H_2O_2와 ascorbic acid가 사람 치주인대섬유모세포의 TIMP-2, Type 1 collagen, PDLs22 발현에 끼치는 효과

최용선[1], 김소영[2], 최성미[1,2], 장현선[1,2], 김병옥[1,2*]

1. 조선대학교 치과대학 치주과학교실
2. 2단계 BK21

I. 서론

치주질환은 세균과 숙주의 면역반응사이의 복잡한 상호작용의 결과[17]로 조직손상이 야기되는 염증성 질환[6,26,28]으로, 세균과 숙주에 의해 조절되는 조직 손상 경로에 반응성 산소종(reactive oxygen species, ROS)도 관여할 것이라고 보고되고 있다[4]. 즉, 염증세포들이 조직 내로 침투한 수 많은 세균이나 항원들과 접촉할 경우 이 염증세포들은 활성화되어 산소소비의 증가, hexose monophosphate shunt의 활성, ROS의 생성을 특징으로 하는 호흡파열을 야기하게 된다. 이러한 ROS의 생성은 세포질 내에 존재하는 reduced nicotinamide adenin dinucleotide phosphate 산화효소와 관련이 있으며, 염증세포 이외에 호기성 세포에서는 사립체 호흡사슬에서 생성될 수 있다[3,6,15].

염증세포는 ROS를 생성하여 bactericidal activity와 virocidal activity를 나타낼 수 있는데, 염증과정에 의하여 야기된 조직 손상에도 중요한 역할을 할 수 있으며, 생성된 ROS는 rheumatoid arthritis, acute respiratory distress syndrome, AIDS 그리고 치주질환 등 100여 가지 이상의 질환과 관련되어 있다고 보고되고 있으며, hydroxyl($\dot{O}H$) radicals, superoxide anion($O_2^{\cdot-}$), nitrous oxide($N\dot{O}$) radical, hydrogen peroxide(H_2O_2), hypochlorous acid (HOCl), singlet oxygen($^1O_2$) 등이 이에 속한다[6].

ROS에 의한 조직손상은 (1) DNA 손상, (2) lipid peroxidation, (3) hyaluronic acid와 proteoglycan을 포함하여 단백질 손상, (4) α-1-antitrypsin과 같은 protease inhibitors 의 불활성화, 그리고 (5) gene transcription factor들인 nuclear factor-kB ($NF-_kB$)와 activation protein-1(AP-1)과 같은 물질에 의한 pro-inflammatory cytokines의 유리 등에 의해 발생될 수 있다[2,8].

숙주세포와 세균들은 ROS에 의한 손상에 대한 방어기능으로 이를 제거하기 위한 정교한 항산화 방어체계를 갖추고 있다. 타액, 치은열구액 또는 혈장 내에 위치해 있는 주요한 세포외항산화제로 ascorbic acid(vitamin C), uric acid, α-tocopherol(vitamin E), carotenoids(vitamin A), bilirubin, reduced gluta-

* 교신저자: 김병옥, 광주광역시 동구 서석동 421번지 조선대학교 치과대학 치주과학교실, 501-759
(전자우편: bobkim@chosun.ac.kr)

thione, transferrin, lacatoferrin, Caeruoplasmin, haptoglobin, ascorbic acid(vitamin C) 등이 있다[2,6,8]. 특히, ascorbic acid는 혈장과 치은열구액, 그리고 synovial fluid 등에 존재하는데, ROS를 제거하는 능력, 막표면에서 생성되는 tocopherol radical로부터 α-tococpherol을 재생할 수 있는 능력, 혈장내 수준보다 치은열구액 내에 3배 정도 더 높다는 점[18], 치은열구액 내의 중성구에서 유래된 교원질분해효소의 활성을 방해한다는 점[30] 등이 보고되었다. 한편, Grossi 등[11]은 담배를 피우는 치주질환자의 혈청내 비타민 C 수준이 감소되어 있다고 보고하면서, 비외과적인 치주치료를 시행할 때 씹을 수 있는 비타민 C를 보충한다면 치주낭 감소와 부착수준의 획득 관점에서 치주치료의 결과를 향상시킬 수 있다고 보고하였는데, 이러한 여러 연구결과를 종합해 보면 ascorbic acid가 ROS에 대한 치주조직의 방어기전에 부분적으로 그 역할을 담당하고 있음을 알 수 있다.

H_2O_2와 ascorbic acid의 연구를 살펴보면, van der Pols[31]와 Shang 등[29]은 수정체에서 H_2O_2에 의한 산화적 스트레스에 대한 ascorbic acid의 보호효과를, Pedeira 등[24]은 식물세포성장률과 H_2O_2/ascorbic acid 비율 사이에 유의한 상관관계가 있음을 보고하는 등 주로 세포보호효과에 관련된 연구결과가 발표된 한편, ascorbic acid가 H_2O_2를 통해서 또 다른 ROS를 생성할 수 있는 pro-oxidative effect도 보고[27]되었다. 그러나 사람치주인대세포(human periodontal ligament fibroblasts, hPDLF)에서 ascorbic acid와 H_2O_2의 연구는 미비한 실정이다.

PDLs는 치아를 지지하며 백악질과 치조골 형성에 관여하고 다양한 세포로 분화할 수 있는 능력을 가지고 있어 치주조직의 재생/치유에 중요한 역할을 담당하고 있는데, 향후 ROS와 항산화제에 대한 연구를 통해 ROS에 의한 조직파괴를 감소시킬 수 있다면 치주조직 파괴를 억제하고 조직재생을 향상시킬 수 있을 것으로 생각된다.

이 연구의 목적은 H_2O_2와 항산화제인 ascorbic acid가 배양된 hPDLF에서 6종류의 세포외기질 단백질, 즉, periodontal ligament specific 22(PDLs22 또는 UNCL), collagen type 1, fibronectin, matrix metalloproteinase(MMP), tissue inhibitor of matrix metalloproteinase(TIMP)의 유전자 발현에 끼치는 영향에 대해 비교 연구하고자 한다.

II. 연구재료 및 방법

1. 사람의 치주인대 섬유아세포(hPDLF)의 배양

조선대학교 치과병원에 내원한 치주조직이 건강한 환자로 교정치료를 위하여 발거된 제 1소구치의 치근 중앙 1/3에서 얻은 조직들을 무균 작업대에서 항생제가 함유된 Hank's balanced salt solution (HBSS, Gibco BRL, Grand Island, NY)으로 수회 세척한 후, 해부 현미경하에서 1~2 ㎣의 크기로 절단하였다. 절단된 조직단편들을 60 ㎜ 세포 배양접시에 위치시킨 후 조직의 이동을 방지하기 위하여 슬라이드 글라스를 조직위에 올려놓고 10% FBS를 함유한 DMEM(Gibco BRL, Grand Island, NY)을 이용하여 5% CO_2, 37℃, 100% 습도 조건에서 배양하였다. 배지는 2일 간격으로 교체하고 세포가 증식함에 따라 계대배양하여 5세대의 세포를 각각 실험에 이용하였다.

2. 역전사 중합효소연쇄반응 (Reverse transcriptase polymerase chain reaction, RT-PCR)

60 ㎜ 배양접시에서 5세대 세포를 2×10^4/dish의 농도로 분주한 후 80~90%로 밀생될 때까지 배양하였다. Ascorbic acid 농도는 hPDLF에서 골결절을 관찰할 때 이용되는 농도(50 ㎍/㎖)를 선택하여 1분, 3분, 30분씩 각각 적용하였다.

H_2O_2 농도는 hPDLF에서 세포생활력검사(MTT assay)를 0.03%, 0.0003%, 0.00003%, 0.000003%, 0.0000003%에서 30초, 1분, 3분, 48시간 각각 적용

Table 1. Application method of H_2O_2 and ascorbic acid used in this study

Concentration	Application time (minutes)
ascorbic acid 50 μg/ml	1
ascorbic acid 50 μg/ml	3
ascorbic acid 50 μg/ml	30
0.03% H_2O_2	1
0.03% H_2O_2	3
0.03% H_2O_2	30
0.00003% H_2O_2	1
0.00003% H_2O_2	3
0.00003% H_2O_2	30
0.03% H_2O_2 + ascorbic acid 50 μg/ml	1
0.03% H_2O_2 + ascorbic acid 50 μg/ml	3
0.03% H_2O_2 + ascorbic acid 50 μg/ml	30
0.00003% H_2O_2 + ascorbic acid 50 μg/ml	1
0.00003% H_2O_2 + ascorbic acid 50 μg/ml	3
0.00003% H_2O_2 + ascorbic acid 50 μg/ml	30

Table 2. Primers for RT-PCR

Primers	Sequences 5'→3'	predicted size (base pairs)
GAPDH-S	5'-CTCTGACTTCAACAGCGACA-3'	330
GAPDH-AS	5'-TCTCTCTCTTCCTCTTGTGC-3'	
MMP-1-S	5'-GGTGATGAAGCAGCCCAG -3'	510
MMP-1-AS	5'-CAGTAGAATGGGAGAGTC -3'	
PDLs22-S	5'-CGGAATTCATGTTACCGAGTACTT-3'	500
PDLs22-AS	5'-CACTTTTTATTTCACTCTGAC-3'	
COLI-S	5'-TTGCTACTGGTGAGACTT-3'	470
COLI-AS	5'-CGCCACCAATGTCCAAAG-3'	
TIMP-1-1-S	5'-ACCCCCGCCATGGAGAGTGT-3'	551
TIMP-1-1-AS	5'-GAGGCAGGCAGGCAAGGTGA-3'	
TIMP-2-1-S	5'-GATCAGGGCCAAAGCGGTCAG-3'	590
TIMP-2-1-AS	5'-GGTGCCCGTTGATGTTCTTCTCTG-3'	
FN-S	5'-ACCACGTAGGAGAACAGT-3'	665
FN-AS	5'-ACAGTATTGCGGGCCAG-3'	

Table 3. Conditions for RT-PCR

	Temperature (℃)				Time (min.)
	GAPDH, FN	MMP-1, TIMP-1, TIMP-2	UNCL (PDLs22)	COL I	
Predenaturation	94	94	94	94	5
denaturation	94	94	94	94	1
Annealing	55	58	45	55	1
Polymerization	72	72	72	72	**

** Polymerization time : MMP-1(1.5 min), TIMP-1,2 (1.5 min), UNCL, COL Ⅰ (1.5min), GAPDH, FN (2min), COL Ⅰ : Type Ⅰ Collagen, FN : Fib ronectin, min.: minute.

하였을 때, 3회 적용한 평균값이 대조군에 비하여 세포가 증식 또는 감소를 보이는 0.00003%와 0.03%를 선택하여 1분, 3분, 30분씩 각각 적용하였다.

그리고 동일한 농도와 배양시간으로 H_2O_2와 as-corbic acid(Sigma, USA)를 동시에 적용하였으며(Table 1), 적용한 후에 PBS로 세척하고 10% FBS가 함유된 DMEM을 넣어 배양하였고 24시간 간격으로 5일간 반복 시행하였다.

6일째 배양된 세포로부터 Trizol Reagent (Invitrogen, USA)를 이용하여 total RNA를 추출하였다. 각각의 RNA들을 total RNA 1 ㎍당 0.5 ㎍의 oligo-dT18 primer, 200 units의 reverse tran-scriptase polymerase, 20 units의 RNase in-hibitor를 혼합하여 65℃에서 10분간 반응시켜 first-strand cDNA를 합성한 후 PDLs22, Type 1 collagen, fibronectin TIMP-1와 -2, MMP-1, 및 GAPDH의 유전자 발현을 확인하기 위한 각각의 oligo-nucleotide primer를 제작하여 RT-PCR에 사용하였다. RT 과정을 통하여 합성한 1 ㎍의 cDNA를 template로 각각의 primer, 1 unit의 Taq DNA polymerase, 250 μM의 dNTPs, 10 mM의 Tris-HCl(pH 9.0), 40 mM의 KCl, 1.5 mM의 $MgCl_2$를 혼합하여 PCR을 시행하였다.

PCR은 PTC-200(MJ Research Inc., USA)를 사용하여 predenaturation을 시행 후, PCR cycles을 (denaturation, annealing, extension) 33회 시행하였다. 이를 통해 얻은 PCR product는 1.5% agarose gel에 전기 영동하여 유전자의 발현을 확인하였고, ImageGauge 3.12를 통하여 각각의 전기영동상의 흑화도를 계산하여 비교하였다.

III. 연구결과

1. 위상차 현미경에서 관찰시 hPDLF의 증식

음성대조군과 실험군간에 큰 차이 없이 잘 증식하였으나 H_2O_2 농도가 진해지는 실험군에서는 세포 수가 감소되는 양상을 보여주어서 세포가 잘 증식하지 못하는 결과를 보였으며 0.03% H_2O_2를 30분 동안 처리한 실험군의 세포들은 모두 사멸하였다(Figure 1).

2. 역전사 중합효소 연쇄반응을 이용한 hPDLF의 PDLs22-, Type 1 collagen-, Fibronectin-, TIMP-1-, TIMP-2-, 그리고 MMP-1-mRNA의 발현 분석

hPDLF에서 H_2O_2와 ascorbic acid가 PDLs22-, Type 1 collagen-, Fibronetin-, TIMP-1-, TIMP-2-, 그리고 MMP-1-mRNA 발현에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 RT-PCR 과정을 3회 반복시행하였고, 그 유전자들의 발현 양상은 다양하게 관찰되었다(Figure 2).

유전자들의 발현은 각각의 전기영동상의 흑화도를 계산하여 비교하였는데(Figure 3~9), H_2O_2, ascor-

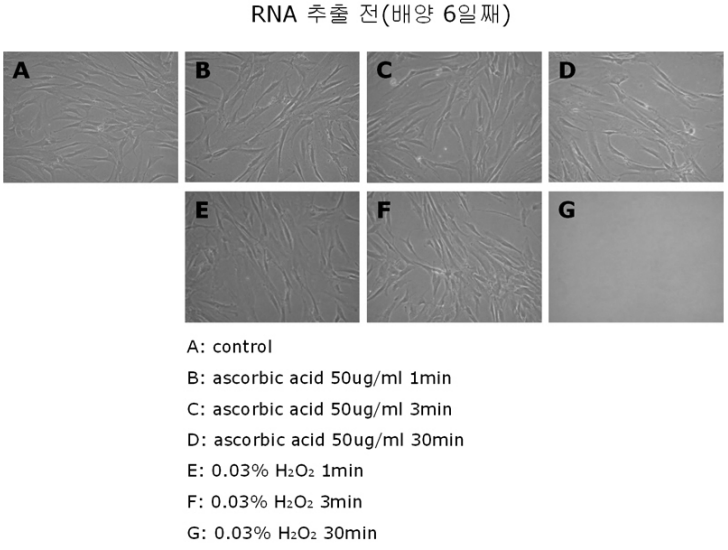

Figure 1. Cultured human periodontal ligament fibroblast. The hPDLF was differently observed according to the application concentration and time of H_2O_2 and ascorbic acid.

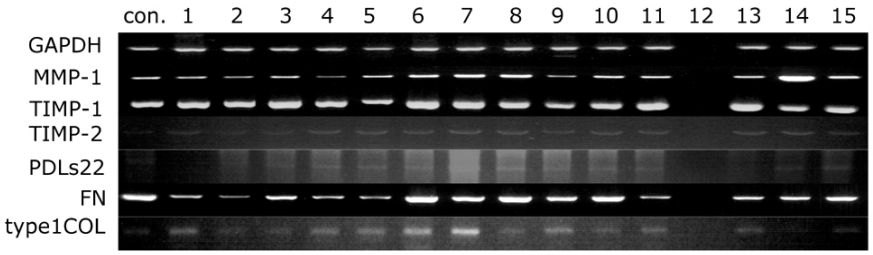

Figure 2. RT-PCR result according to the application concentration and time of H_2O_2 and ascorbic acid. Con.: control; 1, 6 and 11: hPDLF treated with ascorbic acid(50㎍/㎖) and were incubated with the agents for 1 minutes, 3 minutes, 30 minutes; 2, 7 and 12: hPDLF treated with 0.03% H_2O_2 and were incubated with the agents for 1 minutes, 3 minutes, 30 minutes; 3, 8 and 13: hPDLF treated with 0.00003% H_2O_2 and were incubated with the agents for 1 minutes, 3 minutes, 30 minutes; 4, 9 and 14: hPDLF treated with ascorbic acid(50㎍/㎖) and 0.03% H_2O_2 were incubated with the agents for 1 minutes, 3 minutes, 30 minutes; 5, 10 and 15: hPDLF treated with ascorbic acid(50㎍/㎖) and 0.00003% H_2O_2 were incubated with the agents for 1 minutes, 3 minutes, 30 minutes.

bic acid 적용 시간에 따라 다양하게 발현되었다 (Figure 3~7).

50 ㎍/㎖ ascorbic acid를 1분, 3분, 30분 적용하였을 때, Collagen type I-, TIMP-2 mRNA의 발현은 대조군에 비해서 증가된 양상을 보였다 (Figure 3). PDLs22-(UNCL) 발현은 3분, 30분에서 대조군에 비하여 증가하였고, TIMP-1는 대조군과 비슷하게 발현되는 양상을 나타냈다. Fibronectin은 대조군에 비하여 감소된 양상을, MMP-1은 3분, 30분에서 증가된 양상을 나타내었다.

0.03% H_2O_2를 1분, 3분, 30분 적용하였을 때, Collagen type I-, TIMP-2, PDLs22-(UNCL) mRNA의 발현은 대조군에 비해서 1분, 3분에서 증가된 양상을 보였다(Figure 4). TIMP-1는 1분, 3분에서 대조군과 비슷하게 발현되는 양상을 나타냈다. Fibronectin은 대조군에 비하여 감소된 양상을, MMP-1은 3분에서 증가된 양상을, 1분에서 감소된 나타내었다. 0.03% H_2O_2를 30분 적용시에는 모든 유전자의 발현이 관찰되지 않았다.

0.00003% H_2O_2를 1분, 3분, 30분 적용하였을 때, Collagen type I-, TIMP-2, PDLs22-(UNCL) mRNA의 발현은 대조군에 비해서 증가된 양상을 보

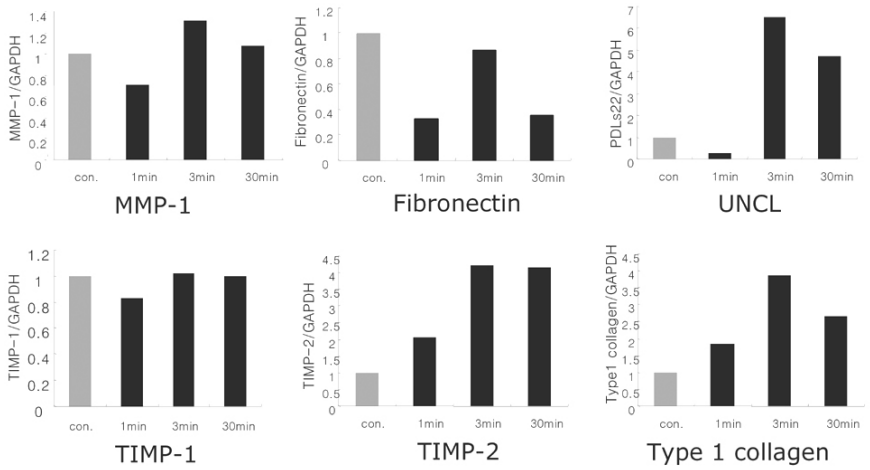

Figure 3. Time course of 50 ㎍/㎖ ascorbic acid effects on mRNA levels. (Con.: control, min: minute)

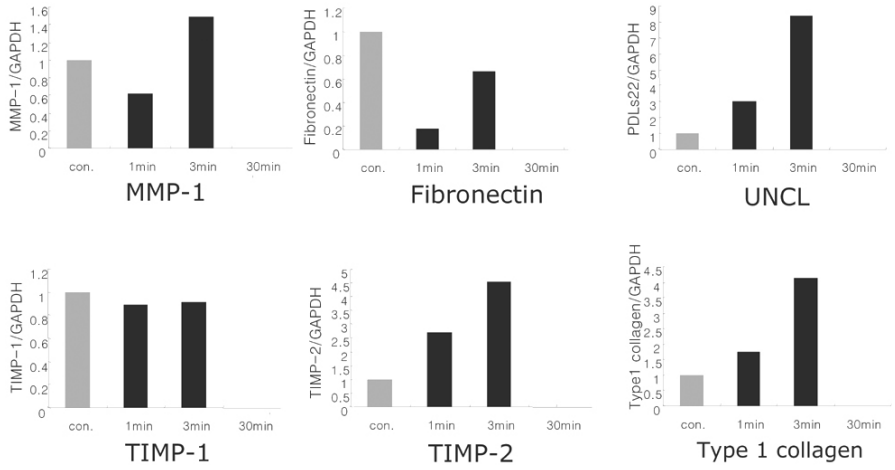

Figure 4. Time course of 0.03% H_2O_2 effects on mRNA levels. (Con.: control, min: minute)

였다(Figure 5). TIMP-1는 1분, 30분에서 대조군보다 증가되고, 3분에서 감소되는 양상을 나타냈다. Fibronectin은 대조군에 비하여 감소된 양상을, MMP-1은 3분, 30분에서 증가되고, 1분에서 감소되는 경향을 나타내었다.

H_2O_2(0.03%)와 ascorbic acid(50 ㎍/㎖)를 혼합 적용하였을 때, 시간의 따른 유전자의 발현 양상이 다양하였다(Figure 6). PDLs22-(UNCL), TIMP-2 mRNA의 발현은 대조군에 비해서 증가된 양상을 보였다(Figure 6). Collagen type I-은 1분, 3분에서 대조군보다 증가된 양상을, 30분에서 감소된 양상을 나타내었다. TIMP-1는 대조군보다 1분에서는 비슷하였으나 3분, 30분에서 감소되는 양상을 나타냈다. Fibronectin은 대조군에 비하여 감소된 양상을, MMP-1은 30분에서 증가되고, 1분, 3분에서 감소하였다.

H_2O_2(0.00003%)와 ascorbic acid (50 ㎍/㎖)를 혼합 적용하였을 때, 시간의 따른 유전자의 발현 양상이 다양하였다(Figure 7). PDLs22-(UNCL), TIMP-2, MMP-1 mRNA의 발현은 대조군에 비해서 증가된 양상을 보였다(Figure 7). Collagen type I-은 1분, 3분에서 대조군보다 증가된 양상을, 30분에서 감소된 양상을 나타내었다. TIMP-1과 Fibronectin은 대조군보다 감소되는 양상을 나타냈다.

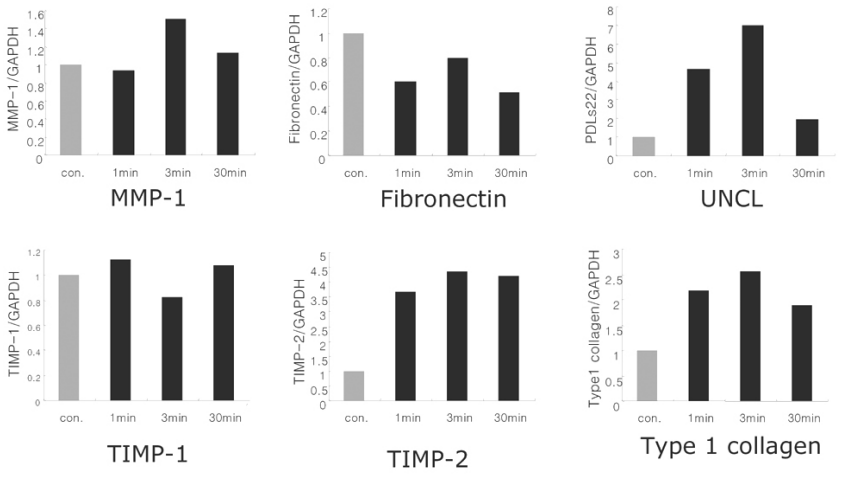

Figure 5. Time course of 0.00003% H_2O_2 effects on mRNA levels. (Con.: control, min: minute)

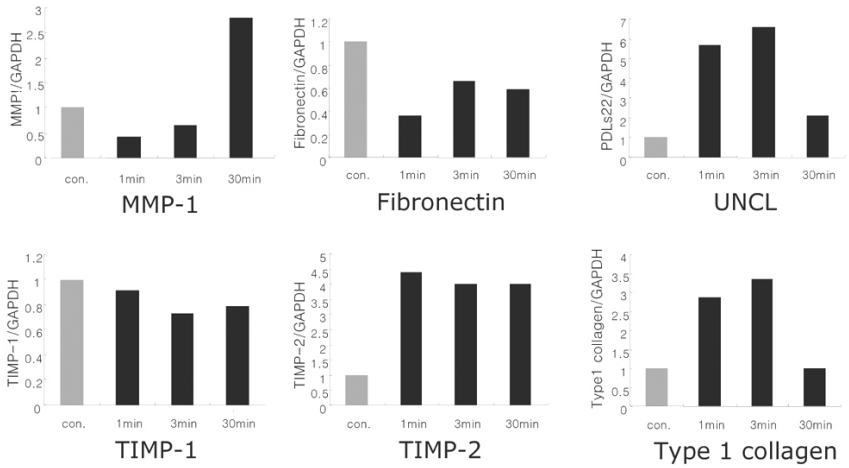

Figure 6. Time course of H_2O_2 (0.03%) and ascorbic acid (50 ㎍/㎖) effects on mRNA levels. (Con.: control, min: minute)

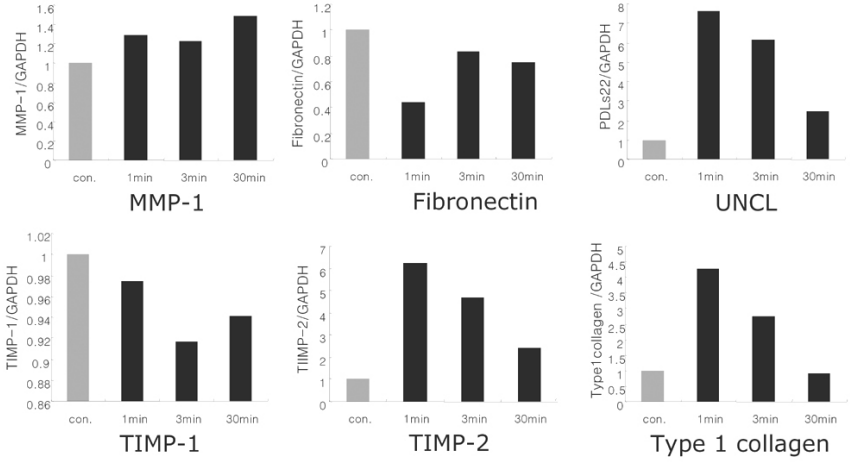

Figure 7. Time course of H_2O_2 (0.00003%) and ascorbic acid (50 ㎍/㎖) effects on mRNA levels. (Con.: control, min: minute)

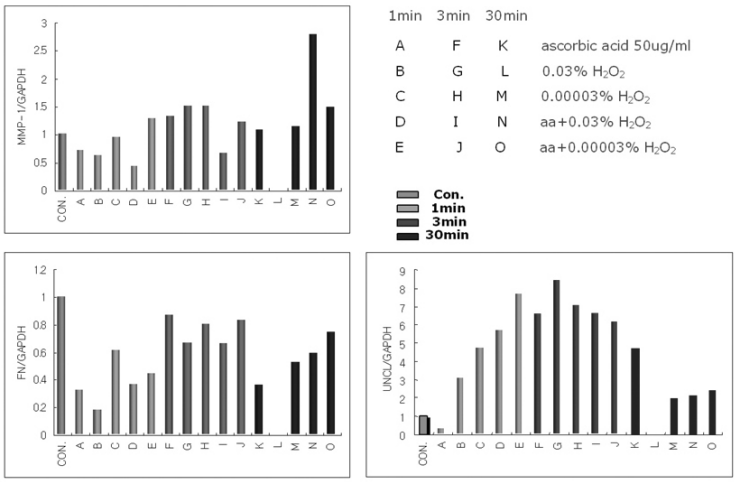

Figure 8. Expression of UNCL-, MMP-1, and Fibronectin-mRNA in hPDLF according to the time and concentration of H_2O_2 and/or ascorbic acid.

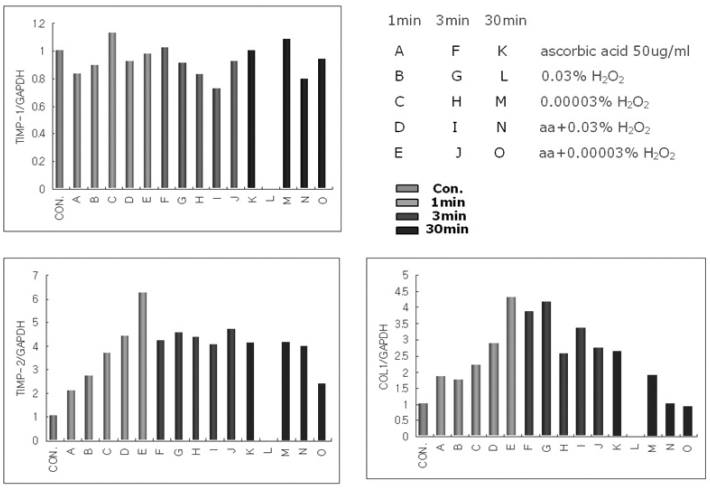

Figure 9. Expression of TIMP-1, TIMP-2, and Type 1 collagen mRNA in hPDLF according to the time and concentration of H_2O_2 and/or ascorbic acid.

Figure 8~9에서 mRNA 종류별로 H_2O_2, ascorbic acid, H_2O_2와 ascorbic acid를 동시 적용한 경우의 시간과 농도에 따른 발현 정도를 비교하였다.

PDLs22(UNCL) mRNA의 경우, 대조군보다 ascorbic acid를 3분, 30분 처리한 실험군에서 발현 양상이 증가하였고 0.00003% H_2O_2를 1분, 3분 처리한 실험군과 0.00003% H_2O_2와 50 ㎍/㎖ ascorbic acid를 함께 처리한 실험군에서 더욱 높게 발현되었다(Figure 8).

MMP-1 mRNA의 경우, 0.03% H_2O_2와 50 ㎍/㎖ ascorbic acid를 함께 30분 동안 처리한 실험군에서 증가하는 양상을 보였고 그 외 실험군에서는 조금 증가하는 경향을 나타냈다(Figure 8).

Fibronectin mRNA의 경우, 음성대조군에 비해 모든 실험군에서 감소하는 경향을 보였으며 0.03% H_2O_2와 50 ㎍/㎖ ascorbic acid를 함께 1분 동안 처리한 실험군에서 많이 감소하였다(Figure 8).

Type 1 collagen mRNA 경우, 0.00003% H_2O_2와 50 ㎍/㎖ ascorbic acid를 함께 30분 동안 처리한 실험군과 0.03% H_2O_2와 50 ㎍/㎖ ascorbic acid를

함께 30분 동안 처리한 실험군에서 약간 낮게 발현되었고 이를 제외한 모든 실험군에서 음성대조군보다 높게 발현되었다(Figure 9).

TIMP-1 mRNA의 경우, 음성대조군에 비해 0.00003% H_2O_2를 처리한 실험군에서만 약간 증가하였고 0.03% H_2O_2와 50 ㎍/㎖ ascorbic acid를 함께 처리한 실험군에서 그 발현양이 감소하는 경향을 나타냈으며 그 외 실험군에서는 조금 감소하는 경향을 보였다(Figure 9).

TIMP-2 m-RNA의 경우, 음성대조군에 비해 모든 실험군에서 증가하는 경향을 나타내었고 0.00003% H_2O_2와 50 ㎍/㎖ ascorbic acid를 함께 30분 동안 처리한 실험군에서 다른 실험군에서 보다 낮게 발현되었다(Figure 9).

IV. 고안

ROS는 호기성 대사의 일부로 생성되는데, 조직이 손상을 받아 저산소증 상태에 이른 후 산소가 다시 유입되는 시기에 또는 염증시에 발생될 수 있다[17]. 이 물질은 고도로 반응성이며 조직 내에 많이 존재할 경우에 collagen, hyaluronic acid, 그리고 proteoglycan과 같은 세포외기질 성분의 depolymerization에 영향을 주며, 세포의 단백질, 핵산, 그리고 막지질의 파괴에 활성을 나타낼 수 있다[3,5].

치주조직의 치유는 여러 조절인자들에 의해서 조절되는데 PDLF는 치아를 지지하며 백악질과 치조골 형성에 관여하며 다양한 세포로 분화할 수 있는 능력을 가지고 있어 치주조직의 치유에 중요한 역할을 담당하고 있다.

이 연구에 이용된 H_2O_2는 특히 급성궤사성궤양성 치은염의 치료시에 이용되는데 체내에서는 산화스트레스로 인한 조직파괴 관련인자로서 보고되고 있으며, ascorbic acid는 hPDLF의 분화 과정의 관련인자로서 그리고 인체 여러 조직의 창상치유에 촉진인자로서 보고[19,21]되고 있다.

최근에는 치주질환의 진행 및 치료에 관한 여러 연구들에서 치주조직의 치유에 관련된 것으로 알려진 MMP-1, TIMP-1, TIMP-2, Type 1 collagen, Fibronectin, PDLs22 등의 여러 유전자의 발현양상에 관한 연구가 활발하게 진행되어 오고 있으나, 이러한 조절인자들, 즉 H_2O_2와 ascorbic acid에 대한 hPDLF에서의 유전자 발현에 관한 연구는 아직 미비한 실정이다.

이 연구에서는 치주조직 치유에 필수적인 PDLF 분화에 영향을 미칠 것으로 예상되는 ascorbic acid와 염증성 치주질환에 의해 염증세포나 호기성 세포들에 의해 생성되는 H_2O_2를 hPDLF에 각각 단독 또는 복합해서 적용한 후, 이들이 조직파괴와 회복에 관련된 6종류의 세포외기질 단백질 (MMP-1, TIMP- 1, -2, collagen type 1, fibronectin, PDLs[22]의 발현에 끼치는 영향에 관하여 평가하였다. 유전자들의 발현변화를 관찰하기 위하여 H_2O_2(0.03%, 0.00003%), ascorbic acid(50㎍/㎖)를 6일 동안 단독 적용하거나 혼합 적용하였는데, 그 적용 시간은 1분, 3분, 30분으로 시행하였다. H_2O_2를 구강에 소독용으로 양치하거나 스켈링 후 소독용 솜을 사용할 경우 대부분 1분 정도의 적용시간이 소요되며, 잔존시간은 일반적으로 30분 정도됨을 감안하여 이 연구에서도 1분, 3분, 30분으로 설정하였다. 또한 6일동안 배양하였을 때 세포의 감소 혹은 증식 소견이 다양하게 관찰되었고, 유전자의 발현 양상을 관찰하기 위하여 RT-PCR을 시행시(Figure 2), 1분, 3분, 30분 적용시간에 따라 유전자 발현 양상이 다양하게 관찰되었다(Figure 3~7).

PDLs22(UNCL)는 PDLF에서 선택적으로 발현되는 유전자들 중의 하나로서 백악질과 치조골의 초기 분화에 그리고 치아이동시 PDLF의 개조와 재생에도 중요한 역할을 할 수 있다고 보고되었는데[22], 최근 조 등[1]은 PDLs22 mRNA는 복제노화가 진행될수록 그 발현양상이 감소되어 세포의 분화 및 노화의 정도를 파악하는 표시자로서도 활용할 수 있음을 제시하였다.

Type I collagen은 성인의 수 많은 결합조직 중에서 가장 풍부하게 분리되는 fibrillar collagen으로서 노화에 영향을 받음이 여러 연구들에서 보고되고

있다[12,14,23,26].

이 연구에서 ascorbic acid와 hPDLF의 배양시간에 따른 mRNA 발현양상을 살펴보면, 3분 동안 배양했을 때 대조군에 비해 PDLs22의 경우 약 7배, collagen type I과 TIMP-2의 경우에는 약 5배 정도 발현이 증가되어 나타났는데, 이것은 ascorbic acid의 창상치유와 관련된 연구결과를 반영한 것이라 생각된다. 특히, 항산화제인 ascorbic acid에 의해 PDLs22 mRNA의 발현이 증가된 양상이 나타났는데 향후에 조직재생과 관련된 PDLs22와 항산화제에 대한 폭넓은 연구가 진행되어야 할 것으로 생각된다.

H_2O_2와 hPDLF의 배양시간에 따른 mRNA 발현양상을 살펴보면, 0.03% H_2O_2에서 3분 동안 배양했을 때 대조군에 비해 PDLs22의 경우 약 9배, collagen type I과 TIMP-2의 경우에는 약 5배 정도 발현이 증가되어 나타났다. 그러나 0.03% H_2O_2에서 30분 동안 배양했을 때 모든 실험군의 mRNA 발현이 나타나지 않아 ROS에 의해 유도된 세포 죽음을 관찰할 수 있었다. 반면, 0.00003% H_2O_2에서 3분 동안 배양했을 때에도 대조군에 비해 PDLs22의 경우 약 7배, collagen type I는 약 5배, 그리고 TIMP-2의 경우에는 약 3배 정도 발현이 증가되어 나타났으며, MMP-1과 fibronectin, 그리고 TIMP-1의 mRNA 발현은 대조군과 거의 비슷한 양상을 나타냈다. 따라서 H_2O_2가 0.03%와 0.00003%의 농도로 3분간 적용될 경우 mRNA 발현을 자극하는 것으로 생각되었다.

H_2O_2와 ascorbic acid를 hPDLF에 동시에 적용한 후 배양시간에 따른 유전자 발현양상을 살펴보면, PDLs22, collagen type I, 그리고 TIMP-2 mRNA의 경우 적용된 H_2O_2 농도에 무관하게 대조군에 비해 증가되어 발현되었고, fibronectin mRNA의 경우 적용된 H_2O_2 농도와 무관하게 비슷하게 발현되었으며, TIMP-1 mRNA는 적용된 H_2O_2 농도와 무관하게 낮게 발현된 반면, MMP-1 mRNA는 적용된 H_2O_2 농도에 따라 그 발현이 다르게 발현되었다.

Type I collagen mRNA는 hPDLF와 H_2O_2, 그리고 ascorbic acid를 3분 동안 배양했을 때 높게 발현되었으나 30분 동안 배양했을 때는 낮게 발현되었는데, 이러한 현상은 첫째, 시간이 경과됨에 따라 ascorbic acid가 고갈되어 항산화작용이 소실되어 발현이 낮게 나타날 수 있으며 둘째, ascorbic acid가 함께 존재할 때 ascorbic acid가 OH^-을 형성하여 지질 인산화물의 생성과 안정화를 통하여 교원질 분화를 조절할 수 있다고 보고[4]된 것처럼 이 두 물질이 교원질분화에 영향을 끼쳐 Type I collagen의 유전자 발현이 낮게 나타날 수 있는데, 향후에 이것을 확신할 수 있는 연구도 필요할 것으로 생각된다.

PDLs22 mRNA의 발현은 0.00003%의 H_2O_2와 항산화제에 의해 증가된 양상이 나타났는데 이와 관련된 이전의 연구결과가 보고된 바 없어 향후에 조직재생과 관련된 PDLs22와 항산화제에 대한 폭넓은 연구가 진행되어야 할 것으로 생각된다.

Fibronectin은 다기능 부착성 당단백으로 섬유아세포와 다른 세포를 결합 이들의 부착과 이주, 즉 세포와 세포 그리고 세포와 기질의 상호작용에 관여하는데[12] 노화에 영향을 받는다고 보고[7]되고 있다. Fibronectin mRNA의 발현은 음성대조군에 비해 모든 실험군에서 감소하는 경향을 보였는데 특히 hPDLF와 고농도의 H_2O_2, 그리고 ascorbic acid를 짧은 시간동안 배양한 군에서 많이 감소하였다. Fibronectin의 경우 고농도의 H_2O_2에 매우 민감하여 유전자 발현양상을 증가시키기 위해서는 보다 더 많은 ascorbic acid가 필요할 것으로 생각된 바, 향후에는 항산화제의 종류에 따른 유전자 발현 양상의 차이에 관한 연구가 필요하리라 생각된다.

활성화된 MMPs와 TIMPs 사이의 균형에 의해 세포외기질의 개조범위가 조절되는데 Murphy와 Hembry[20]는 류마티스 관절염이 MMP와 TIMP 사이의 균형이 파괴된 경우 병리적인 과정이 발생될 수 있다고 하였고, van der Zee 등[32]도 염증세포와 조직 내에 거주하는 세포들에 의해 유래된 metallo-proteinases는 치은의 교원질 파괴에 연관되어 있다고 하였다.

MMP-1은 pro-enzyme의 형태로 분비되는 metal-binding proteinase로 interstitial collagenase의 하나로서, 일반적으로 타액[13]과 치은열구액[2,13,25]이

나 치은조직 내[10,16]에 염증이 존재할 때 증가한다고 보고되었다. 이 연구에서 MMP-1 mRNA의 발현양상은 0.03% H_2O_2와 50 ㎍/㎖ ascorbic acid를 함께 30분 동안 처리한 실험군에서 대조군에 비해 증가하는 양상을 보였고 그 외 실험군에서는 대조군과 비슷한 양상을 나타냈다. 이러한 양상은 고농도의 과산화수소에 대해 항산화제의 함량이 부족하여 세포괴사가 발생되어 MMP-1 mRNA의 발현이 증가되었다고 생각된다. 따라서, 향후에는 항산화제의 종류에 따른 유전자 발현 양상의 차이에 관한 연구가 필요하리라 생각된다. MMP-1 mRNA의 유전자는 0.03% H_2O_2와 ascorbic acid를 동시에 적용한 경우에 대조군에 비해 현저하게 증가된 양상을 보였다.

반면, MMP의 억제제인 TIMPs는 현저한 발적, 부종, 궤양, 그리고 자발출혈이 있는 경우에 TIMP-1이 증가한다고 보고[11]되었는데, 이 연구에서는 전반적으로 TIMP-1 mRNA의 유전자는 대조군과 유사하게, 그리고 TIMP-2 mRNA는 대조군에 비해 증가하는 경향을 나타내어 보다 더 포괄적인 연구가 필요하리라 생각된다.

결론적으로, 본 연구에서 RT-PCR을 통한 MMP-1, TIMP-1, TIMP-2, Type I collagen, Fibronectin, PDLs22 등의 여러 유전자의 발현양상을 분석한 결과 이 연구에 사용된 H_2O_2와 ascorbic acid의 농도는 주로 PDLs22, collagen type I과 TIMP-2등의 유전자 발현에 관여하는 것으로 생각된다. Ascorbic acid(50㎍/㎖)의 적용으로 인해 PDLs22의 발현양이 현저하게 증가하는 경향을 나타내었으며 이는 ascorbic acid가 치주인대세포의 분화를 촉진시키는데 관여하고 있는 것으로 생각된다. 또한 H_2O_2의 적용으로 MMP-1의 발현양이 증가하는 양상을 나타내어 고농도의 H_2O_2가 치주인대세포의 분화에 부정적 영향을 미치는 것으로 사료된다. 또한 TIMP-2, Type I collagen mRNA가 H_2O_2와 ascorbic acid를 함께 처리한 실험군에서 증가된 양상을 나타냄으로써, 이는 H_2O_2에 대한 부정적 효과를 ascorbic acid가 상쇄시킬 수 있는 가능성을 제시한 것으로 사료된다.

향후에는 ROS와 항산화제의 농도와 종류에 따른 유전자 발현, 그리고 조직재생에 관련된 유전자 발현에 관한 연구가 필요하리라 생각된다. 이 연구에 이용된 과산화수소도 노화와 관련되어 있는데 단기간의 연구에서는 그 유전자 발현이 증가되어 나타난 바 고농도의 H_2O_2에 지속적으로 노출되었을 경우 그 노화와 관련된 유전자 발현양상에 대해서 연구가 필요할 것으로 생각되며, 동물 실험 등을 통한 조직학적 연구도 필요하리라 생각된다.

V. 참고문헌

1. 조일준. 치주인대섬유모세포의 노화과정에서 MMP-1, TIMP-1, PDLs22의 발현, 2005년 조선대학교 석사학위논문.
2. 김영곤, 김영균. 프리라디칼. 1997, 여문각, pp154-167.
3. Bartold PM, Wiebkin OW, Thonard JC. The effect of oxygen derived free radicals on gingival proteoglycans and hyaluronic acid. J Periodontal Res 1984;19:390-400.
4. Battino M, Bullon P, Wilson M. et al. Oxidative injury and inflammatory periodontal disease: The challenge of anti-oxidants to free radicals and reactive oxygen species. Crit Rev Oral Biol Med 1999;10(4):458-476.
5. Beaman L, Beaman BL. The role of oxygen and ite derivatives in microbial pathogenesis and host defense. Annu Rev Microbiol 1984;38:27-48.
6. Birkedal-Hansen H. Role of matrix metaloproteinase in human periodontal disease. J Periodontol 1993;64:474-484.
7. Caputi M, Baralle FE, Melo CA. Analysis of the linkage between fibronectin alternative spliced sites during ageing in rat tissues. Biochem Biophys Acta 1995;1263(1):53-59.
8. Chapple ILC. Reactive oxygen species and antioxidants in inflammatory diseases. J

Clin Periodontol 1997;24:287-296.
9. Cook H, Davies KJ, Harding KG, et al. Defective extracellular matrix reorganization by chronic wound fibroblasts is associated with alterations in TIMP- 1, TIMP-2, and MMP-2 activity. J Invest Dermatol 2000;115(2):225-233.
10. 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.
11. Grossi SG, Nowadely CA, Takemura A et al. Development of an antioxidant supplement for smokers with periodontal disease. J Dent Res 2004 (abstr 0192).
12. Hay ED. Cell Biology of extracellular matrix, 2nd ed. Plenum Press, New York and London. 1991;21, 112.
13. Ingman T, Trevahartial T, Ding Y et al. Matrix metalloproteinase and their inhibitors in gingival crevicular fluid and saliva of periodontitis. J Clin Periodontol 1996;23:1127-1132.
14. Khorramizadeh MR, Tredget EE, Telasky C. et al. Aging differentially modulates the expression of collagen and collagenase in dermal fibroblasts. Mol Cell Biochem 1999; 194:9-108.
15. McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. New Eng J Med 1985;312:159-163.
16. Meikle MC, Hembry RM, Holly J et al. Immunolocalization of matrix metalloproteinase and TIMP (Tissue inhibitor of metallo- proteinase) in human gingival tissue from periodontitis patients. J Periodont Res 1994;29:118-126.
17. Meikle 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 1986;15:239-250.
18. Meyle J, Kapitza K. Assay of ascorbic acid in human crevicular fluid from clinically healthy gingival sites by high performance liquid chromatograpy. Arch Oral Biol 1990;35:319-323.
19. Munoz CA, Kiger RD, Stephens JA et al. Effects of a nutritional supplement on periodontal status. Compend Contin Educ Dent 2001;22(5):425-428, 430, 432.
20. Murphy G, Hembry RM. Proteinases in rheumatoid arthritis. J Rheumatol 1992;32: 61-64.
21. Nishida M, Grossi SG, Dunford RG et al. Dietary vitamin C and the risk for periodontal disease. J Periodontol 2000;71(8): 1215-1223.
22. Park JC, Kim HJ, Jang HS et al. Isolation and characterization of cultured human periodontal ligament fibroblast-specific cDNAs. Biochem Biophys Res Commun 2001;282(5):1145-1153.
23. Paz MA, Gallop PM. Collagen synthesized and modified by aging fibroblasts in culture. In Vitro 1975;11(5):302-312.
24. Pedreira J, Sanz N, Pena MJ et al. Role of apoplastic ascorbate and hydrogen peroxide in the control of cell growth in pine hypocotyls. Plant Cell Physiol 2004;45(5): 530-534.
25. Pozo P, Valenzuela MA, Melej C et al. Longitudinal analysis of metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases and clinical parameters in gingival crevicular fluid from periodontitis-affected patients. J Periodontal Res 2005;40:199-207.

26. Reynolds JJ, Meikle MC. Mechanism of connective tissue matrix destruction in periodontitis. Periodontology 2000 1997;14: 144-157.
27. Rose RC, Richer SP, Bode AM. Ocular oxi-dants and antioxidant protection. Proc Soc Exp Biol Med 1998;217:397-407.
28. Saglie FR, Carranza Jr, FA. Newman MG. The presence of bacteria within the oral epithelium in periodontal disease. 1. A scanning and transmission electron micro-scoic study. J Periodontol 1985;56:18-624.
29. Shang F, Lu M., Dudek E, et al. Vitamin C and vitamin E restore the resistance of GSH-depleted lens cells to H_2O_2. Free Rdic Biol Med 2003;34(5):521-530.
30. Suomalainen K, Sorsa T., Lindy O, et al. Hypochlorous acid induced activation of human neutrophil and gingival crevicular fluid collagenase can be inhibited by ascorbate. Scand J Dent Res 1991;99:397-405.
31. van der Pols JC. A possible role for vita-min C in age-related cataract. Porc Nutr Soc 1999;58(2):295-301.
32. 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.

Effects of H_2O_2 and ascorbic acid on TIMP-2, Type 1 collagen, and PDLs22 levels in human periodontal ligament fibroblasts

Yong-Sun Choi[1], So-Young Kim[2], Seong-Mi Choi[1,2], Hyun-Seon Jang[1,2], Byung-Ock Kim[1,2*]

1. Department of Periodontology, College of Dentistry, Chosun University
2. The 2nd Stage of BK21

Reactive oxygen species (ROS) have been implicated in the pathogenesis of various diseases. And vitamin C has shown a protective effect for the tissues.

The aim of this study was to evaluate the effects of H_2O_2 and ascorbic acid on matrix metalloproteinase-1 (MMP-1), tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP: TIMP-1, TIMP-2), Type 1 collagen, fibronectin, and PDLs22 level in human periodontal ligament fibroblasts (hPDLF) via reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR).

hPDLF was obtained from a healthy periodontium and cultured in Dulbecco's modified Eagles's medium plus 10% fetal bone serum.

The concentration of ascorbic acid in hPDLF was 50 ㎍/㎖, and that of H_2O_2 in hPDLF was 0.03% and 0.00003%. Ascorbic acid only, H_2O_2 only and mixture of ascorbic acid and H_2O_2 were applied with hPDLF for 1-, 3-, and 30-min., respectively. The gene expression of MMP-1-, TIMP-1-, TIMP-2-, Type 1 collagen-, fibronectin-, and PDLs22-mRNA in hPDLF was analysed via RT-PCR.

The results were as follows;

1. hPDLF in response to 30-min. incubation with 0.03% H_2O_2 did not show any gene expression.
2. In all the experimental groups, the gene expression of fibronectin mRNA showed the decreased tendency compared to control.
3. In all the experimental groups, the gene expression of TIMP-1 mRNA showed the tendency similar to control.
4. hPDLF in response to 30-min. incubation with 0.03% H_2O_2 and ascorbic acid increased mRNA induction for MMP-1.
5. In all the experimental groups, hPDLF increased mRNA induction for PDLs22, collagen type I, and TIMP-2 compared to control.

Within the limited experiments, H_2O_2 and ascorbic acid increased mRNA induction for PDLs22, collagen type I, and TIMP-2 in hPDLF. More research will be needed in order to confirm the relative importance of the different roles of ROS and antioxidants in hPDLF from a periodontal regeneration or repair standpoint.

Key words : H_2O_2, ascorbic acid, human periodontal ligament fibroblasts