

치주인대세포에서 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*의 IL-8 및 활성산소종 유도능

이양신¹, 박홍규¹, 김성환^{2,3}, 차정현^{1,2,3}, 유윤정^{1,2,3*}

1. 연세대학교 치과대학 구강생물학교실

2. 연세대학교 대학원 응용생명과학과

3. 연세대학교 치과대학 2단계 BK 21 사업단, 구강과학 연구소 및 구강악안면경조직재생연구센터

Induction of IL-8 and reactive oxygen species in periodontal ligament cells by *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Yang-Sin Lee¹, Hong Gyu Park¹, Sung Whan Kim^{2,3}, Jeong-Heon Cha^{1,2,3}, Yun-Jung Yoo^{1,2,3*}

1. Department of Oral Biology, College of Dentistry, Yonsei University

2. Department of Applied Life Science, The Graduate School, Yonsei University

3. BK21 project, Oral Science Research Center, and Research Center for Orofacial Hard Tissue Regeneration, College of Dentistry, Yonsei University

ABSTRACT

Purpose: Interleukin (IL)-8 is one of pro-inflammatory cytokines. Reactive oxygen species (ROS) are reduced metabolites of O₂. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* is one of representative periodontopathogens. To investigate the role of *A. actinomycetemcomitans* in IL-8 expression of periodontal ligament (PDL) cells, we estimated the production of IL-8 and ROS in *A. actinomycetemcomitans* treated PDL cells.

Methods: The IL-8 production was determined by enzyme-linked immunosorbent assay. The ROS production was estimated using H₂DCFDA and FACS.

Results: *A. actinomycetemcomitans* increased the production of IL-8 and ROS at 10, 100, and 500 multiplicity of infection. N-acetylcysteine, an antioxidant of ROS, down-regulated the production of IL-8 induced by *A. actinomycetemcomitans*.

Conclusions: These results suggest that *A. actinomycetemcomitans* induces IL-8 production and ROS may act as a mediator in this process. (*J Korean Acad Periodontol 2009;39:331-337*)

KEY WORDS: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; interleukin-8; periodontal ligament; reactive oxygen species.

서론

치주염은 치태 내 세균에 의하여 치아 지지조직이 파괴되는 염증성 질환으로 치은염증 및 치조골흡수가 유도되는 질환이다.

치주염에 의한 치주조직 파괴는 세균의 직접적인 작용 또는 세균에 대한 방어, 즉 염증 및 면역반응에 의하여 유도된다¹⁾. 따라서 염증유도 cytokine은 치주염에 의한 치주조직 파괴에 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 생각되고 있다. Interleukin (IL)-8은 CXC chemokine이다. IL-8은 염증유도 cytokine으로 염증세포인 호중구의 부착분자 발현, 화학주성 및 활성화를 유도한다²⁾. 또한 IL-8은 이러한 염증유도능 뿐만 아니라 골흡수 유도능도 있는 것으로 보고되었다. Receptor activator of NF- κ B ligand(RANKL)는 파골세포의

Correspondence: Yun-Jung Yoo

Department of Oral Biology, College of Dentistry, Yonsei University
134 Sinchon-dong, Seodaemun-gu, Seoul, 120-752, Korea

E-mail: yu618@yuhs.ac, Tel: 02-2228-3060, Fax: 02-2227-7903

Received: Jun 13, 2009; Accepted: Aug 10, 2009

본 논문은 2006년도 정부재원(교육인적자원부 학술연구조성사업비)으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 연구되었음(KRF-2006-531-E 00078).

분화를 유도하는 cytokine으로 IL-8은 RANKL 의존 또는 비 의존 경로를 통해 파골세포 형성을 유도하는 것으로 보고되었다³⁻⁵. 치주염 시 치은열구 액 및 치주조직의 IL-8이 증가하며 치주염과의 상관관계가 있는 것으로 보고되어 치주염의 병인기전에 있어서 IL-8의 중요성이 제시되었다⁶⁻⁸.

치주염의 병인기전에 있어서 치주인대세포가 생성하는 염증 유도 cytokine의 중요성이 강조되어 왔다. *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* 및 *Treponema species*는 치주염 관련세균이다⁹. 이들 세균 중 *P. gingivalis* 및 *Treponema species*가 치주인대세포의 IL-8 발현을 유도하는 것으로 보고되었다¹⁰⁻¹². 치주인대세포에서 *A. actinomycetemcomitans*의 IL-6 발현 유도능이 보고되었으나¹³, *A. actinomycetemcomitans*가 IL-8의 발현을 유도하는지 보고된 것이 없으며 치주염 관련세균에 의한 IL-8 발현에 관련된 신호전달체계도 명확히 밝혀져 있지 않다.

활성산소종(reactive oxygen species, ROS)은 O₂의 환원 대사물로 superoxide anion, hydrogen peroxide 및 hydroxyl radical이 이에 해당된다¹⁴. Superoxide anion은 NADPH oxidase, xanthin oxidase 또는 mitochondrial electron transport chain oxidase을 통해 형성되며 hydrogen peroxide와 singlet oxygen으로 전환된다. 상피세포를 포함한 일부 세포에서 활성산소종이 IL-8 유도제로 작용하는 것으로 보고되었으며 치주인대세포에서도 활성산소종의 IL-8 유도능이 보고되었다¹⁵⁻²⁰. *Helicobacter pylori*는 위염 및 십이지장염의 원인균으로 *H. pylori*가 상피세포에서 IL-8 발현을 유도하며 활성산소종이 신호전달 매개체로 작용할 수 있음이 제시되었다²¹. 이는 세균에 의한 IL-8 생성에 활성산소종이 관여할 가능성을 시사한다. 따라서 본 연구에서는 치주인대세포에서 *A. actinomycetemcomitans*의 IL-8 및 활성산소종 생성 유도능을 관찰하여 치주인대세포의 IL-8 발현 시 *A. actinomycetemcomitans*의 역할을 평가하였다.

재료 및 방법

1. 치주인대세포 배양

연세대학교 치과병원에 내원한 환자로 교정치료를 위하여 발치한 치아의 치근으로부터 분리 배양하였다. 치아의 중앙 1/3부분을 나이프로 긁어 치주인대 조직 편을 분리하였

다. 분리한 치주인대 조직 편을 300 unit/ml penicillin, 300 g/ml streptomycin 및 0.75 g/ml amphotericin B를 함유한 α -MEM(Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) 배지로 3회 세척하였다. 세척한 조직 편을 100 mm 세포배양기에 위치시킨 후 100 unit/ml penicillin, 100 g/ml streptomycin, 0.25 g/ml amphotericin B 및 20% 우태아혈청(Gibco BRL)을 함유한 α -MEM배지에서 배양하였다. 배지는 2일 간격으로 교체하였으며 조직 편으로부터 세포가 자라나기 시작한 후 10% 우태아혈청을 함유한 α -MEM배지에서 배양하였으며 세포가 자라 70% 정도의 단층을 형성한 후 0.25% trypsin-EDTA로 처리하여 계대 배양하였다. 계대 배양한 세포는 질소탱크에 보관하여 실험에 사용하였으며 본 실험에서는 5-8계대 배양한 세포를 실험에 사용하였다. 이 연구는 연세대학교 치과대학병원 임상시험위원회의 승인을 받았다(YDDT-2008-5).

2. *A. actinomycetemcomitans*의 배양

A. actinomycetemcomitans(ATCC43718)를 10 ml brain heart infusion(BHI)(Becton Dickinson, Sparks, MD, USA) 액체배지에 접종하여 37°C, 10% CO₂ 항온기에서 24시간 배양하였다. 배양된 세균을 1,500 × g에서 5분간 원심분리하여 균체를 모았다. 모은 균체를 PBS로 2회 세척한 후 PBS에 부유시켜 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. *A. actinomycetemcomitans*의 colony forming unit(CFU/ml)와 흡광도의 표준곡선을 기준으로 세균 수를 측정하여 실험에 사용하였다.

3. 세포독성 평가

치주인대세포를 24 well 배양기에 각 well 당 세포수가 1.5×10^5 이 되도록 분주하였다. 20시간 후 세포를 *A. actinomycetemcomitans* 또는 N-acetylcysteine(NAC) (Sigma, St. Louis, MO, USA)으로 24시간 처리한 후 MTT 방법으로 세균 또는 NAC의 세포독성능을 평가하였다. 배양이 끝나는 날 배양 상층액을 제거한 후 각 well에 새 배지와 20 μ l의 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) 시약(5 mg/ml, Sigma)을 첨가하여 MTT-formazan 결정체 형성을 유도하였다. 4시간 후 배양 상층액을 제거한 후 300 μ l의 dimethyl sulfoxide(DMSO)를 첨가하고 실온에서 5분 동안 shaking하여 형성된 결정체를 녹여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4. IL-8 생성 평가

치주인대세포를 60 mm 배양기에 세포수가 1.4×10^6 이 되도록 분주하였다. 세포가 단층을 형성한 후 일정 MOI가 되도록 세균을 접종하였다. 5시간 및 24시간 후 배양 상층액을 모아 ELISA kit(R & D systems, Minneapolis, MN, USA)를 이용하여 배양 상층액 내 IL-8의 농도를 측정하였다.

5. 활성산소종 생성 평가

60 mm 배양기에 세포수가 1.4×10^6 이 되도록 분주하였다. 세포가 단층을 형성한 후 일정 MOI가 되도록 *A. actinomycetemcomitans*로 세포를 처리하였다. 5시간 또는 24시간 후 세균으로 처리한 치주인대세포를 HBSS 완충 용액으로 일회 씻은 후 $20 \mu\text{g/ml}$ H_2DCFDA (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)로 5분간 처리하였다. 세포를 $\text{CM-H}_2\text{-DCFDA}$ 로 처리하면 $\text{CM-H}_2\text{-DCFDA}$ 가 세포 내로 들어가 세포 내 esterase에 의해 가수분해되며 가수분해된 $\text{CM-H}_2\text{-DCF}$ 는 세포 내 형성된 활성산소종에 의하여 산화되어 형광을 발하게 된다. 처리한 세포를 0.25% Trypsin-EDTA로 분리하고 HBSS 완충 용액으로 씻고 fluorescence activated cell sorter(FACS, Becton Dickinson)를 이용하여 활성산소종을 발현하는 세포를 측정하였다.

6. 통계

IL-8 생성 및 세포독성능에 대한 결과는 one-way

ANOVA 및 Tukey's test로 분석하였으며 통계적 유의성 평가를 위한 유의 수준은 0.05를 기준으로 하였다.

결과

1. *A. actinomycetemcomitans*에 의한 IL-8 생성

치주인대세포를 세균 대 세포 수, 즉 MOI 10, 100 및 500에서 24시간 처리한 후 MTT를 시행한 결과 500 MOI 이하에서 세포독성을 보이지 않았다(자료 제시하지 않음). IL-8 생성은 시간의 경과에 따라 MOI에 의존적으로 증가하여 500 MOI에서 24시간 처리한 경우 12,809 pg/ml에 달하였다(Fig. 1).

2. *A. actinomycetemcomitans*에 의한 활성산소종 생성

활성산소종의 생성은 10 MOI에서 증가하기 시작하였으며 500 MOI에서 최대 생성을 보였다(Fig. 2A). 500 MOI로 치주인대세포를 5시간 및 24시간 처리한 경우 활성산소종의 생성은 시간이 지나면서 증가하였다(Fig. 2B).

3. NAC의 *A. actinomycetemcomitans*에 의한 IL-8 생성 억제

NAC으로 치주인대세포를 30분 전 처리한 후 500 MOI가

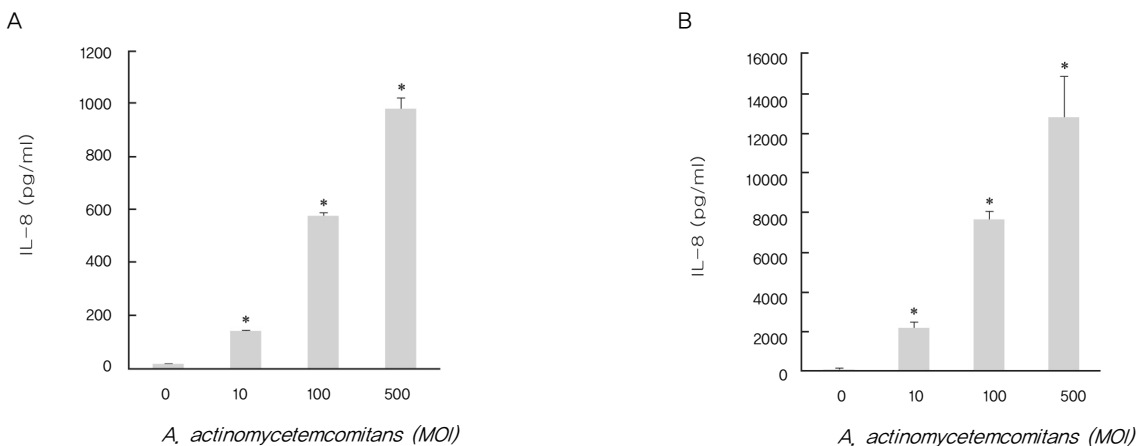


Figure 1. Induction of IL-8 production in periodontal ligament cells treated with *A. actinomycetemcomitans*. Periodontal ligament cells were treated with *A. actinomycetemcomitans* at 10, 100, and 500 MOI for 5 h(A) and 24 h (B). The concentration of IL-8 in culture supernatants was estimated by ELISA. * Significantly different from none-treated cells ($P < 0.05$).

되도록 세균으로 5시간 및 24시간 처리하여 IL-8 농도를 측정하였다(Fig. 3). 5시간 및 24시간 모두에서 NAC은 세균에 의한 IL-8 생성을 감소시켰다. NAC은 IL-8의 생성을 억제하는 농도에서 세포독성을 보이지 않았다(자료 제시하지 않음).

고찰

치주조직의 면역형광염색 및 세균배양을 통해 유년성 치주염 환자의 치주조직에 *A. actinomycetemcomitans*가 존재함을 확인할 수 있었고 전자현미경상에서도 결체조직에서 *A. actinomycetemcomitans*의 집락을 관찰할 수 있었다²²⁻²³. 이들

결과는 *A. actinomycetemcomitans*가 치주조직 내로 침투하여 치주조직 파괴에 관여할 수 있음을 시사한다. 따라서 본 연구에서는 치주인대세포를 *A. actinomycetemcomitans*로 처리하여 IL-8 생성 유도능을 평가하였다. 치주인대세포를 *A. actinomycetemcomitans*로 처리한 경우 세균의 수 및 세균과의 접촉 시간이 증가함에 따라 IL-8 생성이 증가하는 것을 관찰할 수 있었으며 이는 *A. actinomycetemcomitans*가 치주인대세포의 IL-8생성을 유도할 수 있음을 시사한다.

IL-8 발현에 NF- κ B가 관여하며²⁴ 활성산소종의 한 종류인 H₂O₂는 NF-B의 활성화를 매개한다²⁴⁻²⁵. 혈관내피세포를 제외한 세포, 즉 단핵세포, 피부 섬유아세포, 상피세포 및 일부 암세포에서 H₂O₂가 IL-8생성을 유도하는 것으로 보고되었

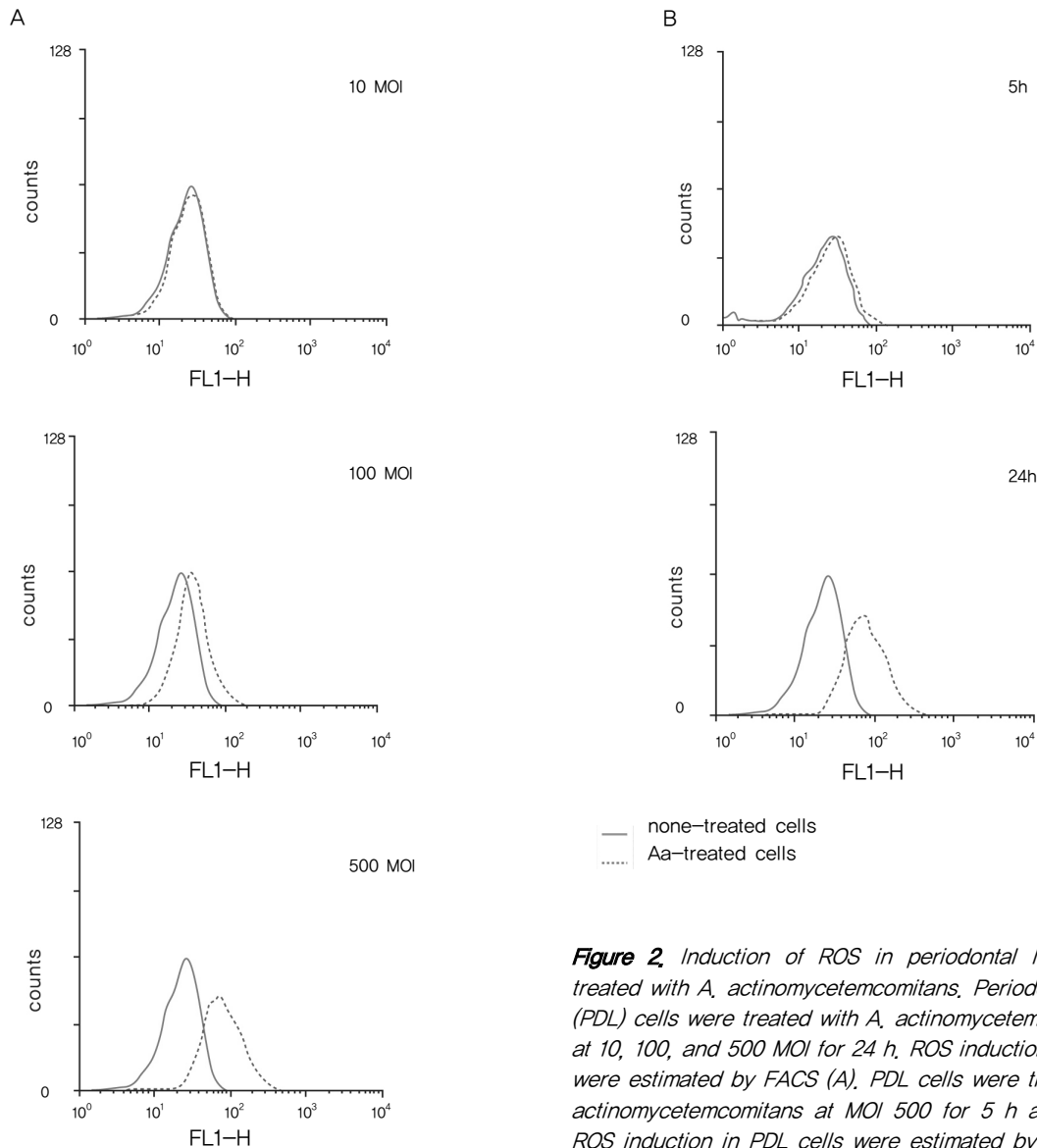


Figure 2. Induction of ROS in periodontal ligament cells treated with *A. actinomycetemcomitans*. Periodontal ligament (PDL) cells were treated with *A. actinomycetemcomitans* (Aa) at 10, 100, and 500 MOI for 24 h, ROS induction in PDL cells were estimated by FACS (A). PDL cells were treated with *A. actinomycetemcomitans* at MOI 500 for 5 h and 24 h and ROS induction in PDL cells were estimated by FACS (B).

다^{15-19,26}). 또한 본 연구팀의 이전 연구를 통해 치주인대세포에서도 H₂O₂가 IL-8 생성을 유도하며 mitogen activated protein kinases(MAPKs)가 이러한 과정에 관여함을 확인할 수 있었다²⁰). 본 연구에서 *A. actinomycetemcomitans*로 치주인대세포를 처리한 경우 세포 내 활성산소종의 생성은 세균 수 및 세균과의 접촉시간이 증가함에 따라 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. 또한 항산화제인 NAC으로 세포를 전 처리한 경우 *A. actinomycetemcomitans*에 의한 IL-8 생성이 감소하는 것을 확인하였다. 이는 치주인대세포에서 본 세균에 의한 IL-8 생성에 활성산소종이 관여할 수 있음을 시사한다.

위 상피세포 및 치은섬유아세포에서 IL-8 발현 시 세포 내 신호전달매개체로서 활성산소종의 역할이 일부 연구자들에 의해 보고되었다. O'harra 등²⁷)은 위 상피세포에서 활성산소종이 TNF에 의한 IL-8 발현을 매개하는 것으로 보고하였다. Seo 등²¹)은 위염 및 십이지장염의 주요한 원인균인 *H. pylori*에 의한 IL-8 생성에 있어서 활성산소종의 역할을 보고하였다. 위 상피세포에서 *H. pylori*는 IL-8 및 활성산소종의 생성을 유도하였으며 NAC은 *H. pylori*에 의한 IL-8 생성을 억제하였다. Kim 등²⁸)은 치은섬유아세포에서 치주염의 원인균인 *P. gingivalis* 및 *A. actinomycetemcomitans*의 lipopolysaccharide(LPS)가 IL-8와 활성산소종의 생성을 유도하며 NAC이 이들 세균의 LPS에 의한 IL-8 생성 억제함을 보고하여 활성산소종과 IL-8 발현과의 관련 가능성을 제시하였다. 치주염 동물 모델을 이용한 연구에서도 활

성산소종 제거제인 tempol 또는 NAC이 치주염의 염증 소견인 호중구의 침윤, 혈관의 투과도, 치조골 흡수를 감소시킴을 관찰하여 항산화제요법이 치주염치료의 보조법으로 유익할 수 있음이 제시되었다²⁹⁻³⁰). 이전 연구자들의 이와 같은 실험결과 및 본 연구의 실험결과는 활성산소종이 IL-8 발현의 매개체로 작용할 수 있음을 시사한다.

치주인대세포에서 보고된 IL-8 발현 유도인자로는 염증 유도 cytokine 및 일부 치주염 원인균이 있다. 염증유도 cytokine으로는 IL-1 및 tumor necrosis factor(TNF)가 치주염의 원인균으로는 *P. gingivalis*와 *P. intermedia*가 또한 *T. maltophilum*과 *T. lecithinolyticum*의 주외막단백질이 IL-8 발현을 유도하는 것으로 보고되었다^{11-12,31-32}). 이들 유도 물질 중 *T. maltophilum*과 *T. lecithinolyticum*의 주외막단백질에 의한 IL-8 생성에 NF- κ B가 관여하는 것으로 보고되었을 뿐 활성산소종의 역할은 연구되지 않았다¹²). 본 연구를 통해 *A. actinomycetemcomitans*가 치주인대세포에서 IL-8 및 활성산소종의 생성을 유도하며 항산화제인 NAC은 *A. actinomycetemcomitans*에 의한 IL-8 생성을 감소시킴을 관찰하였으며 이들 결과는 *A. actinomycetemcomitans*도 다른 치주염 관련세균들과 마찬가지로 치주인대세포의 IL-8 생성을 유도할 수 있으며 활성산소종이 *A. actinomycetemcomitans*에 의한 IL-8 생성의 세포 내 신호전달 매개체로 작용할 수 있음을 시사한다. IL-8은 호중구의 이동/활성화 및 파골세포의 분화를 매개하므로 *A. actino-*

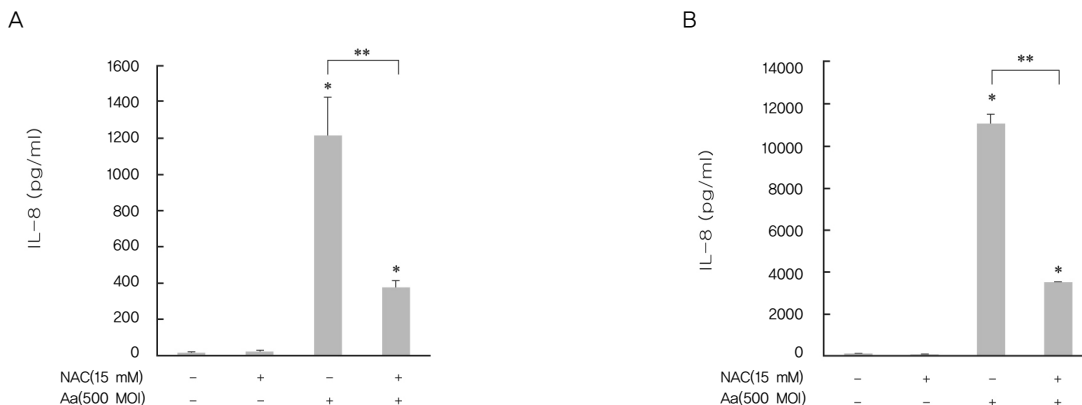


Figure 3. Effect of N-acetylcysteine on *A. actinomycetemcomitans* induced IL-8 production in periodontal ligament cells. Periodontal ligament cells were pretreated with N-acetylcysteine (NAC, 15 mM) for 30 min and then treated with *A. actinomycetemcomitans* (Aa) at 500 MOI for 5 h (A) and 24 h (B). The concentration of IL-8 in culture supernatants was determined by ELISA. * Significantly different from none-treated cells ($P < 0.05$). ** Significantly different from *A. actinomycetemcomitans*-treated cells ($P < 0.05$).

*mycetemcomitans*에 의한 IL-8발현은 치주조직 파괴의 중요한 요인으로 작용할 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Ishikawa I. Host responses in periodontal diseases: a preview. *Periodontol* 2000 2007;43:9-13.
2. Baggiolini M, Clark-Lewis I. Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. *FEBS Lett* 1992;307:97-101.
3. Tanaka S. Signaling axis in osteoclast biology and therapeutic targeting in the RANKL/RANK/OPG system. *Am J Nephrol* 2007;27:466-478.
4. Bendre MS, Montague DC, Peery T, et al. Interleukin-8 stimulation of osteoclastogenesis and bone resorption is a mechanism for the increased osteolysis of metastatic bone disease. *Bone* 2003;33:28-37.
5. Bendre MS, Margulies AG, Walser B, et al. Tumor-derived interleukin-8 stimulates osteolysis independent of the receptor activator of nuclear factor- κ B ligand pathway. *Cancer Res* 2005;65:11001-11009.
6. Tsai CC, Ho YP, Chen CC. Levels of interleukin-1 β and interleukin-8 in gingival crevicular fluids in adult periodontitis. *J Periodontol* 1995;66:852-859.
7. Gamonal J, Acevedo A, Bascones A, Jorge O, Silva A. Levels of interleukin-1 β , -8, and -10 and RANTES in gingival crevicular fluid and cell populations in adult periodontitis patients and the effect of periodontal treatment. *J Periodontol* 2000;71:1535-1545.
8. Gamonal J, Acevedo A, Bascones A, Jorge O, Silva A. Characterization of cellular infiltrate, detection of chemokine receptor CCR5 and interleukin-8 and RANTES chemokines in adult periodontitis. *J Periodontal Res* 2001;36:194-203.
9. Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. *Periodontol* 2000 2005;38:135-187.
10. Yamaji Y, Kubota T, Sasaguri K, et al. Inflammatory cytokine gene expression in human periodontal ligament fibroblasts stimulated with bacterial lipopolysaccharides. *Infect Immun* 1995;63:3576-3581.
11. Yamamoto T, Kita M, Oseko F, et al. Cytokine production in human periodontal ligament cells stimulated with *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontal Res* 2006;41:554-559.
12. Lee SH, Kim KK, Choi BK. Upregulation of intercellular adhesion molecule 1 and proinflammatory cytokines by the major surface proteins of *Treponema maltophilum* and *Treponema lecithinolyticum*, the phylogenetic group IV oral spirochetes associated with periodontitis and endodontic infections. *Infect Immun* 2005;73:268-276.
13. Patil C, Rossa C, Jr., Kirkwood KL. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* lipopolysaccharide induces interleukin-6 expression through multiple mitogen-activated protein kinase pathways in periodontal ligament fibroblasts. *Oral Microbiol Immunol* 2006;21:392-398.
14. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002;82:47-95.
15. Lakshminarayanan V, Beno DW, Costa RH, Roebuck KA. Differential regulation of interleukin-8 and intercellular adhesion molecule-1 by H₂O₂ and tumor necrosis factor- α in endothelial and epithelial cells. *J Biol Chem* 1997;272:32910-32918.
16. Verhasselt V, Goldman M, Willems F. Oxidative stress up-regulates IL-8 and TNF- α synthesis by human dendritic cells. *Eur J Immunol* 1998;28:3886-3890.
17. Josse C, Boelaert JR, Best-Belpomme M, Piette J. Importance of post-transcriptional regulation of chemokine genes by oxidative stress. *Biochem J* 2001;360:321-333.
18. Hwang YS, Jeong M, Park JS, et al. Interleukin-1 α stimulates IL-8 expression through MAP kinase and ROS signaling in human gastric carcinoma cells. *Oncogene* 2004;23:6603-6611.
19. Pelaia G, Cuda G, Vatrella A, et al. Effects of hydrogen peroxide on MAPK activation, IL-8 production and cell viability in primary cultures of human bronchial epithelial cells. *J Cell Biochem* 2004;93:142-152.
20. Lee YS, Bak EJ, Kim M, et al. Induction of IL-8 in periodontal ligament cells by H₂O₂. *J Microbiol* 2008;46:579-584.
21. Seo JY, Kim H, Kim KH. Transcriptional regulation by thiol compounds in *Helicobacter pylori*-induced interleukin-8 production in human gastric epithelial cells. *Ann N Y Acad Sci* 2002;973:541-545.
22. Christersson LA, Albin B, Zambon JJ, Wikesjo UM, Genco RJ. Tissue localization of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontitis. I. Light, immunofluorescence and electron microscopic studies. *J Periodontol*

- 1987;58:529-539.
23. Christersson LA, Wikesjo UM, Albin B, Zambon JJ, Genco RJ. Tissue localization of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontitis. II. Correlation between immunofluorescence and culture techniques. *J Periodontol* 1987;58:540-545.
 24. Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor- κ B: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* 1997;336:1066-1071.
 25. Meyer M, Schreck R, Baeuerle PA. H₂O₂ and antioxidants have opposite effects on activation of NF- κ B and AP-1 in intact cells: AP-1 as secondary antioxidant-responsive factor. *Embo J* 1993;12:2005-2015.
 26. DeForge LE, Preston AM, Takeuchi E, et al. Regulation of interleukin 8 gene expression by oxidant stress. *J Biol Chem* 1993;268:25568-25576.
 27. O'Hara AM, Bhattacharyya A, Bai J, et al. Tumor necrosis factor (TNF)- α -induced IL-8 expression in gastric epithelial cells: role of reactive oxygen species and AP endonuclease-1/redox factor (Ref)-1. *Cytokine* 2009;46:359-369.
 28. Kim do Y, Jun JH, Lee HL, et al. N-acetylcysteine prevents LPS-induced pro-inflammatory cytokines and MMP2 production in gingival fibroblasts. *Arch Pharm Res* 2007;30:1283-1292.
 29. Di Paola R, Mazzon E, Zito D, et al. Effects of Tempol, a membrane-permeable radical scavenger, in a rodent model periodontitis. *J Clin Periodontol* 2005;32:1062-1068.
 30. Toker H, Ozdemir H, Eren K, Ozer H, Sahin G. N-acetylcysteine, a thiol antioxidant, decreases alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. *J Periodontol* 2009;80:672-678.
 31. Long P, Hu J, Piesco N, Buckley M, Agarwal S. Low magnitude of tensile strain inhibits IL-1 β -dependent induction of pro-inflammatory cytokines and induces synthesis of IL-10 in human periodontal ligament cells in vitro. *J Dent Res* 2001;80:1416-1420.
 32. Lee HJ, Cho JW, Kim SC, et al. Roles of p38 and ERK MAP kinases in IL-8 expression in TNF- α - and dexamethasone-stimulated human periodontal ligament cells. *Cytokine* 2006;35:67-76.