

백서 치주인대세포의 RANKL 발현에 대한 p38 MAPK의 역할

김종철 · 김영준 · 정현주 · 김옥수

전남대학교 치과대학 치주과학교실 및 치의학연구소

I. 서론

치주조직은 다양한 경조직과 연조직으로 구성되어 있는데 그 구조로는 치은, 치주인대, 백악질 그리고 치조골이 있다. 치주인대는 치근을 둘러싸고 있는 백악질과 치조골을 연결시키는 결합조직으로 영양공급과 신경전달에 관여¹⁾하고 치조골의 혈관통로를 통하여 골수강과 연결된다. 치조골은 골형성과 흡수가 계속적으로 일어나는 역동적 조직으로 골대사에 이상이 생기면 골흡수와 골형성의 불일치가 일어날 수 있다^{2, 3)}.

최근 골에서 파골세포의 형성과 기능에 대한 연구가 많이 진행되고 있다⁴⁻⁷⁾. 파골세포는 조혈전구세포의 분화에 의하여 발생되고, 조골세포와 골수기질세포에 의하여 분비되는 여러 가지 물질에 의하여 조절되며 조골세포 혹은 골수기질세포의 세포표면단백질인 osteoclast differentiation factor (ODF)가 파골전구세포의 수용체를 통하여 osteoclastogenesis를 촉진시킨다. ODF는 TNF-related activation-induced cytokine (TRANCE)/Receptor activation of nuclear factor κ B ligand (RANKL)과 동일하고 T-cell growth와 dendritic cell의 기능을 증진시킨다. Osteoclastogenesis에 있어

서 중요한 다른 인자는 osteoprotegerin (OPG)으로, 이 물질은 osteoclastogenesis를 억제한다. OPG는 1,25-dihydroxyvitaminD₃, PTH 및 IL-11에 의한 osteoclastogenesis signaling을 차단하고 성숙 파골세포의 파골활성을 억제한다.

치주질환은 치조골 소실을 특징으로 하는 염증성 질환으로 골소실은 골형성보다 골흡수가 더 커서 나타나게 되는데, 이 과정에 치주인대세포가 관여할 것으로 추정된다⁸⁾.

최근 연구에 의하면 mitogen-activated protein kinase (MAPK)의 활성이 proinflammatory cytokines에 의하여 자극되며 특히 IL-1 β TNF α 등에 의하여 p38, JNK (c-jun NH₂-terminal kinase) 등의 MAPK 활성이 조절된다고 알려져 있다⁹⁻¹¹⁾. 특히 RANKL의 발현에 p38 MAPK가 관여한다는 보고도 있어 RANKL과 OPG의 발현 조절에 MAPK가 어떤 역할을 할 것으로 추정된다. 현재 치주인대세포, 조상아세포 및 치수세포에서의 RANKL과 OPG의 발현이 보고되었고¹²⁾ 따라서 염증성 cytokines의 자극시 치주인대세포가 치조골에서의 파골세포 분화에 중요한 역할을 할 것으로 예상된다. 본 교실의 다른 연구에서 proinflammatory cytokine인 IL-1 β 의 자극시 치주인

대세포에서 osteoclastogenesis 조절에 중요한 RANKL의 발현이 관찰되었다. 따라서 본 연구는 염증성 cytokine의 자극시 MAPK가 치주인대세포에 의한 RANKL과 OPG의 발현에 어떤 역할을 할 것으로 생각되며, MAPK에 의한 RANKL과 OPG의 조절과정을 밝혀낼 수 있다면 향후 이들 유전자의 발현을 조절할 수 있으며 osteoclastogenesis를 억제시킬 수 있을 것이다. 이에 본 연구는 그 첫 번째 단계로 IL-1 β 로 자극된 치주인대세포에서의 RANKL 발현시 p38 MAPK의 역할을 구명하고자 한다.

II. 실험 재료 및 방법

1. 백서 치주인대세포의 배양

백서의 치주인대세포의 분리는 Matsuda 등¹³⁾의 방법에 준하여 시행하였다. 치아 발거전 5일 동안 0.4% β -aminopropionitrile (Sigma Chemical Co., U.S.A.) 수용액을 수분으로 섭취시켰다. 실험동물에 pentobarbital sodium 30 mg/kg을 복강내 주사하여 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 (Penicillin-Streptomycin, GibcoBRL, U.S.A.)이 첨가된 DMEM 배지를 이용하여 세포배양을 시행하였으며, 3일 간격으로 배양액을 교환해 주었다. 실험에는 계대배양 5-7세대의 것을 사용하였다.

2. p38 MAPK inhibitor에 의한 치주인대세포에서의 RANKL mRNA 발현 억제

1) p38 MAPK inhibitor 적용시 치주인대세포에서의 RANKL mRNA 발현

백서 치주인대세포를 100 mm dish (Falcon, U.S.A.)에 분주한 후 10% FBS가 포함된 DMEM 배지에서 배양하였다. 세포가 밀생에 도달하면 0.3% FBS가 포함된 DMEM 배지로 교환한 후 약 8시간 후 p38 MAPK inhibitor인 SB203580, (Calbiochem, U.S.A.)을 0, 0.1, 1,

5, 10 20 μ M의 농도로 1시간 동안 전처리 하고 IL-1 β (1.0 ng/ml)를 첨가 후 16-18시간 배양하였다.

2) JNK kinase inhibitor에 의한 치주인대세포에서의 RANKL mRNA 발현 억제

백서 치주인대세포를 100 mm dish (Falcon, U.S.A.)에 분주한 후 10% FBS가 포함된 DMEM 배지에서 배양하였다. 세포가 밀생에 도달하면 0.3% FBS가 포함된 DMEM 배지로 교환한 후 약 8시간 후 JNK kinase inhibitor인 PD98059 (Calbiochem, U.S.A.)을 0, 1, 5, 10, 25, 50 μ M의 농도로 1시간 동안 전처리 하고 IL-1 β (1.0 ng/ml)를 첨가 후 16-18시간 배양하였다.

3. 총 RNA 추출

RNA의 분리는 배양액을 제거하고 2.0 ml의 Trizol (Promega, U.S.A.)을 첨가하여 세포를 1.8 ml tube에 수집하였다. 200 μ l의 chloroform을 첨가하여 RNA를 용해시킨 후 4 $^{\circ}$ C, 12,000 rpm에서 10분간 원심 분리하였다. 상층액을 취한 후 500 μ l isopropyl alcohol을 첨가하여 RNA를 침전시키고 4 $^{\circ}$ C 10,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 상층액을 제거하였다. 분리한 RNA는 Tris-EDTA buffer 40 μ l에 녹인 다음 Spectrophotometer (SmartSpecTM, BioRad, CA, U.S.A.)로 그 양을 측정하였으며 -70 $^{\circ}$ C 냉동고에 보관하였다.

4. 역전사 중합효소연쇄반응 (Reverse transcriptase-polymerase chain reaction; RT-PCR)

추출된 총 RNA중 5 μ g을 RT reaction을 위하여 사용하였다. Superscript II (GIBCOBRL, U.S.A.)를 이용하여 70 $^{\circ}$ C 10분, 42 $^{\circ}$ C 70분, 37 $^{\circ}$ C 15분의 조건으로 cDNA를 합성하였다. PCR반응은 10 \times PCR 완충액 (GibcoBRL, U.S.A.) 5 μ l, 1. 5mM MgCl₂ 3 μ l, 10 mM dNTP mix 1 μ l, 각각의 primer 2.5 μ l, 5 unit Taq polymerase 0.2 μ l, 합성된 cDNA 2 μ l를 혼합한 후 3차 증류수를 이용하여 총 50 μ l가 되게 하였다.

PCR 반응 혼합물들을 PCR cycler (Thermocycler, U.S.A.) 를 이용하여 증폭하였다. 증폭된 PCR 산물들은 loading buffer 2 μ l를 첨가하여 총 10 μ l가 되게 하여 1.5% agarose gel에서 running 하였다. 얻어진 PCR data는 gel image analysis system (QualityOne[®], BioRad, U.S.A)에서 house keeping gene인 GAPDH의 발현을 기준으로 하여 각각의 상대적인 발현 비율을 산출하고 그 결과를 분석하였다.

5. RANKL Immunoassay

백서 치주인대세포를 12 well plate에 1×10^5 개의 세포가 되게 분주하고 90% 정도의 밀생에 도달하는 36~48시간 후 배지를 0.3% fetal bovine serum이 함유된 배지로 교환하고 8시간 동안 배양하였다. p38 MAPK inhibitor인 SB203580 (Calbiochem, U.S.A) 0, 0.1, 1, 5, 10, 20 μ M의 농도로 1시간 동안 전처리한 후 IL-1 β (1.0 ng/ml)를 첨가한 후 16~18시간 배양하

였다. 배양 후 세포의 상층액을 회수하여 실험에 사용되기 전까지 -70℃의 초저온 냉동고에 보관하였다. 이 실험은 3번 시행하였으며 치주인대세포로부터 유리되는 soluble RANKL의 양은 효소면역검사법 (Quantikine[®], R&D, U.S.A)을 이용하여 제조회사의 지시에 의거하여 측정하였다. ELISA plate reader (Microplate manager[®], BioRad, U.S.A)로 파장 450 nm에서의 흡광도를 측정하여 그 양을 분석하였다.

6. 통계학적 분석

실험에서 얻어진 수치는 one-way ANOVA와 비모수 통계방법인 Duncan법을 통하여 검증하였다.

III. 결 과

1. p38 MAPK inhibitor에 의한 치주인대세포에서의 RANKL mRNA 발현

PCR primers					
Primer	Expected base pairs	Sequence (5'-3')			
GAPDH-sense (+)	418	CACCATGGAGAAGGCCGGGG			
GAPDH-antisense (-)		GACGGACACATTGGGGGTAG			
OPG-sense (+)	492	TG TAGAGAGGATAAAAACGG			
OPG-antisense (-)		CTAGTTATAAGCAGCTTAT			
RANKL-sense (+)	499	CAGCACTCACTGCTTTTATAGAATCC			
RANKL-antisense (-)		AGCTGAAGATAGTCTGTAGGTACGCC			

PCR programs					
GAPDH	94 °C 1 min	94 °C 1 min	60 °C 2 min	72 °C 1 min	72 °C 10 min
	25 Cycles				
OPG RANKL	94 °C 1 min	94 °C 1 min	50 °C 2 min	72 °C 1 min	72 °C 10 min
	30 Cycles				

Figure 1. Amplification primer sets and conditions used in polymerase chain reaction. GAPDH indicates glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; OPG, osteoprotegerin; and RANKL, receptor activation of nuclear factor κ B ligand.

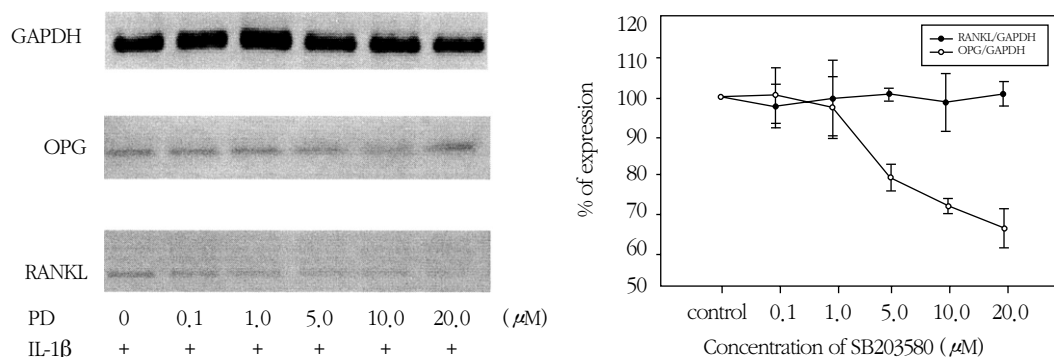


Figure 2. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis of receptor activation of nuclearfactor κ B ligand (RANKL), osteoprotegerin (OPG) and glyceral-dehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) messenger RNA expression in rat periodontal ligament cells.

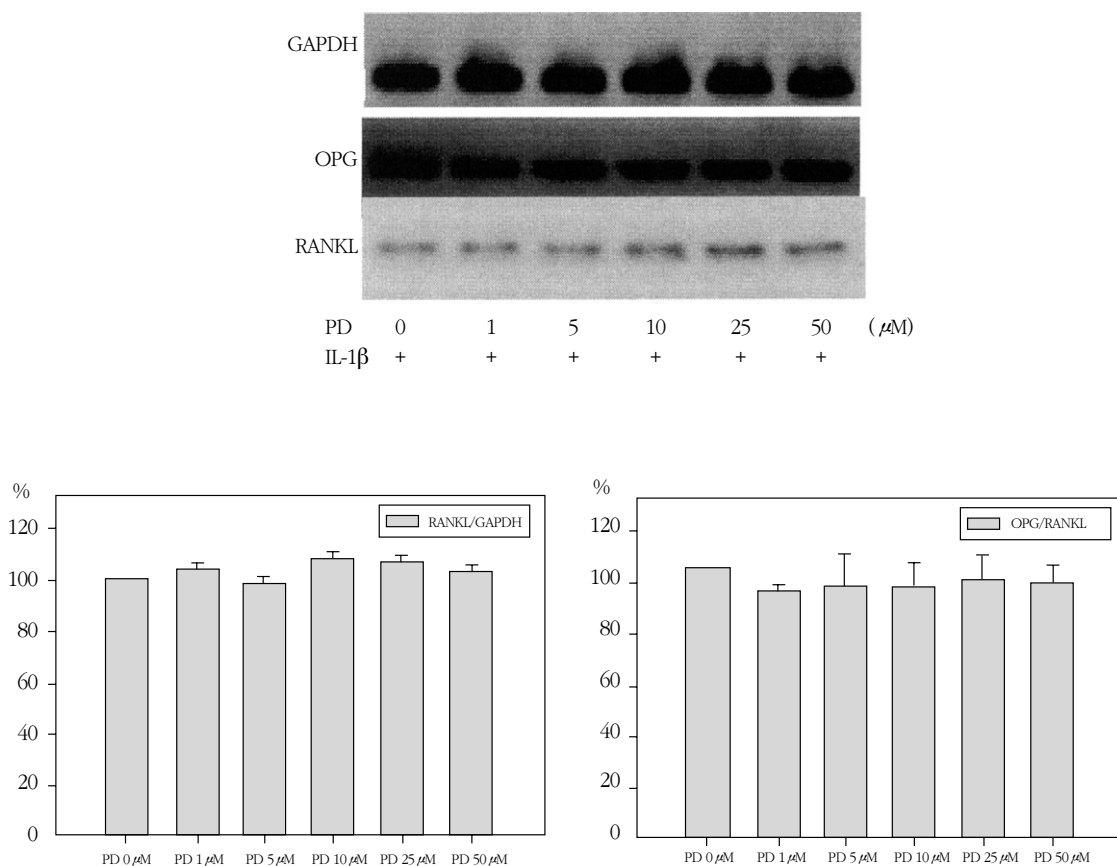


Figure 3. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis of receptor activation of nuclearfactor κ B ligand (RANKL), osteoprotegerin (OPG) and glyceral-dehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) messenger RNA expression in rat periodontal ligament cells.

백서 치주인대세포에서 IL-1 β 자극에 의한 RANKL mRNA의 발현이 p38 MAPK inhibitor에 의하여 억제되는지를 알아본 결과, p38 MAPK inhibitor 농도 5 μ M 이상의 농도에서 RANKL 유전자의 발현이 억제되었다. 그러나 OPG 유전자의 발현은 p38 MAPK inhibitor 농도와 상관없이 일정하였다(Figure 2).

2. JNK kinase inhibitor에 의한 치주인대세포에서의 RANKL mRNA 발현 억제

백서 치주인대세포에서 IL-1 β (1.0 ng/ml) 자극에 의한 RANKL mRNA의 발현이 JNK kinase inhibitor에 의하여 억제되는지를 알아본 결과 JNK kinase inhibitor 농도에 상관없이 RANKL과 OPG mRNA의 발현이 억제되지 않고 일정하게 발현되었다(Figure 3).

3. p38 MAPK에 의한 soluble RANKL 억제

soluble RANKL의 양은 IL-1 β 로만 자극을 준 군은 892 pg/ml이었으며, SB203580 0.1~20 μ M로 전처리

시 그 농도가 증가할수록 그 양이 870~784 pg/ml로 감소하는 경향을 보였으나 통계학적으로 유의한 차이는 없었다(Figure 4).

IV. 고찰

골은 계속 변화하는 조직으로서 조골세포와 파골세포에 의한 골형성과 골흡수가 균형을 이루면서 그 형태와 기능을 유지하게 된다¹⁴⁾. 그러나 그 균형이 깨지면 골다공증 및 osteopetrosis와 같은 골대사성 질환이 발생하게 된다¹⁵⁾. 염증성질환인 치주질환에서는 치조골의 소실을 수반하고 골형성과 흡수의 균형이 깨짐으로써 나타난다. 건강한 치주조직에 있어 치주인대세포는 치조골을 보호할 수 있지만, 치주질환이 존재하는 경우에는 proinflammatory cytokines인 IL-1 β 와 TNF α 등에 의하여 자극을 받은 치주인대세포가 osteoclastogenesis를 유발시키는 물질들을 분비함으로써 치주조직의 파괴를 가져올 수 있다^{16, 17)}.

여러 종류의 cytokines이 염증성 질환을 매개한다^{3, 18)}. 치주질환에서 proinflammatory cytokine의 생성은 골흡수를 유도하며 조직의 정상적인 기능에 부정

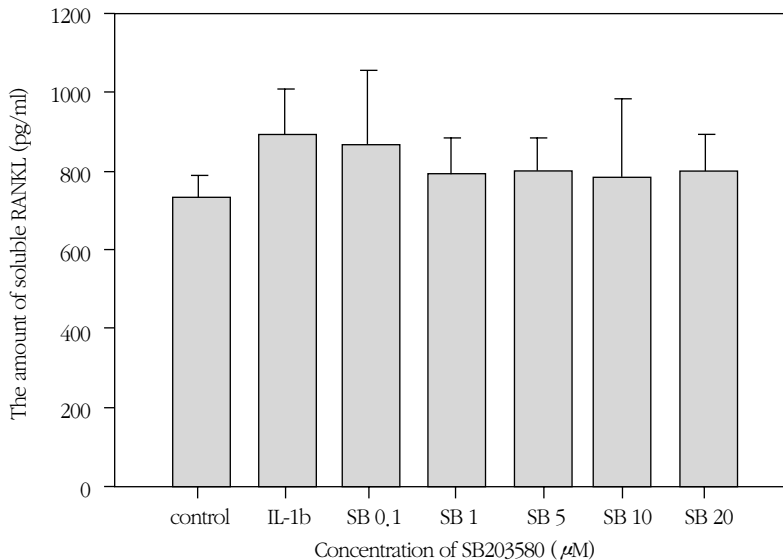


Figure 4. The effect of SB203580 on soluble RANKL production in IL-1 β (1 ng/ml) stimulated rat periodontal ligament cells.

적인 영향을 미치게 된다. 특히 치주인대세포나 골아세포 등에 의해 조절되는 복잡한 cytokine network는 골흡수와 직접 관련된다³⁾. Proinflammatory cytokine인 IL-1 β 와 TNF α 에 의하여 RANKL과 OPG를 포함한 여러 가지 골흡수 물질이 유도된다^{6, 7, 19)}. 따라서 골아세포나 치주인대세포에서 세포전달 경로를 파악하는 것은 골아세포나 치주인대세포에서 파골세포로의 분화를 이해하는데 중요하다.

치조골의 파괴는 골흡수의 주세포인 파골세포의 활성화에 의하여 일어난다³⁾. 파골세포는 조혈세포에서 유래하는 거대다핵세포이다. 이 세포의 분화에는 조골세포와의 세포-세포간 접촉이 파골전구세포가 파골세포로 분화하는데 필수적이다. 조골세포는 파골전구세포를 파골세포로 분화시키는데 이런 작용은 조골세포가 분비하는 RANKL과 M-CSF (macrophage-colony stimulating factor)이라는 세포 표면단백질이 관여한다. OPG도 조골세포가 분비하는 표면단백질로서 RANKL이 파골전구세포에 부착되는 것을 차단함으로써 osteoclastogenesis를 억제한다^{4, 6, 7-10)}. 현재 골아세포와 골수간세포(stromal cell)에서 RANKL과 OPG가 분비되는 것으로 알려져 있다. 또한 이들 세포 이외에 치주인대세포에서도 이들 물질의 발현이 보고되었다²¹⁾. 그러나 osteoclastogenesis에 중요한 이들 물질의 조절에 관한 연구는 드물다.

조골세포의 cytokine 생산을 조절하는 target은 주로 transcription factors, 즉 NF-kB, mitogen-activated kinase (MAPK)이다. 이중 MAPK system이 부분적으로 proinflammatory cytokine에 의해 활성화된다고 보고되었다¹¹⁾. 그러나 이 MAPK에 의한 cytokine 조절을 통하여 성공적으로 골흡수를 조절하기 위해서는 아직 규명되어야 할 부분이 많다. 이에 본 연구에서는 치조골의 흡수를 동반하는 치주질환의 진행에 중요한 역할을 하는 치주인대세포에서 RANKL과 그것의 decoy receptor인 OPG의 발현이 MAPK에 의하여 조절되는지를 알아보고자 본 연구를 시행하였다.

p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK)는 stress-activated serine/threonine protein kinase로 MAP kinase의 superfamily에 속한다. 다양한 세포의

자극 즉, 자외선, 방사선, 열처리, 삼투압의 변화, proinflammatory cytokines등에 의하여 p38 MAPK의 활성을 유도한다. p38 MAPK는 생물학적으로 많은 작용을 갖고 있는데 주된 역할은 세포의 자멸사 (apoptosis), cytokine 생산, 전사조절 (transcriptional regulation)등에 관여한다¹¹⁾. 또한 p38 MAPK는 패혈증, 관절염, Alzheimer's disease, 면역결핍성 바이러스 감염이 있는 경우 세포내 신호전달체계상에서 이 p38 MAPK가 관여하는 것으로 알려지는 등 이 효소 조절의 중요성이 관심사로 대두되고 있다^{9, 11)}. p38 MAPK가 여러 세포에서 어떤 역할을 하는지를 관찰하는 방법은 이 효소만 선택적으로 억제하는 약물이나 제제를 사용하는 것이다²²⁾. 이에 본 연구에서도 p38 MAPK 활성을 선택적으로 억제하는 약물인 SB203580을 이용하여 p38 MAPK가 osteoclastogenesis 조절에 중요한 전달물질의 하나인 RANKL과 OPG 발현의 조절에 어떤 역할을 하는지를 RT-PCR을 통하여 규명하고자 하였다.

RT-PCR의 결과 mRANKL의 발현은 p38 MAPK inhibitor인 SB203580으로 전처리 하였을 경우에 농도 의존적으로 그 발현이 억제되었으나 OPG는 p38 MAPK inhibitor의 농도에 상관없이 일정하게 발현되었다. 이는 RANKL의 발현이 p38 MAPK에 의해 조절이 되며, 치주인대세포에 의한 osteoclastogenesis의 조절이 가능함을 의미한다. 그러나 OPG mRNA는 이 inhibitor에 의해 변화가 없이 일정하게 발현되어 p38 MAPK에 의하여 조절이 되지 않음을 시사하였다. Kanzaki 등²³⁾은 치주인대세포에 기계적 자극 및 PGE₂ 자극 후 RANKL과 OPG 발현을 관찰하였을 때 RANKL 유전자 발현은 PGE₂ 농도 의존적으로 억제되었지만 OPG 유전자 발현은 변화가 없었다고 하였다. Kanzaki 등²³⁾은 RANKL 유전자 발현정도는 COX-2 유전자 발현정도와 관련이 있으나 OPG의 발현은 관계가 없다고 하였는데, COX-2 유전자 발현이 p38 MAPK에 의하여 조절이 된다는 점을 고려할 때 이 결과는 본 실험결과를 간접적으로 지지한다고 할 수 있다.

JNK (c-jun NH₂-terminal kinase) 역시 MAP kinase의 하나로 p38 MAP kinase와 유사하게 세포의 환경

적 자극과 proinflammatory cytokines의 자극에 의하여 활성화되지만, 그 신호전달 경로가 p38 MAPK의 것과는 다르며 역할도 다르다고 알려져 있다¹⁰⁾. 본 실험에서 JNK 활성을 선택적으로 억제하는 약물인 PD98059을 이용하여 JNK가 osteoclastogenesis 조절에 중요한 전달물질의 하나인 RANKL과 OPG 발현의 조절에 어떤 역할을 하는지를 알아보았다. 본 실험결과 RANKL과 OPG의 유전자 발현은 JNK inhibitor인 PD98059의 농도에 관계없이 일정하였다. 이는 JNK가 RANKL과 OPG 유전자 발현을 조절하지 못함을 의미하며 이들 유전자의 발현이 다른 경로를 통하여 조절된다는 것을 시사한다.

따라서 이번 연구 결과 백서 치주인대세포는 proinflammatory cytokine 자극시 osteoclastogenesis를 유도하는 RANKL의 분비를 증가시키며 이것은 p38 MAPK에 의하여 조절됨을 시사하였다. RANKL의 decoy receptor인 OPG도 백서 치주인대세포에서 발현이 되었으나 proinflammatory cytokine의 자극에 의하여 그 발현이 증가하거나 감소하지 않고 일정하게 발현되었다. 이는 백서 치주인대세포에서는 OPG의 발현이 MAP kinase가 아닌 다른 경로를 통하여 조절됨을 의미한다.

Soluble RANKL은 조골세포나 골수 유래의 stromal cell에 parathyroid hormon이나 적절한 cytokines의 자극시 분비된다고 알려져 있으며^{6, 7)}, 그 관찰방법은 주로 분자 생물학적 기법을 이용하고 있다. Soluble RANKL의 합성이나 발현을 관찰하는 방법은 ELISA와 western blot analysis가 있다⁶⁾. Western blot을 이용하여 관찰할 때에는 세포의 상층액(supernatant)을 회수하여 SDS-PAGE gel에 전기영동하여 관찰하는 방법이다. ELISA를 이용하는 방법은 세포의 상층액을 회수하여 그 중 일부를 해당 항체가 들어있는 ELISA plate에 넣고 일정시간 반응 후 기계상에서 흡광도의 차이를 이용하여 그 양을 측정하는 방법으로 western blot보다 더 간단하고 정량분석이 가능하다. 이에 본 연구에서도 soluble RANKL의 관찰을 위하여 보편적으로 이용되는 ELISA 방법을 선택하였다.

Soluble RANKL의 발현을 ELISA를 통하여 관찰한

결과 IL-1 β (1.0 ng/ml) 로 자극한 경우에 soluble RANKL의 합성이 증가되었다. p38 MAPK inhibitor인 SB203580 로 전처리 후 IL-1 β 로 자극하였을 때는 soluble RANKL의 합성이 IL-1 β 만으로 자극한 군에 비하여 농도 의존적으로 그 생성이 억제되는 경향을 보였으나 통계학적으로 유의한 차이는 없었다. 그러나 soluble RANKL의 합성양이 기대했던 것보다 적고 그 편차가 심했다. 이와 같은 결과에 대한 원인을 추정해 보면 첫째, RANKL의 발현에 적절한 농도의 IL-1 β 를 사용했는가이다. 본 연구에서 적용한 IL-1 β 의 농도는 문헌과 본 교실의 RANKL 관련 다른 연구 결과를 토대로 1.0 ng/ml로 하였다. IL-1 β 의 농도에 따른 soluble RANKL의 발현을 관찰한 결과, IL-1 β 로 자극하지 않은 군에 비하여 자극을 한 군에서 RANKL의 합성량이 더 증가하였지만 IL-1 β 의 농도에 따른 RANKL의 합성양에 유의한 차이가 없었다 (data unshown). 둘째, 회수된 상층액의 처리 문제이다. 본 실험은 IL-1 β 를 첨가하고 16-18시간동안 배양 후 상층액을 회수하여 실험시까지 -70℃에 보관하였다. 이 방법은 상층액내 단백질이나 효소를 관찰할 때 통상적으로 사용되는 방법이다. 그러나 이번 실험에서는 회수된 상층액을 농축등의 적절한 처리가 부족했던 것은 사실이며 향후 상층액을 농축시키는 방법등 적절한 상층액의 처리를 통하여 관찰할 필요가 있는 등 기술적인 면의 개선이 필요하리라 생각된다.

본 연구에서는 백서의 치주인대세포를 이용하여 osteoclastogenesis에 중요한 RANKL과 OPG의 발현을 관찰하고 이들 물질의 발현에 mitogen-activated protein kinase의 역할을 규명하고자 하였다. 본 연구결과 치주인대세포에서의 RANKL의 발현은 p38 MAPK inhibitor에 의하여 농도 의존적으로 조절이 되었지만 OPG의 발현은 p38 MAPK와 JNK에 의하여 조절되지 않았다. 본 연구의 결과는 치주질환시 치조골 흡수에 있어서 치주인대세포의 역할을 규명하는데 도움을 줄 것으로 생각된다. 그러나 본 연구는 전파골세포의 파골세포로의 분화에 있어서 치주인대세포의 역할을 규명한 초기 연구이다. 이 후 치주인대섬유아세포에 의한 파골세포 분화조절 인자

들, 특히 OPG의 발현을 조절하는 인자들과 그 경로에 대한 연구가 계속되어야 할 것으로 사료된다.

V. 결론

Mitogen-activated protein kinase (MAPK)중 p38과 JNK (*c-jun* NH₂-terminal kinase)의 활성화는 IL-1 β , TNF α 등의 proinflammatory cytokines에 의하여 자극에 의하여 일어나며 receptor activation of nuclear factor κ B ligand (RANKL)의 조절에도 관여하는 것으로 추정되고 있다. 최근 치주인대세포에서도 RANKL과 OPG의 발현이 보고되고 있고 이들 물질의 발현 조절에 MAPK가 어떤 역할을 할 것으로 생각된다. 이에 본 연구는 치주인대세포에서 RANKL 발현이 p38 MAPK에 의하여 조절되는지를 규명하고자 본 실험을 시행하였다. 백서에서 채취, 분리한 치주인대세포에 IL-1 β (1 ng/ml) 자극을 준 후 RANKL과 OPG의 유전자 발현을 RT-PCR로 관찰하였으며 효소면역검사를 시행하여 soluble RANKL의 양을 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. RT-PCR의 결과 RANKL 유전자의 발현은 p38 MAPK inhibitor인 SB203580으로 전처리 하였을 경우에 농도 의존적으로 그 발현이 억제되었으나 OPG 유전자 발현은 p38 MAPK inhibitor의 농도에 상관없이 일정하게 발현되었다.
2. JNK (*c-jun* NH₂-terminal kinase) inhibitor인 PD98059 에 의한 전처리 후 RANKL과 OPG의 유전자 발현은 JNK inhibitor인 PD98059의 농도에 관계없이 일정하게 발현되었다.
3. Soluble RANKL의 immunoassay 결과, p38 MAPK inhibitor인 SB203580으로 전처리시 RANKL의 발현이 농도 의존적으로 IL-1 β (1 ng/ml) 자극군에 비하여 감소하는 경향을 보였으나 유의한 감소는 없었다.

이상의 결과는 백서 치주인대세포에서의 RANKL 유전자 발현이 p38 MAPK에 의하여 조절됨을 시사되었다.

VI. 참고 문헌

1. Melcher AH: Cellular activity in adaptation of the periodontium. In: Malocclusion and the periodontium, JA McNamara, Jr, and KA Ribbens, Eds., Craniofacial Growth Series Monograph No 15 Ann Arbor, Michigan: University of Michigan Press, 1984:1-15.
2. Pitaru S, McCulloch CAG, Narayanan SA: Cellular origins and differentiation control mechanical during periodontal development and wound healing. J Periodont Res 1994;29:81-94.
3. Mundy GR: Role of cytokines in bone resorption. J Cell Biochem. 1993;53:296-300.
4. 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.
5. Matsumoto M, Sudo T, Saito T, Osada H, Tsujimoto M: Involvement of p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway in osteoclastogenesis mediated by RANKL. J Biol Chem 2000;275:31155-31161.
6. 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- κ B ligand; modulation of the expression by osteotropic factors and cytokines. Biochem Biophys Res Comm 2000;275:768-775.
7. Hofbauer LC and Heufelder AE: Role of receptor activator of nuclear factor- κ B ligand and osteoprotegerin in bone cell biology. J Mol Med 2001;79:243-253.
8. Gillett R, Johnson NW: Bacterial invasion of the periodontium in a case of juvenile periodontitis. J Clin Periodontol 1982;9:93-101.

9. Lee JC, Kumar S, Griswold DE, Underwood DC, Votta BJ, Adams JL: Inhibition of p38 MAP kinase as a therapeutic strategy. *Immunopharmacol* 2000;47:185-201.
10. Herlaar E and Zarin B: p38 MAPK signaling cascades in inflammatory disease. *Mol Med Today* 1999;5:439-449.
11. Luce JM: MAP kinase pathways activated by stress: the p38 MAPK pathway. *Crit Care Med(spec)* 2000;28:N67-N77.
12. Rani CS and MacDougall M: Dental cells express factors that regulate bone resorption. *Mol Cell Biol Res Comm* 2000;3:145-52.
13. 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* vol 1993;38:559-569.
14. Genco RJ, Goldman HM, Cohen DW: Contemporary periodontics. CV Mosby, St Louis, 1990:47-54.
15. Prestwood KM, Kenny AM, Kleppinger A, Kulldorff : Ultralow-dose micronized 17beta-estradiol and bone density and bone metabolism in older women: a randomized controlled trial. *JAMA* 2003;290(8):1042-8.
16. Graves DT and Cochran D: The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *J Periodontol* 2003;74:391-401.
17. Ejeil AL, Gaultier F, Igondjo-Tchen S, Senni K, Pellat B, Godeau G, Gogly B: Are cytokines linked to collagen breakdown during periodontal disease progression?. *J Periodontol* 2003;74:196-201.
18. Kumar S, Votta BJ, Riemann DJ, Badger AM, Gowen M, Lee JC: IL-1 and NF-induced bone resorption is mediated by p38 mitogen activated protein kinase. *J Cell Physiol* 2001;187:294-303.
19. 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;18:529-38.
20. Sasaki T: Differentiation and functions of osteoclasts and odontoclasts in mineralized tissue resorption. *Microscopy Research & Technique* 2003;61(6):483-95.
21. 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;80:887-91.
22. Cuenda A, Rouse J, Doza YN, Meier R, Cohen P, Gallagher TF, Young PR, Lee JC: SB203580 is a specific inhibitor of a MAP kinase homologue which is stimulated by cellular stress and interleukin-1. *FEBS letters* 1995;364:229-233.
23. Kanzaki H, Chiba M, Shimizu Y, Mitani H: Periodontal ligament cells under mechanical stress induce osteoclastogenesis by RANKL up-regulation via prostaglandin E₂ synthesis. *J Bone Min Res* 2002;17:210-220.

RANKL expression is mediated by p38 MAPK in rat periodontal ligament cells

Chong-Cheol Kim, Young-Joon Kim, Hyun-Ju Chung, Ok-Su Kim

Dept. of Periodontology, College of Dentistry and Dental science research institute,
Chonnam National University

Recent studies have demonstrated that human periodontal ligament cells express receptor activation of nuclear factor κ B ligand (RANKL) which enhances the bone resorbing activity of osteoclasts differentiated from hematopoietic preosteoclasts.

The purpose of this study is to determine the effects of p38 MAPK and JNK kinase upon regulating RANKL and OPG in response to IL-1 β (1 ng/ml) in rat periodontal ligament cells. Soluble RANKL was measured by immunoassay. The effects of p38 MAPK on RANKL and OPG expression was determined by RT-PCR.

The results were as follows:

1. Periodontal ligament cells which stimulated by IL-1 β increased soluble RANKL synthesis by dose-dependent pattern.
2. p38 MAP kinase inhibitor (SB203580) showed regulation of soluble RANKL expression by dose-dependent manners.
3. p38 MAP kinase inhibitor (SB203580) regulated the expression of RANKL, but it dose regulate the expression of OPG.
4. JNK (*c-jun* NH₂-terminal kinase) inhibitor (PD98059) did not regulate mRANKL and mOPG.

These results suggested that p38 MAPK play a significant role in RANKL gene expression.