

DNA 형광 염색을 이용한 치은열구상피부착 세균에 관한 연구

신승윤, 이상현, 양승민, 계승범*

성균관대학교 의과대학 삼성서울병원 치과진료부 치주과

Fluorescent detection of bacteria associated with gingival sulcus epithelium

Seung-Yun Shin, Sang-Hyun Lee, Seung-Min Yang, Seung-Beom Kye*

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

ABSTRACT

Purpose: The aim of this study was to compare the number of live and dead bacteria attached to, or within, the stratified squamous epithelium lining the tissue side of the gingival sulcus.

Materials and Methods: A total of 50 patients was examined and classified into healthy or diseased sites according to inflammatory status of the gingival tissue. The surface of stratified squamous epithelium was removed by gentle scraping of the gingival sulcus with curettes. The cells were processed in the laboratory by density-gradient centrifugation to separate the epithelial cells from the loose bacteria and debris. The LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit was applied and the specimens were observed by an epifluorescent microscope and the number of bacteria was counted.

Results: Live and dead bacteria were stained to green and red, irrespectively. Generally, the number of total bacteria in the diseased sites was significantly higher than in the healthy sites. The mean number of detected bacteria in the diseased sites was 58.6 ± 36.0 (red bacteria 10.4 ± 9.2 / green bacteria 48.2 ± 30.5), while it was 1.5 ± 1.7 in the healthy sites (red bacteria 0.1 ± 0.3 / green bacteria 1.4 ± 1.5). The percentage of red bacteria was $17.5 \pm 11.2\%$ in the diseased sites and $2.0 \pm 5.8\%$ in the healthy sites.

Conclusion: The total number of bacteria in the diseased sites was significantly higher than that of the healthy sites. The ratio and the number of red bacteria were also significantly higher in the diseased sites.

(J Korean Acad Periodontol 2008;38:639-644)

KEY WORDS: bacterial adhesion; gingival sulcular epithelium; bacterial viability.

서론

치주질환은 치은연 혹은 그 하방의 치면에 군집하는 세균들에 의해 야기된 감염이며, 숙주, 미생물, 환경적 요인이 복합적으로 조합되어 발현된다.

세균학의 황금기라 불리는 19세기 후반에 의학적으로 중요한 여러 감염질환의 원인균이 밝혀지는 가운데 치주질환과 관련된 세균에 대한 연구가 시작되어, 치주질환의 발

현에 있어 미생물의 역할 및 원인 세균에 대한 다양한 연구들이 이루어졌다. 그러나 치주질환의 원인균을 밝히는 연구는 다른 감염성 질환들에 대한 연구와는 달리 매우 성공적이지는 못하였다. 비교적 최근에 염증반응이 심한 숙주인자가 임상적 증상이 높은 군과 연관된다고 밝혀졌으며, 미생물적 요인만으로는 질환의 발병이나 유병률의 상대적으로 적은 부분만을 설명할 수 있다고 알려져 있다. 쌍둥이의 연구를 통한 역학적 연구에서도 치주질환의 정도에 대한 유전적인 영향이 약 50% 정도 된다고 하였다¹⁾. 이러한 일련의 연구들은 감염질환의 발현에 있어 숙주반응이 중요한 역할을 함을 암시하는 것이다.

또한 상기한 바와 같이 미생물적 요인은 감염질환의 발현을 위한 세 가지 요소의 하나로, 질환의 발현에 필요조건일 뿐 충분조건이 아니긴 하지만, 어떠한 감염질환도 감염원

Correspondence: Dr. Seung-Beom Kye

Dept. of Periodontics, Samsung Medical Center, Sungkyunkwan University School of Medicine, Irwon-dong 50, Gangnam-gu, Seoul 135-710, Korea.

E-mail: Sb123.kye@samsung.com, Tel: 82-2-3410-2421,

Fax: 82-2-3410-0038

Received: Oct. 14, 2008; Accepted: Dec. 6, 2008

없는 상태에서는 발생할 수 없다는 점에서 미생물적 요인의 중요성은 여전히 과소평가할 수 없다.

현재까지는 치아에 부착하는 세균성 치태가 치주염의 원인으로 여겨지고 있다. 하지만, Dzink 등의 연구에 의하면 치은연하 치태에서보다 더 높은 비율의 치주질환 유발 세균이 열구상피의 biofilm에서 발견되며²⁾, 이러한 세균들은 치주염의 발병과 진행에 영향을 미칠 것으로 생각된다. 따라서 치은열구 상피세포에 부착하거나 함입된 세균의 수나 이의 생사 여부가 치주질환의 병인을 이해하는데 도움을 주리라 생각한다.

LIVE/DEAD[®] BacLight[™] Bacterial Viability Kit (Molecular Probes, OR, USA)는 SYTO[®] 9이라는 형광녹색의 핵산 염색제와 propidium iodide라는 형광적색의 핵산 염색제를 혼합해서 사용하는데, SYTO 9 염색제는 일반적으로 세포막이 건전한 것과 손상된 것 모두, 즉 군집 내의 모든 세균을 염색하는 반면, propidium iodide는 세포막이 손상된 세균만을 투과해 들어가서 SYTO 9 염색제의 효과를 감소시킨다. 따라서 세포막이 손상되지 않은 세균은 녹색으로 형광 염색되고 세포막이 손상된 세균은 붉은색으로 형광 염색된다.

본 연구에서는 LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit를 이용해 치은열구 상피세포를 특수 DNA 형광 염색하여, 건강한 치은과 치주질환에 이환된 치은에서 치은열구 상피에 부착된 세균의 수에 차이가 있는지를 알아보고자 하였다. 아울러, 부착되거나 함입된 세균 중 살아있는 세균과 죽어있는 세균의 수를 비교해 보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 치은열구상피 및 세균 채취

삼성서울병원 치주과에 내원한 환자를 검사하여 치주상태가 건강한 사람과 치주질환을 가진 사람을 구분하였다. 피험자들을 검사하여 건강한 치은 부위와 질환이 있는 치은 부위를 구분하였다. 건강한 부위는 치은연이 얇고 표면이 단단하며 임상적 부착상실이나 탐침 시 출혈이 일어나지 않는 곳을 선택하였다. 반면, 질환 부위는 변연이 둥글고 색조가 인접 부착치은보다 붉으며, 변연과 치간유두가 연하고, 치주탐침 시 4 mm 이상의 치주낭을 보이며 탐침 시 출혈이

발생하는 곳을 선택하였다. 이러한 기준으로 50명의 피험자들을 건강한 치은을 갖는 군과 치주질환에 이환된 치주 질환자군으로 구분하여, 전체 25개의 건강한 부위와 25개의 질환 부위로부터 상피세포를 채취하였다.

선택된 부위에 타액이 닿지 않게 커튼 몰로 격리시킨 후, 공기로 가볍게 건조시키고 cotton pellet이나 거즈를 이용해 치은연상치태를 제거하였다. 그 후 멸균된 Gracey curette(Hu-Friedy, USA)을 이용해 치은열구상피를 가볍게 2회 소파하여 멸균된 phosphate-buffered saline 0.5 ml가 담긴 1.5 ml Eppendorf tube(Axygen scientific Inc., USA)에 보관하였다.

2. 부착성 세균 분리

멸균된 22gauge 바늘의 5 ml 주사기(신창메디컬, 대한민국)를 이용해 tube에 있는 치은세포의 부유물을 흡인하고 뿔어내는 것을 수 차례 반복하여 묻혀있는 세포와 세균 덩어리를 분산시켰다. 그 다음 tube를 18500 Xg에서 5분간 원심분리시킨 후, 바닥에 침전된 pellet을 50% Percoll (Sigma-Aldrich Corporation, USA)과 phosphate-buffered saline(Sigma-Aldrich Corporation, USA)을 9:1로 섞은 용액이 담긴 tube에 옮겼다. Density gradient를 형성하여 상피세포와 비부착성 세균을 분리하기 위해 tube를 한번 더 18500Xg에서 10분간 원심분리시켰다. 원심분리 후 바닥에 침전된 비부착성 세균이 섞이지 않도록 조심스럽게 gradient 상층부의 피를 형성한 상피세포를 멸균된 피펫으로 분리하였다.

3. 형광염색

분리해 낸 상피세포를 다시 phosphate-buffered saline 0.5 ml가 담긴 tube로 옮겨 담고, LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit(Molecular Probes, USA)를 이용해 제조사의 사용법에 따라 상피세포를 염색하였다.

4. 현미경 관찰 및 측정

피펫으로 염색된 세포 5 μ l를 분리하여 슬라이드 글라스에 옮기고 커버 글라스를 덮은 후 표준형광장비가 연결된 현미경(Nikon ECLIPSE 80i, Japan)을 이용해 관찰하였다.

관찰부위는 저배율에서 무작위적으로 5개 부위를 선택하여, 고배율에서 관찰한 후에 영상기록 프로그램인 Image-Pro Plus® v5.0(MediaCybernetics, USA)를 이용하여 정지화면을 기록하여 분석하였다. 화면에 전체 세포가 다 보이는 상피세포만 세균 개수 계산에 포함시켰으며, 살아있는 세균과 죽은 세균의 수는 세어진 세균의 수를 상피세포의 수로 나누어 세포 하나당 세균 수로 계산하였다. 각 그룹에서의 살아있는 세균 수와 죽은 세균 수의 차이 및 비율의 차이가 유의성이 있는지 알아보기 위해 Mann-Whitney U-test를 적용하였다.

결과

현미경 관찰 시 저배율에서 상피세포가 비교적 균일하게 분산되어 있었으며, 대개 각 세포가 떨어져 있었으나 간혹 둘 이상 무리를 지어 관찰되기도 하였다. 고배율에서 관찰 시 상피세포에 부착되어 있는 세균들을 명확하게 관찰할 수 있었다. 세포당 세균의 수는 세균이 하나도 관찰되지 않는

경우부터 백여 개 이상 다수가 관찰되는 경우까지 다양하게 나타났으며, 관찰되는 세균의 대부분이 구균이었다(Fig. 1, 2).

전반적으로 치주질환에 이환된 부위에서 건강한 치은 부위보다 현저히 많은 수의 세균이 관찰되었다. 건강한 치은 부위에서 관찰된 총 세균 수의 평균이 1.5 ± 1.7 개인 반면, 치주질환에 이환된 부위에서 관찰된 총 세균 수의 평균은 58.6 ± 36.0 개였다. 또한 건강한 치은 부위에서는 9개의 샘플에서는 어떤 세균도 관찰되지 않았으며, 발견된 세균도 대부분이 녹색으로 발광하는 세균이었으며, 발견된 녹색으로 발광하는 세균의 수(1.4 ± 1.5)도 치주질환에 이환된 부위(48.2 ± 30.5)와 비교하여 매우 작은 수치였다($p < 0.05$). 치주질환에 이환된 부위에서는 거의 모든 상피에서 녹색으로 발광하는 세균(48.2 ± 30.5)과 적색으로 발광하는 세균(10.4 ± 9.2)이 함께 관찰되어 건강한 치은부위에서 발견된 세균수와 비교하여 통계학적으로 유의성 있게 높은 수치를 보였다. 정상 치은 부위와 치주질환에 이환된 부위에서의 적색으로 발광하는 세균의 비율은 각각 $2.0 \pm 5.8\%$, $17.5 \pm 11.2\%$ 였다(Table 1).

Table 1. Number of bacteria associated with gingival sulcular epithelial cell in the healthy and the diseased sites (Mean \pm SD)

	Healthy sites (N=25)	Diseased sites (N=25)
Red bacteria	0.1 ± 0.3	$10.4 \pm 9.2^*$
Green bacteria	1.4 ± 1.5	$48.2 \pm 30.5^*$
Total bacteria	1.5 ± 1.7	$58.6 \pm 36.0^*$
Ratio (red/total, %)	2.0 ± 5.8	$17.5 \pm 11.2^*$

*: statistically significant from healthy sites ($p < 0.05$)

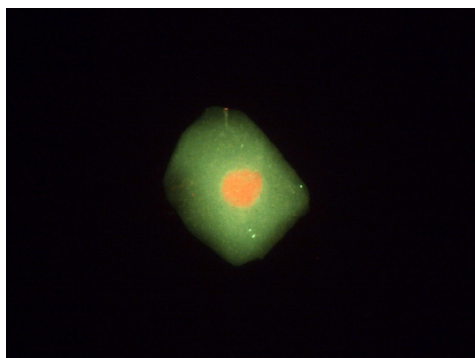


Figure 1. Bacteria associated with sulcular epithelial cell in the healthy site (original magnification $\times 400$).

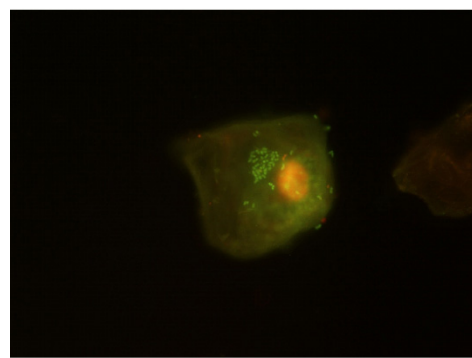


Figure 2. Bacteria associated with sulcular epithelial cell in the diseased site (original magnification $\times 400$).

고찰 및 결론

타액 내의 당단백은 치아와 여타 표면에 침전되며, 여기에 구강 내 세균들이 부착하여 biofilm이 형성된다. 부착 후 얼마 지나지 않아 세균들은 급속 성장기를 거치게 되고 표현형이 변하게 된다. 주된 변화는 polysaccharide ex-polymer의 형성인데, 이는 biofilm이 치태를 형성할 수 있게 해주며, 세균이 백혈구에 의해 포식되는 것을 막아주고 항생제에 대한 저항력을 크게 증가시켜 준다. 시간이 지남에 따라 치태는 치은열구 내로 성장하여 치은연하 치태를 형성한다. 열구 내의 몇몇 세균들은 염증조직으로부터의 serum과 삼출물 내에서 번성하게 되며, 그람 음성 혐기성 세균들이 다수를 이루게 된다.

일부 세균들은 상피세포에 부착할 수 있다. 일례로 *Streptococcus sanguis*는 상피에 부착할 수 있게 해주는 다중의 adhesin을 가지고 있으며³⁾, *Streptococci*는 fibronectin, fibrinogen, laminin, collagen, actin, immunoglobulin 등에 부착할 수 있다⁴⁾. *Streptococci* 외에도 일부 치주질환 유발 세균들도 상피에 부착할 수 있다. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*와 *Porphyromonas gingivalis*는 상피에 쉽게 부착할 수 있으며⁵⁾, 만성 치주염 및 치주부착이 상실된 부위에서 이러한 세균들을 발견할 수 있다. 그러나, Moore와 Moore의 보고에 따르면 이들은 치은연하치태의 깊은 부위에서 채취해 배양할 수 있는 세균의 1%도 되지 않는 소수에 불과한 것으로 알려져 있다⁶⁾.

Dzink 등에 의하면 *P. gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Peptostreptococcus micros* 등의 세균은 치은연하 치태보다 5배에서 20배 가량 더 많은 수가 상피세포에 서식하고 있다고 하였다²⁾. Dibart 등은 DNA혼성화(DNA hybridization)를 이용해 건강한 치은열구의 상피세포로부터 *Streptococcus oralis* 등의 세균을 분리해내고, 치주질환에 이환된 상피세포로부터는 *Bacteroides forsythus*, *P. intermedia*, *Capnocytophaga ochracea*, *Campylobacter rectus* 등을 분리해내어 이를 뒷받침하였다⁷⁾.

상피에 형성되는 biofilm은 종종 단층이며, 따라서 중층 편평상피의 정상적인 교체와 탈락에 의해 상피에 biofilm이 형성될 위험이 감소된다고 생각할 수 있다. 그러나, *A. actinomycetemcomitans*나 *P. gingivalis*와 같은 몇몇 세균은 일단 구강상피에 부착하면 fusion과 endocytosis에 의해

내부로 들어갈 수 있다^{8,9)}. 이렇게 함으로써 그들은 면역계, 항생제로부터 보호받으면서 영양분이 풍부한 환경을 갖게 된다. 또한 상피부착은 streptococcal sore throat, whooping cough, diphtheria, gonorrhea, shigellosis 등의 질환을 발병하게 하는 주요인이기도 하다¹⁰⁾.

치주염에서 상피세포 궤양이 나타나기도 하며, 이로 인해 *P. gingivalis* 등의 세균이 기저막에 있는 4형 교원질에 결합할 수 있게 되어 치은 결합조직 내로 쉽게 함입하게 된다. 만성염증치은에서는 열구상피의 상피간극이 증가되고, 호중구는 temporary channel을 남기면서 상피 사이를 지나 이주한다¹¹⁾. 세균이 상피세포 표면에 부착하면 상피세포가 interleukin-6(IL-6)을 분비하며, 세균이 endocytosis에 의해 함입되는 경우 훨씬 강하게 분비한다. IL-6는 호중구, 대식세포, 임파구, 형질세포 등의 면역세포의 유입을 유도하며, 이는 치아에 대한 치주조직의 부착을 파괴할 수 있는 화농성 염증상태를 야기하게 된다¹²⁾.

본 연구에서는 상피부착세균과 비부착성 세균을 분리하기 위한 방법으로 Percoll density gradient를 이용하였다. 채취한 상피세포 및 세균을 50% Percoll 용액에 넣고 18500 Xg에서 10분간 원심분리하면 상층부에는 얇은 띠가 형성되며 하방에도 띠가 형성된다. Childs와 Gibbons에 의하면 상층부의 얇은 띠가 상피세포 및 부착성 세균이며, 하방의 띠는 비부착성 세균이라고 한다. Childs와 Gibbons은 Percoll density gradient가 1,000개 이하의 적은 수의 상피세포에서도 상피세포와 비부착성 세균을 분리할 수 있는 신뢰할 만한 결과를 보이는 방법이라고 보고하였다¹³⁾.

상피에 부착 또는 침입한 세균 수를 측정하기 위한 여러 가지 방법들이 추천되고 있다. 기존에 가장 많이 사용되던 방법은 radioactive labeling 또는 culture viability 등의 간접적인 방법이었다. Radioactive labeling은 세균의 auto-aggregation 때문에 과대평가되는 경향이 있는 단점을 가진 반면, culture viability는 작은 차이가 간과되는 단점을 지닌다. Papaioannou 등에 의하면 배양하여 집락을 형성하는 세균의 수를 측정하는 방법과 형광 염색하여 현미경으로 관찰하여 세균 수를 측정하는 방법 간에 유의성 있는 차이가 없다고 하였다¹⁴⁾. 이를 토대로 LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit를 이용하여 실험을 진행하였다. LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit는 한번의 염색으로 살아있는 세균과 죽은 세균을 구분하여 관찰할 수 있게 해주는 장점을 가지고 있다.

Vaahntoniemi 등은 임상적으로 건강한 치은을 가진 사람들과 치은염이 있는 사람들의 구강치은상피와 치은열구상피, 순측 점막을 채취하여 형광 염색하여 상피세포에 부착한 세균의 수를 측정하였다. 그 결과 치은염이 있는 경우에서 그렇지 않은 경우에 비해 상피세포에 부착한 세균의 수가 유의성 있게 높게 관찰되었다고 보고하였다¹⁵⁾. 본 연구는 Vaahntoniemi 등과는 달리 치은열구 상피만으로 실험하였으며, 질환군을 치주염으로 정의하였다는 점에서는 차이가 있지만, 건강한 치은 부위에서는 평균 1.53 ± 1.7 개, 치주질환에 이환된 부위에서는 평균 58.6 ± 36.0 개의 세균이 관찰되어 Vaahntoniemi 등의 연구에서와 같이 건강한 치은부위보다 치주질환에 이환된 부위에서 통계학적으로 유의성 있게 많은 수의 상피부착 세균이 관찰되었다.

본 연구에서는 염색 방법으로 immunolabeling이나 Giemsa stain이 아닌 LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit를 이용하였으므로, 전체적인 상피부착 세균의 수 비교 외에도 부착 세균 중 살아있는 것과 죽은 것의 수 또한 비교할 수 있었다. 그 결과 건강한 치은 부위에서는 소수의 녹색으로 발광하는 세균(1.4 ± 1.5)만 관찰될 뿐 적색으로 발광하는 세균(0.1 ± 0.3)이 거의 관찰되지 않았으나, 치주질환에 이환된 부위에서는 거의 모든 상피에서 상당수의 녹색으로 발광하는 세균(48.2 ± 30.5)과 적색으로 발광하는 세균(10.4 ± 9.2)이 함께 관찰되었다. 상피에 부착한 전체 세균 중 죽은 세균의 비율이 건강한 치은부위에서는 $2.0 \pm 5.8\%$ 인 반면 치주질환에 이환된 부위에서는 $17.5 \pm 11.2\%$ 로, 치주질환에 이환된 부위에서의 죽은 세균 비율이 건강한 치은부위에서보다 통계학적으로 유의성 있게 높게 관찰되었다. 이러한 결과는 치주질환에 이환된 숙주가 침입한 세균을 제거하기 위해 작동시킨 면역 체계의 작용으로 여겨진다.

물론 LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit가 최근에 죽어서 아직 세포막이 손상되지 않은 세균을 염색하지 못하였을 가능성이 있으며, vigorous pipetting이나 원심분리 등 준비 도중에 세균이 죽을 가능성도 있으므로 약간의 오차가 발생할 수도 있다. 이는 상대적으로 높은 표준편차를 보이는 실험값들과 어느 정도 연관성이 있을 것으로 생각된다.

본 연구의 결과에 따르면, 치주질환에 이환된 부위의 치은열구 상피세포에서 건강한 부위의 치은열구 상피세포에서보다 통계학적으로 유의성 있게 많은 수의 세균이 관찰되며,

죽은 세균 역시 치주질환에 이환된 부위에서 통계학적으로 높은 수 및 비율로 관찰된다. 건강한 치은부위와 치주질환에 이환된 부위에서 죽은 세균 비율의 차이가 왜 나타나는지, 이 차이가 치주질환 진행에 영향을 미치는 인자인지 치주질환의 결과인지, 영향을 미치는 인자라면 치주질환의 진행 과정에 어떤 영향을 미치는지에 대해서는 명확하게 밝혀진 바가 없으며, 차후 이에 대한 연구가 필요하리라 생각된다.

참고문헌

1. Michalowicz BS, Diehl SR, Gunsolley JC et al. Evidence of a substantial genetic basis for risk of adult periodontitis. *J Periodontol* 2000;71:1699-1707.
2. Dzink JL, Gibbons RJ, Childs WC, 3rd, Socransky SS. The predominant cultivable microbiota of crevicular epithelial cells. *Oral Microbiol Immunol* 1989;4:1-5.
3. Hasty DL, Ofek I, Courtney HS, Doyle RJ. Multiple adhesins of streptococci. *Infect Immun* 1992;60:2147-2152.
4. Jenkinson HF. Cell surface protein receptors in oral streptococci. *FEMS Microbiol Lett* 1994;121:133-140.
5. Meyer DH, Fives-Taylor PM. Adhesion of oral bacteria to soft tissue. *Methods Enzymol* 1995;253:373-385.
6. Moore WE, Moore LV. The bacteria of periodontal diseases. *Periodontol* 2000 1994;5:66-77.
7. 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.
8. Lamont RJ, Chan A, Belton CM et al. Porphyromonas gingivalis invasion of gingival epithelial cells. *Infect Immun* 1995;63:3878-3885.
9. Meyer DH, Lippmann JE, Fives-Taylor PM. Invasion of epithelial cells by Actinobacillus actinomycetemcomitans: a dynamic, multistep process. *Infect Immun* 1996;64:2988-2997.
10. Beachey EH. Bacterial adherence: adhesin-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surface. *J Infect Dis* 1981;143:325-345.
11. Saglie R, Newman MG, Carranza FA, Jr., Pattison GL. Bacterial invasion of gingiva in advanced periodontitis in humans. *J Periodontol* 1982;53:217-222.
12. Hedges SR, Agace WW, Svanborg C. Epithelial cytokine responses and mucosal cytokine networks. *Trends Microbiol*

- 1995;3:266-270.
13. Childs WC, 3rd, Gibbons RJ. Use of Percoll density gradients for studying the attachment of bacteria to oral epithelial cells. J Dent Res 1988;67:826-830.
14. Papaioannou W, van Steenberghe D, Cassiman JJ, Van Eldere J, Quirynen M. Comparison of fluorescence microscopy and culture assays to quantitate adhesion of *Porphyromonas gingivalis* to mono- and multi-layered pocket epithelium cultures. J Periodontol 1999;70:618-625.
15. Vaahtoniemi LH, Raisanen S, Stenfors LE. Attachment of bacteria to oral epithelial cells in vivo: a possible correlation to gingival health status. J Periodontal Res 1993;28:308-311.