

조골세포에서 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* 생균의 파골세포분화유도 cytokine 발현 유도능 및 침투능

최호길¹, 이양신², 김민영¹, 김경대², 차정현³, 유윤정³

1. 연세대학교 치과대학 구강생물학교실 및 2단계 BK21사업
2. 연세대학교 치과대학 구강생물학교실
3. 연세대학교 치과대학 구강생물학교실, 2단계 BK21 사업 및 구강과학연구소

I. 서론

파골세포는 골을 흡수하는 세포로서 tartrate-resistant acid phosphatase(TRAP) 양성 다핵세포이다. 파골세포는 골수의 colony forming unit-macrophage(CFU-M) 세포로부터 유래되며 이들 세포의 증식, TRAP 발현 및 융합 과정을 거쳐 분화한다¹⁾. 조골세포는 골기질을 생성하여 골형성에 관여할 뿐만 아니라 파골세포의 분화를 유도하는 receptor activator of NF- κ B ligand(RANKL), interleukin-1(IL-1), tumor necrosis factor(TNF), interleukin-6(IL-6) 및 macrophage inflammatory protein(MIP)-1 α 를 생성하여 파골세포 분화에 있어서 중요한 역할을 담당한다¹⁻⁴⁾. 이와 같이 조골세포는 파골세포의 분화를 유도하는 다양한 cytokine을 생성하여 골흡수를 조절하므로 세균감염에 대한 조골세포의 반응은 감염에 의한 골 파괴에 있어서 중요하다. 세균에 대한 조골세포 반응은 살아 있는 세균과 세포간의 접촉, 세균이 생성하는 물질 또는 세균이 파괴되어 유리되는 lipopolysaccharide(LPS)와

같은 세균 성분에 의하여 유도될 수 있다. 또한 세균의 조골세포 부착 및 침투는 염증세포/항체와 같은 숙주 방어 기작 및 항생제로부터 도피할 수 있는 중요한 수단이 될 수 있어 치료의 어려움 및 재발의 중요한 원인이 될 수 있다. 조골세포에 부착 및 침투할 수 있는 것으로 보고된 세균으로는 골수염의 원인균인 *Staphylococcus(Staph) aureus* 및 *Streptococcus(Strep) pyogenes*, 치주염의 원인균인 *Porphyromonas(P) gingivalis*가 있으며 *Staph. aureus*의 조골세포 침투시 세균표면에 존재하는 fibronectin 부착 단백질이 관여하는 것으로 보고되었다⁵⁻⁹⁾.

치주염은 치태내 세균에 의하여 치아 지지조직이 파괴되는 염증성질환으로 치조골흡수에 의하여 치아가 상실되는 주된 원인이다. 치주염 관련 세균이 치주조직에 도달하기 위해서는 치은열구 상피세포로 이루어진 방어벽을 통과해야 한다. *Aggregatibacter(A) actinomycetemcomitans*는 치주염의 원인균으로서 침투성이 강한 세균이다. *A. actinomycetemcomitans*는 상피세포¹⁰⁻¹³⁾ 및 혈관내피세포¹⁴⁾에 침투할 수 있으며, 실제로 전자현미경상에서 치주염 환자의 치주

* 교신저자 : 유윤정, 서울시 서대문구 신촌동 134 연세대학교 치과대학 구강생물학교실, 120-752 (전자우편 : yu618@yuhs.ac.kr)

* 이 논문은 2004년 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구되었음 (KRF-2004-015-E00213)

조직에서 *A. actinomycetemcomitans*의 집락을 관찰할 수 있었다¹⁵⁾. *A. actinomycetemcomitans*의 상피세포 침투시 상피세포 원형질막에 존재하는 transferrin receptor 및 integrin이 관여하는 것으로 보고되었다. *A. actinomycetemcomitans*는 숙주 세포 수용체에 결합 후 세포의 actin 재배열에 의하여 세포 내로 들어간다. 세포 내로 들어간 세균은 endosome으로부터 원형질로 빠져나온 후 빠른 속도로 증식하며 세포 원형질의 돌출을 통해 다른 세포로 이동할 수 있다^{11,12)}. 이와 같은 *A. actinomycetemcomitans*의 상피세포 침투능은 세균의 치주 조직으로의 확산에 중요한 독성인자로 작용할 수 있다. 골수 또는 파골세포 전구세포 배양법을 이용하여 *A. actinomycetemcomitans*의 lipopolysaccharide (LPS)¹⁶⁻¹⁸⁾ 및 capsular-like polysaccharide의^{19,20)} 파골세포의 형성 유도능이 입증되었으며 또한 IL-1 또는 prostaglandin E₂(PGE₂) 억제제를 사용하여 PGE₂ 및 IL-1이 LPS 및 capsular-like polysaccharide에 의한 파골세포 형성에 관여함이 보고되었다. 또한 치주인대세포에서 *A. actinomycetemcomitans*의 LPS 및 독소인 cytolethal distending toxin이 RANKL의 발현을 증가시켜^{21,22)} *A. actinomycetemcomitans*와 치주염시 야기되는 치조골 흡수와의 관련성이 제시되었다. 이와 같이 *A. actinomycetemcomitans*의 일부 성분에 의한 파골세포형성 유도능 및 치주인대세포에서의 RANKL 발현 유도능 또한 본 세균의 상피세포와 혈관내피세포 부착 및 침투능은 밝혀졌으나 조골세포에서 *A. actinomycetemcomitans* 생균 또는 *A. actinomycetemcomitans*의 일부 성분에 의한 파골세포분화 유도 cytokine 발현 유도능, 본 세균의 부착 및 침투능은 밝혀져 있지 않다. 조골세포는 파골세포분화 유도인자를 생성하여 파골세포의 분화에 있어서 중요한 역할을 담당하므로 치주질환의 원인균에 대한 조골세포의 반응에 대한 연구는 치주염시 야기되는 치조골 파괴기전을 이해하는데 중요하다. 따라서 본 연구에서는 조골세포에서 *A. actinomycetemcomitans* 생균의 1) RANKL, MIP-1 α , IL-1 β 및 TNF- α 의

발현 유도능 및 2) 부착 및 침투능을 평가하였다.

II. 연구재료 및 방법

1. 마우스 두개골에서 조골세포의 분리

마우스 두개골로부터 조골세포를 다음과 같이 분리하였다. 태생 1~2 일 경과한 ICR 마우스를 희생시킨 후 두개골을 무균적으로 적출하였다. 10개의 마우스 두개골을 10 ml의 0.1% collagenase(Wako Pure Chemicals, Osaka, Japan) 및 0.2% dispase(Gibco BRL, NY, USA)를 함유한 α -MEM(Gibco BRL, NY, USA) 배지에 부유시킨 후 37°C에서 15 분간 교반하여 두개골로부터 조골세포를 모았다. 이 과정을 총 5 회 반복하였으며 2~5 회 반복하여 얻은 세포 부유액을 2000 \times g에서 5 분간 원심분리하여 조골세포를 분리하였다. 분리한 세포를 10 cm 평판세포 배양기에 분주하여 10% 우태아혈청(Gibco BRL, NY, USA)을 함유한 α -MEM 배지에서 3 일간 배양한 후 실험에 사용하였다.

2. *A. actinomycetemcomitans* 배양

A. actinomycetemcomitans ATCC43718를 brain heart infusion broth(BHI, Becton, Dickinson and Company, MD, USA) 액체배지에 접종하여 37°C, 10% CO₂ 항온기에서 48시간 배양하였다. 배양된 *A. actinomycetemcomitans*를 3000 \times g에서 5 분간 원심분리하여 균체를 모았다. 모은 균체를 PBS로 3 회 세척한 후 PBS에 부유시켜 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. *A. actinomycetemcomitans*의 colony forming unit(CFU)/ml 및 흡광도간의 표준곡선을 기준으로 세균수를 측정하여 실험에 사용하였다.

3. *A. actinomycetemcomitans*로 처리한 조골세포의 cytokine 발현 평가

생균 처리 조골세포의 cytokine 발현정도를 역전사

중합효소연쇄반응법(reverse transcriptase-polymerase chain reaction, RT-PCR)으로 측정하였다. 조골세포를 10% 우태아혈청 및 항생제를 함유한 α -MEM 배지에 부유시킨 후 2×10^5 이 되도록 6 well 배양기의 각 well에 분주하였다. 세포가 단층으로 자란 후 항생제와 혈청을 함유하지 않은 배지로 일회 세척한 후 세균을 세균 대 세포 수가 10:1, 50:1 및 100:1이 되도록 분주하였다. 일정 시간 배양한 후 Trizol 용액(Invitrogen, CA, USA)을 사용하여 세포로부터 RNA를 분리하여 RT-PCR 방법으로 cytokine의 발현을 측정하였다.

4. RT-PCR

분광광도계로 세포로부터 분리한 RNA의 농도를 측정 후 cDNA 합성 kit(Bioneer, Seoul, Korea)를 이용하여 RNA 1 μ g로부터 cDNA를 합성하였다. 합성한 cDNA는 DEPC로 희석하여 -70°C 에 보관하여 사용하였다. 1 \times PCR reaction buffer, 80 μ M dNTP, 25 mole/ μ l forward & reverse primer 그

리고 0.5 unit의 Taq DNA polymerase가 들어있는 20 μ l의 반응액(Bioneer, Seoul, Korea)을 이용하여 2 μ g cDNA로부터 각 cytokine의 유전자를 증폭하였다. 사용한 primer 및 annealing temperature는 Table 1과 같다. PCR 산물을 1% agarose gel에서 전기영동을 하고 ethidium bromide로 염색하여 각 cytokine mRNA의 발현을 평가하였다.

5. *A. actinomycetemcomitans*의 조골세포 감염능 평가

Okahashi^{8,9)}의 방법을 일부 변형시켜 세균의 세포표면 부착능 및 세포 내 침투능을 평가하였다. 세균을 세포배양배지에 접종하여 일정 시간 배양한 후 세포를 세척하고 세포표면 및 세포 내로 들어간 세균 수를 측정하였으며, 세척한 세포를 gentamicin(Sigma, MO, USA)으로 처리하여 세포표면에 붙은 세균을 죽인 후 세포 내 침투한 세균 수를 측정하였다. 세포 표면에 부착한 세균 수는 세포세척 후 측정된 세균 수에서 gentamicin 처리 후 측정된 세균 수를 빼어

Table 1. Sequences of primers for RANKL, MIP-1 α , TNF- α , IL-1 β and β -actin

Molecule	Direction	Primer sequence	Annealing temp ($^\circ\text{C}$)	Product size (bp)
RANKL	Forward	5'-CGCTCTGTTCCCTGTACTTTCGAGCG-3'	62.2	750
	Reverse	5'-TCGTGCTCCCTCCTTTTCATCAGGTT-3'		
MIP-1 α	Forward	5'-CAGCGAGTACCAGTCCCTTTT-3'	54.7	363
	Reverse	5'-CCTCGCTGCCTCCAAGA-3'		
TNF- α	Forward	5'-TTCTGTCTACTGAACTTCGGGGTGATCGGTCC-3'	60	468
	Reverse	5'-GTATGAGATAGCAAATCGGCTGACGGTGTGGG-3'		
IL-1 β	Forward	5'-ATGGCAACTGTTCTGAACTCAAGT-3'	55	563
	Reverse	5'-CAGGACAGGTATAGATTCTTTCCTTT-3'		
β -actin	Forward	5'-GGACTCCTATGGTGGTGACGAGG-3'	58	366
	Reverse	5'-GGGAGAGCATAGCCCTCGTAGAT-3'		

측정하였다.

조골세포를 10% 우태아혈청 및 항생제를 함유한 α -MEM 배지에 부유시킨 후 2×10^4 이 되도록 24 well 배양기의 각 well에 분주하였다. 세포가 단층으로 자란 후 항생제와 혈청을 포함하지 않은 배지로 일 회 세척한 후 세균을 세균 대 세포 수가 1000:1이 되도록 분주하였다. 일정 시간 반응시킨 후 세포 배양액을 제거하고 PBS로 세포를 3 회 세척하고 0.5% triton X-100을 함유한 PBS 200 μ l를 각 well에 첨가하여 세포를 깨뜨렸다. 깨뜨린 세포액을 PBS로 희석한 후 BHI 한천배지에 도말하여 37°C, 10% CO₂ 항온기에서 3일간 배양한 후 집락수를 계수하여 세포 표면 및 세포 내에 존재하는 총 세균 수를 측정하였다.

세포 내 침투한 세균 수는 다음과 같이 측정하였다. 위와 동일한 방법으로 세균을 세포에 감염시킨 후 PBS로 3 회 세척하였으며 세포표면에 존재하는 세균을 제거하기 위하여 gentamicin(100 μ g/ml)을 함유한 α -MEM 배지에서 한 시간 배양하였다. 배양이 끝난 후 위와 동일한 방법으로 세포를 깨뜨려 세포내 존재하는 세균 수를 측정하였다.

III. 결과

1. *A. actinomycetemcomitans* 생균에 의한 RANKL mRNA 발현

조골세포를 *A. actinomycetemcomitans*로 세균 대 세포 수가 10:1, 50:1 및 100:1이 되도록 3 시간 처리한 후 RANKL mRNA 발현을 RT-PCR방법으로 측정하였다. *A. actinomycetemcomitans*로 처리하지 않은 조골세포에서 RANKL mRNA가 발현되었다. 조골세포를 세균 대 세포 수가 10:1, 50:1 및 100:1이 되도록 처리한 경우 RANKL mRNA의 발현이 모두 증가하였으며 10:1 및 50:1에서는 접종한 세균 수가 증가함에 따라 발현이 증가하였다(Figure 1).

2. *A. actinomycetemcomitans* 생균에 의한 MIP-1 α IL-1 β 및 TNF- α mRNA 발현

*A. actinomycetemcomitans*로 세균 대 세포 수가 10:1, 50:1 및 100:1이 되도록 조골세포를 3 시간 처리한 후 MIP-1 α IL-1 β 및 TNF- α mRNA의 발현을 RT-PCR 방법으로 평가하였다(Figure 2).

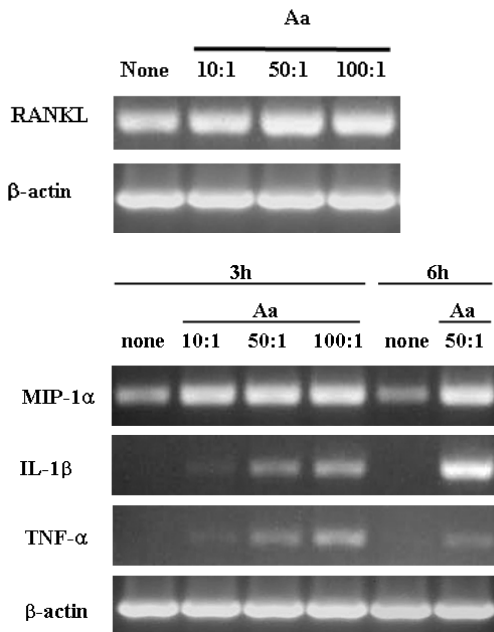


Figure 1. Expression of RANKL mRNA in osteoblasts treated with alive *A. actinomycetemcomitans*. a) Osteoblasts were treated with *A. actinomycetemcomitans* (Aa) at ratio of 10:1, 50:1 or 100:1 (bacteria:osteoblasts) for 3h. The total RNA was extracted and subjected to RT-PCR analysis for RANKL and β -actin.

Figure 2. Expression of osteoclastogenesis-inducing cytokines in osteoblasts treated with *A. actinomycetemcomitans*. Osteoblasts were treated with *A. actinomycetemcomitans* (Aa) at ratio of 10:1, 50:1 or 100:1 (bacteria:osteoblasts) for indicated times. The total RNA was extracted and subjected to RT-PCR analysis for MIP-1 α IL-1 β TNF- α and β -actin.

세균으로 처리하지 않은 조골세포는 MIP-1 α mRNA를 발현하고 있었으며 IL-1 β 및 TNF- α mRNA는 발현하지 않았다. MIP-1 α mRNA의 발현은 10:1, 50:1 및 100:1에서 모두 증가하였다. IL-1 β mRNA 및 TNF- α mRNA도 10:1에서 발현되기 시작하였으며 접종한 세균수가 증가함에 따라 mRNA의 발현이 증가하였다. 세균 대 세포 수 1:50에서 IL-1 β mRNA의 발현은 접종한 시간이 길어짐에 따라 증가하였다.

3. *A. actinomycetemcomitans*의 조골세포 감염능 평가

조골세포배양액에 *A. actinomycetemcomitans*를 세균 대 세포 수를 1000:1로 접종한 후 1 시간 및 3 시간 배양하여 세포표면에 부착한 세균 수 및 세포 내로 침투한 세균 수를 측정하였으며 세균의 세포표면 부착 및 침투율은 다음과 같이 계산하였다; 부착율(%)은 부착한 세균 수/ 접종한 총 세균 수, 침투율(%)은 침투한 세균 수/ 접종한 총 세균 수. 1 시간 및 3 시간 후 조골세포 표면에 부착한 세균 수는 $0.6 \times 10^4 \pm 0.1 \times 10^4$ 개/well 및 $5.6 \times 10^4 \pm 0.5 \times 10^4$ 개/well로서 세포표면에 부착한 세균의 수는 1 시간 및 3 시간 사이에서 점차적으로 증가하였다. 1 시간 및 3 시간 후 세포표면에 부착한 세균은 접종한 총 세균 중 각각 0.014% 및 0.14%이었다. 1 시간 및 3 시간 후 세포 내 침투한 세균 수는 9 ± 5 개/well 및

$2 \times 10^2 \pm 20$ 개/well로서 3 시간 후 세포에 접종한 총 세균 중 0.001%만이 세포 내로 침투하였다(Figure 3).

IV. 고안

2명의 유년성 치주염 환자의 치주조직 중 11개 조직에서 *A. actinomycetemcomitans* 항원이 발견되었으며 전자현미경상에서 *A. actinomycetemcomitans*의 집락이 관찰되었다¹⁵⁾. 이는 치주염시 *A. actinomycetemcomitans*가 치주조직 내로 침투한 후 치주조직세포에 작용하여 조직파괴에 관여할 가능성을 시사한다. 본 연구에서 처음으로 *A. actinomycetemcomitans* 생균이 조골세포의 RANKL, MIP-1 α , IL-1 β 및 TNF- α mRNA의 발현을 증가시키며 조골세포에 부착 및 침투할 수 있음을 입증하였다.

파골세포에 의한 골흡수는 여러 단계 즉, 파골세포 전구세포의 골표면으로의 이동, 이동한 파골세포 전구세포 TRAP 발현, 융합 및 융합한 파골세포의 활성화 과정을 거쳐 일어난다. 생체 내에서 다양한 호르몬 및 cytokine들이 파골세포 형성을 유도할 수 있으나 이들이 작용하는 단계에는 차이가 있다. RANKL은 조골세포에서 생성되는 대표적인 골흡수 유도 cytokine으로서 파골세포 전구세포의 이동을 제외한 모든 분화 단계 즉, 파골세포 전구세포의 TRAP 발현, 융합 및 활성화 과정을 유도한다²³⁾. *Strep. pyogenes*는 세균 대 세포 수가 10:1에서⁸⁾,

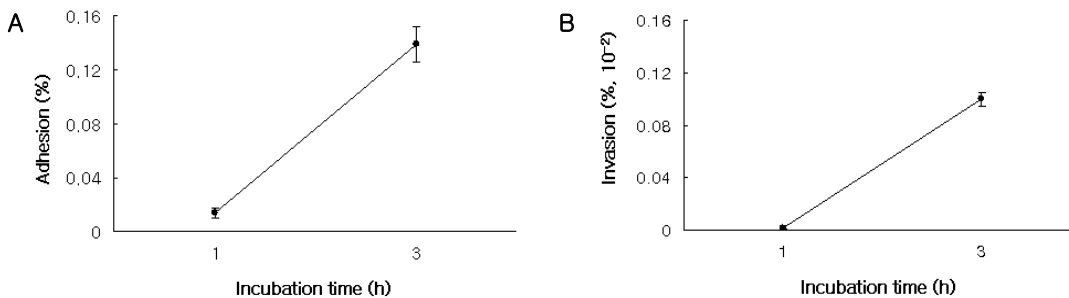


Figure 3. Adhesion to and invasion of osteoblasts by *A. actinomycetemcomitans*. After osteoblasts were treated with *A. actinomycetemcomitans* at ratio of 1000:1 (bacteria:osteoblasts) for 1h and 3h, bacterial adhesion and invasion were estimated. The percentage of adhesion or invasion was calculated as follows: (number of bacteria adhering to or invading)/total number of bacteria in inoculum)

*P. gingivalis*는 50:1에서 조골세포의 RANKL mRNA의 발현을 증가시켰다⁹⁾. 본 연구에서 *A. actinomycetemcomitans*는 10:1에서 RANKL mRNA의 발현을 증가시켰다. 조골세포는 RANKL 이외에 RANKL의 발현을 유도하거나 RANKL의 작용을 촉진시키는 다양한 cytokine 즉, MIP-1 α IL-1 β 및 TNF- α 를 발현하므로 *A. actinomycetemcomitans*가 이들 cytokien의 발현에 미치는 영향을 평가하였다. 단핵세포, 림프구, 가지세포, 호산구 및 자연살세포의 화학주성인자로 알려진 MIP-1 α 는 파골세포 전구세포의 화학주성인자로도 작용한다^{4,24)}. MIP-1 α 단독으로는 파골세포 형성을 유도하지 못하나 RANKL 또는 RANKL 및 TNF- α 와 같이 처리하는 경우 이들에 의한 파골세포 형성을 촉진시킨다^{4,25)}. RANKL과 MIP-1 α 를 같이 처리한 경우 RANKL 단독으로 처리한 경우보다 다핵의 파골세포가 빨리 나타나며, 파골세포의 크기 및 핵의 수가 증가하는 것으로 보고되었다^{4,25)}. 또한 MIP-1 α 는 융합이 끝난 다핵의 파골세포의 골표면에서의 움직임을 촉진시킨 개의 파골세포에 의하여 흡수되는 흡수부위의 면적을 증가시키는 것으로 보고되었다⁴⁾. 이는 MIP-1 α 가 RANKL에 의한 파골세포 전구세포의 융합과정을 촉진할 뿐만 아니라 파골세포 전구세포 및 파골세포의 골표면 이동을 유도하여 골흡수 과정에서 중요한 역할을 할 수 있음을 시사한다. 본 연구에서 *A. actinomycetemcomitans*로 조골세포를 처리한 경우 RANKL mRNA 뿐만 아니라 MIP-1 α mRNA 발현도 증가하였으며 이와 같은 *A. actinomycetemcomitans*에 의한 RANKL 및 MIP-1 α mRNA의 동시 발현은 RANKL이 단독으로 발현되는 경우보다 파골세포분화를 더욱 촉진시킬 수 있을 것으로 사료된다.

TNF- α 및 IL-1 β 도 골흡수유도인자이다. IL-1 β 는 조골세포 또는 파골세포 전구세포에 작용하여 파골세포의 형성을 유도한다. 즉 IL-1 β 는 간접적으로 조골세포의 RANKL 발현을 증가시켜 파골세포 형성을 유도할 수 있으며²⁶⁾, RANKL 및 macrophage-colony stimulating factor(M-CSF)에 의하여 TRAP을 발현하게 된 파골세포 전구세포에 직접 작용하여

이들 세포의 융합 및 활성화 과정을 유도한다²³⁾. TNF- α 도 IL-1 β 와 마찬가지로 조골세포의 RANKL 발현을 증가시키며²⁶⁾, IL-1 β 및 TNF- α 는 RANKL 뿐만 아니라 MIP-1 α 의 발현도 증가시킨다⁴⁾. 본 연구에서 *A. actinomycetemcomitans*는 RANKL mRNA의 발현 뿐만 아니라 IL-1 β 및 TNF- β mRNA의 발현도 증가시켰다. *Strep. pyogenes*⁸⁾ 및 *P. gingivais*도⁹⁾ *A. actinomycetemcomitans*와 마찬가지로 조골세포의 RANKL mRNA의 발현을 증가시켰으나 IL-1 β 및 TNF- α mRNA 발현은 유도하지 않았다. 이와 같은 *A. actinomycetemcomitans*에 의한 조골세포의 IL-1 β 및 TNF- α 발현 증가는 조골세포의 RANKL 및 MIP-1 α 발현을 증가시키며 RANKL에 의한 파골세포 전구세포의 융합과 활성화를 촉진하여 골흡수를 더욱 활성화시킬 가능성이 있을 것으로 사료된다.

*A. actinomycetemcomitans*는 상피세포 및 혈관 내피세포 내로 침투할 수 있다^{10-12,14)}. 상피세포에서 여러 *A. actinomycetemcomitans* 세균주(strain)에 대한 부착 및 침투능을 평가하였으며 세균주에 따라 부착 및 침투능에 차이를 보이는 것으로 보고되었다. 세균 대 세포 수가 100:1이 되도록 *A. actinomycetemcomitans*를 상피세포에 접종한 경우 접종한 총 세균 중 1.1~8.3%가 세포표면에 부착하였으며 0.08% 미만이 세포내로 침투하였다¹⁰⁾. 조골세포에 부착 및 침투하는 것으로 보고된 세균으로는 *P. gingivalis* 및 *Strep. pyogenes*가 있으며^{8,9)} 조골세포를 *P. gingivalis*로 세균 대 세포 수가 100:1이 되도록 처리한 경우 접종한 총 세균 중 3%가 세포표면에 부착하였으며 0.8%가 세포 내로 침투하였다⁹⁾. 예비 연구에서 세균 대 세포 수 50:1 및 100:1에서 *A. actinomycetemcomitans*의 조골세포 부착 및 침투능을 관찰하여 세포 표면에 붙은 *A. actinomycetemcomitans*는 관찰할 수 있었으나 세포 내로 침투한 세균은 관찰할 수 없었다. 따라서 본 연구에서는 1000:1에서 *A. actinomycetemcomitans*의 조골세포 부착 및 침투능을 평가하였으며 조골세포 표면에 부착 및 침투한 *A. actinomycetemcomitans*는

세포에 접촉한 총 세균 중 각각 0.14% 및 0.001% 이었다. *A. actinomycetemcomitans*의 조골세포 부착 및 침투능은 상피세포 부착 및 침투능보다 또한 *P. gingivalis*의 조골세포 부착 및 침투능보다 약하나 *A. actinomycetemcomitans*의 조골세포 침투능은 염증세포/항체와 같은 숙주 방어 기작 및 항생제로부터 도피할 수 있는 중요한 수단이 될 수 있을 것으로 사료된다.

본 연구를 통해 *A. actinomycetemcomitans* 생균이 조골세포에서 파골세포 형성에서 중요한 역할을 하는 RANKL 및 RANKL의 발현을 유도하며 RANKL의 작용을 촉진시키는 MIP-1 α IL-1 β 및 TNF α mRNA의 발현을 동시에 증가시킬 수 있음을 또한 본 세균이 조골세포에 부착 및 침투할 수 있음을 관찰할 수 있었다. 치주인대세포에서 *A. actinomycetemcomitans*의 LPS²¹⁾ 및 독소기²²⁾ RANKL 발현을 증가시키며 *Staph. aureus*의 조골세포 침투시 세균표면에 존재하는 fibronectin 부착 단백질이⁷⁾ 관여하는 것으로 보고되었다. 본 연구에서는 *A. actinomycetemcomitans*에 의한 조골세포의 파골세포 분화유도 cytokine 발현, 조골세포 부착 및 침투에 관여하는 세균의 성분 및 기전은 밝히지 못하였으며 따라서 이에 대한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

V. 결론

*A. actinomycetemcomitans*는 치주염 원인균 중 하나로서 침투성이 강한 세균이다. 조골세포는 다양한 파골세포분화 유도 cytokine을 생성하여 파골세포 형성에 있어서 중요하다. 따라서 *A. actinomycetemcomitans* 생균에 대한 조골세포의 반응은 치주염시 야기되는 치조골 파괴기전을 이해하는데 중요하다. *A. actinomycetemcomitans*의 일부 성분에 의한 파골세포형성 유도능, 상피세포와 혈관내피세포 부착 및 침투능은 밝혀졌으나 조골세포에서 *A. actinomycetemcomitans*의 cytokine 발현 유도능, 부착 및 침투능은 밝혀져 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 조골세포에서 *A. actinomycetemcomitans*

생균의 1) 파골세포분화 유도 cytokine 발현 유도능과 2) 부착 및 침투능을 평가하였다. 조골세포는 마우스 두개골에서 분리하여 사용하였으며 cytokine의 발현은 RT-PCR 방법으로 평가하였다.

1. *A. actinomycetemcomitans*는 세균 대 세포 수 10:1, 50:1 및 100:1에서 조골세포의 RANKL mRNA의 발현을 증가시켰다.
2. *A. actinomycetemcomitans*는 세균 대 세포 수 10:1, 50:1 및 100:1에서 조골세포의 MIP-1 α IL-1 β 및 TNF- α mRNA의 발현도 증가시켰다.
3. *A. actinomycetemcomitans*는 조골세포에 부착 및 침투하였다.

이와 같은 조골세포에서 *A. actinomycetemcomitans*의 파골세포분화 유도 cytokine 발현 유도능, 부착 및 침투능은 치주염시 야기되는 치조골 흡수 및 숙주 방어 기작과 항생제로부터 도피할 수 있는 중요한 수단이 될 수 있을 것으로 사료된다.

VI. 참고문헌

1. Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR et al. The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. *J Bone Miner Res* 2000;15:2-12.
2. Li NH, Ouchi Y, Okamoto Y et al. Effect of parathyroid hormone on release of interleukin 1 and interleukin 6 from cultured mouse osteoblastic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;179:236-242.
3. Gowen M, Chapman K, Littlewood A et al. Production of tumor necrosis factor by human osteoblasts is modulated by other cytokines, but not by osteotropic hormones. *Endocrinology* 1990;126:1250-1255.

4. Yu X, Huang Y, Collin-Osdoby P, Osdoby P. CCR1 chemokines promote the chemotactic recruitment, RANKL development, and motility of osteoclasts and are induced by inflammatory cytokines in osteoblasts. *J Bone Miner Res* 2004;19:2065–2077.
5. Jevon M, Guo C, Ma B et al. Mechanisms of internalization of *Staphylococcus aureus* by cultured human osteoblasts. *Infect Immun* 1999;67:2677–2681.
6. Ellington JK, Reilly SS, Ramp WK et al. Mechanisms of *Staphylococcus aureus* invasion of cultured osteoblasts. *Microbial Pathogenesis* 1999;26:317–323.
7. Ahmed S, Meghji S, Williams RJ et al. *Staphylococcus aureus* fibronectin binding proteins are essential for internalization by osteoblasts but do not account for differences in intracellular levels of bacteria. *Infect Immun* 2001;69:2872–2877.
8. Okahashi N, Sakurai A, Nakagawa I et al. Infection by *Streptococcus pyogenes* induces the receptor activator of NF- κ B ligand expression in mouse osteoblastic cells. *Infect Immun* 2003;71:948–955.
9. Okahashi N, Inaba H, Nakagawa I et al. *Porphyromonas gingivalis* induces receptor activator of NF- κ B ligand expression in osteoblasts through the activator protein 1 pathway. *Infect Immun* 2004;72:1706–1714.
10. Meyer DH, Fives-Taylor PM. Characteristics of adherence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to epithelial cells. *Infect Immun* 1994;62:928–935.
11. Meyer DH, Lippmann JE, Fives-Taylor PM. Invasion of epithelial cells by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: a dynamic, multiple process. *Infect Immun* 1996;64:2988–2997.
12. Meyer DH, Mintz KP, Fives-Taylor PM. Models of invasion of enteric and periodontal pathogens into epithelial cells: A comparative analysis. *Crit Rev Oral Biol Med* 1997;8:389–409.
13. Sreenivasan PK, Meyer DH, Fives-Taylor PM. Requirements for invasion of epithelial cells by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun* 1993 ;61:1239–1245.
14. Schenkein HA, Barbour SE, Berry CR, Kipps B, Tew JG. Invasion of human vascular endothelial cells by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* via the receptor for platelet-activating factor. *Infect Immun* 2000;68:5416–5419.
15. Christersson LA, Albin B, Zambon JJ, Wikesjo UM, Genco RJ. Tissue localization of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontitis. I. Light, immunofluorescence and electron microscopic studies. *J Periodontol* 1987;58:529–539.
16. Ito HO, Shuto T, Takada H et al. Lipopolysaccharide from *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* promote osteoclastic differentiation in vitro. *Archs Oral Biol* 1996;41:439–444.
17. Ueda N, Koide M, Ohguchi M et al. Involvement of prostaglandin E₂ and interleukin-1 α in the differentiation and survival of osteoclasts induced by lipopolysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Y4. *J Periodont Res*. 1998;33:509–516.
18. Yamaguchi N, Kukita T, Li YJ et al. Adiponectin inhibits osteoclast formation stimulated by lipopolysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2007;49:28–34.
19. Nishihara T, Ueda N, Amano K et al.

- Actinobacillus actinomycetemcomitans* Y4 capsular-polysaccharide-like polysaccharide promotes osteoclast-like cell formation by interleukin-1 α production in mouse marrow cultures. *Infect Immun* 1995;63:1893-1898.
20. Ueda N, Nishihara T, Ishihara Y et al. Role of prostaglandin in the formation of osteoclasts induced by capsular-like polysaccharide antigen of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strain Y4. *Oral Microbiol Immunol* 1995;10:69-75.
 21. Tiranathanagul S, Yongchaitrakul T, Pattamapun K, Pavasant P. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* lipopolysaccharide activates matrix metalloproteinase-2 and increases receptor activator of nuclear factor- κ B ligand expression in human periodontal ligament cells. *J Periodontol* 2004; 75:1647-1654.
 22. Belibasakis GN, Johansson A, Wang Y et al. The cytolethal distending toxin induces expression in human gingival fibroblasts and periodontal ligament cells. *Infect Immun* 2005;73:342-351.
 23. Suda T, Takahashi N, Udagawa N et al. Modulation of osteoclast differentiation of function by the new members of tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev* 1999;20:345-357.
 24. Menten P, Wuyts A, Damme JV. Macrophage inflammatory protein-1. *Cytokine Growth Factor Rev* 2002;13:455-481.
 25. Watanabe T, Kukita T, Kukita A et al. Direct stimulation of osteoclastogenesis by MIP-1 α : evidence obtained from studies using RAW264 cell clone highly responsive to RANKL. *J Endocrinol* 2004;180:193-201.
 26. Hofbauer LC, Lacey DL, Dunstan CR et al. Interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α but not interleukin-6, stimulate osteoprotegerin ligand gene expression in human osteoblastic cells. *Bone* 1999;25:255-259.

Induction of osteoclastogenesis–inducing cytokines and invasion by alive *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in osteoblasts

Ho–Kil Choi¹, Yang–Sin Lee², MinYoung Kim¹, Kyoung–Dae Kim²,
Jeong–Heon Cha³, Yun–Jung Yoo³

1. Department of Oral Biology, Brain Korea 21 project, College of Dentistry, Yonsei University
2. Department of Oral Biology, College of Dentistry, Yonsei University
3. Department of Oral Biology, Brain Korea 21 project and Oral Science Research Center, College of Dentistry, Yonsei University

Osteoblasts regulate osteoclastogenesis by production of various cytokines. *Aggregatibacter(A) actinomycetemcomitans* is one of periodontopathogens which invades gingival tissue. Therefore, clarifying the effect of alive *A. actinomycetemcomitans* on osteoblasts is important to understand the mechanism of alveolar bone resorption in periodontitis. We investigated induction of osteoclastogenesis–inducing cytokines, adherence, and invasion by *A. actinomycetemcomitans* in osteoblasts. Osteoblasts were isolated from mouse calvaria and expression of cytokines was determined by RT–PCR.

When the ratio of the number of *A. actinomycetemcomitans* to the number of osteoblasts was 10:1, 50:1 and 100:1, RANKL mRNA expression was increased. *A. actinomycetemcomitans* also increased expression of macrophage inflammatory protein (MIP)–1 α , interleukin (IL)–1 β and tumor necrosis factor (TNF)– α . *A. actinomycetemcomitans* attached to and invaded osteoblasts at ratio of 1000:1. These results suggest that *A. actinomycetemcomitans* increases osteoclastogenesis–inducing ability of osteoblasts by stimulating the expression of RANKL, MIP–1 α , IL–1 β and TNF– α and that invasion of *A. actinomycetemcomitans* provides a means by which the bacteria escape from immune system and antibiotic therapy.

Key words : *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, osteoblast, osteoclastogenesis–inducing cytokine, invasion