T3E1 골세포 균질액에서 caspase 1과 3의 활성을 측정하기 위해 TNF- α (20ng/ml)를 처리한 후 6시간, 12시간, 18시간, 24시간, 30시간 후 MC3T3E1 세포를 수집 후 MC3T3E1 (1 \times 10⁶ cells)을 buffer (1% Triton X-100, 0.32M sucrose, 5mM EDTA, 1mM PMSF, 1 μ g/ml aprotinin, 1 μ g/ml leupeptin, 2mM DTT, 10mM Tris/HCl, pH 8.0)에 lysis 시킨 후 15분 동안 20,000 \times g로 원심분리시켰다. MC3T3E1 세포의 caspase-1-like activity와 3-like activity는 assay buffer (100mM Hepes, 10% sucrose, 0.1% chaps, pH 7.5, 1mM

PMSF, 1 μ g/ml aprotinin, 1 μ g/ml leupeptin, 1mM dithiothreitol (DTT) 상에서 7-amino-4-coumarin (AMC)-YVAD와 7-amino-4-coumarin (AMC)-DEVD 기질의 분해를 측정하여 검색하였다. 검색에서 excitation 파장을 380nm에 조정하였으며 emission 파장을 460nm로 조정하였다.

10. 면역침전 및 Immunoblotting

부착된 MC3T3E1 세포는 HBSS로 조심스럽게 2번 세척한 후 1ml의 lysis buffer (EB buffer: 1% Triton X-100, 10mM Tris, pH 7.6, 50mM NaCl, 0.1% bovine serum albumin, 1% aprotinin, 5mM EDTA, 60mM NaF, 0.1% 2-mercaptoethanol, 5 μ M phenylarsine oxide와 100 μ M sodium orthovanadate)로 처리하여 lysate를 만든 후 12,000rpm, 4 $^{\circ}$ C에서 30분간 원심분리하여 세포부유액만을 얻었다. 이들 세포 lysates에 anti-JNK의 항체 (1 μ g/sample)를 추가하여 4 $^{\circ}$ C, 얼음에서 1.5시간 반응시킨 다음 항체-항원 복합체 (immune complex)를 10% formalin-fixed staphylococcus aureus로 침전시켰다. In vitro kinase assay를 위하여 면역침전체를 substrate 및 32P-ATP와 반응시킨 후 침전 면역복합체를 1 \times Laminin buffer로 재현탁시켜서 98 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 증탕, denature시켜서 SDS-PAGE를 시행하였다. SDS-PAGE 후 gel상의 단백질은 semi-dry electrotransfer system (Alert Inc., Seattle, WA)로 nitrocellulose membrane에 transfer 시켰다. Non-specific binding을 5% skim milk로 blocking한 후 anti-JNK 항체를 상온에서 2시간 동안 반응시킨 후에 alkaline phosphatase에 결합된 anti-rabbit 항체와 반응시켜서 colorimetric develop 시켰다.

11. In vitro JNK1 kinase assay

MC3T3E1 세포 lysate로부터 얻은 anti-JNK 면역 침전체는 EB buffer로 한 번 세척한 후 PAN (0.1 M NaCl, 10 mM Pipes, 1% aprotinin)으로 2번 원심분리하여 상층액을 제거하였다. 20 μ l kinase reaction buffer (25mM HEPES, pH 7.5, 10mM magnesium acetate, 50 μ M ATP)에 재현탁시킨 JNK 면역 침전체는 1 μ Ci (γ -32P) ATP, 1 μ g의 GST-c-Jun과 함께 30 $^{\circ}$ C에서 10 - 15분 동안 반응시킨 후 동량의 2 \times Laminin buffer로 반응을 정지시켜 98 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 증탕, denature시켜서 10% SDS-polyacrylamide gel에 전기영동한 후 transfer된 gel은 건조시켜서 autoradiography 및 Phosphor Image Analyser로 분석하였다.

12. JNK 및 N1-c-Jun 단백질의 분리

pET156 cloning vector에 삽입된 JNK는 BLZI (DE3) expression vector에 옮겨진 후에 E. coli DH5x 균주에서 transformation 되어졌다. His-tagged JNK는 IPTA에 의해서 발현이 유도되었으며 -80 $^{\circ}$ C에서 E. coli 세포파괴 후 Nickel affinity column을 이용하여 분리하였다.

13. 통계분석

실험성적은 4회 반복실험의 평균 (\pm 표준오차)으로 표현하였으며 유의성 검정은 student's t-test를 이용하여 시행하였다.

III. 실험결과

1. TNF- α 가 MC3T3E1 세포의 염기성 인산분해효소 활성도 및 세포성장에 미치는 영향

마우스 조골세포주인 MC3T3E1 세포를 TNF- α (0.1~20ng/ml)로 자극시킨 후 염기성 인산분해효소 활성도 및 세포성장에 미치는 영향을 관찰한 결과 TNF- α (1~20ng/ml) 처리 48시간 후 염기성 인산분해효소 활성도는 10, 20ng/ml 농도에서 유의성있는 감소를 보였다. 48시간 동안 TNF- α 를 처리한 후 배양액을 다시 새로운 정상 배양액으로 교체하여 48시간 더 배양한 다음 염기성 인산분해효소 활성도를 관찰한 결과 염기성 인산분해효소 활성도가 TNF- α 10ng/ml까지는 대조군 수준으로 회복되었다 (Table 1). 또한 TNF- α (0.1~10ng/ml) 처리시 MC3T3E1 세포의 성장이 약간 감소하는 경향을 보였으나 유의한 차이는 관찰되지 않았다 (Table 2).

2. TNF- α 가 파골세포 형성에 미치는 영향

마우스 골수세포를 3 \times 10⁶ cells/well로 분주한 후 TNF- α (10ng/ml)을 10⁻⁷ M 1 α , 25(OH)₂D₃ 혹은 10⁻⁶ M PGE₂와 같이 8일 동안 배양한 후 tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP)로 염색하여 3개 혹은 그 이상의 핵을 포함하는 TRAP-양성세포를 osteoclast-like 다핵세포로 산출하였다 (Fig. 1).

TNF- α (10ng/ml) 단독은 파골세포 형성에는 영향이 없는 반면 1 α , 25(OH)₂D₃ (10⁻⁷ M) 혹은 PGE₂ (10⁻⁶ M)와 같이 8일 동안 배양시 현저한 파골세포 형성을 관찰하였다 (Table 3, Fig. 1).

Table 1. Effect of TNF- α on the activity of alkaline phosphatase in MC3T3E1 cells.

TNF- α concentration (ng/ml)	Alkaline Phosphatase (int. units/mg of protein)	
	day 2	day 4
0 (Control)	10.6 \pm 0.9	10.6 \pm 0.9
1 ng/ml	9.8 \pm 1.2	10.2 \pm 0.6
10 ng/ml	6.4 \pm 0.7*	9.9 \pm 0.9
20 ng/ml	3.1 \pm 0.5*	2.4 \pm 0.6

MC3T3E1 cells were cultured in the presence or absence of TNF- α for 48 h. Alkaline phosphatase activity was quantified spectrophotometrically by using P-nitrophenyl phosphate (PNPP) as a substrate. After 2 days of culture, some of these cells treated with TNF- α were cultured again without TNF- α . On days 2 and 4, alkaline phosphatase was determined. One international unit of alkaline phosphatase activity was defined as the amount of enzyme which catalysed the transformation of 1 μ mol of PNPP per min at 37°C. Data were expressed mean \pm s.e. of four experiments. *Significantly different from control, *: P<0.05.

Table 2. Effect of TNF- α on cell growth of MC3T3E1 cells.

Treatment	Cell number ($\times 10^6$ /dish)
Medium only	1.37 \pm 0.03
TNF- α 0.1ng/ml	1.41 \pm 0.07
1.0ng/ml	1.29 \pm 0.08
10ng/ml	1.24 \pm 0.07

MC3T3E1 (1×10^5) cells were plated into 35-mm dishes. On the following day, medium was replaced with 2 ml α -MEM/FBS medium containing various concentrations of TNF- α . On the 6th day of culture, cell numbers were counted. Data were expressed mean \pm s.e. of triplicate cultures for cell number.

3. TNF- α 가 마우스 조골세포주인 MC3T3E1의 DNA fragmentation에 미치는 영향

MC3T3E1 대조군 및 TNF- α (10ng/ml, 20ng/ml, 40 ng/ml)를 24시간 처리한 후에 광학현미경으로 세포의 apoptosis를 관찰한 후 (Fig. 2) 세포를 수집한 후 DNA를 추출하여 1.4% agarose 겔에 loading하여 DNA fragmentation을 관찰한 결과 대조군과 10ng/ml TNF- α 처리군에서는 DNA fragmentation이 관찰되지 않은 반면 20 ng/ml, 40ng/ml 처리군에서는 DNA fragmentation이 현저히 관찰되었다 (Fig. 3).

4. MC3T3E1 마우스 조골세포주에서 TNF- α 자극에 의한 caspase 효소활성화

Fig. 4는 TNF- α 로 인한 MC3T3E1 조골세포 고사 신호

Table 3. Effect of TNF- α on the generation of osteoclast-like cells in bone marrow cell culture.

Treatment	No. of TRAP-positive multinucleated cells/well
Medium only	1 \pm 1
TNF- α (10 ng/mL) only	1 \pm 1
1 α ,25(OH) $_2$ D $_3$ (10^{-7} M) only	148 \pm 21
PGE $_2$ (10^{-6} M) only	88 \pm 10
1 α ,25(OH) $_2$ D $_3$ + TNF- α	236 \pm 24*
PGE $_2$ + TNF- α	168 \pm 13*

Mouse bone marrow mononuclear cells (3×10^6 cells/well) were cultured for 8 days with 10^{-7} M of 1 α ,25(OH) $_2$ D $_3$ or 10^{-6} M of PGE $_2$ and TNF- α (10ng/ml). Cells were stained for TRAP and the number of TRAP-positive multinucleated cells. Data were represented mean \pm s.e. of 4 replicates.

*Significantly different from 1 α ,25(OH) $_2$ D $_3$ or PGE $_2$ alone. *: P<0.05. TRAP, tartrate-resistant acid phosphatase.

전달 기전에서 cysteine-protease caspase 3 activity가 필수적임을 보여주고 있으며 caspase 1 activity와는 무관함을 동시에 보여주고 있다. TNF- α 처리 18시간 후 caspase 3 activity가 6배 증가되었으며 caspase 1 activity는 대조군과 거의 차이가 없었다 (Fig. 4).

5. MC3T3E1 마우스 조골세포주에서 TNF- α 자극에 의한 JNK의 활성화

TNF- α (20ng/ml) 자극에 의하여 JNK 활성화가 유도되

는지를 확인하기 위하여 2×10^7 개의 세포를 α -MEM 배지 (10% FBS 함유)에서 TNF- α (20ng/ml)와 함께 0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 12, 24시간 동안 배양하였다. MC3T3E1 세포 lysate는 anti-JNK 항체로 면역침전 후 그 기질인 GST-c-Jun N-terminus 단백질 및 γ 32P-ATP와 15분간 30°C에서 반응 후 SDS-PAGE하여 c-Jun N-terminal 단백질의 인산화 정도를 autoradiogram으로 측정하였다.

JNK 활성도는 TNF- α (20ng/ml) 처리 30분부터 나타나기 시작하여 1시간대에 최대발현을 보인 다음 6시간대까지 나타나다가 서서히 감소하여 24시간대에는 대조군과 유사한 양상을 보였다 (Fig. 5).

IV. 고 찰

골조직 대사에는 여러 가지 전신적 및 국소적 조절인자들이 관여하고 있으며 특히 국소적 조절인자들이 골조직 성장 및 개조에 더욱 중요한 역할을 할 것으로 여겨져 최근 이들 국소적 인자에 관한 연구가 많이 이루어지고 있다. 이중 TNF- α 는 면역세포중 단구/대식세포에서 주로 생산되는데 이는 처음 알려진 항암효과³²⁻³⁹ 외에 interleukin-1 (IL-1)과 함께 중요한 염증매개반응을 갖는^{40,41} 주된 "inflammatory cytokine"의 하나로서 병원성 미생물 감염에 대한 숙주의 저항과 밀접한 관계가 있으며 내독소 속 (endotoxic shock)^{42,43} 이식편대 숙주반응 (graft-versus-host reaction), 자가면역질환 (autoimmune disease), rheumatic arthritis, 치근단 염증 및 치주조직 염증으로 인한 치조골 소실 등과 같이 서로 관련이 없어 보이는 여러 가지 염증반응에 공통적으로 관여하고 있음이 보고되고 있다^{6,44}.

Sugarman 등⁴⁵은 TNF- α 가 조골세포 배양 실험에서 골 형성을 억제하고 collagen 합성과 alkaline phosphatase 활성을 억제한다고 하였고 Bertolini 등⁴⁶은 백서태자 장골 배양 실험에서 TNF- α 가 골 흡수를 촉진시킬 뿐만 아니라 골의 collagen 합성을 억제시킨다고 보고한 바 있으며 Ishimi 등⁴⁷도 TNF- α 가 강력한 골흡수 야기물질이라고 보고한 바 있다.

또한 사람의 조골세포에서 형성된⁴⁸ TNF- α 는 조골세포의 증식을 억제하는 경향이 있으며⁴⁹ Rubin 등⁵⁰은 이런 TNF- α 에 의한 조골세포의 세포독성은 일종의 세포고사 기전이라고 제안하여 TNF- α 가 비정상적인 골개조에 중요한 역할을 담당함을 시사한 바 있다.

골조직 흡수에 관여하는 주된 세포인 파골세포가 조절조직에 존재하는 전구세포의 융합에 의해 생성된다는 보고⁵¹가 있는 이래, 시험관내에서 파골세포의 생성에 관한 연구를 위해 그 전구세포가 존재하는 골수배양 방법이 많이 개발되었고 특히 마우스 골수세포 배양방법은 다른 종에 비해 파골세포 유사세포의 생성이 신속하여 널리 이용되고 있다

52-54).

파골세포의 생성은 전구세포의 분열, 분화와 융합의 여러 단계를 포함한 일련의 과정으로 여러 호르몬들에 의하여 조절되어지는 것으로 알려져 있다⁵⁵. 이중 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 는 파골세포의 전구세포의 분화와 융합을 조절하는 것으로 알려져 있으며⁵⁶ Akatsu 등⁵³은 마우스 골수세포 배양시 PGE2에 의해서도 파골세포 유사세포의 생성을 증가시킨다고 보고한 바 있다. Tartrate-resistant acid phosphatase (TRACP)는 단핵식세포와 대식세포에는 존재하지 않고 파골세포에만 존재하는 것으로 알려져 파골세포의 표지효소로서 사용되고 있고^{57,58} Baron 등⁵⁹은 파골세포 전구세포도 이 효소에 양성반응을 나타냄을 보고한 바 있다.

본 연구에서는 TNF- α (10ng/ml)가 파골세포-유사세포 형성에 미치는 영향을 관찰하고자 마우스 골수세포를 배양하여 TNF- α 를 단독 처리한 경우 파골세포-유사세포 형성이 관찰되지 않은 반면 vitamin D의 활성형인 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (10^{-7} M) 혹은 PGE2 (10^{-6} M) 단독처리시 파골세포-유사세포 형성이 148 ± 21 , 88 ± 10 으로 증가하였다. $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (10^{-7} M) 혹은 PGE2 (10^{-6} M) 처리한 군에 TNF- α (10 ng/ml)를 복합처리시 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 혹은 PGE2 단독처리군에 비해 236 ± 24 , 168 ± 23 으로 현저한 파골세포-유사세포 형성을 관찰하였다. TNF- α 단독처리시 파골세포-유사세포 형성이 관찰되지 않은 반면 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 혹은 PGE2와 복합처리시 파골세포-유사세포 형성을 증가시켰으며 이는 TNF- α 가 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 혹은 PGE2에 의한 파골세포-유사세포 형성의 작용을 촉진시키는 것으로 생각된다.

TNF- α 가 마우스 조골세포주인 MC3T3E1 세포의 증식과 분화정도에 미치는 영향을 관찰한 결과 TNF- α 농도의 존적으로 조골세포 증식이 감소하는 경향을 보였으며 alkaline phosphatase 활성의 현저한 감소를 관찰하였다.

세포고사 (apoptosis)의 경우는 죽음의 신호가 개시된 세포에서만 여러 유전자들의 발현이 변화하며, 세포내 효소들의 활성도 변화에 이어 apoptosis의 특징적인 형태적 변화를 보이는 능동적인 죽음이다. Apoptosis가 일어난 세포는 주변이 세포들이나 대식세포의 죽음으로 인한 피해를 전혀 미치지 않고 일어난다^{60,61}.

이러한 apoptosis가 일어나는 세포의 형태적, 생리적 특징으로는 세포막 박리, 세포의 수축, 핵의 응축, DNA의 endonuclease에 의한 oligonucleosome으로의 분해⁶² 등이 보고되고 있다.

TNF- α 는 human leukemia cell line인 HL-60²³과 U937²⁴, murine fibrosarcoma cell line인 L920²⁵ 및 WEHI61²⁶ 등 여러 포유동물세포주에서 DNA fragmentation을 유발한다고 알려져 있다.

본 실험에서는 TNF- α 가 마우스 조골세포주인

MC3T3E1 세포의 세포고사 (apoptosis)에 미치는 영향을 관찰하고자 TNF- α (10, 20, 40ng/ml)를 처리하여 24시간 후 역상차 현미경으로 세포고사를 확인한 다음 (TNF- α 20, 40ng/ml에서만 관찰됨) DNA fragmentation을 관찰한 결과 TNF- α (20, 40ng/ml)에서만 DNA fragmentation을 관찰하였다.

세포고사 (apoptosis) 과정에 시스테인계 프로테아제들이 다양한 동물세포에서 발견되었고 이들 효소들은 caspase (cystein proteASE cleave after ASPatic acid)로 분류되어 불리어지고 있다²⁷.

Caspase들은 활성부위에 시스테인이 있으며 apoptosis 과정에서 효소내부의 절단을 통해 활성화되는 지모겐 (zymogen)들이다. Caspase-1 (ICE)의 경우, 분자량이 45 kDa의 비활성 상태의 단백질이 앞부분 (pro-domain)이 제거되고 다시 단백질 내부에서 절단이 일어나 p20과 p10이 결합한 heterotetramer 형태 ((p20~p10)₂)가 되어 활성을 나타내며⁶³ 다른 caspase들도 효소내 특정부위에서 절단이 일어나 활성화된다.

예를 들면, PARP (poly (ADP-ribose) polymerase)의 경우 caspase-2, 3, 7, 9에 의해 절단됨을 보고되고 있으며^{64,65} caspase들이 이러한 세포내 단백질의 절단을 통해 apoptosis의 세포의 죽음실행단계에 직접 관여할 것으로 예상되고 있다.

Caspase의 생체내에서의 역할을 규명하고자 최근 이들 caspase들에 대한 knock-out mouse들을 만들고 이를 이용한 연구들이 이루어졌다. Caspase 1을 없앤 생쥐는 예상과는 달리 그렇게 뚜렷한 발생이나 분화의 이상을 보여주지 못하였고²⁸ caspase 3가 없는 생쥐는 발생과정에서 여러 문제로 죽거나 계속 성장한 생쥐의 경우도 고사가 일어나지 않아 뇌의 크기가 정상 2배에 이르렀다²⁹. 이들 결과로 caspase 3가 실제로 포유동물세포의 고사에 중요한 caspase로 역할을 할 것으로 예측되었고 caspase 3에 의한 세포고사는 생명체의 발생과 성장에 필수불가결한 조절기작임을 알 수 있었다. 지금까지 동물세포의 고사에서 절반이 일어난다고 보고된 단백질 중 상당수가 caspase 3에 의해 절단되는 것으로 미루어 보아 caspase 3의 apoptosis의 주요 caspase로서의 역할이 대두되고 있다.

본 실험에서는 TNF- α 에 의한 마우스 조골세포주인 MC3T3E1 세포의 고사조절 기전에 caspase가 관여하는가를 관찰하기 위하여 TNF- α (20ng/ml)를 처리한 후 6시간, 12시간, 18시간, 24시간, 30시간 후 caspase 1과 3의 활성을 검사한 결과 caspase 1의 활성에는 영향이 없는 반면 caspase 3의 활성은 서서히 증가하여 18 시간에는 최대를 보이다가 30시간에는 대조군과 유사한 반응을 보여 MC3T3E1 세포고사 조절에 caspase 3가 중요한 역할을 담당함을 관찰하였다.

JNK 혹은 SAPK는 MAP kinase family에 속한다. JNK는 JNK-activating kinase (JNKK1 혹은 SAPK/ERK kinase, SEK 및 MKK4로 알려짐)에 의해서 인산화 및 활성화가 유도되며 JNKK1은 MEKKS로부터 활성화가 이루어진다. JNK 신호전달계는 여러 자극 즉 세포성장인자, 사이토카인, tumor promoters, 단백질 합성억제제, 자외선 조사 및 암 유전자에 의하여 활성이 유도된다. 활성화된 JNK는 몇몇의 전사인자 (transcription factors) 즉 c-Jun, ATF-2, E1K 및 Sap-1 등의 활성을 자극한다고 알려져 있다^{66,67}. JNK를 활성화시키는 JNKK에는 근골격 및 뇌에 특이하게 발현된 JNKK1과 대다수의 조직에 분포하는 JNKK2가 있으며 이들 JNKK의 기질 특이도는 잘 밝혀져 있지 못하다. 세포내에서 JNK 활성화의 결과는 세포를 apoptosis로 빠지게 하거나 아직 그 기능이 잘 밝혀지지 않은 Jun 의존적 전사 (Jun-dependent transcription)가 일어나서 세포의 기능에 영향을 주리라 추정되고 있다^{68,69}.

Jun NH2-terminal kinase (JNKS, SAPKS)는 MAPK의 하나로 염증성 사이토카인, TNF- α , UV 조사 및 heat shock으로 활성화시킴이 최근 다양한 세포에서 활발히 연구, 발표되고 있으며^{30,70} JNK를 비롯한 MAPK의 핵전사는 전사인자 활성화의 주요단계로 인식되고 있다.

MAPKs (ERK, p38과 JNK) 중 JNK/SAPK가 다양한 세포에서 TNF- α 로 활성화됨을 보여주고 있으며 JNK/SAPK는 c-Jun의 NH2 말단의 transactivation domain에 위치한 Ser 잔기 63과 73을 인산화함으로써 transcription factor인 c-Jun을 활성화시킨다고 알려져 있다^{68,71,72}.

Chan 등⁷³은 mouse macrophage에 JNK/SAPK의 isoform, p46과 p54 모두 존재하지만 TNF- α 투여시 선택적으로 p46 JNK/SAPK isoform을 활성화시킴을 밝히고 있으며 macrophage에서의 TNF- α 로 인한 고사기전을 JNK1 의존적 경로로 증명하였다.

본 실험에서는 TNF- α (20ng/ml)가 마우스 조골세포주 MC3T3E1 세포에서 세포의 고사 조절기전에 관여하는 JNK/SAPK의 활성에 미치는 효과를 관찰한 결과 30분부터 활성이 나타나기 시작하여 1시간대에 최대발현을 보인 다음 6시간대까지 발현하다가 서서히 감소하여 24시간대에는 대조군과 유사한 양상을 보였다.

본 연구결과를 종합해 보면 치근단 염증이나 치주염증부위에서 생성된 TNF- α 가 골대사에 미치는 영향은 골수세포를 이용한 파골세포-유사세포 형성 실험에서 TNF- α 단독 처리시 파골세포-유사세포의 형성이 관찰되지 않은 반면 골흡수 촉진물질인 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 혹은 PGE2와 복합처리시 TNF- α 가 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 혹은 PGE2에 의한 파골세포-유사세포의 형성을 더욱 더 증가시킬 뿐만 아니라 조골세포의

세포고사 (apoptosis) 기전 즉 JNK/SAPK 활성을 촉진시킴과 동시에 caspase 3 활성을 증가시켜 DNA fragmentation을 유발시켜 조골세포의 세포고사를 일으켜 비정상적인 골개조를 야기하여 골흡수를 일으킨다고 사료된다.

V. 결 론

본 연구에서는 골조직대사 조절기전의 중요한 국소적 조절인자인 tumor necrosis factor- α (TNF- α)가 골대사에 미치는 영향을 관찰하고자 골수세포를 이용한 파골세포-유사세포 형성 실험, 조골세포의 분화 및 증식에 관한 실험, DNA fragmentation에 미치는 영향, caspase 활성화 측정, JNK/SAPK 활성에 미치는 영향을 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. TNF- α 가 MC3T3E1 세포의 염기성 인산분해효소 활성, caspase 효소 활성, JNK 활성 및 세포성장애 미치는 영향

MC3T3E1 세포를 TNF- α 처리시 염기성 인산분해효소 활성이 유의한 감소를 보였으며 (P<0.05) caspase-1 활성에는 영향이 없는 반면 caspase-3 활성은 유의한 증가를 보였다 (P<0.05). 또한 JNK 활성은 TNF- α 처리 30분부터 나타나기 시작하여 1시간대에 최대발현을 보인 다음 6시간대까지 나타나다가 서서히 감소하여 24시간대에는 대조군과 유사한 양상을 보였다. MC3T3E1세포의 성장은 약간 감소하는 경향을 보였으나 유의하지는 않았다.

2. TNF- α 가 파골세포-유사세포 형성에 미치는 영향

마우스 골수세포 배양에서 TNF- α 단독은 파골세포 형성에는 영향이 없는 반면 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (10^{-7} M) 혹은 PGE2 (10^{-6} M)와 같이 8일 동안 배양시 현저한 파골세포 형성이 관찰되었다 (P<0.05).

3. TNF- α 가 MC3T3E1 세포의 DNA fragmentation에 미치는 영향

TNF- α (10 - 40ng/ml)를 처리하여 세포를 수집한 후 DNA를 추출하여 DNA fragmentation을 관찰한 결과 TNF- α (20ng/ml, 40ng/ml) 처리시 DNA fragmentation이 현저히 관찰되었다.

참 고 문 헌

1. Kahn AJ and Partridge NC : New concepts in bone remodeling : An expanding role for the osteoblast. *Am J Otolaryngol* 8: 258-264, 1987.
2. Vaes G : Cellular biology and biochemical mechanism of bone resorption : A review of recent developments on the formation, activation, and mode of action of osteoclasts *Clin Orthop* 231: 239-271, 1988.
3. Canalis E, McCarthy TL and Centrella M : The role of growth factors in skeletal remodeling. *Endocrinol Metab Clin North Am* 18: 903-918, 1989a.
4. Canalis E, McCarthy TL and Centrella M : The regulation of bone formation by local growth factors. In *bone and mineral research*, Vol 6, edited by Peck WA, p27, Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam 1989b.
5. Chae HJ, Park RK, Chung HT, Kang JS, Kim MS, Choi DY, Bang BG and Kim HR : Nitric oxide is a regulator of bone remodelling. *J Pharm Pharmacol* 49: 897-902, 1997.
6. Vilcek J and Lee TH : Tumor necrosis factor. New insights into the molecular mechanism of its multiple actions. *J Biol Chem* 266: 7313-7316, 1991.
7. Sekut L and Connolly KM : Pathophysiology and regulation of TNF- α in inflammation. *Drug News Perspect* 9: 261, 1996.
8. Beutler PB : Tumor necrosis factors : The molecules and their emerging role in medicine. Raven press, New York, 1992.
9. Manogue KR, Van Denventer JH and Cerami A : Tumor necrosis factor- α of cachectin. In *The Cytokine Handbook*. Thomson A (Ed) Academic Press Inc. San Diego p241, 1992.
10. Bamkey PE and Cerra FB : Hepatic dysfunction in shock and organ failure. In *Pathophysiology of shock, sepsis and organ failure*, Schlag G and Redl H (Eds.), Springer-Verlag, Berlin 948-960, 1993.
11. Zentella A, Manogue K and Cerami A : The role of cachectin/TNF-alpha and other cytokines in sepsis. *Prog Clin Biol Res* 367: 9-19, 1991.
12. Tiegs G, Wolter M and Wendel A : Tumor necrosis factor is a terminal mediator in galactosamine./endotoxin-induced hepatitis in mice. *Biochem Pharmacol* 38: 627-634, 1989.
13. Firestein GS : Rheumatoid synovitis and pannus. In *Rheumatology* (eds Klippel J and Dieppe P) Mosby St. Louis pp 3.12.1-3.12.30, 1994.
14. Sato K, Kasano K, Fujii Y, Kawakami M, Tsushima T and Shizume K : Tumor necrosis factor type α (cachectin) stimulates mouse osteoblast-like cells (MC3T3-E1) to produce macrophage-colony stimulating activity and prostaglandin E2. *Biochem Biophys Res Commun* 145: 323-329, 1987.
15. Scharla SH, Strong DD, Mohan S, Chevalley T and Linkhart TA : Effect of tumor necrosis factor- α on the expression of insulin-like growth factor I and insulin-like growth factor binding protein 4 in mouse osteoblasts. *Eur J Endocrinol* 131: 293-301, 1994.
16. Pacifici R, Brown C, Rifas L, Avioli L : TNF- α and GM-CSF secretion from human blood monocytes: Effect of menopause and estrogen replacement. *J Bone Miner Res* 5(S2): 145-154, 1990.
17. Beutler B, Cerami A : Cachectin (tumor necrosis factor): A macrophage hormone governing cellular metabolism and inflammatory response. *Endocr Rev* 9: 57-66, 1988.

18. Nanes MS, Rubin J, Titus L, Hendy GN, Catherwood BD : Tumor necrosis factor alpha inhibits 1,25-dihydroxyvitamin D₃-stimulated bone gla protein synthesis in rat osteosarcoma cells (ROS 17/2.8) by a pretranslational mechanism. *Endocrinology* 128: 2577-2582, 1991.
19. Keeting PE, Rifas L, Harris SA, Colvard DS, Spelsberg TC, Peck WA and Riggs BL : Evidence for interleukin-1 β production by cultured normal human osteoblast-like cells. *J Bone Miner Res* 6: 827-833, 1991.
20. Thomson BM, Mundy GR and Chambers TJ : Tumor necrosis factors α and β induce osteoblastic cells to stimulate osteoclastic bone resorption. *J Immunology* 138: 775-779, 1987.
21. Kerr JFR, Wyllie AH and Currie AR : Apoptosis : a basic biological phenomenon with wide-ranging implication in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26: 239-257, 1972.
22. Wright KR, Hughes DH, Guise TA, Boyle IT, Devlin R, Windle J, Roodman GD, Mundy GR and Boyce BF : Osteoclasts undergo apoptosis at the interface between resorption and formation in bone remodeling units. *J Bone Miner Res* 9(Suppl. 1): A86-A92, 1994.
23. Elias E, Moore PB, Rose SW : Tumor necrosis factor induced DNA fragmentation of HL-60. *Biochem Biophys Res Commun* 163: 867-873, 1989.
24. Greenblatt MS and Elias E : The type B receptor for tumor necrosis factor- α mediates DNA fragmentation in HL-60 and U937 cells and differentiation in HL-60 cells. *Blood* 80: 1339-1346, 1992.
25. Kyprianou N, Alexander RB, Isaacs JT : Activation of programmed cell death by recombinant human tumor necrosis factor plus topoisomerase II-targeted drugs in L929 tumor cells *J Natl Cancer Inst* 83: 346-350, 1991.
26. Gromkowski SH, Mama K, Yagi J, Sen R, Rath S : Double-stranded RNA and bacterial lipopolysaccharide enhance sensitivity to TNF- α mediated cell death. *Int Immunol* 2: 903-908, 1990.
27. Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW and Yuan J : Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 18: 171-180, 1996.
28. Li P, Allen H, Banerjee S, Franklin S, Herzog L, Johnston C, McDowell J, Paskind M, Rodman L and Salfeld J : Mice deficient in IL-1 beta-converting enzyme are defective in production of mature IL-1 beta and resistant to endotoxic shock. *Cell* 80: 401-411, 1995.
29. Kuida K, Zheng TS, Na S, Kuan C, Yang D, Karasuyama H, Rakic P and Flavell RA : Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice. *Nature* 384: 368-372, 1996.
30. Derijard B, Hibi M, Wu IH, Barrett T, Su B, Deng T, Karin M and Davis RJ : JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell* 76: 1025-1037, 1994.
31. Maciejewski JP, Selleri C, Sato T, Cho HJ, Keefer LK, Nathan CF and Young NS : Nitric oxide suppression of human hematopoiesis in vitro. Contribution to inhibitory action of interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha. *J Clin Invest* 96: 1085-1092, 1995.
32. Adams DO and Hamilton TA : The cell biology of macrophage activation. *Ann Rev Immunol* 2: 283-291, 1984.
33. Aggarwal BB, Kohr WJ, Hass PE and Moffat B : Human tumor necrosis factor, production, purification and characterization. *J Biol Chem* 260: 2345-2354, 1985.
34. Beutler B, Greenwald D, Hulmes JD and Chang J : Identity of tumor necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin. *Nature* 316: 552-554, 1985.
35. Beutler B, Krochin N, Milsark, W and Luedke C : Control of cachectin (tumor necrosis factor) synthesis : mechanisms of endotoxin resistance. *Science* 232: 977-990, 1986.
36. Carswell EA, Old LJ, Kassel RL and Green S : An endotoxin-injured serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad USA* 72: 3666-3670, 1975.
37. Feinman R, Henriksen-DeStefano D, Tsujimoto M and Vilcek J : Tumor necrosis factor is an important mediator of tumor cell killing by human monocytes. *J Immunol* 138: 635-640, 1987.
38. Nowotny A : Antitumor effects of endotoxins. In : Berry LJ (ed) : *Handbook of endotoxins*. Vol. 3. Elsevier/North-Holland Publishing Co. Amsterdam 389-448, 1985.
39. Old LJ : Tumor necrosis factor. *Science* 230: 630-632, 1985.
40. Matsushima K, Morishita K, Yoshimura T, Lavu S, Kobayashi Y, Lew W, Appella E, Kung HF, Leonard EJ and Oppenheim JJ : Molecular cloning of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor (MDNCF) and the induction of MDNCF mRNA by interleukin 1 and tumor necrosis factor. *J Exp Med* 167: 1883-1893, 1988.
41. Shakhov AN, Collart MA, Vassalli P, Nedospasov SA and Jongeneel CV : kB-type enhancers are involved in lipopolysaccharide-mediated translational activation of the tumor necrosis factor α gene in primary macrophages. *J Exp Med* 171: 35-47, 1990.
42. Havel EA : Production of tumor necrosis during murine listeriosis. *J Immunol* 139: 4225-4231, 1987.
43. Havel EA : Evidence that tumor necrosis factor has an important role in antibacterial resistance. *J Immunol* 143: 2894-2899, 1989.
44. Hamblin AS : Lymphokines and interleukins. *Immunology* 1: 39-41, 1988.
45. Sugarman BJ, Aggarwal BB, Hass PE, Figari IS, Palladino Jr MA, Shepard HM : Recombinant human tumor necrosis factor- α : effects on proliferation of normal and transformed cells in vitro. *Science* 230: 943-945, 1985.
46. Bertolini DR, Nedwin GE, Bringman TS, Smith DD and Mundy GR : Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation in vitro by human tumour necrosis factors. *Nature* 319: 516-518, 1986.
47. Ishimi Y, Miyaura C, Jin CH, Akatsu T, Abe E, Nakamura Y, Yamaguchi Y, Yoshiki S, Matsuda T, Hirano T, Kishimoto T and Suda T : *J Immunol* 145: 3297-3303, 1990.
48. Gowen M, Chapman K, Littlewood A, Hughes D, Evans D, Russel G : Production of tumor necrosis factor by human osteoblasts is modulated by other cytokines, but not by osteotropic hormones. *Endocrinology* 126: 1250-1255, 1990.
49. Centrella M, McCarthy TL and Canalis E : Tumor necrosis factor- α inhibits collagen synthesis and alkaline phosphatase activity independently of its effect on deoxyribonucleic acid synthesis in osteoblast-enriched bone cell cultures. *Endocrinology* 123: 1442-1448, 1988.
50. Rubin BY, Smith LJ, Hellermann GR, Lunn RM, Richardson NK and Anderson SL : Correlation between the anticellular and DNA fragmenting activities of tumor necrosis factor. *Cancer Res* 48: 6006-6010, 1988.
51. Kahn AJ and Simmons DJ : Investigation of cell lineage in bone using a chimaera of chick and quail embryonic tissue. *Nature* 258: 325, 1975.

52. Takahashi N, Yamana H, Yoshiki S, Roodman GD, Mundy GR, Jones SJ, Boyde A and Suda T : Osteoclast-like cell formation and its regulation by osteotropic hormones in mouse bone marrow cultures. *Endocrinology* 122: 1373-1381, 1988.
53. Akatsu T, Takahashi N, Debari K, Morita I, Murota S, Nagata N, Takatani O and Suda T : Prostaglandins promote osteoclastlike cell formation by a mechanism involving cyclic adenosine 3',5'-monophosphate in mouse bone marrow cell cultures. *J Bone Miner Res* 4: 29-35, 1989.
54. Collins DA and Chambers TJ : Effect of prostaglandins E1, E2 and E2 α on osteoclast formation in mouse bone marrow cultures. *J Bone Miner Res* 6: 157-167, 1991.
55. Nijweide PJ, Burger EH and Feyen JHM : Cells of bone: Proliferation, differentiation, and hormonal regulation. *Physiol Rev* 66:655-668, 1986.
56. Pharoah MJ and Heersche JNM : 1,25-Dihydroxyvitamin D3 causes an increase in the number of osteoclastlike cells in cat bone marrow cultures. *Calcif Tissue Int* 37: 276-284, 1985.
57. Minkin C : Bone acid phosphatase : Tartrate-resistant acid phosphatase as a marker of osteoclast function. *Calcif Tissue Int* 34: 285-292, 1982.
58. Seifert MF : The biology of macrophages in osteopetrosis. *Clin Orthop Rel Res* 182: 270-282, 1984.
59. Baron R, Nefussi JR and Vignery A : Kinetic and cytochemical identification of osteoclast precursors and their differentiation into multinucleated osteoclasts. *Am J Pathol* 122: 363-373, 1986.
60. Elis HM and Horvitz HR : Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell* 44: 817-829, 1986.
61. Cohen JJ and Duke RC : Apoptosis and programmed cell death in immunity. *Annu Rev Immunol* 10: 267-293, 1992.
62. Wyllie AH : Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284: 555-556, 1980.
63. Kumar S : ICE-like protease in apoptosis. *Trends Biochem Sci* 20: 198-202, 1995.
64. Tewari M, Quan LT, O'Rourke K, Desnoyers S, Zeng Z, Beidler DR, Poirier GG, Salvesen GS and Dixit VM : Yama/CPP32 β , a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly (ADP-ribose) polymerase. *Cell* 81: 801-809, 1995.
65. Thornberry NA, Rano TA, Peterson EP, Rasper DM, Timkey T, Garcia-Calvo M, Houtzager VM, Nordstrom PA, Roy S and Vaillancourt JP : Interleukin-1 beta converting enzyme : a novel cysteine protease required for IL-1 beta production and implicated in programmed cell death. *J Biol Chem* 272: 17907-17911, 1995.
66. Hibi M, Lin A, Smeal T, Minden A and Karin M : Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. *Genes Dev* 7: 2135-2148, 1993.
67. Cavigelli M, Dolfi F, Claret FX and Karin M : Induction of c-fos expression through JNK-mediated TCF/Elk-1 phosphorylation. *EMBO J* 14: 5957-5964, 1995.
68. Kyriakis JM, Banerjee P, Nikolakaki E, Dai T, Rubie EA, Ahmad MF, Avruch J and Woodgett JR : The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature* 369: 156-160, 1994.
69. Smeal T, Binetruy B, Mercola D, Birrer M and Karin M : Oncogenic and transcriptional cooperation with Ha-Ras requires phosphorylation of c-Jun on serines 63 and 73. *Nature* 354: 494-496, 1991.
70. Force T, Pombo CM, Avruch JA, Bonventre JV, Kyriakis JM : Stress-activated protein kinases in cardiovascular disease. *Circ Res* 78: 947-953, 1996.
71. Derijard B, Hibi M, Wu IH, Barrett T, Se B, Deng T, Karin M and Davis RJ : JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell* 76: 1025-1037, 1994.
72. Sluss HK, Barrett T, Derijard B and Davis RJ : Signal transduction by tumor necrosis factor mediated by JNK protein kinases. *Mol Cell Biol* 14: 8376-8384, 1994.
73. Chan ED, Winston BW, Jarpe MB, Wynes M and Riches DWH : Preferential activation of the p46 isoform of JNK/SAPK in mouse macrophages by TNF- α . *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 13169-13174, 1997.

사진부도 설명

- Fig. 1. TRAP-positive multinucleated cells formed in mouse bone marrow cells ($\times 100$). Mouse bone marrow cells (3.0×10^5 cells/well) were plated together onto 4-well plates with 10^{-7} M of $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ for 8 days. Cells were then fixed and stained for TRAP. Nuclei located in the centre (arrows) and in the periphery of the cells (arrowhead).
- Fig. 2. Apoptotic changes of cultured MC3T3E1 osteoblastic cells induced by TNF- α under phase contrast microscope.
(A) Control, (B) TNF- α 10ng/ml
(C) TNF- α 20ng/ml, (D) TNF- α 40ng/ml.
- Fig. 3. Internucleosomal DNA cleavage in TNF- α -induced apoptosis of MC3T3E1 cells.
MC3T3E1 cells were stimulated with TNF- α for 24 hr and then collected. Cellular DNA was extracted and resolved on agarose (1.2%) gels for DNA fragmentation.
M: Size marker, lane 1: control, lane 2: TNF- α (10ng/ml),
lane 3: TNF- α (20ng/ml), lane 4: TNF- α (40ng/ml)
- Fig. 4. Effect of TNF- α (20ng/ml) on caspase activity in MC3T3E1 osteoblastic cells.
Cells were incubated in the presence of 20ng/ml TNF- α for 6, 12, 18, 24 and 30 hr. Caspase activity analysis of the samples at the times indicated was performed as described under "Experimental Procedures".
- Fig. 5. Representative in vitro JNK phosphorylation assay in response to TNF- α (20ng/ml). For details of the assay see the Materials and Methods section.
A: Time course of densitometric changes in JNK activity quantified by computerized image analysis of X-ray films. Values are expressed relative to control.
B: Time course of TNF- α (20ng/ml) stimuli of JNK activation in MC3T3E1 cells. MC3T3E1 cells were stimulated with TNF- α for 0.5, 1, 2, 4, 6, 12 or 24 hr.

사진부도 ①

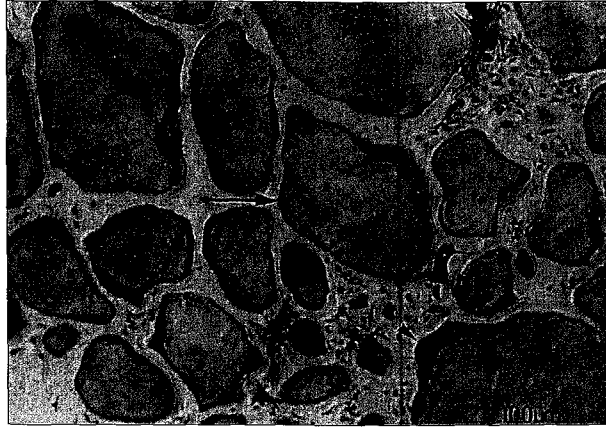
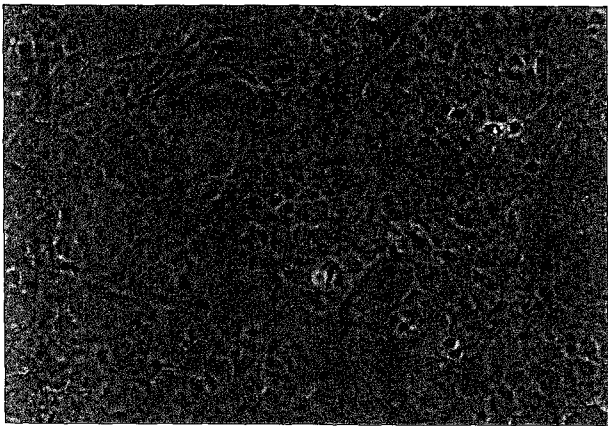
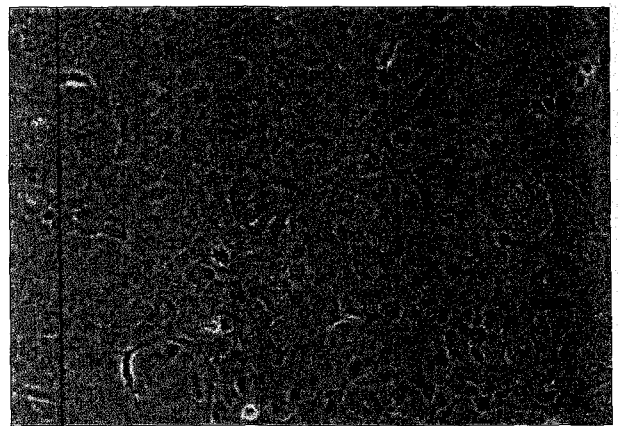


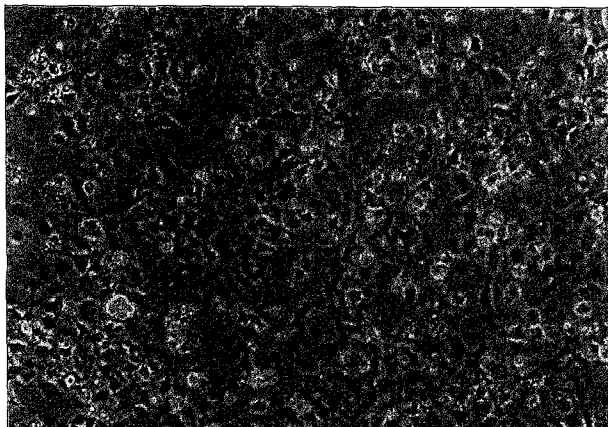
Fig. 1



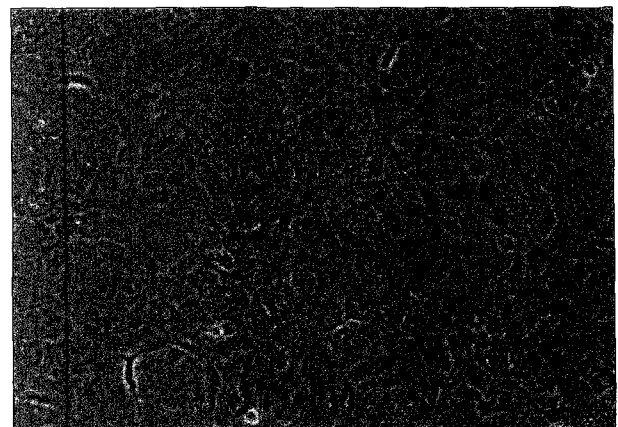
(A)



(B)



(C)



(D)

Fig. 2

사진부도 ②

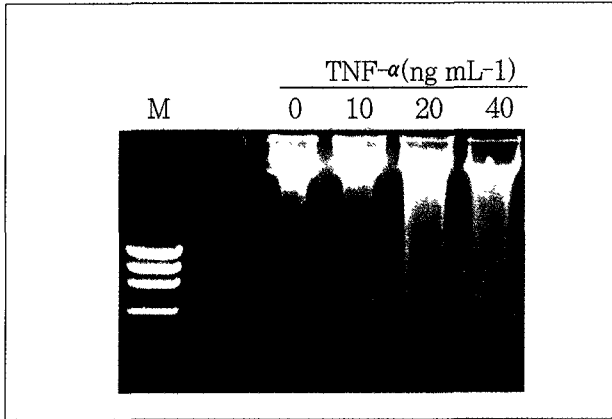


Fig. 3

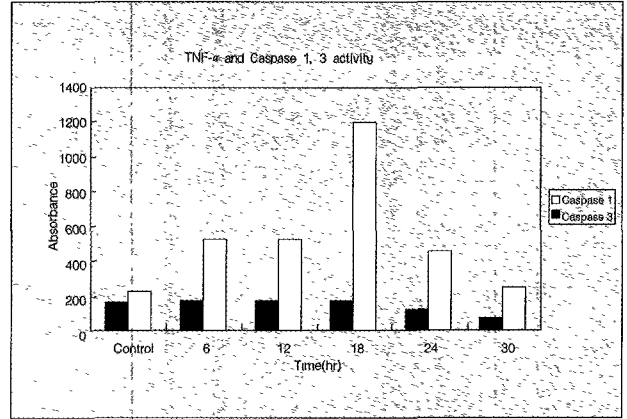


Fig. 4

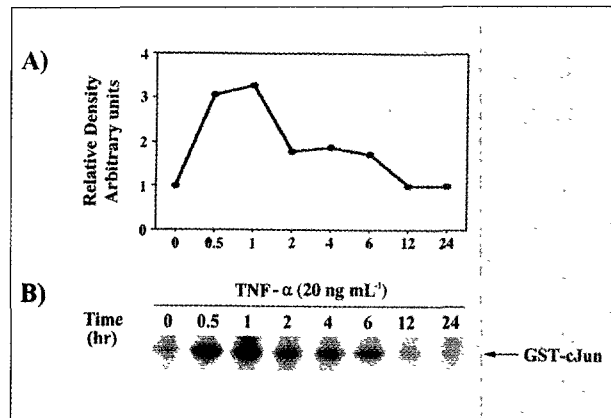


Fig. 5