Porphyromonas gingivalis 분쇄액으로 유도된 파골세포의 분화에 미치는 Taurine과 Alendronate의 효과

연세대학교 대학원

치 의 학 과

박 주 현

Porphyromonas gingivalis 분쇄액으로 유도된 파골세포의 분화에 미치는 Taurine과 Alendronate의 효과

지도 이 승 종 교수

이 논문을 박사학위 논문으로 제출함

2000년 12월 일

연세대학교 대학원
치 의 학 과
박 주 현

박주현의 박사학위 논문을 인준함

심사위원_____ 인

심사위원_____ 인

심사위원_____ 인

심사위원_____ 인

심사위원_____ 인

연세대학교 대학원

2000년 12월 일

감사의 글

논문이 만들어지기까지 시종 격려해주시고 지도해 주신 이 승종 교수님과 금 기연 교수님, 그리고 유 윤정 교수님께 진심으로 감사드리며, 따뜻한 격려와 조언을 아끼지 않으신 이 찬영 교수님, 박 성호 교수님, 그리고 정 일영 교수님께도 감사의 마음을 전합니다. 또한, 본 연구가 진행되는 동안 시종 다함이 없는 관심과 노력으로 도와주신 미생물학 교실의 채 봉규 선생님과 이 현정 선생님께도 진심으로 감사드립니다.

마지막으로 오늘이 있기까지 사랑과 관심으로 격려해주신 부모님과 바쁜 와중에서도 물심양면으로 도와준 사랑하는 남편, 건강하고 예쁘게 자라준 두 딸 현서, 진이, 그리고 많은 관심과 격려를 아끼지 않은 형제들과 함께 이 기쁨을 나누고 싶습니다. 또한, 보존과 의국원 여러분 외 도움을 주시고 격려해 주신 모든 분들께 감사드립니다.

2000년 12월

저 자 씀.

목 차

도표 목차

국문요약

Porphyromonas gingivalis 분쇄액으로 유도된 파골세포의 분화에 미치는 Taurine과 Alendronate의 효과

본 연구의 목적은 파골세포의 분화에 대한 Taurine과 Alendronate의 억제효과를 알아보고자 하는데 있다. 생후 1-2일 된 마우스에서 얻은 조골세포와 골수세포를 10%의 우태아 혈청이 함유된 α-MEM 배지에서 혼합배양하였으며, 여기에 *Porphyromonas gingivalis*의 분쇄액을 첨가하여 파골세포의 형성을 유도하였다. 실험군으로는 10^{-7}M, 10^{-6}M, 10^{-5} M 의 alendronate와 500, 1000, 1500㎍/㎖의 taurine을 배양시 함께 처치하여 이들 약제가 파골세포의 형성에 어떠한 영향을 미치는가를 알아보았다. 파골세포의 존재는 tartrate저항성 산성인산분해효소(tartrate resistant acid phosphotase, TRAP)를 염색하여 확인하였으며, MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl-2,5-diphenyltetrazolium bromide)검정법으로 각 약제의 세포독성을 검사하였다. 또한, 파골세포에 대한 두 약제의 억제효과를 평가하기 위하여 ELISA 방법을 사용, interleukin-6의 농도를 측정하였다. 이상의 실험으로 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. *Porphyromonas gingivalis* 분쇄액의 농도가 0.01-0.1㎍/㎖일 때 파골세포가 유의성 있게 잘 형성되었다. ($P < 0.05$)

2. Alendronate는 10^{-5}M의 농도에서 *P.gingivalis* (0.01㎍/㎖)에 의한 파골세포의 형성을 억제하였다.

3. Taurine은 1500㎍/㎖의 농도에서 *P.gingivalis* (0.01㎍/㎖)에 의한 파골세포의 형성을 억제하였다.

4. 세포독성 검사에서 alendronate와 taurine은 모든 농도에서 마우스 두개골 세포나 골수 세포에 대한 세포독성을 나타내지 않았다.

5. *P. gingivalis*에 의하여 IL-6의 생성이 유도되었으나, 파골세포의 분화에 대해 억제효과를 나타내었던 alendronate(10^{-5}M)와 taurine(1500μg/㎖)에 의해서는 *P. gingivalis*에 의한 IL-6의 생성이 억제되지 않았다.

이상의 결과로 Alendronate(10^{-5}M)와 Taurine(1500μg/㎖)은 파골세포의 분화에 억제효과를 나타냄을 알 수 있으나, IL-6의 생성과는 무관한 것으로 밝혀져 두 약제의 작용이 IL-6의 생성을 감소시킴으로써 파골세포의 분화를 억제하는 것은 아닌 것으로 사료된다.

중심되는 말 : alendronate, taurine, *P. gingivalis*, 파골세포, 치근흡수

Porphyromonas gingivalis 분쇄액으로 유도된 파골세포의 분화에 미치는 Taurine과 Alendronate의 효과

연세대학교 대학원 치의학과

(지도 이 승 종 교수)

박 주 현

I. 서 론

골흡수는 다음의 세 가지 과정에 의하여 이루어진다. 첫 번째는 골세포에 의하여 생성되는 collagen 분해효소에 의한 osteoid의 변성, 두 번째는 전구세포로부터의 새로운 파골세포의 생성, 그리고 세 번째 과정은 이미 형성되었거나 새로이 생성된 파골세포의 활성화 과정이다.[1)] 파골세포는 hemopoietic precursor cell이 골이 흡수되는 부위에서 여러 호르몬이나 국소적 인자들의 조절하에 분화됨으로써 생성되는데, 세포의 크기가 크고 대개가 다핵성이며 흡수하는 조직에 따라 파골세포, 파연골세포, 파치세포로 불리우지만, 비슷한 형태와 작용을 하는 것으로 알려져있다. 현재까지의 치근흡수 연구에서 파치세포를 따로 분리하지 못하였으므로 본 연구에서는 대표적으로 파골세포를 사용하였다.

이들은 두가지의 특이한 구조를 가지고 있다. 즉 첫 번째는 왕성한 골흡수가 일어나는 부위인 변연주름(ruffled border)이며, 두 번째는 이러한 변연주름을 싸고 있으며, 골표면에 파골세포가 부착하는데 관여하는 투명대(clear zone)이다.

파골세포의 분화와 조절에 관한 기전은 1988년에 혼합배양 방법(co-culture system)이 개발됨으로써 일부 밝혀졌다.[2,3] 즉, 마우스 두개골로부터 분리된 조골세포와 파골세포의 전구세포가 존재하는 골수세포를 interleukin-6, interleukin-2, PTH, PGE_2, $1\alpha,25(OH)_2 D_3$같은 골흡수 유도인자(osteotropic factor)의 존재 하에서 같이 혼합배양하면 파골세포와 비슷한 형태의 많은 다핵성 세포가 형성되며, 이렇게 형성된 세포는 상아질 시편상에서 수많은 흡수와를 형성하는 것으로 나타났다.[4] 이러한 혼합배양에서 골수세포는 파골세포의 기원이 되며, 조골세포는 파골세포의 분화를 위한 적절한 환경을 제공하는 보조세포로서의 역할을 한다.[4] 부갑상선 호르몬(PTH), $1\alpha,25(OH)_2D_3$, interleukin-1, interleukin-6 및 PGE_2, 미생물 등과 같은 파골세포 분화 조절인자들은 주로 조골세포에 작용하는데, 최근, 조골세포의 세포막에 존재하는 파골세포의 분화에 필수적인 인자가 밝혀져 파골세포 분화유도인자(ODF;Osteoclast differentiation factor, or OPGL;Osteoprotegerin ligand)라고 명명되었다. 이러한 ODF/OPGL gene은 파골세포 분화 조절인자들에 의해 활성화되며,[5] 활성화된 ODF는 조골세포의 세포막에 부착된 상태로 파골세포의 표면에 존재하는 ODF수용체, 즉 Receptor activator of NF-kB ligand (RANK)에 결합하여 파골세포 전구세포의 분화를 유도하는 신호를 전달한다. 그러나, 조골세포와 골수세포의 혼합배양시, 골흡수 유도인자가 존재하여도 조골세포와 파골세포의 전구세포가 존재하는 골수나 비장세포가 membrane filter등에 의하여 분리될 경우에는 파골세포가 형성이 되지 않는것으로 밝혀졌다.[5] 이러한 결과는 조골세포와 파골세포 전구세포의 세포간 접촉이 파골세포의 형성에 있어서 필수적임을 암시한다.[5]

또한, 최근 인간의 섬유아세포로부터 OCIF(Osteoclastogenesis-inhibitory factor)가 발견되었는데, OCIF의 cDNA 염기서열 분석결과, 이는 TNF 수용체의 일종으로 알려진 Osteoprotegerin과 동일함이 밝혀졌다. OPG/OCIF는 조골세포의 세포막에 있는 ODF에 직접 결합함으로써 ODF에 의해 파골세포 분화를 위한 신호가 파골세포 전구세포로 전달되는 것을 방해한다.[5]

파골세포는 치주질환에서의 치조골 흡수나 치근흡수를 야기하는 주된 세포이다.

특히, 치과 임상에서 악안면 외상에 의한 치아의 탈구(avulsion)을 흔히 볼 수 있는데, 대치성 치근 흡수는 치아의 상실을 초래하는 주된 원인이라고 보고되고 있다. 대치성 치근 흡수는 골성유합(Ankylosis)이라고도 하며, 흡수되는 치근이 인접골로 대체되면서 원래의 치근과 융합되는 현상이다. Andreasen[6]은 치아재식 후 약 85-96%가 점진적인 치근 흡수를 나타낸다고 하였으며, Heithersay[7]는 이러한 대치성 치근흡수로 인해 재식된 치아의 대부분이 4-6년 내에 소실됨을 보고하였다. 또한, Chamber[8]등은 초기에 근관치료를 함으로써 재식 치아의 염증성 흡수를 예방할 수 있었지만, 6년의 관찰기간동안 재식 치아의 100%에서 골성유합을 관찰하였다고 보고하였다. 대치성 치근 흡수, 혹은 골성 유합이 일어나는 기전은 아직 확실하게 밝혀지지는 않았으나, 탈구된 치아의 부적절한 저장방법, 혹은 재식까지의 장시간 경과등으로 인한 치주인대 세포의 생활력 상실이 가장 중요한 이유로 보고되고 있다.[6,9] Hammarstrom[10]등은 정상골의 재형성(remodeling)을 일으키는 것과 같은 방식으로 치근흡수를 일으키는 세포가 자극을 받아 치근이 지속적으로 흡수되어 치조골이 치아경조직과 유합됨을 보고하였다. Tronstad[11]는 이를 파골세포의 '실수(mistake)'로 인한 것이라 하였는데, 일단 치근을 보호하는 치주인대가 소실되면, 파골세포가 백악질, 상아질, 골을 구분하지 못하고 모든 경화된 조직을 흡수하여 새로운 골(osteoid)로 대체하게 된다고 보고하였다. 현재까지 대치성 치근 흡수를 예방하기 위한 효과적인 치료방법은 아직 없는 상태이다. 이에 대치성 치근흡수의 방지를 위한 여러 시도가 이루어져 왔는데, 본 연구에서는 치근흡수를 야기하는 파골세포의 억제에 초점을 맞추고자 하였다.

파골세포의 작용에 영향을 미치는 약제에 대해서는 상당히 많은 연구가 이루어져 왔는데, 골흡수 작용을 억제할 수 있는 칼시토닌, 불소, bisphosphonate, gallium등 여러 약제에 대한 연구 보고가 있다. 이 중, bisphosphonate는 pyrophosphonate의 P-O-P 구조가 P-C-P로 대체되어 효소에 대한 저항성이 증가되는 것으로 알려져 있으며,[12] 특히 골에 대한 효과가 여러 실험에서 많이 다루어졌는데, 임상에서는 Paget'disease 나 전이성 골질환(metastatic bone disease), 악성종양으로 인한 고칼슘혈증 (hypercalcemia of malignancy), 골다공증과 같은 골흡수가 증가되는 대사성 골질환의 치료약제로 널리 사용되고 있다.[13,14,15] 또한,

여러 실험 결과, bisphosphonate는 골의 외면에 직접 침착되어 파골세포의 골 결합능력을 30-40% 감소시킴으로써, 파골세포에 의한 H^+이온의 축적과 단백질 합성을 감소시킴이 밝혀졌는데, 이는 bisphosphonate가 파골세포의 대사를 크게 억제함을 암시하는 것이라고 하였다.[16] 또한 bisphosphonate는 성숙된 파골세포에 영향을 미칠 뿐 아니라, 파골세포의 형성 자체도 감소시키는 것으로 알려지고 있다.[16]

본 실험에서 사용한 alendronate(4-amino-1-hydroxy-butylidenebisphosphonic acid)는 현재 골다공증 치료에 임상적으로 사용되고 있는 bisphosphonate중 가장 강력한 약제로서 특히 골흡수가 선택적으로 일어나는 부위에서 수산화인회석 결정에 부착되어 골흡수 표면에 선택적으로 결합되며, 일단 골과 결합되면 장기간 유지되는데, 인체내에서 제거되기 위한 반감기는 약 10년이라고 알려져 있다.[17]

본 실험에서 사용한 또 하나의 약제인 taurine (2-aminoethanesulphonic acid)은 인간을 포함한 포유류의 milk에 고농도로 함유되어 있는 성분으로서,[18] 현재 시판되고 있는 대부분의 우유에 첨가되고 있다. Taurine의 기능에 대해서는 아직 확실히 밝혀진 바 없으나, 여러 가지 유해한 자극물질에 대해 세포막을 보호하는 역할을 하는 것으로 추측되고 있으며,[19,20] Masanori[19]등은 Taurine이 interleukine-1이나 prostaglandin E_2등과 같은 염증성 매개체에 의하여 유도되는 파골세포의 분화를 억제함을 보고하였다.

이에 저자는 치근단 감염과 치주질환을 일으키는 세균 중 가장 독성이 강한 것으로 보고된 *Porphyromonas gingivalis*의 분쇄액을 파골세포 분화 유도인자로 사용하여, alendronate와 taurine이 파골세포의 분화에 미치는 영향을 혼합배양 방법(co-culture system)을 통하여 비교, 평가해 보고자 하였다.

Ⅱ. 연구 재료 및 방법

가. 연구재료

실험동물로는 4주에서 5주사이의 ICR 마우스 수컷을 사용하였으며, 두개골 세포를 분리하기 위해서 태어난 후 2일이 경과하지 않은 ICR 마우스를 구입하였다. 실험 전에 물과 사료를 충분히 주어 자연적인 조건을 부여해 줌으로써 탈수로 인한 비정상적인 반응을 배제하였다. 세포배양배지로는 Antibiotic and antimycotic sol.이 포함된 Minimum Essential Medium Alpha Medium(α-MEM) (GIBCO BRL, NY, USA)을, 파골세포의 염색은 TRAP-staining kit(Sigma, St.Louis, USA)을 사용하였으며, 유리되는 IL-6의 양은 ELISA kit(Endogen, USA)을 이용하여 측정하였다. 또한, 두개골세포의 분리시에는 교원분해효소와 dispase(Wako, Osaka, Japan)를, 세균분쇄액의 단백질량 측정시에는 protein assay kit(Pierce, Illinois, USA)을 사용하였으며, 파골세포의 분화에 대한 억제효과를 알아보고자 하는 약제로는 alendronate sodium(Merck & Co.,Inc.,N.J, USA)과 taurine(Sigma, St.Louis, USA)을 사용하였다.

나. 연구 방법

1. 세균 배양 및 분쇄

본 실험에 사용된 균주인 *Porphyromonas gingivalis*는 hemin (5 ㎍/㎖)과 menadion (0.5 ㎍/㎖)이 함유된 BHI 배지에 1:20으로 접종한 뒤 2일간 혐기적 조건(N_2 80 %, H_2 10 %, CO_2 10 %)에서 배양하였다. 50 ㎖의 배지에서 일주일간 배양한 배양액을 4℃, 5000×g에서 10분간 원심분리하여 균체를 얻었다. 균체를 50 ㎖ phosphate buffer saline (PBS)에 현탁한 후 4℃, 5000×g에서 10분간 3회 원심분리하여 세척하였다. 세척한 균주를 1㎖ PBS에 부유시킨 후 세포 분쇄기 (Branson model 250 sonifer)를 사용하여 균질화 하였으며, 세균 분쇄액의 단백질

량은 protein assay kit을 이용하여 측정하였다.

2. 조골세포의 분리

태생 1 2일 경과한 ICR 마우스를 에탄올 용액으로 희생시킨 후 두개골을 무균적으로 적출하였다. 10개의 마우스 두개골을 10 ㎖의 0.2% 교원분해효소 및 0.1% dispase가 함유된 α-MEM배지에 부유시킨후 37℃에서 10분간 교반하여 두개골로부터 조골세포를 분리하였다. 이 과정을 3회 반복하여 얻어진 세포 부유액을 2000 g에서 5분간 원심분리하여 마우스 두개골 세포를 분리하였다.

분리한 세포는 10 ㎝ 평판세포배양기에 세포수가 2×10^6 개가 되도록 분주하여 10% FBS가 함유된 α-MEM배지에서 배양하였다. 2일 후 파골세포분화능을 확인하는 실험에 이용하였다.

3. 골수세포의 분리

4 6주 정도 경과한 ICR 마우스의 경골과 대퇴골로부터 연조직을 제거한 후 골말단 부위를 절단하였다. 25 gauge 주사 바늘로 α-MEM 배지를 골수 강내로 주입하여 골수 세포를 뽑아낸 후 2000×g에서 5분간 원심분리 하였다. 상층액을 제거한 후 10 ㎖의 적혈구 용해용액 (10 mM Tris·HCl, 0.83 % ammonium chloride)을 첨가하여 5분간 반응시켜 골수세포로부터 적혈구를 제거하였다.

4. 파골세포의 형성유도

조골세포 및 골수세포를 골수세포 배양배지 (10% 우태아 혈청이 함유된 α MEM) 400 ㎕당 세포수가 각각 1×10^4 및 1×10^5개가 되게 부유한 후 48well 세포배양기의 각 well에 400 ㎕씩 분주하여 3일간 배양하였다. 3일후 배지를 제거하고 *Porphyromonas gingivalis*와 taurine, alendronate가 첨가된 골수세포 배양배지에서 4일간 연속배양하여 파골세포 형성을 유도하였다.

5. Tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) 염색

파골세포 형성 유도 후 파골세포의 표지 물질인 tartrate 저항성 산성인산분해

효소 (tartrate resistant acid phosphatase, TRAP)를 다음과 같은 방법으로 염색하여 균 분쇄액에 의한 파골세포 형성능을 평가하였다.

세포를 고정액 (25㎖ citrate solution, 65㎖ acetone, 8㎖ 37% formaldehyde)으로 처리하여 30초간 고정시킨후 증류수로 세척하였다. Tartrate - resistant acid phosphatase assay kit (Sigma)을 이용하여 제조한 염색액을 고정한 세포에 처리하여 빛이 들어가지 않도록 주의하면서 37℃ water bath에서 1시간 동안 염색하고, 증류수로 세척한 후 위상차 현미경상에서 핵이 3개 이상인 TRAP 양성 세포의 수를 세어 비교하였다.

6. 세포 독성의 측정

파골세포의 억제 효과가 순수한 약제의 효과인지, 아니면 약제의 세포독성으로 인한 것인지를 알아보기 위하여 MTT test를 시행하였다. MTT (3-[4,5-dimethlthiazol-2-yl-]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 측정법은 활성이 있는 마이토콘드리아의 환원효소 (succinate dehydrogenase)에 의해 tetrazolium salt가 환원되는 원리를 이용하여 살아있는 세포를 측정하여 세포의 독성능 또는 세포증식 정도를 알아 보기 위해 사용되는 방법이다. 본 실험에서는 96-well 평판 배양기에 마우스 두개골로부터 분리한 조골세포 및 골수세포를 각각 5×10^3 및 5×10^4개를 분주한 뒤, 10% fetal bovine serum (FBS)가 함유된 α-MEM에서 37℃로 배양하였다. 3일 후 배양배지를 제거하고 Taurine 500, 1000, 1500 ㎍/㎖, alendronate 10^{-7}, 10^{-6}, 10^{-5} M을 처리한 후 아래와 같이 MTT 방법으로 세포의 증식정도를 측정하였다. 배양이 끝나는 날 세포배양액에 50㎕의 MTT (5㎎/㎖) 시약을 넣은 후 4시간 동안 방치하였다가 반응액을 제거한 뒤, 5㎕의 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 첨가하여 세포안에 생성된 formazan 결절을 녹인 뒤 570 nm 에서 흡광도를 측정하였다.

7. ELISA kit을 이용한 IL-6의 농도의 측정

두 약제의 파골세포에 대한 억제효과를 알아보기 위하여 IL-6의 농도를 ELISA kit을 이용하여 측정하였다.

마우스의 조골세포와 골수세포를 3일간 혼합배양한 후 0.01㎍/㎖의 *P.gingivalis* 분쇄액(0.01㎍/㎖)과 alendronate(10^{-5}M) 또는 taurine(1500㎍/㎖)을 첨가하였다. 1일 후 상등액을 얻어 ELISA kit을 이용, IL-6의 농도를 측정하여, *P.gingivalis*만 처치한 경우와 위의 두가지 약제 처치 후의 IL-6 농도를 비교하여 보았다.

8. 실험자료의 분석

대조군과 각 실험용액의 농도에 따른 유의차를 비교하기 위하여 One-way ANOVA와 Duncan test로 통계처리 하였으며, p값 0.05 이하를 통계적으로 유의한 수준으로 판정하였다.

III. 연구성적

가. 파골세포의 확인

파골세포의 존재 확인에 사용되는 방법중의 한가지인 TRAP 염색을 실시한 후 위상차현미경으로 관찰한 결과, TRAP 양성 반응을 보이며 핵을 세 개 이상 가진 붉은 색의 다핵 거대 세포, 즉 파골세포의 존재를 확인할 수 있었다.
(사진부도 1)

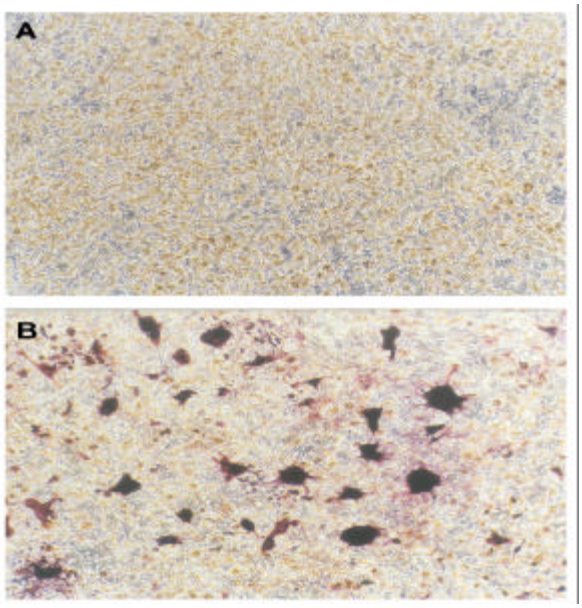

Fig. 1. Osteoclast differentiation induced by sonicated extracts of *P. gingivalis*. Mouse bone marrow cells and calvaria cells were co-cultured for 3 days. After changing the medium, cells were treated with sonicated extracts of *P.gingivalis* (0.01 ㎍/㎖, B) for an additional 4 days. Non treated cells(A) was used as the negaive control. After co-culture, cells were fixed and stained for TRAP. Magnification : x 100

나. *Porphyromonas gingivalis* 분쇄액의 농도에 따른 파골세포의 형성효과

***P. gingivalis* 분쇄액의 농도가 0.1μg/㎖일 때 파골세포가 가장 많이 형성되는 것으로 나타났으나, 이 농도에서는 단층으로 형성되는 파골세포의 층이 말리는 현상이 나타났다. 0.01μg/㎖에서는 세포층이 말리지 않으면서 비교적 많은 파골세포가 형성되었다.**

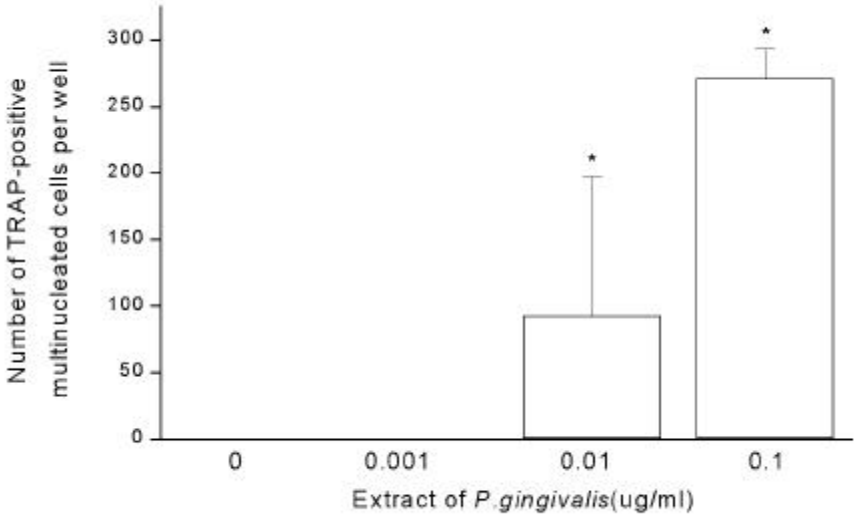

Fig. 2. Concentration-dependent stimulation of osteoclast differentiation induced by sonicated extracts of *P. gingivalis*. Mouse bone marrow cells and calvaria cells were co-cultured for 3 days. After changing the medium, cells were treated with various concentrations of extracts of *P. gingivalis* for additional 4 days. Then, cells were fixed and stained for TRAP. TRAP-positive cells were counted as osteoclast. The results were expressed as means ± SD of four cultures. * Significantly different from the non treated group. ($p<0.05$)

다. Alendronate**의 세포독성 검사**

MTT test**를 시행하여** alendronate**의 세포 독성 정도를 검사하였다**. 10^{-7}, 10^{-6}, 10^{-5}M**의** alendronate**모두** *P. gingivalis***만 첨가한 대조군과 유의차가 없어**, **모든 농도에서 세포 독성은 없는 것으로 나타났다**.

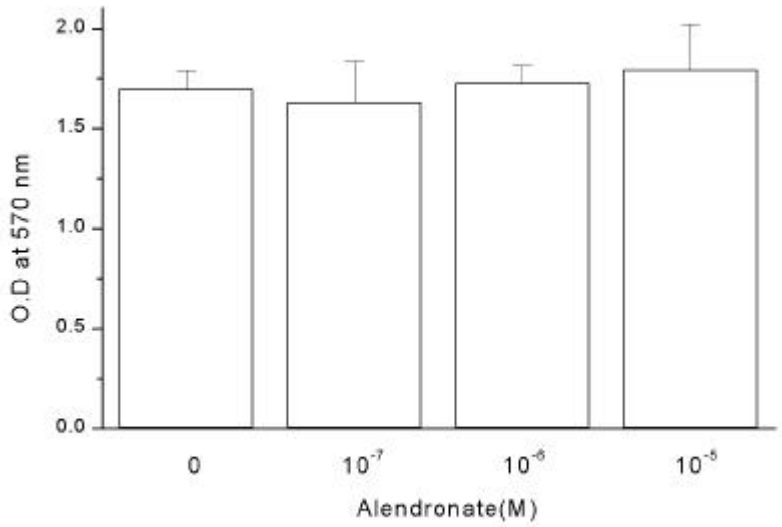

Fig. 3. Cytotoxic effect of alendronate on mouse bone marrow and calvaria cells. Bone marrow cells and calvaria cells were co-cultured for 3 days. After changing the medium, cells were treated with various concentrations of alendronate for additional 4 days. Then, the number of cells were estimated by MTT assay, and data was represented as optical density at 570 nm.

라. *P. gingivalis* **분쇄액에 의하여 유도되는 파골세포의 형성에 대한** alendronate **의 효과**

10^{-7}, 10^{-6}, 10^{-5}M**의** alendronate**를 처치한 결과** 10^{-5}M**의 농도에서** *P.gingivalis* (0.01㎍/㎖)**에 의한 파골세포의 형성 억제 효과가 나타났다**.

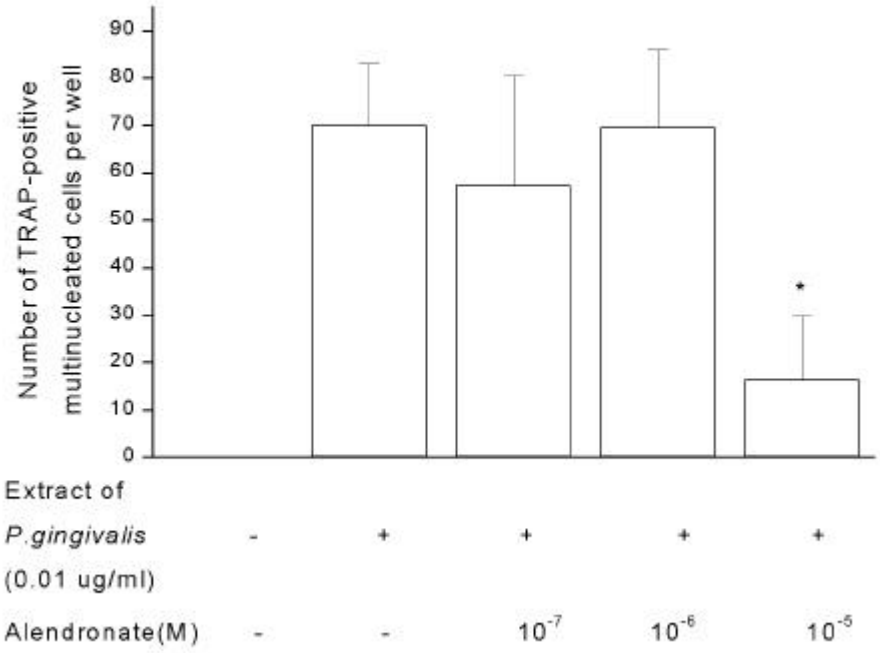

Fig. 4. Effect of alendronate on the osteoclast differentiation induced by sonicated extracts of *P. gingivalis*. Mouse bone marrow cells and calvaria cells were co-cultured for 3 days. After 3 days, cells were cultured with extracts of *P. gingivalis* (0.01 ㎍/㎖) in the presence of various concentrations of alendronate (10^{-7} to 10^{-5} M) for additional 4 days. Then, cells were fixed and stained for TRAP. TRAP-positive cells counted as osteoclast.. Results were expressed as the mean ± SD of six replicate cultures.

* Significantly different from the non-treated group.

마. Taurine**의 세포 독성 검사**

Taurine**의 검증 결과** 500, 1000, 1500㎍/㎖**의 세 농도 모두에서** *P. gingivalis***만 처치한 대조군과 흡광도의 큰 차이가 없는 것으로 나타났다. 이상의 결과에서 모든 농도의 실험용액에서 세포독성이 없는 것으로 평가되었다.**

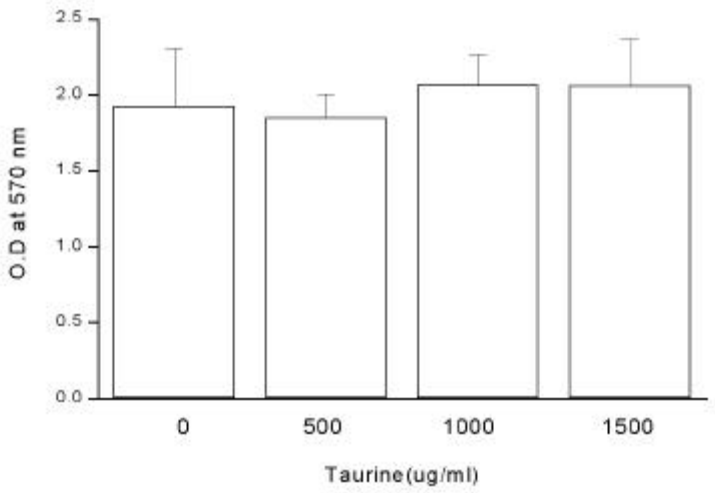

Fig. 5. Cytotoxic effect of taurine on mouse bone marrow and calvaria cells. Bone marrow cells and calvaria cells were co-cultured for 3 days. After changing the medium, cells were treated with various concentrations of taurine for additional 4 days. Then, the number of cells were estimated by MTT assay, and data was represented as optical density at 570 nm.

바. *P. gingivalis* 분쇄액에 의하여 유도되는 파골세포의 형성에 대한 taurine의 효과

500, 1000, 1500㎍/㎖의 taurine을 처치한 결과 1500㎍/㎖의 농도에서 유의할 만한 파골세포의 형성 억제효과가 나타났다.

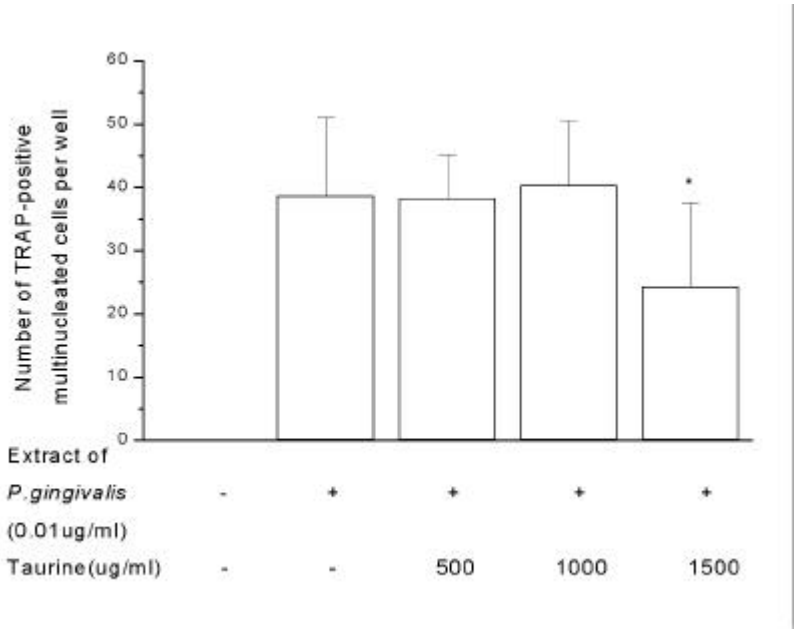

Fig. 6. Effect of taurine on the osteoclast differentiation induced by sonicated extracts of *P. gingivalis*. Mouse bone marrow cells and calvaria cells were co-cultured for 3 days. After 3 days, cells were cultured with sonicated extracts of *P. gingivalis* (0.01 ㎍/㎖) in the presence of various concentrations of taurine (500 to 1500 ㎍/㎖) for additional 4 days. Then, cells were fixed and stained for TRAP. TRAP-positive cells counted as osteoclast. Results were expressed as the mean ± SD of six replicate cultures.

* Significantly different from the non-treated group.

사. ELISA Kit**을 이용한** IL-6**의 농도측정**

*P.gingivalis***의 분쇄액만 첨가한 경우와** alendronate(10^{-5}M), taurine(1500㎍/㎖)**을 첨가한 후의** IL-6**의 농도를 각각 측정하여 비교해 보았다. 그 결과,** *P. gingivalis***에 의하여** IL-6**의 생성이 유도되었으나, 파골세포 분화의 억제에 효과가 있었던** alendronate(10^{-5}M)**와** taurine(1500㎍/㎖)**에 의해서는** *P. gingivalis***에 의한** IL-6**의 생성이 억제되지 않는 것으로 나타났다.**

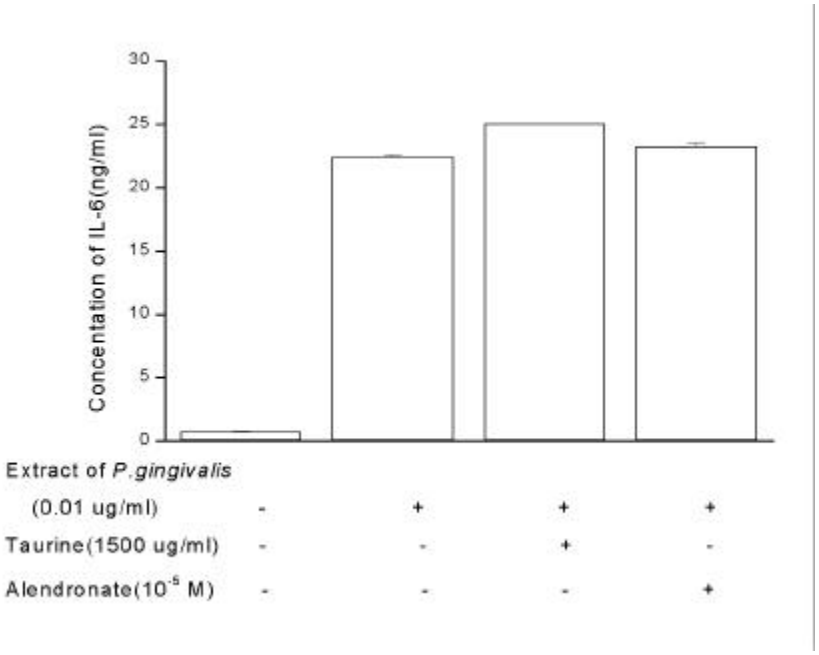

Fig. 7. Effects of alendronate and taurine on induction of IL-6 induced by extracts of *P.gingivalis*. Mouse bone marrow cells and calvaria cells were co-cultured for 3 days. After 3 days, cells were cultured with extracts of *P.gingivalis* (0.01 ㎍/㎖) in the presence or absence of alendronate(10^{-5} M) and taurine(1500 ㎍/㎖) for additional 1 day. The conditioned media were assessd for the production of IL-6 ELISA kit. Results were the mean ± SD of four replicate cultures.

IV. 총괄 및 고찰

치아탈구 후의 대치성 치근 흡수는 외상 후의 치아 상실을 야기하는 주된 원인으로서, 이를 예방하기 위한 여러 가지 시도가 오랜동안 이루어져 왔다. 즉, 괴사된 치주인대를 생체친화성이 있는 재료로 대체하거나, 재식될 치아의 치근표면을 여러 가지 약제에 담그거나 처치하여 치근흡수에 대한 저항력을 증진시키는 방법 등이다. 본 실험에서는 치근과 치조골 흡수를 야기하는 주된 세포인 파골세포를 억제하는데 초점을 맞추었다.

파골세포는 크게 3가지의 형태학적인 특징을 가진다. 첫 번째는 다핵세포라는 것, 두 번째는 경조직 흡수가 활발히 일어나는 부분으로 세포막의 수많은 주름으로 이루어져 있는 변연주름(ruffled border), 그리고 세 번째는 그 주위를 둘러싸고 있는 투명대(clear zone)가 있다는 것이다 변연주름은 흡수와를 산성화하여 경조직의 수산화인회석 결정을 용해시키고, 산 및 분해효소를 분비하여 남아있는 유기물질을 분해시키는 조건을 만들어준다.[12,21] 또한, 파골세포는 투명대에 의하여 경조직에 부착되며, 변연주름 하방의 특수한 미세환경을 격리시킴으로써, 흡수를 효율적으로 수행함과 동시에 주위의 다른 세포를 보호할 수 있다.[22]

파골세포는 외상 후의 치근흡수 뿐 아니라, 치주질환이나 치수질환으로 인한 치조골 파괴에서도 주된 역할을 한다. *Actinomyces actinomycetemcomitans*에서는 세균 세포벽 내, 또는 세포벽 외에 존재하는 lipopolysaccaride 및 다당체, 그리고 세포막에 존재하는 chaperon이라고 불리는 일종의 heat shock protein이 파골세포의 분화를 유도하는 것으로 알려져 있다.[23]

본 실험에서 파골세포의 분화를 유도하기 위하여 사용된 *Porphyromonas gingivalis*는 치주질환과 관련된 치조골 파괴뿐 아니라, Black Pigmented Bacteroides중 가장 독성이 높은 세균으로서 동통과 관련있는 감염근관, 치근단 감염과 연관된 광범위한 치조골 손실과 관련이 있으며, *Porphyromonas*

*endodontalis*와 함께 치수가 괴사된 근관의 급성 감염을 야기한다.[24] *Porphyromonas gingivalis*의 파골세포에 대한 효과는 lipopolysaccaride[25,26,27] 및 세포막에 존재하는 단백물질,[28] 이 외에 세균의 부착에 관여하는 섬모(fimbriae)[29]가 관여하는 것으로 보고되었다. 즉, 이들이 조골세포를 자극하여 interleukin-1의 생성을 유도하며, interleukin-1은 그 자체로도 골흡수를 크게 자극하지만, 여러 세포에서 interleukin-6의 생성도 유도함으로써 파골세포의 형성을 촉진하는 것으로 알려지고 있다.

파골세포의 형성능은 균주의 농도가 0.1μg/㎖에서 가장 크게 나타났으나, 단층으로 형성되는 세포의 층이 말리는 경향이 있어, 세포층이 말리지 않으면서 비교적 파골세포가 많이 형성되는 0.01μg/㎖를 *P. gingivalis*의 농도로 결정하여 실험에 사용하였다.

본 실험에서 파골세포에 대한 억제 효과를 알아보기 위하여 사용된 alendronate는 nitrogen이 첨가된 강력한 골흡수 억제제로서, Paget'disease나 악성종양에 의한 고칼슘혈증(hypercalcemia of malignancy), 또는 골다공증과 같은 골과 칼슘대사에서 일어나는 질병을 치료하는 bisphosphonate 계열의 약제로 사용되어져 왔다.[13,14,15,30] Bisphosphonate는 동맥, 신장, 피부, 심장, 또는 구강 내에서까지도 연조직의 석회화를 억제할 수 있으며, 뇨결석이나 치석 생성을 억제하는 것으로 보고되고 있다.[31] 또한, Weinreb[32]등은 *P. gingivalis*를 투여한 원숭이의 치주질환 모델에서 0.5mg/kg의 alendronate를 IV로 주입한 결과 치조골의 파괴가 감소되었음을 보고하였다. Paul[33]등은 HEBP(1-Hydroxyethylidene-1, 1-bisphosphonate)가 치근흡수를 완전히 방지하지는 못하나 치근흡수를 지연시킴을 보고하였는데, 이는 HEBP가 파골세포의 골흡수 능력을 억제하기 때문이라고 하였다. 또한, Leonard[34]에 의하면 쥐에서 bisphosphonate가 치주조직의 파괴를 예방할 수 있었음을 보고하였으나, Schaff[35]등은 치주질환이 이환된 쥐에서 HEBP나 식염수를 피하 주사한 경우 치조골 흡수의 억제 효과 비교에서 유의차가 없었으며, 6개월 후에 골성유합도 생겼다고 보고하였다. 그러나, 유사한 실험에서 Gotcher와 Jee[36]는 실험동물에서 골흡수를 확실히 지연시킬 수 있었고 골성유합도 관찰할 수 없었다고 하였다. 또한 백[37]은 bisphosphonate계열의 약제인 etidronate

sodium이 10^{-5}, 10^{-4}M의 농도에서 상아질 흡수 억제효과를 나타낸다고 보고하였다.

이러한 bisphosphonate의 주된 약리학적인 효과는 파골세포의 흡수능력을 억제하는데 있음이 여러 연구에서 밝혀졌다.[25,27,38] 모든 bisphosphonate는 P-C-P 구조로 인하여 수산화인회석(hydroxyapatite)에 결합하여 골격에 대한 선택적인 작용을 한다.[24] bisphosphonate가 파골세포에 미치는 효과는 다양하며, 아직 확실히 밝혀지지는 않았으나, 다음에 설명되는 여러 가지 기전에 의할 것으로 추측되고 있다. 즉, bisphosphonate가 전구세포로부터 파골세포의 분화를 억제시키거나, 골흡수와 골형성이 왕성히 일어나는 부위에 작용, 성숙된 파골세포에 유해한 작용을 함으로써 파골세포의 수를 감소시키거나,[13] 파골세포의 세포골격의 변화, 변연주름(ruffled border)의 소실을 야기한다는 것 등이다. Carano[16]등은 bisphosphonate가 파골세포와 골이 결합하는 능력을 30-40%까지 감소시키고, 파골세포에 의한 H^+ 이온 축적과 단백질 합성을 감소시킨다고 하였으며, 이는 bisphosphonate가 파골세포의 대사를 강력히 억제함을 암시하는 것이라고 하였다. 그러나, 어떠한 기전이 정확한 것인지는 아직까지 명확하게 밝혀지지 않고 있다.

최근에는 파골세포의 apoptosis가 bisphosphonste의 작용기전임이 강력히 주장되고 있는데,[39] apoptosis란, 뚜렷한 형태적 변화를 보이는 세포 괴사의 생리학적인 형태를 말한다. 즉, bisphosphonate로 처리된 파골세포는 세포질 수축(cytoplasmin contraction), chromatin 응축(chromatin condensation), 핵의 분열(nuclear fragmentation)같은 형태적인 변화를 보이는데, 이러한 파골세포의 apoptosis는 골흡수 능력과 파골세포의 수의 감소와 밀접한 연관성이 있다.

생체내에서 bisphosphonate의 주된 작용기전으로 추측되는 파골세포의 apoptosis는 조골세포에 의하여 매개된다고 알려져 있다.[1] Nitric oxide, TGF-β나 Fas ligand같은 매개체들은 다른 세포들에서 apoptosis를 유발한다고 알려져있는데, 즉, bisphosphonate가 조골세포에서 이러한 매개체의 분비를 자극함으로써 파골세포의 apoptosis를 일으킨다는 것이다. Masahiko[40]등은 bisphosphonate의 골흡수 억제능력을 형성된 흡수와의 수와 흡수된 총면적에 대한 bisphosphonate의 농도를 측정, 비교하는 실험에서 10^{-7}, 10^{-8}M 정도가 효과적이라고 하였다.

bisphosphonate의 일종인 alendronate는 가장 강력한 골흡수 효과를 가지는데 이는 파골세포를 억제함으로써 골흡수를 억제하는 동시에 신생골 형성에도 직접적인 효과가 있음이 밝혀졌다. 즉, Igarashi[41]등은 저농도의 alendronate는 조골세포의 기능을 활성화시킨다고 하였으며, Tsuchimoto[42]등은 10^{-12}-10^{-7}M의 alendronate는 10-100ng/ml의 1α,25-dihydroxy vitamin D_3 존재하에서 조골세포에 의한 신생골 형성을 증가시킴을 보고하였는데, 10^{-9}M의 alendronate에서 최대의 효과가 나타난다고 하였다. 또한 Linda[17]등은 미완성 치근단을 가진 발치한 치아에서 10^{-9}M의 alendronate가 조상아세포를 자극, 상아질 형성을 유도함으로써 치근단부의 경조직 형성을 촉진시킴을 보고하면서, 실제 임상에서도 근관내에 alendronate를 적용시켜 근첨형성술 등에 응용할 수 있을 것이라고 주장하였다.

파골세포의 존재를 확인하는 지표로는 TRAP 염색,[8] 칼시토닌 수용체의 확인,[43]면역세포학 검사,[44] 파골세포의 골흡수 능력을 주사전자현미경으로 관찰하는 방법 등이 있다. 본 실험에서 사용된 TRAP염색 반응은 식세포 및 파골세포에 있는 acid phosphotase에 대하여 tartrate를 첨가하면, 식세포에서는 acid phosphotase가 반응을 못하지만, 파골세포는 계속 반응을 하므로 배양세포중 파골세포를 확인하는 방법으로 많이 이용되고 있다.[8,45,46]그리고 파골세포가 아닌 다른 세포, 즉 단핵세포나 활성화된 식세포도 TRAP 양성을 보일 수 있으므로[46] 파골세포의 확인은 핵이 두 개 이상인 세포, TRAP 양성반응, 흡수와의 형성능력 등으로 알 수 있다.

우선, 10^{-7}, 10^{-6}, 10^{-5}M의 alendronate를 처치한 실험군에서, 10^{-7}M 농도에서는 *P. gingivalis*만 첨가한 대조군과 큰 차이가 없었으나, 10^{-5}M 에서는 유의할 만한 파골세포의 형성 억제효과가 나타났다. 이는 Vitte등의 실험결과와 일치하는데, 이들은 alendronate(10^{-7}M)가 조골세포에서 파골세포 억제제(inhibitor)의 합성을 유도하여 TRAP 양성세포의 형성을 감소시킴을 보고하였다. 이러한 파골세포 억제제의 본질은 밝혀지지 않았는데, 이러한 TRAP 양성세포의 수가 감소하는 현상이 bisphosphonate가 파골세포 전구세포의 증식을 억제하기 때문인지, 아니면 세포분열을 끝낸 파골세포의 전구세포가 TRAP 양성세포로 분화하여 서로 융합되는 것을 방해하기 때문인지는 확실하지 않다고 하였다.

본 실험에서는 alendronate외에 taurine을 처치하여 파골세포의 형성에 어떠한 영향을 미치는지 알아보았다. Taurine(2-aminoethanesulfonic acid)은 sulfur-containing β-amino acid로서, 1827년에 발견된 이래 예방의학 분야에서 많은 관심의 대상이 되어왔는데, 뇌, 신경조직, 심장, 망막(retina), 중성구(neutrophils), 혈소판(blood platelet)같이 산화되기 쉬운 세포나 조직에 고농도로 분포하며,[20] 인간을 포함한 포유류의 milk에도 포함되어 있다.[18,47] 생체내에서 taurine이 관여하는 가장 널리 알려진 기능은 지방흡수에 필수적인 bile salt의 생합성이며, 그 외에, calcium flux와 신경조직의 흥분성(neuronal excitability) 조절, 삼투조절(osmoregulation), 해독작용(detoxification), 그리고 세포막의 안정화 같은 중요한 생리적 기능에 관여한다. 특히, taurine의 세포막 안정효과와 세포를 보호하는 기능에 관해서는 여러 연구결과가 보고된 바 있는데, Yamauchi[48]등은 동맥질환을 일으키는 vitamin D_3와 nicotine을 4일간 처치한 mice에게 3% taurine이 포함된 물을 8일간 먹였을 경우, 생존율이 증가하고 대동맥과 심근에서의 칼슘증가가 감소됨을 보고하였으며, Gordon[49]등은 0.5% taurine이 포함된 물을 14일간 전처치한 hamster를 NO_2에 24시간 노출시켰을 경우 taurine을 처치하지 않은 군은 심각한 조직손상을 보인 반면, taurine을 처치한 군에서는 조직손상이 거의 발견되지 않았음을 보고하였다. 또한, Hayes[50]등은 taurine이 결핍된 먹이를 먹인 고양이에서 망막의 이상이 관찰되었음을 보고하였다.

이러한 taurine의 세포보호 효과는 taurine이 세포막 투과성의 변화를 방지하고 여러 유해물질을 중화함으로써 일어난다고 보고되고 있다.[47] 즉, taurine이 amino group을 통하여 여러 유해물질과 반응하여 이들을 중화하며, 세포의 손상과 수분의 이동을 방지함으로써 세포를 보호한다는 것이다. taurine은 여러 인체조직과 기관에 의하여 황을 포함하는 아미노산(sulfur-containing amino acid)로부터 합성가능하지만, 유아에서는 비록 다른 동물보다는 덜 민감하나 taurine의 생합성이 매우 떨어지는 것으로 나타나,[51] 1984년부터 미국 FDA(Food & Drug Administration)에서 분유나 우유에 taurine의 첨가가 허용되게 되었다.

갑작스런 외상으로 치아가 완전 탈구되었을 때, 특별히 고안된 저장매체(storage media)가 없을 경우, 우유에 치아를 담구어 운반할 것이 예전부터 권장

되어져 왔다. 이는 우유가 비교적 생리적인 삼투압(osmolality)과 조성을 가지고 있고 타액에 비하여 훨씬 세균 수가 작다는 이유 때문이다. 또한, 대부분의 우유에 taurine이 함유되어 있음을 상기하여 볼 때, taurine이 가지는 외부 자극으로부터의 세포 보호 효과가 치주인대 세포의 생활력 향상에 일조를 하는 것이 아닌가 추측된다.

Masanori, Nobuo[19]등은 taurine(2-aminoethanesulphonic acid)이 골흡수와 파골세포의 형성에 미치는 효과를 알아본 실험에서 taurine은 interleukin-1이나 prostaglandin E_2, LPS같은 염증성 매개체에 의하여 유도되는 파골세포의 분화는 억제하나, 1α,25-dihydroxyvitamin D_3에 의하여 유도되는 파골세포의 형성은 억제하지 못하며, 따라서 taurine의 파골세포 형성 억제효과는 염증성 골흡수에 대해서만 선택적으로 나타나는 것이라고 하였다. 또한, taurine이 골수세포로부터 파골세포의 분화를 억제한다고 보고하였다.

본실험에서는 taurine을 500, 1000, 1500㎍/㎖의 세 농도로 하여 처치하였는데, 1500㎍/㎖의 농도에서 유의할 만한 파골세포의 형성 억제효과가 나타났다.
또한, 본 실험에서 사용한 bisphosphonate와 taurine의 세포독성을 검증하기 위하여 MTT검증을 시행하였다. MTT검증은 정상세포의 mitochondrial dehydrogenase에 의하여 MTT가 환원, blue formazan 결정이 생성되는 것을 이용하여 이것의 흡광도를 측정하여 간접적으로 살아있는 세포수를 비교함으로써 세포 독성, 세포 증식 및 세포의 활성화 등을 측정할 수 있는 방법이다. 본 실험에서는 MTT검증 결과 alendronate와 taurine 모두 *P. gingivalis* 분쇄액만 첨가하고 약제를 처치하지 않은 대조군과 큰 차이가 없어, 각 농도에서 세포독성이 없는 것으로 관찰되었다.

또한 alendronate와 taurine의 파골세포에 대한 억제효과를 다시 한 번 확인하기 위하여 강력한 골흡수 능력을 가지는 cytokine인 IL-6와 IL-1의 농도를 *P. gingivalis*만 처치한 경우와 두 가지 약제 처치 후에 각각 측정하여 비교해 보았다. 그 결과, IL-6의 경우, *P. gingivalis*만 처치한 경우에는 IL-6의 농도가 크게 증가하였으나, alendronate와 taurine에 의해서는 *P. gingivalis*에 의한 IL-6의 생성이 억제되지 않는 것으로 나타났으며, IL-1의 경우에는 pg/ml의 단위로도 확인

되지 않을 정도로 극히 미량이 생성되어 측정하기가 용이하지 않았다. 이로 미루어 볼 때, IL-6나 IL-1은 파골세포의 분화 억제 기전과는 관계가 없는 것으로 보이며, 이들 이외에 PGE_2나 OPG의 생성유도, 혹은 ODF의 발현억제 등과 관련이 있을 것이라고 추측되나, 앞으로 더 연구가 필요하리라 생각된다.

이상의 결과로부터 alendronate와 taurine의 파골세포 분화에 대한 억제효과는 치과 임상에서 대치성 치근흡수의 억제에 응용될 수 있으리라 생각된다. 그러나, 앞으로 탈구된 치아를 재식하기 전에 이러한 농도의 용액에 처리하여 조직학적으로 대치성 치근흡수에 대한 억제효과의 여부를 평가하기 위한 in vivo 실험이 추가되어야 할 것으로 사료되며, 또한, 재식될 치아의 근관을 resorvoir로 사용할 경우, 이들 약제가 상아세관을 통하여 치근표면에 도달될 수 있는 최적의 농도나 carrier의 개발에 대한 연구도 이루어져야 할 것이다. 이러한 파골세포에 대한 억제 기전과 영향인자에 대한 평가를 토대로 임상에서 탈구된 치아의 대치성 치근흡수를 억제할 수 있는 약제나 치료법의 개발이 지속적으로 이루어져야 할 것으로 생각된다.

V. 결 론

본 연구에서는 대치성 치근흡수를 일으키는 파골세포에 대한 taurine과 alendronate의 억제효과를 알아보고자 하였다. 마우스에서 얻은 조골세포와 골수세포를 혼합배양하였으며, 여기에 *Porphyromonas gingivalis*의 분쇄액을 첨가하여 파골세포의 형성을 유도하였다. 실험군으로는 10^{-7}M, 10^{-6}M, 10^{-5}M 의 alendronate와 500, 1000, 1500㎍/㎖의 taurine을 배양시 함께 처치하여 이들 약제가 파골세포의 형성에 어떠한 영향을 미치는가를 알아보았다. 파골세포의 존재는 TRAP염색으로 확인하였으며, MTT검정법으로 각 약제의 세포독성을 검사하였다. 또한, 파골세포에 대한 두 약제의 억제효과를 평가하기 위하여 ELISA방법을 사용, interleukin-6의 농도를 측정하였다. 이상의 실험으로 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. *Porphyromonas gingivalis* 분쇄액의 농도가 0.01-0.1㎍/㎖일 때 파골세포가 유의성 있게 잘 형성되었다. ($P < 0.05$)
2. Alendronate는 10^{-5}M의 농도에서 *P.gingivalis* (0.01㎍/㎖)에 의한 파골세포의 형성을 억제하였다.
3. Taurine은 1500㎍/㎖의 농도에서 *P.gingivalis* (0.01㎍/㎖)에 의한 파골세포의 형성을 억제하였다.
4. 세포독성 검사에서 alendronate와 taurine은 모든 농도에서 마우스 두개골 세포나 골수 세포에 대한 세포독성을 나타내지 않았다.
5. *P. gingivalis*에 의하여 IL-6의 생성이 유도되었으나, 파골세포의 분화에 대해 억제효과를 나타내었던 alendronate (10^{-5}M)와 taurine (1500㎍/㎖)에 의해서는 *P. gingivalis*에 의한 IL-6의 생성이 억제되지 않았다.

이상의 결과로 Alendronate (10^{-5}M)와 Taurine (1500㎍/㎖)은 파골세포의 분화에 억제효과를 나타냄을 알 수 있으나, IL-6의 생성과는 무관한 것으로 밝혀져 두 약제의 작용이 IL-6의 생성을 감소시킴으로써 파골세포의 분화를 억제하는 것은 아닌 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Takuhiko A. et al : Role of prstaglandins in interleukin-1 induced bone resorption in mice in vitro, J Bone Mineral Res, 6 : 183-190, 1991.
2. Peter M.L., Richard P.E. : Osteogenic and osteoclastic cell interaction ; Development of a coculture system, Cell Tissue Res, 294 : 88-108, 1998.
3. Takahashi N., Udagawa N., Sasaki T., Yamaguchi A., moseley J. M., Martin T. J., and Suda T. : Osteoblastic cells are involved in osteoclast formation, Endocrinology, 123 : 2600-2602, 1988.
4. Suda T., Takahashi N., and Martin T. J. : Modulation of osteoclast differentiation, Endocrine Rev, 13 : 66-80, 1972.
5. Hisataka Y., Nobuyuki S. et al : Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to Trans/Rankl, Proc natl Acnd Sci USA, 95 : 3597-3602, 1998.
6. Andreasen J. O. : Analysis of pathogenesis and topography of replacement root resorption(ankylosis) after replantation of mature permanent incisors in monkey, Swed Dent J, 4 : 231-240, 1980.
7. Heithersay G. S. : Clinical endodontic and surgical management of tooth and associated bone resorption, Int J, 18 : 72-79, 1985.
8. Cedric M. : Bone acid phosphotase ; Tartrate-resistant acid phosphotase as a marker of osteoclast function, Calcif tissue Int 34 : 285-290, 1982.
9. Andreasen J. O. : Analysis of topography of surface- and inflammatory root resorption after replantation of mature permanent incisors in monkeys, Swed Dent J, 4 : 135-144, 1980.
10. Hammarstrom L., Blomlof L., Lindskog S. : Dynamics of dentoalveolar ankylosis and associated root resorption, Endod Dent Traumatol, 5 :

163-175, 1989.

11. Tronstad L. : Root resorption-etiology, terminology, and clinical manifestations, Endod Dent Traumatol, 4 : 241-252, 1988.
12. Bonucci E. : New knowledge on the origin, function, and fate of osteoclasts, Clin Ortho Res, 158 : 252-268, 1980.
13. Body J.J., Barh R., burkhardt P. et al : Current use of bisphosphonates in oncology, J Clin Oncol, 16 : 3890-3899, 1988.
14. Masahiko S. et al : Bisphosphonate action-Alendronate localization in rat bone and effects on osteoclast ultrastructure, J Clin Invest, 88 : 2095-2105, 1991.
15. Vitte C., Fleisch H., Guenther HL. : Bisphosphonates induce osteoblasts to secrete an inhibitor of osteoclast mediated resorption, Endocrinology, 137 : 2324-2333, 1996.
16. Carano A., Teitelbaum S.L., Konsel J.D., Schlesinger P.H., Blair H.C. : Bisphosphonates directly inhibit the bone resorption activity of isolated avian osteoclasts in vitro, J Clin Invest, 85 : 456-461, 1990.
17. Linda M.S., Peter M.D., Saryu N.D. et al : Effect of alendronate on immature human dental root explants, J of Endod, 26 : 133-137, 2000.
18. John A.S., Russel W.C. : Taurine in pediatric nutrition, Pediatric clinics of North America, 42 : 879-897, 1995.
19. Masanori K., Nobuo O., Rumi T. et al : Inhibition of experimental bone resorption and osteoclast formation and survival by 2-aminoethanesulfonic acid, Arch Oral Biol, 44 : 711-719, 1999.
20. Tonnomi N., Mizuho O., Ikuo K. et al : The protective effect of taurine on the biomembrane against damage produced by oxygen radicals, Biol Pharm Bull, 16 : 970-972, 1993.
21. Gothlin G., Ericsson J. L. E. : The osteoclast ; Review of ultrastructure, origin, and structure-function relationship, Clin Orthoped Rel Res, 120:

201-228, 1976.

22. Zoran Z., Gregg W., Gideon A.R. : Acid extrusion is induced by osteoclast attachment to bone-Inhibition by alendronate and calcitonin, J Clin Invest, 96 : 2277-2283, 1995.
23. Kirby A. C., Meghji S., Nair S.P., White K. et al : The potent bone resorbing mediator of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* is homologous
24. Markus H., Helena R., Kari R., Haroun S. : Black-pigmented bacteroides species in human apical periodontitis, Inf and Immunity, 53 : 149-153, 1986. to the molecular chaperon, J Clin Invest , 96 : 1185-1194, 1995.

25 Adri A., Jos W., Joke S. : *Bacteroides gingivalis* stimulates bone resorption via interleukin-1 production by mononuclear cells, J Clin Perio, 17 : 409-413, 1990.

26. Sean P.N., Sajeda M., Michael W. : Bacterially induced bone destruction ; Mechanisms and misconceptions, Inf and Immunity, 64 : 2371-2380, 1996.
27. Van Winkelhoff, Van Steenbergen TJM., De Graaff J. : The role of black pigmented bacteroides in human oral infections, J Clin Periodontol, 15 : 145-155, 1988.
28. Wilson M., Meghji S., Barber P. Henderson B. : Biological activities of surface associated material from *Porphyromonas gingivalis*, FEMS Immunol Med Microbiol, 6 : 147-156, 1993.
29. Yasuhiro K., Shigemasa H., Shigeru A. et al : *Porphyromonas gingivalis* fimbriae stimulate bone resorption in vitro, Inf and Immun, 62 : 3012-3016, 1994.
30. Liewehr F.R., Craft D.W. et al. : Effect of bisphosphonate and gallium on dentin resorption in vitro, Endodont Dent Traumatol, 11 : 20-26, 1995.
31. Fleisch H. : Bisphosphonates ; A new class of drugs in diseases of bone and calcium metabolism, Recent Results in Cancer Res, 116 : 1-28, 1989.
32. Weinreb M., Quartuccio H., Seedor J.G. : Histomorphometrical analysis of

the effects of the bisphosphonate alendronate on bone loss caused by experimental periodontitis in monkeys, J of Perio Res, 29 : 35-40, 1994.

33. Paul R.W., Woutwe B. : The influecne of 1-Hydroxyethylidene-1, 1-Bisphosphonate on dental root resorption in the mouse, Calcif Tissue Int, 45 : 104-110, 1989.
34. Leonard E.P., Reese W.V., Madel E.J. : Comparison of the effects ethane-1-hydroxy-1, 1-diphosphonate and dichloromethane diphosphonate upon periodontal bone resorption in rice rats, Arch Oral Biol, 24 : 707-708
35. Schaff J.E., Kafrwy A.H., Standish S.M. : Effects of diphosphonate in experimental periodontal disease in hamsters, J Dent Res, 57 : 195, 1978.
36. Gotcher J.E., Jee W.S.S. : The progress of the periodontal syndrome in the rice rat. II. The effect of a diphosphonate on the periodontium, J Periodont Res, 16: 441-455,1981.
37. **백은영** : Fluoride, bisphosphonate**및** gallium**이 상아질 흡수 억제에 미치는 영향**, **대한 보존 학회지**, 1997.
38. Peter M.L., Richard P.E., Howard C.T. : Effects of *Porphyromonas gingivalis* 2561 extracts on osteogenic and osteoclastic cell function in co-culture, J Periodontol, 69 : 1263-1270, 1998.
39. David E.H. et al : Bisphosphonates promote apoptosis in murine osteoclasts in vitro and in vivo, J Bone Mineral Res, 10 : 1478-1487, 1995.
40. Masahiko S., William G. : Effects of bisphosphonates on isolated rat osteoclasts as examined by reflected light microscopy, J Bone Mineral Res, 5: 31-39, 1990.
41. Igarashi K., Hirafuji M., Adachi H., Shinoda H., Mitani H. : Effects of bisphosphonates on alkaline phosphotase activity, mineralization, and prostaglandin E_2 synthesis in the clonal osteoblast-like cell line MC3T3-E1, Prostaglandins, Leukotrienes and Essential fatty Acids, 56 : 121-125, 1997.

42. Tsuchimoto M., Azuma Y., Higuchi O., Sugimoto I., Hirata N., Kioyuki M., Yamamoto I. : Alendronate modulates osteogenesis of human osteoblastic cells in vitro, Jpn J Pharmacol, 66 : 25-33, 1994.
43. Chambers T.J., Magnus C.J. : Calcitonin alters the behavior of isolated osteoclasts, J Pathol, 136 : 27-39, 1982.
44. Athanasou N.A., Quinn J.M. : Immunophenotypic difference between osteoclasts and macrophage polykaryons-Immunohistological distinction and identification for osteoclast oncogeny and function, J Clin Pathol, 43 : 997-1003, 1990.
45. Burstone M.S. : Histochemical demonstration of acid phosphotases with napthol AS-phosphates, J Natl Cancer Inst, 20 : 601-615, 1958.
46. Takahashi N., Yamana H., Yoshiki S. et al : Osteoclast like cell formation and its generation by osteotropic hormons in mouse bone marrow cultures, Endocrinol, 122 : 1373-1382, 1988.
47. Barry S.K. : Taurine : An overview of its role in preventive medicine, Preventive Medicine, 18 : 79-100, 1989.
48. Yamauchi-Takihara K., Azuma J., Kishimoto S. : Taurine protection vs experimental calcinosis in mice, Biochemi Biophys Res Commun, 140 : 679-683.
49. Gordon R.E., Shaked A.A., Solano D.F. : Taurine protects hamster bronchioles from acute NO_2-induced alteration ; A histologic,ultrastructural, and freeze- fracture study, Amer J Pathol, 125 : 585-600, 1986.
50. Hayes K.C., Carey R.E., Schmidt S.Y. : Retinal degeneration associated with taurine deficiency in the cat, Science, 188 : 949-951, 1975.
51. Sturman, J.A., Hayes K.C. : The biology of taurine in nutrition and development, Adv Nutr Res, 3 : 231-299, 1980.

Abstract

The inhibitory effect of Taurine and Alendronate on the osteoclast differentiation mediated by sonicated extracts of *Porphyromonas gingivalis* in vitro.

Ju Hyun Park D.D.S, M.S.D.

Dept. of Dentistry, The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Seung-Jong Lee, D.D.S., M.S.D., Ph D.)

The objective of this study was to investigate the inhibitory effect of taurine and alendronate on the osteoclast differentiation. Osteoblasts and bone marrow cells from 1-2 day old mouse were co-cultured in 10% fetal bovine serum - minimal essential media (FBS-MEM). Osteoclast differentiation was induced by adding the sonicated extracts of *Porphyromonas gingivalis (P.gingivalis)*. Osteoclasts were identified using tartrate resistant acid phosphotase staining (TRAP). Alendronate of 10^{-7}, 10^{-6}, 10^{-5}M and taurine of 500, 1000, 1500㎍/㎖ were added respectively. The cytotoxic effects of alendronate and taurine were examined using MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl-2,5-diphenyltetrazolium bromide) method. After culturing with the sonicated extracts of *P. gingivalis*, the amounts of IL-6 in the culture supernatants were measured and compared using the ELISA method. The results were as follows:

1. Osteoclasts were differentiated at the concentration of 0.01-0.1 ㎍/㎖ sonicated extracts of *P.gingivalis*. ($P < 0.05$)

2. Alendronate inhibited osteoclasts differentiation at the concentration of 10^{-5} M when the concentration of sonicated extracts of *P.gingivalis* was 0.01㎍/㎖.

3. Taurine inhibited osteoclasts differentiation at the concentration of 1500 μg/mℓ when the concentration of sonicated extracts of *P.gingivalis* was 0.01 μg/mℓ.

4. In cytotoxic test (MTT test), no cytotoxic effect was evident in all concentrations of alendronate and taurine.

5. Taurine(10^{-5}M) and alendronate(1500μg/mℓ) did not change the amounts of IL-6 induced by sonicated extracts of *P. gingivalis* significantly.

From the above results, alendronate and taurine had the inhibitory effect on the osteoclast differentiation. But there was no correlation to the induction of IL-6, the effect of alendronate and taurine does not seem to inhibit the differentiation of osteoclast by preventing induction of IL-6.

Keywords : alendronate, taurine, *P. gingivalis*, osteoclast, replacement root resorption