

# 백서 치주인대세포에서 Doxycycline에 의한 mRANKL 발현 억제

조관표<sup>1</sup>, 최득철<sup>2</sup>, 김영준<sup>1,2</sup>

전남대학교 치의학전문대학원 치주과학교실<sup>1</sup>, 치의학연구소<sup>2</sup>

## I. 서 론

치주질환은 다른 만성 염증성 골질환, 예를 들면 rheumatoid arthritis에서와 같이 염증 관련 사이토카인이 생성되고 그 결과 골 소실이 야기된다. 치주질환에서 proinflammatory cytokine의 생성은 골흡수를 유도하며 조직의 정상적인 기능에 부정적인 영향을 미치게된다. 특히 치주인대세포나 골모세포등에 의해 조절되는 복잡한 사이토카인체계는 골흡수와 직접적인 관련이 있다<sup>1,2)</sup>.

치조골의 파괴는 골흡수의 주세포인 파골세포의 활성화에 의해 일어난다<sup>2)</sup>. 파골세포는 조혈세포에서 유래하는 거대다핵세포이다. 최근 골에서 파골세포의 형성과 기능에 대한 연구가 많이 진행되고 있다<sup>3-6)</sup>. 파골세포는 조혈전구세포의 분화에 의하여 발생되고, 골모세포와 골수기질세포에 의해 분비되는 여러 가지 물질에 의하여 조절이 된다. 현재 골모세포 혹은 골수기질세포의 세포표면단백질인 osteoclast differentiation factor (ODF)가 파골전구세포의 수용체를 통하여 osteoclastogenesis를 촉진한다.

ODF는 파골전구세포의 파골세포로의 분화에 중요한 신호를 보내는데, TNF-related activation-induced cytokine (TRANCE)/Receptor activation of nuclear factor  $\kappa$  B ligand (RANKL)과 동일하고 T세포 성장과 수지상세포의 기능을 증가시킨다. Osteoprotegerin (OPG)는 골모세포가 분비하는 표면단백질이며 RANK에 경쟁적으로 반응하여 RANKL이 전파골세포와 결합하지 못하게 차단하여 osteoclastogenesis를 억제하는 decoy receptor이다<sup>4-7)</sup>.

골모세포와 골수간세포(stromal cell)에 cytokines 및 vitamin D 등의 자극을 주면 RANKL과 OPG가 분비되는 것으로 알려져 있다. 또한 이들 세포이외에 치아관련 세포들 즉, 치주인대세포, 조상아세포 및 치수세포에서도 그 발현이 보고되었다. Rani 등<sup>8)</sup>은 조상아세포와 치수세포에서 RANKL의 발현을 처음으로 보고하였고, Kanzaki 등<sup>9)</sup>과 김등<sup>10)</sup>은 치주인대세포에  $1\alpha, 25$ -dihydroxyvitamin D3 혹은 proinflammatory cytokine인 IL- $1\beta$  첨가시 치주인대세포에서 RANKL의 발현이 증가되며 이는 치조골 흡수와 관련됨을 시사하였다. 따라서 치주인

\* 교신저자 : 김영준, 광주시 동구 학동 5번지 전남대학교 치의학전문대학원 치주과학교실, 우편번호 : 501-746,  
E-mail : youngjun@chonnam.ac.kr

대세포에서 RANKL의 발현을 조절할 수 있다면 골 흡수를 동반하는 치주질환의 치료나 예방이 가능하리라 생각된다.

Tetracycline과 그 유도체들은 치주치료에 있어서 많이 선택되는 약제이다. Tetracycline은 치주질환의 원인 균주들에 대한 우수한 항균효과 뿐만 아니라<sup>11-13)</sup> parathyroid hormone, 혹은 세균의 내독소에 의해 유도되는 골흡수도 억제하는 능력이 있다<sup>14,15)</sup>. 최근에는 tetracycline에 의한 교원질 분해효소의 세포내 기전에 대한 관심이 집중되고 있다. Tetracycline은 염증성 사이토카인인 IL-1 $\beta$ 와 TNF- $\alpha$ 에 의한 IL-6의 발현을 감소시키며<sup>16)</sup> 세포외 기질 단백질 분해효소인 matrix metalloproteinases (MMPs)의 발현을 억제하고 다른 여러 염증 매개물질들의 생성을 조절하여 치주질환의 진행을 억제시키는 것으로 알려져 있다<sup>17-19)</sup>. 이와 같이 tetracycline은 치주질환의 원인세균의 조절뿐만 아니라 MMPs, PGE2 등의 염증매개 물질의 조절을 통하여 치조골의 흡수를 억제시킨다.

그러나 tetracycline이 치조골 흡수에 직접적으로 영향을 주는 매개 물질인 RANKL과 OPG의 조절에 대한 보고는 없다.

이에 본 연구에서는 지금까지 알려진 tetracycline의 효과를 근거로 세포외 기질 단백질 분해 억제 효과가 가장 크다고 알려진 doxycycline이 백서 치주인대세포에서 RANKL과 OPG 유전자 발현에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

## II. 실험 재료 및 방법

### 1. 백서 치주인대세포의 배양

백서의 치주인대세포의 분리는 Matsuda 등<sup>17)</sup>의 방법에 준하여 시행하였다. 치아 발거전 5일동안 0.4%  $\beta$ -aminopropionitrile (Sigma Chemical Co., U.S.A.) 수용액을 섭취시켰다. 실험동물에 pentobarbital sodium 30 mg/kg을 복강내 주사하

여 마취시킨 후 상악 좌, 우측 제 1 대구치를 발거하였다. 발거 1-2일 후 발치와내의 혈병을 제거하여 세절한 다음 35 mm 배양접시에 고르게 분산시켜 1% antibiotic-antimycotic solution (GibcoBRL, U.S.A.)이 첨가된 DMEM 배지를 이용하여 세포배양을 시행하였으며, 3일 간격으로 배양액을 교환해 주었다. 실험에는 계대배양 5-7세대의 것을 사용하였다.

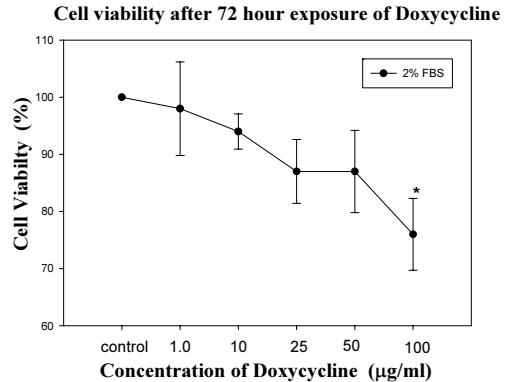
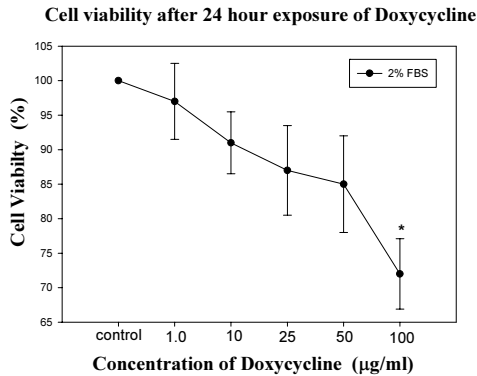
### 2. 배양접시내 doxycycline의 적용

Doxycycline hyclate (Sigma, U.S.A)는 3차 증류수에 녹여서 사용하였다. 사용된 doxycycline hyclate의 농도는 stock solution으로 준비하여 최종농도가 1, 10, 25, 50, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이 되도록 실험에 사용하였다.

### 3. 세포활성도 평가

백서 치주인대세포를 well당 1 x 10<sup>4</sup>개의 세포수가 되게 하여 96 well plate (Nunc, U.S.A.)에 접종한 후 배양하였다. 세포가 약 70% 정도의 밀생에 도달하였을 때 2% fetal bovine serum 포함된 DMEM 배양액으로 교환하고 해당농도의 doxycycline hyclate를 첨가하였다. 배양 1일 후와 3일 후에 MTT 검사를 시행하였다. 각 well에서 배양액을 제거하고 생리식염수로 2회 세척 후 Non-Radioactive Cell Proliferation Assay kit (Promega, WI, U.S.A.)를 이용하여 제조사의 지시대로 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) 용액 50  $\mu\text{L}$ 를 첨가하고 4시간 동안 배양하였다. 반응을 정지시키기 위하여 여기에 20  $\mu\text{L}$ 의 10% SDS를 첨가한 후 ELISA plate reader (Microplate manager  $\square$  BioRad, U.S.A)로 파장 490 nm에서의 흡광도를 측정하였다. Doxycycline hyclate에 대한 세포활성도는 대조군에 대한 백분율로 표시하였다.





**Figure 2.** MTT assay for rat periodontal ligament cell viability with doxycycline.

\*: indicates significantly difference with control group ( $p < 0.05$ )

충용액 5  $\mu$ l, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> 3  $\mu$ l, 10 mM dNTP mix 1  $\mu$ l, 각각의 primer 2.5  $\mu$ l, 5 unit Taq polymerase 0.2  $\mu$ l, 합성된 cDNA 2  $\mu$ l를 혼합한 후 3 차 증류수를 이용하여 총 50  $\mu$ l가 되게 하였다. PCR 반응 혼합물들을 PCR cyclet(Thermocycler, U.S.A.)를 이용하여 증폭하였다. 증폭된 PCR 산물 들은 loading buffer 2  $\mu$ l를 첨가하여 총 10  $\mu$ l가 되게 하여 1.5% agarose gel에서 전기영동하였다. 얻어진 PCR 결과는 gel image analysis system (QualityOne<sup>®</sup>, BioRad, U.S.A)에서 house keeping gene인 GAPDH의 발현을 기준으로 하여 각 mRNA의 상대적인 발현 비율을 산출하였다.

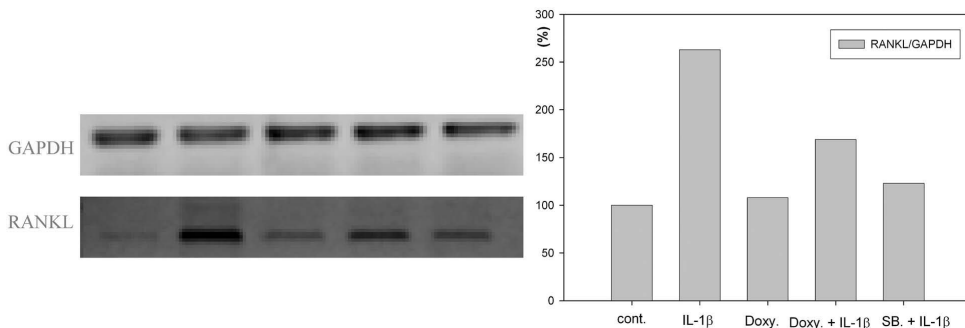
## 5. 통계학적 분석

모든 실험은 3회 시행하였으며 실험에서 얻어진 수 치는 one-way ANOVA와 Duncan 법을 시행하였다.

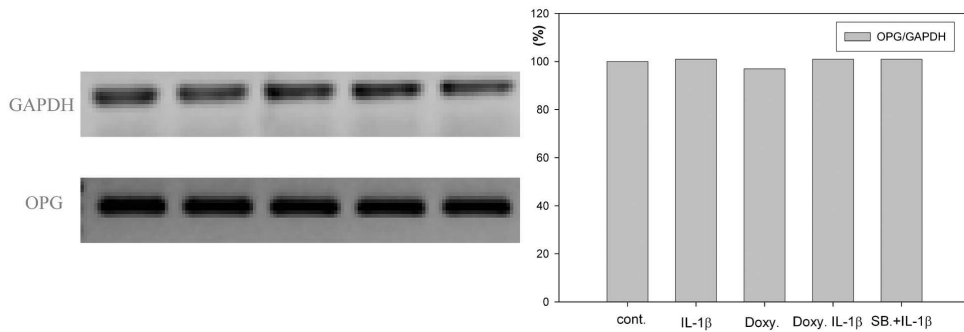
## III. 결 과

### 1. Doxycycline의 백서 치주인대세포의 활성도에 대한 효과

MTT assay 결과, 1일과 3일 모두 세포 활성도는 doxycycline 농도 100  $\mu$ g/ml 이상에서는 대조군에 비해 유의하게 감소하였다 (Figure 2,  $p < 0.05$ ).



**Figure 3.** Semiquantitative RT-PCR of rat periodontal ligament cells showing steady state mRNA levels of the following genes; RANKL, GAPDH. Treatment with Doxycycline 50 mg/ml decreased RANKL expression (lane 1; control, 2; IL-1 $\beta$  (1 ng/ml), 3; Doxycycline (50 mg/ml), 4; Doxycycline + IL-1 $\beta$ , 5; SB203580(10 mM) + IL-1 $\beta$ ).



**Figure 4.** Semiquantitative RT-PCR of rat periodontal ligament cells showing steady state mRNA levels of the following genes; OPG, GAPDH. Treatment with Doxycycline 50  $\mu$ M didn't decrease OPG expression (lane 1: control, 2; IL-1 $\beta$  (1 ng/ml), 3; Doxycycline (50 mg/ml), 4: Doxy cycline (50mg/ml) + IL-1 $\beta$  (1 ng/ml), 5: SB203580 (10mM) + IL-1 $\beta$  .

## 2. Doxycycline이 백서 치주인대세포의 RANKL과 OPG mRNA 수준에 대한 영향

백서 치주인대세포에서의 RANKL mRNA 수준을 RT-PCR로 관찰하였다. RANKL mRNA 수준은 IL-1 $\beta$  자극군이 대조군에 비하여 2.6배 증가하였으나, doxycycline으로 전처리 후 IL-1 $\beta$  자극시 대조군에 비하여 1.7배 증가하여 약 33%의 감소를 보였으며 SB203580으로 전처치시 약 52%의 발현이 감소하였다(Figure 3).

그러나 OPG mRNA는 IL-1 $\beta$  첨가 유무와 doxycycline 전처치에 상관없이 그 발현이 억제되지 않고 일정하였다(Figure 4).

## IV. 고 찰

치주질환은 치조골 감소를 특징으로 하는 염증성 질환으로 치조골 감소는 골생성보다 골흡수가 더 커서 나타나게 되는데, 이 과정에 치주인대세포가 관여하는 것으로 알려져 있다<sup>21)</sup>.

최근 유전자 분자생물학의 발달로 골대사와 흡수에 영향을 미치는 많은 유전자단백질들이 밝혀지고 있다. 그 중 파골세포의 분화를 조절하는데 중요한 역할을 하는 단백질은 RANKL과 그것의 decoy receptor인 OPG이다. OPG는 tumor necrosis factor superfamily의 하나로 골모세포와 골수간세포(bone

stromal cell)에서 분비되며 파골세포의 분화를 억제한다. RANKL도 골모세포와 골수간세포에서 분비되며 전파골세포의 RANK receptor와 결합하여 파골세포의 분화를 유도한다<sup>4-7)</sup>. 최근 치주인대세포에서도 RANKL과 OPG의 발현이 보고되었는데 이는 골모세포 뿐만 아니라 치주인대세포도 치조골의 골개조에 중요한 역할을 담당하는 세포임을 의미한다<sup>8-10)</sup>. 따라서 치주인대세포에서 약물이나 다른 물질에 의한 RANKL과 OPG의 조절이 가능하다면 치조골 흡수를 억제시킬 수 있을 것으로 보인다.

Tetracycline은 치주치료시에 가장 많이 선택되는 약제이다. 이는 치은 연하세균에 대한 항미생물 효과가 뛰어날 뿐만 아니라 항교원질 분해 효소작용, 항염증작용 등의 부가적인 효능으로 인하여 임상적 증상을 개선시킨다<sup>11-13)</sup>. 그 중 doxycycline은 tetracycline에 비해 흡수율이 높아 장내 세균총에 대한 영향이 적어 소화기관내 부작용이 적고, 소량의 약제로 긴 반감기를 나타내어 약효가 장시간 지속된다. 또한 치은열구액내 농도가 혈중농도보다 높아 치주질환과 관련된 치은연하 치태세균에 효과가 우수하기 때문에 치주염 치료를 위한 항생제로 추천되고 있다<sup>22)</sup>.

Doxycycline은 다른 tetracycline와 마찬가지로 단백질 분해효소의 억제<sup>23)</sup>와 염증성 골흡수의 억제<sup>18)</sup> 등을 통하여 치주질환의 진행을 차단시키는 효과를 나타낸다. 그러나 doxycycline에 의한 골흡수 억제

가 치주인대세포에서 분비되는 RANKL과 OPG의 조절에 의한 것인지에 관한 보고는 아직 없다. 이에 본 연구에서는 doxycycline에 의하여 치주인대세포의 RANKL 유전자 발현이 억제되는지를 관찰하여 doxycycline에 의한 골흡수 억제기전을 알아보고자 하였다.

치주인대세포의 활성화에 tetracycline이 미치는 영향을 관찰한 연구로서, Zaho 등<sup>24)</sup>은 tetracycline 농도 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이하에서 사람의 치주인대세포에서 증식과 단백질 생합성이 유의하게 증가하였지만, 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상에서는 세포의 활성이 억제되었으며 doxycycline의 경우에는 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서만 DNA 생합성이 증가하였고 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상의 농도에서는 세포의 활성 저하 뿐만 아니라 세포 형태가 변화된다고 보고하였다. 또한 Tsukuda 와 Gabler<sup>25)</sup>도 치주인대세포에 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 doxycycline을 적용시 세포의 활성이 유의하게 감소하며 저농도의 doxycycline은 세포의 활성을 억제시키지 않지만, 고농도의 doxycycline은 세포의 활성을 억제시켜 부착과 증식에 영향을 준다고 하였다. 이번 연구의 초기 세포독성 연구에서도 doxycycline 농도 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상에서 1일과 3일에 세포 활성도가 유의하게 감소되었으나( $p<0.05$ ), 그 이하의 농도에서는 세포 활성도는 유의한 변화를 보이지 않아 앞의 보고들과 유사하였다. 따라서 이 연구에서는 doxycycline 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  이하의 농도에서는 단기간 즉, 24시간 이내에는 치주인대세포에 대하여 세포활성을 저해하지 않는다고 고려되어 RANKL과 OPG 유전자 발현양상을 관찰하는 농도로 선택하였다.

Tetracycline계 약물은 치주질환 원인균주의 억제에 효과적이는데, tetracycline의 경우에 몇가지 치주병인균의 유효항균 농도는 4-8  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이며 치주질환과 관련된 대부분의 병원균을 제거하기 위해서는 ~30  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 가 필요하다<sup>12,26)</sup>. Doxycycline의 경우 전신적 투여 48시간 후 치은열구액내의 농도는 3-10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 정도라고 알려져 있다<sup>22)</sup>. 따라서 본 실험에 적용한 doxycycline의 농도는 치주질환의 항세균 활성농도보다 약 5-10배정도 높다. 그러나 여러 다양한 세

포에서 doxycycline의 농도와 교원질 분해효소나 골흡수와 관련된 사이토카인 억제 농도에는 차이가 있다. 조등<sup>27)</sup>은 사람 치은섬유모세포에 doxycycline을 투여시 matrix metralloproteinase-3의 활성이 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이하에서 감소하였다고 하였고, Li등<sup>28)</sup>도 사람의 각막 상피세포에서 MMP-9의 활성이 doxycycline 농도 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 감소하였으며, Shlopov등<sup>29)</sup>도 연골세포에 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 doxycycline을 투여시 IL-6의 유전자 발현이 유의하게 감소하였다는 보고 등으로 미루어 보아 치주질환 원인세균을 억제시키는 doxycycline의 농도와 교원질 분해효소나 골흡수와 관련된 사이토카인 억제 농도에는 차이가 있음을 알 수가 있다.

RT-PCR의 결과, doxycycline 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도로 1 시간동안 전처리 후 IL-1 $\beta$  자극시 OPG mRNA는 그 발현이 doxycycline으로 전처리 한 후 IL-1 $\beta$ 로 자극한 군과 IL-1 $\beta$ 로만 자극한 군 사이에 큰 차이가 없었다. 이는 이 실험에 사용한 doxycycline이 OPG의 mRNA 수준에 영향을 미치지 않았음을 의미한다. 그러나 이번 실험에서 치주인대세포를 IL-1 $\beta$ 로 자극시 RANKL 발현이 대조군에 비하여 약 2.6배 증가하였다. IL-1 $\beta$ 에 의해 자극된 골모세포나 치주인대세포내 RANKL mRNA 발현에 있어 상부경로는 mitogen activated protein (MAP) kinases, 그 중에서 p38 MAP kinase의 인산화 활성을 통해 자극되어 나타난다고 알려져 있다<sup>10)</sup>. 이번 실험에서도 p38 MAP kinase 억제제로 알려져 있는 SB203580으로 전처리시 RANKL mRNA 발현이 IL-1 $\beta$ 로만 자극한 군에 비하여 52% 감소를 보였는데 이는 p38 MAP kinase에 의한 RANKL 유전자의 조절이 osteoclastogenesis를 억제시키는데 중요함을 시사하였다. Doxycycline으로 전처리 후의 RANKL mRNA 발현은 IL-1 $\beta$ 만으로 자극한 군에 비하여 33%의 감소율을 나타내어 doxycycline 전처리에 의한 RANKL mRNA 수준의 감소를 관찰할 수 있었다.

Doxycycline에 의한 치주인대세포내 RANKL mRNA 발현 억제에 대한 자세한 기전을 본 실험에

서는 밝히지 않았지만, 몇 가지 추론이 가능하다. 즉, doxycycline이 세포내 p38 MAP kinase mRNA의 발현에 영향을 주었을 경우로, Kirkwood등<sup>30)</sup>은 골모세포에서 cDNA microarray 분석시 chemically modified tetracycline(CMT)-8 은 p38과 JNK MAP kinase mRNA 발현 억제 효과가 있다고 하였다. 그러나 IL-1 $\beta$ 에 의하여 유도된 IL-6 유전자 발현을 chemically modified tetracycline이 억제시키지만 이는 p38 MAP kinase 활성화 억제와는 관련이 없다는 동일한 저자들의 최근의 연구보고<sup>31)</sup>로 다르게 가정할 수 있다. Doxycycline은 치주인대세포내 p38 MAP kinase에 직접적인 영향을 주지 않지만, doxycycline의 전처치에 의하여 proinflammatory cytokines이나 호르몬 자극에 대한 치주인대세포의 반응이 감소하거나 혹은 세포내의 신호전달 체계에 영향을 주었기 때문으로 추정할 수 있다. 그러나 doxycycline에 의한 RANKL mRNA 발현 억제 기전을 정확히 밝히기 위한 더 많은 연구가 필요하리라 생각된다.

이번 연구에서는 doxycycline이 갖는 여러 가지 효과, 항균작용, 항교원질 분해 효소작용 및 항염작용등을 근거로 골흡수 과정에 중요한 단백질인 RANKL과 OPG mRNA의 발현에 미치는 영향을 검토하였다. 실험결과 백서 치주인대세포는 doxycycline 혹은 IL-1 $\beta$  자극 유무와 상관없이 OPG mRNA의 발현은 일정하였으나, IL-1 $\beta$ 로 자극시 RANKL mRNA 발현이 대조군에 비하여 증가되었으며 doxycycline 50  $\mu$ g/ml로 전처치시 RANKL mRNA 발현이 감소하여 doxycycline이 osteoclastogenesis를 조절할 수 있음을 시사하였다. 그러나 이번 실험에서 사용된 doxycycline의 농도는 일반적인 치주질환 세균 억제 농도보다 높은 농도로, 장기간 사용시 체내 상주균의 교란과 칸디다증등의 기회 감염 및 기타 일반적인 부작용의 우려가 있다. 따라서 향후 저용량의 doxycycline이나 항균성분을 제거한 CMT에 의한 RANKL mRNA 억제효과에 대한 연구가 필요하며 치주질환의 치료와 예방을 위하여 치주인대세포나 골모세포에서 p38 MAP kinase 조절

을 통한 RANKL 발현을 억제시킬 수 있는 약물이나 치료제의 개발이 가능할 것으로 생각된다.

## V. 결 론

골모세포나 골수간세포에 의해 분비되는 receptor activation of nuclear factor  $\kappa$  B ligand (RANKL)은 파골세포의 분화를 유도하는 중요한 단백질이며, 이 RANKL의 조절이 치주질환을 포함한 골질환 치료에 주요한 과제이다. 치주인대세포에서 염증성 사이토카인인 IL-1 $\beta$  자극시 RANKL의 발현이 증가된다는 보고들은 치주인대세포가 치조골의 골개조뿐만 아니라 치주질환의 진행에도 관여하고 있음을 시사한다. Tetracycline계 약제들은 치주치료에 있어서 많이 선택되는 약제로 염증성 골질환의 치료와 예방에 좋은 효과를 갖는다고 알려져 있다.

이에 이번 연구는 결합조직내 기질 분해억제 효과가 크다고 알려진 doxycycline이 백서 치주인대세포에서 RANKL 발현의 억제를 통하여 osteoclastogenesis를 억제하는가를 알아보기 위하여 시행되었다.

Doxycycline이 백서 치주인대세포의 활성화에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 doxycycline 농도는 0, 10, 25, 50, 100  $\mu$ g/ml를 세포에 적용하고 1일과 3일 후에 세포 활성을 MTT assay를 통해 관찰하였다. MTT 검사 결과를 근거로 치주인대세포에 50  $\mu$ g/ml doxycycline을 1시간동안 전처치 후 IL-1 $\beta$  (1.0 ng/ml)로 처리하여 14-16시간 배양한 다음 RANKL과 OPG mRNA의 수준을 RT-PCR을 통해 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 치주인대세포에 대한 doxycycline의 세포 독성은 농도 100  $\mu$ g/ml에서 1일과 3일에 세포 활성이 유의하게 감소하였다( $p < 0.01$ ).
2. RT-PCR 분석에서 OPG mRNA는 doxycycline 투여 유무에 관계없이 모든 군에서 일정하게 발현되었다. RANKL mRNA 발현 수준은 IL-1 $\beta$  자극군이 대조군에 비하여 2.6배 증가하였으나, doxycycline으로 전처치 후 IL-1 $\beta$  자극시 IL-1 $\beta$  로만 자극한 군에 비해 mRNA 수준

이 약 33%의 감소하였으며 SB203580으로 전 처치후 IL-1 $\beta$  자극시에는 IL-1 $\beta$  로만 자극한 군에 비해 약 52%의 발현 감소를 보였다.

이상의 결과 doxycycline은 치주인대세포의 RANKL mRNA 발현을 억제함으로써 osteoclastogenesis가 조절되어 치주질환의 진행을 완화시키는 데 도움을 줄 것으로 생각된다.

## VI. 참 고 문 헌

- Pitaru S, McCulloch CAG, Narayanan SA. Cellular origins and differentiation control mechanical during periodontal development and wound healing. *J Periodont Res* 1994 2;9:81-94.
- Mundy GR. Role of cytokines in bone resorption. *J Cell Biochem* 1993;53:296-300.
- Kumar S, Votta BJ, Riemann DJ, Badger AM, Gowen M, Lee JC. IL-1 and NF- $\kappa$ B induced bone resorption is mediated by p38 mitogen activated protein kinase. *J Cell Physiol* 2001;187:294-303.
- Nakashima T, Kobayashi Y, Yamasaki S, Kawakami A, Eguchi K, Sasaki H, Sakai H. Protein expression and functional difference of membrane-bound and soluble receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand; modulation of the expression by osteotropic factors and cytokines. *Biochem Biophys Res Comm* 2000;275:768-775.
- Hofbauer LC and Heufelder AE. Role of receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand and osteoprotegerin in bone cell biology. *J Mol Med* 2001;79:243-253.
- Siggelkow H, Eidner T, Lehmann G, Viereck V, Raddatz D, Munzel U, Hein G, Hufner M. Cytokines, osteoprotegerin, and RANKL in vitro and histomorphometric indices of bone turnover in patients with different bone diseases. *J Bone Miner Res* 2003;18:529-538.
- Kobayashi N, Kadono Y, Naito A, Matsumoto K, Yamamoto T, Tanaka S, Inoue J. Segregation of TRAF6-mediated signaling pathways clarifies its role in osteoclastogenesis. *EMBO J* 2001;20:1271-1280.
- Rani CS and MacDougall M. Dental cells express factors that regulate bone resorption. *Mol Cell Biol Res Comm* 2000;3:145-152.
- Kanzaki H, Chiba M, Shimizu Y, Mitani H. Dual regulation of osteoclast differentiation by periodontal ligament cells through RANKL stimulation and OPG inhibition. *J Dent Res* 2001;80:887-891.
- 김종철, 김영준, 정현주, 김옥수. 백서 치주인대 세포의 RANKL 발현에 대한 p38 MAPK의 역할. *대한치주과학회지* 2004;34:489-498.
- Slots J, Mashimo P, Levine MJ, Genco RJ. Periodontal therapy in humans. I. Microbiological and clinical effects of a single course of periodontal scaling and root planing, and of adjunctive tetracycline therapy. *J Periodontol* 1979;50:495-509.
- Walker CB, Gordon JM, McQuilken SJ, Niebloom TA. Levels achievable in gingival crevice fluid and in vitro effect on subgingival organism. Part III. Susceptibilities of periodontal bacteria. *J Periodontol* 1981;52:613-616.
- Lindhe J, Liljenberg B, Adielsson B. Effect of long-term tetracycline therapy of human periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1983;10:590-601.
- Golub L, Ramamurthy N, McNamara TF, Gomes B, Wolff M, Casino A, Kapoor A, Zambon J, Ciancio S, Schneir M, Perry H. Tetracyclines inhibit tissue collagenase activity: A new mechanism in the treatment



- of periodontal disease. *J Periodont Res* 1984;19:651-655.
15. Seymour RA and Heacman PA. Tetracyclines in the management of periodontal diseases. *J Clin Periodontol* 1995;22:22-35.
  16. Kirkwood KL, Golub LM, Bradford PG. Non-antimicrobial and antimicrobial tetracyclines inhibit IL-6 expression in murine osteoblasts. *Ann N Y Acad Sci* 1999;878: 667-670.
  17. Kirkwood K, Martin T, Andreadis ST, Kim YJ. Chemically modified tetracyclines selectively inhibit IL-6 expression in osteoblasts by decreasing mRNA stability. *Biochem Pharmacol* 2003;66:1809-1819.
  18. Ramamurthy NS, Rifkin BR, Greenwald RA, Xu JW, Liu Y, Turner G, Golub LM, Vernillo AT. Inhibition of matrix metalloproteinase-mediated periodontal bone loss in rats: a comparison of 6 chemically modified tetracyclines. *J Periodontol* 2002;73:726-734.
  19. E-Attar TM, Lin HS, Shultz R. Effect of minocycline on prostaglandin formation in gingival fibroblasts. *J Periodontal Res* 1988;23:285-286.
  20. Matsuda N, Kumar M, Ramakrishnan PR, Lin WL, Genco RJ, Cho MI. Evidence for up-regulation of epidermal growth factors on rat periodontal ligament fibroblastic cells associated with stabilization of phenotype in vitro. *Arch Oral Biol* 1993;38:559-569.
  21. Genco RJ, Goldman HM, Cohen DW. Contemporary periodontics. CV Mosby, St Louis, 47-54, 1990.
  22. Pascale D, Gordon J, Lamster I, Mann P, Seiger M, Arndt W. Concentration of doxycycline in human gingival fluid. *J Clin Periodontol* 1986;13:841-847.
  23. Golub LM, Sorsa T, Lee HM, Ciancio S, Sorbi D, Ramamurthy NS, Gruber B, Salo T, Kontinen YT. Doxycycline inhibits neutrophil (PMN)-type matrix metalloproteinases in human adult periodontitis gingiva. *J Clin Periodontol* 1995;22: 100-109.
  24. Zhao N, Yang PS, Ge SH, Qi XM, Sun QF. Biological effects of tetracycline and doxycycline on cultured human periodontal ligament cells. *Shanghai Kou Qiang Yi Xue*. 2003;12(4):269-272.
  25. Tsukuda N and Gabler WL. The influence of doxycycline of the attachment of fibroblasts to gelatin-coated surfaces and its cytotoxicity. *J Periodontol* 1993;64:1219-1224.
  26. Gordon JM, Walker CB, Murphy JC, Socransky SS. Concentration of tetracycline in human gingival fluid after single doses. *J Clin Periodontol* 1981;8:117-121.
  27. 조종희, 김상목, 김병옥, 한경운. 테트라사이클린계 약물이 치은섬유아세포내 MMP-3의 활성화도에 미치는 영향. *대한치주과학회지* 1999;29: 677-691.
  28. Li DQ, Lokeshwar BL, Solomon A, Monroy D, Ji Z, Pflugfelder SC. Regulation of MMP-9 production by human corneal epithelial cells. *Exp Eye Res* 2001;73:449-459.
  29. Shlopov BV, Stuart JM, Gumanovskaya ML, Hasty KA. Regulation of cartilage collagenase by doxycycline. *J Rheumatol* 2001;28: 835-842.
  30. Kirkwood KL, Ziegler L, Sigurdson W. Expression profiling of gene regulated by chemically modified tetracycline-8 in murine osteoblastic cells. *J Dent Res* 2001; 80:120.
  31. Kirkwood K, Martin T, Andreadis ST, Kim YJ. Chemically modified tetracyclines selectively inhibit IL-6 expression in osteoblasts by decreasing mRNA stability. *Biochem Pharmacol*. 2003;66:1809-1819.

# Inhibition of mRANKL Expression by Doxycycline in Rat Periodontal Ligament Cells

Kwan Pyo Cho<sup>1</sup>, De-Zhe Cui<sup>2</sup>, Young Joon Kim<sup>1,2</sup>

Department of Periodontology<sup>1</sup>, Dental Science Research Institute<sup>2</sup>  
Chonnam National University

Osteoblast or bone marrow stromal cell-derived RANKL is the major effector molecule essential for osteoclastogenesis. Previous studies have shown that tetracyclines have beneficial therapeutic effects in the prevention and treatment of inflammatory bone disease including periodontal disease. Periodontal ligament cells are thought not only to play an important role in the progression of periodontal disease, but to play an important role in alveolar bone remodeling. Previous studies indicated that receptor activation of nuclear factor  $\kappa$  B ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) are expressed in periodontal ligament cells by pro-inflammatory cytokine, such as IL- $1\beta$  and TNF- $\alpha$ .

This study was designed to investigate the inhibitory effect of doxycycline on RANKL and OPG mRNA in rat periodontal ligament cells induced by IL- $1\beta$  (1 ng/ml).

The results are as follows;

1. MTT assay showed that doxycycline at the concentration of 1–50  $\mu\text{g/ml}$  didn't result in statistically significant cell death at day 1 and 3.
2. RANKL mRNA expression was increased to 2.6 folds by IL- $1\beta$ . When cells were treated with doxycycline (50  $\mu\text{g/ml}$ ), IL- $1\beta$ -induced mRANKL expression was reduced by 33%. In contrast to RANKL, OPG mRNA expression was not inhibited by pre-treatment with doxycycline.

These results suggest that doxycycline decrease the expression of mRANKL resulting in regulation of osteoclastogenesis in rat periodontal ligament cells.