

구내 재발성 아프타성 궤양 환자에서 타액내 바이러스 검출 및 단백질의 변화

전남대학교 치과대학 구강내과학교실*, 보철학교실**

박 상 배* · 김 병 국* · 배 정 식**

목 차

- I. 서 론
- II. 연구재료 및 방법
- III. 결 과
- IV. 총괄 및 고찰
- V. 결 론
- 참고문헌
- 영문초록

I. 서 론

구내 재발성 아프타성 궤양은 구강점막에서 가장 많이 발생하는 구강내 연조직 병소로 성인 인구의 약 20%에서 발견된다^{1,2)}. 구내 재발성 아프타성 궤양은 소아프타, 대아프타, 헤르페스형 궤양으로 구분된다³⁾.

구내 재발성 아프타성 궤양의 원인은 명확하지 않으나 유전적 요인, 음식물에 대한 과민반응, 정서적 스트레스와 월경, 외상, 감염, 면역계 조절 이상 등이 가능한 원인요소로 제시되고 있다⁴⁾. 이러한 원인요소 중 감염에 의한 가능성에 대하여 많은 연구자들이 연쇄상 구균의 관련성을 제시하였으나 이후 관련성이 적은 것으로 규명되었고^{3,4)}, Herpes Simplex virus (이하 HSV), Varicella Zoster virus (이하 VZV)와 Cytomegalovirus (이하 CMV)와의 관련성에 대하여 병

소의 배양 및 순환 단핵구를 이용한 연구 등이 시행되어 이러한 바이러스들은 아프타성 궤양의 발생에 직접적인 영향은 미치지 않고 간접적으로 다른 원인요소들을 재활성시킨다고 주장하였으나⁵⁻⁸⁾, 아직은 명확하게 밝혀지지 않았다.

구강내에서 타액은 amylase에 의한 소화기능, 구강점막에 대한 윤활 및 보호기능, 세척기능, lysozyme, lactoferrin, lactoperoxidase에 의한 항세균기능과 secretory IgA에 의한 항바이러스 기능, 세균부착 억제기능, 연조직 치유기능, pH 유지 등의 역할을 수행한다⁹⁾. 특히 타액내 mucin은 타액의 효과적인 윤활작용을 가능하게 하는 주된 요소로서¹⁰⁾, 낮은 용해도, 높은 점도, 높은 탄성 및 부착능을 가지며¹¹⁾, 점막표면의 투과성 조절에 관여하여 독소 및 유해물질의 투과를 억제하며¹²⁾, HSV에 대항하여 비면역성 보호작용을 수행한다¹³⁾.

지금까지 타액을 이용하여 질환을 진단하고 예후를 평가하고자 하는 연구가 많이 시도되어 왔다¹⁴⁾. 다양한 구강내 질환과 전신 질환시 타액의 특성 및 조성의 변화, 타액내 호르몬, 약물, 면역글로불린 등의 농도 측정과 관련된 많은 연구들이 시행됨으로써 타액의 진단적 가치는 날로 증가되고 있는 추세이다¹⁵⁾. 구강내 질환을 가진 환자의 타액내 당단백의 조성 변화에 대한 연구 중, Wu-Wang 등¹⁶⁾은 재발성 아프타성 구내염 환자의 타액내 prostaglandin E₂ (PGE₂)와

epidermal growth factor (EGF)의 수준이 활성화기에서 정상인에 비해 유의하게 낮았다고 보고하였으며, PGE₂와 EGF의 감소와 궤양발생과의 사이에 연관이 있을 것으로 추론하였고, Tammiala-Salonen과 Söderling¹⁷⁾은 정상인과 구강작열감 증후군 환자에서 타액내 총단백량 측정과 sialic acids의 정량분석을 이용한 mucin의 농도측정을 시행하여 이를 비교하였으나 특별한 상관관계를 발견하지 못하였으며, 유와 윤¹⁸⁾은 구강 궤양 환자들의 타액내 IgA의 농도를 정량분석하여 구강 궤양과 secretory IgA의 생성과의 관계를 규명하고자 하였으나 이 역시 명확히 밝혀지지 않았다. 한편 구내 재발성 아프타성 궤양 환자의 타액에서 구강내 점막 방어기전에 중요한 역할을 담당하는 타액내 단백질에 대한 연구는 희소한 편이다.

본 연구는 지금까지 많은 연구자들의 병소 배양 및 혈액을 이용한 감염성 원인요소에 대한 연구와 달리 구강내 환경과 구강점막 보호에 큰 영향을 미치는 타액 내에서도 감염성 원인요소로 알려진 HSV와 VZV가 발현하고 있는 지 여부를 확인하고, 또한 타액내 단백질의 변화 여부를 알아보기 위하여 시행되었다.

II. 연구재료 및 방법

1. 연구재료

전남대학교병원 구강내과에 내원한 구내 재발성 아프타성 궤양 환자 중 3년 이상의 병력을 가진 23명(여:10명, 남:13명)을 환자군으로 하고, 구내 재발성 아프타성 궤양의 증상 및 병력이 전혀 없는 남녀 20명(여:8명, 남:12명)을 대조군으로 하여, 두 군에서 각각 무자극성 전타액을 채취하였다.

환자군의 연령 분포의 범위는 11세부터 72세까지였고 평균 연령은 34세(여:37세, 남:32세)였으며, 대조군의 연령 분포의 범위는 22세부터 65세까지였고 평균 연령은 34세(여:32세, 남:35세)였다.

2. 연구방법

가. 무자극성 전타액의 채취

연구대상자의 전타액을 13시부터 16시 이내의 시각에 채취하였다. 연구대상자로 하여금 많은 양의 증류수로 구강을 헹구게 한 다음, 자극없이 10분간 기다리게 하여 타액이 분비되도록 하였다. 5분에 걸쳐 15 cc 용량의 소독된 튜브(Falcon, USA)에 분비된 타액을 뱉어내게 하고 튜브의 입구를 밀봉하여 실험전까지 -20°C에서 냉동 보관하였다.

나. 타액내 HSV와 VZV 발현 정도 측정

1) Genomic DNA의 추출

주로 혈액내의 DNA 추출시 사용하는 QIAamp Blood Kit (QIAGEN Inc., Chatsworth, CA, USA)를 이용하여 혈액내 DNA 추출방법을 변형하여 타액내 genomic DNA를 추출하였다.

채취한 전타액 1 ml를 0.1 M phosphate buffered saline (pH 7.1) 4 ml와 혼합하고 실온에서 2,500 rpm으로 5분간 원심분리하였다. 상층액 제거 후, 하층의 덩어리를 0.1 M phosphate buffered saline (pH 7.1) 4 ml로 다시 세정하고 실온에서 2,500 rpm으로 5분간 원심분리하였다. 상층액을 제거한 후 하층의 덩어리를 180 µl의 0.1 M phosphate buffered saline (pH 7.1)으로 재용해시킨 후, DNase와 RNase에 오염되지 않은 1.7 ml 용량의 튜브로 옮기고 20 µl RNase solution (Ribonuclease A Type II-A, 86 U/mg, SIGMA, USA), 25 µl Protease solution (a broad specificity serine protease, 20 mg/ml, QIAGEN, USA)과 200 µl의 lysing buffer (QIAGEN buffer AL)를 혼합한 후 70°C에서 10분간 보관하였다. 여기에 96% 에탄올 210 µl를 첨가하여 혼합하였다. 이 혼합물을 DNA binding column에 넣어 실온에서 8,000 rpm으로 2분간 원심분리하였다. DNA binding column을 500 µl의 에탄올이 함유된 세정 buffer로 2회 세정하였다. 70°C에서 예열된 200 µl의 solubilizing buffer (QIAGEN buffer AE)를 세정된 DNA binding column에 넣고 8,000 rpm으로 3분간 원심분리하

여 DNA binding column에 내재된 genomic DNA를 분리하였다.

분광측정기(DU[®]-70 Spectrophotometer, Beckman, USA)를 이용하여 260 nm에서 genomic DNA의 흡광도를 측정하고, 다음의 공식에 의해 DNA의 농도를 산출하였다. 또한 260 nm와 280 nm에서의 흡광도 비율을 계산하여 비율이 1.6에서 1.8 사이의 순도가 높은 DNA 표본을 선택하였다.

DNA의 농도 (mg/ml) =

$$260 \text{ nm의 흡광도} \times \text{희석도} \times 1/20$$

2) Polymerization Chain Reaction (PCR)

HSV 발현을 위해 사용한 primer는 primer 1 (5'-TTTATCAACCGCACCTCCA-3')과 primer 2 (5'-GGGCCATGAGCTTGTAATAC-3')로서, 이들은 HSV-1과 HSV-2에 특정한 것으로서 다른 종류의 herpes virus와 교차반응이 없다. VZV 발현을 위해 사용한 primer는 primer 1 (5'-CGTCACATATTATGCAAACATG-3')과 primer 2 (5'-CGTTTTTAATATTACAAAT-CCCGC-3')로 설계하였다.

PCR은 추출한 genomic template DNA, Taq polymerase (GIBco BRL, Grand Island, NY, USA), dNTP (GIBco BRL, Grand Island, NY, USA)와 customized primers를 이용하는 표준화된 방법으로 시행되었다. 1 µg의 DNA를 사용하였고 primer의 최종농도가 10 nM이 되게하였다. PCR을 위한 혼합물은 Thermal Cycler (Perkin Elmer, Branchburg, NJ, USA)를 이용하여 증폭하였으며, 초기 denaturing은 94°C에서 5분간 시행하였고 HSV에 대하여는 94°C 1분, 62°C 2분, 72°C 3분으로 35 cycles, VZV에 대하여는 94°C 1분, 55°C 2분, 72°C 3분으로 35 cycles 후 각각 72°C에서 7분으로 마무리하였다. 증폭된 PCR product를 1 µg/ml의 ethidium bromide가 함유된 2% agarose gel에 전기영동하여, 자외선광 하에서 발현 여부를 관찰하고 플라로이드 카메라를 이용하여 사진 촬영하였다. 촬영된 사진은 Adobe Photoshop을 이용하여 처리되었다.

3) 통계 분석

환자군과 대조군에서의 HSV와 VZV 발현빈

도를 백분율로 계산하였으며, 두 군 사이의 발현 정도를 비교하기 위하여 chi-square test (Fisher's Exact)를 이용하였다.

다. 단백질의 정량

Bovine serum albumin (BSA, Pierce, USA)을 표준 단백질로 하여 제조사의 지시에 따라 Bio-Rad protein assay system (Bio-Rad, USA)¹⁹⁾을 이용하여 측정하였다.

1) 염료를 이용한 흡광도 영점조정

염료인 Coomassie[®] Brilliant Blue G-250을 증류수에 1 : 4로 희석하고 희석된 염료 2.5 ml를 증류수 50 µl와 혼합한 후 595 nm에서 분광측정기(DU[®]-70 Spectrophotometer, Beckman, USA)의 흡광도를 영점조정하였다.

2) BSA의 정량

BSA (1 mg/ml)를 각각 6.25 µl, 12.5 µl, 25 µl, 50 µl씩 취하고, 순서대로 증류수 43.75 µl, 37.5 µl, 25 µl, 0 µl씩 혼합하여 각각 50 µl의 표준용액을 만든 후, 희석된 염료 2.5 ml와 각각 혼합하여 10분간 반응시킨 후 595 nm에서 흡광도를 측정하여, BSA의 양을 수평축으로 하고 흡광도를 수직축으로 하는 표준 선형그래프를 그렸다. 그래프의 수식은 다음과 같았다.

$$\text{흡광도} = 0.02 \times \text{BSA의 양} (\mu\text{g})$$

3) 환자군과 대조군의 타액내 단백질의 정량

채취한 타액을 4°C에서 3,000 rpm으로 15분 동안 원심분리한 후 상층액에서 30 µl씩 취하고 각각 증류수 20 µl와 혼합하여 50 µl의 혼합용액을 만들었다. 희석된 염료 2.5 ml씩을 50 µl의 혼합용액에 섞어 10분간 반응시킨 후 595 nm에서 흡광도를 측정하였고 표준 선형그래프에 대입하여 단백질의 농도를 측정하였다. 타액시료 30 µl내에 함유되어 있는 단백질의 농도는 다음 공식에 의해 산출되었다.

$$\text{단백의 농도} (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = (\text{흡광도}/0.02) \div 30$$

라. Sialic acids의 정량

Sialic acids (N-acetyl-neuraminic acid ; AcNeu)의 농도를 Boehringer의 commercial kit (Boehringer Mannheim Biochemicals, Indiana-

polis, IN, USA)를 이용하여 제조자의 지시대로 측정하였다.

1) 시약을 이용한 흡광도 영점조정

증류수 0.02 ml 와 5 ml 완충액으로 용해된 시약 A 0.50 ml, 5 ml 완충액으로 용해된 시약 B 0.50 ml를 혼합하고 37°C에서 20분간 보온하였다. 세정액 2.00 ml를 혼합용액에 첨가하고 550 nm에서 분광측정기의 흡광도를 영점조정하였다.

2) 표준혈청에서의 흡광도 측정

1 ml 증류수로 용해된 0.02 ml 표준혈청과 5 ml 완충액으로 용해된 시약 A 0.50 ml, 5 ml 완충액으로 용해된 시약 B 0.50 ml를 혼합하고 37°C에서 20분간 보온하였다. 세정액 2.00 ml를 혼합용액에 첨가하고 550 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3) 환자군과 대조군 타액내의 sialic acids 정량
원심분리된 환자군과 대조군 타액의 상층액에서 각각 0.02 ml씩을 취하여 5 ml 완충액으로 용해된 시약 A 0.50 ml 및 5 ml 완충액으로 용해된 시약 B 0.50 ml와 혼합하고 37°C에서 20분간 보온하였다. 세정액 2.00 ml를 혼합용액에 첨가하고 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 타액내의 sialic acids의 농도는 다음 공식에 의해 산출되었다. 표준혈청내의 sialic acids 농도는 0.75 mg/ml이다.

$$\text{농도 (mg/ml)} = (\text{타액시료의 흡광도} / \text{표준혈청의 흡광도}) \times 0.75$$

마. 단백 젤을 이용한 단백질 외형비교 (Protein profile)

타액내 단백질의 전기영동은 Laemmli 등²⁰⁾의 방법에 의하여 시행되었다. 10% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE Standards, Bio-Rad, USA)로 30 mA에서 4시간 동안 전기영동하였다. 젤을 Coomassie[®] Brilliant Blue R-250으로 염색한 후 methanol 400 ml, acetic acids 80 ml, 증류수 400 ml로 이루어진 탈색용액에서 단백질 띠가 잘 확인될 때까지 탈색하였다.

바. 통계처리

SigmaStat[®] (Microsoft Corp., USA)을 이용하여 통계처리 및 분석을 시행하였으며 각 군간의 차이를 알아보기 위하여 Student t-test와 Mann-Whitney Rank Sum test를 이용하였다.

III. 결 과

1. HSV와 VZV DNA 발현도

289 bp 크기의 HSV DNA band는 구내 재발성 아프타성 궤양 환자군 표본 중 8개(34.78%)에서 양성되었고 대조군 표본 중 2개(10.00%)에서 양성으로 나타나 두 군간 유의한 차이가 없었고 (p>0.05), 224 bp 크기의 VZV DNA band는 환자군 표본 중 9개(39.13%)에서 양성되었고 대조군 표본 중 1개(5.00%)에서 양성으로 나타나 두 군간 유의한 차이가 있었다(p<0.01)(Figure 1, Table 1).

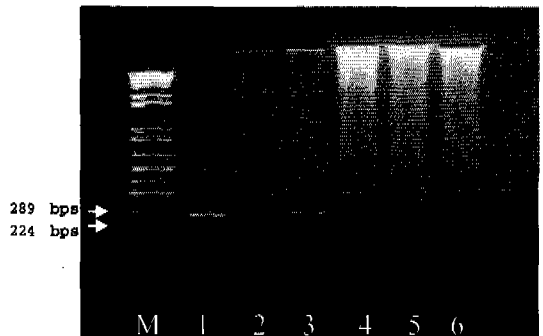


Figure 1. Electrophoresis of amplified DNAs showing the 289 bp and 224 bp DNA run on 2% agarose gel, stained with ethidium bromide and viewed under UV light. M, size marker ; lane 1, control for HSV DNA ; lane 2, control for VZV DNA ; lane 3, positive patient sample for HSV DNA ; lane 4, negative patient sample for HSV DNA ; lane 5, positive patient sample for VZV DNA ; lane 6, negative patient sample for VZV DNA.

Table 1. The proportion of patients with recurrent aphthous ulcer and control subjects with Herpes Simplex virus (289-bp band) and Varicella Zoster virus (224-bp band) detected by Polymerization Chain Reaction amplification

Group	n	HSV positive n (%)	VZV positive n (%)
Patients	23	8 (34.78) ^{NS}	9 (39.13)**
Control	20	2 (10.00)	1 (5.00)

NS : $p > 0.05$, ** : $p < 0.01$.

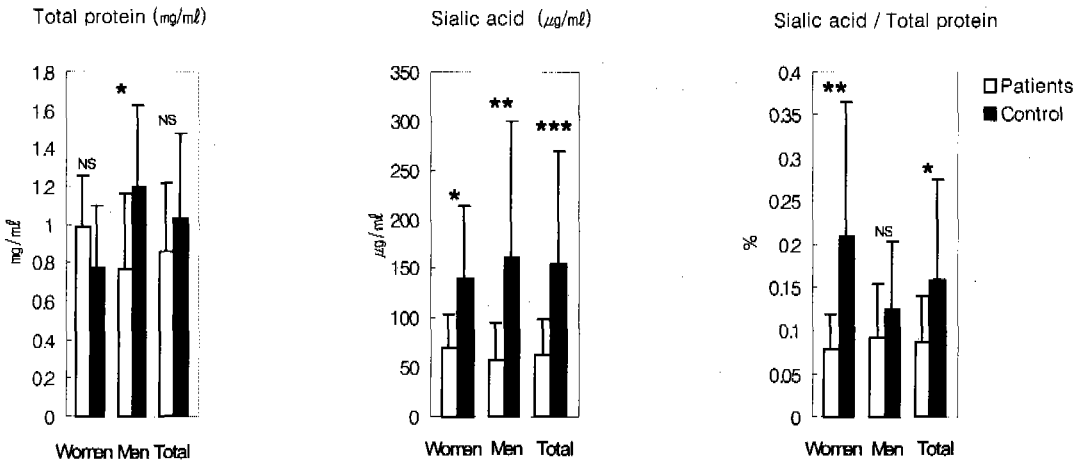
2. 타액내 단백질 및 sialic acids의 농도

무자극성 전타액내 총단백의 평균 농도는 전체 환자군에서 0.86 mg/ml, 전체 대조군에서 1.04 mg/ml로 이들 두 군간에는 유의한 차이가 없었으며($p > 0.05$), 여자 환자군에서 0.99 mg/ml, 여자 대조군에서 0.77 mg/ml로 역시 유의한 차이가 없었으나($p > 0.05$), 남자 환자군에서 0.76 mg/ml, 남자 대조군에서 1.20 mg/ml로 환자군에서 낮게 나타났다($p < 0.05$).

무자극성 전타액내 sialic acids의 평균 농도는 전체 환자군에서 63.70 $\mu\text{g/ml}$, 전체 대조군에서 153.76 $\mu\text{g/ml}$ 로 대조군에 비해 환자군의 평균 농

도가 낮았으며($p < 0.001$), 여자 환자군에서 70.81 $\mu\text{g/ml}$, 여자 대조군에서 139.98 $\mu\text{g/ml}$ 로 환자군에서 낮았고($p < 0.05$), 남자의 경우에도 환자군에서 58.22 $\mu\text{g/ml}$, 대조군에서 162.24 $\mu\text{g/ml}$ 로 환자군의 농도가 낮았다($p < 0.01$).

무자극성 전타액내 sialic acids 대 총단백의 평균 농도비는 전체 환자군에서 0.09%, 전체 대조군에서 0.16%로 환자군의 농도비가 낮았고($p < 0.05$), 또한 여자 환자군에서 0.08%, 여자 대조군에서 0.21%로 여자 환자군에서 낮았으나($p < 0.01$), 남자 환자군에서 0.09%, 남자 대조군에서는 0.13%로 군간 유의한 차이가 없었다($p > 0.05$)(Figure 2).



NS : $p > 0.05$, * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$.

Figure 2. The concentration of total protein and sialic acids and the proportional amount of sialic acids in unstimulated whole saliva.

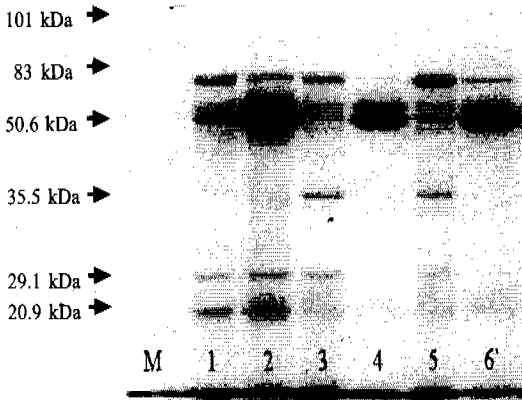


Figure 3. A protein profile from human saliva with recurrent aphthous ulcer and healthy subjects. M, molecular weight marker : Lane 1 and 3, women patients : Lane 2 and 4, women controls : Lane 5, men patient : Lane 6, men control.

3. 환자군과 대조군 간의 단백질 발현의 차이

Protein profile에서 50 kDa 근처에 나타나는 단백질 band의 발현은 환자군에서 적게 나타났으나 다른 band의 발현은 차이가 없었다(Figure 3).

IV. 총괄 및 고찰

구내 재발성 아프타성 궤양의 원인을 규명하기 위한 연구방법으로 혈액내의 세포, 면역적인 방법, 병소의 생검과 타액을 이용한 방법들이 주로 사용되고 있다. 이 중 타액은 genomic DNA를 추출하는 이상적인 원천으로 알려져 있다. 타액을 이용하는 방법은 값싸고 빠르며 신뢰성이 있고 안전하고 전염성이 없으며 혈액채취나 생검 등의 방법에 비해 피검자에 손상을 주지 않고 표본을 쉽게 얻을 수 있는 장점을 가져, 본 연구에서는 타액을 이용하였다. 또한 전타액을 채취하는 방법은 특정 이하선이나 악하선의 타액채취시 요구되는 특수한 장비 등이 필요하지 않고

피검자를 숙련시킬 필요가 없으며 적은 스트레스를 주면서 단순히 튜브에 뱉어내는 방법으로 일정 자극 없이 타액을 채취할 수 있다는 장점이 있다.

최근 들어 구내 재발성 아프타성 궤양의 감염성 원인요소로 HSV와의 연관성에 대한 연구가 활발히 진행되고 있는데, Pedersen²¹⁾은 구내 재발성 아프타성 궤양에서 임파구 독성이 증가하는 것은 자가면역반응의 특성이 아니라 바이러스에 감염된 세포에 대한 면역반응이라고 하였으며, HSV와 VZV의 재활성이 임파구 독성 증가의 가능한 원인이라고 주장하였다. 또한 재발성 아프타성 궤양의 생검조직에서 직접 VZV 항원이 검출되지는 않았으나, 모든 증례에서 PCR products가 양성으로 나타남으로써 VZV와의 연관성이 제기되기도 하였으며⁶⁾, ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)에 의한 specific VZV IgM과 CMV IgM에 대한 연구에서도 재발성 아프타성 궤양과 VZV와 CMV 감염과의 연관설을 제기하였다⁷⁾. Studd 등⁸⁾은 베체트 증후군 환자와 구내 재발성 궤양 환자에서 정상인에 비해 순환 단백질내 211-bp HSV-1 DNA fragment와 혈청내 anti-HSV-1 antibodies가 유의하게 많았다고 보고하였고, Lee 등²²⁾은 베체트 증후군 환자의 타액에서 HSV DNA를 검출하였으나 HSV DNA의 존재와 구내 궤양 사이의 유의성을 발견하지는 못하였다.

본 연구에서도 모든 환자에서 HSV와 VZV에 대한 PCR product가 양성으로 나타나지는 않았으나, HSV에서 34.78%와 VZV에서 39.13%가 양성으로 나타나 이 두 가지 바이러스가 구내 재발성 아프타성 궤양의 발생에 관여하는 것으로 사료된다. 그러나 병력과 증상이 없는 대조군에서도 소수이나 양성의 PCR product를 얻었으며, 환자군 중에서도 음성인 경우가 많아 HSV와 VZV가 구강내 궤양 자체를 발생시키는 데에 직접적인 영향을 주지는 않는 것으로 사료된다.

타액내에 함유되어 있는 당단백으로는 mucins, proline-rich glycoprotein, α -amylase, lactoferrin, salivary peroxidase, secretory IgA, fucose-rich protein, kallikrein 등이 있다²³⁾. 특히 mucin은 후

천성 범광질 박막을 형성하고, 저작시 운활작용을 하며, 다른 타액내 물질들과 상호작용하여 조직 보호기능을 강화시키고, 구강내 미생물의 집락형성을 조절하는 기능을 가지고 있어 구강내 연조직 및 경조직을 보호하는 매우 중요한 역할을 하고 있는 것으로 알려져 있다^{9,11,13,23,24}). Mucin은 크게 high molecular weight mucin (MG1)과 low molecular weight mucin (MG2)으로 구분되며^{23,24}), 이들은 각각 1,000 kDa 이상의 분자량과 200~300 kDa의 분자량을 가지며 3, 4, 6번 과당류 사슬 내에 각각 3.8%, 3.9%의 sialic acids를 함유하고 있다^{24,25}). 이와 같이 mucin은 분자량이 매우 크고 순수하게 추출할 수 있는 양에 한계가 있어 타액내의 모든 mucin을 추출할 수 없으므로, mucin 내에서 항상 존재하고 쉽게 그 양을 측정할 수 있는 sialic acids의 양을 측정함으로써 mucin의 양을 추정할 수 있다.

구강내 연조직 및 경조직의 보호기전에 중요한 역할을 담당하고 있는 mucin의 농도변화는 그 보호기전의 변화를 초래할 것이며, 여러 구강내 질환의 발생 및 경과와 밀접하게 연관되어 있을 것으로 사료된다. 따라서 본 연구에서는 타액내 mucin에 함유되어 있는 sialic acids의 농도를 측정하여 mucin의 농도를 추정함으로써 구내 재발성 아프타성 궤양과 mucin의 농도변화 사이에 어떠한 연관이 있는지 알아보려 하였다.

타액의 분비율이나 조성을 연구하는 데에 있어 몇 가지 고려해야 할 사항 중의 하나가 circadian rhythm인데, Ferguson과 그의 동료들²⁶⁻³⁰)에 의해 이루어진 일련의 연구들은 타액의 분비율이나 조성을 연구하는 데에 있어 유용한 기준을 제시해 주었다. 인간의 타액은 24시간을 하나의 주기로 하여 그 분비율이나 각 구성성분 개개의 농도가 일정한 곡선을 유지하며 변화하는데, 단순한 사인파(sine wave)의 형태로 대개 12시간 간격으로 최대치와 최소치가 나뉘지게 되며, 이러한 양상을 circadian rhythm이라고 한다²⁶⁻²⁸). Dawes³¹)는 자극성 이하선 타액내에서 단백질의 농도는 상당한 circadian rhythm을 보였으나 무자극성 전타액에서는 그렇지 않았다고 하였으며, Ferguson 등²⁶)도 자극성 이하선 타액

내 단백질의 rhythm이 상당함을 보고하였으며, 8시부터 10시 사이에 농도의 변화가 최고에 이른다고 하였다. 타액내 단백질의 농도는 다른 구성성분들과 달리 저녁시간에 최고치에 도달하며, 최고치와 최저치의 사이에서 측정이 이루어질 경우 그 변화의 폭이 증가하여 변이가 크게 나타날 수 있다고 보고되었다^{27,28}). Ferguson과 Botchway^{29,30})는 일련의 연구들을 종합하여 타액의 분비율이나 조성을 연구하는 경우 전타액을 사용하는 것이 유용하며, 단백질은 타액채취 후 변성되기 전에 즉시 분석할 것과 오후 시간의 중간이 타액채취시 적절한 시간이라고 추천하였다.

Ferguson¹⁴)은 생리적인 변이에 무자극성 전타액이 가장 적게 영향받는 것으로 보인다고 보고하여 무자극성 전타액이 임상적인 사용에 가장 선호된다고 제시하였다. 한편 Oberg 등³²)은 여러 생리적인 요인들로 인한 이하선 타액의 단백질 조성의 변화에 대하여 연구대상자 사이의 단백질 조성은 각각 다양하게 측정되었으며, 동일인에서도 휴식시 타액과 자극성 타액 사이의 유형이 서로 달랐다고 하였으나, 동일인에서 비슷한 분비율과 채취방법이 적용될 경우 단백질의 상대적 농도는 circadian 효과에 거의 영향받지 않았다고 보고하였다. 또한 Navazesh 등³³)과 Denny 등³⁴)은 젊은 연령층에서 보다 고령층의 타액에서 MG1, MG2의 농도가 낮다고 보고하였다.

이와 같이 타액의 분비율과 구성성분의 조성은 여러 요인에 의해 영향을 받는다. 본 연구에서는 가장 간편한 방법인 무자극성 전타액 채취를 시행하였고, 가능한 실험적 오류를 최소화하기 위하여 타액채취시 시간이 너무 경과하는 경우는 실험에서 제외시켰고, 타액채취 시각은 13시부터 16시까지로 한정시켰으며, mucin의 농도는 sialic acids와 총단백의 상대적 비율을 통해 비교하였으며, 환자군과 대조군은 서로 비슷한 연령으로 대응시켜 비교하였다.

Tammiala-Salonen과 Söderling¹⁷)은 구강작열감 증후군 환자의 타액내 총단백의 농도와 mucin의 농도를 반영할 수 있는 sialic acids 대 총단백의 농도비를 측정된 결과, 구강작열감 증후군 환자 남, 녀 모두에서 타액내 sialic acids

대 총단백의 평균 비율이 정상인보다 다소 높았으나 유의한 차이는 없었으며, 다만 대조군에 비하여 구강작열감 증후군을 가진 여성의 자극성 전타액내 총단백의 양이 유의하게 적다고 하였다. 이는 갈바닉 통증과 유사한 구강내 증상을 가진 환자의 이하선 전타액내 단백질의 농도가 대조군보다 유의하게 높다는 Syrjänen 등³⁵⁾의 이전의 보고와 일치하지 않았으며, 또한 총단백내 sialic acids의 상대적인 농도가 구내 재발성 아프타성 궤양 환자군에서 대조군에 비해 유의하게 낮은 본 연구의 결과와도 일치하지 않았다. 이는 구강작열감 증후군의 경우 구내 아프타성 궤양에서와 같은 구강점막의 파괴가 없어 타액의 보호기능이 서로 차이가 나기 때문인 것으로 사료된다. 한편 Lehner와 Adinolfi³⁶⁾는 재발성 구내 궤양과 베체트 증후군 환자의 혈액내 acute phase protein, factor B, lysozyme의 농도 변화를 연구한 결과, C9만이 양측 모두, 대조군에 비해 유의하게 높게 검출되었다고 보고하였으나 베체트 증후군의 경우 여러 조직에 병소를 가지며 궤양을 가지기도 하고 궤양이 발생하지 않는 환자들도 있어 구내 아프타성 궤양 환자와의 비교는 어려울 것으로 사료된다.

구내 재발성 아프타성 궤양 환자의 mucin 농도에 대한 이전 연구들이 많지 않으므로 본 연구 결과와 직접적인 비교는 어려우나, 본 연구 결과 환자군의 타액내 총단백량과 sialic acids의 양이 대조군에 비해 적어 구강내 궤양의 발생은 타액내 단백질량과 타액내 mucin의 농도 감소와 관련이 있는 것으로 사료된다. 또한 타액내 단백질의 전기영동으로 관찰할 수 있는 protein profile은 재발성 아프타성 구내염과 구강작열감 증후군에 대한 이전 연구들의 경우 대조군과 차이가 없었으나^{16,17,37)} 본 연구 결과 ovalbumin 근처의 50 kDa 정도의 분자량을 갖는 부분의 band가 대조군에 비해 환자군에서 적게 나타나는 특징을 관찰할 수 있었다. 이로 보아 환자군에서 단백질이 적게 나타난 것은 50 kDa 정도의 단백질이 적은 것과 연관이 있으며, 이 단백질의 부족이 구내 재발성 아프타성 궤양의 발생에 영향을 줄 수 있을 것으로 추정된다. 앞으로 실험실적인 모델의 개

발과 더불어 환자군과 대조군 간에 차이를 보이는 단백을 추출하여 구성성분 및 기능을 확인하는 연구가 계속되어야 할 것으로 사료된다.

V. 결 론

구내 재발성 아프타성 궤양 환자의 원인요소 중 Herpes Simplex virus와 Varicella Zoster virus와의 관련성을 규명하고, 궤양 발생시 타액내 단백질과 mucin 양의 변화에 따른 타액내 요인을 알아내기 위하여, 타액내에서 genomic DNA를 추출하여 Polymerization Chain Reaction을 이용, 두 가지 바이러스의 발현을 확인하고, 타액내 함유된 총단백과 sialic acids의 양을 측정하고, 단백을 전기영동하여 궤양 발생시의 타액내 단백질량과 mucin 양의 변화와 protein profile을 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

구내 재발성 아프타성 궤양 환자의 표본 중 39.13%에서 224 bp 크기의 VZV DNA band가 발현되어 대조군에 비하여 발현빈도가 높았으나 ($p < 0.01$), HSV의 경우 두 군간 유의한 차이가 없었다 ($p > 0.05$).

무자극성 전타액내 총단백의 평균 농도는 남자에서 환자군이 대조군에 비하여 낮았으나 ($p < 0.05$), 전체 환자군과 전체 대조군 사이에서, 여자에서는 두 군간에 유의한 차이가 없었다 ($p > 0.05$).

무자극성 전타액내 sialic acids는 모든 군에서 대조군에 비하여 환자군의 평균 농도가 유의하게 낮았다 ($p < 0.05$).

무자극성 전타액내 sialic acids 대 총단백의 농도비는 전체 두 군간 ($p < 0.05$)에서 그리고 여자의 두 군간 ($p < 0.01$)에서 환자군이 유의하게 낮았으나, 남자의 두 군간에서는 유의한 차이가 없었다 ($p > 0.05$).

Protein profile에서 50 kDa 근처에 나타나는 단백질 band의 발현이 환자군에서 적게 나타났으나 다른 band의 발현은 차이가 없었다.

이상의 결과로 구내 재발성 아프타성 궤양의

발생에는 타액내 HSV와 VZV 같은 바이러스성
원인요소와 총단백량 및 mucin 양의 감소가 관
련되어 있을 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Axell T, Henricsson V : The occurrence of recurrent aphthous ulcers in an adult Swedish population. *Acta Odontol Scand*, 43: 121-125, 1985.
2. Embil JA, Stephens RG, Manuel FR : Prevalence of recurrent herpes labialis and aphthous ulcers among young adults on six continents. *Can Med Assoc J*, 113: 627-630, 1975.
3. Scully C, Porter SR : Recurrent aphthous stomatitis: current concepts of etiology, pathogenesis and management. *J Oral Pathol Med*, 18: 21-27, 1989.
4. Woo SB, Sonis ST : Recurrent aphthous ulcers: a review of diagnosis and treatment. *J Am Dent Assoc*, 127: 1202-1213, 1996.
5. Eglin RP, Lehner T, Subak-Sharp JH : Detection of RNA complementary to herpes-simplex virus in mononuclear cells from patients with Behçet's syndrome and recurrent oral ulcers. *Lacet*, 2: 1356-1360, 1982.
6. Pederson A, Madsen HO, Faber Vestergaard B, Ryder LP : Varicella-zoster virus DNA in recurrent aphthous ulcers. *Scand J Dent Res*, 101: 311-313, 1993.
7. Pedersen A, Hornsleth A : Recurrent aphthous ulceration: a possible clinical manifestation of reactivation of varicella zoster or cytomegalovirus infection. *J Oral Pathol Med*, 22: 64-68, 1993.
8. Studd M, McCance DJ, Lehner T : Detection of HSV-1 DNA in patients with Behçet's syndrome and in patients with recurrent oral ulcers by the polymerase chain reaction. *J Med Microbiol*, 34: 39-43, 1991.
9. Mandel ID : The functions of saliva. *J Dent Res* 1987. 66: 623-627,
10. Winet H : Ciliary propulsion of objects in tubes: wall drag on swimming Tetrahymena (Ciliata) in the presence of mucin and other long-chain polymers. *J Exp Biol*, 64: 283-302, 1976.
11. Tabak LA, Levine MJ, Mandel ID, Ellison SA : Role of salivary mucins in the protection of the oral cavity. *J Oral Pathol*, 11: 1-17, 1982.
12. Adams D : The effect of saliva on the penetration of fluorescent dyes into the oral mucosa of the rat and rabbit. *Arch Oral Biol*, 19: 505-510, 1974.
13. Heineman HS, Greenberg MS : Cell-protective effect of human saliva specific for herpes simplex virus. *Arch Oral Biol*, 25: 257-261, 1980.
14. Ferguson DB : Current diagnostic uses of saliva. *J Dent Res*, 66: 420-424, 1987.
15. Mandel ID : The diagnostic uses of saliva. *J Oral Pathol Med*, 19: 119-125, 1990.
16. Wu-Wang CY, Patel M, Feng J, Milles M, Wang SL : Decreased levels of salivary prostaglandin E₂ and epidermal growth factor in recurrent aphthous stomatitis. *Arch Oral Biol*, 40: 1093-1098, 1995.
17. Tammiala-Salonen T, Söderling E : Protein composition, adhesion, and agglutination properties of saliva in burning mouth syndrome. *Scand J Dent Res*, 101: 215-218, 1993.
18. 유근춘, 윤창록 : 구강케양 환자의 타액내 면역글로불린 A의 농도. *대한구강내과학회지*, 19: 117-123, 1994.
19. Bradford MM : A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72: 248-254, 1976.
20. Laemmli UK : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685, 1970.
21. Pedersen A : Are recurrent oral aphthous ulcers of viral etiology? *Med Hypotheses*, 36: 206-210, 1991.
22. Lee S, Bang D, Cho YH, Lee ES, Sohn S : Polymerase chain reaction reveals herpes simplex virus DNA in saliva of patients with Behçet's disease. *Arch Dermatol Res*, 288: 179-183, 1996.
23. Levine MJ, Reddy MS, Tabak LA et al. : Structural aspects of salivary glycoproteins. *J Dent Res*, 66: 436-441, 1987.
24. Slomiany BL, Murty VL, Piotrowski J, Slomiany

-
- A : Salivary mucins in oral mucosal defense. *Gen Pharmacol*, 27: 761-771, 1996.
25. Slomiany BL, Murty VL, Slomiany A : Structural features of carbohydrate chains in human salivary mucins. *Int J Biochem*, 25: 259-265, 1993.
26. Ferguson DB, Fort A, Elliott AL, Potts AJ : Circadian rhythms in human parotid saliva flow rate and composition. *Arch Oral Biol*, 18: 1155-1173, 1973.
27. Ferguson DB, Fort A : Circadian variations in human resting submandibular saliva flow rate and composition. *Arch Oral Biol*, 19: 47-55, 1974.
28. Ferguson DB, Botchway CA : Circadian variations in flow rate and composition of human stimulated submandibular saliva. *Arch Oral Biol*, 24: 433-437, 1979.
29. Ferguson DB, Botchway CA : Circadian variations in the flow rate and composition of whole saliva stimulated by mastication. *Arch Oral Biol*, 24: 877-881, 1979.
30. Ferguson DB, Botchway CA : A comparison of circadian variation in the flow rate and composition of stimulated human parotid, submandibular and whole salivas from the same individuals. *Arch Oral Biol*, 25: 559-568, 1980.
31. Dawes C : Circadian rhythms in human salivary flow rate and composition. *J Physiol*, 220: 529-545, 1972.
32. Oberg SG, Izutsu KT, Truelove EL : Human parotid saliva protein composition: dependence on physiological factors. *Am J Physiol*, 242: G231-236, 1982.
33. Navazesh M, Mulligan RA, Kipnis V, Denny PA, Denny PC : Comparison of whole saliva flow rates and mucin concentrations in healthy Caucasian young and aged adults. *J Dent Res*, 71: 1275-1278, 1992.
34. Denny PC, Denny PA, Klauser DK et al. : Age-related changes in mucins from human whole saliva. *J Dent Res*, 70: 1320-1327, 1991.
35. Syrjänen S, Piironen P, Yli-Urpo A : Salivary content of patients with subjective symptoms resembling galvanic pain. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 58: 387-393, 1984.
36. Lehner T, Adinolfi M : Acute phase proteins, C9, factor B, and lysozyme in recurrent oral ulceration and Behçet's syndrome. *J Clin Pathol*, 33: 269-275, 1980.
37. Lundy FT, Al-Hashimi I, Rees TD, Lamey PJ : Evaluation of major parotid glycoproteins in patients with burning mouth syndrome. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 83: 252-258, 1997.

- ABSTRACT -

Detection of Viruses and Changes of Protein of Saliva in Patients with Recurrent Aphthous Ulcer

Sang-Bae Park, D.D.S.*, Byung-Gook Kim, D.D.S., M.S.D.*,
Jeong-Sik Bae, D.D.S., M.S.D., Ph.D.**

Dept. of Oral Medicine and Prosthodontics**, School of Dentistry, Chonnam National University*

This study was performed to discover the underlining influences of Herpes Simplex virus (HSV) and Varicella Zoster virus (VZV), to detect the changes of whole protein and mucin level and to observe protein profiles in the saliva when recurrent aphthous ulcer (RAU) was present. Unstimulated whole saliva was collected from 23 patients who for over three years had a clinical history of RAU, in a group of 10 women and 13 men, ranging from 11 to 72 years of age, and 20 healthy subjects, in a group of 8 women and 12 men, who did not have the symptoms nor a past history of RAU. Through the means of Polymerization Chain Reaction, genomic DNA from the HSV and VZV was purified from the saliva samples for identifying precisely the two types of viruses, and the level of whole protein and sialic acids in the saliva and the ratio of sialic acid to whole protein were measured, and SDS-polyacrylamide gel electrophoresis was performed.

The results obtained were as follows ;

1. 39.13% of patients showed 224 bp bands of VZV DNA, those were appeared more in patients than in control group ($p < 0.01$), but there was no significant difference between patients and control group in HSV DNA ($p > 0.05$).
2. The concentration of whole protein in men patients was lower than in men control group ($p < 0.05$), but there were no significant differences between patients and control in other groups ($p > 0.05$).
3. The concentration of sialic acids from patients was lower than control group in all groups ($p < 0.05$).
4. The concentration of sialic acids in proportion to that of whole protein was lower in patients than in control group ($p < 0.05$), and in the two women groups ($p < 0.01$), but no noticeable difference was found between the two men groups ($p > 0.05$).
5. There were no consistent differences observed in the protein profiles of patients with control group except that certain protein bands near 50 kDa was lower in patients than in control group.

These results suggest that viruses such as HSV and VZV and reduction of salivary whole protein and mucin levels are related to development of RAU.

Key words : RAU, saliva, HSV, VZV, sialic acid, total protein