

## PPAR $\gamma$ Inhibits Inflammation through the Suppression of ERK1/2 Kinase Activity in Human Gingival Fibroblasts

Young-Hee Lee, Dong-Hoon Kwak, Min-Soo Kang, Govinda Bhattarai, Nan-Hee Lee, Eun-Chung Jhee, and Ho-Keun Yi\*

Department of Oral Biochemistry, School of Dentistry and Institute of Oral Bioscience, BK21 Program, Chonbuk National University

(received February 23, 2010 ; revised March 18, 2010 ; accepted March 19, 2010)

Periodontal disease is a major oral disorder and comprises a group of infections that lead to inflammation of the gingiva and the destruction of periodontal tissues. PPAR $\gamma$  plays an important role in the regulation of several metabolic pathways and has recently been implicated in inflammatory response pathways. However, its effects on periodontal inflammation have yet to be clarified. In our current study, we evaluated the anti-inflammatory effects of PPAR $\gamma$  on periodontal disease. Human gingival fibroblasts (HGFs) treated with lipopolysaccharide (LPS) showed high levels of intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), and -9 (MMP-9). Moreover, these cells also showed upregulated activities for extracellular signal regulated kinase (ERK1/2), inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2. However, cells treated with Ad/PPAR $\gamma$  and rosiglitazone in same culture system showed reduced ICAM-1, VCAM-1, MMP-2, -9 and COX-2. Finally, the anti-inflammatory effects of PPAR $\gamma$  appear to be mediated via the suppression of the ERK1/2 pathway and consequent inhibition of NF- $\kappa$ B translocation. Our present findings thus suggest that PPAR $\gamma$  indeed has a pivotal role in gingival inflammation and may be a putative molecular target for future therapeutic strategies to control chronic periodontal disease.

**Key words:** human gingival fibroblasts, PPAR $\gamma$ , periodontal inflammation, ERK1/2, iNOS

\*Corresponding author: Ho-Keun Yi, Ph.D., Department of Biochemistry, School of Dentistry, Chonbuk National University 634-18, Geumam-dong, Deokjin-gu Jeonju, Jeonbuk, 561-712, Korea. Tel: 82-63-270-4033, Fax: 82-63-270-4033  
E-mail: yihokn@chonbuk.ac.kr

### 서론

치주조직은 경조직과 연조직으로 이루어진 복잡하고 고도로 특정화된 기관이다. 치주질환의 대부분은 그람-음성 혐기성 세균 등의 감염에 의해 발생하는 감염성 질환이다(Costerton *et al.*, 1999). 치주질환의 특징은 치주조직 내의 염증과 치은염이 동반되어 치주부착소실과 치조골의 파괴로 이어지며 궁극적으로 치아를 상실시킬 수도 있다(Salvi *et al.*, 2005). 치주질환을 유도하는 물질 중 그람-음성세균의 독소에서 유래된 lipopolysaccharide(LPS)는 대식세포를 자극시켜 nitric oxide(NO)와 같은 염증성 사이토카인 등의 면역관련 매개체를 활성화시키며, mitogen-activated protein kinases(MAPKs)의 신호체계 중에 특별히 extracellular signal-related kinase(ERK1/2)의 활성을 유도시킨다(Feng *et al.*, 1999). 특히 LPS는 숙주세포를 파괴하는 생물학적 효과를 가지는 것으로 보고되었고 세균이 가지는 생물학적 특징의 대부분이 LPS와 관련이 있는 것으로 나타났다(Brandenburg *et al.*, 2003). 초기염증반응에서 이러한 유독성물질을 억제하는 것은 치주염 치료에 중요한 문제이다.

Peroxisome proliferator-activated receptors(PPARs)는 핵내에 존재하는 호르몬 수용체로 PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta/\delta$ , PPAR $\gamma$ 의 3개의 이성체가 밝혀져 있으며, 이들은 서로 다른 유전자를 발현시키지만 이미노산의 구성, 리간드, 결합형태 및 DNA 결합영역은 서로 유사하다(Robinson-Rechavi *et al.*, 2001; Schoonjans *et al.*, 1996). 지방세포에 특이적 발현을 보이는 PPAR $\gamma$ 의 주요 기능은 지방대사, 당대사, 지방세포의 분화를 조절한다. 이러한 기능으로 인하여 PPAR $\gamma$ 는 2형 당뇨병, 고지혈증(dyslipidaemia), 염증성 질환, 고혈압 등과 관련되어 치료적 분자로 많은 관심을 받고 있다. PPAR $\gamma$ 의 항염증성 반응으로 세균 LPS

에 의해 자극된 대식세포에서 IL-6와 TNF- $\alpha$ 의 분비를 억제시키는 것으로 알려져 있다(Jiang *et al.*, 1998). PPAR $\gamma$ 의 분자치료의 예로 rosiglitazone, pioglitazone, LY171.833 등이 2형 당뇨병의 치료에 적용되고 있다(Cho *et al.*, 2008). 구강세포인 치주세포에서 PPAR $\gamma$ 는 염증성물질인 MMP-2와 -9 그리고 세포접착인자의 발현을 억제시키는 항염증작용이 알려져 있다(Yu *et al.*, 2009).

치주염 치료의 궁극적인 목적은 가능한 한 많은 치아를 보존시키면서 질환의 재발을 방지하고 치주조직의 파괴를 늦추거나 정제시키는데 있다. 치주질환 치료제로 비스테로이드성 소염제나 항생제 요법 등이 다뤄지고 있으나, 이들 약물은 치주부위까지 고용량의 약물 투여로 인한 위궤양과 항생제에 대한 숙주 내성 증가와 저항균의 발생 등의 부작용이 보고되었다(Salvi *et al.*, 2005). 치주염의 약물치료에 대한 연구는 구강세균과 염증기전이 밝혀지면서 항생제, 항균제 및 항염증성제 등이 다양하게 진행되고 있다. 아직까지 치주염증질환에 대한 PPAR $\gamma$ 는 보고되지 않았다. 이 연구에서는 PPAR $\gamma$ 의 치주염증효과와 PPAR $\gamma$ 의 리간드이며 당뇨치료제인 rosiglitazone의 치주염증질환에 대한 효과를 검토하였다. 이는 PPAR $\gamma$ 가 구강염증질환치료제로 기능을 가지며, 아울러 당뇨합병증인 만성염증질환과 구강염증질환을 연계시켜 치주질환에 PPAR $\gamma$ 의 적용을 위한 기초적 연구를 목적으로 하였다.

## 실험 방법

### 인체 치은섬유아세포의 배양

전북대학교 병원에 내원한 건강한 25세 이전 환자의 각각 발거 될 소구치의 치은유두로부터 서 등(1991)의 방법으로 치은 섬유아세포를 분리, 37°C, 95% 습도, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다. 배양된 세포가 밀생 상태에 이르면 1:3으로 계대 배양한 후 3-7세대 사이의 세포를 시험에 사용하였다. 세포 배양액은 DMEM(Life Technologies, Grand Island, NY, USA) 배지에 56°C에서 30분간 가열하여 비활성화 시킨 우태아 혈청(FBS, Hyclone, Logan, Utah, USA)을 10%, penicillin(100 unit/ml)과 streptomycin (100  $\mu$ g/ml) 및 glutamine(300  $\mu$ g/ml)을 첨가하여 조제하였다.

### 복제 결합 PPAR $\gamma$ 아데노바이러스(Ad/PPAR $\gamma$ ) 제작

PPAR $\gamma$ 의 제작 및 활성화 등은 Yu 등의 방법에 준하여 실시하였다(Yu *et al.*, 2009). 간단히 Ad/PPAR $\gamma$ 의 제작은 Quantum Biotechnologies(Maisonneuve West, Montreal, Canada)의 AdEasy Vector System을 이용하였다. PPAR $\gamma$  유전자를 전달 벡터에 재조합 시키고, 재조합된 plasmid를 pAdEasy-1 vector와 대장균 BJ5183에서 동형재조합을

시켰다. 재조합 PPAR $\gamma$  벡터는 대장균 DH5 $\alpha$ 에 형질 전환시켜 안정된 PPAR $\gamma$  아데노바이러스 벡터를 대량 정제하였으며, Pac I으로 linearizing을 시킨 후, lipofectin transfection(Invitrogen, Gaithersburg, MD, USA) 방법으로 QBI293A(human embryonic kidney) 세포에 transfection 시켜 재조합 바이러스를 제작하였다. QBI293A 세포의 배양은 MEM(minimum essential medium, Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA) 배양액에서 통상적인 배양방법으로 배양하였고, 유전자 도입 2-3 주일 후 아데노바이러스가 생성된 배양 용기로부터 바이러스를 분리하였다. 분리된 바이러스로부터 PPAR $\gamma$  유전자의 확인은 위와 동일하게 제한효소를 이용하였고, 확인된 바이러스를 QBI293A에 재감염 시켜 double CsCl gradient 방법으로 다량의 바이러스를 정제하였다. 이후 바이러스의 보관은 10% glycerol이 함유된 dialysis buffer(10 mM Tris-HCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>)와 함께 -80°C에 저장하였다. 실험에는 대조 바이러스로 대장균의  $\beta$ -galactosidase(Ad/LacZ) 유전자를 이상과 동일하게 제작하여 사용하였고, 실험 세포 주에서의 바이러스의 감염과 유전자의 발현 여부를 대조 바이러스로 확인하였다.

정제된 바이러스의 생물학적 활성은 plaque forming unit(PFU/ml)를 측정하여 실험 세포주에 일정수의 바이러스를 감염시켰다. QBI293A 세포 3  $\times$  10<sup>5</sup>개를 60 mm 배양용기에 하룻밤 배양시키고 정제 후 희석된 바이러스 1 ml와 1.25% SeaPlaque agarose(FMC, Rockland, Maine USA) 1 ml(42°C)를 서서히 섞은 후 세포 위에 부었다. 통상적으로 2주일 전후하여 나타나는 plaque의 숫자를 세어 PFU를 계산하였다.

치은 섬유아세포에 바이러스를 10, 50, 100 MOI (multiplicity of infection, number of active virus particle/cell number)로 감염시켰으며, 감염은 우태아 혈청이 함유되지 않는 배양액에 5분 간격으로 흔들어주면서 37°C에서 3시간 시켰다.

### LPS처리와 Ad/PPAR $\gamma$ 감염 및 Rosiglitazone 처리

치은 섬유아세포의 염증반응은 E. coli 0111로부터 폐놀 추출로 정제한 LPS(Sigma, St Louis, MO, USA)를 증류수에 녹여 사용하였다. 3에서 7세대 사이의 치은 섬유아세포를 3  $\times$  10<sup>6</sup>개를 100 mm 배양용기에 초기 배양시키고, 18 시간 동안 0.5% FBS 배양 후에 LPS 처리에 의해 유도되는 염증반응을 관찰하였다. Ad/PPAR $\gamma$  바이러스 감염은 위와 동일하게 치은섬유세포를 초기 배양시키고 다음 날 100 MOI를 감염시켰다. 감염 48시간 후에 LPS처리에 의한 PPAR $\gamma$ 의 효과를 관찰하였으며, rosiglitazone 처리에 의한 효과와 ERK1/2의 특이적 활성을 억제시키기 위한 저해제로 PD98059(P215, Sigma, St Louis, MO, USA)을 LPS 처리 1시간 전에 처리하여 실험하였다.

## Western hybridization

### i) Total 단백질 추출

치은 섬유아세포에 LPS 처리 혹은 Ad/PPAR $\gamma$ 를 감염시키고 주어진 시간 후 세포로부터 총 단백질을 분리하였다. 세포를 2-3회 차가운 PBS로 세척 후 100 mm 배양용기에 1 ml의 PBS-TDS(PBS, 1% Triton X-100, 0.05% sodium deoxycholate, 0.01% SDS, 0.5  $\mu$ g/ml leupeptin, 1 mM EDTA, 1  $\mu$ g/ml pepstatin, 0.2 mM PMSF) 용액을 첨가, 15분간 얼음 위에서 방치 후 수확한 후 12,000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 세포막 성분 등을 제거하였으며, 단백질 농도는 bovine serum albumin(BSA)을 표준화하여 Bio-Rad Protein Assay Kit(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 사용하여 정량하였다.

### ii) 세포기질과 핵 단백질 추출

i항과 같은 방법으로 처리한 세포에서 세포기질 및 핵 단백질을 분리하기 위하여 다음과 같은 방법을 이용하였다. 세포는 2-3회 차가운 PBS로 세척한 후 100 mm 배양용기에 100  $\mu$ l의 Buffer A(10 mM HEPES pH 7.9, 10 mM potassium chloride, 2 mM magnesium chloride, 1 mM EDTA, 0.5  $\mu$ g/ml leupeptin, 1  $\mu$ g/ml pepstatin, 0.2 mM PMSF) 용액을 첨가하였다. Scraper를 이용하여 세포를 수확한 후 얼음 위에서 10분간 반응시켰다. 20,000  $\times$  g로 10분간 원심 분리하여 상층액은 cytosol 단백질로 사용하였고, pellet에는 1 ml buffer A를 이용하여 washing 한 후 100  $\mu$ l의 Buffer B(20 mM HEPES pH 7.9, 25%, glycerol, 420 mM sodium chloride, 2 mM magnesium chloride, 0.2 mM EDTA, 1 mM DTT 0.5  $\mu$ g/ml leupeptin, 1  $\mu$ g/ml pepstatin, 0.2 mM PMSF) 용액을 첨가하였다. 15분간 얼음 위에서 방치 후 20,000  $\times$  g에서 10분간 원심 분리하여 상층액을 nuclear 단백질로 이용하였다.

### iii) Western hybridization

위의 방법으로 분리한 20  $\mu$ g의 lysate를 8% mini gel(Bio-Rad, Hercules, CA, USA) SDS-PAGE(polyacrylamide gel electrophoresis)로 변성 분리하였고, 이를 nitrocellulose membrane(Hybond-C, Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA)에 80 V로 2시간 동안 전기적으로 이동시켰다. Membrane의 blocking은 5% skim milk가 함유된 TBS-T(TBS, 0.1% Tween 20) 용액으로 상온에서 1시간 동안 실시하였다. Phospho-ERK1/2를 비롯하여 아래에 열거한 단백질의 발현을 측정하기 위한 1차 항체를 1: 1,000으로 TBS 용액에 희석하여 상온에서 4시간 반응시킨 후 TBS-T로 3회 세정하였다. 2차 항체로는 horse radish peroxidase(HRP)가 결합된 anti-mouse IgG 혹은 anti-rabbit IgG(Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA)를 1: 5,000으로 희석하여 상온에서 1시간 반응하

였다. TBS로 3회 세정 후 ECL 기질(Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA)과 30-60초간 반응 후 X-Ray 필름에 감광시켰다.

이 실험에는 PPAR $\gamma$ (sc-7273, Santa Cruz, CA, USA), ICAM-1(sc-8439, Santa Cruz, CA, USA), VCAM-1(sc-8304, Santa Cruz, CA, USA), MMP-2(MAB3308, Millipore, Billerica, MA, USA), MMP-9(AB19016, Millipore, Billerica, MA, USA), p-EKR(#4377, Cell Signaling, Beverly, MA, USA), iNOS(sc-8310, Santa Cruz, CA, USA), COX-2(#4842, Cell Signaling, Beverly, MA, USA), NF- $\kappa$ B(sc-109, Santa Cruz, CA, USA). actin(A-2066, Sigma, St. Louis, MO, USA)를 사용하였다.

## 결 과

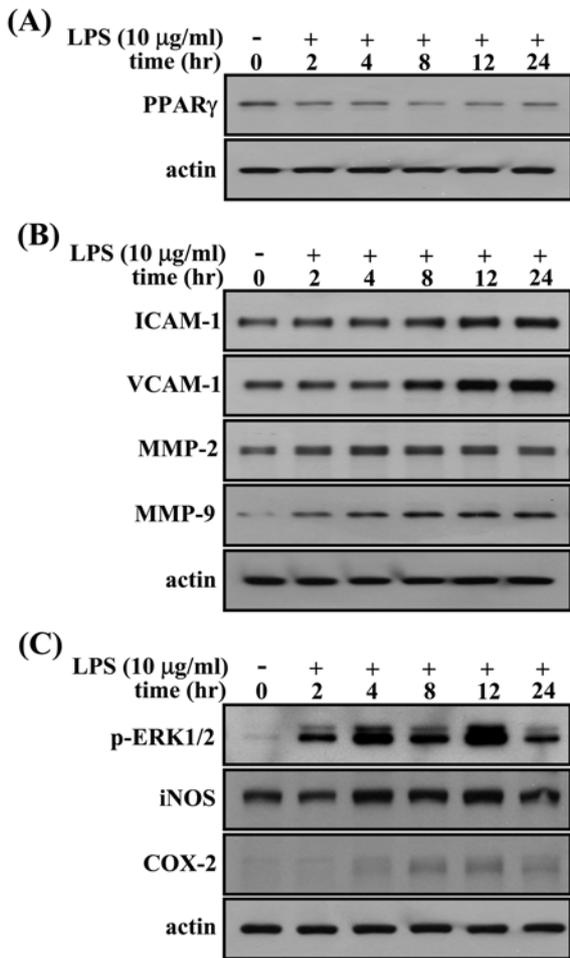
### 치은 섬유아세포에서 LPS에 의한 염증반응 유도

치은 섬유아세포에서 LPS(10  $\mu$ g/ml) 처리에 의한 PPAR $\gamma$ 의 발현 변화를 Western hybridization으로 검토하였다. 18시간 동안 무혈청 배양 세포는 LPS 처리 후 점차적 PPAR $\gamma$ 의 발현이 감소되었다(Fig. 1A). LPS 처리에 의한 염증반응으로 세포접착인자 ICAM-1과 VCAM-1의 발현과 MMP-2와 -9의 발현 변화를 검토하였다. LPS 자극 세포는 ICAM-1과 VCAM-1 그리고 MMP-2와 -9 발현이 초기 6시간이내로 유도되었으며, 이러한 현상은 24시간까지 지속적으로 발현증가가 나타났다(Fig. 1B).

LPS의 자극 세포의 신호전달 경로로서 MAPKs 중에 ERK1/2의 활성변화와 그리고 활성산소의 변화로 inducible nitric oxide(iNO)와 cyclooxygenase-2(COX-2)의 발현변화를 통하여 검토하였다. 치은 섬유아세포는 LPS 자극에 대하여 ERK1/2와 iNOS 그리고 COX-2의 발현이 4시간 이내로 유도되었으며 24시간까지 지속적으로 발현증가가 나타났다(Fig. 1C).

### PPAR $\gamma$ 의 치은 섬유아세포의 염증반응 억제

치은 섬유아세포가 염증반응에 미치는 PPAR $\gamma$ 와 agonist인 rosiglitazone의 효과를 검토하였다. LPS 처리 48시간 전에 Ad/PPAR $\gamma$ 를 감염시켜 치은 섬유아세포에 PPAR $\gamma$ 의 발현을 유도시켰다(Fig. 2A). LPS에 의해 유도되었던 ICAM-1, VCAM-1, MMP-2와 -9의 발현은 PPAR $\gamma$ 의 발현 유도 세포에서는 모두 억제되었으며, 이러한 현상은 rosiglitazone에 처리 세포에서도 동일하게 나타났다(Fig. 2B). 또한 PPAR $\gamma$  발현유도와 rosiglitazone을 동시에 처리한 세포는 이들 발현억제가 더욱 현저하게 억제되었다. 이어서 LPS 유도로 활성화되는 ERK1/2, iNOS와 COX-2의 활성을 비교하였다. PPAR $\gamma$ 의 발현유도세포는 LPS 유도에 의한 이상의 활성화와 발현이 모두 억제되었다(Fig. 2B).



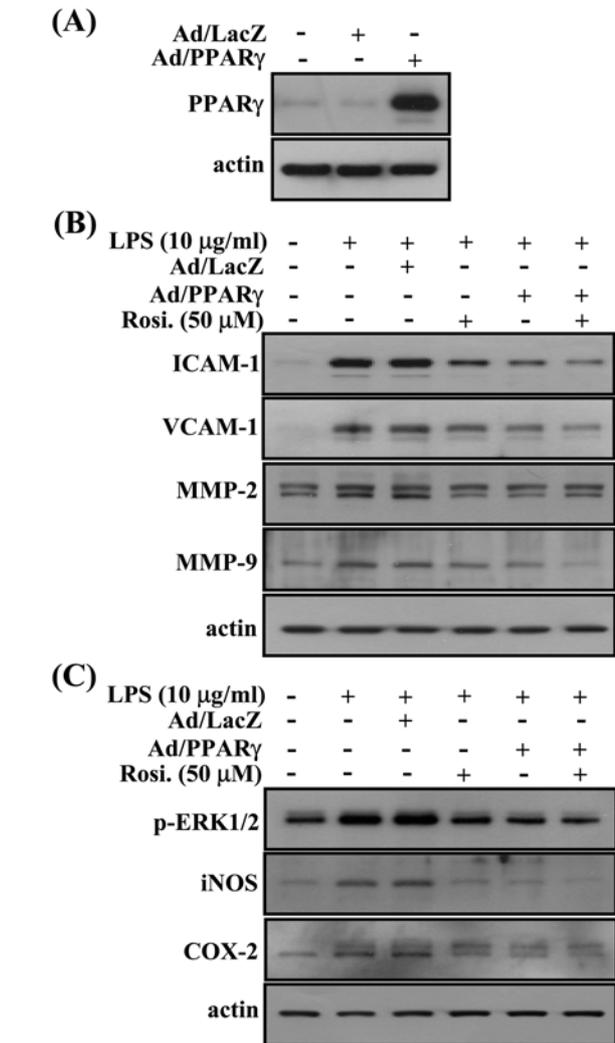
**Fig. 1.** Changes of inflammation related molecules in LPS induced human gingiva fibroblast cells. HGF cells were cultured in serum starvation for 18 h, and then the cells were treated with LPS (10  $\mu$ g/ml) at indicated time. The level of PPAR $\gamma$  expression (A), the levels of ICAM-1, VCAM-1 and MMP-2, -9 expressions (B) and the levels of p-ERK1/2, iNOS and COX-2 expression (C) were determined by Western hybridization.

**ERK1/2 신호활성 억제제를 이용한 PPAR $\gamma$ 의 항염증 작용**

치은 섬유아세포에서 PPAR $\gamma$ 의 염증억제기전이 ERK1/2를 통하여 나타내는지 확인하기 위하여 ERK1/2의 활성억제제인 PD98059를 처리하였다. ERK1/2의 활성억제제인 PD98059는 LPS 유도 치은 섬유아세포의 ERK1/2의 활성을 억제시켰으며(Fig. 3B), 이러한 활성억제는 PPAR $\gamma$ 의 발현과 동일하게 염증성물질의 발현을 모두 억제시켰다(Fig. 3A). 그밖에 ERK1/2 활성억제는 iNOS와 COX-2의 발현을 억제시켰다(Fig. 3B).

**PPAR $\gamma$ 에 의한 NF- $\kappa$ B의 핵내이동의 변화**

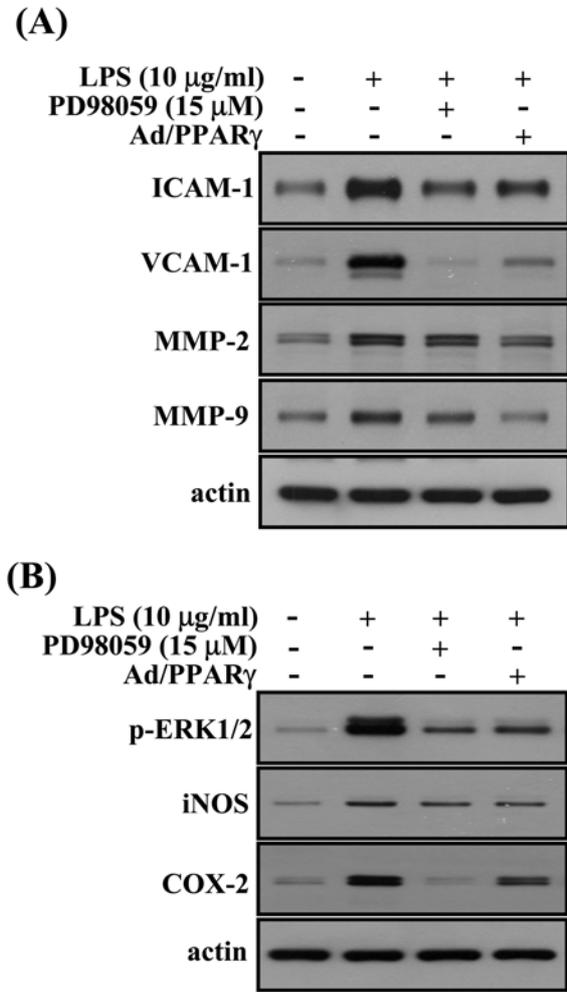
치은 섬유아세포에서 LPS 유도 염증반응으로 ERK1/2의 하부인자와 관련하여 NF- $\kappa$ B의 세포질에서 핵내로의 이동을 검토하였다. 치은 섬유아세포는 LPS 처리로 NF- $\kappa$ B의 핵내로 이동이 유도되었으나, PPAR $\gamma$ 의 발현세포 및 rosiglitazone이 처리된 세포는 핵내 이동이 억제되었다(Fig. 4A). 또한 ERK1/2 활성이 억제된 세포도 NF- $\kappa$ B의 핵내로의 이동이 억제되었다(Fig. 4B).



**Fig. 2.** Anti-inflammatory effect of PPAR $\gamma$  and rosiglitazone in LPS induced HGF cells. HGF cells were transfected with Ad/PPAR $\gamma$  virus at a dose of 100 MOI for 3 h, and allowed to grow under standard culture condition. After 24 h, the cells were cultured serum starvation for 18 h, and then treated with LPS (10  $\mu$ g/ml) for 12 h. The treatment of rosiglitazone was carried before LPS challenge 1 h for 12 h. The level of PPAR $\gamma$  expression (A), the levels of ICAM-1, VCAM-1, MMP-2 and -9 expressions (B) and the levels of p-ERK1/2, iNOS and COX-2 expression (C) were determined by Western hybridization at indicated times. The Ad/LacZ was used a control.

**고 찰**

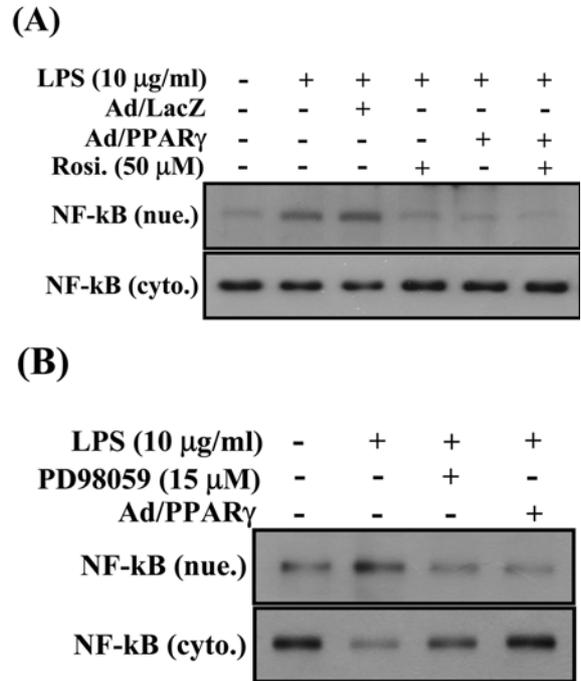
PPAR $\gamma$ 가 활성산소종과 염증반응을 억제시키는 것이 흥미를 나타내고 있다(Blanquart *et al.*, 2003). 치주질환을 치료하기 위한 목적으로 쓰이는 약제들은 미생물 생육억제인 항생제와 비스테로이드성 소염제로 국한되어 있으



**Fig. 3.** PPAR $\gamma$  decreases inflammatory molecules through ERK1/2 activation in HGF cells. HGF cells were transfected with Ad/PPAR $\gamma$  virus at a dose of 100 MOI for 3 h, and allowed to grow under standard culture condition. After 24 h, the cells were cultured serum starvation during 18 h, and then treated with LPS (10  $\mu$ g/ml) for 12 h. The treatment of PD98059 (ERK1/2 inhibitor) was carried before LPS challenge 1 h for 12 h. The levels of ICAM-1, VCAM-1, MMP-2 and -9 expressions (A) and the levels of p-ERK1/2, iNOS and COX-2 expression were determined by Western hybridization at indicated times.

며, 이들 약제들로 인한 전신적인 부작용이 예측된다. 치수세포에서 항염증작용을 억제 시키는 것으로 보고된(Yu *et al.*, 2009) PPAR $\gamma$ 를 치주질환의 치료에 적용하기 위하여 본 연구를 진행하였다.

치은 섬유아세포는 LPS 처리에 의해 PPAR $\gamma$ 의 발현은 감소되었으며, 반면 치수세포에서처럼 MMP-2, -9 그리고 세포접착인자인 ICAM-1, VCAM-1의 발현이 강하게 나타났다. 또한 ERK1/2와 iNOS 그리고 하부염증 분자인 COX-2의 발현이 점차 증가하여 강력한 활성을 나타냈다. 염증조직에서 높게 발현되는 ICAM-1, VCAM-1과 같은 세포접착인자는 초기 면역세포의 혈관내 유입을 촉진하게 되며, 이들의 발현증가는 염증반응을 만성염증 질



**Fig. 4.** PPAR $\gamma$  and PD98059 block NF-kB translocation from cytosol into nucleus in HGF cells. HGF cells were transfected with Ad/PPAR $\gamma$  at a dose of 100 MOI for 3 h, and allowed to grow under standard culture condition. After 24 h, the cells were cultured serum starvation for 18 h, and then treated with LPS (10  $\mu$ g/ml) for 12 h. The rosiglitazone and PD98059 (ERK1/2 inhibitor) were treated before LPS challenge 1 h for 12 h. The nuclear protein and cytosol protein were isolated for NF-kB translocation. The NF-kB translocation was followed and determined by PPAR $\gamma$  and rosiglitazone (A) and PD98059 (B).

환의 원인으로 작용한다(Min *et al.*, 2005). 치주조직의 파괴는 감염세균과 숙주간의 방어균형의 변형으로 유래되며, 미생물에 대한 숙주의 과도한 반응으로 유도된 염증세포에서 분비된 MMPs가 치주의 결합조직을 분해시키게 된다(Dongari-Bagtzoglou *et al.*, 1996; Ingman *et al.*, 1996). 구강내 NO는 타액선에서 생산되어 타액으로 분비되지만, 염증유발 감염미생물이 macrophage 등과 같은 면역세포를 자극시킴으로 구강조직의 NO 생산을 더욱 촉진시키는 것으로 알려져 있다(Ribeiro *et al.*, 1993; Zetterquist *et al.*, 1999). Sung 등(Sung *et al.*, 2004)은 PPAR $\gamma$ 는 LPS에 의한 염증반응이나 노화과정에서 발현이 감소하는 것으로 보고하였다. 이 연구 결과의 치은 섬유아세포에서도 LPS 처리로 PPAR $\gamma$ 의 발현이 감소되었으며, 이는 치주조직의 염증반응에 PPAR $\gamma$ 가 대부분의 조직과 동일하게 염증관여 작용을 나타내고 있음을 시사한다.

치주질환은 구강내의 여러 세균에 의한 복합 감염성 질환으로 치은염, 치주조직의 파괴 등의 주요원인이 되는 질환이다. 치주염이 있는 조직 부위에서는 정상 조직 부위보다 높은 농도의 MMPs의 활성과 높은 농도의 활성산소종이 나타난다. MMPs는 세포외기질의 분해에 관여하

며 질환이 유도되는 과정에서 분비가 촉진된다(Naito *et al.*, 2005). 활성화된 MMPs는 치주 조직의 중요한 구성 물인 교원질의 파괴인자로 작용하며, 이는 결합조직의 부착과 지지골의 상실을 초래시켜 치아손실의 원인이 된다(Birkedal-Hansen, 1993a; Birkedal-Hansen, 1993b; Genco, 1992). 염증질환과 관련하여 병리적인 반응으로 활성산소 종이 생산되며 특히 박테리아와 같은 미생물 감염에 의한 NO의 높은 합성과 활성은 염증관련 사이토카인을 자극시켜 더욱 높은 NO의 합성과 활성을 증가시키는 현상을 초래하게 된다(Zetterquist *et al.*, 1999). LPS는 면역 세포의 다양한 사이토카인의 자극원으로 알려져 있으며, 또한 NO 상승의 주요 원인이기도 하다(McDaniel *et al.*, 1996). 통증성 염증 매개체인 COX-2는 NO의 신호경로에 의해 활성화 된다(Salvemini *et al.*, 1994). 치주염증 질환에 있어서 NO의 높은 활성은 다양한 병리적인 요소를 제공하는 것뿐만 아니라 과도한 치석 축적의 요인이다(Rausch-Fan *et al.*, 2001). 이와 같이 치주질환은 다양한 염증반응 분자들의 활성과 작용으로 치주조직의 파괴 및 치조골의 흡수 등으로 치아가 상실되어지며, 이 과정에서 활성산소종은 숙주세포에 지속적인 반응을 가하여 치주질환을 만성 감염성 염증으로 이끌게 된다. 이 연구에서 LPS 처리로 염증반응이 나타난 치은 섬유아세포이지만 PPAR $\gamma$ 의 발현을 높게 유도시킨 결과 활성산소종의 생성을 유도시키는 iNOS의 발현이 억제되었으며 또한 COX-2의 활성이 억제되었다. 이러한 PPAR $\gamma$ 의 작용은 rosiglitazone 처리에서도 동일하게 나타났으며, 이는 PPAR $\gamma$ 가 치주의 만성염증질환억제에도 적용 가능성을 보일 것으로 추측된다. 또한 LPS 자극으로 인하여 활성화된 ERK1/2 경로가 PPAR $\gamma$ 와 rosiglitazone에 의해서 억제되었다. ERK1/2의 활성저해제인 PD98059 처리로 MMPs, 세포 접착인자, 활성산소종과 COX-2의 활성 모두를 억제시켰으며, 이 경로의 억제는 하부의 NF- $\kappa$ B까지 종합적으로 나타내었다. 이는 치주세포의 염증반응과 관련하여 ERK1/2가 주된 경로임을 알 수 있었으며, PPAR $\gamma$ 의 작용에 비추어 ERK1/2가 표적 경로임을 나타내고 있다. PPAR $\gamma$ 의 염증억제 작용은 활성산소의 생성을 억제시키며(Blanquart *et al.*, 2003), iNOS의 조절을 통한 COX-2의 발현 억제 능력을 갖는 것으로 보고되었다(Mendez *et al.*, 2003; Lin *et al.*, 2007). 특히 rosiglitazone은 ERK1/2를 통하여 활성산소의 생성을 억제시켜 산화스트레스로부터 세포를 보호하는 기전이 보고되었으며(Villegas *et al.*, 2004), 이 연구의 결과에서처럼 염증신호경로 및 활성산소의 생성억제 기능은 rosiglitazone이 당뇨병과 같은 대사성 질환 외에도 만성염증질환의 치료제로 적용 가능성이 예시된다.

치주세포의 LPS 유도 염증반응에서 PPAR $\gamma$ 와 길항제인 rosiglitazone이 ICAM-1, VCAM-1,와 MMP-2, -9을 억제시키며 염증억제 효과를 갖는 것으로 보고하였지만, PPAR $\gamma$ 의 항염증 작용이 갖는 기전과 경로는 제시되지 않

았다(Yu *et al.*, 2009). 이 연구에서는 치은 섬유아세포에서 PPAR $\gamma$ 가 치주세포와 동일하게 항염증작용 뿐만 아니라 MAPKs 중에 ERK1/2의 활성을 억제시키는 기전을 밝혔다. PPAR $\gamma$ 의 ERK1/2의 활성억제는 염증성분자의 발현억제와 특히 iNOS의 활성을 통하여 활성산소종의 생성을 억제시켜 치주염증질환의 강력한 염증억제 분자임을 확인 하였다. 이는 PPAR $\gamma$ 가 통상적인 치주질환에 적용하고 있는 미생물 생육억제와 같은 치료방법이 아닌 근본적으로 치주조직, 치은 그리고 치조골의 보호와 재생에 기반을 두는 분자적 치료에 유용할 것으로 생각된다.

### 참 고 문 헌

Birkedal-Hansen H.(a) The role of cytokine and inflammatory mediators in tissue destruction. *J Periodontol Res.* 1993; 28:500-10.

Birkedal-Hansen H.(b) The role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases. *J Periodontol.* 1993;64:474-84.

Blanquart C, Barbier O, Fruchart JC, Staels B, Glineur C. Peroxisome proliferator-activated receptors: regulation of transcriptional activities and roles in inflammation. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2003;85:267-73.

Brandenburg K, Andrä J, Müller M, Koch MH, Garidel P. Physicochemical properties of bacterial glycopolymers in relation to bioactivity. *Carbohydr Res.* 2003;14:2477-89.

Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science.* 1999;21: 1318-22.

Cho N, Momose Y. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists as insulin sensitizers: from the discovery to recent progress. *Curr Top Med Chem.* 2008;8:1483-507.

Dongari-Bagtzoglou AI, Ebersole JL. Production of inflammatory mediators and cytokines by human gingival fibroblasts following bacterial challenge. *J Periodont Res.* 1996;31:90-8.

Feng GJ, Goodridge HS, Harnett MM, Wei XQ, Nikolaev AV, Higson AP, Liew FY. Extracellular signal-related kinase (ERK) and p38 mitogen-activated protein (MAP) kinases differentially regulate the lipopolysaccharide-mediated induction of inducible nitric oxide synthase and IL-12 in macrophages: Leishmania phosphoglycans subvert macrophage IL-12 production by targeting ERK MAP kinase. *J Immunol.* 1999;15:6403-12.

Genco RJ. Host response in periodontal disease, current concept, mechanism of connective tissue matrix destruction in periodontitis. *J Periodontol.* 1992;63:338-55.

Ingman T, Tervahartiala T, Ding Y, Tscherche H, Haerian A, Kinane DF, Kontinen YT, Sorsa T. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in gingival crevicular fluid and saliva of periodontitis patients. *J Clin Periodontol.* 1996; 23:1127-32.

Jiang C, Ting AT, Seed B. PPAR $\gamma$  agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature.* 1998;391:79-82.

Lin TH, Yang RS, Tang CH, Lin CP, Fu WM. PPARgamma

- inhibits osteogenesis via the down-regulation of the expression of COX-2 and iNOS in rats. *Bone*. 2007; 41:562-74.
- McDaniel ML, Kwon G, Hill JR, Marshall CA, Corbett JA. Cytokines and nitric oxide in islet inflammation and diabetes. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1996;211:24-32.
- Mendez M, LaPointe MC. PPARgamma inhibition of cyclooxygenase-2, PGE2 synthase, and inducible nitric oxide synthase in cardiac myocytes. *Hypertension*. 2003;42: 844-50.
- Min JK, Kim YM, Kim SW, Kwon MC, Kong YY, Hwang IK, Won MH, Rho J, Kwon YG. TNF-related activation-induced cytokine enhances leukocyte adhesiveness: induction of ICAM-1 and VCAM-1 via TNF receptor-associated factor and protein kinase C-dependent NF-kappaB activation in endothelial cells. *J Immunol*. 2005;1:531-40.
- Naito Y, Yoshikawa T. Role of matrix metalloproteinases in inflammatory bowel disease. *Mol Aspects Med*. 2005;26: 379-90.
- Page RC. The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodont Res*. 1991;26: 230-42.
- Rausch-Fan X, Matejka M. From plaque formation to periodontal disease, is there a role for nitric oxide? *Eur J Clin Invest*. 2001;31:833-5.
- Ribeiro JM, Hazzard JM, Nussenzweig RH, Champagne DE, Walker FA. Reversible binding of nitric oxide by a salivary heme protein from a bloodsucking insect. *Science*. 1993;23: 539-41.
- Robinson-Rechavi M, Carpentier AS, Duffraisse M, Laudet V. How many nuclear-hormone receptors are there in the human genome? *Trends Genet* 2001;17:554-556.
- Schoonjans K, Staels B, Auwerx J. The peroxisome proliferator activated receptors (PPARS) and their effects on lipid metabolism and adipocyte differentiation. *Biochim Biophys Acta*. 1996;1302:93-109.
- Salvemini DK, Seibert JL, Masferrer TP, Misko MG, Currie NP. Endogenous nitric oxide enhances prostaglandin production in a model of renal inflammation. *Clin Invest*. 1994; 93:1940-47.
- Salvi GE, Lang NP. Host response modulation in the management of periodontal diseases. *J Clin Periodontol*. 2005;32: 108-29.
- Sung B, Park S, Yu BP, Chung HY. Modulation of PPAR in aging, inflammation, and calorie restriction. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2004;59:997-1006.
- Villegas I, Martín AR, Toma W, de la Lastra CA. Rosiglitazone, an agonist of peroxisome proliferator-activated receptor gamma, protects against gastric ischemia-reperfusion damage in rats: role of oxygen free radicals generation. *Eur J Pharmacol*. 2004;505:195-203.
- Yu MK, Lee JC, Kim JH, Lee YH, Jeon JG, Jhee EC, Yi HK. Anti-inflammatory effect of peroxisome proliferator activated receptor gamma on human dental pulp cells. *J Endod*. 2009; 35:524-528.
- Zetterquist W, Pedroletti C, Lundberg JO, Alving K. Salivary contribution to exhaled nitric oxide. *Eur Respir J*. 1999;13: 327-33.
- 서조영, 최재용, 유현모, 박준봉, 조준승. 치주인대세포와 치은섬유아세포의 성장에 관한 비교. 대한구강생물학회지. 1991;15:14-28.