

다형핵백혈구의 Superoxide anion생성에 대한 Tetracycline-HCl의 영향

배영호 · 김병옥 · 한경윤

조선대학교 치과대학 치주과학교실

I. 서론

치주질환은 병원성 세균과 숙주의 면역반응사이의 복잡한 상호작용의 결과로 조직의 손상과 소실을 일으키는 염증성 질환으로서, 병인성 세균들은 치주낭상피면의 궤양이나 다형핵백혈구의 이주로 인해 형성된 통로를 통하여 용이하게 심부 조직내로 침투할 수 있다¹⁾. 이러한 경로를 통해 조직내로 들어간 세균들은 여러 가지 물질들을 분비하게 되고 염증세포와 접촉하여 염증세포를 활성화시키게 되는데²⁾ 활성화된 염증세포는 산소소비의 증가, hexose monophosphate shunt의 활성화, 반응성 산소유리기(O_2^- , H_2O_2 , OH^- , NO 및 $HOCl$ 등)의 생성을 특징으로 하는 호흡폭발(respiratory burst)을 야기하게 된다³⁾.

호흡폭발을 통해 발생하는 반응성 산소유리기중 H_2O_2 는 superoxide anion(O_2^-)의 자발적 전환(spontaneous dismutation), 과산화물 분자변위 보호소(superoxide dismutase : SOD)에 의한 전환, 그리고 glucose와 glucose oxidase같은 각종 효소계에 의해서 형성되며⁴⁾, OH^- 는 classic Haber-Weiss reaction⁵⁾, Fenton reaction 그리고 지질산화에 의해 형성된 lipid peroxide와 O_2 와의 반응에 의해서 형성된다⁶⁾. O_2^- 는 염증세포의 세포질내에 존재하는 nicotinamide adenine dinucleotide phosphate(NADPH) 산화효소나 hexose monophosphate shunt의 활성화

관련이 있으며, 특히 치주조직내의 다형핵백혈구, 대식세포와 같은 활성화된 식세포에서 생성된다⁶⁾.

반응성 산소유리기의 생리적인 기능은 숙주에 침범한 미생물과 여러 자극에 반응하여 이들을 제거하는 것이지만, 한편으로는 숙주 자신을 공격하여 파괴하기도 한다⁷⁾.

치주질환과 관련된 반응성 산소유리기에 대한 연구로는 Bartold 등⁷⁾이 반응성 산소유리기가 치은의 주요기질인 당단백과 hyaluronic acid의 해축(depolymerization)을 야기하여 치주질환의 발생과 진행에 부분적으로 영향을 미칠 가능성이 있음을 시사하였으며, Seymour 등⁸⁾은 만성치주질환 환자의 다형핵백혈구에서 방출된 산소유리기로 치주조직이 손상될 수 있다고 하였다. Åsman 등⁹⁾은 유년형 치주염 환자에서 세균에 의해 다형핵백혈구가 자극을 받을 때 반응성 산소유리기와 elastase의 유리가 증가한다고 하였고, Shapira 등¹⁰⁾은 급속진행형 치주염 환자에서 말초혈액내 다형핵백혈구로부터 O_2^- 의 형성이 증가한다고 보고하였다. 한편, Kimura 등¹¹⁾은 성인형, 국소적 및 전반적 유년형 치주염 환자의 말초혈액내 다형핵백혈구에서 반응성 산소유리기의 생성이 증가되었으나 치석제거술 및 치근면활택술에 의한 초기 치료후 정상으로 회복됨을 확인하고 반응성 산소유리기의 생성정도가 치주조직의 염증상태를 반영할 수 있으며 반응성 산소유리기가 치주

질환의 병인발생에 관여할 수 있다고 하였다.

숙주에 대한 보호작용과 세포 및 조직에 대한 유해 작용을 동시에 갖는 반응성 산소유리기에 대해 체내에서는 이를 조절할 수 있는 체계를 갖추고 있다. 하지만 이들 조절체계에 대한 연구는 활발하지 못하여 주로 항산화효소에 대한 연구에 국한되어왔다. 그러나 최근 연구에서 항생제가 반응성 산소유리기의 생성을 억제할 수 있음이 보고되었는데, Gabler등¹²⁾은 치주적으로 건강한 사람의 중성구에서 생성되는 O_2^- 가 Tetracycline유도체들에 의해 억제됨을 보고하였다.

Tetracyclines은 정균제로서 여러 치주병인균을 포함하여 수많은 G(+),(-)세균에 효과적이며, 치주질환의 처치에 있어서 효능으로 항세균작용^{13,14)}, 항교원질 분해효소 작용^{15,16,17)}, 항염증작용, 골흡수의 억제, 치근면에 대한 섬유아세포의 부착증진 등이 포함된다¹⁸⁾. 그리고 중성구를 매개로한 적혈구 용혈, 과립체 형성, 중성구이주와 O_2^- 합성 억제등의 효능이 밝혀졌다¹²⁾.

본 연구는 치주질환의 치료에 보조적으로 사용되고 있는 항생제중 1,000mg/ml의 고농도 Tetracycline이 정상 성인의 다형핵백혈구에서 O_2^- 발생을 억제한다고 보고한 선행학들의 연구결과¹⁹⁾를 토대로 치주질환 치료에 임상적으로 사용되고 있는 농도의 Tetracycline-HCl(Tc-HCl)이 정상 성인의 다형핵백혈구에 의한 O_2^- 생성에 미치는 영향을 알아보는데 그 목적이 있다.

II. 연구대상 및 방법

1. 연구대상

전신건강 및 치주조직상태가 양호한 성인남자 11명(나이:23세-28세, 평균:24.9세)을 연구대상으로 선정하였는데, 실험시기로부터 1년이내에 항생제를 복용하지 않았고 치주치료의 경험이 없는 사람들로 선별하였다.

2. 연구방법

(1) 채혈 및 혈청과 다형핵백혈구분리

연구대상자의 주정중피정맥으로부터 60ml의 혈액을 채취한 후, 50ml의 혈액에서 one-step Ficoll-Hypaque gradient centrifugation method²⁰⁾를 이용하여 다형핵백혈구를 분리하였고, 나머지 10ml의 혈액을 실온에서 보관하여 응고시킨후 1,500rpm으로 5분간 원심분리(SORVALL® RT6000D, DUPONT, U.S.A.)하여 혈청을 채취하였다. 채취한 혈청은 56℃ 수조에서 30분간 유지시킨 후 냉동보관하였다. 저장성 용액을 사용하여 적혈구를 제거한 후, 분리된 다형핵백혈구를 Gey's Balanced Salt Solution(GBSS)으로 세척하고 Hemocytometer를 이용하여 다형핵백혈구수를 측정하였다.

(2) Superoxide anion 발생유도

Eppendorf tube에 다형핵백혈구(8×10^6 개/ml)와 GBSS를 넣고, 다형핵백혈구를 활성화시키기 위해 1 μ g/ml 농도의 *P.gingivalis* strain A7436의 LPS(Baylor University, College of Dentistry, Dr. Christopher W. Cutler 제공), 5%의 혈청을 첨가하였고, 군에 따라 다양한 농도(5, 10, 50, 100 μ g/ml)의 Tc-HCl을 첨가하고 GBSS를 넣어 총 1ml의 시료를 만들었다. 이를 37℃에서 5분, 30분, 60분, 120분동안 각각 배양하여 O_2^- 발생을 유도하였다.

(3) 실험군의 구분

다형핵백혈구에 Tc-HCl을 첨가하지 않은 군을 조절군으로, 첨가한 군을 실험군으로 구분하여 O_2^- 발생을 비교하였다.

(4) Superoxide anion 발생측정

각 시간대별로 배양이 끝난후 O_2^- 발생을 측정하기 위해 96-well microplate에 최종 부피가 200 μ l가 되도록 위의 시료에서 취한 다형핵백혈구(5×10^5 개/200 μ l), GBSS와 0.3mg/ml cytochrome C를 넣었다. 마지막으로 1 μ M fMLP(formylmethionyl-leucyl-phenylalanine)를 넣어 다형핵백혈구를 활성화시키고 Microplate Autoreader(BIO-TEK™ Instrument Inc.)를 이용하여 540nm에서 superoxide dismutase

Table 1. O_2^- concentration according to Tc-HCl concentration(mean \pm S.D.)

Groups	O_2^- Concentration(n moles $O_2^- / 5 \times 10^5$ PMNs)
Control	0.158 ± 0.013
Tc-HCl $5 \mu g/ml$	$0.132 \pm 0.005^*$
Tc-HCl $10 \mu g/ml$	$0.131 \pm 0.012^*$
Tc-HCl $50 \mu g/ml$	$0.118 \pm 0.011^*$
Tc-HCl $100 \mu g/ml$	$0.116 \pm 0.012^*$

*: $p < 0.05$ compared to Control

Table 1. O_2^- genevation in the course of time after treatment with concentrations of Tc-HCl(mean \pm S.D.)

	O_2^- Concentration(n moles $O_2^- / 5 \times 10^5$ PMNs)			
	5 minutes	30 minutes	60 minutes	120 minutes
Tc-HCl $5 \mu g/ml$	0.140 ± 0.001	0.030 ± 0.003	0.015 ± 0.000	0.015 ± 0.005
Tc-HCl $10 \mu g/ml$	0.107 ± 0.008	0.041 ± 0.005	0.039 ± 0.015	0.009 ± 0.003
Tc-HCl $50 \mu g/ml$	0.134 ± 0.010	0.038 ± 0.007	0.024 ± 0.001	0.013 ± 0.004
Tc-HCl $100 \mu g/ml$	0.137 ± 0.002	0.046 ± 0.018	0.020 ± 0.004	0.010 ± 0.001

(SOD)를 억제할 수 있는 cytochrome C 환원법²¹⁾ (superoxide dismutase(SOD)-inhibitable cytochrome C reduction method)에 의해 환원된 cytochrome C의 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도는 n moles O_2^- 로 전환되었다.

(5) 통계학적 분석

조절군과 Tc-HCl첨가군간의 O_2^- 발생에 대한 비교는 paired *t*-test로 통계학적 유의성을 검증하였고, Tc-HCl첨가시 시간에 따른 비교는 one-way ANOVA로 통계처리하고 Tukey test로 사후검정하였으며, 농도별 Tc-HCl 첨가시 시간에 따른 양상은 Repeated Measurement test를 이용하여 처리하였다. 통계처리에는 SPSS/PC⁺를 이용하였고, $p < 0.05$ 수준에서 통계학적 유의성을 검증하였다.

III. 연구성적

1. Tc-HCl농도에 따른 O_2^- 생성변화

Tc-HCl을 첨가한 군은 조절군에서보다 O_2^- 생성이

유의성있게 낮았다($p < 0.05$). 그러나 O_2^- 생성이 억제되는 정도와 Tc-HCl의 농도사이에는 통계학적으로 유의성있는 차이가 없었다($p > 0.05$)(Table 1).

2. Tc-HCl에 노출된 시간에 따른 O_2^- 생성 변화

Tc-HCl에 노출된 시간대별로 O_2^- 생성을 비교한 결과, 다형핵백혈구가 Tc-HCl에 노출되는 시간이 길어질수록 유의성있게 O_2^- 생성이 억제됨을 보였다($p < 0.05$)(Table 2 Fig. 1).

IV. 총괄 및 고안

다형핵백혈구는 치태세균의 조직내 침투에 대한 일차적인 방어인자인데, 다형핵백혈구에 의한 숙주 방어기전은 비산화적 보호기전과 산화적 보호기전으로 대별될 수 있다⁴⁾. 다형핵백혈구의 비산화적 보호기전에서는 acid pH, cationic proteins, lysozyme, neutral protease 그리고 lactoferrin 등이 항세균요소로 작용하는데, 특히 lactoferrin은 OH^- 생성의 조절

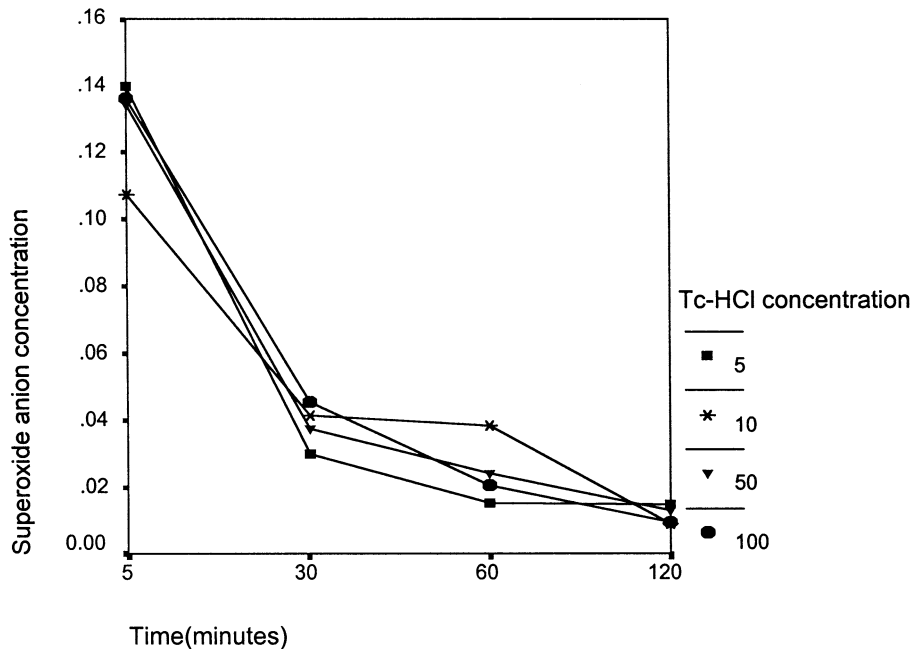


Fig 1. Change of O_2^- concentration in the course of time after treatment with various concentrations of Tc-HCl

역할을 수행하며 다형핵백혈구의 살균작용에 주요한 구성성분임이 밝혀졌다²²⁾. 산화적 보호기전으로 O_2^- , H_2O_2 그리고 OH^- 등의 반응성 산소유리기가 항세균요소로서 작용하는데, 이들은 정상적인 대사과정중이나 조직이 손상을 받아 저산소증상태에 이룬 후 산소가 다시 유입되는 시기에 또는 염증시에 발생될 수 있다²³⁾. 치은조직은 염증반응시 다형핵백혈구가 식균작용을 유도하는 자극에 노출되어 산소분자에서 산소유리기로 환원되는 경우와 호기성 세포내 사립체 호흡사슬에서 과잉생산된 반응성 산소유리기에 노출될 수 있다³⁾.

본 연구에서는 다형핵백혈구를 priming하고 O_2^- 생성을 자극하기 위해 *P.gingivalis* strain A7436의 LPS와 serum, fMLP를 이용하였다. Champagne 등²⁴⁾은 *in vitro*에서 LPS가 다형핵백혈구의 부차수용기 발현을 증가시켜 직접적인 영향을 끼침을 보고하였고, Guthrie 등²⁵⁾과 Opdahl 등²⁶⁾은 LPS가 다형핵백혈구를 priming시켜 oxidative burst를 증진시킨다고 하였다. Guthrie 등²⁵⁾은 다형핵백혈구에 10~100ng/ml

의 LPS를 적용했을때 적절하게 priming된다고 하였고, Shapira 등²⁷⁾은 급속진행형 치주염환자의 다형핵백혈구에는 100ng/ml를, 건강한 성인의 다형핵백혈구에는 1 μ g/ml의 LPS를 적용하였을 때 priming이 된다고 보고하였다. 본 실험은 건강한 성인에서 채취한 다형핵백혈구를 연구재료로 사용하였기에, priming을 위해 1 μ g/ml의 LPS를 적용하였다.

혈청은 LPS의 다형핵백혈구에 대한 자극효과를 증진시키는 역할을 하는데, Aida 등²⁸⁾은 혈청이 없는 상태에서 다형핵백혈구와 LPS를 함께 배양했을 때, LPS의 priming activity가 다형핵백혈구에 의해 상실될 수 있으며 혈청에 의해 이것이 방지될 수 있다고 하였다. 또한 혈청을 적용하기 전 56°C에서 30분 동안 유지하여 혈청내의 보체계를 제거함으로써 혈청의 이러한 효과가 발휘된다고 보고하였다. Shapira 등²⁷⁾은 LPS와 혈청을 사용하지 않은 경우보다 함께 사용한 경우에 다형핵백혈구의 LPS에 대한 반응이 더 크게 나타났고, 5% 혈청을 사용할 때부터 다형핵백혈구의 반응이 크게 증진되었다고 보고했다. 이러

한 연구결과를 근거로 본 실험에서도 56℃에서 30분 간 유지된 5% 혈청을 사용하였다.

본 연구는 치주질환의 치료에 보조적으로 사용되고 있는 항생제중 고농도의 Tetracycline이 정상 성인의 다형핵백혈구에서 O_2^- 발생을 억제한다고 보고한 선학들의 연구결과¹⁹⁾를 토대로 치주질환 치료에 임상적으로 사용되고 있는 농도의 Tc-HCl이 정상 성인의 다형핵백혈구에 의한 O_2^- 생성에 미치는 영향을 알아보는데 그 목적이 있다.

실험에 사용된 항생제는 Tc-HCl로 각각 5, 10, 50, 100 $\mu g/ml$ 의 농도를 사용했는데, 이러한 농도를 사용한 이유는 현재 임상에서 Tc-HCl을 전신투여 했을 때 치은열구액으로 유리되는 농도가 5~10 $\mu g/ml$ 이며^{8,13,29,30)}, 치주질환과 관련된 대부분의 병원균을 제거하기 위해서는 대략 30 $\mu g/ml$ 이 필요하다는 점을 고려하였기 때문이다³¹⁾.

본 실험결과 Tc-HCl은 다형핵백혈구의 O_2^- 생성을 유의성 있게 감소시켰는데, Tc-HCl의 각 농도간에는 유의성 있는 차이가 없었다. 반면, 배양시간에 따른 변화를 관찰해보면 다형핵백혈구가 Tc-HCl에 노출된 시간이 길어짐에 따라 O_2^- 생성은 유의성있게 감소되었다. 이러한 결과는 건강한 성인의 다형핵백혈구가 Tc-HCl에 노출된 시간과 Tc-HCl의 농도가 증가함에 따라 O_2^- 생성이 감소함을 보여준 Agarwal 등¹⁹⁾의 보고와 일치하였다. Agarwal 등¹⁹⁾은 이러한 실험결과가 현재 임상에서 국소약물 송달체계를 이용한 약물의 사용시 약물의 국소적 농도와 송달시간을 조절하는데 도움이 될 것이라고 보고하였다. Miyachi 등³²⁾은 항생제가 다형핵백혈구의 반응성 산소유리기 생성에 끼치는 영향에 관한 연구에서 100 $\mu g/ml$ Tc-HCl을 사용시 O_2^- 생성이 감소됨을 보고하였는데, 이는 Tc-HCl이 O_2^- 를 제거한 것이 아니라 다형핵백혈구의 O_2^- 합성 작용을 억제하기 때문이라고 하였다. 하지만 이 연구는 일정한 시점에서 O_2^- 생성을 측정한 것이었으며, Tc-HCl과 다형핵백혈구가 접촉한 시간변화에 따라 O_2^- 생성이 감소되는 기전에 대해서는 언급하지 않았다.

본 연구는 치주 상태가 건강한 성인에서 채취한 다형핵백혈구의 O_2^- 생성에 대한 Tc-HCl의 영향을 알

아본 것으로, 다형핵백혈구가 Tc-HCl에 노출된 시간이 길어짐에 따라 O_2^- 생성이 감소함을 보여주었다. 향후 유년형 치주염, 급속 진행형 치주염환자와 같이 중성구 기능장애가 있는 것으로 알려진 환자들을 대상으로 한 연구와 다른 여러 항생제의 작용에 대한 연구, 그리고 LPS와 같은 자극원에 의해 다형핵백혈구가 활성화되는 기전으로서 이들 세포내에서 작용하는 신호전달체계에 대한 지속적인 연구가 필요하리라 사료된다.

V. 결론

치주질환 치료에 임상적으로 사용되고 있는 농도의 Tc-HCl이 정상 성인의 다형핵백혈구에 의한 O_2^- 생성에 미치는 영향을 알아보는데 목적을 두고 본 연구를 시행하였는데, 연구대상으로는 전신적 및 치주적으로 건강한 성인남자(23세-28세, 평균:24.9세) 11명을 선별하여 주정중괴정맥에서 혈액 60ml를 채취한 다음 다형핵백혈구는 one-step Ficoll-Hypaque gradient centrifugation method로 분리하였고, superoxide dismutase(SOD)-inhibitable cytochrome C reduction method를 이용하여 항생제 농도변화에 따른 O_2^- 의 생성을 Microplate Autoreader로써 측정하였다.

본 연구를 통한 건강한 성인에서 채취된 다형핵백혈구의 Tc-HCl농도에 따른 O_2^- 생성변화는 다음과 같은 결과를 보였다.

1. Tc-HCl을 첨가한 군에서 조절군에서보다 O_2^- 생성이 유의성있게 낮았다($p < 0.05$). 그러나 O_2^- 생성이 억제되는 정도와 Tc-HCl의 농도사이에는 통계학적 유의성이 없었다($p > 0.05$).
2. 다형핵백혈구가 Tc-HCl에 노출되는 시간이 길어질수록 O_2^- 생성이 유의성있게 감소되었다($p < 0.05$).

이상의 제한된 실험의 결과를 볼 때 Tc-HCl은 건강한 성인의 다형핵백혈구에 의한 O_2^- 생성을 억제시키며 그 억제정도는 다형핵백혈구가 Tc-HCl에 노출

되는 시간에 의해 결정됨을 나타냈다.

VI. 참고문헌

1. 황승환, 김병옥, 한경윤. “치주염 환자의 혈장과 적혈구내 S.O.D와 Catalase 활성도에 관한 연구”, 「대한치주과학회지」 제25권, 1호:167-176, 1995.
2. 김병옥, 김찬진, 한경윤. “치주질환 환자의 말초혈액내 glutathione peroxidase와 catalase의 활성변화에 관한 연구”, 「대한치주과학회지」 제25권, 3호:529-536, 1995.
3. 김병옥, 권영혁, 이만섭. “치주질환 심도에 따른 치은조직내의 Superoxide Dismutase와 Catalase의 활성변화에 관한 연구”, 「대한치주과학회지」 제24권, 1호:39-48, 1994.
4. Miyasaki, K. T.: “The Neutrophil: Mechanisms of Controlling Periodontal Bacteria”, *J. Periodontol.*, 62:761-774 1991.
5. Babior, B. M.: “Oxidants From Phagocytes: Agents of Defense and Destruction”, *Blood*, 64:959-966 1984.
6. Chapple, I. L. C.: “Reactive oxygen species and antioxidants in inflammatory disease”, *J. Clin. Periodontol.*, 24:287-296 1997.
7. Bartold, P. M., Wiebkin, O. W., and Thonard, J. C.: “The effect of oxygen-derived free radicals on gingival proteoglycans and hyaluronic acid”, *J. Periodont. Res.*, 19:390-400, 1984.
8. Seymour, G. J., Whyte, G. J., and Powell, R. N.: “Chemiluminescence in the assessment of polymorphonuclear leukocyte function in chronic inflammatory periodontal disease”, *J. Oral. Pathol.*, 15:125-131, 1986.
9. Åsman, B., Bergström, K., Wijkander, P., and Lockowandt, B.: “Influence of plasma components on luminol-enhanced chemiluminescence from peripheral granulocytes in juvenile periodontitis”, *J. Clin. Periodontol.*, 13:850-855, 1986.
10. Shapira, L., Borinski, R., Sela, M. N., and Soskolne, A.: “Superoxide formation and chemiluminescence of peripheral polymorphonuclear leukocytes in rapidly progressive periodontitis patients”, *J. Clin. Periodontol.*, 18:44-48, 1991.
11. Kimura, S., Yonemura, T., and Kaya, H.: “Increased oxidative product formation by peripheral blood polymorphonuclear leukocytes in human periodontal disease”, *J. Periodont. Res.*, 28:197-203, 1993.
12. Gabler, W. L., and Creamer, H. R.: “Suppression of human neutrophil functions by tetracyclines”, *J. Periodont. Res.*, 26:52-58, 1991.
13. Kornman, K. S., and Karl, E. H.: “The Effect of Long-Term Low-Dose Tetracycline Therapy on the Subgingival Microflora in Refractory Adult Periodontitis”, *J. Periodontol.*, 53:604-610, 1982.
14. Slots, J., Mashimo, P., Levine, M. J., Genco, R. J.: “Periodontal Therapy in Humans. I. Microbiological and Clinical Effects of a Single Course of Periodontal Scaling and Root Planing, and of Adjunctive Tetracycline Therapy”, *J. Periodontol.*, 50:495-509 1979.
15. Golub, L. M., Lee, H. M., Lehrer, G., Nemiroff, A., McNamara, T. F., Kaplan, R. and Ramamurthy, N. S.: “Minocycline reduces gingival collagenolytic activity during diabetes. Preliminary observations and a proposed new mechanism of action”, *J. Periodont. Res.*, 18:516-526 1983.
16. Golub, L. M., Ramamurthy, N., McNamara, T. F., Gomes, B., Wolff, M., Casino, A., Kapoor, A., Zambon, J., Ciancio, S., Schneir, M. and Perry, H.: “Tetracyclines inhibit tissue collagenase activity. A new mechanism in the treatment of periodontal disease”, *J. Periodont.*

- Res., 19:651-655 1984.
17. Golub, L. M., Wolff, M., Lee, H. M., McNamara, T. F., Ramamurthy, N. S., Zambon, J. and Ciancio, S.: "Further evidence that tetracyclines inhibit collagenase activity in human crevicular fluid and from other mammalian sources", *J. Periodont. Res.*, 20:12-23 1985.
 18. Seymour, R. A., and Heacman, P. A.: "Tetracyclines in the management of periodontal diseases", *J. Clin. Periodontol.*, 22:22-35, 1995.
 19. Agarwal, S., Piesco, N. P., Peterson, D. E., Charon, J., Suzuki, J. B., Godowski, K. C., and Southard, G. L.: "Effects of sanguinarium, chlorhexidine and tetracycline on neutrophil viability and function *in vitro*", *J. Periodont. Res.*, 32:335-344, 1997.
 20. Kalmar, J. R., Arnold, R. R., Warbington, M. L and Gardner, M. K.: "Superior leukocyte separation with a discontinuous one-step Ficoll-Hypaque gradient for the isolation of human neutrophils", *J. Immunol. Meth.*, 110:275-281 1988.
 21. Pick, E., and Mizel, D.: "Rapid Microassays for the Measurement of Superoxide and Hydrogen peroxide Production by Macrophages in Culture using an Automatic enzyme immunoassay reader", *J. Immunol. Meth.*, 46:211-226, 1981.
 22. Ambruso, D. R., and Johnston Jr, R. B.: "Lactoferrin Enhances Hydroxyl Radical Production by Human Neutrophils, Neutrophil Particulate Fractions, and an Enzymatic Generating System", *J. Clin. Invest.*, 67:352-360, 1981.
 23. McCord, J. M.: "Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury", *New. Eng. J. Med.*, 312:159-163, 1985.
 24. Champagne, C. M., Holt, S. C., Van Dyke, T. E., Gordon, B. J., and Shapira, L.: "Lipopolysaccharide isolated from *Porphyromonas gingivalis* grown in hemin-limited chemostat conditions has a reduced capacity for human neutrophil priming", *Oral. Microbiol. Immunol.*, 5:319-325 1996.
 25. Guthrie, L. A., Mcphail, L. C., Henson, P. M., and Johnston, Jr. R. B.: "Priming of Neutrophils for Enhanced Release of Oxygen Metabolites by Bacterial Lipopolysaccharide. Evidence for Increased Activity of the Superoxide-producing Enzyme", *J. Exp. Med.*, 160:1656-1671, 1984.
 26. Opdahl, H.: "Direct and Indirect Effects of *E. Coli* Lipopolysaccharide on Isolated Human Polymorphonuclear Granulocytes and Mixed Leukocytes", *Inflammation.*, 17:57-75, 1993.
 27. Shapira, L., Gordon, B., Warbington, M., and Van Dyke, T. E.: "Priming Effect of *Porphyromonas gingivalis* Lipopolysaccharide on Superoxide Production by Neutrophils From Healthy and Rapidly Progressive Periodontitis Subjects", *J. Periodontol.*, 65:129-133, 1994.
 28. Aida, Y., and Pabst, M. J.: "Priming of Neutrophils by Lipopolysaccharide for Enhanced Release of Superoxide. Requirement for Plasma but Not for Tumor Necrosis Factor- α ", *J. Immunol.*, 145:3017-3025, 1990.
 29. Gordon, J. M., Walker, C. B., Murphy, J. C., Goodson, J. M., and Socransky, S. S.: "Concentration of tetracycline in human gingival fluid after single doses", *J. Clin. Periodontol.*, 8:117-121, 1981.
 30. Maze, G. I., Reinhardt, R. A., Payne, J. B., Maze, C., Baker, R. A., Bouwsma, O. J., Damani, N. C., Fitzgerald, J., Hamlin, J. C., and Gerlach, R. W.: "Gingival fluid tetracycline release from bioerodible gels", *J. Clin.*

- Periodontol.*, 23:1133-1136, 1996.
31. The American Academy of Periodontology.:
“Periodontal Disease Management”, A
Conference for the Dental Team, Boston,
Massachusetts, U.S.A. p326, 1993.
32. Miyachi, Y., Yoshioka, A., Imamura, S., and
Niwa, Y.: “Effect of Antibiotics on the
Generation of Reactive Oxygen Species”, *J.*
Invest. Dermatol., 86:449-453, 1986.

Effect of Tetracycline-HCl on superoxide anion generation by polymorphonuclear leukocytes

Young-Ho Bae, Byung-Ock Kim, Kyung-Yoon Han

Department of Periodontology, College of Dentistry, Chosun university

It has been believed that the increased release of free oxygen radicals(O_2^- , H_2O_2 and OH^\cdot) might be one of important factors in the pathogenesis of periodontal diseases.

Polymorphonuclear leukocytes(PMNs) constitute the primary host resistance factor against infection. They are prominent cells in both the gingival tissue and gingival sulcus in most forms of periodontal disease. In response to invading microorganisms, the activated PMNs and macrophages generate free oxygen radicals, which play an important role in bacterial killing. The normal production of these free oxygen radicals is vital for the successful resistance of individuals to bacterial infection. However, the enhanced production of reactive oxygen species by accumulating PMNs may be detrimental to the host in certain disease states.

This study was performed to evaluate the effect of Tetracycline-HCl(Tc-HCl) on generation of superoxide anion by PMNs.

For the present study, 60ml of peripheral venous blood were obtained from systemically healthy subjects by venipuncture in median cubital vein and PMNs were separated by a one-step Ficoll-Hypaque gradient centrifugation method. PMNs were incubated with $1\mu g/ml$ *P.gingivalis* strain A7436 LPS, 5% serum and Tc-HCl(5, 10, 50 and $100\mu g/ml$). The superoxide anion analysis was carried out by superoxide dismutase-inhibitable cytochrome C reduction method using Microplate autoreader(BIO-TEK™ Instrument Inc.).

The difference of superoxide anion generation between control group and Tc-HCl group was statistically analyzed by paired *t*-test. The superoxide anion generation in the course of time after treatment with Tc-HCl was analyzed by ANOVA, and the superoxide anion generation in the course of time after treatment with various concentrations of Tc-HCl was analyzed by Repeated Measurement test.

The results were as follows:

1. Superoxide anion generation by PMNs was significantly decreased by Tc-HCl($p < 0.05$).
2. There was no statistical significance in the inhibition of superoxide anion generation in the course of time after treatment with various concentrations of Tc-HCl($p > 0.05$).
3. Superoxide anion generation by PMNs was significantly decreased in the course of incubation time after treatment with Tc-HCl($p < 0.05$).

The results demonstrate that the Tc-HCl inhibit superoxide anion generation by PMNs and the inhibitory effects depend on the exposure time rather than the concentration of Tc-HCl.

Key words : PMNs, Superoxide anion, Tc-HCl