



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

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

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 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](#)

2022년 2월

석사학위논문

쥐의 치주염 모델에서의

*P. gingivalis*

Lipopolysaccharide에 대한  
염증성 인자들의 발현에 대한  
연구

조선대학교 대학원

치 의 학 과

김 기 훈

쥐의 치주염 모델에서의  
*P. gingivalis*  
Lipopolysaccharide에 대한  
염증성 인자들의 발현에 대한  
연구

Expression of Inflammatory Cytokines to  
*P. gingivalis* Lipopolysaccharide on Rat  
Periodontitis Model

2022년 2월 25일

조선대학교 대학원

치 의 학 과

김 기 훈

취의 치주염 모델에서의  
*P. gingivalis*  
Lipopolysaccharide에 대한  
염증성 인자들의 발현에 대한  
연구

지도교수 유 상 준

이 논문을 치의학 석사학위신청 논문으로 제출함

2021년 10월

조선대학교 대학원

치 의 학 과

김 기 훈

# 김기훈의 석사학위논문을 인준함

위원장 조선대학교 교수 김 병 옥 (인)

위 원 조선대학교 교수 유 상 준 (인)

위 원 조선대학교 교수 이 원 표 (인)

2021년 12월

조선대학교 대학원

## 목 차

### ABSTRACT

I. 서 론 .....	1
II. 실험 재료 및 방법 .....	3
1. 세균 배양 및 LPS 추출 .....	3
2. 백서 치아 실-결찰(silk-ligature) 치주질환 유도 모델	3
3. 염증 인자 평가 (ELISA 분석) .....	4
4. 통계분석 .....	4
III. 연구 결과 .....	5
IV. 총괄 및 고찰 .....	10
V. 결론 .....	13
참고문헌 .....	14

## 표 목 차

Table 1. LPS 투여 농도별 치은조직 내 IL-1 $\beta$ 발현 .....	5
Table 2. LPS 투여 농도별 치은조직 내 IL-6 발현 .....	6
Table 3. LPS 투여 농도별 치은조직 MMP-9 발현 .....	7
Table 4. LPS 투여 농도별 치은조직 내 COX-2 발현 .....	8
Table 5. LPS 투여 농도별 치은조직 내 PGE2 발현 .....	9

# ABSTRACT

## Expression of Inflammatory Cytokines to *P. gingivalis* Lipopolysaccharide on Rat Periodontitis Model

Kim Ki-Hoon

Advisor: Prof. Yu Sang-Joun, D.D.S., P.H.D.

Department of Dentistry

Graduate School of Chosun University

### I. Introduction

The purpose of this study was to evaluate how the expression of specific cytokines related to gingival inflammation. IL-1 $\beta$ , IL-6, COX-2, PGE2 and MMP-9 was changed according to the concentration of LPS injected in a rat periodontitis model.

### II. Materials and Methods

Changes in the inflammatory factors of gingival tissue were evaluated in a periodontal disease induction model in which silk-ligature was wrapped around the maxillary second molar in rats. The experiment was conducted in a total of 4 groups, and 4 male rats were randomly assigned to each group; 1) Non-ligature group (Non-periodontitis model), 2) LPS group 1 (this groups were injected with 2  $\mu$ g/mL pgLPS), 3) LPS 2 group (this groups were injected with 8  $\mu$ g/mL pgLPS), 4) LPS 3 group (this groups were injected with 20  $\mu$ g/mL pgLPS). pgLPS was injected into the gingiva around maxillary 2<sup>nd</sup> molar 3 times for 3 weeks. The ELISA kit was used to measure the expression changes of IL-1 $\beta$ , IL-6, MMP-9, COX-2, and PGE2 in gingival tissues collected from all control and experimental groups.



### III. Results

The expressed IL-1 $\beta$  concentrations in gingival tissue were  $0.591 \pm 0.073$  pg/ml,  $0.859 \pm 0.088$  pg/ml,  $1.767 \pm 0.359$  pg/ml and  $17.103 \pm 2.708$  pg/ml in the non-ligation group, LPS 1 group, LPS 2 group, and LPS 3 group, respectively. The expressed IL-6 concentrations were  $1.466 \pm 0.075$  pg/ml,  $1.756 \pm 0.303$  pg/ml,  $2.595 \pm 0.396$  pg/ml and  $6.486 \pm 1.621$  pg/ml in the non-ligation group, LPS 1 group, LPS 2 group, and LPS 3 group, respectively. The concentrations of expressed MMP-9 were  $0.073 \pm 0.009$  ng/ml,  $0.081 \pm 0.004$  ng/ml,  $0.158 \pm 0.017$  ng/ml and  $0.216 \pm 0.063$  ng/ml in the non-ligation group, LPS 1 group, LPS 2 group, and LPS 3 group, respectively. The expressed COX-2 concentrations were  $0.133 \pm 0.003$  ng/ml,  $0.111 \pm 0.010$  ng/ml,  $0.174 \pm 0.024$  ng/ml and  $0.446 \pm 0.100$  ng/ml in the non-ligation group, LPS 1 group, LPS 2 group, and LPS 3 group, respectively. The expressed PGE2 concentrations were  $0.082 \pm 0.003$  ng/ml,  $0.079 \pm 0.015$  ng/ml,  $0.085 \pm 0.013$  ng/ml and  $4.736 \pm 0.013$  ng/ml in the non-ligation group, LPS 1 group, LPS 2 group, and LPS 3 group, respectively.

### IV. Conclusion

As the concentration of LPS injection was increased, the expression levels of IL-1 $\beta$ , IL-6, MMP-9, COX-2, and PGE2 were increased. LPS can change the expression of inflammatory factors such as cytokines in the gingival tissue even with a small concentration of LPS, and it is thought that the expression of inflammatory factors is more clear when the concentration is increased.

## I. 서론

치주염은 치은의 염증과 치주인대 및 치조골의 소실을 일으키는 염증성 질환이다[1]. 치은의 염증은 상당히 흔한 증상이며, 이것이 지속되고 조절되지 않는다면 치주조직과 치아의 부착기구 파괴로 이어질 수 있다. 이를 치주염이라 정의한다[2]. 치아 부착기구의 파괴는 치아의 상실로 이어질 수 있고, 이는 환자의 삶의 질에 상당한 영향을 끼치며, 사회적이고 경제적인 문제를 일으킬 수 있다[3].

치주염의 발병기전은 치태이며, 20세기에 특정 미생물들이 치주질환 원인균으로 밝혀졌는데[4], 그 중 *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), *Treponema denticola*와 *Tannerella forsythia*로 구성된 “red complex”균이 치주질환 원인균으로 지목되었다[5]. 치주염의 시작과 진행은 다양한 원인 요소들과 위험 요소들이 관련되어 있는데 이 중 국소 부위의 세균들과 숙주 면역반응이 가장 중요하다[6].

치주염의 진행에서 사이토카인들은 항상성 유지와 염증반응 과정에서 중요한 조절인자이다. 이것들은 병원균에 대항하여 반응하며, 세포막과 결합조직 세포에서 림프구들과 함께 반응을 일으킨다[7]. 염증을 유발하는 지질다당류(lipopolysaccharide, LPS)들, 펩티도글리칸(peptidoglycan)들, 지질 타이코산(lipoteichoic acid)들, 단백분해효소(protease)들 그리고 독소(toxin)들과 같은 세균 성분들은 치아 표면의 바이오필름에서 발견된다[8]. 이러한 성분들이 숙주 면역작용과 염증작용을 시작하게 하고, 다형핵백혈구들(polymorphonuclear leukocytes, PMNs)을 포함한 숙주 방어세포를 활성화 시킨다. 또한 세균의 침투가 감소되는 방향으로 항체 반응을 활성화 시킨다. 방어 세균들의 활성화는 사이토카인들, chemokine들, 프로스타글란딘들(prostaglandins, PGEs) 그리고 proteolytic enzyme들인 기질단백분해효소들(matrix metalloproteinases, MMPs)과 같은 염증조절 인자들을 생산하게 하고 이 조절인자들에 의해 결합조직과 골조직의 대사작용이 변화된다.

염증조절 인자들에 대한 많은 연구들에서 사이토카인들과 chemokine들, 그리고 PGE들이 치주조직 파괴에 결정적인 역할을 하는 것으로 밝혀졌다[9]. 염증조절 인자들의 중요한 기전은 치주조직에서 치조골 파괴에 관여하는 주요 세포로 여겨지는 파골세포들과 다핵세포들(multinucleated cells)의 형성을 촉진하는 것이다[10]. 숙주 면역작용과 염증반응이 세균 감염을 제거하는데 불충분한 경우에는 만성 염증반응이 나타나며 이 결과, 치주조직의 파괴 즉 임상적 부착소실이 일어난다[11]. 또한 치주염 동물 실험에서 사이토카인들의 발현과 그 수용체들이 치조골 소실의 표현형에 영향을 주는 것으로 나타났다[12].

세균에 의해 분비되는 항원과 LPS와 펩티도글리칸들과 같은 생산물들은 숙주세포 표면

의 toll-like receptors (TLRs)에 인식되어 염증반응을 시작하게 한다[13]. 이러한 세균과 세포와의 상호작용에 의한 TLRs의 활성화가 신호전달을 통해서 다양한 사이토카인들을 분비하게 한다. 이런 과정으로 분비되는 대표적인 사이토카인들로 인터루킨-1(interleukin-1, IL-1)들, 인터루킨-6(IL-6)들, 인터루킨-8(IL-8) 그리고 종양괴사인자(tumour necrosis factor, TNF)등이 있다. 하지만 지금까지 치은에 주입되는 LPS의 농도 변화에 따라 치은조직 내의 사이토카인들과 chemokine들, 그리고 PGE들이 어떻게 발현되는지에 대한 연구는 미흡하다.

이 연구의 목적은 쥐의 치주염 모델에서 주입되는 LPS의 농도에 따라 치은 염증과 관련된 특정 사이토카인들인 IL-1 $\beta$ , IL-6와 COX-2, PGE2, MMP-9의 발현이 어떻게 변화하는지를 평가하는 것이다.

## II. 실험 재료 및 방법

### A. 세균 배양 및 LPS 추출

본 연구에서 사용한 *P. gingivalis* KCOM 2804 균주는 한국구강미생물자원(Korean Collection for Oral Microbiology, Gwangju, Korea)에서 분양받아 사용하였다. 또한 이 세균은 치주질환자의 치주낭에서 채취하여 분리 배양한 것이다.

*P. gingivalis* KCOM 2804 균주는 Tryptic Soy broth에 0.5% yeast extract, 0.05% cysteine HCl-H<sub>2</sub>O, 0.5 mg/ml hemin 및 2 µg/ml vitamin K1가 포함된 배지에 접종하여, 37°C anaerobic chamber (Bactron I, Sheldon Manufacturing Inc., Cornelius, OR, USA)와 혐기성 조건(10% H<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 85% N<sub>2</sub>)에서 배양하였다. 그리고 LPS 추출은 인트론 회사의 LPS extraction kit을 사용하여 동봉된 제조사의 지시대로 시행한 후 동결 건조하여 무게를 측정 한 후에 농도를 구하여 사용하였다. 이 때 추출한 *P. gingivalis* KCOM 2804 균주 LPS는 p gLPS라고 하였다.

### B. 백서 치아 실-결찰(silk-ligature) 치주질환 유도 모델

LPS 농도에 따른 치은조직 염증인자들의 변화되는 양상을 실-결찰을 쥐의 상악 제2대구치 주위로 둘러싸는 형태의 치주질환 유발 모델에서 평가하였다. 모든 쥐들에 대한 실험은 조선대학교 동물실험윤리심의위원회의 심의를 거쳐 진행하였다(CIACUC2018-A0007). 실험은 총 4개 그룹으로 진행되었고, 각 그룹 당 4마리의 수컷 쥐들(6주, 180-230 g)을 무작위로 배당하여 사용하였다.

- 1) **Control 그룹(Non-ligature group)**: 매일 물 1 ml을 먹인 음성 대조군.
- 2) **LPS 1 그룹(Ligature group 1)**: 5-0의 silk-ligature (직경 0.5-0.6 mm)를 상악 제 2대구치의 cervical part에 고정시키고(Fig. 2) 2 µg/mL pgLPS를 상악 제 2대구치 치은변연 부위에 3주동안 3회 주입한 후 매일 1 ml의 물을 경구용 존대를 이용하여 투여한 실험군.
- 3) **LPS 2 그룹(Ligature group 2)**: 5-0의 silk-ligature로 ligation하고 8 µg/mL pgLPS를 상악 제 2대구치 치은변연 부위에 3주동안 3회 주입한 후 매일 1 ml의 물을 경구용 존대를 이용하여 투여한 실험군.

4) **LPS 3 그룹(Ligature group 3)**: 5-0의 silk-ligature로 ligation하고 20 µg/mL pgLPS를 상악 제 2대구치 치은변연 부위에 3주동안 3회 주입한 후 매일 1 ml의 물을 경구용 존대를 이용하여 투여한 실험군.

동물실험에서 모든 쥐를 xylazine hydrochloride (1 mg/Kg, Rompun<sup>®</sup>, Bayer Korea, Seoul, Korea)로 전신마취 시킨 후 실험을 시행하였으며, 실험은 3주 동안 시행하였다. pgLPS를 1회 주입시 주사기를 사용하여 각각 0.5ml의 용량으로 주입하였다. 주입 시기는 실험 0일째, 1주일째, 2주일째에 주입하였다. 실험 마지막 날인 3주째에는 마취를 하여 carbon dioxide inhalation을 통해 동물들을 희생시켰다. 치은조직을 우측 상악 제 2대구치 주위에서 채득한 후에 특정 염증 cytokine 및 MMPs의 발현 분석을 위해 -80°C에서 보관하였다.

## C. 염증 인자 평가 (ELISA 분석)

모든 대조군과 실험군 백서에서 상악 제 2대구치의 치은열구를 포함한 치은조직을 채취한후 염증성 사이토카인들인 IL-1 $\beta$ , IL-6, MMP-9, COX-2, PGE2 발현 변화를 측정하기 위하여 ELISA kit(MyBiosource<sup>®</sup>, San Diego, CA, USA)를 이용하였다. ELISA kit 실험 진행을 위해 보관된 치은조직은 PBS와 함께 균질화 시킨 후 원심분리를 이용하여 상층액을 분리하였다. 이 실험에서는 상층액을 사용하였으며 제조사의 지시에 따라 microplate reader(Spectrostar nano<sup>®</sup>, bmg labtech, Ortenberg, Germany)를 이용하여 분석을 시행하였다. 결과는 제조사의 공식에 따라 혈액 내에 존재하는 각각 단백질들의 질량 (nanogram per milliliter ; ng/ml or picogram per milliliter; pg/ml)으로 나타냈다.

## D. 통계분석

대조군과 실험군의 실험 수치는 평균  $\pm$  표준편차로 표시하였고, 집단간의 통계적 유의수준의 차이가 있는지를 검증하기 위해 SPSS 통계프로그램(version 12, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용한 비모수검정법인 Kruskal-Wallis test와 Mann-Whitney U test를 실시하였다. 분석 결과 95% 신뢰수준에서 유의 확률이 0.05(유의수준 5%) 미만( $p < 0.05$ )일 때 두 집단 간의 유의미한 차이가 있다고 해석 하였다.

### III. 연구 결과

#### A. LPS 투여 농도별 치은조직내 IL-1 $\beta$ 에 대한 발현 결과

IL-1 $\beta$ 의 발현은 control 그룹에서 가장 낮았으며, 주입하는 LPS 농도가 증가될수록 IL-1 $\beta$ 의 발현이 증가되는 경향을 보였다. 발현한 IL-1 $\beta$ 의 농도는 control 그룹, LPS 1 그룹, LPS 2 그룹, LPS 3 그룹에서 각각  $0.591 \pm 0.073$  pg/ml,  $0.859 \pm 0.088$  pg/ml,  $1.767 \pm 0.359$ pg/ml 그리고  $17.103 \pm 2.708$  pg/ml이었다. LPS 1 그룹은 control 그룹보다 통계적으로 유의하게 더 많은 발현을 나타내며( $p=0.029$ ), LPS 2 그룹은 control 그룹과 LPS 1 그룹보다 통계적으로 유의하게 더 높은 발현을 나타냈다( $p=0.029$ ). 반면 LPS 3 그룹은 다른 그룹에 비해 더 높은 IL-1 $\beta$ 의 발현을 나타내지만, 통계적으로 유의성은 없었다( $p=0.057$ )(Table 1).

Table 1. LPS 투여 농도별 치은조직 내 IL-1 $\beta$  발현

Group	Concentration of IL-1 $\beta$ in the gingiva tissue (pg/ml)				
	Average $\pm$ SD	p value			
		Control	LPS 1	LPS 2	LPS 3
Control	$0.591 \pm 0.073$	-	-	-	-
LPS 1	$0.859 \pm 0.088$	0.029*	-	-	-
LPS 2	$1.767 \pm 0.359$	0.029*	0.029*	-	-
LPS 3	$17.103 \pm 2.708$	0.057	0.057	0.057	-

Control, Non-ligature group; LPS 1, Ligature group 1 with 2  $\mu$ g/mL pgLPS; LPS 2, Ligature group 2 with 8  $\mu$ g/mL pgLPS; LPS 3, Ligature group 3 with 20 $\mu$ g/mL pgLPS; Kruksal-Wallis test,  $p=0.004$ .

\*Statistically significant difference ( $p<0.05$ ) (Mann-Whitney U test)

#### B. LPS 투여 농도별 치은조직내 IL-6에 대한 발현 결과

IL-6의 발현은 control 그룹에서 가장 낮았으며, 주입하는 LPS 농도가 증가될수록 IL-6의 발현이 증가되는 경향을 보였다. 발현한 IL-6의 농도는 control 그룹, LPS 1그룹, LPS 2 그룹, LPS 3 그룹에서 각각  $1.466 \pm 0.075$  pg/ml,  $1.756 \pm 0.303$  pg/ml,  $2.595 \pm 0.396$ pg/ml 그리고  $6.486 \pm 1.621$  pg/ml이었다. LPS 1 그룹은 control 그룹보다 통계적으로 유의하게 더 많은 발현을 나타내며( $p=0.029$ ), LPS 2 그룹은 control 그룹과 LPS 1 그룹보다 통계적으로 유의하게 더 높은 발현을 나타냈다( $p=0.029$ ). LPS 3 그룹은 다른 그룹에 비해 더 높은 IL-6의 발현을 나타내고, 통계적으로 유의한 차이가 있었다( $p=0.029$ )(Table 2).

Table 2. LPS 투여 농도별 치은조직 내 IL-6 발현

Group	Concentration of IL-6 in the gingiva tissue (pg/ml)				
	Average $\pm$ SD	p value			
		Control	LPS 1	LPS 2	LPS 3
Control	$1.466 \pm 0.075$	-	-	-	-
LPS 1	$1.756 \pm 0.303$	0.029*	-	-	-
LPS 2	$2.595 \pm 0.396$	0.029*	0.029*	-	-
LPS 3	$6.486 \pm 1.621$	0.029*	0.029*	0.029*	-

Control, Non-ligature group; LPS 1, Ligature group 1 with 2  $\mu$ g/mL pgLPS; LPS 2, Ligature group 2 with 8  $\mu$ g/mL pgLPS; LPS 3, Ligature group 3 with 20 $\mu$ g/mL pgLPS; Kruksal-Wallis test,  $p=0.003$ .

\*Statistically significant difference ( $p<0.05$ ) (Mann-Whitney U test)

### C. LPS 투여 농도별 치은조직내 MMP-9에 대한 발현 결과

MMP-9의 발현은 control 그룹에서 가장 낮았으며, 주입하는 LPS 농도가 증가될수록 MMP-9의 발현이 증가되는 경향을 보였다. 발현한 MMP-9의 농도는 control 그룹, LPS 1 그룹, LPS 2 그룹, LPS 3 그룹에서 각각  $0.073 \pm 0.009$  ng/ml,  $0.081 \pm 0.004$  ng/ml,  $0.158 \pm 0.017$  ng/ml 그리고  $0.216 \pm 0.063$  ng/ml이었다. LPS 1 그룹과 control 그룹 사이에서는 통계적으로 유의한 발현이 관찰되지 않았다( $p=0.343$ ). LPS 2 그룹은 control 그룹과 LPS 1 그룹보다 통계적으로 유의하게 더 높은 발현을 나타냈다( $p=0.029$ ). LPS 3 그룹은 다른 그룹

에 비해 더 높은 MMP-9의 발현을 나타내고, control 그룹과 LPS 1 그룹과 비교할 때 통계적으로 유의한 차이를 보였다( $p=0.029$ )(Table 3).

Table 3. LPS 투여 농도별 치은조직 MMP-9 발현

Group	Concentration of MMP-9 in the gingiva tissue (ng/ml)				
	Average $\pm$ SD	p value			
		Control	LPS 1	LPS 2	LPS 3
Control	0.073 $\pm$ 0.009	-	-	-	-
LPS 1	0.081 $\pm$ 0.004	0.343	-	-	-
LPS 2	0.158 $\pm$ 0.017	0.029*	0.029*	-	-
LPS 3	0.216 $\pm$ 0.063	0.029*	0.029*	0.20	-

Control, Non-ligature group; LPS 1, Ligature group 1 with 2  $\mu$ g/mL pgLPS; LPS 2, Ligature group 2 with 8  $\mu$ g/mL pgLPS; LPS 3, Ligature group 3 with 20 $\mu$ g/mL pgLPS; Kruksal-Wallis test,  $p=0.007$ .

\*Statistically significant difference ( $p<0.05$ ) (Mann-Whitney U test)

#### D. LPS 투여 농도별 치은조직내 COX-2에 대한 발현 결과

COX-2의 발현은 LPS 1 그룹에서 가장 낮았으며, 주입하는 LPS 농도가 증가될수록 COX-2의 발현이 증가되는 경향을 보였다. 발현한 COX-2의 농도는 control 그룹, LPS 1 그룹, LPS 2 그룹, LPS 3 그룹에서 각각 0.133  $\pm$  0.003 ng/ml, 0.111  $\pm$  0.010 ng/ml, 0.174  $\pm$  0.024 ng/ml 그리고 0.446  $\pm$  0.100 ng/ml이었다. LPS 1 그룹은 control 그룹보다 통계적으로 유의하게 더 적은 발현을 나타내며( $p=0.029$ ), LPS 2 그룹은 control 그룹과 LPS 1 그룹보다 통계적으로 유의하게 더 높은 발현을 나타냈다( $p=0.029$ ). LPS 3 그룹은 다른 그룹에 비해 더 높은 COX-2의 발현을 나타내고, 통계적으로 유의한 차이가 있었다( $p=0.029$ )(Table 4).

Table 4. LPS 투여 농도별 치은조직 내 COX-2 발현



Group	Concentration of IL-6 in the gingiva tissue (ng/ml)				
	Average ± SD	p value			
		Control	LPS 1	LPS 2	LPS 3
Control	0.133 ± 0.003	-	-	-	-
LPS 1	0.111 ± 0.010	0.029*	-	-	-
LPS 2	0.174 ± 0.024	0.029*	0.029*	-	-
LPS 3	0.446 ± 0.100	0.029*	0.029*	0.029*	-

Control, Non-ligature group; LPS 1, Ligature group 1 with 2 µg/mL pgLPS; LPS 2, Ligature group 2 with 8 µg/mL pgLPS; LPS 3, Ligature group 3 with 20µg/mL pgLPS; Kruksal-Wallis test,  $p=0.003$ .

\*Statistically significant difference ( $p<0.05$ ) (Mann-Whitney U test)

### E. LPS 투여 농도별 치은조직내 PGE2에 대한 발현 결과

PGE2의 발현은 LPS 1 그룹에서 가장 낮았으며, 주입하는 LPS 농도가 증가될수록 PGE2의 발현이 증가되는 경향을 보였다. 발현한 PGE2의 농도는 control 그룹, LPS 1그룹, LPS 2 그룹, LPS 3 그룹에서 각각  $0.082 \pm 0.003$  ng/ml,  $0.079 \pm 0.015$  ng/ml,  $0.085 \pm 0.013$  ng/ml 그리고  $4.736 \pm 0.013$  ng/ml이었다. LPS 1그룹과 control 그룹 사이에서는 통계적으로 유의한 발현이 관찰되지 않았다( $p=1.00$ ). LPS 2 그룹은 control 그룹과 LPS 1 그룹과의 비교에서 통계적으로 유의한 차이를 나타내지 않았다( $p=0.886, p=0.486$ ). LPS 3 그룹은 다른 그룹에 비해 더 높은 PGE2의 발현을 나타내고, control 그룹, LPS 1 그룹, LPS 2 그룹과 비교할 때 통계적으로 유의한 차이를 보였다( $p=0.029$ )(Table 5).

Table 5. LPS 투여 농도별 치은조직 내 PGE2 발현

Group	Concentration of IL-6 in the gingiva tissue (ng/ml)				
	Average ± SD	p value			
		Control	LPS 1	LPS 2	LPS 3
Control	0.082 ± 0.003	-	-	-	-
LPS 1	0.079 ± 0.015	1	-	-	-
LPS 2	0.085 ± 0.013	0.886	0.486	-	-
LPS 3	4.736 ± 0.013	0.029*	0.029*	0.029*	-

Control, Non-ligature group; LPS 1, Ligature group 1 with 2 µg/mL pgLPS; LPS 2, Ligature group 2 with 8 µg/mL pgLPS; LPS 3, Ligature group 3 with 20µg/mL pgLPS; Kruksal-Wallis test,  $p=0.033$ .

\*Statistically significant difference ( $p<0.05$ ) (Mann-Whitney U test)

## IV. 총괄 및 고찰

IL-1, IL-6, IL-12, IL-17, IL-18, IL-21, TNF $\alpha$ 와 IFN- $\gamma$ 와 같은 전염증성 사이토카인들은 치주염의 발병에 관여한다. 또한 증가된 IL-1과 IL-6는 치주염 진행을 특징 짓는 B 세포/형질세포 반응에서 생산된다[14]. 염증 사이토카인들인 IL-1과 TNF $\alpha$ 는 치주염의 발생에 중요한 역할을 한다고 보고되고 있으며[15], 임상적으로 치주염이 발생한 치은조직이나 치은열구액에서 TNF $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$ 가 높은 농도로 관찰된다고 알려져있다[16]. IL-1과 TNF $\alpha$ 는 IL-6, IL-8, MMPs, PGE2와 같은 다른 다양한 염증 인자들의 유도과 관련되어 있으며[17], 이 두 염증 사이토카인들은 세포내 기전을 통해 치조골의 흡수를 유도한다. 또한 이것들은 치주조직 내의 단핵구, 대식세포, 다형핵백혈구, 섬유모세포, 상피세포, 혈관내피세포, 골모세포에서 생성된다[15]. 이중 IL-1 $\beta$ 는 숙주와 미생물의 상호작용에 의해 유도되는 것으로 보고되고 있고 광범위하게 Th1 세포와 Th2 세포들의 활성화와 확장을 유도하게 한다[18]. 임상적으로 치은열구액 내에서의 IL-1 $\beta$ 의 총량은 치주염의 심도와 관련이 있다는 보고도 있다[19]. 이전의 연구들과 같은 맥락에서 본 연구에서도 주입하는 LPS 농도가 증가함에 따라 더 많은 IL-1 $\beta$ 의 발현을 관찰할 수 있었다. Zhao 등은 쥐의 치주모델에서 *P. gingivalis*를 치은에 직접 주입하는 실험에서 4주후 IL-1 $\beta$ 가 통계적으로 유의하게 대조군에 비해 약 2배이상 증가되고, 8주후에는 약 4배이상 증가하는 양상을 관찰할 수 있었다고 보고하였다[20]. 또한 Polak 등은 *p. gingivalis*로 감염시킨 치은조직에서 감염후 IL-1 $\beta$ 의 발현이 2시간 후에는 대조군에서 보다 4배이상 증가하다가 24시간 후에는 2배이상으로 감소하는 양상을 보고하였다[21]. 본 연구에서도 3주후에 8  $\mu\text{g/mL}$ 와 20  $\mu\text{g/mL}$  pgLPS를 주입한 실험군에서 대조군보다 2배이상 증가된 IL-1 $\beta$ 의 발현을 관찰할 수 있었지만, 2  $\mu\text{g/mL}$  pgLPS를 주입한 실험군에는 약 1.5배정도의 IL-1 $\beta$ 의 발현만이 관찰되었다.

IL-6는 세균성 LPS, IL-1과 TNF $\alpha$ 와 반응한 상피세포, 림프구, 단핵구, 섬유모세포들에서 생성되고, 파골세포의 형성을 촉진한다고 알려져 있다[8,22]. 또한 치주염 환자의 이환된 치은에서 증가된 양의 IL-6가 보고된 바 있다[23]. 임상적으로는 IL-6 174G/C의 다형성이 21개의 연구들을 포함한 메타분석에서 만성 치주염의 감수성과 연관이 있다고 보고되었으며[24], 실험적 치주염을 가진 원숭이 모델에서 IL-6가 연속적으로 관찰되었는데, 이것은 IL-6의 발현이 초기부터 유도되고 치주염이 진행되고 해결되는 단계에서도 낮게 유지된다는 것을 의미한다[25]. 즉 이 결과는 IL-6가 치주염의 시작과 급성 상태에서 중요한 역할을 하고 있음을 보여주는 것이다. 또한 IL-6는 골의 항성성을 유지하는데 관여한다. 골모세포에서 RANKL 수용체 활성화의 발현은 IL-6에 의해 증가되고, 파골세포의 분화와 골흡수를 일으킨

다고 보고되고 있다[26]. 본 연구에서는 주입하는 LPS의 농도가 증가함에 따라 치은조직에 발현되는 IL-6의 양이 증가됨을 확인할 수 있었다. Zhao 등은 쥐의 치주모델에서의 4, 8주 후에 IL-6가 통계적으로 유의하게 대조군에 비해 약 2배이상 증가되는 양상을 관찰할 수 있었다고 보고하였으며[20], Leira 등은 48시간마다 LPS를 주입하는 실험에서 IL-6의 혈청내 농도가 주입후 24시간에 가장 높게 측정되었고, 1주,2주 및 3주에서 대조군보다 통계적으로 유의하게 발현이 증가됨을 보고하였다[27]. 본 연구에서도 3주후에 8  $\mu\text{g/mL}$ 와 20  $\mu\text{g/mL}$  pgLPS를 주입한 실험군에서 대조군보다 2배이상 증가된 IL-6의 발현을 치은조직에서 관찰할 수 있었지만, 낮은 농도인 2  $\mu\text{g/mL}$  pgLPS를 주입한 실험군에는 대조군과 유사한 IL-6의 발현만이 관찰되었다.

PGE는 염증, 혈소판응집, 신경전달물질의 분비 등과 같은 생리적이고, 병리적인 체내 변화와 관련이 있다. 그중 PGE2가 가장 잘 알려져 있고, 이 물질은 혈관 확장, 부종, 발열, 동통 등을 일으킨다고 보고된다[28]. 또한 PGE2는 치주염과 같은 염증성 질환에서 작용하여 MMPs의 생성을 유도하고 조직손상을 일으키며, 류마티스 관절 환자에서 얻은 채식세포에는 많은 양의 PGE2가 생산됨이 보고되고 있고[29], 이렇게 만들어진 PGE2는 류마티스 관절염 환자에서 염증반응과 조직파괴 기전에 중대한 역할을 한다고 알려져 있다[30]. PGE2의 생성은 phospholipase A2의 효소 작용에 의해 막 인지질에서 arachidonic acid가 생성되는 과정에서부터 시작되며, arachidonic acid는 효소작용에 의해 PGE2가 되고 다시 대사산물인 PGH2가 된다. 이 두 과정에는 COX가 작용하며, 이들 물질의 생성을 촉진한다. COX는 두 종류로 존재하며 이중 COX-1은 혈소판 응집, 위 점막보호, 신기능 조절과 같은 생리적인 기능에 관여하며, COX-2는 염증등의 자극에 의해 발현된다. 즉, COX-2에 의해 생산되는 프로스타글란딘이 염증반응과 세포증식에 관여하며[31], PGH2에서 PGE2로 대사되는 것에 관여하는 PGE synthase 중에서 microsomal PGE synthase-1은 LPS와 같은 염증성 요인이나 IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ 와 같은 염증성 사이토카인에 의해서 발현이 증가된다. 이는 COX-2와 기능적으로 연관하여 PGE2의 생성을 촉진하게 한다는 것을 보여주는 것이다[32]. Miyauchi 등[33]은 LPS를 치주낭에 국소 도포한 후 쥐의 치주조직에서 COX1과 COX2의 발현을 관찰하였는데, LPS 적용후 COX1의 발현은 관찰되지 않았고, COX2의 발현만 접합상피에서 관찰하였다. 이는 접합상피가 LPS의 침입에 대한 첫 번째 방어작용으로 중요한 역할을 할 수 있으며, 접합상피의 PGE2가 치주염증의 시작임을 보여주는 연구이다. 또한 깊은 치주낭이 있는 치주조직 내에서 치주인대 섬유모세포와 백악모세포, 골모세포들에서 증가된 COX2의 발현을 관찰할 수 있었다. 본 연구에서도 쥐의 치주낭 주위의 치은내로 LPS를 주입하였고, 그 결과 2  $\mu\text{g/mL}$ 의 낮은 농도의 LPS에서도 COX2의 발현은 감소되었다가, 더 높은 농도의 LPS를 주입한 쥐의

치은조직에서 더 높은 COX2 발현을 나타냈다. 하지만, PGE2의 발현은 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 높은 농도의 LPS를 주입한 경우에서만 통계적으로 유의하게 증가되는 발현을 관찰할 수 있었다. 또한 PGE2는 콜라겐 분해효소를 생산하여 파골세포에 의한 치조골 흡수와 결합조직의 파괴를 일으키는 것으로 잘 알려져 있다[34]. 더욱이 치은열구에서 증가된 PGE2는 부착소실과 관련이 있다고 보고되고 있다[35]. 이는 치은조직에 주입된 LPS가 COX2의 유도를 통해 다량의 PGE2를 생성하게 하고 이것이 치주염의 특징인 부착소실과 파골세포의 치조골 흡수와 연관될 수 있다는 것을 보여주는 증거이다.

또한 세포의 기질을 유지하는 것이 치은조직의 정상적인 발달과 기능에 중요하다고 알려져 있는데 MMP 효소와 내인성 억제제, metalloprotenases같은 조직 억제제(TIMPs)들은 건강한 조직에서 세포의 기질의 항상성 유지에 관여한다고 보고되고 있다. 그러나 이것들은 염증성 질환에서 조직의 파괴과정에서도 중요한 역할을 한다. 이중 MMP들은 사이토카인과 사이토카인 수용체의 활성을 조절하는데 관여하며, 치주염에서 숙주와 세균에서 유래된 단백질 분해 효소들이 결합조직의 세포질의 기질의 파괴에 관여한다고 알려져 있다. 임상적으로 MMPs, elastase, mast cell tryptase 등과 같은 다양한 숙주 단백질 분해 효소들이 치주염을 가진 환자의 치은열구액에서 관찰된다고 보고되고 있으며[36], 증가된 MMP들의 발현은 치주 질환을 포함한 병리적 상태와 관련이 있다고 알려져 있다. MMP-1, MMP-3 그리고 MMP-9의 다형성은 중국인의 치주염에 대한 감수성과 관련이 있는 것으로 보고된바 있고 [37], In vitro 실험에서 염증 인자인 IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  그리고 세균성 LPS는 치은 섬유모세포에서 MMP-1, MMP-3, MMP-8 그리고 MMP-9의 발현을 증가시킨다고 보고되었다[38]. PGE2와 MMP사이의 긴밀한 상호작용은 대식세포에서 MMP-9의 발현을 조절하고 PGE2 조절효소인 microsomal prostaglandin E synthase-1 (mPGES-1)을 통해 연골세포에서 MMP-3와 MMP-13을 유도하는 PGE2의 핵심역할을 한다고 알려져 있고[39,40], 본 연구에서도 LPS의 주입후 증가된 MMP-9의 발현을 관찰할 수 있었다.

하지만 본 연구는 각 그룹당 개체수가 적었으며, LPS 주입 후 단기간의 치은조직의 반응만을 관찰했으며, 조직학적 치주조직의 염증 양상 및 방사선학적인 치조골 소실의 평가가 이루어지지 못한 한계점을 가지고 있다. 향후 더 많은 개체에서 실험이 이루어져야 할 것으로 사료되며, 더 장기간의 데이터가 측정되어야 하며, 염증 신호인자의 발현 양상과 조직학적, 방사선학적 치주염의 증가 양상이 일정한 양상을 보이는지에 대한 추가적인 연구가 필요하다.

## V. 결론

백서 치아 실-결찰을 이용한 치주질환 유도 모델을 이용하여 및 *P. gingivalis* LPS의 농도를 달리하여 치은조직에 주입한 후 치주염과 관련된 사이토카인인 IL-1 $\beta$ , IL-6, MMP-9, COX-2, PGE2의 변화 양상을 관찰한 결과, 주입하는 LPS의 양을 20 $\mu$ g/mL으로 한 경우에 가장 높은 발현양을 나타냈으며, LPS의 주입농도를 증가시킴에 따라 IL-1 $\beta$ , IL-6, MMP-9, COX-2, PGE2의 발현양이 증가하는 양상을 보였다. *P. gingivalis* LPS는 2 $\mu$ g/mL의 적은 농도로도 치은조직내 사이토카인과 같은 염증인자의 발현을 변화시킬 수 있으며, 그 양이 증가하였을 때 더 명확한 염증인자의 발현을 나타내는 것으로 사료된다. 즉 치주질환을 일으키는 원인균에 의해 생산되는 LPS의 농도가 증가하면, 그 반응으로 치주조직의 염증이 증가할 수 있다.

## 참고문헌

1. Hajishengallis G. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nat Rev Immunol* 2015;15:30-44.
2. Hajishengallis G, Korostoff JM. Revisiting the Page & Schroeder model: the good, the bad and the unknowns in the periodontal host response 40 years later. *Periodontol 2000* 2017;75:116-151.
3. Eke PI, Dye BA, Wei L, Slade GD, Thornton-Evans GO, Borgnakke WS, et al. Update on prevalence of periodontitis in adults in the United States: NHANES 2009 to 2012. *J Periodontol* 2015;86:611-622.
4. Loesche WJ. The specific plaque hypothesis and the antimicrobial treatment of periodontal disease. *Dent Update* 1992;19:70-72.
5. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 1998;25:134-144.
6. Hajishengallis G. Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: keystones, pathobionts, and host response. *Trends Immunol* 2014;35:3-11.
7. Graves D. Cytokines that promote periodontal tissue destruction. *J Periodontol* 2008;79:1585-1591.
8. Madianos PN, Bobetsis YA, Kinane DF. Generation of inflammatory stimuli: how bacteria set up inflammatory responses in the gingiva. *J Clin Periodontol* 2005;32:57-71.
9. Silva TA, Garlet GP, Fukada SY, Silva JS, Cunha FQ. Chemokines in oral inflammatory diseases: apical periodontitis and periodontal disease. *Journal of Dental Research* 2007;86:306-319.
10. Bartold PM, Cantley MD, Haynes DR. Mechanisms and control of pathologic bone loss in periodontitis. *Periodontol 2000* 2010;53:55-69.
11. Page RC, Kornman KS. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontol 2000* 1997;14:9-11.
12. Eskan MA, Jotwani R, Abe T, Chmelar J, Lim JH, Liang S, et al. The leukocyte integrin antagonist Del-1 inhibits IL-17-mediated inflammatory bone loss. *Nat Immunol* 2012;13:465-473.

13. Mahanonda R, Pichyangkul S. Toll-like receptors and their role in periodontal health and disease. *Periodontol 2000* 2007;43:41-55.
14. Ohlrich EJ, Cullinan MP, Seymour GJ. The immunopathogenesis of periodontal disease. *Australian Dental Journal* 2009;54:S2-S10.
15. Graves DT, Cochran D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *J Periodontol* 2003;74:391-401.
16. Perozini C, Chibebe PCA, Leão MBP, Queiroz S, Celso, Pallos D. Gingival crevicular fluid biochemical markers in periodontal disease: a cross-sectional study. *Quintessence International* 2010;41:877-883.
17. Weber A, Wasiliew P, Kracht M. Interleukin-1 (IL-1) pathway. *Sci Signalling* 2010;3:cm1.
18. Ben-Sasson SZ, Li JH, Quiel J, Cauchetaux S, Ratner M, Shapira I, et al. IL-1 acts directly on CD4 T cells to enhance their antigen-driven expansion and differentiation. *Proc. Nat Acad Sci Unit* 2009;106:7119-7124.
19. Gilowski L, Wiench R, Płocica I, Krzemiński TF. Amount of interleukin-1 $\beta$  and interleukin-1 receptor antagonist in periodontitis and healthy patients. *Arch Oral Biol* 2014;59:729-734.
20. Zhao J, Tan L, Lin L, Wang H, Pan C, Pan Y. Local and peripheral cytokines profiling on *Porphyromonas gingivalis* induced rat periodontitis model. *Int J Clin Exp Med* 2016;9(3):5996-6004.
21. Polak D, Wilensky A, Shapira L, Halabi A, Goldstein D, Weiss EI, Houry-Haddad Y. Mouse model of experimental periodontitis induced by *Porphyromonas gingivalis*/ *Fusobacterium nucleatum* infection: bone loss and host response. *J Clin Periodontol* 2009; 36: 406-410. doi: 10.1111/j.1600-051X.2009.01393.x.
22. Deo V, Bhongade ML. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response. *Dentistry Today* 2010;29,60-62,64-6;quiz 68-69.
23. Kurtis B, Develioglu H, Taner IL, Balos K, Tekin IO. IL-6 levels in gingival crevicular fluid (GCF) from patients with non-insulin dependent diabetes mellitus (NIDDM), adult periodontitis and healthy subjects. *J Oral Sci* 1999;41:163-167.
24. Zhu J, Guo B, Fu M, Guo W, Yuan Y, Yuan H, et al. Interleukin-6-174G/C polymorphism contributes to periodontitis susceptibility: an updated meta-analysis of 21 case-control studies. *Dis. Markers* 2016;9612421.



25. Ebersole JL, Kirakodu S, Novak MJ, Stromberg AJ, Shen S, Orraca L, et al. Cytokine gene expression profiles during initiation, progression and resolution of periodontitis. *J Clin Periodontol* 2014;41:853-861.
26. Wu Q, Zhou X, Huang D, Yingchen J, Kang F. IL-6 enhances osteocyte-mediated osteoclastogenesis by promoting JAK2 and RANKL activity in vitro. *Cell Physiol Biochem* 2017;41:1360-1369.
27. Leira Y, Iglesias-Rey R, Gómez-Lado N, Aguiar P, Sobrino T, D'Aiuto F, Castillo J, Blanco J, Campos F. Periodontitis and vascular inflammatory biomarkers: an experimental in vivo study in rats. *Odontology* 2020;108:202-212.
28. Ninnemann JL. Prostaglandins in inflammation and disease. *Immunol Today* 1984;5:173-5.
29. Blotman F, Poubelle P, Chaintreuil J, Damon M, Flandre O, Crastes de Paulet A, et al. Mononuclear phagocytes, prostanoids and rheumatoid arthritis. *Int J Immunopharmacol* 1982;4:119-25.
30. Bingham CO. The pathogenesis of rheumatoid arthritis: pivotal cytokines involved in bone degradation and inflammation. *J Rheumatol* 2002;65:3-9.
31. Turini ME, DuBois RN. Cyclooxygenase-2: a therapeutic target. *Annu Rev Med* 2002;53:35-57.
32. Murakami M, Naraba H, Tanioka T, Semmyo N, Na-katani Y, Kojima F, et al. Regulation of prostaglandin E2 biosynthesis by inducible membrane-associated prostaglandin E2 synthase that acts in concert with cyclooxygenase-2. *J Biol Chem* 2000;275:32783-92.
33. Miyauchi M, Hiraoka M, Oka H, Sato S, Kudo Y, et al. Immuno-localization of COX-1 and COX-2 in the rat molar periodontal tissue after topical application of lipopolysaccharide. *Arch Oral Biol* 2004;49:739-46.
34. Wahl LM, Mergenhagen SE. Regulation of monocyte/macrophage collagenase. *J Oral Pathol* 1998;17:452-455.
35. Preshaw PM, Heasman PA. Prostaglandin E2 concentrations in gingival crevicular fluid: observations in untreated chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 2002;29:15-20.
36. Laugisch O, Schacht M, Guentsch A, Kantyka T, Sroka A, et al. Periodontal pathogens affect the level of protease inhibitors in gingival crevicular fluid.

Molecular Oral Microbiol 2012;27:45-56.

37. Li G, Yue Y, Tian Y, Li JL, Wang M, et al. Association of matrix metalloproteinase (MMP)-1, 3, 9, interleukin (IL)-2, 8 and cyclooxygenase (COX)-2 gene polymorphisms with chronic periodontitis in a Chinese population. *Cytokine* 2012;60:552-560.
38. Kuo PJ, Tu HP, Chin YT, Lu SH, Chiang CY, et al. Cyclosporine-A inhibits MMP- 2 and -9 activities in the presence of Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide: an experiment in human gingival fibroblast and U937 macrophage co-culture. *J Periodont Res* 2012;47:431-438.
39. Khan KM, Kothari P, Du B, Dannenberg AJ, Falcone DJ. Matrix metalloproteinase- dependent microsomal prostaglandin E synthase-1 expression in macrophages: role of TNF-alpha and the EP4 prostanoid receptor. *J Immunol* 2012;188:1970-1980.
40. Gosset M, Pigenet A, Salvat C, Berenbaum F, Jacques, C. Inhibition of matrix metalloproteinase-3 and -13 synthesis induced by IL-1beta in chondrocytes from mice lacking microsomal prostaglandin E synthase-1. *J Immunol* 2010;185: 6244-6252.