

세균액 및 세균단백질 추출물이 배양 세포에 미치는 영향

유영대 · 임미경

원광대학교 치과대학 치과보존학교실

ABSTRACT

EFFECTS OF HEAT-KILLED AND SONIC EXTRACTS OF MICROORGANISM ON CULTURED CELLS

Young-Dae Yu, D.D.S., Mi-Kyung Im, D.D.S., M.S.D., Ph.D.

Department of Conservative Dentistry, College of Dentistry, Wonkwang University

Dental pulp infection is most commonly caused by extensive dental caries, and some bacterial species invade root canals; bacterial components and products are thought to be associated with the pathogenesis of periapical periodontitis. A principle driving force behind pulpal disease response appears to lie in the host immune system's to bacteria and their products. We examined the production of interleukin 1β (IL- 1β) and tumor necrosis factor α (TNF- α) from human peripheral mononuclear cells, lymphocytes and monocytes stimulated by heat-killed *Acetobacillus actinomycetemcomitans* (ATCC 29523), *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277) and *Prevotella intermedia* (ATCC 25611), and also by their sonicated bacterial extracts (SBE), respectively. The effects of three strains of heat-killed bacteria and their SBEs on the morphology of cultured blood cell lines HL-60 (KCLB 10240) and J774A.1 (KCLB 40067) were observed under the inverted microscope. Ultrastructural changes of J774A.1 exposed to heat-killed *P. intermedia* and its SBE were investigated using transmission electron microscopy. Production of IL- 1β was reduced in human peripheral mononuclear cells after stimulation by sonic bacterial extracts of *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, and *P. intermedia*. Heat-killed and sonic extract of *P. gingivalis* inhibited the production of TNF- α in peripheral mononuclear cells. Production of TNF- α was inhibited in peripheral monocytes after stimulation by sonic extracts of *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, and *P. intermedia*. HL-60 and J774A.1 cells showed granular degeneration after treatment with heat-killed and sonic extracts of *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, and *P. intermedia*. Chromatin margination and shrinkage were observed in J774A.1 treated with heat-killed *P. intermedia*. Cell wall structure and organelles were destroyed and vacuoles were formed in cytoplasm in J774A.1 treated with *P. intermedia* sonic extract.

These results suggest that *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* and *P. intermedia* may have an important role in the formation and progression of pulpal diseases via both modulation of production of IL- 1β and TNF- α from blood mononuclear cells and cytopathic effects.

I. 서 론

검은 색소를 형성하는 혐기성 세균인 *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas endodontalis* 및 *Porphyromonas gingivalis* 등은 임상적으로 급성 염증 소견을 나타내는 환자의 감염된 관에서 자주 분리되며 잠재적인 염증 유발 능력으

로 인하여 치수 및 치근단 질환을 유발할 수 있는 원인 균주로 간주되고 있다^{1,2}. *P. gingivalis*는 fimbriae, capsule, peptidoglycan, cell wall protein과 lipopolysaccharide (LPS) 등의 생물학적인 활성을 지닌 다양한 성분을 세포 표면에 갖고 있다³. 이 성분은 염증 매개 인자인 prostaglandin E₂ (PGE₂), interleukin 1 (IL-1) 과 tumor necro-

sis factor (TNF)를 말초 혈액 단핵구와 치주 조직의 섬유아세포로부터 형성하며, 이들 인자는 직접적 혹은 간접적으로 치조골의 흡수와 밀접하게 연관되어 있다^{4,5}. *Prevotella intermedia*는 치근단 질환에서 분리율이 가장 높은 세균으로 fimbriae, capsule, 세포의 vesicle, LPS 및 세포막 단백질 등을 포함하고 있다^{6,7}.

*Actinobacillus actinomycetemcomitans*는 치주 질환의 가능한 원인 균주로서 알려져 있으며, endotoxin과 leukotoxin과 같은 잠재적인 독성 인자와 주성을 억제하는 인자를 분비하여 면역 반응에 영향을 미칠 수 있다⁸.

염증이 발생하면 말초 혈액의 단핵구 세포는 혈관으로부터 염증 부위로 이동 후 활성화되어 백혈구의 cytokine 및 염증성 chemotaxin을 방출한다. 일단 방출된 화학 주성 인자는 다른 백혈구를 소환하여 염증 반응을 증폭시킨다⁹. Cytokine은 급성 및 만성 질환에서 생물학적인 활성을 나타내는 인자로서 여러 종류가 보고된 바 있다^{10,11}. 치수 질환과 cytokine의 연관성에 관한 연구로는 *Prevotella melaninogenica*와 *P. gingivalis*와 같은 *Bacteroides*가 염증성 cytokine인 IL-6의 형성을 유도하거나 체액성 면역 반응을 유발시킴으로써 다수의 치근단 병소 형성을 유발할 수 있다¹². IL-1 β 와 TNF- α 는 활성화된 대식 세포와 단핵구에서 분비되는 염증성 cytokine으로서 경화 조직의 강력한 흡수를 유발한다^{13,14}.

또한 세포의 기질을 분해하는 plasminogen activator와 기질 metalloproteinase 등의 단백질 분해 효소를 합성하고 분비하며 콜라젠과 alkaline phosphatase와 같은 세포의 기질 형성에 필수적인 단백질 생성을 억제한다¹⁵. IL-1 β 와 TNF- α 는 조골세포와 연골세포의 기능 조절에 영향을 주어 세포의 증식과 분화의 속도를 변화시키고 기질 단백질의 형성과 분비에도 영향을 미치는 것으로 알려져 있다^{16,17}.

본 연구에서는 *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*와 *P. intermedia*를 열로 처리한 세균액 및 세균 단백질 추출액으로 사람의 말초 혈액에서 분리한 단핵구, 림프구 및 단구를 처리하여 생성된 IL-1 β 와 TNF- α 를 측정하였다. 또한 혈액 세포에서 기원한 연구 세포주의 형태학적인 변화를 역상 현미경 및 투과전자현미경으로 관찰함으로써 면역 반응의 조절을 통한 치수 및 치근단 질환의 생성과 확산에 미치는 영향을 규명하고자 하였다.

II. 실험 재료 및 방법

1. 실험 재료

치수 및 치근단 질환에서 분리되는 세균으로 표준 균주인 *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (ATCC 29523)와 *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277) 및 *Prevotella intermedia* (ATCC 25611)를 사용하였다. 세포는 사람의

말초 혈액에서 분리한 단핵구, 림프구 및 단구와 혈액 세포에서 기원한 연구 세포주인 HL-60과 J774A.1을 사용하였다.

2. 실험 방법

1) 세균의 준비

*A. actinomycetemcomitans*는 통성 혐기성 그람 음성 세균으로서 MacConkey 배지에 접종하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 배양기에서 3~4 일 동안 배양한 후 순수 집락을 Todd-Hewitt 액체배지에서 16시간 동안 배양하여 실험에 사용하였다. 혐기성 세균인 *P. gingivalis*와 *P. intermedia*는 hemin과 menadione이 첨가된 Brucellar 혈액천배지에 접종하여, CO₂와 H₂ 가스를 생산하는 팩(AnaeroPack, Mitsubishi Gas Chemical, Japan)을 혐기성 단지 (BBL GasPack System, USA)안에 넣고 3~5일간 배양한 후 세균의 집락이 형성되면, hemin과 menadione이 첨가된 tryptic soy broth에 접종하여 혐기성 단지 안에서 배양하였다. 액체 배지에서 증식한 세균들은 인산완충용액(pH 7.2)으로 2회 세척한 후 10분간 끓는 물에 노출시켰다. 다시 인산완충용액으로 3회 세척한 후 분광 광도계로 흡광도를 측정하였다. 인산완충용액을 사용하여 세균의 수를 10⁴/ml과 10³/ml의 두 단계로 각각 희석하였다. 세균은 사용하는 실험 전날 접종하여 배양된 세균을 사용하였다.

2) 세균 단백질 추출

액체 배지에서 배양한 *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*와 *P. intermedia* 세균액을 인산완충용액(pH 7.2)으로 세척한 후 0.1 mm glass bead에 혼합하고 bead beater를 이용하여 2분간 파쇄하였다. 세균이 충분히 파괴되었는지 그람 염색을 하여 확인하였다. 파쇄액을 microtube에 옮긴 후 12,000 rpm에서 1분간 원심분리하고, 상청액을 0.45 μ m 주사기 필터에 통과시켜 세균단백질 추출액을 회수하였다. 단백질의 농도는 Bio-Rad사의 protein assay kit (Bio-Rad Laboratories, USA)를 이용하여 측정하였다. 세균단백질 추출액은 인산완충용액으로 희석하여 최종 농도를 1mg/ml로 하여 사용할 때까지 4 $^{\circ}$ C냉장고에 보관하였다.

3) 말초혈액 단핵구 세포 분리

세 명의 자원자로부터 약 12 ml씩 채혈하여, 방부제가 들어있지 않은 heparin (20 units/ml blood) 튜브에 넣고 잘 혼합하였다. 생리식염수를 동량 섞어 혈액을 희석한 후 비중이 1.077인 Ficoll-Paque (Pharmacia Biotech, Sweden)이 든 원추형 튜브에 3:1의 비율로 중첩하였다. 1,500 rpm에서 30분간 원심분리한 후 Ficoll-Paque보다 낮층에 형성된 단핵구층을 Pasteur 피펫을 이용하여 조심

스럽게 분리하였다. RPMI 1640 배지(Gibco BRL Life Technologies, USA)를 이용하여 2회 세척한 후 hemocytometer (Cambridge Instruments Inc., USA)를 이용하여 세포수를 $5 \times 10^6/\text{ml}$ 로 조정하였다.

4) 림프구와 단구의 분리

앞에서 회수한 단핵구를 75cm^2 플라스크에 넣고, 37°C 배양기에서 3시간 동안 방치하였다. 세포 배양 플라스크 바닥에 부착하지 않고 상층에 부유된 세포를 회수하여 림프구로 사용하였다. 단구는 플라스크 바닥에 부착하는 성질을 이용하여 바닥에 부착된 세포를 scraper로 회수하여 실험에 이용하였다. 단핵구의 70~80%는 림프구로서 림프구는 세포수를 $5 \times 10^6/\text{ml}$ 로 조정하였지만, 단구는 세포수가 충분하지 않아 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 로 조정하였다.

5) 세균을 이용한 말초혈액 세포 자극

단핵구와 림프구 및 단구를 96-well microplate (Nunc, Denmark)에 $100 \mu\text{L}$ 씩 분주하여 세포수를 각 well당 $1 \sim 5 \times 10^5/\text{ml}$ 로 조정하였다. 세균액은 $50 \mu\text{L}$ 씩 분주하여 첫 well이 $5 \times 10^4/\text{ml}$ 이 되도록 하였고, 이후 두 well은 10배씩 균수가 감소하여, 세포수:균수의 비율이 1 : 1과 10 : 1의 두 가지 조건으로 하였고, 또한 준비한 세균단백질 추출물을 $30\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 되도록 첨가하였다. 세균이 들어가지 않는 음성대조군으로는 RPMI 1640 액체배지를 사용하였다. 2% RPMI 1640를 $100 \mu\text{L}$ 씩 첨가한 후, 37°C CO_2 배양기에서 24시간 배양하였다.

6) 말초혈액 세포에서 분비된 IL-1 β 와 TNF- α 측정

Endogen Human IL-1 β 와 TNF- α ELISA kit (Wobrun, USA)을 이용하여 sandwich법으로 IL-1 β 와 TNF- α 를 측정하였다. IL-1 β ELISA는 먼저 세균과 세포 단백질 추출액에 24시간 동안 노출된 단핵구, 림프구 및 단구 상층액 $50 \mu\text{L}$ 를 단클론성 IL-1 β 항체가 코팅된 microwell에 접종하고 커버를 씌운 후 실온에서 3 시간 동안 반응시켰다. 세척용액으로 3회 세척한 후 biotinylated antibody $50 \mu\text{L}$ 를 각 well에 넣었다. 실온에서 30분동안 방치한 후 3회 세척하고, streptavidin-HRP 희석액을 $100 \mu\text{L}$ 씩 넣은 후 실온에서 30분간 반응시켰다. 세척 후 TMB 기질용액을 $100 \mu\text{L}$ 씩 넣고 실온에서 30분간 발색시킨 후, stop 용액 $100 \mu\text{L}$ 를 넣어 발색반응을 종료시켰다. 30분 이내에 ELISA Reader (Dynatech Laboratories Inc., Model MR700, USA)를 이용하여 450 nm 단파장에서 흡광도를 측정하였다. TNF- α ELISA도 앞의 IL-1 β 의 방법과 동일하며 처음에 biotinylated antibody와 시료를 동시에 넣고, 실온에서 2시간 반응시켰다. 분비된 cytokine의 양에 대하여는 윈도우 SPSS 9.0 프로그램의 one-way ANOVA를 이용하여 $p < 0.05$ 로 통계 분석하였다.

7) 세균 자극에 따른 세포주의 형태학적 변화

HL-60 (KCLB 10240)와 J774A.1 (KCLB 40067) 세포주를 한국세포주은행으로부터 구입하여 10% RPMI에 계대배양하여 사용하였다. 위와 같은 방법으로 준비한 세균 및 단백질 추출액을 두 가지 세포주에 노출시켜 역상현미경으로 관찰하였다. J774A.1 세포주를 25cm^2 플라스크에 배양한 후 *P. intermedia* 세균과 세균단백질 추출액에 24시간 동안 노출시킨 후 투과전자현미경 관찰을 하였다.

III. 실험성적

1. 세균으로 자극된 말초혈액 세포의 IL-1 β 및 TNF- α 의 생성

세균액 및 세균단백질 추출액을 말초혈액 단핵구에 첨가하여 자극시킨 후 분비된 IL-1 β 의 양을 측정 한 결과는 Table 1과 같다. *A. actinomycetemcomitans*와 *P. gingivalis*의 세균액 및 세균단백질 추출액을 첨가한 경우 *A. actinomycetemcomitans*에서는 IL-1 β 가 분비되지 않고 *P. gingivalis*에서는 소량이 분비되어 대조군과 비교하면 통계적으로 유의한 차이가 있었다. *P. intermedia*는 세균단백질 추출액을 첨가한 경우가 대조군 및 1 : 10으로 희석한 세균액과 비교시 IL-1 β 의 생성을 유의하게 억제하였다.

세균액 및 세균단백질 추출액을 말초혈액 림프구에 첨가하여 자극시킨 후 분비된 IL-1 β 의 양을 측정 한 결과는 Table 2와 같다. *A. actinomycetemcomitans*만이 세균단백질 추출액을 첨가한 경우 대조군과 비교시 분비된 IL-1 β 의 양이 유의하게 적었다.

세균액 및 세균단백질 추출액을 말초혈액 단구에 첨가하여 자극시킨 후 분비된 IL-1 β 의 양을 측정 한 결과는 Table 3과 같다. *P. gingivalis*의 세균단백질 추출액을 첨가한 경우 소량이 분비되어 대조군 및 세균액으로 자극된 군과 비교하면 유의한 차이가 있었다.

세균액 및 세균단백질 추출액을 말초혈액 단핵구에 첨가하여 자극시킨 후 분비된 TNF- α 의 양을 측정 한 결과는 Table 4과 같다. 3종의 세균의 세균 단백질 추출액을 첨가한 경우에는 모두 대조군에 비하여 TNF- α 의 분비가 유의하게 억제되었다. *P. gingivalis*는 두 가지 농도의 세균액을 첨가한 경우 모두에서 대조군과 비교시 분비된 TNF- α 의 양에서 유의한 차이가 있었다.

세균액 및 세균단백질 추출액을 말초혈액 림프구에 첨가하여 자극시킨 후 분비된 TNF- α 의 양을 측정 한 결과는 Table 5와 같다. *P. gingivalis*는 세균단백질 추출액을 첨가한 경우에서 TNF- α 가 분비되지 않았으며 대조군 및 세균액에 비하여 이 cytokine의 합성이 유의하게 억제되었다. 그러나 두 가지 농도의 세균액은 대조군에 비하여 TNF- α 의 합성을 유의하게 증가시키지 못하였다.

Table 1. Production of IL-1 β (ng/ml) in peripheral mononuclear cells stimulated by sonicated bacterial extract (SBE) and heat killed bacteria

Bacteria	control	SBE (30 μ g/ml)	concentration of bacteria	
			5 \times 10 ⁴ /ml	5 \times 10 ⁸ /ml
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	135.00 \pm 40.63	0*	158.33 \pm 30.99	177.33 \pm 66.37
<i>P. gingivalis</i>	135.00 \pm 40.63	22.33 \pm 28.31*	140.00 \pm 14.73	165.33 \pm 33.72
<i>P. intermedia</i>	135.00 \pm 40.63	9.67 \pm 6.66*	98.00 \pm 14.11	162.00 \pm 54.07

* : p< 0.05 compared to control

Table 2. Production of IL-1 β (ng/ml) in peripheral lymphocytes stimulated by sonicated bacterial extract (SBE) and heat killed bacteria

Bacteria	control	SBE (30 μ g/ml)	concentration of bacteria	
			5 \times 10 ⁴ /ml	5 \times 10 ⁸ /ml
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	146.00 \pm 63.17	38.67 \pm 40.82*	129.67 \pm 61.16	119.67 \pm 58.39
<i>P. gingivalis</i>	146.00 \pm 63.17	105.00 \pm 44.40	99.67 \pm 40.07	108.67 \pm 26.84
<i>P. intermedia</i>	146.00 \pm 63.17	59.67 \pm 44.41	131.67 \pm 34.70	157.00 \pm 67.09

* : p< 0.05 compared to control

Table 3. Production of IL-1 β (ng/ml) in peripheral monocytes stimulated by sonicated bacterial extract (SBE) and heat killed bacteria

Bacteria	control	SBE (30 μ g/ml)	concentration of bacteria	
			5 \times 10 ⁴ /ml	5 \times 10 ⁸ /ml
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	161.00 \pm 30.05	32.00 \pm 21.38	87.00 \pm 53.03	198.67 \pm 176.51
<i>P. gingivalis</i>	161.00 \pm 30.05	16.67 \pm 22.30*	130.33 \pm 16.01	120.00 \pm 32.60
<i>P. intermedia</i>	161.00 \pm 30.05	94.33 \pm 11.02	137.67 \pm 57.87	128.33 \pm 26.10

* : p< 0.05 compared to control

Table 4. Production of TNF- α (ng/ml) in peripheral mononuclear cells stimulated by sonicated bacterial extract (SBE) and heat killed bacteria

Bacteria	control	SBE (30 μ g/ml)	concentration of bacteria	
			5 \times 10 ⁴ /ml	5 \times 10 ⁸ /ml
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	63.33 \pm 22.14	0*	113.00 \pm 61.70	95.67 \pm 55.18
<i>P. gingivalis</i>	63.33 \pm 22.14	0*	164.67 \pm 34.99*	195.00 \pm 51.16*
<i>P. intermedia</i>	63.33 \pm 22.14	0*	85.00 \pm 41.33	111.67 \pm 51.47

* : p< 0.05 compared to control

세균액 및 세균단백질 추출액을 말초혈액 단구에 첨가하여 자극시킨 후 분비된 TNF- α 의 양을 측정한 결과는 Table 6과 같다. *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* 및 *P. intermedia*의 세균단백질 추출액은 TNF- α 가 분비되지 않아서 대조군에 비하여 모두 유의한 억제 효과를 보였다. *P.*

*gingivalis*는 세균단백질 추출액을 첨가한 경우는 두 가지 농도의 세균액에 대하여도 TNF- α 의 분비가 유의하게 억제되었다.

Table 5. Production of TNF- α (ng/ml) in peripheral lymphocytes stimulated by sonicated bacterial extract (SBE) and heat killed bacteria

Bacteria	control	SBE (30 μ g/ml)	concentration of bacteria	
			5 \times 10 ⁴ /ml	5 \times 10 ³ /ml
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	49.33 \pm 34.02	7.00 \pm 8.89	68.33 \pm 42.57	61.33 \pm 36.90
<i>P. gingivalis</i>	49.33 \pm 34.02	0*	91.67 \pm 22.19	89.00 \pm 23.81
<i>P. intermedia</i>	49.33 \pm 34.02	8.00 \pm 4.00	96.00 \pm 61.26	85.00 \pm 49.24

* : p< 0.05 compared to control

Table 6. Production of TNF- α (ng/ml) in peripheral monocytes stimulated by sonicated bacterial extract (SBE) and heat killed bacteria

Bacteria	control	SBE (30 μ g/ml)	concentration of bacteria	
			5 \times 10 ⁴ /ml	5 \times 10 ³ /ml
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	69.33 \pm 45.45	0*	40.33 \pm 33.72	51.33 \pm 22.68
<i>P. gingivalis</i>	69.33 \pm 45.45	0*	72.33 \pm 18.15	67.00 \pm 20.81
<i>P. intermedia</i>	69.33 \pm 45.45	*	33.67 \pm 11.85	65.00 \pm 52.85

* : p< 0.05 compared to control

2. 세균 자극에 따른 세포주의 형태학적 변화

1) 역상 현미경 관찰

HL-60 세포주를 24-well plate에 분주하여 40시간 동안 배양한 후 대조군의 소견을 400배로 관찰한 소견은 Fig. 1과 같다. 이 세포에 *A. actinomycetemcomitans* 세균액 (1 \times 10⁴ bact/mL)을 첨가하여 배양하면 세포 사이에 과립의 균액이 관찰되며 세포가 변성되고 괴사되었다 (Fig. 2). 이 세균의 단백질 추출액을 첨가하면 세포가 과립형으로 변성되었다 (Fig. 3). *P. gingivalis* 세균액을 첨가하면 HL-60 세포의 과립 형태의 변화가 관찰되며 세포들 사이에 균액이 이물질로 나타났으며 (Fig. 4), 세균 단백질 추출액을 첨가한 군에서는 세포가 변성되고 세포의 형태가 파손되었다 (Fig. 5). *P. intermedia* 세균액이 첨가된 군에서는 세포의 과립화 변성이 시작되고 (Fig. 6), 단백질 추출액을 첨가한 군에서는 이러한 과립화 변성이 심화되며 세포의 균집화도 관찰되었다 (Fig. 7).

J774A.1 세포주의 대조군의 소견은 Fig. 8과 같다. 이 세포에 *A. actinomycetemcomitans* 세균액을 첨가하여 배양하면 세포의 과립화가 나타났으며 (Fig. 9), 단백질 추출액을 첨가한 경우에도 역시 세포의 과립화가 시작됨이 관찰되었다 (Fig. 10). 이 세포주에 *P. gingivalis* 세균액으로 자극하면 세포 성장이 억제되고 관찰 시야의 대부분을 세균액이 차지하였다 (Fig. 11). 이 세균의 단백질 추출액을 첨가하면 세포의 과립화 현상이 나타나고 (Fig. 12), *P. intermedia*의 세균액을 첨가한 군에서는 세포의 형태가 손상되고

세포와 세균액의 덩어리가 균집을 이루었다 (Fig. 13).

2) 투과전자현미경을 이용한 세포의 미세구조 변화의 관찰

J774A.1 세포주를 플라스크에 배양하여 투과전자현미경으로 관찰하였다 (Fig. 14). 이 세포는 병리형태학적인 소견인 단구로서 탐식작용이 활발한 세포 작용으로 인하여 세포질 내부에 많은 과립 및 다수의 vesicle이 탐식된 양상이 나타났다. 핵의 이중막 형태는 온전하게 유지되어 있으며, heterochromatin과 euchromatin이 핵 내에 일정한 비율로 균일하게 관찰되었다. 인접한 여러 세포들을 동시에 관찰한 소견은 Fig. 15와 같다. 하단에 관찰되는 세포에서도 핵의 이중막이 유지되며 heterochromatin과 euchromatin이 적절하게 산재되었다. 각 세포의 세포막으로부터 다수의 microvilli가 돌출되어 나온 양상을 보였다. 이 세포에는 과립이나 공포가 비교적 적게 관찰되나, 상부에서 관찰되는 세포에서는 세포질의 대부분이 과립이나 공포 및 자가용해소체 (autolysosome)으로 추정되는 원형의 과립으로 가득 채워져 활발한 탐식 능력이 있는 세포였다. 두 세포의 인접한 경계를 고배율로 관찰하면 (Fig. 16) 세포질에서는 원형의 크고 작은 공포가 전자밀도가 강한 소립자를 다수 함유하고 있었다. 또한 전자 밀도가 강한 이물질을 탐식한 vesicle도 있었으며 세포 외부로 원형의 vesicle을 배출한 양상도 보였다.

*P. intermedia*의 세균액을 첨가하여 배양한 경우는 Fig. 17~19와 같다. 세포의 형태는 대조군에서 보이는 원형의

형태와 달리 전체적인 형태가 위축되어 세포의 크기도 줄어들어 세포질의 양도 감소되었으며 심하게 변성되어 나타났다. 핵의 크기도 줄어들었으며 핵의 염색질이 핵의 주변으로 밀집되는 현상이 관찰되었다. 대조군과는 달리 세포질 외부로 돌출된 microvilli도 관찰되지 않았으며, 세포 외부에는 첨가된 *P. intermedia* 세균액에서 유래된 많은 과립이 보였다 (Fig. 17). 고배율로 관찰한 경우 (Fig. 18), 핵의 염색질의 변연화 및 농축이 관찰되었다. 세포질은 대조군 세포와 비교하면 세포질의 전자 밀도가 강하게 나타났고 대조군보다 공포나 vesicle이 적었으며 세포 소기관들이 밀접하여 리보솜의 발현 빈도가 증가하거나 또는 세포질의 수축에 따른 것으로 추정되었다. 세포 외부에는 이물질인 다수의 세균액이 관찰되었다. 세포질 내부에 탐식된 이물질 vesicle을 고배율 ($\times 65,000$) 사진은 Fig. 19와 같다. 세포질 내부에 전자 밀도가 강한 소립자를 다량 함유한 vesicle이 보이며 세포질의 소기관이 모두 소실된 빈 공간도 모여 세포의 괴사 양상이 관찰되었다.

*P. intermedia*의 세균 단백질 추출액을 첨가하여 배양한 경우는 Fig. 20, 21과 같다. 하단 세포의 핵은 대조군의 정상 세포에 비하여 전반적으로 전자 밀도가 현저히 감소되고 핵질이 소실되었으며 전자 밀도가 감소된 heterochromatin이 핵의 변연부로 이동되었다. 세포질막은 파괴되었으며 세포질 내부를 크고 작은 원형의 공포 및 vesicle이 가득 채우고 있어서 세포가 사멸되었음을 시사하였다. 반면 상단의 세포는 세포질막 외부로 microvilli가 정상적으로 분포되었으며 세포질 내부로 세포내 소기관도 정상적으로 분포하여 비교적 정상적인 소견을 보였다. 두 세포 사이에는 하단의 괴사된 세포에서 분비된 vesicle이 관찰되었다 (Fig. 20). Fig. 21에서는 Fig. 20의 상단의 비교적 정상으로 나타난 세포의 세포질 내부를 확대 ($\times 31,200$) 하여 관찰한 소견이다. 핵의 이중막 구조도 정상적으로 유지되어 있으며 세포질 내부에 세포내 소기관 및 다수의 과립도 정상적으로 관찰되었다.

IV. 총괄 및 고찰

염증 병소는 먼저 중성구가 침윤된 후에 단핵구와 림프구의 순으로 병소 부위에 도달한다. 각각의 세포가 일정한 순서로 나타나는 이러한 과정은 정확하게 조절되며 여러 종류의 cytokine이 발현되고 분비됨에 따라서 영향을 받는다. 또한 단핵구에서 생산된 cytokine들은 치은섬유아세포와 같은 다른 세포에서 chemokine을 생산하여 세균의 침입에 대항하도록 하는 매개체 역할을 한다⁹⁾.

증상이 있는 치근단 질환에서 *P. gingivalis*는 다른 여러 종류의 세균과 같이 분리되어 혼합 감염의 형태로 나타났다¹⁸⁾. 통상적인 근관치료 후에도 치유되지 않고 광범위한 치근단 치조골의 흡수를 보이는 증례에서 *P. gingivalis*가 분리

되었으며¹⁹⁾ 치료하지 않고 남겨둔 근관으로 인하여 급성 치근단 질환이 발생한 경우에서도 *P. gingivalis*를 분리하였다는 보고도 있다²⁰⁾. 또한 Abou-Rass와 Bogen²¹⁾은 근관이 외부와 격리된 증례에서 근관 치료를 받은 11개의 치아 및 외상을 받은 전치에서 통상적인 세균 배양 및 동정 방법을 이용한 결과 단 한 증례에서만 *P. gingivalis*가 분리됨을 보고하였다. Bogen과 Slots²²⁾도 근관이 외부와 격리된 증례에서 통상적인 근관 치료가 실패한 20증례에 대하여 치근단 수술을 시행하는 동안 치근단에서 표본을 채취한 후 PCR primer를 이용하여 *P. endodontalis*, *P. gingivalis*, *P. intermedia* 및 *P. nigrescens*의 발현 빈도를 조사한 결과 중등도의 동통이 있는 한 환자에서 *P. gingivalis*를 동정하였으나, *P. endodontalis*, *P. intermedia*와 *P. nigrescens*는 어떤 증례에서도 발견되지 않았음을 보고하였다.

*Prevotella intermedia*를 초음파 처리 후 세포벽 성분 중 55-kilodalton(kda)의 분자량을 갖는 단백질을 분리하여 사람의 말초혈액 단핵구를 자극한 결과 IL-1 α , -1 β 및 -8과 TNF- α 의 형성이 유도됨을 보고하였으며, 이 성분이 fimbriae에 해당하는 것으로 추정하였다²³⁾.

Interleukine 1 β (IL-1 β)는 선염증성 cytokine으로서 단핵구, 다형핵 백혈구, keratinocyte 및 혈관내피세포 등 여러 가지 세포에서 분비되며, 노출된 치수에도 존재하는 것으로 보고되었다²⁴⁾. IL-1 β 는 불활성으로서 분자량이 31.5-kDa인 선구체로 단구에서 합성되어 IL-1 β 전환효소 (IL-1 β converting enzyme, ICE)로 처리된 후 생물학적 활성을 갖는 17-kDa의 다당류가 되어 세포외로 분비된다²⁵⁾. IL-1 β 의 존재 하에서는 휴지 상태의 T 림프구 및 B 림프구의 성장인자에 대한 반응성이 증가되며, 이들 림프구의 분화와 항체의 형성도 강화된다. 또한 IL-1 β 는 림프구에 대한 주성 인자이며 보체 단백질과 같은 급성기 단백질의 형성을 촉진한다. 골 형성 세포주인 MC3T3-E1을 IL-1 β 로 처리하면 PGE의 형성이 증가하고 골이 흡수되며 파골세포와 같은 세포가 형성되었다²⁶⁾. 또한 IL-1 β 는 치은 섬유아세포와 피부의 섬유아세포에서 콜라겐 분해 효소의 생성을 촉진하였다^{27,28)}.

IL-1 β 와 TNF- α 로 처리한 RPC-C2A 세포는 세포의 기질의 교체에 연관된 기질 metalloproteinase의 수준이 증가된 반면, 사람의 치수 세포에 처리한 경우에는 이 효소의 생산이나 분비에 변화가 없어서 이들 cytokine이 세포에 따라서 미치는 영향이 다르다고 보고되었다²⁹⁾.

대부분의 치근단 감염은 적절히 치료하면 예후가 우수하지만 어떤 증례에서는 치료 경과가 양호하지 않아서 치료 기간이 길어지고 악화되거나 재발하기도 하며 이런 경우에서의 병리조직학적인 반응에 대하여는 명확하게 알려지지 않고 있다. 따라서 이러한 증례에서 숙주 반응의 차이에 따라 치근단 질환의 임상적인 차이가 나타난다고 가정할 수 있다. Matsushita 등³⁰⁾은 10개 이상의 치근단 질환이 있는

환자군에서 말초 혈액을 채취하여 감염 근관에서 발현 빈도가 높은 여러 종류의 혐기성 세균으로 자극한 후 생성되는 IL-1, IL-8 및 TNF- α 의 수준을 병소의 수가 적은 군과 비교하여 측정 한 결과 *Prevotella melaninogenica* ATCC 25845로 자극된 경우에는 IL-6의 생성이 촉진됨을 보고 하였다. 또 10개 이상의 치근단 질환이 있는 환자군에서 혈청과 타액의 *P. gingivalis*에 대한 반응성이 치근단 질환이 적은 군에 비하여 유의하게 증가되어 이들 두 종류의 세균이 특정한 cytokine의 형성을 촉진하거나 체액성 면역을 통하여 많은 치근단 병소의 형성에 기여할 것이라고 하였다.

치근단 병소와 특정 cytokine의 연관성에 관한 연구로 Miki 등³¹⁾은 치근단 병소 부위의 국소적인 PGE₂와 IL-1 α 의 생성이 치근단 질환의 활성화 상관 관계가 있다고 하였으며, Kawashima 등³²⁾은 실험적으로 치근단 병소를 유발시킨 쥐에서 발현된 IL-1과 TNF- α 를 포함한 10가지 종류의 cytokine을 조사한 결과 IL-1과 TNF- α 단백질 및 mRNA의 발현이 다른 cytokine에 비하여 강하게 발현됨을 보고하였다. Fouad³³⁾의 연구에서는 B임파구 및 T임파구의 기능이 결핍된 scid 쥐와 정상적인 쥐를 대상으로 하여 치수를 노출시킨 후 치수의 괴사 및 치근단 질환이 생성되는 양상과 IL- α 와 TNF- α 의 발현을 비교한 결과 이들 구군간에 차이가 없어 치근단 질환의 진행에 B임파구 및 T임파구가 결정적인 역할을 담당하지 않는다고 하였다.

이러한 연구 결과들은 치근단 질환의 생성과 확산에서도 인체의 다른 부분의 염증 및 면역 반응에 의한 질환의 생성 및 확산과 마찬가지로 단핵구가 이들 숙주 반응을 전체적으로 총괄하는 중심적인 역할을 담당하며, 이들이 분비하는 cytokine과 chemokine이 질환의 진행을 결정함을 의미한다고 볼 수 있다.

본 연구에서 사람의 말초 혈액 단핵구를 *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* 및 *P. intermedia*로 자극한 후에는 IL-1 β 의 생성이 대조군에 비하여 유의하게 억제된 반면, 세균을 열처리한 용액을 첨가한 경우에는 대조군과 차이가 없었다(Table 1). 세균 단백질 추출액을 첨가한 경우는 ELISA를 이용하여 분석한 결과로 IL-1 β 가 생성되지 않거나, 적은 양만이 생성되었다. 세균을 열처리한 경우에는 대조군과 비교시 IL-1 β 의 수준이 차이를 보이지 않는 것은 세균 세포벽의 단백질이 변성되어 항원으로서 작용하지 않거나, 첨가한 세균 용액의 농도가 너무 낮아서 IL-1 β 의 생성에 영향을 미치지 못한 것으로도 해석할 수 있다. 반면 세균 단백질 추출액을 첨가한 경우에서 IL-1 β 의 생성 억제는 단핵구 세포들의 정상적인 면역 기능의 수행에 변화가 일어났음을 의미한다. 이러한 변화는 외부 자극인 세균 추출물에 대하여 방어 기전으로서 단핵구 세포가 반응함에 있어 IL-1 β 를 비롯한 여러 가지 cytokine을 생성하는 과정에서 상대적으로 IL-1 β 의 생성량이 감소되어 나타난 결과이

거나, 세균 추출물의 농도가 단핵구 세포가 면역 반응을 수행하여 방어 기전을 발휘하기에는 너무 높은 농도로서 단핵구 세포가 손상되어 기능 이상으로 인한 생성능의 감소로도 해석할 수 있다.

한편, 단핵구에서 림프구만을 분리하여 세균액 및 세균 단백질 추출액을 첨가한 경우에는 (Table 2) *A. actinomycetemcomitans*에서만 대조군에 비하여 IL-1 β 의 생성이 유의하게 억제되었다. 반면에 단핵구로부터 단구만을 분리하여 실험한 경우에는 *P. gingivalis*만이 IL-1 β 의 생성이 감소되었다 (Table 3). 이러한 결과에 따라서 림프구 및 단구는 각각의 세균의 종류에 따라 cytokine의 분비 형태가 달라지면서 면역 반응이 다르게 진행됨을 추정할 수 있다. 또한 단핵구로부터 림프구 및 단구를 각각 분리하여 세균으로 자극하면 cytokine이 분비양과 형태가 달라서 림프구와 단구가 공존하여 나타내는 면역 반응과 다른 양상으로 진행됨을 시사하였다. 이러한 결과로부터 IL-1 β 를 생성하는 주요한 세포인 단구는 세균 자극을 받은 경우 IL-1 β 보다는 다른 cytokine을 많이 생성하여 다른 면역 세포에 영향을 미쳐서 이들 세포와 활발한 공조를 통하여 효과적으로 외부 자극을 제어하려고 시도하는 것으로 사료된다. 이는 림프구 및 단구 단독인 경우보다 단핵구를 자극한 경우에서 3종의 세균 단백질 추출물 모두가 IL-1 β 의 생성을 억제한 결과로도 추정할 수 있다.

3종의 열로 처리한 세균액 및 세균 단백질 추출액을 말초 혈액 단핵구에 첨가한 후 합성된 TNF- α 의 양을 측정 한 Table 4의 결과에서 3종의 세균 단백질 추출액은 TNF- α 의 생성을 대조군에 비하여 유의하게 억제하였다. 이러한 결과는 IL-1 β 의 합성에 이들 세균 단백질 추출액이 미치는 영향과 동일한 양상이었다. IL-1 및 TNF- α 를 주로 분비하는 세포도 대식 세포 혹은 단핵구로서 동일하며 나타내는 작용도 거의 유사하여 동일 자극에 대하여 나타내는 분비의 형태도 비슷하게 나타난 것으로 사료되었다. 그러나 림프구만을 분리하여 세균액 및 세균 단백질 추출액을 첨가하면 Table 5에 나타난 바와 같이 *P. gingivalis*의 세균 단백질 추출액을 첨가한 경우에서만 TNF- α 의 생성이 억제되었다. 이 결과는 IL-1 β 의 생성 양상과는 일치하지 않아서 림프구가 단독으로 세균의 자극에 대하여 생성하는 TNF- α 의 생성 형태가 달랐다. 또한 단구만을 사용하여 세균으로 자극한 경우에는 3종의 세균 단백질 추출액이 모두 TNF- α 의 생성을 억제하여 단구가 세균 단백질 추출액에 대하여 나타내는 반응은 각각의 cytokine의 생성의 형태를 다르게 하여 진행되었다. 세균 자극을 받지 않은 대조군에서도 상당한 수준의 IL-1 β 및 TNF- α 가 항상 분비되어 혈관에서 분리되어 실험에 사용하는 plate에 옮겨지는 과정 자체도 자극으로 작용하였다. 대조군의 TNF- α 와 IL-1 β 의 생성량을 비교하면 낮은 수준이었으며, 이는 자극받은 림프구 및 단구에서도 마찬가지로 낮게 측정되어 IL-1 β 가 TNF- α 보다 적게 분비된

다는 것을 나타내었다.

이러한 반응을 전체적으로 고찰하면 세균 자극은 림프구 및 단구의 정상적인 cytokine의 형성 양태에 영향을 주어 강한 자극에 대하여 IL-1 β 및 TNF- α 의 합성을 억제하는 형태로 나타나며, 또한 림프구 및 단구가 동시에 존재하는 경우에는 이들 cytokine이외에 다른 여러 cytokine을 분비하여 상호 영향을 미쳐서 숙주의 면역 반응을 변화시킨다고 추정할 수 있다.

감염 근관에서 분리되는 혐기성 세균이 배양 세포에 미치는 독성 효과에 관한 연구로서 Yamasaki 등³⁴⁾은 *P. endodontalis*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*와 *Fusobacterium nucleatum*의 초음파 추출물을 치근 섬유아세포에 첨가한 결과 *P. gingivalis*와 *F. nucleatum*에서 다른 균주에 비하여 세포의 성장 억제가 강하게 나타났다고 하였다. *P. intermedia*를 배양한 세포에 비교적 낮은 농도로 첨가한 경우에는 세포의 성장이 억제되지 않는다는 보고도 있다^{34,35)}. Yamasaki 등³⁴⁾의 연구에서는 치근 섬유아 세포를 역상 현미경으로 관찰시 *P. gingivalis*의 초음파 추출물을 첨가한 경우에는 거의 모든 세포에서 섬유아세포의 특징적인 형태가 소실되고 둥근 형태로 변성된 반면, *P. intermedia*를 첨가한 경우에는 일부 세포에서 둥근 형태의 변성이 관찰되었다. 이는 세포의 형태에서 이미 상당한 변화가 있는 후에야 세포의 성장이 영향을 받음을 의미한다.

본 연구에서는 열로 처리한 세균액 및 세균의 초음파 처리한 단백질 추출액이 세포에 미치는 형태학적인 영향을 관찰하였다. 단핵구 및 단구와 림프구에서 IL-1 β 와 TNF- α 의 분비량이 대조군과 달라질 때에 나타나는 세포 전체의 형태 및 미세 구조상의 변화를 연결하여 해석하고자 하는 목적으로 영구 세포주인 HL-60과 J774A.1세포주를 대상으로 역상 현미경 및 투과전자현미경을 이용하였다.

본 연구에서 사용한 HL-60세포주는 림프구에서 기원한 영구 세포주이다. 광학 현미경하에서는 3종류의 세균에서 세균액 및 세균 단백질 추출물이 세포에 나타내는 독성은 세포의 과립형 변성 및 형태의 파손, 세포의 균집화 등의 특징으로 나타났다. 관찰 시야에 따라서 비교적 정상으로 보이는 세포도 간혹 관찰되었으며, 이러한 현상은 Yamasaki 등³⁴⁾의 연구에서도 나타난 소견과 일치하는 것으로 세포가 완전히 괴사되는 경우를 제외하면 세포가 독성 물질에 대하여 나타내는 반응은 개개의 세포에서 약간 다르게 나타났다. 광학 현미경하에서는 3종의 세균에 따른 세포 독성의 뚜렷한 차이는 발견하지 못하였으며, *P. intermedia* 세균액을 첨가한 경우에서 가장 심한 세포의 손상을 보여 세포의 성장이 억제되고 세포의 형태도 파괴되었으며, 세포 및 세균액의 균집을 관찰할 수 있었다.

본 연구를 진행하는 과정에서 이들 두 가지 세포주에 대하여 세균액 및 세균 단백질 추출액을 첨가하여 IL-1 β 및 TNF- α 의 생성을 측정하였는데, 어떤 경우에서도 이들 두

가지 cytokine의 생성을 확인할 수 없었으나, 광학 현미경 하에서는 전술한 바와 같은 형태학적 변화를 관찰하였다. 이러한 결과로 미루어 말초 혈액 단핵구 및 단구와 림프구에서 IL-1 β 및 TNF- α 를 생성하지 않은 실험군의 세포들도 이와 유사한 형태학적인 손상을 보였을 것으로 추정할 수도 있으므로, 본 실험에 사용한 세균 단백질 추출액의 농도는 세포가 건강하게 생존하여 면역 반응을 조절할 수 있는 농도 이상이었을 가능성도 배제할 수 없다.

3종의 세균 중에서 *P. intermedia*를 선택하여 전자현미경으로 미세 구조의 변화를 관찰한 이유는 이 세균이 *P. gingivalis*에 비하여 세포에 미치는 손상의 강도가 약하기 때문에^{34,35)} 세포 손상의 초기 반응을 관찰할 목적이었다. 이 세포는 대식 세포에서 기원한 세포주로서 정상 대조군의 세포에서도 세포질 내에 다수의 공포 및 탐식 소체를 관찰할 수 있었다. 세포와 세포간에는 microvilli가 돌출되어 있었고 인접한 세포 사이에는 분비된 혹은 탐식한 vesicle이 관찰되었다.

*P. intermedia*의 세균액을 첨가하여 배양한 경우에는 세포의 미세 구조의 변화가 나타나 Fig. 17에서와 같은 세포의 수축 변성이 일어났다. 또한 상단에서 관찰되는 세포에서는 핵 chromatin의 농축이 관찰되었으며 마치 모자와 같은 모양으로 핵의 분절 및 핵막 외부로 돌출되는 듯한 양상을 보이면서 세포막의 형태는 그대로 유지되어 apoptosis에서 나타나는 특징적인 소견^{36,37)}과 유사하였다. 이와는 달리 Fig. 18의 세포에서는 세포의 심한 수축과 더불어 세포내 소기관이 밀접하게 분포되어 정상적인 세포에 비하여 전자 밀도가 강하게 관찰되었다. 반면, 세균 단백질 추출액을 첨가한 경우인 Fig. 20에서 관찰되는 세포에서는 핵 chromatin이 변연으로 이동하고 핵의 전자밀도가 정상 대조군에 비하여 현저하게 감소하면서 세포가 Fig. 17에서 관찰된 경우와는 반대로 부종의 양상을 보이면서 세포막이 파괴되어 괴사되는 형태를 보였다. 또한 Fig. 20의 상단에 관찰되는 세포에서는 세포막의 균일성도 온전하게 유지되고 정상적인 세포에서 관찰되는 microvilli도 관찰되었다.

이러한 관찰을 통하여 동일한 자극 하에서도 세포에 따라 반응하는 정도가 다르고 그에 따라 광학 현미경하에서 나타나는 전반적인 세포 손상의 형태는 손상 받은 세포와 비교적 정상인 세포와의 비율에 의하여 결정될 수 있으며, 이러한 비교적 정상적인 세포가 기능을 유지하면서 cytokine을 비롯한 생물학적인 활성을 지닌 물질을 분비함으로써 숙주의 항상성을 유지한다고 추정할 수 있었다.

감염된 근관에서는 본 실험에 사용한 3종의 세균 뿐 아니라 여러 종류의 세균이 다양한 빈도로 보고되고 있으며, 아직 어떤 세균이 가장 근관 감염에서 주요한 역할을 하는지는 규명되어 있지 않다. 따라서 이들 세균 뿐 아니라 감염 근관에서 분리되는 다른 세균들에 대하여도 이들 세균이 cytokine의 생성에 관여하는 역할 및 혈액 세포에 직접적으

로 미치는 영향에 관한 통합적인 연구를 통하여 세균과 치근단 질환과의 상관성에 관한 인과관계를 규명하려는 노력이 필요하다고 사료된다.

V. 결 론

감염된 치수 및 치근단 조직에서 분리되는 세균으로 표준 균주인 *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*와 *P. intermedia*의 면역 반응에서의 역할을 규명하기 위하여 열로 사멸시킨 세균 및 세균에서 추출된 단백질로 사람의 말초 혈액에서 분리한 단핵구, 림프구 및 단구를 처리하여 생성된 IL-1 β 와 TNF- α 를 측정하였다. 또한 역상 현미경 및 투과 전자현미경을 이용하여 혈액 세포에서 기원한 영구 세포주에 대한 형태학적인 영향을 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*와 *P. intermedia*에서 추출한 세균단백질은 사람의 말초 혈액 단핵구의 IL-1 β 의 생성을 감소시켰다.
2. *P. gingivalis*의 열로 사멸시킨 세균액 및 세균에서 추출한 단백질은 사람의 말초 혈액 단핵구의 TNF- α 의 생성을 억제하였다.
3. *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*와 *P. intermedia*에서 추출한 세균단백질은 사람의 말초 혈액 단구의 TNF- α 의 생성을 억제하였다.
4. *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*와 *P. intermedia*의 열로 처리한 세균액 및 세균단백질 추출액은 단핵구 세포주인 HL-60과 J774A.1 세포의 과립 변성을 일으키고 정상적인 성장을 억제하였다.
5. *P. intermedia*의 열로 처리한 세균액은 J774A.1 세포의 핵 염색질을 핵의 변연부로 이동시키고 세포의 위축 변성을 유발하였다.
6. *P. intermedia*의 세균단백질 추출액은 J774A.1 세포의 세포막 구조를 파괴하고 세포내소기관을 손상시켜 공포를 형성하고 괴사를 유발하였다.

References

1. Sundqvist G, Johansson E, and Sjogren U. Prevalence of black-pigmented *Bacteroides* species in root canal infections. *J Endodon* 15:13-9, 1989.
2. Manncke B, Werner H, and Lost C. Microbial flora of sinus tracts and root canals of non-vital teeth. *Endodon Dent Traumatol* 11:15-9, 1995.
3. Takada H, Mihara J, Morisaki I, and Hamada S. Induction of interleukin-1 and -6 in human gingival fibroblast cultures stimulated with *Bacteroides* lipopolysaccharides. *Infect Immun* 59:295-301, 1991.
4. Bertolini DR, Nedwin GE, Bringman TS, Smith DD, and Mundy GR. Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation in vitro by human tumor necrosis factors. *Nature* 319:516-8, 1986.

5. Nishihara T, Ishihara Y, Noguchi T, and Koga T. Membrane IL-1 induces bone resorption in organ culture. *J Immunol* 143:1881-6, 1989.
6. van Winkelhoff AJ, van Steenberghe TJM, and De Graaff J. The role of black-pigmented *Bacteroides* in human oral infections. *J Clin Periodontol* 15:145-55, 1988.
7. Maryland D, Mouton D, and Holt C. Biology of asaccharolytic black-pigmented *Bacteroides* species. *Microbiol Rev* 52:134-52, 1992.
8. Zambon JC, DeLuca C, Slots J, and Genco R. Studies of leukotoxin from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* using the promyelocytic HL-60 cell line. *Infect Immun* 40:205-212, 1983.
9. Oppenheim JJ, Zachariae COC, Mukaida N, and Matsushima. Properties of the novel proinflammatory supergene "intercime" family. *Annu Rev Immunol* 9:617-622, 1991.
10. Bendtzen K. Interleukin 1, interleukin 6, and tumor necrosis factor in infection inflammation and immunity. *Immunol Lett* 19:183-92, 1988.
11. Page RC, Wahl SM, and Wahl LM. Modulation of fibroblast growth and function by monokines and lymphokines. *Lymphokines* 2:179-201, 1981.
12. Matsushita K, Tajima T, Tomita K, Takada H, Nagaoka S, and Torii M. Inflammatory cytokine production and specific antibody responses to lipopolysaccharide from endodontopathic black-pigmented bacteria in patients with multilesional periapical periodontitis. *J Endodon* 25:795-9, 1999.
13. Gowen M, Wood DD, Mundy GR, and Russel RGG. Studies on the actions of interleukin-1 on bone metabolism: IL-1 stimulation of bone cell proliferation, and inhibition of IL-1-induced bone resorption by interferon- γ . *Br J Rheum* 24:147-9, 1985.
14. Thomson BM, Mundy GR, and Chambers TJ. Tumor necrosis factor α and β induce osteoblastic cells to stimulate osteoblastic bone resorption. *J Immunol* 138:775-9, 1987.
15. Stashenko P, Obernesser MS, and Dewhirst FE. Effects of immune-cytokines on bone. *Immunol Invest* 145:239-49, 1989.
16. Panagakos FS, Hinojosa LP, and Kumar S. Formation and mineralization of extracellular matrix secreted by an immortal human osteoblastic cell line: modulation by tumor necrosis factor-alpha. *Inflammation* 18:267-84, 1994.
17. Evan DB, Bunning RAD, Van Damme J, and Russell RGG. Natural human interleukin-1 β exhibits regulatory actions on human bone-derived cells in vitro. *Biochem Biophys Res Comm* 159:1242-8, 1989.
18. Gomes BPFA, Drucker DB, and Lilley JD. Association of specific bacteria with some endodontic signs and symptoms. *Int Endodon J* 27:291-8, 1994.
19. Sjogren U, Hanstrom L, Happonen RP, and Sundqvist G. Extensive bone loss associated with periapical infection with *Bacteroides gingivalis*: a case report. *Int Endodon J* 23:254-62, 1990.
20. van Winkelhoff AJ, van Steenberghe TJM, and De Graaff J. *Porphyromonas (Bacteroides) endodontalis*: its role in endodontal infections. *J Endodon* 18:431-4, 1992.
21. Abou-Rass M and Bogen G. Microorganism in closed periapical lesions. *Int Endodon J* 31:39-47, 1998.
22. Bogen G and Slots J. Black-pigmented anaerobic rods in closed periapical lesions. *Int Endodon J* 32:204-210, 1999.
23. Matsuchita K, Nagaoka S, Arakaki R, Kawabata Y, Iki K, Kawagoe M and Takada H. Immunobiological activities of a 55-kilodalton cell surface protein of *Prevotella intermedia*

- ATCC 25611. Infect Immun 62:2459-69, 1994.
24. Hazuda D, Webb RL, Simon P, and Young P. Purification and characterization of human recombinant precursor interleukin 1 β . J Biol Chem 26:1689-93, 1989.
 25. Kostura MJ, Tocc MJ, Limjuco G, Chin J, Cameron P, Hillman AG, Charain NA and Schmidt JA. Identification of a monocyte specific preinterleukin1 β contertase activity. Proc Natl Acad Sci USA 86:5227-31, 1989.
 26. Cohen MC and Cohen S. Cytokine function. A study in biologic diversity. Am J Clin Pathol 105:589-598, 1996.
 27. Richards D and Rutherford RB. The effects of interleukin 1 on collagenolytic activity and prostaglandin-E secretion by human periodontal-ligament and gingival fibroblast. Arch Oral Biol 33:237-43, 1988.
 28. Postlethwaite AE, Raghow R, Stricklin GP, Poppleton H, Seyer JM, and Kang AH. Modulation of fibroblast functions by interleukin 1: increased steady-state accumulation of type I procollagen messenger RNAs and stimulation of other functions but not chemotaxis by human recombinant interleukin 1 α and β . J Cell Biol 106:311-8, 1988.
 29. Tamura M, Nagaoka S, and Kawagoe M. Interleukin-1 stimulates interstitial collagenase gene expression in human dental pulp fibroblasts. J Endodon 22:240-3, 1996.
 30. Matsushita K, Tajima T, Tomita K, Abeyama K, Maruyama I, Takada H, and Nagaoka S. Inflammatory cytokine production and specific antibody responses against possible causative bacteria in patients with multi-lesional periapical periodontitis. J Endodon 24:817-821, 1998.
 31. Miki Y, Shimauchi H, Fujimoto N, Fukai T, Harada Y and Okada H. Prostaglandin E2 and interleukin-1 α concentrations in periapical exudates from root canals with periapical periodontitis in humans: relationship to clinical findings. Jpn J Conserv Dent 38:258-65, 1995.
 32. Kawashima N and Stashenko P. Expression of bone-resorptive and regulatory cytokines in murine periapical inflammation. Arch Oral Biol 44:55-66, 1999.
 33. Fouad AF. IL-1 α and TNF- α expression in early periapical lesions of normal and immunodeficient mice. J Dent Res 76:1548-54, 1997.
 34. Yamasaki M, Nakata K, Imaizumi I, Iwama A, Nakane A, and Nakamura H. Cytotoxic effect of endodontic bacteria on periapical fibroblasts. J Endodon 24:534-9, 1998.
 35. Layman DL. Growth inhibitory effects of endotoxins from *Bacteroides gingivalis* and intermedium on human gingival fibroblasts in vitro. J Periodontol 58:387-92, 1986.
 36. Mangan DF, Taichman NS, Lally ET, and Wahl SM. Lethal effects of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin on human T lymphocytes. Infect Immun 59: 3267-72, 1991.
 37. Dive C, Gregory CD, Phipps DJ, Evans DL, Milner AE, and Wylie AH. Analysis and discrimination of necrosis and apoptosis(programmed cell death) by multiparameter flow cytometry. Biochem Biophys Acta 1133:275-81, 1992.

사진부도 설명

- Fig. 1. HL-60 cells in control culture ($\times 400$).
- Fig. 2. HL-60 cells incubated with heat-killed *A. actinomycetemcomitans* (1×10^4 bact./mL) for 40 hours showed alteration of morphology ($\times 400$).
- Fig. 3. HL-60 cells incubated with sonic extract of *A. actinomycetemcomitans* ($30 \mu\text{g/mL}$) for 40 hours showed granular degeneration ($\times 400$).
- Fig. 4. HL-60 cells exposed to heat-killed *P. gingivalis* (1×10^4 bact./mL) for 40 hours showed granular degeneration ($\times 400$).
- Fig. 5. HL-60 cells exposed to sonic extract of *P. gingivalis* ($30 \mu\text{g/mL}$) for 40 hours showed degeneration and cellular aggregation ($\times 400$).
- Fig. 6. HL-60 cells incubated with heat-killed *P. intermedia* (1×10^4 bact./mL) for 40 hours showed granular degeneration ($\times 400$).
- Fig. 7. HL-60 cells exposed to sonic extract of *P. intermedia* ($30 \mu\text{g/mL}$) for 40 hours showed degeneration and cellular aggregation ($\times 400$).
- Fig. 8. J774A.1 cells in control culture ($\times 400$).
- Fig. 9. J774A.1 cells incubated with heat-killed *A. actinomycetemcomitans* (1×10^4 bact./mL) for 40 hours showed granular degeneration ($\times 400$).
- Fig. 10. J774A.1 cells incubated with sonic extract of *A. actinomycetemcomitans* ($30 \mu\text{g/mL}$) for 40 hours showed altered cell morphology ($\times 400$).
- Fig. 11. J774A.1 cells exposed to heat-killed *P. gingivalis* (1×10^4 bact./mL) for 40 hours showed granular degeneration ($\times 400$).
- Fig. 12. J774A.1 cells exposed to sonic extract of *P. gingivalis* ($30 \mu\text{g/mL}$) for 40 hours showed degeneration and cellular aggregation ($\times 400$).
- Fig. 13. J774A.1 cells incubated with heat-killed *P. intermedia* (1×10^4 bact./mL) for 40 hours showed granular degeneration and necrosis ($\times 400$).
- Fig. 14. Transmission electron microscopy (TEM) of J774A.1 cells in control culture ($\times 13,000$).
- Fig. 15. TEM of J774A.1 cells in control culture. Cells exhibited typical morphological characteristics of macrophage ($\times 13,000$).
- Fig. 16. TEM of J774A.1 cells in control culture. Microvilli and secretory vesicles were observed ($\times 31,200$).
- Fig. 17. TEM of J774A.1 cells exposed to *P. intermedia* (1×10^4 bact./mL) for 24 hours exhibited shrinkage and nuclear fragmentation ($\times 13,000$).
- Fig. 18. TEM of J774A.1 cells exposed to *P. intermedia* exhibited shrinkage and chromatin condensation ($\times 31,200$).
- Fig. 19. TEM of phagosome containing electron dense materials from J 774A.1 cells exposed to *P. intermedia* ($\times 65,000$).
- Fig. 20. TEM of J774A.1 cells exposed to sonic extract ($30 \mu\text{g/mL}$) of *P. intermedia* demonstrated chromatin margination, loss of plasma membrane integrity and significant cytoplasmic vacuolization ($\times 13,000$).
- Fig. 21. TEM of J774A.1 cells exposed to sonic extract of *P. intermedia* showed relatively normal feature ($\times 31,200$).

사진부도 ①

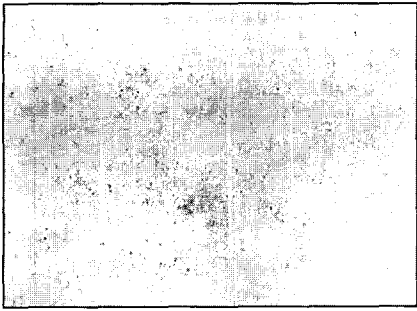


Fig. 1

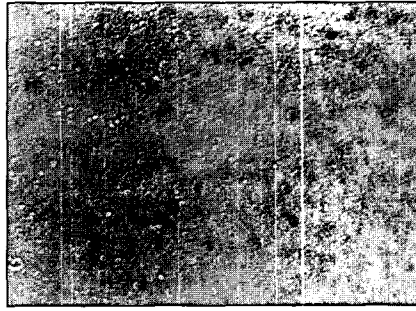


Fig. 2



Fig. 3

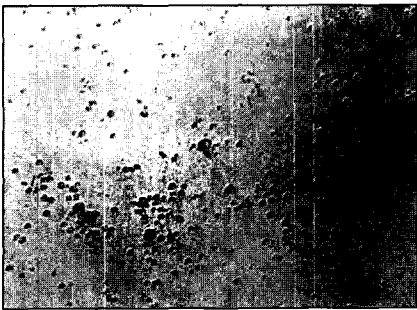


Fig. 4

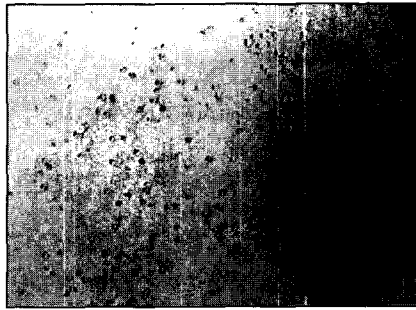


Fig. 5

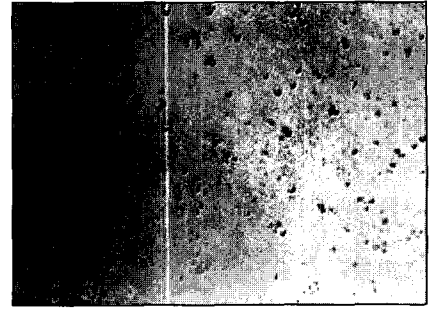


Fig. 6



Fig. 7



Fig. 8



Fig. 9

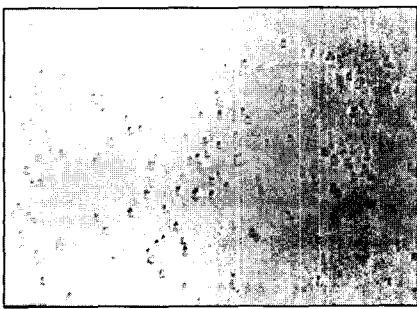


Fig. 10

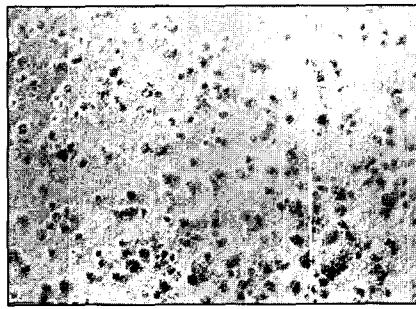


Fig. 11

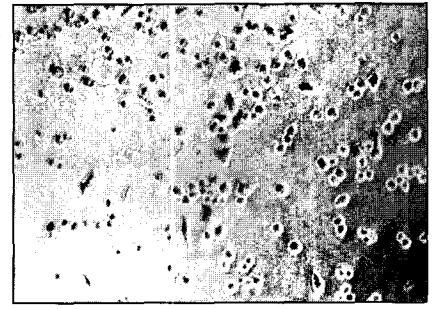


Fig. 12

사진부도 ②

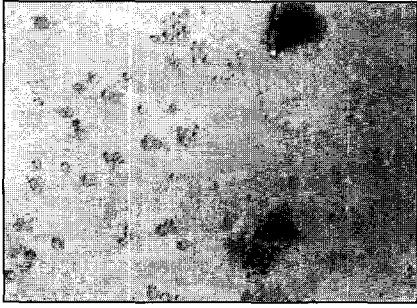


Fig. 13

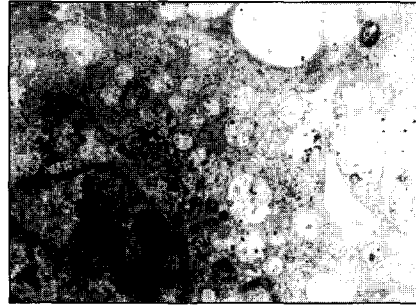


Fig. 14



Fig. 15

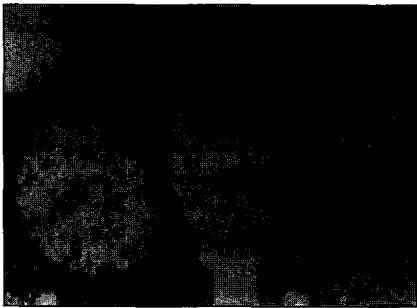


Fig. 16

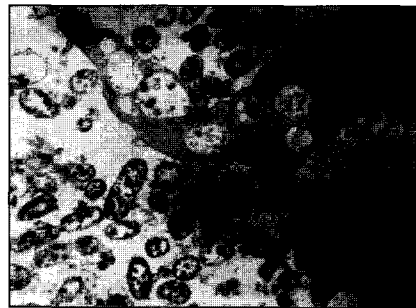


Fig. 17



Fig. 18



Fig. 19



Fig. 20



Fig. 21