

정상 치은 열구액과 혈청 단백질 조성에 관한 연구

전북대학교 치과대학 치주과학교실
임종득 · 문진균 · 김형섭

I. 서 론

과거부터 많은 학자들은 치주질환의 염증 정도를 객관적으로 평가하기 위한 방법의 필요성을 느꼈으며, 그에 따른 많은 노력을 기울였다. 탐침시 치은 출혈과 치주낭 깊이 측정이 임상적으로 치은의 염증 상태를 나타내는 지수가 될 수 있으며, 조직학적인 검사¹⁾와 방사선학적 검사 역시 진단에 도움을 주지만 이러한 방법들은 질환의 결과만을 나타낼 뿐 우발적으로 나타나는 치주질환의 미세한 변화를 측정하기에는 민감도가 부족하다²⁾. 또한 세균배양검사, 혈청, 타액 및 치은열구액내 특정 미생물에 대한 항체 검사도 있으나 이 방법들을 이용하는데에는 많은 시간과 숙련된 기술을 요한다. 따라서 치주조직의 생화학적 지수 측정법을 치주염 진단에 도입하여 치주질환 활성의 정확하고 민감한 지표를 찾는 시도가 이루어졌다. 그런 시도으로써 치주조직과 치은 열구로부터 유래되는 염증성 삼출물인 치은열구액에 관심이 증대되었다.

치은열구액은 숙주상피와 결합조직의 파괴산물, 치주조직내 숙주세포의 산물, 혈장에서 유래된 물질, 치은연하 치태세균에서 유래된 산물등을 포함하고 있으며³⁾, 염증상태에서 그 양이 증가하고⁴⁾, Loe 등⁵⁾ 다른 많은 학자들은 염증의 초기 임상증상이 나타나기에 앞서 열구액의 증가가 나타난다고 보고하였다.

치은열구액 유출량에 대한 연구 뿐 아니라 혈장 단백질과 분해산물의 조성 및 정량, 숙주세포와 미생물에서 유리되는 collagenase, hyaluronidase 등의 기질분해효소, β -glucuronidase⁷⁻⁹⁾, acid phosphatase¹⁰⁾ 등의 용해소체 효소들에 대한 광범위한 연구가 진행되었다. 치주질환은 연령, 성별, 구강내 부위에

따라 특이성을 보이고, 질환의 활성도는 시간별로 다양할 것이라는 점에 대해 논란이 되어 왔음에도 불구하고 이러한 지표들은 모두 분석하여 그 효과를 연구하는 것은 불가능하므로 한번의 검사로 질환 활성을 알아낼 수 있는 방법의 필요성이 대두되었다.

그러므로 본 연구는 우선적으로 정상 치은열구액의 단백질 조성을 알아보고, 후에 파괴적 질환과 관련된 변화를 해석하기 위한 baseline을 제공하고자 SDS /PAGE를 이용하여 혈장단백질과 비교 분석할 목적으로 시행되었다.

II. 실험대상 및 방법

가. 실험대상 및 부위

임상적으로 건강한 치은을 가진 전북대학교 치과 대학생 26명을 정상군으로 선택하였으며, 나이는 23~27세 였다. 전북대학교 치과병원 치주과에 내원한 35세에서 62세의 중등도에서 심한 치주질환을 가진 18명을 치주질환자군으로 실험에 참여시켰다. 전신질환이 있거나 단백질 대사를 변화시킬 수 있는 약물을 복용하였거나 하고있는 자는 실험에서 제외시켰다.

상악 우측 제일대구치와 하악 좌측 견치를 대상으로 하였는데 이 치아를 선택한데는 상악 제일대구치는 치주질환에 가장 감수성을 보이며, 하악 견치는 가장 저항성이 있는 것으로 여겨지기 때문이다.

치은열구액 채취후에 Loe & Silness의 치은염 지수 (GI ; Gingival Index)와 탐침시의 출혈경향(BOP ; Bleeding on probing)으로 치은염증 정도를 평가하였다. 또한 Michigan-o-probe를 사용하여 치주낭 깊이(PD ; Pocket Depth)를 측정하였다.

나. 치은열구액 및 혈액 채취

타액으로 인한 오염을 방지하기 위해 해당부위를 cotton roll로 방습하고 2×8mm filter paper strip (Whatman 3MM chromatography paper)을 5초동안 미약한 저항감이 느껴질 때까지 치은열구에 삽입하였다. 이 방법은 Löe와 Holm-Pederson¹⁸⁾에 의해 처음 제안되어 조직에 최소의 자극을 위해서 받아들여졌다. 열구액 채취후 periotron(HAR-6000)에서 volume을 측정하였으며, 혈액이 묻은 strip은 채택하지 않았다. 치은열구액을 채취한 filter paper strip을 capped microcentrifuge tube에 넣고 얼음속에 보관한 채 실험실로 옮겨, 용출과 연속적 분석을 1주내에 시행하기 위해서 -70℃에서 얼려 보관하였다.

각 환자의 ante-cubital fassa에서 venefuncture하여 20ml의 혈액을 얻어, 실온에서 1시간 방치후 3000xg으로 30분간 원심분리하여 혈청만을 조심스럽게 옮겨 분석에 이용될 때까지 -20℃에서 보관하였다.

다. 치은열구액 용출(elution)

채취한 치은열구액을 paper strip으로부터 용출하기 위하여 치은열구액이 적혀진 paper strip에 1mM의 PMSF(phenylmethyl sulfonyl fluoride)가 함유된 증류수를 50μl 흘려보냈다. 흘려보낸 용액을 다시 취하여 paper strip을 따라 흘려보내는 과정을 얼음 속에서 5~6회 반복하였다. 그후 4℃에서 15분동안 3000xg으로 원심분리 하였다. 상청액을 취하여 다른 microcentrifuge tube에 옮겨 그중 5μl 분획을 단백질 정량에 사용하였다.

라. Sodium dodecyl sulphate/Polyacrylamide gel eletrophoresis(SDS/PAGE)

각 치은열구액 시료 및 혈청은 Laemmli¹⁹⁾의 방법에 따라 reducing condition 하에서 Tall mighty gel electrophoresis system(Hoefer)을 이용하여 SDS/PAGE로 단백질 조성을 분석하였다.

4μg의 단백질이 포함된 치은열구액 용출액을 냉동건조기(Vir Tis)에 건조시켜 5% 2-mercaptoethanol 20μl가 포함된 SDS reducing buffer에 다시 녹인다음 100℃에서 5분간 가열한 후 gel에 loading하였다. 10% acrylamide/bisacrylamide seperating gel과 4% stacking gel을 이용하였고, stacking gel에서는 20mA, seperating 시에는 40mA의 일정한

전류를 걸었다. 전기영동 후에는 coomassie brilliant blue G250(Bio-Rad) 혹은 silver staining(Bio-Rad)하여 단백질 band를 관찰하였다.

high molecular weight marker(Bio-Rad)를 항상 같이 걸어 각 단백질 band의 분자량을 측정하였고, 대부분의 경우 혈청시료를 standard로 같이 걸어 전체적인 단백질 profile을 비교하였다.

마. 단백질 정량

치은열구액 용출액의 5μl 분획으로부터 Lowry (1951) 방법을 이용하여 단백질 정량을 시행하였다.

착색시료가 담긴 microtitre plates는 Titertek Multiscan Mcc(Flow)으로 540nm에서 판독하였고, bovine serum albumin을 standard로 사용하여 단백질 양을 계산하였다.

III. 실험 성적

가. 임상지수

정상군의 치은지수(GI)는 0.77 ± 0.19 , 치주낭 깊이(PD)는 2.42 ± 0.18 , 탐침시 출혈경향(BOP)는 1.04 ± 0.21 이었다.

나. 총단백질 농도

정상 치은열구액에서의 총단백질 농도는 $28.3 \pm 2.7 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 였으며, 정상군의 혈액의 총단백질 농도는 $62.0 \pm 3.2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, 치주질환자군에서는 $65.1 \pm 7.0 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 로 거의 차이가 없었다.

다. 정상 치은열구액과 혈장단백질의 profile 비교

Fig. 1은 정상군과 치주질환자군의 혈액의 단백질 조성을 비교한 것인데 거의 유사한 양상을 띄었다.

정상 치은열구액의 단백질 profile에서는 대부분의 단백질 band가 albumin(66KDa)보다 작은 크기의 것들이 관찰된 반면, 혈장에서는 albumin보다 큰 크기의 단백질이 다량 관찰되었다. (Fig. 2, 3)

혈장에서 heavily staining band로 나타나는 77, 66, 55, 26KDa의 단백질은 모두가 정상 치은열구액에서도 발견되었다. (Fig. 3, Table 1) 이들 단백질은 각각 transferrin, albumin, Ig의 heavy chain, light chain과 동일한 분자량의 위치에서 관찰되며 이는

Curtis³⁾의 결과와 일치한다.

또한 정상 치은열구액에서 non-serum protein으

로서 47, 37DKa의 2개의 band가 항상 나타났다.

Fig. 1. Protein profile of normal & patient' serum
(Coomassie stain)
lane 1 : molecular weight marker
lane 2 : normal serum
lane 3 : patient' serum

Fig. 3. Comparison of protein profiles from normal serum and normal GCF
lane 1 : molecular weight marker
lane 2 : normal serum(20 μ g of protein)
lane 3 : normal GCF(4 μ g of protein)
• : plasma-derived proteins
* : non-plasma protein

Table 1. protein profiles of normal GCF

Molecular weight* of main protein bands	
serum-derived	non-serum
77(transferrin)	47(unknown)
66(albumin)	37(unknown)
55(heavy chain of IgG)	
26(light chain of IgG)	

* KDa

IV. 총괄 및 고안

치은열구액 유출량이 염증을 나타내는 우수한 지표라는 것은 널리 알려져 왔고 1974년 Alfano¹¹⁾는 passively-generated transudate가 임상적으로 건강한 치은열구에 축적된다고 주장하였다. 미세한 양의 세포간질액이 결체조직으로부터 집합상피나 열구상피를 가로질러 나오게 되며, 또한 치태 세균에서 유래된 거대분자에 의해 생긴 삼투압 구배에 의해서 열구액 이동이 생기게 된다. Alfano는 이를 염증치은에서 생성되는 exudate와 구별되는 osmotically pre-inflammatory exudate라 하였다. 이 pre-inflammatory fluid는 정상 혈관 투과성이나 기저막 투과성으로는 albumin과 같은 혈장 단백질의 통과를 방해받으므로 염증성 삼출물 보다 낮은 단백질 용량을 가진다. 치태가 축적됨에 따라 열구에서부터 거대분자가 진정한 염증성 삼출물을 생성할 수 있을 만큼의 염증반응을 유도하기에 충분한 양이 basement membrane에 오게 된다. 실제로 염증이 심한 부위에서 얻은 치은열구액에서의 단백질 농도는 혈장에서 보다 높았으며¹²⁻¹⁴⁾, 염증증상이 없는 열구액에서는 extracellular fluid와는 비슷하고 혈장보다는 적은 단백질을 함유하고 있었다¹⁵⁾.

치은열구액에서 쉽게 찾을 수 있는 alumin과 같은 혈장단백질을 혈장 단백질 유출의 지표로 사용될 수 있다. 초기 염증반응을 보이는 부위의 치은열구액에서는 심한 염증성 치은의 열구액에서 발견되는 albumin의 양보다 적게 나타난다.

임상적으로 염증 증상이 없는 치은열구액은 low-albumin content를 가지며 이는 osmotically-modulated pre-inflammatory gingival fluid임을 뒤받침 해 준다.

Brill과 Bronnestam¹⁶⁾은 자극했을 때와 자극하지 않은 치주낭에서의 치은열구액 분석시 자극받지 않은 열구액에서의 총단백질 농도는 혈액의 1/10이며 자극받았을 때는 그 보다 더 높은 수치를 보였다고 하였으며, Sueda¹⁷⁾등은 치은열구액과 혈액에서 비슷한 양의 단백질을 함유하고 있으며, Bang과 Cima-soni¹³⁾도 역시 차이가 없다고 보고하였다.

Fig. 2와 Fig. 3에서 보는 것처럼 치은열구액에서는 66KDa의 albumin보다 분자량이 큰 단백질은 거의 나타나지 않는다. 그러므로 albumin이 정상 치은열구액과 혈액의 단백질 profile을 구분짓는 크기의 단백질로 여겨진다.

또한 Brill¹⁸⁾은 임상적으로 건강한 치은의 모세혈관에서 적은 양의 albumin이 유출된다고 하였으며 Bickel¹⁹⁾등은 임상적으로 염증이 있는 부위에서 채취한 치은열구액의 albumin농도가 혈장에 근접했다는 보고로 보아 albumin이 정상과 염증시의 치은열구액의 단백질 profile을 구분하는 지표가 되는 크기이며 염증으로 인한 혈관 투과성의 증가시 치은열구액에 나타나는 고분자량의 혈장 단백질이 염증의 지표로 쓰일 수 있다는 것을 알 수 있다.

Fig. 3에서 보는 것처럼 SDS/PAGE를 이용한 단백질내 profile분석에서 77, 66, 55, 26KDa의 단백질 band가 진하게 염색되어 나타났다. 이들은 transferrin, albumin, Ig의 heavy chain과 light chain에 해당되며, Curtis와 Sterne²⁰⁾와 Curtis와 Griffiths³⁾의 결과와 일치한다. 이러한 혈장에서 유래한 단백질이 아닌 37, 47KDa의 단백질도 나타났는데 이것은 혈장이 아닌 다른 단백질의 원천이 존재한다는 것을 제안해 주고 있다. 37, 47KDa의 단백질이 치태의 양과 비례되어 양이 증가되었기 때문에 이들이 bacterial protease에 의한 파괴 부산물이거나 미생물의 분해산물일 것으로 추측된다²⁰⁾. 또한 치태치수가 0인 부위에서도 나타나는 것으로 보아 꼭 세균성으로만 생각되어지지 않으며, 결합조직 turnover의 산물이 치은열구액에 나타나는 단백질의 원천을 형성한다고도 생각되어진다^{21,22)}.

이상에서 혈액과 치은열구액의 단백질 조성은 치주질환 활성의 지표로 사용되어질 수 있으며, 파괴적 질환과 관련된 변화를 해석하기 위한 baseline을 제공하였다. 그러나 아직 밝혀지지 않은 non-protein을 규명하는 작업이 남아있으며, 치은열구액에서 아주

소량만이 존재하는 단백질을 추적함으로써 좀더 정확한 기준을 설정해 줄 수 있는 작업이 필요하다 하겠다.

V. 결 론

임상적으로 건강한 치은을 가진 23세에서 27세의 26명과, 치주질환으로 전북대학교 치과병원 치주과에 내원한 35세에서 62세의 18명을 대상으로 치은열구액과 혈액을 채취하여 단백질 정량과 SDS/PAGE 분석으로 단백질 조성을 비교하여 다음의 결론을 얻었다.

1. 정상 치은열구액의 총단백질 농도는 $28.3 \pm 2.7 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 였으며, 정상군과 치주질환자군 혈장의 총단백질 농도는 $62.0 \pm 3.2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, $65.1 \pm 7.0 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 로 차이가 없었다.
2. SDS/PAGE로 정상군의 단백질 profile을 분석하였을 때 치은열구액에서는 albumin(66KDa)보다 분자량이 적은 단백질 band가 염색되어 나타났으며, 혈장에서는 albumin 크기 이상의 단백질이 다량 관찰되었다. 이것으로 보아 치은열구액에 빠져 나올 수 있는 혈장단백질의 크기의 한계가 albumin인 것을 알 수 있다.
3. 정상 치은열구액에는 혈장에서 유래한 단백질들이 나타나는데, 77, 66, 55, 26KDa의 단백질로 각각 transferrin, albumin, heavy chain of Ig, light chain of Ig에 해당된다. 또한 혈장에서 유래되지 않은 47, 37KDa의 단백질이 발견되었다.
4. 임상적으로 정상인 치은열구액에서 혈장에서 유래한 단백질 albumin이 나타나는 것은 치은열구에서는 임상적으로는 정상이라 할지라도 염증의 전단계(preinflammatory state)로 존재하고 있다는 것을 시사한다.

참고문헌

1. Hancock E.B., Crang R.J., O'Leary T.J. : The relationship between gingiva 1 crevicular fluid and gingival inflammation. J Periodontol 50 : 13, 1979.
2. hancock E.B. : Determination of periodontal disease activity. J Periodontol 52 : 492-499, 1981.
3. Curtis M.A., Griffiths G.S., Price S.J., Johnson N.W. : the total protein concentration of gingival crevicular fluid. Variation with sampling time and gingival inflammation. J Clin Periodontol 15 : 628-632, 1988.
4. Loe H. & Holm-Pederson P. : Absence and presence of fluid from normal and inflamed gingiva. Periodontics 3 : 171-77, 1965.
5. Loe H., Theilade E., Jensen s.B., Schiott C.R. : Experimental gingivitis in man. J Periodont Res 2 : 282-289, 1967.
6. Kryshtalskyj E., Sodek J. & Ferrier J.M. : Correlation of collagenolytic enzymes and inhibitors in GCF with clinical and microbic changes in experimental periodontitis in the dog. Archs Oral Biol 31 : 21, 1986.
7. Bang J., Cimasoni G. & Held A.J. : β -glucuronidase correlated with inflammation in the exudate from human gingiva. Archs Oral Biol 15 : 455, 1970.
8. Goggins J.F. & Billups L.C. : Cytochemical measurements of β -glucuronidase activity in normal and inflamed gingiva. J Histochem Cytochem 19 : 416, 1971.
9. Moon J.K., Kim H.S. : A study of periodontal disease severity and β -glucuronidase activity in normal and inflamed gingiva. J CNU Vol. 8, 1990.
10. Han S.H., Kim H.S. : Lysosomal acid hydrolase and periodontal disease. A study on acid phosphatase in human gingiva. J CNU, 1988.
11. Alfano M.G. : The origin of gingival fluid. J Theor Biol 47 : 127-136, 1974.
12. Brandtzaeg P. : Immunochemical comparison of proteins in human gingival pocket fluid, serum and saliva. Archs oral Biol. 10 : 795-803, 1965.
13. Bang J., Cimasoni G. : Total protein in human crevicular fluid. J Dent Res 50 : 1683, 1971.
14. Shapiro L., Novaes a., Fillios L., Simons G. : Sulcular exudate protein levels as an indicator on the clinical inflammatory response. J Perio-

- dontol 51 : 86-87, 1980.
15. Hattingh J., Ho E. : The concentration of proteins in human gingival crevicular fluid. *J Periodont Res* 15 : 90-95, 1980.
 16. Brill N., Bronnestam R. : Immuno-electrophoresis study of tissue fluid from gingival pockets. *Acta Odontol Scand* 18 : 95, 1960.
 17. Seuda T., Cimasoni G., Held A.J. : Histochemical study of human gingival fluid. *Periodontologie* 20 : 141, 1966.
 18. Brill N. : Influence of capillary permeability on flow of tissue fluid into gingival pocket. *Acta Odontol Scan* 17 : 23, 1959.
 19. Bickel M., Cimasoni G., Anderson E. : Flow and albumin content of early (pre-inflammatory) gingival crevicular fluid from human subjects. *Arch of Oral Biol* 30 : 599-602, 1985.
 20. Curtis M.A., Sterne J.A.C., Price S.J. : The protein composition of gingival crevicular fluid sampled from male adolescents with no destructive periodontitis : Baseline data of a longitudinal study. *J Periodontal Res* 25 : 6-16, 1990.
 21. Page R.C., Ammons W.F. : Collagen turnover in the gingival and other mature connective tissues of the marmoset *sanguinus oedipus*. *Archs Oral Biol* 19 : 651-658, 1974.
 22. Sodek J. : A new approach to assessing collagen turnover by using a micro-assay. *J Biochem* 160 : 243-246, 1976.
 23. Schenkein H.A. & Genco R.J. : Gingival fluid and serum in periodontal disease. *J periodontol* 48 : 772-777, 1977.
 24. Lamster I.B., Fiorello L., Oshrain R., et al. : Markers for catabolic activity in GCF as indicators of attachment loss in patient with periodontitis. *J Dent Res* 66 : 256, 1987.
 25. Lamster I.B., Harper D.S., Fiorello L.A., et al. : Lysosomal and cytoplasmic enzyme activity, crevicular volume, and clinical parameters characterizing gingival sites with shallow to intermediate probing depth. *J Periodontol* 58 : 614, 1987.
 26. Socransky S.S., Haffajee A.D., Goodson J.M., et al. : New concepts of destructive periodontal disease. *J Clin Periodontol* 11 : 21, 1984.
 27. Lamster I.B., Vogel R.I., Hartley L.J., et al. : Lactate dehydrogenase, β -glucuronidase and arylsulfatase activity in gingival fluid associated with experimental gingivitis in man. *J Periodontol* 56 : 139, 1985.
 28. Egelberg J. : Permeability of the dento-gingival blood vessel. II. Clinical healthy gingivae. *J Periodont Res* 1 : 276-286, 1966.
 29. Biswas S., Duperon D.F., Chebib F.S. : Study of periodontal disease in children and young adolescent. *J Periodont Res* 12 : 265-278, 1977.
 30. Arthur B., Novaes A.B.Jr., Shapiro L., Fillos L.C., Wood N. : Gingival fluid fucose to protein ratios as indicators of the severity of periodontal disease. *J Periodontol* 51 : 88-94, 1980.
 31. Laemmli U.K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature* 227 : 680-685, 1970.
 32. Hasegawa K., Cimasoni G. & Vuagnat P. : Inflamed gingiva contain more free lysosomal enzymes. *Esperimentia* 31 : 765, 1975.
 33. Bowers M.R., Fisher L.W., Termine J.D., Sommerman M.J. : Connective tissue-associated proteins in crevicular fluid : Potential markers for periodontal diseases. *J Periodontol* 60 : 448-451, 1989.

THE PROTEIN COMPOSITION OF GINGIVAL CREVICULAR FLUID AND SERUM SAMPLED FROM NORMAL SUBJECTS

Jong-Deuk Lim, Jin-Kyun Moon, Hyung-Seop Kim

Dept. of Periodontology, College of Dentistry, Chonbuk National University

This study was undertaken to examine the protein content of GCF and serum from normal population in order to standardize the sample loading on SDS/PAGE gels.

The results were as follows :

1. The protein concentration of serum was not different between normal group and diseased group.
2. In GCF, the bands of lower molecular weight than albumin were heavily stained, but in serum, the protein bands of higher molecular weight were found.
3. The profile of protein in normal GCF was characterized by heavily staining bands at 77, 66, 55, 26 KDa corresponding to the positions of transferrin, albumin, heavy and light chains of Ig G. Also 47, 37 KDa nonplasma proteins were found.