

세균에 노출된 말초혈액 단핵구에서 Interleukin-8과 Monocyte Chemoattractant Protein-1의 형성에 관한 연구

이정민 · 임미경

원광대학교 치과대학 치과보존학교실

ABSTRACT

PRODUCTION OF INTERLEUKIN-8 AND MONOCYTE CHEMOATTRACTANT PROTEIN-1 BY PERIPHERAL BLOOD MONOCYTES STIMULATED WITH MICROBES

Jung-Min Lee, D.D.S., Mi-Kyung Im, D.D.S., M.S.D., Ph.D.

Department of Conservative Dentistry, College of Dentistry, Wonkwang University

The recruitment of leukocytes to a site of inflammation is dependent on a complex interplay of a number of cytokines. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) is a potent chemoattractant for monocytes, whereas interleukin-8 (IL-8) has chemotactic activity for neutrophils, lymphocytes, and basophils. The purpose of this study was to determine the effects of several microbes found in infected root canal systems on the production of inflammatory cytokines, interleukin 8 and monocyte chemoattractant protein-1 from human peripheral blood mononuclear cells (PBMC).

Monocytes isolated from peripheral blood were stimulated by group A streptococci (GAS, ATCC 19615), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Streptococcus mutans* (ATCC 10449), *Streptococcus sanguis* (clinical isolate), and *Candida albicans* (ATCC 90029) respectively.

Each of these bacteria induced dose-dependent induction in IL-8 and MCP-1 determined by ELISA. IL-8 production by each bacteria was decreased in the range of the microbe-to-PBMC ratios of 0.1-1.0. Group A streptococci was the weak inducer of MCP-1 production.

These results suggest that different oral pathogens induce specific dose-dependent patterns of cytokine release. Such patterns may provide a means of control of the type of immune cells particularly with regard to inflammatory leukocyte recruitment.

Key Words : Microbe, Monocyte, IL-8, MCP-1

I. 서 론

세균의 감염으로 인한 치수의 괴사는 근관계에 여러 염증성 산물을 축적시키며, 세균의 항원에 노출된 염증성 치수에서 초기에 면역 반응이 유발된다¹⁾. 사람의 치수 및 치근단 병소에서 분리되는 여러 세균 및 이의 산물이 치근단 병소의 생성에 기여한다고 보고되었다²⁾. 이러한 치수의 자극물은 치근단 조직으로 유출되어 치근단 조직에 염증이 유발하고 치근단 하방의 골이 흡수되는데³⁾, 이러한 흡수의 기전에

대하여는 파골세포의 작용에 의한 것으로 알려져 있으나, 세균에 의한 감염과 골의 흡수라는 두 가지 단계의 반응을 매개하는 물질에 대하여는 아직 명확하게 밝혀져 있지 않다⁴⁾. 세균의 성분 자체에 의하여도 골의 흡수가 일어나지만, 이는 미약하게 일어나며⁵⁾ 염증성 흡수와 연관된 기전에 의해서도 골의 흡수가 일어난다고 보고되고 있다⁶⁾. 또한 최근의 연구에 의하면 면역 세포가 형성하는 cytokine이라는 물질에 의하여 골의 흡수 병소가 생성되는 것으로 알려지고 있다⁷⁾. 치근단 병소가 있는 부위에는 많은 수의 만성 염증 세

포가 있으며 이들 세포에서 interleukin-1과 tumor necrosis factor (TNF- α)와 같은 강력한 골 흡수 cytokine을 분비한다^{8,9)}.

염증 및 이에 수반되어 조직이 손상되면 중성구가 침윤된다. 또한 이 중성구는 cytokine 매개체의 형성을 증가시키고 산화적인 방어 기전을 활성화시켜서 숙주 반응을 조절한다¹⁰⁾. 조직에서 중성구가 침입하는 것이 반드시 조직의 손상을 의미하는 것은 아니며, 혈액 투석을 받는 환자에서 보체가 활성화되면 중성구의 침윤이 가역성이라는 것이 보고된 바 있다¹¹⁾. 중성구는 이전에는 최종적으로 분화되어 생합성적인 활성이 감소된 세포로서 간주되어 왔으나, 최근에는 혈소판 활성 인자, interleukin (IL)-1, IL-8, tumor necrosis factor- α , granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF)와 transforming growth factor- α 와 - β 등을 포함하는 여러 가지 세포 조절 물질을 합성하는 것으로 알려졌다¹²⁾.

Chemokine은 주성을 갖는 cytokine으로서 최근에 분류되었으며, 다른 전통적인 cytokine과는 달리 비교적 고도의 특이성을 갖는다¹³⁾. 단핵구 대식 세포는 interleukin-8과 monocyte chemoattractant protein-1이 생성되는 주요한 세포이다^{14,15)}. 그러나, 이들 chemokine은 여러 자극에 의하여 섬유아세포 및 혈관내피세포 등 면역 세포가 아닌 세포에서도 생성된다²⁾.

또한 단핵구에서 생성되는 cytokine은 치수의 섬유아세포와 같은 세포에서 세균의 침입에 대하여 chemokine을 생성하는 중요한 매개 역할을 담당한다¹⁶⁾. MCP-1은 치은의 염증과 근관 기원의 병소와 연관된 골의 염증 병소와 같은 세균성 감염에서 발현되었다^{17,18)}. IL-8은 중성구를 자극하는 chemokine으로서 중성구를 병소 부위로 소환하고 활성화시키는 다양한 생물학적 효과를 나타낸다¹⁹⁾. 이에 비하여 MCP-1은 단핵구를 병소 부위로 불러들이는 주성을 나타내지만, 중성구에 대해서는 이러한 효과를 나타내지 않는다¹⁷⁾. 단핵구에서 생성되는 cytokine은 치은의 섬유아세포와 같은 다른 세포가 세균의 침입에 대하여 chemokine을 형성하도록 유도하는 중요한 역할을 담당한다²⁰⁾.

*Streptococcus mutans*는 그람 양성 세균으로서 치태의 주요한 성분이며 치근단 조직의 염증 반응에도 기여할 수 있다²¹⁾. *Candidia albicans*는 구강의 칸디다증의 주요 원인이 되며 후천성 면역 결핍증 환자와 같은 면역 기능이 저하된 환자에서 자주 발견된다. Group A streptococci는 소아 인두염의 주요 원인균이며, 급성 류마티스열과 급성사구체신염 등의 후유증을 유발하는 균주로 알려져 있다²²⁾.

본 연구는 구강 및 전신의 질환의 원인이 될 뿐 아니라, 감염된 근관에서 자주 분리되는 통성 혐기성 세균인 group A streptococci, *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Streptococcus mutans* (ATCC 10449), *Streptococcus sanguis* (임상 분리 균주)와 *Candida albicans* (ATCC

90029)를 사람의 말초 혈액에서 분리한 단핵구에 자극시켜서, 이들 단핵구가 IL-8 및 MCP-1을 생성하는 능력을 관찰함으로써, 이들 세균이 원인이 되는 질환 및 치근단 병소에서 백혈구의 소환에 연관된 병인 및 기전을 연구하고자 하였다.

II. 실험 재료 및 방법

1. 균 주

구강 내에서 자주 분리되는 group A streptococci (GAS, ATCC 19615), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Streptococcus mutans* (ATCC 10449), *Streptococcus sanguis* (임상 분리 균주) 및 *Candida albicans* (ATCC 90029)를 대상으로 하였다. 냉동 보관하였던 균들을 혈액 한천배지에 접종한 후 Todd-Hewitt 액체배지에서 하룻밤 배양하였다. *C. albicans*를 제외한 세균들은 인산완충용액 (pH 7.2)으로 2회 세척한 후 10분간 끓는 물에 노출시켰다. 다시 인산완충용액으로 3회 세척한 후 탁도계(VITEK Colorimeter, Hach Company, Loveland, Colo)로 McFarland 0.5의 탁도로 세균의 수를 조정하였다. 이는 약 10^8 /mL의 균 수에 해당한다. *C. albicans*는 인산완충용액으로 2회 세척한 후 65°C에 30분간 노출시킨 후 인산완충용액으로 5회 세척하였다. McFarland 3의 탁도로 균 수를 조정하였는데, *C. albicans*는 균이 크기 때문에 이 정도의 탁도가 약 10^8 /mL의 세균의 수에 해당한다. 인산완충용액을 사용하여 10배씩 계단 희석하여 균 수를 10^4 /mL까지 만들었다. 균은 사용하는 당일 제조하여 즉시 사용하였다.

2. 말초혈액 단핵구 세포 분리

세 명의 자원자로부터 약 20mL씩 채혈하여, 방부제가 들어있지 않은 heparin (20units/mL blood) 튜브에 넣고 잘 혼합하였다. 생리식염수를 동량 섞어 혈액을 희석한 후 비중(s.g.)이 1.077인 Ficoll-Paque (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)이 든 원추형 튜브에 2 : 1의 비율로 중첩하였다. 1,500rpm에서 30분간 원심 분리한 후 Ficoll-Paque보다 위층에 형성된 단핵구 층을 Pasteur 피펫을 이용하여 조심스럽게 분리하였다. RPMI 1640 배지(Gibco BRL Life Technologies, Madison, Wis)를 이용하여 2회 세척한 후 hemocytometer (Cambridge Instruments Inc., Buffalo, N.Y.)를 이용하여 세포의 수를 5×10^6 /mL로 조정하였다.

3. 세균을 이용한 단핵구 자극

앞에서 준비한 단핵구를 96-well microplate (Nunc,

Roskilde, Denmark)에 100 μ 씩 분주하여 세포의 수를 각 well당 5 \times 10⁵/mL로 조정하였다. 세균은 50 μ 씩 분주하여 첫 well이 5 \times 10⁵/mL이 되도록 하였고, 이후 네 well은 10배씩 세균의 수가 감소하여, 세포수:균수의 비율이 1:1, 10:1, 100:1, 1,000:1과 10,000:1의 다섯 가지 조건으로 하였고, 균이 들어가지 않는 음성대조군으로는 RPMI 1640 액체배지를 사용하였다. 2% RPMI를 100 μ 씩 첨가한 후, 37 $^{\circ}$ C CO₂ 배양기에서 24시간 동안 배양하였다.

4. ELISA를 이용한 IL-8과 MCP-1 측정

Endogen Human IL-8과 MCP-1 ELISA 키트 (Wobrun, MA)을 이용하여 sandwich법으로 IL-8과 MCP-1을 측정하였다. IL-8 ELISA는 먼저 세균에 24시간 동안 노출된 단핵구 상층액 50 μ 를 단클론성 IL-8 항체가 코팅된 microwell에 접종하고 커버를 씌운 후 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 세척용액으로 3회 세척한 후 biotinlyated antibody 50 μ 를 각 well에 넣었다. 역시 실온에서 1시간동안 방치한 후 3회 세척하고, streptavidin-HRP 희석액을 100 μ 씩 넣은 후 실온에서 30분간 반응시켰다. 세척 후 TMB 기질용액을 100 μ 씩 넣고 실온에서 30분간 발색시킨 후, stop 용액 100 μ 를 넣어 발색반응을 종료시켰다. 30분이내에 ELISA Reader (Dynatech Laboratories Inc., Model MR700, Chantilly, VA)를 이용하여 450nm 단파장에서 흡광도를 측정하였다. 표준농도의 흡광도 (Fig. 1)와 비교하여, 각 시료의 IL-8 농도를 구하였다. MCP-1 ELISA도 앞의 IL-8과 방법은 거의 비슷한데, 처음에 biotinlyated antibody와 시료를 동시에 넣고, 실온에서 2시간 반응시키는 것이 다른 점이다.

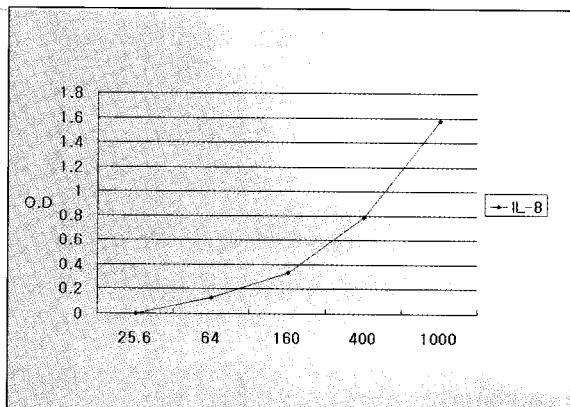


Fig. 1. Standard curve of optical density (O.D.) according to IL-8 level.

III. 실험 성적

Fig. 2는 group A streptococci (GAS), *E. faecalis*, *S. mutans*, *S. sanguis*와 *C. albicans*가 IL-8생성을 자극하였음을 나타내었다. GAS는 단핵구에 대한 세균의 비율이 0.0001에서 0.1까지 증가함에 따라 생성되는 IL-8의 양은 약간 증가되어 일정한 수준을 유지하다가 세균과의 비율이 1에서는 감소되어 나타났다. *E. faecalis*는 단핵구에 대한 세균의 비율이 0.0001에서 0.1로 증가함에 따라 IL-8의 생성량이 증가되었으나, 1의 비율로 증가되면 생성되는 IL-8의 양은 감소되었다. *S. mutans*는 단핵구에 대한 세균의 비율이 0.0001에서 0.001로 증가함에 따라 생성되는 IL-8의 양이 증가하다가 0.01-1로 세균의 비율이 증가하면 다시 감소되는 경향을 보였다. *S. sanguis*는 단핵구에 대한 세균의 비율이 0.0001에서 0.01로 증가함에 따라 생성되는 IL-8의 양이 증가하였으나, 0.1과 1로 세균의 비율이 증가하면서 감소되었다. *C. albicans*에서는 단핵구에 대한 세균의 비율이 0.0001에서 0.1로 증가함에 따라 생성되는 IL-8의 양이 증가하다가 1로 비율이 증가하면 감소되었다.

실험에 사용한 5가지 세균들은 단핵구에 대한 세균의 비율이 증가함에 따라 생성되는 IL-8의 양이 증가하다가 일정 비율 이상에서는 그 생성량이 감소하였다. 단핵구에 대한 세포의 비율에 따라 가장 많은 IL-8을 생성하는 세균이 다르게 나타났다. 즉 0.0001과 0.001에서는 *S. mutans*, 0.01에서는 *E. faecalis*, 0.1에서는 *C. albicans*, 그리고 1에서는 *E. faecalis*가 가장 많은 IL-8의 생성량을 보였으나, 통계학적인 차이는 나타나지 않았다.

이들이 생성한 IL-8의 양은 *C. albicans*가 세포와의 비율이 1일 때 생성한 41.0(ng/mL)과 0.1일 때 생성한 92.3 (ng/ml)에서만 통계적인 유의성이 인정되었다 ($p < 0.05$).

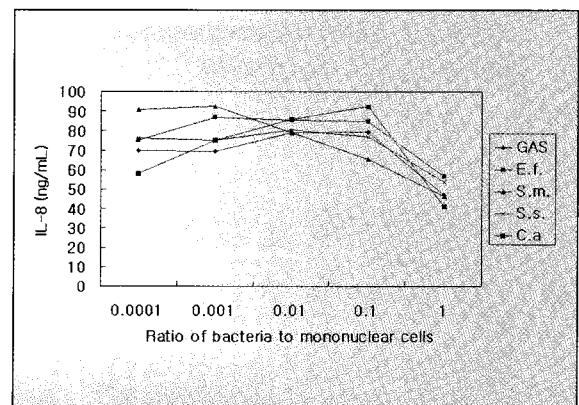


Fig. 2. IL-8 production was stimulated by group A streptococci(GAS), *E. faecalis*(E.f.), *S. mutans*(S.m.), *S. sanguis*(S. s.) and *C. albicans* (C.a.). Each datum points the mean of triplicate samples

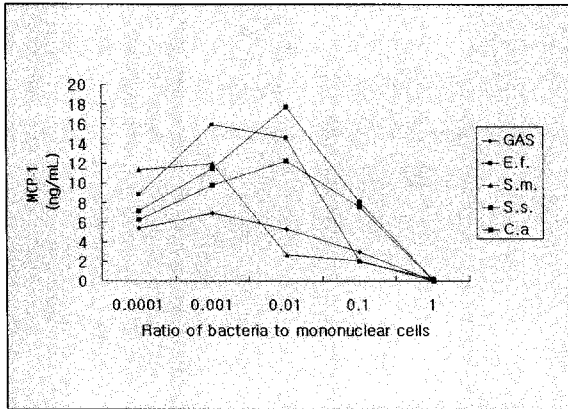


Fig. 3. MCP-1 production was stimulated by group A streptococci (GAS), *E. faecalis* (E.f.), *S. mutans* (S.m.), *S. sanguis* (S. s.) and *C. albicans* (C.a.). Each datum points the mean of triplicate samples.

Fig. 3은 GAS, *E. faecalis*, *S. mutans*, *S. sanguis*와 *C. albicans*가 MCP-1 생성을 유도하였음을 나타내었다. GAS는 단핵구에 대한 세균의 비율이 0.001로 증가함에 따라 생성되는 MCP-1의 양이 증가하다가 0.01과 0.1로 증가됨에 따라 감소하다가 그 비율이 1이 되면 MCP-1이 생성되지 않았다. *E. faecalis*는 단핵구에 대한 세균의 비율이 0.001로 증가하다가 0.01이 되면 약간 감소하기 시작하여 0.1이 되면 급격히 감소하고 그 비율이 1이 되면 MCP-1이 생성되지 않았다. *S. mutans*는 단핵구에 대한 세균의 비율이 0.001로 증가하면서 생성되는 MCP-1의 양이 증가하다가, 세균의 비율이 0.01로 증가하면서 감소되고 그 비율이 0이 되면 MCP-1이 생성되지 않았다. *S. sanguis*는 단핵구에 대한 세균의 비율이 0.01로 증가할 때까지는 생성되는 MCP-1의 양이 증가되다가 0.1~1로 증가하면서 감소되었다. *C. albicans*는 단핵구에 대한 세균의 비율이 0.01로 증가하면서 생성되는 MCP-1의 양이 증가하다가 그 비율이 0.1이 되면 생성되는 MCP-1의 양이 감소하다가 세포와의 비율이 1이 되면 MCP-1이 생성되지 않았다.

5가지 세균 모두 단핵구에 대한 세균의 비율이 증가함에 따라 생성되는 MCP-1의 양이 증가하다가 일정 비율이상에서는 생성되는 양이 감소되는 경향을 보였다. 즉 GAS와 *E. faecalis*와 *S. mutans*는 단핵구에 대한 세균의 비율이 0.01일 때 생성되는 MCP-1의 양이 감소되기 시작하는 반면, *S. sanguis*와 *C. albicans*에서는 0.1에서 생성되는 MCP-1의 양이 감소하였다. 단핵구에 대한 세포의 비율에 따라 가장 많은 MCP-1을 생성하는 세균이 다르게 나타났다. 즉 단핵구에 대한 세균의 비율이 0.0001에서는 *S. mutans*, 0.001에서는 *E. faecalis*, 0.01과 0.1에서는 *S. sanguis*가 가장 많은 양의 MCP-1을 생성하였다. 또한 그 비율이 1인 경우는 GAS, *S. mutans*와 *C. albicans*에서는 MCP-1이 생

성되지 않았고, *E. faecalis*와 *S. sanguis*에서는 미미한 양이 생성되었다. 이들이 생성한 MCP-1의 양은 *E. faecalis*가 세포와의 비율이 0.1일 때 생성한 2.0(ng/mL)과 0.01일 때에 생성한 14.6(ng/mL)에서 통계적으로 유의한 차이가 있었다. 또한 *S. mutans*가 세포와의 비율이 0.01일 때 생성한 2.7(ng/mL)과 0.001일 때에 생성한 12.0(ng/mL)에서도 유의한 차이가 인정되었다.

IV. 총괄 및 고찰

Takehashi 등의 고전적인 연구는 세균 감염과 치근단 부위 병소의 인과관계를 입증하였다. 노출되고 구강 환경으로부터 감염된 정상적인 쥐의 치수의 경우에는 치근단 하방에 병소가 형성되었으나, 무균인 쥐에서는 병소가 없었을 뿐만 아니라 상아질교 (dentin bridge)도 형성되어 감염되지 않은 치수에서는 경조직도 재생될 수 있음을 시사하였다²³. 세균 뿐 아니라 세균의 세포벽, LPS와 독소 등은 항원성이 강하여 숙주로부터 면역 반응을 촉진한다. 또한 이들 물질은 비특이적인 반응도 유발하는데, LPS는 대식 세포를 강력하게 자극하여 IL-1과 TNF와 같은 골 흡수 매개 물질을 분비하도록 한다²⁴. 또한 다형핵 백혈구는 세균으로부터 기인한 화학 주성 물질 및 항원-항체 반응에 의하여 활성화된 보체 성분에 의하여 감염 부위로 이동한다²⁵. 근관계에 형성된 항원-항체 복합체는 다형핵 백혈구가 매개하는 기전에 의하여 치근단 부위에서 골을 흡수하는 것으로 알려져 있다²⁶.

Cytokine은 염증 및 면역 반응에서 강력한 매개물로 알려져 있으나, 면역과 연관되지 않은 많은 반응에도 관여한다. 또한 cytokine은 여러 가지 세포를 활성화시키고 증식 시키며 분화시킬 뿐만 아니라, 항체 형성을 조절하거나 다른 cytokine의 분비를 조절함으로써 면역 반응의 강도와 기간을 조절한다. Cytokine은 분자량이 작은 단백질과 당단백질로서 아주 낮은 농도에서 호르몬과 같은 형태로 수용기에 결합함으로써 작용한다²⁷. Cytokine은 cytokine을 분비한 세포막위에 있는 수용기에 결합하여 작용하기도 하고, cytokine을 분비한 세포에 인접한 세포위의 수용기에 결합할 수도 있으며, 또는 호르몬과 같이 cytokine을 분비한 세포에서 멀리 떨어진 세포의 세포막에 있는 수용기에 결합하여 작용하기도 한다²⁸. Chemokine은 백혈구를 활성화하고 백혈구 주성에 작용하는 단백질이다. Chemokine은 70내지 90개의 아미노산으로 구성되어 있으며, α -chemokine (혹은 CXC chemokine)과 β -chemokine (CC chemokine)으로 분류된다²⁹. CXC chemokine은 주로 중성구를 활성화시키는 반면, CC chemokine은 주로 림프구, 단핵구, 호염구 및 호산구를 활성화시킨다. 가장 먼저 규명된 CXC chemokine은 platelet factor 4 (PF-4)이지만, 주로 연구된 것은 IL-8이다. IL-8은 원래 LPS 등으로 자극시킨 사람의 단핵구 배양액에서 분리되었고, 그후 섬유아세포, 상피

세포 등에서도 분리되었다³⁰⁾. IL-8은 중성구 형태 변화를 유발하며, actin의 중합을 유도한다³¹⁾. 또한 IL-8은 세포내 저장 소기관으로부터 단백질과 효소 등을 방출하여 CD11b/CD18과 CD11c/CD18 두 integrin 생성을 촉진하게 된다³²⁾.

CC chemokine에는 MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, MCP-1, MCP-2 와 MCP-3가 속한다. 그 중 잘 규명된 것은 MCP-1이며, 혈액 단핵구, 신경교종(glioma)과 골수구 세포주의 배양액에서 정제되었다³³⁾. MCP-1은 단핵구의 주 생성물이며 염증성 cytokine, PHA와 LPS의 존재하에서 과량 생산된다³⁴⁾.

말초 혈액의 단핵구 세포(monocyte)는 혈관으로부터 염증 부위로 이동해 와서 활성화되어(activation) 백혈구의 chemotaxin을 포함한 염증성 chemotaxin을 방출한다. 일단 방출되면 이러한 화학 주성(chemotactic) 인자는 다른 백혈구를 소환하여 염증 반응을 증폭시킨다. MCP-1과 IL-8은 아미노산 수준에서는 21%의 homology를 갖지만, MCP-1이 단핵구를 강력히 소환하는 반면, IL-8은 중성구, 림프구 및 호염구에 대하여 화학 주성을 나타낸다. 염증 부위에 특정한 면역 세포들을 소환함으로써 MCP-1과 IL-8이 염증 반응에서 나타나는 세포의 유형을 결정하는 주요한 역할을 담당한다³⁵⁾. 단핵구는 IL-1 β , TNF- α 를 포함하여 여러 가지 자극에 대하여 IL-8을 생성하는 것으로 알려져 왔다³⁶⁾. 그러나, 단핵구가 MCP-1을 생산하는 능력에 관해서는 논란이 있어왔다. 여러 가지 연구에서 MCP-1의 생성을 촉진하지 않는다는 연구³⁷⁾와 촉진한다는 연구³⁸⁾ 및 MCP-1의 생성을 억제한다는 연구³⁹⁾ 등 상반되는 결과가 발표되었다. IL- β 와 TNF- α 에 대해서 단핵구로부터 MCP-1이 형성되는지에 대하여도 서로 일치하지 않았다^{16,17)}. Leibler 등의 연구에서 혈액 중의 단핵구 세포가 phytohemagglutinin으로 자극을 받으면 IL-8과 MCP-1을 생성함을 보고하였다. 이러한 cytokine의 생성과 mRNA의 생성은 자극제의 양에 비례하였으며, IL-8의 mRNA의 유전자 발현이 나타난 3시간 후에야 MCP-1 유전자가 발현된다고 하였다⁴⁰⁾.

많은 염증 병소에서 먼저 중성구가 침윤된 후 이러한 단핵구와 림프구가 병소에 나타난다. 이러한 일정한 순서는 정확하게 조절되며 IL-8이나 MCP-1과 같은 화학 주성 cytokine이 순차적으로 발현됨으로써 일어난다⁴¹⁾. 사람에게서 기원된 거의 모든 세포는 배양시 IL-8을 생성하는 것으로 알려져 있다⁴²⁾.

4종의 연쇄구균과 *C. albicans*를 가열 처리한 후 단핵구와 림프구를 자극하여 24시간 후에 배양액에 분비된 IL-8과 MCP-1을 효소면역법으로 측정하였다. 근관 질환은 매우 서서히 진행하며, 골흡수가 일어나고 중성구 및 단핵구와 림프구의 침윤이 일어난다. 물론 근관 감염을 일으키는 세균은 *Porphyromonas*와 *Prevotella* 등 색소생성 혐기성 세균이 중요한 원인균이지만, 구강내 상재균으로 존재하는 연

쇄구균과 *C. albicans*도 근관염을 일으킬 수 있는 가능성이 있다고 사료된다. 동물 모델에서 이 균들을 실제로 감염시키고, 조직액에서 chemokine을 측정한다면 가장 이상적이겠지만 우선 시험관내 실험에서 이와 비슷한 상황에서 본 연구를 진행하였다. Jiang 등⁴³⁾은 단핵구와 림프구를 즉시 사용할 경우와 24시간 후 사용할 경우 chemokine 분비에 차이가 있다고 하였다. 이들 세포가 채혈되어 말초혈액으로부터 분리되는 과정에서 계속 자극을 받음으로써 그 과정 자체가 세포를 자극시킬 수 있기 때문에 림프구의 안정화를 위해 24시간 정도 필요하다고 하였다. 본 연구에서는 단핵구와 림프구는 따로 구분하여 사용하지 않았고, 말초혈액으로부터 분리한 세포를 24-well microplate에 분주한 후 즉시 가열, 세척한 세균액을 농도별로 노출시켰다. 안정화되기 전 단계에서의 단핵구와 림프구의 세균에 대한 반응도 의미있을 것으로 사료되며, 두 모델 중 어느 것이 더 실제 동물모델이나 사람에서의 감염과 더 일치하는지는 추후 연구가 필요할 것으로 사료된다.

저자는 다섯 가지의 세균에서 유의하게 IL-8과 MCP-1 분비의 차이를 기대하였지만, 유의한 차이는 관찰되지 않았다. IL-8의 경우 단핵구 세포와 세균의 비율이 0.0001에서 0.1까지 달라져도 분비 농도에는 유의한 차이가 없이 58-93ng/mL의 비슷한 범위를 보였고, 비율이 1인 경우 IL-8의 농도가 41~54ng/mL로 약간 낮아졌지만 통계적으로 유의한 차이는 없었다. 반면 MCP-1은 IL-8에 비하여 분비 농도가 20ng/mL 이하로 매우 낮았고, 단핵구 세포와 세균의 비율이 0.1인 경우 10ng/mL 이하로 낮았으며, 비율이 1인 경우 MCP-1이 거의 검출되지 않았다. 이러한 결과로부터 첫째 세포가 일시적으로 세균에 노출되면 세포에서 생산할 수 있는 cytokine의 양이 제한될 수 있다고 가정할 수 있고, 둘째 세포와 반응하는 세균의 최적 농도가 다르다고 볼 수 있다. IL-8은 세포수와 세균의 비율이 0.0001에서도 다량 생산되었고, MCP-1의 경우 0.001 비율에서 가장 많이 생산되었다. 이는 이들 연쇄구균이나 *C. albicans*가 매우 소량만 존재해도 세포를 충분히 자극시켜 cytokine을 형성하게 할 수 있음을 알 수 있다. 그리고 이러한 cytokine의 양은 반드시 세균 수에 비례하지 않음을 알 수 있었다. 오히려 세균수가 세포수에 비하여 일정한 수 이상으로 많아지면 cytokine 농도가 낮아지거나 아예 분비되지 않아 세포의 면역반응에 장애가 있음을 알 수 있었다.

효소면역법은 비교적 방법이 표준화되어 있고, ng 혹은 pg 단위의 미량까지 측정할 수 있는 예민한 검사법이지만 특이도가 낮고 발색이 약한 경우에는 직선성이 없어져 그 데이터를 신뢰하기 어렵다. 반면 발색 정도가 너무 높은 단계에서는 농도를 정확히 계산하기 어려워 직선성이 있는 범위까지 검체를 희석하여 사용하였다. 효소면역법은 상품화된 키트를 사용할 경우 반자동화된 세척 및 분광광도계를 사용하여 많은 검체를 신속히 처리할 수 있는 장점이 있는 반

면, 단일클론성 항체의 가격이 고가여서 반복검사에 어려움이 있다. 본 연구에서는 먼저 표준농도의 IL-8과 MCP-1로 직선성을 확인한 후 시료에서의 농도를 3회 반복하여 측정하였다.

결론적으로 여러 가지 세균에 대한 단핵구의 반응은 세균수에 따라 적합한 비율이 있었고, 세균 수가 많아진다고 단핵구의 cytokine의 생성량이 많아지지 않는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과로부터 인체내에서 병원균에 대한 반응은 세균의 종류와 함께 세균의 양이 중요한 역할을 함을 알 수 있었다. 이러한 반응이 *porphyromonas*나 *prevotella* 등 혐기성 세균에서는 어떻게 일어나는지 살펴보고, 중성구에서의 반응에 대해서도 추후 연구가 더 필요하며, 세균에 대한 숙주의 면역반응에 대한 연구가 다양화되고 심화되어야 하겠다. 아울러 치근단 세포를 일차 배양하여 세균이나 여러 가지 독성 물질에 노출시켜 면역학적 반응을 관찰한다면, 인체내 면역반응을 이해하는데 큰 도움이 될 것으로 사료된다.

V. 결 론

세균이 치수를 감염시켜 염증성 치근단 병소를 생성하는 과정에서 백혈구의 소환과 이에 연관된 cytokine의 관계를 연구하기 위하여 감염 근관계에서 발견되는 세균인 group A streptococci (GAS, ATCC 19615), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Streptococcus mutans* (ATCC 10449), *Streptococcus sanguis* (임상 분류 균주)와 *Candida albicans* (ATCC 90029)를 사람의 말초 혈액에서 분리된 단핵구에 감염시켜서 이들 단핵구가 염증성 cytokine인 interleukin-8과 monocyte chemoattractant protein-1의 생성을 연구하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

IL-8과 MCP-1을 생성하는 능력은 감염시킨 세균의 세포에 대한 비율에 따라 달랐다. 실험에 사용한 모든 세균에서 세균에 대한 세포의 비율이 0.1~1의 범위에서는 생성되는 IL-8의 양은 감소하였다. group A streptococci는 MCP-1을 생성을 유발하는 능력은 약하였다.

감염근관에서 발견되는 세균은 각각 다른 정도로 농도와 연관되어 cytokine을 분비하여 염증성 백혈구를 병소부위에 소환하는데 기여하는 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Warfvinge J, Dahlen G, and Bergenholtz G. Dental pulp response to bacterial cell wall material. J Dent Res 64:1046-1050, 1985.
2. Pantera EA, Zambon JJ, and Shih-Levine M. Indirect immunofluorescence for the detection of Bacteroides species in human dental pulp. J Endodon 14:218-223, 1988.
3. Stashenko P. The role of immune cytokines in the patho-

- genesis of periapical lesions. Endod Dent Traumatol 6:89-96, 1990.
4. Vaes G. Cellular biology and biochemical mechanism of bone resorption. Clin Orthop 231:239-271, 1988.
5. Hausmann E, Weinfeld N, and Miller WA. Effects of lipopolysaccharides on bone resorption in tissue culture. Cal Tissue Res 9:272-282, 1972.
6. Klein DC and Raisz LG. Prostaglandins: stimulation of bone resorption in tissue culture. Endocrinology 86:1436-1442, 1970.
7. Gowen M, Wood DD, Ehrie EJ, McGuire MKB, and Russell RGG. An interleukin 1-like factor stimulates bone resorption in vitro. Nature 306:378-380, 1983.
8. Dewhirst FE, Stashenko P, Mole JE, and Tsurumachi T. Purification and partial sequence of human osteoclast-activating factor: identity with interleukin 1 β . J Immunol 136:2562-2568, 1985.
9. Bertolini DR, Nedwin GE, Bringman TS, Smith DD, and Mundy GR. Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation in vitro by human tumor necrosis factors. Nature 319:516-518, 1986.
10. Mullen PG, Windsor ACJ, Fowler AA, and Sugerman HJ. Tumor necrosis factor- α and interleukin-6 selectively regulate neutrophil function in vitro. J Surg Res 58:124-310, 1995.
11. Arnaout MA, Hakim RM, Todd RF, Dana N, and Colten HR. Increased expression of an adhesion-promoting surface glycoprotein in the granulocytopenia of hemodialysis. N Engl J Med 312:457-503, 1985.
12. Cohen MC and Cohen S. Cytokine function Am J Clin Pathol 105:589-598, 1996.
13. Graves DT, Jiang Y. Chemokines, a family of chemotactic cytokines. Crit Rev Oral Biol Med 6:109-118, 1995.
14. Leibler JM, Kunkel SL, Burdick MD, Standiford TJ, Rolfe MW, and Strieter RM. Production of IL-8 and monocyte chemoattractant peptide-1 by peripheral blood monocytes. J Immunol 152:241-249, 1994.
15. Yu X, Barnhill R, and Graves DT. Expression of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in delayed type hypersensitivity reactions in the skin. Lab Invest 71:226-235, 1994.
16. Nagaoka S, Tokuda M, Sakuta T, Taketoshi Y, Tamura M, Takada H, and Kawagoe M. Interleukin-8 gene expression by human dental pulp fibroblast in cultures stimulated with Prevotella intermedia lipopolysaccharide. J Endod 22:9-12, 1996.
17. Yu X, Antoniadis HN, and Graves DT. Expression of monocyte chemoattractant protein-1 in human inflamed gingival tissues. Infect Immun 61:4622-4628, 1993.
18. Tonetti MS, Imboden MA, Gerber L, Lang NP, Laissue J, and Muller C. Localized expression of mRNA for phagocyte-specific chemotactic cytokines in human periodontal infections. Infect Immun 62:4005-4014, 1994.
19. Martich G, Danner R, Ceska M, and Suffredini A. Detection of interleukin-8 and tumor necrosis factor in normal humans after intravenous endotoxin: the effect of anti-inflammatory agents. J Exp Med 173: 1021-1024, 1991.
20. Tamura M, Tokuda M, Nakaoka S, and Takada H. Lipopolysaccharides of Bacteroides intermedius (Prevotella intermedia) and Bacteroides (Porphyromonas) gingivalis induce interleukin-8 gene expression in human gingival fibroblast cultures. Infect Immun 60: 4932-4937, 1992.
21. Stabholtz A and Sela MN. The role of oral microorganisms in the pathogenesis of periapical pathosis. J Endod 9:171-175, 1983.

22. Bisno AL. The resurgence of acute rheumatic fever in the United States. *Annu Rev Med* 41:319-329, 1990.
23. Kakehashi S, Stanley HR, and Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 20:340-349, 1965.
24. Coutinho A and Moller G. Thymus-independent B-cell induction and paralysis. *Adv Immunol* 21:113-236, 1975.
25. Burchett SK, Weaver WM, Westall JA, Larsen A, Kronheim S, and Wilson CB. Regulation of tumor necrosis factor/cachectin and IL-1 secretion in human mononuclear phagocytes. *J Immunol* 140:3473-3481, 1988.
26. Torabinejad M, Clagett J, and Engel D. A cat model for evaluation of mechanism of bone resorption: induction of bone loss by stimulated immune complexes and inhibition by indomethacin. *Calcif Tissue Int* 29:207-214, 1979.
27. Ari K, Lee F, and Miyajima A. Cytokines. Coordinators of immune and in inflammatory responses. *Ann Rev Biochem* 59:783-836, 1990.
28. Cohen MC and Cohen S. Cytokine function. A study in biologic diversity. *Am J Clin Pathol* 105:589-598, 1996.
29. Baggiolini M, DeWald B, Moser B. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines. CXC and CC chemokines. *Adv Immunol* 55:97-119, 1994.
30. Strieter RM, Kunkel SL, and Showell HL. Endothelial cell gene expression of a neutrophil chemotactic factor by TNF, IL-1 and LPS. *Science* 243:1467-1469, 1989.
31. Thelen M, Peveri P, and Kerman P. Mechanism of neutrophil activation by NAF: A novel monocyte-derived peptide agonist. *FASEB J* 2:2702-2706, 1988.
32. Masure S, Proost P, and Van Damme J. Purification and identification of 91-kDa neutrophil gelatinase: Release by the activating peptide interleukin-8. *Eru J Biochem* 198:391-398, 1991.
33. Yoshimura T, Robinson EA, and Tanaka S. Purification and amino acid analysis of two human monocyte chemoattractants produced by phytohemagglutinin-stimulated human blood mononuclear leukocytes. *J Immunol* 142:1956-1962, 1989.
34. Proost P, Wuyts A, and Van Damme J. Human monocyte chemotactic protein-2 and -3: structural and functional comparison with MCP-1. *J Leuk Biol* 59:67-74, 1996.
35. Oppenheim JJ, Zachariae COC, Mukaida N, and Matsushima. Properties of the novel proinflammatory supergene "intercime" family. *Annu Rev Immunol* 9:617-622, 1991.
36. Peveri PA, Walz B, and Baggiolini A. A novel neutrophil-activating factor produced by human mononuclear phagocytes. *J Exp Med* 167:1547-1554, 1988.
37. Strieter RM, Chensue SW, Standiford TJ, Basha MA, and Showell HJ, Kunkel SL. Disparate gene expression of chemotactic cytokines by human mononuclear phagocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 166:886-893, 1990.
38. Colotta F, Borre A, Ming Wang J, Tattaneli M, and Maddalena F, Polentarutti N, Peri G, Mantovani A. Expression of a monocyte chemotactic cytokine by human mononuclear phagocytes. *J Immunol* 148:760-767, 1992.
39. Rollins B, Stier JP, Ernst T, and Wong GG. The human homolog of the JE gene encodes a monocyte secretory protein. *Mol Cell Biol* 9:4687-4692, 1989.
40. Leibler JM, Kunkel SL, Burdick MD, Standiford TJ, Rolfe MW, and Strieter RM. Production of IL-8 and monocyte chemotactic peptide-1 by peripheral blood monocytes. *J Immunol* 152:241-249, 1994.
41. Kunkel SL, Standiford TJ, Kasahara Ka, and Strieter RM. Stimulus specific induction of monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) gene expression. In *Chemotactic cytokines. Biology of the inflammatory peptide supergene family*. 35th Ed. Westwick J, Lindley IJD, and Kunkel SL. Plenum Press, New York, p65.
42. Larsen CG, Anderson AO, Oppenheim JJ, and Matsushima K. Production of interleukin-8 by human dermal fibroblasts and keratinocytes in response to interleukin-1 or tumor necrosis factor. *Immunol* 68:31-37, 1989.
43. Jiang Y, Russell, TR, Schilder H, and Graves DT. Endodontic pathogens stimulate monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8 in mononuclear cells. *J Endodon* 24:86-90, 1998.