

소아의 다발성 치아우식증과 연관된 타액의 생화학적 특성

연세대학교 치과대학 구강생물학교실, 소아치과학교실*

장희순 · 조우성* · 최병재* · 서정택 · 이승일

Abstract

BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF SALIVA TO BE LINKED TO THE MULTIPLE CARIES IN CHILDREN

Heesoon Chang, Woo-Sung Cho*, Byung-Jai Choi*, Jeong-Taeg Seo, Syng-Il Lee

Department of Oral Biology and Pediatric Dentistry, College of Dentistry, Yonsei University*

Saliva is obviously potential medium to protect the dental caries by not only physical clearing effect, but aggregating action of protein with bacteria. Nevertheless, we still do not understand how the dental caries occur and what brings the individual difference in caries prevalence. In the regards of dental caries prevalence, we hypothesized that the composition of salivary protein might be different from caries susceptible group to caries resistant group. The purposes of this experiment were focused on the molecular analysis of salivary proteins from the subjects who were involved in multiple caries. Electrophoretic analysis was done on the whole saliva collected from the children with and without multiple caries. We found 86.2% of subjects with multiple caries has approximately 120 KDa protein band while 30.4% in the healthy subjects. And the concentration of the total protein on the subjects with multiple caries is significantly higher than that of the healthy group. However, it turned out that the difference of the salivary composition does not affect the bacterial adhesion to hydroxyapatite bead. With regards of enzymes in saliva, the activity of α -amylase and lactate dehydrogenase does not have any significant difference between both groups. However, the concentrations of Na^+ and Cl^- in saliva from multiple caries group is higher than that of the control group.

Taken all together, it may be concluded that 120 KDa protein in saliva may be associated with the process of dental caries, also the high concentration of protein and Na^+ , Cl^- in saliva may be linked to dental caries development as a cofactors.

Key words : multiple caries, salivary protein, saliva

I. 서 론

치아우식증은 아직도 이환율이 높은 질병으로 그 동안 이를 예방하기 위한 많은 노력이 있어 왔다. 그 결과 미국이나 서구 유럽에서는 발생율이 다소 감소하였지만, 우리나라의 경우 아직도 치아우식증이 어린이뿐만 아니라 성인에서도 빈번히 발생하기 때문에 치과영역에서 해결되어야 할 중요한 질환으로 간주되고 있다¹⁾.

치아우식증은 파괴를 동반한 감염성 질환 (progressively infectious disease)으로, 이를 일으키는 균이 국소적으로 자리잡아 점착성 gelatinous mat인 bacterial plaque 형태로 치아의 특수한 부위에 응집됨으로써 발생된다고 믿고 있다²⁾. 이런 치아우식 유발성 물질인 cariogenic plaque에는 대단히 많은 양 (2×10^8)의 균이 포함되어 있으며, 세균에 의하여 자당이 포도당과 과당으로 분해되고 pH가 5.5 이하로 떨어져 경조직인 치아를 탈회시킬 수 있는 조건이 형성된다. 즉 pH 감소에 의한 산생성 과정이 반복되면 법랑질의 미세한 분해가 이어지면서 탈회가 일어나 치아우식 병소 (caries lesion)가 발생하는 것이다. 따라서 치아우식증은 세균에 의한 감염질환이며, 여기에 섭취한 음식물의 종류나 시간에 의한 변수 등이 더해져 이 질환의 진행 정도가 결정된다²⁾. 더욱이 치아우식 자체가 지니고 있는 탈회에 대한 저항력과 크고 작은 타액선으로부터 흘러 나오는 타액도 치아우식증 진행에 빼놓을 수 없는 중요한 인자로 평가하고 있다³⁾. 타액을 치아우식증 진행에 중요한 요인으로 여기기는 하지만, 타액의 물리적 성질인 clearance 개념이나 타액 자체의 조성이 치아우식에 직접적으로 영향을 미치는 지에 대한 연구에 있어서는 일치된 견해를 보이고 있지 않다^{3,4)}.

타액은 구강내에 존재하는 액성물질로 여러 종류의 전해질과 단백질로 구성되어 있으며, 각기 다른 타액선으로부터 분비된다. 이는 그 자체가 지니고 있는 물리·화학적 성질에 의하여 구강을 세척하는 clearance action을 보이기도 하며⁶⁻⁸⁾, 타액내 존재하는 다양한 종류의 단백질에 의하여 항균작용 (antibacterial effects)을 나타내기도 하지만, 세균이 치질에 부착되는 것을 촉진하는 작용도 보인다⁹⁾. 더욱이 최근에는 타액에 존재하는 새로운

단백질이 속속 밝혀지고 있어 타액내 단백질에 대한 연구가 단백질 그 자체는 물론 치아우식증과의 관련성 등과 맞물려 연구자들간에 커다란 관심의 대상이 되어 왔다¹⁰⁾.

이와 같이 구강내 항상성 유지에 중요하고 다양한 역할을 보이는 타액 단백질은 크게 타액에만 존재하는 단백질, 다른 체액에도 존재하는 단백질, 침샘이 아닌 혈장과 같은 다른 기원의 단백질로 나눌 수 있다. 예를 들어 타액에만 존재하는 단백질인 histatin이 있으며, histatin은 histidine을 많이 함유하고 있는 중성 혹은 염기성 펩타이드로서 이하선에서 주로 분비되나 악하선에서도 소량 분비된다^{11,12)}. 지금까지 열두 종류의 histatin이 사람의 타액으로부터 분리되었으며^{12,13)}, 일반적으로 *Streptococcus mutans* 계열에 대하여 항균효과를 가지고 있을 뿐만 아니라 *Porphyromonas gingivalis*의 hemagglutination을 억제한다고 알려져 있다^{14,15)}. 더욱이 그람 음성 박테리아의 외막에 존재하는 내독소인 lipopolysaccharides를 중화시켜 숙주 방어기전에 도움을 주고¹⁶⁾, *Candida albicans*의 성장과 발생을 억제할 수 있는 능력을 가지고 있는데¹⁷⁾, 이러한 histatine의 살균 (bactericidal) 혹은 살진균 (fungicidal) 효과는 양전하를 띠는 histatin이 생체막에 결합해서 그 구조를 파괴하거나 투과도를 변화시키기 때문이라고 여겨진다. 항미생물 효과 외에도 histatin은 구강내에서 획득피막 (acquired pellicle) 형성과 석회화 과정에도 기여하며¹⁸⁾, 비만세포 (mast cell)로부터 histamine이 분비되는 것을 막아 구강염 유발을 억제하는 기능도 가지고 있다¹⁸⁾. 그외에 다른 점액에도 존재하는 타액선 단백질로 mucin을 들 수 있다. Mucin은 모든 점액에 점탄성 (visco-elastic character)을 부여하는 단백질로¹⁹⁻²¹⁾ glycosylation 되어 있기 때문에 protease에 의해 잘 분해되지 않는다. 따라서 mucin은 미생물에 의한 단백질 분해작용을 억제함으로써 세포보호와 유희작용을 하며, 이외에 탈수 억제, 분비물질의 점탄성 유지에도 관여한다^{22,23)}. 그러나 이러한 기능은 mucin 단독으로 나타나는 효과라기 보다, mucin이 다른 타액 단백질 즉, IgA나 albumin과 이 중복합체 (heterotypic complex)를 형성함으로써 얻어지는 것으로 믿고 있다. 또한 mucin은 bacterial surface adhesion의 작용을 차단함으로써 박테리

아의 colonization을 막아 치아우식 유발을 간접적으로 억제하는 것으로 알려져 있다^{24,25)}. 이와 같이 mucin은 이의 단순한 clearance 작용 이외의 복잡한 과정을 통해 치아우식증을 억제하는 것으로 생각된다. 사람의 타액에는 두 종류의 mucin - 저분자 mucin 당단백인 MG2 (150-200 KDa)와 고분자 당단백인 MG1 (> 1000 KDa)이 있는데, 각각은 구조적으로 그리고 기능적으로 서로 다르다. MG1은 *Haemophilus parainfluenza*를 제외한 다른 미생물과 관련이 있다는 보고는 거의 없지만, MG2는 *Candida albicans*나 *Actinobacillus actinomycetemcomitans* 등을 포함한 많은 종류의 미생물과 결합하기 때문에²⁶⁾, 이것에 의하여 세균이 치질에 붙는 정도와 bacterial clearance가 조절되는 것으로 생각된다. 그 외에 침샘이 아닌 혈장과 같은 다른 기원의 단백질로는 albumin이 대표적이다.

위에서 밝힌 바와 같이 타액에는 여러 가지 종류의 단백질이 존재하며, 이에 따라 다양한 기능을 수행하기 때문에 타액의 기능을 단적으로 설명하기 어려운 것이 사실이다. 그러나 현재 밝혀진 내용을 토대로 분석하여 보면¹³⁾, 타액 뿐만 아니라 다른 여러 점액에 존재하는 단백질들은 결과적으로 조직 보호와 같은 점액의 공통적인 기능을 수행하는 반면에, 타액에만 존재하는 histatins나 acidic PRPs와 같은 단백질들은 아마도 구강내에서 그들만의 특수한 기능을 수행하는 것으로 여겨진다²⁷⁾. 하지만 치아우식의 발생과정에서 타액내 존재하는 많은 수의 단백질이 어떤 역할을 하는가에 대한 명확한 답을 제시하기란 그리 간단한 문제가 아니다. 왜냐하면 이미 밝힌 바와 같이 대부분의 타액 단백질은 한가지 이상의 기능 혹은 서로 상반되는 역할을 수행하고 있기 때문이다. 이러한 사실로 미루어 볼 때, 타액이 치아우식증의 발생과 밀접하게 연관되어 있는 것은 사실이나 정확히 타액의 어느 성분이 어떤 과정에 의하여 치아우식증의 발생을 억제하는지에 대한 체계적인 연구는 이루어지고 있지 않다. 다만 지금까지 알려진 바에 의하면 타액은 고유의 기계적, 면역학적, 비면역학적 방법을 통하여 세균을 제거하는데, 이는 곧 세균의 부착을 방해하는 타액의 중요한 기능으로 평가할 수 있다^{28,30)}. 이외에 혀나 입술 근육의 수축 때문에 타액의 물리적인 흐름이 증가

될 수 있으며³¹⁾ 이는 곧 치아표면이나 점막으로부터 많은 수의 균을 제거하는 부수적인 효과를 함께 가져다 준다. 이러한 물리적인 효과 이외에 타액은 분자간의 상호작용인 직접적인 방법에 의하여 균이 치아표면에 부착하는 것을 방해한다^{32,33)}.

이렇게 타액이 항균작용 및 응집작용을 가지고 있고 이와 더불어 균의 성장을 억제함에도 불구하고 치아우식이 유발되는 이유와 개인에 따라 치아우식증에 이환되는 정도가 다른 이유는 첫째, 일반적으로 타액 단백질은 치아우식증을 예방하기도 하지만 촉진하기도 하는 이중 작용을 나타내며, 둘째, 치아우식증에 민감한 사람의 타액은 그렇지 않은 사람의 타액과 견주어 볼때, 단백질 성분이 다르거나 효소 발현 정도가 치아우식증의 발생과 밀접하게 연관되어 있을 가능성도 있기 때문이다. 따라서 이러한 이론적인 가정에 기초하여 치아우식증의 발생원인을 분석한다면, 타액 단백질은 치아우식을 촉진하거나 억제하는 두가지 측면을 지니고 있는데 제 3의 인자에 의하여 그 성상이 치아우식을 발생시키는 방향으로 구강환경을 변화시키거나, 앞서 설명한 바와 같이 타액내 단백질 조성이 치아우식증과 밀접한 상관성을 나타낼 수 있다는 생각이다. 또한 치아우식이나 전신질환에 의하여 타액내 존재하는 효소 발현 혹은 활성도에 차이가 있어 결과적으로 나타나는 현상이 확연히 다를 수 있다는 생각이다. 이와같이 개인별 치아우식증에 감염되는 정도는 여러 가지 요인에 의하여 결정되기 때문에 처음부터 실험조건을 단순화 한다는 것은 그리 쉬운 일이 아니다. 이런 이유로 주로 치아우식에 민감한 집단과 치아우식에 저항력이 있는 집단을 대상으로 타액 단백질 조성의 차이를 비교 분석함으로써 치아우식증의 원인을 타액조성의 차이로 밝혀려는 시도가 있어 왔다³⁵⁾. 그러나 지금까지 진행된 실험의 대부분은 성인이라는 특수한 집단으로 그 대상을 국한하였으며 decay · missing · filling tooth에 의한 DMFT index에 의거하여 피검자의 집단을 분류하였기 때문에, 이를 엄밀한 의미에서 치아우식에 민감한 집단으로 간주하기 어렵다는 지적이 있다. 따라서 이 연구에서는 소아 (2세에서 7세)에서 주로 많이 발생하는 것으로 알려져 있는 다발성 치아우식증 (multiple caries, 혹은 rampant caries)의 원

인을 구명하기 위하여 치아우식에 민감한 집단과 그렇지 않은 집단을 보다 객관적이고 명확한 기준으로 설정하고 이들 타액내 단백질의 양과 전해질의 농도, 그리고 단백질에 대한 전기영동을 시행하였다.

II. 연구 재료 및 방법

1. 타액 채취

치과병원에 내원한 피검자 (2세에서 7세 사이의 발달성 치아우식증 소아와 건강한 소아)를 안정시킨 후, 이들의 타액을 얻었다. 먼저 아무런 자극도 하지 않은 상태에서 whole saliva를 받고 2% citric acid로 타액선을 자극한 후, 이하선 타액을 받았다. 채취된 타액내의 이물질을 제거하기 위해 12,000×g에서 30분간 원심분리하여 상층액을 취했다. 이렇게 얻은 상층액을 microcentrifuge tube에 1.0 ml씩 분주하여 사용전까지 -70 °C에 보관하였다. 그리고 모든 실험은 -4 °C에서 시행하였다.

2. 전기영동 및 단백질의 정량

전기영동은 Laemmli (1970)의 방법에 따라 NOVEX에서 구입한 Xcell II™ Mini-cell 장치로 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 시행하였다. 15%의 separating gel을 먼저 굳히고 그 위에 5%의 stacking gel을 굳혔다. 준비된 sample과 sample buffer를 1:1로 섞은 후 각 well 당 15 µl씩 loading 하였으며, 전기영동은 125 volts로 4 시간 동안 시행하였다. 전기영동후 젤을 염색용액으로 4 시간 동안 염색한 후, 탈색용액으로 12시간 탈색하여 band를 확인하였다.

한편 타액내 단백질은 Bio-Rad protein dye를 이용하여 595 nm에서 흡광도를 측정한 후 정량하였다.

3. 세균의 치질면 (hydroxyapatite)에 대한 부착

Freezer에 보관했던 *Streptococcus mutans*를 녹여 agar

media에 도말한 후 petri dish를 뒤집어 37 °C에서 24 시간 동안 CO₂ incubator에서 배양하였다. 방사능으로 표지된 세균을 얻기 위해 Todd-Hewitt (Difco) 액체배지 1 ml당 2 Ci의 [methyl-³H] thymidine을 함께 넣고 배양한 colony 중 한 개를 따서 50 ml의 액체배지에 같이 접종한 후 anaerobic jar에서 16 시간 배양하였다. 세균은 4 °C, 10,000×g에서 10 분간 원심분리하고 상층액을 제거한 후 30 ml의 인산 완충액으로 세번 세척하였다. 인산 완충액에 현탁하여 1 ml씩 나누어 -70 °C에 보관하면서 필요시 사용하였다. [methyl-³H] thymidine으로 세균을 표지할 때의 표지능 (세균수 / count per minute)은 12,615-26,316 (4회 실험)이 되게 하였다. 이렇게 준비한 현탁액을 냉각고에 보관하여 일주일 동안 사용하였다. 세균수의 계산은 혈구측정기와 세균의 흡광도로 시행하였다. 혈구측정기로 할 때는 세균현탁액에 메틸렌블루 (최종농도 10%)를 첨가하여 세균을 염색하였고, 이렇게 계산한 일정한 세균수의 흡광도를 측정하여 이 표준곡선으로부터 세균수를 측정하였다.

치질면에 대한 세균의 부착실험은 Clark 등의 방법에 의거하여 시행하였다. Hydroxyapatite bead 30 mg을 증류수로 다섯번 세척하여 작은 입자들을 제거한 다음 37 °C에서 건조시켰다. 이렇게 준비된 비드 30 mg에 1 ml의 타액을 넣고 37 °C의 hybridizer에서 20 rpm의 속도로 30분간 처리하였다. 그 후 이 비드를 KCl 완충액으로 세번 세척한 다음 이것에 1 ml의 [methyl-³H] thymidine으로 표지한 세균 (2×10⁸ cells/ml)을 넣고, 37 °C에서 회전기에 장착시켜 20 rpm의 속도로 회전되도록 하면서 세균을 한 시간 동안 혼합시켰다. 그 후 부착되지 않은 세균을 제거하기 위해서 KCl 완충액으로 다시 3번 세척한 후, 37 °C에서 하룻밤 건조시킨 다음 5 ml의 scintillation counter로 방사능을 측정하였다. 측정된 CPM 값은 표지능을 값을 곱하여 부착된 세균수를 산정하였다.

4. α-amylase 활성도의 측정

Amylase reagent를 준비하여 37 °C에 둔 후 cuvet에 20 µl의 시료와 1.0 ml의 amylase reagent를 넣고 잘 흔들어서 섞었다. 이것을 37 °C에서 2 분

동안 incubation하고 흡광도 405 nm에서 수치를 읽은 후 initial A라고 하였다. 각 시료에 대한 amylase activity의 값은 아래의 공식에 의해 계산하였다.

$$\text{Amylase activity(U/L)} = (\Delta A \text{ per min} \times 1000 \times 1.25) / (E \times LP \times SV)$$

(TV = Total volume of reaction mixture

SV = Sample volume

E = Millimolar absorptivity of p-nitrophenol

LP = Lightpath

1000 = Conversion of units per ml to units per l

1.25 = 5 moles of substrate yields 4 moles of PNP)

5. Lactate dehydrogenase 활성도의 측정

NADH vial에 2.85 ml phosphate buffer와 0.05 ml serum을 넣고 뚜껑을 닫은 후 잘 섞었다. 이것을 25 °C에서 20 분 동안 두었다가 cuvette으로 옮기고 0.1 ml의 sodium pyruvate solution을 넣었다. 흡광도 340 nm에서 30 초 간격으로 3 분 동안 수치를 읽어 lactate dehydrogenase 활성도를 계산하였다. lactate dehydrogenase activity는 아래의 공식에 의해 계산하였다.

$$\text{Lactate dehydrogenase activity(Units/ml)} = (\Delta A \text{ per min} \times \text{TCF}) / (0.001 \times 0.05 \times \text{lightpath(cm)})$$

(0.001 = ΔA equivalent to 1 unit of LD activity in 3ml volume with 1cm lightpath at 25 °C

0.05 = Serum volume (ml) in cuvet

TCF = Temperature correction factor (1.0 at 25 °C))

6. 타액내 전해질의 측정

피검자로부터 받은 타액내의 전해질 농도를 Ca²⁺은 OCPC(O-Cresolphthalein Complexone), K⁺, Na⁺, Cl⁻은 ISE(Ion-Selective Electrode) Mg²⁺은 Photometric 방법으로 (Xylidyl blue) 각각 측정하여 타액내 전해질에 대한 정량적인 분석을 시행하였다.

III. 연구 성적

1. 전기영동을 이용한 타액 단백질의 분석

치아우식 활성이 높은 집단인 다발성 치아우식증 환자의 전타액과 치아우식 활성이 낮은 집단인 정상 유아의 전타액을 전기영동하여 젤상에서 단백질 조성의 차이를 비교하였다 (Fig. 1). 다발성 치아우식증 환자와 정상 어린이 사이의 단백질 조성은 분자량이 약 120 KDa 되는 부분을 제외한 나머지 부분에서는 거의 비슷한 양상을 보였다. 분자량이 약 120 KDa인 단백질은 다발성 치아우식증 환자의 전타액에서는 뚜렷하게 나타난 반면, 정상 어린이의 전타액에서는 나타나지 않았다. 이런 현상이 다발성 치아우식증 환자와 정상 어린이에서 일반적으로 나타나는 현상인지 아닌지 확인하기 위하여, 치아우식 활성이 높은 집단인 다발성 치아우식증 환자 29명과 치아우식 활성이 낮은 집단인 정상 어린이 69명을 대상으로 조사하였다 (Table 1). Table 1에서와 같이 치아우식 활성이 높은 집단의 경우, 약 120 KDa 위치에서 band가 있는 경우는 86.2 %였지만, 13.8 %의 경우는 band가 없었다. 이와는 달리 치아우식 활성이 낮은 집단에서는 band가 없는 경우가 69.6 %인 반면, 30.4 %의 경우에는 단백질 band가 나타

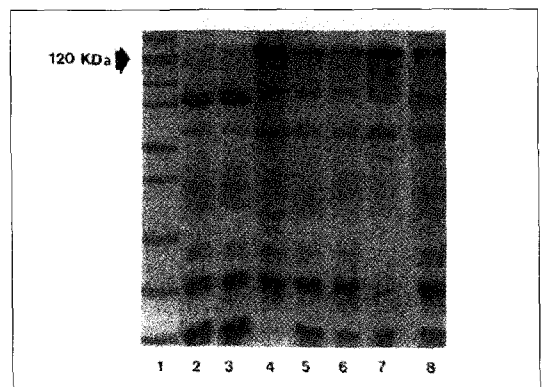


Fig. 1. SDS-PAGE of whole saliva from children with multiple caries. It shows that lane 1 is a size marker, lane 2 and 3 are whole saliva from the healthy children, and from lane 4 to 8 are whole saliva from the children with multiple caries.

Table 1. Analysis of SDS-PAGE of whole saliva from the children with multiple caries.

	Control group (n=69)	Multiple caries group (n=69)
Subject No.*	21	25

* the number of subject with about 120 KDa protein band

났다. 이는 다발성 치아우식증을 가지고 있는 집단에서 약 120 KDa 크기의 단백질이 특징적으로 나타남을 의미하는 결과로 해석된다. 그러나 이 단백질의 존재 유무가 다발성 치아우식증의 원인이라고 결론짓기는 어렵고, 다만 정상 대조군에서도 30.4 %가 120 KDa 단백질을 가지고 있기는 하지만 다발성 치아우식을 지닌 집단에서 이 단백질이 많이 나타나기 때문에 이를 다발성 치아우식증의 한가지 원인으로 풀이할 수 있다.

2. 타액내 단백질의 정량분석

치아우식 활성이 높은 집단과 치아우식 활성이 낮은 집단 사이의 단백질 농도를 비교하였다 (Fig. 2). 치아우식 활성이 낮은 집단 (n=54)의 단백질 농도는 1.36 ± 0.08 mg/ml인데 비하여, 치아우식 활성이 높은 집단 (n=11)에서는 2.10 ± 0.29 mg/ml을 나타내, 치아우식 활성이 높은 집단에서 얻은 타액내 단백질 농도가 더 높았다 ($P < 0.05$). 따라서 이는 타액내 단백질 농도의 차이가 치아우식을 일으키는 한 요인으로 작용할 가능성을 제시한 것으로 생각된다. 이와 같이 치아우식 활성이 높은 다발성 치아우식 집단은 우식활성이 낮은 집단에 비해 단백질 농도가 높은 것은 사실이지만, 이 자체가 어떠한 의미를 던져주는지, 또한 다발성 치아우식과 어떤 관계가 있는지에 대해서는 이 실험 성적만으로 잘라 말하기 어렵다.

3. 타액이 세균의 hydroxyapatite bead 표면 부착능에 미치는 영향

다발성 치아우식증 환자에서 특징적으로 나타나는 약 120 KDa 위치의 단백질이 치아표면에 부

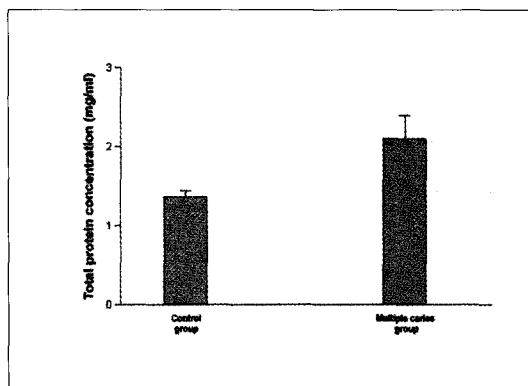


Fig. 2. Quantitative analysis of total proteins in saliva from the control and multiple caries group.

착하는 세균에 어떤 영향을 주는지 확인하기 위하여, 치아우식을 일으키는 세균으로 알려진 세균 중 하나인 *Streptococcus mutans*를 배양하여 치질면에 부착하는 정도를 분석하였다 (Table 2). Table 2에 나타난 바와 같이 치아우식 활성이 낮은 집단의 경우에는 정상 성인과 정상 소아 두 집단으로 나누어 조사하였고, 치아우식 활성이 높은 집단으로는 다발성 치아우식증을 보이는 소아 집단을 대상으로 hydroxyapatite bead 표면에 세균이 부착하는 능력을 비교하였다. 우선 치아우식 활성이 낮은 집단에서 정상 성인과 정상 소아 집단을 비교한 결과, 세균부착능면에서 두 집단간에 유의한 차이가 없었고 ($p > 0.05$), 다발성 치아우식증을 보이는 소아 집단을 치아우식 활성이 낮은 정상 소아 집단과 비교한 결과도 세균부착능에 있어 의미있는 차이가 없었다 ($p > 0.05$). 즉, 치아우식 활성이 높은 집단에서 특징적으로 나타나는 약 120 KDa 위치의 단백질은 치아우식을 일으키는 세균 중 하나인 *Streptococcus mutans*가 치질면에 부착하는데 영향을 미치지 않는 것으로 해석된다.

4. 타액내 α -amylase와 lactate dehydrogenase의 활성도

앞서 지적한 바와 같이, 치아우식 활성이 높은 집단에서 단백질의 양은 많으나 세균이 치질면에 부착하는데는 영향을 미치지 않았다. 따라서 타액내 어떤 효소의 활성이 치아우식증을 일으키는데

Table 2. Bacterial attachment (*Streptococcus mutans*) to hydroxyapatite bead coated with the saliva from the different subjects.

(n = 15)	Healthy adults (n = 15)	Healthy children (n = 15)	Children with multiple caries
No. of <i>S. mutans</i>	548900 ± 74600	487100 ± 691000*	533000 ± 77700**

* not significantly different (p>0.05) from the healthy adult

** not significantly different (p>0.05) from the healthy children

All figures represent ± standard error of the mean

Table 3. α-amylase and lactate dehydrogenase activity in saliva from the healthy children and children with multiple caries.

	Control group (n = 55)	Multiple caries group (n = 15)
α-amylase	434 ± 98	219 ± 93*
Lactate dehydrogenase	0.32 ± 0.05	0.24 ± 0.05*

* not significantly different (p>0.05) from the control group

All figures represent ± standard error of the mean

관여할 수도 있다는 가정하에 치아우식 활성이 낮은 집단 (55명)과 치아우식 활성이 높은 집단 (15명)을 대상으로 α-amylase와 lactate dehydrogenase의 활성도를 비교하였다 (Table 3). 먼저 α-amylase 활성도의 경우, 치아우식 활성이 낮은 집단의 활성도는 434±98 U/L이었고, 치아우식 활성이 높은 집단에서는 219±93 U/L을 나타내었다. 즉, 치아우식 활성이 높은 집단에서 α-amylase 활성도가 낮게 나왔으나, 실제 이 두 집단간에는 의미있는 차이는 없었다 (P>0.05). 한편 치아우식 활성이 높은 집단과 치아우식 활성이 낮은 집단의 lactate dehydrogenase 활성도는 각각 0.24±0.05 U/L와 0.32±0.05 U/L를 나타내, 두 집단간의 유의한 차이가 없었다 (P>0.05).

5. 타액내 전해질의 정량적인 분석

지금까지의 연구 결과 치아우식 활성이 높은 집단에서 특징적으로 나타나는 약 120 KDa 크기의 단백질이 세균의 치질면 부착에 영향을 미치지 않았고, α-amylase나 lactate dehydrogenase와 같은 효소 활성에서도 차이가 없었다. 그러나 ionic strength가 단백질 성상의 변화를 줄 수 있기 때문에, 치아우식 활성이 낮은 집단 (51명)과 치아우

식 활성이 높은 집단 (14명)을 대상으로 일부 전해질과 uric acid 농도를 분석하였으며 (Table 4, Table 5), 전해질로 타액내 Ca²⁺, Na⁺, K⁺, Cl⁻, 그리고 Mg²⁺을 측정하였다. 먼저, Ca²⁺의 경우, 치아우식 활성이 낮은 집단에서는 0.51±0.03 mM, 치아우식 활성이 높은 집단에서는 0.58±0.06 mM이었다. K⁺은 치아우식 활성이 낮은 집단에서 16.8±0.72 mM이었고, 치아우식 활성이 높은 집단에서 17.6±0.77 mM을 보였다. 그밖에 치아우식 활성이 낮은 집단의 Mg²⁺은 0.04±0.004 mM이었고 치아우식 활성이 높은 집단에서는 0.06±0.01 mM로 두 집단간에 의미 있는 차이가 없었다. 결론적으로 위의 실험성적으로 미루어 보아 Ca²⁺, K⁺, Mg²⁺은 치아우식 활성이 높은 집단과 치아우식 활성이 낮은 집단 사이에 의미 있는 차이가 없었다 (P>0.05).

위의 전해질들과는 달리 Na⁺에서는 치아우식 활성도가 높은 집단에서 4.38±0.56 mM인데 비하여, 치아우식 활성이 낮은 집단에서는 2.76±0.33 mM을 나타냈다. 즉, 치아우식 활성이 높은 집단에서 Na⁺ 농도가 많았다. Cl⁻ 역시 치아우식 활성이 낮은 집단에서는 6.28±0.59 mM이었고, 치아우식 활성이 높은 집단에서는 8.85±1.03 mM로 Na⁺과 같이 Cl⁻ 농도도 치아우식 활성이 낮은 집

Table 4. The concentration of electrolytes, Ca²⁺, Na⁺, K⁺, Cl⁻, and Mg²⁺ in saliva

	Control group (n = 51)	Multiple caries group (n = 14)
Ca ²⁺	0.51 ± 0.03	0.58 ± 0.06*
Na ⁺	2.76 ± 0.33	4.38 ± 0.56**
K ⁺	16.8 ± 0.72	17.6 ± 0.77*
Cl ⁻	6.28 ± 0.59	8.85 ± 1.03**
Mg ²⁺	0.04 ± 0.004	0.06 ± 0.01*

* not significantly different (p>0.05) from the control group

** significantly different (p<0.05) from the control group

All figures represent ± standard error of the mean

Table 5. The amounts of uric acid in saliva

	Control group (n = 51)	Multiple caries group (n = 14)
Uric acid	0.11 ± 0.01	0.14 ± 0.02*

* not significantly different (p>0.05) from the control group

All figures represent ± standard error of the mean

단에 비해 치아우식 활성이 높은 집단에서 더 높았다. 결론적으로 치아우식 활성이 높은 집단과 치아우식 활성이 낮은 집단 사이에 Na⁺과 Cl⁻의 의미 있는 차이가 있었다 (P<0.05). 한편 uric acid는 치아우식 활성이 낮은 집단에서 0.11±0.01 mM, 치아우식 활성이 높은 집단에서는 0.14±0.02 mM을 나타냈으나, 이 두 집단간의 uric acid 농도 차이는 없었다 (P>0.05).

IV. 총괄 및 고찰

타액의 물리적, 화학적, 그리고 생물학적 특성이 모두 치아우식 과정에 관여하는 것으로 알려져 있으며, 치아우식에 영향을 미치는 여러 요인 중 특히, salivary amylase, urea, ammonia, calcium, phosphate, pH 등이 치아우식과 연관되어 있는 것으로 생각하고 있다^{4,31-33,36-39}. 그밖에 타액의 성분 이외에도 타액 분비율이 치아우식과 연관되어 있는데 즉, 타액분비가 감소된 사람에서 치아우식 발생율이 높고 우식병소가 급속히 파급된다는 사실은 타액의 분비량과 타액 자체가 지니고 있는 완충능이 치아우식과 밀접하게 연관되어 있다는 실험적 근거로 받아들여지고 있다^{36,39}. 그밖에 타액

내 단백질과 같은 거대 분자들은 세균이 치면에 부착하는 것을 방해하는 역할 및 연조직 보호기능이 있으며, 타액에는 치태내의 pH를 조절하는 단백질 분해 산물들과 bicarbonate buffer 외에도 urea, ammonia, arginine과 lysine을 포함하는 peptide 등이 포함되어 있는 것으로 알려져 있다^{32,33}. 따라서 타액 단백질에 대한 연구는 우식을 예방하는 차원에서 관심의 대상이 되고 있다^{5,8}.

이에 본 연구는 치아우식의 발생의 원인을 타액의 생화학적 성분의 차이에 기인할 것이라는 가정하에 시행되었다. 따라서 이 연구에서는 타액의 단백질을 정상과 비교·분석하였다 (Fig. 1). 그림에 나타낸 바와 같이 치아우식 활성이 높은 집단 (multiple caries group)과 치아우식 활성이 낮은 집단을 선정하여 두 집단 사이의 특성 (전기영동을 통한 단백질 분석)을 비교하였는데, Table 1에서와 같이 치아우식 활성이 높은 집단으로 선정된 다발성 치아우식증 환자의 경우 86.2 %가 약 120 KDa 위치에서 단백질 band를 특징적으로 가지고 있는 것으로 나타났다. 반면에 치아우식 활성이 낮은 집단에서도 피검자의 30.4 %에 해당하는 경우가 위와 같은 단백질 band를 보였다. 물론 과거에 치아우식 활성이 낮은 집단과 치아우식 활성이 높

은 집단 사이에 어떤 단백질 조성의 차이가 있는지에 대한 연구가 다양한 전기영동법에 의하여 시행되어 왔다. 치아우식 활성이 높은 집단에서 주로 나타나는 단백질의 종류로 anodal proteins (pI 4.70 - 5.05, MW 14 - 17 KDa), amylase (62 KDa), mucin의 종류인 MG1 (> 10⁵ KDa)과 MG2 (130 - 150 KDa), slgA (15 KDa- 300 KDa), lysozyme (14 KDa), fibronectin (440 KDa), prolin-rich-proteins (9 - 31 KDa), statherin (12 KDa), 그리고 hydrophobic proteins (55 KDa, 60 KDa) 등이 있다고 알려져 있으나³⁹⁾, 이 연구에서 드러난 120 KDa 크기의 단백질과 연관된 보고는 찾을 수 없다. 다만 분자량으로 보아 MG2가 120 KDa 단백질과 거의 유사하나 동일한 것으로 규정짓기는 어렵다. 이같은 사실로 미루어 타액내 약 120 KDa 크기의 단백질이 치아우식을 일으키는데 관여하는 인자로 생각되지만, 치아우식 활성이 낮은 집단의 피검자에서도 이 단백질이 존재하기 (30.4%) 때문에, 이 단백질의 존재 유무가 다발성 치아우식을 일으키는 결정적인 인자라고 결론지을 수는 없다.

그렇다면 약 120 KDa의 분자량을 가진 단백질이 어떤 과정에 영향을 주어 치아우식 활성을 증가시키는데 대해서는 다음의 두 가지 측면, 즉, 세균의 치면 부착능 그리고 세균의 활성도에 의하여 좌우되는 것으로 이해하고 있다²⁵⁾. 이에 이 연구에서는 120 KDa 크기의 단백질이 세균의 치면 부착에 어떤 영향을 미치는지 확인하기 위하여 *Streptococcus mutans*를 이용하여 치면부착능 실험을 수행하였다. 연구결과 Table 2에 보인 바와 같이 치아우식 활성의 높고 낮음에 관계없이 타액으로 인한 세균부착능의 차이가 없어 (p>0.05), 120 KDa 단백질이 치아우식을 일으키는 주요 세균의 하나인 *Streptococcus mutans*의 치질면 부착에 아무런 영향을 미치지 못하는 것으로 판단된다. 그렇지만 이 연구 결과만으로 세균의 치질면 부착에 관여하는 120 KDa 단백질의 기능을 한 마디로 결론짓기는 어렵다. 그 이유로 첫째, 이 단백질이 세균이 증식하기에 좋은 구강환경을 만드는데 관여하여 구강내의 많은 우식원성 세균이 존재하도록 유도하고, 그 결과 치아표면에 세균이 부착할 확률을 증가시키게 된다면, 치아우식을 일으킬 수도 있기 때

문이다. 만약 이같은 가정이 사실이라면, 세균 부착능 실험만으로 그 양상을 파악하기 어려울 수 있다. 왜냐하면 세균 부착능 실험은 치아 표면에 부착하는 세균의 능력을 측정하기 위하여 실시한 실험이므로 치질면에 타액을 도포한 후 반응 시간으로 30 분을 설정하였는데, 이 반응 시간 30 분은 치질면에 세균이 부착하는데 충분한 시간이라는 하나, 세균이 증식하는데는 너무 짧은 시간이므로 세균 증식 여부를 알 수 없기 때문이다. 둘째, 우식을 일으키는 세균에는 *Streptococcus mutans* 외에도 다양한 세균이 있으나, 세균 부착능 실험에서 사용한 세균은 *Streptococcus mutans*이므로 약 120 KDa의 분자량을 가진 단백질이 다른 세균과 반응하는 단백질인 경우에는 이 연구에서 사용한 세균만으로 치아우식에 관여하는 단백질인지 밝히기 어렵다. 더욱이 이 단백질이 *Streptococcus mutans*와 반응하는 단백질일지라도 다른 세균이나 효소 등의 제 3의 조건이 존재할 때 그 효과를 보이는 경우도 배제할 수 없다. 셋째, 구강내 조건에서 또 다른 요인에 의하여 이 단백질의 역할이나 반응 정도가 생쇄 되었을 경우도 고려하여야 할 부분으로 해석된다.

지금까지 알려진 바에 의하면, 우식 활성이 낮은 사람에 비해 우식 활성이 높은 사람의 전체 타액 혹은 이하선 타액에서 *Streptococcus mutans*가 더 많이 증식함을 관찰하였고, 전기영동을 통해 우식 활성이 높은 타액에 있는 밝혀지지 않은 몇 종류의 단백질이 미생물의 공격에 대해 감수성이 높고, 이에 비해 우식 활성이 낮은 타액내 같은 종류의 단백질은 세균에 대해 저항성이 있다고 하였다. 또한 우식 활성이 높은 사람과 낮은 사람에서 악하선 타액을 분석하여, 우식 활성이 낮은 사람의 타액에서는 세균 응집능 (saliva-mediated bacterial aggregation)이 높고, 세균이 치면에 부착하는 정도 (bacterial adhesion)가 낮았다는 지적도 있다⁴⁰⁾. 즉 타액 매개의 세균 응집 반응과 세균의 치면부착이 우식 저항에 중요한 요소라는 것이다. 그밖에 치아우식 활성이 높은 사람과 낮은 사람의 구강상피로부터 mucin coat를 분리하여 단백질 농도를 분석한 결과, 두 집단 모두에서 유사하였으나, 우식 활성이 낮은 집단에서는 당단백질 함량이 높고, 지질과 공유결합된 지방산의 함량이 더

낮았음을 관찰하고 이러한 당단백질이 세균응집에 일차적 역할을 하는 low molecular-weight mucin (mucin-glycoprotein 2 ; MG2)일 것이라고 주장하였다. 이 연구에서도 치아우식 활성이 높은 집단과 치아우식 활성이 낮은 집단 사이의 타액내 단백질 농도를 비교하였다 (Table 2). 치아우식 활성이 낮은 집단 (n=54)에서 단백질 농도가 1.36 ± 0.08 mg/ml인데 비하여, 치아우식 활성이 높은 집단 (n=11)에서는 2.10 ± 0.29 mg/ml로, 치아우식 활성이 높은 집단의 단백질 농도가 더 높은 값을 나타냈다 ($P < 0.05$). 따라서 이런 단백질 농도의 차이가 치아우식을 일으키는 요인이었을 가능성을 제시한 것으로 생각된다. 그러나 치아우식 활성이 높은 다발성 치아우식 집단은 우식활성이 낮은 집단에 비해 단백질의 양이 많은 것은 사실이지만 이 자체가 어떠한 의미를 던져주며, 앞서 밝힌 바와 같이 120 KDa 단백질의 존재 유무와 상관성에 대해서는 현 상황에서 단언하기 어렵다.

한편 치아우식 활성이 높은 집단과 낮은 집단에서의 *Streptococcus mutans*와 *Streptococcus sanguis*에 대한 세균응집능을 조사한 결과, 치아우식 활성이 낮은 집단에서는 치아우식 활성이 높은 집단에 비해 MG2의 함량이 높고, 치아우식 활성이 높은 집단의 타액에서는 high molecular-weight mucin (mucin-glycoprotein 1 ; MG1)의 함량이 많음을 보고하고, 타액내 MG2의 함량이 높을 때 세균 제거능이 큰 것으로 추론하였다³⁴⁾. 약 120 KDa 위치에서 나타나는 단백질이 *Streptococcus mutans*가 치질면에 부착하는 것에는 관여하지 않는다면 어떤 과정에 의하여 치아우식의 활성을 증가시킬 수 있을까? 이에 대한 이해를 돕기 위하여 타액내 효소중 치아우식과 관련이 있다는 α -amylase와 lactate dehydrogenase의 활성도를 분석하였다 (Table 3). 먼저 α -amylase 활성도의 경우, 치아우식 활성이 낮은 집단의 활성도는 434 ± 98 U/L이었고, 치아우식 활성이 높은 집단의 활성도 값은 219 ± 93 U/L로 치아우식 활성이 낮은 집단에서 높은 값을 보였다. 즉, 치아우식 활성이 높은 집단에서 α -amylase 활성도가 비교적 낮게 나왔으나, 실제 이 두 집단간에는 의미있는 차이는 없었다 ($P > 0.05$). 또한 치아우식 활성이 높은 집단의 lactate dehydrogenase 활성도는 0.24 ± 0.05 U/L인

반면, 치아우식 활성이 낮은 집단에서는 0.32 ± 0.05 U/L로 α -amylase 활성도의 결과와 같이 두 집단간의 차이를 발견할 수 없었다. 다시 말해서 치아우식 활성이 높은 집단의 lactate dehydrogenase 활성도 값이 치아우식 활성이 낮은 집단에 견주어 볼 때, 낮았으나, 의미있는 차이는 아니었다 ($P > 0.05$). 이와 같은 사실로 미루어 볼 때, 타액내 120 KDa 크기의 단백질이 치아우식의 활성도에 영향을 미치는 것으로 생각될 뿐 그밖의 α -amylase나 lactate dehydrogenase가 치아우식 발생에 영향을 주는 것으로 여겨지지 않는다.

그 밖에 치아우식과 관련지어 분비되는 타액량, 타액의 분비속도, 이온양 등을 조사한 보고가 많으나, 그 결과가 서로 일치하지 않아 논란이 많이 일고 있는 실정이다^{31,37,38,41)}. 즉, 치아우식 활성이 높은 집단에서 타액의 분비량이 많고, 양이온이 비교적 많다는 견해가 있는 반면, 치아우식 활성이 높은 사람과 치아우식 활성이 낮은 사람 사이의 타액 분비속도나 이온양, 타액양은 상관관계가 없다는 주장도 제기되고 있다. 따라서 이 연구결과로 얻은 치아우식 활성이 높은 집단에서 특이적으로 나타나는 약 120 KDa 위치의 단백질 이외에, 타액내 이온 조성의 차이가 단백질의 치아우식 유발 효과에 보조적으로 작용할 가능성도 배제할 수 없다. 이에 치아우식 활성이 높은 집단과 치아우식 활성이 낮은 집단간의 일부 전해질 양과 uric acid 농도를 분석하였다 (Table 4, Table 5). 이 연구에서 분석한 전해질의 종류는 Ca^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- , Mg^{2+} 이었지만 치아우식 활성이 높은 집단과 치아우식 활성이 낮은 집단 간에 의미있는 농도 차이는 없었다 ($P > 0.05$). 그렇지만 Na^+ 과 Cl^- 의 경우에는 위의 전해질들과는 다른 양상을 보였다. Na^+ 의 경우, 치아우식 활성도가 높은 집단에서 4.38 ± 0.56 mM인데 비하여, 치아우식 활성이 낮은 집단에서는 2.76 ± 0.33 mM로 치아우식 활성이 높은 집단에서 더 많은 양의 Na^+ 이 있었다. Cl^- 역시 치아우식 활성이 낮은 집단에서는 6.28 ± 0.59 mM이었고 치아우식 활성이 높은 집단에서는 8.85 ± 1.03 mM로 Na^+ 과 같이 Cl^- 농도도 치아우식 활성이 낮은 집단에 비해 치아우식 활성이 높은 집단에서 더 높았다 ($p < 0.05$). Uric acid의 경우에는 치아우식 활성이 높은 집단에서 더 많은 양이 있었으나,

치아우식 활성이 높은 집단과 치아우식 활성이 낮은 집단간에 의미있는 차이는 없었다 ($p>0.05$). 전체적인 측면으로 볼 때, 이 연구에서 측정된 전해질과 uric acid 모두 치아우식 활성이 낮은 집단에 비해 치아우식 활성이 높은 집단에서 더 많이 존재하는 것으로 풀이된다. 따라서 전해질 조성과의 관련성에 있어서는 생각되나, 이에 대한 연구가 체계적으로 이루어져 있는 자료가 없어, 이를 뒷받침 할 만한 근거를 제시하기 어렵다는 문제점이 있다.

이상의 연구 결과를 종합해 보면, 기존의 치아우식 활성이 높은 집단과 치아우식 활성이 낮은 집단을 구분하던 방법과는 달리, 치아우식이 다인 자성 질환이라는 사실을 감안하여 이를 충분히 반영하는 질환으로 다발성 치아우식이 가장 적합하다고 보고, 다발성 치아우식증 환자를 치아우식 활성이 높은 사람으로 간주하였으며, 치아우식 활성이 높은 집단과 치아우식 활성이 낮은 집단의 전체타액을 분석하였다. 분석한 결과, 치아우식 활성이 높은 집단에서 특이적으로 나타나는 약 120 KDa 단백질이 있었다. 즉, 지금까지 보고되지 않은 새로운 단백질이 치아우식 활성이 높은 사람의 전체타액에 존재한다는 것은 이 단백질이 치아우식증을 일으키는 요인 중의 하나임을 시사하는 결과로 받아들여진다. 그리고 다발성 치아우식 집단에서 단백질 농도가 높고, 아울러 전해질 특히 Na^+ 과 Cl^- 가 많이 존재한다는 사실을 감안할 때, 타액내 단백질 조성의 차이와 더불어 전해질 조성 즉, Na^+ 과 Cl^- 가 다발성 치아우식증 더 나아가 일반적인 치아우식을 일으키는데 일부 관여할 것으로 짐작된다. 그러나 앞으로 이 120 KDa 크기의 단백질의 화학적 특성이 무엇이며, 이 단백질이 어떤 과정을 통하여 치아우식에 관여하는지는 연구되어야 할 과제로 생각된다.

V. 결 론

치아우식과 타액과의 관계를 밝히려는 목적으로, 치아우식 활성이 높은 집단과 치아우식 활성이 낮은 집단을 선정하여 두 집단 사이의 특성을 타액 단백질, 전해질, 그리고 효소 등의 정량적인 측면에서 비교·분석하여 다음과 같은 결과를 얻

었다.

1. 치아우식 활성이 높은 집단과 치아우식 활성이 낮은 집단 사이의 전체 단백질의 양은 치아우식 활성이 낮은 집단에 비하여 치아우식 활성이 높은 집단에서 더 많았다.
2. 타액을 전기영동하여 단백질의 정성적인 분석 결과, 치아우식 활성이 낮은 집단에 비해 치아우식 활성이 높은 집단에서 약 120 KDa 크기의 단백질 band가 특징적으로 나타났다.
3. 약 120 KDa 크기의 단백질은 치아우식을 주로 일으키는 세균 중 하나인 *Streptococcus mutans*가 치질면에 부착하는데 영향을 미치지 않았다.
4. 치아우식 활성이 높은 집단과 치아우식 활성이 낮은 집단에서 α -amylase와 lactate dehydrogenase 활성에는 의미있는 차이가 없었다.
5. Ca^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- , Mg^{2+} , uric acid의 양을 분석한 결과, Na^+ 과 Cl^- 는 치아우식 활성이 낮은 집단보다 치아우식 활성이 높은 집단에서 더 많은 양을 가지고 있었지만, 나머지는 의미있는 차이가 없었다.

본 연구는 1996년도 핵심전문연구과제 지원으로 이루어졌음

참 고 문 헌

1. Glass RL : The first international conference on the declining prevalence of dental caries. J Dent Res 61 : 1304-1383, 1982.
2. Kreitzman SN : Nutrition in the process of dental caries. Dent Clin North Am Philadelphia, 20 : 491-505, 1976
3. Billings RJ : Saliva flow and dental caries. Cariology for the nineties : 235-247, 1993.
4. Pickerill HP : The prevention of dental caries and oral spesis. 1912.
5. Mandel ID : Impact of saliva on dental caries. Compend Contin Educ Dent 13 (suppl) : 476-481, 1989.
6. Ericson T, Pruitt K, Wedel H : The reaction of salivary substances with bacteria, J Oral Pathol

- Med 4 : 307-323, 1975.
7. Mandel ID : In defense of the oral cavity. In: Saliva and dental caries (Spec Suppl, Microbiology Abstracts). Kleinberg I, Ellison SA, Mandel ID, editors. Washington, DC : Information Retrieval, Inc. 473-491, 1979.
 8. Mandel ID, Ellison SA : The biological significance of the nonimmunoglobulin defense factors. In : The lactoperoxidase system : chemistry and biological significance. Pruitt KM, Tenovuo JO, editors. Basel, New York : Marcel Dekker Inc. 1-14, 1985.
 9. Lumikari M, Soukka T, Nurmio S : Inhibition of the growth of *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* and *Lactobacillus casei* by oral peroxidase systems in human saliva. Arch Oral Biol 36 : 155-160, 1991.
 10. Babu JP, Beachey EH, Hasty DL : Isolation and characterization of a 60-kilodalton salivary glycoprotein with agglutinating activity against strains *Streptococcus mutans*. Infect Immun. 51 : 405-413, 1986.
 11. Oppenheim FG, Xu T, McMillan FM : Histatins, a novel family of histidine-rich proteins in human parotid secretion. J Biol Chem 263 : 7472 - 7477, 1988.
 12. Sabatini LM, Azen EA : Histatins, a family of histidine-rich proteins, are encoded by At least two loci, HIS1 and HIS2. Biochem Biophys Res Commun 160:495-502, 1989.
 13. Oppenheim FG : Salivary histidine-rich proteins. In : Human saliva : Clinical chemistry and microbiology. Tenovuo JO, editor. Boca Raton : CRC Press, PP. 151-160, 1989.
 14. Murakami Y, Tamagawa H, Shizukuishi S : Biological role of an arginine-residue present in histidine-rich peptide which inhibits hemagglutination of *Porphyromonas gingivalis*. FEMS Microbiol Lett 98 : 201-204, 1992.
 15. Nishikita M, Kanehira T, Oh H : Salivary histatin as an inhibitor of a protease by the oral bacterium *Bacteroides gingivalis*. Biochem Biophys Res Commun 174 : 625-630, 1989.
 16. Sugiyama K : Anti-lipopolysaccharide activity of histatins, peptides from human saliva. Experientia 49 : 1095-1097, 1993.
 17. Xu T, Levitz SM, Diamond RD : Anticandidal activity of major human Salivary histatins. Infect Immun. 59 : 2-2554, 1991.
 18. Sugiyama K, Ogino T, Ogata K : Rapid purification and characterization of histatins (histidine-rich polypeptides) from human whole saliva. Arch Oral Biol 35 : 415-419, 1990.
 19. Balmet RT, Hirsch SR : The non-Newtonian behaviour of human saliva. AICHE Symp Ser Biorheol 74 : 125-129, 1978.
 20. Van der Reijden WA, Veerman ECI, Nieuw Amerongen AV : Shear rate dependent viscoelastic behavior of human glandular salivas. Biorheology 30 : 141-152, 1993.
 21. Waterman HA, Blom C, Holterman HJ : Rheological properties of human saliva. Arch Oral Biol 33 : 589-596, 1988.
 22. Levine MJ, Reddy MS, Tabak LA : Structural aspects of salivary glycoproteins. J Dent Res 66 : 436-441, 1987.
 23. Tabak LA : Genetic control of salivary mucin formation. In : Frontiers of oral biology. Vol. 8. Ferguson DB, editor. Basel : Karger. 77-94, 1991.
 24. Koop HM, Valentijn-Benz M, Nieuw Amerongen AV : Aggregation of oral bacteria by salivary mucins in comparison to salivary and gastric mucins of animal origin. Ant Van Leeuwenhoek 58 : 255-263, 1990.
 25. Toribara NW, Gum JR, Culhane PJ : Muc-2 human small intestinal mucin gene structure-repeated arrays and polymorphism. J Clin Invest 88 : 1005-1013, 1991.
 26. Hoffman MP, Haidaris CG : Analysis of *Candida albicans* adhesion to salivary mucins. Infect. Immun. 61 : 1940-1949, 1993.
 27. Levine MJ : Salivary macromolecules. Ann. New York Aca. Sci. 694 : 11-16, 1993.

28. Fox PC, Van der Ven PF, Baum BJ : Pilocarpine for the treatment of xerostomia associated with salivary gland dysfunction. *Oral Surg.* 61 : 243-248, 1986
29. Mandel ID : The function of saliva. *J Dent Res* 66 : 623-635, 1982.
30. McNabb PC, Tomashi TB : Host defense mechanisms at mucosal surfaces. *Ann Rev Microbiol.* 35 : 477-496, 1981.
31. Carter WJ, Englander HR, Weber TB : Chloride levels in parotid secretion. *J Dent Res* 37 : 902-905, 1958.
32. Dawes C : Inorganic constituents of saliva in relation to caries. *Cariology Today Int. Congr., Zurich*, 70-74, 1983.
33. Dawes L : A mathematical model of salivary clearance of sugar from the oral cavity. *Caries Res.* 17 : 321-324, 1983.
34. Slomiany BL : Physico-chemical characteristics of mucus glycoproteins and lipids of the human oral mucosal mucus coat in relation to caries susceptibility. *Arch Oral Biol* 34 : 229-237, 1989.
35. Qian H, Dao ML : Inactivation of the *Streptococcus mutans* wall-associated protein A gene (wapA) results in a decrease in sucrose-dependent adherence and aggregation. *Infection and Immunity.* 61 : 3597-3604, 1993.
36. Miller WD : A study of certain questions relating to the pathology of teeth. *D. Cosmos* 46 : 981-1001, 1904.
37. Shannon IL : Salivary sodium, potassium and chloride levels in subjects classified as to dental caries experience. *J Dent Res* 37 : 401-406, 1958.
38. Tatevossian A, Gould CT : The composition of the aqueous phase in human dental plaque. *Archs Oral Biol* 21 : 319-323, 1976.
39. Weber TB : The rate of flow of constantly stimulated parotid secretion in caries-free and caries-rampant groups. *Rep.*, 1960
40. Rosan B : Enhanced saliva-mediated bacterial aggregation and decreased bacterial adhesion in caries-resistant versus caries-susceptible individuals. *Infection and immunity* Dec. 1056-1059, 1982.
41. Newburn E : *Cariology* 3rd ed. Quintessence books, 29-52, 1989.