

고농도의 포도당이 치은섬유아세포 및 치주인대세포의 Prostaglandin E₂ 생성에 미치는 영향

정종혁¹ · 권영혁¹ · 이만섭¹ · 박준봉¹ · 허 익¹ · 김성진²

¹경희대학교 치과대학 치주과학교실, ²약리학교실

I. 서론

최근 국민들의 생활수준이 전반적으로 높아지고 음식물의 섭취양상이 서구화됨에 따라 당뇨병환자의 수가 급격히 늘어나는 추세에 있으며 이들 당뇨병환자는 혈당조절이 잘 이루어지지 않을 경우 여러가지 전신적인 합병증을 일으키는 것으로 알려져 있다.

당뇨병을 가지고 있는 환자에서의 치주질환 발병빈도에 대해서도 많은 연구들이 보고되고 있으며, 당뇨병환자가 정상인에 비하여 더 높은 치주질환 발병 빈도를 보이는 것으로 보고되고 있다¹⁻⁴⁾. Hugoson 등(1989)⁵⁾은 당뇨병의 지속기간에 관계없이 당뇨병 환자가 정상인에 비해 치은염에 이환된 비율이 높다고 하였으며, 특히 45세이하의 환자에서 4-5mm의 치주낭깊이와 심각한 골소실을 보인다고 하였다. Nelson 등(1990)⁶⁾과 Grossi 등(1993)⁷⁾은 인슐린비의존성 당뇨병환자의 치주질환이환율을 정상인과 비교한 결과 정상인에 비해 2-3배정도 높게 나타나며 당뇨병이 치주질환에서 중요한 위험인자로 작용한다고 하였다. 또, Bridge 등(1996)⁸⁾은 당뇨병환자가 정상인에 비해 치태지수, 치은지수, 출혈지수, 치주낭깊이, 부착상실등 여러 가지 치주지수(periodontal

parameter)에 대해 높은 수치를 나타내고 당뇨병의 기간과는 상관관계가 없다고 하였으며 Karjalainen 등(1996)⁹⁾은 인슐린의존성 당뇨병환자를 대상으로 조사한 결과 당뇨병으로 인한 과혈당증과 불량한 대사조절로 숙주방어기전이 감소하여 치은출혈을 증가시킨다고 하였으며 당뇨병환자에서 치태에 의한 치은염증을 예방하는 것이 중요함을 강조하였다.

당뇨병환자에서 높은 치주질환발병률을 나타내는 원인에 대해서는 periodontal flora의 영향, 중성구 기능의 이상, 과도한 염증반응, 교원질 대사의 이상, 그리고 상처치유의 이상 등이 제시되고 있다¹⁰⁾. 또한 당뇨병이 치주조직에서 임파구, 대식세포, cytokine, arachidonic acid 대사물질, 그 외의 국소인자들에 영향을 미칠 것으로 추측되지만 아직까지 그 기전은 확실하게 규명되어 있지 않다. Arachidonic acid의 대사물질인 prostaglandin은 치주조직에서 치은염과 치조골흡수를 유발하는 물질로 알려져 있다. 이 중 특히 prostaglandin E₂는 염증반응, 결합조직파괴, 그리고 골흡수 등의 작용을 하는 것으로 보고되고 있다¹¹⁻¹⁴⁾. Prostaglandin에 대한 여러 연구에서 Klein과 Raisz(1970)¹⁵⁾는 조직배양을 통해 prostaglandin이 골흡수에서 강력한 자극

요인으로 작용한다고 하였고, Williams 등(1977)¹⁶은 prostaglandin E₂가 혈관확장, 모세혈관투과성의 증가를 유발하여 광범위한 염증반응을 나타낸다고 하였다. 또 치은염구액과 치은조직표본을 이용한 실험에서도 치주질환을 가지고 있는 염증성 치은의 prostaglandin E₂ level이 건강한 치은조직에 비해 높게 나타나는 것으로 알려져 있다^{13, 17-21}.

치은결합조직을 구성하는 주요세포인 치은섬유아세포와 치주인대를 구성하고 있는 치주인대세포는 여러 가지 자극에 의해 prostaglandin E₂를 생산한다. Garrison 등(1988)²²과 Sismey 등(1991)²³은 치은섬유아세포가 lipopolysaccharide에 의해 자극을 받으면 prostaglandin E₂를 생산한다고 하였으며, Koka 등(1997)²⁴도 치은섬유아세포와 치주인대세포에서, P. gingivalis에서 유리된 lipopolysaccharide에 대한 반응으로 prostaglandin E₂의 생성이 증가되고 특히 치주인대세포에서 더 많은 생성을 보인다고 하였다. 또한 치은섬유아세포와 치주인대세포는 interleukin-1, interleukin-1-β, tumor necrosis factor α, 그리고 parathyroid hormone에 의해서도 prostaglandin 생성이 증가한다고 알려져 있다^{25, 26}.

이에 저자는 고농도의 포도당이 치주조직을 구성하는 주요세포인 치은섬유아세포와 치주인대세포에서 prostaglandin E₂ 생성에 미치는 영향을 알아보기로 이 연구를 시행하였으며 세포수 측정, 단백질함량 측정 및 prostaglandin E₂ 양 측정을 시행하여 실험군과 대조군간에 비교하여, 당뇨병환자의 치주질환 발생과 arachidonic acid 대사물질인 prostaglandin E₂와의 연관성을 규명하고자 하였다.

II. 연구재료 및 방법

1. 연구재료

연구대상은 전신건강이 양호한 성인으로부

터 초기배양한 치은섬유아세포와 치주인대세포를 이용하였으며 임상적으로 염증이 없는 건강한 치주조직이 없다. 치은섬유아세포와 치주인대세포의 배양은 Somerman 등(1988)²⁷의 방법에 의거하여 시행하였다.

(1) 치은섬유아세포의 배양

교정치료를 목적으로 내원한 환자로부터 제1소구치 발치시 건강한 치은조직을 채취하여 200 unit/ml penicillin(Gibco, U.S.A.), 200 μg/ml streptomycin(Gibco, U.S.A.)과 1 μg/ml amphotericin-B(Gibco, U.S.A.)가 첨가된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Gibco, U.S.A.)로 구성된 생김배지로 4회 세척하였다. 조직편을 약 1mm³의 크기로 세절하여 직경 35mm의 배양접시에 10-15조각 정도를 고르게 분포시킨 다음 10% Fetal bovine serum(FBS, Gibco, U.S.A.)과 100unit/ml penicillin, 100 μg/ml streptomycin, 0.5 μg/ml amphotericin-B가 포함된 DMEM으로 구성된 배양액을 넣고, 37°C, 100% 습도, 5% CO₂ 공기혼합 배양기(Vision Scientific Co., Korea)에서 배양하였다.

치은섬유아세포가 조직절편으로부터 증식되어 배양접시를 완전히 덮는 단층이 형성되면 0.05% Trypsin/0.02% EDTA를 처리하여 배양접시로부터 세포를 박리하고 1:3 계대배양하여 4-7세대의 세포를 본 실험에 사용하였다.

(2) 치주인대세포의 배양

교정치료를 목적으로 발거한 제1소구치를 치은섬유아세포에서와 같은 조성의 생김배지로 4회 세척하였다. 치근의 치관측 중부위와 치근단측 중부위를 제외한 중앙 중부위에서 치주인대 조직을 blade로 채취하여 직경 35mm의 배양접시에 고르게 분포시킨 다음 치주인대세포 배양에서와 같은 방법으로 배양하여 4-7세대의 세포를 실험에 사용하였다.

2. 연구방법

(1) 대조군 및 실험군 설정

45mg/dl의 포도당이 포함된 배양액에서 세포를 배양한 군을 대조군으로 하였으며, 이 배양액에 포도당의 농도를 증가시킨 군을 실험군으로 하였다. 100mg/dl의 포도당농도를 가진 군을 실험 제 1 군, 200mg/dl의 포도당 농도를 가진 군을 실험 제 2 군, 400mg/dl의 포도당농도를 가진 군을 실험 제 3 군으로 하여 총세포수는 대조군과 실험군 모두 동일하게 하였다.

(2) 세포수 측정

치은섬유아세포와 치주인대세포를 각각 직경 35mm의 배양접시에 $5 \times 10^4/ml$ 개의 세포가 되도록 하여 10% Fetal bovine serum(FBS, Gibco, U.S.A.)과 100 unit/ml penicillin, 100 $\mu g/ml$ streptomycin, 0.5 $\mu g/ml$ amphotericin-B가 포함된 DMEM으로 구성된 배지에서, 37°C, 100% 습도, 5% CO₂ 공기혼합 배양기에서 대조군, 실험군에 각각 12개씩 48개의 배양접시에 배양하였다. 세포가 부착 완료한 1일후부터 각 군에 해당하는 배양액으로 배양하였으며, 이때부터 배양 12시간, 1일, 2일, 5일째에 0.05% Trypsin/0.02% EDTA로 처리하여 세포를 박리한 다음 hemocytometer를 이용하여 도립현미경하에서 세포수를 측정하였다.

(3) 단백질함량 측정

치은섬유아세포와 치주인대세포를 각각 직경 35mm의 배양접시에 $5 \times 10^4/ml$ 개의 세포가 되도록 하여 세포수 측정에서와 같이 배양한 후, 배양 2일, 5일에 인산완충생리식염수(Phosphate buffered saline)로 2회 세척하여 0.05% Trypsin/ 0.02% EDTA로 처리하고 세포를 박리한 다음 원심분리하여 cell pellet을 0.5ml deionized distilled water에 넣고 혼합하였다. 초음파세포분쇄기로 세포막을 분쇄하고

이중 100 μl 를 취하여 BIO-RAD protein assay kit로 측정하였다.

위의 100 μl 를 취하여 희석된 protein assay kit 시약을 5ml 넣고 혼합 후 UV-VIS spectrophotometer로 595nm에서 흡광도를 측정하고 정규곡선을 이용하여 세포내의 단백질함량을 측정하였다.

(4) Prostaglandin E₂ 양 측정

치은섬유아세포와 치주인대세포를 각각 직경 35mm의 배양접시에 $5 \times 10^4/ml$ 개의 세포가 되도록 하여 세포수 측정에서와 같이 배양한 후, 배양 2일, 5일에 상층액 900 μl 씩을 분취하여 BIOTRAK™ enzyme immunoassay system으로 측정하였다. 이때 assay buffer, prostaglandin E₂ conjugate, antibody, wash buffer를 일정 농도로 희석하고 각 sample을 50 μl 씩 채취하여 Goat anti-mouse IgG가 coating되어있는 plate에 넣은 후 준비된 시약을 첨가하여 450nm에서 ELISA를 시행하여 측정하였다.

(5) 통계분석

세포수, 단백질 함량, prostaglandin E₂ 양의 비교에 있어서 One Way ANOVA Test (Duncan's Multiple Range Test)를 이용하여 P<0.01 수준으로 실험군간의 유의성을 평가하였다.

III. 연구성적

1. 세포수 측정

대조군과 실험 제 1, 2, 3군을 $\frac{1}{2}$, 1, 2, 5일에 세포수를 측정한 결과 치은섬유아세포와 치주인대세포 모두 시간이 경과함에 따라 모든 군에서 세포수가 전반적으로 증가하는 양상을 보였다. 치은섬유아세포는 $\frac{1}{2}$ 일에서는 4군 모두 유사한 양상을 나타냈으나 1일, 2일,

표 1 Effect of high glucose on the proliferation of human gingival fibroblasts

days in culture	Number of cell($\times 10^4$ cells/ml)			
	45mg/dl	100mg/dl	200mg/dl	400mg/dl
day 1/2	5.38±0.38 ^a	5.19±0.06 ^a	5.13±0.25 ^a	4.56±0.19 ^b
day 1	8.19±0.44 ^a	6.63±0.13 ^b	5.19±0.56 ^c	4.81±0.19 ^d
day 2	14.75±0.25 ^a	10.69±0.06 ^b	7.94±0.44 ^c	5.00±0.25 ^d
day 5	45.00±1.17 ^a	34.50±1.08 ^b	24.17±1.64 ^c	7.79±0.19 ^d

Values are mean±S.E. , n=3.

a,b,c,d is statistically significant at P<0.01 between each group by One Way ANOVA Test.

표 2 Effect of high glucose on the proliferation of human periodontal ligament cells

days in culture	Number of cell($\times 10^4$ cells/ml)			
	45mg/dl	100mg/dl	200mg/dl	400mg/dl
day 1/2	5.32±0.41 ^a	5.12±0.20 ^a	5.13±0.25 ^a	4.73±0.18 ^b
day 1	33.75±0.13 ^a	29.63±0.25 ^b	25.52±0.13 ^c	20.44±0.19 ^d
day 2	40.31±0.06 ^a	36.63±1.13 ^b	30.88±0.88 ^c	19.25±1.63 ^d
day 5	51.18±1.68 ^a	38.00±1.13 ^b	33.00±0.63 ^c	20.13±0.13 ^d

Values are mean±S.E. , n=3.

a,b,c,d is statistically significant at P<0.01 between each group by One Way ANOVA Test.

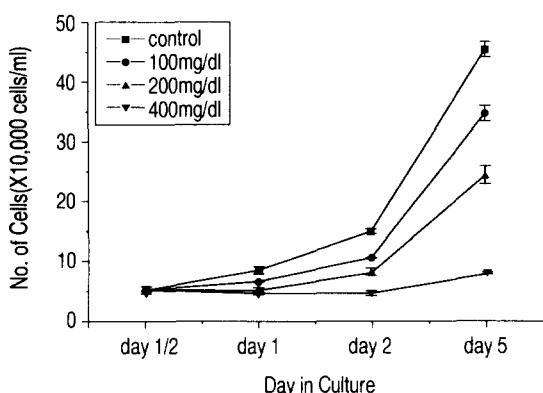


그림 1 Effect of high glucose on the proliferation of human gingival fibroblasts

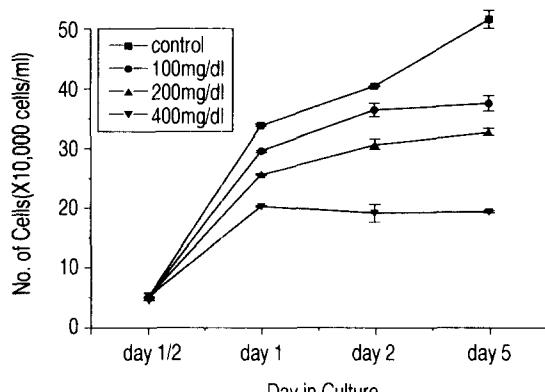


그림 2 Effect of high glucose on the proliferation of human periodontal ligament cells

5일로 갈수록 대조군에 비하여 실험군의 세포수가 유의성 있는 감소를 보였다. 시간별 각 군의 세포수를 보면 1일에는 대조군, 실험 제

1 군, 실험 제 2 군, 실험 제 3 군이 각각 8.19 ±0.44, 6.63±0.13, 5.19±0.56, 4.81±0.19로 포도당 농도가 증가함에 따라 세포수가 감소되

었다. 2일과 5일의 각 군의 결과에서도 2일에서는 14.75 ± 0.25 , 10.69 ± 0.06 , 7.94 ± 0.44 , 5.00 ± 0.25 로 나타났고, 5일에서는 45.00 ± 1.17 , 34.50 ± 1.08 , 24.17 ± 1.64 , 7.79 ± 0.19 로 나타났으며 포도당 농도가 증가할수록 세포수가 감소되어 나타났다. 또한 1일의 결과에 비해 2일의 결과가, 2일의 결과에 비해 5일의 결과가 더 현저한 차이를 보였다(표 1, 그림. 1 참조).

치주인대세포도 2일에서 4군 모두 유사한

양상을 나타냈으나 1일, 2일, 5일로 갈수록 대조군에 비하여 실험군의 세포수가 유의성 있는 감소를 보였다. 시간별 각 군의 세포수를 보면 1일에는 대조군, 실험 제 1, 2, 3군이 각각 33.75 ± 0.13 , 29.63 ± 0.25 , 25.52 ± 0.13 , 20.44 ± 0.19 로 포도당 농도가 증가함에 따라 세포수가 감소되었다. 2일과 5일의 각 군의 결과에서도 2일에서는 40.31 ± 0.06 , 36.63 ± 1.13 , 30.88 ± 0.88 , 19.25 ± 1.63 로 나타났고, 5일에서

표 3 Effect of high glucose on the proliferation in human gingival fibroblasts

days in culture	protein (ug/ml)			
	45mg/dl	100mg/dl	200mg/dl	400mg/dl
day 2	2.88 ± 1.10^a	7.97 ± 0.42^b	6.08 ± 0.46^b	2.55 ± 0.38^a
day 5	18.81 ± 0.13^a	22.43 ± 0.07^b	13.11 ± 0.83^c	9.18 ± 1.32^d

표 4 Effect of high glucose on the proliferation in human periodontal ligament cells

days in culture	protein (ug/ml)			
	45mg/dl	100mg/dl	200mg/dl	400mg/dl
day 2	38.73 ± 0.29^a	37.06 ± 0.23^b	29.61 ± 1.52^c	15.30 ± 0.29^d
day 5	59.88 ± 4.52^a	45.79 ± 1.77^b	40.10 ± 3.13^c	27.08 ± 2.96^d

Values are mean \pm S.E. , n=3.

a,b,c,d is statistically significant at P<0.01 between each group by One Way ANOVA Test.

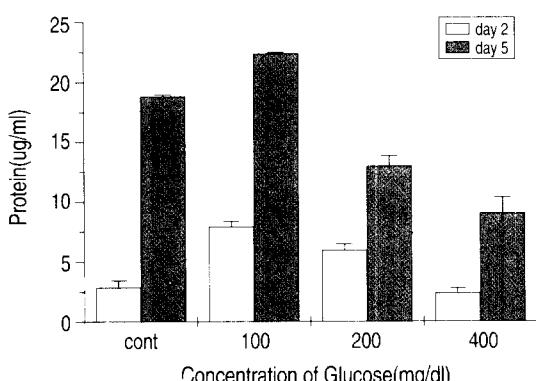


그림 3 Effect of high glucose on the proliferation in human gingival fibroblasts

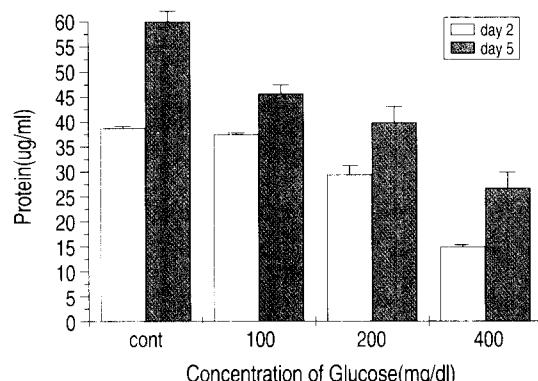


그림 4 Effect of high glucose on the proliferation in human periodontal ligament cells

표 5 Effect of high glucose on the production of prostaglandin E₂ in human gingival fibroblasts

days in culture	PGE ₂ production (pg/10 ⁴ cells)			
	45mg/dl	100mg/dl	200mg/dl	400mg/dl
day 2	9.07±0.775 ^a	13.87±0.282 ^b	22.61±0.19 ^c	40.72±0.42 ^d
day 5	0.202±0.017 ^a	0.402±0.008 ^b	0.935±0.008 ^c	5.227±0.054 ^d

Values are mean±S.E., n=3.

a,b,c,d is statistically significant at P<0.01 between each group by One Way ANOVA Test.

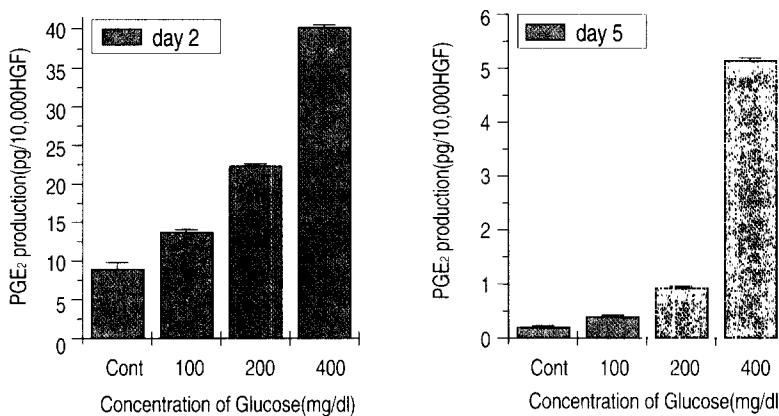


그림 5 Effect of high glucose on the production of prostaglandin E₂ in human gingival fibroblasts

표 6 Effect of high glucose on the production of prostaglandin E₂ in human periodontal ligament cells

days in culture	PGE ₂ production (pg/10 ⁴ cells)			
	45mg/dl	100mg/dl	200mg/dl	400mg/dl
day 2	0.49±0.13 ^a	4.47±0.33 ^b	6.69±0.28 ^c	20.72±0.05 ^d
day 5	0.0095±0.0025 ^a	0.1176±0.0088 ^b	0.2028±0.0086 ^c	1.0293±0.0024 ^d

Values are mean±S.E., n=3.

a,b,c,d is statistically significant at P<0.01 between each group by One Way ANOVA Test.

는 51.18±1.68, 38.00±1.13, 33.00±0.63, 20.13±0.13로 나타났으며 포도당 농도가 증가할수록 세포수가 감소되어 나타났다. 또한 1일의 결과에 비해 2일의 결과가, 2일의 결과에 비해 5일의 결과가 더 현저한 차이를 보였다(표 2, 그림. 2 참조).

2. 단백질함량 측정

대조군과 실험 제 1, 2, 3군을 2, 5일에 단백질함량을 측정한 결과 치은섬유아세포에서는 2일의 측정치가 2.88±1.10(대조군), 7.97±0.42(실험 제 1 군), 6.08±0.46 (실험 제 2 군), 2.55±0.38 (실험 제 3 군)로서 실험 제 1 군,

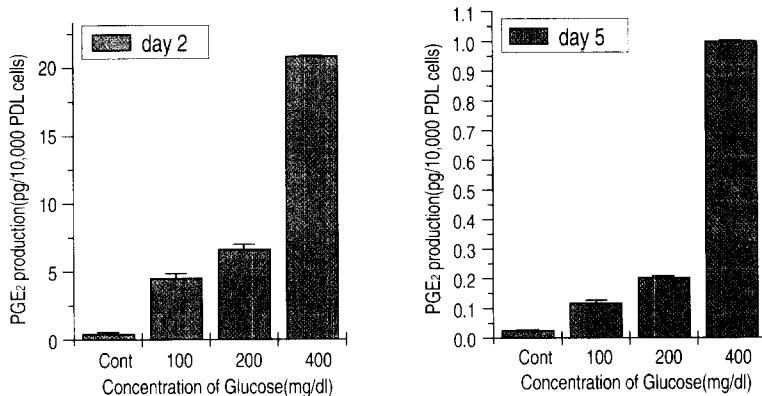


그림 6 Effect of high glucose on the production of prostaglandin E₂ in human periodontal ligament cells

실험 제 2 군, 대조군, 실험 제 3 군 순으로 나타났다. 5일째의 결과에서는 18.81 ± 0.13 (대조군), 22.43 ± 0.07 (실험 제 1 군), 13.11 ± 0.83 (실험 제 2 군), 9.18 ± 1.32 (실험 제 3 군)으로 실험 제 1 군, 대조군, 실험 제 2 군, 실험 제 3 군의 순으로 나타났다. 또한 2일째에 비하여 5일째가 모든 군에서 단백질함량이 증가되어 나타났다(표 3, 그림. 3 참조).

치주인대세포에서는 2일에서의 결과는 38.73 ± 0.29 (대조군), 37.06 ± 0.23 (실험 제 1 군), 29.61 ± 1.52 (실험 제 2 군), 15.30 ± 0.29 (실험 제 3 군)로서 대조군, 실험 제 1 군, 실험 제 2 군, 실험 제 3 군 순으로 나타났고, 5일째의 결과에서는 59.88 ± 4.52 (대조군), 45.79 ± 1.77 (실험 제 1 군), 40.10 ± 3.13 (실험 제 2 군), 27.08 ± 2.96 (실험 제 3 군)으로 대조군, 실험 제 1 군, 실험 제 2 군, 실험 제 3 군의 순으로 나타났다. 2일과 5일의 결과 모두 포도당 농도가 증가할수록 단백질함량이 감소되어 나타났고, 또한 2일째에 비하여 5일째가 모든 군에서 단백질함량이 증가되어 나타났다(표 4, 그림. 4 참조).

3. Prostaglandin E₂ 양 측정

대조군과 실험 제 1, 2, 3군을 2, 5일에

prostaglandin E₂ 양을 측정한 결과 치은섬유아세포와 치주인대세포 모두 2일과 5일의 결과에서 포도당 농도가 증가함에 따라 prostaglandin E₂ 양이 뚜렷한 증가를 보였다. 치은섬유아세포와 치주인대세포 공히 2일의 결과에 비하여 5일의 결과가 각 군간에 더 현저한 차이를 나타냈으며, 2일째의 결과에 비하여 5일째의 결과에서 prostaglandin E₂ 생성이 더 적게 나타났다(표 5, 6, 그림 5, 6 참조).

IV. 총괄 및 고찰

Arachidonic acid는 물리적, 화학적, 기계적 자극에 의해 활성화된 cellular phospholipase에 의해 membrane에서부터 유리된다²⁸⁾. Prostaglandin은 이 arachidonic acid로부터 cyclooxygenase에 의해 생성되는 물질로서 혈소판 응집, 중성구의 화학주성, 혈관투과성의 증가 그리고 골흡수등을 나타내며 이러한 증상들은 치은염과 치조골흡수에서 나타난다^{29), 30)}. 특히 prostaglandin E₂는 염증반응, 결합조직파괴 그리고 골흡수에 있어 중요한 요소로 작용한다고 알려져 있다¹¹⁻¹⁴⁾.

Klein과 Raisz(1970)¹⁵⁾는 조직배양을 통해 prostaglandin이 골흡수에서 강력한 자극요인으로 작용한다고 하였고, Williams등(1977)¹⁶⁾

은 prostaglandin E₂가 혈관확장, 모세혈관투과성의 증가를 유발하여 광범위한 염증반응을 나타낸다고 하였다. 치주질환의 진행에 있어 prostaglandin은 치은열구액과 치은조직표본을 이용한 실험을 통해 치주질환을 가지고 있는 염증성 치은의 prostaglandin E₂ level이 건강한 치은조직에 비해 높게 나타나는 것으로 알려져 있다^{13, 17-21)}. 또 Mendiesta 등(1985)³¹⁾은 arachidonic acid가 있는 상태에서 배양했을 때 건강한 치은의 표본에서보다 염증성 치은이 더 많은 prostaglandin을 생산한다고 하였다.

한편 prostaglandin E₂는 치주질환의 진행여부를 판단하는 기준이 되기도 한다. Offenbacher 등(1986)²¹⁾은 치은열구액의 prostaglandin E₂ level을 통해 진행중인 치주질환을 판단할 수 있고 치주조직의 부착소실을 예측할 수 있다고 하였다. Nakashima 등(1994)³²⁾도 치주질환환자의 치은열구액에서 prostaglandin E₂, osteocalcin, alkaline phosphatase의 양이 증가되어 나타나고 이들은 치주질환의 marker로 고려될 수 있다고 하였다.

Prostaglandin E₂가 치주조직에 미치는 작용으로는 치은섬유아세포의 증식, DNA 합성, 단백질 합성의 억제등이 알려져 있다³³⁾. 또, Miyauchi 등(1992)³⁴⁾은 Wistar rat을 이용한 실험에서 prostaglandin E₂를 치은열구에 적용하였을 때 1.0mg/ml까지는 용량에 비례하여 osteoclast의 수가 증가함을 보고하였다.

치은결합조직은 세포와 교원질, 비교원성단백질, glycosaminoglycan(GAG)같은 세포외기질로 구성되어 있고, 치은섬유아세포는 세포외 기질을 생산하는 주요세포이기 때문에 치은결합조직의 대사에 중요한 역할을 한다. Arai 등(1995)³⁵⁾은 여러 가지 prostaglandin에 대한 치은섬유아세포의 반응에 관한 실험을 통하여 prostaglandin이 세포의 증식, DNA 합성, 교원질 합성 그리고 비교원성단백질 합성을 억제하는 작용을 보이고, 이를 통해 치은

섬유아세포에 이화작용을 나타낸다고 하였으며, 이는 본 논문에서 고농도 포도당군의 세포수, 단백질함량에 대한 측정결과가 감소한 것이 prostaglandin E₂의 영향에 의한 것임을 뒷받침하고 있다. 세포수 측정에 대한 실험결과는 치은섬유아세포와 치주인대세포 모두 포도당의 농도가 증가할수록 시간이 지남에 따라 세포증식이 저하되는 결과를 보였다. 이는 포도당이 치은섬유아세포와 치주인대세포에 미치는 영향과 고농도의 포도당군에서 생성된 prostaglandin E₂의 영향에 의한 것으로 생각된다.

단백질함량측정에 대한 실험결과는 세포수 측정의 실험결과와 유사하게 나타났으나 치은섬유아세포는 5일째의 결과에서 실험 제 2 군과 실험 제 3 군만이 대조군에 비하여 단백질함량이 유의성있게 감소되어 나타났다. 한편 치주인대세포는 2일과 5일의 결과에서 포도당 농도가 증가할수록 단백질함량이 유의성있게 감소되었다. 단백질함량에 대한 실험결과 역시 포도당이 치은섬유아세포와 치주인대세포에 미치는 영향과 고농도의 포도당군에서 생성된 prostaglandin E₂의 영향에 의한 것으로 추측된다.

치주조직이외의 다른 조직에서 당뇨병에 의한 prostaglandin E₂ 생성에 대한 연구로 streptozotocin-induced diabetes mellitus상태의 쥐에서 채취한 사구체의 mesangial cell을 이용한 실험에서 prostaglandin 생성이 증가함을 보고하였다³⁶⁻³⁸⁾. 본 논문에서는 포도당을 이용하여 치주조직에서 고농도의 포도당에 의한 prostaglandin E₂ 생성을 관찰하였다. 그 결과 배양한 치은섬유아세포와 치주인대세포 모두 포도당농도가 증가할수록 prostaglandin E₂ 생성이 증가하는 양상을 볼 수 있었고 이 결과는 사구체의 세포를 대상으로 한 위의 연구들과 일치된 결과를 보였다.

치은섬유아세포와 치주인대세포에서 2일과 5일에 각 군에서 생성된 prostaglandin E₂양을

측정한 결과 2일의 결과에 비하여 5일의 결과에서 생성된 prostaglandin E₂양이 현저히 감소되는 것을 볼 수 있었다. Prostaglandin E₂ 측정결과가 두 세포군에서 모두 5일째의 결과가 감소된 것은 세포자체의 주기와 관련이 있을 것으로 생각된다. 치주질환의 발병기간에 따른 prostaglandin E₂ level에 대한 다른 문헌들을 보면 Offenbacher 등(1989)³⁹⁾은 rhesus monkey에서 ligature-induced periodontitis를 야기시켰을 때 prostaglandin E₂의 생산은 치은열구액에서 측정한 결과 3개월후에 정상에 비하여 3배, 6개월후에 6배의 prostaglandin E₂ level을 보였고, 12개월후에는 초기상태의 prostaglandin E₂ level을 보인다고 하였다. 그 결과 6개월째에 최대치를 나타냈다고 하였으며 치주질환이 활발한 기간동안 증가했다가 치주질환의 잠복기에는 감소하는 경향을 보인다고 하였다. 한편 Pricci 등(1996)⁴⁰⁾은 쥐의 mesangial cell을 배양한 실험에서 30mmol/l의 고농도포도당을 갖는 군을 실험군으로 24시간에서 4주까지 prostaglandin E₂의 생성을 관찰한 결과 24시간까지는 prostaglandin E₂의 생성이 증가하였고 2주까지는 변화가 없는 상태로 진행되었으며 4주후에는 감소되었다고 하였다. 또한 사구체에서의 prostanoid 생성에 대한 실험에서도 당뇨의 초기에는 prostanoid 생성이 활성화되고, 말기에는 활성이 감소되는 것으로 보고되고 있다³⁷⁾. 이러한 연구는 본 논문에서의 prostaglandin E₂ 양 측정 결과가 치은섬유아세포와 치주인대세포 모두 2일에 비해 5일에서 감소된 것과 시간적인 차이는 있으나 실험초기에 생성이 증가하였다가 그 이후에 감소한다는 점에서 유사한 결과를 보이는 것이라 할 수 있다.

고농도의 포도당에 의해 prostaglandin E₂가 증가하는 기전은 확실하지는 않으나, 당뇨상태의 사구체에서 prostaglandin E₂ 생성이 증

가하는 것은 glomerular phospholipase A2의 증가와 이에따라 나타나는 arachidonic acid의 분비증가에 의한 것으로 보고되고 있다^{37, 41)}. 다른 연구에서도 사구체의 mesangial cells을 대상으로 한 실험에서 고농도의 streptozotocin이나 포도당상태 하에서 diacylglycerol이 protein kinase C의 세포활성도를 증가시키고 활성화된 protein kinase C는 phospholipase A2를 활성화시키며 이에 의해 사구체에서 prostanoids의 생성이 증가하는 것을 설명할 수 있다고 하였다^{40, 42-46)}. 이 실험에서 고농도의 포도당에 의해 prostaglandin E₂가 증가하는 기전도 위의 문헌들에서 나타난 기전으로 추측할 수 있다.

또한 치주질환을 가진 동물과 사람을 대상으로 한 실험에서 cyclooxygenase activity와 prostaglandin 생성을 억제하는 nonsteroidal anti-inflammatory drugs의 전신적인 투여로 치조골 파괴가 현저히 감소되었음이 보고되고 있다⁴⁷⁻⁵²⁾. 실제 당뇨병 환자에서 nonsteroidal anti-inflammatory drugs의 전신적인 투여는 여러가지 문제점들이 야기될 것으로 생각되지만 prostaglandin E₂에 의해 나타날 수 있는 치주조직의 파괴에 대해서 nonsteroidal anti-inflammatory drugs를 포함하여 여러 약재의 사용 가능성에 대해서도 더 많은 연구가 이루어져야 할 것이다.

본 논문의 결과를 종합하여 요약하면, 고농도의 포도당은 치은섬유아세포와 치주인대세포의 세포수, 단백질함량등의 세포활성에 영향을 주며 prostaglandin E₂ 양을 증가시키는 것으로 나타났으며 고농도의 포도당으로 인하여 생성되는 prostaglandin E₂가 치은섬유아세포와 치주인대세포에 염증반응을 일으켜서 이를 세포에 독성효과를 유발할 수 있다고 생각된다. 이런 결과는 당뇨병 환자에 있어 치주질환 발생과 진행에 prostaglandin E₂가 관련됨을 제시하고 있다.

V. 결론

당뇨병 환자의 치주질환 이환율 증가에 prostaglandin E₂가 미치는 영향을 알아보고자 치은섬유아세포와 치주인대세포를 이용하여 본 연구를 시행하였다.

배양액의 포도당농도를 달리하여 45mg/dl 농도의 포도당 포함군(대조군), 100mg/dl 농도의 포도당 포함군(제 1 군), 200mg/dl 농도의 포도당 포함군(제 2 군), 400mg/dl 농도의 포도당 포함군(제 3 군)으로 나누어 치은섬유아세포와 치주인대세포를 이용하여 세포수, 단백질함량, prostaglandin E₂양을 비교하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 세포수는 치은섬유아세포와 치주인대세포 모두에서 포도당농도가 증가할수록 감소하였고 1일, 2일, 5일의 결과에서는 각 군간에 유의성 있는 감소를 보였다 ($P<0.01$).
2. 치은섬유아세포에서의 단백질함량은 5일 째의 결과에서 대조군에 비하여 높은 포도당 농도를 갖는 제 2 군, 제 3 군에서 유의성 있게 감소하였다($P<0.01$).
3. 치주인대세포에서의 단백질함량은 2일째 와 5일째의 결과 모두 포도당농도가 증가할수록 감소하였고 대조군에 비하여 각 군간에 유의성 있는 감소를 보였다 ($P<0.01$).
4. Prostaglandin E₂양은 치은섬유아세포와 치주인대세포 모두에서 포도당농도가 증가할수록 유의성 있는 증가를 보였으며 ($P<0.01$), 5일째에 현저한 증가를 보였다.

VI. 참고문헌

1. De Pommereau, V., Dargent-Pare, C., Robert, J. J., and Brion, M. : Periodontal status in insulin- dependent

- diabetic adolescents. *J. Clin. Periodontol.*, 19 : 628-632, 1992.
2. Emrich L. J., Shlossman, M., and Genco, R. J. : Periodontal disease in noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J. Periodontol.*, 62 : 123-130, 1991.
3. Novaes, A. B. Jr., Pereira, A. L. A., de Moraes, N., and Novaes, A. B. : Manifestations of insulin- dependent diabetes mellitus in the periodontium of young Brazilian patients. *J. Periodontol.*, 62 : 116-122, 1991.
4. Thorstensson, H., and Hugosson, A. : Periodontal disease experience in adult long-duration insulin- dependent diabetics. *J. Clin. Periodontol.*, 20 : 352-358, 1993.
5. Hugoson, A., Thorstensson, H., Falk, H., and Kyuljenstierna, J. : Periodontal conditions in insulin- dependent diabetes. *J. Clin. Periodontol.*, 16 : 215-223, 1989.
6. Nelson, R. G., Shlossman, M., Budding, L. M. et al. : Periodontal disease and NIDDM in Pima Indians. *Diabetes Care.*, 13 : 836-840, 1990.
7. Grossi, S. G., Zambon, J. J., Norderyd, C. M. et al. : Microbiological risk indicators for periodontal disease. *J. Dent. Res.*, 72 : 206, 1993.
8. Bridges, R. B., Anderson, J. W., Saxe, S. R., Gregory, K., and Bridges, S. R. : Periodontal status of diabetic and non-diabetic men. *J. Periodontol.*, 67 : 1185-1192, 1996.
9. Karjalainen, K. M., and Knuutila, M. L. E. : The onset of diabetes and poor metabolic control increases gingival bleeding in children and adolescents with insulin-dependent diabetes mellitus.

- J. Clin. Periodontol., 23 : 1060-1067, 1996.
10. Yalda, B., Offenbacher, S., and Collins, J. G. : Diabetes as a modifier of periodontal disease expression. *Periodontology* 2000, 6 : 37-49, 1994.
 11. Dietrich, J., Goodson, J. M., and Raisz, L. G. : Stimulation of bone resorption by various prostaglandins in organ culture. *Prostaglandins*, 10 : 231-238, 1975.
 12. Goldhaber, P., Rabadjija, L., Beyer, W. R., and Kornhauser, A. : Bone resorption in tissue culture and its relevance to periodontal disease. *J. Am. Dent. Assoc.*, 87 : 1027-1033, 1973.
 13. Goodson, J. M., Dewhirst, F. E., and Brunetti, A. : Prostaglandin E2 levels and human periodontal disease. *Prostaglandins*, 6 : 81-85, 1974.
 14. Salmon, J. A., and Riggs, G. A. : Prostaglandins and leukotrienes as inflammatory mediators. *Br. Med. Bull.*, 43(2) : 285-296, 1987.
 15. Klein, D. C., and Raisz, L. G. : Prostaglandins: stimulation of bone resorption in tissue culture. *Endocrinology*, 86 : 1436-1440, 1970.
 16. Williams, T. J., and Peck, M. J. : Role of prostaglandin-mediated vasodilation in inflammation. *Nature*, 270 : 530-532, 1977.
 17. Dewhirst, F., Moss, D., Offenbacher, S., and Goodson, J. M. : Levels of prostaglandin E₂, thromboxane, and prostacyclin in periodontal tissues. *J. Periodont. Res.*, 18 : 156-163, 1983.
 18. El Attar, T. M. A., and Lin, H. S. : Prostaglandins in gingiva of patients with periodontal disease. *J. Periodontol.*, 52 : 16-19, 1981.
 19. Offenbacher, S., Farr, D. H., and Goodson, J. M. : Measurement of prostaglandin E in crevicular fluid. *J. Clin. Periodontol.*, 8 : 359-367, 1981.
 20. Offenbacher, S., Odle, B. M., Gray, R. C., and Van Dyke, T. E. : Crevicular fluid prostaglandin E levels as a measure of the periodontal disease status of adult and juvenile periodontitis patients. *J. Periodont. Res.*, 19 : 1-13, 1984.
 21. Offenbacher, S., Odle, B. M., and Van Dyke, T. E. : The use of crevicular fluid prostaglandin E₂ levels as a predictor of periodontal attachment loss. *J. Periodont. Res.*, 21 : 101-112, 1986.
 22. Garrison, S., Holt, S., and Nichols, F. : Lipopolysaccharide-stimulated PGE2 release from human monocytes. *J. Periodontol.*, 59 : 684-687, 1988.
 23. Sismey-Durrant, H. J., and Hopps, R. M. Effect of lipopolysaccharide from porphyromonas gingivalis on prostaglandin E₂ and interleukin-1 β release from rat periosteal and human gingival fibroblasts in vitro. *Oral Microbiol. Immunol.*, 6 : 378-380, 1991.
 24. Koka, S., and Reinhardt, R. A. : Periodontal pathogen-related stimulation indicates unique phenotype of primary cultured human fibroblasts from gingiva and periodontal ligament : Implications for oral health disease. *J. Prosthet. Dent.*, 77 : 191-196, 1997.
 25. Richards, D., and Rutherford, R. B. : The effects of interleukin-I on collagenolytic activity and prostaglandin-

- E secretion by human periodontal-ligament and gingival fibroblast. *Arch. Oral Biol.*, 33 : 237-243, 1988.
26. Saito, S., Rosol, T. J., Saito, M., Ngan, P. W., Shanfeld, J., and Davidovitch, Z. : Bone-resorbing activity and prostaglandin E produced by human periodontal ligament cells in vitro. *J. Bone Mineral Res.*, 5 : 1013-1018, 1990.
 27. Somerman, M. J., Archer, S. Y., Imm, G. R., and Foster, R. A. : A comparative study of human periodontal ligament cells and gingival fibroblasts in vitro. *J. Dent. Res.*, 67 : 66-70, 1988.
 28. Page, R. : The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease. *J. Periodont. Res.*, 26 : 230-242, 1991.
 29. Goodson, J. M., McClathy, K., Revell, C. : Prostaglandin-induced resorption of adult rat calvarium. *J. Dent. Res.*, 53 : 670-677, 1974.
 30. Howell, T. H. : Blocking periodontal disease progression with anti-inflammatory agents. *J. Periodontol.*, 64 : 828-833, 1993.
 31. Mendieta, C., Reeve, C., and Romero, J. : Biosynthesis of prostaglandins in gingiva of patients with chronic periodontitis. *J. Periodontol.*, 56 : 44-47, 1985.
 32. Nakashima, K., Roehrich, N., and Cimasoni, G. : Osteocalcin, prostaglandin E2 and alkaline phosphatase in gingival crevicular fluid : their relations to periodontal status. *J. Clin. Periodontol.*, 21 : 327-333, 1994.
 33. Ko, S. D., Page, R. C., and Narayanan, A. S. : Fibroblast heterogeneity and prostaglandin regulation of subpopulations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74 : 3429-3432, 1977.
 34. Miyauchi, M., Ijuhin, N., Nikai, H., Takata, T., Ito, H., and Ogawa, I. : Effect of exogenously applied prostaglandin E2 on alveolar bone loss-histometric analysis. *J. Periodontol.*, 63 : 405-411, 1992.
 35. Arai, H., Nomura, Y., Kinoshita, M., Shimizu, H., Ono, K., Goto, H., Takigawa, M., Nishimura, F., Washio, N., Kurihara, H., and Murayama, Y. : Response of human gingival fibroblasts to prostaglandins. *J. Periodont. Res.*, 30 : 303-311, 1995.
 36. Chaudari, A., and Kirschenbaum, M. A. : Effect of experimental diabetes mellitus on eicosanoid biosynthesis in isolated rat glomeruli. *Kidney Int.*, 25 : 326-331, 1984.
 37. Craven, P. A., Caines, M. A., and DeRubertis, F. R. : Sequential alterations in glomerular prostaglandin and thromboxane synthesis in diabetic rats : relationship to the hyperfiltration of early diabetes. *Metabolism*, 36 : 95-103, 1987.
 38. Schambelan, M., Blake, S., Sraer, J., Bens, M., Nivez, M. P., and Wahbe, F. : Increased prostaglandin production by glomeruli isolated from rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus. *J. Clin. Invest.*, 75 : 404-412, 1985.
 39. Offenbacher, S., Odle, B., Braswell, L., Johnson, H., Hall, C., McClure, H., Orkin, J., Strobert, E., and Green, M. : Changes in cyclooxygenase metabolites in experimental periodontitis in Macaca

- mulatta. *J. Periodont. Res.*, 24 : 63-74, 1989.
40. Pricci, F., Pugliese, G., Mene, P., Romeo, G., et al. : Regulatory role of eicosanoids in extracellular matrix overproduction induced by long-term exposure to high glucose in cultured rat mesangial cells. *Diabetologia*, 39 : 1055-1062, 1996.
41. Craven, P. A., Patterson, M. C., and De Rubertis, F. R. : Role of enhanced arachidonate availability through phospholipase A2 pathway in mediation of increased prostaglandin synthesis by glomeruli from diabetic rats. *Diabetes*, 37 : 429-435, 1988.
42. Craven, P. A., and De Rubertis, F. R. : Protein Kinase C is activated in glomeruli from streptozotocin diabetic rats: possible mediation by glucose. *J. Clin. Invest.*, 83 : 1667-1675, 1989.
43. Ayo, S. H., Radnik, R., Garoni, J. A., Troyer, D. A., and Kreisberg, J. I. : High glucose increases diacylglycerol mass and activates PKC in mesangial cell cultures. *Am. J. Physiol.*, 261 : F571-F577, 1991.
44. DeRubertis, F. R., and Craven, P. A. : Activation of protein kinase C in glomerular cells in diabetes. Mechanisms and potential links to the pathogenesis of diabetic glomerulopathy. *Diabetes*, 43 : 1-8, 1994.
45. Dunlop, M. E., and Larkins, R. G. : Persistence in culture of increased de novo synthesis of diacylglycerol, phospholipase A2 activity and prostaglandin production by mesangial cells of diabetics rats. *Diabetes*[Suppl 1], 39 : 189A (Abstract), 1990.
46. Williams, B., and Schrier, R. W. : Glucose-induced protein kinase C activity regulates arachidonic acid release and eicosanoid production by cultured glomerular mesangial cells. *J. Clin. Invest.*, 92 : 2889-2896, 1993.
47. El Attar, T., Lin, H., and Tira, D. : Arachidonic acid metabolism in inflamed gingiva and its inhibition by anti-inflammatory drugs. *J. Periodontol.*, 55 : 536-539, 1984.
48. Jeffcoat, M. K., Williams, R. C., Reddy, M. S., English, R., and Goldhaber, P. : Flubiprofen treatment of human periodontitis: effect on alveolar bone height and metabolism. *J. Periodont. Res.*, 23 : 381-385, 1988.
49. Nyman, S., Schroeder, H. E., and Lindhe, J. : Suppression of inflammation and bone resorption by indomethacin during experimental periodontitis in dogs. *J. Periodontol.*, 50 : 450-461, 1979.
50. Offenbacher, S., Braswell, L. D., Loos, A. S., et al. : Effects of flurbiprofen on the progress of periodontitis in Macaca mulatta. *J. Periodont. Res.*, 22 : 473-481, 1987.
51. Offenbacher, S., Heasman, P. A., and Collins, J. G. : Modulation of host prostaglandin E2 secretion as a determinant of periodontal disease expression. *J. Periodontol.*, 64 : 432-444, 1993.
52. Williams, R. C., Jeffcoat, M. K., and Kaplan, J. L. : Flurbiprofen: a potent inhibitor of alveolar bone resorption in beagles. *Science*, 227 : 640-642, 1985.

-Abstract-

Effect of high glucose on the prostaglandin E₂ production in human gingival fibroblasts and periodontal ligament cells

Jong-Hyuk Chung¹, Young-Hyuk Kwon¹, Man-Sup Lee¹, Joon-Bong Park¹, Yeek Herr¹, Sung-Jin Kim²

¹Department of Periodontology College of Dentistry, Kyung-Hee University

²Department of Dental Pharmacology, College of Dentistry, Kyung-Hee University

The purpose of this study was to evaluate the effect of high glucose on prostaglandin E₂ production in human gingival fibroblasts and periodontal ligament cells in vitro. In control group, the cells(5×10^4 cells/ml) were cultured with Dulbecco's Modified Eagle's Medium contained with 10% fetal bovine serum, 45mg/dl glucose. In experimental groups, glucose was added to the above culture condition at the final glucose concentrations of 100mg/dl(Test group 1), 200mg/dl (Test group 2) and 400mg/dl(Test group 3). Then each group was tested for the cell proliferation rate, protein levels, and prostaglandin E₂ production at $\frac{1}{2}$, 1, 2, 5 days.

The results were as follows :

1. As glucose concentration increased, cell proliferation rate decreased significantly at 1, 2, 5 days in human gingival fibroblasts and periodontal ligament cells($P<0.01$).
2. In human gingival fibroblasts, test group 2 and 3 showed significantly decreased protein levels as compared to control group at 5 days($P<0.01$).
3. In human periodontal ligament cells, as glucose concentration increased, protein levels decreased significantly at 2 days and 5 days($P<0.01$).
4. Prostaglandin E₂ production in human gingival fibroblasts and human periodontal ligament cells significantly increased as glucose concentration increased($P<0.01$).

The results at 5 days showed obvious difference as compared to those at 2 days.

From the above results, high glucose appeared to affect cellular activities including cell proliferation rate, protein levels and enhance prostaglandin E₂ production. It was assumed that prostaglandin E₂ production by high glucose enhances inflammatory reaction and has a toxic effect on human gingival fibroblasts and human periodontal ligament cells. This study suggests that periodontal disease in diabetic patient is related to prostaglandin E₂ production.