염증성 치은조직과 치주인대세포에서 Cytokine에 의해 유도되는 열충격단백 발현에 관한 연구

조인호 · 김덕규 · 김은철* · 유형근 · 신형식

원광대학교 치과대학 치주과학교실
원광대학교 치과대학 구강병리학교실*

I. 서론

치주염과 같은 치주질환에서는 다형핵백혈구, 대식세포, 임파구 등의 여러 면역세포들이 급만성 염증과정에서 각기 독립적이거나 상호복잡한 관계로 숙주 반응을 매개하므로 치주질환의 활성기 동안 정상적인 숙주 방어기전을 이해하는 것이 필요하다.

열충격단백(Heat shock Protein: HSP) 또는 스트레스 단백은 세포가 여러 다양한 자극에 노출될 때 생성되어지는 일종의 단백질이다[1-6]. 1962년 Ritossa[7]가 Droshophila에 고온을 처리했을 때 염색체 puffing이 일어나는 것을 관찰한 이후 Tissieres등[8]은 고온에 의해 유도된 염색체의 Puffing은 열충격단백이라는 특수한 단백질의 합성과 관계 있다는 것을 밝혀냈다.

열충격단백은 온도가 갑자기 상승했을 때 세포에서 합성되어지는 단백질로 생각되었으나 그후 고온 이외에도 비소와 같은 에너지 대사의 억제제, oxygen-free radicals, 자외선 조사, 알콜, adriamycin과 같은 화학요법에 사용하는 약제들, 바이러스 감염, interleukin-2등이 열충격단백을 합성할 수 있는 자극으로 밝혀짐에 따라 스트레스 단백이란 용어가 도입되었다[9].

세포내 열충격단백질의 생물학적인 역할은 아직 명확하지 않은데 이들의 기능 중의 하나로 스트레스에 의해 손상된 단백질을 안정화시키는 작용을 한다고 제시되고 있다[10-15]. 또한 열충격단백질은 면역반응과도 밀접한 관계를 가지고 있는 것으로 보고되었는데, interleukin-2나 interferon과 같은 사이토카인이 열충격단백을 유도하거나 조절할 수 있으며[16-17], 일부 병원균의 숙주 침입시 발생하는 열충격단백을 항원으로 인지하는 많은 항체와 T림프구를 유도해 내기도 한다는 연구[18]가 이를 뒷받침 하고 있다. 또한 자가면역질환과의 관련 가능성 또한 높아 전신성 홍반성 낭창의 경우 열충격단백에 대한 자가항체가 검출되기도 한다[19-20].

열충격 단백의 염증반응과 관계에서 염증에 의한 고온 또는 열 자체가 면역반응을 조절하여 높은 온도에 이른 상태의 동물이나 생체에서 열충격단백이 합성된다고 하였다[21]. Polla[9]에 의하면 발열은 염증의 주요한 증상으로 류마치스 관절염이 있는 관절부위에서 열충격단백 합성이 유도된다고 하였다. 또한 열충격단백의 합성은 염증반응시 조직손상에 관여하는 oxygen free radical에 의하여 유도

되는데, 세포가 oxygen free radical과 같은 환경적 스트레스 뿐 아니라 상승온도에 노출되었을 때 살아남기 위하여 열충격단백이 필수적이라고 보고되고 있다[9].

열충격에 의해 유도되는 포유동물의 단백질은 대략적인 분자량에 따라 ubiquitin, 열충격단백 60족, 열충격단백 70족 및 열충격단백 90족 등으로 분류되고 있다. 관절염환자의 연골세포에서 열충격단백 70이 발현되었으며[22] 열충격단백 중 가장 많이 연구되고 있다[21]. 열충격단백 70족은 세포내에서 단백질의 folding과 assembly를 매개하며 단백질의 변성을 방지시키거나 변성된 단백질을 재생하는데 관여한다고 보고되고 있다[23].

열충격단백 47은 47 kDa의 인산화된 collagen-binding membrane glycoprotein 으로서[24] 치과영역에서는 장골 및 구치에 열충격단백 47이 발현된다는 보고가 있었다[25].

교원질이 치근막에서 중요한 단백이고 열충격단백 47이 교원질 결합 단백이므로 만성 치주염의 회복 또는 재생에 관여할 수 있는 것으로 보고있기 때문에 스테레스 단백의 방어기작으로 세포손상을 조절하는 분야가 관심의 대상이 되고 있다. 구치부 맹출시 procollagen I 생성에 열충격단백 47이 관여한다는 Shroff[25]의 연구와, 실험관내에서 고온이나 비소투여시 열충격단백이 치주인대세포에서 생성된다는 Suak[26-27]연구가 있었을 뿐 생체 및 cytokine에 의해 치주인대세포에서 열충격단백의 역할은 연구된 바가 거의 없었다.

치주인대에는 섬유모세포, 조골세포, 파골세포, 조백악세포 및 그 전구세포들이 다양한 분화정도로 혼합되어 있고[28], 치근막에서 유래한 섬유모세포는 외과적 혹은 병리적 손상후, 재생이나 수복하기 위해 특정 단백성분을 합성하고 증식하는 것으로 보고되고 열충격단백은 생체내 열 발생시 합성되는 것으로 보아 염증반응과 관련이 있는 것으로 연구되고 있으나[29] 치주조직 내에서 열충격단백 발현양상에 관한 연구는 아직까지 미비한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 임상적으로 건강한 치은조직과 염증성 치은조직을 외과적으로 절제하여 열충격단백 47, 열충격단백 70의 발현분포 및 정도에 대해 면역조직화학적으로 알아보며 in vitro에서는 치주인대세포를 배양하여 여러가지 cytokine을 투여시 Western blot으로 열충격단백이 발현되는 차이를 분석하여 치주질환에서의 생물학적 관계를 규명하고자 하였다.

II. 연구 방법

1. 치주조직에서 열충격단백 발현조사

(1) 연구대상

원광대학교 치과병원 치주과에 내원한 환자를 대상으로 건강치은군과 염증성 치은군으로 분류하였으며 건강조직은 다음의 임상적 기준을 만족하는 10명의 검체 부위에서 임상치관 확장술을 통해 치은을 절제하였다.

1. 감지할 수 있는 세균성 치태축적이 없는 경우.
2. 3mm 이하의 치주낭 탐침깊이.
3. 탐침시 출혈 또는 화농의 소견이 보이지 않는 경우.

또한 30명의 성인형 치주염 환자의 생검 조직은 임상적으로 심한 염증의 소견을 보였고, 방사선 사진상 명백한 골소실의 증거와 4mm 이상의 부착 소실을 보이는 부위의 조직을 modified Widman flap operation 도중에 절제하였으며 최근 6개월 이내에 치주치료를 받은 경험이 없는 환자를 대상으로 하였다. 염증성 치은군의 연령은 39세-62세(평균 48.5세)로 남성이 20명, 여성이 10명 이었으며 건강한 치은군의 연령은 21세-33세(평균 25.8세)로 남성이 7명, 여성이 3명 이었다.

(2) 조직절편제작

염증성 및 건강 치은은 치간유두와 치주낭 직하부를 포함하여 최소 0.2×0.2cm이상의 크기로 치근면에 수직으로 절제한 다음, 절제된 치은조직을 10% paraformaldehyde를 함유하고 있는 phosphate buffered saline(PBS)의 고정액에 담그어 24시간 실온에서 유지하였다. 고정 후 치은표본들을 ethanol과 xylene의 graded solution에서 탈수시키고 통법에 따라 paraffin wax에 포매시켰다. Paraffin wax에 포매된 조직은 4-5㎛두께의 절편으로 잘라 Probeon plus slide위에 4℃에서 보관하였다.

(3) 면역조직화학염색

염색은 슬라이드를 맞대어서 생기는 capillary gap action의 원리를 이용한 microprobe system(Fisher Scientic)을 이용하여 실시하였다. 염색 순서는 Paraffin으로 포매된 절편들을 xylene으로 탈파라핀화 시켰으며 증류수로 재수화하였고 내인성 peroxidase에 의한 반응을 피하기 위해 절편들을 실온에서 15분 동안 3% H_2O_2 수용액으로 반응시킨 후 tris-buffered saline(TBS)로 5분동안 세척하였다.

blocking serum으로 정상 토끼 혈청을 10분간 적용시켰다. HSP 47(StressGen, USA)은 1/150, HSP 70(Santa Cruz, USA)은 1/60로 희석해 일차항체를 30분간 반응시킨 다음 TBS로 5분 동안 3회 세척한 후에 link antibody(anti-mouse IgG, Dako, USA)를 10분간 반응시켰다. 그 후 streptavidine alkaline phosphatase로 10분간 반응시킨 후 aminoethyl carbazole(AEC)로 발색시키고 Harrison hematoxylin으로 대조 염색하여 glycerin으로 도포 후 검경하였다.

(4) 조직학적 관찰 및 계측

염색된 조직표본에서 각각의 항체에 대한 양성반응을 상대적인 발현 정도에 따라 양성세포들이 전체세포중 60%이상, 30-60%, 5-30%, 그리고 5%미만이 양성으로 염색되었을 때 각각 심도(+++), 중등도(++), 경도(+), 경미(±), 음성(-)으로 구분 하였으며, 상피에서는 기저층, 상기저층, 유극층, 천층의 4층으로 분류하였고 혈관 내피층과 결체조직의 단핵세포를 대상으로 판정하였다.

2. 치주인대세포에서 cytokine에 의한 열충격단백의 발현조사

(1) 치주인대세포의 배양

치주인대세포의 배양을 위해 본 연구에서의 결체조직은 교정 목적으로 발치를 시행한 소구치나 제3대구치의 건강한 치주인대를 절제하여 얻었다. 발치에 앞서 치은의 건강 상태는 임상 및 방사선적으로 평가되었는데, 임상적으로 치태지수, 치은지수 및 부착상실을 평가하여 치태 및 치은 지수가 1 이하이고 부착상실이 3mm 이하인 경우를 선택하였다. 한편 방사선 사진상으로 치조골의 소실이나 치근단병소가 없는 치아이며 치아우식 또한 없는 경우를 선택하였다. 발치한 치아로부터 절제한 치은조직과 치근의 중간 1/3부위에서 절제한 치주인대 조직을 40% 우태아혈청 (fetal bovine serum, Gibco, USA)과 20% 항생제(penicillin G, streptomycin, amphotericin B 포함, Gibco, USA)를 가한 D-MEM(Minimal Essential Medium, Gibco, USA)로 3회 세척하였다. 치주인대 조직을 세척한후 60mm 세포배양용 배양접시(Nunc, USA)로 옮겨 약 1mm^{2}로 세절하였다. 세절한 조직은 20 분간 37도 5% CO_2, 습도 100% 배양기(Bantex 1820IR, Shel-lab, USA)에서 배양접시에 고르게 부착이 되도록 배양시킨 후, 각 배양접시당 2ml의 10% 우태아혈청과 1% 항생제를 첨가한 D-MEM을 가하고 단일 세포층이 형성될 때까지 3일 간격으로 배양액을 교환하였다.

3일간 배양 후 배양접시 내의 배양액을 제거하고 HBSS(Hank's balanced salt solution, Gibco co. USA)로 2회 세척하여 부착되지 않은 세포를 제거하였다. 부착된 세포의 분리를 위해 HBSS를 제거한 후 0.25 % trypsin/EDTA(10x, Gibco co., USA)를 배양접시당 2ml씩 넣고, 3분간 bench 상에 방치한 후 피펫을 이용하여 배양접시에 부착된 부착세포를 분리시키고 5ml 원심분리용 시험관으로 옮겨서 1200rpm으로 10분간 원침하였다. 원침 후 상청액을 제거하고 HBSS를 가하여 세척한 후 Vortex mixer로 혼합하고 세포부유액을 만들어 60mm 배양접시에 분주하였다.

배양액은 세포의 충분한 증식이 명확히 나타날 때까지 2일 혹은 3일 간격으로 교환하였다. 모든 세포들은 섬유모세포의 형태 및 증식율을 보였고, 본 실험에서는 5회 내지 8회 계대배양한 치주인대세포를 이용하였다.

(2) Cytokine 투여

5-8회 계대 배양된 치주인대세포를 60mm dish에 분주하기 전 trypan-blue로 염색한 후 hemocytometer에 옮겨 도립현미경 상에서 세포수를 세어서 dish당 200,000개의 세포수로 부착이 되도록 분주하고 배양을 실시하였다.

cytokine에 의해 열충격단백이 유도되는지를 확인하기 위해 2일간 배양한 후 치주인대세포에 recombinant-interleukin gamma(100U/ml, Sigma Co), TNF-alpha(1ng/ml, Genzyme, USA), LPS(1㎍/ml, Sigma, USA) 단독 및 이들의 혼합투여를 하고 1일간 배양하였다.

(3) western blotting

각각의 cytokine을 투여한 실험군 및 대조군에서 TRI reagnet(Montgomery, USA)로 단백질을 추출한 후 Lowey 방법으로 단백질을 정량분석한 후 SDS-PAGE와 Western blotting에 사용하였다.

protein standard marker(Biorad, USA)와 단백질에 동량의 loading buffer를 첨가하고, 95°C에서 denaturation시켜서 8% SDS-PAGE를 사용하여 전기영동한 후 coomassie brillant blue 염색을 시행하였다. 전기영동한 gel을 nitrocellulose membrane(Millipore, USA)에 이전시켜서, 3% skim milk에 한 시간 동안 blocking 한 후 HSP 47(StressGen, USA)과 HSP 70(Santa Cruz, USA)을 각각 1:200으로 희석한 후 90분간 반응시켰다. 그후 이차항체(alkaline-phosphatase conjugated anti-rabitt Ig G, Sigma Co)를 1시간 반응시켜 ECL (Amersham, USA) chemiluminence detection kit를 이용하여 탐지하였다.

III. 연구성적

1. 염증성 치은과 건강치은에서 열충격단백 47과 열충격단백 70의 발현

(1) 열충격단백 47의 발현

1) 치은상피

건강한 치은에서의 열충격단백 47은 기저층에서 약한 발현을 보이고 그 외의 다른 층에서는 거의 발현되지 않았다(사진 1). 반면에 염증치은에서는 기저층과 상기저층 그리고 유극층에서 건강치은에 비하여 더 많은 발현을 보였다(사진 2).

2) 모세혈관 내피세포

임상적으로 건강 치은의 내피세포에서 열충격단백 47의 발현은 대체적으로 경미하게 나타났으며 염증성 치은조직에서는 열충격단백 47의 더 많은 발현이 관찰되었다. 특히 내피층과 모세혈관의 lumen에서 주로 열충격단백 47의 발현이 관찰 되었다(사진 3, 4).

3) 단핵세포

건강치은의 염증세포에서는 열충격단백 47

의 발현을 거의 볼 수 없었으나 염증성 치은 조직의 발현률은 사진 5, 6처럼 크게 증가하였으며 양성반응이 혈관내피층에 인접하여 나타났다.

(2) 열충격단백 70의 발현

1) 치은 상피

열충격단백 70은 건강치은과 염증성 치은 상피 대부분에서 거의 발현되지 않아(사진 7, 8), 염증세포 침윤정도에 따른 상피에서의 열충격단백 70 발현차이는 없었다.

2) 모세혈관 내피세포

건강치은의 내피세포 및 모세혈관 내강에서 열충격단백 70 발현은 거의 볼 수가 없었고, 심한 성인형 치주염 치은에서는 사진 8에서처럼 모세혈관이나 혈관내피에서 발현이 거의 없었으나 중등도나 경도의 염증세포 침윤의 경우에는 사진 9, 10에서처럼 혈관내피세포와 혈관 내강에서 강양성의 발현을 보였고 사진 11, 12에서 처럼 주로 출혈소가 있는 부위에서만 발현을 보여 열충격단백 47과 차이가 있었다.

3) 단핵세포

염증성 단핵구 세포들에서 열충격단백 70은 건강 및 염증성 치은에서도 발현이 되지 않았다(사진 8, 10).

2. 치주인대세포에서 Cytokine처리에 따른 열충격단백 47과 열충격단

표 1 Antibody reaction to HSP47 in healthy and inflammed gingiva

	Epithelium				Endothelium	Mononuclear cell
	BA	SU	SP	SF		
Healthy gingiva	±	−	−	−	+	+
Inflammed gingiva	++	+	+	±	+++	++

BA : basal layer, SU : suprabasal layer, SP : spinous layer, SF : superficial layer
− : negative, ± : rare, + : mild, ++ : moderrate, +++ : intense

표 2 Antibody reaction to HSP 70 in healthy and inflammed gingiva

	Epithelium				Endothelium	Mononuclear cell
	BA	SU	SP	SF		
Healthy gingiva	±	±	±	±	±	±
Inflammed gingiva	±	±	±	±	++	±

BA : basal layer, SU : suprabasal layer, SP : spinous layer, SF : superficial layer
− : negative, ± : rare, + : mild, ++ : moderrate, +++ : intense

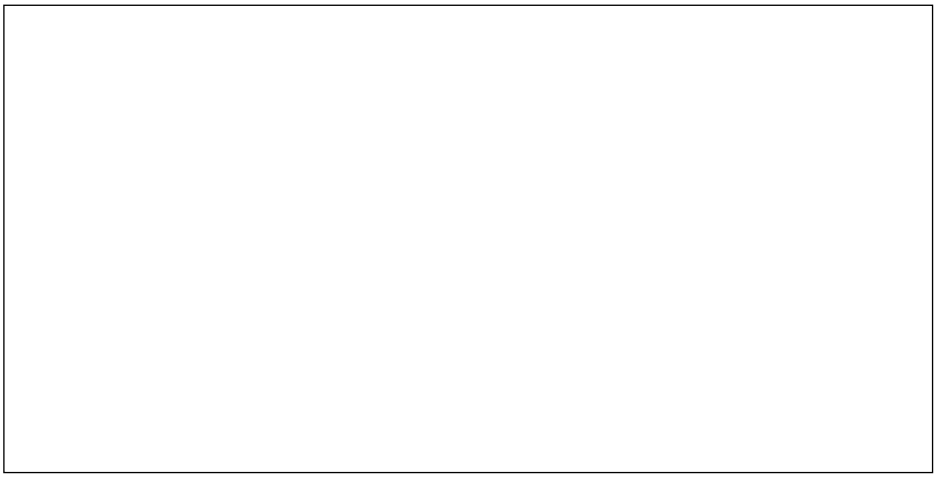


그림 1 HSP 47 protein expression in periodontal ligament cells by cytokine treatment
Cells are treated with TNF-a(1ng/ml), IFN-r(200U/ml), LPS(10ng/ml), combination of TNF-a+IFN-r+LPS

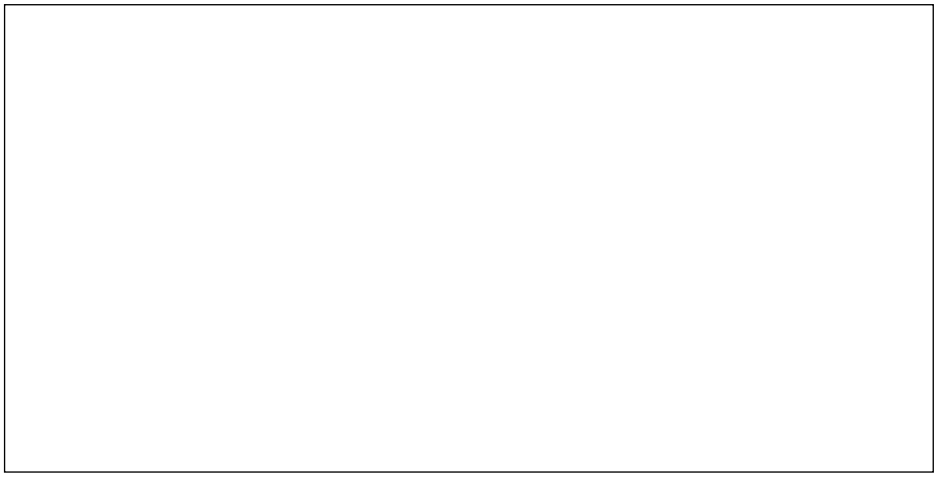


그림 2 HSP 70 protein expression in PDL cells by cytokine treatment

치주인대세포에 TNF-α(1ng/ml), IFN-γ(200U/ml), LPS(100μg/ml), cytokine 3가지의 combination을 처리하여 단백질을 분리한 후 Western blot analysis에 따른 열충격단백 47 발현의 경우 cytokine을 처리하지 않은 대조군은 47kDa 의 단일 band로 관찰되었고(그림 2) cytokine을 처리한 TNF-α(1ng/ml), IFN-γ(200U/ml)군은 대조군과 큰 차이가 없었으나, LPS(100μg/ml)투여군과 3가지 cytokine 복합투여군의 경우 대조군에 비해 열충격단백 발현증가가 관찰되었다.

열충격단백 70 단백발현은 cytokine을 처리하지 않은 대조군과 TNF-α(1ng/ml) 군은 단백질 발현이 거의 없었으나 IFN-γ(200U/ml) 투여군과 LPS(100μg/ml)투여군에서는 70kDa의 band가 검출되었으며 3가지 cytokine의 혼합투여군은 가장 많은 발현을 보여 상승 효과를 나타내었다.

Ⅳ. 총괄 및 고찰

생명체에는 환경의 갑작스러운 변화에 대응하는 방어체계들이 있으며, 이와 관련된 열충격단백은 진화적으로 보존적이어서[30], 생명체의 유지에 중요한 역할을 할 것이라는 것을 암시한다. 열충격반응은 미생물뿐만 아니라 동식물에서도 열에 대한 내성을 갖게하여 고온에 대해 생존률을 높일 수 있게 해주는데 이 내성의 물리적 기초에 대해서는 아직 명확히 밝혀져 있지 않으나 고온 스트레스에 의해 세포의 활성이나 구조가 변화되어 고온에서 방어가 유지되는 동안 RNA splicing의 방해, 단백질 합성 활성의 상실, 열충격단백 70이 핵내외로 이동 등이 관찰되었다[9, 31].

이러한 열충격단백을 유도할 수 있는 많은 조건중에서 한냉충격 역시 Drosophila[12], Escherichia coli[13], yeast[14], Sarcophaga Crassipelpis[32]에서 스트레스 단백질 또는 한냉충격단백질의 합성을 유도할 수 있는 것으로 밝혀졌고 최근 인체 세포에서 한냉충격이 열충격단백을 유도할 수 있는 지에 대한 실험이 시도되고 있다[33]. 열충격단백 유전자를 활성화시키는 유도인자들은 크게 두가지군으로 나뉜다.

즉 에타놀이나 아미노산 유사체, puroruycin을 포함하는 첫 번째 군은 새로 생성되는 단백질의 이상을 유발하고, heat shock, 중금속, 저산소증, ammonium chloride, ionophore, hyd-rozylamine 등을 포함하는 두 번째 group은 기존의 단백질에 변성을 초래하는 것으로 알려져있다[34]

원핵과 진핵세포는 스트레스 단백을 합성하고 정상 단백의 Post-translation합성을 방해하는 열과 다른 환경적 스트레스에 반응한다[35-36]. 이런 반응은 외상시 세포내 항상성을 유지시킬때 반드시 나타나며[37], 스트레스 단백은 열보다는 다른 다양한 요인에 의해 유도되는데 in vivo ischemia와 염증 등에 의해 나타난다[38].

열자체가 면역반응을 조절하고 스트레스 단백의 합성이 oxygen free radicals, cytokine 그리고 immune mediator에 의해 영향 받는데[29], 치주질환같은 염증조직에서도 조직을 보호할 가능성이 있다고 보고되고 있다[37]. 그러나 생체내 연구 즉 성인형 치주염 및 건강치은에서 열충격단백 발현에 대한 연구는 극히 미미하여 특히 in vivo와 in vitro연구를 동시에 행한 연구는 거의 없는 실정으로 본연구에서는 heat shock반응에 관련된 세포 반응과 열충격단백 보호체계에 관한 이해를 하여 염증성 또는 산화적 손상에 대한 새로운 연구에 기초가 될 것으로 사료되어 translation level에서 열충격단백의 변화를 추적하고자 하였다.

열충격단백 유전자의 기능에 대해서 일반적으로 받아들여지고 있는 것은 'chaperone'기능으로써, 자극을 받지 않은 세포에서는 새로운 단백질이 합성되면서 생긴 미성숙 폴리펩티드가 제대로 형태를 형성하도록 하거나, 중합체를 이룰 수 있도록 유지시키거나 다른 구조적인 개조에 필요한 효소반응을 위해 더 이상의 접힘을 막고있다가 ATP를 사용해 분리되면서 기능성이 있는 정상적인 단백질을 형성하도록 한다. 또한 스트레스상태나 심하게 손상받은 단백질이 세포내의 단백질 분해체계의 작용을 받도록 도와서 비정상 단백질을 없애는데 필요하다는 것이다[39].

Polla[40]에 의하면 발열은 염증의 주요한 임상 증상으로 류마티스 관절염이 있는 관절부위나 염증부위에서 열충격단백 합성이 유도된다고 하였고 열충격단백의 합성은 또한 병원성 개체에 대하여 최전방 방어의 역할을 하나, 염증 반응시 조직손상에 관여하는 oxygen free radical에 의해서도 유도된다. 열충격단백의 정확한 기능이 완전히 밝혀진 것은 아니지만 세포가 oxygen free radical과 같은 환경적 스트레스뿐만 아니라 상승온도에 노출되었을 때 살아남기 위하여 열충격단백

이 필수적이라고 보고되고 있다[40].

열충격단백은 여러종류가 존재하는데 분자량에 따라 명명되었고 진핵생물에서의 경우 열충격단백 110, 열충격단백 95, 열충격단백 84, 열충격단백 70, 열충격단백 60 등이 있다. 열충격단백 47은 47kDa의 분자량을 가지며 인산화된 단백으로 collagen-binding membrane glycoprotein이다. 열충격단백 47의 합성은 Rous sarcoma virus에 의해 형질전환된 닭배아 섬유아세포에서 감소하고 전사이후 단백의 인산화 정도는 증가한다고 알려져 있다[24]. 또한 단백의 농도는 retinoic acid와 dibutylcyclic AMP를 가한후 mouse의 teratocarcinoma세포에서 뚜렷히 증가한다고 보고되었다[41].

열충격단백 47은 드문 염기성 등전위점을 가지며[24], 세포외 기질에 부착하는 유일한 단백이라는 점에서 다른 stress protein과는 다른데, 변성된 type I & II collagen과 원형인 I & IV collagen에 부착한다고 한다[24, 41]. 따라서 치주조직에서 교원질은 중요한 단백질이고 열충격단백 47은 만성치주질환, 재생, 재건에 관여할 수 있어 스트레스반응에 대한 세포학적 사건에 대한 보다 심도있는 연구가 세포손상의 조절을 하는데 큰 도움을 줄것으로 사료된다.

인간 치주인대세포에서 Sauk[24, 41]등은 43°C의 열, sodim arsenite 등에 의해서 열충격단백 47이 발현되며 치주질환같은 염증시 조직보호 역할을 할 수 있다고 보고하였는데 열충격단백 47이 사진 1과 사진 2에서처럼 면역조직화학염색에 따라 주로 건강치은의 상피기저층에서 나타났다. 그러나 염증성 치은에서는 건강한 치은과 비교할 때 발현정도나 분포에서 다른 발현양상을 보이는데 중등도 발현을 보이는 기저층은 물론 상기저층과 유극층에서도 강한 염색 반응이 관찰되었다.

치주조직에서 치은 혈관계(gingival vasculature)의 역할은 영양, 치은 열구액의 형성, 염증 등의 관점에서 인식되어 왔으며 염증에 관여하는 혈관에 의하여 변화가 일어난다. 특히 열구상피와 접합상피 하방에서 확장된 혈관과 염증세포들의 밀접한 관계에 대한 연구가 보고 되고있다[42].

열충격단백 47의 기능중 하나는 세포성 스트레스의 발현지표로 볼 수 있어 면역염색에 따라 상피층에서 열충격단백 47이 발현한다는 것은 접합상피를 통하여 치은열구로 백혈구가 이주함을 의미한다. 다시말하면 열충격단백 47은 치은의 혈관내피를 통한 백혈구 이주뿐 아니라 치은열구내에 있는 상피를 통한 이주에도 관여하여 치주질환에 대한 국소적인 방어벽을 이루고 있으며 이와같은 이유로 건강 치은조직과 비교할 때 염증성 치은조직에서 염증세포와 열충격단백 47의 활발한 상호작용에 의해 더욱 강한 반응이 나타난다고 생각된다.

Cytokine은 면역체계와 관련된 세포들에 의해 만들어지는 non-immunoglobulin substrate로서 손상된 조직의 재생을 증진시키는데 영향을 주는 것으로 알려져 있는데, 특히 치주질환에 영향을 미치는 cytokine으로 IL-1과 IL-6, TNF등이 많이 알려져 있다[43-44]. 이러한 Cytokine은 macrophage와 T-cell에 의해 주로 만들어지며, 이외에도 섬유아세포, 상피세포, 각화세포 등이 IL-1과 IL-6를 생산하고, NK 세포가 TNF-α를 분비한다. IL-1과 TNF-α는 파골세포를 활성화시켜 골흡수를 일으키고 신생골의 생성을 억제한다[45-47].

LPS가 면역세포나 염증세포를 자극하여 만들어진 cytokine은 LPS가 섬유아세포를 자극할 때 IL-1을 생성할 수 있는 기폭제 역할을 한다. 이렇게 만들어진 IL-1은 다시 섬유아세포를 자극함으로서 교원질, 다른 기질, collagenase, PGE 2, IL-1, IL-6, IL-8및 colony stimulating factors를 만들어낸다. 이러한 cytokine은 치주조직에서 염증세포와 면역세포를 활성화시키므로서 치조골 파괴를 일으

킬 수 있다[48-52].

치주인대세포에 TNF-α(1ng/ml), IFN-γ(200U/ml), LPS(100μg/ml), cytokine 3가지의 combination을 투여한 후 1일 후 단백질을 분리한 후 Western blot analysis에 따른 열충격단백 47 protein 발현의 경우 cytokine을 처리하지 않은 대조군은 47kDa 의 단일 band로 관찰되었고 cytokine을 처리한 24시간에서 대조군에 비해 TNF-α(1ng/ml), IFN-γ(200U/ml)군은 큰 차이가 없었으나, LPS(100μg/ml)투여군과 3가지 복합투여 cytokine의 경우 모두 대조군에 비해 단백질 수준에서 열충격단백 발현증가가 관찰되었다. 이러한 소견은 small 열충격단백이 보통 세포에서도 존재하다가 자극을 받으면 그 양이 증가[53]한다는 사실과 일치되는 소견으로 여겨졌다.

열충격단백 70은 열에 의해서 신경분비계에 관계된 특정지역에서 발현된다는 사실이 알려져 있으며[30] 또한 세포내에서 단백질의 folding과 assembly를 매개하며 단백질의 변성을 방지시키거나 변성된 단백질을 재생하는데 관여한다고 보고되고 있다[23].

Droshophila에서 고온충격을 주게되면 핵에서 열충격단백이 나타났다가 회복기 동안에 수시간에 걸쳐 세포질로 열충격단백이 이동되는 것이 보고되었는데[54] 본 연구의 상피조직에서는 건강치은 뿐 아니라 심한 염증성 치은조직에서 거의 발현을 보이지는 않았으나, 사진 10에서처럼 중등도나 경도의 염증성 치은에서 열충격단백 70은 혈관내피세포와 혈관 내강에서 강양성의 발현을 보였고 주로 출혈소가 있는 부위에서 발현을 보여 열충격단백 47과는 전혀 다른 발현 유형을 보였다.

이러한 소견은 심한 치주염의 상태에서는 열충격단백질이 생체내에서 환경자극에 대한 방어기능을 전혀 하지 못할정도로 숙주조직이 파괴되기 때문에 열충격단백이 발현되지 못했으나 경한 또는 중등도 염증성 치은의 경우에는 발현되는 것으로 보아 생체조직이 견딜수 있는 정도의 자극시에는 열충격단백이 치주질환에 의해 유도되는 세포손상에 방어역할을 하는 것으로 사료된다.또한 주로 혈관위주로 발현되는 점은 염증성 치은의 변연치은내의 혈관사이에 밀접한 관계가 있음을 보여주는데 열충격단백 70이 국소적인 염증반응시 치은부의 혈관과 상호작용을 하는 것으로 사료되었다.

실험실내에서 열충격단백 70은 자극을 받았을 때에만 급격하고 민감하게 반응하여 상당한 양의 증가를 보이고 회복시기에는 가장 먼저 감소한다고 보고되었는데[55]. 지금까지 알려진 열충격단백 70족은 열충격단백 72, 열충격단백 73, glucose-regulated protein(Grp) 75이 있으며 그 중 급격하게 자극에 반응하여 그 존재 여부가 좌우되는 것은 열충격단백 72(유도성 열충격단백 70)로 알려졌다[56]. 본 연구에서도 대조군 및 TNF-α군에서는 전혀 발현되지 않다가 IFN-γ나 LPS투여군에서는 발현이 되었고 3가지 cytokine 혼합투여군에서는 가장 많은 발현을 보여 HSP 70이 평상시에는 발현이 안되다가 cytokine유도시에는 상당한 발현 증가를 보이는 단백질임을 알 수 있었다.

또한 Sauk[41]의 연구에 따르면 치은인대세포에 osteopontin이나 collagen을 도포한 배양접시에 열충격을 가했더니 열충격단백 70계인 열충격단백 72, 73발현이 크게 발현되었다고 보고하여 열충격단백 70이 유도 열충격단백으로써 역할을 한다고 하였다. 본 연구에서 치주인대세포에 3가지의 combination처리군에서는 synergistic effect를 보여 가장 많은 발현을 보여 염증성 치주조직에서 나타나는 cytokine이 여러 가지 복합작용을 한다는 임상적인 일반적 관찰과 일치하였다고 사료된다.

스테로이드 호르몬인 1,25-dihydroxyvitamin D3도 열충격단백의 합성을 증가시킬 수 있는 것으로 알려졌는데 이 호르몬과 고온의 병합

요법이 건선의 치료에 도입되고 있으며[57-58] 비소 또한 열충격단백을 유도할 수있으므로 건선이나 다른 염증성 질환에 이용할 수도 있고, 고온내성에 대한 이용은 현재 많은 분야에 걸쳐 시도되고 있는데 종양치료에서도 방사선 단독보다 고온과 방사선의 병합처리가 더 효과적이어서 최근 이 방법이 많이 도입되고 있으나 암세포의 고온 내성기작을 극복할 수 있는 방법을 찾아내는 것이 선결문제이므로 더 많은 연구가 요구된다[59].

치주인대세포 및 염증성 치은조직에서 어떻게 열충격단백 70 발현을 유도하는지에 대한 기작은 아직 정확히 밝혀지지 않았으나 치주인대에서 발생되는 세포내 변화가 세포에 손상을 입히는 기전으로부터 열충격단백 70의 발현에 대한 단서를 얻을 수 있을 것이라 생각한다. 또한 치주조직에서 섬유모세포는 경조직 및 연조직의 조절에서 역할을 할 것으로 고려되어 왔는데, 외과적 또는 병적상태에서는 어떤 변화된 구조를 재생 또는 재건하기 위해 구성되는 특이단백요소를 합성하거나 증식함에 반응하는 것으로 보고 있다. in vitro에서의 stress protein의 역할은 아직까지 규명되지 않은 상태이지만, 숙주와 병인(pathogen)간의 상호작용에서 복잡한 부분을 차지할 것으로 사료된다. 즉 stress protein은 산소유리기 같은 산화성 손상, 염증성 cytokine에 대해 세포를 보호하는 역할을 하며 병인제거(pathogen clearence)에도 관여할 수 있다고 사료된다.

열충격단백은 염증시 생체 병리적 역할을 하며 산화적 손상에 대한 열충격단백의 보호효과가 있고, 숙주와 병인 사이에 관계에 복잡한 역할을 한다. 열충격단백이 숙주에 더 이로운지 항원에 더 이로운지는 아직 명백하지 않으나 열충격단백은 oxygen free radical 발생과 독성을 방해하고 보호하기 위한 기전을 가지고 있어 산화적 손상으로부터 숙주세포를 보호하고 병인 제거에 관여한다고 알려져 있으며, 향후 열충격단백 같은 항원에 유도된 병인은 vaccine개발에 새롭고도 중요한 도구로 개선될 것으로 여겨지고 있다. 본 연구의 결과로 보아 생체내 염증성 치은조직과 Cytokine을 가한 치주인대세포에서도 열충격단백을 발현하는 것을 알 수 있으며 이 단백질이 생체내에서 환경자극에 대한 방어기능을 어떻게 이루어 내는지에 대한 정확한 작용기전에 대해서는 더 많은 연구가 필요하다고 생각된다.

V. 결론

건강한 치은과 염증성 치은조직에서 열충격단백 47, 열충격단백 70을 면역조직화학적 염색방법으로 발현분포 및 정도를 알아보고 치주인대세포를 배양하여 여러가지 cytokine을 투여하여 열충격단백의 발현을 Western blot으로 확인함으로써 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 건강한 치은에서의 열충격단백 47은 기저층에서만 약한 발현을 보인 반면 염증성 치은에서는 기저층과 상기저층, 유극층에서 건강치은에 비하여 더 많은 발현을 보였다.
2. 임상적으로 건강 치은의 내피세포 및 염증세포에서 열충격단백 47의 발현은 경미하게 나타났으나 염증성 치은조직에서는 더 많은 발현이 관찰되었다.
3. 열충격단백 70은 건강치은과 염증성 치은상피 및 염증세포에서 거의 발현되지 않아, 염증 침윤정도에 따른 열충격단백 70 발현차이는 없었다.
4. 중등도나 경도의 염증성 치은에서 열충격단백 70은 혈관내피세포와 혈관내강에서 강양성의 발현을 보였고 주로 출혈소가 있는 부위에서 발현을 보였다.
5. 치주인대세포에 cytokine을 투여한 후 열

충격단백 47에 대한 Western blot analysis한 결과 대조군과 TNF-α, IFN-γ 군은 발현차이가 없었으나 LPS투여군과 3가지 복합투여군은 대조군에 비해 발현 증가가 있었다.

6. 치주인대세포에서 열충격단백 70 단백발현은 대조군과 TNF-α투여군에서는 발현이 거의 없었으나, IFN-γ군과 LPS군은 70 kDa의 발현이 나타났고, 3가지 cytokine혼합투여군에서는 가장 많은 발현을 보였다.

이상과 같은 소견으로 치주질환과 같은 염증반응시 열충격단백 47, 열충격단백 70과 밀접한 관계가 있음을 보이고 염증성 cytokine에 의해 열충격단백이 치주인대세포에서 발현되므로 열충격단백이 치주질환에 유도되는 세포손상에 방어역할을 하는 것으로 사료된다.

VI. 참고문헌

1. Ashburner M, Bonner JJ. The induction of gene activity in Drosophilia by heat strock. Cell 1979; 17:241-5
2. Burdon R H Heat shock and the heat shock proteins. Biochem J 1986; 240:313-324
3. Lindquist S. The heat-shock response. Annu Rev Biochem 1986; 55:1151-1191
4. Pelham H. Speculations on the functions of the major heat shock and glucose-regulated proteins. Cell 1986; 46:959-61
5. Schlesinger MJ. Heat shock proteins: The search for functions. J Cell Biol. 1986: 103:321-5
6. Muramatsu T, Tada H, Kobayashi N. Induction of the 72-KD heat shock protein in organ-cultured normal human skin. J Invest Dermatol 1992; 98:786-90
7. Ritossa F. A new puffing pattern induced by heat shock and DNP in Drosophila. Experientia 1962; 18:571-3
8. Tissieres A. Mitchell HK. Tracy UM. Protein synthesis in salivary glands of D. melanogaster: relation to chromosome puffs. J Mol Biol 1974; 84:389-98
9. Polla BS. Heat(shock) and the skin. Dermatologica 1990; 180:113-7
10. Kusher DI, Ware CF, Gooding LR. Induction of the heat shock response protects cells from lysis by tumor necrosis foactor. J Immunol 1990; 145:2925-31
11. Jaattela M, Saksela K, Saksela E. Heat shock protects W EHI-164 target cells from the cytolysis by tumor necrosis factors α and β. Eur J Immunol 1989; 19:1413-7
12. Gatto H, Viac J, Charveron M, Schmitt D. Effects of thermal shocks on interleukin-I levels and heat shock proteins 72(HSP 72) expression in normal human keratinocytes. Arch Dermatol Res 1992; 284:414-7
13. Peterson NS, Young P, Burton V. Heat shock mRNA accumulation during recovery from cold shock in Drosphila Melanogaster. Insect Biochem 1990; 20:679-84
14. Goldstein J, Pollitt NS, Inouye M. Major cold shock protein of Escherichia coli. Proc Natl Acad Sci: USA 1990; 87:283-7
15. Kondo K, Inouye M. Tip I. A cold shock inducible gene of Saccharomyces cerevisiae. J Biol Chem 1991; 166:17537-44
16. Ciocca DR. Evidence for modulation of

a 24K protein in human endometrium during the menstrual cycle. J Clin Endocrinol Metab. 1983;57:496-9
17. Michael FP, Nancy ANG, Amrtin B, Geoffrey LG. Estrogen receptor localization in the female genital tract. Am J Pathol 1986; 123:280-92
18. Young D, Lathigra R, Hendrix R, Sweetser D. Young RA. Stress proteins are immune targets in leprosy and tuberculosis. Proc Natl Acad Sci USA 1988; 85:4276-70
19. Minota Sm. Koyasu S, Yahara I, Winfield J. Autoantibodies to the heat shock protein HSP 90 in systemic erythematous. J Clin Invest 1988; 81:106-9
20. Minota S, Cameron B, Welch WJ, Winfield JB. Autoantibodies to the constitutive 73-KD member of the HSP 70 family of heat shock proteins in systemic lupus erythematous. J Exp Med 1988; 168:1475-80
21. Lindquis S, Craig EA. The heat shock proteins. Ann Rev Genet 1988; 22:631-77
22. Kubo T, Towle CA, Mankin HJ, Treadwell BV. Arthritis Rheum 1985; 28: 1140-1145
23. Sauchez ER, Meshinchi S, Tienrungroj W. Relationship of the 90k-Da murine heat shock protein to the untransformed and transformed states of the L cell glucocorticoid receptor. J Biol Chem 1987; 262:6989-91
24. Nagata K, Sga S, Yamada KM. A major collagen-binding protein of chick embryo fibroblasts is a novel heat shock protein. J Cell Biol 1986; 103:223-229
25. Shroff B, SMith T, Norris K, Pileggi R, Sauk J. HSp is localized to tregions of type I collagen production in developing murine femurs and molars. Connective Tissue Rees 1993; 29:273-286
26. Sauk JJ, Norris K, Moehring J, Foster RA, SOmerman MJ. The expression of colligin/hsp47 after stress in humna periodontal fibroblasts in vitro. In Vitro Arch Oral Biol 1990; 35:645-651
27. Suak JJ, Norris K, Foster R, Moehring J, SOmerman MJ. Expression of heat shock proteins by human periodontal ligament cells. J Oral Path 1988; 17:496-498
28. Melcher AH. Periodontal ligament. In Bhaskar SN, ed. Orban's oral histology and embryology. 10th ed. Toronto, Mosby, pp. 1986;204-239
29. Polla BS. A role of heat-shock ininflammation? Immu Today 1988; 9:134-137
30. Schlesinger MJ. Heat shock proteins: The search for functions. J Cell Biol 1986; 103:321-325
31. Velazquez JM, lindquist S. Hsp 70: Nuclear concentration during envirommental stress and cytoplasmic storage during recovery. Cell 1984; 36:655-62
32. Joplin KH, Yocum GD, Denlinger DL. Cold shock elicits expression of heat shock proteins in the flesh fly. Sarcophage Crassipelpis. J Insect Physiol 1990; 36:825-34
33. Holland DB, Roberts SG, Wood EJ, Cunliffe WJ. Cold induces the synthesis of stress proteins in human keratinocytes. J Invest Dermatol 1993:

101: 196-199 Edwards MJ, Marks R, Dykes PJ, Merrett VR, Morgan HE, O'Donovan MR. Heat shock proteins in cultured human keratinocytes and fibroblasts. J Invest Dermatol 1991: 96:392-396

34. Ananthan J, Goldberg AL, Voellmy R. Abnormal proteins serve as eukaryotic stress signals and trigger the activation of heat shock genes. Science 1986:232:522-524
35. Craig EA, Jacobsen K. Mutations in cognategenes of Saccharomyces cervisiae hsp70 result in reduced growth rates a low temperatures. Mol Cell Biol. 1985; 5:3517-3524
36. Schlesinger MJ. Heat shock proteins: the search for functions. J Cell Biol 1986; 103:321-325
37. Sauk JJ, Norris K, Foster RA, Moehring JM, Somerman MJ. Expression of heat stress proteins by human periodontal ligament cells. J Oral Path 1988; 17:496-498
38. Ananthan J, Goldberg AL, Voellmy R. Abnormal proteins serve as eukaryotic stress signals and trigger activation of heat shock proteins. Science 1986: 232:522-524
39. Hendrick JP, Hertl FU. Molecular chaperone functions of heat-shock proteins., Annu. Rev. Biochem 1993; 62:349-384
40. Polla BS. A role of heat shock proteins in inflammation? Immunology Today 1988;9:134-137
41. Kurkinen MA, Taylor A, Garrels JI, Hogan BLM, Cell surface-associated proteins which bind native type IV collagen or gelation. J Biol Chem 1984; 259:5915-5922
42. Egelberg J. The blood vessel of the dentogingival junction. J Periodont Res 1966; 1:163-179
43. Akira S, Hirano T, Taga T, Kishimoto T. Biology of multifuntional cytokines: IL-6 and related molecules(IL-1 and TNF). FASEB J 1990; 4:2860-2867.
44. Hamblin AS. Inmale(ed), In Focus, IPL Press, Oxford. Lymphokines 1988; 1-71
45. Durum SK, Schmidt JA, Oppenheim JJ. Interleukin 1: An immunological perspective Annu Rev Immunol. 1985; 3:263-287
46. Kunkel SL, Remick DG, strieter JM. Mechanisms that regulate the production and effercts of tumor necrosis factor. Critical Reviews in Immunology. 1989.
47. Kishimoto T, Hirano T. Moleculat regulation of B lymphocytes response. Annu Rev Immunol. 1988;6:485-512
48. Huleihel M, Douvdevani A, Segal S, Apte RN. Regulation of interleukin-1 generation in immune-activated fiberoblasts. Eur J Immunol. 1990; 20:731-738
49. Huleihel M, Douvdevani A, Segal S, Apte RN. Regulation of fibroblasts. Eur J Immunol 1990; 20:731-739
50. Kamagata Y, Miyasaka N, Inoue H, Hashimoto J, Iida M. Study of cytokine production in inflammed human gingival tissue in periodontitis. Interleukin-1 and tumor necrosis factor. Jpn J Periodontol 1989; 31:843-848.
51. Masada MP, Persoon R, Kenny JS, Lee SW, page RC, Allison AC. Measurement of interleukin 1 and 1 in

gingival crevicular fluid implications for the pathogenesis of periodontal disease. J Periodontal Res 1990; 25:156-163
52. Takada H, Mihara J, Morisaki I, Hamada. Induction of interleukin-1 and -6 human gingival fibroblast cultures stimulated by Bacterodides lipoppolysaccharides. Infect Immun 1991; 59:295-301
53 Burdon RJ. Heat shock and the heat shock proteins. Biochem J 1988; 240:313-324
54. Palleros DR, Welch WJ, Fink AL. Interaction of hsp 70 with unfolded proteins: effect of temperature and nucleotides on the kinetics of binding. Proc Natl Acad Sci USA 1991; 88:5719-23
55. Welch WJ, Suhan JP. Cellular and biochemical events in mammalian cells furing and after recovery from physiological stress. J Cell Biol. 1986; 103:2035-2052.
56. Beckmann RP, Mizzen LA, Welch JW. Interaction of Hsp 70 with newly synthesized protein implications for protein folding and assembly. Science 1990; 248: 850
57. Westerhof W, Siddiqui AH, Cormane RH, Infrared hyperthermia and psoriasis. Arch Dermatol Res 1987;279: 209-10
58. Morimoto S, Uoshikawa K, Psorasis and vitamine D3: A review of our experience. Arch Dermatol 1989; 125: 231-4
59. Rofstad EK, Brustad T. Development of thermotolerance in a human melanoma xenograft. Cancer Res 1984; 44:525-30

사진부도 설명

그림 1 Rare expression is observed on epithelium and connective tissue in healthy gingiva.(Immunostain for HSP 47, × 40)

그림 2 Mild expression is observed on basal layer of epithelium in mild inflammed gingiva. (Immunostain for HSP 47, × 100)

그림 3 Severe expression is observed on endothelium in inflammatory gingiva. (Immunostain for HSP 47, × 40)

그림 4 High-power magnification of Fig. 3.(Immunostain for HSP 47, × 100)

그림 5 Moderate expression is observed on mononuclear cells in inflammatory gingiva.(Immunostain for HSP 47, × 40)

그림 6 High-power magnification of Fig. 5(Immunostain for HSP 47, × 100)

그림 7 Rare expression is observed in helathy gingiva.(Immunostain for HSP 70, × 40)

그림 8 Rare expression is observed in severe inflammed gingiva(Immunostain for HSP 70, × 40)

그림 9 Positive anti-HSP 70 cells are observed in endothelial cells of moderately inflammatory gingiva.(Immunostain for HSP 70, × 100)

그림 10 High-power magnification of Fig. 9.(Immunostain for HSP 47, × 4100)

그림 11 Moderate expression is observed on hemorrhagic foci of inflammed gingiva.(Immunostain for HSP 70, × 40)

그림 12 High-power magnification of Fig 11.(Immunostain for HSP 70, × 100)

사진부도(I)

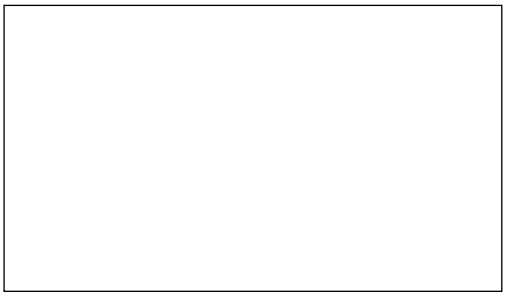


그림 1

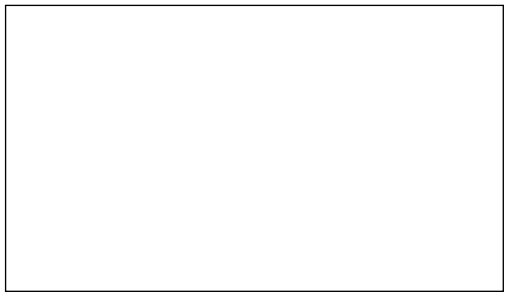


그림 2



그림 3



그림 4

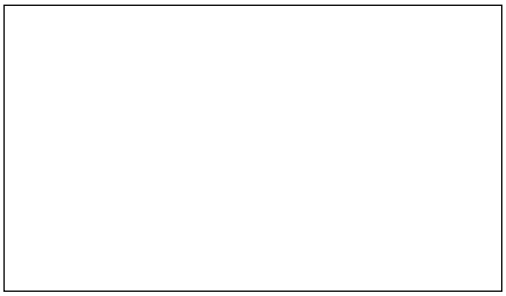


그림 5

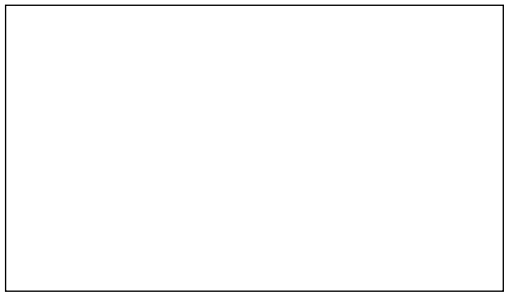


그림 6

사진부도(Ⅱ)

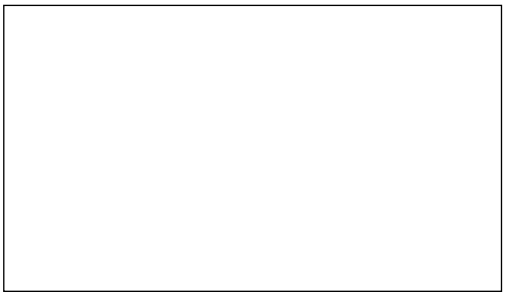


그림 7

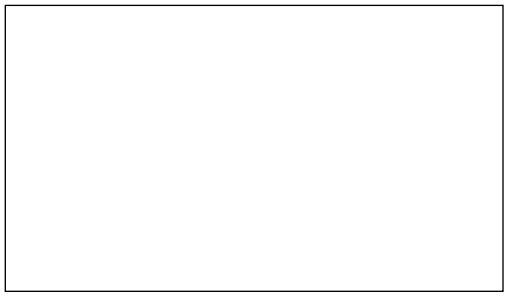


그림 8



그림 9



그림 10

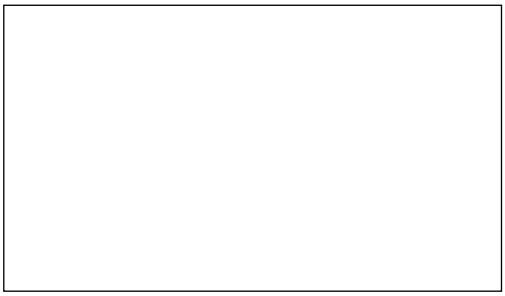


그림 11

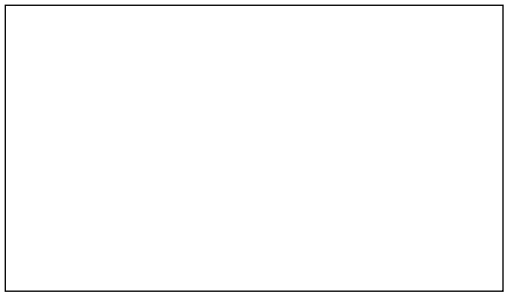


그림 12

Expression of Heat Shock Protein in Cytokine Stimulated PDL Cells and Inflamed Gingival Tissue

In-Ho Cho, Doek-Kyu Kim, Hyung-Keun You, Hyung-Shink Shin, Eun-Cheol Kim*
Dept. of Periodontology, College of Dentistry, Wonkwang University
Dept. of Oral Pathology, College of Dentistry, Wonkwang University*

Prokaryotic and eukaryotic cells respond to heat stress and other environmental abuses by synthesizing a small set of stress proteins and by inhibiting post-transcription synthesis of normal proteins. The purpose of the present study was to document the stress response produced by inflamed gingival tissue in vivo, and cytokine induced human periodontal ligament cells. Human PDL cells were exposed to TNF-α(1ng/ml), INF-γ(200 U/ml), LPS(100ug/ml), combination of cytokine, and SDS-PAGE gels running and Western blotting analysis was done. In vivo studies, the healthy gingival tissusse of a control group and inflamed gingival tissue of adult periodontitis were studied by immunohistochemistry and histology.

The results were as follows

1. HSP 47 was distributed on basal layer in healthy gingiva, but stronger stained in basal, suprabasal, and spinous layer of inflamed gingiva.
2. HSP 47 was rare on endothelial cells and mononuclear cells in healthy gingiva, but stronger expressed in inflamed gingira.
3. HSP 70 expression was rare on epihelium and inflammatory cells in both healthy & inflamed gingiva.
4. HSP 70 was actively expressed on endothelial cells and inflammatory cells of capillary lumen in moderately & mild inflamend gingiva.
5. PDL cells showed low level of HSP 47 protein expression which was significantly induced by cytokine stimulation(LSP only and combination).
6. Maximum HSP 70 protein induction was seen with stimulation by a combination of the cytokine, Combination of TNF-α, INF-γ, LPS have been shown to synergistically effects of HSP 70 expression.

On the above findings, HSP is influenced by cytokine and chronic inflammation in vivo, and may be involved in protection of tissue during periodontal inflammatiom.