

# 만성 치주염 환자의 치은 조직에서 RANK 및 RANKL의 발현

백영란, 이재목\*

경북대학교 치의학전문대학원 치주과학교실

## I. 서론

만성 치주염은 치아를 지지하는 결체조직과 골조직의 파괴로 이어지는 염증성 질환이다<sup>1)</sup>. 조골세포와 파골세포는 치조골의 개조를 담당하는 주요세포로써, 치주질환에서 치조골의 파골세포는 세균감염과 proinflammatory cytokine에 의해 자극을 받아 치조골과 치아의 소실로 이어진다.

최근 Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand(RANKL)와 그 수용체인 Receptor activator of nuclear factor kappa-B(RANK)는 파골세포의 형성을 조절하는 주요 인자로 인식되고 있다<sup>2)</sup>. RANKL(osteoclast differentiation factor, osteoprotegerin ligand, TNF-related activation induced cytokine)은 TNF ligand superfamily이며, 조골세포/기질세포<sup>3)</sup>, 섬유아세포<sup>4)</sup>, 활성화된 T 세포<sup>5)</sup>에서 발현된다. RANKL은 조골세포에서는 membrane-anchored protein이지만, T 세포에서는 대부분 soluble form에서 활성화된다<sup>6)</sup>.

RANK는 TNF receptor superfamily로써, 4개의 cystein-rich pseudorepeats를 가진 총 616개의 아

미노산으로 구성된 1형 transmembrane receptor이다. 기능적 RANK의 발현은 주로 파골세포와 수지상세포에서 관찰되어 왔으며<sup>7)</sup>, 신호전달체계는 c-jun, NF-kB, serine/threonine kinase PKB/Akt 경로를 포함한다<sup>8)</sup>.

RANKL은 파골세포의 형성, 융합, 활성화, 생존에 필수적인 요소이다<sup>9)</sup>. RANKL은 파골 전구세포와 파골세포 표면의 RANK와 결합하여 파골 전구세포의 분화 및 성숙한 파골세포의 활성을 자극하며<sup>10)</sup> 이러한 RANKL의 효과는 osteoprotegerin(OPG)에 의해 억제된다<sup>11)</sup>.

이전의 연구들은 치주조직에서 RANK, RANKL, OPG 발현을 보고하였다<sup>12,13)</sup>. 조골세포뿐 아니라, 치주 인대의 섬유아세포, 치은 섬유아세포는 치주조직에서 RANK와 OPG의 발현에 관여한다고 알려져 있으며<sup>4)</sup>, 최근의 연구에서 인간 치아의 중간엽세포와 상피세포가 RANKL과 OPG를 발현하며 이러한 cytokine은 조골세포 계열에서 RANK와 OPG 발현을 조절하는 것과 동일한 인자에 의해 조절된다는 것이 밝혀졌다<sup>15)</sup>.

실험적으로 유도된 치주염이나 병적인 환경에서,

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

RANK와 RANKL의 발현이 증가하는 것으로 알려져 있다. Teng 등<sup>16)</sup>은 쥐의 실험적 치주염 모델에서, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*가 CD4+T 림프구를 자극하여, RANKL 생산을 증가시키고 치조골 흡수를 증가시킨다고 제시하였다. Ogasawara 등<sup>17)</sup>은 쥐의 치주조직에서 과도한 교정력에 의한 병적인 상태가 야기될 때, in situ 상에서 파골세포가 RANK, RANKL, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ 의 발현을 증가시키는 것을 관찰하였다.

이전의 연구들이 세포단위에서 RANK와 RANKL이 발현되는 것을 보여 주었지만, 치주질환이 있는 조직에서 RANK와 RANKL protein의 발현에 대한 연구는 제한적이며, 치주염의 병인론에서 RANK와 RANKL의 역할과 상호작용은 아직까지 완전히 확립되지 않았다.

이 연구의 목적은 치주질환이 없는 환자와 만성 치주염 환자의 치은 조직에서 RANK와 RANKL의 발현을 관찰하여 상호비교 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 만성 치주염 환자 8명(여성 2명, 남성 6명, 평균나이: 52.4 $\pm$ 16.7세), 그리고 치주질환이 없는 환자 8명(여성 3명, 남성 5명, 평균나이; 42.1 $\pm$ 13.9세)으로 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<sup>18)</sup>, 치주낭 깊이) 그리고 골 흡수의 방사선학적 증거에 따라, 각 치은 조직 표본은 2군(Group 1, 2)으로 나누어졌다.

첫 번째 군(Group 1, 대조군)은 치주질환이 없는 8명의 환자로부터 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 분류<sup>19)</sup>에 따라 진단되었다. 두 번째 군의 모든 환자는 치주낭 깊이가 5 mm 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 Mühlman & Son에 따른 치은 열구 출혈 지수<sup>18)</sup> 3을 보이는 치아로부터 채득되었다. 수술 시, 채득된 조직 표본은 즉시 액화 질소에 급속 동결되었다(-70°C).

### 2. 단백질 분리와 Western blotting

Western blotting은 이전에 Kang 등<sup>20)</sup>의 연구에서 시행된 방법과 동일하게, 동결된 조직을 Cho 등<sup>21)</sup>의 방법을 따라 1:30으로 희석된 protease inhibitor cocktail(Roche, Germany)을 함유한 RIPA 용해완충액(10 mM EDTA, 0.15 M NaCl)에서 균질화시키고, 그 용해물을 10초 동안 세 번 초음파 분쇄하였으며, 4°C, 12000g에서 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% bromphenol 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-RANK, anti-RANKL(Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA) 항체와 1.5시간동안 반응시켰다.

이러한 막은 Tween 20으로 5분씩 5회 세척되고, anti-RANK에 대하여 horseradish peroxidase (HRP)-conjugated donkey anti-goat 이차항체를, anti-RANKL에 대하여 HRP-conjugated goat anti-mouse 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.

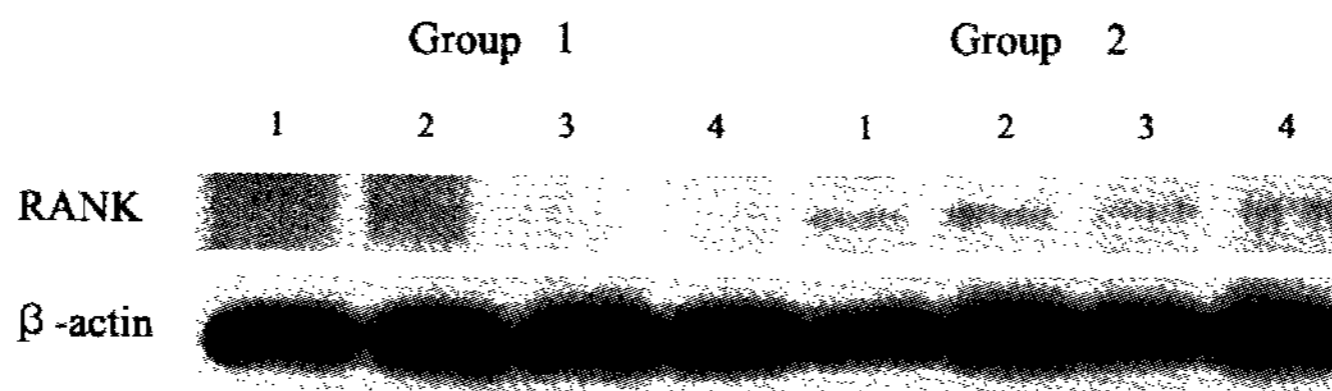
RANK, RANKL 발현에 대한 정량 분석은 densitometer(Image Gauge V 3.46, Koshin Graphic Systems, Fuji Photo Film Co., Japan)을 이용하여 시행되었다. 각 표본에서  $\beta$ -actin(Abcam, UK)에 대한 표준화를 시행하고, RANK, RANKL의 발현은 RANK 또는 RANKL/ $\beta$ -actin의 비율로 나타내었으며, 각 군 사이의 차이가 결정되었다.

### 3. 통계

모든 수치는 평균±표준편차로 나타내었고, 결과는 통계학적으로 분석되었다. 각 군 사이의 RANK, RANKL 수준은 Student's t-Test를 이용하여 비교되었다. ( $p < 0.05$ ).

### III. 결과

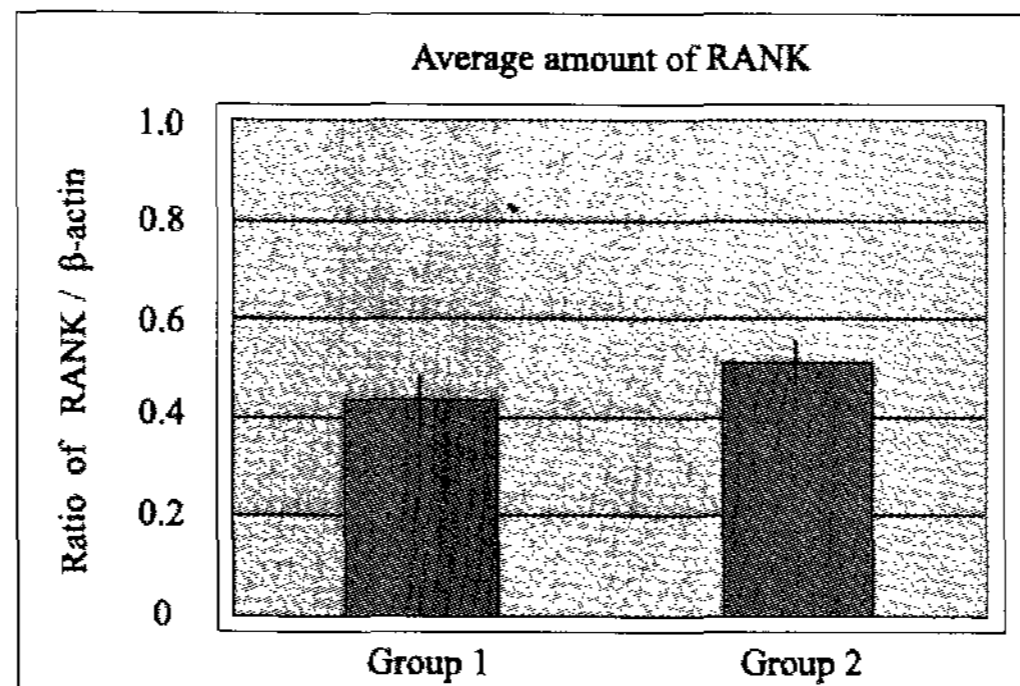
대표적인 Western blot 자료가 Figure 1A에 제시되어 있으며, 두 군에서 RANK는 분자량 90 kDa에서 탐지되었다. 각 군에서 RANK의 발현 수준을 정량화하기 위해, RANK의 발현 수준은 densitometer로 측정되었으며,  $\beta$ -actin에 특이적인 항체를 이용한 Western blot 분석을 통해  $\beta$ -actin의 발현 수준이 또한 측정되었다. 그리고 난 후 RANK 발현 수



**Figure 1A** RANK Western analysis showing 4 representative samples in each group. The expression levels of RANK were rather increased in group 2 than in group 1. In order to quantify detected RANK,  $\beta$ -actin levels were also measured.

Group 1 : healthy gingiva from non-periodontitis patient

Group 2 : inflammed gingiva from patient with chronic periodontitis

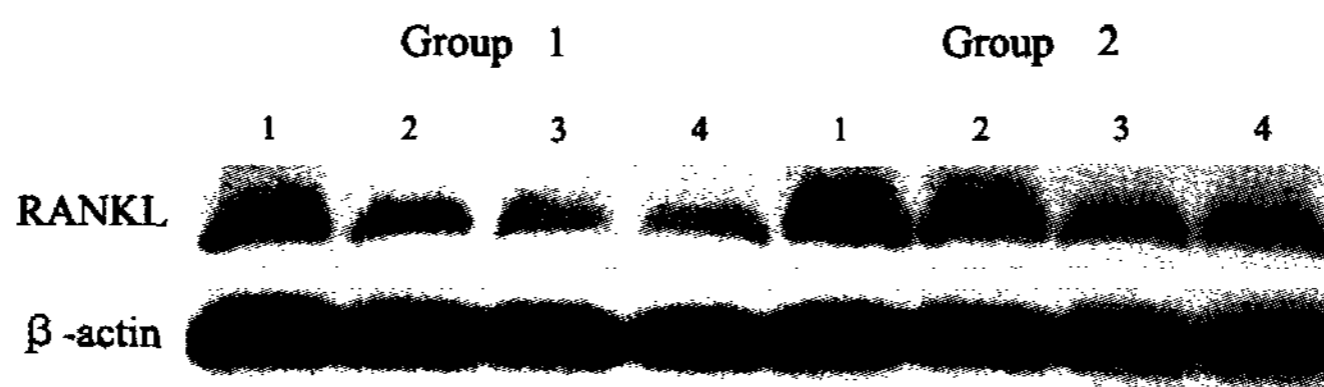


**Figure 1B.** Graphics showing the average amounts (Ratio of RANK/ $\beta$ -actin) and standard deviation of RANK in group 1, 2.

In the inflammed gingiva with chronic periodontitis (group 2), RANK seemed to be increased compared to group 1 but, the difference between two groups was not statistically significant. ( $p > 0.05$ )

Group 1 : healthy gingiva from non-periodontitis patient

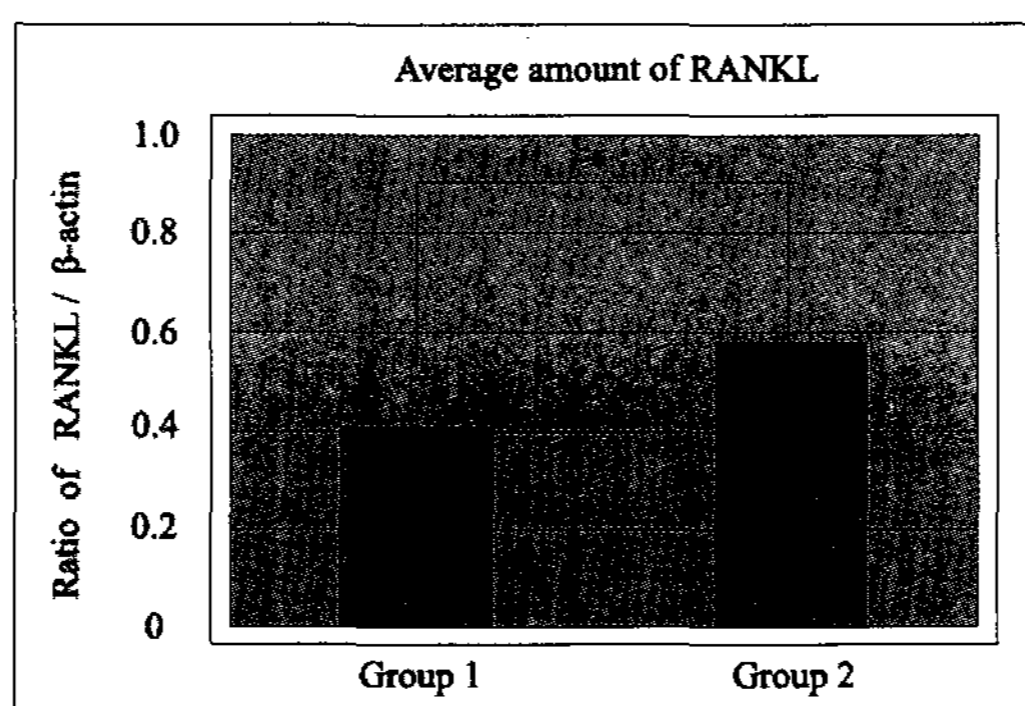
Group 2 : inflammed gingiva from patient with chronic periodontitis



**Figure 2A.** RANKL Western analysis showing 4 representative samples in each group. RANKL corresponding to molecular weight 40KDa was shown to be expressed in all samples including healthy gingiva and the expression levels of RANKL were increased in order of group 1, group 2. In order to quantify detected RANKL,  $\beta$ -actin levels were also measured.

Group 1 : healthy gingiva from non-periodontitis patient

Group 2 : inflamed gingiva from patient with chronic periodontitis



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

Group 1 : healthy gingiva from non-periodontitis patient

Group 2 : inflamed gingiva from patient with chronic periodontitis

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

준은  $\beta$ -actin에 의해 표준화 되었다(RANK/ $\beta$ -actin의 비) 표준화된 RANK의 발현 수준은 Figure 1B에 그래프로 요약되어 있다.

RANK의 발현 수준은 1군에서 평균  $0.432 \pm 0.056$ , 2군에서  $0.511 \pm 0.042$ 를 나타내었다. 1군과 2군 사이에 통계적으로 유의한 차이는 없었다 ( $p > 0.05$ ).

Western blot 분석을 이용한 RANKL의 발현 수준은 분자량 40 kDa의 RANKL에 특이적인 항체를 이용하여 탐지되었다(Figure 2A). RANKL의 발현수준도  $\beta$ -actin 표준화를 통해 정량화 하였으며, RANKL의 발현 수준이 Figure 2B에 요약되어 있다.

RANKL의 발현 수준은 1군에서 평균  $0.406 \pm 0.066$ , 2군에서  $0.574 \pm 0.114$ 로, 2군에서 1군에 비해 유의하게 높게 나타났다( $p < 0.05$ ).

#### IV. 고찰

치주염은 치은 조직으로 단핵세포의 침윤을 특징으로 하는 염증성 질환이다. IL- $1\beta$ , TNF, PGE $_2$ , IL-6<sup>22-24</sup>)와 같이 골 흡수를 자극하는 것으로 알려진 염증성 사이토카인들이 인간의 치주염 조직에 존재한다는 것은 광범위하게 받아들여지고 있지만, 파골세포 활성화의 주요 매개자인, RANK와 RANKL의 역할은 아직까지 명확하게 확립되지 않았다

이번 연구에서는 치주적 파괴에서 RANK와 RANKL protein의 분포를 이해하기 위해, 치주질환이 없는 환자와 만성 치주염을 가진 환자의 치은 조직에서 RANK와 RANKL의 발현을 관찰하여 상호비교 분석하였다.

이 연구에서 분자량 90 kDa에 해당하는 RANK는

대부분의 표본에서 발현되었으며, 정량적 분석 결과 RANK 발현은 치주질환이 없는 환자의 건강한 조직에 비하여 만성 치주염을 가진 환자의 염증성 조직에서 다소 증가하였지만, 통계적 유의성은 없는 것으로 나타났다.

Cortti 등<sup>25)</sup>은 In Situ hybridization을 이용하여, 치주염이 있는 조직의 단핵세포 집합체에서 RANK mRNA의 발현을 관찰하였고, 이러한 RANK를 발현하는 세포의 존재는 치주염의 조직에 성숙한 파골세포를 형성할 가능성이 있는 세포가 존재한다는 것에 대한 증거가 될 수 있다고 제시하였다.

현재까지 몇몇 연구<sup>17,25)</sup>에서 치주 조직에 존재하는 세포의 종류에 따른 RANK 발현이 보고되었지만, 치은 조직에서 RANK 발현에 대한 정성, 정량적 분석을 시도한 보고는 거의 없는 실정이다. RANK가 주로 파골 전구세포와 파골세포에서 발현되기 때문에, 골 조직에서 발현양상이 좀더 명확할 것으로 기대되지만, 치조골의 파괴가 진행될 때, 염증성 산물은 골조직에서 치은 조직을 거쳐 치은 열구로 유리될 수 있기 때문에, 치주염의 치은 조직에서 그 발현양상을 관찰해 보았다.

치주염은 골 파괴를 동반하기 때문에, 염증 상태가 증가하면 RANK와 RANKL의 발현이 증가하고 파골세포 형성이 증가할 것으로 예상되는데, 이러한 가설은 이번 연구의 RANK 발현에 있어서는 다소 차이를 보이는 결과를 보여 주었다.

최근의 한 연구는<sup>26)</sup> 이 결과에 대한 가능한 설명을 제시할 수도 있을 것이다. OPG와 RANKL의 발현은 많은 osteotropic factor에 의해 조절되지만, RANK의 발현 조절은 면역세포에 제한적이고, 파골세포 계열은 대부분의 osteotropic factor에 의한 조절에 실패한다고 보고하였다.

또 다른 가능한 설명은 RANK가 주로 파골 전구세포와 파골세포에서 발현된다는 것에 기인한다<sup>26)</sup>. 골 흡수가 활발한 부위의 치조골 조직이 포함된다면 그 차이가 좀 더 명확해 질것으로 예상되지만, 이 방법은 인간 연구에 적용하기에는 다소 침습적이다.

또한 이 실험에서 조직 표본이 치주질환에 심도에

의해 분류되지 않았기 때문에, 이러한 결과가 채득된 조직 표본의 다양한 염증 정도에 기인할 수도 있을 것이라 추정된다. 마지막으로, 제한된 표본 수와 개인 차(성별, 나이)도 결과에 영향을 미치는 요소로 고려될 수 있을 것이다.

이번 연구에서 RANKL의 발현은 치주질환이 없는 환자의 건강한 치은에 비하여 만성 치주염에서 더 높게 나타났으며, 통계적 유의성이 관찰되었다. 이것은 치주염 환자에서 시행된 mRNA 수준의 연구와 일치하는 결과를 보였다<sup>27-28)</sup>.

이전 연구들은 치주질환에서 RANKL의 발현 및 RANKL mRNA 증가를 보고하였다. Nagasawa 등<sup>27)</sup>은 RANKL 발현되는 부위가 RANKL이 발현되지 않는 부위에 비하여 더 깊은 치주낭을 가진다는 관찰하였으며, Liu 등<sup>28)</sup>은 건강한 대조군과 중등도 치주염에 비하여 진전된 치주염에서 RANKL mRNA 발현이 가장 높다고 보고하였다. 또한 RANKL mRNA가 염증성세포, 주로 림프구와 대식세포에서 발현된다는 것을 보여주었다.

Mogi 등<sup>29)</sup>은 만성 치주염을 가진 환자의 치은열구액에서 RANKL 발현이 증가한다는 것을 보고하였으며, Bostanci 등<sup>30,31)</sup>은 치은 열구액과 치은 조직을 이용한 연구에서 RANKL 발현은 건강한 상태와 치은염에서는 감소하였으며, 여러 유형의 치주염에서 증가하는 것을 제시하였다.

염증과정이 진행됨에 따라, 염증 산물은 치은 조직에서 치은 열구액으로 방출된다. 비록 단백질과 mRNA 수준 사이에 차이가 있지만, 이번 연구는 만성 치주염이 있을 경우, 치은 조직에서 RANKL 발현이 증가한다는 것을 보여주었다.

RANK와 RANKL 발현의 상호관계에서, RANKL 발현이 만성 치주염에서 증가함에 따라, RANK 발현은 1군에 비해 2군에서 다소 증가하였으나, 그 차이는 유의하지 않았다. RANK 발현은 RANKL 발현에 비례해서 증가하지 않는 것으로 보이며, 이에 관련된 조골세포, 파골세포, 림프구, 대식세포 등의 활성화와 세균감염 정도에서도 차이가 있는 것으로 생각된다.

몇몇 연구에서 주요 치주 병원균인 *P.gingivalis*<sup>32)</sup>

와 *A. actinomycetemcomitans*<sup>33)</sup>가 치은 섬유아세포와 조골세포에서 RANK를 발현시킨다고 보고하고 있으며, lipopolysaccharide(LPS)가 조골세포에서 RANKL 발현을 유도한다는 것을 제시하였다<sup>34)</sup>.

치주염의 조직에서 RANKL을 발현하는 주요세포는 림프구로 알려져 있으며, T 림프구는 파골 전구세포와의 상호작용으로 파골세포 형성에 중요하게 작용한다<sup>14)</sup>. 최근에는 B 림프구도 치주질환에서 RANKL에 대한 primary source로 생각되고 있다<sup>35)</sup>. 또한 다양한 hormone(vitamin D, parathyroid hormone)과 cytokine(IL-1, IL-6, IL-11, TNF- $\alpha$ , PGE<sub>2</sub>)이 RANKL 발현을 유도할 수 있다고 알려져 있다<sup>22-24, 36, 37)</sup>.

그러므로, 다음과 같은 치주질환의 골 흡수 기전이 제시될 수 있을 것이다. 치주염의 생체필름(biofilm)과 연관된 감염성 물질은 숙주 반응을 야기하게 되며, 염증세포(주로 림프구와 대식세포)가 치은 조직에 침윤하게 된다. 이들은 proinflammatory cytokine(e.g. IL-1, TNF- $\alpha$ )을 생산하여 조골세포 계열을 통해 RANKL을 간접적으로 발현시키거나, 활성화된 T 세포에서 관찰되는 것과 같이 직접적으로 RANKL을 발현시킨다. 이러한 RANKL은 파골 전구세포의 RANK를 통해 osteoclastogenesis를 촉진시켜 염증진행에 기여하는 것으로 생각된다.

결론적으로, 이 연구는 건강한 치은과 염증성 치은에서 RANK 발현은 유사하였으나, 만성 치주염의 염증성 치은에서 치주질환이 없는 환자의 건강한 치은에 비하여 RANKL 발현이 유의하게 증가하는 것을 보여 염증성 질환의 진단 및 치료과정에서 표지인자 역할이 가능할 것으로 생각되며, 또한 RANK와 RANKL의 상호관계에서는, RANK 발현은 RANKL 발현에 비례해서 증가하지 않는 것으로 추정된다.

치주염의 병인론에서 RANK와 RANKL의 역할을 설명하기 위해서는, 좀 더 높은 수준에서 RANK-RANKL과 다른 cytokine의 효과 및 상호작용을 조사하기 위한 더 많은 *in vitro*와 *in vivo* 연구들이 필요할 것으로 생각된다. 이러한 연구들이 질환의 진단과 치료 방법의 발전에 기여할 수 있을 것으로 사료된다.

## V. 참고문헌

1. Ishikawa I, Nakashima K, Koseki T et al. Induction of the immune response to periodontopathic bacteria and its role in the pathogenesis of periodontitis. *Periodontol* 2000. 1997;14:79-111.
2. Hofbauer LC, Heufelder AE. Role of receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand and osteoprotegerin in bone cell biology. *J Mol Med* 2001;79:243-53.
3. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N et al. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:3597-602.
4. Quinn JMW, Horwood NJ, Elliott J, Gillespie MT, Martin TJ. Fibroblastic stromal cells express receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand and support osteoclast differentiation. *J Bone Miner Res* 2000;15(8):1459-66
5. Taubman MA, Kawai T. Involvement of T-lymphocytes in periodontal disease and in direct and indirect induction of bone resorption. *Crit Rev Oral Biol Med* 2001;12:125-35.
6. Kanamaru F, Iwai H, Ikeda T, Nakajima A, Ishikawa I, Azuma. Expression of membrane-bound and soluble receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand (RANKL) in human T cells. *Immunol Lett* 2004;94:239-46.
7. Katagiri T, Takahashi N. Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation. *Oral Dis* 2002;8:147-59.
8. Wada T, Nakashima T, Hiroshi N, Penninger JM. RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease. *Trends*

- Mol Med 2006;12:17–25.
9. Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR et al. The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. *J Bone Miner Res* 2000;15:2–12.
  10. Hsu H, Lacey DL, Dunstan CR et al. Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:3540–5.
  11. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N et al. Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro. *Endocrinology* 1998;139:1329–37.
  12. Hormdee D, Nagasawa T, Kiji M. Protein kinase-A-dependent osteoprotegerin production on interleukin-1 stimulation in human gingival fibroblasts is distinct from periodontal ligament fibroblasts. *Clin Exp Immunol* 2005;142:490–7.
  13. Mizuno N, Shiba H, Mouri Y et al. Characterization of epithelial cells derived from periodontal ligament by gene expression patterns of bone-related and enamel proteins. *Cell Biol Int* 2005;29:111–7.
  14. Nagasawa T, Kiji M, Yashiro R et al. Roles of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand (RANKL) and osteoprotegerin in periodontal health and disease. *Periodontol* 2000, 2007;43:65–84. Review
  15. Sakata M, Shiba H, Komatsuzawa H et al. Expression of osteoprotegerin (osteoclastogenesis inhibitory factor) in cultures of human dental mesenchymal cells and epithelial cells. *J Bone Miner Res* 1999;14:1486–92.
  16. Teng YT, Nguyen H, Gao X et al. Functional human T-cell immunity and osteoprotegerin ligand control alveolar bone destruction in periodontal infection. *J Clin Invest* 2000;106:R59–67.
  17. Ogasawara T, Yoshimine Y, Kiyoshima T et al. In situ expression of RANKL, RANK, osteoprotegerin and cytokines in osteoclasts of rat periodontal tissue. *J Periodontol Res* 2004;39:42–9.
  18. Muhlemann HR and Son S. Gingival sulcus bleeding a leading symptom in initial gingivitis. *Helv Odontol Acta* 1971;15:107.
  19. Amitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol* 1999;4:1–6.
  20. 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.
  21. Cho JY, Xing S, Liu X et al. Expression and activity of human Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup>symporter in human glioma cells by adenovirus-mediated gene delivery. *Gene Therapy* 2000;7:740–749.
  22. Choi BK, Moon SY, Cha JH, Kim KW, Yoo YJ. Prostaglandin E2 is a main mediator in receptor activator of nuclear factor-kB ligand-dependent osteoclastogenesis induced by *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Treponema socranskii*. *J Periodontol* 2005;76:813–820.
  23. Bickel M, Axtelius B, Solioz C, Attström R. Cytokine gene expression in chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 2001;28(9): 840–7.
  24. Ishihara Y, Nishihara T, Kuroyanagi T et al. Gingival crevicular interleukin-1 and interleukin-1 receptor antagonist levels in

- periodontally healthy and diseased sites. *J Periodontal Res* 199;32:524–9.
25. Crotti T, Smith MD, Hirsch R et al. Receptor activator NF kappaB ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) protein expression in periodontitis. *J Periodontal Res* 2003;38:380–7.
  26. Theoleyre S, Wittrant Y, Tat SK et al. The molecular triad OPG/RANK/RANKL: involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004;15:457–75.
  27. Nagasawa T, Kobayashi H, Kiji M et al. LPS-stimulated human gingival fibroblasts inhibit the differentiation of monocytes into osteoclasts through the production of osteoprotegerin. *Clin Exp Immunol* 2002;130:338–44.
  28. Liu D, Xu JK, Figliomeni L et al. Expression of RANKL and OPG mRNA in periodontal disease: possible involvement in bone destruction. *Int J Mol Med* 2003;11:17–21.
  29. Mogi M, Ootogoto J, Ota N, Togari A. Differential expression of RANKL and osteoprotegerin in gingival crevicular fluid of patients with periodontitis. *J Dent Res* 2004;83:166–9.
  30. Bostanci N, Ilgenli T, Emingil G et al. Gingival crevicular fluid levels of RANKL and OPG in periodontal diseases: implications of their relative ratio. *J Clin Periodontol* 2007;34:370–6.
  31. Bostanci N, Ilgenli T, Emingil G et al. Differential expression of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin mRNA in periodontal diseases. *J Periodontal Res* 2007;42:287–93.
  32. Okahashi N, Inaba H, Nakagawa I et al. Porphyromonas gingivalis induces receptor activator of NF-kappaB ligand expression in osteoblasts through the activator protein 1 pathway. *Infect Immun* 2004;72:1706–14.
  33. Belibasakis GN, Johansson A, Wang Y et al. Cytokine responses of human gingival fibroblasts to Actinobacillus actinomycescomitans cytolethal distending toxin. *Cytokine* 2005;30:56–63.
  34. Kikuchi T, Matsuguchi T, Tsuboi N et al. Gene expression of osteoclast differentiation factor is induced by lipopolysaccharide in mouse osteoblasts via Toll-like receptors. *J Immunol* 2001;166:3574–9.
  35. Kawai T, Matsuyama T, Hosokawa Y et al. B and T lymphocytes are the primary sources of RANKL in the bone resorptive lesion of periodontal disease. *Am J Pathol* 2006;169:987–98.
  36. Huang JC, Sakata T, Pfleger LL et al. PTH differentially regulates expression of RANKL and OPG. *J Bone Miner Res* 2004;19:235–44.
  37. Tsukii K, Shima N, Mochizuki S et al. Osteoclast differentiation factor mediates an essential signal for bone resorption induced by 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3, prostaglandin E2, or parathyroid hormone in the microenvironment of bone. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;246:337–41.



# The Expression of RANK and RANKL in Gingival Tissue of Human Chronic Periodontitis

Young-Ran Baek, Jae-Mok Lee\*

Department of Periodontology, School of Dentistry, Kyungpook National University

**Purpose:** The purposes of this study were to compare and quantify the expressions of RANK and RANKL in the gingival tissues of non-periodontitis patient and patients with chronic periodontitis, in order to understand the contribution of these proteins to periodontal destruction.

**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 two groups. Group 1 (n=8) is clinically healthy gingiva without bleeding and no evidence of bone resorption or periodontal pockets, obtained from non-periodontitis patients. Group 2 (n=8) is inflamed gingiva from patients with chronic periodontitis. Tissue samples were prepared and analyzed by Western blotting. The quantification of RANK and RANKL were performed using a densitometer and statistically analyzed by Student's t-Test.

**Results:** The expression of RANK were similar in group 1 and 2. The difference between group 1 and 2 was not statistically significant. And the mean amount of RANKL was more increased in group 2 than group 1. The difference between group 1 and group 2 was statistically significant.

**Conclusion:** The expression level of RANK didn't show any significant difference between healthy tissue from non-periodontitis patients and inflamed tissue from chronic periodontitis, but the expression level of RANKL in inflamed tissue from chronic periodontitis showed significantly increased tendency compared to healthy gingiva from non-periodontitis patients. Therefore, characteristics of RANK and RANKL in progress of chronic periodontitis would be basis of further studies in diagnostic method and treatment index of the disease.