

## R-5. *Prevotella intermedia* OMZ 248의 세균내독소가 RAW264.7 세포에서의 nitric oxide의 생성과 inducible nitric oxide synthase의 발현에 미치는 영향

최미숙, 최점일, 김성조

부산대학교 치과대학 치주과학교실

### 연구 배경

nitric oxide는 인간에서의 다양한 염증성질환에 있어 중요한 역할을 하며, nitric oxide의 생성을 억제함으로써 질환의 진행을 조절할 수도 있다. 본 연구에서는 염증성 치주질환의 주요 병인균주 중의 하나인 *Prevotella intermedia*의 세균내독소가 백서 대식세포 (RAW264.7)에서의 nitric oxide (NO)의 생성과 inducible nitric oxide synthase (iNOS) 발현에 미치는 영향을 규명하기 위해 수행되었다.

### 연구방법 및 재료

*P. intermedia* OMZ 248을 통법에 따라 GAM broth (Nissui, Tokyo, Japan)를 이용하여 혐기성 조건에서 배양하였으며, Westphal과 Jann (1965)의 hot phenol-water method를 이용하여 세균내독소 (LPS)를 분리한 후 DNase, RNase, 그리고 proteinase K로 처리하였다. 다양한 농도의 LPS를 가하여 RAW 264.7 세포를 일정 시간 배양한 후, 상층액 내 NO 농도를 Griess reagent (Sigma)를 이용하여 측정하였다.

배양한 세포를 용해시킨 후 10% acrylamide gel에서 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDSPAGE)하여, nitrocellulose membrane에 electroblotting 후, iNOS에 대한 polyclonal antibody 및 secondary antibody로 각각 처리하고, enhanced chemiluminescence (ECL) detection system (Amersham Pharmacia Biotech, USA)으로 iNOS 단백질의 발현을 검사하였다.

iNOS mRNA의 발현을 검사하기 위해, RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA)을 이용하여 배양한 세포에서 total RNA를 분리한 후, specific oligonucleotide primer로 iNOS mRNA를 위한 reverse transcriptase (RT)-PCR을 수행하고, cDNA product를 ethidium bromide를 포함하는 2% agarose gel에서 분리한 후 자외선 하에서 관찰하였다. internal control로는  $\beta$ -actin을 활용하였다.

### 연구결과

RAW264.7 세포에서의 NO 형성은 *P. intermedia* LPS의 농도에 의존하여 증대하였으며, *P. intermedia* LPS의 NO 유도능력은 *S. typhimurium* LPS와 유사하였다. 최초 4시간의 lag phase 후, 48시간까지 시간의 경과에 따라 *P. intermedia* LPS에 의한 NO 유발이 증가하였다. iNOS 단백질의 발현도 *P. intermedia* LPS의 농도에 의존하여 증대하였으며, 0.001  $\mu$ g/ml에서부터 iNOS 단백질의 발현이 시작되었다. iNOS 단백질과 iNOS mRNA는 *P. intermedia* LPS를 가한 후 2시간 이후부터 RAW264.7 세포에서 발현되기 시작하여 8시간까지는 증가하였으나, 그 이후에는 서서히 감소되었다.

## 결론

TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , 그리고 IFN- $\gamma$  등의 추가적인 자극이 없는 조건하에서도, iNOS 단백질과 mRNA의 발현에 의한 NO 형성이 *P. intermedia* LPS에 의해 대식세포에서 유발될 수 있음이 본 연구에서 최초로 제시되었다. 염증에 이환된 치주조직 내에 NO가 증대되어 있다는 이전의 보고 등을 고려할 때 본 연구의 결과는 매우 의미있는 것으로 사료된다.