

Regulation of Inflammatory Response in Periodontal Ligament Cells by Transglutaminase 2

Sun Young Lee^{1,2}, Cheol Hun Jang¹ and Je-Hwang Ryu^{1,2,*}

¹Research Center for Biomineralization Disorders, School of Dentistry, Chonnam National University, Gwangju, Republic of Korea

²Department of Pharmacology and Dental Therapeutics, School of Dentistry, Chonnam National University, Gwangju, Republic of Korea

(received November 15, 2017; revised December 04, 2017; accepted December 05, 2017)

Transglutaminase2 (TGM2) is a multi-functional calcium dependent enzyme that affects angiogenesis, apoptosis, differentiation, attachment, and changes in the extracellular matrix. However, its function in periodontal tissue has not yet been studied. The aim of this study was to investigate the association of the TGM2 expression and the modulation of inflammatory mediators in inflamed periodontal ligament (PDL) cells induced by pro-inflammatory cytokines such as Interleukin-1 β and the Tumor necrosis factor- α . The expression of TGM2 was increased in the inflamed periodontal tissue and PDL cells. Over-expressed TGM2 in the PDL cells increased expression of MMP1, MMP3, IL-6, CXCL8, and PTGS2. Conversely, inhibition of TGM2 activity using LDN27219, a TGM2 inhibitor, resulted in decreased expression of MMP1, MMP3, IL-6, and CXCL8. The mRNA expression was confirmed by RT-PCR and quantified by qRT-PCR. Protein levels were also confirmed by immunofluorescence staining. These results suggest that TGM2 plays an important role in the regulation of

inflammatory mediators which exacerbate tissue damage in inflamed periodontal tissue.

Key words: Periodontal ligament cells, Transglutaminase 2, Inflammation, Periodontitis

서론

치주염은 구강 내 치주병인균의 독소에 의해 나타나게 되는데 염증이 진행되는 동안 여러 염증인자 및 면역반응인자들이 조직 내 쌓이게 되고 결과적으로 지지조직 파괴와 치아상실을 야기한다[1-3]. 치주인대섬유모세포인 Periodontal ligament (PDL)세포는 치아와 치조골을 연결하는 조직에 많이 존재하며 치주인대와 백악질, 치조골의 생산과 유지, 개조 등의 기능을 하는 세포로써 치조골과 치아를 연결하는 치주인대의 형성과 유지에 중요한 역할을 한다[4]. 치주염이 발생하면 Interleukin 1 beta (IL-1 β), Tumor necrosis factor alpha (TNF- α), IL-12, IL-23, IL-32와 같은 일차면역 반응과 염증반응을 활성화 시키는 염증성 전구 cytokine이 증가하고, 호중구의 화학주성 역할을 하는 Chemokine (C-X-C motif) ligand 8 (CXCL8)이 증가한다[5-8]. 그리고 기질분해효소인 Matrix metalloproteinase 1 (MMP1), MMP3, MMP8, MMP11 등이 증가하는데 이는 세포외기질(Extracellular matrix, ECM)의 리모델링과 분해, turnover에 중요한 역할을 한다[9]. 또한 염증이 유발되었을 때 염증매개 역할을 하는 Cyclooxygenase 2 (COX2 또는 PTGS2) 등의 인자들도 증가한다[10]. 이러

*Correspondence to: Je-Hwang Ryu, Department of Oral Pharmacology, School of Dentistry, Chonnam National University, 77 Yongbong-ro, Buk-gu, Gwangju 61186, Korea
Tel: +82-62-530-4863, Fax: +82-62-530-4807
E-mail: jesryu@jnu.ac.kr
ORCID : 0000-0002-8708-8943

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

한 치주의 염증 진행과정에서 다양한 염증매개 유전자들의 작용 억제는 치주염의 진행을 막을 수 있고 결과적으로 치주염의 치료 및 예방에 적용할 수 있을 것이다.

Transglutaminase (TGM)는 혈관생성, 세포사멸, 분화, 부착, 세포외 기질의 변화에 영향을 주며 세포의 안정화와 기질 단백질의 중합에 중요한 기능을 하는 칼슘-의존적 효소이다[11]. 세포 내 칼슘농도는 일반적인 상황에서는 낮게 유지되나 염증과 같은 특별한 상황에서는 높게 유지되는데, 이때 TGM이 작용하게 된다. TGM은 지혈과정에서 섬유소 응고 안정화와 정액 응고, 각질화에서 각화된 외피 형성 및 세포외기질의 안정화에 중요한 역할을 한다. 구조적 역할을 수행하는 것 외에도 세포기질과 상호작용 할 뿐만 아니라 성장인자, IL-2와 같은 신호 분자의 생물학적 활성을 조절함으로써 세포에 중대한 영향을 미치는 것으로 나타났다[12,13]. 또한 TGM은 세포외기질의 안정화와 세포부착과 관련된 단백질의 가교역할에 의해서 세포의 모양을 결정하는데 기여하는 것으로 알려져 있다[14]. 현재까지 9종류의 TGM이 알려져 있는데 Fibrin stabilizing factor로도 알려진 Factor XIII은 혈액 응고와 상처치유에서 기능을 하고, Band 4.2는 Erythrocyte에서 구조적인 단백질의 기능을 한다. TGM1, 3은 표면 상피조직에서 각화된 외피 형성에 작용한다고 알려져 있고, TGM4는 정액응고와 관련된 역할을 하며, TGM5는 상피분화에 영향을 주는 것으로 보고되었다. 그리고 TGM6, 7은 아직 기능적인 역할이 밝혀지지 않았다[15].

Tissue transglutaminase라고도 알려진 TGM2는 세포 부착, 세포외기질의 변경, 세포예정사, 상처치유, 종양성장, 뼈광화 과정에 영향을 미친다[16]. 최근 연구들에서 TGM2는 임플란트 주변의 치은 성장에 영향을 준다는 보고가 있다[17]. 또한 PDL 세포에서 TGM2 발현의 증가는 Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL)/Osteoprotegerin (OPG) 경로와 관련이 있다는 보고가 있다[18]. 하지만 PDL 세포에서 염증이 유발되었을 때 TGM2의 역할에 대한 연구는 아직 미미하다.

본 연구에서는 PDL 세포에 pro-inflammatory cytokine인 IL-1 β 및 TNF- α 를 이용하여 염증반응을 유도하고 PDL 세포에서 생성되는 염증매개인자들의 발현과 TGM2의 연관성 및 조절 효과를 알아보려고 하였다.

재료 및 방법

Periodontal ligament (PDL) 세포의 배양 및 처리

실험에 사용된 PDL 세포는 전남대학교 치과병원에 내

원한 환자 중 치주질환이 없는 건강한 환자(5명)와 치주염을 앓고 있는 환자(5명)의 동의를 얻은 후 발치된 치아 샘플에서 얻었다. 본 연구는 전남대학교 치과병원의 기관감사위원회로부터 승인받았다. 발치된 치아의 치근 중간 부위에 붙어 있는 PDL 조직을 채취하여 3 mg/ml의 Type I collagenase (Roche)와 2.4 U의 dispase II (Roche, Mannheim, Germany)를 처리하여 세포를 분리하였다. 분리된 PDL 세포는 10% Fetal bovine serum과 1% Penicillin/Streptomycine이 포함된 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Gibco) 배지에서 배양하였고 배양 3일 간격으로 배양세포 표면을 PBS (phosphate buffered saline)로 씻어준 후 trypsin-EDTA를 넣어 세포를 떼어내어 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지에 부유시킨 다음 100mm dish에 옮겨 CO₂배양기 (37°C)에서 배양하여 passage 6-10 사이의 세포를 실험에 이용하였다. 배양된 세포에 IL-1 β (Genscript) 및 TNF α (Millipore)를 24시간 처리하여 염증반응을 유도하였고, TGM2 과발현 실험을 위해 pcDNA3.0 (Invitrogen)에 human TGM2를 cloning한 vector를 Lipofectamine 2000 (Invitrogen)을 이용하여 transfection한 뒤 36시간 배양하였다. TGM2 발현 저해에 따른 유전자의 활성을 관찰하기 위해 TNF α 가 처리된 세포에 TGM2 inhibitor인 LDN27219 (Tocris Bioscience)를 처리하여 24시간동안 배양하였다.

RNA isolation, Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 및 quantitative real time-PCR (qRT-PCR)

치근으로부터 채취된 PDL 조직을 실험 직전까지 액체 질소를 이용하여 동결시켜두었고 막자사발을 이용하여 조직을 잘 갈아주어 TRI reagent를 이용하여 total RNA를 추출하였고 또한 배양된 PDL 세포도 TRI reagent를 이용하여 total RNA를 분리하였다. 조직 및 세포에서 분리한 1 μ g의 RNA를 주형으로 cDNA를 합성한 뒤, RT-PCR을 수행하여 유전자 발현을 확인하였고 각 cDNA 샘플은 duplication하여 qRT-PCR을 통해 정량화하였다. 본 실험에 사용된 primer 정보는 Table 1과 같다.

면역형광염색 (Immunofluorescence)

PDL 세포 내 단백질 발현을 관찰하기 위해 면역형광염색법을 이용하였다. Glass coverslips 위에 세포를 배양한 뒤 3.5% Paraformaldehyde (PFA)를 이용하여 세포를 고정하였고 PBS를 이용하여 세척하였다. 0.1% Triton X-100을 10분간 처리한 뒤 PBS로 용해된 1% Bovine serum albumin으로 1시간 동안 반응시켰다. 1차 항체와 1시간 반응 시키고 alexa-488이나 alexa-594가 표지된 2차 항체 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)와 1시간 반응하였고 DAPI를 이용하여

Table 1. PCR primer sequences

Gene	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
<i>TGM2</i>	CTTTATCTACCAGGGCTCGG	CGAGTTGTAGTTGGTCACGA
<i>MMP1</i>	GGAGGGGATGCTCATTTTGATG	TAGGGAAGCCAAAGGAGCTGT
<i>MMP3</i>	AATCCTACTGTTGCTGTGCGTG	CAGAGTGTCCGAGTCCAGCCTC
<i>IL-6</i>	AGGCTGGACTGCAGAACTCCTTAAAG	CCCTGAGAAAGGAGACATGTAACAAGAG
<i>CXCL8</i>	CTCTCTGGCAGCCTTCCTGATTC	AAACTTCTCCACAACCCTCTGCAC
<i>PTGS2</i>	AATCCTTGCTGTTCCACCCATG	AAGGGAGTCGGGCAATCATCAGG
<i>GAPDH</i>	GGTGAAGGTCGGAGTCAACG	CAAATGAGCCCCAGCCTTCT

핵을 염색한 뒤 형광현미경(Carl Zeiss, Cambridge, CA, USA)을 이용하여 이미지를 관찰하였다.

자료 분석 및 통계처리

모든 실험 결과는 mean \pm SEM으로 나타내었고 대조군과 각 실험군의 평균 차이는 Student's t-test로 분석한 뒤 p 값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의하다고 판단하였다.

결 과

염증이 유발된 치주조직에서 TGM2의 발현 양상

염증성 환경에서 치주세포 내 TGM2의 유전자 발현 양상을 알아보기 위해 치주염을 앓고 있는 환자의 치주조직과 건강한 치주조직에서 RNA를 추출하여 비교하였다. 그 결과 잘 알려진 대로 기질분해효소 MMP1, MMP3, 염증성 cytokine IL-6, chemokine CXCL8, 그리고 대표적인

염증성 인자 PTGS2의 유전자 발현이 건강한 치주조직보다 증가함을 RT-PCR로 확인하였고 qRT-PCR을 통해 정량화 하였다. 이렇게 검증된 조직에서 TGM2의 발현도 5 배 이상 증가되어 있음을 확인하였다(Fig. 1A, 1B). TGM2와 치주염의 직접적 연관성이 확인된 바, 세포 수준의 검증을 위해 PDL세포를 대표적인 염증성 cytokine인 IL-1 β (0, 1, 2.5, 5 ng/ml)와 TNF- α (0, 25, 50, 100 ng/ml)로 각각 처리하고 24시간 배양하여 확인해 본 결과 환자 조직과 마찬가지로 MMP1, MMP3, IL-6, CXCL8, PTGS2의 발현이 IL-1 β 및 TNF- α 의 농도 의존적으로 증가하였고 TGM2의 발현도 증가됨을 확인하였다(Fig. 2A, 2C). 각 유전자의 양적인 발현차이를 비교하고자 qRT-PCR을 수행한 결과 역시 IL-1 β 및 TNF- α 를 처리한 모든 농도에서 유전자들의 발현이 무처리 대조군과 비교하여 통계적으로 유의하게 증가함을 확인하였다(Fig. 2B, 2D). 단백질 수준에서 확인하기 위해 PDL세포에 IL-1 β (5 ng/ml), TNF- α (100 ng/ml)를 처리하여 24시간 배양한 후, TGM2의 단백질 발현을 면역형광염색법으로 확인하였다. 그 결과 염증성 환경을 유도한 PDL 세포의 세포질에서 염증성 cytokine인 IL-6의 발현이 증가하였고 동일 위치에서 TGM2 발현의 증가가 관찰되었다(Fig 2E). 결론적으로 치주염환자의 염증이 유발된 치주조직 및 염증성 환경이 유도된 PDL 세포에서 TGM2의 발현이 증가함을 통해 TGM2가 염증과정을 조절할 가능성을 유추할 수 있었다.

TGM2가 과발현된 PDL세포에서 염증매개인자들의 발현 변화

염증이 유도된 치주조직 및 PDL세포에서 TGM2가 증가하는 것으로 관찰되었기 때문에 PDL세포 내 TGM2의 과발현이 염증성 인자들의 발현에 영향을 미치는지 알아보고자 하였다. TGM2 유전자(1, 2 μ g)를 PDL 세포 내로 transfection하여 36시간 배양 후 유전자들의 발현 양상을 확인한 결과 MMP1, MMP3, IL-6, CXCL8, PTGS2의 발현이 대조군과 비교하여 증가됨을 RT-PCR을 통해 확인했

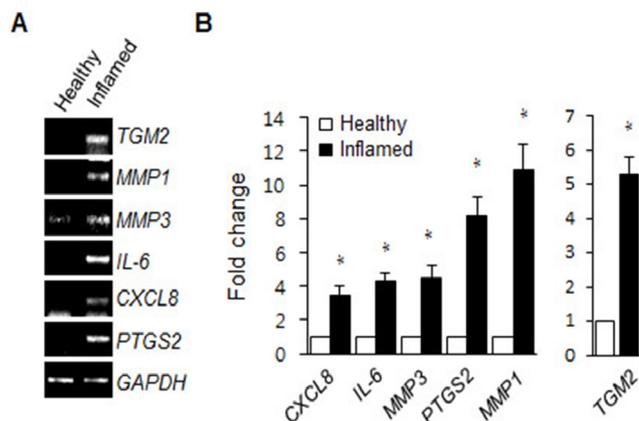


Fig. 1. Total RNA was isolated from whole periodontal tissues of healthy (non-inflamed) or chronic periodontitis (inflamed) patients. Transcriptional levels of catabolic and inflammatory genes were determined by RT-PCR (A) and qRT-PCR (B). n=5, Values are presented as mean \pm SEM (*p < 0.001).

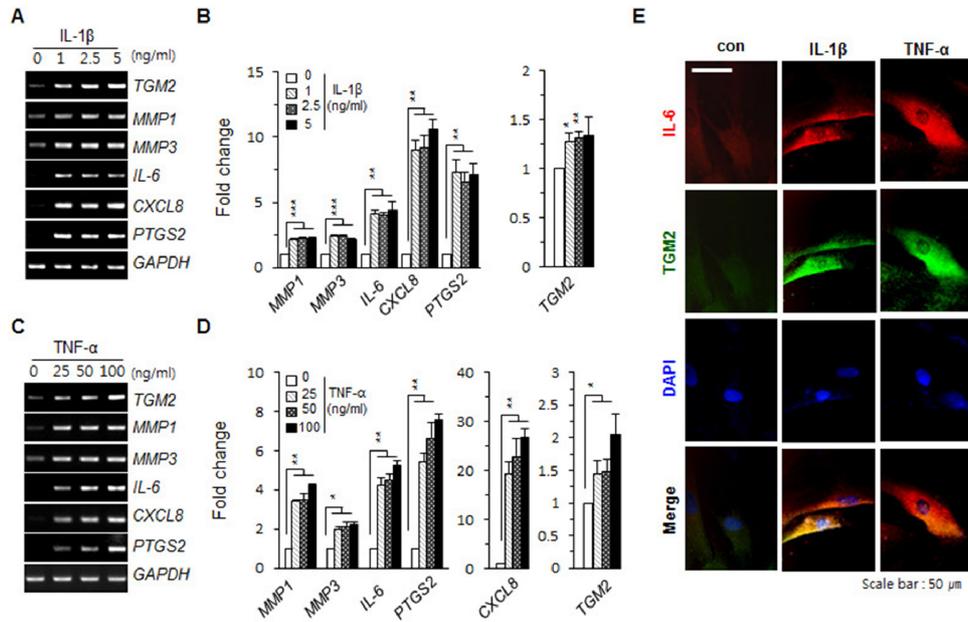


Fig. 2. PDL cells were primary cultured from human periodontal tissues. PDL cells were treated with the indicated doses of IL-1 β (A and B) or TNF- α (C and D) for 24 h. Transcript levels of the indicated genes were determined by RT-PCR (A and C) and quantified by qRT-PCR (B and D). Primary cultured PDL cells were treated with 5 ng/ml IL-1 β or 100 ng/ml TNF- α for 24 h and stained with anti-IL-6 and anti-TGM2 antibodies followed by Alexa-594 and Alexa-488, respectively (E). Nuclei were counter stained with DAPI. n=5, Values are presented as mean \pm SEM (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001). Scale bar : 50 μ m.

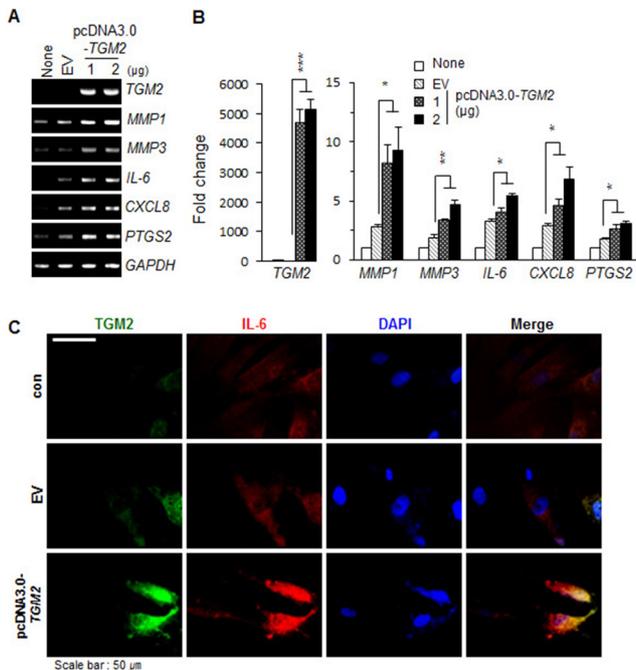


Fig. 3. PDL cells were transfected with pcDNA3.0-TGM2 vector and empty vector (EV) as a control. Transcript levels of the indicated genes were determined by RT-PCR (A) and quantified by qRT-PCR (B). Immunofluorescence microscopy results of TGM2 and IL-6 in PDL cells transfected with empty vector or pcDNA3.0-TGM2 vector (C). n=5, Values are presented as mean \pm SEM (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001). Scale bar : 50 μ m.

다(Fig. 3A). 그리고 염증성매개 인자들의 발현을 정량적으로 확인한 결과 empty vector 대조군과 비교하여 TGM2가 과발현 된 PDL 세포에서 발현이 유의적으로 증가됨을 확인할 수 있었다(Fig. 3B). 면역형광염색을 통해 단백질 발현양상을 확인한 결과 TGM2를 과발현한 PDL 세포의 세포질에서 TGM2 단백질 발현이 증가하였고 동일한 위치에서 IL-6의 단백질 발현이 증가하였다(Fig. 3C). 이러한 결과는 TGM2가 염증이 유발된 치주조직에서 조직손상을 심화시키는 염증매개인자들 조절에 중요한 역할을 함을 보여준다.

TGM2의 기능억제 시 PDL세포 내 염증매개인자들의 발현 변화

PDL세포에서 염증인자들의 조절에 대한 TGM2의 역할을 좀 더 검증하기 위해 TGM2의 활성을 억제하였을 때 염증매개인자들의 발현양상을 살펴보았다. PDL세포에 TNF- α (100 ng/ml)와 TGM2 inhibitor인 LDN27219 (200 μ M)을 동시 처리하여 유전자의 발현 변화를 확인하였다. LDN27219는 가역적으로 TGM2의 GTPase site에 결합함으로써 TGM2의 기능을 억제한다. PTGS2를 제외하고 TNF- α 처리에 의해 증가되었던 MMP1, MMP3, IL-6, CXCL8의 발현이 LDN27219를 함께 처리했을 때 감소함을 RT-PCR 및 qRT-PCR을 통해 확인하였다(Fig. 4A, 4B). 이는 염증성 환경에서 TGM2의 활성 억제를 통해 염증매개인자들의 발현을 조절할 수 있음을 시사한다.

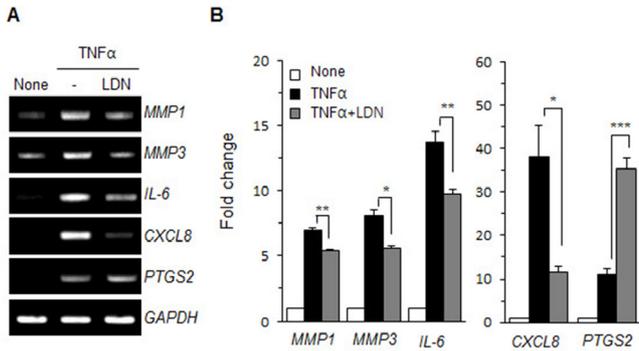


Fig. 4. Cultured PDL cells were treated with TNF- α (100 ng/ml) in a presence or absence of TGM2 inhibitor (LDN27219). The expression of indicated genes was determined by RT-PCR (A) or qRT-PCR (B). n=5, Values are presented as mean \pm SEM (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001).

고찰

치주염이 진행되어 염증상황에 놓이면 대표적인 면역 세포인 호중구, 대식세포, 비만세포 등에서 cytokine들과 같은 염증성인자들이 분비되어 염증환경을 심화시킨다 [19, 20]. 치주를 둘러싸고 있는 PDL세포 역시 cytokine 및 chemokine의 생성을 촉진시켜 치주조직의 염증 반응에 깊게 관여하기 때문에 PDL세포에서 생성되는 염증성인자의 조절은 치주염 치료에 중요한 부분으로 다룰 수 있다 [21]. TGM2는 혈관생성, 세포사멸, 분화, 부착, 세포 외 기질의 변화에 영향을 미치며 세포의 안정화와 기질 단백질의 중합에 중요한 기능을 하는 효소이다. 치주조직과 TGM2와 관련된 연구들에서 다양한 형태의 TGM이 사람의 치은조직(gingival tissue)에서 발현이 나타나는데 Factor XIII은 건강한 조직이나 손상된 조직에서 유사하게 발현되며 TGM2는 만성 치주염에서 약간 증가함을 보이고 TGM1과 TGM3은 현저히 감소한다는 보고가 있다[19]. 그리고 임플란트 시술 후 세포외기질에서 TGM2가 증가되어 나타나는데, 이것은 임플란트 주변의 치은 성장의 발달에 유의한 영향을 준다고 한다[21].

본 연구에서는 국소적인 요인에 의한 치주염에 초점을 맞추어서 염증성 자극에 따라 TGM2가 염증매개인자들의 발현에 어떤 영향을 미치는지 그 상관관계를 규명하고자 하였다. 그 결과 치주염을 앓고 있는 환자의 치주조직에서 TGM2의 발현이 증가하였고 in vitro 실험에서도 PDL 세포가 염증성 환경에 놓이자 TGM2의 발현이 증가하였다. 이는 TGM2의 상향조절이 RANKL/OPG 경로와 관계가 있다는 연구에서 만성 치주염 환자의 치주조직에서 TGM2의 발현이 증가되었다는 결과와 동일하게 나타났다

[18]. TGM2가 직접적으로 염증매개인자들의 발현을 조절하는지 알아보기 위해 TGM2의 발현 및 활성을 조절하였더니 TGM2가 과발현 되었을 때는 염증매개인자들의 발현이 함께 증가되었으며 TGM2 inhibitor인 LDN27219를 처리하여 활성을 억제하자 염증성 환경에 의해 증가되었던 IL-6, CXCL8, MMP1, MMP3의 염증매개인자들의 부분적인 발현 감소를 확인하였다. 이는 TNF α 에 의해 여러 catabolic factor들이 작용하여 염증매개인자들을 조절하는데 그 중 하나로 TGM2가 역할을 하는 것으로 사료되며 그로인해 TNF α 에 의해 증가된 염증매개인자들의 발현이 LDN27219의 처리로 부분적 발현 감소가 나타난다고 유추해 볼 수 있으며 LDN27219에 의해 오히려 증가된 PTGS2의 발현은 TNF α 에 의한 PTGS2의 발현 증가에 TGM2가 역할을 하지 않는 것으로 볼 수 있다. PTGS2를 제외한 다른 인자들의 결과들을 통해 TGM2가 치주조직의 염증매개인자들의 조절을 통해 염증 반응에 깊게 관여하고 있음을 유추해 볼 수 있다.

실제 치주염은 구강 내 세균에 의해 촉발되는 염증이므로[22] *Porphyromonas gingivalis*와 *Escherichia coli*의 Lipopolysaccharide (LPS)를 처리하여 염증성 환경을 재현하였을 때 TGM2의 발현이 증가되는지 추가적으로 확인해볼 필요성이 있으며 또한 구강 내 염증 발생 시 PDL세포 외에 백악질, 치은결합조직, 치조골 등도 영향을 받는데 근접한 다른 조직의 염증에도 어떤 영향을 미치는지에 대한 후속 연구도 뒷받침 되어야 할 것이다.

현재 치주염 치료는 스케일링이나 치근활택술 같은 비외과적 방법과 치은절제술 같은 외과적 방법에 의해서 행해진다. 하지만 치주염이 많이 진행되어 다량의 골소실이 나타날 때 파괴된 치주조직은 재생능력에 한계가 있기 때문에 치료 후에도 발병 전 상태로 원상복구가 불가능하다. 그러므로 건강한 골조직이 많이 남아있는 상태에서 치료해야 예후가 좋다. TGM2가 초기 염증 반응에서 표적 치료법으로 사용될 시 이러한 일반적인 치주염 치료의 한계를 극복하는데 중요한 의미를 갖는다고 볼 수 있다. 본 연구에서는 TGM2가 IL-6, CXCL8, MMP1, MMP3과 같은 염증매개인자들을 조절함을 확인함으로써 치주염과의 연관성을 실험적으로 확인하였으며 이를 통해 향후 치주염 치료에 중요한 조절인자로서의 가능성을 보였다.

감사의 글

이 논문은 2017년도 정부(미래창조과학부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(2011-0030121).

Conflict of interest

We declare that there are no conflicts of interest relevant to this study.

References

1. Román-Malo L, Bullon P. Influence of the Periodontal Disease, the Most Prevalent Inflammatory Event, in Peroxisome Proliferator-Activated Receptors Linking Nutrition and Energy Metabolism. *Int J Mol Sci.* 2017;18(7). pii: E1438. doi: 10.3390/ijms18071438.
2. Cochran DL. Inflammation and bone loss in periodontal disease. *J Periodontol.* 2008;79(8 Suppl):1569-76. doi: 10.1902/jop.2008.080233.
3. Silva N, Abusleme L, Bravo D, Dutzan N, Garcia-Sesnich J, Vernal R, Hernández M, Gamonal J. Host response mechanisms in periodontal diseases. *J Appl Oral Sci.* 2015;23(3):329-55. doi: 10.1590/1678-775720140259.
4. Beertsen W, McCulloch CA, Sodek J. The periodontal ligament: a unique, multifunctional connective tissue. *Periodontol 2000.* 1997;13:20-40.
5. Kim KK. The role of immune response in periodontal disease. *Immune network.* 2003;3(4):261-267.
6. Scheres N, Laine ML, Sipos PM, Bosch-Tijhof CJ, Crielaard W, de Vries TJ, Everts V. Periodontal ligament and gingival fibroblasts from periodontitis patients are more active in interaction with *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontol Res.* 2011;46(4):407-16. doi: 10.1111/j.1600-0765.2011.01353.x.
7. Dosseva-Panova VT, Popova CL, Panov VE. Subgingival microbial profile and production of proinflammatory cytokines in chronic periodontitis. *Folia Med (Plovdiv).* 2014;56(3):152-60.
8. Graves D. Cytokines that promote periodontal tissue destruction. *J Periodontol.* 2008;79(8 Suppl):1585-91. doi: 10.1902/jop.2008.080183.
9. Sonnenschein SK, Meyle J. Local inflammatory reactions in patients with diabetes and periodontitis. *Periodontol 2000.* 2015;69(1):221-54. doi: 10.1111/prd.12089.
10. Ji JD, Lee YH, Song GG. Prostaglandin E2 (PGE2): Roles in immune responses and inflammation. *J Rheum Dis.* 2004;11:307-316.
11. Stephens P, Grenard P, Aeschlimann P, Langley M, Blain E, Errington R, Kipling D, Thomas D, Aeschlimann D. Crosslinking and G-protein functions of transglutaminase 2 contribute differentially to fibroblast wound healing responses. *J Cell Sci.* 2004;117(Pt 15):3389-403.
12. Grenard P, Bates MK, Aeschlimann D. Evolution of transglutaminase genes: identification of a transglutaminase gene cluster on human chromosome 15q15. Structure of the gene encoding transglutaminase X and a novel gene family member, transglutaminase Z. *J Biol Chem.* 2001;276(35):33066-78.
13. Belkin AM. Extracellular TG2: emerging functions and regulation. *FEBS J.* 2011;278(24):4704-16. doi: 10.1111/j.1742-4658.2011.08346.x.
14. Eckert RL, Kaartinen M, Nurminskaya M, Belkin AM, Colak G, Johnson GV, Mehta K. Transglutaminase regulation of cell function. *Physiol Rev.* 2014;94(2):383-417. doi: 10.1152/physrev.00019.
15. Eckert RL, Sturniolo MT, Broome AM, Ruse M, Rorke EA. Transglutaminase function in epidermis. *J Invest Dermatol.* 2005;124(3):481-92.
16. Heath DJ, Downes S, Verderio E, Griffin M. Characterization of tissue transglutaminase in human osteoblast-like cells. *J Bone Miner Res.* 2001;16(8):1477-85.
17. Ceruti P, Asioli S, Mussano F, Righi A, Baldi I, Schierano G, Cassoni P, Carossa S. Transglutaminase 2 May Be Associated with Peri-implant Gingival Overgrowth: Preliminary Assessments. *Int J Prosthodont.* 2015;28(6):615-20. doi: 10.11607/ijp.4280.
18. Matarese G, Currò M, Isola G, Caccamo D, Vecchio M, Giunta ML, Ramaglia L, Cordasco G, Williams RC, Ientile R. Transglutaminase 2 up-regulation is associated with RANKL/OPG pathway in cultured HPDL cells and THP-1-differentiated macrophages. *Amino Acids.* 2015;47(11):2447-55. doi: 10.1007/s00726-015-2039-5.
19. Currò M, Matarese G, Isola G, Caccamo D, Ventura VP, Cornelius C, Lentini M, Cordasco G, Ientile R. Differential expression of transglutaminase genes in patients with chronic periodontitis. *Oral Dis.* 2014;20(6):616-23. doi: 10.1111/odi.12180.
20. Ranney RR. Classification of periodontal diseases. *Periodontol 2000.* 1993;2:13-25.
21. Jönsson D, Nebel D, Bratthall G, Nilsson BO. The human periodontal ligament cell: a fibroblast-like cell acting as an immune cell. *J Periodontol Res.* 2011;46(2):153-7. doi: 10.1111/j.1600-0765.2010.01331.x.
22. Hao C, Wu B, Hou Z, Xie Q, Liao T, Wang T, Ma D. Asiatic acid inhibits LPS-induced inflammatory response in human gingival fibroblasts. *Int Immunopharmacol.* 2017;50:313-318. doi: 10.1016/j.intimp.2017.07.005.