

## 치은 섬유모세포에서 Triclosan에 의한 Prostaglandin E<sub>2</sub> 합성 억제

박성표 · 정현주 · 김영준 · 김옥수

전남대학교 치과대학 치주과학교실 및 치의학연구소

### 1. 서론

치주질환은 치주낭내 치주병인균의 독소에 의하여 유발되며<sup>1-4)</sup> 이들 병인균의 조직내 침투에 의하여 더욱 깊이 진행된다. 독소 및 병인균의 염증유발과 면역반응의 진행으로 여러 염증물질과 면역반응물질이 조직내에 유출되면서 치주조직의 파괴는 급, 만성으로 진행된다. 이중 염증반응과 관련되어 생산되는 cytokines으로는 interleukin-1  $\alpha$ 와  $\beta$  (IL-1  $\alpha$   $\beta$ ) 그리고 tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )가 있으며, 치주조직내 세포의 염증산물로 생산되는 물질의 하나로 prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>)를 들 수 있다. 이들 물질들은 상호 연관이 되어 염증 관련 물질들의 생산을 자극하거나 증강시키며 염증의 중요인자로 존재한다<sup>4,6)</sup>. 따라서 치주질환의 예방 및 치료에 있어서 치주병인균의 억제, 살균 및 이들 세균에서 기시되는 염증 및 면역반응 매개 물질의 생성을 조절하는 것이 중요하다.

일반적으로 염증 억제는 크게 phospholipase 저해제, lipoxigenase 저해제 및 cyclooxygenase (COX)의 저해제의 작용으로 나눌 수 있다. 이 eicosanoids의 생합성 과정 중 염증 반응은 COX에 의해 진행된다. 이 COX는 두 종류의 이성효소를 가지고 있는데, 여러 가지 생체내 장기의 항상성 유지 및 보호작용

들은 COX-1에 의하여며 염증성, 유도성 효과들은 주로 COX-2에 의한 것이다<sup>7)</sup>.

Triclosan (2,4,4'-trichloro-2'-hydroxydiphenyl ether)은 페놀계 화합물로 치태세균에 광범위한 항균효과를 나타내며<sup>8,9)</sup> 부작용이 거의 없어 구강양치용액과 치약의 성분으로 적합하며<sup>10-12)</sup> 또한 불소를 포함한 다른 성분과 함께 사용되어도 그 활성형의 성분이 변화되지 않고 상승효과를 갖는 것으로 알려져 있다<sup>9, 13)</sup>. Triclosan은 세균의 대한 항균효과는 세균 세포막 변화를 유발시켜서 나타내는데, 저농도의 triclosan은 세균의 세포막을 통한 영양공급을 차단시켜서 세균의 증식을 억제시키지만, 고농도에서는 세포막 자체를 파괴시켜서 항균효과를 나타낸다<sup>4)</sup>.

Triclosan은 화학약품 및 히스타민에 의해 유도되는 피부 염증을 억제시키며<sup>15)</sup> sodium lauryl sulfate (SLS)에 의해 야기되는 구강 점막의 궤양을 완화시키는 효과가 있다.<sup>9)</sup> 또한 triclosan을 사람의 치은 섬유모세포에 적용시 interleukin 등을 포함한 cytokines 자극에 의해 생성되는 PGE<sub>2</sub>의 합성을 억제시켜 치은 염증을 해소하는 등 triclosan은 염증과 관련된 여러 가지 매개물질을 조절한다고 알려져 있다<sup>10, 16, 17)</sup>. 현재 triclosan은 피부질환 치료제의 한 성분으로 이용되고 있고 구강 영역에서는 치태 억제 효과를 위한

활성형 성분으로 치약이나 구강양치 용액에 포함되어 사용되고 있다.

지금까지의 많은 연구들로 볼 때 triclosan은 치태 내 세균에 대한 항균 효과와 치은 염증억제 효과가 있는 것으로 생각된다. 그러나 이들 연구들은 대부분 임상적 연구들이거나 세포 수준에서 염증과 관련된 매개물질들의 분비 억제효과를 관찰한 것으로 triclosan에 의한 항 염증작용의 기전을 규명한 연구는 없었다. 따라서 이번 연구에서는 치은 섬유모세포에서 triclosan에 의한 PGE<sub>2</sub> 합성 억제 기전을 알아보고자 본 실험을 시행하였다.

## II. 실험재료 및 방법

### 1. 실험재료

#### 1) 세포배양 및 triclosan 농도

사람의 치은 섬유모세포주 (Human gingival fibroblast; HGF-1; ATCC CRL2014)를 10% fetal bovine serum (FBS)과 1% antibiotic antimycotic (Penicillin-Streptomycin, GibcoBRL, U.S.A.)이 포함된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Life Technologies, U.S.A.)에서 5% 이산화탄소와 37°C에서 배양하였다. 배양액은 2-3일에 한번씩 교환하였으며 실험에 사용된 세포주는 계대배양 #16-20번째의 것을 사용하였다.

실험에 사용된 triclosan은 BML Pharmaceuticals Inc. (NY, U.S.A.)으로부터 제공받았으며 실험에 사용된 최종 농도는 0.001~10 µg/ml로 하였다.

### 2. 실험방법

#### 1) 세포독성실험

HGF-1 세포를 96 well tissue culture plates (Corning-Costar, U.S.A.)에 12,500 cells/well로 분주하였다. 세포를 24~36시간 동안 배양 후 2%와 0% FBS를 포함한 DMEM 배양액으로 교환하고 해당농도의 triclosan을 첨가하였다. 배양 1일 후와 3일 후에 MTT assay를 시행하였다. 각 well에서 배양액을 제거

하고 생리식염수로 2회 세척 후 CellTiter® 96 Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay kit (Promega, U.S.A.)를 이용하여 제조사의 지시대로 3-(4,5-dimethyl-thiazole-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide 용액 50 µl를 첨가하고 4시간 동안 배양하였다. 반응을 정지시키기 위하여 여기에 20 µl의 10% SDS를 첨가한 후 ELISA plate reader (Microplate manager®, BioRad, U.S.A.)로 파장 490 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 이 실험을 3회 반복 시행하였으며 각각의 triclosan 농도에 대한 세포활성도 효과는 대조군에 대한 백분율로 표시하였다.

#### 2) PGE<sub>2</sub> Immunoassay

HGF-1 cells을 12 well plate에 1 x 10<sup>5</sup> cells/well로 분주하고 세포를 48시간 후에 배지를 2% fetal bovine serum이 함유된 배지로 교환하였다. DMEM 배지내에 triclosan 용액을 0.01, 0.1, 1.0, 10 µg/ml 농도로 조정하여 첨가한 후 1시간 동안 전처치를 시행하였다. HGF-1 cells을 TNF α (1.0 ng/ml)로 자극한 후 16-18시간 동안 배양하였다. HGF-1 cell로부터 유리되는 PGE<sub>2</sub>의 양은 세포 배양 상층액을 회수하여 enzyme immunoassay kit (PGE<sub>2</sub> Immunoassay kit®, Oxford Biomedical Research, U.S.A.)를 이용하여 제조사의 지시에 의거하여 측정하였다. ELISA plate reader로 파장 650 nm에서의 흡광도를 측정하여 그 양을 분석하였다.

#### 3) 총 RNA 추출

100 mm dish (Corning-Costar, U.S.A.)에 HGF-1 cells을 분주하고 10% FBS가 함유된 DMEM 배지에 배양하였다. 배양액은 세포가 밀생에 도달할 때까지 3일 간격으로 교환하였다. 세포가 밀생에 도달하면 0.3% FBS가 포함된 DMEM 배양액으로 교환하여 12-14시간 동안 다시 배양하였다. 사람 치은 섬유모세포에서 triclosan에 의한 COX 유전자들의 억제 효과를 비교하기 위하여 4개의 군으로 나누어 처치하였다. 용매 (vehicle)만을 처치한 군을 음성대조군으로, TNF-α만 적용한 군을 TNF α 자극군, triclosan으로 처치 후 TNF-α로 자극한 군을 triclosan 자극군, COX-2

inhibitor인 NS-398 (Cayman Chemical, U.S.A.) 5  $\mu$ M 로 1시간 동안 전처리 후에 TNF- $\alpha$ 로 자극한 군을 양성대조군으로 하였으며 각 군들에 적절한 처치를 시행한 후 16-18시간 동안 배양 후 RNA를 채취하였다.

Triclosan에 의한 COX 유전자들의 조절 기전에 단백질 합성이 필요한지를 알아보기 위하여, 단백질 합성을 억제하는 cyclohexamide를 triclosan 적용 30분 전에 2.0  $\mu$ g/ml 농도로 처리하고 triclosan (0.1  $\mu$ g/ml), TNF- $\alpha$  (1.0 ng/ml) 순으로 처리하였으며 16-18시간 후 RNA를 채취하였다. RNA의 분리는 배양액을 제거하고 2.0 ml의 Trizol (Promega, U.S.A.)을 첨가하여 각각의 triclosan 농도에서 분리된 세포를 1.8 ml Effendorf tube에 수집하였다. 200  $\mu$ l의 chloroform을 첨가하여 RNA를 용해시킨 후 4  $^{\circ}$ C, 12,000 rpm에서 10분간 원심 분리하였다. 상층액만을 취한 후 500  $\mu$ l

isoprophyl alcohol을 첨가하여 RNA를 침전시키고 4  $^{\circ}$ C 10,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 상층액을 제거하였다. 분리한 RNA는 Tris/EDTA buffer 20  $\mu$ l에 녹인 후 Spectrophotometer (SmartSpec<sup>TM</sup>, BioRad, U.S.A.)로 그 양을 측정하였으며 -70  $^{\circ}$ C 냉동고에 보관하였다.

4) 역전사 중합효소연쇄반응 (Reverse transcriptase-polymerase chain reaction; RT-PCR)

추출된 총 RNA중 5  $\mu$ g을 RT reaction을 위하여 사용하였다. Superscript II (gibcobl, Grand Island, NY, U.S.A.)를 이용하여 70  $^{\circ}$ C 10분, 42  $^{\circ}$ C 70분, 37  $^{\circ}$ C 15분의 조건으로 cDNA를 합성하였다. 사람의 cDNA 염기서열에 의거하여  $\beta$ -actin, COX-1, COX-2 primer를 제작한 후, PCR 완충용액 (GibcoBRL,

PCR primers

Primer	Expected base pairs	Sequence (5'-3')
$\beta$ -actin sense (+)	300	AGCGGGAAATCGGCGTG
$\beta$ -actin antisense (-)		CAGGGTACATGGTGGTGC
COX-1 sense (+)	303	TGCCAGCTCCTGGCCCCGCCGCTT
COX-1 antisense (-)		GTGCATCAACACAGGCGCCTCTTC
COX-2 sense (+)	305	TTCAAATGAGATTGTGGGAAAAT
COX-2 antisense (-)		GATCATCTCTGCCTGAGTATCTT

PCR programs

$\beta$ -actin	94 $^{\circ}$ C 1 min	94 $^{\circ}$ C 1 min	60 $^{\circ}$ C 2 min	72 $^{\circ}$ C 1 min	72 $^{\circ}$ C 10 min
	25 Cycles				
COX-1 COX-2	94 $^{\circ}$ C 1 min	94 $^{\circ}$ C 1 min	55 $^{\circ}$ C 2 min	72 $^{\circ}$ C 1 min	72 $^{\circ}$ C 10 min
	30 Cycles				

Figure 1. Amplification primer sets and conditions used in polymerase chain reaction. COX-1 indicates cyclooxygenase 1; COX-2, cyclooxygenase 2

U.S.A.) 5  $\mu$ l, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> 3  $\mu$ l, 10 mM dNTP mix 1  $\mu$ l, 각각의 primer 2.5  $\mu$ l, 5 unit Taq polymerase 0.2  $\mu$ l, cDNA 2  $\mu$ l와 3차 증류수를 넣어 50  $\mu$ l가 되게 하여 PCR 반응 혼합물들을 PCR cycler (Thermocycler, U.S.A.)를 이용하여 증폭하였다 (Figure 1). 증폭된 PCR 산물들을 1.5% agarose gel에서 전기영동을 시행하여 얻은 유전자 영상을 Gel Image Analysis System (QualityOne®, BioRad, U.S.A)에서 house keeping gene인  $\beta$ -actin의 발현을 기준으로 각 유전자 발현정도를 평가하였다.

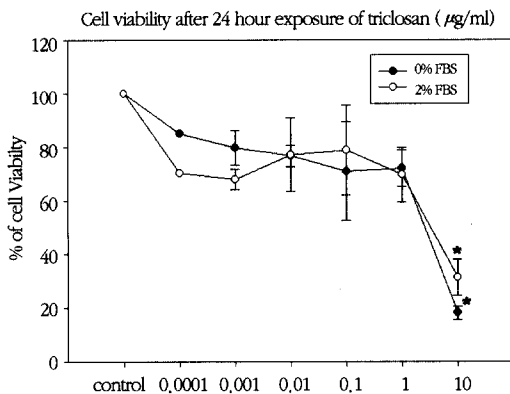
### 3. 통계 분석

Triclosan의 세포독성 검사 및 PGE<sub>2</sub> 합성 억제 실험에서 얻어진 수치는 one-way ANOVA와 비모수 통계방법인 Kruskal-Wallis법을 통하여 검증하였다.

## III. 결과

### 1. 세포활성에 대한 triclosan의 효과

Triclosan이 치은 섬유모세포의 세포활성을 억제시키는지 알아보려고 MTT assay를 시행하였다. Triclosan 농도 10  $\mu$ g/ml에서는 24시간과 72시간에 모두 세포독성을 보였으며 1  $\mu$ g/ml에서는 72시간에



세포활성이 대조군에 비하여 유의하게 감소하였다 ( $p < 0.01$ ). FBS 첨가 유무에 의해 triclosan 자극 후 세포활성도의 변화를 관찰하였을 때 통계학적으로 유의한 차이가 관찰되지 않았다 (Figure 2).

이상의 결과를 근거로 하여 triclosan 10  $\mu$ g/ml 미만의 농도에서는 24시간 이내에는 치은 섬유모세포에 대하여 세포활성을 저해하지 않는 것으로 고려되어 PGE<sub>2</sub> immunoassay를 위한 세포배양과정에 triclosan 0.01-1.0  $\mu$ g/ml의 농도를 적용하였다.

### 2. Triclosan에 의한 PGE<sub>2</sub> 합성 억제

PGE<sub>2</sub>의 양은 대조군은 1175  $\mu$ g/ml, TNF- $\alpha$ 로 자극을 준 군은 9350 pg/ml 였으며 triclosan으로 전처리 후 TNF- $\alpha$ 로 자극을 준 것은 2965~887 pg/ml로, TNF- $\alpha$ 로만 자극을 준 군에 비하여 triclosan 농도 0.01  $\mu$ g/ml 이상을 적용한 경우 모두 유의하게 억제되었다 ( $p < 0.05$ , Figure 3).

### 3. Triclosan에 의한 COX-2 유전자 발현 억제

Triclosan에 의한 PGE<sub>2</sub> 합성 억제효과를 분자 생물학적으로 규명하기 위하여 COX-1, COX-2 그리고 house keeping gene인  $\beta$ -actin의 발현을 관찰하였다. 그 결과 COX-1 유전자 발현은 triclosan 투여 유,

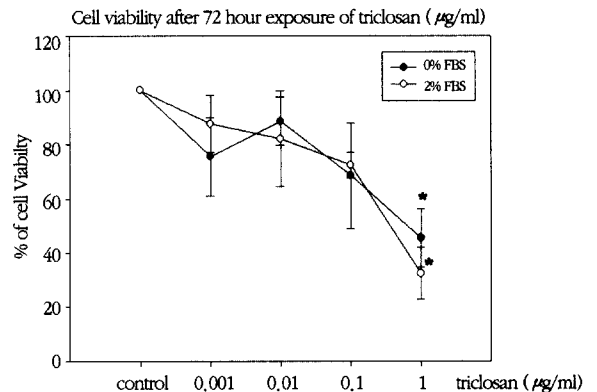


Figure 2. MTT assay for HGF-1 cell viability with triclosan.

\*: indicates significantly difference with control group ( $p < 0.05$ )

PGE<sub>2</sub> production (pg/ml)

Concentration of triclosan ( $\mu\text{g/ml}$ )

Figure 3. The effect of triclosan on PGE<sub>2</sub> production in TNF- $\alpha$  stimulated human gingival fibroblast

\*: indicates significantly difference with control group ( $p < 0.05$ )

무와 관계없이 모든 군에서 일정하게 발현되었다. COX-2 유전자 발현은 TNF- $\alpha$ 만 투여한 군에서 발현이 가장 강하게 관찰되었으며 triclosan 0.1  $\mu\text{g/ml}$ 로 투여한 군에서는 그 발현이 TNF- $\alpha$ 만 투여한 군에서 보다 약 38%의 감소를 나타냈다. COX-2 inhibitor인 NS-398로 투여한 군은 TNF- $\alpha$ 만 투여한 군에서 보다 유전자 발현이 약 41%의 감소가 보였으며 triclosan 0.1  $\mu\text{g/ml}$ 로 투여한 군과 COX-2 유전자 발현 정도가 거의 유사하였다 (Figure 4).

#### 4. Cycloheximide가 triclosan에 의한 COX-2 유전자 발현에 미치는 영향

Triclosan의 COX-2 유전자 발현 억제 기전에 단백질 합성이 필요한지를 알아보기 위하여 단백질 합성 억제제인 cycloheximide를 30분 동안 전처리하고 triclosan, TNF- $\alpha$ 순으로 처리하여 COX-2 유전자 발현을 관찰하였다. 그 결과 Figure 5에 나타난 것처럼 cycloheximide로 전처리시 triclosan에 의한 COX-2 유전자 발현 억제가 나타나지 않았는데, 이는 tri-

Figure 4. RT-PCR analysis of COX-1 and COX-2 mRNA expression in HGF-1 cells, treated with TNF- $\alpha$  (1 ng/ml), triclosan (0.1  $\mu\text{g/ml}$ ), and/or NS-398 (5  $\mu\text{M}$ ).

Figure 5. RT-PCR analysis of COX-1 and COX-2 mRNA expression in HGF-1 cells with triclosan and cycloheximide. M indicates size marker; TRI: triclosan; and CHX: cycloheximide

closan에 의한 COX-2 유전자 발현 억제는 단백질 신합성 (*de novo protein synthesis*)이 필요함을 알 수 있었다.

#### IV. 고찰

치주질환의 일차적인 원인으로는 치태내의 세균에 의한 것으로 이들 세균들의 자극에 의하여 치주조직 세포들이 IL-1, TNF- $\alpha$  등의 proinflammatory cytokines을 분비하고 계속하여 PGE<sub>2</sub>이 생성된다<sup>18-20</sup>. Prostaglandin은 치주질환 진행과 심도를 알 수 있는 중요한 표식자 중 하나로 여겨지고 있는데<sup>21-23</sup> 예를 들어 치주질환 환자의 치은 열구액내 PGE<sub>2</sub> level은 치주질환이 없는 정상인에 비하여 현저히 높게 나타나며<sup>22,23</sup> 염증성 치은 조직에서 그 발현이 증가하는 것으로 알려져 있어<sup>21</sup> prostaglandin은 치주질환의 염증조절에 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다.

Prostaglandin은 생체 내 다양한 조직에서 만들어지며 염증반응 뿐만 아니라 혈액응고, 면역반응, 신장기능, 위장관 보호, 신경조직의 성장과 발달 및 골조직의 대사 등에 관여하는 것으로 알려져 있다<sup>24-26</sup>. NSAIDs 약물의 부작용인 위 점막 손상, 신장 기능이상 등은 COX를 비선택적으로, COX-1과 COX-2

모두를 억제함으로써 각 조직의 보호 역할을 하는 prostaglandin 생성이 억제되어 일어난다<sup>27, 28</sup>. 그래서 기존의 NSAIDs의 부작용을 감소시키기 위하여 COX-2 효소만 선택적으로 억제하는 약물이 개발되고 있다<sup>29, 30</sup>. Prostaglandin의 생성은 phospholipase A2 (PLA2)와 COX에 의하여 조절된다. 특히 COX는 arachidonic acid에서 prostaglandin를 생산하는 과정을 조절하는 효소로서 현재 COX-1과 COX-2가 알려져 있다<sup>31</sup>. 정상적인 상태에서 발현하여 위장관 보호, 신장기능조절과 같은 신체의 항상성 유지에 관여하는 COX-1과 염증이나 oxydative stress, 기타 면역 반응시 세포분열인자나 cytokines등의 자극에 의해 세포내 발현이 증가하는 inducible COX-2가 있다. 비스테로이드성 항염증제 (Non-steroidal antiinflammatory drugs; NSAIDs)는 생체내에 고르게 분포하는 COX 활성을 차단함으로써 염증성 prostaglandin의 생성을 억제하여 소염, 진통 효과를 나타낸다.

Triclosan은 지방 분해성 항균제로서 치약, 구강청정제 및 화장품 등의 구성 성분이다<sup>10-12</sup>. Triclosan은 치약과 구강양치용액의 한 성분으로 이용되며 불소를 포함한 다른 성분의 첨가에 의하여 그 효과가 변화되지 않는 것으로 알려져 있다<sup>9, 13</sup>. 또한 triclosan은 치은 염증에 관련된 여러 가지 mediator를 조절하

는데 특히 사람의 치은 섬유모세포에서 interleukin 자극에 의해 생성되는 PGE<sub>2</sub>의 합성을 억제하는 효과가 있다고 알려져 있다<sup>10, 16, 17</sup>. 그러나 지금까지의 triclosan 연구는 치태 세균의 감소나 치은 염증 억제 및 감소와 관련된 임상적 연구들이거나 세포 수준에서 염증과 관련된 prostaglandin의 분비 억제효과를 관찰한 것들이었다. 또한 triclosan은 고농도 (50 μM 이상)에서는 사람 치은 섬유모세포에 대한 독성이 관찰되었으며<sup>32</sup> 따라서 사람의 치은 섬유모세포에 대한 독성이 없으면서 PGE<sub>2</sub> 합성을 억제할 수 있는 농도를 설정하는 것이 중요하다. 이에 이 연구에서는 사람 치은 섬유모세포에 triclosan을 적용시 세포에 독성이 없이 PGE<sub>2</sub>를 억제하는 적절한 triclosan의 농도를 알아보고 치은 섬유모세포에서 PGE<sub>2</sub>의 억제 기전을 규명하고자 하였다.

초기 세포독성 연구 (MTT assay)에서 triclosan 농도 10 μg/ml에서는 24시간째부터, 72시간째에서는 1.0 μg/ml 이상에서 세포 활성도가 유의하게 감소되었으며 (p<0.01), 그 이하의 농도에서는 24, 72시간째에 세포 활성도는 유의한 변화를 보이지 않았다. Fetal bovine serum에 의한 세포 활성도의 변화유무를 관찰하였을 때 통계학적으로 유의한 차이가 관찰되지 않아 fetal bovine serum이 triclosan에 의한 세포 활성도에 영향을 미치지 않았음을 알 수 있었다. 따라서 본 연구에서는 triclosan 1.0 μg/ml 이하의 농도에서는 단기간 즉, 24시간 이내에는 치은 섬유모세포에 대하여 세포활성을 저해하지 않는 것으로 고려되어 PGE<sub>2</sub> Immunoassay에 triclosan 0.01 - 1.0 μg/ml의 농도를 적용하였다.

사람 치은 섬유모세포의 TNF-α 자극에 의한 PGE<sub>2</sub> 합성이 triclosan에 의해 억제되는가를 관찰한 실험에서 TNF-α 만으로 자극한 것에 비하여 triclosan 0.01 μg/ml 이상의 농도로 자극한 것들에서 PGE<sub>2</sub> 합성이 유의하게 억제되었다 (p<0.01). Triclosan 농도가 증가할수록 더 큰 PGE<sub>2</sub> 합성 억제를 보였으나 triclosan 농도간의 유의한 차이는 없었다. 이 결과는 사람 치은 섬유모세포를 interleukin-1β (1.0 ng/ml)로 자극 후 triclosan 적용시 6.9 uM (2.0 mg/ml) 이상에서 triclosan 농도 의존적으로 prostaglandin E<sub>2</sub> 합

성 억제가 관찰되었다는 Gaffar 등<sup>16</sup>의 결과와 유사하다. 또한 Gaffar 등<sup>16</sup>은 triclosan에 의한 여러 염증 관련 mediators, 예를 들어 prostaglandins, leukotrienes 그리고 lipoxins 등의 억제가 COX-1, COX-2, 5-lipoxygenase and 15-lipoxygenase pathway의 억제와 관련이 있으며 이들 효소들의 조절은 triclosan 농도 의존적이라고 하였다. 그러나 Gaffar 등<sup>16</sup>의 실험에 사용된 triclosan의 농도는 본 실험에 사용한 triclosan 농도보다 200배 이상 높은 농도(2.0 mg/ml- 15.0 mg/ml)의 것을 사용하였으며 이 농도 범위는 본 실험의 치은 섬유모세포에 독성을 나타내는 triclosan 농도를 훨씬 초과하는 고농도로 생각된다. 이번 실험에서 triclosan 10.0 μg/ml 농도에서 대조군과 거의 비슷한 수준의 PGE<sub>2</sub> 합성을 보였으나 이는 배양 24시간째 triclosan 농도 10.0 μg/ml 에서는 세포 활성이 현저히 감소한 점을 고려할 때, Gaffar 등의 실험에서 COX-1과 COX-2의 활성 억제는 고농도의 triclosan에 의하여 치은 섬유모세포의 활성이 억제되어 cytokines 자극에 대하여 반응을 잘 나타내지 못했기 때문으로 추정된다.

Triclosan에 의한 COX 유전자 조절을 알아보기 위하여 본 연구에서는 COX-1과 COX-2 유전자 발현을 관찰하였다. COX-2 유전자는 TNF-α와 같은 cytokines에 의해 그 발현이 증가되며 대조군에 비하여 많은 prostaglandins를 생산한다<sup>6, 28</sup>. 이번 실험의 결과, triclosan 0.1 μg/ml 농도에서 TNF-α 자극시 COX-1 유전자는 그 발현이 대조군 및 TNF-α 자극군과 큰 차이가 없었다. 이는 이번 실험에 사용한 triclosan 농도는 세포 내 constituent gene인 COX-1에는 영향을 미치지 않았음을 시사한다. NS-398 (N-(2-cyclohexyloxy-4-nitrophenyl) methanesulphonamide)은 1993년 Futaki 등<sup>31</sup>에 의해 보고된 비스테로이드성 합성 소염 진통제이다. NS-398은 PGE<sub>2</sub> 합성을 억제시키면서 일반 비스테로이드성 소염 진통제들, 예를 들면 indomethacin, diclofenac acid 등이 나타내는 부작용인 위장관 장애, 신독성이 훨씬 약하며 현재 선택적인 COX-2 억제제로 알려져 있다<sup>31, 33, 34</sup>. 이 연구에서는 triclosan에 의한 PGE<sub>2</sub> 합성 억제가 선택적으로 COX-2 억제에 의한 것인지를 알아보기 위하여 COX-

2 억제제로 알려진 NS-398을 양성 대조군으로 하여 그 유전자 발현 정도를 RT-PCR로 관찰하였다. Figure 3에서 알 수 있듯이 TNF- $\alpha$  자극 군에 비하여 triclosan 0.1  $\mu\text{g/ml}$  군에서 COX-2 유전자 발현이 38% 감소하였다. COX-2 억제제인 NS-398 투여군에서도 TNF- $\alpha$  자극 군에 비하여 COX-2 유전자 발현이 41% 감소하였으며 triclosan 0.1  $\mu\text{g/ml}$  군과 유전자 발현에 큰 차이가 없었다. 이는 triclosan 0.1  $\mu\text{g/ml}$  농도가 치은 섬유모세포에 독성이 없으면서 COX-2 유전자 발현을 억제하는 유효한 농도임을 의미하며, 또한 저농도의 triclosan이 세포내의 여러 가지 항상성 유지에 관련이 있는 COX-1 유전자 발현에는 관여하지 않고 선택적으로 COX-2 유전자 발현에만 관여함을 시사한다.

Triclosan에 의한 PGE<sub>2</sub> 합성 억제 기전에 세포내 단백질 합성이 관여하는지를 알아보기 위하여 cycloheximide 처치를 시행하였다. 그 결과 Figure 5에 나타난 것처럼 triclosan에 의한 COX-2 유전자 발현 억제는 단백질 신합성(de novo protein synthesis)이 필요함을 시사하였다. COX-2 유전자는 모든 조직에서 잘 조절이 되며 이 유전자 조절에는 여러 중요한 세포 내 신호 전달 경로가 관여한다. 따라서 이 실험의 cycloheximide 결과는 여러 가지 세포 내 신호 전달과 관련된 단백질이 COX-2 유전자 조절에 관여됨을 의미한다. 현재 COX-2 유전자 발현에 관계하는 세포내 단백질 (intracellular proteins)은 protein kinase C (PKC)<sup>35)</sup>, p38 mitogenic activated protein kinase (MAPK), 그리고 nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B) 등<sup>36)</sup>이다. Triclosan은 이들 단백질 중 일부 혹은 모두에 영향을 미쳐서 COX-2 유전자 발현 억제를 시키는 것으로 추정되나, 더 자세한 기전은 향후 규명해야 할 것으로 생각된다.

치은 섬유모세포는 대식세포(marophage), 그리고 다른 염증 관련 면역세포와 함께 PGE<sub>2</sub> 조절에 관여하는데, 치주염이 존재시에 정상환자보다 치은 열구 액내의 PGE<sub>2</sub> 수준이 더 증가하는 것으로 알려져 있다. 이번 연구결과 triclosan은 사람 치은 섬유모세포에서 TNF- $\alpha$ 에 의해 유도되는 PGE<sub>2</sub> 합성을 억제하였다. 이는 triclosan이 치태세균의 억제 뿐만 아니라 치은 염증조절에도 유용한 약제임을 시사한다. 또한

이번 연구는 치주질환 예방을 위한 치은 염증 조절 기전의 한 모델을 제시하였으며 향후 치은 섬유모세포에 의한 더 정교한 염증조절 기전의 규명에 도움을 줄 것으로 보인다.

## V. 결론

이 연구는 triclosan이 항균효과뿐만 아니라 PGE<sub>2</sub> 합성 억제에 의한 항염증 효과가 있다는 연구보고에 근거하여 triclosan이 사람 치은 섬유모세포에 TNF- $\alpha$  자극에 의한 PGE<sub>2</sub> 합성 억제 기전을 알아보려고 하였다.

치은 섬유모세포에 대한 triclosan의 세포 독성을 알아보기 위하여 농도 0.001  $\mu\text{g/ml}$  ~ 10  $\mu\text{g/ml}$ 로 24, 72시간 자극을 주었다. 또한 치은 섬유모세포에 TNF- $\alpha$  자극시 PGE<sub>2</sub> 합성에 대한 triclosan의 억제효과를 관찰하였으며 COX-1, COX-2 gene expression을 RT-PCR을 통해 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 인간 치은 섬유모세포의 세포 독성은 triclosan의 농도 10  $\mu\text{g/ml}$ 에서는 24시간에 세포 활성이 유의하게 감소하였다 ( $p < 0.01$ ). Triclosan 농도 1.0  $\mu\text{g/ml}$  이상에서는 72시간에 세포활성이 유의하게 감소하였다 ( $p < 0.01$ ).
2. Triclosan 농도 0.01  $\mu\text{g/ml}$  이상에서 TNF- $\alpha$ 로만 자극을 준 것보다 PGE<sub>2</sub> 합성이 유의하게 농도 의존적으로 억제되었다 ( $p < 0.05$ ).
3. COX-1 유전자 발현은 triclosan 투여 유무에 관계없이 모든 군에서 일정하게 발현되었다. COX-2 유전자 발현은 TNF- $\alpha$ 만 투여한 군과 비교시 triclosan 투여군 (0.1  $\mu\text{g/ml}$ )에서 그 발현이 38% 감소를 보였으며 NS-398 투여군은 41%의 감소를 보였다.
4. Cycloheximide 전처리시 triclosan에 의한 COX-2 유전자 발현 억제가 관찰되지 않았다.

이상의 결과, triclosan의 PGE<sub>2</sub> 합성억제는 COX-2 gene expression의 억제에 의하며 세포내 단백질 합



성 (de novo protein synthesis)을 필요로 함을 알 수 있었다.

## VI. 참고문헌

1. Gillett R, Johnson NW: Bacterial invasion of the periodontium in a case of juvenile periodontitis. *J Clin Periodontol* 9:93-101, 1982
2. Saglie R, Newman MG, Carranza Jr. FA, Pattison GL: Bacterial invasion of advanced periodontitis in humans. *J Periodontol* 53: 217-222, 1982.
3. Richards D, Rutherford RB: The effect of interleukin-1 on collagenolytic activity and prostaglandin E secretion by human periodontal ligament and gingival fibroblast. *Archs Oral Biol* 33:237-243, 1988.
4. Masada MP, Kenney JS, Lee RC, Allison AC: The effects of interleukin -1 and 6 in gingival crevicular fluid implication for the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontal Res* 25:156-163, 1990.
5. Sismey-Durrant HJ, Hopps RM: Effect of lipopolysaccharide from *Porphyromonas gingivalis* on prostaglandin E2 and interleukin-1 $\beta$  release from rat periosteal and human gingival fibroblasts in vitro. *Oral Microbiol Immunol* 6: 378-380, 1991.
6. Takada H, Mihara I, Morisaki K, Hamada K: Induction of interleukin-1 $\gamma$  and -6 in human gingival fibroblast cultures stimulated by bacteroides lipopolysaccharides. *Infect Immun* 59:295-301, 1991.
7. Golden BD, Abramson SB: Selective cyclooxygenase-2 inhibitor. *Rheumatic Dis Clin North Ame* 25:359-378, 1999.
8. Waaler SM, Rollar G, Skjorland KK, Ogaard B: Effects of oral rinsing with triclosan and sodium lauryl sulfate on dental plaque formation: a pilot study. *Scand J Dent Res*, 101:192-195, 1993.
9. Kjarheim V, Skaare A, Barkvoll P, Rolla G: Antiplaque, antibacterial and anti-inflammatory properties of triclosan mouthrinses in combination with zinc citrate or polyvinylmethylether maleic acid (PMV-MA) copolymer. *Eur J Oral Sci* 104:529-534, 1996.
10. Gaffar A, Afflitto J, Nabi N, Kruger J, Olsen S: Recent advances in plaque, gingivitis, tartar and caries prevention technology. *Int Dent J* 44:63-70, 1994.
11. Black JG, Howe D, Rutherford T: Percutaneous absorption and metabolism of Irgasan DP 300. *Toxicology* 3:33-47, 1975.
12. Cox AR: Efficacy of the antimicrobial agent triclosan in topical deodorant products: recent development in vivo. *J Soc Cosmet Chem* 38:223-231, 1987.
13. Skaare AB, Kjarheim V, Barkvoll P, Rolla G: Does the nature of solvent affect the anti-inflammatory capacity of triclosan? An experimental study. *J Clin Periodontol* 24:124-128, 1997.
14. Regos J, Zak O, Solf R, Vischer WA, Weirich EG: Antimicrobial spectrum of triclosan, a broad spectrum antimicrobial agent for topical application II. Comparison with some other antimicrobial agents. *Dermatologica* 158:72-79, 1978.
15. Kjarheim V, Barkvoll P, Waaler SM, Rolla G: Triclosan inhibits histamin-induced inflammation in human skin. *J Clin Periodontol* 22:423-426, 1995.
16. Gaffar A, Scherl D, Afflitto J, Coleman EJ: The effect of triclosan on mediators of gingival inflammation. *J Clin Periodontol* 22:480-484, 1995.
17. Modeer T, Bengtsson A, Rolla G: Triclosan reduces prostaglandin biosynthesis in human gingival fibroblasts challenged with interleukin-1 in vitro. *J Clin Periodontol* 23:927-933, 1996.
18. Bevilacqua MP, Pober JS, Wheeler ME, Cotran

- RS, Gimbrone MA Jr: Interleukin-1 acts on cultured human vascular endothelium to increase the adhesion of polymorphonuclear leukocytes, monocytes and related leukocyte cell lines. *J Clin Invest* 76:2003-2011, 1985.
19. Bevilacqua MP, Pober JS, Mendrick DL, Cotran RS, Gimbrone MA: Identification of an inducible endothelial leukocyte adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 84:9238-9242, 1987.
  20. Birkedal-Hansen H: Role of cytokines and inflammatory mediators in tissue destruction. *J Periodont Res* 28:500-510, 1993.
  21. Offenbacher S, Williams RC, Jeffcoat MK, Howell TH, Odle BM, Smith MA, Hall CM, Johnson HG, Goldhaber P: Effects of NSAIDs on beagle crevicular cyclooxygenase metabolites and periodontal bone loss. *J Periodont Res* 27:207-213, 1992
  22. Offenbacher S, Heasman PA, Collins JG: Modulation of host PGE<sub>2</sub> secretion as a determinant of periodontal disease expression. *J Periodontol* 64:432-444, 1993.
  23. Ebersole JL, Singer RE, Steffensen B, Filloon T, Korman KS: Inflammatory mediators and immunoglobulins in GCF from healthy, gingivitis and periodontal sites. *J Periodont Res* 28:543-546, 1993.
  24. Vane JR, Bakhle YS, Botting RM: Cyclooxygenase 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 38:97-120, 1998.
  25. Kargman S, Charleson S, Cartwright M, Frank J, Reindeau D: Characterization of prostaglandin G/H synthase 1 and 2 in rat, dog, monkey and human gastrointestinal tracts. *Gastroenterol* 111:445-454, 1996.
  26. Kawaguchi H, Pilbeam C, Harrison J, Raisz L: The role of prostaglandins, in the regulation of bone metabolism. *Clin Orthop Relat Res.* 313:36-46, 1995.
  27. Bezerra M, Lima V, Alencar V, Vieira I, Brito G, Ribeiro R, Rocha A: Selective cyclooxygenase-2 inhibition prevents alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. *J Periodontol* 71:1009-1014, 2000.
  28. Wallace JL: Distribution and expression of cyclooxygenase (COX) isoenzymes, their physiological roles, and the categorization of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). *Am J Med* 107(6A):11S-17S, 1999.
  29. Harrison TR: In: *Harrison's principles of internal medicine* (Wilson JD, Braunwald E, Isselbacher KJ, Petersdorf RG, ed.). pp1543-. New York: McGraw Hill, 1994.
  30. Outlet M and Percival MD: Effect of inhibitor time-dependency on selectivity towards cyclooxygenase isoforms. *Biochem J* 306:247-251, 1995.
  31. Futaki N, Takahasi S, Yokoyama M, Yamakawa Y, Arai I, Higuchi S, Otomo S: NS-398, a new anti-inflammatory agent, selectively inhibits prostaglandin G/H synthase/cyclooxygenase (COX-2) activity in vitro. *Prostaglandins* 47:55-59, 1995.
  32. Zuckerbram HL, Babich H, May RJ, Sinensky MC: Triclosan; cytotoxicity, mode of action, and induction of apoptosis in human gingival cells in vitro. *Eur J Oral Sci* 106:628-636, 1998.
  33. Futaki N, Yoshikawa K, Hamasaka Y, Arai I, Higuchi S, Iizuka H, Otomo S: NS-398, a novel non-steroidal anti-inflammatory drug with potent analgesic and antipyretic effects, which causes minimal stomach lesion. *Gen Pharmacol* 24:105-110, 1993.
  34. Futaki N, Arai I, Hamasaka Y, Takahasi S, Higuchi S, Otomo S: Selective inhibition of NS-398 on prostanoid production in inflamed tissue in rat carrageenan-air-pouch inflammation. *J Pharm Pharmacol* 45:753-755, 1993.

35. Yucel-Lindberg T, Ahola H, Carlsstedt-Duke J, Modeer T: Involvement of tyrosin kinases on cyclooxygenase expression and prostaglandin E<sub>2</sub> production in human gingival fibroblasts stimulated with interleukin -1  $\beta$  and epidermal growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* 257:528-532, 1999.
36. Chen C, Sun Y, Chen J, Chang Y: TNF- $\alpha$  induced cyclooxygenase-2 expression via sequential activation of ceramide-dependent mitogen activated protein kinase, and I $\kappa$ B kinase 1/2 in human alveolar epithelial cells. *Mol Pharmacol* 59:493-500, 2001.

## Triclosan Inhibition of Prostaglandin E<sub>2</sub> Production in Human Gingival Fibroblast

Seong-Pyu Park, Hyun-Ju Chung, Young Joon Kim, Ok-Su Kim

Dept. of Periodontology, College of Dentistry and Dental Science Research Institute,  
Chonnam National University

The triclosan was shown to have anti-microbial and anti-inflammatory effect with inhibition of inflammatory mediators such as prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>). The purpose of this study was to elucidate whether and how PGE<sub>2</sub> could be inhibited by triclosan in human gingival fibroblast.

Human gingival fibroblast-1 cells (ATCC CRL2014) were pre-treated for 1 hour with triclosan (0.001  $\mu\text{g/ml}$  ~ 10  $\mu\text{g/ml}$ ) and then stimulated with TNF- $\alpha$  (1.0  $\text{ng/ml}$ ). PGE<sub>2</sub> synthesis was evaluated by ELISA and gene expression of COX-1 and COX-2 was evaluated by RT-PCR after TNF- $\alpha$ , triclosan, and NS-398 (COX-2 inhibitor, 5  $\mu\text{M}$ ) and/ or cycloheximide (protein synthesis inhibitor, 2  $\mu\text{g/ml}$ ).

Triclosan was cytotoxic to human gingival fibroblasts in the concentration higher than 1.0  $\mu\text{g/ml}$  for longer than 24 hours in tissue culture. The PGE<sub>2</sub> synthesis was inhibited by triclosan in dose-dependent manner. Greater COX-2 mRNA suppression was observed with triclosan (0.1  $\mu\text{g/ml}$ ) than with TNF- $\alpha$  alone, without change in COX-1 gene expression. Inhibitory effects of triclosan on PGE<sub>2</sub> synthesis disappeared in presence of cycloheximide.

This study suggests that triclosan inhibit prostaglandin E<sub>2</sub> at the level of COX-2 gene regulation and require *de novo* protein synthesis.