

***P. gingivalis* and *A. actinomycetemcomitans* LPS Differentially Regulate the Expression of Inflammatory Cytokines and Chemokines in Gingival Fibroblast and Periodontal Ligament Fibroblast**

Sin Young Park, Yong Hee Kim, Ji Hae Jun, Gwan-Shik Kim, Byung-Moo Min¹ and Jeong-Hwa Baek

Department of Pharmacology and Dental Therapeutics, ¹Department of Oral Biochemistry, College of Dentistry, Seoul National University

(Received January 24, 2004 ; Accepted February 18, 2004)

Lipopolysaccharide (LPS) from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (*A. a*) and *Porphyromonas gingivalis* (*P. g*) plays a role as a virulent factor in periodontal diseases. Although the inflammatory cells are the major immunomodulatory cells, fibroblasts also secrete a variety of inflammatory cytokines and chemokines. In this study, we compared the effects of *A. a* and *P. g* LPS on the expression of inflammatory cytokines, chemokines and osteoclastogenesis regulatory factors in human gingival fibroblasts (GF) and periodontal ligament fibroblasts (PDL). GF and PDL were cultured in the presence of LPS from *A. a* (1 µg/ml) or *P. g* (1 µg/ml) for 0, 4, 8, 24, 48 h and the expression were analyzed by reverse transcription-polymerase chain reactions. Although Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 were constitutively expressed both in GF and in PDL, their expression levels were more prominent in PDL. LPS increased the expression of interleukin(IL)-1β, IL-6, and tumor necrosis factor-α, IL-8, and RANTES. The expression of transforming growth factor-β, monocyte chemoattractant protein-1, stromal cell-derived factor 1, macrophage-colony stimulating factor, and osteoprotegerin was not significantly altered by LPS in both cells. LPS slightly increased the expression of receptor activator of nuclear factor-κB ligand (RANKL). PDL showed more responsiveness to LPS than GF did, being consistent with TLR expression levels. Moreover, the cytokine/chemokine stimulatory activity of *P. g* LPS was less compared with that of *A. a* LPS, providing *P. g* with the efficiency to evade innate host defense mechanism. These results showed that both GF

and PDL could act as immunomodulatory cells in response to periodontopathic bacteria and LPSs from different bacteria differentially regulated those immuno-regulatory cells.

Keywords: periodontopathic bacteria, lipopolysaccharide, gingival fibroblast, periodontal ligament fibroblast, inflammatory cytokine, chemokine

서 론

치주염은 세균에 의한 감염과 그에 수반되는 염증반응에 의해 유발되며 심하면 치조골을 포함한 치주조직의 파괴로 결국 치아의 탈락까지도 유발되는 질환이다. 치은연하 세균막에는 많은 세균이 존재하나 이 중 치주염 유발과 직접적으로 연관된 것으로 알려진 세균은 비교적 제한적이며 *Porphyromonas gingivalis* (*P. g*)와 *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (*A. a*)와 같은 그램 음성 간균은 대표적인 치주염 관련 세균으로 알려져 있다 (Socransky와 Haffajee, 1993). Lipopolysaccharide (LPS)는 그램 음성 세균의 대표적인 병독인자로 알려져 있으며 그 수용체인 Toll-like receptor (TLR)를 통하여 선천성 면역 반응을 유도하고 염증반응을 유발하는 것으로 알려져 있다 (Heumann과 Roger, 2002). 현재까지 알려진 TLR 중 TLR4가 대표적인 LPS의 수용체로 작용하며, TLR2는 대부분 그램 양성균의 peptidoglycan, lipoteichoic acid, lipoprotein의 인식과 더불어 *P. g* 같은 일부 그램 음성 세균의 LPS를 인식하는 수용체로 작용하는 것으로 보고 되었다 (Takeda 등, 2003).

*Correspondence to: 백정화, 서울시 종로구 연건동 28, 서울대학교 치과대학 치과약리학교실, Tel.: +82-2-740-8688, Fax.: +82-2-741-3193. E-mail: baekjh@snu.ac.kr

치주염 관련 세균의 병독 기전을 설명하기 위해 치주염 관련 세균의 LPS가 염증 관련 세포 활성화에 미치는 영향에 대한 연구가 많이 시행되어 왔다. 특히 단핵구/대식세포를 대상으로 한 연구 결과 LPS 처리 후 interleukin(IL)-1 β , IL-6, tumor necrosis factor- α (TNF- α) 같은 염증성 cytokine과 IL-8, monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)과 같은 chemokine의 발현이 크게 증가함이 보고 되었다 (Zhong 등, 1993; Agarwal 등, 1995; Jiang 등, 1996). 또한 치주염이 진행 중인 부위의 치은열구액과 치주조직에 이러한 염증성 cytokine, chemokine의 함량이 증가됨이 알려져 있다 (Masada 등, 1990; Offenbacher 등, 1993; Gamonal 등, 2000; Kabashima 등, 2002). 이런 염증성 cytokine과 chemokine은 호중구, 단핵구, 림프구 등의 염증세포를 감염부위로 이끌어오고 활성화시키며 collagenase 같은 기질 분해 효소의 분비를 촉진하고 파골세포 생성을 촉진하는 등의 작용을 통해 치주염에서 치주조직 파괴에 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다 (Grave, 1999). 한편 치주염 진행에 따른 치아의 탈락에는 치조골 소실이 중요한 역할을 담당하며 치조골은 활성화된 파골세포의 작용으로 흡수가 진행된다. 파골세포는 단핵구에서 분화되어 생성되는 다핵세포이며 이의 분화와 활성화 조절에 결정적 역할을 담당하는 인자가 최근에 밝혀졌다.

Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL)는 골모세포나 T 림프구 등에서 발현되며 파골세포 전구 세포 표면의 수용체인 RANK에 결합하여 파골세포의 분화와 활성화를 유도하며, 시험관내 단핵구 배양시 파골세포 생성에 중요한 또 다른 인자인 macrophage-colony stimulating factor (M-CSF)와 RANKL을 같이 넣어주면 활성을 가진 파골세포가 생성됨이 알려졌다 (Lacey 등, 1998; Quinn 등, 1998; Yasuda 등, 1998a). 또한 osteoprotegerin (OPG)은 골모세포 등에서 분비되며 RANKL에 결합하여 RANKL-RANK간 결합을 억제함으로써 파골세포 분화와 활성을 억제하는 것으로 알려져 있다 (Simonet 등, 1997; Yasuda 등, 1998b). 비록 RANKL과 OPG가 파골세포 분화 조절에 필수적 역할을 담당하기는 하나 IL-1, TNF- α 등의 염증성 cytokine도 파골세포 분화, 활성화에 촉진작용을 하는 것으로 보고 되어 치주염 진행시 생성된 염증성 cytokine 등도 치조골 파괴에 관련될 것으로 생각되고 있다 (Grave, 1999; Kobayashi 등, 2000).

비록 LPS 병독 기전의 연구에 염증세포를 이용한 연구가 많이 이루어졌으나 치주염의 경우 치주염 관련 세균과 세균산물들이 치은섬유모세포나 치주인대세포에 미치는 영향에 대한 연구도 수행되어 왔다. 이들 세포들은 치은과 치주인대의 주요한 구성세포로 치주염 진행시 세균, 세균산물들과 직접 접촉되며 염증성 cytokine 등을

분비하여 치주조직에서 면역조절기능을 나타내는데 중요한 역할을 담당할 것으로 여겨져 왔다 (McCulloch와 Bordin, 1991; Agarwal 등, 1998; Okada와 Murakami, 1998). 선행연구들은 치은섬유모세포나 치주인대세포에 치주염 관련 세균 LPS를 처리한 경우 IL-1 β , IL-6, IL-8의 발현을 증가시킴을 보고하였다 (Takada 등, 1991; Tamura 등, 1992; Yamaji 등, 1995). 한편 일부 연구들은 연구대상 세포에 따라 세균 또는 LPS에 대한 반응의 종류나 민감도에 차이가 있음을 보고하고 있으며(Koka와 Reinhardt, 1997; Jiang과 Graves, 1999; Hatakeyama 등, 2003), 세균의 종류에 따라 그에서 추출된 LPS에 대한 반응이 서로 다를 수 있음을 보고하였다 (Agarwal 등, 1995; Yamaji 등, 1995; Hirschfeld 등, 2001).

따라서 본 연구에서는 치주조직이 건강한 성인에서 치은섬유모세포와 치주인대세포를 분리 배양하고 TLR2와 TLR4의 발현 정도를 확인한 후 주요 치주염 유발 세균으로 알려진 *A. a*와 *P. g*의 LPS를 처리하여 염증 관련 cytokine으로 IL-1 β , IL-6, TNF- α , transforming growth factor- β (TGF- β)의 발현을, chemokine으로 IL-8, MCP-1, regulated on activation normal T cell expressed and secreted (RANTES), stromal cell-derived factor 1 (SDF-1)의 발현을, 그리고 마지막으로 파골세포 분화 및 활성화 조절인자로 RANKL, OPG, M-CSF의 발현에 미치는 영향을 총체적으로 관찰하여 세포의 종류와 LPS 종류에 따른 차이가 있는지를 규명하고자 하였다.

실험재료 및 방법

실험재료

Dulbecco's modified essential medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), trypsin-EDTA, penicillin-streptomycin, SUPERSRIPT™ First-Strand Synthesis System 등은 Gibco BRL (Gaithersburg, MD, 미국)에서, easy-BLUE™는 iNtRON (서울, 대한민국)에서 구입하였다. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)에 사용된 primer와 TaKaRa Taq™은 TaKaRa (Otsu, 일본)에서, *Escherichia coli* (*E. c*) O26:B6 LPS는 Sigma (St. Louis, MO, 미국)에서 구입하였다. *P. g*와 *A. a*의 LPS는 서울대학교 치학연구소 균주은행에 의뢰하여 *P. g* 381과 *A. a* 33384 균주에서 LPS Extraction Kit (iNtRON)를 이용하여 분리한 것을 받아서 사용하였다.

치은섬유모세포와 치주인대세포의 배양

교정치료를 위해 서울대병원에 내원한 치주조직이 건강한 환자에서 발거된 제1소구치를 이용하였다. 치은섬유모

Table 1. Primer sequences and PCR condition

Gene (product size)	Primer sequence	PCR condition
TLR2 (347 bp)	5'-GCCAAAGTCTTGATTGATTGG-3' 5'-TTGAAGTTCTCCAGCTCCTG-3'	95°C, 30" : 50°C, 30" : 72°C, 1' 40 cycles
TLR4 (495 bp)	5'-TCCCTCCAGGTTCTTGATTA-3' 5'-GTAGTGAAGGCAGAGCTGAAA-3'	95°C, 30" : 50°C, 30" : 72°C, 1' 40 cycles
IL-1 β (248 bp)	5'-GACACATGGGATAACGAGGC-3' 5'-ACGCAGGACAGGTACAGATT-3'	95°C, 30" : 60°C, 30" : 72°C, 1' 35 cycles
IL-6 (546 bp)	5'-ATGAACCTCCTTCTCCACAAG-3' 5'-GTGCCTGCAGCTTCGTGACGA-3'	95°C, 30" : 60°C, 30" : 72°C, 1' 35 cycles
TNF- α (361 bp)	5'-TCAGATCATCTTCTCGAACC-3' 5'-CAGATAGATGGGCTCATACC-3'	95°C, 30" : 60°C, 30" : 72°C, 1' 38 cycles
TGF- β (226 bp)	5'-TAGACCCTTTCTCCTCCAGGAGACG-3' 5'-GCTGGGGGTCTCCCGCAAAGGT-3'	95°C, 30" : 60°C, 30" : 72°C, 1' 32 cycles
RANKL (404 bp)	5'-GTTTCCCATAAAGTGAGTCTGT-3' 5'-TTAAAAGCCCCAAAGTATGTT-3'	95°C, 30" : 55°C, 30" : 72°C, 1' 38 cycles
OPG (406 bp)	5'-GGGGACCACAATGAACAAGTTG-3' 5'-AGTTTGCACCACTCCAAATCC-3'	95°C, 30" : 60°C, 30" : 72°C, 1' 28 cycles
M-CSF (670 bp)	5'-CAGTTGTCAAGGACAGCAC-3' 5'-GCTGGAGGATCCCTCGGACTG-3'	95°C, 30" : 58°C, 30" : 72°C, 1' 32 cycles
MCP-1 (265 bp)	5'-TCCACATGAAAGTCTCGC-3' 5'-TGGAATCCTGAACCCACTTC-3'	95°C, 30" : 55°C, 30" : 72°C, 1' 32 cycles
IL-8 (289 bp)	5'-ATGACTTCCAAGCTGGCCGTGGCT-3' 5'-TCTCAGCCCTCTTCAAAAATTCTC-3'	95°C, 30" : 50°C, 30" : 72°C, 1' 32 cycles
RANTES (258 bp)	5'-GCTGTTCATCCTCAITGCTAC-3' 5'-TCCATCCTAGCTCATCTCCA-3'	95°C, 30" : 55°C, 30" : 72°C, 1' 38 cycles
SDF-1 (309 bp)	5'-ATGAACGCCAAGGTCGTGGTC-3' 5'-GGTCTGTTGTGCTTACTTGTTT-3'	95°C, 30" : 57°C, 30" : 72°C, 1' 37 cycles
β -actin (712 bp)	5'-CGGGAAATCGTGCGTGACAT-3' 5'-GAACTTTGGGGGATGCTCGC-3'	95°C, 30" : 60°C, 30" : 72°C, 1' 23 cycles

세포와 치주인대세포를 얻기 위해 소구치를 항생제가 함유된 DMEM에 3회 세척한 후 치은조직을 따로 떼어내 1 mm³ 내외의 크기로 자르고, 치주인대는 치근의 중간 1/3 부위를 끊어 채취한 후 세포배양접시에 부착시켜 섬유모세포가 자라나오도록 20% FBS가 함유된 DMEM에서 배양하였다. 단일세포층이 형성된 후 세포를 분리하여 10% FBS가 함유된 DMEM으로 교체하여 계대배양을 실시하였으며 3회 계대배양 후 실험에 사용하였다.

LPS 처리

치은섬유모세포와 치주인대세포를 60 mm 세포배양접시에 5 × 10⁵ 개씩 분주하고 24시간 배양하였다. 그 후 *E. c* (5 μ g/ml), *P. g* (1 μ g/ml), *A. a* (1 μ g/ml)에서 얻어진 LPS와 10% FBS가 함유된 DMEM으로 배양액을 교체한 후 4, 8, 24, 48시간 배양하고 easy-BLUETM를 이용하여 total RNA를 분리하였다.

RT-PCR 분석

SUPERSCRIPTTM First-Strand Synthesis System을 이용

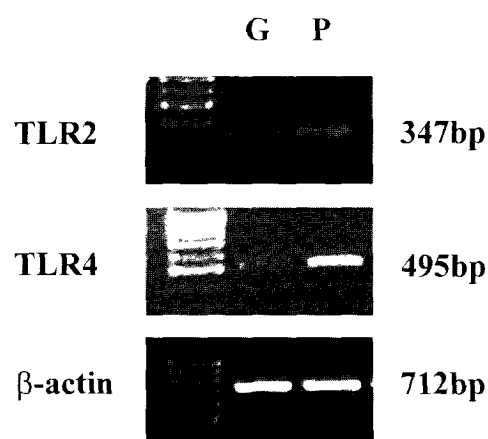


Fig. 1. Expression of TLR2 and TLR4 in gingival fibroblasts (G) and periodontal ligament fibroblasts (P). To examine the mRNA expression of TLR2 and TLR4, RT-PCRs were performed and PCR products were analyzed by 1.2% agarose gel running as described in Materials and Methods.

하여 total RNA 1 μ g으로부터 complementary DNA를 합성하고 TaKaRa TaqTM polymerase를 이용하여 Table

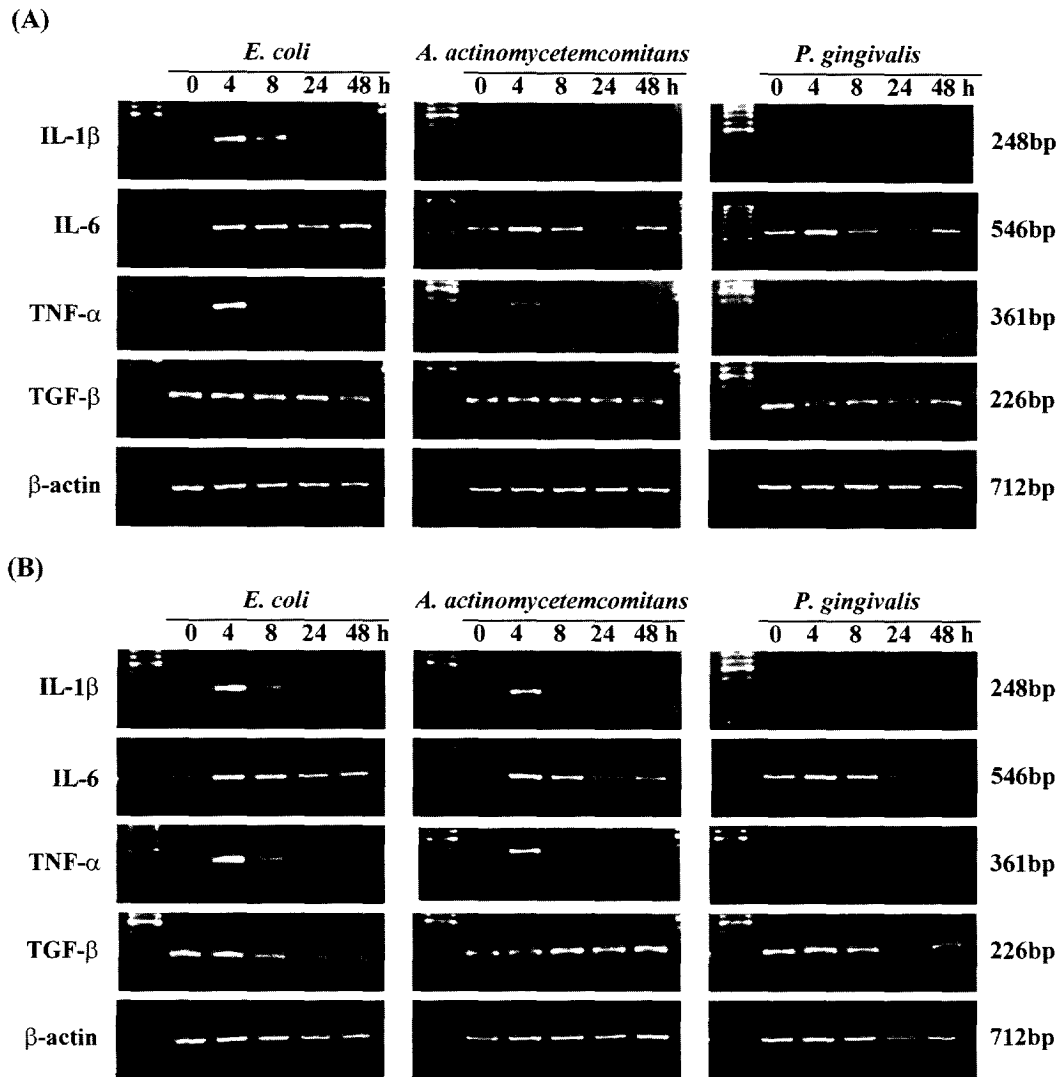


Fig. 2. Effect of LPS on the expression of inflammatory cytokines in gingival fibroblasts (A) and periodontal ligament fibroblasts (B). Cells were treated with LPSs from *E. coli* (5 μ g/ml), *A. actinomycetemcomitans* (1 μ g/ml), or *P. gingivalis* (1 μ g/ml) for indicated times and RT-PCRs were performed as described in Materials and Methods.

1에 제시된 primer와 PCR 조건에서 TLR2, TLR4, IL-1 β , IL-6, TNF- α , TGF- β , RANKL, OPG, M-CSF, MCP-1, IL-8, RANTES, SDF-1, β -actin에 대한 PCR을 시행하였다. PCR 산물은 1.2% agarose gel에 전기영동하고 ethidium bromide로 염색하여 관찰하였다.

실험 결과

먼저 치은섬유모세포와 치주인대세포에서 LPS의 수용체로 알려진 TLR2, TLR4의 발현을 RT-PCR로 확인한 결과 치은섬유모세포 보다 치주인대세포에서 두 수용체 모두의 발현이 좀더 높게 나타났다 (Fig. 1).

P. g LPS와 *A. a* LPS가 치은섬유모세포와 치주인대세포에서 염증관련 cytokine 발현에 미치는 영향을 관찰하였다 (Fig. 2A, 2B). 치은섬유모세포와 치주인대세포에서 LPS로 자극하지 않은 경우에는 아주 낮은 수준의 IL-1 β 와 TNF- α 를 발현하였으나, IL-6와 TGF- β 는 LPS 자극이 없이도 상당한 수준으로 발현이 되었다. 양성대조군으로 사용된 *E. c* LPS로 자극한 경우 두 종류 세포 모두에서 IL-1 β 와 TNF- α 의 발현이 크게 증가되어 4시간째 최고로 증가되었으며 그 이후 발현이 점차 감소되었다. IL-1 β 에 비해 TNF- α 의 발현이 좀더 빠르게 감소하는 경향을 보였다. IL-6의 경우에도 *E. c* LPS 처리에 의해 4시간째 발현이 증가되었으나 증가 정도는 IL-1 β 와 TNF- α 보다는 적게 증가되었으며, 48시간까지도 발현정도가 높게 유지되었다. TGF- β 의 경우에는 *E. c* LPS 처리에

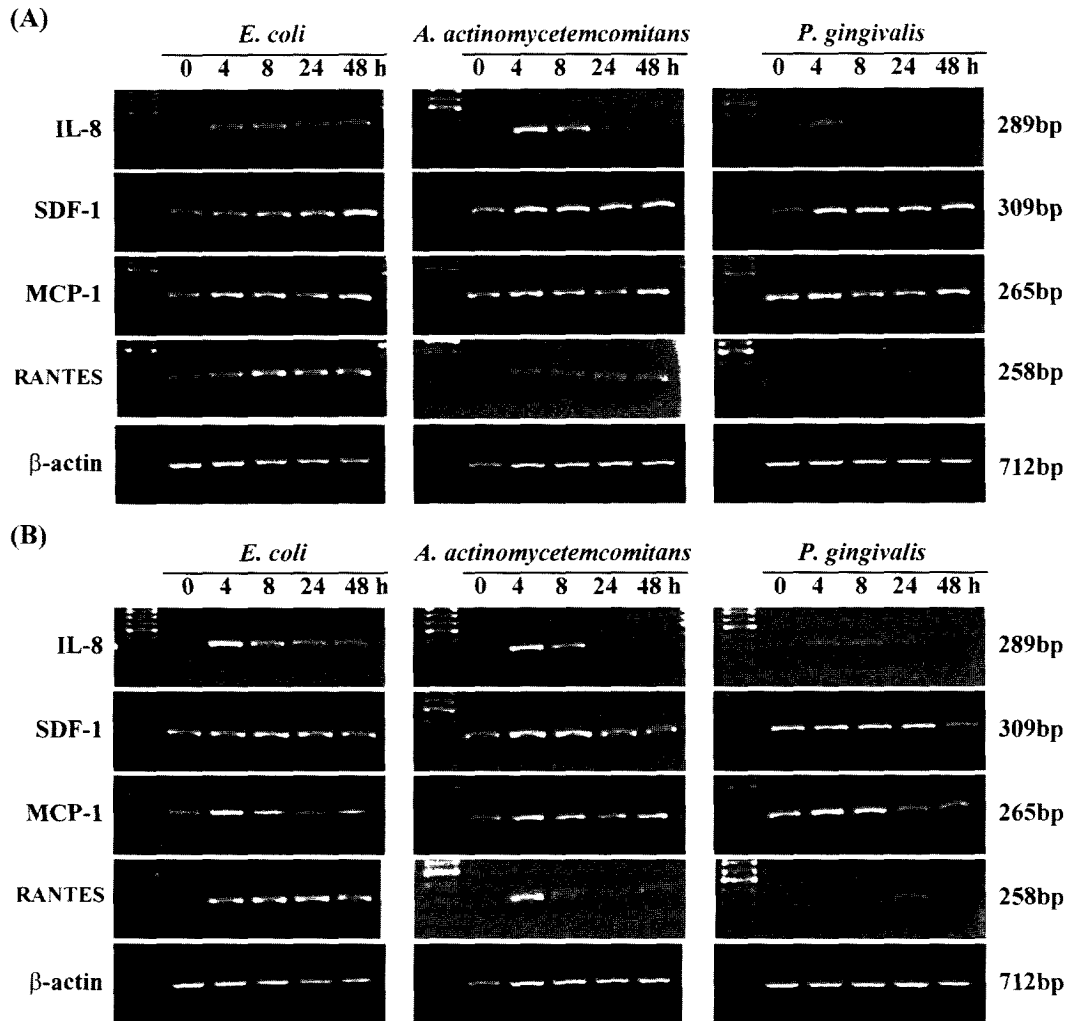


Fig. 3. Effect of LPS on the expression of chemokines in gingival fibroblasts (A) and periodontal ligament fibroblasts (B). Cells were treated with LPSs from *E. coli* (5 μ g/ml), *A. actinomycetemcomitans* (1 μ g/ml), or *P. gingivalis* (1 μ g/ml) for indicated times and RT-PCRs were performed as described in Materials and Methods.

의해 발현이 변화되지 않았다. *A. a* LPS와 *P. g* LPS로 처리한 경우에는 *E. c* LPS로 처리한 경우보다 반응이 약하게 나타났으나 경향은 비슷하였다. 특히 치은섬유모세포와 치주인대세포 간에도 반응 크기에 차이가 나타났는데 TLR 발현 차이와 비슷하게 치주인대세포에서 *A. a* LPS와 *P. g* LPS에 대한 반응이 좀더 높게 나타났다. 또한 각각의 세포에서 *A. a* LPS와 *P. g* LPS의 반응을 관찰한 결과 *A. a* LPS에 대한 반응이 *P. g* LPS에 대한 반응보다 크게 나타나 치은섬유모세포에서는 *P. g* LPS 처리 후에도 IL-1 β 와 TNF- α 발현 증가 정도가 미약하였다. 또한 치주인대세포에서는 *A. a* LPS와 *P. g* LPS에 의한 IL-6 발현 증가가 8시간까지만 유지되었고, 치은섬유모세포에서는 4시간째만 증가되는 것으로 관찰되었다.

Chemokine 발현을 관찰한 결과 SDF-1과 MCP-1은 LPS

자극이 없이도 두 세포 모두에서 어느 정도 발현되었으며 LPS 처리에 의해 발현정도가 크게 변화하지 않았다. 그러나 IL-8과 RANTES의 발현은 LPS 처리에 의해 발현이 증가되는 양상을 보였다 (Fig. 3A, 3B). *E. c* LPS로 자극한 경우 치주인대세포에서 IL-8과 RANTES의 발현 증가 정도가 더 뚜렷하게 관찰되었으며 4시간째 증가되어 48시간까지도 계속 높게 유지되었다. *A. a* LPS를 처리한 경우 두 종류 세포 모두에서 IL-8의 발현이 4시간째 크게 증가하여 8시간 정도까지 유지된 후 급격히 발현이 감소되었다. *P. g* LPS를 처리한 경우 두 세포 모두에서 IL-8의 발현 증가 정도가 *A. a* LPS 처리시 보다 낮게 나타났다. RANTES의 경우 *A. a* LPS와 *P. g* LPS에 대한 반응이 다르게 나타났다. *A. a* LPS 처리시 두 세포 모두 4시간째부터 RANTES 발현이 크게 증가되었지만, *P. g* LPS를 처리한 경우에는 두 세포 모두 24시간째만 발현이 약간 증가되었다. 마지막으로 파골세포

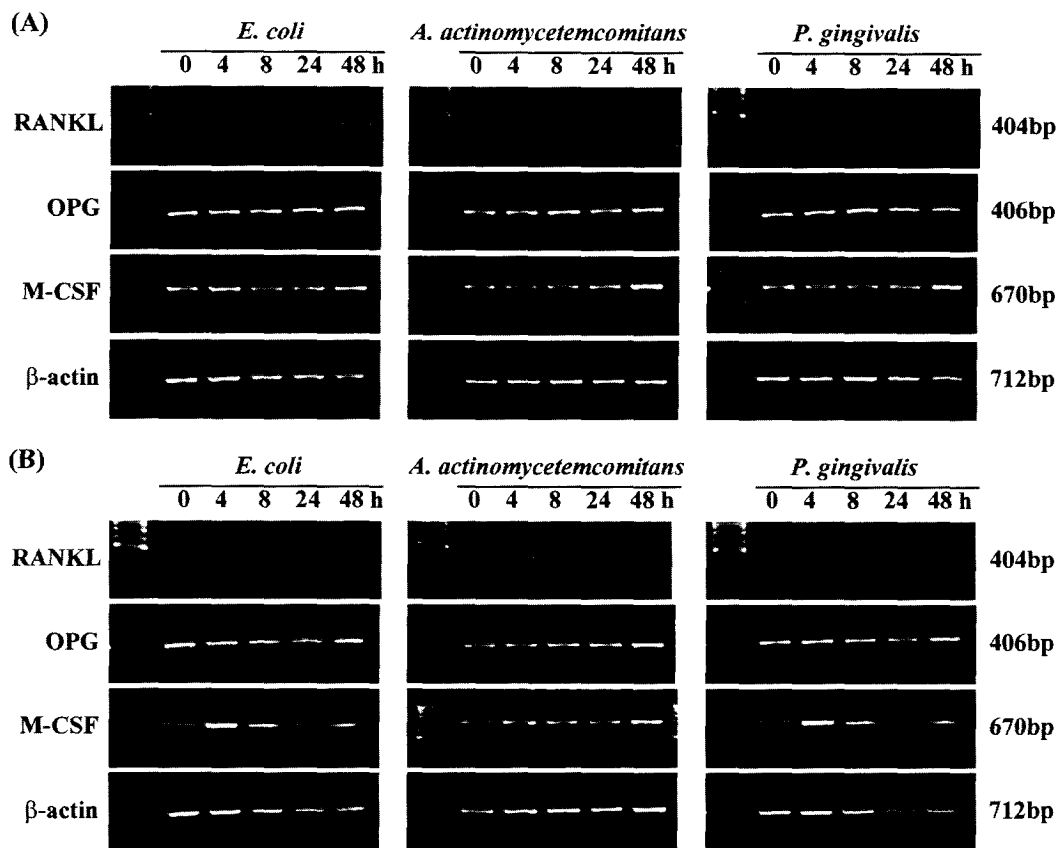


Fig. 4. Effect of LPS on the expression of osteoclastogenesis regulatory factors in gingival fibroblasts (A) and periodontal ligament fibroblasts (B). Cells were treated with LPSs from *E. coli* (5 μ g/ml), *A. actinomycetemcomitans* (1 μ g/ml), or *P. gingivalis* (1 μ g/ml) for indicated times and RT-PCRs were performed as described in Materials and Methods.

생성 조절에 관련된 인자들의 발현에 미치는 영향을 관찰하였다 (Fig. 4A, 4B). 치은섬유모세포와 치주인대세포 모두 LPS 자극이 없이도 OPG와 M-CSF를 많이 발현하였으며 LPS 처리 후에도 이들의 발현정도에 큰 변화는 관찰되지 않았다. 그러나 RANKL의 경우 치주인대세포에서 LPS 자극 없이도 소량 발현되었다. LPS 처리 후 정도의 차이는 있었지만 두 세포 모두에서 세 가지 LPS에 의해 RANKL의 발현이 모두 증가되었으며 먼저 4시간째 증가했다가 감소된 후 24~48시간째 이차적으로 발현이 증가되었다.

고 찰

치주염의 진행에 그람 음성 세균들이 관련되며 특히 *P. g*와 *A. a*는 치주염의 시작과 진행에 관여한다 (Socransky와 Haffajee, 1993; Wang 등, 1999; Wang과 Ohura, 2002). 이러한 그람 음성 세균들이 치주낭에서 증식하면서 다량의 LPS가 대식세포나 섬유모세포 등에서 IL-1 β , IL-6, TNF- α 같은 염증성 cytokine의 생산을 증가시키

며 이들을 통해 염증이 심화되고 치주조직의 파괴가 진행되므로 LPS가 치주염 진행의 중요한 병독소로 작용한다고 알려져 있다 (Grave, 1999; Wang과 Ohura, 2002). 따라서 본 연구에서는 *P. g*와 *A. a* LPS를 이용하여 실험하였다. 먼저 치은섬유모세포와 치주인대세포에서 TLR2와 TLR4 mRNA의 발현을 관찰한 결과 두 세포 모두에서 발현이 확인되었지만 치주인대세포에서 발현이 좀더 높게 나타났다. 이는 최근 치은섬유모세포와 치주인대세포에서 TLR 발현을 비교하여 TLR2는 치주인대세포에서 발현이 많이 되나 TLR4는 두 세포에서 비슷한 정도로 발현된다는 보고 (Hatakeyama 등, 2003)와 부분적으로 일치하였다. 대부분의 LPS는 TLR4에 결합하여 세포내에 신호를 전달하는 것으로 알려져 있으나, *P. g* LPS는 TLR4와 TLR2 중 어느 것에 결합하는지에 대해서는 서로 상반된 보고들이 있어왔다. TLR4의 돌연변이로 LPS 반응성이 떨어지는 C3H/HeJ 생쥐의 대식세포나 치은섬유모세포를 이용하거나, 사람 TLR2, TLR4 유전자를 세포주에 과발현시킨 연구들은 *P. g* LPS가 TLR2를 통해 작용한다고 보고하였으나 (Ogawa 등, 1994; Tanamoto 등, 1997; Hirschfeld 등, 2001; Yoshimura 등, 2002), 사

람 섬유모세포를 이용한 여러 연구는 *P. g* LPS도 TLR4를 통해 작용한다고 보고하여 (Wang 등, 2000; Wang과 Ohura, 2002) 본 연구에서 *P. g* LPS의 작용이 TLR2와 TLR4 중 어느 수용체를 경유하는지는 확실하지 않았다. IL-1과 TNF- α 는 주요한 염증성 cytokine으로 실험적으로 유도된 치주염에서 이들의 작용을 차단하면 염증세포 침윤과 치조골 흡수가 억제되고 (Assuma 등, 1998), 치주염이 진행 중인 치주조직 및 치은열구액에서 IL-1, TNF- α , IL-6 등 염증성 cytokine의 함량이 높다고 하여 (Graves, 1999; Wang 등, 2003), *P. g*와 *A. a* LPS가 이들의 발현에 미치는 영향을 관찰하였다. 배양된 세포에 *E. c* LPS를 처리할 때 *P. g*, *A. a* LPS보다 효력이 떨어진다는 보고가 있어 (Agarwal 등, 1995; Yamaji 등, 1995) 양성대조군으로 사용된 *E. c* LPS의 농도는 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, *P. g*와 *A. a* LPS는 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 사용하였다. *E. c* LPS 처리시 IL-1 β , TNF- α , IL-6의 발현이 증가되었으며 두 세포 간에는 반응에 큰 차이를 보이지 않았다. 그러나 *A. a*와 *P. g* LPS를 처리한 경우에는 이들의 발현 증가 정도도 적고 지속시간도 짧았다. TLR4 발현 정도에 비례하여 LPS에 의한 cytokine 생산이 증가된다는 보고(Wang 등, 2001)와 비슷하게 본 실험에서도 TLR2, TLR4의 발현이 좀더 높았던 치주인대세포에서 *A. a*와 *P. g* LPS에 대한 반응이 더 크게 나타났다. 또한 두 세포 모두에서 *A. a* LPS에 대한 반응이 *P. g* LPS에 대한 반응보다 더 크게 나타났는데 이는 LPS의 구조 차이 또는 수용체 차이에 따른 것으로 생각되었다. 선행연구들은 lipid A가 LPS의 생체활성을 주로 결정하며 cone 모양의 lipid A가 cylinder 모양의 것보다 더 활성이 크고, *A. a* LPS는 Enterobacteriaceae type으로 cone 모양에 가까우나 *P. g* LPS는 cylinder 형에 더 가까운 구조를 가지고 있어 내독소 활성이 약하다고 보고한 바 있다 (Masoud 등, 1991; Ogawa, 1994; Jiang과 Graves, 1999; Netea 등, 2002). 본 연구에서 IL-6와 TGF- β 는 LPS 자극을 하지 않아도 두 세포에서 모두 발현되었는데 이는 건강한 치주조직에서 얻은 치주인대세포에서도 IL-6와 TGF- β 가 발현되며 LPS처리 후에도 TGF- β 의 발현에 변화가 없다는 Yamaji 등(1995)의 보고와 일치하였다. TGF- β 는 국소적으로 고농도로 존재시 염증 부위로 염증세포의 이동 및 활성화를 촉진하여 만성염증에서 염증을 촉진하기도 하지만, 활성화된 T 림프구를 억제하여 면역억제 작용을 나타내기도 한다 (Wahl 등, 1987, 1988, 1993; Chen과 Wahl, 2003). LPS 처리 유무에 관계없이 TGF- β 의 발현이 유지된 본 결과는 TGF- β 가 만성염증 병소인 치주염에서 LPS에 의한 염증반응에는 별 관련이 없을 것을 시사하였다.

Chemokine은 염증성 cytokine의 일종으로 특히 염증이 진행 중인 부위로 특정 백혈구 그룹을 이동시키며 활성

화시키는데 관여하는 인자들로 4개 cysteine 잔기를 함유한 구조를 공통적으로 가진다 (Graves, 1999; D'Ambrosio 등, 2003). 처음 2개 cysteine 잔기의 구성에 따라 크게 4 그룹으로 나뉘어 지나 특히 CXC와 CC chemokine이 잘 알려져 있다. CC chemokine에는 MCPs, macrophage inflammatory protein-1 α , -1 β , RANTES 등이 포함되며 CXC chemokine에는 IL-8, SDF-1 등이 포함된다. Chemokine의 작용에 redundancy가 있기도 하지만 chemokine에 따라 어느 정도 특이성을 가지므로 국소부위에서 발현되는 chemokine의 양상에 따라 염증반응의 진행 및 조절이 영향을 받을 것으로 여겨진다. 치주염 부위에 호중구, 단핵구, 림프구 등이 많이 침윤되어 있으며 건강한 치주조직에 비해 많은 양의 IL-8, RANTES, MCP-1이 생산됨이 알려져 있으므로 (Graves 1999; Gamonal 등, 2000, 2001; Kabashima 등, 2002; Fokkema 등, 2003), 본 연구에서 이들 chemokine의 발현을 관찰하였다. IL-8과 RANTES는 LPS 자극이 없이는 발현정도가 미미하였으나 LPS 처리에 의해 발현이 증가하는 양상을 보였다. *E. c* LPS로 처리한 경우에는 IL-8의 발현이 크게 증가하고 48시간까지도 계속 높은 수준이 유지되었지만 *A. a*와 *P. g* LPS를 처리한 경우에는 발현이 증가되었으나 48시간에는 이미 대조군 수준으로 감소되었다. 또한 IL-1 β , TNF- α 반응과 비슷하게 *P. g* 보다 *A. a* LPS에 대한 반응이 더 크게 나타났다. IL-8은 호중구의 화학주성에 중요한 역할을 하며 호중구는 치주염 진행부위에 초기에 많이 침윤되어 세균에 대한 방어에 중요한 역할을 하므로, 국소조직세포인 치은섬유모세포나 치주인대세포에서 IL-8의 발현 증가는 치주염 유발세균에 대한 초기 방어에 중요한 역할을 담당할 것으로 생각되었다. RANTES는 *A. a* LPS 처리시에는 48시간까지도 발현이 증가됨이 유지되었으나 *P. g* LPS 처리시에는 24시간째만 발현이 약간 증가되어 두 세균간에 차이를 나타내었다. 이러한 결과는 대식세포에 *E. c* LPS와 *P. g* LPS를 처리하면 발현시기, 발현 증가 여부, 발현 증가 정도 차이가 각각의 cytokine, chemokine 종류에 따라 다양하다는 Hirschfeld 등 (2001)의 보고와 유사한 결과로 생각된다. RANTES는 단핵구, 호산구에도 효과를 보이지만 특히 Th2 림프구에는 별효과없이 Th1 림프구에 효과적인 화학주성을 보여 (Siveke와 Hamann, 1998) 항염증성 T 림프구와 염증성 T 림프구간 균형을 조절하는 효과가 있을 것으로 생각된다. 특히 치주염 환자에서도 비활성화 상태인 부위보다 치주염이 활성화된 부위의 치은열구액에서 RANTES가 많이 존재한다는 Gamonal 등 (2000)의 보고는 이러한 추측을 뒷받침하는 것으로 생각된다.

단핵구의 화학주성에 중요한 역할을 하는 MCP-1은 치은조직의 면역염색시 건강한 치은에서는 거의 관찰되지 않으나 치주염 진행 중인 조직에서는 높은 수준으로 발

현되며 이는 침윤된 단핵구에서 주로 분비되고 치주염 치료 후에는 발현이 크게 감소하는 것으로 보고되었다 (Graves 1999; Kabashima 등, 2002; Fokkema 등, 2003). LPS 자극 전에는 MCP-1을 거의 발현하지 않으나 LPS 자극 후에는 다량의 MCP-1을 생산하는 단핵구와는 달리 치은섬유모세포와 치주인대세포에서는 LPS 자극이 없이도 어느 정도 MCP-1을 발현하며 LPS 자극에 의해 발현정도가 크게 변화하지 않은 본 실험결과로 보아, 염증이 뚜렷하지 않은 치은조직에도 존재하는 소수의 단핵구의 이동에는 이들 섬유모세포가 어느 정도 조절작용을 나타낼 수 있으나 치주염 진행시 LPS가 이들 섬유모세포의 MCP-1 과발현을 통해 단핵구 침윤을 촉진하는 작용은 미약하며, 치주염부위에 증가된 MCP-1은 주로 많이 침윤된 단핵구에서의 분비 증가에 따른 것으로 생각되었다.

SDF-1은 다른 chemokine들과는 달리 염증반응 조절보다는 B cell lymphopoiesis, myelopoiesis, 뇌 발생중 neuronal guidance 등에 필요한 인자로 주로 알려져 있으며 많은 조직에서 발현된다 (Nagasawa, 2000; Lapidot와 Kollet, 2002; Lazarini 등, 2003). 최근 SDF-1이 tissue remodeling의 항상성 조절인자로 작용할 것이라는 보고가 있고 (Fedyk 등, 2001), 치은섬유모세포와 치주인대세포도 치주조직의 integrity 조절에 중요한 역할을 담당하므로 SDF-1의 발현을 살펴보았다. 두 세포 모두에서 SDF-1의 발현이 관찰되었으나 LPS 처리에 의해 크게 변화하지 않아, 피부섬유모세포에 LPS 처리시 48, 72시간 후에야 SDF-1의 발현이 약간 감소한다는 보고 (Fedyk 등, 2001)와 비슷한 결과로 생각되었다.

마지막으로 치주염 진행시 치조골흡수가 수반되므로 LPS가 치은섬유모세포와 치주인대세포를 통해 파골세포 조절인자들의 발현을 조절하는지를 살펴보았다. 치은섬유모세포와 치주인대세포 모두 OPG와 M-CSF를 많이 발현하였고 LPS에 의해 발현이 변화되지 않았으나 RANKL의 경우 LPS에 의해 발현이 약간 증가하였다. 치은섬유모세포와 달리 치주인대세포에서는 LPS 자극이 없이도 RANKL이 소량 발현되었는데 이는 선행들의 보고와 일치하였다 (Kanzaki 등, 2001; Nagasawa 등, 2002). 그러나 LPS에 의해 OPG 생산이 증가된다는 Nagasawa 등 (2002)의 결과와는 달리 본 실험에서는 OPG 발현 증가가 관찰되지 않았다. LPS에 의한 RANKL 발현증가가 시간적으로 두 단계로 나뉘어 나타났는데 24시간 이후에 증가된 RANKL은 LPS 자극에 의해 분비된 IL-1 β , TNF- α , IL-6등에 의해 이차적으로 발현이 촉진된 것으로 생각된다. LPS가 파골세포 분화에 미치는 영향에 대하여 여러 연구들은 LPS가 골모세포나 T 림프구에 작용하여 RANKL의 생산을 촉진시키고 이에 따라 파골세포의 분

화를 촉진하거나 (Teng 등, 2000; Kikuchi 등, 2001; Jiang 등, 2002), 파골세포로의 분화가 어느 정도 진행된 파골세포 전구세포에 직접 작용하여 분화를 촉진한다고 하였다 (Suda 등, 2002; Zou와 Bar-Shavit, 2002; Ito 등, 2003). 그러나 단핵구/대식세포 배양에 LPS를 처리하면 오히려 파골세포로의 분화를 억제하고 염증성 cytokine의 생성을 촉진하며, 염증성 cytokine인 IL-1과 TNF- α 는 RANKL에 독립적으로도 파골세포 분화 및 활성을 촉진한다는 보고들은 (Kobayashi 등, 2000; Takami 등, 2002; Zou와 Bar-Shavit, 2002; Ito 등, 2003) 치주조직에 염증 진행시 단핵구가 침윤된 초기에는 세균에 대한 방어 작용이 우세하나 만성적으로 진행되면 활성화된 T 림프구에서 생성된 RANKL의 작용이 우세하여 단핵구가 파골세포로 분화되어 치조골 흡수를 야기함을 시사하는 것으로 생각된다. 실제 치조골흡수가 진행 중인 부위의 육아종 조직에서 RANKL과 OPG 발현 관찰한 결과 건강한 조직에 비해 RANKL은 증가하고 OPG 발현은 감소했으며 RANKL 발현세포는 주로 림프구와 대식세포이고, OPG 발현세포는 주로 혈관내피세포라는 Crotti 등 (2003)의 보고는 이러한 것을 지지하는 결과라 생각된다. 또한 치은섬유모세포나 치주인대세포에서 많이 발현되는 OPG는 건강한 치주조직에서 치조골흡수를 억제하는 효과를 나타내나, 치주염의 진행으로 침윤된 염증세포에서 RANKL이 다량 생산되어 RANKL-OPG의 균형이 파골세포 분화촉진 쪽으로 기울며 다른 염증성 cytokine의 작용과 더불어 치조골 흡수가 야기될 것으로 생각된다.

이상의 결과를 종합하면 주요한 치주염 유발세균인 *A. a*와 *P. g*의 LPS는 염증세포 뿐 아니라 치은섬유모세포와 치주인대세포에도 작용하여 IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-8, RANTES의 발현을 촉진하였으며 이는 치주조직의 구성세포인 치은섬유모세포와 치주인대세포도 면역조절작용을 가지고 있음을 다시 확인할 수 있는 결과였다. 또한 *P. g* LPS는 *A. a* LPS에 비해 이러한 조절작용이 아주 미약하였는데, 이러한 결과는 고농도의 *P. g* LPS는 TLR2를 통해 IL-1의 발현은 증가시키나 TLR4에 대해서는 저농도에서도 다른 LPS의 작용을 억제한다는 Yoshimura 등 (2002)의 보고와 더불어, *P. g*가 치주염의 진행과정에서 초기에 면역반응을 잘 유발하지 않으면서 같이 존재하는 다른 그람음성 세균에 의한 면역반응을 일부 억제해줌으로써 치주염 발생과 진행에 중요한 역할을 담당할 수 있음을 시사하였다. 본 연구에서는 치은섬유모세포보다 치주인대세포에서 LPS의 작용이 좀더 크게 나타나는 것으로 관찰되었으나, 치은섬유모세포에서 LPS에 의한 IL-8의 생산이 더 많다는 Hatakeyama 등 (2003)의 보고와 치은섬유모세포에서 TLR4의 발현 정도가 사람에 따라 다양하다는 Wang 등 (2001)의 보고와 비교해 볼 때 향후 더 많은 사람을 대상으로 한 연구가 필요한 것

으로 생각되었다.

Acknowledgement

This study was supported by a grant 01-PJ5-PG1-01CH12-0002 from the Korea Health 21 R&D Project, Ministry of Health & Welfare, Republic of Korea.

References

- Agarwal, S., Piesco, N.P., Johns, L.P. and Riccelli, A.E.: Differential expression of IL-1 beta, TNF-alpha, IL-6, and IL-8 in human monocytes in response to lipopolysaccharides from different microbes. *J. Dent. Res.* **74**:1057-1065, 1995.
- Agarwal, S., Chandra, C.S., Piesco, N.P., Langkamp, H.H., Bowen, L. and Baran, C.: Regulation of periodontal ligament cell functions by interleukin-1beta. *Infect. Immun.* **66**:932-937, 1998.
- Assuma, R., Oates, T., Cochran, D., Amar, S. and Graves, D.T.: IL-1 and TNF antagonists inhibit the inflammatory response and bone loss in experimental periodontitis. *J. Immunol.* **160**:403-409, 1998.
- Chen, W. and Wahl, S.M.: TGF-beta: the missing link in CD4+CD25+ regulatory T cell-mediated immunosuppression. *Cytokine Growth Factor Rev.* **14**:85-89, 2003.
- Crotti, T., Smith, M.D., Hirsch, R., Soukoulis, S., Weedon, H., Capone, M., Ahern, M.J. and Haynes, D.: Receptor activator NF kappaB ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) protein expression in periodontitis. *J. Periodontal Res.* **38**:380-387, 2003.
- D'Ambrosio, D., Panina-Bordignon, P. and Sinigaglia, F.: Chemokine receptors in inflammation: an overview. *J. Immunol. Methods* **273**:3-13, 2003.
- Fedyk, E.R., Jones, D., Critchley, H.O., Phipps, R.P., Blieden, T.M. and Springer, T.A.: Expression of stromal-derived factor-1 is decreased by IL-1 and TNF and in dermal wound healing. *J. Immunol.* **66**:5749-5754, 2001.
- Fokkema, S.J., Loos, B.G. and van der Velden, U.: Monocyte-derived RANTES is intrinsically elevated in periodontal disease while MCP-1 levels are related to inflammation and are inversely correlated with IL-12 levels. *Clin. Exp. Immunol.* **131**:477-483, 2003.
- Gamonal, J., Acevedo, A., Bascones, A., Jorge, O. and Silva, A.: Levels of interleukin-1 beta, -8, and -10 and RANTES in gingival crevicular fluid and cell populations in adult periodontitis patients and the effect of periodontal treatment. *J. Periodontol.* **71**:1535-1545, 2000.
- Gamonal, J., Acevedo, A., Bascones, A., Jorge, O. and Silva, A.: Characterization of cellular infiltrate, detection of chemokine receptor CCR5 and interleukin-8 and RANTES chemokines in adult periodontitis. *J. Periodontal Res.* **36**:194-203, 2001.
- Graves, D.T.: The potential role of chemokines and inflammatory cytokines in periodontal disease progression. *Clin. Infect. Dis.* **28**:482-490, 1999.
- Hatakeyama, J., Tamai, R., Sugiyama, A., Akashi, S., Sugawara, S. and Takada, H.: Contrasting responses of human gingival and periodontal ligament fibroblasts to bacterial cell-surface components through the CD14/Toll-like receptor system. *Oral Microbiol. Immunol.* **18**:14-23, 2003.
- Heumann, D. and Roger, T.: Initial responses to endotoxins and Gram-negative bacteria. *Clin. Chim. Acta.* **323**:59-72, 2002.
- Hirschfeld, M., Weis, J.J., Toshchakov, V., Salkowski, C.A., Cody, M.J., Ward, D.C., Qureshi, N., Michalek, S.M. and Vogel, S.N.: Signaling by toll-like receptor 2 and 4 agonists results in differential gene expression in murine macrophages. *Infect. Immun.* **69**:1477-1482, 2001.
- Itoh, K., Udagawa, N., Kobayashi, K., Suda, K., Li, X., Takami, M., Okahashi, N., Nishihara, T. and Takahashi, N.: Lipopolysaccharide promotes the survival of osteoclasts via Toll-like receptor4, but cytokine production of osteoclasts in response to lipopolysaccharide is different from that of macrophages. *J. Immunol.* **170**:3688-3695, 2003.
- Jiang, Y. and Graves, D.T.: Periodontal pathogens stimulate CC-chemokine production by mononuclear and bone-derived cells. *J. Periodontol.* **70**:1472-1478, 1999.
- Jiang, Y., Russell, T.R., Graves, D.T., Cheng, H., Nong, S.H. and Levitz, S.M.: Monocyte chemoattractant protein 1 and interleukin-8 production in mononuclear cells stimulated by oral microorganisms. *Infect. Immun.* **64**:4450-4455, 1996.
- Jiang, Y., Mehta, C.K., Hsu, T.Y. and Alsulaimani, F.F.: Bacteria induce osteoclastogenesis via an osteoblast-independent pathway. *Infect. Immun.* **70**:3143-3148, 2002.
- Kabashima, H., Yoneda, M., Nagata, K., Hirofujii, T. and Maeda, K.: The presence of chemokine (MCP-1, MIP-1alpha, MIP-1beta, IP-10, RANTES)-positive cells and chemokine receptor (CCR5, CXCR3)-positive cells in inflamed human gingival tissues. *Cytokine* **20**:70-77, 2002.
- Kanzaki, H., Chiba, M., Shimizu, Y. and Mitani, H.: Dual regulation of osteoclast differentiation by periodontal ligament cells through RANKL stimulation and OPG inhibition. *J. Dent. Res.* **80**:887-891, 2001.
- Kikuchi, T., Matsuguchi, T., Tsuboi, N., Mitani, A., Tanaka, S., Matsuoka, M., Yamamoto, G., Hishikawa, T., Noguchi, T. and Yoshikai, Y.: Gene expression of osteoclast differentiation factor is induced by lipopolysaccharide in mouse osteoblasts via Toll-like receptors. *J. Immunol.* **166**:3574-3579, 2001.
- Kobayashi, K., Takahashi, N., Jimi, E., Udagawa, N., Takami, M., Kotake, S., Nakagawa, N., Kinoshita, M., Yamaguchi, K., Shima, N., Yasuda, H., Morinaga, T., Higashio, K., Martin, T.J. and Suda, T.: Tumor necrosis factor alpha stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of the ODF/RANKL-RANK interaction. *J. Exp. Med.* **191**:275-286, 2000.
- Koka, S. and Reinhardt, R.A.: Periodontal pathogen-related stimulation indicates unique phenotype of primary cultured human fibroblasts from gingiva and periodontal ligament: implications for oral health disease. *J. Prosthet. Dent.* **77**:191-6, 1997.

- Lacey, D.L., Timms, E., Tan, H.L., Kelly, M.J., Dunstan, C.R., Burgess, T., Elliot, R., Colombero, A., Elliot, G., Scully, S., Hsu, H., Sullivan, J., Hawkins, N., Davy, E., Capparelli, C., Eli, A., Qian, Y.X., Kaufman, S., Sarosi, I., Shalhoub, V., Senaldi, G., Guo, J., Delaney, J. and Boyl, W.J.: Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* **93**:165-176, 1998.
- Lapidot, T. and Kollet, O.: The essential roles of the chemokine SDF-1 and its receptor CXCR4 in human stemcell homing and repopulation of transplanted immune-deficient NOD/SCID and NOD/SCID/B2m(null) mice. *Leukemia* **16**:1992-2003, 2002.
- Lazarini, F., Tham, T.N., Casanova, P., Arenzana-Seisdedos, F. and Dubois-Dalcq, M.: Role of the alpha-chemokine stromal cell-derived factor (SDF-1) in the developing and mature central nervous system. *Glia* **42**:139-148, 2003.
- Masada, M.P., Persson, R., Kenney, J.S., Lee, S.W., Page, R.C. and Allison, A.C.: Measurement of interleukin-1 alpha and -1 beta in gingival crevicular fluid: implications for the pathogenesis of periodontal disease. *J. Periodontal Res.* **25**:156-163, 1990.
- Masoud, H., Weintraub, S.T., Wang, R., Cotter, R. and Holt, S.C.: Investigation of the structure of lipid A from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strain Y4 and human clinical isolate PO 1021-7. *Eur. J. Biochem.* **200**:775-781, 1991.
- McCulloch, C.A. and Bordin, S.: Role of fibroblast subpopulations in periodontal physiology and pathology. *J. Periodontal Res.* **26**:144-154, 1991.
- Nagasawa, T.: A chemokine, SDF-1/PBSF, and its receptor, CXC chemokine receptor 4, as mediators of hematopoiesis. *Int. J. Hematol.* **72**:408-411, 2000.
- Nagasawa, T., Kobayashi, H., Kiji, M., Aramaki, M., Mahanonda, R., Kojima, T., Murakami, Y., Saito, M., Morotome, Y. and Ishikawa I.: LPS-stimulated human gingival fibroblasts inhibit the differentiation of monocytes into osteoclasts through the production of osteoprotegerin. *Clin. Exp. Immunol.* **130**:338-344, 2002.
- Netea, M.G., van Deuren, M., Kullberg, B.J., Cavaiillon, J.M. and Van der Meer, J.W.: Does the shape of lipid A determine the interaction of LPS with Toll-like receptors? *Trends Immunol.* **23**:135-139, 2002.
- Offenbacher, S., Collins, J.G. and Heasman, P.A.: Diagnostic potential of host response mediators. *Adv. Dent. Res.* **7**:175-181, 1993.
- Ogawa, T., Uchida, H. and Amino, K.: Immunobiological activities of chemically defined lipid A from lipopolysaccharides of *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiology* **140**:1209-1216, 1994.
- Okada, H. and Murakami, S.: Cytokine expression in periodontal health and disease. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* **9**:248-266, 1998.
- Quinn, J.M.W., Elliot, J., Gillespie, M.T. and Martin, T.J.: A combination of osteoclast differentiation factor and macrophage-colony stimulating factor is sufficient for both human and mouse osteoclast formation *in vitro*. *Endocrinology* **139**:4424-4427, 1998.
- Simonet, W.S., Lacey, D.L., Dunstan, C.R., Kelley, M., Chang, M.S., Luthy, R., Nguyen, H.Q., Wooden, S., Bennett, L., Boone, T., Shimamoto, G., DeRose, M., Elliott, R., Colombero, A., Tan, H.L., Trail, G., Sullivan, J., Davy, E., Bucay, N., Renshaw-Gegg, L., Hughes, T.M., Hill, D., Pattison, W., Campbell, P., Sanders, S., Van, G., Tarpley, J., Derby, P., Lee, R., Amgen EST program and Boyle, W.J.: Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* **89**:309-319, 1997.
- Siveke, J.T. and Hamann, A.: T helper 1 and T helper 2 cells respond differentially to chemokines. *J. Immunol.* **160**:550-554, 1998.
- Socransky, S.S. and Haffajee, A.D.: Effect of therapy on periodontal infections. *J. Periodontol.* **64**:754-759, 1993.
- Suda, K., Woo, J.T., Takami, M., Sexton, P.M. and Nagai, K.: Lipopolysaccharide supports survival and fusion of preosteoclasts independent of TNF-alpha, IL-1, and RANKL. *J. Cell. Physiol.* **190**:101-108, 2002.
- Takada, H., Mihara, J., Morisaki, I. and Hamada, S.: Induction of interleukin-1 and -6 in human gingival fibroblast cultures stimulated with *Bacteroides* lipopolysaccharides. *Infect. Immun.* **59**:295-301, 1991.
- Takami, M., Kim, N., Rho, J. and Choi, Y.: Stimulation by toll-like receptors inhibits osteoclast differentiation. *J. Immunol.* **169**:1516-1523, 2002.
- Takeda, K., Kaisho, T. and Akira, S.: Toll-like receptors. *Ann. Rev. Immunol.* **21**:335-376, 2003.
- Tamura, M., Tokuda, M., Nagaoka, S. and Takada, H.: Lipopolysaccharides of *Bacteroides intermedius* (*Prevotella intermedia*) and *Bacteroides* (*Porphyromonas*) *gingivalis* induce interleukin-8 gene expression in human gingival fibroblast cultures. *Infect. Immun.* **60**:4932-4937, 1992.
- Tanamoto, K., Azumi, S., Haishima, Y., Kumada, H. and Umemoto, T.: The lipid A moiety of *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide specifically mediates the activation of C3H/HeJ mice. *J. Immunol.* **158**:4430-4436, 1997.
- Teng, Y.T., Nguyen, H., Gao, X., Kong, Y.Y., Gorczynski, R.M., Singh, B., Ellen, R.P. and Penninger, J.M.: Functional human T-cell immunity and osteoprotegerin ligand control alveolar bone destruction in periodontal infection. *J. Clin. Invest.* **106**:R59-R67, 2000.
- Wahl, S.M., Hunt, D.A., Wakefield, L.M., McCartney-Francis, N., Wahl, L.M., Roberts, A.B. and Sporn, M.B.: Transforming growth factor type beta induces monocyte chemotaxis and growth factor production. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**:5788-5792, 1987.
- Wahl, S.M., Hunt, D.A., Wong, H.L., Dougherty, S., McCartney-Francis, N., Wahl, L.M., Ellingsworth, L., Schmidt, J.A., Hall, G., Roberts, A.B. and Sporn, M.B.: Transforming growth factor-beta is a potent immunosuppressive agent that inhibits IL-1-dependent lymphocyte proliferation. *J. Immunol.* **140**:3026-3032, 1988.
- Wahl, S.M., Costa, G.L., Mizel, D.E., Allen, J.B., Skaleric, U. and Mangan, D.F.: Role of transforming growth factor beta in the pathophysiology of chronic inflammation. *J. Periodontol.* **64**(5 Suppl):450-455, 1993.
- Wang, P.L. and Ohura, K.: *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide signaling in gingival fibroblasts-CD14 and

- Toll-like receptors. Crit. Rev. Oral Biol. Med. **13**:132-142. 2002.
- Wang, P.L., Shirasu, S., Shinohara, M., Daito, M., Fujii, T., Kowashi, Y. and Ohura, K.: Purification and characterization of a trypsin-like protease from the culture supernatant of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Y4. Eur. J. Oral Sci. **107**:147-153, 1999.
- Wang, P.L., Azuma, Y., Shinohara, M. and Ohura, K.: Toll-like receptor 4-mediated signal pathway induced by *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide in human gingival fibroblasts. Biochem. Biophys. Res. Commun. **273**:1161-1167. 2000.
- Wang, P.L., Oido-Mori, M., Fujii, T., Kowashi, Y., Kikuchi, M., Suetsugu, Y., Tanaka, J., Azuma, Y., Shinohara, M. and Ohura, K.: Heterogeneous expression of Toll-like receptor 4 and downregulation of Toll-like receptor 4 expression on human gingival fibroblasts by *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide. Biochem. Biophys. Res. Commun. **288**:863-867. 2001.
- Wang, P.L., Ohura, K., Fujii, T., Oido-Mori, M., Kowashi, Y., Kikuchi, M., Suetsugu, Y. and Tanaka, J.: DNA microarray analysis of human gingival fibroblasts from healthy and inflammatory gingival tissues. Biochem. Biophys. Res. Commun. **305**:970-973, 2003.
- Yamaji, Y., Kubota, T., Sasaguri, K., Sato, S., Suzuki, Y., Kumada, H. and Umemoto, T.: Inflammatory cytokine gene expression in human periodontal ligament fibroblasts stimulated with bacterial lipopolysaccharides. Infect. Immun. **63**:3576-3581, 1995.
- Yasuda, H., Shima, N., Nakagawa, N., Yamaguchi, K., Kinoshita, M., Mochizuki, S., Tomoyasu, A., Yano, K., Goto, M., Murakami, A., Tsuda E., Morinaga, T., Higashio, K., Udagawa, N., Takahashi, N. and Suda, T.: Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **95**:3597-3602, 1998a.
- Yasuda, H., Shima, N., Nakagawa, N., Mochizuki, S., Yano, K., Fujise, N., Sato, Y., Goto, M., Yamaguchi, K., Kuriyama, M., Kanno, T., Murakami, A., Tsuda, E., Morinaga, T. and Higashio, K.: Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis *in vitro*. Endocrinology **139**:1329-1337, 1998b.
- Yoshimura, A., Kaneko, T., Kato, Y., Golenbock, D.T. and Hara, Y.: Lipopolysaccharides from periodontopathic bacteria *Porphyromonas gingivalis* and *Capnocytophaga ochracea* are antagonists for human Toll-like receptor 4. Infect. Immun. **70**:218-225, 2002.
- Zhong, W.W., Burke, P.A., Hand, A.T., Walsh, M.J., Hughes, L.A. and Forse, R.A.: Regulation of cytokine mRNA expression in lipopolysaccharide-stimulated human macrophages. Arch. Surg. **128**:158-163, 1993.
- Zou, W. and Bar-Shavit, Z.: Dual modulation of osteoclast differentiation by lipopolysaccharide. J. Bone Miner. Res. **17**:1211-1218, 2002.