

## 연쇄구균의 세포벽 단백질 추출물이 림프구 활성의 억제에 미치는 영향

원광대학교 치과대학 치과보존학교실  
상현숙 · 정희일 · 오세홍, 임미경

### Abstract

#### THE INHIBITORY EFFECT OF STREPTOCOCCAL CELL WALL EXTRACTS ON STIMULATION OF LYMPHOCYTES

Hyoung-Sook, Sang, D.D.S., Hee-Il, Jeong, D.D.S., M.S.D., Se-Hong, Oh,  
D.D.S., M.S.D., and Mi-Kyung, Im, D.D.S., M.S.D., Ph.D.

*Department of Conservative Dentistry, College of Dentistry, Wonkwang University*

The inhibitory effect of cell wall extracts of *streptococci*, have been investigated to know host-parasite relationship or pathogenesis of abscess formation.

*Streptococci* isolated from the infected root canals were sonicated to get cell wall extracts which have been known as one of the factors of pyogenesis. Lymphocytes separated by density gradient were stimulated with phytohemagglutinin and exposed to cell wall extracts of *Streptococcus sanguis*, *S. mitis*, *S. uberis*, *S. mutans* (ATCC 10449), and *S. faecalis* (ATCC 19433). [<sup>3</sup>H]-thymidine uptake of lymphocytes was analyzed with scintillation counter and lactate dehydrogenase (LD) activity was measured with autochemistry analyzer.

*S. faecalis* had the strongest inhibitory effect, beginning at 100 µg/ml concentration of sonic extracts. *S. sanguis* and *S. mitis* had inhibitory effect at 300 µg/ml, while *S. uberis* and *S. mutans* showed no inhibitory effect on DNA synthesis even at 300 µg/ml.

Each *streptococci* showed different inhibitory effect on the DNA synthesis of lymphocytes, which finding indicated wide spectrum of susceptibility of lymphocytes according to *streptococcus* spp. There were no significant difference of LD activities between control and each streptococcal extracts. Streptococcal sonic extracts did not affect the morphological findings or number of colonies activated lymphocytes. These finding suggested the inhibitory effect of sonic extract of streptococci to lymphocytes could be detected by DNA synthesis inhibition, not by cellular membrane damage.

## I. 서 론

세균은 치수 및 치근단 질환의 주요한 원인으로 Kakehashi 등<sup>1)</sup>의 연구에서 치수의 괴사 및 치근단부 골의 흡수는 무균 상태인 쥐에서는 발생하지 않는다는 것이 알려졌다. 세균은 치아 우식부의 상아세관을 통하여 또는 치주 질환이나 인접한 치근단 병소로부터 치수로 침입하며 이들을 세균 배양하여 확인할 수 있는데 통상적인 방법으로 근관내의 세균을 배양하면 연쇄 구균, *enterococci*, *diphtheroid*, *micrococci*, *staphylococci*, *lactobacilli*, *enterobacteria*, *Candida albicans*, *Neissera*와 *Veillonella* 등이 발견된다<sup>2)</sup>.

Brown 등<sup>3)</sup>의 초기 연구에서는 외상으로 괴사된 치아의 24%에서만 혐기성 세균이 발견되었다. 그러나 혐기성 세균의 배양 방법이 발달함에 따라 Sudqvist 등<sup>4)</sup>은 외상으로 인하여 괴사된 치수의 90% 이상의 증례에서 혐기성 세균의 분리율을 보고하였다. 이후 여러 연구에서 *Bacteroides* spp.가 근관 감염에서 자주 분리되면서 혐기성 세균 중 이 세균이 근관 감염의 중요한 원인균으로 주목받고 있다<sup>5-10)</sup>. 통상 혐기성 세균 중에서는 연쇄 구균이 관심의 대상이 되고 있는데 연쇄 구균 중 치근단 농양에서는 *S. milleri*가 자주 분리된 바 있다<sup>1)</sup>. Fisher 등<sup>12)</sup>은 치근단 농양이 형성된 환자에서 *milleri* group의 연쇄 구균을 중심으로 연구한 바 있다. 농양 형성에서 연쇄 구균은 절대 혐기성 세균이 근관내에서 성장하도록 하는 환경을 제공하는 것으로 알려졌다<sup>13)</sup>. 또한 *milleri* group의 연쇄 구균이 혐기성 세균과 상호 상승 작용하여 농양을 형성한다고 보고된 바 있으며<sup>14)</sup> Matusow 등<sup>15-17)</sup>은 일련의 연구에서 치근단 농양이 확산되어 봉와직염을 유발한 경우에 연쇄 구균이 중요한 역할을 한다고 하였다.

근관 감염에서는 이와 같이 여러 세균이 검출되며 이 중 발현율이 높은 세균을 주요한 원인균으로 추정하고 있으나, 실제로 이들 균주가 조직에 대하여 나타내는 세포독성에 관한 연구는 적다.

질환 부위에서 배양한 세균에 대한 독성의

평가는 주로 세포 배양을 통한 독성 검사로 이루어져 왔다. Higerd 등<sup>18)</sup>은 *S. mutans* 12종을 비롯한 수종의 구강내 세균의 세포외 단백질이 영구 세포주 2종과 사람의 림프구에 나타내는 독성을 연구하였다. Duguid 등<sup>19)</sup>은 구강의 연쇄구균과 *Actinomyces* 균주의 세포벽 추출물이 배양된 HeLa세포에 미치는 독성을 [<sup>3</sup>H]-thymidine uptake와 radiochromium 방출법을 이용하여 연구하였다.

이에 본 연구는 원광대학교 치과병원 보존과에 내원한 환자의 감염근관에서 분리된 연쇄구균을 대상으로 세포벽 단백질을 추출하였으며 세포 독성 효과를 판정하기 위하여 사람의 혈액을 채취하여 밀도차에 의하여 림프구를 분리하였다. 분리된 림프구를 활성화시킨 후 세균의 세포벽 추출물을 첨가하여 이 추출물이 림프구 활성을 억제시키는지를 관찰하였다. 본 연구를 통하여 면역학적인 기전에 의한 체내 방어기전 혹은 농양 형성의 기전에 대해 기초적인 조사를 하고자 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 세균배양

원광대학교 부속 치과병원 보존과에 내원하여 근관치료를 받은 환자 중 단일 근관을 가진 초진 환자의 전치와 소구치를 대상으로 세균을 배양하였다. Rubber dam으로 치아를 격리하고 치아와 인접 조직 및 clamp를 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 요오드액으로 닦아서 소독하였다. 멸균 소독한 고속 bur로 근관 와동을 무균적으로 형성하기 시작하여 상아질에 도달하면 다시 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 요오드액으로 닦아내고 멸균된 저속 bur로 근관 와동 형성을 완결하였다. Endodontic explorer로 근관 입구를 확인한 후 멸균된 paper point나 file을 치근단부로 추정되는 부위까지 집어넣고 근관내의 삼출액과 조직액에 약 15초간 접촉시켰다. Ringer용액 3ml이 든 시험관에 옮겨 Vortex mixer로 1분간 진탕한 후에 면양 혈액 한천배지에 100 $\mu$ l를 접종하여 7자 유리병으로 고르게 도포하였다. 정확한 세균 수를 산정하기 위해 검체가 든 Ringer 용액을

생리식염수로 10배수씩 희석하였다. 37°C, 10% CO<sub>2</sub>배양기 (비전 과학, Model No. VS-9108 MS, 한국)에서 1~2일간 배양하여 배지에서 자란 균 집락의 형태를 관찰하고 집락의 수를 셀 후 모양이 비슷한 집락을 순수 배양하였다. 순수 배양된 각 세균을 brain heart infusion (BHI)액체 배지에 풀어서 37°C, 10% CO<sub>2</sub>배양기에 1일 배양한 후 균액 0.85ml과 소독된 glycerol 0.15ml을 섞은 후 -70°C의 Ultra Low Temperature Freezer (Revco Scientific Inc., Model No. ULT 2186-5-D-A, USA)에 장기간 보관하였다.

## 2. 연쇄 구균의 동정

냉동고에 보관된 세균을 백금이로 면양 혈액 한천 배지와 MacConkey배지에 접종하여 10% CO<sub>2</sub> 배양기에서 2일간 배양하였다. 세균의 동정은 한천배지에서의 세균 집락의 용혈 양상과 그람염 결과 및 생화학 반응검사로 시행하였다. 그람염색의 결과 그람 양성 구균이며 MacConkey배지에서 자라지 않은 세균을 대상으로 하여 catalase 검사를 시행하여 catalase 반응에 음성인 경우 *Streptococcus* spp.로 간주하여 생화학반응 검사를 시행하였다.

생화학 검사는 자동 세균 동정 기기인 Vitek Systems (BioMerieux, MO, USA)의 gram positive identification (GPI) card를 이용하였다. 방법을 간단히 설명하면 순수 배양된 세균의 집락을 0.45% NaCl 1.8ml에 McFarland No.1의 탁도로 풀었다. GPI card에 작업 번호를 적은 후 transfer tube로 세균액과 카드를 연결시켜 filling stand에 세운 후 filling rack에 장치하였다. Vitek Systems 기기의 filling module에 filling rack을 넣고 세균액을 흡입시켜 각 well에 세균이 고르게 들어가도록 하였다. Filling stand를 Vitek Systems 기기의 sealer module에 밀어 넣어 카드로부터 transfer tube를 절단 분리 하였다. 균액이 들어간 카드를 Vitek Systems 기기의 reader/incubator tray에 꽂은 후 프린터 상태를 확인하고 약 16시간 반응시켰다.

GPI card의 각 Well에 든 생화학 시약은 시

간이 경과하면서 세균에 의해 시약의 색조가 변화를 나타내며 이 변화에 따라 기체가 그 결과를 양성으로 음성으로 자가 인식하여 그 결과를 코드화하여 내장된 컴퓨터의 테이타베이스로부터 균주를 찾아내어 프린터로 출력하도록 되어 있다. 동정된 세균을 30% glycerol에 풀어서 저온냉동고에 보관하였다.

## 3. 연쇄 구균 세포벽 추출물의 분리

본 실험에서는 감염근관에서 분리한 3균주의 *S. sanguis*, *S. mitis*, *S. uberis*와 표준 균주인 *S. mutans* (ATCC 10449)와 *S. faecalis* (ATCC 19433)등 5 균주를 사용하였다. 냉동고에 보관된 각 세균을 실온에서 녹인 후 면양혈액 한천배지에 접종하고 37°C 10% CO<sub>2</sub>배양기에 1일간 배양한 후 형성된 균 집락을 thioglycolate broth 30ml에 10시간 증균한 후 BHI 액체배지 3L에 옮긴후 배양기에서 24시간 더 배양하였다. 액체배지를 원심분리기에서 23,000 xg에서 10분간 원심분리하여 세균의 침전물을 만들고 생리 식염수로 3회 세척하였다.

인산완충용액으로 균액을 부유시킨후, Braumson 1510 sonicator로 얼음 위에서 100-w output에서 15분간 sonication하여 세포벽 단백질을 추출하였다. 세포의 파괴를 그람 염색하여 현미경으로 확인하고 11,000xg에서 30분간 원심분리하여 상청액을 회수한 후 침전물을 다시 위와 같은 방법으로 약 15분간 sonication하였다. Sonication이 완결되면 회수한 상청액을 11,000xg에서 30분동안 원심분리하고 세포가 없는 상청액을 인산완충용액에 대하여 cutoff가 6,000에서 8,000인 투석막 (dialysis membrane)을 이용하여 4°C 냉장실에서 24시간 동안 투석하였다. 투석된 투석막내의 세포벽 추출물을 0.2um syringe filter를 이용하여 여과시켰다. 세포벽 추출물의 단백질의 농도를 표준 곡선을 그린후 (Table 1, Fig. 1) bovine serum albumin (Gibco BRL, USA)을 표준으로 하여 분광광도계 (595nm)를 사용하여 정량하였다. 단백질의 농도를 조절하기 위하여 Mini-con 농축기를 사용하여 농축하였고, 희석이 필요한 경우 인산완충용액으로 희석하였다.

Table 1. Bradford's Standard Curve according to bovine serum albumin concentration.

| Concentration( $\mu\text{g/ml}$ ) | Optical density(mean $\pm$ SD) |
|-----------------------------------|--------------------------------|
| 10                                | 58.0 $\pm$ 4.0                 |
| 20                                | 87.8 $\pm$ 5.5                 |
| 30                                | 148.7 $\pm$ 1.2                |
| 40                                | 198.7 $\pm$ 8.1                |
| 50                                | 229.7 $\pm$ 2.1                |
| 60                                | 271.7 $\pm$ 9.0                |
| 70                                | 292.7 $\pm$ 0.0                |
| 80                                | 324.0 $\pm$ 7.0                |
| 90                                | 344.7 $\pm$ 7.4                |
| 100                               | 387.3 $\pm$ 10.1               |

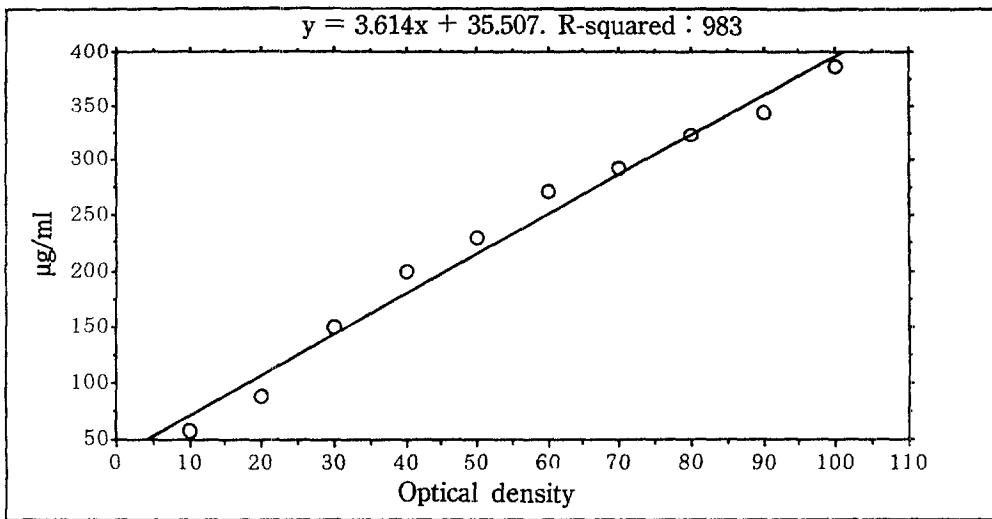


Fig. 1. Bradford's standard curve

#### 4. 림프구의 분리

건강한 성인으로부터 정맥혈을 약 10ml 채혈하여, 방부제가 들어있지 않은 헤파린(preservative free heparin, 20mg/ml)이 든 튜브에 담고, 동량의 생리식염수로 희석한 후 Lymphoprep(Nxcomed AS, Norway, s.g 1.077 g/ml)에 중첩하였다. Pasteur pipette를 이용해 희석 혈액과 Lymphoprep의 비율은 3 : 1 정도 되도록

하였다. 400g에서 30분간 원심분리하여 (Damon/Iec Division, CRU-5000 Centrifuge, U.S.A.), 비중차에 의해 생긴 단핵구층을 Pasteur pipette를 이용해 회수한 후 10% fetal calf serum이 든 IMDM (Iscove's modified dulbecco's medium)으로 2회 세척하여, 세포수를  $2 \times 10^6/\text{ml}$ 로 조정하였다. 세포수는 세포부유액과 동량의 1% trypan blue용액을 섞은 후 he-

mocytometer에서 현미경으로 관찰하였으며, 이때 생존도(viability)와 순수도(purity)를 구하여 생존도, 순수도가 각각 95% 이상의 림프구를 대상으로 하였다.

### 5. 림프구 활성 억제효과의 관찰

#### 1) [<sup>3</sup>H]-thymidine uptake의 측정

분리된 림프구를 ml당  $2 \times 10^6$ ml로 조절한 후 96-well 세포 배양용 plate에 well당 100 $\mu$ l를 분주한 후 phytohemagglutinin (PHA, 50 mg/ml)를 well당 20 $\mu$ l를 가하여 림프구의 활성을 촉진시켰다. 준비된 각 연쇄 구균의 세포벽 추출물을 10 $\mu$ g/ml, 50 $\mu$ g/ml, 100 $\mu$ g/ml과 300 $\mu$ g/ml 농도로 조절하여 림프구가 들어 있는 well에 각각 100 $\mu$ l씩 가하여 3일간 배양하였는데, 배양 마지막 2시간 동안 [<sup>3</sup>H]-thymidine (1.0 mCi/ml, specific activity 79 Ci/mmol, Dupont, NEN, England)을 well당 25 $\mu$ l씩 첨가하였다. Microplate를 Tray mixer로 흔들어 세포를 부유시키고 micropipette을 이용하여 채부유시킨 후, cell harvester (Innotech, Sweden)로 glass fiber 필터 (Type G-7, Innotech, Sweden)에 대해 림프구를 수거하였다. 각 well에 해당하는 glass fiber 필터를 counting vial에 넣고, cocktail 용액을 2ml씩 넣은후 Vortex mixer로 혼합하였다. Liquid scintillation counter (Beckman, USA)를 이용하여 분당방사능(count per minute, cpm)을 측정하고 후 다음과 같이 대조군에 대한 [<sup>3</sup>H]-thymidine uptake의 비율을 계산하였다.

$$\text{DNA syntheise (\%)} = \frac{\text{count per minute, experiment}}{\text{count per minute, control}} \times 100$$

대조군에 대한 각 균의 DNA 합성능을 Student's t-test를 이용하여 통계 검정하였다.

- 2) Lactate dehydrogease (LDH)를 이용한 림프구 분화의 억제  
밀도차를 이용하여 분리한 림프구를 IMDM

배지로 림프구의 수를  $2 \times 10^6$ /ml로 조정하였다. 96-well plate의 각 well에 100 $\mu$ l씩 넣고 30분 후 PHA (5 $\mu$ g/ml) 20 $\mu$ l를 첨가하였다. 30분후 *S. sanguis*, *S. mutans*와 *S. fecalis* 균주의 세포벽 추출물을 50, 100, 500 $\mu$ g/ml 농도별로 100 $\mu$ l씩 각 well에 분주하였다. 대조군으로는 IMDM배지 10 $\mu$ l를 분주한 것을 37 $^{\circ}$ C CO<sub>2</sub>배양기에서 48시간 반응시킨 후 200 $\mu$ l를 sample cup에 옮긴 후 Chem-1 자동화학 분석기 (Technicon, Deutch)로 측정하였다. 측정원리는 LD 효소는 NAD 존재하에 L-lactate를 pyruvate로 전환하는 효소로서 LDH활성도는 NADH 생성 속도를 측정하여 구한다.

#### 3) 림프구의 형태 관찰

말초 혈액에서 비중차를 이용해 림프구를 분리한 후, 96-well microplate에 각 well당  $2 \times 10^6$ 씩 분주하였다. PHA (5 $\mu$ g/ml) 20 $\mu$ l를 넣고, 추출한 연쇄구균 세포벽 추출물을 각 농도별 (10, 50, 100, 300 $\mu$ g/ml)로 100 $\mu$ l씩 넣고 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 세포배양기에서 48시간동안 배양하였다. 연쇄구균 세포벽 추출물이 림프구 형태 및 집락 형성에 미치는 효과를 역상 현미경으로 관찰하고 사진을 촬영하였다.

### III. 실험성적

#### 1) [<sup>3</sup>H]-thymidine uptake의 측정 결과

연쇄구균의 세포벽 추출 단백질이 사람의 말초 혈액에서 분리한 림프구에 나타내는 독성 효과는 Table 2 및 Fig.2와 같다.

*S. sanguis*의 세포벽 단백질을 10 $\mu$ g/ml의 농도로 림프구에 첨가하면 대조군에 대한 DNA 합성능은 84.8%로 나타났다. 세포벽 단백질의 농도를 50 $\mu$ g/ml로 증가시키면 대조군에 대한 DNA의 합성능은 77%로 감소하였다. 단백질의 농도를 300 $\mu$ g/ml로 증가시키면 대조군에 대한 DNA의 합성능은 58.3%로 유의하게 감소하였다( $p < 0.05$ ).

*S. mitis*의 세포벽 단백질을 10 $\mu$ g/ml의 농도로 림프구에 첨가하면 대조군에 대한 DNA의 합성능은 88.8%였으며 세포벽 단백질의 농도를

Table 2. DNA synthesis (%) of human lymphocytes affected by sonic extracts of *Streptococcus* spp.(mean  $\pm$  SD)

| Sonic extract<br>( $\mu\text{g/ml}$ ) | Strain <i>S. sanguis</i> | <i>S. mitis</i> | <i>S. uberis</i> | <i>S. mutans</i><br>(ATCC 10449) | <i>S. faecalis</i><br>(ATCC 19433) |
|---------------------------------------|--------------------------|-----------------|------------------|----------------------------------|------------------------------------|
| 10                                    | 84.8 $\pm$ 9.3           | 88.8 $\pm$ 1.9  | 80.5 $\pm$ 9.8   | 80.8 $\pm$ 5.1                   | 90.3 $\pm$ 13.5                    |
| 50                                    | 77.0 $\pm$ 5.8           | 78.0 $\pm$ 8.9  | 79.5 $\pm$ 2.4   | 82.8 $\pm$ 9.3                   | 88.7 $\pm$ 19.9                    |
| 100                                   | 80.3 $\pm$ 10.0          | 74.3 $\pm$ 1.3  | 78.8 $\pm$ 4.8   | 78.8 $\pm$ 5.3                   | 57.5 $\pm$ 9.0                     |
| 300                                   | 58.3 $\pm$ 2.2           | 57.5 $\pm$ 3.1  | 80.8 $\pm$ 5.1   | 75.8 $\pm$ 14.0                  | 49.5 $\pm$ 8.9                     |

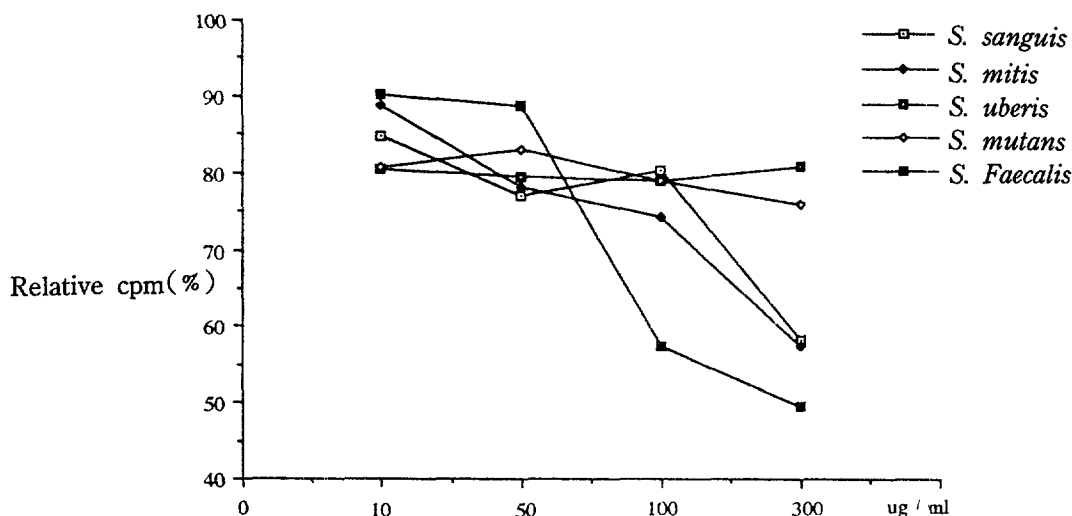


Fig. 2. Relative DNA synthesis of lymphocytes exposed to sonic extracts of *Streptococcus* spp. for 48 hours.

50 $\mu\text{g/ml}$ 로 증가시키면 DNA의 합성능은 78%로 나타났고 100 $\mu\text{g/ml}$ 로 증가시키면 74.3%로 나타났다. 세포벽 단백질의 농도를 300 $\mu\text{g/ml}$ 로 높이면 DNA의 합성능은 57.5%로 유의하게 감소되었다( $p < 0.05$ ).

*S. uberis*의 세포벽 단백질을 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 림프구에 첨가하면 대조군에 대한 DNA의 합성능은 80.5%였다. 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 대조군에 대한 DNA 합성 정도는 79.5%였다.

표준 균주인 *S. mitis*의 세포벽 단백질의 농도를 10 $\mu\text{g/ml}$ 로 하여 배양한 림프구에 첨가하면

대조군에 대한 DNA의 합성능은 80.8%이었다. 세포벽 단백질의 농도를 50 $\mu\text{g/ml}$ 로 증가시키면 대조군에 대한 DNA의 합성능은 82.8%로 나타났다. 단백질의 농도를 100 $\mu\text{g/ml}$ 로 증가시켜도 78.8%로 비슷하였다. 세포벽 단백질의 농도를 300 $\mu\text{g/ml}$ 로 증가시켰을 때에는 75.8%로 나타났다.

표준균주인 *S. faecalis*의 세포벽 단백질의 농도를 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 배양한 림프구에 첨가한 경우 대조군에 대한 DNA 합성능은 90.3%, 50 $\mu\text{g/ml}$  농도에서는 88.7%로 나타났다. *S. fae-*

*calis* 세포벽 단백질의 농도를 100 $\mu$ g/ml의 농도로 증가시키면 DNA 합성능은 57.5%, 300  $\mu$ g/ml로 농도를 더욱 증가시키면 49.5%로 유의한 DNA 합성 억제 효과가 있었다( $p < 0.05$ ).

이상과 같은 결과에서 연쇄구균의 세포벽 단백질이 림프구의 DNA 합성에 미치는 영향은 세포벽 단백질의 농도가 증가됨에 따라서 DNA의 합성능도 감소되어 나타났으나, 균주에 따라 약간씩 다른 결과를 보였다. *S. faecalis* 균주는 세포벽 단백질이 100 $\mu$ g/ml과 300 $\mu$ g/ml 농도인 경우에는 림프구의 DNA의 합성을

유의하게 억제하였다( $p < 0.05$ ). 반면 *S. uberis*와 *S. mutans*는 300 $\mu$ g/ml농도에서도 DNA 합성이 억제되지 않았다.

2) Lactate dehydrogenase (LDH)를 이용한 연쇄구균 세포벽 단백질의 림프구 억제 효과

*S. sanguis*, *S. mitis*와 *S. faecalis*등 3균주 단백질 추출물을 50, 100, 500 $\mu$ g/ml을 가한 후 측정된 LDH의 값은 Table 3 및 Fig. 3과 같다.

*S. sanguis*는 세포벽 추출물 단백질의 농도를

Table 3. Lactate dehydrogenase levels (IU/ml) of lymphocytes affected by sonic extracts of *Streptococcus* spp\*.

| Sonic extract conc. ( $\mu$ g/ml) | <i>S. sanguis</i> | <i>S. mitis</i> | <i>S. faecalis</i> |
|-----------------------------------|-------------------|-----------------|--------------------|
| 50                                | 45.7 $\pm$ 1.5    | 49.0 $\pm$ 3.0  | 58.3 $\pm$ 1.1     |
| 100                               | 40.0 $\pm$ 1.0    | 50.3 $\pm$ 4.0  | 51.7 $\pm$ 1.5     |
| 500                               | 43.7 $\pm$ 2.1    | 44.7 $\pm$ 1.5  | 37.7 $\pm$ 0.5     |

\* LD level of control (n=5) : 52.4  $\pm$  2.9 IU/ml

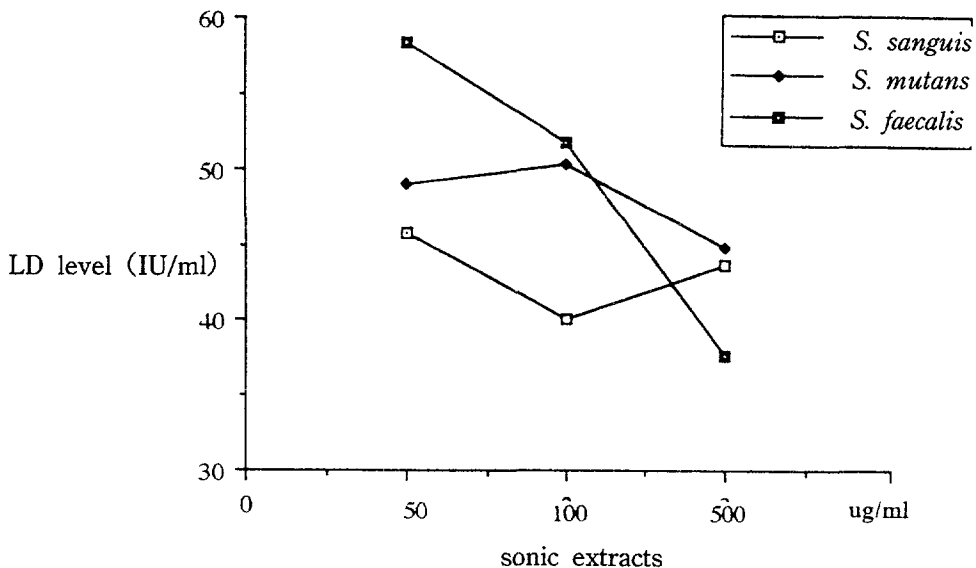


Fig. 3. LD levels of lymphocytes exposed to sonic extracts of three *Streptococcus* spp. for 48 hours

50 $\mu$ g/ml에서 100, 500 $\mu$ g/ml로 증가시킴에 따라서 45.7, 40.0, 43.7 IU/ml로 나타나 LDH수치의 차이가 없었다.

*S. mitis* 역시 단백질의 농도를 높였을 때 LDH값이 49.0, 50.3, 44.7IU/ml로 나타나 500 $\mu$ g/ml의 농도에서 LDH의 수치가 감소하였지만 통계적인 유의성은 없었다. *S. faecalis*에서는 세포벽 추출 단백질의 농도가 50 $\mu$ g/ml인 경우에는 58.3, 100 $\mu$ g/ml인 경우에는 51.7IU/ml로 나타났으며, 500 $\mu$ g/ml로 증가된 경우에는 37.7 IU/ml로서 농도 증가에 따라 오히려 LDH값이 낮게 측정되었다.

### 3) 림프구의 형태 관찰

각 연쇄구균 추출물이 PHA로 활성화시킨 림프구의 형태 및 집락 형성에는 특별한 영향을 미치지 않아서 대조군에 비하여 뚜렷한 차이가 관찰되지 않았다(Photo.1-4).

## IV. 총괄 및 고찰

치근단 농양의 세균의 대부분은 통성 및 절대 혐기성 세균을 포함한 혼합 감염이다. Fisher와 Russel<sup>2)</sup>의 연구에서 milleri group에 속하는 연쇄 구균은 연구 대상으로한 45명의 환자 중 37%인 16명의 환자에서 분리되었는데 이 중 15균주는 *S. anginosus*였으며 나머지 한 균주는 *S. intermedius*였다. 한 환자에서는 *S. anginosus*의 순 배양의 결과가 나타났다. 이러한 결과로 미루어 볼때 연쇄 구균이 치근단 농양과 관련을 갖는 것으로 보인다. 이들의 연구에서 세균 집락의 평균 수는 3.2로서 Aderhold등<sup>13)</sup>의 3.6과 Lewis등<sup>14)</sup>의 3.3의 결과와 유사하였다. 그러나 Aderhold와 Lewi가 사용한 조건은 절대 혐기성 세균은 과소 평가되었으며 혈액한천배지보다 더 복잡한 영양조건이 필요한 세균도 과소평가되었다.

Williams등<sup>9)</sup>, Brook등<sup>20)</sup>, Wayman<sup>21)</sup>와 Wasfy<sup>10)</sup>등은 치근단 농양과 milleri group streptococci간의 연관성을 발견하지 못하였다. 그러나 Lewis등<sup>14)</sup>은 검사한 치근단 농양의 40%에서 *S. milleri*를 검출하였다. Von Konow등<sup>22)</sup>은

악안면 부위의 감염에 관한 연구에서 *S. milleri*가 가장 흔한 통성 혐기성 세균이라고 하였다. 연쇄 구균 감염은 이제까지 과소 평가된 것으로 생각되며 그 이유는 이 균을 동정하는 것이 까다롭기 때문인 것으로 생각된다. 인체의 다른 부위에서 milleri group streptococci의 감염은 흔하지 않다. Aderhold등<sup>13)</sup>이 연쇄구균은 농양의 형성 초기에 중요할 것이며 추후 혐기성 세균의 침입에도 중요할 것이라고 하였다. Lewis등<sup>8)</sup>에 의하여 이러한 제안은 지지되었는데 임상 증상이 있는 초기1~2일 동안에 milleri group streptococci가 우세한 감염 균주라고 하였다.

치수 질환도 연조직 손상의 일부이므로 치수 질환의 형성에 세균의 성분이 중요한 역할을 담당할 수 있을 것이다. 그러나 상아질을 통하여 세균간의 상호 억제도 발생할 것이라는 사실을 유념해야 하는데 상아질은 생물학적 방어막으로서 작용한다. 조직학적인 관찰에 의하면 치수 질환은 세균이 치수에 도달하기 훨씬 전에 기시됨을 보였고 이것은 염증 반응은 세균보다는 세균의 부산물에 의하여 야기됨을 시사한다<sup>23)</sup>. 절단한 직후의 상아질 표면에 치태 추출물도 도포하고 구강으로부터 폐쇄하면 32시간내에 치수에서 염증반응을 유발할 수 있다고 하였다<sup>24)</sup>.

변연 누출이 있는 수복물의 하방의 와동지에서 세균검사를 시행하면 치태의 세균에서 흔하게 나타나는 세균으로 오염되어 있음을 발견하였다<sup>25)</sup>. 가장 흔하게 나타나는 세균은 *Fusobacterium nucleatum*, streptococci 와 black-pigmented *Bacteroides* species였다. 이들 세균 또는 세균의 산물이 치주인대 섬유아세포, HeLa세포에 미치는 효과에 관하여 광범위한 연구가 이루어졌다. 세포 반응은 여러가지 방법을 이용하여 평가되었는데 주로 세포수 산정, radiochromium 방출, [<sup>3</sup>H]-thymidine이나 [<sup>3</sup>H]-leucine incorporation을 평가하는 방법이 사용되었다. Higerd등<sup>18)</sup>은 *S. mutans* 12 균주와 구강내 세균 5종류의 세포의 성분이 섬유아세포 계열의 세포인 HaLa와 AV3의 증식과 사람의 말초혈액에서 얻은 림프구의 blast변환을 억제



하는 능력에 관하여 연구하였다. 이들이 사용한 균주 중 *S. mutans* 균주와 *S. intermedius* 및 *A. viscosus*는 섬유아세포의 증식을 억제하고 PHA로 활성화된 림프구의 분화(blast formation)를 억제하였다. 반면 *S. mutans* E49와 *S. salivarius* 및 *A. naeslundii*는 섬유아세포의 성장을 유의하게 억제하지 않았다고 하였다.

본 연구에서 *S. uberis*와 *S. mutans* 균주는 림프구에 대한 자극이나 억제효과가 없음을 알 수 있다. *S. sanguis*와 *S. faecalis* 균주는 100 µg/ml 이상의 농도에서 림프구 억제효과가 약하게 나타났다. *S. mitis* 균주는 300µg/ml 이상의 농도에서만 약한 림프구 억제효과를 보였다. Higerd 등은 *S. intermedius* 세포벽 추출물이 림프구의 성장보다는 억제하는 것을 관찰하여 본 연구 결과와 비슷하였다. 본 연구에서는 세포벽 추출물을 첨가 후 림프구의 생존도에 관한 실험은 시행하지 않았는데 Higerd 등은 림프구와 생존도는 99.0% 이상 유지됨을 관찰하였다. 300µg/ml 이하의 농도에서 *S. uberis*와 *S. mutans*는 림프구 독성효과가 없었고 *S. sanguis*가 300µg/ml 농도에서부터 *S. mitis*와 *S. faecalis*는 100µg/ml의 농도에서 림프구 독성효과가 나타났다.

본 연구에서는 림프구를 96-well microplate에서 배양하고 beta-counter에서 cpm을 측정하기 위하여 림프구를 회수할 때 cell harvester를 사용하였다. Cell harvester는 처음에 약 80~90% 정도의 세포를 흡인하고 3회 정도의 세척 과정을 거쳐 잔여 세포를 회수하게 된다. 그런데 이 과정에서 microplate의 바닥에서 배양된 림프구가 충분히 흡인되지 않고 남게 되는 경우도 있었다. 따라서 cell harvester의 효능이 적절한지를 먼저 확인하고 림프구가 plate의 바닥에서 완전히 떨어졌는지를 확인해야만 실험상의 오류를 피할 수 있을 것이다.

Duguid 등<sup>19)</sup>은 치태와 구강의 *streptococci*와 *actinomyces* 여러 균주로부터 얻어진 투석 추출물이 세포의 성장에 미치는 영향에 관하여 연구하였는데 HeL 세포배양에서 [<sup>3</sup>H]-thymidine uptake와 <sup>51</sup>Cr 방출을 실험방법으로 하였다. 15종류의 추출물중 8종류에서 세포의 성

장을 억제하였는데 한 경우를 제외하고 모든 경우에서 [<sup>3</sup>H]-thymidine incorporation을 억제하였다. 모든 추출물 중에서 prelabelled cell에서 <sup>51</sup>Cr 방출을 촉진하지 않았다. 이 결과로서 구강내와 치태에서 발견되는 많은 *streptococci*와 *actinomyces*가 큰 분자량을 가진 물질을 생성하여 HeLe cell 성장을 방해하는데 이는 [<sup>3</sup>H]-thymidine uptake와 DNA의 합성을 방해하는 결과로 생기며 외부 세포막의 안정성 정도에는 영향을 미치지 않는다는 것을 알 수 있다. 그들은 세포손상을 측정하는 방법으로 DNA합성의 억제가 가장 적절한 지표라고 하였다.

본 연구에서 세균의 세포벽 추출물이 림프구의 세포막에 손상을 주는지 살펴보고자 LDH수치를 측정된 결과 세 균주간에 약간의 차이가 있었으나 유의한 차이는 없었다. *S. sanguis*의 추출물에서 LDH수치가 약간 낮고 *S. faecalis* 추출물에서 LDH수치가 약간 높았지만 유의한 차이는 없었다. 또한 추출물의 농도가 증가함에 따라 LDH수치도 비례하여 증가하지 않았다. 또한 대조군의 LDH수치가 52.4IU/ml로서 세포벽 추출물을 첨가한 것과 비슷한 수치를 보였다. 이는 세포벽 추출 단백질이 500 µg/ml 농도에서는 림프구 세포막에 대한 독성이 전혀 없음을 시사하였다. 또한 림프구 독성 측정 방법에 따라 약간씩 다른 결과를 얻을 수 있음을 알 수 있다. 즉 [<sup>3</sup>H]-thymidine uptake를 이용한 DNA합성능의 측정 방법에서는 100µg/ml 이상에서 균주에 따라 독성을 보인 반면 LDH측정치에서는 500µg/ml 이하에서도 독성효과를 관찰할 수 없었다.

따라서 본 연구에서도 [<sup>3</sup>H]-thymidine uptake를 측정하는 방법이 LD측정 방법보다 예민한 방법으로 나타나서 Duguid 등<sup>19)</sup>의 보고와 일치하였다. 이는 [<sup>3</sup>H]-thymidine uptake 방법은 DNA합성능을 측정하는 방법이므로 세포가 독성 물질에 노출시 나타내는 초기의 반응을 평가할 수 있기 때문이다. 이에 비하여 LDH의 측정 방법은 세포의 손상이 심하여 세포막이 파괴되어 세포내 효소가 유리된 양을 측정하는 것이므로 평가하고자 하는 성분의 독성이 아주

강할 경우에만 나타나는 세포 손상의 후기 반응을 검사하는 방법이기 때문인 것으로 사료되었다.

세균의 독성은 숙주 조직내에서 침입하고 증식하는 능력뿐 아니라 숙주의 방어기전을 저항하고 피해가는 능력에 의해서도 결정된다<sup>26)</sup>. 면역 억제 인자는 group A streptococci 뿐만 아니라 *Actinomyces actinomycetemcomitans*, *Vibrio cholera*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Plasmodium bergneti*, rubella, influenza, polio, parvovirus에서 생성된다<sup>27-29)</sup>. 면역 반응성을 변화시킬 수 있는 세균의 산물로는 독소, 효소 및 세포벽 성분이 포함된다. 이러한 면역 억제 인자는 억제 단백질을 활성화시키거나 T억제 림프구를 활성화시키거나 T보조 림프구를 억제시키고 간세포(stem cell)와 성숙된 세포에 직접 작용하는 등의 여러 기전에 의하여 이루어진다<sup>30)</sup>. 항우 세포벽 성분의 정제 및 림프구를 더욱 세포화하여 각 림프구 아형에 미치는 영향을 관찰하여 면역학적 기전에 대한 연구가 필요할 것이다.

구강내 세균의 세포벽 성분이나 세균이 생성하는 물질이 정상인의 말초 혈액 림프구의 분화(blast formation)를 억제하는지에 대한 연구에서 세균 혹은 치태를 갈아서 림프구 증식에 미치는 효과에서는 치은염이나 경도의 치주염 환자에서는 림프구를 자극한 반면 심한 치주질환이나 정상 대조군에서는 유의한 자극 효과를 관찰하지 못하였다<sup>18,20)</sup>. 본 연구 결과에서 연쇄구균 세포벽 추출물이 대조군에 비하여 림프구 분화를 억제하는지를 관찰하고자 하였다. 림프구를 PHA로 처리하여 분화를 자극하고 [<sup>3</sup>H]-thymidine uptake 정도로서 림프구의 분화 정도를 판정하였는데 림프구에 대한 독성 효과를 판정하기 위해서 <sup>51</sup>Cr 방출과 MTT법등도 고려될 수 있을 것이다. PHA로 자극한 림프구는 집락을 형성하면서 분화하는데 (Photo. 1), 세포벽 추출물을 첨가한 경우 집락의 형성은 거의 정상적으로 이루어지고 있으며 세포의 형태 변화 혹은 독성 현상은 관찰하기 어려웠다. 따라서 림프구는 연쇄구균의 세포벽 추출물에 대해서는 형태학적으로는 거의

영향을 받지 않는 것을 알 수 있었다. PHA로 자극받은 림프구가 집락을 형성하며 자라기 때문에 세포벽 추출물이 림프구 수에 미치는 영향은 알 수 없었다. 세균이나 치태의 구성 성분을 정밀하게 하지 않은 상태에서 추출물을 준비하여 실험하면 림프구를 자극하는 성분을 정확히 구별하기 어렵다. 본 연구에서는 연쇄구균의 추출물중 독성 성분을 정확히 밝히지는 못하였으나 충분히 sonication하고 투석한 후 주사기로 필터하는 과정을 거쳤으므로 비교적 순수한 세포벽 추출물로 사료된다.

본 연구에서 추출한 세포벽 단백질에서 어느 성분이 림프구에 대하여 독성을 나타내고 또 이들 단백질의 분자량이나 열에 대한 내성 등 단백질 특성에 대하여 연구가 더 필요할 것으로 사료된다. 또한 몇 시간 정도 노출되면 독성이 나타나는지, 혹은 근관세척이나 소독 등으로 이들 균주 혹은 세균 추출물을 몇 시간안에 제거했을 때 독성이 가역적으로 없어지는지에 대해서도 추후 연구가 진행되어야 할 것이다. 감염근관에서 분리된 연쇄구균의 세포벽 추출물이 림프구의 분화를 억제하는 결과는 이들 세포벽 성분이 면역 반응에 관여함을 시사한다고 볼 수 있다. 그러나 이러한 림프구 분화 억제는 균주에 따라서 약간씩 다른 결과를 보였고 숙주의 면역 상태에 따라서 감염근관의 형성 혹은 면역 반응이 다를 것이기 때문에 숙주 요인에 대해서도 향후 연구를 해야 할 것으로 사료된다.

## V. 결 론

감염근관으로부터 분리된 연쇄 구균의 세포벽 단백질 성분이 림프구 활성을 억제시키는지를 관찰하기 위하여 림프구를 PHA로 자극하여 분화를 촉진한 후 5종의 연쇄구균의 세포벽 단백질을 추출하여 첨가하였다. 림프구 활성의 억제 측정 방법으로는 [<sup>3</sup>H]-thymidine uptake 방법과 LDH측정 및 역상 현미경을 이용한 세포의 형태 변화를 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

연쇄구균의 세포벽 단백질이 배양한 림프구의

DNA 합성에 미치는 영향은 균종에 따라 다르게 나타났다. *S. sanguis*와 *S. mitis*는 300 $\mu$ g/ml 부터 DNA 합성 억제 효과가 있었다. 반면 *S. faecalis*는 100 $\mu$ g/ml 농도부터 DNA의 합성 억제 효과가 나타나 3가지 균주중 가장 억제효과가 컸고 *S. uberis*와 *S. mutans*는 300 $\mu$ g/ml농도에서 부터 *S. mitis*와 *S. faecalis*는 100 $\mu$ g/ml 농도부터 림프구의 활성을 억제하였다 ( $p < 0.05$ ). LDH 측정 방법에서는 500 $\mu$ g/ml의 농도에서도 독성 효과가 나타나지 않았다. 연쇄구균 세포벽 추출물은 림프구의 분화시 림프구의 집락의 형태 및 수에는 영향을 주지 않았다.

#### 참고문헌

1. Kakehashi S, Stanley HR and Fitzgerald RJ : The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 20 : 340-9, 1965.
2. Morse DR. : Microbiology and pharmacology. In Cohen S, Burns RC, eds. *Pathways of the pulp*. St Louis : CV Mosby, pp 405-14, 1984.
3. Brown RL and Roudolph CE : Isolation and identification of microorganisms from unexposed canals of pulp-involved teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 10 : 1094-9, 1957.
4. Sundqvist G : Bacteriological studies of necrotic dental pulps. (Umea University Odontological Dissertation No.7) Umea, Sweden : Universtiy of Umea : 34-81, 1976.
5. Bartlett JG and O'Keefe P. : Bacteriology of perimandibular space infections. *J Oral Surg* 52 : 583-7, 1981.
6. Labriola JD, Mascaro J and Alpert B. : The microbiologic flora of orofacial abscesses. *J Oral Maxillofac Surg* 41 : 711-4, 1983.
7. Heimdahl A, von Konow L, Satoh T and Nord CE : Clinical appearance of orofacial infections of odontogenic origin in relation to microbiological findings. *J Clin Microbiol* 22 : 299-302, 1985.
8. Lewis MAO, McCann GF and Schoenkechet FD : Bacteriology of dental abscesses of endodontic origin. *J Clin Microbiol* 18 : 770-4, 1983.
9. Williams BL, McCann GF and Schoenkechet FD : Bacteriology of dental abscesses of endodontic origin. *J Clin Microbiol* 18 : 770-4, 1983.
10. Wasfy MO, McMahan KT, Minah GE and Falker WA : Microbiological evaluation of periapical infections in Egypt. *Oral Microbiol Immunol* 7 : 100-5, 1992.
11. Witworth JM : Lancefield group F and related streptococci. *J Med Microbiol* 33 : 135-151, 1990.
12. Fisher LE and Russel RBB : The isolation and characterization of milleri group streptococci from dental periapical abscesses. *J Dent Res* 72 : 1191-3, 1993.
13. Adehold L, Knothe H and Frenkel G : The bacteriology of dentoalveolar pyogenic infections. *Oral Surg* 52 : 585-7, 1981.
14. Lewis MAO, MacFarlane TW, McGwan DA and MacDonald DG : Assessment of the pathogenicity of bacterial species isolated from acute dentoalveolar abscesses. *J Med Microbiol* 27 : 109-16, 1988.
15. Matusow RJ : Anaerobic isolates in primary pulpal-alveolar cellulitis cases : endodontic resolutions and drug therapy considerations. *J Endod* 9 : 535-43, 1983.
16. Matusow RJ : Acute pulpal-alveolar cellulitis syndrome IV. Exacerbations during endodontic treatment : A clinical study of specific microbial isolates and their etiologic role. Part 2. *Oral Surg Oral Med*

- Oral Pathol 61 : 90–5, 1986.
17. Matusow RJ : Acute pulpal- alveolar cellulitis syndrome IV. Clinical parameters, demographics, and affirmation of a traditional etiologic theory. part 2. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 61 : 96–104, 1986.
  18. Higerd TB, Vesole DH, and Goust JM : Inhibitory effects of extracellular products from oral bacteria on human fibroblasts and stimulated lymphocytes. Infect Immun 21 : 569–74, 1978.
  19. Duguid R and Lyons IR : The effect of extracts from human dental plaque, oral streptococci and actinomyces bacteria on HeLa cell growth, [<sup>3</sup>H]-thymidine uptake and <sup>51</sup>Cr release. Archs Oral Biol 27 : 65–8, 1982.
  20. Brook I, Frazier EH, and Gher ME : Aerobic and anaerobic microbiology of periapical abscesses. Oral Microbiol Immunol 6 : 123–5, 1991.
  21. Wayman BE, Murata SM, Almedia RJ and Fowler CB : A bacteriological and histological evaluation of 58 periapical lesions. J Endod 18 : 152–5, 1992.
  22. Von Konow L, Nord CE and Nordenram A : Anaerobic bacteria in detoalveolar infections. J Oral Surg 10 : 313–22, 1981.
  23. Lundy T and Stanley HL : Correlation of pulpal histopathology and clinical symptoms in human teeth subjected to experimental irritation. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 27 : 187–201, 1969.
  24. Bergenholtz G, and Cox CF, Loesche WJ, and Syed SA : Bacterial leakage around dental restorations : It's effect on the dental pulp. J Oral Pathol 11 : 439–50, 1982.
  25. Mejare B, Mejare I, and Edwardsson S : Bacteria beneath composite restorations. A culturing and bacteriological study. Acta Odontol Scand 37 : 265–75, 1979.
  26. Shenker BJ, Listgarten MA, Taichman NS : Suppression of human lymphocyte responses by oral spirochetes : A monocyte-dependent phenomenon. J Immunol 132 : 2039–45, 1984.
  27. Malakian AH and Schwab JH : Immunosuppressant from group A streptococci. Science 159 : 880–5, 1968.
  28. Hanna EE and Watson DW : Host-parasite relationships among group A streptococci. IV. Suppression of antibody responses by streptococcal pyogenic exotoxin. J Bacteriol 95 : 14–7, 1968.
  29. Miller GA and Jackson RW : The effect of Streptococcus pyogenes teichoic acid on the immune response of mice. J Immunol 110 : 148–52, 1973.
  30. Weir DM and Blackwell CC : Interaction of bacteria with the immune system. J Clin Lab Immunol 10 : 1–4, 1983.

## Explanation of Photographs

Photo.1. Control of lymphocytes without sonic extract ( $\times 400$ ).

Photo.2 Morphological change of lymphocytes after 1 day exposure to sonic extract,  $50\mu\text{g/ml}$  of *S. sanguis* isolated from infected root canal. The lymphocytes produced colonies responding to phytohemagglutinin and seemed to be intact ( $\times 400$ ).

Photo.3 Morphological change of lymphocytes after 1 day exposure to sonic extract,  $100\mu\text{g/ml}$  of *S. sanguis* isolated from infected root canal. ( $\times 400$ ).

The lymphocytes produced colonies responding to phytohemagglutinin and it appeared to be intact.

Photo.4 Morphological change of lymphocytes after 1 day exposure to sonic extract,  $500\mu\text{g/ml}$  of *S. sanguis* isolated from infected root canal. ( $\times 400$ ).

The lymphocytes produced colonies responding to phytohemagglutinin and no specific morphological change was observed.

논문사진부도

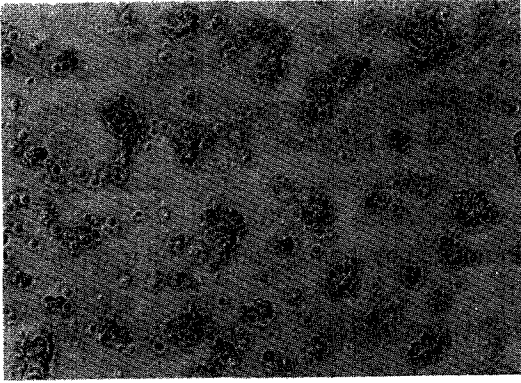


Photo.1.

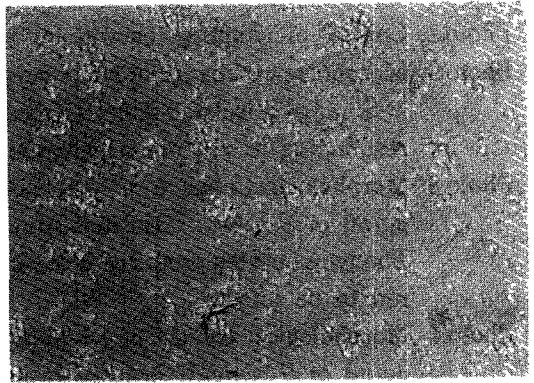


Photo.2

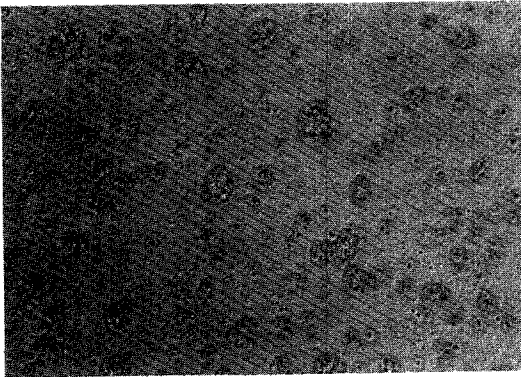


Photo.3

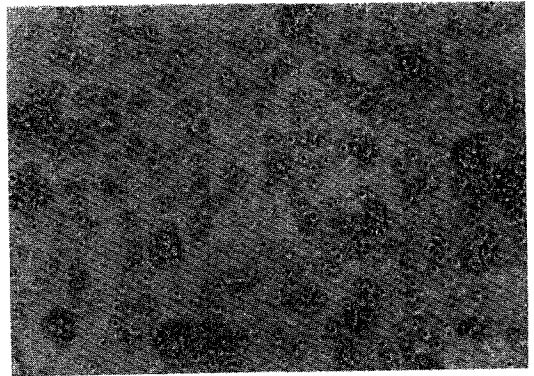


Photo.4