

사람 치주인대섬유모세포에서 MMP-1, TIMP-1,2, Type 1 collagen, fibronectin 및 UNCL 발현에 미치는 H₂O₂와 chlorhexidine의 효과

최성미¹, 장현선^{1,2}, 김병옥^{1,2*}

1. 조선대학교 치의학전문대학원 치주과학교실

2. 2단계 BK21

Effects of H₂O₂ and chlorhexidine on MMP-1, TIMP-1,2, Type 1 collagen, fibronectin and UNCL expressions in human periodontal ligament fibroblasts

Seong-Mi Choi¹, Hyun-Seon Jang^{1,2}, Byung-Ock Kim^{1,2*}

1. Department of Periodontology, School of Dentistry, Cho Sun University

2. The 2nd stage of BK21

ABSTRACT

Purpose: To evaluate the effects of chlorhexidine and H₂O₂ on matrix metalloproteinase-1 (MMP-1), tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-1, TIMP-2), Type 1 collagen, fibronectin and UNCL expressions in human periodontal ligament fibroblasts (hPDLF).

Materials and Methods: 1.2×10⁻¹%, 1.2×10⁻²% and 1.2×10⁻³% CHX and 3×10⁻³%, 3×10⁻⁴% and 3×10⁻⁵% H₂O₂ and mixture of CHX and H₂O₂ were applied to hPDLF for 1 min and 30 min. The mRNA expressions of MMP-1, TIMP-1 and 2, Type 1 collagen, fibronectin and UNCL in hPDLF were analysed by RT-PCR.

Results: The result were as follows:

1. The expression of UNCL mRNA was higher than that of other mRNAs.
2. 1.2×10⁻³% CHX increased mRNA expressions of hPDLF as application time increased.
3. H₂O₂ lower than 3×10⁻³% increased expression of UNCL mRNA, and did not decrease mRNA expression of hPDLF.
4. hPDLF treatment with 1.2×10⁻¹% CHX (with or without H₂O₂) resulted in no gene expression.
5. hPDLF treatment with 1.2×10⁻²% CHX (with or without H₂O₂) for 30 minutes resulted in no gene expression.

Conclusion: Because low concentration of CHX and H₂O₂ increased UNCL mRNA expression of hPDLF, low concentration of CHX and H₂O₂ may have an antioxidative effect. (*J Korean Acad Periodontol* 2008;38:645-656)

KEY WORDS: chlorhexidine; H₂O₂; human periodontal ligament fibroblasts.

서론

치주질환은 세균과 숙주의 면역 체계 사이의 상호작용의 결과로 발생하는 염증성 질환으로, 세균은 독성산물을 형성하고 숙주 면역체계를 활성화시켜 치주조직의 파괴를 야기하게 된다^{1,2}. 활성화된 면역체계로 polymorphonuclear

leukocytes(PMNs)가 증가되고, 이 PMNs의 호흡과열로 반응성 산소종(reactive oxygen species, ROS)이 형성된다^{3,4}. ROS의 종류에는 hydrogen peroxide(H₂O₂), hydroxyl radical(·OH)과 superoxide radical(·O₂-) 등이 있으며 이들은 DNA 손상, Lipid peroxidation, 단백질 손상, 효소 산화 및 pro-inflammatory cytokine 유리 등을 통하여 조직 손상을 야기한다고 알려져 있다⁴. 이러한 ROS는 치주질환 외에도 rheumatoid arthritis, acute respiratory distress syndrome, AIDS를 포함한 100여 가지 이상의 질환과 관련되어 있다고 보고되었다³. 또한 ROS는 노화에 관여하는 것으로 알려져 있으며⁵, 따라서 ROS를 억제함으

Correspondence: Dr. Byung-Ock Kim

Department of Periodontology, School of Dentistry, Chosun University, Seosuk-Dong, Dong-gu, Gwang-Ju, 501-759, Korea.

E-mail: bobkim@chosun.ac.kr, Tel: 82-62-220-3854,

Fax: 82-62-224-4664

*본 연구는 2007년 조선대학교 교내학술연구비 지원을 받아 연구되었음.

Received: Oct. 29, 2008; Accepted: Dec. 10, 2008

로써 치주질환의 억제와 치주조직의 노화를 억제할 수 있는 가능성을 예측할 수 있다.

Chlorhexidine(CHX)은 구강 내 치태 관련 세균을 감소시키거나 억제시키기 위해 널리 쓰이고 있는 구강 세정액이다. CHX을 치주질환 환자에게 사용할 때 치태 침착, 염증, 치주낭 깊이가 감소된다는 결과들이 보고되어 왔다^{6,7)}. 그러나 이런 효과 외에도 치주조직에 독성을 보인다는 보고들도 있다⁸⁾. Giannelli 등⁸⁾은 골모세포, 섬유모세포, 내피세포에 대한 CHX의 독성효과를 연구하여 CHX에 의한 세포사, mitochondria 기능 변화 및 oxidative stress 등을 보고하였다. 그러나 Goultschin 등⁹⁾은 치주조직 염증 시 증가되는 ROS를 CHX이 억제한다고 보고하였으며, Battino 등¹⁰⁾과 Firatli 등¹¹⁾도 CHX의 항산화 기능을 보고하였다. 이러한 결과들은 섬유모세포나 골모세포 등에서 CHX의 효과에 대한 정확한 결론이 아직 규정되어 있지 않다는 것을 의미하며, 사람 치주인대섬유모세포에서 CHX의 효과에 대한 연구 또한 미비한 실정이다.

사람 치주인대섬유모세포는 백악질과 치조골 형성에 관여하고 골모세포, 백악모세포, 치주인대섬유모세포 등으로 분화할 수 있는 능력을 가지고 있어 치주조직의 재생과 치유에 중요한 역할을 담당하고 있으며, ROS와 항산화제에 대한 연구를 통해 ROS에 의한 조직파괴를 감소시킬 수 있다면 치주조직 파괴를 억제하고 조직재생을 향상시킬 수 있을 것으로 생각된다.

본 연구에서는 배양된 사람 치주인대섬유모세포에서 6종류의 세포의 기질단백질(matrix metalloproteinase-1(MMP-1), tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1,2(TIMP-1,2), Type 1 collagen, fibronectin, UNCL)들의 mRNA 발현에 미치는 H₂O₂와 CHX의 효과를 비교하여, CHX의 항산화 역할과 치주조직 재생에 미치는 영향을 평가하고자 한다.

재료 및 방법

1. 사람 치주인대섬유모세포 배양

조선대학교 치과병원에 내원한 치주조직이 건강한 환자로 교정치료를 위하여 발거된 제 1소구치의 치근 중앙 1/3에서 얻은 조직들을 무균 작업대에서 항생제가 함유된 Hank's balanced salt solution(HBSS, Gibco BRL, Grand

Island, NY)으로 수회 세척한 후, 해부 현미경하에서 1~2 mm³의 크기로 절단하였다. 절단된 조직단편들을 60 mm 세포 배양접시에 위치시킨 후 조직의 이동을 방지하기 위하여 슬라이드 글라스를 조직 위에 올려놓고, 10% fetal bovine serum(FBS)을 함유한 DMEM 배지(Gibco BRL, Grand Island, NY)를 이용하여 5% CO₂, 37°C, 100% 습도 조건에서 배양하였다. 배지는 2일 간격으로 교체하였으며, 세포의 증식상태를 관찰하며 계대배양하여 5세대의 세포를 각각 실험에 이용하였다.

2. MTT assay

실험에 사용할 H₂O₂와 CHX의 농도를 결정하기 위하여 세포 활성도를 측정하였다. CHX(클로헥신[®], 대웅제약)은 1.2×10⁻¹%를 사용하였고, listerine(뉴트린[®], 근화제약)은 CHX과 비교하기 위하여 실험에 추가하였다. 계대배양된 세포를 24-well plate에 2×10⁴/well로 분주하고 CHX 1.2×10⁻¹%, 1.2×10⁻²%, 1.2×10⁻³%, H₂O₂ 3×10⁻³%, 3×10⁻⁴%, 3×10⁻⁵%와 listerine 100%, 50%, 1%를 1분과 30분씩 각 well에 단독 혹은 병용하여 적용시킨 후 PBS로 세척하였다. 24시간 후 같은 방법으로 CHX, H₂O₂와 listerine을 재적용시킨 후, MTT assay를 시행하였다.

3. 역전사 중합효소연쇄반응(Reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)

60 mm 배양접시에 5세대 세포를 2×10⁴/dish의 농도로 분주한 후, 80~90%로 밀생될 때까지 배양하였다. MTT assay 결과를 바탕으로 CHX 농도는 1.2×10⁻¹%, 1.2×10⁻²%, 1.2×10⁻³%를, H₂O₂ 농도는 3×10⁻³%, 3×10⁻⁴%와 3×10⁻⁵%를, listerine은 1%를 선택하였으며 1분, 30분씩 각각 적용하였다. 동일한 농도와 배양시간으로 CHX과 H₂O₂를, listerine과 H₂O₂를 병용하여 적용하였다(Table 1). 적용 후 PBS로 세척하고 10% FBS가 함유된 DMEM을 넣어 배양하였으며, 동일한 방법으로 5일 동안 24시간 간격으로 시약을 적용하였다.

총 6일 동안 배양된 세포로부터 Trizol Reagent (Invitrogen, USA)를 이용하여 total RNA를 추출하였다. 각 RNA 1μg당 0.5μg의 oligo-dT, 200 unit의 reverse transcriptase, 20 unit의 RNase inhibitor를 혼합하여 65°C

에서 60분간 반응시켜 first strand cDNA를 합성하였다. UNCL, Type 1 collagen, fibronectin, TIMP-1과 -2, MMP-1 및 GAPDH의 mRNA 발현을 확인하기 위하여 각각의 primer를 이용하여 RT-PCR을 시행하였다. 사용된 각각의 primer는 GAPDH(5'-CTCTGACTTCAACAGCGACA-3', 5'-TCTCTCTCTTCTCTTTGTGC-3', 330bp), MMP-1(5'-GGTGATGAAGCAGCCCAG-3', 5'-CAGTAGAATGGGAGAGTC-3', 510bp), UNCL(5'-GTGCTGGACATGGGATTCCTT-3', 5'-GTCTCTGCTCTGTGCGTTTCA-3', 141bp), Type 1 collagen (5'-CTTCCTGCGCCTGATGTCCA-3', 5'-CTCGTGCAGCCATCGCAGT-3', 192bp), TIMP-1(5'-ACCCCGCCATGGAGAGTGT-3', 5'-GAGGCAGGCAGGCAAGGTGA-3', 551bp), TIMP-2(5'-GATCAGGGCCAAAGCGGTCAG-3', 5'-GGTGC

CCGTTGATGTTCTTCTCTG-3', 590bp), Fibronectin (5'-ACCACGTAGGAGAACAGTT-3', 5'-ACACTATTGCGG GCCAG-3', 665bp)이다. RT 과정을 통하여 합성한 1µg의 cDNA를 template로 각각의 primer, 1 unit의 Taq DNA polymerase, 250µM의 dNTPs, 10 mM의 Tris-HCl(PH 9.0), 40 mM의 KCl, 1.5 mM의 MgCl₂를 혼합하여 PCR을 시행하였으며, PCR 조건은 Tabel 2에 나타내었다.

PCR은 PTC-200(MJ Research Inc., USA)를 사용하여 predenaturation 후, denaturaion, annealing 및 extension의 과정을 33회 반복하였고, PCR product는 1.5% agarose gel에 전기영동하여 확인하였다. ImageGauge 3.12를 통하여 각 전기영동상의 흑화도를 계산하여 비교하였다.

Table 1. Twenty Groups with Different Application Conditions of H₂O₂, CHX and Listerine

Groups	Concentration	Application time (min)
1	Control	1, 30
2	CHX 1.2×10 ⁻¹ % +H ₂ O ₂ 3×10 ⁻³ %	1, 30
3	CHX 1.2×10 ⁻¹ % +H ₂ O ₂ 3×10 ⁻⁴ %	1, 30
4	CHX 1.2×10 ⁻¹ % +H ₂ O ₂ 3×10 ⁻⁵ %	1, 30
5	CHX 1.2×10 ⁻² % +H ₂ O ₂ 3×10 ⁻³ %	1, 30
6	CHX 1.2×10 ⁻² % +H ₂ O ₂ 3×10 ⁻⁴ %	1, 30
7	CHX 1.2×10 ⁻² % +H ₂ O ₂ 3×10 ⁻⁵ %	1, 30
8	CHX 1.2×10 ⁻³ % +H ₂ O ₂ 3×10 ⁻³ %	1, 30
9	CHX 1.2×10 ⁻³ % +H ₂ O ₂ 3×10 ⁻⁴ %	1, 30
10	CHX 1.2×10 ⁻³ % +H ₂ O ₂ 3×10 ⁻⁵ %	1, 30
11	Lis 1% +H ₂ O ₂ 3×10 ⁻³ %	1, 30
12	Lis 1% +H ₂ O ₂ 3×10 ⁻⁴ %	1, 30
13	Lis 1% +H ₂ O ₂ 3×10 ⁻⁵ %	1, 30
14	CHX 1.2×10 ⁻¹ %	1, 30
15	CHX 1.2×10 ⁻² %	1, 30
16	CHX 1.2×10 ⁻³ %	1, 30
17	H ₂ O ₂ 3×10 ⁻³ %	1, 30
18	H ₂ O ₂ 3×10 ⁻⁴ %	1, 30
19	H ₂ O ₂ 3×10 ⁻⁵ %	1, 30
20	Lis 1%	1, 30

CHX: Chlorhexidine, Lis: Listerine, H₂O₂: hydrogen peroxide

Table 2. Conditions for RT-PCR

	Temperature (°C)				Time (min.)
	GAPDH	MMP-1	UNCL	COL I	
	FN	TIMP-1			
		TIMP-2			
Predenaturation	94	94	94	94	5
Denaturation	94	94	94	94	1
Annealing	55	58	65	65	1
Extension	72	72	72	72	1

결과

사람 치주인대세포의 기질 단백질 발현에 미치는 H₂O₂와 CHX의 효과를 비교하기 위하여 배양된 사람 치주인대세포에 H₂O₂와 CHX를 적용하였다. 또한 Listerine은 CHX과 비교하기 위하여 실험에 추가하였다. 시약의 적용 농도를 결정하기 위하여 MTT assay를 실시한 결과 Listerine 100%, 50%가 함유된 시약이 적용된 실험군은 대조군보다 낮은 세포활성도를 보여 본 실험에서 배제하고 H₂O₂ 3×10⁻³%, 3×10⁻⁴%, 3×10⁻⁵%, CHX 1.2×10⁻¹%, 1.2×10⁻²%, 1.2×10⁻³%와 Listerine 1%를 적용하였다. CHX, H₂O₂과 listerine은 단독으로 1분, 30분씩 각각 적용하였으며 동일한 농도와 배양시간으로 CHX과 H₂O₂를, listerine과 H₂O₂

를 병용하여 적용하였다(Table 1), 적용 후 PBS로 세척하고 10% FBS가 함유된 DMEM을 넣어 배양하였으며, 동일한 방법으로 5일 동안 24시간 간격으로 시약을 적용하였다.

시약 적용되어 배양된 세포를 이용한 RT-PCR를 통해 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 사람 치주인대섬유모세포의 증식에 미치는 CHX 효과

CHX 1.2×10⁻¹%가 포함된 실험군에 치주인대섬유모세포는 거의 관찰되지 않았으며 CHX 1.2×10⁻²%가 포함된 실험군 중 30분 적용된 실험군의 세포 수도 감소되었으나, 그 외 실험군의 치주인대섬유모세포는 대조군과 큰 차이가 없었다(Fig. 1).

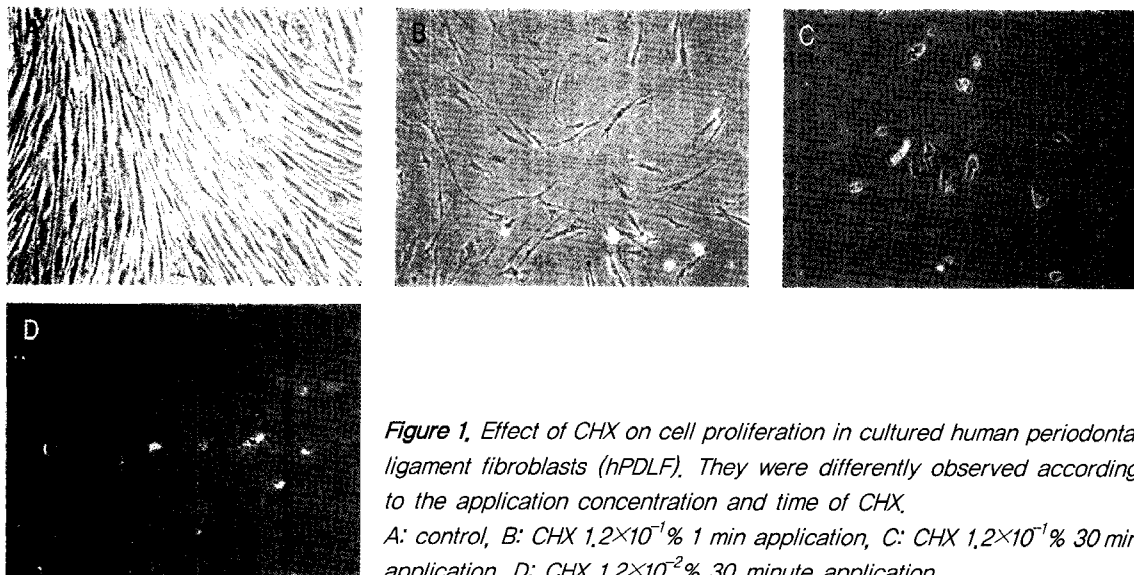


Figure 1. Effect of CHX on cell proliferation in cultured human periodontal ligament fibroblasts (hPDLF). They were differently observed according to the application concentration and time of CHX. A: control, B: CHX 1.2×10⁻¹% 1 min application, C: CHX 1.2×10⁻¹% 30 min application, D: CHX 1.2×10⁻²% 30 minute application.

2. UNCL, Type 1 collagen, fibronectin, TIMP-1, TIMP-2 및 MMP-1 mRNA 발현 분석

사람 치주인대섬유모세포에서 UNCL mRNA는 1분 적용한 실험군에서 대조군보다 발현이 두드러졌으며 H₂O₂ 3×10⁻⁵%를 30분 적용한 실험군에서는 발현이 감소되었다. MMP-1 mRNA는 H₂O₂ 3×10⁻⁵%를 30분 적용한 실험군에서 대조군보다 발현이 감소하였다(Fig. 2).

CHX 1.2×10⁻¹% + H₂O₂ 3×10⁻³%, CHX 1.2×10⁻¹% + H₂O₂ 3×10⁻⁴%, CHX 1.2×10⁻¹% + H₂O₂ 3×10⁻⁵%와 CHX 1.2×10⁻¹%를 1분과 30분 적용한 실험군과 CHX 1.2×10⁻²% + H₂O₂ 3×10⁻³%, CHX 1.2×10⁻²% + H₂O₂ 3×10⁻⁴%, CHX 1.2×10⁻²% + H₂O₂ 3×10⁻⁵%와 CHX 1.2×10⁻²%를 30분 적용한 실험군에서는 조사한 모든 mRNA의 발현을 볼 수 없었다(Fig. 2).

1) mRNA 발현

1분 동안 시약 적용 실험군에서 UNCL mRNA는 다른 유전자보다 발현이 뚜렷하였으나 30분 적용 실험군에서는 다른 유전자와 비슷한 발현을 보였다(Fig. 3).

2) CHX 적용 시 mRNA 발현 양상

(1) CHX 1.2×10⁻²%이 포함된 1분 실험군

CHX 단독 적용 실험군에서는 UNCL mRNA만이 대조군보다 높은 발현을 보였으며, H₂O₂와 병용하여 적용한 실험군에서도 유사한 결과를 보였다. UNCL mRNA는 CHX 1.2×10⁻²%와 H₂O₂ 3×10⁻³%를 동시에 적용한 실험군에서 가장 높은 발현을 보였으며, 이는 CHX 1.2×10⁻²%를 단독으로 적용한 실험군에서보다 높았다(Fig. 4).

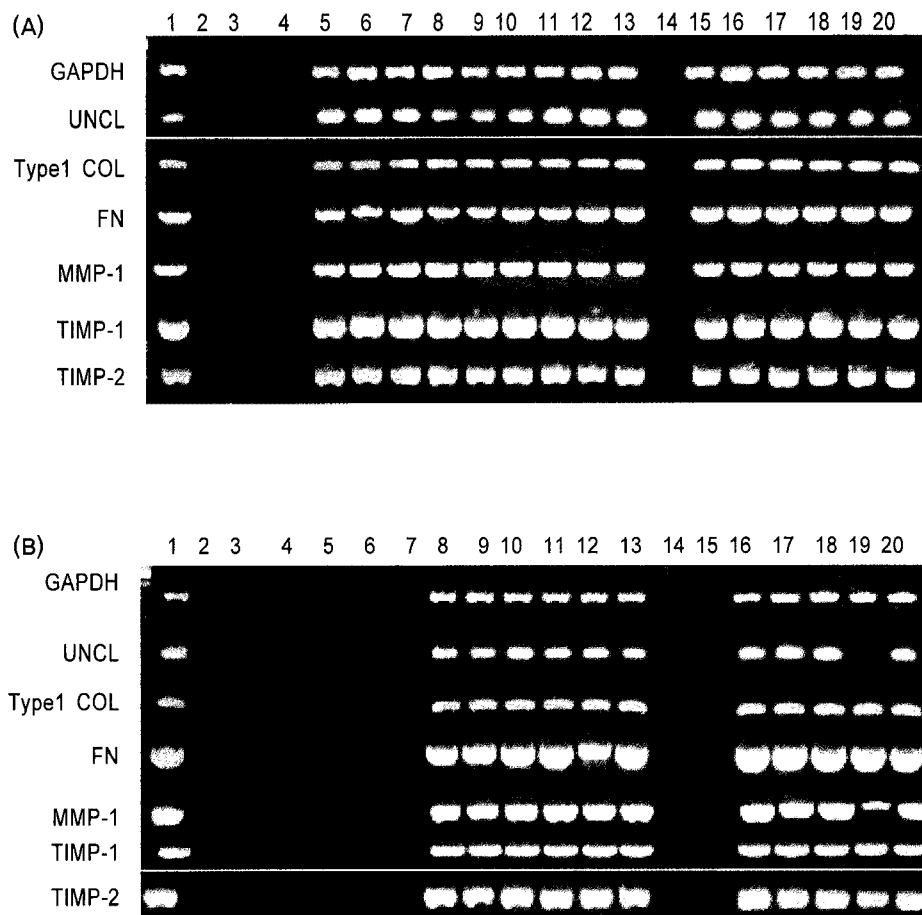


Figure 2. RT-PCR results according to the application concentration and time of H₂O₂, CHX and listerine. A: 1 min application, B: 30 min application

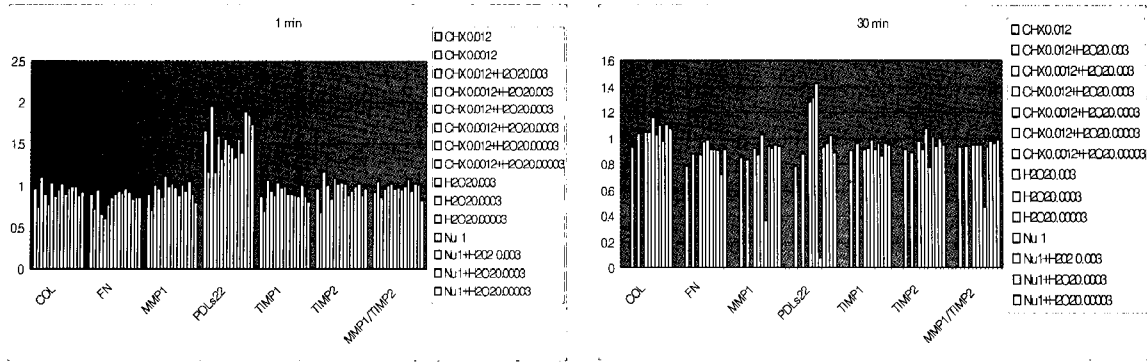


Figure 3. Expression of mRNA on 1 and 30 min, application group.

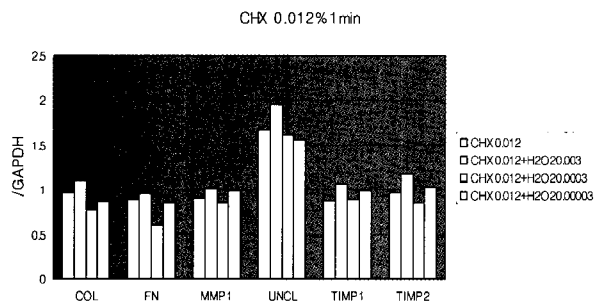


Figure 4. Effect of CHX $1.2 \times 10^{-2}\%$ with or without H_2O_2 on mRNA expressions.

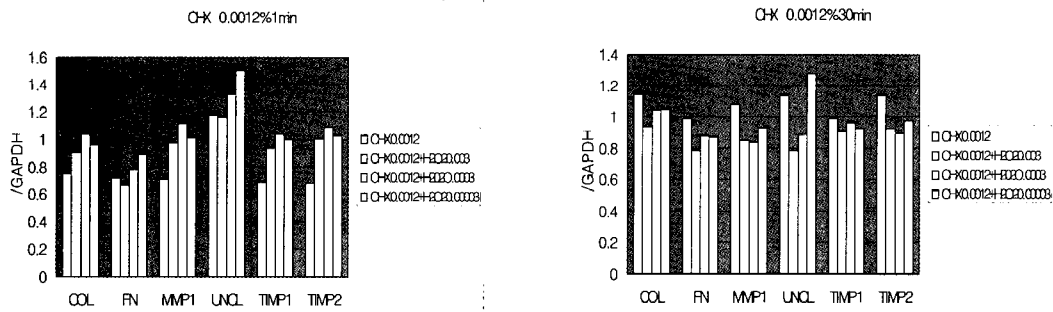


Figure 5. Effect of CHX $1.2 \times 10^{-3}\%$ with or without H_2O_2 on mRNA expressions.

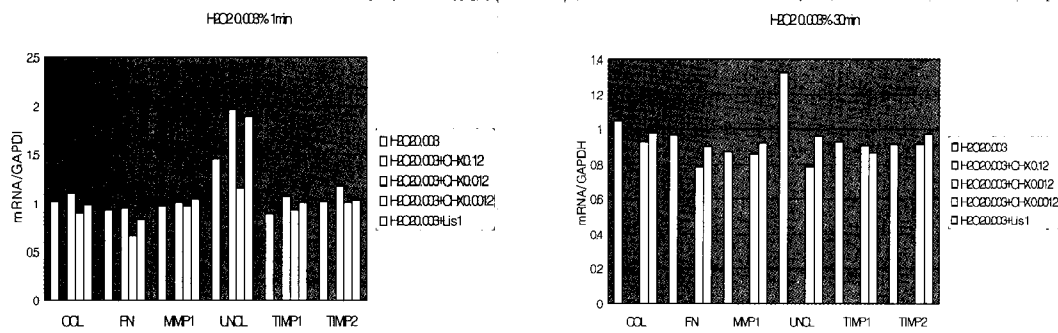


Figure 6. Effect of H_2O_2 $3 \times 10^{-3}\%$ with or without CHX on mRNA expressions.

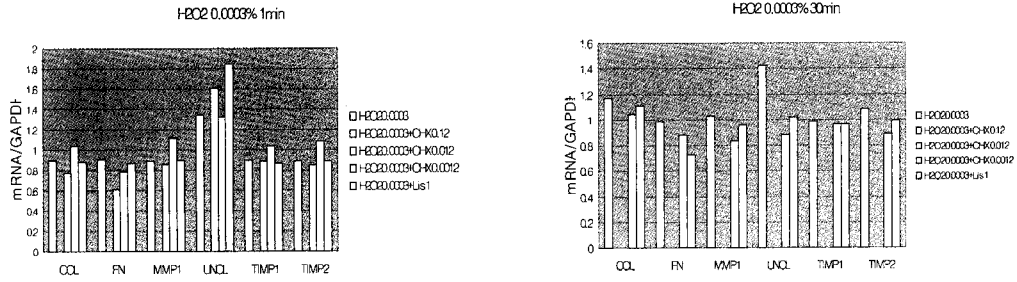


Figure 7. Effect of H₂O₂ 3×10⁻⁴% with or without CHX on mRNA expressions.

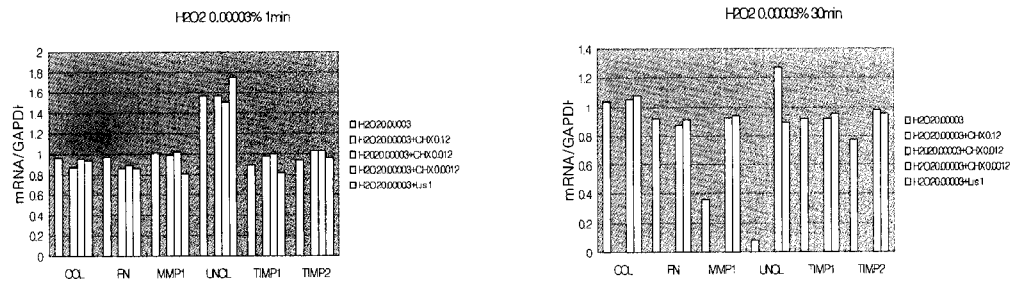


Figure 8. Effect of H₂O₂ 3×10⁻⁵% with or without CHX on mRNA expressions.

3) H₂O₂ 적용 시 mRNA 발현 양상

(1) H₂O₂ 3×10⁻³%이 포함된 실험군

H₂O₂를 단독으로 적용한 실험군에서 UNCL mRNA는 대조군보다 높은 발현을 보였으며, 이를 제외한 나머지 mRNA는 대조군과 유사한 발현을 보였다. UNCL mRNA는 1분 실험군에서는 CHX 1.2×10⁻²%를 병용해서 적용했을 때 가장 높은 유전자 발현을 보였으며, 30분 실험군에서는 H₂O₂를 단독으로 적용했을 때 가장 높은 발현을 보였다(Fig. 6).

(2) H₂O₂ 3×10⁻⁴%이 포함된 실험군

H₂O₂ 단독 적용 실험군에서 1분 적용 시 UNCL mRNA는 대조군보다 높은 발현을 보였고 나머지 실험군은 대조군과 유사한 발현을 보였으며, 30분을 적용한 실험군에서 1분 실험군보다 높은 발현을 보였다. 30분을 적용한 실험군에서는 H₂O₂를 단독으로 적용한 실험군이 CHX과 병용하여 적용한 실험군보다 약간 높은 유전자 발현을 보였다(Fig. 7).

(3) H₂O₂ 3×10⁻⁵%이 포함된 실험군

1분 적용 실험군에서 H₂O₂를 단독으로 적용한 실험군과 CHX과 동시에 적용한 실험군에서 UNCL mRNA는 대조군보다 높은 발현을 보였으며, 나머지 mRNA는 모두 대조군

과 유사한 발현을 보였다. 특히 UNCL mRNA는 CHX 1.2×10⁻¹%가 포함된 실험군을 제외하고는 매우 높은 발현을 보였다(Fig. 8).

총괄 및 고안

CHX은 높은 살균 능력과 glycosydic과 proteolytic activity를 억제하고 matrix metalloproteinase(MMP)의 활성을 감소시키는 효과^{12,13,14})가 있어 현재에도 만성 치주염과 임플란트 주위염의 치료 및 구강 내 수술 전 단계에서 세균 억제를 위해 널리 사용되고 있다¹⁵). 그러나 구강 내 조직과 세포에 미치는 부작용 또한 여러 연구들을 통해 보고되고 있으며, 실제 몇몇 연구에 의하면 CHX은 (1) 배양된 치조골과 치은 상피세포에 cytotoxic activity를 보이고¹⁶) (2) 치은 섬유모세포 증식 감소와 collagen과 non-collagen protein 생성을 감소시키고^{17,18}) (3) 섬유모세포의 치근부착과 치주조직의 재생을 방해하며¹⁹) (4) 구강세정을 위해 사용될 때 상피 및 혈관세포에 genotoxic side effect를 나타낸다고²⁰) 보고되었다. Giannelli 등⁸)은 1×10⁻²% CHX을 골모세포에 적용했을 때 활성도가 유의적으로 감소되고 적용 30분 후에 반응성 산소종이 형성된다고 보고하였으며, 이렇게 형성된

반응성 산소종에 의한 oxidative stress는 DNA, 단백질 및 지질 등의 손상을 일으켜 결국 세포사멸을 유도한다고 보고하였다. 또한 강 등²¹⁾은 $1.2 \times 10^{-1} \sim 6 \times 10^{-3} \%$ 의 CHX은 치은 섬유모세포의 활성을 감소시키며, listerine의 경우 10% 이상의 농도에서 세포활성을 감소시킨다고 보고하였다. 이러한 이전 연구자들의 결과는 본 연구의 세포 활성도 측정 결과와 매우 유사하다. 뿐만 아니라 본 실험의 결과에서, CHX $1.2 \times 10^{-1} \%$ 를 단독 또는 H_2O_2 와 병용하여 적용한 실험군 모두와 $1.2 \times 10^{-2} \%$ 의 CHX을 단독 또는 H_2O_2 와 병용하여 30분 적용한 실험군에서 시험한 모든 mRNA 발현이 관찰되지 않았다. 따라서 $1.2 \times 10^{-1} \%$ 의 CHX은 사람 치주인대 섬유모세포의 유전자 발현에 영향을 주어 이는 치주인대 섬유모세포의 치주조직 재생능력을 감소시키며, 결국 치주조직의 치유를 억제할 것으로 생각된다. 이러한 결과들을 고려해 볼 때 치주질환 및 임플란트 주위 질환의 치료를 위한 재생 술식에서 CHX은 신중히 사용되어야 할 것으로 사료된다.

본 연구에서 CHX의 농도가 낮아지면 mRNA 발현을 관찰할 수 있었으며, 약물의 적용 시간에 따라 발현하는 정도가 달라짐을 알 수 있었다. CHX의 농도가 낮아질수록 적용 시간이 길수록 유전자 발현이 높아짐을 볼 수 있었다. Goultchin 등⁹⁾은 저농도($1 \times 10^{-4} \sim 1 \times 10^{-5} \%$)의 CHX은 PMNs의 superoxide 생성을 방해한다고 보고하였으며, Battino 등¹⁰⁾과 Firatli 등¹¹⁾ 또한 미약하지만 CHX의 항산화 효과를 보고하였다. Yeung 등²²⁾은 CHX의 저농도($2 \times 10^{-5} \sim 2 \times 10^{-2} \%$)에서는 항산화 효과가 관찰되었으나 고농도($> 8.3 \times 10^{-2} \%$)에서는 ROS를 형성하였다고 보고하였다. 본 연구에서 CHX $1.2 \times 10^{-3} \%$ 를 단독으로 1분간 적용하였을 때 UNCL를 제외한 모든 mRNA의 발현이 가장 낮았고, 적용시간이 길수록 대조군보다 mRNA 발현이 증가되었으며, 이 결과는 저농도의 CHX을 일정시간 이상 적용시켰을 때 mRNA 발현이 자극됨을 시사한다. 그러나 H_2O_2 와 병용하여 적용했을 때 H_2O_2 단독 적용 시보다 mRNA 발현이 감소되는 것을 관찰할 수 있었다. 이는 H_2O_2 를 oxidative stress로 볼 때 CHX의 항산화 효과가 미미하여 일어나는 현상으로 사료된다.

ROS는 조직이 손상을 받아 저산소증 상태에 이른 후 산소가 다시 유입되는 시기나 염증 시에 발생될 수 있다²³⁾. 이 물질은 조직 내에 많이 존재할 경우 collagen, hyaluronic acid 및 proteoglycan 같은 세포의 기질 성분의 depoly-

merization에 영향을 주며, 세포의 단백질, 핵산 및 막지질의 파괴를 유도할 수 있다^{24,25)}. 특히 치주조직에서는 ground substance degradation, collagenolysis, 과도한 pro-inflammatory cytokine의 방출, PG-F2의 생성 및 PMNs의 호흡 파열 등을 통하여 치주조직의 염증과 부착소실을 야기하게 된다²⁶⁾. ROS 중의 하나인 H_2O_2 는 PMNs의 호흡 파열로 발생한 superoxide가 dismutation되어 발생되며, 이것은 Fe 또는 Cu과 반응(Fenton reaction)하여 가장 반응성이 높은 hydroxyl radical로 전환한다. 이러한 H_2O_2 의 생체 내 악영향은 H_2O_2 의 세포막을 자유롭게 통과하는 능력에 의한 것²⁷⁾으로, 조직 손상의 높은 잠재력을 가지고 있으며, 특히 metal ion이 이용되는 조직에 손상을 일으킬 수 있다. 그러나 Sen Gupta 등²⁸⁾은 V79 세포 (chinese hamster lung fibroblasts)를 고농도의 H_2O_2 에 노출시키기 전 저농도($9 \times 10^{-5} \%$)의 H_2O_2 에서 1시간 동안 전 처리시켰을 때, 전 처리하지 않은 실험군보다 세포사멸에 더욱 저항력이 높아졌다고 보고하였다. Bose 등¹⁹⁾도 V79 세포를 저용량의 H_2O_2 에 몇 주간 반복 노출시킨 후 H_2O_2 에 다시 노출시킨 세포들은 그렇지 않은 세포보다 세포사멸에 저항성을 보이며 apoptosis가 감소되었다고 보고하였다. 본 연구에서는 H_2O_2 $3 \times 10^{-3} \%$ 를 단독으로 적용한 실험군에서 대조군과 유사한 mRNA 발현을 관찰할 수 있었으며, 이는 H_2O_2 가 사람의 치주인대 섬유모세포의 유전자 발현에 영향을 미칠 것이라는 가정과는 다른 결과이다. 또한 최 등³⁰⁾도 $3 \times 10^{-2} \%$ 의 H_2O_2 를 30분 동안 적용한 실험군에서 치주인대 섬유모세포의 유전자 발현이 나타나지 않았으며, $3 \times 10^{-5} \%$ H_2O_2 를 3분간 적용한 실험군에서 사람 치주인대 섬유모세포의 UNCL, Type 1 collagen 및 TIMP-1 발현이 현저히 증가됨을 보고하였다. 이러한 결과를 보아 $3 \times 10^{-3} \%$ 이하의 저농도 H_2O_2 는 치주인대 섬유모세포에서 유전자의 발현을 자극할 수 있을 것으로 생각된다.

UNCL은 사람 치주인대 섬유모세포에서 발현되는 유전자들 중의 하나로, 백악질과 치조골의 초기 분화에, 치아이동시 개조와 재생에도 중요한 역할을 한다고 보고되었으며³¹⁾, 조 등³²⁾은 UNCL mRNA는 노화가 진행될수록 그 발현양상이 감소되어 세포의 분화 및 노화의 정도를 파악하는 표시자로서 활용할 수 있음을 제시하였다. 본 연구에서 UNCL mRNA는 일부 실험군을 제외하고는 모두 대조군보다 높은 발현을 보였으며, 모든 실험군에서 30분 적용군 경우에서 mRNA 발현이 감소하였다. 이 결과는 UNCL이 다른 유전자

에 비해 H₂O₂와 CHX에 민감하게 반응한다는 것을 가리키며 저농도의 CHX과 H₂O₂의 단시간 적용은 UNCL mRNA의 발현을 유도하여 치주인대섬유모세포의 노화를 감소시키고 치주재생을 촉진시킬 수 있을 것으로 사료된다.

MMPs는 결합조직 파괴에 가장 중요한 요소이고 치주인대 부착과 골기질 단백질을 감소시키는 것으로 알려져 있으며, 이들의 억제제로 TIMPs가 작용을 한다. Kubota 등³³⁾은 만성 치주질환에 이환된 치은을 이용한 연구에서 MMP-1, TIMP-1 및 MMP1/TIMP-2 비율이 건강한 치은에서보다 높은 발현을 보였으며, TIMP-2는 두 집단 사이에서 유사한 발현을 보였다고 보고하였다. 그러나 Dahan 등³⁴⁾은 RT-PCR을 이용하여 MMPs mRNA 발현정도를 연구한 보고에서 정상 치은과 치주질환에 이환된 치은에서 MMPs 발현의 유의적 차이는 없다고 보고하였다. 본 연구에서 MMP-1와 TIMP-1,2 mRNA는 모든 실험군에서 유사한 발현을 보였으며, 이는 Type 1 collagen mRNA 발현양상과도 비슷하였다. 이러한 결과들은 H₂O₂가 oxidative stress를 유도하지 않아 발생한 결과로 생각된다. 따라서 더 다양한 oxidative stress 조건 하에서 MMP-1과 TIMP-1,2의 발현양상이나 CHX의 영향에 관한 연구가 필요하리라 생각된다.

Type I collagen은 결합조직 중 가장 풍부하게 발견되는 fibrillar collagen으로 노화에 영향을 받음이 여러 연구들에서 보고되고 있다^{35,36)}. 본 연구에서는 모든 실험군에서 30분 적용군이 1분 적용군과 대조군보다 mRNA 발현이 증가하였으나, 저농도의 CHX과 H₂O₂의 적용시간에 따른 Type I collagen 유전자 발현양상에 관한 연구가 더 필요하리라 생각된다.

Fibronectin은 세포의 부착과 이주, 창상치유에 중요한 세포의 기질로서 치주인대세포와 세포의 기질의 상호작용에 관여한다고 보고되고 있다³⁷⁾. 또한 fibronectin은 노화과정에서 발생한 반응성 산소종에 의해 손상을 입으며, 이로 인해 골 형성이 감소될 수 있다고 보고되었다³⁸⁾. 본 연구에서 fibronectin mRNA는 모든 실험군에서 대조군보다 낮은 발현을 보였다. 또한 대부분의 실험군에서 1분 적용 시보다 30분 적용 시에 mRNA 발현이 증가되었다. 향후 저농도의 CHX과 H₂O₂를 30분 이상 장시간 적용시킨 후, 유전자 발현양상의 변화에 관한 연구가 더 필요하리라 생각된다.

Listerine은 멘톨, 치몰, 유칼립톨과 살리실산 메칠 등으로 구성된 구강 세정제로서, 여러 치주병원성 세균을 억제하고 치은 염증을 감소시키는 것으로 보고되었으며^{36,39)}, 항

산화 능력도 보고되고 있다. Firatli 등¹¹⁾은 여러 구강 세정액의 항산화 효과에 관한 연구에서 CHX보다 listerine이 항산화력이 더 높다고 보고하였으며, Battino 등¹⁰⁾도 listerine의 높은 항산화 능력을 보고하였다. 본 연구에서 UNCL mRNA 발현은 listerine과 H₂O₂를 1분간 동시에 적용하였을 때 크게 증가하였다. 이는 H₂O₂를 단독으로 적용하였을 때보다 높은 수준이었고 적용시간이 길어지면 mRNA 발현이 감소하였으며, 이는 listerine의 항산화력이 적용시간에 의존함을 시사한다.

결론적으로, 본 연구에서 저농도의 CHX과 H₂O₂는 사람 치주인대섬유모세포에서 주로 UNCL mRNA 발현에 관여하는 것으로 생각되며 이는 향후 치주조직의 노화와 관련된 항산화제의 연구에 중요한 기초 자료를 제공하리라 사료된다. 본 연구에서 사용된 H₂O₂의 농도는 사람 치주인대섬유모세포의 mRNA 발현을 현저하게 감소시키지 않았으며, 향후 H₂O₂의 농도와 적용시간에 따른 사람 치주인대섬유모세포의 유전자 발현양상에 대한 연구가 더 필요할 것으로 생각된다.

참고문헌

1. Page RC, Kornman KS. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontol* 2000. 1997;12:9-11.
2. Williams. RC. Periodontal disease. *New England J of Med*. 1990;322:373-382.
3. Battino M, Bullon P, Wilson M, Newman H. Oxidative injury and inflammatory periodontal diseases: the challenge of anti-oxidants to free radicals and reactive oxygen species. *Crit Rev in Oral Biol Med*. 1999;10:458-476.
4. Chapple IL. Reactive oxygen species and antioxidants in inflammatory diseases. *J Clin Periodontol*. 1997;24:287-296.
5. Bonnefoy M, Drai J, Kostka T. Antioxidants to slow aging, facts and perspectives. *Presse Med*. 2002;31:1174-1184.
6. Brex M, Netuschil L, Reichert B, Schreil G. Efficacy of Listerine, Meridol and Chlorhexidine mouthrinses on plaque, gingivitis and plaque bacteria vitality. *J Clin Periodontol*. 1990;17:292-297.
7. Walsh TF, Glenwright HD, Hull PS. Clinical effects of pulsed oral irrigation with 0.2% chlorhexidine digluconate in patients with adult periodontitis. *J Clin Periodontol*. 1992;19:245-248.

8. Giannelli M, Chellini F, Margheri M, Tonelli P, Tani A. Effect of chlorhexidine digluconate on different cell types: a molecular and ultrastructural investigation. *Toxicol In Vitro*. 2008;22:308-317.
9. Goultschin J, Levy H. Inhibition of superoxide generation by human polymorphonuclear leukocytes with chlorhexidine. Its possible relation to periodontal disease. *J Periodontol*. 1986;57:422-424.
10. Battino M, Ferreio MS, Fattorini D, Bullon P. In vitro antioxidant activities of mouthrinses and their components. *J Clin Periodontol*. 2002;29:462-467.
11. Firatli E, Unal T, Onan U, Sandalli P. Antioxidative activities of some chemotherapeutics. A possible mechanism in reducing gingival inflammation. *J Clin Periodontol*. 1994;21:680-683.
12. Beighton D, Decker J, Homer KA. Effects of chlorhexidine on proteolytic and glycosidic enzyme activities of dental plaque bacteria. *J Clin Periodontol*. 1991;18:85-89.
13. Cronan CA, Potempa J, Travis J, Mayo JA. Inhibition of *Porphyromonas gingivalis* proteinases by chlorhexidine.: synergistic effect of Zn(II). *Oral Microbiol Immunol*. 2006;21:212-217.
14. Gendron R, Grenier D, Sorsa T, Mayrand D. Inhibition of the activities of matrix metalloproteinases 2, 8 and 9 by chlorhexidine. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1999;6:437-439.
15. Cadosch J, Zimmermann U, Ruppert M, Guindy J, Case D, Zappa U. Root surface debridement and endotoxin removal. *J Periodontal Res*. 2003;38:229-236.
16. Cabral CT, Fernandes MH. In vitro comparison of chlorhexidine and povidone-iodine on the long-term proliferation and functional activity of human alveolar bone cells. *Clin Oral Investing*. 2007;11:155-164.
17. Cline NV, Layman DL. The effects of chlorhexidine on the attachment and growth of cultured human periodontal cells. *J Periodontol*. 1992;63:598-602.
18. Pucher JJ, Daniel JC. The effects of chlorhexidine digluconate on human fibroblasts in vitro. *J Periodontol*. 1992;63:526-532.
19. Alleyn CD, O'Neal RB, Strong SL, Scheidt MJ, Van Dyke TE, McPherson JC. The effect of chlorhexidine treatment of root surfaces on the attachment of human gingival fibroblasts in vitro. *J Periodontol*. 1991;62:434-438.
20. Eren K, Ozmeriç N, Sardaş s. Monitoring of buccal epithelial cells by alkaline comet assay (single cell gel electrophoresis technique) in cytogenetic evaluation on chlorhexidine. *Clin Oral Investing*. 2002;6:150-154.
21. 강정구, 유형근, 신형식. Chlorhexidine과 Listerine이 인체 치은 섬유모세포의 활성화에 미치는 영향. *대한치주과학회지*. 1995;25:1-13.
22. Yeung SY, Huang CS, Chan CP, Lin CP, Lin HN, Lee PH. et. al. Antioxidant and pro-oxidant properties of chlorhexidine and its interaction with calcium hydroxide solutions. *Int Endod J*. 2007;40:837-844.
23. Meikle MC, Heath JK, Reynolds JJ. Advances in understanding cell interactions in tissue resorption. Relevance to the pathogenesis of periodontal disease and a new hypothesis. *J Oral Pathol*. 1986;15:239-250.
24. Bartold PM, Wiebkin OW, Thonard JC. The effect of oxygen-derived free radicals on gingival proteoglycans and hyaluronic acid. *J Peirodental Res*. 1984;19:390-400.
25. Beaman L, Beaman BL. The role of oxygen and its derivatives in microbial pathogenesis and host defense. *Annu Rev Microbiol*. 1984;38:27-48.
26. Waddington RJ, Moseley R, Embery G. Reactive oxygen species: a potential role in the pathogenesis of periodontal diseases. *Oral Dis*. 2000;6:138-151.
27. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine, 2nd edition. Oxford: Clarendon Press. 1989.
28. Sen Gupta S, Bhattacharjee SB. Induction of repair functions by hydrogen peroxide in Chinese hamster cells. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med*. 1988;53:935-942.
29. Bose K, Bhaumik G, Ghosh R. Chronic low dose exposure to hydrogen peroxide changes sensitivity of V79 cells to different damaging agents. *Indian J Exp Biol*. 2003;41: 832-836.
30. 최용선, 김소영, 최성미, 장현선, 김병욱. H2O2와 ascorbic acid가 사람 치주인대섬유모세포의 TIMP-2, Type 1 collagen 및 PDLs22 발현에 끼치는 효과. *대한치주과학회지*. 2007;4:655-669.
31. Park JC, Kim YB, Kim HJ, Jang HS, Kim HX, Kim BO. et. al. Isolation and characterization of cultured human periodontal ligament fibroblast-specific cDNAs. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;282:1145-1153.
32. 김병욱, 조일준, 박주철, 국중기, 김홍중, 장현선. 분자생물학을 이용하여 복제노화된 사람 치주인대세포의 세포학적 연구. *대한치주과학회지*. 2005;3:623-634.
33. Kubota T, Itagaki M, Hoshino C, Nagata M, Morozumi T, Kobayashi T. et. al. Altered gene expression levels of ma-

- trix metalloproteinases and their inhibitors in periodontitis-affected gingival tissue. *J Periodontol.* 2008;79:166-173.
34. Dahan M, Nawrocki B, Elkaïm R, Soell M, Bolcato-Bellemin AL, Birembaut P. et. al. Expression of matrix metalloproteinases in healthy and diseased human gingiva. *J Clin Periodontol.* 2001;28:128-136.
35. Hay ED. *Cell Biology of extracellular matrix.* 2nd ed. Plenum Press, New York and London. 1991. pp 21, 112.
36. Khorramizadeh MR, Tredget EE, Telasky C, Shen Q, Ghahary A. Aging differentially modulates the expression of collagen and collagenase in dermal fibroblasts. *Mol Cell Biochem.* 1999;194:99-108.
37. Kapila YL, Lancero H, Johnson PW. The response of periodontal ligament cells to fibronectin. *J Peiodontol.* 1998;69(9):1008-1019.
38. Abiko Y, Shimizu N, Yamaguchi M, Suzuki H, Takiguchi H. Effect of aging on functional changes of periodontal tissue cells. *Ann Peirodontol.* 1998;3:350-369.
39. Pitts G, Pianotti R, Feary TW, McGuinness J, Masurat T. The in vivo effects of an antiseptic mouthwash on odor-producing microorganism. *J Dent Res.* 1981;60: 1891-1896.

