*Porphyromonas endodontalis*의 Lipopolysaccharide가 섬유아세포의 세포막 투과성에 미치는 영향

-김재희 · 김민겸 · 윤수한
서울대학교 치과대학 치과보존학교실*

ABSTRACT

EFFECTS OF *Porphyromonas endodontalis* LIPOPOLYSACCHARIDE ON MEMBRANE PERMEABILITY OF FIBROBLAST

Jae-Hee Kim, D.D.S., M.S.D., Min-Kyum Kim, D.D.S., M.S.D., Ph.D.,
Soo-Han, Yoon, D.D.S., M.S.D., Ph.D.
Department of Conservative Dentistry, College of Dentistry, Seoul National University

Porphyromonas endodontalis(P. endodontalis) is one of the important causative bacteria of pulpal and periapical disease. *P. endodontalis* has lipopolysaccharide(LPS) and it plays a major role in stimulating the synthesis and release of cytokines from immune cells and prostaglandin E_2 from host cells.

The purpose of this study is to prepare LPS from *P. endodontalis* and to evaluate the effect of LPS on membrane permeability of fibroblast.

P. endodontalis ATCC 35406 was cultured in anaerobic condition, and LPS was extracted. LPS was confirmed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. Human periodontal ligament cell, colon fibroblast(CCD-18Co, KCLB 21459) and skin fibroblast(Detroit 551, KCLB 10110) were perfused with 0.01% *P. endodontalis* LPS solution, high concentration of K^+ solution and Ca^{2+}-free solution. Ca^{2+} concentration ratio was measured by microfluorometry.

1. Intracellular Ca^{2+} concentration was not changed in human periodontal fibroblast and skin firoblast(Detroit 551) stimulated by *P. endodontalis* LPS.
2. Intracellular Ca^{2+} concentration was increased in colon fibroblast(CCD-18Co) stimulated by *P. endodontalis* LPS.
3. Colon fibroblast(CCD-18Co) has voltage dependent Ca^{2+} channel activated by high concentration of K^+ solution.
4. *P. endodontalis* LPS has no effect on the increase of intracellular Ca^{2+} concentration during perfusion of Ca^{2+}-free solution.

Key Words : *Porphyromonas endodontalis*, Lipopolysaccharide, Fibroblast, Calcium concentration, Microfluorometry

Ⅰ. 서 론

성공적인 근관 치료를 위해서는 치수 및 치근단 질환의 원인 요소를 밝히고 이를 제거하는 것이 필수적이다. 그러므로 치수 및 치근단 질환의 주요 원인인 미생물에 대한 연구가 지속적으로 이루어지고 있다[1-4]. 특히 혐기성 세균은 배양 기술이 향상되어 세균의 분리 동정이 가능해짐에 따라 감염 근관 내에서의 발현 빈도가 높아지고 있으며[5,6], 최근에는 간접 면역 형광법, DNA 프루브법, 중합효소연쇄반응법 등을 이용하여 더 높은 빈도로 검출되고 있다.

감염 근관에서 발견되는 세균중 *P. endodontalis*는 특히 대기중의 산소에 민감하고 배양 기간이 길며 신선한 배지에서만 자라는 특성 때문에 다른 혐기성 세균보다 늦게 발견되었으며[7-11] 타진 반응이나 악취 등의 임상 증상과 연관되어 나타나고 급성의 치근단 질환에서 주로 발견되었다[12].

*P. endodontalis*는 그람 음성의 절대 혐기성 간균으로 혈액 한천 배지상에 black-pigmented colony를 형성한다. *P. endodontalis*는 성장물질로 다른 세균에서 생성된 hemin, menadione(vit K) 등을 필요로 하므로 다른 세균과 혼합되어 있을때 독성이 나타나며[13,14], 섬모를 지녀 다른 세균이나 치아에 부착하고 보합체와 면역 글로블린을 파괴하고 cytotoxin을 만들어 독성을 나타낸다[8,13,14]. *P. endodontalis*는 혈청학적으로 capsule의 존재 유무에 따라 3가지 serotype(O1K1, O1K2, O1K$^-$)이 존재하고[15] 세포막에는 3개의 major protein(59 kDa, 43 kDa, 41 kDa)과 다수의 minor protein이 존재하며 minor protein은 strain과 성장 환경에 따라 다르게 나타난다[16].

*P. endodontalis*와 같은 그람 음성 세균은 endotoxin으로서 세포외벽에 lipopolysaccharide(LPS)를 지니며 이것은 세균 성장중에 세포벽에서 떨어져 나오거나 세균이 파괴된 후에도 근관내에 남아 치근단 조직에 영향을 준다[17]. Monocyte 등의 면역세포들은 LPS에 민감하게 반응하므로 소량의 LPS가 근관내 남아 있어도 숙주에 큰 영향을 준다[18]. *P. endodontalis*의 LPS는 항원으로 작용하여 면역 반응을 일으키며[19] 다른 세균의 LPS보다 독성이 강하고 치주인대 세포의 interleukin-6(IL-6) 분비를 자극하여 골흡수와 염증의 진행에 관여하는 것으로 알려져 있다[20,21,22]. 또한 *P. endodontalis*의 LPS는 치수 세포의 단백질이나 DNA합성을 억제하고[23] IL-6와 interleukin-1β(IL-1β)의 생성을 촉진시킨다[24,25].

이상의 보고로 볼 때 LPS는 치주인대 세포와 치수세포 등으로부터 성장인자와 단백질 분해효소의 유리 촉진 등을 통해 조직에 영향을 줄 수 있다. 그러나 이러한 LPS가 세포막에 작용하는 기전이나 세포의 기능조절에 중요한 역할을 하는 칼슘이온에 미치는 영향에 대한 연구는 희귀한 실정이다.

세균의 독성물질이나 세균에서 분리한 물질이 세포막에서 독성물질로 작용하는 경우가 많이 있으며, 이러한 물질중 어떤 것은 세포막의 이온채널에 작용하여 세포내 이온농도를 변화시켜 세포기능을 조절하는 데 영향을 줄 수 있다[26,27]. 세균독소가 세포막에 작용하여 세포막의 이온투과성, 특히 세포내 신호전달체계에서 중요한 역할을 하는 칼슘이온채널에 영향을 준다면 이것은 세균독소의 작용기전을 설명하는데 유용할 것이라 사료된다.

이에 저자는 *P. endodontalis*의 LPS가 섬유아세포에 작용하는 기전을 규명하고자 *P. endodontalis*의 LPS를 추출하고, LPS가 수종의 배양 섬유아세포주의 칼슘채널에 미치는 영향을 연구하여 그 결과를 보고하는 바이다.

Ⅱ. 실험재료 및 방법

1. *P. endodontalis* 의 배양

실험에 사용한 *P. endodontalis*는 ATCC 35406 세균주로 무균작업대에서 냉동건조된 *P. endodontalis*의 이중 용기 표면을 가열하고 증류수로 냉각시켜 외부 용기를 파괴한 후 이를 혐기성 배양기로 옮겼다. 내부 용기 속에 든 냉동건조된 *P. endodontalis*를 1ml의 modified chopped meat medium (MCMM)의 액체성분에 잘 현탁한 후, 현탁된 균액 전체를 MCMM 시험관에 옮겨 접종하고 37℃에서 혐기성 조건으로 배양액이 세균 성장으로 혼탁해 질 때까지 4 - 6일간 배양하였다. MCMM에서 배양한 세균 배양액을 500ml의 modified brain heart infusion(BHI) 액체 배지 및 혈액 한천 배지에 접종하고 계속해서 37℃에서 혐기성 조건으로 5 - 7일간 배양하였다. 혈액 한천 배지에서 나타나는 세균 집락의 성장속도와 형태로서 순수배양을 확인한 후 modified BHI 액체배지에서 배양한 세균으로부터 세균 LPS를 추출하였다.

1) Modified chopped meat medium 제조법

Ground beef(fat free) 200g에 증류수 400ml와 1 N NaOH 10 ml를 가하고 잘 저어서 끓을 때까지 가열하였다. 이를 냉각한 후 표면에 굳은 지방층을 제거하고 고형성분과 고기즙을 분리하였다. 고기즙은 증류수를 보충하여 다시 400ml가 되게 한 다음, tryptone 12g, yeast extract 2g, K2PO4 2g, 0.1% resazurin 1.6ml를 첨가하고 15분간 가압멸균기에서 멸균하였다. 멸균 후 혐기성 배양기로 옮기고 0.05% hemin 용액 4ml, 0.5% vitamin K 용액 0.08ml, L-cystein HCl 0.2g을 가하여 MCMM의 액체배지 성분을 완성하였다. 고형성분을 따로 시험관에 옮겨 약 2ml씩 분주하고 15분간 가압멸균기에서 멸균한 후 혐기성 배양기로 옮기고, 완성된 액체배지를 7ml씩 가하여 MCMM을 완성하였다.

2) Modified BHI medium과 혈액 한천 배지 제조법

Modified BHI medium은 증류수 400ml에 BHI 14.8g, yeast extract 2 g, 0.1% resazurin용액 1.6ml, L-cystein HCl 0.2g, 0.5% vitamin K 용액 0.08ml, 0.05% hemin 용액 4ml를 첨가하여 20분간 가압멸균기로 멸균하여 제조하였고, 혈액 한천 배지는 BHI medium 500ml에 토끼 혈액을 5%로 첨가하여 만들었다.

2. *P. endodontalis* 로 부터 LPS 추출

배양한 세균을 수집하고 냉동건조한 후 증류수와 혼합하여 충분히 교반하고 5분 간격으로 진탕하면서 100℃ 수조에 15

분간 방치하였다. 12,000 × g에서 5분간 원심분리하고 상층액을 취하여 proteinase K를 50 μl당 1mg으로 첨가하고 60 ℃에서 1시간 배양하였다. 끓는 물에 5분간 방치한 다음 12,000 × g에 5분간 원심분리하여 상층액을 얻었다 상층액을 투석한 다음 다시 원심분리하여 침전물을 제거하고 상층액을 냉동건조하여 세균의 LPS를 얻었다.

3. *P. endodontalis* LPS의 검정

1) sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)법

12% polyacrylamide의 vertical slab gel을 이용하여 SDS-PAGE법을 시행하였다. *P. endodontalis* LPS를 4% SDS, 5% 2-mercaptoethanol, 40% glycerol이 들어있는 20 mM Tris hydrochloride 완충용액(pH 6.8)에 넣고 4% stacking gel과 12% separating gel 상에 150 V, 25 mA 하전하에 2시간 동안 분획하였다.

2) Silver stain

전기영동된 gel은 즉시 20% ethanol과 10% acetic acid 정착용액에 넣어서 정착용액을 20분 간격으로 세 번 교환하였다. 증류수로 10분간격으로 세 번 세척하고 silver equilibration용액에 넣고 30분간 가볍게 흔들어 반응시킨 후 증류수로 10 - 20초간 세척하였다. Developer용액(sodium carbonate, 증류수, formaldehyde)을 gel에 붓고 진한 band가 나타날 때까지 주의해서 관찰하였다. Developer용액을 버리고 즉시 stop용액(1% acetic acid)을 붓고 5분간 놓아둔 후, 300ml 증류수로 10분 간격으로 3번 세척하였다. 그 후 gel을 reducer용액(potassium ferricyanide 2.0ml, sodium thiosulfate 4.0ml, sodium carbonate 0.7ml, 증류수 300 ml)에 10 - 30초간 놓아둔 후 reducer용액을 제거하고 증류수로 10분 간격으로 3회 세척하였다.

4. 세포의 준비와 배양

실험에는 사람 치주인대에서 분리하여 배양한 섬유아세포와 한국세포주은행으로부터 구입한 대장 섬유아세포주 CCD-18Co(KCLB 21459) 및 피부 섬유아세포주 Detroit 551(KCLB 10110)을 사용하였다. 동결세포앰플은 37 - 40 ℃의 수조에 넣어 40 - 60초 동안 신속하게 녹인 후 상온의 70% 알코올속에 넣어 소독하였으며, 바로 무균작업대로 옮긴후 그 속에서 개봉하였다. 기존의 dimethylsulfoxide(DMSO)를 제거하기 위하여 15ml 튜브에 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM, Gibco BRL, USA)을 10ml 정도 넣은 다음 앰플속의 세포부유액 1ml를 옮겨 1000 rpm에서 3분간 원심분리하였다. 상층액을 제거한 후, 약 5ml의 배지에 cell pellet을 부유시켜 배양용 플라스크(T25cm^2)에 세포부유액을 옮겨 5% CO2와 95%의 O2가 공급되는 37 ℃의 배양기에서 배양하였으며 배지는 1주일에 두 번 정도 교체하였다. 실험 당일에는 1ml trypsin-EDTA(Gibco BRL, U.S.A.) 효소처리로 단일세포화하여 실험에 사용하였다.

5. 세포내 칼슘 농도의 측정

1) 관류액

정상 관류액과 고농도의 칼륨액, 0.01% LPS를 첨가한 용액, 칼슘이 없는 관류액, CdCl2를 첨가한 용액을 사용하였다. 정상 관류액의 성분은 NaCl 120 mM, KCl 5 mM, MgSO4 1 mM, NaH2PO4 0.96 mM, Hepes 20 mM, CaCl2 1 mM 이었으며, 이 용액에 glucose 0.2%, BSA 0.1%를 첨가하였고 pH는 7.4로 조절하였다. 고농도의 K^+ 용액으로 세포내 칼슘농도 변화를 유발할 경우 75 mM K^+ 용액을 사용하였다. 칼슘이 없는 관류액을 만들 경우 Ca^{2+}을 제외한 용액에 EGTA 1 mM를 첨가하여 사용하였다. 대조용액으로 관류하면서 관류용액에 0.01% 농도로 *P. endodontalis*에서 추출한 LPS를 첨가하여 실험용액으로 하였다. 그리고 칼슘통로 차단물질인 CdCl2를 100 μM로 첨가하여 사용하였다.

2) Microfluorometry

*P. endodontalis*에서 추출한 LPS가 세포막의 칼슘 투과성에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 세포내 칼슘농도를 microfluorometry로 측정하였다.

섬유아세포를 기록용기의 밑면에 부착시키고 관류장치(AIA scientific instrument)를 이용하여 분당 약 2ml 속도로 Krebs-Ringer-Hepes 완충용액을 관류시켰다. Acetoxymethyl-ester 형태의 fura-2/AM(Sigma, U.S.A.)을 fluorescent Ca^{2+} indicator로 사용하였고, 분리된 단일 세포들은 2 μM fura-2/AM으로 실온에서 30분간 loading시켰다. 기록 시작전에 관류시 세포가 떠내려 가는 것을 막기 위하여 coverslip의 표면은 미리 cell tak(Collaborative Biomedical Products)으로 처리하였다. 세포가 coverslip의 표면에 부착된 후 400배의 oil immersion objective lense(ZEISS, Germany)하에서 fluorescence를 감지하였다. 광원은 75 W xenon arc lamp를 이용하였으며 dual spectrophotometer(Photon Technology International; PTI, U.S.A.) system을 이용하였다. Excitation wavelengths (340과 380 nm)는 spinning chopper (60 Hz)로 조절되었고, emitted light는 510 nm에서 수집되어 photomultiplier로 들어가게 하였다. Data의 저장 및 분석은 Felix software(PTI, U.S.A.)를 이용하였다. 세포내 칼슘농도의 변화를 화상분석기로 분석하기 위해 CCD camera로 컴퓨터에 선택된 세포의 화상을 기록하고 ImageMaster(PTI, U.S.A.) 프로그램으로 분석하였다.

Ⅲ. 실험결과

1. *P. endodontalis* LPS의 검정(SDS-PAGE)

P. endodontalis LPS를 SDS-PAGE로 분획하고 silver stain 한 결과, 31kDa 부위에 다수의 band가 나타났다(Fig. 1).

2. 세포내 칼슘농도의 측정

사람 치주인대에서 배양한 섬유아세포와 피부에서 분리한 섬유아세포(Detroit 551)에 0.01% 농도의 LPS가 첨가된 관류액으로 관류할 경우 세포내 칼슘농도는 변화하지 않았다. 그러나 대장에서 분리한 섬유아세포(CCD-18Co)는 LPS에 반응하여 세포내 칼슘농도를 증가시켰다.

Fig. 2는 CCD-18Co 세포내 칼슘 농도비(340/380nm)가 LPS에 반응하여 증가한 것을 보여 주는 그림이다. 안정 상태에서 칼슘 농도비는 0.75 내지 1사이의 값을 보이며 0.01%의 LPS는 섬유아세포내 칼슘 농도비를 최대 2.2까지 증가시켰다. LPS가 첨가된 관류용액을 1분간 흘렸을 경우(그림의 검은선) 세포내 칼슘 농도비의 반응은 약 40내지 50초가 경과한 뒤부터 나타나서 곧바로 자극전 수준으로 회복되었다. 세포내 칼슘 농도비의 증가는 두번째 LPS 자극에서도 관찰되지만 이 경우 증가된 칼슘 농도비의 크기는 첫번째 자극시 보다 현저히 줄어든 것을 볼 수 있다. 세번째 LPS 자극에서는 반응이 나타나지 않았다.

Fig. 3은 LPS에 대한 세포내 칼슘 농도비의 증가가 막전압 의존성 칼슘 통로에 의한 것인지를 확인한 것으로, 첫번째 0.01%의 LPS로 자극했을 때 세포내 칼슘 농도비는 안정 상태 0.9에서 1.5까지 뚜렷이 증가되었다. 두번째 자극은 관류액중 50 mM의 NaCl을 동량의 KCl로 대치시켜 막전압을 저분극시킨 경우이다. 반응시간이 조금 빠르기는 하지만 LPS로 자극했을때와 매우 유사한 반응이 나타났다. 세포내 칼슘 농도비가 안정상태로 회복된 후 다시 0.01%의 LPS로 자극했을 때 Fig. 2와는 달리 첫번째 자극과 별 차이가 없는 뚜렷한 반응이 관찰되었다.

Fig. 4는 세포내의 칼슘 농도 변화를 화상분석장치로 분석한 결과로 LPS에 의한 세포내 칼슘농도 변화는 중심에서 균일하게 동서에 증가하였으며, LPS 적용후 3분정도 경과시 원상회복됨을 알 수 있었다.

Fig. 5는 칼슘 이온이 없는 용액으로 관류시키며 0.01% LPS로 자극시킨 결과로 세포내 칼슘 농도비의 증가가 나타나지 않

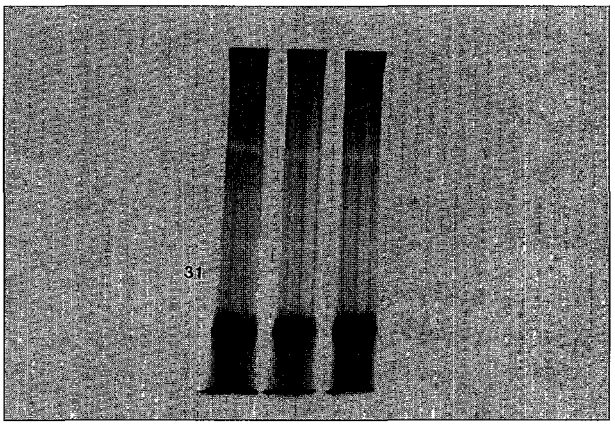


Fig. 1 Silver-stained SDS-PAGE of *P. endodontalis* LPS

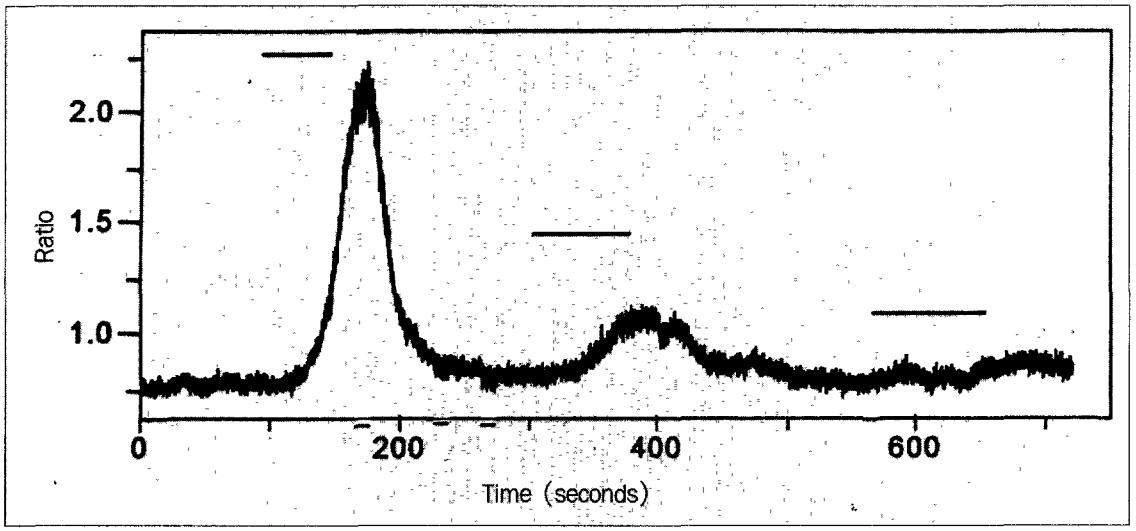


Fig. 2. Increase of intracellular Ca^{2+} concentration ratio in CCD-18Co cell by 0.01% LPS extracted from *P. endodontalis*(the first peak). The response of Ca^{2+} increase by the second stimulation with LPS was not clear(the second peak) and there was no response to the third stimulation with LPS. The period of LPS application was indicated by dark bar.

았다. 세번째 자극은 다시 정상 관류액으로 관류시키며 LPS로 자극한 것으로 첫번째 자극보다는 작지만 칼슘 농도비의 증가가 나타났다

Fig 6-A와 B는 관류액에 칼슘통로 차단물질인 CdCl2를 첨가한 결과로 LPS에 의한 세포내 칼슘 농도의 증가는 현저히 차단되거나 완전 억제되는 것을 관찰할 수 있었다.

Ⅳ. 총괄 및 고안

치수 및 치근단 질환의 주요 원인인 미생물에 관한 연구는 지속적으로 이루어지고 있으며 혐기성 배양 기술이 발전함에 따라 혐기성 세균의 중요성이 증대되고 있다. 특히 *P. endodontalis*는 배양에 어려움이 많아 다른 혐기성 세균보다 늦게 발견되었으며 발현 빈도도 연구에 따라 많은 차이를 보였다 1984년 van Steenbergen 등[28]이 처음으로 감염 근관에서 발견한 이후 Winkelhoff 등[29]은 *P. endodontalis*가 감염 근관이 원인인 치근단 농양에서 특이하게 발견된다고 보고하였다.

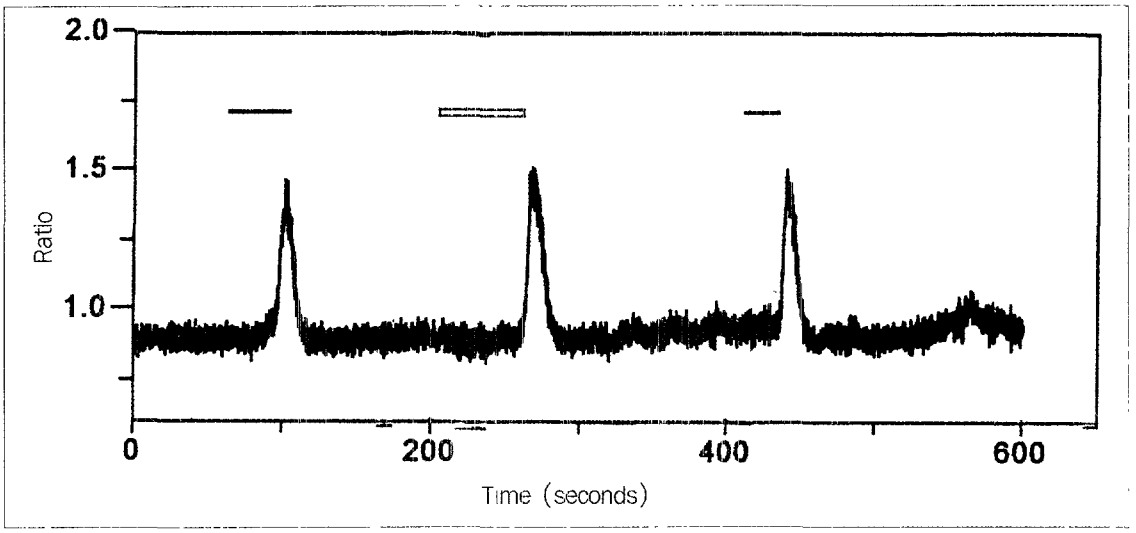
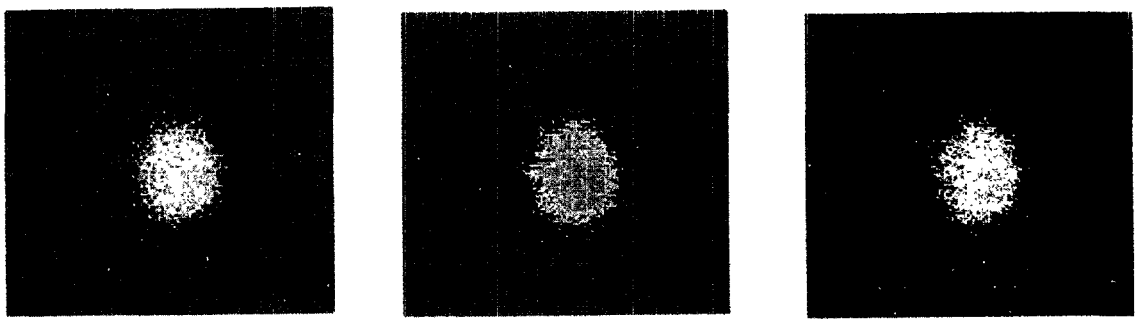


Fig. 3. Reproducible intracellular Ca^{2+} response in CCD-18 Co cell to 0.01% LPS and to membrane depolarization. Intracellular Ca^{2+} concentration ratio was also increased by exposure to high K^+ solution(the second peak). Contrary to fig. 2, the intracellular Ca^{2+} concentration ratio was also clearly increased by second stimulation with 0.01% LPS(the third peak). The period of exposure to high K^+ solution was indicated by white bar.



Before application of LPS

Application of LPS for 40 seconds

3minutes after application of LPS

Fig. 4. Image analysis of change of intracellular calcium concentration induced by LPS.

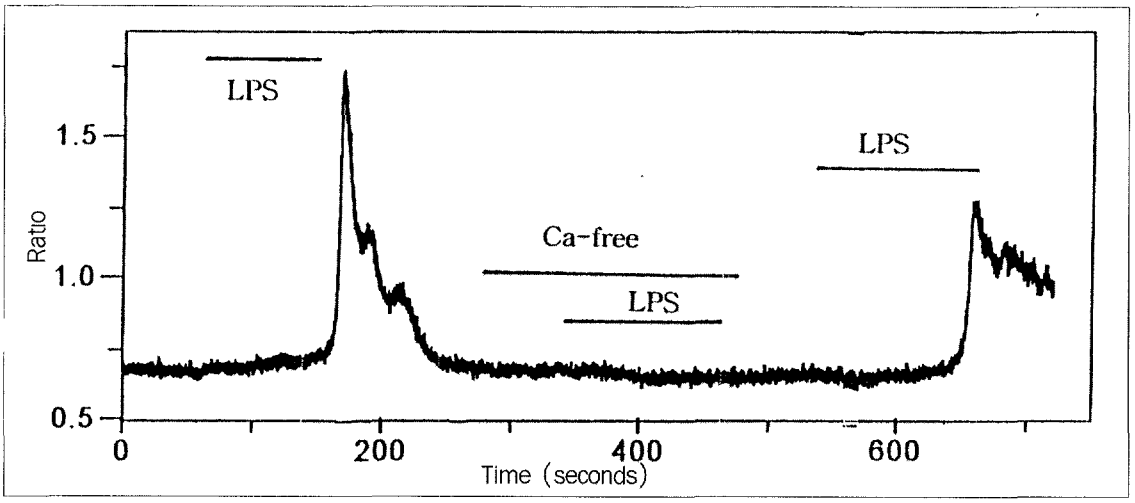


Fig. 5. Effect of external calcium on the response to LPS. LPS has no effect on the increase of intracellular calcium concentration during perfusion of Ca^{2+}-free solution. The response to LPS was reversible in normal perfusion solution. The period of LPS application and perfusion of Ca^{2+}-free solution was indicated by dark bar.

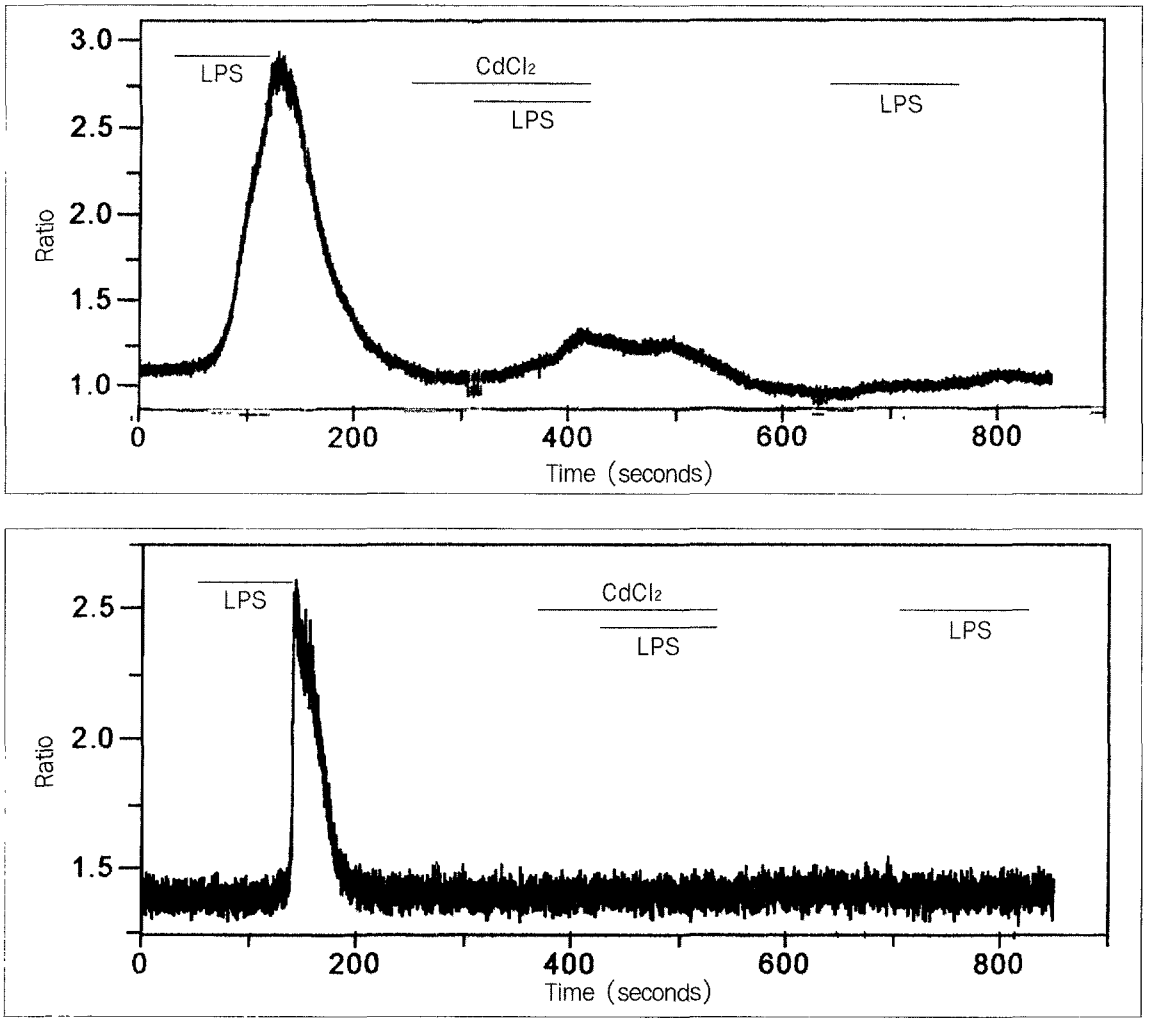


Fig. 6. Effect of $CdCl_2$ on the response to LPS. Cadmium inhibits the Ca^{2+} influx.

Haapasalo 등[5]은 *P. endodontalis*와 *P. gingivalis*는 급성염증에서만 발견된다고 하였으며 32개 치아중 2개에서만 *P. endodontalis*를 검출할 수 있다고 하였다. Hashioka 등[12]은 *Porphyromonas*와 *Bacteroides*는 타진 반응이나, 동통, 악취 등의 임상 증상과 연관되어 발견되며 *P. endodontalis*가 차지하는 비율은 4 58%라고 하였다. 그러나 배양법만으로는 *P. endodontalis*를 검출하기 어려우므로 배양법보다 쉽고 정확하게 *P. endodontalis*를 검출하려는 노력이 이루어져 Pantera 등[13]은 간접면역형광법과 배양법으로 *P. endodontalis*를 검출하는 방법을 비교 연구하여 배양법으로는 1%에서만 발견되었으나 간접면역형광법으로는 16%에서 검출할 수 있었다고 하였다. 또한 최근에는 DNA 프루브법이나 중합효소연쇄반응법 등을 이용하여 *P. endodontalis*의 검출 빈도가 높아지고 있다.

*P. endodontalis*에는 3가지 혈청형이 존재하며, 이것은 열에 안정한 capsule의 유무에 의한 분류로 capsule이 있는 O1K1, O1K2와 capsule이 없는 O1K이다[14]. 혈청형에 따라 다른 독성을 지니리라 생각되지만 아직 확실히 알려지지는 않았으며 주로 표준 균주인 ATCC 35406에 대한 연구가 이루어지고 있다.

Herweijer 등[10]은 *P. endodontalis*의 세포막 단백질을 연구하여 3개의 major protein(59, 43, 41 kDa)과 다수의 minor protein이 존재하며 major protein은 3가지 혈청형에서 공통으로 나타나나 minor protein은 strain과 성장 환경에 따라 다르게 나타난다고 하였다. 저자[15]도 SDS-PAGE를 이용하여 *P. endodontalis*의 세포막 단백질을 *P. gingivalis*와 비교 연구하여 이와 유사한 결과를 얻었으며, *P. endodontalis*에 대한 항체를 얻고 immunoblotting법으로 연구한 결과 *P. endodontalis*의 면역 반응에는 각기 다른 antigenic determinant가 작용한다고 보고한 바 있다.

Ogawa 등[16]은 *P. endodontalis*의 세포막 단백질을 크로마토그래피와 SDS-PAGE로 연구하여 OMP(outer membrane protein)-I과 OMP-II가 존재한다고 보고하였다. OMP-I는 31 kDa의 major protein과 40.3 51.4, 67, 71.6 kDa의 minor protein으로 구성되고 OMP-II는 14, 15.5, 27, 44 kDa의 단백질로 구성되며 OMP-I은 porin의 활성도를 지녀 친수성 물질의 이동을 조절하는 역할을 한다고 하였다. OMP-II에 대한 IgG 분비 세포는 존재하지만 OMP-I이나 LPS에 대한 항체를 형성하는 세포는 존재하지 않는다고 보고하였다.

*P. endodontalis*와 같은 그람 음성 세균의 독성은 주로 세포벽에 존재하는 LPS에 의해 나타나며 이것은 세균의 종류에 따라 생물학적 활성도에 차이를 보인다[17]. LPS는 O-specific polysaccharide, common core, lipid A의 3 부분으로 이루어져 있다[18]. 대부분의 세균에서 LPS의 독성은 lipid A에 의해 나타나며[19] 따라서 lipid A의 구조가 변화되면 발열성 대식세포 활성화, 그리고 보체 활성화 등의 독성이 사라진다는 연구도 있다[20,21]. 일반적으로 고농도의 LPS는 섬유아세포와 세포외기질을 파괴하여 조직의 괴사를 일으키며[22] 면역 세포로부터 IL-1과 tumor necrosis factor-α (TNF-α) 같은 cytokine을 분비시키고 숙주 세포로부터 prostaglandin E2 (PGE2)도 분비시킨다[18,23].

*P. endodontalis*의 LPS에 관한 연구는 비교적 최근에 이루어지기 시작하여 Hanazawa 등[9]은 *P. endodontalis*의 LPS를 추출하고 여기에 대한 단일 항체를 얻어 immunoblotting법으로 연구한 결과, LPS가 *P. endodontalis*의 항원으로 작용한다고 보고하였으며 LPS에 대한 항체를 이용한 immunoslot blot 방법으로 *P. endodontalis*를 검출할 수 있다고 보고하였다.

Ogura 등[2]은 감염 근관과 치근 낭종에서 검출한 *P. endodontalis*의 LPS는 다른 세균의 LPS보다 독성이 강하며 치주 인대 세포의 IL-6 분비를 자극하므로 치수 질환시 나타나는 골흡수와 염증의 진행에 관여할 것이라 보고하였다.

Nakane 등[13]은 *P. endodontalis* LPS 농도에 따른 치수 세포의 변화를 DNA 함량, 단백질 함량, alkaline phosphatase 활성도로 측정한 결과, 1 μg/ml에서는 DNA나 단백질 생성에 영향이 없으며 DNA합성은 10 μg/ml에서 오히려 증가했다가 100 μg/ml에서는 억제되었고, 단백질 합성은 10 μg/ml나 100 μg/ml 모두에서 감소하였으며 alkaline phosphatase activity는 모든 농도에서 영향이 없었다고 보고하였다.

Hosoya 등[24]은 1996년과 1997년의 연구에서 *P. endodontalis* LPS는 치수세포의 IL-6 생성을 촉진시키며 이것은 IL-1β와 무관하게 일어나고 IL-1β는 시간과 양에 비례하여 증가가 일어난다고 하였다.

이와 같이 *P. endodontalis*의 LPS는 치수세포의 DNA나 단백질 생성을 촉진하고 치주인대 세포에서 interleukin을 생성시키고 염증의 진행과 조직파괴와 밀접한 관계가 있는 PGE2 및 TNF-α[9], collagenase[10] 등의 생성을 자극하여 치주 조직의 파괴를 일으키는 것을 알 수 있다. 그러나 LPS가 직접 섬유아세포에 작용하는 기전에 대한 연구는 거의 이루어지지 않았다. 세균의 독성 물질이나 세균에서 분리한 물질이 세포막에 독성 물질로 작용하는 경우가 많으며, 이러한 물질중 어떤 것은 세포막의 이온채널에 작용하여 세포내 이온농도를 변화시켜 세포기능을 조절하는 데 영향을 줄 수 있다. 세균으로부터 추출된 물질들이 인공지질막에서 이온채널 역할을 한다는 보고가 있고[25], 세균독소와 칼슘이온이 밀접한 관계를 가진다는 보고[26]와 *P. endodontalis*와 같은 세균의 막단백질은 인공지질막에 결합되어 친수성의 확산소공을 형성함으로써 porin의 활성도를 나타낸다는 보고[27]로 볼 때, 세균독소가 세포막에 작용하여 세포막의 이온투과성 특히 세포내 신호전달체계에서 중요한 역할을 하는 칼슘이온채널에 대해 영향을 준다면 이것은 세균독소의 작용기전을 설명하는데 유용할 것으로 생각된다.

본 연구에서는 *P. endodontalis*의 LPS를 추출하기 위한 방법으로 1993년 Eidhin과 Mouton[11]이 소개한 새로운 방법을 사용하였다. 이 방법은 종전에 Hanazawa 등[9]이나 Nakane 등

[23]이 사용한 Westphal과 Jann[42]의 phenol-water법의 단점을 보완한 것이다. 종전 방법으로 LPS를 추출한 경우에는 LPS-specific monoclonal antibody에 대한 sensitivity가 낮은 경우가 종종 있었다. 이번에 사용한 방법은 proteinase K로 처리한 다음 100℃ 물로 끓임으로써 SDS나 proteinase K가 남아 있지 않아 높은 항원성을 유지하게 하는 장점이 있다.

추출한 LPS를 검정하기 위하여 SDS-PAGE로 분획하고 silver stain을 시행한 결과, 31 kDa 부위에 다수의 band가 나타났다. 이것은 Hanazawa 등[19]이 *P. endodontalis*의 LPS가 전형적인 반복성의 'ladder' 형태를 보인다는 보고와 유사하며 Eidhin과 Mouton[41]이 LPS를 검정하기 위해 SDS-PAGE와 silver stain을 시행한 결과와도 유사하다.

본 연구에 사용한 LPS의 양은 100 ㎍/ml로 하였으며 이것은 조직에서 발견되는 LPS의 농도가 1 - 100 ㎍/ml정도라는 Schein과 Schilder[43], Dahlen과 Bergenholtz[44], 및 Horiba[45]등의 보고와, Nakane 등[23]이 100 ㎍/ml의 LPS가 DNA합성과 단백질 합성을 감소시킨다고 보고한 것을 근거로 한 것이다.

실험에 사용한 3가지 세포주중 CCD-18Co는 LPS에 반응하여 칼슘 농도의 변화가 나타났으나 치주인대 섬유아세포와 Detroit 551은 변화가 나타나지 않았으며 이것은 Pinero 등[36]이 지적한 것처럼 LPS에 대한 세포의 예민성, 세포의 유래와 종류의 차이가 중요한 요인이라 생각되나 좀 더 많은 연구를 통해 규명되어져야 할 것이라 사료된다.

세포내 칼슘 농도가 증가되는 것은 칼슘채널에 의해 외부의 칼슘이 세포내로 유입되는 경우와 세포내의 칼슘 저장고에서 칼슘이 유리되어 농도가 증가하는 경우가 있다 Fig. 3에서 CCD-18Co 세포주는 고농도의 칼륨용액으로 세포막을 저분극시킨 경우에도 칼슘 농도가 증가했으므로 막전위 의존성 칼슘채널이 존재한다는 것을 알 수 있으며 Fig. 5에서 칼슘이 없는 용액으로 관류시키며 LPS로 자극한 경우 세포내 칼슘 농도에 변화가 없었으므로 외부의 칼슘이 세포내로 유입되어 세포내 칼슘 농도가 증가한 것으로 추정되며, 칼슘통로 차단제인 cadmium에 의해 LPS의 세포내 칼슘 농도 증가 효과가 억제됨을 볼 수 있었다(Fig. 6). 이상의 결과와 LPS가 작용하여 효과가 나타나기까지의 시간을 고려하면 세포내 칼슘 농도 증가는 LPS가 세포막에 함입되어 작용한다기 보다는 직접 칼슘채널에 작용하여 나타난 것으로 사료된다.

LPS가 세포에 작용하는 기전은 아직 확실히 알려지지 않았으나 최근 LPS binding protein(LBP)과 LPS가 결합하는 세포막 수용체인 CD14이 발견되어 많은 연구가 이루어지고 있다. LBP는 60 kDa의 혈청 glycoprotein이며 LPS의 lipid A 부위에 부착한다. LBP는 두 부분으로 이루어져 하나는 LPS가 결합하는 부분이고 나머지 하나는 LPS-CD14 결합을 유도하는 부분이다. CD14은 LPS나 LPS-LBP 복합체가 세포에 부착하는 수용체 역할을 하며 myeloid cell에서는 glycosylphosphatidylinositol(GPI)-anchored membrane protein(mCD14)이 작용하고 unmyeloid cell에서는 GPI-anchor 없이 수용성인 혈청 단백질(sCD14) 상태로 작용하는 것으로 알려져 있다[46]. 최근에는 LPS가 세포 표면에 부착하는 것 뿐 아니라 세포 내부로 신호를 보내는 Toll-like receptor 2(TLR2)가 발견되었으며 TLR2에 LPS가 결합할 때도 LBP와 CD14-LPS가 작용하는 것으로 알려져 있다[47]. 그러나 이번 연구에서는 0.01% LPS로 관류시킨 섬유아세포에서 세포내 칼슘 농도의 증가가 나타났으므로 LBP 없이 반응이 나타난 것으로 생각되나 이 점에 대해서는 좀 더 많은 연구가 이루어져야 할 것이다.

Ⅴ. 결 론

치수 및 치근단 질환에서 다수로 발견되는 *P. endodontalis*의 lipopolysaccharide(LPS)가 섬유아세포에 작용하는 기전을 규명하고자 혐기성 조건에서 *P. endodontalis* ATCC 35406을 배양하여 LPS를 추출하였으며, 추출된 0.01% LPS를 사람 치주인대 섬유아세포와 피부에서 분리한 Detroit 551 섬유아세포, 대장에서 분리한 CCD-18Co 섬유아세포에 관류시키고 세포내 칼슘 농도 변화를 microfluorometry로 분석하여 다음의 결론을 얻었다.

1. 치주인대 섬유아세포와 피부에서 분리한 섬유아세포(Detroit 551)는 *P. endodontalis* LPS가 첨가된 관류액으로 관류시 세포내 칼슘 농도의 변화가 없었다.
2. 대장에서 분리한 섬유아세포(CCD-18Co)는 LPS가 첨가된 관류액으로 관류시 세포내 칼슘 농도를 증가시켰다.
3. 대장에서 분리한 섬유아세포(CCD-18Co)에는 고농도 칼륨에 의해 활성화되는 막전위 의존성 칼슘채널이 존재한다.
4. 대장에서 분리한 섬유아세포(CCD-18Co)는 칼슘이 없는 관류액으로 관류시키며 LPS로 자극한 경우 세포내 칼슘 농도의 변화가 없었다.

참 고 문 헌

1 Kakehashi, S., Stanley, H R , Fitzgerald, R J The effects of surgical exposure of dental pulp in germ-free and conventional laboratory lab Oral Surg. 20:340-349, 1965.

2. Zavistoski, J , Dzink, J., Onderdonk, A , Bartlett, J : Quantitative bacteriology of endodontic infection. Oral Surg. 49 171-174, 1980.

3 Griffee, M.B., Patterson, S S , Miller, C H., Kafrawy, A H., Newton, C.W. · The relationship of *Bacteroides melaninogenicus* to symptoms associated with pulpal necrosis Oral Surg 50 457-461, 1980

4. Fukushima, H , Yamamoto, K., Hirohata, K , Sagawa, H , Leung, K-P, Walker, C.B. Localization and identification of root canal bacteria in clinically asymptomatic periapical pathosis J. Endodon 16 534-538, 1990

5 Attebery, H R , Kimura, J.T., Carroll, G.W An acute anaerobic infection following endodontic treament J Endodon 6 793-795, 1980
6. Kannagara, D W , Thadepalli, H , McQuirter, J L Bacteriology and treatment of dental infections Oral Surg 50 103-109, 1980.
7. van Winkelhoff, A.J , van Steenbergen, T J M , Kippuw, N , de Graaff, J. Further characterization of *Bacteroides endodontalis*, an asaccharolytic black-pigmented *Bacteroides* species from the oral cavity. J. Clin. Microbiol. 22 75-79, 1985b
8. Haapasalo, M , Ranta, H., Ranta, K , Shah, H Black-pigmented *Bacteroides* spp. in human apical periodontitis Inf & Immun. 53:149-153, 1986.
9 Sundqvist, G Prevalence of black-pigmented *Bacteroides* species in root canal infections J Endodon. 15 13-19, 1989
10 Baumgartner, J C , Falkler, W.A. · Bacteria in the apical 5mm of infected root canals J Endodon 17 380-383, 1991
11. Sundqvist, G. Associations between microbial species in dental root canal infections. Oral Microbiol Immunol 7 257-262, 1992
12. Hashioka, K , Yamasaki, M., Nakane A , Horiba, N , Nakamura, H · The relationship between clinical symptoms and anaerobic bacteria from infected root canals. J Endodon 18 558-561, 1992
13 van Winkelhoff, A J , van Steenbergen, T.J M , de Graaff, J The role of black-pigmented *Bacteroides* in human oral infections. J Clin Periodontol. 15:145-155, 1988
14. van Winkelhoff, van Steenbergen, T.J M , de Graaff, J · *Porphyromonas endodontalis* Its role in endodontal infection J Endodon. 18 431-434, 1992
15. van Winkelhoff, A.J , Kippuw, N , De Graaff, J Serological characterization of black-pigmented *Bacteroides endodontalis* Inf & Immun. 51 972-974, 1986
16 Herweijer, J A., Loos, B G., Neiders, M E Characterization of total membrane proteins of *Porphyromonas endodontalis* J Endodon. 18 620-624, 1992
17. Mattsby-Baltzer, I , Lindgren, K , Lindholm, B., Edebo, L Endotoxin shedding by enterobacteria free and cell-bound endotoxin differ in Limulus activity Inf & Immun. 59:689-95, 1991
18 Morrison, D C , Ryan, J L · Endotoxin and disease mechanisms. Ann Rev Med, 38 417-432, 1987.
19 Hanazawa, S , Sagiya, T , Kitami, H , Ohta, K , Nishikawa, H , Kitano, S. · Monoclonal antibody against *Porphyromonas (Bacteroides) endodontalis* lipopolysaccharide and application of the antibody for direct identification of the species J. Clin Microbiol. 29 2550-2553, 1991
20. Bartold, P M , Haynes, D R · Interleukin-6 production by human gingival fibroblasts J Periodontol. Res 26:339-345, 1991
21. Yamazaki, K , Ikarashi, F , Aoyagi, T , Takahashi, K , Nakajima, T , Hara, K , Seymour, G J. Direct and indirect effects of *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide on interleukin-6 production by human gingival fibroblast Oral Microbiol Immunol. 7 218-224, 1992
22. Ogura, N., Shibata, Y , Kamino, Y , Matsuda, U., Hayakawa, M , Oikawa, T., Takiguchi, H , Izumi, H , Abiko, Y Stimulation of interleukin-6 production of periodontal ligament cells by *Porphyromonas endodontalis* lipopolysaccharide Biochem Med Metab. Biol 53 130-136, 1994
23. Nakane, A , Yoshida, T , Nakata, K , Horiba, N , Nakamura, H : Effects of lipopolysaccharides on human dental pulp cells J Endodon 21 128-130, 1995
24 Hosoya, S , Matsushima, K., Ohbayashi E , Yamazaki, M , Shibata, Y , Abiko, Y Stimulation of interleukin-1β-independent interleukin-6 production in human dental pulp cells by lipopolysaccharide. Bioch Med 59:138-143, 1996
25 Hosoya, S., Matsushima, K. Stimulation of interleukin-1β production of human dental cells by *Porphyromonas endodontalis* lipopolysaccharide J Endodon 23:39-42, 1997
26 Ward, R.J , Leonard, K. The *Staphylococcus aureus* alpha-toxin channel complex and the effect of Ca^{2+} ions on its interaction with lipid layers J. Struct Biol. 109 129-141, 1992.
27 Krasilnokov, O V , Merzlyak, P.G , Yuldasheva, L N , Azimova, R K and Nogueira, R.A Pore-forming properties of proteolytically nicked staphylococcal alpha-toxin the ion channel in planarlipid bilayer membranes Med Microbiol Immunol Berl 186:53-61, 1997
28 van Steenbergen, T.J M., van Winkelhoff, A J , Mayrand, D , Grenier, D , de Graaff, J. *Bacteroides endodontalis* sp nov , an asaccharolytic black-pigmented *Bacteroides* species from infected dental root canals Int. J. Syst. Bacteriol 34:118-120, 1984
29 van Winkelhoff, A.J , Carlee, A.W , de Graaff, J · *Bacteroides endodontalis* and other black-pigmented *Bacteroides* species in odontogenic abscesses Inf & Immun. 49 494-497 1985a
30 Pantera, E , Zambon, J J , Shih-Levine, M Indirect immunofluorescence for the detection of *Bacteroides* species in human dental pulp J Endodon 14:218-223, 1988
31 김세희, 윤수한 치근단 병소가 있는 환자에서 *Porphyromonas endodontalis* 항원에 대한 혈청 특이 항체의 면역 반응 연구 대한 치과 보존 학회지 19 485-498, 1994
32 Ogawa, T , Kuribayashi, S , Shimauchi, H , Toda, T , Hamada, S. Immunochemical and biological characterization of outer membrane proteins of *Porphyromonas endodontalis* Inf & Immun 60 4528-4533, 1992
33 Koga, T , Nishihara, T , Fujiwara, T , Nisizawa, T , Okahashi, N , Noguchi, T , Hamada, S. Biochemical and immunological properties of lipopolysaccharide(LPS) from *Bacteroides gingivalis* and comparasion with LPS from *Escherichia coli*. Inf & Immun 47 638-647, 1985
34 Qureshi, N Position of ester groups in the lipid A backbone of lipopolysaccharide obtained from Salmonella typhimurium J Biol Chem 258:12947-51, 1983
35 Niwa, M. Alteration of physical, chemical and biological properties of endotoxin by treatment with mild alkali J Bacteriol 97 1069-1077, 1969
36 Pineo, G , Kiatopongsah, S , Hutchins, M O , Hoover, J The effect of endotoxin on the synthesis of connective tissue matrix components by pulp fibroblasts in vitro J Endodon 9 2 7, 1983
37 Raisz, L G The role of prostaglandins in the local regulation of bone metabolism Prog Clin Biol Res 332 195-203, 990
38 Wang C Y , Stashenko, P · Kenetics of bone-resorbing activity in developing periapical lesions J Dent Res 70 1362-366, 1991
39 Lindemann, R A , Economou, J S , Rothermel, H Production of interleukin- , and tumor necrosis factor by human peripheral monocytes Activated by peripheral bacterial and extracted lipopolysaccharides. J Dent Res 67 1131-1135, 1988
40 Heath, J.K , Atkinson, S.J., Hembry, R.M , Reynolds, J J and Meikle, M C Bacterial antigens induce collagenase and prostaglandin E2 synthesis in human gingival fibroblasts through a primary effect on circulating mononuclear cells Inf & Immun 55:2148-2154, 1987
41 Eidhin, D N , Mouton, C A rapid method for preparation of rough and smooth lipopolysaccharide from *Bacteroides, Porphyromonas* and *Prevotella*. FEMS Microbiology Letters, 110 133-138, 1993
42 Westphal, O , Jann, K · Bacterial lipopolysaccharides ex-

traction with phenol-water and further applications of the procedure Method. Carbohydr Chem 5 83-91, 1965.
43 Schein, B and Schilder, H : Endotoxin content in endodontically involved teeth J Endodon 1:19-21, 1975
44 Dahlen, G , Bergenholtz, G. : Endotoxic activity in teeth with necrotic pulps. J. Dent Res 59:1033-1040, 1980.
45 Horiba, N., Maekawa, Y , Matsumoto, T., Nakamura, H A study of the distribution of endotoxin in the dentinal wall of infected root canals J Endodon 16:331-334, 1990
46 Ulevitch, R J , Tobia, P S : Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin Annu. Rev Immunol 13 437-457, 1995
47 Yang, R-B, Mark, M.R , Gray, A , Huang, A., Xie, M H., Zhang, H., Goddard, A , Wood, W I , Gurney, A.L , Godowski, P.J : Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signalling Nature 395 284-288, 1998