치주질환 심도와 치은열구액내 Myeloperoxidase에 관한 연구

최병선 · 곽정민 · 김형섭

전북대학교 치과대학 치주과학교실

I. 서 론

치은열구액은 혈장, 치주결합조직, 상피세포, 염증세포, 치은연하치태로부터 나오는 여러 물질을 포함하고 있기 때문에 염증성 치주질환을 연구하는데 좋은 매개체이다[1]. 최근 치은열구액내 치은열구액의 양, 숙주산물 및 미생물과의 관계가 염증이 있는 부위나 건강한 부위에 있어 다양하게 연구되어져 왔다. 이러한 연구는 염증성 치주질환의 과정을 이해하고, 질환의 발생과 진행을 진단하고 치료하는데 객관적인 지표로 이해되고 있다.

건강한 구강에서도 치은열구액내에는 92-95 % 다형핵백혈구(Polymorphonuclear leukocyte : PMN)가 존재하나, 염증이 있는 부위에서는 더 많은 PMN이 나타난다. PMN은 protease, carbohydrases, lactoferrin, lysozyme, myeloperoxidase와 더 많은 종류의 생물학적 활성물질을 갖고 있다. 이러한 물질들은 PMN과 미생물과의 반응, 자체파괴 등에 의해 유리되어 치은열구액내에 들어가게 되어 치은열구액내에 중요한 구성성분이 된 것이다[2,3]. 그러나 치은열구액내 구성물질중 PMN에서 유래된 물질에 대한 연구가 비교적 드물기 때문에 저자는 치은열구액내 myeloperoxidase(MPO) 활성과 염증성 치주질환과의 관계를 규명하고자 하였다.

MPO는 MPO-hydrogen peroxide-halide system에 있어 중요한 역할을 한다. 또한 PMN의 건조중량의 5%나 차지하는 MPO를 치은열구액내 생화학적 인자로 사용하여서[4] 염증부위와 건강한 부위에 있어서의 비교 및 치주질환 심도에 따른 MPO의 관계를 규명하고자 본 실험을 시행하였다.

II. 실험 대상 및 방법

1. 실험 대상

전북대학교병원 치주과에 내원한 30세에서 57세 환자의 치주질환 활성 29 부위와 치주질환 비활성 18 부위를 대상으로 연구하였다. 모든 환자는 최근 6개월 내에 항생제나 면역억제제를 복용하지 않았고, 방사선치료, 당뇨병 및 기타 전신질환은 없었으며 치주치료도 받지 않았다. 치관보철물이 장착되어 있거나 우식이 있는 치아, 복합레진 등으로 충전되어 있는 치아는 실험대상에서 제외하였다.

2. 실험 방법

1) 치은열구액 채취 및 임상 지수 측정

타액으로 인한 오염을 방지하기 위하여 해당부위를 cotton roll로 방습시키고 압축공기로 약하게 건조시킨 후 소독된 paper strip(Perio Paper-Harco Electronics, Winnipeg, Canada R3HON3)을 치아의 설면 중앙으로 가능한 한 미약한 저항감을 느낄 때까지 삽입시켰다. 치

은열구액내 strip을 삽입시켜 놓은 채 30초 동안 방치한 다음 제거하여 즉시 periotron 6000(Harco Electronics, Winnipeg, Canada R3HON3)에 위치시켜 unit치를 측정하였다. 이때 혈액이 묻은 strip은 채택하지 않았으며 치은열구액이 적셔진 paper strip을 360μℓ 50mM potassium phosphate buffer(pH 2.75)가 들어 있는 microcentrifuge tube에 넣었다. 치은열구액을 채취한 후 실험자간의 오차를 줄이기 위하여 동일한 실험자가 치은지수(GI : Gingival Index)[5], 치간유두출혈지수(PBI : Papillary Bleeding Index)를 조사하였고, Michigan O probe를 사용하여 치주낭 깊이(PD : Pocket Depth)를 측정하였다.

2) Myeloperoxidase activity 측정

치은열구액이 적셔진 periopaper strip을 360 μℓ 50mM potassium phosphate buffer(pH 2.75)가 들어 있는 microcentrifuge tube에 넣어 ice bed내에서 효소용출을 위해 60분 동안 정기적으로 흔들어 준다. 그런 후 33μM cold monochlorodimedon 40μℓ와 5M cold NaCl 40μℓ를 첨가한 다음 absorbance 276−282μℓ에서 scanning한다. 0.3% cold H_2O_2 20μℓ를 첨가한 후 실온에서 10분간 incubation하여 absorbance 276−282μℓ에서 측정하고 incubation 전후의 absorbance 차이로부터 MPO 효소활성을 구하였다[6].

MPO activity를 Lamster의 방법에 의해서 총효소량(MPO unit activity/site)과 농도(MPO unit/μℓ GCF)로 나누어서 나타냈다. 또한 MPO의 수치 중 전체 부위를 두 집단으로 나누었다. low MPO 집단은 $50\times10_{-6}$ unit/site 이하로, high MPO 집단은 50×10^{-6} unit/site 이상으로 구분하여 비교하였다.

3) 통계 처리

이상의 과정에서 나온 결과를 분산분석(ANOVA), 평균치 개별비교(Scheffe test), 상관분석(Correlation analysis), student t-test에 의해서 통계적으로 분석하였다.

Ⅲ. 실험 성적

1. 치주질환 활성부위와 비활성부위에서 임상지수와 MPO의 평균치 비교

Table 1에서 GI, PD, PBI, periotron unit, MPO활성(unit/site) 모두에서 치주질환 활성부위가 비활성부위에서보다 높게 나타났으며, MPO(unit/μℓ GCF)에서는 반대의 현상을 보였다.

Table 1. Mean values for clinical parameters and MPO between control sites and active sites

Mean± S. E.

	Control (N=18)	Acute (N=29)
GI	1.28± 0.14	2.69± 0.09**
PD	2.08± 0.20	3.83± 0.40**
PBI	0.89± 0.16	2.38± 0.14**
Periotron Unit	27.72± 4.32	75.17± 5.90**
MPO(unit/site)	41.89± 5.02	69.83± 3.87**
MPO(unit/μℓ GCF)	265.12± 20.26	206.77± 2.28*

* : Statistically significant by student t-test (P<0.05)

** : Statistically significant by student t-test (P<0.01)

GI : Gingival Index

PD : Pocket Depth

PBI : Papillary Bleeding Index

2. 임상지수에 따라 MPO(unit/site)와 MPO(unit/μℓ GCF)의 평균치 비교

앞서 Table 1에서 치주질환 활성부위와 비활성부위의 통계적 차이가 유의한 것을 보고, 그에 따라 임상지수에 따라 MPO의 변화를 관찰하기 위해 임의로 GI는 0−1과 2−3의 두 그룹으로, PD는 ≤3, >3㎜로, PBI는 0−1, 2−4, periotron unit는 0−30, 30−60, 60이상으로 나누어 관찰하였다.

그 결과 Table 2에서와 같이 MPO(unit/site)에서 GI 2−3에서 0−1로 PBI 2−4에서 0−1로 통계적으로 유의하였다(P<0.01). MPO(unit/μℓ GCF)에서는 PD>3㎜이 ≤3㎜보다 통계적으로 유의하였다(P<0.01). Periotron unit가 증가함에 따라 MPO는 group 3에서 group 1, 2에 비해 통계적 유의성을 가졌고(P<0.05), MPO(unit/μℓ GCF))에서 group 2, 3에서 group 1에 대하여 유의성이 있었다(P<0.05) (Table 3, 4).

3. Low MPO(unit/site)와 High MPO (unit/site) 집단에 있어서 치주 임상지수의 평균치 비교

High MPO 집단이 low MPO 집단에 비하여 GI(P<0.05), PD(P<0.01), PBI(P<0.01)에 있어 통계적으로 유의하게 높은 값을 보였으나, periotron unit에서의 값의 차이는 통계적 유의성이 없었다(Table 5).

4. MPO 활성과 임상지수와의 상관분석

MPO(unit/site)에 있어서는 GI(r=0.4782), PD(r=0.2342), PBI(r=0.4479), periotron unit(r=0.3177)의 상관관계를 보였으며, 이중에서 GI에서 가장 높은 상관관계를 나타내었다. 또한 MPO(unit/μℓ GCF)에서는 GI(r=−0.4011), PD(r=−0.3127), PBI(r

Table 2. Mean values for MPO(unit/site) and MPO(unit/μℓ GCF) According to Clinical parameters

Mean± S. E.

	Group	N	MPO(unit/site)	MPO(unit/μℓ GCF)
GI	0−1	14	37.4± 5.9	267.31± 24.15
	2−3	33	68.4± 3.5**	212.92± 5.34*
PD	≤3	21	49.9± 6.5	260.96± 14.70
	>3	26	66.6± 3.7*	203.40± 7.68**
PBI	0−1	19	44.6± 6.2	258.43± 19.75
	2−4	28	69.0± 3.6**	209.23± 2.99*

*: Statistically significant by student t-test (P<0.05)
**: Statistically significant by student t-test (P<0.01)

Table 3. Mean values for MPO(unit/site) and Periotron Unit

Mean± S. E.

Groups	Periotron Unit	N	MPO(unit/site)
Group 1	0−30	11	46.54± 6.77
Group 2	30−60	16	53.24± 7.06
Group 3	> 60	20	70.77± 4.16*

*: Statistically significant between Group 1 and Group 3 by ANOVA and Scheffe Test (P<0.05)

Table 4. Mean values for MPO(unit/μℓ GCF) and Periotron Unit

Mean± S. E.

Groups	Periotron Unit	N	MPO(unit/μℓ GCF)
Group 1	0−30	11	311.12± 17.22
Group 2	30−60	16	205.88± 12.28*
Group 3	> 60	20	202.61± 2.37*

* : Statistically significant compared to Group 1 by ANOVA and Scheffe Test ($P<0.05$)

Table 5. Mean values for clinical parameters of low MPO(unit/site) group and high MPO(unit/site) group

Mean± S. E.

	All N=47	Low MPO(unit/site) N=17	High MPO(unit/site) N=30
GI	2.15± 0.13	1.71± 0.21	2.40± 0.18*
PD	3.16± 0.28	2.24± 0.24	3.68± 0.39**
PBI	1.81± 0.15	1.29± 0.23	2.10± 0.18**
Periotron unit	57.0± 5.22	46.6± 8.9	63.4± 6.3

* : Statistically significant by student t-test ($P<0.05$)

** : Statistically significant by student t-test ($P<0.01$)

Table 6. Correlation coefficients between clinical parameters and MPO

	MPO(unit/site)	MPO(unit/μℓ GCF)
GI	r=0.4782	r=−0.4011
	p=0.000	p=0.003
PD	r=0.2342	r=−0.3127
	p=0.057	p=0.016
PBI	r=0.4479	r=−0.4292
	p=0.001	p=0.001
Periotron unit	r=0.3177	r=−0.5901
	p=0.015	p=0.000

=−0.4292), periotron unit(r=−0.5901)을 나타내었으며, 이중에서 periotron unit에서 가장 높은 상관관계를 나타내었다.

Ⅳ. 총괄 및 고안

중성구(PMNs)에 의한 항균적 대사에서 oxygen-dependent pathways에 관여하는 요소로는 acid pH, cationic proteins, lactoferrin, lysozyme, neutral proteases(elastease, collagenase, cathepsin G)와 다른 lysosomal hydrolase가 포함된다.

oxygen-dependent pathways에는 oxygen metabolite(H_2O_2, $-O_2$, OH^-)와 myelopero-

xidase system이 있다. 특히 myeloperoxidase system(myeloperoxidase+halide ions)에서 MPO는 lysosomes에서 phagosome으로 유리되고, chloride ion과 H_2O_2와 결합하여 hypochlorous acid(HOCl)를 형성한다. 이 acid는 강력한 살균제재이다[6,7].

염증이 있는 치은열구에 많은 PMN이 존재하고, 정상적인 치은열구에도 PMN이 존재하고 있다. 치은열구 PMN은 대사작용에 활성이고 생체내에서 10−40% 세포가 식균작용을 보여준다(Kowolik 1980). 많은 PMN이 존재하면 PMN 자체 파괴나 치태 미생물과 PMN이 작용하여 치은열구액내로 많은 MPO가 존재한다. 치은열구 MPO의 측정은 치은열구속의 PMNs를 측정하는 간단한 방법이다. 그러므로 심한 염증이 있는 부위에 많은 PMN이 있고, 그에 따라 치은열구액내 MPO가 증가하게 될 것이다[8,9]. 본 실험에서는 Table 1에서 염증부위에서 GI, PD, PBI, periotron unit와 같은 임상지수 및 MPO(unit/site) 모두 증가하고 있는 양상을 보였다. 다른 인종간의 실험에서도 염증부위에서 MPO의 증가를 보이는 Smith, Wolff, Cao의 논문결과와 일치하였다[10-13].

본 실험에서 MPO 측정치를 Lamster방법에 의해 MPO(unit/site)와 MPO(unit/μℓ GCF)로 나누어 측정하였다[14,15]. Smith는 전체 MPO(unit/site)가 어떤 부위 치주상태의 좋은 지표가 되며, 치은열구액내 전체 효소치가 효소의 농도보다 좀 더 신뢰할 수 있는 지표라고 보고하였다. MPO의 결과중 MPO(unit/site)는 extrasulcular fluid의 존재에 영향을 받지 않고, MPO(unit/μℓ GCF)보다 유용한 것 같았다. 이러한 가정은 치은열구 PMNs 이주와 치은열구액 유출과는 독립적인 현상이라는 결론과 일치한다[16]. 또한 염증부위의 치은열구양은 측정시, periotron의 능력을 초과할 수도 있어 정상적인 방법으로 치은열구액내 MPO를 측정시 MPO(unit/site)가 좀 더 이론적 근거가 있는 것으로 추정된다.

Smith는 임상지수와 MPO의 관계가 미약한 것으로 보고하였으나 본 실험에 있어서는 임상지수가 증가함에 따라 MPO(unit/site)가 증가하는 것이 보여졌다. 이것은 GI가 증가함에 따라 LDH(Lactate Dehydrogenase)가 증가한다고 보고한 Lamster의 결과와 일치하였고, Smith의 결과와 상이했던 것은 임상지수의 주관적인 면이 그 원인으로 사료된다[15,16]. MPO의 측정치를 high MPO(unit/site)와 low MPO(unit/site)로 나누었을 때 이 결과 high MPO(unit/site)에서 GI, PD, PBI에서 통계적 유의성을 나타내는 것은 이 집단이 치주질환 활성지표로서 민감한 변화를 갖고 있는 것 같다. Smith는 치근 활택술 후 high MPO 집단에서도 MPO가 감소했으나, low MPO 집단에서는 MPO가 변화하지 않았다고 보고하였다.

Kowolik의 보고에 의하면 모든 혈액 PMN MPO는 정상범위였고, 치은열구액 MPO는 염증조직에서는 정상이나, 염증이 없으면 효소치가 거의 50%에서 나타나지 않았으며, GI와 MPO는 상관관계를 보인 것으로 나타났다($P<0.0003$)[18]. Cao는 치은열구액내 MPO는 GI 2에서 GI 0−1 보다 더 많이 나타나고, 증가된 GCF MPO는 치은 염증과 더불어 부가적인 PMNs의 존재를 나타내는 것 같다고 하였다. 그러므로 GCF MPO는 치은열구액내 PMN 수나 치은염증을 반영하고 있지 특정 치주질환이나 치주염을 보이는 것 같지는 않다. 본 실험에 있어서도 MPO(unit /site)와 GI에 있어서 가장 좋은 상관관계를 보여 주었다($r=0.48$). 그러나 임상지수와 LDH($r=0.93$) MPO($r=0.78$)와 같은 높은 상관관계를 보여주는 Lamster의 보고와는 차이가 있었다. 이것은 인종, 실험자, 실험방법의 차이에 기인하는 것 같다. 미래에는 치은열구액내 여러 효소 및 물질이 임상적, 미생물학적인 측정과 연결되어 좀 더 치주질환 상태 평가에 정확한 방법으로 사용될 것이며, 치주질환 활성 예측에도 이용될 것이다. Collagenase, β-glucuronidase, arysulfatase와 더불어 본 실험의 myeloperoxidase도 치은열구액내 유용한 생화학적 지표가 될 것으로 사료된다[19,20].

V. 결 론

치주질환으로 전북대학교 치과병원 치주과에 내원한 30세에서 57세 까지 환자의 치주질환 활성 29부위와 치주질환 비활성 18부위를 대상으로 연구하였다. Perio paper를 이용하여 치은열구액을 채취하여 MPO를 측정하고 GI, PBI, PD와 비교하여 다음의 결론을 얻었다.

1. 치주질환 활성부위(N=29)와 치주질환 비활성부위(N=18)를 비교한 결과 GI, PD, PBI, periotron unit 모두에서 모두 통계적으로 유의했으며($P<0.01$), MPO(unit/site)와 MPO(unit/μℓ GCF)에서도 유의한 차의 변화를 보였다($P<0.01$, $P<0.05$).
2. 임상지수가 증가함에 따라 MPO(unit/site)와 MPO(unit/μℓ GCF) 모두에서 통계적으로 유의한 차이가 있었다($P<0.01$, $P<0.05$).
3. High MPO(unit/site) 집단이 low MPO (unit/μℓ GCF) 집단보다 GI($P<0.05$), PD ($P<0.01$), PBI($P<0.01$)에 있어서 통계적으로 유의한 차이가 있었다.
4. 실험 대상자 치주 임상지수와 효소활성의 상관관계에서 MPO(unit/site)는 GI($r=0.4782$)에서, MPO(unit/μℓ GCF)는 periotron unit($r=-0.5901$)에서 높은 상관관계를 나타내었다.

참고문헌

1. Cimasoni, G. 1983. Crevicular fluid updated. Monographs in Oral Science. ed. Myers, H. M., Vol 12. Basel : S. Karger.
2. Hancock, E. B., Cray, R. J. & O'Leary, T. J. : . The relationship between gingival crevicular fluid and gingival inflammation. A clinical and histologic study. Journal of Periodontology 50 : 13-19, 1979.
3. Kowolik, M. J. and Raeburn, J. A. : Functional integrity of gingival crevicular neutrophil polymorphonuclear leukocytes as demonstrated by nitroblue tetrazolium reduction. J. Periodont. Res. 15 : 483-491, 1980.
4. Klebanoff, S. J. and Clark, R. A. : The Neutrophil : Function and Clinical Disorders. North-Holland, Amsterdam. 1978.
5. L e, H. : The gingival index, the plaque index and the retention index systems. Journal of Periodontology 38 : 610-616, 1967.
6. Smith, Q. T. & Yang, C. H. : Salivary myeloperoxidase of young adult humans. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine 175 : 468-475, 19 84.
7. Avila, J. L. : Comparative biochemical cytology of the exoplasmic apparatus in polymorphonuclear leukocytes. In : Lysosomes in Applied Biology and Therapeutics 6. ed. Dingle, J. T., Jacques, P. J. & Shaw, I. H. Ch 8, 235-266. Amsterdam : North-Holland Publishing Company. 1979.
8. Attstr m, R. : Presence of leukocytes in crevices of healthy and chronically inflammed gingivae. Journal of Periodontal Research 5 : 42-47, 1970.
9. Attstr m, R. : Studies on neutrophil polymorphonuclear leukocytes at the dentogingival junction in gingival health and disease. Journal of Periodontal Research (Suppliment) 8 : 7-15, 1971.
10. Taichman, N. S., Tasi, C. C., Baehni, P. C., Stoller, N. & McArthur, W. P. : Interaction of inflammatory cells and oral microorganisms. IV. In vitro release of lysosomal constituents from polymorphonuclear leukocytes exposed to supragingival and subgingival bacterial plaque. Infection and Immunity 16 : 1013-1023, 1977.
11. Smith, Q. T., Hinrichs, J. E. & Melnyk,

R. S. : Gingival crevicular fluid myeloperoxidase at periodontitis sites. Journal of Periodontal Research 21 : 45−55, 1986.
12. Wolff, L. F., Smith, Q. T., Snyder, W. K., Bedrick, J. A., Liljemark, W. F., Aeppli, D. A. & Bandt, C. L. : Relationship between lactate dehydrogenase and myeloperoxidase levels in human gingival crevicular fluid and clinical and microbial measurements. Journal of Clinical Periodontology 15 : 110−115, 1988.
13. Cao, C. F. and Smith, Q. T. : Crevicular fluid myeloperoxidase at healthy, gingivitis and periodontitis sites. Journal of Clinical Periodontology 16 : 17−20, 1989.
14. Lamster, I. B., Mandella, R. D. & Gordon, J. M. : Lactate dehydrogenase activity in gingival crevicular fluid collected with filter strips : analysis in subjects with noninflammed and mildly inflammed gingiva. Journal of Clinical Periodontology 12 : 153−161, 1985a.
15. Lamster, I. B., Vogel, R. S., Hartley, L. J., DeGorge, C. A. & Gordon, J. M. : Lactate dehydrogenase, βγ-glucuronidase and arylsurfatase activity in gingival crevicular fluid associated with experimental gingivitis in man. J. of Periodontol. 56 : 139−147, 1985b.
16. Kowashi, Y., Jaccard, F. & Cimasoni, G. : Sulcular polymorphonuclear leukocytes and gingival exudate during experimental gingivitis in man. Journal of Periodontal Research 15 : 151−158, 1980.
17. Lamster, I. B., Hartley, L. J., Vogel, R. I. : Development of a biochemical profile for gingival crevicular fluid. Special Suppliment Issue, New approach to the diagnosis and chemotherapeutic management of the periodontal disease. J. of Periodontol. 56 : 13−21, 1985c.
18. Kowolik, M. J. and Grant, M. : Myeloperoxidase activity in human gingival crevicular neutrophils. Archs oral Biol. 28(4) : 293−295, 1983.
19. Lamster, I. B., Oshrain, R. L. & Gordon, J. M. : Enzyme activity in human gingival crevicular fluid : Consideration in data reporting based on analysis of individual crevicular sites. Journal of Clinical Periodontology 13 : 799−546, 1986.
20. Fine, D. H. & Mandel, I. D. : Indicators of periodontal disease acitivity : an evaluation. Journal of Clinical Periodontology 13 : 533−546, 1986.

A STUDY ON PERIODONTAL DISEASE SEVERITY AND MYELOPEROXIDASE IN GINGIVAL CREVICULAR FLUID

Byung-Son Choi, Jung-Minn Kwack, Hyung-Seop Kim
Dept. of Periodontology, College of Dentistry, Chonbuk National University

This investigation was undertaken to determine the relationship between the amount of polymorphonuclear leukocyte(PMN) enzyme myeloperoxidase(MPO) in gingival crevicular fluid(GCF) collected from active or control site and gingival disease status described by clinical indices(gingival index, papillary bleeding index, pocket depth, periotron unit).

The results were as follows :

1. MPO activity/site was greater at active sites than at control sites.
2. According to increasing the clinical parameters, MPO/sites was higher statistically ($P<0.01$, $P<0.05$).
3. High MPO(unit/site) groups was higher statistically than low MPO(unit/site) groups in various clinical parameters.
4. Correlation coefficients between MPO(unit/site) and GI, MPO(unit/$\mu\ell$ GCF) and periotron unit were 0.4782, −0.5901, respectively.