

2007년 8월
박사학위논문

염산테트라싸이클린이 사람
치주인대섬유모세포의 MMP-1,
MMP-8, MMP-13 및 TIMP-1의
발현에 끼치는 영향

조선대학교대학원

치의학과

김명준

염산테트라사이클린이 사람
치주인대섬유모세포의 MMP-1,
MMP-8, MMP-13 및 TIMP-1의
발현에 끼치는 영향

Effect of tetracycline-HCl on matrix metalloproteinase
(MMP-1, MMP-8, MMP-13) and tissue inhibitors of matrix
metalloproteinase (TIMP-1) expression by human
periodontal ligament fibroblasts in culture

2007년 월 일

조선대학교대학원

치의학과

김명준

염산테트라사이클린이 사람
치주인대섬유모세포의 MMP-1,
MMP-8, MMP-13 및 TIMP-1의
발현에 끼치는 영향

지도교수 김 병 옥

이 논문을 치의학 박사학위신청 논문으로 제출함.

2007년 월 일

조선대학교대학원

치 의 학 과

김 명 준

김명준의 박사학위논문을 인준함

위원장	전남대학교	교수	정현주	인
위원	조선대학교	교수	박주철	인
위원	조선대학교	교수	김수관	인
위원	조선대학교	교수	장현선	인
위원	조선대학교	교수	김병옥	인

2007년 월 일

조선대학교 대학원

목 차

영문초록

I. 서론	1
II. 연구재료 및 방법	2
III. 연구결과	4
IV. 총괄 및 고안	10
V. 결론	13
참고문헌	14

도 목 차

Fig. 1. Western blots of the MMP-1 in hPDLF.	4
Fig. 2. 2 Phase contrast micrographs of hPDLFs.	5
Fig. 3. Western blotting assay of the expression of MMP-1 protein in the hPDLFs.	6
Fig. 4. Western blotting assay of the expression of MMP-8 protein in the hPDLFs..	7
Fig. 5. Western blotting assay of the expression of MMP-13 protein in the hPDLFs..	8
Fig. 6. Western blotting assay of the expression of TIMP-1 protein in the hPDLFs..	9

ABSTRACT

Effect of tetracycline-HCl on matrix metalloproteinase (MMP-1, MMP-8, MMP-13) and tissue inhibitors of matrix metalloproteinase (TIMP-1) expression by human periodontal ligament fibroblasts in culture

Myung-Jun, Kim, D.D.S., M.S.D.

Advisor: Prof. Byung-Ock, Kim, D.D.S., Ph.D.

Department of Dentistry,

Graduate School of Chosun University

The purpose of this study was to evaluate the level of MMPs such as MMP-1, MMP-8, and MMP-13 and TIMP-1 expressed by human periodontal ligament fibroblasts (hPDLs) via western blotting method.

hPDLs were obtained from a healthy periodontium and cultured in Dulbecco's modified Eagles's medium plus 10% fetal bone serum. The concentration of tertacycline-HCl (TC-HCl) application in hPDLs was 250mg/5ml, 250mg/100ml, 250 mg/1,000ml, 25mg/3,000ml, 250mg/5,000ml, 250mg/7,000ml, 250mg/9,000ml, and 250 mg/10,000ml. TC-HCl was applied with hPDLs for 1-min. a day over 5 days, respectively. The gene expression on the proenzyme forms and/or enzyme forms of MMP-1-, MMP-8-, MMP-13-, and TIMP-1-mRNA in hPDLs was analysed at 6-day after TC-HCl application via western blotting method. Within the limited experiments, the present data showed that both the protein expression of MMPs (especially MMP-13) and TIMP-1 was increased after 250mg/5ml of TC-HCl application in hPDLs. In future, more research will be needed to evaluate the effect of increased MMPs and TIMP-1 on periodontal cells

I. 서론

치주조직의 결합조직을 구성하고 있는 세포외기질은 교원질, fibronectin, laminin, proteoglycan core protein 등의 단백질로 되어 있는데, 이 기질은 생리적 또는 병리적인 상황에서 효소와 이의 활성제 및 억제제, cytokine 그리고 성장인자 등이 세포와 세포, 그리고 세포와 기질 사이의 복잡한 상호작용에 관여하여 재구성되고 있다. 조직 재구성에 관련된 효소로는 matrix metalloproteinases (MMP)와 tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) 등이 있는데, 활성화된 MMP와 TIMP 사이의 균형에 의해 세포외기질의 개조범위가 조절된다^{1,2)}.

MMP는 matrixin family에 속하며 주로 비활성형 효소로 분비되는 metal-binding proteinase로, MMP의 구조적 및 기능적 특성에 따라 interstitial collagenases (MMPs -1, -8, -13), gelatinases (MMPs -2, -9, type IV collagenase), stromelysin (MMPs -3, -10, -11, -19), membrane-type collagenases (MMPs -14, -15, -16, -17, -24, -25), 그리고 matrilysins (MMP-7) 등 적어도 5개의 아종으로 분류되며, 중성에 가까운 pH에서 세포외기질을 파괴시킬 수 있다³⁾. 이러한 MMP의 단백분해 활성은 내인성의 특이 억제제인 TIMP와 순환중인 억제제인 α_2 -macroglobulin에 의해 조절되고 있다^{4,5)}.

치주질환의 진행에 있어서 van der Zee 등⁵⁾은 파열이론을 통해서 MMP가 악화기 동안에 염증세포 (단핵구, 대식구, 그리고 중성구 등)와 조직내 고유의 거주세포 (섬유아 세포, 상피세포, 그리고 내피세포 등)에 의해 발현되는 MMP에 의해 치은조직의 파괴 (주로 교원질)가 발생된다고 하였다.

치주영역에서 MMP와 TIMP 유전자 발현에 관련된 임상적 연구를 살펴보면, Alpagot 등⁷⁾은 치은열구액내에서 MMP-3과 TIMP-1 level을 치주염의 예측요소로서 평가하였으며, Pozo 등⁸⁾은 치주염에 이환된 환자의 치은열구액내에서 치석제거술과 치면활택술을 시행한 후에 MMP와 TIMP 유전자 발현 변화를, 그리고 Töter 등⁹⁾은 치주치료 후에 치은열구액내에서 MMP-3와 TIMP-1의 유전자 발현 변화를 보고하였는데, 일반적으로 염증이 존재하였을 때는 MMP 유전자 발현이 증가되었으며 치료가 끝난 뒤에는 TIMP 유전자 발현이 증가되었다. 배양된 세포를 이용한 연구를 살펴보면, Kut-Lasserre 등¹⁰⁾은 배양된 치은섬유모세포를 이용하여 아보카도와 콩의 추출물들이 MMP와 TIMP의 발현을 변화시킬 수 있다고 하였고, Nishikawa 등¹¹⁾은 hPDLs에서 TNF- α 가 MMP-1, MMP-3, MMP-13 mRNA 수준을 증가시킨다고 하였으며, 그리고 Chang 등¹²⁾은 PDLs에서 여러 cytokines와 치주병인균에 의해 MMP 유전자 발현이 조절될 수 있음을 보고하였다.

치주질환은 구강내에 존재하는 생체피막과 숙주의 상호작용의 결과로서 치주부착기구의 소실과 치조골 소실이 나타나는 것이 특징인데, 이러한 질환을 예방 또는 치료하기 위해서 치주조직에 대한 자극원으로서 치근면에 부착된 세균과 이의 부산물을 철저히 제거

제거 또는 감소시키는 것이 성공적인 치료의 필수적인 요인이라고 알려져 있다. 이에 대한 방법으로서 치근면활택술과 TC-HCl을 비롯한 여러 약제를 이용한 치근면 처치가 임상에서 흔하게 사용되고 있다. 경구투여된 다른 항생제와 TC-HCl을 치은열구액내에서 그 양을 비교하였을 때 TC-HCl이 치은열구액에서 비교적 높은 농도로 검출되며 여러 치주병인균을 포함하여 수많은 그람 양성 및 음성 세균에 대한 항균작용, 항염증작용, 골형성 작용, 치근면에 대한 섬유모세포의 부착증진 효과 그리고 항교원질분해 효과가 있다고 보고되었다^{13,14,15}.

이 연구의 목적은 hPDLs에 임상에서 사용되고 있는 염산 테트라싸이클린 (TC-HCl)을 투여한 후 조직의 재구성과 관련된 효소인 MMP-1 (collagenase-1), MMP-8 (collagenase-2, neutrophil type), 그리고 MMP-13 (collagenase-3, bone cell collagenase), 그리고 TIMP-1의 단백질 발현양상을 western blotting 방법에 의해 규명하는 것이다.

II. 연구재료 및 방법

1. 사람의 치주인대섬유모세포(*human periodontal ligament fibroblasts, hPDLFs*) 배양

00대학교 치과병원 치주과에 내원한 환자 중 교정치료를 위하여 발거된 제 1소구치의 치근중앙 1/3에서 얻은 조직들을 무균 작업대에서 항생제가 함유된 Hank's balanced salt solution (HBSS, Gibco BRL, Grand Island, NY)으로 수회 세척하고, 해부 현미경 하에서 1~2 mm³의 크기로 절단하고 절단된 조직편들을 60 mm 세포 배양접시에 위치시킨 후 조직의 이동을 방지하기 위하여 슬라이드 글라스를 조직위에 올려놓고 항온 세포 배양기에서 2주 동안 일차 배양하였다. 배지는 2일 간격으로 교체하고 세포가 증식함에 따라 증식한 세포를 10% DMEM (Gibco BRL, Grand Island, NY)을 이용하여 5% CO₂, 37°C, 100% 습도 조건에서 배양하여 각각 실험에 이용하였다.

2. 세포 생존율 측정

5회 계대 배양된 치주인대섬유모세포를 0.25% trypsin/EDTA로 떼어낸 후, 혈구계수기로 세포수를 세어 96well plate의 각 well 당 2x10⁴개의 세포가 들어가도록 분주하였다. 세포들이 부착할 수 있도록 5% CO₂, 37°C, 100% 습도의 배양기에 배양한 다음 부착되지 않은 세포를 제거하기 위하여 1일 후에 배지를 교환하였다. 실험계획에 따른 TC-HCL의 농도(250mg/1ml, 250mg/5ml, 250mg/10ml, 250mg/100ml, 250mg/250ml, 250mg/500ml, 250mg/1000ml, 250mg/1500ml, 250mg/2000ml, 250mg/3000ml, 250mg/4000ml, 250mg/5000ml, 250mg/6000ml, 250mg/7000ml, 250mg/8000ml, 250mg/9000ml, 250mg/10000ml)로 각각 1분씩 2일간 처리한 후 각 well당 20ul MTT labeling reagent (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany)을 첨가하여 5% CO₂, 37°C 배양기 내에서 3시간 배양한 후, 배지를 제거하고 solubilization solution 120ul를 첨가하여 formazan 결정을 용해시킨 후 ELISA 분석기(Bio-Tek instruments Inc. USA)로 595nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군으로는 10% FBS가 함유된 DMEM과 식염수를 이용하였다. 각각의 실험은 3회 반복하여 TC-HCL의 실험농도에 따른 생존율을 분석하였고 이에 따라 western blot을 시행할 농도를 결정하였다.

3. hPDLFs에 TC-HCL를 적용한 후 단백질 추출

60 mm 배양접시에서 계대 배양된 hPDLF를 2x10⁴cells/dish의 농도로 분주하여 80~90%로 밀생될 때까지 배양시킨 후 TC-HCL를 다음과 같이 적용하였다. TC-HCL 적용

군은 250mg/5ml, 250mg/100ml, 250mg/1000ml, 250mg/3000ml, 250mg/5000ml, 250mg/7000ml, 250mg/9000ml 그리고 250mg/10000ml의 농도로 1분씩 5일간 처리하였다. 적용한 후에는 PBS로 세척하고 10% FBS가 함유된 DMEM (Gibco BRL, Grand Island, NY)을 넣어 항온항습배양기에 배양하였고 24시간 간격으로 동일한 처리를 5일간 반복 시행하였다. 6일째 배양된 세포로부터 단백질을 lysis buffer (NP-40, leupeptin, aprotinin, AEBSF)를 이용하여 단백질을 추출하여 실험에 사용하였다.

4. Western blotting 방법에 의한 MMP-1, MMP-8, MMP-13 및 TIMP-1 분석

추출한 단백질을 정량하여 각 30 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 를 12% SDS-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동한 후 nitrocellulose membranes에 transfer하였다. 그리고, nitrocellulose membranes을 5% blocking reagent(non-fat milk)로 1시간 정도 처리하고 0.05% Tween 20/PBS (PBS-T)로 세척한 다음, primary antibody (CEDARLANE, CANADA)를 1:1000 농도로 nitrocellulose membranes에 2시간 동안 결합시킨 후에 PBS-T로 3회 10분씩 세척하였다. 그 후 secondary antibody (SIGMA, USA)를 1:2000 농도로 1시간 동안 결합시켜 PBS-T로 세척하였다. 세척한 transfer membrane은 ECL reagent (Amersham Pharmacia)를 이용하여 단백질 band를 확인하였다. 얻어진 band는 densitometry를 이용하여 정량화하였다.

III. 연구결과

이 연구에 사용된 다양한 TC-HCl의 농도에서 hPDLFs에 대한 세포증식효과를 평가한 결과 대조군에 비하여 TC-HCl을 2일 처리한 결과 250mg/3000ml에서 대조군에 비해 세포성장률이 약간 증가하였을 뿐 전 농도에서 세포증식을 억제하는 결과를 보였다 (Fig. 1).

배양된 hPDLFs에 TC-HCl을 각 농도별로 적용한 후 MMP-1, MMP-8, MMP-13, 그리고 TIMP-1 발현을 평가하였는데, MMPs 단백질 발현은 250mg/5ml TC-HCl 적용군에서 대조군에 비해 높은 발현양상을 보였는데, 특히 비활성형의 MMP-13 (63kD)의 경우는 약 37배 정도 발현이 증가됨을 나타냈다. 적용된 다른 TC-HCl 농도에서는 약간의 증감을 보였을 뿐 변화를 나타내지 않았다. 또한, TIMP-1 단백질 발현은 역시 250mg/5ml의 농도에서 5배정도 증가되어 발현되었다(Fig. 2, 3, 4, 5).

1. 농도별 TC-HCl 처리군에서의 hPDLFs에 대한 세포증식 효과 (생존율)

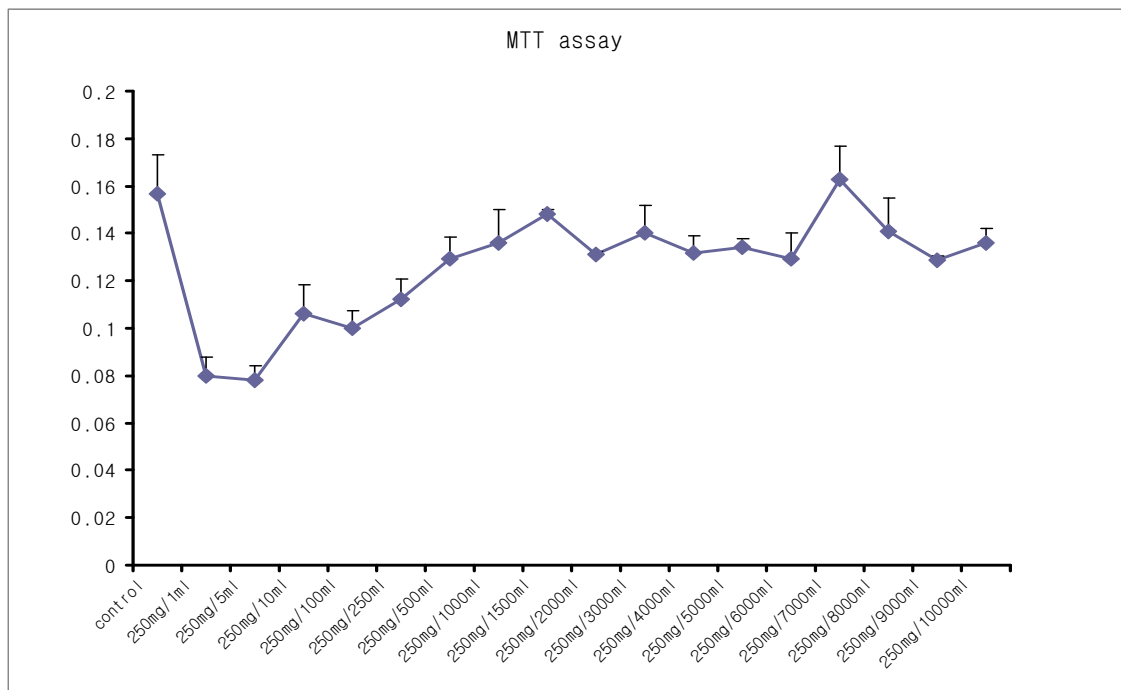


Fig. 1 MTT assay of human periodontal ligament fibroblasts treated with various concentration TC-HCL.

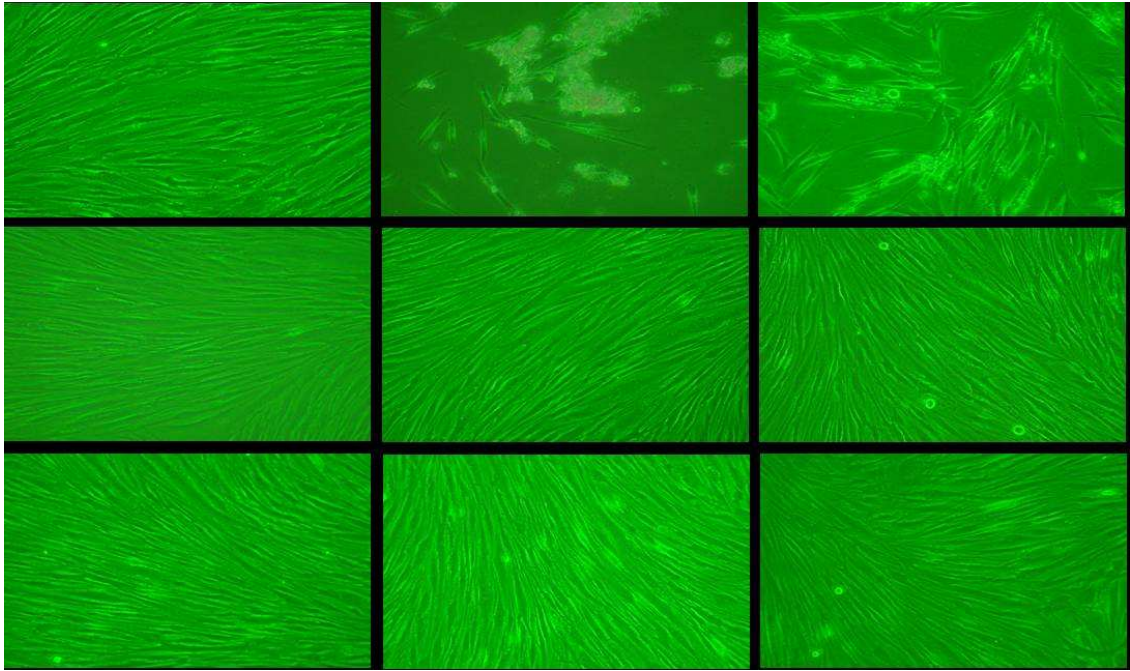


Fig. 2 Phase contrast micrographs of hPDLFs. Con:Negative control, 1: TC-HCl 250 mg /5ml treated group, 2: TC-HCl 250mg/100ml treated group, 3: TC-HCl 250mg/1000ml treated group, 4: TC-HCl 250mg/3000ml, treated group, 5:TC-HCl 250mg/5000ml treated group, 6:TC-HCl 250mg/7000ml treated group, 7:TC-HCl 250mg/9000ml treated group 8:TC-HCl 250mg/10000m treated group.

2. MMP-1

음성대조군에 비해 MMP-1의 비활성형 (53kD)과 활성형 (47kD) 모두 250 mg/5ml TC-HCl을 처리한 실험군의 경우 높게 발현되었고 나머지 처리군에서는 음성대조군과 비교하여 비슷한 발현양상을 보였다.

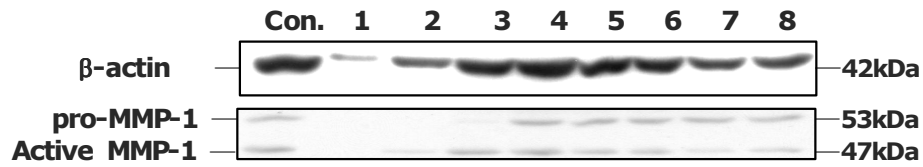
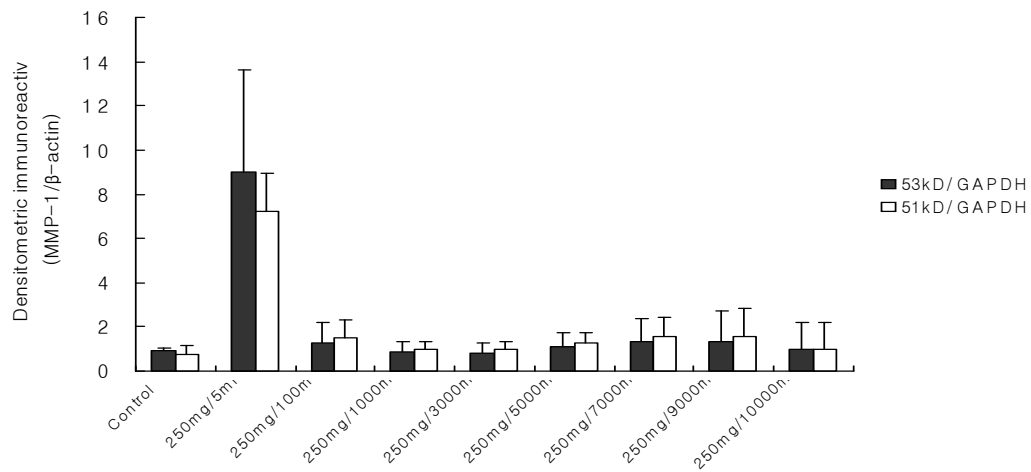
A**B**

Fig. 3 Western blotting assay of the expression of MMP-1 protein in the hPDLFs. (A) Representative expression of MMP-1 protein, as determined by Western blot analysis. (B) Quantitative analysis of the expression of the protein for MMP-1, analyzed by scanning densitometry. Values are means MMP-1/ β -actin. Con: Negative control, 1: TC-HCl 250 mg/5ml treated group, 2: TC-HCl 250mg/100ml treated group, 3: TC-HCl 250mg/1000ml treated group, 4: TC-HCl 250mg/3000ml, treated group, 5: TC-HCl 250mg/5000ml treated group, 6: TC-HCl 250mg/7000ml treated group, 7: TC-HCl 250mg/9000ml treated group 8: TC-HCl 250mg/10000ml treated group.

2. MMP-8

MMP-8의 비활성형 (85KD)은 250mg/5ml TC-HCl을 처리한 실험군의 경우 음성대조군과 다른 농도의 TC-HCl 처리군에 비해 약 2배정도 높은 발현양상을 보였고, 활성형 (64, 58, 22KD)은 음성대조군에 비해 TC-HCl을 처리한 모든 실험군에서는 높게 발현 발현되었다.

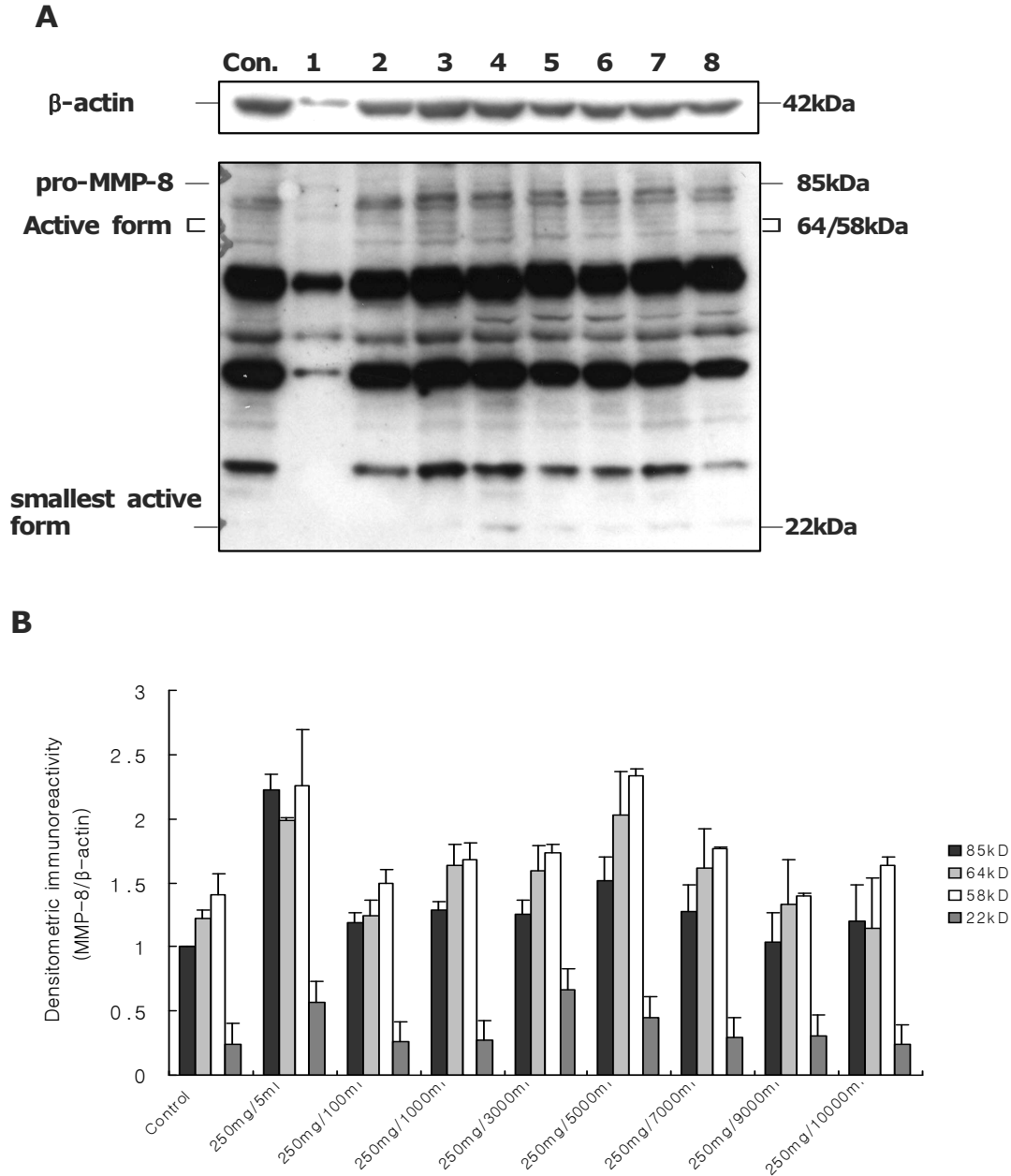


Fig. 4. Western blotting assay of the expression of MMP-8 protein in the hPDLFs. (A) Representative expression of MMP-8 protein, as determined by Western blot analysis. (B) Quantitative analysis of the expression of the protein for MMP-8, analyzed by scanning densitometry. Values are means MMP-8/β-actin. Con:Negative control, 1:

TC-HCl 250 mg/5ml treated group, 2: TC-HCl 250mg/100ml treated group, 3: TC-HCl 250mg/1000ml treated group, 4: TC-HCl 250mg/3000ml, treated group, 5:TC-HCl 250mg/5000ml treated group, 6:TC-HCl 250mg/7000ml treated group, 7:TC-HCl 250mg/9000ml treated group 8:TC-HCl 250mg/10000m treated group.

3. MMP-13

MMP-13은 250 mg/5ml 농도로 TC-HCl을 처리한 실험군에서 음성대조군에 비해 약 37배 정도 높게 발현되었고 250mg/100ml 농도의 TC-HCl을 처리한 실험군에서도 음성대조군에 비해 약 10배정도의 높게 발현되었으며, 다른 농도의 TC-HCl 처리군에서는 음성대조군과 그 발현양상이 유사하였다.

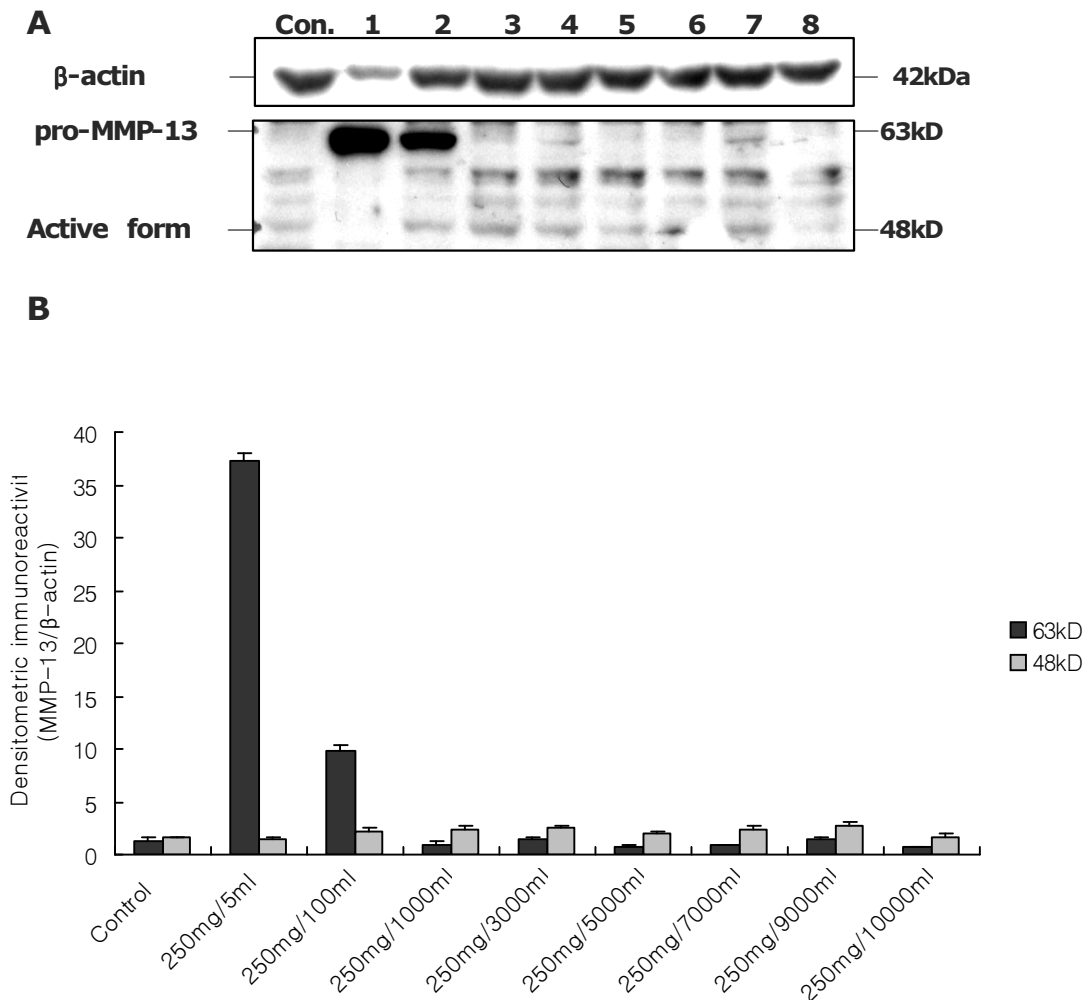


Fig. 5. Western blotting assay of the expression of MMP-13 protein in the hPDLFs. (A) Representative expression of MMP-13 protein, as determined by Western blot analysis.

(B) Quantitative analysis of the expression of the protein for MMP-13, analyzed by scanning densitometry. Values are means MMP-13/ β -actin. Con:Negative control, 1: TC-HCl 250 mg/5ml treated group, 2: TC-HCl 250mg/100ml treated group, 3: TC-HCl 250mg/1000ml treated group, 4: TC-HCl 250mg/3000ml, treated group, 5:TC-HCl 250mg/5000ml treated group, 6:TC-HCl 250mg/7000ml treated group, 7:TC-HCl 250mg/9000ml treated group 8:TC-HCl 250mg/10000m treated group.

4. TIMP-1

TIMP-1은 음성대조군에 비해 250 mg/5ml 농도로 TC-HCl을 처리한 실험군에서 5배 정도 높게 발현되었고 다른 농도 처리군에서는 음성대조군에 비해 농도 의존적으로 감소하는 경향을 보였다.

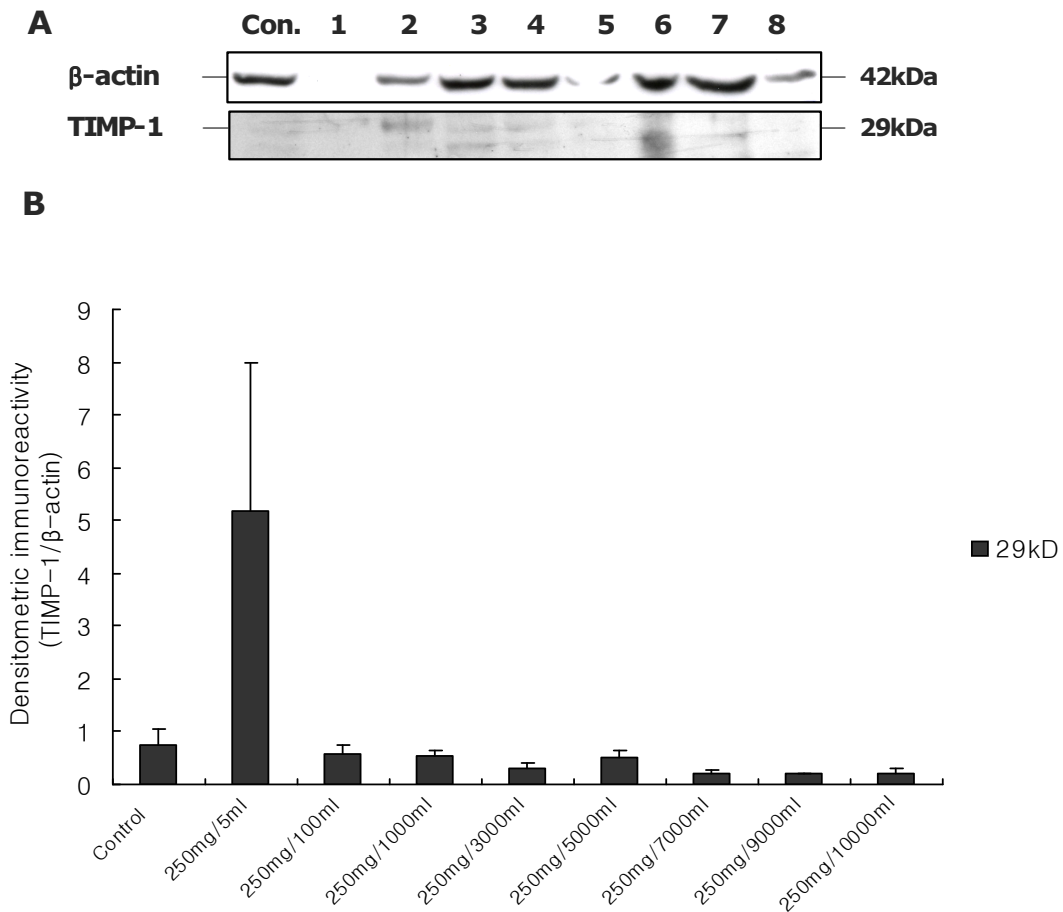


Fig. 6. Western blotting assay of the expression of TIMP-1 protein in the hPDLFs. (A) Representative expression of TIMP-1 protein, as determined by Western blot analysis. (B) Quantitative analysis of the expression of the protein for TIMP-1, analyzed by scanning densitometry. Values are means TIMP-1/ β -actin. Con:Negative control, 1:

TC-HCl 250 mg/5ml treated group, 2: TC-HCl 250mg/100ml treated group, 3: TC-HCl 250mg/1000ml treated group, 4: TC-HCl 250mg/3000ml, treated group, 5:TC-HCl 250mg/5000ml treated group, 6:TC-HCl 250mg/7000ml treated group, 7:TC-HCl 250mg/9000ml treated group 8:TC-HCl 250mg/10000m treated group.

IV. 총괄 및 고찰

세포외기질은 결합조직의 생리적인 성질에 관여하는 복잡하며 통합된 체계로 되어 있는데, 치아맹출과 같은 생리적인 과정과 치주염이 진행되는 동안 세포외기질의 병리적인 파괴는 Domeij 등¹⁶⁾과 Segquier 등¹⁷⁾이 보고한 것처럼 활성화된 MMP 유전자와 이를 억제하는 TIMP 유전자의 생성과 파괴의 불균형에 의해 야기될 수 있다.

일반적으로, 질환이 있는 치은열구액에서나 치은조직에서 MMP 유전자 발현이 증가되면서 TIMP 유전자 발현은 감소되어 나타나는데^{18,19)}, 치주질환에 따른 MMP 유전자 발현이 다르다고 보고되었다. 즉 성인형 치주염에서는 중성구에서 유래된 MMP-8 유전자가 주로 관련되어 MMP-8이 높게 나타난 반면^{20,21,22)}, 국소유년형치주염에서는 섬유아세포, 대식세포, 상피세포에서 유래된 MMP-1 유전자가 주로 관련되어 MMP-1이 높게 나타난다고 보고되고 있다^{19,23)}. 최근, Ejeil 등²⁴⁾도 건강한 치은조직과 질환에 이환된 치은조직에서 MMP와 TIMP 유전자 발현에 대해 연구하였는데 MMP-1, MMP-2, MMP-9, 그리고 MMP-13이 치은세포외기질 변성에 관련되어 있다고 보고하면서 이런 효소들과 교원질 소실사이에 상관관계가 있음을 보고하였다. 또한, Borsani 등²⁵⁾은 임상적으로 건강한 치주조직과 정상적인 임플란트 주위 점막 그리고 임상적으로 명백한 임플란트주위염을 가진 사람에게서 MMP-1,-3,-8,-13 그리고 TIMP-1의 분포를 면역조직화학적으로 연구하였다. 이 연구에서 4가지 효소 모두 기질내에서 희미하게 국소화되어 염색되었는데, 건강한 임플란트 주위조직에서는 MMP-13이 결합조직내에서 그리고 임플란트 주위염에서는 상피조직에서 발현되었다고 보고하면서, 대체로 임플란트주위염을 가진 조직의 세포외기질에서 collagen V, tenascin, 그리고 MMP-13의 패턴에 변화가 있다고 제시하였다.

TC-HCl 계통의 약물들은 MMP 활성을 억제하는 것으로 알려져 있는데, Ashley²⁶⁾와 Golub 등²⁷⁾은 치주질환 환자들에게 저용량의 doxycycline을 복용하게 하였을 때 MMP-8과 MMP-13 활성이 억제되었음을 보고한 바 있는데, 이 연구에서는 배양된 hPDLs에 치주질환 치료시에 사용되는 TC-HCl를 여러 농도로 투여한 후 MMP-1, MMP-8, MMP-13, 및 TIMP-1 단백질 발현을 평가하였다.

세포의 생존율을 검사한 결과, 임상에서 사용되고 있는 250mg/5ml TC-HCl 농도에서는

다른 농도의 TC-HCl에 비해 생존율이 현저하게 감소되는 양상이 나타난 바 좀 더 세심한 연구가 필요하리라 생각되었다.

MMP-1에 관련된 연구를 살펴보면, 성인형 치주염을 가진 환자의 치은조직내에서 MMP-1은 상피조직의 어떤 부위에서도 관찰되지 않았다²⁸⁾. MMP-1 단백질 발현에 있어서, 음성대조군과 비교하였을 때 250mg/5ml TC-HCl 농도에서만 약 8-10배 정도 높게 발현되었으며 그 이하의 농도에서는 음성대조군과 비슷한 수준의 발현을 나타냈다.

MMP-8에 관련된 연구를 살펴보면, Romanelli 등²⁹⁾은 임상적으로 정상인 사람, 그리고 치은염 또는 치주염을 가진 환자의 치은열구액내에서 MMP-8 수준을 분석하였는데, 임상적으로 정상인 사람에서는 활성이 나타나지 않았으며 치은염을 가진 환자의 MMP 수준에 비해서 치주염을 가진 환자의 MMP 활성은 6배나 높은 활성을 나타냈다고 보고하였다. 또한, Kiili 등³⁰⁾은 성인형 치주염을 가진 환자의 치은열구액과 치은조직내에서 MMP-8과 MMP-13 수준을 관찰하였는데, MMP-8 PMN-type의 효소와 비활성형의 MMP-13은 치은 및 출혈지수와 상관관계가 있다고 하였다. 또한, MMP-8은 염증성 치은 결합조직내의 혈장세포, 그리고 중성구, 열구상피내에서 나타났으며, MMP-13은 대식구 유사세포내에서 그리고 열구상피내에서 면역학적 반응성이 나타났는데, MMP-8과 MMP-13은 치료되지 않은 치주염의 치은열구액에서 증가되었으며 활성형이 교원질과 괴활성에 관여한다고 하였다.

MMP-8 단백질 발현에 있어서, 음성대조군과 비교하였을 때, 연구된 다른 MMP에 비해서 그 증가 폭이 크지 않았는데, 이것은 MMP-8이 주로 중성구에서 유래되기 때문에 배양된 hPDLs에서는 변화가 크지 않았다고 생각된다.

MMP-13에 관한 연구를 살펴보면, Ilgenli 등³¹⁾은 만성치주염에 이환된 환자의 치은열구액내의 MMP-13 수준이 높은 것이 만성치주염의 병인발생에 있어서 중요한 역할을 할 것이라고 하였다. Uitto 등²⁸⁾은 MMP-13은 성인형 치주염을 가진 환자의 치은조직내에서 기저세포내에서 뚜렷하게 관찰되었으며 이주하고 있는 세포들에서 나타나는 laminin-5가 강하게 발현되었으며, 종종 치은낭에 접하고 있는 기저세포 상부층에서도 관찰되었으며 염증성의 상피하결합조직의 섬유모세포유사세포에서 발현되었다고 하였다.

MMP-13 단백질 발현에 있어서, 음성대조군과 비교하였을 때, 250mg/5ml TC-HCl 농도에서 활성형 (63kD) MMP-13이 약 37배 정도 높게 발현되었으며 그 이하의 농도에서는 음성대조군과 비슷하게 발현되었다. MMP-13은 골세포와 관련된 교원질분해효소이므로 골세포로 분화될 수 있는 hPDLs가 이 농도에서 자극을 받은 것으로 생각된다. 그러나, MMP는 주로 비활성형 효소로 분비되며 세포외에서 또는 serine proteinases나 다른 MMPs에 의해 세포막에 인접하여 활성화 된다고 보고³²⁾되었는데, 비활성형의 MMP-13은 연구된 모든 농도에서 비슷한 양상을 나타내고 활성형만 증가된 것에 대한 이유를 설명할 수 있는 연구가 좀 더 진행되어야 할 것으로 생각된다. 또한, Golub 등

133)은 MMP-13은 골흡수를 포함한 병리적인 콜라겐 파괴와 연관되어 있는데, 항균 효과가 없는 낮은 농도의 MMP억제제를 투여하였을 때 MMP-8보다 MMP-13이 훨씬 더 실질적으로 감소된다고 하였는데 이 연구에서는 특정 농도에서 단백질 발현이 증가되어 나타난 바 이에 대한 원인을 규명해야 될 것이다.

TIMP-1 단백질 발현에 있어서, 음성대조군과 비교하였을 때, 250mg/5ml TC-HCl 농도에서 약 5배 증가되었으며, 그 이하의 농도에서는 음성대조군과 유사한 수준을 나타냈다.

이전에 발표된 연구결과들은 주로 치은열구액이나 치은조직을 이용하여 MMP와 TIMP의 활성 변화를 연구하였으나 이 연구에서는 배양된 세포를 이용하였기 때문에 비교할 수 없지만, 이 연구에서 배양된 hPDLs에 TC-HCl을 적용하여 세포외기질의 단백질 발현 양상을 보았을 때 특정농도에서 MMPs (특히 MMP-13)와 TIMP-1 단백질이 모두 증가된 양상을 관찰 할 수 있었다.

이 제한된 연구결과, 특정 농도에서 MMP-1, MMP-8, MMP-13, 그리고 TIMP-1 단백질 발현이 증가되어 나타났는데, 향후에는 염증조건하에서 배양된 hPDLFs의 TC-HCl에 의한 MMP와 TIMP 단백질 발현기전에 관한 연구, 그리고 TC-HCl에 의해 증가된 MMP가 치주조직을 구성하는 세포에 끼치는 영향에 관한 연구가 필요하리라 생각된다.

V. 결론

이 연구는 치주질환에 이환된 치근면에 대한 처치방법으로서 임상에서 사용되고 있는 TC-HCl을 hPDLs에서 적용시킨 후 MMP-1, MMP-8, MMP-13, 및 TIMP-1 단백질 발현에 끼치는 효과를 평가하고자 시행되었다.

hPDLs는 00대학교 치과병원 치주과에 내원한 환자 중 교정치료를 위하여 발거된 제 1 소구치를 이용하였다. 발거된 치아의 치근중앙 $\frac{1}{3}$ 에서 얻은 조직들을 1~2 mm의 크기로 절단하고 10% DMEM (Gibco BRL, Grand Island, NY)을 이용하여 5% CO₂, 37°C, 100% 습도 조건에서 배양하였다. 배지는 2일 간격으로 교체하고 세포가 증식함에 따라 계대 배양한 세포를 각각 실험에 이용하였다. 60 mm 배양접시에서 계대 배양된 hPDLs를 2×10^4 cells/dish의 농도로 분주하여 80~90%로 밀생될 때까지 배양시킨 후 음성대조군은 TC-HCl을 적용하지 않은 군으로 하였고, 실험군으로서 TC-HCl 적용군은 250mg/5ml, 250mg/100ml, 250mg/1,000ml, 25mg/3,000ml, 250mg/5,000ml, 250mg/7,000ml, 250mg/9,000ml 그리고 250mg/10,000ml의 농도로 1분씩 5일간 처리하였다. 적용한 후에는 PBS로 세척하고 10% FBS가 함유된 DMEM을 넣어 배양하였고 24시간 간격으로 5일간 반복 시행하였다. 6일째 배양된 세포로부터 단백질 lysis buffer를 이용하여 단백질을 추출하였다. 추출한 단백질을 정량하여 Western blotting 방법에 의한 MMP-1, MMP-8, MMP-13, 및 TIMP-1 단백질 발현을 분석하였다.

Western blotting을 통한 실험 결과, 배양된 hPDLs에 여러 농도의 TC-HCl을 적용하여 세포외기질의 단백질 발현 양상을 보았을 때 250mg/5ml 농도에서 MMPs (특히 MMP-13)와 TIMP-1 단백질이 모두 증가된 양상을 관찰 할 수 있었다. 향후에는 염증 조건하에서 배양된 hPDLs의 TC-HCl에 의한 MMP와 TIMP 단백질 발현기전에 관한 연구, 그리고 TC-HCl에 의해 증가된 MMP가 치주조직을 구성하는 세포에 끼치는 영향에 관한 연구가 필요하리라 생각된다.

참고문헌

1. Emingil G, Tervahartiala T, Mäntylä P. et al. Gingival crevicular fluid matrix metalloproteinase (MMP)-7, extracellular MMP inducer, and tissue inhibitor of MMP-1 levels in periodontal disease. *J Periodontol* 2006;77:2040-2050.
2. Wahl LM, Corcoran ML. Regulation of monocyte/macrophage metallo- proteinase production by cytokines. *J Periodontol* 1993;64:467-473.
3. Lapp CA, Lohse JE, Lewis JB. et al. The effects of progesteron on matrix metalloproteinases in cultured human gingvial fibroblasts. *J Periodontol* 2003;74:277-288.
4. Nagase H, Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999;274: 21491-21494.
5. Uitto VJ, Overall CM, McCulloch C. Proteolytic host cell enzymes in gingival crevicular fluid. *Periodontol 2000* 2003;31:77-104.
6. van der Zee E, Everts V, Beertsen W. Cytokines modulate routes of collagen breakdown. Review with special emphasis on mechanisms of collagen degradation in the periodontium and the burst hypothesis of periodontal disease progression. *J Clin Periodontol* 1997;24:297-305.
7. Alpagot T, Bell C, Lundergan W. et al. Longitudinal evaluation of GCF MMP-3 and TIMP-1 levels as prognostic factor for progression of periodontitis. *J Clin Periodontol* 2001;28:353-359.
8. Pozo P, Valenzuela MA, Melej C. et al. Longitudinal analysis of metallopro- teinases, tissue inhibitors of metalloproteinases and clinical parameters in gingival crevicular fluid from periodontitis-affected patients. *J Periodont Res* 2005;40:199-207.
9. Töter G, Kurtis T, Serdar M. et al. Effects of phase I periodontal treatment on gingival crevicular fluid levels of matrix metalloproteinase-3 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1. *J Clin Periodontol* 2005;32:1011-1015.
10. Kut-Lasserre C, Miller CC, Ejeil AL. et al. Effect of Avocado and Soybean unsaponifiables on gelatinase A (MMP-2), Stromelysin 1 (MMP-3), and tissue inhibitors of matrix metalloproteinase (TIMP-1 and TIMP-2) secretion by human fibroblasts in culture. *J Periodontol* 2001;72:1685-1694.
11. Nishikawa M, Yamaguchi Y, Yoshitake K, et al. Effects of TNFalpha and prostaglandin E2 on the expression of MMPs in human periodontal ligament fibroblasts. *J Periodontal Res* 2002;37(3):167-176.

12. Chang YC, Yang SF, Lai CC. et al. Regulation of matrix metalloproteinase production by cytokines, pharmacological agents and periodontal pathogens in human periodontal ligament fibroblast cultures. *J Periodont Res* 2002;37:196-203.
13. Komman KS, and Karl EH. The effect of long-term low dose tetracycline therapy adult periodontitis. *J Periodontol* 1982;53:604-610.
14. Slot J, Mashimo P, Levin RJ. et al. Periodontal therapy in humans. I. Microbiological and clinical effects of a single course of periodontal scaling and root planing and of adjunctive tetracycline therapy. *J Periodontol* 1979;50: 495- 509.
15. Seymour RA, and Heacman PA. Tetracyclines in the management of periodontal diseases. *J Clin Periodontol* 1995;22:22-35.
16. Domeij H, Modeer T, Yucel-Lindberg T. Matrix metalloproteinase-1 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 production in human gingival fibroblasts: the role of protein kinase C. *J Periodont Res* 2004;39:308-314.
17. Segquier S, Gogly B, Bodineau A. et al. Is collagen breakdown during periodontitis linked to inflammatory cells and expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human gingival tissue?. *J Periodontol* 2001;72: 1398-1406.
18. Golub LM, Sorsa T, Lee HM. et al. Doxycycline inhibits neutrophil (PMN)-type matrix metalloproteinases in human adult periodontitis gingiva. *J Clin Periodontol* 1995;22:100-109.
19. Sorsa T, Uitto VJ, Suomalainen K. et al. Comparison of interstitial collagenases from human gingiva, sulcular fluid secreted by and polymorphonuclear leukocyte. *J Periodont Res* 1988;23:386-393.
20. Lee W, Aitken S, Sodek J. et al. Evidence of a direct relationship between neutrophil collagenase activity and periodontal tissue destruction in vivo: role of active enzyme in human periodontitis. *J Periodont Res* 1995;30:23-33.
21. Mekle MC, Heath JK, Retnold JJ. Advances in understanding cell interactions in tissue resorption to the pathogenesis of periodontal disease and a new hypothesis." *J Oral Pathol* 15:239-250, 1986.
22. Salo T, Kylmaniemi M, Helaakoski T. et al. MMP-8/Neutrophil collagenase mRNA may also be expressed in other cells than PMNs. *J Dent Res* 1995;4(special issue): 530(abstr. 1036).
23. Makela M, Salo T, Uitto VJ. et al. Matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) of the oral cavity: cellular origin and relationship to periodontal status. *J*

Dent Res 1994;73:1397-1406.

24. Ejeil AL, Tchen SI, Ghomrasseni S. et al. Expression of matrix (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) in healthy and diseased human gingiva. *J Periodontol* 2003;74:188-195.

25. Borsani E, Salgarello S, Mensi M. et al. Histochemical and immunohistochemical evaluation of gingival collagen and metalloproteinases in periimplantitis. *Acta Histochem* 2005;107(3):231-240.

26. Ashley RA. Clinical trials of a matrix metalloproteinase inhibitor in human periodontal disease. SDD Clinical Research Team. *Ann N Y Acad Sci*. 1999;30(878):335-346.

27. Golub LM, Lee HM, Greenwald RA. et al. A matrix metalloproteinase inhibitor reduces bone-type collagen degradation fragments and specific collagenases in gingival crevicular fluid during adult periodontitis. *Inflamm Res* 1997;46(8):310-319.

28. Uitto VJ, Airola K, Vaalamo M. et al. Collagenase-3 (matrix metalloproteinase-13) expression is induced in oral mucosal epithelium during chronic inflammation. *Am J Pathol* 1998;152(6):1489-1499.

29. Romanelli R, Mancini S, Laschinger C. et al. Activation of neutrophil collagenase in periodontitis. *Infect Immun* 1999;67(5):2319-2326.

30. Kiili M, Cox SW, Chen HY, et al. Collagenase-2 (MMP-8) and collagenase-3 (MMP-13) in adult periodontitis: molecular forms and levels in gingival crevicular fluid and immunolocalisation in gingival tissue. *J Clin Periodontol* 2004;31(2):149.

31. Ilgenli T, Vardar-Sengul S, Gürkan A, et al. Gingival crevicular fluid matrix metalloproteinase-13 levels and molecular forms in various types of periodontal diseases. *Oral Dis* 2006;12(6):573-579.

32. Nagase H. Activation mechanism of matrix metalloproteinases. *Biol Chem* 1999;378:151-160.

저작물 이용 허락서

학 과	치의학과	학 번	20047440	과 정	박 사
성 명	한글 : 김 명 준 한문 : 金明駿 영문 : Kim Myung - Jun				
주 소	500-100 제주도 제주시 이도 1동 1685-3 양암타워빌 201호				
연락처	011-698-9889, 064-759-9889				
논문제목	한글 : 염산테트라싸이클린이 사람 치주인대섬유모세포의 MMP-1, MMP-8, MMP-13 및 TIMP-1의 발현에 끼치는 영향 영문 : Effect of tetracycline-HCl on matrix metalloproteinase (MMP-1, MMP-8, MMP-13) tissue inhibitors of matrix metalloproteinase (TIMP-1) expression by human periodontal ligament fibroblasts in culture				

본인이 저작한 위의 저작물에 대하여 다음과 같은 조건아래 조선대학교가 저작물을 이용할 수 있도록 허락하고 동의합니다.

- 다 음 -

1. 저작물의 DB구축 및 인터넷을 포함한 정보통신망에의 공개를 위한 저작물의 복제, 기억장치에의 저장, 전송 등을 허락함.
2. 위의 목적을 위하여 필요한 범위 내에서의 편집·형식상의 변경을 허락함. 다만, 저작물의 내용 변경은 금지함.
3. 배포·전송된 저작물의 영리적 목적을 위한 복제, 저장, 전송 등은 금지함.
4. 저작물에 대한 이용기간은 5년으로 하고, 기간종료 3개월 이내에 별도의 의사표시가 없을 경우에는 저작물의 이용기간을 계속 연장함.
5. 해당 저작물의 저작권을 타인에게 양도하거나 또는 출판을 허락을 하였을 경우에는 1개월 이내에 대학에 이를 통보함.
6. 조선대학교는 저작물의 이용허락 이후 해당 저작물로 인하여 발생하는 타인에 의한 권리 침해에 대하여 일체의 법적 책임을 지지 않음.
7. 소속대학의 협정기관에 저작물의 제공 및 인터넷 등 정보통신망을 이용한 저작물의 전송·출력을 허락함.

2007년 8월 일

저작자 : 김 명 준 (서명 또는 인)

조선대학교 총장 귀하