

5-Lipoxygenase 대사산물들이 파골세포 생성에 미치는 영향

서울대학교 치과대학 치과약리학교실 김효진, 백정화, 김관식

ABSTRACT

Effects of 5-Lipoxygenase Metabolites on the Osteoclast Formation

Department of Pharmacology and Dental Therapeutics, College of
Dentistry, Seoul National University

Hyo-Jin Kim, D.D.S., M.S., Jeong-Hwa Baek, D.D.S., M.S., Ph.D.,
Gwan-Shik Kim, D.D.S., M.S., Ph.D.

Since 5-lipoxygenase metabolites production is known to be enhanced in inflamed and malignant tissues which are associated with local bone destruction, it is likely that 5-lipoxygenase metabolites play some roles in bone destruction. Therefore we performed this study to find out the effect of 5-lipoxygenase metabolites on the osteoclast formation. Coculture of neonatal mouse calvarial osteoblastic cells and mouse bone marrow cells was established and cultured for 7 days. After the culture, staining for tartrate-resistant acid phosphatase, a marker enzyme of osteoclast, was executed and the number of tartrate-resistant acid phosphatase positive multinucleated cells was counted. 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and tumor necrosis factor- α significantly stimulated the osteoclast formation. When 5-lipoxygenase pathway was blocked by caffeic acid, 1,25-dihydroxyvitamin D₃- or tumor necrosis factor- α -induced osteoclast formation was significantly inhibited. Furthermore, when both cyclooxygenase and 5-lipoxygenase pathway were blocked by combined treatment of indomethacin and caffeic acid, 1,25-dihydroxyvitamin D₃- or tumor necrosis factor- α -induced osteoclast formation was almost completely inhibited. Though phospholipase A₂ or mellitin failed to induce osteoclast formation by themselves, they significantly enhanced 1,25-dihydroxyvitamin D₃-induced osteoclast formation. And caffeic acid partly inhibited the osteoclast formation induced by combined treatment of phospholipase A₂ and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ or mellitin and 1,25-dihydroxyvitamin D₃. Taken together, 5-lipoxygenase metabolites seem to have certain role(s) in the osteoclast formation induced by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ or tumor necrosis factor- α and in the local bone destruction associated with inflammation by enhancing osteoclast formation.

Key words : 1,25-dihydroxyvitamin D₃, 5-Lipoxygenase metabolite, Osteoclast, Phospholipase A₂, Tumor necrosis factor- α .

I. 서론

세포막에 존재하는 phospholipids의 많은 대사산물들은 세포의 여러 가지 기능을 조절하는 것으로 알려져 있다. 특히 phospholipase A₂ (PLA₂)의 작용을 받으면 arachidonic acid가 생성되며¹⁾ 이는 cyclooxygenase의 작용에 의해 prostaglandins (PGs)와 thromboxanes을 포함한 prostanoids를 생성하거나 5-lipoxygenase (5-LOX)의 작용에 의해 5-hydroxy-eicosatetraenoic acids (5-HETEs)와 leukotrienes (LTs)를 생성한다²⁾. PLA₂는 염증성 관절염, 복막염, 급성 폐손상이나 패혈 증성 속 등과 같은 국소적, 전신적 염증반응에서 그 분비가 증가되며 특히 염증성 관절염과 같이 국소적으로 골파괴가 이루어지는 부위에서 PLA₂의 분비와 활성이 증가됨이 보고되었다³⁻⁵⁾. 이로부터 PLA₂의 작용에 의해 생성된 arachidonic acid 대사산물들이 골흡수에 중요한 역할을 할 것으로 여겨진다. 대사산물 중 특히 PGE₂에 대한 연구는 많이 진행되어 왔다. 성숙한 파골세포의 배양에 PGE₂를 첨가하면 파골세포의 세포질의 수축과 파골세포활성의 일시적 억제를 보이며⁶⁻⁸⁾ PGE₂를 매일 투여하면 해면골의 양이 증가된다는 보고가 있었으나⁹⁾, Klein과 Raisz¹⁰⁾와 Tashjian 등¹¹⁾은 골조직 배양시 배양액에 PGE₂를 첨가하면 골흡수가 촉진됨을 보고하였고 Boyce 등¹²⁾, Bertolini 등¹³⁾과 Tashjian 등¹⁴⁾은 interleukin-1, tumor necrosis factor (TNF)나 transforming growth factor- β 와 같은 국소조절인자들에 의한 골조직 파괴과정에서 이차적으로 생성이 촉진된 PGE₂가 부분적으로 이들의 작용을 매개할 것으로 보고하여 PGE₂의 작용은 대체적으로 골흡수를 촉진하는 것으로 알려져 있다.

한편 최근에는 arachidonic acid 대사산물 중 5-

LOX 대사산물인 5-HETEs와 LTs이 골조직 대사에 미치는 영향에 대한 연구도 진행되어 왔다. 알레르기와 염증반응에서 중요한 역할을 하는 것으로 보이는 5-LOX 대사산물은 골조직 대사에 중요한 영향을 미치는 것으로 여겨지는데 Meghji 등¹⁵⁾은 조골세포에서 5-LOX 대사산물이 생성되며 이들에 의해 골흡수가 촉진됨을 보고하였다. Gallwitz 등¹⁶⁾은 거대세포종(giant cell tumor)에서 얻어진 간질세포인 C433 세포가 5-LOX 대사산물들(5-HETE, LTC₄, LTD₄, LTE₄)를 생성하여 파골세포의 수를 증가시키고 활성을 촉진시킴을 보고하였으며, Garcia 등¹⁷⁾은 조골세포 배양시 synthetic LTD₄를 첨가하면 골흡수가 촉진됨을 보고하였고, 또한 분리된 조류 파골세포에 LTD₄ 수용체가 존재하며 LTD₄에 의해 흡수와 생성이 촉진됨을 보고하였다. 또한 LTB₄도 *in vitro*, *in vivo* 모두에서 파골세포 생성을 통하여 골흡수를 일으킨다고 하였다¹⁸⁾. 그러나 LTs와 5-HETEs가 배양 골조직의 골흡수에 영향을 미치지 않는다는 상반된 보고도 있어 왔다¹⁹⁾.

5-LOX 대사산물은 생물학적 반감기가 짧기 때문에 LTs에 대한 지속적인 효과를 관찰하는 데는 제한이 있어 왔다¹⁶⁾. 따라서 본 연구는 5-LOX 대사산물이 파골세포 생성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 배양시 LTs를 직접 첨가하는 대신, PLA₂를 첨가하거나 PLA₂를 활성화시키는 것으로 알려진 1,25-dihydroxyvitamin D₃(VD₃), TNF- α , 또는 mellitin을 첨가하여 arachidonic acid의 생성을 증가시키고 5-LOX 억제제인 caffeic acid를 투여하여 5-LOX 대사산물의 생성을 차단함으로써 간접적으로 5-LOX 대사산물이 파골세포 생성 과정에 미치는 영향을 관찰하였다.

II. 실험 재료 및 방법

실험 재료: α -Minimum essential medium (α -MEM), fetal bovine serum (FBS), collagenase, trypsin-EDTA 등은 Gibco laboratories (Grand Island, NY, USA)에서 구입하였으며 plastic tissue culture wares는 Corning Inc. (Corning, NY, USA)에서 구입하였다. VD₃는 Calbiochem-Novobiochem Corp. (San Diego, CA, USA)로부터 구입하였으며 TNF- α 는 Genzyme (Cambridge, MA, USA)에서 구입하였다. PLA₂, mellitin, naphtol AS-MX phosphate,

fast red violet LB salt는 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

조골세포의 준비: 생후 2에서 3일된 마우스(ICR)의 전두골과 두정골을 무균적으로 적출하여 혼합효소 용액(0.1% crude collagenase, 0.05% trypsin, 0.5 mM EDTA)에 연속적으로 6회(10, 10, 10, 20, 20, 20분) 처리하고 조골세포의 특성을 지닌 세포들이 많이 존재하는 IV~VI군의 세포를 수집하여 배양액으로 세척한 후 10% FBS가 포함된 α -MEM에 배양하고 1차 계대배양하여 실험에 사용하였다.

골수세포의 준비: 생후 4에서 6주된 마우스(ICR)를 경부 염전으로 희생시킨 후 경골과 대퇴골을 무균적으로 적출하고 부착 연조직이 없도록 분리하였다. 장골의 양 끝을 가위로 끊은 후 26G의 주사침을 이용하여 1 ml의 α -MEM을 골수강의 한쪽 끝에서 천천히 주사하여 골수세포를 모은 후 α -MEM으로 두 번 세척하였다.

조골세포와 골수세포의 혼합배양: 세포수를 계수하여 신생마우스두개관 조골세포는 1.5×10^4 cells/well, 마우스 골수세포는 3.0×10^5 cells/well이 되도록 혼합하여 24-well plates에 분주하고 10% FBS가 포함된 α -MEM에 7일간 배양하였다. 배양 동안 10^{-8} M VD₃, 20 ng/ml TNF- α , 1 U/well PLA₂, 100 nM, 200 nM mellitin, 20 μ M caffeic acid, 10^{-6} M indomethacin을 배양 첫날부터 단독 혹은 복합 투여하였다.

Tartrate-저항성 산성인산분해효소(TRAP)의 조직화학적 활성검색: 파골세포의 표지효소인 TRAP 염색은 Burstone 변법²⁰⁾을 이용하였다. 7일간 배양이 끝난 후 세포를 인산완충생리식염수(pH 7.0)로 세척한 후 차가운 ethanol-acetone(50:50, vol/vol)으로 1분간 고정시키고 상온에서 10분 동안 말린 후 기질인 naphtol AS-MX phosphate, 반응 산물의 염색제인 fast red violet LB salt와 20 μ M의 sodium tartrate가 포함된 acetate 완충용액(0.1 M sodium acetate, pH 5.0)을 첨가하여 상온에서 20분간 반응시킨 후 광학현미경 상에서 관찰하여 3개 이상의 핵을 포함한 TRAP 양성인 다핵세포의 수를 계수하였다.

III. 실험 결과

신생마우스두개관 조골세포와 마우스 골수세포의 혼합배양시 약물을 첨가하지 않고 배양한 경우에는 TRAP 양성인 다핵세포가 거의 생성되지 않았으며 caffeic acid와 indomethacin의 단독 투여에 의해서는 거의 영향을 받지 않았다. VD₃ (10⁻⁸ M)를 첨가시 well당 300개 이상의 많은 TRAP 양성인 다핵세포가 생성되었으며 이에 20 μM caffeic acid를 복합첨가하여 배양하였을 때에는 그 생성이 유의하게 감소하였다(그림 1). TNF-α (20 ng/ml)를 첨가하여 배양한 경우에도 많은 수의 TRAP 양성인 다핵세포가 생성되었으며 이에 caffeic acid를 첨가하였을 때 그 생성이 유의하게 감소하였다. 또한 cyclooxygenase 억제제인 indomethacin을 복합첨가한 경우에는 TRAP 양성 다핵세포가 거의 생성되지 않았다(그림 2). VD₃와 TNF-α를 복합 첨가하여 배양한 경우 VD₃만 첨가시보다 더 많은 수의 TRAP 양성인 다핵세포가 생성되었으며 caffeic acid에 의해 그 수가 유의하게 감소되었고 indomethacin을 함께 첨가해 주면 TRAP 양성 다핵세포는 거의 생성되지 않았다(그림 3). PLA₂ (1 U/well)의 단독 첨가에 의해서는 TRAP 양성 다핵세포의 생성이 유의하게 촉진되지 않았으나 PLA₂와 VD₃를 복합첨가하여 배양한 경우에는 VD₃만으로 배양시보다 더 많은 수의 TRAP 양성인 다핵세포가 생성되었으며 caffeic acid에 의해 유의하게 억제되었다(그림 4).

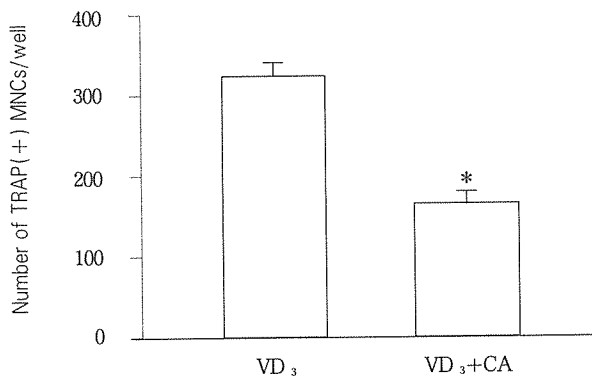


그림 1. Effect of caffeic acid on the formation of TRAP(+) MNCs induced by VD₃(10⁻⁸ M) in coculture of mouse calvarial osteoblastic cells and mouse bone marrow cells for 7 days.
*p<0.05, compared to VD₃ alone
TRAP(+) MNCs : tartrate-resistant acid phosphatase positive multinucleated cells VD₃ : 1,25-dihydroxyvitamin D₃
CA : caffeic acid

PLA₂ activator인 mellitin (100 nM, 200 nM)을 단독 첨가하여 배양한 경우 TRAP 양성 다핵세포가 거의 생성되지 않았지만 VD₃와 복합투여하여 배양한 경우에는 VD₃만 첨가시보다 3배이상 많은 수의 TRAP 양성인 다핵세포가 생성되었으며 caffeic acid의 첨가로 그 생성이 일부 감소되었다(그림 5).

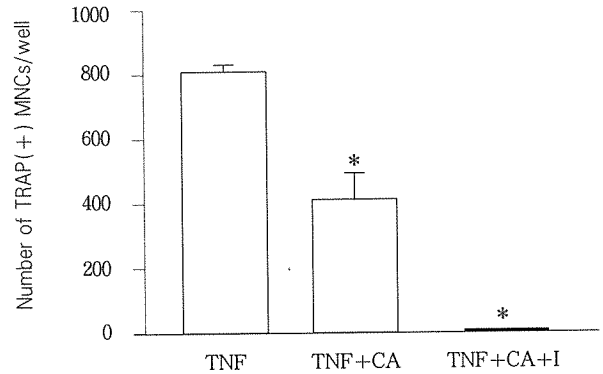


그림 2. Effects of caffeic acid and indomethacin on the formation of TRAP(+) MNCs induced by TNF-α (20ng/ml) in coculture of mouse calvarial osteoblastic cells and mouse bone marrow cells for 7 days.
*p<0.05, compared to TNF-α alone
TRAP(+) MNCs:tartrate-resistant acid phosphatase positive multinucleated cells
TNF:tumor necrosis factor-α
CA:caffeic acid
I:indomethacin

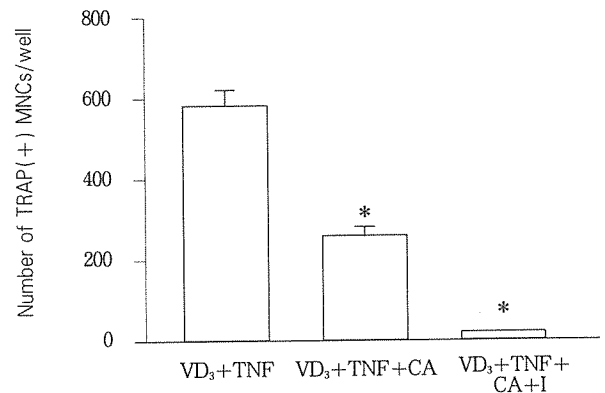


그림 3. Effects of caffeic acid and indomethacin on the formation of TRAP(+) MNCs induced by VD₃ (10⁻⁸ M) and TNF-α (20ng/ml) in coculture of mouse calvarial osteoblastic cells and mouse bone marrow cells for 7 days.
*p<0.05, compared to combined treatment of VD₃ and TNF-α
TRAP(+) MNCs:tartrate-resistant acid phosphatase positive multinucleated cells
VD₃:1,25-dihydroxyvitamin D₃
TNF:tumor necrosis factor-α
CA:caffeic acid
I:indomethacin

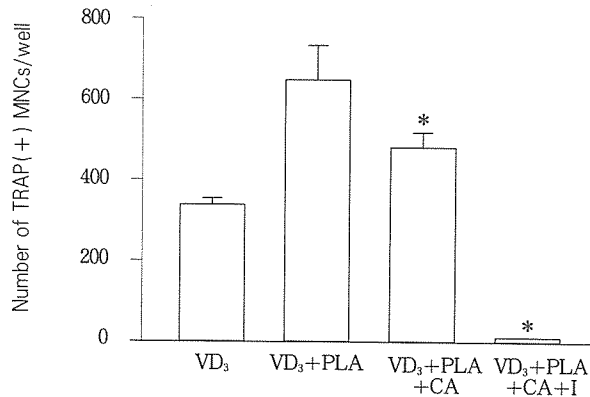


그림 4. Effects of caffeic acid and indomethacin on the formation of TRAP (+) MNCs induced by VD₃ (10⁻⁸ M) and PLA₂ (1 U/well) in coculture of mouse osteoblastic cells and mouse bone marrow cells for 7 days.

*p(0.05, compared to combined treatment of VD₃ PLA₂ TRAP(+) MNCs: tartrate-resistant acid phosphatase positive multinucleated cells
 VD₃: 1,25-dihydroxyvitamin D₃
 PLA: phospholipase A₂
 CA: caffeic acid
 I: indomethacin

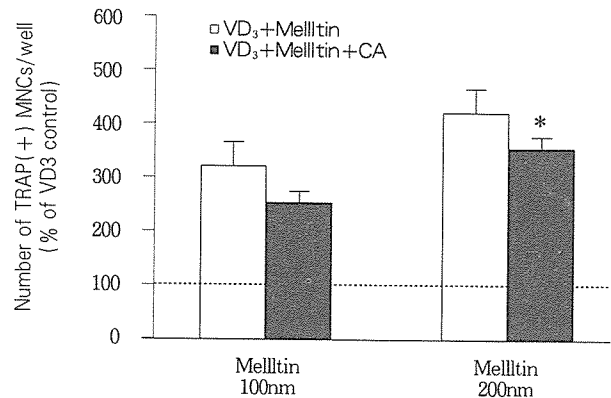


그림 5. Effects of caffeic acid on the formation of TRAP (+) MNCs induced by VD₃ (10⁻⁸ M) and mellitin (100 nM, 200 nM) in coculture of mouse calvarial osteoblastic cells and mouse bone marrow cells for 7 days.

*p(0.05, compared to combined treatment of VD₃ and mellitin TRAP(+) MNCs: tartrate-resistant acid phosphatase positive multinucleated cells
 VD₃: 1,25-dihydroxyvitamin D₃
 CA: caffeic acid

IV. 고 찰

골흡수는 다수의 핵과 운동성을 갖고 있는 파골세포에 의해 진행되며 이러한 파골세포는 전구세포의 골조직 내로의 이동과 이들 세포들의 증식, 분화 및 다핵세포로의 융합과정에 의해 형성된다. 파골세포 전구세포는 조혈조직에 존재하는 것으로 알려져 있어^{22, 23} 골수세포의 배양을 이용하여 파골세포의 생성에 관한 많은 연구가 행해져 왔으나 VD₃, 부갑상선호르몬 (PTH) 등으로 유도되는 TRAP 양성 다핵세포의 생성은 골수세포의 단독 배양으로는 실험간 오차가 많았기 때문에 본 실험에서는 마우스두개관 조골세포와 마우스 골수세포의 혼합배양을 이용하였다. 또한 5-LOX 대사산물은 생물학적 반감기가 짧기 때문에 배양시 이들을 직접 첨가하여 지속적인 효과를 관찰하는데 제한이 있으므로 PLA₂를 첨가하거나 PLA₂를 활성화하는 것으로 알려진 약물을 첨가하여 arachidonic acid의 생성을 증가시키고 5-LOX 억제제인 caffeic acid를 투여하여 간접적으로 5-LOX 대사산물이 파골세포 생성에 미치는 영향을 관찰하였다.

세포막 phospholipids가 PLA₂의 작용을 받으면 arachidonic acid가 생성되며 이는 cyclooxygenase 작용에 의해 PGs와 thromboxanes을 포함한 prostanoids를 생성하거나 5-LOX의 작용에 의하여 5-HETEs와

LTs를 생성한다^{1, 2}. PLA₂는 염증성 관절염, 복막염, 급성 폐손상이나 패혈증성 속등과 같은 국소적, 전신적 염증반응에서 그 분비가 증가하며^{3, 4} 류마티스성 관절염에서 혈청내 PLA₂ 활성도와 질병 정도가 관계있다는 보고도 있다²⁴. PLA₂가 염증성 관절염과 같은 염증 부위에서 많이 검출되는 것으로 보아 국소적인 골파괴가 이루어지는 부위에 다량 존재함을 알 수 있으며³⁻⁵ 이로보아 PLA₂의 대사산물들이 골흡수와 관계가 있을 것으로 생각된다. 특히 이런 부위에는 cyclooxygenase 대사산물들보다는 5-LOX 대사산물들이 더 많이 존재한다는 보고들²⁵⁻²⁸로 미루어 보아 염증부위에서의 국소적 골흡수과정에 5-LOX 대사산물들이 영향을 미칠 것으로 생각된다.

한편 조골세포에서도 PLA₂ 활성이 관찰되고 soluble PLA₂가 분비됨이 보고되었으며^{29, 30} PLA₂-activating protein, interleukin-1 (IL-1), TNF- α 등의 cytokines, epidermal growth factor, VD₃ 등은 조골세포에서 PLA₂의 분비와 활성을 증가시키는 것으로 알려져 있다³⁰⁻³³. VD₃는 골조직대사를 조절하는 중요한 전신적 조절인자로서 VD₃가 부족하면 골기질 합성과 연골 성장이 억제되고 골형성이 늦어지나³⁴, 과도한 경우에는 골흡수가 증가하며 이는 파골세포의 수와 활성이 증가되어 나타나고³⁵ 또한 새로 생성되는 골기질의 결정화가 억제되어 hyperostoidosis가 유발됨이 관찰되

있다³⁶⁾. 또한 Schwartz와 Boyan³²⁾은 VD_3 가 연골 성장 부위의 세포 배양에서 PLA_2 의 활성도를 조절함을 보고한 바 있다. Takahashi 등³⁷⁾은 마우스 골수세포를 PTH 또는 VD_3 의 존재하에 8일간 배양시 TRAP 양성인 다핵세포 생성이 증가하였음을 관찰하였는데 이는 이번 실험의 결과와 일치한다고 할 수 있다. Schwartz 등³³⁾은 조골세포의 특성을 지닌 세포주 (MC3T3-E1, ROS 17/2.8, MG-63)에서도 각각의 세포주에 따라 차이는 있지만 VD_3 가 PLA_2 의 활성을 증가시키며, PGs의 생성을 촉진하고, 세포막에서 PGE_2 의 autocrine, paracrine action을 유발함을 관찰하였는데 이들은 cyclooxygenase 억제제인 indomethacin을 이용하여 주로 PGE_2 의 영향만을 보았지만 이번 실험에서는 caffeic acid를 사용하여 VD_3 가 5-LOX 대사산물을 통하여 부분적으로 파골세포의 수적 증가를 유발함을 관찰할 수 있었다 (그림 1). 이는 5-LOX 대사산물이 염증성 치은 조직, 염증성 치주 조직, 구강암 (편평상피세포암종)과 같은 국소적인 골과피 부위에 다량 존재한다는 보고²⁵⁻²⁸⁾와도 연관된 결과로 생각된다.

TNF- α 는 골흡수를 촉진하고 골생성을 억제하며¹³⁾ 이러한 작용에는 조골세포가 관여하는 것으로 보고되었다³⁶⁾. 또한 Pfeilschifer 등³⁹⁾은 사람 골수 단핵세포를 이용하여 TNF가 파골세포 전구세포의 증식과 분화를 촉진함을 관찰하였다. 한편 Vadas 등³⁰⁾과 Bomalaski 등³¹⁾은 PLA_2 에 의해 TNF- α 의 생성이 유도되며 또한 TNF- α 가 PLA_2 를 활성화시킨다고 보고하며 TNF- α 의 효과가 PLA_2 의 활성과 어느정도 관련이 있음을 시사하였다. 본 실험결과도 TNF- α 의 파골세포 생성 촉진작용이 부분적으로는 5-LOX 대사산물의 작용을 통해 나타남을 시사하는 것으로 여겨진다 (그림 2). 최근의 보고에 의하면 골흡수에 대하여 LTs는 prostanoids와는 다른 효과를 나타내지만 서로 상호 보완한다고 하는데, prostanoids 생성이 억제되면 TRAP 양성인 단핵세포에는 영향이 없으나 TRAP 양성 다핵세포로의 분화와 분화된 파골세포의 활성이 억제됨이 보고되었다⁴⁰⁻⁴²⁾. 한편 비만세포와 조골세포로부터 유래된 LTs는 파골세포 전구세포의 수와 분화, 그리고 골표면으로의 유인을 조절함이 보고되었다⁴³⁾. 본 실험에서 indomethacin을 함께 투여한 경우 caffeic acid만 투여시보다 파골세포 생성이 더 많이 억제되는 것으로 보아 cyclooxygenase 대사산물과 5-LOX 대사산물이

각각 다른 경로로 TNF- α 의 파골세포 생성에 영향을 미친다는 보고와 일치한다고 할 수 있다. VD_3 와 TNF- α 를 복합 투여한 경우도 비슷한 결과를 얻었다 (그림 3).

PLA_2 activating protein은 mellitin과 구조적, 기능적으로 유사한 포유류의 protein으로 여러 종류의 세포에서 arachidonic acid의 분비와 eicosanoids의 생성을 자극함이 보고되었으며⁴⁴⁻⁴⁶⁾ 류마티스성 관절염 환자의 활액에도 다량 존재함이 관찰되었다⁵⁾. 또한 사람의 단핵세포에서 IL-1, TNF의 생성을 유도함이 보고되었다³¹⁾. 본 실험에서 PLA_2 나 mellitin 단독 처리시에는 TRAP 양성인 다핵세포가 거의 생성되지 않은 것으로 보아 VD_3 나 TNF- α 에 의해 유도되는 파골세포 생성과정에서 PLA_2 활성화 외에 다른 경로가 필요한 것으로 보이며 이들을 VD_3 와 같이 첨가하여 배양한 경우 VD_3 단독 처리시보다 TRAP 양성 다핵세포가 많이 생성되는 것은 배양 중 PLA_2 활성이 더욱 증가된 결과로 여겨진다. 한편 PLA_2 나 mellitin이 VD_3 와 복합첨가된 배양에서는 VD_3 의 단독첨가 배양에서 보다 caffeic acid에 의한 TRAP 양성 다핵세포의 생성 억제효과가 적게 나타남이 관찰되었는데 그 정확한 이유는 알 수 없지만, LTs이 고농도에서는 오히려 그 효과가 감소한다는 보고¹⁵⁾로 미루어 보아 배양내 PLA_2 활성이 매우 높아짐으로써 그 대사산물인 prostanoids와 LTs가 많이 생성되고, 고농도의 LTs는 효과가 적어지므로 상대적으로 prostanoids의 역할이 커짐으로써 나타난 결과일 가능성이 있는 것으로 생각된다.

본 실험의 결과를 종합해보면 prostanoids와 더불어 5-LOX 대사산물들도 VD_3 , TNF- α 에 의한 파골세포 생성 과정에 부분적으로 관여하는 것으로 생각된다.

V. 결 론

5-LOX 대사산물들이 파골세포 생성에 미치는 영향을 알아보기로 파골세포의 생성을 강력하게 촉진하는 물질들인 VD_3 또는 TNF- α 의 파골세포 생성에 5-LOX 억제제인 caffeic acid가 어떤 영향을 미치는지를 관찰하였다. 이를 위하여 신생마우스두개관 조골세포와 골수세포의 혼합배양을 이용하였으며 10^{-8} M VD_3 , 20 ng/ml TNF- α , 1 U/well PLA_2 , 100 nM, 200 nM mellitin, 20 μ M caffeic acid, 또는 10^{-6} M

indomethacin을 배양 첫날부터 단독 혹은 복합첨가하여 7일간 배양하고 TRAP 양성인 다핵세포의 수를 계수하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. Caffeic acid는 VD_3 에 의해 유도되는 TRAP 양성인 다핵세포의 생성을 유의하게 감소시켰다.

2. Caffeic acid는 $TNF-\alpha$ 에 의해 유도되는 TRAP 양성인 다핵세포의 생성을 유의하게 감소시켰으며 이에 cyclooxygenase 억제제인 indomethacin을 첨가하였을 때 TRAP 양성인 다핵세포의 생성이 거의 억제되었다.

3. Caffeic acid는 VD_3 와 $TNF-\alpha$ 에 의해 유도되는 TRAP 양성인 다핵세포의 생성을 유의하게 감소시켰

으며 indomethacin의 첨가로 TRAP 양성인 다핵세포의 생성이 거의 억제되었다.

4. Caffeic acid는 VD_3 와 PLA_2 에 의해 유도되는 TRAP 양성인 다핵세포의 생성을 유의하게 감소시켰으며 indomethacin의 첨가로 TRAP 양성인 다핵세포의 생성이 거의 억제되었다.

5. Caffeic acid는 VD_3 와 200 nM mellitin에 의해 유도되는 TRAP 양성인 다핵세포의 생성을 유의하게 감소시켰다.

이상의 결과로 보아 5-LOX 대사산물들이 VD_3 나 $TNF-\alpha$ 에 의한 파골세포 생성과정에 부분적으로 관여하는 것으로 생각된다.

참고문헌

1. Chapman D. Lipid dynamics in cell membranes, *In cell membranes*, edited by Weissman G, Clairborne R, HP Publishing company, 1975;13
2. Murphy RC, Hammaström S, Samuelsson B. Leukotriene C; A slow-reacting substance from murine mastocytoma cells, *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76: 4275~4279
3. Pruzanski W, Vadas P. Secretory synovial fluid phospholipase A_2 and its role in the pathogenesis of inflammation in arthritis, *J Rheumatol* 1988;15:1601~1603
4. Vadas P, Pruzanski W, Stefanski E, et al. Receptor and phospholipase control of inositol phosphate, PAF and eicosanoid production, edited by Dennis E, Hunter T, Berridge M, Alan R Liss, 1989;311~316
5. Bomalaski JS, Fallon M, Turner RA, et al. Identification and isolation of phospholipase A_2 activating protein in human rheumatoid arthritis synovial fluid: induction of eicosanoid synthesis and an inflammatory response in joints injected in vivo, *J Lab Clin Med* 1990;116:814~825
6. Arnett TR, Dempster DW. Effect of arachidonic acid metabolites on the bone resorption by isolated rat osteoclasts, *J Bone Miner Res* 1987;4:209~215
7. Fuller K, Chamber TJ. Effect of arachidonic acid metabolites on bone resorption by isolated rat osteoclasts, *J Bone Miner Res* 1989;4:209~215
8. Chambers TJ, McSheehy PMJ, Thomason BM, Fuller K. The effect of calcium-regulating hormones and prostaglandins on bone resorption by osteoclasts disaggregated from neonatal rabbit bones, *Endocrinology* 1985;116:234~239
9. Ito H, Ke HZ, Jee WS, Sakou T. Anabolic responses of an adult cancellous bone site to prostaglandin E_2 in the rat, *Bone Miner* 1993;21:219~236
10. Klein DC, Raisz LG. Prostaglandins; Stimulation of bone resorption in tissue culture, *Endocrinology* 1970;86:1436~1440
11. Tashjian AH, Voelkel EF, Levine L, Goldhaber P. Evidence

that the bone resorption-stimulating factor produced by mouse fibrosarcoma cells is prostaglandin E_2 : a new model for the hypercalcemia of cancer, *J Exp Med* 1972;136:1329~1343

12. Boyce BR, Aufdemorte TB, Garrett IR, et al. Effects of interleukin-1 on bone turnover in normal mice, *Endocrinology* 1989;125:1142~1150

13. Bertolini DR, Nedwin GE, Bringman TS, et al. Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation in vitro by human tumor necrosis factors, *Nature* 1986;319:516~518

14. Tashjian AH, Voelkel EF, Lazzaro M, et al. Tumor necrosis factor- α (cachectin) stimulates bone resorption in mouse calvaria via a prostaglandin-mediated mechanism, *Endocrinology* 1987;120:2029~2036

15. Meghji S, Scutt A, Harvey W. Lipoxygenase metabolites of arachidonate: osteoblast mediators of osteoclastic bone resorption, *Calcif Tiss Int* 1988;36:139~149

16. Gallwitz WE, Mundy GR, Lee CH, et al. 5-Lipoxygenase metabolites of arachidonic acid stimulate isolated osteoclasts to resorb calcified matrices, *J Biol Chem* 1993;268:10087~10094

17. Garcia C, Qiao M, Kirchen M, et al. Effects of synthetic peptido-leukotrienes on bone resorption in vitro, *J Bone Miner Res* 1996;11:521~529

18. Garcia C, Boyce BF, Gilles J, et al. Leukotriene B $_2$ stimulates osteoclastic bone resorption both in vitro and in vivo, *J Bone Miner Res* 1996;11:1619~1627

19. 오귀옥, 김세원. Arachidonic acid 대사산물이 배양골 조직의 골흡수에 미치는 영향에 관한 연구, *대한구강생물학회지* 1989;13:87~94

20. Baron R, Nefussi JR, Vignery A. Kinetic and cytochemical identification of osteoclast precursors and their differentiation into multinucleated osteoclasts, *Am J Pathol* 1986;122:363~378

21. Ko JS, Bernard GW. Osteoclast formation in vitro from bone marrow mono nuclear cells in osteoclast-free bone, *Am J Anat* 1981;161:415~425

22. Scheven BA, Visser JWM, Nijweide PJ. In vitro osteoclast generation from different bone marrow fractions, including a highly enriched hematopoietic stem cell population,

Nature 1986;321:79~81

23. Schneider GB, Relfson M, Nicolas J. Pluripotent hemopoietic stem cells give rise to osteoclasts, *Am J Anat* 1986;177:505~511

24. Pruzanski W, Keystone EC, Sternby B, et al. Serum phospholipase A₂ correlates with disease activity in rheumatoid arthritis, *J Rheumatol* 1987;15:1351~1355

25. Sidhagen B, Hamberg M, Fredholm BB. Formation of 12L-hydroxyeicosatetraenoic acid (12-HETEs) by gingival tissue, *J Dent Res* 1982;61:761~763

26. El Attar TMA, Lin HS. Relative conversion of arachidonic acid through lipoxygenase and cyclooxygenase pathways by homogenates of diseased periodontal tissue, *J Oral Pathol* 1983;12:7~10

27. El Attar TMA, Lin HS, Killoy WJ, et al. Hydroxy fatty acids and prostaglandin formation in diseased human periodontal pocket tissue, *J Perio Res* 1986;21:169~176

28. Porteder H, Matejka M, Ulrich W, Sinzinger D. The cyclooxygenase and lipoxygenase pathway in human oral cancer tissue, *J Max Fac Surg* 1984;12:145~147

29. Scutt A, Meghji S, Harrey W. Synthesis of lipoxygenase products by mouse osteoblasts in vitro, *J Dent Res* 1987;66:239~242

30. Vadas P, Pruzanski W, Stefanski E, et al. Extracellular phospholipase A₂ secretion is a common effector pathway of interleukin-1 and tumor necrosis factor action, *Immunol Letters* 1991;28:187~194

31. Bomalaski JS, Ford T, Hudson AP, Clark MA. Phospholipase A₂-activating protein induces the synthesis of IL-1 and TNF in human monocytes, *J Immunol* 1995;154:4027~4031

32. Schwartz Z, Boyan BD. The effects of vitamin D metabolites on phospholipase A₂ activity of growth zone and resting zone cartilage cells in vitro, *Endocrinology* 1988;122:2191~2198

33. Schwartz Z, Dennis R, Bonewald L, et al. Differential regulation of prostaglandin E₂ synthesis and phospholipase A₂ activity by 1,25-(OH)₂D₃ in three osteoblast-like cell lines (MC-3T3-E1, ROS 17/2.8 and MG-63), *Bone* 1992;13:51~58

34. Raisz LG, Kream BE. Regulation of bone formation

(second of two parts), *N Engl J Med* 1983;309:83~89

35. Tinkler SMB, Williams DM, Johnson NW. Osteoclast formation in response to intraperitoneal injection of 1 α -hydroxycholecalciferol in mice, *J Anat* 1981;133:91~97

36. Hock JM, Gunnes-Hey M, Poser J, et al. Stimulation of undermineralized matrix formation by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in long bones of rats, *Calcif Tiss Int* 1986;38:79~86

37. Takahashi N, Yamana H, Yoshiki S, et al. Osteoclast-like cell formation and its regulation by osteotropic hormones in mouse bone marrow cultures, *Endocrinology* 1988;122:1373~1382

38. Thompson BM, Mundy GR, Chambers TJ. Tumor necrosis factors alpha and beta induce osteoblastic cells to stimulate osteoclastic bone resorption, *J Immunol* 1987;138:775~779

39. Pfeilschifter J, Mundy GR, Roodman GD. Interleukin-1 and tumor necrosis factor stimulate the formation of human osteoclast-like cells in vitro, *J Bone Miner Res* 1989;4:113~118

40. Leroux P, Saffar JL. Dose-effect and evidence of escape of inhibition after indomethacin treatment in a synchronized model of bone resorption, *Agents Actions* 1993;38:290~294

41. Saffar JL, Lasfargues JJ, Leroux P, Guez D. In vivo prostanoid regulation of osteoclastic resorption, *C R Soc Biol* 1993;187:608~619

42. Saffar JL, Leroux P. Role of prostaglandins in bone resorption in a synchronized remodelling sequence in the rat, *Bone* 1988;9:141~145

43. Miller CF, Saffar JL. The 5-lipoxygenase inhibitor BWA4C impairs osteoclastic resorption in a synchronized model of bone remodelling, *Bone* 1995;17:185~191

44. Haberman E. Bee and wasp venoms, *Science* 1972;117:314~322

45. Hassid A, Levine L. Stimulation of phospholipase activity and prostaglandin biosynthesis by mellitin in cell cultures and in vivo, *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1977;18:507~517

46. Salari HP, Braquet P, Borgeat P. Stimulation of lipoxygenase product synthesis in human leukocytes and platelets by mellitin, *Mol Pharmacol* 1985;28:546~548