

Responsiveness to Lipopolysaccharide Changes According to the Aging of Periodontal Ligament Fibroblasts

Ji Hae Jun, Gwan-Shik Kim, Kyung Mi Woo, Byung-Moo Min¹, and Jeong-Hwa Baek*

Department of Pharmacology and Dental Therapeutics,

¹Department of Oral Biochemistry, College of Dentistry, Dental Research Institute, Seoul National University

(Received January 19, 2005 ; Accepted February 21, 2005)

The elderly suffer from an impaired immune function being obvious in a higher susceptibility to infections. Although the inflammatory cells are the major immunomodulatory cells, fibroblasts also secrete a variety of inflammatory cytokines and chemokines. Therefore periodontal tissue aging might play a role in development and progress of periodontitis. In this study, we investigated the effect of *in vitro* periodontal ligament cellular aging on the inflammatory cytokines, chemokines, and matrix metalloprotease(MMP)-2 expression induced by lipopolysaccharide(LPS) treatment. Three different cell populations were used; passages 4-5, 14-15, and 24-25 (at passage 27, more than 90% cells were replicative senescent). LPS increased the expression of interleukin(IL)-1 β , IL-6, and tumor necrosis factor- α , IL-8, RANTES, and MMP-2. However, the order of induction folds were passages 14-15 > 4-5 > 24-25. While the expression level of Toll-like receptor(TLR) 4 decreased according to the increase in passage number, the level of TLR2 was highest at passages 14-15 and then decreased at passages 24-25. While the spontaneous expression of IL-8 decreased according to the increase in passage number, that of RANTES and proMMP-2 increased according to the increase in passage number. These results suggest that the aging of periodontal ligament fibroblasts differentially affect the role as immunomodulatory cells in response to periodontopathic bacteria and therefore might be another risk factor of periodontitis progression.

Keywords: In vitro aging, Periodontal ligament fibroblasts, Lipopolysaccharide, Inflammatory cytokine, Chemokine, Matrix metalloprotease-2, Toll-like receptor

*Corresponding author: Jeong-Hwa Baek, Department of Pharmacology and Dental Therapeutics, College of Dentistry, Dental Research Institute, Seoul National University. Tel.: +82-2-740-8688, Fax.: +82-2-741-3193, E-mail: baekjh@snu.ac.kr

서 론

노인의 치아상실의 주요한 원인은 세균감염에 따른 치주염으로 인한 치조골 소실이다. 노화와 치주염간의 관계에 대해 몇몇 보고들은 연령이 증가할수록 치주조직의 파괴정도가 증가하며(Haffajee 등, 1991; Papapanou 등, 1991), 노화된 치주인대섬유모세포는 세포성장이 감소하고, type I collagen, osteocalcin 생성, 알칼리성인산분해 효소 활성 등이 감소된다고 하여(Goseki 등, 1996; Nishimura 등, 1997; Sawa 등, 2000), 치주조직의 노화가 노인에서 치주염 발생, 진행에 중요한 역할을 할 수 있음을 시사하였다.

치은연하 세균막에는 많은 세균이 존재하나 이 중 치주염 유발과 직접적으로 연관된 것으로 알려진 세균은 비교적 제한적이며 *Porphyromonas gingivalis*와 *Actinobacillus actinomycetemcomitans*와 같은 그램 음성 간균은 대표적인 치주염 관련 세균으로 알려져 있다(Socransky와 Haffajee, 1993). Lipopolysaccharide(LPS)는 그램 음성 세균의 대표적인 병독인자로 알려져 있으며 그 수용체인 Toll-like receptor(TLR)를 통하여 선천성 면역반응을 유도하고 염증반응을 유발하는 것으로 알려져 있다(Heumann과 Roger, 2002). 현재까지 알려진 TLR 중 TLR4가 대표적인 LPS의 수용체로 작용하며, TLR2는 대부분 그램 양성균의 peptidoglycan, lipoteichoic acid, lipoprotein의 인식과 더불어 *Porphyromonas gingivalis* 같은 일부 그램 음성세균의 LPS를 인식하는 수용체로 작용하는 것으로 보고되었다(Takeda 등, 2003).

치주염 관련 세균의 병독 기전을 설명하기 위해 치주염 관련 세균의 LPS가 염증 관련 세포 활성화에 미치는 영향에 대한 연구가 많이 시행되어 왔다. 특히 단핵구세포

식세포를 대상으로 한 연구 결과 LPS 처리 후 interleukin (IL)-1 β , IL-6, tumor necrosis factor- α (TNF- α) 같은 염증성 cytokine과 IL-8, monocyte chemoattractant protein-1과 같은 chemokine의 발현이 크게 증가함이 보고 되었다(Zhong 등, 1993; Agarwal 등, 1995; Jiang 등, 1996). 또한 치주염이 진행 중인 부위의 치은열구액과 치주조직에 이러한 염증성 cytokine, chemokine의 함량이 증가됨이 알려져 있다(Masada 등, 1990; Offenbacher 등, 1993; Gamonal 등, 2000). 이런 염증성 cytokine과 chemokine은 호중구, 단핵구, 림프구 등의 염증세포를 감염부위로 이끌어오고 활성화시키며 collagenase 같은 기질 분해 효소의 분비를 촉진하고 파골세포 생성을 촉진하는 등의 작용을 통해 치주염에서 치주조직 파괴에 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다(Grave, 1999).

비록 LPS 병독 기전의 연구에 염증세포를 이용한 연구가 많이 이루어졌으나 치주염의 경우 치주염 관련 세균과 세균산물들이 치은섬유모세포나 치주인대섬유모세포에 미치는 영향에 대한 연구도 수행되어 왔다. 이들 세포들은 치은과 치주인대의 주요한 구성세포로 치주염 진행 시 세균, 세균산물들과 직접 접촉되며 염증성 cytokine 등을 분비하여 치주조직에서 면역조절기능을 나타내는데 중요한 역할을 담당할 것으로 여겨져 왔다(McCulloch와 Bordin, 1991; Okada와 Murakami, 1998). 선행연구들은 치은섬유모세포나 치주인대섬유모세포에 치주염 관련 세균 LPS를 처리한 경우 IL-1 β , IL-6, IL-8의 발현을 증가시킴을 보고하였다(Tamura 등, 1992; Yamaji 등, 1995).

Hayflick 이론에 따르면 세포 복제노화에 도달하는데 걸리는 세포분열 횟수는 조직 공여자의 연령에 반비례하므로 시험관내 세포노화는 생체내 노화를 반영한다고 하였다(Hayflick, 1965). 따라서 본 연구에서는 치주조직이 건강한 환자에서 얻은 치주인대섬유모세포를 지속적인 계대배양을 통해 복제노화된 세포를 얻고, 노화의 진행에 따라 LPS에 의한 염증관련 cytokine과 chemokine의 발현, matrix metalloproteinase 2의 발현과 활성화 정도가 어떻게 변화하는지를 알아보고자 하였다.

실험재료 및 방법

실험재료

Dulbecco's modified essential medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), trypsin-EDTA, penicillin-streptomycin, SUPERSRIPT™ First-Strand Synthesis System, 10% gelatin zymogram gel 등은 Invitrogen life technologies (Carlsbed, CA, 미국)에서, easy-BLUE™

는 iNtRON (서울, 대한민국)에서 구입하였다. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)에 사용된 primer와 TaKaRa Taq™은 TaKaRa (Otsu, 일본)에서, *Escherichia coli* (*E. coli*) O26:B6 LPS는 Sigma (St. Louis, MO, 미국)에서 구입하였다.

치주인대섬유모세포의 배양

교정치료를 위해 서울대병원에 내원한 치주조직이 건강한 10대 후반 환자에서 발거된 제1소구치를 항생제가 함유된 DMEM에 3회 세척한 후, 치근의 중간 1/3 부위를 끊어 채취한 후 세포배양접시에 부착시켜 섬유모세포가 자라나오도록 20% FBS가 함유된 DMEM에서 배양하였다. 단일세포층이 형성된 후 세포를 분리하여 10% FBS가 함유된 DMEM으로 교체하여 배양을 시작하였으며 이를 P1으로 정하였다. 그 후 노화된 세포를 얻기 위해 매 6일마다 1:3의 비율로 계대배양을 시행하였고 P22부터는 매 12일 마다 계대배양을 시행하였다. Passage 별 세포 증식능을 파악하고자 24 well 조직배양접시에 well당 10,000개의 세포를 넣고 2, 4, 6일째에 trypsin-EDTA를 처리하여 세포를 분리한 후 세포수를 계수하였다. 또한 노화된 세포를 확인하기 위해 Dimri 등(1995)의 방법에 따라 senescence associated β -galactosidase(SA- β -gal) 염색을 시행하였으며, 80% 이상의 세포가 SA- β -gal 염색에 양성이고 세포 크기가 커진 상태를 노화된 세포군으로 결정하였다(Kim 등, 2002).

염증성 cytokine, chemokine, TLR 발현 분석

치주인대섬유모세포를 60 mm 세포배양접시에 5×10^5 개 씩 분주하고 24시간 배양하였다. 5 μ g/ml 농도로 LPS를 4시간 처리한 후 easy-BLUE™를 이용하여 total RNA를 분리하였다. SUPERSRIPT™ First-Strand Synthesis System을 이용하여 total RNA 1 μ g으로부터 complementary DNA를 합성하고 TaKaRa Taq™ polymerase를 이용하여 Table 1에 제시된 primer와 PCR 조건에서 TLR2, TLR4, IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-8, RANTES, β -actin에 대한 polymerase chain reaction(PCR)을 시행하였다. PCR 산물은 1.2% agarose gel에 전기영동하고 ethidium bromide로 염색하여 관찰하였다.

MMP-2 발현 및 활성화 분석

각 passage 별 세포에서 LPS 처리에 따른 MMP-2 발현과 활성화 변화를 확인하기 위해 치주인대섬유모세포를 24 well 조직배양접시에 well당 100,000개의 세포를 넣고 2일 후 serum이 없는 배지로 12시간 배양한 후 1% bovine serum albumin과 5 μ g/ml LPS가 함유된 배양액 0.5 ml로 교체하였다. 48시간 후 배양액을 수집하고, 세포의 수를 계수하였다. 배양액 10 μ l를 이용하여 gelatin

Table 1. Primer sequences and PCR condition

Gene (product size)	Primer sequence	PCR condition
TLR2 (347 bp)	5'-GCCAAAGTCTTGATTGATTGG-3' 5'-TTGAAGTCTCCAGCTCCTG-3'	95°C, 30" ; 50°C, 30" ; 72°C, 1' 40 cycles
TLR4 (495 bp)	5'-TCCCTCCAGGTTCTTGATTA-3' 5'-GTAGTGAAGGCAGAGCTGAAA-3'	95°C, 30" ; 50°C, 30" ; 72°C, 1' 43 cycles
IL-1 β (248 bp)	5'-GACACATGGGATAACGAGGC-3' 5'-ACGCAGGACAGGTACAGATT-3'	95°C, 30" ; 60°C, 30" ; 72°C, 1' 32 cycles
IL-6 (546 bp)	5'-ATGAACTCCTTCTCCACAAG-3' 5'-GTGCCTGCAGCTTCGTAGCA-3'	95°C, 30" ; 60°C, 30" ; 72°C, 1' 32 cycles
TNF- α (361 bp)	5'-TCAGATCATCTTCTCGAACC-3' 5'-CAGATAGATGGGCTCAIACC-3'	95°C, 30" ; 60°C, 30" ; 72°C, 1' 36 cycles
IL-8 (289 bp)	5'-ATGACTTCCAAGCTGGCCGTTGGCT-3' 5'-TCTCAGCCCTCTTCAAAAATTCTC-3'	95°C, 30" ; 50°C, 30" ; 72°C, 1' 29 cycles
RANTES (258 bp)	5'-GCTGTCATCCTCATTGCTAC-3' 5'-TCCATCCTAGTCTCATCTCCA-3'	95°C, 30" ; 55°C, 30" ; 72°C, 1' 38 cycles
β -actin (712 bp)	5'-CGGGAAATCGTGCCTGACAT-3' 5'-GAACTTTGGGGGATGCTCGC-3'	95°C, 30" ; 60°C, 30" ; 72°C, 1' 23 cycles

zymogram을 시행하였다. Gelatin zymogram은 Invitrogen사의 10% gelatin zymogram precast gel과 zymogram system을 이용하여 지시에 따라 시행하였다. Molecular size marker와 비교하여 볼 때 주요한 gelatinolytic band는 pro-MMP-2와 active form의 MMP-2에 해당하였다. 이 gelatinolytic band에 대한 densitometric analysis를 시행하고, 이를 각 well당 세포 수로 나눈 후 LPS를 처리하지 않은 passage 5 세포에 대한 비율을 계산하여 pro-MMP-2와 MMP-2의 양을 나타내었다.

실험결과

치주인대섬유모세포를 지속적으로 1:3의 비율로 계대배양하였을 때 계대배양 횟수가 증가할수록 세포성장 속도가 둔화되었으며, passage 26 이상으로 넘어가면서 세포들이 더 이상 confluent해지지 않았다. passage 4, 14, 24의 세포를 대상으로 세포증식 속도를 측정된 결과 passage 14의 세포도 증식능이 현격하게 감소됨이 확인되었다(Fig. 1A). Passage 27의 세포들에 SA- β -gal염색

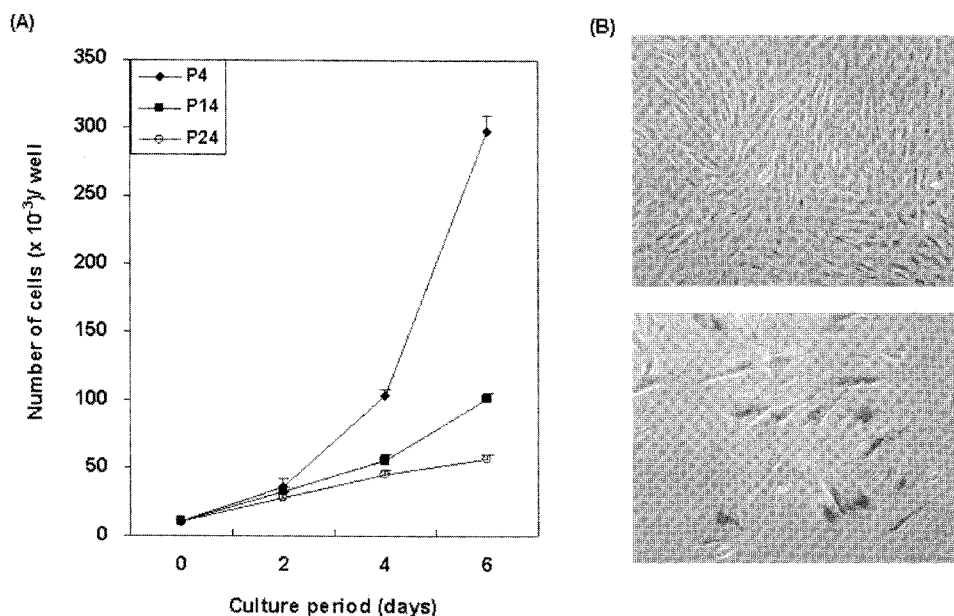


Fig. 1. Proliferation rate decreased according to the increase in passage number of periodontal ligament fibroblasts(A). The size of cells increased as the number of passages increased and at passage 27, more than 90% of cells were senescence-associated- β -galactosidase-positive(B). upper; passage 5, lower; passage 27 (X100).

을 시행한 결과 90% 이상의 세포들이 양성으로 염색되었으며, 세포크기도 커지는 노화된 세포의 특징적 양상을 보여주었다(Fig. 1B). 이러한 결과를 바탕으로 passage 5, 15, 25의 세포를 이용하여 다음 실험을 진행하였다.

치주인대섬유모세포의 노화가 LPS 처리에 의한 염증성 cytokine과 chemokine 발현에 미치는 영향을 관찰하기 위해 *E. coli* LPS를 각 passage의 세포에 처리하였다. 기존의 연구에서 치주인대섬유모세포에서 LPS 처리에 의한 cytokine과 chemokine 발현 유도 정도가 LPS처리 후 4시간째에 가장 뚜렷했기 때문에 4시간째에 그 반응을 관찰하였다(Park 등, 2004). 그 결과 IL-1 β , IL-6, TNF- α 의 발현이 LPS 처리에 의해 크게 증가되었다. 그러나 passage 15의 세포에서 발현증가 정도가 가장 컸으며, passage 25의 세포에서는 발현 증가폭이 오히려 passage 5보다도 줄어드는 양상을 보였다(Fig. 2). Passage 15에서는 LPS를 처리하지 않은 경우에도 IL-6 발현이 관찰되었다. Chemokine인 IL-8과 RANTES의 경우에도 LPS 처리에 의해 발현이 증가되는 양상을 보였다. 특이한 점은 IL-8의 경우 LPS를 처리하지 않은 경우에도 어느 정도 발현이 나타났으며, passage가 증가할수록 그 발현 정도는 감소되었다. 반면 RANTES의 경우에는 LPS를 처리하지 않은 경우에도 passage가 증가할수록 그 발현 정도가 증가되었다.

이러한 LPS의 효과가 TLR의 발현 정도와 관계있는지 알아보하고자 TLR의 발현 정도를 관찰하였다(Fig. 2). LPS의 주요한 수용체인 TLR4의 경우 세포의 passage number가 증가할수록 발현이 감소되었다. 또한 LPS 처리에 의해 대조군에 비해 TLR4 발현이 증가되었다. TLR2의 경우에도 LPS 처리에 의해 발현이 증가되었다. 그러나 TLR4

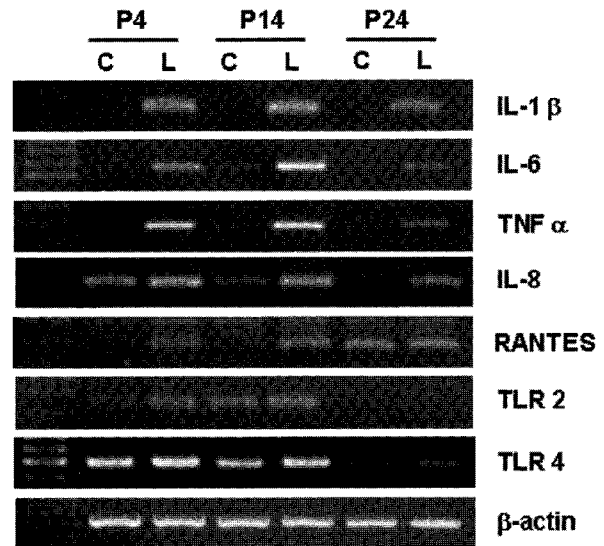


Fig. 2. Effect of LPS on the expression of inflammatory cytokines, chemokines, and Toll-like receptor (TLR) in periodontal ligament fibroblasts of different passages. Cells were treated with LPSs from *E. coli* (5 μ g/ml) for 4 hours and RT-PCRs were performed as described in Materials and Methods. C; control, L; LPS treatment.

와는 달리 passage 15의 세포에서는 passage 5 세포보다 TLR2의 기본적 발현수준이 높았으며, passage 25에서는 다시 발현이 크게 감소하였다.

치주조직의 파괴에 관여하는 효소 중 하나인 MMP-2 분비와 활성화에 미치는 영향을 관찰하고자 gelatin zymography를 시행하였다. 이에서 관찰된 치주인대섬유모세포에서 분비된 주요한 MMP는 그 크기로 보아 72 kDa proMMP-2에 해당하였으며, 소량의 활성화된 MMP-2(62 kDa)가 관찰되었다(Fig. 3). LPS가 없이도 치주인

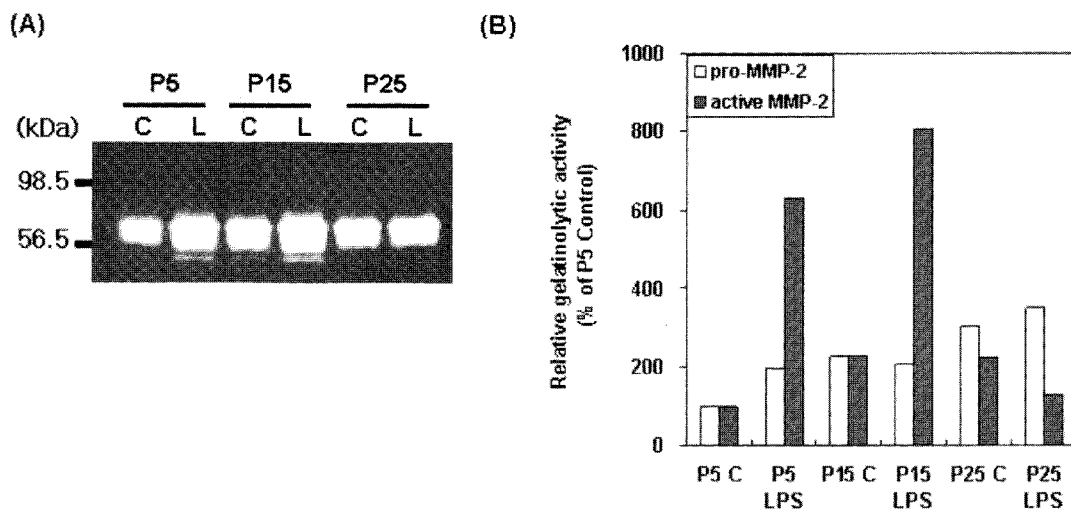


Fig. 3. Effect of LPS on the secretion and activation of pro-MMP-2 in expression of chemokines in periodontal ligament fibroblasts of different passages. (A) Cells were serum starved overnight, treated with LPS for 48 hours and gelatin zymography was performed using 10 μ l of conditioned medium. Major gelatinolytic band represents pro-MMP-2 and smaller band active MMP-2. C; control, L; LPS treatment. (B) The relative gelatinolytic activity was presented as the relative ratio to P5 control. The densitometric analysis of bands was performed and each value was divided by the number of cells per well. Then the values were converted to the percentage of P5 control.

대섬유모세포에서 proMMP-2가 분비되며, 소량의 활성화된 MMP-2도 존재함이 확인되었다. 그러나 passage number가 증가할수록 분비되는 MMP-2의 양은 점차 증가되는 양상을 보였다. LPS를 처리해준 경우 passage 5와 15 세포에서는 active MMP-2가 크게 증가되었다. 그러나 passage 25에서는 LPS처리에 의한 active MMP-2 증가가 나타나지 않았다.

고 찰

노화가 진행되면서 면역기능이 저하되어 노인에서는 다양한 감염발생이 증가하는 것으로 알려져 있다(Miller, 1996). 특히 T 림프구의 수, 기능 저하가 대표적이며, 대식세포, 호중구 등의 세포들도 그 기능이 감소되는 것으로 보고되었다(Miller, 1996; Doria와 Frasca, 1997; Hsu 등, 2001; Butcher 등, 2001). 노화에 따른 면역기능 저하의 기전이 아직 뚜렷이 밝혀지지는 않았지만, 면역세포의 증식, 활성화 등을 조절하는데 관여하는 여러 cytokines, chemokines의 발현이 노화에 따라 달라진다는 보고들이 있어왔다(Gabriel 등, 2002; Mariani 등, 2002; Saito 등, 2003). 치주염의 진행시 치주인대섬유모세포도 세균, 세균산물들과 직접 접촉되며 염증성 cytokine 등을 분비하여 치주조직에서 면역조절기능을 나타내는데 중요한 역할을 담당할 것으로 여겨지므로 이들 세포의 노화도 치주염 발생, 진행에 영향을 미칠 것으로 생각된다. 또한 건강한 치은을 가진 20대 청년과 65세 이상 노인을 대상으로 실험적으로 치은염을 유도했을 때 노인 그룹에서 호중구의 분포가 적고 B 림프구가 많았다는 Fransson 등(1999)의 보고는, 이러한 차이가 치은 국소조직의 노화의 영향인지 염증세포의 노화의 결과인지 분명하지는 않지만, 노화가 치주조직 염증의 진행에도 영향을 미치는 요인으로 작용할 수 있음을 시사하고 있다. 따라서 본 연구에서는 치주인대섬유모세포를 이용하여 세포노화에 따른 LPS에 대한 반응의 차이를 살펴보고자 하였다.

시험관내에서 계속적 계대배양을 통해 복제노화에 도달한 세포와 생체 내 노화된 세포를 완전히 동일하게 볼 수는 없지만, 시험관내 복제노화된 치은섬유모세포와 노화된 환쥐에서 얻어진 치은섬유모세포를 비교해보았을 때 비슷한 반응을 보인다는 보고로 미루어보아(Takiguchi 등, 1997; Okamura 등, 1999; Mochizuki 등, 1999), 본 연구에서 이용된 치주인대섬유모세포도 어느 정도 생체 내 노화의 결과를 반영해줄 수 있을 것으로 생각된다. 치주인대섬유모세포의 계대배양 횟수가 증가할수록 세포크기가 점차 증가하며 증식능이 감소됨이 뚜렷하였다. 이러한 세포증식능 감소는 세포분열주기로 들어가는 세포의 비율이 점차 감소됨에 의한 것으로 알려지고 있으며(Nishimura 등, 1997), 본 연구에서는 passage 수가 증

가할수록 노화된 세포가 점차 축적된 결과로 나타난 현상으로 보인다.

IL-1 β , IL-6, TNF- α 는 주요한 염증성 cytokine으로 실험적으로 유도된 치주염에서 이들의 작용을 차단하면 염증세포 침윤과 치조골 흡수가 억제되고, 치주염이 진행 중인 치주조직 및 치은열구액에서 IL-1, TNF- α , IL-6 등 염증성 cytokine의 함량이 높다고 하여(Assuma 등, 1998; Graves, 1999; Wang 등, 2003), LPS가 이들의 발현에 미치는 영향을 관찰하였다. 선행보고에서와 같이(Park 등, 2004), LPS를 처리해준 경우 이들 3가지 cytokine의 발현이 크게 증가되었다. 특히 passage 15 세포에서 그 발현 증가정도가 가장 높았다. 이러한 결과는 복제노화에 도달하는 population doubling(PD)이 30 정도인 사람치은섬유모세포에서 PD5-6 세포와 PD17-18인 세포를 비교했을 때 LPS 처리 후 IL-1 β , prostaglandinE2, IL-6, plasminogen activator의 분비가 노화된 세포에서 더 크게 증가되었다는 보고와 유사하였다(Ogura 등, 1996; Takiguchi 등, 1997; Okamura 등, 1999; Mochizuki 등, 1999). 또한 IL-6의 경우 passage 15의 세포에서는 LPS를 처리하지 않아도 발현이 증가되었는데 이 역시 Ogura 등(1996)의 보고와 유사하였다. 노화된 세포에서 LPS에 대한 반응성의 증가는 섬유모세포 뿐 아니라 혈액세포에서도 비슷하게 관찰되었다(Gabriel 등, 2002; Saito 등, 2003). 이러한 LPS에 대한 반응성의 차이가 TLR의 발현수준과 관계있는지 살펴보고자 TLR4와 TLR2의 발현을 관찰하였다. TLR2의 경우에는 passage 15에서 발현이 더 증가하였다가 passage 25에서 크게 감소됨을 보인 반면, E. coli LPS의 주요한 수용체로 알려진 TLR4의 경우에는 passage가 증가함에 따라 점차 발현수준이 감소함을 보여주었다. 세포노화에 따른 TLR의 발현 변화에 대한 보고는, 2-3개월과 18-24개월된 C57BL/6 생쥐에서 대식세포를 가지고 실험한 결과 노화된 생쥐 대식세포에서는 TLR2와 TLR4의 발현이 모두 감소되었고 LPS나 *S. aureus*에 의한 IL-6, TNF- α 분비가 모두 감소했다는 보고(Renshaw 등, 2002)만 찾을 수 있었다. 24개월령 생쥐의 대식세포 노화정도가 본 연구에서 passage 25 세포와 비슷한 정도인지 명확하지는 않지만, 세포노화가 많이 진행되면 선천면역의 중요한 매개수용체인 TLR이 감소하여 노인의 면역력 감소를 야기할 수 있음을 시사하는 결과로 생각된다. 본 연구에서 LPS 처리에 따른 cytokine, chemokine, MMP-2의 반응크기가 TLR4의 발현 양상과 일치하는 대신 TLR2의 발현양상과 더 유사한 이유는 분명하지 않다. 한가지 가능성은 구입하여 사용한 E. coli LPS에 TLR2 수용체에 결합할 수 있는 세포벽 성분이 소량 섞여있음으로 나타났을 수 있다고 생각되며, 다른 가능성은 mRNA 변화와는 달리, 세포막에 존재하는 TLR4 단백질의 양이 passage 15에서는 아직 높게 존재할 수 있는 것이다. TLR2와 TLR4 단백질 발

현을 확인하고자 항체로 염색하여 유세포분석기로 분석하였으나 염색도가 너무 낮아 확인이 되지 않았다(결과 보이지 않음).

Chemokine은 염증성 cytokine의 일종으로 특히 염증이 진행 중인 부위로 특정 백혈구 그룹을 이동시키며 활성화시키는데 관여하는 인자들로 4개 cysteine 잔기를 함유한 구조를 공통적으로 가진다(Graves, 1999; D'Ambrosio 등, 2003). 처음 2개 cysteine 잔기의 구성에 따라 크게 4그룹으로 나뉘어 지나 특히 CXC와 CC chemokine이 잘 알려져 있다. CC chemokine에는 macrophage inflammatory protein-1 α , -1 β , RANTES 등이 포함되며 CXC chemokine에는 IL-8, IP-10 등이 포함된다. Chemokine의 작용에 redundancy가 있기도 하지만 chemokine에 따라 어느 정도 특이성을 가지므로 국소부위에서 발현되는 chemokine의 양상에 따라 염증반응의 진행 및 조절이 영향을 받을 것으로 여겨진다. 치주염 부위에 호중구, 단핵구, 림프구 등이 많이 침윤되어 있으며 건강한 치주조직에 비해 많은 양의 IL-8, RANTES가 생산됨이 알려져 있으므로(Graves 1999; Gamonal 등, 2000, 2001; Kabashima 등, 2002), 본 연구에서 이들 chemokine의 발현을 관찰하였다. IL-8과 RANTES 모두 LPS 처리에 의해 발현이 증가되는 양상을 보여 다른 cytokine과 비슷한 반응을 보였다. 그러나 특이하게도 IL-8은 passage가 증가할수록 basal expression이 현저히 감소해가지만 반대로 RANTES의 경우에는 passage가 증가할수록 basal level이 오히려 증가되는 양상을 보였다. IL-8은 호중구의 화학주성에 중요한 역할을 하며, 호중구는 치주염 진행부위에 초기에 많이 침윤되어 세균에 대한 방어에 중요한 역할을 하므로, 국소조직세포인 치은섬유모세포나 치주인대세포에서 IL-8의 발현 증가는 치주염 유발세균에 대한 초기 방어에 중요한 역할을 담당할 것으로 생각된다. 이러한 IL-8의 발현 감소는 치은섬유모세포에서도 공통적으로 관찰되었으며(결과 보이지 않음), 이는 실험적 치은염 유발실험에서 노인에서는 청년에 비해 호중구 수가 적었다는 보고(Fransson 등, 1999)와 관련될 수 있을 것으로 생각되었다. 그러나 백혈구에서는 노화가 진행됨에 따라 IL-8 분비가 증가하는 것으로 보고된 바 있어(Mariani 등, 2001; Gabriel 등, 2002), 치주인대섬유모세포와 치은섬유모세포의 노화에 따른 IL-8 발현 감소가 섬유모세포 특이적인지 또는 시험관내 복제노화의 결과인지 분명하지는 않았다. 또다른 CXC chemokine인 IP-10의 경우에는 다른 cytokine의 반응과 유사한 양상을 나타내어(결과 보이지 않음), 이러한 노화에 따른 변화가 CXC chemokine에 일반적인 현상은 아님을 시사하였다. RANTES는 단핵구, T림프구, 신경세포, mesangial cell 등에서도 노화에 따라 basal expression이 증가하는 것으로 보고되어(Mariani 등, 2002; Sandhir 등, 2004; Zheng 등, 2004) 치주인대섬유모세포를 포함한 다양한 세포의

노화과정에서 발현이 증가하는 것으로 여겨진다.

LPS에 의한 proMMP-2의 분비와 활성화 증가도 cytokine의 양상과 유사하였다. 다만, 치주인대섬유모세포의 passage가 증가할수록 자연적으로 분비되는 MMP-2의 양이 증가되는 것으로 관찰되었다. 섬유모세포의 노화에 따른 MMP-2 분비에 대한 보고는 없었지만, 노화된 치주인대 섬유모세포에서 cathepsin L, cathepsin B의 분비가 증가한다는 Goseki 등(1996)의 보고와 같이 고려해 볼 때 치주인대조직의 노화가 진행되면 이러한 세포외기질 분해효소의 분비가 증가하여 치주인대조직의 파괴 증가에 기여할 것으로 생각되었다.

이상의 결과를 종합하면 치주인대섬유모세포의 노화가 진행됨에 따라 LPS에 대한 반응성이 변화되며 그에 따라 IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-8, RANTES, MMP-2 발현 정도에 영향을 미쳐, 세포의 노화는 치주염 진행과정을 조절하는 요소 중 하나로 역할을 할 것으로 생각되었다. 이러한 LPS의 반응성에 대한 변화는 TLR의 발현 수준의 변화와 관계가 있었다. 말초혈액 단핵세포에서 LPS에 의한 chemokine 발현 반응이 86-95세 노인에서는 크게 증가하지만 95세 이상의 노인에서는 오히려 증가폭이 감소한다는 보고(Pulsatelli 등, 2000)로 미루어 보아 세포 노화 진행정도에 따라 LPS에 대한 반응성이 달라지는 본 연구의 결과가 실제 생체 내에서도 일어날 가능성이 있음을 시사하였다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 보건과학기술진흥사업의 지원에 의하여 이루어진 것임(01-PJ5-PG1-01CH12-0002).

Reference

- Agarwal, S., Piesco, N.P., Johns, L.P. and Riccelli, A.E.: Differential expression of IL-1 beta, TNF-alpha, IL-6, and IL-8 in human monocytes in response to lipopolysaccharides from different microbes. *J. Dent. Res.* **74**:1057-1065, 1995.
- Assuma, R., Oates, T., Cochran, D., Amar, S. and Graves, D.T.: IL-1 and TNF antagonists inhibit the inflammatory response and bone loss in experimental periodontitis. *J. Immunol.* **160**:403-409, 1998.
- Butcher, S.K., Chahal, H., Nayak, L., Sinclair, A., Henriquez, N.V., Sapey, E., O'Mahony, D. and Lord, J.M.: Senescence in innate immune responses: reduced neutrophil phagocytic capacity and CD16 expression in elderly humans. *J. Leukoc. Biol.* **70**:881-886, 2001.
- D'Ambrosio, D., Panina-Bordignon, P. and Sinigaglia, F.: Chemokine receptors in inflammation: an overview. *J. Immunol. Methods* **273**:3-13, 2003.
- Dimri, G.P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G.,

- Roskelley, C., Medrano, E.E., Linskens, M., Rubelj, I. and Pereira-Smith, O. *et al.*: A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**:9363-9367, 1995.
- Doria, G. and Frasca, D.: Genes, immunity, and senescence: looking for a link. *Immunol. Rev.* **160**:159-170, 1997.
- Fransson, C., Mooney, J., Kinane, D.F. and Berglundh, T.: Differences in the inflammatory response in young and old human subjects during the course of experimental gingivitis. *J. Clin. Periodontol.* **26**:453-460, 1999.
- Gabriel, P., Cakman, I. and Rink, L.: Overproduction of monokines by leukocytes after stimulation with lipopolysaccharide in the elderly. *Exp. Gerontol.* **37**:235-247, 2002.
- Gamonal, J., Acevedo, A., Bascones, A., Jorge, O. and Silva, A.: Levels of interleukin-1 beta, -8, and -10 and RANTES in gingival crevicular fluid and cell populations in adult periodontitis patients and the effect of periodontal treatment. *J. Periodontol.* **71**:1535-1545, 2000.
- Gamonal, J., Acevedo, A., Bascones, A., Jorge, O. and Silva, A.: Characterization of cellular infiltrate, detection of chemokine receptor CCR5 and interleukin-8 and RANTES chemokines in adult periodontitis. *J. Periodontol. Res.* **36**:194-203, 2001.
- Goseki, T., Shimizu, N., Iwasawa, T., Takiguchi, H. and Abiko, Y.: Effects of *in vitro* cellular aging on alkaline phosphatase, cathepsin activities and collagen secretion of human periodontal ligament derived cells. *Mech. Ageing Dev.* **91**:171-183, 1996.
- Graves, D.T.: The potential role of chemokines and inflammatory cytokines in periodontal disease progression. *Clin. Infect. Dis.* **28**:482-490, 1999.
- Haffajee, A.D., Socransky, S.S., Lindhe, J., Kent, R.L., Okamoto, H. and Yoneyama, T.: Clinical risk indicators for periodontal attachment loss. *J. Clin. Periodontol.* **18**:117-125, 1991.
- Hayflick, L.: The limited *in vitro* lifetime of human diploid cell strains. *Exp. Cell. Res.* **37**:614-636, 1965.
- Heumann, D. and Roger, T.: Initial responses to endotoxins and Gram-negative bacteria. *Clin. Chim. Acta.* **323**:59-72, 2002.
- Hsu, H.C., Shi, J., Yang, P., Xu, X., Dodd, C., Matsuki, Y., Zhang, H.G. and Mountz, J.D.: Activated CD8(+) T cells from aged mice exhibit decreased activation-induced cell death. *Mech. Ageing Dev.* **122**:1663-1684, 2001.
- Jiang, Y., Russell, T.R., Graves, D.T., Cheng, H., Nong, S.H. and Levitz, S.M.: Monocyte chemoattractant protein 1 and interleukin-8 production in mononuclear cells stimulated by oral microorganisms. *Infect. Immun.* **64**:4450-4455, 1996.
- Kabashima, H., Yoneda, M., Nagata, K., Hirofuji, T. and Maeda, K.: The presence of chemokine (MCP-1, MIP-1alpha, MIP-1beta, IP-10, RANTES)-positive cells and chemokine receptor (CCR5, CXCR3)-positive cells in inflamed human gingival tissues. *Cytokine* **20**:70-77, 2002.
- Kim, H., You, S., Farris, J., Kong, B.W., Christman, S.A., Foster, L.K. and Foster, D.N.: Expression profiles of p53-, p16(INK4a)-, and telomere- regulating genes in replicative senescent primary human, mouse, and chicken fibroblast cells. *Exp. Cell. Res.* **272**:199-208, 2002.
- Mariani, E., Pulsatelli, L., Meneghetti, A., Dolzani, P., Mazzetti, I., Neri, S., Ravaglia, G., Forti, P. and Facchini, A.: Different IL-8 production by T and NK lymphocytes in elderly subjects. *Mech. Ageing Dev.* **122**:1383-1395, 2001.
- Mariani, E., Pulsatelli, L., Neri, S., Dolzani, P., Meneghetti, A., Silvestri, T., Ravaglia, G., Forti, P., Cattini, L. and Facchini, A.: RANTES and MIP-1alpha production by T lymphocytes, monocytes and NK cells from nonagenarian subjects. *Exp. Gerontol.* **37**:219-226, 2002.
- Masada, M.P., Persson, R., Kenney, J.S., Lee, S.W., Page, R.C. and Allison, A.C.: Measurement of interleukin-1 alpha and -1 beta in gingival crevicular fluid: implications for the pathogenesis of periodontal disease. *J. Periodontol. Res.* **25**:156-163, 1990.
- McCulloch, C.A. and Bordin, S.: Role of fibroblast subpopulations in periodontal physiology and pathology. *J. Periodontol. Res.* **26**:144-154, 1991.
- Miller, R.A.: The aging immune system: primer and prospectus. *Science* **73**:70-74, 1996.
- Mochizuki, K., Yamaguchi, M. and Abiko, Y.: Enhancement of LPS-stimulated plasminogen activator production in aged gingival fibroblasts. *J. Periodontol. Res.* **34**:251-260, 1999.
- Nishimura, F., Terranova, V.P., Braithwaite, M., Orman, R., Ohyama, H., Mineshiba, J., Chou, H.H., Takashiba, S. and Murayama, Y.: Comparison of *in vitro* proliferative capacity of human periodontal ligament cells in juvenile and aged donors. *Oral Dis.* **3**:162-166, 1997.
- Offenbacher, S., Collins, J.G. and Heasman, P.A.: Diagnostic potential of host response mediators. *Adv. Dent. Res.* **7**:175-181, 1993.
- Ogura, N., Matsuda, U., Tanaka, F., Shibata, Y., Takiguchi, H. and Abiko, Y.: *In vitro* senescence enhances IL-6 production in human gingival fibroblasts induced by lipopolysaccharide from *Campylobacter rectus*. *Mech. Ageing Dev.* **87**:47-59, 1996.
- Okada, H. and Murakami, S.: Cytokine expression in periodontal health and disease. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* **9**:248-266, 1998.
- Okamura, H., Yamaguchi, M. and Abiko, Y.: Enhancement of lipopolysaccharide -stimulated PGE2 and IL-1beta production in gingival fibroblast cells from old rats. *Exp. Gerontol.* **34**:379-392, 1999.
- Papapanou, P.N., Lindhe, J., Sterrett, J.D. and Eneroth, L.: Considerations on the contribution of ageing to loss of periodontal tissue support. *J. Clin. Periodontol.* **18**:611-615, 1991.
- Park, S.Y., Kim, Y.H., Jun, J.H., Kim, G.S., Min, B.M. and Baek, J.H.: *P. gingivalis* and *A. actinomycetemcomitans* LPS differentially regulate the expression of inflammatory cytokines and chemokines in gingival fibroblast and periodontal ligament fibroblast. *Int. J. Oral. Biol.* **29**:27-36, 2004.
- Pulsatelli, L., Meliconi, R., Mazzetti, I., Dolzani, P., Meneghetti, A., Neri, S., Silvestri, T., Ravaglia, G., Forti, P., Facchini, A. and Mariani, E.: Chemokine production by peripheral blood mononuclear cells in elderly subjects. *Mech. Ageing Dev.* **121**:89-100, 2000.
- Renshaw, M., Rockwell, J., Engleman, C., Gewirtz, A., Katz,

- J. and Sambhara, S.: Cutting edge: impaired Toll-like receptor expression and function in aging. *J. Immunol.* **169**:4697-4701, 2002.
- Saito, H., Sherwood, E.R., Varma, T.K. and Evers, B.M.: Effects of aging on mortality, hypothermia, and cytokine induction in mice with endotoxemia or sepsis. *Mech. Ageing Dev.* **124**:1047-1058, 2003.
- Sandhir, R., Puri, V., Klein, R.M. and Berman, N.E.: Differential expression of cytokines and chemokines during secondary neuron death following brain injury in old and young mice. *Neurosci. Lett.* **369**(1):28-32, 2004.
- Sawa, Y., Phillips, A., Hollard, J., Yoshida, S. and Braithwaite, M.W.: Impairment of osteocalcin production in senescent periodontal ligament fibroblasts. *Tissue Cell* **32**:198-204, 2000.
- Socransky, S.S. and Haffajee, A.D.: Effect of therapy on periodontal infections. *J. Periodontol.* **64**:754-759, 1993.
- Takeda, K., Kaisho, T. and Akira, S.: Toll-like receptors. *Ann. Rev. Immunol.* **21**:335-376, 2003.
- Takiguchi, H., Yamaguchi, M., Okamura, H. and Abiko, Y.: Contribution of IL-1 beta to the enhancement of *Campylobacter rectus* lipopolysaccharide -stimulated PGE2 production in old gingival fibroblasts in vitro. *Mech. Ageing Dev.* **98**:75-90, 1997.
- Tamura, M., Tokuda, M., Nagaoka, S. and Takada, H.: Lipopolysaccharides of *Bacteroides intermedius* (*Prevotella intermedia*) and *Bacteroides (Porphyromonas) gingivalis* induce interleukin-8 gene expression in human gingival fibroblast cultures. *Infect. Immun.* **60**:4932-4937, 1992.
- Wang, P.L., Ohura, K., Fujii, T., Oido-Mori, M., Kowashi, Y., Kikuchi, M., Svetsugu, Y. and Tanaka, J.: DNA microarray analysis of human gingival fibroblasts from healthy and inflammatory gingival tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **305**:970-973, 2003.
- Yamaji, Y., Kubota, T., Sasaguri, K., Sato, S., Suzuki, Y., Kumada, H. and Umemoto, T.: Inflammatory cytokine gene expression in human periodontal ligament fibroblasts stimulated with bacterial lipopolysaccharides. *Infect. Immun.* **63**:3576-3581, 1995.
- Zheng, F., Cheng, Q.L., Plati, A.R., Ye, S.Q., Berho, M., Banerjee, A., Potier, M., Jaimes, E.A., Yu, H., Guan, Y.F., Hao, C.M., Striker, L.J. and Striker, G.E.: The glomerulosclerosis of aging in females: contribution of the proinflammatory mesangial cell phenotype to macrophage infiltration. *Am. J. Pathol.* **165**:1789-1798, 2004.
- Zhong, W.W., Burke, P.A., Hand, A.T., Walsh, M.J., Hughes, L.A. and Forse, R.A.: Regulation of cytokine mRNA expression in lipopolysaccharide- stimulated human macrophages. *Arch. Surg.* **128**:158-163, 1993.