

고농도 포도당이 뼈모세포와 치주인대세포의 세포자멸사에 미치는 영향에 관한 연구

경희대학교 치의학전문대학원 구강해부학교실¹, 경희대학교 치의학전문대학원 구강내과학교실²

박성호¹ · 주성숙¹ · 홍정표² · 신제원¹

고농도 포도당이 뼈모세포와 치주인대세포의 세포자멸사에 미치는 영향과 그 경로를 알아보기 위하여 뼈모세포주인 MC3T3-E1 (E1) 세포와 사람 치주인대로부터 일차배양을 통해 얻은 치주인대세포를 1,000 mg/L 농도의 포도당이 포함된 배양액 (대조군)과 4,500 mg/L 농도의 포도당이 포함된 배양액 (실험군)으로 나누어 24시간과 48시간 배양하였다. 그 후, ELISA assay를 통해 p38 MAPK와 caspase-3의 발현을 평가하고 Western blot을 통해 JNK-1과 ERK-1의 발현을 평가하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 뼈모세포와 치주인대세포 모두 대조군에 비해 실험군에서 caspase-3와 p38 MAPK 발현이 증가하였다.
2. 실험군에서의 caspase-3와 p38 MAPK 발현은 뼈모세포에 비해 치주인대세포에서 더욱 크게 증가하였다.
3. 뼈모세포와 치주인대세포 모두 대조군에 비해 실험군에서 JNK-1 발현이 증가하였다.
4. 뼈모세포와 치주인대세포 모두 ERK-1 발현에는 변화가 없었다.

이상의 결과로 보아, 고혈당 조건에 의해 뼈모세포와 치주인대세포의 세포자멸사가 증가하며, 치주인대세포가 고혈당 조건에 더욱 민감하게 반응하여 세포자멸사가 크게 증가하는 것으로 생각된다. 또한 이들 세포의 세포자멸사 과정은 p38 MAPK와 JNK-1 경로가 관여하며 ERK-1 경로는 관여하지 않는 것으로 추정된다.

주제어: 포도당, 뼈모세포, 치주인대세포, 세포자멸사, p38 MAPK, JNK-1

I. 서 론

최근 치과영역에서는 임플란트 기술이 광범위하게 시행되면서 보다 빠르게 뼈조각이 회복되고 보다 강한 osseointegration을 얻고자 하는 노력의 일환으로 뼈재생에 영향을 미치는 여러 요인에 대한 관심이 높아지고 있다. 또한 치주질환으로 인해 손실된 뼈의 재생을 촉진하기 위한 기술을 개발하기 위해서도 뼈재생과 연관된 많은 지식이 요구된다. 이러한 요구는 인

구의 노령화로 인해 치주질환 환자와 상실치를 수복하고자 하는 환자가 증가하면서 더더욱 커지고 있는데, 인구의 노령화는 곧 만성질환을 앓고 있는 환자의 증가를 의미하므로 만성질환이 뼈재생에 미치는 영향에 대한 고려가 필요하다. 당뇨병은 우리나라 성인의 상당수가 앓고 있는 대표적인 만성 대사성 질환으로¹⁻⁴, 고혈당으로 인하여 다양한 합병증이 유발되는데, 최근에는 고혈당으로 인한 골다공증과 골질의 증가에 관심이 모아지고 있다⁵⁻⁸. 치과영역에 있어서도 당뇨병의 합병증으로써의 치주조직 파괴에 대해 이전부터 많은 연구가 있어왔으며, 정상인에 비해 당뇨 환자에게서 더욱 광범위하게 치조골이 파괴되고 치주낭이 깊어진다고 보고되고 있다⁹⁻¹¹.

이와 같은 배경으로 뼈형성과 고혈당과의 관계를 밝히기 위해 다양한 실험이 시행되었다. Botolin 등¹²은 마우스 당뇨 모델을 이용한 실험에서 고혈당이 뼈 파괴세포의 수와 활성에는 영향을 미치지 않지만 뼈

교신저자 : 신제원
서울시 동대문구 회기동 1번지
경희대학교 치과대학 구강해부학교실
전화: 02-961-0568
Fax: 02-960-1457
E-mail: shinjw@khu.ac.kr

원고접수일 : 2007-08-23
심사완료일 : 2007-12-02

모세포의 성숙과 기능은 억제한다고 보고하였다. 또한 당뇨 환자의 뼈조직에서 뼈모세포가 감소한다^{13,14)}는 보고도 있는데 이는 고혈당이 뼈모세포의 수와 활성화에 영향을 미치는 것을 보여준다. Ho 등¹⁵⁾은 당뇨병으로 인한 합병증이 다양한 심혈관 문제와 관련이 있음에 착안하여 고혈당과 혈관 내피세포와의 관계에 대하여 실험한 결과 고혈당이 혈관 내피세포의 세포자멸사 (apoptosis)를 증가시킨다고 보고하였다. 이들 연구결과를 종합해 볼 때, 당뇨로 인한 뼈모세포의 수와 활성의 감소는 고혈당이 뼈모세포의 세포자멸사를 증가시키는 것도 일부 원인이 될 수 있음을 시사한다.

이에 본 연구에서는 고농도 포도당 환경이 뼈모세포와 치주인대세포의 세포자멸사에 미치는 영향을 살펴보고자 하였다. 특히, 치주조직을 구성하는 치조골의 경우 인체 다른 부위의 뼈모세포와는 달리 신경능선에서 유래한 외배엽성중간엽으로부터 분화된 뼈모세포에 의해 형성된다. 성인 치조골의 재생과정에서는 치주인대내의 줄기세포로부터의 뼈모세포 분화가 필수적인 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 마우스 유래 뼈모세포주인 MC3T3-E1 세포와 사람 치주인대의 일차배양을 통해 얻은 치주인대세포를 이용하여 고농도 포도당이 이들 세포의 세포자멸사에 미치는 영향을 살펴보고자 하였다.

p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK)는 다양한 자극에 대한 반응으로 활성화 되어 세포자멸사, DNA 전사의 조절, 싸이토카인 합성의 조절과 같은 중요한 세포반응을 매개하는 역할을 한다¹⁶⁻¹⁹⁾. Caspase의 활성화는 DNA 합성, gene 발현, 핵구조의 유지, 세포의 항상성 등과 관련된 단백질을 파괴하는 특정 단백분해과정을 촉진함으로써 세포자멸사를 유도하는 역할을 하는 것으로 알려져 있으며 특히 caspase-3가 세포자멸사에 가장 큰 원인이라고 알려져 있다²⁰⁾.

따라서 본 연구에서는 고농도 포도당 환경에서 뼈모세포와 치주인대세포를 24시간과 48시간 배양하면서 caspase-3의 변화를 비교하여 세포자멸사를 평가하고, p38 MAPK를 포함한 MAPK cascade를 확인하고자 한다.

II. 실험재료 및 방법

1. 실험재료

1) 세포

본 실험에는 마우스 머리뿔개뼈에서 유래한 뼈모세

포주인 MC3T3-E1 세포와 사람 치아로부터 일차 배양을 통해 얻은 치주인대세포를 사용하였다.

사람 치주인대 세포를 얻기 위해 교정목적으로 발거된 소구치의 치주조직을 멸균상태에서 취하였다. 이렇게 얻은 조직은 penicillin (100 U/ml)-streptomycin (100 µg/ml) (Gibco, USA)이 포함된 멸균 Dulbecco's modified eagle media (DMEM; Gibco, USA)로 세정한 후 면도날로 잘게 잘랐다. 조직 조각을 배양접시에 위치시키고 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco, USA)과 항생제가 포함된 DMEM을 최소량 첨가한 후 37°C, 5% 이산화탄소하에서 배양하여 배양접시에 조직 조각이 부착되도록 하였다.

조직의 부착이 확인되면 동일한 배양액을 첨가하여 동일조건에서 배양하였다. 세포가 조직으로부터 충분히 자라나오면 배양접시에서 조직을 제거하였다. 세포가 배양접시에 어느 정도 차게 되면 배양접시에서 배양액을 제거하고, 칼슘과 마그네슘이 포함되지 않은 Hank's balanced salt solution (HBSS; Gibco, USA)으로 세정하고 0.05% trypsin-0.53 mM tetrasodium ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA; Gibco, USA)를 넣어 세포가 배양접시 바닥에서 떨어지도록 하였다. 이렇게 얻은 세포는 1:3의 비율로 계대배양하였다. 세포는 일주일에 3회 배양액을 교환하면서 동일한 조건에서 배양하면서 계대배양 4~6대의 세포를 실험에 사용하였다.

2) 고농도 포도당 배양액

실험에 사용된 고농도 포도당 배양액은 4,500 mg/L 농도의 포도당이 포함된 alpha-minimum essential medium (α-MEM; Gibco, USA)을 사용하였다. 대조군으로는 1,000 mg/L 농도의 포도당이 포함된 일반적인 α-MEM을 사용하였다.

2. 실험방법

1) caspase-3와 p38 MAPK의 Elisa assay

각 세포는 100 mm 배양접시에 1×10⁶개씩 분주하고, 10% FBS가 포함된 일반 α-MEM에서 24시간 배양하여 배양관 바닥에 세포가 부착하도록 한 후 24시간동안 무혈청배지에 배양하여 혈청의 영향력을 배제하였다. 이후 대조군 혹은 고농도 포도당 배양액으로 교환하고 24시간과 48시간 배양하였다.

배양된 세포들은 각 시기별로 배지를 완전히 제거한 후, PBS로 2회 세척한 후 배양접시 바닥에 부착된

세포를 멸균된 scrapper를 이용하여 회수하였다. 원심분리기를 이용하여 상층액을 제거하고 1 mM phenylmethyl sulfonyl fluoride와 protease inhibitor cocktail (Sigma, USA)이 포함된 NP40 cell lysis buffer (Biosource, USA)를 250 μ l 씩 첨가하여 4°C에서 30분간 방치한 후, microcentrifuge (Eppendorf, USA)에서 12,000 rpm의 속도로 30분간 원심분리시켜 단백질을 용출된 상층액을 얻었다. 이렇게 얻은 단백질 용출액을 p-38 MAPK와 caspase-3 Elisa Kit (Invitrogen, USA)에 각각 well당 100 μ l 씩 넣고 실온에서 2시간 방치하였다. 그 후 용액을 모두 제거하고 PBS로 4회 수세한 후 detection antibody를 well당 100 μ l 씩 넣고 실온에서 1시간 방치하고 다시 PBS로 4회 수세하였다. 다시 peroxidase conjugated anti-rabbit antibody를 well당 100 μ l 씩 넣고 실온에서 30분 방치한 후 PBS로 4회 수세하고 stabilized chromogen을 well당 100 μ l 씩 넣고 실온에서 30분 방치하였다. 마지막으로 stop solution을 100 μ l 씩 넣고 Microplate Reader (Model 550, Bio-Rad, USA)로 450 nm의 파장에서 optical density를 측정하였다.

2) Western blot

뼈모세포와 치주인대세포의 JNK-1과 ERK-1을 측정하기 위해 Western blot을 시행하였다.

100 mm 배양접시에 각 세포를 1×10⁶ 개씩 분주하고, 10% FBS가 포함된 일반 α -MEM에서 24시간 배양하여 배양판 바닥에 세포가 부착하도록 한 후 24시간 동안 무혈청배지에 배양하여 혈청의 영향력을 배제하였다. 이후 대조군 혹은 고농도 포도당 배양액으로 교환하고, 24시간과 48시간 배양하였다.

이렇게 배양된 세포들은 각 시기별로 배지를 완전히 제거한 후, PBS로 2회 세척한 후 배양접시 바닥에 부착된 세포를 멸균된 scrapper를 이용하여 회수하였다. 원심분리기를 이용하여 상층액을 제거하고 cell lysis buffer (Biosource, USA)를 250 μ l 씩 첨가하고 4°C에서 30분간 방치한 후, microcentrifuge (Eppendorf, USA)에서 12,000 rpm의 속도로 30분간 원심분리시켜 단백질을 용출된 상층액을 얻었다. Protein assay kit[®](Bio-rad, USA)를 사용하여 spectrophotometer에서 단백질 양을 측정하였다. 각각의 시편에 sample buffer [100 mM Tris-Cl (pH 6.8), 200 mM DTT, 4% SDS, 0.2% bromophenol blue, 20% glycerol]를 첨가하여 100°C에서 3분간 끓여 준비하였다. Gel running kit (Xcell IITM Blot; Invitrogen,

USA)에 4-12% Tris-Glycine gel (Invitrogen, USA)을 준비하여 장착한 후, 마커와 준비한 각각의 시편을 전기영동하였다. 120V에서 2시간 전기영동을 시행한 후 젤을 떼어내어 Tris-glycine transfer buffer (Invitrogen, USA)에 안정화 시킨 후, transfer kit (Xcell IITM Blot; Invitrogen, USA)를 이용하여 200mA에서 2시간 동안 Nitrocellulose membrane (Invitrogen, USA)에 옮겼다.

membrane을 떼어내어 blocking buffer에 1시간 동안 blocking하였다. 0.5% skim milk와 0.02% sodium azide가 포함된 PBS에 1:200으로 희석한 일차항체 [recombinant c-Jun N-terminal kinase-1 (JNK-1)과 recombinant extracellular signal-regulated kinase-1 (ERK-1); Santacruz, USA]를 넣어 상온에서 1시간 30분 동안 배양한 후, 0.05% Tween-20가 포함된 PBS로 30분씩 3회 세척하였다. blocking buffer에 1:10000으로 희석한 이차항체를 넣어 상온에서 1시간 배양한 후, PBS-t로 30분씩 3회 세척하였다. cassette에 membrane을 놓고 ECL kit (Amersham Biosciences, USA) 혼합액을 떨어뜨린 뒤, 1분간 방치하고 랩으로 싸서 암실에서 감광하여 밴드를 확인하였다.

III. 실험성적

1. caspase-3와 p38 MAPK의 Elisa assay

뼈모세포 (MC3T3-E1)의 caspase-3의 양은 시간 경과와 포도당 농도 증가에 의해 증가하였다. 24시간 배양의 경우 대조군에 비해 실험군에서 caspase-3 발현이 약간 증가하였으며 (대조군 대비 135%), 48시간 배양한 경우에는 caspase-3 발현이 크게 증가하여 24시간 대조군에 비해 약 393% (48시간 대조군 대비 196%) 였다 (Fig. 1).

뼈모세포의 경우 24시간 배양하였을 때 대조군에 비해 실험군에서 p38 MAPK가 약간 증가하였다 (대조군 대비 123%). 48시간 배양하였을 때 대조군에서도 p38 MAPK 증가가 관찰되었으며 (24시간 대조군 대비 377%), 실험군의 경우에는 24시간 대조군 대비 715% (48시간 대조군 대비 190%) 로 크게 증가하는 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 2).

치주인대세포 caspase-3의 경우도 시간이 지남에 따라, 그리고 고농도 포도당 환경에서 크게 증가하는 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 3). 24시간 배양하였을 때에는 대조군에 비해 실험군에서 약간 증가하는 정도

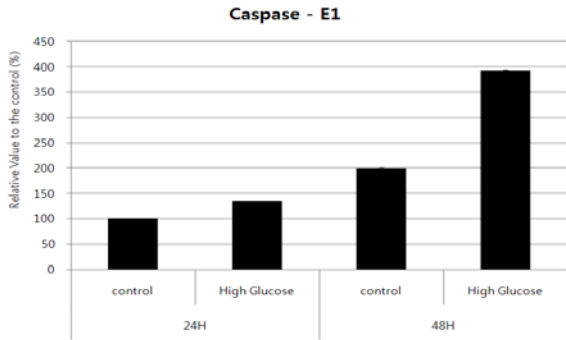


Fig. 1. Measurement of caspase-3 in MC3T3-E1 cells. The cells were incubated 24 and 48 hours with 1000 mg/L (control) or 4500 mg/L (high glucose) of extracellular glucose.

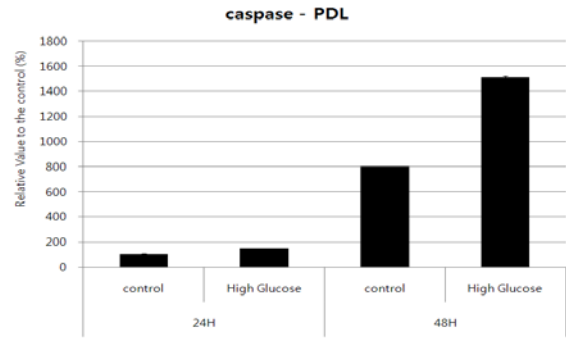


Fig. 3. Measurement of caspase-3 in periodontal ligament cells. The cells were incubated 24 and 48 hours with 1000 mg/L (control) or 4500 mg/L (high glucose) of extracellular glucose.

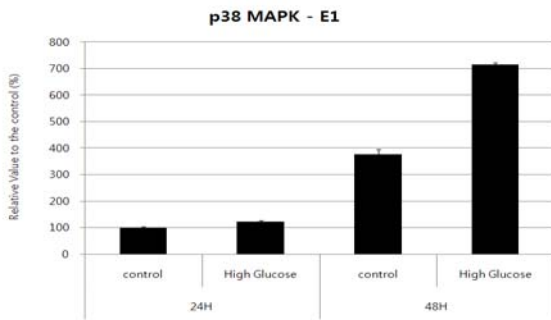


Fig. 2. Measurement of p38 MAPK in MC3T3-E1 cells. The cells were incubated 24 and 48 hours with 1000 mg/L (control) or 4500 mg/L (high glucose) of extracellular glucose.

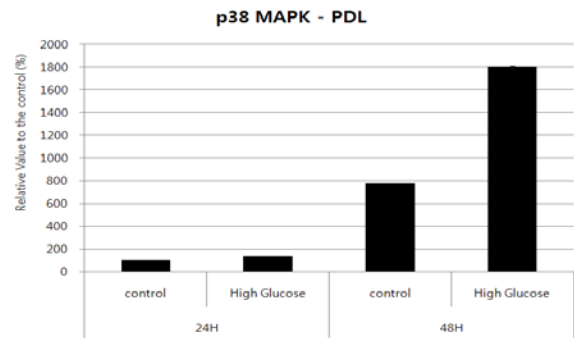


Fig. 4. Measurement of p38 MAPK in periodontal ligament cells. The cells were incubated 24 and 48 hours with 1000 mg/L (control) or 4500 mg/L (high glucose) of extracellular glucose.

였으나 (대조군 대비 147%), 48시간 배양하였을 때에는 대조군에서도 24시간 배양시에 비해 크게 증가하였으며 (24시간 대조군 대비 798%), 실험군의 경우에는 더욱 크게 증가하여, 24시간 대조군에 비해 1514% (48시간 대조군 대비 233%)를 보였다.

치주인대세포의 p38 MAPK 발현도 24시간 배양하였을 때는 뼈모세포의 경우와 유사하게 대조군에 비해 실험군에서 p38 MAPK 발현이 약간 증가하는 것을 관찰할 수 있었다 (대조군 대비 135%). 그러나, 배양 48시간째에는 대조군에서도 p38 MAPK 발현이 크게 증가하였으며 (24시간 대조군 대비 776%), 실험군의 경우에는 24시간 대조군 대비 1806% (48시간 대조군 대비 233%)로 폭발적으로 증가하는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 4).

2. Western blot

E1 세포의 JNK-1은, 24시간 배양군에서 대조군에 비해 실험군에서 약간 증가하였다. 48시간 배양하였을 때, 대조군도 24시간 배양군에 비해 약간 증가하였으나, 실험군에서 더 많이 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. ERK-1은 시간경과나 포도당 농도변화에 의해 크게 차이가 없었다 (Fig. 5).

치주인대세포의 경우 JNK-1의 양은 크게 변화하였다. 24시간 배양하였을 때 대조군보다 실험군에서 JNK-1 양이 크게 증가하였으며, 대조군만을 시간 경과에 따라 관찰하였을 때에도, 시간이 지남에 따라

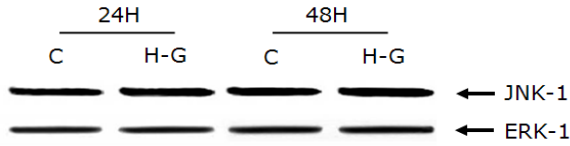


Fig. 5. Western blot analysis of JNK-1 and ERK-1 expression of MC3T3-E1 cells after 24- and 48-hour incubation with glucose at high concentration. C: control media, H-G: high glucose media (4500 mg/L).

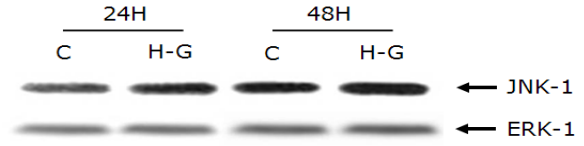


Fig. 6. Western blot analysis of JNK-1 and ERK-1 expression of periodontal ligament cells after 24- and 48-hour incubation with glucose at high concentration. C: control media, H-G: high glucose media (4500 mg/L).

JNK-1 양이 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. 또한, 48시간 실험군의 경우에는 JNK-1 양이 크게 증가하여 나타나는 것을 관찰할 수 있었다. 이에 비해 ERK-1은 시간경과나 포도당 농도 변화에 의해 그 양이 크게 변화하지 않는 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 6).

IV. 총괄 및 고안

고혈당이 혈관 내피세포의 세포자멸사 (apoptosis) 를 증가시킨다는 Ho 등의 보고¹⁵⁾는 당뇨병으로 인해 유발되는 골다공증과 골질의 증가⁸⁻¹²⁾를 설명할 수 있는 또 하나의 방법을 제시한다. 따라서 본 실험에서는 고농도 포도당이 뼈모세포와 치주인대세포의 세포자멸사에 미치는 영향을 알아보려고 하였다.

뼈모세포인 MC3T3-E1 세포의 경우 caspase-3 발현은 대조군에서도 시간 경과에 따라 약간 증가하는 것을 관찰할 수 있었으며, 실험군의 경우에는 24시간 배양시에도 대조군에 비해 발현이 증가하였고 48시간 배양시에는 발현이 크게 증가하는 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 1). 치주인대세포의 경우도 E1 세포의 경우에서와 마찬가지로 시간경과에 따라 caspase-3 발현이 증가하였고, 대조군에 비해 실험군에서 발현이 증가하였으며, 특히 48시간 배양시 고농도 포도당 조건에 의해 caspase-3 발현이 폭발적으로 증가하는 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 3). 이 결과로 보아 뼈모세포에 비해 치주인대세포가 고농도 포도당에 더욱 민감하게 반응하여 세포자멸사가 증가하는 것으로 보인다.

In vitro 연구를 통해 ICE/CED-3 family의 단백질 분해효소들이 스스로 활성화되며, 같은 군에 속하는 다른 효소들도 활성화시켜 다양한 단백질 분해 작용을 함으로써 세포자멸사 과정에서 세포의 생화학적, 형태학적 변화를 일으킨다는 것이 밝혀졌다²¹⁻²³⁾. 그중에서 caspase-3/ CPP32는 세포자멸사 과정에 작용하는 단

백분해효소의 중요한 핵심요소인 것으로 여겨지고 있다^{22,23)}. HUVEC 세포를 이용한 Ho 등¹⁵⁾의 연구에서 고농도 포도당에 의해 caspase family의 활성을 평가하였을 때 caspase-3가 가장 우선하게 활성화됨을 보고하여, HUVEC 세포의 세포자멸사에 caspase-3 활성이 가장 크게 작용함을 밝혔다. 이 결과는 caspase-3 발현의 변화를 관찰한 본 실험에서도 고농도 포도당에 의해 caspase-3 발현이 크게 증가하여 이 결과와 상응하였으며, 이에 기초하여 caspase family의 다른 효소들이 뼈모세포와 치주인대세포의 세포자멸사에 미치는 영향에 관해서 알아보는 일도 흥미있는 일이라 하겠다.

고농도 포도당이 뼈모세포와 치주인대세포의 세포자멸사를 활성화시키는 신호전달경로를 알아보기 위해 p38 MAPK, JNK-1, 그리고 ERK1 발현을 관찰하였다.

E1 세포의 경우 p38 MAPK는 대조군 내에서도 시간경과에 따라 발현이 증가하였으며, 대조군과 실험군을 비교하였을 때는 실험군에서 그 발현이 월등히 증가하는 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 1). 치주인대세포의 경우에도 p38 MAPK 발현은 시간경과에 따라 증가하였으며, 48시간 배양 실험군의 경우에는 폭발적으로 증가하는 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 3). E1 세포와 치주인대세포를 비교해 보면, E1 세포에 비해 치주인대세포에서 p38 MAPK 발현이 크게 증가하여, E1 세포에 비해 치주인대세포가 고농도 포도당에 더욱 민감하게 반응하는 것을 알 수 있었다. 또한 이 결과는 각 세포의 caspase-3 발현의 결과와 일치하여 이들 세포의 세포자멸사에 p38 MAPK 경로가 우선하게 작용할 것을 예상할 수 있었다.

E1 세포의 JNK-1 발현은 대조군에 비해 실험군에서 약간 증가하는 것을 관찰할 수 있었으나, ERK-1 발현은 대조군과 실험군에서 차이가 없었다 (Fig. 5).

치주인대세포의 경우에 JNK-1 발현은 시간경과에 따라 대조군에서도 약간의 증가를 보였으며, 대조군과 실험군을 비교하였을 때는 실험군에서 월등히 발현이 증가하는 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 6). 이는 caspase-3 발현과 상응하는 결과로, 세포자멸사 경로에 JNK-1이 관여함을 알 수 있다. 이에 비해 ERK-1은 뼈모세포의 경우와 마찬가지로, 시간경과에 따른 변화도 관찰할 수 없었으며, 대조군과 실험군에서 변화가 없어 이들 세포의 세포자멸사 경로에 ERK-1은 관여하지 않음을 알 수 있었다.

p38 MAPK와 JNK 경로는 세포자멸사 뿐 아니라 세포의 성장과 분화에도 관여하는 경로로 알려져 있다²⁴⁾. 그럼에도 이들 경로는 세포자멸사의 대표적인 경로로 알려져 있는데, PC-12 세포를 이용한 실험에 의하면 JNK의 과발현은 세포자멸사를 유도하고, JNK의 활성을 차단하면 세포자멸사가 감소한다고 하였다²⁵⁾. 최근에는 기계적인 스트레칭²⁶⁾이나 angiotensin II 처리²⁷⁾ 등과 같은 다양한 스트레스도 JNK 경로를 활성화시킬 수 있다고 보고되고 있다. 이와 같은 연구 결과는 본 실험 결과로 나타난, 고농도 포도당으로 유도되어 p38 MAPK와 JNK 경로를 통해 일어나는 것으로 보이는 세포자멸사의 증가가 세포의 포도당으로 인한 삼투압 변화에 의한 것일 수도 있음을 보여준다. 따라서 삼투압 변화에 따른 세포자멸사의 변화와 그 경로에 대한 더 깊은 연구가 필요할 것으로 생각된다. 또한, 본 실험 결과에 따르면, 고농도 포도당에 의해 증가한 세포자멸사는 ERK-1 경로와는 관계가 없음을 보여주었다.

V. 결 론

고농도 포도당이 뼈모세포와 치주인대세포의 세포자멸사에 미치는 영향과 그 경로를 알아보기 위하여 뼈모세포주인 MC3T3-E1 (E1) 세포와 사람 치주인대로부터 일차배양을 통해 얻은 치주인대세포를 1,000 mg/L 농도의 포도당이 포함된 배양액 (대조군)과 4,500 mg/L 농도의 포도당이 포함된 배양액 (실험군)으로 나누어 24시간과 48시간 배양하였다. 그 후, ELISA assay를 통해 p38 MAPK와 caspase-3의 발현을 평가하고 Western blot을 통해 JNK-1과 ERK-1의 발현을 평가하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 뼈모세포와 치주인대세포 모두 대조군에 비해 실험군에서 caspase-3와 p38 MAPK 발현이 증가하였다.

2. 실험군에서의 caspase-3와 p38 MAPK 발현은 뼈모세포에 비해 치주인대세포에서 더욱 크게 증가하였다.
3. 뼈모세포와 치주인대세포 모두 대조군에 비해 실험군에서 JNK-1 발현이 증가하였다.
4. 뼈모세포와 치주인대세포 모두 ERK-1 발현에는 변화가 없었다.

이상의 결과로 보아, 고혈당 조건에 의해 뼈모세포와 치주인대세포의 세포자멸사가 증가하며, 치주인대세포가 고혈당 조건에 더욱 민감하게 반응하여 세포자멸사가 크게 증가하는 것으로 생각된다. 또한 이들 세포의 세포자멸사 과정은 p38 MAPK와 JNK-1 경로가 관여하며 ERK-1 경로는 관여하지 않는 것으로 추정된다.

참 고 문 헌

1. Khan CR. Insulin resistance. A common feature of diabetes mellitus. *N Eng J Med* 1986;315:252.
2. Ervasti T, Knutilla M, Pohjamo L, Haukipuro K. Relation between control of diabetes and gingival bleeding. *J Periodontol* 1985;56:154-157.
3. Min H. The clinical characteristics of Korean diabetic patients. *Korean Diabetics* 1992;16:163-173.
4. Shin CS. The prevalence of diabetics in yeon-cheon area of Gyeong Gi-do. *Korean diabetics* 1996;20:264-270.
5. Auwerx J, Dequeker J, Bouillon R, Geusens P, Nijjs J. Mineral metabolism and bone mass at peripheral and axial skeleton in diabetes mellitus. *Diabetes* 1988 37:8-12.
6. Krakauer JC, McKenna MJ, Buderer NF, Rao DS, White-house FW, Parfitt AM. Bone loss and bone turnover in diabetes. *Diabetes* 1995;44:775-782.
7. Hui SL, Epstein S, Johnson CC Jr. A prospective study of bone mass in patients with type I diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 1986;60:74-80.
8. Bouillon R. Diabetic bone disease. *Calcif Tissue Int* 1991;49:155-160.
9. Emrich LJ, Schlossman M, Genco RJ. Periodontal disease in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Periodontol* 1991 62:123-130.
10. Thorstensson H, Hugoson A. Periodontal disease experience in adult long duration insulin-dependent diabetics. *J Clin Periodontol* 1993;20:352-358.
11. Shlossman M, Knowler WC, Pettitt DJ, Genco RJ.

- Type 2 diabetes mellitus and periodontal disease. *J Am Dent Assoc* 1990;120:532-536.
12. Botolin S, Faugere MC, Malluche H, Orth M, Meyer R, McCabe LR. Increased bone adiposity and peroxisomal proliferator-activated receptor- γ 2 expression in type I diabetic mice. *Endocrinology* 2005;146:3622-3631.
 13. Sasaki T, Kaneko H, Ramamurthy NS, Golub LM. Tetracycline administration restores osteoblast structure and function during experimental diabetes. *Anat Rec* 1991;231(1):25-34.
 14. Verhaeghe J, Van Herck E, Visser WJ *et al*. Bone and mineral metabolism in BB rats with long-term diabetes. *Diabetes* 1990;39:477-482.
 15. Ho FM, Liu SH, Liao CS, Huang PJ, Lin-Shiau SY. High glucose induced apoptosis in human endothelial cells is mediated by sequential activations of c-Jun NH2-terminal kinase and caspase-3. *Circulation* 2000;101:2618-2624.
 16. Schaeffer HJ, Weber MJ. Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol Cell Biol* 1999;19:2435-2444.
 17. Chang L, Karin M. Mammalian MAP kinase signaling cascades. *Nature* 2001;410:37-40.
 18. Dong C, Davis RJ, Flavell RA. MAP kinases in the immune response. *Annu Rev Immunol* 2002;20:55-72.
 19. Platanias LC. Map kinase signaling pathways and hematologic malignancies. *Blood* 2003;101:4667-4679.
 20. Villa P, Kaufmann SH, Earnshaw WC. Caspases and caspase inhibitors. *Trends Biochem Sci* 1997;22(10):388-393.
 21. Henkart PA. ICE family proteases: mediators of all apoptotic cell death? *Immunity* 1996;4:195-201.
 22. Wang X, Zelenski NG, Yang J. Cleavage of sterol regulatory element binding protein (SREBPs) by CPP32 during apoptosis. *EMBO J* 1996;15:1012-1020.
 23. Kumar S. The apoptotic cysteine protease CPP32. *Int J Biochem Cell Biol* 1997;29:393-396.
 24. Raman M, Chen W, Cobb MH. Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene* 2007;26:3100-3112.
 25. Xia Z, Dickens M, Raingeaud J. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* 1995;270:1326-1331.
 26. Komuro I, Kudo S, Yamazaki T. Mechanical stretch activates the stress-activated protein kinases in cardiac myocytes. *FASEB J* 1996;10:631-636.
 27. Kudoh S, Komuro I, Minuzo T. Angiotensin II stimulates c-Jun NH2-terminal kinase in cultured cardiac myocytes of neonatal rats. *Circ Res* 1997;80:139-146.

- ABSTRACT -

Effect of Glucose at High Concentrations on the Apoptosis of the Cultured Periodontal Ligament Cells and Osteoblasts

Sung-Ho Park¹, Seong-Suk Jue¹, Jung-Pyo Hong², Je-Won Shin¹

Department of Oral Anatomy, School of Dentistry, Kyung Hee University¹

Department of Oral Medicine, School of Dentistry, Kyung Hee University²

This experiment was designed to clarify the effect of extracellular glucose on the osteoblasts and periodontal ligament cells. The cells were incubated for 24 and 48 hours with α -MEM including 1,000 mg/L (control group) and 4,500 mg/L (experimental group) of glucose. Then, the expressions of caspase-3, p38 MAPK, JNK-1, and ERK-1 were examined using Elisa assay and Western blot. The results were as follows:

1. The expression of caspase-3 and p38 MAPK was increased by the high extracellular glucose in both cells.
2. The expression of caspase-3 and p38 MAPK was increased greatly in the periodontal ligament cells than the E1 cells by the high extracellular glucose.
3. The expression of JNK-1 was increased by the high extracellular glucose in both cells.
4. The expression of ERK-1 was not changed by the high extracellular glucose in both cells.

These results suggest that extracellular glucose at high concentrations may inhibit the periodontal regeneration process increasing cellular apoptosis. And p38 MAPK and JNK-1 pathway may be the most responsible intracellular pathway rather than ERK-1.

Key words : Glucose, Osteoblast, Periodontal ligament cell, Apoptosis, p38 MAPK, JNK-1
