

치수세포에서 PPAR $\gamma$ 의 항 염증작용에 관한 연구

김정희\*

전북대학교 치과대학 보존학교실

## ABSTRACT

ANTI-INFLAMMATORY EFFECTS OF PPAR $\gamma$  ON HUMAN DENTAL PULP CELLS

Jeong-Hee Kim\*

*Department of Conservative Dentistry, College of Dentistry, Chonbuk National University*

Dental pulp is a loose, mesenchymal tissue almost entirely enclosed in the dentin. It consists of cells, ground substance, and neural and vascular supplies. Damage to the dental pulp by mechanical, chemical, thermal, and microbial irritants can provoke various types of inflammatory response. Pulpal inflammation leads to the tissue degradation, which is mediated in part by Matrix metalloproteinase leads to accelerate extracellular matrix degradation with pathological pathway. We have now investigated the induction of MMPs and inflammatory cytokines by Lipopolysaccharide (LPS) control of inflammatory mediators by peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs).

Human dental pulp cells exposed to various concentrations of LPS (1-10  $\mu\text{g/ml}$ ) revealed elevated levels of MMP-2 and MMP-9 at 24 hrs of culture. LPS also stimulated the production of ICAM-1, VCAM-1, IL-1 $\beta$ , and TNF- $\alpha$ . Adenovirus PPAR $\gamma$  (Ad/PPAR $\gamma$ ) and PPAR $\gamma$  agonist rosiglitazone reduced the synthesis of MMPs, adhesion molecules and pro-inflammatory cytokines. The inhibitory effect of Ad/PPAR $\gamma$  was higher than that of PPAR $\gamma$  agonist.

These result offer new insights in regard to the anti-inflammatory potential of PPAR $\gamma$  in human dental pulp cell. [J Kor Acad Cons Dent 31(3):203 -214, 2006]

**Key words:** Inflammation, MMPs, Adhesion molecules, PPAR, Pulp cell

- Received 2006.1.21., revised 2006.3.3., accepted 2006.5.8. -

## I. 서 론

치수는 세균이 직접 치수에 도달하지 않더라도 세균의 각종 산물이 치수와 근접하게 되면 염증이 유발되고 시간이

지날수록 비가역적인 손상을 입게 된다. 치수염과 관련되어 그람-음성 세균의 lipopolysaccharide (LPS)는 숙주세포를 파괴하는 생물학적 효과를 가지는 것으로 보고되었고 박테리아 산물이 가지는 생물학적 특징의 대부분이 LPS와 관련이 있는 것으로 알려져 있다<sup>1)</sup>.

치수가 염증반응을 일으키면 조직 분해가 진행되며, 이 때 조직분해를 일으키는 활성 경로에는 plasminogen-dependent pathway, phagocytic pathway, matrix metalloproteinase (MMP)-dependent pathway, PMN-serine proteinase pathway, osteoclastic bone resorption 등이 있으며, 이밖에 세균의 단백질분해효소에 의한 직접적인 세

\* Corresponding Author: Jeong-Hee Kim

Dept. of Conservative Dentistry, College of Dentistry,  
Chonbuk National University  
Geumam-Dong, Deokjin-Gu, Jeonju, Jeonbuk, 561-712, Korea  
Tel: 82-63-250-2119 Fax: 82-63-250-2049  
E-mail: endo95@naver.com

포의 기질의 분해경로가 존재한다<sup>2,3</sup>). MMPs는 세포 외 기질의 분해에 작용하는 zinc-dependent endopeptidase이며, 정상적인 상태에서의 MMPs는 창상 치유, 조직의 회복, 혈관 재형성화, 조직의 형태학적 발달단계에 중요한 역할을 한다<sup>4</sup>). 일반적으로 MMPs는 염증이나 창상, 다른 병적인 과정에 작용하지 않는 낮은 정도로만 존재하지만, 질환이 유도되는 과정에서 분비가 촉진된다<sup>5</sup>). 이러한 MMPs는 기질을 분해시키는 기능에 따라 collagenase (MMP-1, MMP-8), gelatinase (MMP-2, MMP-9), stromelysin, membrane-type metalloproteinase로 구분된다. MMP-2와 MMP-9은 type-IV collagenase 또는 gelatinase로 불리며 주로 gingival fibroblast와 pulp cell에 의해 합성되어 치수염이나 치주염의 병인에 깊은 관련성이 언급되고 있다<sup>6</sup>).

LPS는 치수 또는 치근단 세포를 자극시켜 MMPs의 분비를 비롯하여 염증성 사이토카인 interleukin-1과 tumor necrosis factor를 분비시킨다<sup>7</sup>). IL-1과 TNF는 단핵 혹은 대식세포 등으로부터 분비되어 면역 반응을 매개하게 되며, 치수세포의 염증반응에서도 이들 염증성 사이토카인은 다양한 면역세포의 반응으로부터 유리될 것이다. 이들 사이토카인의 분비를 자극시키는 경로의 하나로 단핵세포와 표면항원표시세포의 결합이 존재하며, 결합에 관여하는 cell adhesion molecules (CAM)인 ICAM-1과 VCAM-1은 내피세포를 비롯하여 혈구세포, 피부 섬유모세포 등에서 분비된다<sup>8</sup>). 치수세포로부터의 ICAM-1과 VCAM-1 등의 세포접착인자의 발현은 보고된 바 있지만<sup>9</sup>, 그 관련 기전 및 작용에 관해서는 거의 알려져 있지 않으며, 다만 치수세포가 염증반응에 대하여 여러 면역세포와의 작용이 예측된다.

Peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR)은 핵 내에 존재하는 호르몬 수용체에 속한다. PPAR에는 PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta/\delta$ , PPAR $\gamma$ 의 3개의 이성체가 밝혀져 있으며, 이들은 서로 다른 유전자를 발현시키지만 아미노산의 구성, 라이간드와 결합형태 및 DNA 결합영역은 서로 비슷하다<sup>10</sup>). 지방세포에서 특이적으로 많은 발현을 보이는 PPAR $\gamma$ 의 주요 기능은 지방대사, 당대사, 지방세포의 분화를 조절하며, 그밖에 2형 당뇨병을 비롯하여 염증성 질환에 관련이 있다. PPAR $\gamma$ 의 항 염증성 반응작용으로 세균 LPS에 의해 자극된 대식세포에서 IL-6와 TNF- $\alpha$ 의 분비를 억제시키는 것으로 알려져 있다<sup>11</sup>). 이러한 다양한 체내 반응에 관여 할 것으로 예측되는 PPAR $\gamma$ 는 새로운 분자치료에 표적이 되고 있으며, 그 예로 PPAR $\gamma$  ligand인 rosiglitazone, pioglitazone, LY171.833 등이 2형 당뇨병의 치료에 적용되고 있다<sup>12,13</sup>).

치수염과 관련하여 LPS로 자극된 세포에서 MMP 분비에 관한 많은 연구가 이루어지고 있지만, 세포접착인자에 관해서는 발현을 비롯하여 기전에 관해서는 거의 알려져 있

지 않다. 본 연구에서는 사람의 치수세포 배양계에서 LPS로 자극에 의한 세포접착인자 등의 변화와 발현기전을 검토하였으며, 치수염의 치료분자로서 PPAR $\gamma$ 의 항 염증반응 기전을 밝혀 치수질환의 분자적 치료를 위한 기초적 실험을 수행하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 치수세포의 분리와 배양

세포는 primary culture를 통한 사람의 치수세포를 실험에 사용하였다. 건전한 제3대구치를 발거 (전북대학교 치과병원 구강악안면외과)하여 통상적인 pulp explant culture 방법을 이용하여 일차 배양하였다<sup>14</sup>). 세포 배양액은 DMEM (Life Technologies, Grand Island, NY)에 56°C에서 30분간 가열하여 비활성화 시킨 우태아 혈청 (FBS, Hyclone, Logan, Utah, USA)과 10% penicillin (100 unit/ml), streptomycin (100  $\mu$ g/ml) 및 300  $\mu$ g/ml-glutamine을 첨가하여 조제하였다. 세포주는 위의 배양액을 사용하여 37°C, 95% 습도, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였고, 실험에는 3-8 계대의 치수세포들을 사용하였다.

### 2. 복제 결함 (replication deficient) PPAR $\gamma$ 아데노바이러스 (Ad/PPAR $\gamma$ ) 제작

PPAR $\gamma$ 의 cDNA는 한국 생명공학연구원의 인간유전자은행으로부터 구입하였으며, 478개의 아미노산을 암호화하는 1434 bp의 유전자 (PPAR $\gamma$ 2)를 바이러스 제작에 사용하였다. Ad/PPAR $\gamma$ 의 제작은 Quantum Biotechnologies (Maisonneuve West, Montreal, Canada)의 AdEasy Vector System을 이용하였다. PPAR $\gamma$  유전자를 CMV promoter가 결합된 전달 벡터에 재조합 시키고, 재조합된 plasmid를 pAdEasy-1 vector와 대장균 BJ5183에서 homologous recombination을 시켰다. 이상의 재조합 PPAR $\gamma$  벡터를 대장균 DH5 $\alpha$ 에 형질 전환시켜 안정된 PPAR $\gamma$  아데노바이러스 벡터를 대량 정제하였다. 재조합 PPAR $\gamma$  벡터를 Pac 1으로 linearizing을 시킨 후, Lipofectin transfection (Invitrogen, San Diego, CA, USA) 방법으로 QBI293A (human embryonic kidney) 세포에 transfection시켜 재조합 바이러스를 제작하였다. QBI293A 세포의 배양은 MEM(minimum essential medium, Gibco BRL, Gaithersburg, MD) 배양액에서 통상적인 배양방법으로 배양하였고, 유전자 도입 2-3 주일 후 아데노바이러스가 생성된 배양 용기로부터 바이러스를 분리하였다. 분리된 바이러스로부터 PPAR $\gamma$  유전자의 확인은 위와 동일하게 제한효소를 이용하였고, 확인된 바이러스

를 QBI293A에 재감염 시켜 double CsCl gradient 방법으로 다량의 바이러스를 정제하였다. 실험에는 대조 바이러스로 대장균의  $\beta$ -galactosidase (Ad/LacZ) 유전자를 이상과 동일하게 제작하여 사용하였고, 실험 세포 주에 바이러스의 감염과 유전자의 발현의 여부를 대조 바이러스로 확인하였다.

정제된 바이러스의 생물학적 활성은 plaque forming unit (PFU/ml)를 측정하여 실험세포주에 일정수의 바이러스를 감염시켰다. QBI293A 세포  $3 \times 10^6$ 개를 60mm 배양용기에 하룻밤 배양시키고 정제 후 희석된 바이러스 1 ml와 1.25% SeaPlaque agarose (FMC, Rockland, Maine USA) 1 ml (42°C)를 서서히 섞은 후 세포 위에 부었다. 통상적으로 2주일 전후하여 나타나는 plaque의 숫자를 세어 PFU를 계산하였다. 치수세포에 바이러스를 10, 50, 100 MOI (multiplicity of infection, number of active virus particle/cell number)로 감염시켰으며, 감염은 우태아 혈청이 함유되지 않는 배양액에 5분 간격으로 흔들어주면서 37°C에서 3시간 시켰다.

### 3. LPS 처리와 Ad/PPAR $\gamma$ 감염

치수세포의 염증반응은 E. coli 0111로부터 페놀 추출로 정제한 LPS (Sigma, St Louis, MO, USA)를 처리하여 유도시켰다. LPS는 멸균 증류수에 녹여서 실험하였다. 3에서 8세대 사이의 치수세포  $3 \times 10^6$ 개를 100 mm plate에 배양시키고 다음 날 LPS 1  $\mu$ g/ml에서 10  $\mu$ g/ml를 처리하여 24시간에서 48시간 후에 유도되는 염증반응을 실험하였다. Ad/PPAR $\gamma$  바이러스 감염은 위와 동일하게 치수세포를 배양시키고 다음 날 100 MOI를 감염시켰다. 감염 24시간 후에 LPS 및 기타의 실험 약제를 처리하여 유도되는 반응을 실험하였다. 대조군에 PBS를 동일 양 처리하였다. 치수세포의 염증반응 유도는 대장균 유래 LPS를 1-10  $\mu$ g/ml 농도로 처리 후 MMP-2와 MMP-9의 활성을 gelatin zymography를 통하여 검토하였다.

### 4. Gelatin Zymography

LPS 단독 혹은 Ad/PPAR $\gamma$  바이러스와 병합하여 처리 후 유도되는 MMPs의 활성은 gelatin zymography를 이용하여 측정하였다. 주어진 시간에 도달한 배양 상층액의 단백질 5  $\mu$ g을 5x sample buffer (0.4 M Tris-HCl, pH 6.8, 5% SDS, 20% glycerol, 0.1% bromophenol blue)와 혼합시키고, 1 mg/ml gelatin 기질과 0.1% SDS가 함유된 8% polyacrylamide gel에 전개하여 분리시켰다. 전기영동 후 gel은 SDS 제거를 위해 renaturing buffer (2.5%

Triton X-100)로 20°C에서 1시간 반응시키고, 5분간 developing buffer (50 mM Tris-HCl, 20 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1% Triton X-100)로 세척하였다. Gel은 37°C의 신선한 MMP 기질용액 (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 20 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.02% Brij 35)에서 24시간 반응시키고 coomassie blue 염색을 시행 후 gel을 고정시켰다.

### 5. Western hybridization

#### i) Total 단백질 추출

치수세포에 LPS 처리 혹은 Ad/PPAR $\gamma$ 를 감염시키고 주어진 시간 후 세포로부터 총 단백질을 분리하였다. 세포를 2-3회 차가운 PBS로 세척 후 100 mm 배양용기에 1 ml의 PBS-TDS (PBS, 1% Triton X-100, 0.05% sodium deoxycholate, 0.01% SDS, 0.5  $\mu$ g/ml leupeptin, 1 mM EDTA, 1  $\mu$ g/ml pepstatin, 0.2 mM PMSF) 용액을 첨가, 15분간 얼음 위에서 방치 후 12,000 rpm에서 5분간 원심 분리하여 세포막 성분 등을 제거하였으며, 단백질 농도는 bovine serum albumin (BSA)을 표준화하여 Bio-Rad Protein Assay Kit (Bio-Rad, Hercules, CA)를 사용하여 정량하였다.

#### ii) Cytosol과 nuclear 단백질 추출

i)항과 같은 방법으로 처리한 세포에서 cytosol 및 nuclear 단백질을 분리하였다. 먼저 세포는 트립신을 처리하여 분리하였다. 분리한 세포는 2 - 3회 차가운 PBS로 세척한 후 100 mm 배양용기에 100  $\mu$ l의 Buffer A (10 mM HEPES pH 7.9, 10 mM Potassium chloride, 2 mM Magnesium chloride, 1 mM EDTA, 0.5  $\mu$ g/ml leupeptin, 1  $\mu$ g/ml pepstatin, 0.2 mM PMSF) 용액을 첨가하였다. Scraper를 이용하여 세포를 모은 후 얼음 위에서 10분간 반응시켰다. 20,000x g로 10분간 원심 분리하여 상층액은 cytosol 단백질로 사용하였고, pellet에는 1 ml Buffer A를 이용하여 씻어낸 후 100  $\mu$ l의 Buffer B (20 mM HEPES, pH 7.9, 25%, v/v, glycerol, 420 mM Sodium chloride, 2 mM Magnesium chloride, 0.2 mM EDTA, 1 mM DTT 0.5  $\mu$ g/ml leupeptin, 1  $\mu$ g/ml pepstatin, 0.2 mM PMSF)용액을 첨가하였다. 15분간 얼음 위에서 방치 후 20,000xg에서 10분간 원심 분리하여 상층액을 nuclear 단백질로 이용하였다.

#### iii) Western Hybridization

세포를 2 - 3회 차가운 PBS로 세척 후 100 mm 배양용기에 1 ml의 PBS-TDS (PBS, 1% Triton X-100, 0.05%

Table 1.

Antibody	Catalogue number	제조회사
Anti-ICAM-1, mouse	sc-8439	Santa Cruz, CA, USA
Anti-VCAM-1, rabbit	sc-8304	Santa Cruz, CA, USA
Anti-MMP-9, rabbit	sc-10737	Santa Cruz, CA, USA
Anti-PPAR, mouse	sc-7382	Santa Cruz, CA, USA
Anti-NF $\kappa$ B, rabbit	sc-109	Santa Cruz, CA, USA
Anti-I $\kappa$ B, mouse	sc-1643	Santa Cruz, CA, USA

sodium deoxycholate, 0.01% SDS, 0.5  $\mu$ g/ml leupeptin, 1 mM EDTA, 1  $\mu$ g/ml pepstatin, 0.2 mM PMSF) 용액을 첨가, 15분간 얼음 위에서 방치 후 12,000 rpm에서 5분간 원심 분리하여 세포막 성분 등을 제거하였으며, 단백질 농도는 bovine serum albumin (BSA)을 표준화하여 Bio-Rad Protein Assay Kit (Bio-Rad, Hercules, CA)를 사용하여 정량 하였다. 위의 방법으로 분리한 20  $\mu$ g의 lysate를 7.5% mini gel (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) SDS-PAGE (poly acrylamide gel electrophoresis)로 변성 분리하였고, 이를 nitrocellulose membrane (Hybond-C Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ)에 60V로 2시간 동안 이동시켰다. Membrane의 blocking은 5% skim milk가 함유된 TBS-T (TBS, 0.1% Tween<sup>20</sup>용액으로 상온에서 1시간 동안 실시하였다. 발현을 측정하기 위한 1차 항체를 1:1,000으로 TBS 용액에 희석하여 상온에서 1시간 반응시킨 후 TBS로 3회 세정하였다. 2차 항체로는 horse radish peroxidase (HRP)가 결합된 anti-mouse IgG 혹은 anti-rabbit IgG (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ)를 1: 5,000으로 희석하여 상온에서 1시간 반응하였다. TBS로 3회 세정 후 ECL 기질 (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ)과 30 - 60초간 반응 후 X-Ray 필름에 감광시켰다.

본 실험에 사용한 항체는 다음과 같다.

통계방법은 Student's *t*-test를 사용하였으며 재현성을 위해 세 번 이상 실험하였고 *P*값은 0.05 미만일 때 통계적인 유의성을 인정하였다.

### III. 결 과

#### 1. LPS 자극에 의한 치수 세포의 염증 반응 유도

사람의 제3대구치로부터 분리한 치수세포는 실험방법에 준하여 3 - 4일 간격으로 계대 배양이 가능하였다. 치수세

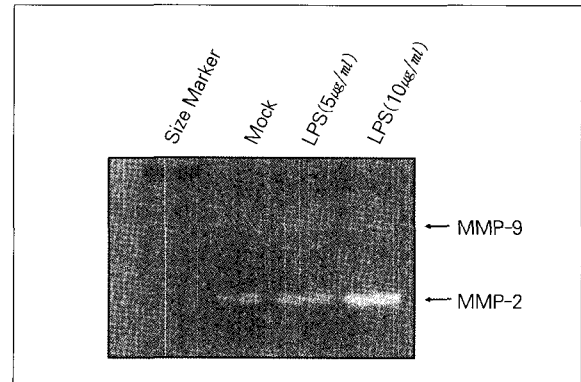
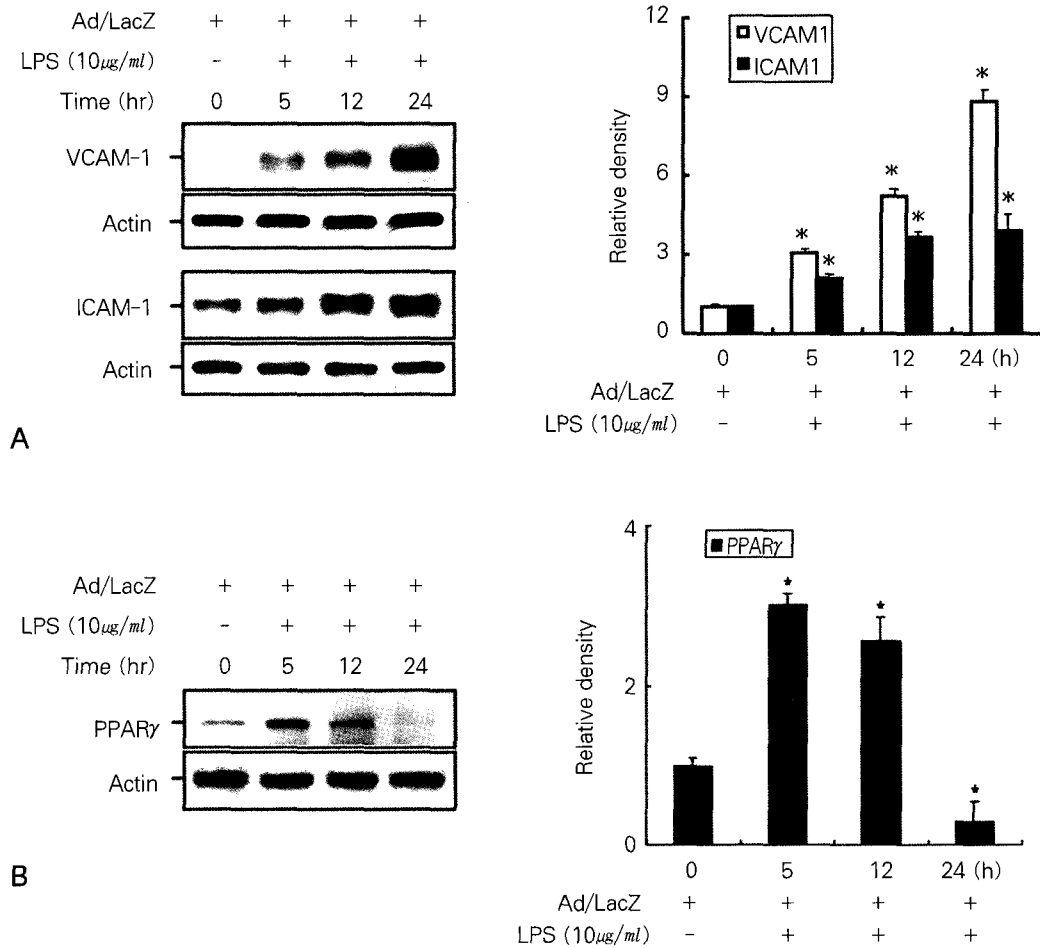


Figure 1. Activation of MMPs secretion in the dental pulp cells treated with LPS for 24 hours. Condition medium were analyzed by gelatin zymography.

포는 LPS의 자극에 초기 5시간 이내에 MMP-2와 MMP-9의 활성이 유도되었으며 24시간을 전후하여 활성의 정점에 달하였다. 또한 LPS의 농도 의존적으로 MMP의 활성이 유도되었으며, 이 후 10  $\mu$ g/ml 농도의 자극으로 MMPs를 유도시켰다 (Figure 1).

분리된 치수세포는 핵 내 호르몬 수용체인 PPAR $\gamma$ 을 발현하고 있었다 (Figure 2B). 치수세포는 재조합 바이러스 PPAR $\gamma$ 의 감염에 의해서 24시간 이내에 높은 발현이 나타났으며 (Figure 3B), 이는 치수세포에 외래 유전자의 발현을 위한 아데노바이러스의 감염과 유전자의 발현이 정상적으로 유도되고 있음을  $\beta$ -galactosidase 유전자의 활성을 응용한 Ad/LacZ 바이러스를 통하여 확인 하였다 (data not shown). 따라서 이 후의 실험에는 Ad/LacZ을 대조바이러스로 사용하였다.

LPS 자극으로 치수세포는 ICAM-1과 VCAM-1의 세포 접착인자의 발현이 유도되었다 (Figure 2A). VCAM-1의 발현 양은 자극 전에 비교하여 24시간에서 9배 정도 증가를 보여주었으며, ICAM-1도 4배 이상의 높은 증가를 보여주



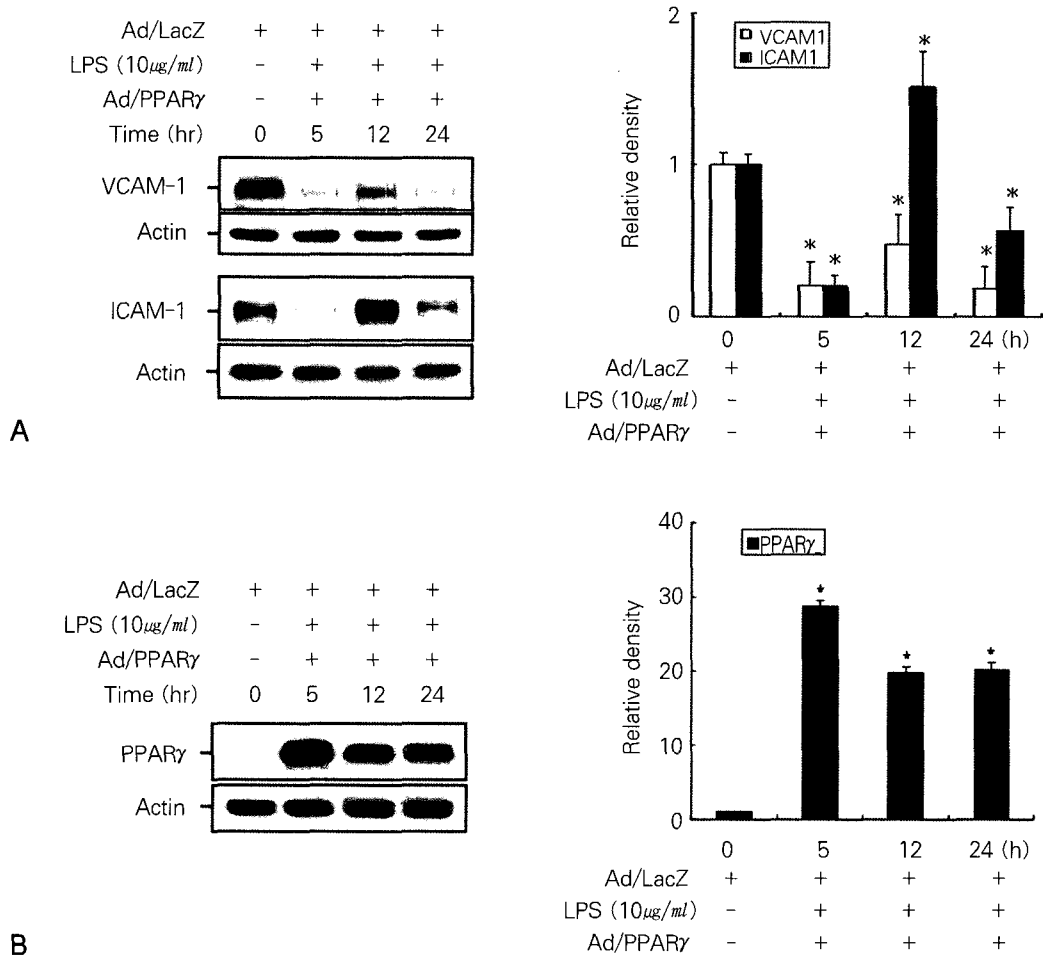
**Figure 2.** Activation of cell adhesion molecules in the dental pulp cells were treated with LPS for 24 hours. Western blot analysis detected adhesion molecules (left), Protein bands were quantified by densitometry (right) (A). Modulation of PPAR $\gamma$  in the dental pulp cells treated with LPS for 24 hours (B). Actin was used as a control for protein loading.

었다. 치수세포 내에 존재하는 PPAR $\gamma$ 의 작용과 접착인자의 발현과의 상관성을 검토하기 위하여 LPS의 처리 후 24시간 내에 변화되는 PPAR $\gamma$ 의 발현을 분석하였다. LPS의 자극에 의해서 치수세포는 12시간까지는 PPAR $\gamma$ 의 발현이 약하게 증가되었지만 24시간에서는 거의 발현이 나타나지 않았다 (Figure 2B).

## 2. PPAR $\gamma$ 에 의한 치수세포의 염증반응의 저하

치수세포가 염증반응의 표현으로 나타내는 ICAM-1과 VCAM-1의 발현증가를 PPAR $\gamma$ 의 활성화로 제어되는 현상

을 검토하였다. LPS 처리 전 24시간에 Ad/PPAR $\gamma$ 를 감염시켜 치수세포 내에 PPAR $\gamma$ 의 발현을 유도시켰으며 (Figure 3B), LPS 처리에도 불구하고 PPAR $\gamma$  발현을 유도한 세포는 VCAM-1과 ICAM-1의 발현이 현저하게 저하되었다 (Figure 3A). LPS 자극 후 12시간째 두 접착인자의 발현이 약하게 증가하는 경향이 있었지만, 24시간에서는 급격히 감소하여 처리전과 비교하여 VCAM-1의 경우 1/4로 감소되었고 ICAM-1은 1/2로 감소되었다. 또한 이들 두 인자의 발현을 억제 시킨 과정에 있어서 치수세포는 Ad/PPAR $\gamma$ 에 의한 상대적으로 높은 PPAR $\gamma$ 의 발현이 유도되고 있었다 (Figure 3B).

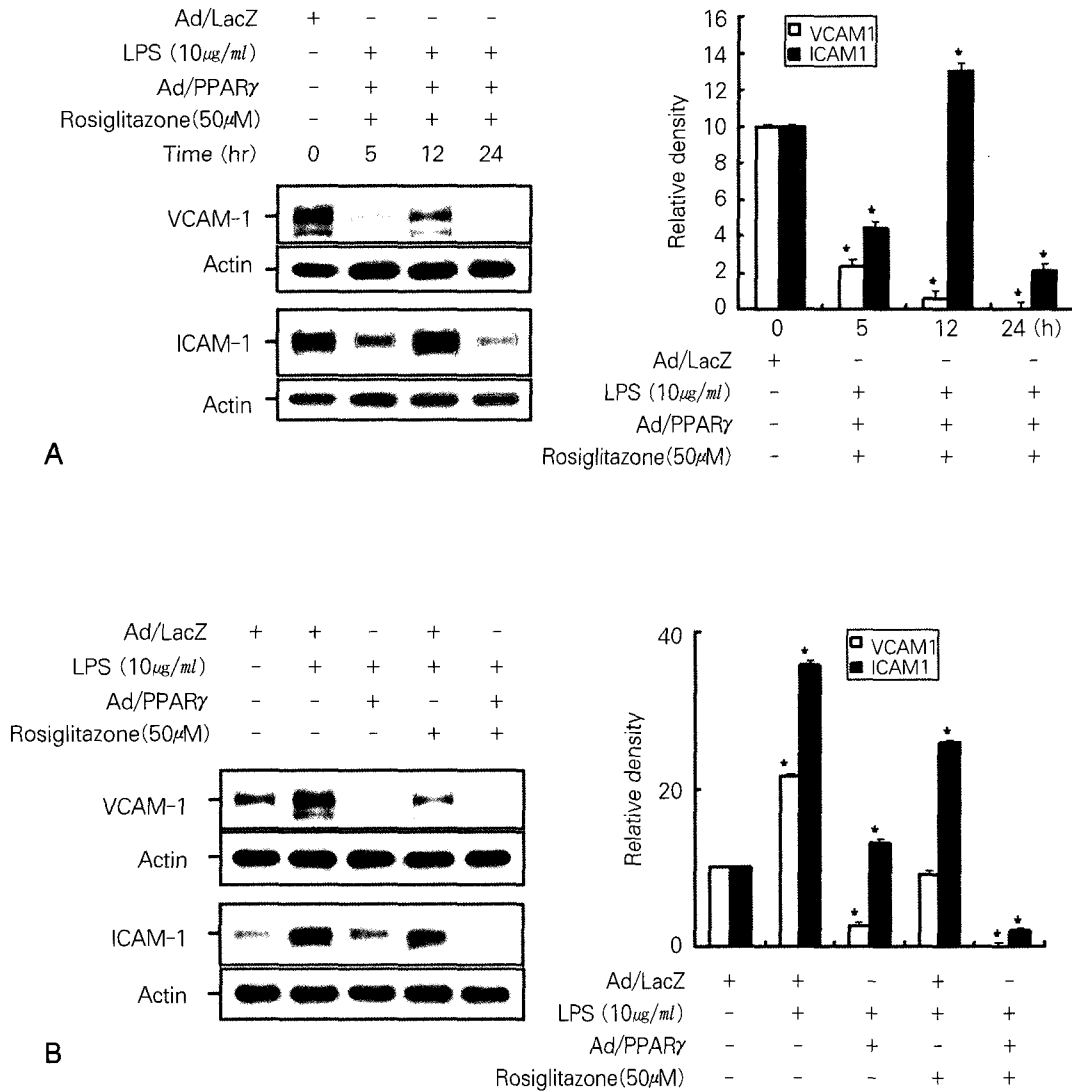


**Figure 3.** Down-regulation of adhesion molecules by PPAR $\gamma$  in time-dependent manner. Western blot analysis detected adhesion molecules (left). Protein bands were quantified by densitometry (right) (A). PPAR $\gamma$  expression in the dental pulp cells treated with ad/PPAR $\gamma$  (B). Actin was used as a control for protein loading.

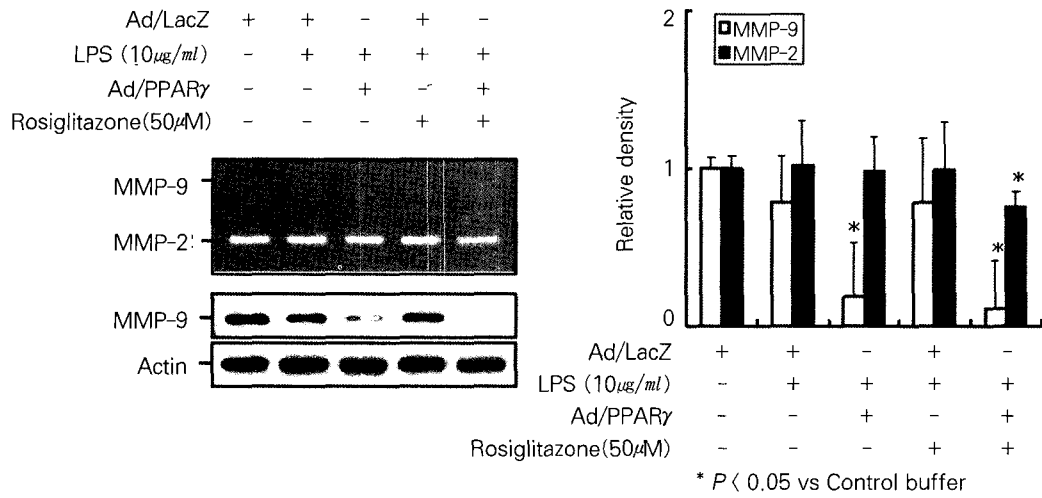
PPAR $\gamma$ 의 agonist이며 2형 당뇨병 환자의 치료약으로 이용되는 rosiglitazone과 PPAR $\gamma$ 의 복합적 활성화는 LPS에 의해서 유도되는 두 접착인자의 발현을 더욱 현저하게 감소시켰으며, 이러한 세포접착인자의 발현감소는 48시간까지 지속적으로 유지되는 것을 확인할 수 있었다 (Figure 4). 그러나 rosiglitazone 또는 PPAR $\gamma$ 의 각각 단독 처리보다는 복합적 활성화가 현저한 발현억제 효과를 나타내었으며, rosiglitazone에 비교하여 PPAR $\gamma$ 가 발현효과가 더욱 높았다. 종합적으로 치수세포의 초기 염증반응으로 활성화 되어 분비되는 MMP-2와 MMP-9의 활성을 검토한 결과 PPAR $\gamma$ 와 rosiglitazone이 MMP-2, MMP-9 모두 감소시

켰으며, 두 인자의 복합처리가 가장 효과적으로 나타났다 (Figure 5). MMP-9는 zymography 상에서 약하게 유도되었으며 Western hybridization으로 검토한 결과 zymography와 유사한 결과를 보여주었다.

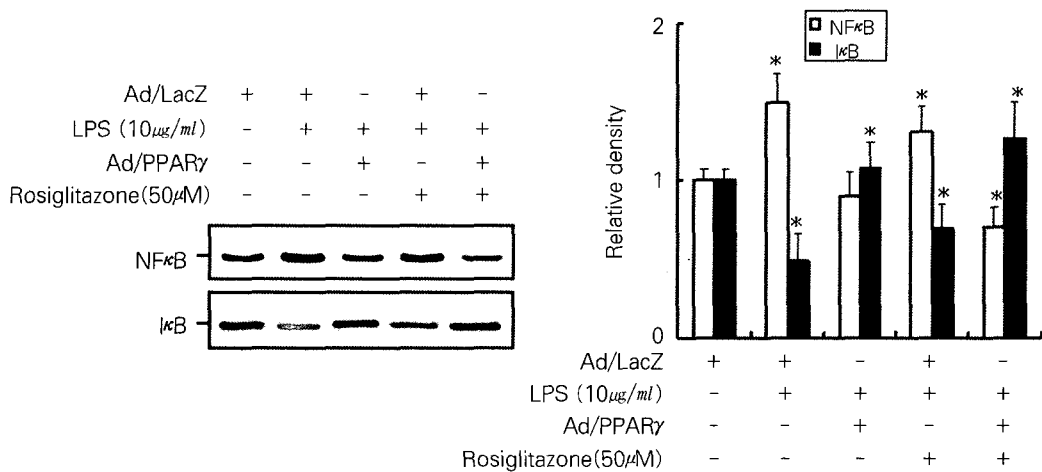
이상의 치수세포가 LPS에 의한 염증반응으로 나타내는 MMPs, 세포접착인자의 발현유도와 관련하여 NF- $\kappa$ B의 핵 내의 이동과 사이토졸에 존재하는 I $\kappa$ B의 발현 관련성을 검토하였다. 치수세포는 LPS의 자극에 의해서 핵 내로 NF- $\kappa$ B의 이동이 유도되었으며, NF- $\kappa$ B의 핵 내로의 이동은 PPAR $\gamma$ 의 발현으로 감소되었고, rosiglitazone에 의해서도 억제되었다 (Figure 6).



**Figure 4.** The short (A) and long (48h) (B) time effects of PPAR $\gamma$  and rosiglitazone on cell adhesion molecules in the dental pulp cells. (A) Down-regulation of ICAM-1 and VCAM-1 in dental pulp cells combined treated with Ad/PPAR $\gamma$  and rosiglitazone. The cells were infected with 100 MOI of Ad/PPAR $\gamma$  for 1 hours, and then treated with LPS and rosiglitazone for 24 hours. The protein expression was detected by immunoblotting with specific antibody (left), and protein bands were quantified by densitometry (right). (B) Down-regulation of ICAM-1 and VCAM-1 in dental pulp cells combined treated with Ad/PPAR $\gamma$  and rosiglitazone.



**Figure 5.** Down-regulation of MMP-2, -9 by treatment of PPAR $\gamma$  and its agonist. Left panel shows gelatin Zymography for MMP-2, MMP-9 from dental pulp cells. Actin was used as a control for protein loading. Right panel shows relative densitometric units. Data are expressed as mean  $\pm$  SD of three separate experiments.



**Figure 6.** Effects of PPAR $\gamma$  and PPAR $\gamma$  agonist on NF- $\kappa$ B activation in the dental pulp cells. Left panel shows western blot analysis for NF- $\kappa$ B in nuclear extracts, I $\kappa$ B in cytosol from dental pulp cells. Actin was used as a control for protein loading. Right panel shows relative densitometric units. Data are expressed as mean  $\pm$  SD of three separate experiments.



#### IV. 고 찰

PPAR $\gamma$ 는 세포의 대사를 제어하는 중심적인 인자로서 지방대사를 비롯하여 당 대사 등의 기능을 갖고 있다. 특히 PPAR $\gamma$ 가 다양한 염증반응을 억제시키는 기능이 알려지고 있다<sup>15)</sup>. 치성감염은 국소적으로 나타나므로 근관치료 또는 치주치료로 해결이 가능하지만 감염의 심각성에 따라 짧은 시간 내에 근막을 통하여 급격히 연조직으로 확산되는 경우도 있다. 치수감염으로 유도되는 염증반응은 조직의 손상에 대한 손상부위를 되돌리려는 고도의 방어기전으로 해석된다<sup>16)</sup>. 치수염증의 반응에는 치수세포 내 MMPs와 사이토카인 IL-1 $\beta$ 와 TNF- $\alpha$ 가 매개되는 것으로 알려졌다<sup>6,17)</sup>. 이들 매개물질을 비롯하여 염증반응 시에 사이토카인의 발현에 관여 할 것으로 추측되는 세포간 접착인자의 발현 및 관련 기전은 알려져 있지 않다. 이 연구에서는 사람의 치수세포 배양계에 LPS 자극으로 유도되는 염증반응에 세포접착인자의 발현과 PPAR $\gamma$ 가 유도하는 염증반응의 저하를 검토하였다.

일반적으로 치수감염의 원인으로 대장균은 크게 작용하지 않지만 대장균 유래 LPS는 효과적인 치수세포의 염증반응 유도물질로 인식되고 있으며<sup>18)</sup>, 이는 치수 내 분리 세균이며 염증유발 세균인 Enterococcus 속의 세균과 동일한 염증반응 경로로 나타날 것으로 예측된다. 분리 배양한 치수세포는 LPS의 자극으로 MMP-2와 -9의 분비와 활성이 강화되었다 (Figure 1). 이는 치수세포를 비롯한 다양한 세포에서 염증반응의 초기물질로 MMPs의 분비가 유도되는 것과 일치하여 대장균유래의 LPS는 치수세포에 효과적인 염증반응 유도인자로서 인정되었으며, MMPs의 분비 및 활성은 처리 LPS의 양에 따라 증가되었다.

세포접착인자인 ICAM-1은 내피세포를 비롯하여 혈구세포, 섬유모세포 등에서 발현되며, 주로 호중구 세포, T 세포 또는 B 세포의 LFA-1과 Mac-1과 결합하여 사이토카인 등의 분비에 관여한다. VCAM-1 또한 주로 내피세포에서 발현되며 주로 IL-1과 TNF 등에 의해서 유도된다<sup>19)</sup>. 이 실험의 치수세포는 LPS의 자극으로 ICAM-1과 VCAM-1이 24시간 이내에 4배에서 9배에 달하는 증가를 보여주었다 (Figure 2A). 배양계의 치수세포는 대부분의 섬유모세포였으며, 두 접착인자의 발현은 내피세포계열을 비롯하여 치수 섬유모세포에서의 활발한 반응을 보이는 것으로 이해된다. 치수세포는 LPS의 자극으로 MMPs와 접착인자의 발현이 증가되는 과정에서 PPAR $\gamma$ 의 초기 발현은 증가되었지만 24시간째에는 거의 발현이 나타나지 않는 특징을 보였다 (Figure 2B). 이는 LPS의 자극에 의한 염증반응중 초기 세포의 대응에 PPAR $\gamma$ 가 특별한 역할을 수행하고 있는 것으로 해석되지만, 24시간째 대부분의 발현이 사라지면서 조직은 MMPs를 비롯하여 접착인자 등의 발현증가를 통해

고도의 염증반응이 진행되는 것으로 생각된다. PPAR $\gamma$ 의 발현을 유도시킨 치수세포 (Figure 3B)는 LPS의 자극에 의해서 접착인자가 대조세포에 비교하여 2배 이상 감소되었으며, 이는 Figure 2의 접착인자 발현 정도에 비교하면 PPAR $\gamma$ 가 현저하게 접착인자의 발현을 감소시키는 것을 알 수 있었다. 이는 PPAR $\gamma$ 에 의한 접착인자의 발현의 저하로 해석되며, 이러한 접착인자 발현의 저하는 전반적인 염증반응의 저하로 생각된다. 특히 PPAR $\gamma$ 의 촉진제인 rosiglitazone에 의해서도 두 접착인자의 발현이 감소되어 PPAR $\gamma$ 의 직접적인 작용의 근거로 이해된다 (Figure 4). PPAR $\gamma$ 에 의한 이상의 세포접착인자의 제어는 최근 관심의 대상으로 특별한 기전이나 억제 경로에 관해서는 알려진 바 없으며, 제한적으로 PPAR $\gamma$ 가 혈구세포와 혈관내피세포에서 위의 두 접착인자의 발현을 억제시킨 것으로 알려져 있다<sup>20,21)</sup>. Rosiglitazone의 효과가 나타나는 것은 치수세포에 내재적으로 PPAR $\gamma$ 가 발현되고 있기 때문이다. 실험에 사용한 PPAR $\gamma$ 2는 PPAR $\gamma$ 1에 비교하여 라이간드 비의존적 활성이 존재하므로 치수세포에서 PPAR $\gamma$ 가 촉진제에 비해서 높은 억제효과가 나타나며, 복합적으로 처리시에는 더욱 높은 활성의 억제효과가 나타나는 것으로 생각된다.

PPAR $\gamma$ 는 MMP-2와 -9의 분비 또한 현저하게 억제시켰다 (Figure 5). MMPs의 억제는 PPAR $\gamma$ 가 촉진제보다 높게 나타났으며, 복합적 처리는 이상의 억제를 더욱 효과적으로 유도하였다. 염증반응과 관련하여 PPAR $\gamma$ 가 MMPs 분비를 억제시키는 작용은 오직 PPAR $\gamma$ 의 촉진제를 이용한 실험에서 보고되고 있으며<sup>22)</sup>, 작용기전은 추후 연구의 초점이 되고 있다.

세균 또는 세균의 구성성분은 염증반응을 유도하게 되며, 이러한 구성성분으로는 LPS를 비롯하여 peptidoglycans, lipoteichoic acids, fimbriae, proteases, heat-shock proteins, formyl-methionyl peptides, 독소 등이 있다<sup>23)</sup>. 이들 물질은 조직세포에 존재하는 다양한 수용체에 결합하여 신호전달체계에 의한 염증반응이 시작되며, 염증반응의 수용체로는 toll-like receptors (TLRs), CD14, nucleotide-binding oligomerization domain proteins (Nod), G-protein-coupled receptors, formyl-methionyl peptide receptors, protease-activated receptors 등이 있다<sup>23)</sup>. 본 연구의 결과에서 제시되는 치수세포의 LPS에 대한 MMPs, 접착인자 등의 발현은 TLR-4의 경로로부터 시작될 것으로 예측되며, 이로부터 Figure 6에 표현되는 NF- $\kappa$ B의 핵 내 이동의 촉진이 초기 염증반응의 연쇄적 기전으로 생각된다. 그러나 치수세포에서의 염증반응에 대한 신호체계는 전혀 알려져 있지 않으며, 따라서 PPAR $\gamma$ 의 활성에 의한 치수세포의 염증반응의 기전은 TLR-4로부터 NF- $\kappa$ B에 이어지는 과정에서 유도되는 활성으로 이해하고자 한다. PPAR $\gamma$ 의 작용이 NF- $\kappa$ B에 직접적으로 영향을 미치지

않을 것으로 예측되며, 이는 NF- $\kappa$ B상부의 Akt/PKB나 여러 MAPKs의 활성화에 PPAR $\gamma$ 가 작용할 것으로 생각되며 또한 PPAR $\gamma$ 가 COX-2의 발현을 억제함으로써 염증반응의 매개에 중요한 역할을 할 것으로 예측된다.

양<sup>24)</sup> 등은 치주인대 섬유모세포에서 *Prevotella nigrescens*의 LPS에 의한 MMPs의 분비 변화를 관찰한 바 있고, Polymorphonuclear Neutrophils에서 *Enterococcus faecalis*에 의해 MMP-8의 변화를 연구한 결과<sup>25)</sup>를 바탕으로 추후에는 치수세포뿐 아니라 치주인대세포를 이용하여 위식 관련세균이나 근관 감염시 흔히 발견되는 세균의 LPS로 자극 시 염증매개 물질의 변화를 관찰하는 것도 필요할 것으로 생각된다. 이상의 연구에서 치수세포로부터 PPAR $\gamma$ 의 활성을 통한 염증의 치료에 이용 가능성이 나타난 결과로 이해되었으며, 치수세포의 미분화적 다양성을 이용한 재생공학과 연계되어 PPAR $\gamma$ 의 응용이 기대된다.

## V. 결 론

1. LPS에 의해 자극된 치수세포에서 염증매개물질인 ICAM-1, VCAM-1, MMPs의 분비가 증가하였다 ( $p < 0.05$ ).
2. Ad/PPAR $\gamma$  처리시 ICAM-1, VCAM-1의 분비가 감소되었다 ( $p < 0.05$ ).
3. PPAR $\gamma$ 와 PPAR $\gamma$  agonist를 동시에 처리시 48시간째 ICAM-1, VCAM-1의 분비가 확연히 감소하였고 특히 VCAM-1의 경우 거의 완전한 감소를 보였다 ( $p < 0.05$ ).
4. PPAR $\gamma$ 와 PPAR $\gamma$  agonist 처리시 핵 내 NF- $\kappa$ B가 감소하였고 사이토졸내  $\kappa$ B가 증가하였다 ( $p < 0.05$ ).

## 참고문헌

1. Brandenburg K, Andra J, Muller M, Koch MH, Garidel P. Physicochemical properties of bacterial glycopolymers in relation to bioactivity. *Carbohydr Res* 338(23): 2477-2489, 2003.
2. Birkedal-Hansen H. Role of cytokines and inflammatory mediators in tissue destruction. *J Periodontol Res* 28:500-510, 1993.
3. Marie-Agenes, Karim Bordji. PPAR- $\gamma$  ligands modulate effects of LPS in stimulated rat synovial fibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol* 282:125-133, 2002.
4. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 92(8):827-839, 2003.
5. Naio Y, Yoshikawa T. Role of matrix metalloproteinases in inflammatory bowel disease. *Mol Aspects Med* 26:379-390, 2005.
6. Gusman H, Santana RB, Zehnder M. Matrix metalloproteinase levels and gelatinolytic activity in clinically

- healthy and inflamed human dental pulps. *Eur J Oral Sci* 110(5):353-357, 2002.
7. Wang CY, Stashenko P. Kinetics of bone-resorbing activity in developing periapical lesion. *J Dent Res* 70:1362-1366, 1991.
8. Zhu X, Subbaraman R, Sano H, Jacobs B, Sano A, Boetticher E, Munoz NM, Leff AR. A surrogate method for assessment of beta(2)-integrin-dependent adhesion of human eosinophils to ICAM-1. *Immunolo* 23:240(1-2):157-164, 2000.
9. Sawa Y, Yoshida S, Shibata KI, Suzuki M, Mukaida A. Vascular endothelium of human dental pulp expresses diverse adhesion molecules for leukocyte emigration. *Tissue Cell* 30(2):281-291, 1998.
10. Schoonjans K, Staels B, Auwerx J. The peroxisome proliferator activated receptors (PPARs) and their effects on lipid metabolism and adipocyte differentiation. *Biochim Biophys Acta* 1302:93-109, 1996.
11. Jiang C, Ting AT, Seed B. PPAR- $\gamma$  agonists inhibits production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature* 391:79-82, 1998.
12. Willson TM, Brown PJ, Sternbach DD, Henke BR. The PPARs: from orphan receptors to drug discovery. *J Med Chem* 43:527-550, 2000.
13. Lemberger T, Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: a nuclear receptor signaling pathway in lipid physiology. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12:335-363, 1996.
14. Panagakos FS, O' Boskey JF Jr, Rodriguez E. Regulation of pulp cell matrix metalloproteinase production by cytokines and lipopolysaccharides. *J Endod* 22:358-61, 1996.
15. Zingarelli B, Cook JA. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a new therapeutic target in sepsis and inflammation. *Shock* 23(5):393-399, 2005.
16. Tiadehane L. The mechanism of pulpal wound healing. *Aust Endod* 28(2):68-74, 2002.
17. Lin SK, Wang CC, Huang S, Lee JJ, Chiang CP, Lan WH, Hong CY. Induction of dental pulp fibroblast matrix metalloproteinase-1 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 gene expression by interleukin-1alpha and tumor necrosis factor-alpha through a prostaglandin-dependent pathway. *J Endod* 27:185-189, 2001.
18. Coli J, Tam E, Waterfield JD. Proinflammatory cytokine profiles in pulp fibroblasts stimulated with lipopolysaccharide and methyl mercaptan. *J Endod* 30(2):88-91, 2004.
19. Min JK, Kim YM, Kim SW, Kwon MC, Kong YY, Hwang IK, Won MH, Rho J, Kwon YG. TNF-related activation-induced cytokine enhances leukocyte adhesiveness: induction of ICAM-1 and VCAM-1 via TNF receptor-associated factor and protein kinase C-dependent NF-kappaB activation in endothelial cells. *Immunolo* 175(1):531-540, 2005.
20. Sasaki M, Jorden P, Welbourne T, Minagar A, Joh T, Itoh M, Elrod JW, Alexander JS. Troglitazone, a PPAR-gamma activator prevents endothelial cell adhesion molecule expression and lymphocyte adhesion mediated by TNF-alpha. *BMC Physiol* 5(1):3-14, 2005.
21. Pasceri V, Wu HD, Willerson JT, Yeh ET. Modulation of vascular inflammation *in vitro* and *in vivo* by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activators. *Circulation* 101(3):235-238, 2000.

22. Ward JE, Fernades DJ, Taylor CC, Bonacci JV, Quan L, Stewart AG. The PPAR $\gamma$  ligand, rosiglitazone, reduces airways hyperresponsiveness in a murine model of allergen-induced inflammation. *Pulm Pharmacol Ther* 19(1):39-46, 2006.
23. Mandison PN, Bobetsis YA, Kinane DF. Generation of inflammatory stimuli: how bacteria set up inflammatory responses in the gingiva. *J Clin Periodon* 6:57-71, 2005.
24. Yang WK, Lee WC, Kim MR, Son HH. MMP and TIMP production in periodontal ligament fibroblasts stimulated by *Prevotella nigrescens* lipopolysaccharide. *J Kor Acad Cons Dent* 30(5):372-383, 2005.
25. Park SK, Shon WJ, Lim SS. Effect of Sonicated extracts of *Enterococcus faecalis* on the production of Matrix Metalloproteinase-8 by human polymorphonuclear neutrophils. *J Kor Acad Cons Dent* 30(2):138-143, 2005.

**국문초록**

**치수세포에서 PPAR $\gamma$ 의 항 염증작용에 관한 연구**

김정희\*

전북대학교 치과대학 보존학교실

치수는 상아질로 둘러싸인 간엽조직으로 다양한 세포와 기저 물질들로 구성되어 있으며 혈관과 신경조직이 분포되어 있다. 치수의 염증은 조직의 분해를 야기하며 이는 Matrix Metalloproteinase에 의해 세포 외 기질의 분해가 촉진되어 병적인 과정을 거치게 된다. 이에 Lipopolysaccharide에 의한 MMP와 inflammatory cytokine의 유도과 peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR)에 의한 염증매개 물질의 조절에 대해 알아보하고자 하였다.

사람의 치수세포를 다양한 LPS농도에 노출시킨 후 24시간째 MMP-2, MMP-9의 변화를 보고 LPS에 의해 자극된 치수세포에서 ICAM-1, VCAM-1, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ 의 분비가 증가됨을 알 수 있었다. 또한 Adenovirus PPAR $\gamma$  (Ad/PPAR $\gamma$ )와 PPAR $\gamma$  agonist인 rosiglitazone를 LPS로 자극된 치수세포에 처리하였을 때 48시간째 MMPs와 Adhesion molecules, cytokines의 감소를 확인하였다.

이로써 사람의 치수세포에서 PPAR $\gamma$ 가 가지는 항 염증효과에 대해 지속적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

**주요어:** 염증반응, MMP, 세포접착인자, 치수세포, PPAR