

## *Treponema lecithinolyticum* lipopolysaccharide에 의한 matrix metalloproteinase-9의 발현

남정아<sup>1</sup> · 문선영<sup>1</sup> · 이진욱<sup>1</sup> · 차정연<sup>1</sup> · 최봉규<sup>2</sup> · 유윤정<sup>1</sup>

<sup>1</sup>연세대학교 치과대학 구강생물학교실

<sup>2</sup>서울대학교 구강악안면 감염 면역학

### I. 서론

골흡수는 파골세포에 의하여 야기되며 골 흡수 단계는 1) 혈관으로부터 파골세포 전구세포의 이동 및 2) 이동한 파골세포 전구세포로부터 파골세포의 분화의 두 단계로 나눌 수 있다. 파골세포 전구세포의 이동에 있어서 화학주성인자와 혈관내피세포 주변의 basal lamina 및 세포외 기질을 분해하는 단백분해효소(Matrix metalloproteinases, MMPs)가 중요한 역할을 한다. Matrix metalloproteinases는 구조 및 기질의 특이성에 따라 collagenase, gelatinase, stromelysin 및 membrane type MMPs로 분류된다<sup>1)</sup>. MMPs는 불활성화 형태(latent form)로 생성되며 단백분해효소 또는 이전에 활성화된 MMPs가 불활성화 형태의 MMPs의 활성화 과정에 관여한다. Collagenase(MMP-1, -8 및 -13)는 type I collagen을 분해하며 gelatinase(MMP-2 및 -9)는 type IV collagen 및 type V collagen을 분해한다. 골흡수에 있어서 MMPs의 역할로는 파골세포의 골표면 부착<sup>2,3)</sup>, 파골세포 전구

세포 및 파골세포의 이동(migration)<sup>4,5)</sup> 및 골흡수 유도인자의 활성화<sup>1)</sup>가 있다. 파골세포가 골표면에 부착을 해야 골흡수가 시작되며 이러한 과정에서 조골세포로부터 생성되는 MMP-13이 중요하다. 정확한 기전은 아직 밝혀져 있지 않으나 MMP-13이 골기질 단백을 분해해야 파골세포가 골표면에 부착하여 골흡수가 시작되는 것으로 보고되었다<sup>3)</sup>. MMP-9은 파골세포 전구세포와 파골세포의 이동에 관여하며 파골세포분화를 유도하는 cytokine의 활성화 과정에도 관여하는 것으로 보고되었다<sup>4,5,6)</sup>.

화학주성인자는 cystein의 위치에 따라 CXC, CC, C 및 CX3C로 분류된다<sup>7)</sup>. Stromal cell-derived factor(SDF)-1은 CXC에 속하며 파골세포 전구세포의 화학주성인자이다<sup>5)</sup>. SDF-1은 골 조직에서 조골세포와 혈관내피세포에서 발현되며<sup>8)</sup>, SDF-1의 수용체인 CXCR4는 파골세포 전구세포에 존재한다<sup>5)</sup>.

파골세포(osteoclast)는 골수세포로부터 유래되며 증식, 분화 및 융합과정을 거쳐 분화된 tartrate-resistant acid phosphatase(TRAP) 양성 다핵세포이다<sup>9)</sup>. Receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand

\*본 연구는 한국과학재단 목적기초연구(R04-2002-000-00119-0)지원으로 수행되었음

교신저자 : 유윤정, 서울시 서대문구 신촌동 134 연세대학교 치과대학 구강생물학교실(yu618@yumc.yonsei.ac.kr)

(RANKL)는 조골세포가 발현하는 cytokine이며 RANKL은 파골세포 전구세포의 RANK에 결합하여 파골세포의 분화를 유도한다<sup>10)</sup>. 파골세포분화를 유도하는 인자들로는 interleukin-1(IL-1), tumor necrosis factor(TNF) 및 1 $\alpha$ ,25 dihydroxy-vitamin D<sub>3</sub>(1 $\alpha$ , 25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) 등이 있으며 이들은 조골세포에서 RANKL의 발현을 증가시킨다<sup>10)</sup>.

치주염(periodontitis)은 치태내 세균에 의한 염증성 질환으로 치아 지지조직인 치조골 흡수가 일어나 치아상실의 주된 원인이 되고 있다<sup>11)</sup>. 치주염 환자의 치주낭 치태, 즉 치은연하치태를 현미경으로 관찰할 때 나선형의 구강스피로헤타(spirochete)가 치주낭 세균총의 50% 이상을 차지하며, 스피로헤타의 증가는 건강한 치주조직에서 치주염이 발생할 때 나타나는 중요한 변화로 간주된다<sup>12)</sup>. 구강내 스피로헤타는 *Treponema* 종에 속하며 따라서 치주염 병인에 있어서 *Treponema*의 중요성이 강조되었다. 최근에 치태세균으로부터 16S ribosomal RNA(rRNA) 유전자은행을 제조하여 분석한 결과 한 치주염환자로부터 지금까지 배양이 되지 않았던 19종의 새로운 구강 *Treponema* 종이 있음을 확인하였다<sup>13)</sup>. 또한 급속진행성 치주염환자를 대상으로 한 분자적 역학연구에서 *T. denticola*를 포함한 기존 배양된 *Treponema* 균종보다 새로 배양된 균주인 *T. lecithinolyticum*의 분포도가 훨씬 높다는 연구결과가 발표되었으며<sup>14)</sup>. 한국인 성인성 치주염 환자에서도 *T. lecithinolyticum* 균주가 *T. denticola*보다 훨씬 더 많이 검출되는 결과를 얻었다<sup>15)</sup>. 이러한 역학조사 결과는 *T. lecithinolyticum*이 치주염과 밀접한 관련이 있을 가능성을 시사한다. *T. lecithinolyticum*의 병원성에 대한 연구는 초기단계로서 이 세균의 외막성분이 MMP-2를 활성화시키며<sup>16)</sup>, 외막단백질이 intercellular adhesion molecule-1(ICAM-1), IL-6 및 IL-8의 발현을 증가시켜 염증반응의 유도에 관여하는 것으로 보고되었다<sup>17)</sup>. 골흡수에 있어서는 본 세균의 균분쇄액이 파골세포형성을 유도할 수 있음이 보고되었을 뿐<sup>18)</sup>, 어떤 성분이 어떤 기전에 의하여 골

흡수를 유도하는지 골흡수 유도기작이 명확히 규명되어 있지 않다.

따라서 본 연구에서는 *T. lecithinolyticum*로부터 LPS를 분리한 후 *T. lecithinolyticum* LPS가 골조직세포에서 MMP-9 및 SDF-1의 발현에 미치는 영향을 평가하여 이 세균에 의한 치조골 파괴기전을 규명하고자 하였다.

## II. 실험재료 및 방법

### 1. 실험재료

*T. lecithinolyticum*은 ATCC(700332)에서 분양 받았으며 마우스 두개골세포 및 골수세포는 ICR 마우스(Bio Korea Co. Seoul, Korea)로 부터 분리하여 사용하였다. 우태아혈청(fetal bovine serum) 및  $\alpha$ -minimal essential medium( $\alpha$ -MEM)은 GIBCO BRL(Grand Island, NY, USA)에서, LPS Extraction Kit는 Intron Biotechnology (Sungnam, Korea)에서, Sliver staining kit는 Amersham Pharmacia (Uppsala, Sweden)에서 구입하여 사용하였다. Trizol은 Life Technologies (Grand Island, NY)에서 구입하였다. MMP-9 ELISA kit는 R&D systems(Minneapolis, MN, USA)에서 구입하였다.

### 2. 연구방법

#### 1) *T. lecithinolyticum*의 배양 및 LPS 분리

*T. lecithinolyticum*을 OMIZ-Pat 액체배지<sup>19)</sup>에서 5일간 혐기적으로 배양하였다. 배양액을 원심 분리하여 균체를 모은 후 LPS 분리 kit(Intron Biotechnology, Sungnam, Korea)를 이용하여 LPS를 분리하였다. 먼저 균체를 1 ml lysis buffer에 부유시킨 후 200  $\mu$ l chloroform을 첨가하여 20 초간 혼합하였다. 실온에서 5분간 반응시킨 후 12000  $\times$  g, 4°C에서 10분간 원심분리하여 상층액을 모았다. 상층액에 800  $\mu$ l purification buffer

를 첨가하여 혼합한 후  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 10분간 방치하였다.  $12000 \times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 15분간 원심분리하여 모은 침전물을 1 ml 70% ethanol로 세척하고 실온에서 건조시켰다. 모아진 LPS 침전물을 70  $\mu\text{l}$ 의 10mM Tris-HCl buffer(pH 8.0)에 녹여 1분 동안 끓인 후 동결건조하여 실험에 사용하였다. SDS-PAGE를 수행하여 silver 염색법(Amersham Pharmacia, Uppsala, Sweden) 및 Coomassie Brilliant blue 염색법(Bio-Red, Hercules, CA, USA)으로 LPS의 크기 및 단백질의 존재 여부를 확인하였다.

## 2) 마우스 두개골 세포 및 골수세포의 배양

마우스 두개골로부터 조골세포를 다음과 같이 분리하였다<sup>18)</sup>. 태생 1-2 일 경과한 ICR 마우스를 희생시킨 후 두개골을 무균적으로 적출하였다. 10개의 마우스 두개골을 10 ml의 0.2% collagenase(Wako pure chemicals, Osaka, Japan) 및 0.1% dispase(GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA)를 함유한  $\alpha$ -MEM배지에 부유시킨 후  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 20분간 교반하여 두개골로부터 조골세포를 모았다. 이 과정을 총 5회 반복하였으며 2-5회 반복하여 얻어진 세포부유액을  $2000 \times g$ 에서 5 분간 원심 분리하여 조골세포를 분리하였다. 분리한 세포를 10 cm 평판세포배양기에  $2 \times 10^6$  개가 되도록 분주하여 10% FBS를 함유한  $\alpha$ -MEM배지에서 2일간 배양한 후 실험에 이용하였다.

ICR 마우스(5-8주)의 경골과 대퇴골로부터 연조직을 제거한 후 골말단 부위를 절단하였다. 주사바늘(25 gauge)로  $\alpha$ -MEM 배지를 골수강내로 주입하여 골수세포를 뽑아 낸 후  $2000 \times g$ 에서 5분간 원심분리하였다. 상층액을 제거한 후 10 ml의 적혈구용해액(10 mM HCl, 0.83% ammonium chloride)을 첨가하여 5분간 반응시켜 골수세포로부터 적혈구를 제거하여 실험에 바로 사용하였다.

*T. lecithinolyticum* LPS의 MMP-9 및 SDF-1 유도능은 조골세포 및 파골세포 전구세포를 같이 배양하는 혼합배양법을 이용하여 평가하였다. 마우스 두개골세포 및 파골세포 전구세포가 존재하는 골수세

포를 10% FBS를 함유한  $\alpha$ -MEM배지 400  $\mu\text{l}$ 당 세포수가 각각  $1 \times 10^4$  개 및  $1 \times 10^5$  개가 되도록 부유한 후 48 well 세포배양기의 각 well당 400  $\mu\text{l}$ 씩 분주하여 3일간 배양하였다. 3일 후 배지를 제거하고 *T. lecithinolyticum* LPS, PGE<sub>2</sub>(SIGMA, St. Louis, MO, USA) 또는 PGE<sub>2</sub> 생성억제제인 NS398(SIGMA, St. Louis, MO, USA)을 함유한 배양배지를 첨가하여 72시간 동안 배양한 후 역전사중합효소연쇄반응법(reverse transcriptase-polymerase chain reaction, RT-PCR) 또는 효소면역측정법(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)을 이용하여 MMP-9, SDF-1, IL-1 $\beta$  및 TNF- $\alpha$ 의 발현 정도를 평가하였다.

## 3) 역전사중합효소연쇄반응법

Trizol용액을 사용하여 *T. lecithinolyticum* LPS, PGE<sub>2</sub> 또는 NS398로 처리한 세포로부터 RNA를 분리하여 중합효소연쇄반응법으로 MMP-9, SDF-1, IL-1 $\beta$  및 TNF- $\alpha$  mRNA의 발현을 평가하였다. 분리한 RNA(1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )를 주형(template)으로 RT kit(Bioneer, Daejeon, Korea)를 사용하여 cDNA를 합성하였다. cDNA(4  $\mu\text{l}$ )는  $1 \times$  PCR buffer, 200  $\mu\text{M}$  deoxynucleoside triphosphate, 200  $\mu\text{M}$  forward primer, 200  $\mu\text{M}$  reverse primer 및 1 U Taq DNA polymerase(Bioneer, Daejeon, Korea)를 함유한 50  $\mu\text{l}$  반응용액에서 DNA thermal cycler(Biometra, Göttingen, Germany)를 사용하여 증폭시켰다. 총 30회 증폭시켰으며 실험에 사용한 primer 및 annealing temperature는 Table 1과 같다. PCR로 증폭한 DNA는 1% agarose gel에서 전기연동한 후 ethidium bromide 염색을 하여 확인하였다.

## 4) MMP-9 농도 측정

*T. lecithinolyticum* LPS, PGE<sub>2</sub> 또는 NS398로 처리한 세포의 배양상청액내 MMP-9의 농도를 MMP-9 항체를 이용한 ELISA kit를 이용하여 측정하였다.

Table 1. The primer sequence of MMP-9, SDF-1, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and  $\beta$ -actin

Primers		sequences	Annealing temperature(°C)	Product size (bp)
MMP-9	forward	5'-CTGTCCAGACCAAGGGTACAGCCT-3'	60	263
	reverse	5'-GTGGTATAGTGGGACACATAGTGG-3'		
SDF-1	forward	5'-CTGCATCAGTGACGGTAAACC-3'	60	142
	reverse	5'-CAGCCGTGCAACAATCTGAAG-3'		
IL-1 $\beta$	forward	5'-ATGGCAACTGTTTCCTGAACTCAAGT-3'	50	563
	reverse	5'-CAGGACAGGTATAGATCTTTCCTTT-3'		
TNF- $\alpha$	forward	5'-TTCTGTCTACTGAACTTCGGGGTGATCGGTCC-3'	60	468
	reverse	5'-GTATGAGATAGCAAATCGGCTGACGGTGTGGG-3'		
$\beta$ -actin	forward	5'-GGACTCCTATGGTGGGTGACGAGG-3'	64	366
	reverse	5'-GGGAGAGCATAGCCCTCGTAGAT-3'		

### III. 결과

#### 1. *T. lecithinolyticum*의 LPS 분리

*T. lecithinolyticum*으로부터 분리한 LPS를 SDS-PAGE로 전기영동한 후 silver 염색을 하여 *T. lecithinolyticum* LPS의 band 형태를 *E. coli* LPS의 band와 비교하였다(Figure 1). *E. coli* LPS에서는 14.4 kDa 이하에서 주 band가 나타났

으며 사다리 모양(ladder form)의 band 형태를 보였다. *T. lecithinolyticum*의 LPS에서는 14.4 kDa과 21.5 kDa사이 및 21.5 kDa과 31 kDa 사이에 band가 나타났으며 사다리 모양의 band 형태는 보이지 않았다. *T. lecithinolyticum* LPS를 SDS-PAGE로 전기영동한 후 Coomassie Brilliant blue로 염색하여 분리한 LPS에 단백질이 없음을 확인하였다.

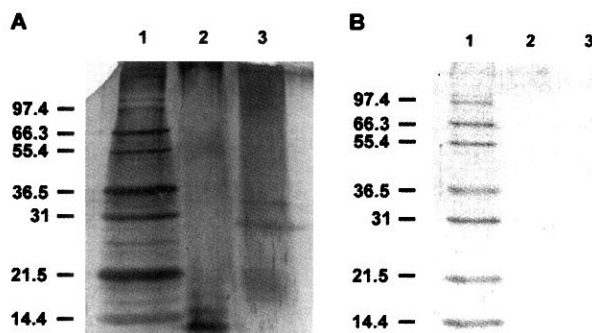


Figure 1. SDS-PAGE of LPS from *T. lecithinolyticum*. Lane 1, protein standards; Lane 2, LPS of *E. coli*; Lane 3, LPS of *T. lecithinolyticum*. The 14% polyacrylamide gel was stained using the silver staining kit (A) and Coomassie Brilliant blue (B).

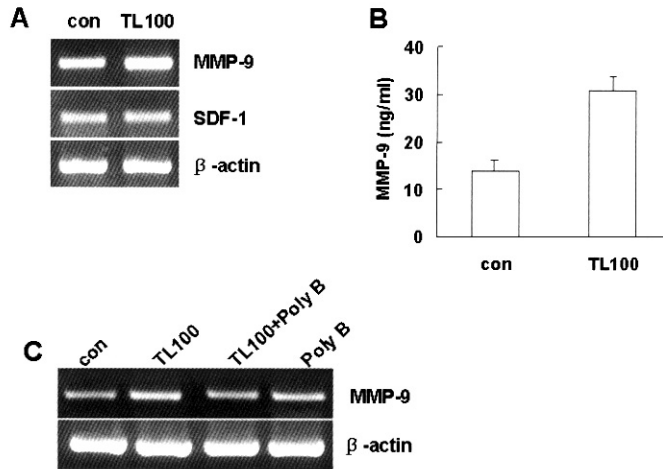


Figure 2. Effect of LPS from *T. lecithinolyticum* on MMP-9 and SDF-1 expression in coculture of mouse bone marrow cells and calvaria-derived osteoblasts. Mouse bone marrow cells and calvaria-derived osteoblasts were cocultured to confluence and treated with *T. lecithinolyticum* LPS(100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) or polymyxin B(40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) for additional 3 days. The RNA was isolated from the cultured cells and the levels of MMP-9, SDF-1, and  $\beta$ -actin mRNA were analyzed by RT-PCR (A, C). Representative result of three experiments that yielded similar results is shown. The concentration of MMP-9 was determined by ELISA Kit(C). The data are the means  $\pm$  standard errors for three experiments.

## 2. *T. lecithinolyticum* LPS에 의한 MMP-9 및 SDF-1의 발현

*T. lecithinolyticum* LPS에 의한 MMP-9 및 SDF-1 발현을 평가하기 위하여 조골세포 및 골수세포를 *T. lecithinolyticum* LPS(100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )를 함유한 배지에서 3일간 배양한 후 MMP-9 및 SDF-1의 발현을 RT-PCR 방법으로 평가하였다(Figure 2A). LPS로 처리하지 않은 세포에서 MMP-9 및 SDF-1 mRNA가 발현되어 있었으며 *T. lecithinolyticum* LPS는 MMP-9 mRNA의 발현을 증가시켰으나 SDF-1 mRNA의 발현에는 영향을 미치지 않았다. LPS로 처리한 세포의 배양상청액내 MMP-9의 농도를 ELISA 방법으로 측정한 결과 처리하지 않은 경우와 비교하여 두배 정도 증가함을

확인할 수 있었다(Figure 2B). LPS와 LPS의 억제제인 polymyxin B를 동시에 처리한 경우 LPS 단독으로 처리한 경우보다 MMP-9 mRNA의 발현이 저하되었다(Figure 2C).

## 3. *T. lecithinolyticum* LPS에 의한 MMP-9 발현에 PGE<sub>2</sub> 관련성

IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  및 PGE<sub>2</sub>가 *T. lecithinolyticum* LPS에 의한 MMP-9발현에 관여하는지 평가하였다. 조골세포와 골수세포를 LPS로 3일간 처리한 후 IL-1 $\beta$  및 TNF- $\alpha$  mRNA의 발현을 RT-PCR로 평가하였다(Figure 3). LPS는 조골세포 및 골수세포에서 IL-1 $\beta$  및 TNF- $\alpha$  mRNA 발현은 증가시키지 않았다. PGE<sub>2</sub>(10<sup>-7</sup>, 10<sup>-6</sup> 및 10<sup>-5</sup> M)로

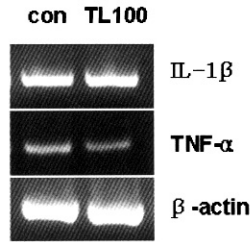


Figure 3. Effect of *T. lecithinolyticum* LPS on induction of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  mRNA in coculture of mouse bone marrow cells and calvaria-derived osteoblasts. Mouse bone marrow cells and calvaria-derived osteoblasts were cocultured to confluence and treated with *T. lecithinolyticum* LPS(100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) for additional 3 days. The RNA was isolated from the cultured cells and the levels of each cytokine and  $\beta$ -actin mRNA were analyzed by RT-PCR. Representative result of two experiments that yielded similar results is shown.

조골세포 및 골수세포를 3일간 처리한 후 MMP-9의 발현을 RT-PCR 및 ELISA로 평가하였다 (Figure 4A, B). PGE<sub>2</sub>는 10<sup>-7</sup>M 이상에서 MMP-9의 발현을 증가시켰다. LPS와 PGE<sub>2</sub> 생성억제인자인 NS398로 조골세포 및 골수세포를 3일간 처리

한 후 MMP-9의 발현을 평가하였다(Figure 4C). LPS와 NS398를 동시에 처리한 경우 LPS 단독으로 처리한 경우보다 배양상청액내 MMP-9의 농도가 저하되었다.

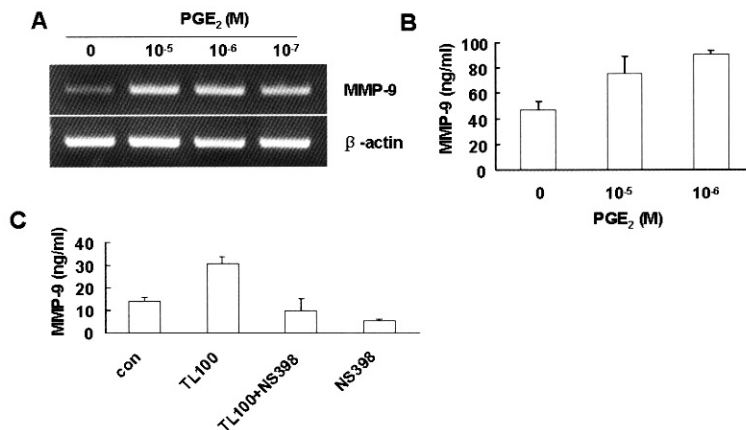


Figure 4. Involvement of PGE<sub>2</sub> in MMP-9 expression in coculture of mouse bone marrow cells and calvaria-derived osteoblasts induced by *T. lecithinolyticum* LPS. Mouse bone marrow cells and calvaria-derived osteoblasts were cocultured to confluence and treated with PGE<sub>2</sub>(10<sup>-7</sup>, 10<sup>-6</sup>, and 10<sup>-5</sup> M) (A, B) or in combination with *T. lecithinolyticum* LPS(100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) and NS398 (1  $\mu\text{M}$ ) for additional 3 days (C). The RNA was isolated from the cultured cells, and the level of MMP-9 and  $\beta$ -actin mRNA were analyzed by RT-PCR. Representative result of three experiments that yielded similar results is shown. The concentration of MMP-9 was determined by ELISA Kit. The data are the means  $\pm$  standard errors for three experiments.

#### IV. 고안

*T. lecithinolyticum* LPS는 조골세포 및 파골세포 전구세포를 함유한 골수세포의 혼합배양에서 MMP-9의 발현을 증가시켰으며 SDF-1의 발현은 증가시키지 않았다. MMP-9은 골흡수과정에서 중요한 역할을 담당한다. 파골세포 전구세포의 화학주성 인자인 SDF-1는 파골세포 전구세포의 MMP-9의 발현 뿐 만 아니라 collagen이 도포된 transwell을 통한 이동을 증가시켰으며 MMPs 억제제가 SDF-1에 의한 파골세포 전구세포의 이동을 저하시켜 MMP-9이 파골세포 전구세포 이동에 관여할 수 있음이 제시되었다<sup>5)</sup>. MMP-9은 파골세포 전구세포 뿐 만 아니라 성숙한 파골세포에서도 발현된다<sup>20)</sup>. MMP-9 결핍 마우스에서 파골세포의 이동이 저하되었으며 MMP-9이 골기질로부터 파골세포의 화학주성인자(chemotactic factor)인 vascular endothelial growth factor(VEGF)를 유리시켜 MMP-9이 성숙한 파골세포의 이동에도 중요한 것으로 보고되었다<sup>21)</sup>. 골흡수유도인자인 IL-1 $\beta$ 는 불활성화 형태로 생성되며 단백질분해효소에 의한 활성화과정이 필요하다. 일반적으로 불활성화형태의 IL-1 $\beta$ 는 IL-1 $\beta$ -converting enzyme에 의하여 활성화되나 converting enzyme 이외에 MMP-9도 IL-1 $\beta$ 의 활성화를 유도할 수 있음이 보고되었다<sup>1,6)</sup>. 이들 결과는 MMP-9이 파골세포 전구세포와 파골세포의 이동 및 IL-1 $\beta$ 의 활성화에 관여하여 골흡수에서 중요한 역할을 할 수 있음을 시사한다. 본 연구에서 *T. lecithinolyticum* LPS는 골조직세포에서 MMP-9 발현을 증가시켰다. 이는 *T. lecithinolyticum* LPS가 MMP-9의 발현을 증가시켜 파골세포 전구세포/파골세포의 이동에 관여할 수 있음을 시사한다. 또한 치조골흡수가 야기된 치주염 환자에서 치은 열구액내 IL-1 $\beta$ 의 농도가 증가하므로<sup>22)</sup> *T. lecithinolyticum* LPS에 의한 MMP-9 발현 증가가 IL-1 $\beta$ 의 활성화를 촉진시켜 치주염시 야기되는 치조골 파괴를 촉진시킬 수 있을 것으로 사료된다. 본 연구에서는 골조직세포에서 *T. lecithinolyticum* LPS의

MMP-9 유도능을 평가하기 위하여 조골세포 및 파골세포 전구세포가 존재하는 혼합배양을 이용하였다. MMP-9은 파골세포 전구세포 뿐 만 아니라<sup>5)</sup> 조골세포에서도 생성될 수 있으므로<sup>23)</sup> *T. lecithinolyticum* LPS가 어떤 세포에서 MMP-9의 발현을 유도하는지 이에 대한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

MMP-9의 생성은 cytokine에 의하여 조절된다. IL-1 $\beta$  및 TNF- $\alpha$ 는 조골세포에서 MMP-9의 발현을 증가시켰으며<sup>23)</sup> SDF-1은 파골세포 전구세포에서 MMP-9의 발현을 증가시켰다<sup>5)</sup>. 이들 cytokine들의 관련성을 확인하기 위하여 조골세포 및 골수세포를 *T. lecithinolyticum* LPS로 처리하였으나 이들 cytokine의 증가를 관찰할 수 없었다. Cytokine 이외에 PGE<sub>2</sub>가 간세포(hepatocyte)에서 MMP-9의 발현을 증가시킨다는<sup>24)</sup> 보고가 있었으며 본 연구에서도 PGE<sub>2</sub>가 MMP-9의 발현을 증가시키는 것을 확인할 수 있었다. PGE<sub>2</sub>는 cyclooxygenase (COX)-2를 통해 arachidonic acid로부터 생성된다. NS398은 COX-2 억제제로서 PGE<sub>2</sub>의 생성을 억제한다. 조골세포 및 골수세포의 혼합배양시 세포배양배지에 *T. lecithinolyticum* LPS와 NS398을 동시에 첨가한 경우 *T. lecithinolyticum* LPS에 의한 MMP-9의 생성이 억제되었으며 이는 *T. lecithinolyticum* LPS에 의한 MMP-9의 발현에 PGE<sub>2</sub>가 관여함을 시사한다.

*E. coli* LPS는 0.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서 MMP-9의 발현을 증가시켰다<sup>26)</sup>. 본 연구에서 *T. lecithinolyticum* LPS는 MMP-9의 발현을 증가시켰으나 *E. coli* 보다 높은 농도(100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )에서 MMP-9의 발현을 증가시켰다. 이는 *T. lecithinolyticum* LPS 및 *E. coli* LPS 모두 MMP-9발현을 유도할 수 있으나 유도능에는 차이가 있을 가능성을 시사한다. 임상실험에서 치주염에 걸린 환자의 치주조직 및 치은 열구액내 MMP-9의 농도를 건강한 치주조직을 지닌 사람과 비교한 결과 치주염에 걸린 경우 치주조직 및 치은 열구액내 MMP-9의 농도가 높음을 확인하였다<sup>27)</sup>. 또한 PGE<sub>2</sub>에 대한 임상연구에서

도 치은 열구액내 PGE<sub>2</sub>의 농도가 치주염 환자에서 더 높게 나타나는 것으로 보고되었다<sup>28)</sup>. 본 연구를 통해 골조직세포에서 *T. lecithinolyticum* LPS가 PGE<sub>2</sub>를 매개로 MMP-9의 발현을 증가시킴을 규명하였다. 이와 같은 연구결과는 치주염시 야기되는 MMP-9 발현 증가에 *T. lecithinolyticum* LPS가 관여하여 파골세포 전구세포/파골세포 이동 및 파골세포 형성유도인자의 활성화를 촉진시켜 치주염시 야기되는 치조골파괴에 관여할 수 있음을 시사한다.

## V. 결론 및 요약

골 흡수는 혈관으로부터 파골세포 전구세포의 이동과 골 표면에서 파골세포의 형성과정의 두 단계를 거쳐 유도된다. 파골세포 전구세포의 화학주성인자인 SDF-1 및 세포외기질을 분해하는 MMP-9은 파골세포 전구세포의 이동시 중요한 역할을 한다. 치주염은 치태세균에 의하여 치아지지조직인 치조골이 파괴되는 염증성질환으로 치아상실의 주된 원인이다. 치주염환자의 치태내 분포도가 높은 것으로 보고되 치주염에 있어서 중요성이 제시된 *T. lecithinolyticum*은 배양이 까다로워 다른 치주염관련세균에 비해 독성인자에 대한 연구가 더디게 진행되어 왔으며 본 세균의 LPS에 의한 골흡수기전은 밝혀져 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 *T. lecithinolyticum*으로부터 LPS를 분리하여 LPS가 골조직세포의 MMP-9 및 SDF-1의 발현에 미치는 영향을 평가하였다.

1. *T. lecithinolyticum* LPS는 *E. coli* LPS와는 band pattern의 양상이 다르게 나타났다.
2. *T. lecithinolyticum* LPS는 MMP-9의 발현을 증가시켰으나 SDF-1의 발현에는 영향을 미치지 않았다.
3. PGE<sub>2</sub>는 MMP-9의 발현을 증가시켰으며 PGE<sub>2</sub> 생성 억제인자인 NS398은 *T. lecithinolyticum* LPS에 의한 MMP-9 발현을 억제하였다.

이들 결과는 *T. lecithinolyticum* LPS가 PGE<sub>2</sub>를 매개로 골흡수유도물질의 활성화 및 파골세포 전구세포의 이동에 관여하는 MMP-9의 발현을 증가시킴으로써 치주염시 야기되는 치조골파괴에 관여할 수 있음을 시사한다.

## VI. 참고문헌

1. McCawley LJ and Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore. *Curr Opin Cell Biol* 2001;13:534-540.
2. Chambers TJ, Darby JA, Fuller K. Mammalian collagenase predisposes bone surfaces to osteoclastic resorption. *Cell Tissue Res* 1985;241:671-675.
3. Uchida M, Shima M, Chikazu D et al. Transcriptional induction of matrix metalloproteinase-13(collagenase) by 1  $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in mouse osteoblastic MC3T3-E1 cells. *J Bone Miner Res* 2001;16:221-230.
4. Sato T, Foged NT, Delaissé JM. The migration of purified osteoclasts through collagen is inhibited by matrix metalloproteinase inhibitors. *J Bone Miner Res* 1998;13:59-66.
5. Yu X, Huang Y, Collin-Osdoby P, Osdoby P. Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) recruits osteoclast precursors by inducing chemotaxis, matrix metalloproteinase-9(MMP-9) activity, and collagen transmigration. *J Bone Miner Res* 2003;18:1404-1418.
6. Schönbeck U, Mach F, Libby P. Generation of Biologically active IL-1 $\beta$  by matrix metalloproteinases: A novel Caspase-1-independent pathway of IL-1 $\beta$



- processing. J Immunol 1998;161:3340-3346.
7. Bendall L. Chemokines and their receptors in disease. Histol and Histopathol 2005;20:907-926.
  8. Ponomaryov T, Peled A, Petit I et al. Induction of the chemokine stromal-derived factor-1 following DNA damage improves human stem cell function. J Clin Invest 2000;106:1331-1339.
  9. Takahashi N, Udagawa N, Suda T. A new member of tumor necrosis factor ligand family, ODF/OPGL/TRANCE/RANKL, regulates osteoclast differentiation and function. Biochem Biophys Res Commun 1999;256:449-455.
  10. Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR et al. The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. J Bone and Miner Res. 2000;15:2-12.
  11. Schwartz Z, Goultschin J, Dean DD, Boyan BD. Mechanisms of alveolar bone destruction in periodontitis. Periodontol 2000 1997;14:158-172.
  12. Loesche WJ. The role of spirochetes in periodontal disease. Adv Dent Res. 1988;2:275-283.
  13. Choi BK, Paster BJ, Dewhirst FE, Göbel UB. Diversity of cultivable and uncultivable oral spirochetes from a patient with severe destructive periodontitis. Infect Immun 1994;62:1889-1895.
  14. Moter A, Hoenig C, Choi BK, Riep B, Göbel UB. Molecular epidemiology of oral treponemes associated with periodontal disease. J Clin Microbiol 1998; 36:1399-1403.
  15. 김혜현, 최봉규, 최성호 등. 한국인 성인성 치주염환자에서의 구강스피로헤타의 분포. 대한치주과학회지 1998;28:661-677.
  16. Choi BK, Jung JH, Suh HY et al. Activation of matrix metalloproteinase-2 by a novel oral siprochetal species *Treponema lecithinolyticum*. J Periodontol 2001;72:1594-1600.
  17. 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.
  18. Choi BK, Ohk SH, Lee HJ et al. Effects of whole cell sonicates of *Treponema lecithinolyticum* on osteoclast differentiation. J Periodontol 2001;72:1172-1177.
  19. Wyss C, Choi BK, Schüpbach P, Guggenheim B, Göbel UB. *Treponema maltophilum* sp. Nov., a small oral spirochete isolated from human periodontal lesions. Int J Syst Bacteriol 1996; 46:745-752.
  20. Andersen TL, del Carmen Ovejero M, Kirkegaard T et al. A scrutiny of matrix metalloproteinases in osteoclasts: evidence for heterogeneity and for the presence of MMPs synthesized by other cells. Bone 2004;35:1107-1119.
  21. Engsig MT, Chen QJ, Vu TH et al. Matrix metalloproteinase-9 and vascular endothelial growth factor are

- essential for osteoclast recruitment into developing long bones. *J. Cell Biol* 2000 ;151:879-889.
22. Holmlund A, Hanstrom L, Lerner UH. Bone resorbing activity and cytokine levels in gingival crevicular fluid before and after treatment of periodontal disease. *J Clin Periodontol* 2004;31: 475-482.
  23. Uchida M, Shima M, Shimoaka T et al. Regulation of Matrix Metalloproteinases (MMPs) and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases (TIMPs) by bone resorptive factors in osteoblastic cells. *J Cell Physiol.* 2000;185:207-214.
  24. Callejas NA, Casado M, Diaz-Guerra MJ, Bosca L, Martin-Sanz P. Expression of cyclooxygenase-2 promotes the release of matrix metalloproteinase-2 and -9 in fetal rat hepatocytes. *Hepatology* 2001;33:860-867
  25. Zhang Y, McCluskey K, Fujii K, Wahl LM. Differential regulation of monocyte matrix metalloproteinase and TIMP-1 production by TNF- $\alpha$ , granulocyte-macrophage CSF, and IL-1 $\beta$  through prostaglandin-dependent and independent mechanisms. *J Immunol* 1998;161: 3071-3076.
  26. Shankavaram UT, DeWitt DL, Wahl LM. Lipopolysaccharide induction of monocyte matrix metalloproteinases is regulated by the tyrosine phosphorylation of cytosolic phospholipase A<sub>2</sub>. *J Leukoc Biol* 1998;64:221-227.
  27. Soell M, Elkaim R, Tenenbaum H. Cathepsin C, Matrix metalloproteinases, and their tissue inhibitors in gingiva and gingival crevicular fluid from periodontitis-affected patients. *J Dent Res* 2002;81:74-178.
  28. Tsai CC, Hong YC, Chen CC, Wu YM. Measurement of prostaglandin E<sub>2</sub> and leukotriene B<sub>4</sub> in the gingival crevicular fluid. *J Dent* 1998;26:97-103.

## Effect of *Treponema lecithinolyticum* lipopolysaccharide on matrix metalloproteinase-9 expression

Jeong-Ah Nam<sup>1</sup> · Sun-Young Moon<sup>1</sup> · Jin-Wook Lee<sup>1</sup> ·  
Jeong-Heon Cha<sup>1</sup> · Bong-Kyu Choi<sup>2</sup> · Yun-Jung Yoo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dept of Oral Biology, College of Dentistry, Yonsei University, Seoul, Korea

<sup>2</sup>Dept of Oromaxillofacial Infection and Immunity, and Dental Research Institute,  
College of Dentistry, Seoul National University, Seoul, Korea

Bone resorption involves sequential stages of osteoclast precursor migration and differentiation of osteoclast precursors into multinucleated osteoclasts. Stromal cell derived factor (SDF)-1 is a chemotactic factor for osteoclast precursor migration. Matrix metalloproteinase (MMP)-9 is involved in migration of osteoclast precursors and activation of interleukin(IL)-1 $\beta$ . Alveolar bone destruction is a characteristic feature of periodontal disease. *Treponema lecithinolyticum* is a oral spirochete isolated from the periodontal lesions. The effect of lipopolysaccharide(LPS) from *T. lecithinolyticum* on expression of SDF-1 and MMP-9 was examined in cocultures of bone marrow cells and osteoblasts derived from mouse calvariae.

*T. lecithinolyticum* LPS increased expression of MMP-9 in the coculture. Polymyxin B, an inhibitor of LPS, abolished the increase of MMP-9 mRNA expression by LPS. LPS did not increase the expression of SDF-1, IL-1 $\beta$  and tumor necrosis factor(TNF)- $\alpha$  mRNA in cocultures. Prostaglandin E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>) up-regulated the expression of MMP-9 and NS398, an inhibitor of PGE<sub>2</sub> synthesis, down-regulated the induction of MMP-9 expression by *T. lecithinolyticum* LPS.

These results suggest that *T. lecithinolyticum* LPS increases MMP-9 expression in bone cells via PGE<sub>2</sub> and that the induction of MMP-9 expression by *T. lecithinolyticum* LPS is involved in alveolar bone destruction of periodontitis patients by the increase of osteoclast precursor migration and the activation of bone resorption-inducing cytokine.

---

**Key words** : *Treponema lecithinolyticum*, lipopolysaccharide, MMP-9