

골막기원세포의 조골세포로의 분화과정에서 염증성 사이토카인의 효과

박봉욱^{1,2} · 최문정^{1,2} · 하영술³ · 조희영³ · 김덕룡^{2,4} · 김욱규⁵ · 강희제⁶ · 김종렬⁶ · 변준호^{1,2*}¹경상대학교 의학전문대학원 구강악안면외과학교실, ²경상대학교 건강과학연구원, 의생명과학사업단, Brain Korea 21 (BK21),³경상대학교병원 임상의학연구소, ⁴경상대학교 의학전문대학원 생화학교실,⁵부산대학교 치의학전문대학원 구강악안면외과, ⁶온중합병원 턱얼굴외과**Abstract** (J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg 2010;36:341-5)

Evaluation of osteogenic activity of periosteal-derived cells treated with inflammatory cytokines

Bong-Wook Park^{1,2}, Mun-Jeoung Choi^{1,2}, Young-Sool Hah³, Hee-Young Cho³, Deok Ryong Kim^{2,4},
Uk-Kyu Kim⁵, Hee-Jea Kang⁶, Jong-Ryoul Kim⁶, June-Ho Byun^{1,2*}¹Department of Oral and Maxillofacial Surgery, School of Medicine and Institute of Health Sciences, Gyeongsang National University,²Biomedical center, Brain Korea 21 (BK21), Gyeongsang National University, ³Clinical Research Institute, Gyeongsang National University Hospital, ⁴Department of Biochemistry, School of Medicine and Institute of Health Sciences, Gyeongsang National University, Jinju, Korea, ⁵Department of Oral and Maxillofacial Surgery, School of Dentistry, Pusan National University, Yangsan, Korea⁶Maxillofacial Center, Onhospital, Busan, Korea**Introduction:** Skeletal homeostasis is normally maintained by the stability between bone formation by osteoblasts and bone resorption by osteoclasts. However, the correlation between the inflammatory reaction and osteoblastic differentiation of cultured osteoprogenitor cells has not been fully investigated. This study examined the effects of inflammatory cytokines on the osteoblastic differentiation of cultured human periosteal-derived cells.**Materials and Methods:** Periosteal-derived cells were obtained from the mandibular periosteum and introduced into the cell culture. After passage 3, the periosteal-derived cells were further cultured in an osteogenic induction Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) medium containing dexamethasone, ascorbic acid, and β -glycerophosphate. In this culture medium, tumor necrosis factor (TNF)- α with different concentrations (0.1, 1, and 10 ng/mL) or interleukin (IL)-1 β with different concentrations (0.01, 0.1, and 1 ng/mL) were added.**Results:** Both TNF- α and IL-1 β stimulated alkaline phosphatase (ALP) expression in the periosteal-derived cells. TNF- α and IL-1 β increased the level of ALP expression in a dose-dependent manner. Both TNF- α and IL-1 β also increased the level of alizarin red S staining in a dose-dependent manner during osteoblastic differentiation of cultured human periosteal-derived cells.**Conclusion:** These results suggest that inflammatory cytokines TNF- α and IL-1 β can stimulate the osteoblastic activity of cultured human periosteal-derived cells.**Key words:** Periosteal-derived cells, Inflammatory cytokine, Tumor necrosis factor- α (TNF- α), Interleukin-1 β (IL-1 β)

[paper submitted 2010. 5. 31 / revised 2010. 9. 30 / accepted 2010. 10. 13]

I. 서 론

장기적으로 나타나는 염증질환은 골과 광물질 대사에 직

접적 또는 간접적으로 영향을 미친다. 특히, 류마티스관절염과 같은 류마티스질환은 직접적으로 골흡수를 야기시켜 골생성과 골흡수의 균형을 변화시킨다. 이러한 염증질환에서 tumor necrosis factor (TNF)- α 와 interleukin (IL)-1 β 가 가장 주요한 역할을 한다고 알려져 있다. TNF- α 는 전신염증성 병변에 관여하는 사이토카인으로 주로 급성기 반응을 일으키며, 이러한 역할은 면역세포를 조절함으로써 이루어진다. IL-1 β 또한 염증성 반응에서 중요한 역할을 하는 사이토카인으로 중추신경계(central nerve system)에서 IL-1 β 에 의한 사이클로옥시제네이스(cyclooxygenase)-2의 유도가 염증성 동통의 원인이 된다^{1,4}.

변준호

660-702 경상남도 진주시 칠암동 90번지
경상대학교 의학전문대학원 구강악안면외과학교실

June-Ho Byun

Department of Oral and Maxillofacial Surgery, School of Medicine and Institute of Health Sciences, Biomedical center, Brain Korea 21 (BK21), Gyeongsang National University

90 Chilam-dong, Jinju-city, Gyeongsangnam-do, 660-702, Korea

Tel: +82-55-750-8258 Fax: +82-55-761-7024

E-mail: surbyun@gsnu.ac.kr

* This work was supported by the National Research Foundation of Korea (NRF) grant funded by the Korea government (MEST, 2009-0065482).

골대사에 관한 여러 선행연구들을 통하여 TNF- α 와 IL-1 β 의 역할이 지속적으로 보고되고 있다. Walsh 등⁵은 TNF- α 와 IL-1 β 의 작용을 저해하는 치료에 의하여 류마티스관절염에서 나타날 수 있는 골소실이 감소한다고 하였다. TNF- α 와 IL-1 β 의 작용을 저해할 경우, 염증성 병변과 관련이 없는 질환에서도 골소실을 예방할 수 있다고도 보고되고 있다. 난소를 절제한 쥐를 이용한 동물실험에서 Ammann 등⁶은 TNF- α 의 저해제인 soluble tumor necrosis factor receptor (TNFR)-immunoglobulin G 3 (IgG3) fusion protein을 통하여 TNF- α 의 역할을 억제할 경우, 골소실이 일어나지 않았다고 하였다. Lorenzo 등⁷도 난소를 절제한 쥐를 이용한 동물실험에서 IL-1 수용체를 저해하여 IL-1의 역할을 억제할 경우, 상완골 골소실이 일어나지 않았다고 보고하였다. TNF- α 와 IL-1 β 가 골흡수를 야기하는 기전은 골흡수 과정을 직접적으로 활성화시켜 골흡수를 일으킨다는 것과 골전구세포의 조골세포로의 분화와 골생성을 억제하여 간접적으로 골흡수를 야기한다는 점 등이 알려져 있다. 골전구세포의 조골세포로의 분화 초기 단계에 중요한 역할을 하는 전사인자로 조골세포의 초기 특이 표지자로 알려져 있으며 core-binding factor $\alpha 1$ (Cbf $\alpha 1$)이라고도 불리우는 Runx2와 관련하여 TNF- α 는 이 Runx2의 발현을 감소시킨다고 알려져 있다⁸.

골대사에 대한 이러한 염증성 사이토카인의 역할과 상반되는 결과로 염증성 사이토카인이 골형성을 유도한다는 보고도 최근에 대두되고 있다. Doherty 등⁹은 만성 혈관성 염증질환인 죽상동맥경화증(atherosclerosis)에서 염증성 사이토카인이 혈관벽에 이소성 골침착을 야기한다고 보고하였다. 류마티스관절염 등과 같은 염증질환에 흔히 이용하는 텍사메타손이 치료 약리학적 용량으로 적용될 경우, 골조직에는 골다공증 또는 무혈관성 괴사를 나타낸다고 알려져 있으나, 세포배양에서 생리학적 용량으로 적용될 경우, 골전구세포의 조골세포로의 분화과정을 촉진시킨다고 알려진 것과 같이 어떠한 약물이나 단백질은 작용하는 상황에 따라 상반된 결과를 도출할 수 있다^{10,11}.

골막기원세포의 조골세포로의 분화과정에서 TNF- α 와 IL-1 β 가 적용되었을 경우, 그 효과에 대해서는 알려진 것이 거의 없는 관계로 본 연구에서는 TNF- α 와 IL-1 β 가 골막기원세포의 조골세포로의 분화과정에 미치는 효과를 연구하고자 한다.

II. 연구대상 및 방법

1. 골막기원세포의 추출 및 배양

골막기원세포를 추출하고 증식하는 과정은 이전 연구방법에 의하여 실시하였다^{12,13}. 경상대학교 병원의 윤리위원회를 따르고 환자 동의하에 매복된 하악 제3대구치의 발치 과정에서 약 5×20 mm의 골막을 채취하여 여러 조각으로

자른다. 이를 100-mm culture dish에 넣은 후 10% fetal bovine serum, 100 IU/mL penicillin, 그리고 100 μ g/mL streptomycin이 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 배지에서 37°C, 5% CO₂ 배양기를 통하여 배양하였다. 약 90%의 세포군집(confluence)을 나타내면 증식된 세포들을 0.02% 트립신과 0.02% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)로 5분간 트립신 처리하고 1,500 rpm에서 원심 분리하여 계대배양을 실시하였다.

2. 골막기원세포의 조골세포로의 분화 및 염증성 사이토카인의 적용

Passage 3을 거친 후, 골막기원세포들은 3×10⁴ cells/well의 밀도로 24-well plate에 주입하고 10% fetal calf serum, 50 μ g/mL L-ascorbic acid 2-phosphate, 10 mM β -glycerophosphate, 그리고 10 nM dexamethasone이 포함된 DMEM 배지로 구성된 골형성 유도 배지에서 0.1, 1, 그리고 10 ng/mL의 TNF- α 를 처리하거나 0.01, 0.1, 그리고 1 ng/mL의 IL-1 β 를 처리하여 2주 동안 배양하였다.

3. 알칼리성 인산분해효소의 조직화학적 검사(histochemical detection of alkaline phosphatase (ALP) activity)

인산염 식염수로 세포층을 세척한 후, 3.7% 포르말데히드와 90% 에탄올로 2분간 고정하고 10분간 Tris buffer saline (TBS)에 세척하였다. 이후 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate와 nitroblue tetrazolium (BCIP/NBT, Amresco, Ohio, USA) 알칼리성 인산분해효소 기질을 이용하여 실온에서 10분간 염색하여 알칼리성 인산분해효소의 조직화학적 검사를 시행하였다.

4. Alizarin red S 염색 및 정량화

배양된 세포를 인산염 식염수로 세척하고 4% 포르말데히드로 10분간 고정하였다. 2% alizarin red S 용액으로 5분간 부드럽게 진탕한 후 탈염수로 여러 번 세척하여 여분의 염색액을 제거하고 염색양상을 관찰하였다. 염색된 alizarin red를 정량화하기 위하여 스캐너를 사용하여 염색된 24-well plate의 이미지를 얻은 후, 100 mM cetylpyridinium chloride (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, USA) 용액을 첨가하여 상온에서 2시간 반응시켜 염색된 alizarin red를 용해시켜 추출하였다. 용해된 alizarin red의 농도는 multiplate reader 분광광도계(Molecular Devices, Menlo Park, CA, USA)를 사용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하여 표시하였다.

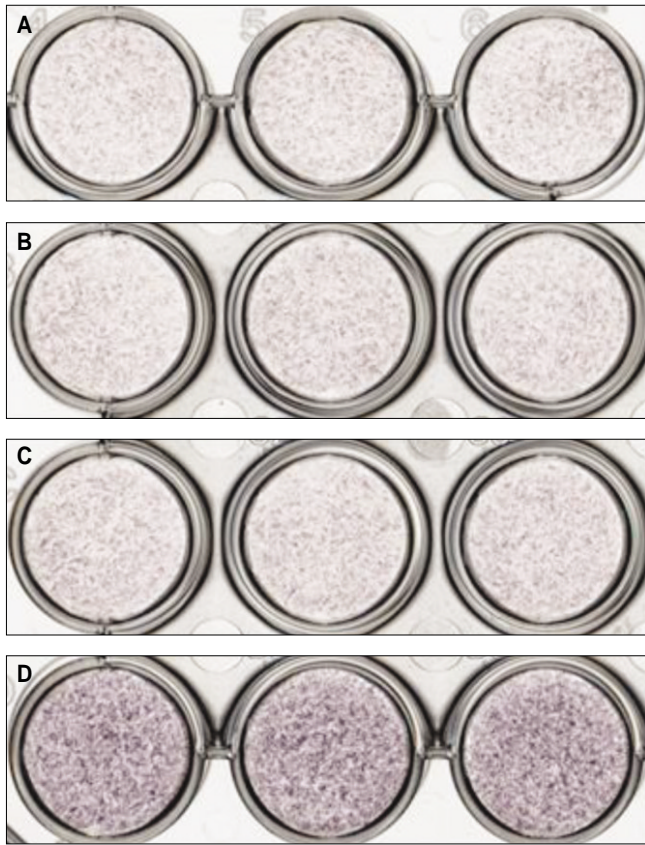


Fig. 1. ALP expression in the periosteal-derived cells treated with TNF- α at 3 days of culture. A. No treatment of TNF- α . B. Treatment of 0.1 ng/mL TNF- α . C. Treatment of 1 ng/mL TNF- α . D. Treatment of 10 ng/mL TNF- α . (ALP: alkaline phosphatase, TNF: tumor necrosis factor)

III. 결 과

1. 알칼리성 인산분해효소의 발현

일반적으로 알칼리성 인산분해효소는 조골세포의 분화 초기에 그 활성이 뚜렷하여 초기 조골세포의 특이 표지자로 알려져 있어, 0.1, 1, 그리고 10 ng/mL의 TNF- α 를 처리하거나 0.01, 0.1, 그리고 1 ng/mL의 IL-1 β 를 처리한 후, 골막기원세포에서 발현되는 알칼리성 인산분해효소의 조직화학적 평가는 배양 3일째에 시행하였다. 알칼리성 인산분해효소의 발현은 TNF- α 나 IL-1 β 를 처리하였을 경우 증가되었고 그 양상은 농도의존성 경향을 나타내었으며 특히 IL-1 β 를 처리하였을 경우 알칼리성 인산분해효소의 발현이 뚜렷하게 관찰되었다.(Figs. 1, 2)

2. 골기질 형성평가

Alizarin red S 염색은 석회화된 골기질을 평가하는데 가



Fig. 2. ALP expression in the periosteal-derived cells treated with IL-1 β at 3 days of culture. A. Treatment of 0.01 ng/mL IL-1 β . B. Treatment of 0.1 ng/mL IL-1 β . C. Treatment of 1 ng/mL IL-1 β . (ALP: alkaline phosphatase, IL: interleukin)

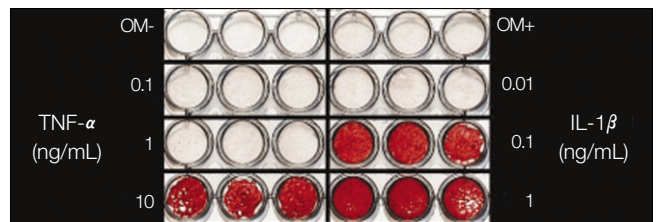


Fig. 3. Alizarin red S staining for mineralized nodule formation in periosteal-derived cells treated with 0.1, 1, and 10 ng/mL TNF- α or 0.01, 0.1, and 1 ng/mL IL-1 β . (TNF: tumor necrosis factor, IL: interleukin, OM-: non-osteogenic induction medium, OM+: osteogenic induction medium)

장 많이 사용하는 방법 중의 하나이며 석회화된 골기질 형성 정도는 성숙한 조골세포의 표지자로 알려져 있으므로 0.1, 1, 그리고 10 ng/mL의 TNF- α 를 처리하거나 0.01, 0.1, 그리고 1 ng/mL의 IL-1 β 를 처리한 후, 골막기원세포에서 발현되는 alizarin red S 염색양상은 배양 14일째에 평가하였다. Alizarin red S 양성 골기질은 TNF- α 나 IL-1 β 를 처리하였을 경우 뚜렷하게 관찰되었다. TNF- α 의 경우는 10 ng/mL의 TNF- α 를 처리하였을 경우, alizarin red S 염색양상이 뚜렷하게 관찰되었으며, IL-1 β 의 경우는 0.1 그리고 1 ng/mL의 IL-1 β 를 처리하였을 경우, 그 염색양상이 뚜렷하였다. 특히 1 ng/mL의 IL-1 β 를 처리하였을 경우가 가장 뚜렷한 alizarin red S 양성 골기질을 나타내었다.(Figs. 3, 4)

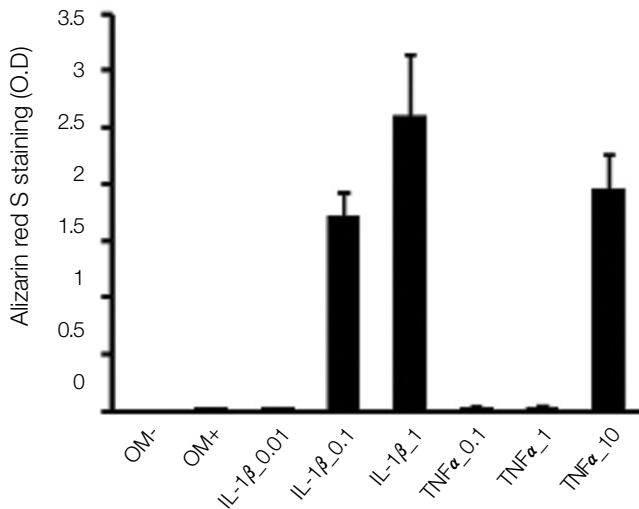


Fig. 4. Quantification of alizarin red S in periosteal-derived cells treated with 0.1, 1, and 10 ng/mL TNF- α or 0.01, 0.1, and 1 ng/mL IL-1 β . (TNF: tumor necrosis factor, IL: interleukin, OM-: non-osteogenic induction medium, OM+: osteogenic induction medium)

IV. 총괄 및 고찰

염증성 병변이 존재할 경우, 일반적으로는 골대사에서 골흡수를 야기시키는 것으로 알려져 있으나 류마티스질환에서는 최근에 상반된 결과들이 보고되고 있다. 류마티스관절염에서는 골흡수를 야기하는 반면, 척추관절염(spondyloarthropathies)과 같은 류마티스질환에서는 병변 부위에서 골증가를 나타낸다고도 보고되고 있는 것이다⁴. 이러한 점을 고려하면 염증성 사이토카인이 상황에 따라 다른 결과를 나타낼 수도 있음을 시사한다. 그리하여 본 연구에서는 골막기원세포를 이용하여 골전구세포의 조골세포로의 분화과정에서 대표적 염증성 사이토카인인 TNF- α 와 IL-1 β 를 적용하였을 경우, 조골세포로의 분화과정에 미치는 영향을 비교적 간단한 실험으로 살펴보았다.

TNF- α 와 IL-1 β 는 대표적인 염증성 사이토카인으로 동일하지는 않지만 유사한 신호체계를 통하여 그 역할을 수행한다. TNF- α 는 TNF로도 불리우고 류마티스관절염 등에서 활성화된 T 세포뿐 아니라, 병변에 인접한 대식세포나 운활막세포(synoviocytes) 등에서 주로 분비되며 이러한 세포들에서 파골세포의 분화에 직접적으로 영향을 미치는 receptor activator of nuclear factor κ B (RANK)의 발현을 촉진시켜 골흡수를 야기한다고 한다. 또한 TNF는 관절병변

과 인접한 골조직에서는 조골세포로의 분화나 조골세포 자체의 기능을 저해하는 것으로 알려져 있다. 생체 외 실험에서는 TNF가 알칼리성 인산분해효소와 제1형 콜라겐 형성을 억제하며 osteocalcin mRNA의 발현을 저해한다고 알려져 있다¹⁵⁻¹⁸. IL-1은 상과(superfamily)로 IL-1 α , IL-1 β , 및 IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra)로 이루어져 있고 IL-1 α 와 IL-1 β 가 면역반응 등에 관여하는 사이토카인이며 IL-1Ra는 IL-1 α 및 IL-1 β 가 수용체에 결합하는 것을 방지하여 면역반응을 억제하는 역할을 한다. 이 중 IL-1 β 는 대식세포, 섬유아세포 및 수지상세포(dendritic cells) 등에서 발현되어 염증성 반응뿐 아니라, 세포증식, 세포분화 및 세포사멸과 같이 관련된 세포에서 다양한 기능에 관여한다¹⁹⁻²¹.

골전구세포인 골막기원세포에서 조골세포로의 분화과정에서 이러한 사이토카인의 효과를 관찰한 본 연구에서는 TNF- α 와 IL-1 β 모두 알칼리성 인산분해효소의 활성을 증가시키고 alizarin red S 양성 골기질 형성을 촉진시키는 것으로 나타났다. 알칼리성 인산분해효소는 조골세포에서 형성되는 외효소(ectoenzyme)로, 무기성 피로인산염(inorganic pyrophosphate)의 분해에 관여하여 무기질 침착을 위한 인산염 또는 무기성 피로인산염의 국소적 증가를 이루게 하는 역할을 하므로 일반적으로 조골세포의 분화 초기에 그 활성이 뚜렷하여 초기 조골세포의 특이 표지자로 알려져 있어 본 연구에서는 배양 3일째에 이의 발현을 관찰하였다. 알칼리성 인산분해효소의 발현과 관련하여서는 특히 IL-1 β 를 처리하였을 경우 그 발현이 뚜렷하게 증가됨을 관찰하였다. 석회화된 골기질 형성정도를 통하여 성숙한 조골세포에 대한 평가를 시행하는데 가장 많이 사용하는 방법은 von kossa 염색이나 alizarin red S 염색방법이다. 본 연구에서는 alizarin red S 염색을 통한 석회화된 골기질 형성정도를 배양 14일째에 시행하였다. Alizarin red S 염색을 통해 나타나는 석회화된 골기질 형성정도가 조골세포 관련 배양에서 골형성 정도의 최종 잠재력을 평가하는데 이용할 수 있지만 그 정도에 대하여 정량화적 평가방법이 동원된다면 더 정확한 평가방법이 될 수 있으므로 본 연구에서는 alizarin red S 정량화도 시행하여 골막기원세포의 조골세포로의 분화과정에 TNF- α 와 IL-1 β 를 적용할 경우, 골기질 형성이 촉진된다는 것을 관찰하였다. 다만, TNF- α 의 경우는 10 ng/mL의 TNF- α 를 처리하였을 경우가, IL-1 β 의 경우는 0.1 그리고 1 ng/mL의 IL-1 β 를 처리하였을 경우, alizarin red S 양성 골기질의 뚜렷한 증가를 확인하였다.

본 연구는 비교적 간단한 실험만을 시행한 것이나 골막기원세포라는 골전구세포의 조골세포로의 분화과정에서 염증성 사이토카인의 긍정적 효과를 확인할 수 있었다. 염증성 사이토카인을 골조직공학에서 적절하게 활용한다면 이는 골전구세포의 조골세포로의 분화에 기여하는 또 다른 주요한 인자가 될 수 있을 것으로 생각한다. 본 연구와 관련하여 이의 기전 및 여러 가지 다양한 사이토카인의 적용에 대한 추가적인 연구가 동반되어야 할 것이다.

V. 결 론

경상대학교 병원의 윤리위원회를 따르고 환자 동의하에 매복된 하악 제3대구치의 발치과정에서 5×20 mm의 골막을 채취하여 1차 배양 및 계대배양을 실시하고 passage 3을 거친 골막기원세포에 0.1, 1, 그리고 10 ng/mL의 TNF- α 를 처리하거나 0.01, 0.1, 그리고 1 ng/mL의 IL-1 β 를 처리하여 골형성 유도 배지에서 14일 동안 배양한 후, 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 알칼리성 인산분해효소의 발현은 TNF- α 나 IL-1 β 를 처리하였을 경우 그 발현정도가 증가함을 관찰하였고 그 양상은 농도의존성 경향을 나타내었으며, 특히 IL-1 β 를 처리하였을 경우 알칼리성 인산분해효소의 발현이 뚜렷하게 관찰되었다.
2. Alizarin red S 양성 골기질은 TNF- α 나 IL-1 β 를 처리하였을 경우 뚜렷하게 관찰되었는데 TNF- α 의 경우는 10 ng/mL의 TNF- α 를 처리하였을 경우가, IL-1 β 의 경우는 0.1 그리고 1 ng/mL의 IL-1 β 를 처리하였을 경우, 그 염색양상이 뚜렷하였다. 특히 1 ng/mL의 IL-1 β 를 처리하였을 경우가 가장 뚜렷한 alizarin red S 양성 골기질을 나타내었다.

References

1. Saldenbergh-Kermanac'h N, Corrado A, Lemeiter D, deVernejoul MC, Boissier MC, Cohen-Solal ME. TNF-alpha antibodies and osteoprotegerin decrease systemic bone loss associated with inflammation through distinct mechanisms in collagen-induced arthritis. *Bone* 2004;35:1200-7.
2. Yamamoto K, Yoshino S, Shue G, Nagashima M. Inhibitory effect of bone resorption and inflammation with etidronate therapy in patients with rheumatoid arthritis for 3 years and *in vitro* assay in arthritis models. *Rheumatol Int* 2006;26:627-32.
3. Suzuki Y, Aoki K, Saito H, Umeda M, Nitta H, Baron R, *et al.* A tumor necrosis factor-alpha antagonist inhibits inflammatory bone resorption induced by Porphyromonas gingivalis infection in mice. *J Periodontol Res* 2006;41:81-91.
4. Benatti BB, Silvério KG, Casati MZ, Sallum EA, Nociti FH Jr. Inflammatory and bone-related genes are modulated by aging in human periodontal ligament cells. *Cytokine* 2009;46:176-81.
5. Walsh NC, Crotti TN, Goldring SR, Gravallesse EM. Rheumatic diseases: the effects of inflammation on bone. *Immunol Rev* 2005;208:228-51.
6. Ammann P, Rizzoli R, Bonjour JP, Bourrin S, Meyer JM, Vassalli P, *et al.* Transgenic mice expressing soluble tumor necrosis factor-receptor are protected against bone loss caused by estrogen deficiency. *J Clin Invest* 1997;99:1699-703.
7. Lorenzo JA, Naprta A, Rao Y, Alander C, Glaccum M, Widmer M, *et al.* Mice lacking the type I interleukin-1 receptor do not lose bone mass after ovariectomy. *Endocrinology* 1998;139:3022-5.
8. Gilbert L, He X, Farmer P, Rubin J, Drissi H, van Wijnen AJ, *et al.* Expression of the osteoblast differentiation factor RUNX2 (Cbfa1/AML3/Pebp2alpha A) is inhibited by tumor necrosis factor-alpha. *J Biol Chem* 2002;277:2695-701.
9. Doherty TM, Asotra K, Fitzpatrick LA, Qiao JH, Wilkin DJ, Detrano RC, *et al.* Calcification in atherosclerosis: bone biology and chronic inflammation at the arterial crossroads. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:11201-6.
10. Weinstein RS, Nicholas RW, Manolagas SC. Apoptosis of osteocytes in glucocorticoid-induced osteonecrosis of the hip. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:2907-12.
11. Mikami Y, Omoteyama K, Kato S, Takagi M. Inductive effects of dexamethasone on the mineralization and the osteoblastic gene expressions in mature osteoblast-like ROS17/2.8 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;362:368-73.
12. Park BW, Byun JH, Lee SG, Hah YS, Kim DR, Cho YC, *et al.* Evaluation of osteogenic activity and mineralization of cultured human periosteal-derived cells. *J Korean Assoc Maxillofac Plast Reconstr Surg* 2006;28:511-9.
13. Park BW, Byun JH, Ryu YM, Hah YS, Kim DR, Cho YC, *et al.* Correlation between vascular endothelial growth factor signaling and mineralization during osteoblastic differentiation of cultured human periosteal-derived cells. *J Korean Assoc Maxillofac Plast Reconstr Surg* 2007;29:197-205.
14. Walsh NC, Gravallesse EM. Bone remodeling in rheumatic disease: a question of balance. *Immunol Rev* 2010;233:301-12.
15. Li YP, Stashenko P. Proinflammatory cytokines tumor necrosis factor-alpha and IL-6, but not IL-1, down-regulate the osteocalcin gene promoter. *J Immunol* 1992;148:788-94.
16. Panagakos FS, Hinojosa LP, Kumar S. Formation and mineralization of extracellular matrix secreted by an immortal human osteoblastic cell line: modulation by tumor necrosis factor-alpha. *Inflammation* 1994;18:267-84.
17. Nanes MS. Tumor necrosis factor-alpha: molecular and cellular mechanisms in skeletal pathology. *Gene* 2003;321:1-15.
18. Segal B, Rhodus NL, Patel K. Tumor necrosis factor (TNF) inhibitor therapy for rheumatoid arthritis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008;106:778-87.
19. Ji H, Pettit A, Ohmura K, Ortiz-Lopez A, Duchatelle V, Degott C, *et al.* Critical roles for interleukin 1 and tumor necrosis factor alpha in antibody-induced arthritis. *J Exp Med* 2002;196:77-85.
20. Wei S, Kitaura H, Zhou P, Ross FP, Teitelbaum SL. IL-1 mediates TNF-induced osteoclastogenesis. *J Clin Invest* 2005;115:282-90.
21. Zwerina J, Redlich K, Polzer K, Joosten L, Krönke G, Distler J. TNF-induced structural joint damage is mediated by IL-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:11742-7.