

치수 및 치근단 질환에서의 단백분해효소 및 단백분해효소 억제제의 활성도에 관한 연구

김진우 · 임성삼

서울대학교 치과대학 치과보존학교실, 강릉대학교 치과대학 치과보존학교실

ABSTRACT

A STUDY ON THE ACTIVITY OF PROTEINASE AND PROTEINASE INHIBITOR IN PULPAL AND PERIAPICAL PATHOSES

Jin-Woo Kim, Suk-Keun Lee¹, Sung-Sam Lim

Dept. of Conservative Dentistry College of Dentistry, Seoul National University

Dept. of Oral pathology, College of Dentistry, Kangnung National University¹

It is known that injuries to the dentin have a corresponding inflammatory effect on the pulp and these inflammatory effects frequently result in pulpal pathoses due to progressive degradation of pulpal connective tissue. It was supposed that the tissue degradation in different inflammatory process was controlled by proteinase activity and antiproteinase activity. Therefore, the purpose of this study was to examine the pulp and periapical pathoses in terms of the activities of proteinase and proteinase inhibitor.

37 pulpal tissues were divided by clinical diagnostic criteria into normal pulp, acute inflamed pulp, and chronic inflamed pulp, and then those groups were subdivided by histopathological findings into 5 pulpal pathoses groups, i.e. normal pulp (P1, n=8), chronic pulpitis with fibrotic change (P2, n=2), chronic pulpitis with dystrophic calcification (P3, n=11), chronic pulpitis with pulp abscess (P4, n=7), acute pulpitis with necrotic change (P5, n=4).

26 periapical tissues were also divided by ordinary histopathological findings into 3 periapical pathoses group, i.e., granuloma (A1, n=17), cyst (A2, n=2) and abscess (A3, n=7).

The activities of proteinases (cathepsin G, MMP-3) and proteinase inhibitors (α 1-AT, TIMP-1 and, SLPI) were evaluated by RT-PCR and immunohistochemical methods. The results were as follows.

1. Generally, the intensity of immunohistochemical staining of proteinases and proteinase inhibitors increased in P2 and P5 groups compared to P1 group.
2. The immunohistochemical stain of proteinases and proteinase inhibitors was intensely detected in P2 group, showing low inflammatory reaction and low tissue degradation, but it was reduced in P3 and P4 groups, showing severe tissue degradation.
3. The distribution of proteinases and proteinase inhibitors in pulpal pathoses was consistently presented by immunohistochemical staining, while the expression of proteinase and/or proteinase inhibitors mRNAs in pulpal pathoses was occasionally detected by RT-PCR methods
4. RT-PCR of proteinase and proteinase inhibitors was usually positive in P2, showing rare tissue degradation, but it was almost negative in P3 and P4, showing severe tissue degradation.
5. We presume that the reason why the level of proteinase and proteinase inhibitors was so sparse in RT-PCR method is due to the abrupt decrease of mRNA synthesis or degradation of synthesized mRNA of proteinase and/or proteinase inhibitors depend on the inflammatory reaction and/or on the degradation of pulp tissues(P3, P4).
6. Pulpal pathoses groups showed significant lower RT-PCR detection of proteinases and proteinase inhibitors than the periapical pathoses group($p < 0.05$), and there is no significant difference among the periapical pathoses groups($p > 0.05$).

Key Words : Pulpal and Periapical Pathoses, Proteinase, Proteinase Inhibitor, RT-PCR, Immunohistochemical Staining.

I. 서 론

치아우식, 치주질환, 외상 등의 원인으로 치수에 세균이 침입해 염증이 발생되면, 다형핵 중성구(PMNs)와 단핵세포/대식세포의 침윤이 증가하고, 이들 세포의 탐식작용이나 세포외기질의 과립 분비가 세균으로부터 조직을 보호하는데 중요한 역할을 하게된다¹⁻³⁾. 활성화된 다형핵 중성구는 세포외 결체조직의 기질로 단백분해효소와 염증성 치수 분해와 관련된 복합 성분이 들어있는 라이소솜 과립(lysosomal granule)을 우선적으로 분비하게 되는데^{3,4)}, 탄성섬유분해효소(Polymorphonuclear neutrophil elastase, PMN-E)나 cathepsin-G(CG) 같은 단백분해효소가 과다하게 분비되면 세균이 쉽게 제거되지만, 이와 동시에 건강한 치수 결체조직의 주된 구성요소인 제 3형 교원섬유와 당단백질 등도 분해될 수 있어서 이미 염증이 일어난 치수조직에 위해 작용을 일으키게 되며, 결국 치주질환으로 이어지게 된다³⁻⁷⁾.

세포외기질의 분해에 필수적인 존재인 단백분해효소는 대상에 대한 작용에 따라 크게 세 가지로 분류하는데, 1) serine proteinase, 2) cystein proteinase, 3) matrix metalloproteinase이다. Serine proteinase에는 plasminogen activator(PA), 탄성섬유분해효소(elastase) 및 cathepsin-G가 포함되며, 치수 및 치근단 병소에서의 활성도에 대해 많은 연구가 있어 왔다. Morand 등⁸⁾은 화농성 치수염과 치근단 병소가 있는 과사성 치수로 진단된 실험군에서 교원섬유 분해효소(collagenase)와 탄성섬유 분해효소의 활성도가 증가했다고 하였으며, Rauschenberger 등⁹⁾은 치수질환에서 탄성섬유분해 효소와 cathepsin-G의 발현이 증가한다고 보고한 바 있다. Cathepsin-G는 포식작용 중에 중성구나 단핵세포가 분비하는 중요한 효소중의 하나로, 탄성소(elastin), 교원섬유, 당단백질 등과 같은 결체조직의 단백질을 신속하게 분해시키므로, 예를 들면 폐기종(pulmonary emphysema)의 발현 시 폐포의 파괴에 중요한 역할을 하는 것으로 추측되고 있으며¹⁰⁾, 결체조직분해에 탄성섬유분해 효소와 서로 상호작용(synergistic)으로 작용하고, 염증 시 모세혈관의 투과도를 증가시키는 것으로 보고되고 있다¹¹⁾.

Matrix metalloproteinases(MMP)는 다형핵 중성구, 단핵세포, 골세포, 섬유아세포 등에서 분비되며, 교원섬유와 당단백질과 같은 세포외 기질 구성성분의 분해에 관여하는 중요한 단백분해효소이다¹²⁾. 치수에서 cytokine과 MMP의 관계에 대한 여러 연구¹³⁻¹⁶⁾가 있어왔는데, 치수 및 치근단 조직의 염증반응에 MMP가 작용하리라는 가능성이 제시된 바 있으며¹⁵⁾, 신 등¹⁷⁾은 MMP가 만성치수염에서보다 급성치수염에서 치수파괴에 더 중요한 역할을 하며, 치수염에서의 증상과 관련이 있다고 보고하였고, 치주조직에서도 많은 연구가 이루어지고 있다¹⁸⁻²⁰⁾. MMP는 구조와 기

능에 따라 여러 가지 종류로 분류되며, 그 중 MMP-3는 stromelysin 1이라고도 부르며, 세포외 기질의 다양한 구성성분을 분해하는 능력이 있고¹²⁾, 조직분해과정에서 기질세포의 관련여부를 판단하는데 이용할 수 있으며²¹⁾, 방사선 사진에서 발견되지 않는 악관절 질환의 초기 골 변성여부를 알 수 있는 표지로 이용할 수 있다고 보고된 바 있다²²⁾.

신체에서는 단백분해효소에 의한 비특이적인 결체조직의 분해를 억제하거나 조절하기 위해서 혈장 단백질의 한 종류인 단백분해효소 억제제가 존재한다²³⁾. 단백분해효소 억제제는 단백분해효소와 서로 항상성을 유지하면서 조직내의 불필요한 축적물을 용해하고 또한 지나친 분해 및 용해작용을 억제함으로써 조직 세포들을 보호하는 역할을 한다.

간 세포나 단핵세포에서 생성되는 혈청의 주요 단백분해효소 억제제인 α_1 -anti-trypsin (α_1 -AT, 52 kDa)은 중성구에서 유래된 몇 가지 단백분해효소의 작용을 억제하며, 염증이 존재할 경우 그 농도가 증가하는 것으로 알려져 있다^{24,25)}.

McClanahan 등²³⁾은 정상과 염증성 치수에서 α_1 -AT과 α_2 -macroglobulin(α_2 -M)의 농도를 Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)를 이용해 측정하였는데, 염증성 치수에서 모두 농도가 증가하며, 중등도 이상의 염증성 치수에서 α_2 -M의 농도가 유의성 있게 증가하였고, 이들 단백분해효소 억제제가 염증성 치수질환의 진행과정에 관여한다고 보고하였다. Figueredo 등²⁶⁾은 치은 열구액에서의 단백분해효소에 대한 연구에서 치주질환에서 단백분해효소의 활성도가 증가하지만 과도한 양의 α_1 -AT을 첨가함으로써 단백분해효소 활성도의 90% 정도를 억제할 수 있다고 보고하였다.

MMP는 혈장 단백분해효소 억제제인 α_2 -M에 의해 억제되기도 하지만, 이의 주된 억제제는 tissue inhibitor of matrix metalloproteinase(TIMP)이다. 4 가지 형태의 TIMP가 존재하며, 그 중에서 TIMP-1, 2 두 가지 형태가 주로 연구되고 있다. TIMP-1은 30-kDa의 당단백질로 대부분의 결체 조직 세포와 대식세포(macrophage)에 의해 합성 및 분비되므로, 거의 모든 체액에서 발견된다¹⁸⁾.

Secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI)는 탐식작용 중 백혈구에서 분비되며, 정액이나, 코, 기관지, 및 자궁경부의 점막, 이하선타액, 혼합 타액 그리고, 관절의 연골에서 발견되었다. SLPI는 탄성섬유분해 효소나 cathepsin-G와 같은 단백분해효소로부터 조직을 보호하며, 염증성 질환에서 가장 중요한 조절인자일 것으로 추측되고 있다²⁷⁾.

조직에서 단백분해효소 및 단백분해효소 억제제를 연구하는 방법으로는 면역조직화학적 염색²⁷⁻²⁹⁾, ELISA^{9,11,23)}, Northern blotting^{13,28)}, Western blotting, gel zymography¹⁵⁾, in situ hybridization²⁷⁾, Polymerase Chain Reaction(PCR)³⁰⁾ 등이 있는데, PCR은 DNA의 양쪽가닥

을 주형으로 하여 동시에 primer extension을 일으킴으로써 primer annealing site 사이의 특정 염기서열을 증폭하는 방법으로 매우 신속하고 간단하게 아주 적은 수의 병원균의 동정이나 mRNA도 검출이 가능하며, 현재 세포가 만들고 있는 mRNA의 존재를 확인 할 수 있다는 장점이 있다.

치수질환의 진단은 정확한 치료계획을 수립하기 위해 필수적이지만, 치수는 경조직에 의해 둘러싸여 있으므로 치수에서 직접적인 정보를 쉽게 얻을 수 없고, 임상 증상에 기반을 둔 현재의 치수질환의 진단과 분류방법은 조직병리학적 검사결과와 일치하지 않는 경우가 많은데⁷⁾, 치수염증과정에서 단백분해효소와 단백질분해효소 억제제의 작용에 의하여 다양한 환자의 자각증상이 나타나는 것이 이러한 진단결과의 차이점이 발생하는 여러 가지 원인중의 하나로 추측되고 있다. 따라서 단백분해효소와 단백질분해효소 억제제의 측면에서 연구하는 것이 의미 있는 과정일 것이다. 본 연구에서는 치수 및 치근단 병소에서 단백분해효소 및 단백질분해효소 억제제의 활성도를 관찰하기 위하여 PCR법 및 면역조직화학적 염색법을 이용한 연구를 통해, 다소의 지견을 얻었기에 이를 보고하는 바이다.

II. 실험방법

1. 실험대상

강릉대학교 치과병원에 내원 한 환자의 치아에서 통상의 근관치료 중 발수하거나 교정치료를 위해 발거 한 치아에서 얻은 37개의 치수조직과 통상의 치근단 수술에서 얻은 26개의 치근단 병소를 이용하였다.

치수조직은 기존의 임상적 분류나 조직병리학적 분류에 따르지 않고, 먼저 증상과 임상검사결과에 따라 정상, 급성치수염, 만성치수염으로 나눈 다음, 조직병리소견에 따라 다시 5개의 실험 군으로 세분하였는데, 정상치수는 1군(P1)으로 분류하고, 만성치수질환이면서 치수의 섬유화(fibrosis) 변성이 보이는 치수조직은 2군(P2)으로, 만성치수질환이면서 퇴행성 석회화 치수변화를 보이는 치수조직

은 3군(P3)으로, 만성치수질환이면서 치수농양이 존재하는 치수조직은 4군(P4)으로, 급성치수질환이면서 치수괴사를 보이는 치수조직은 5군(P5)으로 분류하였으며, 급성치수질환이면서 치수농양이 존재하는 경우는 치수조직을 얻기가 불가능해 실험 군에서 제외하였다.

치근단 병소(육아조직, 육아종, 낭 등)는 통상적인 분류법에 따라서 치근단 육아종을 1군(A1)으로, 치근단 낭종을 2군(A2)으로, 치근단 농양을 3군(A3)으로 분류하였다 (Table 1).

2. 조직 채취

치수 조직은 러버댐을 장착하여 치아를 분리시키고, 통상의 근관외동을 형성한 다음, 치수를 얻기 쉽고 비교적 넓은 근관인 상악 대구치의 구개근관, 하악 대구치의 원심 근관, 또는 단근치의 근관에 barbed broach를 삽입하여 발수하였다. 교정치료를 위해 발거 한 치아에서의 치수는 상악치아는 협설면에, 하악치아는 근원심면에 #170 bur로 치아 장축방향의 구를 형성한 다음 #301 elevator로 치아를 파절시키고, 노출된 치수를 endodontic excavator로 채취하였다. 치근단 질환 군은 치근단 수술 및 발거한 치아의 치근단에서 소파술을 통해 채취하였다.

실험 군에서 채취한 치수 및 치근단 질환 조직은 슬라이드 글라스에 위치시키고 15번 메스를 이용해 장축방향으로 절단해 1/2로 나누고, 반으로 나뉜 조직은 조직시편제작에 사용하고, 나머지 반은 액화질소에서 급냉한 다음, 70℃의 deep freezer(GuDeRo, IShin Lab. Co., Seoul, Korea)에 보관 후 단백분해효소 억제제를 검출하기 위해 사용하였다.

3. 조직절편 제작

조직절편 제작을 위해 채취된 치수 및 치근단 조직은 10% buffered formalin 용액에 고정시켰으며, 고정된 조직을 통법에 의하여 paraffin에 포매한 다음, 6μm의 두께로 절편을 제작하고, hematoxylin과 eosin으로 염색 한 후 광학 현미경으로 관찰하였다.

Table 1. Experimental group of this study

Group	P1	P2	P3	P4	P5	A1	A2	A3
No. of sample	8	7	11	7	4	17	2	7
Age (mean)	22.9±17.0	31.0±13.8	42.8±18.6	35.9±14.4	43.8±11.1	39.9±15.7	49.0±12.7	37.9±20.5
Male/Female	5/3	4/3	8/3	6/1	2/2	11/6	0/2	3/4

P1: normal pulp, P2: chronic pulpitis with fibrotic change, P3 : chronic pulpitis with dystrophic calcification, P4: chronic pulpitis with pulpal abscess, P5 : acute pulpitis with necrotic change,

A1: granuloma, A2: cyst, A3: abscess.

Table 2. Primary antibody used in immunohistochemical staining

Proteinases/ proteinase inhibitors	Primary antibody	Manufacturer
CG	Purified Anti-human Neutrophil Cathepsin-G	PharMingen int. San Diego, CA, USA
MMP-3	Mouse monoclonal antibody	NeoMarkers, Union, CA, USA
α 1-AT	Rabbit anti-human alpha-1-antitrypsin	Zymed, Inc., San Francisco, CA, USA
TIMP-1	Mouse monoclonal antibody	NeoMarkers, Union, CA, USA

CG : Cathepsin G, MMP-3 : matrix metalloproteinase-3,

α 1-AT: alpha 1 antitrypsin, TIMP-1 : tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1.

Table 3. Immunohistochemical staining method used in this study

1. Deparaffinize	Xylene 10min. \times 4, 70%, 90%, 99% alcohol, distilled water
2. Blocking	3% H ₂ O ₂ 5min. \times 3, PBS 30min.
3. primary antibody	4°C overnight
4. secondary antibody	room temperature, 30min.
5. Streptavidine	room temperature, 30min.
6. DAB(diaminobenzidine)	3~5min.
7. Counterstaining	Harris hematoxylin

4. 면역조직화학적 염색

조직 내 어느 세포가 단백분해효소 및 단백분해효소 억제제를 생성, 분비하는지 알아보기 위하여 단백분해효소인 Cathepsin-G(CG), MMP-3와 단백분해효소 억제제인 α 1-AT, TIMP-1에 대한 면역조직화학적 염색을 수행하였다. SLPI는 항체를 구할 수 없어 실험에서 제외하였고, 실험에 사용한 일차항체는 Table 2와 같다. 이차항체로는 단일클론성항체로 anti-mouse와 anti-rabbit이 혼합된 이차항체 IgG를, 복합 클론성 항체로는 anti-rabbit IgG를 사용하여 streptavidin-peroxidase 방법을 사용하였다. (Dako, LSAB K0681, Copenhagen, Denmark) 실험방법은 Table 3과 같다. 다형핵중성구, 단핵세포와 같은 급성염증세포, 대식세포, 형질세포와 같은 만성염증세포, 섬유아세포, 혈관내피세포, 세포외기질로 구분하여 단백분해효소 및 단백분해효소 억제제에 대한 반응을 판독하였다.

5. RT-PCR

1) RNA 추출

실험에 사용하기 위해 -70°C 의 deep freezer에 보관하였던 조직에서 Promega사의 SV Total RNA isolation system (Promega, Madison, WI, USA)를 사용하여 원심분

리방법으로 순수한 total RNA를 추출하였다.

2) primer 제작

DNA/RNA synthesizer (394DNA/RNA synthesizer, Applied Biosystems, Foster, CA, USA)를 이용해 단백분해효소 및 단백분해효소 억제제의 PCR primer를 Table 4와같이 제작하였다. 이들 primer의 염기서열은 Gen Bank 검색에서 다른 유전자와의 유사성이 없었다. 그리고, 이들 primer의 AT와 CG분포에 의한 T_m 값은 대략 53~57°C의 분포를 보였다.

3) RT-PCR

각 군의 조직에서 추출한 total RNA는 RT-PCR kit (Access RT-PCR system, Promega, Madison, WI, USA)에 포함되어 있는 AMV reverse transcriptase에 의해 cDNA로 변환시킨 다음, 미리 제작한 primer와 RT-PCR kit를 사용해 PCR machine(GeneAmp PCR System 2400, Perkin Elmer, Norwalk, USA)에서 Fig. 1과 같이 touch-down 방법으로 시행하였다. 즉 annealing 온도를 65°C에서 11회 동안 2°C씩 낮추어서 최저온도를 45°C로 설정하였으며, 주 annealing 온도는 primer들의 T_m 값의 평균인 55°C로 설정하였다.

Table 4. Sequences of primers used in this study

Type of gene	Gene Bank	Fragment size	sequences of primers	
CG	M16117	471 bp	sense	ACC ATC CAG AAT GAC ATC ATG (318-338)
			antisense	AAG GCT CTG GCA ACA CTG TGG (829-809)
MMP-3	NM002422	463 bp	sense	GCA TAG AGA CAA CAT AGA GCT (6-26)
			antisense	CTC CTT CAT ACA GCC TGG AGA (509-489)
α 1-AT	K01396	472 bp	sense	ACT GTA AGA AGC TGT CCA GCT (783-803)
			antisense	GTT GAG GAG CGA GAG GCA GTT (1295-1275)
TIMP-1	S68252	560 bp	sense	CAT CCT GTT GTT GCT GTG GCT (33-53)
			antisense	CAG GAT TCA GGC TAT CTG GGA (633-623)
SLPI	X04503	436 bp	sense	TCG ATC AAC TGG CAC TTC TTG (66-86)
			antisense	TGT GGA AGG CTC TGG AAA GTC (542-522)

CG : Cathepsin G, MMP-3 : matrix metalloproteinase-3, α 1-AT: alpha 1 antitrypsin.

TIMP-1 : tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1, SLPI: Secretory leukocyte protease inhibitor

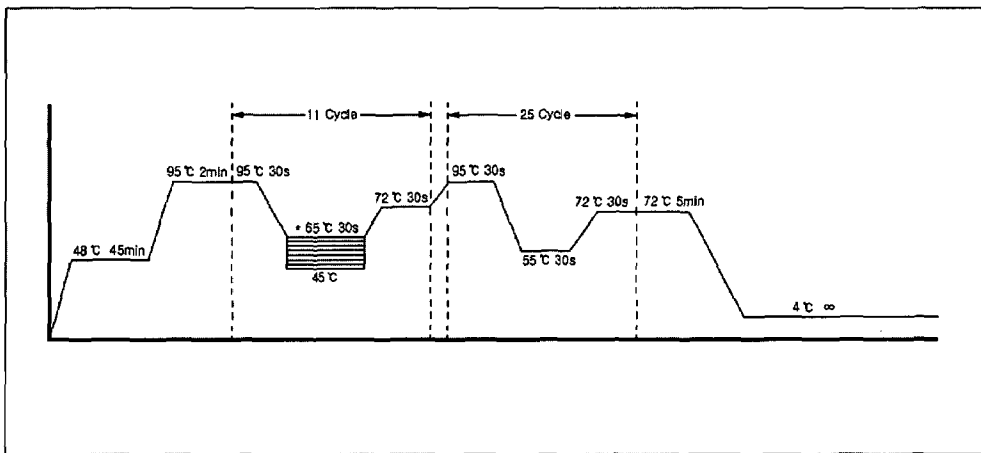


Fig. 1. PCR cycling method used in this study

* : Touch-down PCR (annealing temperature : 2°C down from 65°C to 45°C, 11cycle)

6. Analysis of PCR products

RT-PCR을 통해 얻어진 산물을 확인하기 위해 8% acrylamide gel에서 100V의 직류전원으로 80분간 전기영동 (Electrophoresis power supply EPS200, Hoefer HE 33, Pharmacia Biotech, USA)을 시행하고, ethidium bromide로 염색한 다음 UV transilluminator (Transilluminator TI3, Bio metra, Germany)를 이용하여 각각의 band 위치를 확인하였다. DNA size marker로는 100bp 간격의 DNA ladder (GeneRuler, MBI Fermentas, Lithuania)를 사용하였으며, Biometra사의 CCD camera (BioDoc CCD Camera #970345)가 장착된 BioDoc II와 digital printer(Videocopy processor P66DE, Biometra, Germany)로 출력하였다.

III. 실험결과

1. RT-PCR

1) 치수병소

RT-PCR을 이용해 정상치수 및 치수병소에서 단백분해효소 및 단백분해효소 억제제를 검출한 결과는 Table 5와 같다.

단백분해효소 및 단백분해효소 억제제중에서 TIMP-1이 가장 많이 검출되었으며(p<0.05), α 1-AT는 비교적 빈번하게 검출되었고, MMP-3와 SLPI는 검출되지 않았다. 치수 질환분류에서 정상치수인 1군(P1)에 비해 만성치수질환이 진행될수록 즉, 치수의 섬유화 변성(P2), 퇴행성 치수변화(P3), 치수농양(P4)으로 진행될수록 단백분해효소 및 단백분해효소 억제제의 검출 빈도가 감소하였다(p<0.05).

Table. 5 Result of RT-PCR in pulpal pathoses

Group	Number of positive reactions of RT-PCR (%)				
	CG	MMP-3	α 1-AT	TIMP-1	SLPI
P1 (n=8)	1 (12.5%)	0 (0%)	4 (50.0 %)	6 (75.0%)	0 (0%)
P2 (n=7)	1 (14.3%)	0 (0%)	1 (14.3%)	5 (71.4%)	0 (0%)
P3 (n=11)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (9.1%)	0 (0%)
P4 (n=7)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
P5 (n=4)	1 (25%)	0 (0%)	1 (25.0%)	2 (75.0%)	0 (0%)

P1: normal pulp, P2: chronic pulpitis with fibrotic change,

P3 : chronic pulpitis with dystrophic calcification, P4: chronic pulpitis with pulpal abscess.

P5 : acute pulpitis with necrotic change.

CG : Cathepsin G, MMP-3 : matrix metalloproteinase-3, α 1-AT: alpha 1 antitrypsin,

TIMP-1 : tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1, SLPI: Secretory leukocyte protease inhibitor

Table. 6 Result of RT-PCR in periapical pathoses

Group	Number of positive reactions of RT-PCR (%)				
	CG	MMP-3	α 1-AT	TIMP-1	SLPI
A1 (n=17)	4(23.5%)	3 (17.6%)	3 (17.6%)	2 (11.8%)	4 (23.5%)
A2 (n=2)	1 (50.0%)	0 (0%)	1 (50.0%)	0 (0%)	1 (50%)
A3 (n=7)	2 (28.0%)	3 (42.9%)	2 (28.6%)	3 (42.9%)	3 (42.9%)

A1: granuloma, A2: cyst, A3: abscess.

CG : Cathepsin G, MMP-3 : matrix metalloproteinase-3, α 1-AT: alpha 1 antitrypsin,

TIMP-1 : tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1, SLPI: Secretory leukocyte protease inhibitor

Table. 7. Result of immunohistochemical staining in pulpal pathoses

GROUP	CG					MMP-3					α 1-AT					TIMP-1				
	AC	CC	F	En	Ec	AC	CC	F	En	Ec	AC	CC	F	En	Ec	AC	CC	F	En	Ec
P1	-	-	+	+	+	-	-	++	++	++	-	-	++	++	++	-	-	+	+	+
P2	+	±	++	+	++	+	+	+	++	+	++	++	++	++	++	+	±	±	±	±
P3	±	±	±	+	±	±	+	+	++	++	++	++	++	+	++	±	±	±	+	±
P4	±	+	±	-	+	±	+	+	++	+	±	+	+	+	++	±	±	±	±	±
P5	+	-	±	±	+	+	-	+	+	++	++	-	++	++	++	±	±	+	+	+

P1: normal pulp, P2: chronic pulpitis with fibrotic change,

P3 : chronic pulpitis with dystrophic calcification, P4: chronic pulpitis with pulpal abscess,

P5 : acute pulpitis with necrotic change,

AC : acute inflammatory cells (PMNs, monocyte)

CC : chronic inflammatory cells (macrophage, plasma cell)

F : fibroblast

En : endothelial cells

Ec : extracellular matrix

- : none, ± : rare, + : slight, ++ : marked, +++ : strong

(Kruscal Wallis ANOVA on Ranks test)

2) 치근단 병소

RT-PCR을 이용해 치근단 병소에서 단백분해효소 및 단백분해효소 억제제를 검출한 결과는 Table 6과 같다.

치수병소의 경우에 비해 단백분해효소인 CG와 MMP-3, 단백분해효소 억제제인 $\alpha 1$ -AT와 SLPI의 검출빈도가 높았고($p < 0.05$), TIMP-1의 검출빈도는 치수병소의 경우에 비해 감소하였다($p < 0.05$). 치근단 질환 종류에 따른 단백분해효소 및 단백분해효소 억제제의 검출빈도의 유의할 만한 차이는 없었다($p > 0.05$). (Kruscal Wallis ANOVA on Ranks test)

2. 면역조직화학적 염색

1) 치수 병소

치수병소에서의 단백분해효소 및 단백분해효소 억제제에 대한 면역조직화학적 염색의 결과는 Table 7과 같다. 다형핵중성구, 단핵세포와 같은 급성염증세포, 대식세포, 형질세포와 같은 만성염증세포, 섬유아세포, 혈관내피세포, 세포외기질로 구분하여 면역조직화학적 반응을 판독하였고, 급성치수 질환인 5군(P5)은 검출된 조직의 크기가 작아 관찰하기가 어려웠으며, 면역조직화학적 염색 중 대부분 상실되었다.

(1) Cathepsin G(CG)

CG는 세포외 기질에서도 양성 반응을 나타냈지만, 주로 세포 내 기질과 핵에서 뚜렷하게 양성 반응을 나타내었다.

1 군(P1)에서는 주로 간질을 이루고 있는 섬유아세포와 세포외 기질에서 양성 반응을 보였으며, 혈관의 내피세포에서도 양성 반응을 보였고, 염증세포의 침윤은 나타나지 않았다.

2 군(P2)에서는 전반적으로 양성 반응이 미만성으로 관찰되었고, 특히 섬유아세포와 세포외기질 및 급성염증세포에서 양성 반응이 관찰되었다.

3 군(P3)에서는 조직의 변성이 진행되어 비교적 CG의 발현이 감소되었고, 혈관의 내피세포에서만 지속적인 양성 반응이 관찰되었다.

4 군(P4)에서는 조직변성이 심화되어 양성 반응이 매우 감소되었으며 침윤된 다수의 만성염증세포에서 양성 반응이 관찰되었다.

5 군(P5)에서는 급성염증세포와 세포외 기질에서 양성 반응이 관찰되었다.

(2) Matrix metalloproteinase-3(MMP-3)

MMP-3는 CG에 비해 전반적으로 강한 양성 반응을 나타내었고, 급성 및 만성 염증세포, 섬유아세포, 세포외기질에서 양성 반응이 관찰되었고, 특히 혈관내피세포에서 강한 양성 반응이 관찰되었다.

1 군(P1)에서는 간질을 이루고 있는 섬유아세포 및 세포

외기질에서 매우 강한 양성 반응이 관찰되었고, 치수내 혈관내피세포에서도 강한 양성 반응이 관찰되었다.

2 군(P2)에서는 전반적으로 양성 반응이 미만성으로 관찰되었으며, 침윤된 급성 및 만성 염증세포에서도 양성 반응이 관찰되었다.

3 군(P3)에서는 양성 반응이 지속적으로 관찰되었고, 특히, 간질을 이루고 있는 섬유아세포 및 세포외기질에서 양성 반응이 증가되었다.

4 군(P4)에서는 지속적인 양성 반응이 나타나서 섬유아세포와 세포외기질, 혈관의 내피세포, 만성염증세포에서 뚜렷한 양성 반응이 관찰되었다.

5 군(P5)에서는 급성염증세포, 섬유아세포 및 혈관의 내피세포에서 양성 반응이 관찰되었고, 세포외기질 강한 양성 반응이 관찰되었다.

(3) Alpha 1 antitrypsin($\alpha 1$ -AT)

다른 단백분해효소나 단백분해효소 억제제에 비해 강한 양성 반응을 나타내었으며, 특히 세포외 기질에 강한 양성 반응을 나타내는 경향을 보였다.

1 군(P1)에서는 강한 양성 반응이 치수 내에서 관찰되었으며, 주로 섬유아세포, 세포외기질 및 혈관내피세포에서 관찰되었다.

2 군(P2)에서는 전반적으로 증가된 양성 반응이 섬유아세포, 세포외기질 및 혈관내피세포에서 관찰되었고, 침윤된 급성 및 만성염증세포에서도 강한 양성 반응이 관찰되었다.

3 군(P3)에서는 전반적으로 미만성의 강한 양성 반응이 지속되었는데 조직의 변성으로 인하여 혈관의 분포가 저조하였으며, 혈관내피세포에서의 양성 반응이 감소되었다.

4 군(P4)에서는 심한 조직변성으로 인해 오히려, 양성 반응이 전반적으로 감소되었지만 세포외기질에서는 전반적인 양성 반응이 잔존하였다.

5 군(P5)에서는 급성염증세포에서 강한 양성 반응이 관찰되었고, 섬유아세포, 세포외기질 및 혈관내피세포에서도 강한 양성 반응이 관찰되었다.

(4) Tissue inhibitor of matrix metallo- proteinase-1(TIMP-1)

다른 단백분해효소나 단백분해효소 억제제에 비하여 전반적으로 양성 반응이 미약하게 관찰되었다.

1 군(P1)에서는 치수내 섬유아세포, 세포외기질 및 혈관내피 세포에서 뚜렷한 양성 반응이 관찰되었다.

2 군(P2)에서는 치수내 세포성분과 세포외기질에서 양성 반응이 감소되었지만 침윤된 급성 및 만성 염증세포에서의 양성 반응이 증가되었다.

3 군(P3)에서는 전반적으로 미약한 양성 반응이 관찰되었고, 특히, 혈관내피세포에서 뚜렷한 양성 반응이 관찰되었다.

4 군(P4)에서는 조직의 심한 변성으로 인하여 전반적으

Table 8. Results of immunohistochemical staining in periapical pathoses

GROUP	CG					MMP-3					α1-AT					TIMP-1				
	AC	CC	F	En	Ec	AC	CC	F	En	Ec	AC	CC	F	En	Ec	AC	CC	F	En	Ec
A1	+	+	±	±	+	±	+	±	+	++	+	++	++	+	+++	±	±	±	±	±
A2	+	±	±	±	±	+	±	+	+	±	+	+	++	+	+++	±	±	±	±	±
A3	++	+	-	±	+	±	+	+	±	++	+	++	+	++	+++	±	±	±	-	±

A1: granuloma, A2: cyst, A3: abscess.

AC : acute inflammatory cells (PMNs, monocyte)

CC : chronic inflammatory cells (macrophage, plasma cell)

F : fibroblast

En : endothelial cells

Ec : extracellular matrix

- : none, ± : rare, + : slight, ++ : marked, +++ : strong

로 양성반응이 매우 감소되었다.

5 군(P5)에서는 치수내 섬유아세포, 세포외기질 및 혈관 내피 세포에서 양성반응이 미약하게 관찰되었다.

2) 치근단 병소

치근단 병소에서의 단백분해효소 및 단백분해효소 억제제에 대한 면역조직화학적 염색의 결과는 Table 8과 같다. 다형핵중성구, 단핵세포와 같은 급성염증세포, 대식세포, 형질세포와 같은 만성염증세포, 섬유아세포, 혈관내피세포, 세포외기질로 구분하여 면역조직화학 반응을 판독하였다.

(1) Cathepsin G(CG)

전반적인 반응강도는 미약하였고, 세포외 기질에서도 양성반응을 나타냈지만, 주로 세포내 기질과 핵에서 뚜렷하게 양성반응을 나타내었다.

1 군(A1)에서는 대부분 조직의 변성이 심해 섬유아세포, 혈관내피세포에서는 양성반응이 감소되었고, 세포외기질이나 침윤된 급성 및 만성염증세포에서는 뚜렷한 양성반응이 관찰되었다.

2 군(A2)에서는 일반적으로 양성반응이 미약하지만 침윤된 만성염증세포에서는 뚜렷한 양성반응이 관찰되었다.

3 군(A3)에서는 조직의 변성이 매우 심해져 병소내 섬유아세포, 혈관내피세포에서는 양성반응이 거의 없거나 매우 감소되었지만, 세포외 기질이나 침윤된 급성 및 만성염증세포에서는 증가된 양성반응이 관찰되었다.

(2) Matrix metalloproteinase-3(MMP-3)

전반적인 반응강도는 미약하였으나 치근단 육아종인 1군(A1)과 치근단 농양인 3군(A3)에서 세포외 기질에서 중등도의 양성반응을 나타내었다.

1 군(A1)에서는 섬유아세포에서는 양성반응이 감소되었지만 혈관내피세포, 세포외기질 및 침윤된 만성염증세포에서는 뚜렷한 양성반응이 관찰되었다.

2 군(A2)에서는 병소내 섬유아세포와 혈관내피세포에서 뚜렷한 양성반응이 관찰되었고, 침윤된 급성염증세포에서도 양성반응이 관찰되었다.

3 군(A3)에서는 병소내의 산재되어있는 섬유아세포와 세포외 기질에서 매우 증가된 양성반응이 관찰되었으며, 침윤된 급성 및 만성염증세포에서도 뚜렷한 양성반응이 관찰되었다.

(3) Alpha 1 antitrypsin(α1-AT)

다른 단백분해효소나 단백분해효소 억제제에 비해 가장 강한 양성반응을 나타내었으며, 특히 간질을 구성하고 있는 섬유아세포나, 세포외 기질에 강한 양성반응을 나타내는 경향이 있었으며, 만성염증세포와 섬유아세포에서도 중등도의 양성반응이 관찰되었다.

1 군(A1)에서는 전반적으로 뚜렷한 양성반응이 관찰되었고, 섬유아세포, 세포외기질, 침윤된 만성염증세포에서 강한 양성반응이 관찰되었다.

2 군(A2)에서는 전반적으로 증가된 양성반응이 관찰되었고, 특히 산재된 섬유아세포와 세포외기질에서 강한 양성반응이 관찰되었다.

3 군(A3)에서는 일반적으로 증가된 양성반응이 관찰되었고, 주로 혈관내피세포, 세포외기질, 그리고 침윤된 만성염증세포에서 강한 양성반응이 관찰되었다.

(4) Tissue inhibitor of matrix metallo- proteinase-1(TIMP-1)

1 군(A1), 2 군(A2), 3 군(A3) 모두에서 양성반응이 매우 미약하였으며, 혈관내피세포에서도 발현이 매우 저조하였고, 침윤된 급성 및 만성염증세포에서도 양성반응이 매우 불량하였다.

IV. 총괄 및 고찰

치수질환은 치수가 단단한 상아질에 둘러싸여 있고, 혈액의 공급원이 다양하지 않아, 염증발생 시 쉽게 비가역적 변화가 생기며, 동통이 심하고, 혈행을 통한 약제에 의한 치유가 거의 불가능하다는 특징이 있다. 치수의 염증은 정적인 상태가 아니고, 한 방향으로만 진행되는 않기 때문에 치수에서의 급성염증이 만성으로 진행되기도 하고, 반대로 만성염증이 급성염증으로 진행되기도 한다. 따라서 하나의 치수조직에서 급성 및 만성염증이 동시에 나타날 수도 있다³¹⁾. 본 연구에서도 치수병소의 임상진단이 조직병리학적 진단과 일치하지 않은 경우가 있었는데, 환자의 증상 및 임상 검사결과 급성 및 만성 치수염으로 진단된 증례에서 염증세포의 침윤이 나타나지 않고 치수조직의 변성만 나타나는 경우가 많았으며, 정상치수라고 진단된 증례에서 조직의 변성이 나타나는 경우도 있었다. 환자의 임상증상이나, 의사의 경험적 판단에 의해 내리는 치수질환의 진단도 매우 어려운데, 환자와 의사의 주관이 많이 포함되어 객관적인 비교가 어렵고, 과학적 근거가 부족한 단점이 있다. 환자의 주관적 증상인 동통은 중요한 임상진단의 기준 중 하나로 환자에 따라 그 차이가 심한데, Mitchell과 Tarplee 등³²⁾은 동통의 정도와 지속시간이 치수의 상태와 어느 정도 관련이 있지만 주관적인 증상이므로 잘못 해석할 수 있다고 하였다. 본 연구에서는 치수병소를 기존의 임상적 분류나 조직병리학적 분류에 따르지 않고, 먼저 증상과 임상검사결과에 따라 정상, 급성치수염, 만성치수염으로 나눈 다음, 조직병리소견인 섬유화변성, 퇴행성 변성, 농양 형성 등에 따라 세분하였다.

다형핵 중성구는 염증성 질환에서 중요한 역할을 하는데, 이들 세포는 단백질 분해효소를 포함하는 많은 양의 조직 파괴 효소를 세포내의 과립에 저장하고 있다가 cytokine, arachidonic acid 대사물과 세균성 산물 등과 같은 염증 매개물질에 의한 자극에 의해 세포외로 분비하게 된다²⁴⁾. 단백분해효소는 zymogen의 활성화, 전구물질로부터 호르몬의 유리, 생리적으로 활성화된 펩티드의 유리, 세포막을 통한 translocation, 또는 수용기(receptor)의 활성화 같은 특별한 생물학적인 기능을 한다. 그러나, 이런 생리학적인 필요에도 불구하고, 대부분의 단백분해효소는 주위환경에는 위해한 존재로 작용하며, 염증이 발생한 곳의 결체조직의 분해는 주로 단백분해효소의 분해작용에 의한 것으로 여겨지고 있다³³⁾. 염증 질환에서의 조직파괴는 단백분해효소의 내인성 억제제의 농도가 감소하거나, 불활성화되어서 단백분해효소 억제제의 활성화도에 대한 단백분해효소 활성화도의 비율이 과도하게 높을 때 발생할 수 있다^{24,33,34)}.

역전사 증합효소 연쇄반응법으로 단백분해효소 및 단백분해효소 억제제의 활성화도를 평가한 결과 치수병소에서는 치근단 병소에 비해 단백분해효소 및 단백분해효소의 검출빈

도가 낮았고 ($p < 0.05$), TIMP-1, $\alpha 1$ -AT 그리고 CG의 순서로 검출빈도가 높았으며, MMP-3 및 SLPI는 검출되지 않았다. TIMP-1, $\alpha 1$ -AT 및 CG는 정상치수(P1), 만성치수질환이면서 섬유화변성이 존재하는 치수병소(P2) 및 급성치수질환(P5)에서는 검출되었지만, 치수조직의 염증과 변성이 심화된 치수병소 군(P3, P4)에서는 검출되지 않았다. 이는 염증의 초기에 여러 가지 경로를 거쳐 단백분해효소의 활성화도가 증가하고, 이를 억제하기 위한 단백분해효소 억제제의 활성화도도 증가하지만, 염증이 진행되면 치수조직의 세포의 파괴가 심화되어 더 이상 단백분해효소 및 단백분해효소 억제제가 생성되지 않기 때문일 것으로 추측된다.

면역조직화학염색의 현미경 관찰은 양성반응을 보이는 세포를 확인하고 양성세포 수를 image analyzer를 통하여 측정하고자 하였으나 치수조직의 변성과 조직괴사가 심한 경우에는 image analyzer를 통하여 양성세포 수를 통계 처리하는 것이 거의 불가능하므로 본 연구에서는 통법에 의한 양성반응정도 판정의 방법으로 발현빈도에 따라 -, ±, +, ++, +++의 등급을 사용하였다.

치수병소에서 면역조직화학적 염색의 결과, 정상치수에 비해 치수병소에서 단백분해효소 및 단백분해효소 억제제의 양성반응이 일반적으로 증가하였는데, 단백분해효소 중 MMP-3는 CG에 비해 전반적으로 강한 양성반응을 나타내었고, 급성 및 만성 염증세포, 섬유아세포, 세포외기질에서 양성반응이 관찰되었으며, 특히 혈관내피세포에서 강한 양성반응이 관찰되었다. $\alpha 1$ -AT는 다른 단백분해효소나 단백분해효소 억제제에 비해 가장 강한 양성반응을 나타내었으며, 특히 세포외 기질에 강한 양성반응을 나타내는 경향을 보였다. $\alpha 1$ -AT는 acute phase protein으로 급성의 염증성 자극이 있을 때 혈장에서의 농도가 증가되며, 다형핵 중성구에서 유리되는 탄성섬유분해효소의 주 억제제인 것으로 알려져 있으며^{35,36)}, 교원섬유분해효소의 억제제이기도 하다³⁷⁾. 또 다른 단백분해효소 억제제인 alpha-2 macroglobulin ($\alpha 2$ -M)은 725kDa의 당단백질로서 크기가 크기 때문에 혈관 내에만 존재하며, $\alpha 1$ -AT보다 작용범위가 넓다³⁸⁾. Cootauco 등²⁹⁾은 ultracryoimmunocytochemical 방법을 사용해 정상치수와 비가역적 치수염으로 진단된 치수에서 단백분해효소인 PMN elastase(PMN-E)와 PMN cathepsin-G (PMN-CG), 단백분해효소 억제제인 $\alpha 2$ macroglobulin($\alpha 2$ -M)의 분포를 연구한 결과 PMN-E와 PMN CG는 비가역적 치수염으로 진단된 치수의 세포외 기질에 분비되어, 치수 결체조직의 분해를 촉진하고, PMN-E와 PMN CG이 증가하거나, 조직파괴가 심해짐에 따라, 이들의 작용을 억제하기 위해 $\alpha 2$ -M의 분비가 증가한다고 보고하였다.

McClanahan 등²³⁾은 치수의 염증이 중등도 이상이거나 심한 군에서는 $\alpha 2$ -M의 농도는 증가하지만, $\alpha 1$ -AT의 농도는 증가하지 않아 정상치수나 염증이 미약한 군에서의 결과

와 비슷하다고 보고하였으나 그 이유에 대해서는 설명하지 못했다. 본 실험에서 조직의 변성이 심한 군(P3, P4)에서 RT-PCR법으로 $\alpha 1$ -AT가 검출되지 않았던 결과와 종합해 볼 때, 면역조직화학적 염색결과 P3, P4군에서 양성반응이 관찰되는 것은 mRNA수준에서는 더 이상의 합성이 이루어지지 않지만, 이미 생성되었거나, 분비된 것이 면역조직화학적 양성반응을 나타내는 것으로 사료되며, $\alpha 1$ -AT는 주로 염증의 초기에 작용하는 것으로 추측된다.

MMPs는 정상적, 병적 조직 재형성에 중요한 효소로, 중성 pH에서 작용하며, 세포외 기질에 있는 모든 거대분자를 소화시킬 수 있는 능력이 있다. 생리학적으로 MMPs의 단백질분해활성도(proteolytic activity)는 endogenous TIMPs(tissue inhibitors of metalloproteinases)에 의해 조절되며, 이 균형이 붕괴되면, 관절염, 동맥경화증, 암의 증식과 전이 등의 질환이 발생하게 된다^{12,19}. MMPs는 악성 암종 세포에서 흔히 발견되며, 종양의 발생과 전이에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다¹². MMPs는 구조와 기능에 따라 간질성 교원섬유를 분해하는 교원섬유 분해효소(collagenase, MMP-1, 8, 13), 주로 제 4형 교원섬유와 변성된 교원섬유(젤라틴)을 분해하는 젤라틴 분해효소(gelatinase, MMP-2, 9), proteoglycan의 core protein, 교원섬유의 laminin과 non helical region등의 여러 가지 기질 구성성분을 분해하는 등 작용범위가 넓은 Stromelysin (MMP-3, 10, 11) 그리고, membrane type mmps (MT-MMP, MMP14, 15, 16)등의 크게 4가지 종류로 나눌 수 있다³⁶. Asai등⁴⁰은 성견의 치근단 육아종에서 교원섬유분해효소의 존재를 확인한 바 있으며, Lin등⁴¹은 치근단 낭종에서의 면역조직화학적 연구에서 MMP-1과 TIMP-1의 불균형이 치근단 낭종의 팽창을 야기할 수 있다고 하였고, Teronen등⁴²은 악골의 낭종에서의 교원섬유분해효소의 활성도를 측정 한 결과 MMP-1과 미량의 MMP-8이 존재한다고 보고하였다. 치주염에서의 최근의 연구에 의하면 치주질환의 병인론에 있어서 핵심과정은 미생물이 신체에서 MMP의 생산 그리고/또는 활성화를 유도할 수 있는 능력이 있는 가이며, 약물학적으로 MMP의 활성도를 억제시키는 것이 치주치료에서 만족할 만한 결과를 얻는데 중요한 역할을 할 것으로 생각되어지고 있다¹⁹. 본 연구에서는 여러 가지 MMPs중 작용범위가 넓어 여러 가지 기질 구성성분을 분해하는 능력이 있는 MMP-3 (stromelysin-1)를 선택하였는데, 치근단 조직에서는 면역조직화학적 염색에서 양성반응이 관찰되고, RT-PCR법에서도 검출되었지만, 치수병소에서의 면역조직화학적 염색에서는 양성반응이 관찰되었으나, RT-PCR법으로는 검출되지 않았다. 치수병소에서 MMP-3가 RT-PCR법으로 검출되지 않는 명확한 이유를 설명할 수는 없지만, 아마도 두 조직의 차이에 의한 것으로 추측되며, 앞으로 이에 관한 추가적인 연구가 있어야 할 것으로 사료된다.

복잡한 DNA 주형으로부터 성공적인 PCR 산물을 얻기 위해서는 여러 가지 변수가 최적화 되어야 한다. 본 연구에서는 완충제와 반응 조건 등의 여러 가지 변수를 최적의 상태로 하고, annealing온도 변수를 다양화함으로써 PCR을 최적화 시키는 방법인 Touch-down(TD) PCR법^{38,39}을 사용하였다. 이러한 touch-down 방법은 T_m 온도와 다르게 template DNA의 구조에 따른 annealing 온도변화에 의한 primer hybridization의 오류를 피할 수 있으며, 매우 작은 양의 DNA로부터 PCR을 성공적으로 얻을 수 있는 방법이다. 그러나, 본 연구결과 치수의 염증 정도나 조직변성 정도가 낮은 군에서는 RT-PCR방법으로 단백질분해효소 및 단백질분해효소 억제제를 검출할 수 있어 치수병소의 진행을 파악할 수 있었으나, 조직변성이 심한 군에서는 예상과는 달리 단백질분해효소 및 단백질분해효소 억제제를 검출할 수 없었다. 이것은 아마도 조직변성이 심해지면 치수 조직세포에서 더 이상 단백질분해효소 및 단백질분해효소 억제제를 합성하지 않기 때문일 것으로 추측되며, 따라서 치수병소의 진행을 파악하는데는 역전사 중합효소 연쇄반응법보다는 면역조직화학적 염색방법이 유리할 것으로 사료된다.

V. 결 론

치수 및 치근단 염증과정에서 단백질분해효소와 단백질분해효소 억제제의 작용에 관해 알아보고자, 37개의 치수조직과 26개의 치근단 조직을 임상증상과 조직병리학적 소견에 따라 5개 치수질환 군과 3개의 치근단 질환 군으로 분류하고, 단백질분해효소인 cathepsin G(CG)와 MMP-3 및 단백질분해효소 억제제인 $\alpha 1$ -AT, TIMP-1 및 SLPI의 활성도를 역전사 중합효소 연쇄반응법과 면역조직화학적 염색법으로 연구한 결과 다음의 결론을 얻었다.

1. 정상치수조직 군(P1)에 비해 조직의 염증이 증가되어 있는 만성치수질환이면서 섬유화변성이 보이는 치수조직(P2)과 초기의 급성치수질환군(P5)에서 전반적으로 단백질분해효소 및 단백질분해효소 억제제의 면역조직화학적 양성반응이 증가되었다.
2. 치수병소에서 조직의 변성이 심화되어 괴사양상을 보이는 부위에서는 단백질분해효소 및 단백질분해효소 억제제의 면역조직화학적 양성반응이 감소하였다.
3. 면역조직화학적 염색법을 통하여 치수질환에서 축적된 단백질분해효소 및 단백질분해효소 억제제의 분포를 알 수 있었고, 역전사 중합효소 연쇄반응법으로는 치수질환에서 단백질분해효소 및 단백질분해효소 억제제를 생산하는 세포의 상태를 간접적으로 파악할 수 있었다.
4. 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR)에서 염증 정도나 조직변성 정도가 낮은 군(P2)에서는 단백질분해효소 및 단백질분해효소 억제제의 발현을 확인할 수 있었으나, 조직변성이 심한 군(P3, P4)에서는 거의 확인할 수 없었다.

5. 조직변성이 심한 군(P3, P4)에서 단백분해효소 및 단백질분해효소 억제제가 검출되지 않은 것은 이들 세포의 단백질분해효소 및 단백질분해효소 억제제의 mRNA 생산량이 감소되거나, 생산된 mRNA가 분해되어 소멸된 것으로 추측된다.
6. 역전사 중합효소 연쇄반응에서 치근단 병소의 단백질분해효소 및 단백질분해효소 억제제의 검출빈도는 치수병소에 서의 경우에 비해 높았고 ($p < 0.05$), 치근단 병소 각 군 간의 유의할 만한 차이는 보이지 않았다($p > 0.05$).

참 고 문 헌

1. Walton RE, Torabinejad M. : Principles and practice of endodontics. Philadelphia. WB Saunders. 354. 1989.
2. Torneck CD: Changes in the fine structure of the human dental pulp subsequent to caries exposure. J. Oral Pathol. 6:82-95, 1977.
3. Van Dyke, TE & Hoop GA: neutrophil function and oral disease. Critical Review in Oral Biology and Medicine 1:117-33, 1990.
4. Boxer LA. and Smolen JE: Neutrophil granule constituents and their release in health and disease. Hematology /Oncology Clinics of North America 2:101-134, 1988.
5. Goldstein IM: Polymorphonuclear leukocyte lysosomes and immune tissue injury. Prog Allergy 20:301-40, 1976.
6. Van Amerongen JP., Lemmens IG. and Tonino GJM: The concentration, ex- tratability and characterization of collagen in human dental pulp. Archs Oral Biol. 28:339-345, 1983.
7. Tadashi Nakanishi, et. al.: Quantitative analysis of immunoglobulins and inflammatory factors in human pulpal blood from exposed pulps, J Endod. 21:131-136, 1995.
8. Morand MA., et. al.: Collagenolytic and elastolytic activities from diseased human dental pulps, J Endodon. 7:156-160, 1981.
9. Rauschenberger CR., et. al.: Comparison of human polymorphonuclear neutrophil elastase, polymorphonuclear neutrophil cathepsin-G, and $\alpha 2$ -macroglobulin levels in healthy and inflamed dental pulp, J Endodon. 20:546-550, 1994.
10. James Travis: Structure, function, and control of neutrophil proteinases. The American Journal of Medicine 84(suppl6A):37-42, 1988.
11. Rauschenberger CR., et. al.: Human polymorphonuclear granule components : relative levels detected by a modified enzyme-linked immunosorbent assay in normal and inflamed dental pulp, J Endodon. 17:531-536, 1991.
12. Willam CP, and Robert PM: Matrix Metalloproteinases. San Diego. Academic Press. 1998.
13. Masato T. et. al.: Interleukin-1 α stimulates interstitial collagenase gene expression in human dental pulp fibroblast, J Endodon. 22:240-43, 1996.
14. Fotinos S. Panagakos et. al.: Regulation of pulp cell matrix metalloproteinases production by cytokines and lipopolysaccharides. J Endodon. 22:358-61, 1996.
15. F. James O Boskey, Jr. and Fotinos S. Panagakos: Cytokines stimulate matrix metalloproteinases production by human pulp cells during long-term culture, J Endodon. 24:7-10, 1998.
16. HJ Ko, SS Lim : Tissue levels of interleukin-1 α , Interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α in pulpal and periapical pathosis. J of Korean Academy of Conservative Dentistry 23:316-27, 1998.
17. SJ Shin, SS Lim : Tissue levels of matrix metalloproteinase in pulps and periapical lesions. unpublished.
18. John J. Reynolds and Murray C. Meikle: Mechanism of connective tissue matrix destruction in perio- dontitis. Periodontology 2000, 14:144- 57, 1997.
19. Pourtaghi N., et. al.: The effect of subgingival antimicrobial therapy on the levels of stromelysin and tissue inhibitor of metalloproteinases in gingival crevicular fluid, J Periodontol. 67:866-70, 1996.
20. Haerian A., et. al.: Effects of treatment on gingival crevicular collagenase, stromelysin and tissue inhibitor of metalloproteinases and their ability to predict response to treatment, J Clin Periodontol 23:83-91, 1996.
21. Birkedal-Hansen H., et. al.: Matrix metalloproteinases: A Review. Crit Rev Oral Biol Med 4:197-250, 1993.
22. Kubota E, et. al.: Interleukin 1 beta and stromelysin (MMP3) activity of synovial fluid as possible markers of osteoarthritis in the temporomandibular joint. J Oral Maxillofac Surg 55:20-7, discussion 27-8, 1997.
23. McClanahan SB. et. al.: Natural modifiers of the inflammatory process in the human dental pulp, J Endodon. 17:589-593, 1991.
24. Lee HM, et. al.: $\alpha 1$ -Proteinase- inhibitor in gingival crevicular fluid of humans with adult periodontitis: serpinolytic inhibition by doxycycline, J Periodont Res 32:9-19, 1997.
25. Bristow CL et. al.: Specific activity of alpha 1 proteinase inhibitor and alpha 2 macroglobulin in human serum : application to insulin- dependant diabetes mellitus, Clin Immunol Immunopathol 89:247-59, 1998.
26. Figueredo CM., Gustafsson A.: Protease activity in gingival crevicular fluid : presence of free protease. J. Clin. Periodontol. 25 : 306-310, 1998.
27. Ohlsson S. et. al.: Distribution of the secretory leukocyte proteinase inhibitor in human articular cartilage, Biol Chem 378: 1055-1058, 1997.
28. Tervahartiala T, Konttinen YT et. al.: Cathepsin G in gingival tissue and crevicular fluid in adult periodontitis, J Clin Periodontol 23:68-75, 1996.
29. C.J. Cootauco et. al.: Immunocyto- chemical distribution of human PMN Elastase and Cathepsin-G in dental pulp JDR 72(11) : 1485-90, 1993.
30. Shiki Hosoya, et. al.: Stimulatory effect of interleukin-6 on plasminogen activator activity from human dental pulp cells, J Endodon 24:331-34, 1998.
31. S Selzer and IB Bender: The dental pulp 3rd ed. Lippincott company.
32. Reizo Inoki et. al.: Dynamic aspects of dental pulp-molecular biology, pharmacology and pathophysiology. Chapman and Hall, 1990.
33. Wolfram Bode et. al.: Endoproteinase-protein inhibitor interactions. APMIS 107:3-10, 1999.
34. Wolfram Bode and Robert Huber: New protein proteinase inhibitor and their interaction with proteinase. Eur. J. Biochem. 204:433-451, 1992.
35. Ohlsson K.: Neutral leukocyte protease and elastase inhibited by plasma alpha-1-antitrypsin. Scand J Clin Lab Invest 28:251-3, 1971.
36. Ohlsson K., Olsson I.: Neutral protease of human granulocyte. III Interaction between human granulocyte elastase and plasma protease inhibitors. Scand J Clin Lab Invest 34:349-55, 1974.
37. Ohlsson K., Olsson I.: Neutral protease of human granulocyte.

- cyte. IV. interaction between human granulo- cyte collage- nase and plasma protease inhibitors. J Lab Clin Med 89:269-77, 1977.
38. Travis J., Salvesen GS: Human plasma proteinase inhibitors. Annu Rev Biochem 52:655-709, 1983.
 39. Kugler A.: Matrix metalloproteinases and their inhibitors. Anticancer research. 19: 1589-1592, 1999.
 40. Asai K. et. al. : Characteristics of collagenase in experi- mental periapical granulomas from the teeth of dogs. Arch oral Biol 34:923-8, 1989.
 41. Lin SK et. al. : Immunolocalization of interstitial collage- nase (MMP-1) and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) in radicular cysts. J Oral Pathol Med 26:458-63, 1997.
 42. Teronen O. et. al. : Characterization of interstitial collage- nase in jaw cyst wall, Eur J Oral Sci 103:141-7, 1995.
 43. R. H. Don, et. al.: "Touch down" PCR to circumvent spu- rious priming during gene amplication, Nucleic Acid Res 19:4008, 1991.
 44. Karl H. Hecker and Kenneth H. Roux: High and low annealing temperatures increase both specificity and yield in touchdown and stepdown PCR, BioTechniques 20:478-85, 1996.

사진부도 설명

Fig. 2. Gel Running of RT-PCR Products for CG

M: size marker 100bp ladder, lane 1: A1-10, lane 2: A1-13, lane 3: A3-2, lane 4: A1-16, lane 5: A1-12, lane 6: P2-7

Fig. 3. Gel Running of RT-PCR Products for MMP-3

M: size marker 100bp ladder, lane 1: A3-3, lane 2: A1-13, lane 3: A3-2, lane 4: A1-12, lane 5: A1-5, lane 6: A3-4

Fig. 4. Gel Running of RT-PCR Products for A1AT

M: size marker 100bp ladder, lane 1: P5-3, lane 2: A2-1, lane 3: P1-6, lane 4: P1-7, lane 5: P1-5, lane 6: P2-7, lane 7: P1-4, lane 8: A3-1, lane 9: A3-2

Fig. 5. Gel Running of RT-PCR Products for TIMP

M: size marker 100bp ladder, lane 1: A3-3, lane 2: A3-2, lane 3: A1-12, lane 4: A3-4, lane 5: P1-6, lane 6: P1-7, lane 7: P1-3, lane 8: P1-4, lane 9: P1-5

Fig. 6. Gel Running of RT-PCR Products for SLPI

M: size marker 100bp ladder, lane 1: A3-3, lane 2: A2-1, lane 3: A1-13, lane 4: A3-1, lane 5: A3-2, lane 6: A1-12

Plate 1. Immunohistochemical staining of P1 group

- a. H-E staining ($\times 200$)
- b. Immunohistochemical reactivity to CG ($\times 200$)
- c. Immunohistochemical reactivity to CG ($\times 400$)
- d. Immunohistochemical reactivity to MMP-3 ($\times 100$)
- e. Immunohistochemical reactivity to MMP-3 ($\times 400$)
- f. Immunohistochemical reactivity to $\alpha 1$ -AT ($\times 200$)
- g. Immunohistochemical reactivity to $\alpha 1$ -AT ($\times 400$)
- h. Immunohistochemical reactivity to TIMP-1 ($\times 400$)

Plate 2. Immunohistochemical staining of P2 group

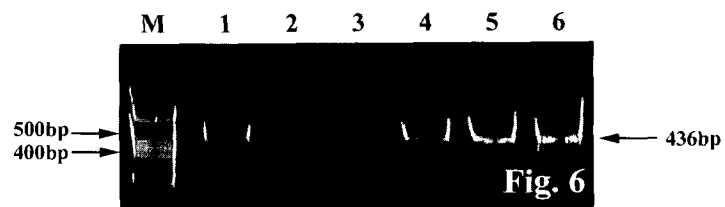
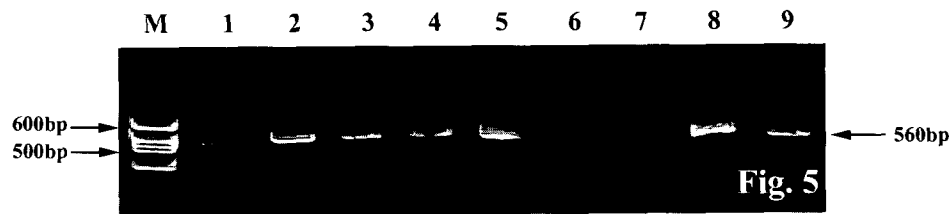
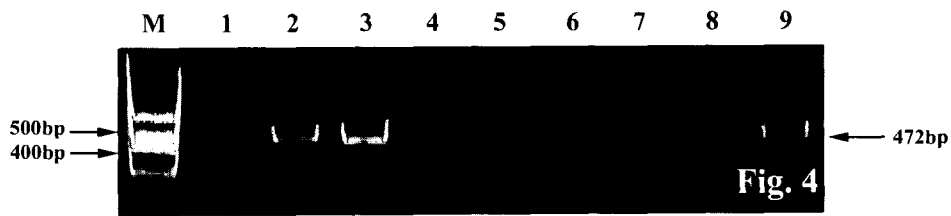
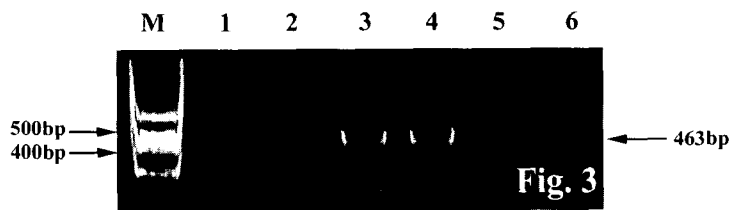
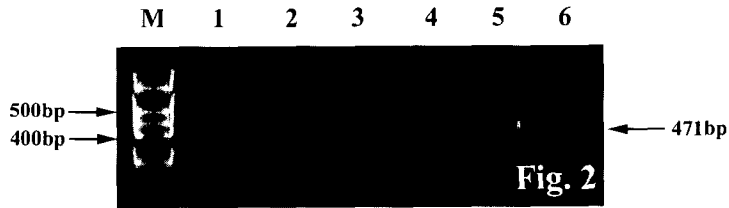
- a. H-E staining ($\times 200$)
- b. Immunohistochemical reactivity to CG ($\times 200$)
- c. Immunohistochemical reactivity to CG ($\times 400$)
- d. Immunohistochemical reactivity to MMP-3 ($\times 200$)
- e. Immunohistochemical reactivity to MMP-3 ($\times 400$)
- f. Immunohistochemical reactivity to $\alpha 1$ -AT ($\times 200$)
- g. Immunohistochemical reactivity to $\alpha 1$ -AT ($\times 400$)
- h. Immunohistochemical reactivity to TIMP-1 ($\times 400$)

Plate 3. Immunohistochemical staining of P3 group

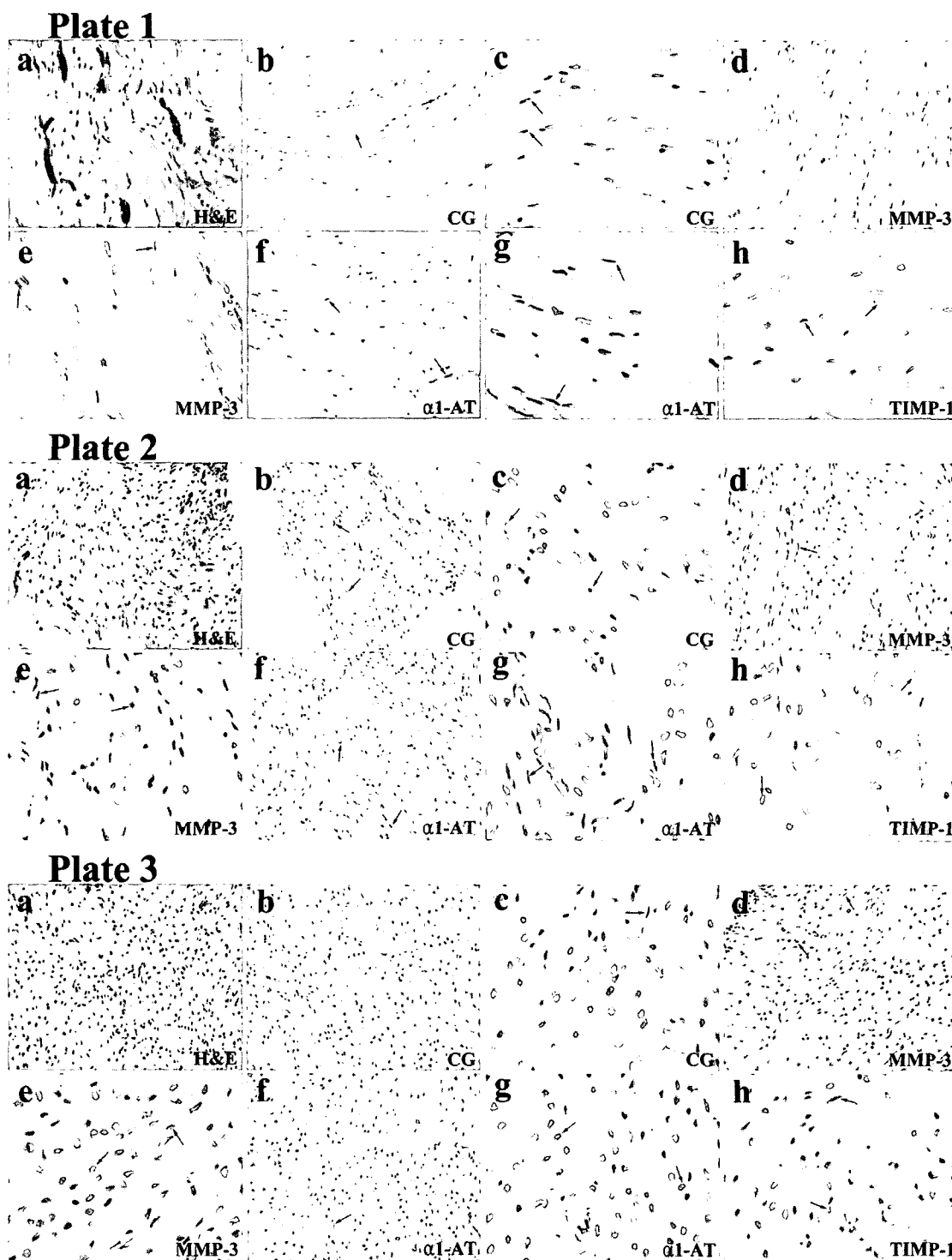
- a. H-E staining ($\times 200$)
- b. Immunohistochemical reactivity to CG ($\times 200$)
- c. Immunohistochemical reactivity to CG ($\times 400$)
- d. Immunohistochemical reactivity to MMP-3 ($\times 200$)
- e. Immunohistochemical reactivity to MMP-3 ($\times 400$)
- f. Immunohistochemical reactivity to $\alpha 1$ -AT ($\times 200$)
- g. Immunohistochemical reactivity to $\alpha 1$ -AT ($\times 400$)
- h. Immunohistochemical reactivity to TIMP-1 ($\times 400$)

- Plate 4. Immunohistochemical staining of P4 group
- a. H-E staining ($\times 200$)
 - b. Immunohistochemical reactivity to CG ($\times 200$)
 - c. Immunohistochemical reactivity to CG ($\times 400$)
 - d. Immunohistochemical reactivity to MMP-3 ($\times 200$)
 - e. Immunohistochemical reactivity to MMP-3 ($\times 400$)
 - f. Immunohistochemical reactivity to $\alpha 1$ -AT ($\times 200$)
 - g. Immunohistochemical reactivity to $\alpha 1$ -AT ($\times 400$)
 - h. Immunohistochemical reactivity to TIMP-1 ($\times 400$)
- Plate 5. Immunohistochemical staining of P1 group
- a. H-E staining ($\times 200$)
 - b. Immunohistochemical reactivity to CG ($\times 400$)
 - c. Immunohistochemical reactivity to MMP-3 ($\times 200$)
 - d. Immunohistochemical reactivity to MMP-3 ($\times 400$)
 - e. Immunohistochemical reactivity to $\alpha 1$ -AT ($\times 200$)
 - f. Immunohistochemical reactivity to $\alpha 1$ -AT ($\times 400$)
 - g. Immunohistochemical reactivity to TIMP-1 ($\times 200$)
 - h. Immunohistochemical reactivity to TIMP-1 ($\times 400$)
- Plate 6. Immunohistochemical staining of A1 group
- a. H-E staining ($\times 200$)
 - b. Immunohistochemical reactivity to CG ($\times 400$)
 - c. Immunohistochemical reactivity to MMP-3 ($\times 200$)
 - d. Immunohistochemical reactivity to MMP-3 ($\times 400$)
 - e. Immunohistochemical reactivity to $\alpha 1$ -AT ($\times 200$)
 - f. Immunohistochemical reactivity to $\alpha 1$ -AT ($\times 400$)
 - g. Immunohistochemical reactivity to TIMP-1 ($\times 200$)
 - h. Immunohistochemical reactivity to TIMP-1 ($\times 400$)
- Plate 7. Immunohistochemical staining of A2 group
- a. H-E staining ($\times 200$)
 - b. Immunohistochemical reactivity to CG ($\times 200$)
 - c. Immunohistochemical reactivity to CG ($\times 400$)
 - d. Immunohistochemical reactivity to MMP-3 ($\times 200$)
 - e. Immunohistochemical reactivity to MMP-3 ($\times 400$)
 - f. Immunohistochemical reactivity to $\alpha 1$ -AT ($\times 200$)
 - g. Immunohistochemical reactivity to $\alpha 1$ -AT ($\times 400$)
 - h. Immunohistochemical reactivity to TIMP-1 ($\times 200$)
- Plate 8. Immunohistochemical staining of A3 group
- a. H-E staining ($\times 200$)
 - b. Immunohistochemical reactivity to CG ($\times 200$)
 - c. Immunohistochemical reactivity to CG ($\times 400$)
 - d. Immunohistochemical reactivity to MMP-3 ($\times 200$)
 - e. Immunohistochemical reactivity to MMP-3 ($\times 400$)
 - f. Immunohistochemical reactivity to $\alpha 1$ -AT ($\times 200$)
 - g. Immunohistochemical reactivity to $\alpha 1$ -AT ($\times 400$)
 - h. Immunohistochemical reactivity to TIMP-1 ($\times 200$)

사진부도 ①



사진부도 ②



사진부도 ③

Plate 4

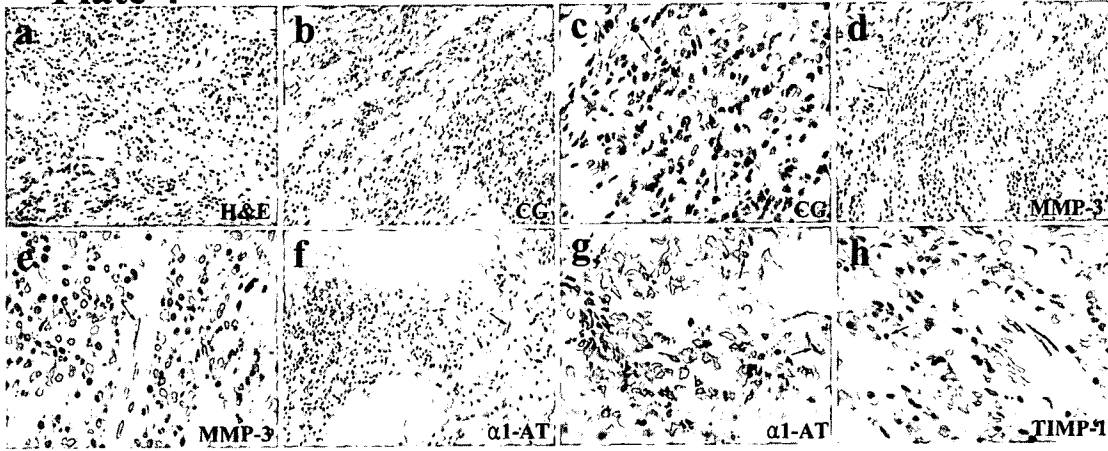
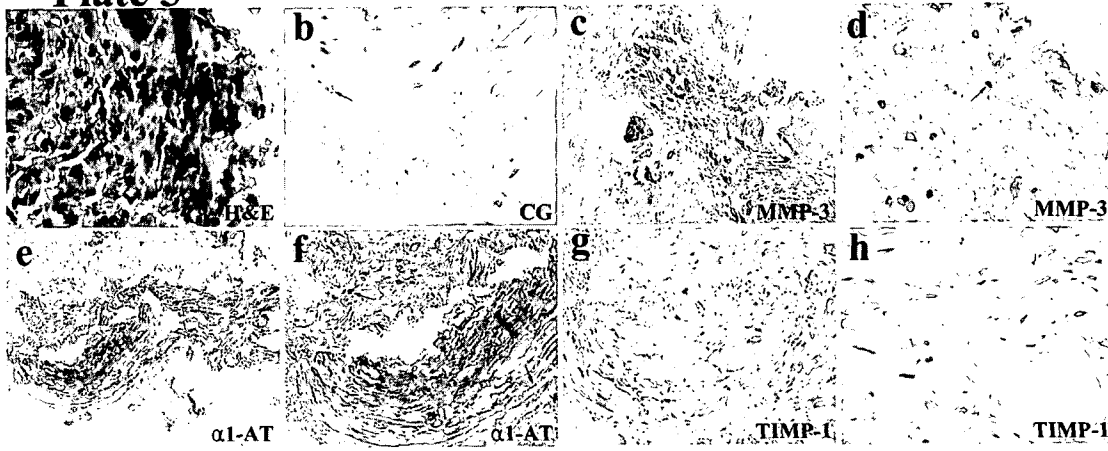


Plate 5



사진부도 ④

Plate 6

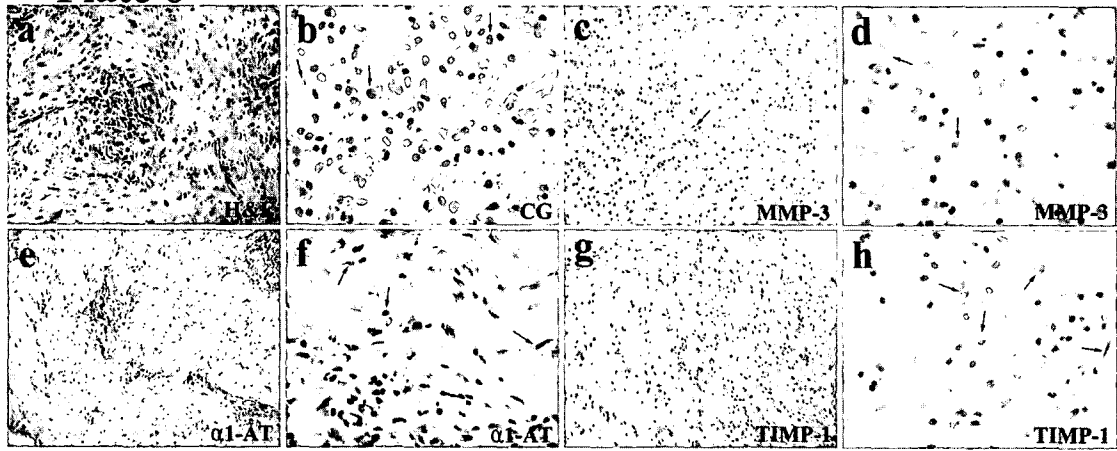


Plate 7

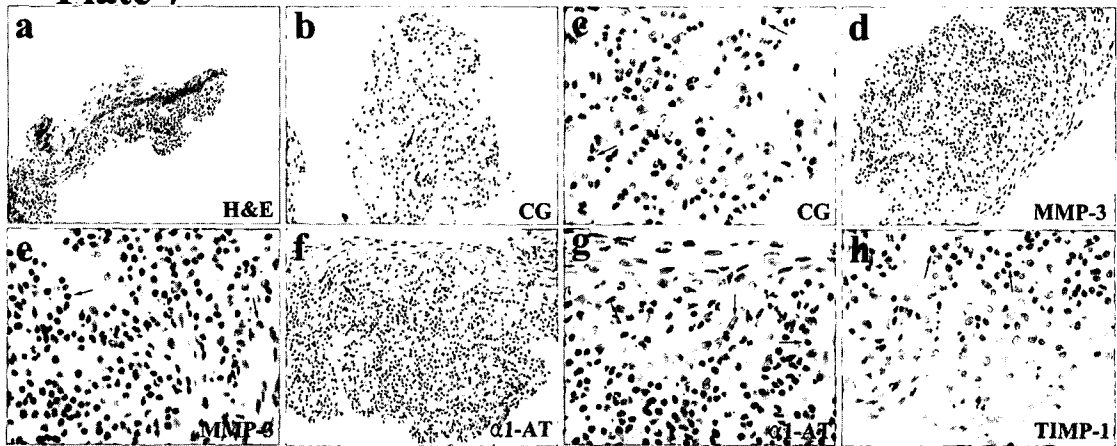


Plate 8

