

치주인대 기원의 섬유아 세포에 압축력을 가한 경우 Interleukin-6 및 Interleukin-8의 발현 변화에 관한 연구

이연희 · 김성곤* · 남동석

서울대학교 치과대학 치과교정과, *한림대학교 성심병원 구강악안면외과

Abstract (J. Kor. Oral Maxillofac. Surg. 2006;32:426-429)

THE CHANGE OF EXPRESSION OF INTERLEUKIN-6 AND -8 AFTER THE APPLICATION OF THE STATIC COMPRESSIVE PRESSURE ON THE FIBROBLAST ORIGINATED FROM THE PERIODONTAL LIGAMENTS

Yeon-Hee Lee, Seong-Gon Kim*, Dong-Seok Nahm

Dept. of Orthodontics, College of Dentistry, Seoul National University

**Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, College of Medicine, Hallym University*

The fibroblast in the periodontal ligaments received various stress. Among them, compression and tension are quite important and they are related to the remodeling of tooth and alveolar bone. We studied the change of expression of interleukin-6 (IL-6) and interleukin-8 (IL-8) in the fibroblasts of the periodontal ligaments by real-time RT-PCR and ELISA.

In results, the relative activity of IL-6 mRNA in 2 hours after was 1.54 ± 0.08 and 1.00 ± 0.05 in control and test, respectively ($P < 0.05$). Its 12 hours after was 1.23 ± 0.06 and 2.78 ± 0.14 in control and test, respectively ($P < 0.05$). The relative activity of IL-8 mRNA in 2 hours after was 1.00 ± 0.05 and 0.24 ± 0.01 in control and test, respectively ($P < 0.05$). Its 12 hours after was 1.23 ± 0.06 and 0.63 ± 0.03 in control and test, respectively ($P < 0.05$). The concentration of IL-6 was 1.02 ± 0.16 ng/ml, 0.90 ± 0.14 ng/ml, and 1.32 ± 0.12 ng/ml ($P < 0.05$) in control, 2, and 12 hours after, respectively. The concentration of IL-8 was 2.26 ± 0.17 ng/ml, 1.70 ± 0.26 ng/ml ($P < 0.05$), and 0.84 ± 0.47 ng/ml ($P < 0.05$) in control, 2, and 12 hours after, respectively.

In conclusion, the expression of IL-6 was significantly increased after the application of the static compressive force, but IL-8 was significantly decreased. Considering their known function, their expression is quite important in tooth and bone resorption.

Key words: IL-6, IL-8, Compressive force

I. 서 론

치주인대는 치아를 둘러싸고 있으면서 치아에 가해지는 힘을 완충하는 작용을 가지고 있다. 또한 치조골이나 백악질의 재생 및 재형성에도 관여하며 치근의 흡수에도 관여한다¹⁾. 따라서 치아나 악골에 손상이 가는 경우, 이의 회복에 중요한 역할을 담당하게 된다. 치주인대는 악골의 성장에도 중요한 영향을 미쳐 치주인대가 존재하지 않는 현재 개념의 임플란트를 소아 환자의 악골에 식립하는 경우 악골 성장이 억제된다는

보고가 종종 있어왔다²⁾. 치주인대에 압축력이 가해지는 상황은 일상생활에서나 특수한 상황에서 흔히 접할 수 있는데, 저작 시에도 압축력이 가해질 수 있으며 악골골절 시에 강선고정을 하는 과정에서나 치열 교정 치료 시에 장치를 통하여서도 압축력이 가해질 수 있다.

치아에 압축력이 가해지는 경우 발생하는 치주인대의 변화에 대하여 기계적인 측면에서는 많은 연구가 있어왔다^{3,4)}. 동물을 이용한 실험에서 적출한 악골에 위치한 치아에 기계적인 힘을 가하는 경우 치주인대의 부피변화나 각 부위가 받는 힘에 대한 연구가 있었고^{5,6)}, 유한요소법과 같은 소프트웨어를 이용한 분석도 보철 치료와 연관하여 많이 이루어져 왔다^{7,8)}.

일차적으로 치주인대가 압축력을 받으면 세포외 기질 성분은 기계적으로 반응하게 되나 세포 성분은 생리학적으로 반응하게 되며 이에 관여하는 여러 가지 신호전달 물질이 존재할 수 있다. 그런데 압축력에 대한 반응으로 발현이 증감되는 성분에 대한 연구는 상대적으로 소홀했던 것이 현실이다.

Interleukin-6 (IL-6) 및 interleukin-8 (IL-8)은 치주염에서 발현이

김 성 곤

431-070 경기도 안양시 동안구 평촌동 896번지
한림대학교 성심병원 구강악안면외과

Seong-Gon Kim

Dept. of OMFs, Sacred Heart Hospital, Hallym Univeristy
#896, Pyungchon-Dong, Dongan-Gu, Anyang city Kyoungkido,
431-070, Republic of Korea
Tel: +82-31-380-3870 Fax: +82-31-387-2475
E-mail: epker@chollian.net

증가되는 것으로 알려진 cytokine이며⁹⁾, 연골세포나 심근세포에서 압축력을 받을 때에도 발현이 증가되는 것으로 알려져 있다^{10,11)}. 따라서 본 연구에서는 치주인대 기원의 섬유아세포에 압축력을 가한 경우 IL-6 및 IL-8의 발현이 변화할 것이라는 가설 하에 세포를 콜라겐 겔 내에 3차원적으로 배양하여 이에 압축력을 가한 후 각 인자의 발현변화를 real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) 및 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)로 조사하였다.

II. 재료 및 방법

세포 배양

Immortalized human periodontal fibroblasts을 이용하여 실험을 수행하였다. 상기 세포주를 Ham's F12/Dulbecco's modified Eagle's medium (Gibco, BRL, Gaithersburg, MD)에서 키워졌고 배양액에는 1% penicillin/streptomycin, bFGF (100 µg/ml), 그리고 10% fetal bovine serum (FBS)를 함유하고 있었다. 배양된 세포는 압축력을 가하기 24시간 전에 PBS로 세 차례 세척을 시행하였고 10ml의 혈장이 포함되어 있지 않는 배양액을 넣었다.

치주인대 섬유아 세포에 가해지는 정적인 압축력을 재현하기 위하여 세포들을 3차원적인 콜라겐 겔 시스템에 배양하였다. 콜라겐 겔은 시판 중인 소의 피부 (Sigma, St Louis, MO)를 1 mM의 acetic acid에 녹여서 type I 콜라겐을 얻었다. 얻어진 콜라겐의 평균 농도는 3.33 mg/ml이었고 이를 탈이온화된 물을 이용하여 6시간 동안 투석하였다. 겔 내의 최종 세포 농도는 실험군의 경우 2.25×10^6 cells/ml 이었고, 대조군에서는 2.5×10^6 cells/ml이었다. 겔에 가해지는 압축력은 겔 위에 압축력에 해당하는 무게를 가진 추를 올림으로서 얻어졌는데, 이 방법은 이

미 출판된 논문을 참고로 하여 시행되었다(Fig. 1)¹²⁻¹⁴⁾. 가해진 압축력은 중력 가속도로 계산되었으며, 본 실험에서는 100g가 가해졌다. 압축력을 가하고 이루어진 세포 배양은 세포가 외부에서 스트레스를 받은 경우 가해진 스트레스와 연관된 mRNA의 발현이 가장 최고조에 달하는 2시간과 단백질 합성이 최고조로 이루어지는 12시간을 기준으로 관찰하였다. 대조군의 경우 실험군과 같은 조건에서 배양하였고 단지 압축력만 가하지 않은 상태이었다.

Real-time Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Real time RT-PCR은 상대적인 mRNA의 발현량을 측정하기 위하여 시행되었으며 CYBR green PCR master mix (ABI, USA)를 사용하였다. 그리고 본 실험에 사용된 시발체의 디자인은 PrimerExpress software (ABI, USA)를 통하여 이루어졌다. 3µg의 전체 RNA를 역전사하여 200ng의 재조합 DNA를 각 중합쇄연쇄반응의 주형으로 사용하였다. 25µl의 CYBR green PCR master mix와 1µl의 10 mmol의 시발체가 사용되었는데, IL-6의 경우 forward: TGGCTGCAGGACATGACAACCT, reverse: GACCA-GAA- GAACCAATGCCC였고, IL-8의 경우 forward: CCTTG-GATTCCCTTTATTTCCT, reverse: CGTATGTCCCAT-GACATTG TG이었다. 시약과 물을 포함한 전체 부피는 50 µl이었다. 각각의 실험에는 negative control로서 주형을 포함하고 있지 않은 샘플을 포함시켰다. 중합쇄연쇄반응은 95 °C에서 10분, 95 °C에서 15초, 60 °C에서 1분으로 40회의 주기로 시행하였다. Cycle threshold (Ct) 값은 형광의 발현이 역치를 넘어가는 수치로 결정되었다. 각 시료의 Ct값은 시료가 충분히 증폭되어 통계적으로 유의할 수준으로 기준선을 넘어간 것을 의미한다.

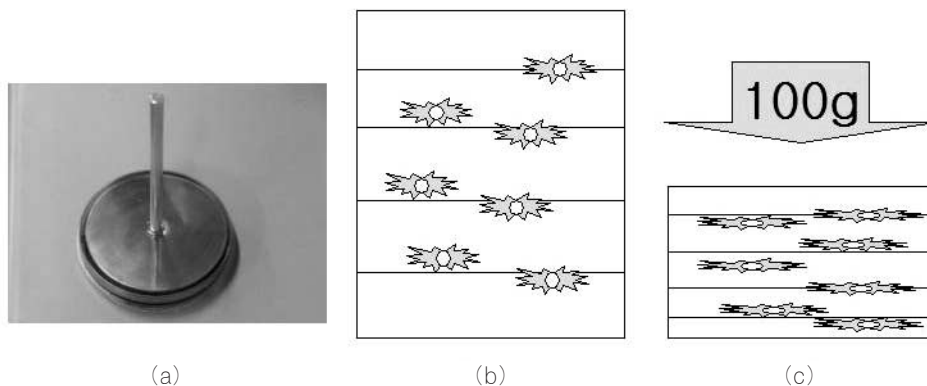


Fig. 1. The appliance for the static compressive force application (a) and the diagrams (b, c). When the compressive force is applied to collagen gel, the density of cells and collagen fibers are increased (c) compared to the control (b).

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

상업적으로 나와 있는 키트를 이용하여 실험하였다 (Quantikine, human IL-6 & IL-8 kit: R&D Systems, Minneapolis, MN). 100 μL 의 에세이 희석액을 microplate에 첨가한 후에 100 μL 의 표준 용액이나 시편을 넣고 2시간 정도 반응을 시킨 후에 4번의 세척을 시행한다. 다음에 200 μL 의 conjugate를 첨가하고 2시간 정도 반응을 시킨 후에 반복적으로 세척을 시행한다. 최종적으로 200 μL 의 substrate solution을 각각 첨가하고 20분 정도 반응시킨다. 반응을 중단시킨 후에 30분 이내에 490 nm의 optical density에서 ELISA reader를 통하여 각 plate의 결과를 읽는다.

III. 결 과

Real-time RT-PCR을 한 결과와 ELISA 결과는 Fig. 2 및 3에 있으며, 압축력을 가한 경우 치주인대 섬유아세포에서의 IL-6 및 IL-8의 발현양상이 관측시간에 따라 서로 다르게 나타남을 알 수 있다. 압축력을 가한 후 2시간이 경과한 시점에서 Real-time RT-PCR한 결과를 보면 IL-6의 경우 상대적인 mRNA의 발현량이 대조군의 경우 1.54 ± 0.08 이었던 것에 비하여, 실험군에서는 1.00 ± 0.05 이었다 ($P < 0.05$). 12시간이 경과한 경우 IL-6의 발현량 변화는 대조군의 경우 1.23 ± 0.06 이었던 것에 비하여, 실험군에서는 2.78 ± 0.14 이었다 ($P < 0.05$). IL-8의 경우를 살펴보면 2시간이 경과한 시점에서 상대적인 mRNA의 발현량이 대조군의 경우 1.00 ± 0.05 이었던 것에 비하여, 실험군에서는 0.24 ± 0.01 이었다 ($P < 0.05$). 12시간이 경과한 경우 IL-8의 발현량 변화는 대조군의 경우 1.23 ± 0.06 이었던 것에 비하여, 실험군에서는 0.63 ± 0.03 이었다 ($P < 0.05$).

ELISA의 결과를 살펴보면 (Fig. 3), IL-6의 양은 대조군, 2시간 경과 시 및 12시간 경과 시의 검출농도가 각각 $1.02 \pm 0.16 \text{ ng/ml}$, $0.90 \pm 0.14 \text{ ng/ml}$, $1.32 \pm 0.12 \text{ ng/ml}$ 이었다. 대조군과 비교 시에

12시간 경과 시의 양만이 통계적으로 유의한 차이를 보여주었다 ($P < 0.05$). IL-8의 양은 대조군, 2시간 경과 시 및 12시간 경과 시의 검출농도가 각각 $2.26 \pm 0.17 \text{ ng/ml}$, $1.70 \pm 0.26 \text{ ng/ml}$, $0.84 \pm 0.47 \text{ ng/ml}$ 이었다. 대조군과 비교 시에 2시간 경과 시 및 12시간 경과 시의 양이 모두 통계적으로 유의한 차이를 보여주었다 ($P < 0.05$).

IV. 고 찰

본 연구에서는 치주인대 기원의 섬유아세포에 압축력이 가해지는 경우 IL-6 및 IL-8의 발현량 변화를 real-time RT-PCR과 ELISA를 통하여 mRNA 및 단백질 수준에서 평가하였다. 그 결과 IL-6은 압축력을 가하고 2시간이 경과한 시점에서는 발현량이 감소되나 12시간 후에는 오히려 증가되는 양상을 보여주었고 IL-8의 경우에는 지속적으로 발현량이 감소되는 양상을 보여주었다 (Fig. 2, 3).

치주인대 기원의 섬유아세포에서의 IL-8의 발현은 압축력에 대하여 지속적으로 감소되는 양상을 보여주는데 (Fig. 2, 3), IL-8의 알려진 기능은 다양하다. IL-8은 혈관신생에 중요하게 관여하는 인자이고 칼슘 이온에 의하여 매개되는 신호전달이나 스트레스에 대한 반응에 관여한다. IL-8의 발현 증가는 인장력에 대한 반응으로 자궁 기원의 섬유아세포에서 관찰된 바 있다¹². 대개의 수압은 피부 기원의 섬유아세포에서 IL-6 및 IL-8의 발현을 모두 증가시키나 protein kinase C (PKC)에 의하여 유도된 반응의 경우에는 IL-8의 발현을 억제하고 IL-6의 발현은 억제하지 않는다는 보고가 있다¹³. 이번 연구에서 IL-6의 발현이 증가된 것을 감안하면 (Fig. 2, 3), 치주인대 기원의 섬유아세포가 압축력에 대하여 반응하는 것에도 PKC가 관여할 가능성이 있으나 이는 추가적인 실험을 통하여 밝혀야 할 것이라고 본다. 흥미있게도 최근에 본 연구진에 의하여 실시된 DNA chip 결과를 보면 PKC의 발현이 증가되어 있는 것을 관찰할 수 있

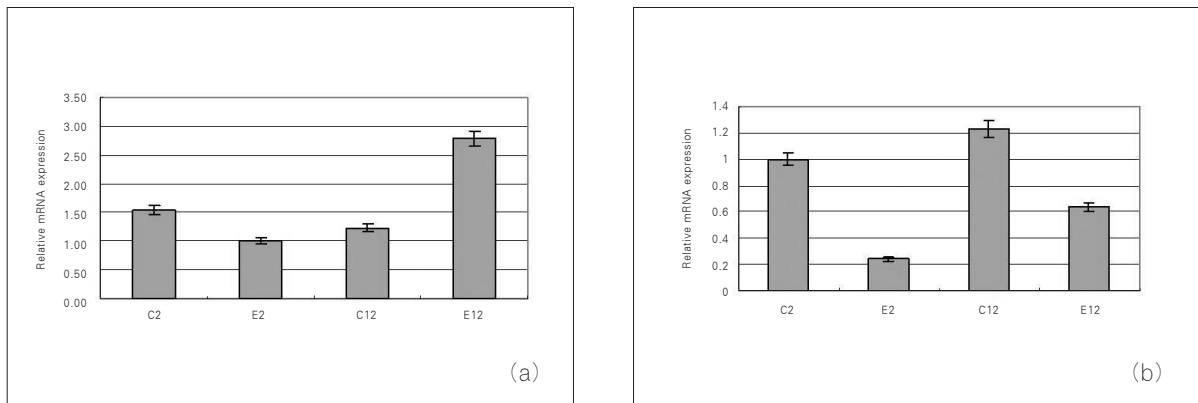


Fig. 2. The results of real-time RT-PCR. (a) Interleukin-6, (b) Interleukin-8.

참고문헌

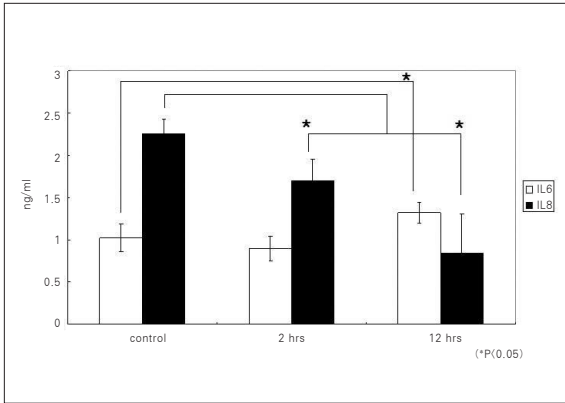


Fig. 3. The results of ELISA. In contrast to IL-8, the expression of IL-6 was increased at 12 hours after the initial compressive force application.

었다 (data not shown).

압축력을 가한 후의 IL-6의 발현은 12시간 경과 후에 관찰한 경우 유의할 정도로 증가된 것을 알 수 있었다 (Fig. 2, 3). 압축력에 의한 IL-6의 발현 증가는 이전의 연구에서 연골양 세포에서 관찰하여 보고한 바 있다^{10,11,14}. IL-6은 파골세포를 강력하게 활성화시키는 인자로서 이의 과발현은 치주질환을 가지고 있는 치아 및 치조골에서 흔히 관찰된다¹⁵. 그리고 치주인대에서 IL-6의 발현증가는 치아나 치조골의 흡수와 관련이 있다¹⁶. 임상적으로 치주인대에 일정한 정도의 압축력을 지속적으로 가하게 되면 치조골의 흡수 및 치아의 이동이 일어나게 된다. 따라서 치주인대 기원의 섬유아세포에서 가해진 압축력에 반응하여 증가된 IL-6의 발현은 압축력에 의한 치아의 이동이 주로 IL-6에 의하여 매개될 것임을 의미한다.

결론적으로 치주인대 기원의 섬유아세포에 가해진 지속적인 압축력은 IL-6의 발현 증가와 IL-8의 발현 감소를 가져왔으며, 이는 문헌고찰을 통하여 살펴 본 결과 치아의 이동 및 치조골의 흡수와 밀접한 관련이 있을 것으로 사료된다.

1. Berkovitz BK: The structure of the periodontal ligament: an update. *Eur J Orthod* 1990;12:51-76.
2. Troulis MJ, Williams WB, Kaban LB: Staged protocol for resection, skeletal reconstruction, and oral rehabilitation of children with jaw tumors. *J Oral Maxillofac Surg* 2004;62:335-43.
3. Wills DJ, Picton DC, Davies WI: An investigation of the viscoelastic properties of the periodontium in monkeys. *J Periodontol Res* 1972; 7:42-51.
4. Daly CH, Nicholls JJ, Kydd WL, et al: The response of the human periodontal ligament to torsional loading-I. Experimental methods. *J Biomech* 1974;5:517-22.
5. Toms SR, Dakin GJ, Lemons JE, et al: Quasi-linear viscoelastic behavior of the human periodontal ligament. *J Biomech* 2002; 35:1411-5.
6. Fung YC: *Biomechanics: Mechanical Properties of Living Tissues*. Springer, New York, 1981.
7. Rieger MR, Adams WK, Kinzel GL: A finite element survey of eleven endosseous implants. *J Prosthet Dent* 1990;63:457-65.
8. Anusavice KJ, Hojjatie B: Influence of incisal length of ceramic and loading orientation on stress distribution in ceramic crowns. *J Dent Res* 1988;67:1371-5.
9. Kamma JJ, Giannopoulou C, Vasdekis VG, et al: Cytokine profile in gingival crevicular fluid of aggressive periodontitis: influence of smoking and stress. *J Clin Periodontol* 2004;31:894-902.
10. O' Neill CW, Liu JJ, Leibenberg E, et al: Percutaneous plasma decompression alters cytokine expression in injured porcine intervertebral discs. *Spine J* 2004;4:88-98.
11. Freund C, Schmidt-Ullrich R, Baurand A, et al: Requirement of nuclear factor-kappaB in angiotensin II- and isoproterenol-induced cardiac hypertrophy in vivo. *Circulation* 2005;111:2319-25.
12. Takemura M, Itoh H, Sagawa N, et al: Cyclic mechanical stretch augments both interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1 production in the cultured human uterine cervical fibroblast cells. *Mol Hum Reprod* 2004;10:573-80.
13. Koyama S, Aizawa M: PKC-dependent IL-6 production and inhibition of IL-8 production by PKC activation in normal human skin fibroblasts under extremely high hydrostatic pressure. *Extremophiles* 2002;6:413-8.
14. Takahashi I, Nuckolls GH, Takahashi K, et al: Compressive force promotes Sox9, type II collagen and aggrecan and inhibits IL-1 β expression resulting in chondrogenesis in mouse embryonic limb bud mesenchymal cells. *J Cell Sci* 1998;111:2067-76.
15. Rasmussen L, Hanstrom L, Lerner UH: Characterization of bone resorbing activity in gingival crevicular fluid from patients with periodontitis. *J Clin Periodontol* 2000;27:41-52.
16. DeLaurier A, Allen S, deFlandre C, et al: Cytokine expression in feline osteoclastic resorptive lesions. *J Comp Pathol* 2002;127:169-77.