

특정 세균으로 유도된 백서의 치수염에서 T 세포 아군집의 분포와 interleukin-2, interferon- γ , interleukin-4의 수준에 관한 연구

김선아 · 임성삼

서울대학교 치과대학 치과보존학교실

ABSTRACT

THE LEVELS OF INTERLEUKIN-2, INTERFERON- γ , INTERLEUKIN-4 AND T LYMPHOCYTE SUBPOPULATIONS IN RAT PULPAL INFLAMMATION INDUCED EXPERIMENTALLY BY SPECIFIC BACTERIA

Seon-Ah Kim, Sung-Sam Lim

Department of Conservative Dentistry, Graduate School, Seoul National University

Immune responses associated with bacterial infection involve various inflammatory cells. Clinical symptoms and pathologic features are particularly influenced by the predominant cells. Among inflammatory cells, T cells have the heterogeneity. T cells may develop into the mature cells expressing the cell surface markers with different functions and T helper cells are categorized into Th1 and Th2 cells based on their different patterns of cytokine production. The objective of this study was to investigate the change of expression of surface markers on T cells and the Th1/Th2 immune response in pulpal inflammation associated with specific bacteria.

We experimentally induced pulpal inflammation in rat incisors by drilling without coolant and inoculated with *Streptococcus mutans* (S.M. group), *Porphyromonas endodontalis* (P.E. group), or only sterile cotton (control group). After 1, 2, and 5 days, mandibular incisors were extracted and the pulp tissues were extirpated. The expressions of IL-2 receptors (CD25) and ICAM-1 (CD54) on CD4+ and CD8+ cells in the pulps were determined using a flow cytometer, and the concentration of IL-2, IFN- γ and IL-4 was measured by enzyme-linked immunosorbent assay.

The results were as follows:

1. In the S.M. group, CD4+ cells were more increased at 2nd day than 1st day and in the P.E. group, CD8+ cells were more increased at 2nd day than 1st day.
2. The percentages of CD4+, CD4+25+ and CD4+54+ cells were decreased in the pulp tissues at 5th day after irritation in all groups.
3. The ratios of CD4+/CD8+, CD4+/CD4+25+ and CD4+/CD4+54+ in the pulps at 2nd day after irritation by *P. endodontalis* were significantly lower than the other groups.
4. The higher concentrations of IFN- γ than IL-4 in the pulps at 2nd day after irritation by *P. endodontalis* showed that T helper 1 reaction were predominant in the early stage of the pulpal inflammation induced by *P. endodontalis*.
5. The higher concentrations of IL-4 than IFN- γ in the pulps at 1st day and 5th day after irritation by *S. mutans* were measured but the differences were not significant.

Key words : Pulp, *Streptococcus mutans*, *Porphyromonas endodontalis*, T cells.

I. 서 론

감염에 따른 면역반응에는 여러 종류의 면역세포들이 관여하고 있다. 면역세포들의 다양성은 다양한 염증반응이 동시에 일어남을 뜻하지만, 임상적 증상과 병리학적 특성은 관여하는 면역세포의 주된 종류에 따라 달라진다. 치근단 질환에서 관찰되는 염증상태와 염증진행정도에 따른 면역세포의 종류와 수에 관한 많은 연구가 이루어졌다¹⁻³⁾.

Kopp 등⁴⁾은 16개의 치근단육아조직의 면역세포를 관찰한 결과 거식세포가 수적으로 가장 우세하며, HLA/DR 항원발현세포, T helper (Th) 세포, T suppressor/cytotoxic (Ts) 세포 순으로 많았다고 보고하였다. Stashenko 등⁵⁾과 Kawashima 등⁶⁾은 실험적으로 유도된 백서의 구치부 치근단 병변을 관찰한 결과, 치근단 병소의 크기가 증가되는 시기에는 Th 세포의 수가 Ts 세포보다 많았으며, 병소의 크기가 더 이상 증가되지 않고 유지되는 시기에는 Ts 세포가 Th 세포보다 더 많이 존재하였다고 보고하였다. 즉 병소의 초기에는 CD4+ 세포가 항원제공세포와 더불어 면역반응을 유도하는데 주요한 역할을 하고, 병소의 크기가 어느 정도 커져서 변화가 적어지면 CD8+ 세포와 형질세포가 병소의 만성적 특징을 나타내게 한다고 보았다. 또, Matsuo 등⁷⁾은 임상적으로 타진반응에 민감하게 반응하는 치아의 치근단 병소에서 증상이 없는 치아의 경우보다 많은 수의 CD11+ 세포가 있음을 보고하였다.

염증세포 중에서 특징적으로 T 세포는 더 세분화될 수 있는 다양성을 가지고 있다. T 세포는 동일한 전구세포로부터 여러 종류의 성숙한 세포로 분화하여 서로 다른 면역기능을 가진다. 이러한 분화과정에서 T 세포의 표면에 여러 개의 세포표면항원 혹은 세포표면표지자(cell surface marker)물질이 발현되는데, 세포의 표면항원은 항원의 자극을 전달하고, 다른 세포에서 분비된 cytokines의 수용체로서 매우 중요한 역할을 한다. 대부분의 Th 세포는 CD4를 가지고 있으며, Ts 세포는 CD8을 세포표면단백으로 발현하고 있어 면역반응에서의 그 역할은 서로 다르다. 세포표면항원단백물질은 cluster of differentiation(CD)으로 표기하며, 최근에는 유세포분석기를 이용하여 많은 종류의 면역세포 집단에서 림프구를 분석하고 CD 물질의 표현양상에 따른 림프구 아군집의 비율을 구한다.

오와 임⁸⁾은 치근단 병소 조직 내의 T4, T8 세포와 B 세포의 분포를 유세포분석기를 이용하여 분석한 결과, 낭종의 경우는 T8 세포가 T4 세포보다 많았고 육아종의 경우는 그 반대였다고 보고하였다. 그리고 Sol 등⁹⁾은 유세포분석기와 여러 가지 단일클론항체를 이용하여 치근단

병소에서 여러 종류의 면역세포를 보고하였고, CD4+/CD8+ 비(ratio)는 1.4로 Th 세포가 Ts 세포보다 더 많이 검출되었다고 보고하였다.

T helper 세포는 cytokines의 분비양상에 따라 더 자세히 나뉘어 T helper 1 (Th1) 세포와 T helper 2 (Th2) 세포로 구별될 수 있다¹⁰⁾. Interleukin(IL)-2, interferon(IFN)- γ , tumor-necrosis factor(TNF)- β 를 주로 생성하는 Th1 세포는 세포매개면역반응 또는 지연성 과민반응(delayed-type hypersensitivity)에 관여하고, IL-4, IL-5, IL-6, IL-13 등을 주로 생성하는 Th2 세포는 B 세포와 더불어 체액성 면역반응에 관여한다. Th1 세포가 주로 분비하는 IL-2, IFN- γ , TNF- β 등의 농도가 높은 면역반응을 Th1 반응, Th2 세포가 주로 분비하는 IL-4, IL-5, IL-6, IL-13 등의 농도가 높은 면역반응을 Th2 반응이라고 한다. 즉 면역반응에 어떤 종류의 세포들이 관여하는가에 따라 그 면역반응의 방향이 달라질 수 있다.

최근에는 치수 및 치근단 질환의 주요한 원인이 되는 세균의 검출여부와 면역반응과의 상관관계에 대한 연구가 활발히 이루어졌다. 백서의 치근단 병변에서 시간이 지날수록 세균의 endotoxin양이 많아지며 Gram음성 세균도 검출됨이 보고되었고¹¹⁾, Gemmell 등¹²⁾은 생쥐에서 *Porphyromonas gingivalis*를 이용하여 병소를 형성시켜 병소와 비장에서의 면역세포를 분석하여 높은 농도의 IFN- γ 가 검출되는 Th1 반응이 우세함을 보고하였다. 변 등¹³⁾은 치수 및 치근단 질환에서 조직파괴와 관련된 cytokines의 농도를 측정하고 특정세균을 동정하여, 이들 세균이 존재할 때의 cytokines의 분포가 그렇지 않을 때보다 높게 나타났다고 보고하였다. Ihan Hren 등¹⁴⁾은 혐기성세균이 많이 검출되는 치근단 병소와 호기성세균이 많이 검출될 때의 치근단 병소에서 T 세포의 세포표면항원의 표현양상이 다르다는 것을 보고하였다.

정상 치수와 염증성 치수의 면역반응과 면역능력세포에 관한 많은 보고를 통하여 치수조직에는 대식세포, 수지상세포와 림프구가 존재한다고 보고되었다¹⁵⁻¹⁸⁾. 이러한 연구들은 침입하는 세균 및 자극들에 대해 치수가 즉각적 반응을 할 수 있음을 보여준다. Hahn 등¹⁹⁾의 연구에서는 정상 치수에서보다 염증성 치수조직에서 더 많은 림프구가 분포한다고 하였으며, 치수 염증의 상태에 따라 T/B와 T4/T8의 비가 달라졌다. 이러한 연구들은 T 세포가 치수 염증반응에서 어떤 역할을 하고 있음을 보여주고 있다. 그러나 치수조직에서의 세분화된 T 세포 아군집의 분포에 관한 연구는 거의 없었으며, T 세포의 침윤과 분화를 유도하는 cytokines과 침윤된 T 세포가 분비하는 cytokines에 관한 연구는 단편적으로만 이루어

졌다.

본 연구의 목적은 백서의 하악 절치에 마찰력 자극에 의한 와동형성과 세균감염을 통하여 치수 염증을 실험적으로 유도하고, 염증성 치수조직에서의 T 세포 아군집의 역학과, 그와 관련된 cytokines인 IL-2, IFN- γ 와 IL-4의 양을 측정하여 치수염증에서 T 세포 반응의 방향을 알아보는 것이다. 이에 침윤된 T 세포의 비율을 유세포분석기를 이용하여 측정하였고, IL-2, IFN- γ 와 IL-4의 양을 ELISA로 측정하여 치수조직의 염증반응의 방향에 관해 다소의 지견을 얻었기에 이를 보고하는 바이다.

II. 실험재료 및 방법

1. 세균배양

Streptococcus mutans (ATCC 25175)는 37°C CO₂ 배양기에서 배양하였고, *Porphyromonas endodontalis* (ATCC 35406)의 배양은 혐기성 조건(85% N₂, 5% CO₂, 10% H₂)으로 37°C 혐기성 세균배양기에서 배양하였다. 두 세균 모두 rabbit blood와 hemin, menadion을 첨가한 columbia agar plate에서 배양하였다.

2. 실험동물 및 재료

체중 300±50g의 백서 180마리의 하악 절치 360개를 이용하였다. 실험동물의 체중 kg 당 60 mg의 Ketamin HCl (Youhan Co. Seoul, Korea)를 복강 내 주입하여 마취하였다. 절치의 치은연에서 마찰력 발생방지용 냉각매없이 35,000rpm의 속도로 이동용 기공엔진 (Saeshin Co. Seoul, Korea)을 이용하여 치관의 끝을 절단하고, 절단된 상아질에 5mm 깊이의 와동을 형성하였다. #15번 K-file을 이용하여 치수의 노출을 확인하고, #20번과 #25번 K-file을 차례로 이용하여 와동을 확대한 다음, 각각 120개의 치아씩 3군으로 분류하였다.

대조군(마찰력 자극만 가한 군)은 치수 노출 후 소독된 작은 면구를 넣고 즉시 Caviton(GC Co. Tokyo, Japan)으로 가봉하였고, 치수노출 후 소독된 작은 면구를 이용하여 *S. mutans*의 colony를 따서 근관 내로 삽입하고 가봉한 군을 S.M. 군이라 하였으며, 같은 방법으로 *P. endodontalis*를 치수에 접종한 후 가봉한 경우 P.E.군이라 하였다.

1, 2, 5일 후 각 군의 실험동물을 희생시키고 하악 절치를 발거하였다. 유세포분석을 위해서는 발치된 치아에서 즉시 치수조직을 적출하여 사용하였고, cytokines의 농도 측정을 위해서는 발치된 치아를 액체질소에 보관하

였다.

3. 유세포분석

1) 조직의 처리

각 군 당 90개의 치아를 사용하였는데, 세 개의 치아에서 적출된 치수조직을 합쳐서 한 개의 sample로 이용하였으며, 각 날짜별로 10개씩의 sample을 얻었다. 적출한 치수조직은 즉시 복합항생제와 10% fetal bovine serum이 포함된 RPMI 1640 medium으로 옮겨 세절하였고, Mangkorn-karn 등²⁰⁾의 방법대로 2mg/ml의 농도로 collagenase를 첨가한 후 37°C CO₂ 배양기에서 30분간 두어 단일세포현탁액으로 만들었다. 원심분리하여 세포를 모으고 PBS로 세척하였다.

2) 단일클론항체염색

다시 원심분리한 후 상층액은 버리고 남아있는 세포 덩어리를 1.5ml의 PBS로 희석한 후 4개의 FACS tube(Becton Dickinson Co. USA)에 300 μ l씩 분주하였다. 첫 번째 시험관에는 anti-CD4(conjugated with cy-chrome), anti-CD25(FITC)와 anti-CD54(PE) monoclonal antibody를 첨가하였고 두 번째 시험관에는 anti-CD8(perCP), anti-CD25(FITC)와 anti-CD54 (PE) monoclonal antibody를 첨가하였다, 나머지 시험관에는 각각의 antibody에 대한 isotype negative control antibody를 첨가하여 반응시켰다.

상기의 단일클론항체를 세포현탁액과 잘 섞어 4°C 어두운 장소에서 30분간 반응시킨 후 PBS로 세척하였다. 그 후 RBC lysis 용액을 1ml 씩 각 시험관에 첨가하여 1분간 혼합하였고, 2% parafor-maldehyde 용액으로 고정시켰다.

3) T 세포분석

항체 염색후 FACStar plus(Becton Dickinson Co. USA) 유세포분석기를 이용하여 T 세포 분석을 시행하였다. 각각의 실험군의 날짜별로 10개의 sample을 분석하였고, One-way ANOVA로 통계 처리하여 p값이 0.05이하인 경우를 통계적 유의성이 있다고 보았다.

4. Enzyme-linked immunosorbent analysis

각 군 당 30개씩의 치아를 사용하여 각 날짜별로 10개씩의 치아를 발거하였다. 발거한 후 액체질소에 보관한 치아를 10분 동안 실온에 놓아둔 후 치아를 절개하여 치수조직을 적출하였다. 적출된 치수조직의 무게를 측정 한 후, 조직 mg당 50 μ l의 homogenizing buffer를 첨가하

여 잘게 다지고 두 시간동안 놓아둔 후 glass homogenizer로 균일하게 갈았다. 잔사는 원심분리로 제거하고 추출물을 얻은 뒤 R&D사(Minneapolis, USA)의 ELISA kit를 이용하여 분석하였다. 이 분석은 quantitative sandwich enzyme immunoassay technique의 방법을 이용하는 것이다.

buffer로 추출된 용액을 각 cytokines에 특이성을 갖는 단일클론항체가 도포되어 있는 microtiter plate의 각 시험관에 assay용액을 첨가한 후, 제조사에서 제공한 standard와 치수조직의 sample을 50 μ 씩을 혼합하

였다. 그 후 conjugate를 반응시키고, 세척후 substrate로 발색을 유도하였다. stop용액을 첨가한 후 microtiter plate reader에서 450nm로 optical density(O.D.) 값을 측정하였다. 제조사에서 제공한 standard의 측정된 O.D.와 제공된 standard의 농도를 log 값으로 환원하여 직선의 추세선을 만들고, 각 sample의 O.D. 값을 대입하여 농도를 얻었다.

각 군간의 cytokines 농도는 One-way ANOVA를 이용하여 비교하였으며, 각 군 내의 IL-4와 IFN- γ 의 농도 비교는 paired t-test로 하였다.

5) 병리조직표본

각 실험군의 치수조직을 한 sample씩 H&E 염색표본을 만들어 관찰하였다.

III. 결 과

1. 유세포분석

한 시험관에서 10,000개의 세포를 분석하였다. 세포의 크기와 과립도를 이용하여 T 세포의 분포범위가 포함되는 gated 영역을 지정하였다(Fig. 1). gated 영역에서는 500에서 2,500개의 세포가 포함되었는데, 이 영역의 세포들에 대해 two-color fluorescence analysis를 시행하여 각각의 CD 물질과 결합한 항체의 형광성에 따

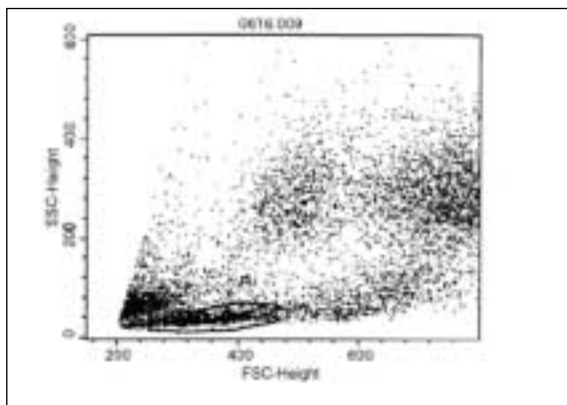


Fig. 1. Lymphocytes were gated(R1) on FSC(cell size) versus SSC(cell granularity) plot.

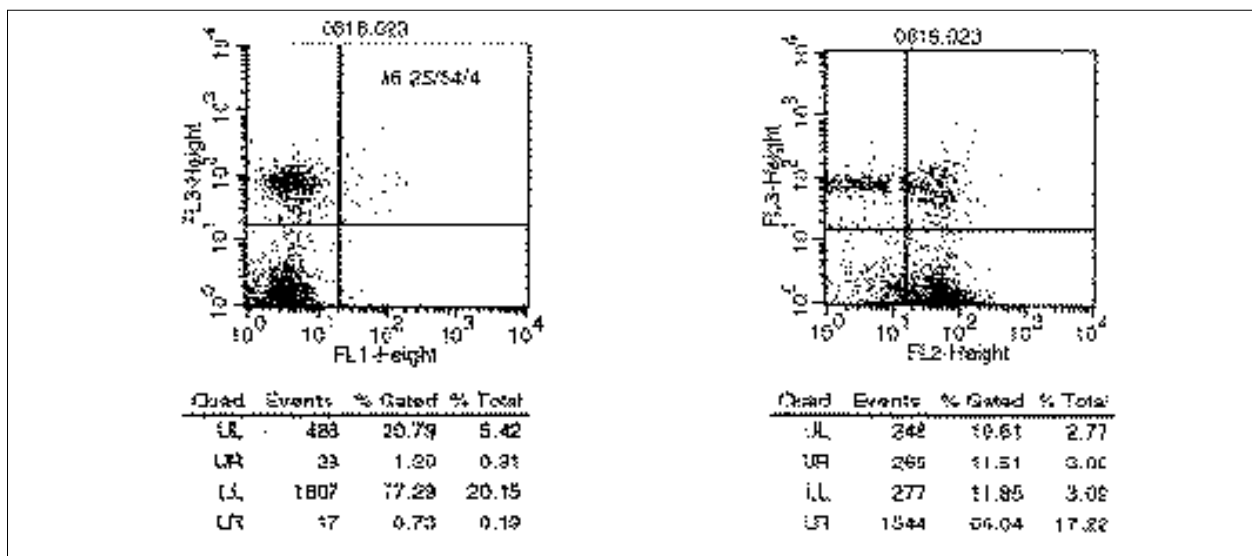


Fig. 2. Two-color fluorescence analysis of CD25 (FL1-Height) and CD4 (FL3-Height) in left plot and two-color fluorescence analysis of CD54 (FL2-Height) and CD4 (FL3-Height) is shown in right plot. UL: upper left, UR: upper right, LL: lower left, LR: lower right, % Gated: percentage in the gated area, % Total: percentage in all particles.

Table 1. The percentages and standard deviations of CD4+ cells in the gated area

group day cells	Control group			S.M. group			P.E. group		
	1	2	5	1	2	5	1	2	5
CD4+ %(\pm S.D.)	25.13+ (\pm 12.49)	24.82* (\pm 2.08)	17.98+ \ddagger (\pm 16.26)	25.82+ (\pm 4.36)	31.54* \ddagger (\pm 6.42)	14.79+ \ddagger (\pm 4.81)	38.28+ (\pm 10.17)	29.33* \ddagger (\pm 5.91)	14.26+ \ddagger (\pm 5.45)
CD4+25+ %(\pm S.D.)	3.19 \circ (\pm 2.27)	2.20\$ (\pm 0.65)	1.70 (\pm 1.05)	2.11 \ddagger (\pm 0.72)	3.24 \circ (\pm 1.19)	1.92 (\pm 0.69)	9.22+* \ddagger (\pm 3.78)	5.42+* \circ \ddagger (\pm 1.93)	2.8+ \ddagger (\pm 1.34)
CD4+54+ %(\pm S.D.)	22.08 (\pm 11.33)	12.17 \circ (\pm 3.14)	13.23 (\pm 16.29)	12.89 (\pm 4.49)	20.31* \ddagger (\pm 5.04)	11.70 (\pm 3.54)	28.11 (\pm 9.85)	25.18* \ddagger (\pm 4.92)	12.14 (\pm 8.06)

*, #, \circ , \$ in the same line: statistically significant ($p < 0.05$; by One-way ANOVA) between groups.

+ , \ddagger in the same line: statistically significant ($p < 0.05$; by One-way ANOVA) in the group.

Table 2. The percentages and standard deviations of CD8+ cells in the gated area

group day cells	Control group			S.M. group			P.E. group		
	1	2	5	1	2	5	1	2	5
CD8+ %(\pm S.D.)	46.34 (\pm 20.90)	26.36+ \circ (\pm 4.85)	60.62+ (\pm 15.87)	31.67+ (\pm 10.64)	34.26* \ddagger (\pm 9.53)	63.38+ \ddagger (\pm 9.63)	43.58+ \ddagger (\pm 14.33)	61.41* \ddagger (\pm 13.54)	56.11+ (\pm 32.43)
CD8+25+ %(\pm S.D.)	0.89 (\pm 0.52)	0.51 \circ (\pm 0.14)	0.65 (\pm 0.36)	0.97 (\pm 1.23)	0.78 \ddagger (\pm 0.17)	0.65 (\pm 0.32)	2.76+ (\pm 2.45)	1.10* \ddagger (\pm 0.68)	0.66+ (\pm 0.11)
CD8+54+ %(\pm S.D.)	46.36 (\pm 21.25)	19.42 \circ (\pm 15.31)	56.52 (\pm 15.68)	26.35 (\pm 10.77)	28.93 \ddagger (\pm 10.09)	61.28 (\pm 10.21)	32.48 (\pm 16.13)	57.97* \ddagger (\pm 14.31)	54.91 (\pm 16.45)

*, # in the same line: statistically significant ($p < 0.05$; by One-way ANOVA) between groups.

+ , \ddagger in the same line: statistically significant ($p < 0.05$; by One-way ANOVA) in the group.

라 전체 T 세포 아군집의 비율(percentage)을 구하였다 (Fig. 2).

각 실험군의 gated 영역에서의 T 세포 아군집의 비율의 평균은 Table 1과 Table 2와 같다.

CD4+ 세포는 대조군과 P.E.군에서 시간이 경과함에 따라 그 비율이 감소하였고, S.M.군에서는 2일째의 CD4+ 세포의 비율이 1일째보다 증가하다 5일째에는 감소하였다(Fig. 3). CD4+ 세포에서의 CD25의 발현은 P.E.군의 1일째와 2일째에서 다른 군에 비해 유의성 있게 높은 수치를 보이면서 5일째에는 감소하였고, 대조군은 지속적 감소를 보이고 S.M.군에서는 2일째에 최고 비율을 나타냈으나 유의성 있는 큰 변화는 없었다(Fig. 4).

CD8+ 세포는 S.M.군과 P.E.군에서는 시간에 따른 증가를, 대조군에서는 2일째까지는 감소한 후 다시 증가되었다(Fig. 5). CD8+25+ 세포는 P.E.군에서 시간에 따른 감소 양상이 뚜렷하나 CD4+25+ 세포와 마찬가지로 대조군과 S.M.군에서는 시간에 따른 큰 차이를

보이지 못했다(Fig. 6). CD4+54+와 CD8+54+ 세포 비율의 변화는 각각 CD4+ 세포와 CD8+ 세포 비율의 변화와 비슷한 양상을 보였다.

그러나 이러한 비율은 gated 영역의 비율을 말하는 것으로 한 군집(subset)의 비율의 증가는 다른 군집의 비율에 상당히 영향을 줄 수 있다. 각 T 세포의 아군집 비율은 gated 영역의 지정범위에 따라 달라지기 때문이다. 형광 염색된 세포들의 수가 유세포분석기로 탐지되는 개체(particles)의 최소 1% 이상이 될 경우 세포군집간의 비(ratio)는 gated 영역이 달라져도 어느 정도 안정성이 있게 되므로 세포군의 비율을 이용하여 얻은 아군집 간의 비(ratio)가 더 신뢰성이 있다. gated 영역의 T 세포 아군집의 비율(percentage)을 이용하여, CD4+/CD8+, CD4+/CD4+25+, CD4+/CD4+54+, CD8+/CD8+25+, CD8+/CD8+54+를 얻었다. 각 아군집 간의 비(ratio)의 평균과 표준편차는 Table 3과 같다.

대조군, S.M.군과 P.E.군에서 모두 1일, 2일째보다

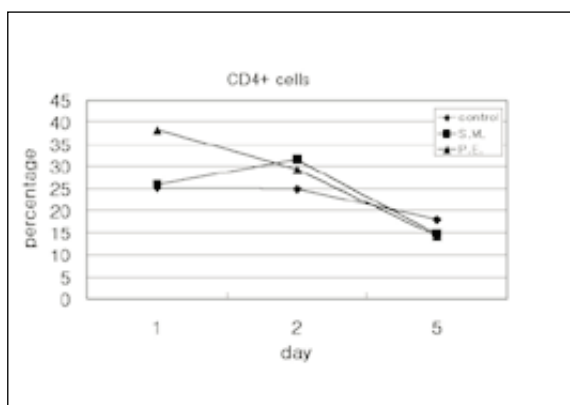


Fig. 3. The percentages of CD4+ cells.

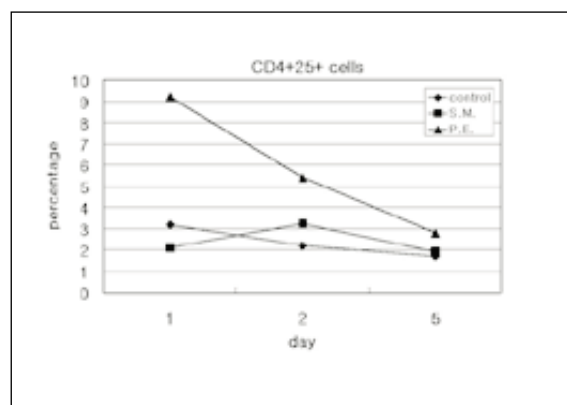


Fig. 4. The percentages of CD4+25+ cells.

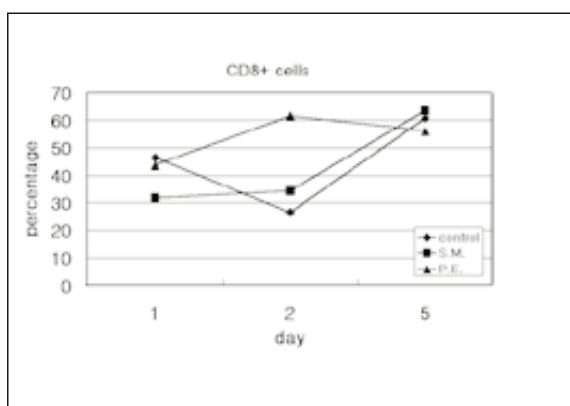


Fig. 5. The percentages of CD8+ cells.

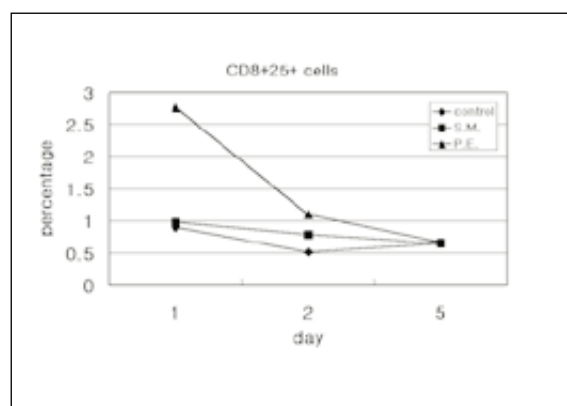


Fig. 6. The percentages of CD8+25+ cells.

Table 3. The mean ratios of cell populations

group day ratios	Control group			S.M. group			P.E. group		
	1	2	5	1	2	5	1	2	5
CD4+/CD8+ (±S.D.)	0.71+ (±0.54)	0.96* (±0.14)	0.29+ (±0.41)	0.72+ (±0.17)	0.99* (±0.37)	0.25+ (±0.11)	1.02+ (±0.55)	0.52* (±0.22)	0.37+ (±0.241)
CD4+/CD4+25+ (±S.D.)	10.24 ^s (±4.70)	11.77 ^r (±3.22)	10.58 (±12.29)	9.70 ^o (±1.78)	10.36 ^s (±1.89)	7.86 (±1.79)	4.79 ^{so} (±1.62)	5.84 ^r (±1.67)	6.09 (±1.23)
CD4+/CD4+54+ (±S.D.)	1.15 (±0.14)	2.16 ^r (±0.57)	1.36 (±0.24)	1.28 (±0.06)	1.58 ^s (±0.26)	1.26 (±0.04)	1.43 (±0.38)	1.17 ^s (±0.13)	1.12 (±0.16)
CD8+/CD8+25+ (±S.D.)	71.47 (±45.50)	41.72 (±20.11)	111.21 (±56.25)	20.25+ (±13.67)	57.13 (±17.15)	134.85+ (±90.91)	24.69 (±9.56)	71.98 (±23.13)	82.74 (±26.32)
CD8+/CD8+54+ (±S.D.)	1.05 (±0.26)	1.25 (±0.24)	1.08 (±0.02)	1.10 (±0.03)	1.21 (±0.24)	1.04 (±0.02)	1.63 (±1.05)	1.05 (±0.04)	1.03 (±0.03)

*, #, ∞, \$ in the same line: statistically significant (p<0.05; by One-way ANOVA) between groups.

+, † in the same line: statistically significant (p<0.05; by One-way ANOVA) in the group.

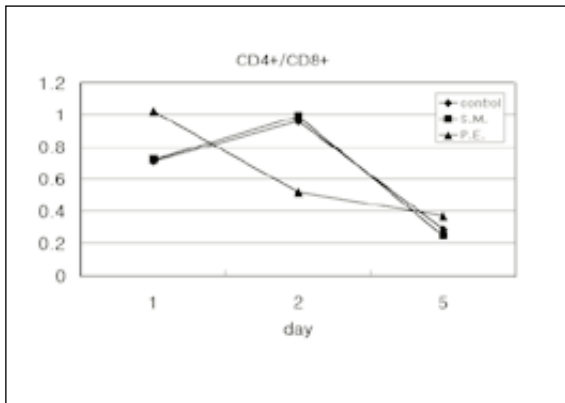


Fig. 7. The ratios of CD4+/CD8+.

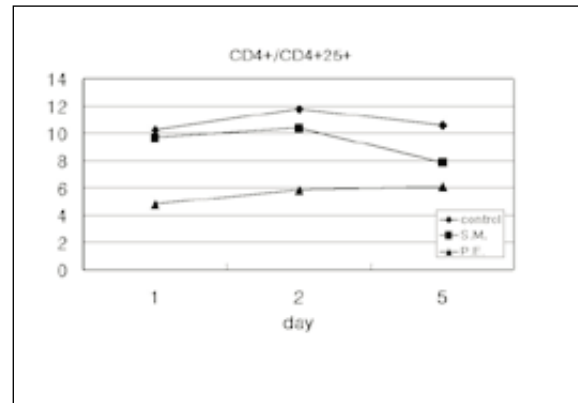


Fig. 8. The ratios of CD4+/CD4+25+.

Table 4. The average concentrations of cytokines

group day cytokines	Control group			S.M. group			P.E. group		
	1	2	5	1	2	5	1	2	5
IL-2 pg/mg tissues(S.D.)	0.52 (± 0.51)	0.78 (± 0.79)	0.39 (± 0.61)	1.22 (± 1.68)	1.82 (± 0.85)	0.44 (± 0.45)	1.69 (± 1.88)	3.27 (± 2.02)	0.44 (± 0.54)
IFN- γ pg/mg tissues(S.D.)	0.32 (± 0.23)	0.51* (± 0.64)	1.14 (± 1.21)	0.30 (± 0.41)	0.93* (± 0.66)	0.32 (± 0.31)	1.62 (± 0.46)	4.79+* (± 4.47)	0.89+ (± 0.24)
IL-4 pg/mg tissues(S.D.)	0.42 (± 0.76)	0.21 (± 0.21)	0.31 (± 0.44)	0.95 (± 1.75)	0.60 (± 0.53)	0.59 (± 0.79)	0.74 (± 0.59)	0.79 (± 0.36)	0.65 (± 0.67)

*, # in the same line; statistically significant ($p < 0.05$; by One-way ANOVA) between groups.

+, † in the same line; statistically significant ($p < 0.05$; by paired t-test) in the group.

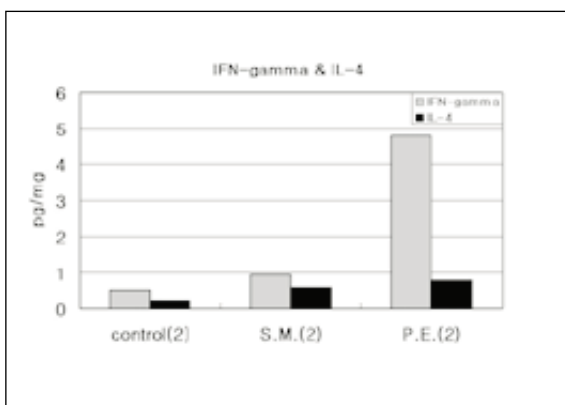


Fig. 9. The concentration of IFN- γ and IL-4.

5일째의 CD4+/CD8+의 비가 통계적 유의성 있게 감소하였으며, 대조군과 S.M.군의 변화양상은 비슷하였다(Fig. 7). P.E.군의 2일째의 CD4+/CD8+의 값은 다른 군의 2일째 값보다 유의성 있게 낮았다.

CD4+/CD4+25+의 비는 P.E.군의 값이 대조군과 S.M.군에 비해 2일째에서 다른 군에 비해 유의성 있게 낮았다(Fig. 8). CD8+/CD8+25+의 비는 S.M.군과 P.E.군에서 시간에 따라 증가되었고, 대조군에서는 2일째에서 약간 감소 후 5일째에 다시 증가되었다. CD4+/CD4+54+의 비와 CD8+/CD8+54+의 비는 각 군간의 유의한 차이를 보이지 않으며 그 값이 1 이상 2.5이하로 나타났다.

2. ELISA

Table 4는 각 군의 cytokines의 평균 농도를 보여주고 있다.

1일째와 2일째의 S.M.군과 P.E.군의 IL-2의 농도가 대조군의 IL-2에 비해 높았지만 5일째에는 모든군에서 비슷한 수준으로 감소하였다. IFN- γ 는 2일째에 다른 군에 비해 P.E.군에서 유의성 있게 높은 증가 양상을 나타냈고 1일째와 5일째에는 낮은 농도를 보이며 각 군간의

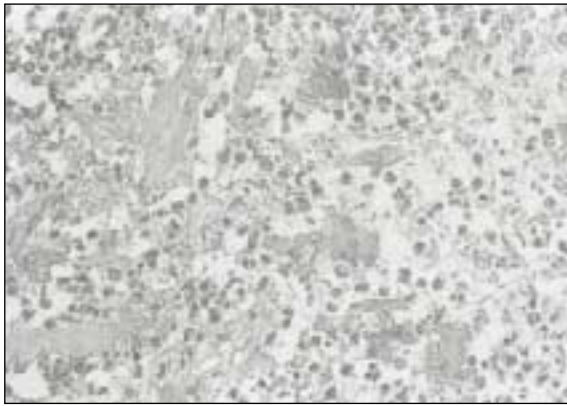


Fig. 10. The pulp tissue in the P.E. group at 2nd day after irritation (H&E stain $\times 400$).

차이가 없었다. IL-4는 S.M.군과 P.E.군에서 1일째, 2일째 그리고 5일째 모두 대조군보다 높은 농도를 보였는데 IL-2나 IFN- γ 와는 달리 5일째에도 농도의 감소가 나타나지 않았다.

대조군과 S.M.군의 1일째 IL-4 농도가 IFN- γ 보다 높고, S.M.군의 5일째 IL-4 농도도 IFN- γ 보다 높았으나 통계적 유의성은 없었다. 그 외의 나머지 군에서는 모두 IL-4보다 IFN- γ 가 높게 나타났는데, 특히 P.E.군에서 2일째의 IFN- γ 농도보다 유의성있게 높았다(Fig. 9).

3. H&E 염색 조직표본

세균을 접종한 실험군과 세균 없이 열과 기계적 자극을 가한 대조군 모두 2일째의 표본에서 PMN 등의 염증세포를 관찰할 수 있었다(Fig. 10). 그러나 치수조직 전체에 걸친 염증을 일어나지 않았고 염증 부분은 절단면에 형성된 와동의 인접한 부위로 국한되어 있었다. 대조군과 실험군 모두 5일째의 표본에서는 염증부위의 범위가 줄어들었다(Fig. 11).

IV. 고 찰

유세포분석으로 형질이 서로 다른 림프구들의 집합에서 표면항원단백에 의한 아군집의 분류를 빠르고 쉽게 할 수 있게 되고, 측정이 표준화를 이룬 점은 큰 발전이라 볼 수 있다. 실험자의 손으로 이루어지는 면역글로불린과 sheep E-rosettes에 의한 T 세포와 B 세포의 확인법도 어느 정도 표준화되어 있지만 표준단일클론항체와 유세포분석기에 의해 확인되는 세포의 수는 실험실간의 차이가 거의 없다²¹⁾. 그러나 측정되는 세포군집의 비율이 어느 정도 되어야 신뢰성 있게 세포군집 간의 비를 구할 수

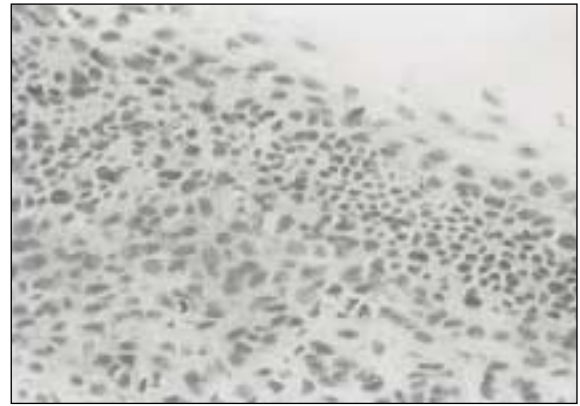


Fig. 11. The pulp tissue in the P.E. group at 5th day after irritation (H&E stain $\times 400$).

있다.

Mangkornkarn 등²⁰⁾은 정상 치수조직을 유세포분석하여 T 림프구의 비율이 1~2% 정도로 확인하였고, 김 등²²⁾은 사람의 염증성 치수조직을 임상적으로 발수하여 유세포분석을 하였는데, 염증의 증상이 심할수록 침윤된 T 림프구의 수가 증가되어 유세포분석이 가능하였음을 볼 수 있었다. 그러나 비슷한 증상의 치수를 모을 수 없었기 때문에 얻을 수 있는 조직의 크기가 너무 적었으며, 유세포분석 가능한 림프구의 비율이 낮아 아군집 간의 비를 구하기에는 적당하지 않았다.

백서의 절치에 자극을 가하여 치수내 염증을 관찰하고 염증성 산물을 측정 한 많은 연구가 있었다²³⁻²⁵⁾. Hashimoto 등²⁶⁾은 백서의 절치를 상아질에 냉각매없이 와동을 형성함으로써 생기는 열과 기계적 자극에 의하여 치수조직 내의 다형백혈구 및 림프구 수의 증가와 Leukotriene B₄의 농도 증가를 관찰하였다.

본 실험에서는 위의 연구와 비슷하게 백서의 절치를 이용하여 같은 자극을 가한 치아에서 발수한 치수조직을 3개씩 모아 한 sample로 모았기 때문에 유세포분석기로 측정된 림프구 비율이 적절하였다. 그리고 본 실험에서의 치수염의 유도는 세균의 차이에 따른 다른 자극에 대한 직접적 치수변화를 살펴볼 수 있었다. 대조군의 치수조직은 정상 치수조직이 아니라, 세균에는 노출되지 않았지만 와동을 형성할 때 생기는 열과 기계적 자극에 의해 실험적으로 염증이 유도된 상태라 볼 수 있고, 다른 실험군에서는 세균의 자극에 반응하여 침윤된 림프구 아군집의 분포 변화 양상을 살펴보기 위하여 이러한 열과 기계적 자극과 더불어 세균을 접종하였다.

P.E.군에서 2일째에 CD8 비율의 증가는 Ihan Hren의 연구¹⁴⁾결과와 비교해볼 수 있는데, Ihan Hren의 연구에서는 절대형기성세균이 주로 검출된 치근단 육아종

이 streptococcus 종이 더 많이 검출된 육아종에 비해 더 많은 CD8+ 세포가 유세포분석기로 확인되었다. Ihan Hren의 연구에서는 streptococcus 종이 더 많이 검출된 육아종은 CD8+ 세포에서의 IL-2 receptors인 CD25의 발현이 감소되었다고 보고하였는데, 이와는 달리 본 실험에서는 세균의 자극이 있는 S.M.군과 P.E.군에서 모두 대조군보다 1일째와 2일째에서 CD8+25+ 세포의 비율이 유의성있게 높았다. 그러나 2일째의 CD8+/CD8+25+ 비는 P.E.군에서 S.M.군보다 높았는데 이는 P. endodontalis에 의해 자극을 받은 치수조직에서 CD25가 발현되지 않은 CD8+25- 세포의 침윤이 다른 군에 비해 더 많이 일어났다고 볼 수 있다.

실험적으로 유도된 백서의 치근단 염증에 관한 또 다른 연구에서는 ICAM-1를 발현하는 내피세포(endothelial cell)와 CD25를 발현하는 림프구의 증가가 보고되었다²⁷⁾. 본 실험에서도 CD4+ 세포에서의 CD25와 CD54의 발현이 S.M.군과 P.E.군에서 대조군에 비해 증가된 것으로 보아 치수조직에서도 세균의 자극이 없을 경우보다 세균의 자극에 의한 염증성 치수에서 림프구의 CD25와 CD54 발현이 더 증가한다고 볼 수 있었다.

사람의 치수염에서의 IL-2 농도에 관한 연구에서 immunoreactive IL-2의 농도는 치수염증의 병적 염증활동(pathologic inflammatory activity)의 표지(marker)가 될 수 있다고 보고하였는데²⁸⁾, 이와 비교해 볼 때 본 실험에서의 농도는 매우 낮았다. 따라서 본 실험에서 유도된 치수염은 그 염증의 종류가 심하지 않다고 볼 수 있다. 실제로 병리표본 관찰을 통하여 염증부위는 치수조직 전체에 걸친 염증을 일어나지 않았고, 절단면에 형성된 와동의 인접한 부위로 국한되어 있음을 관찰할 수 있었다.

IL-2의 생리학적 농도에서 CD25의 발현은 IL-2의 기능에 필수라고 보고되었다²⁹⁾. 본 실험에서의 1일째와 2일째에 비하여 5일째에 감소된 IL-2의 농도변화 양상은 CD4+ 세포 내의 CD25의 발현 양상과 어느 정도 비슷하다고 볼 수 있었다. CD4+ 세포의 비율은 모든 실험군에서 5일째에 감소하였으며 CD4+25+ 세포의 비율도 감소하였다. 이점은 백서의 절치가 계속 분화 증식하는 조직으로, 시간이 지남에 따라 치수에 가한 열과 기계적 자극 또는 세균의 자극 등의 영향이 줄어드는 것으로 보인다.

CD4+/CD8+의 비는 염증조절단계의 특성을 나타낸다고 볼 수 있는데, Hahn 등¹⁹⁾의 연구에서 치수의 염증의 상태와 심화단계에 따라 T/B의 비와 CD4+/CD8+의 비가 달라짐을 보고하였다. 즉 정상 치수에서보다 염증이 심한 만성치수염의 조직에서 CD4+/CD8+의 비가 높았고, 정상 치수에서는 CD8+ 세포가 CD4+ 세

포보다 많이 존재하여 CD4+/CD8+의 비가 0.26으로 보고하였다. 본 실험에서도 자극의 종류에 따라 그 비가 달라짐을 볼 수 있었는데 자극의 종류에 관계없이 자극을 가한 후 시간이 경과된 5일째에서는 CD4+ 세포의 비율이 감소되어 CD4+/CD8+의 비가 0.25~0.37로 낮아졌는데 이는 백서의 절치를 이용한 다른 연구^{30,31)}에서도 시간의 경과에 따라 염증성물질의 감소한 결과와 유사하며, Hahn의 정상 치수조직의 CD4+/CD8+ 값과 비슷하다. 그러나 본 실험에서 사용한 유세포분석법은 세포군집 간의 비를 구하는 방법으로는 매우 효과적이었으나 조직 내 침윤된 T 세포의 절대값을 보여주지 못하는 단점이 있다.

열과 기계적 자극만을 가한 대조군과 S. mutans를 접종한 S.M.군은 1일째와 2일째에서 CD4+ 세포의 비율이 상당히 높게 나타났으며, P. endodontalis를 접종한 P.E.군에서도 1일째에 CD4+ 세포의 비율이 높음을 볼 수 있었다. P.E.군의 2일째에서는 CD8+ 세포의 비율이 매우 증가되어 CD4+/CD8+의 비가 다른 군에 비해 낮아졌지만 CD4+ 세포의 비율은 다른 군과 마찬가지로 높게 나타났다.

따라서 치수조직의 염증반응과정에서 CD4를 발현하는 Th 세포의 역할이 매우 중요하다고 보여진다. Th 세포는 면역조절기능에 따라 Th1 세포와 Th2 세포로 나뉜다. Th1 세포가 주로 참여하는 면역반응에서 유리되는 IFN- γ 는 거식세포를 활성화시켜 식균작용을 나타내고, IgG 항체의 생성을 촉진함으로써 대식작용을 유발시키며, IL-2와 더불어 CD8+ 세포의 분화를 촉진시킨다. Th2 반응에서 주로 유리되는 IL-4는 B 세포를 분화시켜 IgE의 생성을 유도하며 비만세포매개반응에 주요한 역할을 한다. 그러나 Th1 세포와 Th2 세포를 구분할 수 있는 특징적인 표면항원은 없는 것으로 알려져 있으며, Th(CD4+) 세포 이외의 T 세포에서도 이러한 cytokines이 분비되므로, "Th1-우세반응"과 "Th2-우세반응"의 표현이 더 적당하다¹⁰⁾.

본 실험에서는 P.E.군의 2일째에서 IFN- γ 의 농도가 IL-4의 농도보다 유의성있게 증가된 것으로 보아, P. endodontalis에 의한 자극은 치수조직의 염증 반응을 Th1 반응으로 유도한다고 볼 수 있었다. 이 결과와 비슷하게 Gemmell 등¹²⁾은 P. gingivalis에 의해 높은 농도의 IFN- γ 가 검출되는 Th1 반응이 우세함을 보고하였다. 본 실험에서의 다른 군에서는 유의한 결과가 없었는데 대조군과 S.M.군의 1일째 IL-4 농도가 IFN- γ 보다 높고, S.M.군의 5일째 IL-4 농도도 IFN- γ 보다 높았으나 통계적 유의성은 없었다. IL-4 농도의 변화를 살펴보면 IFN- γ 와는 달리 5일째에도 농도의 감소가 나타나지 않았다. 이는 IL-4 역할로 미루어 볼 때 만성 염증의 특성

을 나타내며 염증의 늦은 단계에서 침윤된 형질세포와 B 세포 등에 의해 분비된 것으로 생각된다.

Kettering 등³²⁾의 연구에서도 만성치근단병변의 환자의 IgA antistreptococcal 반응이 IgG보다 높게 나타나 치근단 염증반응에서의 antistreptococcal 면역반응과 Th2 반응과의 관계를 암시하였다. 따라서 각기 다른 세균의 특성에 따른 면역반응에 있어서 Th1/Th2 균형의 변화에 대한 연구가 더 필요할 것으로 사료된다.

면역반응에서의 Th1/Th2의 균형을 결정하는데 항원의 양은 중요한 인자로 알려져 있다. 몇몇 예외를 제외하고는 낮은 수준의 감염(low-dose infection)은 주로 Th1 반응을 유도하고 높은 수준의 감염(high-dose infection)은 Th2 반응을 촉진시킨다고 한다³³⁾. 본 실험에서는 cytokines의 농도가 대체로 낮았고, 조직표본의 관찰결과도 치수조직전반에 걸친 염증은 일어나지 않았다. 그러나 염증성 cytokines의 농도가 상당히 높은 조직에서는 T 세포를 비롯한 세포들의 생활력(vitality)이 낮아져 유세포분석을 위한 단일클론항체와 적절히 결합하기 어려울 것으로 사료된다. 즉 본 실험에서의 실험적 치수염의 유도는 T 세포 아군집의 변화를 보기 위한 것으로 cytokines의 농도 변화와 염증의 심화정도를 살펴보는 데는 크게 효과적이지 못했다. 실험에서 유도된 치수염은 약한 정도의 염증이므로 치수내의 Th1/Th2 반응을 살펴보기 위해서는 염증의 심화정도를 고려할 수 있는 실험재료를 사용하는 연구가 필요할 것으로 사료된다.

V. 결 론

백서의 하악 절치에 치수염증을 유도하기 위하여, 냉각매 없이 열과 기계적 자극으로 와동을 형성하였고 각 3군으로 나뉘어, 대조군은 소독된 작은면구를 넣고 즉시 가봉하였고, S.M.군은 소독된 면구를 이용하여 *Streptococcus mutans*의 colony를 따서 근관 내로 삽입하였고 P.E.군은 S.M.군과 같은 방법으로 *Porphyromonas endodontalis*를 치수에 접종한 후 가봉하였다. 1일 2일 그리고 5일 후 치수를 적출하여 T 세포의 분포와 cytokines의 농도를 측정하였다. T helper(CD4+) 세포와 T suppressor/cytotoxic(CD8+) 세포의 비율을 알아 보기 위해 anti-CD4, anti-CD8 monoclonal antibody를 사용하였고, 각각 CD4+ 세포와 CD8+ 세포에서의 IL-2 수용체인 CD25와 ICAM-1인 CD54의 비율을 유세포분석기로 측정하고, Th1 세포의 반응을 주도하는 cytokines인 IL-2와 IFN- γ 의 양, 그리고 Th2 세포의 반응에 주로 관여하는 IL-4의 양을 ELISA로 측정하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 백서의 절치에 자극을 가한 후 S.M.군은 1일째보다 2일째에 CD4+ 세포의 비율이 증가하였고, P.E.군은 1일째보다 2일째에 CD8+ 세포의 비율이 증가하였다.
2. 백서의 절치에 자극을 가한 후 5일째에는 모든 실험군에서 1일째와 2일째에 비해 CD4+ 세포, CD4+25+ 세포와 CD4+54+ 세포의 비율이 감소하였다.
3. *P. endodontalis*에 의해 자극을 받은 치수조직에서 2일째의 CD4+/CD8+, CD4+/CD4+25+와 CD4+/CD4+54+의 비는 대조군과 S.M.군에 비해 유의성있게 낮은 값을 나타냈다.
4. *P. endodontalis*에 의해 자극을 받은 치수조직에서 2일째의 IFN- γ 의 농도가 IL-4의 농도보다 유의성 있게 높게 나타나 *P. endodontalis*에 의한 치수염증 초기단계에는 Th1 반응이 우세한 것으로 나타났다.
5. *S. mutans*에 의해 자극을 받은 치수조직에서 2일째에는 IFN- γ 의 농도가 IL-4의 농도보다 높았고, 1일째와 5일째에는 IL-4의 농도가 IFN- γ 의 농도보다 높았으나 모두 통계적 유의성은 없었다.

참고문헌

1. I.J. Marton, C. Kiss Characterization of inflammatory cell infiltrate in dental periapical lesions International endodontic journal 1993;26:131-6.
2. A.F. Fouad IL-1alpha and TNF-alpha expression in early periapical lesions of normal and immunodeficient mice J Dent Res 1997;76(9):1548-54.
3. 백승호, 임성삼 실험적 치수 및 치근단병소에서의 면역글로블린 G 아강 분포에 관한 연구. 대한치과보존학회지 1991;16:41-59.
4. Kopp W, Schwarting R Differentiation of T lymphocyte subpopulations, macrophages, and HDA-DR-restricted cells of apical granulatuib tissue J Endodon 1989;15:72-5.
5. Stashenko P, Yu SM, Wang CY. Kinetics of immune cell and bone resorptive responses to endodontic infections. J Endodon 1992;18:422-6.
6. Kawashima N, Okiji T, Kosaka T Kinetics of macrophages and lymphoid cells during the development of experimentally induced periapical lesions in rat molars: a quantitative immunohistochemical study J Endodon 1996;22:311-6.
7. Matsuo T, Ebisu S, Shimabukuro Y Quantitative analysis of immunocompetent cells in human periapical lesions: Correlations with clinical findings of the involved teeth. J Endodon 1992;8:497-500.
8. 오태석, 임성삼 유세포분석기를 이용한 치근단병소의 임파구조성 및 cycling cell분포에 관한 연구. 대한치과보존학회지 1993;18: 317-40.
9. Sol MA, Tkaczuk J, Voigt JJ Characterization of lymphocyte subpopulations in periapical lesions by flow cytometry Oral Microbiol Immunol 1998;13:253-8.
10. Abbs AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of

- helper T lymphocytes. *Nature* 1996;383:787-93.
11. Yamasaki M, Nakane A, Kumazawa M. Endotoxin and Gram-negative bacteria in the rat periapical lesions. *J Endodon* 1992;18(Oct):501-504.
12. Gemmell E, Winning TA, Bird PS. Cytokine profiles of lesional and splenic T cells in *Porphyromonas gingivalis* infection in a murine model. *J Periodontol* 1998; 69:1131-8.
13. 변호영, 임성삼, 박동성. 치근단 및 치수병변 환자에서의 TNF- α 와 β , IL-1 β 및 TGF- β 1의 수준과 근관내 특정 black pigmented bacteria와의 연관성에 관한 연구. *대한치과보존학회지* 1999;24:1-12.
14. Ihan Hren N, Gubina M, Ihan A. Cytotoxic T lymphocytes versus streptococcal colonization in periapical granulomas. *J Endodon* 1999;25:239-42.
15. Speer ML, Madonia JV, Heuer MA. Quantitative evaluation of the immunocompetence of the dental pulp. *J Endodon* 1977;3:418-23.
16. Jontell M, Gunraj N, Bergenholtz G. Immunocompetent cells in normal dental pulp. *J Dent Res* 1986;66:1149-53.
17. Pulver WH, Taubman MA, Smith OJ. Immune components in normal and inflamed human dental pulp. *Arch Oral Biol* 1977; 22:103-11.
18. 이우철, 임성삼. 비가역성치수염의 임상적 증상에 따른 임파구의 분포에 관한 연구. *대한치과보존학회지* 1995;20: 235-49.
19. Hahn CL, Falkler WA, Siegel MA. A study of T and B cells in pulpal pathosis. *J Endodon* 1989;15:20-6.
20. Mangkornkarn C, Steiner JC, Bohman R, Lindemann RA. Flow cytometric analysis of human dental pulp. *J Endodon* 1991;17:49-53.
21. Kotylo HA, Sample RB, Redmond NL. Reference ranges for lymphocyte subsets. A comparison of standard vs rapid whole-blood lysis techniques. *Arch Pathol Lab Med* 1991;115:181-4.
22. 김선아, 배광식, 임성삼. 유세포분석기를 이용한 정상치수조직과 염증성 치수조직 내의 임파구 분포에 관한 연구. *대한치과보존학회지* 1997;22:374-87.
23. Okiji T, Morita I, Sunada I, Murota S. Involvement of arachidonic acid metabolites in increases in vascular permeability in experimental dental pulpal inflammation in the rat. *Archs Oral Biol* 1989;34:523-8.
24. Bergenholtz G, Nagaoka S, Jontell M. Class II antigen expressing cells in experimentally induced pulpitis. 1991;24:8-14.
25. Okiji T, Morita I, Kobayashi C, Sunada I, Murota S. Arachidonic-acid metabolism in normal and experimentally-inflamed rat dental pulp. *Archs Oral Biol* 1987; 32(10):723-7.
26. Hashimoto S, Maeda M, Yamakita J, Nakamura Y. Effects of zinc oxide-eugenol on leucocyte number and lipoxygenase products in artificially inflamed rat dental pulp. *Archs Oral Biol* 1990;35:87-93.
27. Suzuki N, Okiji T, Suda H. Enhanced expansion of activation - association molecules on macrophages of heterogeneous populations in expanding periapical lesions in rat molars. *Arch Oral Biol* 1999;44:67-79.
28. Rauschenberger CR, Bailey JC, Cootauco CJ. Detection of human IL-2 in normal and inflamed dental pulps. *J Endodon* 1997; 23:366-70.
29. Nguyen T, Wang R, Russeu JH. IL-12 enhances IL-2 function by inducing CD2 expression through a p38 mitogen-activated protein kinases pathway. *Eur J Immunol* 2000;30:1445-52.
30. Okiji T, Morita I, Sunada I, Murota S. The role of Leukotriene B4 in neutrophil infiltration in experimentally-induced inflammation of rat tooth pulp. *J Dent Res* 1991;70(1):34-7.
31. Wedenberg C, Borstein R. Pulpal reactions in rat incisors to Caridex. *Australian Dental Journal* 1990;35(6):505-8.
32. Kettering JD, Torbinejad M, Jones SL. Specificity of antibodies present in human periapical lesions. *J Endodon* 1991;17:213-6.