

Glucosamine Inhibits Lipopolysaccharide-induced Inflammatory Responses in Human Periodontal Ligament Fibroblasts

Eun Dam Kim, Hyun-Jung Park, and Jeong-Hwa Baek*

Department of Molecular Genetics, School of Dentistry and Dental Research Institute, Seoul National University, Seoul 110-749, Korea.

(received November 19, 2014; revised December 8, 2014; accepted December 9, 2014)

Glucosamine is commonly taken by the elderly without prescription as a nutritional supplement to attenuate the progression or symptoms of osteoarthritis. Previous studies demonstrated that glucosamine shows anti-inflammatory effects in tissues such as blood vessels and the heart. However, there have been few reports about the effects of glucosamine on oral inflammatory diseases. Therefore, in this study, the effects of glucosamine on lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory responses were investigated using human periodontal ligament fibroblasts (HPDLFs). HPDLFs were incubated in the presence and absence of glucosamine (10 mM) for 24 h, followed by treatment with *E. coli* LPS (100 ng/ml) or vehicle. Quantitative RT-PCR and ELISA results showed that LPS exposure significantly increased the levels of IL-6 and IL-8 mRNA and protein, while the effect was significantly suppressed by glucosamine treatment. Glucosamine did not attenuate, but slightly increased, the LPS-induced activation of mitogen activated kinases (ERK, p38, JNK). However, it suppressed the LPS-induced increase in the DNA binding affinity and transcriptional activity of NF- κ B. These results suggest that glucosamine exerts

anti-inflammatory effects on HPDLFs exposed to LPS via inhibition of NF- κ B activity, necessitating further studies using animal periodontitis models.

Key words: human periodontal ligament fibroblasts, glucosamine, lipopolysaccharide, inflammation, NF- κ B

서론

글루코사민은 거의 모든 세포에 존재하며 글리코프로테인과 프로테오글리칸 합성에 필요한 당의 주요 요소이다 [1]. 포도당이 hexosamine 생합성경로로 유입되어 여러 단계를 거쳐 최종적으로 uridine diphospho-*N*-acetylglucosamine (UDP-GlcNAc)이 만들어지면 O-GlcNAc transferase의 작용에 의해 표적 단백질의 세린과 트레오닌 잔기에 O-GlcNAcylation (O-GlcNAc 변형)을 유도하는데 사용된다[2]. 단백질의 O-GlcNAc 변형은 단백질의 전사후 변형의 한 종류로 많은 단백질들의 기능을 변화시키는 것으로 알려져 있다. 세포에 글루코사민을 투여하면 hexosamine 생합성경로에서 곧바로 UDP-GlcNAc 합성에 사용되므로 세포내 UDP-GlcNAc 함량이 증가되어 전반적으로 단백질의 O-GlcNAc 변형이 증가된다.

세포내 여러 kinase, phosphatase, 전사인자, 세포골격단백질도 O-GlcNAc 변형이 이루어지는 것으로 알려졌으며, 글루코사민 투여로 증가된 이러한 다양한 단백질의 O-GlcNAc 변형은 결과적으로 체내에 여러 영향을 미칠 수 있음이 보고되고 있으며 특히 항염증효과를 나타낼 수 있음이 보고되고 있다[3]. 많은 형태의 혈관질환 발병에 있어

*Correspondence to: Jeong-Hwa Baek, Department of Molecular Genetics, Seoul National University School of Dentistry, 28 Yeongun-dong, Jongno-gu, Seoul 110-749, Korea.
Tel: +82-2-740-8688; Fax: +82-2-741-3193;
E-mail: baekjh@snu.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

혈관내막의 손상 후 백혈구가 침윤되고 염증성 매개인들이 발현되어 염증반응이 일어나며, 글루코사민을 처리했을 때 염증성 매개인들의 발현이 현저히 감소하는 항염증효과와 혈관보호 효과가 나타났고 그 과정에 단백질의 O-GlcNAc 변형 증가가 관여한다고 보고되었다[4]. 또한 흰 쥐 동맥 평활근세포에 글루코사민을 투여하면 NF- κ B p65 단백질의 O-GlcNAc 변형을 유도하고 이는 NF- κ B 전사활성을 저해하여 tumor necrosis factor- α (TNF- α)에 의한 염증성 매개인들의 발현을 억제한다고 하였다[2]. 골관절염에 대한 글루코사민의 효능도 항염증효과와 관련한 것으로 보고되고 있다. 골관절염 부위에는 TNF- α , interleukin-1 β (IL-1 β)같은 염증성 시토카인이 많이 발현되고, 그 결과 이들 염증성 시토카인이 연골기질 단백질 생합성을 저해하고 matrix metalloproteinase 3 (MMP3)같은 기질분해효소 발현을 증가시켜 연골조직의 파괴가 진행되는 것으로 알려져 있다. 연골세포에 글루코사민을 투여한 경우 IL-1 β 에 의한 NF- κ B 활성화를 저해하고 Akt 활성화를 유도하였으며 그 결과 MMP3 발현을 저해하는 효과를 나타냄이 보고되었다[5]. 그 외에도 미세아교세포나 대식세포에서 글루코사민이 lipopolysaccharide (LPS)에 의한 염증매개인들의 발현을 억제하여 항염증 효과를 보인 연구도 보고된 바 있으며[6,7], 심장허혈/재관류 또는 뇌허혈/재관류 동물 모델에서 글루코사민을 투여하면 심장세포나 뇌세포의 손상을 감소시키는 효과가 있는 것으로 나타났다[1,8].

기존의 보고에 따르면 LPS에 의해 유도되는 염증반응에 NF- κ B 활성화가 중요한 역할을 담당하며, 글루코사민의 항염증 작용에 NF- κ B 경로를 억제하는 것이 관여하는 것으로 알려져 있다[6,7]. NF- κ B는 Rel 단백질 군에 속하는 단백질의 이합체 형태로 표적유전자의 전사를 조절하는 전사인자이다. Rel 단백질 군에는 c-Rel, RelA (p65), RelB, p105/p50, p100/p52 단백질이 속해 있으며, 가장 흔하게 관찰되는 NF- κ B 전사인자는 RelA/p50 이합체의 형태이다. 활성화 신호가 주어지지 않을 때는 NF- κ B가 억제 단백질 I κ B와 결합한 형태로 세포질 내에서 비활성화 상태로 있으나, 세포에 활성화 신호가 전달되면 I κ B kinase (IKK)에 의해 I κ B의 N말단 세린 잔기가 인산화되고 그 결과 I κ B 유비퀴틴화 및 프로테아좀에서의 분해과정을 거치게 되며, I κ B에서 떨어져 나온 NF- κ B는 핵 안으로 이동하여 표적유전자의 전사를 조절한다. RelA도 인산화 될 수 있으며, RelA 인산화는 전사활성, 핵 내의 위치, 단백질 안정성의 조절 효과를 보이는 것으로 알려져 있다[9,10].

골관절염, 혈관염증, 뇌세포 염증 등에 대한 글루코사민의 항염증 효과가 보고되었지만 치주염 등의 구내 염증질환에 대한 글루코사민의 효능에 대한 보고는 찾을 수 없었다. 따라서 본 연구에서는 사람 치주인대섬유모세포에

LPS를 이용하여 염증반응을 유도하고 글루코사민이 나타내는 조절 효과 및 그 기전을 알아보고자 하였다.

실험재료 및 방법

세포 배양

사람 치주인대섬유모세포(HPDLFs)는 ScienCell Research Laboratories (Carlsbad, CA, USA)에서 구입한 후 계대배양하여 p7-8의 세포를 실험에 사용하였다. 세포는 10% 소혈청, 100 μ g/ml streptomycin, 100 U/ml penicillin (Hyclone; Logan, UT, USA)이 포함된 alpha modified Eagle's medium (Hyclone)에서 배양하였다.

기존 발표된 논문에 따르면 섬유모세포나 상피세포에 CD14과 LPS를 함께 처리하면 LPS 단독처리에 비해 염증성 시토카인과 케모카인 유도반응이 증진되는 것으로 알려져 있고, 본 연구실에서도 사람 치주인대섬유모세포를 이용한 기존 연구에서 비슷한 양상을 확인한 바 있다[11-13]. 그러므로 본 연구에서도 HPDLFs에 LPS에 의한 염증반응을 유도하기 위해 100 ng/ml *E. coli* LPS (Invivogen; San Diego, CA, USA)와 10 ng/ml CD14 (R&D systems; Minneapolis, MN, USA)를 섞어서 처리하였다. 글루코사민 (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA)은 10 mM의 농도로 사용하였다.

역전사효소-중합연쇄반응(RT-PCR)

Easy-BlueTM RNA Extraction Reagents (iNtRON Biotechnology; 성남, 한국)를 이용하여 total RNA를 준비하고 AccuPowerTM RT premix (Bioneer; 대전, 한국)를 이용해 cDNA를 제작한 후 SYBR premix EX Taq (Takara; Otsu, Japan)을 사용하여 정량적 PCR을 수행하였다. PCR에 사용된 primer의 염기 서열은 다음과 같다: IL-6-f 5'-AAC AAC CTG AAC CTT CCA AAG A-3', IL-6-r 5'-TCA AAC TCC AAA AGA CCA GTG A-3'; IL-8-f 5'-CTG GCC GTG GCT CTC TTG-3', IL-8-r 5'-CCT TGG CAA AAC TGC ACC TT-3'; glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)-f 5'-TCA ATG ACA ACT TTG TCA AGC-3', GAPDH-r 5'-CCA GGG TTT CTT ACT CCT TGG-3'.

Transient transfection

96-well 조직배양 플레이트에 HPDLFs를 분주하고 다음 날 NF- κ B 발현 플라즈미드(0.2 μ g/well)와 NF- κ B responsive element를 포함하는 luciferase reporter (0.2 μ g/well)를 Lipofectamine2000 (Invitrogen; Carlsbad, CA, USA)을 이용하여 transient transfection하였다. 세포가 회복된 후 글루

코사민이 포함되거나 포함되지 않은 배양액에서 4시간 배양한 후 LPS를 첨가하거나 첨가하지 않은 배양액에서 24시간 더 배양하였다. 그 후 Bright-Glo Luciferase Assay System (Promega; Madison, WI, USA)을 이용하여 luciferase 활성을 측정하였다.

Western blot 분석

배양이 끝난 세포를 phosphate-buffered saline (PBS)로 세척 후 10 mM Tris-Cl (pH 7.5), 1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 1 mM EDTA (pH 8.0), 50 mM NaF, 1 mM PMSF, 0.2 mM Na₃VO₄, 1 µg/ml aprotinin, 1 µM leupeptin, 1 µM pepstatin을 포함하는 세포용해 완충액을 이용해 세포를 용해시킨 후 단백질 시료를 얻었다. Modified Bradford reagent (Bio-Rad Laboratories; Hercules, CA, USA)를 이용하여 단백질을 정량하고 20 µg의 단백질을 5X Laemmli sample buffer에 섞은 후 10% gel을 이용하여 SDS-PAGE를 시행하고 PVDF membrane에 electrotransfer하였다. 0.1% Tween 20이 포함된 Tris-buffered saline에 녹인 5% 탈지분유 용액으로 membrane blocking을 시행하고, 표적단백질에 대한 일차항체 용액에서 4°C에서 밤새 반응시킨 후 HRP가 붙은 이차항체에서 반응시켰다. 그 후 Sensi-view™ Pico ECL Reagent (Lugen Sci Inc.; 부천, 한국)와 MicroChem (DNR; Jerusalem, Israel) 장비를 이용하여 면역복합체를 관찰하였다. RelA, phospho-RelA (ser536), IκBα, phospho-IκBα, IKKα/β, phospho-IKKα/β, Akt, phospho-Akt, extracellular signal-regulated kinase (ERK), phospho-ERK, c-Jun N-terminal kinase (JNK), phospho-JNK, p38 mitogen-activated protein kinases (p38 MAPK), phospho-p38 MAPK에 대한 항체는 Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA) 제품을 사용하였고, β-actin 항체, rabbit anti-goat HRP-conjugated IgG, goat anti-mouse HRP-conjugated IgG, goat anti-rabbit HRP-conjugated IgG는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) 제품을 사용하였다.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

6-well 조직배양 플레이트에 HPDLFs를 분주하고 글루코사민을 함유하거나 함유하지 않은 배양액에 24시간 배양한 후 LPS를 첨가하거나 첨가하지 않고 24시간 추가 배양하였다. 배양액을 수집하여 원심분리한 후 상청액을 모아 ELISA에 사용하였다. 사람 IL-6, IL-8에 대한 ELISA kit (KOMA biotechnology; 서울, 한국)를 사용하여 측정을 시행하였다.

Biotin pull-down assay

NF-κB의 DNA 결합능을 확인하기 위해 biotin pull-down

분석을 시행하였다. HPDLFs를 글루코사민을 함유하거나 함유하지 않은 배양액에 24시간 배양하고, LPS를 첨가하거나 첨가하지 않고 24시간 추가 배양한 후, NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (Pierce Biotechnology; Rockford, IL, USA)를 이용하여 세포핵 분획 단백질을 분리하였다. 핵단백질과 NF-κB binding element consensus sequence를 포함하는 biotinylated DNA probe (염기서열(5'-AGC TTC AAC AGA GGG GAC TTT CCG AGA GGC TCG AG-3'))를 반응시키고, streptavidin-agarose beads를 이용하여 DNA probe에 결합한 NF-κB를 원심분리하여 얻은 후 RelA 항체를 이용하여 western blot 분석을 시행하였다.

통계분석

정량적 PCR, ELISA, luciferase 활성 결과는 평균±표준편차로 제시하였고, Student's *t*-test로 분석하여 *p*값이 0.05보다 적은 경우 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 판단하였다.

결과

글루코사민이 LPS에 의해 유도된 IL-6, IL-8 발현에 미치는 영향

치주인대섬유모세포를 LPS로 자극했을 때 증가되는 염증성 시토카인의 발현을 글루코사민이 감소시킬 수 있는지를

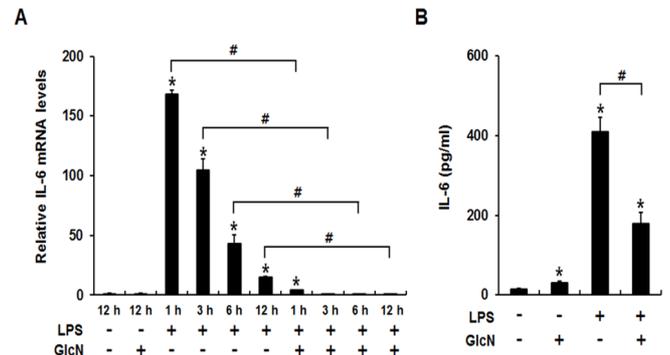


Fig. 1. Glucosamine significantly suppressed LPS-induced IL-6 expression. Human periodontal ligament fibroblasts (HPDLFs) were incubated in the presence or absence of glucosamine (10 mM, GlcN), followed by treatment with vehicle or *E. coli* LPS (100 ng/ml) for the indicated time periods (A) or for 24 h (B). Then, quantitative RT-PCR was performed using total RNA (A) or ELISA was performed using conditioned medium (B). IL-6 mRNA levels were presented as the relative fold changes compared with that of control group (LPS(-)/GlcN(-)). The data represent the mean ± SD. **p*<0.05 compared with control group (LPS(-)/GlcN(-)). #*p*<0.05 compared with the indicated group.

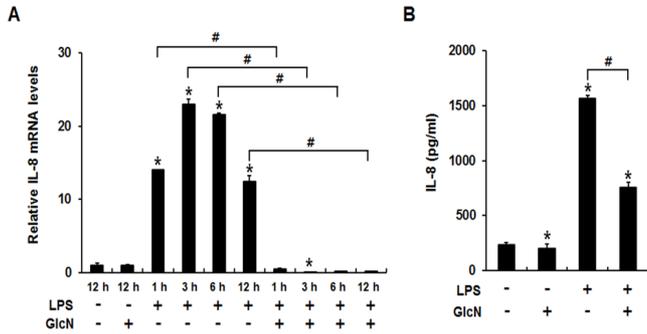


Fig. 2. Glucosamine significantly suppressed LPS-induced IL-8 expression. HPDLFs were incubated in the presence or absence of glucosamine for 24 h, followed by treatment with vehicle or *E. coli* LPS for the indicated time periods (A) or for 24 h (B). Then, quantitative RT-PCR was performed using total RNA (A) or ELISA was performed using conditioned medium (B). The data represent the mean ± SD. **p*<0.05 compared with control group (LPS(-)/GlcN(-)). #*p*<0.05 compared with the indicated group.

알아보기 위해, HPDLFs에 *E. coli* LPS를 처리하고 1, 3, 6, 12시간 후에 total RNA를 추출하여 cDNA를 만들고 정량적 PCR을 시행해 IL-6, IL-8의 발현 양을 비교하여 보았다. IL-6와 IL-8의 mRNA 발현 수준을 관찰한 결과 대조군에 비해 LPS 처리후 IL-6와 IL-8의 발현이 모두 크게 증가하였다 (Fig. 1A, 2A). 글루코사민을 24시간 전처리하고 LPS와 함께 글루코사민을 처리한 경우에는 LPS에 의한 IL-6, IL-8 발현 유도가 차단되어 관찰한 모든 시점에서 LPS 단독 처리군과 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 나타났다(Fig. 1A, 2A). 단백질 수준에서도 확인하기 위해 LPS 첨가 후 24시간 경과하였을 때 세포 배양액을 수집하여 ELISA 분석을 시행하였다. LPS를 단독 처리한 군에서는 IL-6, IL-8 단백질 분비가 유의하게 증가되었으며, 글루코사민을 함께 처리한 군에서는 LPS에 의한 증가가 통계적으로 유의하게 억제되었다 (Fig. 1B, 2B). 그러나 단백질 수준에서의 글루코사민의 억제 효과는 mRNA에 대한 억제 작용만큼 현저하지는 않았다. 이러한 차이가 나타나는 이유에 대해서는 명확하지 않으며, 이러한 현상이 mRNA와 단백질을 검출하는 실험 기법의 차이에 의한 것인지 아니면 글루코사민이 실제로 이들 mRNA로부터의 번역을 촉진하는 어떤 조절 작용을 가지고 있을지에 대한 내용은 향후 추가 연구를 통해 밝혀져야 할 내용이라고 생각된다.

글루코사민이 MAPKs 활성화에 미치는 영향

글루코사민이 HPDLFs에서 LPS에 의한 IL-6, IL-8 발현 증가를 억제하는 것으로 관찰되었기 때문에 글루코사민이 어떤 신호전달경로에 영향을 미치는지 알아보기 위해 먼저 MAPKs 활성화에 미치는 영향을 western blot 분석으로

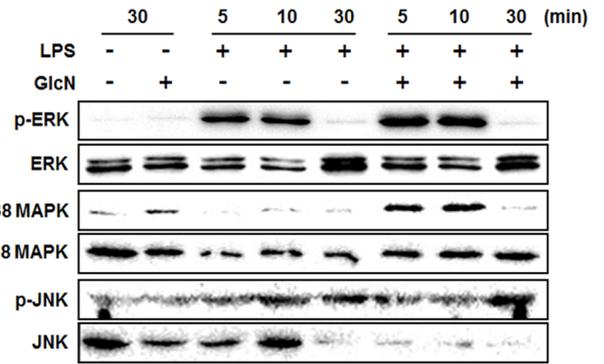


Fig. 3. Glucosamine did not attenuate LPS-induced activation of MAPKs. HPDLFs were incubated in the presence or absence of glucosamine for 24 h, followed by treatment with vehicle or *E. coli* LPS for the indicated time periods. Activation of MAPKs was examined by western blot analyses using the antibodies to the phosphorylated MAPKs. Glucosamine treatment did not suppress LPS-induced MAPKs activation, but showed the tendency to enhance the activation of MAPKs.

확인하였다. 이를 위해 HPDLFs을 글루코사민이 포함되거나 포함되지 않은 배양액에서 24시간 배양하고 vehicle 또는 LPS를 첨가한 후 5, 10, 30분 후에 단백질 시료를 준비하였으며 ERK, p38 MAPK, JNK의 활성화 정도는 이들 단백질의 인산화를 관찰하여 확인하였다. HPDLFs에 LPS 처리 후 5, 10분 후에 ERK활성화, 5, 10, 30분 후에 JNK의 활성화가 관찰되었지만 p38 MAPK의 활성화는 뚜렷하게 관찰되지 않았다(Fig. 3). 글루코사민을 LPS와 함께 처리한 군에서 LPS에 의한 ERK, JNK 활성화를 저해하는 효과는 관찰되지 않았고, 오히려 ERK, JNK, p38 MAPK의 활성화가 더 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 3).

글루코사민이 NF-κB 활성화에 미치는 영향

LPS에 의한 염증성 시토카인 발현에 NF-κB가 중요한 전사인자로 작용할 수 있음이 보고된 바 있으므로 글루코사민이 HPDLFs에서도 NF-κB활성화에 영향을 미치는지 알아보려고 하였다. MAPKs 활성화를 관찰하는데 사용한 동일한 시료를 이용하여 IκBα의 인산화 및 단백질 양의 변화를 관찰하였다. LPS를 처리하고 10분 후에 IκBα 인산화의 증가가 관찰되었으며, LPS 처리 후 30분째에는 IκBα 단백질의 양적 감소가 뚜렷이 나타났다(Fig. 4A). LPS와 글루코사민을 모두 처리한 군에서는 LPS 단독 처리군에 비해 10분 후에 나타나는 IκBα 인산화가 약간 감소되었고, 30분 후에 나타났던 IκBα 단백질의 양적 감소가 관찰되지 않았다(Fig. 4A). LPS 처리 후 10분째에 IκBα 인산화가 가장 뚜렷이 나타났으므로 대조군, 글루코사민 단독, LPS 단독, LPS와 글루코사민을 10

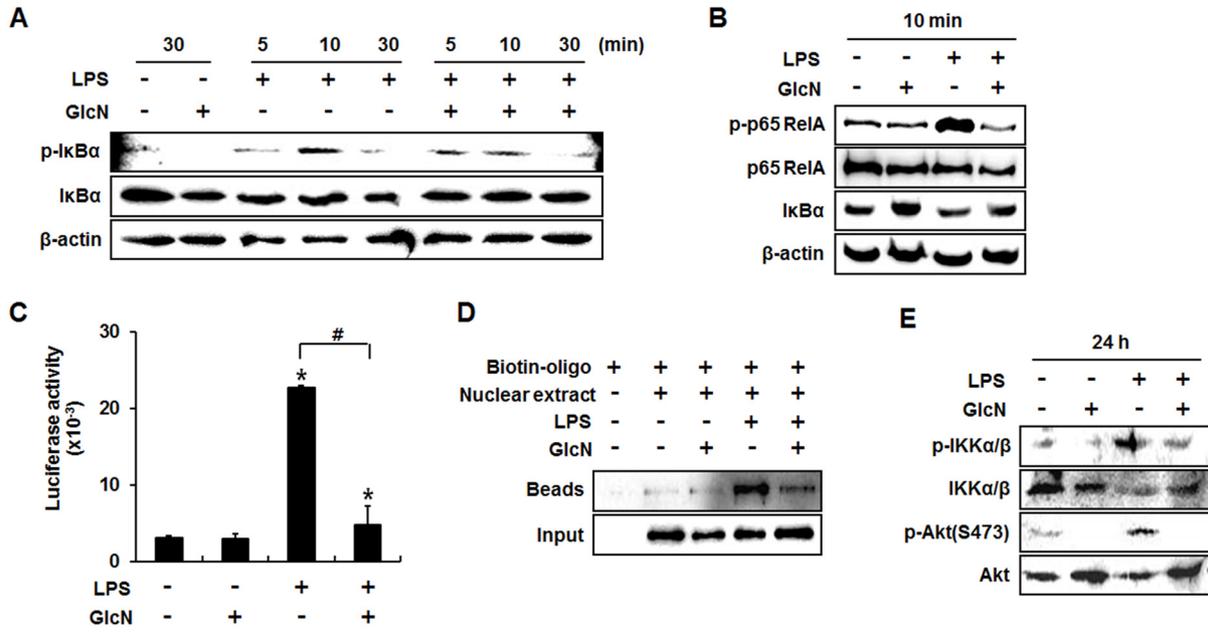


Fig. 4. Glucosamine suppressed LPS-induced activation of NF-κB transcriptional activity. (A, B) HPDLFs were incubated in the presence or absence of glucosamine for 24 h, followed by treatment with vehicle or *E. coli* LPS for the indicated time periods. Cell lysates were then prepared and western blot analysis was performed. LPS induced phosphorylation of IκBα and p65 NF-κB (RelA) and degradation of IκBα, which were attenuated by glucosamine treatment. (C) HPDLFs were transiently transfected with luciferase reporter plasmid containing NF-κB responsive element. Then, cells were incubated in the presence or absence of glucosamine for 4 h, followed by treatment with vehicle or *E. coli* LPS for 24 h. At the end of culture period, luciferase activity was measured and data were presented as the mean ± SD. **p*<0.05 compared with control group. #*p*<0.05 compared with the indicated group. Glucosamine blocked LPS-induced activation of NF-κB transcriptional activity. (D) HPDLFs were incubated in the presence or absence of glucosamine for 24 h, followed by treatment with vehicle or *E. coli* LPS for 24 h. Nuclear protein was incubated with 5'-biotinylated double-stranded oligonucleotides that contain the NF-κB responsive element. Biotinylated DNA-protein complexes were then pulled down with streptavidin-agarose beads, and bound NF-κB was detected by immunoblotting with RelA antibody. LPS increased DNA binding affinity of NF-κB, which was reduced by glucosamine treatment. (E) HPDLFs were incubated in the presence or absence of glucosamine for 24 h, followed by treatment with vehicle or *E. coli* LPS for 24 h. Western blot analysis demonstrated that LPS-induced phosphorylation of IKKα/β and Akt was maintained after incubation for 24 h, which was suppressed by glucosamine.

분간 함께 처리한 네 가지 군의 단백질 시료를 준비하고 RelA 인산화 정도와 IκBα 단백질의 양적 변화를 다시 확인하였다. 그 결과 LPS 단독 처리군에서는 RelA 인산화 증가와 IκBα 단백질의 양적 감소가 뚜렷이 관찰되었으나 LPS와 글루코사민을 함께 처리한 군에서는 이러한 변화가 억제되는 것으로 나타났다(Fig. 4B).

LPS 및 글루코사민에 의한 IκBα의 양적 변화와 RelA 인산화가 실제 NF-κB의 전사활성을 조절하는지 알아보기 위해 NF-κB responsive element를 포함하는 luciferase reporter를 HPDLFs에 transient transfection 하고 NF-κB 전사활성 변화를 측정하였다. LPS를 단독 처리한 경우 NF-κB 전사활성이 통계적으로 유의하게 증가하였으며, 글루코사민을 함께 처리한 경우에는 LPS에 의한 luciferase 활성 증가를 거의 차단하는 것으로 나타났다(Fig. 4C). 글루코사민에 의한 IκBα 인산화 억제효과에 비교하여, 글루코사민의 RelA 인산화 및 NF-κB 전사활성 억제효과가 더 뚜렷하게

관찰되었으므로 다음은 글루코사민이 시험관내에서 RelA의 DNA 결합능에 미치는 영향을 관찰하였다. NF-κB responsive element consensus sequence를 함유한 DNA probe를 이용한 biotin pull-down 분석 결과 LPS 처리한 시료에서는 RelA의 DNA 결합이 현저히 증가한 반면 LPS와 글루코사민을 함께 처리한 시료에서는 RelA의 DNA 결합이 LPS 단독 처리군에 비해 현저히 감소함을 관찰할 수 있었다(Fig. 4D).

LPS에 의해 증가된 RelA 인산화가 글루코사민에 의해 차단되는 것으로 나타났으므로(Fig. 4B) 다음은 RelA 인산화를 유도하는데 관여하는 것으로 알려진 상위 kinase인 IKK와 Akt의 활성화에도 글루코사민이 영향을 미치는지 확인하였다. NF-κB 전사활성 및 DNA 결합능 실험을 위한 시료는 LPS를 24시간 처리한 후 만들어졌으므로, 24시간째에도 이들 상위 분자에 대한 효과가 지속되는지 확인하고자 LPS처리 24시간째에 단백질 시료를 준비하였다. LPS

단독 처리군에서는 IKK α/β 와 Akt 인산화의 증가가 관찰되었으나, LPS와 글루코사민을 함께 처리한 군에서는 LPS에 의한 IKK α/β 와 Akt 인산화 증가가 억제되는 것으로 나타났다(Fig. 4E).

고찰

서론에서 기술한 바와 같이 관절, 혈관, 뇌에서 일어나는 염증반응에 대해 동물실험 또는 각 조직 구성세포를 활용한 시험관내 시험을 통해 글루코사민이 항염증효과를 나타낸다고 보고되었지만 구강 조직 구성세포나 치주염 같은 구내 염증질환과 관련한 글루코사민의 항염증효과에 대한 보고는 찾을 수 없었다. 따라서 본 연구에서는 글루코사민이 사람의 치주염에 치료효과를 가질 수 있는지에 대한 가능성을 탐색해보기 위해 사람 치주인대섬유모세포를 이용하여 연구를 진행하였다. 그 결과 글루코사민이 LPS에 의한 IL-6, IL-8의 발현 증가를 저해할 수 있으며, 글루코사민의 억제효과는 LPS에 의해 활성화되는 신호전달계 중 NF- κ B 활성화 및 전사활성 저해에 의존함을 확인하였다.

치주인대섬유모세포는 골모세포로 분화하여 치조골 형성에도 관여할 수 있을 뿐 아니라, 세균에 노출되었을 때 시토카인, 케모카인들의 분비를 촉진하여 치주조직의 염증반응에 기여하는 것으로 알려져 있다. 따라서 치주의 염증을 줄이기 위해서는 전통적인 염증성 세포들인 호중구, 대식세포, 비만세포 등에서 생성하는 시토카인 뿐 아니라 치주인대섬유모세포에서 분비하는 염증성 시토카인을 감소시키는 데에도 초점을 맞추어야 한다고 하였다[14]. G(-) 세균의 대표적인 독성인자인 LPS에 노출되면 치주인대섬유모세포의 시토카인, 케모카인 분비가 증가됨이 잘 알려져 있다[15,16]. 치주인대섬유모세포에 대한 LPS의 염증유도 효과가 비교적 낮은 농도인 1-10 ng/ml LPS에 의해서도 나타난다고 하였으나[17,18], 비교적 짧은 시간 LPS 처리를 시행한 본 연구에서는 1-10 ng/ml 농도에서는 뚜렷한 염증유발 효과를 관찰하지 못하였으므로 100 ng/ml 농도의 LPS를 사용하였다. 본 연구에서 IL-6와 IL-8 이외에 TNF- α , IL-1 β 에 대한 RT-PCR을 수행하였지만 LPS에 의한 TNF- α , IL-1 β 발현 증가는 잘 관찰되지 않았으므로 IL-6, IL-8에 대한 결과만 제시하였다. 이러한 결과는 사람 치주인대섬유모세포에 *E. coli* LPS를 처리하였을 때 IL-6, IL-8, transforming growth factor- β 의 발현 증가는 관찰되지만 IL-1 α , IL-1 β , TNF- α 의 발현은 잘 관찰되지 않았다는 Yamaji 등의 보고와 유사하였다[15].

사람 치주인대섬유모세포에서도 글루코사민이 항염증

효과를 나타낼 수 있음을 확인하였으므로 이런 효과들이 어떤 분자적 기전을 통해 일어나게 되는지에 대해 알아보기 위해 세포내 신호전달계에 대한 효과를 관찰하였다. 기존의 보고에 글루코사민이 MAPKs 활성을 억제하여 항염증 효과를 나타내는 것으로 알려져 있으므로 본 연구에서도 LPS에 의한 MAPKs의 활성 변화와 이에 대한 글루코사민의 효과를 관찰하였다. 본 연구에서는 HPDLFs에서 ERK, p38 MAPK, JNK 활성은 LPS 단독 처리군에 비해 글루코사민을 함께 처리한 군에서 오히려 좀더 증가하는 것으로 나타났다. 글루코사민 처리가 MAPKs 활성에 미치는 영향에 대한 기존 보고를 살펴보면, 일차배양한 사람 윤활막섬유모세포(synovial fibroblasts)에서 글루코사민을 처리하면 IL-1 β 에 의해 유도된 ERK, JNK, p38 MAPK 활성화를 일시적으로 증가시키며[19], 연골육종세포주를 이용한 실험에서는 글루코사민 전처치가 IL-1 β 에 의해 유도된 ERK, JNK 활성화를 더 강화시키지만 p38 MAPK 활성화에는 억제효과를 보임이 알려져 있어[5], 본 연구의 결과는 이들 보고와 부분적으로 유사한 것으로 나타났다. 그러나 사람 피부섬유모세포에서는 글루코사민 전처치가 IL-1 β 에 의해 유도된 ERK2의 활성은 증가시키나 JNK 활성화에는 아무런 영향을 미치지 않고 p38 MAPK 활성화는 차단하는 것으로 보고된 바 있으며[20], 흰쥐 심근세포에서 p38 MAPK의 O-GlcNAc 변형이 증가되면 허혈상태의 심장을 보호하는 효과가 증가되고[21] 전립선암세포에서는 글루코사민에 의해 MAPKs 활성화가 약화되어 IL-8 분비가 억제된다는 보고[22]가 있는 등 본 연구와 상반된 결과들도 보고된 바 있다. MAPKs 활성화에 대한 글루코사민의 효과가 다양한 이유가 명확하지 않으나, 이러한 결과들은 세포의 종류에 따라, 그리고 세포에 노출된 자극의 종류에 따라 글루코사민의 항염증 작용의 표적이 달라질 수 있음을 시사하는 결과로 생각된다.

NF- κ B는 LPS에 의한 염증성 시토카인 발현 유도에 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있고, 글루코사민이 연골세포와 동맥 평활근세포에서 NF- κ B 경로 활성화에 억제 효과를 보인다는 보고가 있었으므로 본 연구에서도 NF- κ B 활성화 경로 및 전사활성에 미치는 영향을 관찰하였다[2,5]. HPDLFs에 LPS를 단독으로 처리한 경우 I κ B α 의 인산화 증가와 I κ B α 단백질의 감소가 나타났으며 LPS와 글루코사민을 함께 처리한 경우 I κ B α 인산화 증가 및 I κ B α 단백질 감소가 완화되는 것으로 나타났다. 또한 NF- κ B의 전사활성도 동일하게 조절되는지 관찰한 결과 LPS에 의해 증가된 NF- κ B 전사활성이 글루코사민에 의해 유의하게 감소되며, 이러한 전사활성에 대한 영향은 NF- κ B의 시험관내 DNA 결합능 변화양상과 동일하게 나타났다. 그러나 NF- κ B 전사활성에 대한 글루코사민의 현저한 억제효과에

비해 I κ B α 인산화 증가 및 I κ B α 단백질 감소에 대한 글루코사민의 완화효과는 약하게 나타났다. 기존의 보고에 따르면, I κ B/NF- κ B 경로의 활성화 및 RelA의 핵내 이동뿐 아니라 RelA의 인산화 조절(세린 276, 세린 529, 세린 536)도 NF- κ B 전사활성 조절에 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다[23-25]. 즉 RelA의 인산화는 DNA 결합능을 증가시키고 전사활성을 증가시키는 조절역할을 담당한다. RelA의 인산화를 유도할 수 있는 kinase로 casein kinase II, Akt, IKK 등이 알려져 있으며, G(-) 세균에 의한 RelA 인산화(세린 529 또는 세린 536)에 IKK β 와 phosphatidylinositol 3-kinase/Akt 경로가 관여함이 보고된 바 있다[23]. 본 연구에서도 LPS 처리에 의해 RelA 세린 536 잔기의 인산화가 증가하였고, IKK α/β , Akt 인산화 증가가 관찰되었으며, 글루코사민을 함께 처리한 군에서는 이러한 인산화 증가가 현저히 억제됨을 관찰할 수 있었다. 이상의 결과로 보아 글루코사민에 의한 NF- κ B 전사활성 감소에는 RelA 인산화 저해 및 그로 인한 DNA 결합능 감소도 중요한 기전으로 작용할 것으로 생각된다.

글루코사민은 단백질의 세린과 트레오닌 잔기에 O-GlcNAc 변형을 시켜 많은 단백질들의 기능을 변화시킨다[3]. 기존의 보고에 의하면 글루코사민이 대동맥 혈관 평활근 세포에서 RelA의 O-GlcNAc 변형을 증가시키며 동시에 RelA 세린536 잔기의 인산화를 감소시키고 그 결과 NF- κ B 전사활성을 억제한다고 하였으므로, 본 연구에서도 글루코사민에 의한 RelA 인산화 감소에 상위 kinase 활성의 감소 뿐 아니라 RelA의 O-GlcNAc 변형 증가도 관여할 것으로 여겨지며 이에 대한 추가 연구가 필요한 것으로 생각된다.

본 연구에서 글루코사민의 효과를 알아보기 위해 10 mM 농도를 사용하였다. 건강기능식품 용도로 통상적으로 권장되는 글루코사민의 양은 하루 1500 mg이며, 이 정도 용량을 복용하면 장내에서 소화효소나 세균에 의해 파괴되어 실제 관찰되는 혈중 글루코사민 농도는 최대 0.005 mM 정도라고 보고된 바 있다[26]. 그러나 세포에서의 효능을 관찰하기 위해서 사용하는 글루코사민은 대개 2-50 mM 농도로 단기간(72시간 이내) 처리하여 효과를 관찰하며, 본 연구에서도 HPDLFs에 전처리 시간을 포함하여 5, 10 mM 글루코사민을 최대 48시간 처리하였다. 5 mM 글루코사민은 IL-6, IL-8 발현 저해 효과가 10 mM 보다 현저하게 적었으므로 주로 10 mM 글루코사민을 이용하여 실험에 진행하였다. 실제 글루코사민 복용으로 얻어지는 혈중 글루코사민 농도와 시험관내 실험에서 세포에 처리하는 글루코사민 농도는 큰 차이가 있으므로 시험관내 실험 결과를 생체내 반응에 직접 연결시키기 어렵다는 주장도 있었으나, 최근 연구 결과에 따르면 사람 혈중 글루코사민

농도와 유사한 농도를 얻을 수 있는 용량으로 흰쥐에 글루코사민을 6주간 투여하면, 연골과 신장에서 transforming growth factor β 1과 connective tissue growth factor의 발현이 시험관내 세포에 고농도 글루코사민을 처리했을 때 얻어지는 반응과 유사하게 증가하는 것으로 보고된 바 있어 [27], 고농도 글루코사민을 이용한 시험관내 세포 실험결과가 인체 내 글루코사민 반응과 관련성이 있을 수 있음을 제시하고 있다.

이상의 연구 결과를 종합하면 글루코사민이 사람 치주 인대섬유모세포에서 LPS에 의한 염증 반응을 감소시킬 수 있으며, 그 과정에 특히 글루코사민에 의한 NF- κ B 활성화 저해가 중요한 역할을 담당할 것임을 시사하였다. 이러한 연구 결과는 글루코사민이 치주염에 항염증 효과를 나타낼 가능성이 있음을 시사하지만, 당뇨병자에서는 고혈당으로 인해 세포 내 UDP-GlcNAc 생성이 증가되고 그 결과 단백질의 O-GlcNAc 변형이 증가하며 이는 혈관신생 감소에 기여한다는 보고[28]를 감안하여 볼 때 글루코사민 투여가 실제 치주염 완화에 도움을 줄 수 있을 지 알아보기 위해서는 치주염 동물 모델을 이용한 추가 연구가 필요하다고 생각된다.

감사의 글

이 논문은 2014년도 정부(미래과학부)의 재원으로 서울대학교 치의학대학원 구강악안면 노인성 기능장애 연구센터(No. 2014050477)를 통해 지원받아 수행한 선도연구센터 연구임.

Conflict of interest

All of the authors declare that there are no conflicts of interest related to this study.

References

1. Hwang SY, Shin JH, Hwang JS, Kim SY, Shin JA, Oh ES, Oh S, Kim JB, Lee JK, Han IO. Glucosamine exerts a neuroprotective effect via suppression of inflammation in rat brain ischemia/reperfusion injury. *Glia*. 2010;58:1881-1892.
2. Xing D, Gong K, Feng W, Nozell SE, Chen YF, Chatham JC, Oparil S. O-GlcNAc modification of NF κ B p65 inhibits TNF- α -induced inflammatory mediator expression in rat aortic smooth muscle cells. *PLoS One*. 2011;6:e24021.

3. Lima VV, Giachini FR, Hardy DM, Webb RC, Tostes RC. O-GlcNAcylation: a novel pathway contributing to the effects of endothelin in the vasculature. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2011;300:R236-R250.
4. Xing D, Feng W, Not LG, Miller AP, Zhang Y, Chen YF, Majid-Hassan E, Chatham JC, Oparil S. Increased protein O-GlcNAc modification inhibits inflammatory and neointimal responses to acute endothelial arterial injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008;295:H335-342.
5. Lin YC, Liang YC, Sheu MT, Lin YC, Hsieh MS, Chen TF, Chen CH. Chondroprotective effects of glucosamine involving the p38 MAPK and Akt signaling pathways. *Rheumatol Int*. 2008;28:1009-1016.
6. Chuang KH, Peng YC, Chien HY, Lu ML, Du HI, Wu YL. Attenuation of LPS-induced lung inflammation by glucosamine in rats. *Am J Resp Cell Mol Biol*. 2013;49:1110-1119.
7. Hwang SY, Hwang JS, Kim SY, Han IO. O-GlcNAcylation and p50/p105 binding of c-Rel are dynamically regulated by LPS and glucosamine in BV2 microglia cells. *Brit J Pharmacol*. 2013;169:1551-1560.
8. Zou L, Yang S, Champattanachai V, Hu S, Chaudry IH, Marchase RB, Chatham JC. Glucosamine improves cardiac function following trauma-hemorrhage by increased protein O-GlcNAcylation and attenuation of NF- κ B signaling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009;296:H515-H523.
9. Lewander A. NF κ B p65 phosphorylated at serine-536 is an independent prognostic factor in Swedish colorectal cancer patients. *Int J Colorectal Dis*. 2012;27:447-452.
10. Moynagh PN. The NF- κ B pathway. *J Cell Sci*. 2005;118:4589-4592.
11. Kim DY, Jun JH, Lee HL, Woo KM, Ryoo HM, Kim GS, Baek JH, Han SB. N-acetylcysteine prevents LPS-induced pro-inflammatory cytokines and MMP2 production in gingival fibroblasts. *Arch Pharm Res*. 2007;30:1283-1292.
12. Fukuda K, Kumagai N, Yamamoto K, Fujitsu Y, Chikamoto N, Nishida T. Potentiation of lipopolysaccharide-induced chemokine and adhesion molecule expression in corneal fibroblasts by soluble CD14 or LPS-binding protein. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2005;46:3095-3101.
13. Delude RL, Savedra R, Jr., Zhao H, Thieringer R, Yamamoto S, Fenton MJ, Golenbock DT. CD14 enhances cellular responses to endotoxin without imparting ligand-specific recognition. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995;92:9288-9292.
14. Jonsson D, Nebel D, Bratthall G, Nilsson BO. The human periodontal ligament cell: a fibroblast-like cell acting as an immune cell. *J Periodontal Res*. 2011;46:153-157.
15. Yamaji Y, Kubota T, Sasaguri K, Sato S, Suzuki Y, Kumada H, Umemoto T. Inflammatory cytokine gene expression in human periodontal ligament fibroblasts stimulated with bacterial lipopolysaccharides. *Infect Immun*. 1995;63:3576-3581.
16. Park SY, Kim YH, Jun JH, Kim GW, Min BM, Baek JH. *P. gingivalis* and *A. actinomycetemcomitans* LPS differentially regulate the expression of inflammatory cytokines and chemokines in gingival fibroblast and periodontal ligament fibroblast. *Int J Oral Biol*. 2004;29:27-37.
17. Jonsson D, Nebel D, Bratthall G, Nilsson BO. LPS-induced MCP-1 and IL-6 production is not reversed by oestrogen in human periodontal ligament cells. *Arch Oral Biol*. 2008;53:896-902.
18. Jonsson D, Amisten S, Bratthall G, Holm A, Nilsson BO. LPS induces GRO α chemokine production via NF- κ B in oral fibroblasts. *Inflamm Res*. 2009;58:791-796.
19. Lu HT, Liang YC, Sheu MT, Ho HO, Lin YT, sieh MS, Chen CH. Disease-modifying effects of glucosamine HCl involving regulation of metalloproteinases and chemokines activated by interleukin-1 β in human primary synovial fibroblasts. *J Cell Biochem*. 2008;104:38-50.
20. Hong H, Park YK, Choi MS, Ryu NH, Song DK, Suh SI, Nam KY, Park GY, Jang BC. Differential down-regulation of COX-2 and MMP-13 in human skin fibroblasts by glucosamine-hydrochloride. *J Dermatol Sci*. 2009;56:43-50.
21. d'Abusco AS, Calamia V, Cicione C, Grigolo B, Politi L, Scandurra R. Glucosamine affects intracellular signalling through inhibition of mitogen-activated protein kinase phosphorylation in human chondrocytes. *Arthritis Res Ther*. 2007;9:R104.
22. Tsai CY, Lee TS, Kou YR, Wu YL. Glucosamine inhibits IL-1 β -mediated IL-8 production in prostate cancer cells by MAPK attenuation. *J Cell Biochem*. 2009;108:489-498.
23. Ruiz PA, Kim SC, Sartor RB, Haller D. 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ -mediated ERK signaling inhibits gram-negative bacteria-induced RelA phosphorylation and interleukin-6 gene expression in intestinal epithelial cells through modulation of protein phosphatase 2A activity. *J Biol Chem*. 2004;279:36103-36111.
24. Sizemore N, Lerner N, Dombrowski N, Sakurai H, Stark GR. Distinct roles of the I κ B kinase α and β subunits in liberating nuclear factor κ B (NF- κ B) from I κ B and in phosphorylating the p65 subunit of NF- κ B. *J Biol Chem*. 2002;277:3863-3869.
25. Madrid LV, Mayo MW, Reuther JY, Baldwin AS, Jr. Akt stimulates the transactivation potential of the RelA/p65 subunit of NF- κ B through utilization of the I κ B kinase and activation of the mitogen-activated protein kinase p38. *J Biol Chem*. 2001;276:18934-18940.
26. Silbert JE. Dietary glucosamine under question. *Glycobiology*. 2009;19:564-567.
27. Ali AA, Lewis SM, Badgley HL, Allaben WT, Leakey JE. Oral glucosamine increases expression of transforming growth factor β 1 (TGF β 1) and connective tissue growth factor (CTGF) mRNA in rat cartilage and kidney: implications for human efficacy and toxicity. *Arch Biochem Biophys*. 2011;510:11-18.
28. Luo B, Soesanto Y, McClain DA. Protein modification by O-linked GlcNAc reduces angiogenesis by inhibiting Akt activity in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28:651-657.