

백서 치주인대세포에서 Doxycycline의 Mefenamic Acid 병용사용 시 MMP-13 mRNA 발현 억제 효과

서진희^{1,2}, 최득철^{2,3}, 김영준^{1,3}

¹전남대학교 치과대학 치주과학교실, ²전남대학교 대학원 치의학과 및 ³치의학연구소

I. 서론

치주염은 진행성의 부위 특이성 질환으로 치아 주위조직의 파괴와 부착소실을 특징으로 한다. 치주염에서 나타나는 연조직, 경조직의 파괴는 주로 세균성 치태의 존재로 야기되는 숙주의 면역-염증 방어작용의 활성화에 의한 것으로¹⁾ 숙주 염증반응의 정확한 기전에 대해서는 아직 명확히 알려지지 않았지만 숙주유래 pro-inflammatory mediator와 matrix metalloproteinases (MMPs)와 같은 단백분해 효소를 포함하는 cytokine이 결합조직과 골의 대사를 변화시켜 치주인대의 파괴와 치조골의 흡수를 일으킨다²⁾.

MMPs는 zinc-의존성 단백분해 효소이며 세포원형 질막이나 세포의 기질 내에 존재하는 교원질, gelatin, proteoglycan core protein, fibronectin, laminin, elastin 등의 분해를 촉진하며^{3,5)} 류마티즘성 관절염, 골관절염, 자가 면역성 피부 궤양 병소, 종양 세포 침투와 암 전이와 같은 병적상태에서 나타나는 세포외기질의 파괴에 주요한 작용을 한다^{3,4)}. 질환에 이환된 치주조직에서 MMPs 생산과 분비증가⁶⁾, 치주낭 내 치은열구액에서 나타나는 활성화된 MMP의 증가⁷⁾, 치주질환병소 내 세포의 MMP mRNA의 존재 등

을 통해 치주질환의 발현과 진행에 있어서도 MMP가 중요한 역할을 한다고 알려졌다. MMP-13은 치주염 환자의 치은열구액에서 관찰되며⁸⁾ 1, 3, 5형 교원질 뿐 아니라 2형 교원질의 분해에도 관여한다⁹⁾. 또한 염증성 치은과 치주조직에서 MMP-8, 9, 13이 MMP-1에 비해 상당히 증가되며¹⁰⁾ 이렇게 증가된 MMPs로 인해 조직파괴가 가속화되므로 치주질환에 있어 MMP의 생산과 활성의 조절이 치주질환의 진행을 억제시키는 중요한 전략이 된다.

Tetracycline은 치주치료에 많이 선택되는 약제로 치주질환에 이환된 조직에서 항교원질 분해 효소작용, 항염증작용, 골흡수 억제 및 치근면에 대한 섬유아세포 부착증진 등의 효능이 있다¹¹⁾. Doxycycline은 시판되는 tetracycline계열 중 가장 강력한 교원분해 억제 능력을 가지고 있는 약제로 fibroblast-type collagenase (MMP-1) 활성보다는 PMN-type collagenase (MMP-8) 활성을 억제하는 것으로 보고되었는데^{12,13)} 따라서 정상 결합조직의 교체에 영향을 주지 않고 병적으로 증가된 collagenase의 수준을 낮출 수 있는 안전한 방법이 될 수 있다.

비스테로이드성 소염제는 실험적 상황에서 치은염증과 치조골흡수를 감소시킬 수 있는 것으로 나타

났다. Greenwald 등¹⁴⁾은 염증성 관절염을 유발한 백서에서 비스테로이드성 소염제와 doxycycline을 함께 사용했을 때 단독으로 사용했을 때보다 골과괴와 MMP 활성 감소효과가 상승되어 나타났다고 보고하였고 Lee 등¹⁵⁾은 만성 치주질환자에서 doxycycline과 비스테로이드성 소염제를 혼용하였을 때 숙주유래성 MMP (collagenase, gelatinase 등)의 활성이 단독사용 시 보다 유의하게 감소하였다고 보고하였다.

치주인대세포는 치주질환과 관계된 조직파괴에 중요한 역할을 하며, 최근에는 pro-inflammatory TNF- α 가 사람 치주인대세포에서 MMP-13 mRNA의 발현을 증가시킨다고 알려졌다¹⁶⁾. 따라서 치주인대세포에서의 MMP-13 생산 조절을 통한 치주질환의 예방이나 차단이 가능할 것으로 보인다. 이에 이번 연구는 백서 치주인대세포에 doxycycline의 단독 혹은 비스테로이드성 소염제의 병용투여가 MMP-13 mRNA 발현에 어떤 영향을 주는지를 관찰하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 세포 배양

실험재료로 백서 치주인대세포를 사용하였다. 백서 치주인대세포의 분리는 Matsuda 등¹⁷⁾의 방법에 준하여 시행하였다. 치아 발거전 5일 동안 0.4% β -aminopropionitrile (Sigma Chemical Co., U.S.A.) 수용액을 수분으로 섭취시켰다. 실험동물에 pentobarbital sodium 30 mg/kg을 복강내 주사하여 마취시킨 후 상악 좌, 우측 제 1대구치를 발거하였다. 발거 1-2일 후 발치와 내의 혈병을 제거하여 세절한 다음 35 mm 배양접시에 고르게 분산시켜 1% fetal bovine serum (FBS, Sigma Chemical Co., U.S.A.)과 1% antibiotic-antimycotic solution (Penicillin-Streptomycin, GibcoBRL, U.S.A.)이 첨가된 Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM, GibcoBRL, U.S.A.) 배지를 이용하여 세포배양을 시행하였으며, 3일 간격으로 배양액을 교환해 주었다. 실험에는 계대배양 5-7세대의 것을 사용하였다.

2. 세포활성도 검사

Well당 1×10^4 개의 세포수가 되도록 백서 치주인대세포를 분주하고 70% 정도의 밀생에 도달하면 doxycycline hyclate (Sigma Chemical Co., U.S.A.) 농도 1, 10, 25, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 이 포함된 2% FBS 함유 배지로 교환하여 배양하고 배양 24시간 후와 72시간 후에 MTT 검사를 시행하였다. 각 well에서 배양액을 제거하고 생리식염수로 2회 세척 후 Cell Titer 96 Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay Kit (Promega, U.S.A.)를 이용하여 제조사의 지시대로 3-(4,5-dimethyl-thiazole-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide 용액 50 μl 를 첨가하고 4시간 동안 배양하였다. 반응을 정지시키기 위하여 20 μl 의 10% SDS를 첨가한 후 ELISA plate reader (Microplate manager, BioRad, U.S.A.)로 파장 490 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 해당농도의 doxycycline에 대한 세포활성도는 doxycycline hyclate가 없는 배지에서 배양된 대조군에 대한 백분율로 표시하였다.

3. 역전사 중합효소연쇄반응 (Reverse transcription-polymerase chain reaction; RT-PCR) 분석

1) 세포의 배양조건

백서 치주인대세포를 100 mm dish (Falcon, U.S.A.)에 분주한 후 10% FBS가 포함된 DMEM 배지에서 배양하였다. 세포가 밀생에 도달하면 0.3% FBS가 포함된 DMEM 배지로 교환하고 약 8시간 후 각각 처치하지 않은 군 (대조군)(group 1), interleukin 1-beta (IL-1 β ; 1.0 ng/ml)(group 2), doxycycline hyclate (50 $\mu\text{g/ml}$)(group 3), mefenamic acid (10^{-6} M)(group 4), doxycycline hyclate (50 $\mu\text{g/ml}$) 처치 후 interleukin 1-beta (IL-1 β ; 1.0 ng/ml)(group 5), doxycycline hyclate (50 $\mu\text{g/ml}$)와 Mefenamic acid (10^{-6} M) 처치 후 interleukin 1-beta (IL-1 β ; 1.0 ng/ml)(group 6), mefenamic acid (10^{-6} M) 처치 후 interleukin 1-beta (IL-1 β ; 1.0 ng/ml)(group 7)를 처치하였다(Table 1).

Table 1. Treatment condition for each group

Group	처치 조건	Doxycycline hyclate	Mefenamic acid	Interleukin 1-beta
1		—	—	—
2		—	—	+
3		+	—	—
4		—	+	—
5		+	—	+
6		+	+	+
7		—	+	+

PCR primers

Primer	Expected base pairs	Sequence (5'-3')
MMP-13-sense (+)	318	GACTTCAGATGGCATTGCTG
MMP-13-antisense (-)		GCATCAACCTGCTGAGGATGC
GAPDH-sense (+)	428	ATTCCATGGCACCGRCAAGGCT
GAPDH-antisense (-)		TCAGGTCCACCACTGACACGTT

PCR programs

MMP-13	94℃	94℃	55℃	72℃	72℃
		30 cycles			
GAPDH	94℃	94℃	60℃	72℃	72℃
		25 cycles			

Figure 1. Amplification primer set and conditions used in polymerase chain reaction. GAPDH indicates glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

2) 총 RNA 추출

RNA의 분리를 위하여 배양액을 제거하고 2.0 ml의 Trizol® (Promega, U.S.A.)을 첨가하여 분리된 세포를 1.8 ml tube에 수집하였다. Chloroform 200 µl을 첨가하여 RNA를 용해한 후 4℃, 12,000 rpm에서 10분간 원심 분리하였다. 상층액을 취한 후 500 µl isopropyl alcohol을 첨가하여 RNA를 침전시키고 4℃, 10,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 상층액을 제거하였다. 분리한 RNA를 T/E buffer 40 µl에 녹인 후 spectrophotometer (BioRad, U.S.A.)로 그 양을 측정하였으며 -70℃ 냉동고에 보관하였다.

3) 역전사 중합효소연쇄반응 (Reverse transcription-polymerase chain reaction; RT-PCR)

RT reaction을 위한 RNA는 spectrophotometer

(BioRad, U.S.A.)를 사용하여 5 µg을 정량하여 사용하였다. cDNA는 Superscript II (GibcoBRL, U.S.A.)를 이용하여 70℃ 10분, 42℃ 70분, 37℃ 15분의 반응조건으로 합성하였다. PCR반응은 10x PCR 완충용액 5 µl, 1.5 mM MgCl₂ 3 µl, 10 mM dNTP mix 1 µl, 각각의 primer 2.5 µl, 5 unit Taq polymerase 0.2 µl, 합성된 cDNA 2 µl를 혼합한 후 3차 증류수를 이용하여 총 50 µl가 되게 하였다. PCR 반응 혼합물들을 PCR cycler (Thermocycler, U.S.A.)를 이용하여 증폭하였다(Figure 1).

증폭된 PCR 산물들은 loading buffer 2 µl를 첨가하여 총 10 µl가 되게 하여 1.5% agarose gel에서 전기영동하였다. 얻어진 PCR data는 gel image analysis system (QualityOne, BioRad, U.S.A.)에서 house keeping gene인 Glyceraldehyde-3-phosphate dehy-

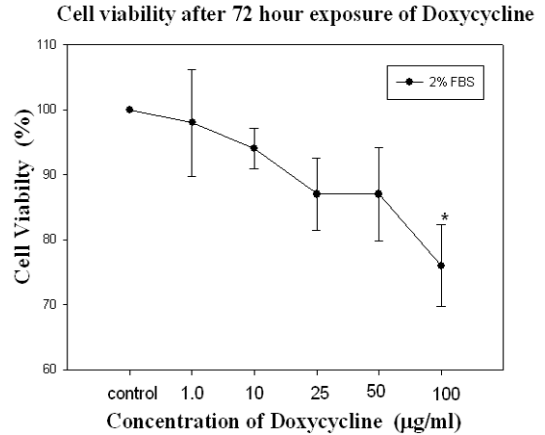
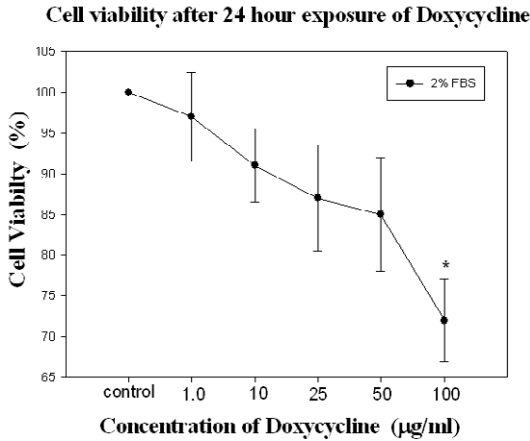


Figure 2. MTT assay for PDL cell viability with doxycycline

drogenase (GAPDH)의 발현을 기준으로 각각의 상대적인 발현율을 산출하고 그 결과를 비교하였다.

4. 시간에 따른 MMP-13 mRNA의 발현

IL-1 β 유도 MMP-13 mRNA의 안정성에 대한 doxycycline hyclate의 영향을 평가하기 위해서 doxycycline hyclate 처리 유,무에 따른 IL-1 β 유도 MMP-13 mRNA의 발현을 살펴보고자 하였다. 치주인대세포를 doxycycline hyclate로 전처리하고 1시간 후 IL-1 β (1.0 ng/ml)를 첨가하고 16시간 동안 배양한 후 다시 actinomycin D를 첨가하여 0, 1, 2, 4시간 동안 배양하고 총 RNA를 얻어 RT-PCR을 통해 분석하였다. 얻어진 PCR data는 gel image analysis system (QualityOne, BioRad, U.S.A)에서 house keeping gene인 GAPDH의 발현을 기준으로 각각의 상대적인 발현율을 산출하고 0시간의 발현율을 100%로 시간에 따른 발현을 비교하였다.

5. 통계분석

모든 실험은 3회 시행하여 평균치와 표준편차로 정리하였으며 군간의 차이에 대한 유의성 검정을 위하여 one-way ANOVA와 Duncan 사후검정을 시행

하였다.

III. 결과

1. 세포활성도

MTT assay 결과 24시간과 72시간 후 모두, 세포활성도는 doxycycline 농도 100 μ g/ml 이상에서 대조군에 비하여 유의한 감소를 보였다($p < 0.05$) (Figure 2).

2. Doxycycline 전처치에 의한 MMP-13 mRNA 발현 억제 효과

각 발현율은 대조군(group 1)을 100%로 할 경우 IL-1 β 를 처리한 군(group 2)은 202%, doxycycline를 처리한 군(group 3)은 104%, mefenamic acid를 처리한 군(group 4)은 106%, doxycycline 전처리 후 IL-1 β 처리군(group 5)은 139%, doxycycline과 mefenamic acid 전처리 후 IL-1 β 처리군(group 6)은 120%, mefenamic acid 전처리 후 IL-1 β 처리군(group 7)은 199%였다.

MMP-13 mRNA는 대조군에 비하여 IL-1 β 에 의해 그 수준이 약 2배 증가되었으며 doxycycline으로 전처리 후 IL-1 β 로 처리한 군에서는 대조군에 비해 1.4

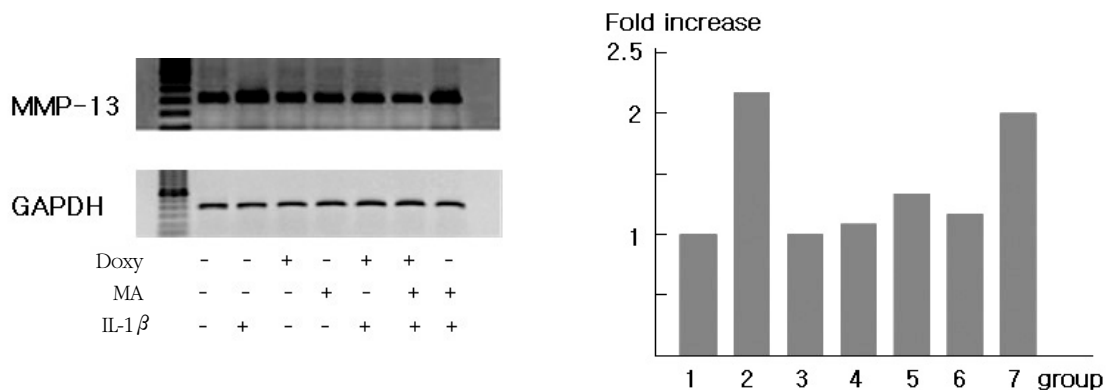


Figure 3, Semiquantitative RT-PCR of rat periodontal ligament cells showing steady state mRNA levels of the following genes; MMP (Matrix metalloproteinase)-13, GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)

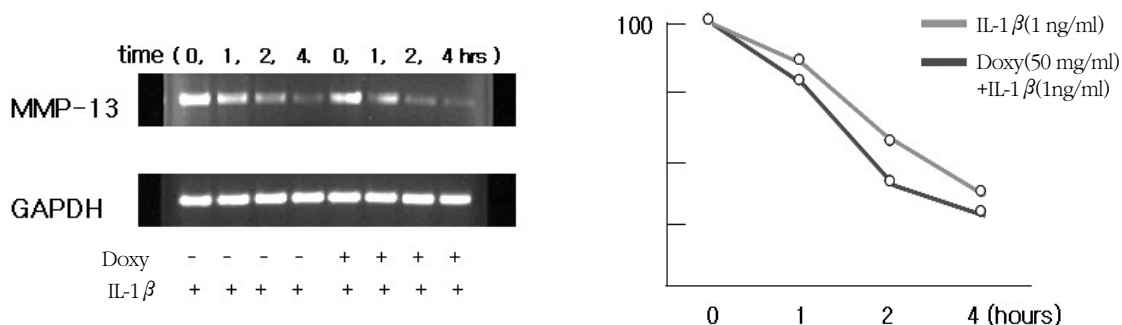


Figure 4, MMP-13 mRNA stability using Actinomycin D in rat PDL cell

배 증가되었으나 그 비율은 IL-1 β 만으로 처리한 군에 비해 31% 감소하였다(Figure 3).

3. Mefenamic acid 처치에 의한 MMP-13 mRNA의 발현 억제 효과

Mefenamic acid로 전처리한 후 IL-1 β 로 처리한 군에서는 대조군(100%)에 비해 MMP-13 mRNA의 수준이 약 2배 증가 되어 IL-1 β 유도 MMP-13 mRNA의 발현을 202%와 유의한 차이가 없었다. Doxycycline과 mefenamic acid를 함께 전처리한 경우는 발현율이 120%정도로 IL-1 β 만 처리한 군에 비해 41%의 발현

감소를 나타내었다(Figure 3).

4. IL-1 β 유도 MMP-13 mRNA의 안정성에 대한 doxycycline의 효과

Doxycycline을 처리한 군과 처리하지 않은 군의 IL-1 β 처리 후 MMP-13 mRNA 수준은 0, 1, 2, 4시간 후 각각 100, 67, 39, 27%와 100, 78, 59, 34%로 시간이 경과하면서 감소하였으며 doxycycline을 전처리한 경우와 전처리 하지 않은 경우를 비교하였을 때는 doxycycline을 처리한 군이 1~4시간 후 그 수준이 더 감소하였으나 그 양이 유의한 정도는 아니었다(Figure 4).

IV. 고찰

치주질환은 세균에 의한 복합 감염성 질환으로 세균의 양을 줄이기 위한 치태와 치석의 기계적인 제거가 효과적인 치료 방법이나 치주염에서 나타나는 조직파괴가 주로 숙주의 면역-염증 방어 작용의 활성화에 의한 것¹⁾이라고 알려진 이후 숙주 반응을 조절하는 새로운 치료전략이 개발되었다. 치주영역에 있어서 “숙주-조절 요법”은 세균자극인자에 대한 환자의 숙주 반응을 pharmaceutical 또는 biologic agent를 이용하여 변화시키는 것으로 약 10년전 Golub 등¹⁸⁾에 의해 소개되었다. 현재 임상이나 연구에 쓰이는 숙주 조절 약제는 비항균제성 tetracycline과 화학적으로 조절된 비항균성 tetracycline 화합물, 비스테로이드성 소염제, bisphosphonate로 나뉜다. 이 중 비항균제성 tetracycline 제제인 subantimicrobial dose doxycycline(SDD)은 collagenase와 gelatinase를 포함하는 MMP의 생산과 활성을 억제하기 위한 것으로 tetracycline의 장기간 사용으로 나타나는 내성균의 출현, 기회감염, 위장관 장애와 같은 부작용이 나타나지 않는다고 보고되었다¹⁹⁻²²⁾.

건강한 조직에서의 교원질의 교체는 세포외기질의 섬유모세포성 교원질 분해 효소에 의해 조절되지만, 염증조직에서는 interleukin-1 α 와 β , tumor necrosis factor- α (TNF- α) 등의 자극에 의해 PMN (MMP-8, MMP-9), 골이나 상피세포 (MMP-13) 등에서 MMPs의 생산이 증가된다²³⁾. 그러므로 정상적인 조직유지에 기여하는 MMP-1의 조절 보다는 염증상태에서 증가되는 MMP-8, MMP-9, MMP-13 등의 조절이 치주질환 치료방법으로 바람직하다. 치주인대세포는 치주질환과 관련된 조직파괴에 중심적인 역할을 하며 pro-inflammatory TNF- α 에 의해 MMP-13 mRNA의 발현이 증가된다고 보고되었다¹⁶⁾. 이와 같은 이유로 이 연구에서도 host-modulation agent로 사용되는 doxycycline이 치주인대세포에서 염증시 증가되는 MMP-13 mRNA에 어떠한 영향을 미치는지를 살펴보고자 하였다.

골모세포에 있어 전신적 호르몬과 cytokine이 MMP-13의 합성을 조절한다는 것이 여러 연구에서

알려졌으나 치주인대세포에서 다양한 pro-inflammatory cytokine과 hormone이 MMP 발현에 미치는 영향을 살펴본 연구는 많지 않다. Kirkwood²⁴⁾는 골모세포에 있어 TNF- α 가 MMP-13의 발현을 대조군에 비해 상당히 증가시킨다고 보고를 한 반면 Chung 등²⁵⁾은 치주인대세포에 있어서는 TNF- α 가 MMP-13의 발현을 약간 증가시킬 뿐 이라고 보고하였다. 이러한 차이는 서로 다른 종류의 세포를 사용했기 때문이라고 생각되고 또한 여러 가지 cytokine과 hormone이 MMP-13의 발현을 유도할 수 있으나 서로 다른 세포에 있어서는 발현여부나 발현정도는 차이가 있는 것으로 사료된다. 이번 실험에서는 치주인대세포에서 MMP-13의 steady state expression이 관찰되었으며 골모세포나 상피세포에서와 마찬가지로 IL-1 β 에 의해 발현이 증가됨이 관찰되었다. 이는 염증상태에서 pro-inflammatory mediator에 의해 치주인대세포에서 MMP-13의 발현이 증가되고 이것이 치주질환의 파괴에 기여할 수 있음을 나타낸다.

숙주 조절 약제의 두 번째 영역에 속하는 비스테로이드성 소염제는 tetracycline과 유사하게 만성치주염이나 류마티즘성 관절염과 같은 만성 염증성 파괴질환의 치료에 사용되지만 이 둘의 pathogenic target은 매우 다르다. 예로 류마티즘성 관절염에 있어 비스테로이드성 소염제는 동통과 부종을 감소시키지만 SDD를 포함한 비항균성 tetracycline은 결합조직 파괴를 감소시키는 작용을 한다¹⁴⁾. Greenwale 등¹⁴⁾은 염증성 관절염이 있는 백서에서 tetracycline을 투여하였을 때 질환에 이환된 관절 내의 MMP 활성은 감소하였지만 염증은 변화하지 않는 반면 비스테로이드성 소염제는 부종과 충혈은 감소시킨 반면 MMP 활성에는 변화를 주지 않았으며 tetracycline과 비스테로이드성 소염제를 함께 투여하였을 때는 상승적으로 골파괴와 MMP 활성을 감소시켰다고 보고하였다. Ramamurthy 등²⁶⁾도 백서의 악관절에서 tetracycline과 비스테로이드성 소염진통제를 함께 사용했을 때 유사한 결과를 얻었다고 보고를 하였고 Cohen 등²⁸⁾도 수포성 유선포창 환자에서 tetracycline과 비스테로이드성 소염제를 함께 사용하였을 때 수포의 숫자가 더 유의하게 감소했다고 보고를

하였다. 이 실험에서 IL-1 β 처리 후 mefenamic acid를 사용했을 때는 MMP-13 mRNA의 발현에 영향을 나타내지 않은 반면 doxycycline을 투여했을 때는 MMP-13 mRNA의 발현이 감소되었고 doxycycline과 mefenamic acid를 함께 처리했을 때는 doxycycline 단독 사용한 경우보다 MMP-13 mRNA의 발현이 더 감소되어 나타났다. 이는 비스테로이드성 소염제 단독으로는 MMP 발현에 영향을 주지 못하지만 doxycycline과 함께 사용했을 때는 doxycycline의 MMP 억제효과를 증진시키며 이로 인해 골과 결합조직의 파괴를 상승적으로 억제함을 제시한다.

Doxycycline은 여러 상충기전을 통해 교원질 분해 활성을 억제하는데 이러한 기전에는 doxycycline의 calcium-, zinc- 결합 능력에 의한 활성 MMP의 직접 억제와²⁸⁾, hypochlorous acid (HOCl)를 포함한 PMN-유래 반응 산소 대사산물 생산의 감소를 따르는²⁹⁾ HOCl에 의한 latent pro-MMP의 활성화 억제 등을 통해서 조절하고^{33,31)}, 부가적인 기전으로 이 효소의 세포내 발현이나 합성을 억제하여 상피유래 MMP의 생산을 줄인다고 알려져 있다^{32,33)}. Doxycycline에 의한 MMP-13 mRNA 발현의 조절은 전사나 전사 후 단계에서 이루어질 수 있는데, 전사 후 단계에서의 MMP-13 mRNA의 안정성에 대한 doxycycline의 영향을 알아보기 위하여 mRNA 분해에 대한 연구를 시행하였다. 그 결과 시간에 따라 doxycycline을 처리한 군에서 mRNA의 발현이 더 감소하였으나 대조군과 비교하여 통계적으로 유의한 차이를 나타내지 않았다. 이는 doxycycline이 MMP-13 mRNA의 안정성에는 별다른 영향을 미치지 않으며 doxycycline의 MMP-13 mRNA의 발현감소는 전사 후 단계가 아닌 다른 단계에서 조절됨을 암시한다.

본 연구에서는 MTT assay 결과에 근거하여 세포 활성도가 유지되는 doxycycline 농도 50 $\mu\text{g/ml}$ 를 세포의 전처치에 사용하였다. 이는 정상적 용량을 경구 복용한 후 체내에서 유지되는 농도에 비해 상당히 높은 농도로 정상 용량의 경구투여 후 농도는 Caton³⁴⁾에 의하면 doxycycline 20 mg을 하루 2회 복용했을 때 최고 혈중 농도는 0.7~0.8 $\mu\text{g/ml}$, 유지 혈중 농도는 약 0.4 $\mu\text{g/ml}$ 라고 보고 하였고 Kapusnik-

Uner 등³⁵⁾은 200 mg doxycycline 복용 2시간 후 최고 혈중 농도가 3 $\mu\text{g/ml}$, Sakellari D 등³⁷⁾은 2.35 $\mu\text{g/ml}$ 이라고 보고 하였다. 따라서 정상 용량의 doxycycline 경구투여 후 혈중 농도로 치주인대세포를 전처치를 하였을 때 MMP-13 mRNA의 발현을 살펴보는 것이 필요하리라 생각된다.

이 연구는 치주인대세포에서 doxycycline으로 전처치 후 IL-1 β 로 자극시 MMP-13 mRNA의 발현정도를 관찰하였는데 이는 염증이 조절된 상태에서 doxycycline의 사용 중 염증을 유발시켰을 때의 억제 효과가 있는지를 살펴본 것으로 질환을 치료하기 위하여 doxycycline therapy를 시행한 환자에서의 효과를 살펴보기 위해서는 IL-1 β 로 처리 후 doxycycline을 사용했을 때의 영향을 평가하는 것이 필요하다.

V. 결론

치주염에서 나타나는 연조직, 경조직의 파괴는 주로 세균성 치태의 존재로 야기되는 숙주의 면역-염증 방어작용의 활성화에 의한 것으로, matrix metalloproteinase (MMP)를 포함한 숙주 유래의 pro-inflammatory mediator에 의해 치주인대와 치조골의 대사가 변화되어 조직파괴가 일어난다. 질환의 발현과 진행에 있어 숙주 염증반응의 중요성이 강조됨에 따라 숙주 반응을 조절하려는 치료방법들이 소개되었고 치주영역에 있어서는 doxycycline이 MMP의 생산과 활성을 감소시키는데 널리 사용되고 있다. MMP는 조직파괴에 중요한 역할을 하는 단백분해 효소로 건강한 조직에서는 주로 MMP-1이 분비되지만 염증상태에서는 MMP-8, 9, 13 등이 증가한다고 알려져 있다. 이중 MMP-13은 가장 최근에 알려진 MMP로 제 2형 교원질을 주로 분해하는 것으로 보고되고 있다. 이번 연구는 치주파괴과정에 중요한 작용을 하는 세포인 백서 치주인대세포에서 doxycycline이 MMP-13 mRNA의 발현에 미치는 영향을 살펴보고자 하였다.

1. 치주인대세포에 대한 doxycycline의 세포 독성은 농도 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서 24시간과 72시간에 세포활

성이 유의하게 감소하였다($p < 0.05$).

2. MMP-13 mRNA는 대조군에 비하여 IL-1 β 에 의해 발현이 202% 증가되었고 doxycycline으로 전처치 후 IL-1 β 로 처치한 군에서는 대조군에 비해 139% 증가되었으나 그 발현비율은 IL-1 β 만으로 처치한 군에 비해 31% 감소하였다.
3. Mefenamic acid로 전처치한 경우는 처치하지 않은 경우와 비교해 IL-1 β 유도 MMP-13 mRNA의 발현에 차이를 나타내지 않았으나 doxycycline과 mefenamic acid를 함께 전처치 한 경우는 IL-1 β 만 처치한 군에 비해 41%의 발현 감소를 나타내었다.
4. Doxycycline은 IL-1 β 유도 MMP-13 mRNA의 안정성에 영향을 미치지 않았다.

이상의 결과 doxycycline은 IL-1 β 에 의해 유도되는 MMP-13 mRNA의 발현을 억제시키며 비스테로이드성 소염제와 함께 투여시 MMP-13 mRNA의 발현을 상승적으로 억제하였다. 이는 향후 치주질환의 치료와 예방에 있어 doxycycline과 비스테로이드성 소염제의 병행 사용이 효과적인 치료방법이 될 수 있음을 보여준다.

VI. 참고문헌

1. Offenbacher S. Periodontal diseases: pathogenesis, Ann Periodontol 1996;1:821-878.
2. Preshaw PM, Hefti AF, Jepsen S, Etienne D, Walker C, Bradshaw MH. Subantimicrobial dose doxycycline as adjunctive treatment for periodontitis. A review. J Clin Periodontol 2004;31:697-707.
3. Birkedal-Hansen H. Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases. J Periodontol 1993;64:474-484.
4. Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, Decarlo A, Engler JA. Matrix metalloprotenases. A review. Crit Rev Oral Biol Med 1993;4:197-250.
5. Ryan ME, Ramamurthy NS, Golub LM. Matrix metalloproteinases and their inhibition in periodontal treatment. Curr Opin Periodontol 1996;3:85-96.
6. Fullmer H, Gibson W. Collagenolytic activity of gingivae of man. Nature 1966;209:728-729.
7. Golub LM, Ciano S, Ramamamurthy NS, Leung M, McNamara TF. Low-dose doxycycline therapy: effect on gingival and crevicular fluid collagenase activity in humans. J Periodont Res 1990;25:321-330.
8. Golub L, Lee H, Greenwald R, Ryan M, Sorsa T, Salo T, Giannobile W. A matrix metalloproteinase inhibitor reduces bone-type collagen degradation fragment and bone-type collagenase in gingival crevicular fluid during adult periodontitis. Inflamm Res 1997;4:310-319.
9. Freije JMP, Diez-Itza I, Balbin M, Sanchez LM, Blasco R, Tolivia J, Lopez-Ortin C. Molecular cloning and expression of collagenase-3, a novel human matrix metalloproteinase produced by breast carcinomas. Biol Chem 1994;269:16766-16773.
10. Ejeil AL, Igondjo-Tchen S, Ghomrasseni S, Pellat B, Godeau G, Gogly B. Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP) in healthy and diseased human gingiva. J Periodontol 2003;74:188-195.
11. 조종희, 김상목, 김병옥, 한경윤. 테트라사이클린계 약물이 치은섬유아세포내 MMP-13의 활성화도에 미치는 영향. 대한치주과학회지 1999;29:677-691.
12. Golub LM, Sorsa T, Lee HM, Ciano S, Sorbi D, Ramamurthy N S, Gruber B, Salo T, Kontinen YT. Doxycycline inhibits neutrophil (PMN)-type matrix metalloproteinases in human adult periodontitis gingiva. J Clin Periodontol 1995;22:100-109.

13. Smith GN Jr, Mickler EA, Hasty KA, Brandt KD. Specificity of inhibition of matrix metalloproteinase activity by doxycycline: relationship to structure of the enzyme. *Arthritis Rheum* 1999;42:1140-1146.
14. Greenwald RA, Moak SA, Ramamurthy NS, Golub LM. Tetracycline suppresses metalloproteinase activity in adjuvant arthritis and in combination with flurbiprofen, ameliorates bone damage. *J Rheumatol* 1992;19:927-938.
15. Lee HM, Cinacio S, Tuter G, Ryan ME, Komaroff E, Golub LM. Subantimicrobial dose doxycycline efficacy as a matrix metalloproteinases inhibitor in chronic periodontitis patients is enhanced when combined with a non-steroidal anti-inflammatory drug. *J Periodontol* 2004;75:453-463.
16. Nishikawa M, Yamaguchi Y, Yoshitake K, Seaki Y. Effects of TNFalpha and prostaglandin E2 on the expression of MMPs in human periodontal ligament fibroblasts. *J Periodont Res* 2002;37:167-76.
17. Matsuda N, Lin WL, Kumar NM, Cho MI, Genco RJ. Mitogenic chemotactic and synthetic responses of rat periodontal fibroblastic cells to polypeptide growth factors in vitro. *J Periodontol* 1992;63:515-525.
18. Golub LM, Suomalainen K, Sorsa T. Host modulation with tetracyclines and their chemically-modified analogs. *Curr Op Dent* 1992;2:80-90.
19. Golub LM, Lee HM, Ryan ME, Giannobile WV, Payne J, Sorsa T. Tetracyclines inhibit connective tissue break down by multiple non-antimicrobial mechanisms. *Adv Dent Res* 1998;12:12-26.
20. Thomas J, Metheny R, Karakioris JM, Wetzel M, Crout R. Long-term subantimicrobial doxycycline (Periostat) as adjunctive management in adult periodontitis. 1. Effects on subgingival bacterial population dynamics. *Adv Dent Res* 1998;12:32-39.
21. Walker C, Thomas J, Nango S, Lennon J, Wetzel J, Powala C. Long-term treatment with subantimicrobial dose doxycycline exerts no antibacterial effect on the subgingival microflora associated with adult periodontitis. *J Periodontol* 2000;71:1465-1471.
22. Skidmore R, Walker C, Kouach R, Thomas J, Bradshaw M, Leyden J, Powala C, Ashley R. Effects of sub-antimicrobial dose doxycycline in the treatment of moderate acne. *Arch Dermatol* 2003;139:459-464.
23. MacNaul KL., Chartrain N, Lark M, Tocci MJ, Hutchinson NI. Discoordinate expression of stromelysin, collagenase, and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in rheumatoid human synovial fibroblasts. Synergistic effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha on stromelysin expression. *J Bio Chem* 1990;265:17238-17245.
24. Kirkwood K, Martin T, Agnello K, Kim YJ. Differential regulation of MMP-13 by chemical modified tetracycline in osteoblasts. *J Int Acad Periodontol* 2004;6:39-46.
25. Chang YC, Yang SF, Lai CC, Liu JY, Hsieh YS. Regulation of matrix metalloproteinase production by cytokines, pharmacological agents and periodontal pathogens in human periodontal ligament fibroblast cultures. *J Periodontal Res* 2002;37:196-203.
26. Ramamurthy NS, Greenwald RA, Moak S. CMT/tenidap treatment inhibits TMJ destruction in adjuvant arthritis (AA) rats. *Ann NY Acad Sci* 1994;732:140-151.
27. Cohen DM, Lee HM, Bhattacharyya I, Sensat ML, Payne JB, Golub LM. Effective treatment for cicatricial pemphigoid using a novel combination therapy. *J Clin Oncol* 2001;19:584-592.
28. Golub LM, Lee HM, Ryan ME, Giannobile WV,

- Payne J, Sorsa T. Tetracyclines inhibit connective tissue breakdown by multiple non-antimicrobial actions. *Adv Dent Res* 1998;12:12-26.
29. Wasil M, Halliwell B, Moorhouse CP. Scavenging of hypochlorous acid by tetracycline, rifampicin and some other antibiotics: a possible antioxidant action of rifampicin and tetracycline? *Biochem Pharmacol* 1988;37:775-778.
 30. Ramamurthy NS, Vernillo AT, Greenwald RA, Lee HM, Sorsa T, Golub LM, Rifkin BR. Reactive oxygen species activate and tetracyclines inhibit rat osteoblast collagenase. *J Bone and Miner Res* 1993;8:1247-1253.
 31. Ryan ME, Ashley RA. How do tetracycline work? *Adv Dent Res* 1998;12:149-151.
 32. Nip LH, Uitto VJ, Golub LM. Inhibition of epithelial cell matrix metalloproteinases by tetracyclines. *J Periodont Res* 1993;28:379-385.
 33. Uitto VJ, Airola K, Vaalamo M, Johansson N, Putnins EE, Firth JD, Salonen J, Lopez-Otin C, Saarialho-Kere U, Kahari VM. Collagenase-3 (matrix metalloproteinase-13) expression is induced in oral mucosal epithelium during chronic inflammation. *Am J Pathol* 1998;152:1489-1499.
 34. Caton JG. Evaluation of Periostat for patient management. *Compend Contin Educ Dent* 1999;20:451-456.
 35. Kapusnik-Uner JE, Sande MA, Chambers HF. Tetracycline, chlormphenicol, erythromycin and miscellaneous antibacterial agents. In: J. G. Hardman, L. E. Limbird, P. B. Molinoff, R. W. Ruddon, A. G. Gilman (eds.). *The pharmacological basis of therapeutics*. New York: McGraw-Hill, Health Professions Division 1996:1123-1153.
 36. Sakellari D, Goodson JM, Socransky SS, Kolokotronis A. Concentration of 3 tetracyclines in plasma, gingival crevice fluid and saliva. *J Clin Periodontol* 2000;27:53-60.

Inhibiton of MMP-13 mRNA expression by Doxycycline combination with Mefenamic Acid in the rat Periodontal ligament cells

Jin-Hee Seo^{1,2}, De-Zhe Ciu^{2,3}, Young-Joon Kim^{1,3}

Dept. of Periodontology¹, Graduate School, Dept. of Dental Science²,
and Dental Science Research Institute³, Chonnam National University

It has been focused on the importance of the host inflammatory response in periodontal pathogenesis and progression, treatment has been introduced to control the host response and the method, which diminishes production and activity of MMP by doxycycline, has been used in periodontal field. MMP is a proteolytic enzyme which plays a major role in tissue destruction and MMP-1 is secreted in the periodontally healthy tissue, while MMP-8, 9, 13, etc in the inflammatory state. Among these, MMP-13 has been discovered lately and reported to degrade primarily type II collagen. Periodontal ligament (PDL) cell plays a role in destruction of periodontal tissue. This study was to evaluate the effect of doxycycline and mefenamic acid, non-steroidal anti-inflammatory drug on MMP-13 mRNA expression in the rat PDL cell.

Doxycycline concentration of 1~100 $\mu\text{g/ml}$ was added rat PDL cell and cell activity was measured by MTT assay at day 1 and 3. MMP-13 gene expression was evaluated by RT-PCR after PDL cells were pre-treated for 1 hour with doxycycline (50 $\mu\text{g/ml}$) alone or with mefenamic acid (10^{-6} M), then added IL-1 β (1.0 ng/ml) and incubated for 16 -18 hours.

The results are as follows:

1. Cell activity decreased significantly at 24 and 72 hours in 100 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0.05$).
2. Level of MMP-13 mRNA was in 202% increase by IL-1 β and in pre-treating doxycycline group, expression of IL-1 β induced MMP-13 mRNA was inhibited by 31% than IL-1 β treated only.
3. Mefenamic acid did not inhibit on the expression of IL-1 β induced MMP-13 mRNA, while mefenamic acid in combination with doxycycline inhibited the expression by 41% compared to only IL-1 β stimulation.

These results suggest that doxycycline synergistically inhibit the expression of IL-1 β induced MMP-13 mRNA in combination with mefenamic acid.

Keywords : rat periodontal ligament cell, MMP-13, doxycycline, NSAIDs, RT-PCR