

E. coli lipopolysaccharides로 유도된 사람 호중구에서 CD14, Toll-like receptors, cytoskeletal inhibitors 그리고 NF- κ B inhibitor가 MMP-8 분비에 미치는 영향

양승민^{1,2,3} · 김태일¹ · 설양조¹ · 이용무¹ · 구 영¹ · 정종평¹ · 한수부¹ · 류인철¹

서울대학교 치과대학 치주과학교실¹

성균관대학교 의과대학 치과학교실²

삼성서울병원 치과진료부 치주과³

I. 서론

치주질환은 백혈구의 침윤, 결합조직의 소실, 치조골의 흡수, 그리고 치주낭의 형성 등을 특징으로 하는 만성 염증성 질환이다.¹⁾ 이러한 치주질환은 그 원인이 치근면에 부착된 치주병인균의 독소에 의해 유발되며, 이들 병인균의 조직내 침투에 의해 더욱 깊게 진행된다. 독소 및 병인균의 염증 유발과 면역 반응의 진행으로 여러 염증물질과 면역반응 물질이 조직내에 유출되면서 치주조직의 파괴가 급, 만성으로 진행된다.^{2,3)} 호중구(Neutrophil)는 말초순환계에 있는 가장 많은 수의백혈구이며, 치주질환 초기에 치주낭과 치은열구에 존재하는 염증세포의 다수를 차지한다. 또한 치은열구 내에서 세균과 그 부산물에 대한 방어작용을 함으로서 치주조직 건강을 유지하는 데 중요한 역할을 한다.^{4,5)} 치주조직 건강을 유지하는 기전으로 포식작용과, 함유하고 있는 여러 효소들을 방출하여 병원균을 세포 외에서 제거하는 작용이 있다. 그러나 호중구가 만성적으로 높은 수준을 유지하고 있으면 여러 효소들이 조직손상과 치

주조직의 파괴를 야기한다.⁶⁾ 이처럼 호중구는 치주조직 건강의 유지와 치주질환의 조직파괴를 나타내는 양면성을 보인다. 호중구는 그 내부에 과립 형태로 다양한 효소를 가지고 있고, 과립은 세균의 인지에 따라 방출되거나 포식된 세균을 제거하는 데 사용된다.⁷⁾ 호중구의 여러 효소 중 하나인 matrix metalloproteinases(MMPs)는 흔히 collagenase로 간단히 언급되기도 하며, 대개 결합조직세포, 혈관 내피세포, 단핵세포, 대식세포에 의해 합성되고, 금속과 결합하는 단백분해효소이다. MMP의 구성원을 보면 interstitial collagenase(MMP-1,-8,-13), gelatinase(MMP-2,-9), stromelysin(MMP-3,-10,-11) 그리고 membrane-bound group(MMP-14,-15-16,-17)등이 있다. 여러 MMP중 호중구는 MMP-8을 분비한다. 일반적으로 MMP발현의 조절은 전사적 단계를 거쳐서 이루어지나, 호중구의 경우는 이주가 일어나기 전까지 MMP-8,-9의 합성이 완전히 끝나고 발현의 조절은 단지 전사적 단계보다는 과립의 방출에 의해서 이루어진다.⁸⁾

Innate immune response에서 숙주에 침입한 세균은, 숙주 세포에 직접 부착하거나 pattern recognition receptors를 통해 세균의 특정 성분을 인지한 숙주세포에 의해 인식된다.

pattern recognition receptors는 세균의 구조를 인식하기 보다는 특정 형태를 인지하기 때문에 다중특이성을 갖고 상대적으로 소수의 숙주 세포가 빨리 작용할 수 있게 하는 요인이기도 하다.^{9,10)} 이러한 pattern recognition receptors로는 lipopolysaccharide, doublestranded RNA, unmethylated CpG motifs, specific mannans와 glycan등이 있다.^{11,12)} 이 중 lipopolysaccharide (LPS)는 그람음성 세균의 세포막 외막에 존재하는 성분으로 다당류, 인지질 및 소량의 단백질로 구성되어 있고,¹³⁾ 세균의 급속한 성장시기나 세균의외막이 손상된 경우에 유리되어 숙주조직을 파괴시킬 수 있는 다양한 생물학적 활성을 중개한다.¹⁴⁾ 염증의 유발을 비롯한 다양한 생물학적 작용을 가지고 있으며, 구강 내에서는 치태, 타액, 치은삼출액, 염증치은조직, 치석, 그리고 치주질환에 이환된 백악질 등에 세균내독소가 존재한다.¹⁵⁻¹⁷⁾ LPS는pattern recognition시 CD14 의존적인 방식이 여러 세포에서 보여진다. CD14는 두 가지 형태가 있는데 세포막에 부착되어 있는 형태가 있고(mCD14) 다른 하나는 extracellular matrix에 수용성의 형태가 있다(sCD14). CD14가 결합된 LPS는 세포막 표면에 toll-like receptor(TLR)와 부속 단백질인 MD-2로 이루어진 복합수용기와 반응하여 하나 혹은 그 이상의세포내 경로를 통하여 염증매개체의 발현을 야기한다. LPS와 CD14의 결합은 CD14 표면의 전하를 띤 아미노산과의 정전기적 상호작용에 의한 것으로, CD14의 이런 특성으로 인하여 구조적으로 다양한 LPS뿐만 아니라 다른 세균의 성분, 예를 들어 펩티도글리칸이나 lipoteichoic acid등, 과도 반응할 수 있다.^{18,19)} 다른 미생물 성분을 인식하는 것으로toll-like receptors(TLRs)도 소개되었는데 다양한 분자들이 TLRs과 숙주세포 표면에서 복합체를 이루는 것으로 알려졌다. 이러한 분자들로는 CD

14, 분비물 인자인 MD-2, 유도관 단백질 MyD88 등이 있다.²⁰⁻²⁴⁾

미생물이나 다른 세포의 신호를 인식한 세포는 염증매개체의 발현을 나타내는 데 그 과정은 세포질 또는 세포핵에서의 특이 경로를 통하여 이루어진다. 호중구의 경우는 기존의 연구에서 세포핵의 전사단계보다는 과립의 방출에 의해 이루어짐이 알려져 있다.⁸⁾

이번 연구의 목적은 치주질환의 초기에 작용하는 innate immune response에서 pattern recognition receptors의 하나인 LPS가 호중구에 작용하여 MMP-8의 발현을 일으키는 경로에서 CD14, TLR의 역할을, 이 수용기들에 대한 항체를 통하여 알아보고, 호중구로부터 MMP-8의 분비 기전을 설명하기 위해서 세포질에서의 세포뼈대 변화의 효과를 튜불린 중합반응 억제제(tubulin polymerization inhibitors)와 액틴 중합반응 억제제(actin polymerization inhibitors)를 이용하여 조사하고 세포핵에서는 NF-B 억제제를 이용하여 조사하여 분비 경로를 밝히는 것이다.

II. 연구재료 및 방법

1. 연구대상

연구대상자는 연구 6개월 이내에 항생제와 치주치료의 경험이 없는, 전신건강 및 치주상태가 양호한 성인 남자 11명(나이:23-28세, 평균 24.9세)을 선정하였다.

2. 호중구의 분리

연구대상자의 40ml의 혈액을 채취한 후, 동량의 PBS와 5% 텍스트란 용액을 혼합한 후 37°C에서 부화시킨 후, Ficoll-Hypaque(Amersham Bioscience, Uppsala, Sweden)gradient centrifugation method를 이용하여 호중구를 분리하였다. 분리된 호중구를 Phosphate Buffered Solution(PBS)와 Hanks' Balanced Salt Solution

(HBSS)(GIBCO, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 세척하고 RPMI 1640과 10%FBS(GIBCO, Carlsbad, CA, USA) 그리고 1% 항생제가 혼합된 배지에 부유시켰다. Trypan blue 염색을 통한 생활력 검사에서는 98%이상의 생활력을 보였으며, 형태적으로 95%이상의 순도를 보였다.

3. Pattern Recognition Receptors 적용

1) CD14의 중화

분리된 호중구(1.25×10^6 cell/ml)를 anti-CD14 monoclonal antibody(Coulter Clone MY4, 1/400 dilution, Coulter Corporation, Miami, FL, USA)로 15분간 4°C에서 전처리한 후 $1 \mu\text{g/ml}$ 의 E-LPS(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 처리하고 30분간 37°C에서 배양시킨다.

2) TLR2, 4의 중화

분리된 호중구를 1, 2, 그리고 $4 \mu\text{g/ml}$ 의 anti-TLR2 antibody(Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, Germany)와 10, 20, 그리고 $40 \mu\text{g/ml}$ 의 anti-TLR4 monoclonal antibodies (HTA125)(eBioscience, Anaheim, CA, USA)로 37°C에서 1시간 동안 전처리 한 후, $1 \mu\text{g/ml}$ 의 E-LPS를 처리하고 30분간 37°C에서 배양시킨다

4. cytoskeletal inhibitors의 적용

분리된 호중구에 E-LPS($1 \mu\text{g/ml}$)를 처리한 군과 처리하지 않은 군 각각에 미세관 중합반응 억제제(25 μM colchicines, 10 μM nocodazole and 2 μM demecolcine)와 액틴 중합반응 억제제(2 μM cytochalasin B)를 처리한 후 37°C에서 30분간 배양하였다.

5. NF- κ B 억제제의 적용

호중구를 NF- κ B 억제제인 L-1-tosylamido-2-phenylethyl chloromethyl ketone (TPCK)(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 1차

간 전처리 한 후, E-LPS를 처리한 후 37°C에서 각각 1시간, 12시간, 24시간 배양시킨다.

6. MMP-8의 농도 측정

호중구를 다양한 조건하에서 배양 후 적용용 배지를 모은 후 단백분해효소억제제 cocktail(Roche Applied Science, Penzberg, Germany)를 처리하고 MMP-8의 농도를 측정하기 위하여 ELISA Kit(Amersham Bioscience, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK)을 이용한 후 absorbance microplate reader system(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 통하여 분석하였다.

III. 연구결과

1. Pattern Recognition Receptors의 중화가 MMP-8분비에 대한 영향

1) CD14의 중화가 MMP-8분비에 대한 영향

분리된 호중구를 E-LPS로 15분 처리한 결과 아무 처리도 하지 않은 대조군에 비해 약 5배 증가된 MMP-8 분비를 나타내었다. CD14로 중화한 군에서는 E-LPS로 처리한 군의 MMP-8분비가 통계적 유의성을 보일 만큼 억제되었고 E-LPS 처리하지 않고 CD14만 전처리한 군과 비슷한 양을 분비하였다.(Fig. 1)

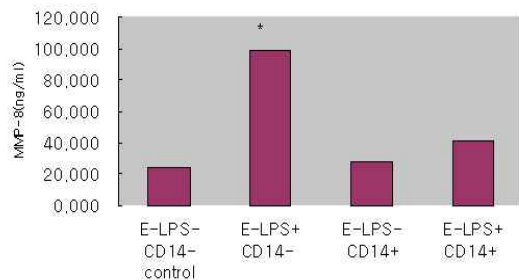


Fig. 1. Effect of anti-CD14 monoclonal antibody on E-LPS-induced MMP-8 release. *Significantly different from control($p < 0.05$)

2) TLR의 중화가 MMP-8분비에 대한 영향

호중구를 E-LPS로 처리한 군, anti-TLR2 monoclonal antibodies로 전처리하고 E-LPS

처리한 군, anti-TLR4 monoclonal antibodies로 전처리하고 E-LPS 처리한 군의 MMP-8 분비를 비교하였다. E-LPS로 처리한 군과 비교해서 anti-TLR2 antibodies로 전처리한 군에서는 항체 농도의 증가와 관련 없이 MMP-8분비에 대한 영향이 없었다. 그러나, anti-TLR4 monoclonal antibodies로 전처리한 경우는 저농도에서는 영향이 없었으나 농도가 증가함에 따라 유의성 있는 MMP-8분비의 감소가 보였다.(Fig.2) 이 결과로 보아 호중구의 E-LPS로 처리한 MMP-8분비는 TLR4와 CD14의 경로를 따른다고 제시할 수 있다.

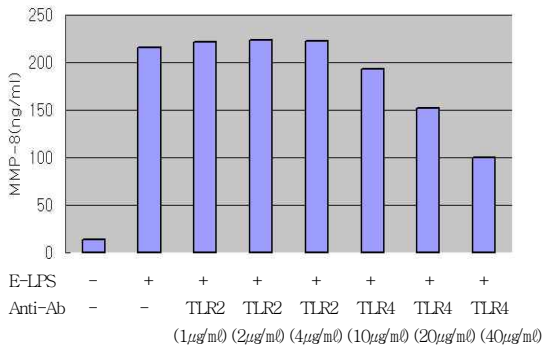


Fig.2. Effect of anti-TLR antibodies on E-LPS-induced MMP-8 release.

2. 세포뼈대와 관련된 억제제의 MMP-8분비에 대한 영향

세포질 내에서의 MMP-8분비 과정을 알아보기 위해 미세관 중합반응 억제제와 액틴 중합반응 억제제를 이용하였다. Colchicine, nocodazole 그리고 demecolcine과 E-LPS를 동시에 처리한 호중구의

MMP-8분비는 E-LPS 단독으로 처리한 군과 비교하여 유의성 있는 억제를 보였고 cytochalasin B 역시 통계적으로 유의성 있는 MMP-8분비의 억제를 보였다. 그러나 각각의 중합반응 억제제는 단독적으로 호중구의 MMP-8분비에 영향을 주지는 못하였다.(Fig.3)

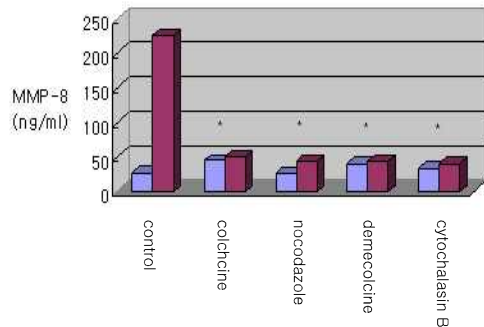


Fig.3 Effect of cytoskeleton-related inhibitors on E-LPS-induced MMP-8 release. Neutrophils were incubated in the absence(blue color) or presence (red color) of E-LPS. * Significantly different from E-LPS alone($p < 0.05$).

3. 세포핵의 NF-κB 경로가 MMP-8분비에 대한 미치는 영향

세포핵 내에서 MMP-8분비의 경로를 알아보기 위해 NF-κB 신호 억제제인 L-1-tosylamido-2-phenylethyl chloromethyl ketone(TPCK)를 처리하였다. TPCK를 전처리하고 E-LPS를 처리한 군과 E-LPS만 처리한 군에서는 배양시간과 관련 없이통계적으로 유의성 있는 차이를 보였으며 배양 시간과 관련해서는 TPCK를 전처리하고 E-LPS를 처리한 군에서 1시간과 24시간 사이에 유의성 있는 차이가 있었다.

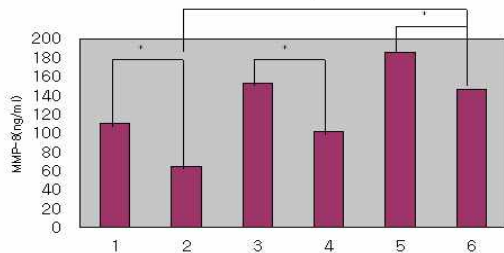


Fig.4 Effect of NF- κ B inhibitor, TPCK, on ELPS-induced MMP-8 release. As timepasses, the release of MMP-8 increase, but in case of incubation with TPCK, the amount of MMP-8 is less than that of E-LPS only. 1: E-LPS 1hr, 2:TPCK+ELPS 1hr, 3: E-LPS 12hr, 4: TPCK+ELPS 12hr, 5: E-LPS 24hr, 6: TPCK+ E-LPS 24hr. * Each group is significantly different.($p<0.05$)

IV. 총괄 및 고찰

일반적으로 LPS가 호중구나 단핵구에서 IL-1 β , TNF- α , 그리고 IL-6등을 비롯한 염증성 사이토카인의 분비를 자극하는 것으로 알려져 있다²⁵⁻²⁷. Sugita 등²⁸은 호중구에서 anti-CD14 monoclonal antibody(MY4)가 LPS로 유도된 NF- κ B활성화를 차단하고, CD14가 LPS 신호전달에 밀접하게 관련되어 있음을 보고하였다. 위의 결과 등으로 볼 때 이 번 실험은 E-LPS로 유도된 MMP-8분비가 anti-CD14 monoclonal antibody(MY4)에 의해서 뚜렷하게 억제됨을 보이고 이것은 E-LPS가 CD14를 포함한 LPS 신호통로를 통한 호중구의 MMP-8분비를 자극함을 암시한다.

초파리의 Toll 수용기와 유사한 사람의 Toll-like Receptor는 세포에서 인식 수용기의 역할을 하는 것으로 10종류가 있다. 이들은 leucine이 풍부한 세포외 영역과 포유류의 IL-1수용기와 상동성을 가지는 세포내 영역으로 이루어져 있다²⁹. TLR2와 TLR4는 막수용기로서 신호전달에서 LPS 신호를 CD14를 통하여 세포내 성분으로 전달하고 선천면역계에서 중요한 역할을 한다³⁰. TLR2는 그람양성균을 인

지하는데 관여하고³¹ TLR4는 그람음성균을 인지하는데 관여한다³². Kido 등³³은 호중구에서 LPS에 의해 유도된 calprotectin의 분비는 anti-TLR2 항체에 의해 유의성 있게 억제됨을 보고 하였고, Fan 등³⁴은 다형핵 백혈구의 이동이 TLR4 신호를 통해 이루어짐을 보고하였고, Frendeus 등³⁵은 E-LPS의 P fimbriae가 상피세포를 활성화 시킬 때 TLR4 신호통로를 이용한다고 하였다. 이번 연구에서는 anti-TLR2 항체보다는 anti-TLR4 항체가 E-LPS로 유도된 MMP-8분비를 유의성 있게 억제하였다. Toshchakov³⁶ 등은 E-LPS가 IFN- β 의 초기 유도에서 TLR4의 활성화가 관찰되고 Calkins 등³⁷은 E-LPS 처리된 TLR4 변형 쥐에서 다형핵백혈구의 격리가 관찰되지 않았다고 보고하였다. 이번 실험에서도 MMP-8분비가anti-TLR4 항체의 농도가 증가할수록 억제되고 anti-TLR2 항체에는 영향을 덜 받았다. 이번 실험은 이전 연구들과 마찬가지로 호중구와 대식세포에서는 E-LPS가 TLR4를 통해서 작용함을 알 수 있다.

호중구는 MMP와 같은 단백분해효소를 특이과립의 형태로 세포질에 저장하고 있고, 이것은 외부 자극이나 세균에 의해 분비되어 강력한 항세균작용을 하게 된다. 이러한 항세균작용은 포식작용과 같이 세포내에서 일어나거나 외부 환경으로 여러 효소를 분비하여 살균을 한다³⁸. 과립의 분비를 세포질과 핵에서의 경로를 알아보기 위해 cytoskeletal 억제제와 NF- κ B 억제제를 이용하였다. LPS는 미세관과 미세섬유의 중합반응에 대한 영향을 통해 단백질 생성을 조절하고 미세관 기질화는 NF- κ B를 활성화시켜서 단백질 생성의 조절에 참여하게 된다^{39,40}. 이번 연구에서도 cytoskeletal 억제제와 E-LPS가 같이 처리된 호중구에서유의성 있는 MMP-8분비의 감소가 보였고, NF-B 억제제인 TPCK의 경우도 비슷한 결과를 보였다. 이번 연구결과와 다른 연구들을 참고할 때 E-LPS에 의해 유도된 MMP-8분비는 NF- κ B활성화와 연계된 미세관 의존 통로나 미세섬유 의존 통로를 통해 이루어짐을 유추할 수 있다.

V. 결론

치주질환은 백혈구의 침윤, 결합조직의 소실, 치조골의 흡수, 그리고 치주낭의 형성 등을 특징으로 하는 만성염증성 질환이다. 특히 결합 조직의 소실과 치조골의 흡수등은 숙주의 면역-염증 방어작용 활성화에 의한 것으로 숙주의 염증반응 과정의 정확한 경로를 밝힘으로써 치주질환의 발현과 진행의 이해에 도움이 된다. 이 번 연구에서는 치주조직 파괴과정의 초기에서 호중구의MMP-8발현이 어떤 경로를 거치는 가를 E.coli의 LPS를 이용하여 알아보았다.

1. E-LPS의 자극에 의한 호중구의 MMP-8 분비는 CD14에 의해 억제되었다. ($p<0.05$)
2. E-LPS의 pattern recognition시 TLR-2보다는 TLR-4에 의존적이며 농도가 증가할수록 MMP-8의 분비는 감소하였다.
3. E-LPS의 자극에 대한 호중구의 MMP-8분비는 세포질 파립의 배출과 연관이 있으며 이는 cytoskeletal 억제제에 의해 감소한다. ($p<0.05$)
4. 호중구의 MMP-8분비는 세포질 내의 파립 방출 뿐만 아니라 일부분은 세포핵 내의 전사과정을 통해 생성된 MMP-8을 분비한 것으로 유추할 수 있다.

이상의 결과고 보아 호중구의 MMP-8분비는 CD14, TLR4의 pattern recognition을 통하여세포질 내의 파립 방출과 세포핵 내에서의 전사과정을 통해 MMP-8을 분비하는 두 가지 경로가 모두 작용하는 것으로 유추할 수 있었다.

VI. 참고문헌

1. Snyderman R. Periodontal disease: a model for the study of inflammation. J Infect Dis 1971;123(6):676-7.
2. Page RC. The role of inflammatory media-

tors in the pathogenesis of periodontal disease. J Periodontal Res; 1991. p. 230-42.

3. Wilson M. Biological activities of lipopolysaccharides from oral bacteria and their relevance to the pathogenesis of chronic periodontitis. Sci Prog 1995;78 (Pt 1):19-34.
4. Genco RJ. Host responses in periodontal diseases: current concepts. J Periodontol 1992;63(4 Suppl):338-55.
5. Wilton JM. The role of the polymorphonuclear leukocyte in the control of subgingival plaque formation. J Periodontal Res 1982;17(5):506-8.
6. Smith JA. Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword. J Leukoc Biol 1994;56(6):672-86.
7. Dixon DR, Bainbridge BW, Darveau RP. Modulation of the innate immune response within the periodontium. Periodontol 2000 2004;35:53-74.
8. Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A, et al. Matrix metalloproteinases: a review. Crit Rev Oral Biol Med 1993;4(2):197-250.
9. Petersen SV, Thiel S, Jensenius JC. The mannan-binding lectin pathway of complement activation: biology and disease association. Mol Immunol 2001;38(2-3):133-49.
10. Turner MW, Hamvas RM. Mannose-binding lectin: structure, function, genetics and disease associations. Rev Immunogenet 2000;2(3):305-22.
11. Janeway CA, Jr. The immune system evolved to discriminate infectious non-

- self from noninfectious self. *Immunol Today* 1992;13(1):11-6.
12. Medzhitov R, Janeway CA, Jr. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol* 1997;9(1):4-9.
13. Morrison DC, Duncan RL, Jr., Goodman SA. In vivo biological activities of endotoxin. *Prog Clin Biol Res* 1985;189:81-99.
14. Morrison DC, Ulevitch RJ. The effects of bacterial endotoxins on host mediation systems. A review. *Am J Pathol* 1978;93(2):526-617.
15. Maidwell-Smith M, Wilson M, Kieser JB. Lipopolysaccharide(endotoxin) from individual periodontally involved teeth. *J Clin Periodontol* 1987;14(8):453-6.
16. Shapiro L, Lodato FM, Jr., Courant PR, Stallard RE. Endotoxin determinations in gingival inflammation. *J Periodontol* 1972;43(10):591-6.
17. Simon BI, Goldman HM, Ruben MP, Baker E. The role of endotoxin in periodontal disease. I. A reproducible, quantitative method for determining the amount of endotoxin in human gingival exudate. *J Periodontol* 1969;40(12):695-701.
18. Sugawara S, Arakaki R, Rikiishi H, Takada H. Lipoteichoic acid acts as an antagonist and an agonist of lipopolysaccharide on human gingival fibroblasts and monocytes in a CD14-dependent manner. *Infect Immun* 1999;67(4):1623-32.
19. Uehara A, Sugawara S, Tamai R, Takada H. Contrasting responses of human gingival and colonic epithelial cells to lipopolysaccharides, lipoteichoic acids and peptidoglycans in the presence of soluble CD14. *Med Microbiol Immunol(Berl)* 2001;189(4):185-92.
20. Akashi S, Nagai Y, Ogata H, Oikawa M, Fukase K, Kusumoto S, et al. Human MD-2 confers on mouse Toll-like receptor 4 species-specific lipopolysaccharide recognition. *Int Immunol* 2001;13(12):1595-9.
21. Shapira L, Takashiba S, Amar S, Van Dyke TE. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide stimulation of human monocytes: dependence on serum and CD14 receptor. *Oral Microbiol Immunol* 1994;9(2):112-7.
22. Sharp L, Poole S, Reddi K, Fletcher J, Nair S, Wilson M, et al. A lipid A-associated protein of *Porphyromonas gingivalis*, derived from the haemagglutinating domain of the RI protease gene family, is a potent stimulator of interleukin 6 synthesis. *Microbiology* 1998;144 (Pt 11):3019-26.
23. Takeuchi O, Takeda K, Hoshino K, Adachi O, Ogawa T, Akira S. Cellular responses to bacterial cell wall components are mediated through MyD88-dependent signaling cascades. *Int Immunol* 2000;12(1):113-7.
24. Watanabe A, Takeshita A, Kitano S, Hanazawa S. CD14-mediated signal pathway of *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide in human gingival fibroblasts. *Infect Immun* 1996;64(11): 4488-94.
25. Bocker U, Yezersky O, Feick P, Mani-

- gold T, Panja A, Kalina U, et al. Responsiveness of intestinal epithelial cell lines to lipopolysaccharide is correlated with Toll-like receptor 4 but not Toll-like receptor 2 or CD14 expression. *Int J Colorectal Dis* 2003;18(1):25-32.
26. Latz E, Visintin A, Lien E, Fitzgerald KA, Espevik T, Golenbock DT. The LPS receptor generates inflammatory signals from the cell surface. *J Endotoxin Res* 2003;9(6):375-80.
27. Schroder NW, Opitz B, Lamping N, Michelsen KS, Zahringer U, Gobel UB, et al. Involvement of lipopolysaccharide binding protein, CD14, and Toll-like receptors in the initiation of innate immune responses by *Treponemaglycolipids*. *J Immunol* 2000;165(5):2683-93.
28. Sugita N, Kimura A, Matsuki Y, Yamamoto T, Yoshie H, Hara K. Activation of transcription factors and IL-8 expression in neutrophils stimulated with lipopolysaccharide from *Porphyromonas gingivalis*. *Inflammation* 1998;22(3):253-67.
29. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA, Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997;388(6640):394-7.
30. da Silva Correia J, Soldau K, Christen U, Tobias PS, Ulevitch RJ. Lipopolysaccharide is in close proximity to each of the proteins in its membrane receptor complex. transfer from CD14 to TLR4 and MD-2. *J Biol Chem* 2001;276(24):21129-35.
31. Yoshimura A, Lien E, Ingalls RR, Tuomanen E, Dziarski R, Golenbock D. Cutting edge: recognition of Gram-positive bacterial cell wall components by the innate immune system occurs via Toll-like receptor 2. *J Immunol* 1999;163(1):1-5.
32. Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in *Tlr4* gene. *Science* 1998;282(5396):2085-8.
33. Kido J, Kido R, Suryono, Kataoka M, Fagerhol MK, Nagata T. Calprotectin release from human neutrophils is induced by *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide via the CD-14-Toll-like receptor-nuclear factor kappaB pathway. *J Periodontal Res* 2003;38(6):557-63.
34. Fan J, Malik AB. Toll-like receptor-4 (TLR4) signaling augments chemokine-induced neutrophil migration by modulating cell surface expression of chemokine receptors. *Nat Med* 2003;9(3):315-21.
35. Frendeus B, Wachtler C, Hedlund M, Fischer H, Samuelsson P, Svensson M, et al. *Escherichia coli* P fimbriae utilize the Toll-like receptor 4 pathway for cell activation. *Mol Microbiol* 2001;40(1):37-51.
36. Toshchakov V, Jones BW, Lentschat A, Silva A, Perera PY, Thomas K, et al. TLR2 and TLR4 agonists stimulate unique repertoires of host resistance genes in murine macrophages: interferon-beta-dependent signaling in TLR4-mediated responses. *J Endotoxin Res* 2003;9(3):169-75.

37. Calkins CM, Barsness K, Bensard DD, Vasquez-Torres A, Raeburn CD, Meng X, et al. Toll-like receptor-4 signaling mediates pulmonary neutrophil sequestration in response to grampositive bacterial enterotoxin. *J Surg Res* 2002; 104(2):124-30.
38. Delima AJ, Van Dyke TE. Origin and function of the cellular components in gingival crevice fluid. *Periodontol* 2000 2003;31:55-76.
39. Isowa N, Keshavjee SH, Liu M. Role of microtubules in LPS-induced macrophage inflammatory protein-2 production from rat pneumocytes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000;279(6):L1075-82.
40. Isowa N, Xavier AM, Dziak E, Opas M, McRitchie DI, Slutsky AS, et al. LPS-induced depolymerization of cytoskeleton and its role in TNF-alpha production by rat pneumocytes. *Am J Physiol* 1999;277(3 Pt 1):L606-15.

Effect of CD14, Toll-like receptors, cytoskeletal inhibitors and NF- κ B inhibitor on MMP-8 release from human neutrophils induced by E. coli lipopolysaccharides.

Seung-Min Yang^{1,2,3}, Tae-Il Kim¹, Yang-Jo Seol¹, Yong-Moo Lee¹,
Young Ku¹, Chong-Pyoung Chung¹, Soo-Boo Han¹, In-Chul Rhyu¹

Department of Periodontology, School of Dentistry, Seoul National University¹

Department of Dentistry, School of Medicine, Sungkyunkwan University, ²

Department of Periodontics, The institute of Oral Health Science, Samsung Medical Center³

Objective: MMP-8 is a neutrophil enzyme and its level increases in some inflammatory diseases, including periodontal disease. We knew that the lipopolysaccharide of E.coli(E-LPS) induced MMP-8 release from human neutrophils. E-LPS is known to induce the production and release of inflammatory cytokines through CD14, Toll-like receptor(TLR). In the present study, we investigated whether MMP-8 release by E-LPS is induced via CD14-TLR pathway and the cellular mechanism of MMP-8 release in human neutrophils.

Material and methods: Human neutrophils were isolated from the peripheral blood of healthy donors and pre-incubated in medium containing antibodies against CD14, anti-TLR2 and anti-TLR4 or several inhibitors of microtubules and microfilaments and then incubated with E-LPS. The cells were treated TPCK and E-LPS simultaneously. The MMP-8 amount in the culture medium was determined using ELISA.

Results: E-LPS increased MMP-8 release from neutrophils and its induction was inhibited by anti-CD14 and anti-TLR4 but not by anti-TLR2 antibodies. The inhibitors of microtubule and microfilament polymerization significantly decreased E-LPS-induced MMP-8 release. TPCK inhibited E-LPS-induced MMP-8 release.

Conclusion: These results suggest that MMP-8 release is induced by E-LPS via the CD14-TLR4 signal pathway in human neutrophils and may be dependent on microtubule and microfilament systems and NF- κ B pathway.

Key words : Human Neutrophil, CD14, TLRs, Cytoskeletal Inhibitors, NF- κ B inhibitor, MMP-8