

Cyclosporine에 의한 조골세포의 자연사 관련 단백질 발현에 대한 효과

오영림, 어완규*, 홍기연*, 김양수*, 김홍열

고신대학교 의과대학 산부인과학교실, 경희대학교 의과대학 내과학교실*
원광대학교 의과대학 산부인과학교실¹, 고신대학교 의과대학 내과학교실²

The Effect of Apoptosis Related Protein Expression by Cyclosporine in Osteoblast

Young Lim Oh, Wan Kyu Eo*, Ki Yoen Hong*, Yang Soo Kim*, Heung Yeol Kim

Department of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine, Kosin University, Busan Korea, Department of Internal Medicine, College of Medicine, Kyung Hee University*, Seoul, Korea*, Department of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine, Wonkwang University, Iksan, Korea¹. Department of Internal Medicine, College of Medicine, Kosin University, Busan Korea².

Abstract

Background : Cyclosporin (CsA), an immunosuppressive agent, has a number of serious side effects, such as nephrotoxicity, hepatotoxicity and neurotoxicity. In addition, CsA causes bone loss in the human, thus contributing to post-transplantation bone disease. The precise mechanism of bone loss by CsA is not known. In this study, the effects of CsA on apoptosis in cultured osteoblast cells were investigated.

Methods : We treated the CsA of 0, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 20 and 40 g/ml concentration in the ROS 17/2.8 cell which is osteoblast and observed a cytotoxicity and morphological change. Only the bay it knows, it confirmed revelation of the cell natural company relation factor due to the CsA as Western blot.

Results : There was a dose-dependent decrease in cell viability by CsA treatment. When cells were treated with CsA, cells were detached and floated to the top of the culture dish, and a monolayer was not found. Although CsA had no effect on the degradation of DNA, under the Western blot analysis, CsA induced the activation of caspase-3 and caspase-8. And the level of cleaved PARP, a caspase-3 substrate, was elevated. The expression of p53 and Bax protein levels were up-regulated by CsA. Bcl-2, an inhibitor of apoptosis, was decreased after CsA treatment in the osteoblasts.

Conclusion : These results suggest that CsA appears to trigger apoptosis by activating pro-apoptotic signals. CsA plays a role in the post-transplantation bone diseases via the induction of apoptosis in osteoblast.

Key words : Apoptosis, Cyclosporin, Osteoblast

서 론

최근 의료분야에서는 장기(organ) 이식의 중요성이 점차 증가하고 빠르게 발전하고 있으며, 장기 이식은 1955년 Murray가 말기신부전 환자에서 처음으로 신장이식을 성공한 이후, 현재 25가지의 다른 장기

이식이 이루어지고 있다.¹⁾ 수십 년에 걸쳐 장기 이식의 거부 반응을 극복하기 위해 사용되는 약물 요법이 주목할 만한 발전을 이루었으며, 이러한 장기 이식의 발전에 따라 새로운 면역억제제의 개발이 활발하게 진행되고 있는 추세이다. 가장 널리 사용되어 온 면역억제제인 cyclosporine (CsA)은 11개의 아미노산으로 구성된 난용성 cyclic polypeptide로, *Trichoderma polysporum*과 *Cyclindrocarron lucidum* 곰팡이에서 분리되어 강력한 면역억제작용이 확인되었

교신저자 : 김 홍 열

주소 : 602-702, 부산광역시 서구 암남동 34번지
고신대학교 의과대학 산부인과학교실
TEL : 051-990-6463, FAX : 051-244-6939
E-mail : hykyale@yahoo.com

다.²⁾ 장기 이식 후 면역억제제로 임상에 사용되기 시작한 이후 유럽과 미국의 여러 이식기관에서 신장 뿐만 아니라 심장, 간, 췌장 및 골수 이식에 면역억제제로 사용되고 있다.³⁾ CsA은 신장, 간 및 심장 이식환자의 거부 반응을 예방하는 목적으로 사용되었고, 그 외 건선, 아토피 피부염, 류마티스 관절염, 천식, 포도막염 및 콩팥증후군 등의 치료에도 이용되고 있다.^{4,5)} CsA은 수십 년 동안 장기 이식 수여자의 생존율과 생활의 질을 향상시켰으나, 신독성, 간독성, 신경독성, 및 고혈압 등의 부작용을 나타내는 것으로 보고되고 있다.^{6,8)} 특히 이식 후 골감소증 및 골다공증은 이미 잘 알려진 CsA의 부작용 중 하나이다.⁹⁾ 이식 후 골감소증은 다인성 질환으로 면역억제제 요법이 골 소실에 관여하는 것으로 보고되고 있으며 CsA이 골감소증을 유발한다는 것은 최근에 알려지기 시작하였는데, 신장 이식환자에서의 조직학적 분석으로부터 CsA이 골감소증에 관여하며, 심장이식 환자의 28-35%가 골감소증을 나타낸 것으로 알려져 있다.^{10,11)} 또한 CsA을 투여한 동물에서 새로운 유골 기질을 합성하는 세포의 감소에 의해 골감소증 유발되는 것으로 보고하였다.¹²⁾ 이처럼 CsA의 부작용이 밝혀졌으나 골감소증에 대한 CsA의 기전에 대해서는 명확하게 밝혀진 바가 없다. 정상적인 뼈는 조골세포와 파골세포의 균형적인 재형성 과정을 통해 유지되는데, 이러한 뼈 재형성은 각종 호르몬, 성장인자 및 사이토카인 등에 의해 조절된다. 그러나 호르몬이나 여러 물질에 의한 조골세포와 파골세포 간의 균형이 깨어지면 골 질환이 유발된다. 특히 조골세포의 기능 이상이나 그 수적 감소에 의한 것으로 보고되고 있으며, 이러한 비정상적인 세포사멸은 암이나 면역결핍, 퇴행성 질환 등의 여러 질병의 원인이 된다.¹³⁾ 세포사멸은 대부분의 경우 세포자연사(apoptosis)라는 특이한 형태로 이루어진다. 세포자연사는 세포 내·외부 인자의 자극에 의해 세포 내부에 존재하는 세포사의 신호가 개시되어 세포에서 여러 유전자들이 발현됨으로써 일어나는 능동적인 죽음으로, 이러한 세포자연사가 일어나는 세포의 형태적, 생리적 특징으로는 세포막 박리, 세포의 수축, 핵의 응축 및 DNA의 분절 등이 보고되고 있

다.¹⁴⁾ 따라서, 조골세포의 비정상적인 세포사멸은 골 조직의 항상성의 불균형을 초래하여 골감소증을 초래할 수 있다.

본 연구에서는 CsA이 조골세포의 세포자연사를 유도하여 이식 후 골감소증을 유발할 수 있는지를 알아보고자 CsA을 조골세포에 처리하여 세포자연사와 관련된 단백질 발현을 확인하였다.

재료 및 방법

1. 재 료

1) 시 약

Dulbeco's Modified Eagles Medium (DMEM), Antibiotic-antimycotic (10 U/mL penicillin 및 10 μ g/mL streptomycin), trypsin-EDTA, fetal bovine serum (FBS) 및 phosphate buffered saline (PBS)는 Invitrogen Co. (GibcoBRL, Grand Island, NY, 미국)에서 구입하였다. CsA은 Novartis사(Basle, 스위스) 제품을 사용하였다. Cell Counting Kit-F (CCK-F)는 Dojindo사(Kumamoto, 일본)로부터 구입하였으며, monoclonal anti- β -actin 및 anti-p53은 CST (Cell signaling technology Inc., Danvers, MA, 미국)로부터 구입하였다. Monoclonal anti-Bax, anti-Bcl-2, anti-caspase-3, anti-caspase-8, anti-PARP, 및 secondary antibody는 Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, 미국) 제품을 사용하였다. Enhanced Chemiluminescence (ECL) kit는 Amersham Biosciences (Piscataway, NJ, 미국) 제품을, 단백질 정량은 Bio-Rad DC kit (Bio-Rad laboratories, Inc., Hercules, CA, 미국)를 사용하였으며, 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA)는 Sigma (St. Louis, MO, 미국) 제품을 사용하였다. 그 외 일반시약은 시판되는 특급 또는 일급품을 사용하였다.

2) CsA의 제조

CsA은 100% 에탄올로 50 mg/mL의 농도로 만들어 이를 원액으로 사용하였다. 각 실험에서는 CsA 원액을 배지로 희석하여 사용하였다.

2. 방 법

1) 세포 배양

조골세포주인 ROS 17/2.8 세포는 10% FBS와 1% antibiotic-antimycotic이 함유된 DMEM 배지로 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 배양하였다. 세포는 3일 간격으로 0.05% trypsin-EDTA를 처리하여 계대하였다.

2) 세포 독성 검사

CsA에 의한 세포독성은 CCK-F를 이용하여 생존하는 세포를 형광측정법으로 확인하였다. ROS 17/2.8 세포는 96-well plate에 5,000 cells/well의 밀도로 접종한 후, 세포가 plate 바닥에 부착하면 FBS-free DMEM 배지로 교체하여 24 시간 동안 세포의 증식을 정지시켰다. 2%의 FBS가 함유된 배지에 CsA를 0.01—40 µg/mL의 농도로 48 시간 동안 처리하고, CCK-F 용액 10 µL를 첨가한 뒤 1 시간 반응시켰다. 형광 정도를 Model 550 microplate reader (Bio-Rad Lab. Inc., Hercules, CA, 미국)로 535 nm에서 측정하였다. CsA에 의한 세포독성은 다음의 식으로 나타내었다.

$$\text{Cytotoxicity(\%)} = \left(1 - \frac{A_{535\text{nm of sample}} - A_{535\text{ nm of blank}}}{A_{535\text{nm of control}} - A_{535\text{ nm of blank}}}\right) \times 100$$

3) DNA 단편화 확인

세포를 회수한 다음, 5 mM Tris (pH 7.4), 20 mM EDTA, 0.5% TritonX-100 및 1 mM PMSF가 함유된 용해 완충액(DNA isolation buffer)을 500 µL 가한 후, 4°C에서 30분간 세포를 용해시켰다. 4°C에서 12,000 rpm으로 20분간 원심하여 얻어진 상층액에 동량의 phenol/chloroform/isoamylalcohol (25 : 24 : 1, v/v/v) 용액을 가하여 DNA를 분리하였다. 얻어진 DNA를 정량한 다음, 1.5% agarose gel에 50 V로 2 시간 동안 영동하여 ethidium bromide로 염색하여 DNA 절편화를 확인하였다.

4) Western blot

CsA를 처리한 세포를 회수한 후, 세포 용해 완충액(10 mmol/L Tris-Cl, pH 7.4, 5 mmol/L EDTA, 130 mmol/L NaCl, 1% Triton X-100)과 단백질 분해효소

억제제 혼합액(0.2 mmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 µg/mL leupeptin, 20 U aprotinin, 1 mmol/L NaF)을 넣고 4°C에서 30 분간 방치하였다. 다음 12,000 rpm으로 4°C에서 15 분간 원심한 후, 상층액을 취한 후, 단백질 정량 kit를 이용하여 분리한 단백질의 농도를 정량하였다. 얻어진 단백질 분획의 일정량을 polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 전기영동한 후에 Immobilon-P PVDF transfer membrane (Milipore Co., Bedford, MA, 미국)으로 전기이동을 실시하였다. 그 후, filter를 5% skim milk가 함유된 TBS-T 용액(20 mmol/L Tris, pH 7.5, 137 mmol/L NaCl, 0.05% Triton X-100)으로 상온에서 1 시간 blocking한 다음, 일차항체 및 이차항체와 반응시킨 후, ECL kit를 이용하여 발광시키고, autoradiography를 실시하였다. 일차항체로는 procaspase-3, procaspase-8, caspase-8, cytochrome c, nuclear factor-κB (NF-κB), retinoblastoma (Rb) 및 poly(ADP-ribose)polymerase (PARP)에 대한 항체를 사용하였다.

5) 성적 검정

자료는 평균 ± 표준편차로 표시하고, 실험군 사이의 비교는 Student's t-test로 하였으며 통계학적 유의수준은 P값이 0.05 미만으로 하였다.

결 과

1. CsA이 조골세포의 생존에 미치는 영향

CsA이 ROS 17/2.8 세포주의 사멸에 미치는 영향을 알아보기 위해 0, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 20 및 40 µg/mL 농도의 CsA를 24 시간 처리한 후 MTT 방법으로 세포 생존능을 측정하였다. 대조군에 대한 각 농도별 세포 생존율은 85%, 80%, 73%, 60%, 45%, 40% 및 27%로 나타났다. 즉, CsA의 농도가 증가함에 따라 세포 생존능이 유의하게 감소하였다(Fig. 1).

2. CsA이 조골세포의 형태적 변화에 미치는 영향

대조군에서는 배양 플라스크에 부착하여 일정한 형태의 단층을 유지한 반면, CsA를 처리한 세포는

배양 플라스크에 부착되지 못하고 부유상태로 존재하며, 단층을 형성하지 못하였다(Fig. 2).

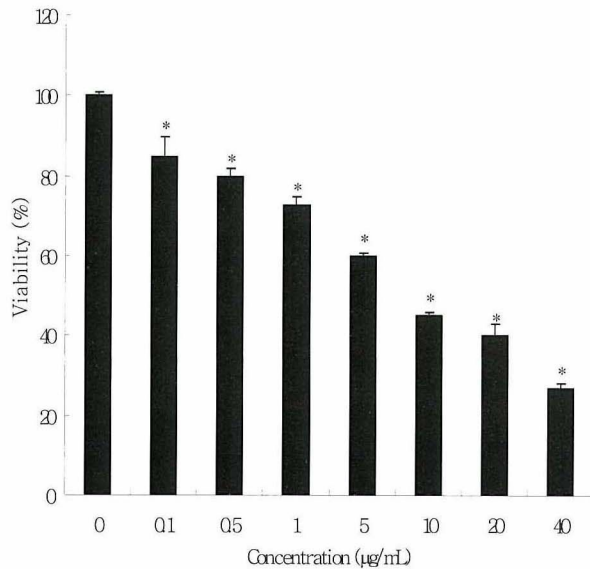


Fig. 1. Effect of cyclosporine on the growth of ROS 17/2.8 cells. Cells were cultured with the indicated concentrations of cyclosporine for 24 h. Cell viability was assessed by MTT assay. Values were expressed as mean $\pm$ SD. Statistical significance was performed using a paired t-test. * : $P < 0.05$ vs. control.

3. CsA이 DNA 절편화에 미치는 영향

세포사멸의 특징인 internucleosomal DNA 절편화를 확인하기 위해 1.5% agarose gel을 이용하여 DNA 전기영동을 실시한 결과, CsA에 의한 DNA 절편화는 일어나지 않았다(Fig. 3).



Fig. 3. Analysis of DNA integrity in cyanate-treated cells. ROS 17/2.8 cells were treated with different concentrations of cyclosporine for 24 h and 48 h. DNA was extracted and electrophoresed through a 1.5% agarose gel and visualized by staining with ethidium bromide.

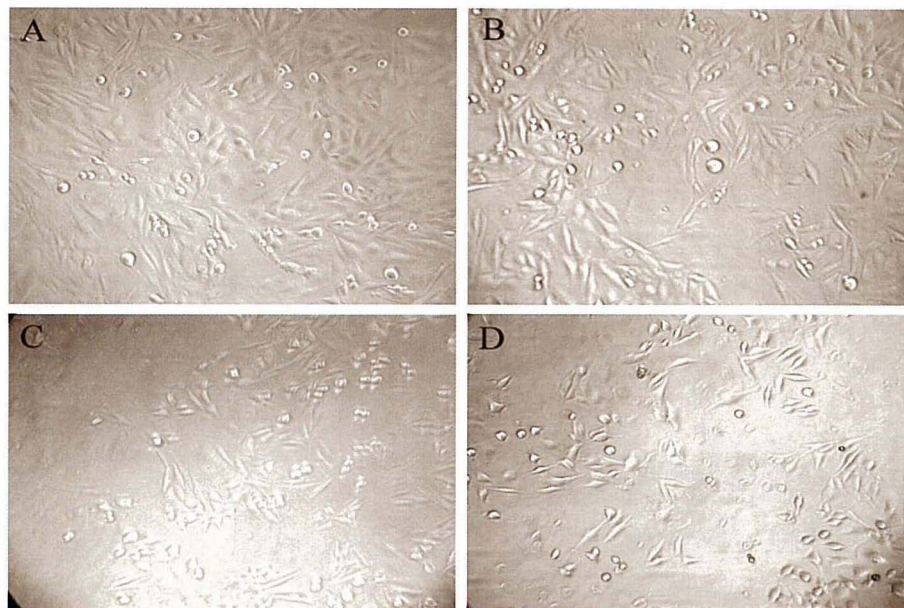


Fig. 2. Cyclosporine(CsA)-induced change of cell morphology. Substantial morphological changes were observed in ROS 17/2.8 cells when they were treated with cyanate for 24 h. A : control; B : 5 µg of CsA/mL; C : 10 µg of CsA/mL; D : 20 µg of CsA/mL.

4. CsA에 의한 p53 단백질의 변화

CsA와 ROS 17/2.8 세포사멸과 p53과의 관계를 확인하기 위해 Western blot을 실시하였을 때, CsA의 농도에 비례하여 p53 단백질 발현이 증가하였다(Fig. 4).

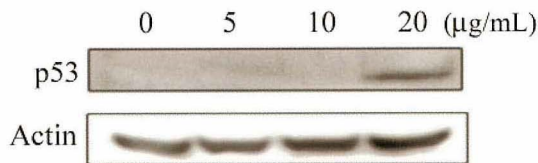


Fig. 4. Effect of cyclosporine on p53 expression. Cells were treated with the indicated concentrations of cyclosporine for 24 h. The protein expression was determined by Western blot in cell lysates.

5. CsA에 의한 caspase-3 단백질의 변화

CsA이 caspase-3 발현에 미치는 영향을 확인하기 위하여 Western blot을 실시하였다. CsA 농도가 20 µg/mL일 경우, 비활성 형태의 caspase-3 단백질의 양적 감소가 관찰되었다(Fig. 5).

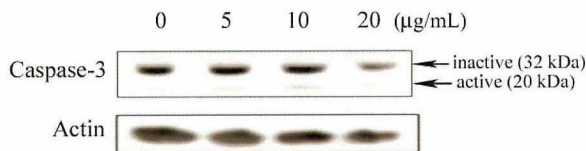


Fig. 5. Effect of cyclosporine on caspase-3 expression. Cells were treated with the indicated concentrations of cyclosporine for 24 h. The protein expression was determined by Western blot in cell lysates.

6. CsA에 의한 caspase-8 단백질의 변화

CsA이 caspase-8 발현에 미치는 영향을 확인하기 위해 Western blot을 실시한 결과, CsA 처리에 의해 caspase-8 단백질의 양적 증가가 관찰되었다(Fig. 6).

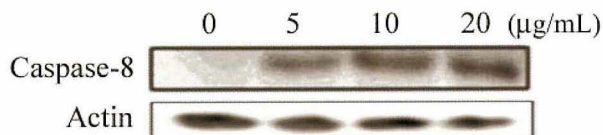


Fig. 6. Effect of cyclosporine on caspase-8 expression. Cells were treated with the indicated concentrations of cyclosporine for 24 h. The protein expression was determined by Western blot in cell lysates.

7. CsA에 의한 PARP 단백질의 변화

Caspase-3의 활성화에 따른 caspase-3의 기질인 PARP 단백질의 절단 양상을 조사하기 위하여 Western blot을 실시하였다. CsA에 의해 116 kDa의 precursor가 85 kDa과 25 kDa으로 절단되었다(Fig. 7).

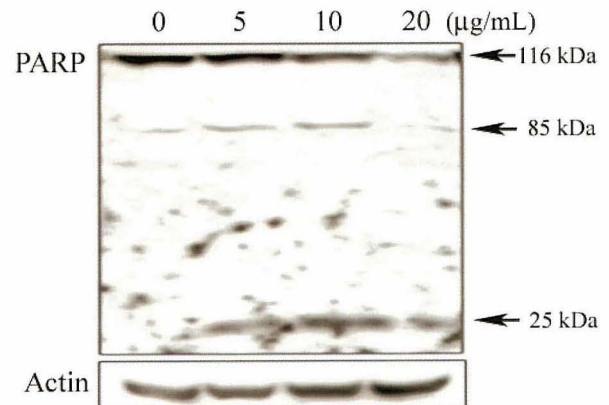


Fig. 7. Effect of cyclosporine on PARP expression. Cells were treated with the indicated concentrations of cyclosporine for 24 h. The protein expression was determined by Western blot in cell lysates.

8. CsA에 의한 Bax 단백질의 변화

CsA이 Bax 발현에 미치는 영향을 확인하기 위해 Western blot을 실시한 결과, CsA 처리에 의해 Bax 단백질의 양적 증가가 관찰되었다(Fig. 8).

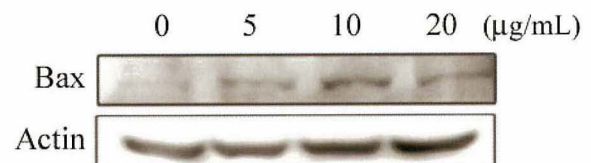


Fig. 8. Effect of cyclosporine on Bax expression. Cells were treated with the indicated concentrations of cyclosporine for 24 h. The protein expression was determined by Western blot in cell lysates.

9. CsA에 의한 Bcl-2 단백질의 변화

CsA이 Bcl-2 발현에 미치는 영향을 확인하기 위해 Western blot을 실시한 결과, CsA 처리에 의해 Bcl-2 단백질의 양적 감소가 관찰되었다(Fig. 9).

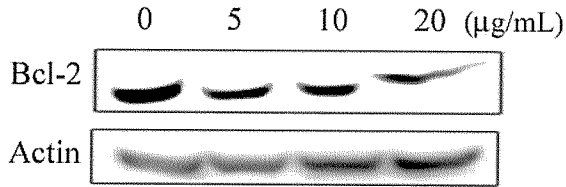


Fig. 9. Effect of cyclosporine on Bcl-2 expression. Cells were treated with the indicated concentrations of cyclosporine for 24 h. The protein expression was determined by Western blot in cell lysates.

고찰

CsA은 11개의 아미노산으로 구성된 난용성 cyclic polypeptide로, 신장뿐만 아니라 심장 및 간 등의 여러 장기 이식에 면역억제제로 사용되고 있다.³⁾ Glucocorticoid에 의한 골량의 감소는 몇몇 연구자들에 의해 보고되었지만, CsA에 의한 골감소증은 최근에 연구되기 시작하였다.¹⁵⁾ 조골세포는 뼈 조직을 구성하는 주요 세포 중 하나로, 골기질 물질을 생성하고 새로운 골조직을 형성하며, 정상적인 뼈는 조골세포와 파골세포의 균형적인 재형성 과정을 통해 유지되는데, 이러한 과정은 각종 호르몬, 성장인자 및 사이토카인 등에 의해 조절된다.¹⁶⁾ 그러나 호르몬이나 여러 물질에 의한 조골세포와 파골세포 간의 균형이 깨지면 각종 골질환이 유발되며, 몇몇 연구에서는 조골세포의 세포자멸사에 의해 골 소실이 초래하는 것으로 보고하고 있다.^{15,17-19)} 그러므로, CsA에 의한 조골세포의 사멸은 골대사에 작용하여 골감소증을 유발할 것으로 본다. 세포자멸사는 세포 분해를 위해 세포 내의 효소들이 활발하게 관여하는 능동적인 죽음 기작이다. 이 과정은 형태적으로 세포의 비중감소, 세포막의 파괴, 염색체의 응축 등과 더불어 세포 내부의 물질들이 사멸체(apoptotic body)라는 포낭을 형성하면서 식세포 작용과 함께 진행되며, 세포 외부로 화학적·물리적 자극, 생존의 여러 인자들이 세포 표면에 존재하는 수용체를 통하여

나 미토콘드리아에서 세포자멸사 신호에 의해 조절된다.²⁰⁻²²⁾ 세포자멸사는 여러 가지 자극물질에 의한 세포자멸사 신호물질의 활성화에 의해 일어난다.²³⁾ 세포자멸사는 형태학적 및 생화학적 특징을 나타내는데, 가장 일반적으로 나타나는 현상은 cytosolic protease, 특히 caspase의 발현이다.²⁴⁻²⁶⁾ 세포자멸사는 다양한 종류의 단백질들의 상호작용에 의해 조절되는데, caspase, Fas, cytochrome c 및 inhibitor of apoptosis protein (IAP) 등이 그 기전을 담당하고 있다. 특히, 시스테인계의 단백질분해 효소인 caspase가 발견되면서 caspase가 세포자멸사의 중심적인 요소로 작용하는 것으로 간주되고 있다.¹⁵⁾ Caspase는 현재까지 14 종의 isoform이 알려져 있으며, 이들 중, 세포사멸에서 가장 보편적으로 알려진 caspase-3는 세포사멸신호에 의해 활성화되면 기질 단백질 분해를 일으킨다. 그리고, caspase-8은 Fas와 tumor necrosis factor-α (TNF-α) 수용체의 세포질 부위에 결합하는 효소로, 여러 caspase 중에서 가장 가까이 세포막에 위치한다. Caspase-8 효소가 세포사멸 유도인 호박합체에 결합한 후 활성화되어 세포사멸경로를 통하게 되는데, 활성화형 caspase-8은 caspase-3, -6 및 -7과 같은 caspase의 활성을 촉진시키게 된다. 본 실험에서 ROS 17/2.8 세포에 CsA를 처리한 결과, caspase-8 단백질 발현이 증가하였고, 비활성형 caspase-3의 감소를 확인하였다. 이는 활성화형 caspase-3가 상대적으로 증가하였음을 의미하며, caspase-8의 활성화는 caspase cascade에 의해 caspase-3를 활성화시켜 세포자멸사를 유발시키게 된다. 이 결과로부터 CsA에 의한 조골세포의 세포자멸사는 caspase-3 및 8과 밀접한 관계가 있음을 알 수 있다. Caspase-3는 세포자멸사에 관여하는 주요 단백질 분해효소로, 활성화된 caspase-3는 PARP와 같은 기질을 선택적으로 절단한다. PARP는 세포자멸사를 거치는 여러 세포에서 caspase-3를 포함한 여러 caspase에 의하여 절단되며, 이렇게 절단된 PARP

는 많은 고등세포에서 세포자연사의 지표로 작용하게 된다.²⁶⁻²⁸⁾ 본 연구에서도 CsA을 24 시간 처리한 ROS 17/2.8 세포에서 CsA의 농도에 비례하여 116 kDa의 PARP가 85 kDa과 25 kDa으로 절단되어짐을 확인하였다. 이는 CsA이 caspase-3를 활성화시켜 활성 caspase-3의 신호로 기질인 PARP가 분해됨으로서 세포자연사가 일어남을 확인하였다. p53은 세포 조절자로서 세포 정지, 세포자연사, DNA 복구 혹은 노화와 같은 세포 기능을 조절하는 인자이다.²⁹⁾ CsA이 p53 단백질 발현 증가시켜 ROS 17/2.8 세포의 세포자연사의 원인이 되는 것을 확인하였다. Bcl-2 단백질군은 세포자연사와 밀접한 관련이 있는 것으로 잘 알려져 있다. Bcl-2 단백질군 중 Bax는 죽음 작동 단백질인 반면, Bcl-2는 죽음 억제 단백질이다.²²⁾ CsA은 Bax 단백질의 발현을 유도하는 반면 Bcl-2 단백질 발현은 감소시켰다. 세포자연사는 다양한 요인에 의해 조절되는데, 특히 활성산소가 세포자연사의 주요 조절인자로 작용한다.³⁰⁻³²⁾ 이상의 실험 결과로부터 CsA은 세포자연사를 일으키는 단백질인 caspase계 효소인 caspase-3와 caspase-8를 활성화시킨다. 활성화된 caspase-3는 이들의 기질인 PARP를 절단하여 세포자연사를 일으키게 된다. 또한 CsA은 세포자연사를 촉진시키는 p53과 Bax 단백질 발현을 증가시키고, 세포자연사 억제 인자인 Bcl-2 단백질 발현을 억제시켜 조골세포의 세포자연사를 유도하는 것으로 확인되었다. 이러한 결과는 이식 후 골질환에 CsA이 조골세포의 세포사멸을 유도함으로써 유발되는 것으로 생각된다.

참고문헌

1. Murray JE, Merrill JP, Hartwell Harrison J. Renal homotransplantation in identical twins. J Am Soc Nephro 4 : 432-6, 1955
2. Borel JF. The history of cyclosporin A and its significance, In. White DJG, eds. Cyclosporin A. Amsterdam. Elsevier. Biomedical Press 5-17, 1982
3. Calne RY, Rolles K, White DJ, Thiru S, Evans DB, McMaster P et al. Cyclosporin A initially as the only immunosuppressant in 34 recipients of cadaveric organs. 32 kidneys, 2 pancreases, and 2 livers. Lancet 17(2) : 1033-6, 1979
4. Ojeda R, Sanchez Regana M, Massana J, Loiete R, Umberto P. Clinical experience with the use of cyclosporin A in psoriasis. Results of a retrospective study. J Dermatolog Treat 16(4) : 238-41, 2005
5. Lee SS, Tan AW, Giam YC. Cyclosporin in the treatment of severe atopic dermatitis : a retrospective study. Ann Acad Med Singapore 33(3) : 311-3, 2004
6. Karamelic J, Asceric M, Tulumovic T, Kabil E, Uzeirbegovic M, Hadzibegic N. Hepatotoxicity of cyclosporine in patients with kidney transplants. Med Arh 53(4) : 193-5, 1999
7. Derici U, Arinsoy T, Sindel S, Tali T, Leventoglu A, Sert S. Cyclosporine-A induced neurotoxicity after renal transplantation. Acta Neurol Belg 101(2) : 124-7, 2001
8. Bennett WM, Porter GA. Cyclosporine-associated hypertension. Am J Med 85(2) : 131-3, 1988
9. Epstein S, Shane E, Bilezikian JP. Organ transplantation and osteoporosis. Curr Opin Rheumatol 7 : 255-61, 1995
10. Epstein S. Post-transplantation bone disease. the role of immunosuppressive agents and the skeleton. J Bone Miner Res 11(1) : 1-7, 1996
11. Shane E, Rivas MC, Silverberg SJ, Kim TS, Staron RB, Bilezikian JP. Osteoporosis after cardiac transplantation. Am J Med 94(3) : 257-64, 1993
12. Fornoni A, Comacchia F, Howard GA, Roos BA, Striker GE, Striker LJ. Cyclosporin A affects extracellular matrix synthesis and degradation by mouse MC3T3-E1 osteoblasts in vitro. Nephrol Dial Transplant 16(3) : 500-5, 2001
13. Marcus R. Normal and abnormal bone remodeling in man. Ann Rev Med 38 : 129-41, 1987

14. Wyille AH, Ker JFR, Curie AR. Cell death, the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 68 : 251-305, 1980
15. Kamesaki H. Mechanism involved in chemotherapy-induced apoptosis and their implications in cancer chemotherapy. *Int J Hematol* 68 : 29-43, 1998
16. Rodan GA, Rodan SB. The cells of bone. In: Riggs BL, Melton LJ, editors. *Osteoporosis. etiology, diagnosis, and management*. 2nd ed. Philadelphia. Lippincott-Raven. 1995, 1-39
17. Kitajima I, Shao Q, Soejima Y, Maruyama I. Ceramide induced AP-1 activation is a mediator of apoptotic response to TNF- α in periarticular osteoblasts in patients with rheumatoid arthritis. Program of the Sixty-first annual meetin of the American college of Rheumatology. Washington, DC. 1997, S78
18. Kawakami A, Eguchi K, matsuoka N, Tsuboi M, Koji T, Urayama S et al. Fas and Fas ligand interacion is necessary for human osteoblast apoptosis. *J Bone Miner Res* 12 : 1637-46, 1997
19. Silvestrini G, Ballanti P, Patacchioli FR, Mocetti P, Di Grezia R, Wedard BM et al. Evaluation of apoptosis and the glucocorticoid receptor in the cartilage growth plate and metaphyseal bone cells of rats after high-dose treatment with corticosterone. *Bone* 26(1) : 22-42, 2000
20. Vaux DL, Korsmeyer SJ. Cell death in development. *Cell* 96 : 245-54, 1999
21. Evan GI, Vousden KH. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* 411 : 342-8, 2001.
22. Green DR and Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 281 : 1309-12, 1998
23. Gabai VL, Meriin AB, Yaglom JA, Volloch VZ, Sherman MY : Role of Hsp70 in regulation of stresskinase JNK. implications in apoptosis and aging. *FEBS Lett* 434 : 1-4, 1998
24. Stewart BW. Mechanisms of apoptosis. integration of genetic, biochemical, and cellular indicators. *J Natl Cancer Inst* 86(17) : 1286-96, 1994
25. Gong X, Wang M, Wu Z, Tashiro S, Onodera S, Ikejima T. Pseudolaric acid B induces apoptosis via activation of c-Jun N-terminal kinase and caspase-3 in HeLa cells. *Exp Mol Med* 36(6) : 551-6, 2004
26. Cohen GM. Caspase. the executioners of apoptosis. *Biochem J* 326 : 16, 1997
27. Lazebnik YA, Kaufmann SH, Desnoyers S, Poirier GG, Eamshaw WC. Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with peoperties like ICE. *Nature* 371 : 346-7, 1994
28. Li X, Darzynkiewicz Z. Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase measured in situ in individual cells. relationship to DNA fragmentation and cell cycle position during apoptosis. *Exp Cell Res* 255(1) : 125-32, 2000
29. Brown JP, Pagano M. Mechanism of p53 degradation. *Biochim Biophys Acta* 1332(2) : 1-6, 1997
30. Buttke TM, Sandstrom PA. Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunol Today* 15 : 7-10, 1994
31. Anderson KM, Seed T, Ou D, Harris JE. Free radicals and reactive oxygen species in programmed cell dath. *Med Hypotheses* 52 : 451-63, 1999
32. Mates JM, Sanchez-Jimenez FM. Role of reactive oxygen species in apoptosis. implications for cancer theraphy. *Int J Biochem Cell Biol* 32 : 157-70, 2000