

저용량 독시싸이클린 투여가 당뇨환자 및 성인성 치주염 환자의 치은열구액내 효소 활성도에 미치는 영향에 관한 비교연구

정성념 · 한수부

서울대학교 치과대학 치주과학교실

I. 서론

치주질환의 치료에 대한 연구는 치태, 특히 치은연하치태 세균을 효과적으로 제거함으로써 치주질환의 진행을 억제하려는 데 초점을 두고 이루어져왔다^{1, 2)}. 기계적 혹은 외과적인 방법에 의한 치태조절은 치주치료의 근본이 되어왔으며, 여기에 다양한 약물을 병용하여 치료효과를 높이려는 치료법이 시행되어져왔다. 치주치료의 병용약물로서 전신적으로 투여한 항생제가 임상 및 미생물학적으로 치주조직의 상태를 개선시킨다는 연구결과가 현재 널리 인정되고 있으며^{3, 4, 5)}, 특히 테트라싸이클린은 치은열구내 세균구성에 관한 효과^{6, 7, 8)}, 혈중농도보다 치은열구액내에 높은 농도로 집중되는 성질^{9, 10)}, substantivity가 큰점^{11, 12)}, 섬유아세포와 결합조직의 부착을 증진시키는^{13, 14)} 등의 치료적 잇점이 인정되어 오래 전부터 치주치료에 병용되어져왔다.

이와 더불어 테트라싸이클린 계열의 항생제가 항미생물작용과는 무관한 기전으로 교원질분해효소(collagenase)의 활성을 억제하고¹⁵⁻²⁰⁾, 교원질 합성을 증진시키며²¹⁾, 중성구와 파골세포의 기능을 억제하고 결합조직 및 기저막 분해에 관여하는 여러 가지 matrix

metalloproteinase를 억제한다는 사실이²²⁻²⁴⁾ 밝혀졌다. 그러나 테트라싸이클린 계열의 항생제를 장기적으로 적용하였을 때는 세균에 대한 내성발현 및 위장관 장애, 기타 전신적인 부작용을 초래할 수 있다^{25, 26, 27)}. Golub 등¹⁸⁾은 테트라싸이클린 계열의 항생제가 항균작용을 가지지 않으면서 효소억제작용만을 나타낼 수 있는 방법에 대한 연구를 진행하여, 항생제로서 흔히 이용되는 정량(50mg 또는 100mg)의 독시싸이클린 캡슐 대신에, 교원질 분해효소는 억제하지만 혈중 농도가 항미생물작용을 나타내는 수준에 다르지 못하는 20mg(때로는 30mg)의 저용량 독시싸이클린 제제(LDD capsule)를 치주치료에 도입하게 되었다. 이때 사용된 독시싸이클린은 반합성 테트라싸이클린으로 흡수율이 좋고 반감기가 길며 상업적으로 이용할 수 있는 테트라싸이클린 중에서 가장 강력한 교원질 분해효소 억제작용을 가지고 있다^{18, 22, 23)}. Golub 등²⁸⁻³⁰⁾은 일련의 연구를 통하여 다양한 기간동안 LDD를 성인성 치주염환자에게 복용시켰는데, 항생제 투여시 예견되는 가장 큰 부작용 중의 하나인 저항균주의 발현없이, 치주낭 깊이, 부착수준, 치은 열구액내 교원질 분해효소 활성도에 유의한 개선을 보였음을 보고하였다.

이러한 결과는 LDD가 항균작용과는 무관한 기전으로 치주조직의 상태를 개선시킬 수 있으며, 장기적인 LDD 복용요법이 기계적인 치주치료의 유용한 보조치료법이 될 수 있음을 시사하였다³¹⁾.

테트라사이클린의 교원질분해효소활성 억제 작용은 효소의 기원에 따라 특이성을 갖는 것으로 알려져 있다^{32, 33)}. 즉 PMN으로부터 만들어지는 교원질분해효소(Matrix metalloproteinase -8; MMP-8)는 완전히 억제하나 섬유아세포로부터 유래된 교원질분해효소(MMP-1)에 대해서는 억제능력이 매우 적은 것으로 알려져 있다. Sorsa 등³²⁾은 성인성 치주염환자와 당뇨병 치주염환자의 치은 열구액내의 교원질분해효소는 독시사이클린에 의해 쉽게 억제되는 PMN 기원의 효소이고, 국소 유년성 치주염환자의 치은열구액 교원질분해효소는 일상적인 치료용량의 독시사이클린에 의해서 억제되지 않는 섬유아세포 기원의 교원질분해효소임을 보고하였다. 이러한 선택적인 효소억제작용은 염증시 조직파괴는 줄이면서 조직의 보전에 필요한 정상적인 교원질 대사에는 영향을 미치지 않는 효과를 가진다고 하겠다.

당뇨환자에서는 교원질 합성저하³⁴⁾, 새로 합성된 교원질의 분해 증가³⁵⁾, 치은 및 피부내의 교원질 분해효소 활성도의 증가³⁶⁾ 등을 포함한 광범위한 교원질 대사의 변이를 보인다. 교원질을 포함한 세포외 기질의 과도한 분해를 특징으로 하는 치주질환은 당뇨병 환자의 주요 합병증 중의 하나로 알려져 있고, 비당뇨환자에서 보다 더욱 발생 빈도가 높고 심도가 큰 것으로 보고되었다^{37, 38)}. 당뇨병환자에서 나타나는 다양한 생화학적 변화 중에서, 치주조직 파괴에 가장 주된 역할을 하는 것은 치은조직내의 교원질 분해효소 활성의 증가인 것으로 추측된다. 당뇨에 이환된 동물에게 minocycline 이나 doxycycline을 투여하여 증가된 교원질 분해효소의 활성을 정상화시

킬 수 있었음을 보고한 논문이 이미 발표된 바 있으나^{20, 36)} 당뇨에 이환된 사람에서의 저용량 독시사이클린의 치료효과에 대한 연구는 아직 미비하다. 당뇨환자에서는 항생요법에 의한 항균작용보다는 증가된 교원질 분해효소 활성억제에 초점을 맞춘 비교적 장기적인 약의 복용이 더 유용할 것으로 생각되어 이 연구를 시작하게 되었다.

엘라스틴 분해효소(elastase)는 조직이 손상을 입거나 세균에 의하여 감염을 받았을 때 백혈구에 의해 방출되는 단백분해효소의 일종으로, 결합조직의 중요 구성 단백질의 하나인 엘라스틴의 대사에 관여하며 교원질과 젤라틴, proteoglycan의 분해에도 관여하는 것으로 알려져 있다³⁹⁾. Gustaffson 등⁴⁰⁾과 Meyer 등⁴¹⁾은 백혈구성 엘라스틴 분해효소가 치주질환에 이환된 환자의 치은열구액에 다량 존재함을 확인하였고, 엘라스틴 분해효소의 활성도가 치주조직 파괴의 심도를 반영하는 질환의 marker로서 유용하게 사용될 수 있음을 보고한 바가 있다. 따라서, 치은열구액에서 발견되는 교원질 분해효소와 엘라스틴 분해효소는 세포외기질의 생리적인 그리고 병적인 이화작용을 반영하는 지표로 사용될 수 있으며 또한 저용량 독시사이클린에 의해 억제될 수 있기 때문에 이 연구에서는 위의 두가지 효소의 활성도를 검사하였다.

이 연구의 목적은, 성인성 치주염 및 당뇨에 이환된 치주염환자에서 저용량 독시사이클린에 의한 치료효과를 임상 지수 및 치은열구액내의 효소 활성도를 통해 평가하여 이 치료법이 기계적 치주치료의 유용한 보조수단이 될 수 있는가를 알아보고, 당뇨환자에게 저용량 독시사이클린의 장기 복용 효과에 관한 연구를 시행하기에 앞서 2주간의 실험적 투여를 통해 안전성을 검증하고 적절한 투약기간 및 재투약 시기에 관한 기본적 정보를 얻고자 하는 것이다.

II. 연구대상 및 연구방법

1. 연구대상

치주낭 깊이가 4mm 이상인 부위를 최소 2부위 이상 지닌 환자를 대상으로 하였으며, 전신적으로 건강한 성인형 치주염 환자 28명(실험군 15명 36부위, 대조군 13명 33부위)과 당뇨에 이환된 치주염 환자 21명(실험군 11명 28부위, 대조군 10명 22부위)을 선택하였다. 환자의 평균연령은 45세로 남자 29명 여자 20명이었고, 총 119부위에서 임상검사 및 효소활성도 검사를 시행하였다. 환자선택에 있어서 임신부 및 수유부, 최근 6개월 이내에 치주치료를 받은 경험이 있는 자, 최근 3개월 이내에 항생제 치료를 받은 자, 및 테트라사이클린 제제에 과민반응이 있는 자는 제외하였다. 당뇨환자는 American Diabetes Association과 World Health Organization의 기준에 의하여 인슐린비의존성 당뇨병(NIDDM)으로 진단된 환자⁴⁴⁾ 중에서 경구 혈당 강하제를 복용하면서 비교적 당이 잘 조절되는 환자를 대상으로 하였으며(140mg/dl < fasting blood sugar level < 200mg/dl), 각 연구대상에게 실험의 목적 및 취지를 개별적으로 설명하고 동의를 얻었다.

2. 연구방법

모든 연구대상에게 초음파기기를 이용한 치석제거술을 시행하였고 그후 2주째 되는 날에, 검사를 시행하고(임상지수 측정 및 효소활성도 검사를 위한 치은열구액 채취) 치근활택술을 시행하였다. 치근활택술을 시행한 후, 성인성 치주염 환자들과 당뇨에 이환된 치주염 환자들을 임의로 각각 실험군과 대조군으로 나누어, 실험군은 저용량 독시사이클린(capsule 당 20mg)을 하루 두 번씩 2주간 복용하도록 하였고 대조군은 같은 방법으로

위약을 2주간 복용하도록 하였다. 약제를 투여하기 시작한지 2주, 4주, 8주 째에 각각 임상검사 및 열구액내 효소 활성도 검사를 실시하였다. 이때 실험군과 대조군에 의한 약제투여 및 제 검사는 이중맹검법에 의해 실시되었다.

3. 임상검사

각 부위에서 다음의 사항을 측정하였다.

- 1) 치태지수(Silness and Loe)⁴²⁾
- 2) 치은지수(L e and Silness)⁴³⁾
- 3) 치주낭 깊이 및 치주부착수준(Probing pocket depth and Probing attachment level)
- 4) 치은열구액 채취 및 양 측정

대상치면으로부터 타액을 분리하고 건조한 다음 Periapaper strip(Proflow, Inc., Amityville, NY)을 치은열구내에 1mm까지 삽입한 후 30초후에 제거하고 새로운 periopaper를 다시 삽입하여 3분간 둔 후 제거하여 Periotron 6000R(Harco Electronics Ltd., Winnipeg, Canada)에서 양을 측정하였다. 채취한 열구액은 0.5ml microcentrifuge(Sarstedt, Numbrecht, Germany)에 넣어 생화학적 분석시까지 -70℃에서 냉동보관하였다. 채취한 열구액은 2개월 이내에 효소활성도 검사를 실시하였다.

4. LDD의 제조

Low dose doxycycline(LDD) capsule은 서울대학 병원 약제부에서 Vibramycin®(Pfizer Phamaceu. USA)을 이용하여 doxycycline이 20mg씩 함유되도록 제조하였고, microcrystalline cellulose(Avicel®, USA))을 비활성 filler로 사용하였다

5. 효소활성도검사

(1) 재료 및 시약

Type I collagen, Brij 35, 30% bis-acrylamide(electrophoresis grade), sodium dodecyl sulfate와 standard elastase, elastase의 합성 기질인 methoxysuccinyl-ala-ala-pro-val-p-nitroanilide는 Sigma Chemical Co.(St. Louis, USA)로부터, Phenylmercuric chloride(PMC)는 Fluka Chemical Co(Buchs, Switzerland)로부터 구입하였고 기타 시약은 analytical/electrophoresis grade를 사용하였다.

(2) 교원질 분해효소 활성검사

채취한 열구액은 200 μ l의 collagenase assay buffer(50 mM Tris HCl, pH 7.5, 200 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, 0.05%(v/v) Brij 35, 0.05%(w/v) sodium azide 구성됨)로 4°C에서 1시간 동안 추출하였다. 12000g으로 10분간 원심분리한 후 각 sample을 0.2 μ l microfilterfuge tube(Rainen Instru. Co., Woburn, MA)을 통하여 멸균하였다. 활성형의 교원질 분해효소량을 측정하기 위하여 치은열구액 희석용액 50 μ l에 type I 교원질 용액을 최종농도 1.5 μ M이 되도록 넣어 22°C에서 24시간 동안 반응시켰다. 비활성형을 포함한 총 효소량 측정을 위해 동일 성분의 혼합액에 비활성형 교원질 분해효소를 활성화시키는 것으로 알려진 phenylmercuric chloride (PMC)를 최종농도 1 mM이 되도록 추가하여 동일한 조건으로 반응시켰다. 반응후 14 μ l의 6배농축 sample buffer(0.36 M Tris-HCl pH 6.8, 36% glycerol, 0.24% bromophenol blue, 18% sodium dodecyl sulfate, 0.6 M DTT)을 넣고 60°C에서 30분간 가열하여 반응을 중지시켰다.

반응물은 8% separating gel과 5% stacking gel을 이용한 SDS-PAGE방법으로 분리하였고 1.2 mM Coomassie Brilliant blue R250으로 염색하였다. Type I collagen α -chain이 교원질 분해효소에 의해 3/4 α -chain으로 전환되는

정도를 Imaging Densitometer Model GS-70(Bio-Rad Laboratories, 2000, Alfred Nobel Drive, Hercules, CA)와 Molecular Analyst^R software (Macintosh Software for Bio-Rad's Image analysis systems)을 이용하여 정량하였다. 교원질 분해효소의 활성도는 아래의 공식을 이용하여 교원질의 % lysis로 표시하였다.

$$\text{교원질 분해효소 활성도} = \frac{4/3(\alpha^A + \alpha^2A)}{4/3(\alpha^A + \alpha^2A) + (\alpha^1 + \alpha^2)} \times 100$$

LDD의 복용 실험에 앞서 예비실험(preliminary study)으로, 당뇨병자와 성인성 치주염 환자(각각 5명)의 치은열구액내 교원질 분해효소의 doxycycline에 의한 억제정도(susceptibility)를 in-vitro로 측정하였다. 성인형 치주염 환자와 당뇨병자 모두 doxycycline에 대한 교원질 분해효소의 IC₅₀이 약 15-25 μ M로 PMN origin의 collagenase인 MMP-8의 IC₅₀(25 μ M)^{20, 33)}과 유사하였다.

(3) 엘라스틴 분해효소의 활성도 측정

96-well ELISA plate 내에 각 25 μ l 씩의 치은열구액 희석액을 넣고 여기에 PMN elastase의 특이기질인 1.33mM methoxysuccinyl-ala-ala-pro-val-p-nitroanilide 200 μ l을 함께 넣어 37°C에서 2.5시간동안 반응시켰다.

2.5 시간후에 405 nm 파장에서의 optical density로 효소와 기질간의 발색반응 정도를 측정하였고, elastase의 활성도는 μ g substrate degraded/hour/GCF strip으로 표현하였다.

6. 통계분석

각 검사부위를 분석의 단위로 삼았다. 연구결과의 분석은 동일 치료군 내에서 baseline 값과 각 검사시기에 따른 지수의 변화는 paired-t test법을 이용하여 차이를 비교하였

고, 동일 검사시기에 모든 치료군 간의 상호 비교는 분산분석법(ANOVA test)중 Tukey법을 이용하여 시행하였으며, 이후 다시 성인형 치주염 환자와 당뇨병 환자를 분리하여 독시사이클린 투여군과 대조군 사이의 차이를 Tukey법으로 비교하였다. 치태지수와 치은지수, 치은열구액 양, 교원질 분해효소 활성도와 엘라스틴 분해효소 활성도는 각 처치군의 평균값을 비교하였고, 치주낭 깊이와 치주부착 수준은 평균값과 함께 치주낭 깊이 감소와 부착획득을 비교하였다. 통계처리는 SAS® Computer Package를 이용하여 시행하였고, 각 data는 평균과 표준오차(SE)를 표기하였다.

III. 연구성적

1. 임상지수

치태지수는 4개의 처치군 모두에서 실험 2

주 검사부터 8주째 검사까지 baseline에 비하여 지속적으로 유의성 있게 감소하였다($P<0.01$). 성인형 치주염 환자군과 당뇨병 환자군 모두에서 독시사이클린 투여군과 대조군간의 유의한 차이는 인정되지 않았다(표 1). 당뇨병 환자와 성인형 치주염 환자들 사이에도 치태지수의 차이는 인정되지 않았다.

치은의 염증정도는 치은지수(Löe and Silness)를 이용하여 평가하였는데 4개의 모든 치료군에서 baseline에 비하여 8주째 까지 지속적으로 유의성 있게 감소하였다($P<0.01$). 성인성 치주염 환자군과 당뇨병 환자군 모두에서 독시사이클린 투여군과 대조군간에 치은지수의 유의한 차이를 보이지는 않았으며 성인성 치주염 환자와 당뇨병 환자 사이에도 치은지수의 차이는 없었다(표 2).

치주낭 깊이 측정 결과, 4개의 처치군 모두에서 2주, 4주, 8주째 검사시까지 지속적으로 baseline에 비하여 유의성 있게 감소된 값을

표 1 Plaque Index Score(mean SE)

week	AP Patient		DM Patient	
	placebo	doxycycline	placebo	doxycycline
0	1.52±0.59	1.58±0.08	1.77±0.11	1.57±0.10
2	1.03±0.11 ⁺	1.17±0.11 ⁺	1.36±0.14 ⁺	1.14±0.10 ⁺
4	1.12±0.12 ⁺	1.19±0.11 ⁺	1.18±0.14 ⁺	1.11±0.12 ⁺
8	1.09±0.13 ⁺	1.17±0.11 ⁺	1.18±0.14 ⁺	1.11±0.13 ⁺

⁺significantly different from time 0 ($P<0.01$)

표 2 Gingival Index Score(mean SE)

week	AP Patient		DM Patient	
	placebo	doxycycline	placebo	doxycycline
0	2.36±0.14	2.56±0.12	2.64±0.19	2.57±0.10
2	1.58±0.13 ⁺	1.53±1.10 ⁺	1.86±0.15 ⁺	1.82±0.09 ⁺
4	1.55±0.13 ⁺	1.28±0.10 ⁺	1.59±0.11 ⁺	1.68±0.09 ⁺
8	1.60±0.12 ⁺	1.42±0.10 ⁺	1.50±0.11 ⁺	1.64±0.09 ⁺

⁺significantly different from time 0 ($P<0.01$)

표 3 Probing Pocket Depth(mean SE in mm)

week	AP Patient		DM Patient	
	placebo	doxycycline	placebo d	oxycycline
0	5.58±0.22	5.96±0.23	5.89±0.29	6.18±0.26
2	4.52±0.21 ⁺	4.94±0.22 ⁺	4.86±0.24 ⁺	4.98±0.23 ⁺
4	4.37±0.21 ⁺	4.44±0.22 ⁺	4.70±0.26 ⁺	4.68±0.24 ⁺
8	4.18±0.17 ⁺	4.13±0.21 ⁺	4.57±0.24 ⁺	4.43±0.20 ⁺

⁺significantly different from time 0(P<0.01)

표 4 Probing Pocket Depth Reduction(mean SE in mm)

	AP Patient		DM Patient	
	placebo	doxycycline	placebo	doxycycline
2	1.06±0.07	1.01±0.12	1.02±0.11	1.19±0.14
4	1.20±0.09	1.51±0.11 ^{*,*}	1.18±0.10	1.50±0.13 ⁺
8	1.39±0.14	1.83±0.12 ^{*,*}	1.32±0.14	1.75±0.15 ^{*,*}

⁺ significantly different from previous week(P<0.01)

^{*} significantly different from relevant placebo group(P<0.05)

나타내었다(P<0.01). 또한 독시사이클린 투여 군에서는 성인성 치주염 환자군과 당뇨병 환자군 모두에서 2주째와 비교하여 4주째, 4주째와 비교하여 8주째에 추가적인 치주낭 깊이의 감소가 나타났으나, 대조군에서는 4주와 8주째에 유의한 추가적인 개선은 보이지 않았다(표 3, 4). 모든 검사시기에 실험군과 대조군간에 평균 치주낭깊이 값의 유의한 차이는 없었으나, 치주낭 깊이의 감소량에는 실험군과 대조군 사이에 유의한 차이가 있었다(그림 1). 성인성 치주염 환자군에서는 실험 4주와 8주 검사시에 독시사이클린 투여군에서의 치주낭 깊이의 감소량(각각 1.51과 1.83)이 대조군에서의 감소량(각각 1.20과 1.39)보다 유의하게 크게 나타났다(P<0.05). 당뇨병 환자군에서는 실험 2주와 4주 검사시의 치주낭 깊이 감소량에는 실험군과 대조군간에 차이가 없었으나, 실험 8주 검사시에는 실험군

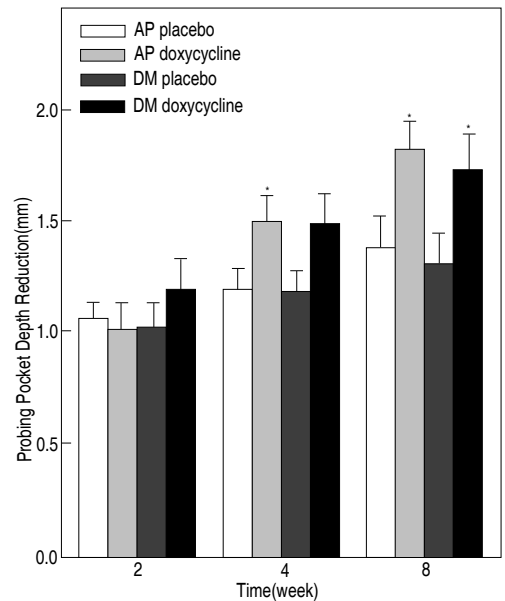


그림 1 Probing pocket depth reduction(mean±SE in mm)

^{*} significantly different from relevant placebo group(P<0.05)

표 5 Probing Attachment Level(mean SE inmm)

AP Patient			DM Patient	
week	placebo	doxycycline	placebo	doxycycline
0	6.30±0.27	6.93±0.27	6.84±0.37	6.89±0.37
2	5.48±0.28 ⁺	6.15±0.27 ⁺	6.00±0.37 ⁺	5.91±0.36 ⁺
4	5.34±0.29 ⁺	5.76±0.27 ⁺	5.89±0.37 ⁺	5.63±0.36 ⁺
8	5.17±0.26 ⁺	5.43±0.27 ⁺	5.77±0.37 ⁺	5.36±0.33 ⁺

⁺significantly different from time 0(P<0.01)

표 6 Attachment Gain(mean SE in mm)

AP Patient			DM Patient	
week	placebo	doxycycline	placebo	doxycycline
2	0.82±0.06	0.78±0.11	0.84±0.11	0.98±0.13
4	0.95±0.08	1.17±0.10	0.95±0.10	1.27±0.12
8	1.14±0.11	1.50±0.12*	1.07±0.13	1.54±0.14*

* significantly different from relevant placebo group(P<0.05)

의 감소량(1.75)이 대조군의 감소량(1.32)보다 유의하게 컸다(P<0.05). 당뇨병자와 성인성 치주염 환자사이에는 독시사이클린투여군과 대조군 모두에서 치주낭 깊이의 유의한 차이는 인정되지 않았다.

치주부착수준을 측정한 결과, 4개의 처치군 모두에서 실험 8주 검사까지 baseline에 비하여 유의하게 감소된 값을 나타내었다(P<0.01)(표 5). 당뇨병 환자군과 성인형 치주염 환자군 모두에서, 실험군과 대조군간에 평균 치주부착수준 값의 유의한 차이는 없었으나, 부착획득값을 비교하면 유의할 만한 차이가 인정되었다(표 6, 그림 2). 성인성 치주염 환자군에서 실험 8주째에 독시사이클린 처치군의 부착획득은 1.50mm, 대조군은 1.14mm로 독시사이클린 투여군에서의 부착획득이 유의하게 크게 일어났다(P<0.05). 당뇨병 환자군에서도 성인성 치주염 환자군에서의 결과와 같이, 실험 8주째에 독시사이클린 투여군은 1.54mm, 대조군은 1.07mm로 실험군에

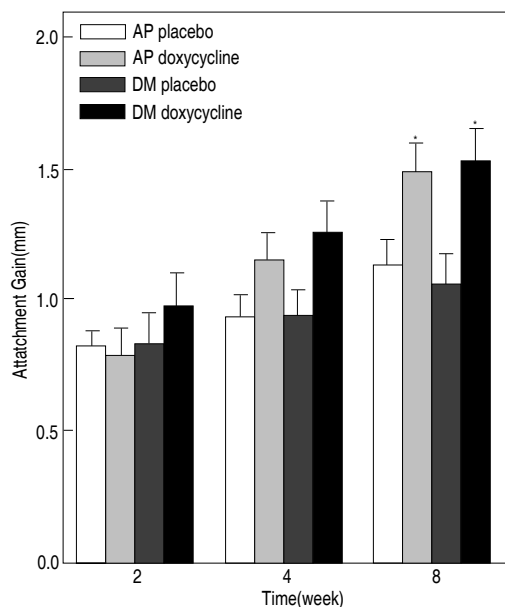


그림 2 Attachment Gain(mean±SE in mm)

* significantly different from relevant placebo group(P<0.05)

서 유의하게 큰 (P<0.05) 부착획득이 일어났

표 7 GCF volume(mean SE in Periotron® unit)

week	AP Patient		DM Patient	
	placebo	doxycycline	placebo	doxycycline
0	82.21±9.39	96.79±7.89	75.95±11.44	77.43±7.67
2	71.21±8.57	74.92±8.17 ⁺	70.32±8.75	71.96±8.19
4	69.88±8.10	67.58±7.72 ⁺	71.64±8.68	54.46±7.78 ⁺
8	82.18±7.38	75.97±7.17 ⁺	73.05±8.00	75.39±6.12

⁺ significantly different from time 0 (P<0.05)

다. 동일 검사시기에 당뇨병자와 성인성 치주염 환자를 비교한 경우에 치주부착 수준과 부착획득에 있어서 치료군간의 유의한 차이는 없었다.

치은열구액 양은 치료군에 따라 심한 변이를 보였고, 같은 환자내에서도 측정 부위에 따라 큰 편차를 보였다. 성인성 치주염 환자에서 독시사이클린 투여군 경우에는 실험 2주, 4주 8주 검사시에 치은열구액의 양이 0 day 값에 비하여 유의하게 감소하였으나 (P<0.05), 대조군에서는 치은 열구액의 양이 감소하였지만 유의성은 없었고, 8주 검사시에는 baseline값으로 회귀하는 경향을 보였다. 당뇨병 환자에서 독시사이클린 투여군의 경우에는 실험 4주 검사시에만 치은열구액 양이 유의성 있게 감소하였고(P<0.05), 대조군의 경우에는 모든 검사시기에 유의한 감소를 보이지 않았다. 성인성 치주염 환자군과 당뇨병 환자군 모두에서, 실험군과 대조군 사이에 치은열구액 양의 유의할 만한 차이는 인정되지 않았다(표 7).

2. 치은열구액내의 효소활성도 실험

(1) 교원질 분해효소 활성도

치은열구액 희석액을 Type I 교원질과 24시간 반응시켰을 때, 열구액 내에 존재하는 숙주 기원의 교원질 분해효소(mammalian collagenase)에 의해 α -chain($\alpha 1$, $\alpha 2$)이 3/4 α -

그림 3 SDS-PAGE pattern of type I collagen incubated(22 °C, 24h) with GCF sample from one severe adult periodontitis patient at baseline. Lane 1, undegraded collagen substrate; Lane 2, collagen incubated with GCF sample with PMC(+) which activate latent enzyme; Lane 3, collagen incubated with GCF sample without PMC(-). This lane represent the activity of active collagenase. Note the α -chains($\alpha 1$, $\alpha 2$) and its 3/4 cleavage products($\alpha 1^A$, $\alpha 2^A$) by host collagenase in GCF. AI represents albumin band.(C), control.

chain($\alpha 1^A$, $\alpha 2^B$)으로 전환되는 양상을 관찰할 수 있었다. 치은열구액 내의 교원질 분해효소는 상당 부분이 전구효소(latent enzyme or proenzyme)의 형태로 존재하며, 이 효소를 PMC로 활성화 시킨 경우에는 활발한 교원질 분해가 일어났고, PMC를 넣지않은 경우에는 전반적으로 교원질 분해작용이 미약하여 활성형(Active form)의 효소가 적은 것을 육안

그림 4 SDS-PAGE pattern of type I collagen incubated with GCF sample from one representative subject from placebo- and LDD-treated group of "adult periodontitis" groups. Lane 1 and 10, undegraded type I collagen substrate; Lane 2 through 9, GCF from the placebo treated subject at the baseline, 2, 4 and 8 week; Lane 11 through 18, GCF from the LDD treated subject at the same week. (+), incubation with PMC; (-), incubation without PMC; (C), control

그림 5 SDS-PAGE pattern of type I collagen incubated with GCF sample from one representative subject from placebo and LDD-treated group of Diabetic groups with periodontitis. Lane 1 and 10, undegraded type I collagen substrate; Lane 2 through 9, GCF from the placebo treated subject at the baseline, 2, 4 and 8 week; Lane 11 through 18, GCF from the LDD treated subject at the same week. (+), incubation with PMC; (-), incubation without PMC; (C), control.

적으로도 확인할 수 있었다(그림 3). 각 치료 군 대표적인 SDS-PAGE pattern을 보면(그림 4, 5), 치료이후 효소의 활성이 baseline에 비하여 다양한 양상으로 감소하는 것을 알 수

있다. 각 band($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 1^A$, 2^A)를 Imaging Densitometer로 정량분석한 후에 공식을 이용하여 효소활성도를 산출하였다(표 8, 9). 총 교원질 분해효소(활성형과 비활성형을 포함)

활성도는 4개의 처치군 모두에서 2주, 4주, 8주 검사시 baseline에 비하여 유의하게 감소하였다($P<0.01$). 성인성 치주염 환자에서는 실험 2주, 4주, 8주 검사시에 독시사이클린 투여군의 총효소 활성도가 대조군의 총효소 활성도보다 낮은 값을 나타내었지만 통계학적인 유의성은 없었다. 당뇨병환자에서는 실험 4주와 8주 검사시에, 독시사이클린 투여군의 총효소 활성도가 대조군의 총효소 활성도보다 유의하게 낮은 값을 나타내었다($P<0.05$)(표 8, 그림 6). 8주 검사시의 대조군의 총효소 활성도 값은, 독시사이클린을 투여받은 성인성 치주염 환자의 총효소 활성도 값과도 유의한 차이를 보였다($P<0.05$)(표 8).

활성형의 교원질 분해 효소(active collagenase) 만을 비교하면, 성인성 치주염 환자의 경우는 독시사이클린 투여군의 대조군

모두에서 실험 2주부터 8주까지 지속적으로 baseline에 비하여 유의하게 감소된 값을 보였다($P<0.01$). Baseline에서의 독시사이클린 투여군의 활성형 효소값이 대조군보다 통계학적으로 유의하게 높았으나($P<0.05$), 실험이 진행된 이후에는 독시사이클린 투여군과 대조군간의 활성형 효소 평균값의 차이는 없어졌다. 당뇨 환자의 경우 독시사이클린을 투여한 군에서는 실험 2주부터 8주까지 지속적으로 baseline에 비하여 유의하게 감소된 값을 보였고($P<0.01$), 대조군에서는 실험 2주째에는 활성형 효소값이 유의하게 감소하였으나($P<0.01$), 실험 4주와 8주 검사시에서는 효소 활성이 증가하여 baseline에 비하여 통계적인 유의성은 없는 정도로만 감소하였다. 독시사이클린 투여군과 대조군 사이에는, baseline에서의 활성형 효소값에는 차이가 없었으나

표 8 Total Collagenase Activity (mean SE in % lysis)

AP Patient			DM Patient	
week	placebo(1)	doxycycline(2)	placebo(3)	doxycycline(4)
0	36.4±3.9	41.3±3.3	35.7±2.7	37.9±3.8
2	23.1±2.9 ⁺	17.9±2.3 ⁺	24.4±3.3 ⁺	17.0±2.1 ⁺
4	18.5±1.7 ⁺	16.3±1.6 ⁺	22.6±2.4 ^{+,*(4)}	14.6±1.4 ^{+,*(3)}
8	23.0±2.0 ⁺	19.3±2.2 ^{+,*(3)}	28.3±2.3 ^{+,*(2,4)}	18.2±1.3 ^{+,*(3)}

+ significantly different from time 0($P<0.01$)

* significantly different from indicated group in parenthesis($P<0.05$)

표 9. Active collagenase Activity(mean SE in % lysis)

AP Patient			DM Patient	
week	placebo(1)	doxycycline(2)	placebo(3)	doxycycline(4)
0	12.2±1.2	17.6±1.7 ^{*(1)}	15.8±1.6	15.6±1.8
2	8.1±0.8 ⁺	8.3±0.9 ⁺	11.2±1.0 ^{+,*(4)}	6.6±0.7 ^{+,*(3)}
4	8.2±0.9 ⁺	7.8±1.0 ^{+,*(3)}	11.7±1.0 ^{*(2, 4)}	6.2±0.7 ^{+,*(3)}
8	9.2±0.9 ^{+,*(3)}	8.7±1.0 ^{+,*(3)}	14.8±1.0 ^{*(1, 2, 4)}	6.8±0.8 ^{+,*(3)}

+significantly different from time 0($P<0.01$)

*significantly different from indicated group in parenthesis($P<0.05$)

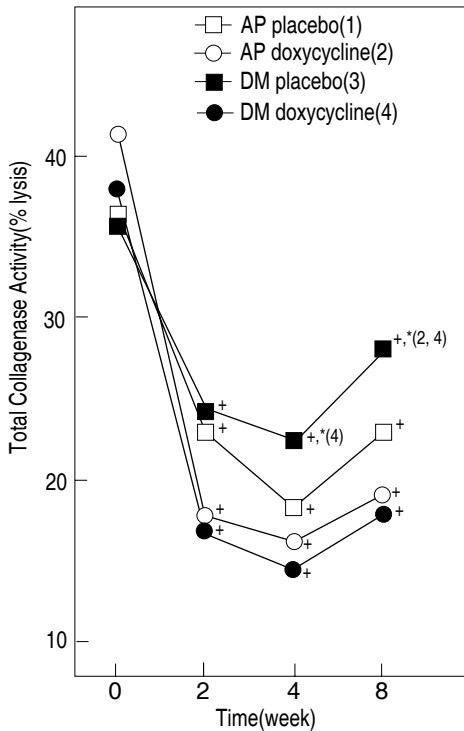


그림 6 Total Collagenase Activity(% lysis)

+ significantly different from time 0 ($P < 0.01$) * significantly different from indicated group in parenthesis ($P < 0.05$)

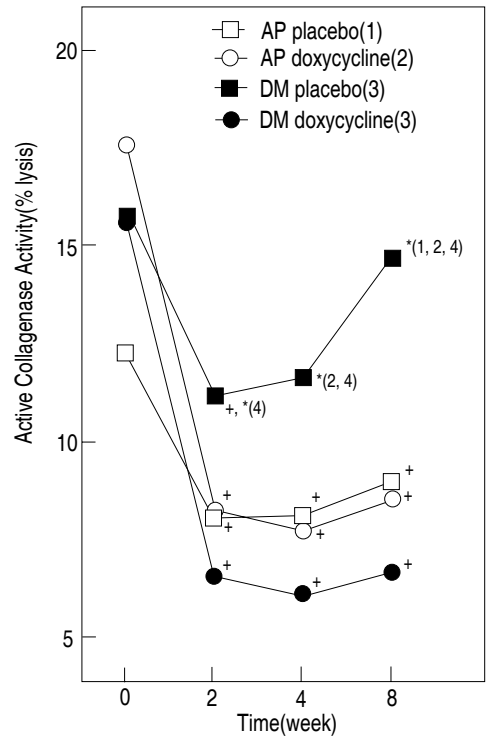


그림 7 Active Collagenase Activity(% lysis)

+ significantly different from time 0 ($P < 0.01$) * significantly different from indicated group in parenthesis ($P < 0.05$)

실험 2주, 4주, 8주째의 활성도 값에서는 독시사이클린 투여군에서 유의하게 낮았다 ($P < 0.05$) (표 9, 그림 7). 실험 8주 검사시의 대조군의 활성형 효소값은 거의 baseline 값에 회귀하여, 동일한 시기에 검사한 성인성 치주염 환자의 효소활성도와 비교시에도 유의한 차이를 나타내었다 ($P < 0.05$) (표 9).

(2) 엘라스틴 분해효소 활성도

치은열구액내의 엘라스틴 분해효소 활성을 측정한 결과 4개의 치료군 모두에서 baseline에 비하여 실험 2주부터 8주까지 지속적으로 유의한 감소가 일어났다 ($P < 0.01$). 성인성 치주염 환자와 당뇨 환자 모두에서 독시사이클린 투여군과 대조군 사이의 유의한 차이는 없었으며 ($P < 0.05$) 효소 활성의 감소량도 유사

하였으나 환자 및 검사부위에 따라 변화가 매우 심하였다 (표 10, 그림 8).

IV. 총괄 및 고찰

본 연구의 목적은, 성인성 치주염 환자 및 당뇨병에 이환된 치주염 환자에서 저용량 독시사이클린 제제의 복용이 기계적 치주치료 (치근활택술)의 유용한 보조치료 수단이 될 수 있는가를 임상치수 및 치은열구액내의 효소활성도를 통해 평가하는 것이었다. 치주질환이 당뇨환자에서 빈도와 심도가 높다는 것은 이미 널리 보고되었고^{37, 38}, 최근 Grossi 등⁴⁵에 의하여 당뇨환자와 관련된 치주질환을 치료함에 있어 항미생물 효과와 약리학적인 숙주반응의 변조를 모색하는 치료가 도입되

표 10 Elastase Activity of GCF (mean SE in g substrate degraded/hour/strip)

week	AP Patient		DM Patient	
	placebo	doxycycline	placebo	doxycycline
0	113.8±14.5	117.3±12.0	116.2±8.4	116.9±16.2
2	49.2±8.6 ⁺	53.5±9.8 ⁺	52.5±13.4 ⁺	54.6±8.7 ⁺
4	51.1±8.0 ⁺	48.5±7.1 ⁺	47.4±7.1 ⁺	48.8±9.4 ⁺
8	62.5±7.5 ⁺	61.1±7.1 ⁺	58.1±7.4 ⁺	59.3±7.0 ⁺

⁺significantly different from time 0(P<0.01)

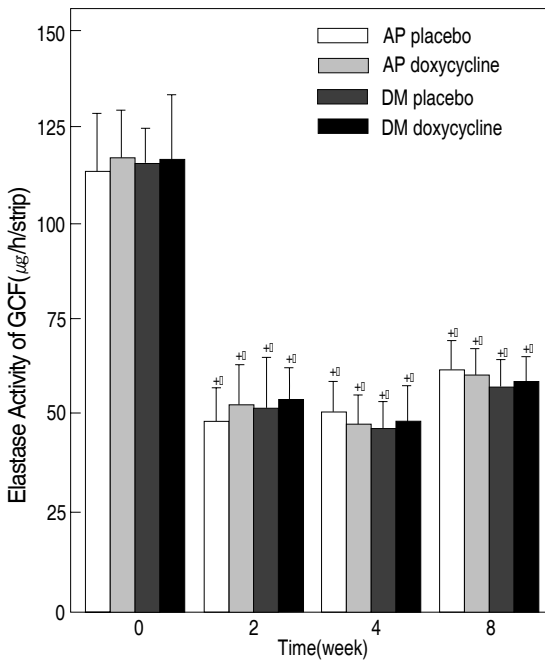


그림 8 Elastase Activity of GCF(mean±SE in μg substrate degraded/hour/strip)
+ significantly different from time 0(P<0.01)

는 등, 당뇨병환자의 치주치료에 관심이 고조되고 있다.

Ramamurthy 등^{35, 36)}은 실험적으로 당뇨병을 일으킨 쥐에서 교원질의 합성과 성숙, 분해 등 전반적인 대사과정에서 이상이 발생함을 보고하였고, Golub 등^{15, 35)}은 당뇨병 쥐의 피부 및 치은조직내에서 교원질 분해효소의

활성이 정상보다 크게 증가함을 보고하였다. Sorsa 등^{32, 33)}은 당뇨병에 이환된 사람의 치은 열구액내에서 교원질 분해효소의 활성이 증가됨과, 이 효소가 중성구(neutrophil)로부터 기원함을 보고하였다. 이렇게 증가된 교원질 분해효소는 치주조직의 파괴를 가속화시킬 수 있다고 믿어지는데, Golub 등¹⁵⁻²⁰⁾과 Yu 등³⁶⁾은 일련의 연구에서, Minocycline, Doxycycline, Chemically-modified Tetracycline 등이 실험동물과 사람에서 증가된 교원질 분해효소의 활성을 낮추고 당뇨병 쥐에서 나타나는 교원질 구조와 대사의 이상을 상당량 정상화 시킴을 보고하였다²¹⁾. 더욱이 최근에는 20mg의 low-dose doxycycline capsule을 복용시킨 경우에도 정량의 독시사이클린과 같은 효소억제작용을 유지하면서 저항균주의 출현이나 위장관 장애와 같은 장기적 항생요법에 수반되는 전형적인 부작용을 없앨 수 있었음을 보고하였다^{18, 29-31, 46)}. 그들은 6개월 동안의 지속적인 복용이나, 6개월 동안 2개월 간격의 cyclic한 복용을 통하여 조직파괴의 지수로 볼 수 있는 교원질 분해효소와 치주낭 깊이, 부착수준의 유의한 개선이 이루어짐을 보고하였다. 따라서 이 연구는 성인성 치주염의 진행을 방지하는데 있어서 기계적인 치료법과 함께 비교적 안전하고 효과적이라고 보고된 저용량 독시사이클린의 복용이, 치주질환에 의한 부착상실과 골소실의 high-risk group인 당뇨병환자^{37, 38)}에서도 성인성 치주염

환자에서와 같은 치료효과를 나타낼 수 있는가를 알아보기 위하여 시행되었다. 이 연구의 결과, 당뇨병환자와 성인성 치주염 환자 모두에서 치주낭 깊이의 감소와 부착수준의 증진은 치근활택술만을 시행한 군보다는 저용량 독시사이클린을 함께 투여한 군에서 유의하게 더 컸은 것으로 관찰되었다. 교원질 분해효소의 억제효과는 특히 저용량 독시사이클린 복용한 당뇨병환자에서 더욱 크게 나타났다.

치료방법과 무관하게 4개의 모든 치치군에서 치태지수와 치은지수의 유의한 개선이 있었는데 이러한 결과는 내원의 반복에 따른 구강위생 능력의 향상과 치근활택술에 의한 치은염증의 감소효과에 기인한다고 볼 수 있다^{1, 3)}. 저용량 독시사이클린 복용시 혈중내 peak level은 0.2-0.3 μ g/ml로서 이는 항미생물 작용을 나타내지 못하는 낮은 농도이다^{12, 31)}. 항미생물 제제를 사용하는 경우 기계적인 치주치료만을 시행하였을 때보다 치태 억제효과나 치은염증의 감소효과가 더 컸음을 보고한 이전의 다른 연구^{47, 48)} 결과와는 달리, 본 연구에서는 실험군과 대조군 사이에 유의한 차이가 없는 것으로 볼때 저용량 독시사이클린의 항미생물효과는 미미하거나 없는 것으로 평가된다. 치주낭 깊이의 감소와 부착수준의 증진은 Crout 등³¹⁾이 보고한 바와 같이 기계적 치주치료만 시행한 군보다 독시사이클린 복용군에서 더 크게 나타났다. 이 연구에서는 위약군에서도 상당한 개선이 일어났는데 이러한 결과는, 위약군에게 치은연상 치석 제거술만을 실시한 다른 연구^{4, 49)}에 비하여 본 연구에서는, 위약군에게도 기본적인 치주치료라고 볼 수 있는 치석제거술과 치근활택술을 시행한 결과로 추측된다. 비외과적인 기계적 치주치료의 효과에 관하여는 이미 많은 연구를 통하여 입증된바 있고⁴⁹⁻⁵¹⁾, 치주치료의 근간으로서의 중요성은 본 연구에서 다시 한번 입증되었다고 하겠다.

치주낭 깊이의 감소와 부착수준의 증진은

조직학적 검사가 시행되지 않았으므로 확증할 수는 없으나, 진정한 부착획득이라기 보다는 대부분은 치주조직 구성의 변화를 반영한다고 할 수 있겠다. Armitage 등^{52, 53)}과 Spray 등⁵⁴⁾은 치은조직내의 부종 감소와 교원질 증가에 의한 치밀도 증가가 치주탐침자의 침투에 큰 영향을 미치는 것으로 보고하였다. 본 연구에서 치근활택술에 의한 조직의 염증 감소효과는 실험의 초반부터 반영되고, 독시사이클린에 의한 조직파괴에 관여하는 요인의 억제에 의한 추가적 효과는 비교적 실험의 후반부에 나타나는 양상을 보였다. 실험 8주째에 성인성 치주염 환자와 당뇨에 이환된 치주염 환자군 모두에서, 독시사이클린 처치군과 비치치군 간에 부착수준 증진의 유의한 차이가 나타났다. 이 차이가 독시사이클린이 교원질 분해효소를 포함한 조직파괴효소를 억제함으로써 발생한 결과라고 단정짓기는 어려우나 다른 연구의 결과를 토대로 하여 볼때, 이론적 근거로서 뿐 만 아니라 실험적 결과를 근거로도 독시사이클린 투여를 긍정적으로 고려하여 볼 수 있다고 하겠다.

임상지수를 통해 치료의 결과를 평가할 때 전신적으로 건강한 치주염 환자와 당뇨에 이환된 치주염 환자는 비슷한 양상으로 반응하는 것이 관찰되었다. 이러한 결과는 연구대상을 선정할때 치주낭 깊이와 치주부착수준이 유사한 자를 대상으로 삼았고, 외과적인 시술이 금기될 정도의 심한 당뇨병환자는 제외하고 어느정도 당이 조절되는 Type II의 당뇨병환자를 대상으로 삼았기 때문에 얻어질 수 있었던 결과라고 본다^{44, 45)}. Hugoson 등⁵⁶⁾의 연구에 의하면 당뇨병환자는 비당뇨군에 비하여 치주염에 이환될 확률이 세배나 증가함이 보고되었고 연령과 구강위생과는 무관하게 치주질환의 빈도와 심도를 증가시키는 것으로 알려져 있다^{37, 38)}. 당이 잘 조절되지 않는 환자에서 전통적인 치주치료는 그 예후를 예측하기 어렵기 때문에, 당뇨에 이환된 치주염 환

자에서 적절한 임상 치료효과를 얻으려면 당뇨의 조절과 치주병인군의 억제가 동시에 이루어져야한다고 알려져 있다^{56, 57}).

치은열구액 양은, 독시사이클린을 투여받은 성인성 치주염 환자군을 제외하고 나머지 세 치료군에서는 유의하게 감소하지 않았다. 일반적인 경우, 치은열구액은 치은조직의 염증시 증가하고 적절한 치료시에 감소하는 것으로 알려져 있는데⁵⁸, 본 연구에서는 다른임상지수들이 일괄적으로 치은조직내의 염증감소를 반영하여 준 반면 치은열구액의 양은 감소하기는 하였으나 통계학적으로 유의하지는 않은 경우가 많았다. 이러한 결과의 원인을 추정하면, 첫째 치은열구액 채취시 방법을 철저히 하였으나 약간의 타액오염이 있었을 수 있고, 둘째 연구대상의 등급을 치주낭 깊이나 초기 염증정도 등을 기준으로 세분화 하여 분석하지 않았으며, 셋째 치료효과가 열구액의 양보다는 구성성분의 질적인 변화로 주로 반영되었을 수 있다는 것이다.

치은열구액 분석은 여러 가지 임상적 질환 평가방법과의 병용시 질환상태에 대한 정보를 제공할 수 있으며, 이미 여러 연구를 통해 숙주 및 세균산물 염증매개물질, 조직생성 및 파괴과정중의 대사산물 등에 관한 검사가 이루어졌다^{59, 60}). Sodek 등^{61, 62})은 척추동물성 교원질 분해효소활성이 파괴성 치주염 병소의 치은열구액내에 존재함을 밝혔고, 이 효소의 활성이 치은염 및 치주염에서 염증반응의 정도와 비례하고 병소의 활성도와 관련된다는 보고가 있었다^{63, 64}). Hakkarainen 등⁶⁵)은 치석 제거 및 치근활택술, 교합조절술에 의해 효소의 활성이 유의하게 감소함을 보고하였고, Golub 등¹⁵⁻²⁰)은 테트라사이클린의 교원질 분해효소활성 억제작용을 지속적으로 연구하여 괄목할 만한 연구업적을 성취하였다.

본 연구에서도 당뇨 및 비당뇨군 모두에서 치근활택술에 의하여 치은열구액내의 총 교원질분해효소 활성이 유의하게 감소하였고

(약 43%), 저용량 독시사이클린 복용에 의해 더욱 효과적으로 효소활성이 억제되는 것을 관찰할 수 있었다(약 61%). 저용량 독시사이클린은 활성형 효소와 비활성형 효소(latent enzyme), 즉 전구효소를 동시에 억제하는 경향을 보였고, 치근활택술은 특히 당뇨군에서 활성형 효소를 효과적으로 억제하지 못하는 경향을 보였다(약 28%).

Sorsa 등³²), Ramamurthy와 Golub³⁵)이 당뇨 환자에서는 치은조직 및 치은열구액내의 교원질 분해효소 활성이 증가됨을 보고하여, 치료전 baseline에서의 치은열구액내의 교원질 분해효소 활성이 성인성 치주염 환자에서보다 당뇨환자에서 더 증가되어 있을 것을 예상하였으나, 총효소 및 활성형 효소 모두에서 baseline값에 있어서 두 군간의 유의한 차이는 없는 것으로 나타났다. 그러나 교원질 분해효소의 반응양상에는 차이가 있었는데, 성인성 치주염 환자에서는 치근활택술에 의하여 치은열구액내의 교원질 분해효소 총활성도와 활성형 효소의 활성도가 모두 유의하게 감소하였지만, 당뇨환자에서는 앞서 언급하였듯이 치근활택술만으로는 활성형의 효소를 효과적으로 억제할 수 없는 것으로 나타났다. 당뇨환자에서 활성형 효소는 치근활택술에 의해 2주째에 불완전하게 억제되었다가 실험 4주째에는 벌써 그 감소량이 유의성이 없어지면서 빠르게 증가하였다. 독시사이클린을 복용한 실험군에서는 당뇨환자에서도 성인성 치주염 환자에서처럼 교원질 분해효소의 활성이 8주까지 지속적으로 유의하게 억제되는 것으로 나타나, 당뇨환자에서는 치근활택술과 함께 교원질 분해효소 억제를 위한 보조적인 치료법을 시행하는 것이 성인성 치주염 환자에서보다 더욱 유용할 수 있음을 시사해 주었다.

테트라사이클린의 matrix metalloproteinase에 대한 억제기전을 밝히기 위한 활발한 연구가 이루어지고 있는데, 활성화된 교원질 분

해 효소를 직접 억제하거나, 전구효소(procollagenase)가 활성화되는데 필요한 요소를 억제하거나, 전구효소의 expression을 RNA 수준에서 하향조절하는 것으로 추측된다^{22, 23, 32, 66}. 이 연구에서는, 치은열구액내의 교원질 분해효소가 대부분 비활성형 즉 전구효소의 형태로 존재하며, 치근활택술은 전구효소에 주로 작용하여 간접적으로 활성을 억제할 뿐만 아니라 활성형의 효소도 어느정도는 억제할 수 있는 능력이 있으며, 독시싸이클린 복용은 활성형 및 비활성형 효소를 모두 강력하게 억제하는 것을 관찰할 수 있었다. 그러나 정확한 억제기전에 관한 정보는 얻지 못하였다.

이 연구에서, 독시싸이클린 복용에 의하여 교원질 분해효소활성이 유의하게 억제되지 않는 환자들도 있었는데, 이들 환자의 경우 치은열구액내에 섬유아세포로부터 기원한 교원질 분해효소가 상당량 존재하였을 가능성이 있다. 테트라싸이클린은 PMN을 포함한 다양한 세포로부터 유래된 콜라젠분해효소(MMP-8)를 억제하지만, 특징적으로 섬유아세포 기원의 교원질분해효소(MMP-1)는 억제하지 않는 것으로 알려져 있다^{20, 32, 33}. 이러한 선택적인 효소억제작용은 염증시 조직파괴는 줄이면서 조직의 유지를 위한 정상적인 교원질 대사에는 영향을 미치지 않는 효과를 가진다고 하겠다. Ingman 등³³은 국소유년형 치주염 환자의 경우를 제외하고 일반적인 치주질환이나 당뇨병환자에서의 결합조직파괴에는 주로 PMN 기원의 교원질분해효소가 관여함을 보고하였고, 이례적으로 국소유년형 치주염 환자의 치은열구액 내에는 일반적인 치료용량의 독시싸이클린에 의해 억제되지 않는 섬유아세포 기원의 교원질 분해효소가 대부분임을 보고하였다. 본 연구의 예비실험에서도 성인성 치주염 환자와 당뇨병환자의 치은열구액내의 교원질분해효소가 대부분 PMN 기원(MMP-8)임을 확인할 수 있었다. 이 결

과는 개개 환자에 있어서 테트라싸이클린에 의한 치은열구액내 교원질분해효소의 억제정도를 in-vitro나 in-vivo로 평가한다면, 이 효소의 기원에 대한 정보를 얻고 그 환자의 치주질환의 성격을 좀더 명확히 하는데 도움을 줄 수 있음을 시사한다고 하겠다.

본 연구에서 엘라스틴 분해효소의 활성은 치근활택술에 의해서 충분히 억제되었고 독시싸이클린 복용에 의하여 추가적인 억제효과는 나타나지 않았다. Huynh 등⁶⁷, Meyer 등⁴¹의 보고에 의하면 elastase는 PMN으로부터 방출된 직후, 이 효소의 억제자인 α_1 -proteinase inhibitor(α_1 -PI)와 빠르게 결합하는 것으로 알려져있다. 그러나 이 결합은 병적인 치은조직에 존재하는 다량의 MMP에 의하여 파괴된다고 한다. 테트라싸이클린은 교원질 분해효소(MMP-8)를 억제할 뿐만 아니라 PMN elastase와 같은 단백분해효소(serine proteinase)에 대항하는 조직의 주요방어 수단인 α -PI가 MMP에 의해 분해되거나 비활성화되는 것을 방지함으로써 엘라스틴 섬유, fibronectin, proteoglycan와 같은 비교원질성 기질이 파괴되는 것을 간접적으로 억제한다고 알려져있다^{23, 31}. 우리의 실험에서는 활성형의 엘라스틴 분해효소의 양만을 측정하였기 때문에 독시싸이클린에 의한 간접적 효과를 정확히 평가하지 못했을 가능성이 있다. 앞으로 α_1 -PI와 결합된 형태의 엘라스틴 분해효소를 함께 측정하고, MMP에 대항하는 tissue inhibitor의 수준을 측정하여, 독시싸이클린의 효과를 좀 더 명확히 규명해내야 할 것이다.

교원질 분해효소의 활성 검사법 중에서 주로 사용되는 방법은 방사성 동위원소가 표지된 교원질을 기질로 반응시킨 뒤 전기영동검사(SDS-PAGE)와 fluorography로 검사하는 법^{18, 20, 36})으로서 정확하기는 하지만 조작이 힘들고 방사능에 노출될 위험이 있다. 또 다른 방법으로는 액상의 교원질을 microwell 내

에 박막상태로 피복시켜 반응시킨후 잔존 교원질의 양을 spectrometer를 이용하여 측정하는 것^{68, 69)}으로 비교적 신속하고 경제적인 장점이 있으나 다른 오염 물질의 영향을 받을 가능성이 있다. 흔히 사용되지는 않으나 항체를 이용한 ELISA 방법⁷⁰⁾도 있다. 본 연구에서는 Ingman 등⁷¹⁾, Halinen 등⁷²⁾이 보고한 방법을 이용하였는데, SDS-PAGE 법을 이용한다는 점에서는 기본적으로 첫 번째 방법과 같다고 볼 수 있으나 방사성 동위원소로 표지되지 않은 교원질을 사용하며 Coomassie Blue로 염색한다는 점이 차이가 있었다. 이 방법은 첫번째 방법이 다소 약식화 된 것으로 방사성 동위원소를 사용하지 않는 장점이 있었으나 민감도가 조금 떨어지는 인상을 받았고 매우 오랜 시간을 소모하는 단점이 있었다. 교원질 분해효소의 활성도를 정확하고 예민하게 그리고 용이하게 측정해내는 방법의 개발이 요구됨을 절감하였다. 최근 Golub 등¹⁹⁾이 HPLC(High Performance Liquid Chromatography) 방법에 기초를 둔 새로운 측정방법의 개발이 진행되고 있다고 보고한 바 있어 매우 고무적이라 하겠다.

병적인 교원질 분해현상은 치주질환이나 당뇨 뿐만이 아니라, 류마티성 관절염이나 골성 관절염(osteoarthritis), 각종 수포성 피부질환, 각막궤양(corneal ulcer)과 같은 조직파괴 질환에서 흔히 나타나는 현상으로²³⁾ 테트라사이클린의 MMP 억제작용은 치과영역 뿐만 아니라 일반 의학분야에서도 큰 적용 가능성을 가지고 있으므로 앞으로는 이론적 연구를 바탕으로 다양한 임상적 적용이 이루어지리라 생각한다. 이 연구에서는 당뇨환자에게 있어 저용량 독시사이클린의 안전성이 검증된 바가 없어 투여기간을 2주로 정하였는데, 별다른 부작용이 없었고 대부분의 환자에서 효과적으로 교원질 분해효소가 억제되는 것을 관찰할 수 있었다. 그러나 일부 환자에서는 충분한 효소활성의 억제가 일어나지 않았고, 8

주 검사시에는 치료전 상태로 회귀하는 경우도 있어, 2주의 투약기간이 불충분함을 시사하였다. 앞으로 독시사이클린 투약기간을 좀더 장기화함으로써, 부작용 발현 여부와 추가적인 효소억제효과 유무를 평가하는 연구가 시행되어야 할 것이다. 동시에 투약방법을 다양화 하여 적절한 재투약 시기에 관한 정보를 얻고, 지속적인 투약을 피하면서 적절하게 치료효과를 유지할 수 있는 regimen을 개발하기 위한 후속 연구가 반드시 필요할 것이다.

V. 결론

성인성 치주염 환자 28명과 당뇨에 이환된 치주염 환자 21명을 대상으로, 실험군에게는 치근활택술과 함께 20mg 독시사이클린 제제를 하루 2회씩 2주간 복용하도록 하고, 대조군에게는 치근활택술만을 시행하여 임상 및 치은열구액내 효소활성도를 측정한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 치태지수와 치은지수, 치은열구액내 엘라스틴 분해효소활성은 모든 처치군에서 실험기간 동안 유의하게 감소하였고, 실험군과 대조군간의 차이는 없었다.
2. 치주낭 깊이의 감소는, 성인성 치주염 환자의 경우는 4주와 8주 검사시에, 당뇨환자의 경우는 8주 검사시에 독시사이클린 복용군에서 유의하게 크게 일어났다.
3. 부착획득은, 성인성 치주염 환자와 당뇨환자의 경우 모두 8주 검사시에 독시사이클린 복용군에서 유의하게 크게 일어났다.
4. 치은열구액내 교원질 분해효소 활성은 성인성 치주염 환자의 경우는 실험군과 대조군 모두에서 차이없이 baseline에 비하여 유의하게 감소하였으나, 당뇨환자에서는 대조군에 비하여 독시 사이클린 처치군에서 총효소(4주, 8주 검사시) 및 활성형 효소의 활성(2주, 4주, 8주 검사시)

이 유의하게 크게 감소하였다.

이러한 결과를 토대로하여 볼 때, 치주질환에 의한 부착상실과 골소실의 위험이 정상인보다 큰 당뇨병환자의 치주염 치료시, 기계적인 치주치료와 병용하여 저용량 독시싸이클린을 복용시키는 것은 조직파괴에 관련된 요인을 억제한다는 점에서 효과적이며, 앞으로 구체적인 임상적용을 위한 많은 후속 연구가 필요하다고 생각된다.

VI. 참고문헌

1. Axelsson P, Lindhe J: Effect of controlled oral hygiene procedures on caries and periodontal disease in adults. *J Clin Periodontol* 1978;5:133-151.
2. Magnusson I, Liljenberg B, Lindhe J, Yoneyama T: The effect of supragingival plaque control on microbial repopulation and clinical healing of pockets. *J Clin Periodontol* 1984;11:193-198.
3. Slots J, Mashimo P, Levine MJ, Genco RJ: Periodontal therapy in humans. I. Microbiological and clinical effects of single course of periodontal scaling and root planing and a adjunctive tetracycline therapy. *J Periodontol* 1979;50:495-509.
4. Listgarten MA, Lindhe J, Hellden L: Effect of tetracycline and/or scaling on human periodontal disease-Clinical, microbiological and histological observation. *J Clin Periodontol* 1978;5:246-271
5. Haffajee AD, Dibart S, Kent Jr. RL, Socransky SS: Clinical and microbiological changes associated with the use of 4

adjunctive systemically administered agents in the treatment of periodontal infections. *J Clin Periodontol* 1995;22:618-627

6. Slots J, Rosling BG: Suppression of the periodontopathic microflora in localized juvenile periodontitis by systemic tetracycline. *J Clin Periodontol* 1983;10:465-468.
7. Williams BL, Osterberg KA, Jorgensen J: Subgingival microflora of periodontal patients on tetracycline therapy. *J Clin Periodontol* 1979;6:210-221
8. Reynolds H, Mashimo P, Slots J, Sedransk N, Genco RJ: Use of tetracycline in the treatment of periodontitis, II. Microbiological studies. (Abstr. 769) *J Dent Res* 1978;57 (Special issue A):267
9. Ciancio SG, Mather ML, McMullen JA: An evaluation of minocycline in patients with periodontal disease. *J Periodontol* 1980;51:530-535
10. Christersson LA, Albin BI, Zambon J: Demonstration of *Actinobacillus actinomycetem-comitans* in gingiva of localized juvenile periodontitis lesion. (Abstr. 255) *J Den Res* 1993;62 (Special issue):198
11. Baker P, Evans R, Coburn R, Genco R: Tetracycline and its derivatives strongly bind to and are released from the tooth surface in active form. *J Periodontol* 1983; 54:580-586
12. Demirel K, Baer PN, McNamara TF: Topical application of doxyxycine on periodontally involved root surfaces in vitro: Comparative analysis of substantivity on cementum and dentin. *J Periodontol* 1991;62:312-316.

13. Terranova VP, Franzetti LC, Hick S: A biochemical approach to periodontal regeneration: Tetracycline treatment of dentin promotes fibroblast adhesion and growth. *J Periodont Res* 1986;21:330-337.
14. Somerman MJ, Foster RA, Vorsterg G, Progebin K, Wynn RL: Effects of minocycline on fibroblast attachment and spreading. *J Periodont Res* 1988;23:154-159.
15. Golub LM, Lee HM, Lehrer G, Nemiroff A, McNamara TF, Kaplan R, Ramamurthy NS: Minocycline reduce gingival collagenolytic activity during diabetes. *J Periodont Res* 1983;18:516-526.
16. Golub LM, Ramamurthy NS, McNamara TF, Gomes B, Wolff M, Zambon J, Cinacio A, Kapoor A, Ciancio S, Schneir M, Perry H: Tetracycline inhibit tissue collagenase activity. *J Periodont Res* 1984;19:651-655.
17. Golub LM, Wolff M, Lee HM, McNamara TF, Ramamurthy NS, Zambon J, Cinacio S: Further evidence that tetracycline inhibit collagenase activity in human crevicular fluid and from other mammalian sources. *J Periodont Res*, 1985;20:12-23.
18. Golub LM, Ciancio S, Ramamurthy NS, Leung M, McNamara TF: Low-dose doxycycline therapy : Effects on gingival and crevicular fluid collagenase activity in huamans. *J Periodont Res* 1990;25:321-330.
19. Golub LM, Wolff M, Roberts S, Lee HM, Leung M, Payonk GS: Treating periodontal diseases by blocking tissue-destructive enzymes. *J Am Dent Assoc* 1994;125:163-171.
20. Golub LM, Sorsa T, Lee HM, Ciancio S, Sorbi D, Ramamurthy NS, Gruber B, Salo T, Konttinen YT: Doxycycline inhibits neutrophil(PMN)-type matrix metalloproteinases in human adult periodontitis gingiva. *J Clin Periodontol* 1995;22:100-109.
21. Sasaki T, Ramamurthy NS, Golub LM: Tetracycline administration restore osteoblast structure and function during experimental diabetes. *Ana Record* 1991;231:25-34.
22. Galber WL, Creamer HR: Suppression of human neutrophil function by tetracyclines. *J Periodont Res* 1991; 26:52-58.
23. Rifkin BR, Vernillo AT, Golub LM: Blocking periodontal disease progression by inhibiting tissue destructive enzyme : A potential therapeutic role for tetracyclines and their chemically-modified analogs. *J Periodontol* 1993;64:819-827.
24. Lee HM, Golub LM, Gwinnett AJ, Ramamurthy NS: Minocycline inhibit collagenase and elastase produced by rat macrophage in cell culture. *AADR abstract. J Dent Res* 1985;64(spec Issue):1175.
25. Slot J, Rams TE: Antibiotics in periodontal therapy: Advantages and disadvantage. *J Clin Periodontol* 1990; 17:479-493
26. Lindhe J, Liljenberg B, Adielsson B: Effects of long-term tetracycline therapy on human periodontal disease. *J*

- Periodontol 1983;10:590-601.
27. Olsvik B, Tenover FC: Tetracycline-resistance in periodontal pathogen. Clin Infec Dis 1993;16(Suppl. 4):S310-S313.
 28. Lee W, Aitken S, Kulkarni G, Birek P, Overall CM, Sodek J, McCulloch CAG: Collagenase activity in recurrent periodontitis: relationship to disease progression and doxycycline therapy. J Periodont Res, 1991;26:479-485.
 29. Schroeder K, Ramamurthy NS, Tofil P, Smith R, Lee HM, Golub LM: Low-dose doxycycline prevent attachment loss in adult periodontitis. J Dent Res 1992;71(Spec. Issue): 758(Abstr. 1936).
 30. Bouwsma O, Payonk G, Baron H, Sipos T: Low-dose doxycycline effects on clinical parameters in adult periodontitis. J Dent Res 1992; 71(Spec. Issue):245(Abstr. 1119)
 31. Crout RJ, Lee HM, Schroeder K, Crout H, Ramamurthy NS, Wiener M, Golub LM: The cyclic regimen of Low-dose doxycycline for adult periodontitis: A preliminary study. J Periodontol 1996;67:506-514.
 32. Sorsa T, Ingman T, Suomalainen K, Halinen S, Saari H, Konttinen YT, Uitto V-J, Golub LM: Cellular source and tetracycline-inhibition of gingival crevicular fluid collagenase of patients with labile diabetes. J Clin Periodontol 1992;19:146-149.
 33. Ingman T, Sorsa T, Halinen S, Lindy O, Lauhio A, Saari H, Konttinen YT, Golub LM: Tetracycline inhibition and the cellular source of collagenase in gingival crevicular fluid in different periodontal diseases. A review article. J Periodontol 1993;64:82-88.
 34. Schneir M, Ramamurthy NS, Golub LM: Diabetes reduces mandibular collagen synthesis rather than enhancing its catabolism. J Den Res 60(Spec Issue A):1332
 35. Ramamurthy NS, Golub LM: Diabetes increases collagenase activity in extracts of rat gingiva and skin. J Periodont Res 1983;18:23-30.
 36. Yu Z, Ramamurthy NS, Leung M, Chang KM, Mcnamara TF, Golub LM: Chemically-modified tetracycline normalizes collagen metabolism in diabetic rats: a dose-response study. J Periodont Res 1993;28:420-428.
 37. Basic M, Plancak D, Granic M: CPITN assessment of periodontal status in diabetic patients. J Periodontol 1988; 59:816-822
 38. Le H: Periodontal disease. The sixth complication of diabetes mellitus. Diabetes care 1993;16:329-334.
 39. Palcanis KG, Larjava IK, Wells BR, Suggs KA: Elastase as an indicator of periodontal disease progression. J Periodontol 1992;63:237-242
 40. Gustaffsson A, Asman B, Bergstrom K, Soder P-O: Granulocyte elastase in gingival crevicular fluid: A possible discriminator between gingivitis and periodontitis. J Clin Periodontol 1992; 19:535-540.
 41. Meyer J, Guessous F, Hyunh C, Godeau G, Hornebeck W, Giroud JP, Roch-Arveiller M: Active and 1-Proteinase inhibitor complexed leukocyte elastase levels in crevicular fluid from patients with periodontal disease. J Periodontol

- 1997;68:256-261.
42. Silness J, L  e H: Periodontal disease in pregnancy. II. Correlation oral hygiene and periodontal condition. *Acta Odontol Scand* 1964;22:121-135.
43. L  e H, Silness J: Periodontal disease in pregnancy I. Prevalence and severity. *Acta Odontol Scand* 1963; 21:533-551.
44. American Diabetes Association. Office Guide to diagnosis and classification of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance(Position Statement) *Diabetes care* 1993;16:4
45. Grossi SG, Skrepicki FB, DeCardo T, Zambon JJ, Cumminis D, Genco RJ: Respose to periodontal therapy in daibetics and smoker. *J periodontol* 1996;67:1094-1102
46. Kornman KS, Karl EH: The Effects of long term low dose tetracycline therapy on the subgingival microflora in refractory adult periodontitis. *J Periodontol* 1982;53:604-6102
47. Goodson JM, Holborow D, Dunn RL, Hogan PE, Dunham S: Monolithic tetracycline-containing fibers for controlled delivery to periodontal pockets. *J Periodontol* 1983;54:575-579
48. Radvar M, Pourtaghi N, Kinane DF: Comparison of 3 periodontal local antibiotic therapies in persistent periodontal pocket. *J Periodontol* 1996;67:860-865
49. Hellden LB, Listgarten MA, Lindhe J: The effect of tetracycline and/or scaling on human periodontal disease. *J Clin periodontol* 1979; 6:222-230.
50. Ramfjord S, Caffesse R, Morrison E: Four modality of periodontal treatment compaired over 5 years. *J Clin Periodontol* 1987;14:445-452
51. Isidor F, Karring T: Long-term effect of surgical and non-surgical periodontal treatment. *J Periodont Res* 1986;21:462-472
52. Armitage GC: Relationship between percentage of subgingival spirochete and the severity of periodontal disease. *J Periodontol* 1982;53:550-556
53. Armitage GC, Svanverg GK, L  e H: Microscopic evaluation of clinical measurements of connective tissue attachment levels. *J Clin Periodontol* 1977;4:173-190.
54. Spray JR, Garnick JJ, Doles LK, Klawitter JJ: Microscopic demonstration of the position of periodontal probes. *J Periodontol* 1978;49:148-152
55. Shlossman M, Knowler WC, Pettitt DJ, Genco RJ: Type 2 diabetes mellitus and periodontal disease. *J Am Dent Assoc* 1990;121:532-536
56. Hugoson A, Thorstensson H, Falk H, Kuylensstierna J: Periodontal condition in insulin-dependent diabetes. *J Clin Periodontol* 1989;16:215-223.
57. Gibson J, Lamey P-J, Lewis MOA, Frier BM: Oral Manifestation of previosly undiagnosed non-insulin dependent diabetes mellitus. *J Oral Pathol Med* 1990;19:284-284
58. Cimasoni G: Crevicular fluid. updated. *Monographs in oral science*. 1983 Vol 12, 129-145 S. Karger.
59. Lamster IB, Oshrain RL, Harper S, Celenti RS, Hovilaras CA, Gordon JM: Enzyme activity in crevicular fluid for

- detection and prediction of clinical attachment loss in patient with chronic adult periodontitis. J Periodontol 1988;59:516-523.
60. Fine DH, Mandel ID: Indicator of periodontal disease activity: an evaluation. J Clin Periodontol 1986; 13:553-546
61. Sodek J, Hurum S, Feng J: A highly sensitive and specific assay for vertebrate collagenase. J Periodont Res 1981;16:425-433
62. Kryshchak E, Sodek J: Nature of collagenolytic enzyme and inhibitor activities in crevicular fluid from healthy and inflamed periodontal tissues of beagle dogs. J Periodont Res 1987; 22:264-269
63. Vilella B, Cogen PR, Bartolucci AA, Birkedal-Hansen H: Crevicular fluid collagenase activity in healthy, gingivitis, chronic adult periodontitis and localized juvenile periodontitis patients. J Periodont Res 1987;22:209-211.
64. 고규섭, 손성희: 성인형 치주염과 급성 진행형 치주염에 있어서 치은열구액 양과 교원질 용해작용 및 치은연하 세균의 상호관계에 관한 연구. 대한치주과학회지 1984;14(1):75-86.
65. Hakkarainen k, Uitto VJ, Ainamo J: Collagenase activity and protein content of sulcular fluid after scaling and occlusal adjustment of teeth with deep periodontal pocket. J Periodont Res 1988;23:204-210.
66. Seymour RA, Heasman PA: Tetracycline in the management of periodontal diseases. A review. J Clin Periodontol 1995;22:22-35.
67. Huynh C, Roch-Arveiller M, Meyer J, Giroud JP: Gingival crevicular fluid of patients with gingivitis or periodontal disease: evaluation of elastase-proteinase inhibitor complex. J Clin Periodontol 1992;19:187-192
68. Nethery A, Lyons JU, O'grady R: A spectrophotometric collagenase assay. Anal Biochem 1986;159:390-395.
69. 정현주: 진행성 치주염에서의 치은열구액내 교원질분해효소 활성. 대한치주과학회지 1996;26(1):161-175.
70. Yoshioka H, Oyamada I, Usuku G: An assay of collagenase activity using ELISA for mammalian collagenase. Anal Biochem 1987;166:172-177.
71. Ingman T, Kononen M, Konttinen YT, Siirila HS, Suomalainen K, Sorsa T: Collagenase, gelatinase and elastase activities in sulcular fluid of osseointegrated implants and natural teeth. J Clin Periodontol 1994;21:301-307.
72. Halinen S, Sorsa T, Ding Y, Ingman T, Salo T, Konttinen YT, Saari H: Characterization of Matrix Metalloproteinase (MMP-8 and -9) Activities in saliva and in gingival crevicular fluid of children with Down's syndrome. J periodontol 1996;67:748-754.

The effects of low dose doxycycline regimen on gingival crevicular fluid enzyme actmty of diabetic patients with periodontitis and adult periodontitis patients

Seong-Nyum Jeong · Soo-Boo Han,

Department of Periodontology, School of Dentistry, Seoul National University

It was reported that low dose doxycycline(LDD) regimen could inhibit pathologically elevated collagenase activity in the gingival crevicular fluid of petients with adult periodontitis without producing typical antibiotic side effects. The purpose of this study was to evaluate the effects of LDD regimen(20mg) administered during non-surgical therapy on clinical index and gingival crevicular fluid enzyme activity in diabetics who are at high risk for periodontal disease. Forty-nine subjects having at least two sites with probing pocket depths greater than 4mm were selected. In this double-blind, placebo-controlled study, the patients were administered 20 mg doxycycline capsule or placebo capsule b.i.d. for 2 weeks. Clinical parameters of dental plaque, gingival inflammation, probing pocket depth and probing attachment level were assessed at week 0, 2, 4, and 8. Gingival crevicular fluid samples were collected at the same time to evaluate the activities of collagenase and elastase.

Clinical parameters and elastase activity were significantly reduced in all groups compared to the baseline value after treatment. Significantly greater reduction in pocket depth and gain in attachment level was shown in the LDD-administered group compared to placebo group in both adult periodontitis and diabetic patients. Total collagenase activity was also reduced significantly in all groups after treatment, but the greater reduction was seen in the LDD-administered diabetics group compared to relevant placebo group(at 4, 8week).

Significantly greater reduction in active collagenase activity was also seen in the LDD-administered group compared to placebo group in diabetic patients(at 2, 4, 8week). These results indicated that use of low dose doxycycline could be aueseful adjunct to instrumentation therapy in the management of diabetic patient with periodontitis as well as adult periodontitis patient.

key words : low dose doxycycline, collagenase, elastase, diabetics, periodontitis, root planing