치은섬유아세포와 치주인대섬유아세포의 interleukin - 6 분비 및 세포성장에 미치는 단핵구세포주와 섬유아세포의 세포간 접촉작용

김수아 · 이 호 · 오귀옥* · 김형섭

전북대학교 치과대학 치주과학교실

I. 서론

치태성분은 직접적으로, 혹은 lipopolysaccharide (LPS)와 같은 치태 내 세균산물을 통하여 국소적 숙주반응을 활성화시킴으로써 궁극적으로 치주조직의 손상을 유발한다[1,2]. 염증이 만성화되면 다른 만성 염증병소에서와 마찬가지로 치주병소의 혈관외결체조직에서는 단핵구성 탐식세포 및 임파구를 주종으로 하는 다량의 면역적격세포(immunocompetent cell)들이 침윤되며, 이러한 침윤세포들이 국소적 염증반응을 주도하고 치주 면역감시기구로서의 역할을 하는 것으로 알려져 있다[3-11].

침윤세포들의 면역 조절기능에 대하여는 그동안 많은 연구가 있었으나, 치주 결체조직을 이루고 있는 거주세포인 치은섬유아세포(human gingival fibroblast: HGF)나 치주인대섬유아세포(periodontal ligament fibroblast: PDLF)도 치주 면역조절 반응에 있어 기여하는 바가 있는지에 대하여서는 최근에 와서야 연구되고 밝혀지기 시작하였다. HGF와 PDLF는 치주 결체조직을 이루는 주된 세포로서, HGF는 치조골을 둘러싸고 있는 연조직을 형성하고 조직의 통합성에 필요한 세포외기질성분을 생산, 유지하는 역할을 하며, PDLF는 치아를 치조골에 부착시키는 인대섬유를 유지하고 개형(remodelling)하는 역할을 한다. 건강 치주조직에서 섬유아세포의 주된 역할은 치주 결체조직의 건강상태를 유지하고 손상된 조직을 보수하는 것이지만, 병소조직에서는 단순한 참여인자로서가 아니라 면역세포의 일원으로서 면역반응에 적극적으로 참여한다는 것이 밝혀졌다. 즉, HGF는 cytokine을 분비하거나 부착단백질을 발현하여 치주병소에 침윤된 염증세포와 밀접한 상호작용을 함으로써 치주질환의 면역/염증반응 조절에 관여한다[12]. 염증부위에서 섬유아세포는IL - 1, IL - 6, TNF - α등의 기염증성(proinflammatory) 및 면역 조절 cytokine들을 분비하는 것으로 알려졌으며[13-20], 이러한 사실은 치주병소에서 침윤 염증세포와 더불어 섬유아세포도 결체조직을 파괴하는데 기여할 수 있다는 것을 시사하는 것이다[21].반대로 면역적격세포들이 분비한 IL - 1, TNF - α, 및 IFN - γ등 기염증성 cytokine들은 섬유아세포의 세포성장과 PGE_2 생산의 변화 등을 유발하기도 한다고 보고되었다[22-24].

치은조직을 이루고 있는 HGF, keratinocytes, 내피세포와 같은 결체조직 세포들은 순환 T 임파구의 homing receptor에 대하여 배위자(ligand) 역할을 하는 부착단백질들

을 지니고 있다[25]. 또한 임파구와 섬유아세포의 세포간 부착에 intercellular adhesion molecule-1(ICAM-1)/leukocyte function-associated antigen-1(LFA-1)과 LFA-3/CD2[26-28], very late antigen (VLA) integrins, CD44/hyaluronate[29], CD40/CD40L[30] 경로가 관여한다고 보고된 바 있다. Shimabukuro 등[31]은 IFN-γ로 자극 받은 HGF에서 ICAM-1과 HLA-DR의 발현이 증가, 유도됨으로써 HGF가 T 세포에 대한 항원제시기능을 가진 것으로 추측된다고 하였다.

염증세포가 병소조직으로 이동하고 그곳에 축적되는 현상에 관하여 분자수준에서의 기전이 아직 완전하게 규명된 것은 아니지만, 적어도 세포간 접촉을 매개하는 부착단백질들이 이에 관여하고 있는 것으로 추측된다[32]. 이러한 부착단백질들은 세포간 직접접촉현상을 매개함으로써 단순히 특정 세포들의 염증부위로의 이동과 축적을 담당하는 것 외에도, 부착단백질끼리 결합함으로써 세포내 신호전달체계를 활성화시켜 결합된 세포간에 crosstalk 현상을 일으키는 이른바 signaling receptor로서의 역할을 하기도 한다[33]. 이들 분자들은 몇몇 세포들에서 본질적(constitutive)으로 발현되기도 하지만 염증성 cytokine이나 세균산물들에 반응하여 많은 종류의 세포들에서 부착단백질의 발현이 유도되는 것으로 보고된 바[26,34-39], 이는 부착단백질이 염증, 면역반응 조절에 중요한 역할을 하고 있음을 의미하는 것이다. 여러 부착단백질들 중에서 특히 관심의 촛점이 되고있는 ICAM-1은 5개의 immunoglobulin-like domain을 가지고 있는 표면단백질 구조를 하고 있다. ICAM-1은 LFA-1, Mac-1과 같은 β_2 integrins와 특이적으로 결합하여 β_2 integrins를 표현하는 임파구, 단핵구/대식세포, 다형핵백혈구 등의 면역적격세포들이 혈관을 투과해서 염증조직에 축적되는 과정을 주도한다[40].

최근에는 치주염의 발병기전에서도 ICAM-1이 매우 중요한 역할을 담당하고 있다는 실험적 증거가 밝혀지고 있다[12,29,41-45]. 치주병소에는 면역적격세포들에 의하여 분비된 기염증성 cytokine이 고농도로 존재하며, 이들 cytokine의 작용에 의하여 HGF 세포표면에서는 ICAM-1의 발현이 증가된다고 하였다[12,41]. 뿐만 아니라 HGF가 cytokine에 의하여 활성화되면 말초혈액 T 임파구(PBT)와의 결합활성(avidity)이 매우 증가하게되며, ICAM-1/LFA-1 상호작용을 anti-ICAM-1 항체로서 차단하였을때 HGF-PBT 세포간 결합이 현저하게 억제되었다고 보고되었다[29]. 또한 *Porphyromonas gingivalis, Prevotella intermedia(nigrescens)* 등 치주질환 원인균의 sonic extract, *E. coli* LPS 등에 의하여서도 HGF의 ICAM-1 발현이 증가하며[41,42], 정상 치은조직보다 치주염환자의 치은조직에서 더 높은 ICAM-1 mRNA 발현이 관찰되었다고 하였다[41]. 한편, Murakami 등[29]은 HGF-임파구 세포결합에 의하여 T임파구 세포성장속도가 증가하며 HGF의 IL-1β mRNA 발현이 증가한다고 보고하였다. 따라서 치주병소에서 HGF는 세포표면 부착단백질들을 발현함으로써 임파구의 치주병소로의 침윤을 도모할 뿐 아니라, HGF-임파구의 이종세포간 접촉(heterotypic cell adhesion)으로 세포내 신호전달체계가 활성화됨으로써 결과적으로 숙주방어기전의 효과를 증폭시키는 역할을 한다고 볼 수 있다.

만성 치주병소에서 침윤염증세포 중 특히 대식세포는, 다량의 기염증성 cytokine과 생물학적 활성매개체들을 분비함으로써 치아를 둘러싸고 있는 결체조직과 치조골의 파괴를 유발하는 가장 중요한 원인이 되는 세포로 알려져 있다[21]. 만성치주염의 면역발병기전, 및 치주조직 파괴의 기전을 규명하기 위하여, 치주 염증병소에서 단핵구/대식세포의 이주와 축적, 및 섬유아세포와의 상호관계에 관한 분자수준적 기전을 밝히는 일은 치주면역학 분야에서 연구

되어야할 중요한 과제 중의 하나이다. 따라서 본 연구에서는 첫째, PDLF, HGF 등의 섬유아세포와 단핵구세포주의 직접접촉으로 섬유아세포의 활성화가 일어나는지 밝히기 위하여 PDLF 및 HGF와 단핵구세포주인 THP - 1 및 U937을 동시배양하여 섬유아세포의 IL - 6 생산량과 세포성장속도를 측정하였고, 단핵구와 동시배양한 HGF에서 TNF - α mRNA 발현을 관찰하였으며, 둘째, 치주염과 가장 밀접한 관련이 있는 부착단백질인 ICAM - 1의 발현을 PDLF와 HGF에서 flow cytometry로 측정하고, 차단용 anti - ICAM - 1 항체를 이용하여 섬유아세포와 단핵구의 결합에 ICAM - 1이 관여하는지를 관찰하였다.

II. 실험재료 및 방법

1. 세포배양

치은섬유아세포(HGF)와 치주인대섬유아세포(PDLF), 및 피부섬유아세포(human foreskin dermal fibroblast: HDF)는 건강한 치주조직 및 피부로부터 적출하여 penicillin 100 U/㎖, streptomycin 100㎍/㎖, fetal calf serum(FCS) 10%가 포함된 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)(GIBCO Laboratories, Grand Island, N.Y.)에서 5% CO_2, 37℃의 조건으로 배양하였으며, 5에서 10 계대 사이의 세포를 실험에 사용하였다. 사람의 단핵구세포주인 THP - 1, U937과 erythroleukemia 세포주인 K562는 American Type Culture Collection(Rockville, Md)에서 구입하였으며, penicillin 100 U/㎖, streptomycin 100㎍/㎖, 및 FCS 10%가 포함된 RPMI1640(GIBCO)에서 5% CO_2, 37℃ 조건으로 배양하였다. 섬유아세포와 동시배양하는데 이용할 세포의 준비는 K562, THP - 1, 및 U937세포를 그대로, 혹은 lipopolysaccharide(LPS, *E. coli* 0127:B8) 0.5 ㎍/㎖로 18시간 자극하여 Dulbecco's phosphate buffered saline(DPBS)으로 2회 세척한 다음 1% paraformaldehyde(PFA)/PBS로 4℃에서 2시간 동안 고정한 후 DPBS로 1회 세척하고 10%의 FCS이 포함된 DMEM에 재부유하여 4℃로 보관하였다.

2. 섬유아세포와 단핵구의 동시 배양

세포배양용 24 well plate에서 섬유아세포를 그대로, 혹은 IL - 1β 0.1 ng/㎖ 이나 IFN - γ 200 U/㎖을 첨가하여 24시간 배양하고 DPBS로 3회 세척하였다. 미리 준비하였던 고정된 THP - 1, U937 세포를 섬유아세포의 20배 숫자만큼 첨가하여 48시간 동안 배양하여 배양상청액은 IL - 6 정량분석에 이용하였으며, 섬유아세포의 세포수를 측정하여 세포 성장속도를 비교하는데 이용하였다. ICAM - 1 차단용 anti - ICAM - 1 단일클론항체를 이용한 실험에서는 항체 3 ㎍/㎖을 2시간 동안 섬유아세포에 미리 적용시킨 후, 단핵구와 동시 배양을 시행하였다.

3. ELISA에 의한 IL - 6 정량분석

상청액으로 분비된 IL - 6는 Genzyme사의 IL - 6 ELISA kit를 이용하여 sandwitch ELISA법으로 정량하였다. 즉, mouse anti - human IL - 6 단일클론항체가 immobilize 되어 있는 96 well ELISA plate에 IL - 6 표준시료나 세포배양상청액 시료를 적용시켜, 18시간 동안 실온에서 반응시킨 다음 5회 세척하였다. Biotinylated anti - IL - 6 항체를 적용시켜 2시간 동안 37℃에서 반응시킨 다음 5회 세척하고, horseradish peroxidase conjugated streptavidin을 첨가하여 37℃에서 30 분간 반응시켰다. 반응이 끝나면 5회 세척하여 0.02% hydrogen peroxide 가 포함된 완충액과 tetramethylbenzidine을 1:1로 혼합하여 실온에서 30분간 반응시킨 다음, 실험 종료시약을

첨가하여 450 nm 파장에서의 흡광도를 ELISA reader(BioRad)로 측정하였다. 측정치 흡광도에서 blank의 흡광도를 제한 값을 이용하여 IL-6 표준곡선으로부터 농도를 환산하였다.

4. Northern blot을 이용한 섬유아세포의 TNF-α mRNA 발현 측정

배양접시에 왕성하게 자란 HGF에 LPS(0.5 μg/mℓ)로 18시간 자극하여 1% PFA로 고정한 K562, THP-1, 또는 U937 세포를 HGF의 20배 숫자만큼 첨가하고 3시간 동안 동시배양하여 DPBS로 2회 세척한 후, HGF를 Northern blot 분석에 이용하였다. 20μg의 총 RNA를 추출한 다음 formaldehyde가 포함된 1% agarose gel에서 전기영동으로 분리하고 20% SSC 용액내에서 Nytran plus nylon membrane에 옮겼다. 이를 denatured salmon sperm DNA가 포함된 50% formamide, 8% dextran sulfate, 6X SSPE, 0.1% SDS 용액에서 45℃로 30분간 전교잡(prehybridization)한 후, random priming(Amersham)에 의하여 〔^{32}P〕dCTP로 표지된 TNF-α의 cDNA(Americal Type Culture Collection) probe를 0.25 M NaOH로써 37℃에서 10분간 처리한 후 교잡용액에 첨가하였다. 45℃에서 24시간 교잡시킨 후 high stringency 조건으로 세척하고 Image Analyzer(BAS-1500, Fuji Film)로 측정하였다.

5. 세포성장속도 비교

세포배양용 24 well plate에서 72시간 동안 단핵구세포주와 동시배양한 섬유아세포를 trypsin 0.05%/EDTA 0.53 mM로 plate에서 떼어내어 그 세포 수를 측정하였다. 각 실험은 1벌 3회 반복실험으로 시행하였다.

6. 섬유아세포 표면의 ICAM-1 발현 측정을 위한 flow cytometry 분석

IFN-γ 100 U/mℓ, 또는 IL-1β 0.1 ng/mℓ을 적용시켜, 혹은 적용시키지 않은채로 세포배양용 6 well plate에서 24시간 동안 배양한 PDLF, HDF, 및 HGF를 EDTA 1 mM로 떼어내서 PBS로 2회 세척하였다. 1:100의 anti-ICAM-1 단일클론항체가 포함된 1% bovine serum albumin/PBS(BSA/PBS) 용액 200μℓ

Table 1. IL-6 production by PDLF, HGF, and HDF exposed to LPS-stimulated and fixed THP-1 cells

Coculture cell		IL-6 production by fibroblast[b](ng/ml)			
Fibroblast	LPS treated THP-1	–	PDLF	HGF	HDF
+	–	–	0.076	6.90	3.20
+	+	–	0.291	13.40	6.92
+/IFN-γ treated[c]	+	–	0.668	21.21	8.00
+/IL-β treated[d]	+	–	1.380	28.26	18.50
–	supernatant	<0.02	–	–	–
–	+	<0.02	–	–	–
+	supernatant	–	0.069	7.10	3.33

[a] : THP-1 cells were treated with 0.5μg/mℓof LPS for 18 hours and fixed with 1% of PFA.
[b] : LPS treated and fixed THP-1 cells were cocultured with or without PDLF, HGF or HDF for 48 hours and IL-6 was determined from culture supernatant by ELISA.
[c] : Fibroblasts were treated with 200U/mℓof IFN-γ for 18 hours and then subjected into coculture experiment.
[d] : Fibroblasts were treated with 0.1ng/mℓ of IL-1β for 18 hours and then subjected into coculture experiment.

에 세포를 재부유하여 실온에서 tube를 회전시키면서 30분간 반응시킨 후 BSA/PBS로 1회 세척하고, fluorescein isothiocyanate(FITC)-conjugated goat anti-mouse IgG 항체(Pierce)를 1:200의 농도로 적용시켜 실온에서 회전시키면서 20분간 반응시켰다. BSA/PBS로 2회 세척한 후 세포를 1% PFA/PBS로 10분간 고정하고, PBS로 1회 세척하여 250μℓ의 BSA/PBS에 재부유한 다음 fluorescence activated cell sorter(FACSCalibur, Becton& Dickinson)로 분석하였다.

7. 통계처리

차이의 통계적 유의성 검정은 student's t-test를 이용하였다.

II. 결과

1. 단핵구-섬유아세포 동시배양에 의한 섬유아세포의 IL-6 생산

섬유아세포와 단핵구세포주가 직접 접촉하여 섬유아세포가 활성화됨으로써 그 결과 IL-6를 분비하는지 관찰하기 위하여, LPS로 자극한 단핵구세포주 THP-1을 PFA로 고정한 후 PDLF, HGF 및 HDF와 각각 동시배양하였다. PDLF만을 배양한 배양액에서는 0.076ng/mℓ의 IL-6가 측정되어 단독배양 상태에서도 PDLF는 소량의 기저선(base-line) IL-6 분비를 하고 있음을 알 수 있었다(Table 1). 그러나 PDLF에 THP-1을 첨가하여 배양하였을 경우에는, IL-6의 분비가 기저선 보다 4배(0.291ng/mℓ)가량 증가되었으며, PDLF를 IFN-γ, 혹은 IL-1β로 전처치하여 THP-1과 동시배양 하였을 경우에는 동시배양에 의한 IL-6의 분비가 2배(IFN-γ: 0.668 ng/mℓ), 및 5배(IL-1β: 1.380ng/mℓ) 가량 증가되었다. HGF는 단독배양 상태상태에서는 PDLF에 비하여 기저선 IL-6 분비량이 90배(6.90ng/mℓ) 정도 많았으나, THP-1과의 동시배양으로 인

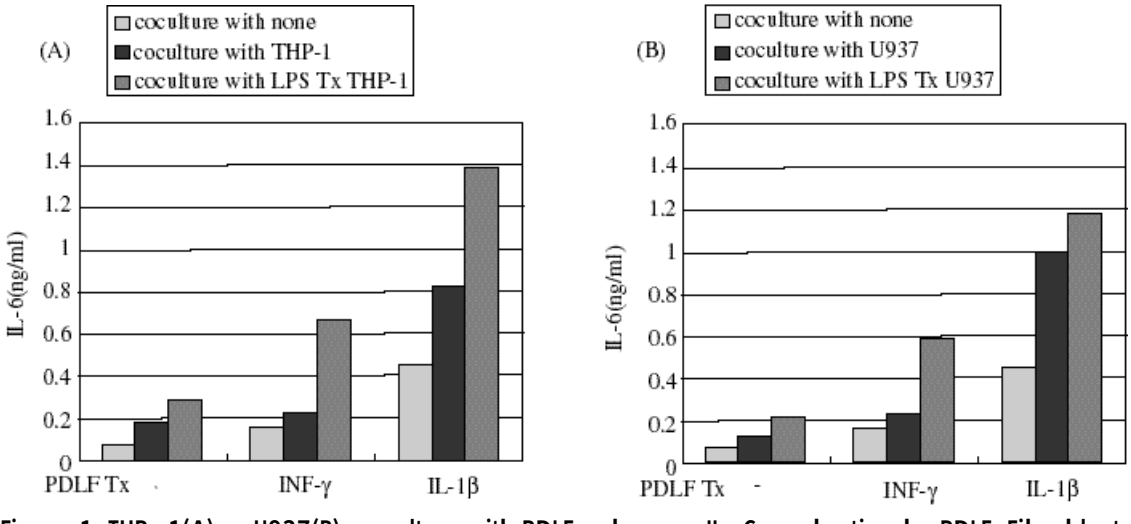

Figure 1. THP-1(A) or U937(B) coculture with PDLF enhances IL-6 production by PDLF. Fibroblasts were pretreated for 24 hours with or without IFN-γ (200U/mℓ) or IL-1β (0.1ng/mℓ). THP-1 and U937 were stimulated for 18 hours with or without LPS(0.5μg/mℓ) and fixed with 1% PFA for 2 hours. Supernatants were harvested after 48 hours of coculture and the amount of IL-6 determined using an ELISA assay. Representative data from 2 experiments performed are

한 IL - 6의 분비 증가는 기저선 IL - 6 분비량의 약 2배(13.40ng/㎖)에 지나지 않았으며, HGF를 cytokine으로 전처치하여 THP - 1과 동시배양하였을 경우에는 동시배양에 의한 IL - 6의 분비가 1.5배(IFN - γ: 21.21 ng/㎖), 및 2배(IL - 1β: 28.26ng/㎖) 정도 증가하여, PDLF의 경우보다 증가의 폭이 전반적으로 적은 편이었다. HDF의 기저선 IL - 6 분비량은 3.20 ng/㎖이었으며, THP - 1과의 동시배양으로 인한 IL - 6의 분비가 기저선의 약 2배(6.92ng/㎖)였고, cytokine으로 HDF를 전처치하여 THP - 1과 동시배양한 경우에는 동시배양으로 인한 IL - 6 분비의 증가가 1.2배(IFN - γ: 8.00ng/㎖) 및 2.5배(IL - 1β: 18.50 ng/㎖)로서, HGF와 전체적으로 유사한 양상을 보였다. 즉, 세가지 섬유아세포에서 모두 THP - 1과의 동시배양으로 인하여 IL - 6 분비량이 상승되었으며, 섬유아세포를 동시배양 전에 IFN - γ나 IL - 1β와 같은 cytokine으로 전처치하면 IL - 6의 분비가 더욱 증가되었다. 다음으로, IL - 6 분비가 과연 섬유아세포에서 분비되며 IL - 6 분비 현상이 세포간의 직접접촉때문에 일어나는지를 밝히기 위하여, 섬유아세포를 빼고 THP - 1 세포만, 혹은 그 상청액만을 동일 방법으로 배양한 후 IL - 6 양을 측정하여 본 결과, IL - 6가 거의 측정되지 않았다. 또한 섬유아세포에 THP - 1의 상청액만을 첨가하여 배양하였을 때 측정된 IL - 6의 양(PDLF, 0.069ng/㎖; HGF, 7.10ng/㎖; HDF, 3.33ng/㎖)은 각 섬유아세포의 기저선 IL - 6 분비량과 거의 유사하였다. 즉, 단핵구와 섬유아세포 동시배양으로 인하여 유리되어 나온 IL - 6의 원천은 섬유아세포이며, 섬유아세포의 IL - 6 분비를 증가시키는 유발인자는 THP - 1의 수용성인자가 아니라 THP - 1과 섬유아세포의 세포간 직접적 상호작용인 것을 알 수 있었다(Table 1).

THP - 1의 LPS 전처치 여부와 PDLF의 cytokine 전처치 여부등을 각기 달리하여 단핵구 - PDLF 동시배양을 실시한 결과(Figure 1A), 전처치하지 않은 PDLF의 경우 THP - 1

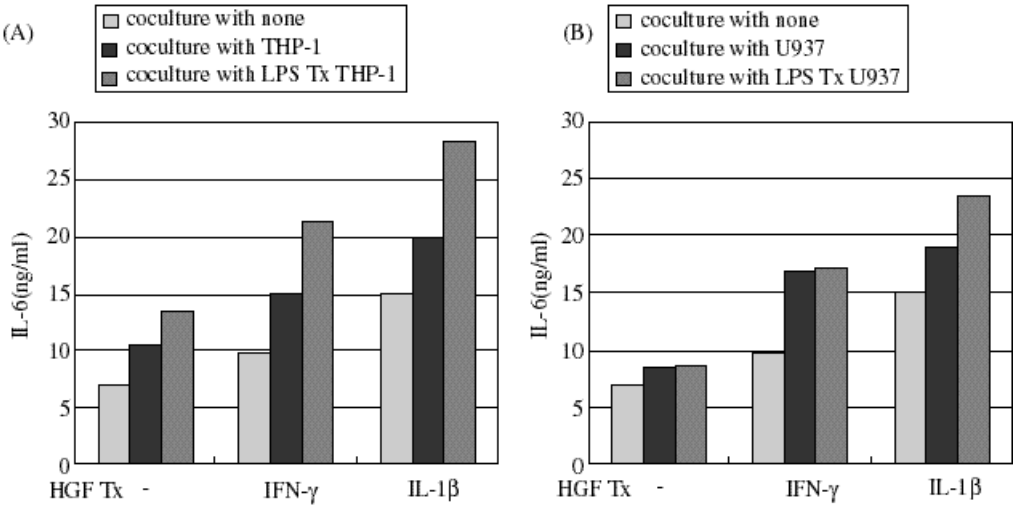

Figure 2. THP - 1(A) or U937(B) coculture with HGF enhances IL - 6 production by HGF. Fibroblasts were pretreated for 24 hours with or without IFN - γ (200U/㎖) or IL - 1β (0.1ng/㎖). THP - 1 and U937 were stimulated for 18 hours with or without LPS(0.5μg/㎖) and fixed with 1% PFA for 2 hours. Supernatants were harvested after 48 hours of coculture and the amount of IL - 6 determined using an ELISA assay. Representative data from 2 experiments performed are shown.

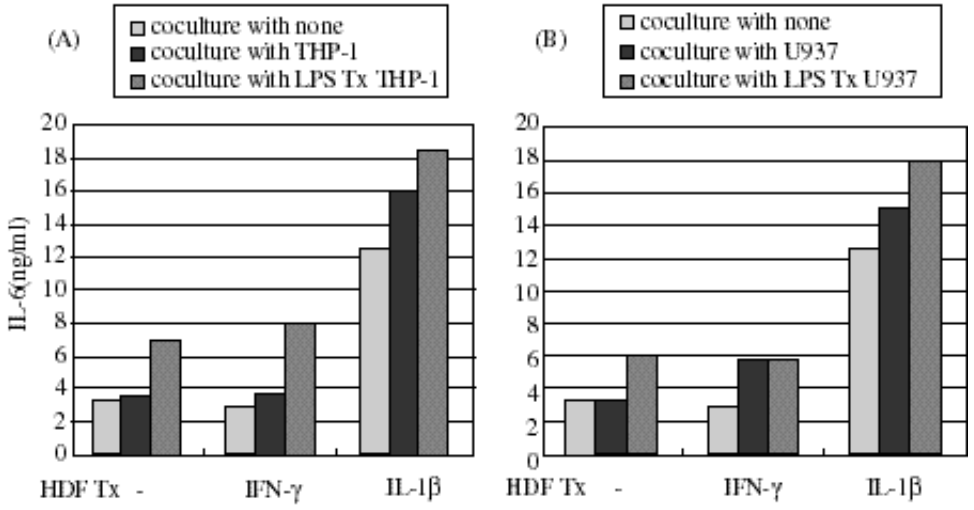

Figure 3. THP-1(A) or U937(B) coculture with HDF enhances IL-6 production by HDF. Fibroblasts were pretreated for 24 hours with or without IFN-γ (200U/㎖) or IL-1β(0.1ng/㎖). THP-1 and U937 were stimulated for 18 hours with or without LPS(0.5㎍/㎖) and fixed with 1% PFA for 2 hours. Supernatants were harvested after 48 hours of coculture and the amount of IL-6 determined using an ELISA assay. Representative data from 2 experiments performed are shown.

과 동시배양하였을 때 IL-6 분비가 기저선 분비(0.076ng/㎖)의 약 2.5배(0.185ng/㎖) 상승하였으며, LPS 전처치 THP-1을 동시배양에 사용하였을 경우에는 IL-6 분비의 증가가 기저선 보다 4배(0.291ng/㎖)나 증가되었다. IFN-γ 전처치 PDLF의 경우에는 단독배양 하였을 때 0.160ng/㎖의 기저선 IL-6 분비를 보여 IFN-γ가 PDLF의 기저선 IL-6 분비 자체를 약 2배 상승시켰음을 나타내었다. 그러나 THP-1과 동시배양 하였을 경우에는 이것 보다도 약 1.5배(0.229ng/㎖)의 IL-6 분비 증가를 보였으며, LPS 전처치 THP-1과 IFN-γ 전처치 PDLF를 동시배양하였을 때는 기저선 보다 4배(0.668 ng/㎖)나 IL-6 분비가 증가되었다. IL-1β 전처치 PDLF의 경우 기저선 분비가 0.451ng/㎖로 6배 상승되었고, THP-1, 또는 LPS 전처치 THP-1을 동시배양하였을 때는 IL-6 분비량이 약 2배(0.822ng/㎖), 및 3배(1.380ng/㎖) 증가되었다. 정도의 차이는 있었으나 U937 세포(Figure 1B)의 경우에서도 비슷한 양상을 띄었다. 따라서 PDLF 단독배양하였을 때의 기저선 IL-6 분비량에 비하여 단핵구세포주를 동시배양하였을 때 IL-6 분비량이 증가되었으며, LPS로 단핵구를 미리 자극하여 동시배양한 경우에는 IL-6 분비가 더욱 증가되었다. 또한 PDLF도 cytokine으로 전처치하여 사용하면 단독배양에 의한 기저선 IL-6 분비도 상승할 뿐 아니라 동시배양에 의한 IL-6 분비도 크게 증가하여, 단핵구와 PDLF에 대한 전처치가 동시배양에 의한 PDLF의 IL-6 분비에 상승 효과를 나타내었음이 관찰되었다(Figure 1A, B). HGF의 경우는 IL-6 기저선 분비량(6.9ng/㎖)이 PDLF의 기저선(0.076ng/㎖)에 비하여 높게 관찰되었지만, 동시배양에 의한 IL-6 분비 증가폭(THP-1, 10.44ng/㎖, 1.5배 ; LPS 전처치 THP-1, 13.40ng/㎖, 2배 ; U937, 8.33ng/㎖, 1.2배 ; LPS 전처치 U937, 8.42ng/㎖, 1.2배)은 PDLF에 비하여 적은 편이었다(Figure 2). cytokine으로 전처치한 HGF의 경우에는 기저

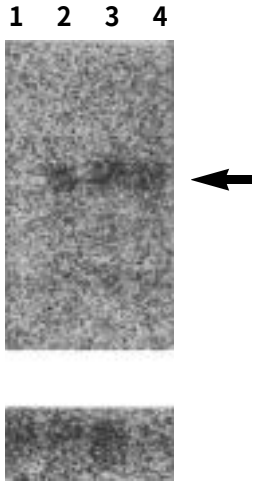

Figure 4. Effect of coculture on TNF - α mRNA expression of HGF. K562, THP - 1, and U937 cells were stimulated with LPS(0.5μg/mℓ) for 18 hours and fixed with 1% PFA for 2 hours. HGF were cultured with THP - 1 supernatant(1), K562(2), THP - 1(3), and U937(4) for 3 hours and mRNA was isolated from the cultured HGF. Arrow indicates TNF - α mRNA band. Lower column

선 IL - 6 분비량이 9.74 ng/mℓ(IFN - γ), 및 15.00ng/mℓ(IL - 1β)로 상승하였으며, THP - 1 동시배양에 의하여 기저선 분비량 보다 1.6배 (IFN - γ, 15.05 ng/mℓ), 및 1.3배(IL - 1β, 20.00ng/mℓ) 증가하였다. 또한 LPS 전처치 THP - 1의 동시배양시에는 기저선 분비량에 비하여 HGF의 IL - 6 분비량이 2.2배(IFN - γ, 21.21ng/mℓ), 및 1.9배(IL - 1β, 28.26ng/mℓ) 증가하였다. U937도 THP - 1 보다는 약간 적은 증가폭 이지만 동시배양에 의하여 HGF의 IL - 6 분비량을 증가시켰다. 이로써 HGF의 경우에서도 IL - 6 분비가 단핵구와의 동시배양으로 인하여 증가하였으며, 단핵구의 LPS 전처치, 및 HGF의 cytokine 전처치는 동시배양에 의한 IL - 6 분비능력에 상승 효과를 나타내었지만 그 상승 효과의 정도는 PDLF에 비하여 적었다(Figure 2 A, B). 치주조직을 이루고 있는 섬유아세포는 아니지만 비교군으로서 HDF를 사용하여 동일 실험을 시행하였을 때, 기저

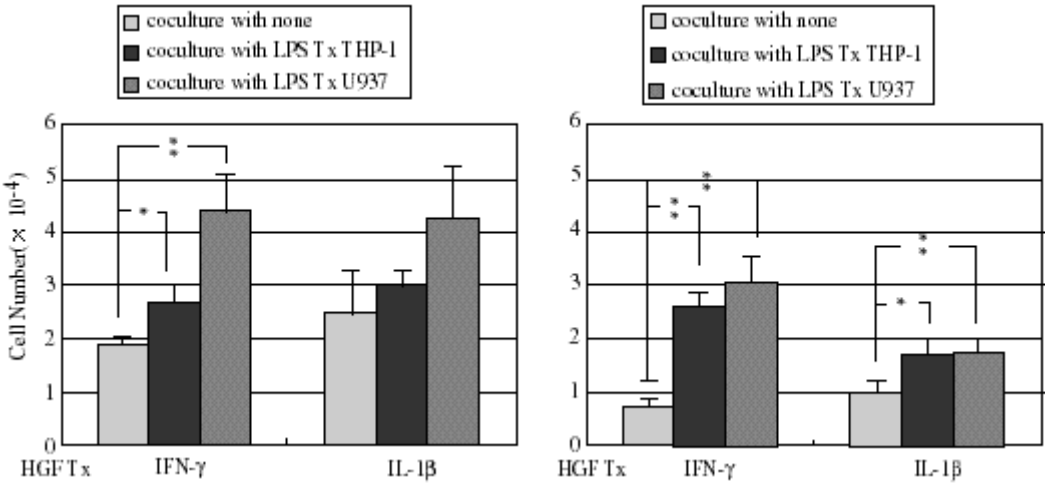

Figure 5. Monocyte coculture increases cell proliferation rate of PDLF and HGF.THP - 1 and U937 were stimulated with LPS (0.5μg/mℓ) for 18 hours and fixed with 1% PFA for 2 hours. Fibroblasts were pretreated with IFN - γ (100U/mℓ) or IL - 1β (0.1ng/mℓ) for 24 hours and cocultured with THP - 1 or U937 for 72 hours. Fibroblasts were detached with trypsin/EDTA and cell numbers were counted. The data are presented as mean±SD of cell numbers from triplicate wells.
***: P<0.05 when compared with control**
**** : P<0.01 when compared with control**

선 IL - 6 분비가 HGF의 약 절반정도인 것 외에 그 결과의 양상은 전체적으로 HGF와 매우 유사하였다(Figure 3 A, B).

실험 대상이 되었던 2종의 치주조직 섬유아세포와 1종의 피부조직 섬유아세포에서 공통적으로, 단핵구 - 섬유아세포의 세포간 접촉에 의하여 섬유아세포가 활성화됨으로써 IL - 6 분비가 증가하였고, 단핵구와 섬유아세포를 배양전에 자극하였을 경우에는 IL - 6 분비량이 더욱 증가되는 양상을 띄었다. 그러나 실험 대상 섬유아세포 중 IL - 6 기저선 분비량이 가장 적었던 PDLF에서 단핵구와의 동시배양에 의한 섬유아세포 활성화의 양상이 가장 뚜렷하게 나타났다(Table 1, Figure 1, 2, 3).

2. 단핵구 - HGF 동시배양에 의한 TNF - α mRNA 발현

HGF와 LPS로 자극한 단핵구세포주를 동시에 배양하였을 때 TNF - α의 mRNA 발현을 HGF 세포에서 관찰하였다(Figure 4). THP - 1 세포 대신 그 상청액만을 HGF와 함께 배양한 것을 음성 대조군(lane 1)으로 이용하였다. K562는 동시 배양한 HGF 세포에서 IL - 1β mRNA를 발현시켰다고 보고된 임파구양 세포주로서[29], K562와 HGF 동시배양한 것을 양성 대조군(lane 2)으로 이용하였다. K562 - HGF 동시배양과 비슷한 정도의 TNF - α mRNA가 THP - 1, 또는 U937 - HGF 동시배양시에도 발현되었으나, 음성대조군 HGF에서는 발현되지 않았다. 각 lane간 mRNA 양에 대한 지표로서 사용했던 β - actin mRNA는 모든 경우에서 상호 유사하게 발현되었다. 따라

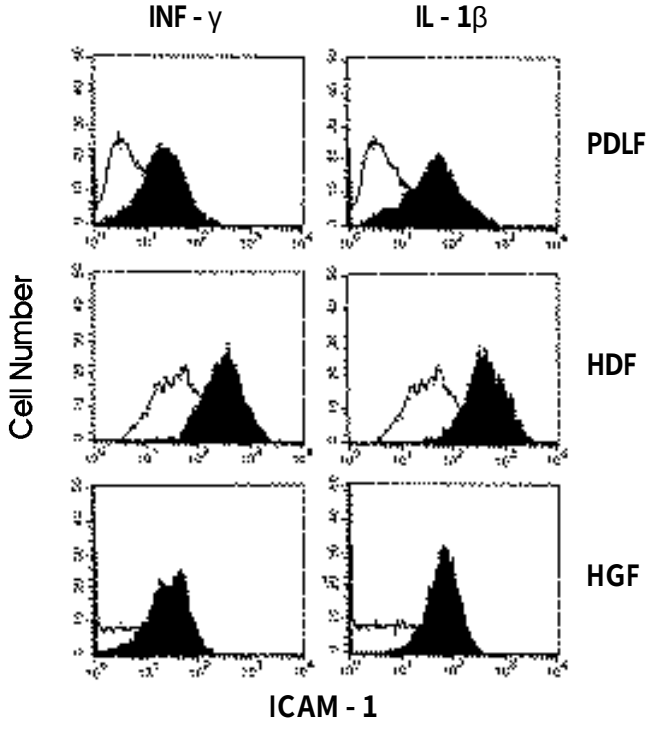

Figure 6. IFN - γ - or IL - 1β - induced ICAM - 1 expression by Fibroblasts. PDLF, HDF, and HGF were cultured in the presence(closed profile) or absence(open profile) of IFN - γ (100U/㎖) or IL - 1β (0.1ng/㎖) for 24 hours and stained with anti - ICAM - 1 monoclonal antibody, followed by

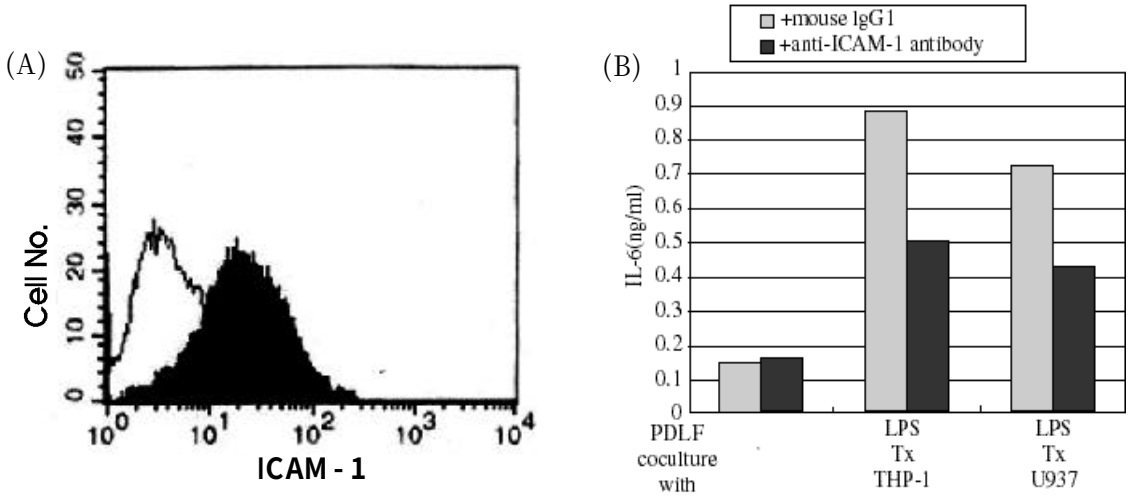

Figure 7. Involvement of ICAM - 1 in the adhesive interaction between monocyte and IFN - γ- activated PDLF. A) PDLF were cultured in the presence(closed profile) or absence(open profile) of IFN - γ (100U/㎖) for 24 hours and stained with anti - ICAM - 1 monoclonal antibody, followed by FITC - anti - mouse IgG antibody and analyzed by flow cytometry. B) PDLF were cultured in the presence of mouse IgG1(3μg/㎖) or anti - ICAM - 1 monoclonal antibody(3μg/㎖) for 2 hours, and then cocultured with LPS - treated and fixed THP - 1 or U937 for 48 hours.

서 HGF - 단핵구 세포간 접촉으로 TNF - α mRNA 발현유도와 같은 HGF 세포의 활성화가 유발되었음을 알 수 있었다.

3. 단핵구 - 섬유아세포 동시배양에 의한 섬유아세포 성장속도의 변화

LPS로 자극해서 고정한 THP - 1, 또는 U937세포와 cytokine으로 전처치한 PDLF, 및 HGF를 72시간 동시배양하여 각 군간의 세포수 차이를 비교하였다(Figure 5). IFN -γ 전처치 PDLF의 단독배양시 세포수는 18.67±1.53 ±10^3 이었는데 비하여, 동시배양시 세포수는 27.00±3.00×10^3(THP - 1), 및 44.00±7.55 ×10^3(U937)으로서, 동시배양으로 인하여 각각 1.4배 (P<0.05; THP - 1), 및 2.4배 (P<0.01; U937) 만큼 세포수가 증가하였다. IL - 1β 전처치 PDLF는 단독배양시 세포수가 25.00±6.08×10^3 이었고, 동시배양시 세포수는 30.33±0.58×10^3(THP - 1), 및 43.00± 10.15 ×10^3(U937)으로서, 차이의 통계적 유의성은 없었지만 동시배양으로 인하여 세포수가 각각 1.2배(THP - 1), 및 1.7배(U937) 증가하였다. 한편, IFN -γ 전처치 HGF의 단독배양시 세포수는 7.67±3.06×10^3 이었으나, 동시배양시 세포수는 26.00±2.65×10^3(THP - 1), 및 30.67±5.69×10^3(U937)으로서, 동시배양으로 인하여 세포수가 각각 3.4배 (P<0.01; THP - 1), 및 4.0배(P<0.01; U937) 증가하였다. IL - 1β 전처치 HGF의 단독배양시 세포수는 9.67±1.15×10^3 이었고, 동시배양시 세포수는 17.33±2.52×10^3(THP - 1, 및 17.67±1.53×10^3(U937) 으로서, 동시배양으로 인하여 세포수가 각각 1.8배(P<0.05; THP - 1), 및 1.8배(P<0.01; U937) 증가하였다. 즉, 섬유아세포와 단핵구의 세포접촉으로 인하여 섬유아세포의 성장속도가 통계적으로 유의하게 증가하는 양상을 나타내었으며, PDLF 보다는 HGF에서 세포간 접촉으로 인한 세포성장속도의 증가가 더 뚜렷하였다.

4. 단핵구 - 섬유아세포의 세포간 접촉에서 ICAM - 1 부착단백질의 관련성

백혈구의 동종, 또는 이종세포간 세포결합에 가장 중요한 부착단백질인 ICAM - 1의 발현을 PDLF, HGF, 및 HDF에서 flow cytometry로 분석하여본 결과, IFN - γ과 IL - 1β는 3가지 실험 대상 섬유아세포들에서 모두 ICAM - 1의 발현을 10배 가까이 증가시켰다(Figure 6). 3가지 섬유아세포 중, 단핵구와 동시배양시 IL - 6 분비량이 가장 뚜렷하게 증가되었던 PDLF를 택하여, ICAM - 1 분자를 차단함으로써 세포간 접촉에 어느 정도 영향을 미치는지 관찰하였다. anti - ICAM - 1 단일클론항체를 이용하여, IFN - γ로 전처치한 PDLF 표면의 ICAM - 1 분자를 차단한 후 LPS 전처치 단핵구와 동시배양한 다음, ICAM - 1을 차단하지 않은 mouse IgG1 대조군과 IL - 6 분비량을 서로 비교하여 보았다. PDLF 단독배양시의 기저선 IL - 6 분비량은 mouse IgG1 대조군과 anti - ICAM - 1 단일클론항체군 간에 서로 차이가 없었다 (mouse IgG1, 0.143ng/㎖ ; anti - ICAM - 1 항체, 0.155ng/㎖), 그러나 PDLF와 THP - 1를 동시배양한 경우는 ICAM - 1을 항체로 차단함으로써 0.883에서 0.500ng/㎖로 PDLF의 IL - 6 분비량이 약 40% 정도 억제되었으며, U937과의 동시배양시에도 마찬가지로 0.719에서 0.418ng/㎖로 IL - 6 분비량이 약 40% 감소되었다(Figure 7). 따라서 ICAM - 1 부착단백질의 차단으로 인하여 PDLF - 단핵구 세포간 접촉이 방해되어 PDLF의 IL - 6 분비가 억제되었음을 나타내었다.

IV. 고찰

만성치주염에서 단핵구/대식세포가 치주 결체조직으로 이동하고 축적되는현상에는 단핵구/대식세포와 치주 결체조직 섬유아세포의 상호작용이 매우 중요한 것으로 여겨지지만 이에 대한 분자수준의 기전이 아직 밝혀지지 않았다. 본 연구결과에 의하면 HGF, PDLF가 단핵구와 접촉하여 기염증성 cytokine인 IL - 6, 및 TNF - α mRNA를 분비, 또는 발현하였을 뿐 아니라, 단핵구와의 접촉에 의하여 섬유아세포의 세포성장이 증가하였다. 또한 anti - ICAM - 1 단일클론항체로 부착단백질 결합을 차단하였을 때 단핵구와의 세포접촉에 의한 섬유아세포의 IL - 6 분비가 억제되었음을 관찰할 수 있었다. 이러한 결과는 HGF와 PDLF가 단핵구/대식세포의 이동과 축적에 관여할 수 있으며, 이에 ICAM - 1/LFA - 1 경로가 관계할 것임을 시사하는것이다. 또한 섬유아세포가 단핵구와의 세포간 결합에 의하여 염증 cytokine 들을 분비하고 세포증식이 활발해진다는 사실은 치주질환에서 단핵구가 주도하는 조직 파괴작용을 치주 섬유아세포가 더욱 증폭시킬 수 있고 손상된 조직의 보수에도 관여할 수 있음을 나타내고 있는 것이다.

성인에서 치아상실의 가장 주된 원인이 되는 질환인 치주염은 보통 세균감염에 의한 만성염증질환이다. 만성 치주병소에는 활성화된 임파구, 대식세포, 및 호중구가 국소적으로 침윤되어 있어[4], 이 침윤백혈구들이 치주조직에 격렬한 면역/염증반응을 유도함으로써 결체조직 및 치조골의 파괴에 따른 치아상실이 궁극적으로 일어나게 된다. 급성 염증에서는 조직파괴를 담당하는 염증세포가 주로 호중구이지만, 만성화된 염증조직에서는 대식세포가 중심역할을 하게된다. 만성치주염에서 치은조직 및 치조골의 파괴를 일으키는 단백분해효소, cytokine, 및 생물학적 활성매개체들이 활성화된 단핵구/대식세포로부터 다량으로 분비된다고 보고되었다[46].

혈액의 단핵구가 염증병소로 동원되기 위해서는 다른 백혈구와 마찬가지로 우선 활성화된 혈관내피세포를 통하여 혈관을 투과해야한다. 이 혈관외유출현상(extravasation)은 첫째, selectin 과 그 배위자의 결합에 의한 내피세포

와 단핵구의 초기 접촉단계, 둘째, rolling, 셋째, Gαi 신호경로의 활성화, 넷째, integrin이 관여하는 세포간 결합의 강화, 및 정지의 여러 단계를 거친다[47]. 혈관벽을 지난 후, 화학주성물질의 농도경사에 따라 이동한 단핵구/대식세포가 염증병소에 축적되고 활성화되는데 이 단계에서 치주 섬유아세포와 단핵구/대식세포의 상호작용이 관여할 것이라고 추측된다. 섬유아세포가 염증세포의 이동과 축적 및 활성화에 관계하리라는 것은 T임파구와 섬유아세포의 상호작용에 관한 몇가지 연구결과에서 추론할 수 있다. 즉, 활성화 T임파구를 병소조직에 축적시키는 역할을 할 것으로 추정되는 부착단백질 ICAM - 1은 cytokine에 의하여 섬유아세포에서 발현이 증가되며[12], 정상조직보다 치주 염증조직에서 ICAM - 1 발현이 높았다고 보고되었다[41]. 또한 ICAM - 1 부착단백질 작용을 차단하였을 때 T임파구 - HGF의 세포간 결합이 감소되었고, T임파구와 HGF의 결합으로 T임파구 증식과 HGF의 cytokine 분비 증가 등 신호전달체계 활성화의 반응이 나타난다고 하였다[29]. 단핵구는 치주결체조직의 섬유아세포와 상호작용하여 이와 비슷한 방법으로 염증조직에 동원되고 활성화될 것으로 추측되지만 아직 실험적으로 증명된 바 없다.

섬유아세포가 비활성상태에서는 결체조직의 건강상태를 유지하고 손상된 조직을 보수하는 역할을 하지만, 일단 활성화되면 cytokine 분비 및 부착단백질 발현을 통하여 침윤염증세포와 밀접한 상호작용을 함으로써, 면역적격세포와 마찬가지로 적극적인 면역/염증조절기능을 나타내게된다[12]. 건강, 또는 질병상태에서 접하게되는 cytokine들의 외적 자극에 대하여 섬유아세포가 보일 수 있는 활성화반응을 나타내는 척도로서 세포성장, 기질단백질 생산, cytokine 분비와 같은 작용들이 이용되어 왔었다[48]. 그러나 최근에 와서는 섬유아세포가 이러한 외적 자극에 대하여 반응할 뿐 아니라, 수용체 - 상대 수용체(receptor - counterreceptor)의 결합을 통한 세포간 직접접촉에 의하여 숙주의 이종세포로부터 신호를 직접 전달받아 반응하기도 한다는것이 알려졌다[49,50]. 섬유아세포와 이종 세포간 직접접촉작용에 대하여 자세한 기전은 아직 모르지만, 이에 관련이 있을 것으로 보이는 부착단백질 수용체와 그 상대 배위자에 관한 연구결과들이 계속해서 발표되고 있다[25 - 31]. 치주조직의 여러 결체조직 세포들은 순환 T임파구의 homing receptor 에 대한 부착단백질을 지니고 있어서 임파구 - HGF의 직접작용에 ICAM - 1/LFA - 1, LFA - 3/CD2, VLA inte - grins, CD44/hyaluronate, CD40/ CD40L 등의 경로가 관여한다고 보고되었다[25 - 31]. 또한 HGF와 임파구의 세포간 접촉으로 IL - 1β mRNA가 발현되고 T임파구의 증식이 증가되며[29], 임파구와의 접촉에 관여할 것으로 추측되는 HGF의 CD40을 단일클론항체로 crosslinking 하였을 때 HGF의 IL - 6 분비가 상승된다. 이러한 결과는 HGF와 이종세포가 부착단백질의 결합으로 접촉하게되면 상호 부착단백질에서 세포 내부로 향한 신호(inward signaling)가 유발되어 접촉한 세포 상호간에 활성화가 일어난다는 사실을 알 수 있게한다.

본 실험결과에서도 단핵구와의 접촉으로 HGF와 PDLF의 IL - 6 생산이 증가되었다. IL - 6는 정상보다 염증 치주조직에서 특히 다량으로 생산되며 치은열구액에서도 발견되므로, 치주조직의 섬유아세포가 단핵구와 반응하여 IL - 6를 생산하였다는것은 매우 의미있는 결과라 할 수 있다[51]. 또한 IL - 6는 B세포를 형질세포로 성숙시키므로, 치주조직 섬유아세포가 다클론성활성화에 의해 치주병소조직에서 발견되는 large B cell/plasma cell infiltrate에도 영향을 줄 가능성이 있으며, virus나 다른 세균감염시에도 이러한 현상이 이미 발견된 적이 있다[52,53]. 그러나 PDLF의 IL - 6 생산량이 HGF에 비하여 1/90 밖에 안되었는데, 이는 Sempowski 등[30]의 결과와 크게 다르다. 즉, Sempowski 등[30]의 실험결과에 의하면 기저선

분비량에서는 HGF와 PDLF 사이에 큰 차이가 없었는데, anti - CD40으로 crosslinking 하였을 경우 HGF와 달리 PDLF에서는 IL - 6가 생산되지 않았다. 본 실험결과에 의하면 기저선분비량은 HGF가 크게 높았으나 세포간 접촉에 의한 IL - 6 분비에 있어서는 PDLF의 반응성이 약간 더 큰것으로 나타났다. 치주조직 섬유아세포간에 이러한 IL - 6 분비량의 차이가 존재한다는것은, 치주조직의 섬유아세포들 사이에 서로 기능적 이질성이 존재할 뿐 아니라, 이들 이질적인 조직들이 기능적으로 구획화 되어있다는 것을 반증하는 것이다. 또한 두 섬유아세포에서 IL - 6 분비량이 크게 다르게 나타난 이유를 Sempowski등[30]은 두 세포간에 CD40 신호에 대한 반응성이 차이가 있기 때문인것으로 해석하였으나, 기저선분비량에서 HGF와 PDLF간에 분명한 차이를 보였던 본 실험결과를 보면, 두 세포가 서로 다른 고유의 IL - 6 분비능력을 가지고 있는것으로 보인다. 또한 ICAM - 1의 본질적 발현이나 cytokine에 의하여 증가된 발현에 있어 두 세포간에 큰 차이가 없었던 점으로 미루어 ICAM - 1 신호에 대한 세포내 반응성의 차이로 보기도 힘들다. PDLF 고유의 낮은 IL - 6 분비능력은 염증반응에 의한 조직손상에 대하여 PDLF가 특별한 내성을 지닐 수 있다는특별한 의미를 갖는다. 즉, 세포간 접촉이나 cytokine 등에 의하여 다른 섬유아세포와 동일한 정도로 활성화되었을 때 그 결과로서 나타나는 cytokine 분비 등 염증반응을 최소화함으로써, 치주인대와 같은 조직에서 가능한 한 조직파괴에 의한 결손을 적게 받도록하려는 생리학적 방어수단으로 보인다. 이러한 결과는, HGF에 비해 본질적 CD40의 발현이 낮은 PDLF가 CD40을 매개로한 세포접촉이 더 어려우며 이것이 염증반응을 최소화하기 위한 생리현상이라고 설명한 Sempowski등[30]의 보고와 일맥 상통하는 것이다. 한편, 치은 결체조직이 치주낭의 항원들과 거리상 가까워 더 자주 접하게 되므로 HGF가 PDLF보다 훨씬 많은 기염증성 cytokine을 분비한다고도 볼 수 있다[30]. 기저선 및 활성화에 의한 IL - 6 분비량에 있어 Sempowski 등[30]의 결과와 본 실험의 결과는 매우 상이하였다. Murakami등[54]은 HGF line 마다 부착단백질 발현에 차이가 있고, 배양계대수와 HGF의 성장세포밀도 정도에 따라서도 영향을 받을 수 있다고 하여, 이러한 인자들이 세포표면 부착단백질의 발현을 다르게 할 수 있음을 시사하였다. 따라서 동일한 세포를 대상으로한 실험이라 하더라도 실험간에 나타나는 결과의 차이에는 이러한 인자들이 어느정도 기여했을 가능성이 있다고 사료된다.

임파구와 피부섬유아세포(HDF)의 결합은 HDF의 ICAM - 1과 임파구의 LFA - 1에 의하여 매개되지만[26,54,55] HGF와 T임파구의 결합은 주로 VLA - 4를 매개로 하여 일어나며, anti - ICAM - 1이나 anti - LFA - 1 단일클론항체로는 HGF와 T임파구의 결합이 별로 억제되지 않는다. 따라서 Murakami[54]는 T임파구가 상이한 조직에 정착하는데는 상이한 분자기전을 이용하는 것으로 보고한 바 있다. 그러나 기염증성 cytokine으로 HGF를 처리하면, HGF와 T 임파구의총 기능적 결합력중 ICAM - 1/LFA - 1 경로가 차지하는 부분이 크게 증가하여 VLA - 4 경로가 차지하는 부분보다 커지는데, 이것은 cytokine에 의하여 HGF의 ICAM - 1 발현이 증가하는 현상으로 일부 설명될 수 있다[12,31].치주질환 원인균의 sonic extract, cytokine이 HGF에서 ICAM - 1의 발현을 크게 증가시키고, 건강조직보다 치주병소의 HGF가 ICAM - 1 발현이 더 높았다고 보고되었다[41]. 연구에서는 5명의 정상인에서는 모두 음성이었으며 7명의 치주염 환자 치주조직에서는 ICAM - 1 mRNA가 모두 양성으로 발현되었으나 개별차가 있었다. 또한 Hayashi[41]는 성인치주염의 치주 섬유아세포에서도 면역화학적으로 ICAM - 1 발현이 증가되었다고 하였다. 본 실험에서도 IFN - γ와 IL - 1β 처리에 의하여 실험대상 섬유아세포에서 ICAM - 1 발

현이 모두 크게 증가하였고, 단핵구-PDLF의 접촉에 의한 PDLF의 IL-6 분비를 anti-ICAM-1 단일클론항체가 크게 억제하기는 하였으나 완전히 억제하지 못하였던 것은 ICAM-1 이외에도 여러 종류의 부착단백질이 단핵구-PDLF의 세포간 결합에 관여하고 있기 때문일 것으로 사료된다. 이렇듯 만성치주염에서는 염증부위로 백혈구의 이동과 축적에서 LFA-1/ICAM-1 경로가 가장 중요한 역할을 담당하는 것으로 여겨지지만 류마치스 관절염과 같은 자가면역질환에서는 VLA-4/vascular cell adhesion molecule-1(VCAM-1) 경로가 더욱 깊게 관여하는 것으로 보고된 바 있다[56].

본실험의 결과 단핵구와 치주섬유아세포의 세포간 접촉에 ICAM-1 부착분자가 적어도 일부 관여함을 나타내었다. 또한 단핵구와의 직접접촉에 의하여 치주 섬유아세포의 IL-6 생산, 및 TNF-α mRNA 발현이 증가되었으며, 섬유아세포의 성장이 증가되었다. 치주 섬유아세포의 IL-6 생산은 cytokine 처리에 의하여서도 증가되었던 바, 치주 섬유아세포는 수용성인자를 매개로한 작용과 활성화된 세포간 직접접촉 작용, 이 두가지 방법에 의하여 자극될 수 있음을 알 수 있었다. 이에따라 섬유아세포는 만성치주염의 조직파괴에 주된 역할을 하는 단핵구/대식세포를 염증부위로 동원하고 활성화시키는 역할을 할 뿐 아니라, 섬유아세포 그 자신도 수용성인자나 세포간 접촉을 통하여 활성화됨으로써, 치주염의 염증반응을 강화시키고, 치조골과 치아를 유지하는 결체조직의 파괴를 대식세포와 더불어 더욱 증폭시키는데 기여하는 것으로 사료된다.

V. 결론

만성치주병소에서 백혈구를 동원하는데 결체조직 섬유아세포가 관계하며, 백혈구와 섬유아세포의 부착단백질을 매개로한 세포간 접촉으로 상호 세포활성화가 유발된다고 알려져있다. 만성치주병소에서 조직손상에 주된 역할을 하는 단핵구/대식세포가 염증병소로 동원되는데 있어 치주 섬유아세포의 역할과 세포접촉에 의한 섬유아세포 활성화 여부를 밝힘으로써, 면역반응에 의한 만성치주염의 조직손상기전을 규명하고자 하였다. HGF(치은섬유아세포), PDLF(치주인대섬유아세포), 및 HDF(피부섬유아세포)와 고정한 단핵구세포주 THP-1, U937을 함께 배양하여 세포간 접촉으로 분비되는 섬유아세포의 IL-6를 ELISA로 측정하였고, TNF-α mRNA 발현을 Northern blot으로 관찰하였으며, 섬유아세포의 성장속도를 비교하기 위하여 동시배양 후 세포수를 측정 비교하였다. 또 이러한 세포간 접촉에 ICAM-1/LFA-1 경로가 관여하는지 밝히기 위하여, cytokine에 의한 HGF, PDLF의 ICAM-1 발현을 Flow cytometry로 관찰하고, anti-ICAM-1 단일클론항체를 사용하여 섬유아세포-단핵구의 세포간 접촉에 의한 IL-6 분비 억제능을 측정, 비교하여 다음의 결과를 얻었다.

1. 섬유아세포 단독배양시의 기저선 IL-6 분비량은 PDLF가 0.076ng/㎖, HGF가 6.90ng/㎖, HDF가 3.20ng/㎖이었다.
2. IFN-γ, 또는 IL-1β 처리시 기저선 IL-6 분비량이 PDLF는 각각 2, 6배 증가되었으며 HGF는 1.5, 2배, HDF는 1.2, 2.5배가 각각 증가되었다.
3. PDLF, HGF, 및 HDF 모두 단핵구와의 동시배양에 의하여 섬유아세포의 IL-6 분비가 증가되었고, 단핵구를 LPS 로, 섬유아세포를 IFN-γ, 또는 IL-1β로 배양전에 전처치하였을 경우에는 IL-6 분비량이 더욱 증가되는 양상을 띄었다.
4. HGF 단독배양시에는 TNF-α mRNA의 발현이 없었으나, THP-1, 또는

U937과 동시배양하였을 때는 K562 동시 배양의 경우와 유사한 정도의 TNF-α mRNA의 발현을 보였다.

5. 활성화된 단핵구와의 세포접촉으로 인하여 PDLF, HGF의 세포성장속도가 통계적으로 유의하게 증가되었다.
6. IFN-γ, IL-1β 처리로 PDLF, HGF, HDF에서 ICAM-1 부착단백질의 발현이 10배 가량 증가되었다.
7. 단핵구와의 세포접촉으로 인한 PDLF의 IL-6 분비가 ICAM-1 부착단백질의 차단에 의하여 약 40% 억제되었다.

이상의 결과로부터, 치주 결체조직의 섬유아세포는 만성치주염의 조직파괴에 주된 역할을 하는 단핵구/대식세포를 염증부위로 동원하고 활성화시키는 역할을 할 뿐 아니라, 섬유아세포가 수용성인자나 세포간 접촉을 통하여 활성화됨으로써, 치주염의 염증반응을 강화시키고, 치조골과 치아를 유지하는 결체조직의 파괴를 대식세포와 더불어 더욱 증폭시키는데 기여하는 것으로 사료된다.

VI. 참고문헌

1. Socransky, S.S., and Haffajee, A.D.: Microbial mechanisms in the pathogenesis of destructive periodontal diseases: A critical assessment. *J. Periodont. Res.* 26;195-212, 1991.
2. Williams, R.C.: Periodontal disease. *New Engl. J. Med.* 322;373-382, 1990.
3. Mackler, B.F., Frostad, K.B., Robertson, P.B., and Levy, B.M.: Immunoglobulin bearing lymphocytes and plasma cells in human periodontal disease. *J. Periodont. Res.* 12;37-45, 1977.
4. Okada, H., Kida, T., and Yamagami, H.: Identification and distribution of immunocompetent cells in inflamed gingiva of human chronic periodontitis. *Infect. Immun.* 41;365-374, 1983.
5. Seymour, G.J., and Greenspan, J.S.: The phenotype characterization of lymphocyte subpopulations in established human periodontal disease. *J. Periodont. Res.* 14;39-46, 1979.
6. Ito, H., Harada, Y., Matsuo, T., Ebisu, S., and Okada, H.: Possible role of T cells in the establishment of IgG plasma cell-rich periodontal lesion. Augmentation of IgG synthesis in the polyclonal B cell activation response by autoreactive T cells. *J. Periodont. Res.* 23;39-45, 1988.
7. Okada, H., Ito, H., and Harada, Y.: T-cell requirement for establishment of the IgG-domain B-cell lesion in periodontitis. *J. Periodont. Res.* 22;187-189, 1987.
8. Okada, H., Kassai, Y., and Kida, T.: T lymphocyte subsets in the inflamed gingiva of human adult periodontitis. *J. Periodont. Res.* 19;593-598, 1984.
9. Lesley, J., Hyman, R., and Kincade, P.W.: CD44 and its interaction with extracellular matrix. *Adv. Immunol.* 54;271-335, 1993.
10. Murakami, S., Shimabukuro, Y., Miki, Y., *et al.*: Inducible binding of human lymphocytes to hyaluronate via CD44 does not require cytoskeleton association but does require new protein synthesis. *J. Immunol.* 152;467-477, 1994.
11. Miyake, K., Underhill, C.B., Lesley, J., and Kincade, P.W.: Hyaluronate can function as a cell adhesion molecule and

CD44 participates in hyaluronate recog - nition. *J. Exp. Med.* 172;69 - 75, 1990.

12. Takahashi, K., Takigawa, M., Takashiba, S., Nagai, A., Miyamoto, M., Kurihara, H., and Murayama, Y.: Role of cytokine in the induction of adhesion molecules on cultured human gingival fibroblasts. *J. Periodontol.* 65;230 - 235, 1994.
13. Yu, X.H., and Graves, D.T.: Fibroblasts, mononuclear phagocytes, and endothelial cells express monocyte chemoattractant protein - 1(MCP - 1) in inflamed human gingiva. *J. Periodontol.* 66;80 - 88, 1995.
14. Xiao, Y., Bunn, C.L., and Bartold, P.M.: Immunohistochemical demonstra - tion of the plasminogen activator system in human gingival tissues and gingival fibroblasts. *J. Periodont. Res.* 33;17 - 26, 1998.
15. Bartold, P., and Haynes, D.: Interleukin - 6 production by human gin - gival fibroblasts. *J. Periodont. Res.* 26;339 - 345, 1991.
16. Iribe, H., Koga, T., Kotani, S., Kusumoto, S., and Shiba, T.: Stimulating effect of MDP and its adjuvant - active analogues on guinea pig fibroblasts for the production of thymocyte - activating factor. *J. Exp. Med.* 157;2190 - 2195, 1983.
17. Larsen, C.G., Anderson, A.O., Oppenheim, J.J., and Matsushima, K.: Production of interleukin - 8 by human dermal fibroblasts and keratinocytes in response to interleukin - 1 or tumour necrosis factor. *Immunology.* 68;31 - 36, 1989.
18. Rose, G.G., Pinero, G.J., and O'Neill, P.A.: Human gingival fibroblast production of interferon. *J. Dent. Res.* 63;1369 - 1375, 1984.
19. Tamura, M., Tokuda, M., Nagaoka, S., and Takada, H.: Lipopolysaccharides of *Bacteroides(Porphyromonas) gingi - valis* induce interleukin - 8 gene expres - sion in human gingival fibroblast cul - tures. *Infect. Immun.* 60;4932 - 4937, 1992.
20. Takada, H., Mihara, J., Morisaki, I., and Hamada, S.: Induction of inter - leukin - 1 and - 6 in human gingival fibroblast cultures stimulated with Bacteroides lipopolysaccharides. *Infect. Immun.* 59;295 - 301, 1991.
21. Page, R.C.: The role inflammatory mediators in the pathogenesis of peri - odontal disease. *J. Periodont. Res.* 26;230 - 242, 1991.
22. Newton, R.C., and Covington, M.: The activation of human fibroblast prostaglandin E production by interleukin 1. *Cell Immunol.* 110;338 - 349, 1987.
23. Schmidt, J.A., Mizel, S.B., Cohen, D., and Green, I.: Interleukin 1, a poten - tial regulator of fibroblastproliferation. *J. Immunol.* 128;2177 - 2182, 1982.
24. Le, J., and Vilcek, J.: Accessory function of human fibroblasts in mito - gen - stimulated interferon - γ production by T lymphocytes. Inhibition by inter - leukin 1 and tumor necrosis factor. *J. Immunol.* 139;3330 - 3337, 1987.
25. Crawford, J.M., and Hopp, B.: Junctional epithelium expresses the intercellular adhesion molecule ICAM - 1. *J. Periodont. Res.* 25;254 - 257, 1990.

26. Dustin, M.L., Rothlein, R., Bhan, A.K., Dinarello, C.A., and Springer, **T.A.:** Induction by IL - 1 and interferon - γ tis - sue distribution, biochemistry, and func - tion of a natural adherence molecule(ICAM - 1). *J. Immunol.* 137;245 - 254, 1986.
27. Haynes, B.F., Grover, B.J., Whichard, L.P., *et al.:* Synovial microen - vironment - T cell interactions: Human T cells bind to fibroblast - like synovial cells *in vitro. Arthritis Rheum.* 31;947 - 955, 1988.
28. Diamond, M.S., Staunton, D.E., de Fougerolles, A.R., *et al.:* ICAM - 1(CD54): a counter - receptor for Mac - 1(CD11b/CD18). *J. Cell Biol.* 111;3129 - 3139, 1990.

29. Murakami, S., Shimabukuro, Y., Saho, T., Hino, E., Kasai, D., Hashikawa, T., Hirano, H., and Okada, H.: Immunoregulatory roles of adhesive interactions between lymphocytes and gingival fibroblasts. *J. Periodont. Res.* 32;110 - 114, 1997.
30. Sempowski, G.D., Chess, P.R., Moretti, A.J., Padilla, J., Phipps, R.P., and Blieden, T.M.: CD40 mediated activation of gingival and periodontal ligament fibroblasts. *J. Periodontol.* 68;284 - 292, 1997.
31. Shimabukuro, Y., Murakami, S., and Okada, H.: Antigen - presenting - cell function of interferon γ - treated human gingival fibroblasts. *J. Periodont. Res.* 31;217 - 228, 1996.
32. Butcher, E.C.: Leukocyte - endothelial cell recognition: three(or more) steps to specificity and diversity. *Cell* 67;1033 - 1036, 1991.
33. Hynes, R.O.: Integrin: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 69;11 - 25, 1992.
34. Bevilacqua, M.P., Stengelin, S., Gimbrone, M.J., and Seed, B.: Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regula - tory proteins and lectins. *Science* 243;1160 - 1165, 1989.
35. Carlos, T.M., Schwartz, B.R., Kovach, N.L., Yee, E., Rosso, M., Osborn, L., Chi - Rosso, R.G., Newman, B., Lobb, R., and Harlan, J.M.: Vascular cell adhesion molecule - 1 mediates lymphocyte adherence to cytokine - activated cultured human endothelial cells. *Blood* 76;965 - 970, 1990.
36. Mulligan, M.S., Varani, J., Dame, M.K., Lane, C.L., Smith, C.W., Anderson, D.C., and Ward, P.A.: Role of endothelial adhesion molecule 1(ELAM - 1) in neutrophil - mediated lung injury in rats. *J. Clin. Invest.* 88;1396 - 1406, 1991.
37. Munro, J.M., Pober, J.S., and Cotran, R.S.**:** Recruitment of neutrophils in the local endotoxin response: association with *de novo* endothelial expression of endothelial leuko - cyte adhesion molecule - 1. *Lab. Invest.* 64;295 - 299, 1991.
38. Osborn, L., Hession, C., Tizard, R., Vassallo, C., Luhowskyj, S., Chi - Rosso, G., and Lobb, R.: Direct expression cloning of vascular cell adhesion molecule 1, a cytokine - induced endothelial protein that binds to lymphocytes. *Cell* 59;1203 - 1211, 1989.
39. Pober, J., Gimbrone, M.A.J., Lapierre, L.A., Mendrick, D.L., Fiers, W., Rothlein, R., and Springer, T.A.: Overlapping patterns of activation of human endothelial cells by inter - leukin 1, tumor necrosis factor, and immune interferon. *J. Immunol.* 137;1893 - 1896, 1986.
40. Springer, T.A.: Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigra - tion: the multistep paradigm. *Cell* 76;301 - 314, 1994.
41. Hayashi, J., Saito, I., Ishikawa, I., and Miyasaka, N.: Effects of cytokine and peri - odontopathic bacteria on the leukocyte function - associated antigen 1/intercellular adhe - sion molecule 1 pathway in gingival fibroblasts in adult periodontitis. *Infect. Immun.* 62;5205 - 5212, 1994.
42. Hayashi, J., Masaka, T., Saito, I., and Ishikawa, I.: Soluble CD14 mediates

lipopolysaccharide - induced intercellular adhesion molecule 1 expression in cul - tured human gingival fibroblasts. *Infect. Immun.* 64;4946 - 4951, 1996.

43. Crawford, J.M.: Distribution of ICAM - 1, LFA - 3, and HLA - DR in healthy and diseased gingival tissues. *J. Periodont. Res.* 27;291 - 298, 1992.
44. Gemmell, E., Walsh, L.J., Savage, N.W., and Seymour, G.J.: Adhesion mol - ecule expression in chronic inflammato - ry periodontal disease tissue. *J. Periodont. Res.* 29;46 - 53, 1994.
45. Takeuchi, Y., Sakurai, K., Ike, I., Yoshie, H., Kawasaki, K., and Hara, K.: ICAM - 1 - expressing pocket epithelium, LFA - 1 - expressing T cells in gingival tissue and gingival crevicular fluid as features characterizing inflammatory cell invasion and exudation in adult peri - odontitis. *J. Periodont. Res.* 30;426 - 435, 1995.
46. Matsuki, Y., Yamamoto, T., and Hara, K.: Interleukin - 1 mRNA expressing macrophages in human chronically inflamed gingival tissues. *Am. J. Pathol.* 138;1299 - 1305, 1991.
47. Butcher, E.C.: Overview: cell adhesion receptors in the immune sys - tem. In *Weir's Handbook of Experimental Immunology*, 5th ed. Blackwell Science, 67.1 - 67.7, 1996.
48. McCulloch, C.A.G., and Bordin, S.**:** Role of fibroblast subpopulations in periodontal physiology and pathology. *J. Periodont. Res.* 26;144 - 154, 1991.
49. Fries, K.M., Sempowski, G.D., Gaspari, A.A., Blieden, T., Looney, R.J., and Phipps, R.P.: CD40 expression by human fibroblasts. *Clin. Immunol. Immunop.* 77;42 - 51, 1995.
50. Foy, T.M., Durie, F.H., and Noelle, R.J.: The expansive role of CD40 and its ligand, gp39, in immunity. *Seminars Immunol.* 6;259 - 266, 1994.
51. Guillot, J.L., Pollock, S.M., and Johnson, R.B.: Gingival IL - 6 concentra - tion following phage I therapy. *J. Periodontol.* 66;667 - 672, 1995.
52. Frei, K., Leist, T.P., Meager, A., et al.: Production of B - cell stimulatory factor - 2 and interferon gamma in the central nervous system during viral meningitis and encephalitis. Evaluation in a murine model infection and in patients. *J. Exp. Med.* 168;449 - 453, 1988.
53. Helfgott, D.C., Tatter, S.B., Santhanam, U., et al.: Multiple forms of IFN - b2/IL - 6 in serum and body fluids during acute bacterial infection. *J. Immunol.* 142;948 - 953, 1989.
54. Murakami, S., Saho, T., Shimabukuro, Y., Isoda, R., Miki, Y., and Okada, H.: Very late antigen integrins are involved in the adhesive interaction of lymphoid cells to human gingival fibroblasts. *Immunology* 79;425 - 433, 1993.
55. Piela, T.H., and Korn, J.H.: ICAM - 1 - dependent fibroblast - lymphocyte adhesion: discordance between surface expression and function of ICAM - 1. *Cell. Immunol.* 129;125, 1990.
56. van Dinther - Janssen, A.C.H.M., Horst, E., Koopman, G., Newmann, W., Scheper, R.J., Meijer, C.J., and Pals, S.T.**:** The VLA - 4/VCAM - 1 pathway is involved in lymphocyte adhesion to

endothelium in rheumatoid synovium. *J. Immunol.* 147;4207 - 4210, 1991.

- Abstract -

Effects of Direct Cell Contact Between Monocytes and Fibroblasts on the Inter - leukin - 6 Production and Cell Proliferation of Human Gingival and Peri - odontal Ligament Fibroblasts

Soo - Ah Kim, Ho Lee, Kwi - Ok Oh*, Hyung - Seop Kim
Department of Periodontology and Research Institute of Oral Bio - science, College of Dentistry, Chonbuk National University
Institute of Dentistry, College of Dentistry, Seoul National University

In order to reveal immunopathogenesis of periodontal tissue destruction, it is impor - tant to clarify the molecular mechanism of trafficking and retention of activated leuko - cytes, including monocytes/macrophages. Gingival fibroblasts may be involved in the regulation of inflammatory cell accumulation in the extravascular periodontal connective tissues via cytokine production and surface expression of adhesion molecules. In this study, it was investigated the molecular basis for the adhesive interactions between monocytes and fibroblasts such as peri - odontal ligament fibroblast(PDLF), human gingival fibroblast(HGF), and human dermal fibroblast(HDF). First, it was examined the evidence whether monocyte - fibroblast cell contact may cause signal transduction in fibroblasts. Being directly in contact with fixed human monocyte cell line THP - 1, or U937, upregulation of IL - 6 production, TNF - α mRNA expression and increased cell proliferation could be seen for fibrob - lasts. IL - 6 production induced by mono - cyte - fibroblast coculture were further increased when fibroblasts had been pre - treated with IFN - γ or IL - 1β, and mono - cytes with LPS. Next, it was examined the expression of ICAM - 1 which has been known to be involved in accumulation and activation of leukocytes in inflammatory diseases such as periodontitis. ICAM - 1 was upregulated up to 10 - fold on PDLF, HGF, and HDF by exposure to IFN - γ or IL - 1β. Furthermore, anti - ICAM - 1 mono - clonal antibody clearly blocked coculture - induced IL - 6 production by fibroblasts, suggesting that ICAM - 1/β_2 integrin path - way is involved in periodontal fibroblast - monocyte interaction. Overall, these find - ings provide evidence that periodontal fibroblasts could be involved in the accu - mulation and retention of monocytes/macrophages in periodontal inflammatory lesion at least in part by ICAM - 1 expression. In addition, periodon - tal fibroblast - monocyte interaction could cause activation signals in fibroblasts intra - cellularly which result in cytokine produc - tion and cell proliferation. Thus, periodontal fibroblasts are speculated to play an impor - tant role in immunoregulation and tissue

destruction in chronic periodontal diseases by interaction with monocytes/macrophages.