

개 연골세포의 손상에 의한 Tartrate Resistant Acid Phosphatase 활성의 변화 측정

설재원 · 이해범 · 김남수 · 김인식 · 강형섭 · 이영훈* · 강동원** · 박상열¹

헬스케어 사업단, 전북대학교 수의과대학 생체안전성 연구소

*전북대학교 치과대학 구강생체과학연구소

**송파동물병원

The Change of Tartrate Resistant Acid Phosphatase Activity in Capsaicin-Induced Canine Chondrocyte Death

Jae-won Seol, Hae-beom Lee, Nam-soo Kim, In-shik Kim, Hyung-sub Kang,
Young-hoon Lee*, Dong-won Kang** and Sang-youel Park¹

Center for Healthcare Technology Development, Bio-safety Research Institute College of Veterinary Medicine
Chonbuk National University, Jeonju, 561-756, Korea

*Institute of Oral Bioscience, School of Dentistry Chonbuk National University, Jeonju, 561-756, Korea

**Song Pa Animal Clinic

(게재승인: 2006년 5월 20일)

Abstract : Apoptotic death of articular chondrocytes has been implicated in the pathogenesis of osteoarthritis. Tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) has been used for several years as a marker enzyme of bone-resorbing osteoclasts. This study investigated the activity of TRAP in media of apoptotic cell death-induced canine chondrocyte. We exposed canine chondrocyte to capsaicin and the results showed that capsaicin induced cell death in a dose dependent manner. And we measured TRAP activity in media of chondrocyte death induced by capsaicin treatment and the results capsaicin significantly increased the activity of TRAP in media for dose dependent. We also investigated whether the combination treatment with capsaicin and TRAIL enhance apoptotic cell death in canine chondrocyte. We exposed canine chondrocyte to capsaicin for 24 hrs at the indicated dose, and then treated with recombinant TRAIL protein for 24 hrs. TRAIL alone did not induce cell death after 24 hours, but the combined treatment of both induced more cell death compared with capsaicin alone in a dose dependent manner. Also, the combination treatment with capsaicin and TRAIL increased the activity of TRAP in culture media. These results suggest that TRAP can flow out into extracellular after chondrocyte damage, and TRAP may be a successful biomarker for detection of joint disease such as osteoarthritis.

Key words : Tartrate resistant acid phosphatase, capsaicin, TRAIL, osteoarthritis

서 론

관절염은 관절부위에 염증이 있는 것을 말하며 세균에 의한 유균성 관절염과 세균에 관계하지 않은 무균성 관절염으로 분류된다. 특히 관절을 둘러싸고 있는 활막과 주위 연부 조직에 만성적으로 염증을 일으키는 류마티스 관절염과 연령증가에 의한 관절연골의 변화에 기인한 퇴행성 관절염은 일반적으로 자주 발생하는 관절염이다. 퇴행성 관절염(osteoarthritis)은 동물과 사람에서 체중 부하를 많이 받는 고

관절이나 무릎관절에서 흔히 볼 수 있으며, 육안적으로는 연골의 손상과 섬유화 및 세포수의 감소 등을 나타내는 것이 특징이다(5,23).

Tartrate-resistant acid phosphatases (TRAP)은 purple acid phosphatase로 알려져 있고 금속이온 효소로 분류된다(27). TRAP은 최초로 백혈병성 세망내피증(leukemic reticuloendotheliosis) 환자의 모세포(hairy cells)로부터 세포화학 염색방법에 의하여 확인 하였으며 소나 랫트의 비장(8,24), 사람과 랫트의 뼈(1,9), 사람의 폐 및 태반(4,13)과 같은 부위로부터 분리 및 동정 되었다. TRAP은 최근 몇 년 동안 뼈 재흡수와 관련된 뼈파괴세포(osteoclast)의 biomarker enzyme으로서 사용되어져 왔으며, 실제적으로 골다공증이나 관절염과 같은

¹Corresponding author.
E-mail : sypark@chonbuk.ac.kr

병리학적 상태에서 TRAP이 혈청이나 활액내에 많이 활성화된다고 알려져 있다(26).

Capsaicin(trans-8-methyl-N-vanillyl-6-nonenamide)은 고추에서 추출된 매우 자극적인 성분으로 향신료나 약제로 사용되어 왔으며, 최근에는 capsaicin의 발암성 또는 항암성에 대한 연구들이 보고되고 있다. Capsaicin 자체가 돌연변이를 유발할 수 있으며 종양형성을 조장한다는 보고가 있는 반면(15,30), 다양한 다른 발암 인자들에 의한 돌연변이나 종양형성을 방지하는 효과와 암 세포주 등에서 세포 성장을 억제한다는 보고도 있다(22,33).

본 연구에서는 *in vitro* 상에서 개의 연골조직에서 분리한 연골세포를 배양한 후 capsaicin에 의한 연골세포의 사멸 효과와 tumor necrosis factor (TNF) family의 하나이며 퇴행성 관절염 질병에서 염증 관련 인자들에 의하여 흔히 유리되는 것으로 알려진 TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand)을 병행 처리하여 유도되는 세포 사멸 효과를 확인하였다. 또한 연골세포 손상시 세포외로 유리되는 것으로 알려진 TRAP의 활성을 측정하여 관절염 등의 관절 질환 발생시 치료와 진단의 biomarker로서 이용 가능성을 조사하였다.

재료 및 방법

연골세포의 분리 및 배양

전북대학교 부속동물병원에서 12개월령 비글의 좌측 슬관절 부위에서 연골을 채취한 후 실험실에서 멸균된 PBS로 2번 세척한 후에 연골조각을 1 mm³ 이하로 잘게 잘랐다. 잘게 잘른 연골 조각을 0.1% collagenase (Type II Sigma, MO, USA)가 들어있는 DMEM (10% FBS와 1% penicillin) 배지에 넣어 37°C에서 12 시간 동안 배양하였다. 기질로부터 연골세포의 분리를 위하여 cell strainer를 이용하여 걸러낸 후 4°C에서 400*g로 10분간 원심 분리하였다. 원심 분리 후 가라앉은 세포를 DMEM 배지에 넣어 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다.

연골세포 생존능 측정

연골세포의 생존능을 측정하기 위해서 1차 배양된 연골세포를 12-well plate에 1.0×10⁴이 되게 각 well에 넣은 다음 5% CO₂, 37°C 상태에서 24시간 배양 시켰다. 12-well plate에서 증식한 세포에 capsaicin (Sigma, M2028)을 0, 100, 200, 400 μM의 농도로 48시간 동안 처리하였다. 또한 capsaicin을 농도별로 24시간 전 처리한 후 재조합 TRAIL (100 ng/ml) (CALBIOCHEM. CAT. NO: 616375) 단백질을 처리하여 24시간 동안 더 배양하였다. 세포의 생존능 측정은 crystal violet 염색 방법에 의해 검사할 수 있었고, 세포의 형태를 현미경에서 검사한 후 사진 촬영을 하였다. 세포의 생존능 측정은 세포를 30% ethanol과 3% formaldehyde가 들어있는 0.5% crystal violet으로 실온에서 10분간 염색하고 흐르는 물에서 4회 세척한 후 건조하였다. 건조된 후에 세포

를 1% SDS 용액으로 용해시켜서 550 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 대조군을 100%로 정하고 세포의 생존능을 결정하였다.

TRAP 활성 측정

연골세포를 12-well plate에 1.0×10⁴이 되게 각 well에 넣은 다음 5% CO₂, 37°C 상태에서 24시간 배양 시킨 후 capsaicin을 0, 100, 200 그리고 400 μM의 농도로 48시간 동안 처리하고, 또한 capsaicin을 앞의 농도로 전처리한 후 재조합 TRAIL (100 ng/ml) 단백질을 처리하여 24시간 동안 더 배양하였다. TRAP의 활성을 측정하기 위하여 각 well의 media를 모아 96 well plate에 2.5 mM pNPP (p-nitrophenylphosphate) (Sigma chemical Co, St Louis)가 포함된 reaction buffer (0.1 M sodium acetate buffer, PH 5.8, 0.2 M KCl, 0.1% Triton X-100, 1 mM ascorbic acid와 FeCl₃)와 sample을 각각 100 μl 넣은 후에 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 다음 0.9 M NaOH 50 μl를 각 well에 넣은 후 5분 동안 배양하고 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. TRAP의 활성 지표인 1 IU는 37°C에서 1분 동안 1 M의 p-nitrophenol이 유리된 것을 나타낸다.

결 과

배양된 연골세포에 capsaicin을 0, 100, 200 그리고 400 μM의 농도로 48시간 동안 처리한 후에 연골세포의 생존능을 측정하였다(Fig 1). 연골세포에 capsaicin을 농도별로 처리한 결과, 처리농도가 증가함에 따라 연골세포의 생존능이 감소하는 것을 볼 수 있었다. 또한 capsaicin을 전처리한 후 TRAIL을 처리하여 배양된 연골세포의 변화를 조사하였다. Capsaicin을 0, 100, 200 그리고 400 μM의 농도로 24시간 동안 전처리한 후에 재조합된 TRAIL 단백질 100 ng

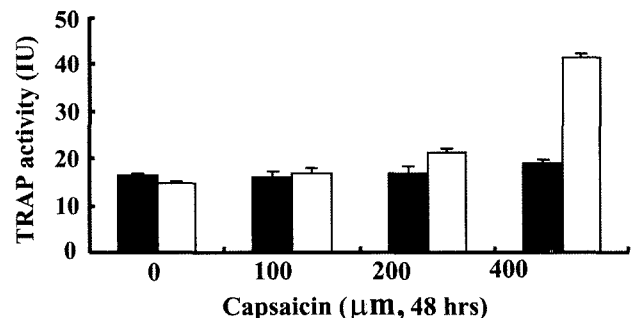


Fig 1. The combination effect of capsaicin and TRAIL in canine chondrocyte. Canine chondrocyte cells plated in 12-well were pretreated with capsaicin (24 hrs) for the indicated dose, and then coincubated with or without recombinant TRAIL protein (100 ng/ml) for additional 24 hrs. Cell viability was determined by crystal violet staining method. Viability of control cells was set at 100%, and viability relative to the control was presented. The experiments were performed at triplicate, at least twice.

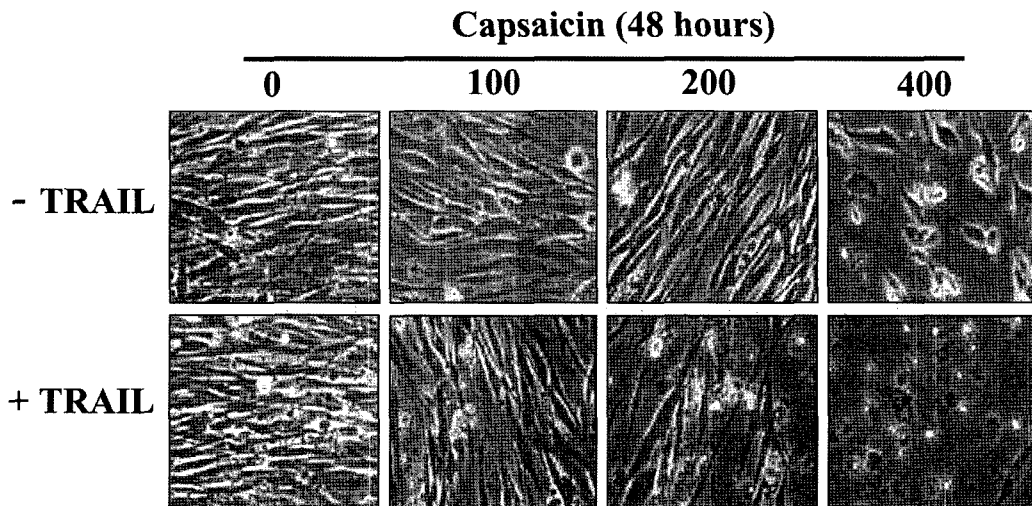


Fig 2. The combination effect of capsaicin and TRAIL in canine chondrocyte. Canine chondrocyte cells plated in 12-well were treated with capsaicin (24 hrs) for the indicated dose, and then coincubated with or without recombinant TRAIL protein (100 ng/ml) for additional 24 hrs. Cell morphology was photographed by microscope ($\times 100$)

을 24시간 동안 더 처리하고 연골세포의 생존능을 측정하였다(Fig 1). 그 결과 capsaicin을 농도별로 48시간 동안 단독으로 처리하였을 때와 비교하여 capsaicin 전처리 후 TRAIL의 병행 처리 시 연골세포의 생존능이 더욱 감소하는 것을 확인 할 수 있었다. 또한 capsaicin과 TRAIL에 의한 연골세포의 변화를 확인 하기 위하여 현미경하에서 관찰한 결과 capsaicin의 처리농도의 증가에 따라 연골세포의 사멸이 증가되는 것을 확인할 수 있었으며, capsaicin의 단독 처리보다는 TRAIL과 병행 처리 시 더 많은 세포 사멸을 유도하는 것을 확인 할 수 있었다(Fig 2).

또한 관절염과 같은 병리학적 상태에서 혈청이나 활액내에서 많이 활성화 되는 것으로 보고된 TRAP이 실제적으로 관절연골을 이루는 연골세포의 손상에 의해서 유리되는 것인지 확인하기 위하여 capsaicin을 0, 100, 200 그리고 400 μM 의 농도로 48시간 동안 처리하여 연골세포의 사멸을 유도한 후 연골세포 배양시 사용한 배지를 모은 후에 흡광도를 이용하여 TRAP의 활성도를 측정하였다(Fig 3). Fig 3에서와 같이 연골세포에 처리한 capsaicin의 농도가 증가할수록 TRAP의 활성 역시 유의성 있게 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, 이것은 capsaicin에 의해 손상된 연골세포로부터 직접적으로 TRAP이 유리되거나 손상된 연골세포의 다양한 인자들이 TRAP의 활성을 증가시킬 수 있음을 보여주는 결과이다. 또한 capsaicin에 의한 연골세포의 손상시 배지에서 보이는 TRAP 활성도의 증가와 관련하여 과연 재조합된 TRAIL 단백질과의 병행 처리에 의해서 더 많은 세포 손상을 보이는 연골세포에서 TRAP이 더 많이 유리되는지를 조사하였다. Capsaicin을 0, 100, 200 그리고 400 μM 의 농도로 24시간 동안 전처리한 후에 재조합된 TRAIL (100 ng) 단백질을 24시간 동안 더 처리한 후 배지를 모아서 TRAP의 활성도를 확인하였다(Fig 3). Capsaicin의 농도 증가에 따

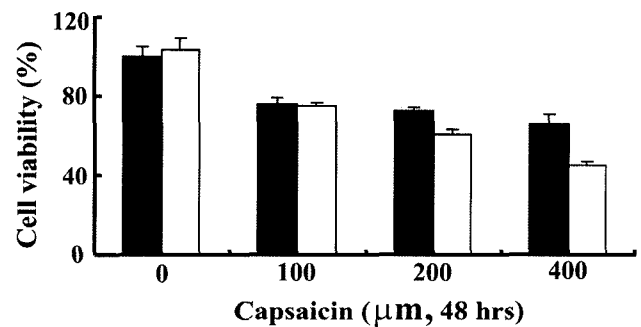


Fig 3. The activity of TRAP by the combination treatment of capsaicin and TRAIL. Canine chondrocyte cells plated in 12-well were treated with capsaicin (24 hrs) for the indicated dose, and then coincubated with or without recombinant TRAIL protein (100 ng/ml) for additional 24 hrs. Treated cell collected media, and the activity of TRAP in media was determined at 405 nm using ELISA. One unit of TRAP activity corresponds to 1 mol of p-nitrophenol liberated per minute at 37°C. The experiments were performed at triplicate, at least twice. The bar indicated standard error.

른 TRAP의 활성 증가와 비교하여 TRAIL을 병행 처리하였을 때 배지내 TRAP의 활성이 더 많이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 본 결과는 연골세포의 손상에 비례하여 TRAP의 활성 역시 증가되는 것을 보여주는 것이다.

고 찰

관절연골은 연골에 탄력성을 부여하는 연골기질(extracellular matrix)인 콜라겐(collagen)과 프로테오글리칸(proteoglycan)을 분비하고 노화된 물질을 처리하는 연골세포(chondrocyte)로 구성되어 있으며, 직접 뼈들이 부딪쳐 손상

되는 것을 막고 윤활액을 흡수하거나 내보내어 충격을 완화시킬 수 있는 기능을 한다. 그러나 퇴행성 관절염과 같은 관절 질환 발생시 관절 연골이 닳아서 없어지면서 연골세포의 손상과 기질의 섬유화 등의 국소적인 퇴행성 변화가 나타난다. 본 연구는 퇴행성 관절염이 자주 발생하는 부위인 슬관절 부위에서 연골을 채취하여 연골 세포를 분리한 후 *in vitro*에서 1차 배양을 하였으며, 배양한 연골세포의 세포 사멸 효과와 TRAP의 활성을 조사하였다.

Capsaicin이 다양한 세포주에서 세포사멸을 유도하여 세포 성장을 억제한다는 보고들이 있으나(28,29), capsaicin의 염색체 변이를 일으키는 특성과 발암성에 대한 많은 연구들의 결과는 상반되게 보고되고 있다(11,17,33). 특히 관절 질환과 관련하여서는 손 등의 퇴행성 관절염 발생시 국소적인 capsaicin의 처리가 염증 정도를 감소시켰다고 보고하였으며(20), 류마티스 관절염의 활막세포(synoviocytes)에서 capsaicin이 DNA의 합성과 collagenase와 prostaglandin E2의 생산을 자극하여 세포의 분화와 성장을 촉진한다고 보고하였다(19). 본 연구에서는 퇴행성 관절염 발생시 연골세포의 손상이 유도된다는 것과 관련하여 *in vitro*상에서 연골세포를 분리 및 배양하여 capsaicin을 농도별로 처리한 결과 농도의 증가에 따라 연골세포의 사멸이 유도된다는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 관절연골을 구성하는 연골세포가 capsaicin을 투여하였을 때 손상을 입을 수 있다는 것을 보여주며, 또한 연골손상과 관련된 퇴행성 관절염이 발생할 수 있다는 것을 보여준다.

TRAIL은 tumor necrosis factor (TNF) family로 분류되며, ligand-type의 세포사멸을 유도하는 단백질을 의미한다(2,3,10). 최근에 재조합 TRAIL 단백질의 처리 시 심한 부작용 없이 종양세포의 증식을 효과적으로 억제 시킨다는 것을 보고 하였으며(6,32), *in vitro*나 *in vivo*에서 사람의 정상적인 간세포 (hepatocyte)에 독작용이 없이 종양세포에서만 특이적으로 세포사멸 효과가 나타난다고 보고하였다(7). 또한 TRAIL이 정상적인 사람의 관절 연골세포에서 caspase-3의 활성화에 의해 형태적인 변화 및 세포사멸을 유도한다고 보고하였으나(25) 개 연골세포에서의 TRAIL의 효과는 잘 알려져 있지 않다. 본 연구에서는 정상적인 개 연골세포에 TRAIL을 처리하였을 때 농도별로 세포사멸 효과를 보인다는 것을 확인하였으나, 일반적으로 사용하는 100 ng/mL에서는 세포사멸 효과가 미비하다는 것을 확인하였다. 그러나 capsaicin의 전처리 후 재조합 TRAIL 단백질을 추가로 처리하였을 때 capsaicin의 단독처리보다 더 많은 연골세포의 사멸을 보여 TRAIL이 연골세포의 손상과 관련하여 관절염 등의 질환을 악화시킬 수 있는 요인으로 작용한다고 생각한다.

TRAP은 최초로 백혈병성 세망내피증(leukemic reticulo-endotheliosis) 환자의 모세포(hairy cells)에서 세포화학 염색 방법을 이용하여 발견되었으며, uteroferrin 또는 purple acid phosphatase로 알려져 있다(18,27). 최근에는 면역세포화학측정법(immunocytochemical)과 RT-PCR 등의 방법을 이용하여 가지세포(dendritic cells), 대식구, 파골세포 등과 같이 골수

에서 기인한 세포등에서 TRAP이 확인되었으나 아직까지 파골세포가 TRAP의 주된 세포로 알려져 있다(12,14,21). TRAP의 기능은 확실히 알려져 있지는 않지만, 이 유전자를 없앤 knockout mice에서 골다공증이 유발된 것이 확인되어 뼈의 흡수나 아교섬유용해 등에 관련이 있을 것이라고 생각되어 왔으며, 몇 년 동안 뼈흡수의 표지 효소로 사용되어져 왔다. 또한 류마티스 관절염 환자의 연골 활막 연결 부위에서 TRAP positive cell을 확인하였으며, 관절 연골 파괴에 중요한 역할을 할 것이라고 보고 하였다(31). 또한 정상 개의 관절액에서 성별, 나이, 몸무게 별로 구별하여 TRAP의 농도를 측정한 연구 결과도 보고 되었다(16). 본 연구에서는 TRAP이 관절연골을 이루는 연골세포의 손상에 의해서 연골세포의 외부로 유리된다는 것을 확인하였으며, 연골세포의 손상과 비례하여 TRAP의 세포의 활성이 증가된다는 것을 확인하였다.

결론

본 연구는 시험관내에서 연골세포의 손상과 TRAP 활성간의 상관성을 조사하였다. 관절연골을 이루는 연골세포는 capsaicin 등의 화학제제의 처리에 의해 쉽게 손상될 수 있으며, 또한 다양한 염증 인자들에 의해 생산되는 것으로 알려진 TRAIL에 의해서도 연골세포 손상이 유도됨이 증명되었다. 또한 TRAP의 활성평가에서는 연골세포의 손상 증가에 의존하여 TRAP 효소의 활성이 증가되는 경향을 보였으며, 이는 TRAP의 활성이 연골세포의 손상과 깊은 관련성을 가지고 있음을 증명하는 것이다. 본 연구 결과는 관절 등의 연골관련 질환의 조기 진단 및 예후 판단의 주요한 biomarker로서 TRAP을 활용 하는데 중요한 기초 자료가 될 것으로 생각된다.

감사의 글

본 논문은 한국과학재단 특정기초 연구사업(R01-2004-000-10459-0)과 2단계 BK21 사업에 의해 지원되었으며, 지원에 감사드립니다.

참고 문헌

1. Allen SH, Nuttleman PR, Ketcham CM, Roberts RM. Purification and characterization of human bone tartrate-resistant acid phosphatase. *J Bone Miner Res* 1989; 4: 47-55.
2. Cartee L, Kucera GL, Willingham MC. Induction of apoptosis by gemcitabine in BG-1 human ovarian cancer cells compared with induction by staurosporine, paclitaxel and cisplatin. *Apoptosis* 1998; 3: 439-449.
3. Cha SS, Kim MS, Choi YH, Sung BJ, Shin NK, Shin HC, Sung YC, Oh BH. 2.8 Å resolution crystal structure of human TRAIL, a cytokine with selective antitumor activity. *Immunity* 1999; 11: 253-261.
4. Efstratiadis T, Moss DW. Tartrate-resistant acid phosphatase

- of human lung: apparent identity with osteoclastic acid phosphatase. *Enzyme* 1985; 33: 34-40.
5. Goggs R, Carter SD, Schulze-Tanzil G, Shakibaei M, Mobasher A. Apoptosis and the loss of chondrocyte survival signals contribute to articular cartilage degradation in osteoarthritis. *Vet J* 2003; 166: 140-158.
 6. Griffith TS, Anderson RD, Davidson BL, Williams RD, Ratliff TL. Adenoviral-mediated transfer of the TNF-related apoptosis-inducing ligand/Apo-2 ligand gene induces tumor cell apoptosis. *J Immunol* 2000; 165: 2886-2894.
 7. Hao C, Song JH, Hsi B, Lewis J, Song DK, Petruk KC, Tyrrell DL, Kneteman NM. TRAIL inhibits tumor growth but is nontoxic to human hepatocytes in chimeric mice. *Cancer Res* 2004; 64: 8502-8506.
 8. Hara A, Sawada H, Kato T, Nakayama T, Yamamoto H, Matsumoto Y. Purification and characterization of a purple acid phosphatase from rat spleen. *J Biochem (Tokyo)* 1984; 95: 67-74.
 9. Hayman AR, Warburton MJ, Pringle JA, Coles B, Chambers TJ. Purification and characterization of a tartrate-resistant acid phosphatase from human osteoclastomas. *Biochem J* 1989; 261: 601-609.
 10. Hymowitz SG, Christinger HW, Fuh G, Ultsch M, O'Connell M, Kelley RF, Ashkenazi A, de Vos AM. Triggering cell death: the crystal structure of Apo2L/TRAIL in a complex with death receptor 5. *Mol Cell* 1999; 4: 563-571.
 11. Jung MY, Kang HJ, Moon A. Capsaicin-induced apoptosis in SK-Hep-1 hepatocarcinoma cells involves Bcl-2 downregulation and caspase-3 activation. *Cancer Lett* 2001; 165: 139-145.
 12. Kafienah W, Bromme D, Buttle DJ, Croucher LJ, Hollander AP. Human cathepsin K cleaves native type I and II collagens at the N-terminal end of the triple helix. *Biochem J* 1998; 331 (Pt 3): 727-732.
 13. Ketcham CM, Roberts RM, Simmen RC, Nick HS. Molecular cloning of the type 5, iron-containing, tartrate-resistant acid phosphatase from human placenta. *J Biol Chem* 1989; 264: 557-563.
 14. Lang P, Schultzberg M, Andersson G. Expression and distribution of tartrate-resistant purple acid phosphatase in the rat nervous system. *J Histochem Cytochem* 2001; 49: 379-396.
 15. Lawson T, Gannett P. The mutagenicity of capsaicin and dihydrocapsaicin in V79 cells. *Cancer Lett* 1989; 48: 109-113.
 16. Lee HB, Alam MR, Choi SJ, Park SY, Lee YH, Chon SK, Choi IH, Kim NS. The Concentration of Tartrate Resistant Acid Phosphatase in Synovial Fluid of Canine Stifle Joint. *J Vet Clin* 2005; 22: 190-193
 17. Macho A, Blazquez MV, Navas P, Munoz E. Induction of apoptosis by vanilloid compounds does not require de novo gene transcription and activator protein 1 activity. *Cell Growth Differ* 1998; 9: 277-286.
 18. Martin RB, Butcher RL, Sherwood LL, Buckendahl P, Boyd RD, Farris D, Sharkey N, Dannucci G. Effects of ovariectomy in beagle dogs. *Bone* 1987; 8: 23-31.
 19. Matucci-Cerinic M, Marabini S, Jantsch S, Cagnoni M, Partsch G. Effects of capsaicin on the metabolism of rheumatoid arthritis synoviocytes *in vitro*. *Ann Rheum Dis* 1990; 49: 598-602.
 20. McCarthy GM, McCarty DJ. Effect of topical capsaicin in the therapy of painful osteoarthritis of the hands. *J Rheumatol* 1992; 19: 604-607.
 21. Moore KW, Read RA. Cranial cruciate ligament rupture in the dog—a retrospective study comparing surgical techniques. *Aust Vet J* 1995; 72: 281-285.
 22. Morre DJ, Chueh PJ, Morre DM. Capsaicin inhibits preferentially the NADH oxidase and growth of transformed cells in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 1831-1835.
 23. Oakley SP, Lassere MN, Portek I, Szomor Z, Ghosh P, Kirkham BW, Murrell GA, Wulf S, Appleyard RC. Biomechanical, histologic and macroscopic assessment of articular cartilage in a sheep model of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2004; 12: 667-679.
 24. Orlando JL, Zirino T, Quirk BJ, Averill BA. Purification and properties of the native form of the purple acid phosphatase from bovine spleen. *Biochemistry* 1993; 32: 8120-8129.
 25. Pettersen I, Figenschau Y, Olsen E, Bakkelund W, Smedsrod B, Svenbjornsson B. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand induces apoptosis in human articular chondrocytes *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 296: 671-676
 26. Scarnecchia L, Minisola S, Pacitti MT, Carnevale V, Romagnoli E, Rosso R, Mazzuoli GF. Clinical usefulness of serum tartrate-resistant acid phosphatase activity determination to evaluate bone turnover. *Scand J Clin Lab Invest* 1991; 51: 517-524.
 27. Strater N, Klabunde T, Tucker P, Witzel H, Krebs B. Crystal structure of a purple acid phosphatase containing a dinuclear Fe(III)-Zn(II) active site. *Science* 1995; 268: 1489-1492.
 28. Surh YJ, Lee SS. Capsaicin, a double-edged sword: toxicity, metabolism, and chemopreventive potential. *Life Sci* 1995; 56: 1845-1855.
 29. Surh YJ, Lee SS. Capsaicin in hot chili pepper: carcinogen, co-carcinogen or anticarcinogen? *Food Chem Toxicol* 1996; 34: 313-316.
 30. Toth B, Rogan E, Walker B. Tumorigenicity and mutagenicity studies with capsaicin of hot peppers. *Anticancer Res* 1984; 4: 117-119.
 31. Tsuboi H, Matsui Y, Hayashida K, Yamane S, Maeda-Tanimura M, Nampei A, Hashimoto J, Suzuki R, Yoshikawa H, Ochi T. Tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) positive cells in rheumatoid synovium may induce the destruction of articular cartilage. *Ann Rheum Dis* 2003; 62: 196-203.
 32. Walczak H, Miller RE, Ariail K, Gliniak B, Griffith TS, Kubin M, Chin W, Jones J, Woodward A, Le T, Smith C, Smolak P, Goodwin RG, Rauch CT, Schuh JC, Lynch DH. Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand *in vivo*. *Nat Med* 1999; 5: 157-163.
 33. Wolvetang EJ, Larm JA, Moutsoulas P, Lawen A. Apoptosis induced by inhibitors of the plasma membrane NADH-oxidase involves Bcl-2 and calcineurin. *Cell Growth Differ* 1996; 7: 1315-1325.