*Treponema denticola*와 *Treponema lecithinolyticum*의 분쇄액이 치은섬유아세포의 Cytokine 분비 및 Matrix metalloproteinase 활성에 미치는 영향

서혜연[1] · 최봉규[2] · 최성호[1] · 조규성[1] · 김종관[1] · 채중규[1]

연세대학교 치과대학 치주과학교실, 치주조직재생연구소[1]

I. 서론

치주질환은 여러 종류의 세균종에 의한 복합 감염성 질환이다. 현재까지 밝혀진 치주질환의 원인균은 *Porphyromonas gingivalis, Prevotella intermedia, Fusobacterium nucleatum, Campylobacter rectus, Eikenella corrodens, Spirochetes, Actinobacillus actinomycetemcomitans* 등이며 이들은 강력한 독성 성분을 갖고 있어 치주조직의 파괴를 일으킬 수 있다[1].

이들 세균의 공격에 대항하는 숙주 면역계의 역할은 감염을 치주조직에 국소화시킴으로서 전신적인 감염을 예방할 수 있으나 한편 그 염증 산물로 인해 국소적인 조직파괴를 유발시켜 치주질환을 야기시킬 수 있다. 최근에는 숙주 면역계에서 cytokine의 중요성이 활발히 연구되어 cytokine network가 염증성 치주질환의 시작에 있어서 주요한 역할을 한다고 보고 있다[2]. 즉, 세균과 그 항원은 toxin으로서 직접 파괴를 일으킬 뿐만 아니라 숙주 면역세포를 자극하여 cytokine, arachidonic acid product, complement, protease 등의 면역병리학적 매개체를 분비하게 유도함으로써 간접적으로 치주조직의 염증성 병변을 야기,진행시킨다는 것이다[3,4]. Cytokine은 과거 lymphokine이라 불리던 물질로서 interleukin, growth factor, cytotoxic factor, activating or inhibitory factor, colony stimulating factor, intercrine 등 세포의 활성을 조절하는 역할을 하며[5] 이 중 치주질환과 관련된 염증성 cytokine은 Interleukin - 1(IL - 1α, β), Interleukin - 6(IL - 6), Interleukin - 8(IL - 8), Tumor necrosis factor - α(TNF - α) 등이다[1,2,4 - 6]. IL - 1의 주요 기능은 중성구의 chemotaxis와 B cell, T cell의 분화 촉진, 섬유아세포의 matrix metalloproteinase(MMP) 분비 촉진, 파골세포 형성 촉진 등이다. IL - 6의 주요 기능은 B cell이 plasma cell로 분화하는 것을 촉진시켜 immunoglobulin의 생성을 유도하며, 파골세포 형성을 촉진하여 치조골 흡수를 야기시키는 것이다. 이들 염증성 cytokine은 치주염에 이환된 환자의 치은 열구액에서 정상보다 높은 농도로 나타난다. 1990년 Masada 등의 연구[7]에 의하면 치주염에 이환된 부위의 치은 열구액에서 IL - 1의 농도가 정상인보다 높게 나타나며 치주염 치료후에는 급격히 감소한다고 보고하였고 1993년 Reinhardt 등의 연구[8]에 의하면 재발성 치주염(refractory periodontitis) 환자의 치은 열구액에서 IL - 1 및 IL - 6의 농도

가 높은 것으로 보고되었다. 이러한 염증성 cytokine은 정상조직에서도 비록 농도는 낮으나 발견되는 것으로 보아 치주조직의 turnover와 integrity유지에 참여하는 것으로 보인다. 그러나 세균의 lipopolysaccharide(LPS), 항원-항체 복합체 등에 의해 자극되면 그 양이 과다하게 분비되면서 숙주조직의 파괴를 야기시킨다[5]. 이들 cytokine의 주요 분비 세포는 단구/대식세포(monocyte/macrophage)로 알려져 왔으나[9-13], 그 밖에 섬유아세포(fibroblast), 상피세포(epithelial cell), 혈관내피세포(endothelial cell) 등에서도 분비되는 것으로 밝혀졌으며[5] 특히 치은섬유아세포는 그 분비량이 단구/대식세포에 비해서는 적지만 치주조직의 대부분을 차지하는 주요세포이므로 염증반응에서의 역할이 클 것으로 보인다[14]. 그 동안의 연구에 근거하면 보통 단구/대식세포가 세균의 LPS에 의해 자극받아 IL-1을 분비하고 이 IL-1이 다시 치은섬유아세포를 자극하여 MMP, IL-6, IL-8, PG을 유리시킨다는 보고가 많으나[4,15-18], 세균과 함께 배양시 단구/대식세포의 자극 없이도 바로 IL-1, IL-6, IL-8, MMP 등을 분비한다는 연구 보고도 많다[14,15,19-21]. 본 연구에서는 염증성 cytokine 중 치주 질환과 가장 관련이 있고, 치은섬유아세포에서 그 분비량이 많이 보고되는 IL-1β와 IL-6를 택하여 실험하였다.

MMP는 collagenase로 간단히 언급되기도 하며, 대개 결합조직세포, 혈관내피세포, 단핵세포, 대식세포에 의해 합성되고, 금속과 결합하는 단백분해효소이다. MMP의 구성원을 보면 interstitial collagenase(MMP-1, -8, -13), gelatinase(MMP-2와 -9), stromelysin(MMP-3, -10, -11) 그리고 membrane-bound group(MMP-14, -15, -16 -17)이 있다. gelatinase는 72 kDa의 gelatinase A(MMP-2) 와 95 KDa의 gelatinase B(MMP-9) 가 있으며 MMP-2는 주로 섬유아세포, 혈관내피세포, 골아세포에서 유리되고 MMP-9은 주로 대식세포, 상피세포, 다형핵백혈구에서 유리된다. 이들은 MMP-1에 의해 나선구조가 풀린 denatured interstitial collagen과, laminin, elastin, fibronectin, basement membrane을 분해시킨다[22]. 이러한 MMP-2는 비활성형으로 분비되며 이의 활성화는 plasmin, 세균의 단백 분해 효소에 의해 이루어 질 수 있다. 활성화된 MMP-2와 tissue inhibitor of metalloproteinase-2(TIMP-2)의 조절에 의해 세포외 기질 즉 치아 주위의 결합조직의 파괴량이 결정된다. Cytokine과 MMP의 연구는 주로 *A. actinomycetem-comitans, P. gingivalis, P. intermedia, C. rectus* 등 그람 음성 세균의 LPS로 실험한 것이었으므로 본 연구에서는 spirochetes를 치은섬유아세포에 처리시 cytokine의 분비증가 및 MMP 활성 여부를 알아보도록 할 것이다.

Spirochetes는 내편모가 있어 운동성이 있는 나선형의 세균으로서 *Treponema, Leptospira, Borrelia, Spirochaeta, Cristispira* 속(genus)이 있으며 구강 스피로헤타는 모두 *Treponema* 속이다. 1988년 Loesche의 연구[23]에 의하면 암시야 현미경으로 관찰시 성인형 치주염(adult periodontitis) 환자 치은연하 치태의 40%, 조기 발현 치주염(early-onset perodontitis) 환자 치은연하 치태의 50%를 spirochetes가 차지한다고 한다. 건강한 치주조직에서보다 치주염 환자에서 spirochetes수가 현저하게 증가한다는 보고와[24-26], 성공적인 치주질환 치료후 그 수가 감소하며[27], 치료후에도 spirochetes수가 줄어들지 않는 환자는 재발의 가능성이 훨씬 높은 것으로 보아[28,29] spirochetes가 치주질환의 병인론에 큰 역할을 차지하는 것으로 보인다. 그러나, 배양이 까다로와 복원력이 1%밖에 되지 않아 spirochetes에 대한 연구가 어려웠다. 1987년 Woese 등[30]에 의해 ribosomal RNA(rRNA) 염기서열을 이용한 세균종의 분석과 분류가 가능해졌고 DNA소식자, 면역화학적 요법 등에

의해 배양이 안되던 spirochetes 20여 종이 더 발견되고[31] 이들에 대한 연구가 활발해졌다. 현재까지 분리되어 보고된 구강 spirochetes 종으로는 *Treponema denticola, Treponema pectinovorum, Treponema socranskii, Treponema vincentii, Treponema mal - tophilum, Treponema medium, Treponema amylovorum* 등이 있는데 치주염과 관련된 연구는 주로 배양이 쉬운 *Treponema denticola*에 한정되어 있다[32]. 현재까지 밝혀진 구강 spirochetes의 독성성분으로는 LPS와 pepti - doglycan, chymotrypsin like enzyme 등이 있으며[33,34] 이들 성분에 의해 치주낭 상피세포의 세포간 결합을 소실시켜 조직내로 침투할 수 있고[34,35,36], LPS에 의해 숙주세포를 자극하여 cytokine을 분비시킬 수 있다. 또한 섬유아세포 및 치주인대 세포의 증식을 억제시키며[6,37,38], IL - 1β precursor를 활성화 시킨다는 보고[39]도 있다.

세균으로 치은섬유아세포를 처리할 때 LPS 등 특정 독소만을 추출해서 처치하는 경우가 많으나 최근의 연구[31]에 의하면 LPS외에 다른 outer membrane protein도 병인론에 영향을 많이 미치는 것으로 보고되었고, 또한 정[51] 등의 연구에 의하면 균분쇄액으로 처리하는 경우와 whole organism으로 처리하는 경우 결과의 차이가 없었으므로 본 연구에서는 균분쇄액을 사용하였다.

이에 본 연구는 *T. denticola*와, 가장 최근에 분리 배양된 *T. lecithinolyticum* 의 분쇄액으로 처리한 치은섬유아세포에서의 IL - 1β와 IL - 6 분비증가 여부를 확인하고, 치은섬유아세포에서 비활성형으로 분비되는 MMP - 2(progeltinase A)를 활성화시켜 교원질 분해를 증가 시키는가를 확인함으써 구강내 spiro - chetes가 치주질환 병인론에서 차지하는 역할을 연구하여 이에 보고하는 바이다.

II. 실험재료 및 연구방법

1. 실험재료

(1) *Treponema culture*

Treponema denticola ATCC 33521과 *Treponema lecithinolyticum* ATCC 700332를 각각 OMIZ - Pat[49] 배지에서 37℃, 혐기성 조건에서 3일간 배양한후 5000×g 힘으로 10분간 원심분리하고 phosphate buffer solu - tion(PBS)으로 세척한 뒤 균 침전물을 모았다. 이를 다시 인산 완충액에 부유한 후 세포분쇄기*(Branson model 250 sonifer)를 사용하여 균질화 하였으며 단백질양은 Coomassie pro - tein assay reagent(Pierce, Rockford, IL, USA)를 사용하여 측정하였다.

(2) 치은섬유아세포 배양과 세균 분쇄액 처리

전신적으로 건강한 16세 남자의 정상 치은을 채취하여 Hank's balanced salt solution(HBSS)으로 3회 세척하여 잔존하는 혈액을 제거한 다음 15번 blade로 채취하여 세절하였다. 치은섬유아세포가 조직세편으로부터 증식되어 단층밀생이 형성되면 75 mm 세포배양 접시를 이용하여 7 - 10일 간격으로 계대배양하였다. 본 실험에서는 세포의 균일한 특성을 얻기 위해 5 - 7세대의 세포를 사용하였다. 그 다음 치은섬유아세포를 96 - well microtiter plate에 well당 1×10^4 개씩 분주한 후 α - MEM(10% FBS 함유)배지를 넣고 24 - 48 시간 동안 37℃에서 배양하여 단일층이 형성된 것을 확인 했다. 혈청이 없는 α - MEM(200μℓ /well)으로 교환해 준 뒤 24시간을 방치하고 *T. denticola* 및 *T. lecithi - nolyticum*의 세포분쇄액(2.3μg - 75 μg)으로 처리한 후 24 - 48시간 동안 세포 배양기에서 유지한 후 세포 배양액을 모아 실험하였으며, 비처치군은 균 분쇄액 없이 치은섬유아세포만

*Fisher Scientific, USA

배양하여 실험하였다.

2. 연구방법

(1) MTT test

MTT test(microtiter assay which uses the tetrazolium test)는 살아있는 세포를 측정하여 세포증식 정도를 알아 보기 위해 사용되는 방법으로, 대사적으로 활성이 있는 마이토콘드리아의 환원효소에 의해 tetrazolium salt가 환원되는 원리를 이용한 것이다. 살아있는 세포의 succinate dehydrogenase에 의해 tetrazolium salt가 환원되어 색이 있는 불용성 formazan salts로 된다. 이 불용성 염기를 용해하여 형성된 formazan의 양을 정량하여 세포증식이나 세포독성을 측정하는데 이용하는 것이다. 본 실험에서는 치은섬유아세포를 96-well microtiter plates에 1×10^4 개씩 각각 분주한 뒤, 10% FBS가 함유된 α-MEM에서 37℃로 24시간 배양하였다. 그 다음, 혈청이 함유되어 있지 않은 배지로 교환하여 24 시간 동안 배양한 후 여러 가지 농도(2.3μg-75μg)의 세균 분쇄액을 1일, 2일 동안 처리하여 세포증식에 대한 세균의 효과를 MTT test로 측정하였다. 세포배양액을 제거한 후에 100μℓ의 MTT 시약(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl-]-2,5-diphenyltetrazolium bromide)을 넣은 후 4시간 동안 방치하였다. MTT 시약을 제거한 뒤, 50μℓ dimethyl sulfoxide(DMSO)를 첨가하여 세포안에 생성된 formazan 결정을 녹인 뒤 570 nm light filter를 사용하여 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) reader에서 흡광도를 읽었다.

(2) IL-6, IL-1β ELISA

Human IL-6 ELISA kit(Endogen, Woburn, MA, USA)를 이용하여 실험하였다. IL-6, IL-1β가 도포되어 있는 96 stripwell plates에 각 well 당 50μℓ의 biotinylated anti-body를 넣고 위의 *Treponema* 분쇄액으로 처리한 치은섬유아세포 배양액, 균 분쇄액이 없는 치은섬유아세포 배양액 및 표준 용액을 50μℓ 넣은후 실온에서 2시간 방치하였다. 세척 완충액으로 3번 충분히 세척한후 streptavidin-HRP(horseradish peroxidase) solution을 각 well당 100μℓ 씩 넣고 실온에서 30분간 방치하였다. 다시 3번 세척 후 100μℓ 의 TMB(diaminobenzidine tetrahydrochloride) substrate solution을 넣어 암실에서 30분 반응시키고 다시 100μℓ의 stop solution으로 반응을 정지시킨후 30분 이내에 450nm와 550nm 파장에서의 흡광도를 측정하였다. 450nm에서의 흡광도 값에서 550nm 의 흡광도 값을 감하여 standard curve를 만들고 이에 근거하여 각 배양액의 IL-6, IL-1β 양을 측정하였다.

(3) Gelatinase zymography

치은섬유아세포에서 분비되는 비활성형의 pro MMP-2가 TDC와 TLC에 의해 활성형으로 변화되는 가를 알아보기 위해 zymography를 시행하였다. 세포배양액 15μℓ를 4μℓ의 시료완충액(2.5% SDS, 3% sucrose, 0.005% bromophenol bluel)과 섞은 뒤 0.2% gelatin을 함유한 SDS-polyacrylamide gel(8%)에서 전기영동하였다. Gel을 탈변성용액(2.5% Triton X-100과 50 mM Tris-HCl, pH 7.5)으로 30분간 2회 세척하여 SDS를 제거하였다. Gel을 37℃에서 효소반응용액(0.15 M NaCl, 10 mM $CaCl_2$, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5)과 18시간 반응시킨 후 염색액 Coomassie Blue R-250로 염색하고 isoprophyl alcohol: glacial acetic acid: dH_2O(1:1:8)로 탈색하여 clear band로 나타나는 부분을 보았다.

(4) Gelatin 분해능 측정

Zymography에서와 같이 세균으로 처리한 치은섬유아세포가 분비한 pro-MMP-

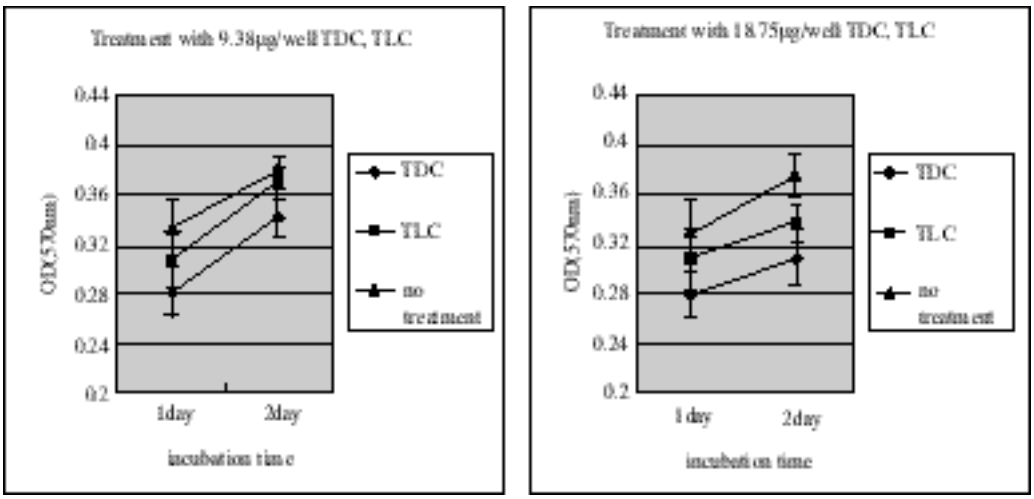

Figure 1. The effect of TDC and TLC on fibrobast proliferation with time

2(progelatinase A) 활성도를 human [^{3}H] - collagen type IV를 사용하여 측정하였다. 먼저 반응 완충액(2×: 1×[50 mM Tris - HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 10mM $CaCl_2$]에 human [^{3}H] - collagen type IV(N - [propionate - 2,3 - ^{3}H] - propionylated, 0.1 mCi/ml, NEN™ Life Science Products, Boston, MA,USA)를 50: 0.2(V/V)의 비율로 혼합하여 60℃에서 30분간 열처리 하였다. 이 collagen 용액을 microtube에 각각 50.2㎕씩 분주한 후 49.8㎕의 HGF 배양상등액을 혼합하여 100㎕의 반응총액을 만든 후 37℃에서 18시간 유지시켰다. 반응 완료 후 분해되지 않은 collagen type IV를 침전시키기 위해 0.06% tannic acid/ 1% trichloroacetic acid를 첨가한 후 30분간 얼음에 유지시킨 후 12,000g에서 5분간 원심분리하였다. 상등액 150㎕를 5ml cocktail solution과 잘 혼합하여 liquid scintilation counter(LSC, Wallac 1409)로 방사능(counter per minute, cpm)을 측정하였다. Gelatin 분해능이 활성 MMP - 2에 의한 것인지, 세균의 효소중 gelatin 분해능을 가진 serin protease에 의한 것인지를 알아보기 위해 MMP의 inhibitor인 EDTA(ethylen diaminetetraacetic acid, 최종농도 2 mM)와 serine protease의 inhibitor인

Table 1. Production of IL - 6 by gingival fibroblast treated with TDC and TLC(pg/ml)

	TDC1	TDC2	TLC1	TLC2
18.75μg/well	1108.3±105.8*	1537.7±130.6*	1733.2±203.4*#	1687.0±190.7*
9.38μg/well	870.9±50.9*	112.9±78.3*	1178.8±109.3*#	1608.5±150.8*#
no treatment	386.8±25.7	782.7±36.3	386.8±25.7	782.7±36.3

TDC 1: Gingival fibroblasts were incubated with TDC for 1 day
TDC 2: Gingival fibroblasts were incubated with TDC for 2 day
TLC 1: Gingival fibroblasts were incubated with TLC for 1 day
TLC 2: Gingival fibroblasts were incubated with TLC for 2 day
*: Statistically significant difference compared to no tx group, P<0.05
#: Statistically significant difference compared to TDC group, P<0.05

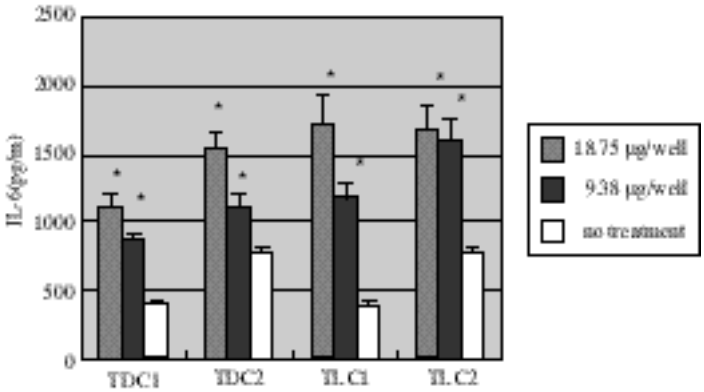

Figure 2 The amount of IL - 6 secretion by gingival fibroblast treated with TDC and TLC
*** : Statistically significant difference compared to no tretment group,P<0.05**

PMSF(phenylmethylsulfonyl fluoride, 최종농도 1 mM)를 치은섬유아세포 배양상등액과 혼합하여 37℃에서 30분간 유지시킨 후 반응완충액 및 human [^{3}H] - collagen type IV를 혼합하여 위에서와 같이 측정하였다.

(5) 통계처리

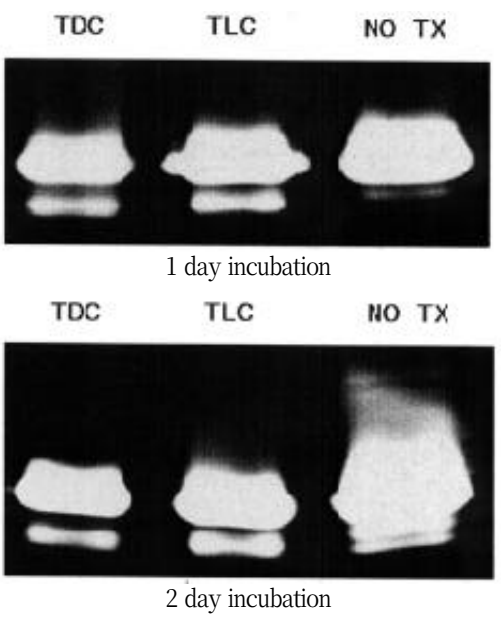

Figure 3. Zymography of MMP - 2 secreated by gingival fibroblast treated with TDC

TDC, TLC처치군과 균 분쇄액이 없는 비처치군과의 차이 그리고 각처치군간의 차이를 알아보기 위해 비모수 검정인 Mann - Whitney U test로 통계처리하고 p value< 0.05를 유의수준으로 하였다.

III. 연구결과

1. MTT test

MTT test 결과 TDC와 TLC를 18.75μg/well , 9.38 μg/well 농도로 처리한 군과 비처치군에서 살아있는 세포수가 유의차가 없었으며 배양 2일째에서 1일째보다 세포수가 더 많게 관찰되었다(Figure 1). 그러므로 아래의 IL - 6와 IL - 1β 및 zymography 실험에서 9.38, 18.75μg/well 농도의 TDC와 TLC로 처리한 치은섬유아세포를 비처치군과 비교하였다.

2. 치은섬유아세포의 Interleukin - 6 분비에 미치는 영향

Human IL - 6 ELISA kit를 통해서 TDC와 TLC가 치은섬유아세포의 IL - 6 분비량에 영향

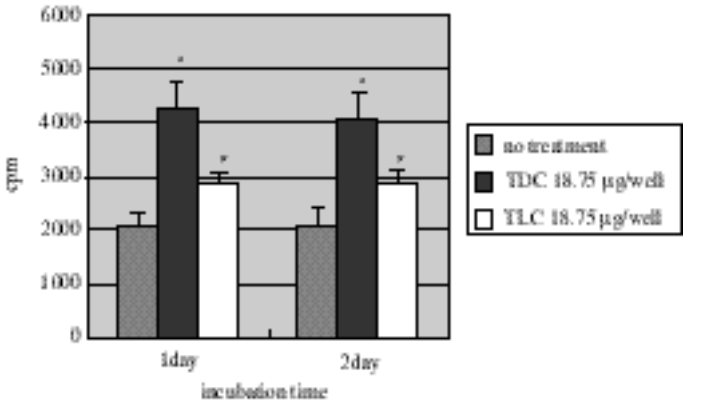

Figure 4. The effect of TDC and TLC on gelatin dissolubility of MMP - 2 secreted by gingival fibroblast
*** : Statistically significant difference compared to no treatment group , P<0.05**

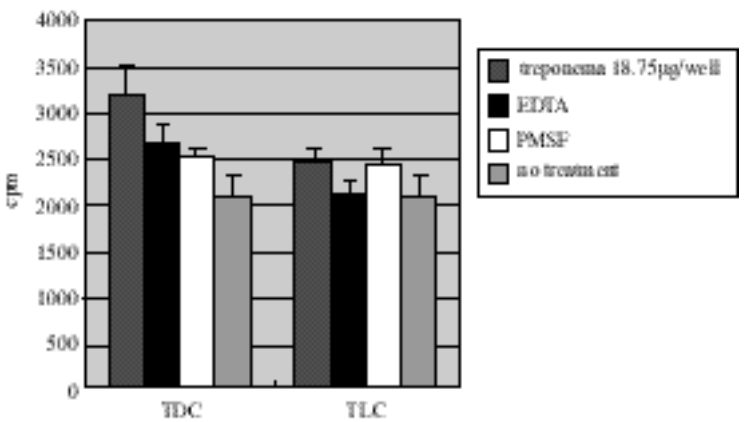

Figure 5. The effect of EDTA and PMSF on the gelatin degradation by gingival fibroblast
EDTA: ethylen diaminetetraacetic acid, PMSF: phenylmethylsulfonyl fluoride

을 미치는가를 알아본 결과 TDC와 TLC로 처리한 경우 비처치군보다 IL - 6 분비량이 증가하였으며 $p < 0.05$ 수준에서 유의성 있는 차이가 있었다. 또한 배양 1일째에서는 TLC 처치군에서 TDC 처치군보다 유의차가 있게 분비량이 많았으나 배양 2일째에서는 18.75μg/well의 농도에서 유의차가 없었다(Table 1, Figure 2).

3. 치은섬유아세포의 Interleukin - 1β 분비에 미치는 영향

ELISA를 통해서 TDC와 TLC가 치은섬유아세포의 IL - 1β 분비량에 영향을 미치는가를 알아본 결과 TDC 와 TLC 처치군, 비처치군 모두에서 측정 가능치(1 pg/ml) 이하의 분비량이 관찰되었다. 즉, *T. denticola*와 *T. lecithi - nolyticum*의 분쇄액은 치은섬유아세포의 IL - 1β 분비에 영향이 없는 것으로 보인다.

4. Gelatinase Zymography

TDC와 TLC로 처리한 군에서는 각 농도에서 모두 pro-MMP-2가 활성형으로 발현되어 clear band가 62 kDa의 위치에서 관찰되었으며, 18.75μg/well의 세균 분쇄액 농도에서 가장 뚜렷이 관찰 되었고 배양 1일과 2일에서는 차이가 없었다. 균 분쇄액이 없는 비처치군에서는 배양 1일째에서는 68kDa의 위치에서, 배양 2일째에서는 68 kDa과 62 kDa 위치에서 희미하게 band가 나타났다(Figure 3).

5. Gelatin 분해능 측정

TDC와 TLC 가 치은섬유아세포에서 분비되는 gelatinase의 활성도에 미치는 영향을 알아보기 위해 human [^{3}H]-collagen type IV를 이용하여 실험하였다. 세균의 농도는 75μg/well에서 반감으로 2.3μg /well 까지 실험하였는데 그 중 18.75μg/well 에서 활성도가 가장 크게 나왔으므로 이 농도에서의 수치를 비교하였다. gelatin 분해능은 TDC 처치군과 TLC 처치군에서 비처치군보다 높게 나타났으며 $p<0.05$수준에서 유의성 있는 차이가 있었다. 배양 1일과 2일 에서는 큰 차이가 없었다(Figure 4). 그러나 gelatin의 분해는 치은섬유아세포가 분비하는 효소 뿐만 아니라 세균이 가지고 있는 단백 분해 효소에 의해서도 이루어질 수 있으므로 이를 구별하기 위해 MMP의 inhibitor인 EDTA(최종농도 2 mM)와 serine protease의 inhibitor인 PMSF(phenylmethylsulfonyl fluoride, 최종농도 1 mM)를 사용하였고 그 결과 TDC에서는 gelatin 분해능의 약 50%가 serine protease에 의한 것이고 TLC에서는 gelatin 분해능의 대부분이 치은섬유아세포의 MMP에 의한 것으로 나타났다. 즉, TLC에서는 gelatin 분해능이 전적으로 활성화된 MMP에 의한 것이다(Figure 5).

IV. 총괄 및 고찰

치주질환은 세균에 의한 감염성 질환이며 세균과 숙주면역 방어의 균형이 깨질 때 치주조직의 국소적인 파괴가 일어난다. 1997년 Schroeder[4]의 병인론에 관한 연구에 의하면 결합조직내로 침투한 세균의 lipopolysaccharide(LPS)에 의해 자극된 단구/대식세포가 IL-1, IL-6, IL-8, TNF-α, PGE_2 등의 염증성 매개체를 분비한다.이들의 기능은 중성구의 chemotaxis, 림파구의 증식, 형질세포로의 분화촉진, 치은섬유아세포의 MMP분비 촉진, 파골세포 형성 촉진에 의한 치조골 흡수등이다[1,5]. 특히 IL-1β는 가장 영향력 있는 cytokine으로 치은섬유아세포를 자극하여 MMP, PGE_2의 분비량을 증가시켜 결합조직과 치조골의 파괴를 야기시킨다. 그 증거로서 1991년 Stashenko의 연구[40]에 의하면 부착상실과 IL-1β의 농도가 비례한다고 하였고, 1991년 Jandinski의 연구[41]에 의하면 치주질환 환자에서 IL-1β를 생산하는 세포가 정상인보다 3배가 증가했다. 그동안 이들 염증성 cytokine의 주요 분비세포로서 단구/대식세포를 주로 연구하였으나[9,11,12] 최근에는 치은섬유아세포의 cytokine분비에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 1990년 Takada 등[21]은 *Bacteroides* LPS와 *A. actinomycetemcomitans* LPS로 섬유아세포를 자극한 결과 IL-1, IL-6의 분비가 증가하는 것을 보고하였고, 1995년 Agarwal 등[14]은 *A. actinomycetemcomitans, E. coli*의 LPS 모두 치은섬유아세포의 IL-1, IL-6, IL-8의 m-RNA 발현을 현저히 증가시킨다고 하였다. 또한 1996년 Dongari 등[15]은 유년성 치주염에 감염되어 *A. actinomycetemcomitans*의 LPS로 자극되어 있는 치은섬유아세포에서 IL-6, IL-8을 다량 분비할 수 있다고 보고하였고, 1997년 Kent 등[20]은 *E. coli, P. gingivalis* LPS의 자극에 의해 치은섬유아세포에서 IL-6의 분비량이 증가하는 것을 관찰하였으나 LPS 보다는 recombinant human IL-1에 의한 자극에서 좀더 분비량이 많았다고 보

고하였다. 본 연구에서는 현재까지 연구된 바가 적은 spirochetes의 분쇄액으로 치은섬유아세포를 자극 했을 때 세균 분쇄액이 없는 비처치군에 비해 더 많은 염증성 cytokine이 유리되는가를 보기 위해 IL - 1β, IL - 6를 택하여 연구하였다. 구강내 spirochetes의 분포는 치주염의 형태에 따라 다르지만 급성 괴사성 치은염[42], 만성 성인성 치주염과의 연관성이 밝혀져 있다. 특히 치주염이 진행중인 병소에서 많이 관찰되며[24,25,43] 치주염 치료 후 예후를 판단할 수 있는 근거로서 *T. denticola*를 이용할 수 있다는 보고도 있다[29,43,44]. Spirochetes에는 중성구의 lysosomal enzyme 분비를 억제시킬 수 있는 능력이 있고[37,45], chymotrypsin like proteinase로 상피세포간 결합을 파괴시켜 결합조직까지 침투할 수 있는 능력을 갖고 있으므로[34,36] 치태 세균 중 전략적으로 최전방에 위치하여 다른 병원균의 침투를 용이하게 할 수 있다. 본 실험에서는 *T. denticola* 분쇄액(TDC)과 *T. lecithinolyticum* 분쇄액(TLC)이 치은섬유아세포에 미치는 영향을 관찰한 바, *T. denticola*는 배양이 쉬워 가장 많이 연구되어 치주염과 가장 연관이 깊은 종이나 cytokine분비 증가에 관한 연구는 다른 세균에 비해 적다. *T. lecithinolyticum*은 가장 최근에 분리 배양된 종으로서 혐기성이고 나선형 coil을 가진 운동성의 균종으로 약 5㎛ 길이와 0.15 ㎛의 폭을 가지며 두 개의 periplasmic flagella로 이루어져 있다. 효소활동을 보면 alkaline phosphatase, acid phosphatase, β - galactosidase, β - glucuronidase, N - acetyl - β - glucosaminidase, phospholipase A와 C가 많다[46]. 1999년 정 등의 연구[38]에 의하면 *T. lecithinolyticum*이 치주 인대 세포의 증식을 억제하고 모양을 변형시킨다고 하였으나, 치은섬유아세포에 미치는 영향에 관한 연구는 지금까지 보고된 바가 없다.

본 실험에서는 TDC와 TLC를 분쇄하여 단백질 정량후 치은섬유아세포에 처리하여 치은섬유아세포의 cytokine 분비량 증가 및 MMP 활성도를 관찰 하였다. 실험 결과 TDC와 TLC 처치군에서 IL - 6 분비량이, 세균 없이 치은섬유아세포만 배양한 비처치군보다 증가하였고 유의차가 있었다. TDC보다 TLC로 처리한 실험군에서 분비 증가량이 배양 1일째에서는 유의차 있게 많았으나, 배양 2일째 18.75μg/well 농도에서는 TDC 처치군과 TLC처치군에서 유의차가 없었다. 배양 2일째에서 1일째보다 IL - 6 분비량이 더 많았는데 그 이유는 MTT test 결과에서 볼 수 있듯이 세포수가 증식하여 분비량이 증가된 것으로 보이며, 세균 분쇄액 농도가 높을 때 *Treponema* 균에 의한 치은섬유아세포의 IL - 6 분비 자극이 더 큰 것을 볼 수 있다. 그러나 IL - 1β의 경우는 TDC,TLC 처치군과 비처치군에서 모두 측정 수준 이하의 분비량이 관찰되어, TDC와 TLC가 치은섬유아세포의 IL - 1β 분비에는 영향을 미친다고 볼 수 없겠다. 결론적으로 TDC와 TLC의 세포 성분은 치은섬유아세포의 IL - 6 분비량을 증가시킬 수 있으나 IL - 1β의 분비량에는 영향이 없다고 볼 수 있다. 치은섬유아세포의 IL - 1β 분비에 대해서는 논란이 많은데 1995년 Agarwal의 연구[14]에서는 *A. actinomycetemcomitans, E. coli*의 LPS로 치은섬유아세포 자극시 IL - 1β가 분비될 수 있다고 하였으나 IL - 6 보다는 분비량이 훨씬 적었다. 1991년 Takada등[21]은 *Bacteroides*균만 치은섬유아세포의 IL - 1β 분비를 유도할 수 있는데 이는 LPS의 특별한 구조 때문일 것으로 보고 있다. 또한 1996년 Dongari[15,19]에 의하면 pro - IL - 1β를 활성화시켜주는 convertase enzyme(ICE)이 monocyte에만 존재하고 섬유아세포에는 없기 때문에, 치은섬유아세포의 세포질 내에는 pro - IL - 1β가 상당량 발견되나 mature IL - 1β는 분비할 수 없다는 연구도 있다. 또하나 IL - 1β분비가 적은 이유로는 1995년 Reddi[8]의 실험으로서, *A. actinomycetemcomitans*를 0.5M NaCl에서 추출하여 빠져 나오는 surface

associated material(SAM)에서 LPS를 제거한 후 치은섬유아세포에 처리한 결과 IL-6만 분비되는 것을 관찰하였다. 즉 *A. actino-mycetemcomitans*와, *E. coli*의 LPS 자극시 IL-1β, IL-6, TNF-α 등이 모두 소량 분비 유도되지만 다른 outer membrane protein은 주로 IL-6의 분비량을 증가시키므로 결국 IL-6의 분비량만 현저히 증가시킨다는 것이다. 위의 연구에서 정확한 원인을 알 수는 없으나 본 실험의 spirochetes 자극에서도 치은섬유아세포에서는 주로 IL-6가 분비된다는 것이 확인 되었으며 IL-1β는 주로 단구/대식세포에서 분비되는 것으로 보인다. 이 IL-6는 B cell의 분화를 촉진시켜 형질세포의 IgG 생성을 증가시키고 파골세포 형성을 촉진시키는데 기여한다고 볼 수 있다. 왜 IL-1β의 분비가 증가하지 않았는가에 대한 원인과, spirochetes와 대식세포로 함께 자극한다면 IL-1β의 분비가 과연 증가하는가에 대해서는 앞으로 좀더 자세한 연구가 필요하리라 생각된다.

Zymography를 이용한 gelatinse 활성화 실험은 TDC 및 TLC가, 치은섬유아세포에서 합성되는 matrix metalloproteinase(MMP)에 미치는 영향을 살펴보는 것이다. 치은섬유아세포는 건강한 조직에서는 교원질과 세포외 기질의 생성이 활발한 반면 병변시에는 교원질 분해효소 유전자의 발현이 증폭하여 Type I collagen을 분해하여 치주조직을 파괴하는데 결정적 역할을 한다.[30] 교원질은 interstitial collagenase(MMP-1, -8, -13)에 의해 3/4과 1/4 길이의 두 조각으로 분해되면서 나선 구조가 풀리면 gelatinase(MMP-2, -9)에 의해 작은 조각으로 분해되어 lysosome에 의해 소화된다. 그러므로 이들 MMP의 활성화는 치주조직의 결합조직 소실과 치주염 병인론에서 중요한 역할을 하게 되며 그 생성량이 hormone이나 cytokine에 의해 조절된다.특히 단구/대식세포가 분비하는 IL-1β, TNF-α에 의해 치은섬유아세포의 MMP 분비가 촉진된다고 보고있다. 1994년 Makela의 연구[22]에 의하면 MMP-2, MMP-9 모두 건강한 치은 열구액보다 치주질환에 이환된 치은의 치은 열구액에서 많이 발현되며 치주염 치료후 농도가 현저히 감소한다고 하였다. MMP는 섬유아세포, 상피세포, 백혈구 등에 의해 비활성형으로 분비되며 이의 활성화를 위해서는 active site의 Cys-Zn^{2+} 결합이 소실되야 한다[47]. Pro-MMP-2의 활성화는 plasmin, 세균의 단백분해 효소, oxygen metabolite, neutrophil elastase 등에 의해 이루어질 수 있으며, 활성화 되었을 때 zymography상에서 62 kDa의 단백질이 분리될 수 있다. 본 실험에서는 세균을 처리하지 않은 치은섬유아세포와 TLC, TDC를 각 농도로 처리시켰을 때의 영향을 zymography와 gelatin 분해능으로 알아보았다. 결과는 TLC 및 TDC로 처리한 모든 농도에서 72 kDa의 pro-MMP-2가 활성형으로 바뀌어 62 kDa의 위치에서 뚜렷한 band가 나타나는 것을 관찰할 수 있었고 특히 세균 분쇄액 18.75μg군에서 가장 뚜렷하였다. 비처치군에서는 배양 1일째에서는 68kDa의 위치에서, 배양 2일째에서는 68 kDa과 62 kDa 위치에서 희미하게 2개의 band가 관찰되었는데 세균의 단백효소 이외의 다른 경로, 즉 autocatalytic activation에 의해 활성형이 소량 발현된 것으로 보인다. 68kDa은 부분적 활성형이고 62kDa은 완전한 활성형으로 알려져 있다. 또한 gelatin 분해능의 측정에 있어서도 TDC로 처리한 치은섬유아세포의 경우에는 비처치군보다 2배, TLC로 처리한 치은섬유아세포의 경우에는 비처치군보다 1.5배 분해능이 증가하는 것을 알 수 있었다. 또한 EDTA와 PMSF를 통한 inhibition assy에서 TDC의 경우 세균 자체의 serine protease가 gelatin 분해에 상당량 영향을 미치나 TLC의 경우는 전적으로 치은섬유아세포 유래의 MMP-2가 TLC에 의해 활성화되어 gelatin을 분해시킨 것으로 보인다. 결론적으로 TDC와 TLC의 단백분해 효소에 의해 치은섬유아세포

가 분비한 MMP - 2가 활성형으로 바뀌어 교원질을 분해시킴으로서 치주조직 병인론에 기여한다는 것을 확인할 수 있었다.

이번 실험을 통해 TDC와 TLC는 치은섬유아세포를 자극하여 단구/대식세포 없이도 IL - 6의 분비를 증가시킬 수 있으며, 치은섬유아세포가 분비하는 pro - MMP - 2를 활성화시켜 결합조직의 파괴를 야기시킴으로서 치주 질환의 병인론에 기여한다는 사실을 확인하였다.

V. 결론

T. denticola 분쇄액(TDC)과 *T. lecithi - nolyticum* 분쇄액(TLC)이 치은섬유아세포의 cytokine 분비에 미치는 영향을 알아보기 위하여 IL - 1β, IL - 6 ELISA를 이용한 실험과 gelatin zymography, gelatin 분해능을 이용한 pro - MMP - 2 활성화 실험을 통해 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. .....TDC와 TLC가 치은섬유아세포의 IL - 6 분비에 미치는 영향을 살펴 본 결과, TDC 와 TLC 처치군에서 세균 분쇄액이 없는 비처치군에 비해 IL - 6 분비량이 증가하였으며 유의성 있는 차이가 있었다.($p<0.05$)
2. .....TDC 와 TLC로 처리한 치은섬유아세포의 IL - 1β분비는 측정 가능치(1pg/ml) 이하의 분비량이 관찰되었다. 그러므로 IL - 1β의 분비에는 영향이 없는 것으로 보인다.
3. .....치은섬유아세포에서 분비되는 분자량 72 kDa의 pro - MMP - 2가 TDC와 TLC에 의해 활성형으로 발현되어 zymography 상에서 62kDa의 위치에 clear band로 나타났다.
4. .....치은섬유아세포가 분비하는 MMP - 2의 gelatin 분해능이, TDC와 TLC 처치군에서 비처치군보다 높게 나타났으며 유의성 있는 차이가 있었다.($p<0.05$)
5. .....TDC 처치군에서는 gelatin 분해능에 있어서 세균 자체의 serin protease의 영향이 있었으나 TLC 처치군에서는 치은섬유아세포의 MMP에 의해서만 gelatin이 분해되었다.

이상의 결과를 보아 TDC와 TLC는 치은섬유아세포를 자극하여 IL - 6의 분비는 증가시킬 수 있으나 IL - 1β의 분비에는 영향을 미칠 수 없으며, 치은섬유아세포에서 분비되는 pro - MMP - 2를 활성형으로 발현시켜 치주 질환의 병인론에 기여할 수 있음을 확인하였다.

VI. 참고문헌

1. .....Genco R.J. : Host response in Periodontal disease, current concept, Mechanisms of connective tissue matrix destruction in periodontitis, J. Periodontol., 63: 338 - 355,1992.
2. .....Flecher J., Reddy K., Poole S., Nair S., Handerson B., Tabona P., Wilson M.: Interaction between periodonto - patho - genic bacteria and cytokines, J. Periodont. Res. 32: 200 - 205,1997.
3. .....Okamatsu Y., Kobayashi M., Nishihara T., Hasegawa K.: Interleukin - 1α produces in human gingival fibroblsts induces severe activities related to the progression of periodontitis by direct contact, J. periodont. Res., 31 : 355 - 364, 1996.
4. .....Page R.C., Offenbacher S., Schroeder H.E. : Advances in the pathogenesis of periodontitis, summary of developments, clinical implication and future directions, Periodontology 2000, 14: 216 - 248,1997.L
5. .....Okada H., Murakami S.: Cytokine

Expression in periodontal health and disease, Crit.Rev.Oral Biol Med ,9 : 248 - 266, 1998.

6. .....Boehringer H., Taichman N.S., Shenker B.J. : Suppression of Fibroblast Proliferation by Oral Spirochetes, Infection and Immunity, 45: 155 - 159,1984.

7. .....Masada M.P. Persson R., Kenny J.S., Lee S.W.,Page RC., Allison AC.: Measurement of interleukin - 1α, β in gingival crevicular fluid, J. Periodont. Res., 25: 156 - 163,1990.

8.....Reinhardt RA., Masada MP., Kaldahl WB., Oubois CM., Kornman KS., Choi JI. et al. : Gingival fluid IL - 1 and IL - 6 level in refractory periodontitis, J. Clin. Periodontol., 20: 225 - 231,1993.

9. .....Garrison S.W., Holt S.C., Nichls F.C. : Lipopolysaccharide - stimulated PGE_2 Release from human monocytes, J. Periodontol.,59: 684 - 687,1987.

10.....Kjeldsen M., Holmstrup P., Lindemann R.A., Bendtzen K. : Bacterial - stimulated Cytokine production of peripheral mononuclear cells from patients of various periodontitis categories, J. Periodontol. , 66 : 139 - 144, 1995

11.....Shapira L., Soskolne W., Sela M.N., Offenbacher S., Barak V. : The secretion of PGE_2, IL - 1β, IL - 6 and TNF - α by adherent mononuclear cells from early onset periodontits patient, J. Periodontol., 65: 139 - 146, 1994.

12.....Shapira L., Soskolne W., Van dyke T. : Prostaglandin E_2 secretion, Cell maturation, and CD14 expression by monocyte - derived macrophages from LJP patients, J. Periodontol., 67: 224 - 228, 1996.

13.....Yoshimura A., Hara Y., Kaneco T., Kato I. : Secretion of IL - 1β, TNF - α, IL - 8, IL - 1ra by human PMN in response to LPS from Periodontopathic bacteria, J. Periodont. Res., 32: 279 - 286, 1997.

14.....Agarwal S., Baran C., Piesco NP., Langkamp HH., Johns LP., Chandra CS. : Synthesis of proinflammatory cytokines by human gingival fibroblasts in response to lipopolysaccharides and interleukin - 1β, J. Periodont Res., 30:382 - 389, 1995.

15.....Dongari - Bagtzoglou A.I., Ebersole J.L. : Gingival fibroblast Cytokine profiles in *A. actinomycetemcomitans* - asociated Periodontitis, J. Periodontol., 67 : 871 - 878, 1996.

16.....Murakami S., Shimabukuro Y.,Hino E.,Kasai D.,Hashikawa T.,Hirano h., Okada H. : Immunoregulatory roles of adhesive interaction between lympho - cytes and gingival fibroblasts, J. Periodont. Res., 32: 110 - 114, 1997.

17.....Odake H., Koizumi F., Hatakeyama S.,Furuta I., Nakagawa H. : Production of cytokines belonging to the interleukin - 8 family by human gingival fibroblasts stimulated with interleukin - 1β in culture, Experimental and molecular pathology 58:14 - 24,1993.

18.....Richards D., Rutherford R.B. : The effects of IL - 1 on collagenolytic activity and prostaglandin - E_2 secretion by human PDL and gingival fibroblast, Archs oral Biol. ,33: 237 - 243, 1988.

19.....Dongari - Bagtzoglou A.I., Ebersole

J.L. : Production of inflammatory media - tors and cytokines by human gingival fibroblasts following bacterial challenge, J. Periodont Res., 31: 90 - 98, 1996.

20.....Kent L.W., Rahemtulla F., Hockett R.D., Rebecca C. : Effect of Lipopolysaccharide and Inflammatory Cytokines on Interleukin - 6 production by healthy human gingival fibroblast, Infection and Immunity, 66: 608 - 614, 1998.

21.....Takada H., Mihara J., Morisaki I.,Hamada S.: Induction of IL - 1 and IL - 6 in human gingival fibroblast cultures stimulated with *Bacteroides* Lipopolysaccharide, Infection and Immunity, 59: 295 - 301, 1991.

22. .....Makela M., Salo T., Uitto V.J., Larjava H.: Matrix Metalloproteinase(MMP - 2, MMP - 9) of the oral cavity, cellular origin and rela - tionship to periodontal status, J. Den. Res.,73(8): 1397 - 1406,1994.

23.....Loesche W.J. : The role of Spirochetes in Periodontal disease, Adv.dent.res., 2: 275 - 283,1988.

24.....Evian C., Rosenburg E.S., Listgarten M.: Bacterial variability within diseased peri - odontal sites, J. Periodontol., 53: 595 - 598, 1982.
25.....Lindhe, J., Liljenberg, B., and Listgarten, M. : Some microbiological and histopatho - logical features of periodontal disease in man, J. Periodontol., 51:264 - 269, 1980
26.....Riviere G.R., Elliot K.S., Adams D.F., Simonson L.G. et al : Relative proportion of pathogen - related oral spirochetes(PROS) and *Treponema denticola* in supragingival and subgingival plaque from patients with periodontitis, J.periodontol., 63: 131 - 136, 1992.
27. .....Listgarten M.A., Lindhe, J., Hellen L. : Effects of Tetracycline and/or scaling on human periodontal disease, clinical, histological & microbiological observation, J. Clin. Periodontol., 5: 246 - 271,1978.
28. .....Listgarten, M.A., and Levin, S. : Positive correlation between the proportions of subgingival spirochetes and motile bacteria and susceptibility of human subjects to peri - odontal deterioration, J. Clin. Periodontol., 8:122, 1981.
29.....Simonson, L.G., Robinson P.J. PRanger R.J., Cohen M.E., Morton H.E. : *Treponema denticola* and *Porphyromonas gingivalis* as Prognostic markers following periodontal treatment, J. Periodontol., 63: 270 - 273, 1992.
30.....Woese C.R. : Bacterial evolution, Microbiol. Rev., 51: 221 - 271, 1987.
31.....Choi, B.K., Paster B.J., Dewhirst F.E. : Diversity of cultivable and uncultivable Oral Spirochetes from a patient with severe Destructive Periodontitis, Infection and Immunity, 62 : 1889 - 1895, 1994.
32.....Cockayne A., Sanger R., Ivic A., Strunnel A., Macdougall J.H., Russel R.R.B., Penn C.W. : Antigenic and structural analysis of *Treponema denticola* , J. General Microbiology, 155 :3209 - 3218,1989.
33.....Loesche W.J., Syed S.A., Stoll J. : Trypsin - like activity in subgingival plaque, J. Periodontol., 58: 266 - 273, 1986.
34.....Uitto V.J., Pan U.M., Leung W.K. et al. : Cytopathic effects of *Treponema denticola* Chymotrypsin - like proteinase on migrating and stratified epithelial cells, Infection and immunity, 63: 3401 - 3410, 1995.
35.....Riviere, G.R., Weisz, K.S., Adams,D.F., Thomas, D.D. : Pathogen - related oral spiro - chetes from dental plaque are invasive, Infection and Immunity, 59:3377 - 3380, 1991.
36.....Sagile R., Newman M.G., Carranza F.A., Pattison G.L. : Bacterial invasion of gingiva in Advanced Periodontitis in humans, J. Periodontol., 53: 217 - 222, 1982.
37.....Taichman N.S., Bohringer C.H., Shenker B.J., Listgarten M.A., Shapiro I. : Pathobiology of oral spirochetes in periodontal disease, J. Periodont. Res., 17: 449 - 451, 1982.
38.....정정학 등: *Treponema denticola*와 *Treponema lecithinolyticum*이 치주인대세포에 미치는 영향, 대한치주과학회지, 29 : 311 - 324 , 1999
39.....Beausejour A., Deslauriers N., Grenier D.: Activation of the interleukin - 1β precur - sor by *Treponema denticola*, a Potential role in chronic inflammatory periodontal disease,

Infection and Immunity, 65:3199 - 3202, 1997.
40.....Stashenko P., Fujiyoshi P., Oberneser MS. : Levels of interleukin - 1β in tissue from sites of active periodontal disease, J. Clin. Periodontol.,18: 548 - 554, 1991.
41.....Jandinski J.J., Stashenco P., Feder L.S.et al. : Localization of interleukin - 1β in human periodontal tissue, J. Periodontol., 62: 36 - 43,1991.
42.....Riviere, G.R., Wagoner M.A. et al. : Identification of Spirochetes related to *Treponama palladium* in ANUG and chronic periodontitis, The new England journal of medicine, 325: 539 - 543,1991.
43.....Simonson, L.G., Goodman, C.H., Bial, J.J., Morton, H.E. : Quantitative relationship of *Treponema denticola* to severity of periodontal disease, Infect. Immun., 56:726 - 728, 1988.
44.....Okada H., Murakami S., Kitamura M., Nozaki T., Kusumoto Y. : Diagnostic strategies of periodontitis based on the molecular mechanism of periodontal destruction, Oral disease ,2 : 87 - 95, 1996.
45.....Boehringer H.,Berthold P.H., Taichman N.S. : Studies on the interaction of human neutrophils with plaque spirochetes, J. Periodont Res., 21: 195 - 209, 1986
46 Wyss, C., Choi, B.K., Schupbach, P., Moter,A., Guggenheim, B., Gobel, U.B. : *Treponema lecithinolyticum* sp. nov., a small saccharolytic spirochetes with phospholipase A and C activities associated with periodontal diseases, accepted in Int. J. Syst. Bacteriol., 1999.
47.....Havemose - Poulsen A., Holmstrup P. : Factors affecting IL - 1 - mediated collagen metabolism by fibroblast and the Pathogenesis of Periodontal disease, a Review of the lit - erature, Crit. Rev. Oral Biol. Med.,8: 217 - 236,1997.

- 국문요약 -

*Treponema denticola*와 *Treponema lecithinolyticum*의 분쇄액이 치은섬유아세포의 cytokine 분비 및 Matrix Metalloproteinase 활성에 미치는 영향

본 연구에서는 치주질환과 관련이 깊은 것으로 알려진 구강내 spirochetes 균중 *Treponema denticola* 분쇄액(TDC)과 가장 최근에 분리 배양된 *Treponema lecithinolyticum* 분쇄액(TLC)이 치은섬유아세포의 cytokine 분비 및 matrix metalloproteinase(MMP) 활성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 균의 분쇄액을 치은섬유아세포에 처리한 후 Interleukin - 6(IL - 6)와 Interleukin - 1β(IL - 1β)의 분비 증가 여부를 ELISA를 통하여 측정하였으며, 또한 gelatinase zymography와 gelatin 분해능 측정을 통하여 교원질 분해 효소의 하나인 pro - MMP - 2(progelatinase A)의 활성화 여부를 측정한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. .....TDC와 TLC가 치은섬유아세포의 IL - 6 분비에 미치는 영향을 살펴 본 결과, TDC 와 TLC 처치군에서 세균 분쇄액이 없는 비처치군에 비해 IL - 6 분비량이 증가하였으며 유의성 있는 차이가 있었다 ($p<0.05$).
2.....TDC 와 TLC로 처리한 치은섬유아세포의 IL - 1β 분비는 측정 가능치(1pg/ml) 이하의 분비량이 관찰되었다. 그러므로 IL - 1β의 분비에는 영향이 없는 것으로 보인다.
3.....치은섬유아세포에서 분비되는 분자량 72 kDa의 pro - MMP - 2가 TDC와 TLC에 의해 활성형으로 발현되어 zymography상에서 62kDa의 위치에 clear band로 나타났다.
4.....치은섬유아세포가 분비하는 MMP - 2의 gelatin 분해능이, TDC와 TLC 처치군에서 비처치군보다 높게 나타났으며 유의성 있는 차이가 있었다($p<0.05$).
5.....TDC 처치군에서는 gelatin 분해능에 있어서 세균 자체의 serin protease의 영향이 있었으나 TLC 처치군에서는 치은섬유아세포의 MMP에 의해서만 gelatin이 분해되었다.

이상의 결과를 보아 TDC와 TLC는 치은섬유아세포를 자극하여 IL - 6 의 분비는 증가시킬 수 있으나 IL - 1β의 분비에는 영향을 미칠 수 없으며, 치은섬유아세포에서 분비되는 pro - MMP - 2를 활성형으로 발현시켜 결합조직의 파괴를 야기함으로서 치주 질환의 병인론에 기여할 수 있음을 확인하였다.

핵심되는 말 : *Treponema denticola* 분쇄액 (TDC), *Treponema lecithinolyticum* 분쇄액 (TLC), Interleukin - 1β, Interleukin - 6, MMP - 2

- Abstract -

The Effect of Sonicated Extracts of *Treponema Denticola* and *Treponema Lecithinolyticum* on the Cytokine Secretion and Matrix Metalloproteinase Activation of Gingival Fibroblast

Hye - Yuhn Suh[1], Bong - Kyu Choi[2], Seong - Ho Choi[1], Kyoo - Sung Cho[1], Chong - Kwan Kim[1], Jung - Kiu Chai[1]
Department of Periodontology, Research Institute for Periodontal Regeneration[1] and Oral Biology[2],
College of Dentistry, Yonsei University

This study was investigated to observe the effect of *Treponema denticola* cell sonicates(TDC) and *Treponema lecithinolyticum* cell sonicates(TLC) on cytokine secretion and matix metalloproteinase - 2(MMP - 2) activation of cultured human gingival fibroblast. Several experiments

were performed including IL - 1β, IL - 6 ELISA for the effect on the IL - 1β, IL - 6 secretion of human gingival fibroblast. Also gelatinase zymography and gelatin dissolubility test for the activation of MMP - 2 secreted by gingival fibroblast. The results were as follows.

1. .....The effect of TDC and TLC on IL - 6 secretion of human gingival fibroblast showed statistically significant increase of IL - 6 secretion in the TDC and TLC treated group compared to no treatment group($p<0.05$) .
2. .....The amount of IL - 1β secretion was below the lower limit and there was no difference in the IL - 1β secretion of gingival fibroblast between TDC, TLC treated group and no treatment group.
3. .....The active form of pro MMP - 2 with 72 kDa molecular weight was activated in both TDC and TLC treated group and clear band was appeared at 62kDa site on the zymography.
4. .....Gelatin dissolubility of MMP - 2 secreted by gingival fibroblast was higher in TDC and TLC treated group compared to no treatment group($p<0.05$).
5. .....In the TDC treated group, serine protease of *T. denticola* affect gelatin dissolubility. But in the TLC treated group gelatin was degraded by only MMP secreted by gingival fibroblast.

Regarding to the above results, TDC and TLC have an effect on the IL - 6 secretion increase of human gingival fibroblast and appears to activate pro MMP - 2 which degrades collagen.

Key words : *Treponema denticola* cell sonicates(TDC), *Treponema lecithinolyticum* cell sonicates(TLC), Interleukin - 1β, Interleukin - 6, ELISA, MMP - 2