Treponema Denticola와 Treponema Lecithinolyticum이 치주인대세포에 미치는 영향

정정학[1] · 최봉규[2] · 문익상[1] · 조규성[1] · 채중규[1] · 김종관[1]

[1]연세대학교 치과대학 치주과학교실, 치주조직재생연구소
[2]연세대학교 치과대학 구강생물학교실

I. 서론

치아상실의 중요한 원인중 하나인 치주질환은 그 발생과 진행에 있어 구강 내 수종의 치주병원균이 주된 작용을 하는 것으로 알려졌다[33,38,39]. 1800년대 후반부터 이러한 구강내 세균이 치주질환에 작용하는 병원균으로 생각되어졌으며[53], 구강내 세균의 종류 및 그 병원성을 밝히기 위한 노력은 계속되어 왔는데, 각기 다른 개인들의 치주낭에서는 모두 300가지 이상의 세균종을 배양할 수 있었고, 한 부위에서도 30~100여종의 세균이 배양될 수 있게 되었다[10]. 이러한 병원성 세균이 치주질환의 일차유발인자로 생각되었으며[7,8,15,16,50-52], 병원성 세균의 존재여부는 치주질환의 활성도와 관련하여 진단용 척도로 사용되었고[17], 기계적 치태조절 및 항균제 등을 이용한 화학적 치태조절을 통해 전체 세균의 수를 줄임으로써 치주질환의 진행을 억제시키고[20,27,28,29,58], 그 치료 효과를 검사하는데 이용되기도 한다[42]. 다양한 형태의 치주질환과 특정세균의 관계가 연구되어 왔는데, 유년성 치주염에는 *Actinobacillus actinomycetemcomitans*와 *Capnocytophaga* species가 깊은 관계가 있고, 급속 진행형 치주염(rapidly progressive periodontitis)에는 *Porphyromonas gingivalis, Fusobacterium nucleatum,* spirochetes가 관련이 있고 만성 성인형 치주염에는 *Prevotella intermedia, Pleomorphic bacteroides, Eikenella corrodens, Actinomyces* species, spriochetes가 관련이 있음이 연구되어졌다[10].

Spirochetes는 유병율이 높은 만성 성인형 치주염 중에서도 심하게 진행된 치주병소와 급성 괴사성 궤양성 치주병소의 생검조직에서 많은 수가 존재하는 것으로 밝혀졌다[22,25]. 또한 13세에서 19세 사이의 연령층에서 조기 발현되는 치주염(early onset periodontitis)에서도 *Porphyromonas gingivalis*와 함께 *Treponema denticola*가 유의성 있게 높은 퍼센트를 차지하고 있음이 보고되었다[1].

Riviere 등은 치주적으로 건강한 부위가 치주염으로 이행될 때 spirochetes와의 연관성에 대한 연구에서, *Treponema denticola*와 아직까지 확실치 않은 spirochetes 등이 염증의 감수성 증가와 관계있음을 보고하였다[43]. Spirochetes의 역할을 밝히는데 가장 어려운 점은 개개의 종을 구분하기가 어렵다는 것이다. 적어도 15가지의 치은연하 spirochetes종이 기술되었으나[10], 치태를 이용한 대부분의 연구에서는 하나의 그룹이나 세포크기(small, medium, large)에 기초한 그룹으로 조합하여 시행된 것이다. 개개 spirochetes의 병원성을 평가해야만 하는 필요성은 혈청 항체 반응의 연구에서 더욱 강조되었는데, 특정 spirochetes는 파괴적 치주질환을 가진 그룹에서 상승된 반응을 보였으나[19,31,56], 다른 종에서는 오히려 감소된 항체반응을 보였다. 이러한 결과는 검사한

환자군에서의 여러 spirochetes종이 숙주와의 상호작용과 관련하여 그 역할이 연구되어져야함을 보여준다. 개개 spirochetes의 병원성에 대한 정확한 평가를 위해 DNA 소식자나 면역학적 방법이 중요한 방법으로 주목되고 있으며 현재는 올리고뉴클레오타이드 소식자(oligonucleotide probe)나 특이항체를 이용하고 있다.

Loesche는 치주질환에서 spirochetes의 역할을 단백질 분해효소와 keratinolytic enzyme을 분비하고 임파구 생성을 억제시키며 섬유아세포 기능억제와 다형핵 백혈구 기능을 억제시키는데 있다고 보고하였다[6,30,44].

백인의 급속 진행형 치주염 환자를 대상으로한 역학 조사에서 아직 분리 배양되지 않은 균주의 분포가 더 많다는 사실이 밝혀졌으며[26], 현재까지 분리되어 보고된 구강내 spirochetes종은 *Treponema denticola, Treponema pectinovorum, Treponema socranskii, Treponema vincentii, Treponema maltophilum*[62], *Treponema medium*[59], *Treponema amylovorum*[48] 등이 있다. 특히, spirochetes중에 독성이 강한 *Treponema denticola*에 관한 연구가 많이 이루어져 왔는데, 앞에서 언급했듯이 건강한 부위보다는 치주병소에서, 치은연상보다는 치은연하에서 흔하게 발견되고, 치주 치료 후 급격히 감소되는 것을 알 수 있다.

본 연구는 *Treponema denticola*가 치주인대세포에 미치는 영향과 최근의 spirochetes종에 관한 역학조사에서 가장 높은 분포를 보였으며[36], 가장 최근에 분리, 배양된 *Treponema lecithinolyticum*이 치주인대세포에 미치는 영향에 관한 실험을 통해 다소의 지견을 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

II. 실험재료 및 연구방법

1. 실험재료

(1) 치주인대세포 배양

교정치료를 목적으로 발거된 건강치주조직을 함유한 제1소구치를 Hank's balanced salt solution (HBSS)으로 3회 세척하여 잔존하는 혈액을 제거한 다음 치근 중간 1/3부위에서 치주인대조직을 15번 blade로 채취하여 세절하였다. 직경 25mm의 배양접시에 20% fetal bovine serum(FBS), penicillin(100 unit/ml), streptomycin(100mg/ml), amphotericin-B(0.5mg/ml)가 포함된 α-minimal essential medium(α-MEM)을 넣고 37℃, 100% 습도, 5% CO_2에서 배양하였다. 치주인대세포가 조직세편으로부터 증식되어 단층밀생이 형성되면 75mm 세포배양 접시를 이용하여 7～10일 간격으로 계대배양하였고, 본 실험에서는 세포의 균일한 특성을 얻기 위해 5～7세대의 세포를 사용하였다.

(2) Treponema culture

Treponema denticola ATCC 33521과 *Treponema lecithinolyticum* ATCC 700332를 각각 OMIZ-Pat 배지에서 37℃, 혐기성 조건에서 3일간 배양한 후 5000 ×g 힘으로 10분간 원심분리하고 phosphate buffer solution(PBS)으로 세척한 뒤 균의 침전물을 모았다.

이를 분쇄기[1](Branson model 250 sonifer)로 분쇄하고 13,000rpm으로 10분간 원심 분리하여 세포잔사를 제거한 후 Protein Assay Kit(Pierce, USA)로 단백질을 정량하였다. 균의 분쇄액을 pore size가 0.22 ㎛인 membrane filter로 여과하여 치주인대세포를 처리하는데 사용하였다.

2. 연구방법

(1) MTT test(Microtiter assay which uses the tetrazolium test)

MTT test는 살아있는 세포에서의 세포증식이나 세포독성을 측정하는데 사용되는 방법으로, 대사적으로 활성이 있는 세포에 의해 tetrazolium salt가 환원되는 원리를 이용한 것이다. 살아있는 세포의 succinate dehydrogenase에 의해 tetrazolium salt가 환원되어 색이 있는 불용성 formazan salts로 된다. 이 불용성 염기를 용해하여 형성된 formazan의 양을 정량하여 세포증식이나 세포독성을 측정하는데 이용하

1. Fisher Scientific, USA

는 것이다. 본 실험에서는 치주인대세포를 96-well microtiter plates에 1×10^4개씩 각각 분주한 뒤, 10% FBS가 함유된 α-MEM에서 37℃로 24시간 배양하였다. 2% FBS가 함유된 α-MEM으로 교환한 뒤 여러 가지 농도의 세균분쇄액을 1일, 2일, 3일 동안 처리하여 세포증식에 대한 세균의 효과를 MTT test로 측정하였다. 즉, 세포배양액을 제거한 후에 100㎕의 MTT(3-[4,5- dimethylthiazol-2-yl-]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 시약을 넣은 후 4시간 동안 방치하였다. MTT 시약을 제거한 뒤, 50㎕ dimethyl sulfoxide(DMSO)를 첨가하여 세포안에 생성된 formazan 결정을 녹인 뒤 570nm Light filter를 사용하여 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) reader에서 흡광도를 읽었다. 또한, 열처리한 세균의 효과를 보기위해 세균분쇄액을 85℃에서 1시간 동안 방치한 후 앞에서와 같이 처리하였다.

(2) 위상차현미경(Phase-contrast microscopy)을 이용한 세포형태의 관찰

치주인대세포를 두 세균의 분쇄액으로 일정한 시간(1일, 2일)동안 각각 처리하여 변화된 세포형태를 400배율의 역위상차현미경으로 정상 치주인대세포(대조군)와 비교, 관찰하였다.

(3) LDH(Lactate dehydrogenase) test

세포의 생존도를 알아보는 실험으로, 세포가 용해될 때 원형질에 존재하는 효소가 세포배양액으로 유리되는 정도를 알아보기 위해 lactate dehydrogenase를 정량하였다.

2.5ml 시료시약에 0.1ml의 시료를 혼합하여 30초간 반응시킨 후 340nm에서 흡광도를 처음 읽은 후, 1분, 2분, 3분 마다 흡광도를 읽었다. 모든 시약은 25℃로

LDH 시약 A :

NADH	0.194mmol/l
phosphate buffer, pH7.5	0.54mmol/l

LDH 시약 B

pyruvate	16.2mmol/l

$$\text{pyruvate+NADH+H}^+ \underset{}{\overset{\text{LDH}}{\rightleftarrows}} \text{L-Lactate+NAD}^+$$

warming하여 사용하였고, 시료시약(Sigma)은 0.4ml LDH 시약 A와 10ml LDH 시약 B의 혼합액이다.

(4) Gelatin zymography

세포외 기질의 교원질은 이를 분해하는 효소인 collagenase와 gelatinase에 의해 분해될 수 있기 때문에 세균을 처리한 후 효소의 활성을 검사하기 위해 zymography를 시행하였다.

치주인대세포(1×10^4개)를 α-MEM(10% FBS 함유)을 사용하여 96-well microtiter plate에서 하루동안 배양한 후, 혈청이 없는 α-MEM으로 교환하고 하루동안 37℃에서 방치하여 serum이 없는 조건으로 만들었다. 세균의 분쇄액을 1일, 2일, 3일 동안 처리한 뒤, 상등액으로 분비된 matrix metalloproteinase-2 (MMP-2 혹은 gelatinase A)를 gelatin이 함유된 sodium dodesyl sulfate-polyacrylamide gel(SDS-PAGE)로 분석하였다. 즉, 치주인대 세포 상등액을 시료완충액(2.5% SDS, 3% sucrose, 0.005% bromophenol bluel)과 섞은 뒤 0.2% gelatin을 함유한 SDS-PAGE에서 전기영동하였다. Gel을 탈변성용액(2.5% Triton X-100과 50mM Tris-HCl, pH 7.5)으로 30분간 2회 세척하여 SDS를 제거한다. Gel을 37℃하에서 효소반응용액(0.15M NaCl, 10mM $CaCl_2$, 50mM Tris-HCl, pH 7.5)에서 18시간 반응시킨 후 염색액 Coomassie Blue R-250(0.05%, isoprophyl alcohol: glacial acetic acid: dH_20 =1:1:8)으로 염색하고 isoprophyl alcohol: glacial acetic acid: dH_20 (1:1:8)로 탈색하여 clear band로 나타나는 부분을 보았다. 세균을 처리하지 않은 정상 치주인대세포를 대조군으로 하여 병원성이 없는 *T. phagedenis*를 처리한 경우와 *T. denticola*와 *T. lecithinolyticum*을 처리한 경우를 비교하였다.

III. 연구결과

1. MTT test

(1) 일정한 반응시간에서 농도에 따른 세포증식억제 효과

2일째 *Treponema lecithinolyticum* cell soni-

cates(TLC)에서는 75㎍/well까지 별 차이가 없었으나 150㎍/well에서는 억제효과가 나타났고, *Treponema denticola* cell sonicates(TDC)에서는 9.4 ㎍/well의 낮은 농도에서도 세포증식 억제 효과가 나타났다. 3일째에서는 2일째와 비슷한 양상으로 나타났다(Figure 1).

(2) 일정한 농도에서 시간에 따른 세포증식억제효과

TLC의 경우 2일째 150㎍/well 농도에서 세포증식 억제 효과가 나타났고 300㎍/well에서는 1일째에도

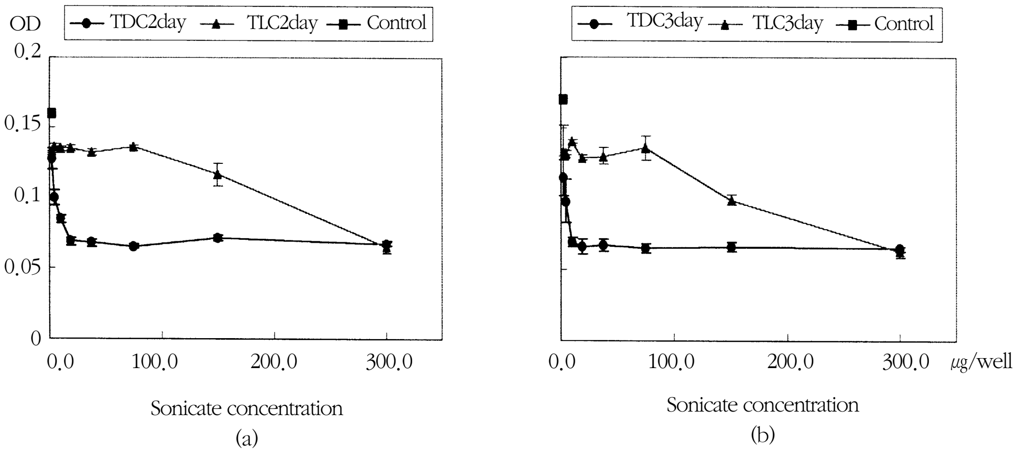

Figure 1. The effect of concentration on cell proliferation with time
(a) 2-day incubation (b) 3-day incubation

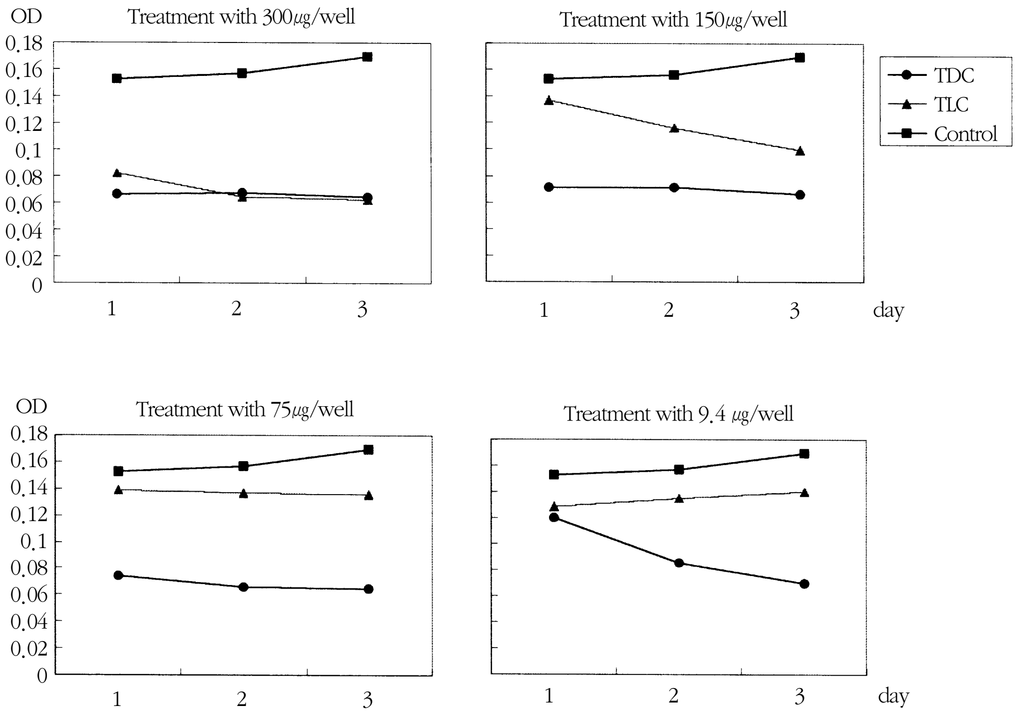

Figure 2. The effect of time on cell proliferation with concentration

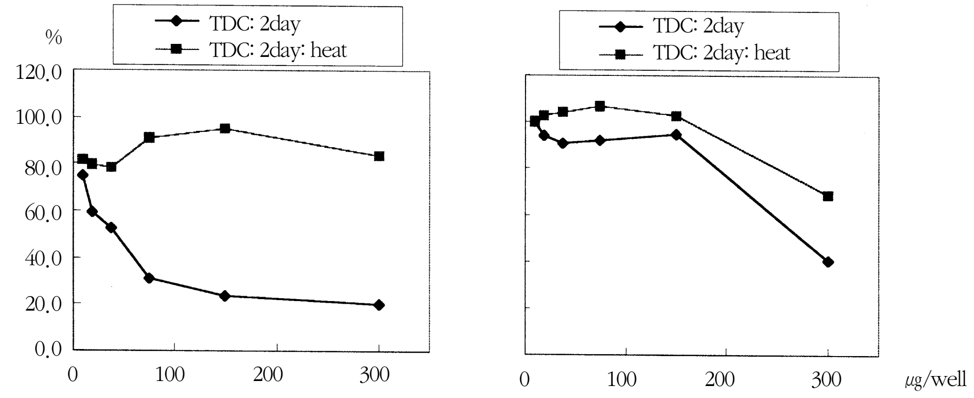

Figure 3. The effect of heat-treated TDC and TLC at 2-day incubation

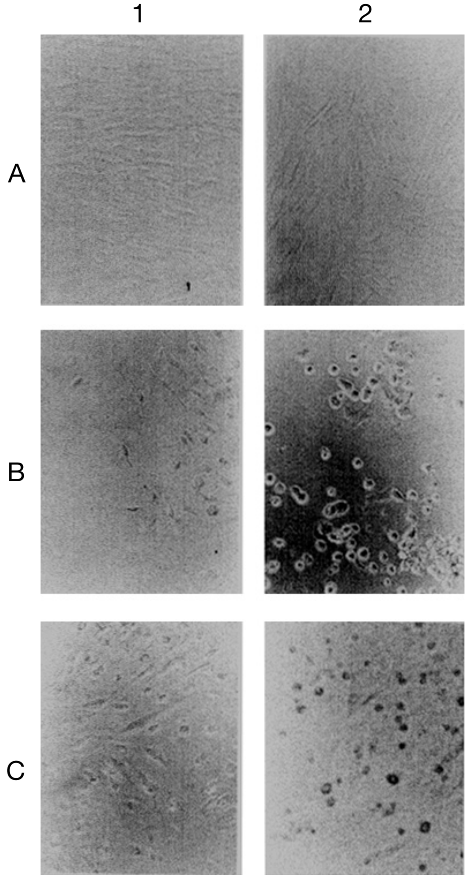

Figure 4 Cell morphology change which was observed by phase-contrast microscopy

1A: control(1day incubation), 2A: control(2day incubation), 1B: treatment with TDC(150㎍/well) for 1day, 2B: treatment with TDC(150㎍/well) for 2days, 1C: treatment with TLC(300㎍/well) for 1day, 2B: treatment with TLC(300㎍/well) for 2 days

나타났다. TDC의 경우는 9.4㎍/well의 낮은 농도에서 2일째에서부터 세포증식 억제 효과가 나타나기 시작했고 그 이상의 농도에서는 1일째부터 세포증식 억제 효과가 나타나기 시작했다(Figure 2).

(3) 열처리한 세균의 세포증식억제 효과

2일째 결과에서 TDC에서는 농도가 높아질수록 열처리 시킨 경우와 그렇지 않은 경우에 차이가 나타났으며, TLC에서는 큰 차이가 없었다(Figure 3).

2. 위상차현미경으로 관찰한 치주인대세포의 형태변화

1일째에는 대조군에 비해 TDC 및 TLC에서 세포형태가 손상되어 방추형이 소실되어 가고 있으며, TDC에서 상대적으로 더 뚜렷하였다. 세포증식도 억제된 것이 관찰되었고 세포끼리의 연결도 끊어져 분리되어가고 있었다. 2일째에서는 대조군에 비해 세포형태의 손상이 더 커져 방추형에서 구형의 모양으로 바뀌었다(Figure 4).

3. LDH test

치주인대세포가 용해될 때 유리되는 lactate dehydrogenase 활성도를 측정해보는 것으로 세균으로 처리하지 않은 대조군에 비해 큰 차이가 없는 것으로

Table 1. LDH Test

	300㎍/well		150㎍/well		75㎍/well	
	A	B	A	B	A	B
TDC	115.64	10.9	101.71	8.1	114.2	10.6
TLC	128.1	13.4	58.5	-0.6	66.88	1.1

A: LED activity B: Percentage with control

나타났다(Table 1).

4. Zymography를 통해서 본 교원질 분해에 미치는 영향

치주인대세포를 TLC와 TDC로 처리한 경우와 처리하지 않은 경우(C) 그리고 비병원성 *Treponema*인 *T. phagedenis*로 처리한 경우(TP)를 비교해 볼 때, TDC와 TLC로 처리한 군에서는 각 농도에서 모두 progelatinase A가 활성형으로 발현된 small clear band가 관찰되었다(Figure 5).

IV. 총괄 및 고찰

치주질환은 치은결합조직 및 치주인대, 백악질, 치조골의 점진적인 손상을 통해 치아를 상실하게끔 하는 중요한 치과질환이다. 이러한 치주질환을 유발하는데 있어 치태내 세균이 일차적인 원인인자로 여겨지며, 세균의 직접적인 독성인자와 숙주반응에 의해 치주조직의 손상이 일어나는 것으로 알려져 있다. 치태내 세균의 역학조사가 계속되어 왔으나 아직도 수많은 세균종이 제대로 평가되지 않고 있으며, 치주염 환자의 치은연하치태에서 많이 발견되는 구강 내 spirochetes균도 7종만이 배양을 통해 연구된 정도이다. 심한 치주질환과 치은연하 spirochetes의 분포에 관한 연구에서, Listgarten과 Helden은 평균 7.3mm의 치주낭을 가진 진행성 치주염 환자를 대상으로 조사한 결과 37.7%의 spirochetes와 50.4%의 운동성 세균을 관찰하였다[23]. Lindhe등은 8mm이상 치주낭을 가진 치주염 환자를 대상으로 조사한 결과 치은연하 세균의 57.2%가 spirochetes임을 발견하였으며[21], Listgarten과 Levin은 평균 3.9mm의 치주낭에서는 전체 치은연하세균 중 8% 정도가 spirochetes임을 보고하였다[24].

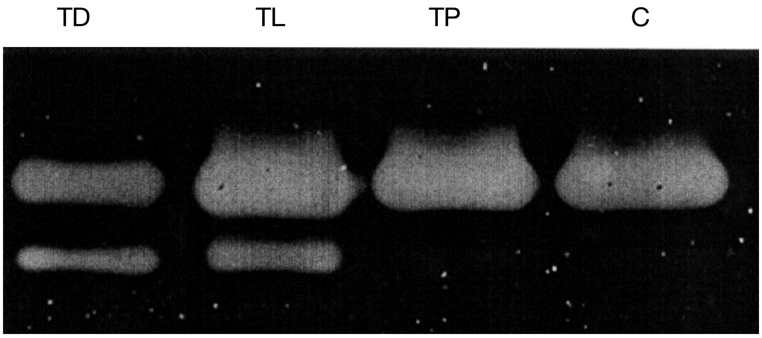

Figure 5. Gelatin zymography at 2-day treatment
TD: Treponema denticola
TL: Treponema lecithinolyticum
TP: Treponema phagedenis
C: No treatment with TLC, TDC

깊은 치주낭에서 얻은 구강 내 작은 크기의 spirochetes가 가진 10개 strain의 뚜렷한 특징은 독성이 강한 phospholipase A와 phospholipase C를 활성화 시키는 것이다. DNA/DNA hybridization과 16S rDNA sequence에 의해 이들 spirochetes는 두 개의 그룹으로 나뉘는데 *Treponema maltophilum*과 *Treponema lecithinolyticum*이다[62]. *Treponema lecithinolyticum* specific probe를 이용한 분자량 역학 분석(molecular epidemiologic analysis)에서도 치주염 환자의 깊은 치주병소와 관련이 있는 것으로 나타났다. *Treponema lecithinolyticum*은 혐기성이며 나선형 coil을 가진 운동성의 균종으로 약 5㎛ 길이와 0.15㎛의 폭을 가지며 두 개의 periplasmic flagella로 이루어져 있다. 효소활동을 보면 alkaline phosphatase, acid phosphatase, β-galactosidase, β-glucuronidase, N-acetyl-β-glucosaminidase, phospholipase A와 C가 많고, 반면에 C4 esterase, C8 esterase, naphthol phosphohydrolase와 α-fucosidase는 가끔 표현되며 catalase는 생산하지 않는다[62].

본 실험에서는 *Treponema denticola*(TDC)와 *Treponema lecithinolyticum*(TLC) 종이 치주인대세포에 미치는 영향을 관찰한바, TDC는 *Treponema*균중 배양이 일찍 시작된 종으로 인간의 치은섬유아세포에 미치는 영향에 관해 연구가 진행되었으나 치주인대세포에 관한 세포독성실험등은 부족한 상태이며, TLC는 최근에 분리배양이 성공된 종으로서 치주인대세포에 미치는 영향에 관한 실험이 별로없는 상태이다. 두 세균이 치주인대세포에 미치는 영향을 알아보기 위해 시행한 MTT test에서는 TLC의 경우 2일째 150㎍/well 정도의 높은 농도에서 세포증식억제 효과를 보였으며, TDC에서는 연속 농도 희석(serial dilution method)을 통해 9.4㎍/well과 같은 낮은 농도에서도 억제 효과가 나타났었다. 사람의 치근단 부위 치주인대에서 얻은 치근단 섬유아세포에 혐기성 Gram(-) 세균인 *Porphyromonas endodontalis, Porphyromonas gingivalis, Prevotella intermedia, Fusobacterium nucleatum*의 sonicated bacterial extracts(SBEs)의 영향을 알아보는 실험에서는 *Porphyromonas gingivalis*와 *Fusobacterium*의 세포독성이 강했는데, 일찍이 *Porphyromonas gingivalis*는 염증개시 반응과 골흡수를 포함하는 강력한 독성효과를 가진 혐기성 세균으로 잘 알려져 있고, 단백질 및 교원질 용해를 일으키며, 다양한 세포들이 cytokine을 분비하게끔 하고 활성기로 전환시키는 능력을 가지고 있다. 또한 Gram(-) 세균은 세포벽에 있는 lipopolysaccharide (LPS)가 염증의 개시와 골파괴에 관련있는 다양한 생물학적 효과를 가지고 있음이 잘 알려져 있는데, 모든 SBEs 농도에서 치근단 섬유아세포의 증식이 억제되는 농도 비의존성(non-dose dependent manner) 양상을 보였다[32].

본 실험에서는 TDC와 TLC를 열처리하여 protease의 영향을 제한한 상태에서 세포증식 효과를 알아보았는데 TDC에서 뚜렷하게 반응을 보였다.

몇몇 학자[34,40,56,60]들은 SBEs로 처리된 섬유아세포의 형태변화에 대해 관찰하였는데, 그중 Steenbergen등은 *Porphyromonas gingivalis*에서 얻은 SBEs를 처리했을 때 섬유아세포의 모양이 비정상적으로 둥근 모양이 되었음을 보고하였고[60], Stevens와 Hammond[56]는 *Fusobacterium nucleatum*의 SBEs에서도 치은섬유아세포의 모양이 비정상적인 것을 관찰하였으며, Pissiotis와 Spanberg[40]는 치수세포에 미치는 *Porphyromonas gingivalis*의 SBEs 효과를 알아보는 과정에서 세포모양이 대조군과 다르게 나타났음을 보고하였다. 반면에 *Porphyromonas intermedia*의 SBEs에서는 세포모양의 변화가 관찰되지 않았다. 본 실험에서는 TDC와 TLC의 SBEs로 처리된 경우 대조군에 비해 실험군 모두가 시간이 경과하면서 세포형태가 비정상적인 둥근 형태로 바뀌는 것이 관찰되었고, 세포끼리의 연결이 끊어지면서 세포증식 또한 억제되는 것이 위상차현미경을 통해 관찰되었다.

Lactate dehydrogenase test에서는 TLC, TDC 모두 대조군에 비해 큰 차이가 없는 것으로 보아 세포 용해가 아닌 세포 증식 억제를 통해 영향을 미침을 알 수 있었다.

Zymography를 이용한 TDC 및 TLC가 교원질 분해에 미치는 영향을 알아보는 실험은 섬유아세포나

결합조직세포에서 합성되는 matrix metalloproteinase(MMP)에 미치는 영향을 살펴보는 것이다.

MMP는 matirixin이나 collagenase로도 간단히 언급되기도 하며, 대개 결합조직세포, 혈관상피세포, 단핵세포, 대식세포에 의해 합성되고, 금속과 결합하는 단백분해효소이다. MMP의 구성원을 보면 interstitial collagenase(MMP-1, -8, -13), gelatinase(MMP-2와 -9로 type IV collagenase라고도 한다), stromelysin(MMP-3, -10, -11) 그리고 membrane-bound group(MMP-14, -15, -16, -17)이 있으며 matrilysin(MMP-7)과 metalloelastase(MMP-12)는 정확하진 않다[13]. collagenase는 collagen을 $\frac{3}{4}$과 $\frac{1}{4}$길이의 두 조각으로 분할시켜 단백질 용해에 감수성을 띄게 하는데 이런 endopeptidase는 interstitial collagen의 재형성(remodeling)에 핵심적인 역할을 제공한다[9].

Type IV collagenase인 gelatinase는 두 개가 있음이 밝혀졌는데, 72kDa의 gelatinase A(MMP-2)는 주로 mesenchymal cell에서 유래되고 95kDa의 gelatinase B(MMP-9)는 다형핵 백혈구, 대식세포와 관계있다. 이들 효소들은 변성된 교원질의 세포밖 분해에 관계있고 Type IV 교원질의 기저막(basement membrane) 분해에도 관여한다. Plasmin은 대부분의 prometalloproteinase를 활성화시킬 수 있지만 gelatinase A의 활성기전은 아직도 연구 중에 있다. 섬유아세포의 세포막과 함께 progelatinase A를 incubation시키면 활성화를 얻을 수 있다고 하였다[13].

조직이나 세포배양배지, 체액에서의 collagenase를 정량화하기 위해 사용되는 방법으로는 radiolabeled collagen의 이용, fluorometric oligopeptide substrates, ELISA등이 있다[2,3,18]. 그러나 이들 방법은 민감성(sensitivity)과 특이성(specificity)이 부족하고, ELISA는 효소의 활성형과 비활성형을 구분할 수가 없다. collagenase를 구분하는 기술은 처음으로 Birkedal-Hansen과 Taylor[4]에 의해 기술되었고, Heussen과 Dowle에 의해 Substrate-containing polyacrylamide gel 전기영동방법으로 72kDa과 95kDa Type IV collagenase를 구분하는 기술이 증명되었다[12].

인간의 치은 섬유아세포에서 발견된 collagenase에 미치는 interleukin 1의 영향을 평가하기 위해 collagen zymography를 사용한 실험에서, interleukin 1은 배양된 몇 가지 세포에서 발현되는 collagenase를 증가시켰으며 인간의 치은섬유아세포를 배지에 배양한 후에는 collagenase 분비가 2.7배나 증가되었음이 관찰되었다[9]. 이는 collagen zymography를 이용하여 collagenase를 구분하고 이를 정량화시킬 수 있음을 보여주는 것으로, 본 실험에서는 세균을 처리하지않은 치주인대세포와 비병원성균인 *Treponema phagedenis*를 처리한 경우 그리고 TLC, TDC를 각 농도로 처리시켰을 때의 영향을 zymography로 알아보았다. 결과는 TLC 및 TDC로 처리한 모든 농도에서 Type IV collagenase의 하나인 72kDa의 progelatinase A가 활성형으로 바뀌는 것을 알 수 있었다.

이번 실험을 통해 TLC와 TDC는 세포증식 억제효과를 통해 치주인대세포에 영향을 미치며, 교원질 분해 효소 Type IV의 하나인 progelatinase A를 활성형으로 발현시킴을 확인하였다. TLC와 TDC가 어떻게 서로 다른 기전을 가지고 세포증식억제 효과를 가지는가에 대해서는 앞으로 좀더 자세한 연구가 필요하리라 생각된다.

V. 결론

*Treponema denticola*와 *Treponema lecithinolyticum*이 치주인대세포에 미치는 영향을 알아보기 위하여 MTT test와 위상차현미경을 이용하여 세포형태의 변화를 관찰하였고, 세포독성을 알아보는 LDH test 그리고 gelatin zymography를 이용한 실험을 통해 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 일정한 반응시간에서 농도에 따른 세포증식 억제효과에서는 TLC의 경우 높은 농도(150㎍/well)에서부터 세포증식 억제효과가 나타났으며, TDC에서는 낮은 농도(9.4㎍/well)에서도 억제 효과가 나타났다.
2. 일정한 농도에서 시간에 따른 세포증식 억제

효과에서는 TLC의 경우 2일째 150㎍/well 농도에서부터 세포증식 억제효과가 나타났으며, TDC에서는 9.4㎍/well 농도에서도 2일째에 세포증식 억제효과가 나타났다.
3. 열처리한 세균의 세포증식 억제 효과에서는 TDC의 경우에서 열처리 시킨 경우와 그렇지 않은 경우에 차이가 나타났으나, TLC의 경우에는 차이가 없었다.
4. 위상차현미경으로 관찰한 치주인대세포의 형태 변화는 대조군에 비해 실험군에서 세포 형태의 손상으로 방추형이 소실되었고 세포증식이 억제되었으며, 세포끼리의 연결 또한 끊어져 분리되어 있었다.
5. 세포독성을 알아보기 위한 LDH test에서는 대조군, 실험군 모두 큰 차이가 없었다.
6. Zymography를 통한 교원질 분해에 미치는 영향에서는 TDC와 TLC에 의해 분자량 72kDa의 progelatinase A가 활성형으로 발현되었다.

이상의 결과를 보아 TLC와 TDC는 세포증식 억제 효과를 통해 치주인대세포에 영향을 미치며, 교원질 분해 효소 Type IV의 하나인 progelatinase A를 활성형으로 발현시킴을 확인하였다.

VI. 참고문헌

1. Albandar, J.M., Brown, I.J., Loe, H. : Putative periodontal pathogens in subgingival plaque of young adults with and without early-onset periodontitis, J. Periodontol., 68:973-981, 1997.
2. Bergmann, U., Michaelis, J., Oberhoff, R., Knauper, V., Beckmann, R., and Tschesche, J. : Clin. Chem. Clin. Biochim., 27:351-359, 1989.
3. Bigg, H.F., Clark, I.M., and Cawston, T.E. : Biochim. Biophys. Acta., 1208, 157-165, 1994.
4. Birkedal-Hansen, H., Taylor, R. E., : Biochem. Biophys. Res. Commun., 107:1173-1178, 1982.
5. Breckon, J.J.W., Hembry, R.M., Reynolds, J.J., Meikle, M.C. : Regional and temporal changes in the synthesis of matrix metalloproteinases and TIMP-1 during development of the rabbit mandibular condyle, J. Anat., 184:99-110, 1994.
6. Choi, B.K., Wyss, C., Gobel, U.B. : Phylogenetic analysis of pathogen related oral spirochetes, J. Clin. Microbiol., 34:1922- 1925, 1996.
7. Ellison, S.A. : Oral bacteria and periodontal disease, J. Dent. Res., 49:198, 1970.
8. Genco, R.J., Evans, R.T., and Ellison, S.A. : Review of dental research: Dental research in microbiology with emphasis on periodontal disease, J. Am. Dent. Assoc., 78:1016, 1969.
9. Gogly, B., Groult, N., Hornebeck, W., Godeau, G., and Pellat, B. : Collagen zymography as a sensitive and specific technique for the determination of subpicogram levels of interstitial collagenase, Anal. Biochem., 255:211-216, 1998.
10. Haffajee, A.D., Socransky, S.S. : Microbiol etiological agents of destructive periodontal disease, Periodontol. 2000., 5:78-111, 1994.
11. Hembry, R.M., Bagga, M.R., Reynolds, J.J., Hamblen, D.L. : Immunolocalisation studies on six matrix metalloproteinases and their inhibitors TIMP-1 and TIMP-2, in synovia from patients with osteo and rheumatoid arthritis, Ann. Rheum. Dis., 54:25-32, 1995.
12. Heussen, C., Dowle, E.B. : Anal. Biochem, 102:196-202,1980.
13. John, J.R., and Murray, C.M. : Mechanisms of connective tissue matrix destruction in periodontitis, Periodontol. 2000., 14:144-157, 1997.
14. Kapila, Y.L., Kapila, S., Johnson, P.W. :

Fibronection and fibronectin fragments modulate the expression of proteinases and proteinase inhibitors in human periodontal ligament cells, Matrix. Biol., 15:251-261, 1996.
15. Kelstrup, J., and Theilade, E. : Microbes and periodontal disease, J. Clin. Periodontol., 1:15, 1974.
16. Keyes, P. H. : Are periodontal pathoses caused by bacterial infections on cervicoradicular surfaces of teeth?, J. Dent. Res., 49:223, 1970.
17. Keyes, P.H., Rams, T.E. : A rationale for management of periodontal diseases : rapid identification of microbial 'therapeutic targets' with phase-contrast microscopy, J. Am. Dent. Assoc., 106:803-812, 1983.
18. Knight, C.G., Willenbrock, F., and Murphy, G. : FEBS Lett., 296, 263-266, 1992.
19. Lai, C.H., Listgarten, M.A., Evian, C.L., Doungherty, P. : Serum IgA and IgG antibodies to *Treponema vincentii* and T*reponema denticola* in adult periodontally healthy subjects, J. Clin. Periodontol., 13:752-757, 1986.
20. Lindhe, J., and Nyman, S. : The effect of plaque control and surgical pocket elimination on the establishment and maintenance of periodontal health. A longitudinal study of periodontal therapy in cases of advanced periodontitis, J. Clin. Periodontol., 2:67, 1975.
21. Lindhe, J., Liljenberg, B., and Listgarten, M. : Some micro- biological and histopathological features of periodontal disease in man, J. Periodontol., 51:264, 1980.
22. Listgarten, M.A. : Electron microscopic observations of the bacterial flora of acute necrotizing ulcerative gingivitis, J. Periodontol., 36:328-339, 1965.
23. Listgarten, M. A., and Hellden, L. : Relative distribution of bacteria at clinically helathy and periodontally diseased sites in humans, J. Clin. Periodontol., 5:115, 1978.
24. Listgarten, M.A., and Levin, S. : Positive correlation between the proportions of subgingival spirochetes and motile bacteria and susceptibility of human subjects to periodontal deterioration, J. Clin. Periodontol., 8:122, 1981.
25. Listgarten, M.A., Socransky, S.S. : Ultrastructural charac- teristics of a spirochete in the lesion of actute necrotizing ulcetative gingivostomatitis (Vincent's infection), Arch. Oral. Biol., 9: 95-96, 1964.
26. Locsche, W.L. : The identification of bacteria associated with periodontal disease and dental caries by enzymatic methods, Oral. Microbiol, Immunol., 1:65, 1986.
27. Loe, H., and Schiott, C,R. : The effect of mouth rinses and topical application of chlorhexidine on the development of dental plaque and gingivitis in man, J. Periodont. Res., 5:79, 1970.
28. Loe, H., Schiott, C.R., Glavind, L., and Karring, T. : Two years oral use of chlorhexidine in man. I. General design and clinical effects, J. Periodont. Res., 11:135, 1976.
29. Löe, H., Theilade, E., and Jensen, S.B. : Experimental gingi- vitis in man, J. Periodontol., 36:177, 1965.
30. Loesche, W.J. : The role of spirochetes in periodontal disease, Adv. Dent.Res., 2(2):275-283, 1988.
31. Mangan, D.F., Langhon, B.E., Bower, B., Lopatin, D.E. : In vitro lymphocyte blastogenic responses and titers of humoral antibodies from periodontitis patients to oral spirochete isolates, Infect. Immun., 37:445-451, 1982.
32. Masahiro, Y., Kazuhiko, N., Ichiro, I. : Cytotoxic effect of endodontic bacteria on

periapical fibroblasts, J. Endodon., 24:534-539, 1998.
33. Moore, W.E.C., Moore, L.V.H. : The bacteria of periodontal diseases, Periodontol. 2000., 5:66-77, 1994.
34. Morioka, M., Hinode, D., Nagata, A., Hayashi, H., lchimiya, S., Ueda, M., Kido, R., Nakamura, R.: Cytotoxicity of *Porohyromonas gingivalis* toward cultured human gingival fibroblast, Oral. Microbiol. Immunol., 8:203-207, 1993.
35. Mosmanr, T. : Rapid colorimetric assay for cellular growth and Survival application to proliferation and cytotoxicity assay, J. Immunol. Methods., 65:55-63, 1983.
36. Moter, A., Choi, B. K., Purucker, P., Riep, B and Gobel, U. B. : Molecular epidemiology of uncultured oral treponemes in patients with rapidly progressing periodontitis, 47th Conference of German Society for Hygiene and Microbiology, Wuerzburg, Germany, In Immunitaet und Infektien, supplement 1 : 150, 1995.
37. Nakane, A., Yoshida, T., Horiba, N., Nakamura, H. : Effects of lipopoly- saccharides in human dental pulp cells, J. Endodon., 21:128-130, 1995.
38. Newman, H.N. : Update on plaque and periodontal disease, J. Clin. Periodontol., 7:251,1980.
39. Newman, M.G., Socransky, S. S., Savit, E.D., Propas, D.A., and Crawford, A. : Studies of the microbiology of periodontosis, J. Periodontol., 47:373, 1976.
40. Pissiotis, E., Spanberg, L.S.W. : Toxicity of sonicated extracts of *Bacteroides gingivalis* on human pulpal cells and L929 cells *in virto*, J. Endodon., 17:553-560, 1991.
41. Pourtaghi, N., Radvar, M., Mooney, J., Kinane, D.F. : The effect of subgingival antimicrobial therapy on the levels of stromelysin and tissue inhitor of metalloproteinases in gingival crevicular fluid, J. Periodontal., 67:866-870, 1996.
42. Rams, T.E., Keyes, P.H. : A rationale for the management of periodontal diseases: effects of tetracycline on subgingival bacteria, J. Am. Dent. Assoc., 107:37-41, 1983.
43. Riviere, G.R., DeRouen, T.A. : Association of oral spirochetes from periodontally helathy sites with development of gingvitis, J. Periodontol., 69:496-501, 1998.
44. Riviere, G.R., Weisz, K.S., Adams,D.F., Thomas, D.D. : Pathogen-related oral spirochetes from dental plaque are invasive, Infection and Immunity, 59:3377-3380, 1991.
45. Rosling, B., Nyman, S., and Lindhe, J. : The effect of systematic plaque control on bone regeneration in infrabony pockets, J. Clin. Periodontol., 3:38, 1976.
46. Simonson, L.G., Goodman, C.H., Bial, J.J., Morton, H.E. : Quantitative relationship of *Treponema denticola* to severity of periodontal disease, Infect. Immun., 56:726-728, 1988.
47. Simonson, L.G., McMahon, L.T., Childers, D.W., Morton, H.E. : Bacterial synergy of *Treponema denticola* population, Oral. Microbiol. Immunol., 7: 111-112, 1992.
48. Slots, J. : The prominent cultivable organisms in juvenile periodontitis, Scan. J. Dent. Res., 84:1-10, 1976.
49. Slots, J., Ashimoto, A., Flynn, M.J., Li, G., Chen, C. : Delection of putative periodontal pathogens in subgingival specimens by 16S ribosomal DNA amplification with the polymerase chain reaction, Clin. Infect. Dis., 20(supp12) :304-307, 1995.
50. Socransky, S.S. : Microbiology of periodontal

disease present status and future considerations, J. Periodontol., 48:497-504, 1997.

51. Socransky, S.S. : Relationship of bacteria to the etiology of periodontal disease, J. Dent. Res., 49:203, 1970.

52. Socransky, S.S., and Crawford, A.C. : Recent advances in the micro- biology of periodontal disease. Current Therapy, 5th ed. in press. St. Louis, C.V., Mosby., 1977.

53. Socransky, S.S., Haffajee, A.D. : Evidence of bacterial etiology: a historical perspective. In : Socransky SS, Haffajee AD, ed. Microbiology and immunology of periodontal diseases, Periodontol. 2000., 5:7-25, 1994.

54. Springman, E.B., Angleton, E.L., Birkedal-Hansen, H., and Van., Whrt, H.E. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 87:364-368, 1990.

55. Steinberg, A.I., Cershoff, S.N. : Quantitative differences in spirochetal antibody observed in periodontal disease, J. Periodontol., 39:286-289, 1968.

56. Stevens, R.H., Hammond, B.F. : The comparative cytotoxicity of periodontal bacteria, J. Periodontol., 59:741-749, 1988.

57. Tew, J.G., Smibert, R.M., Scott, E.A., Burmeister, J.A., Ranney, R.R. : Serum antibodies in young adult humans reactive with periodontitis associated treponemes, J. Periodont. Res., 20:580-590, 1985.

58. Theilade, E., Wright, W.H., Jensen, S.B., and Löe, H. : Expe- rimental gingivits in man. ll. A longitudinal, clinical and bacteriological investigation, J. Periodont. Res., 1:1, 1966.

59. Umemoto, T., Nakazawa, F., Hoshino, E., Okada, K., Fukunaga, M., Namikawa, I. : *Treponema medium* sp.nov., isolated from human subgingival dental plague, Int. J. Syst. Bacteriol., 43:67-72, 1997.

60. Van Steenbergen, T.J.M., Den Ouden, M.D., Touw, J.J.A., De Graaf, J. : Cytotoxic activity of *Bacteroides gingivalis* and *Bacteroides asaccharolyticus*, J. Med. Microbiol., 5:253-258, 1982.

61. Ward, R.V., Atkinson, S.J., Slocombe, P.M., Docherty, A.J.P., Reynolds, J.J., Murphy, G. : Tissue inhibitor of metallo- proteinases-2 inhibitis the activation of 72 kDa progelatinase by fibroblast membranes, Biochim. Biophys. Acta., 1079 :242-246, 1991.

62. Wyss, C., Choi, B.K., Schupbach, P., Moter,A., Guggenheim, B., Gobel, U.B. : *Treponema lecithinolyticum* sp. nov., a small saccharolytic spirochetes with phospholipase A and C activities associated with periodontal diseases, accepted in Int. J. Syst. Bacteriol., 1999.

63. Wyss, C., Choi, B.K., Schupbach, P., Guggenheim, B., Gobel, U.B. : *Treponema maltophilum* sp. nov., a small oral spirochete isolated from human periodontal lesions, Int. J. Syst. Bacteriol., 46:745-752, 1996.

국문요약

Treponema Denticola와 Treponema Lecithinolyticum이 치주인대세포에 미치는 영향

본 연구에서는 치주질환과 관련이 깊은 것으로 알려진 구강내 spirochetes 균중 *Treponema denticola*(TDC)와 가장 최근에 분리 배양된 *Treponema lecithinolyticum*(TLC)이 치주인대세포에 미치는 영향을 알아보기 위하여 두 spirochtes 균주를 배양한후 MTT test를 이용한 치주인대 세포의 증식 억제효과를 알아보았다. 또한, 위상차 현미경을 이용한 세포형태의 변화를 관찰하였으며, LDH(lactate dehydrogenase) test를 이용한 세포독성 실험과, gelatin zymography를 시행하여 교원질 분해효소의 하나인 gelatinase의 활성화 여부를 측정한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 일정한 반응시간에서 농도에 따른 세포증식 억제효과에서는 TLC의 경우 높은 농도(150㎍/well)에서부터 세포증식 억제효과가 나타났으며, TDC에서는 낮은 농도(9.4㎍/well)에서도 억제 효과가 나타났다.
2. 일정한 농도에서 시간에 따른 세포증식 억제효과에서는 TLC의 경우 2일째 150㎍/well 농도에서부터 세포증식 억제효과가 나타났으며, TDC에서는 9.4㎍/well 농도에서도 2일째에 세포증식 억제효과가 나타났다.
3. 열처리한 세균의 세포증식 억제 효과에서는 TDC의 경우에서 열처리 시킨 경우와 그렇지 않은 경우에 차이가 나타났으나, TLC의 경우에는 차이가 없었다.
4. 위상차현미경으로 관찰한 치주인대세포의 형태변화는 대조군에 비해 실험군에서 세포 형태의 손상으로 방추형이 소실되었고 세포증식이 억제되었으며, 세포끼리의 연결 또한 끊어져 분리되어 있었다.
5. 세포독성을 알아보기 위한 LDH test에서는 대조군, 실험군 모두 큰 차이가 없었다.
6. Zymography를 통한 교원질 분해에 미치는 영향에서는 TDC와 TLC에 의해 분자량 72kDa의 progelatinase A가 활성형으로 발현되었다.

이상의 결과를 보아 TLC와 TDC는 세포증식 억제효과를 통해 치주인대세포에 영향을 미치며, 교원질 분해효소 Type IV의 하나인 progelatinase A를 활성형으로 발현시킴을 확인하였다.

핵심되는 말 : *Treponema denticola, Treponema lecithinolyticum,* MTT test, 세포증식 억제효과, gelatinase A

-Abstract-

The Effect of Treponema Denticola and Treponema Lecithinolyticum on Periodontal Ligament Cells

Jung-Hag Jung[1], Bong-Kyu Choi[2], Ik-Sang Moon[1], Kyoo-Sung Cho[1], Jung-Kiu Chai[1], Chong-Kwan Kim[1]
[1]Department of Periodontology, Research Institute for Periodontology Regeneration,
Dental College, Yonsei University
[2]Department of Oral Biology, Dental College, Yonsei University

This study was investigated to observe the effect of *Treponema denticola*(TDC) and *Treponema lecithinolyticum*(TLC) on cultured human periodontal ligament cells. Several experiments were performed including MTT test for the inhibition effect of cell proliferation, LDH test for the cytotoxicity , gelatin zymography for the gelatinase activation and observation of cell morphology change using the phase-contrast microscopy. The results were as follows.

1. The effect of concentration on cell proliferation with time showed an inhibitory effect at high concentration(150㎍/well) for TLC and at low concentration(9.4㎍/well) for TDC.
2. The effect of time on cell proliferation with concentration showed an inhibitory effect at 150㎍/well on 2-day incubation for TLC and at 9.4㎍/well on 2-day incubation for TDC.
3. The effect of heat-treated TDC and TLC on the inhibition of cell proliferation showed the difference in the heat-treated group compared to the non-heat treated group for TDC, whereas no difference was found for TLC.
4. The morphological changes which were observed from the phase-contrast microscopy showed the difference in the test group compared to the control group. The loss of spindle-like appearance, cell-to-cell detachment and inhibition of cell proliferation were observed.
5. There was no difference of the cytotoxicity effect between the test group and the control group in the LDH test.
6. The active form of progelatinase A with molecular weight 72kDa was activated in both TDC and TLC on the gelatin zymography.

Regarding to the above results, TDC and TLC have an effect on periodontal ligament cells by playing an inhibitory role in cell proliferation and appears to activate progelatinase A which degrades type IV collagen.

Key words : *Treponema denticola*(TDC), *Treponema lecithinolyticum*(TLC), MTT test, inhibition effect of cell proliferation, gelatinase A