

House Dust Mite Extract Induces PLC/IP₃-dependent Ca²⁺ Signaling and IL-8 Expression in Human Gingival Epithelial Cells

Ga-Yeon Son^{1,2}, Aran Son^{1,2}, Wonse Park³, and Dong Min Shin^{1,2*}

¹Department of Oral Biology, Yonsei University College of Dentistry, Seoul, 120-752, Korea

²BK21 PLUS Project, Yonsei University College of Dentistry, Seoul, 120-752, Korea

³Department of Advanced General Dentistry, Yonsei University College of Dentistry, Seoul, 120-752, Korea

(received January 26, 2015; revised March 05, 2015; accepted March 09, 2015)

The gingival epithelium of the oral cavity is constantly exposed to exogenous stimuli such as bacterial toxins, allergens, and thermal changes. These exogenous stimuli are resisted by innate host defense in gingival epithelial cells. However, it is unclear exactly how the exogenous stimuli affect detrimentally on the human gingival epithelial cells. Here, we investigated whether the allergen, such as house dust mite (HDM) extract, is linked to Ca²⁺ signaling and pro-inflammatory cytokine expression in primary cultured human gingival epithelial cells. HDM extract induced an increase in intracellular Ca²⁺ concentration ([Ca²⁺]_i) in a dose-dependent manner. Extracellular Ca²⁺ depletion did not affect on the HDM extract-induced increase in [Ca²⁺]_i. The HDM extract-induced increase in [Ca²⁺]_i was abolished by the treatment with U73122 and 2-APB, which are inhibitors of phospholipase C (PLC) and inositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃) receptor. Moreover, HDM extract induced the mRNA expression of pro-inflammatory cytokine, interleukin (IL)-8. These results suggest that HDM extract triggers PLC/IP₃-dependent Ca²⁺ signaling and IL-8 mRNA expression in

primary cultured human gingival epithelial cells.

Key words: Ca²⁺ signaling, house dust mite, human gingival epithelial cells, interleukin

서 론

구강은 호흡 및 섭식을 하는 과정에서 환경적인 요소와 미생물에 대해 끊임없이 노출된다[1]. 세균 독소 및 알레르겐(allergen), 온도 변화와 같은 외인성 요소들은 잠재적인 위험요소 또는 자극요소로 작용하여 구강 건강을 위협한다[2-3]. 특히 구강 상피세포는 다양한 외인성 병원균에 대하여 일차방호장벽의 역할을 수행한다고 알려져 있는데[4], 병원균뿐만 아니라 공기 중에 떠다니는 알레르겐 또한 호흡하는 과정에서 직접적으로 노출될 수 있다.

환경적인 요소들 중에 집 먼지 진드기(house dust mite) 및 바퀴벌레, 고양이의 비듬, 곰팡이와 같이 실내의 공기 중에 존재하는 알레르겐은 천식의 발생과도 관련이 있다. 천식은 폐 속에 있는 기관지에서 환경적 또는 유전적인 요소들의 복합적인 작용에 의해 발생하는 만성 염증성 질환으로[5], 구강에서 발생하는 만성 염증성 질환인 치은염이나 치주염을 포함한 치주질환과 비슷한 병리학적 특성을 공유할 것으로 여겨진다. 이전의 연구 결과들을 참고하면 구강건강과 천식의 밀접한 관계를 확인 할 수 있다. 천식에 이환된 환자들은 건강한 사람에 비해 치아우식 및 치은염에 대해 높은 발병률과

*Correspondence to: Dong Min Shin, Department of Oral Biology, Yonsei University College of Dentistry, 50 yonsei-ro, Seodaemon-gu, Seoul 120-752, Korea
Tel.: +82-2-2228-3051, Fax: +82-2-364-1085
E-mail: dmshin@yuhs.ac

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.

낮은 타액 분비율을 보였다[6-7]. 이러한 구강건강과 천식의 연관성에 대한 보고가 있음에도 불구하고, 천식 유발성 알레르겐이 잇몸 상피세포의 생리적 또는 병리적 현상에 어떠한 영향을 미치는지에 대해서는 알려진 바가 많지 않다.

알레르겐 중 하나인 집 먼지 진드기에 의해 생성되는 단백질 분해 효소(protease)는 상피세포층의 방호장벽 기능을 약화시킬 수 있다. 특히, *Dermatophagoides pteronyssinus* 종의 집 먼지 진드기는 가장 흔한 진드기로 알려져 있으며, 이 집 먼지 진드기의 추출물은 단백질 분해 효소에 의존적인 경로를 통해 상피세포의 박리를 야기한다고 알려져 있다. 단백질 분해 효소에 의한 자극은 세포의 박리, 시토카인(cytokine) 및 케모카인(chemokine)의 생산과 같은 알레르기성 염증반응을 야기한다. 기도 상피세포는 집 먼지 진드기 추출물에 대한 반응으로 전 염증성 시토카인(pro-inflammatory cytokine)인 인터류킨(interleukin; IL)-6와 IL-8의 발현을 증가시키며, 이러한 시토카인의 분비는 단백질 분해 효소에 의해 활성화되는 수용체(protease-activated receptor; PAR)-2에 의해 매개되는 것으로 알려져 있다[8-10].

4가지 아류형(subtype)으로 구성된 PAR는 주로 트롬빈(thrombin; PAR-1 및 3, 4), 트립신(trypsin; PAR-2)과 같은 세린(serine) 특이적인 단백질 분해효소에 의해 활성화된다. 이 단백질 분해 효소는 리간드(ligand)로 작용하는 수용체의 N-말단을 잘라내고, 이 단계에서 N-말단의 잘려지고 남은 부분이 그 자체로 작용제(agonist) 역할을 하여 생리적인 반응을 야기한다. 또한 PAR는 G_q 및 $G_{12/13}$, G_i 단백질에 의해 매개되는 신호를 전달하는 G-단백질 연관 수용체(G protein-coupled receptor; GPCR)로 알려져 있다. 이 중 활성화된 G_q 단백질은 phospholipase C (PLC)를 활성화시켜 세포막의 인지질인 phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP_2)를 inositol 1,4,5-trisphosphate (IP_3)와 diacylglycerol (DAG)로 가수분해한다. DAG는 단백질 인산화 효소 C(protein kinase C; PKC)를 활성화시키는 반면, IP_3 는 소포체(endoplasmic reticulum; ER)의 막에 존재하는 칼슘 통로인 IP_3 수용체에 결합하여 소포체에서 시토솔(cytosol)로 칼슘의 방출을 야기한다[11].

이미 이전의 보고에서 사람의 잇몸 상피세포에는 PAR-4를 제외한 나머지 PAR-1 및 2, 3가 존재하며[4], PAR-2의 경우 만성 치주염에 이환된 환자에서 그 발현이 증가된다는 보고도 있었다[12]. 이전에 미생물에 의해 발생하는 치주질환이 PAR의 활성화와 관련이 있다는 몇몇 연구 결과가 보고되어 왔으나[4,13], 집 먼지 진드기와 같은 천식 유발성 알레르겐이 잇몸 상피세포의 생리적 또는 병리적 현상에 미치는 영향에 대한 연

구는 보고된 바가 없다. 본 연구를 통해 사람의 잇몸 상피세포에서 천식 유발성 알레르겐인 집 먼지 진드기 추출물이 세포 내 칼슘 신호와 전 염증성 시토카인의 발현에 어떠한 영향을 미치는지 조사해보고자 한다.

실험재료 및 방법

재료

Keratinocyte Basal Medium-2 (KBM-2)는 Lonza (Walkersville, MD, USA)에서 구입하였다. Collagenase A와 Dispase II는 Roche (Mannheim, Germany)에서, U73122, U73433, 2-APB는 Sigma Chemical Co., Ltd (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Thapsigargin (Tg)은 Alexis Biochemical (San Diego, CA, USA)에서, Fura-2/AM과 Pluonic F-127은 Molecular Probe (Eugene, OR, USA)에서 구입하였다. 집 먼지 진드기(house dust mite; *Dermatophagoides pteronyssinus*) 추출물은 연세대학교 의과대학 의용절지동물소재은행 (Seoul, Korea)에서 구입하였다.

세포 배양

모든 실험의 계획서는 연세대학교 치과병원 및 치과대학의 연구 윤리 위원회에 의해 검토 및 승인을 받았다. 기관감사위원회(Institutional Review Board; IRB)의 윤리 규정에 따라 모든 지원자로부터 피험자 동의서를 받았다. 제3대구치(사랑니) 발치를 위해 내원한 건강한 지원자에게서 절제한 잇몸 조직으로부터 잇몸 상피세포를 분리시켰다. 잇몸 상피세포에 0.25% Collagenase A와 2.4 unit Dispase II를 40분 동안 처리한 후, KBM-2 배지로 교체하여 5% CO_2 가 유지되는 37°C 배양기에서 배양시켰다. 모든 실험은 3~4번까지 계대 배양한 세포로 수행하였다.

역전사 중합효소 연쇄반응 (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction; RT-PCR)

Trizol reagent (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 잇몸 상피세포에서 RNA를 추출하였다. 그리고 cDNA는 AccuPower RT PreMix (BIONEER, Daejeon, Korea)를 사용하여 42°C에서 60분 동안 역전사 반응을 시행하였다. cDNA는 HiPi Thermostable DNA polymerase (Elpis, Pusan, Korea)를 사용하여 94°C에서 5분, 변성(denaturation) 반응을 94°C에서 30초, 결합(annealing) 반응을 58°C에서 30초, 중합(extension) 반응을 72°C에서 30초 동안 35 주기로 반복하고, 72°C에서 5분 동안 연장(elongation) 반응을 시켰다. 중합효소 연쇄반응에 사용된

IL-8과 GAPDH의 primer는 다음과 같다. IL-8 (sense) 5'-ATGACTTCCAAGCTGGCCGTGGCT-3', (antisense) 5'-TCTCAGCCCTCTTCAAAAATTCT-3'; GAPDH (sense) 5'-GTCGGAGTCAACGGATT-3', (antisense) 5'-GCCATGGG TGAATCATA-3'. PCR product는 1.2% agarose gel에서 전기영동을 이용하여 확인하였다.

세포 내 칼슘 농도 측정

세포 내 칼슘 농도의 변화를 측정하기 위하여 사람의 잇몸 상피세포를 cover glass (22x22) 위에 배양시키고, 생리식염수(physiological saline solution; PPS) (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 10 mM HEPES, 10 mM glucose, 310 mOsm, pH 7.4 with NaOH)에 담근 후 중력을 이용한 관류장치를 통해 실험을 진행하는 동안 용액을 교환하였다. Fura-2/AM에 의한 형광은 Molecular Device (Universal Imaging Co., Downingtown, PA, USA)를 이용하여 측정하였으며, excitation 파장(340 nm와 380 nm)과 emission 파장(510 nm)을 사용하여 형광의 변화를 확인하였다 (ratio=F340/F380). Fura-2/AM에 의한 형광 이미지는 도립 현미경(inverted microscope, Nikon Instruments Inc., Tokyo,

Japan)에 부착되어 있는 CCD 카메라(Photometrics, Tucson, AZ, USA)를 이용하여 2초 간격으로 기록하였고, MetaFluor system (Molecular Devices, PA, USA)으로 분석하였다.

통계학적 분석

Student t-test를 실시하여 통계학적으로 분석하였으며, $P < 0.05$ 일 때 유의성 있는 차이로 간주하였다.

실험 결과

집 먼지 진드기 추출물은 사람의 잇몸 상피세포에서 세포 내 칼슘 농도를 증가시킨다.

집 먼지 진드기 추출물이 사람의 잇몸 상피세포에서 칼슘 신호를 야기하는지 알아보기 위해 1~100 $\mu\text{g/ml}$ 의 집 먼지 진드기추출물을 처리하여 세포 내 칼슘 농도의 변화를 측정하였다. 비록 1 $\mu\text{g/ml}$ 의 집 먼지 진드기 추출물을 처리한 경우 칼슘 신호를 야기하지 못했지만, 10, 30, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 집 먼지 진드기 추출물을 처리한 경우 2~5분 이내에 세포 내 칼슘 농도를 증가시켰다

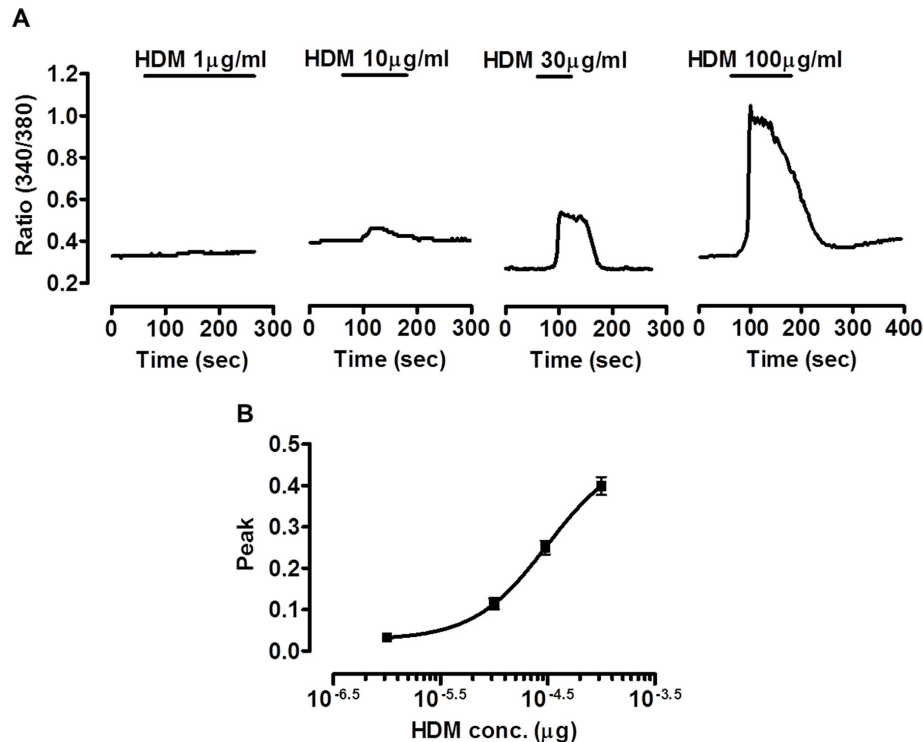


Fig. 1. House dust mite (HDM) extract induces increase in intracellular Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) in human gingival epithelial cells.

(A) Increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ by HDM extract in human gingival epithelial cells. HDM extract was applied various concentrations ranging from 1 to 100 $\mu\text{g/ml}$ in physiological saline solution (PPS). (B) Summary of the peak value by dose-dependent HDM extract application on $[\text{Ca}^{2+}]_i$. The fluorescence intensity was measured at excitation wavelengths of 340 and 380 nm.

(Fig. 1A). 세포 내 칼슘 농도의 최고 값(peak value)은 집 먼지 진드기 추출물의 농도에 비례하여 증가하였다 (Fig. 1B).

집 먼지 진드기 추출물은 PLC/IP₃에 의존적인 통로를 통해 소포체로부터 칼슘을 유출시켜 세포 내 칼슘 농도를 증가시킨다.

세포 내 칼슘 농도의 증가는 세포 외부로부터의 칼슘의 유입이나 소포체와 같은 세포 내부의 칼슘 저장고로부터의 칼슘의 유출에 의해 야기된다. 또한 소포체의 칼슘 펌프 (endo/sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase pump; SERCA pump) 차단제인 thapsigargin (Tg) 은 SERCA pump를 차단시키는 동시에 선택적으로 소포체 내부의 칼슘을 유출시켜 고갈시킨다고 알려져 있다[14-15]. 집 먼지 진드기 추출물에 의해 증가된 칼슘의 근원을 알아보기 위해 세포 외부 또는 내부 저장고의 칼슘이 결핍된 상태에서 집 먼지 진드기 추출물에 의한 칼슘 신호

변화를 관찰하였다. 집 먼지 진드기 추출물에 의한 칼슘 신호 변화를 측정하기 전에 칼슘이 결핍된 생리식염수 또는 칼슘이 결핍된 생리식염수에 희석시킨 Tg을 예비 처리하였다. 집 먼지 진드기 추출물에 의한 세포 내 칼슘 농도의 증가는 칼슘이 결핍된 생리식염수를 처리한 경우에도 여전히 유지되었다. Tg에 의해 소포체의 칼슘이 고갈된 후에는 집 먼지 진드기 추출물에 의한 세포 내 칼슘 농도 증가가 나타나지 않았다(Fig. 2A). 이러한 결과는 집 먼지 진드기 추출물에 의한 세포 내 칼슘 농도의 변화가 세포 외부의 칼슘에는 의존적이지 않지만, 세포 내 칼슘 저장고인 소포체 내부의 칼슘에는 의존적이라는 것을 의미한다. 집 먼지 진드기 추출물의 단백질 가수분해성 알레르겐인 Der p3와 Der p9은 사람의 기도 상피세포에서 PAR-2를 통해 세포 내 칼슘 농도를 증가시킨다고 알려져 있다[16-17]. 또한 이전의 보고에서 카이틴 분해 효소(chitinase)에 의해 PAR-2가 활성화되면 PLC/IP₃ 의존적인 칼슘 신호를 야기한다고 알려져 있다

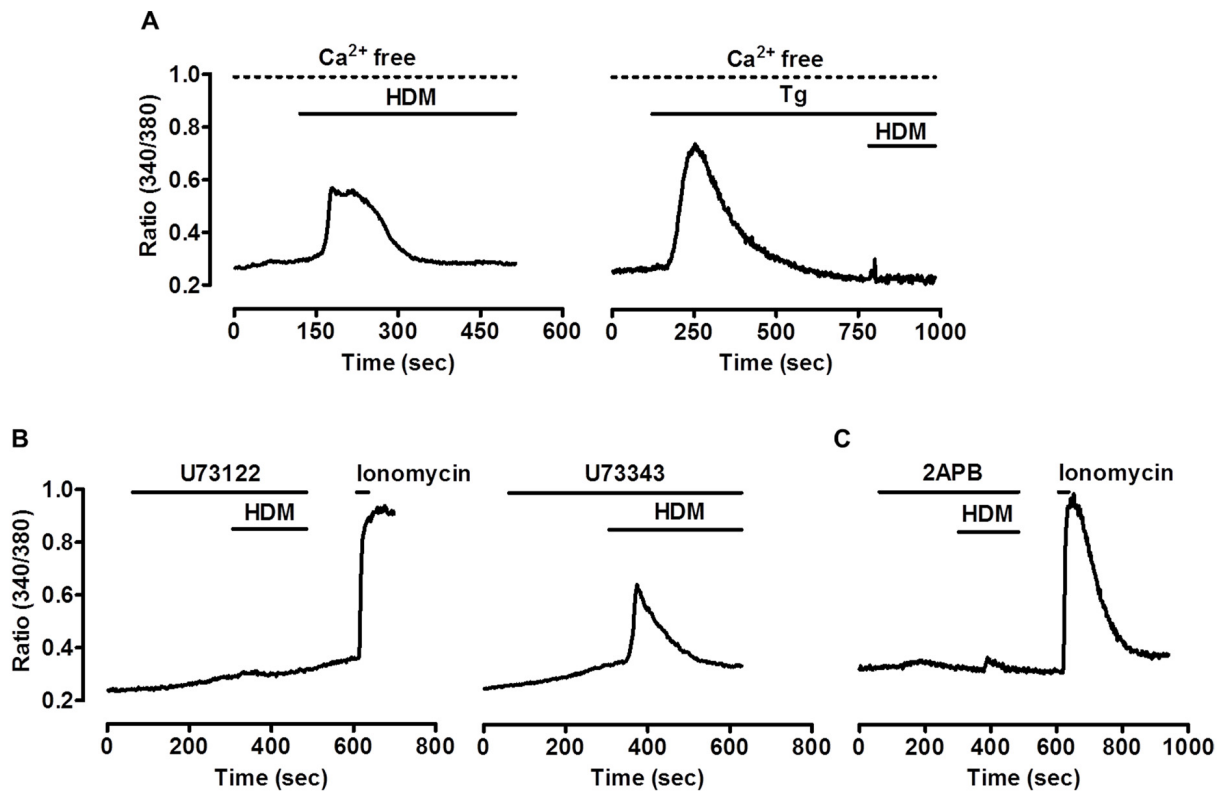


Fig. 2. HDM extract triggers PLC/IP₃ dependent Ca²⁺ signaling in human gingival epithelial cells.

(A) Effects of extracellular Ca²⁺ depletion or thapsigargin (Tg) treatment on HDM extract-induced increase in [Ca²⁺]_i. The change in [Ca²⁺]_i in response to HDM extract was measured after the pre-treatment of a Ca²⁺-free PPS or Tg (1 μM) in a Ca²⁺-free PPS. (B) Effects of U73122 or U73343 treatment on HDM extract-induced increase in [Ca²⁺]_i. The change in [Ca²⁺]_i in response to HDM extract was measured after the pre-treatment of U73122 (10 μM) or U73343 (10 μM) in PPS. Ionomycin was used as a positive control. (C) Effect of 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) treatment on HDM extract-induced increase in [Ca²⁺]_i. The change in [Ca²⁺]_i in response to HDM extract was measured after the pre-treatment of 2-APB (75 μM) in PPS.

[18]. 집 먼지 진드기 추출물에 의한 세포 내 칼슘 농도의 증가가 PLC/IP₃에 의존적인 통로를 통해 일어나는지 알아보기 위해 사람의 잇몸 상피세포에 PLC 특이적인 길항제인 U73122 또는 U73122의 비활성 아날로그인 U73343을 처리하여 집 먼지 진드기 추출물에 의한 칼슘 신호 변화를 관찰하였다. 집 먼지 진드기 추출물에 의한 칼슘 신호 변화를 측정하기 전에 생리식염수에 희석시킨 U73122 또는 U73343을 예비 처리하였다. U73122는 집 먼지 진드기 추출물에 의한 세포 내 칼슘 농도의 증가를 막았지만, U73343의 경우 아무런 영향을 미치지 않았다(Fig. 2B). 또한 Fig. 2C의 결과와 같이 IP₃ 길항제인 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB)를 예비 처리한 경우, 집 먼지 진드기 추출물에 의한 세포 내 칼슘 농도의 증가의 억제력을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 집 먼지 진드기 추출물에 의한 세포 내 칼슘 농도의 증가가 PLC/IP₃에 의존적인 통로를 통해 소포체 내부로부터의 칼슘의 유출에 의해 야기된다는 것을 의미한다.

집 먼지 진드기 추출물은 전 염증성 시토카인인 IL-8의 발현을 증가시킨다.

사람의 기도 상피세포에서 PAR-2의 활성화는 IL-6와 IL-8과 같은 전 염증성 시토카인의 생산을 야기한다고

보고된 바 있다[8-10]. 사람의 잇몸 상피세포에서의 염증 반응에 대한 집 먼지 진드기 추출물의 직접적인 효과를 알아보기 위해 집 먼지 진드기 추출물에 의한 시토카인의 발현을 확인하였다. 집 먼지 진드기 추출물을 3시간 동안 처리한 후, IL-8의 발현의 증가를 확인할 수 있었다(Fig. 3A 와 3B).

고 찰

본 연구는 천식 유발성 알레르겐인 집 먼지 진드기 추출물이 사람의 잇몸 상피세포의 생리적 또는 병리적 현상에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위해 진행되었다. 공기 중에 떠다니는 알레르겐은 호흡하는 과정에서 체내로 유입되며 기도 상피조직에 도달하기 이전에 잇몸 상피조직에 직접적으로 노출될 가능성이 있다. 몇몇 알레르겐은 천식의 발병과 밀접한 관련이 있으며, 치은염과 치주염을 포함한 치주질환은 만성 염증성 질환이라는 점에서 천식과 비슷한 병리학적 특징을 공유하고 있다. 게다가 불량한 구강건강과 만성 폐 질환의 연관성 또한 이미 보고된 바 있다[19-20]. 때문에 본 연구를 통해 천식 유발성 알레르겐인 집 먼지 진드기 추출물이 사람의 잇몸 상피세포에 어떠한 영향을 미치는지 알아보고자 하였다.

사람의 잇몸 상피세포에서의 칼슘 신호전달 및 칼슘 신호가 생리적 또는 병리적 현상에 미치는 영향에 대해서는 아직 밝혀진 바가 많지 않다. 이전의 보고들을 참고하면 캡사이신(capsaicin)에 의해 일시적 수용체 전위차 바닐로이드 1 통로(transient receptor potential vanilloid 1 channel; TRPV1)가 활성화되어 세포 내 칼슘 농도가 증가되면 사람의 잇몸 상피세포의 증식을 가속화시킨다는 보고가 있었으며[21], *Porphyromonas gingivalis*에 감염된 사람의 잇몸 상피세포에서 칼슘 진동이 야기된다는 보고도 있었다[22]. 이와 같이 칼슘 신호와 생리적 또는 병리적 현상의 연관성에 대한 보고가 있음에도 불구하고, 세포 내 칼슘 농도의 변화가 어떤 경로를 통해 일어나는지 밝힌 연구 결과는 없었다. 이에 본 연구는 천식 유발성 알레르겐인 집 먼지 진드기 추출물이 PLC/IP₃에 의존적인 칼슘 신호전달을 촉발시킨다는 것을 확인하였다(Fig. 2). 이는 이전에 보고된 사람의 기도 상피세포에서 PAR-2의 활성화가 PLC/IP₃에 의존적인 통로의 활성을 야기해 세포 내 칼슘 농도를 증가시킨다는 연구 결과와 같은 양상을 보였다[23].

세포 내 칼슘 농도의 증가는 세포의 병리적 현상과 관련이 깊다[24]. 또한 집 먼지 진드기 추출물이 만성 염증

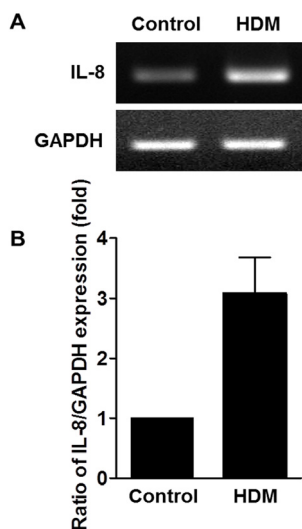


Fig. 3. HDM extract induces expression of pro-inflammatory cytokine, interleukin (IL)-8, in human gingival epithelial cells. (A and B) Expression of IL-8 by HDM extract in human gingival epithelial cells. (A) Cells were treated with HDM extract (50 μ g/ml) for 3 hours. The mRNA levels of IL-8 were analyzed by RT-PCR. (B) The mRNA levels of IL-8 were quantified after the value was normalized to glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (n = 3). The asterisks denote statistically significant differences between the compared values: ** $p < 0.01$

성 질환인 천식을 유발시키는 것으로 미루어보아 잇몸 상피세포의 염증반응에도 관여할 것으로 추측되었다. 이에 본 연구에서는 집 먼지 진드기 추출물에 의한 세포 내 칼슘 농도의 변화뿐만 아니라 전 염증성 시토카인인 IL-8의 발현도 확인하였다(Fig. 3). 이전의 보고들을 보면 사람의 잇몸 상피세포에서 치주질환을 야기하는 *Porphyromonas gingivalis*로부터 생성된 아르기닌(arginine) 특이적인 단백질 분해 효소는 PAR를 활성화시켜 IL-6의 분비를 야기하며[4], *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* 추출물에 의한 IL-8의 발현이 PAR-2에 의해 매개된다는 보고도 있었다[13]. 이와 같이 사람의 잇몸 상피세포와 관련하여 병원성 세균에 대한 보고는 있었지만, 천식 유발성 알레르겐인 집 먼지 진드기 추출물에 대한 연구는 없었다. 더불어 이전의 연구를 통해 사람의 폐 상피세포에서 PAR-2의 활성화는 IL-6와 IL-8의 발현을 유도하는 것을 확인할 수 있으며[9,13], 집 먼지 진드기 추출물의 단백질 가수분해성 알레르겐인 Der p1과 Der p3는 NF- κ B의 전사 활성화에 의존적으로 IL-8의 발현을 촉발시키는 것을 확인할 수 있다[8]. 이러한 연구 결과들은 사람의 잇몸 상피세포나 기도 상피세포에서 집 먼지 진드기 추출물에 의한 PAR-2의 활성이 IL-8의 발현에 있어서 비슷한 영향을 주는 것으로 여겨진다.

이미 많은 연구들을 통해 집 먼지 진드기 추출물에 의해 PAR-2가 활성화된다고 보고되어 왔으며[8-10], 사람의 잇몸 상피세포에 PAR-1 및 2, 3가 존재한다고 알려져 있었다[4]. 본 연구를 통해 사람의 잇몸 상피세포에서 천식 유발성 알레르겐인 집 먼지 진드기 추출물이 PAR-2에 의해 매개되는 PLC/IP₃에 의존적인 통로의 활성을 촉발시켜 소포체로부터 칼슘의 방출을 야기하고, 전 염증성 시토카인인 IL-8의 발현을 증가시키는 것을 확인하였으며 이는 기도 상피세포에서의 연구 결과들과 비슷한 양상을 보였다. 본 연구에서는 칼슘 신호와 IL-8의 발현 사이의 직접적인 연관성을 보여주기 못했지만, 이전의 연구 결과를 보면 사람의 기도 세포에서 세균성 산물에 의한 세포 내 칼슘 농도의 변화는 NF- κ B에 의존적인 유전자 발현과 연관이 있는 것을 확인할 수 있다[25]. 이러한 연구 결과들을 종합해보면 사람의 잇몸 상피세포에서 집 먼지 진드기 추출물에 의한 세포 내 칼슘 농도의 증가가 NF- κ B에 의존적인 IL-8의 발현을 촉발시키는 것으로 사료된다. 본 연구의 결과는 천식과 치주질환에 있어서 염증 진행의 병리학적인 활성화 및 두 질환의 상호작용에 대한 이전의 견해를 새롭게 뒷받침하게 된다고 여겨진다. 앞으로 본 연구와 같은 취지의 연구들을 통해 두 질환 사이의 밀접한 연관성을 더 밝혀낼 수 있다면, 구강 건강이 천식의 진단 표지가 될 수

있을 것으로 여겨진다. 추가적으로, 본 연구뿐만 아니라 다른 연구들에서 천식 및 치은염 치료에 있어 PAR-2가 신중 표적이 될 것이라고 강력히 제안되고 있다. 따라서 집 먼지 진드기 추출물과 같은 천식 유발성 알레르겐과 연관된 염증 반응에 있어서 PAR-2의 길항제의 개발 및 시험은 천식과 치주질환 치료에 큰 도움이 될 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 연세대학교 치과대학 2014년도 교수연구비에 의하여 이루어졌음(6-2014-0073).

Conflict of interest

The authors declare no potential conflicts of interest.

References

1. Nogueira AV, Nokhbehsaim M, Eick S, Bourauel C, Jager A, Jepsen S, Cirelli JA, Deschner J. Regulation of visfatin by microbial and biomechanical signals in PDL cells. *Clin Oral Investig*. 2014;18:171-178. doi: 10.1007/s00784-013-0935-1.
2. Al-Ghutaimel H, Riba H, Al-Kahtani S, Al-Duhaimi S. Common periodontal diseases of children and adolescents. *Int J Dent*. 2014;2014:850674. doi: http://dx.doi.org/10.1155/2014/850674.
3. Jung UW, Kim CS, Choi SH, Kim S. Gingival coverage of iatrogenically denuded labial bone resulting from thermal trauma. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2013;33:635-639. doi: 10.11607/prd.1024.
4. Loubakos A, Potempa J, Travis J, D'Andrea MR, Andrade-Gordon P, Santulli R, Mackie EJ, Pike RN. Arginine-specific protease from *Porphyromonas gingivalis* activates protease-activated receptors on human oral epithelial cells and induces interleukin-6 secretion. *Infect Immun*. 2001;69:5121-5130. doi: 10.1128/IAI.69.8.5121-5130.2001.
5. Gregory LG, Lloyd CM. Orchestrating house dust mite-associated allergy in the lung. *Trends Immunol*. 2011;32:402-411. doi: 10.1016/j.it.2011.06.006.
6. Mehta A, Sequeira PS, Sahoo RC, Kaur G. Is bronchial asthma a risk factor for gingival diseases? A control study. *N Y State Dent J*. 2009;75:44-46.
7. Stensson M, Wendt LK, Koch G, Oldaeus G, Ramberg P, Birkhed D. Oral health in young adults with long-term, controlled asthma. *Acta Odontol Scand*. 2011;69:158-164. doi: 10.3109/00016357.2010.547516.

8. Adam E, Hansen KK, Astudillo Fernandez O, Coulon L, Bex F, Duhant X, Jaumotte E, Hollenberg MD, Jacquet A. The house dust mite allergen Der p 1, unlike Der p 3, stimulates the expression of interleukin-8 in human airway epithelial cells via a proteinase-activated receptor-2-independent mechanism. *J Biol Chem.* 2006;281:6910-6923. doi: 10.1074/jbc.M507140200.
9. Asokanathan N, Graham PT, Fink J, Knight DA, Bakker AJ, McWilliam AS, Thompson PJ, Stewart GA. Activation of protease-activated receptor (PAR)-1, PAR-2, and PAR-4 stimulates IL-6, IL-8, and prostaglandin E2 release from human respiratory epithelial cells. *J Immunol.* 2002;168:3577-3585. doi: 10.4049/jimmunol.168.7.3577.
10. Kauffman HF, Tamm M, Timmerman JA, Borger P. House dust mite major allergens Der p 1 and Der p 5 activate human airway-derived epithelial cells by protease-dependent and protease-independent mechanisms. *Clin Mol Allergy.* 2006;4:5. doi:10.1186/1476-7961-4-5.
11. Reed CE, Kita H. The role of protease activation of inflammation in allergic respiratory diseases. *J Allergy Clin Immunol.* 2004;114:997-1008; quiz 1009. doi: 10.1016/j.jaci.2004.07.060.
12. Pereira AL, Holzhausen M, Franco GC, Cortelli SC, Cortelli JR. Human beta-defensin 2 and protease activated receptor-2 expression in patients with chronic periodontitis. *Arch Oral Biol.* 2012;57:1609-1614. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.archoralbio.2012.04.018>.
13. Shimada T, Sugano N, Ikeda K, Shimada K, Iizuka T, Ito K. Protease-activated receptor 2 mediates interleukin-8 and intercellular adhesion molecule-1 expression in response to *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Oral Microbiol Immunol.* 2009;24:285-291. doi: 10.1111/j.1399-302X.2009.00507.x.
14. Thastrup O, Dawson AP, Scharff O, Foder B, Cullen PJ, Drobak BK, Bjerrum PJ, Christensen SB, Hanley MR. Thapsigargin, a novel molecular probe for studying intracellular calcium release and storage. *Agents Actions.* 1989;27:17-23.
15. Treiman M, Caspersen C, Christensen SB. A tool coming of age: thapsigargin as an inhibitor of sarco-endoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPases. *Trends Pharmacol Sci.* 1998;19:131-135.
16. Cho HJ, Choi JY, Yang YM, Hong JH, Kim CH, Gee HY, Lee HJ, Shin DM, Yoon JH. House dust mite extract activates apical Cl(-) channels through protease-activated receptor 2 in human airway epithelia. *J Cell Biochem.* 2010;109:1254-1263. doi: 10.1002/jcb.22511.
17. Sun G, Stacey MA, Schmidt M, Mori L, Mattoli S. Interaction of mite allergens Der p3 and Der p9 with protease-activated receptor-2 expressed by lung epithelial cells. *J Immunol.* 2001;167:1014-1021. doi: 10.4049/jimmunol.167.2.1014.
18. Hong JH, Hong JY, Park B, Lee SI, Seo JT, Kim KE, Sohn MH, Shin DM. Chitinase activates protease-activated receptor-2 in human airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2008;39:530-535. doi: 10.1165/rcmb.2007 - 0410OC.
19. Hyyppa T. Gingival IgE and histamine concentrations in patients with asthma and in patients with periodontitis. *J Clin Periodontol.* 1984;11:132-137.
20. Ostergaard PA. IgA levels, bacterial carrier rate, and the development of bronchial asthma in children. *Acta Pathol Microbiol Scand C.* 1977;85:187-195.
21. Takahashi N, Matsuda Y, Yamada H, Tabeta K, Nakajima T, Murakami S, Yamazaki K. Epithelial TRPV1 signaling accelerates gingival epithelial cell proliferation. *J Dent Res.* 2014;93:1141-1147. doi: 10.1177/0022034514552826.
22. Belton CM, Goodwin PC, Fatherazi S, Schubert MM, Lamont RJ, Izutsu KT. Calcium oscillations in gingival epithelial cells infected with *Porphyromonas gingivalis*. *Microbes Infect.* 2004;6:440-447. doi: 10.1016/j.micinf.2004.01.007.
23. Oikawa M, Saino T, Kimura K, Kamada Y, Tamagawa Y, Kurosaka D, Satoh Y. Effects of protease-activated receptors (PARs) on intracellular calcium dynamics of acinar cells in rat lacrimal glands. *Histochem Cell Biol.* 2013;140:463-476. doi: 10.1007/s00418-013-1082-0.
24. Lee MG, Ohana E, Park HW, Yang D, Muallem S. Molecular mechanism of pancreatic and salivary gland fluid and HCO₃ secretion. *Physiol Rev.* 2012;92:39-74. doi: 10.1152/physrev.00011.2011.
25. Chun J, Prince A. Activation of Ca²⁺-dependent signaling by TLR2. *J Immunol.* 2006;177:1330-1337. doi: 10.4049/jimmunol.177.2.1330.