

16S rDNA 클론 Libraries를 이용한 치근단 농양 병소의 세균 동정

유소영 · 김미광 · 김화숙 · 황호길¹ · 김평식¹ · 임성훈¹ · 오상호¹ · 민정범¹ · 국중기*
조선대학교 치과대학 구강생화학교실, ¹구강생물학 연구소

Identification of Bacteria from Periapical Abscess Using 16S rDNA Clone Libraries. Yoo, So Young, Mi-Kwang Kim, Hwa-Sook Kim, Ho-Keel Hwang¹, Pyeong Sik Kim¹, Sung-Hoon Lim¹, Sang-Ho Oh¹, Jeong Beom Min¹, and Joong-Ki Kook*. Department of Oral Biochemistry, and ¹Oral Biology Research Institute, College of Dentistry, Chosun University, 375 Seo-suk Dong, Dong-Gu, Gwang-ju 501-749, Korea – Molecular analysis was performed on the microflora found in the necrotic pulpal tissue collected from 5 infected root canals that were diagnosed as a periapical abscess. 16S rRNA coding gene (rDNA) library construction and sequencing were performed in order to identify the microflora. The 16S rDNA sequences from 278 clones were identified by a comparison with the database sequence in GenBank. Three phylum and 31 species, which were related to the oral microflora, were identified from the 3 samples (No. 87, 105, and 115). *Dialister invisus* (5.6%), *Peptostreptococcus micron* (18.3%), and *Veillonella sp.* (3.3%) were the organism present in all three samples. *Lactobacillus fermentum* (2.8%), *Eubacterium sp./E. infirmum* (6.7%), *Shuttleworthia satelles* (3.9%), *Pseudoramibacter alactolyticus* (13.3%), *Bulleidia moorei* (2.8%), and *Prevotella denticola* (1.1%) were found in two samples. Two phylum and four species of environmental microflora were identified from 2 samples (No. 95 and 101). The reason for this might be contamination of the samples with dental water. These results showed that molecular analysis could reveal more diverse microflora that are associated with endodontic infections than that revealed by conventional cultural methods. In addition, these results may offer the basic data to epidemiological studies related with endodontic infection.

Key words: Identification, periapical abscess, 16S rDNA

치수 및 치근단 질환은 치아우식증, 치주질환과 더불어 구강 내에서 가장 빈번히 발생하는 세균에 의한 감염성 질환이며, 그 발병 기간에 따라 급성 치수염과 만성 치수염으로 구별할 수 있고, 그 병소 진행 정도에 따라 치수염, 치근단 질환, 치근단 치주염 등으로 나눌 수 있다. 치아는 치조골을 포함하는 치주조직으로 둘러 쌓여있는 해부학적 특성 때문에 상아질이 파괴되어 치수까지 진행되는 치아우식증에 의해 타액 및 치면세균막 내에 존재하는 모든 세균들이 치수조직 뿐만 아니라 혈액을 통해 전신에 침입할 수 있다. 특히, 면역 기능이 저하된 환자들의 경우에 있어서 치수조직의 괴사에 의해 치근단까지 병원성 세균이 침투하여 치근단 질환을 야기시킨다[8, 9]. 이러한 치수 및 치근단 질환의 병인론을 연구하기 위해서는 이와 관련된 세균들에 대한 연구가 필수적이다. 특정 질환과 그 원인이 되는 세균을 알아내기 위해서는 먼저 역학조사가 선행되어야 한다. 그리고, 이를 바탕으로 가장 연관성이 높은 세균을 알아내고, 그들의 독력인자를 찾는 것이 중요하다.

최근 치수 및 치근단 질환에 관련된 세균 종에 대한 연구

가 활발히 진행되고 있다[2, 4, 13]. 초기 연구들은 전통적인 세균배양법을 이용한 연구결과들[17]이었으며, 최근의 연구들은 세균배양법에 의해 선행된 연구 결과 병원성 세균이라 알려진 세균에 대한 종-특이 DNA 프로브를 이용한 방법 [16], 세균의 단백질분해 효소의 전기영동 패턴의 비교 연구 [3], 세균 종-특이 프라이머를 이용한 중합효소연쇄반응법 [15]을 이용한 결과들이다. 이런 연구들의 결과를 살펴보면 *Porphyromonas endodontalis*와 같이 주로 치수 및 치근단 병소에 연관되어 나타나는 세균 종이 구별되어 있기도 하지만, 치주질환과 연관이 많은 *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella nigrescens*, *Tannerella forsythia*(*Bacteroides forsythus*), *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Actinobacillus actino-mycetemcomitans*, *Campylobacter rectus* 등이 치수 및 치근단 병소에서도 검출됨을 알 수 있다. 하지만, 이러한 전통적인 세균배양법이나 DNA 프로브법, 종-특이 프라이머를 이용하는 방법들로는 치수 및 치근단 질환 병소에 존재하는 모든 세균 종을 알아내기가 어렵다. 즉, 모든 세균을 배양할 수 있는 기술이 아직 개발되어 있지 않고, DNA 프로브법이나 중합효소연쇄반응법은 짧은 시간에 특정 세균의 존재 유무를 알아낼 수 있는 장점[10]은 있으나, 특정 세균 종을 대상으로 하기 때문에 이 또한 모든 병소 내 모든 세균 종을 동정할 수 없는 단점이 있다.

*Corresponding author

Tel: 82-62-230-6877, Fax: 82-62-224-3706

E-mail: jkkook@chosun.ac.kr

이러한 세균배양법과 중합효소연쇄반응법의 단점을 보완할 수 있고, 그 결과를 가장 신뢰할 수 있는 방법이 16S 라이보솜 RNA 유전자(rDNA) 클로닝 및 핵산염기서열결정법이다[11]. 세균의 16S rDNA 염기 서열은 유사한 종간에 상동성이 높아 세균의 계통분류학적 측면에서 많이 이용되고 있다. 특히, 16S 라이보솜 RNA는 그 크기가 약 1,500 bp로 구성되어 있어 비교적 작기 때문에 핵산염기서열을 분석하기가 용이한 편이고, 지금까지 알려진 대부분의 세균 종에 대한 핵산염기서열이 밝혀져 있으며, 이들의 상동성 여부를 검색할 수 있는 프로그램도 개발되어 공개되어 있다.

본 연구에서는 치주질환에 이환되지 않고, 치아우식증에 이환되어 있으며, 치근단 병소가 존재하여 치근단 농양(periapical abscess)이라고 진단된 치아의 치관부 치수를 제거하고, 치근에 존재하는 피사된 치수 및 농양부위의 샘플을 채취하여, 16S rDNA library를 제작하고, 이들의 핵산염기서열을 결정하여 병소에 존재하는 세균 종을 검출하였다.

조선대학교 부속 치과병원에 근관치료를 위해 내원한 환자들 중 최근 항생제를 복용하거나 근관치료를 받은 사람을 제외한 환자에서, 치아우식증, 동통, 치근단 방사선 투과상의 크기, 누공의 유무, 근관내 화농성 삼출액의 유무를 확인하여 치근단 농양이라고 진단된 5명의 환자 각각의 치아를 rubber dam으로 격리하고, 치관부를 3% 과산화수소, 5% iodine으로 1분간 소독하고, 5% Sodium thiosulfate로 치면의 iodine을 불활성화 시킨 다음 근관을 개방하고, 파일 또는 paper point를 이용하여 근관내 내용물을 채취하여 1 ml의 1X PBS에 담아 실험실로 옮겨 -20°C에 얼려서 다음의 실험에 이용할 때까지 보관하였다. 환자 각각의 임상적 증상은 Table 1과 같다.

위에서 채취한 샘플을 10,000 × g의 원심력을 이용하여 수확하고, 이를 iNtRon사(Seoul, Korea)의 G-spin™ Genomic DNA Extraction Kit를 이용하여 제조회사의 지시에 따라 지놈 DNA를 추출하였다.

16S rDNA를 증폭할 수 있는 universal PCR primers (27F; 5'-AGAGTTTGATC[A/C]TGGCTCAG-3', 1492R; 5'-TACGG [C/T]TACCTTGTACGACTT-3')와 AccuPower® Premix (Bioneer Corp., Seoul, Korea)를 이용하고, PTC-200(MJ Research Inc., Watertown, MA, U.S.A) PCR machine을 이용하여 16S rRNA 유전자를 증폭하였다. 이때

PCR의 조건은 다음과 같이 시행하였다. 20 µl의 PCR 혼합 용액이 되도록, 20 pmoles 썩의 forward 및 reverse primers와 100 pg의 세균 genomic DNA를 넣고 94°C에서 2분간 초기 변성을 실시한 다음 94°C에서 1분간 변성, 55°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 1분간 extension하는 과정을 30회 반복하여 증폭한 다음 마지막으로 72°C에서 10분간 extension하였다. 최종 반응물을 2 µl씩 1.5% agarose gel에서 전기영동을 실시하여 그 증폭 여부를 확인하였다.

앞에서 증폭한 16S rRNA 유전자를 pGEM-T easy vector(Promega Corp., Madison, WI, U.S.A.)에 제조회사의 지시에 따라 직접 클로닝하였다. 이때 삽입 유전자가 들어간 흰색 균락을 100여개를 선택하여 이를 5 ml의 LB broth에서 배양한 다음 플라즈미드를 추출하여 전기영동하여 insert DNA가 들어간 것을 확인하여, 핵산염기서열을 결정하였다.

E. coli DH5α에 transformation시킨 각각의 재조합된 플라즈미드 DNA는 통상의 alkaline lysis법으로 AccuPrep™ Plasmid Extraction Kit(Bioneer Corp.)를 이용하여 제조회사의 지시대로 추출하였다. 16S rRNA 유전자의 핵산염기서열은 바이오니아사에 의뢰하여 결정하였다. 이때 사용된 프라이머는 Seq-F2(5'-GGATTAGATACCCTGG-3'; 802~781 nts)이었다. 그 결과 결정된 약 500 bp(220~ 720 nts)를 미국국립보건원에서 제공하는 Blastn 프로그램을 이용하여 상동성 검색을 하여, 98% 이상의 상동성을 보이는 세균 종을 같은 종이라고 판정하였다.

본 연구 결과 5명의 치근단 농양 병소를 가진 환자들 중 3명의 환자(No. 87, 105 및 115)에서 얻은 샘플에서 180 클론을 얻었으며, 주로 구강 내에서 발견된 3개의 문(phylum), 31개의 종(species)이 검출되었다(Table 2). 세 명의 환자에서 모두 발견되는 세균 종은 *Dialister invisus*(5.6%) *Peptostreptococcus micron*(18.3%) 및 *Veillonella* sp.(3.3%)였다. 최근에 *D. invisus* 종이 치근관 병소와 깊은 치주낭에서 6 균주가 발견되어 새로운 종으로 알려졌다[5]. 이들은 *D. pneumosintes*의 16S rDNA 핵산염기서열과 93% 상동성을 보이며, 생화학적으로 반응성이 적고, 당을 가수분해할 수 있는 능력이 없는 혐기성의 그람 음성인 coccobacill라고 한다[5]. 또한 이들 균주의 지놈 DNA의 G+C 함량이 45-46 mol%인 것으로 조사되었다. 이러한 *D. invisus*와 유사한 종인 *D. pneumosintes*가 32개의 치근관병소를 대상으

Table 1. Clinical symptoms of the patients.

Patients' No.	Teeth (#)	Caries	Pain	Swelling	Sinus track	Apical Lesion	Vitality	Periodontitis
87	34	O	O	O	X	O	X	X
101	35	O	O	O	X	O	X	X
115	13	O	O	O	X	O	X	X
95	36	O	O	X	X	O	X	X
105	16	O	O	X	X	O	X	X

Table 2. Summary of the isolated clones derived from 3 periapical abscess lesions (No. 87, 105, and 115).

Phylum/subphylum Genus or species	Patient No.			Total	
	87	105	115	n = 180	%
<i>Firmicutes/ Bacilli</i>					
<i>Streptococcus constellatus</i>	14			14	7.8
<i>Streptococcus mutans</i>	1			1	0.6
<i>Streptococcus sanguinis</i>			1	1	0.6
<i>Streptococcus anginosus</i>			2	2	1.1
<i>Streptococcus gordonii</i>		1		1	0.6
<i>Granulicatella adiacens</i>	3			3	1.7
<i>Gemella morbillorum</i>	1			1	0.6
<i>Lactobacillus fermentum</i>		4	1	5	2.8
<i>Lactobacillus salivarius</i>			4	4	2.2
<i>Firmicutes/ Clostridia</i>					
<i>Anaeroglobus geminatus</i>	2			2	1.1
<i>Dialister invisus</i>	1	3	6	10	5.6
<i>Peptostreptococcus micros</i>	11	3	19	33	18.3
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	25			25	13.9
<i>Veillonella</i> sp.	4	1	1	6	3.3
<i>Veillonella atypica</i>			2	2	1.1
<i>Veillonella dispar</i>			1	1	0.6
<i>Eubacterium</i> sp.			2	2	1.1
<i>Eubacterium infirmum</i>	8		2	10	5.6
<i>Mogibacterium vescum</i>	1			1	0.6
<i>Mogibacterium timidum</i>			2	2	1.1
<i>Peptoniphilus harei</i>		3		3	1.7
<i>Peptoniphilus lacrimalis</i>		1		1	0.6
<i>Shuttleworthia satelles</i>		4	3	7	3.9
<i>Pseudoramibacter alactolyticus</i>		6	18	24	13.3
<i>Finegoldia magna</i>			1	1	0.6
<i>Bulleidia moorei</i>		1	4	5	2.8
<i>Firmicutes/ Mollicutes</i>					
<i>Prevotella denticola</i>		1	1	2	1.1
<i>Fusobacteria</i>					
<i>Fusobacterium nucleatum</i>			4	4	2.2
<i>Actinobacteria</i>					
<i>Bifidobacterium dentium</i>			1	1	0.6
<i>uncultured Olsenella</i>			2	2	1.1
<i>Atopobium rimae</i>			4	4	2.2
Total	71	28	81	180	100.0

로 실험한 결과 21개의 병소에서 검출(65.6%) 되어 치근관 질환의 병인균일 것이라는 보고가 있었다[14]. 이러한 결과들을 종합할 때, *D. invisus* 역시 치근관 질환의 병인균일 수 있을 것으로 생각되며, 차후 *D. invisus*를 검출 및 동정할 수 있는 종합효소연쇄반응 프라이머를 설계하여 보다 많은 치근관 농양을 포함하는 치수 및 치근단 병소에서 검출율을 조사하여 이를 증명하고자 한다.

또한, 나머지 두 개의 치근단 농양 샘플에서 발견된 종은

Lactobacillus fermentum(2.8%), *Eubacterium* sp./*E. infirmum* (6.7%), *Shuttleworthia satelles*(3.9%), *Pseudoramibacter alactolyticus* (13.3%), *Bulleidia moorei*(2.8%) 및 *Prevotella denticola*(1.1%)였다. 이들 중 *S. satelles* 또한 최근에 구강에서 새로이 동정되었다[6]. 이들은 혐기성이며, 포자를 형성하지 못하는 그람(+) 간균이고, 당을 발효시킬 수 있는 능력이 있고, 포도당을 발효시켜 acetate, butyrate 및 lactate의 최종 유기산을 생산하는 것으로 조사되었다. 또한, esculin을 가수분해시킬 수 있고, indole을 생산할 수 있다고 한다. 이들 표준균주인 DSM 14600^T 균주 지놈 DNA의 G+C 함량은 51 mol%인 것으로 조사되었다[6]. *S. satelles*의 치수 및 치근단 질환과의 연관성에 대한 자료는 아직 없는 실정이지만, 이 역시 차후 역학조사를 통한 병원성 여부를 조사할 필요가 있다고 생각된다. 현재 *Eubacterium* 속에는 그람 양성이며, 포자를 형성하지 않는 혐기성 간균들이 포함되며, 그들 대부분은 성장 속도가 느리며, 배양이 까다롭고, 생화학적인 실험에 반응성이 적다고 알려져 있다[7]. Fouad 등[7]은 치과 임플란트에 연관된 치아기원 감염병소와 건강한 사람의 타액으로부터 105 균주를 얻어서 표현형 및 유전형질을 분석한 결과 91 균주가 기존에 종 수준에서 확립이된 14 종에 포함되고, 나머지 14균주는 아직 분류학적으로 확립이 안된 종임을 보고하였다. 이들의 연구 결과 *Eubacterium* 속의 균주들이 다양함을 알 수 있었지만, 어떤 그룹의 세균 종들이 구강 감염과 연관성이 있는지는 밝히지 못하였다. 최근 *P. alactolyticus*는 치근관 기원의 병소의 56%에서 nested PCR법에 의해 검출됨이 보고되어 치수 및 치근관 질환의 잠재적 병원균 후보로 보고되었다[14]. 이러한 결과를 종합할 때, 추후 *P. alactolyticus*, *M. timidum* 및 *E. infirmum* 종들의 한국인의 치수 및 치근단 질환에 대한 병원성 여부를 밝히는 연구가 필요하리라 생각된다. *Prevotella denticola*는 본 연구에서 한 개의 병소에서만 검출된 *F. nucleatum*과 더불어서 중요한 치주질환 병원성 세균으로 알려져 있다[1]. 이는 본 연구의 대상이 치주질환에 이환되지 않은 치아를 대상으로 하였기 때문에 타액에 존재하였던 *P. denticola*와 *F. nucleatum* 두 세균 종이 우식된 치관부 치수를 통해 치근단 농양 병소에 감염된 것으로 생각된다.

반면에 또 다른 2명의 환자(No. 95 및 101)에서는 98 균주 중 환경에서 발견되는 세균 종이 96 균주(98%)가 발견되었다(Table 3). 이러한 결과는 아마도 근관 개방 및 샘플링 과정 중에 치과용수에 의해 오염되어 나타난 것으로 생각된다. 이러한 결과는 치과 치료 과정 중에 오염된 치과용수를 사용할 경우, 치수에 감염될 수 있음을 시사하는 것으로 이러한 환경 미생물이 병원성 세균으로 작용할 수 있는 가능성을 배제할 수 없다. 그러므로, 치수 및 치근관 질환의 치료시 멸균된 용수를 사용해야 할 것으로 생각된다.

본 연구에서 사용된 16S rDNA library 제작 및 핵산염기서열결정법은 병소에 존재하는 세균 중 배양 기술의 부족으

Table 3. Summary of the isolated clones derived from 2 periapical abscess lesions (No. 95 and 101).

Phylum/ subphylum Genus or species	Patient' No.		Total	
	95	101	n = 98	%
<i>Firmicutes/ Bacilli</i>				
<i>Lactobacillus</i> sp.		1	1	1.0
<i>Proteobacteria</i>				
<i>Burkholderia pyrrocinia</i>	19		19	19.4
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> (<i>Rhizobium radiobacter</i>)	12		12	12.2
<i>Acidovorax</i> sp.		65	65	66.3
<i>Sphingomonas</i> sp.		1	1	1.0
Total	31	67	98	100.0

로 배양되지 않는 세균 종의 존재 유무를 알아 낼 수 있는 장점이 있는 반면, 살아있는 세균을 얻을 수 없기 때문에 차후 숙주세포와 병원성 세균간의 상호작용에 대한 연구를 진행하기 불가능하다는 단점도 있다. 하지만, 본 연구 결과에서 알 수 있듯이, 16S rDNA library 제작 및 핵산염기서열 결정법은 특정 질환과 연관성이 있을 것으로 생각되는 새로운 세균 종의 존재를 비교적 빠른 시간에 알아낼 수 있으며, 이를 대상으로 하는 역학조사를 통해 그 병원성 여부를 알 수 있는 토대를 마련해 준다는 점과 구강 내에는 약 500여 종의 세균이 존재한다[12]는 점을 미루어 보아 임플란트 주위염, 악골 골수염 등과 같은 여러 구강 내 감염성 질환의 잠재적 병원성 세균을 알아내는 데 있어 좋은 실험 방법으로 이용될 수 있으리라 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2002년도 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구되었음(KRF-2002-003-E00144).

REFERENCES

- Albandar, J. M., L. J. Brown, and H. Loe. 1997. Putative periodontal pathogens in subgingival plaque of young adults with and without early-onset periodontitis. *J. Periodontol.* **68**: 973-981.
- Abou-Rass, M. and G. Bogen. 1998. Microorganisms in closed periapical lesions. *J. Int. Endodont.* **31**: 39-47.
- Baumgartner, J. C., K. S. Bae, T. Xia, J. Whitt, and L. L. David. 1999. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and polymerase chain reaction for differentiation of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens*. *J. Endodont.* **25**: 324-328.
- Baumgartner, J. C., B. J. Watkins, K. S. Bae, and T. Xia. 1999. Association of black-pigmented bacteria with endodontic infections. *J. Endodont.* **25**: 413-415.
- Downes, J., M. Munson, and W. G. Wade. 2003. *Dialister invisus* sp. nov., isolated from the human oral cavity. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**: 1937-1940.
- Downes, J., M. A. Munson, D. R. Radford, D. A. Spratt, and W. G. Wade. 2002. *Shuttleworthia satelles* gen. nov., sp. nov., isolated from the human oral cavity. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**: 1469-1475.
- Fouad, A. F., K. Y. Kum, M. L. Clawson, J. Barry, C. Abenoja, Q. Zhu, M. Caimano, and J. D. Radolf. 2003. Molecular characterization of the presence of *Eubacterium* spp and *Streptococcus* spp in endodontic infections. *Oral Microbiol. Immunol.* **18**: 249-255.
- Kurihara, H., Y. Kobayashi, I. A. Francisco, O. Isoshima, A. Nagai, and Y. A. Murayama. 1995. Microbiological and immunological study of endodontic-periodontic lesions. *J. Endodont.* **21**: 617-621.
- Lana, M. A., A. P. Ribeiro-Sobrinho, R. Stehling, G. D. Garcia, B. K. Silva, J. S. Hamdan, J. R. Nicoli, M. A. Carvalho, and L. D. Farias. 2001. Microorganisms isolated from root canals presenting necrotic pulp and their drug susceptibility in vitro. *Oral Microbiol. Immunol.* **16**: 100-105.
- Maidak, B. L., G. J. Olsen, N. Larsen, R. Overbeek, M. J. McCaughey, and C. R. Woese. 1996. The ribosomal database project (RDP). *Nucleic Acids Res.* **24**: 82-85.
- Munson, M. A., T. Pitt-Ford, B. Chong, A. Weightman, and W. G. Wade. 2002. Molecular and cultural analysis of the microflora associated with endodontic infections. *J. Dent. Res.* **81**: 761-766. Erratum in: *J. Dent. Res.* 2003. **82**: 69. *J. Dent. Res.* 2003. **82**: 247.
- Paster, B. J., S. K. Boches, J. L. Galvin, R. E. Ericson, C. N. Lau, V. A. Levanos, A. Sahasrabudhe, and F. E. Dewhirst. 2001. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J. Bacteriol.* **183**: 3770-3783.
- Rolph, H. J., A. Lennon, M. P. Riggio, W. P. Saunders, D. MacKenzie, L. Coldero, and J. Bagg. 2001. Molecular identification of microorganisms from endodontic infections. *J. Clin. Microbiol.* **39**: 3282-3289.
- Siqueira, J. F. Jr., and I. N. Rocas. 2002. *Dialister pneumosintes* can be a suspected endodontic pathogen. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* **94**: 494-498.
- Siqueira, J. F. Jr., I. N. Rocas, J. C. Oliveira, and K. R. Santos. 2001. Molecular detection of black-pigmented bacteria in infections of endodontic origin. *J. Endodon.* **27**: 563-566.
- Siqueira, J. F. Jr., I. N. Rocas, R. Souto, M. de Uzeda, and A. P. Colombo. 2000. Checkerboard DNA-DNA hybridization analysis of endodontic infections. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* **89**: 744-748.
- Tanner, A. and N. Stillman. 1993. Oral and dental infections with anaerobic bacteria: clinical features, predominant pathogens, and treatment. *Clin. Infect. Dis.* **4**: S304-S309.

(Received Mar. 8, 2004/Accepted June 2, 2004)