

Prevotella nigrescens의 용혈특성에 관한 연구

곽주석¹ · 장훈상¹ · 장석우¹ · 이수종¹ · 유용욱² · 민경산^{1*}

¹원광대학교 치과대학 치과보존학교실, ²원광대학교 치과대학 구강생화학교실

ABSTRACT

A STUDY ON THE HEMOLYTIC PROPERTIES OF PREVOTELLA NIGRESCENS

Ju-Seok Kwak¹, Hoon-Sang Jang¹, Seok-Woo Jang¹, Su-Jong Lee¹,
Yong-Wook Yu², Kyung-San Min^{1*}

¹Department of Conservative Dentistry, College of Dentistry, Wonkwang University,

²Department of Oral Biochemistry, College of Dentistry, Wonkwang University

Hemolytic property is a specific feature of bacteria to obtain iron which is essential for its survival in host tissues. Therefore, it is thought to be one of several factors of virulence. The purpose of this study was to investigate the hemolytic properties of *Prevotella nigrescens* isolated from the teeth diagnosed as pulp necrosis and apical periodontitis under the presence of hemolysin inhibitors such as NaN₃ and dithiothreitol, heat, various pH and cultural conditions.

The results were as follows:

1. Clinically isolated *P. nigrescens* strains and standard *P. nigrescens* ATCC 33563 showed hemolytic activity.
2. *P. nigrescens* showed higher hemolytic activity against human erythrocytes than sheep or horse erythrocytes.
3. NaN₃ and dithiothreitol (DTT) reduced the hemolytic activity of *P. nigrescens* in a dose dependent manner ($p < 0.05$).
4. Optimal pH for the maximum hemolytic activity of *P. nigrescens* was 4.0 and the hemolysin was stable under the 50°C, but the hemolytic activity was significantly decreased at 95°C.
5. *P. nigrescens* cultured in 10% CO₂ condition showed higher hemolytic activity than the bacteria cultured in the anaerobic condition. [J Kor Acad Cons Dent 30(4):335-343, 2005]

Key words: *P. nigrescens*, Hemolytic property, Iron, Virulence, Erythrocyte, Hemolysin inhibitor

- Received 2005.1.12, revised 2005.2.18, accepted 2005.2.21 -

* Corresponding author: Kyung-San Min

Instructor, Department of Conservative Dentistry,
College of Dentistry, Wonkwang University
344-2 Shinyong-dong, Iksan, Cheonbuk, Korea, 570-749
Tel: 82-63-850-6930 Fax: 83-63-850-1932
E-mail: mksdd@wonkwang.ac.kr

I. 서 론

치수염 및 치주염 발병에 구강내 세균이 관여하는 것이 보고됨에 따라^{1,2)} 병인인자로서 주된 연구의 대상이 되어왔으며 치수와 치주병변의 형성에서 호기성 및 혐기성 세균들이 중요한 역할을 할 것이라고 여겨지게 되었다³⁾. 그러나 이에

※ 이 논문은 2004년도 원광대학교의 교비 지원에 의해서 수행됨.

관련된 세균의 배양은 적당한 혐기적 배양기술이 개발되고 나서야 가능하게 되었으며 많은 치수질환 및 치주질환 병원균을 더욱 정확하게 동정할 수 있게 되었다. 이에 힘입어 치수와 치주질환의 발생과정에 관여하는 세균의 산물 및 독성 인자들의 분석이 뒤따르게 되었으며 이 인자들 중에서 특히 지질다당체, 효소 그리고 백혈구 독소 및 용혈소 등에 관한 연구가 중점적으로 이루어졌다. 이들의 역할은 치은의 세포 외 기질 파괴와 용해 뿐 아니라 섬유아세포, 다형핵 백혈구 그리고 림프구의 기능을 저해하는 것으로 알려져 있다^{4,6)}. 그러므로 이런 성분들이 가지고 있는 세균의 생물학적 활성을 연구하는 것은 치주질환 및 치수질환의 잠재적 경로를 밝히는데 중요하다.

*P. nigrescens*는 그람음성의 편성 혐기성 간균으로서 치은연하 치태와 근관에서 빈번히 검출된다. 이 세균은 구강에서 특징적으로 발견되지만 전신에서 생기는 여러 농양과 혼합 혐기성 감염에서도 분리된다. 또한 치은염 및 심한 치수질환과 치주질환이 생길 때 *P. nigrescens*의 세균수가 상대적으로 증가한다고 보고된 바 있다^{7,8)}.

상주균이나 외부에서 침입하는 세균이 숙주 내에서 성장하고 증식하기 위해서는 숙주 내의 철의 획득이 필수적인데 숙주 내에서 이용할 수 있는 철은 거의 모두 적혈구와 같은 세포 속에 존재한다. 이들 세포에 대한 세균의 용혈활성은 세균 성장 및 증식에 필요한 철의 획득을 증가시키는 작용을 하는 것으로 보이며 기능면에서 볼 때 중요한 독력 인자로 간주될 수 있다.

일반적으로 박테리아의 외독소 (extracellular toxin)는 크게 단백질과 세포용해소 (cytolysin)로 나눌 수 있다. 이 중 세포용해소는 관찰하기 쉬운 적혈구의 용혈상에서 먼저 발견되어 용혈소 (hemolysin)라 불리어 왔으며 이들 중 일부는 적혈구 이외의 세포에도 강한 독성을 나타낸다. 이들을 실험동물에 투여하여 나타나는 소견으로 임상증세를 설명할 수 있다. 용혈소는 작용기전에 따라 (1) 세포막의 phospholipid를 분해하는 phospholipase, (2) 세포막의 cholesterol에 부착하여 막의 투과성을 변화시키는 thiol-activated cytolysin, (3) 세포막에 작용하는 detergent 작용을 가진 세포용해소 및 그 작용기전을 알 수 없는 것들로 나눌 수 있다. 용혈소의 중요기능은 생체 혹은 시험관 내에서 적혈구의 외막 성분인 인지질막을 파괴하여 헤모글로빈을 방출시키는 것으로 보고되고 있다^{9,10)}.

세균 중에서는 *Streptococcus species*¹¹⁾, *Escherichia coli*¹²⁾, *Serratia species*¹³⁾, *Staphylococcus species*¹⁴⁾, *Actinobacillus pleuropneumoniae*¹⁵⁾, *Porphyromonas gingivalis*¹⁶⁾, *Clostridium botulinum*¹⁷⁾, *Listeria monocytogenes*¹⁸⁾와 *Fusobacterium nucleatum*¹⁹⁾ 등의 용혈활성에 관한 연구가 보고되었다. *P. nigrescens*는 용혈현상을 나타내는 것으로 보고되었으나²⁰⁾, 용혈특성에 관한 연구는

거의 이루어져 있지 않다.

따라서 본 연구는 괴사치수와 치근단 치주염을 가진 치아의 치수에서 분리한 병원성세균인 *P. nigrescens*의 용혈특성에 대해 연구함으로써 이 세균의 용혈기전을 밝히는데 도움을 얻고자 하였다.

II. 연구 재료 및 방법

1. *P. nigrescens*의 분리 및 배양

근관치료를 위해 원광대학교 치과병원 보존과에 내원한 환자 중 최근 3개월 동안 항생제를 복용하지 않았으며 괴사치수와 치근단 치주염을 가진 치아를 선택하여 치아를 퍼미스로 세정하고 러버댐으로 격리한 후 치아, 러버댐 및 클램프를 3% 과산화수소로 소독하였다. 근관와동을 형성하고 치수관을 개방 후, #15 paper point를 근관에 1분간 넣어서 근관내 용액을 채취하였다. Paper point를 미리 환원시킨 trypticase-soy broth (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA)가 든 tube에 넣은 후, vortexer로 혼합하고 5% defibrinated sheep blood, 5 µg/ml hemin 및 0.5 µg/ml menadione이 첨가된 Brucella agar 배지 (BBL Microbiology Systems, Cockeysville, MD, USA)에 접종하였다. 일차 배양은 85% N₂, 10% H₂, 5% CO₂를 포함한 혐기성 세균 배양기 (Coy Laboratory Products, MI, USA)에서 8-15일간 37°C에서 배양시켰다.

일차배양 시 형성된 black-pigmented colony들을 계대 배양하여 각각 special potency disk 검사, filter paper spot 검사, PCR 및 API kit 검사를 통하여 *P. nigrescens*로 동정된 세균을 분리하였다. 검사의 정확도를 높이기 위해 표준균주인 *P. nigrescens* ATCC와 각 검사 결과를 비교하여 동정하였다.

2. 적혈구의 준비

사람의 적혈구는 혈액형이 A형인 사람의 정맥으로부터 채취하여 Alsever 용액과 동일한 양으로 섞어 4°C에서 보관하여 사용하였으며, 면양 및 말의 혈액은 코리아 미디아 (Seoul, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 적혈구는 항응고 생리식염수로 세척 후, 원침 (1,500×g, 10분, 4°C) 하였다. 세척한 적혈구는 혈구계산판을 이용하여 적혈구 수를 측정하고, 항응고 생리식염수 1 ml당 2 × 10⁹의 적혈구 세포의 농도로 조정하여 사용하였다.

3. 용혈활성 측정

세균 배양액을 원심분리 (12,000 rpm, 15분, 4°C)하여

균을 제거하고 상청액에 1% 적혈구 부유액을 넣고 37°C에서 1시간 배양하였다. 그 후 용혈되지 않고 남아있는 온전한 적혈구를 제거하기 위해 원심분리 (12,000 rpm, 15분, 4°C) 하여 상청액을 얻은 다음 상청액에 유리된 헤모글로빈의 흡광도를 450 nm의 파장에서 읽어 세균의 용혈활성을 측정하였다. 기준균은 적혈구 현탁액에 세균을 넣지 않고 항응고 생리식염수만을 섞어서 반응시킨 다음 동일한 방법으로 흡광도를 측정하였다.

4. 적혈구의 출처에 따른 용혈활성의 비교

적혈구의 출처에 따른 용혈활성을 비교하기 위해 표준균주인 *P. nigrescens* ATCC 33563과 임상 분리 균주인 *P. nigrescens* 2304에 대하여 사람, 면양 및 말의 혈액을 항응고 생리식염수로 세척하고 최종적으로 같은 생리식염수에 2.5배 (v/v) 희석하여 용혈활성시험에 이용하였다.

5. 용혈활성에 대한 NaN₃ 및 dithiothreitol (DTT)의 영향

일반적인 용혈소 억제제로 알려진 NaN₃ 및 dithiothreitol (DTT)가 *P. nigrescens*의 용혈 활성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 NaN₃과 DTT를 세균 배양 상청액에 각각 2 mM, 10 mM 및 50 mM 농도로 희석한 후 용혈활성을 관찰하였으며, 이때 같은 조건 하에서 세균을 첨가하지 않은 균을 기준균으로 하였다. 실험은 모두 3회 반복하였으며, 억제비율은 [(대조군-실험군)/대조군] × 100의 식을 이용하여 계산하였다. 얻은 결과는 통계프로그램인 SPSS (ver 10.0)를 사용하여, 평균과 표준편차로 제시하였으며, $\alpha = 0.05$ 수준에서 실험군과 대조군의 평균치를 Mann-Whitney U test로 유의성을 검증하였다.

6. 열처리가 용혈활성에 미치는 효과

P. nigrescens 용혈소의 열에 대한 안정성을 시험하기 위하여 세균 배양 상청액을 각각 25°C, 37°C, 50°C 및 95°C 항온수조에서 1, 24, 48 및 72시간 열처리 한 후 용혈활성 시험을 시행하였다.

7. pH가 용혈활성에 미치는 효과

P. nigrescens 용혈소가 최대 활성을 보이는 최적의 pH를 알아보기 위하여 용혈 반응액을 각각 pH가 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 및 10으로 조절한 후 용혈활성시험에 이용하였다.

8. 배양조건이 용혈활성에 미치는 효과

배양조건에 따른 용혈활성의 변화를 알아보기 위해 세균을 혐기성 배양기, 호기성 배양기 및 10% CO₂ 배양기에서 1, 24, 48 및 72시간 각각 배양한 후 용혈활성을 관찰하였다. 기준균으로서는 적혈구 현탁액에 세균을 넣지 않고 항응고 생리식염수만을 섞어서 반응시킨 다음 동일한 방법으로 흡광도를 측정하였다.

III. 연구 결과

1. 용혈활성 실험

괴사치수와 치근단 치주염을 가진 환자의 치아를 선택하여 세균을 채취한 후, 배양하여 각각 special potency disk 검사, filter paper spot 검사, PCR 검사 및 API 검사를 통하여 *P. nigrescens* 7 균주를 분리 하였다. 표준균주인 *P. nigrescens* ATCC 33563과 분리 균주에 대해 용혈활성을 검사한 결과, 표준균주가 0.150의 흡광도를 나타낸 반면, 임상분리균주는 0.082 (55%)에서 0.149 (99%)의 흡광도를 나타내었다 (Table 1).

2. 적혈구의 출처에 따른 용혈활성의 비교

사람, 면양 및 말의 적혈구를 사용하여 *P. nigrescens* ATCC 33563과 *P. nigrescens* 2304의 용혈활성을 조사한 결과 세 종의 적혈구 중에서 사람의 적혈구가 가장 높은 용혈활성을 나타내었다 (Table 2). 면양 적혈구에 대해 *P. nigrescens* ATCC 33563의 용혈활성은 사람 적혈구에 비하여 18%, *P. nigrescens* 2304는 32%의 용혈활성을 보여 비교적 낮은 감수성을 보였다. 말의 적혈구의 용혈활성은 표준균주인 *P. nigrescens* ATCC 33563에 대해서는 거의 나타나지 않았으며, 임상균주인 *P. nigrescens* 2304에 대해서는 사람의 적혈구에 비해 51%의 용혈활성을 나타내었다.

3. 용혈활성에 대한 NaN₃ 및 dithiothreitol (DTT)의 영향

P. nigrescens 균주의 용혈활성에 대한 NaN₃와 dithiothreitol (DTT)의 영향은 Table 3과 4와 같다. *P. nigrescens* ATCC 33563에 대해 sodium azide를 첨가하지 않은 대조군에 대해 2 mM 첨가하였을 때 5.0%의 용혈활성을 보여 용혈활성이 유의하게 감소되었고 ($p < 0.05$), 10 mM과 50 mM 농도에서는 각각 용혈활성을 나타내지 않았

Table 1. Hemolytic activity of *P. nigrescens* isolates

Strains	Host			hemolytic activity (A450)
	Age	Sex	Isolation site	
<i>P. nigrescens</i> ATCC 33563				0.150 ± 0.003
<i>P. nigrescens</i> 203	22	F	#46	0.131 ± 0.001
<i>P. nigrescens</i> 304	22	F	#47	0.107 ± 0.002
<i>P. nigrescens</i> 204	22	F	#46	0.129 ± 0.002
<i>P. nigrescens</i> 801	67	M	#26	0.082 ± 0.001
<i>P. nigrescens</i> 2203	39	F	#25	0.113 ± 0.002
<i>P. nigrescens</i> 2304	65	F	#34	0.133 ± 0.004
<i>P. nigrescens</i> 2903	59	F	#46	0.149 ± 0.001

Table 2. Hemolytic activity of *P. nigrescens* ATCC 33563 and *P. nigrescens* 2304 strains based on erythrocytes

Red blood cell origin	Hemolytic activity (A450)	
	<i>P. nigrescens</i> ATCC 33563	<i>P. nigrescens</i> 2304
Human	0.132 ± 0.028(100) ^a	0.116 ± 0.031(100)
Sheep	0.024 ± 0.031(18)	0.037 ± 0.027(32)
Horse	ND ^b	0.059 ± 0.017(51)

^a Relative hemolytic activity (%)

^b ND: not detected

Table 3. Effect of NaN₃ on hemolytic activity of *P. nigrescens* ATCC 33563 and *P. nigrescens* 2304

NaN ₃ (mM)	Hemolytic activity (A450)	
	<i>P. nigrescens</i> ATCC 33563	<i>P. nigrescens</i> 2304
0	0.139 ± 0.035(100) ^a	0.173 ± 0.020(100)
2	0.007 ± 0.012(5.04)*	0.037 ± 0.027(21.4)*
10	ND ^b	0.020 ± 0.012(11.6)*
50	ND	ND

^a Relative hemolytic activity (%)

^b ND: not detected

* p < 0.05 compared with control by Mann-Whitney U test

다 (p < 0.05). *P. nigrescens* 2304에 대해서는 2 mM 과 10 mM 농도로 첨가했을 경우 대조군에 비해 각각 21.4% 와 11.6%의 용혈활성을 보여 유의하게 용혈활성이 감소되었고 (p < 0.05), 50 mM에서는 용혈활성을 보이지 않았다 (p < 0.05).

P. nigrescens ATCC 33563에 대해 DTT를 2 mM 농

도로 첨가 시에는 DTT를 첨가하지 않은 대조군에 대해 110.8%의 용혈활성을 보여 용혈활성을 유의하게 증가시켰고 (p < 0.05), 10 mM 첨가하였을 때는 90.4%로 유의하게 감소시켰으며 (p < 0.05), 50 mM 농도에는 용혈활성을 보이지 않았다 (p < 0.05). *P. nigrescens* 2304에 대해서는 DTT를 2 mM 농도로 첨가 시 대조군에 비해 98.3%의

Table 4. Effect of dithiothreitol (DTT) on hemolytic activity of *P. nigrescens* ATCC 33563 and *P. nigrescens* 2304

DTT (mM)	Hemolytic activity (A ₄₅₀)	
	<i>P. nigrescens</i> ATCC 33563	<i>P. nigrescens</i> 2304
0	0.139 ± 0.035(100) ^a	0.173 ± 0.020(100)
2	0.154 ± 0.032(110.8)*	0.170 ± 0.012(98.3)
10	0.127 ± 0.023(91.4)*	0.124 ± 0.023(71.7)*
50	ND ^b	ND

^a Relative hemolytic activity (%)

^b ND: not detected

* p < 0.05 compared with control by Mann-Whitney U test

Table 5. Effect of pH on hemolytic activity of *P. nigrescens* ATCC33563 and 2304

pH	Hemolytic activity (A ₄₅₀)	
	<i>P. nigrescens</i> ATCC 33563	<i>P. nigrescens</i> 2304
3	ND ^a	ND
4	0.018 ± 0.023	0.035 ± 0.041
5	ND	ND
6	0.001 ± 0.012	ND
7	0.002 ± 0.016	ND
8	0.001 ± 0.010	0.001 ± 0.012
9	0.002 ± 0.012	0.001 ± 0.017
10	0.001 ± 0.017	ND

^a ND: not detected

Table 6. Effect of temperature on hemolytic activity of *P. nigrescens* ATCC 33563 and *P. nigrescens* 2304

Strains	Time	Hemolytic activity (A ₄₅₀)			
		25°C	37°C	50°C	95°C
<i>P. nigrescens</i> ATCC 33563	1h	0.142 ± 0.025	0.137 ± 0.025	0.138 ± 0.028	0.067 ± 0.121
	24h	0.148 ± 0.012	0.138 ± 0.031	0.116 ± 0.020	0.098 ± 0.032
	48h	0.174 ± 0.025	0.140 ± 0.012	0.192 ± 0.026	0.085 ± 0.030
	72h	0.168 ± 0.040	0.176 ± 0.037	0.178 ± 0.032	0.022 ± 0.033
<i>P. nigrescens</i> 2304	1h	0.119 ± 0.023	0.119 ± 0.026	0.116 ± 0.020	0.043 ± 0.097
	24h	0.127 ± 0.028	0.121 ± 0.021	0.072 ± 0.025	0.063 ± 0.028
	48h	0.143 ± 0.030	0.121 ± 0.026	0.135 ± 0.027	0.002 ± 0.023
	72h	0.132 ± 0.025	0.115 ± 0.012	0.128 ± 0.022	ND ^a

^a ND: not detected

Table 7. Effect of various culture status on hemolytic activity of *P. nigrescens* ATCC 33563 and *P. nigrescens* 2304

Strains	Time	Hemolytic activity (A ₄₅₀)		
		Anaerobic incubator	Aerobic incubator	10% CO ₂ incubator
<i>P. nigrescens</i> ATCC 33563	1h	0.091 ± 0.023	0.003 ± 0.038	0.137 ± 0.025
	24h	0.122 ± 0.023	ND ^a	0.138 ± 0.031
	48h	0.103 ± 0.030	ND	0.140 ± 0.012
	72h	0.115 ± 0.040	ND	0.176 ± 0.037
<i>P. nigrescens</i> 2304	1h	0.093 ± 0.024	ND	0.119 ± 0.026
	24h	0.120 ± 0.023	ND	0.121 ± 0.021
	48h	0.100 ± 0.020	ND	0.121 ± 0.026
	72h	0.087 ± 0.028	ND	0.115 ± 0.012

^a ND : not detected

용혈활성을 보였고, 10 mM 농도에서는 71.7%로 용혈활성이 유의하게 감소되었고 (p < 0.05), 50 mM 농도에는 용혈활성을 나타내지 않았다 (p < 0.05).

4. 용혈활성에 대한 pH의 영향

P. nigrescens 균주의 용혈활성에 대한 pH의 영향은 Table 5와 같다. *P. nigrescens* ATCC 33563과 *P. nigrescens* 2304 모두 pH 4에서 용혈활성이 가장 높았으나 다른 pH에서는 용혈활성이 매우 낮게 나타났다. 이러한 결과는 *P. nigrescens* 용혈소가 최대 용혈활성을 나타내는 최적의 pH는 4라는 것을 나타낸다.

5. 열처리가 용혈활성에 미치는 효과

P. nigrescens 용혈소의 열에 대한 안정성을 평가하기 위하여 *P. nigrescens* ATCC 33563과 *P. nigrescens* 2304의 배양 상청액을 25℃, 37℃, 50℃ 및 95℃의 온도에서 각각 1, 24, 48 및 72시간 처리 한 후 용혈활성을 관찰하였다. *P. nigrescens* ATCC 33563과 *P. nigrescens* 2304 모두에서 25℃, 37℃ 및 50℃ 온도로 72시간까지 처리하여도 용혈활성은 큰 차이가 없었으나 95℃로 처리 시 시간이 경과할수록 용혈활성이 감소하는 경향을 보였다. 이러한 결과는 *P. nigrescens*의 용혈소가 50℃ 이하의 온도에서는 안정성이 있는 것을 보여 준다 (Table 6).

6. 배양조건이 용혈활성에 미치는 효과

P. nigrescens ATCC 33563과 *P. nigrescens* 2304에서 모두 10% CO₂ 배양 시 가장 강한 용혈활성을 나타내었

으나 호기성 배양 시에는 거의 용혈활성이 나타나지 않았다. 또한 시간에 따른 용혈활성의 변화는 크게 나타나지 않았다 (Table 7).

IV. 총괄 및 고찰

본 연구에서는 괴사치수와 치근단 치주염으로 진단된 환자의 근관에서 7 균주의 *P. nigrescens*를 분리할 수 있었다. *P. nigrescens*는 gram-negative, non-spore forming, obligately anaerobic, rod 모양의 세균으로 0.3 - 0.7 μm의 폭에 1 - 2 μm 길이까지 자란다. Blood agar 상에 나타나는 colony는 0.5 - 2 mm의 직경에 원형이고 갈색 내지 흑색을 나타내며 Pigmentation은 colony의 주변부에서 주로 나타나고 중심부는 크림색 내지는 암갈색을 띤다. Glucose가 함유된 액체배지에서의 주요한 효소산물은 acetic, isobutyric, isovaleric, 그리고 succinic acid 등이다. Dextran과 glucose, maltose, sucrose의 발효는 대부분의 균주에서 나타나나 fructose나 glycogen, insulin의 발효는 차이가 있다고 보고되었다^{7,8,21}.

*P. nigrescens*와 *P. intermedia*의 site specificity에 대한 연구를 보면, Gharbia 등²²은 정상치주조직과 근관병소에서는 주로 *P. nigrescens*가 많이 분리되고, 치주병소에서는 *P. intermedia*가 많이 분리되며, Bae 등²³은 근관감염부에서 *P. nigrescens*가 73.2%를 차지한다고 보고하였다.

숙주 내에서 세균의 성장과 증식이 일어나려면 철의 획득이 필수적인데 숙주 내에서 이용할 수 있는 철은 거의 모두 적혈구와 같은 세포 속에 있고, 세포 외부에 남아있는 것은 알부민, 합토클로빈, 헤모펙신, 트란스페린 및 락토페린에 결합되어 있다. 세균의 용혈소는 감염이 일어나는 국소적 부위에서 적혈구를 용해하여 세균이 이용할 수 있도록 헤모

글로빈을 유리시키는 작용을 하는 것으로 알려져 있다^{24,25)}. 따라서 세균의 용혈활성은 상주균이나 외부에서 침입하는 세균이 숙주 내에서 성장하고 증식하는데 필요한 철의 획득을 증가시키는 작용을 하는 것으로 보이며 기능면에서 볼 때 중요한 독립인자로 생각할 수 있다^{26,27)}.

본 연구에서 환자에서 분리한 *P. nigrescens*는 모두 용혈활성을 나타내었다. 표준균주 *P. nigrescens* ATCC 33563과 비교하였을 때 임상 분리 균주는 55~99%의 용혈활성이 있는 것으로 나타난다.

사람, 면양 및 말의 3가지 적혈구를 사용하여 *P. nigrescens* ATCC 33563과 *P. nigrescens* 2304의 용혈활성을 조사한 결과 사람 적혈구에 비하여 면양 적혈구에 대한 *P. nigrescens* ATCC 33563의 용혈활성은 18%, *P. nigrescens* 2304는 32%의 용혈활성을 보였다. 말의 적혈구의 용혈활성은 *P. nigrescens* ATCC 33563, *P. nigrescens* 2304 각각 0%, 51%의 용혈활성을 나타내었다. 즉, 세 가지 적혈구 중에서 사람의 적혈구가 가장 높은 용혈활성을 나타내고 면양 및 말의 적혈구에서는 사람의 적혈구보다 낮은 용혈활성을 나타내어, 종간에 용혈활성의 차이가 뚜렷하게 관찰되었다.

일반적인 용혈소 억제제로 알려진 NaN_3 와 DTT가 *P. nigrescens*의 용혈활성에 미치는 영향을 관찰한 결과, 표준균주인 *P. nigrescens* ATCC 33563과 임상분리균주인 *P. nigrescens* 2304에서 모두 농도 의존적으로 용혈활성이 감소하였다. 이는 Chu 등¹⁶⁾의 *P. gingivalis*에 있어서 NaN_3 가 용혈활성을 감소시킨다는 보고와 동일한 결과이다.

SH기는 일반적으로 용혈소를 활성화시키거나, 또는 불활성화 시킨다는 상반된 보고가 있는데^{17,28,29)}, 본 연구에서는 *P. nigrescens* ATCC 33563에 대해 DTT를 첨가하지 않은 대조군에 비해 2 mM 농도로 첨가 시에는 용혈활성이 약간 증가되는 경향을 보였으나, 10 mM 첨가하였을 때는 90.4%로 유의하게 감소되었으며 ($p < 0.05$), 50 mM 농도에는 용혈활성이 완전히 억제되었다 ($p < 0.05$). *P. nigrescens* 2304에 대해서는 대조군에 비해 2 mM에는 98.3%로 용혈활성이 감소하는 경향을 볼 수 있었으며, 10 mM 농도에서는 71.7%로 용혈활성이 유의하게 감소되었고, 50 mM 농도에서는 완전히 억제되었다 ($p < 0.05$).

P. nigrescens 용혈활성에 미치는 pH의 영향을 알아본 결과, *P. nigrescens* ATCC 33563과 *P. nigrescens* 2304 모두 pH 4에서 용혈활성이 가장 높았고, 다른 pH에서는 용혈활성이 매우 낮게 나타났으며 반응의 최적 pH는 4임을 알 수 있었다.

P. nigrescens 용혈소의 열에 대한 안정성을 조사하기 위하여 *P. nigrescens* ATCC 33563과 *P. nigrescens* 2304의 25°C, 37°C, 50°C 및 95°C의 반응온도에서 각각 1, 24,

48 및 72시간을 처리한 결과, 두 균주 모두 95°C에서는 용혈활성이 억제되었으며, 50°C 이하에서는 열에 대한 안정성이 있는 것으로 나타났다.

배양조건에 따른 용혈활성을 알아본 결과 *P. nigrescens* ATCC 33563과 *P. nigrescens* 2304에서 모두 혐기성 조건에서 배양한 것 보다 10% CO_2 배양기에 배양했을 때 보다 높은 용혈활성을 보였으며, 호기성 조건에서 배양했을 때는 용혈활성이 거의 나타나지 않았다. 또한 시간에 따른 용혈활성의 변화는 낮았다.

이상의 결과로 미루어 볼 때, NaN_3 에 의해서는 *P. nigrescens* 표준균주, 임상균주 모두 농도 의존적으로 용혈활성이 감소되었고, DTT는 50 mM 이상에서 용혈활성이 완전히 억제되었다. 용혈활성이 가장 높은 적정 pH는 4이었으며, 온도가 95°C에서는 두 균주 모두 용혈활성이 억제되었고, 50°C이하에서는 열에 대한 안정성이 있는 것으로 보였다. 호기성 배양 시에는 두 균주 모두 균 생장이 억제되어 용혈활성을 나타내지 않으며, 혐기성 배양 시보다는 10% CO_2 배양기에서 배양 시 더 용혈활성이 높게 관찰되었다.

앞으로 *P. nigrescens* 용혈소를 완전 정제하여 보다 정확한 용혈기전, 용혈소와 병원성과의 관계 규명 등의 후속 연구가 필요할 것으로 사료된다.

V. 결 론

괴사치수 및 치근단 치주염 환자의 치아에서 분리한 병원성세균인 *P. nigrescens*의 용혈특성을 규명해 보기 위해 표준균주 (*P. nigrescens* ATCC 33563)와 임상분리균주 (*P. nigrescens* 2304)를 대상으로 연구하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 임상에서 분리한 *P. nigrescens*와 표준균주인 *P. nigrescens* ATCC 33563에서 모두 용혈활성이 나타났다.
2. 사람, 면양 및 말 세가지 종에 대해 용혈활성을 비교한 결과 *P. nigrescens* ATCC 33563과 *P. nigrescens* 2304 둘 다 사람의 적혈구에서 가장 강한 용혈활성을 나타내었고 면양 및 말의 적혈에서는 비교적 낮은 용혈활성을 나타내었다.
3. 일반적으로 용혈활성 억제제로 알려진 NaN_3 와 DTT가 *P. nigrescens*의 용혈활성에 미치는 영향을 관찰한 결과 NaN_3 에 의해서 *P. nigrescens* ATCC 33563과 *P. nigrescens* 2304 둘 다 모두 농도 의존적으로 용혈활성이 감소되었으며, DTT는 50 mM 이상에서 용혈활성이 완전히 소실되는 것으로 나타났다 ($p < 0.05$).
4. *P. nigrescens* ATCC 33563과 *P. nigrescens* 2304가 최대 용혈활성을 나타내는 최적의 pH는 4이었으며,

*P. nigrescens*의 열에 대한 안정성을 관찰한 결과 95℃에서는 시간에 관계없이 *P. nigrescens* ATCC 33563과 *P. nigrescens* 2304 모두 낮은 용혈활성을 보여, *P. nigrescens* ATCC 33563은 50℃에서 48시간 처리하였을 때, *P. nigrescens* 2304의 경우에는 25℃에서 48시간 처리한 경우가 가장 높은 용혈활성을 보였다.

- 배양조건에 따른 *P. nigrescens*의 용혈활성을 비교한 결과 10% CO₂ 배양기에 배양한 경우 혐기성 조건에서 배양한 것보다 더 높은 용혈활성을 보였으며, 호기성 조건에서 배양했을 때는 용혈활성이 거의 나타나지 않았다.

참고문헌

- Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA, Sahasrabudhe A, Dewhirst FE. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol* 183:3770-3783, 2001.
- Slots J, Kamma JJ. General health risk of periodontal disease. *Int Dent J* 51:417-427, 2001.
- Loesche WJ. Role of anaerobic bacteria in periodontal disease. *Ann Otol Rhinol Laryngol Suppl* 154:43-45, 1991.
- Daly CG, Seymour GJ, Kieser JB. Bacterial endotoxin: a role in chronic inflammatory periodontal disease? *J Oral Pathol* 9:1-15, 1980.
- Daly C, Fitzgerald GF, Davis R. Biotechnology of lactic acid bacteria with special reference to bacteriophage resistance. *Antonie Van Leeuwenhoek* 70:99-110, 1996.
- Daly C, Mitchell D, Grossberg D, Highfield J, Stewart D. Bacteraemia caused by periodontal probing. *Aust Dent J* 42:77-80, 1997.
- Shah HN, Gharbia SE. Biochemical and chemical studies on strains designated *Prevotella intermedia* and proposal of a new pigmented species, *Prevotella nigrescens* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 42:542-546, 1992.
- Takahashi N, Yamada T. Glucose metabolism by *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens*. *Oral Microbiol Immunol* 15:188-195, 2000.
- Amano A, Kuboniwa M, Kataoka K, Tazaki K, Inoshita E, Nagata H, Tamagawa H, Shizukuishi S. Binding of hemoglobin by *Porphyromonas gingivalis*. *FEMS Microbiol Lett* 134:63-67, 1995.
- Chattopadhyay K, Bhattacharyya D, Banerjee KK. Vibrio cholerae hemolysin. *Eur J Biochem* 269:4351, 2002.
- Eberhard TH, Sledjeski DD, Boyle MD. Mouse skin passage of a *Streptococcus pyogenes* Tn917 mutant of sagA/pel restores virulence, beta-hemolysis and sagA/pel expression without altering the position or sequence of the transposon. *BMC Microbiol* 1:33, 2001.
- Jurgens D, Ozel M, Takaisi-Kikuni NB. Production and characterization of *Escherichia coli* enterohemolysin and its effects on the structure of erythrocyte membranes. *Cell Biol Int* 26:175-186, 2002.
- Hertle R, Hilger M, Weingardt-Kocher S, Walev I. Cytotoxic action of *Serratia marcescens* hemolysin on human epithelial cells. *Infect Immun* 67:817-825, 1999.
- Ali-Vehmas T, Vikerpuur M, Pyorala S, Atroshi F. Characterization of hemolytic activity of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitic milk. *Microbiol Res* 155:339-344, 2001.
- Byrd W, Hooke AM. Immunization with temperature-sensitive mutants of *Actinobacillus pleuropneumoniae* induces protective hemolysin-neutralizing antibodies in mice. *Curr Microbiol* 34:149-154, 1997.
- Chu L, Bramanti TE, Ebersole JL, Holt SC. Hemolytic activity in the periodontopathogen *Porphyromonas gingivalis*: kinetics of enzyme release and localization. *Infect Immun* 59:1932-1940, 1991.
- Haque A, Sugimoto N, Horiguchi Y, Okabe T, Miyata T, Iwanaga S, Matsuda M. Production, purification, and characterization of botulinolysin, a thiol-activated hemolysin of *Clostridium botulinum*. *Infect Immun* 60:71-78, 1992.
- Glomski IJ, Gedde MM, Tsang AW, Swanson JA, Portnoy DA. The *Listeria monocytogenes* hemolysin has an acidic pH optimum to compartmentalize activity and prevent damage to infected host cells. *J Cell Biol* 156:1029-1038, 2002.
- Falkler WA Jr, Clayman EB, Shaefer DF. Haemolysis of human erythrocytes by the *Fusobacterium nucleatum* associated with periodontal disease. *Arch Oral Biol* 28:735-739, 1983.
- Okamoto M, Maeda N, Kondo K, Leung KP. Hemolytic and hemagglutinating activities of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens*. *FEMS Microbiol Lett* 178:299-304, 1999.
- Sayers NM, James JA, Drucker DB, Blinkhorn AS. Possible potentiation of toxins from *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, and *Porphyromonas gingivalis* by cotinin. *J Periodontol* 70:1269-1275, 1999.
- Gharbia SE, Haapasalo M, Shah HN, Kotiranta A, Lounatmaa K, Pearce MA, Devine DA. Characterization of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* isolates from periodontic and endodontic infections. *J Periodontol* 65:56-61, 1994.
- Bae KS, Baumgartner JC, Shearer TR, David LL. Occurrence of *Prevotella nigrescens* and *Prevotella intermedia* in infections of endodontic origin. *J Endod* 23:620-623, 1997.
- Scheffer J, Konig W, Braun V, Goebel W. Comparison of four hemolysin-producing organisms (*Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Aeromonas hydrophila*, and *Listeria monocytogenes*) for release of inflammatory mediators from various cells. *J Clin Microbiol* 26:544-551, 1988.
- Beem JE, Nesbitt WE, Leung KP. Identification of hemolytic activity in *Prevotella intermedia*. *Oral Microbiol Immunol* 13:97-105, 1998.
- Gadeberg OV, Orskov I. *In vitro* cytotoxic effect of alpha-hemolytic *Escherichia coli* on human blood granulocytes. *Infect Immun* 45:255-260, 1984.
- Konig B, Konig W. Effect of growth factors on *Escherichia coli* alpha-hemolysin-induced mediator release from human inflammatory cells: involvement of the signal transduction pathway. *Infect Immun* 62:2085-2093, 1994.
- Krasilnikov OV, Merzlyak PG, Yuldasheva LN, Rodrigues CG, Bhakdi S, Valeva A. Electrophysiological evidence for heptameric stoichiometry of ion channels formed by *Staphylococcus aureus* alpha-toxin in planar lipid bilayers. *Mol Microbiol* 37:1372-1378, 2000.
- Mengaud J, Chenevert J, Geoffroy C, Gaillard JL, Cossart P. Identification of the structural gene encoding the SH-activated hemolysin of *Listeria monocytogenes*: listeriolysin O is homologous to streptolysin O and pneumolysin. *Infect Immun* 55:3225-3227, 1987.

국문초록

Prevotella nigrescens의 용혈특성에 관한 연구

곽주석¹ · 장훈상¹ · 장석우¹ · 이수종¹ · 유용욱² · 민경산^{1*}

¹원광대학교 치과대학 치과보존학교실, ²원광대학교 치과대학 구강생화학교실

세균의 용혈활성은 세균이 숙주 내에서 생존하기 위해 필요한 철을 획득하기 위한 특성이며 기능면에서 볼 때 숙주에 대한 중요한 독립인자로 간주될 수 있다. 본 연구에서는 괴사치수 및 치근단 치주염으로 진단된 환자의 근관에서 분리한 Prevotella nigrescens의 용혈활성을 다양한 조건 하에서 측정하여 그 특성을 규명하는 것을 목적으로 한다.

1. 임상에서 분리한 *P. nigrescens*와 표준균주인 *P. nigrescens* ATCC 33563에서 모두 용혈활성이 나타났다.
2. 사람, 면양 및 말 세 가지 종에 대해 용혈활성을 비교한 결과 사람의 적혈구에서 가장 강한 용혈활성을 나타내었다.
3. 용혈소 억제제인 NaN_3 와 dithiothreitol (DTT)는 농도의존적으로 *P. nigrescens*의 용혈활성을 감소시켰다 ($p < 0.05$).
4. *P. nigrescens*가 최대 용혈활성을 나타내는 최적의 pH는 4이었으며, 50°C이하의 온도에서는 용혈활성을 보였으나 95°C에서 급격히 감소하였다.
5. 배양조건에 따른 *P. nigrescens*의 용혈활성을 비교한 결과 10% CO_2 배양기에 배양한 경우 혐기성 조건에서 배양한 것보다 더 높은 용혈활성을 보였다.

주요어: *P. nigrescens*, 용혈활성, 철, 독립인자, 적혈구, 용혈소 억제제