

Activation of acetylcholine receptor elicits intracellular Ca²⁺ mobilization, transient cytotoxicity, and induction of RANKL expression

Seong-Jong Heo and Min Seuk Kim*

Department of Oral Physiology, and Institute of Biomaterial-Implant, School of Dentistry, Wonkwang University, Iksan 54538, Republic of Korea

(received June 27, 2016; revised July 12, 2016; accepted July 13, 2016)

Acetylcholine receptors (AChR) including muscarinic and nicotinic AChR are widely expressed and mediate a variety of physiological cellular responses in neuronal and non-neuronal cells. Notably, a functional cholinergic system exists in oral epithelial cells, and nicotinic AChR (nAChR) mediates cholinergic anti-inflammatory responses. However, the pathophysiological roles of AChR in periodontitis are unclear. Here, we show that activation of AChR elicits increased cytosolic Ca²⁺ ([Ca²⁺]_i), transient cytotoxicity, and induction of receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL) expression. Intracellular Ca²⁺ mobilization in human gingival fibroblast-1 (hGF-1) cells was measured using the fluorescent Ca²⁺ indicator, fura-2/AM. Cytotoxicity and induction of gene expression were evaluated by measuring the release of glucose-6-phosphate dehydrogenase and RT-PCR. Activation of AChR in hGF-1 cells by carbachol (Cch) induced [Ca²⁺]_i increase in a dose-dependent manner. Treatment with a high concentration of Cch on hGF-1 cells caused transient cytotoxicity. Notably, treatment of hGF-1 cells with Cch resulted in upregulated RANKL expression.

*Correspondence to: Min Seuk Kim, Department of Oral Physiology, and Institute of Biomaterial-Implant, School of Dentistry, Wonkwang University, Iksan 54538, Republic of Korea.
Tel: 82-63-850-6997
E-mail: happy1487@wku.ac.kr
ORCID : 0000-0003-0071-0830

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

The findings may indicate potential roles of AChR in gingival fibroblast cells in bone remodeling.

Key words: acetylcholine receptor, gingival fibroblast, intracellular Ca²⁺ mobilization, RANKL, Osteoprotegerin

서론

Acetylcholine (ACh)은 중추신경계 및 말초신경계에서 작용하는 신경전달물질로서, acetylcholine 수용체(AChR)를 활성화시킴으로써 다양한 세포활성을 매개한다 [1]. AChR는 크게 nicotinic AChR (nAChR)와 muscarinic AChR (mAChR) 두 종류로 나누어지며, 두 수용체는 신경세포는 물론, 비 신경세포에서 발현되는 것으로 알려져 있다 [2]. 흥미롭게도, 치은 keratinocyte 및 섬유아세포 내 ACh의 합성 및 분해를 담당하는 효소들이 존재하며, ACh의 분비는 주변 세포 간 autocrine 및 paracrine 방식의 상호작용 매개 가능성을 제기하였다 [3,4]. 구강상피세포 중 keratinocyte 세포에서 외부 nicotine에 의한 nAChR 활성화는 IL-8 발현 억제를 통해 콜린성(cholinergic) 항염증반응을 매개하며 [5], α7 nAChR의 활성화는 *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) 및 lipopolysaccharide에 의한 염증반응을 억제함이 보고되었다 [6]. 그러나 현재 치은섬유아세포 내 AChR의 생리활성에 대한 연구는 충분히 이뤄지지 않고 있다.

만성치주염(chronic periodontitis)은 구강미생물 등의 복합 요인에 의해 치주조직(periodontal tissue) 내 염증반응이 만성화됨으로써 경조직 파괴를 유발하는 질병으로 잘

알려져 있다. 만성염증에 의한 과도한 면역시스템 활성화는 파골세포 과분화를 유도하고 결과적으로 치조골 유실로 이어진다. Receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL)은 활성화된 조골세포로부터 발현되어 파골세포 전구체로부터 파골세포로의 분화를 유도하는 핵심인자로 최초 보고되었다 [7]. 그러나 이후 골세포(osteocyte), 면역세포, 섬유아세포 등 조골세포 이외 세포에서도 RANKL이 발현되며 국소적 골 재형성을 조절하는 역할을 수행하는 것으로 알려지고 있다[8-10]. 특히, 치은섬유아세포 및 치주인대세포가 bisphosphonate 또는 *P. gingivalis*에 노출되었을 때 세포 내 RANKL 및 osteoprotegerin (OPG) 발현이 조절된다는 보고가 있으며, 이러한 보고들은 치주조직 내 세포들이 치조골 항상성에 직접적으로 연관되어 있음을 나타낸다 [11,12]. 본 연구에서는 AChR의 활성화에 의한 인체치은세포(human gingival fibroblast; hGF-1) 내 칼슘증가와 RANKL 발현증가를 나타내고 있다. 따라서 치주세포 내 AChR는 항염증 반응 매개뿐만이 아닌, 치조골 항상성 조절인자로서의 역할수행 가능성을 제시한다.

실험방법 및 실험재료

세포 배양 및 시약

hGF-1 세포는 ATCC (CRL-2014)에서 구입하여 사용하였으며 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 세포 배양배지에 10% fetal bovine serum, 100 IU/ml penicillin 및 100 IU/ml streptomycin 첨가한 배지에서 37°C, 5% CO₂ 세포배양기에서 배양하였다. Carbachol (Cch)은 Sigma Aldrich (MO, USA)에서 구입하여 사용하였다.

세포독성 실험

실험 하루 전 96 well plate에 hGF-1 세포를 분주하고(1×10^4 /well), 다음 날 각 실험군에 지정된 농도의 Cch를 처리하고 정한 조건에 따라 세포배양기에서 배양하였다. 이후 세포독성은 Vybrant 세포독성 키트(Vybrant® Cytotoxicity assay kit, ThermoFisher Scientific, MA, USA)를 이용하여 제조사에서 제시하는 실험방법에 따라 세포독성을 확인하였다. 전 처리 후, 각 샘플의 배양배지를 새로운 well에 옮긴 후, 배양배지 내 존재하는 glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD)의 활성을 resazurin으로부터 생성되는 resorufin 형광(530/590 nm, Ex/Em)을 측정함으로써 G6PD 분비량(%)을 계산하였다.

세포질 내 칼슘농도([Ca²⁺]_i)측정

hGF-1 세포를 22 x 22 mm 크기의 커버글라스에 분주

한 뒤, 다음 날 실험에 사용하였다. 세포배양액에 Fura2/AM (TEFLabs, TX, USA)를 5 μ M의 농도로 첨가한 뒤 세포배양기에서 1시간 동안 배양하였다. 배양 이후, 커버글라스는 용액 관류 챔버(chamber)에 부착되었다. HEPES buffer (mmole/l, 10 HEPES, 140 NaCl, 5 KCl, 1 MgCl₂, 1CaCl₂, and 10 glucose, pH7.4, 310 mOsm)를 세포에 지속적으로 관류시킴으로써 잔류 Fura2를 씻어내고, 세포를 안정화 시킨 뒤 [Ca²⁺]_i측정을 시작하였다. 세포 내 칼슘이온의 농도는 340/380 nm dual wavelength를 이용한 excitation과 그로부터 방출된 형광을 510 nm의 필터를 이용하여 측정하였다. 각 결과는 Ratio (F₃₄₀/F₃₈₀)값으로 표시되었다. 각 실험에 사용된 Cch은 HEPES buffer에 희석되어 표시된 시간 동안 처리되었다.

RT-PCR 및 PCR

6 well plate에 분주 된 hGF-1 세포에 Cch (1 mM)을 처리한 뒤, 정해진 시간 동안 배양하였다. 다음 날 각 각의 세포로부터 mRNA를 Trizol을 이용하여 추출하였다. 추출된 mRNA (1 μ g)로부터 cDNA를 합성하였으며 각 샘플의 cDNA로부터 primer (IL-6 forward 5'-GAG GCA CTG GCA GAA AAC AA-3', reverse 5'-TTG GGT CAG GGG TGG TTA TT-3'; RANKL forward 5'-GTA CCA TGA TCG GGG TTG GG-3', reverse 5'-CGG ATC CAG TAA GGA GGG GT-3'; GAPDH forward 5'-AGG GCT GCT TTT AAC TCT GGT-3', reverse 5'-CCC CAC TTG ATT TTG GAG GGA-3'; OPG forward 5'-TCA AGC AGG AGT GCA ATC G-3', reverse 5'-AGA ATG CCT CCT CAC ACA GG-3')를 이용하여 유전자 발현의 정도를 확인하였다. 대조단백으로 GAPDH (house-keeping gene)을 사용하였다.

통계학적 유의성 검사

대조군과 실험군의 통계학적 유의성 검사에는 SPSS 14 (SPSS Inc., IL, USA)을 사용하였다. 통계학적 유의성 검증을 위해 one-way ANOVA를 실시하였으며, Tukey's post hoc test로 사후검정을 실시하였다. 통계적 유의성의 표준값은 P<0.05로 설정하였다. 모든 결과는 독립된 3 이상의 실험들로부터 얻어졌으며, 평균 \pm SD로 표시되었다.

결 과

Cch 자극 정도에 따른 hGF-1 세포 내 [Ca²⁺]_i증가

세포 내 칼슘이온은 다양한 생리활성을 유도하는 이차신호전달자(second messenger)로서 nAChR 및 mAChR의 활성화는 [Ca²⁺]_i증가를 유도하는 것으로 잘 알려져 있다

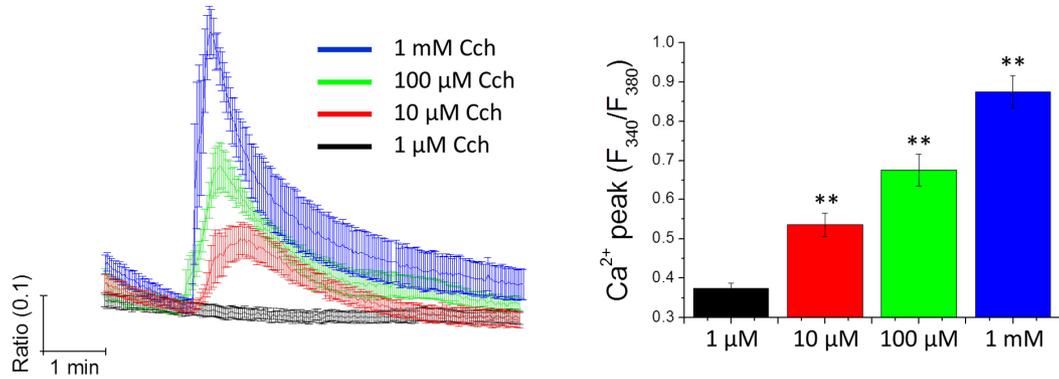


Figure 1. $[Ca^{2+}]_i$ increase in hGF-1 cells responding to Cch. Cells plated on coverglass were treated with 1, 10, 100, and 1000 μ M of Cch, respectively. Intracellular Ca^{2+} mobilization in hGF-1 cells was then monitored using Fura-2/AM Ca^{2+} indicator. Columns on the right are the averages of ratio (F_{340}/F_{380}) of Ca^{2+} peak. ** denotes $p < 0.05$ compared to 1 μ M Cch treated samples.

[13]. 치은세포 내 AchR의 생리활성을 알아보기 위해 hGF-1 세포에 Cch를 처리하고 세포질 내 칼슘이온의 농도변화를 측정하였다. Cch은 muscarinic AchR 및 nicotinic AchR를 모두 활성화 시키는 콜린성 작용제(cholinergic agonist)로서, 치은세포 내 AchR 활성화가 $[Ca^{2+}]_i$ 증가를 유도하는지, 그리고 자극의 정도에 따라 $[Ca^{2+}]_i$ 증가가 조절되는지를 확인하고자 1 μ M부터 1 mM 농도의 Cch를 hGF-1 세포에 처리하였다. 실험결과, 1 μ M Cch 자극에 대해서는 세포 내 $[Ca^{2+}]_i$ 증가가 관찰되지 않았으나, 10, 100, 1000 μ M의 Cch 자극에 따라 이상성(biphasic) 양상의 유의한 $[Ca^{2+}]_i$ 증가(0.374 ± 0.012 , 0.534 ± 0.029 , 0.676 ± 0.041 , 0.874 ± 0.04)가 확인되었다 (Figure 1).

고농도 Cch 자극에 따른 hGF-1 세포 세포독성 확인

세포 내 칼슘이온은 이차신호전달자로 다양한 생리활성을 유도하는 반면, 고농도의 지속적 자극에 의한 $[Ca^{2+}]_i$ 증가는 미토콘드리아 및 ER 기능이상 및 세포사멸 관련 유전자의 발현을 유도함으로써 세포독성을 나타낸다 [14,15]. hGF-1 세포에의 고농도 Cch 자극에 의한 $[Ca^{2+}]_i$ 증가가 세포독성을 유도하는지 확인하기 위하여 세포 내 G6PD의 분비 정도를 측정하였다. hGF-1 세포에 1 mM 농도의 Cch를 처리하고 Figure 2에 표시된 시간만큼 추가 배양하였다. 세포독성은 대조군과 비교하여 Cch 처리 후 10분, 30분, 1시간에 2.06 \pm 0.21, 1.93 \pm 0.14, 1.78 \pm 0.15배로 증가하였으나, 3시간부터는 차이를 보이지 않았다(Figure 2). 이는, 고농도 Cch 자극에 의한 세포독성이 약 3시간 이후부터, 자극제가 존재함에도 불구하고, 세포 스스로의 (신호전달)억제기전에 의해 조절되고 있음을 나타낸다.

고농도 Cch 자극에 의한 hGF-1 세포 내 골 재형성 관련 유전자 발현

RANKL 및 OPG는 파골세포의 분화를 조절하는 핵심

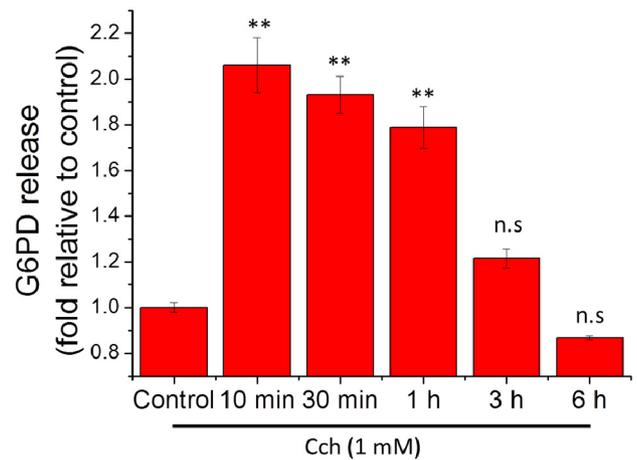


Figure 2. The effects of Cch on cytotoxicity of hGF-1 cells. Cells plated in 96 well plate were treated with 1 mM Cch for indicated time. Following the incubation, only culture media was collected and used for measuring the G6PD activity. Percent of G6PD release from total G6PD was calculated and presented in fold change by comparing with control (vehicle treated). ** denotes $p < 0.05$ compared to control.

인자로, 파골세포 분화도에 따라 골 재형성 정도가 결정되는 것은 잘 알려져 있다. 또한, 기존보고들은 조골세포 외, 특히, 구강상피세포에서 RANKL과 OPG의 발현되며, 두 유전자 간 발현비율에 따라 치조골 재형성 조절의 가능성을 제시하였다 [10]. 앞선 두 결과는 Cch의 hGF-1 세포 자극은 세포 내 $[Ca^{2+}]_i$ 증가를 조절하며 장시간 자극 시 세포염증반응이 아닌 다른 생리활성을 유도함을 나타낸다. 이를 확인하기 위해 hGF-1 세포에 고농도의 Cch를 시간별 처리하고 RT-PCR방법을 통해 RANKL, OPG, IL-6의 발현 정도를 확인하였다. 실험결과, OPG와 IL-6의 발현에는 변화가 관찰되지 않았으나, Cch 자극 후 3시간 이후부터 hGF-1 세포 내 RANKL 발현이 증가됨이 확인되었다(Figure 3).

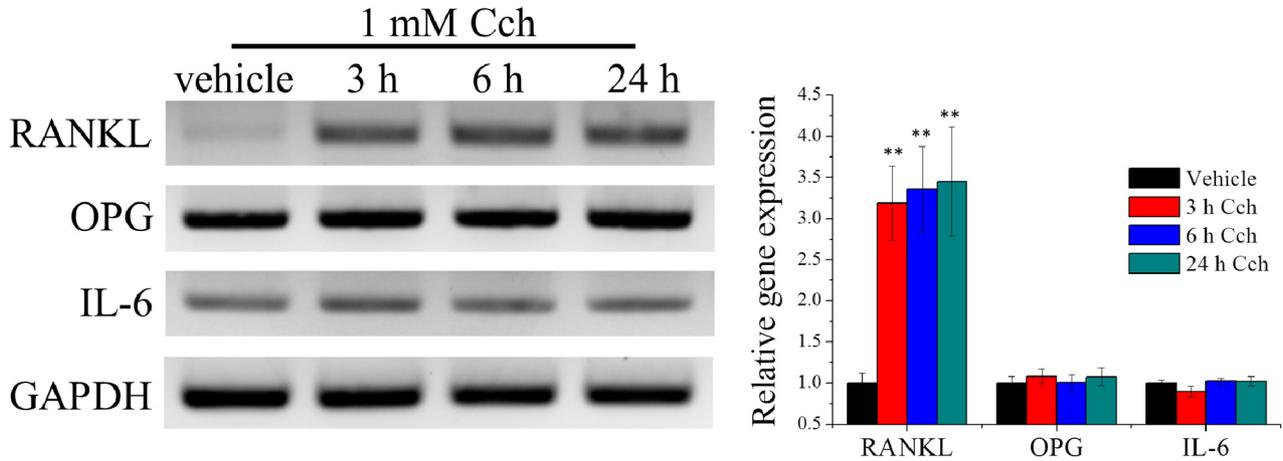


Figure 3. The effects of Cch on RANKL, OPG, and IL-6 expression. Cells were treated with 1 mM Cch and incubated as indicated. Total mRNA was isolated using Trizol and 1 μ g of mRNA was used for synthesizing cDNA. Using each primer, RANKL, OPG, and IL-6 expression were evaluated. GAPDH was used as loading control. Column on the right presents relative gene expression compared to each control (vehicle treated). ** denotes $p < 0.05$ compared to control.

고찰

신경세포는 물론, 비 신경세포 내에도 콜린성 시스템 (cholinergic system)이 존재하며, Ach의 paracrine 또는 autocrine 방식의 세포 간 상호작용은 AChR 활성 매개를 통한 다양한 세포활성을 유도 한다 [4]. 특히, 구강상피세포 내 nAChR의 활성은 TNF- α , IL-1, IL-6 등의 염증성 사이토카인 발현을 매개함으로써 구강 면역 활성을 조절하는 것으로 보고되었다 [6]. 구강상피세포 내 AChR 활성은 주로 cAMP 생성에 의한 신호전달기전이 주로 알려져 있으나, 외부 allergen 및 arecoline 자극에 따른 구강상피세포 활성 보고들은 구강상피세포 내 $[Ca^{2+}]_i$ 증가 및 관련 신호전달기전들의 관련 가능성을 제시하고 있다 [16, 17]. Figure 1의 결과는 AChR 자극제인 Cch의 농도에 따라 $[Ca^{2+}]_i$ 증가 양상이 정확하게 조절되고 있음을 나타내는 결과로, 치주조직 내 신경세포 또는 구강상피세포로부터 발현, 분비된 Ach이 주변 세포 내 $[Ca^{2+}]_i$ 증가를 매개로 한 세포 간 상호작용의 가능성을 제시한다. 또한, Cch에 의한 $[Ca^{2+}]_i$ 반응에서 주목할 점은, 급격한 $[Ca^{2+}]_i$ 증가 뒤, Cch의 존재에도 불구하고, 자극 전 $[Ca^{2+}]_i$ 수준까지 감소한다는 점이다. 췌장선세포의 경우, 지속적이고 강한 자극은 외부 Ca^{2+} 의 유입을 지속시킴으로써 세포독성을 매개하고 결과적으로 급성 췌장염을 유발 시킨다 [18]. hGF-1 세포 내 위와 같은 반응은 고농도 Cch 자극에 대한 세포 독성이 아닌 다양한 생리활성을 매개함을 짐작하게 한다. 예상한대로, 고농도의 Cch 자극은 짧은 시간 동안 세포독성을 유도하는 듯 보였으나, Cch 자극 1시간 이

후부터 세포독성이 점차 완화되는 것이 확인되었는데, 이는 Ach 자극에 의한 $[Ca^{2+}]_i$ 증가가 세포독성 외의 다른 생리활성을 갖는다는 가설을 다시 한 번 확인시켜주는 결과로, 치은세포 간 Ach에 의한 상호작용이 치주조직 생리활성에 역할을 수행하고 있음을 짐작케 한다.

치주조직 내 만성염증에 의한 면역세포 집중은 치주조직 내 파골세포 과분화를 초래하고 결과적으로 치조골 및 치아 유실로 이어진다. RANKL 및 OPG, IL-6는 파골세포로의 분화 정도를 조절하는 핵심인자들로써, 치주상피세포 내 발현되며 다양한 외부조건에 따른 치조골 재형성에 관여되어 있다 [19]. 특히, RANKL과 OPG 간의 발현비율 (RANKL/OPG ratio)은 파골세포 분화도를 결정하는 생리 지표로서 bisphosphonate 및 *P. gingivalis* 등의 치주구강상피세포에의 자극은 RANKL/OPG 발현비율을 조절하고 있음이 보고된 바 있다 [12]. 본 연구결과, Cch에 의한 hGF-1 세포 내 $[Ca^{2+}]_i$ 증가는 위 세 인자들 중 RANKL 발현만을 증가시키고 OPG 및 IL-6의 발현에는 영향을 미치지 않음이 확인되었는데, 이는 AChR 활성에 따른 신호기전이 OPG 및 IL-6 발현기전과 독립적인 신호기전에 의해 조절됨을 암시하고 있다. 또한, RANKL 발현 증가에 따라 RANKL/OPG 발현비율이 증가함이 확인되었는데, 이는, Ach을 통한 세포 간 상호작용이 치조골 재형성 과정과 직접적으로 연관되어 있음을 입증한다. 본 연구결과는 hGF-1 세포 내 AChR의 활성은 세포 내 $[Ca^{2+}]_i$ 증가 및 일시적 세포독성을 유도하며, RANKL 유전자 발현을 증가시키는 것을 확인시켜주었다. 종합적으로, 위 결과들은 치은섬유아세포 내 AChR의 활성이 치조골 항상성 유지에 관여되어 있을 가능성을 강하게 나타내고 있다.

Acknowledgements

이 논문은 2016년도 원광대학교 교내연구비 지원에 의하여 수행되었음.

Conflict of interest

All authors declare no conflict of interest.

References

- Nachmansohn D. Role of acetylcholine in axonal conduction and neuromuscular transmission. *Am J Phys Med*, 1959. 38: 190-206.
- Wessler I, Kilbinger H, Bittinger F, Unger R, Kirkpatrick CJ. The non-neuronal cholinergic system in humans: expression, function and pathophysiology. *Life Sci*, 2003. 72(18-19): 2055-61.
- Wessler I, Kirkpatrick CJ. Acetylcholine beyond neurons: the non-neuronal cholinergic system in humans. *Br J Pharmacol*, 2008. 154(8): 1558-71. doi: 10.1038/bjp.2008.185
- Nguyen VT, Hall LL, Gallacher G, Ndoye A, Jolkovsky DL, Webber RJ, Buchli R, Grando SA. Choline acetyltransferase, acetylcholinesterase, and nicotinic acetylcholine receptors of human gingival and esophageal epithelia. *J Dent Res*, 2000. 79(4): 939-49.
- Pavlov VA, Wang H, Czura CJ, Friedman SG, Tracey KJ. The cholinergic anti-inflammatory pathway: a missing link in neuroimmunomodulation. *Mol Med*, 2003. 9(5-8): 125-34.
- Wang H, Yu M, Ochani M, Amella CA, Tanovic M, Susarla S, Li JH, Wang H, Yang H, Ulloa L, Al-Abed Y, Czura CJ, Tracey KJ. Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature*, 2003. 421(6921): 384-8. doi: 10.1038/nature01339
- Walsh MC, Kim N, Kadono Y, Rho J, Lee SY, Lorenzo J, Choi Y. Osteoimmunology: interplay between the immune system and bone metabolism. *Annu Rev Immunol*, 2006. 24: 33-63. doi: 10.1146/annurev.immunol.24.021605.090646
- Rani CS, MacDougall M. Dental cells express factors that regulate bone resorption. *Mol Cell Biol Res Commun*, 2000. 3(3): 145-52. doi: 10.1006/mcbr.2000.0205
- Nagasawa T, Kobayashi H, Kiji M, Aramaki M, Mahanonda R, Kojima T, Murakami Y, Saito M, Morotome Y, Ishikawa I. LPS-stimulated human gingival fibroblasts inhibit the differentiation of monocytes into osteoclasts through the production of osteoprotegerin. *Clin Exp Immunol*, 2002. 130(2): 338-44.
- Wada N, Maeda H, Yoshimine Y, Akamine A. Lipopolysaccharide stimulates expression of osteoprotegerin and receptor activator of NF-kappa B ligand in periodontal ligament fibroblasts through the induction of interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha. *Bone*, 2004. 35(3): 629-35. doi: 10.1016/j.bone.2004.04.023
- Tipton DA, Seshul BA, Dabbous M. Effect of bisphosphonates on human gingival fibroblast production of mediators of osteoclastogenesis: RANKL, osteoprotegerin and interleukin-6. *J Periodontal Res*, 2011. 46(1): 39-47. doi: 10.1111/j.1600-0765.2010.01306.x.
- Belibasakis GN, Bostanci N, Hashim A, Johansson A, Aduse-Opoku J, Curtis MA, Hughes FJ. Regulation of RANKL and OPG gene expression in human gingival fibroblasts and periodontal ligament cells by *Porphyromonas gingivalis*: a putative role of the Arg-gingipains. *Microb Pathog*, 2007. 43(1): 46-53. doi: 10.1016/j.micpath.2007.03.001
- Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2000. 1(1): 11-21. doi: 10.1038/35036035
- Petersen OH, Sutton R. Ca²⁺ signalling and pancreatitis: effects of alcohol, bile and coffee. *Trends Pharmacol Sci*, 2006. 27(2): 113-20. doi: 10.1016/j.tips.2005.12.006
- Sutton R, Petersen OH, Pandolfi S. Pancreatitis and calcium signalling: report of an international workshop. *Pancreas*, 2008. 36(4): e1-14. doi: 10.1097/MPA.0b013e3181675010
- Son GY, Shin DM, Hong JH. Bacterial PAMPs and Allergens Trigger Increase in [Ca²⁺]_i-induced Cytokine Expression in Human PDL Fibroblasts. *Korean J Physiol Pharmacol*, 2015. 19(3): 291-7. doi: 10.4196/kjpp.2015.19.3.291
- Chiang SL, Jiang SS, Wang YJ, Chiang HC, Chen PH, Tu HP, Ho KY, Tsai YS, Chang IS, Ko YC. Characterization of arecoline-induced effects on cytotoxicity in normal human gingival fibroblasts by global gene expression profiling. *Toxicol Sci*, 2007. 100(1): 66-74. doi: 10.1093/toxsci/kfm201
- Kim MS, Hong JH, Li Q, Shin DM, Abramowitz J, Birnbaumer L, Muallem S. Deletion of TRPC3 in mice reduces store-operated Ca²⁺ influx and the severity of acute pancreatitis. *Gastroenterology*, 2009. 137(4): 1509-17. doi: 10.1053/j.gastro.2009.07.042
- Krajewski AC, Biessei J, Kunze M, Maersch S, Perabo L, Noack MJ. Influence of lipopolysaccharide and interleukin-6 on RANKL and OPG expression and release in human periodontal ligament cells. *APMIS*, 2009. 117(10): 746-54. doi: 10.1111/j.1600-0463.2009.02532.x