

Superoxide Dismutase가 치주인대 세포에 미치는 면역세포학적 연구

강현구 · 강정구 · 유형근 · 신형식

원광대학교 치과대학 치주과학교실

I. 서 론

치주질환은 여러 국소적인 요인에 의해 발생되고 다양한 임상증상을 나타내는데 국소적 인자로서는 세균성 치태와 세균 대사 산물 등이 있다. 치태 세균의 조직내 침투에 따라 미생물의 분비물질들은 염증체계를 활성화 시켜 이차적으로 치주조직에 영향을 미칠 수 있는데¹⁾ 염증 세포들은 조직내로 침투한 세균이나 항원을 인식한 후 활성화 되어 산소 소비의 증가, 육탄당 일인산염 회로(hexose monophosphate shunt)를 통한 당대사의 증가 및 반응성 산소 유리기와 이들의 대사 산물의 생성을 특징으로 하는 사립체호흡사슬(mitochondrial respiratory burst)를 겪게되며, 모든 호기성세포들은 이 호흡사슬을 통해 산소유리기를 생성하게 된다. 이중 superoxide radical은 산소분자에 전자하나가 더 부가되어 있어 음이온 형태를 취하는 것으로($O_2 + e \rightarrow O_2^-$) 산소독성의 중추적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다²⁻⁵⁾.

Superoxide dismutase(이하 SOD)는 O_2^- 가 과산화수소와 산소로 전환되는 것을 촉진하는 금속함유 효소이며 superoxide radical 을 제거하여 염증반응에서 중요한 역할을 하고 세포독성을 방지한다⁶⁻⁸⁾.

염증세포는 살균 작용에서 활성화된 산소를 생산하며 직접 주위조직으로 해를 가하는 동안 염증자체가 허혈성 손상을 일으킬수 있으며

생성된 활성산소들은 내독성쇼크, 화상에 의한 혈장량 감소, 동맥경화증등에 역할을 한다고 한다⁹⁾. Grandy등¹⁰⁾에 의하면 SOD나 catalase 같은 항산화 효소는 랑거한스 섬의 β -세포의 기능 유지에 도움을 준다고 보고하였고, Wong등¹¹⁾은 폐암세포의 처치에 SOD를 이용하는 방법을 연구하였으며 백서, 토끼, 돼지 등에서 내독소 유발 폐혈증과 관련된 폐손상 발생이 억제된다고 하였다¹²⁾.

SOD나 catalase는 상당한 소염작용을 가지는데 MacCormic등¹³⁾은 폐렴 및 피부염의 치료에 SOD를 이용하였고 그 외 여러 염증질환과 퇴행성 질환에서 안전하고 효과적인 것으로 보고되어왔으며, 또한 많은 소염제(indomethacin, Acetaminophene, imidazole, phenylbutazone)들의 작용도 활성화된 산소계와 연관이 있다고 한다¹⁴⁾.

치주질환과 활성산소와의 관련성에 대해서는 Asman등¹⁵⁾이 유년형 치주염 환자들에서 말초 혈액내 다형핵백혈구에 의한 O_2^- 생성이 증가되었음을 보고하였고, 최근 Kimura등¹⁶⁾은 성인형 치주염, 국소 및 전신 유년형 치주염 환자에서 활성 산소유리기 생성이 증가되나 치석 제거술, 치근면 활택술과 같은 초기 치료 후에 정상으로 회복됨을 확인하고 활성 산소유리기의 생성정도가 치주조직의 염증상태를 반영할수 있다고 보고하였으며, 김¹⁷⁾ 등은 백서의 실험적 치은염에 SOD를 투여 후 염증감소가 있다고

보고하여 여에 대한 관심이 증가되어 왔다.

산소유리기의 생성은 호기성 대사의 일부이지만 이 물질들은 고도로 반응성이어서 조직 내에 많이 존재할 경우 교원질이나, 상피세포 기저막의 주성분인 hyaluronic acid, proteoglycan과 같은 세포외기질 성분의 탈중합(depolymerization)에 영향을 끼칠뿐만 아니라 세포의 단백질, 핵산 그리고 막지질 등을 파괴할 수 있다¹⁸⁻²⁰.

Proliferating cell nuclear antigen(이하 PCNA)는 증식중인 세포와 DNA를 합성하는 세포를 면역염색을 통해 알수 있는 대표적인 것으로서 증식세포내에 존재하는 DNA polymerase의 보조단백질이며 세포주기중 주로 G1 후기부터 S기 전반에 걸쳐 합성된다^{21,22}. 또한 PCNA는 분자량이 36 kDa으로 DNA합성에 필수적인 산성단백질이며, 증식중인 세포내에서 제한적으로 나타난다는 점을 이용하여 PCNA 지수를 질병의 진단에 사용하고 있으며 치은 증식의 경우에도 사용되었으나²³ *in vitro*에서 SOD와의 관련성은 아직 밝혀지지 않았다.

교원질은 인체결체조직중에서 가장 많은 부분을 차지하는 단백질로써 그중 제1형 교원질은 가장 풍부한 유형의 교원질이며 그 분자는 두 개의 $\alpha_1(I)$ chain과 하나의 α_2 chain이 결합한 형태로 $[\alpha_1(I)]_2\alpha_2$ 로 표시되고 64nm 마다 특징적인 횡문을 보이는 섬유형의 형태로 피부, 힘줄, 인대, 근막등의 연조직에서 뿐 만 아니라 골, 상아질, 백악질등의 경조직에도 존재하며 주로 장력에 대한 저항의 기능을 갖는다^{24,25}. Narayanan²⁶ 등은 치은에 존재하는 교원질중에서 제 1형과 제 3형 교원질이 전체의 98%를 차지한다고 하였고 여러 면역조직화학적 연구에서 치주인대의 주된 구성분이 제 1형과 제 3형 교원질임을 확인하였지만 산소 유리기와 제1형 교원질과의 관계에 대한 연구는 미비하였다²⁷⁻³¹.

Fibronectin은 분자량이 200 kDa에서 250 kDa에 이르는 2개의 소단위가 disulfide 결합에 의해 연결되어 이루어진 당단백질이다³². Fibronectin은 세포 fibronectin과 혈장 fibronectin으로 구분되며 세포 fibronectin은 비수용성

단백질과 유사한 구조를 가지며 결합조직 및 기저막에 존재한다. 혈장 fibronectin은 수용성 단백질과 유사한 구조를 가지며, 혈장, 뇌척수액등의 체액에 존재한다. Fibronectin은 세포 부착성, 세포 골격형성, 세포의 변형, 세포분화, 세포이동과 화학주성에 중요한 역할을 하며 이물질과 세균에 대한 대식세포의 탐식작용에 관여하여 조직방어 기전에 중요한 역할을 한다³³. 또한 조직손상부의 섬유소 혈병위에 피막을 형성하여 교원질 침착을 도움으로써 지혈 및 창상치유에도 커다란 역할을 한다고 하였다³⁴. 또한 배양된 섬유모세포에서도 분비되며, 세포 부착에 주된 역할을 하는 것으로 알려져 있어서³⁵⁻³⁸, 결합조직 기질의 주 성분인 fibronectin 과 세포외기질성분인 교원질을 동시에 연구할 필요가 있다.

염증의 정상방어기전과 관련되어 섬유모세포와 교원질에 손상을 줄 수 있는 활성산소(O_2^- , OH^-) 및 다양한 단백질분해효소등을 염증세포가 유리한다고 알려져 왔는데³⁹⁻⁴² 본 연구는 분리 배양한 치주인대세포에 SOD를 세균내독소와 동시 투여후 세포활성 변화를 밝히고 세포 증식성을 알아보기 위해 PCNA에 대한 면역세포화학적 염색을 하여 PCNA지수를 구하고 결합조직 주 성분인 제1형 교원질 및 fibronectin에 대한 면역세포화학적 염색을 하여 배양세포에서 발현 정도를 정량적으로 비교하여 염증시 발생하는 산소 유리기에 대한 SOD의 효과를 치주인대 세포를 이용하여 알아 보고자 하였다.

II. 연구재료 및 방법

1. 연구재료

1) Superoxide dismutase

실험에 사용한 SOD(Sigma, U.S.A.)는 제조 회사의 추천에 따라 증류수에 희석하였고, SOD 1 Unit의 정의는 pH 7.8, 25°C, 3.0ml 부피에서 xanthine, xanthine oxidase의 혼합계에서 cytochrome C 환원속도를 50% 억제하는 효소양의 단위로서 10U, 50U, 150U, 300U로 나누어 사용하였다.

2) 세균의 내독소

세균의 내독소는 *Fusobacterium nucleatum* 10953에서 분리한 lipopolysaccharides (LPS)를 사용하였다. 세균의 배양은 Schaedler배지를 이용하여 냉동 보관중인 균주를 혐기성 배양기 (80% N₂, 10% H₂, 10% CO₂: COY Lab Products Ann Arbor MI, USA)를 이용하여 37°C에서 통상적으로 36시간 혐기성으로 배양하였다. 배양된 세균은 원침(10,000×g, 20min 4°C)하여 멸균된 생리 식염수로 3회 세척한 후 증류수로 1회 세척하여 냉동 건조하였다. 건조시킨 균체를 200μg이 되도록 하여 분산시킨 후 동일한 양의 90%(W/W) phenol (Merck)과 혼합하여 15분간 교반하여 반응시켰다. 그 후 얼음물에 10°C까지 냉각시킨 후 10,000×g, 30분간 원침시킨 후 상층액 부분을 채취하고 동일량의 증류수를 가하면서 2회 반복하여 수집된 수용액 부분을 72시간 동안 투석시킨 후 냉동 건조하여 내독소를 분리하였다.

3) 치주인대세포의 배양

본 연구에서의 결체조직은 교정 목적으로 발치를 시행한 소구치나 제3 대구치의 건강한 치주인대를 절제하여 얻어졌다. 발치에 앞서 치은의 건강 상태는 임상 및 방사선적으로 평가되었는데, 임상적으로 치태지수, 치은지수 및 부착상실을 평가하여 치태 및 치은 지수가 1 이하이고 부착 상실이 1mm이하인 경우를 선택하였다.

한편 방사선 사진상으로 치조골의 소실이나 치근단 병소가 없는 치아이며 치아우식 또한 없는 경우를 선택하였다. 발치한 치근의 중간 1/3 부위에서 절제한 치주인대 조직은 20% 우태아혈청 (Fetal bovine serum, Gibco Co., USA) 과 10% 항생제(penicillin G, streptomycin, amphotericin B포함, Gibco Co., USA)를 가한 α-MEM(Minimal Essential Medium, Gibco Co., USA)으로 3회 세척하였다. 치주인대 조직을 세척한 후 60mm 세포 배양용 배양접시(Nunc Co., USA)로 옮겨 약 1mm²로 세절하였다. 세절한 조직은 20분간 37도, 5%

CO₂, 습도 100% 배양기 (Bantex 1820IR, SHEL-LAB, USA)에서 배양 접시에 고르게 부착이 되도록 배양 시킨후, 각 배양 접시당 2ml의 10% 우태아 혈청과 1% 항생제를 첨가한 α-MEM을 가하고 단일 세포층이 형성될 때까지 3일 간격으로 배양액을 교환하였다.

3일 간 배양후 배양 접시내의 배양액을 제거하고 HBSS(Hank's Balanced Salt Solution, Gibco Co. USA)로 2회 세척하여 부착되지 않은 세포를 제거하였다. 부착된 세포의 분리를 위해 HBSS를 제거한후 0.25% Trypsin/EDTA (10x, Gibco Co., USA)를 배양접시당 2ml씩 넣고, 3분간 bench상에 방치한 후 피펫을 이용하여 배양접시에 부착된 부착세포를 분리시키고 5ml 원심분리용 시험관으로 옮겨서 1,200 rpm으로 10분간 원침하였다. 원침후 상층액을 제거하고 HBSS를 가하여 세척한후 Vortex mixer로 혼합하고 세포부유액을 만들어 60mm 배양접시에 분주하였다. 배양액은 세포의 충분한 증식이 명확히 나타날 때까지 2 혹은 3일 간격으로 교환하였으며 본 실험에서는 계대 배양한 4세대 내지 6세대 치주인대 세포를 이용하였다.

2. 연구방법

1) LPS 및 SOD가 치주인대세포의 활성화에 미치는 영향

상기 농도의 SOD를 단독으로 가하거나 또는 LPS와 SOD를 동시에 가한 후 1일과 3일간 배양한 후, 세포 활성을 측정하기 위해 생리 식염수에 용해한 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, Sigma Co., USA) 용액 50μl를 각 well에 넣고 4시간 동안 배양 후 MTT용액을 버리고, DMSO를 50μl씩 첨가하여 formazan 결정을 용해시킨 후 세포활성도의 측정을 위해 96well plate상으로 옮겼다. Plate를 잘 흔든 후 ELISA analyser (Model ETY-96, Toyo instruments Inc., Japan)에 plate를 넣고 570nm에서 흡광도를 측정하였다. 매 실험마다 SOD를 희석한 용액을 대조군으로 하여 세포활성도는 대조군에 대한 백분율로 산출하였다.

2) 배양세포의 면역세포화학적 염색

1. PCNA의 면역세포화학적 검출

SOD를 단독으로 가하거나 또는 LPS와 SOD를 동시에 가한 후 1일, 2일과 3일간 배양한 후 배양 치주인대세포를 4% paraformaldehyde로 15분간 고정한 후 3% H₂O₂를 5분 처리하고 PBS로 세척하였고 blocking serum으로 normal rabbit serum을 30분간 적용시켰다. 일차항체로는 PCNA(monoclonal, Dako, Denmark) 1 : 100으로 희석하였고, 1시간동안 부란시키고 PBS를 사용하여 세척한 후 이차항체(anti-mouse IgG)를 20분간 처리하였다. 그후 Streptavidine alkaline phosphatase로 20분간 처리한 후 Aminoethyl carbazole (AEC)로 발색시킨 후 검경하였다. 음성대조군은 일차항체 대신 생리식염수를 사용한후 동일 방법으로 염색하였다. PCNA 지수는 각각 4개의 현미경 시야에서 사진 촬영하여 양성 세포를 전체 세포로 나누어 백분율로 환산하였다.

2. 제1형 교원질에 대한 면역세포화학적 검출

면역조직화학적 검출을 위하여 배양 치주인대세포를 4% paraformaldehyde로 15분간 고정한 후 3% H₂O₂를 5분 처리하고 PBS로 3회 세척하였다. 일차 항체로는 collagen type I(monoclonal, Dako, Denmark)을 1 : 150으로 희석하였고, 이 후의 과정은 PCNA에 대한 면역세포화학적 검출과정과 동일하게 처리하였다.

3. Fibronectin의 면역세포화학적 검출

Fibronectin에 대한 면역세포화학적 검출에는 antibody diluent(Dako, Denmark)로 fibronectin(polyclonal, Vector, USA)을 1 : 150으로 희석시키고 1시간 동안 처리하였고 이후의 과정은 PCNA에 대한 과정과 동일하게 처리하였다.

4. 면역세포화학적 분석

치주인대 세포에서 제1형 교원질 및 fibronectin 발현 정도를 평가하기 위해 100배 시야의 4 부위 이상을 사진 촬영한 후 Image-pro II를 이용하여 200개 이상의 세포에서 정량 분석하였다.

3) 통계처리

각 농도와 시간에 따른 실험군을 대조군에 대한 백분율로 환산된 세포활성도 및 정량분석결과와 평균과 표준편차를 구하고 이들의 통계학적 유의성은 분산분석법(ANOVA)를 이용하여 통계처리 하였다.

III. 연구결과

1. SOD의 단독투여가 치주인대세포의 활성화에 미치는 영향

배양 1일째에 10U에서 300U까지 대조군에 비해 큰 차이가 없었고 150U에서만 세포활성이 증가되었지만 유의성은 없었다. 배양 2일째는 대조군에 비해 증가하는 경향을 보였는데 150U에서는 132.31±7.91%, 300U에서는 133.35±8.64%로 유의한 활성증가를 보였다. 배양 3일째는 1일군에 비해서 SOD 150U 농도에서만 128.43±11.69%로 대조군에 비해서 유의한 세포 활성도의 증가를 보였으나(P<0.05) 나머지 군에서는 큰 활성 변화가 없었다 (Table 1).

2. LPS와 SOD가 치주인대세포 활성화에 미치는 영향

LPS 0.5µg/ml의 농도에서 치주인대 세포의 활성화는 배양 1일째 102.00±12.1%로 대조군과 큰 차이가 없었으나 배양 2일째에는 78.06±9.63%으로 유의한 감소를 가져왔고(P<0.05), 3일군에서는 92.95±6.13%으로 감소 경향을 보였지만 유의성은 없었다.

LPS와 SOD동시 투여시 LPS 농도 0.5µg/ml 경우 배양 1일째에 300U, 150U, 50U, 10U모두 대조군 및 LPS 농도 0.5µg/ml 단독 처리군에 비해 약간 낮은 세포 활성을 보였으나 유의성은 없었다. 배양 2일째에는 LPS단독 처리군에 비해 10U, 50U는 큰 차이가 없었지만 150U에서는 133.60±10.85%로 대조군 및 LPS단독투여군에 비해 활성증가를 보였으나 300U에서는 118.90±14.33%으로 LPS단독군에서만 증가를 보였다(P<0.05). 배양 3일째에도 10U를 제외하고는 전반적으로 유의한 증가 경향을 보였고

특히 300U에서는 $145.46 \pm 13.40\%$ 로 큰 증가를 보였다(Table 2).

LPS $5\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도 단독 배양 1일에서는 $93.37 \pm 2.30\%$, 2일째에는 $71.42 \pm 8.69\%$, 3일은 $80.25 \pm 5.16\%$ 로 감소되었고 2일군에서만 통계학적 유의성이 있었다($P < 0.05$). LPS $5\mu\text{g}/\text{ml}$ 와 SOD를 동시에 가한 1일 째에는 10U, 50U, 150U, 300U 모두 대조군 및 LPS 단독군에 비해 유의한 차이를 보이지 않았고 동시 배양 2일째에서는 10U와 50U는 대조군과 차이가 없었으나 150U와 300U에서만 LPS 단독군에 비해 유의한 증가가 있었고 동시배양 3일군의 경우 모두 LPS 단독군에 비해 유의한 증가를 보였고 150U, 300U에서는 $145.47 \pm 13.40\%$,

$144.55 \pm 15.63\%$ 로 LPS 단독 및 대조군에 비해 유의한 활성을 보였다($P < 0.05$, Table 3).

3. LPS와 SOD가 치주인대세포의 PCNA에 미치는 영향

대조군의 경우 PCNA는 세포의 핵을 중심으로 적색의 양성발현을 보였다(Fig. 1). PCNA 지수는 대조군의 경우 배양 1일은 $2.06 \pm 0.25\%$, 2일은 $1.49 \pm 0.38\%$, 3일은 $2.27 \pm 0.18\%$ 로서 SOD 단독 투여군의 경우 최하 1.61에서 최고 3.01까지 큰 변화는 없었고 대조군에 비해 유의한 차이가 없었다. LPS($0.5\mu\text{g}/\text{ml}$) 단독 투여군 배양 1일은 $1.54 \pm 0.19\%$, 2일은 $1.76 \pm 0.56\%$ 으로 대조군과 차이가 없었으나 배양 3

Table 1. The effects of SOD on the activity of PDL cell (Mean \pm S.D)

day concentration	1 day	2 days	3 days
control	100.00 ± 2.20	100.00 ± 3.51	100.00 ± 6.13
SOD 10U	101.84 ± 7.24	114.82 ± 3.67	103.66 ± 3.49
SOD 50U	101.23 ± 9.30	117.71 ± 9.80	107.39 ± 14.33
SOD 150U	110.75 ± 8.79	$132.31 \pm 7.91^*$	$128.43 \pm 11.69^*$
SOD 300U	96.19 ± 5.32	$133.35 \pm 8.64^*$	110.27 ± 9.30

* : Significantly different from control ($P < 0.05$)

Table 2. The effects of SOD and LPS ($0.5\mu\text{g}/\text{ml}$) on the cell activity of PDL cell (Mean \pm S.D)

day concentration	1 day	2 days	3 days
control	100.00 ± 2.10	100.00 ± 3.51	100.00 ± 4.53
LPS ($0.5\mu\text{g}/\text{ml}$)	102.00 ± 12.10	$78.06 \pm 9.63^*$	92.95 ± 6.13
LPS 0.5 + SOD 10U	94.65 ± 15.68	81.00 ± 4.33	111.92 ± 12.71
LPS 0.5 + SOD 50U	99.82 ± 3.91	90.77 ± 6.30	$122.35 \pm 7.10@$
LPS 0.5 + SOD 150U	93.18 ± 5.86	$133.60 \pm 10.85^*@$	$135.46 \pm 12.18^*@$
LPS 0.5 + SOD 300U	95.36 ± 3.12	$118.90 \pm 14.33@$	$145.46 \pm 13.40^*@$

* : Significantly different from control ($P < 0.05$)

@ : Significantly different from LPS $0.5\mu\text{g}/\text{ml}$ ($P < 0.05$)

Table 3. The effects of SOD and LPS (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) on the cell activity of PDL cell (Mean \pm S.D)

concentration \ day	1 day	2 days	3 days
control	100.00 \pm 2.10	100.00 \pm 3.51	100.00 \pm 4.53
LPS (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	93.37 \pm 2.30	71.42 \pm 8.69	80.25 \pm 5.16
LPS 5 + SOD 10U	86.16 \pm 3.51	89.53 \pm 12.00	120.11 \pm 11.70@
LPS 5 + SOD 50U	83.12 \pm 3.24	94.84 \pm 12.22	118.62 \pm 6.85@
LPS 5 + SOD 150U	91.57 \pm 6.03	100.29 \pm 16.95@	145.47 \pm 13.40* @
LPS 5 + SOD 300U	93.99 \pm 6.40	110.55 \pm 13.53@	144.55 \pm 15.63* @

* : Significantly different from control(P<0.05)

@: Significantly different from LPS 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (P<0.05)

일째에만 1.28 \pm 0.61%로 감소되었으며 통계학적으로 유의성은 없었다(P<0.05). LPS(0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)에 SOD혼합투여의 경우 SOD 10, 50, 150U 배양 1, 2, 3일에서 대조군 및 LPS 단독투여군에 비해 큰 차이는 없었고 SOD 300U를 혼합투여한 배양 2일째 3.31 \pm 0.97%로 대조군 및 LPS 단독군에 비해 증가되었고 유의성이 있었다(P<0.05).

LPS(5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 단독투여한 배양 1일군의 경우도 2.13 \pm 0.65%, 2일째는 감소하여 0.80 \pm 0.37%, 3일째는 1.49 \pm 0.36%이지만 대조군과는 유의성있는 차이는 없었다. LPS(5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)와 SOD를 혼합투여한 경우 10U, 50U에서는 배양 1, 2, 3일 동안 대조군 및 LPS(5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 단독투여군과 차이가 없었지만 150U에서는 배양 3일째에 3.66 \pm 0.73%으로 증가하였고 300U는 배양 2일째에는 3.74 \pm 0.81%, 3일의 경우 3.90 \pm 0.97%으로 대조군 및 LPS 단독군에 비해 증가하였고 통계학적으로 유의성이 있었다(P<0.05, Table 4).

4. LPS와 SOD가 치주인대세포의 제1형 교원질에 미치는 영향

indirect peroxidase 방법으로 제 1형 교원질에 대해 면역염색한 치주인대세포는 주로

세포질에서 적색의 발현을 보였고 이를 정량 분석한 결과 대조군의 경우 배양 1일, 2일, 3일 각각 102.33 \pm 18.98%, 96.30 \pm 12.13%, 97.20 \pm 9.98%로 나타났고 SOD 단독투여군의 경우 그 변이도가 적어서 81.32 \pm 5.91%에서 105.10 \pm 13.42%까지 나타났지만 배양 기간 및 SOD 투여양에 따라 대조군과 큰 차이가 없었다. LPS(0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 단독 처리군의 경우 배양 1일에서만 73.14 \pm 13.63%로 대조군에 비해 감소되었고 2일 3일군은 차이가 없었는데 LPS(0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)에 SOD혼합투여한 경우 LPS(0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 단독군에 비해 배양 기간 및 SOD 농도에 따라 유의한 변화를 보이지 않았다.

LPS(5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 단독 투여한 경우에는 배양 1, 2, 3일 각각 77.63 \pm 16.70%, 66.63 \pm 8.76%, 72.14 \pm 12.19%로 대조군에 비해 감소하였고 배양 2, 3일에 부분적으로 대조군과 유의한 차이를 보였다(P<0.05). LPS(5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)에 SOD를 혼합 투여한 경우 LPS(5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 단독군에 비해 증가하는 경향을 보였고 SOD 150U 배양 2일에는 121.31 \pm 24.15%, 3일에서는 129.70 \pm 10.07%로 증가를 보여 LPS(5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 단독군 및 대조군에 비해 유의성이 있었다(P<0.05, Table 5).

Table 4. The effect of SOD on the PCNA index of PDL cell (Mean±S.D)

day concentration	1 day	2 days	3 days
control	2.06±0.25	1.49±0.38	2.27±0.18
SOD 10U	2.35±0.11	1.61±0.47	1.92±0.34
SOD 50U	1.85±0.66	1.72±0.89	2.13±0.33
SOD 150U	2.30±0.97	2.36±0.70	3.01±0.91
SOD 300U	2.19±0.27	2.25±0.52	2.81±0.49
LPS (0.5µg/ml)	1.54±0.19	1.76±0.56	1.28±0.61*
LPS 0.5+SOD 10U	1.98±0.52	1.21±0.43	2.16±0.35
LPS 0.5+SOD 50U	1.56±0.91	2.33±0.73	2.70±0.47
LPS 0.5+SOD 150U	2.76±0.43	2.98±0.56	2.53±0.84
LPS 0.5+SOD 300U	2.27±0.32	3.31±0.97*@	2.64±0.38
LPS (5µg/ml)	2.13±0.65	0.80±0.37	1.49±0.36
LPS 5 +SOD 10U	2.30±0.51	1.36±0.28	1.96±0.60
LPS 5 +SOD 50U	2.81±0.53	1.01±0.39	2.11±0.58
LPS 5 +SOD 150U	1.52±0.70	1.29±0.35	3.66±0.73*@
LPS 5 +SOD 300U	2.19±0.62	3.74±0.81*@	3.90±0.97*@

* : Significantly different from control(P<0.05)

@: Significantly different from LPS only treated group(P<0.05)

5. LPS와 SOD가 치주인대세포의 Fibronectin에 미치는 영향

Indirect peroxidase 방법으로 fibronectin에 대해 면역 염색한 결과 치주인대 세포의 세포질 중심부 및 변연부에서 섬유모 세포의 주행에 따라 적색의 난원형 또는 길게 늘어진 띠 모양으로 나타났지만 군 간의 발현 형태에서 차이는 거의 없었다. 정량분석한 치주인대세포 대조군의 경우 1일에는 90.00±16.94%, 2일은 106.25±8.18%, 3일은 92.85±17.72%로 나

타났고 SOD단독 투여군의 경우 농도 및 배양 기간에 따라 큰 차이를 보이지 않았으며 LPS(0.5µg/ml) 단독처리군도 대조군에 비해 약간 감소하는 경향이였지만 유의성은 모두 없었다. LPS(0.5µg/ml)에 SOD혼합투여한 경우 10U, 50U, 150U 모두 유의한 차이를 보이지 않았으나, 300U에서 배양 3일째에 128.75±13.54%로 유의한 증가를 보였다(P<0.05).

LPS(5µg/ml)를 단독처리한 경우에도 대조군에 비해 감소하였지만 유의성은 없었고, SOD

Table 5. The effect of SOD on the quantitative expression of Collagen type I of PDL cell (Mean \pm S.D)

day concentration	1 day	2 days	3 days
control	102.33 \pm 18.98	96.30 \pm 12.13	97.20 \pm 9.98
SOD 10U	89.28 \pm 5.74	93.61 \pm 7.23	85.42 \pm 15.86
SOD 50U	82.50 \pm 14.19	98.29 \pm 14.31	95.29 \pm 12.08
SOD 150U	81.32 \pm 5.91	93.14 \pm 22.19	105.10 \pm 13.42
SOD 300U	84.11 \pm 10.09	101.40 \pm 16.83	102.20 \pm 15.41
LPS (0.5 μ g/ml)	73.14 \pm 13.63*	86.28 \pm 17.11	91.90 \pm 15.30
LPS 0.5+SOD 10U	74.25 \pm 12.34	85.00 \pm 11.13	91.60 \pm 7.23
LPS 0.5+SOD 50U	81.37 \pm 3.91	90.77 \pm 6.30	82.35 \pm 7.10
LPS 0.5+SOD 150U	96.16 \pm 16.35	108.30 \pm 15.91	107.00 \pm 16.70
LPS 0.5+SOD 300U	90.42 \pm 9.51	89.80 \pm 6.64	107.42 \pm 19.86
LPS (5 μ g/ml)	77.63 \pm 16.70	66.63 \pm 8.76*	72.14 \pm 12.19*
LPS 5 +SOD 10U	96.21 \pm 8.15	79.35 \pm 11.12	102.32 \pm 17.15
LPS 5 +SOD 50U	116.70 \pm 18.84	108.80 \pm 15.97	96.23 \pm 14.32
LPS 5 +SOD 150U	120.20 \pm 22.68	121.31 \pm 24.15* @	129.70 \pm 10.07* @
LPS 5 +SOD 300U	105.54 \pm 13.04	98.50 \pm 18.33	99.16 \pm 11.17

* : Significantly different from control(P<0.05)

@: Significantly different from LPS only treated group(P<0.05)

10, 50, 150U에서도 배양 기간과 농도에 따라 LPS단독군 및 대조군에 비해 유의한 증가 및 감소가 없었지만 300U에서만 배양 3일째 132.67 \pm 18.37%로 증가를 보였으며 통계학적으로 유의하였다(P<0.05).

IV. 총괄 및 고찰

염증의 일반적인 특징은 호중구나 대식세포 등의 염증세포가 국소적으로 축적되는 것으로 이들 세포는 숙주의 방어기전에 필수적인 역할을 하며 활성산소종(reactive oxygen spe-

cies)이나 이들의 중간대사물은 활성화된 식세포의 특징인 호흡 사슬로부터 주로 발생된다⁴³⁻⁵⁰. 활성산소종에 만성적인 노출은 인접조직에서의 세포막 용해, DNA 분절, 효소의 불활성, 교원 분해 효소와 같은 단백질용해효소의 활성화, hyaluronic acid와 proteoglycan 같은 특정 세포외기질의 파괴 등과 같은 광범위한 병리적 반응을 일으킬 수 있다^{41, 46}.

이러한 식세포는 치주질환과 관련된 염증을 포함하여 염증과 감염부위에 흔히 존재하는 다발성 자극에 반응하는 저항세포로서 이런 자극중에는 opsonized microbes, complement

Table 6. The effect of SOD on the quantitative expression of Fibronectin of PDL cell
(Mean \pm S.D)

day concentration	1 day	2 days	3 days
control	90.00 \pm 16.94	106.25 \pm 8.18	92.85 \pm 17.72
SOD 10U	82.92 \pm 14.75	104.81 \pm 8.74	85.14 \pm 13.58
SOD 50U	90.83 \pm 13.42	102.60 \pm 12.30	93.89 \pm 8.63
SOD 150U	102.60 \pm 12.30	90.83 \pm 13.42	102.13 \pm 11.19
SOD 300U	96.75 \pm 17.02	90.20 \pm 18.27	103.35 \pm 21.34
LPS (0.5 μ g/ml)	102.00 \pm 13.95	98.60 \pm 17.24	81.19 \pm 14.23
LPS 0.5+SOD 10U	83.17 \pm 9.51	95.34 \pm 8.32	89.61 \pm 10.27
LPS 0.5+SOD 50U	106.00 \pm 14.39	109.60 \pm 11.01	112.73 \pm 8.91
LPS 0.5+SOD 150U	101.20 \pm 9.33	110.92 \pm 11.63	110.29 \pm 8.56
LPS 0.5+SOD 300U	89.00 \pm 5.47	111.66 \pm 15.51	128.75 \pm 13.54* @
LPS (5 μ g/ml)	93.61 \pm 16.72	80.05 \pm 19.42	83.44 \pm 8.13
LPS 5 +SOD 10U	89.62 \pm 7.84	87.56 \pm 12.13	101.93 \pm 11.74
LPS 5 +SOD 50U	102.60 \pm 15.17	79.78 \pm 10.56	83.58 \pm 12.59
LPS 5 +SOD 150U	76.83 \pm 11.02	91.35 \pm 12.45	89.17 \pm 9.72
LPS 5 +SOD 300U	113.00 \pm 5.94	118.52 \pm 7.41	132.67 \pm 18.37* @

* : Significantly different from control(P<0.05)

@: Significantly different from LPS only treated group(P<0.05)

C5a, leukotriene B4, 용해 미생물로부터 유리되는 N-formylated oligopeptides가 있다. 강력한 산화효소를 생산하는 방어기전으로 산소흡수를 빨리 증가시키는 호흡 사슬 현상은 superoxide, 과산화수소, hydroxy radical을 생산한다. 이런 잠재성 산화물은 세포외기질 및 주위 정상세포를 파괴시키게 되어 정상조직파괴는 전형적인 염증반응의 한 부분으로

여겨진다. 따라서 oxygen radical을 제거시켜 주는 효소인 SOD는 산화로부터 정상세포와 기질요소를 보호하고 생물체를 보호하는 소염작용이 있다고 알려져 왔다⁵¹⁾.

치주질환에서는 국소 유년형 치주염, 그리고 급속 진행형 치주염에 이환된 환자들의 말초 혈액내 다형핵 백혈구에 의한 O2와 H2O2의 생성에 관하여 주로 연구되었는데, Charon등⁵⁰⁾

은 치태세균들의 산소 대사에 대한 영향을 규명하고자 건강한 사람의 말초 혈액내 중성구와 치은연상치태 또는 치은 연하 치태를 각각 배양시킨 후 H₂O₂ 생성에 관하여 조사하여 치은연상 치태중 *Actinomyces viscosus*는 중성구의 산소대사(H₂O₂생성에) 영향을 미치지 않으나, 치은치태중 *Bacteroides gingivalis*와 *Actinobacillus actinomycetemcomitans*는 중성구의 산소대사를 억제시킬 수 있음을 보고하였다. Jacoby와 Davis⁵¹⁾에 의하면 치주인대를 포함한 치근 주위조직에 g당 약 4000 Unit의 SOD효소활성도를 보이며 간, 신장, 적혈구 같은 다른 세포와 조직과 큰 차이가 없었고 superoxide를 포함한 독성물질의 전신적 혈장 청명(plasma cleance)에 한 역할을 한다고 하였으며 치주질환의 염증으로 superoxide가 나타나면 이에 따른 국소적 독성을 치주인대 관련 SOD가 제거할 수 있다고 주장하였다. 특히 Cu-Zn SOD는 교원 섬유소내에서는 효소 활성도가 관찰되지 않아 SOD활성은 섬유모세포의 glycocalyx에 국소화된다고 하였으며, Vitamin E, ascorbic acid, selenium과 같은 항산화물과 이에 따른 효소 작용이 만성 치주질환과 관련된 국소적 결체조직 파괴의 치료에 효과적 일 수 있다고 하였다⁵²⁾. 또한 염증성 치주질환의 발병 원인 요소는 주로 세균을 주성분으로 하는 치태이지만 세균자체가 직접 질환에 영향을 미치기 보다는 세균내독소와 같은 세포독성 및 항원성이 있는 세균의 산물이 치주질환의 발병 및 그에 따른 조직파괴에 있어 중요하며⁵²⁾ 세균내독소는 그람 음성 세균의 세포벽 외막에 존재하는 lipopolysaccharide(LPS)성분으로 염증의 유발을 비롯한 여러 작용을 가지고 있으며, 염증성 치은조직 및 치주질환 등에 내독소가 존재함이 보고되어^{53,54)}, 치주인대세포에 투여하였다.

이상과 같은 결과를 바탕으로 본 연구는 배양 치주인대세포에 활성산소기를 제거하는 효소인 SOD를 세균내독소와 동시 투여후 세포활성변화를 밝히고자 하였는데 SOD 1 Unit의 정의는 pH 7.8, 25°C, 3.0ml부피에서 xanthine, xanthine oxidase의 혼합계에서 cytochrome C 환

원을 50% 억제하는 단위로서, 일차 배양한 치주인대세포에서 SOD단독 투여 배양1일째에는 대조군에 비해 활성차이가 없었고 배양2일째 150U, 300U에서 대조군에 비해 활성증가가 있었고 배양3일째 150U에서 대조군에 비해 활성증가가 있어 SOD자체가 세포독성은 없는 것으로 사료되었다. LPS(0.5µg/ml)와 SOD동시 투여시 배양 2일째의 150U에서는 대조군및 LPS단독 투여군에 비해 활성증가를 보였으나, 배양 3일째에는 50U, 150U, 300U에서 유의한 증가를 보였으며 LPS 5µg/ml와 SOD를 동시에 가한 3일군의 경우 10, 50, 150, 300U 모두 LPS단독군에 비해 유의한 증가를 보였다(P<0.05). 이상과 같은 소견은 SOD를 in vitro에서 다룬 연구가 비교적 적어서 비교하기에 어려움이 있지만 LPS에 의한 세포독성물질에 대한 방어기전 또는 superoxide radical존재에 따른 방어기전으로 염증매개물에 의해 LPS농도와 SOD농도가 높을수록 서로 상관관계를 갖으며 세포활성증가가 일어났다고 사료된다.

PCNA는 DNA polymerase delta의 보조 단백질로 알려져 있는데 1978년 Miyachi 등⁵⁵⁾이 전신성 홍반성 낭창 환자에서 증식세포의 핵속에 있는 PCNA에 대한 자가항체가 혈청 내에 존재함을 처음으로 보고하였고 PCNA 발현은 세포의 증식기중 G1중기에 급속도로 증가하여 S기에서 가장 높은 수준을 유지하다가 G2/M기에 감소하기 시작하기 때문에 세포의 증식 정도를 평가하는데 가장 유용하다고 알려져 있다⁵⁶⁻⁶⁴⁾.

특히 Celis⁶³⁾는 PCNA가 DNA 복제과정과 세포분열 과정에서 중심 요소로 작용한다고 보고하였고, 세포분열과정에서 시기별 증식세포핵항원의 발현 양상에 관하여 S기일때 세포의 핵내에 증식세포핵항원이 축적되어 최고치를 보인다고 많은 학자들⁶²⁾에 의해 보고되었는데, Morris등⁶³⁾은 DNA합성이 가장 왕성할때 증식세포핵항원도 최고치를 보인다고 하였으며 Kurki등⁶⁴⁾은 G1말기에 증식세포핵항원이 발현하기 시작하여 DNA합성시기인 S기에 현저히 증가되었다가 G2/M기에 감소됨을 보고하였다.

본 연구에서 배양 치주인대세포에서 anti-hu-

man PCNA 항체에 대한 면역 염색 반응도는 사진 1, 2와 같이 세포의 핵을 중심으로 면역 염색 반응을 나타냈지만 발현 위치는 군 간의 차이가 없었고 PCNA 면역 양성 세포 지수는 대조군에 비해 SOD 단독군의 경우 농도 및 배양 기간에 따라 차이가 없었지만, LPS(0.5µg/ml)와 SOD 300U를 혼합 투여한 배양 2일째에 대조군 및 LPS 단독군에 비해 유의한 증가가 있었고, LPS (5µg/ml)와 SOD를 혼합 투여한 경우 150U와 300U에서 배양 2, 3일째에 대조군 및 LPS 단독군에 비해 증가하였고 통계학적으로 유의성이 있었다($P < 0.05$). 이와 같이 LPS와 SOD 복합 투여의 경우 상대적으로 높은 PCNA 지수를 보여주는 결과는 세균 내독소 등이 있을 때 대조군에 비해 상피 성장 인자 및 섬유모세포 성장 인자 등의 국소 인자 자극에 의한 세포 분열의 증가가 나타났다고 사료되며 LPS 농도가 높을수록 이런 자극 요소는 SOD 농도에 의존해 많은 세포 증식 지수를 보였다.

과산화물의 존재는 교원질의 gelation 특히 triple helix 형성과 관련된 수소 결합을 못하게 하며^{43, 45} 결체 조직에서 이런 자유 전자기는 외인성 SOD, vitamin E를 투여함으로써 감소시킬 수 있다^{41, 44}. 결체 조직과 관련된 세포의 기질 요소는 염증 세포 매개 과산화물 손상에 특히 노출되어 있는 것으로 보고되었으며⁴⁴ 만성 염증성 골 관절염, 만성 치은염 등에서 세포의 기질과 활성 산소가 관계 있음이 연구되었다^{43, 49, 65}.

치주인대에는 제1형 및 제3형의 교원질이 풍부하게 존재하는데 최근에 치아와 그 주위 조직의 발생, 분화 및 재생과 관련된 기질 단백질에 대한 관심이 증가하고 있으며, 이들 조직에서의 교원질 분포에 관한 연구가 활발히 이루어지고 있다^{66, 67}. 교원질은 주로 생화학적 방법¹⁹, 면역조직화학적 방법⁶⁸⁻⁷⁰ 등으로 세포의 기질의 변화에 대한 분석이 이루어져 왔는데 본 연구에서는 생화학적 방법을 사용하지 않고 배양 세포를 고정 한 후 면역세포 화학적 염색을 시행하여 이를 200개 이상의 세포에서 정량 분석해 각 군 간의 비교를 시도하였다.

제1형 교원질에 대해 면역 염색한 치주인대

세포를 정량 분석한 결과 SOD 단독군 및 LPS(0.5µg/ml)에 SOD 혼합 투여한 경우 배양 기간 및 SOD 투여 양에 따라 대조군과 큰 차이가 없었지만 LPS(5µg/ml)에 SOD를 혼합 투여한 경우 SOD 150U 배양 3일에서 LPS 단독군 및 대조군에 비해 유의성이 있었는데($P < 0.05$), 고농도의 세균 내독소인 LPS 투여 후에 SOD 150U를 정점으로 제1형 교원질의 발현이 증가되었고 교원 섬유와 SOD의 관계는 정상 염증 반응 동안 전형적으로 유리되는 산소 전자기에 대해 이 기질 요소가 생물학적 방어를 할 수 있으리라 사료된다. 또한 이러한 SOD 노출 후 제1형 교원질 발현 증가가 산소 유리를 제거한 후 회복 여부에 관한 장기적인 연구가 필요하다고 여겨진다.

세균성 내독소는 치주 질환의 병리기전에 중요한 역할을 하여, *in vitro*에서 LPS는 원형질막 관련 효소인 NADPH(Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Hydroxy) oxidase의 활성을 통해 식세포에 의해 활성 산소의 생산을 유도한다고 하였고 Jacoby와 Davis⁵¹는 세균 내독소가 배양 섬유모세포에 의해 자유 전자의 유리를 유도한다고 하였지만, NADPH oxidase는 아직 섬유모세포의 막에서 확인되지 못해 내독소 자극 섬유모세포가 활성 산소 생산에 관여하는 기전을 향후 연구해야 한다고 사료된다.

fibronectin은 분자량이 큰 당단백질로서, 결합 조직의 기질의 주 성분이며, 기저막에도 분포하는 것으로 알려져 있다⁷¹. 세포 및 혈장으로 구분되는 이들 두 종류는 여러 가지 면에서 매우 유사하지만 완전히 동일하지는 않음이 Hayashi 등⁷², McDonagh 등⁷³에 의해 규명되었으며, fibronectin은 교원질과 부착하는 성질이 큰데, 이러한 성질이 세포 분화와 밀접한 연관이 있다고 하였고⁷⁴⁻⁷⁶, 최근 세포 부착성과 세포 이동을 촉진하는 fibronectin의 성질을 이용하여 치근면 탈회 후에 fibronectin을 도포해 주므로써 상피 세포의 하방 이동을 차단하고 섬유 결합에 의한 치주 조직의 신부착(new attachment)을 도모하는데 보다 양호한 결과를 얻을 수 있음이 Caffesse⁷⁷ 등에 의해 확인되

었다.

본 연구에서는 fibronectin에 대한 면역세포 화학적 염색의 발현 결과 치주인대 세포의 세포질 중심부 및 변연부에서 섬유모 세포의 주행에 따라 적색의 난원형, 또는 길게 늘어진 띠 모양으로 나타났지만 군 간의 발현 형태에서 차이는 거의 없었다. 치주인대 세포에서 fibronectin은 전체적으로 고르게 강한 염색 반응을 나타냈는데 이는 fibronexus를 통해 fibronectin이 교원섬유와 섬유모세포 사이 혹은 섬유모세포와 섬유모 세포 사이의 부착에 관여한다는 사실을 뒷받침해 준다.

Fibronectin에 대해 면역염색한 치주인대 세포를 정량 분석한 결과 SOD단독 투여군의 경우 농도 및 배양 기간에 따라 큰 차이를 보이지 않았으며, LPS(0.5, 5 μ g/ml)에 SOD혼합 투여한 경우 10U, 50U, 150U는 유의한 차이를 보이지 않았으나, LPS(0.5, 5 μ g/ml)에 300U 혼합한 배양 3일째에는 LPS투여군에 비해 유의한 발현 증가를 보여 Uitto⁷⁶⁾이 보고한 바와 같이 염증으로 인한 정상조직 구조의 파괴는 fibronectin에 의해 매개되는 정상적인 세포기질간의 상호작용이 결핍되는 것과 관계가 있다고 사료된다. 또한 LPS와 SOD를 동시 투여시 LPS단독군에 비해 fibronectin 발현이 증가하였다는 것은 내독소 등 치태 세균에 대한 식균작용에 fibronectin이 직접 관여하거나 중성구와 대식세포의 이동에 화학 주성을 나타냄으로써 간접적으로 신체 방어기전에 막중한 역할을 하고 있음을 보여주는 결과라 할수 있고, 또한 파괴된 결체조직을 다시 회복하는데 필요한 섬유모세포들이 조직 손상부로 모일 수 있도록 fibronectin이 화학주성 역할과 함께 세포 이동에 관여하고 있음을 반영하고 있는 것으로 사료된다.

또한 활성 산소에 대한 과민성 때문에 치주 질환이 일어나는 조직의 교원질이 활성산소제거효소인 SOD에 의해 보호될 수 있다고 하였지만⁵³⁾, 치주 질환이 흔히 만성적으로 나타나기 때문에 이 SOD가 일시적으로 불활성되거나 고갈되면 국소적 조직 손상을 받아 치은염이 악화 될 수 있고 유전적 또는 후천적 영향으로

교원질 결합 효소의 활성을 감소시킬 수 있게 된다. 그러므로 염증 반응 동안 유리되는 산소전자기로 부터 생물학적 방어를 하는 SOD를 외부에서 투여해 염증 반응의 감소를 일으키는 시도를 할 수 있다고 사료된다.

이상과 같은 소견으로 염증 반응 동안 전형적으로 유리되는 산소 전자기에 대해 SOD가 세포분열의 증가 능력, 교원질 및 fibronectin 등과 관련되어 생물학적 방어를 하며 이를 이용하여 임상 영역에서도 사용할 수 있음을 시사해 주지만 내독소 자극 섬유모 세포가 활성 산소 생산에 관여하는 기전에 대해서는 앞으로 더 많은 연구가 필요하다고 생각된다.

V. 결 론

본 연구는 배양 치주인대 세포에 활성 산소기를 제거하는 효소인 superoxide dismutase (SOD)를 세균 내독소(LPS)와 동시에 투여후 세포 활성 변화를 밝히고, 제1형 교원질, fibronectin, proliferating cell nuclear antigen (PCNA)에 대한 변화를 알아보기 위해 면역세포화학적 염색을 하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 치주인대 세포에 SOD 단독 투여시 실험 2, 3일째 부터 150U 이상의 고농도에서는 세포 활성도가 유의하게 증가하였다($P < 0.05$).
2. LPS(0.5, 5 μ g/ml)와 SOD를 동시 투여시 실험 2일 째 150U에서 부터 LPS 단독군 및 대조군에 비해 세포 활성도가 유의한 증가를 보였다($P < 0.05$).
3. 치주인대세포의 PCNA 지수에서는 LPS(5 μ g/ml)와 SOD를 혼합 투여한 경우 SOD 150U, 300U에서 배양 2,3일 째에 대조군 및 LPS 단독군에 비해 세포 활성도가 유의하게 증가하였다($P < 0.05$).
4. 제 1형 교원질에 있어서 LPS(5 μ g/ml)에 SOD를 혼합 투여한 경우 제1형 교원질발현은 SOD 150U 배양 3일에서 LPS 단독군 및 대조군에 비해 각각 유의한 증가를 보였다($P < 0.05$).

5. Fibronectin에 있어서는 LPS(0.5, 5 μ g/ml)에 SOD를 혼합 투여한 경우 fibronectin의 발현은 SOD 300U 배양 3일 째에 LPS 단독군 및 대조군에 비해 각각 유의한 증가를 보였다(P<0.05).

이상과 같은 결과로부터 염증 반응시 발생하는 활성 산소기에 대해 SOD가 세포 활성의 증가 능력, 교원질 및 fibronectin 등과 관련되어 생물학적 방어를 하며 이를 이용하여 임상 영역에서도 사용할 수 있음을 시사해 주지만, 내독소 자극 섬유모 세포가 활성 산소 생산에 관여하는 기전에 대해서는 앞으로 더 많은 연구가 필요하다고 생각된다.

참고 문헌

- Ambruso DR, Johnston RB : Lactoferrin enhances hydroxyl radical production by human neutrophils, neutrophil particulate fractions and an enzymatic generating system J. Clin. Invest. 67 : 352-360, 1981.
- McCord JM : Oxygen-derived free radicals in postschemic tissue injury. New. Eng. J. Med. 312 : 159-163, 1985.
- Jesen PK : Antimycin-insensitive oxidation of succinate and reduced nicotinamide adenine dinucleotide in electron transport particle. Biochem. Biophys. Acta. 122 : 157-161, 1966.
- Hinkel PC, Bultow RA Racker E, Chance B. : Partial resolution of the enzyme catalyzing oxidative phosphorylation J. Biochem. 242 : 5169-5175, 1967
- Loschen G, Flohe L, Chance B : Respiratory chain linked H₂O₂ production in pigeon heart mitochondria. FEBS. Lett. 18 : 261-265, 1971.
- Yoshida A, Miyachi Y, Imamura S : Mechanisms of reactive oxygen species-induced skin erythema and superoxide dismutase activity in guinea pigs. J. Dermatol. 14 : 569-575, 1987.
- Rajagoalan KV, Fridovich I, Handler P : Hepatic aldehyde oxidase. J. Biol. Chem. 237 : 922-928, 1962.
- Fridovich I : Superoxide dismutase. Ann. Rev. Biochem. 44 : 147-159, 1975 .
- Mason RF, Chingnell CF : Free radicals in pharmacology and toxicology-selected topics. Pharma. Rev. 33 : 189-194, 1981.
- Grandy SE, Buse MG, Crouch RK : Protective role of Superoxide Dismutase against diabetogenic drugs J. Clin. Invest. 70 : 650-658, 1982.
- Wong GH, Goeddel DV : Induction of manganese Superoxide Dismutase by tumor necrosis factor : Possible protective mechanism. Science. 242 : 941-944, 1988.
- Shaw JO, Henson J, Webster RO : Lung inflammation induced by complement-derived chemotactic fragments in the alveolus. Lab Invest. 42 : 547-541, 1980.
- McCormic JR, Harkin MM, Johnson KJ, Ward PA : Suppression by superoxide dismutase of immune complex-induced pulmonary alveolitis and dermal inflammation. Am. J. Pathol 102 : 55-61, 1981.
- Proctor PH : Free radicals and human disease. CRC handbook of free radicals and antioxidants. Vol I. 209-221, 1994.
- Asman B : Peripheral PMN cells on juvenile periodontitis J. Clin. Periodontol. 15 : 360-364, 1986.
- Kimura S, Yonemur T, Kaya H : Increased oxidative product formation by peripheral blood polymorphonuclear leukocytes in human periodontal diseases J. Periodontol Res. 28 : 197-203, 1993.
- 김운성, 유형근, 신형식. Superoxide Dismutase가 백서의 실험적 치은염과 3T3섬유모 세포의 활성에 미치는 영향. 원광치의학. 1995 : 5 : 75-92.
- Bartold PM, Wiebkin OW, Thonard JC :

- The effect of oxygen-derived free radicals on gingival proteoglycans and hyaluronic acid. *J. Periodontal Res.* 19 : 390-400, 1984.
19. Greenwald RA, Moy WW, Lazarus D : Degradation of cartilage proteoglycans and collagen by superoxide radical. *Arthritis & Rheuma.* 19 : 799-803, 1976.
 20. Greenwald RA, Moy WW : Inhibition of collagen gelation by action of the superoxide radical. *Arthritis & Rheuma.* 22 : 251-255, 1979.
 21. Yu CCW, Woods AL, Levinson DH. The assessment of cellular proliferation by immunohistochemistry. *Histochemical J.* 24 : 121-131, 1992.
 22. Morris GF, Matthews MB : Regulation of cellular nuclear antigen during cell cycles. *J. Bio. Chem.* 264 : 13856-13864, 1989.
 23. 이강남, 한수부, 이재일. 치은증식시 세포 구성과 성장 인자에 관한 면역조직화학적 연구. 대한 치주과학회지. 24 : 357-375, 1994.
 24. Fleishmajer R, Gay S, Perlish JS, Cesarini J : Immunoelectron microscopy of type III collagen in normal and scleroderma skin. *J. Invest. Dermat.* 75 : 189-191, 1980.
 25. Fleishmajer R, Oslen BR, Timple R, Perlish JS, Lovelace O : Collagen fibril formation during embryogenesis. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 80 : 3354-3358, 1983.
 26. Narayanan AS, Page RC : Connective tissues of the periodontium : A summary of current work. *Collagen & Related Res.* 3 : 33-64, 1983.
 27. Rao LG, Wang HM, Kalliecharan R, Heersche JNM, Sodek J : Specific immunohistochemical localization of type I collagen in porcine periodontal tissues using the peroxidase-labelled antibody technique. *Histochemical Journal* 11 : 73-82, 1979.
 28. Wang HM, Nanda V, Rao LG, Melcher AH, Heersche JNM, Sodek J : Specific immunohistochemical localization of type III collagen in porcine periodontal tissues using the peroxidase-anti-peroxidase methods. *Journal of Histochem. & Cytochem.* 28 : 1215-1223, 1980.
 29. Tung PS, Domenicucci C, Wasi S and Sodek J : Specific immunohistochemical localization of osteonectin and collagen type I and III in fetal and adult porcine dental tissues. *J. Histochem. Cytochem. Cytochem.* 33 : 531-540, 1985.
 30. Takita K, Ohsaki Y, Nakata M, Kurisu K : Immunofluorescence localization of type I and type III collagen and fibronectin in mouse dental tissues in late development and during molar eruption. *Archs Oral. Biol.* 32 : 273-279, 1987.
 31. Huang YH, Ohsaki Y and Kurisu K : Distribution of type I and type III collagen in the developing periodontal ligament of mice. *Matix*, 11 : 25-35, 1991.
 32. Hynes RO, Yamada KM : Fibronectins : Multifunctional modular glycoproteins. *J. Cell Biol.* 195 : 369-377, 1982.
 33. Mosher DF, Furcht LT : Fibronectin review of its structure and possible functions. *J. Invest. Dermatol.* 77 : 175-18, 1981.
 34. Ginsberg MH, Painter RG, Forsyth J, Birdwell C, Plow ZEF : Thrombin increases expression of fibronectin antigen on the platelet surface. *Pro. Nat. Acad. Sci.* 77 1049-1053, 1980.
 35. Murray JC, Stingl G, Kleiman HK, Martin GR, Katz SI : Epidermal cells adhere preferentially to type IV (basement membrane) collagen. *J. Cell Biol.* 80 : 197-201, 1979.
 36. Klebe, RJ : Isolation of a collagen-dependent cell attachment factor. *Nature (London)*, 250 : 248-251, 1974.

37. Yamada, K M, Yamada SS, Pastan L : The major cell surface glycoprotein of chick embryo fibroblasts is an agglutinin. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, 72 : 3158–3162, 1975.
38. Pearlstein, E. : Plasma membrane glycoprotein which mediates adhesion of fibroblasts to collagen, *Nature(London)*, 262 : 497–500, 1976.
39. Freeman BA, Crapo JD : Biology of disease : Free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 47 : 412–426, 1982..
40. Greenwald RA : Effect of oxygen-derived free radicals on connective tissue macromolecules. In : Bannister WH, Bannister JV, eds. *Developments in Biochemistry* Vol. 11B. Amsterdam : Elsevier. 160–191, 1980.
41. Greenwald RA, Moy WW : Effect of oxygen-derived free radicals on hyaluronic acid. *Arthritis Rheum.* 23 : 455–460, 1980.
42. Greenwald RA, Moy WW, Lazurus D : Degradation of cartilage proteoglycans and collagen by superoxide radicals. *Arthritis Rheum.* 19 : 499–503, 1976.
43. Babior BM, Kipnes RS, Cornutte JT. Biological defense mechanisms : The production by leukocytes of superoxide a potential bactericidal agent. *J Clin. Invest.* 52 : 41–45, 1973.
44. Babior BM : Oxidants from phagocytes : Agents of defense and destruction. *Blood* 64 : 959–963, 1984.
45. Drath DB, Karnovsky ML : Superoxide production by phagocytotic leukocytes. *J. Exp. Med.* 141 : 25–262, 1975.
46. Fantone JC, Ward PA : Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reactions. *Am. J. Pathol.* 107 : 397–402, 1982.
47. Flohe L, Giertz H : Endotoxins, arachidonic acid, and superoxide formation. *Rev. Infect. Dis.* 9 : S553–557, 1987.
48. Weissman G, Korchak HM, Perez HD, Smolen JE, Goldstein IM, Hoffstein ST : Leukocytes as secretory organs of inflammation. *Adv. Inflammation Res.* 1 : 95–99, 1974.
49. Huber W, Schulte YL, Carson S, Goldhammer RE, Volgin EE : Some chemical pharmacological properties of a novel anti-inflammatory product. *Toxic Appl. Pharmacol.* 12 : 308–311, 1968.
50. Charon J, Suzuki B, Collison B, Capron A : Influence of bacterial preparation on PMN oxygen metabolism measured by chemiluminescence. *J. Dent. Res. Abst (1810)*, 1985.
51. Jacoby BH, Davis WL : The electron microscopic immunolocalization of copper-zinc superoxide dismutase in association with collagen fibers of periodontal soft tissues. *J Periodontol.* 62 : 413–420, 1991.
52. Carranza FA. *Glickman's clinical periodontology.* 6th ed, pp 370, 1984.
53. Cheetham WA, Wilson M, Kieser JB : Root surface debridement-an vitro assessment. *J Clin. Periodontol.* 15 : 288–292, 1988.
54. Jones W, O'Leary T : The effectiveness of in vivo not planning in removing bacterial endotoxin from the roots of periodontally involved teeth. *J Periodontol.* 49 : 337–341, 1978.
55. Miyachi K, Fritzlner MJ, Tan EM : Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. *J. Immunol.* 121 : 2228–2234, 1978.
56. Robbins BA, Vega D, Ogata K, Tan EM, Nakamura RM : Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen in solid human malignancies. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 11 : 841–845, 1987.
57. Dierendonck JH, Eijnsman JH, Keijer R,

- Velde CJH, Comelisse CJ : Cell-cycle-related staining patterns of anti-proliferating cell nuclear antigen monoclonal antibodies. *Am. J. Pathol.* 138 : 1165–1172, 1991.
58. Yu CCW, Woods AL, Levinson D : A review of currently available methods and their applications. *Histochemical J.* 24 : 121–131, 1992.
59. Miyagawa S, Okada N, Takasaki Y, Iida T, Kitano Y, Yoshikawa K, Teinberg ML : Expression of proliferating cell nuclear antigen/cyclin in human keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 93 : 678–681, 1988.
60. Toschi L, Bravo R : Changes in cyclin/proliferating cell nuclear antigen distribution during DNA repair synthesis. *J. Cell. Biol.* 107 : 1623–1628, 1988.
61. Cellis JE, Ceils A : Cell cycle dependent variations in the distribution of the nuclear protein cyclin proliferating cell nuclear antigen in cultured cells : subdivision of S phase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82 : 3262–3266, 1985.
62. Thaete LG, Ahnen DJ, Malkinson AM : Prolifiting cell nuclear antigen(PCNA) immunohistochemistry as a labeling index in mouse lung tissues. *Cell tissue Res.*, 256 : 167–170, 1989.
63. Morris GF, Matthews MB : Regualtion of cell nuclear antigen during cell cycles. *J Biol Chem.* 264 : 13856–13860, 1989.
64. Kurki P, Vanderlaan M, Dolbeare F, Gray J, Tan EM : Monoclonal antibodies to proliferating cell nuclear antigen/cyclin as probes for proliferating cells by immunofluorescence microscopy and flow cytometry. *J immunol. Methods* 109 : 49–54, 1988.
65. McCord JM : Protection of synovial fluid by superoxide dismutase. *Science* 185 : 529–531, 1971.
66. Cho MI, Garant PR, Lee YL : Immunohistological localization of collagen(I and III) and fibronectin in inflammed and non-inflammed gingival connective tissue and sulcular fluid of beagle dogs *J. Perodont. Res.* 19 : 638–641, 1984.
67. Cho MI, Lee YL, Garant PR. : Immunocytochemical localization of extracellular matrix components in beagle periodontium : I. Collagen types I and II in healthy gingival connective tissue. *J. Perodont. Res.* 22 : 313–319, 1987.
68. Sadnell LJ, Boyd CD : In Extracellular Matrix Genes. *Ann. Rev. Biochem.* 5, 837–872, 1990.
69. Burgeson RE, Hebda PA, Moris NP, Hollister DW. : Human Cartilage Collagens. *J Bio. Chem.* 257 : 7852–7856, 1992.
70. Von der Mark K. Immunological studies on collagen type transition in chondrogenesis. Monroy A, Moscona AA, eds. *Current Topics in Development Biology.* vol. 14 new york : academic press. 199–225, 1980.
71. Stenman S, Vaheri : Distribution of a major connective tissue protein, fibronectin, in normal human tissue. *J. Exp. Med.*, 147 : 1054–1064, 1978.
72. Hayasi M, Yamada KM : Differences in Domain Structures between Plasma and cellular Fibronectins. *J. Biol. Chem.* 256 : 11292–11300, 1985.
73. McDonagh J : . Fibronectin : A Molecular Clue. *Arch Pathol. Lab. Med*, 105 : 393–396, 1981.
74. Thesleff L, Stenman S, Vaheri A, Timpl R : Changes in the matrix proteins, fibronectin and collagen, during differentiation of mouse tooth germ. *Dev. Biol.*, 70 : 116–126, 1979.
75. Lechner JH, Kalnitsky G : The presence of large amounts of type III collagen in

- bovine dental pulp and its significance with regard to the mechanism of dentinogenesis. *Archs Oral Biol.* 26 : 265–273, 1981.
76. Hendrix MJ, Hay ED, Mark K, Linsenmayer TF : Immunohistochemical localization of collagen I and II in the developing chick cornea and tibia by electron microscopy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 22 : 359–375, 1982.
77. Caffesse RG, Smith BA Nasjileti CE, Lopetin DE : Cell Proliferation after Flap Surgery, Root Conditioning and Fibronectin Application. *J. Periodontol.* 58 : 661–666, 1987.
78. Uitto VJ, Larjava H, Peltonen J, Brunette DM. : Expression of fibronectin and integrins in cultured periodontal ligament epithelial cells. *J. Dent. Res.* 71 : 1203–1211, 1992.

Explanation of figure

- Fig. 1. Control group at 1 day after cultivation(Immunostain of PCNA, $\times 100$).
- Fig. 2. LPS($5\mu\text{g}/\text{ml}$) group at 1 day after cultivation(Immunostain of PCNA, $\times 100$).
- Fig. 3. LPS($5\mu\text{g}/\text{ml}$) & SOD 50U group at 1 day after cultivation(Immunostain of PCNA, $\times 100$).
- Fig. 4. LPS($5\mu\text{g}/\text{ml}$) & SOD 150U group at 3 day after cultivation(Immunostain of PCNA, $\times 100$).
- Fig. 5. Control group at 1 day after cultivation(Immunostain of Collagen type I, $\times 100$).
- Fig. 6. LPS($5\mu\text{g}/\text{ml}$) group at 1 day after cultivation(Immunostain of Collagen type I, $\times 200$).
- Fig. 7. LPS($0.5\mu\text{g}/\text{ml}$) & SOD 50U group at 1 day after cultivation(Immunostain of Collagen type I, $\times 100$).
- Fig. 8. LPS($5\mu\text{g}/\text{ml}$) & SOD 150U group at 3 day after cultivation(Immunostain of Collagen type I, $\times 200$).
- Fig. 9. Control group at 1 day after cultivation(Immunostain of Fibronectin, $\times 100$).
- Fig. 10. LPS($5\mu\text{g}/\text{ml}$) group at 1 day after cultivation(Immunostain of Fibronectin, $\times 100$).
- Fig. 11. LPS($5\mu\text{g}/\text{ml}$) & SOD 50U group at 1 day after cultivation(Immunostain of Fibronectin, $\times 100$).
- Fig. 12. LPS($5\mu\text{g}/\text{ml}$) & SOD 150U group at 3 day after cultivation(Immunostain of Fibronectin, $\times 200$).

논문 사진부도(1)

Fig 1.

Fig 2.

Fig 3.

Fig 4.

Fig 5.

Fig 6.

논문 사진부도(2)

Fig 7.

Fig 8.

Fig 9.

Fig 10.

Fig 11.

Fig 12.

IMMUNOCYTOCHEMICAL STUDY OF THE EFFECT OF SUPEROXIDE DISMUTASE ON THE PERIODONTAL LIGAMENT CELLS

Hyun-Koo Kang, Jung-Ku Kang, Hyung-Keun Yoo, Hyung-Shik Shin
Department of Periodontology, College of Dentistry, Wonkwang University

The cells associated with normal defense mechanism in inflammation release free oxygen radicals, hydroxy radicals, and various protease, all of which can damage the surrounding cells (fibroblasts) and matrix molecules (collagen). The objective of this study was to evaluate the effects of "scavenger" enzyme, superoxide dismutase (SOD), to periodontal ligament (PDL) cells.

Human PDL cells were cultured from the teeth extracted for non-periodontal reason. Cultured PDL cells in vitro were treated with SOD and LPS according to dosage and culture times. Cellular activity was examined by Microtitration (MTT) assay. The quantitative expression of cellular proliferation by proliferating cell nuclear antigen (PCNA), collagen type I and fibronectin by indirect immunocytochemically stain in PDL cells were done.

The results were as follows :

1. As only SOD treated group at 2 and 3 days, PDL cell activity was significantly increased at more than 150U ($P < 0.05$).
2. When LPS (0.5, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and SOD (more than 150U) were added together, it was significantly increased than LPS only treated and control groups at 2 days ($P < 0.05$).
3. When LPS (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and SOD (150, 300U) were added together, PCNA index was significantly increased than LPS only treated and control groups at 2 and 3 days ($P < 0.05$).
4. When LPS (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and SOD (150U) were added together, collagen type I was significantly increased than LPS only treated and control groups at 3 days ($P < 0.05$).
5. When LPS (0.5, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and SOD (300U) were added together, fibronectin was significantly increased than LPS only treated and control groups at 3 days ($P < 0.05$).

On the above the results, the SOD in association with collagen type I, fibonectin, and PCNA may afford biological protection to oxy-radicals that were typically liberated during normal inflammatory response. Thus, the exogenous application of SOD may be effective in the treatment of the localized breakdown associated with chronic periodontal disease.