

*Porphyromonas endodontalis*의 침투에 따른 혈관 내피세포의 유전자 발현공희정<sup>1</sup> · 최경규<sup>1</sup> · 박상혁<sup>1</sup> · 이진용<sup>2</sup> · 최기운<sup>1\*</sup>경희대학교 대학원 치의학과 <sup>1</sup>치과보존학교실, <sup>2</sup>구강생물학연구소

## ABSTRACT

## GENE EXPRESSION OF HUMAN CORONARY ARTERY ENDOTHELIAL CELLS IN RESPONSE TO PORPHYROMONAS ENDODONTALIS INVASION

Hee-Joung Kong<sup>1</sup>, Kyoung-Kyu Choi<sup>1</sup>, Sang-Hyuk Park<sup>1</sup>, Jin-Yong Lee<sup>2</sup>, Gi-Woon Choi<sup>1</sup><sup>1</sup>Department of Conservative Dentistry, <sup>2</sup>Institute of oral biology, Division of Dentistry, Graduate of Kyung Hee University

During the last two decades, there has been an increasing interest in the impact of oral health on atherosclerosis and subsequent cardiovascular disease (CVD). To date, some periodontal pathogens including *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) have been reported to be relevant to CVD. *Porphyromonas endodontalis* (*P. endodontalis*), which shares approximately 87% sequence homology with *P. gingivalis*, is mostly found within infected root canals. However, recent studies reveal that this pathogen also resides in the dental plaque or periodontal pocket in patients with periodontitis. It has been shown that *P. endodontalis* invades human coronary artery endothelial cells (HCAEC) and coronary artery smooth muscle cells (CASMC). To evaluate whether *P. endodontalis* can participate in the progression of atherosclerosis and CVD, we examined the changes in transcriptional gene expression profiles of HCAEC responding to invasion by *P. endodontalis* in this study.

The following results were obtained.

1. *Porphyromonas endodontalis* was invasive of HCAEC.
2. According to the microarray analysis, there were 625 genes upregulated more than two-folds, while there were 154 genes downregulated by half.
3. Upregulated genes were relevant to inflammatory cytokines, apoptosis, coagulation and immune response. Enhanced expression of MMP-1 was also noticeable.
4. The transcription profiles of the 10 selected genes examined by real-time PCR agreed well with those observed in the microarray analysis.

Thus, these results show that *P. endodontalis* presents the potential to trigger and augment atherosclerosis leading to CVD. [J Kor Acad Cons Dent 34(5):537-550, 2009]

**Key words:** *Porphyromonas endodontalis*, Atherosclerosis, Cardiovascular disease (CVD), Invasion, Human coronary artery endothelial cells (HCAEC), Gene expression

-Received 2009.9.8., revised 2009.9.28., accepted 2009.10.28.-

## I. 서 론

\*Corresponding Author: **Gi-Woon Choi**  
Professor of Division of Dentistry, Graduate school of  
KyungHee University  
1, Hoegi Dong, Dongdaemun Gu, Seoul, Korea, 130-702  
Tel: 82-2-958-9336  
E-mail: gwchoi@khu.ac.kr

치수 및 치근단 질환은 구강 내 세균에 의해 유발되며, 과거에는 이러한 균들을 직접적인 배양법으로 검출했기 때문에 균의 종류와 특성에 따라 탐지해 내기가 어려운 경우가 많았다. 특히 *Porphyromonas endodontalis*(이하 *P. endodontalis*)는 산소에 민감하고 다른 세균들보다 자라는

속도가 매우 느리며 vancomycin이 포함된 선택 배지에서는 성장이 억제되므로, 전통적인 세균동정법에서는 잘 발견되지 않았다<sup>2)</sup>. 그러나 최근 DNA-DNA hybridization, 중합효소 연쇄반응법(polymerase chain reaction, PCR)과 같은 분자생물학에 근거한 분자진단법(molecular diagnostic method)의 발달로 비교적 빠르고 정확하게 세균을 분리할 수 있게 되었으며, 배양조건이 까다로워서 검출이 어려웠던 균들도 잘 분리해낼 수 있게 되었다. *P. endodontalis* 역시 예전에는 감염 근관에서 주로 발견되었으나<sup>3)</sup> 동통이나 부종, 악취, 타진반응, 삼출액 등의 임상증상이 있는 경우에만 나타난다<sup>4)</sup>고 하였으나, 최근 여러 가지 새로운 검출방법에 의해 임상증상이 없는 경우에도 많이 발견되고 있으며<sup>5)</sup>, 구강 점막하 농양<sup>6)</sup>이나 치은염이 있는 환자의 치은연상치태와 혀<sup>1,6)</sup>, 치주질환 환자의 치주낭<sup>7-9)</sup> 등에서도 자주 발견된다.

한편 죽상경화증(atherosclerosis)을 포함하는 심혈관질환(cardiovascular disease, CVD)은 인간의 사망 원인 중 큰 비중을 차지하며, 죽상경화증의 병태생리에 대해서는 여러 가지 의견이 있지만, 현재는 '혈관 내피세포의 손상에 의한 만성 염증질환'으로 인식되고 있다<sup>10)</sup>.

혈관 내피세포는 산화질소(nitric oxide, NO) 및 여러 가지 혈관확장인자들과 혈관수축인자들을 분비하여 혈관의 항상성 유지에 중요한 역할을 한다<sup>11,12)</sup>. 특히 산화질소는 저밀도지단백(low-density lipoprotein)의 산화를 억제하므로 산화질소의 생산 및 활성의 저하는 내피세포 기능장애(endothelial dysfunction)를 유발하여 혈관확장과 혈관수축의 균형을 깨뜨리고 내피세포의 투과성과 혈소판 응고, 백혈구 부착, cytokine의 생산을 증대시켜서 죽상경화증을 더욱 악화시키게 된다<sup>10)</sup>.

죽상경화증의 위험 요소로는 고콜레스테롤혈증, 고혈압, 담배, 비만, 당뇨병, 가족력, 특히 산화된 지단백 등이 있다<sup>13,14)</sup>. 정상적인 혈관에서는 단핵세포, 중성구 등이 혈관벽과 상호작용을 일으키지 않고 혈류를 따라 흘러다니다가 죽상경화증 위험 요소들의 자극으로 혈관 내피세포가 손상을 받으면 vascular cell adhesion molecule-1(VCAM-1), intercellular adhesion molecule-1(ICAM-1), P-selectin, E-selectin 등의 백혈구 부착분자들(adhesion molecules)이 분비되므로, 단핵세포 등이 혈관벽을 따라 구르는(rolling) 현상이 나타나면서 혈관벽에 붙기 시작한다. 그 후 단핵세포는 내피세포 사이를 통과하여 혈관 내막(intima) 안으로 이동하게 되는데, 이 때는 monocyte chemoattractant protein-1(MCP-1, CCL2로도 명명)으로 대표되는 다양한 chemokine이 작용하여 단핵세포의 이동을 유도하며, MCP-1의 경우 단핵세포의 CCR2 수용체와 결합하게 된다. 혈관 내막에 위치하게 된 단핵세포는 대식세포로서의 특징을 갖게 되고, 대식세포의 scavenger

receptor는 산화에 의해 변성된 지단백과 서로 결합한다. 이 과정을 통해 대식세포 내에 지질이 축적되면서 대식세포는 거품세포(foam cell)로 전환된다. 이러한 대식-거품세포는 여러 가지 염증성 cytokine과 tissue factor, 성장인자, matrix metalloproteinase(MMP) 등을 분비하며, 대식세포에서 유리된 cytokine과 성장인자는 T cell과 더불어 평활근세포를 이주, 증식시키고 세포외기질을 만들어낸다. 증식된 평활근세포 내에 있던 작은 지질 방울들이 모여 큰 지질 핵(lipid core)을 형성하게 되고, 대식세포는 세포자멸사(apoptosis) 등의 과정을 거쳐서 사망에 이르러 지질 핵과 함께 괴사된 핵(necrotic core)을 형성한다. 괴사된 핵이 혈관 평활근세포의 증식에 의해 섬유성 모자(fibrous cap)로 덮이면 죽상경화판(atherosclerotic plaque)이 만들어진다. 대식세포에서 분비되는 MMP는 죽상경화판의 섬유성 모자의 강도에 영향을 주며, 불안정한 경화판이 파열되면 대식세포에서 유리된 tissue factor 등의 혈액응고 물질들이 혈액과 접촉하면서 혈전을 형성한다<sup>14-16)</sup>.

그러나 위에서 언급한 위험 요소들만으로는 죽상경화증의 모든 상황들을 설명하는데 한계가 있으며, 최근에는 다른 질환의 원인이 되는 감염균과의 연관성이 부각되고 있다. 즉 *Chlamydia pneumoniae*<sup>17)</sup>, *Helicobacter pylori*<sup>18)</sup>, 바이러스<sup>19)</sup> 등과 같은 미생물의 감염은 내피세포와 평활근세포의 생태학적인 변화를 초래하고, 이러한 변화는 죽상경화증의 원인이 된다.

감염 후 나타나는 혈관 내 변화로는 혈액응고, 대식세포의 scavenger receptor 발현과 활성의 증가, 콜레스테롤과 변형된 저밀도지단백의 축적 증가, 염증성 cytokine과 부착단백질의 발현 증가, 평활근세포의 이주와 증식의 증가, 세포자멸사의 조절 등이 있으며, 균종에 따라서는 대식세포가 거품세포로 전환되는 것을 가속화시키거나 대식세포가 죽상경화판의 불안정성과 파열을 유도하는 cytokine을 많이 발현하도록 만드는 경우도 있다<sup>20)</sup>. 미생물들은 혈관벽 세포를 직접 감염시켜서 병소를 유발하기도 하지만, 다른 곳의 조직이 감염되어도 감염 부위에서 유도된 cytokine이 순환도중 멀리 떨어져 있는 세포에 영향을 줄 수 있으므로 간접적으로도 질병을 일으킬 수 있다<sup>20)</sup>. 또한 단일 종류의 균 감염 시에도 이러한 변화들이 일어날 수 있지만, 'pathogen burden' 즉, 여러 종류의 균들이 같이 작용했을 때에는 내피세포 기능장애가 증가되고 염증반응의 시너지 효과로 죽상경화증을 비롯한 심혈관질환에 대한 위험이 훨씬 증가하는 것으로 보고되고 있다<sup>21,22)</sup>.

이와 같이 죽상경화증의 위험 요소 중에 염증과 감염이 중요한 부분을 차지하게 되면서 구강 내 감염 인자들과 전신 질환과의 관련성에 대한 관심이 높아지고 있다. Mattila 등<sup>23)</sup>이 치아건강과 급성심근경색증과의 연관성을 발표한 이래, 불량한 구강상태 및 치주조직 파괴와 심혈관질환과의

관계에 대한 연구들이 이루어졌는데, Beck 등<sup>24)</sup>은 그람 음성 세균에 의한 치주질환과 심혈관질환과의 연관성을 역학적으로 조사하여 보고하였고, Haraszthy 등<sup>25)</sup>은 죽상경화판을 중합효소 연쇄반응법으로 관찰하여 *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides forsythus*, *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis*(이하 *P. gingivalis*) 등의 치주질환 원인균들의 존재를 확인하였다. 또 Spahr 등<sup>26)</sup>이 시행한 역학조사에 따르면 여러 종류의 치주질환 원인균들이 'pathogen burden'으로 작용했을 때 심혈관질환과의 연관성은 더욱 커지는 것으로 나타났다. 치주질환 원인균인 *P. gingivalis*는 심혈관질환과 관련해서 가장 많은 연구가 이루어진 구강 세균이다. *P. gingivalis*는 혈관 내피세포 및 평활근세포에 침투(invagination)<sup>27,28)</sup>하며, 이 때 분비되는 여러 가지 염증성 cytokine과 세포반응 물질들은 죽상경화증 및 심혈관질환에 영향을 준다<sup>29)</sup>.

근관 감염 시에 주로 발견되는 *P. endodontalis*는 *P. gingivalis*와 동일한 속(genus)에 포함되고, 87% 정도의 종(species)간 유사성을 가지는 것으로 알려져 있다<sup>30)</sup>. Dorn 등<sup>31)</sup>은 *P. endodontalis*가 사람의 혈관 내피세포와 평활근세포에 침투할 수 있다고 보고하였다. 또한 앞에서 기술한 바와 같이 *P. endodontalis*가 감염 근관 뿐만 아니라 치주조직을 비롯한 구강 내 여러 부위에서도 많이 발견되므로, *P. gingivalis*처럼 혈관 내로 침투한 *P. endodontalis*가 염증반응을 일으키고 더 나아가서는 죽상경화증, 심혈관질환에 영향을 줄 수 있다는 가설을 가능하게 한다.

따라서 본 연구에서는 *P. endodontalis*와 심혈관질환과의 연관성을 알아보기 위해서, 인체의 여러 곳 중 죽상경화증이 발생했을 때 심근경색과 같은 심각한 상황과 직결될 수 있는 부위인 관상동맥에서 유래된 1차 내피세포(primary endothelial cell)를 선택하여 *P. endodontalis*가 침투하는지를 관찰하였다. 또한 *P. endodontalis*가 침투하는 과정에서 관상동맥 내피세포의 유전자 발현에 미치는 영향에 대해 microarray와 real-time PCR로 측정하여 이들 유전자 발현의 변화가 죽상경화증을 포함하는 심혈관질환과 연관되어 있는지를 분석하였다.

## II. 실험재료 및 방법

### 1. 실험균주 및 배양

실험균주로는 *Porphyromonas endodontalis*(ATCC 35406)를 사용하였고, 배지는 Tryptic Soy broth(TS 액체배지; Difco laboratories, Livonia, MI, USA)에 1.5% agar, 5% 면양적혈구, hemin(5µg/ml), vitamin K1(0.2 µg/ml)을 첨가한 TS 한천배지와 Brain Heart Infusion

broth(18.5mg/ml; BHI 액체배지; Difco laboratories)에 yeast extract(5mg/ml), hemin(5µg/ml), vitamin K1(0.2µg/ml)을 첨가한 half-strength BHI 액체배지를 이용하였다. 실험균주를 배지에 접종한 후, 혐기성 배양기(85% N<sub>2</sub>, 10%H<sub>2</sub>, 5%CO<sub>2</sub>; Isotemp, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA)에서 37°C로 배양하였다.

### 2. 관상동맥 내피세포 배양

실험을 위해 사람의 관상동맥 내피세포(human coronary artery endothelial cell; Clonetics®, CC-2585, Walkersville, MD, USA)를 사용하였다. 내피세포의 증식과 실험을 위해 기본 배지인 Endothelial Cell Basal Medium-2(Clonetics®, CC-3156)에 제조사의 지시에 따라 hEGF 0.5ml, hydrocortisone 0.2ml, GA-1000 0.5ml, FBS 25ml, VEGF 0.5ml, hFGF-B 2ml, R3-IGF-1 0.5ml, ascorbic acid 0.5ml 등이 포함된 성장인자 용액(Clonetics®, CC-3202)을 첨가하여 사용하였다. 실험에 이용된 관상동맥 내피세포는 4세대를 넘지 않도록 제한하였고, 5% CO<sub>2</sub> 하에서 37°C로 배양하였다.

### 3. 내피세포 내 세균침투 실험

실험균주가 관상동맥 내피세포에 침투하는 것을 관찰하기 위해 antibiotic protection assay<sup>27,31)</sup>를 시행하였다. 이를 위해 내피세포 CC-2585를 24-well plate에 접종하고, 성장인자용액이 첨가된 Endothelial Cell Basal Medium-2를 1ml씩 첨가한 후 배양하였다. 내피세포가 증식하여 세포 포화상태(confluence)에 이르렀을 때 PBS(pH 7.2)로 세정하고 각 well에 기본 배지 900µl씩을 분주하였다. 실험균주는 BHI 액체배지에서 대수증식기(log phase)로 배양한 후, 기본 배지로 세정하고 균 농도를 흡광도 0.1(600nm)로 조정하였다. 균액 100µl(생균수 1.0×10<sup>7</sup>)를 내피세포 CC-2585가 있는 각 well에 넣고 60분과 90분 동안 배양하였다. 각 well의 CC-2585를 기본 배지로 세정한 다음, 100µg의 metronidazole(Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA)이 첨가된 기본 배지를 1µl씩 다시 각 well에 분주하고 1시간 동안 추가로 배양하여 CC-2585 표면에 붙어있는 실험균주를 사멸시켰다. PBS(pH 7.2)로 CC-2585를 세정하고 각 well에 멸균증류수를 1µl씩 분주한 다음, 30분 후 진탕(vortex)하여 내피세포를 용해시켰다.

내피세포 내에 침투하여 항생제(metronidazole)의 영향을 받지 않고 생존한 *P. endodontalis*가 포함된 내피세포 용해액(lysate)을 1:10으로 단계 희석하고 TS 한천배지 표면에 100µl씩 떨어뜨려 골고루 도말한 후, 37°C에서 4~5

일간 혐기적으로 배양하였다. 배양 후 나타난 *P. endodontalis* 균주의 집락수를 세어 생균수, 즉 CC-2585에 침투한 실험균주의 수를 계산하였다.

#### 4. Total RNA 추출

내피세포 내 세균침투 실험과 동일한 방법으로 실험균주와 내피세포를 준비하였다. 균액 100 $\mu$ l(생균수  $1.0 \times 10^7$ )를 내피세포 CC-2585가 있는 각 well에 넣고 90분 동안 배양한 후, 세정하여 내피세포에 침투하지 못한 실험균주를 제거하였다. RNeasy Mini Kit(Qiagen, Valencia, CA, USA)를 이용해서 제조사의 지시에 따라 내피세포에서 total RNA를 추출하여 실험균으로 하였다. 실험균주로 처리하지 않은 내피세포의 total RNA도 추출하여 대조군으로 하였다. 추출된 RNA의 상태를 확인하기 위해 NanoDrop ND-1000(NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA)과 Agilent bioanalyzer 2100(Agilent technologies, Santa Clara, CA, USA)으로 정량, 정성 분석하였다.

#### 5. cDNA microarray

##### 1) Fluorescent DNA probe의 제작과 hybridization

Total RNA 표본을 증폭시킨 후, 각각의 표본(30 $\mu$ g)을 역전사 효소인 SuperScrip II (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 역전사시키고, Cyanine3-dCTP(Cy3, green)와 Cyanine5-dCTP(Cy5, red)(Amersham Biosciences Corporation, Piscataway, NJ, USA)로 표지(labeling)를 하였다. 표지된 cDNA 혼합물을 에탄올 침전법을 이용하여 농축시킨 후, Cy3와 Cy5로 표지된 cDNA를 30 $\mu$ l의 hybridization solution(GenoCheck, Ansan, Gyeonggi-do, Korea)에 다시 부유시켰다. cDNA를 혼합한 후, OpArray Human genome 35K(OPHSV4, Operon Biotechnologies GmbH, Huntsville, AL, USA) 위에 놓고 MAUI FL chamber(BioMicro systems, Inc. Salt Lake City, UT, USA)로 덮었다. MAUI system(BioMicro systems, Inc.)을 이용하여 슬라이드를 62 $^{\circ}$ C에서 12시간 동안 hybridization하였다. Hybridization된 슬라이드는 실온에서  $2 \times$  SSC, 0.1% SDS로 2분간 수세하고 1X SSC로 3분간 수세한 후, 마지막으로  $0.2 \times$  SSC로 2분간 수세하였다. 3,000 rpm으로 원심분리하고 20초간 건조시켰다.

##### 2) Microarray 자료 분석

Hybridization된 슬라이드는 GenePix 4000B scanner(Axon Instruments, Sunnyvale, CA, USA)를 이용

하여 scanning하였으며, scan된 이미지는 GenePix Pro 5.1(Axon Instruments)과 GeneSpring GX 7.3.1(Silicon Genetics, Redwood City, CA, USA)로 분석하였다. 얻어진 자료의 오류를 줄이고 정확도를 높이기 위해 전체 표준화방법(Global normalization method, GN)과 LOWESS 표준화(LOWESS normalization)를 이용한 강도 기준 표준화방법(Intensity dependent normalization method), 슬라이드 내의 print-tip 표준화방법(Within print-tip normalization method) 등을 이용하여 자료들을 표준화하였다. GeneSpring GX 7.3.1 프로그램을 사용하여 유사성(similarity)을 갖는 자료들로 군집분석(cluster analysis)하였다.

Microarray 분석결과에서 *P. endodontalis* 침투 후 발현이 대조군보다 2배 이상 증가 또는 1/2 이하로 감소한 유전자들을 판별하였으며, 죽상경화증과 관련된 고혈압, 심근경색 시 관찰되는 세포반응과 연관성이 있는 유전자를 선택하여 분석하였다.

#### 6. 실시간 중합효소연쇄반응(Real-Time Polymerase Chain Reaction)

Microarray 결과를 확인하기 위해 real-time PCR을 시행하였다. 죽상경화증, 고혈압, 심근경색과 관련된 유전자 중 적어도 두 가지 이상의 질환과 연관된 10개의 유전자를 선별하여 이들 유전자의 특이 염기서열에 근거한 primer를 제작한 후 real-time PCR을 시행하였다.

##### 1) cDNA 합성

Power cDNA Synthesis Kit(iNtRON Biotechnology, Seongnam, Gyeonggi-do, Korea)를 이용하여 total RNA 1 $\mu$ g으로 cDNA 20 $\mu$ l를 합성하였고, 이것을 real-time PCR의 주형(template)으로 사용하였다.

##### 2) Primer 제작 및 확인

Primer의 디자인은 PCR product 길이를 70~200bp (base pair), Tm을 58~60 $^{\circ}$ C로 하여 Primer Express<sup>®</sup> software(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 이용하여 제작하였다(Table 1). 만들어진 primer의 genome 오염 여부를 확인하기 위해 13% acrylamide gel 을 사용해서 전기영동을 시행하였다.

##### 3) Real-Time PCR

준비된 cDNA와 primer, 2X SYBR Green I master mix(Applied Biosystems)를 이용하여 실험하였다. 95 $^{\circ}$ C에서 30초간 변성(denaturation)한 후, 60 $^{\circ}$ C에서 30초간 결합(annealing)하고 72 $^{\circ}$ C에서 30초간 신장(extension)

**Table 1.** Primers and product sizes for RT-PCR analysis\*

Gene	Primer	Sequence	Product size (bp)
MMP1	Forward	5' -TGG ATC CAG GTT ATC CCA AA-3'	183
	Reverse	5' -TCC TGC AGT TGA ACC AGC TA-3'	
PTX3	Forward	5' -GTG GGT GGA GAG GAG AAC AA-3'	186
	Reverse	5' -AAT CTG CAG GAT TCC TCC CT-3'	
CAV1	Forward	5' -TTT CCC TGC CTC TCA TCA AC-3'	104
	Reverse	5' -CCG GTG ATG GAT TAG TTT GG-3'	
EDN1	Forward	5' -AGC CCT AGG TCC AAG AGA GC-3'	84
	Reverse	5' -TTG GCT AGC ACA TTG GCA T-3'	
BAX	Forward	5' -TTT GCT TCA GGG TTT CAT CC-3'	111
	Reverse	5' -CAC TCG CTC AGC TTC TTG GT-3'	
HMGB1	Forward	5' -CTG TCC ATT GGT GAT GTT GC-3'	179
	Reverse	5' -TCA GCC TTG ACA ACT CCC TT-3'	
CCND1	Forward	5' -ACG GCG TTG TAC CTG TAG GA-3'	176
	Reverse	5' -TGT GAG CTG GCT TCA TTG AG-3'	
CD40	Forward	5' -GGC TTC TTC TCC AAT GTG TCA-3'	78
	Reverse	5' -CAC AAC CAG GTC TTT GGT CTC-3'	
MYC	Forward	5' -CCA CAG CAA ACC TCC TCA CAG-3'	105
	Reverse	5' -GCA GGA TAG TCC TTC CGA GTG-3'	
NFKBIA	Forward	5' -TGT GCT TCG AGT GAC TGA CC-3'	77
	Reverse	5' -CCC ACA TCA CTG AAC GCT TA-3'	

\*The full names of the genes and their UniGene IDs are given in Table 3.

하는 과정을 40회 반복하였다. PCR 반응을 위한 용액(20 $\mu$ l)은 0.5 $\mu$ l의 template, 0.8 $\mu$ l의 primer(forward+reverse, 10pmol/ $\mu$ l), 10 $\mu$ l의 2X SYBR Green I mixture(Applied Biosystems) 및 8.7 $\mu$ l의 증류수로 구성되었고, ABI 7900 HT(Applied Biosystems) 상에서 real-time PCR을 시행하였다.

Real-time PCR 결과는 relative standard curve method를 이용하여 분석하였다. House keeping gene인 GAPDH와 대조군의 cDNA를 기본 주형으로 하여 각각 1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16로 희석하여 standard curve를 도출해내었고, 이를 이용해서 각각의 주형의 변이에서 기인하는 증폭 양을 표준화하였다. 또한 GAPDH를 기준으로 각 유전자의 정량을 유도해내었으며, 대조군의 발현양을 기준으로 실험군의 상대적인 정량을 산출하였다. Real-time PCR 실험은 3번 반복하여 평균값을 산출하였고, 표준편차값을 오차범위로 나타내었다.

### 7. 세포 신호전달 경로 분석(Cell Signaling Pathway Analysis)

Microarray에서 대조군과 비교하여 발현이 증가한 유전

자 중 심혈관질환과 관련된 유전자들과 이들이 연관된 KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) pathway와의 유의성 여부를 평가하기 위해, GenPlex™ V3.0 software program(Istech, Seoul, Korea)을 사용하여 p-value를 산출하였다.

## III. 실험성적

### 1. *P. endodontalis*의 관상동맥 내피세포 침투

*P. endodontalis*(ATCC 35406)는 사람의 관상동맥 내피세포에 침투하였다(Table 2). 침투시간에 따라 침투율에 차이를 보였는데, 침투시간이 60분일 때에는 침투율이 0.00984%이었고, 90분일 때에는 0.017%로 60분일 때보다 증가했다.

### 2. cDNA microarray

Microarray 분석에서 표준화를 시행하여 얻은 27,634개의 유전자 중, 대조군에 비해 2배 이상 과도하게 발현된 유전자 수는 625개였고, 1/2이하로 감소된 유전자 수는 154

**Table 2.** Invasion of human coronary artery endothelial cells by *P. endodontalis* strains

Invasion time	No. ( $\times 10^7$ ) of bacteria added <sup>a</sup>	No. ( $\times 10^3$ ) of bacteria invading $\pm$ S.D. (%) <sup>b</sup>
60 min	1.25	1.23 $\pm$ 0.471 (0.00984 $\pm$ 0.00377)
90 min	1.25	2.13 $\pm$ 0.047 (0.017 $\pm$ 0.000376)

<sup>a</sup>Defined as the actual number of viable cells of *P. endodontalis* inoculum as determined by plating method. Bacterial cell suspension was adjusted to optical density of 0.1 at 600nm and 100 $\mu$ l of the suspension was added to each well (1ml) of a 24-well plate.

<sup>b</sup>Defined as the number and percentage of *P. endodontalis* cells protected from metronidazole killing, which represents invading bacterial cells, after the infection period. Values are means ( $\pm$  standard deviation) of triplicate.

**Table 3.** Upregulated genes relevant to CVD including atherosclerosis

(The genes expressed more than two-folds are listed in this table.)

UniGene ID	Gene Symbol	Description	Intensity
Hs.83169	MMP1	matrix metalloproteinase 1 (interstitial collagenase)	58.3479
Hs.567326	PTX3	pentraxin-related gene, rapidly induced by IL-1 beta	6.2994
Hs.789	CXCL1	chemokine (C-X-C motif) ligand 1	5.6684
Hs.559623	CXCL8	Interleukin-8	4.8338
Hs.74034	CAV1	caveolin 1 (caveolae protein)	3.3944
Hs.513457	IL4R	interleukin 4 receptor	3.0991
Hs.511899	EDN1	endothelin 1	3.0499
Hs.3280	CASP6	caspase 6 (apoptosis-related cysteine peptidase)	3.0241
Hs.164226	THBS1	thrombospondin 1	2.8585
Hs.489615	PBEF1	Pre-B-cell colony enhancing factor 1	2.8566
Hs.189329	SMURF1	SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 1	2.7086
Hs.159428	BAX	BCL2-associated X protein	2.6950
Hs.434102	HMGB1	high-mobility group box 1	2.6509
Hs.75862	SMAD4	SMAD, mothers against DPP homolog 4 (Drosophila)	2.4744
Hs.516966	BCL2L1	BCL2-like 1	2.4527
Hs.244723	CCNE1	cyclin E1	2.4184
Hs.523852	CCND1	cyclin D1	2.4112
Hs.306343	TNFAIP8L3	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 8-like 3	2.3764
Hs.472860	CD40	CD40 antigen (TNF receptor superfamily member 5)	2.2558
Hs.533977	TXNIP	thioredoxin interacting protein	2.2123
Hs.498727	DHCR24	24-dehydrocholesterol reductase	2.1841
Hs.202453	MYC	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)	2.1578
Hs.521456	TNFRSF10B	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b	2.0932
Hs.435765	ENPEP	glutamyl aminopeptidase (aminopeptidase A)	2.0802
Hs.440848	VWF	von Willebrand factor	2.0565
Hs.333418	FXYD5	FXYD domain containing ion transport regulator 5	2.0494
Hs.495138	MAPKAP1	mitogen-activated protein kinase associated protein 1	2.0436
Hs.520028	HSPA1A	heat shock 70kDa protein 1A	2.0324
Hs.527653	CD55	decay accelerating factor for complement	2.0316
Hs.445351	LGALS1	lectin, galactoside-binding, soluble, 1 (galectin 1)	2.0292
Hs.81328	NFKBIA	NF-kB inhibitor alpha, nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor alpha	2.0181

개였다. 2배 이상 증가된 유전자 중에서 죽상경화증, 고혈압, 심근경색 등 심혈관질환과 관련된 유전자를 Table 3에 기술하였다.

교원섬유 분해효소인 MMP-1의 발현이 가장 높게 나타났고, PTX3, IL4R, CXCL1, CXCL8과 같은 염증성 cytokine과 그 수용체 및 chemokine의 발현이 크게 증가하였다. 또한 세포자멸사(apoptosis)에 관여하는 CASP6, BAX, BCL2L1, MYC, TNFRSF10B, NFKBIA 등의 발현도 높게 나타났다. Transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ )의 세포 내 신호전달 매개체인 SMAD4와 SMURF1, 세포주기(cell cycle) 조절인자인 CCND1과 CCNE1도 많이 증가되었다. 그 외에도 THBS1, VWF 같은 혈액응고 인자들과 CD40, HSPA1A, CD55 등의 면역반응 관련 요소들의 발현 정도도 증가되었다.

### 3. Real-Time PCR

Real-time PCR을 시행한 후 대조군의 발현양을 기준으로 실험군의 상대적인 정량을 산출한 결과, MMP-1, PTX3, BAX, CAV1, NFKBIA, HMGB1, EDN1, CCND1, MYC, CD40 모두 대조군보다 높게 발현되었다. 이것을 microarray에서의 측정치와 비교해 본 결과, 10개의 유전자 모두 microarray 결과와 비슷한 정도로 증가되는 것이 확인되었다(Table 4).

### 4. 세포 신호전달 경로 분석

대조군과 비교하여 *P. endodontalis* 침투 시 발현에 차이를 보인 유전자들이 관련 KEGG pathway에서 어느 정도의 영향력을 미치는지를 평가하기 위해 p-value를 산출하였으며 Table 5와 같은 결과를 얻었다.

발현에 차이를 보인 유전자 중, CAV1, THBS1, VWF, CCND1 등이 포함되어 있는 focal adhesion pathway의 p-value가 가장 낮게 산출되었다. 즉 이러한 유전자들의 발현 증가는 focal adhesion pathway에서 가장 유의성 있게 영향을 미치는 것으로 나타났다. 이 외에도 세포주기 정지와 세포자멸사를 통해 세포성장을 억제하는 p53 signaling pathway에서는 THBS1, TNFRSF10B, CCND1, CCNE1, BAX 등이 유의성 있게 영향을 미치는 것으로 나

타났다. Cell cycle에서는 SMAD4, CCND1, CCNE1 등이 유의성 있게 나타났고, SMAD4, THBS1, MYC 등이 포함된 TGF- $\beta$  signaling pathway에서도 각 유전자들이 높은 신뢰도를 보이고 있었다. 죽상경화증의 진행에서 중요한 역할을 하는 apoptosis pathway와 cytokine-cytokine receptor interaction에서도 여러 유전자들이 주요한 작용을 하고 있는 것으로 나타났다. 본 실험과 관련된 유전자 중에서는 CASP6, BCL2L1, TNFRSF10B, BAX 등이 apoptosis pathway에서 유의성 있게 나타났고, CXCL1, CXCL8, CD40, IL4R, TNFRSF10B 등이 cytokine-cytokine receptor interaction에서 높은 신뢰도를 보였다. Cytokine과 성장인자들에 대한 세포반응 조절에 관여하는 JAK-STAT signaling pathway에서는 MYC, IL4R, BCL2L1, CCND1 등이, 선천성 면역반응과 관련된 toll-like receptor signaling pathway에서는 CXCL8, CD40 등이 유의성 있게 나타났다. 이러한 결과를 통해 *P. endodontalis*의 침투 후 내피세포에서 발현이 증가한 유전자들은 KEGG pathway에 유의성 있는 영향을 미칠 수 있음을 알 수 있다.

## IV. 총괄 및 고안

세균이 조직에 부착(adhesion)하는 것은 세균 감염의 첫 번째 단계에서 나타나며, 감염과정 중 가장 결정적인 단계이다<sup>32)</sup>. 부착된 세균 중의 일부는 조직 내로 침투하는데, 세균은 침투과정을 통해 숙주의 방어기능과 면역체계에 저항하면서 증식하여 퍼져나가게 되므로<sup>33)</sup>, 침투는 세균의 병원성에 기여하는 중요한 인자이다. 본 연구에서는 *P. endodontalis*와 심혈관질환과의 연관성을 알아보기 위해 *P. endodontalis*로 사람의 관상동맥 내피세포를 감염시켰고, 이 때 균이 내피세포 내로 직접 침투해 들어갔음을 확인하였다.

*P. endodontalis*와 심혈관질환과의 관련성에 대한 연구는 현재까지 거의 이루어지지 않았는데, Dorn<sup>31)</sup> 등은 *P. endodontalis*의 여러 가지 균주(strain) 중 *P. endodontalis* ATCC 35406, *P. endodontalis* H11a-e, *P. endodontalis* R-41이 사람의 혈관 내피세포와 평활근세포에 침투하는지를 실험하였다. 그 결과 *P. endodontalis* ATCC 35406만이 세포 내로 침투하는 것으로 나타났으며,

**Table 4.** Comparison of gene expression measured by microarray and real-time PCR

	MMP-1	PTX3	BAX	CAV1	NFK-BIA	HMGB1	EDN1	CCND1	MYC	CD40
Intensity in cDNA microarray	58.3479	6.2994	2.6950	3.3944	2.0181	2.6509	3.0499	2.4112	2.1578	2.2558
Intensity in real-time PCR	26.2913	9.6443	5.7074	4.0350	2.5568	2.5110	2.1588	2.0820	1.9585	1.7902

**Table 5.** Pathway analysis of the significantly upregulated genes

KEGG Pathway	P-value	UiGene ID (Gene Symbol)	
Focal adhesion	$3.07 \times 10^{-12}$	Hs.74034 (CAV1)	Hs.369920 (RAP1B)
		Hs.125503 (MAPK10)	Hs.439726 (LAMB2)
		Hs.164226 (THBS1)	Hs.440848 (VWF)
		Hs.203717 (FN1)	Hs.479747 (BCAR1)
		Hs.212332 (CAV2)	Hs.508716 (COL4A2)
		Hs.247077 (RHOA)	Hs.523852 (CCND1)
		Hs.252820 (PGF)	Hs.603096 (CAV2)
		Hs.295626 (ITGB1)	Hs.643813 (ITGB1)
P53 signaling pathway	$5.06 \times 10^{-9}$	Hs.79101 (CCNG1)	Hs.414795 (SERPINE1)
		Hs.164226 (THBS1)	Hs.521456 (TNFRSF10B)
		Hs.226390 (RRM2)	Hs.523852 (CCND1)
		Hs.244723 (CCNE1)	Hs.631546 (BAX)
Cell cycle	$2.41 \times 10^{-8}$	Hs.75862 (SMAD4)	Hs.460184 (MCM4)
		Hs.147433 (PCNA)	Hs.492407 (YWHAZ)
		Hs.244723 (CCNE1)	Hs.523852 (CCND1)
		Hs.350966 (PTTG1)	Hs.591697 (MAD2L1)
Wnt signaling pathway	$2.91 \times 10^{-8}$	Hs.2256 (MMP7)	Hs.467192 (PPP2R1A)
		Hs.75862 (SMAD4)	Hs.516297 (TCF7L1)
		Hs.125503 (MAPK10)	Hs.523852 (CCND1)
		Hs.202453 (MYC)	Hs.591863 (FZD6)
		Hs.247077 (RHOA)	Hs.591953 (PLCB3)
ECM-receptor interaction	$5.45 \times 10^{-8}$	Hs.164226 (THBS1)	Hs.440848 (VWF)
		Hs.203717 (FN1)	Hs.502328 (CD44)
		Hs.295626 (ITGB1)	Hs.508716 (COL4A2)
		Hs.439726 (LAMB2)	Hs.643813 (ITGB1)
TGF- $\beta$ signaling pathway	$1.26 \times 10^{-5}$	Hs.75862 (SMAD4)	Hs.247077 (RHOA)
		Hs.164226 (THBS1)	Hs.463642 (RPS6KB1)
		Hs.202453 (MYC)	Hs.467192 (PPP2R1A)
Cell Communication	$1.27 \times 10^{-5}$	Hs.164226 (THBS1)	Hs.440848 (VWF)
		Hs.203717 (FN1)	Hs.508716 (COL4A2)
		Hs.439726 (LAMB2)	Hs.594444 (LMNA)
Apoptosis	$1.63 \times 10^{-5}$	Hs.280342 (PRKAR1A)	Hs.521456 (TNFRSF10B)
		Hs.389452 (CASP6)	Hs.631546 (BAX)
		Hs.516966 (BCL2L1)	Hs.632790 (IL3RA)
MAPK signaling pathway	$2.70 \times 10^{-4}$	Hs.2128 (DUSP5)	Hs.298654 (DUSP6)
		Hs.125503 (MAPK10)	Hs.369920 (RAP1B)
		Hs.202453 (MYC)	Hs.435811 (ARRB2)
		Hs.274402 (HSPA1B)	Hs.524430 (NR4A1)
Cytokine-cytokine receptor interaction	$6.06 \times 10^{-4}$	Hs.624 (CXCL8)	Hs.513457 (IL4R)
		Hs.789 (CXCL1)	Hs.521456 (TNFRSF10B)
		Hs.1116 (LTBR)	Hs.551925 (CXCL8)
		Hs.443948 (CXCL8)	Hs.561078 (CXCL8)
		Hs.472860 (CD40)	Hs.632790 (IL3RA)
PPAR signaling pathway	$9.62 \times 10^{-4}$	Hs.83169 (MMP1)	Hs.406678 (ACSL1)
		Hs.388034 (RXRB)	Hs.476365 (SCP2)
JAK-STAT signaling pathway	0.002126	Hs.202453 (MYC)	Hs.523852 (CCND1)
		Hs.513457 (IL4R)	Hs.632790 (IL3RA)
		Hs.516966 (BCL2L1)	
Toll-like receptor signaling pathway	0.020656	Hs.624 (CXCL8)	Hs.472860 (CD40)
		Hs.125503 (MAPK10)	Hs.551925 (CXCL8)
		Hs.443948 (CXCL8)	Hs.561078 (CXCL8)



이 결과를 바탕으로 하여 본 실험에서도 *P. endodontalis* ATCC 35406이 사람의 혈관 내피세포에 침투하는지를 먼저 확인하였다. 즉 혈관세포에 단순히 부착을 하는 세균보다 침투하는 세균이 더 많은 세포반응을 유도하게 되고, 이때 분비되는 물질이 결과적으로 죽상경화증, 나아가서 심장질환을 유도할 가능성이 더 크기 때문에, 세포가 세균과 반응하여 심장질환과 관련되는 일련의 변화가 있는지를 관찰하는 본 연구의 목적상 침투력이 있는 *P. endodontalis*를 선택하였다.

한편 내피세포에 대한 *P. endodontalis*의 침투력은 같은 속에 포함되는 *P. gingivalis*에 비해 1/10정도 낮은 것으로 보고되었다<sup>31)</sup>. 그 이유는 침투를 위해서는 부착이 중요한데, *P. endodontalis*에서는 *P. gingivalis*의 fimbriae와 같은 특징적인 부착기구가 없는 것으로 알려져 있으므로, *P. gingivalis*보다 침투율이 낮은 것으로 생각된다.

*P. endodontalis*는 이러한 침투과정을 통해 내피세포에 직접적인 손상을 유발하여 내피세포가 죽상경화증 및 심혈관질환의 발생이나 진행에 관련된 물질을 분비하도록 만들고 정상 내피세포와 비교했을 때 유전자 발현에도 차이를 보일 것으로 예상되어 microarray를 통해 발현되는 유전자의 변화를 관찰하였다. Microarray 분석결과, 대조군과 실험군 내피세포 유전자를 비교했을 때 실험군 유전자 중에서 발현 정도가 2배 이상 증가된 유전자가 625개, 1/2이하로 감소된 유전자가 154개였다. 발현이 크게 증가한 유전자들 중 다수가 죽상경화증 및 심혈관질환과 연관된 염증성 cytokine 및 chemokine, 세포자멸사, 혈액응고반응, 면역반응 등과 관련성이 있는 것으로 나타났다. 발현이 감소한 유전자들이 죽상경화증에 미치는 영향에 대해서는 알려진 바가 거의 없으므로 이 부분에 대해서 앞으로 더 많은 연구가 필요할 것으로 보인다.

Microarray 실험결과 발현 정도가 가장 현저하게 증가한 것은 MMP-1이었다. MMP-1은 죽상경화판의 섬유성 모자를 형성하는 교원섬유를 과도하게 분해하여 경화판을 과열시킬 수 있다. 이 때 tissue factor와 같은 응고 인자가 혈액으로 노출되어 혈전이 형성되며, 크기가 큰 혈전이 혈관의 좁은 부위에 도달하여 혈관을 막을 경우 허혈성 상태가 되어 급성 심근경색증이나 심장 발작 등을 일으킬 수 있다<sup>13,34)</sup>. 따라서 혈관 내피세포 내로 침투한 *P. endodontalis*는 다른 요소들보다 더 위험하게 작용할 수도 있다고 여겨진다.

또한 죽상경화증은 여러 가지 염증 매개체와 관련된 만성 염증 질환이므로, *P. endodontalis*가 관상동맥 내피세포를 침투하는 과정에서 염증성 cytokine이나 chemokine의 발현을 변화시키는지를 분석하는 것은 *P. endodontalis*의 침투와 죽상경화증과의 관련성을 규명하는데 있어서 중요하다. Microarray 분석결과, *P. endodontalis*가 침투하는 과정에서 관상동맥 내피세포에서는 PTX3와 같은 염증성

cytokine, IL4의 수용체인 IL4R, 그리고 CXCL1, CXCL8 등과 같은 chemokine의 발현이 크게 증가하였다.

그 중에서 PTX3는 IL-1 $\beta$ 에 의해 유리되는 염증성 cytokine으로, 염증 부위의 단핵/대식세포, 내피세포, 평활근세포, 섬유아세포, 지방세포 등에서 생산되고 특히 혈관벽에 염증이 있을 때 높은 정도로 발현되며 심혈관질환과도 연관되어 나타난다<sup>35)</sup>. 본 실험에서 대조군보다 6배 이상이나 높게 발현된 PTX3는 혈관의 항상성 유지에 중요한 역할을 하는 내피세포의 손상을 초래하여 죽상경화증의 발생과 진행에 큰 영향을 미칠 것으로 여겨진다.

IL4R은 염증성 cytokine인 IL4의 수용체로 본 실험에서 3.0991의 발현 정도를 보였다. IL4는 사람의 혈관 내피세포에서 산화와 염증성 반응을 유발하고 VCAM-1, E-selectin, chemokine (C-C motif) ligand 2(CCL2, MCP-1으로도 명명) 등의 발현을 증가시킴으로써 죽상경화증의 초기 단계에 영향을 미친다<sup>36)</sup>.

Chemokine은 세포의 화학주성을 유도하는 cytokine으로, 죽상경화증과 관련된 대표적인 염증성 chemokine은 CCL2와 CXCL8(IL8)이다<sup>37)</sup>. 이들은 단핵/대식세포를 감염부위나 손상된 혈관벽 쪽으로 끌어당기는 화학주성 인자로 작용하고 염증세포의 생성, 분화 등에 필수적인 역할을 하여 죽상경화증을 유도하고 죽상경화판을 취약하게 한다. 앞서 언급한 바와 같이 본 실험에서는 CXCL1(5.6684), CXCL8(4.8338)의 발현 정도가 높게 나타났고, CCL2도 2배 가까이 증가(1.907)하였다. 그 외에 CXCL12도 다소 증가(1.6458)하였다.

*P. endodontalis*와 중간 유사성이 큰 *P. gingivalis*는 내피세포에 침투하는 과정에서 CCL2, CXCL8 등의 염증성 chemokine 뿐만 아니라 VCAM-1, ICAM-1, P-selectin, E-selectin과 같은 부착분자들의 발현도 크게 증가시키는 데<sup>38)</sup>, 이 때 fimbriae가 중요한 역할을 하는 것으로 보고되고 있다<sup>29,38)</sup>. Fimbriae가 없는 것으로 알려진 *P. endodontalis*를 이용한 본 실험의 경우, E-selectin(1.6147)을 제외한 다른 부착분자들의 발현양에는 변화가 거의 없는 것으로 나타났다.

이처럼 발현이 증가된 염증성 cytokine과 chemokine들이 관련 KEGG pathway인 cytokine-cytokine receptor interaction에서 어느 정도의 영향력을 미치는지를 알아보기 위해 GenPlex™ V3.0 프로그램으로 분석한 결과, 매우 높은 유의성이 있는 것으로 나타났다( $p < 0.000606$ ).

한편 세포자멸사는 세포의 자연적이고 예정된 죽음을 나타내며, 세포괴사와는 구별되는 개념이다. 이것은 죽상경화증과 죽상경화판의 성장에서 매우 중요한 역할을 하는데, 세포자멸사가 증가하면 죽상경화판이 과열되어 혈전이 형성되고 그로 인해 심근경색과 같은 급성 허혈성 증상이 나타날 수 있다<sup>39)</sup>. 반면 세포자멸사가 감소하면 경화판은 안정

적이지만 시간이 지남에 따라 병소의 섬유성 모자의 크기가 커져서 동맥이 폐색(occlusion)될 수도 있다<sup>39)</sup>. 죽상경화판에서는 대개 세포자멸사가 증가하는 것으로 알려져 있으나<sup>38)</sup>, 균에 의한 감염의 경우, 세균이나 바이러스의 특정 단백질이 숙주 세포의 세포자멸사를 억제할 수도 있는 것으로 보고되고 있다<sup>40,41)</sup>. 세포자멸사와 관련된 기전 중에는 세포 외의 사망 리간드(death ligand)가 세포 표면의 사망 수용체(death receptor)와 결합하는 외인성 경로(extrinsic pathway)를 통하는 경우와 사립체(mitochondria) 등의 내인성 경로(intrinsic pathway)를 통하는 경우가 있다<sup>42)</sup>.

본 실험에서 세포자멸사와 관련되어 발현이 증가된 유전자는 CASP6, BAX, BCL2L1, MYC, TNFRSF10B, NFKBIA 등이었다. CASP6는 외인성 경로나 내인성 경로를 통해 발현이 증가된 것으로 보이며, CASP6 외의 다른 caspase의 발현 정도에는 큰 변화가 없는 것으로 나타났다. BAX, BCL2L1 등이 포함되어 있는 BCL-2 family 역시 세포자멸사를 조절하는 대표적인 요소 중의 하나로, 여기에는 세포자멸사를 유발하는 단백질인 BAX, BCL-XS, BAD, BAK 등과 세포자멸사를 억제하는 단백질인 BCL-2, BCL2L1(BCL-XL), BCL2L2(BCL-W), myeloid cell leukaemia-1(MCL-1) 등이 속하고 있다<sup>43)</sup>. 본 실험에서는 세포자멸사 유발 유전자인 BAX와 억제 유전자인 BCL2L1의 발현이 모두 2배 이상 증가했다. BCL-2 family에 속하는 여러 요소들은 서로 같은 것끼리 homodimer를 이루거나 다른 것과 heterodimer를 이루어 상호작용함으로써 세포자멸사를 억제하거나 촉진시킨다. 그 중 BCL-2와 BAX의 상호작용은 매우 중요하며 이 두 단백질의 균형 및 발현비(BCL-2/BAX)에 따라 세포자멸사가 증가 또는 감소될 수 있다<sup>44)</sup>. 본 실험에서는 BCL-2와 비슷한 BCL2L1(BCL2-like 1)의 발현 정도가 2.4527이었고 BAX의 발현 정도는 2.6950이었다. 이 두 유전자의 발현비는 0.91 정도로 BCL2L1에 비해 BAX의 발현 정도가 약간 더 높지만 발현비가 거의 1에 가깝게 나타났으므로, 본 실험에서는 이 두 유전자가 세포자멸사의 전체적인 증가나 감소에 큰 영향을 미치지 않았을 것으로 보인다.

세포자멸사와 관련된 또 다른 유전자인 MYC(c-MYC)의 발현도 2배 이상 크게 증가했다. MYC는 세포주기의 진행, 세포의 형질전환에서 기능을 하는 핵의 인단백(phosphoprotein)이며, 세포자멸사를 유발하고 죽상경화증의 병인 및 진행에 중요한 역할을 한다<sup>45)</sup>. 또한 TNF receptor superfamily 중의 하나인 TNFRSF10B(DR5, TRAIL-R로도 명명)는 본 실험에서 약 2배 정도의 발현 증가를 보였다. TNF- $\alpha$ 는 세포자멸사를 유발하기도 하고 억제하기도 하는데, Dimmeler 등<sup>46)</sup>의 보고에 의하면 TNF- $\alpha$ 가 내피세포에서 BCL-2를 분해하고 caspase-3를 활성화하여 세포자멸사를 유도할 수 있다고 하였다. 본 실험에서는

TNFRSF10B가 여러 신호전달 경로 중 p53 signaling pathway와 apoptosis pathway에서 중요한 작용을 하는 것으로 보이므로, 세포자멸사를 증가시키는 역할을 하는 것으로 여겨진다. 그 외에 nuclear factor-kappa-light-chain enhancer of activated B cells(NF-kB)와 죽상경화증과의 관계 역시 상반된 의견이 공존하여 병소를 유발하기도 하고 억제하기도 하는 것으로 알려져 있다<sup>47)</sup>. 세포자멸사와 관련된 역할로만 한정해서 본다면, NF-kB는 세포자멸사를 억제하는 다양한 인자들을 조절하여 자멸사를 억제하고 죽상경화증도 억제한다<sup>47)</sup>. 본 실험에서 발현이 높게 나타난 NFKBIA는 NF-kB의 억제제이므로, 이러한 NFKBIA는 결국 세포자멸사를 유발할 것으로 판단된다.

또한 CASP6, BCL2L1, TNFRSF10B, BAX의 증가는 apoptosis pathway에서 유의성 있게 영향을 미치는 것으로 분석되었고(Table 5), BAX와 TNFRSF10B 역시 p53 signaling pathway에서 중요한 작용을 하는 것으로 나타났다(Table 5). 따라서 *P. endodontalis*가 관상동맥 내피세포에 침투한 경우, 죽상경화증과 관련된 세포자멸사는 결과적으로 증가할 것으로 보인다. 그러나 *Chlamydia* 속이나 cytomegalovirus와 같은 미생물에 의한 감염일 경우에는 세포자멸사가 감소한다는 보고<sup>40,41)</sup>도 있으므로, 이 부분에 대해서는 앞으로 더 많은 연구가 필요할 것이다.

한편 THBS1, VWF와 같은 혈액응고 관련 단백질들의 발현 정도도 높게 나타났다. 혈액응고는 미생물 감염에 의한 죽상경화증 발생에서 중요한 기전이며, 혈전형성 과정에서도 중요하다. Thrombospondin은 세포외기질 단백질의 한 종류로, 세포-세포간이나 세포-세포의 기질간 신호전달에 참여하는 당단백질(glycoprotein)이다. 트롬빈 등에 의해 혈소판이 자극을 받아 활성화되면 THBS1이 분비되어 혈액응고와 혈관의 항상성 유지에 중심적인 역할을 하게 된다<sup>48)</sup>. 또한 상처의 회복 및 조직의 재생에도 중요한 작용을 하며, 특히 죽상경화가 진행 중인 혈관의 내피세포나 손상 부위에서 세포의 증식과 이동, 부착, 세포자멸사 등을 조절한다<sup>49)</sup>.

VWF는 내피세포에서 합성되어 저장되는데, 혈소판 응집을 중재하고 혈소판이 혈관 내피세포에 부착되도록 한다. 내피세포가 손상되었을 때 VWF의 발현이 증가하므로 VWF는 내피세포 기능장애의 지표로 여겨지고 있다<sup>49)</sup>. 본 실험에서 *P. endodontalis*의 침투에 의해 내피세포가 손상되었고 이에 따라 VWF의 발현양도 증가한 것으로 보인다. THBS1, VWF은 focal adhesion, ECM-receptor interaction, cell communication 등의 여러 신호전달 경로에서 유의성 있게 영향을 미치고 있다(Table 5).

한편 면역반응과 관계된 요소들의 발현도 증가되어 CD40, HSPA1A, CD55의 발현 정도가 높게 나타났다. CD40은 TNF family에 속하는 단백질로 세포의 증식, 분

화 및 세포자멸사를 조절하며, 죽상경화 병소에서 매우 중요하다<sup>45,50</sup>. 이것은 CD40 ligand(CD40L, CD154)와 결합을 이루어 죽종형성(atherogenesis)의 시작, 진행, 파열 등 모든 단계에서 죽종형성과 연관된 세포를 자극하여 여러 가지 물질을 생산한다<sup>51</sup>. 본 실험에서 CD40은 cytokine-cytokine receptor interaction과 toll-like receptor signaling pathway에서 주요한 작용을 하고 있는 것으로 분석되었다(Table 5).

또한 heat shock protein(HSP)은 세포가 고온으로 자극되었을 때 다량으로 생성되는 단백질로, 사람의 죽상경화 병소에서 높게 발현된다. 감염, 산화된 저밀도지단백, 고혈압 등의 죽상경화증 위험 요소들은 heat shock 전사요소(transcription factor)들을 활성화시킴으로써 내피세포와 평활근세포, 대식세포에서 HSP가 과도하게 발현되도록 한다<sup>52</sup>. HSP는 분자량에 따라 몇 가지로 나뉘는데, 본 실험에서는 분자량이 70kDa(HSP70)인 heat shock 70kDa protein 1A(HSPA1A)와 60kDa(HSP60)인 heat shock 60kDa protein 1(HSPD1)의 발현정도가 각각 2.0324, 1.6971로 높게 나타났다.

한편 동맥 내막에서 염증에 기여하는 요소들 중에 보체계(complement system)도 면역반응과 관련이 있으며, 사람의 죽상경화 병소에서 활성화된다<sup>53</sup>. 본 실험에서는 CD55가 높게 발현되었다.

Microarray 분석 후 결과를 확인, 검증하기 위해 real-time PCR을 시행하였다. 이를 위해 microarray에서 가장 높은 발현 정도를 보였던 MMP-1과 염증성 cytokine인 PTX3, 세포자멸사와 관련된 BAX, NFKBIA, MYC, 면역반응과 관계된 CD40을 선택하였고, 그 밖에 죽상경화증과 연관된 고혈압이나 심근경색과 관련이 있는 CAV1, EDN1, HMGB1, CCND1을 선택하였다. Real-time PCR을 통해 얻은 결과는 microarray의 결과와 대체로 일치하였다.

위와 같이 microarray와 real-time PCR에서 얻어진 결과들로 미루어 보아 *P. endodontalis*는 사람의 관상동맥 내피세포에서 심혈관질환과 관련된 여러 가지 세포반응을 나타내며, 죽상경화증의 위험 요소인 감염의 원인이 되는 세균 중의 하나로서 다른 위험 요소들과 함께 오랜 기간 만성적으로 작용할 경우 죽상경화증 등의 심혈관질환을 유발할 수 있다고 생각된다.

## V. 결 론

본 연구에서는 *Porphyromonas endodontalis*(ATCC 35406)와 죽상경화증 및 심혈관질환과의 관계를 알아보기 위해, *P. endodontalis*가 사람의 관상동맥 내피세포에 침투했을 때 나타나는 유전자 발현의 변화를 microarray와

real-time PCR로 측정하였고, 발현이 증가된 유전자 중에서 죽상경화증과 연관된 유전자들이 관련 KEGG pathway 상에서 유의성 있는 영향을 미치는지를 분석하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. *P. endodontalis*는 사람의 관상동맥 내피세포에 침투하였다.
2. Microarray 분석결과, 대조군보다 발현이 2배 이상 증가된 유전자는 625개였고, 1/2이하로 감소된 유전자는 154개였다.
3. 발현이 2배 이상 증가된 유전자 중에는 PTX3, IL4R, CXCL1, CXCL8 등의 염증성 cytokine 및 chemokine, CASP6, BAX, BCL2L1, MYC, TNFRSF10B, NFKBIA 등의 세포자멸사 관련 유전자들, THBS1, VWF와 같은 혈액응고 관련 단백질들, CD40, HSPA1A, CD55 등의 면역반응 관련 유전자들이 포함되었다.
4. Microarray 분석결과를 확인하기 위해 MMP-1, PTX3, BAX, CAV1, NFKBIA, HMGB1, EDN1, CCND1, MYC, CD40으로 real-time PCR을 시행하였고, 그 결과 microarray에서와 마찬가지로 발현 정도가 대조군보다 모두 높게 나타났다.
5. 죽상경화증 및 심혈관질환과 연관된 유전자들이 관련 KEGG pathway 상에서 미칠 수 있는 영향력을 분석한 결과, p53 signaling pathway, TGF- $\beta$  signaling pathway, apoptosis pathway, cytokine-cytokine receptor interaction, JAK-STAT signaling pathway, toll-like receptor signaling pathway 등 죽상경화증과 밀접한 관련이 있는 경로에서 유의성을 보였다.

따라서 *P. endodontalis*가 사람의 관상동맥 내피세포에 만성적으로 작용했을 때, 심혈관질환에서 중요한 부분을 차지하는 죽상경화증을 유발하는 위험 요소 중의 하나로 작용할 수 있을 것으로 판단된다. 이와 관련된 자세한 기전을 이해하기 위해서는 앞으로 더 많은 연구가 필요할 것으로 보인다.

## 참고문헌

1. van Winkelhoff AJ, Carlee AW, de Graaff J. Bacteroides endodontalis and other black-pigmented Bacteroides species in odontogenic abscesses. *Infect Immun* 49(3):494-497, 1985.
2. Seltzer S, Farber PA. Microbiologic factors in endodontology. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 78(5):634-645, 1994.
3. van Steenberg TJM, van Winkelhoff AJ, Mayrand D, Grenier D, De Graaff J. Bacteroides endodontalis sp. nov., an asaccharolytic black-pigmented Bacteroides species from infected dental root canals. *Int J Syst*

- Bacteriol* 34(2):118-120, 1984.
4. Hashioka K, Yamasaki M, Nakane A, Horiba N, Nakamura H. The relationship between clinical symptoms and anaerobic bacteria from infected root canals. *J Endod* 18(11):558-561, 1992.
  5. Machado de Oliveira JC, Siqueira JF, Alves GB, Hirata R, Andrade AFB. Detection of Porphyromonas endodontalis in infected root canals by 16S rRNA gene-directed polymerase chain reaction. *J Endod* 26(12):729-732, 2000.
  6. van Winkelhoff AJ, van Steenberghe TJ, Kippuw N, De Graaff J. Further characterization of Bacteroides endodontalis, an asaccharolytic black-pigmented Bacteroides species from the oral S cavity. *J Clin Microbiol* 22(1):75-79, 1985.
  7. Tanner AC, Paster BJ, Lu SC, Kanasi E, Kent R Jr, Van Dyke T, Sonis ST. Subgingival and tongue microbiota during early periodontitis. *J Dent Res* 85(4):318-323, 2006.
  8. Kumar PS, Griffen AL, Barton JA, Paster BJ, Moeschberger ML, Leys EJ. New bacterial species associated with chronic periodontitis. *J Dent Res* 82(5):338-344, 2003.
  9. Dahlén G, Leonhardt A. A new checkerboard panel for testing bacterial markers in periodontal disease. *Oral Microbiol Immunol* 21(1):6-11, 2006.
  10. Ross R. Atherosclerosis—an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340(2):115-126, 1999.
  11. Lüscher TF, Barton M. Biology of the endothelium. *Clin Cardiol* 20(11 suppl 1):13-10, 1997.
  12. Kinlay S, Libby P, Ganz P. Endothelial function and coronary artery disease. *Curr Opin Lipidol* 12(4):383-389, 2001.
  13. Willerson JT, Ridker PM. Inflammation as a cardiovascular risk factor. *Circulation* 109(21 suppl 1):12-10, 2004.
  14. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 105(9):1135-1143, 2002.
  15. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature* 407(6801):233-241, 2000.
  16. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 420(6917):868-874, 2002.
  17. Saikku P, Leinonen M, Tenkanen L, Linnanmäki E, Ekman MR, Manninen V, Mänttari M, Frick MH, Huttunen JK. Chronic *Chlamydia pneumoniae* infection as a risk factor for coronary heart disease in the Helsinki Heart Study. *Ann Intern Med* 116(4):273-278, 1992.
  18. Mendall MA, Goggin PM, Molineaux N, Levy J, Toosy T, Strachan D, Camm AJ, Northfield TC. Relation of *Helicobacter pylori* infection and coronary heart disease. *Br Heart J* 71(5):437-439, 1994.
  19. Hajjar DP, Fabricant CG, Minick CR, Fabricant J. Virus-induced atherosclerosis. Herpesvirus infection alters aortic cholesterol metabolism and accumulation. *Am J Pathol* 122(1): 62-70, 1986.
  20. Epstein SE, Zhu J, Burnett MS, Zhou YF, Vercellotti G, Hajjar D. Infection and atherosclerosis: potential roles of pathogen burden and molecular mimicry. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20(6):1417-1420, 2000.
  21. Epstein SE. The multiple mechanisms by which infection may contribute to atherosclerosis development and course. *Circ Res* 90(1):2-4, 2002.
  22. Espinola-Klein C, Rupprecht HJ, Blankenberg S, Bickel C, Kopp H, Rippin G, Victor A, Hafner G, Schlumberger W, Meyer J. Impact of infectious burden on extent and long-term prognosis of atherosclerosis. *Circulation* 105(1):15-21, 2002.
  23. Mattila KJ, Nieminen MS, Valtonen VV, Rasi VP, Kesäniemi YA, Syrjälä SL, Jungell PS, Isolouma M, Hietaniemi K, Jokinen MJ. Association between dental health and acute myocardial infarction. *BMJ* 298(6676):779-781, 1989.
  24. Beck J, Garcia R, Heiss G, Vokonas PS, Offenbacher S. Periodontal disease and cardiovascular disease. *J Periodontol* 67(10 suppl):1123-1137, 1996.
  25. Haraszthy VI, Zambon JJ, Trevisan M, Zeid M, Genco RJ. Identification of periodontal pathogens in atherosclerotic plaques. *J Periodontol* 71(10):1554-1560, 2000.
  26. Spahr A, Klein E, Khuseynova N, Boeckh C, Muche R, Kunze M, Rothenbacher D, Pezeshki G, Hoffmeister A, Koenig W. Periodontal infections and coronary heart disease: role of periodontal bacteria and importance of total pathogen burden in the Coronary Event and Periodontal Disease (CORODONT) study. *Arch Intern Med* 166(5):554-559, 2006.
  27. Deshpande RG, Khan MB, Genco CA. Invasion of aortic and heart endothelial cells by *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun* 66(11):5337-5343, 1998.
  28. Dorn BR, Dunn WA Jr, Progulsk-Fox A. Invasion of human coronary artery cells by periodontal pathogens. *Infect Immun* 67(11):5792-5798, 1999.
  29. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 362(6423):801-809, 1993.
  30. Paster BJ, Dewhirst FE, Olsen I, Fraser GJ. Phylogeny of Bacteroides, Prevotella, and Porphyromonas spp. and related bacteria. *J Bacteriol* 176(3): 725-732, 1994.
  31. Dorn BR, Harris LJ, Wujick CT, Vertucci FJ, Progulsk-Fox A. Invasion of vascular cells in vitro by *Porphyromonas endodontalis*. *Int Endod J* 35(4):366-371, 2002.
  32. Gibbons RJ. Bacterial adhesion to oral tissues: a model for infectious diseases. *J Dent Res* 68(5):750-760, 1989.
  33. Falkow S. Bacterial entry into eukaryotic cells. *Cell* 65(7):1099-1102, 1991.
  34. Pearce E, Tregouet DA, Samnegård A, Morgan AR, Cox C, Hamsten A, Eriksson P, Ye S. Haplotype effect of the matrix metalloproteinase-1 gene on risk of myocardial infarction. *Cir Res* 97(10):1070-1076, 2005.
  35. Presta M, Camozzi M, Salvatori G, Rusnati M. Role of the soluble pattern recognition receptor PTX3 in vascular biology. *J Cell Mol Med* 11(4):723-738, 2007.
  36. Lee YW, Eum SY, Chen KC, Hennig B, Toborek M. Gene expression profile in interleukin-4-stimulated human vascular endothelial cells. *Mol Med* 10(1-6):19-27, 2004.
  37. Ito T, Ikeda U. Inflammatory cytokines and cardiovascular disease. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2(3):257-265, 2003.
  38. Chou HH, Yumoto H, Davey M, Takahashi Y, Miyamoto T, Gibson FC 3rd, Genco CA. *Porphyromonas gingivalis* fimbria-dependent activation of inflammatory genes in human aortic endothelial cells. *Infect Immun* 73(9):5367-5378, 2005.
  39. Gagarin D, Yang Z, Butler J, Wimmer M, Du B, Cahan P, McCaffrey TA. Genomic profiling of acquired resistance to apoptosis in cells derived from human athero-

- sclerotic lesions: potential role of STATs, cyclinD1, BAD, and Bcl-XL. *J Mol Cell Cardiol* 39(3):453-465, 2005.
40. Fan T, Lu H, Hu H, Shi L, McClarty GA, Nance DM, Greenberg AH, Zhong G. Inhibition of apoptosis in *Chlamydia*-infected cells: blockade of mitochondrial cytochrome c release and caspase activation. *J Exp Med* 187(4):487-496, 1998.
  41. Zhu H, Shen Y, Shenk T. Human cytomegalovirus IE1 and IE2 proteins block apoptosis. *J Virol* 69(12):7960-7970, 1995.
  42. Grütter MG. Caspases: key players in programmed cell death. *Curr Opin Struct Biol* 10(6):649-655, 2000.
  43. Xu G, Gong Z, Yu W, Gao L, He S, Qian Z. Increased expression ratio of Bcl-2/Bax is associated with crocin-mediated apoptosis in bovine aortic endothelial cells. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 100(1):31-35, 2007.
  44. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 281(5381):1322-1326, 1998.
  45. Toutouzias K, Androulakis G, Chatzigianni E, Davaris PS, Karayannis M, Konstadoulakis MM, Messaris E. Expression of c-myc and H-ras and absence of expression of p53 and bcl-2 genes in atherosclerotic human carotid arteries. *J Clin Basic Cardiol* 5(3):253-256, 2002.
  46. Dimmeler S, Breitschopf K, Haendeler J, Zeiher AM. Dephosphorylation targets Bcl-2 for ubiquitin-dependent degradation: a link between the apoptosome and the proteasome pathway. *J Exp Med* 189(11):1815-1822, 1999.
  47. Jung IK, Kim DM, Kim BY, Kim YG, Kim IJ, Kim TH, Park JY, Son SM, Yoo HJ, Lee MK, Lee BY, Lee IK, Cha BY. NF- $\kappa$ B and atherosclerosis. *BioWave* 9(7):1-13, 2007.
  48. Esemuede N, Lee T, Pierre-Paul D, Sumpio BE, Gahtan V. The role of thrombospondin-1 in human disease. *J Surg Res* 122(1):135-142, 2004.
  49. Vischer UM. von Willebrand factor, endothelial dysfunction, and cardiovascular disease. *J Thromb Haemost* 4(6):1186-1193, 2006.
  50. Dadgostar H, Zarnegar B, Hoffmann A, Qin XF, Truong U, Rao G, Baltimore D, Cheng G. Cooperation of multiple signaling pathways in CD40-regulated gene expression in B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(3):1497-1502, 2002.
  51. Mach F, Schönbeck U, Libby P. CD40 signaling in vascular cells: a key role in atherosclerosis? *Atherosclerosis* 137 suppl:S89-95, 1998.
  52. Xu Q. Role of heat shock proteins in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22(10):1547-1559, 2002.
  53. Haskard DO, Boyle JJ, Mason JC. The role of complement in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 19(5):478-482, 2008.

국문초록

## *Porphyromonas endodontalis*의 침투에 따른 혈관 내피세포의 유전자 발현

공희정<sup>1</sup> · 최경규<sup>1</sup> · 박상혁<sup>1</sup> · 이진용<sup>2</sup> · 최기운<sup>1\*</sup>

경희대학교 대학원 치의학과 <sup>1</sup>치과보존학교실, <sup>2</sup>구강생물학연구소

본 연구에서는 *Porphyromonas endodontalis*와 죽상경화증 및 심혈관질환과의 관계를 알아보기 위해, *P. endodontalis*가 사람의 관상동맥 내피세포에 침투했을 때 나타나는 유전자 발현의 변화를 microarray와 real-time PCR로 측정하였고, 발현이 증가된 유전자 중에서 죽상경화증과 연관된 유전자들이 관련 KEGG pathway 상에서 유의성 있는 영향을 미치는지를 분석하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. *Porphyromonas endodontalis*는 사람의 관상동맥 내피세포에 침투하였다.
2. Microarray 분석결과, 대조군보다 발현이 2배 이상 증가된 유전자는 625개였고, 1/2이하로 감소된 유전자는 154개였다.
3. 발현이 2배 이상 증가된 유전자 중에는 염증성 cytokine 및 chemokine, 세포자멸사, 혈액응고와 면역반응 관련 유전자들이 포함되었다.
4. Microarray 분석결과를 확인하기 위해 발현이 2배 이상 증가된 유전자 중에서 10개의 유전자를 선택하여 real-time PCR을 시행하였고, 그 결과 microarray에서와 마찬가지로 발현 정도가 대조군보다 모두 높게 나타났다.

따라서 *P. endodontalis*가 사람의 관상동맥 내피세포에 만성적으로 작용했을 때, 심혈관질환에서 중요한 부분을 차지하는 죽상경화증을 유발하는 위험 요소 중의 하나로 작용할 수 있을 것으로 판단된다. 이와 관련된 자세한 기전을 이해하기 위해서는 앞으로 더 많은 연구가 필요할 것으로 보인다.

**주요단어:** *Porphyromonas endodontalis*, 죽상경화증, 심혈관질환, 침투, 혈관 내피세포, 유전자 발현