

만성 치주염 환자에서 2형 당뇨병이 PGE₂, MMP-14 및 TIMP의 발현 양상에 미치는 영향

김선우, 박진우, 서조영, 이재목*

경북대학교 치과대학 치주과학교실

I. 서론

당뇨는 치주 질환의 중요한 위험 요소 중 하나이다. 이러한 전신질환은 치주 질환에 대한 주요 기여인자 중 하나이고, 또한 그 치료에서도 제한 요소가 될 수 있다. 비록, 당뇨 자체가 치주염을 일으키지는 않지만, 혈당 조절이 잘 되지 않는 환자의 경우, 치주 질환을 더욱 급속히 진행시키고, 더 많은 치아 상실을 초래할 수 있다¹⁻³⁾.

심한 치주염은 당 조절이 잘 되지 않을 때의 위험성과 관련이 있고, 치료받지 않은 진행된 치주 질환은 당뇨의 대사성 조절을 악화시킬 수 있다⁴⁾. 당뇨를 가진 경우 치주염의 증가된 이환율과 심도를 설명하는 다양한 병리적 요소들이 제안되어져 왔다⁵⁾. 당뇨를 가진 환자에서 다형핵 백혈구의 기능에 관한 많은 연구는 손상된 화학주성, 부착 및 탐식기능을 보여주었고, 이러한 손상된 기능이 감염에 대한 저항성을 떨어뜨릴 수 있다고 제안하였다. 치주염의 심도는 결합이 있는 화학주성과 관련되어져 왔고, 이것은 확장된 치주 조직 파괴와 연관된 것으로 보인다. 심한 치주염을 가진 당뇨 환자는 정도의 치주

염을 가진 환자 또는 심하거나 정도의 치주염을 가진 비당뇨 환자와 비교하여 떨어진 다형핵 백혈구의 화학주성 능력을 가짐이 보고되고 있다⁶⁾.

만성 치주염은 치은, 치주인대, 백악질 그리고 치조골과 같은 치아-지지 조직의 파괴를 초래하는 염증성 질환이다⁷⁾. 만성 치주염은 interleukin (IL)-1 α 과 IL-1 β 와 같은 cytokines의 존재와 강하게 연관된다. 사실 치주조직의 많은 세포들이 이러한 물질들을 생산할 수 있는 능력을 가지고 있다. 치주염을 가진 환자의 치은 혈구액과 IL-1의 자극을 받은 치주 조직에서 prostaglandin E2 (PGE₂)의 농도가 증가됨을 볼 수 있었다. 염증 전과 면역 조절 효과를 가진 것으로 알려진 arachidonic acid 대사물인 PGE₂는 치주 질환의 발달과 진행에 중요한 역할을 한다⁸⁾. PGE₂는 염증, 부종, 통증 및 발열을 일으키고, 치주 조직의 부착 상실과 연관된 골 흡수를 자극할 가능성이 있는 물질이다⁹⁾. 치주인대 세포뿐 아니라 단핵 세포, 호중구, 내피 세포와 같은 치주 조직의 다양한 종류의 세포들에서 IL-1 α , IL-1 β , tumor necrosis factor(TNF)- α , IL-6, lipopolysaccharides (SPS)와 mitogens과 같은 염증 전 cytokines에 의한

* 교신저자 : 이재목, 대구광역시 중구 삼덕2가 50번지, 경북대학교 치과대학 치주과학교실, 700-422 (전자우편 : leejm@knu.ac.kr)

활성화 후 PGE_2 를 생산한다¹⁰⁾.

생리적 그리고 병리적 상태 하에 PGE_2 생산은 cyclooxygenases(COX)의 활성화와 밀접히 연관되어 있다. COX-1과 COX-2는 arachidonic acid를 prostaglandin으로 바꾸는 효소 반응을 촉매하는 2가지 주요한 효소이다. COX-1 동소체는 본질적으로 다양한 조직에서 표현되는 반면¹¹⁾, COX-2는 염증 전 cytokines과 세균에 의한 생산물에 의해 유도된다¹²⁾.

Matrix metalloproteinases(MMPs)는 세포외기질과 기저막의 파괴를 증대하는, 금속 의존 단백질 분해 효소의 한 군이다¹³⁾. MMPs는 중성에 가까운 pH에서 세포외기질의 단백질을 파괴할 수 있는 zinc 또는 calcium-의존 endopeptidases와 관련하여 적어도 23개로 구성되어 있다^{21,22)}. MMPs는 비활성 형태로 분비되어 세포와 부분 또는 세포막 가까이에서 다른 MMPs 또는 serine proteinases에 의해 peptide 분해로 활성화 된다¹⁵⁾.

MMPs¹⁶⁾와 기질-파괴 serine proteinases가 류마티스 관절염, atherosclerotic plaque와 종양 전이와 같은 질환의 진행에서 세포외기질의 파괴에 참여함이 보여지고 있다. 활동적인 치주염이 있는 동안, 치은 조직(특히, collagen)의 파괴는 염증 세포들(단핵세포, 대식세포, 림프구, 다형핵 백혈구)과 잔존 세포들(섬유모세포, 상피세포, 내피세포)에 의해 표현되는 MMPs와 부분적으로 연관됨이 현재 인식되고 있다.

MMPs는 그것의 기질 특성과 배열 상동관계에 기초하여, 크게 4가지로 구분된다¹³⁾: (1) collagenases(fibroblast type MMP-1, neutrophil type MMP-8, collagenase 3 또는 MMP-13과 collagenase 4 또는 MMP-18); (2) gelatinases 즉 type IV collagenases(A 또는 MMP-2와 B 또는 MMP-9); (3) stromelysins(-1 또는 MMP-3, -2 또는 MMP-10 그리고 -3 또는 MMP-11, matrilysin 또는 MMP-7); (4) MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17과 같이 최근 발견된 membrane type matrix metalloproteinases(MT-MMPs). MMP-12

(Metalloelastase), MMP-19와 MMP-20(enamelysin) 또한 MMPs 군에 속한다.

1994년 Sato 등¹⁷⁾은 membrane type-MMP(MT1-MMP, MMP-14)를 처음 발견하여, 이것이 pro-MMP-2를 활성화 시킨다고 설명하였다. 이후, MMP-14는 type I, II, III collagen, fibronectin, laminins 그리고 proteoglycans을 포함한 다양한 세포외기질의 구성성분을 파괴함이 관찰되었다¹⁸⁾. MMP-14는 분비되지 않고 세포막에서 역할을 하며, pro-MMP-8과 -13을 활성화 시킨다. Achong 등¹⁹⁾은 치주 병소의 개조와 치유 단계 동안, 세포막에서 활성화된 MMP-2와 함께 MMP-14가 세포 이주와 세포외기질의 재구성을 일으킬 것이라 설명하였다.

collagen 분해 효소의 역할은 적어도 3가지 구분된 단계 즉 생산, 활성, 억제 단계에서 조절된다²⁰⁾. 첫째, 그 효소는 비활성 형태로 합성되고, 분비된다. 둘째, 그 효소는 자가 활성, stromelysin 또는 plasmin에 의해 활성화 된다. 셋째, 한번 활성화 되면, 그 효소는 촉매적 활성을 형성하고, 이어서 특정 tissue inhibitors of metalloproteinases(TIMPs)에 의해 억제된다. TIMPs는 MMPs 군의 조절 인자로, 4가지 구성 인자가 보고되어 왔다.

이들 중, 모든 MMPs에 억제 효과를 가진, TIMP-1과 TIMP-2는 치주 병소에서 찾아 볼 수 있다. TIMP-2는 PMN 유래의 MMPs에 강한 억제 작용을 보이고, TIMP-1은 fibroblast 유래의 MMPs에 큰 억제 효과를 보인다. TIMPs는 보통 2가지 주요 구조를 가지는데, 이 중 단지 the inhibitory N domain만이 MMPs를 억제하는 능력을 가진다. N-terminal Cys의 aminogroup은 활성화 부위 틈을 차지하고, 촉매적 domain의 주위 표면을 포함한 인접 residues와 함께, 활성 부위 Zn^{2+} 를 조정한다.

골 흡수를 동반한 염증 반응에서 PGE_2 , MMP-14 그리고 TIMP-1의 역할과 상호작용은 아직 명백하지 않다. 치조골 흡수를 동반한 치주염의 병인에서 PGE_2 , MMP-14와 TIMP-1의 상대적인 기여도 또한 아직 잘 알려져 있지 않다. 또한, 당뇨를 동반하거나 동반하지 않은 만성치주염 환자에서 각 PGE_2 , MMP-14,

TIMP-1과 그것들의 상호관계를 동시에 분석한 연구는 아직 미흡한 실정이다. 이번 연구의 목적은 제2형 당뇨병 환자와 전신적으로 건강한 성인의 치조골 흡수를 동반한 만성 치주염 부위 치은 조직에서 PGE₂, MMP-14 그리고 TIMP-1의 발현을 정량하고 상호 비교 분석하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 환자 선정 및 조직 표본 채득

이번 연구에 참여한 환자는 만성 치주염 치료를 위해 경북대학교 병원을 내원한 환자들 중 제2형 당뇨병을 동반한 만성 치주염 환자 8명, 전신적으로 건강한 만성 치주염 환자 8명 그리고 전신적으로 건강한 성인 8명으로 구성되었다. 치주 조직 표본은 모든 환자에게 동의를 얻은 후, 치주 수술(치관연장술 포함) 또는 발치 시 내사면절개에 의해 얻어졌다.

환자의 전신적 상태(나이, 성별, 혈당 수치, 흡연 유무), 치은의 임상적 기준(치은 열구 출혈 지수, 치주낭 깊이) 그리고 골 흡수의 방사선학적 증거에 따라, 각 치은 조직 표본은 3가지 군(Group 1, 2, 3)으로 나누어 졌다.

첫 번째 군(Group 1, 대조군)은 전신적으로 건강한 8명의 성인으로부터 얻어진, 출혈이 없고 골 흡수 또는 치주낭이 없는 임상적으로 건강한 치은 조직으로 하였고, 두 번째 군(Group 2)은 만성 치주염 환자로부터 얻어진 염증성 치은 조직으로 하였다. 만성 치주염은 임상적 그리고 방사선학적(골 흡수) 기준을 기초로 치주 질환과 상태에 대한 분류에 따라 진단되었다. 두 번째 군의 모든 환자는 전신적으로 건강하고, 치주낭 깊이가 5mm 이상인 부위를 한 부위 이상 가지며, 4mm 이상의 부착 소실을 보이는 치아를 적어도 한 개 이상 가지고 있었다. 모든 치은 조직 표본은 5mm 이상의 치주낭 깊이, 변연 치은의 부종 그리고 Mühlemann & Son에 따른 치은 열구 출혈 지수 3을 보이는 치아로부터 채득되었다.

세 번째 군(Group 3)은 제2형 당뇨병을 동반한

만성 치주염 환자로부터 얻어진 염증성 치은 조직으로 하였다. 세 번째 군은 적어도 6개월 이전에 제2형 당뇨병 진단을 받고, 식후 2시간째 혈당 수치가 200mg/dl 이상 보이는 환자를 대상으로 하였다. 두 번째 군과 세 번째 군의 환자는 유사한 치주 상태를 보이지만, 두 번째 군은 전신적으로 건강한 환자를 대상으로 하였고, 세 번째 군은 약물치료 중인 제2형 당뇨병 환자를 대상으로 하였다.

수술 시, 채득된 조직 표본은 즉시 액화 질소에 급속 동결되었다(-70°C).

2. 단백질 분리와 Western blotting

Western blotting은 이전에 Kang 등²¹⁾의 연구에서 시행된 방법과 동일하게, 동결된 조직을 Cho 등²²⁾의 방법을 따라 1:30으로 희석된 protease inhibitor cocktail(Roche, Germany)²²⁾을 함유한 RIPA 용해완충액(10mM EDTA, 0.15M NaCl)에서 균질화시키고, 그 용해물을 10초 동안 세 번 초음파 분쇄하였으며, 4°C, 12000rpm에서 15분 동안 원심 분리하였다. 상층액의 단백질 농도는 BSA를 표준용액으로 이용하여 Bradford protein assay(Quick Start, BIO-RAD, USA) 통해 결정되었다.

그 용해물의 상층액을 SDS samples buffer(1M Tris-HCl(pH 6.8), 40% glycerol, 8% SDS, 2% mercapto-ethanol, 0.002% Bromophenol blue)에서 끓인 후, 15% sodium dodecyl sulfate(SDS)-polyacrylamide gels에서 분리하고, polyvinylidene difluoride(PVDF) 막으로 전이하였다.

막은 비특이적인 반응을 제거하기 위해 5% powdered milk와 1% BSA를 함유한 Tris-buffered saline(TBS)으로 1시간동안 처리하고, 실온에서 polyclonal anti-MMP-3, anti-PGE₂, and anti-IL-6(Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA) 항체와 1.5시간동안 반응시켰다.

이러한 막은 Tween 20으로 5분씩 5회 세척되고, anti-PGE₂에 대하여 horseradish peroxidase(HRP)-conjugated goat anti-rabbit 이차항체를, an-

ti-MMP-14와 anti-TIMP-1에 대하여 horseradish peroxidase(HRP)-conjugated donkey anti-goat 이차 항체를 TBS에서 1: 2000으로 희석하여, 실온에서 1시간동안 반응시켰다. 다시 막은 Tween 20으로 5분씩 5회 세척된 후 ECL Plus development kit (Amsterdam, Beckinghamshire, UK)으로 밴드를 확인하였다.

PGE₂, MMP-14, TIMP-1 발현에 대한 정량 분석은 densitometer(Image Gauge V 3.46, Koshin Graphic Systems, Fuji Photo Film Co., Japan)을 이용하여 시행되었다. 각 표본에서 β -actin (Abcam, UK)에 대한 표준화를 시행하고, PGE₂, MMP-14, TIMP-1의 발현은 PGE₂ 또는 MMP-14 또는 TIMP-1/ β -actin의 비율로 나타내었으며, 세 군사이의 차이가 결정되었다.

3. 통계

모든 수치는 평균±표준편차로 나타내었고, 결과는 통계학적으로 분석되었다. 각 3군 사이의 PGE₂, MMP-14 그리고 TIMP 수준은 one way ANOVA를 이용하여 비교되었고, Tukey test에 의해 사후검증되었다(P<0.05).

III. 결과

제2형 당뇨병을 동반한 만성 치주염 환자와 전신적으로 건강한 만성 치주염 환자의 채득된 모든 조직 표본에서 PGE₂, MMP-14 그리고 TIMP-1의 발현이 관찰되었다. 치은 조직에서 PGE₂의 발현 수준은 특정 항체가 약 62 kDa 크기의 PGE₂를 탐지하면

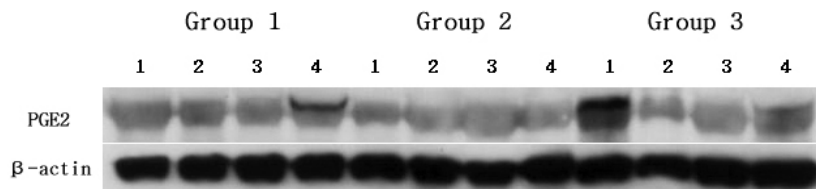


Figure 1A. PGE₂ Western analysis showing 4 representative samples in each group. PGE₂ corresponding to molecular weight 62 kDa was shown to be expressed in all samples including healthy gingiva, and the expression levels of PGE₂ were increased in patients with type 2 diabetes mellitus than in control healthy subjects. In order to quantify the PGE₂ levels, β -actin levels were also performed.

Group 1: healthy gingiva from systemically healthy person; Group 2: inflamed gingiva from patient with chronic periodontitis; Group 3: inflamed gingiva from patient with chronic periodontitis and type 2 DM.

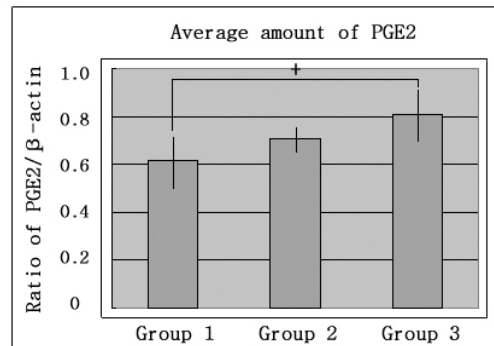


Figure 1B. Graphics showing the average amounts (Ratio of PGE₂/ β -actin) and standard deviation of gelatinase PGE₂ in group 1, 2 and 3. In the inflamed gingiva with diabetes (group 3), PGE₂ seemed to be increased compared to group 1 and group 2.

+ significant difference between group 1 and group 3 (P<0.05); Group 1: healthy gingiva from systemically healthy person; Group 2: inflamed gingiva from patient with chronic periodontitis; Group 3: inflamed gingiva from patient with chronic periodontitis and type 2 DM.

서 관찰될 수 있었다(Figure 1A, B). 각 군에서 PGE₂의 발현 수준을 정량화하기 위해, PGE₂의 발현 수준은 densitometer로 측정되었다. β-actin에 특이적인 항체를 이용한 Western blot 분석을 통해 β-actin의 발현 수준이 또한 측정되었다. 그리고 난

후 PGE₂ 발현 수준은 β-actin에 의해 표준화 되었다(PGE₂/β-actin의 비).

PGE₂ 발현 수준은 group 1에서 평균 0.619±0.112, group 2에서 0.709±0.059 그리고 group 3에서 0.806±0.106을 나타내었다. group 3에서의

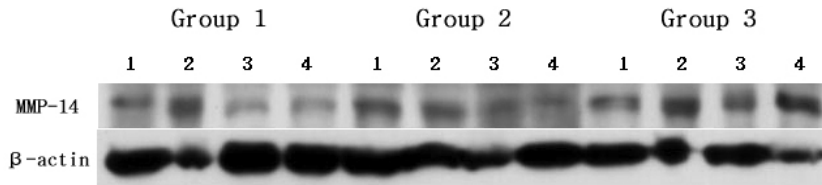


Figure 2A. MMP-14 Western analysis showing 4 representative samples in each group. MMP-14 corresponding to molecular weight 60 kDa was shown to be expressed in all samples including healthy gingiva and the expression levels of MMP-14 were increased in patients with type 2 diabetes mellitus than in control healthy subjects. In order to quantify detected MMP-14, β-actin levels were also measured.

Group 1: healthy gingiva from systemically healthy person; Group 2: inflamed gingiva from patient with chronic periodontitis; Group 3: inflamed gingiva from patient with chronic periodontitis and type DM.

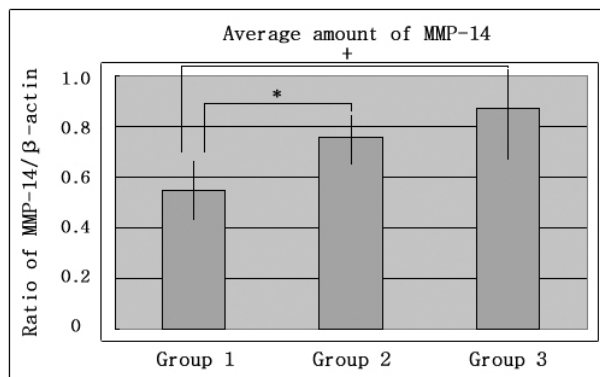


Figure 2B. Graphics showing the average amounts (Ratio of MMP-14/β-actin) and standard deviation of gelatinase MMP-14 in group 1, 2 and 3. In the inflamed gingiva (with or without diabetes, group 2 & 3), the levels of MMP-14 was higher compared to healthy gingiva. The difference between group 3 and group 1 was statistically significant ($P < 0.05$).

* significant difference between group 1 and group 2 ($P < 0.05$); + significant difference between group 1 and group 3 ($P < 0.05$); Group 1: healthy gingiva from systemically healthy person; Group 2: inflamed gingiva from patient with chronic periodontitis; Group 3: inflamed gingiva from patient with chronic periodontitis and type 2 DM.

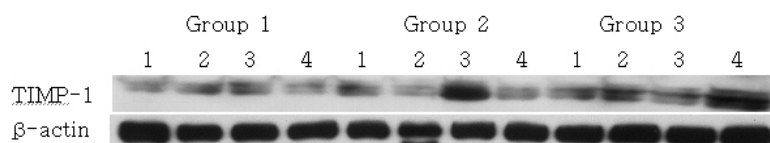


Figure 3A. TIMP-1 Western analysis showing 4 representative samples in each group. TIMP-1 corresponding to molecular weight 28.5 kDa was expressed in all samples including healthy gingiva and the expression levels of TIMP-1 were increased significantly in group 2, group 3 than in control subjects.

In order to quantify the TIMP-1 levels, β-actin levels were also measured. Group 1: healthy gingiva from systemically healthy person; Group 2: inflamed gingiva from patient with chronic periodontitis; Group 3: inflamed gingiva from patient with chronic periodontitis and type 2 DM.

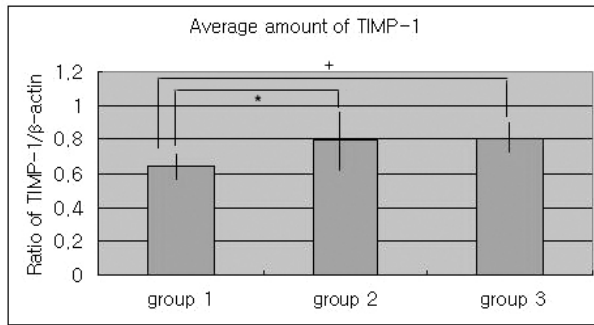


Figure 3B. Graphics showing the average amounts (Ratio of TIMP-1/β-actin) and standard deviation of TIMP-1 in group 1, 2 and 3. In the inflamed gingiva (with or without diabetes, group 2 & 3), TIMP-1 seemed to be not increased compared to healthy gingiva. And the difference was not statistically significant ($P>0.05$).

* significant difference between group 1 and group 2 ($P<0.05$)

+ significant difference between group 1 and group 3 ($P<0.05$); Group 1: healthy gingiva from systemically healthy person; Group 2 : inflamed gingiva from patient with chronic periodontitis; Group 3 : inflamed gingiva from patient with chronic periodontitis and type 2 DM

PGE_2 발현 수준은 group 1에서 보다 유의하게 높았다($P<0.05$).

MMP-14 발현 수준은 세 군 모두 63 kDa 분자량을 탐지하는 MMP-14 특이 항체를 이용한 Western blot 분석을 통해 관찰되었다(Figure 2A). 또한, MMP-14의 발현 수준을 정량화 하고 β-actin으로 표준화 하였다(Figure 2B).

MMP-14 발현 수준은 group 1에서 평균 0.547 ± 0.122 , group 2에서 0.755 ± 0.095 그리고 group 3에서 0.873 ± 0.189 를 나타내었다. group 3과 2에서의 MMP-14의 발현 수준은 group 1에서보다 유의하게 높았다($P<0.05$). MMP-14의 경우, 대조군과 만성 치주염 환자군 사이에 유의한 차이가 관찰되었지만, 제2형 당뇨병을 동반한 만성 치주염 환자군과 전신적으로 건강한 만성 치주염 환자군 사이에서는 유의한 차이가 관찰되지 않았다.

이번 연구에서 Western blot 분석을 이용한 TIMP-1의 발현 수준은 분자량 22 kDa의 TIMP-1에 특이적인 항체를 이용하여 탐지되었다(Figure 3A). 그 표준 정량화된 수치는 Figure 3B에 나타내었다. TIMP-1의 발현 수준은 group 1에서 평균 0.666 ± 0.040 , group 2에서 0.775 ± 0.092 그리고 group 3에서 0.803 ± 0.099 를 나타내었다. 그 유의한 차이는 제2형 당뇨병을 동반한 만성 치주염 환자

군과 대조군 사이에 관찰되었다.

PGE_2 , MMP-14 그리고 TIMP-1 발현의 상호관계에서, 비록 비율적인 관계는 없었지만, PGE_2 가 발현되는 것만큼 MMP-14의 발현이 증가되었고, TIMP-1의 발현은 제2형 당뇨병을 동반한 만성 치주염 환자에서 증가되는 경향을 나타내었다.

IV. 고찰

많은 연구들이 인간을 대상으로 당뇨와 치주 질환 사이의 상호관계에 대해 설명해 오고 있다. 비록 당뇨 자체가 치주염을 일으키지 않지만, 이것은 치주 질환을 더욱 급속히 진행시키고, 더 많은 치아 상실을 일으킨다. 당뇨를 가진 경우 치주염의 증가된 이환율과 심도를 설명하는 다양한 병인적 요소들이 제안되어 왔다^{1,2)}. Offenbacher 등²³⁾은 치주염을 가진 환자의 치은 열구액에서 증가된 농도의 PGE_2 를 보고하였고, Achong 등¹⁹⁾은 MMP-14가 치주염에서 MMP-2와 다른 단백질 분해 효소와 관련하여 세포 외 기질의 파괴에 어떤 역할을 할지도 모른다고 제안하였다. MMPs의 유전자 발현은 cytokines과 prostaglandins과 같은 염증 매개 물질에 의해 조절된다²⁴⁾.

MMP는 변성된 collagens(gelatin), 기저막(type

IV collagen) 그리고 다른 기질의 파괴에 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다. 이러한 파괴 과정은 치아와 상피, 결합 조직 사이 부착 기구의 상실을 초래하고, 이것은 염증 과정을 촉진시켜 치주낭을 깊게 만들며, 골 흡수를 야기한다³⁾. 이러한 MMPs의 발현과 활성화에 관한 몇몇 연구들은 타액과 열구액에서 시행되었다²⁵⁾. 그러나, 치조골 흡수를 동반한 치주염과 관련하여 당뇨를 가진 환자의 치은 조직에서 PGE₂, MMP-14와 TIMP-1의 발현에 관한 직접적인 연구는 제한적이다²⁶⁾.

이번 연구의 목적은 제2형 당뇨병 환자에서 치주 파괴에 이러한 단백질들의 기여도를 이해하기 위해, 제2형 당뇨병을 동반한 만성 치주염 환자의 치조골 흡수 과정에서 PGE₂, MMP-14와 TIMP-1의 발현을 정량하고 상호 비교해보고자 하였다.

PGE₂ 발현 정도는 전신적으로 건강한 성인의 건강한 치은 조직에 비해 제2형 당뇨병을 동반한 만성 치주염 환자와 전신적으로 건강한 만성 치주염 환자에서 증가되었다. 그 유의한 차이는 단지 group 1과 group 3 사이에서 관찰되었다(P<0.05, Figure 1B). 각 그룹 사이에서는 적은 차이를 보였다.

비당뇨 환자의 만성 치주염 부위와 제2형 당뇨병 환자의 만성 치주염 부위에서의 PGE₂ 발현 수준을 비교하였을 때, 제2형 당뇨병 환자의 만성 치주염 부위에서 비당뇨병 환자의 만성 치주염 부위에서보다 더 높은 수준을 관찰하였다. 인간을 대상으로 한 이러한 관찰은 insulin 결핍의 당뇨 쥐 모델을 이용한 연구에서 또한 보고되고 있다²⁷⁾.

PGE₂는 염증 전 cytokines과 MMP의 생산 뿐 아니라 혈관 확장과 골 흡수와 같은 염증성 그리고 면역학적 상태에서 다양한 효과를 발휘한다. IL-1β는 몇 가지 종류의 치주 세포에서 COX-2 단백질 발현을 유도함으로써 PGE₂ 생산을 증가시키는 것으로 알려져 있다. IL-1β는 bradykinin과 같은 다른 염증성 매개 물질에 의해 직접 혹은 간접적으로 이러한 생산을 유도할 수 있다.

MMP-14의 발현 정도는 전신적으로 건강한 성인의 건강한 치은 조직에 비해 제2형 당뇨병을 동반한

만성 치주염 환자와 전신적으로 건강한 만성 치주염 환자에서 증가되었다. 제2형 당뇨병 환자의 염증성 조직에서의 그 발현 수준은 전신적으로 건강한 만성 치주염 환자에서 보다 약간 높았다. 그 유의한 차이는 대조군과 두 만성 치주염 환자군 사이에서 관찰되었다. 그러나, 전신적으로 건강한 만성 치주염 환자와 제2형 당뇨병을 동반한 만성 치주염 환자군 사이의 차이는 통계학적으로 유의하지 않았다. 이러한 관찰은 PGE₂가 MMP-14와 포함된 다른 cytokines을 증가시키는 것으로 생각된다. MMP-14의 발현은 전신적으로 건강한 군에서 보다 제2형 당뇨병을 동반한 군에서 약간 더 증가하는 경향을 보여주었다³⁾.

섬유모세포는 만성적인 병소에서 관찰되는 MMPs의 증가된 수준에 주요 기여 인자가 될지도 모른다. 염증성 치은 조직에서 상피하 섬유모세포(subepithelial fibroblasts)는 MMP-14를 생산하는 주요 세포이다²⁸⁾. 당뇨 상태에서의 관찰되는 고혈당은 다양한 cytokines을 높은 수준으로 유도할 수 있다. 이러한 cytokine은 치은 섬유모세포를 자극할 지도 모른다. 그러나, 그 정확한 신호전달 기전을 밝히기는 어려우며, 치은 조직 내에서 MMP-14와 다른 매개체의 염증성 반응에 대한 좀 더 많은 연구가 필요한 것으로 생각된다.

Ohuchi 등²⁹⁾은 MMP-14를 간질성 collagen 분해 효소(interstitial collagenases)와 그 기질 특성을 공유하고, 세포외기질의 분해 효소로 설명하였다. 그리고, 세포외기질 분해에서 직접 작용하거나 병적인 상태 하에 pro-MMP-2의 활성화를 통해 그 역할을 할 것이라고 보고하였다. 또한, 열구 상피의 기저 세포 또는 치은 결합 조직 내에서 발현되는 MMP-14는 procollagenase(MMP-14)의 활성 인자로서 역할을 하는 것으로 보고되고 있다³⁰⁾.

당뇨에서 화학주성, 화학 운동성 그리고 탈과립과 관련하여 손상된 다형핵 백혈구가 보고되어 왔다^{2,31,32)}. 이것은 치주염을 포함하여 다양한 감염성 질환에서 당뇨병 환자의 증가된 감수성을 설명할 수 있다. 이러한 결과는 다형핵 백혈구의 기능 장애가

염증성 치은에 늘어난 호중구로부터 분비된 탈과립 물질 내에 반영되었을 가능성을 고려할 수 있다. 또한, 비록 각 군 사이의 성별 차이는 관찰되지 않았지만, 이러한 결과에 나이, 혈당 그리고 이러한 결과에 영향을 미칠 수 있는 다른 알려지지 않은 요소들의 영향을 배제할 수 없다.

이번 연구에서는 MMPs의 억제 물질 중 주요한 군으로 TIMPs가 관찰되었다. TIMP의 발현 정도는 제2형 당뇨병을 동반하거나 동반하지 않은 염증성 치은과 대조군 사이에 유의한 차이가 관찰되었다. 그러나, 전신적으로 건강한 환자의 염증성 치은과 제2형 당뇨병 환자의 염증성 치은 사이에는 유사한 발현 정도가 관찰되었다. 염증 반응에서, MMP-14의 수준이 증가되면, TIMP 수준도 증가되지만, 제2형 당뇨병 환자의 염증성 치은의 경우, MMP-14 발현 정도는 TIMP의 발현 정도와 비례하지 않았다. 제2형 당뇨병 환자의 만성 치주염 부위의 염증성 치은에서, group 2와 group 3 사이에 유의한 차이는 없었다.

TIMP-1은 당단백질이고, 대식세포 뿐 아니라 대부분의 결합 조직 세포에 의해 합성되고 분비된다. 또한, 이것은 혈소판 내 과립에 존재하며, 대부분의 체액에서 확인될 수 있다. 인간 TIMP-1의 아미노산 서열은 중을 넘어 널리 보존되어 있고, 이것은 MMPs의 활성 형태와 높은 친화력을 가지고, 본질적으로 비가역적인 비-공유 복합체를 형성한다³⁷⁾. Drouin 등⁴⁵⁾은 건강한 대조군의 타액에서 TIMP-1과 간질성 collagen 분해 효소의 존재와 이하선과 악하선의 타액에서 TIMP의 존재를 탐지하였다. 세포 배양에서 결합 조직 세포에 의해 MMPs와 TIMPs의 발현은 많은 cytokines(특히 IL-1), 성장 인자 그리고 호르몬들에 의해 조절된다³²⁾. 이번 결과에서 건강한 성인의 일반적인 염증성 조직과 비교하여 당뇨병을 동반한 경우 조직 내 TIMP 생산 능력의 감소와 다른 염증 기전이 있을 것으로 추측된다.

PGE₂, MMP-14 그리고 TIMP-1 사이의 상호 관계에서, PGE₂와 MMP-14의 발현은 제2형 당뇨병을 동반한 만성 치주염에서 증가하는 경향을 보였고,

TIMP-1의 발현은 group 2에서 보다 group 3에서 더욱 증가하였지만, PGE₂, MMP-14 그리고 TIMP-1 사이에 유의한 상호 관계는 관찰되지 않았다 ($P>0.05$). 제2형 당뇨병을 동반한 만성 치주염 환자의 염증성 치은에서, PGE₂와 MMP-14 발현의 증가에도 불구하고, TIMP-1의 발현은 전신적으로 건강한 환자와 당뇨병 환자의 만성 치주염 부위 염증성 치은에서 서로 다르지 않았다. 이것은 제2형 당뇨병을 동반한 만성 치주염 부위에서 더욱 높은 염증 반응이 있음을 추측하게 한다.

따라서, 이러한 결과에 대한 몇 가지 가능한 이유가 제안된다. 먼저, 순환하는 TIMP-1에 대한 항체 군성 치주 치료의 효과와 제2형 당뇨병 환자의 당화된 혈색소(hemoglobin) 수준 그리고 Hayakawa 등³³⁾에 의한 다른 연구들에 따르면, 순환하는 TIMP-1 자체는 매우 낮았다. 그래서 각 군 사이에서 TIMP-1에 대한 차이가 PGE₂와 MMP-14의 발현에 단독으로 영향을 미칠 만큼 유의하게 충분하지 못하였음이 제안될 수 있다.

두 번째, MMPs의 합성과 활성에서의 변화들은 시간에 의존적인 것으로 생각할 수 있다. 단핵구 또는 지방 세포에 의해 생산된 TIMP-1이 염증의 초기 단계에서 활성화된 목표 세포들에 역할을 한 후, 후기 단계에 나타나는 면역 세포 또는 TIMP-1에 의해 활성화된, 다른 치은 조직 내 상주 세포가 MMPs를 생산하기 시작하였을 수 있다.

세 번째, TIMP-1의 농도가 각 군 사이에 MMP 발현의 차이를 보일 만큼 충분하지는 않았지만, 염증 부위에서 TIMP-1에 대한 목표 세포들은 대조군과 비교하여 치주염 군에서 높았고, 이것은 활성화의 기회를 증가시켰을 것이다⁸⁾.

네 번째, MMPs의 활성은 유전자 발현, 활성화를 요구하는 전효소(pro-enzymes)의 분비 그리고 TIMPs에 의한 억제를 포함한 몇 가지 수준에서 밀접하게 조절된다^{34,35)}.

결론적으로, MMP-14와 TIMP-1이 염증조직에서 증가하는 양상을 보였으며, PGE₂와 MMP-14가 제2형 당뇨병 환자의 만성 치주염 진행과정에서 치조골

흡수의 부분적인 기여 인자로서 역할을 하는 것으로 생각된다.

마지막으로, 높은 수준에서 치주 질환의 치조골 흡수 과정에 영향을 미치는 다른 cytokines과 MMPs 사이의 상호 관계와 그 영향에 대한 좀 더 많은 연구가 필요한 것으로 사료된다.

V. 참고문헌

1. Emrich LJ, Shlosman M and Genco RJ. Periodontal disease in non-insulin dependent diabetes mellitus. J Periodontol 1991; 62:123-129.
2. Taylor GW, Burt BA, Becker MP et al. Non-insulin dependent diabetes mellitus and alveolar bone loss progression over 2 years. J Periodontol 1998;69:76-83.
3. Collin H-L, Uusitupa M and Niskanen L. Periodontal findings in elderly patient with non-insulin dependent diabetes mellitus. J Periodontol 1998;69:962-966.
4. Salvi GE, Yalda B, Collins JG. Inflammatory Mediator Response as a Potential Risk Marker for Periodontal Diseases in Insulin-Dependent Diabetes mellitus patients. J Periodontol 1997;68:127-135.
5. AAP Position Paper. Diabetes and periodontal disease. J Periodontol 1999;70:935-949.
6. Bissada NF, Manoucher-Pour M, Haddow M and Spagnulo PJ. Neutrophil functional activity in juvenile and adult onset diabetic patients with mild and severe periodontitis. J Periodont Res 1982;17:500-502.
7. Page RC and Schroeder HE. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. Lab Invest 1976;34:235-249.
8. Zhong Y, Slade GD, Beck JD, Offenbacher S. Gingival crevicular fluid interleukin-1beta, prostaglandin E2 and periodontal status in a community population. J Clin Periodontol 2007;34(4):285-93.
9. Offenbacher S, Heasman PA, Collins JG. Modulation of host PGE₂ secretion as a determinant of periodontal disease expression. J Periodontol 1993;64:432-444.
10. Matejka M, Ulm C, Nell A et al. Stimulation of PGI₂ synthesis in the periodontal tissue by interleukin -1α and -1β. Adv Exp Med Biol 1997;433:443-446.
11. Noguchi K, Shitashige M, Ishikawa I. Involvement of cyclooxygenase-2 in interleukin 1α-induced prostaglandin production by human periodontal ligament cells. J Periodontol 1999;70:902-908.
12. O'Neill GP, Ford-Hutchinson AW. Expression of mRNA for cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human tissues. FEBS Lett 1993;330:156-160.
13. Ryan EM and Golub LM. Modulation of Matrix metalloproteinase activities in periodontitis as a treatment strategy. Periodontology 2000 2000;24:226-238.
14. Birkedal-Hansen H. Role of Matrix Metalloproteinases In Human Periodontal Diseases. J Periodontol 1993;64:474-484.
15. Chang Y-C, Yang S-F, Lai C-C, Liu J-Y and Hsieh Y-S. 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.
16. Uitto VJ, Overall CM and McCulloch C. Proteolytic host cell enzymes in gingival crevice fluid. Periodontology 2000 2003;31: 77-104.
17. H. Sato, T. Takino, Y. Okada et al. A ma-

- trix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells, *Nature* 1994;370:61–65.
18. M. Seiki. The cell surface: the stage for matrix metalloproteinase regulation of migration, *Curr. Opin. Cell Biol.* 2002;14:624–632.
 19. R. Achong, I Nishimura, H. Ramachandran et al. Membrane Type(MT)1–matrix metalloproteinase(MMP) and MMP–2 expression in ligature–induced periodontitis in the rat. *J Periodontol* 2003;74:494–500.
 20. Erwin van der Zee, Everts V and Beertsen W. Cytokines modulate routes of collagen breakdown. *J Clin Periodontol* 1997;24:297–305.
 21. Kang MG, Cha HG, Song SH et al. MMP–2, MMP–8 Expression in gingival tissue of chronic periodontitis associated to Type 2 Diabetes Mellitus. *Journal of Korean Academy of Periodontology* 2005;35:661–674.
 22. Cho JY, Xing S, Liu X et al. Expression and activity of human Na⁺/I[–] symporter in human glioma cells by adenovirus–mediated gene delivery. *Gene Therapy* 2000;7: 740–749.
 23. Offenbacher S, Odle BM, Van Dyke TE. The use of crevicular fluid prostaglandin E2 levels as a predictor of periodontal attachment loss. *J Periodont Res* 1986;21:101–112.
 24. Birkedal–Hansen H. Role of cytokines and inflammatory mediators in tissue destruction. *J Periodont Res* 1993;28:500–510.
 25. Mundy, GR. Inflammatory mediators and the destruction of bone. *J Periodont Res* 1991; 26:213–217.
 26. Socransky SS, Haffajee AD, Goodson JM, Lindhe J. New concepts of destructive periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1984;11: 21–32.
 27. Golub LM, Lee HM, Lehrer G. Minocycline reduces gingival collagenolytic activity during diabetes. Preliminary observations and a proposed new mechanism of action. *J Periodont Res* 1983;18:516–526.
 28. Trengove NJ, Stacey MC, MacAuley S et al. Analysis of the acute and chronic wound environments: the role of proteases and the inhibitors. *Wound Repair Regeneration* 1999; 7:442–52.
 29. Ohuchi E, Imai K, Fujii Y et al. Membrane type–1 matrix metalloproteinase digests interstitial collagens and other extracellular matrix macromolecules. *J Biol Chem* 1997;272:2446–2451.
 30. Knauper V, Will H, Lopez–Otin C et al. Cellular mechanisms for human procollagenase–3 (MMP–13) activation. Evidence that MT1–MMP (MMP–14) and gelatinase A(MMP–2) are able to generate active enzyme. *J Biol Chem* 1996;271:17124–17131.
 31. Drouin L, Overall CM, Sodea J. Identification of matrix metalloproteinase inhibitor (TIMP) in human parotid saliva : partial purification and characterization. *J Periodont Res* 1988;23:370–377.
 32. Nagase H, Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999;274: 21491–21494.
 33. Hayakawa H, Yamashita K, Ohwaki K. Collagenase activity and tissue inhibitor of metalloproteinases–1(TIMP–1)content in human whole saliva from clinically healthy and periodontally diseased subjects. *J Periodont Res* 1994;29:305–308.
 34. Ryan ME, Ramamurthy NS, Sorsa T, Golub LM. MMP–mediated events in diabetes. *Ann NY Acad Sci* 1999;873:311–314.

35. Choi DH, Moon IS, Choi BK et al. Effects of sub-antimicrobial dose doxycycline therapy on crevicular fluid MMP-8 and gingival tissue MMP-9, TIMP-1 and IL-6 levels in chronic periodontitis. *J Periodont Res* 2004;39:20-26.

The Influence of Diabetes on of PGE₂, MMP-14 and TIMP Expressions in Human Chronic Periodontitis

Seon-Woo Kim, Jin-Woo Park, Jo-Young Suh, Jae-Mok Lee*

Department of Periodontology, School of Dentistry, Kyungpook National University

Purpose: The purposes of this study were to compare and quantify the expression of PGE₂, MMP-14 and TIMP-1 in the gingival tissues of patients with type 2 diabetes mellitus and healthy adults of chronic periodontitis with alveolar bone resorption.

Materials and Methods: Gingival tissue samples were obtained during periodontal surgery or tooth extraction. According to the patient's systemic condition & clinical criteria of gingiva, each gingival sample was divided into three groups. Group 1 (n=8) is clinically healthy gingiva without bleeding and no evidence of bone resorption or periodontal pockets, obtained from systemically healthy 8 patients. Group 2 (n=8) is inflamed gingiva from patients of chronic periodontitis with alveolar bone resorption. Group 3 (n=8) is inflamed gingiva from patients of chronic periodontitis with alveolar bone resorption associated with type 2 diabetes. Tissue samples were prepared and analyzed by Western blotting. The quantification of PGE₂, MMP-14 and TIMP-1 were performed using a densitometer and statistically analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey test.

Results: The expressions of MMP-14 and TIMP-1 were showed increasing tendency in group 2 & 3 compared to group 1. The expressions of PGE₂, MMP-14 were showed increasing tendency in group 3 compared to group 1 and group 2. According to MMP-14 levels were increasing, PGE₂ showed increasing tendency in group 3, and although PGE₂, MMP-14 levels were increasing, TIMP-1 levels were similar expressed comparing to group 2.

Conclusion: In conclusion, this study demonstrated that the expression levels of MMP-14 and TIMP-1 had increasing tendency in inflamed tissue. It can be assumed that PGE₂ and MMP-14 may be partly involved in alveolar bone resorptive process and the progression of periodontal inflammation associated to type 2 DM.

Key words : PGE₂, MMP-14, TIMP-1; DM