

## 2형 당뇨병환자의 만성 치주염 치은조직에서 골흡수 인자의 발현 양상 비교

김미정, 류상호, 박진우, 서조영, 이재목\*

경북대학교 치의학전문대학원 치주과학교실

### I. 서론

치주염은 치아를 지지하는 결합조직과 골조직의 파괴로 이어지는 만성 염증성 질환으로, 치주조직에서 교원섬유와 다른 세포외기질 성분의 소실이 특징적이다. 치주조직에서 세포외기질의 분해기전은 인간과 세균의 단백분해효소가 독립적으로 또는 협력적으로 작용한다<sup>1)</sup>. Matrix metalloproteinase(MMPs)는 세포외기질 성분의 분해에 중요한 역할을 하며, 이 효소들은 세포외기질의 주요성분인 교원질과 단백질의 가수분해를 촉매한다. MMPs 유전자의 발현은 cytokine이나 prostglanidins과 같은 염증성 매개인에 의해 조절된다.

교원질 분해효소의 작용은 합성, 활성화, 억제를 포함하는 최소 세 단계에서 조절된다. 첫째, 효소가 합성되어서 불활성 proform으로 분비된다. 둘째, 효소는 autoactivation이나 stromelysin, plasmin에 의하여 활성화된다. 셋째, 일단 활성화되면, 효소는 촉매 작용을 수행하고, MMPs의 특정 조직억제인자(TIMPs)에 의해 억제된다.

MMPs<sup>2,3)</sup>와 matrix-degrading serine protei-

nase는 류마티스 관절염, 동맥경화의 죽상반, 전이성 암과 같은 다양한 질환의 진행과정에서 세포외기질의 분해에 관여하는 것으로 알려져 왔다. 구강내에서, MMPs는 치주조직의 파괴, 구강 편평태선, 이형성증, 편평세포 암, 골과 연골의 분해와 치근 우식과 같은 병적과정에서 중요한 역할을 한다. 현재 활동적인 치주염에서, 치은조직의 분해(주로 교원질)는 염증세포(단핵구, 대식세포, 림프구, 다형핵 백혈구)와 거주세포(섬유아세포, 상피세포, 내피세포)에 의해 in situ에서 발현되는 MMPs에 부분적으로 기여한다.

MMPs는 collagen, proteoglycans, laminin, elastin, fibronectin<sup>4)</sup>과 같은 세포외기질 성분의 분해를 담당하는 효소의 일족이다. 특히, MMP-3 (Stromelysin-1)는 섬유아세포 유형의 교원질 분해 효소<sup>5)</sup>를 활성화 시킬 수 있다. MMP-3는 치은 섬유아세포<sup>6)</sup>뿐 아니라, 단핵구, 내피세포, 연골세포, 활막세포를 포함한 다양한 세포에서 합성된다. 또한 MMP-3는 gelatin, proteoglycan, laminin, fibronectin과 type I, type IX collagen을 포함하는 많은 세포외기질의 분해에 효과적이다<sup>7)</sup>. MMP-3에

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

의해 매개되는 교원질 분해는 치주염에서 결합조직의 파괴와 개조에 주요 경로가 된다<sup>8,9)</sup>.

MMPs 유전자의 발현은 cytokine이나 prostaglandins 과 같은 염증성 매개인자에 의해 조절된다. Prostaglandin 역시 치주염에서 염증성 매개인자로 작용하는 것으로 보고 되고 있다<sup>10)</sup>. PGE<sub>2</sub>는 다양한 세포에 작용하여 cAMP의 합성을 촉진하고, cAMP 의존성 protein kinase A의 작용을 통하여 특정 단백질군에서 특정한 세포 활성을 활성화 하거나 억제함으로써 다양한 세포 기능을 조절한다<sup>11)</sup>.

치주 부착소실과 직접적으로 연관되는 IL-1의 생물학적 효과에는 stromelysin과 collagenase의 유도 및 골의 탈회<sup>12)</sup>가 포함된다. 몇몇 bone culture system에서, IL-1은 골의 탈회에 있어서 가장 강력한 유도인자로 알려져 있다. 파골세포에 의한 골흡수에 있어서 IL-1의 역할 중 일부는 PGE<sub>2</sub>의 방출 유도에 의해 매개되는 것으로 추정된다<sup>13)</sup>. PGE<sub>2</sub>는 조직 대사에 있어서 이화와 동화작용을 모두 가진다. PGE<sub>2</sub>는 골 흡수의 강력한 자극인자로 알려져 있는 반면, 노화된 수컷 쥐(rat)의 피질골에서는 동화작용을 가졌다. 일반적으로 치주염에서 PGE<sub>2</sub>의 분해작용이 강조되지만<sup>14)</sup>, 몇몇 연구의 치주염에서 PGE<sub>2</sub>는 분해 억제 효과를 나타내었다<sup>11)</sup>.

Interleukin-6(IL-6)는 치은염에서 치주염으로의 진행에 관여하는 인자로 알려져 있으며, 또한 염증성 치은에서 IL-6의 축적은 치주질환의 진행에 중요한 인자로 제안되었다. IL-6의 농도는 치주질환<sup>15)</sup>이나 난치성 부위의<sup>16)</sup> 병인론에서 후기에 상승한다. IL-6는 치주염과 치조골 소실의 잠재성을 증가시키며, 이러한 cytokine은 이 질환에 특징적인 조직파괴와 관련된다<sup>17)</sup>. 치은열구액이나 치주조직에서 IL-6 수준은 잠재적인 난치성 부위나 환자에서 유용한 지표가 될 것이며, IL-6의 생물학적 활성은 재발성 부착소실의 기전 중 일부를 설명할 수 있을 것이다<sup>16)</sup>.

당뇨병은 진행성 치주질환과 관련된다. 당뇨병이 치주질환의 예측인자가 되며<sup>18)</sup>, 제2형 당뇨병(인슐린 비의존성 당뇨병)은 심한 치조골 소실의 진행에

있어 유의적인 위험 인자로 알려져 있다<sup>19)</sup>. 몇몇 연구들은<sup>20,21)</sup> 당뇨병을 가진 사람의 치주염에 대한 감수성을 설명하는데 있어서 다음과 같은 기전을 제시하였다 : 미세혈관변증, 치은 열구액의 변화, 교원질 대사의 변화, 숙주 반응의 변화, 치은 연하 미생물총 및 유전양상의 변화.

당뇨병 환자는 일반적으로 감염성 질환에 감수성이 있으며<sup>22)</sup>, 다형핵 백혈구의 기능 이상 및 교원질 대사의 이상과 같은 숙주의 저항성과 관련된 인자가 치주염의 심도에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다<sup>23)</sup>. 이러한 기능이상은 PMN의 화학주성, 부착, 탐식 작용의 assay에서 밝혀졌다<sup>24)</sup>. PMN 결함에 대한 연구들은 이러한 기능 이상이 감염에 대한 숙주 저항성의 이상으로 이어질 수 있다고 제시하였다. 치주염의 심도는 광범위한 치주조직의 파괴와 연관되는 화학주성의 결함과 관련되는 것으로 추정된다.

당뇨병 환자의 치은 섬유아세포는 비 당뇨군에 비하여 교원질 합성이 감소한다. 교원질 합성 감소에 부가적으로, 당뇨병 환자에서 치은 열구액의 교원질 분해효소 활성은 증가한다<sup>25)</sup>. 이러한 증가된 열구액의 교원질 분해효소 활성은 주로 중성구에서 기원하는 것 같다. 혈관 변화는 당뇨를 가진 환자에서 일반적이며, 기저막 단백질은 고혈당 환경에서 당화되고 비후되어 물리적인 성질이 변화한다. 심한 치주염이 혈당조절이 불량한 경우와 관련되었고, 반대로 치료되지 않은 진단된 치주질환이 당뇨병의 대사 조절을 악화시킬 수 있다<sup>26)</sup>.

골 흡수와 관련된 염증 반응에서, MMP-3, PGE<sub>2</sub>, IL-6의 역할과 상호작용은 명확하지 않으며, 치주염의 병인론에서 MMP-3, PGE<sub>2</sub>, IL-6의 상대적인 분포는 아직까지 완전히 확립되지 않았다. 게다가 만성 치주염을 가진 당뇨 및 비당뇨 환자에서 MMP-3, PGE<sub>2</sub>, IL-6 각각 및 이들의 상호작용을 동시에 분석한 in vivo 연구가 없다. 이 연구의 목적은 골 흡수를 동반한 만성 치주염을 가진 제2형 당뇨 환자 및 건강한 환자의 치은 조직에서 MMP-3, PGE<sub>2</sub>, IL-6의 발현을 비교하고 정량화하는 것이다.

## 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 환자에서 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 군으로 나누어졌다. 첫 번째 군(대조군)은 전신적으로 건강한 8명의 성인으로부터 얻어진, 출혈이 없고 골 흡수 또는 치주낭이 없는 임상적으로 건강한 치은 조직으로 하였고, 두 번째 군은 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 Muhlman & Son<sup>27)</sup>에 따른 치은 열구 출혈 지수 3을 보이는 치아로부터 얻어졌다. 세 번째 군은 제2형 당뇨병을 동반한 만성 치주염 환자로부터 얻어진 염증성 치은 조직으로 하였다. 세 번째 군은 적어도 6개월 이전에 제2형 당뇨병 진단을 받고, 식 후 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 등<sup>28)</sup>의 연구에서 시행된 방법과 동일하게, 동결된 조직은 Cho 등<sup>29)</sup>의 방법을 따라 1:30으로 희석된 protease inhibitor cocktail(Roche, Germany)을 함유한 RIPA 용해완충액(10mM EDTA, 0.15M NaCl)에서 균질화되었다. 용해물은 10초동안 세 번 초음파 분쇄가 시행되고, 4°C, 12000g에서 15분동안 원심분리하였다. 상층액의 단백질 농도는 BSA를 표준용액으로 이용하여 Bradford protein assay(Quick Start, BIO-RAD, USA) 통해 결정되었다.

용해물은 SDS samples buffer(1M Tris-HCl (pH 6.8), 40% glycerol, 8% SDS, 2% mercapto-ethanol, 0.002% Bromophenol blue)에서 끓인다. 준비된 표본은 15% sodium dodecyl sulfate(SDS)-polyacrylamide gels에서 분리되고, polyvinylidene difluoride(PVDF) 막으로 전이된다.

막은 5% powdered milk와 1% BSA를 함유한 Tris-buffered saline(TBS)에서 1시간동안 비특이적인 반응을 제거하기 위한 처리를 하고, 실온에서 polyclonal anti-MMP-3, anti-PGE<sub>2</sub>, and anti-IL-6(Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA) 항체와 1.5시간동안 반응시켰다.

막이 Tween 20으로 5분씩 5회 세척되고, anti-IL-6에 대하여 horseradish peroxidase(HRP)-conjugated goat anti-rabbit 이차항체를, anti-MMP-3, anti-PGE<sub>2</sub>에 대하여 horseradish peroxidase(HRP)-conjugated donkey anti-goat 이차항체를 TBS에서 1:2000으로 희석하여 실온에서 1시간동안 반응시켰다. 부가적으로 Tween 20으로 5분씩 5회 세척 후 ECL Plus development kit (Amsterdam, Beckinghamshire, UK)으로 밴드를 확인하였다.

MMP-3, PGE<sub>2</sub>, IL-6 발현에 대한 정량 분석은 densitometer(Image Gauge V 3.46, Koshin Graphic

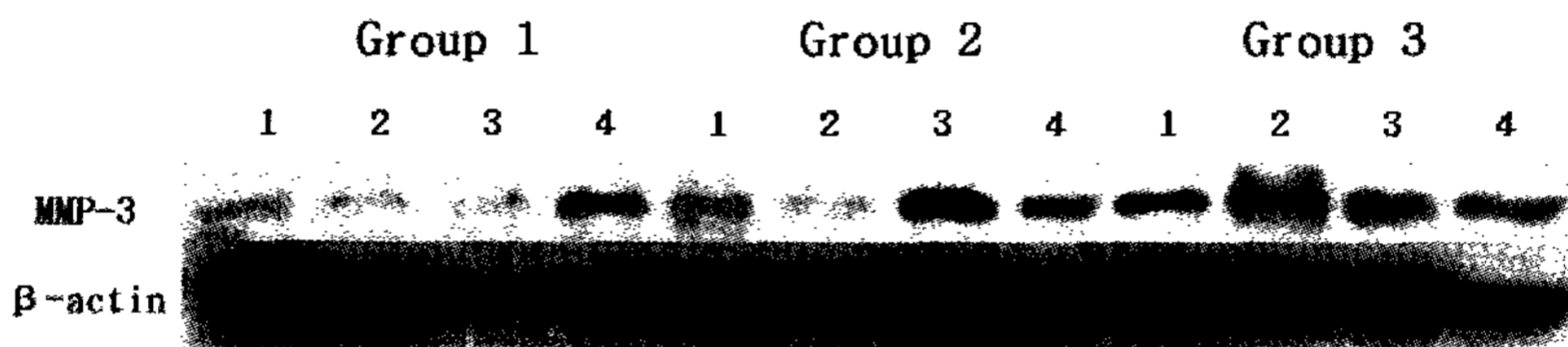
Systems, Fuji Photo Film Co., Japan)을 이용하여 시행되었다. 각 표본에서  $\beta$ -actin(Abcam, UK)에 대한 표준화를 시행하고, MMP-3, PGE<sub>2</sub>, IL-6의 발현은 MMP-3 or PGE<sub>2</sub> or IL-6/ $\beta$ -actin의 비율로 나타내었으며, 세 군 사이의 차이가 결정되었다.

### 3. Western blot의 통계학적 처리

모든 자료는 평균±표준편차로 표현되었으며, 결과는 통계학적으로 분석되었다. MMP-3, PGE<sub>2</sub>, IL-6은 one-way ANOVA로 비교되었고, Tukey test로 사후검증되었다(P < 0.05).

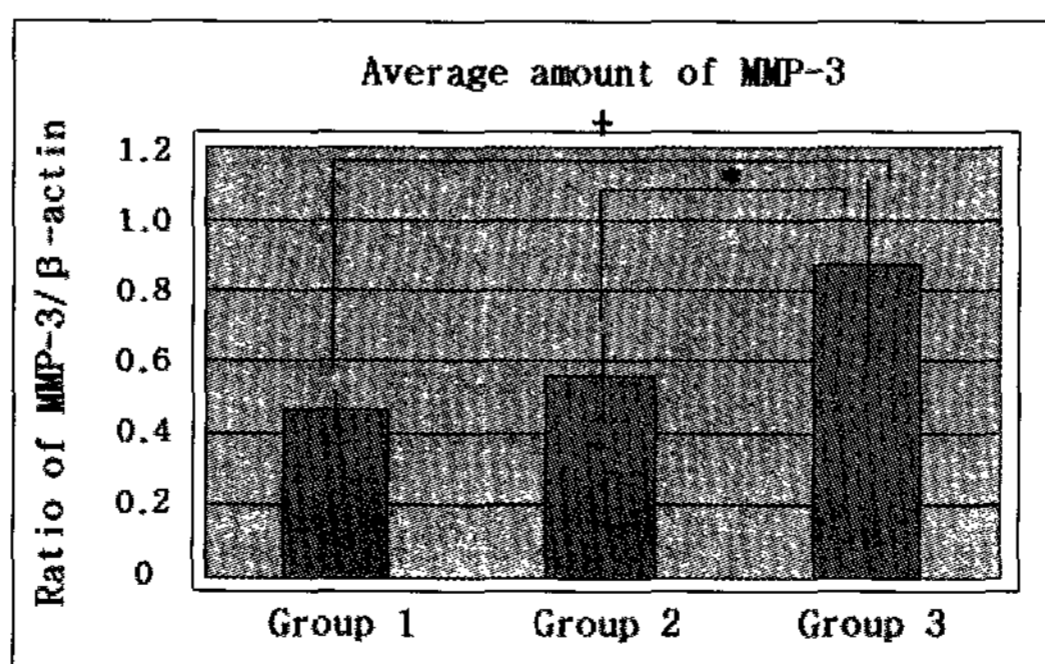
### III. 결과

만성치주염군과 제2형 당뇨병을 가진 만성치주염군의 모든 표본에서 MMP-3, PGE<sub>2</sub>, IL-6의 발현을 보였다. 제2형 당뇨병을 동반하거나, 동반하지 않은 만성치주염의 치은에서 MMP-3의 발현을 비교하기 위하여, MMP-3에 특이적인 항체가 조직에서 cytokine을 발견하는데 사용되었다(Figure 1A, B). 대표적인 Western Blot 자료가 Figure 1A에 제시되었다. 또한  $\beta$ -actin의 발현 수준이 anti- $\beta$ -actin specific western blot 분석으로 측정되었다. 각 군에서 MMP-3 발현 수준을 정량화하기 위하여, 각 표본의 MMP-3 발현 수준이 densiometer를 통해



**Figure 1A.** MMP-3 Western analysis showing 4 representative samples in each group. MMP-3 corresponding to molecular weight 59 kDa was shown to be expressed in all samples including healthy gingiva, and the expression levels of MMP-3 were increased in order of group 1, group 2, group 3. In order to quantify the MMP-3 levels,  $\beta$ -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

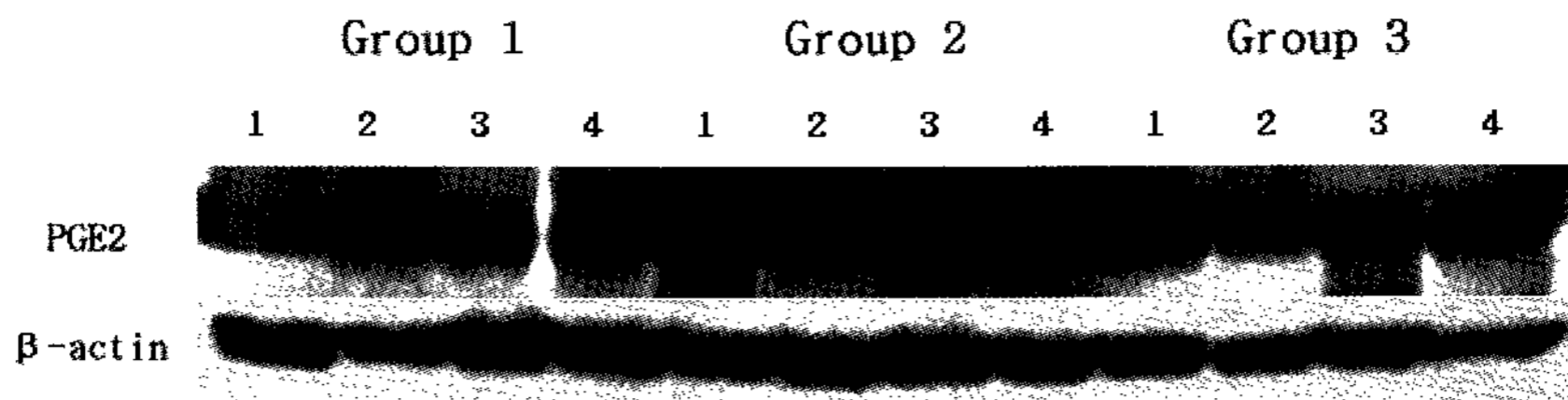


**Figure 1B.** Graphics showing the average amounts (Ratio of MMP-3/ $\beta$ -actin) and standard deviation of MMP-3 in group 1, 2 and 3. In the inflamed gingiva with diabetes (group 3), MMP-3 seemed to be increased compared to group 1 and group 2.

- 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

+ significant difference between group 1 and group 3 (P<0.05)

\* significant difference between group 2 and group 3 (P<0.05)

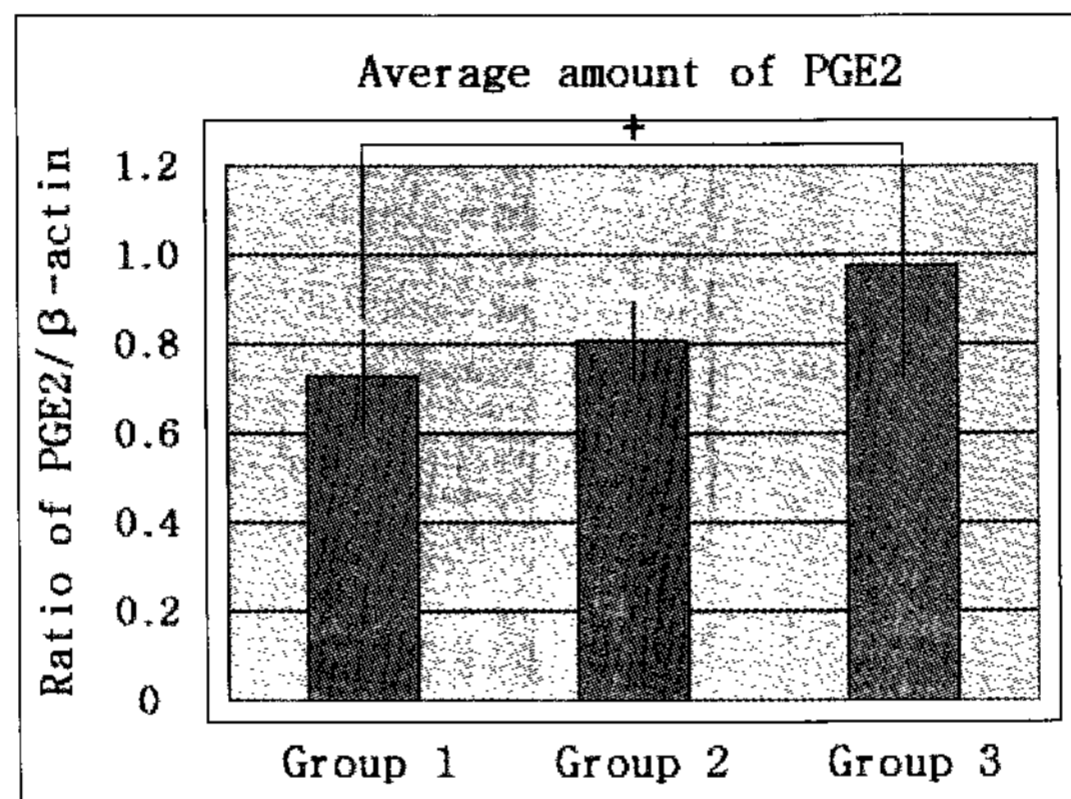


**Figure 2A.** PGE<sub>2</sub> Western analysis showing 4 representative samples in each group. PGE<sub>2</sub> corresponding to molecular weight 62 kDa was shown to be expressed in all samples including healthy gingiva. The expression levels of PGE<sub>2</sub> were increased in order of group 1, group 2, group 3. In order to quantify detected PGE<sub>2</sub>,  $\beta$ -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



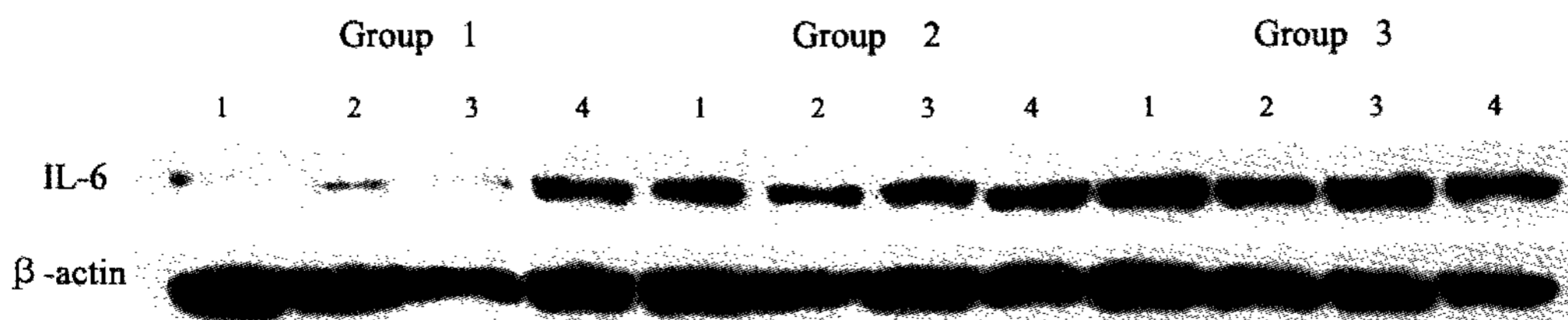
**Figure 2B.** Graphics showing the average amounts (Ratio of PGE<sub>2</sub>/ $\beta$ -actin) and standard deviation of PGE<sub>2</sub> in group 1, 2 and 3. In the inflamed gingiva (with or without diabetes, group 2 & group 3), the levels of PGE<sub>2</sub> was higher compared to healthy gingiva.

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

+ significant difference between group 1 and group 3 ( $P < 0.05$ )

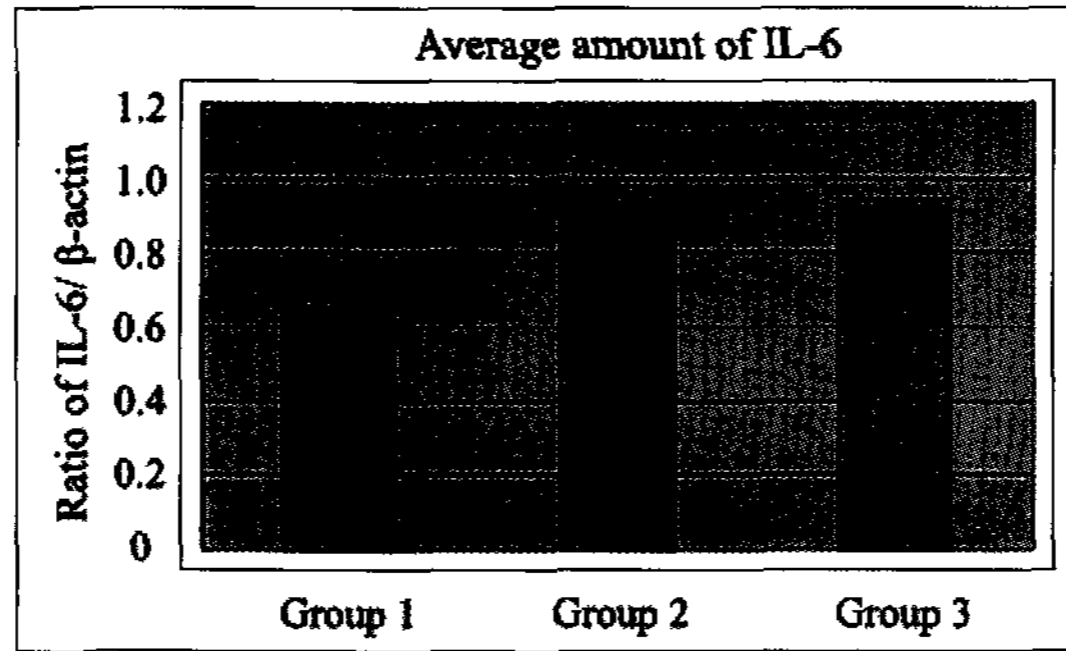


**Figure 3A.** IL-6 Western analysis showing 4 representative samples in each group. IL-6 corresponding to molecular weight 28 kDa was shown to be expressed in all samples including healthy gingiva and the expression level of IL-6 was increased in patients with type 2 diabetes mellitus than in control healthy subjects. In order to quantify detected IL-6,  $\beta$ -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 3B.** Graphics showing the average amounts (Ratio of IL-6/ $\beta$ -actin) and standard deviation of IL-6 in group 1, 2 and 3. In the inflamed gingiva (with or without diabetes, group 2 & 3), the levels of IL-6 was higher compared to healthy gingiva.

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

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

+ significant difference between group 1 and group 3 ( $P < 0.05$ )

측정되었다. MMP-3 발현 수준의 비교는 MMP-3에 특이적인 항체를 이용한 Western blot 분석으로 연구되었으며, 세 군에서 약 59 kDa의 MMP-3가 검출되었다 (Figure 1A). 그 후 MMP-3 발현 수준은  $\beta$ -actin (ratio of MMP-3/ $\beta$ -actin)으로 표준화되었다. 표준화된 MMP-3의 발현 수준은 Figure 1B에 도표로 요약되어있다.

MMP-3의 평균 발현 양 (ratio of MMP-3/ $\beta$ -actin)은 1군은  $0.464 \pm 0.063$ , 2군은  $0.563 \pm 0.133$ , 3군은  $0.872 \pm 0.289$ 로 나타났다. 1군과 2군 사이에는 유의한 차이가 없었지만 1군과 3군, 2군과 3군 사이의 차이는 통계학적으로 유의하였다 ( $P < 0.05$ ).

$PGE_2$  발현 수준의 비교도 역시  $PGE_2$ 에 특이적인 항체를 이용한 Western blot 분석으로 연구되었으며, 세 군에서 약 62 kDa의  $PGE_2$ 가 검출되었다 (Figure 2A).  $PGE_2$  발현 수준은 역시  $\beta$ -actin (ratio of  $PGE_2$ / $\beta$ -actin) 표준화로 정량되었으며, 표준화된  $PGE_2$ 의 발현 수준은 Figure 2B에 제시되었다.  $PGE_2$ 의 평균 발현 양 (ratio of  $PGE_2$ / $\beta$ -actin)은 1군은  $0.725 \pm 0.116$ , 2군은  $0.806 \pm 0.093$ , 3군은  $0.982 \pm 0.264$ 로 나타났다. 단지 1군과 3군에서만 유의한 차이가 관찰되었다 ( $P < 0.05$ ).

Western blot 분석을 이용한 IL-6의 발현 수준에

대한 연구에서, IL-6의 분자량은 28 kDa (Figure 3A)으로 확인되었다. 표준화된 정량화 자료가 Figure 3B에 제시되었다. IL-6의 평균 발현 양 (ratio of IL-6/ $\beta$ -actin)은 1군은  $0.646 \pm 0.245$ , 2군은  $0.884 \pm 0.122$ , 3군은  $0.944 \pm 0.039$ 로 나타났다. 1군과 2군, 1군과 3군에서 통계적으로 유의한 차이가 있었으며, 2군과 3군에서는 유의한 차이가 없었다 ( $P < 0.05$ ).

#### IV. 고찰

치주질환은 치주조직에서 교원 섬유와 다른 세포 외기질 성분의 소실이 특징적으로 치주조직에서 세포외기질의 분해기전은 인간과 세균의 단백질분해효소가 독립적으로 또는 협력적으로 작용한다<sup>1)</sup>.

당뇨병이 고혈당이 특징적이며, 고혈당에 대한 지연된 노출은 당뇨의 합병증이 발생하는데 있어 일차 요소가 된다<sup>30)</sup>. 일반적인 생화학적 기전은 고혈당에 의해 매개되는 non-enzymetic advanced glycation end products (AGEs)의 형성이다. 당에 의해 매개되는 AGE의 축적은 단백질과 탐식세포의 이주와 탐식능에 영향을 미쳐서 결과적으로 좀더 병적인 치은연하 미생물총을 형성한다. 차례로 이것은 cytokine

upregulation의 infection-mediated pathway를 자극한다.

많은 연구들은 인간에서 당뇨병과 치주질환의 관련성을 제안했다. 당뇨병은 나이, 성별, 구강 위생이나 다른 치과적 방법에 기초하여 설명할 수 없는 방식으로, 진행성 치주질환의 발생 위험을 약 3배정도 증가시키는 것으로 나타났다<sup>18)</sup>. 다양한 병적인자들이 당뇨병에서 치주염의 유병률과 심도가 증가하는 것을 설명하기 위해 제시되었다<sup>18,19)</sup>.

이 연구의 목적은 제2형 당뇨병환자의 치조골 소실을 동반한 치주적 파괴에 있어서 MMP-3, PGE<sub>2</sub>, IL-6의 분포를 이해하기 위하여, 제2형 당뇨병을 동반한 만성치주염을 가진 환자의 치은 조직에서 MMP-3, PGE<sub>2</sub>, IL-6의 발현을 정량화하고 비교하는 것이다.

MMP-3는 broad-spectrum의 MMP이며, 잠복성 MMPs의 중추 활성인자이다<sup>31)</sup>. MMP-3가 pro-MMP-1-8-9<sup>8,9,31)</sup>를 포함하는 procollagenase를 활성화할 수 있는 것으로 나타났다. Unemori 등은 교원질에 대한 촉매 활성은 부족하지만, MMP-3가 교원질 분해의 조절에 작용할 수 있다고 보고하였다<sup>5)</sup>. collagenetic cascade에서 MMPs의 공동작용이 중요하기 때문에, MMP-3의 조절작용은 생리적 및 병적 환경 모두에서 결체조직 분해의 전반적 조절에 있어서 중요한 것으로 추정된다.

선행된 연구들은 치주질환에서 MMP-3의 발현 및 MMP-3 mRNA의 증가를 보고하였다<sup>31)</sup>. MMP-3는 조직 분해과정에서 marker stromal cell로 기능하는 것으로 제안되었다<sup>32)</sup>. 치은 열구액을 분석한 몇몇 연구에서 GCF MMP-3와 TIMP 수준으로 건강한 부위와 치주질환 부위를 구별할 수 있는 것으로 나타났다<sup>33)</sup>, 또한 Alpagot 등은 MMP-3와 TIMP-1이 치주염이 확립된 부위에서 부착소실의 발생을 예측하는 인자가 될 수 있다고 보고하였다<sup>34)</sup>.

현재까지, 제2형 당뇨병을 가진 치주염 환자에서 MMP-3의 발현경향에 대한 연구는 거의 없다. 이 연구에서 MMP-3에 대한 정량적 분석을 통하여, MMP-3의 발현이 전신적으로 건강한 환자의 건강한

치은이나 염증성 치은에 비하여, 제2형 당뇨병과 연관된 염증성 치은에서 다소 증가함을 보여주었으며, 그 차이는 통계학적으로 유의하였다. 이러한 결과는 MMP-3가 제2형 당뇨병 환자의 질환 진행에 있어서 다른 반응 경향을 보이며, 전신질환을 가진 환자의 골흡수에서 염증 반응의 증가에 부분적으로 작용한다는 것을 보여준다.

PGE<sub>2</sub>는 염증성 치은에서 증가하였다. PGE<sub>2</sub>의 발현은 전신적으로 건강한 사람의 건강한 치은과 비교할 때 제2형 당뇨병을 가진 만성 치주염에서 증가하였으며, 그 차이는 통계적으로 유의하였다. Choi 등은 세 가지 치주병원균, *P. gingivalis*, *T. denticola*, *T. socranskii*에 의한 osteoclastogenesis의 유도가 RANKL(receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand)에 의하여 매개되며, RANKL의 발현 증가와 osteoprotegerin(a RANKL inhibitor)의 발현 감소가 주로 PGE<sub>2</sub>에 의해 매개된다는 증거를 제시하였다<sup>35)</sup>. Prostaglandin이 MMP mRNA 발현에 있어서 증가와 감소 두 가지 효과를 모두 가지며, 이것이 cAMP에 의해 매개 되는 것으로 나타났으며, Prostaglandin에 의해 영향을 받는 MMPs의 유형이 다른 것처럼, MMP mRNA 발현에 대한 prostaglandin의 효과는 세포 유형에 따라 다양했다<sup>11)</sup>.

IL-6는 활성화된 단핵구, 대식세포, 내피세포, 섬유아세포, 골 세포와 같은 IL-1 분비세포에 부가적으로, 활성화된 T-cell에 의해서도 생산된다. IL-6의 생물학적 작용은 골 흡수를 자극하는 것을 포함하여 IL-1의 작용과 공통점이 있다. 소량의 IL-6는 in vitro에서 골흡수를 유도할 때, IL-1과 상승 작용을 하는 것으로 나타났다<sup>36)</sup>. 치주적 파괴에 기여하는 IL-6의 이화작용은 섬유아세포의 성장억제, 파골세포의 수 증가, 골아세포의 alkaline phosphatase 활성 감소 및 교원질 합성 감소를 포함하는 것으로 알려져 있다. IL-1의 강력한 골흡수능이 부분적으로 prostaglandin에 의해 매개되는 반면, IL-1의 prostaglandin-비의존성 골 흡수는 IL-6에 의해 매개되는 것으로 제시되었다<sup>36)</sup>.

이 연구에서, IL-6의 발현은 전신적으로 건강한

사람의 건강한 치은보다 제2형 당뇨병을 동반 혹은 동반하지 않은 염증성 치은에서 더 높게 나타났다. 세 군 사이의 차이는 1군과 2, 3군 사이에 통계적으로 유의했다( $P < 0.05$ )(Figure 3B). 제 2형 당뇨병을 동반한 만성치주염과 제 2형 당뇨병을 동반하지 않은 만성치주염 사이에서 IL-6의 발현을 비교할 때, 제2형 당뇨병을 동반한 만성치주염은 당뇨가 없는 만성치주염에서 보다 높은 수준을 나타내었다. 이러한 결과는 염증성 조건에서 나타나는 이전의 연구들과 일치한다<sup>15)</sup>.

IL-6는 제2형 당뇨병을 동반하거나 동반하지 않은 염증성 조직에서 발현되며, 제2형 당뇨병을 가진 만성치주염 환자는 염증성 반응에서 더 높은 cytokine 활성과 골흡수를 나타내었다.

당뇨병에서 화학주성(chemotaxis), 화학운동성(chemokinesis), 탈과립화(degranulation)와 관련된 PMN 기능 이상이 보고되었다<sup>29)</sup>. 이것은 치주염을 포함한 다양한 감염성 질환에 대한 당뇨병 환자의 감수성 증가를 설명할 수 있을 것으로 생각된다. 이러한 결과는 PMN 기능 이상이 염증성 치은으로 군집하는, 치은 중성구 탈과립 물질에 반영된다고 생각하는 것을 가능하게 한다. 집단 사이에 성별차이는 관찰되지 않았지만, 나이, 혈당, 다른 미지 요소가 결과에 영향을 미칠 수 있다는 것을 배제할 수는 없었다.

결론적으로, 이 연구에서 MMP-3와 IL-6는 당뇨병을 가진 염증성 조직의 골흡수 과정에서 증가하는 경향을 보이며, 양의 상관성을 보였다. 이것은 MMP-3와 IL-6가 제2형 당뇨병을 가진 치주적 염증의 치조골 흡수 과정에 부분적으로 관련된다는 것을 제시한다. 면역 반응과 관련되는 방어인자는 당뇨병 군에서 감소하고, MMP-3와 IL-6가 더 높게 발현되는 것처럼 당뇨병 군에서 염증성 인자는 증가하는 것으로 보인다.

마지막으로, 당뇨병을 가진 치주 염증에서 치조골 흡수과정에 영향을 미치는 다른 골흡수 인자와 면역 인자의 효과 및 상호 관계에 대한 더 많은 연구가 필요할 것이며, 이러한 연구들은 질환의 진단과 치료방법의 발달에 기여할 수 있을 것으로 사료된다.

## V. 참고문헌

1. Sorsa T, Ding Y, Ingman T et al. Cellular source, activation and inhibition of dental plaque collagenase. *J Clin Periodontol* 1995; 22:709-717.
2. Uitto VJ, Overall CM, McCulloch C. Proteolytic host cell enzymes in gingival crevice fluid. *Periodontol* 2000 2003;31:77-104.
3. Ejeil AL, Igondjo-Tchen S, Ghomrasseni S et al. Expression of matrix metalloproteinases(MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) in healthy and diseased human gingiva. *J Periodontol* 2003;74:188-195.
4. Woessner JF. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB Journal* 1991;5:2145-2154.
5. Unemori EN, Bair MJ, Bauer EA, Amento EP. Stromelysin expression regulates collagenase activation in human fibroblast. *J Biol Chem* 1991;266:23477-23482.
6. Domeij H, Yucel-Lindberg T, Modeer T. Signal pathways involved in the production of MMP-1 and MMP-3 in human gingival fibroblasts *European Journal of Oral Science* 2002;110:302-306.
7. Nakaya H, Oates TW, Hoang AM, Kamei K, Cochran DL. Effects of IL-1 beta on matrix metalloproteinase 3 levels in human periodontal ligament cells. *J Periodontol* 1997; 68:517-523.
8. Suzuki K, Enghild JJ, Morodomi T, Salvesen G, Nagase H. Mechanisms of activation of tissue procollagenase by matrix metalloproteinase 3 (stromelysin). *Biochemistry* 1990;29:10261-10270.
9. Ogata Y, Enghild JJ, Nagase H : Matrix



- metalloproteinase 3 (stromelysin) activates the precursors for human matrix metalloproteinase 9. *J Biol Chem* 1992;267:3581–3584.
10. Salvi GE, Brown CE, Fujihashi K et al. Inflammatory mediators of the terminal dentition in adult and early onset periodontitis. *J Periodont Res* 1998;33:212–225.
  11. Nishikawa M, Yamaguchi Y, Yoshitake K, Saeki Y. Effects of TNF $\alpha$  and prostaglandin E2 on the expression of MMPs in human periodontal ligament fibroblasts. *J Periodont Res* 2002;37:167–176.
  12. He CS, Wilhelm SM, Pentland AP et al. Tissue cooperation in a proteolytic cascade activating human interstitial collagenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 1989;86:2632–2636.
  13. Richards D, Rutherford RB. The effects of interleukin-1 on collagenolytic activity and prostaglandin-E secretion by human periodontal-ligament and gingival fibroblasts. *Archives of Oral Biology* 1988;33:237–243.
  14. Zhong Y, Slade GD, Beck JD, Offenbacher S. Gingival crevicular fluid interleukin-1 $\beta$ , prostaglandin E2 and periodontal status in a community population. *J Clin Periodontol*. 2007;34(4):285–93.
  15. Geivellis M, Turner DW, Pederson ED, Lamberts B. Measurements of interleukin-6 in gingival crevicular fluid from adults with destructive periodontal disease. *J Periodontol* 1993;64:980–983.
  16. Reinhardt RA, Masada MP, Kaldahl WB et al. Gingival fluid IL-1 and IL-6 levels in refractory periodontitis. *J Clin Periodontol* 1993;20:225–231.
  17. Irwin CR, Myrillas TT. The role of IL-6 in the pathogenesis of periodontal disease. *Oral Dis* 1998;4:43–47.
  18. Emrich LJ, Shlossman M, Genco RJ. Periodontal disease in non-insulin dependent diabetes mellitus. *J Periodontol* 1991;62:123–130.
  19. 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.
  20. Wilton JMA, Griffiths GS, Curtis MA et al. Detection of high-risk groups and individuals for periodontal diseases. *J Clin Periodontol* 1988;15:339–346.
  21. Olliver RC, Tervonen T. Diabetes—A risk factor for periodontitis in adults? *J Periodontol* 1994;65:530–538.
  22. Rayfield EJ, Ault MJ, Keusch GT et al. Infection and diabetes, the case for glucose control. *Am J Med* 1982;72:439–450.
  23. The American Academy of Periodontology. Diabetes and periodontal diseases (position paper). *J Periodontol* 1996;67:166–176.
  24. Wilson RM, Reeves WG. Neutrophil phagocytosis and killing in insulin-dependent diabetes. *ClinExpImmunol* 1986;63:478–484.
  25. Sorsa T, Ingman T, Suomaainen K et al. Cellular source and tetracycline inhibition of gingival crevicular fluid collagenase of patients with labile diabetes mellitus. *J Clin Periodontol* 1992;19:146–149.
  26. Salvi GE, Yalda B, Collins JG et al. Inflammatory mediator response as a potential risk marker for periodontal diseases in insulin-dependent diabetes mellitus patients. *J Periodontol* 1997;68:127–135.
  27. Mühlman HR and Son SH. Gingival bleeding — a leading symptom in initial gingivitis. *Helvetica Odontologica Acta* 1971;15:107–113.
  28. 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. *J Korean Aca Periodontol* 2005;35:661-674.
29. Cho JY, Xing S, Liu X et al. Expression and activity of human Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup>-symporter-inhumangliomacellsbyadenovirus-mediatededge-nedelivary. *GeneTherapy*2000;7:740-749.
  30. Brownlee M. Glycation and diabetic complications. *Diabetes* 1994;43:836-841.
  31. Kubota T, Nomura T, Takahashi T, Hara K. Expression of mRNA for matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in periodontitis-affected human gingival tissue. *Archives of Oral Biology* 1996;41:253-262.
  32. Birkedal-Hansen H. Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases. *J Periodontol* 1993;64:474-484.
  33. Tüter G, Kurtis B, Serdar M et al. Effects of phase I periodontal treatment on gingival crevicular fluid levels of matrix metalloproteinase-3 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1. *J Clin Periodontol* 2005;32:1011-1015.
  34. Alpagot T, Bell C, Lundergan W, Chambers DW, Rudin R. Longitudinal evaluation of GCF MMP-3 and TIMP-1 levels as prognostic factors for progression of periodontitis. *J Clin Periodontol* 2001;28:353-359.
  35. Choi BK, Moon SY, Cha JH, Kim KW, Yoo YJ. Prostaglandin E2 is a main mediator in receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand-dependent osteoclastogenesis induced by *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Treponema socranskii*. *J Periodontol* 2005;76:813-820.
  36. Ishimi Y, Miyaura C, Jin CH et al. IL-6 is produced by osteoblasts and induces bone resorption. *J Immunol* 1990;145:3297-3303.

# The Gingival Tissue Levels of Bone Resorptive Mediators in Human Chronic Periodontitis with Type 2 Diabetes Mellitus

Mi-Jeong Kim, Sang-Ho Ryu, 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 MMP-3, PGE<sub>2</sub> and IL-6 in the gingival tissues of patients with type<sub>2</sub> diabetes mellitus and healthy adults with chronic periodontitis.

**Material 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 with chronic periodontitis. Group 3(n=8) is inflamed gingiva from patients with chronic periodontitis associated with type 2 DM. Tissue samples were prepared and analyzed by Westernblotting. The quantification of MMP-3, PGE<sub>2</sub> and IL-6 were performed using a densitometer and statistically analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey test.

## Results:

1. The expression levels of MMP-3 were shown highest in group 3 compared to group 1 and 2, and It showed increasing tendency in group 2 and 3.
2. The expressions of PGE<sub>2</sub> and IL-6 were shown increasing tendency in group 2 and 3, and It was highest in group 3.
3. As expressions of MMP-3 were increased, PGE<sub>2</sub> and IL-6 expressions showed increasing tendency in group 3 than group1 and 2, although there were no proportional relationship.

**Conclusion:** This study demonstrated that the expression levels of MMP-3, PGE<sub>2</sub> and IL-6 will be inflammatory markers of periodonta linflamed tissue and DM. It can be assumed that MMP-3 affect to expressions of PGE<sub>2</sub> and IL-6 in progression of periodontal inflammation with alveolar bone re-sorption to type 2 DM.