

2

제2형 당뇨병모델 생쥐에서 치주인대조직 내
항상성조절인자 변화: 예비연구

Running title : 모델 생쥐 치주인대조직의 OPG 감소

최원준, Ni Xiong, 임원희

서울대학교 치의학전문대학원 치과교정학교실

표기된 두 저자는 공동의 제1저자로서 본 연구에 동일하게 기여하였습니다.

ORCID ID

Wonjun Choi,  <https://orcid.org/0000-0002-8550-1677>Ni Xiong,  <https://orcid.org/0000-0002-2935-537X>Won Hee Lim,  <https://orcid.org/0000-0003-4803-4835>

ABSTRACT

Altered homeostatic factor of db/db mice's periodontal ligament: A pilot study

Wonjun Choi, Ni Xiong, Won Hee Lim

Department of Orthodontics, Seoul National University Dental Hospital

Running title : Decrease of OPG in PDL of diabetic mice

Purpose: Diabetes is a risk factor for periodontal disease and can cause alveolar bone loss. The purpose of this study was to explore the effect of diabetes on homeostatic factor of periodontal tissue using leptin receptor (db/db) mice.

Materials and Methods: The db/db mice(experimental group) were compared with the wild type mice (control group) using histology and immunohistochemical analyses. Collagen fibers were evaluated using H&E, picrosirius red, fibromodulin staining and osteogenic factors (periostin, osteopontin, osteocalcin, osterix), and factors related to osteoclasts (OPG, RANKL) in the PDL were investigated.

Results: Collagen fibers and osteogenic factors in the PDL showed no differences between a control and an experimental group. In an experimental group, expression of receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL) was similar compared with a control group, while expression of osteoprotegerin (OPG) was decreased.

Conclusions: RANKL/OPG ratio may be one of homeostatic factors related to bone remodeling in diabetic mice.

Key words : diabetes, homeostasis, periodontal tissue, RANKL, OPG

Corresponding Author

Won Hee Lim, DDS, MS, PhD

Department of Orthodontics, Seoul National University Dental Hospital, 101, Daehak-ro, Jongno-gu, Seoul, 03080, Republic of Korea.

Tel : +82 2 2072 0272 / Fax : +82 2 2072 3817 / E-mail : whlim@snu.ac.kr

ACKNOWLEDGEMENT This study was supported by grant no 05-2017-0016 from the SNUDH Research Fund.

I. 서론

당뇨병의 유병율이 꾸준히 증가하고 있으며 크게 두 가지 형태로 분류된다^{1,2)}. 1형 당뇨병은 자가면역질환으로 췌장에서 인슐린을 만드는 β -세포의 파괴로 인하여 인슐린이 만들어지지 않는다³⁾. 당뇨병의 대부분을 차지하는 2형 당뇨병은 인슐린이 일부 분비되나 인슐린 저항성으로 인하여 인슐린이 상대적으로 부족해서 세포가 포도당을 효과적으로 연소하지 못한다.

오랜 연구를 통하여 당뇨병이 치은질환과 치주질환을 일으키는 위험 요소라고 보고되어 왔다^{3,4)}. 같은 양의 치태를 가진 어린이와 비교했을 때 1형 당뇨병을 가진 어린이에서 잇몸 염증이 더 많이 나타났다⁵⁾. 또한, 당뇨병 환자에서 치은 출혈과 치은 염증이 더 많이 증가하였다^{6,7)}. 나이, 성별과 구강 위생상태 등의 변수를 고려한 후 정상인과 비교 시 당뇨병 환자에서 치주질환의 유병율이 약 3배 가량 증가하는 것으로 보고되었다^{8,9)}. 한편 당뇨병은 지속적인 치주조직의 파괴를 보이기도 하고¹⁰⁾, 직접적인 관련성이 없는 것으로 알려졌다^{11,12)}. 즉 혈당 조절과 지속적인 치주조직의 파괴가 연관이 되어 있다고 보는 반면^{10,13,14)} 그렇지 않다는 견해도 있다^{11,12,15)}. 혈당 조절이 치주질환의 지속적인 진행에 영향을 미치는 데는 개개인의 다양성이 어느 정도 관여하는 것으로 생각해 볼 수 있다.

당뇨병과 치주질환 사이의 연관 관계가 있다는 많은 보고가 있어 왔지만 당뇨병을 앓고 있는 생쥐의 치아 및 치주조직에서 분자 생물학적 변화의 유무에 대한 보고는 많지 않다¹⁶⁾. 특히 실험실용 생쥐에서는 치주질환이 생기지 않는 것으로 알려졌다¹⁷⁾. 따라서 당뇨2형 모델로 사용되는 생쥐를 실험군으로 하여 대조군과 비교하였을 때 치주조직의 변화를 비교 분석함으로써 당뇨병이 치주조직에 미치는 영향에 대하여 살펴보는 것이 이 논문의 목적이다.

II. 재료 및 방법

1. Leptin receptor (db/db) mice

2형 당뇨병의 모델인 db/db 생쥐는 leptin receptor 유전자에 point mutation이 있는 생쥐이다. 각각 12주령 db/db 생쥐 다섯마리 (실험군)와 일반생쥐 (대조군) 다섯마리를 스탠포드 대학의 동물 보호와 사용 (IA-CUC13146)으로부터 승인을 얻어서 시행하였다.

2. 조직표본 제작

대조군과 실험군에서 상악골을 분리하였다. 4°C에서 하룻밤동안 4% 파라포름알데하이드에 넣어 샘플을 고정시켰다. 이후 탈회를 위하여 19% EDTA에 15일 동안 넣어 두었다. 탈수화를 위하여 다단계의 에탄올을 이용하였고, embedding 시킨 후 8-um 두께로 잘랐다. 조직표본의 제작을 위하여 Superfrost plus 슬라이드(Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)를 사용하였다.

3. 일반염색분석

Hematoxylin and eosin (H&E) staining을 통하여 전반적인 치아와 치주조직의 구조를 분석했다. 치주인대 내의 교원질 섬유질의 전반적인 구조와 주행방향 등을 분석하기 위하여 picrosirius red 염색을 시행하였다. 자연사한 세포를 비교하기 위하여 terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL, Roche, Basel, Switzerland) 키트를 이용하여 염색한 후 형광현미경 하에서 촬영했다.

4. 면역조직화학 (Immunohistochemistry) 염색 분석

면역조직화학 염색을 통하여 치주인대 내의 교원섬유의 양적, 질적 분석을 시행하였으며, 치주인대 내의 골형성 인자의 분자 생물학적 변화를 비교하였으며, 치주인대 내의 세포 변화를 분석하였다.

파라핀을 제거한(deparaffinized) 조직표본을 hydrogen peroxide에 5분동안 담가서 peroxidase activity를 얻었다. phosphate-buffered saline (PBS)에서 씻은 후 5% goat serum (Vector, Burlingame, CA, USA)에 1시간 동안 처리하였다. 각각의 항체에 대한 1차 항체 (primary antibody)로 처리한 후에 4°C 냉장고에 하룻밤동안 보관하였다. 30분 동안 biotinylated 2차 항체 (secondary antibodies; Vector, Burlingame, CA, USA)로 처리하고, PBS로 씻은 후에 30분동안 Avidin/biotinylated enzyme complex 키트(ABC Peroxidase Standard Vectastain PK-4000; Vector, Burlingame, CA, USA)로 처리했다. 3,3'-diaminobenzidine (DAB) substrate 키트 (Vector Peroxidase substrate DAB SK-4100; Vector, Burlingame, CA, USA)를 사용하여 발색이 되도록 기다렸다. 본 실험에 사용된 항체 (antibody)는 periostin (Abcam, Milton, Cambridge, UK; 1:200 dilution), fibromodulin (Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA, USA; 1:500 dilution), osteopontin (OPN, NIH LF 17, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA; dilution 1:2500), osteocalcin (Merck Millipore, Burlington, MA, USA; dilution 1:2000), osterix(Abcam, Milton, Cambridge, UK; 1:100 dilution), Osteoprotegerin (OPG, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA; dilution 1:100), receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA; dilution 1:1000), cluster of differentiation (CD68, Thermo Scientific,

Waltham, MA, USA; dilution 1:100), interleukin-alpha (IL-alpha, Origene, Rockville, MA, USA; dilution 1:1000) 이었다.

III. 결과

치아의 전체적인 조직학적 형태와 크기는 두 그룹 사이에 차이가 없었다. 또한, 치아와 치조골 사이에 위치한 치주인대 안에서 관찰되는 세포 수와 교원질 섬유 주행 방향에 차이가 없었다. (Fig. 1. A, B). 치주인대의 넓이를 비교했을 때 대조군과 실험군 사이에 차이가 없었다. 치조골의 양과 치조골 내의 lacunae 수도 두 그룹 사이에 차이가 없었다. 확대한 대조군과 실험군의 사진에서 보면 치주인대 내의 세포 수와 교원질 섬유의 주행 양상 등도 차이가 없었다. (Fig. 1. C, D).

치주인대 내의 교원질 섬유 구조와 관련 분자 생물학적 변화 등을 관찰하기 위해 picrosirius red, periostin과 fibromodulin염색을 시행하였다 (Fig. 2). 대조군과 비교했을 때 실험군에서 교원질 섬유의 주행 방향은 같았다. 또한 교원질 섬유 사이의 거리와 전반적인 양도 대조군과 실험군 사이에 차이가 없었다 (Fig. 2. A, B). 대조군과 비교했을 때 실험군에서 periostin 발현정도에서 차이를 발견할 수 없다 (Fig. 2. C, D). 대조군과 실험군에서 fibromodulin의 발현정도는 차이가 없었다 (Fig. 2. E, F).

치주인대 내의 골형성 인자의 분자 생물학적 변화를 살펴보면 osteopontin의 발현량은 대조군과 실험군 사이에 차이가 없었다 (Fig. 3. A, B). osteocalcin의 발현정도를 비교해 볼 때 대조군과 실험군 사이에 차이가 없었다 (Fig. 3. C, D). 위의 결과와 유사하게 osterix의 발현정도도 대조군과 실험군에서 차이가 없었다 (Fig. 3. E, F).

TUNEL염색에서 실험군의 apoptosis가 대조군에 비하여 증가되어 있었다 (Fig. 4. A, B). 대조군과 비교 시 실험

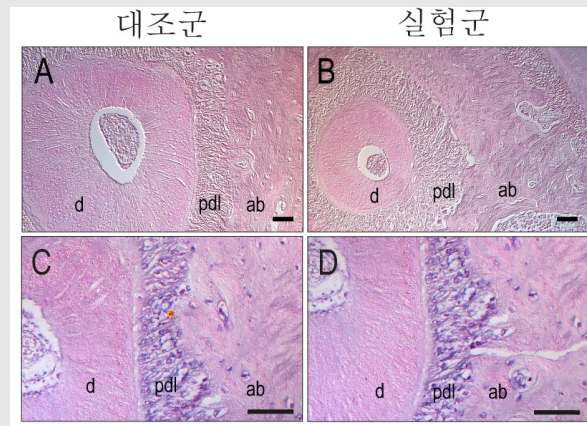


Figure 1. H&E 염색을 통해 본 생쥐 치주복합체의 전반적인 구조

(A, B) No difference is found in general histologic appearance between a control and an experimental group. (C, D) In higher magnification, cells and collagen fibers in an experimental group show no difference compared to a control group. d, dentin; ab, alveolar bone; pdl, periodontal ligament. All scale bars are 500 μ m.

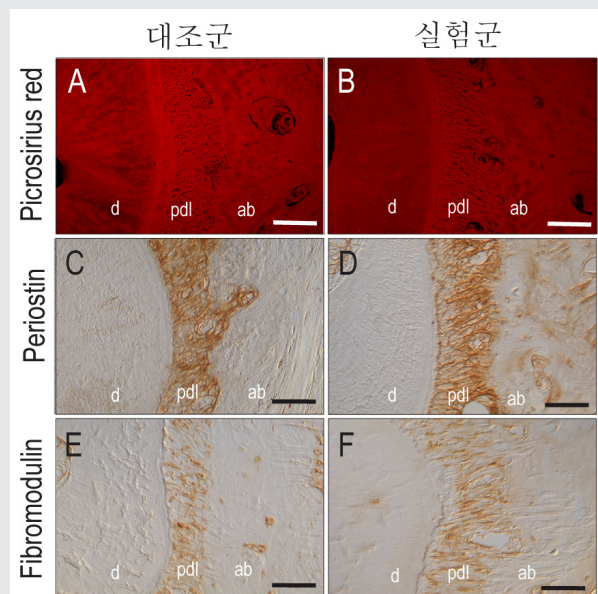


Figure 2. 치주인대 내의 교원섬유 관련 분자 생물학적 변화

(A, B) There is no difference between a control and an experimental group in picrosirius red staining. (C, D) There is no difference in expression of periostin between a control and an experimental group. (E, F) There is no difference in expression of fibromodulin between a control and an experimental group. d, dentin; ab, alveolar bone; pdl, periodontal ligament. All scale bars are 500 μ m.

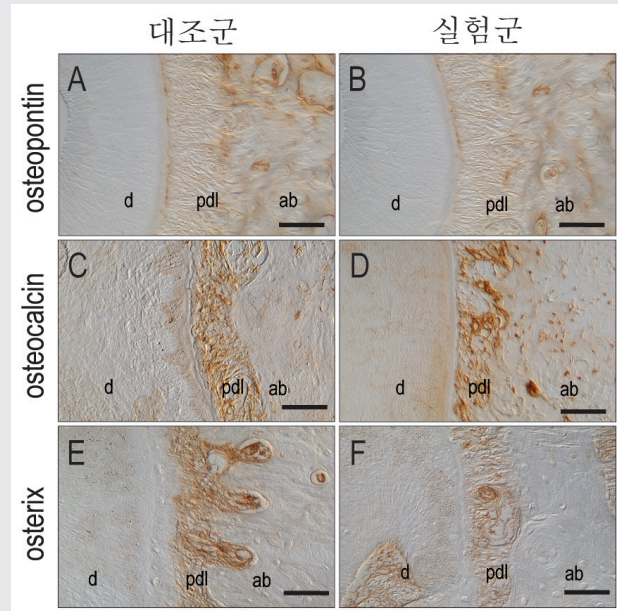


Figure 3. 치주인대 내의 골형성 인자의 분자 생물학적 변화

(A, B) Expression of osteopontin shows no difference between a control and an experimental group. (C, D) Expression of osteocalcin shows no difference between a control and an experimental group. (E, F) No difference in expression of osteonin is found between two groups. d, dentin; ab, alveolar bone; pdl, periodontal ligament. All scale bars are 500 μ m.

험군에서 OPG의 발현정도는 감소하였다 (Fig. 4. C, D). 반면, RANKL의 발현정도는 대조군과 실험군 사이에 차이가 없었다 (Fig. 4. E, F). CD68 염색에서 대조군과 실험군 사이에 차이가 없었다 (Fig. 4. G, H). IL- α 염색에서 대조군과 실험군 사이에 차이가 없었다 (Fig. 4. I, J).

IV. 고찰

H&E염색을 통하여 조직 형태학적 비교를 했을 때 실험군과 대조군 사이에 차이는 없었다. 제2형 당뇨병 모델 생쥐에서 고혈당 식이를 제공할 경우에 Advanced glycation

end products (AGEs)가 축적되어 심각한 치주질환이 야기되며 이에 따른 치주조직에서의 골소실 등의 뚜렷한 변화를 관찰할 수 있다^{18,19}. 이번 실험에서는 고혈당 식이 대신 일반 식이 제공되었으며 치주질환을 야기하는 세균 등을 이식하지 않아서 치주조직에서의 변화는 대조군과 다르지 않은 것으로 생각된다. 치주인대 안에서 발현되는 periostin과 fibromodulin의 양도 실험군과 대조군 사이의 차이는 없었다. Periostin은 치주인대 내에서 발현되는 조골세포인자이다. Fibromodulin은 치주인대 내에서 발현되나 정확한 기전에 대하여는 알려진 바가 없다. 다만, 혈관에서 fibromodulin은 교원질 섬유를 조절하는 것으로 보고되었고²⁰ 상아질에서 광화작용 (mineral-

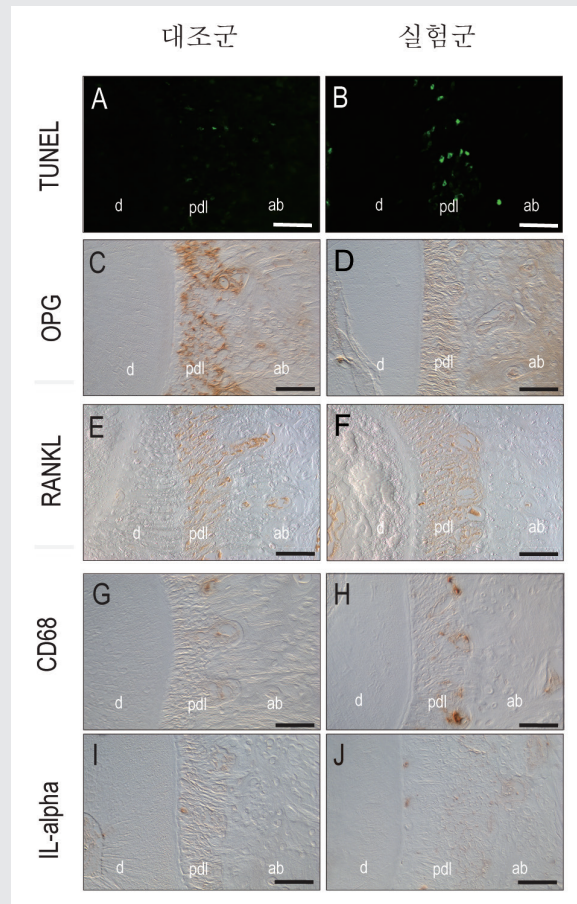


Figure 4. 치주인대 내의 파골세포 관련 분자 생물학적 변화

(A, B) Apoptosis in an experimental group is decreased by TUNEL staining. (C, D) Expression of OPG is decreased in an experimental group. (E, F) Expression of RANKL is not altered in an experimental group. (G, H) CD68 staining shows no difference between a control and an experimental group. (I, J) IL- α staining shows no difference between a control and an experimental group. d, dentin; ab, alveolar bone; pdl, periodontal ligament. All scale bars are 500 μ m.

ization)을 억제하는 것으로 보고되었다²¹⁾.

치주인대 내의 골형성 인자의 발현정도를 비교하기 위하여 osteopontin, osteocalcin과 osterix를 면역조직화학 염색을 시행하였다. 대조군과 비교하였을 때 실험군에서 치주인대 내의 골형성 인자의 발현정도에 차이는 없었

다. 즉, 2형 당뇨병을 앓고 있는 실험군 생쥐의 치주인대 내에서 교원질 섬유질의 질적, 양적 차이를 찾을 수 없었고, 골형성 인자의 발현정도에서도 차이가 없었다. 반면, 2형 당뇨병을 앓고 있는 사람에서 정상적인 골밀도를 가지고 있지만, 골질의 빈도가 증가하는데^{22,23)} 이는 골형성인자

의 분화의 변화와 골형성인자의 감소 등에 기인한다²⁴⁾. 2형 당뇨병 생쥐 모델에서 골형성인자인 OPN, OCN, Runx2등이 발현이 현저히 감소되었다²⁵⁾.

골조직은 조골세포와 파골세포의 활동으로 끊임없는 리모델링 과정을 통해 항상성을 유지하고 있다. 골조직의 리모델링에 관여하는 주요 요소는 Receptor activator of nuclear factor kappa-B (RANK), RANKL과 OPG 시스템이다. RANKL은 골흡수의 증가와 관련된 일련의 과정에 관여하며 OPG는 RANKL의 억제제로 골흡수를 억제하는 과정에 관여한다²⁶⁾. 따라서 RANKL/OPG의 상대적 비율이 골조직의 항상성을 결정한다²⁷⁾. 실험군에서 OPG의 발현량은 감소하였고, RANKL의 발현량은 대조군과 비교 시 차이가 없다. 파골세포의 활성화에 관여하는 CD68과 IL-alpha의 발현량을 비교했을 때 실험군과 대조군 사이의 차이는 보이지 않았다. 한편 세포자멸사를 보여주는 apoptosis는 실험군에서 증가하였다. 실험군에서 OPG의 발현량이 감소하는 것으로 미루어 볼 때 골조직의 항상성의 변화를 가져올 수 있다고 사료된다. 즉 RANKL/OPG가 일정한 비율을 유지하지 않고 OPG가 감소함으로써 골조직 리모델링에 변화가 생길 수 있다. 본 실험의 결과와 동일하게 2형 당뇨병 생쥐에서 apoptosis의 증가되었고 OPG 발현은 감소되었다^{25,28)}. 반면, 2형 당뇨병 환자에서 apoptosis는 증가한 반면, OPG 발현량은 다양한 결과를 보였다^{29,30)}. 치주인대세포를 이용한 실험에서 포도당의 농도에 따라서 RANKL/OPG의 비율이 바뀌

며 OPG의 양이 감소할 경우 치조골 소실로 이어졌다³¹⁾. 2형 당뇨병 모델 생쥐에서 치조골의 파괴를 동반한 경우에 염증 인자 등의 변화가 있었다 28. 본 실험에서 IL-alpha의 발현량의 차이가 없는 이유는 염증을 동반한 치조골의 소실 등을 보이지 않는 등 당뇨병의 진행 정도가 심하지 않기 때문으로 생각된다. 반면, 염증이 있는 치주 조직에 이런 변화가 생길 경우에 치조골 항상성 유지가 어려울 것으로 사료된다.

당뇨병을 가진 동물에서 치주조직에 나타나는 항상성 인자에 변화에 관한 보고가 많지 않았었다. 이번 실험을 통하여 제2형 당뇨병 모델 db/db 생쥐에서 치주조직의 조직학적, 면역조직화학적 변화를 보고하였다는 점에서 의미가 있다. 다만 본 실험에서는 각각 5마리의 적은 개체수의 생쥐에서 혈당을 직접 측정하지 않았으며 세포를 이용하여 정량변화를 병행하지 않은 한계가 있다. 향후에 나이 든 당뇨병 생쥐를 이용하여 현재의 결과와 비교 분석을 한다면 임상에 활용할 수 있는 정보를 얻을 수 있을 것으로 사료된다.

V. 이해상충

The authors declare that they have no competing interests.

참 고 문 헌

1. Lin KY, Hsieh WH, Lin YB, Wen CY, Chang TJ. Update in the epidemiology, risk factors, screening, and treatment of diabetic retinopathy. *J Diabetes Investig* 2021;12:1322-1325.
2. Cho NH, Shaw JE, Karuranga S, et al. IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. *Diabetes Res Clin Pract* 2018;138:271-281.
3. Mealey BL, Ocampo GL. Diabetes mellitus and periodontal disease. *Periodontol 2000* 2007;44:127-153.
4. Mealey BL, Moritz AJ. Hormonal influences: effects of diabetes mellitus and endogenous female sex steroid hormones on the periodontium. *Periodontol 2000* 2003;32:59-81.
5. Cianciola LJ, Park BH, Bruck E, Mosovich L, Genco RJ. Prevalence of periodontal disease in insulin-dependent diabetes mellitus (juvenile diabetes). *J Am Dent Assoc* 1982;104:653-660.
6. Ervasti T, Knuuttila M, Pohjamo L, Haukipuro K. Relation between control of diabetes and gingival bleeding. *J Periodontol* 1985;56:154-157.
7. Cutler CW, Machen RL, Jotwani R, Iacopino AM. Heightened gingival inflammation and attachment loss in type 2 diabetics with hyperlipidemia. *J Periodontol* 1999;70:1313-1321.
8. Shlossman M, Knowler WC, Pettitt DJ, Genco RJ. Type 2 diabetes mellitus and periodontal disease. *J Am Dent Assoc* 1990;121:532-536.
9. Emrich LJ, Shlossman M, Genco RJ. Periodontal disease in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Periodontol* 1991;62:123-131.
10. Taylor GW, Burt BA, Becker MP, et al. Non-insulin dependent diabetes mellitus and alveolar bone loss progression over 2 years. *J Periodontol* 1998;69:76-83.
11. Barnett ML, Baker RL, Yancey JM, MacMillan DR, Kotoyan M. Absence of periodontitis in a population of insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) patients. *J Periodontol* 1984;55:402-405.
12. Tervonen T, Karjalainen K, Knuuttila M, Huuonen S. Alveolar bone loss in type 1 diabetic subjects. *J Clin Periodontol* 2000;27:567-571.
13. Tsai C, Hayes C, Taylor GW. Glycemic control of type 2 diabetes and severe periodontal disease in the US adult population. *Community Dent Oral Epidemiol* 2002;30:182-192.
14. Sadeghi R, Taleghani F, Mohammadi S, Zohri Z. The Effect of Diabetes Mellitus Type I on Periodontal and Dental Status. *J Clin Diagn Res* 2017;11:ZC14-ZC17.
15. Sabharwal A, Gomes-Filho IS, Stellrecht E, Scannapieco FA. Role of periodontal therapy in management of common complex systemic diseases and conditions: An update. *Periodontol* 2000 2018;78:212-226.
16. Fu X, Liu B, Sun J, et al. Perturbation of mitochondrial dynamics links to the aggravation of periodontitis by diabetes. *J Histo-technol* 2023;1-12.
17. Zang Y, Song JH, Oh SH, et al. Targeting NLRP3 Inflammation Reduces Age-Related Experimental Alveolar Bone Loss. *J Dent Res* 2020;99:1287-1295.
18. Lalla E, Lamster IB, Feit M, Huang L, Schmidt AM. A murine model of accelerated periodontal disease in diabetes. *J Periodontol Res* 1998;33:387-399.
19. Lalla E, Lamster IB, Stern DM, Schmidt AM. Receptor for advanced glycation end products, inflammation, and accelerated periodontal disease in diabetes: mechanisms and insights into therapeutic modalities. *Ann Periodontol* 2001;6:113-118.
20. Shami A, Gustafsson R, Kalamajski S, et al. Fibromodulin deficiency reduces low-density lipoprotein accumulation in atherosclerotic plaques in apolipoprotein E-null mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013;33:354-361.
21. Goldberg M, Septier D, Oldberg A, Young MF, Amey LG. Fibromodulin-deficient mice display impaired collagen fibrillogenesis in predentin as well as altered dentin mineralization and enamel formation. *J Histochem Cytochem* 2006;54:525-537.
22. Ballato E, Deepika F, Prado M, et al. Circulating osteogenic progenitors and osteoclast precursors are associated with long-term glycemic control, sex steroids, and visceral adipose tissue in men with type 2 diabetes mellitus. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2022;13:936159.
23. Ehnert S, Freude T, Ihle C, et al. Factors circulating in the blood of type 2 diabetes mellitus patients affect osteoblast maturation - description of a novel in vitro model. *Exp Cell Res* 2015;332:247-258.
24. Carnevale V, Romagnoli E, D'Erasmo L, D'Erasmo E. Bone damage in type 2 diabetes mellitus. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2014;24:1151-1157.
25. Li J, He W, Liao B, Yang J. FFA-ROS-P53-mediated mitochondrial apoptosis contributes to reduction of osteoblastogenesis and bone mass in type 2 diabetes mellitus. *Sci Rep* 2015;5:12724.
26. Boyce BF, Xing L. Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. *Arthritis Res Ther* 2007;9 Suppl 1:S1.
27. Badiger AB, Gowda TM, Chandra K, Mehta DS. Bilateral Interrelationship of Diabetes and Periodontium. *Curr Diabetes Rev*

참 고 문 헌

- 2019;15:357-362.
28. Li Z, Zheng Z, Pathak JL, et al. Leptin-deficient ob/ob mice exhibit periodontitis phenotype and altered oral microbiome. *J Periodontol Res* 2023;58:392-402.
29. Sassi F, Buondonno I, Luppi C, et al. Type 2 diabetes affects bone cells precursors and bone turnover. *BMC Endocr Disord* 2018;18:55.
30. Rashad NM, El-Shal AS, Shalaby SM, Abdel-Nour HM, Sarhan WM. Osteoprotegerin expression and serum values in obese women with type 2 diabetes mellitus. *Mol Biol Rep* 2021;48:7095-7104.
31. Zhang L, Ding Y, Rao GZ, Miao D. Effects of IL-10 and glucose on expression of OPG and RANKL in human periodontal ligament fibroblasts. *Braz J Med Biol Res* 2016;49:e4324.