



저작자표시-비영리-동일조건변경허락 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



동일조건변경허락. 귀하가 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공했을 경우에는, 이 저작물과 동일한 이용허락조건하에서만 배포할 수 있습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

치의학석사학위논문

글루코사민이 lipopolysaccharide에 의해  
유도된 치주인대섬유모세포 염증반응에 미치는 영향

2015년 2월

서울대학교 치의학대학원

치 의 학 과

김은담

글루코사민이 lipopolysaccharide에 의해  
유도된 치주인대섬유모세포 염증반응에 미치는 영향

지도교수 백정화

이 논문을 치의학석사학위논문으로 제출함

2014년 10월

서울대학교 치의대학원

치 의 학 과

김은담

김은담의 석사학위논문을 인준함

2014년 11월

위 원 장 \_\_\_\_\_ (인)

부위원장 \_\_\_\_\_ (인)

위 원 \_\_\_\_\_ (인)

## 글루코사민이 lipopolysaccharide에 의해 유도된 치주인대섬유모세포 염증반응에 미치는 영향

김은담  
서울대학교 치의학대학원  
치의학과

글루코사민은 골관절염의 예방 및 치료 목적으로 처방전 없이 건강식품의 형태로 많이 복용되고 있다. 글루코사민의 효능과 관련하여 혈관에서의 항염증효과, 신경보호, 면역조절기능 등이 보고되고 있지만 치과 관련 효능에 대한 보고는 거의 찾을 수 없었다. 따라서 이 연구에서는 치주염 관련하여 글루코사민이 항염증효과를 나타낼 수 있는지 알아보기 위해 사람 치주인대섬유모세포에 lipopolysaccharide(LPS)를 처리하여 염증 반응을 유도하고 그에 대한 글루코사민의 효과를 관찰하였다. 계대배양한 사람 치주인대섬유모세포를 아무 처리도 하지 않은 대조군, 24 시간 동안 글루코사민(10 mM)을 전처리 한 군으로 나누고 다시 이들 세포를 반씩 나누어 *E. coli* LPS (100 ng/ml)를 처리하거나 처리하지 않고 배양한 후 단백질시료, total RNA, 배양액 시료를 모아 실험을 진행하였다. 염증성 시토카인인 IL-6, IL-8 mRNA 와 단백질 발현 변화를 관찰한 결과, LPS 처리에 의해 유도된 IL-6, IL-8 발현 증가가 글루코사민 처리에 의해 통계적으로 유의하게 감소하는 것으로 나타났다. 글루코사민의 작용점을 알아보려고 mitogen activated kinases (ERK, p38, JNK)와 NF $\kappa$ B 활성화 정도를 관찰한 결과 글루코사민이 이들 mitogen activated kinases 활성화를 오히려 약간 증가시키지만 NF- $\kappa$ B 활성화를 억제하고 DNA 결합능을 줄여 전사활성을 감소시킴을 확인하였다. 이상의 결과는 글루코사민이 사람 치주인대섬유모세포에서 LPS 에 의해 유도되는 염증반응에 억제효과를 나타낼 수 있음을 보여주는 결과로

생각되며, 이후 동물 치주염 모델에서 글루코사민의 효능을 확인하는 추가 연구가 필요함을 시사하였다.

---

**주요어:** 사람 치주인대섬유모세포, 글루코사민, lipopolysaccharide, IL-6, IL-8,  
NF- $\kappa$ B

**학 번:** 2011-22430

목 차

서 론

실험재료 및 방법

결 과

고 찰

참고문헌

영문초록

# 서론

글루코사민은 거의 모든 세포에서 합성되는 당류이며 글리코프로테인과 프로테오글리칸의 필수요소이다 [1]. 포도당이 hexosamine 생합성경로로 유입되어 여러 단계를 거쳐 최종적으로 uridine diphospho-N-acetylglucosamine (UDP-GlcNAc)이 만들어지면 O-GlcNAc transferase 의 작용에 의해 표적 단백질의 세린과 트레오닌 잔기에 O-GlcNAcylation (O-GlcNAc 변형)을 유도하는데 사용된다 [2]. 단백질의 O-GlcNAc 변형은 단백질의 전사후 변형의 한 종류로 많은 단백질들의 기능을 변화시키는 것으로 알려져 있다. 세포에 글루코사민을 투여하면 hexosamine 생합성경로에서 곧바로 UDP-GlcNAc 합성에 사용되므로 세포내 UDP-GlcNAc 함량이 증가되어 전반적으로 단백질의 O-GlcNAc 변형이 증가된다.

세포내 여러 kinase, phosphatase, 전사인자, 세포골격단백질도 O-GlcNAc 변형이 이루어지는 것으로 알려졌으며 글루코사민 투여로 증가된 이러한 다양한 단백질의 O-GlcNAc 변형은 결과적으로 체내에 여러 영향을 미칠 수 있음이 보고되고 있으며 특히 항염증효과를 나타낼 수 있음이 보고되고 있다 [3]. 많은 형태의 혈관질환 발병에 있어 혈관내막의 손상 후 백혈구가 침윤되고 염증성 매개인자들이 발현되어 염증반응이 일어나며, 혈관내강에 글루코사민을 처리했을 때 염증성 매개인자들의 발현이 현저히 감소하는 항염증효과와 혈관보호 효과가 나타났고 그 과정에 단백질의 O-GlcNAc 변형 증가가 관여한다고 보고되었다 [4]. 또한 흰쥐 동맥 평활근세포에 글루코사민을 투여하면 NF- $\kappa$ B p65 단백질의 O-GlcNAc 변형을 유도하고 이는 NF- $\kappa$ B 전사활성을 저해하여 tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )에 의한 염증성 매개인자들의 발현을 억제한다고 하였다 [2]. 골관절염에 대한 글루코사민의 효능도 항염증효과와 관련한 것으로 보고되고 있다. 골관절염 부위에는, TNF- $\alpha$ , interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )같은 염증성 시토카인이 많이 발현되고 이들 염증성 시토카인이 연골기질 단백질 생합성을 저해하고 matrix metalloproteinase 3 (MMP3)같은 기질분해효소 발현을 증가시켜 연골조직의 파괴가 진행되는 것으로 알려져 있다. 연골세포에 글루코사민을 투여한 경우 IL-

$1\beta$  에 의한 NF $\kappa$ B 활성화를 저해하고 Akt 활성화를 유도하였으며 그 결과 MMP3 발현을 저해하는 효과를 나타냄이 보고되었다 [5]. 그 외에도 미세아교세포나 대식세포에서 글루코사민이 lipopolysaccharide (LPS)에 의한 염증매개인자의 발현을 억제하여 항염증 효과를 보인 연구도 보고된 바 있으며 [6, 7], 심장허혈/재관류 또는 뇌허혈/재관류 동물 모델에서 글루코사민을 투여하면 심장세포나 뇌세포의 손상을 감소시키는 효과가 있는 것으로 나타났다 [1, 8].

기존의 보고에 따르면 LPS 에 의해 유도되는 염증반응에 NF- $\kappa$ B 활성화가 중요한 역할을 담당하며, 글루코사민의 항염증 작용에 NF- $\kappa$ B 경로를 억제하는 것이 관여하는 것으로 알려져 있다 [6, 7]. NF- $\kappa$ B 는 Rel 단백질 군에 속하는 단백질의 이합체 형태로 표적유전자의 전사를 조절하는 전사인자이다. Rel 단백질 군에는 c-Rel, RelA (p65), RelB, p105/p50, p100/p52 단백질이 속해 있으며, 가장 흔하게 관찰되는 NF- $\kappa$ B 전사인자는 RelA/p50 이합체의 형태이다. 활성화 신호가 주어지지 않을 때는 NF- $\kappa$ B 가 억제단백질 I $\kappa$ B 과 결합한 형태로 세포질 내에서 비활성화 상태로 있으나, 세포에 활성화 신호가 전달되면 I $\kappa$ B kinase (IKK) 에 의해 I $\kappa$ B 의 N 말단 세린 잔기가 인산화되고 그 결과 I $\kappa$ B 유비퀴틴화 및 프로테아좀에서의 분해과정을 거치게 되며, I $\kappa$ B 에서가 떨어져 나온 NF- $\kappa$ B 는 핵 안으로 이동하여 표적유전자의 전사를 조절한다. RelA 도 인산화 될 수 있으며, RelA 인산화는 전사활성, 핵 내의 위치, 단백질 안정성의 조절 효과를 보이는 것으로 알려져 있다 [9, 10].

골관절염, 혈관염증, 뇌세포 염증 등에 대한 글루코사민의 항염증 효과가 보고되었지만 치주염 등의 구내 염증질환에 대한 글루코사민의 효능에 대한 보고는 찾을 수 없었다. 따라서 본 연구에서는 사람 치주인대섬유모세포에 LPS 를 이용하여 염증반응을 유도하고 글루코사민이 나타내는 조절 효과 및 그 기전을 알아보고자 하였다.



# 실험재료 및 방법

## 세포 배양

사람 치주인대섬유모세포 (HPDLFs)는 ScienCell Research Laboratories (Carlsbad, CA, USA)에서 구입한 후 계대배양하여 p7-8 의 세포를 실험에 사용하였다. 세포는 10% 소혈청, 100 µg/ml streptomycin, 100 U/ml penicillin (Hyclone; Logan, UT, USA) 이 포함된 alpha modified Eagle's medium (Hyclone) 에서 배양하였다.

HPDLFs 에 LPS 에 의한 염증반응을 유도하기 위해 100 ng/ml *E. coli* LPS (Invivogen; San Diego, CA, USA)와 10 ng/ml CD14 (R&D systems; Minneapolis, MN, USA)을 섞어서 처리하였다. 글루코사민 (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA)은 10 mM 의 농도로 사용하였다.

## Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

Easy-Blue<sup>TM</sup> RNA Extraction Reagents (iNtRON Biotechnology; 성남, 한국)를 이용하여 배양된 세포에서 total RNA 를 준비하고 AccuPower<sup>TM</sup> RT premix (Bioneer; 대전, 한국)를 이용해 cDNA 를 제작한 후 SYBR premix EX Taq (Takara; Otsu, Japan)을 사용하여 정량적 PCR 을 수행하였다. PCR 에 사용된 primer 의 염기 서열은 다음과 같다: interleukin-6 (IL-6)-f 5'-AAC AAC CTG AAC CTT CCA AAG A-3', IL-6-r 5'-TCA AAC TCC AAA AGA CCA GTG A-3'; IL-8-f 5'-CTG GCC GTG GCT CTC TTG-3', IL-8-r 5'-CCT TGG CAA AAC TGC ACC TT-3'; glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)-f 5'-TCA ATG ACA ACT TTG TCA AGC-3', GAPDH-r 5'-CCA GGG TTT CTT ACT CCT TGG-3'.

## Transient transfection

96-well 조직배양 플레이트에 HPDLFs 를 분주하고 다음날 NF- $\kappa$ B 발현 플라스미드 (0.2  $\mu$ g/well)와 NF- $\kappa$ B responsive element 를 포함하는 luciferase reporter (0.2  $\mu$ g/well) 를 Lipofectamine2000 (Invitrogen; Carlsbad, CA, USA)을 이용하여 transient transfection 하였다. 세포가 회복된 후 글루코사민이 포함되거나 포함되지 않은 배양액에서 4 시간 배양한 후 vehicle 또는 LPS 를 첨가한 배양액에서 24 시간 더 배양하였다. 그 후 Bright-Glo Luciferase Assay System (Promega; Madison, WI, USA)을 이용하여 luciferase 활성을 측정하였다.

## Western blot 분석

배양이 끝난 세포를 phosphate-buffered saline (PBS)로 세척 후 10 mM Tris-Cl (pH 7.5), 1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 1 mM EDTA (pH 8.0), 50 mM NaF, 1 mM PMSF, 0.2 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1  $\mu$ g/ml aprotinin, 1  $\mu$ M leupeptin, 1  $\mu$ M pepstatin 을 포함하는 lysis buffer 를 이용해 용해시킨 후 단백질 시료를 얻었다. Modified Bradford reagent (Bio-Rad Laboratories; Hercules, CA, USA)를 이용하여 단백질을 정량한 후, 20  $\mu$ g의 단백질을 5X Laemmli sample buffer 에 섞은 후 10% gel 을 이용하여 SDS-PAGE 를 시행하고 PVDF membrane 에 electrotransfer 하였다. 0.1% Tween 20 이 포함된 Tris-buffered saline (TBS-T)에 녹인 5% 탈지분유 용액으로 membrane blocking 을 시행하고, 표적단백질에 대한 일차항체 용액에 membrane 을 넣고 4°C 에서 밤새 반응시킨 후 TBS-T 로 씻어내고 HRP 가 붙은 이차항체에서 반응시켰다. 그 후 Sensi-view<sup>TM</sup> Pico ECL Reagent (Lugen Sci Inc.; 부천, 한국)와 MicroChemi (DNR; Jerusalem, Israel) 장비를 이용하여

면역복합체를 관찰하였다. RelA, phospho-RelA (ser536), I $\kappa$ B $\alpha$ , phospho-I $\kappa$ B $\alpha$ , IKK $\alpha$ / $\beta$ , phospho-IKK $\alpha$ / $\beta$ , Akt, phospho-Akt, extracellular signal-regulated kinase (ERK), phospho-ERK, c-Jun N-terminal kinase (JNK), phospho-JNK, p38 mitogen-activated protein kinases (p38 MAPK), phospho-p38 MAPK 에 대한 항체는 Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA) 제품을 사용하였고,  $\beta$ -actin 항체, rabbit anti-goat HRP-conjugated IgG, goat anti-mouse HRP-conjugated IgG, goat anti-rabbit HRP-conjugated IgG 는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) 제품을 사용하였다.

### Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

6-well 조직배양 플레이트에 HPDLFs 를 분주하고 glucosamine 을 함유하거나 함유하지 않은 배양액에 24 시간 배양하고, vehicle 또는 LPS 를 첨가한 후 24 시간 추가 배양하였다. 배양이 끝난 후 배양액을 수집하여 원심분리한 후 상청액을 모아 ELISA 에 사용하였다. 사람 IL-6, IL-8 에 대한 ELISA kit (KOMA biotechnology; 서울, 한국)를 사용하여 측정을 시행하였다.

### Biotin pull-down assay

NF- $\kappa$ B의 DNA 결합능을 확인하기 위해 biotin pull-down 분석을 시행하였다. HPDLFs를 glucosamine을 함유하거나 함유하지 않은 배양액에 24시간 배양하고, vehicle 또는 LPS를 첨가하고 24시간 추가 배양한 후, NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (Pierce Biotechnology; Rockford, IL, USA)를 이용하여 세포핵 분획 단백질을 분리하였다. 핵단백질과 NF- $\kappa$ B binding element consensus sequence를 포함하는 biotinylated DNA probe (염기서열(f) 5'-AGC TTC AAC AGA GGG GAC TTT CCG AGA GGC TCG AG-3')를 반응시키고,

streptavidin-agarose beads를 이용하여 DNA probe에 결합한 NF- $\kappa$ B를 원심분리하여 얻은 후 RelA 항체를 이용하여 western blot 분석을 시행하였다.

## 통계분석

정량적 PCR, ELISA, luciferase 활성 결과는 평균±표준편차로 제시하였고, Student's *t*-test로 분석하여 *p*값이 0.05보다 적은 경우 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 판단하였다.

## 결 과

### 글루코사민이 LPS 에 의해 유도된 IL-6, IL-8 발현에 미치는 영향

치주인대섬유모세포를 LPS 로 자극했을 때 생성되는 염증성 시토카인의 발현을 글루코사민이 감소시킬 수 있는지를 알아보기 위해, HPDLFs 에 *E. coli* LPS 를 처리하고 1, 3, 6, 12 시간 후에 total RNA 를 추출하여 cDNA 를 만들고 정량적 PCR 을 시행해 IL-6, IL-8 의 발현 양을 비교하여 보았다. IL-6 와 IL-8 의 mRNA 발현 수준을 관찰한 결과 대조군에 비해 IL-6 와 IL-8 의 발현이 모두 크게 증가하였으나, IL-6 는 1 시간째 발현수준이 제일 높고 그 이후 시간 경과에 따라 발현수준이 감소하는 양상을 보였지만 IL-8 은 3-6 시간 정도에 발현 수준이 제일 높게 나타났다 (Fig. 1A, 2A). 글루코사민을 24 시간 전처리하고 LPS 와 함께 글루코사민을 처리한 경우에는 LPS 에 의한 IL-6, IL-8 발현 유도가 차단되어 관찰한 모든 시점에서 LPS 단독 처리군과 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 나타났다 (Fig. 1A, 2A). 단백질 수준에서도 확인하기 위해 LPS 첨가 후 24 시간 경과하였을 때 세포 배양액을 수집하여 ELISA 분석을 시행하였다. LPS 를 단독 처리한 군에서는 IL-6, IL-8 단백질 분비가 유의하게 증가되었으며, 글루코사민을 처리한 군에서는 LPS 에 의한 증가가 통계적으로 유의하게 억제되었다 (Fig. 1B, 2B).

### 글루코사민이 MAPK 활성화에 미치는 영향

글루코사민이 HPDLFs 에서 LPS 에 의한 IL-6, IL-8 발현 증가를 억제하는 것으로 관찰되었기 때문에 글루코사민이 어떤 신호전달경로에 영향을 미치는지 알아보기 위해 먼저 MAPK 활성화에 미치는 영향을 western blot 분석으로 확인하였다. 이를 위해 HPDLFs 을 글루코사민이 포함되거나 포함되지 않은 배양액에서 24 시간 시행하고 vehicle 또는 LPS 를 첨가한 후 5, 10, 30 분 후에 단백질 시료를 준비하였으며 ERK, p38 MAPK, JNK 의 활성화 정도는 이들 단백질의 인산화를 관찰하여 확인하였다. HPDLFs 에 LPS 처리 후 5, 10 분 후에 ERK 활성화, 5, 10, 30 분 후에 JNK 의 활성화가 관찰되었지만 p38 MAPK 의

활성화는 뚜렷하게 관찰되지 않았다 (Fig. 3). 글루코사민을 LPS 와 함께 처리한 군에서 LPS 에 의한 ERK, JNK 활성화를 저해하는 효과는 관찰되지 않았고, 오히려 ERK, JNK, p38 MAPK 의 활성화가 더 증가하는 것으로 나타났다 (Fig. 3).

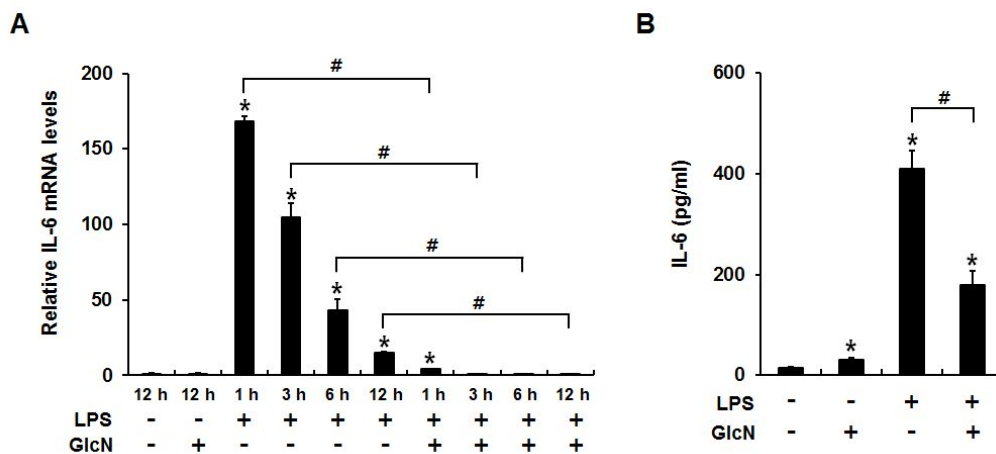
### 글루코사민이 NF- $\kappa$ B 활성화에 미치는 영향

LPS 에 의한 염증성 시토카인 발현에 NF- $\kappa$ B 가 중요한 전사인자로 작용함이 잘 알려져 있으므로 글루코사민이 HPDLFs 에서도 NF- $\kappa$ B 활성화에 영향을 미치는지 알아보려고 하였다. MAPK 활성화를 관찰하는데 사용한 동일한 시료를 이용하여 I $\kappa$ Ba의 인산화 및 단백질 양의 변화를 관찰하였다. LPS 를 처리하고 10 분 후에 I $\kappa$ Ba 인산화의 증가가 관찰되었으며, LPS 처리 후 30 분째에는 I $\kappa$ Ba 단백질의 양적 감소가 뚜렷이 나타났다 (Fig. 4A). LPS 와 글루코사민을 모두 처리한 군에서는 LPS 단독 처리군에 비해 10 분 후에 나타나는 I $\kappa$ Ba 인산화가 감소되었고, 30 분 후에 나타나던 I $\kappa$ Ba 단백질의 양적 감소가 관찰되지 않았다 (Fig. 4A). LPS 처리 후 10 분째에 I $\kappa$ Ba 인산화가 가장 뚜렷이 나타났으므로 대조군, 글루코사민 단독, LPS 단독, LPS 와 글루코사민을 10 분간 함께 처리한 네 가지 군의 단백질 시료를 준비하고 RelA 인산화 정도와 I $\kappa$ Ba 단백질의 양적 변화를 다시 확인하였다. 그 결과 LPS 단독 처리군에서는 RelA 인산화 증가와 I $\kappa$ Ba 단백질의 양적 감소가 뚜렷이 관찰되었으나 LPS 와 글루코사민을 함께 처리한 군에서는 이러한 변화가 억제되는 것으로 나타났다 (Fig. 4B).

LPS 및 글루코사민에 의한 I $\kappa$ Ba의 양적 변화와 RelA 인산화가 실제 NF- $\kappa$ B 의 전사활성을 조절하는지 알아보기 위해 NF- $\kappa$ B responsive element 를 포함하는 luciferase reporter 를 HPDLFs 에 transient transfection 하고 NF- $\kappa$ B 전사활성 변화를 측정하였다. LPS 를 단독 처리한 경우 한 후 NF- $\kappa$ B 전사활성이 통계적으로 유의하게 증가하였으며, 글루코사민을 함께 처리한 경우에는 LPS 에 의한 luciferase 활성 증가를 거의 차단하는 것으로 나타났다 (Fig. 4C). 글루코사민에 의한 I $\kappa$ Ba 인산화 억제효과에 비교하여, 글루코사민의 RelA 인산화 및 NF- $\kappa$ B 전사활성 억제효과가 더 뚜렷하게 관찰되었으므로 다음은 RelA 의 시험관내 DNA 결합능에 미치는 영향을 관찰하였다. NF- $\kappa$ B responsive element consensus sequence 를 함유한 DNA probe 를 이용한 biotin pull-down 분석 결과 LPS

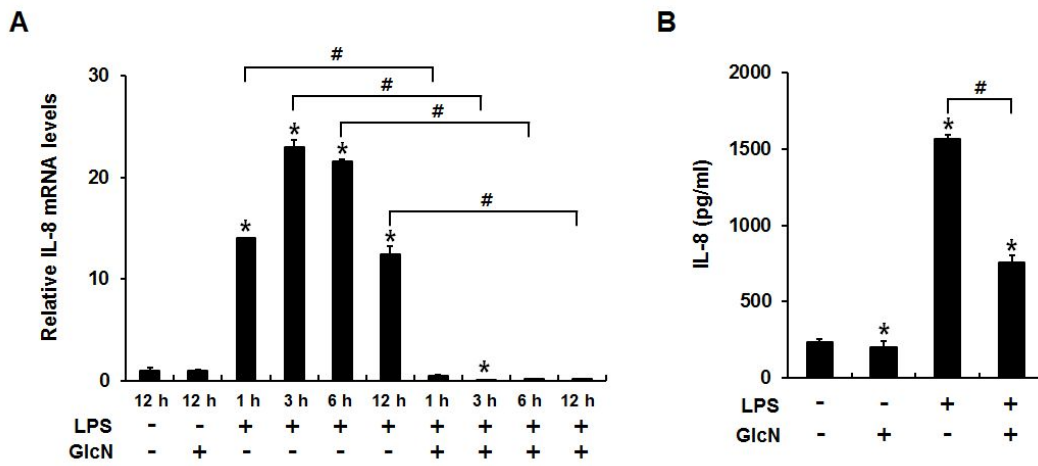
처리한 시료에서는 RelA 의 DNA 결합이 현저히 증가한 반면 LPS 와 글루코사민을 함께 처리한 시료에서는 RelA 의 DNA 결합이 LPS 단독 처리군에 비해 현저히 감소함을 관찰할 수 있었다 (Fig. 4D).

LPS 에 의해 증가된 RelA 인산화가 글루코사민에 의해 차단되는 것으로 나타났으므로 (Fig. 4B) 다음은 글루코사민이 RelA 인산화를 유도하는데 관여하는 것으로 알려진 IKK 와 Akt 의 활성화에도 영향을 미치는지 확인하였다. NF- $\kappa$ B 전사활성 및 DNA 결합능 실험을 위한 시료는 LPS 를 24 시간 처리한 후 만들어졌으므로, 24 시간째에도 이들 상위 분자에 대한 효과가 지속되는지 확인하고자 LPS 처리 24 시간째에 단백질 시료를 관찰하였다. LPS 단독 처리군에서는 IKK $\alpha/\beta$ 와 Akt 인산화의 증가가 관찰되었으나, LPS 와 글루코사민을 함께 처리한 군에서는 LPS 에 의한 IKK $\alpha/\beta$ 와 Akt 인산화 증가가 억제되는 것으로 나타났다 (Fig. 4E).

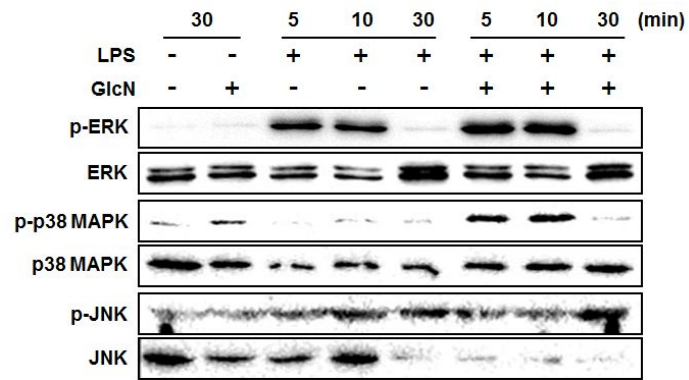


**Fig. 1.** Glucosamine significantly suppressed LPS-induced IL-6 expression. Human periodontal ligament fibroblasts (HPDLFs) were incubated in the presence or absence of glucosamine (10 mM, GlcN), followed by treatment with vehicle or *E. coli* LPS (100 ng/ml) for the indicated time periods (A) or for 24 h (B). Then, quantitative RT-PCR was performed using total RNA (A) or ELISA was performed using conditioned medium (B). IL-6 mRNA levels were presented as the relative fold changes compared with that of control group (LPS(-)/GlcN(-)). The data represent the mean  $\pm$  SD. \* $p < 0.05$  compared with control group (LPS(-)/GlcN(-)). # $p < 0.05$  compared with the indicated group.

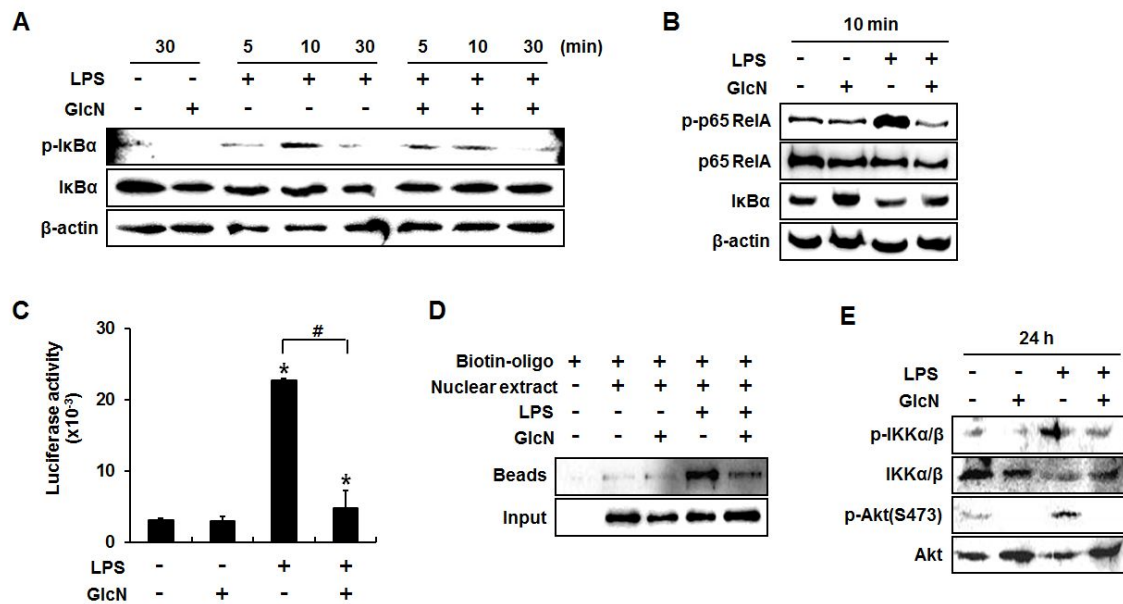




**Fig. 2.** Glucosamine significantly suppressed LPS-induced IL-8 expression. HPDLFs were incubated in the presence or absence of glucosamine for 24 h, followed by treatment with vehicle or *E. coli* LPS for the indicated time periods (A) or for 24 h (B). Then, quantitative RT-PCR was performed using total RNA (A) or ELISA was performed using conditioned medium (B). The data represent the mean  $\pm$  SD. \* $p < 0.05$  compared with control group (LPS(-)/GlcN(-)). # $p < 0.05$  compared with the indicated group.



**Fig. 2.** Glucosamine did not attenuate LPS-induced activation of MAPKs. HPDLFs were incubated in the presence or absence of glucosamine for 24 h, followed by treatment with vehicle or *E. coli* LPS for the indicated time periods. Activation of MAPKs was examined by western blot analyses using the antibodies to the phosphorylated MAPKs. Glucosamine treatment did not suppress LSP-induced MAPKs activation, but showed the tendency to enhance the activation of MAPKs.



**Fig. 3.** Glucosamine suppressed LPS-induced activation of NF- $\kappa$ B transcriptional activity. (A, B) HPDLFs were incubated in the presence or absence of glucosamine for 24 h, followed by treatment with vehicle or *E. coli* LPS for the indicated time periods. Cell lysates were then prepared and western blot analysis was performed. LPS induced phosphorylation of I $\kappa$ B $\alpha$  and p65 NF- $\kappa$ B (RelA) and degradation of I $\kappa$ B $\alpha$ , which were attenuated by glucosamine treatment. (C) HPDLFs were transiently transfected with luciferase reporter plasmid containing NF- $\kappa$ B responsive element. Then, cells were incubated in the presence or absence of glucosamine for 4 h, followed by treatment with vehicle or *E. coli* LPS for 24 h. At the end of culture period, luciferase activity was measured and data were presented as the mean  $\pm$  SD. \* $p < 0.05$  compared with GlcN group. # $p < 0.05$  compared with the indicated group. Glucosamine blocked LPS-induced activation of NF- $\kappa$ B transcriptional activity. (D) HPDLFs were incubated in the presence or absence of glucosamine for 24 h, followed by treatment with vehicle or *E. coli* LPS for 24 h. Nuclear extracts were prepared and incubated with 5'-biotinylated double stranded oligonucleotides that contain the NF- $\kappa$ B responsive element. Biotinylated DNA-protein complexes were then pulled down with streptavidin-agarose beads, and bound NF- $\kappa$ B was detected by immunoblotting with RelA antibody. LPS increased DNA binding affinity of NF- $\kappa$ B, which was reduced by glucosamine treatment. (E) HPDLFs were incubated in the presence or absence of glucosamine for 24 h, followed by treatment with vehicle or *E. coli* LPS for 24 h. Western blot analysis demonstrated that LPS-induced phosphorylation of IKK $\alpha$ / $\beta$  and Akt was maintained after incubation for 24 h, which was suppressed by glucosamine.

## 고찰

서론에서 기술한 바와 같이 관절, 혈관, 뇌에서 일어나는 염증반응에 대해 동물실험 또는 각 조직 구성세포를 활용한 시험관내 시험을 통해 글루코사민이 항염증효과를 나타냄이 보고되었지만 구강 조직 구성세포나 치주염 같은 구내 염증질환과 관련한 글루코사민의 항염증효과에 대한 보고는 찾을 수 없었다. 따라서 본 연구에서는 글루코사민이 사람의 치주염에 치료효과를 가질 수 있는지에 대한 가능성을 탐색해보기 위해 사람 치주인대섬유모세포를 이용하여 연구를 진행하였다. 그 결과 글루코사민이 LPS 에 의한 IL-6, IL-8 의 발현 증가를 저해할 수 있으며, 글루코사민의 억제효과는 LPS 에 의해 활성화되는 신호전달계 중 NF- $\kappa$ B 활성화 및 전사활성 저해에 의존함을 확인하였다.

치주인대섬유모세포는 골모세포로도 분화하여 치조골 형성에도 관여할 수 있을 뿐 아니라, 세균에 노출되었을 때 시토카인, 케모카인들의 분비를 촉진하여 치주조직의 염증반응에 기여하는 것으로 알려져 있다. 따라서 치주의 염증을 줄이기 위해서는 전통적인 염증성 세포들인 호중구, 대식세포, 비만세포 등에서 생성하는 시토카인 뿐 아니라 치주인대섬유모세포에서 분비하는 염증성 시토카인을 감소시키는 데에도 초점을 맞추어야 한다고 하였다[11]. G(-) 세균의 대표적인 독성인자인 LPS 에 노출되면 치주인대섬유모세포의 시토카인, 케모카인 분비가 증가됨이 잘 알려져 있다 [12]. 치주인대섬유모세포에 대한 LPS 의 염증유도 효과가 비교적 낮은 농도인 1-10 ng/ml LPS 에 의해서도 나타난다고 하였으나 [13, 14], 비교적 짧은 시간 LPS 처치를 시행한 본 연구에서는 1-10 ng/ml 농도에서는 뚜렷한 염증유발 효과를 관찰하지 못하였으므로 100 ng/ml 농도의 LPS 를 사용하였다. 본 연구에서 IL-6 와 IL-8 이외에 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  에 대한 RT-PCR 을 수행하였지만 LPS 에 의한 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  발현 증가는 잘 관찰되지 않았으므로 IL-6, IL-8 에 대한 결과만 제시하였다. 이러한 결과는 사람 치주인대섬유모세포에 *E. coli* LPS 를 처리하였을 때 IL-6, IL-8, transforming growth factor- $\beta$  의 발현 증가는 관찰되지만 IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ 의 발현은 잘 관찰되지 않았다는 Yamaji 등의 보고와 유사하였다 [12].

사람 치주인대섬유모세포에서도 글루코사민이 항염증효과를 나타낼 수 있음을 확인하였으므로 이런 효과들이 어떤 분자적 기전을 통해 일어나게 되는지에 대해 알아보기 위해 세포내 신호전달계에 대한 효과를 관찰하였다. 기존의 보고에 글루코사민이 MAPK 활성을 억제하여 항염증 효과를 나타내는 것으로 알려져 있으므로 본 연구에서도 LPS 에 의한 MAPKs 의 활성 변화와 이에 대한 글루코사민의 효과를 관찰하였다. 본 연구에서는 HPDLFs 에서 ERK, p38 MAPK, JNK 활성은 LPS 단독 처리군에 비해 글루코사민을 함께 처리한 군에서 오히려 좀더 증가하는 것으로 나타났다. 이는 흰쥐 심근세포에서 p38 MAPK 의 O-GlcNAc 변형이 증가되면 허혈상태의 심장을 보호하는 효과가 증가된다는 보고 [15] 및 전립선암세포에서 글루코사민에 의해 MAPK 활성화가 약화되어 IL-8 분비가 억제된다는 기존의 보고 [16]와는 상반된 결과이며, 그 이유는 명확하지 않으나 세포의 종류에 따라, 그리고 세포에 노출된 자극의 종류에 따라 글루코사민의 항염증 작용의 표적이 달라질 수 있음을 시사하는 결과로 생각된다.

NF- $\kappa$ B 는 LPS 에 의한 염증성 시토카인 발현 유도에 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있고, 글루코사민이 연골세포와 동맥 평활근세포에서 NF- $\kappa$ B 경로 활성화에 억제 효과를 보인다는 보고가 있었으므로 본 연구에서도 NF- $\kappa$ B 활성화 경로 및 전사활성에 미치는 영향을 관찰하였다 [2, 5]. HPDLFs 에 LPS 를 단독으로 처리한 경우 I $\kappa$ Ba의 인산화 증가와 I $\kappa$ Ba 단백질의 감소가 나타났으며 LPS 와 글루코사민을 함께 처리한 경우 I $\kappa$ Ba 인산화 증가 및 I $\kappa$ Ba 단백질 감소가 완화되는 것으로 나타났다. 또한 NF- $\kappa$ B 의 전사활성도 동일하게 조절되는지 관찰한 결과 LPS 에 의해 증가된 NF- $\kappa$ B 전사활성이 글루코사민에 의해 유의하게 감소되며, 이러한 전사활성에 대한 영향은 NF- $\kappa$ B 의 시험관내 DNA 결합능 변화양상과 동일하게 나타났다. 그러나 NF- $\kappa$ B 전사활성에 대한 글루코사민의 현저한 억제효과에 비해 I $\kappa$ Ba 인산화 증가 및 I $\kappa$ Ba 단백질 감소에 대한 글루코사민의 완화효과는 약하게 나타났다. 기존의 보고에 따르면, I $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B 경로의 활성화 및 RelA 의 핵내 이동뿐 아니라 RelA 의 인산화 조절(세린 276, 세린 529, 세린 536)도 NF- $\kappa$ B 전사활성 조절에 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다 [17-19]. 즉 RelA 의 인산화는 DNA 결합능을 증가시키고 전사활성을 증가시키는 조절역할을 담당한다. RelA 의 인산화를 유도할 수 있는 kinase 로

caseine kinase II, Akt, IKK 등이 알려져 있으며, G(-) 세균에 의한 RelA 인산화(세린 529 또는 세린 536)에 IKK $\beta$  와 phosphatidylinositol 3-kinase/Akt 경로가 관여함이 보고된 바 있다[17]. 본 연구에서도 LPS 처리에 의해 RelA 세린 536 잔기의 인산화가 증가하였고, IKK $\alpha/\beta$ , Akt 인산화 증가가 관찰되었으며, 글루코사민을 함께 처리한 군에서는 이러한 인산화 증가가 현저히 억제됨을 관찰할 수 있었다. 또한 ERK 활성화도 G(-) 세균에 의한 RelA 인산화 및 IL-6 발현 효과를 억제할 수 있다는 기존의 보고를 감안해 볼 때 [17], 본 연구에서 글루코사민 처리에 의해 증가된 ERK 활성화도 RelA 인산화 감소에 기여했을 것으로 생각된다. 이상의 결과로 보아 글루코사민에 의한 NF- $\kappa$ B 전사활성 감소에는 RelA 인산화 저해 및 그로 인한 DNA 결합능 감소도 중요한 기전으로 작용할 것으로 생각된다.

글루코사민은 전사 후 과정에서 단백질의 세린과 트레오닌 잔기에 O-GlcNAc 변형을 시켜 많은 단백질들의 기능을 변화시킨다[3]. 기존의 보고에 의하면 글루코사민이 대동맥 혈관 평활근 세포에서 RelA 의 O-GlcNAc 변형을 증가시키며 동시에 RelA 세린 536 잔기의 인산화를 감소시키고 그 결과 NF- $\kappa$ B 전사활성을 억제한다고 하였으므로, 본 연구에서도 글루코사민에 의한 RelA 인산화 감소에 상위 kinase 활성화의 감소 뿐 아니라 RelA 의 O-GlcNAc 변형 증가도 관여할 것으로 여겨지며 이에 대한 추가 연구가 필요한 것으로 생각된다.

이상의 연구 결과를 종합하면 글루코사민이 사람 치주인대섬유모세포에서 LPS 에 의한 염증 반응을 감소시킬 수 있으며, 그 과정에 특히 글루코사민에 의한 NF- $\kappa$ B 활성화 저해가 중요한 역할을 담당할 것임을 시사하였다. 이러한 연구 결과는 글루코사민이 치주염에 항염증 효과를 나타낼 가능성이 있음을 시사하지만, 당뇨병자에서는 고혈당으로 인해 세포 내 UDP-GlcNAc 생성이 증가되고 그 결과 단백질의 O-GlcNAc 변형이 증가하며 이는 혈관신생 감소에 기여한다는 보고[20]를 감안하여 볼 때 글루코사민 투여가 실제 치주염 완화에 도움을 줄 수 있을 지 알아보기 위해서는 치주염 동물 모델을 이용한 추가 연구가 필요하다고 생각된다.

## 참고문헌

1. Hwang, S.Y., et al., *Glucosamine exerts a neuroprotective effect via suppression of inflammation in rat brain ischemia/reperfusion injury*. *Glia*, 2010. **58**(15): p. 1881-92.
2. Xing, D., et al., *O-GlcNAc modification of NFkappaB p65 inhibits TNF-alpha-induced inflammatory mediator expression in rat aortic smooth muscle cells*. *PLoS One*, 2011. **6**(8): p. e24021.
3. Lima, V.V., et al., *O-GlcNAcylation: a novel pathway contributing to the effects of endothelin in the vasculature*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2011. **300**(2): p. R236-50.
4. Xing, D., et al., *Increased protein O-GlcNAc modification inhibits inflammatory and neointimal responses to acute endoluminal arterial injury*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2008. **295**(1): p. H335-42.
5. Lin, Y.C., et al., *Chondroprotective effects of glucosamine involving the p38 MAPK and Akt signaling pathways*. *Rheumatol Int*, 2008. **28**(10): p. 1009-16.
6. Chuang, K.H., et al., *Attenuation of LPS-induced lung inflammation by glucosamine in rats*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2013. **49**(6): p. 1110-9.
7. Hwang, S.Y., et al., *O-GlcNAcylation and p50/p105 binding of c-Rel are dynamically regulated by LPS and glucosamine in BV2 microglia cells*. *Br J Pharmacol*, 2013. **169**(7): p. 1551-60.
8. Zou, L., et al., *Glucosamine improves cardiac function following trauma-hemorrhage by increased protein O-GlcNAcylation and attenuation of NF- $\kappa$ B signaling*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2009. **296**(2): p. H515-23.
9. Lewander, A., *NF $\kappa$ B p65 phosphorylated at serine-536 is an independent prognostic factor in Swedish colorectal cancer patients*. *Int J Colorectal Dis*(2012), 2011. **27**: p. 6.
10. Moynagh, P.N., *The NF-kappaB pathway*. *J Cell Sci*, 2005. **118**(Pt 20): p. 4589-92.
11. Jonsson, D., et al., *The human periodontal ligament cell: a fibroblast-like cell acting as an immune cell*. *J Periodontal Res*, 2011. **46**(2): p. 153-7.
12. Yamaji, Y., et al., *Inflammatory cytokine gene expression in human periodontal ligament fibroblasts stimulated with bacterial lipopolysaccharides*. *Infect Immun*, 1995. **63**(9): p. 3576-81.
13. Jonsson, D., et al., *LPS-induced MCP-1 and IL-6 production is not reversed by oestrogen in human periodontal ligament cells*. *Arch Oral Biol*, 2008. **53**(9): p. 896-902.
14. Jonsson, D., et al., *LPS induces GROalpha chemokine production via NF-kappaB in oral fibroblasts*. *Inflamm Res*, 2009. **58**(11): p. 791-6.
15. d'Abusco, A.S., et al., *Glucosamine affects intracellular signalling through inhibition of mitogen-activated protein kinase phosphorylation in human chondrocytes*. *Arthritis Res Ther*, 2007. **9**(5): p. R104.
16. Tsai, C.Y., et al., *Glucosamine inhibits IL-1beta-mediated IL-8 production in prostate*

- cancer cells by MAPK attenuation.* J Cell Biochem, 2009. **108**(2): p. 489-98.
17. Ruiz, P.A., et al., *15-deoxy-delta12,14-prostaglandin J2-mediated ERK signaling inhibits gram-negative bacteria-induced RelA phosphorylation and interleukin-6 gene expression in intestinal epithelial cells through modulation of protein phosphatase 2A activity.* J Biol Chem, 2004. **279**(34): p. 36103-11.
  18. Sizemore, N., et al., *Distinct roles of the Ikappa B kinase alpha and beta subunits in liberating nuclear factor kappa B (NF-kappa B) from Ikappa B and in phosphorylating the p65 subunit of NF-kappa B.* J Biol Chem, 2002. **277**(6): p. 3863-9.
  19. Madrid, L.V., et al., *Akt stimulates the transactivation potential of the RelA/p65 Subunit of NF-kappa B through utilization of the Ikappa B kinase and activation of the mitogen-activated protein kinase p38.* J Biol Chem, 2001. **276**(22): p. 18934-40.
  20. Luo, B., Y. Soesanto, and D.A. McClain, *Protein modification by O-linked GlcNAc reduces angiogenesis by inhibiting Akt activity in endothelial cells.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008. **28**(4): p. 651-7.



Abstract

## Effects of glucosamine on lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in human periodontal ligament fibroblasts

EunDam Kim

Department of Dentistry

School of Dentistry

Seoul National University

Glucosamine is commonly taken without prescription as a health supplement to prevent or attenuate the progress of osteoarthritis. Previous studies demonstrated that glucosamine has anti-inflammatory effects in vessels, neuro-protective effects and immune regulatory function. However, there was few report about the effect of glucosamine on oral diseases. Therefore, in this study the effects of glucosamine on lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory responses were investigated using human periodontal ligament fibroblasts (HPDLFs). HPDLFs were incubated in the presence and absence of glucosamine (10 mM) for 24 h, followed by treatment with *E. coli* LPS (100 ng/ml) or vehicle. Quantitative RT-PCR and ELISA results showed that LPS significantly increased the levels of IL-6 and IL-8 mRNA and protein, which were significantly suppressed by glucosamine treatment. Glucosamine treatment did not attenuate, but slightly increased, LPS-induced activation of mitogen activated kinases (ERK, p38, JNK). However, glucosamine attenuated LPS-induced increase in DNA binding affinity and transcriptional activity of NF- $\kappa$ B. These results suggest that glucosamine exert anti-inflammatory effects on HPDLFs exposed to LPS via inhibition of NF- $\kappa$ B activity, necessitating further studies using animal periodontitis models.

---

**Keywords:** Human periodontal ligament fibroblasts, glucosamine, lipopolysaccharide, IL-6, IL-8, NF- $\kappa$ B

**Student number:** 2011-22430