

형광제자리부합법을 이용한 치은열구세포 내의 치주염 유발 세균의 관찰

고영경

가톨릭대학교 의과대학 치과학교실

Visualization of periodontopathic bacteria within crevicular epithelial cells with fluorescence in situ hybridization

Youngkyung Ko

Department of Dentistry, School of Medicine, The Catholic University

ABSTRACT

Purpose: Periodontal pathogens can invade the host tissue. Morphologic studies have revealed bacteria within the pocket epithelium, gingival connective tissues, alveolar bone, and oral epithelium. The objective of this study was to visualize and evaluate presence of *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythia* in crevicular epithelial cells of periodontally healthy subjects and chronic periodontitis patients.

Materials and Methods: A total of 666 crevicular epithelial cells in the samples obtained from 27 chronic periodontitis patients and 9 healthy volunteers were examined. Specific probes for *P. gingivalis* and *T. forsythia* and a universal probe for detection of all eubacteria targeting 16S rRNA for fluorescence *in situ* hybridization was used in conjunction with confocal laser scanning microscopy.

Results: 98.99% of sulcular epithelial cells from healthy volunteers and 84.40% of pocket epithelial cells from periodontitis patients were found to harbor bacteria. *P. gingivalis* and *T. forsythia* were discovered more often in crevicular epithelial cells from periodontitis patients.

Conclusion: *P. gingivalis* and *T. forsythia* can invade crevicular epithelial cells and intracellular bacteria may act as a source of bacteria for persistent infection. (*J Korean Acad Periodontol* 2008;38:691-698)

KEY WORDS: bacterial invasion; *Porphyromonas gingivalis*; *Tannerella forsythia*; gingival epithelial cells.

서론

치주염은 세균에 의한 숙주의 면역반응에 따른 치아 주위 조직의 파괴로 특징 지워지는 질환이다.

대부분의 환자의 경우, 치태와 치석을 제거하는 기계적 치료에 좋은 반응을 보인다. 그러나 일부 세균은 치아 주위의 연조직에 침투하는 것이 가능하며¹⁻²⁾, 이러한 경우에는 세균을 제거하는 것이 한층 어려워진다. 상당히 여러 세균 종이 치주염에 이환된 치주조직에서 관찰되었으며³⁻⁵⁾, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*⁶⁾, *Fusobacterium*

*nucleatum*⁷⁾, *Porphyromonas gingivalis*⁸⁾와 *Treponema denticola*⁹⁾와 같은 일부 세균들은 *in vitro* 상에서 숙주세포 침입능을 보인 바 있다. *P. gingivalis*와 같은 경우는 진행 세포 내에서 분열과 성장이 가능하다고 발표되었다¹⁰⁾.

치은열구상피는 세균과 접하고 있으며, 치주질환의 진행의 시작이 되는 위치이다. 치주질환이 진행되면서 결합조직의 부착상실이 일어나고 골 소실이 일어나는 것은 열구상피가 치주낭상피로 전환되는 것과 연관되어 일어난다. 병원성 세균들이 숙주의 상피세포 내에 침입하여 숙주의 면역 기전을 회피하는 것은 이 세균들의 중요한 생존 전략 중 하나이다. 생체 내에서 치은열구세포는 세균의 침입을 차단하는 제 일선에 있다. 현재 상피세포는 세균에 접했을 경우, 숙주 반응의 신호를 보내며 선천성과 후천성 면역 반응의 통합에 관여한다고 가정되며 치은열구세포도 이와 같은 역할을 할 것으로 추정된다¹¹⁾.

Correspondence: Youngkyung Ko
Department of Dentistry, Kangnam St Mary's Hospital, 505 Banpo-dong, Seocho-gu, Seoul, Korea,
E-mail: ko_y@catholic.ac.kr, Tel: 82-2-590-1620,
Fax: 82-2-537-2374
Received: Nov. 28, 2008; Accepted: Dec. 14, 2008

세균의 생태를 실제의 병원성 환경에서 관찰하기 위해서는 제자리부합법(in situ hybridization)이 상당히 유용한 방법이다¹²⁾. 16S rRNA는 존재하는 모든 세균에서 발견되며, 계통발생학이나 분류학에 있어서 가장 많이 이용되는 분자이다. 이 분자는 구조적으로나 기능적으로 오랜 기간 동안 일정하게 유지되어 왔기 때문인데, 그럼에도 불구하고 변화는 있으며, 이 변화도 아주 오랜 기간 동안에 느리게 일어났기 때문에 여기에서 모든 원핵 생물의 계통 정보를 얻을 수가 있고, 상당한 다양성이 있기 때문에 계통발생학적으로 거리가 먼 세균뿐만이 아니라 아주 가까운 세균들도 동정하는 것이 가능하다. 16S rRNA 분석에 따른 분자식별법은 시간과 정확도 두 가지 면에서 이점이 있을 뿐만이 아니라 비교적 빠르고 효율적인 면역학적 방법보다도 빨리 결과를 얻을 수도 있다. 배양하기 어렵거나, 배양이 불가능한 세균도 이 방법을 이용하면 채취한 샘플에서 직접 인지할 수 있다¹³⁻¹⁴⁾.

공초점 레이저 주사현미경은 분자생물학의 여러 가지 응용기법에서 널리 이용되고 있으며, 삼차원적 화상화에 있어서는 필수불가결한 도구이다¹⁵⁻¹⁶⁾. 16S rRNA를 검출하는 소수 뉴클레오티드 프로브(oligonucleotide probe) 검출법과 공초점 레이저 주사현미경을 함께 사용할 경우 치은열구세포에 손상을 주지 않고도 세포 내 세균의 존재 여부를 검사할 수 있다.

협부상피세포 내의 세균의 유무를 16S rRNA 프로브와 공초점 레이저 주사현미경을 이용하여 조사한 연구가 Rudney 등²⁾에 의해 발표되었고, 치은열구상피세포 내외의 세균의 유무를 체커보드 DNA-DNA 중합 기법을 이용하여 조사한 연구가 Dibart 등¹⁸⁾과 Colombo 등¹⁹⁾에 의하여 보고되었다. Colombo 등²⁰⁾은 또한 치은열구세포 내의 세균 식별을 16S rRNA 프로브와 공초점 레이저 주사현미경을 이용하여 조사한 후 발표하였다.

이번 연구에서는 16S rRNA 프로브를 이용한 형광제자리부합법(fluorescence in situ hybridization; FISH)을 사용하여 치은열구세포 내에서 대표적인 치주 병원균인 *P. gingivalis*와 *T. forsythia*를 관찰하고 그 결과를 공초점 레이저 주사현미경을 이용하여 기록하였다.

재료 및 방법

1. 피험자와 샘플 채취

가톨릭대학교 의료원 강남성모병원 치과를 내원한 만성 치주염 환자 중 실험에 참여하기에 동의한 27명의 환자에서 샘플을 채취하였다. 9명의 건강한 지원자에게서도 샘플을 채취하였다. 치주염 환자의 경우는 임상적 부착 상실이 나타나는 부위와 치주낭 깊이가 4 mm 이상인 부위가 6 부위 이상인 경우에만 선정하였다. 건강한 지원자의 경우에는 임상적 부착 상실이 관찰되지 않는 경우만을 선정하였다.

치주염 군에서의 샘플 채취는 치주낭 깊이가 5 mm 이상이며 탐침 후 출혈이 관찰되는 부위 3 부위에서 치은연상치태를 제거한 후에 치실을 이용하여 치은연하를 흡어 채취하였다. 건강한 군에서의 샘플 채취는 같은 방법을 이용되 치주낭 깊이가 3 mm 이하이며 탐침 후 출혈이 없는 치은열구세 부위에서 치은연하로 치실을 넣어 치은열구 내연을 흡어 올렸으며, 치실을 바로 3.7%(v/v) paraformaldehyde in phosphate buffered saline(PBS) (pH 7.4)가 들어있는 에펜도르프 튜브에 넣어 채취한 샘플을 고정하였다.

모든 환자들은 이 연구의 성격과 잠재적 위험성, 연구 참여의 혜택이 없다는 정보를 받았으며, 연구에 참여하기 전 고지에 의한 동의에 서명하였다. 이 연구는 강남성모병원 기관윤리위원회(IRB) 승인을 받았다(KCM07BR156).

2. 샘플의 처리

채취한 샘플은 바로 3.7%(v/v) paraformaldehyde in phosphate buffered saline(PBS) (pH 7.4)에 고정하여 4°C에 보관하였다. 차가운 PBS로 2회 씻어낸 후 1배의 96% 에탄올을 더한 후 -20°C에서 보관하였다. 5μl씩 슬라이드 글라스에 놓은 뒤 건조한 후 50%, 80%, 96%(v/v) 에탄올에서 각각 3분씩 탈수하였다. 그 후 46°C에서 수 분 건조하였다.

3. 16S rRNA 올리고뉴클레오티드 프로브

표적 세균의 프로브는 프로브베이스(probeBase)에 등재된 뉴클레오티드 염기배열 순서를 사용하였다²¹⁾.

모든 진정세균(Eubacteria)에서 동일한 16S rRNA 부분과 결합하는 EUB338 프로브를 이용하여 전체 세균을 검출

Table 1. 16S rRNA Oligonucleotide Probe Sequences²¹⁾

Probes	Target organisms	Sequences
POGI	<i>P. gingivalis</i>	5'- CAA TAC TCG TAT CGC CCG TTA TTC -3'
B(T)AFO	<i>T. forsythia</i>	5'- CGT ATC TCA TTT TAT TCC CCT GTA -3'
EUB338	Eubacteria	5'- GCT GCC TCC CGT AGG AGT -3'
NON338	Negative control	5'- ACT CCT ACG GGA GGC AGC -3'

하였고, EUB338 프로브의 역순의 염기서열인 NON338 프로브를 음성대조 프로브로 이용하였다. POGI 프로브로 *P. gingivalis*를 검출하였으며, B(T)AFO 프로브를 이용하여 *T. forsythia*를 동정하였다. 모든 올리고뉴클레오티드 염기서열은 바이오니아(대전, 대한민국)에서 구입하였다. 형광표지 물질로 녹색의 AlexaFluor 488(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)와 붉은 색의 Cy3(PerkinElmer, Waltham, MA, USA)를 Terminal transferase kit(Roche, Penzberg, Germany)를 이용하여 올리고뉴클레오티드에 부착하여 이용하였다.

중 특이 프로브의 양성대조균으로 고정된 *P. gingivalis* ATCC 33277와 *T. forsythia* ATCC 43047를 한국 균주 은행에서 분양 받아 사용하였다. EUB338 프로브의 경우 각 현미경 시야에 함께 나타나는 세포 외 세균을 양성 대조균으로 삼았다. 각 특이 프로브와 EUB338 프로브를 보색의 형광표지 물질을 부착하여 모든 실험에 함께 사용하였다. 일부 샘플에서는 NON338 프로브를 이용하여 EUB338 프로브의 비특이 부착을 조절하였다. Counterstain으로서 세균, 진균, 그리고 숙주의 DNA와 결합하는 4', 6'-diamidino-2-phenylindole(DAPI)를 이용하였다.

4. FISH

부합용액은 0.9M NaCl, 20 mM tris/HCl, pH 8.0, 0.01% SDS를 포함하였고, stringency 조절을 위하여 20% formamide를 더하였다. 미리 덮혀둔 부합완충용액 20 µl에 각 프로브 5 pmol를 섞어 샘플 위에 조심스럽게 적용한 후 46°C의 어두운 부합실에서 1.5시간 배양하였다. 그 후 멸균된 이중 증류수로 조심스럽게 씻어낸 후 어두운 곳에서 건조시키고 Citifluor AF1(Chemical Laboratory, Kent, Great Britain)을 이용하여 슬라이드를 고정하였다.

5. 공초점 레이저 주사 현미경

아르곤 레이저(488 nm)와 HeNe G laser(543 nm), HeNe R laser(633 nm), 그리고 LD405 레이저가 설치된 올림푸스 Fluoview FV-300 공초점 레이저 주사 현미경(Olympus, Japan)을 이용하여 광학 사진을 기록하였다. 모든 치은열구 상피세포는 공초점 레이저 주사 현미경을 이용하여 조사하였다. 현미경과 함께 제공되는 기본 소프트웨어인 Fluoview FV-300을 이용하여 이미지를 처리하였고 결과는 TIFF 파일로 저장하였다.

6. 통계적 분석

건강한 군과 치주염 군에서 채취한 세포 내 모든 세균과 세포 내 특이 세균을 기록하였다. 분석은 세포 단위, 그리고 개체 단위로 시행하였다. 정규성 검정은 Shapiro-Wilk test를 이용하였다.

카이 제곱 검정이나 Fisher의 정확 검정, Wilcoxon Rank Sum Test를 이용하였다. 분석 소프트웨어는 The SAS System for Windows v 8.02를 이용하였다.

결과

27명의 만성 치주염 환자와 9명의 치주적으로 건강한 지원자들이 본 실험에 참여하였다. 만성 치주염 군에서 3명은 이미지 저장 시의 오류로 *T. forsythia*의 존재 여부를 기록할 수 없었다. 마찬가지로 *P. gingivalis*의 존재 여부를 기록하지 못한 경우가 1건 있었다.

9명의 건강한 지원자들에서는 198개의 치은열구상피세포를 조사하였고, 27명의 만성 치주염 환자에서는 *P. gingivalis*를 조사한 개체 수가 26명, *T. forsythia*를 조사할 수 있었던 환자가 24명 있었으며 총 468개의 치은열구상피세포

포를 조사하였다.

모든 경우에 있어 개별 특이 프로브와 EUB338 프로브를 보색으로 사용하여 함께 보합반응을 시켰으며, 특이 프로브의 경우, EUB 프로브에서도 양성으로 나타나야만 양성으로 인정하였다. 예를 들어 치주염 군의 환자의 상피세포 샘플에서 *P. gingivalis* 존재 여부를 조사한 Fig. 1에서 보면 우측 하단의 초록색과 붉은색이 겹쳐 보이는 부분만이 특이 프로브가 양성으로 *P. gingivalis*가 존재한다고 인정하였다 (흰 화살표). 특이 프로브만 시그널을 보인 경우는 허위 양성반응으로 판단하여 특이세균의 존재를 인정하지 않았다 (노란 화살표).

개별 치은열구상피 세포 내에서 발견되는 세균 수와 빈도를 Table 2에 기록하였다. 건강한 군에서의 세균이 발견되는 빈도와 치주염 군에서 세균이 발견되는 빈도는 카이 제곱 검정을 이용하였으며 $p < 0.05$ 로 분석하였다. 건강한 군의 치은열구세포 내에서 세균이 발견되는 비율이 98.99%로 높았으며, 만성 치주염 군에서는 세균이 발견되는 비율이 84.40%였다. 이는 통계적으로 유의한 차이를 보였다. 건강

한 군의 세포 내에서 *P. gingivalis*가 나타날 확률이 10.89%이고, 만성 치주염 군의 세포 내에서 *P. gingivalis*가 나타날 확률이 29.96%로 통계적으로 유의한 차이가 나타났다. 반면에 *T. forsythia*가 건강한 군과 치주염 군에서 나타날 빈도는 12.37%와 18.96%로 치주염 군에서 더 많은 경향을 보였으나 이는 통계적으로 유의한 차이는 아니었다.

세포 내 발견되는 세균의 수를 없음, 1-19개 사이, 20-49개 사이, 50개 이상으로 구획 지었을 때, 각 군당 나타나는 비율은 Fisher의 정확 검정으로 분석하였고, 마찬가지로 $p < 0.05$ 수준에서 검정하였다. 건강한 군과 만성 치주염 군에서의 세포당 나타나는 세균 수의 비율에서는 통계적으로 유의한 차이가 보였다. 마찬가지로 *P. gingivalis*가 나타나는 세균 수의 군의 비율에서도 통계적으로 차이가 있었다. *T. forsythia*의 경우에는 그 차이가 통계적으로 유의하지 않았다.

실험군별로 각 피험자당 발견되는 전체 세균과 치주병원균의 비율을 비교하여 Table 3에 기록하였다. 통계상의 편의를 위하여 전체 세균과 특이 세균 중 하나라도 발견되는

Table 2. Frequency of Detection (%) and Frequency of Ranks of Cell Numbers of Whole Population of Bacteria and Periodontopathic Bacteria Detected by FISH within Crevicular Epithelial Cells

	Periodontally healthy subjects	Chronic periodontitis subjects
Universal probe*	98.99 (n=198) **	84.40 (n=468) **
Rank ^{§,§§}		
0	2.02	15.60
1-19	52.53	49.79
20-49	35.35	23.50
> 50	10.10	11.11
<i>Porphyromonas gingivalis</i> *	10.89 (n=101) **	29.96 (n=257) **
Rank ^{§,§§}		
0	89.11	70.82
1-19	10.89	27.63
20-49	0	0.78
> 50	0	0.78
<i>Tannerella forsythia</i> *	12.37 (n=97)	18.96 (n=211)
Rank [§]		
0	87.63	80.57
1-19	12.37	18.96
20-49	0	0.47
> 50	0	0

Numbers of epithelial samples are written within the parentheses.

* Chi-square test, ** statistically significant difference ($p < 0.05$).

§ Fisher's exact test, §§ statistically significant difference ($p < 0.05$).

Table 3. Detection Frequency of Whole Bacteria and Periodontopathic Bacteria in Crevicular Epithelial Cells of Individuals

	Periodontally healthy subjects	Chronic periodontitis subjects
Universal probe*	99.17% (n=18)	82.94% (n=50)
<i>P. gingivalis</i> or <i>T. forsythia</i> *	10.46% (n=18)	23.67% (n=50)
<i>P. gingivalis</i>	9.95% (n=9)	28.05% (n=26)
<i>T. forsythia</i>	10.98% (n=9)	18.92% (n=24)

Observation with each specific probe was counted as one individual for evaluation of detection frequency of the universal probe and both specific probes. Numbers of individuals observed are written within the parentheses.

Wilcoxon two-sample test, *statistically significant difference ($p < 0.05$).

Table 4. Detection of Periodontopathic Bacteria in Sulcular Epithelial Cells at the Level of the Individual

	Periodontally healthy subjects	Chronic periodontitis subjects
<i>P. gingivalis</i> or <i>T. forsythia</i> *	5 (n=18)	31 (n=50)
<i>P. gingivalis</i>	3 (n=9)	18 (n=26)
<i>T. forsythia</i>	2 (n=9)	13 (n=24)

Chi-square test, *statistically significant difference ($p < 0.05$).

비율의 경우는 각 특이 프로브 당 관찰한 피험자를 1인으로 산정하여 EUB338와 특이 프로브를 관찰한 개체 수가 건강한 군에서는 18, 만성 치주염 군에서는 50이 되었다. Universal 프로브의 경우 *P. gingivalis* 관찰 시 이중으로 보합반응을 시행한 26명과 *T. forsythia*와 함께 시행한 24명을 합하여 50명으로 산정하여 통계처리를 하였다.

건강한 피험자의 치은열구세포 내에서 세균이 발견될 확률은 99.17%, 만성 치주염 군에서 세균이 발견될 확률은 82.94%로 통계적으로 유의한 차이가 있었다. 마찬가지로 조사한 치주병원균 중 어느 쪽이라도 발견될 확률이 치주적으로 건강한 피험자 군에서 10.46%, 만성 치주염 군에서 23.67%로 통계적으로 유의한 차이가 있었다.

그러나 개별적으로 *P. gingivalis*와 *T. forsythia* 각각의 치은열구세포 내 존재 유무를 살펴보았을 때는 치주염 군에서 발견될 확률이 높기는 높았으나 이 차이는 통계적으로 유의하지는 않았다.

검정은 Wilcoxon two-sample test를 이용하였으며 $p < 0.05$ 로 산정하였다.

피험자당 채취한 상피세포 중 단 한 세포에서라도 *P. gingivalis* 나 *T. forsythia*가 발견되었을 때를 양성으로 산정하여 Table 4에 기록하였다. 각 피험자 단위로 살펴보았을 때, 건강한 피험자와 만성 치주염 군의 피험자 사이에서 *P. gingivalis* 또는 *T. forsythia* 중 어느 하나라도 발견될

가능성에는 통계적으로 유의한 차이가 있었다. 그러나 *P. gingivalis*가 발견될 확률이나 *T. forsythia*가 발견되는 확률은, 만성 치주염 군에서 더 높게 나타나기는 하였으나, 이 차이는 통계적으로 유의하지는 않았다. 카이 제곱 검정을 이용하였으며 $p < 0.05$ 로 산정하였다.

고찰

인체 내에는 다양한 상피 조직이 존재하나 공통적으로 체내와 체외를 가르는 보호막 역할을 한다. 상피 조직의 존재 부위에 따라 물리적, 화학적 공격, 또는 세균의 공격에서 개체를 보호한다. 이러한 상피 보호막의 완결성은 다양한 세균의 공격에 의해서 파괴되는데, 세포간의 교소체나 junction을 공격하는 기법을 사용하는 세균들이 있으며, 또 다른 기전으로는 상피 세포의 액틴 세포내 골격 구조의 재구성을 야기하여 상피 세포 내 침투하는 방법이 있다. 이 중 *P. gingivalis*는 후자의 기전을 이용하는 것으로 알려져 있다²²⁾. 이러한 세균의 공격에 상피 조직은 수동적으로 반응하는 것이 아니라, 세균의 부착과 침입에 적극적으로 반응한다. 치은 상피세포도 마찬가지로 항생 펩티드를 생성하기도 하고, IL-6, IL-8 등의 사이토카인 등을 분비하여 면역 반응에 적극 기여한다²³⁾. 치은 상피세포와 치주병원균 중 *P. gingivalis*의 침입과 그 상호 작용에 관해서는 상당히

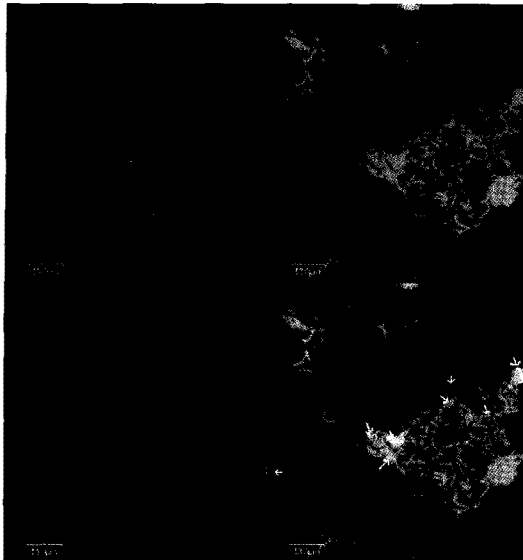


Figure 1. Confocal images from a periodontitis patient hybridized with green POGI probe and red EUB338 probe. Upper left: green probe POGI targeting *P. gingivalis*. Upper right: red probe targeting all eubacteria. Lower left: counterstain with DAPI. Lower right: Converged image. 1000X magnification. Converged signal from POGI and EUB338 probe (white arrows). False positive signals (yellow arrows).

많은 연구가 이루어지고 있는데, *in vitro* 상황에서 *P. gingivalis*를 침입시킨 후의 1차 배양된 치은 상피세포나 KB 세포주에서의 반응을 조사한 보고들이 있다²⁴⁾.

치은 상피 중에서도 치은 열구 상피가 치주염의 시발점에 있다고 할 수 있는데, *in vivo* 상에서 치은열구 상피세포와 치주병원균의 침입 관계를 살핀 조사는 앞서 인용한 Colombo 등의 연구²⁰⁾가 유일하다. 본 연구에서는 치주염 군과 치주적으로 건강한 군에서 치은열구 상피세포를 채취하여 2가지 치주병원균의 존재 여부를 조사하였다.

이 번 조사에서는 채취한 상피세포 단위와 개개 피험자 단위로 나누어 통계 분석을 시행하였다. 우선 세포 내 세균의 존재 유무를 살폈을 때, 건강한 군에서의 상피세포 내에서는 98.99%에서 세균을 발견할 수 있었는데 비해서, 치주염 군에서 채취한 상피세포 내에서는 84.40%의 세포에서 발견되었다. 피험자 수준에서 조사하였을 때는 건강한 피험자의 99.17%에서 세균이 발견되었고, 만성 치주염 군에서는 82.94%에서 세균이 발견되었다. 이런 결과가 나타난 것은, 만성 치주염 군 중 일부 환자들에게서 세포 내 발견되는 세균 수가 작거나, 없는 경향이 있었기 때문이다. Rudney 등²⁵⁾의 험부상피세포의 관한 조사에서도 “super-invaded” 세포와 세균이 없거나, 적은 세포가 공존하고 있음이 보고되었다. 염증의 정도에 따라 상피세포의 turnover가 빨라지면서 세균과 접촉하는 시간이 줄어들어 침입 세균 수가 줄었을 것이라고 추정할 수 있다.

이 결과는 Colombo 등의 연구²⁰⁾에서 모든 치은열구세포에서 세균이 발견되었고, 치주염 군에서 세포 내 세균 수가

치주염 군에서 더 높은 것과는 상반되는 결과이다. 그러나 이들의 연구에서도 인정했듯이, 공초점 레이저 주사 현미경을 사용하지 않은 형광 현미경에서의 형광제자리부합법의 결과 분석은, 세균이 세포 내에 존재하는지, 단지 세포에 부착되어 있는 것인지를 밝힐 수 없다는 한계가 있다. 통계 분석한 자료를 보면, 공초점 레이저 주사 현미경을 사용하지 않고 형광 현미경에서의 세균 수를 관찰한 것이라 세포 내의 세균을 정확히 셀 수 있었으리라고 보기 힘들다. 이들의 연구에서는 공초점 레이저 주사 현미경은 일부 세포(치주염 군에서 32 세포, 건강한 군에서 10 세포)의 관찰에만 사용하였고 이를 측정할 기록은 공개하지 않았다. 또한 프로브 사용시 특이 프로브를 단독으로 사용하거나, universal 프로브를 단독으로 사용하였기 때문에 위양성 결과가 상당히 있었을 것으로 추정된다. 일반적으로 형광제자리부합법을 이용하여 세균을 동정할 때에는 가능한 표적 세균을 식별할 수 있는 특이 프로브 두 가지를 서로 다른 색의 형광물질로 표지 하여 동시에 양성으로 나타나는 경우만을 세균으로 판정하는 것이 추천된다. 이는 자가 형광반응이나, 또는 위양성 반응이 나타나기 쉽기 때문인데, 원하는 세균을 인지할 수 있는 프로브가 하나 밖에 없을 경우에는 최소 universal 프로브라도 함께 사용하는 것을 추천한다¹²⁾. Fig. 1의 우측 하단의 중첩 사진을 살펴보면, universal 프로브는 부착되지 않았는데도 불구하고 초록색의 특이 프로브는 부착된 부위(노란색 화살표) *P. gingivalis*가 아닌 위양성반응이라고 판정할 수 있다.

T. forsythia 또는 *P. gingivalis*가 치은열구세포 내에서

발견될 확률은 세포 단위와 개체 단위로 분석하였을 때, 두 경우 모두에 있어서 치주염 이환군에서 더 높게 나타났으며, 이는 통계적으로 의미가 있었다. *P. gingivalis*는 만성 치주염 균의 열구 상피세포 안에서 나타날 확률이 더 높았다. *T. forsythia*의 경우에는 만성 치주염 군에서 더 높게 나타나는 경향이 있었으나, 이 차이는 통계적으로 유의하지 않았다. 피험자 단위로 조사했을 때 *P. gingivalis*나 *T. forsythia*가 발견될 확률이나 발견 여부의 차이는 통계적 유의성이 없었는데, 이는 검정하기에 개체 수가 작아서라고 여겨진다.

치주병원균의 치은열구 상피세포의 침입은 세포 내에서의 지속적인 감염을 가능하게 하여 치주염의 진행에 기여할 것으로 보인다. Johnson 등은 급진성 치주염 치료 후에도 협부상피세포 내의 치주병원균이 잔존하여 치주염의 재발이나 난치성 치주염의 진행에 기여할 가능성을 지적하였다²⁶⁾. 치료 전과 후의 치은열구 상피세포 내 치주병원균의 잔존 여부도 조사하는 것이 의미가 있을 것이다. 본 연구에서 조사한 두 가지 세균은 대표적인 치주병원균으로 in vitro에서의 세포침입능이 보고되어 있으며 치은열구세포 내나 협부상피세포 내에서도 발견이 보고되어 있다. 이 두 세균종들이 치주염 군에서 더 많이 발견되기는 하나 양적으로 봤을 때 세포 내 세균의 적은 부분만을 차지한다. 이외의 다른 어떤 세균들이 치은열구 상피세포 내에 존재하는지와 상피세포 내 세균의 존재와 치주염의 진행과의 관계를 밝히는 것이 앞으로의 숙제가 될 것이다. 또한 같은 치주염 군 내에서도 치은열구 상피세포 내에서 세균이 적거나 거의 발견되지 않았던 피험자들이 있었으므로 이 점이 임상적으로 유의한 차이와 연계되어 있는지도 조사해보아야 할 것이다. in vitro 연구에서의 세균 침입 시의 상피세포의 반응을 in vivo 환경과 연계하여 세포 내 세균의 존재가 치은열구 상피세포에 어떤 영향을 미치는지도 살펴보아야 할 것이다.

참고문헌

1. Noiri Y, Ozaki K, Nakae H, Matsuo T, Ebisu S. An immunohistochemical study on the localization of Porphyromonas gingivalis, Campylobacter rectus and Actinomyces viscosus in human periodontal pockets. J Periodontol Res 1997;32:598-607.
2. Rudney JD, Chen R, and Sedgewick GJ. Intracellular

- Actinobacillus actinomycetemcomitans and Porphyromonas gingivalis in buccal epithelial cells collected from human subjects. Infection and Immunity 2001;69:2700-2707.
3. Fillery ED, Pekovic DD. Identification of microorganisms in immunopathological mechanism on human gingivitis. J Dent Res 1982;61:253.
4. Saglie FR, Marfany A, Carmago P. Intra gingival occurrence of Actinobacillus actinomycetemcomitans and Bacteroides gingivalis in active destructive periodontal lesions. J Periodontol 1988;59:259.
5. Carranza FA, Jr, Saglie R, Newman MG. Scanning and transmission electron microscopic study of tissue-invading microorganisms in localized juvenile periodontitis. J Periodontol 1983;54:598.
6. Sreenivasan PK, Meyer DH, Flives-Taylor PM. Requirements for invasion of epithelial cells by Actinobacillus actinomycetemcomitans. Infect Immun 1993; 61:1239.
7. Han YW, Shi W, Huang GT et al. Interactions between periodontal bacteria and human oral epithelial cells: Fusobacterium nucleatum adheres to and invades epithelial cells. Infect Immun 2000;68:3140.
8. Sandros J, Papapanou P, Dahlen G. Porphyromonas gingivalis invades oral epithelial cells in vitro. J Periodontal Res 1993;28:219.
9. Wang B, Holt SC. Interaction of Treponema denticola with HEp-2 cells. J Dent Res 1993;72:324.
10. Madianos PN, Papapanou PN, Nannmark U, Dahlen G, Sandros J. Porphyromonas gingivalis FDC381 multiplies and persists within the human oral epithelial cells in vitro. Infect Immun 1996;64:660-664.
11. Dale BA. Periodontal epithelium: a newly recognized role in health and disease. Periodontol 2000 2002;30:70-78.
12. Moter A, Göbel UB. Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. J Microb Methods 2000;41:85-112.
13. Sakamoto M, Umeda M, Benno Y. Molecular analysis of human oral microbiota. J Periodontal Res 2005;40:277-285.
14. Claridge JE 3rd. Impact of 16S rRNA sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. Clin Microbiol Rev 2004;17:840-62.
15. Földes-Papp Z, Demel U, Tilz GP. Laser scanning confocal fluorescence microscopy: an overview. International Immunopharmacology. 2003;3:1715-1729.
16. Michalet X, Kapanidis AN, Laurence T, Pinaud F, Doose

- S, Pflughoeft M, Weiss S. The power and prospects of fluorescence microscopies and spectroscopies. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 2003;32:161-82.
18. Dibart S, Skobe Z, Snapp KR et al. Identification of bacterial species on or in crevicular epithelial cells from healthy and periodontally diseased patients using DNA-DNA hybridization. *Oral Microbiol Immunol* 1998;13:30-35.
19. Colombo AV, Silva CM, Haffajee A, Colombo AP. Identification of oral bacteria associated with crevicular epithelial cells from chronic periodontitis lesions. *J Med Microbiol* 2006;55:606-615.
20. Colombo AV, Silva CM, Haffajee A, Colombo APV. Identification of intracellular oral species within human crevicular epithelial cells from subjects with chronic periodontitis by fluorescence in situ hybridization. *J Periodontol Res.* 2007;42:236-243.
21. Loy A, Maixner F, Wagner M, Horn M. probeBase - an online resource for rRNA-targeted oligonucleotide probes: new features 2007. *Nucleic Acids Res.* 2007;35:D800-D804.
22. Lamont RJ, Yilmaz Ö. In or out: the invasiveness of oral bacteria. *Periodontol* 2000 2002;30:61-69.
23. Sandros J, Karlsson C, Lappin DF, et al. Cytokine responses of oral epithelial cells to *Porphyromonas gingivalis* infection. *J Dent Res* 2000;79:1804-1814.
24. Andrian E, Grenier D, Rouabhia M. *Porphyromonas gingivalis*-epithelial cell interactions in periodontitis 2006;85:392-403.
25. Rudney JD, Chen R, Sedgewick GJ. *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Tannerella forsythensis* are components of a polymicrobial intracellular flora within human buccal cells. *J Dent Res* 2005;84:59-63.
26. Johnson JD, Chen R, Lenton PA et al. Persistence of extracrevicular bacterial reservoirs after treatment of aggressive periodontitis. *J Periodontol* 2008;79:2305-2312.