

치근단 및 치수병변 환자에서의 TNF- α 와 β , IL-1 β 및 TGF- β 1의 수준과 근관내 특정 black pigmented bacteria와의 연관성에 관한 연구

변호영 · 임성삼 · 박동성*

서울대학교 치과대학 치과보존학교실, 삼성의료원 치과진료부 보존과*

ABSTRACT

LEVELS OF TNF- α , - β , IL-1 β , TGF- β 1 AND THEIR RELATIONSHIP WITH THE PRESENCE OF SPECIFIC BLACK PIGMENTED BACTERIA IN PERIAPICAL AND PULPAL DISEASES

Ho-Young Byun, D.D.S., M.S.D., Sung-Sam Lim, D.D.S., M.S.D., Ph.D.,
Dong-Sung Park, D.D.S., M.S.D., Ph.D.*

Department of Conservative Dentistry, Collage of Dentistry, Seoul National University

**Institute of Oral Health Science SamSung Medical Center*

Bacterial infection of the pulp results in the development of a periapical lesion with the concomitant resorption of periapical bone. The cytokines are believed to play an important role in this matter. The purpose of this study was to find the relationship among the presence of black pigmented bacteria, the levels of cytokines(TNF- α , - β , IL-1 β , and TGF- β 1), and the amount of bone resorption in periapical and pulpal diseases. For the purpose, the patients were grouped into chronic apical pathosis, acute apical pathosis, acute pulpitis, and a healthy control group. Root canal samples were taken from periapical tissue exudates during routine endodontic treatment, and the venous blood was taken from each patients. The samples were processed to measure local and systemic levels of the cytokines using enzyme linked immunosorbent assay(ELISA). Bacterial content of *Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Prevotella nigrescens* were measured by indirect immunofluorescence method and the size of the periapical lesions were measured from the radiographs.

The following results were obtained:

1. The levels of bone resorptive cytokines(TNF- α , TNF- β , IL-1 β) in exudates from acute and chronic apical pathoses were significantly higher than those from acute pulpitis and the normal pulps($p < 0.05$).
2. IL-1 β were the highest among the bone resorptive cytokines in apical pathoses. However, no statistical difference between acute and chronic lesions were found($p > 0.05$).
3. The levels of TGF- β 1 in exudates from acute pulpitis and chronic apical pathoses were significantly higher than those from acute apical pathoses and the normal pulps($p < 0.05$). However, there were no significant correlations among the levels of bone resorptive cytokines.
4. The levels of TNF- β in serum were significantly higher than those from the exudates while serum TGF- β 1 concentrations were significantly lower($p < 0.05$).
5. Exudates from the canals in which the *P. nigrescens* were detected showed significantly higher levels of IL-1 β than those from the canals without the microorganism($p < 0.05$).
6. There were no significant correlations among the levels of the cytokines, the amount of bone destruction, and the presence of acute and chronic symptoms($p > 0.05$).

Key Words : TNF- α , - β , IL-1 β , TGF- β 1, ELISA, Indirect Immunofluorescence

I. 서론

치수의 세균 감염은 치수의 괴사와 치근단병변을 야기하고 동시에 골흡수를 초래한다. 치근단병변에는 국소적인 면역 반응이 나타나며 다수의 혼합된 염증세포들의 침윤을 보여 치주염등의 감염과 골흡수를 동반하는 다른 병변과 유사한 원인과 경로를 보인다. 골흡수는 일차적으로 칼슘이온과 인산 이온이 세포외액으로 유리되며 다음으로 유기물질이 제거된다. 이러한 현상은 동시에 또는 연속적으로 파골세포의 인접골에서 일어난다. 골흡수는 파골세포에 의해 일어나는 능동적인 과정이지만 현재로서는 감염과 연결된 치근단 골흡수의 경로는 명확히 규명되어 있지 않고 여러 중간 물질들만 제시되어 이들이 독립적으로 혹은 복합적으로 골흡수를 촉진시킨다고 알려져 있다. 이들 중에는 lipopolysaccharide(LPS)등의 세균 세포벽 성분에 의한 직접적인 골흡수 효과와 세균에 의해 촉진되는 숙주 유리물질들인 Tumor Necrosis Factor(TNF), Interleukin 1(IL-1) 등의 cytokine과 prostaglandin, bradykinin등이 있다¹⁻⁴⁾. 이들 중 cytokine은 여러 생리학적, 병리학적 과정에서 세포와 세포사이의 연락을 전달하는 필수 요소들이며 특히 세포의 성장과 분화에 관련된 부분을 조절하거나 매개하는 것으로 추측되고 있다. TNF와 IL-1은 단핵세포나 대식세포로부터 유리되어 다양한 면역학적 염증 현상을 야기하는 물질로 알려져 있으며 특히 파골세포를 활성화 시키고 조골세포에 의한 골형성을 억제하는 주요 물질로 보고되고 있다^{5,6)}. 골흡수를 촉진하는 osteoclast activating factor(OAF)를 정제한 결과 IL-1 β 와 동일한 것으로 밝혀졌고 TNF도 *in vitro*에서 골흡수를 야기하며 이들 두 물질이 존재할 때 골의 교원질 합성이 억제되고 골형성이 억제된다고 알려져 있다⁶⁻¹⁰⁾. 그람음성 혐기성 세균의 세포벽 성분인 내독소(endotoxin)를 체내에 주입하면 TNF, IL-1등의 수준이 상승하는 것이 확인되었고 내독소에 반응하여 대식세포가 활성화 되는 것도 알려진 바 있다⁵⁾. 만성치근단병변에서의 염증조직에는 대식세포, 다형핵백혈구, T, B 세포등이 주로 나타나 치근단병변의 근단 조직에는 상당량의 cytokine이 존재할 것으로 예상된다¹¹⁻¹³⁾. 한편 TGF- β 1은 다양한 세포들의 성장과 분화를 조절하며 골 형성과정에 중요 역할을 하는 것으로 추측하고 있다^{14,15)}. TGF- β 1은 항원에 의해 활성화된 T세포나 LPS에 의해 활성화된 mononuclear phagocytes등에서 유리되며 골흡수를 증가시키는 호르몬인 부갑상선호르몬, 1,25-dihydroxycholecalciferol, IL-1등이 TGF- β 의 유리를 촉진하고 calcitonin에 의한 골흡수 억제가 TGF- β 활동을 감소시키는 것으로 알려져 있다¹⁶⁾. 체내에서의 골흡수는 파골세포의 활동력의 변화뿐만 아니라 파골세포 수의 변화에 관련되어 있고 TGF- β 1은 파골세포의 생성에 영향을 미치는 것으로 보고되고 있다. 파골세포의

기능에 밀접하게 관여하는 조골세포는 TGF- β 1에 반응할 뿐만 아니라 TGF- β 1을 합성하며, 흡수되고 있는 골에서 유리되는 TGF- β 1의 근원이 된다. 따라서 TGF- β 1은 조골세포에 의한 파골세포의 조절에 관련되어 있는 것으로 보이며 조골세포에 의한 교원질 생성을 증가시킨다¹⁷⁾. 또한 TGF- β 1은 임파구에 대한 반대작용을 나타내어 T세포의 분화와 cytotoxic T 임파구의 발달, 대식세포의 활성화등을 억제하며, 다형핵백혈구와 내피세포에 작용하여 염증으로 형성된 cytokine에 대한 역반응 효과를 나타내어 면역반응을 차단하는 신호로 간주되고도 있다¹⁸⁻²⁰⁾.

이러한 cytokine의 수준과 분포를 알아보는 것은 치수 및 치근단병변에서의 염증과정과 골파괴의 기전에 관련된 역할을 파악해 볼 수 있는 방법중 하나일 것이다. 본 실험에서는 이를 측정할 수 있는 방법으로 널리 사용되는 Enzyme Linked Immunosorbent Assay(ELISA)를 이용하였는데, 그 기본 원리는 항원과 항체 모두 활성력을 유지하면서 매개체 표면에 쉽게 부착한다는 것과 면역 시약을 효소에 결합시킬 수 있다는 것에 기초를 두고 있으며 특이성과 민감도가 우수한 장점을 가지고 있다²¹⁾.

치근단병변과 골흡수에서의 혐기성세균의 역할이 중요함은 널리 알려져 있는데 특히 LPS를 갖고 있는 세균이 주요 역할을 하며, 괴사된 치수 자체만으로는 치근단병변을 야기하지 못하며 특정 혐기성 그람 음성 세균에 감염되어야 치근단병변과 골흡수가 일어난다고 한다²²⁾. 이들 중 과거에 Black-pigmented Bacteroides(BPB)로 분류되었던 세균들이 치근단질환의 주요 병원균으로 알려져 있다. 이 세균들은 악취, 동통, 누공형성과 관련이 있고 만성치근단질환의 악화에 중요하다고 하였다^{23,24)}. 근관내 세균을 실험동물에 주입한 결과 증상이 없는 근관에 존재하는 세균들의 조합과는 달리 증상이 있는 근관에 존재하는 세균들의 조합은 전염성을 일으켰고 BPB가 반드시 포함되어 있어 치근단의 화농성 염증에는 이들 세균이 필수적으로 존재해야 한다고 하였다^{3,25,26)}. 그리고 실험동물에서 근관을 오염시켜 치수 괴사를 일으킨 결과 시간이 갈수록 혐기성 세균이 현격히 증가하여 결국은 세균의 대부분을 그람 음성 혐기성 세균이 차지하며 특히 Bacteroides의 증가가 두드러진다는 보고가 있어 강력한 치근단질환의 병원균으로 여겨지고 있으며 따라서 지속적인 임상증상이 있는 치근단 질환의 경우 이들 세균이 있을 가능성이 높다²⁷⁾. 최근의 세균 배양 연구들은 다양한 BPB종이 여러 다른 감염에서 각각 특정한 작용을 한다고 보고하고 있다. *Porphyromonas gingivalis*는 파괴성 치주염과 관련되어 있고 *Prevotella intermedia*는 치은염, 치주염, 치근단감염과 치성 농양에서 발견되며 *Porphyromonas endodontalis*는 치근단감염과 농양에 밀접한 관계가 있다고 보고되고 있다^{26,28-30)}. 이들 균주들의 독성은 여러 독성요인으로 비교되는데 그중 단백질 분해능력이 가장 중요한 요소이다. *P. gingivalis*가 BPB종 중에서 가장 단백질

분해능력이 크며 다음으로 *P. endodontalis* 순서로 보고되고 *P. gingivalis*와 *P. endodontalis*는 독성이 강해 급성 염증에서 주로 발견되나 *P. intermedia*는 증상이 있거나 없는 근관 내에서 두루 발견된다고 한다^{15,26,31,32}. 다른 세균과 마찬가지로 *P. gingivalis*의 내독소는 골흡수에 활동적이며 peripheral monocytes에서의 IL-1 생성을 촉진한다고 한다^{26,33}. 한편 최근에는 *P. intermedia*에서 다른 DNA 구조를 가진 이중 균주 *P. nigrescens*를 분리하는데 성공하였는데 *P. intermedia*와 *P. nigrescens*가 구강내에 동일하게 존재하며 *P. intermedia*는 치주가 건강한 성인과 아동에서는 발견되지 않고 치주염이 심화될수록 검출이 증가하는 것으로 보여 치주질환과 관련되어 있고 *P. nigrescens*는 건강한 치주조직에서, 그리고 감염된 근관에서 *P. intermedia*보다 3배 이상 검출되었다는 보고가 있다³⁴⁻³⁷.

혐기성 세균을 검출하는 전통적 배양방법은 세균의 이송과 배양에 어려움이 많고 그 과정 중에서 산소에 노출되어 세균이 죽어 배양 결과가 다르게 나타날 수 있어 기술적으로 매우 숙달을 요함과 동시에 시간과 비용, 노력이 많이 필요하다. 본 연구에서 사용한 간접면역형광법은 항원 항체 반응의 특이성으로 병인균의 검출에 유용하고 빠르며, 세균의 존재 유무를 나타내는 민감도와 특이도가 배양법에 비해 매우 높은 장점이 있고 특정한 표적을 찾아내는데 배양법보다 더 민감하여 특히 치근단 질환에서의 균주를 검출하는데 유용하다고 하였다^{38,39}.

따라서 본 연구에서는 그람 음성 세균의 감염에 관련되어 있고 골흡수에 관여하는 것으로 알려진 TNF- α , TNF- β , IL-1 β 와 anti-cytokine 작용이 있는 TGF- β 1을 치근단 삼출액내에서 ELISA로 조사, 그 수준을 비교하고 근관내의 감염과 치근단병변 및 골파괴의 주요 병인균으로 알려진 *P. gingivalis*, *P. endodontalis*, *P. nigrescens*의 존재 여부를 간접면역형광법으로 관찰하여 cytokine의 수준과 특정 균주와의 연관성 및 골파괴양과의 상호관련 유무를 살펴 그 결과를 보고하는 바이다.

II. 실험 재료 및 방법

II-1 실험 재료

서울대학병원 치과진료부 보존과 및 저자의 의원에 내원한 18~45세까지의 환자 중 각각 만성치근단병변, 급성치근단병변, 급성치수염으로 진단된 환자에서 근관내의 삼출액과 정맥에서 채득한 혈액을 실험 대상으로 삼았고 보철 치료시 치수의 노출이 우려되어 근관치료를 요하는 치아를 비교 대상으로 삼았다. 치근단병변환자에서는 치수 과사가 확인되고 방사선상에 치근단의 분명한 투과상을 나타내는 경우를 선택하였는데 특별한 임상증상이 없거나 누공만 존재하는 20개의 치아를 만성치근단병변균으로, 타진에 심한 양성반응을 보이고

연조직의 종창이나 동통등을 나타내는 17개의 치아를 급성치근단병변균으로 구분하였다. 치수염환자에서는 한냉검사나 온열검사에 민감하게 반응하고 전기치수생활력검사에 정상치아보다 낮은 수치에 반응하며 심한 자발통을 호소하는 13개의 치아를 급성치수염균으로 분류하였으며 비교균으로 12개의 정상 치아를 선택하였다. 이전 1개월 사이에 항생제를 복용한 경험이 있는 환자와 치주낭의 깊이가 4mm 이상 되는 치아, 근관이 타액으로 오염되거나 이전에 근관 치료를 받았던 치아들은 제외하였다.

II-2 실험 방법

1. 실험 표준 균주의 배양

본 실험에 사용한 세균은 *Porphyromonas endodontalis*(ATCC 35406), *Porphyromonas gingivalis* serotype a(381), *Prevotella nigrescens*(ATCC 33563)로 균주를 5% 가토 혈액, 5 μ g/ml의 hemin과 0.5 μ g/ml vitamin K₁이 포함된 한천배지에 접종하여 37 $^{\circ}$ C 혐기성 세균 배양기에서 5~7일간 배양하여 순수 분리한 후 균집락을 취하여 이를 가토혈액 및 5 μ g/ml hemin과 vitamin K₁이 첨가된 Brain Heart Infusion(BHI) broth(Difco, Michigan, U.S.A.)에 접종하고 37 $^{\circ}$ C의 혐기성 조건하에서 배양하였다. 균주는 16,000xg, 4 $^{\circ}$ C에서 15분간 원심분리하여 사용할 때 까지 -20 $^{\circ}$ C에서 보관하였다.

2. 가토 항혈청의 생산

P. endodontalis 및 *P. gingivalis*의 항혈청은 본 교실에서 보유하고 있는 항혈청⁴⁰을 사용하기로 하였고 *P. nigrescens*에 대한 항혈청만 다시 생산하였다. 균주를 PBS(pH7.3)로 세척하고 0.5% formalin 용액에 16~24시간 넣어 고정시킨후 다시 PBS로 세척하였다. 균주에 대한 항체를 얻기위해, 균주를 10mg/ml(wet weight)되도록 PBS로 희석하고 체중 2.5~3.5kg 내외의 세 마리의 가토 귀정맥에 균주 용액을 0.3ml 부터 0.3ml씩 격일로 용액을 증가시키며 한 마리 당 10번씩 (0.3ml, 0.3ml, 0.6ml, 0.6ml, 0.9ml, 0.9ml, 1.2ml, 1.2ml, 1.5ml, 1.5ml)주사한 다음, 일주일 후에 3일간 연속적으로 1.5ml씩 booster 주사하였다. 적정 항체역가를 측정하기 위해 가토의 central ear artery에서 혈액을 채취하여 ELISA를 실시하였고, 적정 항체역가가 나온 가토는 충분한 양의 혈청을 얻고자 심장천공법으로 혈액을 채취하여 원심분리하였다. 얻은 혈청은 -70 $^{\circ}$ C의 deep freezer에서 사용할 때까지 냉동보관하였다.

3. 항 혈청의 검정

1) ELISA

ELISA를 실시하기 위하여 각 균주를 원심분리 한후

0.02% NaN₃가 들어 있는 0.1M NaHCO₃ buffer용액(pH 9.6)으로 희석하여 580nm의 분광기로 최저 최적 농도인 흡광도(O.D.) 0.3을 맞춘 뒤 이를 각각 일회용 flat bottom polystyrene microtiter plates에 부착시켰다. 항원 부착을 위하여 plate well에 항원(균주) 200 μ 씩을 넣은 다음 CO₂ incubator에서 37 $^{\circ}$ C로 2시간 부화 시킨 후 2%(wt/vol) bovine serum albumin이 들어있는 항원 coating buffer 용액 100 μ 를 첨가하여 4 $^{\circ}$ C 냉장고에 사용할 때 까지 보관하였다. 실험 전에 plate의 각 well을 washing buffer (PBS+ Tween 20)용액으로 3회 씻어낸 후 antibody dilution buffer(PBS+0.05% Tween 20+0.5% BSA+0.02% NaN₃)용액으로 1/100, 1/200, 1/400, 1/800, 1/1600로 희석한 가토의 혈청 항체 200 μ 를 각 well에 넣고 37 $^{\circ}$ C의 CO₂ incubator에서 2시간 동안 부화 반응시켰다. 그후 plate의 각 well을 씻고 conjugate dilution buffer (PBS+0.05% Tween 20+0.5% BSA+0.02% NaN₃)로 적정량 희석된 Alkaline phosphatase-conjugated goat anti-rabbit IgG를 각 well에 200 μ 씩 넣어서 37 $^{\circ}$ C의 CO₂ incubator에서 1시간을 부화시킨 후 다시 washing buffer로 3회 세척하고 substrate buffer용액에 용해시킨 p-nitrophenyl phosphate(type 104;Sigma chemical Co.)를 200 μ 씩 well속에 넣어 37 $^{\circ}$ C incubator에서 1시간 동안 반응시킨 후 이 효소 반응을 정지시키기 위해 50 μ 의 1N NaOH를 첨가하였다.

이렇게 반응을 정지시킨 후 각 well의 발색반응을 관찰하였고 ELISA Reader(Titertek Multiskan[®] Plus MK II;Flow Laboratories AG, Switzerland)로 405nm에서의 optical density를 측정하여 생산한 항혈청과 각 균주와의 반응여부를 관찰하였다.

2) 간접면역형광법

간접면역형광법을 실시하기 위해 각 균주를 0.5% formalin으로 고정하고 PBS 세척후 spectrophotometer (Bausch & Lomb spectronic 21 U.V.D.)를 이용하여 650nm에 0.15 흡광도로 표준화시켜 희석하였다. 희석한 각 균주 용액을 20 μ 씩 각기 다른 받침 유리에 떨어뜨린 후 공기중에서 건조시켜 열처리로 고정하고 -20 $^{\circ}$ C에 보관하였다. 항혈청 용액을 PBS에 4% bovine serum albumin을 넣은 용액으로 checkerboard 역가측정법에 의해 배수 희석하여 사용하였다. 각 균주 위에 희석한 항혈청을 20 μ 씩 떨어뜨린 후 30분간 습실내에서 반응시켜 PBS로 세척하고 Fluorescein isothiocyanate로 conjugate된 goat anti-rabbit IgG(Melog Lab., Inc., Springfield, Va., U.S.A.)를 각각 1:50, 1:100으로 희석하여 20 μ 씩 받침유리에 떨어뜨려 30분간 반응시킨 후 다시 세척하고 90% glycerol로 고정하여 형광현미경 하에서 관찰하고 각 균주와 항혈청과의 교차반응 유무를 확인하였다.

4. 환자 삼출액 및 혈액 채취

정상 근관치료 과정 중에 근관으로부터 삼출액을 채취하였다. 먼저 치아를 rubber dam으로 방습한 후 표면을 30% H₂O₂로 닦고 치아 및 주변을 5% iodine tincture로 소독하였다. 그 후 근관와동형성을 실시하고 방사선 사진상의 근관장보다 1~2mm 짧게 근관작업장을 설정하였다. 치근단병변군에서는 근관와동 형성후 다른 기구나 세척액을 사용하기 전에 멸균소독된 paper point를 근관내에 넣어 삼출액을 찍어 내었고 바로 0.9ml의 PBS가 담겨 있는 소독된 1.8ml plastic tube에 넣었다. 계속해서 다른 paper point로 바꿔가며 삼출액이 나오지 않을 때 까지 같은 과정을 반복하였다.

급성치수염 치아나 정상 치아에서는 근관 작업장을 설정하고 발수를 행한 후 앞에서와 같은 방법으로 조직액을 취하였다. 이렇게 취한 sample들은 실험때 까지 4 $^{\circ}$ C에서 냉장 보관하였다.

만성치근단병변 환자와 급성치수염 환자의 팔 정맥에서 말초혈액을 채취하고 원심분리하여 얻은 상층액을 사용할 때 까지 -20 $^{\circ}$ C에서 냉동 보관하였다.

5. 치근단 병소의 크기 측정

촬영한 방사선 사진상에서 치근단의 방사선 투과상을 나타내는 부위의 가로, 세로 길이를 측정하였다.

6. 간접 면역 형광법

근관에서 채취한 paper point가 들어있는 인산완충용액(phosphate-buffered saline, PBS:pH7.2)에서 20 μ 씩 받침유리에 떨어뜨린 후 공기중에서 건조시켜 열처리로 고정하고 -20 $^{\circ}$ C에서 보관하였다. 인산완충용액에 4% bovine serum albumin을 넣은 용액으로 항 혈청용액을 checkerboard 역가측정법으로 1:80으로 희석하여 사용하였다.

환자에게서 채취한 sample 위에 희석한 각 세균의 항 혈청을 20 μ 씩 떨어뜨린 후 30분 동안 37 $^{\circ}$ C moisture chamber에서 반응시켜 PBS로 세척하고 Fluorescein isothiocyanate로 conjugate된 goat anti-rabbit IgG(Melog Lab., Inc., Springfield, Va., U.S.A.)를 각각 1:50으로 희석하여 20 μ 씩 받침유리에 떨어뜨려 30분간 반응시킨 후 다시 세척하고 90% glycerol로 고정하여 형광현미경(Olympus fluorescence Microscope BH2-RFL;Olympus Optical Co., Ltd., Tokyo, Japan)하에서 관찰하였으며 Exciter filter는 UG-1, Dichronic mirror는 L-435, light source는 HBO200 수은 등이었다.

형광염색에 의한 판정등급은 다음과 같은 기준에 의해 0부터 4+ 까지 나누어서 3+, 4+를 양성반응으로 결정하였다.

0 : no fluorescence

1+ : bare fluorescence with single cells not distinguishable

- 2+ : faint fluorescence with single cells visible, no definition of cell shape
- 3+ : moderate fluorescence with good cell envelope definition and a dark cell center
- 4+ : brilliant fluorescence with good cell envelope definition and a dark cell center

III. 실험 결과

7. ELISA

취득한 삼출액을 각각 human TNF- α , TNF- β , IL-1 β , TGF- β 1 ELISA kit(R & D Co. Minn. U.S.A.)를 이용하여 분석하였는데 4단계의 과정을 거쳐 행하였다. 먼저 standard와 표본을 200 μ 씩 microtiter plate의 각 well에 담고 adhesive strip으로 덮어 실온에서 2시간 동안 부화시켰다. 2시간 후 plate를 수세용 buffer를 이용하여 4회 세척하였다. 다음으로 각 cytokine에 대한 conjugate를 200 μ 씩 well에 첨가하여 실온에서 1시간 동안 부화시켜 3회 세척하였다. 그런후 각각의 well에 기질용액을 200 μ 씩 넣어 20분간 방치하였다가 반응을 정지시키기 위해 stop solution 1N NaOH를 50 μ 씩 첨가하여 30분 내에 ELISA Reader Colorimeter인 Titertek MultiskanR Plus MK II(Flow Laboratories AG, Switzerland)로 plate well의 상층부에서 하단부까지로 관통하여 450nm에서의 optical density를 측정하였다.

8. 통계처리

SPSS(ver.7.5) 통계용 program을 사용하여 Wilcoxon Test로 각 군내의 cytokine간의 수준을 비교하고 Mann-Whitney Test로 각 군간의 차이, 군주의 발현과 cytokine의 수준을 유의수준 p=0.05 하에서 분석하였으며 Spearman's rho를 이용하여 cytokine, 병변의 크기, 군주와의 상관관계를 조사하였다.

각 실험군에서 측정된 각각의 cytokine 수준은 Table 1, 2 및 Fig. 1, 2와 같았으며 대조군보다 만성, 급성 치근단병변, 급성치수염군 모두에서 TNF- α , TNF- β , IL-1 β 의 수준이 유의성있게 높았으며 치근단병변군에서 치수염군보다도 역시 유의성있게 높은 차이를 나타내었다(p<0.05). TNF- α 와 TNF- β 의 수준은 만성치근단병변군에서 가장 높았고 급성치근단 병변군, 급성치수염군 순이었으나 만성치근단병변군과 급성치근단병변군간에는 유의성있는 차이가 없었다. IL-1 β 의 수준 역시 만성치근단병변, 급성치근단병변, 급성치수염 순이었고 급성과 만성치근단병변군간에는 유의성있는 차이가 없었으나 치수염군과는 유의할 만한 차이를 나타내었다(p<0.05). TGF- β 1은 급성치수염군에서 가장 높았고 만성치근단병변군, 급성치근단병변군 순이었으며 급성치수염군과 만성치근단병변군은 급성치근단병변 및 정상치수염군보다 유의성있게 높은 수준을 나타내었다(p<0.05).

만성 및 급성치근단병변군내에서는 TGF- β 1의 수준이 유의성있게 가장 높았으며 IL-1 β , TNF- β , TNF- α 의 순으로 나타났고 급성치수염군에서는 TGF- β 1, TNF- β , IL-1 β , TNF- α 순으로 나타났다. 만성 및 급성치근단병변군에서는 TNF- α 와 IL-1 β 사이에 유의성있는 차이가 나타났으나(p<0.05) 상관관계는 존재하지 않았고 TGF- β 1과 골흡수 cytokine간에도 상관관계를 발견하지 못하였다. 골흡수 cytokine중 TNF- β 의 전신적 수준은 국소적 수준보다 유의성있게 높은 차이를 보였으며(p<0.05) TGF- β 1은 오히려 유의성있게 낮은 수준을 나타냈다(p<0.05).

각 군에서의 군주의 발현빈도는 Table 3 및 Fig. 3과 같으며 만성치근단병변군의 20개 치아에서 *P. gingivalis*와 *P. nigrescens*가 동일하게 13개에서 발견되었고 *P. endodontal-*

Table 1. Local concentrations of cytokines(Mean concentration \pm *SD, pg/ml)

Group	TNF- α	TNF- β	IL-1 β	TGF- β 1
I(n=12)	0.38 \pm 0.44	1.85 \pm 1.54	1.32 \pm 1.53	116.58 \pm 75.98
II(n=20)	22.18 \pm 21.94	26.81 \pm 9.35	61.32 \pm 75.96	231.15 \pm 151.01
III(n=17)	18.97 \pm 13.67	24.66 \pm 10.10	52.26 \pm 75.02	126.28 \pm 76.84
IV(n=13)	9.78 \pm 6.62	12.92 \pm 5.97	11.20 \pm 8.67	233.74 \pm 150.87

*SD(Standard deviation)

n=number of samples

Group I : Normal pulp

Group II : Chronic apical pathosis

Group III : Acute apical pathosis

Group IV : Acute pulpitis

Table 2. Concentrations of cytokines in serum(Mean concentration \pm SD, pg/ml)

Group	TNF- α	TNF- β	IL-1 β	TGF- β 1
II(n=20)	9.93 \pm 5.15	96.87 \pm 37.65	25.38 \pm 7.42	91.78 \pm 44.69
IV(n=13)	11.77 \pm 5.73	88.46 \pm 37.18	26.17 \pm 10.15	117.45 \pm 61.14

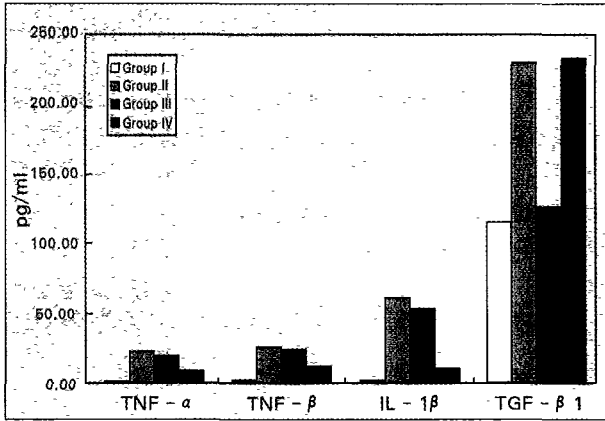


Fig. 1. Group comparison of local cytokine levels

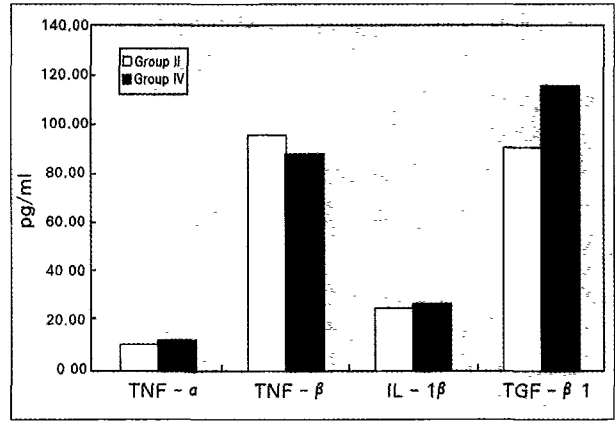


Fig. 2. Group comparison of serum cytokine levels

Table 3. Occurrence of three black pigmented bacteria in each group

Group	<i>P. endodontalis</i>	<i>P. gingivalis</i>	<i>P. nigrescens</i>
I (n=12)	0 (0.0%)	1 (8.3%)	0 (0.0%)
II (n=20)	6(30.0%)	13(65.0%)	13(65.0%)
III (n=17)	9(52.9%)	11(64.7%)	12(70.5%)
IV (n=13)	0 (0.0%)	3(23.0%)	1 (7.6%)

n=number of samples

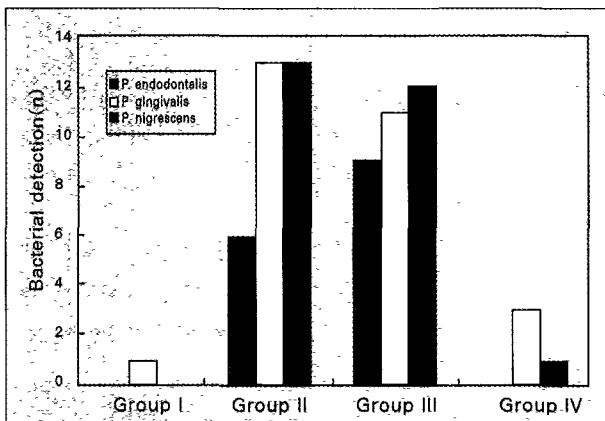


Fig. 3. Occurrence of black pigmented bacteria in each group

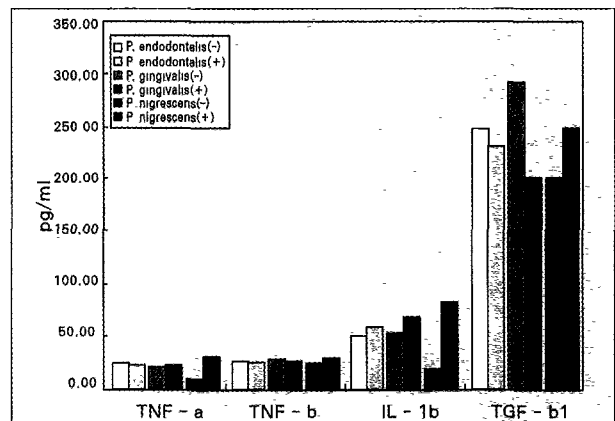


Fig. 4. Comparison of local cytokine levels in chronic apical pathoses in relation to black pigmented bacteria

is가 6개의 치아에서 발견되었으며 20개의 치아중 18개에서 최소 한가지 이상의 균주가 나타났다. 급성치근단병변군에서는 17개의 치아중 *P. nigrescens*와 *P. gingivalis*가 각각 12, 11개의 치아에서 나타났고 *P. endodontalis*는 9개의 치아에서 발견되었으며 17개 모든 치아에서 최소 한가지 이상의 균주가 나타났다. 급성치수염군에서는 13개의 치아중 *P. gingivalis*가 3개의 치아에서 *P. nigrescens*가 2개의 치아에서 발견되었고 *P. endodontalis*는 나타나지 않았다.

각 균의 발현 여부와 cytokine의 관계는 Table 4 - 6, Fig. 4 - 6과 같고 근관내에 균주가 나타나는 경우의 cytokine 수

준이 균주가 없었던 경우보다 약간 높거나 비슷한 수준으로 유의성은 없었고 *P. nigrescens*의 존재 유무에 따라 IL-1β의 수준에서만 유의성있는 차이를 나타내었다(p<0.05). 반면 임상 증상과 균주간의 발현빈도 간에는 동통, 악취, 타진반응등의 급성증상을 나타낼 때 *P. endodontalis*가 더 많이 발견되었으나 유의성있는 차이는 없었고 *P. gingivalis*와 *P. nigrescens*는 만성, 급성증상에서 거의 동일하게 발견되었다.

치근단병변군에서의 병변의 크기와 각 cytokine의 수준, 균주의 발현빈도와와의 관련 여부 조사에서는 서로간의 유의할 만한 상관관계가 없었다.

Table 4. Local cytokine levels of chronic apical pathoses in relation to black pigmented bacteria(pg/ml)

		TNF- α	TNF- β	IL-1 β	TGF- β 1
<i>P. endodontalis</i>	-	24.43 \pm 25.91	25.93 \pm 9.05	49.73 \pm 73.06	248.81 \pm 144.31
	+	22.45 \pm 20.89	25.96 \pm 9.66	59.55 \pm 73.61	229.14 \pm 144.31
<i>P. gingivalis</i>	-	21.08 \pm 13.06	27.80 \pm 10.40	53.43 \pm 72.85	289.05 \pm 202.78
	+	22.78 \pm 26.00	26.27 \pm 9.13	70.25 \pm 89.91	199.97 \pm 111.97
<i>P. nigrescens</i>	-	9.14 \pm 6.61	25.16 \pm 6.69	17.35 \pm 31.88	200.00 \pm 127.64
	+	29.20 \pm 24.24	27.69 \pm 10.71	81.92 \pm 82.83	247.92 \pm 164.59

Mean concentration \pm Standard deviation

+: bacteria detected, -: no detection

Table 5. Local cytokine levels of acute apical pathoses in relation to black pigmented bacteria(pg/ml)

		TNF- α	TNF- β	IL-1 β	TGF- β 1
<i>P. endodontalis</i>	-	15.30 \pm 8.95	22.40 \pm 8.66	35.37 \pm 53.32	107.50 \pm 38.94
	+	22.24 \pm 16.68	26.67 \pm 11.35	56.75 \pm 95.69	142.96 \pm 99.07
<i>P. gingivalis</i>	-	20.91 \pm 5.48	20.78 \pm 8.93	38.45 \pm 53.85	98.89 \pm 38.81
	+	17.92 \pm 16.66	31.78 \pm 7.80	61.79 \pm 93.27	141.21 \pm 88.58
<i>P. nigrescens</i>	-	15.16 \pm 7.79	22.77 \pm 10.79	28.81 \pm 44.21	138.00 \pm 125.27
	+	28.13 \pm 20.80	29.21 \pm 7.17	89.60 \pm 93.03	121.39 \pm 52.85

Mean concentration \pm Standard deviation

+: bacteria detected, -: no detection

Table 6. Serum cytokine levels of chronic apical pathoses in relation to black pigmented bacteria(pg/ml)

		TNF- α	TNF- β	IL-1 β	TGF- β 1
<i>P. endodontalis</i>	-	27.90 \pm 7.98	93.30 \pm 37.92	9.01 \pm 3.09	92.37 \pm 50.59
	+	21.60 \pm 4.86	102.22 \pm 40.15	11.31 \pm 7.43	90.89 \pm 38.66
<i>P. gingivalis</i>	-	22.35 \pm 6.61	83.37 \pm 41.54	8.94 \pm 5.86	79.67 \pm 20.49
	+	26.90 \pm 7.65	103.37 \pm 36.02	10.43 \pm 5.02	97.83 \pm 52.89
<i>P. nigrescens</i>	-	25.15 \pm 12.76	94.88 \pm 29.03	8.23 \pm 3.73	79.42 \pm 46.45
	+	25.47 \pm 5.31	102.33 \pm 61.26	14.61 \pm 6.15	96.27 \pm 45.44

Mean concentration \pm Standard deviation

+: bacteria detected, -: no detection

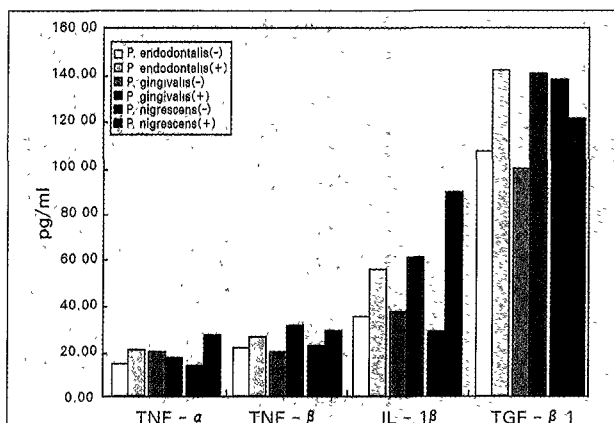


Fig. 5. Comparison of local cytokine levels in acute apical pathoses in relation to black pigmented bacteria

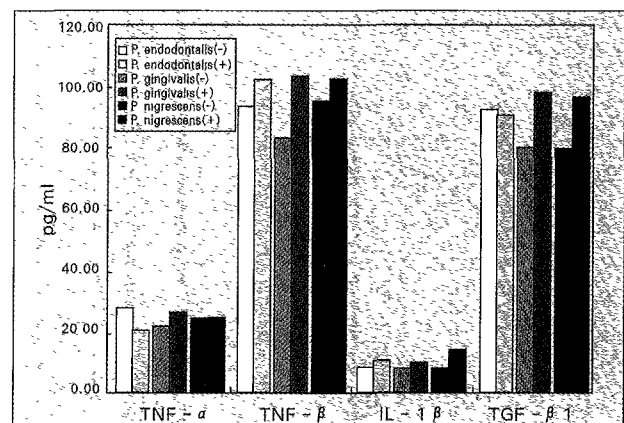


Fig. 6. Comparison of serum cytokine levels in chronic apical pathoses in relation to black pigmented bacteria

IV. 총괄 및 고안

악골의 골 흡수는 항상 일어나고 있다. 즉, 정상 대사 과정 중에도 치조골에는 파골세포의 활동이 일어나고 있으며 동시에 골 형성 과정도 일정하게 일어나 균형을 이루게 된다. 하지만 특정 질병 과정이 골에 영향을 미치면 골 흡수가 골 형성 보다 많이 일어나게 된다. 정상 상태에서의 치근 인접골에서도 백악질 보다 골의 흡수가 더 일어나고 있으며 염증과정이 진행되면 골 흡수가 더욱 빨라지게 됨으로써 치근단 육아종의 주위에 골 흡수를 발견할 수 있는 것이다²⁰. 치수의 세균 감염은 치근단병변을 야기하고 동시에 골 흡수를 초래하며 다수의 T, B세포, 호중구와 대식세포, 형질세포, 호산구등이 혼합된 염증세포의 침윤을 보이는 국소적인 면역 반응을 나타낸다⁴¹⁻⁴³. 단핵세포와 대식세포는 특정 cytokine을 합성해서 여러 세포기능을 조절하는 것으로 알려져 있다. 단핵세포와 대식세포에서 유도되는 cytokine 중 Tumor Necrosis Factor (TNF)와 Interleukin-1(IL-1)이 가장 알려져 있으며 이 두 물질은 생화학적으로나 면역학적으로 분명히 다른 단백질이지만 유사한 생물학적 작용을 나타낸다⁵.

TNF는 분자량 17 kd의 단백질로 본래 특정 종양의 출혈성 괴사를 야기하는 것으로 발견되었는데 이 외에도 세포에 대해 다양한 호르몬 같은 효과를 나타내고 염증과정의 주요 중간물질로 작용한다. TNF는 다량 생성시에는 종양이나 병원균에 조직의 회복이나 방어기전을 보이기도 하지만 만성소모성질환, 식욕감퇴, 체중감소, 전신쇠약, 그리고 치명적인 그람음성 shock을 야기할 수도 있다^{5,44}. 이들 다양한 작용외에도 TNF는 파골세포를 활성화 시키는 작용이 있는데 *in vitro*에서 칼슘이온을 유리하도록 하여 골흡수를 동반하는 염증질환에 중요한 역할을 한다. TNF의 아미노산 순서는 다른 동물들의 것 과도 상당히 유사한데 쥐의 것은 인간의 TNF 단백질과 약 80% 정도의 구조적 유사성을 나타내 특정 종 만의 특이한 TNF 작용이 아님을 설명해 주고 있다^{5,45}. TNF는 활성화된 임파구에서 생산되는 단백질인 lymphotoxin과 구조적, 기능적으로 관련되어 있고 TNF와 lymphotoxin은 동일한 유전인자로부터 발생된 것으로 보이며 원래의 TNF를 TNF- α , lymphotoxin을 TNF- β 라 명하기도 한다.

IL-1은 원래 lymphocyte activating factor로 불리던 것으로 단핵세포, 대식세포가 주요 공급원이지만 거의 모든 유허세포는 IL-1의 기능을 가진 분자를 생산할 수 있음이 발견되었다. 분자 cloning연구에 의해 isoelectric point 5.0과 7.0의 두 개의 다른 IL-1 polypeptide가 있음이 알려졌고 각각은 IL-1 α 와 IL-1 β 로 불리고 있다. 두 물질은 30% 이하의 구조적 동질성을 갖지만 동일한 receptor에 부착하며 생물학적인 작용이 거의 유사하다⁴⁶. IL-1은 thymocyte의 증식을 유발하고 helper T 세포의 활성화를 촉진시키는 것으로 알려져 있고

섬유아세포에 의한 prostaglandin-E₂와 collagenase의 생성을 촉진시키며 골흡수를 자극하고 골의 조골세포 분화와 파골세포 활성화를 야기한다고 알려져 있다^{47,48}. IL-1 β 는 골흡수를 촉진하는 외에 골생성을 방해하는데 골흡수에 있어서의 자극강도가 IL-1 α 보다 13배 더 강하며 TNF 보다는 1000배 정도 강하다고 하며 적정농도의 IL-1 β 는 TNF- α 와 결합시 골흡수 작용이 1.5 - 10배까지의 상승 효과를 보인다고 한다⁹. 일단 골흡수가 일어난 후에는 염증세포에 의해 생성되는 cytokine 양은 추가적인 골흡수를 야기하기에는 충분하지 못하지만 reparative bone을 형성하는 것을 방해할 수 있고 이렇게 복합적 작용으로 전체적인 골 크기는 감소하게 될 것이고 치근단병소는 골흡수와 골생성이 연결되어 일어나지 않는 양상을 보인다고 한다⁴⁹. 이러한 점에서 골흡수는 숙주의 방어기전 역할을 하여 염증세포가 침투할 수 있는 공간을 제공하고 감염부위로부터 골이 퇴축하여 염종의 전신적인 확산과 경조직으로의 침투를 억제한다고 한다.

알려진 바와 같이 TNF와 IL-1등의 cytokine은 단핵세포, 대식세포등으로 부터 유리되어 다양한 면역학적 염증 현상을 야기하며 특히 파골세포를 활성화 시키는 주요 물질로 보고되고 있다⁵. 만성치근단병변에서의 염증조직에는 대식세포가 주로 차지하고 있어 치근단병변의 근단 조직에도 상당량의 cytokine이 존재할 것으로 예상되었다. Hönig등⁵⁰은 치주환자의 치은조직에 높은 수준의 IL-1 β 가 나타나고 건강한 치주조직에는 전혀 검출되지 않았다고 하였으며 Stashenko등⁵¹은 치주질환에서 IL-1 β 양이 가장 많이 나타났고 TNF, IL-1 α 의 순서로 발견 되었다고 보고하면서 치주질환의 병인에 중요한 매개체로 IL-1 β 의 역할을 제시하였다. 한편 치근단 부위에서의 연구에서는 Safavi등⁵²이 만성근단성치주염 환자의 근단 삼출액에서 정상에서보다 높은 수준을 나타낸다고 하였고 Barkhordar등⁵³은 치근단병변에서의 IL-1 β 의 높은 수준을 보고한 바 있으나 IL-1 β 수준과 방사선 상의 병변 크기, 즉 골 흡수 양과의 상관관계는 없는 것으로 보고하였다. Wang등⁴⁹은 치근단 염증 조직에서의 골흡수 활동을 조사한 바 있는데 골 흡수 효과는 anti-IL-1 β , anti-TNF- β 의 항체에 의해 억제되며 indomethacin으로 처리한 경우 골흡수 활동이 역시 감소되었다고 하였다. 이로써 만성치근단병변에서의 골흡수 활동은 IL-1 β 와 TNF- β 에 기인한다고 하였으며 이들의 연구에서 정상 치주조직에서는 전혀 이들 cytokine이 나타나지 않았다고 하였다.

Wang등²⁵은 또한 rat model을 이용하여 급성병소와 만성병소를 비교하였는데 급성병소에서 높은 골흡수 활동성을 나타내어 IL-1 α 가 주요 물질로 작용한다고 보았고 만성병소에서는 상대적으로 낮은 골흡수 활동성을 보이지만 anti-IL-1 α 에 의해서만 중화됨을 보고하여 급성과 만성병소에서의 병변 진행은 골흡수 cytokine의 양적인 차이에 의한 것으로 보고하였다. 또한 D'Souza⁵³, 고⁵⁴ 등은 염증 치수 조직에서의

IL-1, TNF 등의 수준이 정상치수에서 보다 높게 나타난다고 하였고 Stashenko⁵¹⁾는 IL-1 및 TNF- α 는 염증성 조직에서의 질병상태에는 큰 영향을 받지 않고 동등한 결과를 보인다고 하였다. 본 연구에서는 치근단병변에서 급성치수염이나 정상치수에서보다 유의성있게 높은 골흡수 cytokine 수준을 나타내었고 IL-1 β , TNF- β , TNF- α 순으로 나타나 치근단병변에서의 골흡수 활동은 IL-1 β 와 TNF- β 에 기인한다는 Wang⁴⁹⁾의 연구와 일치하는 결과를 나타내었고 급성치근단병변과 만성치근단병변 사이에도 cytokine의 수준에 유의한 차이가 없게 나타나 Stashenko의 보고와 일치하였다. 하지만 본 실험에서의 치근단병변의 급, 만성군의 구분을 병변 발생 기간에는 관계없이 동통, 종창의 유무 등 급성 증상으로만 구분하였기 때문에 전체적인 골파괴 양, 병변의 발생 기간, 현재의 골파괴 활성도 등의 영향을 포함시킨 질병상태의 구분에 의한 비교가 더 정확할 것으로 생각된다. 또한 치근단 병변의 크기와 골흡수 cytokine의 수준과의 관계에서는 유의성있는 상관관계가 없었으나 방사선상의 병변 크기가 아닌 현재의 골흡수 활동력을 알 수 있는 방법으로 측정된 골파괴 양과의 관계를 추후 다시 조사해 볼 수 있으면 한다.

Abbas²⁰⁾은 내독소를 주입시 TNF가 유리되고 TNF가 mononuclear phagocytes와 혈관의 내피세포에 작용하여 IL-1 β 를 유리시킨다고 하였고 소량의 TNF 존재시에는 국소적 염증을 나타내고 적정량이 되면 발열이나 간에서의 특정 단백질의 합성등 전신적인 반응이 나타나며 다량 존재시에는 septic shock을 일으킨다고 하였다. Michie⁴⁴⁾은 건강한 남성에 내독소를 주입한 바 혈중 TNF의 수준이 급격히 상승하나 IL-1 β 수준은 변화가 없었다고 보고하였다. 또한 Girardin⁵⁵⁾은 Gram(-) septicemia의 환자 95%에서 혈중 TNF 수준이 상승하였고 21%의 환자에서 IL-1의 혈중 농도가 상승하였다고 보고하면서 TNF- α 가 endotoxic shock의 필수적인 매개체로 생각하였다. 한편 TNF와 IL-1은 endogenous pyrogen으로 체온을 상승시키는 것으로 알려져 있어 급성치근단병변 환자에서의 증상중 특히 고열이 있는 환자에서의 이들 cytokine의 수준을 조사해 보는 것도 흥미로운 것이다. 본 연구에서는 만성치근단병변에서의 혈중 IL-1 β , TNF- α 의 수준은 삼출액내의 국소적 수준보다 낮게 나타났는데 이는 치수감염으로 생성된 cytokine양이 전신적 영향을 미칠 정도의 많은 양이 아님을 보이며 골흡수는 숙주의 방어기전 역할을 하여 염증세포가 침투할 수 있는 공간을 제공하고 감염부위로부터 골이 퇴축하여 염증의 전신적인 확산과 경조직으로의 침투를 억제한다는 이론에도 부합한다고 할 수 있겠다. 하지만 TNF- β 의 혈중 수준은 유의성있게 높게 나타나 Wang⁴⁹⁾의 치근단 병변에서의 골흡수에 TNF- β 가 주로 작용한다는 보고에 부합되는 듯 하나 TNF- β 는 T세포에서 합성되며 mononuclear phagocyte에서 생성되는 TNF- α 보다 소량이고 혈중에서 많이 검출되지 않는다고 알려져 있어 극히 상반된 결과를 나타내었다.

TGF- β 1은 다양한 세포들의 성장과 분화를 조절하며 골 형성과정에 중요 역할을 하는 다양한 기능을 가진 cytokine으로 25 kd의 분자량을 갖고 있다. TGF- β 1은 세포와 양에 의존하는 기능을 가지고 있어 대부분의 세포에는 성장을 억제하지만 촉진제로도 작용한다^{56,57)}. 이 TGF- β 1은 어디에나 존재하고 생성되는데 골 형성, 유방의 발달, 창상의 치유, 조절작용, 태아의 혈관 형성, 세포의 간질의 생산등을 조절하며 면역반응에서는 T 세포와 B 세포의 분화를 억제하고 항염증 물질로 작용한다²⁰⁾. 골흡수를 증가시키는 호르몬인 parathormone, 1,25-dihydroxycholecalciferol, IL-1등이 TGF- β 의 유리를 촉진하고 골흡수의 calcitonin억제가 TGF- β 활동을 감소시키는 것으로 알려져 있다^{58,59)}. 특히 골조직에는 다른 연조직 보다 TGF- β 가 100배 정도 많이 존재하고 있다는 보고가 있고 TGF- β 가 골조직에 미치는 영향에 대하여도 매우 다양한 효과들이 보고되어 왔다⁶⁰⁾. 신생 마우스 두개관에서는 골흡수를 촉진한다는 보고가 있는 반면 백서태자 장골에서는 골흡수가 억제되는 등 TGF- β 는 골의 생리학적인 과정에 긴밀하게 작용하는 것은 확실하나 조골세포의 생성과 분화, 간질세포의 합성, 골 형성등에 상반된 효과를 나타내고 있다^{61,62)}. 파골세포의 기능에 중요하게 영향을 미치는 조골세포는 TGF- β 1에 반응할 뿐만 아니라 TGF- β 1을 합성하기도 함으로써 조골세포에 의한 파골세포의 조절에 TGF- β 1이 관련되어 있는 것으로 추측된다^{63,64)}. Takai⁶⁵⁾은 TGF- β 가, 파골세포에 의한 골흡수를 억제함으로써 골조직을 조절하는 osteoprotegerin(OPG)/osteoclastogenesis inhibitory factor(OCIF)의 생성을 촉진함을 밝혀 파골세포의 조절에 관여하는 것을 확인하였다. 또한 TGF- β 는 대식세포의 성숙과 활성화를 억제하며 내피세포에 작용하여 염증으로 형성된 cytokine에 역반응 효과를 나타내어 면역반응을 차단하는 신호로 간주되고 있다²⁰⁾. 따라서 TGF- β 의 수준이 높은 경우 TNF와 IL-1 β 의 수준이 억제되고 골 흡수 작용 등이 억제될 것으로 예상되었으나 본 실험에서는 cytokine의 수준이 낮은 급성 치수염환자에서 가장 높게 나타났고 cytokine의 수준이 가장 높게 나타난 만성치근단병변 환자에서도 치수염과 유사하게 높은 TGF- β 1의 수준이 나타나 상반된 결과를 나타내었으며 골흡수 cytokine과의 상관관계도 보이지 않았다. 이는 *in vitro*가 아닌 *in vivo*에서 골조직 대사에 관여하는 여러가지 국소적, 전신적 성장인자들의 영향과 TGF- β 1의 다양한 생물학적 작용에 의한 것으로 추론해 보며 따라서 TGF- β 1에 대한 지속적인 연구가 요구되고 있다.

치근단질환에서의 혐기성 세균 특히 Black-pigmented Bacteroides의 역할이 중요함은 알려진 바 있다. Brauner 등³⁴⁾은 근단성치수염에서 82.3%의 절대적 혐기성세균이 차지한다고 하였고 그중 *P. intermedia*가 가장 많은 빈도로 검출되었다고 하였다. Baumgartener⁶⁶⁾은 감염근관의 근단 5mm에서 68%의 세균이 절대적 혐기성 세균이었고 *Actinomyces*, *Lactobacillus*, Black-pigmented Bacteroides등이 가장

많이 검출되었다고 하였다. Sundqvist 등²²⁾은 Black-pigmented Bacteroides가 존재할 때 발견되어지는 세균종류가 많았다고 했고 Eugene 등⁶⁷⁾은 치근단 병변의 화농성 삼출액에서 73%의 BPB species가 발견되며 이중 *P. intermedia*, *P. gingivalis*, *P. endodontalis* 순으로 나타난다고 하였다. Griffie 등²³⁾은 급성 염증증세가 있는 치아에서 *Bacteroides melaninogenicus*의 이종들을 확인하고 증상들과의 상관관계를 보고한 바 있다. van Winkelhoff 등^{26,30)}은 치아근관에서 유래된 치근단 농양에서 거의 모두 *P. endodontalis*가 발견되고 *P. intermedia*는 모든 병변에서 가장 많이 검출된다고 하였다. 또한 *P. gingivalis*가 가장 단백질분해능력이 크며 *in vitro*에서 콜레스테롤을 야기하고 IL-1 유리를 자극시킨다고 하였다. Haapasalo 등²⁸⁾은 근단성치주염에서 *P. intermedia*가 가장 많이 나타났고 *P. endodontalis*와 *P. gingivalis*는 급성 감염에서만, *P. intermedia*는 증상이 있거나 없는 경우 모두에서 발견된다고 보고하였다. 또 Yoshida 등²⁴⁾은 급성치근단병변에서 *Peptococcus magnus*와 *Bacteroides speices*가 일반적으로 나타나며 증상이 없는 경우에 *streptococci*와 *enteric bacteria*가 주로 검출되었다고 하였으며 Gomes 등^{29,68)}은 동통과 근관내의 *Prevotella*와 *Peptostreptococcus spp.*의 존재 유무와의 사이에 유의성 있는 상관관계가 있음을 결론내렸다. 최근에는 Shah 등³⁷⁾이 *P. intermedia*로부터 2개의 DNA homology group이 존재함을 발견하여 *P. nigrescens*를 분리해 냈고 Matto 등³⁶⁾은 *P. intermedia*와 *P. nigrescens*는 구강내에 동시에 나타나며 이중 *P. intermedia*는 치주염과 관련되어 있다고 하였고 아이들이나 건강한 치주에서는 나타나지 않았으며, 초기의 치주염 환자에서는 *P. intermedia*보다 월등히 많은 *P. nigrescens*가 발견된다고 하였다. Gharbia 등³⁵⁾은 건강한 치은에서 17개중 16개의 세균이 *P. nigrescens*였으며 감염근관에서는 *P. nigrescens*가 *P. intermedia*보다 거의 세 배 이상 검출되었다고 하였고 Bae 등⁶⁹⁾도 SDS-PAGE를 이용한 단백질 분리법으로 *P. nigrescens*를 구분 할 수 있는 18.6 kDa band를 확인하여 감염근관에서 BPB 중 *P. nigrescens*가 가장 많이 나타난다고 보고하고 있다. 본 실험에서는 *P. nigrescens*가 가장 많이 나타나 Gharbia, Bae 등의 연구와 일치하였지만 *P. gingivalis*도 유사한 빈도로 많이 나타나 기존의 연구보다 높은 발현율을 보였다. 급성치근단병변에서는 균주의 발현빈도율이 만성병변에서보다 증가하였으나 유의성있는 차이는 없어 세 균주의 근관내 존재와 급성증상간에 관련이 있다는 Sundqvist 등⁷⁰⁾의 보고와는 차이가 있었으나 본 실험에서는 각각의 증상과 균주의 유무를 직접 조사하지 않았기에 큰 의미가 없을 것으로 생각되며 다른 다양한 혐기성 세균의 발현을 조사해 보지 않아 균간의 상호작용을 배제한 아쉬움이 있다. 한편 이들 균주의 발현빈도와 cytokine의 수준간에는 특정 균주가 있었을 때의 콜레스테롤 cytokine 수준은 균주가 없었을 때 보다 대체로 높게 나타나 BPB의 골파

괴 관련을 뒷받침하며 특히 *P. nigrescens*가 존재할 때의 IL-1 β 의 국소적수준은 *P. nigrescens*가 없었을 때 보다 유의성 있게 높은 수준을 보여 치근단병변에서의 골파괴에는 *P. gingivalis* 보다 *P. nigrescens*가 더 영향을 미치는 것으로 추측된다. 그러나 치주질환에서의 골파괴에 주요 원인균으로 알려진 *P. gingivalis*의 LPS가 *in vitro*에서 콜레스테롤에 활성적이며 macrophage와 peripheral monocyte에 작용하여 IL-1을 유리시키는 것으로 알려진 것 같이 *P. nigrescens*의 골파괴도와 콜레스테롤 cytokine의 유리 능력을 실험하여 다른 균주와 비교해 볼 필요가 있을 것으로 사료된다. 한편 TGF- β 1은 균주의 유무에 따른 차이가 거의 없게 나타났는데 이는 혐기성 그람 음성균의 내독소 등에 의해 유리되는 콜레스테롤 cytokine(IL-1, TNF)과는 달리 TGF- β 는 다른 기전을 통해 유리됨을 제시하고 있다.

결론적으로 본 연구에서는 치근단질환에서의 콜레스테롤 cytokine의 유리 및 골파괴에 BPB가 작용하고 감염 근관내에서의 *P. nigrescens*가 골파괴에 주요 병인균종 하나일 가능성을 제시하였지만 molecular probe 등의 더 예민한 방법으로 많은 종의 균주를 동시에 조사해 보아 균주간의 상호작용을 확인하고 임상적 증상 차이에 따른 변화등을 알아보는 지속적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

V. 결 론

치근단 질환에서의 골 파괴 물질로 알려진 TNF- α , TNF- β , IL-1 β 및 anti-cytokine 작용이 있는 TGF- β 1의 국소적, 전신적 수준을 알아 보고 감염근관에 주로 발견되어지며 치근단 병변과 골파괴의 병인균으로 알려진 특정 black-pigmented bacteria와의 연관성을 알아 보기 위해 만성치근단병변군과 급성치근단병변군 및 급성치수염군, 정상치수염군으로 구분하여 근관내에서 채득한 삼출액과 정맥에서 얻은 혈액을 모아 각 cytokine에 대한 ELISA를 실시하였으며 간접면역형광법으로 근관내의 *P. endodontalis*와 *P. gingivalis*, *P. nigrescens*의 발현빈도를 조사한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 콜레스테롤을 일으키는 cytokine(TNF- α , TNF- β , IL-1 β)의 국소적 수준은 급성 및 만성 치근단병변군에서 급성치수염군이나 정상치수염군보다 유의성있게 높은 수준을 나타냈다 ($p < 0.05$).
2. 치근단병변군에서의 콜레스테롤 cytokine의 국소적 수준은 정상인에 비해 대체로 높았으나 IL-1 β 에서만 유의성이 있었으며 ($p < 0.05$) 만성치근단병변과 급성치근단병변 사이의 유의성있는 차이는 없었다 ($p > 0.05$).
3. TGF- β 1의 국소적 수준은 급성치수염군, 만성치근단병변군에서 급성치근단병변군과 정상치수염군보다 유의성있게 높았으며 ($p < 0.05$) 콜레스테롤 cytokine (TNF- α , β , IL-1 β)과도

유의성있는 차이가 있었으나(p<0.05) 상관 관계는 보이지 않았다.

4. 골흡수 cytokine중 TNF- β 의 전신적 수준은 국소적 수준 보다 유의성있게 높은 차이를 보였으며(p<0.05) TGF- β 1은 유의성있게 낮은 수준을 나타냈다(p<0.05).
5. 근관내에 *P. nigrescens*가 있었던 병변의 IL-1 β 국소적 수준은 균이 없었을 때 보다 유의성있게 높았으며(p<0.05) 다른 균주들도 세균이 나타났을 때의 골흡수 cytokine 수준이 높거나 비슷했으나 유의성은 없었다(p>0.05).
6. 병변의 크기와 cytokine의 수준, 증상의 급성, 만성간에 유의성있는 상관관계가 없었다(p>0.05).

참고문헌

1. Hausman, E., Weinfeld, N., Miller, W.A. : Effects of ipopolysaccharide on bone resorption in tissue culture. *Calcif. Tissue Res.* 9: 272-282, 1972.
2. Lehner, U. : Bradykinin, a new potential mediator of inflammation-induced bone resorption. *Arthritis Rheum.* 30: 530-539, 1987.
3. Stashenko, P.P., Dewhirst, F.E., Peros, W.J., Kent, R.L. : Role of immune cytokines in the pathogenesis of periapical lesions. *Endod. Dent. Traumatol.* 6: 89-95, 1990.
4. Cohen, J., Reader, A. : A radioimmunoassay determination of the concentrations of PGE2 and F2 in painful and asymptomatic human dental pulps. *J Endodon.* 11:330-335, 1985.
5. Le, J., Vilcek, J. : Tumor Necrosis Factor and Interleukin 1: Cytokines with Multiple overlapping Biological activities. *Laboratory Investigation* 56: 234-248, 1987.
6. Nguyen, L., Dewhirst, F.E., Hauschka, P.V., Stashenko, P. : Interleukin 1 β stimulates bone resorption and inhibits bone formation in vivo. *Lymphokine Cytokine Res.* 10: 15-21, 1990.
7. Dewhirst, F.E., Stashenko, P.P., Mole, J.E., Tsurumachi, T. : Purification and partial sequence of human osteoclast-activating factor: Identity with Interleukin 1. *J Immunology* 135:2562-2568, 1985.
8. Bertolini, D.R., Nedwin, G.E. : Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation in vitro by human TNF. *Nature* 320: 584, 1986.
9. Stashenko, P.P., Dewhirst, F.E., Peros, W.J., Kent, R.L. et al. Synergistic interactions between IL-1, TNF, and lymphotoxin in bone resorption. *J Immunology* 138: 1464-1468, 1987.
10. Stashenko, P.P., Dewhirst, F.E., Rooney, M.L. : Interleukin 1 β is a potent inhibitor of bone formation in vitro. *J. Bone Min. Res.* 2: 559-565, 1987.
11. Stern, M.H., Mackler, B.F., Dreizen, S. : A quantitative method for the analysis of human periapical inflammation. *J. Endodon.* 7: 70-74, 1981.
12. Barkodar, R.A., DeSouza, Y.G. : Human T-lymphocyte subpopulations in human periapical lesions. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* 65: 763-766, 1988.
13. Torabinejad, M., Kettering, J.D. : Identification and relative concentration of B and T lymphocytes in human chronic periapical lesions. *J. Endodon.* 11: 122-125, 1985.
14. Centrella, M., Horowitz, M.C., Wozney, J.M. : Transforming Growth Factor- β gene family members and bone. *Endocrine Reviews* 15: 27-39, 1994.
15. Hattersley G, Chambers T. Effects of Transforming Growth Factor β 1 on the regulation of osteoclastic development and function. *J Bone and Mineral Research* 6: 165-172, 1991.
16. Datta, H.K., Sullivan, M., Rathod, H., MacIntyre, I. : Transforming growth factor- β modulates eicosanoid metabolism in osteogenic osteosarcoma cells. *Biochem. & Biophys. Res. Comm.* 178:940-945, 1991.
17. Canalis, E., McCarthy, T.L., Centrella, M. : Growth factors and cytokines in bone cell metabolism. *Annu. Rev. Med.* 42: 17-24, 1991.
18. Gehron, R.P., Young, M.F., Flander, K.C. : Osteoblasts synthesize and respond to transforming growth factor-type β in vitro. *J. Cell. Biol.* 105: 457-463, 1987.
19. Centrella, M., McCarthy, T.L. : Transforming growth factor β is a bifunctional regulator of replication collagen synthesis in osteoblast-enriched cell cultures from fetal rat bone. *J. Biol. Chem.* 262: 2869-2874, 1987.
20. Abbas A.K., Lichtman A.H., Pober J.S., Cellular and Molecular Immunology 2nd. ed. Saunders 240-260
21. Envall, E. : Enzyme Linked Immunosorbent Assay. *J. Immunology* 109: 129-135, 1972.
22. Sundqvist, G. : Prevalence of black pigmented Bacteroides in root canal infections. *J. Endodon.* 15:13-19, 1989.
23. Griffiee, M.B. : Relationship of Bacteroides melaninogenicus to symptoms associated with pulpal necrosis. *J. Oral Surg.* 50:457-461, 1980.
24. Yoshida, M. : Correlation between clinical symptoms and microorganisms isolated from root canals of teeth with periapical pathosis. *J Endodon.* 13:24-28, 1987.
25. Wang, C.Y., Stashenko, P. : The role of IL-1 in the pathogenesis of periapical bone destruction in a rat model system. *Oral Microbiol Immunol* 8:50-56, 1993.
26. van Winkelhoff, A.J. : The role of black-pigmented Bacteroides in human oral infections. *J Clin Periodontol* 15:145-155, 1988.
27. Fabricus, L. : Predominant indigenous oral bacteria isolated from infected root canals after varied times if closure. *J. Dent. Res.* 90:134-144, 1982.
28. Haapasalo, M. : Black-pigmented Bacteroides spp. in human apical periodontitis. *Infection and Immunity* 53:149-153, 1986.
29. Gomes, B.P.F.A., Drucker, D.B. : Association of endodontic symptoms and signs with particular combinations of specific bacteria. *International Endodontic Journal* 29:69-75, 1996.
30. van Winkelhoff, A.J. et al., : Bacteroides endodontalis and other BPB species in odontogenic abscesses. *Infection and Immunity* 49:494-497, 1985.
31. Aqrabawi, J., Schilder, H. : Biochemical and histochemical analysis of the enzyme arylsulfatase in human lesions of endodontic origin. *J Endodon.* 19:335-338, 1993.
32. Barkhordar, R., Hussain, Z. Detection of interleukin-1 beta in human periapical lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 73:334-336, 1992.
33. Hanazawa, S., Nakada, K. : Fuctional role of IL-1 in periodontal disease : induction of IL-1 production by B. gingivalis lipopolysaccharide in peritoneal macrophage from C3H/HeN and C3H/HeJ mice. *Infection & Immunity* 50:262-270, 1985.
34. Brauner, A.W., Conrads, G. : Studies into the microbial spectrum of apical periodontitis. *International Endodontic Journal* 28:244-248, 1995.
35. Gharbia, S.E., Hapaasalo, M., Shah, H.N. :

- Characterization of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* isolates from periodontic and endodontic infections. *J Periodontol.* 65:56-61, 1994.
36. Matto, J., Saarela, M. : Distribution and genetic analysis of oral *P. intermedia* and *P. nigrescens*. *Oral Microbiol. Immunol.* 11:96-102, 1996.
 37. Shah, H.N., Gharbia, S.E. : Biochemical and chemical studies on strains designated *P. intermedia* and proposal of a new pigmented species, *P. nigrescens* sp. nov. *International Journal of systematic bacteriology* 42:542-546, 1992.
 38. Kettering, J.D., Torabinejad, M. : Specificity of antibodies present in human periapical lesions. *J. Endodon.* 17: 213-216, 1991.
 39. Roberts, J. : Indirect Immunofluorescence microscopy for identification of *Actinomyces* sp. in endodontic disease. *J. Endodon.* 16:318-322, 1990.
 40. 김재희 : 치근단병소가 있는 환자에서의 *Porphyromonas endodontalis* 항원에 대한 혈청 특이 항체의 면역학적 연구. 대한치과보존학회지 19:485-498, 1994.
 41. Sundqvist, G. : Bacteriological studies of necrotic dental pulp. PhD thesis. Umea: Umea university Odontol Dissertation no. 7: 1-94, 1976.
 42. Nilsen, R., Johannessen A.C. : In situ characterization of mononuclear cells in human dental periapical inflammatory lesions using monoclonal antibodies. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 58: 160-165, 1984.
 43. Stern, M.H., Dreizen, S., Mackler, B.F. : Isolation and characterization of inflammatory cells from the human periapical granuloma. *J. Dent. Res.* 61:1408-1412, 1982.
 44. Michie, H.R. : Detection of circulating Tumor Necrosis Factor after endotoxin administration. *N Eng J Med* 318:1481-1486, 1988.
 45. Beutler, B., Cerami, A. : Cachectin and tumor necrosis factor as two sides of the same biological coin. *Nature* 320:584-588, 1986.
 46. Oppenheim, J.J., Kovac, E.J. : There is more than one interleukin 1. *Immunol. Today* 7:46, 1986.
 47. Rossomando, E.F., Gronwicz, T.G. : TNF induced shape changes in dental fibroblasts. *J. Leuk. Biol.* 42:558, 1987.
 48. Meikle, M.C., Alkinson, S.J., Ward, R.V. : Gingival fibroblasts degrade type I collagen films when stimulated with tumor necrosis factor and interleukin-1: evidence that breakdown mediated by metalloproteinases. *J. Periodont. Res.* 24:207, 1989.
 49. Wang, C. : Characterization of bone resorbing activity in human periapical lesions. *J Endodon* 19:107-111, 1993.
 50. Honig, J. : Increased Interleukin-1 beta concentration in gingival tissue from periodontitis patients. *J Periodont Res* 24:362-367, 1989.
 51. Stashenko, P. : Tissue levels of Bone resorptive cytokines in periodontal disease. *J Periodontol* 62:504-509, 1991.
 52. Safavi, K. : Alteration of biological properties of bacterial LPS by calcium hydroxide. *J Endodon* 20:127-129, 1994.
 53. D Souza, R. : Detection and characterization of interleukin in human dental pulps. *Arch Oral Biol* 34:307-313, 1989.
 54. 고희정 : 치수 및 치근단병소에서 interleukin-1 α , interleukin-1 β , tumor necrosis factor- α 의 분포에 관한 연구. 대한치과보존학회지 22:485-498, 1997.
 55. Girardin, E. : Tumor necrosis factor and Interleukin-1 in the serum of children with severe infectious purpura. *N Engl J Med* 319:397-400, 1988.
 56. Sporn, M.B., Roberts, A.B. : Some recent advances in the chemistry and biology of transforming growth factor- β . *J. Cell Biol* 105:1039-1045, 1987.
 57. Hill, D.J., Strain, A.J., Elstow, S.F., Swenne, I. : Bifunctional action of transforming growth factor - β on DNA synthesis in early passage human fetal fibroblasts. *J. Cell Physiol.* 128:322-328, 1986.
 58. Pfeilschfter, J., Mundy, G.R. : Modulation of type β transforming growth factor activity in bone cultures by osteotropic hormones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:2024, 1987.
 59. Pfeilschfter, J., D'Souza, S.M., Mundy, G.R. : Effects of transforming growth factor β on osteoblastic osteosarcoma cells. *Endocrinology* 121:212, 1987.
 60. Seyedin, S.M., Segarini, P.R., Rosen, D.M., Thompson, A.Y. : Cartilage-inducing factor-B is a unique protein structurally and functionally related to transforming growth factor β . *J. Biol. Chem.* 262:1946, 1987.
 61. Tashjian, A.H., Voelkel, E.F., Lazzaro, M. : Alpha and beta human transforming growth factors stimulate prostaglandin production and bone resorption in cultured mouse calvaria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:4535, 1985.
 62. Pfeilschfter, J., Seyedin, S.M., Mundy, G.R. : Transforming growth factor β inhibits bone resorption in fetal rat long bone cultures. *J. Clin. Invest.* 82: 680, 1988.
 63. Chenu, C., Pfeilschfter, J., Mundy, G.R. : Transforming growth factor beta inhibits formation of osteoclast-like cells in longterm human marrow cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5683, 1988.
 64. Oreffo, R.C., Bonewald, L., Kukita, A. : Inhibitory effect of the bone derived growth factors osteoinductive factor and transforming growth factor- β on isolated osteoclasts. *Endocrinology* 126:3069, 1990.
 65. Takai, H., Kanematsu, M., Yano, K., Tsuda, E. : Transforming growth factor-beta stimulates the production of osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor by bone marrow stromal cells. *J. Biol. Chem.* 273(42):27091-27096, 1998.
 66. Baumgartner, J.C., Falkler, W.A. : Bacteria in the apical 5mm of infected root canals. *J. Endodon.* 17:380-383, 1991.
 67. Eugene, A., Pantera, M. : Indirect Immunofluorescence for the detection of *Bacteroides* species in human dental pulp. *J. Endodon.* 14:218-223, 1988.
 68. Gomes B.P.F.A. : Association of specific bacteria with some endodontic signs and symptoms. *International Endodontic Journal* 27:291-298, 1994.
 69. Bae, K.S., Baumgartner, J.C., Shearer, T.R., David, L.L. : Occurrence of *Prevotella nigrescens* and *Prevotella intermedia* in infections of endodontic origin. *J. Endodon.* 23:620-623, 1997.
 70. Sundqvist, G., Johansson, E., Sjogren, U. : Prevalence of black pigmented *Bacteroides* in root canal infections. *J. Endodon.* 15: 13-19, 1989.