테트라사이클린계 약물이 치은섬유아세포내 MMP-3의 활성도에 미치는 영향

조종희 · 김상목 · 김병옥 · 한경윤

조선대학교 치과대학 치주과학교실

I. 서론

치주조직의 결합조직내 세포외기질은 기저막 교원질, fibronectin, laminin과 proteoglycan core protein 등의 단백질로 구성되어 있는데, 치은에는 60% 이상, 치조골에는 유기질의 90%이상이 교원질에 의해 세포외기질을 이루고 있다.

세포외기질의 분해는 조직의 증식과 재구성에 필요한 중요한 전구단계이며[1-3], 진행성 치주질환에서의 치주인대와 치조골의 파괴는 이들 조직의 주성분인 교원질 분해과정에 의해 초래된다. Viella등[4]은 교원질분해효소의 활성이 치은염 및 치주염에서 염증반응의 정도에 비례하고 병소의 활성도와 관련이 있으며, 다형핵백혈구에서 유래된 교원질분해효소가 치은열구액내에 더 많이 존재한다고 하였다. Woolly등[5]은 치은조직에서 섬유아세포에서 유래된 교원질분해효소는 주로 접합상피와 치주낭상피에 접한 치은결합조직과 관련이 깊다고 보고하였다. Gangbar등[6]은 구강양치액에서 교원질분해효소 활성이 치주질환의 치료전에 증가하고 처치후 감소하며 치은염증과 관련되어 있다고 보고하면서 이 효소가 치주질환 진행의 활성도 평가에 사용가능성이 있음을 제시하였다.

세포외기질의 분해과정에 중요한 효소인 proteinase는 metal, serine, cysteine, aspartic의 활성기를 지닌다. 그중에서 metal기가 proteinase에 결합된 matrix metalloproteinase(MMP)는 interstitital collagenase(MMP-1, -8, -13), gelatinase(MMP-2, -9), stromelysin(MMP-3, -10, -11)으로 대별된다[1,3].

MMP는 만성 염증성질환, 류마티스 관절염, 피부질환, 암과 같은 여러 질환에서 조직파괴와 조직 재구성에 관여하는 중요한 단백질분해효소로 간주되고 있으며, 치주질환과 관련된 MMP군들은 다형핵백혈구, 섬유아세포, 대식세포, 상피세포등에서 유래된다[1,3]. MMP, tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) 및 조절분자와 관련된 유전물질들은 치주질환의 병적인 진행정도를 평가할수 있고 잠재적인 진단 표시자로 이용할 수 있음이 보고되었다[7-9]. Meikle등[10-12]은 면역조직학적 연구에 의해 만성염증성 치주질환을 갖는 환자의 치은에서 MMP-1, -2, -3, 와 TIMP을 확인하였다.

치주질환은 치태세균의 면역조직학적 반응 및 염증반응의 결과로 진행되는 감염성 질환이다. 치태세균에서 분비된 내독소와 같은 독성물질은 숙주내의 임파구나 단핵세포 및 대식세포를 자극하여 interleukin-1(IL-1), tumor necrosis factor-α와 같은 cytokine들과 transforming growth factor-α와 같은 성장인자의 생성에 크게 영향을 미친다[8,9,13].

IL-1은 세균침투에 대한 신체반응의 중요한 조절기능을 하며, 염증성 병리과정과 관련된 조직파괴의

잠재적인 국소 매개체이다[14-17]. IL-1은 유전자 구조에 따라 막결합형인 IL-1α와 분비형인 IL-1β로 분류되며, 골흡수의 활성화에 있어 IL-1β는 IL-1α보다 15배 강력하다고 밝혀졌다[18-20]. IL-1β는 치주염 환자의 치은조직과 치은열구액에서 많이 검출되며, 교원질 분해효소의 생성과 prostaglandin의 합성을 증가시켜 염증진행을 촉진시킴으로써 교원질 합성능을 저해한다[10].

화학적 요법을 이용한 치주처치에 대한 이론적 근거는 치주 질환의 주원인이 세균이라는데 있고, 치주영역에서의 화학적 요법은 치주염치료에 단독으로 적용되거나 기계적인 치료에 부가적인 처치로 적용되어 왔다. 치주질환을 일으키는 주요 세균에 대해 다양한 항생제들의 항균작용에 대한 연구가 이루어져 왔으며, 최근에는 국소약물송달법에 의한 약물의 투여효과에 관한 연구가 보고되었다. 이중 테트라사이클린계 항생제는 치주병인균에 대해 낮은 농도로도 다른 항생제와 비슷한 정도의 억제효과를 발휘하기 때문에 치주질환에 더 효과적인 것으로 알려졌다[25-27].

Tetracycline-HCl은 여러 치주병인균을 포함하여 수많은 그람 양성 및 음성 세균에 대한 항균작용[28,29] 이외에, 치주질환에 이환된 조직에서 항교원질분해효소작용[30], 항염증작용, 골흡수의 억제, 치근면에 대한 섬유아세포의 부착증진 등의 효능[31]을 나타낸다.

Doxycycline-HCl은 tetracycline-HCl에 비해 흡수율이 높아 장내 세균총에 대한 영향이 적어 소화기관내 부작용이 적고, 소량의 약제로 긴 반감기를 지녀 약효가 장기간 지속된다. 또한 치은 열구액내 농도가 혈중농도보다 높아 치주질환과 관련된 치은연하 치태세균에 효과가 크기 때문에 치주염 치료를 위한 항생제로 추천되고 있다[15].

Minocycline-HCl은 치주질환의 원인균주에 대한 감수성이 높고, 내성균 발현율이 낮으며[25,32], 조직 친화성이 크고 특히 치면의 칼슘과 흡착되는 작용이 있어 지속적인 항균작용을 나타낸다. 또한 지방용해성이 크고 혈장반감기가 길며 뇨배출이 적고 치은열구액내에는 혈장보다 5배나 높은 농도를 보이면서 치주병인균에 대해 강한 항균효과를 보이는 것으로 알려져 있다[26,32].

지금까지 치주치료 영역에서의 화학요법에 관한 연구들은 많이 있었으나, 주로 치주질환을 일으키는 주요 세균에 대해 항생제들의 항균작용에 대한 연구가 이루어져 왔으며, 항생제가 치주조직내 단백질분해효소에 미치는 영향에 관한 연구는 극히 미미하였다. 이에 치은섬유아세포에 IL-1β를 농도별로 적용함으로써 MMP-3를 활성화시킬 수 있는 적정농도를 설정한 후, 테트라사이클린계 약물의 농도별 적용이 IL-1β에 의해 유도된 MMP-3 활성도에 미치는 영향을 규명하고자 본 연구를 시행하였다.

II. 실험재료 및 방법

1. 실험재료

(1) 치은섬유아세포

건강한 치은 조직을 채취하여HBSS(Hanke's buffered salt solution, GIBCO/BRL, USA) 5ml을 포함한 용기에 4℃로 냉장보관하였다. 채취후 6-8시간 이내에 HBSS로 3회 세정한 다음 1x1x1mm의 크기로 세절하였다. 10-15개의 조직절편을 세포배양접시(NUNC, Netherland)에 담아 20% fetal bovine serum(FBS, Gibco, USA)과 10 unit/ml의 penicillin, 100㎍/ml의 streptomycin이 포함된 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)을 넣고, 37℃, 100% 습도, 5% CO_2 공기혼합 배양기(Sanyo, Japan)에서 배양하였다. 섬유아세포가 조직절편으로부터 증식되어 배양접시에 밀생상태(confluent)가 되었을 때, 세포배양접시(NUNC, Netherland)로 옮겨 5-6일 간격으로 계대배양한 후 5-10세대를 사용하였다.

(2) IL-1β및 tetracycline계 약물의 준비

IL-1β(R & D Systems, Minneapolis, MN)는 dimethyl sulfoxide(Sigma, USA)에 용해하여 -20℃ 저온 냉동고에 보관한 후 실험시 실온에서 녹여 사용하였다. Tetracycline-HCl(Sigma, USA), doxycycline-HCl(Sigma, USA), minocycline-HCl(Sigma, USA)은 3차 증류수에 용해한 후 -20℃에 보관하였다가 실

험시 실온에서 녹여 사용하였다.

2. 방법

(1) IL-1β기준농도 설정

6 well 조직배양판에서 배양된 세포가 밀생상태에 이르면 IL-1β처리 24시간 전에 항생제를 배제한 0.1% FBS가 함유된 DMEM으로 교체하여 배양하였다. 24시간 배양 후 조직 배양액을 모두 제거하고 IL-1β를 첨가하지 않은 군을 대조군으로 하고 5, 10, 25, 50, 100ng/ml 농도의 IL-1β 1ml와 0.1% FBS가 함유된 DMEM 1ml를 함께 적용하여 24시간 배양한 다음 ELISA를 이용하여 각 농도에 따른 MMP-3의 활성도를 평가함으로써 본실험에서 MMP-3를 활성화 시키기 위한 IL-1β의 기준 농도로 설정하였다.

(2) ELISA를 이용한 MMP-3의 활성도 검사(Figure 1)

배양된 multiwell culture plate로부터 상층액을 채취하여 proMMP-3 ELISA kit(The Binding site, San Diego. CA)의 96 well plate의 각 well에 적절히 triplicate하여 나눠 넣고 60분간 실온에 방치한 후 각 well에 wash buffer로 3회 세척한 다음, 100㎕의 biotinylated antibody를 각 well에 적용하고 60분간 실온에 반응시킨 후 wash buffer로 다시 3회 세척하

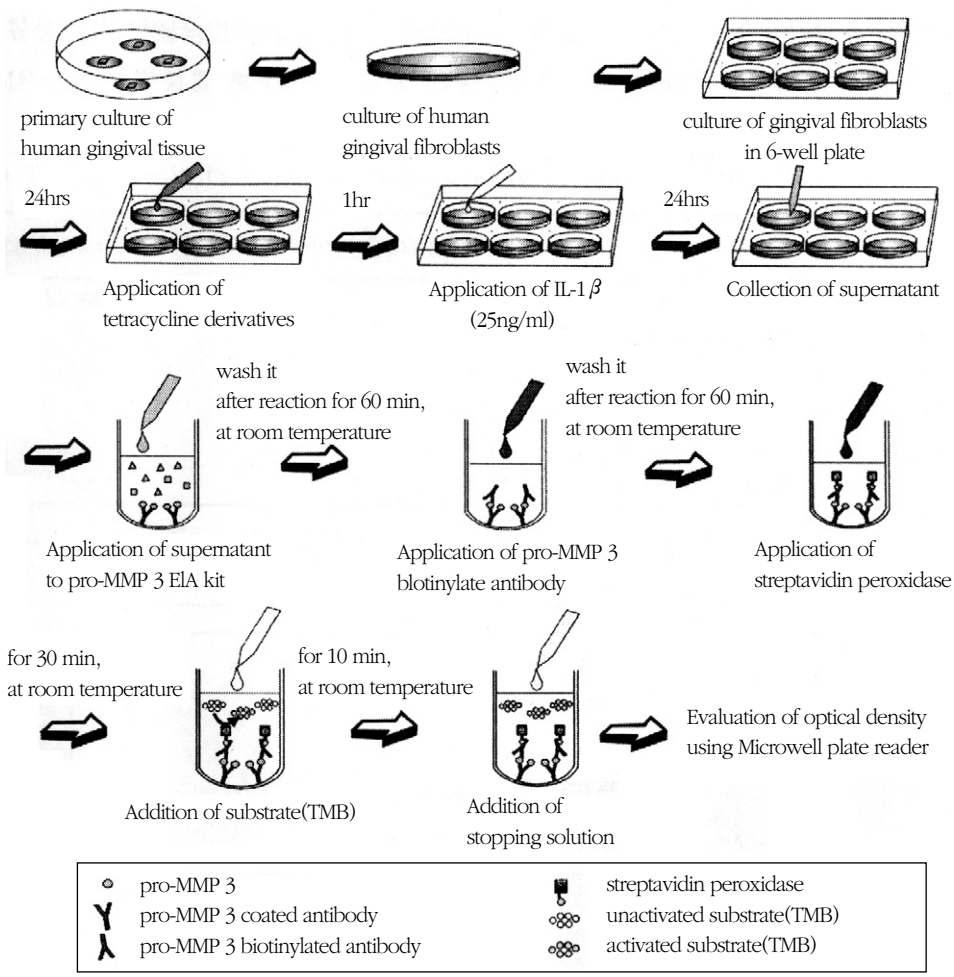

Figure 1. A Schematic illustration of the experimental procedure

였다. Streptavidin peroxidase를 각 well에 100㎕씩 분주하고 실온에서 30분간 반응시킨 후 wash buffer로 3회 세척하였다. 각 well에 3,3', 5,5'-tetramethylbenzidine 기질 100㎕씩을 분주한 다음 실온에서 10분간 방치한 후 100㎕의 stopping solution을분주하였다. 청색에서 황색으로 변화되는 stopping reaction을 확인한 후 30분내에 microwell plate reader (Bio-Tek instrument, USA)에서 450nm로 각 well의 흡광도(optical density)를 측정하였고, 대조군에 대한 각 농도군 흡광도의 백분율을 구하여 MMP-3의 상대적 활성도(relative activity)로 평가하였다.

(3) Tetracycline계 약물의 투여

약물을 전혀 투여하지 않은 대조군으로부터 10, 25, 50, 100, 200㎍/ml 농도의 tetracycline-HCl, doxycycline-HCl 및 minocycline-HCl 각 1ml를 0.1% FBS를 함유한 DMEM배양액 1ml와 함께 첨가하여 치은섬유아세포를 배양하였다. 1시간 후 25ng/ml의 IL-1β를 배양액과 함께 첨가한 후 24시간 배양한 다음 proMMP-3 ELISA kit를 이용하여 동일한 방법으로 MMP-3의 상대적 활성도를 평가하였다.

(4) 통계학적 분석

흡광도와 MMP-3의 상대적 활성도에 대한 IL-1β의 농도에 따른 차이 및 tetracycline계 약물의 각 농도에 따른 차이를 일원 분산분석법(one-way ANOVA)으로 분석하였고 Turkey test로 사후검증을 하였다. 통계처리는 SPSS/PC+를 이용하였고, $p<0.05$수준에서 통계학적 유의성을 검증하였다.

III. 실험성적

1. IL-1β의 농도에 따른 MMP-3의 활성도

치은섬유아세포에 5, 10, 25, 50, 100ng/ml농도의 IL-1β를 투여하여 24시간 배양한 후 IL-1β를 가하지

Table 1. The activity of MMP-3 according to the concentrations of IL-1β

Concentration(ng/ml)	Number	Optical density(Mean±S.D)	Relative activity(Mean(%)±S.D)
0(control)	6	0.30±0.26	100.00
5	6	1.17±0.60	395.05±202.87
10	6	0.99±0.52	336.06±174.50
25	6	2.01±0.83*	680.94±280.89*
50	6	1.96±0.73*	664.00±247.48*
100	6	2.47±0.21*	826.57±51.95*

* $p<0.05$: significantly different from the control

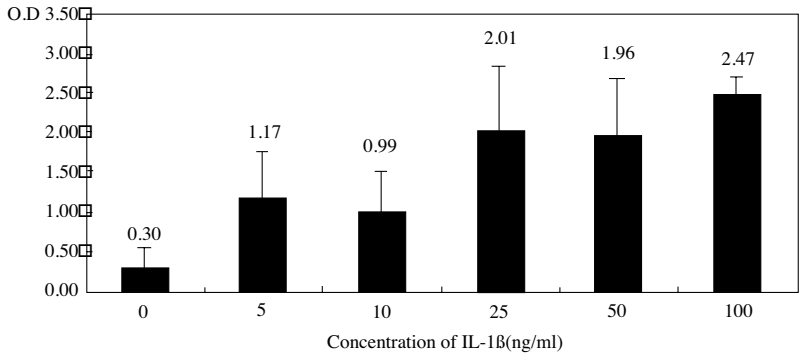

Figure 2.The difference of the optical density(O.D) of MMP-3 according to the concentrations of IL-1β

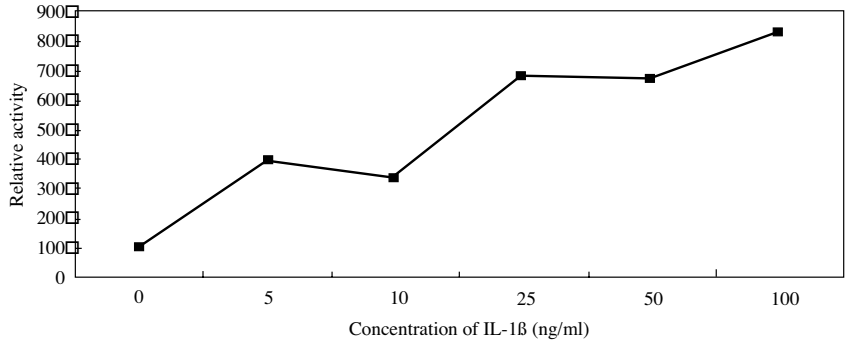

Figure 3. The difference of the relative activity of MMP-3 according to the concentrations of IL-1β

않은 대조군과 MMP-3의 활성도를 비교한 결과 대조군에 비해 25ng/ml이상의 농도에서 통계학적으로 유의성있게 높은 MMP-3의 활성도가 발현되었다 ($p<0.05$, Table 1, Figure 2, Figure 3). 이에 본 실험에서 MMP-3의 활성화를 위한 IL-1β의 기준농도를 25ng/ml로 설정하였다.

2. Tetracycline-HCl의 농도에 따른 MMP-3의 활성도

Tetracycline-HCl 투여가 MMP-3의 활성도에 미치는 영향을 분석한 결과 tetracycline-HCl을 투여하지 않은 대조군에 비해 통계학적 유의성은 없었으나, 저농도인 10㎍/ml의 tetracycline-HCl 투여군에서 가장 낮은 MMP-3의 활성도를 보였으며, 200㎍/ml 농도의

Table 2. The activity of MMP-3 according to the concentrations of tetracycline-HCl

Concentration(ng/ml)	Number	Optical density(Mean±S.D)	Relative activity(Mean(%)±S.D)
0(control)	6	1.11±0.09	100.00
10	6	0.56±0.12	51.18±13.48
25	6	0.73±0.25	67.48±26.50
50	6	1.00±0.40	92.31±41.18
100	6	1.37±0.34	125.40±37.46
200	6	1.88±0.56*	172.80±61.66*

* $p<0.05$: significantly different from the control

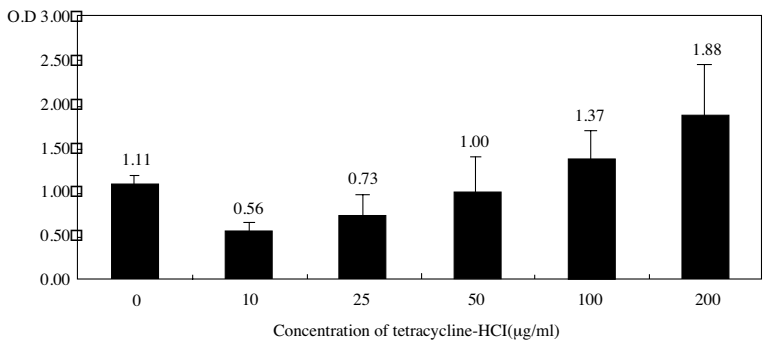

Figure 4. The difference of the optical density(O.D) of MMP-3 according to the concentrations of tetracycline-HCl

tetracycline-HCl을 투여한 군에서는 MMP-3의 활성도가 유의성있게 높았다($p<0.05$, Table 2, Figure 4).

3. Doxycycline-HCl의농도에 따른 MMP-3의 활성도

Doxycycline-HCl을 적용하지 않은 대조군에 비해 10, 25, 50, 100㎍/ml 농도의 doxycycline-HCl을 투여한 군에서는 MMP-3의 활성도가 유의성있게 낮았고, 반면에 200㎍/ml 농도 투여군에서는 MMP-3의 활성도가 유의성있게 높게 나타났다($p<0.05$, Table 3, Figure 5).

Table 3. The activity of MMP-3 according to the concentrations of doxycyline-HCl

Concentration(㎍/ml)	Number	Optical density(Mean±S.D)	Relative activity(Mean(%)±S.D)
0(control)	6	1.26±0.12	100.00
10	6	0.52±0.03*	41.77±3.60*
25	6	0.67±0.06*	53.06±2.25*
50	6	0.73±0.09*	58.09±3.70*
100	6	1.00±0.05*	80.03±10.34*
200	6	1.45±0.10*	115.89±8.23*

* $p<0.05$: significantly different from the control

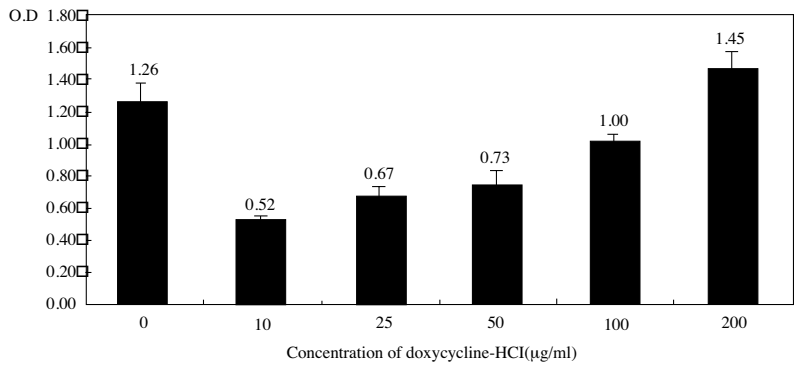

Figure 5. The difference of the optical density(O.D) of MMP-3 according to the concentrations of doxycycline-HCl

Table 4. The activity of MMP-3 according to the concentrations of minocycline-HCl

Concentration(㎍/ml)	Number	Optical density(Mean±S.D)	Relative activity(Mean(%)±S.D)
0(control)	6	2.69±0.12	100.00
10	6	0.89±0.18*	33.05±6.53*
25	6	1.06±0.22*	39.00±7.93*
50	6	1.64±0.30*	60.71±10.98*
100	6	1.89±0.27*	69.98±10.36*
200	6	1.86±0.32*	68.80±11.76*

* $p<0.05$: significantly different from the control

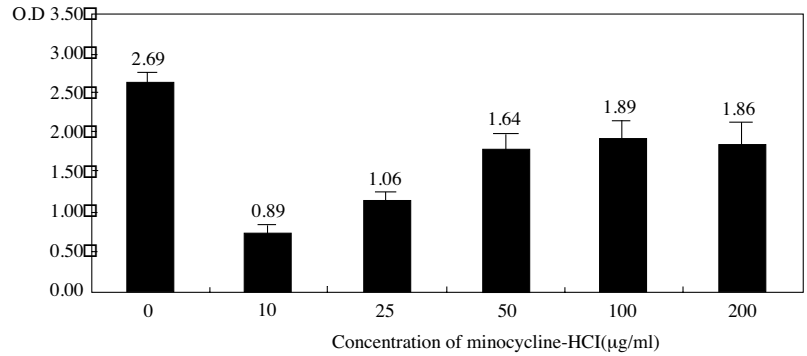

Figure 6. The difference of the optical density(O.D) of MMP-3 according to the concentrations of minocycline-HCl

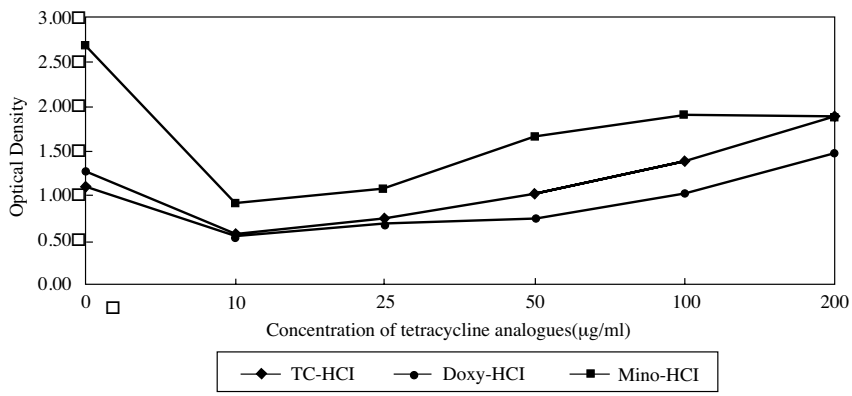

Figure 7. The difference of the optical density of MMP-3 according to the concentrations of 3 tetracycline analogues

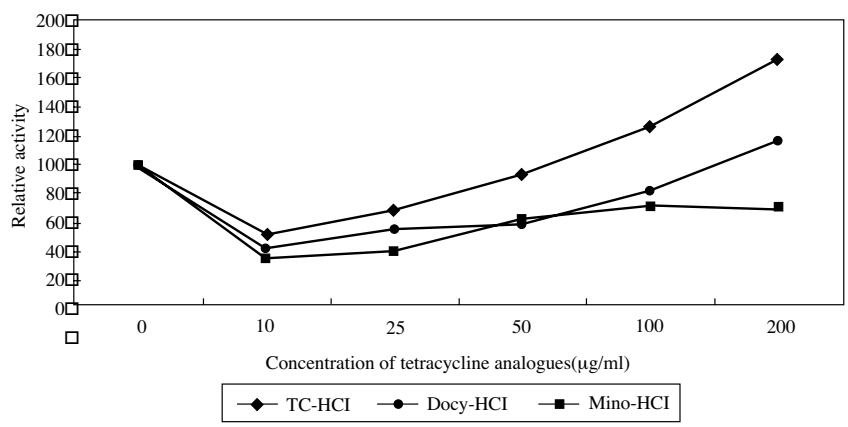

Figure 8. The difference of the relative activity of MMP-3 according to the concentrations of 3 tetracycline analogues

4. Minocycline-HCl의 농도별 MMP-3의 활성도

Minocycline-HCl을 투여하지 않은 대조군에 비해 10㎍/ml의 저농도를 투여한 군으로부터 200㎍/ml의 고농도를 투여한 군까지 모두 MMP-3의 활성도가 유의성 있게 낮게 나타났다($p<0.05$, Table 4, Figure 6).

5. Tetracycline계 약물이 MMP-3 활성도에 미치는 영향

3종의 tetracycline계 약물 모두 고농도보다는 저농도로 투여되었을 때 약물을 투여하지 않은 대조군에 비해 MMP-3의 활성이 억제되는 경향이 관찰되었다(Figure 7, Figure 8).

IV. 총괄 및 고안

치주염의 일차적인 원인은 치태 세균이며, 이 세균으로부터 분비된 내독소와 같은 독성물질은 대식세포를 활성화시켜 다양한 cytokine들을 분비함으로써 다형핵백혈구, 치은섬유아세포, 대식세포 및 상피세포 등의 숙주세포를 자극하여 MMP를 방출하고 활성화시킨다[8,9,33-35]. MMP는 치아맹출과 같은 생리적인 과정과 치주질환과 같은 병적인 과정에 작용하며, 치주염에서 세포외기질에 대한 병리적 파괴는 활성화된 MMP와 이에 대한 억제제인 TIMP의 불균형에 의해 야기된다[1,12,14,36-39].

성인형 치주염에서는 다형핵백혈구에서 유래된 interstitial collagenase(MMP-8)가 주로 관련된 반면[40,41], 국소 유년형 치주염에서는 섬유아세포, 대식세포, 상피세포에서 유래된 interstitial collagenase (MMP-1)가 주로 관련된다[1]. 치은열구액과 타액에서 검출된 단백질분해효소와 억제물질은 치주조직의 건강을 반영하는 것으로 간주되고 있는데, 성인형 치주염에서는 MMP-8이 높게 나타난 반면, 국소 유년형 치주염에서는 MMP-1이 높게 나타난다[4,42,43]. 최근 치은, 치은열구액과 타액에서 MMP-8, MMP-9는 doxycycline과 chemically modified non-antimicrobial tetracyclines(CMTs)에 의해 억제될수 있다고보고되었다[43,44].

치주질환에서 나타나는 MMP중에서 MMP-3(stromelysin-1)은 gelatin, proteoglycans, laminin, fibronectin과 type IV 와 IX collagen을 포함한 다양한 세포외기질의 분해를 담당한다[45-47]. 또한 MMP-3는 류마티스관절염과 골관절염을 포함한 다양한 염증성 질환과 관련된 결합조직의 파괴에 중요한 역할을 하며, MMP-1의 활성을 조절하여 병인과정이 시작되는 결정적인 요소를 제공할 것이라고 보고되었다[48,49].

인체 치은섬유아세포는 5,000-15,000개의 IL-1 수용체를 지니며[20], proinflammatory cytokine에 대응하여 MMP를 생산하는데, MMP-3의 활성은 IL-1β의 매개에 의해 조절되어지고, 치주질환과 관련된 결합조직의 파괴에서 IL-1β와 MMP-3가 중요한 역할을 한다[49].

본 연구는 선학들의 연구결과를 토대로 질환의 활성을 매개하기 위한 수단으로 인체 치은섬유아세포에 IL-1β를 첨가하여 MMP-3를 활성화할 수 있음을 확인한 다음, 화학요법제중 tetracycline계 약물이 MMP-3의 활성도에 미치는 영향을 규명하고자 tetracycline-HCl, doxycycline-HCl, minocycline-HCl의 tetracycline계 약물을 배양중인 인체 치은섬유아세포에 설정된 농도로 각각 투여하고 1시간 후 IL-1β를 적용한 후 24시간 동안 배양하여 MMP-3의 활성도를 비교분석하였다.

MMP의 활성화는 MMP 유전자 전사단계의 조절, 전구물질의 활성화, 기질특이성의 차별화 및 MMP inhibitor의 작용억제 등으로 이루어지는데[1,50-53], IL-1β는 유전자 전사단계에 작용하여 MMP-3의 활성을 유도한다. MMP-3의 활성을확인하는 방법으로는 chromatography, reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR). immunocytochemistry, ELISA 등이 이용되고 있는데, 본 연구에서는 실험실적으로 쉽게 이용할 수 있고, 객관적이며 재현성이 높은 장점들을 갖는 proMMP-3 ELISA kit(The Binding site, San Diego. CA)를 이용하였고 흡광도

를 측정한 후 MMP-3의 상대적 활성도를 구하여 비교 분석하였다.

본 실험에서 MMP-3의 활성화를 유도하기 위한 IL-1β의 적정농도를 설정하기 위해 먼저 IL-1β를 5, 10, 25, 50, 100ng/ml의 농도로 구분하여 실험한 결과 25ng/ml이상의 농도에서 MMP-3의 활성도가 유의성있게 상승됨을 확인하였고, 이에 본 실험을 위한 기준농도로 25ng/ml를 설정하였다. Stashenko등[54]은 성인형 치주염을 갖는 환자들을 대상으로 한 연구결과 IL-1β의 농도가 건강한 부위에서는 6.2±4.6ng/ml, 활성화되지 않은 질환부위에서는 12.6±2.5ng/ml, 활성화된 질환부위에서는 28.4±7.2ng/ml 정도 였다고 보고하였는데, 본 실험에서 적용된 25ng/ml의 IL-1β 농도는 활성화된 치주질환에 상응하는 농도로 간주할 수 있다.

Tetracycline계 약물은 IL-1β에 의한 MMP-3의 유도단계를 차단하거나 활성화된 MMP들의 Zn^{2+}와 결합함으로써 활성이 상실되도록 작용하는데[30,44], tetracycline-HCl의 경우 치주병인균의 효과적인 농도가 4-8㎍/ml이며, 치주질환과 관련된 대부분의 병원균을 제거하기 위해서는 대략 30㎍/ml이 필요하다고 한 Gordon등[55]의 보고, doxycycline-HCl의 경우 전신적으로 투약한지 48시간후 치은 열구액내 농도가 3-10㎍/ml정도 된다고 한 Pascale등[15]의 보고, minocycline-HCl의 경우 치주병원성 세균에 대한 항세균 활성농도를 4㎍/ml라고 한 Ciancio등[26,32]의 보고들을 토대로 본 연구에서 tetracycline계 약물의 농도를 10, 25, 50, 100, 200㎍/ml로 설정하여 농도에 따른 MMP-3의 활성도 차이를 비교하고자 하였다.

본 연구결과에서 대조군에 비해 tetracycline-HCl을 25㎍/ml 이하의 저농도로 투여한 실험군에서는 통계학적 유의성은 없었으나 MMP-3의 활성도가 억제되는 경향을 보였고, 200㎍/ml의 고농도에서는 MMP-3 의 활성도가 오히려 유의성있게 상승되었는데($p<0.05$), 이러한 결과는 질환별에 따른 tetracycline-HCl의 투여효과에 관한 실험에서 성인형 치주염과 관계깊은 다형핵백혈구로부터 유래된 교원질분해효소에 대해서는 억제효과가 있었으나, 섬유아세포로부터 유래된 교원질분해효소에 대한 억제효과는 적었다고 보고한 Ingman등[14,38]의 연구 결과와 맥락을 같이 한다고 볼 수 있다.

Doxycycline-HCl을 투여한 본 연구에서 100㎍/ml 이하의 농도군에서는 MMP-3의 활성도가 억제되었으나($p<0.05$), 200㎍/ml 농도군에서는 활성도 상승이 관찰되었는데($p<0.05$), 토끼의 각막으로부터 정제된 교원질분해효소에 대한 tetracycline계 약물의 IC_{50}은 doxycycline(15㎛)이 minocycline(190㎛)이나 tetracycline(350㎛)에 비해 효소의 활성과 관련있는 Zn^{2+}에 대한 결합력이 가장 강함을 확인한 Burns등[56]의 연구를 고려할 때 doxycycline-HCl은 저농도에서 MMP-3와 쉽게 결합하기 때문에 결과적으로 MMP-3의 활성도를 억제하는 효과를 발휘하는 것으로 사료된다. 또한 20mg의 저용량 doxycycline 제제를 성인형 치주염환자에게 복용시켰을 때 항생제 투여후 예견되는 가장 큰 부작용 중의 하나인 저항균주의 발현없이 치주낭 깊이, 부착수준, 치은열구액내 교원질분해효소 활성도에 유의한 개선을 보였음을 보고한 Golub등[30,44]의 연구결과는 낮은 용량의 doxycycline이 항균작용과는 무관한 기전으로 치주조직의 상태를 개선시킬수 있으며, 장기적인 저용량 복용요법이 기계적인 치주치료의 유용한 보조치료법이 될 수 있음을 시사하였다.

Minocycline-HCl이 치은섬유아세포에 대한 직접적인 영향을 관찰한 실험에서 Somerman등[57]은 전신투여시 용량이 50㎍/ml일 때 치주낭의 세균총을 감소시키며 부작용이 가장 적었고, 고농도의 minocycline-HCl은 세포의 확산을 방해하여 치근면에 대한 결합조직 세포의 부착을 방해하며 24시간 이상 100㎍/ml의 농도에 세포를 노출시키는 경우 세포부착을 방해하여 결국 세포의 활동성 상실을 초래한다고 보고하였다. 또한 윤등[58]은 minocycline-HCl이 치은섬유아세포와 치주인대세포의 활성에 미치는 영향을 조사한 결과 저농도인 2㎍/ml에서 세포활성도가 가장 높았으며, 50㎍/ml이상의 농도에서는 세포활성이 감소되는 경향을 보였고, 100㎍/ml이상의 농도에서는 세포의 부착이 감소되는 경향을 보인다고 보고하였다. 본 연구에서도 minocycline-HCl을 투여한 경우 10-200㎍/ml의 모든 농도군에서 MMP-3의 활성도

가 억제되었으나($p<0.05$), 약물의 농도가 높을수록 MMP-3의 활성도 억제효과가 떨어지는 경향이 관찰되었는데, 이러한 결과는 minocycline-HCl 역시 저농도로 투여하는 것이 바람직함을 제시하고 있다.

이상과 같은 본 연구결과를 종합해 보면 치은섬유아세포에 tetracycline계 약물을 저농도로 적용하였을 때 IL-1β에 의해 유도된 MMP-3의 활성도가 억제될 수 있음을 시사하였고, 고농도로 적용하였을때는 IL-1β에 의한 MMP-3의 활성도 억제 효과가 감소됨을 보였는데, 이는 약물의 항균작용과는 무관한 기전으로 고농도의 약물이 오히려 세포 활성도를 감소시키고 세포 손상을 야기함으로써 MMP-3의 활성도가 상승되어 나타난 결과로 추정된다.

치은결합조직의 대부분을 이루는 세포외기질을 생산하는 주된 세포가 치은섬유아세포이고, 섬유아세포에는 IL-1β에 대한 수용기가 많이 존재하는 것으로 알려져 있기 때문에 본 연구에서는 치은섬유아세포를 대상으로 하여 MMP-3의 활성도를 평가하였는데, 향후 인체 치주인대세포에 대한 tetracycline계 약물투여시 MMP-3의 활성도에 미치는 영향을 비롯하여 각 약물의 농도를 보다 세분하여 최적의 투여농도를 규명할 수 있는 추가적인 연구가 필요하다 하겠다. 또한 성인형 치주염에는 다형핵백혈구에서 유래된 MMP-8이 치은섬유아세포에서 유래된 MMP-1이나 MMP-3보다 더 많이 관여하는 것으로 알려져 있으며, 이들의 활성도를 억제하는데는 doxycycline이 더 효과적이라고 알려져 있는 바 다형핵백혈구에서 유래된 MMP-8의 활성도에 대한 항생제의 영향을 평가하는 연구가 이루어져야 될 것으로 사료된다.

치주질환의 치료에서 화학적 요법은 세균에 대한 항균작용과 질환의 활성과정들에 대한 억제작용을 위해 이용된다. 항생제의 투여 방법도 전신적인 투여와 국소약물송달법[59]이 있는데, 본 연구 결과에 근거할때 단백질분해효소의 억제에 필요한 약물의 적정농도를 규정하고, 약물 투여방법에 따라 치은열구내에서 적정농도로 작용시간을 지속시킬 수 있는 방안 모색을 위한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

V. 결론

Tetracycline계 약물이 MMP-3의 활성도에 미치는 영향을 평가하는데 목적을 두고 인체 치은섬유아세포에서 MMP-3의 활성을 유발할수 있는 IL-1β의 기준농도를 설정한 후, tetracycline-HCl, doxycycline-HCl, minocycline-HCl을 농도별(10, 25, 50, 100, 200 ㎍/ml)로 적용하고, 1시간 후에 25ng/ml의 IL-1β를 적용한 다음 24시간 배양한 후 ELISA에 의해 흡광도를 측정하고 상대적 활성도를 구하여 대조군과 통계학적으로 비교분석 함으로써 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. Tetracycline-HCl의 경우 25㎍/ml이하의 농도군에서는 MMP-3의 활성도가 억제되는 경향을 보였으나, 200㎍/ml의 농도에서는 MMP-3의 활성도가 유의성있게 상승되었다($p<0.05$).
2. Doxycycline-HCl의 경우 100㎍/ml 이하의 농도군에서는 MMP-3의 활성도가 억제되었으나($p<0.05$), 200㎍/ml 농도에서는 MMP-3의 활성도가 상승되었다($p<0.05$).
3. Minocycline-HCl의 경우 10-200㎍/ml의 모든 농도군에서 MMP-3의 활성도가 억제되었다($p<0.05$).

이상과 같은 결과는 tetracycline계 약물을 저농도로 적용하였을 때 인체 치은섬유아세포에서 IL-1β에 의해 유도된 MMP-3의 활성도가 억제될 수 있음을 시사하였다.

VI. 참고문헌

1. Birkedal-Hansen, H. : "Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases", *J. Periodontol.*, 64:474-484, 1993.
2. Evert, V., Van der Zee, E., Creemers, L. and Beertsen, W. : "Phagocytosis and intracellular digestion of collagen, its role in turnover and remodeling", *J. Histochem.*, 28:229-245, 1996.
3. Reynolds, J.J. and Meikle, M.C. : "Mechanisms of connective tissue matrix destrution in periodontitis", *Periodontology 2000.*, 14:144-157,

1997.

4. Villela, B., Cogen, R.B., Bartolucci, A.A. and Birkedal-Hansen H. : "Collagenolytic activity in crevicular fluid from patients with chronic adult periodontitis, localized juvenile periodontitis and gingivitis, and from healthy control subjects", *J. Periodont. Res.,* 22:381-389, 1987.
5. Woolley, D.E. and Davies, R.M. : "Immunolocalization of collagenase in periodontal disease", *J. Periodont Res.,* 16:292-297, 1981.
6. Gangbar, S., Overall, C.M., McCulloch, C.A.G., and Sodek, J. : "Identification of polymorphonuclear leukocyte collagenase and gelatinase activities in mouthrinse samples: Correlation with periodontal disease activity in adult and juvenile periodontitis", *J. Periodont. Res.,* 25:257-267, 1990.
7. Chin, J.R., Murphy, G. and Werb, Z. : "Stromelysin, a connective tissue-degrading metalloproteinase stimulated rabbit synovial fibroblasts in parallel with collagenase", *J. Biol. Chem.* 250:12367-12376. 1985.
8. Ding, Y., Haapasalo, M., Kerosuo, E., Lounatamaa, K., Kotiranta, A. and Sorsa, T. : "Release and activation at neutrophil matrix metallo-and serine proteinases during phagocytosis of Fusobacterium nucleatum, Porphyromonas gingivalis and Treponema denticola", *J. Clin. Periodontol.,* 24:237-248.1997.
9. Ding, Y., Vitto, V.J., Haapasalo, M., Lounatmaa, L., Konttinen, Y.I., Salo, T., Grenier, D. and Sorsa, Y. : "Release of human neutrophil proteinases triggered by membrane components of treponema denticola", *J. Dent. Res.,* 76(special issue):291(abstr.2217), 1997.
10. Meikle, M.C., Atkinson, S.J., Ward, R.V., Murphy, G. and Reynolds, J.J. : "Gingival fibroblasts degrade type I collagen films when stimulated with tumor necrosis factor and interleukin-1: evidence that breakdown is mediated by metalloproteinases", *J. Periodont. Res.,* 24:207-213, 1989.
11. Meikle, M.C., Heath, J.K. and Reynolds, J.J. : "Advances in understanding cell interactions in tissue resorption: Relevance to the pathogenesis of periodontal diseases and a new hypothesis", *J. Oral. Pathol.,* 15:239-250, 1991.
12. Meikle, M.C., Hembry, R.M., Holly, J., Horton,C., McFarlane, C.G. and Reynolds, J.J. : "Immunolocalization of matrix metalloproteinases and TIMP-1(tissue inhibitor of metalloproteinases)in human gingival tissues from periodontitis patients". *J. Periodont. Res.,* 29:118-126, 1994.
13. Page, R.C. : "The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal diseases". *Arch. Oral. Biol.,* 26:230-242, 1991.
14. Ingman, T., Sorsa, T., Suomalainen, K., Halinen, S., Lindy, O., Lauhio, A., Saari, H., Konttinen, Y.T. and Golub, L.M. : "Tetracycline inhibition and the cellular source of collagenase in gingival crevicular fluid in different periodontal diseases", *J. Periodontol.,* 64:702-709, 1993b.
15. Pascale, D., Gordon, J., Lamster, I., Mann, P., Seiger, M. and Arndt, W. : "Concentration of doxycyline in human gingival fluid", *J. Clin. Periodontol.,* 13:841, 1986.
16. Reinhardt, R.A., Masada, M.P. and Kaldahl, W.B. : "Gingival fluid IL-1 and IL-6 levels in refractory periodontitis", *J. Clin. Periodontol.,* 20:225-231, 1993.
17. Strongin, A.Y., Collier, I., Bannikov, G., Marmer, B.L., Grant, G.A. and Goldberg, G.I. : "Mechanism of cell surface activation of 72kDA type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease" *J. Biol. Chem.,* 270:5331-5338, 1995.
18. Höning, J., Rordorf-Adam, C., Seigmund, C.,

Wiedemann, W. and Erard, F. : "Increased interleukin-1 beta(IL-1β)concentration in gingival tissue from periodontitis patients", *J. Periodontol. Res.,* 24:362-367, 1989.

19. Richards, D. and Rutherford, R.B. : "Interleukin-1 regulation of procollagenase mRNA and protein in periodontal fibroblasts in vitro", *J. Periodont. Res.,* 25:222-229, 1990.

20. Tatakis, D.S., : "Interleukin-1 and bone metabolism: A review", *J. Periodontol.,* 64:416-431, 1993.

21. 강승훈 · 서조영 · 박준봉:"미노사이클린이 치주인대 세포의 부착과 전개에 미치는 효과",「대한구강생물학회지」제15권, 1호:29-37, 1991.

22. 권영혁 · 박지원 · 허 익 · 박준봉:"치근면 활택술 후 2% minocycline gel의 치료효과",「대한치주과학회지」제28권, 4호:531-542, 1998.

23. 신형식 · 한경윤 · 정종평:"미노클린 첨부제의 만성 변연성 치주염의 치료효과에 대한 유효성과 안전성의 평가"「대한치주과학회지」 제24권 3호:493-502, 1994.

24. Greenstien, G. and Polson, A. : "The role of local drug delivery in the management of periodontal diseases: A comprehensive review", *J. Periodontol.,* 69:507-520, 1998.

25. Baker, P.J., Evans, R.T., Covurn, R.A. and Genco, R.J. : "Tetracycline and its derivatives strongly bind to and are released from the tooth surface in active form", *J. Periodontol.,* 54:580-585, 1983.

26. Ciancio, S.G., Reynolds, H., Slots, J., Golub, L. and Zambon, J.J. : "Comparison of tetracycline and minocycline as adjunctive antimicrobial agents in the treatment of adult periodontitis", *J. Dent. Res.,* 63(Spec. Issue):267 (Abstr.870), 1984.

27. Crout, R.J., Lee, H.M. and Schroeder, K. : " The "cycle" regimen of low-dose doxycycline for adult periodontitis: a preliminary study", *J. Periodontol.,* 67:506-514, 1996.

28. Komman, K.S. and Karl, E.H. : "The effect of long-term low dose tetracycline therapy adult periodontitis", *J. Periodontol.*, 53:604-610, 1982.

29. Slot, J., Mashimo, P., Levine, R.J. and 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.

30. Golub, L., 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.

31. Seymour, R.A. and Heacman, P.A. : "Tetracyclines in the management of periodontal diseases", *J. Clin. Periodontol.,* 22:22-35, 1995.

32. Ciancio, S.G., Mather, M.L. and McMullen, J.A. : "An evaluation of minocycline in patients with periodontal disese", *J. Periodontol.,* 51:530-534, 1980.

33. Morrison, D.C. and Ulevitch, R.J. : "A review the interaction of bacterial endotoxins with cellular and humoral mediation system", *Am. J. Path.,* 93:527-618, 1978.

34. Van der Zee, E., Everts, V. and Beertsen, W. : "Cytokine-induced endogenous procollagenase stored in the extracellular matrix of soft connective tissue resullts in a burst of collagen breakdown following its activation", *J. Periodont. Res.,* 31:483-488, 1996.

35. Wilson, M., Reddi, K. and Henderson, B. : "Cytokine-induced component of periodontopathogenic bateria", *J. Periodont. Res.,* 31:393-407, 1996.

36. Alvares, O., Klebe, R, Grant, J. and Cochran,

D.L. : "Growth factors effects on the expression of collagenase and TIMP-1 in periodontal ligament cells", *J. Periodontol.*, 66:552-558, 1995.

37. Apte, S.S., Olsen, B.R. and Murphy, G. : "The gene structure of tissue inhibitior of metalloproteinases(TIMP)-3 and its inhibitory activiteies define the distinct TIMP gene family", *J. Biol. Chem.*, 270:14313-14318, 1995.

38. Ingman, T., Tervahartiala, T., Tschesche, H., Haerian, A., Kinane, D. F., Konttinen, Y. T. and Sorsa, T. : "Matrix metalloproteinases and their inhibitors in gingival crevicular fluid and saliva of periodontitis patients", *J. Clin. Periodontol.*, 23:1127-1132, 1996.

39. Pourtaghi, J.S., Gibbins, J.R. and Hunter, N. : "Vascular co-localization of proteolytic enzymes and proteinase inhibitors in advanced periodontitis". *J. Path.*, 179:326-332, 1996.

40. Lee, W., Aitken, S., Sodek, J. and McCulloch, C.A.G. : "Evidence of a direct realtionship between neutrophil collagenase activity and periodontal tissue destruction in vivo: role of active enzyme in human periodontitis", *J. Periodont. Res.*, 30:23-33, 1995.

41. Salo, T., Kylmaniemi, M., Helaakoski, T., Virkkunen, J., Ding, Y., Konttinen, Y. T. and Sorsa, T. : "MMP-8/Neutrophil collagenase mRNA may also be expressed in other cells than PMNs", *J. Dent. Res.*, 4(special issue): 530(abstr.1036), 1995.

42. Makela, M., Salo, T., Uitto V.J. and Larjava, H. : "Matrix metalloproteinases(MMP-2 and MMP-9) of the oral cavity: cellular origin and relationship to periodontal status", *J. Dent. Res.*, 73:1397-1406, 1994.

43. Sorsa, T., Uitto, V.J., Suomalainen, K., Vauhkonen, M. and Lindy, S. : "Comparison of interstitial collagenases from human gingiva, sulcular fluid secreted by and polymorphonuclear leukocyte", *J. Periodont. Res.*, 23:386-393, 1988.

44. Golub, L.M., Sorsa, T., Lee, H.M., Ciancio, S., Sorbi, D., Ramamurthy, N.S., Salo, T. and Konttinen, Y.T. : "Doxycycline inhibits neutrophil(PMN)-type matrix metalloproteinases in human adult periodontitis gingiva", *J. Clin. Periodontol.*, 21:100-109, 1995.

45. MacNaul, K.L., Chartrain, N., Lar, M., Tocci, M.J. and Hutchinson, N.I. : "Discoordinate expression of stromelysin, collagenase, and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in rhenmatoid human synovial fibroblasts", *J. Biol. Chem.*, 48:17238-17245, 1990.

46. Nagase, H. and Fields, C.G. : "Design and characterization of the fluorogenic substrate selectively hydrolyzed by stromelysin-1(matrix metalloproteinase-3)", *J. Biol. Chem.*, 269:20952-20957, 1994.

47. Okada, Y., Nagase, H. and Harris, E.D. Jr. : "A metalloproteinase from human rheumatoid synovial fibroblasts that digests connective tissue matrix components", *J. Biol. Chem.*, 261:14245-14255, 1986.

48. Suzuki, K., Enghild, J.J., Morodomi, T. and Salvasen, G. : "The activation of tissue procollagenase by matrix metalloproteinase-3 (stromelysin)", *J. Biol. Chem.*, 29:10261-10270, 1990.

49. Unemori, E.N., Bair, M.J., Bauer, E.A. and Amento E.P. : "Stromelysin expression regulates collagenase activation in human fibroblasts. Dissociable control of two metalloprotienases by interferon-γ", *J. Biol. Chem.*, 266:23477-23482, 1991.

50. Drouin, L., Overall, C.M. and Sodek, J. : "Identification of matrix metalloproteinase inhibitor(TIMP) in human parotid saliva: partial purification and characterization", *J. Periodont. Res.*, 23:370-377, 1988.

51. Kubota, T., Nomura, T., Takahashi, T. and Hara, K. : "Expression of MMPs and TIMPs mRNA in human gingival tissue", *J. Dent. Res.,* 74(special issue):573(abstr.1380), 1995.
52. Larivee, J., Sodek, J. and Ferrier, J.M. : "Collagenases and collagenase inhibitor activities crevicular fluid of patients receiving treatment for localized juvnile periodontitis", *J. Periodontol.,* 21:792-715, 1986.
53. Shapiro, S.D., Kobayashi, D.K. and Welgus, H.G. : "Identification of TIMP-2 in human alveolar macrophages. Regulation of biosynthesis is opposite to that of metalloproteinases and TIMP-1", *J. Biol. Chem.,* 267:13890-13894, 1992.
54. Stashenko, P., Fujiyoshi, P., Obernesser, M.S., Prostak, L., Haffajee, A.D. and Socransky, S.S. : "Levels of interleukin-1β in tissue from sites of active periodontitis disease", *J. Clin. Periodontol.,* 18:548-554, 1991.
55. 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.
56. Burns, F., Stack, M., Gray, P. and Paterson, C. : "Inhibition of purified collagenase from alkarine-buried rabbit corneas", Invest. *Opthalmol. Vis. Sci.,* 30:1569-1575, 1989.
57. Somerman, M.J., Foster, R.A., Vorsteg, G., Progenin, K. and Wynn, R.L. : "Effect of minocycline on fibroblast attachment and spreading", *J. Periodont. Res.,* 23:154-159, 1988
58. 윤동환 · 유형근 · 신형식: "Minocycline 및 TGF-β1이 배양 인체 치은섬유모세포와 치주인대세포에 미치는 영향",「대한치주과학회지」제26권, 1호:188-200, 1996.
59. Goodson, J.M., Haffajee, A.D. and Socransky, S.S. : "Periodontal therapy by local delivery of tetracycline", *J. Clin. Periodontol.,* 6:83-92, 1979.

-Abstract-

Effect of Tetracycline Analogues on The Activity of Matrix Metalloproteinase-3 in Gingival Fibroblasts

Jong-Hee Cho, Sang-Mok Kim, Byung-Ock Kim, Kyung-Yoon Han
Department of Periodontology, College of Dentistry, Chosun University

Extracellular matrix component is degraded by enzymes of thematrix metalloproteinases(MMPs). MMPs are produced by both hemopoietic and structural cells. Increased activity of MMP-3 in periodontium is strongly associated with inflammatory periodontal disease.

The purpose of the present study was to determine the effect of tetracycline analogues on the activity of MMP-3. Tetracycline-HCl, doxycycline-HCl, and minocycline-HCl were applied to huamn gingival fibroblasts at various concentrations of 10, 25, 50, 100, 200㎍/ml, and 1 hour later IL-1β of 25ng/ml was added. After incubation for 24 hours the cells were reacted by enzyme-linked immunosorbent assay using proMMP-3 ELISA kit. The optical density was measured by microwell plate reader at 450nm. The relative activity of MMP-3 was calculated as the percentage of the optical density of each experimental group to that of the control. The difference of the optical density and the relative activity of MMP-3 between the experimental groups and the control wasstatistically analyzed by one way ANOVA.

The results were as follows:

1. Tetracycline-HCl showed the tendency to inhibit the activity of MMP-3 at the concentration lower than 25 ㎍/ml, but increased significantly the activity of MMP-3 at the concentration of 200㎍/ml($p<0.05$).
2. Doxycycline-HCl inhibited significantly the activity of MMP-3 at the concentration lower than 100㎍/ml, but increased significantly the activity of MMP-3 at the concentration of 200㎍/ml($p<0.05$).
3. Minocycline-HCl inhibited the activity of MMP-3 at the concentration in the range of 10 to 200㎍/ml.

Within the limit of the present study, the above results suggested that the low concentration of tetracycline analogues could inhibit the activity of MMP-3 induced by IL-1β in human gingival fibroblasts.

Key words ; tetracycline analogues, Interleukin-1β, matrix metalloproteinase-3 human gingival fibroblasts.