

Porphyromonas gingivalis 추출물이 마우스 두개골 일차 조골세포의 기능에 미치는 효과

윤정호¹ · 최성호² · 조규성² · 채중규¹ · 김종관² · 김창성¹

¹연세대학교 치과대학 치주과학교실, 구강과학연구소

²연세대학교 치과대학 치주과학교실, 구강과학연구소, BK21 의과학사업단

I. 서론

*Porphyromonas gingivalis*는 그람 음성 혐기성이며 구형이나 짧은 막대모양의 비운동성 세균으로서 치주질환의 원인에 중요한 역할을 담당하는 것으로 확인되었다^{1,2)}. *P.gingivalis*는 진행된 치주염을 갖는 성인 환자의 치주병소(치주낭) 내에서 높은 빈도로 다수 존재하지만, 건강한 부위에서는 거의 존재하지 않거나 소수로 존재한다³⁾. 아울러, *P.gingivalis*는 구강세균 중에서 가장 많은 독성인자를 갖는 세균이며⁴⁾, *P.gingivalis*가 많이 분포하는 부위에서는 치조골의 심한 파괴와 함께 활발한 진행성, 화농성 치주염이 관찰되며⁵⁾, 적절한 치주술식을 시행하여 *P.gingivalis*의 수가 감소되었을 경우 치주 증상이 크게 호전된다고 보고 되었다⁶⁾.

*P.gingivalis*는 독성인자에 의해 직접적으로 치주조직의 파괴를 일으킬 뿐만 아니라⁷⁻⁹⁾, 숙주의 염증 반응을 유도함으로써 간접적으로 치주조직의 파괴를 일으킬 수 있다고 알려져 있다¹⁰⁾. *P.gingivalis*는 여러 종류의 세포에서 숙주에 의해 매개되는 염증반응의 중요한 매개체로 여겨지는 prostaglandin E₂ (PGE₂)의 생성을 증가시키는 것으로 보여 졌다¹¹⁻¹³⁾.

또한 기존의 많은 연구들에서 *P.gingivalis* 추출물이 염기성 인산분해 효소 (alkaline phosphatase; ALP) 활성 및 칼슘과 무기 인산이온 축적을 억제하며, type-I 콜라겐 합성 또한 억제시킨다고 보고 되었으며, 다양한 형태의 세포들에서 조골세포의 특징적인 유전자의 발현이 *P.gingivalis* 추출물에 의해서 감소 되는 것으로 보고 되었다. 이러한 결과는 *P.gingivalis*가 조골세포 활성을 억제할 수 있다는 것을 제안한다^{8,14-16)}. 아울러, lipopolysaccharide (LPS), 세포막 단백질, 단백질분해효소와 같은 *P.gingivalis*의 생성물은 숙주의 matrix metalloproteinase (MMP)의 유전자 발현을 유도할 뿐 아니라 MMP 활성을 촉진시킨다고 보고 되었다^{7,17-21)}.

한편, 치주질환에 의한 치주조직의 파괴에서 골 흡수는 치아상실로 이어지기 때문에 임상적으로 매우 중요한 문제이다. 골 흡수는 골의 무기요소와 유기요소의 제거를 의미하며, 파골세포가 이러한 과정에 주된 작용을 하는 것으로 알려져 있다²²⁾. 아울러, 파골세포가 광화된 골 조직에 작용하기 위해서는 골 표면을 덮고 있는 비광화된 osteoid 층(주로 type-I 콜라겐)이 제거되어야 하는데, 조골세포는 이러한 osteoid 층을 분해하는 MMP를 유리함으로써 골 흡수의 초기

*이 논문은 2003년도 연세대학교 학술 연구비의 지원에 의하여 연구되었음

교신 저자: 김창성, 서울특별시 서대문구 신촌동 134 연세대학교 치과대학 치주과학교실, 우편번호: 120-752

화에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다³³⁾. 이러한, MMP는 아연 이온 의존성 단백질 분해 효소로서 collagenase, gelatinase, stromelysin을 포함하며, 결합조직 기질의 유기 성분을 분해할 수 있는 능력을 지닌다^{24,25)}. 현재에 20여 가지 이상의 MMP가 식별되었으며, 이중 collagenase (MMP-1과 MMP-13)와 gelatinase (MMP-2와 MMP-9)가 조골세포에 의한 콜라겐 분해에 관여하는 주된 MMP인 것으로 고려되어 진다²⁶⁻³⁰⁾. collagenase는 type-I 콜라겐의 초기 분해에 작용하며, 뒤이어 gelatinase (MMP-2와 MMP-9)가 변형된 콜라겐 섬유의 분해에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되었다²⁸⁾. 또한, 염증성 치은 조직에서 PGE₂를 포함하는 prostaglandin (PG)의 양이 정상적인 치은 조직과 비교하여 증가되며³¹⁾, 특히, PGE₂는 골 흡수의 강력한 자극원으로 작용한다고 보고 되었다³²⁾.

이러한 결과들은 치주조직에 잔존하는 세균의 독성 물질에 의해 골 형성 세포의 골 재생능이 저하되며 동시에 골 흡수능이 촉진될 수 있다는 것을 보여준다. 그러나 이러한 여러 가지 연구결과에도 불구하고, 분자생물학적 수준에서 *P.gingivalis*가 조골세포에 미치는 영향에 대해서는 연구가 미흡한 실정이다. 그러므로 본 연구에서는 *P.gingivalis*가 조골세포의 골 형성능 뿐만 아니라 골 흡수능에 동시에 영향을 미칠 수 있는지를 분자생물학적 방법에 의해서 알아보고자 하였다. 이러한 목적을 위하여 *P.gingivalis* 추출물이 마우스 두개골 일차 조골세포의 ALP 활성화에 어떠한 영향을 미치는지 조사하였고 동시에 MMP-2, -9, -13의 유전자 발현에 미치는 영향에 대하여 평가하였다. 아울러 *P.gingivalis* 추출물이 일차 조골세포에서 PGE₂의 생성에 미치는 영향도 조사하였다.

II. 연구재료 및 방법

1. 연구재료

1) *P.gingivalis* 배양 및 *P.gingivalis* 초음파 분쇄 추출물 (sonicated *P.gingivalis* extracts: SPEs)의 준비
사용된 *P.gingivalis* 균주는 ATCC 33277 이었으며, 이들 균주를 hemin (5 mg/ml)과 Vitamin K (0.5 mg/

ml)가 포함된 brain heart infusion (BHI) 액체배지에 접종한 뒤, 37°C에서 혐기적 조건(80% N₂, 10% H₂, 10% CO₂)으로 배양하였다. 2일간의 배양 후에 배양액을 4°C, 3,200×g에서 20분간 원심 분리하여 균체를 얻었으며, phosphate buffered saline (PBS)으로 3회 세척하였다. 얻어진 균주의 순도는 위상차 현미경과 Gram-staining에 의해서 확인하였고, 세포분쇄기에 의해서 균주를 균질화하여 *P.gingivalis* 초음파 분쇄 추출물 (sonicated *P.gingivalis* extracts: SPEs)을 준비하였다. 비수용성 침전물은 4°C, 12,000×g에서 5분간 원심 분리하여 제거하였다. 원심 분리 후 상층액은 membrane filter (pore size 0.22 μm)를 사용하여 멸균 처리하였고, 이와 같이 얻어진 SPEs의 단백질 양은 protein assay reagent kit*을 사용하여 측정하였다. SPEs는 사용 전까지 -70°C에서 보관되었다.

2) 마우스 두개골 일차 조골세포의 분리과 배양

일차 조골세포는 생후 1일-2일된 ICR 마우스의 두개골에서 분리되었다³³⁾. ICR 마우스를 에탄올 용액으로 희생시킨 후 두개골을 무균적으로 적출하였다. 10개의 마우스 두개골을 10 ml의 0.2% collagenase와 0.1% dispase가 함유된 α-최소 필수 배지 (α-MEM)에 부유시킨 후 37°C에서 20분간 교반하여 두개골로부터 조골세포를 분리하였다. 이 과정을 4회 반복하여 첫 번째 얻어진 조골세포는 버리고 2-4번째 얻어진 조골세포의 세포 부유액을 원심 분리하여 마우스 두개골 일차 조골세포를 분리하였다. 분리한 세포는 직경 10 cm 배양접시에 분주하여 10% 우태아 혈청, 100 units/ml penicillin, 100 μg/ml streptomycin, 0.25 μg/ml amphotericin-B가 포함된 α-MEM를 이용하여 37°C, 5% CO₂ 공기 혼합 배양기에서 배양하였다. 배양액은 매 3일 간격으로 교환하면서 밀생 단일층이 얻어질 때까지 배양하였다. 밀생 배양이 형성되면 배양액을 제거하고 0.25% trypsin-1mM EDTA를 첨가하여 세포를 탈리시키고 α-MEM을 동량 이상 첨가하여 희석시킨 다음 4°C에서 1,200 rpm으로 5분 동안 원심 분리하고 상층액을 제거하였다.

* Pierce, Rockford, IL.

2. 연구방법

1) SPEs의 세포 독성 검사

일차 조골세포에 대한 *P.gingivalis*의 세포독성은 MTT assay³⁴⁾에 의하여 측정하였다. MTT assay는 살아있는 세포에서의 세포 증식이나 세포 독성을 측정하는데 사용되는 방법으로, 대사적으로 활성이 있는 세포의 mitochondria에 의해 tetrazolium salt가 환원되는 원리를 이용한 것이다. 환원된 tetrazolium salt는 색이 있는 불용성의 formazan salt로 되며, 유기 용매에 의해 용해된 formazan의 양을 측정하게 된다. 96-well 평판 세포배양기에 일차 조골세포를 각 well 당 1×10^4 개씩 분주하고 10% 우태아 혈청이 함유된 α -MEM 배양액 200 μ l를 첨가하여 동일 조건에서 배양하였다. 3일 후에 배양액을 제거하고 SPEs가 각각 0, 0.01, 0.1, 1, 10, 20 μ g/ml가 함유된 배양액으로 교환하고 3일간 더 배양한 뒤 MTT assay를 시행하였다. 각 well에서 배양액을 제거하고 50 μ l의 MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 용액 (5 mg/ml)를 첨가한 후 4시간 동안 반응시켰다. 반응액을 제거하고 200 μ l의 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 첨가하여 형성된 formazan 결정을 용해한 후 ELISA reader로 파장 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2) 염기성 인산분해 효소 (alkaline phosphatase; ALP) 활성도 측정

염기성 인산분해 효소 (alkaline phosphatase; ALP) 활성도 검사는 *p*-nitrophenyl phosphate (*p*NPP)의 가수 분해 반응에 ALP가 촉매로 작용하는 것을 이용하여, 가수 분해의 산물인 *p*-nitrophenol의 양을 측정함으로써 ALP의 농도를 간접적으로 산출하는 것이다. 이 때 세포수의 차이가 ALP 활성도에 영향을 미칠 수 있으므로 총 단백질 양을 측정하여 ALP 농도를 나누어 줌으로써 단위 세포수 당 ALP 활성도를 계산한다.

본 실험에서는 일차조골세포를 직경 35 cm 배양접시에서 1×10^5 개씩 분주하고 밀생 단일층이 형성될 때까지 배양한 다음, 10% 우태아 혈청, 10 mM β -

glycerophosphate, 50 μ g/ml ascorbic acid와 SPEs가 적정 농도별로 함유된 배지와 교환한 후, 2일 / 4일 / 6일 / 8일 동안 배양하였다. 이후 각각의 배양접시에서 배양액을 제거하고 효소 용액 (0.2% collagenase, 0.1% dispase)으로 세포를 분리시킨 후 세포 부유액을 4 $^{\circ}$ C, 8,000 rpm에서 10분 동안 원심 분리하였다. 상층액을 제거하고 PBS로 세척한 후, 분리한 세포를 얼음에 옮겨 0.5% Triton X-100 100 μ l, PBS 200 μ l을 첨가하고 1시간 동안 방치하여 세포막을 파괴하였다. PBS 200 μ l를 첨가하고 4 $^{\circ}$ C, 8,000 rpm에서 10분간 원심 분리한 후 상층액을 모아 ALP 활성도 측정에서 사용하였다. 20 μ l의 세포액을 1 ml의 ALP-10[®] 용액과 혼합하여 30 $^{\circ}$ C에서 30초간 반응시킨 후 생성되는 *p*-nitrophenol의 양을 405 nm에서 흡광도를 측정하였다(Initial data). 30 $^{\circ}$ C에서 계속 반응시켜 2분 경과 후 동일 파장에서 흡광도를 측정하고(Final data), 2분간의 흡광도 변화를 이용하여 다음과 같이 ALP 활성도를 계산하였다.

$$\begin{aligned} \text{ALP(U/L)} &= (\text{Final data}-\text{Initial data})/2 \times \text{Total volume} \times 1000 / (18.45 \times \text{Sample volume} \\ &\quad \times \text{Light path}) \\ &= (\text{Final data}-\text{Initial data}) \times 1382 \end{aligned}$$

각 군별 세포액의 단백질의 양은 protein assay reagent kit[†]을 사용하여 측정하였다. ALP 농도를 단백질 농도로 나누어 ALP 활성도를 계산하였다.

3) Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

일차 조골세포를 직경 35 cm 배양접시에 2×10^5 개씩 분주하고 10% 우태아 혈청이 함유된 α MEM 배양액에서 밀생 단일층이 얻어질 때까지 배양한 후 우태아 혈청이 포함되어 있지 않고 1 mg/ml bovine serum albumin (BSA)를 함유한 α -MEM 배양액으로 교체 후 24시간동안 배양하였다. 이후 실험군에는 SPEs (1 μ g/ml)를 처리하고, 대조군에는 아무런 처리

[†] Sigma, Poole, UK.

Table 1. Synthetic oligonucleotide primers used for RT-PCR

Target gene	Primer sequence	Length of PCR product (base pairs)
MMP-2 ³⁶⁾	Forward : 5'-CTGTCTGACCAAGGATATAGCCT-3' Reverse : 5'-ACCTGTGGGCTTGTACAGTGGTGT-3'	355
MMP-9 ³⁶⁾	Forward : 5'-CTGTCCAGACCAAGGGTACAGCCT-3' Reverse : 5'-GTGGTATAGTGGGACACATAGTGG-3'	263
MMP-13 ³⁶⁾	Forward : 5'-CATTTCAGCTATCCTGGCCACCTTC-3' Reverse : 5'-CAAGTTTGCCAGTCACCTCTAAGC-3'	250
GAPDH ³⁶⁾	Forward : 5'-TGAAGGTCGGTGTGAACGGATTTGGC-3' Reverse : 5'-CATGTAGGCCATGAGGTCCACCAC-3'	983

도 시행하지 않고 48시간동안 배양하였다. 배양액을 제거하고 1 ml의 TRIzol[‡]을 첨가하여 각 군의 탈락된 세포를 1.5 ml tube에 수집하였다. 0.2 ml chloroform을 첨가하여 RNA를 용해시킨 후 4°C, 12,000×g에서 15분간 원심 분리하였다. 상층액만을 취한 후 0.5 ml isopropyl alcohol을 첨가하여 RNA를 침전시키고 4°C, 12,000×g에서 10분 간 원심 분리하여 상층액을 제거한 후 75% ethanol로 세척하였다. 분리한 RNA는 0.1% diethyl pyrocarbonate-treated distilled water (DEPC-treated H₂O) 50 µl에 녹여 260 nm와 280 nm에서 흡광도를 측정하여 농도를 확인하였다. MMP-2, -9, -13과 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA에 대한 RT-PCR은 one step RNA-PCR kit[§]를 사용하여 시행하였다. 대조군과 실험군에서 분리된 total RNA가 complementary DNA (cDNA) 합성을 위한 template로 사용되었으며, total RNA의 cDNA로의 역전사와 뒤따르는 증폭은 50 µl의 reaction mixture를 담고 있는 single tube에서 행해졌다³⁵⁾. one step RNA PCR buffer를 담고 있는 각 reaction tube는 다음을 포함하고 있었다; 1 µg total RNA, 0.1 unit/µl Avian Myeloblastosis Virus (AMV) RTase, 0.1 unit/µl Taq DNA polymerase, 0.8 unit/µl RNase inhibitor, 5 mM MgCl₂, 1 mM dNTPs, 0.4 µM forward/reverse oligonucleotide primer (Table 1).

RT-PCR은 thermocycler에서 시행되었으며 cycling condition은 다음과 같다; 42°C, 30분 (reverse transcription), 94°C, 2분 (reverse transcriptase 비활성화), 35회의 통상적인 PCR (denaturarion 95°C, 30초 / annealing 60°C, 45초 / polymerization 72°C, 1분), 그리고 72°C, 5분. 증폭된 PCR product 10 µl를 ethidium bromide를 함유한 1.5% agarose gel 전기영동에 의해서 분석하였다. 각 band의 밀도는 Tina Image software[¶]에 의해서 분석되었고, MMP mRNA / GAPDH mRNA의 비율이 계산되었다.

4) PGE₂ 생성량 측정

일차 조골세포를 직경 35 cm 배양접시에 1×10⁵개씩 분주하고 밀생 단일층이 형성될 때까지 배양한 다음, 10% 우태아 혈청, 10 mM β-glycerophosphate, 50 µg/ml ascorbic acid가 함유된 배지와 교환한 후, 실험군에는 SPEs (1 µg/ml)를 처리하고, 대조군에는 아무런 처리도 시행하지 않고 2일 동안 배양하였다. 이후 실험군과 대조군 모두 SPEs가 함유되지 않은 새로운 배양액으로 교체 후 3일간 더 배양하였다. 배양 종료 후, 배양액 상층액을 수집하고 enzyme immunoassay (EIA) kit^{**}를 사용하여 배양액 내로 유리된 PGE₂의 양을 구하였다.

[‡] Gibco BRL, Life Technologies.

[§] Raytest, Wilmington, NC, USA.

[¶] Takara Shuzo co., Ltd.

^{**} Cayman Chemical, Ann Arbor, MI.

5) 통계학적 분석

각 실험은 최소 3회 반복 실험 하였다. 평균 (mean)과 표준편차 (SD)를 계산하였으며 모든 자료는 평균±표준편차 (mean±SD)로 표시하였다. 통계학적 분석은 ANOVA와 *post-hoc t*-검정을 시행하였고 SPEs를 처리한 군과 처리하지 않은 군을 비교하기 위하여 Mann-Whitney 검정법을 시행하였다. 통계적 유의성은 $P < 0.05$ 에서 결정되었다.

III. 연구결과

1. SPEs의 세포독성 검사

일차 조골세포에 대한 SPEs의 세포독성을 확인하고, 적절한 처리 농도를 결정하기 위해 MTT assay를 시행하였다. 대조군 ($0 \mu\text{g/ml}$)과 SPEs를 농도별 ($0.01, 0.1, 1, 10, 20 \mu\text{g/ml}$)로 처리한 각 실험군을 배양 3일 후에 MTT assay를 이용하여 대사적 활성을 평가하였다. $10 \mu\text{g/ml}$ 이상의 농도에서 대조군과 비교하여 유의성 있는 세포 활성 감소가 나타났다 (Figure 1). 이상의 결과에 근거하여 마우스 두개골에서 분리한 일차 조골세포에 대하여 독성을 나타내지 않는 $1 \mu\text{g/ml}$ 이하의 농도에서 SPEs를 처리하여 이후 실험을 진행하였다.

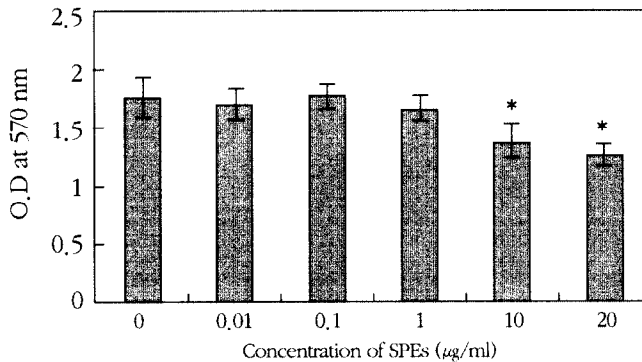


Figure 1. The effect of SPEs on the viability of primary osteoblastic cells.

The data are expressed as the mean \pm SD of six cultures.

* $P < 0.05$; significantly different from the non-treated group.

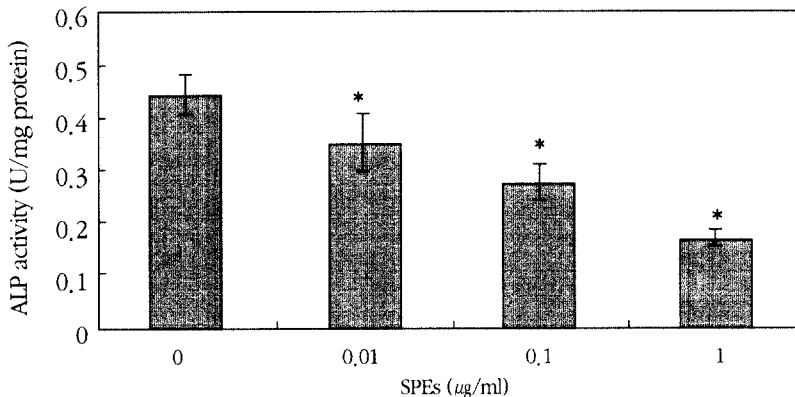


Figure 2. Dose-dependent effect of SPEs on ALP activity in primary osteoblastic cells.

Confluent primary osteoblastic cells were treated with SPEs (0 to $1 \mu\text{g/ml}$) for 8 days and then ALP activity was measured. The data are expressed as the mean \pm SD. ALP activity was significantly reduced when compared to cells without SPEs at * $P < 0.05$.

2. SPEs가 일차 조골세포의 ALP 활성도에 미치는 영향

SPEs의 존재하에 8일간 배양된 일차 조골세포에서 SPEs의 농도가 증가함에 따라 0.01, 0.1, 1 $\mu\text{g/ml}$ 에서 ALP 활성도가 대조군과 비교하여 통계적으로 유의하게 상당한 감소를 보였다 (Figure 2). 0.01 $\mu\text{g/ml}$ SPEs는 ALP 활성도를 대조군의 70% 정도로 감소시켰으며, 1 $\mu\text{g/ml}$ 의 SPEs는 대조군의 39%로 더 많은 감소를 일으켰다. 또한 SPEs 처리 기간에 따른 ALP 활성도에 미치는 영향을 조사했을 때, 1 $\mu\text{g/ml}$ 의

SPEs는 2일 후부터 일차 조골세포의 ALP 활성도를 상당히 억제하기 시작했으며 (대조군의 65%), 처리 기간이 길어질수록 억제효과는 증가되었다 (Figure 3). 이러한 결과는 SPEs가 상대적으로 짧은 기간의 처리에 의해서도 ALP 활성도의 감소에서 보여지듯이 일차 조골세포의 분화에 상당한 억제 효과를 지니고 있다는 것을 나타낸다.

3. SPEs가 일차 조골세포의 MMP-2, -9, -13 mRNA 발현에 미치는 영향

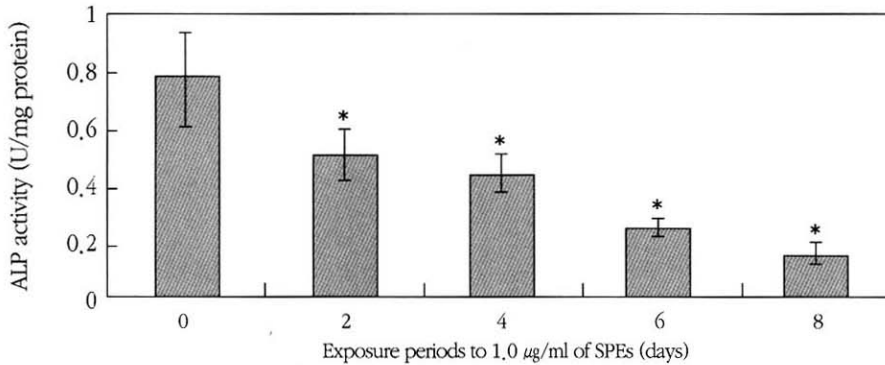


Figure 3. The effect of exposure time to SPEs on ALP activity in primary osteoblastic cells.

Confluent primary osteoblastic cells were treated with or without SPEs (1 $\mu\text{g/ml}$) for different time periods, and then ALP activity was measured. The data are expressed as the mean \pm SD. ALP activity was significantly reduced when compared to cells without SPEs at * $P < 0.05$.

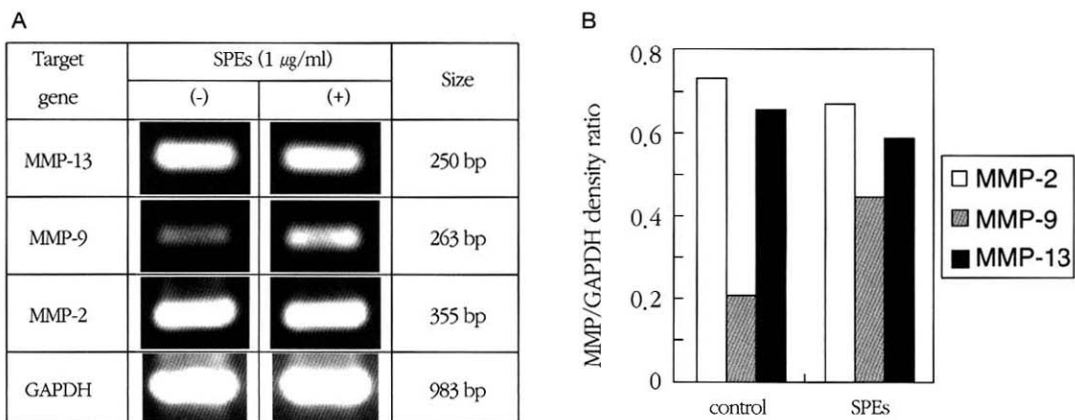


Figure 4. The effect of SPEs on the expression of MMP-2, -9, -13 mRNA.

The expression of specific mRNA was analyzed by RT-PCR (A). Density of the bands was measured. The density ratios of MMPs to GAPDH were computed (B)

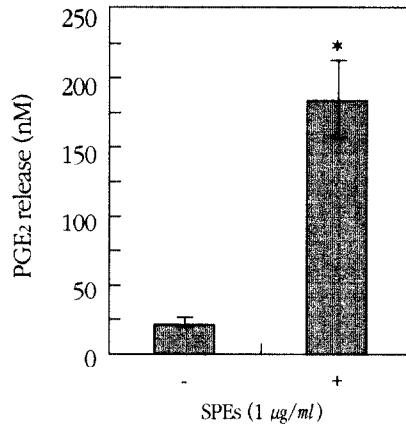


Figure 5. The effect of SPEs on the PGE₂ release

Confluent primary osteoblastic cells were pre-treated with SPEs (1 μg/ml) for 2 days and cultured without SPEs for an additional 3 days. At the end of the cultures, the amount of PGE₂ secreted in culture supernatant was measured. The data are expressed as the mean ± SD. *P < 0.05; significantly different from the non-treated group.

일차 조골세포에 SPEs를 1 μg/ml의 농도로 처리한 후 MMP-2, -9, -13 mRNA의 발현 양상을 RT-PCR 분석에 의해서 측정하였다. SPEs의 처리에 관계없이 일차 조골세포에서 MMP-2, -9, -13이 모두 발현되었다 (Figure 4A). SPEs (1 μg/ml)의 처리는 대조군과 비교하여 MMP-9 mRNA의 발현을 크게 증가시켰으며, 이는 band 밀도 분석에서 대조군에 비하여 215% 증가한 것으로 나타났다. 그러나, MMP-2 와 MMP-13 mRNA의 발현은 SPEs의 처리에 의해 유의성 있게 변화하지 않았다 (Figure 4B).

4. SPEs가 일차 조골세포의 PGE₂ 생성에 미치는 영향

SPEs (1 μg/ml)를 전처리한 실험군에서 처리하지 않은 대조군에 비교하여 유의하게 많은 PGE₂가 유리되는 것을 관찰할 수 있었다 (Figure 5). SPEs (1 μg/ml)를 전처리한 실험군은 유리된 PGE₂ 농도가 1.85 ± 0.28 × 10⁻⁷M로 측정되었으며 처리하지 않은 대조군은 2.23 ± 0.27 × 10⁻⁸M로 측정되었다.

IV. 총괄 및 고찰

본 연구는 치주질환의 주 원인균인 *P.gingivalis*가

조골세포의 기능에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 시행되었으며, 마우스 두개골 일차 조골세포에 *P.gingivalis* 초음파 분쇄 추출물을 처리하여 골 형성 및 골흡수에 관여하는 ALP 활성능, MMP 유전자 발현 (MMP-2, -9, -13), PGE₂의 생성이 어떤 영향을 받는지 조사하였다. 연구 결과는 *P.gingivalis*에 의하여 ALP 활성능이 감소되며 MMP-9 mRNA의 발현이 증가되는 것으로 나타났다. 더불어 *P.gingivalis*에 의하여 PGE₂의 생성이 증가되는 것을 알 수 있었다. 따라서 *P.gingivalis*에 의하여 조골 세포의 골성분화능이 감소되어 골 형성능이 저하됨은 물론이며 골 흡수 또한 촉진된다는 것을 알 수 있다. 또한, 이러한 조골 세포의 기능 변화에는 내인성 PGE₂ 경로가 관여되는 것으로 추정할 수 있다.

염기성 인산분해 효소 (alkaline phosphatase; ALP)는 유기인산 에스테르를 가수분해하여 석회화가 이루어지는 곳에서 국소적으로 인산이온의 농도를 증가시키는 효소로서 세포의 기질에 인산칼슘을 침착시켜 석회화를 유도하는 기능을 갖는다고 알려져 있다³⁷⁾. Woldarski 등³⁸⁾은 이러한 ALP 활성은 골 형성능이 있는 세포에서는 높지만 그렇지 않은 세포에서는 낮다고 보고하였다. 즉 ALP는 골형성능을 가진 세포의 표식자로서 유용하다고 주장하였다.

본 연구 결과에서 보여 졌듯이, SPEs의 농도가 증

가함에 따라 마우스 두개골 일차 조골세포의 ALP 활성도는 농도 의존형으로 억제되었다. 또한, 분화 초기(0~2일)에 일시적으로 SPEs로 처리되어도 일차 조골세포의 ALP 활성도가 유의하게 감소되는 것이 관찰되었으며, ALP 활성도 억제 효과는 SPEs의 영향이 제거되더라도 지속되는 것으로 나타났다. 이는 chicken periosteal osteogenesis model을 이용한 Loomer 등^{14,15)}의 연구 결과와도 일치한다. 이 연구자들은 *P.gingivalis*로부터의 초음파 분쇄 추출물을 처리하였을 때 *in vitro*에서 조골세포의 ALP 활성, 콜라겐 합성, 칼슘과 무기 인산이온의 축적을 크게 억제하여 골형성을 저해한다고 보고하였고 *P.gingivalis*는 골흡수를 자극할 뿐만 아니라 골 형성을 직접적으로 억제함으로써 골 상실에 기여한다고 제안하였다. 또한 이러한 추출물의 억제효과는 총 6일간의 배양기간 중 처음 2일간만 처리하더라도 유의하게 억제효과를 발휘한다고 보고하였다. Matsuda 등³⁹⁾ 역시 *P.gingivalis* 추출물에 의하여 치주인대의 성장이 저하되며 DNA 합성 역시 감소됨을 보고하였고, 더불어 혈소판 유래 성장 인자에 대한 치주인대 세포의 화학 주성 또한 *P.gingivalis* 추출물에 의하여 현저히 감소됨을 보고하였다. 저자는 *P.gingivalis* 추출물을 세포 배양의 초기에 일시적으로 전처리 하더라도 이러한 치주인대 세포에 대한 억제 효과는 유효하다고 보고하면서, *P.gingivalis* 추출물의 전처리는 치주인대 세포의 비가역적인 변화를 일으킨다고 제시하였다. Millar 등⁴⁰⁾은 *P.gingivalis*로부터 분리된 lipopolysaccharide (LPS)가 골의 콜라겐 합성을 억제하여 치조골 소실에 기여한다고 보고 하였고, 또한 골형성에 대한 이러한 억제 효과는 *P.gingivalis* 초음파 분쇄 추출물이 조골세포의 분화 과정이나 그 이전에 처리되어질 때 비가역적이며, 분화 후에 처리되면 가역적이라고 보고하였다²⁰⁾. 아울러, Kadono 등¹⁶⁾은 *P.gingivalis* 추출물이 ALP 활성 및 bone nodule의 형성을 크게 억제하며, 골 대사와 관련된 중요한 효소인 ALP, osteocalcin, osteopontin의 mRNA 발현 또한 *P.gingivalis* 추출물에 의해 상당히 억제된다고 보고하였다. 결과적으로 치주질환에서 *P.gingivalis*에 의한 골 흡수는 파골세포 뿐만 아니라 조골세포

에 대한 작용에 의해서 이루어진다고 제안하였다. 본 연구의 결과와 함께 상기 열거된 이전 연구들이 제시한 여러 증거들을 종합해보면, *P.gingivalis* 추출물의 처리에 의한 세포 기능 억제 효과는 다양한 세포들에 대하여 공통적으로 일어나는 현상이며 이러한 억제 효과는 초기에 일시적으로 *P.gingivalis* 추출물을 처리하더라도 비가역적으로 일어난다는 것을 알 수 있다.

한편, 기존의 여러 연구에서 *P.gingivalis*의 추출물은 다양한 세포에서 MMP 발현을 유도하거나 활성화시킬 수 있다고 보고 되었다.^{7,17-21)} 본 연구에서는 마우스 두개골 일차 조골세포를 이용하여 골흡수의 초기에 작용하는 것으로 여겨지는 조골세포의 MMP-2, 9, 13의 발현이 *P.gingivalis*에 의해서 어떤 영향을 받는지 조사하였다. 연구결과 SPEs를 처리하였을 때 MMP-2와 MMP-13 mRNA의 발현에는 큰 영향이 없는 반면, MMP-9 mRNA의 발현은 크게 증가시키는 것으로 RT-PCR 분석에 의해서 나타났다. 이러한 연구 결과는 Sismey-Durrant 등⁴¹⁾의 연구 결과와 일맥상통한다. 이 연구자들은 *P.gingivalis*의 LPS가 마우스 조골세포에서 MMP 중의 하나인 collagenase 생성을 크게 증가시키며 동시에 MMP의 조직 억제인자인 TIMP (tissue inhibitor of matrix metalloproteinase)의 발현을 억제한다고 보고 하였다. 그러나, Uchida 등³⁶⁾은 비록 MMP-2 와 MMP-9의 mRNA가 일차 조골세포에서 정상적으로 발현되지만, 이들 MMP의 유전자 발현은 SPEs와 유사한 골흡수 유도 인자의 처리에 의해 영향 받지 않는다고 보고하여, 이전 연구와 이번 연구와는 다소 상반된 연구 결과를 제시하였다. 이는 SPEs가 특정 MMP의 유전자 발현을 촉진시키는 기전에 여러 가지 인자들이 복잡하게 관여되고 있음을 시사하며, 이러한 상반된 연구 결과는 실험 환경, 사용된 세포 형태, 그리고 균액 추출방법 등의 요인들이 작용하여 나타난 것으로 생각할 수 있다. 이에 관한 보다 자세한 연구가 필요하리라 사료된다.

다른 한편, *P.gingivalis*의 추출물에 의한 조골세포의 분화 억제 및 MMP 발현 촉진 현상에 내인성 PGE₂ 경로가 관여된다고 제시될 수 있다. PGE₂는 염

증 반응을 일으키는 중요한 매개체이며, 골에서 autocrine/paracrine 기능을 매개하는 중요한 국소인자 중의 하나로서 특히, 강력한 골 흡수 물질로서 묘사되어 왔으며, *in vivo*와 *in vitro*에서 골 흡수를 자극하는 것으로 여러 연구에 의해서 보고 되었고,^{32,42)} 유기 배양에서 골의 콜라겐 합성을 억제한다고 밝혀졌다⁴³⁾. 또한, embryonic chicken calvarium의 골의 막 조직에 *P.gingivalis* 초음과 분쇄 추출물을 처리하였을 때, ALP 활성, 콜라겐 합성, 칼슘과 무기 인산이온의 축적을 억제하여 결과적으로 골형성이 억제되며, 이러한 억제 작용은 PGE₂ 생성 억제제로 알려져 있는 indomethacin의 처리에 의해 제거될 수 있다고 보고 되었다⁴⁵⁾. 그러므로 본 실험에서는 SPEs의 전처리가 일차 조골세포의 PGE₂의 생성에 미치는 효과를 조사하여, *P.gingivalis*가 조골세포에 미치는 영향에 PGE₂의 매개 가능성을 알아보고자 했다. Enzyme immunoassay 결과에서 요약했듯이 SPEs에 의한 일차 조골세포의 전처리는 세포 배양액에 분비되는 PGE₂의 양을 크게 증가시켰으며, 이는 본 실험에서 SPEs에 의한 ALP 활성 감소에서 보여지듯이 일차 조골세포 분화의 초기에 SPEs의 전처리는 세포에 비가역적 변화를 유도하여 이후 SPEs의 처리 없이도 PGE₂ 생성을 증가시킬 수 있음을 시사한다. 이러한 결과는 PGE₂의 증가와 ALP 활성 감소 및 MMP-9 mRNA 발현 증가가 서로 연관되어 있을 가능성을 제시한다. 이와 관련하여, Igarash 등⁴⁴⁾은 MC3T3-E1 세포에서 내인성 PGE₂가 autocrine 작용에 의해서 ALP 활성을 억제한다고 보고한 바 있으며, 이는 본 연구의 결과와 근본적으로 일치한다. 결국, 조골세포에서 SPEs에 의한 ALP 활성이 감소하는 기전에 내인성 PGE₂ 경로가 관여될 가능성을 생각해 볼 수 있다.

결론적으로, 이상의 실험 결과는 SPEs가 마우스 두개골 일차 조골세포의 ALP 활성을 감소시키고, MMP-9 mRNA의 발현을 증가시켜 골형성을 감소시키고 동시에 골흡수를 증가시킬 수 있으며, 이에 아마도 내인성 PGE₂ 경로가 관여될 수 있다는 것을 보여준다. 또한, SPEs에 의한 이러한 변화가 일차 조골세포 분화의 초기에 일어나면 비가역적으로 지속될 수 있다는 것을 시사한다. 결국, *P.gingivalis*는 다

양한 기전에 의해 조골세포에 작용하여 골흡수를 촉진하고 골형성을 억제함으로써 치조골 흡수를 일으킬 수 있을 것으로 사료된다. 그러나, 어떤 신호 전달 체계에 의해서 *P.gingivalis*가 조골세포의 골대사에 영향을 미치는지와 이상의 실험에서 보여진 것과 같은 골흡수와 골형성에 관계되는 각각의 인자들이 서로 어떤 연관성을 지니고 있는지에 대해서는 많은 의문이 남아 있으며, 앞으로 더 많은 연구가 필요할 것이다.

V. 결론

본 연구는 *P.gingivalis*가 조골세포의 골 형성능 및 골 흡수능에 미치는 영향을 알아보기 위해 시행되었다. 이를 위해 *P.gingivalis* 초음과 분쇄 추출물(SPEs)이 마우스 두개골 일차 조골세포에 독성을 나타내지 않는 최고의 농도를 결정하고, 이 농도이하의 SPEs를 마우스 두개골 일차 조골세포에 처리하여, 골형성 및 골흡수에 관여하는 ALP 활성능, MMP 유전자 발현 (MMP-2, -9, -13), PGE₂의 생성이 어떤 영향을 받는지 조사하여, 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. SPEs의 세포 독성 검사 결과 SPEs의 농도가 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이하일 경우 세포 독성이 나타나지 않았다.
2. SPEs의 처리는 일차 조골세포의 ALP 활성을 농도 의존형으로 억제하였으며, SPEs 처리 기간에 따른 ALP 활성도에 미치는 영향을 조사했을 때 SPEs (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)는 초기 2일간의 처치에 의해서도 일차 조골세포의 ALP 활성도를 억제하기 시작했으며, 처리 기간이 길어질수록 억제효과는 증가되었다.
3. SPEs (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)의 처리는 일차 조골세포의 MMP-9 유전자 발현을 증가시켰다.
4. SPEs (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)의 전처리는 일차 조골세포의 PGE₂ 생성을 증가시켰다.

이상의 결과에서 볼 때, *P.gingivalis*는 조골세포의 ALP 활성을 감소시키고, MMP-9 mRNA의 발현을 증가시켜 골형성을 감소시키고 동시에 골흡수를 촉진

시킬 수 있으며, 이러한 조골 세포의 기능 변화에는 내인성 PGE₂ 경로가 관여되는 것으로 추정할 수 있다. 또한 SPEs에 의한 이러한 변화가 일차 조골세포 분화의 초기에 일어나면 비가역적으로 지속될 수 있다는 것을 시사한다.

VI. 참고문헌

1. Loesche WJ, Syed SA, Schmidt ES, Morrison EC. Bacterial profiles of subgingival plaques in periodontitis. *J Periodontol* 1985;44:447-456.
2. Dahlen GG. Black-pigmented gram-negative anaerobes in periodontitis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1993;6:181-192.
3. Tanner AC, Socransky SS, Goodson JM. Microbiota of periodontal pockets losing crestal alveolar bone. *J Periodont Res* 1984;19:279-291.
4. Mayrand D, Holt SC. Biology of asaccharolytic black-pigmented *Bacteroides* species. *Microbiol Rev* 1988;52:134-152.
5. Rodenburg JP, van Winkelhoff AJ, Winkel EG, et al. Occurrence of *Bacteroides gingivalis*, *Bacteroides intermedius*, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in severe periodontitis in relation to age and treatment history. *J Clin Periodontol* 1990;17:392-399.
6. Christersson LA, Rosling BG, Dunford RG, et al. Monitoring of subgingival *Bacteroides gingivalis* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in the management of advanced periodontitis. *Adv Dent Res*. 1988;2:382-388.
7. Utito VJ, Larjava H, Heino J, Sorsa T. A protease of *Bacteroides gingivalis* degrades cell surface and matrix glycoproteins of cultured gingival fibroblasts and induces secretion of collagenase and plasminogen activator. *Infect Immun* 1989;57:213-218.
8. Meghji S, Henderson B, Nair S, Wilson M. Inhibition of bone DNA and collagen production by surface-associated material from bacteria implicated in the pathology of periodontal disease. *J Periodontol* 1992;63:736-742.
9. Morioka M, Hinode D, Nagata A, et al. Cytotoxicity of *Porphyromonas gingivalis* toward cultured human gingival fibroblasts. *Oral Microbiol Immunol* 1993;8:203-207.
10. Birkedal-Hansen H. Role of cytokines and inflammatory mediators in tissue destruction. *J Periodont Res* 1993;28:500-510.
11. Sismey-Durrant HJ, Hopps RM. Effect of lipopolysaccharide from *Porphyromonas gingivalis* on prostaglandin E₂ and interleukin-1- β release from rat periosteal and human gingival fibroblasts *in vitro*. *Oral Microbiol Immunol* 1991;6:378-380.
12. Steffen MJ, Holt SC, Ebersole JL. *Porphyromonas gingivalis* induction of mediator and cytokine secretion by human gingival fibroblasts. *Oral Microbiol Immunol* 2000;15:172-180.
13. Noguchi K, Yanai M, Shitashige M, Nishihara T, Ishikawa I. Cyclooxygenase-2-dependent prostaglandin production by peripheral blood monocytes stimulated with lipopolysaccharides isolated from periodontopathogenic bacteria. *J Periodontol* 2000;71:1575-1582.
14. Loomer PM, Sigusch B, Sukhu B, Ellen RP, Tenenbaum HC. Direct effects of metabolic products and sonicated extracts of *Porphyromonas gingivalis* 2561 on osteogenesis *in vitro*. *Infect Immun* 1994;62:1289-1297.
15. Loomer PM, Ellen RP, Tenenbaum HC. Characterization of inhibitory effects of suspected periodontopathogens on osteogenesis *in vitro*. *Infect Immun* 1995;63:3287-3296.
16. Kadono H, Kido J, Kataoka M, Yamauchi N, Nagata T. Inhibition of osteoblastic cell differentiation by lipopolysaccharide extract from *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun*

- 1999;67:2841-2846.
17. Sorsa T, Ingman T, Suomalainen K, et al. Identification of proteases from periodontopathogenic bacteria as activators of latent human neutrophil and fibroblast-type interstitial collagenases. *Infect Immun* 1992;60:4491-4495.
 18. Fravallo P, Menard C, Bonnaure-Mallet M. Effect of *Poyphyromonas gingivalis* on epithelial cells MMP-9 typeIV collagenase production. *Infect Immun* 1996;64:4940-4945.
 19. DeCarlo AA, Windsor LJ, Bodden MK, Birkedal-Hansen B, Birekdal-Hansen H. Activation and novel processing of matrix metalloproteinases by a thiol-proteinase from the oral anaerobe *Porphyromonas gingivalis*. *J Dent Res* 1997;76:1260-1270.
 20. Chang YC, Yang SF, Lai CC, Liu JY, HsiehYS. Regulation of matrix metalloproteinase production by cytokines, pharmacological agents and periodontal pathogens in human periodontal ligament fibroblast cultures. *J Periodont Res* 2002;37:196-203.
 21. Pattamapun K, Tiranathanagul S, Yongchaitrakul T, Kuwatanasuchat J, Pavasant P. Activation of MMP-2 by *Porphyromonas gingivalis* in human periodontal ligament cells. *J Periodont Res* 2003;38:115-121.
 22. Baron R. Molecular mechanisms of bone resorption by the osteoclast. *Anat Rec* 1989;224:317-324.
 23. Delaiss JM, Engsig MT, Everts V, et al. Proteinases in bone resorption: obvious and less obvious roles. *Clin Chim Acta* 2000;291:223-234.
 24. Birkedal-Hansen H. Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases. *J Periodontol* 1993;64:474-484.
 25. Reynolds JJ, Meikle MC. Mechanisms of connective tissue matrix destruction in periodontitis. *Periodontol* 2000 1997:144-157.
 26. Heath JK, Atkinson SJ, Meikle MC, Reynolds JJ. Mouse osteoblasts synthesize collagenase in response to bone resorbing agents. *Biochim Biophys Acta* 1984;802:151-154.
 27. Meikle MC, Bord S, Hembry RM, et al. Human osteoblasts in culture synthesize collagenase and other matrix metalloproteinases in response to osteotropic hormones and cytokines. *J Cell Sci* 1992;103:1093-1099.
 28. Hill PA, Docherty AJP, Bottomley KM, et al. Inhibition of bone resorption *in vitro* by selective inhibitors of gelatinase and collagenase. *Biochem J* 1995;308:167-175.
 29. Kusano K, Miyaura C, Inada M et al. Regulation of matrix metalloproteinases (MMP-2, -3, -9, and -13) by interleukin-1 and interleukin-6 in mouse calvaria: association of MMP induction with bone resorption. *Endocrinology* 1998;139:1338-1345.
 30. Mizutani A, Sugiyama I, Kuno E, Matsunaga S, Tsukagoshi N. Expression of matrix metalloproteinases during ascorbate-induced differentiation of osteoblastic MC3T3-E1 cells. *J Bone Miner Res* 2001;16:2043-2049.
 31. Ohm K, Albers H-K, Lisboa BP. Measurement of eight prostaglandins in human gingival and periodontal disease using high pressure liquid chromatography and radioimmunoassay. *J Periodont Res* 1984;19:501-511.
 32. Klein DC, Raisz LG. Prostaglandins: stimulation of bone resorption in tissue culture. *Endocrinology* 1970;86:1436-1440.
 33. Suda T, Jimi E, Nakamura I, Takahashi N. Role of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in osteoclast differentiation and function. *Methods Enzymol* 1997;282:223-235.
 34. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*

- 1983;65:55-63.
35. Mallet F, Oriol G, Mary C, Verrier B, Mandrand B. Continuous RT-PCR using AMV-RT and *Taq* DNA polymerase: characterization and comparison to uncoupled procedures. *BioTechniques* 1995;18:678-687.
 36. Uchida M, Shima M, Shimoaka T, et al. Regulation of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) by bone resorptive factors in osteoblastic cells. *J Cell Physiol* 2000;185:207-214.
 37. Bellows CG, Aubin JE, Heersche JN. Initiation and progression of mineralization of bone nodules formed in vitro: the role of alkaline phosphatase and organic phosphatase. *Bone and Mineral* 1991;14:27-40.
 38. Woldarski KH, Reddi AH. Alkaline phosphatase as a marker of osteoinductive cells. *Calcif Tissue Int* 1986;39:382-385.
 39. Matsuda N, Takemura A, Taniguchi S, Amano A, Shizukuish S. *Porphyromonas gingivalis* reduces mitogenic and chemotactic responses of human periodontal ligament cells to platelet-derived growth factor *in vitro*. *J Periodontol* 1996;67:1335-1341.
 40. Millar SJ, Goldstein EG, Levine MJ, Hausmann E. Modulation of bone metabolism by two chemically distinct lipopolysaccharide fractions from *Bacteroides gingivalis*. *Infect Immun* 1986;51:302-306.
 41. Sismey-Durrant HJ, Atkinson SJ, Hopps RM, Heath JK. The effect of lipopolysaccharide from *bacteroides gingivalis* and muramyl dipeptide on osteoblast collagenase release. *Calcif Tissue Int* 1989;44:361-363.
 42. Goodson JM, McClatchy K, Revell C. Prostaglandin-induced resorption of the adult rat calvaria. *J Dent Res* 1974;53:670-677.
 43. Raisz LG, Koolemans-Beynen AR. Inhibition of bone collagen synthesis by prostaglandin E₂ in organ culture. *Prostaglandins* 1974;8:377-385.
 44. Igarashi K, Hirafuji M, Adachi H, Shinoda H, Mitani H. Role of endogenous PGE₂ in osteoblastic functions of a clonal osteoblast-like cell, MC3T3-E1. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 1994;50:169-172.

Effects of *Porphyromonas gingivalis* extracts on the function of mouse calvarial primary osteoblastic cells

Jeong-Ho Yun¹, Seong-Ho Choi², Kyoo-Sung Cho², Jung-Kiu Chai¹, Chong-Kwan Kim², Chang-Sung Kim¹

¹Department of Periodontology, Oral Science Research Institute, College of Dentistry, Yonsei University

¹Department of Periodontology, Oral Science Research Institute, College of Dentistry and Brain
Korea 21 project for Medical Science, Yonsei University

Porphyromonas gingivalis has been implicated as an important periodontopathogenic bacterium in the etiology and progression of periodontal diseases. It has been reported that *P. gingivalis* may mediate periodontal destruction not only directly through its virulence factors, but also indirectly by inducing complex host mediated inflammatory responses. The purpose of this study was to evaluate the effects of *P. gingivalis* on the bone formation and resorption by osteoblasts. For this purpose, after determining the concentration below which sonicated *P. gingivalis* extracts (SPEs) have no cytotoxicity on mouse calvarial primary osteoblastic (POB) cells, we investigated the effects of SPEs on the alkaline phosphatase (ALP) activity, matrix metalloproteinase (MMP) expression (MMP-2, -9, 13), and prostaglandin E₂ (PGE₂) release in POB cells by treatment with SPEs below that concentration.

The results were as follows;

1. SPEs showed no cytotoxic effect on POB cells up to a concentration of 1 $\mu\text{g/ml}$.
2. The treatment with SPEs reduced ALP activity in a dose-dependent manner in POB cells. In addition, when we investigated the effect of SPEs (1 $\mu\text{g/ml}$) on ALP activity for different exposure periods, statistically significant inhibition of ALP activity was shown at 2 days of exposure, and further significant inhibition occurred by extending the periods of exposure.
3. The treatment with SPEs stimulated the gene expression of MMP-9 in POB cells.
4. The pre-treatment with SPEs increased the amount of PGE₂ released in POB cells.

In summary, the present study shows that *P. gingivalis* could inhibit osteogenesis and stimulate bone resorption not only by reducing ALP activity but also by increasing MMP-9 mRNA expression in osteoblasts, possibly through an endogenous PGE₂ pathway. In addition, our results suggest that if *P. gingivalis* affects osteoblasts in early differentiation stage, such effects by *P. gingivalis* could be irreversible.

Key words: *Porphyromonas gingivalis*, osteoblast, alkaline phosphatase, matrix metalloproteinase, prostaglandin E₂