

치주질환 심도에 따른 조직내 림프구 및 NK 세포의 변화에 관한 면역조직학적 연구

경희대학교 치과대학 치주과학교실

최호근 · 권영혁 · 이만섭

목 차

- I. 서 론
- II. 연구대상 및 방법
- III. 연구성적
- IV. 총괄 및 고찰
- V. 결 론
- 참고문헌
- 영문초록
- 사진부도

I. 서 론

세균성 치태는 염증성 치주질환을 일으키는 가장 중요한 원인이며, 치태를 구성하고 있는 세균과 그 대사 산물 및 내독소는 치주질환을 발생, 진행시키는 중요한 인자이다. 이 치태세균이 직접 치주조직을 파괴하며, 세균성 항원에 의해 활성화된 숙주의 면역반응도 조직 파괴에 관여한다. 따라서 치주조직의 상태는 치은열구내에 상주하는 세균총과 숙주반응간의 상호작용에 좌우되며, 염증의 확산과 유지를 조절하는 면역기전이 치주질환의 진행에 중요한 역할을 하고 있다^{1,4)}.

치주조직에서 일어나는 면역반응은 국소 인자에 대한 방어와 더불어 염증발생시 염

증을 국소화시켜 주지만, 한편으로는 과민반응의 형태로써 조직파괴를 일으키며, 조직파괴의 범위와 심도는 치태세균의 자체독성 및 존재여부와 이것에 대한 면역반응의 지속시간에 좌우된다고 보고되고 있다⁵⁻⁷⁾. 이와 같이 치주조직의 파괴에는 숙주의 방어기전에 의한 염증세포의 역할이 매우 중요하며, 많은 선학들이 치주질환의 병인론을 연구하기 위하여 치주병소내의 염증세포 분포에 대한 연구를 하여 왔다.

치태침착후 2~4일 내에 많은 수의 다형핵 백혈구가 유주하여 치은열구내로 이동하여 수일 혹은 수주가 지나면서 림프구, 형질세포 순으로 염증부위에 나타난다고 보고⁸⁻¹⁰⁾하였다. Page 등(1975)¹¹⁾ 및 Page와 Schroeder (1982)¹²⁾등도 치주염 환자의 치은내의 림프구가 섬유아세포의 변성과 밀접한 관계를 보인다고 보고하였다. 또한 치주질환의 염증반응은 체액성 면역 및 세포매개 면역이 함께 관여하며 T 및 B 림프구가 치주염의 발생과 진행에 중요한 역할을 한다는 보고도 있다^{13,14)}.

치주질환 환자의 말초혈액내 T와 B림프구, T림프구의 아형(subset)인 suppressor T림프구(Ts)와 helper T림프구(Th)의 분포에 대한 활발한 연구가 진행되어 치주질환시 전신적 면역반응에 대한 연구가 되어왔으며¹⁴⁻¹⁸⁾, 최근 단클론 항체의 발달로 조직표본에서 치주조

직의 국소적 면역반응 및 이들 세포의 분포에 관한 특징을 지을 수 있게 되었다. T림프구는 치주질환의 초기에 주로 나타나며 염증의 진행에 따라 B림프구성 병소로 전환되며, 치주조직의 파괴는 B림프구가 주된 역할을 한다는 연구가 보고^{19,22)}된 바 있다.

Seymour등(1979)¹⁹⁾이 만성치주염 병소를 B림프구병소라 한 이래 B림프구는 성인형 치주염의 치주낭 하방 결합조직에서 많이 발견되며 실제로 진행성 치주염을 B림프구 병소라 다시 지적하였다^{23,24)}. 또한 Reinhardt등(1988)²⁵⁾도 진행성 치주염병소를 B림프구 병소라 하였고, helper T림프구는 B림프구의 밀도가 높은 곳에서 발견되며, 이것은 B림프구의 활성도를 증가시키는 작용을 하며 안정된 비활성도를 보이는 병소는 T림프구가 지배하는 병소라 하였고, 질환의 활성도가 증가시 점차 B림프구가 지배하는 병소로 전환된다고 보고하였다^{20,23,26)}.

최근에 Natural Killer(NK)세포 활성도가 만성치주질환의 조직파괴에 기여할 수 있다는 가능성이 제시되었다^{27,28)}. Seymour등(1984)²⁷⁾은 NK세포활성도가 만성염증성 치주질환의 조직파괴에 중요한 역할을 한다고 하였고, Cobb등(1989)²⁹⁾은 만성치주염 환자에서 NK세포는 정상조직보다 약 3배의 증가를 보인다고 하였으며, Wynne등(1986)³⁰⁾과 Celenligil등(1990)³¹⁾은 B림프구가 많이 존재하는 병소부위에 NK세포가 많이 나타나며 이 NK세포는 치주질환 발병시 면역 병리기전에 관여함을 보고하였다.

이상의 연구보고와 같이 치주질환의 면역 병리기전을 규명하기 위해서는 치은조직내 림프구와 NK세포의 분포와 활성도 및 면역학적 기능과 특성에 관한 연구가 중요하게 생각된다.

그러나 림프구와 NK세포의 분포가 치주질환심도 및 질환의 활성도에 따라 변하는 것에 대한 연구가 많지 않았기에 저자는 염증성 치주질환에서 치은상피 및 결합조직내의 염증세포에서 T, B 림프구, T 림프구 아형 및 NK세포의 분포를 단클론항체를 이용한

면역조직화학적 염색법을 이용하여 관찰한 결과 다소의 지견을 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

II. 연구대상 및 방법

1. 연구대상

경희대학교 치과대학 부속병원 치주과에 내원한 환자중 전신건강이 양호하고 최근 3개월 이내에 항생제 복용이나 치주치료를 받지 않은 치주질환에 이환된 환자 20명을 실험군으로 선정하였으며, 대조군으로는 치은지수(Löe와 Silness, 1963)³²⁾ 및 치은열구출혈지수(Muhlemann과 Son, 1971)³³⁾가 각각 0이고 치주낭 깊이가 3mm미만인 5명을 선정하였다. 대상환자의 연령분포는 12세에서 66세까지였으며, 성별분포는 남자 16명 여자 9명이었다.

2. 연구방법

대상 환자의 치은지수 및 치은열구출혈지수와 치주낭 깊이를 각각 측정하여, 치은지수는 0을 대조군으로 하고, 치은지수 1, 2, 3을 실험군으로 하였다. 치은열구출혈지수는 0을 대조군으로 하고, 치은열구출혈지수 1, 2, 3, 4를 실험군으로 하였다. 치주낭 깊이의 경우는 1~3mm를 I군으로 하여 대조군으로 삼았으며, 4~6mm를 II군으로 7mm이상을 III군으로 분류하였다. 25명의 환자로 부터 치은조직을 치주 치료전에 국소 마취하에서 협측 및 치간 치은 부위의 치은상피와 결합 조직이 포함된 상태로 절취하여 조직검사를 시행하였다.

1) 조직준비

채취된 치은은 생리 식염수로 세척한 후 즉시 OCT embedding compound(Tissue-Tek, USA)에 매몰하고 냉동박절 표본제작이 용이하도록 액화질소로 급냉시킨 후 냉동 박절기(Cryo-cut : American Optical Inc. USA)로 4~

6 μ m 두께의 냉동 박절 표본 6매를 제작하였다. 이때 냉동박절 표본은 열구상피, 결합조직, 구강상피등이 포함되도록 제작하며 그중 1매는 조직학적인 관찰을 위해 통상적인 H-E 염색을 시행하고 나머지 5매는 각각 아래와 같은 방법으로 면역 조직 화학법에 의한 염색을 시행한 후 광학 현미경(Olympus BH-2, Tokyo Japan)으로 검경하였다.

2) 면역 조직 화학 염색

면역 조직 화학 염색을 하기전 준비된 poly-L-lysine이 피복된 slide위에 동결된 조직 절편을 박절하여 부착시킨 후 실온에서 10분 건조시킨다. cold acetone에 10분 동안 고정시킨 후 10분동안 실온에서 건조시켜 phosphate buffered saline(PBS, pH7.2)에 10분동안 담그어 두었다.

슬라이드를 moist chamber에 두고 1차 항체를 가할 때 발생할 수 있는 비특이적인 염색 반응을 제거하기 위해 정상 말혈청(Vector, USA)을 2~6방울 점적하여 20분간 반응시킨다.

남아 있는 과도한 혈청은 제거하고 1차 항체를 점적한다. 1차 항체로 B림프구 항체인 CD20(L26, 1 : 300, Dako, Denmark), T림프구 항체인 CD45RO(UCHL-1, 1 : 100, Dako, Denmark), NK 세포 항체인 CD57(Leu-7, 1 : 10, BD, Denmark), helper T림프구 항체인 CD4(Leu3a, 1 : 25, BD, Denmark), suppressor T림프구 항체인 CD8(Leu2a, 1 : 25, BD, Denmark)를 각기 희석 배수에 따라 희석하여 4~6방울 점적후 30분간 반응시킨다.

PBS용액으로 10분간 수세후 2차 항체로 1 : 20으로 희석한 biotin이 붙어있는 anti-mouse IgG(Vector, USA)을 점적한 후 30분간 반응시킨다. 다시 PBS로 10분간 수세후 avidin-biotin-peroxidase complex(Vector, USA)을 점적하여 30분간 반응시킨다. PBS로 2회 세척한 조직 표본을 diaminobenzidine(Sigma, USA)으로 10분간 발색시킨다. 발색 반응이 끝난후 증류수로 수세하고 Meyer's hematoxylin으로 대조 염색을 시행하였다.

3) 세포수 산정

면역 조직 화학 방법으로 염색된 표본은 세포 분포에 대한 평가를 위해 대안렌즈에 1cm \times 1cm의 ocular grid가 달린 400배의 광학현미경하에서 갈색의 색조를 띠는 양성 세포의 분포를 계산하여 통계 처리하고 t-test를 사용하여 유의성 검증을 하였다.

III. 연구성적

1. 치은지수에 따른 림프구 및 NK 세포의 분포

T림프구의 경우 치은 지수 0인 대조군에 비하여 치은 지수 1, 2, 3군에서 훨씬 많이 분포하였으나, 치은 지수의 증가에 따른 T림프구의 수의 비례적 증가는 보이지 않았고 치은 지수 0군에 비해 1군과 3군에서 통계학적으로 유의하게 T림프구가 증가하였다($p < 0.05$). suppressor T 림프구는 치은지수 0군에 비하여 치은 지수가 1, 2, 3군에서 많이 분포하였으나 통계학적 유의성은 없었다. 반면 helper T 림프구의 분포는 0군에 비하여 1, 2, 3군에서 공히 유의하게 증가하였다($p < 0.05$). 또한 B 세포도 치은 지수가 증가함에 따라 증가하는 경향을 보였으며, 0군에 비하여 3군에서 유의한 차이가 있었다($p < 0.05$). NK 세포는 치은 지수 0군에 비해 1, 2, 3군에서 통계학적 유의한 차이가 있었으나 ($p < 0.05$), 1, 2, 3군간에는 유의한 차이가 없었다(Table 1) (Fig. 1).

2. 치은 지수에 따른 helper T 림프구와 suppressor T 림프구의 비율

치은 지수 0군에 비해 1군에서 helper T 림프구와 suppressor T 림프구와의 비율이 증가하다가 2, 3군에서 다시 감소하였다. 치은 지수 1군에 비해 3군에서 helper T 림프구와 suppressor T 림프구와의 비율이 유의하게 감소하였다($p < 0.05$) (Table 2).

Table 1. The changes in the distribution of lymphocyte subpopulations and natural killer cells according to gingival index (Mean \pm S.E.)

GI	T	Ts	Th	B	NK
0	18.00 \pm 4.04	10.33 \pm 3.93	11.67 \pm 3.84	4.33 \pm 4.33	1.00 \pm 0.56
1	57.75 \pm 10.97	24.00 \pm 5.60	39.25 \pm 6.20	9.50 \pm 3.92	8.75 \pm 3.15
2	42.40 \pm 13.17	21.80 \pm 3.81	31.40 \pm 7.85	24.40 \pm 12.16	8.40 \pm 2.66
3	45.17 \pm 19.13	22.00 \pm 9.82	17.08 \pm 9.24	33.00 \pm 15.67	6.91 \pm 2.30

* p<0.05

Table 2. The changes in the ratio of helper T/suppressor T cells according to gingival index (Mean \pm S.E.)

GI	0	1	2	3
T _H /T _S	1.46 \pm 0.78	1.71 \pm 0.38	1.64 \pm 0.78	0.95 \pm 0.15

* p<0.05

3. 치은열구출혈지수에 따른 림프구 및 NK 세포의 분포

치은열구출혈지수 0군에 비해 1, 2, 3, 4군에서 T 림프구가 많이 분포하였으며, 1군에 비해 3군에서 유의하게 감소하였고(p<0.01), 1군에 비해 4군에서도 유의하게 감소하였다(p<0.05). suppressor T 림프구는 0군에 비해 3군에서 그 수가 감소하였으나 1, 2, 4군에서는 증가하였다. 또한 1군에 비해 3군에서 유의하게 감소하였다(p<0.05). helper T 림프구는 0군에 비해 1, 2군에서 그 수가 증가하다가 3, 4군에서 감소하였고 1군에 비해 3군에서 유의하게 감소하였다(p<0.05). B 림프구는

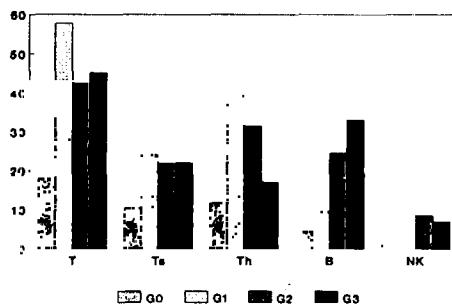


Fig. 1. The changes in the distribution of lymphocyte subpopulations and natural killer cells according to gingival index

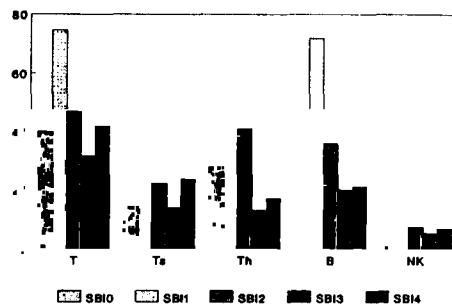


Fig. 2. The changes in the distribution of lymphocyte subpopulations and natural killer cells according to sulcular bleeding index

Table 3. The changes in the distribution of lymphocyte subpopulations and natural killer cells according to sulcular bleeding index (Mean \pm S.E.)

SBI	T	Ts	Th	B	NK
0	40.00 \pm 14.50	14.30 \pm 4.70	28.00 \pm 14.75	10.66 \pm 4.33	0.67 \pm 0.37
1	74.67 \pm 7.79	30.33 \pm 8.21	36.00 \pm 9.54	72.00 \pm 21.25	14.33 \pm 5.12
2	47.00 \pm 16.50	22.33 \pm 6.64	41.00 \pm 9.07	36.00 \pm 18.01	7.33 \pm 4.67
3	31.67 \pm 4.15	14.00 \pm 2.14	13.17 \pm 3.77	20.17 \pm 7.25	5.33 \pm 1.02
4	42.11 \pm 5.68	23.89 \pm 4.17	17.33 \pm 2.38	21.33 \pm 6.67	7.00 \pm 1.43

*p < 0.05 **p < 0.01

대조군과 실험 각 군간에 유의한 차이가 없었으나, NK 세포는 0군에 비해 1, 2, 3, 4군에서 그 수가 유의하게 증가하였다($p < 0.05$, $p < 0.01$) (Table 3) (Fig 2).

4. 치은열구출혈 지수에 따른 helper T 림프구와 suppressor T 림프구와의 비율

치은열구출혈 지수에 따른 helper T 림프구와 suppressor T 림프구의 비율은 0군에 비해 2군에서만 높았고, 1, 3, 4군은 낮았다. 0군에 비해 4군에서 유의하게 비율이 감소하였고 ($p < 0.05$), 2군에 비해 4군에서 유의하게 비율이 감소하였다($p < 0.05$) (Table 4).

5. 치주낭 깊이에 따른 림프구 및 NK 세포의 분포

T 림프구는 I 군에 비해 II, III군에서 그 수가 적었고, suppressor T 림프구는 I 군에 비해 II 군에서 그 수가 적었으나 III군에서는 많았다. helper T 림프구는 I 군에 비해 II,

III군에서 유의하게 감소하였다($p < 0.05$). B 림프구는 I 군에 비해 II, III군에서 적었고, NK 세포는 I 군에 비해 II, III군에서 그 수가 다소 증가하는 경향을 보였으나 각 군간의 통계학적 유의성은 없었다(Table 5) (Fig 3).

6. 치주낭 깊이에 따른 helper T 림프구와 suppressor T 림프구와의 비율

치주낭 깊이에 따른 helper T 림프구와 suppressor T 림프구와의 비율은 I 군에 비해 II,

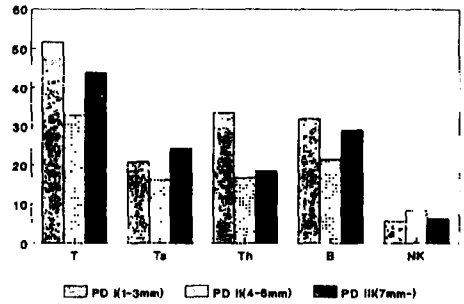


Fig. 3. The changes in the distribution of lymphocyte subpopulations and natural killer cells according to pocket depth

Table 4. The changes in the ratio of helper T/suppressor T cells according to sulcular bleeding index (Mean \pm S.E.)

SBI	0	1	2	3	4
T_h/T_s	1.98 ± 0.58	1.24 ± 0.15	2.13 ± 0.67	0.93 ± 0.22	0.93 ± 0.18

* $p < 0.05$

* $p < 0.05$

Table 5. The changes in the distribution of lymphocyte subpopulations and natural killer cells according to pocket depth (Mean \pm S.E.)

PD	T	Ts	Th	B	NK
I (1~3mm)	51.75 ± 10.11	20.88 ± 3.50	33.63 ± 5.90	32.00 ± 11.78	5.75 ± 2.24
II (4~6mm)	32.86 ± 8.67	16.29 ± 4.91	16.86 ± 4.31	21.57 ± 15.28	8.43 ± 3.01
III (7mm~)	3.89 ± 4.73	24.33 ± 3.73	18.56 ± 2.70	29.11 ± 6.56	6.33 ± 1.20

* $p < 0.05$

III군에서 점차 감소하였으나 통계학적 유의성은 없었다(Table 6).

Table 6. The changes in the ratio of helper T/suppressor T cells according to pocket depth (Mean \pm S.E.)

PD	I (1~3mm)	II (4~6mm)	III (7mm~)
T _H /T _S	1.77 \pm 0.32	1.18 \pm 0.33	0.94 \pm 0.19

IV. 총괄 및 고찰

세균성 치태가 치주 조직에 작용하는 기전은 아직 명확하게 규명되지 않았으나, 치주질환의 발생 및 진행은 항원으로 작용하는 치태 구성 성분에 대한 초기 숙주 반응과 이 결과 초래되는 면역 반응에 기인하며 이 같은 면역 반응은 외부 자극물에 대한 방어나 염증을 국소화시켜 주지만 한편으로는 숙주 자신도 이 과정에서 파괴를 일으키게 된다^{1,6,7,34}.

항원성 치태 구성성분에 대한 치주 조직의 면역 반응은 세포성 매개 면역 기전이 관여된다고 하며 이 면역 기전을 림프구가 주로 담당하고 있다.

치주 질환의 면역 기전에 관한 연구에서 Hausman(1974)³⁵은 치태내 항원 물질이 치조골의 소실을 직접 또는 간접적으로 유도한다고 보고하였으며, Guggenheim과 Schroeder(1974)³⁶는 동물 실험에서 골소실도는 세포 침윤물의 파괴 능력보다는 파괴 세포를 활성화시키고 섬유아 세포의 활동을 저하시키는 인자에 의해서 야기된다고 하였다. 사람의 말초 혈액 림프구를 치태내의 항원 물질로 자극시켜서 얻은 세포 부유물 내에 치조골을 흡수시키는 용성 매질이 존재한다고 보고¹⁶하였다. Grant(1976)³⁷는 염증으로 인한 파괴 세포의 골 흡수 능력은 숙주의 면역 반응의 발현에 관여 된다고 하였고, Key 등(1976)³⁸은 동물 실험을 통해 세포성 면역 반응이 억제될 때 치조골 소실이 야기된다고 하였다. O'Neil등(1982)³⁹은 건강한 치은으로

부터 유리된 림프구들은 세포 독성을 보이지 않으며 림프구 독소(lymphotoxin)의 생산도 거의 없으나 치은염과 치주염의 염증성 치은 조직내 림프구들은 치은 섬유아세포에 세포 독성을 나타내는 림프구 독소를 생산한다고 보고하였는데 이는 염증성 치은에서 얻어진 림프구의 세포 독성 기전이라고 설명하였다. 치주질환 환자의 림프구 분포에 관한 연구에서 T 림프구는 치은 열구 상피에서 많이 발견되고 치주질환 초기의 염증세포의 대다수를 차지하며 염증 침윤과 비례한다고 보고함으로써 T 림프구의 존재가 치주조직의 국소적 방어와 관련되며 치주조직의 염증성 파괴 기전에 관련됨을 암시하였다²².

Seymour와 Greespan(1977)⁴⁰, Okada 등(1984)²¹과 Johannessen등(1986)⁴¹은 중증 치주염은 많은 형질세포를 포함하는 B 림프구 지배 병소로 간주되어 왔으나 치주낭 상피에 인접해 많은 T 림프구가 발견되었으며 이같은 T 림프구는 B 림프구의 증식과 분화에 도움을 준다고 보고하였다.

본 연구에서는 치은 지수 0군에 비해서 치은 지수 1, 2, 3군에서 T 림프구 및 B 림프구가 많이 분포하였으며, 특히 B 림프구는 치은지수 증가에 따라 B 림프구의 분포가 증가하는 경향을 보였다. 치은열구출혈지수 0군에 비해 1, 2, 4군에서 T 림프구가 많이 분포하였으며, 1군에 비해 3군과 4군에서 유의하게 감소하였다. B 림프구는 0군에 비해 1, 2, 3, 4군에서 그 수가 많았으나 어떤 특징적인 경향을 보이지는 않았다. 치주낭 깊이의 경우 치주낭 깊이가 얇은 I군에 비해 II, III군에서 T 림프구수가 훨씬 적게 나타나 Meng과 Zheng(1989)²²의 보고와 유사하였으나, B 림프구의 경우 치주낭 깊이에 따른 B 림프구의 분포차에 어떠한 의의를 찾기는 어려운 것으로 사료된다.

최근 T 림프구에는 다양한 면역반응의 조절에 있어 그 기능을 달리한 아형 즉 suppressor T 림프구(T_S)와 helper T 림프구(T_H)로 나뉜다는 것이 확인되었다⁴². T_S와 T_H세포는 분열 물질에 대한 반응력과 그 형태 및 조

직내의 분포가 상이하며 B 림프구 분화에 대한 마이트젠(mitogen) 유도를 증가시키는 T 림프구의 조절기능은 T_h 세포에 속하고 T_s 세포는 B 림프구분화를 억제시키는 기능을 나타낼 수 있음이 밝혀졌다⁴³⁻⁴⁵. 중증 치주염은 많은 형질세포를 포함하는 B 림프구 지배병소로 간주하였으며, 치주낭 상피에 인접해 있는 형질세포 가까이 많은 T 세포가 발견되었다고 하였고, 치주병소부에서 B 림프구 분화시 T 림프구 조절기능은 치은 림프구내 T_h 와 T_s 세포가 발견된다는 사실로써 설명하였으며²¹, Reinhardt등(1988)²⁵은 B 림프구는 건강한 치은이나 안정된 병소에서 보다 활동성 병소에 현저히 많이 침윤되었으며, T 림프구와 B 림프구의 비율은 안정된 병소에서 보다 활동성 병소에서 현저히 낮았다고 하였다. Seymour등(1983)²⁰은 치주질환의 초기는 T 림프구가 주로 나타나는 병소이나, 염증의 진행에 따라 B 림프구가 주된 역할을 할 것이라 하였다. 이같은 초기의 T 림프구성 병소가 치주질환의 진행에 어떤 역할을 하는지는 확실치 않으나 피부와 연관된 림프구성 조직에서 Langerhan's cell에 의해 활성화되는 세포는 대부분 helper T 세포로 이들이 이후의 B 림프구의 배자발생에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다^{46,47}.

본 연구에서 치은지수 0군에 비해 T_s 세포 및 T_h 세포가 1, 2, 3군에서 각각 증가하였으며 T_h 증가시 B 세포도 연관되게 증가하는 경향을 보였다. 치은열구출혈지수에서 치은열구출혈 지수 0군에 비해 1, 2군에서 T_h 세포가 현저히 많았으나 3, 4군에서는 그 수가 적었고 T_s 세포는 0군에 비해 3군에서 그 수가 감소하였으나 1, 2, 4군에서는 증가하였다. 치주낭 깊이의 경우 치주낭 깊이 증가에 따라 T_h 세포의 수가 증가하는 것을 보이지 않았고 T_s 세포는 I 군에 비해 II 군에는 감소하였으나 III 군에서는 증가하였다.

Meng과 Zheng(1989)²²은 T_h/T_s 의 평균 비율은 병적인 군과 건강한 군 사이에 별다른 차이는 없었으며 염증성 치은염 치은에서 T_h/T_s 비율이 높거나 낮은 것은 비정상적인

면역 조절기능에 관련된다고 보고하였으며, Stashenko등(1985)⁴⁶도 성인형 치주염 군과 건강한 군의 치은에 T_h/T_s 비율이 낮은 환자에서는 비율이 높은 환자에서 보다 발적 및 치은출혈등이 심하게 나타나며 이것은 질환의 활성도와는 무관하게 관찰된다고 보고하였다. 이와같이 숙주면역요소 즉 helper T 림프구 반응은 세균성 치은염을 억제하는데 도움이 된다는 것을 암시하고 이다. Chen등(1983)⁴⁹과 Reinhardt등(1988)²⁵도 T_h/T_s 비율은 치은조직간에 현저한 차이점은 없었으나 진행형 치주염 병소부의 T_h 림프구가 상대적으로 낮은 경향을 보인다고 보고한 반면 Kinane등(1989)²⁶은 유년형 치주염과 급속 진행형 치주염 환자에 있어 T_h/T_s 비율은 건강한 환자의 비율에 비해 현저히 낮았으며, T 림프구의 아형비율의 증감이 치주질환 진행에 영향을 미친다고 지적하였다. 또한 Kornman등(1982)⁵⁰도 원숭이를 이용한 동물실험에서 치주질환은 T_h/T_s 비율이 감소된다고 하였으며 Taubman등(1984)⁵¹과 Jully등(1986)⁵²도 비율의 감소는 치주질환을 가진 조직에서 보여지며 치주질환 진행에 있어 T 림프구 조절에 대한 역할을 설명하였다.

본 연구에서 치은지수의 증가에 따른 T_h/T_s 비율이 어떠한 특이한 특징을 보이지 않았고 치은열구출혈지수에 따른 T_h/T_s 비율은 감소 추세를 보였으나 어떠한 특징적인 점을 유추해 볼 수는 없었으며 치주낭 깊이에 따라서 T_h/T_s 비율이 점차 감소하는 추세를 보였는데 이는 Kornman등(1982)⁵⁰의 보고와 일치하였다.

최근에는 T 림프구와 B 림프구의 치주질환 발병과 조직파괴에 작용하는 면역화학적 연구와 더불어 Natural Killer(NK) 세포활성도가 만성 염증성 치주질환의 조직파괴에 기여할 수 있다고 알려져 있다^{29,30,53}. O'Neil등(1982)³⁹은 치태추출물이 섬유아세포를 처리하여 NK세포에 노출시킬 때 섬유아세포에 세포독성반응이 증가하였다고 보고하였으며, NK 세포 활성화시작은 interleukin-1, interleukin-2, α -interferon에 의하나 반면 일시적인

높은 증가는 G(-) bacterial lipopolysaccharide의 노출에 의해 유도된다고 하였으며⁵⁴⁾, NK 세포의 활성화는 prostaglandin에 의해 억제되어지며 interleukin-2, prostaglandin E₂와 cytotoxic T 림프구사이 미묘한 균형이 존재한다고 보고하였다⁵⁵⁾. Celenligil등(1990)³¹⁾은 유년형 치주염과 급속진행형 치주염 환자의 말초혈액내 T 림프구 아형, B 림프구, HLA-Dr⁺ 세포의 분포가 정상치를 나타냈으나 NK 세포는 건강인에 비해 현저히 증가되었는데, 이는 NK 세포가 치주질환의 발병에 관여함을 시사해 준다. Wynne등(1986)³⁶⁾은 건강한 치은과 치은염 및 치주염 환자의 치은조직내 NK 세포 분포에 관한 면역조직화학적 연구에서 NK 세포가 건강한 치은에는 존재하지 않았으며, 치은염 조직에서는 약간의 NK세포가 존재하였고, 치주염조직에서는 많은 수의 NK 세포가 나타난다고 보고하였다. 한편 Cobb등(1989)²⁹⁾은 만성치주염 환자의 치은조직내 NK 세포에 관한 면역조직화학적 연구에서 T 림프구가 많이 존재하는 병소부 조직내에서는 NK 세포가 잘 나타나지 않았으며, B 림프구가 많이 존재하는 병소부 조직내에서 B 림프구와 인접하여 NK 세포가 더 잘 나타나고 NK 세포가 B 림프구 기능을 조절할 수 있다고 설명하였다.

본 연구에서 치은지수 0군에 비해 1, 2, 3군에서 NK 세포 수가 많았으며, 특히 치은열구출혈지수에 따른 NK 세포 수의 변화는 대조군에 비하여 실험 각 군에서 유의하게 증가되었으며, 치주낭 깊이 I군에 비해 II, III군에서 NK 세포수가 증가하는 경향을 보였다. 이는 Wynne 등(1986)의 보고와 유사하였다. 따라서 치주질환의 가장 객관적인 임상증상의 기준으로 삼고 있는 치은출혈이 치주질환의 활성화도와 밀접히 관계된다는 것을 NK세포가 반영한다고 할 수 있다.

이상으로 미루어 여러가지 임상지수에 따른 T 림프구, B 림프구 및 T림프구 아형과 NK 세포에 대한 분포의 변화는 매우 미약한 것으로 사료되며, 차후에는 임상지수와 치주질환의 활성화도사이에 상관관계가 있는지 각

종 면역세포를 이용하여 연구하여야 할 것으로 사료된다.

V. 결 론

염증성 치주질환에서 치은상피 및 결합조직내의 T 림프구, B 림프구, T 림프구 아형 및 NK 세포의 분포와 임상지수와 상관을 규명하고자 치주질환에 이환된 25명의 환자에서 치은조직을 채취하여 단클론 항체를 이용한 면역조직화학적 염색법을 이용하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 치은지수의 경우, 0군에 비해 1군과 3군에서 T림프구의 수가 유의하게 증가하였으며($p < 0.05$), helper T 세포 및 NK세포는 0군에 비해 1, 2, 3군 공히 유의하게 증가하였다($p < 0.05$).

2. 치은열구출혈지수의 경우 1군에 비해 3군과 4군에서 T 세포가 각각 유의하게 감소하였으며($p < 0.01$, $p < 0.05$), 특히 NK세포수는 0군에 비하여 1, 3, 4군 공히 유의하게 증가하였다($p < 0.05$, $p < 0.01$).

3. 치은열구출혈지수의 경우 helper T 림프구와 suppressor T 림프구와의 비율은 0군에 비해 4군에서, 2군에 비해 4군에서 각각 유의하게 감소하였다($p < 0.05$, $p < 0.05$).

4. 치주낭깊이에 따라 helper T 림프구는 I군에 비하여 II군과 III군에서 유의하게 감소하였으며($p < 0.05$), 반면 NK 세포수가 증가하는 경향을 보였으나 각 군간의 유의한 차이는 보이지 않았다.

5. 치주낭깊이에 따라 helper T 림프구와 suppressor T 림프구와의 비율은 감소하는 경향을 보였으나 각 군간의 유의한 차이는 보이지 않았다.

이상의 결론을 미루어 볼 때 치주질환 심도에 따른 T 림프구, B 림프구, T 림프구 아형 및 NK 세포 분포의 변화에서 분명한 특징은 발견되지 않았으나, 치은지수 및 치은열구출혈지수에서 T 세포와 NK 세포의 분명한 변화를 관찰할 수 있었다.

REFERENCES

1. Carranza, F.A. : Glickman's clinical periodontology, 6th ed., Saunders, pp.328-360, 1984.
2. Roitt, I.M., and Lehner, T. : Immunology of oral diseases. Blackwell scientific publication, pp.56-65, 157-176, 341-362, 1980.
3. Schluger, S., Yuodelis, R.A., and Page, R.C. : Periodontal disease. Lea & Febiger, pp.196-238, 1977.
4. Lindhe, J. : Textbook of Clinical Periodontology. 1st ed. pp.25-26, 177-185 Munksgaard, 1983.
5. Seymour, G.J. Dockrell, H.M. and Greenspan, J.S. : Enzyme differentiation of lymphocyte subpopulations in serial sections of human lymph node, tonsils and periodontal disease. Clin. Exp. Immunol, 32 : 169, 1978.
6. Nisengard, R.J. : The role of immunology in periodontal disease, J. Periodontol, 48 : 505-516, 1977.
7. Goodson, J.M., Tanner, A.C.R., Haffajee, A.D., Sornberger, G.C., and Socransky, S.S.I : Patterns of progression and regression of advanced destructive periodontal disease. J. Clin. Periodontol., 9 : 472-481, 1982.
8. Page, R.C., Simpson, D.H., Ammons, W.F., and Schectman, L.R. : Host tissue response in chronic periodontal disease : III. Clinical, histopathologic and ultrastructural features of advanced disease in a colony maintained marmose, J. Periodontal Res., 7 : 283-296, 1972.
9. Listgarten, M.A., and Ellegaard, B. : Experimental gingivitis in Rhesus monkeys, J. Periodontal Res., 8 : 199-214, 1973.
10. Schroeder, H. E., Graf-de Beer, M., and Attström, R. : Histopathologic feature of the initial and early stage of experimental gingivitis in man. J. Periodontal Res., 10 : 51-64, 1975.
11. Page, R.C., Simpson, D.M., and Ammons, M.F. : Host tissue response in chronic inflammatory disease. IV. The periodontal and dental status of a group of aged great apes. J. Periodontol., 46 : 144-154, 1975.
12. Page, R.C., and Schroeder, H.E. : Periodontitis in man and other animal. Karger, pp.222-283, 1982.
13. 이만섭, 권영혁 : 세포성 면역과 치주질환의 관계에 대한 고찰. 대한치과의사협회지, 19 : 61-66, 1980.
14. 권영혁 : 중증 치주염 환자의 T 및 B 림파구와 T-subsets의 분포에 관한 연구. 대한치주과학회지, 12 : 31-42, 1982.
15. 이만섭, 김영석 : 치주질환시 면역글로브린과 보체의 혈청 농도에 관한 연구. 대한치주과학회지, 12 : 87-100, 1982.
16. Pazandak, D.P., Rogers III, R.S., and Reeve, c.M. : T and B lymphocyte distribution in periodontal disease. J. Periodontol., 49 : 625-630, 1979.
17. Genco, R.J., Mashimo, P.A., Krygier, G., and Ellison, S.A. : Antibody-mediated effects on the periodontium. J. Periodontol, 45 : 330-337, 1974.
18. Horton, J.E., Oppenheim, J.J., and Mergenhegen, S.E. : A role for cell-mediated immunity in the pathogenesis of periodntal disease. J. Periodontol., 45 : 351-360, 1974.
19. Seymour, G.J., Powell, R.N., and Davia, W.I.R. : Conversion of a stable T-cell lesion to a progressive B-cell lesion in the pathogenesis of chronic inflammatory pathogenesis of chronic inflammatory periodontal disease : An hypothesis. J. Clin. Periodontol., 6 : 267-277, 1979.
20. Seymour, G.J., Powell, R.N., Cole K.L., Aitken, J. F., Brooks, D., Beckman, I., Zola, H., Bradley, J., and Burns, G.F. : Experimental gingivitis in humans : a histochemical and immunological characterization of the lymphoid cell subpopulation. J. Periodontal Res., 18 : 375-385, 1983.
21. Okada, H., Kassai, Y., and Kida, T. : T lymphocyte subsets in the inflamed gingiva of human adult periodontitis. J. Periodontal Res., 19 : 595-598, 1984.
22. Meng, H.X., and Zheng, L.F. : T cells and T cells subsets in Periodontol disease. J. Periodontal Res., 24 : 121-126, 1989.

23. Okada, H., Kida, T., and Yamagami, H : Identification and distribution of immunocompetent cells in inflamed gingiva of human chronic periodontitis. *Infect. Immun.*, 41 : 365-371, 1983.
24. Gillett, R., Cruchley, A., and Johnson, N.W. : The nature of the inflammatory infiltrates in childhood gingivitis, Juvenile periodontitis and adult periodontitis : immunocytochemical studies using a monoclonal antibody to HLADr. *J. Clin. Periodontol.*, 13 : 281-288, 1986.
25. Reinhardt, R.A., Bolton, R.W., McDonald, T.L., Dubois, L.M., and Kaldahl, W.B. : In site lymphocyte subpopulations from active versus stable periodontal sites. *J. Periodontol.*, 59 : 656-670, 1988.
26. Kinane, D.F., Johnston, F.A., and Evans, C.W. : Depressed helper-to-suppressor T-cell ratios in early-onset forms of periodontal disease. *J. Periodontal Res.*, 24 : 161-164, 1989.
27. Seymour, G.J., Horwood, B.W., Aaskov, J., and Powell, R.N. : Natural killer(NK) cell activity against human gingival fibroblasts exposed to dental plaque extract. *J. Periodontol.*, 55 : 289-293, 1984.
28. 임수덕 : NK 세포 시스템(면역학). 2nd, ed., 서울대학교, pp.277-286, 1989.
29. Cobb, C.M., Singla, O., Feil, P.H., Theisen, F.C., and Shultz, R.E. : omparison of NK-cell(Leu-7⁺ and Leu-11b⁺) populations in clinically healthy gingiva, chronic gingivitis and adult periodontitis. *J. Periodontal Res.*, 24 : 1-7, 1989.
30. Wynne, S.E., Walsh, L.J., Seymour, G. J., and Powell, R.N. : In site demonstration of natural killer(NK) cells in human gingival tissues. *J. Periodontol.*, 57 : 699-702, 1986.
31. Celenligil, H., Kansu, E., and Erataly, K. : Juvenile and rapidly progressive periodontitis. peripheral blood lymphocyte subpopulations. *J. Clin. Periodontol.*, 17 : 207-210, 1990.
32. Loe, H., and Silness, J. : Periodontal disease in pregnancy. *Acta Odontol. Scand.*, 21 : 533, 1963.
33. Muhlemann, H. R., and Son, S. : Gingival sulcus bleeding-a leading symptom in initial gingivitis. *Helv. Odontol. Acta*, 15 : 107, 1971.
34. Hancock, E.B. : Determination of periodontal disease activity. *J. Periodontol.*, 52 : 491-499, 1981.
35. Hausman, E. : Potential pathways for bone resorption in human periodontal disease. *J. Periodontol.*, 45 : 338-343, 1974.
36. Guggenheim, B., and Schroeder, H.E. : Reaction in the periodontium to continuous antigenic stimulation in sensitized gnotobiotic rats. *Infect. Immun.*, 10 : 565-577, 1974.
37. Grant, P. : The effects of antigen-antibody induced inflammation on connective tissue and bone. *J. Dental Res.*, 55 : Special Issue B : B 258, 1976.
38. Key, G.S., App, G.R., Rosen, S., and Wolf, J. : Effect of immunosuppression on alveolar bone resorption in rice rats. *J. Dental Res.*, 55 : Special Issue B : B204, 1976.
39. O'Neil, p.A., Woodson, D.L., and Mackler, B.F. : Functional characterization of human gingival lymphocyte. Cytotoxic activity. *J. Periodontal Res.*, 17 : 50-59, 1982.
40. Seymour, G.J., and Greespan, J.S. : The phenotypic characterization of lymphocyte subpopulation in established human periodontal disease. *J. Periodontal Res.*, 14 : 39-46, 1977.
41. Johannessen, A.C., Nilsen, R., and Knudsen, G.E. : In site characterization of mononuclear cells in human chronic marginal periodontitis using monoclonal antibodies. *J. Periodontal Res.*, 21 : 113-127, 1986.
42. Moretta, L., Ferrarini, M. C., Moretta, A., and Webb, S.R. : Subpopulations of human T cells identified by receptors for immunoglobulins and mitogen responsiveness. *J. Immunol.*, 117 : 2171-2174, 1976.
43. Baker, J. J., and Tondreau, S.P. : The stimulation of human peripheral blood lymphocytes by solulized dental plaque : macrophage and T-cell dependence. *J. Periodontol.*, 56 : 410-418m 1985.
44. Gupta, S. : Functionally distinct subpopulations

- of human T lymphocytes-A review. Clin. Bulletin., 8 : 100-106, 1978.
45. Moretta, L., Ferrarini, M., and Cooper, M.D. : Characterization of human T-cell subpopulations as defined by specific receptors for immunoglobulins. *Contemp. Top Immunobiol.*, 8 : 19-54, 1978.
 46. Ivanyi, L., Topic, B., and Lydyard, P.M. : The role of T lymphocytes in cell mediated immunity in patients with periodontal disease. *Clin. Exp. Immunol.*, 46 : 633, 1981.
 47. Yem, A. W., and Parmely, J. : Modulation of Ia-like antigen expression and antigen presenting activity of human monocytes by endotoxin and zymosan. *A. J. Immunol.*, 127 : 2245, 1981.
 48. Stashenko, P., Resmini, L.M., Haffajee, A. D., and Socransky, S.S. : Helper and suppressor T cells in periodontal disease. *J. Periodontal Res.*, 20 : 51-521, 1985.
 49. Chen, P., Park, B., and Genco, R. J. : Immunologic profile of patients with juvenile periodontitis. *J. Dental Res.*, 62 : 273, Abstract 933, 1983.
 50. Kornman, K.S., Manti, F., and Goldschneider, I. : Peripheral blood lymphocyte populations in ligature-induced periodontitis. *J. Periodontal Res.*, 17 : 469, 471, 1982.
 51. Taubman, M.A., Stoufi, E.D., Ebersole, J.L., and Smith, D.J. : Phenotypic studies of cells from periodontal disease tissue. *J. Periodontal Res.*, 19 : 587-590, 1984.
 52. Jully, J.M., Bene, M.C., Martin, G., and Faure, G. : Immunohistological identification of cell subsets in human gingiva after local treatment for gingivitis or periodontitis. *J. Clin. Periodontol.*, 13 : 223-227, 1986.
 53. 김종현, 이만섭, 권영혁 : 치주병소 조직내 림프구 분포 및 활성도에 관한 면역조직화학적 연구, *경희대논문집*, 13 : 23-33, 1991.
 54. Domzig, W., Stadler, B.M., and Herbermn, R.B. : Interleukin 2 dependence of human natural killer(NK) cell activity. *J. Immunol.*, 130 : 1970-1973, 1983.
 55. Seymour, G.J. : Possible mechanisms involved in the immunoregulation of chronic inflammatory periodontal disease. *J. Dental Res.*, 66 : 2-9, 1987.

ILLUSTRATION OF FIGURES

Fig. 1. Photomicrograph was showed that T lymphocytes, B lymphocytes, Th cells and NK cells in experimental groups (GI-1, GI-2, GI-3) were distributed higher than that of control group(GI-0).

(a) T lymphocytes in GI-0 ($\times 200$)

(b) T lymphocytes in GI-1 ($\times 200$)

(c) B lymphocytes in GI-0 ($\times 200$)

(d) B lymphocytes in GI-3 ($\times 200$)

(e) Th cells in GI-0 ($\times 200$)

(f) Th cells in GI-1 ($\times 200$)

(g) NK cells in GI-0 ($\times 200$)

(h) NK cells in GI-1 ($\times 200$)

Fig. 2. Photomicrograph was showed that T lymphocytes and NK cells in experimental groups (SBI-1, SBI-2, SBI-3) were distributed higher than that of control group (SBI-0):

(a) T lymphocytes in SBI-0 ($\times 200$)

(b) T lymphocytes in SBI-1 ($\times 200$)

(c) NK cells in SBI-0 ($\times 200$)

(d) NK cells in SBI-1 ($\times 200$)

사진부도 ①

Fig. 1-g.

Fig. 1-h.

사진부도 ②

Fig.2-c.

Fig.2-d.

AN IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY ON THE CHANGES OF LYMPHOCYTE SUBPOPULATIONS AND NK CELLS ACCORDING TO THE SEVERITIES OF THE PERIODONTAL DISEASE

Ho-Keun Choi, Young-Hyunk Kwon, Man-Sup Lee

Department of Periodontology, College of Dentistry, Kyung Hee University

Periodontal disease research has been focused on understanding the immunopathologic mechanisms which may operate in the development and maintenance of periodontal inflammatory changes. Immunologic and inflammatory responses may relate to the etiology and pathogenesis of periodontal disease. In order to research immunopathology of periodontal disease, previous investigators have spent much time on the distribution of lymphocyte subpopulations and NK cells but they have spent less time on the changes of those cells to the periodontal disease severity.

The purpose of study was performed to investigate the changes of the distribution of T lymphocytes, B lymphocytes, T lymphocyte subsets, and Natural Killer cells in the gingival epithelium and connective tissue of the periodontal disease with the various clinical parameters including Gingival Index, Sulcular Bleeding Index, and pocket depth. Gingival tissues were obtained from 25 patients with different severity of periodontal disease. Serial cryostat sections displaying a cross section of gingiva were labelled with monoclonal antibody for pan T cells, T cytotoxic/suppressor cells, T helper/inducer cells, pan B cells, and NK cells were developed using an avidin-biotin-peroxidase system. Lymphocyte populations were enumerated in repeatable fields from gingival section.

1. T cells were more increased at grade 1 and 3 than at grade 0 of gingival index ($p < 0.05$). Helper T cells and NK cells were significantly increased at grade 1, 2, 3 than at grade 0 ($p < 0.05$).
2. T cells were more decreased at grade 3 and 4 than at grade 1 of sulcular bleeding index ($p < 0.01$, $p < 0.05$). Especially, Natural Killer cells were significantly increased at grade 1, 2, 3, 4 than at grade 0 ($p < 0.05$, $p < 0.001$).
3. The ratios of helper T/suppressor T cells were more decreased at grade 4 than at grade 0 and at grade 4 than at grade 2 of sulcular bleeding index ($p < 0.05$, $p < 0.05$).
4. Helper T cells were significantly decreased at grade II and III than at grade I, however the Natural Killer cells showed a increasing tendency with the increase of the pocket depth, there were no significant differences between each grade of pocket depth.
5. The ratios of helper T/suppressor T cells were tended to be decreased with the increase of the pocket depth, there were no significant differences between each grades of pocket depth.

There was a very weak change in the distribution of T lymphocytes, B lymphocytes, T lymphocyte subsets, and Natural Killer cells in the gingival epithelium and connective tissue of the periodontal lesion with the various clinical parameters including gingival index, sulcular bleeding index, and pocket depth. But, the number of T lymphocytes and Natural Killer cells were significantly changed in gingival index and sulcular bleeding index.