

치주질환 심도에 따른 치은조직내의 Superoxide Dismutase와 Catalase의 활성변화에 관한 연구

경희대학교 치과대학 치주과학교실
김병옥 · 권영혁 · 이만섭

I. 서 론

염증세포들이 조직내로 침투한 세균이나 항원들과 접촉한 경우 이 염증세포들은 활성화되어 산소 소비의 증가, hexose monophosphate shunt의 활성화, 반응성의 산소 유리기(oxygen-derived free radicals : superoxide anion: O_2^- , 과산화수소: H_2O_2 , 수산화기: OH^-)의 생성을 특징으로 하는 respiratory burst를 야기하게 되는데 이러한 산소 유리기의 생성은 세포질내에 존재하는 reduced nicotinamide adenin dinucleotide phosphate 산화효소와 관련이 있으며¹⁾, 염증세포 이외의 호기성 세포에서는 사립체 호흡사슬에서 산소 유리기가 생성될 수 있다^{2,3,4)}.

염증세포는 산소 유리기를 생성하여 bactericidal activity와 virocidal activity를 나타낼 수 있으며, 또한 이러한 대사물질들은 염증과정의 의하여 야기된 조직 손상에도 중요한 역할을 할 수 있다⁵⁾. 즉 산소 유리기의 생성이 일상의 호기성 대사의 일부라 할지라도 이 물질들은 고도로 반응성이며 조직내에 풍부한 경우 collagen, hyaluronic acid 그리고 proteoglycan과 같은 세포의 기질 성분의 depolymerization에 영향을 끼칠 뿐만 아니라, 세포의 단백질, 핵산 그리고 막지질의 파괴에 활성을 나타낼 수 있다^{6,7,8,9,10)}. 따라서 숙주세포 뿐만 아니라 세균들이 호기성 환경에서 생존하기 위해서는 세포

및 조직에 유해한 산소 유리기를 제거하는 정교한 효소체계를 갖추어야만 한다¹¹⁾.

Superoxide dismutase(SOD)는 O_2^- 가 과산화수소와 산소로 전환되는 것을 촉진하는 금속 함유 효소로 진핵세포의 세포질내에 존재하는 CuZn-SOD, 그리고 영양류의 세포질내와 사립체의 내강내에 국한되어 존재하는 Mn-SOD 두 종류가 있다^{5,12)}.

세포질내에 존재하는 catalase는 하나의 막으로 둘러싸인 세포소기관인 peroxisome내에서 과산화수소를 물과 산소로 분해하는 효소로, 포유동물과 cytochrome system을 가진 호기성 세포에 광범위하게 분포되어 있는데 포유동물의 간세포나 적혈구내에 고농도로 존재하여 과산화수소에 의한 산화적 손상으로 부터 세포를 보호해주는 중요한 역할을 한다¹³⁾.

항산화효소에 관한 연구로는 Crouch 등(1978)¹⁴⁾, Grankvist 등(1981)¹⁵⁾, 및 Loven 등(1983)¹⁶⁾은 당뇨를 유도한 실험동물의 각종 장기들에서의 활성변화를 연구하였고, Matkovic(1977)¹⁷⁾과 Höggelöf 등(1983)⁵⁾은 당뇨병시 항산화효소의 활성변화에 관하여 연구하였으며, Grandy 등(1982)¹⁸⁾과 Buse 등(1983)¹⁹⁾은 랭거한스섬의 β -세포의 기능 유지 수단으로, McCormic 등(1981)²⁰⁾은 염증제거 수단으로, 그리고 Wong 등(1988)²¹⁾은 폐암세포의 처치수단으로 SOD를 이용하는 방법을 연구하였다.

치주질환에 이환된 환자들을 대상으로 한 연

구로는 국소유년형 치주염, 그리고 급속진행형 치주염에 이환된 환자들의 말초혈액내 다형핵백혈구에 의한 O_2^- 와 H_2O_2 의 생성에 관하여 주로 연구되었는데, Charon 등(1985)²²⁾은 치태 세균들의 산소대사에 대한 영향을 규명하고자 건강한 사람의 말초혈액내 중성구와 치은연상 치태 또는 치은연하치태를 각각 배양시킨 후 H_2O_2 생성에 관하여 조사하여 치은연상치태 중 *Actinomyces viscosus*는 중성구의 산소대사(H_2O_2 생성)에 영향을 미치지 않으나, 치은연하치태중 *Bacteroides gingivalis*와 *Actinobacillus actinomycetemcomitans*는 중성구의 산소대사를 억제시킬 수 있음을 보고하였으며, van Dyke 등(1986)²³⁾은 다형핵백혈구의 화학주성에 결합이 있는 국소 유년형 치주염환자의 경우에서 말초혈액내 다형핵백혈구에 의한 O_2^- 의 생성은 정상이라고 보고하였으나, Asman 등(1988)²⁴⁾은 유년형 치주염환자들에서 말초혈액내 다형핵백혈구에 의한 O_2^- 생성이 증가 되었음을 보고하였고, 최근 Kimura 등(1993)²⁵⁾은 성인형 치주염, 국소 및 전신 유년형 치주염 환자의 말초혈액내 다형핵백혈구에서의 과산화수소 생성이 증가되나 치석 제거술, 치근면 활택술에 의한 초기 치료 후 정상으로 회복됨을 확인하고, 치주질환 환자들에서 다형핵백혈구가 반응성의 산소 대사산물을 생성할 수 있는 능력을 측정하므로써 치은의 염증상태를 평가할 수 있을 것이라고 보고하였다.

그러나 치주질환에 이환된 치은조직내 항산화효소의 활성변화에 관한 연구는 아직까지 활발하지 못하여 치주질환에 있어서 항산화효소의 분명한 역할이 밝혀져 있지 않은 실정이다. 따라서 저자는 SOD와 catalase 같은 항산화효소들이 산소 유리기를 소거하여 조직파괴에 대해 보호 역할을 담당한다는 여러 선학들의 연구 결과를 토대로, 염증성 치은조직내에서 항산화효소인 SOD와 catalase의 활성변화를 측정하여 치주조직의 염증상태 및 치주질환의 진행에 있어서 그 역할을 구명하고자 본 연구를 시행하였다.

II. 연구대상 및 방법

1. 연구대상

OO대학교 부속 치과병원 치주과에 내원한 치주질환 환자들 중 전신건강이 양호하고 최근 1년 이내에 항생제 복용이나 치주치료의 경험이 없는 치주질환 환자 27명을 질환군으로 선정하였으며, 정상군으로는 방사선상 치조골의 파괴가 없으며 임상적 치주낭 깊이가 3mm 이하이고 치간유두출혈지수가 0으로 나타난 제 3대구치 발치, 또는 임상적 치관 확장술을 요하는 환자 9명을 선별하였다. 대상 환자의 연령 분포는 20세에서 55세(평균 39.2세)까지 였으며, 성별분포는 남자 20명, 여자 16명이었다.

2. 연구방법

질환군은 초진시 Page와 Schroeder의 분류(1982)²⁶⁾에 따라 치은염(9 예), 성인형 치주염(13 예), 그리고 급속 진행형 치주염(5 예)으로 분류되었으며, 치주낭의 깊이는 Michigan O probe를 이용하여 측정하였는데 3mm 이하를 I군, 4-6mm를 II군, 7mm 이상을 III군으로 구분하였고 0.5mm 이상은 반응립하였다. 또한 치간유두출혈지수(Saxer와 Mühleman)²⁷⁾를 측정하고 치간유두출혈지수(PBI)에 따라 PBI 0, 1, 2, 3, 4군으로 구분하였다.

(1) 치은조직 준비

국소마취하에서 발치 및 치주수술 도중 낭상피, 접합상피, 그리고 치은 결합조직을 포함한 근심치간유두조직을 절취하여 치은조직편을 얻은 후, 생리 식염수에 세척하여 혈액을 제거하고 실험할 때까지 영하 80°C에 냉동보관하였다.

치은조직의 무게를 습중량으로 측정한 다음 그 무게의 20배에 해당하는 무게에 이르도록 50mM 인산 완충액(pH 7.0)을 가한 후 homogenizer(ULTRA-TURRAX T25, Germany)로 균질화하였고, 균질액은 4°C에서 12,000 X g로 10분간 원심분리(Micro-centrifuge MH

-2, U.S.A.)하여 상청액을 효소 활성을 위한 시료로 사용하였다.

(2) Superoxide dismutase(SOD) 활성도 측정

SOD 활성도는 Crapo 등(1978)²⁸⁾의 방법에 따라 측정되었는데, 0.1mM EDTA와 0.1mM KCN을 함유한 50mM phosphate buffer(pH 7.8) 2.3ml에 0.5mM xanthine 0.3ml와 0.1mM cytochrome C 0.3ml를 넣은 후 xanthine oxidase 0.1ml를 가하여 550nm에서 1분 동안에 증가되는 흡광도를 UV-spectrophotometer (Gilford instrument Lab. U.S.A.)로 측정하여 흡광도의 증가속도가 매 분당 0.020이 되도록 xanthine oxidase의 농도를 표준화하였다. Total-SOD 활성도는 표준화된 효소 반응액에 치은조직으로부터 얻어진 시료 0.05ml를 가하여 흡광도의 변화 정도로 평가하였으며, cytochrome C의 환원 속도를 50% 억제하는 효소의 양을 1 unit(U)로 표시하였다. Mn-SOD 활성도는 효소반응액에 KCN 2mM을 첨가한 점을 제외하고 상기와 동일한 방법으로 측정하였으며, Total-SOD 활성도로 부터 Mn-SOD 활성도를 뺀 나머지 값을 CuZn-SOD 활성도로 평가하였다.

(3) Catalase 활성도 측정

Catalase 활성도는 Aebi(1983)²⁹⁾의 방법에 따라 측정되었는데, 50mM phosphate buffer(pH 7.0) 2.0ml에 100mM H₂O₂용액 0.98ml와, 시료 0.02ml를 넣은 후 240nm에서 1분 동안에 변화되는 흡광도를 UV-spectrophotometer (Gilford instrument Lab. U.S.A.)를 이용하여 측정하였으며, 효소의 활성도는 1분동안에 1μM의 H₂O₂를 분해시키는 효소량을 1 unit(U)로 하였다.

(4) 단백질 정량

단백질 정량은 Lowry 등(1951)³⁰⁾의 방법에 의하여 측정하였다. 먼저 3가지 표준 시약을 준비하였는데 CuSO₄ 0.5g와 Na₃C₆H₅O₇ 1g을 100ml가 되도록 증류수를 가하여 용해시켜 용액 A를 만들고, Na₂CO₃ 20g와 NaOH 4g을

100ml가 되도록 증류수를 가하여 용액 B를 만들고, Folin-Ciocalteu phenol reagent를 증류수로 2배 희석시켜 용액 C를 만들어 각각 실험할 때 까지 4°C에서 보관하였다. 실험 직전에 용액 A와 용액 B를 50:1로 혼합하여 시험관에 2.5ml씩 취하고 증류수 250μl와 시료액 50μl를 첨가하여 혼합시킨 후 상온에서 10분간 방치하였다. 그리고 200μl의 용액 C를 가하고 혼합하여 20분 경과 후에 600nm에서 흡광도를 측정하였으며, 표준 단백 시료(Bovine serum albumin(1 mg/ml)도 같은 방법으로 측정하여 단백질량을 환산하였다.

(5) 통계처리

본 연구에서 얻어진 측정치들에 대한 각 군간의 차이를 Student t-test를 이용하여 통계학적 유의성을 검정하였는데, p값이 0.05 미만인 경우를 유의한 것으로 판정하였다.

III. 연구성적

치주질환군별, 치간유두출혈지수군별, 그리고 치주낭 깊이군별로 구분하여 각각에 대한 Total-superoxide dismutase(Total-SOD), CuZn-superoxide dismutase(CuZn-SOD)와 Mn-superoxide dismutase(Mn-SOD) 그리고 catalase의 활성 차이를 분석하였다.

(1) 치주질환군별 항산화효소의 활성도

각 질환별 Total-SOD, CuZn-SOD, Mn-SOD, 그리고 catalase의 활성이 Table 1과 Fig. 1과 같이 나타났는데, Total-SOD의 활성은 정상군(7.60±1.77)에 비하여 급속진행형 치주염군(6.02±0.99)에서 유의성있게 낮게 나타났으며(P<0.05), CuZn-SOD의 활성도 정상군(5.48±1.76)에 비하여 급속진행형 치주염군(4.45±0.76)에서 유의성 있게 낮게 나타났다(P<0.05).

Mn-SOD의 활성은 정상군(2.12±0.70)에 비하여 치은염군(1.67±0.47), 성인형 치주염군(1.60±0.31), 그리고 급속진행형 치주염군(1.57±0.32) 모두에서 유의성 있게 낮게 나타났으

Table 1. Comparison of activity of Total-SOD, CuZn-SOD, Mn-SOD, and catalase among each periodontal disease group (unit: U/mg protein) (mean \pm S.D.)

Disease group	Total-SOD	CuZn-SOD	Mn-SOD	catalase
normal (11) [@]	7.60 \pm 1.77 *	5.48 \pm 1.76	2.12 \pm 0.70	70.55 \pm 19.17
gingivitis (11)	7.75 \pm 1.53	6.08 \pm 1.49	1.67 \pm 0.47	67.99 \pm 17.58
adult periodontitis(15)	6.97 \pm 1.82	5.37 \pm 1.79	1.60 \pm 0.31	64.31 \pm 16.91
rapidly progressive periodontitis (11)	6.02 \pm 0.99	4.45 \pm 0.76	1.57 \pm 0.32	62.48 \pm 14.05

*: P<0.05, @: number of samples

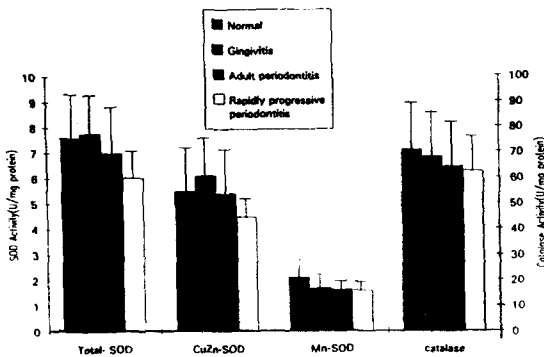


Fig. 1 Comparison of activity of Total-, CuZn-, and Mn-SOD, and Catalase among each periodontal disease group

나(P<0.05), catalase의 활성은 정상군(70.55 \pm 19.17)에 비하여 치은염군(67.99 \pm 17.58), 성인형 치주염군(64.31 \pm 16.91), 그리고 급속진행형 치주염군(62.48 \pm 14.05)의 각 질환군간에 유의성 있는 차이를 나타내지 못하였다(P>0.05).

(2) 치간유두출혈지수(PBI)군별 항산화효소의 활성도

치은 염증을 평가할 수 있는 치간유두출혈지수군(PBI)에 따른 Total-SOD, CuZn-SOD, Mn-SOD, 그리고 catalase의 활성은 Table 2와 Fig. 2와 같이 나타났는데, Total-SOD와

CuZn-SOD의 활성은 PBI 0군(7.60 \pm 1.77, 5.48 \pm 1.76)에 비하여 PBI 1군(6.82 \pm 1.04, 5.14 \pm 0.95), 2군(7.01 \pm 1.86, 5.52 \pm 1.69), 3군(7.05 \pm 1.31, 5.47 \pm 1.34), 그리고 4군(6.89 \pm 1.08, 5.20 \pm 1.19)의 각 군간에 유의성있는 차이를 나타내지 못하였다(P>0.05).

Mn-SOD의 경우에 있어서는 PBI 0군(2.12 \pm 0.70)과 비교시 PBI 1군(1.68 \pm 0.30)만 제외하고 PBI 2군(1.49 \pm 0.35), 3군(1.58 \pm 0.24), 및 4군(1.69 \pm 0.25)에서 모두 유의성있게 낮은 활성을 보였으나(P<0.05), catalase의 경우에 있어서 PBI 0군(70.55 \pm 19.17)에 비하여 PBI 1군(68.50 \pm 13.50), 2군(64.69 \pm 10.04), 3군(65.26 \pm 24.30), 그리고 4군(64.02 \pm 15.10) 모두 각 군간에 유의성있는 차이를 나타내지 못하였다(P > 0.05).

(3) 치주낭 깊이군별 항산화효소의 활성도

치주낭 깊이에 따른 Total-SOD, CuZn-SOD, Mn-SOD, 그리고 catalase의 활성은 Table 3과 Fig.3 과 같이 나타났는데, Total-SOD와 CuZn-SOD의 활성은 치주낭 깊이 I군(7.21 \pm 1.63, 5.38 \pm 1.44), II군(6.58 \pm 2.09, 5.15 \pm 2.06)과 III군(7.22 \pm 1.30, 5.53 \pm 1.31) 모두 군간에 유의성있는 차이를 나타내지 못하였다(P >0.05).

Mn-SOD에 있어서는 치주낭 깊이 I군(1.87

Table 2. Comparison of activity of Total-SOD, CuZn-SOD, Mn-SOD, and catalase among papillary bleeding index groups(PBI).(unit: U/mg protein). (mean \pm S.D.)

PBI	Total-SOD	CuZn-SOD	Mn-SOD	catalase
0(11) [@]	7.60 \pm 1.77	5.48 \pm 1.76	2.12 \pm 0.70	70.55 \pm 19.17
1(7)	6.82 \pm 1.04	5.14 \pm 0.95	1.68 \pm 0.30	68.50 \pm 13.50
2(13)	7.01 \pm 1.86	5.52 \pm 1.69	1.49 \pm 0.35	64.69 \pm 10.04
3(6)	7.05 \pm 1.31	5.47 \pm 1.34	1.58 \pm 0.24	65.26 \pm 24.30
4(11)	6.89 \pm 1.08	5.20 \pm 1.19	1.69 \pm 0.25	64.02 \pm 15.10

*: P<0.05, @: number of samples

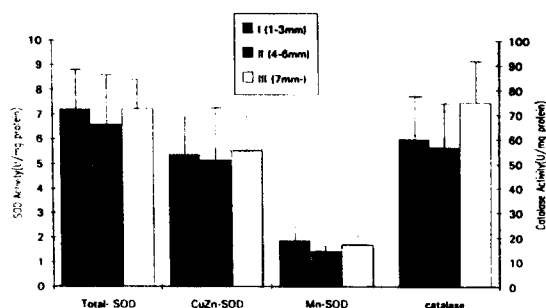
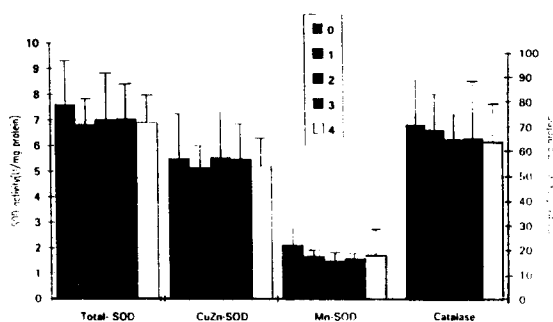


Fig.2. Comparison of activity of Total-SOD, CuZn-SOD, Mn-SOD, and catalase among papillary bleeding index groups.

Fig.3. Comparison of activity of Total-SOD, CuZn-SOD, Mn-SOD, and catalase among probing depth groups.

Table 3. Comparison of activity of Total-SOD, CuZn-SOD, Mn-SOD, and catalase among probing depth groups.(unit: U/mg protein)(mean \pm S.D.).

groups	Total-SOD	CuZn-SOD	Mn-SOD	catalase
I(1-3mm)(26) [@]	7.21 \pm 1.63	5.38 \pm 1.44	1.87 \pm 0.59	59.79 \pm 18.10
II(4-6mm)(11)	6.58 \pm 2.09	5.15 \pm 2.06	1.43 \pm 0.27	56.64 \pm 17.62
III(7mm-)(11)	7.22 \pm 1.30	5.53 \pm 1.31	1.69 \pm 0.29	74.82 \pm 16.39

*: P<0.05, @: number of samples

±0.59)에 비하여 II군(1.43±0.27)에서 유의성 있게 낮았으며, II군(1.43±0.27)에 비하여 III군(1.69±0.29)에서 유의성 있게 높게 나타났다(P < 0.05).

catalase에 있어서는 치주낭 깊이 I군(59.79±18.10)과 II군(56.64±17.62)에 비하여 III군(74.82±16.39)에서만 유의성 있게 높게 나타났다(P<0.05).

IV. 총괄 및 고안

1907년 Goadby³¹⁾가 치은조직내에 세균이 존재함을 처음으로 가정한 이래로 1918년 Turner와 Drew 등³²⁾이 세균에 대한 조직학적 소견을 밝히고, 접합상피, 치주낭, 열구상피 및 구강상피가 심부 치주조직내로 세균 침투를 위한 경로를 제공할 수 있음이 많은 연구에 의하여 밝혀졌다^{33,34,35,36)}.

중성구는 치태세균의 조직내 침투에 대한 일차적인 방어인자로서 치은숙주방어 또는 치은손상의 매개체로서 많은 연구가들의 연구주제가 되어 왔는데, 중성구에 의한 숙주방어기전은 비산화적 보호기전과 산화적 보호기전으로 대별될 수 있다¹¹⁾. 치은조직내에서 중성구의 비산화적 보호 기전으로서 acid pH, cationic proteins, lysozyme, neutral protease 그리고 lactoferrin 등이 항세균요소로서 작용하는데, 특히 lactoferrin은 OH⁻ 생성의 조절역할을 수행하며 중성구의 살균작용에 주요한 구성성분이 밝혀졌다³⁷⁾. 산화적 보호기전으로서 O₂⁻, H₂O₂, 그리고 OH⁻ 등의 산소 유리기가 항세균요소로서 작용하는데, 산소 유리기는 조직이 손상을 받아 저산소증(hypoxia)상태에 이른 후 산소가 다시 유입되는 시기에 또는 염증시에 발생할 수 있는데³⁸⁾ 치은 조직이 과잉 생산된 산소 유리기에 노출될 수 있는 경로로는 염증 반응시 중성구가 식균작용을 유도하는 자극에 노출되어 산소분자에서 산소 유리기로 환원되는 경우와 호기성 세포내 사립체 호흡사슬^{2,3,4,13)}에서 발생할 수 있다.

사립체 호흡사슬은 일련의 산화-환원 반응

을 촉매하는 pyridine nucleotide, flavoproteins, iron-sulfur proteins, ubiquinone 및 cytochrome으로 이루어진 복합체로서 사립체 내막에 존재한다. 호흡사슬중에서 O₂⁻과 H₂O₂의 주 생성부위는 NADH-ubiquinone reductase (complex I), ubiquinone-cytochrome reductase (complex III)이며, succinate dehydrogenase (complex II)에서는 거의 생성되지 않으며, 산소 분압이 높아지거나, 호흡사슬 구성물이 환원되어 있을 경우에 그 생성량이 증가하게 된다¹³⁾.

기저상태의 산소분자의 전자 구조는 산소로 하여금 쉽게 1가의 환원과정을 거치게 하고, 이러한 일련의 1가 환원 동안에 호기성 세포들 내에서 O₂⁻, H₂O₂, 그리고 OH⁻이 발생되어 이 세포들의 생존에 위협을 가하게 되기 때문에 호기성 세포들의 생존을 위한 다층의 방어 체계들이 진화, 발전되어 왔는데³⁹⁾, 첫번째 방어 기전은 단순히 1가의 환원 과정을 피하는 것으로서 중간대사산물의 유리없이 산소를 물로 4가의 환원을 성취하는 cytochrome oxidase 라는 효소에 의하여 이루어진다. 두번째 방어기전은 superoxide dismutase(SOD)라는 metallo-protein에 의하여 제공되는데, 이 SOD는 포유동물세포들의 세포질내에서 발견되는 CuZn-SOD는 분자량이 32,500인 homodimer로 활성 부위에 Cu⁺⁺와 Zn⁺⁺를 함유하고 있다. Cu⁺⁺는 이화과정동안에 Cu⁺로 환원되고 다시 산화되며, Zn는 결합가를 변화시키지 않으며 효소의 구조적 안정에 관여하고 있다. 진핵세포는 활성 부위에 Mn을 가지고 있는 또다른 Mn-SOD를 가지고 있는데, 이 효소는 분자량이 95,000이상인 homotetramer로서 사립체의 내강내에서 뿐만 아니라 일부 세균에서도 발견되며 O₂⁻와 계속해서 접촉하는 동안 Mn⁺⁺⁺의 환원 및 재산화가 교대로 반복되고 CuZn-SOD에 비하여 안정성이 낮으며 외부의 구조 변화에 의하여 효소량이 변화될 수 있다. 세번째 방어 기전은 O₂⁻의 전환(dismutation)에 의하여 또는 환원형 flavoenzyme의 재산화에 의하여 생성되는 H₂O₂를 소거하는 효소 즉 분자량이 240,000의 homotetrameric enzyme인 catalase에 의하여 제공되는데 혈장 catalase는 H₂O₂에

의한 산화로 부터 비효소계 항산화물질인 ascorbic acid를 보호한다¹²⁾.

본 연구에서 항산화효소 활성은 UV/VIS-spectrophotometer(Gilford Instrument Lab.)를 이용하여 측정되었는데, xanthine이 xanthine oxidase에 의하여 uric acid로 전환될 때 부산물로 생성되는 O_2^- 이 cytochrome c를 환원시키고 SOD가 O_2^- 를 소거하여 cytochrome c 환원량이 감소되는 바, 그 환원된 cytochrome c는 550nm에서 최대 흡광도를 나타내므로 UV/VIS-spectrophotometer로 측정하는 것이 SOD 활성의 측정 원리이며, 과산화수소가 240nm에서 최대의 흡광도를 나타내는 바 catalase에 의하여 소모되는 과산화수소의 양을 UV-spectrophotometer로 측정하는 것이 catalase 활성의 측정 원리이다.

본 연구에서 각 질환별 항산화효소의 활성 변화를 보면 정상군에 비하여 치은염군, 성인형 치주염군, 및 급속진행형 치주염군에서 공히 Mn-SOD의 활성이 유의성있게 낮았으며 ($P<0.05$), 특히 급속진행형 치주염군에서는 CuZn-SOD와 Mn-SOD의 활성이 유의성있게 낮게 나타났는데($P<0.05$), 급속진행형 치주염은 사춘기와 약 35세 사이에 발현되는 심한 염증, 급속한 결합조직부착상실, 변연 치은조직의 증식과 자발출혈 그리고 전반적인 치조골 파괴를 특징으로하는 성인형 만성 염증성 치주염들 중의 하나로 중성구나 단핵구의 기능 이상을 나타내며 전신질환과도 관계되어 있는 바^{40,41)}, 젊은 성인형 치주염 환자들의 말초 혈액내 다형핵 백혈구는 대사적으로 활성화된 상태에 있으므로 늙은 성인형 치주염 환자들에 비하여 O_2^- 생성이 증가되어 나타난다고 한 Whyte 등(1989)⁴²⁾의 보고와, 급속진행형 치주염환자들의 말초 혈액내 다형핵 백혈구에 의한 O_2^- 이 급속 진행형 치주염의 병인 발생에 그 역할을 담당할 수 있다고 한 Shapira 등(1991)⁴³⁾의 보고를 고려할 때, 급속진행형 치주염군에서 CuZn-SOD와 Mn-SOD의 활성이 유의성있게 낮게 나타난 본 연구 결과는 SOD 활성이 감소되어 산소 유리기를 완전히 제거하지 못하여 O_2^- 이 급속 진행형 치주염의 병인 발생에 관

여함을 시사하는 결과로 사료된다.

치간유두출혈지수에 따른 활성변화를 보면 치은 염증의 심도가 증가할수록 사립체내에 존재하는 Mn-SOD가 감소하는 활성변화를 나타냈는데, 치은염증시 치은조직세포내 사립체 막의 투과성 변화때문에 다른 항산화효소에 비하여 비교적 불안정한 Mn-SOD만이 활성변화를 나타낸 것으로 사료된다. 그리고 CuZn-SOD와 catalase의 경우에 있어서는 효소 활성이 치간유두출혈지수 각 군간에 통계학적으로 유의성 있는 차이가 나타나지 않았는데, 이것은 CuZn-SOD의 경우에 있어서 구조적 안정에 기여하는 Zn 때문에, 그리고 catalase의 경우에 있어서는 세포질내에 존재하는 비교적 안정된 효소라는 점과 관련되어 나타난 결과로 사료된다.

치주낭 깊이에 따른 활성변화를 보면 Mn-SOD의 활성이 I군에 비하여 II군에서 유의성 있게 낮게 나타났으나($P<0.05$), II군에 비하여 III군에서 다시 유의성 있게 높게 나타난 양상을 보였는데($P<0.05$), 이것은 치은열구출혈지수가 3 내지 4이고, 치주낭 깊이가 4 내지 5인 성인의 자연 발생 초기 치주염시 치주낭 상피세포내 소기관의 공포화되며 심한 경우에는 세포질의 붕괴로 세포 괴사, 결합조직내 섬유아세포는 건강조직내의 섬유아세포의 특징적인 형태인 방추형이 상실되며, 사립체는 cristae의 특유한 모습이 소실된 공포모양을 하고 세포질의 변화와 심한 경우에는 세포막이 파괴됨을 관찰한 김 등(1983)⁴⁴⁾의 전자 현미경적 소견과 관계 깊은 결과로 사료된다. 그러나 치주낭이 깊은 III군에서 SOD의 활성이 I군과 비슷한 수준으로 높게 나타난 것과, 특히 catalase의 경우에 I군과 II군에 비하여 III군에서 유의성 있게 오히려 더 높게 나타난 결과는, 쥐에 85% 이상의 산소를 공급하거나 치사량 이하의 내독소를 주입한 실험에서 항산화효소가 유도됨을 보고한 Townsley 등(1989)⁴⁵⁾의 결과와 관계가 있을 것으로 사료되며, 이는 또한 산소 유리기에 의한 조직 파괴의 관점에서 볼 때 치주낭 깊이만으로는 치주조직의 조직병리학적 변화나 치주질환의 활성도를 단정적으로 평가해서는

않됨을 시사하는 것이라 하겠다²⁷⁾.

산소 유리기는 중성구 살균작용의 주요 매개체이므로 병원균들이 이런 산물들의 치사효과를 피하기 위해서는 몇가지 기전들을 소유해야만 하는데 몇몇 혐기성 및 호기성 세균들은 SOD와 catalase 같은 효소들을 합성하여 중성구에 의한 식균작용에 저항할 수 있다. *Capnocytophaga species*²⁷⁾, *Listeria monocytogenes*⁴⁶⁾, *Nocardia asteroides*⁴⁷⁾, 및 *Shigella flexneris*⁴⁸⁾ 등은 SOD를 생성함으로써, 그리고 *Actinobacillus actinomycetemcomitans*²⁶⁾, *Staphylococcus aureus*⁴⁹⁾, 및 *Neisseria gonorrhoeae*⁵⁰⁾ 등은 catalase를 생성하여 식세포에 의한 식균작용으로부터 보호하는 것으로 보고되었다. 그러나 *Escherichia coli*⁵¹⁾ 내의 SOD나 catalase가 중성구의 식균작용으로부터 보호 역할을 수행하지 못함도 보고되었다. 또한 Amano 등(1988)⁵²⁾은 *P. gingivalis*는 SOD 활성만 가지고 있을 뿐 catalase 활성은 가지고 있지 않다고 보고한 이후 최근에는 *P. gingivalis*에서 추출된 SOD가 중성구의 식균작용에 대한 방어기전의 일부를 형성할 것이라고 보고하였는데⁵³⁾, 본 연구에서는 이러한 세균들에 의한 영향을 배제하지 않고 염증성 치은조직으로부터 주위조직의 파괴를 초래할 수 있는 산소 유리기의 소거를 담당하는 SOD와 catalase의 활성 변화를 연구한 바, 향후 치주질환군별 환자의 혈장내 SOD와 catalase의 활성변화에 대한 연구와, 사람체막에서의 O₂⁻ 생성 변화, 대사성 전신질환 환자의 치은 조직내 항산화효소의 활성변화, 치은 조직내에서 항산화효소의 합성유도 가능성, 그리고 급속진행형 치주염 치료시 전통적인 치료술식 이외에 보조요법으로서 SOD의 투여시 그 치유양상에 대한 연구 등이 계속 되어져야 할 것으로 사료된다.

V. 결 론

염증성 치은조직내에서 superoxide dismutase와 catalase의 활성변화를 측정하기 위하여 OO대학교 부속 치과병원 치주과에 내원한 20세에서 55세(평균 39.2세) 사이의 치주질환 환

자를 정상군, 치은염군, 성인형 치주염군, 그리고 급속진행형 치주염군으로 분류하였으며, 치간유두부위에서 치주낭 깊이와 치간유두출혈지수를 조사하고 치주낭 깊이와 치간유두출혈지수에 따라 각각 구분한 다음 치은조직을 절취하여 치은조직내 항산화효소중 superoxide dismutase(SOD: CuZn-SOD와 Mn-SOD)는 Crapo 등의 방법에 따라, catalase는 Aebi의 방법에 따라 각각 활성변화를 UV-spectrophotometer로 측정하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 치주질환군별 항산화효소의 활성도는 정상군에 비하여 급속진행형 치주염군에서 CuZn-SOD와 Mn-SOD 및 Total-SOD의 활성이 유의성 있게 낮게 나타났다(P<0.05).
2. 치간유두출혈지수에 따른 항산화효소의 활성도 차이는 Mn-SOD의 활성만이 치간유두출혈지수 0군에 비하여 2, 3, 4군에서 유의성 있게 낮게 나타났다(P<0.05).
3. 치주낭 깊이에 따른 항산화효소의 활성도 변화는 어떤 특징을 보이지 않았으나, catalase 활성도는 7mm 이상의 깊은 군에서만 다른 군에 비하여 유의성있게 높았다(P < 0.05).

이상과 같은 결과들은 항산화효소중 Mn-SOD의 활성도가 치은조직의 염증 상태를 가장 잘 반영할 수 있다는 것과, SOD의 감소된 활성도가 급속 진행형 치주염의 진행에 있어서 중요한 관련 인자중의 하나임을 시사하였다.

REFERENCES

1. Beaman, L., and Beaman, B. L.: The role of oxygen and its derivatives in microbial pathogenesis and host defense. *Annu. Rev. Microbiol.*, 38:27-48, 1984.
2. Jensen, P. K.: Antimycin-insensitive oxidation of succinate and reduced nicotinamide adenine dinucleotide in electron transport particle. *Biochim. Biophys. Acta.*, 122:157, 1966.
3. Hinkel, P. C., Butow, R. A., Racker, E., and Chan-

- ce, B.: Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation. *J.Biochem.*, 242:5169, 1967.
4. Loschen, G., Flohe, L., and Chance, B.: Respiratory chain - linked H₂O₂ production in pigeon heart mitochondria. *FEBS, Lett.*, 18:261, 1971.
 5. Hägglöf, B., Marklund, S. L. and Holmgren : CuZn superoxide dismutase, Mn superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in lymphocytes and erythrocytes in insulin-dependent diabetic children. *Acta Endocrinologica.*, 102:235-239, 1983.
 6. Bartold, P. M., Wiebkin, O. W., and Thonard, J. C. : The effect of oxygen-driven free radicals on gingival proteoglycans and hyaluronic acid. *J. Periodontal Res.*, 19:390-400, 1984.
 7. Greenwald, R. A., Moy, W. W. and Lazarus, D. : Degradation of cartilage proteoglycans and collagen by superoxide radical. *Arthritis and Rheumatism*, 19 : 799, 1976.
 8. Greenwald, R. A. and Moy, W. W.: Inhibition of collagen gelation by action of the superoxide radical. *Arthritis and Rheumatism*, 22:251-259, 1979.
 9. Greenwald, R. A. and Moy, W. W.: Effect of oxygen - derived free radicals on hyaluronic acid. *Arthritis and Rheumatism*, 23:455-463, 1980.
 10. Freeman, B. A. and Crapo, J. C. : Biology and tissue injury. *Lab. Invest.*, 47:412-426, 1982.
 11. Jan Lindhe: Textbook of Clinical Periodontology, 2nd ed. Munksgaard, 129-192, 1989.
 12. Stocker, R., and Frei, B.: Endogenous antioxidant defences in human blood plasma (in *Oxidative Stress and Antioxidants*), Academic Press Ltd., 213-242, 1991.
 13. 박동기: *Lehninger 생화학*, 유한문화사, 33-64, 505-549, 1986.
 14. Crouch, R. G., Kimsey, D. G., Sarda, P. A., and Buse, M. G. : Effect of streptozotocin on erythrocyte and retinal superoxide dismutase. *Diabetologia*, 15:53-57, 1978.
 15. Grankvist, K., Marklund, S. L., and Taljedal, I. B.: CuZn-superoxide dismutase, Mn-superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in pancreatic islets and other tissues in the mouse. *J. Biochem.*, 199:393-398, 1981.
 16. Loven, D., Oberley, L., Schel, H., and Wilson, H.: Superoxide dismutase activities in jejunum and kidney of diabetic rats treated with insulin and glutathione. (In *Oxygen Radicals and Their Scavenger Systems, II Cellular and Medical Aspect*) Elsevier Science Publishing Co., Inc., 17-21, 1983.
 17. Matkovic, B.: Superoxide and Superoxide Dismutase, Michelson, A. M., McCord, J.M., and Fridovich, I.ed., Academic Press, New York, 501-523, 1977.
 18. Gandy, S. E., Buse, M. G., and Crouch, R. K.: Protective role of superoxide dismutase against diabetogenic drugs. *J. Clin. Invest.*, 70:650-658, 1982.
 19. Buse, M. G., Gandy, S. E., and Crouch, R. K.: SOD protects B-cells against diabetogenic drugs in rats and in isolated canine islets. (in *Oxy Radicals and Their scavenger systems, Vol. II: Cellular and Medical Aspects*), Elsevier Science Pub. Co., Inc. 119-124, 1983.
 20. McCormic, J. R., Harkin, M. M., Johnson, K. J., and Ward, P. A.: Suppression by superoxide dismutase of immune complex-induced pulmonary alveolitis and dermal inflammation. *Am. J. Pathol.*, 102 -55-61, 1981.
 21. Wong, G. H., and Goeddel, D. V.: Induction of manganese superoxide dismutase by tumor necrosis factor: Possible protective mechanism. *Science.*, 242: 941-944, 1988.
 22. Charon, J., Suzuki, B., Collison, B., and Capron, A.: Influence of bacterial preparation on PMN oxygen metabolism measured by chemiluminescence. *J. Dent Res. Abst(1810)*, 1985.
 23. Van Dyke, T. E., Zinney, W., Winkel, K., Taufiq, A., Offenbacher, S., and Arnold, R. R. : Neutrophil function in localized juvenile periodontitis, phagocytosis, superoxide production and specific granule release. *J.Periodontol.*, 57:703-707, 1986.
 24. Asman, B.: Peripheral PMN cells on juvenile periodontitis. *J.Clin. Periodontol.*, 15:360-364, 1986.
 25. Kimura, S., Yonemura, T., and Kaya, H.: Increased oxidative product formation by peripheral blood polymorphonuclear leukocytes in human periodontal diseases. *J.Periodontal Res.*, 28:197-203, 1993.
 26. Page, R. C. and Schroeder, H. E.: Periodontitis in man and other animals: a comparative review. *Karger*, 45-47, 1982.
 27. 치주과학교수협의회: *치주과학*, 지영문화사, 개정판, 96 - 114, 370-380, 1992.
 28. Crapo, C. H., McCord, J. M., and Fridovich, I.: Preparation and assay of superoxide dismutase. *Methods in enzymology*, eds, Fleischer, S. and Packer, L. Academic press, New York., 53:382-389, 1978.
 29. Aebi, H.: Catalase (in *Methods of Enzymatic Analysis*), Bergmeyer, H.U. Bergmeyer, J. and Grab, M., 2nd ed., Verlag Chem., 3:273-286, 1983.
 30. Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L. and

- Randall, R. J.: Protein measurement with folin the phenol reagent. *J. Biol.Chem.*, 193:256-277, 1951.
31. Godby, K. W.: Erasmus Wilson's lecture on pyorrhea alveolaris. *Lancet*. 1:633, 1907.
 32. Turner, J. G., and Drew, A. H.: An experimental inquiry into the bacteriology of pyorrhea. *Proc. R. Soc. Med.*, 13:104, 1918-1919
 33. Saglie, F. R., Newman, M. G., Carranza, F. A. Jr., and Pattison, G.L.: Bacterial invasion of gingiva in advanced periodontitis in humans. *J Periodontol.*, 53: 217. 1982.
 34. Pekovic, D. D., and Fillery, E. D.: Identification of bacteria in immunopathological mechanisms of human periodontal disease. *J Periodont. Res.*, 19:329, 1984.
 35. Sanz, M., Herrera, I., Saglie, F. R., et al.: Invasion of junctional epithelium in human periodontitis by microorganisms. *J.Dent Res.(Abstr)*, 63:250, 1984.
 36. Saglie, F. R., Carranza, Jr. F. A., and Newman, M. G.: The presence of bacteria within the oral epithelium in periodontal disease. 1. A Scanning and Transmission Electron Microscopic Study. *J. Periodontol.*, 56:618-624, 1985.
 37. Ambruso, D. R., and Johnston, 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.
 38. McCord, J. M.: Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *New Eng. J. Med.*, 312: 159-163, 1985.
 39. Fridovich, I.: Antioxidant defenses in the lung. *Ann. Rev. Physiol.*, 48:693-702, 1986.
 40. Page, R. C., Altman, L. C., Ebersole, J. L., Vandestein, G. E., Dahlberg, W. H., Williams, B. L., and Osterberg, S. K.: Rapidly progressive periodontitis, A distinct clinical condition. *J.Periodontol.*, 54:197-209, 1983.
 41. Nevins, M., Becker, W., and Kornman, K.: Proceedings of the World Workshop in Clinical Periodontics. 1-1-I-32, 1989.
 42. Whyte, G. J., Seymour, G. J., Cheung, K., and Robinson, M. F.: Chemiluminescence of peripheral polymorphonuclear leukocytes from adult periodontitis patients. *J. Clin. Periodontol.*, 16:69-74, 1989.
 43. 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.
 44. 김광석, 최성근, 김종관: 성인의 자연발생 초기 치주염시 치은조직의 전자현미경적 연구. *대한치주과학회지, 대한치주과학회*, 13:212-224, 1983.
 45. Townsley, M. I., and Tylor, A. E.: Involvement of oxygen radicals in pulmonary edema(in *Handbook of free radicals and antioxidants in biomedicine*) CRC PRESS, Boca Raton, Florida., 297-314, 1989.
 46. Welch, D. F., Sword, C. P., Brehm, S., and Dusanic, D.: Relationship between superoxide dismutase and pathogenic mechanisms of *Listeria monocytogenes*. *Infect & Immun.*, 23:863-872, 1979.
 47. Filice, G. A.: Resistance of *Nocardia asteroides* to oxygen dependent killing by neutrophils. *J. Infect. Dis.*, 148:861-867, 1983.
 48. Franzon, V. L., Arondel J., and Sansonetti P. J.: Contribution of superoxide dismutase and catalase activities to *Shigella flexneris* pathogenesis. *Infect & Immun.*, 58:529-535, 1990.
 49. Mandell, G. L.: Catalase, superoxide dismutase, and virulence of *Staphylococcus aureus*. In vitro and in vivo studies with emphasis on staphylococcal-leukocyte interaction. *J.Clin. Invest.*, 55:561-566, 1975.
 50. Archibald, F. S., and Duong, M. N.: Superoxide dismutase and oxygen toxicity defenses in the genus *Neisseria*. *Infect & Immun.*, 51:631-641, 1986
 51. Schwartz C. E., Krall, J., Norton, L., McKay, K., and Lynch, R. E.: Catalase and superoxide dismutase in *Escherichia coli*: roles in resistance to killing by neutrophils. *J.Biol. Chem.*, 258:6277-6281, 1983.
 52. Amano, A., Tamagawa, H., Takagaki, Y., Murakami S., Shizukuishi, S., and Tsunemitsu, A.: Relationship between enzyme activities involved in oxygen metabolism and oxygen tolerance in black pigmented *Bacteroides*. *J. Dent. Res.*, 67:1196-1199, 1988.
 53. Amano, A., Ishimoto, T., Tamagawa, H., and Shizukuishi, S.: Role of superoxide dismutase in resistance of *Porphyromonas gingivalis* to killing by polymorphonuclear leukocytes. *Infect & Immun.*, 60 :712-714, 1992.

ALTERATION OF SUPEROXIDE DISMUTASE-AND CATALASE-ACTIVITY IN HUMAN GINGIVAL TISSUES BY THE PERIODONTAL DISEASE SEVERITY

Byung-Ok Kim, Young-Hyuk Kwon, Man-Sup Lee
Dept. of Periodontology, College of Dentistry, Kyung-Hee University

It has been believed that antioxidant enzymes such as CuZn- and Mn-superoxide dismutase and catalase protect the tissue from damage resulting from the oxygen derived free radicals(O_2^- , H_2O_2 and OH).

The purpose of this study was to investigate the relationship between activity of antioxidant enzymes including CuZn- and Mn- superoxide dismutase and catalase and inflammatory periodontal disease and periodontal parameters.

For this study, the patients were classified into normal, gingivitis, adult periodontitis and rapidly progressive periodontitis, and then their papillary bleeding index(PBI) and probing depth were checked.

Gingival tissues were surgically obtained from the patients during periodontal surgery, extraction, and clinical crown lengthening procedure. The activity of CuZn- and Mn- superoxide dismutase and catalase in the gingival tissues was measured by using UV-spectrophotometer by the same methods as Crapo et al. and Aebi did, respectively.

The results were as follows:

1. CuZn- and Mn- and total-superoxide dismutase activity were significantly low in rapidly progressive periodontitis group in comparison to normal group($P < 0.05$).
2. In comparison of the antioxidant enzyme activity according to papillary bleeding index group(PBI), Mn-superoxide dismutase activity only was significantly lower in PBI 2, 3, and 4 groups than PBI 0 group($P < 0.05$).
3. Superoxide dismutase activity failed to show any significant difference according to probing depth. But significantly high catalase activity was shown in deep pocket group (≥ 7 mm)($P < 0.05$).

In conclusion, these results suggest that the activity of Mn-superoxide dismutase among the antioxidant enzymes may reflect the inflammatory status of gingival tissue and that the decreased activity of superoxide dismutase may be one of responsible factors for progression of rapidly progressive periodontitis.