

조골세포 세포사멸의 Estrogen 조절에 대한  
Hsp27 의 영향에 관한 연구

고려대학교 의과대학 치과학교실 구강악안면외과

장 현석, 임 재석, 권 종진, 최 철민

저자연락처

: 장 현석

경기도 안산시 고잔동 516번지

고려대학교 안산병원 구강악안면외과(우편번호:425-020)

전화:031-412-5370

E-mail:omfs1109@korea.ac.kr

Fax:031-485-5373

## Abstract

### Hsp27 Contributes to Estrogen Regulation of Osteoblast Apoptosis

Korea University, College of Medicine, Dept. of Oral & Maxillofacial Surgery

Hyonseok Jang, Jaesuk Rim, Jongjin Kwon, Cheolmin Choi

Estrogen may promote osteoblast/osteocyte viability by limiting apoptotic cell death. We hypothesize that hsp27 is an estrogen-regulated protein that can promote osteoblast viability by increasing osteoblast resistance to apoptosis. The purpose of this study was to determine the effect of estrogen treatment and heat shock on TNF $\alpha$ -induced apoptosis in the MC3T3-E1 cell line. Cells were treated with 0 – 100 nM 17 $\beta$  estradiol (or ICI 182780) for 0 – 24 hours before heat shock. After recovery, apoptosis was induced by treatment with 0 – 10 ng/ml TNF $\alpha$ . Hsp levels were evaluated by Northern and Western analysis using hsp27, hsp47, hsp70c and hsp70i-specific reagents. Apoptosis was revealed by *in situ* labeling with Terminal Deoxyribonucleotide Transferase (TUNEL). A 5-fold increase in hsp27 protein and mRNA was noted after 5 hours of treatment with 10–20 nM 17 $\beta$  estradiol prior to heat shock. Increased abundance of hsp47, hsp70c or hsp70i was not observed. TUNEL indicated that estrogen treatment also reduced (50%) MC3T3-E1 cell susceptibility to TNF $\alpha$ -induced apoptosis. Treatment with hsp27-specific antisense oligonucleotides prevented hsp27 protein expression and abolished the

protective effects of heat shock and estrogen treatment on TNF $\alpha$  – induced apoptosis. Hsp27 is a determinant of osteoblast apoptosis, and estrogen treatment increases hsp27 levels in cultured osteoblastic cells. Hsp27 contributes to the control of osteoblast apoptosis and may be manipulated by estrogenic or alternative pathways for the improvement of bone mass.

-----

Key Words: Heat Shock, Bone, Oligonucleotide, TNF- $\alpha$ , TUNEL

## I. 서론

세포사멸(Apoptosis)은 조직의 생성과 파괴에 기여하는 기전의 하나로 DNA fragmentation 을 통하여 궁극적으로 세포의 파괴를 야기하는 다양한 경로를 거치게 된다. 세포사멸 기전이 시작되는 신호는  $TNF\alpha$ 에 의하는데 이는  $TNF\alpha$  수용체를 통하게 된다. 이밖에도 CD95 와 Fas, APO1, APO2, TRAIL-R 그리고 APO3/LARD 등의 수용체 등이 작용하는 것으로 알려져 있으며 이런 신호들은 caspase 등의 단백분해효소와 작용하는 FADD/MORT1 혹은 TRADD 등의 단백질과 관계 있는 다양한 경로를 통해 매개되는 것으로 알려지고 있다. Bcl 2, Bax, Bad 등, caspase 를 활성화 시키는 여러 가지 조절 인자들이 밝혀졌는데 궁극적으로 caspase 는 세포사멸을 유발하는 다양한 핵산 분해효소를 활성화시키는 것으로 알려져 있다.<sup>1</sup>

세포사멸을 조절하는 여러 유전자뿐만 아니라 몇 가지 hsp(heat shock protein)도 역시 세포사멸을 방지하는 역할을 하는 것으로 여겨지고 있는데 몇 가지 실험 모델에서 hsp70 과 hsp27 에 의한 세포사멸 억제가 보고되었다.<sup>2,3</sup> 또한 미리 열처리(heat shock)를 시행한 경우에서 역시 hsp 의 발현과 이에 따른 세포사멸의 억제를 보이는 결과가 보고되었으나<sup>4</sup>, 흥미롭게도 유사한 실험 모델에서 정반대로 열처리에 의한 세포사멸의 촉진도 보고되고 있다.<sup>5,6</sup> 위의 보고들을 통하여 볼 때 세포에 따른 특이성 혹은 hsp 특이성에 의하여 세포사멸의 신호화를 촉진, 혹은 억제하는 것으로 생각된다.

조골세포(osteoblast)의 증식이나 세포사멸 기전에 의해 성장과 발육과정에서 이 세포들의 수가 조절되는데 골조직에서 골세포(ostecocyte)와 조골세포가 세포사멸 과정을 거쳐 제거된다.<sup>7</sup> 골세포의 세포사멸은 골병변이 발생하였을 때 증가되는 것이 관찰되는데

<sup>8,9,10</sup> , 골 대사조절 (bone adaptation) 과정에 관련된 세포들의 작용에 의한 것으로 생각되고 있다.<sup>10</sup> 현재까지 조골세포와 골세포에서 이런 기전이 명확히 규명되지는 않았지만 MC3T3-E1 세포주를 이용한 연구에서 NF- $\kappa$ B의 활성화에 의한 세포사멸 기전이 보고 되어있다.<sup>11</sup>

조골세포와 골세포의 세포사멸 과정에서의 estrogen의 작용은 많은 관심을 유발하고 있는데 이는 조골세포의 활성화에 영향을 미치는 생리적, 혹은 병적상태의 골조직에서 estrogen에 의해 골량이 변화될 수 있기 때문인 것으로 생각된다. 실제로 생활력 있는 조골세포의 수가 골량을 나타내는 중요한 지표로 사용되고 있다. 이와 같이 estrogen은 세포사멸 작용에 관계되어 골내의 조골세포와 골세포의 수를 조절할 수 있는 것으로 생각되는데 난소절제 실험동물에서 골수에서 세포사멸 과정의 골세포가 다수 관찰된다.<sup>8</sup> 실제 사람에서도 약물과 연관되어 estrogen이 저하된 경우에 골세포의 세포사멸이 다량 관찰되는데<sup>12</sup> 이와 같은 estrogen에 의한 세포사멸 조절은 다양한 기전을 통하여 이루어지는 것으로 생각되는데 hsp27이 조골세포의 세포사멸 조절에 작용하는 estrogen에 관련되는 단백질임이 밝혀짐에 따라<sup>13,14,15</sup> 본 연구에서는 성장중인 백서 경골부에서 면역조직화학 분석을 통하여 hsp27의 발현을 확인하여 보고 MC3T3-E1 세포주를 이용하여 estrogen에 의한 세포사멸 조절에 미치는 hsp27의 작용기전을 규명하고자 하였다.

## II. 연구 재료 및 방법

1. **면역조직 화학분석:** 200g의 성장중인 Fisher 344 백서 경골부에서 hsp27의 발현 여부를 확인하기 위하여 면역조직 화학분석을 시행하였다. 백서 경골부를 채취하여 10% formalin에서 2시간 동안 고정한 후 100 mM phosphate buffer (pH 7.3)에 보관하였다. 10% EDTA를 이용하여 탈회하고 5  $\mu$ m 파라핀 포매 절편을 제작하여 toluidine blue (pH 5.5)를 이용하여 각각의 절편을 염색하여 연조직, 연골부 및 골조직부를 확인하였고 normal goat serum으로 blocking하고 세척한 후 affinity purified anti-hsp27 antibody, normal rabbit serum 혹은 PBS로 1-24 시간 동안 부란하였다. 세척 후 모든 표본을 1:250의 horseradish peroxidase - conjugated goat anti - rabbit antibody (Vector)으로 부란하였고 AEC chromagen (Zymed, South San Francisco, CA)을 이용하여 관찰하였다.

2. **세포배양:** 10% FCS와 penicillin/streptomycin 등의 항생제를 포함한  $\alpha$ MEM을 사용하여 MC3T3 - E1 세포를 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 의 조건에서 배양 하였다.<sup>16</sup> 먼저 10% charcoal stripped serum (Hyclone)과 항생제를 포함한 phenol red free media에서 24시간 동안 계대배양을 시행하였으며 에탄올에 포함된 10mM stock solution을 이용하여 배양액에 0 - 100 nM의 농도로 희석하여 17  $\beta$  estradiol( $\beta$ E<sub>2</sub>, Sigma)을 0-24 시간 동안 투여하였다. 배양용기를 42.5°C incubator에서 2시간 동안 열처리(heat shock)를 시행 하였으며 열처리 시행 후 3시간 동안 세포의 회복기를 준 후 RNA와 protein을 추출하였다. TNF $\alpha$ 를 투여하여 세포사멸을 유도하였는데 0 - 2.0 ng / ml의 TNF $\alpha$ 를 대조군 배지와 열처리 배지에 각각 투여하였다.

3. **HSP 발현의 측정:** Hsp의 발현을 열처리와  $\beta$ E<sub>2</sub> 의 농도 및 TNF $\alpha$  투여에 따라 측정하였는데 총 단백을 RIPA buffer를 이용하여 추출하여 micro BCA assay를 이용하여 양을 측정하였다. 각 10  $\mu$ g의 단백질을 10% SDS - PAGE을 이용하여 전기영동을 시행하였으며

methanol - based buffer를 이용하여 니트로셀룰로스 filter에 이전하였다.<sup>17</sup> Immunoblotting은 정제된 rabbit anti-hsp27 antibody<sup>18</sup> 와 hsp47, hsp70 cognate, hsp70 inducible, hsp90(StressGen: Vancouver, BC)에 대한 monoclonal antibody를 이용하여 Blotting을 사용하였으며 Horseradish - peroxidase conjugated secondary antibody (Vector; Burlingame, CA)을 이용하여 immunocomplex(ECL, Amersham, Arlington Heights, IL)의 chemiluminescent detection을 시행 하였다. 배양세포로부터 acid phenol 추출법을 이용하여 RNA를 추출하였는데 cold PBS로 3회 세척한 후 guanidine isothiocyanate buffer에 녹여 시행 하였다.<sup>19</sup> RNA의 농도를 spectrophotometry를 이용하여 OD 260에서 측정 하였다. 10 µg의 RNA를 1.0% agarose formaldehyde denaturing gel에서 전기영동을 시행 하였으며 이 gel을 Whatman's paper에서 건조 시킨 뒤 DEPC H<sub>2</sub>O를 이용하여 rehydration 시켰다. Prehydration 후 gel을 hsp27, hsp68과 hsp86의 [<sup>32</sup>P]-αdCTP random primer labeled mouse cDNA probe를 이용하여 표지 하였고, 65°C에서 1x SSC를 이용하여 세척하였으며, 자가방사선 사진을 촬영하여 Scionics PC image analysis software (Scionics PC, NIH, Bethesda, MD)를 이용하여 측정하였다.

**4. Antisense oligonucleotide 처리:** Murine hsp27 cDNA의 첫 36bp에 대한 S - oligos<sup>20</sup>(5' -CGCGGCGCTCGGTCATGT and 5' - GCAGCAGCGAGAAGGGCA)를 합성 하였다. 80% 정도 confluent한 상태에서 세포를 PBS로 세 차례 세척하고 0 - 20 nM 농도의 oligonucleotide를 포함한 αMEM을 배양액에 투여 하였다. 2시간 경과 후 10% 양의 serum을 투여한 후 밤새 부란하였다. 그 후 세포를 estrogen과 vehicle 처리 하였고 열 처리를 시행 하였다. 세포사멸을 유도하기 위해 TNFα를 투여 하였다.

**5. 세포 생활력의 측정:** TNFα 처리 후와 hsp 발현 후의 생활력을 유지하는 세포의 수를 trypan blue를 이용하여 직접 계산하였다. 각각의 처리 군에서 5회씩 측정 하였으며 평균

값을 구하였다.

**6. DNA fragmentation 의 분석:** 세포사멸을 분석하기 위해 DNA fragmentation 을 이용하였는데 biotinylated nucleotides 의 terminal deoxyribonucleotide transferase incorporation(TUNEL, Trevigen, Rockville MD)을 사용하여 fragmented DNA 를 측정하였다. 세포들을 charcoal stripped serum 를 포함한 phenol – red free media 를 이용하여 4 well glass 배양 slide 를 사용하여 estrogen, vehicle 및 열처리를 시행한 후 8–16 시간 동안 0 – 2.0 ng/ml TNF $\alpha$  또는 0 – 600 nM staurosporine 로 처리 하였다. Coverslips 을 cold PBS 로 세척한 뒤 고정하고 fragmented DNA 의 enzymatic labeling 을 시행 하였다. Well 당 전체 세포 수와 양성 반응을 보이는 세포의 수를 직접 계산하였으며 세포사멸을 보이는 세포의 비율을 계산 하였다(n = 5).



### III. 연구결과

#### 1. 골 주위세포(bone lining cell)와 조골세포의 hsp27 의 발현

백서 경골부의 면역조직화학 검사 소견상 골을 형성하는 부위의 골 주위세포와 조골세포 부위에서 hsp27 의 발현을 관찰할 수 있었고 골세포 부위에서는 anti - hsp27 항체의 염색 소견을 관찰할 수 없었다(Figure 1).

#### 2. MC3T3-E1 세포에서 hsp27, hsp68, hsp86 mRNA 의 발현

Hsp27, hsp68 과 hsp86 의 [<sup>32</sup>P]- $\alpha$ dCTP random primer labeled mouse cDNA probe 를 이용하여 hsp27, hsp68 과 hsp86 mRNA 의 발현을 관찰하였다.

대조군(C)에서는 hsp 의 발현이 관찰되지 않았지만 열처리를 시행한 경우(HS) hsp27, hsp68 과 hsp86 mRNA 의 발현이 관찰 되었다(Figure 2).

#### 3. MC3T3-E1 세포에서 estrogen 에 의한 hsp27 의 발현 조절

열처리 전 MC3T3-E1 세포에 5 시간 동안 0, 2, 20, 100 nM 17 $\beta$  estradiol( $\beta$ E<sub>2</sub>)를 투여하고 42.5°C 에서 2 시간 동안 열처리를 가하였을 때 hsp27 의 발현이 증가되었다(Figure 3).

#### 4. Estrogen 투여에 의한 hsp27 및 기타 hsp 의 발현

MC3T3-E1 세포에 20 nM 의  $\beta$ E<sub>2</sub> 을 0(lane 1), 2(lane 2), 5(lane 3), 8(lane 4), 24 시간(lane 5) 동안 투여한 후 42.5°C 에서 2 시간 동안 열처리를 시행하고 3 시간 동안 회복기를 준 뒤 hsp27, hsp47, hsc (heat shock protein 70 cognate), hsp70i (inducible

hsp70)와 hsp90의 발현이 관찰되었고(Figure 4a), 열처리 전 5시간 동안 2 nM 이상의 농도를 투여 하였을 때 열처리에 의한 hsp27의 증가가 뚜렷하였으며 열처리를 시행하지 않은 경우(37°C) hsp27의 발현이 관찰되지 않았다(Figure 4b).

#### 5. 열처리된 MC3T3-E1 세포에서 hsp27 발현에 대한 estrogen antagonist의 영향

세포 배양액에 0 - 100 nM 농도의 ICI182780를 투여 하였을 때 20 nM  $\beta E_2$ 에 의한 hsp27의 증가가 관찰 되었으나 taxmoxifen의 고농도 투여 시에는 이의 증가가 관찰 되지 않았다(Figure 5).

#### 6. TNF $\alpha$ 나 staurosporine 처리가 MC3T3-E1 세포의 사멸에 미치는 영향

세포배양에서 MC3T3-E1 세포의 사멸을 유도할 수 있는데(Figure 5), 고농도의 TNF $\alpha$ 나 staurosporine 투여 시 잔존 부착 세포의 수가 현저히 감소되는 것을 관찰할 수 있었으나(Figure 6a), estrogen 처리는 TNF $\alpha$ 나 staurosporine에 의한 세포사멸을 감소시키는 것이 관찰 되었다(Figure 6b).

#### 7. Hsp27의 발현 억제가 열처리 후 MC3T3-E1 세포의 생활력에 미치는 영향

열처리 전 MC3T3-E1 세포에 대한 antisense S-oligonucleotide 처리로 hsp27의 발현이 현저히 감소 되었으며(figure 7a), TNF $\alpha$  처리에 의한 MC3T3-E1 세포의 생활력 감소도 관찰 되었다(Figure 7b).

#### IV. 총괄 및 고찰

본 연구의 MC3T3-E1 을 이용한 실험 결과는 백서 두개부의 장기배양(organ culture)과 SMER 14 세포에서 estrogen 처치에 의한 골 조직과 조골세포에서 hsp27 의 발현이 증가 되는 결과와 일치 하였다.<sup>14</sup> Estrogen 은 단독으로 유방암 세포주에서 hsp27 의 발현을 증가 시키는 것으로 알려져 있으나, 대조적으로 본 연구에서 보면 MC3T3-E1 세포주에서 열처리와 무관한 hsp27 의 발현 증가는 관찰 되지 않았다.

Estrogen antagonist 인 ICI 182,780 투여는 estrogen 에 의한 열처리 hsp27 의 증가를 억제하지는 못 했는데 고농도(100 배), 장시간 처치(4 시간)에서도 ICI 182,780 는 사멸세포 수의 현저한 증가가 관찰 되어 본 연구의 이 antagonist 투여에 의한 세포사멸 결과 분석에 많은 혼란을 가져왔지만 ovarian cancer cell 을 이용한 이전의 연구 결과와 일치 하였다<sup>22</sup>. Tamoxifen 은 strain 과 연관된 골의 remodeling 을 포함한 골 조직에 대한 estrogen 의 효과에 반대되는 기전을 보이는데<sup>23</sup>, 본 연구에서는 tamoxifen 의 투여가 estrogen 에 의한 hsp27 의 발현 증가를 억제하는 결과를 나타내지만 현재까지 tamoxifen 이 estrogen 에 의한 세포사멸의 억제작용을 감소시킬 수 있는지는 명확하지 않은 것으로 알려지고 있다

현재까지의 연구 결과는 MC3T3-E1 세포에서 어떤 기전에 의하여 estrogen 이 hsp27 의 발현을 증가시키는지 밝혀지지 않고 있다. 조골세포 세포주에서 hsp27 의 promoter 는 estrogen 감수성이 있는 것으로 알려지고 있는데, 20 nM  $\beta$ E2 를 이용하여 5 시간 동안 전처치를 시행하였을 때 SMER14 세포에 chimeric reporter constructs 를 transfection 하였을 때 전사의 증가가 관찰되지만 parental ROS17/2.8 세포에서는 증가를 나타내지 않는 것으로 알려지고 있다.<sup>24</sup> Promotor 상에서 estrogen

response element (ERE)의 절반은 인접한 SP1 부위와 같이 작용하여 estrogen에 의한 전사조절에 영향을 미치며 또한 여기에 핵기질 단백질 HET1이 작용하여 전사를 조절한다.<sup>26</sup> Hsp27의 발현에 미치는 비유전적인 영향은 특별히 밝혀진 바는 없지만 hsp27의 인산화(phosphorylation)는 hsp27의 기능에 필수적이므로 여기에 미치는 estrogen의 효과에 대한 규명이 필요하리라 생각된다.<sup>27</sup>

Hsp27은 caspase 9의 활성화를 억제함으로써 세포사멸 작용을 조절하는 것으로 알려져 있다.<sup>3</sup> Estrogen 결핍으로 인한 골세포의 세포사멸이 증가된다는 보고가 있으나<sup>8</sup> 골세포에서 hsp27의 발현이 조골세포나 골 주위세포에 비해 미약하거나 거의 없는 것으로 보아 골 형성 세포의 생성과 생활력의 유지에 조골세포내의 hsp27의 유무가 커다란 영향을 미치는 것으로 생각된다.

MC3T3-E1 세포주에서 estrogen의 투여는 후의 TNF $\alpha$ 나 staurosporine의 투여에도 불구하고 열처리 세포의 세포 생활력을 증가시키는 것이 관찰되었는데 다른 hsp에 대한  $\beta$ E2의 효과가 없는 것으로 보아 이는 단지 hsp27에 의한 것으로 여겨진다. 또한 열처리를 시행하지 않은 MC3T3-E1 세포에서, 즉 hsp27이 없는 경우에는 estrogen의 투여가 세포의 생활력에 영향을 미치지 않은 결과도 이를 뒷받침 하는 것으로 생각된다. 본 연구의 결과에서 MC3T3-E1 세포에 대한 열처리 시행 후 hsp27 뿐만 아니라 hsp68, hsp 47, hsc, hsp 70i, hsp 90 및 hsp86 mRNA의 발현이 증가되어 있어 이에 대한 추후 연구가 필요하리라 사료된다.

Estrogen에 의한 세포사멸 조절은 여러 가지 기전을 생각해볼 수 있는데 몇 가지 종류의 세포에서 estrogen 투여가 TNF $\alpha$ 의 발현을 감소시키는 것으로 알려졌으며<sup>28</sup>, 다른 기전으로는 estrogen에 의한 Nitric Oxide(NO) 조절을 들 수 있다. NO는 cytokine의 조절에 중요한 역할을 하며 또한 배양 조골세포의 mechanical strain 효과에 영향을 미치는 것으로 알려지고 있으며, estrogen의 결핍은 Nitric Oxide Synthase의

발현을 감소시켜 세포사멸의 유도에 작용하는 것으로 보고되고 있다.<sup>29</sup> Estrogen 투여에 의한 혈액 내 NO의 증가와<sup>30</sup> NO에 의한 PC12 세포 사멸 방지 효과에 대한 보고가 있지만<sup>31</sup>, 이와 대조적으로 최근의 다른 연구에서 MC3T3-E1 세포에서는 NO가 세포사멸을 촉진시키는 연구 결과가 보고되고 있어<sup>32</sup> 현재까지 estrogen이 세포사멸의 억제에 미치는 기전에 대해서는 논란이 많은 실정이다.

결론적으로 세포 수 조절에 의한 골량의 조절에 미치는 estrogen의 역할은 이전의 많은 연구와 같은 결과를 보이고 있다. Estrogen 투여는 파골세포에서는 세포사멸을 촉진시키는 것으로 알려지고 있는데<sup>33</sup>, 이는 이와 같은 세포사멸 기전에 의해 조골세포와 파골세포 수의 생리적 조절이 이루어짐을 보여 준다. 조골세포와 골세포의 세포사멸 작용은 골대사 작용의 다른 조절 기전일 수도 있는 것으로 알려지고 있는데 최근에 와서 PTH의 투여에 의한 골형성 증가는 조골세포의 수명을 증가시켜 이에 따라 세포사멸의 억제에 의한 것이라는 보고가 있다.<sup>34</sup> 본 실험의 결과를 통해 향후 골량의 조절에 있어서 조골세포와 골세포 수 조절 과정에서의 세포사멸에 미치는 estrogen의 역할 및 기능에 대한 연구에 도움이 되었으면 하는 바램이다.

## V. 참고문헌

1. Peter ME, Heufelder AE, Hengartner MO. Advances in apoptosis research. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997;94:12736–12737.
2. Brar BK, Stephanou A, Wagstaff MJ, Coffin RS, Marber MS, Engelmann G, Latchman DS. Heat shock proteins delivered with a virus vector can protect cardiac cells against apoptosis as well as against thermal or hypoxic stress. *J. Mol. Cell Cardiol.* 1999;31:135–146.
3. Mosser DD, Caron AW, Bourget L, Denis–Larose C, Massie B. Role of the human heat shock protein hsp70 in protection against stress–induced apoptosis. *Mol. Cell Biol.* 1997;17:317–327.
4. Ito H, Shimojo T, Fujisaki H, Tamamori M, Ishiyama S, Adachi S, Abe S, Marumo F, Hiroe M. Thermal preconditioning protects rat cardiac muscle cells from doxorubicin–induced apoptosis. *Life Sci.* 1999;64:755–761
5. DeMeester SL, Buchman TG, Qiu Y, Dunnigan K, Hotchkiss RS, Karl IE, Cobb JP. Pyrrolidine dithiocarbamate activates the heat shock response and thereby induces apoptosis in primed endothelial cells. *Shock* 1998;10: 1–6.
6. Wagstaff MJ, Smith J, Collaco–Moraes Y, de Bellerocche JS, Voellmy R, Coffin RS, Latchman DS. Delivery of a constitutively active form of the heat shock factor using a virus vector protects neuronal cells from thermal or ischaemic stress but not from apoptosis. *Eur. J. Neurosci.* 1998;10: 3343–3350.
7. Jilka RL. Weinstein RS. Bellido T. Parfitt AM. Manolagas SC. Osteoblast

- programmed cell death (apoptosis): modulation by growth factors and cytokines. *J Bone Miner. Res.* 1998;13(5):793–802.
8. Tomkinson A, Gevers EF, Wit JM, Reeve J, Noble B. The role of estrogen in the control of rat osteocyte apoptosis. *J. Bone Miner. Res.* 1998;13:1243–1250.
  9. Ohyama K, Farquharson C, Whitehead CC, Shapiro IM. Further observations on programmed cell death in the epiphyseal growth plate: comparison of normal and dyschondroplastic epiphyses. *J. Bone Miner. Res.* 1997;12:1647–1656.
  10. Noble BS, Stevens H, Loveridge N, Reeve J. Identification of apoptotic changes in osteocytes in normal and pathological human bone. *Bone.* 1997;20:273–282.
  11. Kitajima I, Nakajima T, Imamura T, Takasaki I, Kawahara K, Okano T, Tokioka T, Soejima Y, Abeyama K, Maruyama I. Induction of apoptosis in murine clonal osteoblasts expressed by human T-cell leukemia virus type I tax by NF- $\kappa$ B and TNF- $\alpha$ . *J. Bone Miner. Res.* 1996;11:200–210.
  12. Tomkinson A, Reeve J, Shaw RW, Noble BS. The death of osteocytes via apoptosis accompanies estrogen withdrawal in human bone. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1997;82:3128–3135.
  13. Cooper LF, Uoshima K. Differential estrogenic regulation of small M(r) heat shock protein expression in osteoblasts. *J. Biol. Chem.* 1994;18;269:7869–7873.
  14. Kosmidou L, Webb L, Cooper LF. Estrogenic control of hsp 27 expression in

- calvarial organ culture. *J. Dent. Res. (special issue)* 1995;74: 51.
15. Shakoori AR, Oberdorf AM, Owen TA, Weber LA, Hickey E, Stein JL, Lian JB, Stein GS. Expression of heat shock genes during differentiation of mammalian osteoblasts and promyelocytic leukemia cells. *J. Cell Biochem.* 1992;48:277–287.
  16. Shiina–Ishimi Y, Abe E, Tanaka H, Suda T. Synthesis of colony–stimulating factor (CSF) and differentiation–inducing factor (D–factor) by osteoblastic cells, clone MC3T3–E1. *Biochem & Biophys Res Comm.* 1996;134(1):400–406.
  17. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1979;76:4350–4354.
  18. Schneider GB, Hamano H, Cooper LF. In vivo evaluation of hsp 27 as an inhibitor of actin polymerization: hsp 27 limits actin stress fiber and focal adhesion formation after heat shock. *J. Cell. Physiol.* 1998;177: 575–584.
  19. Chomczynski P, Sacchi N. Single–step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 1987;162:156–159.
  20. Nakano M, Knowlton AA, Dibbs Z, Mann DL. Tumor necrosis factor–alpha confers resistance to hypoxic injury in the adult mammalian cardiac myocyte. *Circulation.* 1998;97:1392–1400.
  21. Gollapudi L, Oblinger MM. Estrogen and NGF synergistically protect terminally differentiated, ERalpha– transfected PC12 cells from apoptosis. *J. Neurosci. Res.* 1999;56: 471–81.



22. Ercoli A, Scambia G, Fattorossi A, Raspaglio G, Battaglia A, Cicchillitti L, Malorni W, Rainaldi G, Benedetti Panici P, Mancuso S. Comparative study on the induction of cytostasis and apoptosis by ICI 182,780 and tamoxifen in an estrogen receptor-negative ovarian cancer cell line. *Int. J. Cancer*. 1998;76:47-54.
23. Damien E, Price JS, Lanyon LE. The estrogen receptor's involvement in osteoblasts' adaptive response to mechanical strain. *J. Bone Miner. Res*. 1998;13:1275-1282.
24. Mitchell KB, McAndrew KS, Cooper LF. Structural determinants affecting heat shock inducible transcription of the rat hsp27 gene. *J. Dent. Res. (special issue)* 1997;76: 49.
25. Porter W, Wang F, Wang W, Duan R, Safe S. Role of estrogen receptor/SP1 complexes in estrogen-induced heat shock protein 27 gene expression. *Mol. Endocrinol*. 1996;10:1371-1378.
26. Oesterreich S, Lee AV, Sullivan TM, Samuel SK, Davie JR, Fuqua SA. Novel nuclear matrix protein HET binds to and influences activity of the HSP27 promoter in human breast cancer cells. *J. Cell Biochem*. 1997;67:275-286.
27. Marin R, Landry J, Tanguay RM. Tissue-specific posttranslational modification of the small heat shock protein HSP27 in Drosophila. *Exp. Cell Res*. 1996;223:1-8.
28. Srivastava S, Weitzmann MN, Cenci S, Ross FP, Adler S, Pacifici R. Estrogen decreases TNF gene expression by blocking JNK activity and the resulting production of c-Jun and JunD. *J. Clin. Invest*. 1996;104:503-513.

29. Berman JR, McCarthy MM, Kyprianou N. Effect of estrogen withdrawal on nitric oxide synthase expression and apoptosis in the rat vagina. *Urology*. 1998;51:650–656.
30. Cicinelli, E, Ignarro LJ, Matteo MG, Galantino P, Schonauer LM, Falco N. Effects of estrogen replacement therapy on plasma levels of nitric oxide in postmenopausal women. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1999;180:334–339.
31. Kim YM, Chung HT, Kim SS, Han J., Yoo YM, Kim KM, Lee GH, Yun HY, Green A, Li J, Simmons RL, Billiar TR. Nitric oxide protects PC12 cells from serum deprivation–induced apoptosis by cGMP–dependent inhibition of caspase signaling. *J. Neurosci.* 1999;19:6740–6747.
32. Mogi M, Kinpara K, Kondo A, Togari A. Involvement of nitric oxide and biopterin in proinflammatory cytokine–induced apoptotic cell death in mouse osteoblastic cell line MC3T3–E1. *Biochem. Pharmacol.* 1999;58:649–655.
33. Hughes DE, Dai A, Tiffée JC, Li HH, Mundy GR, Boyce BF. Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF–beta. *Nat. Med.* 1996;2:1132–1136.
34. Jilka RL, Weinstein RS, Bellido T, Roberson P, Parfitt AM, Manolagas SC. Increased bone formation by prevention of osteoblast apoptosis with parathyroidhormone. *J. Clin. Invest.* 1999;104:439–446.

## 사진부도

### Figure 1

Immunohistochemical localization of hsp27 in bone. Adult male rat tibia was decalcified and prepared for immunohistochemical localization of hsp27 using rabbit polyclonal anti-hsp27 antiserum (1:50 dilution) and AEC chromagenic identification via a biotinylated-conjugated secondary antibody. Hsp27 is localized within cells lining bone (large arrows), but absent from osteocytes in bone (small arrows).

### Figure 2

Expression of heat shock protein mRNAs in MC3T3-E1 cells. 15  $\mu$ g aliquots of total RNA extracted from MC3T3-E1 cells grown at 37°C (C) or heat shocked for 2 hours at 43°C followed by 3 hour recovery at 37°C (HS) were separated by denaturing agarose gel (1.2%) electrophoresis and transferred to nitrocellulose membranes. Hsp27, hsp68 and hsp86 mRNA was revealed by probing with [<sup>32</sup>P]-labeled cDNAs encoding hsp27, hsp68 and hsp86. For each transcript, a constitutive absence was revealed and induction was observed following heat shock.

### Figure 3

Effect of  $\beta$ E<sub>2</sub> treatment on the steady-state abundance of hsp27 in heat shocked MC3T3-E1 cells. 10  $\mu$ g aliquots of total RNA from cells pre-treated for 5 hours

with 0, 2, 20 or 100 nM  $\beta E_2$  (as indicated above lanes) were separated by electrophoresis in a 1.0% agarose formaldehyde denaturing gel. The gel was stained with ethidium bromide and the UV transilluminated image was photographed (bottom panel). The gel was dried, rehydrated, prehybridized and hybridized with  $0.5 \times 10^6$  cpm / ml [ $^{32}P$ ]dCTP – labeled mouse hsp27 cDNA. After washing in 0.5X SSC at 65°C, hybridized RNA was identified by autoradiography. A 24 hour exposure on Kodak XAR film is represented here.

#### **Figure 4**

Heat shock protein expression in MC3T3–E1 cells following estrogen treatment.

a) 10  $\mu$ g of total protein lysates were separated on 10% SDS PAGE, transferred to nitrocellulose and probed with antibodies specific for hsp27, hsp47, hsc (heat shock protein 70 cognate), hsp70i (inducible hsp70) and hsp90. MC3T3–E1 cells were heat shocked for 2 hours at 42.5°C and allowed three hours recovery before lysing. Prior to heat shock cells were pre treated with 20 nM  $\beta E_2$  for 0 hours (lane 1), 2 hours (lane 2), 5 hours (lane 3), 8 hours (lane 4), and 24 hours (lane 5).

b) Estrogen enhancement of hsp27 expression is maximal between 2 and 10 nM  $\beta E_2$ . Cells were pretreated with 0 – 100 nM  $\beta E_2$  for 5 hours preceding heat shock. Unstressed cells (37°C) do not produce hsp27. When pre–treated with  $\beta E_2$ , hsp27 abundance was increased.

#### **Figure 5**

Effect of estrogen antagonists on hsp27 and hsp70c abundance in  $\beta E_2$  treated

MC3T3-E1 cells. 10ug total protein lysates prepared in RIPA buffer were separated by SDS-PAGE (10% total acrylamide), transferred to nitrocellulose and immunoblotted with anti-hsp27 or anti-hsp70c antibodies. Chemiluminescent (3 – 4 minutes) images are shown. Cells were treated for 5 hours preceding heat shock with vehicle (O),  $\beta E_2$ , ICI182,780 (ICI),  $\beta E_2$  + ICI, Tamoxifen (Txf) or Txf +  $\beta E_2$  (as indicated above lanes) and subsequently heat shocked for 2 hours at 42.5°C and allowed to recover for 3 hours at 37°C.

### Figure 6

Cells cultured in the presence or absence of 20nM  $\beta E_2$  were subsequently heat shocked and after 3 hour recovery the cells were challenged with 0 – 10 ng/ml TNF $\alpha$  or 0 – 600 nM staurosporine. In the absence of TNF $\alpha$  or staurosporine, confluent cultures were largely devoid of DNA fragmentation revealed by TUNEL (a). Either inducing agent resulted in significant loss of adherent cells and the presence of DNA fragmentation in the nuclei of adherent cells (b).  $\beta E_2$  treatment (20 nM) limited apoptosis following exposure to 400 nM staurosporine; At 600 nM, the loss of adherent cells prohibited meaningful assessment of cell death.

### Figure 7

a) Effect of antisense oligonucleotides on hsp27 expression in heat shocked MC3T3 cells. Cells were treated with antisense oligos in serum free media for 2 hours, then overnight in complete media and subsequently heat shocked for 2 hours at 37°C (lanes 1 – 4) or 42.5°C (lanes 5 – 8) and allowed to recover for 3 hours at 37°C.

Cells were lysed into RIPA buffer and 10  $\mu$ g total protein lysates were evaluated by immunoblotting of hsp27 as described in Figure 2. Cells were treated with 0 nM (lanes 1 and 5), 1 nM (lanes 2, and 6), 5 nM (lanes 3 and 7), or 20 nM (lanes 4 and 8) antisense oligonucleotide. The arrow identifies the hsp27 band.

**b)** Effect of antisense oligonucleotides on heat shock protection of TNF $\alpha$ -mediated MC3T3-E1 cell killing. Antisense oligonucleotides were added at 0 or 20 nM as described above and viability of cells measured by counting of trypan blue excluding cells after 24 hours growth in 0 or 1 ng/ml TNF $\alpha$  (n = 4 or 5 wells / point). Heat shock alone killed cells, however, relative protection (28,000 vs 12,000 viable cells) from TNF $\alpha$  mediated killing was noted. Antisense oligonucleotides had no effect on unstressed MC3T3 – E1 cells which do not express hsp27. Antisense oligonucleotides reduced heat shock protection of TNF $\alpha$  mediated killing ( 28,000 vs. 17,000 viable cells). Asterisk indicates significant differences (p < 0.05) evaluated by pair-wise comparison.