

## 수산화칼슘 처리된 *Porphyromonas endodontalis* Lipopolysaccharide가 다형핵백혈구의 IL-1과 TNF- $\alpha$ 생성에 미치는 영향에 관한 연구

박찬제\*\*\* · 박동성 · 유현미 · 오태석 · 임성삼\*

서울대학교 치과대학 치과보존학교실\*, 삼성의료원 치과진료부 보존과\*\*,  
성균관대학교 의과대학, 삼성의료원 치과진료부 보존과

### ABSTRACT

#### IL-1 AND TNF- $\alpha$ RELEASE IN HUMAN POLYMORPHONUCLEAR LEUKOCYTES AFTER EXPOSURE TO CALCIUM HYDROXIDE TREATED *Porphyromonas endodontalis* LIPOPOLYSACCHARIDE

Chan-Je Park\*\*\*, Dong-Sung Park, Hyeon-Mee Yoo, Tae-Seok Oh, Sung-Sam Lim\*

*Department of Conservative Dentistry, College of Dentistry, Seoul National University\**

*The Institute of Oral Health Science, Samsung Medical Center\*\**

*The Institute of Oral Health Science, Samsung Medical Center, Sungkyunkwan University School of Medicine*

Bacterial lipopolysaccharide (LPS) plays a major role in stimulating the synthesis and release of the principal osteoclast-activating cytokines, namely, interleukin 1 and tumor necrosis factor- $\alpha$  from immune cells. Although monocytes/macrophages are the main producers of these cytokines, recent evidence has indicated that polymorphonuclear leukocytes (PMN) have the ability to release IL-1 and TNF- $\alpha$ . Calcium hydroxide has been shown to be an effective medicament in root canal infections, reducing the microbial titre within the canal. It has been proposed that the therapeutic effect of Ca(OH)<sub>2</sub> may also be the result of direct inactivation of LPS. The purpose of this study was to investigate whether treatment of *Porphyromonas endodontalis* LPS with calcium hydroxide alters its biological action as measured by human PMN secretion of IL-1 and TNF- $\alpha$ , and it was compared with *Escherichia coli* LPS.

*P. endodontalis* ATCC 35406 was cultured in anaerobic condition, and LPS was extracted using the hot-phenol water extraction method and purified. Purchased *E. coli* LPS was also purified. 100  $\mu$ g/ml of each LPS in pyrogen free water were incubated with 25mg/ml Ca(OH)<sub>2</sub> at 37°C for 7 days. The supernatants were subjected to ultrafiltration, and the isolates were lyophilized and weighed. PMNs were obtained from peripheral blood by centrifugation layered over Lymphoprep. The cells were resuspended ( $4 \times 10^6$  cells/ml) in RPMI 1640 followed by treatment with various concentrations of LPS (0, 0.1, 1, 10  $\mu$ g/ml) for 24 hours at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> incubator. The supernatants of cells were collected and the levels of IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  were measured by enzyme-linked immunosorbent assay.

The results were as follows:

1. The levels of IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  from PMN treated with each LPS were significantly higher than those released from unstimulated PMN of the control group ( $p < 0.05$ ).
2. The levels of all three cytokines released from PMN stimulated with each calcium hydroxide treated LPS were significantly lower than those released from PMN stimulated with each untreated LPS ( $p < 0.05$ ), while they were not significantly different from those released from unstimulated PMN of the control group ( $p > 0.05$ ).

\*이 연구는 삼성생명과학연구소 연구비(C-A2-3101)의 보조로 이루어졌음.

3. The levels of secretion for all three cytokines were affected in a dose-dependent manner in PMN stimulated with each LPS ( $p < 0.05$ ), but not in PMN stimulated with each calcium hydroxide treated LPS ( $p > 0.05$ ).
4. The levels of all three cytokines released from PMN stimulated with *P. endodontalis* LPS were significantly lower than those released from PMN stimulated with *E. coli* LPS ( $p < 0.05$ ).

**Key words** : Calcium hydroxide, Lipopolysaccharide, Polymorphonuclear leukocytes, *Porphyromonas endodontalis*, cytokines

## I. 서 론

치수 및 치근단 질환의 발생과 진행에 있어서 미생물이 중요한 역할을 한다는 것은 잘 알려져 있으며<sup>1)</sup>, 이러한 미생물을 근관으로부터 제거하는 것이 근관치료의 주목적이다. 감염된 근관으로부터 세균을 제거하기 위해서는 근관의 기계-화학적 형성이 필수적이지만, 이것만으로는 세균을 완전히 제거하기 어렵기 때문에<sup>2-4)</sup>, 여러 가지 종류의 근관내 약제가 사용되어 왔다.

1920년 Hermann에 의해 치과계에 소개된 수산화칼슘(calcium hydroxide,  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ )은 pH 12.5 정도의 강염기이며, 수용액에서 칼슘이온과 수산화이온으로 용해되고, 항균효과<sup>5)</sup>, 치수용해 작용<sup>6,7)</sup>, 치근흡수 방지<sup>8)</sup>, 경조직 형성 유도<sup>9)</sup> 등의 다양한 생물학적 특성을 가지므로, 임상에서 여러 가지 용도로 사용되고 있으며<sup>10,11)</sup>, 특히 근관치료영역에서 가장 효과적이고 안전한 약제로 평가되고 있다<sup>12)</sup>.

근관내 약제로서 수산화칼슘의 작용 기전은 명확히 밝혀져 있지 않으나, 수산화기에 의한 높은 알칼리성에 의한 것으로 추측되고 있다. 수산화칼슘은 낮은 용해성(약 1.2g/L, at 25°C water)으로 인하여 치근단조직에 자극을 적게 주면서 상대적으로 많은 양을 근관내에 넣을 수 있으며, 근관내에서 오랜 기간 효과를 나타낸다<sup>13)</sup>.

Lipopolysaccharide(LPS)는 그램 음성 세균의 세포 외벽에 존재하며, 세균이 성장하는 동안이나 세포분해의 결과로 세포벽으로부터 떨어져 나오며<sup>14)</sup>, 근관내에서 세균이 제거된 후에도 남아 치근단 치주염을 지속시킬 수 있다<sup>5,15,16)</sup>. LPS는 O-specific polysaccharide, common core, lipid A의 3부분으로 구성되어있으며<sup>17)</sup>, 독성은 주로 lipid A에 의해 나타나고<sup>18)</sup>, lipid A의 구조가 변화되면 발열성, 대식세포 활성화, 그리고 보체 활성화 등의 독성이 사라진다는 연구도 있다<sup>18,19)</sup>. LPS는 염증세포 등을 자극하여 interleukin 1(IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ )과 tumor necrosis factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) 같은 염증성 cytokine을 분

비시킨다<sup>18,20)</sup>.

Cytokine은 여러 생리학적, 병리학적 과정에서 세포와 세포사이의 연락을 전달하는 필수 요소들이며, 특히 세포의 성장과 분화에 관련된 부분을 조절하거나 매개하는 것으로 추측되고 있다<sup>21)</sup>. TNF와 IL-1은 단핵세포나 대식세포로부터 유리되어 다양한 면역학적 염증 현상을 야기하는 물질로 알려져 있으며 특히 과골세포를 활성화시키고 조골세포에 의한 골 형성을 억제하는 주요 물질로 보고되고 있다<sup>21,22)</sup>.

이들 cytokine은 단핵세포와 대식세포가 주로 생산하는 것으로 알려져 있으나, 최근 연구에서 다형핵백혈구(PMN, Polymorphonuclear leukocytes)도 역시 이러한 기능을 가지고 있다고 보고되었다<sup>23,24)</sup>. 다형핵백혈구는 치수 및 치근단 조직에 세균이 침입했을 때 이에 반응해서 이들 조직으로 운반되는 최초의 세포이며, 염증 조직에 대식세포보다 훨씬 더 많은 수가 존재한다. 그러므로 다형핵백혈구도 치수 및 치근단 조직에서 염증성 cytokine을 생산하는 중요한 세포일 것이다.

최근 연구에서 수산화칼슘은 세균을 죽일 뿐만 아니라 세균의 LPS의 지질성분을 가수분해하는 능력이 있다는 것이 밝혀졌으며<sup>13,25)</sup>, LPS의 분해 기전은 LPS의 lipid A 부분에서 ester bonds의 alkali hydrolysis를 통한 것이라고 하였다. 또한 LPS는 단핵세포를 자극하여 PGE<sub>2</sub> 분비를 증가시키지만, 수산화칼슘 처리된 LPS는 이러한 능력이 소실된다는 것이 밝혀졌다<sup>26)</sup>. Barthel 등<sup>27)</sup>은 *E. coli* LPS를 수산화칼슘으로 처리하면 중화되어 단핵세포의 TNF- $\alpha$  생산을 자극하지 못한다고 보고한 바 있다. 하지만 치수 및 치근단 질환에서 중요한 역할을 하는 *Porphyromonas endodontalis*의 LPS에 대한 수산화칼슘의 작용에 대해서는 알려진 바가 없다.

치근단 병변과 골 흡수에서 혐기성 세균이 중요한 역할을 한다는 것은 잘 알려져 있다. 특히 LPS를 갖는 세균이 주요 역할을 하며, 괴사된 치수 자체만으로는 치근단 병변을 야기하지 못하며 특정 혐기성 그램 음성 세균

에 감염되어야 치근단병변과 골 흡수가 일어난다고 한다<sup>28)</sup>. 감염 근관에서 발견되는 세균 중 *P. endodontalis*는 특히 대기중의 산소에 민감하고 배양기간이 길며 신선한 배지에 서만 자라는 특성 때문에 다른 혐기성 세균보다 늦게 발견되었으며<sup>28,29,30)</sup> 타진 반응이나 악취 등의 임상 증상과 연관되어 나타나고 급성의 치근단 질환에서 주로 발견된다<sup>31)</sup>. *P. endodontalis*는 그램 음성의 절대 혐기성 간균으로 세포외벽에 LPS를 지닌다.

최근 본 교실에서 이루어진 연구결과에 의하면 *P. endodontalis* LPS에 의해 자극된 다형핵백혈구에서 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-1ra의 생성이 증가된다는 것이 밝혀졌다<sup>32)</sup>. 그러므로 *P. endodontalis* LPS를 수산화칼슘 처리하여 다형핵백혈구를 자극하였을 때 생성되는 cytokine을 조사하는 것은 수산화칼슘이 근관내 약제로서 작용하는 기전을 밝히는데 도움이 될 것으로 생각된다.

본 연구의 목적은 근관내 약제로 많이 사용되고 있는 수산화칼슘이 치수 및 치근단 질환의 발생과 진행에 중요한 역할을 하는 *Porphyromonas endodontalis* LPS의 생물학적 활성도에 미치는 영향을 알아보기 위함이며, *E. coli* LPS와 *P. endodontalis* LPS를 수산화칼슘으로 처리한 후, 각각의 LPS로 다형핵백혈구를 자극하여 이에 반응하여 나타나는 염증성 cytokine인 IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ 를 ELISA로 조사, 그 수준을 비교, 분석하여 결과를 보고하는 바이다.

## II. 실험 재료 및 방법

### 1. *P. endodontalis* 의 배양

실험에 사용된 세균은 *Porphyromonas endodontalis* (ATCC 35406)로 균주를 5% 가토 혈액, 5 $\mu$ g/ml의 hemin과 0.5 $\mu$ g/ml vitamin K<sub>1</sub>이 포함된 한천배지에 접종하여 37 $^{\circ}$ C 혐기성 세균 배양기에서 5~7일간 배양하여 순수 분리한 후 균 집락을 취하여 이를 가토 혈액 및 5 $\mu$ g/ml hemin과 vitamin K<sub>1</sub>이 첨가된 Brain Heart Infusion(BHI) broth (Difco, Michigan, U.S.A.)에 접종하고 37 $^{\circ}$ C의 혐기성 조건(85% N<sub>2</sub>, 10% H<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>)하에서 배양하였다. 균주는 4 $^{\circ}$ C, 10,000 $\times$ g에서 15분간 원심분리하고 증류수로 세 번 세척한 후 동결건조하였다.

### 2. LPS 추출

LPS의 추출은 hot phenol-water extraction method<sup>33)</sup>를 사용하였다.

동결건조된 *P. endodontalis* (1g)를 pyrogen-free wa-

ter 35ml에 부유시킨 후 90% phenol 35ml를 첨가하여, 70 $^{\circ}$ C에서 15분간 혼합하고, 4 $^{\circ}$ C, 10,000 $\times$ g에서 30분간 원심분리하였다. Aqueous phase는 분리하여 따로 보관하고 phenol phase와 insoluble precipitate는 물 35ml로 재 추출하였다. Aqueous phase의 혼합물은 실온에서 3일간 증류수에 투석(MWCO, 3500)시키고 동결건조하였다.

*Escherichia coli* LPS(O111:B4, Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA)는 상품화된 것을 구매하여 사용하였다.

### 3. LPS의 정제

Koga 등<sup>34)</sup>의 방법을 사용하여 LPS를 정제하였다. 각 Crude LPS(1g)를 100ml의 pyrogen-free water에 부유시키고, 4 $^{\circ}$ C, 100,000 $\times$ g에서 3시간 동안 원심분리하였다. 이 pellet을 0.1mM ZnCl<sub>2</sub>와 400 $\mu$ g nuclease P1(from *Penicillium citrinum*, Amersham Life Science, Cleveland, OH, USA)을 함유하는 10mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) 20ml에 부유시켜 37 $^{\circ}$ C에서 16시간 동안 반응시켰다. 그 후, 실온에서 24시간 동안 증류수에 투석(MWCO, 3500)한 후 pyrogen-free water로 수세하고 원심분리한 후 동결건조시켰다. 동결건조된 LPS(1mg/ml)를 2mM CaCl<sub>2</sub>와 pronase (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Germany) 1mg을 함유하는 0.1M borate buffer (pH 7.4)에 부유시켰다. 이 혼합물을 37 $^{\circ}$ C에서 24시간 동안 incubation한 후 100 $^{\circ}$ C에서 5분간 가열하고 실온에서 24시간 동안 증류수에 투석(MWCO, 3500)한 후 동결건조하였다.

### 4. LPS의 검정

#### 1) SDS-PAGE

12% Tris-Glycine gel(Novex<sup>®</sup>, Invitrogen Co., CA, USA)을 이용하여 SDS-PAGE법을 시행하였다. marker와 *P. endodontalis* LPS, *E. coli* LPS를 각각 sample buffer(Novex<sup>®</sup>, Invitrogen Co., CA, USA)와 섞은 후 pre-cast gel의 각 well에 넣고 running buffer(Novex<sup>®</sup>, Invitrogen Co., CA, USA)가 들어있는 전기영동장치에서 125V, 40mA 하전 하에 2시간동안 분획하였다.

#### 2) Silver Staining

silver staining kit(Intron Biotechnology, Korea)를 이용하였다. 요약하면, 전기 영동된 gel을 충분한 양

의 증류수에 담그고, 실온에서 10분간 incubation한 후, fix solution을 넣고 5분간 incubation하였다. 증류수로 수세한 후 staining solution에서 20분간 incubation하고 다시 수세한 후 증류수에서 10분간 incubation하였다. 증류수를 버리고 developing solution을 첨가한 후 band가 나올 때까지 15-20분 정도 incubation하였다. 원하는 band가 나온 후 developing solution을 버리고 여기에 stop solution을 적당량 첨가하여 반응을 종료시켰다. gel dryer와 셀로판지를 이용하여 gel을 건조시키고 필름형태로 보관하였다.

### 5. LPS의 수산화칼슘 처리

각 LPS를 pyrogen-free water에 용해시켜 100 $\mu$ g/ml가 되게 한 후 수산화칼슘 분말 (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA)을 1ml당 25mg씩 첨가시켜 포화되게 하였다. 모든 sample은 20초간 vortex 한 후 37 $^{\circ}$ C에서 7일간 보관하였으며, 이 기간동안 하루에 한번씩 20초간 vortex하였다. 그 후 상층액을 ultra-filtration(Centriprep<sup>®</sup> YM-10, 10,000 NMWL, Millipore Co., USA)하여 LPS를 추출한 후 동결건조하였다.

### 6. 다형핵백혈구의 추출

건강한 6명의 자원자(26-35세)들로부터 heparinized tube를 이용하여 정맥혈을 채취하였다. 채취된 혈액은 6% dextran(Mwt. 500,000, Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) sedimentation을 거쳐서 적혈구를 분리하고, Lymphoprep(Nycomed Pharma AS, Oslo, Norway)을 이용하여 원심분리한 후 백혈구를 얻었으며, 남아 있는 적혈구는 hypotonic lysis를 시행하여 제거하였다. 이 방법으로 추출한 다형핵백혈구는 Trypan blue dye exclusion test와 Giemsa staining을 통해 검증한 결과 98% 이상의 생활력과 97% 이상의 순도를 나타내었다.

얻어진 세포들은 100U penicillin/ml, 100 $\mu$ g streptomycin/ml, 10% heat-inactivated fetal bovine serum(FBS, Amersham Life Science, Cleveland, OH, USA)을 함유한 RPMI 1640(Amersham Life Science, Cleveland, OH, USA)에 부유시켜 다음 과정을 위해 준비하였다.

### 7. 실험군의 분류 (Table 1)

*P. endodontalis* 및 *E. coli* LPS를 각각 수산화칼슘 처리

한 군과 처리하지 않은 군으로 분류한 후, 각각의 LPS를 PBS에 용해시켜 농도(0.1, 1, 10 $\mu$ g/ml)에 따라 세분하였다. 채취된 다형핵백혈구를 well당 1ml 씩 4 $\times$ 10<sup>6</sup> cells이 되도록 24well plate에 넣은 후 각각의 LPS를 111 $\mu$ l 씩 첨가하여 최종 농도가 0.1, 1, 10 $\mu$ g/ml가 되도록 하였으며, 대조군에는 LPS없이 PBS만 첨가하였다. 이후 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하였으며, 24시간 후 각 표본의 상층액을 얻어내어 -70 $^{\circ}$ C에 보관하였다.

### 8. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

취득한 상층액은 각각 human IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  ELISA kit (Quantikine<sup>®</sup>, R&D systems, Minneapolis, MN, USA)를 이용하여 분석하였다. 먼저 제조사에서 제공한 standard와 표본을 200 $\mu$ l 씩 microtiter plate의 각 well에 담고 adhesive strip으로 덮어 실온에서 2시간 동안 incubation시켰다. 2시간 후 plate를 수세용 buffer를 이용하여 3회 세척하였다. 다음으로 각 cytokine에 대한 conjugate를 200 $\mu$ l 씩 well에 첨가하여 실온에서 1시간 동안 incubation시켜 3회 세척하였다. 그런 후 각각의 well에 기질용액을 200 $\mu$ l 씩 넣어 20분간 방치하였다가 반응을 정지시키기 위해 stop solution을 50 $\mu$ l 씩 첨가한 후 30분 내에 ELISA Reader(Thermomax, Molecular device, USA)로 plate well의 상층부에서 하단부까지 관통하여 450nm에서의 optical density(O.D.)를 측정하였다. 측정된

**Table 1.** The treatment groups used in the experiment

LPS	Concentration of LPS( $\mu$ g/ml)	Sample No
<i>P. endodontalis</i> LPS	10	6
	1	6
	0.1	6
Ca(OH) <sub>2</sub> treated <i>P. endodontalis</i> LPS	10	6
	1	6
	0.1	6
<i>E. coli</i> LPS	10	6
	1	6
	0.1	6
Ca(OH) <sub>2</sub> treated <i>E. coli</i> LPS	10	6
	1	6
	0.1	6
Control	0	12

standard의 O.D.와 제공된 standard의 농도를 log값으로 환원하여 직선의 추세선을 만들고, 각 표본의 O.D.값을 대입하여 농도를 얻었다.

### 9. 통계처리

SPSS(ver 10.0) 통계용 program을 사용하여 Kruskal-Wallis Test와 Mann-Whitney Test로 각 군간의 cytokine 수준의 차이를 유의수준  $p=0.05$  하에서 분석하였다.

## III. 실험결과

### 1. LPS의 검정(SDS-PAGE)

LPS를 SDS-PAGE로 분획하고 silver stain한 결과, 특징적인 사다리모양의 구조를 보이며, *P. endodontalis* LPS는 31kDa 부위에 다수의 band가 나타났다(Fig. 1).

### 2. ELISA

각 실험군에서 측정된 각각의 cytokine 수준은 Table 2 및 Fig. 2, 3, 4와 같다.

*P. endodontalis* 및 *E. coli* LPS로 자극된 다형핵백혈구에서 분비되는 IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  및 TNF- $\alpha$ 의 수준은 LPS로 자극되지 않은 대조군에서보다 유의성있게 높게 나타

났으며( $p<0.05$ ), *E. coli* LPS로 자극된 다형핵백혈구에서 분비되는 세 가지 cytokine의 수준은 같은 농도의 *P. endodontalis* LPS로 자극된 군에서보다 유의성있게 높게 나타났다( $p<0.05$ ).

수산화칼슘 처리되지 않은 각각의 LPS로 자극된 다형핵백혈구에서 분비되는 IL-1 $\alpha$  및 IL-1 $\beta$ 의 수준은 TNF- $\alpha$ 의 수준보다 유의성있게 높게 나타났으며( $p<0.05$ ), IL-1 $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$ 의 수준은 유의할 만한 차이가 없었다( $p>0.05$ ).

수산화칼슘 처리된 *P. endodontalis* 및 *E. coli* LPS로 자극된 다형핵백혈구에서 분비되는 세 가지 cytokine의 수준은 수산화칼슘 처리되지 않은 LPS로 자극된 군보다 유

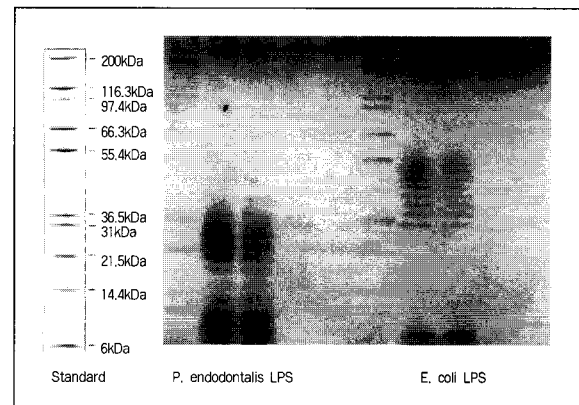


Fig. 1. SDS-PAGE of LPS.

Table 2. Mean concentration of cytokines (Mean  $\pm$  S.D., pg/ml)

LPS	Concentration of LPS ( $\mu$ g/ml)	IL-1 $\alpha$	IL-1 $\beta$	TNF- $\alpha$
<i>P. endodontalis</i> LPS	10	260.92 $\pm$ 89.81	221.73 $\pm$ 69.17	70.11 $\pm$ 21.21
	1	115.79 $\pm$ 38.68	108.56 $\pm$ 30.10	55.23 $\pm$ 14.66
	0.1	53.52 $\pm$ 21.19	47.43 $\pm$ 20.09	32.60 $\pm$ 9.81
Ca(OH) <sub>2</sub> treated <i>P. endodontalis</i> LPS	10	9.20 $\pm$ 2.51	9.22 $\pm$ 3.39	12.78 $\pm$ 4.15
	1	9.01 $\pm$ 2.65	9.04 $\pm$ 3.00	11.67 $\pm$ 3.62
	0.1	8.99 $\pm$ 2.56	9.20 $\pm$ 2.62	12.31 $\pm$ 3.64
<i>E. coli</i> LPS	10	598.29 $\pm$ 163.13	542.66 $\pm$ 165.74	217.24 $\pm$ 92.07
	1	265.65 $\pm$ 98.54	245.58 $\pm$ 85.26	112.32 $\pm$ 47.88
	0.1	163.96 $\pm$ 56.51	138.47 $\pm$ 57.51	74.51 $\pm$ 23.75
Ca(OH) <sub>2</sub> treated <i>E. coli</i> LPS	10	10.33 $\pm$ 4.68	10.12 $\pm$ 5.41	12.66 $\pm$ 3.84
	1	9.32 $\pm$ 3.47	11.16 $\pm$ 3.63	12.85 $\pm$ 4.31
	0.1	9.28 $\pm$ 2.05	9.41 $\pm$ 4.41	12.92 $\pm$ 4.05
Control	0	8.34 $\pm$ 2.82	8.72 $\pm$ 3.64	13.68 $\pm$ 3.61

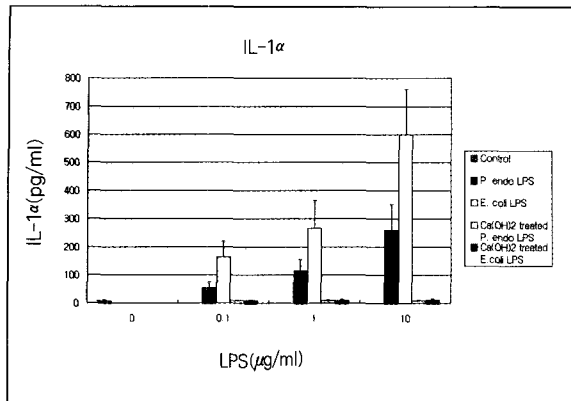


Fig. 2. IL-1 $\alpha$  levels in supernatants of PMN stimulated with each LPS.

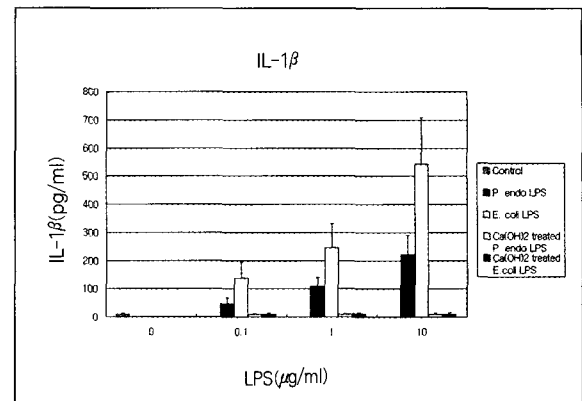


Fig. 3. IL-1 $\beta$  levels in supernatants of PMN stimulated with each LPS.

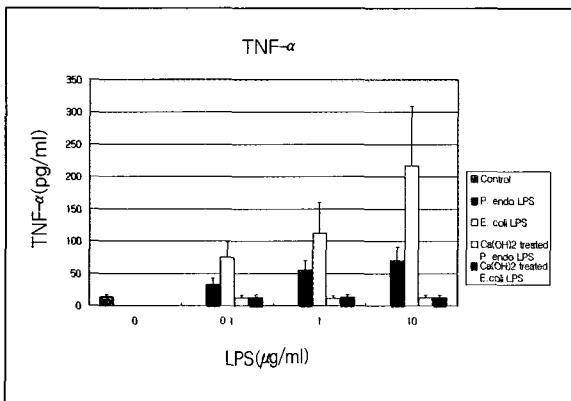


Fig. 4. TNF- $\alpha$  levels in supernatants of PMN stimulated with each LPS.

의성있게 낮게 나타났으며( $p < 0.05$ ), 대조군과는 유의할 만한 차이가 없었다( $p > 0.05$ ).

*P. endodontalis* 및 *E. coli* LPS의 농도가 증가함에 따라 (0.1, 1, 10 $\mu$ g/ml) 다형핵백혈구에서 분비되는 세 가지 cytokine의 수준은 같이 증가하는 양상을 보였으나 ( $p < 0.05$ ), 수산화칼슘 처리된 LPS의 경우에는 농도에 따른 cytokine의 수준은 유의할 만한 차이가 없었다 ( $p > 0.05$ ).

#### IV. 총괄 및 고안

감염된 근관은 염증세포, 괴사된 치수, 세균 등 여러 가지 생물학적 요소를 포함하며, 세균의 존재는 그 대사산물과 내독소와 같은 죽은 세균의 세포 성분이 있음을 의미한다. 내독소, 즉 lipopolysaccharide(LPS)는 그 램 음성 세균의 세포벽의 구성성분으로 세균이 죽은 후

에도 강력한 염증 매개 물질로 작용한다. LPS는 prostaglandins, leukotrienes, platelet-activating factor, complement 3a와 5a, IL-1, TNF 등의 다양한 염증 매개 물질을 활성화시키며, 이로 인해 혈관투과성 증가, 백혈구의 margination, 백혈구의 chemotaxis, collagenase 분비, 발열, lymphocyte 활성화 등을 야기하여 골 흡수와 만성 육아종의 형성과 같은 다양한 생물학적 효과를 나타내게 된다<sup>18,35</sup>. 이와 같은 반응은 치수 및 치근단 질환의 증상과도 깊은 관계가 있다.

근관소독제로 사용된 수산화칼슘은 근관내 세균을 효과적으로 없앨 수 있다는 것이 여러 연구에서 밝혀졌다<sup>5,36,37</sup>. 현재 근관치료 시 수산화칼슘은 근침형성술, 치근흡수의 처치, 치근천공의 치료, 삼출물이 지속적인 근관(weeping canal)의 치료 등 여러 가지 용도로 사용되고 있으며, 근관에 남아있는 동안 효과가 유지되므로 특히 다음 내원 시까지의 약속기간이 길어질 때는 아주 효과적인 근관소독제이다<sup>38</sup>. 근관소독제로서 수산화칼슘을 오랫동안 사용하면 치근단 병변에서 골 재생을 촉진한다는 보고도 있으며<sup>39</sup>, 최근에는 일상적인 근관소독제로서 수산화칼슘의 사용이 추천되고 있다.

Lipid A 분해를 통한 LPS의 중화는 enzyme을 이용한 deacylation<sup>40</sup>, acid hydrolysis, alkali 처리<sup>19</sup> 등의 여러 가지 방법으로 입증되었다. 또한 Niwa 등<sup>19</sup>은 희석된 수산화나트륨에 의해 LPS의 가수분해가 이루어지며, ethyl alcohol이나 dimethyl sulfoxide가 이 반응을 더욱 촉진시킨다고 보고하였다. LPS의 분해 기전은 LPS의 lipid A 부분에서 ester bonds의 alkali hydrolysis를 통한 것으로 여겨지고 있다. Lipid A 구조는 carbohydrate 부분에 fatty acid를 연결하는 다수의 ester bond로 이루어져 있으며, 이 부분이 alkali 조건에서 가수분해가 이루어진다. Lipid A에서의 작은 변

화는 이 구조를 생물학적으로 불활성한 상태로 만들어서 LPS를 중화시키게 된다<sup>19)</sup>. 그러나 LPS의 독성은 lipid A 이외의 다른 부분에 의해서도 나타날 수 있으므로<sup>18)</sup> 이것만으로는 LPS의 중화 기전을 완전히 설명할 수 없으며 이에 대한 추가적인 연구가 필요하리라 생각된다.

본 실험에서 수산화칼슘으로 1주간 처리된 *P. endodontalis* 및 *E. coli* LPS는 다형핵백혈구의 cytokine 분비를 자극하지 못한다는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과는 수산화칼슘이 세균의 LPS에 작용하여 독성을 없앨 수 있다는 것을 의미하며 Safavi와 Nichols<sup>13)</sup> 그리고 Barthel 등<sup>27)</sup>의 보고와 일치하는 결과를 보였다. Safavi와 Nichols<sup>13)</sup>는 수산화칼슘 용액에 1주간 노출된 LPS는 가수분해되어 lipid A에서 hydroxy fatty acid가 유리된다고 보고하였으며, 이러한 작용은 근관치료 시 수산화칼슘이 나타내는 유용한 효과의 일부분을 설명해 준다고 하였다. 또한 그들은<sup>26)</sup> *Salmonella typhimurium* 과 *Prevotella intermedia* LPS를 수산화칼슘으로 1주일간 처리한 후 단핵세포를 자극하여 생성되는 prostaglandin E<sub>2</sub>의 양을 측정된 결과, 수산화칼슘 처리된 LPS로 자극된 세포에서는 PGE<sub>2</sub>가 분비되지 않았다고 보고하였으며, 수산화칼슘 처리가 bacterial LPS의 생물학적 성질을 변화시킨다고 결론지었다. 즉, LPS의 생물학적 성질은 ester-linked hydroxy fatty acid를 필요로 하며, 이 linkage는 수산화칼슘처리에 의해 파괴된다고 하였다. Barthel 등<sup>27)</sup>은 수산화칼슘으로 1주간 처리된 *E. coli* LPS는 중화되어 단핵세포에서 TNF- $\alpha$ 의 생산을 자극하지 못하였다고 보고하였으며, Buck 등<sup>25)</sup>은 근관세척액과 수산화칼슘의 LPS에 대한 효과를 분석하기 위해 분해된 지방산의 양을 측정된 결과 chlorhexidine, ethanol, sodium hypochlorite의 염기성 혼합물로 30분간 처리하거나, 수산화칼슘으로 하루 이상 처리하게 되면 lipid A의 fatty acid chain에서 ester bond의 가수분해가 일어나 LPS의 독성을 제거할 수 있다고 하였다. 이와 같은 결과는 항균효과와 더불어 수산화칼슘이 감염된 근관의 소독에 우수한 약제로 사용될 수 있음을 의미하며, 특히 LPS가 있을 것으로 예상되는 근관에서 수산화칼슘을 1주일 이상 두는 것은 임상적으로 매우 유용할 것으로 생각된다.

본 실험에서 수산화칼슘이 LPS에 미치는 영향을 알아보기 위해 IL-1과 TNF- $\alpha$ 의 수준을 측정된 것은 이들 cytokine이 치수 및 치근단 질환의 발생과 진행에 있어서 중요한 역할을 하기 때문이다. 치수의 세균 감염은 치근단 병변을 야기하고 동시에 골 흡수를 초래하며 다수의 T, B 세포, 호중구와 대식세포, 형질세포, 호산구 등이 혼합된 염증세포의 침윤을 보이는 국소적인 면역반응을 나타낸다<sup>41,42,43)</sup>. 단핵세포와 대식세포는 특정 cytokine

을 합성해서 여러 세포 기능을 조절하며, 이들 cytokine 중 IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  등이 치수 및 치근단 질환에서 골 흡수와 관련이 있다고 알려져 있다<sup>44)</sup>. 고등<sup>45)</sup>은 염증 치수 조직과 치근단 병소 조직에서의 IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  등의 수준이 대조군으로 사용된 정상 치수조직에서보다 높게 나타났다고 보고하였으며, 변 등<sup>46)</sup>은 골 흡수를 일으키는 cytokine(TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , IL-1 $\beta$ )의 국소적 수준은 급성 및 만성 치근단병변에서 급성치수염이나 정상치수보다 유의성있게 높은 수준을 나타내었다고 보고하였고, 공 등<sup>47)</sup>은 치성낭종액에서 IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ 의 농도는 정상 치근단조직보다 높게 나타났다고 보고한 바 있다.

다형핵백혈구는 손상 및 감염에 대한 숙주의 방어에 대단히 중요한 요소로서 이 세포는 모든 염증부위에 보여지며 특히 손상 부위에서 집중되어 나타나며 감염세균을 탐식, 식균작용을 하며 다른 위해물질을 중화시키기도 한다. 오랫동안 다형핵백혈구는 최종 분화된 세포로서 단백질을 생산하지 못하는 것으로 생각되어 왔으나, 최근 연구 결과에 의하면 다형핵백혈구도 IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-1ra, IL-8, TGF- $\beta$ 1 등과 같은 다양한 cytokine을 합성하여 분비할 수 있다는 것이 밝혀졌다<sup>23,24)</sup>. 본 연구에서도 다형핵백혈구는 주어진 농도의 LPS의 자극에 대한 반응으로 cytokine의 분비가 증가하였으며, 이것은 농도에 따라 증가하는 양상을 보여주었다. 이것은 고와 임<sup>32)</sup>이 *P. endodontalis* 및 *E. coli* LPS로 자극된 다형핵백혈구는 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-1ra를 생성할 수 있음을 단백질과 mRNA 수준에서 관찰하여 보고한 것과 일치하는 결과를 나타내었다. 다형핵백혈구는 치수 및 치근단 염증에서 대식세포보다 훨씬 많은 수가 존재하므로, 다형핵백혈구가 생산하는 염증성 cytokine이 치수 및 치근단질환에서 중요한 역할을 할 것으로 생각된다.

*P. endodontalis*의 LPS에 관한 연구는 비교적 최근에 이루어지기 시작하였으며, Ogura 등<sup>48)</sup>은 감염근관과 치근단 낭종에서 분리된 *P. endodontalis*의 LPS는 검사된 다른 치주병원균의 LPS보다 독성이 강하며 치주인대 세포를 자극하여 IL-6을 분비시키므로 치주 및 치근단 질환에서 나타나는 골 흡수와 염증의 진행에 중요한 역할을 할 것이라고 보고하였다. Hosoya 등<sup>49,50)</sup>은 *P. endodontalis* LPS는 치수세포를 자극하여 IL-6 및 IL-1 $\beta$ 를 분비시키며 이것은 치수 및 치근단 질환에서 염증의 진행에 중요한 역할을 할 것이라고 하였다. 따라서 본 연구에서는 수산화칼슘이 LPS에 미치는 영향을 알아보기 위해 *P. endodontalis* LPS를 사용하였으며 이것을 잘 알려져 있는 *E. coli* LPS와 비교하였다. 본 연구의 결과에서 *P. endodontalis* LPS는 다형핵백혈구를 자극하여 cytokine을 생산하는 능력이 *E. coli* LPS에 비해 약하게 나

타났다. 이것은 두 세균에서 LPS의 화학적 구조가 다르기 때문이며, BPB LPS의 lipid A는 enterobacterial LPS의 그것과 다른 fatty acids를 포함하며 이러한 이유로 독성이 약하다고 알려져 있다<sup>51)</sup>. Yoshimura 등<sup>52)</sup>과 Matsushita 등<sup>53)</sup>도 BPB LPS는 *E. coli* LPS에 비해 훨씬 적은 양의 cytokine 분비를 야기한다고 보고한 바 있다. 그러나 수산화칼슘 처리된 두 가지 LPS는 모두 독성이 제거되어 다형핵백혈구를 자극하지 못하는 것으로 판명되었다.

본 실험에서 추출한 LPS를 검정하기 위하여 SDS-PAGE로 분획하고 silver stain을 시행한 결과, 31kDa 부위에 다수의 band가 나타났다. 이것은 Hanazawa 등<sup>54)</sup>이 *P. endodontalis*의 LPS가 전형적인 반복성의 ladder 형태를 보인다는 보고와 유사하며 Eidhin과 Mouton<sup>55)</sup>, 그리고 김 등<sup>56)</sup>이 LPS를 검정하기 위해 SDS-PAGE와 silver stain을 시행한 결과와도 유사하였다.

본 연구에 사용한 LPS의 양은 0.1-10 $\mu$ g/ml로 하였으며 이것은 근관내에 존재하는 LPS의 농도가 0.1~10 $\mu$ g/ml 정도라는 보고를 근거로 한 것이다<sup>57,58)</sup>. Schonfeld 등<sup>59)</sup>은 치근단 병변이 있는 조직의 내독소(endotoxin, LPS)의 존재를 측정하여, 염증이 있는 치근단 육아종 조직의 75%에서 내독소가 존재하지만, 염증이 없는 치근단 낭종이나 치근단 반흔 조직에는 20%에서만 내독소가 존재한다고 하였으며, 내독소의 존재는 조직의 염증과 높은 상관관계가 있다고 하였다. Horiba 등<sup>58)</sup>은 감염된 근관에서 임상증상과 내독소의 양 사이의 상관관계를 조사하였으며, 증상이 있는 치아와 증상이 없는 치아에서 내독소의 양은 각각 8.0 $\mu$ g/ml 와 0.7 $\mu$ g/ml 이었다고 보고하여 증상이 있는 치아는 높은 수준의 내독소를 포함한다고 하였다. Yamasaki 등<sup>60)</sup>은 쥐의 실험적 치근단 병변에서 시간이 지남에 따라 내독소의 양이 증가함을 보고하였다.

본 실험에서 LPS를 수산화칼슘으로 처리하는 기간을 7일로 하였다. 이것은 Sjogren 등<sup>36)</sup>의 연구에서 수산화칼슘의 항균효과는 이것을 근관내에 최소한 7일 이상 넣어 두었을 때 가장 효과적이었다는 보고에 따른 것이다. 결과적으로 100 $\mu$ g/ml의 LPS를 포화된 수산화칼슘으로 7일간 처리하게 되면 LPS의 독성이 사라지는 것을 알 수 있었다. 수산화칼슘은 근관내에 보통 1주일 이상 넣어 두게 되므로 이러한 성질은 임상에서 매우 유용할 것으로 생각된다.

Sweadner 등<sup>61)</sup>은 LPS는 수용액에서 다양한 크기로 존재하며 가장 작은 분자량은 10,000에서 20,000 정도이고 10,000 NMWL(nominal molecular weight limit) 필터를 사용하여 LPS를 효과적으로 분리할 수 있다고 보고하였다. 이에 따라 본 실험에서는 수산화칼슘

처리된 LPS를 재 추출하기 위해 10,000 NMWL를 가지는 필터를 사용하여 ultrafiltration을 시행하였다. 즉, 작은 분자량을 가지는 hydroxy fatty acid와 수산화칼슘은 ultrafiltration membrane을 통과하여 수용액에 남게되고 큰 분자량을 가지는 LPS만 추출할 수 있었다.

본 실험에서 수산화칼슘 처리된 LPS는 그 농도에 관계없이 다형핵백혈구를 자극하여 cytokine을 생산하지 못하였다. 이것은 본 실험에서 사용된 100 $\mu$ g/ml의 LPS를 수산화칼슘으로 1주일간 처리하게 되면 LPS의 독성을 효과적으로 제거할 수 있다는 것을 의미한다. 그러나 이것은 다형핵백혈구에 의한 IL-1과 TNF- $\alpha$  생산에만 국한된 실험으로 다른 종류의 세포와 여러 가지 염증 매개 물질에 대한 연구가 더 필요하리라 생각된다. 또한, 근관의 감염은 다양한 세균에 의해서 일어나며, 세균의 종류에 따라 LPS의 구조에 다소 차이가 있으므로 다른 종류의 세균에서 얻어진 LPS에 대한 수산화칼슘의 효과에 대한 추가적인 연구도 필요하리라 사료된다.

결론적으로 본 연구에서는 실험적 조건에서 *P. endodontalis* 및 *E. coli* LPS를 수산화칼슘으로 처리하면 다형핵백혈구에서 IL-1과 TNF- $\alpha$  분비를 자극하는 능력이 소실되는 것을 확인하였으며, 이것은 수산화칼슘이 LPS의 생물학적 성질을 변화시키고 중화시키기 때문인 것으로 생각된다. 이러한 성질은 항균효과와 더불어 수산화칼슘이 감염된 근관의 소독에 효과적으로 사용될 수 있음을 의미한다. 향후 다른 종류의 LPS에 대한 중화능력과 polymyxin B와 같은 알려진 LPS 중화물질과의 비교 등의 연구가 필요하리라 사료되며, 이러한 연구를 통하여 치수 및 치근단 질환에서 수산화칼슘의 작용기전을 밝히는데 도움이 되리라 생각된다.

## V. 결 론

근관내 약제로 많이 사용되고 있는 수산화칼슘이 치수 및 치근단 질환의 발생과 진행에 중요한 역할을 하는 *Porphyromonas endodontalis* lipopolysaccharide의 생물학적 활성도에 미치는 영향을 알아보기 위해 *P. endodontalis*를 배양하여 LPS를 추출하였으며, *P. endodontalis*와 *E. coli* LPS를 수산화칼슘으로 7일간 처리한 후, 각각의 LPS로 사람의 다형핵백혈구를 24시간 자극하여 그에 따라 분비되는 염증성 cytokine인 IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ 의 수준을 ELISA로 비교, 분석하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. *P. endodontalis* 및 *E. coli* LPS로 자극된 다형핵백혈구에서 분비되는 IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ 의 수준은 LPS로 자극되지 않은 대조군보다 유의성있게 높게 나



타났다( $p < 0.05$ ).

2. 수산화칼슘 처리된 *P. endodontalis* 및 *E. coli* LPS로 자극된 다형핵백혈구에서 분비되는 IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ 의 수준은 수산화칼슘 처리되지 않은 LPS로 자극된 군보다 유의성있게 낮게 나타났으며( $p < 0.05$ ), 대조군과는 유의할 만한 차이가 없었다( $p > 0.05$ ).
3. *P. endodontalis* 및 *E. coli* LPS의 농도가 증가함에 따라 (0.1, 1, 10 $\mu$ g/ml) 다형핵백혈구에서 분비되는 세 가지 cytokine의 수준은 같이 증가하는 양상을 보였으나( $p < 0.05$ ), 수산화칼슘 처리된 LPS의 경우에는 농도에 따른 cytokine의 수준은 유의할 만한 차이가 없었다( $p > 0.05$ ).
4. *E. coli* LPS로 자극된 다형핵백혈구에서 분비되는 세 가지 cytokine의 수준은 같은 농도의 *P. endodontalis* LPS로 자극된 군에서보다 유의성있게 높게 나타났다( $p < 0.05$ ).

#### 참고문헌

1. Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. Oral Surg Oral Med & Oral Pathol 20:340-349, 1965.
2. Bystrom A, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy. Scand J Dent Res 89:32-38, 1981.
3. Bystrom A, Sundqvist G. The antibacterial action of sodium hypochlorite and EDTA in 60 cases of endodontic therapy. Int Endod J 18:35-40, 1985.
4. Siqueira JF Jr, Machado AG, Silveira RM, Lopes HP, Uzeda M. Evaluation of the effectiveness of sodium hypochlorite used with three irrigation methods in the elimination of *Enterococcus faecalis* from the root canal. Int Endod J 30:279-282, 1997.
5. Bystrom A, Claesson R, Sundqvist G. The antibacterial effect of camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals. Endod Dent Traumatol 1:170-175, 1985.
6. Hasselgren G, Olsson B, Cvek M. Effects of calcium hydroxide and sodium hypochlorite in the dissolution of necrotic porcine muscle tissue. J Endod 14:125-127, 1988.
7. Andersen M, Lund A, Andreasen JO, Andreasen FM. In vitro solubility of human pulp tissue in calcium hydroxide and sodium hypochlorite. Endod Dent Traumatol 8:104-108, 1992.
8. Tronstad L. Root resorption - etiology, terminology and clinical manifestations. Endod Dent Traumatol 4:241-252, 1988.
9. Foreman PC, Barnes F. A review of calcium Hydroxide. Int Endod J 23:283-297, 1990.
10. Heithersay GS. Calcium hydroxide in the treatment of pulpless teeth with associated pathology. J Br Endod Soc 8:74-93, 1975.
11. Fava LR, Saunders WP. Calcium hydroxide pastes: classification and clinical indications. Int Endod J 32(4):257-282, 1999.
12. Siqueira JF Jr, Lopes HP. Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. Int Endod J 32:361-369, 1999.
13. Safavi KE, Nichols FC. Effect of calcium hydroxide on bacterial lipopolysaccharide. J Endod 19:76-78, 1993.
14. Mattsby-Baltzer I, Lindgren K, Lindholm B, Edebo L. Endotoxin shedding by enterobacteria: free and cell-bound endotoxin differ in Limulus activity. Inf & Immun 59:689-695, 1991.
15. Bystrom A, Happonen RP, Sjogren U, Sundqvist G. Healing of periapical lesions of pulpless teeth after endodontic treatment with controlled asepsis. Endod Dent Traumatol 3(2):58-63, 1987.
16. Ørstavik D, Kerekes K, Molven O. Effects of extensive apical reaming and calcium hydroxide dressing on bacterial infection during treatment of apical periodontitis. Int Endod J 24:1-7, 1991.
17. Rietschel ET, Kirikae T, Schade FU, Mamat U, Schmidt G, Loppnow H, Ulmer AJ, Zahringer U, Seydel U, Di Padova F, et al. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. FASEB J 8(2):217-225, 1994.
18. Morrison DC, Ryan JL. Endotoxin and disease mechanisms. Ann Rev Med 38:417-432, 1987.
19. Niwa M, Milner KC, Ribi E, Rudbach JA. Alteration of physical, chemical and biological properties of endotoxin by treatment with mild alkali. J Bacteriol 97:1069-1077, 1969.
20. Wang CY, Stashenko P. Kinetics of bone-resorbing activity in developing periapical lesions. J Dent Res 70:1362-1366, 1991.
21. Le J, Vilcek J. Tumor necrosis factor and interleukin 1 : Cytokines with multiple overlapping biological activities. Laboratory Investigation 56:234-248, 1987.
22. Nguyen L, Dewhirst FE, Hauschka PV, Stashenko P. : Interleukin 1 $\beta$  stimulates bone resorption and inhibits bone formation in vivo. Lymphokine Cytokine Res 10:15-21, 1990.
23. Lloyd AR, Oppenheim JJ. Poly's lament: the neglected role of the polymorphonuclear neutrophil in the afferent limb of the immune response. Immunol Today 13:169-172, 1992.
24. Cassatella MA. The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. Immunol Today 16(1):21-26, 1995.
25. Buck RA, Cai J, Eleazer PD, Staat RH, Hurst HE. Detoxification of endotoxin by endodontic irrigants and calcium hydroxide. J Endod 27(5):325-327, 2001.
26. Safavi KE, Nichols FC. Alteration of biological properties of bacterial lipopolysaccharide by calcium hydroxide treatment. J Endod 20:127-129, 1994.
27. Barthel CR, Levin LG, Reisner HM, Trope M. TNF- $\alpha$  release in monocytes after exposure to calcium hydroxide treated *Escherichia coli* LPS. Int Endod J 30:155-159, 1997.
28. Sundqvist G. Prevalence of black-pigmented bacteroides species in root canal infections. J Endod 15:13-19, 1989.
29. Haapasalo M, Ranta H, Ranta K, Shah H. Black-pigmented bacteroides spp. in human apical periodontitis. Inf & Immun 53:149-153, 1986.
30. Baumgartner JC, Falkler WA. Bacteria in the apical 5mm of infected root canals. J Endod 17:380-383,

- 1991.
31. Hashioka K, Yamasaki M, Nakane A, Horiba N, Nakamura H. The relationship between clinical symptoms and anaerobic bacteria from infected root canals. *J Endod* 18:558-561, 1992.
  32. Ko HJ, Lim SS. Effects of *Porphyromonas endodontalis* lipopolysaccharide on IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and IL-1ra production by human polymorphonuclear leukocytes. PhD thesis, Dept. of Conservative Dentistry, Seoul National University, Korea, 2001.
  33. Westphal O, Jann K. Bacterial lipopolysaccharides : extraction with phenol-water and further applications of the procedure. *Methods Carbohydr Chem* 5:83-91, 1965.
  34. Koga T, Nishihara T, Fujiwara T, Nisizawa T, Okahashi N, Noguchi T, Hamada S. Biochemical and immunobiological properties of lipopolysaccharide from *Bacteroides gingivalis* and comparison with LPS from *Escheria coli*. *Infect Immun* 47(3):638-647, 1985.
  35. Pitts DL, Williams BL, Morton TH Jr. Investigation of the role of endotoxin in periapical inflammation. *J Endod* 8(1):10-18, 1982.
  36. Sjogren U, Figdor D, Spangberg L, Sundqvist G. The antimicrobial effect of calcium hydroxide as a short-term intracanal dressing. *Int Endod J* 24(3):119-125, 1991.
  37. Stuart KG, Miller CH, Brown CE Jr, Newton CW. The comparative antimicrobial effect of calcium hydroxide. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 72(1):101-104, 1991.
  38. Lim SS. 임상근관치료학. 의치학사, Korea 123, 1994.
  39. Martin DM, Crabb HS. Calcium hydroxide in root canal therapy. A review. *Br Dent J* 142(9):277-283, 1977.
  40. Munford RS, Hall CL. Detoxification of bacterial lipopolysaccharides(endotoxins) by a human neutrophil enzyme. *Science* 234:203-205, 1986.
  41. Nilsen R, Johannessen AC, Skaug N, Matre R. *In situ* characterization of mononuclear cells in human dental periapical inflammatory lesions using monoclonal antibodies. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 58:160-165, 1984.
  42. Stern MH, Dreizen S, Mackler BF, Levy BM. Isolation and characterization of inflammatory cells from the human periapical granuloma. *J Dent Res* 61:1408-1412, 1982.
  43. Yu SM, Stashenko P. Identification of inflammatory cells in developing rat periapical lesions. *J Endod* 13:535-540, 1987.
  44. Stashenko P. Role of immune cytokines in the pathogenesis of periapical lesions. *Endod Dent Traumatol* 6:89-95, 1990.
  45. Ko HJ, Chung KH, Lim SS. Tissue levels of IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  in pulpal and periapical pathosis. *J Kor Aca Cons Dent* 23(1):316-327, 1998.
  46. Byun HY, Lim SS, Park DS. Levels of TNF- $\alpha$ , - $\beta$ , IL- $\beta$ , TGF- $\beta$ 1 and their relationship with the presence of specific black pigmented bacteria in periapical and pulpal diseases. *J Kor Aca Cons Dent* 24(1):1-12, 1999.
  47. Gong HG, Park DS, Lim SS. Levels of IL-1 and TNF- $\alpha$  in odontogenic cyst & cystic fluid. *J Kor Aca Cons Dent* 24(1):49-54, 1999.
  48. 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(2):130-136, 1994.
  49. Hosoya S, Matsushima K, Ohbayashi E, Yamazaki M, Shibata Y, Abiko Y. Stimulation of interleukin-1beta-independent interleukin-6 production in human dental pulp cells by lipopolysaccharide. *Biochem Mol Med* 59(2):138-143, 1996.
  50. Hosoya S, Matsushima K. Stimulation of interleukin-1 beta production of human dental pulp cells by *Porphyromonas endodontalis* lipopolysaccharide. *J Endod* 23(1):39-42, 1997.
  51. Hofstad T, Skaug N, Svein K. Stimulation of B lymphocytes by LPS from anaerobic bacteria. *Clin Inf Dis* 16(suppl.4):S200-202, 1993.
  52. Yoshimura A, Hara Y, Kaneko T, Kato I. Secretion of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-8 and IL-1ra by human polymorphonuclear leukocytes in response to lipopolysaccharides from periodontopathic bacteria. *J Periodont Res* 32:279-286, 1997.
  53. Matsushita K, Tajima T, Tomita K, Takada H, Nagaoka S, Torii M. Inflammatory cytokine production and specific antibody responses to lipopolysaccharide from endodontopathic black-pigmented bacteria in patients with multilesional periapical periodontitis. *J Endod* 25:795-799, 1999.
  54. 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(11):2550-2553, 1991.
  55. Eidhin DN, Mouton C. A rapid method for preparation of rough and smooth lipopolysaccharide from *Bacteroides*, *Porphyromonas* and *Prevotella*. *FEMS Microbiol Lett* 110(2):133-138, 1993.
  56. Kim JH, Kim MK, Yoon SH. Effects of *Porphyromonas endodontalis* lipopolysaccharide on membrane permeability of fibroblast. *J Kor Aca Cons Dent* 24(3):437-446, 1999.
  57. Schein B, Schilder J. Endotoxin content in endodontically involved teeth. *J Endod* 1:19-21, 1975.
  58. Horiba N, Maekawa Y, Abe Y, Ito M, Matsumoto T, Nakamura H. Correlations between endotoxin and clinical symptoms or radiolucent areas in infected root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 71(4):492-495, 1991.
  59. Schonfeld SE, Greening AB, Glick DH, Frank AL, Simon JH, Herles SM. Endotoxic activity in periapical lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 53(1):82-87, 1982.
  60. Yamasaki M, Nakane A, Kumazawa M, Hashioka K, Horiba N, Nakamura H. Endotoxin and gram-negative bacteria in the rat periapical lesions. *J Endod* 18(10):501-504, 1992.
  61. Sweadner KJ, Forte M, Nelsen LL. Filtration removal of endotoxin(pyrogens) in solution in different states of aggregation. *Appl Environ Microbiol* 34:382-385, 1977.