

*Actinobacillus actinomycetemcomitans*의 유전자형의 유용성과 세포 독성에 관한 연구

조월순 · 정민호 · 이상화 · 황희성^{1*}

동아대학교 의과대학 미생물학교실, ¹치과학교실

A study on the practicability of genotyping and cytotoxicity of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* isolated from periodontal patients

Wol-Soon Jo, Min-Ho Jeong, Sang-Hwa Lee and Hie-Sung Hwang^{1*}

Dong-A University College of Medicine, Department of Microbiology, ¹Department of Dentistry

Abstract

The purpose of this study was to evaluate the genotypic characterization of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*) using arbitrarily primed polymerase chain reaction (AP-PCR), to investigate the cytotoxicity of both clinical isolates and standard strains of *A. actinomycetemcomitans* for the human Jurkat T cells, and to measure the osteoclastogenic cytokines released by Jurkat cells infected with these bacterial strains.

The random sequence primer 15 and 16 could distinguish different AP-PCR profiles between clinical isolates of *A. actinomycetemcomitans*.

A. actinomycetemcomitans significantly suppressed Jurkat cell viability in time dependent fashion and the results of DNA fragmentation assay indicated that this bacterial species induced apoptosis in Jurkat cells. Jurkat cells undergoing apoptosis released the osteoclastogenic cytokine, IL-1 β , IL-6, TNF- α .

These data support the hypothesis that induction of apoptosis is at least one essential step in *A. actinomycetemcomitans* induced local immunosuppressive pathway, and that *A. actinomycetemcomitans* can modulate the immunomodulatory cell population in the periodontal tissue by inducing T cell death through apoptosis, and that apoptosis of local resident T cells may play an active role in bone resorption by releasing osteoclastogenic cytokines, e.g. IL-1 β , IL-6, TNF- α .

Key words – Apoptosis, cytokine, *A. actinomycetemcomitans*

서 론

감염성 질환을 효과적으로 차단하거나 지연시키려면, 우

선 감염원을 파악하고, 아울러 감염자로부터 비감염자에게로 세균이 전이되는 감염경로 및 병인과정을 이해하는 것이 중요하다. 치주질환의 병인론에 관한 연구들이 진행되면서, 병원균으로 가장 주목되고 있는 세균인 *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*)가 생산하는 질병유발 가능성이 있는 독성인자들을 여러 연구자

*To whom all correspondence should be addressed
Tel · 051-240-5471, Fax :051-240-9750
E-mail address: hshwang@daunet.donga.ac.kr

가 보고하였다. Shenker 등은 immunosuppressive factor (ISF, 60kDa)는 mitogen에 의한 T 세포 증식과 면역글로블린 생산을 억제한다고 하였고[23], Kurita-Ochiai 등은 suppressive factor 1 (SFI, 14kDa) 이 T 세포 증식과 cytokine 생산을 저하 시킨다고 하였다[9]. Leukotoxin (115kDa)은 mitogens과 항원에 대한 사람 말초 혈액 단핵세포(PBMC)들의 반응성을 억제하고, lipopolysaccharide (LPS)는 활성화된 대식세포에서 prostaglandin E2 유리하는 과정을 거치는 항원이나 mitogen에 의해 유도된 사람 T 세포 증식을 억제한다고 하였다[3, 16]. 그러나 이제까지 보고된 대부분의 *A. actinomycetemcomitans* 독성인자가 *in vitro*에서 최종적으로 표적에 작용하는 물질이나 이에 반응하는 숙주의 특성에 집중되었으며, 이들 인자가 실제로 질병을 유발시키는지 여부에 대해서는 많은 의문이 제기되고 있어 아직까지 병인과정 에 대한 충분한 해석이 되지 않고 있다. 그러나 한가지 인정되고 있는 사실은 이들 세균이 조직 내로 직접 침투하는 것이 아니라 그들이 생산해 내는 특정 물질이 과도한 면역 반응을 유발시켜 숙주의 면역체계에 손상을 줌으로서 질병이 유발되는 면역병리 현상으로 병인과정을 설명하려는 경향이 있다[21]. 즉 질환의 특성상 숙주의 면역체계와 원인으로 생각되는 세균과의 상호작용이 병인과정에 관여할 것으로 생각하며, 이러한 상호작용으로 환자의 호발 연령이 결정되고, 질환이 다양하게 진행되는 과정을 겪으며 숙주에 따라 유전적인 감수성에 차이가 난다고 해석하고 있다[21]. 숙주의 방어체계는 치주조직에서 세균의 수를 감소시키고 상재균에 의한 치주질환을 예방하는데 기여하며, 치주질환의 병인에서 숙주의 면역체계가 어떤 역할을 하는지 정확히 알려져 있지 않지만, 치주병원균에 대해 세포성 혹은 체액성 면역이 결여되거나 결핍되면 치주질환으로 발전한다는 증거가 있으므로 치주조직에서 세균에 의한 감염의 방위에 면역계가 중요한 역할을 한다는 것이 일반적인 생각이다[22,26,29].

따라서 연구자들은 치주질환의 진행시 lymphoblastic response(임파아구 반응)가 치은부위와 치주조직에 존재하는 세균성 항원에 의해 유도된다는 사실과, 치주질환자의 치주 점막에 림프구가 과도하게 침윤되어 있음을 주목하여[6,14] 첫번째 과제로서 미량의 균점막에서 *A. actinomycetemcomitans*의 염색체 DNA를 분리하고 arbitrary primer-polymerase chain reaction (AP-PCR)을 실시하여 agarose 전기 영동상

에서 우리나라 사람에게 분리되는 유전자형을 조사하여 AP-PCR을 이용한 유전자 형 분류의 유용성을 검증하고자 하였다. 두 번째 과제로는 이 균이 생산하는 과도한 면역반응을 유발하는 물질[7]의 영향을 조사하기 위한 전단계 연구로서 표준 균주와 임상 분리 균주의 균체에 대하여 Jurkat 세포가 세포독성을 보이는가를 조사하였으며 동시에 이 세포주가 생산한 cytokine의 종류를 조사함으로써 치주질환이 진행됨에 따라 치주조직에서 보이는 lymphoblastic response와 치주골 흡수에 의한 치아상실의 원인에 대해 설명하고자 하였다.

재료 및 방법

균주 및 세포주

본 연구에 사용된 표준균주 *A. actinomycetemcomitans* ATCC 29522, 43717, 43718, 43719는 ATCC(American type culture collection)에서 구입하였고, 동아대학교 병원 치과에 내원한 환자와 건강인의 치주조직에서 임상 균주를 분리하기 위해 Table 1의 trypticase soy bacitracin vancomycin (TSBV) 배지와 tedduced transport fluid (RFT) 배지를 사용하여 37°C, 10% CO₂ 배양기에서 3일간 배양하였다. 분리된 임상 균주를 실험에 이용할 때는 brain heart infusion (BHI)을 사용하여 배양하였다. 사람유래 T 세포주인 Jurkat는 한국 세포주 은행에서 분양 받아 사용하였다.

임상분리주의 동정

분리 균주의 동정을 위한 생화학적 성상 시험은 "Bergeys's Manual of Systematic Bacteriology (Vol. 2)를 참고로 하여, MacConkey배지에서의 생육여부, catalase 검사, indole 생성여부와 fructose 발효 여부를 확인하였다. 최종적으로 API 20E test kit(Biomériux)를 이용하여 확인하였다.

표준균주 및 임상분리균주의 혈청형

항혈청 준비

항원의 제조를 위하여 표준균주 ATCC 43717(혈청형 a), 43718(혈청형 b), 43719(혈청형 c)를 BHI 배지에 각각 접종하여 37°C, 10% CO₂ 배양기에서 3일간 배양하고, 배양액을 4°C에서 16,000g로 15분간 원심분리하여 세포침사를 얻었다. PBS로 3회 세척하여 세균현탁액을 준비하고 0.5ml부터

Table 1. Fomular of medium for isolating *A. actinomycetemcomitans* from patients and students

TSVB media (100ml)		RTF media (100ml)	
Tryptic soy broth	3 g	Stock minimal salt solution no. 1; 0.6% K ₂ HPO ₄	7.5 ml
Tryptic soy agar	1.2 g	Stock minimal salt solution no. 2; 1.2% NaCl, 1.2% (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0.6% (KH ₂)SO ₄ , 0.25% MgCl ₄	7.5 ml
Yeast extract	0.1 g	0.5M EDTA	0.2 ml
Horse serum	10 ml	8% Na ₂ CO ₃	0.5 ml
Vancomycin (stock; 7.5mg/ml)	10 ml	1% DTT	2 ml
Bacitracin (stock; 7.5mg/ml)	0.1 ml	0.1% resazurin	0.1 ml

2.0ml까지 양을 증가시키면서 토끼 이정맥에 1주일 간격으로 총8회 주사한 다음 현탁액 2.0 ml를 연속 3회 주사하였다. 1주일 후 심장 채혈하여 혈청을 분리한 다음, 면역흡착으로 항혈청 내의 비특이 물질을 제거하였다.

Serotype 결정

혈청형을 확인하기 위하여 각각의 항혈청을 96 well microplate에서 PBS로 계단희석하였다. 각 혈청형의 희석액에 확인하고자하는 항원 100 μ l를 첨가하고 37 $^{\circ}$ C에서 약 2시간 반응시킨 후 응집여부를 관찰하였다. 그리고 ELISA로 혈청형을 결정하기 위하여 580nm에서 OD값이 0.25-0.3 nm되게 0.1M NaCO₃ buffer(pH9.6)로 각각의 항원을 조절하고 각 well에 50 μ l씩 첨가하여 37 $^{\circ}$ C배양기에 2시간 동안 두어 항원을 부착시키고, 0.05% Tween 20을 포함하는 PBS (PBS-T)로 3회 세척하였다. 그리고 항원이 부착된 각 well에 3% 소의 혈청 알부민(bovine serum albumin)이 들어있는 PBS로 blocking하고 PBS-T로 다시 3회 세척하였다. 준비된 항혈청을 각 혈청형별로 계단희석하여 50 μ l씩 첨가하고 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 반응시켰다. 다시 PBS-T로 4회 세척하고 alkaline phosphatase가 부착된 2차항체를 PBS-T로 1000배 희석하여 50 μ l씩 첨가하였고, 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 반응시킨 후 PBS-T로 5회 세척하였다. *p*-NPP(*p*-nitrophenyl phosphate, Sigma)가 첨가된 기질용액을 50 μ l씩 첨가한 후 발색반응이 나타나면 3M NaOH를 50 μ l씩 첨가하여 반응을

정지시킨 다음 ELISA reader로 405nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

표준균주 및 임상분리균주의 AP-PCR을 통한 유전자형

4개의 표준균주 및 임상분리균주를 BHI배지 10ml에 37 $^{\circ}$ C, 10% CO₂ 조건으로 3일간 배양하였고, 배양액 1.5ml씩을 microcentrifuge tube로 옮겨서 13,000g, 10분간 원심분리하였다. TE buffer (10mM tris HCl, 1mM EDTA pH 8.0) 600 μ l를 넣고 균체를 현탁시킨 다음 10% SDS(sodium dodecyl sulfate, sigma) 30 μ l를 첨가하여 잘 혼합하고, 37 $^{\circ}$ C에서 약 1시간 반응시켰다. 5M NaCl 100 μ l를 첨가하여 완전히 혼합한 다음 CTAB/NaCl(NaCl, 10% hexadecyl trimethyl ammonium bromide)용액을 80 μ l 더하여 혼합한 후 65 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응하였다. Chloroform/isoamy alcohol (24:1) 혼합액을 넣고 4 $^{\circ}$ C에서 13,000g로 15분간 원심분리하여 상층액을 얻은 다음 phenol/chloroform/isoamy alcohol (25:24:1)로 반복하여 단백을 제거하였다. Isopropanol을 첨가하고 잘 혼합한 다음 -20 $^{\circ}$ C에서 하룻밤 방치하고, 13,000g, 4 $^{\circ}$ C, 15분간 원심분리하여 상층액을 제거하고 침사를 70% ethanol로 세척하였다. TE buffer 100 μ l로 침사를 녹여 RNase로 처리한 후 0.7% agarose gel 전기영동 상에서 DNA band를 확인하였다.

AP-PCR을 수행하기 위해 4개의 표준균주와 분리균주들의 DNA를 0.4 μ g/ μ l 농도로 희석하여 template DNA로 사

용하였고, 증폭을 위하여 16개의 random single primer (Bioneer, Korea)를 사용하였다(Table 2). PCR 반응은 PCR premix-Top K-2014 (100unit-0.5ml microtube, 20ml reaction: Bioneer, Korea)에 template DNA(0.4µg/µl bacterial genomic DNA)와 20pmole primer를 혼합한 후 mineral oil로 중층하여 PCR을 실행하였다. PCR은 94℃에서 5분간 pre-denaturation 시키고 첫 번째 cycle은 94℃에서 1분간 denaturation 시켰고 36℃에서 2분간 annealing하였고 72℃에서 2분간 extension시켰다. 두 번째부터 35번째 cycle까지는 94℃에서 1분간 denaturation 시켰고 42℃에서 2분간 annealing하였고 72℃에서 2분간 extension시켰고 마지막 cycle의 extension은 72℃에서 10분간 실시한 다음 1% agarose gel상에서 확인하였다.

세포주의 균 감염

RPMI 1640 배지(Sigma)에 sodium bicarbonate(0.2%)와 우태아 혈청(10%)를 첨가한 것을 Jurkat 세포주 배양을 위한 완전배지로 사용하였다. 균은 2500 rpm으로 20분간 원심하고 침사를 우태아 혈청이 들어있지 않은 RPMI-1640배지로 2회 세척하여 2X10⁶CFU/ml이 되게 농도를 맞춘 다음 Jurkat 세포주에 접종하고 37℃, 5% CO₂ 조건하에서 배양하였다.

Cell viability

세포를 0.25%의 trypan blue (Sigma)로 염색하고 5분간 방치한 다음 hemocytometer를 이용하여 광학현미경으로 살아있는 세포수를 세었다.

DNA fragmentation 확인을 위한 DNA추출 및 전기영동

Jurkat 세포주를 원심하여 회수하고 침사는 2.5 ml의 NET (150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 50 mM Tris · HCl[pH7.5]) 완충액으로 현탁시킨 다음 proteinase K와 SDS를 각각 200 µg/ml 및 1% 되도록 첨가하여 55℃ 수조에서 하룻밤 동안 반응시켰다. 포화된 NaCl을 675 µl 넣고 15초 동안 진탕한 후 8000 rpm으로 20분간 원심하여 상층액을 따로 모았다. Tris 완충액으로 포화시킨 phenol을 2.5 ml넣고 1시간 동안 흔들어서 잘 섞이게 하고 3000 rpm으로 20분간 원심 분리한 다음 상층액에 2.5 ml의 phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1)로 15분간 재처리하였다. 상층액에 2배 용량의 냉 ethanol을 넣고 4℃에서 하룻밤 동안 방치하여 DNA를 침전시키고 14,000 rpm으로 원심하여 침사를 모아 TE 완충액에 녹였다. 260nm와 280nm 에서 OD 값이 1.7 이상인 시료만을 RNase로 1시간 처리하여 전기 영동 완충액과 잘 섞어 ethidium bromide가 첨가된 2% agarose gel에서 1시간 동안 전기 영동하였다. DNA 분자량 측정을 위한 marker로는 DNA molecular weight marker VIII (Boehringer Mannheim)를 사용하였다.

Cytokine의 정량적 분석

Jurkat 세포주를 well당 2×10⁶cell이 되게 맞추고 균(bacterium/cell ratio of 500:1)을 접종하였다. 세포 배양 배지에서 정해진 시간에 배양액을 채취하여 -70℃에 보관하였다가 적정량의 검체가 모이면 ELISA 방법으로 정량적 분석을 실시하였다. 사람 cytokine에 대한 항체를 96 well

Table 2. The base sequences of the 16 primers for AP-PCR

Primer	Nucleotides sequences	Primer	Nucleotides sequences
1	5'-CAG-GCC-CTT-C-3'	9	5'-CAA-TCG-CCT-GT-3'
2	5'-TGC-CGA-GCT-G-3'	10	5'-TCG-GCG-ATA-G-3'
3	5'-AAT-CGG-GCT-G-3'	11	5'-TTC-CGA-ACC-C-3'
4	5'-AGG-GGT-CIT-G-3'	12	5'-AGG-TGA-CCG-T-3'
5	5'-GAA-ACG-GGT-G-3'	13	5'-AGC-CAG-CGA-A-3'
6	5'-GTG-ACG-TAG-G-3'	14	5'-GAC-CGC-TTG-T-3'
7	5'-GGG-TAA-CGC-C-3'	15	5'-GTT-GCG-ATC-C-3'
8	5'-GTG-ATC-GCA-G-3'	16	5'-CAG-CAC-CCA-C-3'

plate에 4℃에서 하루밤 동안 부착하고 PBS-T로 2회 세척한 후 3% BSA를 포함한 PBS로 실온에서 2시간동안 blocking 하였다. 정량적 측정을 위해 정해진 농도로 2배 계단 희석한 standard cytokine이나 검체를 각 well에 100 μl 씩 넣고 실온에서 4시간 반응시킨 다음 PBS-T로 4회 세척하였다. Biotin이 부착된 2차 항체를 각 well에 100 μl 씩 넣고 실온에서 1시간 반응 시킨 다음 streptavidin-HRP를 첨가하여 1시간 반응 시킨 후 PBS-T로 5회 세척하였다. 여기에 TMB (1,1' trimethylene-bis(4-formylpyridinium bromide) dioxime)를 넣어 어두운 곳에서 30분간 반응시키고 0.15M H₂SO₄를 첨가하여 반응을 정지시킨 후 spectrophotometer (Molecular Devices, Sunnyvale, CA)로 450 nm에서 흡광도를 측정하고, 표준곡선을 이용하여 생산된 cytokine의 양을 산출하였다.

결 과

표준균주 및 임상분리균주의 형태적 특징 및 생화학적 성장

형태적 특징

본 연구에 사용된 표준균주 *A. actinomycetemcomitans* ATCC 29522, 43717, 43718, 43719와 임상 분리 균주들을 BHA 평판배지에서 3일간 배양하였을 때의 집락의 양상은 Fig. 1의 a와 같았다. 특히 임상분리균주는 TSBV 배지에서 특징적으로 집락의 중앙에 이균의 특징적인 inner star 형태를 나타내었으며(Fig. 1의 b), 이를 BHA에서 연속 계대배양할 경우 이 형태는 없어지고, 표준균주와 동일한 양상을 나타내었다. *A. actinomycetemcomitans* 균주의 그람 염색 결과는 그람음성 구, 간균의 형태를 나타내었다.

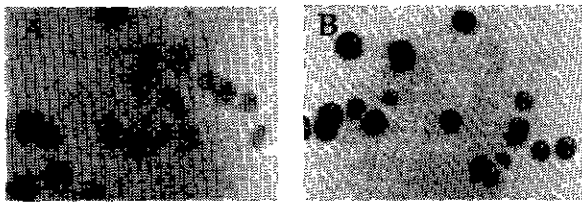


Fig. 1. The colony morphology of *A. actinomycetemcomitans*.
 a) clinical isolates J1 grown on BHA media.
 b) clinical isolates J1 grown on TSBV media.

생화학적 성장

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology에 의한 *A. actinomycetemcomitans*의 일반적인 생화학적 성장 분류기준에 따라 생화학적 성상을 조사한 결과 *A. actinomycetemcomitans*로 동정된 모든 분리균주들은 장내세균 감별에 이용되는 MacConkey배지에 성장하지 않았고, catalase반응에 양성을 나타내었으며 nitrate를 nitrite로 환원시켰다. Oxidase와 urease에는 음성을 나타내었고 indole을 생성하지 않았다. Arginine dihydrolase, lysine decarboxylase에 음성반응을 보였고 glucose, fructose, mannose를 fermentation시켰다.

임상분리균주의 혈청형

병원성과 비병원성의 *A. actinomycetemcomitans*는 5가지의 혈청형으로 분류하는데, 일반적으로 우리나라에서 치주질환과 관련성이 있는 혈청은 혈청형 b로 알려져 있고, 일부 유럽이나 다른 지역에서는 혈청형 a와 c가 치주질환과 관련이 있다는 보고가 있다. 본 연구에 사용된 *A. actinomycetemcomitans* 균주의 혈청형은 응집반응과 ELISA를 통하여 확인한 결과, 분리된 균주 17주 중에 혈청형 a에 속하는 것이 8주, b에 속하는 것이 1주, 혈청형 c에 속하는 것이 8주였다. 슬라이드 응집반응 보다는 ELISA에서 역가 차이가 분명하였으므로 혈청형 결정에는 ELISA 방법이 더 유용함을 확인할 수 있었다.

표준균주 및 임상분리균주의 유전자형

본 연구에 사용된 표준균주와 혈청형이 b인 임상분리균주 J1의 유전자형을 결정하기 위하여 AP-PCR을 실시하였다. 1차적으로 16개의 random primer를 사용하여 가장 유용한 primer를 찾는 실험을 실시하였으며, 그 중 primer-15와 primer-16을 이용한 결과가 균주간의 가장 뚜렷한 전기영동상의 차이를 나타내었다. 임상분리균주 J1은 primer 15에서 비병원성 혈청형 균주 ATCC 43717과 가장 유사한 유전자형을 나타내었고, primer 16의 경우에는 병원성 혈청형 균주 ATCC 29522와 가장 유사한 유전자형을 나타내었다(Fig. 2).

표준균주와 혈청형 a와 b로 확인된 분리균주는 모두가 다른 RAPD 유전자형을 나타내었다(Fig. 3-A). 혈청형 c로 확인된 분리균주에서도 다양한 유전자형을 나타냈으나, 일부 특히 같은 환경에서 많은 시간을 함께보이는 건강인(동

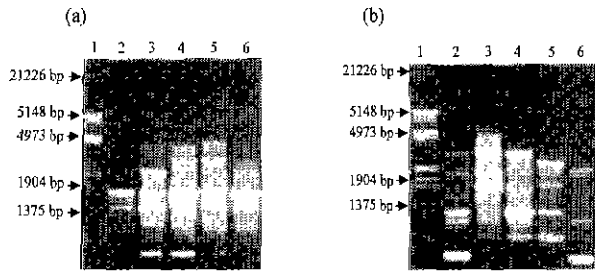


Fig. 2. RAPD patterns of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* standard strains (a) amplified by primer-15 and (b) amplified by primer-16.

Lane 1: Lamda DNA EcoR I Hind III, Lane 2: ATCC 29522, Lane 3: ATCC 43717, Lane 4: ATCC 43718, Lane 5: ATCC 43719, Lane 6: clinical isolate J 1.

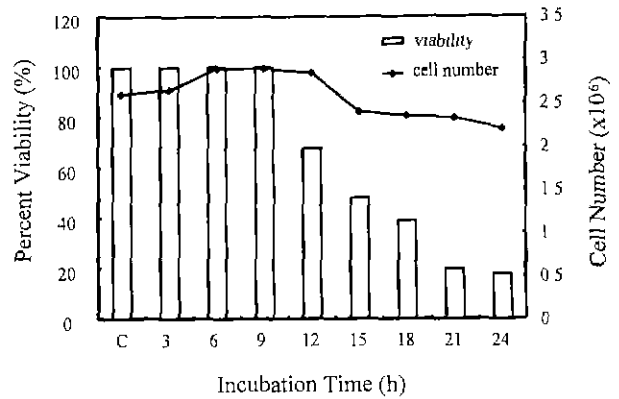


Fig. 4. Percent viability and total cell number of Jurkat cell line infected with *A. actinomycetemcomitans*. One representative experiment out of four is shown.

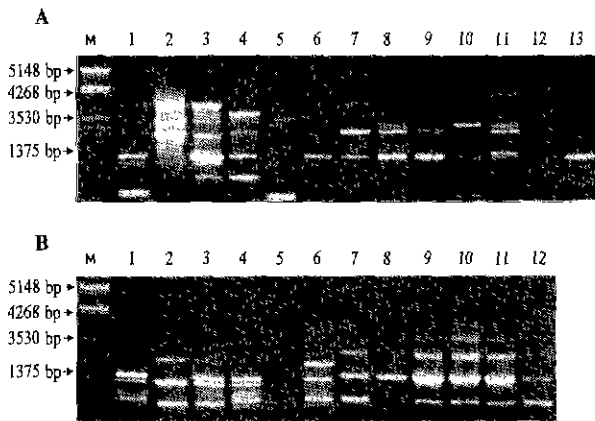


Fig. 3. RAPD patterns of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* clinical isolates. Primer-16 were used.

A. serotype a except lane 1, 3 and 5 which are serotype b, B. serotype c. M: Lamda DNA EcoR I and Hind III.

아의대 학생)에서 분리한 경우에 비교적 일정한 패턴을 보이는 것(그림3-B, lane 2-11)을 관찰할 수 있었다.

*A. actinomycetemcomitans*에 의한 Jurkat 세포주의 생존율 검사

표준 균주인 ATCC 29522, 43717, 43719 균주와 임상 분리균주인 J 1을 대상으로 Jurkat 세포주에 접종하여 세포의 생존율을 조사하였다. ATCC 29522 표준균주는 균 접종 후 12시간에 세포의 생존율이 감소하기 시작하였다(Fig. 4). 세포주의 생존율은 세균과 세포의 비가 500:1일 때 균 접종 후 15시간과 24시간에 각각 68% 와 18%로 감소하였다. 임

상분리균주 J 1도 균 접종 후 12시간부터 세포의 생존율이 감소하였으며(생존율; 82%), 세포주의 생존율은 균 접종 후 15시간과 24시간에 각각 69% 와 33%로 감소하였다. 그러나 혈청형 a와 c에 속하는 ATCC 43717, 43719 균주는 24 시간 내에는 균을 접종하지 않은 대조군과 생존율에 차이가 없었다.

이러한 세포의 생존율 저하가 *A. actinomycetemcomitans* ATCC 29522와 J 1에 의해 Jurkat 세포주가 apoptosis로 유도되기 때문임을 확인하기 위하여 Jurkat세포주의 DNA가 fragmentation이 되는지를 조사하여 *A. actinomycetemcomitans* J 1의 경우에 Fig. 5과 같은 결과를 얻었다. DNA가 fragmentation되는 정도는 균 접종 후 15시간에서 24시간에 증가하였다. 이 결과는 trypan blue 염색약 배제 실험을 실시하였을 때 살아있는 세포의 수가 감소하는 결과와 일치하며, 이는 살아있는 Jurkat 세포주의 감소가 *A. actinomycetemcomitans*에 의해 유도된 apoptosis 때문임을 시사한다. 세포주와 생존율에 차이가 없었던 ATCC 43717 및 43719는 Jurkat 세포주에 apoptosis를 유도하지 못하였다.

Proinflammatory cytokine의 정량

A. actinomycetemcomitans 표준 균주 및 임상분리 균주가 apoptosis를 유도 할 때 Jurkat 세포주가 생산하는 proinflammatory cytokine (IL-1 β , IL-6, IFN- γ , TNF- α , TGF β)의 종류를 조사하고 시간별로 배지 내에 분비되어 측정된 cytokine의 양을 ELISA 방법으로 조사하였다(Fig. 6). 실험 결

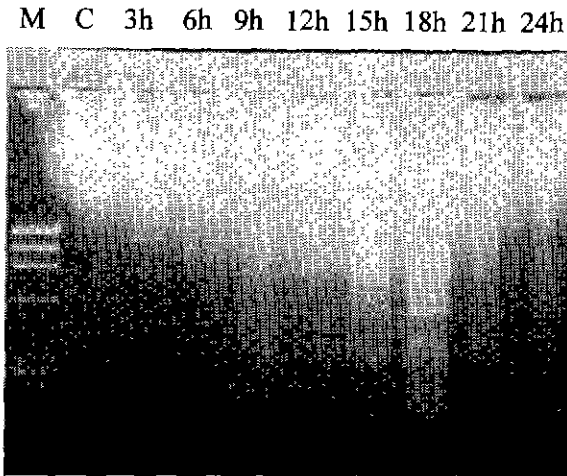


Fig. 5. *A. actinomycetemcomitans* infection induces inter-nucleosomal DNA cleavage. The cellular DNA was isolated at 3 hours intervals from Jurkat cells infected with *A. actinomycetemcomitans* at bacterium/cell ratio of 500:1.

The DNA samples were analysed by using a 2% agarose gel stained with ethidium bromide. Lane C, cellular DNA from uninfected Jurkat cells; lane 3h-24h; cellular DNA isolated at designated time intervals from *A. actinomycetemcomitans* infected Jurkat cells.

과 J1 임상분리균주에 의해 Jurkat 세포주가 강력한 포유동물의 골 용해요소로 알려져 있는 IL-1 β 는 균 감염 후 6시간째부터 TNF- α 는 균 감염 후 3시간후에 생산되었다. 반면에 표준균주인 ATCC 29522는 IL-1 β 는 균 감염 후 6시간째부터, IL-6는 균 감염 후 9시간후에 생산되어, 동일유전자형, 동일 혈청형의 균주간에도 Jurkat 세포주의 cytokine 생산양상에 차이를 보였다. 표준균주인 ATCC 29522와 J1 임상분리균주는 Jurkat 세포주에서 IFN- γ 와 TGF β 의 생산을 유도하지 않았다.

고찰

*A. actinomycetemcomitans*는 그람 음성, 통성혐기성세균으로 심내막염, 뇌막염, 골수염과 치주질환을 포함하는 사람의 질병과 관계가 있으며, 한때는 *Haemophilus*속에 포함시키기도 하였지만 현재는 *Haemophilus*속과는 구별된 *Actinobacillus* 속으로 분류한다[15,20].

1950년대에 치태의 역할에 관한 연구가 시작되어 치주질환

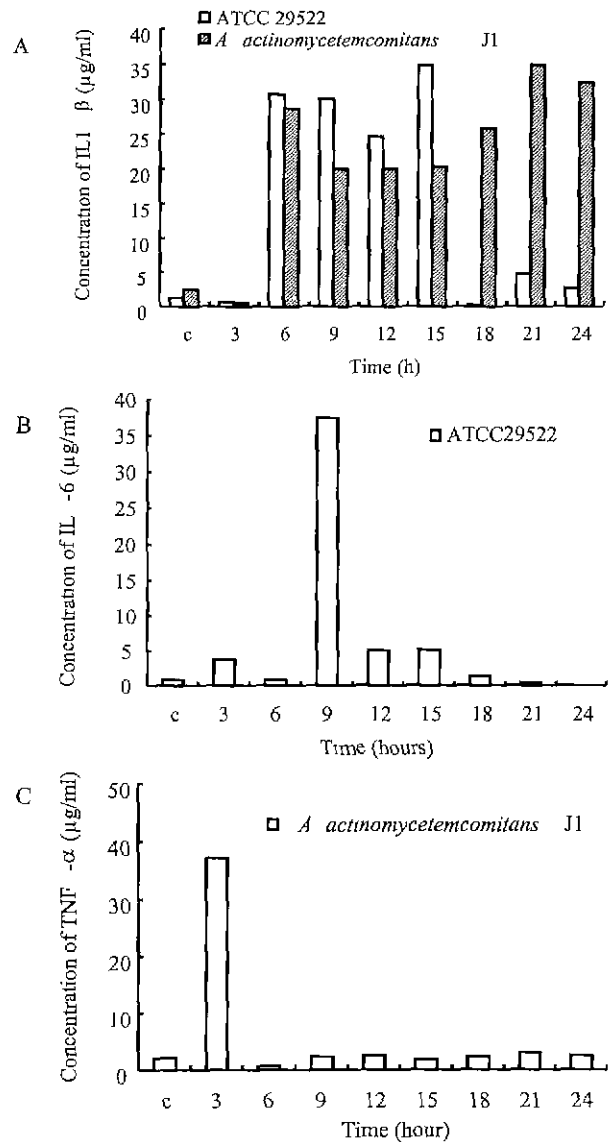


Fig. 6. Effect of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* on the secretion of IL-1 β (A), IL-6 (B) and TNF- α (C) in Jurkat.

Jurkat (5×10^5 cells in 5ml of medium) were infected with ATCC 29522 or J1 for up to 24h. Supernatant were collected and assayed with ELISA. One representative experiment out of four is shown.

환의 연구가 진행되었으나, 1960년대에도 치태는 어떤 환자들에서든지 혹은 어느 부위에서든지 동일한 성분으로 구성되어 있다고 생각하였다. 그러나 치태가 많고 심한 치주염이 있는데도 치주 파괴현상이 일어나지 않고 치태가 거의 없고 임상적으로 염증의 증거가 거의 없는데도 치주조직의

파괴가 심한 경우가 있어 치태의 구성 성분이 일정하다는 생각에 의문을 갖게되었다. Scoransky 등과 Drienzo 등은 치주조직 파괴에 대해 특정 세균이 관여한다고 보고하였는데, 치주질환이 진행되는 치주낭내의 치태세균은 건강한 치은열구역내의 치태세균과 다른 조성성분을 가지고 있으며 각종 치주질환에 따라 각기 다른 특정 세균들이 관여한다고 하였다[2,25]. 1980년대 들어오면서 Slots, Zambon, Moore 등의 연구에 의해 *A. actinomycetemcomitans*가 유년성 치주염환자 뿐만 아니라 사춘기전 치주염에서도 대부분 분리되어 치주질환의 중요한 원인균으로 이 균종을 지목하게 되었다[2,12,31].

여러 지역에서 조사된 자료에 의하면 치주염을 일으키는 원인균은 *A. actinomycetemcomitans* 혈청형 b이며 건강인에게는 혈청형 c가 흔히 분리된다[1,31]. *Eikenella corrodens*, *Streptococcus mutans*, *Prevotella melangiogenica*와 같은 구강내에서 분리되는 균종은 한 개체내에서도 여러 가지 유전자형이 분리되는 특성을 보이는 반면에 *A. actinomycetemcomitans* 균종은 한 개체내에서는 하나의 혈청형과 유전자형이 분리되며 몇 년간 동일한 균주가 지속적으로 분리되는 경향이 있다[2,18]. *A. actinomycetemcomitans* 균종은 restriction fragment length polymorphism (RFLP)과 AP-PCR을 이용한 연구를 통하여 유전적 다양성이 존재함이 알려졌다[2,24]. Asikainen 등은 15가지의 AP-PCR 유전자형이 93주의 *A. actinomycetemcomitans*로부터 분류가 되었고, 3가지 가장 흔한 유전자형이 68%를 차지하였다고 하였고, 유전자 형이 같으면 같은 혈청형에 속하였고 b 혈청형균의 유전자형의 양상은 다른 혈청형균과 구별되었다고 보고하여 AP-PCR의 역학적인 유용성을 제시하였으며[1], Slots 등도 AP-PCR과 RFLP를 이용하여 *A. actinomycetemcomitans*의 유전자형 분류를 시도하였다[24].

본 연구에서는 *A. actinomycetemcomitans* 분리동정 방법을 구축하고 37주의 분리균주를 확보하였다. 16개의 random primer를 사용하여 *A. actinomycetemcomitans* 표준균주를 조사한 결과 primer-15와 primer-16을 이용한 결과가 균주 간에 가장 뚜렷한 차이를 나타내었다. 표준균주와 혈청형 a와 b로 확인된 분리균주는 모두가 다른 유전자형을 나타내었다(Fig. 3-A). 혈청형 c로 확인된 분리 균주에서도 다양한 유전자형을 나타냈으나, 같은 환경에서 많은 시간을 함께 보내는 건강인(동아의대 학생)에서 분리한 경우에 비교적

일정한 양상을 보이는 것(Fig. 3-B, lane 2-11)을 관찰할 수 있었고, 치주 질환과 관련있는 균주는 다양한 유전자형을 보이고 있어, 치주 질환의 역학적 조사에 유용한 자료로 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

*A. actinomycetemcomitans*가 숙주의 방어체계에도 불구하고 치주질환에 영향을 미치는 중요한 질병원으로 작용할 수 있는 것은 이들이 가지는 다양한 독성인자와 조직을 손상시키는 산물 때문이라고 보고하고 있다[4]. 최근에 이 균종이 만들어 내는 독성인자로는 다형핵 백혈구와 대식구를 직접 파괴하는 leucotoxin, 다른 세균의 성장을 방해하는 bacteriocin, 호중구의 chemotactic inhibitor, 섬유모세포에 대한 cytotoxic factor, 보체활성화를 억제하는 Fc binding protein, 대식구를 활성화하는 lipopolysaccharide, collagenase, 림프구의 활성화를 억제하는 immunosuppressive factor, tetracycline에 대한 내성, 상피세포에 대한 부착성 등이 보고되고 있지만 현재까지 밝혀진 병원성 인자들로서는 치주 질환의 병인과정을 충분히 해석하기는 어렵다[9,11,17,19, 27,32].

치주질환의 진행시 임파구 반응이 치은부위와 치주조직에 존재하는 세균성 항원에 의해 유도된다는 보고와 치주 질환자의 치주점막에 림프구가 과도하게 침윤되어 있음을 주목하여[6,14], 병원성에 관계있는 혈청형 b군에 속하며, AP-PCR 법에 의해 유전자형이 비슷한 표준 균주 ATCC 29522와 임상분리균주 J1을 시험관내에서 사람 T 세포주인 Jurkat 세포주에 감염시켜 Jurkat 세포주의 반응을 조사하였다. 규정된 시간동안 배양하여 Jurkat 세포주의 생존능을 조사하였고, Jurkat 세포주가 이 균주들에 의해 apoptosis 되었음을 확인하였다.

1992년 Zychlinsky 등[33]이 *Shigella flexneri*가 생쥐 유래 대식세포에 apoptosis를 유도함을 보고한 이래, 세균이 숙주세포에 유도하는 apoptosis의 과정에 대해서 그리고 그 유도 기전에 대하여 많은 보고가 있으며, Kato는 *A. actinomycetemcomitans* 균종이 생쥐 유래 대식세포에 apoptosis를 유도한다고 하였다[8]. Zychlinsky 등은 *Shigella* 균종에 의하여 생쥐 유래 대식세포가 apoptosis될 때 IL-1 β 가 유리됨을 보고하였고, 감염질환에 있어 세균에 의해 숙주세포가 apoptosis될 때 유리되는 cytokine에 의하여 감염병의 진행 과정에 깊이 관여한다고 하였다[5].

*A. actinomycetemcomitans*는 세균의 대규모 증식이 없는

데도 단기간에 강력한 조직파괴가 일어나는 현상을 통하여 세균자체의 독성산물보다는 숙주의 면역체계에서 유도되는 cytokine들을 포함한 면역반응의 부산물이 숙주의 방어 체계에 손상을 주어 질병의 진행과정에 영향을 미친다는 사실들이 보고되고 있다[21].

간과하기 쉬운 사실이지만 골 조직에 가장 흔하게 생기는 질병은 치주질환이다. 이 치주질환과 치주낭, 세균성 관절염, 골염(osteitis), 골수염 등은 골조직에 대한 세균의 활동으로 생긴다. 섬유조직으로 강화된 석회화된 조직인 골조직은 조골세포와 파골세포의 상호작용과 활동으로 끊임없이 재형성된다. 조골세포는 골간질 성분을 생산하고 파골세포의 활동을 조절하는 역할을 한다. 골조직의 흡수는 조골세포가 collagenase를 분비하여 세포간질을 제거하고 파골세포가 석회화된 간질에서 칼슘염을 용해시키고 여러 가지 라이소좀 효소로 세포간질을 제거하는 과정이다. 이러한 골 재형성은 hormone과 prostaglandin, leukotriene, cytokine 등의 국소에 작용하는 여러 가지 인자들에 의해 조절된다[28]. 치주조직에 병적인 골 재형성을 일으키는 세균은 *A. actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Eikenella corrodens*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Campylobacter rectus* 등이다[13,30]. 이러한 골조직에 생기는 질환의 발생기전에 관한 주된 의문점은 이러한 세균이 어떻게 골조직에 침투하고, 병리 현상을 일으키는 방법에 관한 것이다. *A. actinomycetemcomitans* 균은 subgingiva에서 biofilm을 형성하고 있으므로 부착소 등 세균과 골조직과의 부착과 관계하는 인자는 중요하지 않다. 또한 이 균들이 치주조직에 침입하는 능력이 없으므로, 세균이 생산하는 수용성 병독인자의 역할에 대해 주목하여왔다. 세균이 골상실을 야기하는 기전은 첫째로 세균이 산이나 단백 분해효소를 분비하여 골조직의 미세포성 구성 요소를 직접 파괴하는 것이고 둘째는 세균이 골분해를 일으키는 세포성 반응을 야기하는 것이며 셋째는 세균이 골 간질의 합성을 억제하는 것으로 요약할 수 있다. 충치의 병리 현상을 첫 번째 기전으로 설명할 수 있으나 다른 골 감염의 기전을 설명하기는 부족하다. 두 번째와 세 번째 기전과 같이 세균에 의해 유리된 인자에 직접적인 영향을 받거나 골세포에 자극하는 cytokine이나 prostaglandin 등의 숙주측 인자를 유도하여 골 질환이 생긴다고 설명함이 타당하다. 이러한 세균에 의한 골파괴 인자로 내독소(LPS)의 역할에 대해 많은 연구를 진

행하여, 이 내독소가 직접적으로 파골세포를 자극한다는 증거를 찾기위한 노력이 있었으나 최근에는 내독소가 IL-1, IL-6, GM-CSF, prostaglandin E2, Nitric oxide와 같은 골파괴 인자를 분비하는 조골세포를 자극한다는데 초점을 맞추고 연구가 진행되고 있다. 그외에도 세균의 lipoteic acid, muramyl dipeptide, fimbriae 등의 병독인자가 치주 질환과 관계된 골흡수에서의 역할에 대해 연구하고 있다[13,30].

본 실험에서는 면역조절과정에서 T세포가 중추적인 역할을 하므로 사람 유래 T 세포주인 Jurkat 세포에 *A. actinomycetemcomitans* 표준 균주 및 임상분리 균주를 접종하여 apoptosis가 유도됨을 확인하였고, 이때 Jurkat 세포주가 생산하는 proinflammatory cytokine (IL-1 β , IL-6, IFN- γ , TNF- α , TGF β)의 종류를 정해진 시간별로 배지 내에 분비되어 측정된 cytokine의 양을 ELISA 방법으로 조사하였다. 세균에 감염된 Jurkat 세포는 강력한 포유동물의 골 용해요소로 알려져 있는 IL-1 β , IL-6, TNF- α 를 생산하였으며 J 1 임상분리균주와 표준균주인 ATCC 29522에 의해 IL-1 β 는 감염 후 6시간 제부터 유리하기 시작하였다. TNF- α 는 균 감염 후 3 시간후에 J 1 임상분리균주에 의해 유리되었고 반면에 표준균주인 ATCC 29522는 IL-6는 균 감염 후 9시간후에 유리되어, 같은 유전자형과 혈청형을 가지더라도 이들 세균에 의한 Jurkat 세포주의 cytokine 생산 양상에는 차이가 있었다. 이 세포주가 생산한 cytokine의 양상은 치주질환이 있는 환자의 치주조직에서 보이는 임파구 반응과 치조골 흡수에 의한 치아상실의 원인을 일부 설명할 수 있을 것이다.

요 약

Actinobacillus actinomycetemcomitans 분리동정 방법을 구축하고 37주의 균주를 확보하였다. 임상 분리 균주는 대부분이 3형(약간 그리고 천천히 전파되는 형태: post-LJP pattern) 혹은 5형(성인형 치주염)에 해당되는 치주질환 환자에서 분리하였다. 16개의 random primer를 사용하여 *A. actinomycetemcomitans* 표준균주를 검사한 결과 primer-15와 primer-16을 이용한 결과가 균주 간에 가장 뚜렷한 차이를 나타내었다. 임상 분리 균주에 대한 유전자형을 조사하였다. 표준균주와 혈청형 a와 b로 확인된 분리균주는 모두가 다른 유전자형을 나타내었다. 혈청형이 c인 분리균주도 다

양한 유전자형을 나타냈으나, 같은 환경에서 많은 시간을 함께 보내는 건강인(동아의대 학생)에서 분리한 경우에 비교적 일정한 양상을 보이는 것을 관찰할 수 있어서 RAPD 유전자형을 감염의 역학적 조사에 유용하게 이용될 수 있을 것으로 생각한다.

사람 유래 T 세포주인 Jurkat 세포에 *A. actinomycetemcomitans* 표준 균주 및 임상분리 균주를 접종하여 apoptosis가 유도됨을 확인하였고, 세균에 감염된 Jurkat 세포는 골유해요소로 알려져 있는 IL-1 β , IL-6, TNF- α 를 생산하였으며, 이러한 cytokine의 생산 양상은 치주 질환이 있는 환자의 치주조직에서 보이는 임파구 반응과 치조골 흡수에 의한 치아상실의 원인을 일부 설명할 수 있을 것이다.

감사의 말

이 논문은 1997년도 한국학술진흥재단 학술연구조성비(자유공모과제)에 의하여 연구되었습니다. 감사드립니다.

참고 문헌

1. Asikainen, S., C. Chen and J. Slots. 1995. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* genotypes in relation to serotypes and periodontal status. *Oral Microbiol. Immunol.* **10**, 65-68.
2. DiRienzo, J. M., J. Slots, M. Sixon, M. A. Sol, R. Harmon and T. L. McKay. 1994. Specific genetic variants of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* correlate with disease and health in a regional population of families with localized juvenile periodontitis. *Infect. Immun.* **62**, 3058-3062.
3. Ellner, J. J. and D. J. Spagnuolo. 1979. Suppression of antigen and mitogen induced human T lymphocyte DNA synthesis by bacterial lipopolysaccharide: mediation by monocyte activation and production of prostaglandins. *J. Immunol.* **123**, 2689-2695.
4. Fives-Taylor, P., D. Meyer and K. Mintz. 1996. Virulence factors of the periodontopathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J. Periodontol.* **67**, 291-297.
5. Hilbi, H., Y. Chen, K. Thirumalai and A. Zychlinsky. 1997. The interleukin 1 β -converting enzyme, caspase 1, is activated during *Shigella flexneri*-induced apoptosis in human monocyte-derived macrophages. *Infect. Immun.* **65**, 5165-5170.
6. Jeong, M. H., J. M. Song, S. M. Park, S. J. Jeong, W. S. Jo, S. H. Yoo, S. H. Lee, S. T. Yee, S. Y. Seo and J. M. Kim. 1998. Identification of a lymphocyte mitogenic factor produced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J. Korean Soc. Microbiol.* **33**, 521-535.
7. Jeong, S. J., S. T. Yee, W. S. Jo, S. H. Yoo, S. H. Lee, Y. J. Lim, Y. H. Yoo, J. M. Kim, J. D. Lee and Jeong M. H. 2000. A novel factor isolated from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* stimulates mouse B cells and human peripheral blood mononuclear cells. *Infect. Immun.* **68**, 5132-5138.
8. Kato, S., M. Muro, S. Akifusa, N. Hanada, I. Semba, T. Fujii, Y. Kowashi and T. Nishihara. 1995. Evidence for apoptosis of murine macrophages by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* infection. *Infect. Immun.* **63**, 3914-3919.
9. Kurita-Ochiai, T. and K. Ochiai. 1996. Immunosuppressive factor from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* down regulates cytokine production. *Infect. Immun.* **64**, 50-54.
10. Lee, S. H., S. J. Jeong, S. H. Yoo, S. M. Park, M. H. Jeong, S. T. Yee, S. Y. Seo and J. M. Kim. 1998. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* induced apoptosis of Jurkat cell line through the cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase. *J. Korean Soc. Microbiol.* **33**, 507-519.
11. Meyer, D. H. and P. M. Fives-Taylor. 1994. Characterization of adherence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to epithelial cells. *Infect. Immun.* **62**, 928-935.
12. Moore, W. E. C., L. V. Holderman, E. P. Cato, R. M. Smibert, J. A. Burmeister, K. G. Palcanis and R. R. Ranney. 1985. Comparative bacteriology of juvenile periodontitis. *Infect. Immun.* **48**, 507-519.
13. Nair, S. P., S. Meghji, M. Wilson, K. Reddi, P. White and B. Henderson. 1996. Bacterially induced bone destruction: mechanisms and misconceptions. *Infect. Immun.* **64**, 2371-2380.
14. Ostenberg, S. K., R. C. Page and T. Sims. 1983. Blastogenic responsiveness of peripheral blood mononuclear cells and effects of treatment. *J. Clin. Periodontol.* **10**, 72-88.
15. Patel, P. K. and M. W. Seitchik. 1986. *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: a new cause for granuloma of the parotid gland and buccal space. *Plast Reconstr. Surg.* **77**, 476-478.

16. Rabie, G., E. T. Lally and B. J. Shenker. 1988. Immunosuppressive properties of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin. *Infect. Immun.* **56**, 122-127.
17. Roe, D. E., P. H. Brahan, A. Weinberg and M. C. Roberts. 1995. Characterization of tetracycline resistance in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Oral Microbiol. Immunol.* **10**, 227-232.
18. Saarela, M., S. Asikainen, H. Jousimies-Somer, T. Asikainen and B. von Troil-Linden. 1993. Hybridization patterns of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes a-e detected an rRNA gene probe. *Oral Microbiol. Immunol.* **8**, 111-115.
19. Saglie, F. R., K. Simon, J. Merrill and H. P. Koeffler. 1990. Lipopolysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* stimulates macrophages to produce interleukin-1 and tumor necrosis factor mRNA and protein. *Oral Microbiol. Immunol.* **5**, 256-262.
20. Salman, R. A., S. J. Bonk, D. G. Salman and R. S. Glickman. 1986. Submandibular space abscess due to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J. Oral Maxillofac. Surg.* **44**, 1002-1005.
21. Socransky, S. S. and A. D. Haffajee. 1991. Microbial mechanisms in the pathogenesis of destructive periodontal diseases: a critical assessment. *J. Periodont. Res.* **26**, 195-212.
22. Seymour, G. J., K. L. Cole and R. N. Powell. 1985. Analysis of lymphocyte population extract from chronically inflamed human periodontal tissues. *J. Periodont. Res.* **20**, 571-579.
23. Shenker, B. J., W. P. McArthur and C. C. Tsai. 1982. Immune suppression induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: Effects on human peripheral blood lymphocyte responses to mitogens and antigens. *J. Immunol.* **128**, 148-154.
24. Slots, J., Y. B. Liu, J. M. DiRienzo and C. Chen. 1993. Evaluating two methods for fingerprinting genomes of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Oral Microbiol. Immunol.* **8**, 337-343.
25. Socransky, S. S. and A. D. Haffajee. 1992. The bacterial etiology of destructive periodontal disease: Current concepts. *J. periodontol.* **63**, 322-331.
26. Stashenko, P., L. M. Resmini, A. D. Haffajee and S. S. Socransky. 1983. T cell response of periodontal disease patients and healthy subjects to oral microorganisms. *J. Periodont. Res.* **18**, 587-600.
27. Stevens, R. H., S. E. Lillard and B. F. Hammond. 1987. Purification and biochemical properties of bactericin from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect. Immunol.* **55**, 692-697.
28. Tam, V. K., D. Schotland and J. Green. 1998. Inflammatory cytokines (IL-1 α , TNF- α) and LPS modulate the Ca²⁺ signaling pathway in osteoblasts. *Am. J. Physiol.* **274**, C1686-1698.
29. Tew, J. G., D. R. Marshall, W. E. C. Moore, A. M. Best, K. G. Palcanis and R. R. Ranny. 1985. Serum antibody reactive with predominant organisms in the subgingival flora of young adults with generalized severe periodontitis. *Infect. Immun.* **48**, 303-311.
30. Wilson, M., R. Seymour and B. Henderson. 1998. Bacterial perturbation of cytokine networks. *Infect. Immun.* **66**, 2401-2409.
31. Zambon, J. J., L. A. Christerson and J. Slots. 1983. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease: prevalence in patient groups and distribution of biotypes and serotypes within families. *J. Periodontol.* **54**, 707-711.
32. Zambon, J. J., V. I. Haraszthy, G. H. Hariharan, E. T. Lally and D. R. Demuth. 1996. The microbiology of early-onset periodontitis: Association of highly toxic *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains with localized juvenile periodontitis. *J. periodontol.* **67**, 282-290.
33. Zychlinsky, A., M. C. Prevost and P. J. Sansonetti. 1992. *Shigella flexneri* induces apoptosis in infected macrophages. *Nature* **358**, 167-169.

(Received November 28, 2000; Accepted January 29, 2001)