

진행성 치주염에서의 치은열구액내 교원질분해효소 활성

정 현 주

전남대학교 치과대학 치주과학 교실

I. 서 론

치주질환은 세균에 의한 치아지조직의 염증성질환으로서 활동기(active, exacer-bating stage)와 회복기(remission stage)가 반복적으로 나타나는 일과성이며 주기적인 진행양상을 가진다고 받아들여지고 있다¹⁾. 따라서 활동기를 진단하고 질환 활성도(disease activity)를 인지할 수 있는 믿을 만한 진단방법이 요구된다. 그러나 현재까지 주로 사용되어 온 임상적계수들 - 즉 치은발적, 치주낭깊이, 방사선학적 골소실 - 은 진행중인 질환의 활성을 반영하기 보다는 과거에 진행된 질환의 결과에 의한 병소를 반영한다.

진행성 치주질환에서의 치주인대와 치조골의 파괴는 이들 조직의 주성분(치은 : 60%, 치조골 : 90%)인 구성하는 교원질 기질의 분해에 의한다. 질환 진행중 교원질 분해 과정에 대한 정확한 기전은 좀 더 규명되어야 하지만 내인성 교원질분해효소가 중성산도 및 체온에서 native collagen triple helix를 분해시킬 수 있는 유일한 숙주의 단백분해효소이므로 이 효소가 중요한 역할을 한다고 추정된다.^{2, 3)} 즉 치은결합조직 및 세포들이 조직배양시 교원질 분해효소를 방출하거나⁴⁻⁷⁾, 면역형광염색법에

의해 치은조직내 존재함이 관찰되었고⁸⁾, 질환시의 조직내 효소활성에 차이가 있음을 보이는 연구보고가 있었다.⁹⁻¹¹⁾

치은열구액은 염증시 증가하거나 구성성분의 변화를 보이며 채취시 손상이 적고 비외과적으로 가능하므로 관심을 끌고 있다. 즉 간단한 방법으로 좁은 병소 및 대상부위결합조직에서 채취될 수 있으며 대사상의 변화에 대한 분석이 가능하다. 따라서 치은열구액의 분석은 치은 및 치주지수 등을 이용한 임상적 질환평가방법과 병용시 질환 상태에 대한 정보를 제공할 수 있으며 이미 여러 연구를 통해 열구액내 단백질, 숙주 및 세균 산물, 염증매개물질, 조직생성 및 파괴과정중의 대사산물 등에 대한 검사가 이루어졌다.¹²⁾ Sodek등¹⁵⁾, Kryshalskyj등^{16, 17)}, Larivee등¹⁸⁾의 연구에서 척추동물성 교원질분해효소의 특징인 type I 교원질 분해물질(TC^A, TC^B)을 생성하는 효소활성이 파괴성 치주염병소의 치은열구액내에 존재함이 알려졌고, 이러한 교원분해효소와 효소억제활성이 치은염 및 치주염에서 염증반응 정도와 치주조직파괴에 관련된다고 하였다. 효소활성에 대해 Villela등¹⁹⁾, 고와 손²⁰⁾은 질환의 심도에 비례하여 증가한다고 하였고 Lee등²¹⁾은 항생제 치료중의 질환진행과정에서,

* 본 연구논문은 1994년도 교육부 학술진흥재단의 자유 공모과제 연구비 보조로 이루어졌음

Soulmalainen²²⁾ 등은 유년형 치주염에서의 효소 활성을 관찰하여 교원질분해효소 활성이 질환의 진행과 관련될 수 있음을 보고했다.

그러나 여러 연구에서 주로 사용된 분석법은 방사성 동위원소(³H, ¹⁴C)가 표지된 교원질을 기질로 반응시킨 뒤 전기영동검사와 fluorography로 검사하는 것으로 조작이 힘들고, 복잡하며 방사능에 노출될 위험이 있다. 반면 Levenson²³⁾을 거쳐 Nethery등²⁴⁾ 등이 제안한 방법은 액상의 교원질을 microwell내에서 gel화시켜서 박막상태로 피복하여 반응시킨 다음 잔존 교원질양을 automatic microtiter spectrometer(Ab 500)를 이용하여 측정하는 것으로 간단하고 신속하며 경제적이라는 장점을 가지며 정량분석이 용이하다.

분석의 민감도, 또는 lower detection limit는 방사성 표지 교원질 사용시는 24시간 후 16ng/ml, 후자의 방법은 16시간 후 10ng/ml라고 보고되어 있다.

이에 치주질환활성도를 측정할 수 있는 치은열구액내 교원질분해효소의 활성검사 방법중 spectrophotometric collagenolytic assay가 임상적으로 유용한지 알아보고, 치주질환 활성도 진단법으로서 이 교원질분해효소 활성검사가 타당한지 평가하기 위해 본 연구를 시행하였다.

I. 연구내용 및 방법

1. 재료 및 시약

Brij 35, 30% bis-acrylamide(electrophoresis grade), sodium dodecyl sulfate(SDS), urea, p-aminophenyl mercuric acetate(APMA), bacterial collagenase, type I collagen은 Sigma 회사(USA)의 것을 구입하여 사용하였고 ³H-propionylated collagen, vertebral collagenase는 New England Nuclear 회사(USA)의 교원질분해효소 검사용을 구입하여 사용하였다. 또한 기타시약은 analytical/ electrophoresis grade를 구입하여 사

용하였다.

2. 교원질분해효소 활성분석방법의 비교

1) 검사방법비교

(1) 방사성표지 교원질을 이용한 radiofibril assay

① 방사성교원질의 조작

³H-propionylated-collagen(specific activity 10 μ Ci/0.166ml, 1.3×10^5 dpm/3.3 μ g/10 μ l)은 cold collagen(3.5 μ g/10 μ l)과 섞어 10 μ l당 22000dpm의 방사성을 갖고 농도 3.0 μ g가 되게 조절하였다.

② 교원질분해효소 활성검사

표준 교원질 분해효소(bacterial enzyme(Sigma Chemical Co.,USA), Tad pole collagenase(NEM Co.,USA)를 1 μ g/ml~1ng/ml로 희석하여 collagenase assay buffer(CAB, 50mM Tris-HCl, pH 7.4, 200mM NaCl, 5mM CaCl₂, 0.05%(v/v) Brij35, 0.02%(w/v) sodium azide)와 함께 10 μ l [³H]collagen(22000dpm)을 22°C에서 3~24시간 반응시켰다. 반응후 12000xg에서 10분간 원심분리시켜 10 μ l의 상층액을 얻어 4ml liquid scintillation cocktail (Enlightening and Enhance, NEN, USA)을 혼합한 후 liquid scintillation counter에서 방사성을 측정하였다. 효소활성은 % digestion(=cpms in supernatant/ total cpms added)으로 산정하였다.

치은열구액 효소검사비교를 위해서는 성인형치주염환자에서 치주낭깊이 5mm이상인 병소 및 건강부위를 택하였다. Periopaper strip(Harco Co. Canada)을 각환자당 4부위에서 치은열구내 1mm까지 삽입하여 3분후 Periotron(Harco Co. Canada)에서 양(1 unit=0.005 μ l)을 측정한 후 0.5ml microcentrifuge tube에 넣어 냉동 보관하였다. 건강 및 질환부 치은열구액은 Periotron unit 100단위당 100ul의 collagenase assay buffer(CAB, 50mM Tris-

HCl, pH 7.4, 200mM NaCl, 5mM CaCl₂, 0.05%(v/v) Brij35, 0.02%(w/v) sodium azide) 로 4°C에서 1시간 동안 추출한 후 활성형의 효소정량을 위해 치은열구액의 희석용액 50-70μl에 10μl [³H]collagen (22000dpm)을 22°C에서 24시간 반응시켰으며, 비활성형을 포함한 총효소정량을 위해서는 동일성분의 혼합액에 p-aminophenyl mercuric acetate(APMA)를 최종농도 1.2mM이 되도록 추가하여 동일한 조건으로 반응시켰다. 반응을 중지시키기 위해 최종농도 10mM이 되게 EDTA용액을 가하고 13000rpm으로 원심분리후 상층액 10μl를 제거하여 방사성을 측정하였다. 나머지 반응액은 65°C에서 30분 가열하여 교원질을 변성시키고 10% cross-linked mini vertical slab gel(Hoeffer Co. USA)과 5% stacking gel를 이용하여 7.5mA에서 4시간 시행하였다.²⁵⁾ gel은 0.125% Coomassie blue R-250이나 silver stain으로 염색하였으며 type I collagen α -chain의 3/4 α -chain으로의 전환을 densitometry(Image analysis system : digital converter-256 grey-levels, DT 2851, Data Translation Co.,USA)로 판독하여 정량하였다. 매번 반응시마다 대조군으로 열구액성분이 첨가되지 않은 교원질기질만의 반응계를 사용하였다.

효소활성은 다음 식으로 산출하며 dilution factor를 고려하여 효소농도보다는 효소의 존재량을 해당부위에서의 총치은열구액 유출 속도를 곱하여 산정하였다²⁶⁾.

$$\begin{aligned} \text{enzyme activity(Units)} &= \\ &1 - [\alpha \text{ chain}] / [\alpha \text{ chain} + 3/4 \alpha \text{ chain}] \\ \text{total enzyme activity} &= \\ &\text{enzyme activity} \times \text{gingival crevicular fluid} \\ &\text{flow/min} \times \text{dilution factor} \end{aligned}$$

(2) Spectrophotometric assay에 의한 분석²⁴⁾

① 효소활성검사준비

Type I collagen을 0.05M acetic acid에 용해하였다. 교원질용액은 동량의 neutralizing

buffer(0.1M Tris-HCl, 0.2M NaCl, 0.04% sodium azide, pH 7.8) 및 10배 buffer를 소량(1/20 체적비) 가하여 최종농도가 700μg/ml이 되게 하였다. 희석 교원질액 50μl-100μl(35-70mg)을 microwell내에 신속히 가하고 30°C에서 40시간 두었다(16시간 : 습, 24시간 : 건). 그 후 각 well은 증류수로 3회 세정하고 건조한 다음 상온에 두었다가 효소활성검사에 이용하였다.

② 교원질분해효소활성 검사

표준교원질 분해효소 및 치은열구액에서 채취후 추출된 효소용액을 35°C에 두었다가 교원질이 피복 처리된 well에 50μl씩 가하여 활성형효소정량 및 비활성형을 포함한 총효소정량을 하였다. 16시간 정도 35도에서 습한 상태로 배양한 후 기울여서 CAB로 2회 세정하고 증류수로 2회 세척하였으며 100ul의 염색액(0.25% Coomassie blue R-250 reagent, 10% acetic acid, 50% methanol)을 가하고 25°C에서 25분 둔 다음 액을 버리고 증류수로 3회 세정한 뒤 상온에서 건조시킨 다음 570nm에서의 흡광도를 automatic spectrophotometer(Beckmann Co. USA)에서 측정한다. 이때 사용하지 않은 microwell을 blank로 사용하였다.

교원질 분해효소 활성산정을 위한 잔여 교원질양의 표준곡선을 위해 800μg/ml용액을 2배씩 희석하여 50μl을 교원질 0.5ng~40μg을 각각 함유하도록 2well씩 피복시킨 다음, 동일한 방법으로 염색하여 흡광도를 측정하였으며 표준효소의 활성을 참조하여 열구액내 효소활성을 산정하였다. 이때 매번 반응시마다 대조군으로 열구액성분이 첨가되지 않은 교원질기질만의 반응계를 사용하였다. 효소활성은 37°C에서 1분간 교원질 1μg을 분해할 수 있는 활성을 1 Unit로 한 효소활성단위로 산정하였으며 총효소활성은 dilution factor를 고려하여 해당부위에서의 1분간의 총 치은열구액 유출 속도를 곱하여 산정하였다.

3) 진행형 치주염 환자에서의 치주질환 활성검사

(1) 대상환자 및 부위 선정

치주질환으로 전남대학교 병원 치주과에 내원 후 계속 관리중이거나 신환으로서 병력청취 시 진행기 치주염으로 인정되는 환자 중 다음 요건에 의해 12인을 선정하였다 : ① 치주농양이 빈번한 환자, ② 한면 또는 그 이상의 부위에서 2mm 이상의 치주조직 부착 상실(loss of periodontal attachment)이 진행된 경우 ③ 치주염으로 발치가 필요한 환자. 전신질환이 있거나 과거 3개월간 항생제를 복용한 경우는 배제하였다.

각 환자에서 다음의 병소를 선정하였다

- ① 염증상을 보이고 치은조직 및 골의 흡수 진행양상을 보이는 병소나 치주농양이나 치은염증 및 치주낭 탐침시 출혈상이 관찰된 진행성 병소(progressive site)
- ② 활성부위와 유사한 치주낭 깊이를 보이지만 주위치은염증이 없고 부착상실의 진행상이 관찰되지 않은 안정병소(comparably stable site)
- ③ 치은열구가 3mm미만이고 부착상실이 없는 대조부위(control site)
이 경우 치은의 염증상태를 점검하였다.

(2) 임상검사 및 방사선촬영

각 부위(환자당 최소 3부위)에서 다음 사항을 측정하였다.

- ① 치태지수(Silness & LÖe)
- ② 치은열구액 채취 및 양 측정
대상치면의 치은연상 치석 및 치태를 제거하고 타액으로부터 분리하고 건조시킨 다음 Periopaper strip을 각 환자당 5부위에서 치은열구내 1mm까지 삽입한 후 30초후에 제거하고 새로운 Periopaper(1~2장)를 다시 삽입하여 3분간 둔 후 제거하여 periotron 6000에서 양을 측정하였다.

채취한 열구액은 1.0ml microcentrifuge tube에 두어 생화학적 분석시까지 -60~-70°C에서 냉동 보관한다.

- ③ 치은열구출혈지수(Mühlemann & Son)
- ④ 치주낭 깊이 및 치주부착 상실도 측정
- ⑤ 구내방사선사진 촬영 및 공제적 방사선상 판독

(3) 치은열구액 교원질 분해효소 활성 검사

치은열구액은 채취 후 1개월 이내에 검사하였다. 보관된 Periopaper strip은 200µl의 CAB를 넣어 열구액을 추출하였다. Spectrophotometric collagenolytic assay법을 이용하여 검사하였으며 열구액내 효소활성은 unit로 표시하였다.

(4) 통계처리

각 환자에서 검사된 3부위에서 임상 및 생화학적 검사치의 비교를 위해 부위별 평균값을 산정하고 일원 변량분석 및 nonpaired Student-test을 시행하였다. 또한 질환 활성도 진단 및 예측의 척도에 관한 타당성 검정을 위해서는 치주질환 진행성에 대해 교원질효소 활성치의 sensitivity, specificity, overall agreement를 산정하였다.

diagnosis\Ds	disease present	disease absent
detectable	True Positive(TP)	False Positive(FP)
indetectable	False Negative(FN)	True Negative(TN)

$$\text{Sensitivity} = \text{TP} / (\text{TP} + \text{FN})$$

$$\text{Specificity} = \text{TN} / (\text{FP} + \text{TN})$$

$$\text{Overall agreement} = (\text{TP} + \text{TN}) / \text{total}$$

III. 결 과

1) 검사법의 비교

(1) 방사성표지 교원질을 이용한 radiofibril

assay

Bacterial collagenase는 10 μ g/ml의 농도로(실제 반응액내 양 : 100ng/10 μ l) 3시간 동안 반응시켰을 때 반응 상층액에서 50%의 방사성이 탐지되었으며, 효소없이 반응시 8.6%의 비특이 교원질분해를 보였다. 반면 vertebral collagenase인 tad pole collagenase는 2-10 μ g/ml(반응액내 20~100ng/10 μ l)의 농도로 24시간 반응시 12.1-18.9%의 교원질분해활성을 보였다. 환자 치은열구액 배양 실험시에도 0-34%의 분해율을 보였으며, 총 효소활성도 이와 유사하였다.

반응액의 전기영동검사시 bacterial collagenase는 24시간 후 교원질을 완전히 분해하여 염색된 band가 관찰되지 않았으나 Tad pole collagenase(10 μ g/ml)는 24시간 후 type I collagen α -chain이 3/4 α -chain으로 전환되는 양상을 관찰하였으며 densitometry분석시 41.3%의 교원질분해활성을 보였다. 한편 치주질환자의 치은열구액 반응액에서도 type I collagen α -chain의 3/4 α -chain으로의 전환상을 관찰하였으며 혈청 albumin에 해당하는 띠

를 관찰할 수 있어 치주질환시 치은열구액내 혈장단백의 유출상을 확인할 수 있었다. Densitometry분석시활성효소 9-12.5%, 총효소활성 43.8-53.1%를 나타내어 상층액의 방사성 분석에 의한 결과보다 높게 나타났다(Fig. 1).

(2) Spectrophotometric assay에 의한 분석

2-1) 교원질함량에 따른 흡광도

교원질농도 40 μ g~5 μ g범위에서는 570nm의 흡광도는 농도에 따라 선형관계를 나타냈으나 3.65 μ g미만의 농도에서는 일정한 흡광도를 유지하면서 plateau를 나타내어 그 이상의 교원질잔존시 교원질분해효소 활성를 정확하게 정량 분석할 수 있었다.

2-2) 표준교원질분해효소의 활성

효소활성은 bacterial collagenase의 경우 반응시간이 길수록 증가되어 1.5시간 경과후에는 0.25 μ g, 2.5시간 경과후에는 31.25ng, 3.5시간후에는 15.63ng이상의 농도에서 기질(약 35 μ g type I 교원질)을 거의 다 분해하였다. 활성 인지가 능 최하농도는 모든 반응 시간에서 반응 효소 농도 최소치인 1ng까지로 나타났다.

Fig. 1. Gel electrophoresis using 10% Laemmli gel of cleavage fragments of type I collagen by standard collagenase(Mwt marker : lane 1 and 11, Collagen substrate:lane 2 and 8, Bacterial collagenase:lane 3, Tad pole collagenase:lane 9 by enzyme of 6 μ g/ml, and lane 10 by enzyme of 10 μ g/ml) and GCF extract(lane 4-7). The collagen substrates were incubated with enzyme solution for 24 h at 25°C without(lane 4 and 6) or with adding 1.4mM APMA(lane 5 and 7). Note the collagen α -chains and their 3/4 length fragments, and also the serum albumin band.

Fig. 2. A freshly neutralized collagen solution(800mg/ml) was diluted with assay buffer, on ice, to give a range of collagen concentration. 50 μ l aliquots of each solution were gelled, washed in microwells, and then stained, and the Ab₅₇₀ was measured as described($Y=0.00984X + 0.00895$).

Table 1. Clinical features and enzyme activity of GCF sampling sites

group	No. site	GCF flow (30sec)	probing depth (mm)	active enzyme(mu)	total enzyme(mu)	ratio of active/total enzyme activity
Progressive	21	119(7.9)	6.4(0.4)	13.5(2.7)	15.8(3.1)	0.90(0.05)
Stable	12	63(9.5)	5.7(0.4)	3.4(1.1)	6.9(2.6)	0.52(0.12)
Gingivitis	5	97(17)	2.8(0.2)	7.4(3.1)	17.0(2.2)	0.53(0.23)
Healthy	6	51(11)	2.8(0.4)	1.7(0.6)	5.2(2.1)	0.53(0.18)

Values are mean(SE).

Table 2. Statistical analysis by ANOVA and Student t-test

	group	GCF flow (30sec)	active enzyme(mu)	total enzyme(mu)	ratio of active/total enzyme activity
ANOVA	***	*	ND	**	
t-test	P>G	ND	ND	ND	***
	P>S	***	*	****	
	G>S	*	ND	*	ND
	S>H	ND	ND	ND	ND
	G>H	*	*	**	ND

*** p<0.001, ** p<0.01, * p<0.05

ND : There's no difference between 2 groups by nonpaired Student t-test at P<0.05.

P : Progressive, S: Comparably stable, G : Gingivitis, H : Healthy

3.5시간 반응후 bacterial collagenase 효소활성은 Sigma사의 효소(720U/mg)에서는 1~3.9ng까지의 효소활성이 인지되었고 다른 효소는

15.6~31.2ng까지의 활성이 인지되었다. 반면 tad pole collagenase의 경우 62.5~125ng까지만 활성이 인지되어 bacterial collagenase활성에 비

해 활성도가 낮은 것으로 나타났다.

(3) 치주질환자 치은열구액내 교원질 분해 효소활성

3-1) 임상소견및 교원질 분해효소 활성

총 12명 환자로부터의 치은열구액내 교원질 분해효소 활성검사를 위해 진행병소 21부위, 안정병소 12부위, 치은염 5부위, 또는 건강부위 6부위가 검사되었고 치은열구액이 채취되었다. 30초간의 치은열구액 유출량, 치주낭깊이, 치은염증정도는 Table 1에 정리되어 있다.

교원질분해효소는 개인차이가 매우 크게 나타났다. 치은액유출량 및 활성교원질효소양에 대한 일원변량분석 결과 병소의 임상상태에 따라 차이가 있는 것으로 관찰되었다. Student T-Test를 이용한 구간비교시 치은열구액 유출량 및 활성효소양 모두 진행병소, 치은염병소, 안정치주염병소, 건강부위순으로 작아졌다. 치주질환진행병소와 비파괴병소(안정병소, 치은염병소, 건강부위)의 비교시 활성효소/총효소의 비가 유의하게 차이가 있는 것으로 나타났다.

총 효소활성은 일원변량분석결과 전체적으로는 차이가 없는 것으로 나타났으나 두 부위 간에는 Student t-test시 활성치주병소가 안정병소보다 많이 나타났고 치은염병소에서는 활성치주병소만큼 많이 나타났으며 치주낭이 깊지만 안정된 병소는 건강부위와 거의 유사한 총효소활성을 보였다(Table 2, Fig. 3).

단위시간당 치은열구액 유출량이 클수록 활성및 총 효소활성이 증가하였고(Fig 4) 치주낭 깊이는 효소활성에 유의할 만한 영향을 미치지 않았다(Fig. 5).

3-2) 치주질환 활성도 진단법으로의 유용도

교원질분해효소 활성이 진행성병소의 진단 척도로 유용한지 평가하기 위하여 specificity, sensitivity를 산출하였다. 활성교원질분해효소의 활성 5-12mu의 역치수준에서 sensitivity는 57.1-80.9%, specificity는 69.6-82.6%, overall agreement는 70.5~75%였으며, 5mu를 역치(건강부위평균 + 2 SD=4.7mU)로 평가시 각각 80.9%, 69.6%, 75%의 수치를 보여 specificity가 낮은 경향을 나타내었다(Table 3).

0.6-0.9의 활성효소/총효소비를 역치수준으

Fig. 3. Comparison of collagenolytic enzyme activity according to the periodontal status of the sites.

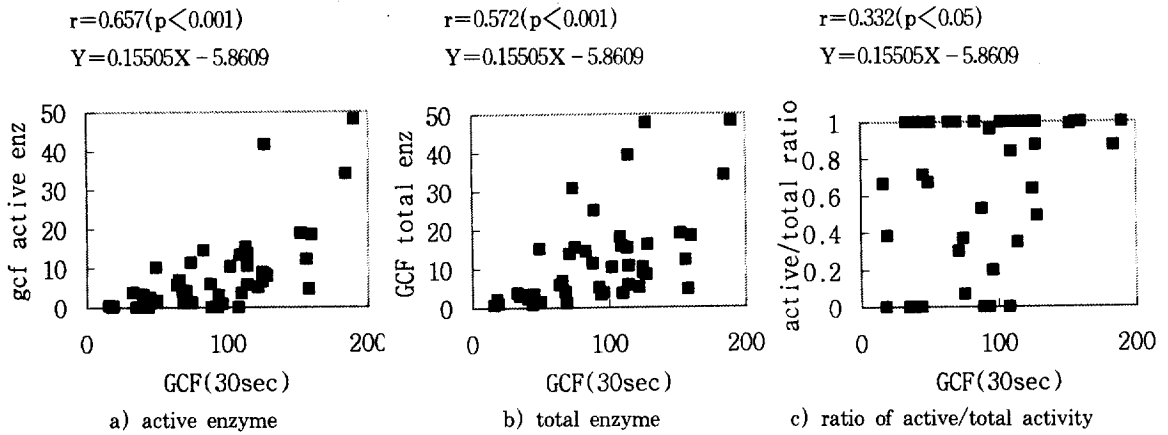


Fig. 4. Scatter diagram for the pattern of enzyme activity according to the GCF flow rate of the sampled sites.

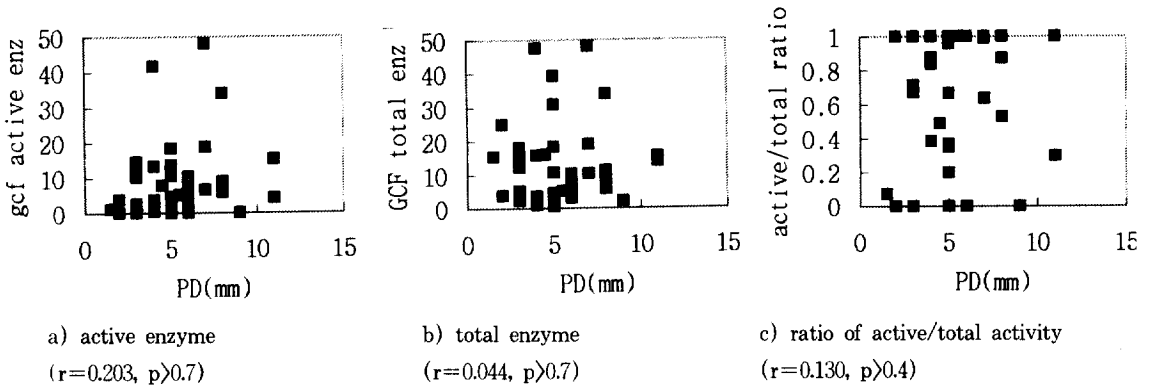


Fig. 5. Scatter diagram for the pattern of enzyme activity according to the probing depth of the sampled sites.

Table 3. Evaluation of the diagnostic value using active collagenolytic activity for periodontal disease activity

threshold level	sensitivity (%)	specificity (%)	overall agreement (%)
12mu	52.4	91.3	72.7
10mu	57.1	82.6	70.5
7mu	66.6	78.4	72.7
5mu	80.9	69.6	75.0

로 이용한 경우 sensitivity는 71.4-90.5%, specificity는 58.8-65.2%, overall agreement 65.9~72.7%로 나타났다. 0.8(안정병소치 + 2SE=0.77)을 역치로 이용시 각각 85.7%, 65.2%, 72.7%를 나타내어 specificity가 약간 낮

은 경향을 보였다(Table 4).

IV. 고 찰

치주질환은 연령에 따라 그 유병률이 증가

Table 4. Evaluation of the diagnostic value using the ratio of active/total collagenolytic activity for periodontal disease progression

threshold level	sensitivity(%)	specificity(%)	overall agreement(%)
0.9	66.7	65.2	65.9
0.8	85.7	65.2	72.7
0.7	85.7	60.9	65.9
0.6	90.5	56.6	72.7

하여 35세 이상의 성인인구의 85% 이상에서 치주질환을 가지는 것으로 알려져 있다. 또한 최근 과학 및 의학의 발달에 따라 노인인구가 증가되면서 치주치료 요구도도 증가되는 추세이다. 그런데 이 질환은 활동기와 회복기를 갖고 반복적으로 파괴되는 일과성이며 주기적인 진행양상을 가진다고 받아들여지고 있다.¹⁾ 처치후 치유양상도 치료전에 질환 활성도가 존재하지 않는 병소에서는 치료후 확실한 처치효과를 기대하기 힘들고, 경우에 따라서는 과거 질환의 심도에 근거하여 치료를 하는 경우 과잉처치가 될 수도 있다. 따라서 언제, 어느 부위에 치료가 요구되며 치료후 개선이 초래될 수 있는지 규명하기 위해서도 활동기를 진단하고 질환의 활성을 인지할 수 있는 신뢰도 높은 평가방법이 요구된다.

치은열구액은 염증이 증가하거나 성분의 변화를 보이며 채취시 손상이 적은 수단으로서 간단한 채취방법을 통해 좁은 병소 및 대상부위 결합조직에서 대사상의 변화에 대한 분석이 가능하고 치은 및 치주지수 등을 이용한 임상적 질환 평가와 병용시 질환 상태에 대한 정보를 제공할 수 있다. 이미 여러 연구를 통해 열구액내 단백질, 숙주및 세균 산물, 염증매개물질, 조직생성 및 파괴과정 중의 대사산물등에 대한 검사가 이루어졌으며 많은 관심이 주어지고 있다.¹²⁾

본 연구의 1차적 목적은 교원질분해효소 연구에 있어서 Coomassie blue 염색에 의한 microtiter spectrophotometric assay의 유용성을

평가하고자 하는 것이다. 이 검사 방법의 주 잇점은 조작이 간편하고 최소한의 시약만을 필요로 하며 방사성에 대한 노출위험이 없고 경제적이며 신속하고 비교적 안전하며 재현성이 높고 예민하며 정량이 가능하다. Fluorometric collagenase assay이용시에는 Chromophore가 검사시료(crude sample)에 포함될 수 있으므로 결과에 영향을 미칠 수 있는 단점이 있다.

본 검사법에 의해서는 정량화를 위해 spectrophotometer가 이용되지만 열구액 시료에 교원질 분해효소가 포함된 경우 장비 없이 청색조의 농도변화가 육안으로도 인지될 수 있으리라 기대하였는데, 교원질 양 3.5~5 μ g차이는 육안적으로 판별가능하여 교원질 분해효소 활성이 5mU이상인 열구액시료를 16시간 배양한 후에야 육안적으로 인지할 수 있었다. 반면 총 단백질분해효소활성의 검사에 이용되는 Azocoll(Calbiochem Co. USA) 분석법에서는 단백질분해효소에 의한 적색소의 방출정도에 따라 측정하는 방법으로 효소활성도를 육안적으로 판별하기는 용이하였으나, 표준효소 활성을 이용한 분석시 교원질분해효소의 민감도가 Nethery의 방법²⁴⁾에 비해 매우 저하되어 있어 교원질분해효소활성의 평가에는 부적합하였다.

교원질분해효소활성검사법의 인지민감도(Detection limit)에 대해 bacterial collagenase를 이용한 경우, Nethery등²⁴⁾, Johnson - Wint²⁷⁾은 10ng, Birkedal - Hansen와 Dano⁶⁾는 1ng, Levenson²³⁾는 7.5ng이하로 보고하였는데 본 연구에서는 Sigma사의 세균성 교원질분해효소

(720U/mg) 1~3.9ng(1.4-0.7mU), NEN사의 효소는 15.6~31.2ng까지의 활성을 인지할 수 있었다. 이에 비해 척추동물의 표준교원질분해효소에 대한 활성인지는 Nethery등²⁴⁾의 경우, crude sample에서 16시간 후 60 μ g으로 보고하였는데 본연구에서 tad pole collagenase의 경우 62.5~125ng까지만 활성이 인지되어 세균성 교원질분해효소에 비해 활성도가 낮은 것으로 나타났다. 반면에 Collagenase assay kit를 이용한 radiofibril assay시 세균(3시간 반응) 및 척추동물(24시간 반응) 교원질분해효소활성 인지는 20ng정도로 추정되었으며 효소양 증가에 따른 반응상의 기울기가 매우 낮았다.

Spectrophotometric assay결과에 대한 실험환경의 영향으로 SDS, CH₃COOH가 효소활성을 저해하는 것으로 나타났고 collagen을 함유한 microplate을 1주 이상 건조상태에서 보관한 후 사용하면 교원질분해효소에 의한 용해도가 저하되었으며 이를 방지하기 위해 Nethery등²⁴⁾, Johnson - Wint²⁷⁾은 건조상태로 두지 않고 assay buffer를 추가하여 보관하는 것이 유리하다고 하였다.

본 검사법의 한계점으로서 지적될 수 있는 사항으로 교원질에 결합하는 단백질(잔여교원질)에 의해 염색시 영향을 받을 수 있으므로 시료의 구성성분에 대해 고려해야 한다. 이러한 영향은 단백질분해효소를 선택적으로 억제하는 성분을 사용하여 막을 수 있다. 둘째로 염색 과정으로 인해 spectrophotometer에 의해 인지가 가능한 최고 기질농도가 결정되는데 염색 시간을 짧게 하거나 Coomassie blue의 extinction coefficient가 낮은 파장을 선택함으로써 교원질 기질의 사용 농도를 높일 수 있다. Nethery등의 실험에서는 1~5 μ g, 본 연구에서도 3.65~5 μ g이하의 기질 농도에서 흡광도의 변화가 비선형관계를 보였는데 이는 소량의 교원질이 gel화에 불리하거나 microplate수지면에 잘 부착하지 않고 용해되기 때문이라 추정된다. 셋째로 mammalian collagenase는 initial

lag phase를 가지므로 specific activity산정이 어렵다. 마지막으로 다른 검사법에서와 같이 본 검사방법도 collagen peptide bond의 분해를 측정하지 않고 교원질의 용해도를 측정하는데 이는 시료내 포함된 다른 단백질분해효소의 존재로 영향받을 수 있는 생성물질의 용해도에 따라 다르다. 이러한 경우 오염된 다른 단백질분해효소의 존재로 인해 교원질 분해물질의 용해도가 증가되고 효소활성인지도가 증가될 수 있다. 이와 관련된 문제점으로 검사방법의 trypsin susceptibility를 들 수 있는데 Nethery등²⁴⁾은 6시간 후 18% 기질 소실, Levenson²³⁾은 3시간 후 30%의 소실을 보고하여 radiolabeled collagen 이용시의 20~30시간 후 8~12% 소실에 비해 매우 높게 나타났다. 이에 대해 이들은 배양후 세척시 soluble peptide가 씻겨진 것을 이유로 들었는데 trypsin hydrolyzed peptide가 collagenase hydrolyzed peptide보다 더 용해성이 높거나 염색도가 저하될 수 있다고 추정하였다. 남은 불용성 collagen에 친화력이 있는 peptide가 세척시 제거된다면, 세척과정에 의해 용해정도를 좀더 정확하게 결정하게 된다. 따라서 이 검사에 이용되는 기질로는 변성교원질을 제거하기 위해 salt precipitation에 의해 고도로 정제된 것을 사용하는 것이 바람직하다고 하였다. Nethery등²⁴⁾의 연구에서 Levenson²³⁾에서보다 trypsin susceptibility가 낮았는데 이는 기질이 원래상태에 더 가깝게 gel화되었기 때문이라 하였다. 본 연구방법에서와 같이 기질의 건조이전에 gel화 기간 및 온도를 조절함으로써 microfibril/fibril의 상태를 조절할 수 있는데 Nethery등²⁴⁾이 gel화 및 건조 과정을 동시에 시도하면 trypsin용해에 대한 저항성이 감소된다고 하였다. 따라서 본 실험에서는 gel화 16시간, 건조 24시간-30시간으로 시행하여 trypsin action에 저항하도록 하였다. 본 연구에서는 gel화 및 건조 후 1일에 1 μ g-1mg trypsin을 검사하였는데 교원질분해효소액을 포함하지 않은 교원질 well과 유사한 흡광

도를 보임으로써 trypsin에 예민하지 않음을 보였다.

한편 교원질 분해양상을 비교하기 위해 시행한 전기영동분석결과 치주질환자의 치은열구액 반응액에서는 세균성 효소의 분해양상과 달리 type I collagen α -chain의 3/4 α -chain으로의 전환상을 관찰하여 효소가 숙주의 백혈구(또는 섬유아세포)에서 주로 기원한다고 추정할 수 있었으며 혈청 albumin에 해당하는 띠를 관찰할 수 있어 치주질환시 치은열구액 내 혈장단백의 유출상을 확인할 수 있었다. 이는 Hakarrainen등³¹⁾이 치주낭이 깊은 부위에서 채취한 열구액의 분석 결과와 매우 유사하다.

본 연구의 2차적 목적으로서 교원질분해효소 활성검사가 질환활성도 진단법으로 타당한지 평가하였다. Gangbar등¹¹⁾은 구강양치액에서, Lee등²¹⁾은 치은열구액에서 치주질환의 치료전 또는 치료후 점검과정에서 교원질분해효소 활성이 치료전에 증가하고 처치후 감소하고 치은염증과 연관되어 있다고 보고하면서 이 효소의 치주질환진행 활성도로서의 사용가능성을 제시하였다. Lee등²⁸⁾은 진행병소에서 안정병소에 비해 활성 교원질분해효소가 5~6배 증가하였고, 치은염증이 심한 치은염병소에서 latent enzyme이 염증이 없는 치주병소에 비해 2배 이상 증가하였고, 활성 및 총효소활성비는 진행성 병소에서 안정병소 및 치은병소에 비해 50% 증가하였다고 하였다. 또한 이들은 한 치주병소의 장기적 효소활성검사중 조직파괴 1~2개월전에 교원질분해효소 활성이 이전에 비해 41% 증가하기 시작하여 총 3.65×10^{-2} CU(약 30mU)가 축적되면 치주조직의 부착상실이 일어났다고 보고했으며 급성진행형치주염병소에서는 22mU를 관찰하여 치주결합조직의 파괴를 위한 교원질분해효소 활성의 역치 개념을 제안하였고 치은열구액내 교원질 분해효소활성이 치주질환활성도의 진단척도로 이용될 수 있다고 하였다.

본 연구에서 교원질분해효소 활성은 Lee등²¹⁾

에서와 같이 개인차이가 매우 크게 나타났다. Lee등²⁸⁾의 보고와 같이 치은액유출량 및 활성 교원질효소양은 병소의 임상상태에 따라 다르게 관찰되었다. Nonpaired Student t-test를 이용한 군간비교시 치은열구액 유출량 및 활성 효소양 모두진행병소, 치은염병소, 안정치주염병소, 건강부위순으로 작아졌다. 총효소활성은 활성치주병소와 치은염증병소가 안정병소보다 2-3배 크게 나타났고 치주낭이 깊지만 안정된 병소는 건강부위와 거의 유사한 총효소활성을 보였다. 치은열구액 유출속도가 클수록 활성 및 총 효소활성이 증가하여 치주낭내 염증상과의 상관관계가 비교적 높았으며 과거 질환진행의 증거인 현재의 치주낭깊이는 이들 효소 활성과의 상관관계가 매우 약하게 나타났다. 활성효소/총효소의 비율은 치주질환진행병소에서 비파괴병소(안정병소,치은염병소, 건강부위)에 비해 약 2배 정도 크게 나타났다. 5mU의 활성효소 및 활성효소/총효소활성의 비 0.8을 진단척도로 사용할 수 있는지 타당성검정을 한 결과, 각각 sensitivity 80.9%, 85.7%, specificity 69.6%, 65.2%, overall agreement 75%, 72.7%가 산정되어 specificity가 낮은 경향을 나타내었다. 그 이유로 본 연구에 포함된 병소가 조직파괴병소로 진단된 시기가 실제 진행시기보다 늦어진 경우도 있을 수 있어 진행병소의 열구액 채취시기가 조직파괴가 인지된 직후이므로 이전의 활성이 소실된 연후에 이루어져 효소활성이 낮아진 열구액이 포함되었기 때문이 아닌가 추정된다.^{19, 21, 28)} Offenbacher등³⁰⁾은 질환 진행성의 진단척도로서의 PGE에 대한 연구에서 sensitivity 76%, specificity 96%, overall agreement 89%로서 유용성을 보고한 반면 본 교원질효소활성 검사는 specificity면에서 다소 떨어지지만 11개의 임상적 척도를 이용한 Discriminant analysis를 행하여 Haffajee등³¹⁾이 보고한 sensitivity 65%, specificity 86%, overall agreement 80.1%와 거의 유사한 결과를 보였다.

본 연구를 통해 치주질환의 진행시 치주조직내 주성분인 교원질의 분해가능성을 반영하는 열구액내 효소활성의 증가가 유의하게 관찰되어 고위험집단에서의 질환활성도 진단방법으로 이용될 수 있음을 알 수 있었다. 또한 효소활성 검사법으로 spectrophotometric method가 예민하고 정확하며 용이한 방법임이 확인되었으며 치은열구액 채취시 기질을 미리 흡착시킨 strip 개발이 가능하며 따라서 chair side gingival crevicular fluid collagenolytic assay의 기본이 될 수도 있다. 또한 교원질분해효소활성에 대한 연구는 치주질환의 항균치치에 주로 사용되는 테트라사이클린약제의 국소적인 치근면도포시 치주질환 진행억제효과 및 치주치료후 유지관리기중 점검방법으로 유용한 질환활성도 진단법으로 유용할 것이다.

V. 결 론

치주질환 병소의 치은열구액내 교원질분해효소의 활성검사 방법중 spectrophotometric collagenolytic assay가 임상적으로 유용한지 알아보고, 치주질환 활성도 진단법으로서의 이 교원질분해효소활성검사의 타당성을 평가하기 위해 본 연구를 시행하였다

먼저 표준 교원질분해효소를 이용한 radiofibril assay와 spectrophotometric collagenolytic assay를 각각 행하여 효소활성의 인지민 감도를 비교한 결과 두 방법간에 큰 차이는 없었다.

또한 치주질환자 12인의 진행병소, 안정병소, 대조부위에서 치은열구액을 채취한 후 16시간 spectrophotometric collagenolytic assay로 교원질분해효소 활성을 검사하였다. 그 결과 활성효소양은 진행병소, 치은염병소, 안정치주염병소, 건강부위순으로 작아졌다. 총효소활성은 활성치주병소와 치은염증병소가 안정병소보다 2-3배 크게 나타났고 치주낭이 깊지만 안정된 병

소는 건강부위와 거의 유사한 총효소활성을 보였다. 활성효소/총효소의 비는 치주질환진행병소에서 비파괴병소(안정병소, 치은염병소, 건강부위)에 비해 약 2배 정도 크게 나타났다. 치은열구액 유출속도가 클수록 활성 및 총효소활성이 증가하여 치주낭내 염증상태와의 상관관계가 비교적 높았다. 5mU의 활성효소 및 활성효소/총효소활성의 비 0.8을 진단척도로 사용시 각각 sensitivity 80.9%, 85.7%, specificity 69.6%, 65.2%, overall agreement 75%, 72.7%가 산정되어 치주질환 진행성의 진단에 유용할 것으로 추정되었다.

참고문헌

1. Socransky SS, Haffajee AD, Goodson JM, and Lindhe J: New concepts of destructive-periodontal disease. *J Clin Periodontol* 11 : 21-32, 1984.
2. Uitto VJ, Turto H, and Saxen L: Extraction of collagenase from human gingiva, *J Periodont Res* 12 : 207-214, 1978.
3. Sorsa T, Soumalainen K, and Uitto VJ: The role of gingival crevicular fluid and salivary interstitial collagenases in human periodontal diseases. *Archs Oral Biol* 35(suppl) : 193-196, 1990.
4. Fullmer HM, and Gibson W: Collagenolytic activity in gingiva of man. *Nature* 209 : 728-729, 1966.
5. Fullmer HM, Gibson W, Lazarus SS et al: The origin of collagenase in periodontal tissues of man. *J Dent Res* 48 : 641-651, 1969.
6. Birkdall-Hansen H, and Dano K: A sensitive collagenase assay using [³H] collagen labeled by reaction with pyridoxal phosphate and [³H] borohydride. *Anal*

- Biochem 115 : 18-26, 1981.
7. Geiger S, Harper E: Human gingival collagenase in periodontal disease: The release of collagenase and the breakdown of collagen in gingival explants. *J Dent Res* 59 : 11-16, 1980.
 8. Meiki MC, Hembry RM, Holley J, Horton C, McFarlane CG, and Reynolds JJ: Immunolocalization of MMPs and TIMP-1 in human gingival tissues from periodontitis patients. *J Periodont Res* 29 : 118-126, 1994.
 9. Uitto VJ, and Raeste AM: Activation of latent collagenase of human leukocytes and gingival fluid by bacterial plaque. *J Dent Res* 57 : 844-841, 1978.
 10. Overall CM, Wiebkin OW, and Thonard JC: Demonstration of tissue collagenase activity in vivo and its relationship to inflammation severity in human gingiva. *J Periodont Res* 22 : 81-88, 1987.
 11. Gangbar S, Overall CM, McCulloch CAG, 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.
 12. Cimasoni G: Crevicular fluid. updated Monographs in oral science. Vol. 12. 129-145 : S. Karger. 1983.
 13. Golub LM, Siegel K, Ramarmurthy NS, and Mandel ID: Some characteristic of collagenase activity in gingival crevicular fluid and its relationship to gingival diseases in humans. *J Dent Res* 55 : 1049-1057, 1976.
 14. Kowashi Y, Jaccard F, and Cimasoni G: Increase of free collagenase and neutral protease activities in the gingival crevice during experimental gingivitis in man. *Arch Oral Biol* 24 : 645-650, 1979.
 15. Sodek J, Hurum S, and Feng J: A highly sensitive and specific assay for vertebrate collagenase. *J Periodont Res* 16 : 425-433, 1981.
 16. Kryshtalskyj E, Sodek J, and Ferrier JM: Correlation of collagenolytic enzymes and inhibitor in gingival crevicular fluid with clinical and changes in experimental periodontitis in the dog. *Arch Oral Biol* 31 : 21-31, 1986.
 17. Kryshtalskyj E, and Sodek J: Nature of collagenolytic enzyme and inhibitor activities fluid in crevicular fluid from healthy and inflamed periodontal tissues of beagle dogs. *J Periodont Res* 22 : 264-269, 1987.
 18. Larivee J, Sodek J, and Ferrier JM: Collagenase and collagenase inhibitor activity in sulcal fluid of patients receiving treatment for localized juvenile periodontitis. *J Periodont Res* 21 : 702-715, 1986.
 19. Villela B, Cogen RB, Bartolucci AA, Birkedal-Hansen HL: 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.
 20. 고규섭, 손성희: 성인형 치주염과 급성 진행형 치주염에 있어서 치은 열구액 양과 교원질용해 작용 및 치은 연하 세균의 상호 관계에 대한 연구. 대한치주과학회지 제14권(1) : 75-86, 1984.
 21. Lee W, Aiken S, Kulkarni GF, Birek P, Overall CM, Sodek J, and McCulloch

- CAG: Collagenase activity in recurrent - periodontitis: relationship to disease progression and doxycycline therapy. *J Periodont Res* 26 : 479 - 485, 1991.
22. Soumalainen K, Sorsa T, Saxen L, Vauhkonen M, and Uitto VJ: Collagenase activity in gingival crevicular fluid of patients with juvenile periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 6 : 24 - 29, 1991.
 23. Levenson R: A collagen film microassay for tissue collagenase. *Anal Biochem* 76 : 579 - 588, 1976.
 24. Nethery A, Lyons JG, and O'Grady RL: A spectrophotometric collagenase assay. *Anal Biochem* 159 : 390 - 395, 1986.
 25. Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 : 680 - 685, 1970.
 26. Lamster IB, Oshrain RL, Harper DS, Celenti RS, Hovliaras CA, Gordon JM: Enzyme activity in crevicular fluid for detection and prediction of clinical attachment loss in patients with chronic adult periodontitis. *J Periodontol* 59 : 516 - 523, 1988.
 27. Johnson - Wint B : *Anal Biochem* 104 : 175 - 1181, 1980.
 28. Hakkarainen K, Uitto VJ, and Ainamo J: Collagenase activity and protein content of sulcular fluid after scaling and occlusal adjustment of teeth with deep periodontal pockets. *J Periodont Res* 23 : 204 - 210, 1988.
 29. Lee W, Atkin S, Sodek J, and McCulloch CAG: Evidence of a direct relationship between neutrophil collagenase activity and periodontal tissue destruction in vivo: role of active enzyme in human periodontitis. *J Periodont Res* 30 : 23 - 33, 1995.
 30. Offenbacher S, Odle BM, and Van Dyke TE: The use of crevicular fluid prostaglandine E2 levels as a predictor of periodontal attachment loss. *J Periodont Res* 21 : 101 - 112, 1986.
 31. Haffajee AD, Socransky SS, Lindhe J, Kent RL, Okamoto H, and Yoneyama T: Clinical risk indicators for periodontal attachment loss. *J Clin Periodontol* 18 : 117 - 125, 1991.

Collagenolytic Activity Of Gingival Crevicular Fluid In Progressive Periodontitis

Hyun - Ju Chung

Dept. of Periodontology, College of Dentistry, Chon - nam National University

There were many reports that elevations in the levels of active and latent collagenase in gingival crevicular fluid(GCF) have been correlated positively with periodontal disease activity. To provide a simple diagnostic approach for testing GCF collagenolytic activity, the detection limit of enzyme activity was compared using radiofibril assay(Sodek et al. 1981) and spectrophotometric collagenolytic assay(Nethery et al. 1986). The detection limits of both assay for standard bacterial enzyme were similar and the radiofibril assay showed a little(1/2) lower detection limit for tad pole collagenase. To evaluate the relationship between periodontal tissue destruction and the collagenolytic activity, GCF was collected, and latent and active enzyme activities were measured by a spectrophotometric collagenolytic assay. Twelve subjects showing progressive lesions were selected according to the presence of immediate tissue destruction, frequent abscess formation, and increasing need for tooth extraction, and the absence of underlying systemic disease and previous antibiotic medication history within 6 months. Comparisons were made between sites with either: 1) inflammation with a previous history of progressive loss of periodontal tissue and bone support(21 progressive sites): 2) previous history of bone loss and periodontal destruction but now clinically stable(12 comparably stable sites): or 3) no loss of periodontal tissue and bone support(11 control sites including 5 gingivitis sites and 6 healthy sites). Active collagenase activity was the highest in the progressive sites and decreased in the order of the gingivitis sites, the stable sites, and the healthy sites. The total enzyme activity was 2~3 fold higher in the progressive sites and the gingivitis sites, compared to the stable and the healthy sites. The ratio of active to total collagenolytic activity was twice in the progressive sites. Analysis of active collagenase level(5mU) and the ratio of active to total collagenolytic activity(0.8) as a diagnostic test indicates that these measurements have the sensitivity of 0.81 and 0.86, the specificity of 0.70 and 0.65, and the overall agreement of 0.75 and 0.73, respectively. Thus, this method has significant merits as a diagnostic tool to determine whether the site is in a state of remission or progression.

Key word : disease activity collagenase, spectrophotometry, gingival crevicular fluid.