

Treponema denticola 분쇄액에 의한 파골세포 형성 효과

최봉규 · 이현정 · 정국진 · 정순희 · 곽얼아 · 유윤정

연세대학교 치과대학 구강생물학교실

I. 서론

치주질환은 치은연하치태내 존재하는 세균에 의하여 야기되는 염증성질환으로서 치아를 지지하고 있는 치조골 파괴로 치아가 상실되는 주 원인이다. 치주질환이 진행됨에 따라 *Spirochetes*, *Porphyromonas gingivalis* 및 *Actinobacillus actinomycetemcomitans* 등 혐기성 그람 음성세균의 비율이 급속히 증가한다. 특히 치주염 환자에게 형성된 치주낭의 치태, 즉 치은연하치태를 현미경으로 관찰할 때 나선형의 구강 스피로헤타는 치주낭 세균총의 50% 이상을 차지하며, 스피로헤타의 증가가 건강한 치주조직에서 치주염이 발생할 때 나타나는 중요한 변화로 간주되어 치주염 진행에 있어서 스피로헤타의 중요성이 강조 되어 왔다^{1,2)}.

구강 스피로헤타는 모두 *Treponema*(T) 속(genus)에 속하며, *T. denticola*, *T. pectinovorum*, *T. socranskii* 및 *T. vincentii*이 기존 배양된 균주였으며, 이중 *T. denticola*에 대해서 많은 연구가 진행되어, 단백분해효소³⁾, 세포독성인자⁵⁾, 섬유아세포의 성장억제인자⁶⁾ 등 다양한 병원성인자를 지니고 있는 것으로 보고되었다. 치주질환의 주요 증상은 치조골 파괴로서 이는 정상적인 골개조 즉, 골생성 및 골흡수의 불균형에

의해 야기되며, 골개조의 불균형은 치태내 존재하는 세균에 의한 것으로 여겨지고 있다. 이미 치주염의 치태내 존재하는 *P. gingivalis* 및 *A. actinomycetemcomitans*에서는 세균의 어떤 성분이 어떤 기전에 의하여 치조골 파괴를 유도하는지 일부 골파괴기전이 보고되었다. *Treponema* 종에서는 *T. denticola*의 외막에 존재하는 lipopolysaccharide(LPS) 유사물질이 마우스 두개골의 칼슘 유리량을 증가시킨다는 보고가 있으나⁶⁾, LPS 유사물질 이외에 다른 성분도 골흡수와 관련이 있는지 또한 어떤 기전에 의해서 즉 조골세포로부터 수용성물질의 생성을 유도하여 간접적으로 파골세포의 분화를 유도하는지 또는 직접 파골세포전구세포에 작용하여 파골세포의 분화를 유도하는지 작용기전이 밝혀져 있지 않다. 골흡수는 분화 및 활성화된 파골세포에 의해 유도되며, 부갑상선 호르몬, $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin $D_3(1\alpha,25(OH)_2D_3)$, IL-1, IL-6 및 prostaglandin $E_2(PGE_2)$ 등 다양한 인자들이 파골세포형성에 관여한다⁷⁾. 이들 파골세포 분화조절인자들은 조골세포로부터 파골세포 분화유도인자(osteoclast differentiation factor; ODF)의 생성을 자극하며⁸⁾, 이렇게 생성된 ODF는 조골세포의 세포막에 부착된 상태로 파골세포전구세포의 표면에 존재하는 ODF 수용체 즉 RANK(receptor activator of NF- κ B)

* 본 연구는 96년도 연세대학교 학술연구비에 의하여 연구되었습니다.

에 결합하여 파골세포전구세포의 분화를 유도한다^{9,10,11}. 이와 같이 파골세포의 분화에 있어서 조골세포는 중심적인 역할을 하며 이러한 이론을 바탕으로 시험관내에서도 마우스 두개골로부터 분리된 조골세포와 파골세포 전구세포가 존재하는 골수세포를 같이 배양하는 co-culture system을 이용하여 파골세포의 형성을 유도할 수 있게 되었다^{12,13}. 따라서 본 연구에서는 파골세포의 분화를 유도하는 co-culture system을 사용하여, *T. denticola* 균주에 의한 파골세포 분화능 및 파골세포분화와 관련된 일부 기전을 연구하므로써 치주염시 야기되는 치조골 파괴에서 *T. denticola* 균주의 역할을 규명하고자 하였다.

II. 실험 재료 및 방법

1. 실험재료

실험동물로는 5주령에서 8주령사이의 ICR 마우스 수컷을 사용하였으며 두개골 세포를 분리하기 위해서, 태어난 후 1~2일이 경과한 ICR 마우스를 구입하여 사용하였다. 실험 전에 물과 사료를 충분히 주어 자연적인 조건을 부여해 줌으로써 탈수로 인한 비정상적인 반응을 배제하였다.

세포배양매지에 사용되는 alpha Minimum Essential Medium(α MEM), Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM), Antibiotic and antimycotic sol., Sodium pyruvate, Non-essential amino acid, Vitamin sol.은 GIBCO BRL(USA)에서 구입하였으며, 파골세포 형성의 양성대조군인 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, indomethacin, TRAP-staining kit는 sigma(USA)에서 구입하였다.

두개골세포를 분리하기 위해 사용하는 효소인 교원분해효소와 dispase는 Wako(Japan)에서 구입하였으며, 세균분쇄액의 단백질량을 측정하기 위해 Bio-rad에서 구입한 protein assay kit를 사용하였다.

2. 실험 방법

(1) 세균 배양 및 분쇄

본 실험에 사용된 균주인 *T. denticola* (ATCC

33521)는 OMIZ-Pat액체 배지에서 혐기적으로 배양하여 사용하였다. 50ml의 OMIZ-Pat액체 배지¹⁴⁾에서 일주일간 배양한 배양액을 4°C, 5000xg에서 10분간 원심분리하여 균체를 얻었다. 균체를 50ml phosphate buffered saline(PBS)에 현탁한 후 4°C, 5000xg에서 10분간 원심분리하여 세척하였다. 세척한 균주를 1ml PBS에 부유시킨 후 세균 분쇄액을 얻었다. 세균 분쇄액의 단백질량은 Bio-rad protein assay kit를 이용하여 측정하였으며 세균 분쇄액의 농도는 단백질 농도를 기준으로 나타내었다.

(2) ICR 마우스의 두개골로부터 조골세포의 분리

태생 1~2일 정도 경과한 ICR 마우스를 에탄올 용액으로 희생시킨 후 두개골을 무균적으로 적출하였다. 10개의 마우스 두개골을 10ml의 0.2% 교원분해 효소 및 0.1% dispase가 함유된 DMEM배지에서 부유시킨 후 37°C에서 10분간 교반하여 두개골로부터 조골세포를 분리하였다. 이 과정을 3회 반복하여 얻어진 세포 부유액을 2000xg에서 5분간 원심분리하여 마우스 두개골 세포를 분리하였다. 분리한 세포는 10cm 평판세포배양기에 2×10^6 개가 되도록 분주하여 10% 우태아혈청이 함유된 DMEM배지에서 배양하였으며 2일 후 10% 우태아혈청 및 10% DMSO가 함유된 DMEM 배지 1 ml에 마우스 두개골 세포를 2×10^6 개가 되도록 부유시킨 후 liquid nitrogen tank에 보관하여 사용하였다.

(3) ICR 마우스의 골수세포 분리

5~8주 정도 경과한 ICR 마우스의 경골과 대퇴골로부터 연조직을 제거한 후 골말단 부위를 절단하였다. 25 gauge 주사 바늘로 α MEM배지를 골수 강내로 주입하여 골수 세포를 뽑아낸 후 2000xg에서 5분간 원심분리하였다. 상층액을 제거한 후 10ml의 적혈구 용해용액(10 mM Tris · HCl, 0.83% ammonium chloride)을 첨가하여 5분간 반응시켜 골수세포로부터 적혈구를 제거하였다.

(4) 파골세포 형성유도

조골세포 및 골수세포를 배양매지(10% 우태아 혈

청이 함유된 α MEM) 200 μ l 당 세포수가 각각 1×10^4 개 및 1×10^5 개가 되도록 부유한 후 48well 세포배양기의 각 well에 200 μ l씩 분주하여 3일간 배양하였다. 3일 후 배지를 제거하고 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$, *T. denticola* 분쇄액 단독 또는 *T. denticola* 분쇄액 및 indomethacin이 같이 함유된 배양배지에서 4일간 연속배양하여 파골세포 형성을 유도하였다. 또한 세균 분쇄액을 80 $^\circ\text{C}$ 에서 30분간 열처리함으로써 파골세포 형성유도 물질의 단백질 여부를 확인하였다.

(5) Tartrate resistant acid phosphatase 염색

파골세포 형성 유도 후 파골세포의 표지 물질인 tartrate 저항성 산성인산분해효소(tartrate resistant acid phosphatase, TRAP)를 다음과 같은 방법으로 염색하여 균 분쇄액에 의한 파골세포 형성능을 평가하였다. 세포를 고정액(25ml citrate solution, 65ml acetone, 8 ml 37% formaldehyde)으로 처리하여 30초간 고정시킨 후 증류수로 세척하였다. TRAP kit(Sigma)를 이용하여 제조한 염색액을 고정한 세포에 처리하여 빛이 들어가지 않도록 주의하면서 37 $^\circ\text{C}$ water bath에서 1시간 동안 염색하였다. 증류수로 세척한 후 위상차 현미경상에서 각 Well 당 형성된 핵이 3개 이상인 TRAP 양성 세포의 수를 세어 비교하였다.

III. 결과

1. *T. denticola* 분쇄액의 파골세포 형성능

파골세포 전구세포가 함유된 골수세포 및 조골세포가 함유된

포가 함유된 마우스 두개골세포를 *T. denticola* 분쇄액이 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 함유된 배지에서 4일간 배양한 후 TRAP 염색을 실시하여 *T. denticola*에 의한 파골세포 형성능을 평가하였으며, 파골세포 형성능은 균 분쇄액을 처리하지 않은 경우 및 10^{-8} M $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 로 처리한 경우와 비교하였다. 실험결과 균 분쇄액으로 처리하지 않은 경우 TRAP 양성 다핵세포는 관찰되지 않았으나, 10^{-8} M의 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 또는 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 *T. denticola* 분쇄액으로 처리한 경우 TRAP 양성 다핵세포가 관찰되었다(Figure 1).

2. *T. denticola* 분쇄액의 농도에 따른 파골세포 형성능

파골세포 및 두개골세포를 0.25, 2.5, 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 *T. denticola* 분쇄액으로 4일간 처리하여 파골세포 형성능을 평가하였다. 형성된 TRAP 양성 다핵세포 수는 비처치군에서는 관찰되지 않았으며 *T. denticola* 분쇄액 0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 및 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서는 각각 3 ± 1 개 및 36 ± 6 개, 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 64 ± 9 개 로서 0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서도 TRAP 양성 다핵세포가 관찰되었으며 농도가 증가함에 따라 TRAP 양성 다핵세포 수도 증가하였다(Figure 2).

3. 열처리한 *T. denticola* 분쇄액에 의한 파골세포 형성능

80 $^\circ\text{C}$ 에서 30분간 열처리한 *T. denticola* 분쇄액 또는 열처리를 하지 않은 균 분쇄액 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 골수세포

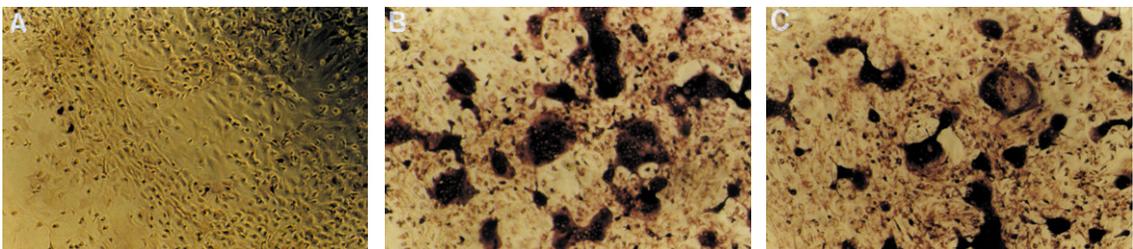


Figure 1. Osteoclast formation induced by extract of *T. denticola*. Mouse bone marrow cells and calvaria cells were co-cultured for 3 days. After changing the medium, cells were treated with extract of *T. denticola*(25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, c) for an additional 4 days. 10^{-8} M $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ treated(b) or non treated cells(a) were used as the positive control and negative control, respectively. After 4 days, cells were fixed and stained for TRAP. Magnification: $\times 100$

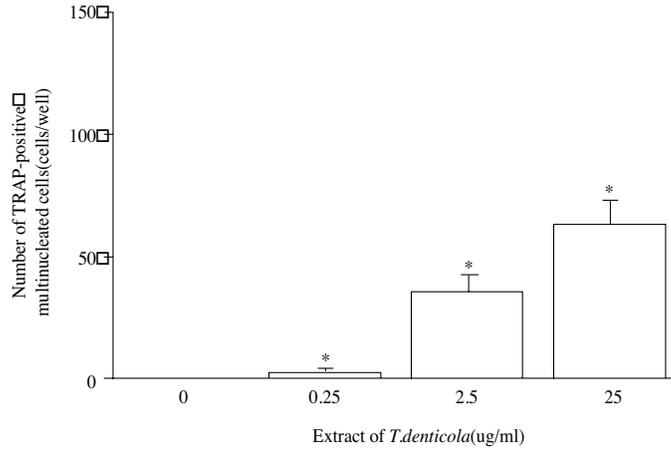


Figure 2. Concentration-dependent stimulation of osteoclast formation induced by extract of *T. denticola*. Mouse bone marrow cells and calvaria cells were co-cultured for 3 days. After changing the medium, cells were treated with various concentrations of extract of *T. denticola*. Then, cells were fixed and stained for TRAP. TRAP-positive multinucleated cells containing more than three nuclei were counted as osteoclast. The results were expressed as means \pm SD of four cultures, *: Significantly different from the non treated group.

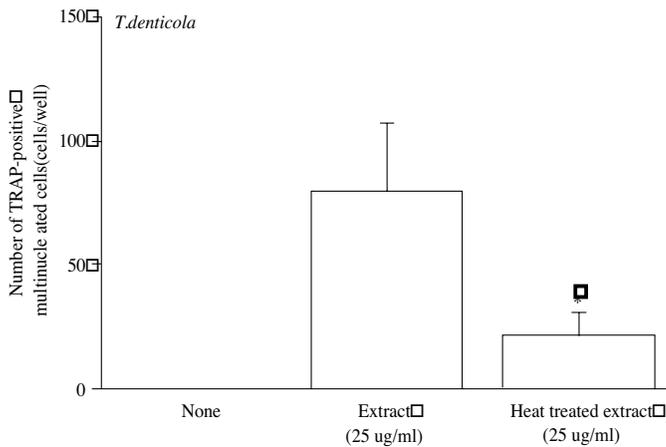


Figure 3. Effect of heat-treated extract of *T. denticola* on the osteoclast formation. Mouse bone marrow cells and calvaria cells were co-cultured for 3 days. After 3 days, cells were cultured in the presence of heat-treated extract of *T. denticola* (25 ug/ml) for additional 4 days. Then, cells were fixed and stained for TRAP. TRAP-positive multinucleated cells containing more than three nuclei were counted as osteoclast. Results are expressed as the mean \pm SD of six cultures, *: Significantly different from the non treated group.

포 및 두개골세포를 4일 간 처리하여 열처리한 균 분쇄액에 의한 파골세포 형성능을 관찰하였다. 열처리를 하지 않은 경우 *T. denticola* 분쇄액에 의하여 형성된 파골세포 수는 80 ± 28 개 이었으며, 열처리를

한 경우에는 22 ± 9 개 로서 열처리에 의하여 *T. denticola* 분쇄액에 의한 파골세포 형성능이 28%로 감소하였다(Figure 3).

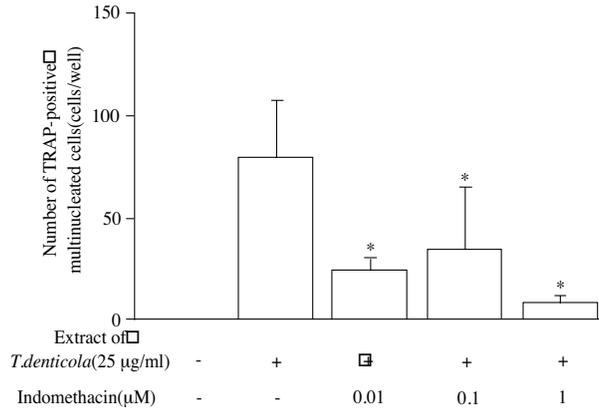


Figure 4. Effect of indomethacin on the osteoclast formation induced by extract of *T. denticola*. Mouse bone marrow cells and calvaria cells were co-cultured for 3 days. After 3 days, cells were cultured with extract of *T. denticola* (25 µg/ml) in the presence of various concentrations of indomethacin (0.01 to 1 µM) for additional 4 days. Then, cells were fixed and stained for TRAP. TRAP-positive multinucleated cells containing more than three nuclei were counted as osteoclast. Results are expressed as the mean ± SD of six cultures. *: Significantly different from the non treated group.

4. *T. denticola* 분쇄액에 의한 파골세포 형성에 미치는 indomethacin의 영향

골수세포와 두개골로부터 분리한 조골세포를 25 µg/ml의 *T. denticola* 분쇄액과 prostaglandin 합성을 저해하는 indomethacin을 함께 처리하여 *T. denticola* 분쇄액에 의한 파골세포형성에 PGE₂의 관련성 여부를 평가하였다. 파골세포는 균 분쇄액 비 처리군에서는 관찰되지 않았으며 *T. denticola* 분쇄액 25 µg/ml만 처리한 경우에는 80 ± 28개, indomethacin 0.01 µM을 함께 처리한 경우에는 25 ± 5개로 균 분쇄액 처리군과 비교하여 31%로 감소하였으며 indomethacin 0.1 µM 또는 1 µM와 함께 처리한 경우에는 각각 36 ± 30개 및 9 ± 3개로서 45% 및 11%로 감소하였다(Figure 4).

IV. 고찰

골개조는 골기질을 형성하는 조골세포 및 골기질을 흡수하는 파골세포의 상호작용에 의하여 이루어진다. 즉 조골세포는 교원질 분해효소를 생성하여 골표면을 덮고 있는 유기물을 제거하여 파골세포의

부착을 유도하며, 또한 파골세포전구세포의 분화를 유도하는 수용성 물질 즉, macrophage-colony stimulating factor(M-CSF) 및 osteoclast differentiation factor(ODF)를 생성하여 파골세포의 증식 및 분화를 유도한다. 이러한 과정에 의하여 분화된 파골세포는 골기질을 분해하며, 이때 골기질내에 존재하는 수용성 물질이 기질로부터 유리되어 조골세포의 분화에 관여하며 최종적으로 분화된 조골세포는 새로운 골기질을 형성한다^{5,9)}. 이와 같이 골흡수 및 골형성은 조골세포 및 파골세포의 일련의 상호작용에 의해 일어나며, 이러한 골흡수 및 골형성에 균형이 깨지면 병리적인 골흡수가 유발된다. 치주염시 유발되는 치조골파괴는 바로 이러한 조골세포에 의한 골형성 및 파골세포에 의한 골흡수의 불균형에 의하여 야기되는 것으로 생각되고 있으며, 치태내 존재하는 세균분포의 불균형이 주원인으로 여겨지고 있다. 세균이 골파괴를 유도하는 기전은 세가지로 분류할 수 있다. 첫째는 세균에 의하여 분비되는 산 및 단백분해 효소에 의한 골기질의 파괴, 둘째는 파골세포의 분화 및 활성화의 촉진, 셋째는 조골세포의 골기질의 합성 억제이다⁵⁾. 본 연구에서는 치주염 환자에서 빈발하게 확인되는 *T. denticola* 분쇄액이 파골세포의 분화

를 유도하였다. vitamin D₃의 활성화 형태인 1 α ,25(OH)₂D₃는 시험관 및 생체내에서 파골세포의 형성을 유도하며, 혼합배양(co-culture system)에서는 10⁻⁸ M에서 파골세포의 분화를 유도하는 것으로 알려져 있어¹⁶⁾, 본 연구에서도 10⁻⁸M 1 α ,25(OH)₂D₃를 양성 대조군으로 하여, 25 μ g/ml 농도에서 *T. denticola* 분쇄액에 의한 파골세포 형성능을 비교하였다. 그 결과 *T. denticola* 분쇄액이 1 α ,25(OH)₂D₃와 유사한 형태의 파골세포 형성을 유도함을 확인할 수 있었으며(Figure 1), 균 분쇄액 0.25~25 μ g/ml 농도 범위에서 농도에 비례해서 파골세포 형성능을 촉진시켰다(Figure 2). 이와 같은 결과는 *T. denticola*가 파골세포의 분화를 촉진시켜 치조골의 파괴에 관여할 가능성을 제시한다.

Treponema 이외에 *Porphyromonas gingivalis* 및 *Actinobacillus actinomycetemcomitans*도 대표적인 치주염의 원인균이며, *Treponema*보다는 배양이 용이하여 *Treponema*와는 달리 이들 세균의 어떤 성분이 골흡수에 관여하는 지 골흡수와 연관된 연구가 활발히 진행되어 왔다. *A. actinomycetemcomitans*에서는 세균 세포벽에 존재하는 LPS¹⁷⁾ 및 캡막(Capsule) 다당체¹⁸⁾ 그리고 세포막에 존재하는 chaperone이라는 불리는 일종의 heat shock protein이 파골세포의 분화를 유도하는 것으로 알려졌다^{19,20)}, *Porphyromonas gingivalis*에서는 LPS²¹⁾ 및 세포막에 존재하는 단백질²²⁾ 이외에 세균의 부착에 관여하는 섬모(Fimbriae)도²³⁾ 골흡수와 관련이 있는 것으로 보고되었다. 치주염과는 관련이 없으나 세균성 관절염의 일으키는 *Pasteurella multocida*에서는 *pasteurella multocida* toxin(PMT)이라 불리는 독소가²⁴⁾, 골수염과 관련이 있는 *Salmonella typhimurium*에서는 세포막에 channel을 형성하는 porin이라 불리는 단백질구조물이²⁵⁾ 골흡수 유도 물질로 보고되었다. 이와 같은 결과들은 세균의 여러 구조물들이 골파괴에 관여하며 세균에 따라 골파괴 유도인자들이 다양함을 시사한다. Gopalsami⁶⁾등은 처음으로 *T. denticola*로부터 분리된 외막(outer sheath)이 마우스 두개골의 Ca²⁺ 유리량을 증가시키며, 외막을 열처리한 경우 Ca²⁺ 유리량이 억제되지 않는 것으로 보아, 외막

에 존재하는 열에 안정한 LPS 유사물질이 파골세포의 분화와 관련이 있을 것으로 보고하였다. *T. denticola* 분쇄액을 열처리하여 단백질질을 불활성 시킨 후 파골세포 분화능을 측정한 결과, 열처리하지 않은 것보다 약 75% 정도 감소하였다(Figure 3). 이러한 결과는 Gopalsami⁶⁾등이 실험한 결과와 상이한데 이는 외막만을 사용한 것과 세균 분쇄액을 사용한 것과의 차이에 의한 것으로 생각되며 열처리 후 파골세포 분화능의 현저한 감소는 LPS유사물질이외에도 열에 불안정한 단백질이 파골세포의 분화에 관여함을 추측할 수 있다.

파골세포의 기원 세포는 granulocyte and macrophage colony-forming cells(CFU-GM)이며 처음에는 파골세포 분화 표식인자인 TRAP을 표현하지 않은 단핵세포 형태로 존재하나 파골세포의 분화가 유도되면 일단 TRAP 양성 단핵세포가 된 후 융합과정을 거쳐 성숙된 TRAP 양성 다핵의 파골세포로 분화한다. 이러한 분화과정에서 M-CSF 및 ODF가 동시에 있어야만 TRAP 음성 단핵세포가 TRAP 양성 단핵세포가 형성되며, M-CSF, ODF 또는 IL-1은 각각 단독으로 TRAP 양성 단핵세포의 융합을 유도한다^{9,26)}. 1 α ,25(OH)₂D₃, PGE₂, 부갑상선 호르몬 및 IL-11은 파골세포 분화 조절 인자로서, 이들 물질은 조골세포로부터 ODF 및 M-CSF의 발현을 유도하여 파골세포의 분화를 유도한다^{8,10)}. *T. denticola* 분쇄액의 파골세포분화는 어떤 기전에 의하여 유발되는지 몇 가지 가능성이 있을 것으로 생각된다. 첫째는 직접 조골세포에 작용하여 ODF 및 M-CSF의 발현을 유도하여, 둘째는 조골세포로부터 다른 매개체 즉 cytokine 또는 PGE₂의 생성을 자극하여 야기될 수 있을 것으로 생각된다. 현재 *A. actinomycetemcomitans* 세균의 캡막다당체 및 LPS에 의한 골흡수에는 IL-1 및 PGE₂가 관여하나^{17,18)} 같은 세균의 표면 단백질인 chaperone에 의한 파골세포 형성에는 IL-1 및 PGE₂가 무관한 것으로 보고되었으¹⁹⁾, *P. gingivalis*의 섬모에 의한 골흡수에는 IL-1 또는 GM-CSF가²³⁾, LPS의 작용에는 IL-1 및 IL-6가²¹⁾ 그리고 세포막 표면 단백질의 작용에는 IL-1, PGE₂ 및 TNF가 모두 관여하는 것으로 알려졌다²²⁾. 이와 같은 결과들은

균 분쇄액이 조골세포로부터 cytokine 또는 PGE₂의 생성을 유도하여 이들 물질이 파골세포의 분화를 매개할 가능성을 제시한다. PGE₂는 세포막에 존재하는 phospholipid가 phospholipase A₂ 및 cyclooxygenase 효소에 의하여 분해되어 생성되는 물질이다. indomethacin은 PGE₂의 합성에 관여하는 cyclooxygenase의 작용을 저해하여 PGE₂ 합성을 억제한다. 본 연구에서 *T. denticola* 분쇄액과 함께 indomethacin을 동시 처리한 경우 균 분쇄액에 의한 파골세포 형성능이 감소하는 것으로 나타났으며 이는 *T. denticola*에 의한 파골세포의 형성에 PGE₂가 관여함을 시사한다(Figure 4). PGE₂에 의한 파골세포 형성은 ODF에 의하여 매개되므로⁸⁾ 최종적으로 이들 균 분쇄액에 의한 파골세포 분화는 조골세포부터의 ODF의 발현에 의하여 야기될 것으로 생각되나 실제로 균 분쇄액에 의하여 ODF가 발현이 되는지에 대한 연구는 더 진행해야 할 것으로 사료된다.

본 연구를 통해 *T. denticola* 분쇄액에 존재하는 열에 불안정한 단백질이 파골세포의 분화와 관련이 있는 것으로 나타났으나 실제로 어떤 물질이며, 파골세포 분화과정에서 PGE₂가 단독으로 관여하는지 또는 다른 cytokine 도 같이 관여하는지 앞으로 연구가 되어야 하겠다.

V. 결론

성인에서 치아 상실의 주 원인은 치주질환으로 알려져 있는데, 주요 증상은 치조골 파괴로서 이는 정상적인 골개조 즉 골생성 및 골흡수의 불균형에 의해 야기되며, 골개조의 불균형은 치태내 존재하는 세균에 의한 것으로 여겨지고 있다. 따라서 치주염 환자과 깊은 연관성을 갖고 있는 *T. denticola*가 골흡수에 미치는 영향을 평가하고자 본 연구에서는 *T. denticola* 분쇄액에 의한 파골세포 형성능을 평가하였다. 파골세포형성능은 파골세포 전구세포 및 조골세포를 같이 배양하여 파골세포 분화를 유도하는 혼합 배양법(co-culture system)을 사용하여 평가하였으며, 형성된 파골세포의 수는 파골세포 분화 표식인자인 tartrate resistant acid phosphatase(TRAP)염색을

실시한 후 TRAP 양성 다핵세포의 수를 세어 확인하였다.

1. 파골세포는 *T. denticola* 분쇄액 0.25~25 μ g/ml 농도 범위에서 형성되었으며 농도가 증가함에 따라 그 수도 증가하였다.
2. 균주 분쇄액을 열처리한 경우 분쇄액(25 μ g/ml)에 의한 파골세포 형성이 감소하였다.
3. PGE₂생성억제인자인 indomethacin을 동시에 처리한 경우 균 분쇄액(25 μ g/ml)에 의한 파골세포 형성이 감소하였다.

이러한 결과는 *T. denticola*의 성분 중 열에 불안정한 물질이 PGE₂를 매개로 파골세포 분화를 유도하여 치주염시 야기되는 치조골 파괴에 관여할 가능성을 제시한다.

VI. 참고문헌

1. Simonson LG, Robinson PJ, Pranger RJ, Cohen ME, Morton HE: *Treponema denticola* and *Porphyromonas gingivalis* as prognostic markers following periodontal treatment. *J. Periodontol.* 63: 270-273, 1992.
2. Loesche WJ: The role of spirochetes in periodontal disease. *Adv. Dent. Res.* 2: 275-283, 1988
3. Rosen G, Naor R, Rahamim E, Yishai R, Sela MN: Protease of *Treponema denticola* outer sheath and extracellular vesicles. *Infect. Immun.* 63: 3973-3979, 1995.
4. Greiner D, Uitto VJ: Cytotoxic effect of peptidoglycan from *Treponema denticola*. *Microbi. Pathog.* 15: 389-397, 1993.
5. Baehni PC, Song M, McCulloch CA, Ellen RP: *Treponema denticola* induces actin rearrangement and detachment of human gingival fibroblast. *Infect. Immun.* 60: 3360-3368, 1992.
6. Gopalsami C, Yotis W, Corrigan K, Schade S, Keene J, Simonson L: Effect of outer membrane

- of *Treponema denticola* on bone resorption. *Oral Microbiol. Immunol.* 8: 121-124, 1993.
7. Suda T, Uagawa N, Nakamura I, Miyaura C, and Takahashi N.: Modulation of osteoclast differentiation by local factors. *Bone* 17: 87S-91S, 1995.
 8. Tsukii K, Shima N, Mochizuki S, Yamaguchi K, Kinoshita M, Yano K, Shibata O, Udagawa N, Yasuda H Suda T, Higashio K: Osteoclast differentiation factor mediates an essential signal for bone resorption induced by $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D₃, prostaglandin E₂, or parathyroid hormone in the microenvironment of bone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 246: 337-341, 1998.
 9. Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespi MT, Martin TJ : Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr. Rev.* 20: 345-357, 1999.
 10. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinoshita M, Mochizuki SI, Tomoyasu A, Yano K, Goto M, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K, Udagawa N: Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor is identical to TRANCE /RANKL. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 3597-3602, 1998.
 11. Nakagawa N, Kinoshita M, Yamaguchi K, Shima N, Yasuda H, Yano K, Morinaga T, and Higashio K: RANK is the essential signaling receptor for osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 253: 395-400, 1998.
 12. Takahashi N, Akatsu T, Udagawa N, Sasaki T, Yamaguchi A, Moseley JM, Martin TJ, and Suda T: Osteoblastic cells are involved in osteoclast formation. *Endocrinology* 123: 2600-2602, 1988.
 13. Loomer PM, Ellen RP, Tenenbaum HC Osteogenic and osteoclastic cell interaction: development of a co-culture system. *Cell Tissue. Res.* 294: 99-108, 1998.
 14. Wyss C, Choi BK, Schupbach P, Guggenheim B, Gobel UB: *Treponema maltophilum* sp. nov., a small oral spirochete isolated from human periodontal lesions. *Int. J. System Bacteriol* 46:745-752, 1996.
 15. Nair sp, Meghji, Wilson M, Redd: k, White P, Henderson B: Bacterially induced bone destruction: Mechanisms and misconceptions. *Infect. Immun.* 64: 2371-2380, 1996.
 16. Suda T, Jimi E, Nakamura I, Takahashi N: Role of $1\alpha, 25$ -dihydroxy vitamin D₃ in osteoclast differentiation and function. *Methods in Enzymology* 282: 223-235, 1997.
 17. Ueda N, Koide M, Ohguchi M, Ishihara Y, Okahashi N, Nishihara T: Involvement of prostaglandin E₂ and interleukin-1 α in the differentiation and survival of osteoclasts induced by lipopolysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Y4. *J. Periodontol. Res.* 33: 509-516, 1998
 18. Nishihara T, Ueda N, Amano K, Ishihara Y, Hayakawa H, Kuroyanagi T, Ohsaki Y, Nagata K, and Noguchi T: *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Y4 capsular-polysaccharide promotes osteoclast-like cell formation by interleukin-1 α production in mouse bone marrow cultures. *Infect. immun.* 63: 1893-1898, 1995.
 19. Meghji S, Wilson M, Barber P, Henderson B; Bone resorbing activity of surface-associated material from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Eikenella corrodens*: *J. Med. Microbiol.* 41: 197-203, 1994.
 21. Kirby AC, Meghji S, Nair SP, White P, Reddi K, Nishihara T, Nakashima K, Willis AC, Sim R, Wilson M and Hendersson B: The potent bone-resorbing mediator of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* is homologous to the molecu-

- lar chaperone GroEL. *J. Clin. Invest.* 96: 1185-1194, 1995.
21. Miyata Y, Takeda H, Kitano S, Hanazawa S: *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide-stimulated bone resorption via CD 14 is inhibited by broad-spectrum antibiotics. *Infect. Immun.* 65: 3513-3519, 1997.
22. Wilson M, Meghji S, Barber P, Henderson B: Biological activities of surface-associated material from *Porphyromonas gingivalis*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol* 6: 147-155, 1993.
23. Kawata Y, Hanazawa S, Amano S, Murakami Y, Matsumoto T, Nishida K, Kitano S : *Porphyromonas gingivalis* fimbriae stimulate bone resorption in vitro. *Infect. Immun* 62:3012-3016, 1994.
24. Felix R, Fleisch H, Frandsen PL: Effect of *Pasteurella multocida* toxin on bone resorption in vitro. *Infect. Immun.* 60: 4984-4988, 1992.
25. Sajeda M, Henderson B, Nair SP, Tufano MA : Bacterial porins stimulate bone resorption. *Infect Immun* 65: 1313-1316, 1997.
26. Takahashi N, Udagawa N, Suda T : A new member of tumor necrosis factor ligand family, ODF/OPGL/TRANCE/RANKL, regulates osteoclast differentiation and function. *Biochem Biophys Res Commun* 256:449-455, 1999.

Effect of Sonicated Extract of *Treponema Denticola* on Osteoclast Differentiation

Bong-Kyu Choi, Hyun-Jung Lee, Gook-Jin Jeong, Soon-Hee Jung, Wall-Ah Kwak, Yun-Jung Yoo
Dept. of Oral Biology College of Dentistry, Yonsei University

Alveolar bone destruction is a characteristic of periodontal disease. *Treponema denticola* are found in significantly increased numbers in the sites affected with periodontal disease. In order to clarify the role of *T. denticola* in destruction of alveolar bone in periodontal disease, this study was undertaken to determine the effect of sonicated extract of *T. denticola* on osteoclast differentiation in co-culture system of mouse bone marrow cells and calvaria cells. The ability of osteoclast formation was estimated by counting the number of tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) positive cells. Sonicated extract of this bacteria stimulated osteoclast formation in a dose dependent manner ($p < 0.05$). Indomethacin, an inhibitor of prostaglandin synthesis, decreased osteoclast formation induced by sonicated extract of this bacteria ($p < 0.05$). Extract-induced osteoclast formation was decreased, when sonicated extract of bacteria was heated ($p < 0.05$). These findings suggest that *T. denticola* induces osteoclast differentiation, and protein component of this bacteria and PGE₂ may play an important role in this process.

Key words : *Treponema denticola*, Osteoclast differentiation, Prostaglandin E₂