

방사선조사가 *Streptococcus mutans*에 미치는 영향

경희대학교 치과대학 구강악안면방사선학교실 및 구강생물학연구소
안기동 · 김규태 · 최용석 · 황의환

Effect of irradiation on the *Streptococcus mutans*

Ki-Dong Ahn, Gyu-Tae Kim, Yong-Suk Choi, Eui-Hwan Hwang

Department of Oral and Maxillofacial Radiology, College of Dentistry and Institute of Oral Biology, Kyung Hee University

ABSTRACT

Purpose : To observe direct effect of irradiation on cariogenic *Streptococcus mutans*.

Materials and Methods : *S. mutans* GS5 was exposed to irradiation with a single absorbed dose of 10, 20, 30, and 40 Gy. Viability and changes in antibiotic sensitivity, morphology, transcription of virulence factors, and protein profile of bacterium after irradiation were examined by pour plate, disc diffusion method, transmission electron microscopy, RT-PCR, and SDS-PAGE, respectively.

Results : After irradiation with 10 and 20 Gy, viability of *S. mutans* was reduced. Further increase in irradiation dose, however, did not affect the viability of the remaining cells of *S. mutans*. Irradiated *S. mutans* was found to have become sensitive to antibiotics. In particular, the bacterium irradiated with 40 Gy increased its susceptibility to cefotaxime, penicillin, and tetracycline. Under the transmission electron microscope, number of morphologically abnormal cells was increased as the irradiation dose was increased. *S. mutans* irradiated with 10 Gy revealed a change in the cell wall and cell membrane. As irradiation dose was increased, a higher number of cells showed thickened cell wall and cell membrane and lysis, and appearance of ghost cells was noticeable. In RT-PCR, no difference was detected in expression of *gtfB* and *spaP* between cells with and without irradiation of 40 Gy. In SDS-PAGE, proteins with higher molecular masses were gradually diminished as irradiation dose was increased.

Conclusion : These results suggest that irradiation affects the cell integrity of *S. mutans*, as observed by SDS-PAGE, and as manifested by the change in cell morphology, antibiotic sensitivity, and eventually viability of the bacterium. (*Korean J Oral Maxillofac Radiol* 2007; 37 : 35-43)

KEY WORDS : Radiotherapy; Xerostomia; Dental Caries; *Streptococcus Mutans*

서론

타액은 치아 법랑질의 재광화에 필요한 무기질, 구강점막을 보호하는데 필요한 면역글로불린과 같은 항체, 살균작용에 관여하는 리소자임과 정균작용에 관여하는 락토페린과 같은 항균물질을 함유하고 있으며, 저작, 연하, 발음 시에 운환작용을 할 뿐만 아니라, 구강 내 세균의 탄수화물대사로 인해 생성되는 산을 중화시키는 완충작용 등과 같은 다양한 구강기능을 수행하는데 있어 매우 중요한 역할을 담당하고 있다.^{1,2} 그러나 타액선 질환, 당뇨병, 구호흡,

정신 장애, 호르몬 장애 등이 발생하거나, 이뇨제, 항고혈압제 등과 같은 약물복용, 두경부 방사선치료를 시행하는 경우에는 타액의 분비 감소가 유발되며,^{1,3-5} 이로 인한 미각 장애, 치아우식증, 치주조직의 파괴, 점막염, 연조직 궤양 등의 부작용이 발현됨으로써 식욕 상실에 따른 영양 상태의 불균형이 나타나게 된다.⁶⁻⁸

특히, 두경부 방사선치료 시에는 방사선 자체가 치아우식증의 진행에 영향을 미치지 않는으나, 타액선이 방사선 조사야에 자주 포함되므로 타액의 분비 감소와 더불어 치아우식증의 진행에 영향을 미치는 타액의 점도, 수소가 온농도지수 및 무기질과 유기질 성분에 변화가 야기된다.^{9,10} 또한 구강균총의 균형에도 심각한 변화가 초래되어 비우식유발 미생물이 감소되고, 우식유발 미생물이 증가됨으로써 중증의 다발성 치아우식증이 발생되는데,¹¹⁻¹⁴ 탄수

접수일 : 2006년 12월 4일; 심사일 : 2006년 12월 5일; 채택일 : 2007년 1월 3일
Correspondence to : Prof. Eui-Hwan Hwang
Department of Oral and Maxillofacial Radiology, College of Dentistry, Kyung Hee University 1 Hoigi-dong, Dongdaemun-gu, Seoul 130-701, Korea
Tel) 82-2-958-9405, Fax) 82-2-965-1256, E-mail) hehan@khu.ac.kr

화물의 과다한 섭취와 구강위생 불량도 치아우식증을 촉진시키는 것으로 보고되고 있다.¹⁵

방사선유발 구강건조증시 구강균총의 변화에 대해, Larson과 Keyes¹⁶는 방사선유발 구강건조증 환자에서 치아우식증의 감수성이 현저히 증가된다는 것은 타액이 숙주의 저항성과 치아우식 유발 병원균간의 상호작용에 중요한 역할을 담당한다는 것을 제시하는 것이라고 하였고, Beumer 등⁹은 두경부 방사선치료 후 구강균총의 변화는 방사선에 의한 직접적인 영향이기보다는 방사선유발 구강건조증에 따른 이차적인 변화에 의해 나타난다고 하였다. 또한 Epstein 등¹⁷은 방사선치료에 따른 타액분비량의 감소와 타액의 수소이온농도지수의 저하가 치아우식증을 유발시킬 수 있는 미생물의 증식과 관련이 있다고 하였으며, Al-Nawas와 Grötz¹⁸는 두경부 방사선치료시 구강균총의 변화는 타액의 분비량과 구성 성분에 의해 주로 영향을 받는다고 하였다. 그러나 Brown 등¹²은 치아우식증은 미생물에 의해 직접적으로 발병되는 질환이므로 방사선유발 구강건조증과 치아우식증과의 관련성은 구강 내 미생물의 전체적인 변화와 밀접하다고 하였고, Lacatusu 등¹⁹은 두경부 방사선치료 환자의 89%에서 다발성 치아우식증이 나타났으며, 이는 치아우식증의 주요 요인으로 간주되는 세균이 방사선에 의해 변화되었기 때문이므로 치아우식증을 예방하기 위해서는 구강 미생물 중 특정 세균의 변화를 연구하여야 한다고 하였다.

이와 같이 두경부 방사선치료는 구강건조증을 유발시킬 뿐만 아니라, 구강균총의 현저한 변화를 야기시키며, 이러한 구강균총의 변화는 타액의 분비감소, 타액의 성분 변화 등과 맞물려 중증의 치아우식증을 일으키는 것으로 보고되고 있다.^{11,12}

최근 분자생물학적 기술의 발전에 따른 진단방법의 개선으로 인해 치아우식증의 병인은 주요 병원균과 관련이 있는 것으로 밝혀져 있다. 따라서 두경부 방사선치료의 만성 부작용 중의 하나인 방사선치아우식증과 관련된 우식유발 미생물을 억제시키기 위한 국소적인 방부제, 항생제 및 각종 불소제제의 사용에 따른 우식유발균의 변화에 대한 연구들²⁰⁻²²은 활발히 진행된 바 있으나, 두경부 방사선치료 환자에서 이들 주요 병원균의 발현양상이나 방사선이 실제 우식유발 미생물에 미치는 직접적인 영향에 관한 연구는 매우 드물다. 또한 두경부 방사선치료시에는 치아우식증의 높은 발현율과 발치에 따른 방사선골수염과 같은 심각한 합병증으로 인해 방사선치료 동안은 물론, 방사선치료 시행 전과 후에도 이에 대한 적극적인 예방 치치가 매우 중요하므로 우식유발 미생물의 방사선감수성을 숙지하는 것은 치과임상에서 의의가 크다고 생각된다.

이에 본 연구에서는 치아우식증의 원인균인 *Streptococcus mutans*²³를 대상으로 방사선을 조사한 다음, 실험균주의 생균 수와 항생제에 대한 감수성을 검사하였으며, 실험

균주의 구조적, 형태적 변화를 투과전자현미경과 분자생물학적 방법을 이용하여 관찰하였다.

재료 및 방법

1. 실험균주

치아우식증 원인균인 *S. mutans* GS5를 실험균주로 채택하였으며, 이를 실험목적에 따라 방사선비조사균을 대조군으로, 방사선조사균을 실험군으로 각각 나누었으며, 실험군을 다시 방사선조사선량에 따라 10 Gy 조사군, 20 Gy 조사군, 30 Gy 조사군 및 40 Gy 조사군으로 정하였다.

2. 실험방법

1) 방사선조사 전 실험균주의 배양

생균 수의 측정 및 항생제 감수성 검사를 위해 *S. mutans* 실험균주를 brain heart infusion (BHI) 액체배지와 BHI 한천배지에서 37°C에서 24시간 혐기적으로 배양하였다. 배양된 실험균주를 분광광도계 (Ultraspec 2000, Pharmacia Biotech, USA)로 600 nm에서 흡광도가 0.1이 되도록 새 BHI 액체배지에 희석하였다. 한편, 투과전자현미경 및 분자생물학적 관찰을 위해서는 실험균주를 BHI 액체배지에 접종하여 37°C 혐기 배양기에서 분광광도계로 600 nm에서 흡광도가 0.4가 되도록 배양하였다.

2) 방사선조사

배양된 실험균주를 멸균된 100 mL 비이커에 옮긴 후 혈액방사선조사장치 (CIS Bio International, France)를 이용하여 선량률 667 cGy/min으로 10, 20, 30, 40 Gy의 흡수선량이 되도록 방사선을 1회 조사하였다.

3) 관찰항목

(1) 생균 수 측정

방사선을 조사한 직후 배양액 내 균의 농도가 균일하게 되도록 가볍게 진탕하고 나서 100 μ L를 취하여 생리식염수 900 μ L가 담긴 1.5 mL microcentrifuge tube에 넣고 vortex하여 10배 희석균액을 만들었다. 희석균액을 다시 100 μ L 취하여 생리식염수 900 μ L가 담긴 새 1.5 mL microcentrifuge tube에 넣고 vortex하는 과정을 반복하여 10^{-7} - 10^{-9} 까지 단계적으로 희석하였다. 단계 희석된 균액 100 μ L를 BHI 한천배지에 적당한 다음, 멸균된 유리밀대를 사용하여 균액을 한천배지 전면에서 고루 도말하였다. 도말된 한천배지를 37°C 혐기 배양기에서 2일간 배양한 후 형성된 *S. mutans* 집락이 200개 정도로 나타난 한천배지를 선택하여 집락수를 센 다음, 이 배지에 도말했던 균액의 희석배수를 역산하여 균액 원액 100 μ L당 생균 수를 계산하였다.

(2) 항생제 감수성 검사

방사선을 조사한 *S. mutans*의 항생제에 대한 감수성 변화를 관찰하기 위하여 disc 확산법을 시행하였다. 우선, 위에서와 같이 비이커 내에서 방사선조사선량이 다르게 조사된 각각의 *S. mutans* 실험균주의 생균 수가 일정하게 되도록 조절하였다. 이를 위해, 앞서 생균 수 실험을 통해 10, 20, 30, 40 Gy를 조사한 후 얻은 각각의 생균 수 결과를 토대로 생균 수가 많은 대조군과 10, 20, 30 Gy를 조사한 균액에 새 BHI 액체배지를 첨가, 희석함으로써 40 Gy를 조사한 균액 내 생균 수와 동일하게 조절하였다.

항생제 감수성 검사에 앞서 예비실험을 통해 disc 확산법으로 나타난 억제환 (inhibition zone)의 크기가 측정하기 용이한 20-40 mm 정도가 되도록 항생제 농도를 미리 결정하였다. 이 후, 멸균된 8 mm 직경의 paper disc에 항생제 용액을 20 µL씩 적하하여 각 paper disc 당 항생제 농도가 위에서 결정한 적정농도, 즉 amoxicillin 5 µg, ampicillin 5 µg, cefotaxime 15 µg, penicillin 5 µg, tetracycline 15 µg이 되도록 최종 농도를 조절하였다. 항생제 용액이 적하된 paper disc는 50°C 배양기에서 무균상태로 건조시켰다. 균 농도가 일정하게 조절된 *S. mutans* 균액을 100 µL씩 도달한 BHI 한천배지에 적정농도의 항생제 disc를 올려 놓은 상태로 37°C에서 혐기적으로 2-3일간 배양한 후 항생제 disc 주변에 형성된 *S. mutans*의 억제환 직경을 측정하였다.

(3) 투과전자현미경 관찰

방사선조사에 의한 *S. mutans*의 세포벽, 세포막 및 세포질 구조의 변화를 관찰하기 위해 투과전자현미경을 이용하였다. 방사선을 조사한 *S. mutans* 실험균주를 원심분리하여 얻은 균 pellet을 PBS (phosphate buffered saline, pH 7.4)로 세정한 후 2% glutaraldehyde와 0.2% ruthenium red로 4°C에서 1시간 전고정하였고, PBS로 세정한 다음 2차 고정액인 2% OsO₄로 4°C에서 1시 30분간 후고정하였다. 표본은 ethanol로 탈수시킨 후 Epon 812, DDSA (dodecyl succinoinanhydride), NMA (nadid methyl anhydride), DMP-30 (tridimethyl amino-methyl phenol)을 혼합하여 포매한 다음, 극박 절단하여 uranyl acetate와 lead citrate로 염색한 후, 투과전자현미경 (M-7100; Hitachi, Japan)을 이용하여 관찰하였다.

(4) Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

① Total RNA 추출

방사선조사 후 *S. mutans* 실험균주의 glucosyltransferase (GTF) 유전자인 *gtfB*와 부착물질인 P1 유전자인 *spaP* 발현의 변화를 전사수준에서 관찰하기 위한 RT-PCR을 시행하기에 앞서 total RNA를 분리하였다. 우선 실험균주를 BHI 액체 배지에 접종하여 37°C에서 혐기 상태로 24시간 배양한 다음 배양액 100 µL를 새 액체배지 10 mL 접종한 후

흡광도가 600 nm에서 0.4가 될 때까지 배양하였다. 균 배양액을 10, 20, 30, 40 Gy로 방사선조사한 후 즉시 1 mL씩 취하여 얼음에서 냉각시킨 RNase-free microcentrifuge tube에 옮긴 다음, Qiagen total RNA isolation kit (Valencia, USA)를 사용하여 제조회사의 지시에 따라 total RNA를 추출하였다.

② RT

Qiagen RT-PCR Kit를 사용하여 RT를 시행하였다. 정량하여 RNA 농도를 동일하게 맞춘 Total RNA (50 ng-100 ng/µL), RNasin (40 Units/µL) 0.2 µL, 2 mM NTPs 2 µL, oligo dT primer (10 pmol) 1 µL, MgCl₂ (2-5 mM) 2-4 µL, RNase inhibitor (40 Units/µL) 1 µL를 혼합하고 증류수로 최종량을 20 µL로 조절하였다. 이 RT 혼합액을 50°C에서 30분, 95°C에서 15분간 시행하고 4°C에서 반응을 정지시켜 cDNA를 얻었다.

③ PCR

방사선조사가 *S. mutans*의 병원성에 변화를 초래하는지를 관찰하기 위해 *S. mutans*의 병원성을 결정짓는 데에 중요한 독성인자를 대상으로 유전자 발현의 차이를 전사수준에서 관찰하였다. 우선 sucrose를 이용하여 부착성의 비수용성 glucan을 합성하는 효소인 GTF 유전자인 *gtfB*의 발현을 관찰하기 위해 Hata 등²⁴의 *gtfB* 중간 염기서열에 기초하여 고안한 PCR 산물 크기가 517 bp로 예상되는 forward와 reverse primer를 제작하였다. 한편 실험균주의 부착물질인 P1의 유전자인 *spaP*을 위해서는 PCR산물의 크기가 106 bp로 예상되는 forward와 reverse를 제작하였다 (Table 1).

Table 1. Primers used in RT-PCR of *S. mutans*

Primers	Sequence (5' to 3')	Amplicon size (bp)
<i>gtfB</i> -forward	TAC ACT TTC GGG TGG CTT GG	135
<i>gtfB</i> -reverse	GCT TCT TGC TTA GAT GTC ACT GCG	
<i>spaP</i> -forward	TTT GCC GAT GAA ACG ACC AC	106
<i>spaP</i> -reverse	TAC TCG CAC TCC CTT GAG CCT C	

PCR을 위해 cDNA (10-50 ng/µL) 1-5 µL, primer 각각 10 pmol, Taq DNA polymerase (5 Units/µL; TaKaRa Korea) 0.25 µL, 2 mM dNTP 2-5 µL, 10× buffer 2-5 µL, MgCl₂ (2-5 mM) 2-4 µL를 혼합하고 증류수로 최종량을 50 µL로 조절하였다. PCR 혼합액을 95°C에서 5분간 변성시킨 다음, PCR cycle은 94°C에서 30-60초, 52-55°C에서 30-60초, 72°C에서 60-90초로 25-30회 반복하고, 72°C에서 10분간 반응한 후 4°C에서 반응을 정지하여 PCR 산물을 얻었다. PCR 산물은 1% agarose gel상에서 전기영동한 후 ethidium bromide (0.5 µg/µL)로 염색한 다음, 자외선 하에서 나타난 띠의 크기와 상대적인 양을 확인하고, 확인한 결과는 사진촬영으로 기

특하였다.

(5) Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

방사선조사가 *S. mutans*의 단백질 및 기타 구성 물질 발현에 변화를 초래하는지를 관찰하기 위해 SDS-PAGE를 시행하였다. 방사선을 조사한 *S. mutans* 실험균주를 원심분리한 후 균체를 초음파파쇄기로 1분간 파쇄시킨 다음, 원심분리하여 얻은 상층액을 Bradford방법으로 정량하여 각 시료의 단백질 총량을 동일하게 조절하였다. 농도가 조절된 상층액에 sample buffer를 첨가하여 100°C에서 10분간 처리한 후, SDS-10% polyacrylamide gel 상에서 전기영동하였다. 전기영동이 끝난 polyacrylamide gel은 Coomassie blue (Sigma Chemicals, USA)로 염색한 다음, 염색된 띠를 관찰하였다.

결 과

1. 방사선조사 후 *S. mutans*의 생균 수

대조군에서는 *S. mutans*의 생균 수가 100 µL당 1.77×10^5 이었으나, 10 Gy 조사군에서는 생균 수가 1.47×10^5 으로, 대조군에 비해 생균 수가 다소 감소하여 약 83%의 생존율을, 20 Gy 조사군에서는 생균 수가 4.5×10^5 으로, 대조군에 비해 생균 수가 급격하게 감소하여 약 25%의 생존율

Table 2. Effect of irradiation on viability of *S. mutans* GS5

Radiation dose (Gy)	Number of viable cells (%)
0	177 ^a (100%)
10	147 (83.05%)
20	45 (24.86%)
30	44 (25.42%)
40	44 (25.42%)

S. mutans GS5 grown up to optical density of 0.4 at 600 nm was irradiated and 100 µL of the irradiated bacterial cells was smeared on an agar plate. Number of the viable cells (colony forming unit: CFU) was counted after 48-h incubation. The results shown here are the representative of several experiments unless otherwise indicated. a; indicates CFU at 10⁻³ dilution (%)

Table 3. Change in antibiotic sensitivity of *S. mutans* GS5 after irradiation

Antibiotics	0	10 Gy	20 Gy	30 Gy	40 Gy
Amoxicillin (5 µg)	38 ^a	38	38	37	39
Ampicillin (5 µg)	36	36	36	34	36
Cefotaxime (15 µg)	42	42	40	44	46
Penicillin (5 µg)	39	39	40	40	44
Tetracycline (15 µg)	26	26	28	28	30

Change in antibiotic sensitivity of the bacterium was determined by measuring inhibition zone created by discs containing different antibiotics. a; diameter of the inhibition zone (mm)

을 보였다. 그러나 30 Gy 조사군과 40 Gy 조사군에서는 20 Gy 조사군에 비해 생존율의 차이를 보이지 않았다(Table 2).

2. 방사선조사 후 *S. mutans*의 항생제 감수성

대조군에 비해 실험군에서 항생제 감수성이 전체적으로는 다소 증가하는 경향을 보였다. cefotaxime의 경우 억제환의 직경이 대조군에서는 42 mm이었으나, 40 Gy 조사군에서는 46 mm로 측정되었고, tetracycline의 경우에도 억제환의 직경이 대조군에서는 26 mm이었으나, 40 Gy 조사군에서는 30 mm로 측정되어, 억제환의 직경이 각각 4 mm씩 증가되었다. *S. mutans*의 penicillin에 대한 감수성은 방사선의 영향을 가장 많이 받는 것으로 나타났는데, 대조군에서는 억제환의 직경이 39 mm이었으나, 40 Gy 조사군에서는 44 mm로 측정되어, 억제환의 직경이 5 mm 증가된 것으로 나타났다. 그러나 amoxicillin과 ampicillin의 경우에는 항생제 감수성이 방사선의 영향을 받지 않은 것으로 나타났다(Table 3).

3. 투과전자현미경 관찰

대조군에서는 일부 균에서 세포벽과 세포막이 탈락하는 세포용해 현상이 관찰되었으나, 대부분의 균에서 정상적인 세포벽과 세포막이 뚜렷하게 관찰되었다. 정상적인 형태를 유지하고 있는 균 중 일부에서는 세포분열 초기로 세포벽

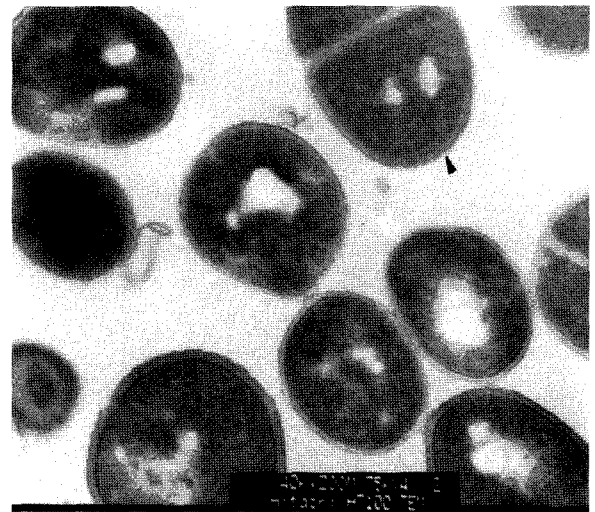


Fig. 1. A transmission electron microphotograph of *S. mutans* without irradiation. *S. mutans* grown up to optical density of 0.4 at 600 nm was fixed, embedded, ultrathin-sectioned, and then stained with uranyl acetate and lead citrate. Notice that the cell wall and cell membrane of the cells are discernible (arrow head) and ribosomes are evenly distributed in the cytoplasm. Some cells are undergoing cell division revealing that the membrane is invaginating and growing toward the center of the cell. (×40,000 mag.)

이 균 중앙을 향해 함입되어 있었고, 또한 일부에서는 세포막이 균 중앙을 완전히 가로 질러 두 개의 세포로서 분열되기 직전의 형태를 보이고 있었다. 균의 내부 세포질은 전자밀도가 높은 리보솜으로 채워져 있었으며, 핵산으로 추정되는 부위는 시편 제작과정에서 떨어져 나간 공포의 형태로 관찰되었다(Fig. 1). 이에 비해 실험군에서는 방사선조사량이 증가됨에 따라 비정상적인 형태를 갖는 균이

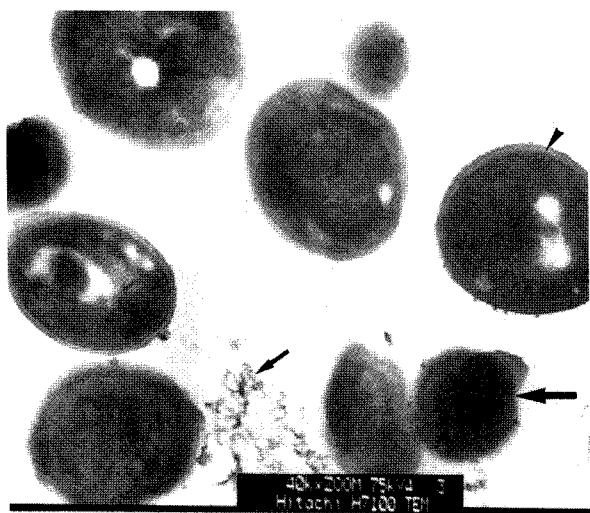


Fig. 2. A transmission electron microphotograph of *S. mutans* irradiated with a single absorbed dose of 10 Gy. Morphologically abnormal cells (arrow head) appear, which have thickened cell wall and cell membrane that cannot be distinguishable from each other. A few lysed cells with sparse remnant of the cell body (small arrow) are observed and abnormally smaller sized, degenerated cells (big arrow) are also detected. ($\times 40,000$ mag.)

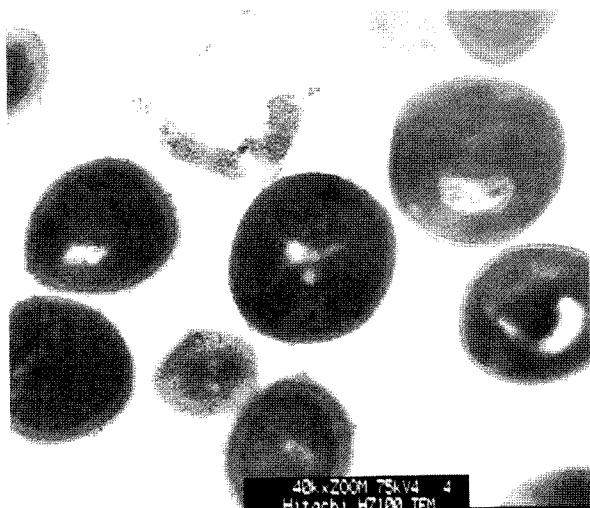


Fig. 3. A transmission electron microphotograph of *S. mutans* irradiated with a single absorbed dose of 20 Gy. Cells with the thickened cell wall and cell membrane are more frequently found and number of lysed cells is increased. ($\times 40,000$ mag.)

상대적으로 많이 증가되었다. 10 Gy 조사군에서는 대조군에 비해 세포의 크기가 다양하게 나타났는데, 비정상적인 크기를 보이는 균 중 일부에서는 세포벽과 세포막의 구분이 불분명해졌고, 세포벽이 탈락하거나 세포벽과 세포막이 함께 탈락하는 균이 다수 관찰되었으며, 이 중 일부 균은 완전히 용해되어 세포의 잔사만이 나타나기도 하였다. 또한 비정상적인 세포 모양을 보이는 균 중에서 작은 크기를 보이며 변성되는 형태를 보이는 것들도 상당수 관찰되었다(Fig. 2). 20 Gy 조사군에서는 상당수 균에서 세포벽과

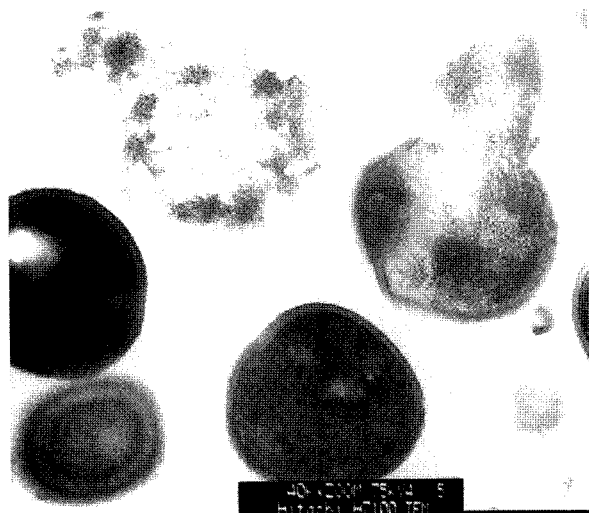


Fig. 4. A transmission electron microphotograph of *S. mutans* irradiated with a single absorbed dose of 30 Gy. A higher number of cells reveal thickening of the cell wall and cell membrane, and cell lysis. ($\times 40,000$ mag.)

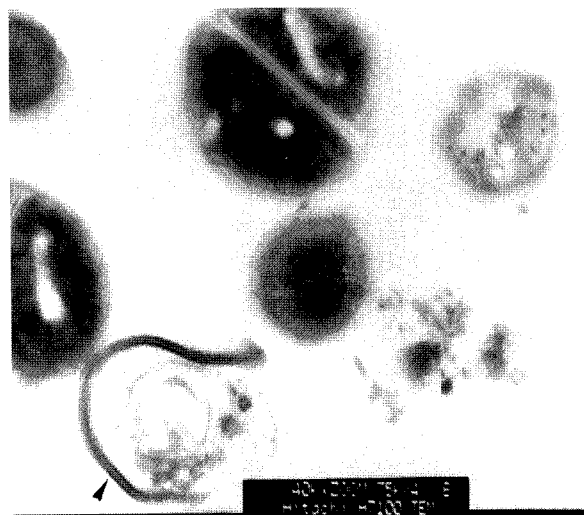


Fig. 5. A transmission electron microphotograph of *S. mutans* irradiated with a single absorbed dose of 40 Gy. Cell lysis becomes prominent and appearance of ghost cells (arrow head) is noticeable. ($\times 40,000$ mag.)

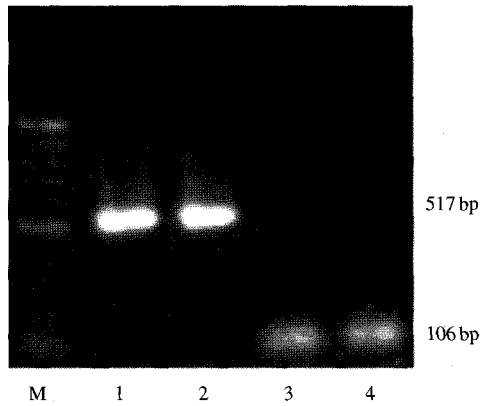


Fig. 6. RT-PCR of *S. mutans* with or without irradiation. *S. mutans* was irradiated and further incubated for 2 h. The cultured cells of *S. mutans* were centrifuged to collect the cell pellet. Total RNA was extracted from the cell pellet and subjected to RT-PCR as described in the text. Lanes: M, 100 bp DNA markers; lanes 1 and 2, RT-PCR of *gtfB*; lanes 3 and 4, RT-PCR of *spaP*; Lanes 1 and 3, *S. mutans* without irradiation; lanes 2 and 4, *S. mutans* with 40 Gy.

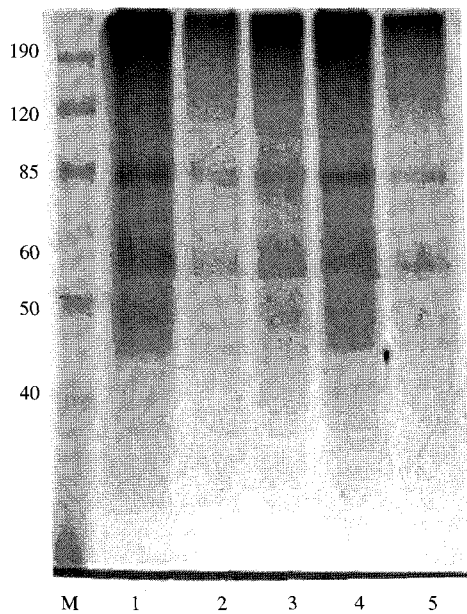


Fig. 7. SDS-PAGE of *S. mutans* with or without irradiation. *S. mutans* was irradiated and further incubated for 6 h. The cultured cells of *S. mutans* were centrifuged to collect the cell pellet, which in turn boiled in sample buffer for 10 min and subjected to SDS-10% polyacrylamide gel electrophoresis. Lanes: M, protein molecular markers; 1, *S. mutans* without irradiation; 2, *Streptococcus mutans* with 10 Gy; 3, *S. mutans* with 20 Gy; 4, *S. mutans* with 30 Gy; 5, *S. mutans* with 40 Gy.

세포막 사이가 비대해지는 현상이 나타나고, 용해된 균의 수도 증가되었다 (Fig. 3). 30 Gy 조사군에서는 세포벽과 세포막 사이의 간격이 더욱 넓어지는 군과 용해된 균의 수

도 증가되었다 (Fig. 4). 40 Gy 조사군에서는 용해된 균의 수가 증가되었고, 일부 균의 경우에는 세포질이 거의 용해되어 사라졌으며, 세포벽과 세포막이 세포질과 분리된 후 분해되지 않고 남아있는 유령세포의 형태도 많이 관찰되었다 (Fig. 5).

4. RT-PCR

*S. mutans*의 우식원성을 대표하는 독성인자인 효소 GTF의 유전자인 *gtfB*와 균의 부착 물질인 P1의 유전자인 *spaP*의 발현을 RT-PCR로 분석한 결과, 실험군에서 *gtfB*와 *spaP* 유전자의 발현 정도는 대조군과 차이가 없었다 (Fig. 6).

5. SDS-PAGE

실험군에서의 *S. mutans*의 단백질의 변화를 SDS-PAGE로 분석한 결과, 실험군에서 단백질 발현 정도는 대조군과 커다란 차이가 없었다. 그러나 190 kDa 이상의 단백질들의 경우 대조군에 비해 실험군에서 방사선조사선량이 증가할수록 점차 감소하였다 (Fig. 7).

고 찰

구강균총은 타액, 연령, 숙주의 방어기전, 치아 상태, 발효성 탄수화물의 섭취 여부, 구강위생 상태 등 여러 요인에 의해 영향을 받는데,²⁵⁻²⁷ 이 중 타액이 가장 중요한 요인으로 간주되고 있다. 따라서 두경부 방사선치료 시에는 타액선이 방사선조사야에 자주 포함되며, 이로 인해 타액선의 기능 이상이 유발되어 타액의 분비량, 점조도, 수소이온농도지수 및 무기질과 유기질 성분의 변화가 나타나고, 이러한 변화는 골의 심각한 감염을 일으킬 수 있는 치아우식증의 주요 소인이 된다.^{9,28} 또한 방사선유발 구강건조증이 발생되면 특정 미생물의 현저한 증가가 동반되어 나타난다. 특히, *S. mutans*, *Lactobacillus*, *Staphylococcus* 및 *Candida*와 같은 산생성 미생물의 수가 증가되는 반면, *Streptococcus sanguis*, *Neisseria* 및 *Fusobacterium*의 수가 감소되며, *Actinomyces*의 수가 증가되는데, 이러한 구강균총의 변화는 방사선치료 후에도 상당한 기간 동안 지속되는 것으로 보고되고 있다.^{9,12}

일반적으로 방사선유발 구강건조증이 심화됨에 따라 치태의 축적이 증가되지만, 치태 내 미생물의 전체적인 수는 거의 일정하며, 세균 구성의 변화만이 나타나는 것으로 보고되고 있다.^{29,30} Llory 등²⁹은 방사선유발 구강건조증 환자의 치태에서 방사선치료 전에 전체 streptococci 중 *S. mutans*의 비율이 0.6%이었으나, 방사선치료 6주 후에 43.8%로 급격히 증가되었다고 하였고, Brown 등¹²은 *S. mutans*의 비율이 방사선치료 전 1.5%에서 방사선치료 3개월 후에는

25.8%, 12개월 후에는 83.3-94.4%의 증가를 보였다고 하였다.

이와 같이 두경부 방사선치료 시에는 타액 분비의 감소, 타액 성분의 변화와 함께 우식유발미생물의 증가로 인해 치아우식증의 발현이 증가된다. 따라서 본 연구에서는 가장 중요한 우식유발 세균인 *S. mutans*를 대상으로 타액선 기능에 영향을 미치는 방사선조사선량으로 알려진 10, 20, 30, 40 Gy의 흡수선량을 조사하여 이의 방사선감수성을 관찰하였는데, 타액선에 10-20 Gy의 방사선이 조사되면 타액선 기능의 심각한 장애로 인해 타액 분비의 급속한 감소가, 20-30 Gy의 방사선이 조사되면 미각 상실, 그리고 40 Gy 이상의 방사선이 조사되면 타액선의 영구적인 손상이 야기되는 것으로 보고되고 있다.^{28,31}

본 연구에서는 방사선조사 후 *S. mutans*의 생균 수를 측정된 결과, 대조군에 비해 실험군에서는 10 Gy 조사군에서 약 83%의 생존율을, 20-40 Gy 조사군에서는 약 25%의 생존율을 보여, *S. mutans*가 20 Gy 이상의 방사선조사선량부터는 급격하게 생균 수가 감소되었으며, 방사선조사선량의 증가에 따른 *S. mutans*의 생균 수의 감소는 나타나지 않았다. 이러한 본 연구의 결과는 방사선조사 직후 *S. mutans*에 대한 방사선의 직접적인 살균효과를 관찰한 것으로서, 실제 임상에서는 방사선조사로 인해 일시적인 *S. mutans*의 감소가 나타나지만, 일정시간 경과 후에는 구강 환경의 변화로 *S. mutans*의 증식이 왕성하게 이루어지는 것으로 판단되는데, 이는 방사선조사로 인해 타액의 완충작용, 희석작용, 항균작용, 유험작용 및 정화작용이 상실되기 때문인 것으로 알려져 있으며,¹² 또한 타액 분비의 감소와 더불어 타액의 수소이온농도지수의 저하로 인해 치아우식증을 일으킬 수 있는 미생물이 증식되기 때문인 것으로 보고되고 있다.^{11,32}

치아우식증은 우식유발 병원균과 밀접한 관련이 있으므로 두경부 방사선치료시 우식유발 병원균을 억제하기 위한 약제의 효과는 중요한 관심의 대상이 되어왔다. 따라서 국소적인 방부제, 항생제 및 각종 불소제재의 사용에 따른 우식유발균의 일시적인 변화에 대해서는 많은 연구²⁰⁻²²가 보고된 바 있는데, Jones 등³³은 두경부 방사선치료 환자에게 항생제 연고와 광범위항생제를 비경구로 투여한 결과, *S. mutans*는 현저히 감소되었으나, *Lactobacillus*는 거의 영향을 받지 않았다고 하였다. 또한 Epstein 등¹⁴은 방사선치료를 받은 환자에서 불소가 *S. mutans*와 *Lactobacillus*의 증식을 일시적으로 감소시킨다고 하였으며, Emilson³⁴은 chlorhexidine에 의한 *S. mutans*의 감소에 따른 치아우식증의 예방 효과를 보고한 바 있다. 그러나 Al-Nawas와 Grötz¹⁸는 치태 제거에도 불구하고 치태지수와 우식 병원균의 감소가 나타나지 않았으며, 심지어 chlorhexidine의 투여에도 불구하고 *S. mutans*와 *Lactobacillus*의 증식이 억제되지 않았는데, 이러한 결과는 상아모세포의 생존 능력에 대한 방

사선의 직접적인 손상과 더불어 일반적인 개념에 근거한 치아우식증의 효과적인 예방에는 한계가 있음을 보여주는 것이라고 하였다.

본 연구에서 방사선조사 후 *S. mutans*의 항생제에 대한 감수성 변화를 관찰한 결과, 대조군에 비해 실험군에서 항생제 감수성이 대체적으로 다소 증가하는 경향을 보였다. 특히, cefotaxime, penicillin 및 tetracycline의 경우 40 Gy 조사군에서 항생제 감수성의 증가가 나타났다. 그러나 방사선조사로 인한 세균의 항생제 감수성 변화는 세균의 구조적, 형태적 변화 등과 밀접한 관련이 있을 것으로 생각되는 바, 이에 관해서는 향후 분자생물학적 연구 등이 추가적으로 이루어져야 할 것으로 판단된다.

따라서 본 연구에서는 방사선조사 후 *S. mutans*의 세포막과 세포질 내 구조 등을 투과전자현미경으로 관찰하였는데, 10 Gy 조사군에서는 대조군에 비해 세포의 크기가 다양하게 나타났고, 일부에서는 세포벽과 세포막의 변화가 관찰되었다. 또한 10 Gy 조사군에서부터 용해된 균이 관찰되기 시작하여, 20 Gy 조사군과 30 Gy 조사군에서는 균 중 상당수에서 세포벽과 세포막 사이가 비대해지는 현상이 나타났고, 용해된 균의 수도 점차 증가되었다. 특히, 40 Gy 조사군에서는 용해된 균의 수가 증가되었을 뿐만 아니라, 일부 균의 경우에는 세포질이 거의 용해되어 사라지고 세포벽과 세포막만 남아있는 유령세포의 형태도 많이 관찰되었다. 이러한 소견들로부터 20 Gy에서부터 생균 수의 현저한 감소가 나타난 본 연구결과를 확인할 수 있었으며, 방사선조사선량이 증가됨에 따라 세포의 비정상적인 형태를 갖는 균이 상대적으로 많이 증가됨으로써 항생제의 감수성에도 영향을 미쳤을 것으로 생각된다. 그러나 방사선조사선량이 20 Gy에서 40 Gy로 증가됨에 따라 세포 형태가 보다 비정상적으로 변화했음에도 불구하고, 20-40 Gy에서 *S. mutans*의 생존능력에는 차이가 없었다. 이는 방사선조사선량에 따라 *S. mutans*의 세포 형태가 더욱 비정상적으로 변화되기는 하였으나, 생존능력을 더욱 감소시킬 정도의 변화는 아니었기 때문인 것으로 판단된다. 또한 투과전자현미경 소견은 방사선조사 직후 시편을 제작하여 관찰한 것이지만, 생균의 수는 방사선조사 후 한천배지에서 48시간 배양한 다음 측정했기 때문에 완전 손상을 받지 않은 일부 세균들이 정상적인 생활력을 회복했기 때문일 가능성도 있으므로, 이에 대한 연구가 지속적으로 진행되어야 할 것으로 사료된다.

한편 *S. mutans*는 효소 GTF를 생산하고, 이 GTF는 sucrose로부터 점착성의 비수용성 glucan을 합성하여 치아 평활면에 부착하는 능력에 있는데, *S. mutans*는 치아 표면에 glucan을 매개로 하여 단단히 부착하기에 앞서 치아 표면에 형성된 획득피막(acquired pellicle)에 있는 타액 단백질과 반응함으로써 치아 표면에 우선 부착하게 된다. 따라서 이 두 인자는 *S. mutans*의 중요한 우식원성 인자인 것

으로 알려져 있다.³⁵

따라서 본 연구에서는 방사선조사가 *S. mutans*의 병원성에 변화를 초래하는지를 관찰하기 위해 RT-PCR을 이용하여 비수용성 glucan을 합성하는 효소인 GTF 유전자인 *gtfB*와 균의 부착물질인 P1의 유전자인 *spaP*의 발현 양상을 관찰한 결과, 실험군에서 *gtfB* 및 *spaP* 유전자의 발현 정도는 대조군과 차이가 없었다. 그러나 SDS-PAGE를 이용하여 *S. mutans*의 단백질의 발현 양상을 관찰한 결과에서는 방사선조사선량이 증가됨에 따라 190 kDa 이상의 단백질들의 발현 양이 점차 감소하였다. 따라서 방사선조사가 *S. mutans*의 중요 독성인자인 GTF, P1 등에는 변화를 초래하지 않았으나, 일부 단백질에는 변화를 일으킬 수 있는 것으로 생각되며, 이것이 방사선조사 후 *S. mutans*의 형태 변화에도 관여하였을 가능성이 있는 것으로 판단된다. 또한 방사선조사 후 *S. mutans*에서는 다른 세균들과는 달리 SDS-PAGE에서 관찰되는 단백질이 다양하게 나타나지 않았고, 방사선조사에 의해 변화가 나타난 비교적 높은 분자량의 단백질도 어떠한 단백질인지 현재로서는 정확히 알 수 없기 때문에 향후 *gtfB*, *spaP* 이외의 다른 유전자를 대상으로 RT-PCR을 시행하던가 microarray 분석연구가 추가적으로 필요할 것으로 생각된다.

이상의 실험결과, *S. mutans*가 방사선에 조사된 경우, 세균 수의 감소, 항생제 감수성의 증가 및 균의 비정상적인 구조적, 형태적 변화가 유발되었으나, 이러한 변화들이 실제 두경부 방사선치료 환자의 치아우식증에 미치는 영향에 대해서는 환자들의 치아우식증 발현 양상 등에 대한 장기간의 추적조사 등을 통한 좀 더 상세한 연구와 더불어 *Lactobacillus* 등 치아우식증에 관여하는 다양한 세균들의 방사선감수성에 대해서도 추가적인 연구가 진행되어야 할 것으로 생각된다. 또한 방사선치아우식증의 여러 다양한 병인과 관련해서는 임상적으로 방사선유발 구강건조증의 예방에 중점을 두어야 할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Petersen JK. Xerostomia. Scand J Rheumatol 1986; 61 : 185-9.
2. Manthorpe R, Axéll T. Xerostomia. Clin Exp Rheumatol 1990; 8 : 7-12.
3. Fox PC, van der Ven PF, Sonies BC, Weiffenbach JM, Baum BJ. Xerostomia: evaluation of a symptom with increasing significance. J Am Dent Assoc 1985; 110 : 519-25.
4. Strahl RC, Welsh S, Streckfus CF. Salivary flow rates: a diagnostic aid in treatment planning geriatric patients. Clin Prev Dent 1990; 12 : 10-2.
5. Saunders RH, Handelman SL. Effects of hyposalivatory medications on saliva flow rates and dental caries in adults aged 65 and older. Spec Care Dent 1992; 12 : 116-21.
6. Mossman KL. Quantitative radiation dose-response relationship for normal tissues in man. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1978; 4 : 663-70.
7. Frank R, Herdly J, Philippe E. Acquired dental defects and salivary

- gland lesions after irradiation for carcinoma. J Am Dent Assoc 1965; 70 : 868-83.
8. Chencharick J, Mossman K. Nutritional consequences of the radiotherapy of head and neck cancer. Cancer 1983; 51 : 811-5.
9. Beumer J, Curtis T, Harrison RE. Radiation therapy of the oral cavity: sequelae and management, part 1. Head Neck Surg 1979; 1 : 301-12.
10. Walker R. Direct effect of radiation on the solubility of human teeth in vitro. J Dent Res 1975; 54 : 901.
11. Keene HJ, Daly T, Brown LR, Dreizen S, Drane JB, Horton IM, et al. Dental caries and *Streptococcus mutans* prevalence in cancer patient with irradiation-induced xerostomia: 1-13 years after radiotherapy. Caries Res 1981; 15 : 416-27.
12. Brown LR, Dreizen S, Handler S, Johnston DA. Effect of radiation-induced xerostomia on human oral microflora. J Dent Res 1975; 54 : 740-50.
13. Keene HJ, Fleming TJ. Prevalence of caries-associated microflora after radiotherapy in patients with cancer of head and neck. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1987; 64 : 421-6.
14. Epstein JB, McBride BC, Stevenson-Moore P, Merilees H, Spinelli J. The efficacy of chlorhexidine gel in reduction of *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* species in patients treated with radiation therapy. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1991; 71 : 172-8.
15. Grötz KA, Riesenbeck D, Brahm R, Seegenschmiedt MH, Al-Nawas B, Dörr W, et al. Chronische Strahlenfolgen an den Zahnhartgeweben ("Strahlenskaries")-Klassifikation und Behandlungsansätze. Strahlenther Onkol 2001; 177 : 96-104.
16. Larson RH, Keyes PH. The influence of reduced salivary flow on the intensity of the cariogenic challenge. Helv Odont Acta 1967; 11 : 36-43.
17. Epstein JB, Emerton S, Le ND, Stevenson-Moore P. A double-blind crossover trial of balance gel and biotene toothpaste versus placebo in patient with xerostomia following radiation therapy. Oral Oncol 1999; 35 : 132-7.
18. Al-Nawas B, Grötz KA. Prospective study of the long term change of the oral flora after radiation therapy. Supp Care Cancer 2006; 14 : 291-6.
19. Lacatusu S, Francu L, Francu D. Clinical and therapeutical aspects of rampant caries in cervicofacial irradiated patients. Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi 1996; 100 : 198-202.
20. Maltz M, Zickert I, Krasse B. Effect of intensive treatment with chlorhexidine on number of *Streptococcus mutans* in saliva. Scand J Dent Res 1981; 89 : 445-9.
21. Shoeken MJM, De Jong MH, Franken HCM, van der Hoeven JS. Effects of highly concentrated stannous fluoride and chlorhexidine regimens on human dental plaque flora. J Dent Res 1986; 65 : 57-61.
22. Zickert I, Emilson CG, Ekblom K, Klasse B. Prolonged oral reduction of *Streptococcus mutans* in humans after chlorhexidine disinfection followed by fluoride treatment. Scand J Dent Res 1987; 95 : 315-9.
23. Hamada S, Slade HD. Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. Microbiol Rev 1980; 44 : 331-84.
24. Hata S, Hata H, Miyasawa-Hori H, Kudo A, Mayanagi H. Quantitative detection of *Streptococcus mutans* in the dental plaque of Japanese preschool children by real time PCR. Lett Appl Microbiol 2006; 42 : 127-31.
25. De Stoppelaar JD, van Houte J, Backer Dirks O. The effect of carbohydrate restriction on the presence of *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis* and iodophilic polysaccharide-producing bacteria in human dental plaque. Caries Res 1970; 4 : 114-23.
26. Sixou J-L, De Medeiros-Batista O, Bonnature-Mallet M. Modification

- of the microflora of the oral cavity arising during immunosuppressive chemotherapy. *Oral Oncol Eur J Cancer* 1996; 32 : 306-10.
27. Socransky SS, Manganiello SD. The oral microbiota of man from birth to senility. *J Periodontol* 1971; 42 : 485-94.
 28. Kuten A, Ben-Aryeh H, Berdicevsky I, Ore L, Szargel R, Gutman D, Robinson E. Oral side effects of head and neck irradiation: correlation between clinical manifestations and laboratory data. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1986; 12 : 401-5.
 29. Llorly H, Dammron A, Frank RM. Changes in the oral flora following buccal-pharyngeal radiotherapy. *Arch Oral Biol* 1971; 16 : 617-30.
 30. Llorly H, Dammron A, Gionanni M, Frank RM. Some population changes in oral anaerobic microorganisms, *Streptococcus mutans*, and yeast following irradiation of salivary glands. *Caries Res* 1972; 6 : 298-311.
 31. Mossman KL. Quantitative radiation dose-response relationships for normal tissues in man. II. Response of the salivary glands during radiotherapy. *Rad Res* 1983; 95 : 392-8.
 32. Wijers OB, Levendag PC, Harms ER, Gan-Tang AM, Schmitz PI, Hendriks WD, et al. Mucositis reduction by selective elimination of oral flora in irradiated cancers of the head and neck: a placebo-controlled double-blind randomized study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001; 50 : 343-52.
 33. Jones LR, Toth BB, Keene HJ. Effects of total body irradiation on salivary gland function and caries-associated oral microflora in bone marrow transplant patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1992; 73 : 670-6.
 34. Emilson CG. Effect of chlorhexidine gel treatment on *Streptococcus mutans* population in human saliva and dental plaque. *Scand J Dent Res* 1981; 89 : 239-46.
 35. Tanzer JM. Microbiology of dental caries. In: Slots J, Taubman MA. Contemporary oral microbiology and immunology. St. Louis: Mosby Year Book; 1992. p. 377-424.