

# *Prevotella intermedia*의 세균내독소가 치은섬유아세포와 치주인대세포에서의 matrix metalloproteinase 및 tissue inhibitor of metalloproteinase의 발현에 미치는 영향

김성조<sup>1</sup> · 최은영<sup>2</sup> · 최인순<sup>2</sup> · 이주연<sup>1</sup> · 최점일<sup>1</sup> · 김종관<sup>3</sup>

<sup>1</sup>부산대학교 치과대학 치주과학교실

<sup>2</sup>신라대학교 자연대학 생명과학과

<sup>3</sup>연세대학교 치과대학 치주과학교실

## I. 서론

치주질환은 부착소실과 치조골 파괴를 유발하고 치아의 상실을 초래할 수도 있는 만성 염증성 질환이다. 치주질환의 일차적인 원인요소는 치은열구 내에 존재하는 몇몇 그람음성 혐기성 세균이다. 치주질환 병인균주는 단백질 분해효소를 직접 분비하여 숙주세포의 개입없이 치주조직의 파괴를 유발하거나, 각종 독소, 효소, 그리고 세균내독소 등 병인균주의 산물들이 숙주세포를 활성화시켜 arachidonic acid 대사산물, 각종 싸이토카인, 그리고 단백질 분해효소 등의 생물학적 활성물질을 생성하도록 함으로써 간접적으로 조직파괴를 유발할 수 있다<sup>1,2)</sup>.

Matrix metalloproteinase (MMP)는 숙주에서 유래하는 일련의 단백질 분해효소로서, 간질성 교원질과 기저막 교원질 뿐 만 아니라, fibronectin, laminin, proteoglycan, 그리고 elastin 등의 세포외 기질 성분의 대사와 관련이 있다<sup>3)</sup>. 25종 이상의 MMP가 확인되었으며, 기질 특이성과 구조의 상동성에 의거하여 interstitial collagenase (MMP-1, MMP-8, MMP-13,

MMP-18), gelatinase (MMP-2, MMP-9), stromelysin (MMP-3, MMP-10, MMP-11), matrilysin (MMP-7), metalloelastase (MMP-12), 그리고 membrane-type MMP (MT-MMP) (MMP-14 또는 MT1-MMP, MMP-15, MMP-16, MMP-17) 등의 6개의 하위군으로 분류된다<sup>4-6)</sup>. MT-MMP를 제외한 대부분의 MMP는 비활성 proenzyme (zymogen) 상태로 분비되며, plasmin, plasma kallikrein, trypsin, neutrophil elastase, 그리고 활성 MMP 등 몇몇 단백질 분해효소들에 의해 propeptide가 분열함으로써 조직 내에서 활성화 된다<sup>7,8)</sup>. MMP는 zinc와 calcium 의존성을 가지며, zinc와 calcium 결합 catalytic domain을 가지고 있다.

MMP는 생리적인 개조, 창상 치유, 그리고 치아 발생 등에 관여한다<sup>2,3,9-11)</sup>. 또한, MMP는 치주염, 류마티스관절염, 그리고 골관절염 등의 다양한 염증성 질환에 있어 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다<sup>2-14)</sup>. 섬유아세포, 상피세포, 대식세포, 다형핵 백혈구, 그리고 혈관내피세포 등 치주조직의 각종 세포에 의해 MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-8 그리고 MMP-9 등의 MMP가 발현되고 분비될 수 있으며,

\*이 연구는 한국 보건복지부 (03-PJ1-PG1-CH08-0001) 지원으로 수행되었음.

교신저자: 김성조, 부산광역시 서구 아미동 1-10 부산대학교 치과대학 치주과학교실, 우편번호: 602-739

MMP의 발현은 치주질환과 연관이 있음이 보고된 바 있다<sup>15,20</sup>.

*Prevotella intermedia*는 치주질환 주요 병인균주 중의 하나로 성인성 치주염 환자의 치주낭 내에서 우세하게 존재한다<sup>21-23</sup>. 또한, *P. intermedia*는 급성 괴사성 궤양성 치은염과 임신성 치은염과도 연관이 있다<sup>24,25</sup>. 세균내독소 (lipopolysaccharide; LPS)는 *P. intermedia*와 같은 그람음성 세균의 세포외막의 주요 성분 중의 하나이다. LPS는 대식세포 등의 숙주세포를 자극하여 tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-1 $\beta$ , interleukin-6, interleukin-8, 그리고 nitric oxide 등의 염증매개 물질의 생성과 분비를 유도한다<sup>26</sup>. 본 연구는 치주질환 주요 병인균주 중의 하나인 *P. intermedia*의 LPS가 치은섬유아세포와 치주인대세포에서의 MMP와 tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)의 발현에 미치는 영향을 규명하고자 수행되었다.

## II. 연구재료 및 방법

### 1. 균주 및 배양조건

*P. intermedia* ATCC 25611을 통법에 따라 1 $\mu$ g/ml menadione과 5 $\mu$ g/ml hemin을 포함하고 있는 enriched trypticase soy agar 또는 GAM broth (Nissui, Tokyo, Japan)를 이용하여 37 $^{\circ}$ C의 혐기성 조건 (5% H<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>/90% N<sub>2</sub>)에서 배양하였다. 액체 배지에서 24시간 배양한 early stationary phase의 균주를 4 $^{\circ}$ C에서 12,000 x g로 20분 원심분리하여 회수하고, phosphate buffered saline (PBS, pH 7.2)으로 3회 세척한 후 동결건조 하였다.

### 2. LPS의 분리

Westphal과 Jann<sup>27</sup>의 hot phenol-water 방법의 거하여 동결건조한 균주로부터 LPS를 추출하였다. 간략히 소개하면, 균주를 소독된 증류수에 녹인 후 90% phenol을 가하고, 68 $^{\circ}$ C에서 20분간 2회 추출하여 냉각한 후, 7,000 x g에서 15분간 원심분리하여

aqueous phase를 수집하고, 4 $^{\circ}$ C에서 증류수로 철저히 투석하였다. 투석 후 105,000 x g에서 3시간 원심분리하여 동결건조한 LPS를 0.1 M Tris (pH 8.0)에 녹인 DNase (25  $\mu$ g/ml; Sigma Chemical, St. Louis, Mo, USA)와 RNase (25  $\mu$ g/ml; Sigma)로 37 $^{\circ}$ C에서 밤새 배양하여 핵산을 제거하였으며, proteinase K (50  $\mu$ g/ml; Sigma)를 첨가하여 60 $^{\circ}$ C에서 1시간 가열하고 37 $^{\circ}$ C에서 밤새 배양하여 오염된 단백질을 제거하였다. 순수분리한 LPS의 단백질 함량은 Markwell 등<sup>28</sup>의 방법에 의해 측정된 바에 의하면 0.1% 미만이었다. 또한, sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel에 과량의 분리한 LPS를 가하여 전기영동한 후 Coomassie blue로 염색한 결과 단백질 밴드는 보이지 않았다 (자료제시 않함).

### 3. 치은섬유아세포 및 치주인대세포의 배양

건강한 치은조직과 치근 중앙부의 치주인대를 고정처치를 위해 발거한 치아로부터 환자 동의 하에 각각 채취하였다. 채취한 조직을 잘게 자른 후, 100 mm 직경의 tissue culture dish (Falcon; Becton Dickinson Labware, Lincoln Park, NJ)에서 10% fetal bovine serum (FBS; Flow Laboratories), 100 U/ml penicillin/streptomycin (Gibco) 그리고 2 mM glutamine (Sigma)을 포함하는 alpha minimal essential medium ( $\alpha$ -MEM; Flow Laboratories, McLean, VA)으로 5% CO<sub>2</sub>하에 37 $^{\circ}$ C에서 배양하였다. Confluent cell monolayer가 형성될 때까지 3일에 1회씩 10-15 일 간 배지를 교환하였다. 0.025% trypsin을 이용하여 3-4회 subculture 한 후, 섬유아세포와 치주인대세포의 특징적 형태를 보이는 5-12 subculture level의 confluent monolayer를 실험에 활용하였다. 100 mm dish 당 1 x 10<sup>6</sup> 세포를 분주하여 10% FBS를 포함하는  $\alpha$ -MEM으로 1-2일 confluence를 이룰 때까지 배양하여 HBSS로 3회 세척 후, FBS를 포함하지 않는 배지를 가하여 24시간 배양하고, *P. intermedia* LPS (10  $\mu$ g/ml)를 포함하는 배지를 가하여 24시간 배양하였다.

Table 1. Sequences of synthetic oligonucleotide primers for RT-PCR

Primers	Sequence	Annealing temp (°C)	Product size (bp)
MMP-1	F 5'-CTGAAGGTGATGAAGCAGCC-3' R 5'-AGTCCAAGAGAATGGCCGAG-3'	60	428
MMP-2	F 5'-GCCACAAGAAGTATGGCTTC-3' R 5'-TGCCAAGGTCAATGTCAGGA-3'	60	390
MMP-3	F 5'-CTCACAGACCTGACTCGGTT-3' R 5'-CACGCCTGAAGGAAGAGATG-3'	60	294
MMP-10	F 5'-GTCCTTCGATGCCATCAGCA-3' R 5'-CTTGCTCCATGGACTGGCTA-3'	62	380
MMP-11	F 5'-CAGGTGGCAGCCCATGAATT-3' R 5'-GTACTGAGCACCTTGAAGA-3'	58	456
MMP-14	F 5'-CAACACTGCCTACGAGAGGA-3' R 5'-GTTCTACCTTCAGCTTCTGG-3'	60	380
TIMP-1	F 5'-ACCATGGCCCCCTTTGAGCCCTG-3' R 5'-TCAGGCTATCTGGGACCGCAGGGA-3'	60	627
TIMP-2	F 5'-TGGAAACGACATTTATGGCAACC-3' R 5'-ACAGGAGCCGTCACCTTCTTGAT-3'	60	431
$\beta$ -actin	F 5'-AAGAGAGGCATCCTCACCCT-3' R 5'-TACATGGCTGGGGTGTGAA-3'	66	218

Abbreviations: F: forward; R: reverse

#### 4. Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction과 PCR product의 분석

배양 후 세포를 PBS로 2회 수세하고, 원심분리하여 회수하였다. 제조사의 지시에 따라 RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA)을 활용하여 total RNA를 분리하였다. AccuPower RT/PCR Premix kit (Bioneer, Korea)과 thermal cycler (GeneAmp PCR system 2400; PE Applied Biosystems, USA)를 이용하여, 추출한 RNA로부터 cDNA를 합성하고, reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)을 수행하여 cDNA를 증폭하였다. Internal control로는  $\beta$ -actin을 활용하였다. Nonsaturating PCR condition을 위한 cycle 수는 예비실험을 통해 결정하였다. PCR 증폭은 95°C에서 1분간, 62°C에서 1분간, 그리고 72°C에서 1분간, 35 cycle로 수행되었다. 사용된 oligonucleotide primer는 Table 1과 같다. 증폭된 PCR 산물을 ethidium bromide를 포함하고 있는 1.5% agarose gel에서 전기 영동하여 자외선 하에서 관찰하였다. Gel 사진 상의 PCR band의 강도는 den-

sitometry를 이용하여 평가하였다.

### III. 결과

#### 1) *P. intermedia* LPS가 치은섬유아세포에서의 MMP와 TIMP mRNA 발현에 미치는 영향

*P. intermedia* LPS (10  $\mu$ g/ml)로 24시간 처리한 치은섬유아세포에서의 MMP-1, -2, -3, -10, -11과 -14, 그리고 TIMP-1과 -2 mRNA의 발현을 RT-PCR을 수행하여 조사하였다. 이들 MMP 및 TIMP mRNA는 LPS로 처리하지 않은 치은섬유아세포에서도 발현되었고, *P. intermedia* LPS로 처리한 세포에서는 MMP-1, -2, -3, -10과 -14, 그리고 TIMP-1 mRNA의 발현이 증가되었으며, 이들 중 MMP -1, -3와 -10 mRNA의 증대가 가장 현저하였다(Figure 1). 반면, MMP-11과 TIMP-2 mRNA의 발현은 *P. intermedia* LPS로 처리한 섬유아세포에서 감소되었으며, 이들 중 TIMP-2 mRNA의 감소가 가장 현저하였다(Figure 1).

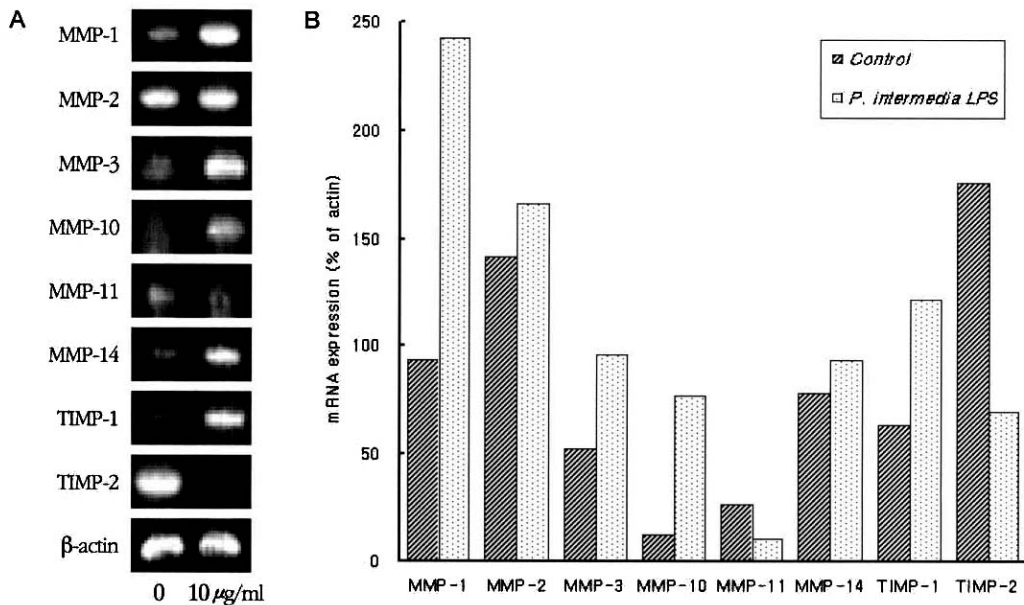


Figure 1. Expression of MMP and TIMP mRNAs in human gingival fibroblasts stimulated with *P. intermedia* LPS. Cells were incubated in the presence of 10  $\mu\text{g/ml}$  of *P. intermedia* LPS for 24 h. The intensities of the PCR bands on gel photographs were quantified by densitometry. See Materials and methods for further details

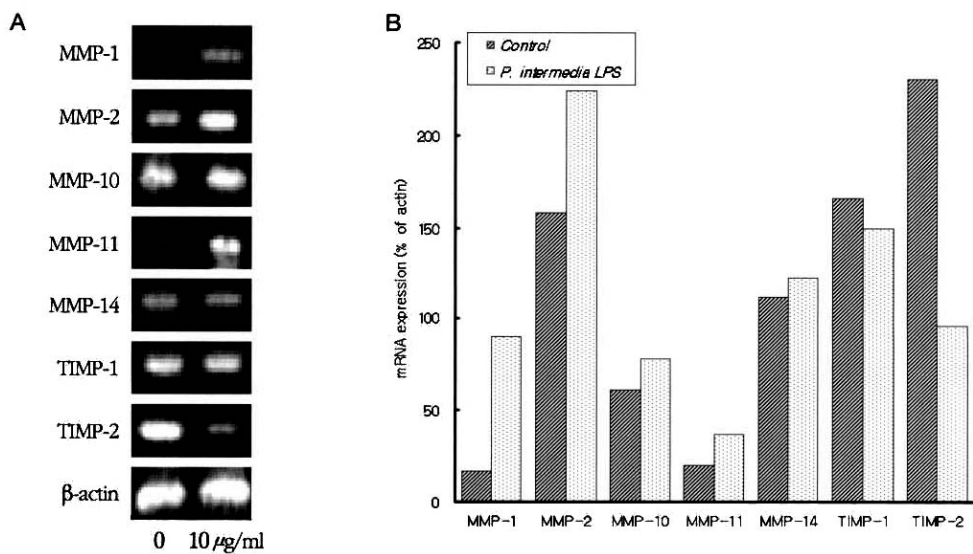


Figure 2. Expression of MMP and TIMP mRNAs in human periodontal ligament fibroblasts stimulated with *P. intermedia* LPS. Cells were incubated in the presence of 10  $\mu\text{g/ml}$  of *P. intermedia* LPS for 24 h. The intensities of the PCR bands on gel photographs were quantified by densitometry. See Materials and methods for further details

## 2) *P. intermedia* LPS가 치주인대세포에서의 MMP와 TIMP mRNA 발현에 미치는 영향

*P. intermedia* LPS (10 µg/ml)로 24시간 처리한 치주인대세포에서의 MMP-1, -2, -10, -11과 -14, 그리고 TIMP-1과 -2 mRNA의 발현을 RT-PCR을 수행하여 조사하였다. 이들 MMP 및 TIMP mRNA는 LPS로 처리하지 않은 치주인대세포에서도 발현되었고, *P. intermedia* LPS로 처리한 세포에서는 MMP-1, -2, -10, -11과 -14 mRNA의 발현이 증가되었으며, 이들 중 MMP-1 mRNA의 증대가 가장 현저하였다(Figure 2). 반면, TIMP-1과 -2 mRNA의 발현은 *P. intermedia* LPS로 처리한 치주인대세포에서 감소되었으며, 이들 중 TIMP-2 mRNA의 감소가 가장 현저하였다(Figure 2).

## IV. 고찰

MMP는 생리적 및 병리적 상황에서 세포의 기질의 개조와 분해에 관여한다<sup>2)</sup>. 치주질환 시의 결합조직의 파괴는 단핵세포, 대식세포, 임파구, 그리고 다형핵 백혈구 등의 염증세포와 섬유아세포, 상피세포, 그리고 혈관내피세포 등의 상주세포에 의해 발현되는 MMP와 그들의 억제제인 TIMP 간의 불균형으로 인한 MMP의 과도한 활성화에 부분적으로 기인하는 것으로 여겨진다<sup>2,29)</sup>.

치주인대 및 치은섬유아세포에 의해 생성되는 Type I 및 III 교원질은 치주조직에 있어 가장 우세한 세포의 기질 성분이다<sup>29)</sup>. 치은 및 치주인대 교원질의 분해는 치주염의 중요한 특징 중의 하나이며, 이러한 분해는 숙주세포에서 유래된 간질성 교원분해 효소에 의해 수행된다. MMP-1 (collagenase-1)은 섬유아세포형 간질성 교원분해 효소로, 중성구형 교원분해 효소인 MMP-8과 함께, 치은조직에서의 교원질의 생리적 및 병적 분해에 관여한다<sup>30,31)</sup>. MMP-1은 섬유아세포, 상피세포, 그리고 대식세포에 의해 생성된다. MMP-1은 type I, II 그리고 III 교원질의 helix를 제한적으로 분열시켜 교원질의 분해를 개시하며, 그 후 gelatinase와 stromelysin에 의해 추가적인 분해가 진행된다. 치주염 시 MMP-1이 증가되며<sup>19,32)</sup>, MMP-1

mRNA는 치주염에 이환된 치은에 증가되어 있다<sup>33)</sup>. 이는 MMP-1이 치주질환 병소에서의 교원질 분해와 연관이 있다는 것을 의미한다. MMP-1의 활성화는 주로 TIMP-1에 의해 엄격하게 조절된다.

MMP-3 (stromelysin-1)는 type IV와 IX 교원질 뿐만 아니라 laminin, proteoglycan 그리고 fibronectin도 분해한다<sup>34)</sup>. MMP-3는 pro-MMP-1, pro-MMP-8 그리고 pro-MMP-9의 활성화에 있어 중요한 역할을 한다<sup>35)</sup>. MMP-3는 치주염, 류마티드 관절염, 그리고 골관절염 등 만성 염증성 질환에서의 결합조직 파괴에 관여한다<sup>29,36)</sup>. 치주염 이환 부위에서의 치은열구액과 치은조직 내에 MMP-3 단백질과 MMP-3 mRNA의 발현이 각각 증가됨이 증명된 바도 있다<sup>9,33)</sup>.

MMP-10 (stromelysin-2)은 MMP-3와 유사하게 aggrecan, type III, IV와 V 교원질과 elastin, fibronectin, gelatin I, casein 그리고 fibrinogen의 분해에 관여한다<sup>6)</sup>. MMP-11 (stromelysin-3)는 다른 MMP들과는 달리 교원질, laminin, fibronectin, 그리고 elastin 같은 세포의 기질 성분을 분해하지는 않으며,  $\alpha$ 1-proteinase inhibitor,  $\alpha$ 2-macroglobulin, 그리고 insulin-like growth factor binding protein 등을 분해한다<sup>37)</sup>. 또한 대부분의 MMP들이 비활성 zymogen으로 분비되는데 비해, MMP-11은 45 kDa의 활성 효소로 분비된다<sup>38)</sup>.

MMP-2 (72 kDa type IV collagenase, gelatinase A)는 기저막의 개조를 조절한다. MMP-2는 기저막에 존재하는 type IV 교원질, elastin, type V, VII과 X 교원질 등의 기타 기질 성분을 분해할 수 있다<sup>8)</sup>. 또한, 이들은 간질성 교원 분해효소 (MMP-1, -13, -18)에 의해 교원질 분자가 1/4과 3/4 segments로 분해된 후 gelatin을 분해한다. MMP-2는 섬유아세포, keratinocyte, 단핵구, 대식세포, 그리고 골아세포 등 다양한 세포에서 proenzyme 형태로 분비되나, 다형핵 백혈구에서는 분비되지 않는다. MMP-2는 type IV 교원 분해효소 이므로, 감염부위에서 이들이 부적절하게 활성화 되는 경우 기저막과 접합상피의 integrity에 심각한 영향을 미칠 수 있다.

MT1-MMP라고도 불리는 MMP-14는 세포막 결합부위를 가지고 있으며, 세포의 표면에 존재한다.

MMP-14는 types I, II와 III 교원질, fibronectin, type 1 과 5 laminin, vitronectin, fibrin, 그리고 aggrecan 같은 세포의 기질 성분을 분해한다<sup>39,40</sup>. MMP-14는 세포막에 부착되어 있어 여타의 교원 분해효소에 비해 세포표면에서 효율적으로 교원질 분해를 수행할 수 있다<sup>41</sup>.

TIMP는 MMP 활성을 조절하며, 4종의 TIMP가 보고된 바 있다<sup>42</sup>. 이들 중 모든 종류의 MMP에 억제효과를 발휘하는 TIMP-1과 TIMP-2는 치주질환 병소에서 발견된다<sup>43</sup>. TIMP-1은 섬유아세포에서 유래된 MMP에 대해 강력한 억제효과를 발휘하며, TIMP-2는 다형핵 백혈구에서 유래된 MMP에 강력한 억제효과를 보인다<sup>48</sup>. TIMP-1은 28 kDa의 glycoprotein으로, 활성화된 MMP와 1:1 stoichiometry의 복합체를 형성하며<sup>44</sup>, MMP를 생성한 세포가 TIMP-1도 생성 분비할 수 있다<sup>45</sup>. 활성화된 MMP와 TIMP 간의 균형에 의해 세포의 기질의 개조의 정도가 좌우되며, MMP와 TIMP 간의 균형이 깨지게 되면 세포의 기질의 병적인 파괴가 일어나 류마티오이드 관절염과 혈관질환 등의 병적인 상황이 초래될 수 있다. TIMP-1은 치은열구액과 치은조직 내에 존재하는 MMP에 대한 주된 억제제이다<sup>33,43,46,47</sup>. 염증 부위에서의 치은열구액 내에 TIMP-1 단백질이 증가되어 있으며<sup>19,47</sup>, 치주염 이환 치은 조직 내에 MMP-1과 TIMP-1 mRNA가 증가되어 있다<sup>33,46</sup>.

MMP 유전자의 발현은 사이토카인을 포함한 다양한 인자에 의해 조절된다. 본 연구는 치주질환 주요 병원균 중의 하나인 *P. intermedia*의 LPS가 치은섬유아세포와 치주인대세포에서의 MMP 및 TIMP 발현에 미치는 영향을 규명하고자 수행되었다. *P. intermedia* LPS는 치은섬유아세포와 치주인대세포에서 MMP-1, -2, -3, -10과 -14, 그리고 TIMP-1 mRNA와 MMP-1, -2, -10, -11과 -14 mRNA의 발현을 각각 증대시켰다. 반면, MMP-11과 TIMP-2 mRNA 그리고 TIMP-1과 -2 mRNA의 발현은 *P. intermedia* LPS로 처리한 섬유아세포 및 치주인대세포에서 각각 감소되었다. *P. intermedia* LPS는 치은섬유아세포 및 치주인대세포에서의 MMP 및 TIMP의 발현을 조절함으로써 치주질환 시의 결합조직 파괴에 있어 중요한

역할을 하는 것으로 사료된다.

## V. 결론

MMP는 생리적인 개조, 창상 치유, 그리고 치아 발생 등에 관여한다. 또한, MMP는 치주염 등의 다양한 염증성 질환에 있어 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 본 연구는 치주질환 주요 병원균 중의 하나인 *P. intermedia*의 LPS가 치은섬유아세포와 치주인대세포에서의 MMP 및 TIMP 발현에 미치는 영향을 규명하고자 수행되었다. *P. intermedia* LPS는 치은섬유아세포와 치주인대세포에서 MMP-1, -2, -3, -10과 -14, 그리고 TIMP-1 mRNA와 MMP-1, -2, -10, -11과 -14 mRNA의 발현을 각각 증대시켰다. 반면, MMP-11과 TIMP-2 mRNA 그리고 TIMP-1과 -2 mRNA의 발현은 *P. intermedia* LPS로 처리한 섬유아세포 및 치주인대세포에서 각각 감소되었다. *P. intermedia* LPS는 치은섬유아세포 및 치주인대세포에서의 MMP 및 TIMP의 발현을 조절함으로써 치주질환 시의 결합조직 파괴에 있어 중요한 역할을 하는 것으로 사료된다.

## VI. 참고문헌

1. Sorsa T, Ingman T, Suomalainen K et al. Identification of proteases from periodontopathogenic bacteria as activators of latent human neutrophil and fibroblast type interstitial collagenases. *Infect Immun* 1992;60:4491-4795.
2. Birkedal-Hansen H, Moore WGI, Bodden MK et al. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med* 1993;4:197-250.
3. Woessner, J. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J* 1991;5:2145-2154.
4. Hoekstra R, Eskens FALM, Verweij J. Matrix metalloproteinase inhibitors: current developments and future perspectives. *Oncologist*. 2001;6:415-427.

5. McCawley LJ, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore! *Curr Opin Cell Biol* 2001;13:534-540.
6. Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001;17:463-516.
7. Nagase H, Okada Y in *Textbook of Rheumatology* (Kelley WN, Harris ED Jr, Ruddy S, Sledge CB Eds.), 5th ed, pp 323-340, Sanders, 1996, Philadelphia, PA.
8. Nagase H. Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol Chem* 1997;378:151-160.
9. Salo T, Mäkelä M, Kylmäniemi M, Autio-Harmainen H, Larjava H. Expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 during early human wound healing. *Lab Invest* 1994; 70, 176-182.
10. Llano E, Pendas AM, Knauper V et al. Identification and structural and functional characterization of human enamelysin (MMP-20). *Biochemistry* 1997;36:15101-15108.
11. Pirilä E, Ramamurthy N, Maisi P et al. Wound healing in ovariectomized rats. Effects of chemically modified tetracycline (CMT-8) and estrogen on matrix metalloproteinases -8 and -13 and type I collagen expression. *Curr Med Chem* 2001;8:281-294.
12. Reynolds JJ. Collagenases and tissue inhibitors of metalloproteinases: a functional balance in tissue degradation. *Oral Dis* 1995;2:70-76.
13. Van der Zee E, Everts V, Beertsen W. Cytokines modulate routes of collagen breakdown. *J Clin Periodontol* 1997;24:297-305.
14. Hanemaaijer R, Sorsa T, Kottinen YT et al. Matrix metalloproteinase-8 is expressed in rheumatoid synovial fibroblasts and endothelial cells. Regulation by tumor necrosis factor-alpha and doxycycline. *J Biol Chem* 1997;272:31504-31509.
15. Tonetti MS, Freiburger K, Lang NP, Bickel M. Detection of interleukin-8 and matrix metalloproteinases transcripts in healthy and diseased gingival biopsies by RNA/PCR. *J Periodont Res* 1993;28:511-513.
16. Sorsa T, Ding YL, Salo T et al. Effects of tetracyclines on neutrophil, gingival, and salivary collagenases. A functional and western-blot assessment with special reference to their cellular sources in periodontal diseases. *Annal New York Acad Sci* 1994;732:112-131.
17. Makela M, Salo T, Uitto VJ, Larjava H. Matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) of the oral cavity: cellular origin and relationship to periodontal status. *J Dent Res* 1994;73:1397-1406.
18. Aida T, Akeno N, Kawane T, Okamoto H, Horiuchi N. Matrix metalloproteinases-1 and -8 and TIMP-1 mRNA levels in normal and diseased human gingivae. *EurJ Oral Sci* 1996;104:562-569.
19. Ingman T, Tervahartiala T, Ding Y et al. Matrix metallo-proteinases and their inhibitors in gingival crevicular fluid and saliva of periodontitis patients. *J Clin Periodontol* 1996;23:1127-1132.
20. Korostoff JM, Wang JF, Sarment DP et al. 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.
21. Tanner ACR, Haffer C, Bratthall GT, Visconti RA, Socransky SS. A study of the bacteria associated with advancing periodontitis in man. *J Clin Periodontol* 1979;6:278-307.
22. Slots J, Bragd L, Wikstrom M, Dahlen G. The occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides gingivalis* and *Bacteroides intermedius* in destructive periodontal disease in adults. *J Clin Periodontol* 1986;13:570-577.
23. Socransky SS, Haffajee AD. The bacterial etio-

- gy of destructive periodontal disease: current concepts. *J Periodontol* 1992;63:322-331.
24. Chung CP, Nisengard RJ, Slots J, Genco RJ. Bacterial IgG and IgM antibody titers in acute necrotizing ulcerative gingivitis. *J Periodontol* 1983;54:557-562.
  25. Kornman KS, Loesche WJ. The subgingival microbial flora during pregnancy. *J Periodont Res* 1980;15:111-122.
  26. Morrison DC, Ryan JL. Endotoxins and disease mechanisms. *Annu Rev Med* 1987;38:417-432.
  27. Westphal O, Jann K. Bacterial lipopolysaccharides: extraction with phenol-water and further applications of the procedure. In: Whistler RL, ed. *Methods in carbohydrate chemistry*. New York: Academic Press, 1965: 83-91.
  28. Markwell MA, Haas SM, Bieber LL, Tolbert NE. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal Biochem* 1978;87:206-210.
  29. Birkedal-Hansen H. Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases. *J Periodontol* 1993;64:474-484.
  30. Goldberg GI, Wilhelm SM, Kronberger A et al. Human fibroblast collagenases. Complete primary structure and homology to an oncogene transformation-induced rat protein. *J Biol Chem* 1986; 261:6600-6605.
  31. Devarajan P, Mookhtiar K, Wart HV, Berliner N. Structure and expression of the cDNA encoding human neutrophil collagenase. *Blood* 1991;77:2731-2738.
  32. Sorsa T, Uitto VJ, Suomalainen K, Vauhkonen M, Lindy S. Comparison of interstitial collagenases from human gingiva, sulcular fluid and polymorphonuclear leukocytes. *J Periodont Res* 1988;23:386-393.
  33. Kubota T, Nomura T, Takahashi T, Hara K. Expression of mRNA for matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in periodontitis-affected human gingival tissue. *Arch Oral Biol* 1996;41:253-262.
  34. Matsian LM. The matrix-degrading metalloproteinases. *Bioessays* 1992;14:455-463.
  35. Ogata Y, Enghild JJ, Nagase H. Matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) activates the precursors for human matrix metalloproteinase 9. *J Biol Chem* 1992;267:3581-3584.
  36. McCachren SS. Expression of metalloproteinases and metalloproteinase inhibitor in human arthritic synovium. *Arthrit Rheum* 1991;34:1085-1093.
  37. Manes S, Mira E, Barbacid MM et al. Identification of insulinlike growth factor-binding protein-1 as a potential physiological substrate for human stromelysin-3. *J Biol Chem* 1997;272:25706-25712.
  38. Pei D, Weiss SJ. Furin-dependent intracellular activation of the human stromelysin-3 zymogen. *Nature* 1995;375:244-247.
  39. d' Ortho MP, Will H, Atkinson S et al. Membrane-type matrix metalloproteinases 1 and 2 exhibit broad-spectrum proteolytic capacities comparable to many matrix metalloproteinases. *Eur J Biochem* 1997;250:751-757.
  40. Ohuchi E, Imai K, Fujii Y et al. Membrane type 1 matrix metalloproteinase digests interstitial collagens and other extracellular matrix macromolecules. *J Biol Chem* 1997;272:2446-2451.
  41. Hotary K, Allen E, Punturieri A, Yana I, Weiss SJ. Regulation of cell invasion and morphogenesis in a three-dimensional type I collagen matrix by membrane-type matrix metalloproteinases 1, 2, and 3. *J Cell Biol* 2000;149:1309-1323.
  42. Nagase H, Woessner JF. Matrix metalloproteinases *J Biol Chem* 1999;274:21491-21494.
  43. Kubota T, Matsuki Y, Nomura T, Hara K. In situ hybridization study on tissue inhibitors of metal-



- loproteinases (TIMPs) mRNA-expressing cells in human inflamed gingival tissue. *J Periodont Res* 1997;32:467-472.
44. Stricklin GP, Welgus HG. Human skin fibroblast collagenase inhibitor. Purification and biochemical characterization. *J Biol Chem* 1983;258:12252-12258.
45. Welgus HG, Jeffrey JJ, Eisen AZ, Roswit WT, Stricklin GP. Human skin fibroblast collagenase: interaction with substrate and inhibitor. *Coll Relat Res* 1985;5:167-179.
46. Nomura T, Takahashi T, Hara K. Expression of TIMP-1, TIMP-2 and collagenase mRNA in periodontitis-affected human gingival tissue. *J Periodont Res* 1993;28:354-362.
47. Nomura T, Ishii A, Oishi Y, Kohma H, Hara K. Tissue inhibitors of metalloproteinases level and collagenase activity in gingival crevicular fluid: the relevance to periodontal diseases. *Oral Dis* 1998;4:231-240.

# Expression of mRNA for matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human gingival and periodontal ligament fibroblasts treated with lipopolysaccharide from *Prevotella intermedia*

Sung-Jo Kim<sup>1</sup>, Eun-Young Choi<sup>2</sup>, In-Soon Choi<sup>2</sup>, Ju-Youn Lee<sup>1</sup>, Jeom-Il Choi<sup>1</sup>, Chong-Kwan Kim<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Periodontology, College of Dentistry, Pusan National University

<sup>2</sup>Department of Life Science, College of Natural Science, Silla University

<sup>3</sup>Department of Periodontology, College of Dentistry, Yonsei University

Matrix metalloproteinases (MMPs) are a family of host-derived proteolytic enzymes and implicated in the remodeling and degradation of extracellular matrix under both physiological and pathological conditions. Connective tissue degradation in periodontal diseases is thought to be due to excessive MMP activities over their specific inhibitors. The effects of lipopolysaccharide (LPS) from *Prevotella intermedia*, one of the major putative pathogens of periodontitis, on the expression of mRNA for MMPs and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) in human gingival and periodontal ligament fibroblasts were examined by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). The expression of mRNAs encoding MMP-1, -2, -3, -10, and -14 was increased in human gingival fibroblasts treated with *P. intermedia* LPS, whereas MMP-11 and TIMP-2 mRNA expression was decreased in these cells stimulated with LPS. *P. intermedia* LPS increased the MMP-1, -2, -10, -11, and -14 mRNA expression and decreased TIMP-1 and -2 mRNA expression in human periodontal ligament fibroblasts. These findings imply that *P. intermedia* LPS may play an important role in the connective tissue degradation in periodontitis.

---

Key words : matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases, human gingival fibroblasts, human periodontal ligament fibroblasts, *Prevotella intermedia* LPS