

IL-1 β 처리 백서 두개관 세포의 mineral trioxide aggregate에 대한 반응

이술현¹, 박지일², 김영준^{1*}

1. 전남대학교 치의학전문대학원 치주과학교실, 전남대학교 치의학연구소

2. 광주보건전문대학 치위생과

Response of fetal rat calvarial cells on mineral trioxide aggregate after IL-1 β stimulation

Sool-Heon Lee¹, Ji-Il Park², Young-Joon Kim^{1*}

1. Department of Periodontology, School of Dentistry, Dental Science Reserch Institute, Chonnam National University

2. Department of Dental hygiene, Gwangju Health College

ABSTRACT

Purpose: The purpose of this study was to investigate the ability of Mineral trioxide aggregate(MTA) to support osteoclastic differentiation from fetal rat calvarial cell.

Methods: In this study, response of IL-6, RANKL, and OPG in fetal rat calvarial cells stimulated with IL-1 β on MTA was evaluated by ELISA and RT-PCR.

Results: The results were as follows; there was no significant difference between glass and MTA at 5days. In ELISA analysis, Glass group and MTA group showed similar IL-6 expression, Glass+IL-1 β group and MTA+IL-1 β group showed similar IL-6 expression. In RT-PCR analysis, Glass group and MTA group showed similar IL-6, RANKL, OPG mRNA expression, MTA+IL-1 β group and Glass+IL-1 β group showed 3 fold increase of IL-6 and RANKL mRNA expression when compared with MTA group. All groups showed similar OPG mRNA expression.

Conclusions: MTA does not suppress cell proliferation and increase the proinflammatory cytokine that induce osteoclastogenesis. Thus, MTA is biocompatible material that could be used in various clinical conditions.

(J Korean Acad Periodontol 2009;39:359-365)

KEY WORDS: biocompatible materials; cytokines; ELISA; mineral trioxide aggregate.

서론

치과 치료에서 사용되는 재료들은 주변 조직과 접촉하게 되므로 주변 조직에 해를 끼치거나 치유과정을 방해하는 부작용이 없어야 한다. 특히 치근단 부위나 치근 이개부에 사용되는 재료들은 치근단 조직에 유해한 작용이 없어야 한다. Mineral trioxide aggregate(MTA)는 Portland cement가 기본인 수복재료, 1995년부터 치과에서 사용되었으며¹⁾, 치

근단 충전 재료 뿐 아니라 치근 천공, 직접 치수 복조술, 치수 절단술에 사용되는 재료이다. MTA가 수분과 접촉하면 수산화 칼슘이 주로 방출되며 초기 pH는 10.3이고 3시간 후 12.5로 상승한다¹⁾. 알칼리 pH와 Ca²⁺ 이온 유리로 인해 MTA는 골 세포의 생물학적 활성 기질로서 기능한다²⁾. 여러 연구들에 의하면 MTA는 생체적합성과 치근단 봉쇄능력이 우수하여 가장 적당한 치근단 충전제로 여겨진다³⁾. Zhu 등은 IRM이나 amalgam과 비교하여 MTA에서 골모세포가 더 친화적인 반응을 보인다고 하였으며 MTA는 생체적합성이 우수하고 골모세포의 분화를 자극하여 골 재생을 촉진시킬 수 있다고 하였다⁴⁾. MTA의 생체 친화성에 대한 이전의 여러 연구들을 종합해 보면, MTA는 amalgam, super Epoxy Benzoic Acid(EBA), intermediate restorative material(IRM) 보다 독성이 낮고⁴⁻⁶⁾, 인접 세포의 증식을 억제하

Correspondence: Dr. Young-Joon Kim

Department of Periodontology, School of Dentistry, Dental Science Reserch Institute, Chonnam National University, 333, Yong Bong Ro, Buk-gu, Gwang-Ju, 500-757, Korea

E-mail: youngjun@chonnam.ac.kr, Tel: 062-530-5648,

Fax: 062-530-5649

Received: Aug 12, 2009; Accepted: Sep 17, 2009

지 않으며 MTA에 근접하여 골모세포에 의한 골의 침착을 촉진시킴을 알 수 있다.

창상의 완벽한 폐쇄가 안 되었거나 염증이 잔존된 창상, 내독소 등이 완전히 제거가 되지 않은 오염된 치근면 등에서는 여러 염증성 사이토카인이 존재하며 이런 사이토카인은 MTA와 접촉하는 세포의 생물학적 반응을 변화시킬 수 있다. 치주치료 후 치주 조직에 잔존할 수 있는 Interleukin (IL)-1은 염증 표지자로서 염증 반응에 관여하는데⁷⁾, IL-1 α 와 IL-1 β 의 두 가지 형태로 나누어지며, IL-1 β 가 IL-1 α 에 비해 골의 이화작용에 더 민감하다고 알려져 있다. 또한 IL-1 β 는 건강한 부위에 비해 치주염증이 있는 부위에서 더 증가하며, 골 흡수를 자극한다고 알려져 있다⁸⁻¹⁰⁾. 만일 이러한 염증성 사이토카인이나 내독소가 MTA와 접촉한 세포에 반응하여 다른 염증성 사이토카인의 활성화에 영향을 준다면 조직의 치유는 지연되고 골흡수가 진행될 수 있다.

치근단 부위나 치근 이개부에 사용되는 MTA는 골조직과 직접 접촉되므로, 골흡수를 야기하거나 골세포의 증식을 억제하면 안 되며 파골세포의 분화 물질의 분비를 촉진하지 않아야 한다. 이에 이번 연구에서는 MTA에 백서 두개관 세포를 부착하여 접촉시킨 후 세포 증식률을 MIT assay로 평가하였으며, IL-1 β 로 자극하였을 때의 파골세포 분화에 관여하는 IL-6, receptor activated nuclear factor ligand(RANKL), osteoprotegerin(OPG)의 발현을 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)와 Reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR)을 통해 평가하였다.

재료 및 방법

1. 시편 제작

MTA(ProRootTM MTA Root canal Repair Material; Densply, U.S.A)를 준비하고 제조자 지시대로 섞어서 중합시켰다. MTA를 직경 12 mm, 두께 1 mm의 디스크 형태로 만들어 12-well 혹은 6-well 배양접시에 위치시키고, 직경 12 mm, 두께 1 mm의 glass cover slip(VWR science, U.S.A)을 양성 대조군으로 준비하였다. 준비된 디스크와 glass cover slip을 70% ethanol로 씻고 말린 후 무균 작업대 내에서 UV light 하에서 60분 동안 멸균 처리하였다. Glass에 백서 두개관 세포를 부착시킨 군, MTA에 백서 두

개관 세포를 부착시킨 군, glass에 백서 두개관 세포를 부착시킨 후 IL-1 β 로 자극한 군, 그리고 MTA에 백서 두개관 세포를 부착시킨 후 IL-1 β 로 자극한 군으로 분류하였다.

2. 백서 태자 두개관 세포 배양

세포는 임신 21일째의 백서 태자 두개관(Sprague-Dawley 21 day fetal rat calvaria)에서 연속적인 교원질 효소의 분해 과정을 통해 얻었다. 태자 두개관의 골막을 제거한 다음 골조직을 가위로 작은 조각으로 잘라냈다. 그 후 두개관은 0.5% type II collagenase(Type II; Invitrogen, U.S.A)을 함유한 효소에 의해 37 $^{\circ}$ C 인산 중화 식염수 안에서 분해되었다. 각각 15분이 소요되는 연속적인 분해 과정 중 3 번째에서 5 번째 분해과정의 세포들을 수집하여 75 mm 조직 배양 용기에서 적중하였다. 수집된 세포는 10% 우태아혈청(fetal bovine serum), 100 mg/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin이 첨가된 BGjb 배지(Life Technologies, U.S.A)에 넣어 37 $^{\circ}$ C, 5% 이산화탄소 하에서 배양하였다.

3. 세포 증식도 측정

세포 증식도는 세포독성실험(MTT assay)으로 측정하였다. MTA를 12-well 배양접시에 위치시킨 후, 세포의 증식을 평가하기 위해서 10% FBS가 첨가된 BGjb 배지와 함께 세포를 1.0×10^5 cells/ml 밀도로 MTA 디스크(직경 12 mm, 1 mm 두께), glass cover slip(VWR science, U.S.A) 위에서 배양하였다. 배양 후 부착된 세포를 세척하고 MTT assay(CellTiter 96[®] Aqueous, Promega, U.S.A)를 이용하여 세포의 부착과 증식을 평가하였다.

실험 동안에 증가된 formazan product는 살아있는 세포의 수와 비례하게 되며, 측정된 formazan은 ELISA plate reader(microplate manager, BioRad, U.S.A)에 의해 490 nm에서 흡수를 정량화 하였다. 세포 증식도는 3일째와 5일째에 측정되었으며, 실험은 세 번 반복 시행되었다.

4. IL-6 concentration

1일째와 3일째 사이토카인 양의 변화와 standardized cell population, 특히 파골세포 활성화와 연관 있는 IL-6을 평가하기 위해서 ELISA analysis를 이용하였다. 세포가 밀생에

도달한 후 FBS가 포함된 BGjb 배지로 교환 후 약 8시간째에 IL-1 β (1.0 ng/ml)를 첨가하였다. 14~18시간 추가 배양 후 BGjb 배양액을 배양접시에서 제거하여 5,000 rpm에서 5분간 원심 분리하였으며 ELISA 분석을 위해 -70°C에서 보관하였다. Quantikine™ immunoassay kits(R & D Systems, U.S.A)를 이용하여 사이토카인을 분석하였으며, 제조자의 지시에 따라 quantitative “sandwich” enzyme immunoassay technique을 이용하였다. 반응 후 ELISA plate를 이용하여 450 nm에서 측정되었다.

5. 역전사 중합효소 연쇄반응(Reverse transcription polymerase chain reaction(RT-PCR) analysis)

세포 배양 3일째에 0.3% FBS가 포함된 BGjb 배지로 교환하고, IL-1 β (1.0 ng/ml)를 첨가한 후 14~18시간 후 RNA를 채취하였다.

1) 총 RNA 추출

RNA 분리는 배양액을 제거하고 2 ml의 TRIZOL(Promega, U.S.A)를 첨가하여 각 군에서 분리된 세포를 1.8 ml tube에 수집하였다. 200 μ l의 chloroform을 첨가하여 RNA를 용해시킨 후 4°C, 12,000 rpm에서 10분간 원심 분리하였다. 상층액만을 취한 후 500 μ l isoprophyl alcohol을 첨가하여 RNA를 침전시키고 4°C, 10,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 상층액을 제거하였다. 분리한 RNA는 T/E buffer 20 μ l에 녹인 후 분광광도계로 그 양을 측정하였으며 -70°C 냉동고에 보관하였다.

2) 역전사 중합효소 연쇄반응

추출된 총 RNA 중 5 μ g을 RT reaction을 위하여 사용하였다. Superscript II(GibcoBRL, U.S.A)를 이용하여 70°C 10분, 42°C 70분, 37°C 15분의 조건으로 cDNA를 합성하였다. 2 μ l의 RT product를 PCR의 template로 사용하여 IL-6, RANKL, OPG, and GAPDH를 증폭하였으며, 이들

Table 1. Amplication Primer Sets Used in Polymerase Chain Reaction

Primer	Expected base pairs	Sequence(5'-3')
GAPDH-sense(+)	418	CACCATGGAAGGCCGGGG
GAPDH-antisense(-)		GACGGACACATTGGGGGTAG
RANKL-sense(+)	499	CAGCACTCACTGCTTTTATAGAATCC
RANKL-antisense(-)		AGCTGAAGATAGTCTGTAGGTACGCC
OPG-sense(+)	492	TGTAGAGAGGATAAAACGG
OPG-antisense(-)		CTAGTTATAAGCAGCTTAT
IL-6-sense(+)	638	ATGAAGTTCCTCTCTGCAAGAGACT
IL-6-antisense(-)		CACTAGGTTTGCCGAGTAGATCTC

PCR programs					
	94°C	94°C	60°C	72°C	72°C
GAPDH	1 min	1 min	2 min	1 min	10 min
		┌──┐			
		25 Cycles			
	94°C	94°C	50°C	72°C	72°C
IL-6 OPG RANKL	1 min	1 min	2 min	1 min	10 min
		┌──┐			
		30 Cycles			

GAPDH indicate glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; RANKL, receptor activation of nuclear factor κ B ligand; OPG, osteoprotegerin; IL-6, interleukin-6.

의 유전자 수준을 RT-PCR을 통해 관찰하였다(Table 1). PCR 반응은 10x PCR 완충용액 5 μ l, 1.5 mM MgCl₂ 3 μ l, 10 mM dNTP mix 1 μ l, 각각의 primer 2.5 μ l, 5 unit Taq polymerase 0.2 μ l, 합성된 cDNA 2 μ l를 혼합한 후 3차 증류수를 이용하여 총 50 μ l가 되게 하였다. PCR 반응 혼합물들을 PCR cycler(Thermocycler, U.S.A)를 이용하여 30 cycle 증폭하였다. 증폭된 PCR 산물들은 loading buffer 2 μ l를 첨가하여 총 10 μ l가 되게 하여 1.5% agarose gel에서 전기영동하였다. 얻어진 PCR 결과는 gel image analysis system(Gel-doc[®], BioRad, U.S.A)에서 GAPDH의 발현을 기준으로 하여 각 유전자의 상대적인 발현 비율을 산출하였다.

6. 통계학적 분석

세포 증식도와 ELISA분석의 군 간 차이의 유의성 검정을 위해 SPSS 14.0K를 사용하여 one way ANOVA로 분석하였고 Duncan's multiple comparison을 시행하였다.

Table 2. Cell Proliferation Assay After 3 Days and 5 Days of Culture on Glass and MTA

	Glass	MTA
3days	0.292	0.225*
5days	0.360	0.342

* : Significantly different compared to glass at day 3 ($p < 0.05$).

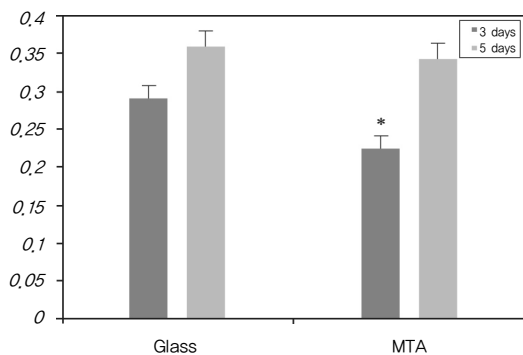


Figure 1. Cell proliferation assay after 3 days and 5 days of culture on glass and MTA.

* : significantly different compared to glass at day 3 ($p < 0.05$).

결과

1. 세포 증식도 측정

MTT assay를 통해 세포 증식도를 측정하였으며 3일 후 MTA와 glass간에 유의한 차이를 보였다(Table 2, $p < 0.05$). 흡광도를 보면 MTA의 모든 샘플에서 세포 증식은 3일에서 5일 사이에 증가하였으며 5일 후에는 MTA와 glass 사이의 유의한 차이가 없었다(Fig. 1).

2. IL-1 β 를 첨가한 후 IL-6의 농도 변화

ELISA에 의한 IL-6의 농도는 glass를 제외한 모든 군에서 1일째 가장 높았으며, 3일째 감소하였다. 또한 IL-1 β 로 처리한 세포들이 glass, MTA에서 배양된 세포들보다 1, 3일째 모두 유의하게 더 많은 IL-6를 분비한 것으로 나타났다(Table 3, Fig. 2).

Table 3. Mean Concentration of IL-6 in Cell Culture on Glass, MTA, MTA+IL-1 β , Glass+IL-1 β (pg/ml)

	1 day	3 days
Glass	31.2 \pm 2.0	35.8 \pm 15.0
MTA	95.9 \pm 33.7*	73.0 \pm 15.4 \S
MTA+IL-1 β	226.2 \pm 13.1* \dagger	108.9 \pm 27.5 \S
Glass+IL-1 β	248.7 \pm 27.0* \dagger	92.3 \pm 18.4 \S

* : Significantly different to Glass at day 1 ($p < 0.05$).

\dagger : Significantly different to MTA at day 1 ($p < 0.05$).

\S : Significantly different to Glass at day 3 ($p < 0.05$).

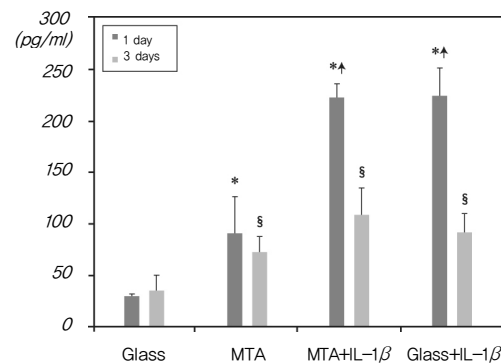


Figure 2. Mean concentration of IL-6 in glass, MTA, MTA+IL-1 β , glass+IL-1 β .

* : Significantly different to Glass at day 1 ($p < 0.05$).

\dagger : Significantly different to MTA only at day 1 ($p < 0.05$).

\S : Significantly different to Glass at day 3 ($p < 0.05$).

3. RT-PCR Gene expression analysis

세포 배양 7일 후 IL-6, RANKL, OPG, GAPDH 유전자의 발현을 RT-PCR로 평가하였다. Figure 3은 glass, MTA, MTA+IL-1 β , glass+IL-1 β 에서의 유전자 발현 양상이다. 이번 RT-PCR 결과에서는 glass에 비해 MTA는 1.2배의 IL-6 유전자 발현을 보였으며 MTA+IL-1 β , glass+IL-1 β 은 각각 3.1배, 3.4배의 IL-6 유전자 발현을 보였다. RANKL 유전자는 glass에 비해 MTA에서 1.2배의 높은 발현을 보였으며 MTA+IL-1 β , glass+IL-1 β 는 각각 2.7배, 3.1배를 보였다. OPG 유전자는 glass에 비해 MTA에서 1.1배의 발현을 보였으며 MTA+IL-1 β , glass+IL-1 β 는 각각 1.1배, 1배를 보였다(Fig. 3).

고찰

치근 이개부 천공 부위나 외과적 근관치료시 사용하는 MTA는 혈액이나 다른 조직 및 조직액과 접촉하게 된다. MTA는 in vitro에서 세포 친화적인 재료로 알려져 있으며, Koh 등은 MTA가 생체 친화적인 근관치료용 재료라고 하였다¹¹⁾. 이번 연구에서는 MITT assay를 통해 증식하는 세포의 수를 측정하였는데¹²⁾, 이 방법에서 세포의 mitochondrial dehydrogenase 활성은 pale yellow salt를 dark blue formazan product 내로 잘라내게 된다. 이에 대한 결과는 분광 광도계로 측정하고 반응이 살아있는 세포에서만 일어나

기 때문에 흡광도는 세포 독성과 반비례하게 된다. 이번 연구에서 MTA 표면에서의 살아있는 세포를 관찰하였는데 그 결과 3일째에서 5일 사이에 유의한 증가를 보였고 3일째는 glass와 유의한 차이를 보였으나, 5일째는 glass와 유의한 차이를 보이지 않았다($p < 0.05$). Nakayama의 연구에서도 이와 유사하게 MTA 표면의 세포가 배양 기간에 따라 증가하나 glass보다 낮은 결과를 보였다¹³⁾. 이 결과를 바탕으로 이번 연구에서는 밀생에 도달할 때까지 세포 배양을 한 후 IL-1 β 로 자극하여 염증성 사이토카인의 발현을 평가하였다.

최근 유전자 분자생물학의 발달로 골 대사와 흡수에 영향을 미치는 많은 유전자 단백질들이 밝혀지고 있다. 그 중 파골세포의 분화를 조절하는데 중요한 역할을 하는 단백질은 RANKL과 그것의 경쟁적 수용체인 OPG이다. RANKL은 골모세포와 골수간세포에서 분비되며 전파골세포의 RANK 수용체와 결합하여 파골세포의 분화를 유도한다¹⁴⁻¹⁷⁾. RANKL은 골모세포 표면에 존재하며 염증과정에 영향을 받게 되며¹⁸⁻¹⁹⁾, RANKL은 골모세포 뿐 아니라 섬유모세포, T 임파구, B 임파구와 같은 다양한 세포에 의해 발현된다²⁰⁾. OPG는 골모세포가 분비하는 표면 단백질이며 RANK와 경쟁적으로 반응하여 RANKL이 전파골세포와 결합하지 못하게 차단함으로써 파골세포의 분화를 억제하는 경쟁적 수용체이다¹⁴⁻¹⁷⁾.

정상의 생리적 환경에서는 골 흡수와 골 형성이 균형을 이루고 있다¹⁹⁾. 골 흡수와 형성은 RANKL과 이의 경쟁적 수용체인 OPG의 상대적 농도에 의해서 조절된다. RANKL의 발현이 OPG보다 우세하다면 RANKL이 파골세포 전구체의 RANK에 부착하게 되어 파골세포의 활성이 증가하고 결과적

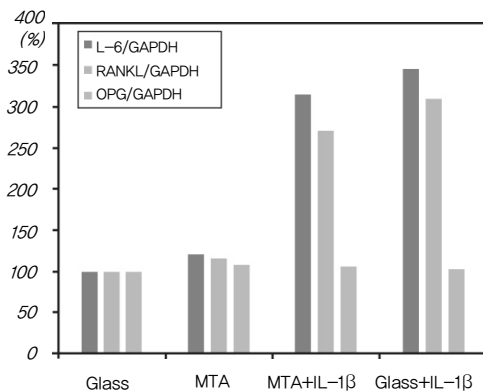
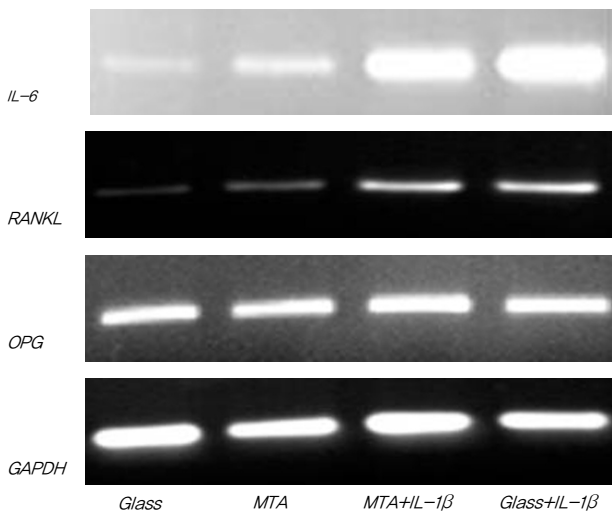


Figure 3. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RTc-PCR) analysis of IL-6, RANKL and OPG mRNA expression related to GAPDH means in rat calvarial cells.

으로 골 흡수가 발생된다. 만일 OPG 발현이 RANKL 발현보다 상대적으로 높다면 OPG는 RANKL이 RANK에 부착하는 것을 방해하여 파골세포의 형성을 억제하고 이전에 존재하던 파골세포의 고사를 유발한다¹⁹⁾. 즉, 골 형성은 RANKL/OPG 비율이 감소하는 경우에 발생하며, RANKL/OPG 비율이 증가하는 경우에는 병적인 골 흡수가 나타난다.

염증 과정 동안 전 염증성 사이토카인인 IL-1 β , -6, -11, -17 그리고 tumor necrosis factor-(TNF- α)는 골아세포/간질세포의 OPG 생성을 감소시키며 RANKL을 증가시키게 되어 파골세포의 분화를 유도하게 된다¹⁴⁾. IL-6는 전 염증성 매개체인 IL-1 β , TNF- α 에 노출되었을 때 증가하게 된다. IL-6은 다기능성의 사이토카인으로 치주병인 세균에 의한 감염의 감수성을 결정하는 데 중요하며, 숙주 방어에 중요한 역할을 한다²¹⁾. 또한 IL-6는 염증성 감염원에 대한 염증반응에 중요한 역할을 하며 특히 그람 음성 세균에 의한 감염의 경우 더욱 그러하다²²⁾. 이번 연구에서는 치주질환이 잔존하는 상태를 in vitro에서 재현하기 위해 ELISA, RT-PCR을 통한 MTA에 대한 IL-1 β 첨가 백서 두개관 세포에서의 여러 사이토카인의 반응을 평가하였다. ELISA 분석에서 자극 1일째에 glass를 제외한 모든 군에서 백서 두개관 세포는 더 높은 IL-6 발현을 보였으며 glass에 비해 MTA, MTA+IL-1 β , glass+IL-1 β 군에서 더 높은 IL-6의 발현을 보였다. 또한 IL-1 β 를 첨가하지 않은 군에 비해 IL-1 β 를 첨가한 군에서 백서 두개관 세포는 더 높은 IL-6의 발현을 보였다. 3일째에는 glass를 제외한 모든 군에서 1일 후에 비해 IL-6 발현이 감소하는 경향을 보였으며, glass에 비해 MTA, MTA+IL-1, glass+IL-1 β 군에서 더 높은 IL-6 발현을 보였다. 또한 glass+IL-1 β 군과 MTA+IL-1 β 군 사이에서는 IL-6의 발현의 유의한 차이가 나타나지 않았다. 따라서 MTA는 IL-1 β 이 존재하는 환경에서 IL-6의 발현을 유의하게 더 증가시키지는 않는다는 것으로 보인다.

RT-PCR을 통한 사이토카인 분석에서 백서 두개관 세포에서의 IL-6 발현을 살펴보면, glass 군과 MTA 군이 유사하게 나타났고, glass+IL-1 β 군과 MTA에 IL-1 β 를 첨가한 군이 유사하게 나타났었다. IL-1 β 를 첨가한 군은 그렇지 않은 군에 비해 glass와 MTA 모두 IL-6 유전자 발현이 약 세 배 정도 높게 나타났었다. RANKL 유전자 발현 또한 glass 군과 MTA 군이 유사하게 나타났고, glass에 IL-1 β 첨가한 군과 MTA에 IL-1 β 를 첨가한 군이 서로 유사하게 나타났었다.

IL-1 β 를 첨가한 군은 그렇지 않은 군에 비해 RANKL 발현이 약 세 배 정도 높게 나타났다. OPG 발현은 네 군 모두에서 유사한 값을 보였다. IL-6, RANKL의 유전자 발현에서 MTA에 IL-1 β 를 첨가한 군이 glass에 IL-1 β 를 첨가한 군보다 약간 더 낮게 나타나는 경향을 보였는데, 이는 MTA의 세포 독성 실험 결과를 고려해 보았을 때 MTA 군의 백서 태자 두개관 세포의 활성이 조금 더 낮았기 때문으로 추측할 수 있으나 이 부분에 대한 더 많은 연구가 필요하다.

이상의 결과, MTA는 인접 세포의 증식을 방해하지 않으며 파골세포의 분화를 유도하는 사이토카인을 증가시키지 않아 생체 적합성이 뛰어난 물질로 여겨지며 여러 영역에서 사용될 수 있을 것으로 생각된다. 즉, 이번 실험의 결과에서 MTA는 주변 세포의 증식을 방해하지 않았으며 염증이 잔존되어 있는 환경에서도 주변 세포의 염증성 사이토카인의 발현을 자극하지 않아 조직과 접촉하는 부위에도 적용이 가능하리라 생각되나 추가적인 연구가 더 필요하다.

참고문헌

1. Torabinejad M, Hong CU, McDonald F, Pitt Ford TR. Physical and chemical properties of a new root-end filling material. J Endod 1995;21:349-353.
2. Koh ET, McDonald F, Pitt Ford TR, Torabinejad M. Cellular response to Mineral Trioxide Aggregate. J Endod 1998;24:543-547.
3. Robert HW, Toth JM, Berzins DW, Charlton DG. Mineral trioxide aggregate material use in endodontic treatment: a review of the literature. Dent Mater 2008;24:149-164.
4. Zhu Q, Haglund R, Safavi KE, Spangberg LSW. Adhesion of human osteoblasts on root-end filling materials. J Endod 2000;26:404-406.
5. Torabinejad M, Hong CU, Pitt Ford TR, Kettering JD. Cytotoxicity of four root-end filling materials. J Endod 1995;21:489-492.
6. Pelliccioni GA, Ciapetti G, Cenni E, Granchi D, Nanni M, Pagani S, Giunti A. Evaluation of osteoblast-like cell response to ProRoot MTA cement. J Mat Sci 2004;15:167-173.
7. Yavuzylmaz E, Yamalik N, Bulut S, Ozen S, Ersoy F, Saatci U. The gingival crevicular fluid interleukin-1beta

- and tumor necrosis factor- α levels in patients with rapidly progressive periodontitis. *Aust Dent J* 1995;40:46-49.
8. Tsai CC, Hou YP, Chen CC. Levels of interleukin-1 β and interleukin-8 in gingival crevicular fluid in adult periodontitis. *J Periodontol* 1995;66:852-859.
 9. Ishihara Y, Kuroyagani T, Shirozi N, Yamagishi E, Ohguchi M, Koide M, Ueda N, Amano K, Noguchi T. Gingival crevicular interleukin-1 and interleukin-1 receptor antagonist levels in periodontally healthy and diseased sites. *J Periodont Res* 1997;32:524-529.
 10. Giannopoulou C, Kama JJ, Mombelli A. Effect of inflammation, smoking, and stress on gingival, crevicular fluid cytokine level. *Journal of Clinical Periodontology* 2003; 30:145-153.
 11. Barrieshi-Nusair K, Qudeimat MA. A prospective clinical study of mineral trioxide aggregate for partial pulpotomy in cariously exposed permanent teeth. *J Endod* 2006;32:731-735.
 12. Cory AH, Barltrop JA, Cory JG. Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. *Cancer Commun* 1991;3:207-212.
 13. Nakayama A, Ogiso B, Tanabe N, Takeichi O, Matsuzaka K, Inoue T. Behaviour of bone marrow osteoblasts-like cells on mineral trioxide aggregate: morphology and expression of type 1 collagen and bone-related protein mRNAs. *Int Endodont J* 2005;38:203-210.
 14. Nakashima T, Kobayashi Y, Yamasaki S, Kawakami A, Eguchi K, Sasaki H, Sakai H. Protein expression and functional difference of membrane-bound and soluble receptor activator of NF- κ B ligand : Modulation of the expression by osteotropic factors and cytokines. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;275:768-775.
 15. Hofbauer LC, Heufelder AE. Role of receptor activator of nuclear factor- κ B ligand and osteoprotegerin in bone cell biology. *J Mol Med* 2001;79:243-253.
 16. Siggelkow H, Eidner T, Lehmann G, Viereck V, Raddatz D, Munzel U, Hein G, Hufner M. Cytokine, osteoprotegerin, and RANKL in vitro and histomorphometric indices of bone turnover in patients with different bone disease. *J Bone Miner Res* 2003;18:529-538.
 17. Kobayashi N, Kadono Y, Naito A, Matsumoto K, Yamamoto T, Tanaka S, Inoue J. Segregation of TRAF6-mediated signaling pathways clarifies its role in osteoclastogenesis. *EMBO J* 2001;20:1271-1280.
 18. Lerner UH. Inflammation-induced bone remodeling in periodontal disease and the influence of post menopausal osteoporosis. *J Dent Res* 2006;85:596-607.
 19. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 2003;423:337-342.
 20. Cochran DL. Inflammation and bone loss in periodontal disease. *J Periodontol*. 2008;79(Suppl):1569-1576.
 21. Ishihara K, Hirano T. IL-6 in autoimmune disease and chronic inflammatory proliferative disease. *Cytokine Growth Factor Rev* 2002;13:357-368.
 22. Dalrymple SA, Slattery R, Aud DM, Krishna M, Lucan LA, Murray R. Interleukin-6 is required for a protective immune response to systemic *Escherichia coli* infection. *Infect Immun* 1996;64:3231-3235.