

치은섬유아세포의 MMP 발현에 대한 Nitric Oxide의 영향

신인식¹ · 윤상오³ · 정현주¹ · 고정태²

전남대학교 치과대학 치주과학교실¹, 치과약리학교실², 치의학연구소^{1,2}
한국과학기술원 생물과학실³

1. 서론

치주염은 치주부착소실과 골파괴를 동반하는 염증성 질환이다. 치주인대와 치은섬유아세포에서 만들어지는, 치주조직내 세포외기질(extracellular matrix)의 주 구성성분인 다양한 교원질(collagen)들은 치주염 진행중 분해대상이 된다. 세포외기질을 분해시키는 체내의 단백분해효소들 중 matrix metalloproteinase (MMP) 효소군은 치주질환에 있어서, 조직파괴와 재형성에 중요한 역할을 가진다. 치은과 치주인대 교원질의 파괴는 진행성 또는 급성 치주 손상의 주요한 특징으로서 주로 체내에 있는 MMP에 의해 초래된다^{2,3}.

세포간질 분해에 관여하는 MMP 효소군은 정상적인 발생과정, 혈관 생성 및 상처 재생 등에 관여하고, 세포간질의 파괴가 선행되는 전이암과 관절염, 골다공증, 치주염등의 질병에 관여하는 것으로 알려져 있다. MMP 효소군에 속하는 단백질들은 현재까지 여러 동물에서 약 20여종이 알려져 있으며, prodomain, prodomain, metal ion-binding catalytic domain, hinge domain, hemopexin-like domain을 공통으로 가지고 있다. 현재까지 발견된 모든 MMP들은 활성이 없는 proenzyme으로 생합성되어 세포 밖으로 배

출되며, prodomain이 절단됨으로써 MMP의 활성화가 이루어진다⁴. MMP 효소군은 기질 특이성에 따라 collagenase 계열, gelatinase 계열, stromelysin 계열로 나누어져 왔으나, 최근 transmembrane domain을 가지는 membrane type-MMP(MT-MMP)들이 알려지면서 크게 4가지 계열로 분류되고 있다. 기질 특이성에 대한 연구가 부족한 MT-MMP 계열을 제외한 나머지 3계열의 MMP들은 기질 특이성이 비교적 광범위하여 선호하는 기질 외에도 일부 세포간질 구성 성분들을 서로 중복되게 기질로 사용한다. 치주질환 병소와 관련된 것으로 MMP 1, 2, 3, 8, 9, 13 등의 활성 증가가 알려져 있다^{2,3}.

MMP 효소군 중 type IV collagen을 분해하는 gelatinase 계열은 72-kDa gelatinase (MMP-2, Gelatinase A)와 92-kDa gelatinase (MMP-9, Gelatinase B)이 알려져 있는데 각각 다른 mRNA에서 전사된다. MMP-2는 그 활성을 위하여 아연을 필요로 하며 활성화되었을 때 prodomain이 잘려 66kDa이 되어 type IV, V, VII collagen과 fibronectin, 그리고 elastin 등의 다양한 세포간질 구성 성분들을 분해하며, denatured collagen인 gelatin을 분해한다. 또한 MMP-2는 *in vitro*에서 4-aminophenylmercuric acetate (APMA), sodium dodecyl sulfate (SDS) 등에

의해서도 활성화된다. MMP-2는 기저막의 주요 구성 성분인 type IV collagen의 triple-helical 부분을 절단 함으로 발생과정, 상처치유, 치주질환 뿐만 아니라 암 전이 및 비정상적인 혈관 생성에 의한 관절염 등의 질환에서도 중요한 역할을 한다. 따라서 MMP-2의 억제제는 유용한 항암제 및 관절염 치료제 등의 의약품으로 사용될 수 있어 세계적으로 MMP-2의 억제제를 탐색 및 분석하는 연구가 진행되고 있다^{5,6)}.

치주염 병소조직에는 포식세포 수와 활성이 증가 되고, 그로 인하여 superoxide anion, hydrogen peroxide, nitric oxide (NO), peroxyntirite 등, 활성산소 종(Reactive oxygen species, ROS)이 증가하게 된다^{7,8)}. 그 중 NO는 nitric oxide synthases (NOS)에 의해 L-arginine으로부터 유래된다. NOS isoform에는 endothelial cell NOS (ecNOS), brain NOS (bNOS, nNOS), inducible macrophage-type NOS (iNOS)가 있으며, cNOS에 의하여 생리적으로 필요한 양이 생산되어 정상적 생리기전에 사용되고, 이와 달리 iNOS는 많은 양의 NO를 생산하여 염증성 질환의 진행에 관여한다.

MMP의 발현과 iNOS의 유도가 별개의 과정이지만 두 과정 간의 상호작용이 있을 수 있다. 이에 근거하여 Hirai 등⁹⁾은 류마티스성 관절염에서 pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , IFN- γ , TNF- α)에 의해 자극받은 synovial cell의 iNOS에 의해 NO 양이 증가하는 것을 관찰하고, 이들이 중재물질로 작용하여 MMP의 양을 증가시킨다고 하였다.

따라서, 이번 연구에서는 류마티스성관절염과 병리

기전을 공유하는 치주질환에서의 MMP 활성화에 미치는 영향을 규명하고자 치주조직의 섬유아세포에서 NO의 작용에 의해 MMP의 발현이 유도될 것이라고 가정하고, 이에 NO 공여체를 투여하여 치은섬유아세포에서의 MMP 형성에 어떠한 영향을 미치는지 평가하였다. 본 연구의 결과는 NO가 치은섬유아세포로부터 MMP-2 분비를 유도할 수 있음을 제시하고 있다.

II. 실험재료 및 방법

1. 실험재료

Peroxyntirite, hydrogen peroxide, sodium nitroprusside (SNP)등의 ROS와, JNK inhibitor II, G06976, genistein, indomethacin, SB203580, FPTI III, PD98059, H7, PDKC와 LY294002 등의 kinase inhibitor은 Calbiochem (La Jolla, CA, USA)으로부터 구입하였다. Phenazine methosulfate (PMS), gelatin, sodium dodecyl sulfate, acrylamide, bis-acrylamide, glycerol, tris, ammonium persulfate, glycine, Commassie Brilliant Blue R-250, penicillin, streptomycin, HEPES는 Sigma (ST. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. Reverse transcription kit은 Promega (Madison, WI, USA)로부터 구입했으며, polymerase chain reaction을 위한 primer는 Bioneer (충북 청원군)에서 주문하였다. Gentamycin, DMEM, fetal bovine serum은 Invitrogen (CH Groningen, Netherlands)으로부터 구입했으며, [³H]-thymidine과

Table 1. Kinase inhibitor substance to find the signal pathway

Substance	Function in Signal pathway
JNK inhibitor II	JNK inhibitor
PD98059	MEK-ERK pathway inhibitor
SB203580	p38 inhibitor
LY294002	PI3-kinase inhibitor
G06976	calcium dependent protein kinase C inhibitor
Genistein	Tyrosine kinase inhibitor
H7	Inhibitor of PKA, PKC, and PKG
FPTI III	Ras processing inhibitor
PDKC	NF- κ B inhibitor

polyacrylamide gel electrophoresis를 위한 kit은 Amersham Pharmacia로부터, reverse transcription과 PCR 시약은 Takara (Shiga, Japan)에서 구입하였다.

2. 실험방법

가. 인체 치은섬유아세포와 HT1080 세포의 배양

전신적으로 건강한 30세 이전의 비흡연자로부터, 치열 교정의 이유로 발치를 하는 동안 건강한 치은 조직을 얻었다. 치은조직은 penicillin과 streptomycin을 포함한 DMEM을 사용하여 3번 반복하여 씻어준 후, 작은 조각으로 잘랐다. Primary culture는 20% fetal bovine serum, penicillin (100 µg/ml), streptomycin (100U/ml)을 포함하는 DMEM를 사용하여 이루어졌다. 1차계대 후 세포는 10 mM HEPES, 50 mg/L gentamycin, 10% fetal bovine serum을 포함한 DMEM 배지에서 유지시켰다. MMP-2와 MMP-9을 발현하는 대표적 세포로 알려진 HT1080 세포 (Human fibrosarcoma cell line)도 치은섬유아세포와 같은 조건에서 키웠다.

나. [3H]-Thymidine Incorporation Assay

세포 증식은 [3H]-thymidine incorporation법을 이용하여 측정하였다. 세포를 6 well plate에 접종 후 배양하여, 세포가 70-80% 찻을 때, 세포에 다양한 ROS 물질 또는 kinase inhibitor(Table 1)를 처리한 후 2시간 후에, 1 µCi의 [3H]-thymidine을 넣고 24시간 다시 배양하였다. 세포들은 PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na₂HPO₄·7H₂O, and 1.4 mM KH₂PO₄)로 2번 씻어내고 0.4 M NaOH에 용해시킨 후 세포내 방사성을 liquid scintillation counter로 측정하였다.

다. Zymography

MMP양을 검사하기 위하여 MMP-2와 MMP-9 기질인 gelatin 0.1%를 포함하는 10% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel에 세포배양 상층액 시료를 2 x SDS buffer (2% SDS, 60 mM Tris-HCl, pH 6, 5% glycerol, 0.05% bromophenol blue)와 섞은 후 비환원 조건에서 부가하여 전기영동하였다. 전기영동 후 washing buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 2.5% Triton X-100)으로 1시간 동안 세척하여 MMPs를 정상화 및 활성화시켰다. 다시 Triton X-100이 없는 washing buffer로 10분간 세척하고, incubation buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, 0.02% NaN₃, 1mM ZnCl₂)로 37°C에서 18시간 반응시켰다. 이 gel을 Coomassie brilliant blue로 염색한 후 washing buffer로 탈염하여 MMPs의 활성 밴드를 확인하였다.

라. RNA Isolation과 RT-PCR

배양된 세포로부터 TRI 시약(Molecular Research Center)을 이용하여 총 RNA를 분리하여 후 각각의 first-strand cDNA는 1 µg RNA와 MuLV reverse transcriptase (Gibco BRL, Gaithersburg, MD)를 사용하여 42°C에서 45분간 reverse transcription을 하여 얻었다. 이 cDNA는 99°C에서 5분간 변성시킨 후 5°C에서 식히고 이를 증폭해 사용하였다. PCR을 위해서 5 µl의 denatured cDNA, 1U Taq polymerase (Gibco BRL), 각각의 1 µM primer (Table 2), 1.5 mM MgCl₂ 와 각각의 1.5 µM dNTP를 포함한 Taq polymerase buffer를 섞어 최종 20 µl 혼합액을 만들었다. 이를 thermal cycler (Perkin Elimer, MA, USA)에서 94°C 1분, 54°C 1분, 72°C 1분간 28 cycle을 돌리고 최종적

Table 2. Specific primer used in PCR

Target	Primer sequence
MMP-2(sense)	5-TTTTCTCGAATCCATGATGG-3
MMP-2(antisense)	5-CTGGTGCAGCTCTCATATTT-3
TIMP-2(sense)	5-GTCAGTGAGAAGGAAGTGGACTCT-3
TIMP-2(antisense)	5-ATGTTCTCTGTGACCCAGTC-3

으로 72°C에서 10분간 지속시키는 과정으로 PCR을 시행하였다.

III. 실험 결과

1. 치은섬유아세포에서의 proMMP-2의 발현

인체 치은섬유아세포가 type IV collagenase를 생산하여 분비하는지 알아보기 위하여 HT1080 세포를 대조군으로 사용하여 gelatin zymography를 시행하였다. MMPs는 zymogen의 형태로 세포 밖으로 방출되는데, 자극받지 않은 HT1080 세포는 proMMP-2와 proMMP-9을 발현함을 관찰하였다. 한편 치은섬유아세포는 HT1080 세포와는 달리 proMMP-2만을 발현하였다. HT1080 세포의 경우 다량의 proMMP-2를 발현하는데, 치은섬유아세포의 경우 gelatin 분해정

도가 HT1080 세포의 경우와 비슷한 강도로 다량의 proMMP-2이 발현됨을 관찰하였다(Figure 1).

2. 활성산소종이 MMPs 발현에 미치는 영향

가. HT1080 세포에 대한 영향

HT1080 세포에서 활성산소종이 MMP-2와 MMP-9의 발현에 미치는 영향을 보기 위하여 H₂O₂, peroxynitrite, SNP, PMS의 여러 종류를 사용하였다. SNP의 경우 이는 NO를 생성시키는 물질이며, PMS는 superoxide anion을 생성하는 물질이다. H₂O₂는 높은 농도(≥25 μM)에서 MMP-9의 발현을 어느 정도 증가시켰지만, MMP-2는 그다지 많이 증가시키지 못했다(Figure 2). 200 μM의 H₂O₂는 MMP-9의 발현을 3배 가까이 증가시켰다. Peroxynitrite의 경우 NaOH

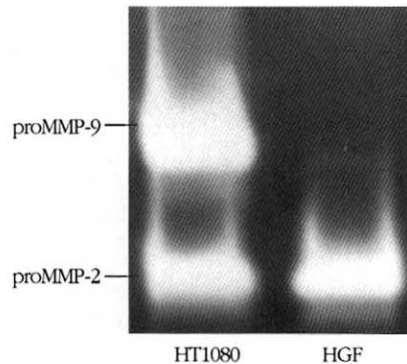


Figure 1. MMPs expressed from human gingival fibroblast (HGF) and reference cell line.

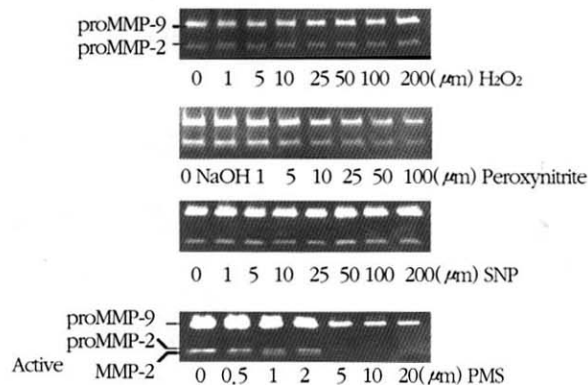


Figure 2. The effect of ROS on MMPs expression by HT1080 cells.

에 녹아 있으므로, NaOH만 사용한 것을 대조군으로 사용하였다. NaOH의 경우 MMP-2와 MMP-9의 발현에 영향을 끼치지 않았다. 높은 농도의($\geq 5 \mu\text{M}$) peroxy-nitrite는 MMP-9과 MMP-2의 발현을 모두 억제시켰다. Tryphan blue dye exclusion assay를 이용하여 세포수를 측정한 결과, $10 \mu\text{M}$ 이상의 peroxy-nitrite는 독성으로 인해 세포의 수를 현저하게 감소시켰는데 이러한 MMPs의 감소는 MMPs의 발현 억제라기보다는 세포독성에 의한 효과로 보인다. 한편, NO를 생성시키는 SNP의 경우 사용한 농도에 상관없이 MMP-2와 MMP-9의 발현에는 영향이 없었다.

Superoxide anion을 생성시키는 PMS의 경우, 세포 독성이 없는 $1\sim 2 \mu\text{M}$ 범위에서 proMMP-2의 활성화를 유도했으나, MMP-2의 발현 및 활성화에는 영향을 끼치지 않았다. 농도가 $5 \mu\text{M}$ 이상인 경우 PMS는 MMP-2와 MMP-9의 발현은 현저하게 감소하였다.

나. 인체 치은섬유아세포에 대한 영향

인체 치은섬유아세포에서 활성산소종이 MMP-2의 발현에 미치는 영향을 보기 위해 H_2O_2 , peroxy-nitrite, SNP, PMS를 각각 처리한 세포를 48시간 배양하였다. H_2O_2 는 $5 \mu\text{M}$ 이상의 농도에서 proMMP-2의 발현을

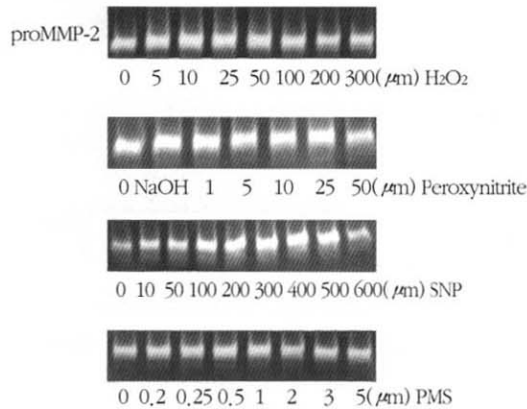


Figure 3. The effect of ROS on MMPs expression by human gingival fibroblasts.

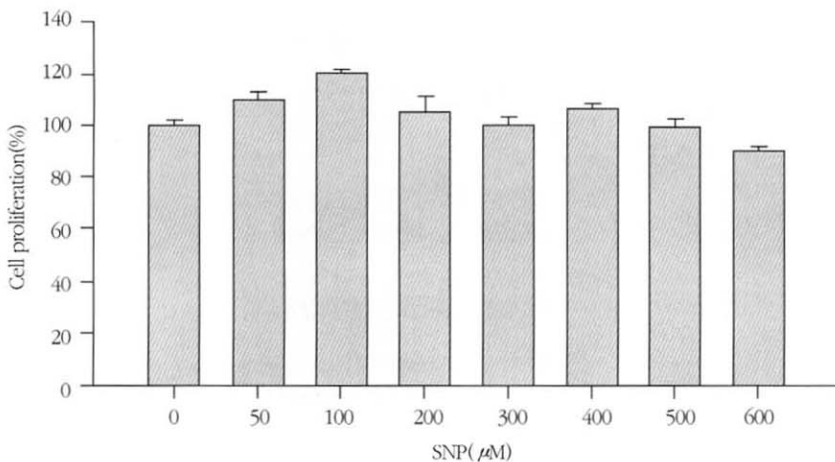


Figure 4. The effect of NO on apoptosis of human gingival fibroblasts.

다소 증가시켰다(Figure 3). Peroxynitrite는 50 μM 미만의 농도에서 MMP-2의 발현에 영향을 미치지 않았다. 한편 NO 발생 공여체인 SNP를 처리한 경우 MMP-2의 발현이 증가하여 특히 300 ~ 500 μM SNP 농도에서 현저히 증가됨을 볼 수 있었다. 한편, superoxide anion을 발생시키는 PMS의 경우, HT1080 세포에서와는 달리 인체 치은섬유아세포에서 MMP-2의 활성화 및 발현에는 영향을 미치지 못하였다.

3. NO의 영향

가. 인체 치은섬유아세포의 성장에 미치는 영향

NO가 인체 치은섬유아세포의 성장에 미치는 영향을 보기 위하여 SNP를 처리한 24시간 후 trypan blue dye exclusion assay 및 thymidine incorporation assay를 수행하였다. 100 μM SNP는 세포 성장을 약 20%를 증가시켰지만 그 이상의 농도에서 세포 성장에 큰 영향을 미치지 못하였다(Figure 4). 본 실험에 사용한 농도한도(600 μM)에서 세포 독성은 발견되지 않았다.

나. MMP-2와 TIMP-2 발현에 미치는 영향

NO가 gingival fibroblast에서 proMMP-2의 발현을 증가시켰는데, NO가 MMP-2에 직접 작용하여 활성을 증가시킨 것인지, 또는 세포에 작용하여 MMP-2의 생산을 증가시킨 것인지 확인하기 위하여 다음

실험을 진행시켰다. 첫번째, 300 μM 의 SNP를 세포가 없는 conditioned media에 넣고, 시간별로 반응시킨 후 zymography를 수행하였다. Figure 5A에서 보는 바와 같이 시간에 따라 MMP-2의 활성에는 별 차이가 없었다. 100 μM ~ 400 μM 의 SNP를 시간별로 처리한 것도 MMP-2의 활성에는 별 차이가 없었다. 따라서 NO가 MMP-2에 직접적으로 작용한 것은 아니라는 사실을 알 수 있었다. 두번째, 300 μM 의 SNP를 치은섬유아세포에 처리 후 각 시간대에서 RNA를 얻어 RT-PCR을 수행하였다. Figure 5B에서 보는 바와 같이 SNP 처리 후 1시간 후부터 지속적인 MMP-2 mRNA의 증가가 있었다. 이러한 결과들은 MMP-2에 대한 NO의 직접적 작용보다는, NO가 세포 내 MMP-2의 발현을 증가시켜 단백질 양을 증가시킨다는 것을 의미한다. 한편 MMP-2의 활성을 직접적으로 억제하는 TIMP-2 (tissue inhibitor of metalloproteinase-2)의 경우에는 NO에 의한 변화를 관찰할 수 없었다.

4. 각종 신호전달억제제의 영향

가. HT1080 세포의 MMPs의 발현에 미치는 영향

HT1080 세포에서 MMP-2와 MMP-9의 발현에 어떠한 세포 내 신호 전달 단백질이 관여하는지 보기 위하여 각종 신호 전달 물질 억제제를 처리한 후 gelatin zymography를 수행하였다. 우선, 세포독성

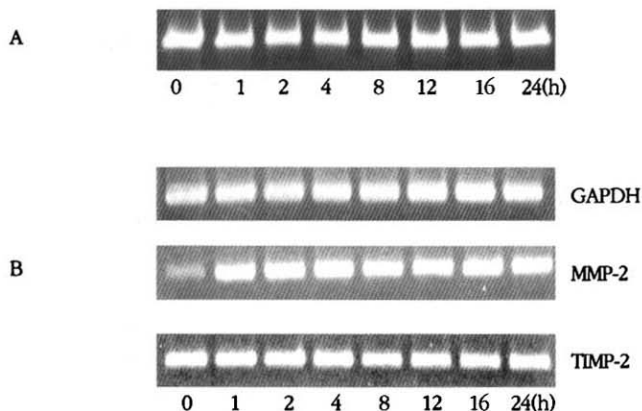


Figure 5. The effect of NO on expression of MMPs and TIMP-2 by human gingival fibroblasts: A, NO (using 300 μM SNP) on MMP production; B, RT-PCR for MMP-2 and TIMP-2 mRNA

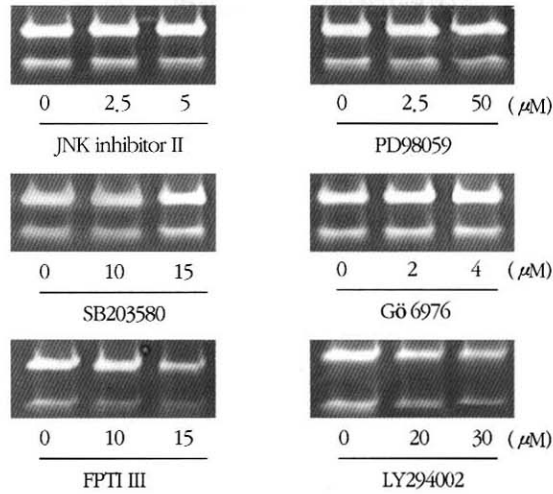


Figure 6. The effects of various kinase inhibitors on MMPs expressions by HT1080 cells.

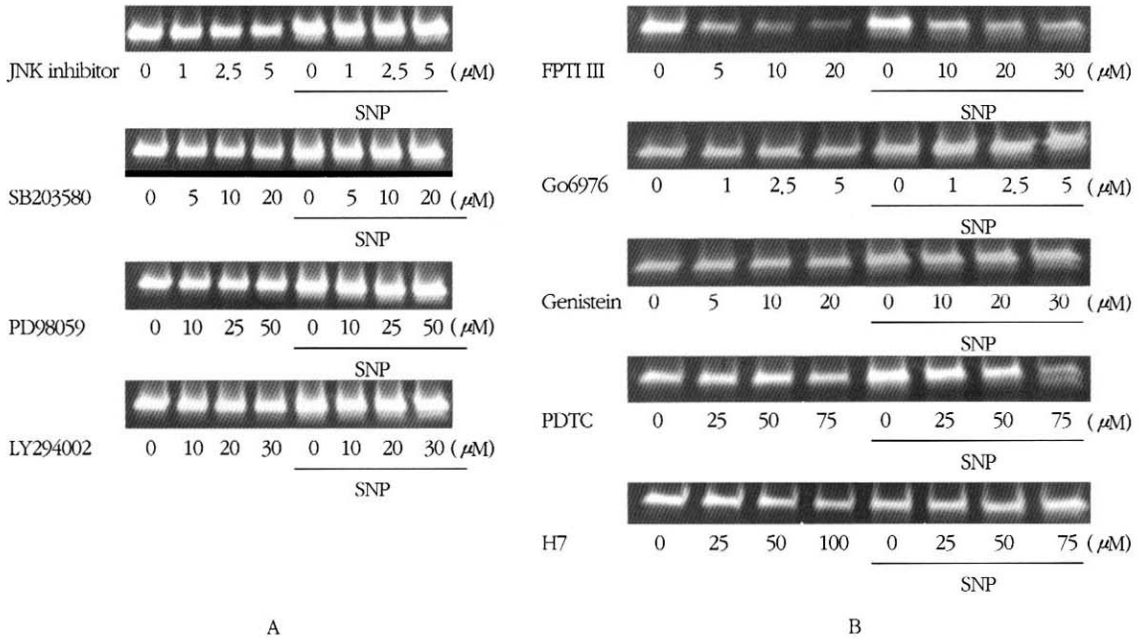


Figure 7. The effects of various kinase inhibitors on MMP-2 expression by human gingival fibroblasts.

이 없는 각종 억제제들의 농도를 결정하고 그 범위에서 다음 실험을 진행하였다. MAP kinases 중 JNK를 억제하는 JNK inhibitor II는 MMP-2와 MMP-9의 발현에는 아무런 영향을 미치지 못하였다(Figure 6). 또한, 다른 MAP kinase 인 MEK-ERK와 p38을 각

각 억제하는 PD98059와 SB203580의 경우도 MMP-2와 MMP-9의 발현에 아무런 영향이 없었다. PKC inhibitor인 Go6976의 경우도 독성이 없는 범위 내에서 MMP-2와 MMP-9의 발현에 영향을 미치지 못하였다. 하지만 Ras inhibitor인 FPTI III의 경우 10 μ M에

서 MMP-2의 발현을 억제시켰으며, 15 μM 에서는 MMP-2와 MMP-9 둘 다의 발현을 억제시켰다. 또한 PI3-kinase 억제제인 LY294002를 처리한 경우 20 μM 및 30 μM 에서 MMP-2와 MMP-9의 발현을 억제시켰다. 이 결과는 HT1080 cell에서 MMP-2 발현 조절에 중요한 영향을 미치는 것은 Ras/PI3-kinase pathway임을 의미한다.

나. 인체 치은섬유아세포에서 MMP-2의 발현에 미치는 영향

인체 치은섬유아세포에서 NO에 의한 MMP-2의 발현 증가가 어떠한 신호 전달 체계를 통하여 이루어지는지 알아보기 위하여 각종 신호전달 억제제를 처리한 후 gelatin zymography를 수행하였다. JNK inhibitor II는 SNP 자극이 없을 때 MMP-2의 발현을 농도 의존적으로 감소시켰으나 SNP 자극이 있을 경우, 억제 효과를 나타내지 못하였다. SB203580, PD98059 및 LY294002의 경우는, SNP 자극의 유무에 관계없이 MMP-2의 발현에 영향을 미치지 못하였다 (Figure 7A). 따라서 인체 치은섬유아세포에서는 각종 MAP Kinases 및 PI3-kinase는 NO에 의한 MMP-2의 발현에 관여하지 않음을 알 수 있다.

한편, PKC의 inhibitor인 Go6976과 tyrosine kinase inhibitor인 genistein의 경우도 NO의 유무에 관계없이 MMP-2 발현에 영향을 미치지 못하였다. PKA, PKC 및 PKG의 저해제인 H7의 경우, NO가 없을 경우, MMP-2를 억제하였지만, NO가 있을 경우, 오히려 MMP-2의 발현 증가를 가져왔다. Ras processing inhibitor인 FPTI III와 NF-kB inhibitor인 PDTC는 SNP의 유무에 관계없이 MMP-2의 발현을 크게 감소시켰다(Figure 7B). 이 결과는 인체 치은섬유아세포에서 MMP-2의 발현은 Ras and/or NF-kB가 중요한 pathway이지만 NO가 존재하는 경우 MMP-2의 발현은 PKA, PKC 및 PKG를 통한 pathway가 관여할 수 있음을 의미한다.

IV. 고찰

치주염은 류마티스성 관절염과 병리학적으로 유

사하다. 류마티스성 관절염의 시작이 치주염처럼 박테리아 감염에 의한 것인지는 아직 확인되지 않았지만, 둘 다 만성염증질환이고 염증에 관여하는 많은 병리학적 양상이 유사하다. 류마티스성 관절염처럼 치주염은 염증이 한 부위에 국한되고, 염증부 주위로 세포외기질(ECM), 교원질, 결합조직파괴와 염증성 조직액 축적을 보이며, 결국은 골조직 파괴가 야기된다. 또한 류마티스성 관절염에서 발견되는 거의 모든 cytokine들이 치주염 병소인 치주낭과 질환조직에서도 다량 존재한다. 류마티스성 관절염에서는 pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , IFN- γ , TNF- α)에 의해 자극받은 synovial cell의 iNOS에 의해 NO의 양이 증가하는 것을 볼 수 있고, 이들이 중재물질로 작용하여 MMP의 양을 증가시키는 것으로 밝혀졌다⁹⁾. 치주염이 있는 조직부위에서는 정상조직부위보다 높은 농도의 활성산소종(ROS)과 활성화된 MMP가 발견된다. 또한, 최근 연구에 의하면 치은 섬유아세포가 NO와 MMP의 중요한 공급자 중의 하나임을 알 수 있다¹⁰⁾.

이에 이번 연구는 류마티스성 관절염의 연구결과⁹⁾에 근거하여 치주염에서 치은섬유아세포, NO, MMP 간에 관련성이 있을 것이라는 가정 하에 실험을 하게 되었다. 본 연구결과 활성산소종 중 NO는 치은섬유아세포로부터 MMP-2 생산을 유도하고, MMP-2 활성화와 TIMP-2 생산에는 별다른 영향을 주지 않는 것을 알 수 있었다. MMP의 조절은 합성, 분비, 활성화 등을 포함하여 여러 단계에서 이루어진다. RT-PCR과 zymography 분석은 외부에서 투여한 NO가 MMP-2 mRNA 양을 증가시키는 것을 보여주었고, 여기에 Ras and/or NF-kB Pathway와 PKA, PKC 및 PKG pathway가 관여할 수 있음이 관찰되었다.

실험결과를 종합해보면 NO가 치주질환에서 치은섬유아세포로부터 MMP-2생산의 증가를 유도하는 proinflammatory mediator로 작용한다는 것을 보여줬다. NO는 많은 세포에서 생산되고, 많은 세포에 작용하는 다기능성의 중재물질이고, 염증과 자가면역질환에 의한 조직파괴에 참여한다. NO level은 치주질환 병소에서 증가하며, 이때 치은섬유아세포는 주된 NO 생산자가 된다. 만성 염증조직에서는 상당

한 양의 superoxide anion, hydrogen peroxide, NO와 같은 활성산소종이 활성화된 면역세포에서 많이 발생된다. 과도한 활성산소종은 AIDS, 암, 동맥경화증, 만성염증에 관여하며, 또한 노화를 유발하는 인자로서 알려져 있다^{11,12}). 만성염증반응의 경우, 특히 NO가 rheumatoid joint, demyelinating nerves, 궤양성대장염의 대장, 피부염과 같은 염증이 있는 부위에서 고농도로 존재하게 되는데 이는 주로 iNOS의 발현 증가 때문이다. NO는 superoxide anion과 반응하여 peroxynitrite를 생성하며, HOCl은 nitrite와 반응하여 nitryl chloride를 생성시킨다. 따라서 이러한 활성산소종과 질소종을 제거하거나, 생성을 억제하는 물질을 찾으려는 노력이 많이 진행되고 있다^{13,14}).

MMPs는 ECM을 구성하는 요소들을 분해하는 효소군이다. 따라서 MMP 활성을 조절하는 것이 조직 재구성과 상처치유의 정상적 과정을 유지하는데 매우 중요함을 알 수 있다. MMP는 또한 종양침투, 전이(metastasis), 염증진행과정에도 참여하고 있다. 치주염은 활성산소종과 MMPs의 증가를 보이는 염증 질환이고, 면역반응에 의한 조직파괴를 보인다^{5,16}). 치주질환의 치주조직파괴를 유도하는 여러 기전 중에는 세균 작용, 이에 대응하는 숙주 면역활성계에 의해 유도된 활성산소종의 역할이 포함된다. 치주염 환자의 경우 정상인에 비교할 때, 활성산소종의 농도가 높은 반면, 전체 항산화 활성은 건강한 사람과 비슷하거나, 혹은 더 낮은 수준이다. 따라서 tocopherol과 selenium과 같은 항산화제의 투여는 활성산소종에 의한 collagen degradation을 억제한다고 보고되었다⁷). 또한 치주염 환자에게 투여하는 tetracycline, chlorhexidine과 같은 항미생물 물질도 세균의 성장 억제 뿐만 아니라, 항산화제로 작용하여 활성산소종을 없애는 역할을 하여 조직파괴를 감소시킨다고 보고되었다¹⁸). 하지만 활성산소종이 정확히 어떻게 치주염에 관여하는지에 대한 보고는 미미하다. 활성산소종과 관련된 연구는 주로, 활성산소종이 치주결합조직과 같은 치은 조직의 구조에 관여하는 여러 단백질이나 당단백에 직접적으로 어떤 작용을 하여 조직을 파괴시키는가에 관한 것으로¹⁶), 치은 기질의 주요 구성성분을 만들고 분해하는데 관여하

는 치은섬유아세포에서의 활성산소종의 역할에 대한 보고는 거의 없었다. 특히 활성산소가 기질을 이루는 구성성분을 자르는데 관여하는 주요 단백질효소인 MMP의 활성화와 발현에 어떻게 관여하는지에 대한 연구는 거의 없다.

본 연구에서는 여러 활성산소종 중 NO가 치은섬유아세포에서 Ras and/or NF-kB pathway를 통해 MMP-2의 발현을 증가시키며, 그 억제제인 TIMP-2의 발현에는 아무런 영향을 끼치지 않았다는 것을 보여주었다. NO의 구강내 역할에 대해서 몇 연구자들은 NO가 구강 내에서 세균이 과하게 증식하는 것을 막는 비특이성 자연방어기전에 관여한다고 주장하거나 혹은 점막 보존이나 항상성 유지를 위해 중요한 역할을 한다고 주장한다¹⁹). 그러나 다른 연구자들은 치태 침착 개시 단계나 치주질환 중 NO가 증가하기 때문에 NO가 치주 조직에는 해롭다고 주장한다²⁰). 그람양성 구균인 *Staphylococcus* spp.와 그람음성 간균인 *Escherichia coli*은 NO를 직접 생산하게 한다. 그러므로 치태 형성은 치은세포에서 iNOS의 발현을 up-regulation함으로써 NO의 생성을 증가시킨다고 할 수 있다. 이는 세균 증식 뿐 아니라 세균성 치태에 의해 자극되는 cytokine의 생성을 통해서도 간접적으로 유도된다. 치주염 병소 조직은 건강한 조직보다 iNOS의 발현이 더 높다. 하지만, 치주염 환자의 내피 세포나, 대식세포, 치은섬유아세포로부터 발생하는 NO의 해로운 역할에 대해서는 알려진 바가 거의 없다.

본 연구결과로부터 세균, 치태, 치주염 병소조직 등에서 많이 발생하는 NO가 치은섬유아세포에서 MMP-2의 발현을 증가시킴으로써 조직 손상과 치주질환 악화에 기여할 수 있다는 가능성을 제시해주며, 따라서 후자의 주장에 가깝게 근접한다. 여러 활성산소종 중 특히 NO가 치은섬유아세포에서 Ras/NF-kB pathway를 경유하여 MMP-2의 발현을 증가시키므로, NO와 같은 활성산소종을 제거하는 항산화제의 사용이나, Ras and/or NF-kB pathway를 억제하는 물질의 사용은 치주질환의 정도를 감소시킬 수 있는 유망한 치료용약물로서 중요한 역할을 할 수 있으리라 기대된다.

V. 결론

현재까지 치은섬유아세포에서 ROS에 의한 MMPs의 발현에 대한 보고는 거의 없어 이번 연구는 류마티스성 관절염과 치주질환의 유사성에 착안하여 치주질환에서 ROS와 MMPs의 관계를 알아보고, ROS 중에서도 특히 nitric oxide가 MMP-2의 발현을 증가시키는데 중요한 매개체가 되는지 구명하고자 하였다.

인체치은섬유아세포와 HT1080 (human fibrosarcoma)세포의 배양 중 여러 ROS (hydrogen peroxide, phenazine methosulfate (PMS), peroxyntirite, sodium nitroprusside (SNP))를 첨가하여 배양액의 MMP-2와 MMP-9 효소활성을 gelatin zymography로 평가하였다. ROS 처리후 배양세포의 RNA를 분리하여 RT-PCR에 의한 MMP-2, TIMP-2 m-RNA 발현도를 검사하였고 여러 신호전달억제제(kinase inhibitors)를 첨가후 MMP-2와 MMP-9 발현을 평가하였다.

연구 결과 proMMP-2와 proMMP-9를 발현하는 HT1080 세포와 달리 치은섬유아세포는 proMMP-2만 발현하였다. HT1080세포에서는 hydrogen peroxide에 의하여 MMP-9의 발현이 증가하였고, 치은섬유아세포에서는 SNP에 의하여 MMP-2 level이 현저하게 증가되었다. HT1080 세포에서는 FPTI III (Ras inhibitor)와 LY294002 (PI3-kinase inhibitor) 처리시 MMP-2,9의 발현이 억제되어 Ras/PI3-kinase pathway가 MMPs 발현에 역할을 하였으며 치은섬유아세포에서는 FPTI III 및 PDTC (NF-kB inhibitor) 처리시 SNP 존재와 무관하게 MMP-2가 현저히 감소되어 Ras and/or NF-kB가 NO에 의한 MMP-2 발현에 역할을 하였다.

이상의 실험결과로부터 ROS, 특히 nitric oxide가 Ras/NF-kB pathway를 통하여 치은섬유아세포의 MMP-2 발현을 증가시키며, 이는 NO가 치주염에서 염증성 조직파괴와 세포외기질 재형성과정의 조절에 관여하는 중요한 기전이 될 수 있음을 보여준다.

VI. 참고 문헌

1. Segquier S, Gogly B, Bodineau A, Godeau G,

- Brousse N. Is collagen breakdown during periodontitis linked to inflammatory cells and expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human gingival tissue? *J Periodontol* 2001;**72**: 1398-1406.
2. Korostoff JM, Wang JF, Sarment DP, Stewart JC, Feldman RS, Billings PC. Analysis of in situ protease activity in chronic adult periodontitis patients: expression of activated MMP-2 and a 40 kDa serine protease. *J Periodontol* 2000;**71**: 353-360.
3. Kut-Lasserre C, Mille CC, Ejeil AL, Gogly B, Dridi M, Piccardi N, Guillou B, Pellat B, Godeau G. Effect of avocado and soybean unsaponifiables on gelatinase A (MMP-2), stromelysin 1 (MMP-3), and tissue inhibitors of matrix metalloproteinase (TIMP-1 and TIMP-2) secretion by human fibroblasts in culture. *J Periodontol* 2001;**72**: 1685-1694.
4. Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Ann Rev Cell Dev Biol* 2001;**17**: 463-516.
5. Jackson C, Nguyen M, Arkell J, Sambrook P. Selective matrix metalloproteinase (MMP) inhibition in rheumatoid arthritis- targeting gelatinase A activation. *Inflamm Res* 2001;**50**: 183-186.
6. Liabakk NB, Talbot I, Smith RA, Wilkinson K, Balkwill F. Matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) and matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) type IV collagenases in colorectal cancer. *Cancer Res* 1996;**56**: 190-196.
7. Lohinai Z, Benedek P, Feher E, Gyorfai A, Rosivall L, Fazekas A, Salzman AL, Szabo C. Protective effects of mercaptoethylguanidine, a selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase, in ligature-induced periodontitis in the rat. *Brit J Pharmacol*. 1998;**123**:353-360
8. Sculley DV, Langley-Evans SC Salivary antioxidants and periodontal disease status. *Proc Nutr*

- Soc* 2002;**61**: 137-143.
9. Hirai Y, Migata K, Honda S, Ueki Y, Yamasaki S, Urayama S, Kamachi M, Kawakami A, Ida H, Kita M, Fukuta T, Shibatomi K, Kawabe Y, Aoyagi T, Eguchi K. Effects of nitric oxide on matrix metalloproteinase-2 production by rheumatoid synovial cells. *Life Sci* 2001;**68**: 913-920.
 10. Westermark J, Kahari VM. Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *FASEB J* 1999;**13**: 781-792.
 11. Hensley K, Robinson KA, Gabbita SP, Salsman S, Floyd RA. Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. *Free Radic Biol Med* 2000;**28**: 1456-1462.
 12. Hogg N. Free radicals in disease. *Sem Reprod Endocrinol* 1998;**16**: 241-248.
 13. Rausch-Fan X, Matejka M. From plaque formation to periodontal disease, is there a role for nitric oxide? *Eur J Clin Invest* 2001;**31**: 833-835.
 14. Kendall HK, Marshall RI, Bartold PM. Nitric oxide and tissue destruction. *Oral Dis* 2001;**7**: 2-10.
 15. Halliwell B. Oral inflammation and reactive species: a missed opportunity? *Oral Dis* 2000;**6**: 136-137.
 16. Waddington RJ, Moseley R, Embery G. Reactive oxygen species: a potential role in the pathogenesis of periodontal diseases. *Oral Dis* 2000;**6**: 138-151.
 17. Asman B, Wijkander P, Hjerpe A. Reduction of collagen degradation in experimental granulation tissue by vitamin E and selenium. *J Clin Periodontol* 1994;**21**: 45-47
 18. Firatli E, Unal T, Onan U, Sandalli P. Anti-oxidative activities of some chemotherapeutics. A possible mechanism in reducing gingival inflammation. *J Clin Periodontol* 1994;**21**: 680-683.
 19. Bodis S, Haregewoin A. Evidence for the release and possible neural regulation of nitric oxide in human saliva. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;**194**: 347-350.
 20. Matejka M, Partyka L, Ulm C, Solar P, Sinzinger H. Nitric oxide synthesis is increased in periodontal disease. *J. Periodontal Res* 1998;**33**: 517-518.

Nitric Oxide on the MMP-2 expression by human gingival fibroblasts

In-Sik Shin¹, Sang-Oh Yoon³, Hyun-Ju Chung¹, Jung-Tae Koh²

¹Department of Periodontology and ²Department of Dental Pharmacology, College of Dentistry & Dental Science Research Institute, Chonnam National University, Kwangju,

³Department of Biological Sciences, Korea Advance Institute of Science and Technology, Daejeon

It has been suggested that increased number and activity of phagocytes in periodontitis lesion results in a high degree of reactive oxygen species (ROS) such as superoxide anion, hydrogen peroxide, nitric oxide and peroxynitrite. There are few reports on the relationship between ROS and MMPs expressions in gingival fibroblast. We studied to elucidate whether and how ROS, especially nitric oxide affects the MMP expression.

Human gingival fibroblasts and HT1080 cells (human fibrosarcoma cell line as reference) were grown in DMEM supplemented with 10 mM HEPES, 50 mg/L gentamicin, and 10% heat inactivated fetal bovine serum with addition of various reactive oxygen species (ROS). Culture media conditioned by cells were examined by gelatin zymography. HT1080 cells expressed proMMP-2 and proMMP-9, but human gingival fibroblasts (HGF) produced only proMMP-2. Hydrogen peroxide upregulated MMP-9 expression in HT1080 cells, whereas in human gingival fibroblast SNP treatment showed marked increase in MMP-2 level compared to other ROS. These results suggest that the effects of ROS on MMPs expressions are cell-type specific. RT-PCR for MMP-2 and TIMP-2 m-RNA were performed using total RNA from cultured cells under the influence various kinase inhibitors. In HT1080 cells, treatment with FPTI III (Ras processing inhibitor) and LY294002 (PI3-kinase inhibitor) resulted in inhibition of MMP-2 and MMP-9 expressions, suggesting that Ras/PI3-kinase pathway is important for MMPs expression in HT1080 cells. In gingival fibroblasts, treatment with FPTI III and PDTC (NF-kB inhibitor) showed marked decrease in MMP-2 regardless of the of SNP, suggesting that Ras/NF-kB could be the key pathway for NO-induced MMP-2 expression in gingival fibroblasts.

This study showed that ROS, especially nitric oxide, could be the critical mediator of periodontal disease progression through control of MMP-2 expression in gingival fibroblasts possibly via Ras/NF-kB pathway.

Key words : NO, MMP-2, gingival fibroblast, Ras/NF-kB

약어 목록 : MMP : matrix metalloproteinase, ECM : extracellular matrix, NF-kB : nuclear factor kB, JNK : c-Jun NH₂-terminal kinase, ERK : extracellular signal-regulated kinase, MT1-MMP : membrane type 1-matrix metalloproteinase, TIMP : tissue inhibitor of metalloproteinase