

# การเปลี่ยนแปลงกระบวนการทำงาน ของ cytokine ในสภาวะกระดูกพรุน ของหญิงวัยหมดประจำเดือน

หัตถยา เพชรพิบูลย์ไทย, วทม. (กายวิภาคศาสตร์)\*

## บทคัดย่อ

หญิงวัยหมดประจำเดือนจะมีระดับของ estrogen ในเลือดลดลง ระดับของ estrogen ที่ลดลง นอกจากจะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของ reproductive tissue แล้ว ยังมีผลต่อเนื้อเยื่ออื่นๆ อีก เช่น เนื้อเยื่อกระดูก เนื้อเยื่อไขมัน และเซลล์ของเส้นเลือด เป็นที่ทราบกันดีว่าสภาวะขาด estrogen เป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดโรคกระดูกพรุนในหญิงวัยหมดประจำเดือน มีการศึกษาว่า estrogen receptor ถูกพบบนเซลล์กระดูก และเซลล์อื่นๆ ได้แก่ osteoblast osteocyte osteoclast hematopoietic cells และ vascular cells บทความนี้ได้กล่าวถึงการศึกษาต่างๆ เกี่ยวกับความสัมพันธ์ของระดับ estrogen ในหญิงวัยหมดประจำเดือน และระดับของ cytokine ที่เปลี่ยนแปลงไป ซึ่งจะนำไปสู่การละลายกระดูก (bone resorption) โดยพบว่าระดับของ estrogen ที่ลดลงจะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงการสร้างและหลั่ง cytokine ของเซลล์ที่มี estrogen receptor เหล่านี้ และ cytokine เหล่านี้จะไปมีผลในการเพิ่มจำนวน กระตุ้นการทำงานและยึด ช่วงอายุของ osteoclast ซึ่งเป็นกลไกในการละลายกระดูก (bone resorption) ในหญิงวัยหมดประจำเดือน

## Abstract

### Changes in cytokine activity in postmenopausal osteoporosis

Hattaya Petchpiboonthai, Ms.C\*

Menopause is associated with a rapid decline in circulating estrogen. The decline in sex hormones has many implications for reproductive tissue and non reproductive tissue such as bone, adipose tissue and blood vessels. Estrogen deficiency is a primary pathogenic factor in postmenopausal osteoporosis. Estrogen receptors have been identified in osteoblast, osteocyte, osteoclast, hematopoietic cells and vascular cells. Estrogen deficiency changes the activity of cytokine producing in these cells. Cytokines are the most powerful stimulants of bone resorption known. They directly and through the stimulation of other local factors intervene with every single step in osteoclastogenesis that determine the rate of bone resorption in postmenopausal osteoporosis.

(MJS 2003 ; 10 : 33 - 43)

\* ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ  
Department of Anatomy , Faculty of Medicine , Srinakarinwirot University

## บทนำ

กระดูกจัดเป็น dynamic tissue เนื่องจากมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างได้ เช่น เมื่อมีแรงกด (pressure) หรือแรงยืด (tension) มากกระทำบนกระดูก จะทำให้เกิดการละลาย (bone resorption) หรือการสร้างกระดูกบริเวณนั้นตามลำดับ และที่สำคัญคือ กระดูกจะมีการละลายและสร้างตลอดชีวิตที่เรียกว่า bone remodeling เพื่อรักษาสมดุลย์ของระดับแคลเซียมในเลือด โดยการละลายกระดูกนี้จะเกิดบริเวณ osteon ที่สร้างใหม่ อายุยังไม่มาก และมีการสะสมเกลือแร่ (mineralization) ที่ยังไม่สมบูรณ์

การสร้างกระดูกในระยะ embryo มี 2 วิธี คือ intramembranous และ endochondral bone formation intramembranous bone formation เริ่มต้นภายใน mesenchymal tissue ส่วน endochondral bone formation เริ่มต้นจากการสร้างเป็นกระดูกอ่อนขึ้นมาเป็นต้นแบบ (model) ก่อนแล้วจึงสร้างเป็นกระดูกมาแทนที่กระดูกอ่อน อย่างไรก็ดีตามการสร้างกระดูกทั้ง 2 วิธี จะได้กระดูกที่มีลักษณะทางจุลกายวิภาคของเนื้อกระดูกเหมือนกัน กระดูกชุดแรกที่ได้จากการสร้างกระดูกทั้ง 2 วิธี เรียก primary bone หรือ immature bone ซึ่งต่อมา primary bone จะมีการจัดเรียง collagen และ lamella ภายในเนื้อกระดูกใหม่ได้เป็น secondary bone ขึ้นมาใหม่ secondary bone จะถูกละลายหรือสร้างทดแทนที่เรียกว่า remodeling ตลอดชีวิตเพื่อรักษาระดับแคลเซียมในเลือด การเจริญเติบโตของกระดูกประกอบด้วย การสร้างกระดูก (bone formation) การปรับแต่งรูปร่างกระดูก (bone modeling) และการละลายและสร้างเนื้อกระดูก (bone remodeling) ฮอรโมน local factors และปัจจัยต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างและละลายกระดูก

1. พันธุกรรม (genetic)
2. โภชนาการ (nutrition)
3. การออกกำลังกาย (exercise)
4. ฮอรโมน (hormone)
  - 4.1 vitamin D
  - 4.2 parathyroid hormone
  - 4.3 calcitonin

- 4.4 glucocorticoid
- 4.5 growth hormone (GH) and insulin-like growth factor (IGF)
- 4.6 estrogen
- 4.7 progesterone
- 4.8 testosterone
5. Cytokines and other local factors that regulate bone remodeling

ภาวะกระดูกพรุน (osteoporosis) หมายถึง ภาวะที่มวลกระดูกลดลง (decrease in bone mass) ร่วมกับมีการเปลี่ยนแปลงในทางเสื่อมลงของ micro-architecture ของกระดูกซึ่งมีผลทำให้กระดูกเปราะและหักง่าย<sup>1</sup>

## พยาธิสภาพพื้นฐานที่ทำให้เกิดภาวะกระดูกพรุน<sup>2</sup> คือ

1. ความล้มเหลวของการเกิด peak bone mass ในระยะการสร้างกระดูก (failure to achieve optimal peak bone mass during skeletal growth)
2. การละลายกระดูกที่มากเกินไปในระยะหลังเกิด peak bone mass (excessive resorption of bone once peak bone mass has been achieved)
3. การบกพร่องของการสร้างกระดูกในระยะ remodeling (impaired bone formation response during remodeling)

ผู้ที่อายุน้อย (young person) จะมีอัตราการสร้างกระดูก (bone development) เร็วกว่าอัตราการละลายกระดูก (bone resorption) ผู้ใหญ่ (adulthood) ที่กระดูกเจริญเต็มที่แล้วอัตราการสร้างกระดูกจะสมดุลย์กับอัตราการละลายกระดูก เซลล์กระดูกที่เกี่ยวข้องกับการสร้างและการละลายกระดูก ได้แก่ osteoprogenitor cell osteoblast osteocyte และ osteoclast osteoprogenitor cell คือ เซลล์ที่มีศักยภาพเปลี่ยนไปเป็น osteoblast ได้ osteoblast เป็นเซลล์อ่อนของกระดูกทำหน้าที่สร้าง organic component ของ bone matrix osteocyte เป็นเซลล์กระดูกที่เจริญเต็มที่เปลี่ยนแปลงมาจาก osteoblast osteocyte เป็นเซลล์ที่ไม่ active สร้าง organic component ของ bone matrix เพียงเพื่อรักษาสภาพของกระดูก (bone

maintenance) และเพื่อตอบสนองต่อ tension ที่มากระทำต่อกระดูก (mechanotransduction) เท่านั้น osteoclast เป็น multinucleated cell มีเซลล์ต้นกำเนิดตัวเดียวกันกับเซลล์ต้นกำเนิดของ monocyte คือ granulocyte-macrophage progenitor cell ใน bone marrow, osteoclast เป็นเซลล์ที่มีบทบาทสำคัญในการละลายกระดูก (bone resorption) osteoclast มี receptor สำหรับ osteoclast-stimulating factor, colony-stimulating factor-1, osteoprotegerin (OPG) osteoprotegerin ligand (OPGL) และ calcitonin osteoclast-stimulating factor สร้างจาก osteoblast เชื่อว่า osteoclast จะเข้าสู่ขบวนการ apoptosis หลังจากทำหน้าที่ละลายกระดูกแล้ว<sup>2</sup>

ผู้หญิงวัยหมดประจำเดือน (menopause) หรือหญิงที่ได้รับการผ่าตัดเอารังไข่ออกจะมีระดับของ estrogen ลดลงอย่างรวดเร็ว และภายใน 15-20 ปี หลังจากรังไข่หยุดทำงานไปหญิงเหล่านี้จะมีอัตรากระดูกหักสูงขึ้นซึ่งเป็นผลมาจากภาวะกระดูกพรุน (osteoporosis) พบว่าเซลล์หลายชนิดรวมทั้งเซลล์กระดูกมี receptor สำหรับ estrogen<sup>3-8</sup> เซลล์เหล่านี้ได้แก่ osteoblast osteocyte, osteoclast, hematopoietic cells และ vascular cells ที่อยู่ใกล้กับกระดูก มีหลักฐานแสดงให้เห็นว่าภาวะ estrogen deficiency สามารถกระตุ้นให้เซลล์เหล่านี้สร้างและหลั่ง cytokine ได้ cytokine เหล่านี้ได้แก่ Interleukin-1 (IL-1) Interleukin-6 (IL-6) Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) macrophage-colony stimulating factor (M-CSF) granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) osteoprotegerin ligand (OPGL) และ Transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) ทำให้คิดว่าภาวะหมดประจำเดือนซึ่งมีระดับ estrogen ลดลง มีผลให้เซลล์ที่กล่าวมาแล้วสร้างและหลั่ง cytokine ซึ่ง cytokine เหล่านี้จะมีผลทำให้เกิดการส่งเสริมให้มีการละลายกระดูก (จะได้กล่าวรายละเอียดต่อไป)

เนื่องจาก osteoclast เป็นเซลล์สำคัญในการละลายกระดูก และปัจจุบันเชื่อว่า cytokine สามารถออกฤทธิ์โดยตรงหรือโดยอ้อมผ่าน local factor ที่แต่ละขั้นตอนของการสร้าง osteoclast (osteoclastogenesis) การละลายกระดูกโดย osteoclast (osteoclast resorption

capacity) และขบวนการ apoptosis ของ osteoclast<sup>9</sup> osteoclastogenesis ประกอบด้วยขั้นตอนย่อยๆ ได้แก่ การแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของ early osteoclast precursor cell และการเปลี่ยนแปลง osteoclast precursor cell ไปเป็น mature osteoclast ดังนั้นถ้ามี cytokine มากระตุ้นให้มีการเพิ่มจำนวนของ osteoclast precursor cell ให้ได้จำนวนมากก็จะได้ mature osteoclast จำนวนมากด้วย เป็นผลให้มี osteoclast จำนวนมากมาทำการละลายกระดูก นอกจากนั้นถ้ามี cytokine มายับยั้ง apoptosis ของ osteoclast ทำให้ช่วงอายุ (life span) ของ osteoclast ยืนยาวขึ้น เป็นผลให้มี osteoclast เหลืออยู่จำนวนมากเพื่อทำการละลายกระดูก ต่อไปนี้จะกล่าวถึงผลของ estrogen และ estrogen deficiency ต่อ cytokine ซึ่ง cytokine จะมีผลต่อการสร้าง osteoclast การกระตุ้นการละลายกระดูกโดย osteoclast และ apoptosis ของ osteoclast ดังนี้

### I สภาวะขาด estrogen สภาวะหมดประจำเดือนทั้งจากธรรมชาติและการผ่าตัด ที่มีผลต่อการสร้างและหลั่ง cytokine

มีการทดลองที่แสดงให้เห็นว่า สภาวะขาด estrogen (estrogen deficiency) และสภาวะหมดประจำเดือนทั้งจากธรรมชาติหรือจากการผ่าตัด (natural and surgical menopause) กระตุ้นให้เซลล์ที่อยู่ใน bone microenvironment สร้าง cytokine มากขึ้น เช่น estrogen deficiency ทำให้ circulating monocyte<sup>10,11</sup> bone marrow macrophage<sup>12-15</sup> osteoblast<sup>16</sup> สร้างและหลั่ง IL-1, IL-6 และ TNF- $\alpha$  มากขึ้น และสภาวะ natural หรือ surgical menopause ก็ทำให้ระดับของ IL-6<sup>17</sup> และ TNF- $\alpha$ <sup>18</sup> ในเลือดจะสูงขึ้นด้วย มีการศึกษาพบว่าสภาวะขาด estrogen มีกลไกทำให้เซลล์สร้าง cytokine มากขึ้นโดย estrogen จะไปเพิ่มจำนวน cytokine receptors และเพิ่ม cofactor ของ cytokine action<sup>19</sup>

### II Estrogen มีฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้างและหลั่ง cytokine

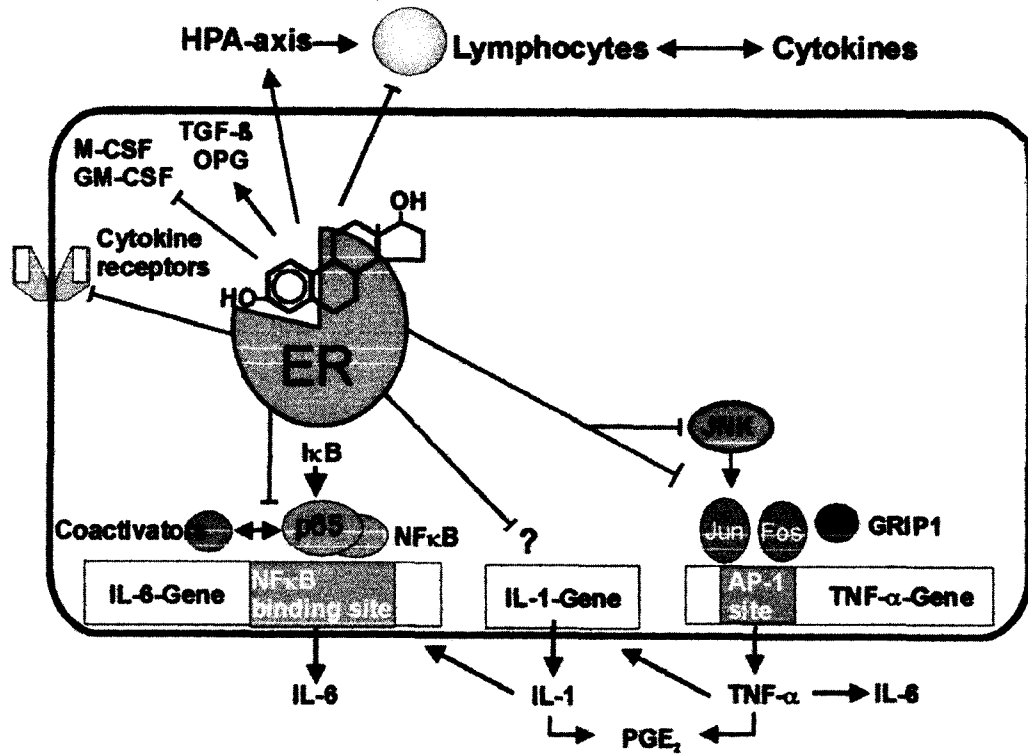
มีการศึกษาที่พบว่า estrogen สามารถยับยั้งเซลล์ที่สร้างและหลั่ง cytokine ให้สร้างและหลั่ง cytokine ได้น้อยลง เช่น estrogen จะยับยั้ง osteoblast-like

cell<sup>20-21</sup> monocyte/macrophage<sup>11,22-26</sup> และ whole blood culture<sup>27</sup> ให้สร้างและหลั่ง IL-1 $\beta$  และ TNF- $\alpha$  ได้น้อยลง estrogen สามารถยับยั้ง macrophage<sup>26-28</sup> bone marrow cell<sup>29</sup> whole blood culture<sup>27</sup> bone marrow stromal cell<sup>30</sup> และ osteoblast<sup>31-34</sup> ให้สร้างและหลั่ง IL-6 ได้ลดลง นอกจากนี้ยังพบว่าในหญิงวัยหมดประจำเดือนที่รักษาด้วยฮอร์โมน<sup>35,36,37</sup> และการให้ estrogen แก่หนู mice ที่ถูกตัดรังไข่<sup>38</sup> จะทำให้ระดับของ IL-6 ในเลือดต่ำลง

มีการทดลองที่แสดงให้เห็นว่า กลไกที่ estrogen ยับยั้งเซลล์ไม่ให้สร้าง IL-6 คือ estrogen จะไปยับยั้งไม่ให้ NF- $\kappa$ B จับกับ receptor ที่อยู่บน regulatory region ของ IL-6 gene<sup>33</sup> (รูปที่ 1) และกลไกที่ estrogen ออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง TNF- $\alpha$  คือ estrogen จะออกฤทธิ์ขัดขวางที่ตำแหน่ง activator protein-1 (AP-1) บน TNF- $\alpha$  transcription gene โดยผ่านทาง JNK activity<sup>39</sup> (รูปที่ 1)

### III ผลของ estrogen และ estrogen deficiency ต่อการสร้างและหลั่ง OPG RANK RANKL M-CSF GM-CSF TNF- $\alpha$ และ TGF- $\beta$

จากที่กล่าวมาแล้วข้างต้นจะพบว่าสภาวะ estrogen deficiency มีผลกระทบต่อนิวเคลียสที่เกี่ยวข้องกับการสร้างและการละลายกระดูกสร้าง cytokine มากขึ้น ส่วน estrogen จะมีผลยับยั้งการสร้าง cytokine cytokine ที่กล่าวถึงไปแล้วนั้นได้แก่ IL-1 IL-6 TNF- $\alpha$  ยังมี cytokine ตัวอื่นๆที่เกี่ยวข้องกับการสร้างและการละลายกระดูกที่ยังไม่ได้กล่าวถึงรายละเอียด cytokine เหล่านี้ได้แก่ osteoprotegerin (OPG) receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B (RANK) receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANKL) macrophage-colony stimulating factor (M-CSF) granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) Transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) ซึ่งจะได้



รูปที่ 1 แผนภาพแสดงผลของ estrogen ต่อ cytokine activity estrogen จะมีผลยับยั้ง IL-6 และ TNF- $\alpha$  gene โดยผ่านทาง NF- $\kappa$ B และ AP-1 dependent mechanism ตามลำดับ cytokine ที่ถูกควบคุมโดย estrogen ได้แก่ IL-1 IL-6 TNF- $\alpha$  M-CSF GM-CSF OPG และ TGF- $\beta$  ( $\downarrow$  = มีผลกระทบ  $\perp$  = มีผลยับยั้ง) (ดัดแปลงจาก J. Pfeilschifter, R.Koditz, M. Pfohl, and H.Schatz Changes in Proinflammataory Cytokine Activity after Menopause Endocr. Rev., February 1, 2002 ; 23(1) : 90-119)

กล่าวถึงรายละเอียดของ cytokine แต่ละตัวดังนี้

#### 1. Osteoprotegerin (OPG)

OPG บางทีเรียกว่า osteoclastogenesis inhibiting factor จัดอยู่ในกลุ่ม TNF receptor OPG มีบทบาทในการยับยั้ง osteoclast formation<sup>40,41</sup> OPG สร้างมาจากเนื้อเยื่อหลายชนิด<sup>2</sup> estrogen จะกระตุ้น human osteoblast<sup>17</sup> และ stromal cell<sup>42,43</sup> ให้มีการสร้าง OPG mRNA และโปรตีนมากขึ้น สภาวะ estrogen deficiency มีผลให้การสร้าง OPG ลดลง และเมื่อให้การรักษาด้วย estrogen จะทำให้การสร้าง OPG กลับมามากขึ้น<sup>44</sup> จากการเปรียบเทียบพบว่าหญิงวัยหมดประจำเดือนที่ได้รับการรักษาด้วย hormone จะมีระดับของ OPG ในเลือดสูงกว่าหญิงวัยหมดประจำเดือนที่ไม่ได้รับการรักษาด้วย hormone<sup>45</sup>

#### 2. Receptor activator of nuclear factor kappa B (RANK)

RANK บางทีเรียกว่า osteoclast differentiation and activation receptor RANK จัดอยู่ในกลุ่ม TNF receptor พบได้บนเซลล์ของ osteoclast และ dendritic cell

#### 3. Receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANKL)

RANKL บางทีเรียกว่า osteoclast differentiation factor หรือ OPG-ligand หรือ TNF related activation - induced cytokine RANKL จัดอยู่ในกลุ่ม TNF ligand family เป็น receptor ที่พบบน membrane ของ stromal cell osteoblast lymphocyte และ endothelial cell RANKL มีบทบาทเกี่ยวกับ lymphocyte development สภาวะ estrogen deficiency จะเปลี่ยนแปลง activity ของ RANKL เป็นผลให้มีการพัฒนาและกระตุ้น activity ของ T และ B cell<sup>46</sup> ปฏิกริยาระหว่าง RANKL และ RANK ซึ่งอยู่บน osteoclast จะกระตุ้น differentiation ของ osteoclast precursor cell ไปเป็น mature osteoclast และเพิ่ม activity ของ osteoclast<sup>47</sup> พบว่าเมื่อ OPG แยกที่ RANK จับกับ RANKL จะสามารถยับยั้งปฏิกริยานี้ได้ ในหนู mice ที่มี RANKL และ RANK deficiency จะมีผลให้ osteoclast ไม่พัฒนา<sup>48, 49</sup>

แสดงให้เห็นว่า เมื่อ RANKL จับกับ RANK จะ

ส่งเสริมให้มี osteoclastogenesis และเมื่อ OPG แยกที่ RANK จับกับ RANKL จะสามารถยับยั้ง osteoclastogenesis ได้

#### 4. Granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) และ macrophage-colony stimulating factor (M-CSF)

GM-CSF และ M-CSF สร้างโดย bone marrow stromal cell มีบทบาทในการชักนำให้เกิด osteoclast formation โดยควบคุมการสร้าง การเจริญเติบโต และการทำหน้าที่ของ granulocyte และ monocyte-macrophage<sup>50</sup> พบว่าการเลี้ยง mononuclear cell ที่นำมาจากเลือดของหญิงที่ทำการ surgical menopause จะถูกกระตุ้นให้มีการเพิ่ม activity ของ GM-CSF<sup>10</sup> และเซลล์ของ bone marrow ของหญิงที่อยู่ในระยะ 5 ปีแรกของ natural menopause จะหลั่ง GM-CSF มากกว่าเซลล์ของ bone marrow ของหญิงในระยะ premenopause<sup>15</sup> สภาวะ estrogen deficiency กระตุ้นให้ stromal cell ใน bone marrow สร้าง soluble M-CSF<sup>23, 51</sup> ส่วน estrogen จะยับยั้ง bone marrow ไม่ให้สร้าง membrane bound M-CSF<sup>52</sup>

ตามที่ทราบมาแล้วว่า osteoclast มีกำเนิดมาจาก granulocyte-macrophage progenitor cell ใน bone marrow และ osteoclast มีบทบาทสำคัญในการละลายกระดูก จากผลการทดลองข้างต้นจึงกล่าวได้ว่าเมื่อเปรียบเทียบหญิงวัยหมดประจำเดือนหรือหญิงที่มีสภาวะ estrogen deficiency จะกระตุ้นให้มีการสร้าง GM-CSF และ M-CSF มากกว่า และชักนำให้เกิด osteoclast จำนวนมากกว่าและมีผลให้เกิดการละลายกระดูกมากกว่า เมื่อเทียบกับหญิงวัยก่อนหมดประจำเดือนซึ่งมีระดับของ GM-CSF น้อยกว่า

#### 5. Tumor necrosis factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )

TNF- $\alpha$  สร้างจาก macrophage มีหน้าที่คล้ายกับ IL-1 นอกจากนั้นยังมีการศึกษาพบว่า TNF- $\alpha$  ยับยั้งไม่ให้ osteoblast สร้าง collagen<sup>53, 54-59</sup>

#### 6. Transforming growth factor- $\beta$ (TGF- $\beta$ )

TGF- $\beta$  ถูกปล่อยมาจาก bone matrix ระหว่างการละลายเนื้อกระดูก (osteoclasia) ปัจจุบันพบว่าหน้าที่ของ TGF- $\beta$  มีทั้งยับยั้งและกระตุ้นการเกิด osteoclast หน้าที่ของ TGF- $\beta$  เกี่ยวกับการยับยั้ง

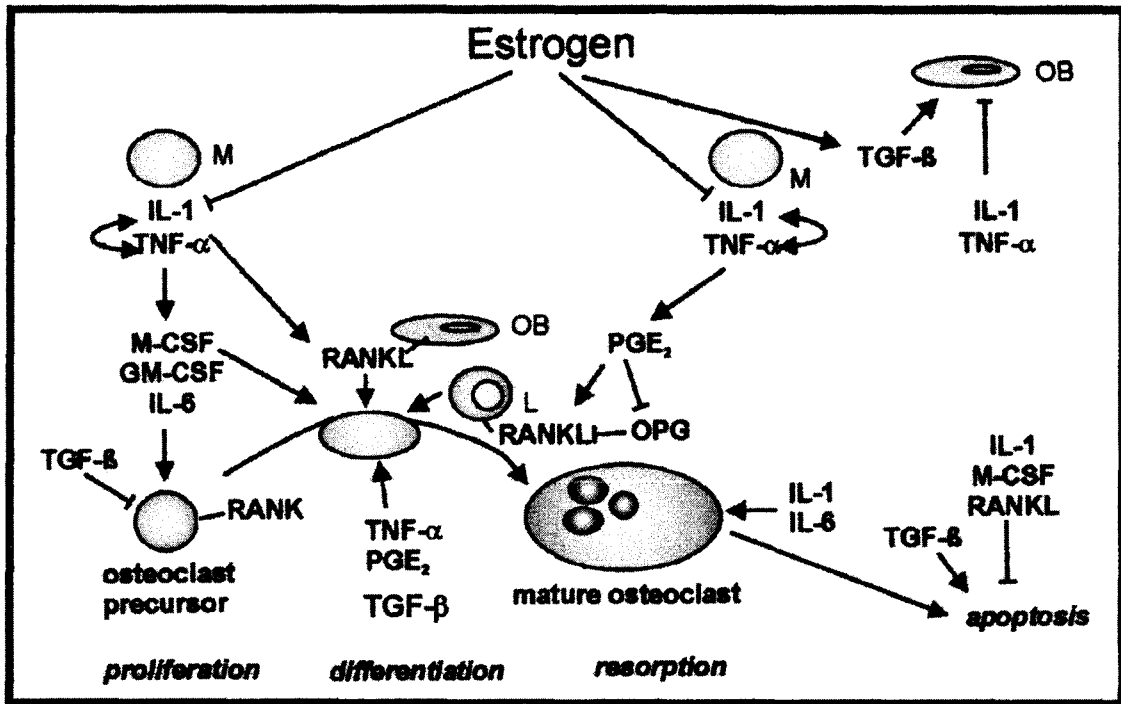
osteoclast ได้แก่ การศึกษาที่พบว่า TGF- $\beta$  เป็น major inhibitor ของ osteoclast generation<sup>60,61</sup> โดย TGF- $\beta$  จะยับยั้งการเพิ่มจำนวนของ osteoclast precursor (รูปที่ 2) และยังพบว่า TGF- $\beta$  ชักนำ osteoblast ให้สร้าง bone matrix<sup>62,63</sup> และส่งเสริมการเกิด mineralization ของ matrix นอกจากนี้ TGF- $\beta$  ยังกระตุ้นการเกิด apoptosis ของ osteoclast<sup>64</sup> (รูป 2) ในทางกลับกันการศึกษาเมื่อไม่นานมานี้พบว่า TGF- $\beta$  มีบทบาทสำคัญในการ differentiation ของ osteoclast precursor cell ไปเป็น osteoclast<sup>65-67</sup> ซึ่งการที่ TGF- $\beta$  มีบทบาท 2 อย่างที่ตรงกันข้ามนี้ยังต้องการการศึกษาเพิ่มเติมอีกต่อไป

จากการศึกษาพบว่า ovariectomized rat เมื่อได้รับ IL-1 receptor antagonist (IL-1ra)<sup>13</sup> หรือ inhibitory ต่อ IL-1<sup>68</sup> หรือ TNF- $\alpha$  binding protein (potent inhibitor of TNF- $\alpha$ )<sup>14</sup> จะสามารถป้องกันการสูญเสียกระดูกได้ และใน IL-6 knockout mice ที่ถูกทำ ovariectomy สามารถป้องกันไม่ให้มี bone

loss ได้<sup>69</sup> ใน ovariectomized mice ที่มี T cell deficiency ก็จะไม่มีการเพิ่ม bone loss<sup>70</sup> นอกจากนี้การเพิ่มขึ้นของจำนวน osteoclast ทั้งใน *in vitro* และ *in vivo* ของ ovariectomized mice ถูกยับยั้งได้โดย antibody ต่อ IL-6<sup>12,71</sup>

**IV Multiple interaction by which cytokine and estrogen regulate bone resorption**

จากที่กล่าวมาทั้งหมดตั้งแต่ต้นจะเห็นว่าระดับของ estrogen จะมีผลควบคุมให้เซลล์บางชนิด เช่น bone cells, cells located with in bone environment, hematopoietic cells และ lymphocyte สร้าง cytokines และ cytokines จะไปมีผลที่ขั้นตอนต่างๆ ของ osteoclastogenesis ขั้นตอนกระตุ้น osteoclast activity และขั้นตอน apoptosis ของ osteoclast ซึ่งปฏิกิริยาทั้งหมดจะไปมีผลต่อการละลายตัวของกระดูก โดย cytokine อาจจะถูกปล่อยโดยตรงหรือออกฤทธิ์ผ่าน local factor ตัวอื่น เราสามารถแบ่งกลุ่ม cytokine ตามการออกฤทธิ์ของ cytokine ดังนี้



รูปที่ 2 แผนภาพแสดงปฏิกิริยาของ estrogen ที่มีผลต่อ cytokine activity และ cytokine เหล่านี้จะมีผลที่ขั้นตอน osteoclast precursor proliferation osteoclast differentiation osteoclast resorption activity และ apoptosis ของ osteoclast (↓ = มีผลกระตุ้น ⊥ = มีผลยับยั้ง) (ดัดแปลงจาก J. Pfeilschifter, R.Koditz, M. Pfohl, and H.Schatz Changes in Proinflammataory Cytokine Activity after Menopause Endocr. Rev., February 1, 2002; 23(1): 90-119)

## กลุ่มของ cytokine แบ่งตามการออกฤทธิ์ของ cytokine (รูป 2)

1. กลุ่ม cytokine ที่ออกฤทธิ์กระตุ้นการเพิ่มจำนวน osteoclast precursor cell (facilitate osteoclast precursor proliferation) ได้แก่ IL-6 RANKL, M-CSF และ GM-CSF

- IL-1 และ TNF- $\alpha$  จะกระตุ้นให้มีการสร้าง M-CSF, GM-CSF และ IL-6 ซึ่งเป็น cytokine ที่สำคัญในการกระตุ้น early osteoclast precursor ให้แบ่งตัวเพิ่มจำนวน<sup>72,73,74</sup> โดย IL-1 สร้างจาก monocyte และ macrophage<sup>75</sup> และ TNF- $\alpha$  สร้างจาก monocyte / macrophage<sup>75</sup> และ T cell<sup>76,77,78</sup> ของ bone marrow ของหญิงวัยหมดประจำเดือน

2. กลุ่ม cytokine ที่มีบทบาทในการเปลี่ยน osteoclast precursor cell ไปเป็น mature osteoclast (participate in the differentiation of osteoclast precursor cell into mature osteoclast) ได้แก่ RANKL TNF- $\alpha$  PGE<sub>2</sub> และ TGF- $\beta$

- TNF- $\alpha$ <sup>79,80,81,82</sup> PGE<sub>2</sub><sup>83</sup> และ TGF- $\beta$  ออกฤทธิ์โดยตรงในปฏิกิริยา osteoclast differentiation โดยไม่ผ่าน RANKL

3. กลุ่ม cytokine ที่กระตุ้นปฏิกิริยาการละลายกระดูกของ osteoclast (stimulate the bone resorption activity of the mature osteoclast) ได้แก่ RANKL IL-1 และ IL-6

- IL-1 และ TNF- $\alpha$  กระตุ้นให้มีการสร้าง prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) มากขึ้น<sup>84</sup> และ PGE<sub>2</sub> ไปกระตุ้นให้ lymphocyte สร้าง RANKL<sup>85</sup> เมื่อ RANKL จับกับ RANK บน osteoblast จะกระตุ้น resorbing activity ของ osteoclast ขณะเดียวกัน PGE<sub>2</sub> จะไปยับยั้งไม่ให้มีการสร้าง OPG (เพราะ OPG จะแย่ง RANK จับกับ RANKL)

- IL-1<sup>80,81</sup> และ IL-6<sup>86</sup> กระตุ้น osteoclast activity ด้วยวิธี RANKL-independent mechanism

4. กลุ่ม cytokine ที่ควบคุม osteoclast apoptosis (modulate osteoclast apoptosis) ได้แก่ IL-1 M-CSF RANKL และ TGF- $\beta$  พบว่าการเพิ่มขึ้นของระดับ IL-1<sup>87,88</sup>, M-CSF<sup>89</sup>, RANKL<sup>90</sup> และการลดลงของระดับ TGF- $\beta$ <sup>64</sup> มีผลยับยั้ง osteoclast

apoptosis ทำให้ช่วงอายุของ osteoclast ยาวขึ้นเป็นผลให้มี bone resorption มากขึ้น

5. กลุ่ม cytokine ที่มีผลต่อการทำงานของ osteoblast (have potent effects on osteoblast function) ได้แก่ IL-1 TNF- $\alpha$  และ TGF- $\beta$

- IL-1 และ TNF- $\alpha$  ยับยั้ง osteoblast ไม่ให้สร้าง collagen<sup>53,54-59</sup>

- TGF- $\beta$  กระตุ้น bone formation ของ osteoblast<sup>62, 63</sup>

จากหลายๆ ปฏิกิริยาที่แสดงถึงการควบคุมกันระหว่าง estrogen กับ cytokine ซึ่งนำไปสู่การละลายของกระดูก จะพบว่า cytokines ส่วนใหญ่จะถูกควบคุมโดย cytokines ตัวอื่นทำให้เกิดเป็น network ของปฏิกิริยาการประสานงานกันของ cytokines ที่มีผลต่อการกระตุ้น osteoclastogenesis osteoclast resorption activity และการยับยั้ง apoptosis ของ osteoclast ซึ่งจะนำไปสู่การละลายกระดูกและก่อให้เกิดสภาวะกระดูกพรุน (osteoporosis)

## สรุป

บทความนี้ได้อธิบายให้เห็นถึงความสัมพันธ์ของการเปลี่ยนแปลงกระบวนการทำงานของ cytokine (cytokine activity) ตามการเปลี่ยนแปลงของระดับ estrogen ที่ลดลงของหญิงวัยหมดประจำเดือน โดยพบว่าสภาวะ estrogen deficiency มีผลให้ IL-1 IL-6 และ TNF- $\alpha$  M-CSF GM-CSF RANK และ RANKL สูงขึ้น ซึ่งจะมีผลในการเพิ่มจำนวนและเพิ่มการทำงานของ osteoclast และส่งผลให้มีการละลายเนื้อกระดูกมากขึ้นในสภาวะหมดประจำเดือน ส่วน estrogen จะกระตุ้นให้มีการสร้าง OPG ซึ่งจะไปแย่งที่ RANK จับกับ RANKL เพื่อยับยั้ง osteoclastogenesis TGF- $\beta$  ออกฤทธิ์ทั้งกระตุ้นและยับยั้ง osteoclastogenesis ซึ่งยังต้องการการศึกษาหน้าที่ของ TGF- $\beta$  เพิ่มเติมต่อไปอีก สภาวะกระดูกพรุนของหญิงวัยหมดประจำเดือนเกิดจากอัตราการละลายกระดูกมากกว่าอัตราการสร้างกระดูก โดยอัตราการละลายกระดูกจะเพิ่มขึ้นตามอายุและสภาวะหมดประจำเดือน มีการศึกษาที่พบว่า การออกกำลังกายหลังวัยหมด

ประจำเดือนไม่สามารถป้องกันการละลายกระดูกได้ ซึ่งเชื่อว่าเป็นเพราะสภาวะ estrogen deficiency ไปเปลี่ยน set point ของกระดูกในการตอบสนองต่อ mechanical force (mechanostat) ดังนั้นในระยะที่กระดูกยังสามารถเจริญเติบโตได้ควรจะทำให้กระดูกมี optimal peak bone mass ให้สูงที่สุดโดยรับประทานอาหารที่มีประโยชน์ ได้รับแคลเซียมและวิตามินให้เพียงพอ และออกกำลังกายสม่ำเสมอ เมื่อเข้าสู่สภาวะวัยหมดประจำเดือนซึ่งมีอัตราการละลายกระดูกมากกว่าอัตราการสร้างกระดูกความหนาแน่นของกระดูกจะได้น้อยเหลือ น้อยเกินไปจนเป็นสาเหตุให้เกิดกระดูกเปราะและหักง่ายในหญิงวัยหมดประจำเดือน

### เอกสารอ้างอิง

- Consensus Development Conference : prophylaxis and treatment of osteoporosis. Am J Med. 1993; 94: 646-650.
- Lawrence G. Raisz 2001 Pathogenesis of postmenopausal osteoporosis. Reviews in Endocrine And Metabolic Disorders 2(1): 5-12.
- Eriksen EF, Colvard DS, Berg NJ, Graham ML, Mann KG, Spelsberg TC, Riggs BL 1988 Evidence of estrogen receptors in normal human osteoblast-like cells. Science 241: 84-86.
- Komm BS, Terpening CM, Benz DJ, Graeme KA, Gallegos A, Korc M, Greene GL, O'Malley BW, Haussler MR 1988 Estrogen binding, receptor mRNA, and biological response in osteoblast-like osteosarcoma cells. Science 241: 81-84.
- Oursler MJ, Osdoby P, Pyfferoen J, Riggs BL, Spelsberg TC 1991 Avian osteoclasts as estrogen target cells. Proc Natl Acad Sci USA 88: 6613-6617.
- Hoyland JA, Mee AP, Baird P, Braidman IP, Mawer EB, Freemont AJ 1997 Demonstration of estrogen receptor mRNA in bone using *in situ* reverse-transcriptase polymerase chain reaction. Bone 20: 87-92.
- Onoe Y, Miyaura C, Ohta H, Nozawa S, Suda T 1997 Expression of estrogen receptor  $\beta$  in rat bone. Endocrinology 138: 4509-4512.
- Bellido T, Girasole G, Passeri G, Yu XP, Mocharla H, Jilka RL, Notides A, Manolagas SC 1993 Demonstration of estrogen and vitamin D receptors in bone marrow-derived stromal cells: up-regulation of the estrogen receptor by 1,25-dihydroxyvitamin-D<sub>3</sub>. Endocrinology 133: 553-562.
- Pfeilschifter J, Koditz R, Pfohl M, Scholz H 2002 Changes in proinflammatory cytokine activity after menopause. Endocr Rev 23(1): 90-119.
- Pacifici R, Rifas L, McCracken R, Vered I, McMurtry C, Avioli LV, Peck WA 1989 Ovarian steroid treatment blocks a postmenopausal increase in blood monocyte interleukin 1 release. Proc Natl Acad Sci USA 86: 2398-2402.
- Pacifici R, Brown C, Puscheck E, Friedrich E, Slatopolsky E, Maggio D, McCracken R, Avioli LV 1991 Effect of surgical menopause and estrogen replacement on cytokine release from human blood mononuclear cells. Proc Natl Acad Sci USA 88: 5134-5138.
- Jilka RL, Hangoc G, Girasole G, Passeri G, Williams DC, Abrams JS, Boyce B, Broxmeyer H, Manolagas SC 1992 Increased osteoclast development after estrogen loss: mediation by interleukin-6. Science 257: 88-91.
- Kimble RB, Vannice JL, Bloedow DC, Thompson RC, Hopfer W, Kung VT, Brownfield C, Pacifici R 1994 Interleukin-1 receptor antagonist decreases bone loss and bone resorption in ovariectomized rats. J Clin Invest 93: 1959-1967.
- Kitazawa R, Kimble RB, Vannice JL, Kung VT, Pacifici R 1994 Interleukin-1 receptor antagonist and tumor necrosis factor binding protein decrease osteoclast formation and bone resorption in ovariectomized mice. J Clin Invest 94: 2397-2406.
- Bismar H, Diel I, Ziegler R, Pfeilschifter J 1995 Increased cytokine secretion by human bone marrow cells after menopause or discontinuation of estrogen replacement. J Clin Endocrinol Metab 80: 3351-3355.
- Passeri G, Girasole G, Jilka RL, Manolagas SC 1993 Increased interleukin-6 production by murine bone marrow and bone cells after estrogen withdrawal. Endocrinology 133: 822-828.
- Girasole G, Giuliani N, Modena AB, Passeri G, Pedrazzoni M 1999 Oestrogens prevent the increase of human serum soluble interleukin-6 receptor induced by ovariectomy *in vivo* and decrease its release in human osteoblastic cells *in vitro*. Clin Endocrinol (Oxf) 51: 801-807.
- Deswal A, Petersen NJ, Feldman AM, Young JB, White BG, Mann DL 2001 Cytokines and cytokine receptors in advanced heart failure: an analysis of the cytokine database from the Vesnarinone trial (VEST). Circulation 103: 2055-2059.
- Lin SC, Yamate T, Taguchi Y, Borba VZC, Girasole G, O'Brien CA, Bellido T, Abe E, Manolagas SC 1997 Regulation of the gp80 and gp130 subunits of the IL-6 receptor by sex steroids in the murine bone marrow. J Clin Invest 100: 1980-1990.
- Rickard D, Russell G, Gowen M 1992 Oestradiol inhibits the release of tumour necrosis factor but not interleukin 6 from adult human osteoblasts *in vitro*. Osteoporos Int 2: 94-102.
- Wang X, Schwartz Z, Yaffe P, Ornoy A 1999 The expression of transforming growth factor- $\beta$  and interleukin-1 $\beta$  mRNA



- and the response to 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 17β-estradiol, and testosterone is age-dependent in primary cultures of mouse-derived osteoblasts *in vitro*. *Endocrine* 11: 13-22.
22. Ralston SH, Russell RGG, Gowen M 1990 Estrogen inhibits release of tumor necrosis factor from peripheral blood mononuclear cells in postmenopausal women. *J Bone Miner Res* 5: 983-988.
  23. Shanker G, Sorci-Thomas M, Adams MR 1994 Estrogen modulates the expression of tumor necrosis factor mRNA in phorbol ester-stimulated human monocytic THP-1 cells. *Lymphokine Cytokine Res* 13: 377-382.
  24. Kimble RB, Srivastava S, Ross FP, Matayoshi A, Pacifici R 1996 Estrogen deficiency increases the ability of stromal cells to support osteoclastogenesis via an interleukin-1 and tumor necrosis factor-mediated stimulation of macrophage colony-stimulating factor production. *J Biol Chem* 271: 28890-28897.
  25. Morishita M, Miyagi M, Iwamoto Y 1999 Effects of sex hormones on production of interleukin-1 by human peripheral monocytes. *J Periodontol* 70: 757-760.
  26. Bernard-Poenaru O, Roux C, Blanque R, Gardner C, de Vernejoul MC, Cohen-Solal ME 2001 Bone-resorbing cytokines from peripheral blood mononuclear cells after hormone replacement therapy: a longitudinal study. *Osteoporos Int* 12: 769-776.
  27. Rogers A, Eastell R 2001 The effect of 17β-estradiol on production of cytokines in cultures of peripheral blood. *Bone* 29: 30-34.
  28. Zuckerman SH, Bryan-Poole N, Evans GF, Short L, Glasebrook AL 1995 *In vivo* modulation of murine serum tumour necrosis factor and interleukin-6 levels during endotoxemia by oestrogen agonists and antagonists. *Immunology* 86: 18-24.
  29. Cheleuitt D, Mizuno S, Glowacki J 1998 *In vitro* secretion of cytokines by human bone marrow: effects of age and estrogen status. *J Clin Endocrinol Metab* 83: 2043-2051.
  30. Farhat MY, Lavigne MC, Ramwell PW 1996 The vascular protective effects of estrogen. *FASEB J* 10: 615-624.
  31. Girasole G, Jilka RL, Passeri G, Boswell S, Boder G, Williams DC, Manolagas SC 1992 17β-Estradiol inhibits interleukin-6 production by bone marrow-derived stromal cells and osteoblasts *in vitro*: a potential mechanism for the antiosteoporotic effect of estrogens. *J Clin Invest* 89: 883-891.
  32. Pottratz ST, Bellido T, Mocharfa H, Crabb D, Manolagas SC 1994 17β-Estradiol inhibits expression of human interleukin-6 promoter-reporter constructs by a receptor-dependent mechanism. *J Clin Invest* 93: 944-950.
  33. Stein B, Yang MX 1995 Repression of the interleukin-6 promoter by estrogen receptor is mediated by NF-κB and C/EBP-β. *Mol Cell Biol* 15: 4971-4979.
  34. Kassem M, Harris SA, Spelsberg TC, Riggs BL 1996 Estrogen inhibits interleukin-6 production and gene expression in a human osteoblastic cell line with high levels of estrogen receptors. *J Bone Miner Res* 11: 193-199.
  35. Cantatore FP, Loverro G, Ingrosso AM, Lacanna R, Sassanelli E, Selvaggi L, Carozzo M 1995 Effect of oestrogen replacement on bone metabolism and cytokines in surgical menopause. *Clin Rheumatol* 14: 157-160.
  36. Scheidt-Nave CE, Bismar H, Leidig-Bruckner G, Seibel MJ, Ziegler R, Pfeilschifter J 1999 Serum interleukin-6 is a major predictor of bone loss in women specific to the first decade past menopause. *J Bone Miner Res* 14(Suppl 1): S147.
  37. Straub RH, Hense HW, Andus T, Scholmerich J, Riegger GA, Schunkert H 2000 Hormone replacement therapy and interrelation between serum interleukin-6 and body mass index in postmenopausal women: a population-based study. *J Clin Endocrinol Metab* 85: 1340-1344.
  38. Gregory MS, Duffner LA, Faunce DE, Kovacs EJ 2000 Estrogen mediates the sex difference in post-burn immunosuppression. *J Endocrinol* 164: 129-138.
  39. Srivastava S, Weitzmann MN, Cenci S, Ross FP, Adler S, Pacifici R 1999 Estrogen decreases TNF gene expression by blocking JNK activity and the resulting production of c-Jun and JunD. *J Clin Invest* 104: 503-513.
  40. Rodan GA, Martin TJ 1981 Role of osteoblasts in hormonal control of bone resorption - a hypothesis. *Calcif Tissue Int* 33: 349-351.
  41. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelly M, Chang MS, Luthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan HL, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Campbell P, Boyle WJ 1997 Osteoprotegerin: A novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 89: 309-319.
  42. Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, Lacey DL, Spelsberg TC, Riggs BL 1999 Estrogen stimulates gene expression and protein production of osteoprotegerin in human osteoblastic cells. *Endocrinology* 140: 4367-4370.
  43. Saika M, Inoue D, Kido S, Matsumoto T 2001 17β-Estradiol stimulates expression of osteoprotegerin by a mouse stromal cell line, ST-2, via estrogen receptor-. *Endocrinology* 142: 2205-2212.
  44. Hofbauer LC, Heufelder AE 2000 Clinical review 114: hot topic. The role of receptor activator of nuclear factor-κB ligand and osteoprotegerin in the pathogenesis and treatment of metabolic bone diseases. *J Clin Endocrinol Metab* 85: 2355-2363.
  45. Browner WS, Lui LY, Cummings SR 2001 Associations of serum osteoprotegerin levels with diabetes, stroke, bone density, fractures, and mortality in elderly women. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 631-637.

46. Kong YY, Boyle WJ, Penninger JM 2000 Osteoprotegerin ligand: a regulator of immune responses and bone physiology. *Immunol Today* 21: 495-502.
47. Stock JL, Coderre JA, McDonald B, Rosenwasser LJ 1989 Effects of estrogen *in vivo* and *in vitro* on spontaneous interleukin-1 release by monocytes from postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 68: 364-368.
48. Kong YY, Yoshida H, Sarosi I, Tan HL, Timms E, Capparelli C, Morony S, Oliveria-dos-Santos AJ, Van G, Itie A, Khoo W, Wakeham A, Dunstan CR, Lacey DL, Mak TW, Boyle WJ, Penninger JM 1999 OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature* 397: 315-323.
49. Dougall WC, Glaccum M, Charrier K, Rohrbach K, Brasel K, De Smedt T, Daro E, Smith J, Tometsko ME, Maliszewski CR, Armstrong A, Shen V, Bain S, Cosman D, Anderson D, Morrissey PJ, Peschon JJ, Schuh J 1999 RANK is essential for osteoclast and lymph node development. *Genes Dev* 13: 2412-2424.
50. Baldwin GC 1992 The biology of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: effects on hematopoietic and nonhematopoietic cells. *Dev Biol* 151: 352-367.
51. Srivastava S, Weitzmann MN, Kimble RB, Rizzo M, Zahner M, Milbrandt J, Ross FP, Pacifici R 1998 Estrogen blocks M-CSF gene expression and osteoclast formation by regulating phosphorylation of Egr-1 and its interaction with Sp-1. *J Clin Invest* 102: 1850-1859.
52. Sarma U, Edwards M, Motoyoshi K, Flanagan AM 1998 Inhibition of bone resorption by 17 $\beta$ -estradiol in human bone marrow cultures. *J Cell Physiol* 175: 99-108.
53. Bertolini DR, Nedwin GE, Bringman TS, Smith DD, Mundy GR 1986 Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation *in vitro* by human tumour necrosis factors. *Nature* 319: 516-518.
54. Centrella M, McCarthy TL, Canalis E 1988 Tumor necrosis factor- $\alpha$  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.
55. Smith DD, Gowen M, Mundy GR 1987 Effects of interferon- $\gamma$  and other cytokines on collagen synthesis in fetal rat bone cultures. *Endocrinology* 120: 2494-2499.
56. Harrison JR, Vargas SJ, Petersen DN, Lorenzo JA, Kream BE 1990 Interleukin-1 and phorbol ester inhibit collagen synthesis in osteoblastic MC3T3-E1 cells by a transcriptional mechanism. *Mol Endocrinol* 4: 184-190.
57. Stashenko P, Dewhirst FE, Rooney ML, Desjardins LA, Heeley JD 1987 Interleukin-1  $\beta$  is a potent inhibitor of bone formation *in vitro*. *J Bone Miner Res* 2: 55-565.
58. Nguyen L, Dewhirst FE, Hauschka PV, Stashenko P 1991 Interleukin-1  $\beta$  stimulates bone resorption and inhibits bone formation *in vivo*. *Lymphokine Cytokine Res* 10: 15-21.
59. Gilbert L, He X, Farmer P, Boden S, Kozlowski M, Rubin J, Nanes MS 2000 Inhibition of osteoblast differentiation by tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Endocrinology* 141: 3956-3964.
60. Pfeilschifter J, Seyedin SM, Mundy GR 1988 Transforming growth factor  $\beta$  inhibits bone resorption in fetal rat long bone cultures. *J Clin Invest* 82: 680-685.
61. Chenu C, Pfeilschifter J, Mundy GR, Roodman GD 1988 Transforming growth factor  $\beta$  inhibits formation of osteoclast-like cells in long-term human marrow cultures. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 5683-5687.
62. Centrella M, Horowitz MC, Wozney JM, McCarthy TL 1994 Transforming growth factor- $\beta$  gene family members and bone. *Endocr Rev* 15: 27-39.
63. Raisz LG 2001 Potential impact of selective cyclooxygenase-2 inhibitors on bone metabolism in health and disease. *Am J Med* 110: 43-45.
64. Hughes DE, Dai A, Tiffée JC, Li HH, Mundy GR, Boyce BF 1996 Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF- $\beta$ . *Nat Med* 2: 1132-1136.
65. Kaneda T, Nojima T, Nakagawa M, Ogasawara A, Kaneko H, Sato T, Mano H, Kumegawa M, Hakeda Y 2000 Endogenous production of TGF- $\beta$  is essential for osteoclastogenesis induced by a combination of receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand and macrophage-colony-stimulating factor. *J Immunol* 165: 4254-4263.
66. Sells Galvin J, Gattlin CL, Horn JW, Fuson TR 1999 TGF- $\beta$  enhances osteoclast differentiation in hematopoietic cell cultures stimulated with RANKL and M-CSF. *Biochem Biophys Res Commun* 265: 233-239.
67. Horwood NJ, Kartsogiannis V, Quinn JM, Romas E, Martin TJ, Gillespie MT 1999 Activated T lymphocytes support osteoclast formation *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun* 265: 144-150.
68. Bradbeer JN, Stroup SJ, Hoffman JC, Gowen M 1996 An orally active inhibitor of cytokine synthesis prevents bone loss in the ovariectomized rat. *J Bone Miner Res* 11(Suppl 1): 123.
69. Poli V, Balena R, Fattori E, Markatos A, Yamamoto M, Tanaka H, Ciliberto G, Rodan GA, Constantini F 1994 Interleukin-6 deficient mice are protected from bone loss caused by estrogen depletion. *EMBO J* 13: 1189-1196.
70. Cenci S, Weitzmann MN, Roggia C, Namba N, Novack D, Woodring J, Pacifici R 2000 Estrogen deficiency induces bone loss by enhancing T-cell production of TNF- $\alpha$ . *J Clin Invest* 106: 1229-1237.
71. Most W, Schot L, Ederveen A, van der Wee-Pals L, Papapoulos S, L $\ddot{u}$ wik C 1995 *In vitro* and *ex vivo* evidence that estrogens suppress increased bone resorption induced by ovariectomy or PTH stimulation through an effect on

- osteoclastogenesis. *J Bone Miner Res* 10: 1523-1530.
72. Kurihara N, Bertolini D, Suda T, Akiyama Y, Roodman GD 1990 IL-6 stimulates osteoclast-like multinucleated cell formation in long-term human marrow cultures by inducing IL-1 release. *J Immunol* 144: 4226-4230.
73. Roodman GD 1992 Interleukin-6: an osteotropic factor? *J Bone Miner Res* 7: 475-478.
74. Pacifici R 1999 Aging and cytokine production. *Calcif Tissue Int* 65: 345-351.
75. Horowitz MC 1993 Cytokines and estrogen in bone: antiosteoporotic effects. *Science* 260: 626-627.
76. Olsen NJ, Kovacs WJ 1996 Gonadal steroids and immunity. *Endocr Rev* 17: 369-384.
77. Rifas L 1999 Bone and cytokines: beyond IL-1, IL-6 and TNF-. *Calcif Tissue Int* 64: 1-7.
78. Gilmore W, Weiner LP, Correale J 1997 Effect of estradiol on cytokine secretion by proteolipid protein-specific T cell clones isolated from multiple sclerosis patients and normal control subjects. *J Immunol* 158: 446-451.
79. Li J, Sarosi I, Yan XQ, Morony S, Capparelli C, Tan HL, McCabe S, Elliott R, Scully S, Van G, Kaufman S, Juan SC, Sun Y, Tarpley J, Martin L, Christensen K, McCabe J, Kostenuik P, Hsu H, Fletcher F, Dunstan CR, Lacey DL, Boyle WJ 2000 RANK is the intrinsic hematopoietic cell surface receptor that controls osteoclastogenesis and regulation of bone mass and calcium metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 1566-1571.
80. Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT, Martin TJ 1999 Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev* 20: 345-357.
81. Kobayashi K, Takahashi N, Jimi E, Udagawa N, Takami M, Kotake S, Nakagawa N, Kinosaki M, Yamaguchi K, Shima N, Yasuda H, Morinaga T, Higashio K, Martin TJ, Suda T 2000 Tumor necrosis factor stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of the ODF/RANKL-RANK interaction. *J Exp Med* 191: 275-286.
82. Azuma Y, Kaji K, Katogi R, Takeshita S, Kudo A 2000 Tumor necrosis factor- $\alpha$  induces differentiation of and bone resorption by osteoclasts. *J Biol Chem* 275: 4858-4864.
83. Wani MR, Fuller K, Kim NS, Choi Y, Chambers T 1999 Prostaglandin E2 cooperates with TRANCE in osteoclast induction from hemopoietic precursors: synergistic activation of differentiation, cell spreading, and fusion. *Endocrinology* 140: 1927-1935.
84. Tashjian Jr AH, Voelkel EF, Lazzaro M, Goad D, Bosma T, Levine L 1987 Tumor necrosis factor- $\alpha$  (cachectin) stimulates bone resorption in mouse calvaria via a prostaglandin-mediated mechanism. *Endocrinology* 120: 2029-2036.
85. Burgess TL, Qian Y, Kaufman S, Ring BD, Van G, Capparelli C, Kelley M, Hsu H, Boyle WJ, Dunstan CR, Hu S, Lacey DL 1999 The ligand for osteoprotegerin (OPGL) directly activates mature osteoclasts. *J Cell Biol* 145: 527-538.
86. Adebajo OA, Moonga BS, Yamate T, Sun L, Minkin C, Abe E, Zaidi M 1998 Mode of action of interleukin-6 on mature osteoclasts. Novel interactions with extracellular Ca<sup>2+</sup> sensing in the regulation of osteoclastic bone resorption. *J Cell Biol* 142: 1347-1356.
87. Jimi E, Shuto T, Koga T 1995 Macrophage colony-stimulating factor and interleukin-1 maintain the survival of osteoclast-like cells. *Endocrinology* 136: 808-811.
88. Jimi E, Ikebe T, Takahashi N, Hirata N, Suda T, Koga T 1996 Interleukin-1 activates an NF- $\kappa$ B-like factor in osteoclast-like cells. *J Biol Chem* 271: 4605-4608.
89. Fuller K, Owens JM, Jagger CJ, Wilson A, Moss R, Chambers TJ 1993 Macrophage colony-stimulating factor stimulates survival and chemotactic behavior in isolated osteoclasts. *J Exp Med* 178: 1733-1744.
90. Takahashi N, Udagawa N, Suda T 1999 A new member of tumor necrosis factor ligand family, ODF/OPGL/TRANCE/RANKL, regulates osteoclast differentiation and function. *Biochem Biophys Res Commun* 256: 449-455.