대한치과보존학회지:Vol. 23, No. 1, 1998

치수 및 치근단병소에서 interleukin-1α, interleukin-1β, tumor necrosis factor-α의 분포에 관한 연구

서울대학교 치과대학 치과보존학교실

고현정 · 정관희 · 임성삼

Abstract

TISSUE LEVELS OF INTERLEUKIN-1α, INTERLEUKIN-1β AND TUMOR NECROSIS FACTOR-α IN PULPAL AND PERIAPICAL PATHOSIS

Hyun-Jung Ko, Kwan-Hee Chung, Sung-Sam Lim

Dept. of Conservative Dentistry, College of Dentistry, Seoul National University

This study was designed to examine the tissue levels of interleukin-1α(IL-1α), interleukin-1β(IL-1β) and tumor necrosis factor-α(TNF-α) in inflamed human dental pulps and periapical lesions, and to determine the relationship between each cytokine and pulpal and periapical pathosis.

The pulps used in this experiment, were obtained in routine endodontic treatment and the periapical lesions in periapical surgery after clinical diagnoses were performed. These specimens were divided into four groups as normal pulp group(control group, n=9), acute pulpitis group(n=9), chronic pulpitis group(n=10) and periapical lesion group(n=18) and stored in liquid N_2. For extract preparation, tissues were finely minced with a scalpel, and the fragments were incubated in 0.5㎖ homogenizing buffer (0.1 mol/L potassium chloride, 0.02 mol/L TRIS; pH=7.6) for two hours and grinded with glass homogenizer. Debris was removed by centrifugation and supernatants were immediately tested with enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA, R&D Co., Minneapolis, USA).

Following results were obtained ;

1. The concentrations of IL-1α in all experimental groups were significantly higher than in control group($p<0.05$). And the concentrations of IL-1α in periapical lesion group were somewhat higher than in two pulpitis groups, but the differences among those

본 논문은 1995년도 서울대학교병원 지정진료연구비 지원에 의해 이루어진 것임.

groups were not stastically significant($p>0.05$).
2. The concentrations of IL-1β in all experimental groups were significantly higher than in control group($p<0.05$), and all the experimental groups expressed similar concentrations.
3. The concentrations of TNF-α in all experimental groups were higher than in control group but only the differences between chronic pulpitis group and control group were statistically significant($p<0.05$). And the concentrations of TNF-α in acute and chronic pulpitis groups were higher than in periapical lesion group but only the differences between chronic pulpitis group and periapical lesion group were statistically significant ($p<0.05$).
4. There was significant correlation only between IL-1α and IL-1β in periapical lesion group ($p<0.05$).

Key words : pulp, periapical lesion, cytokine, interleukin-1α, interleukin-1β, tumor necrosis factor-α, enzyme-linked immunosorbent assay

Ⅰ. 서 론

치수조직의 세균 감염은 치수괴사를 유발하며 근관계에 많은 양의 염증산물의 축적을 유발한다. 세균적 요인뿐만 아니라 숙주의 면역반응이 치수 및 치근단질환의 병인에 관여하는데, 실제로 면역글로불린을 합성하는 대식세포, T 세포, B 세포, 형질세포 등의 immunocompetent 세포가 치수 및 치근단병소에서 발견되며, 이는 이들 병소에서의 면역반응이 매우 활발히 일어난다는 것을 의미한다[1-5].

치수 자극 물질이 치근단 조직으로 침투하면 치근단 주위에 염증과 골흡수를 일으킨다[1-7]. 비록 세균이 치근단병소와 골흡수에 원인 요소로 작용하고, 골흡수는 파골세포에 의해서 수행되는 과정이긴 하지만, 감염과 파골세포로 인한 흡수간의 연관성에 대해서는 알려진 바가 적다. Lipopolysaccharides와 같은 세균 요소도 자체적으로 파골세포의 흡수작용을 일으킬 수 있지만 영향력은 매우 적으며, 또한 prostaglandin E_2(PGE_2)와 같은 arachidonic acid의 대사산물들도 염증성 골흡수의 과정에 관여한다고 보고되었으나[2,8,9], 이들만으로는 치근단 주위 골흡수과정을 설명하기 어렵고, 다른 인자가 존재할 것으로 생각된다. 최근 연구에 의하면, 면역세포가 생산하는 cytokine이라고 불리는 다양한 조절인자들이 중요시되고 있다. 즉 이러한 관점에서 보면 치수 및 치근단병소에 다량으로 존재하는 만성 염증세포들에 의해 생성되는 cytokine에 의해서 골흡수가 일어나게 된다. 알려진 바에 의하면 세균과 그의 산물은 염증세포를 자극해서 cytokine의 생산을 유도한다[1-7,10]. Cytokine은, 많은 생리적 또는 병생리적 과정에 있어서, 세포간의 상호작용의 필수전달물질이다. 최근 연구에 의하면, 이 다기능 단백질은 세포의 성장과 분화와 관련된 필수적인 생화학 반응을 조절한다[10]. 단핵세포와 대식세포가 독특한 cytokine을 만들어 내어 다양한 세포 기능을 조절한다는 사실은 잘 알려져 있고[11], 그 중 interleukin-1(IL-1)과 tumor necrosis factor-α(TNF-α)가 많이 연구되어 왔는데, 이들은 neoplastic cell을 약화시키거나 파괴시키고, 백혈구, 내피세포, 섬유세포 등의 target cell에 hormone과 같은 작용을 나타낸다[12].

IL-1은 많은 생물학적 작용을 나타내는데, 그 중 섬유아세포 증식, 면역반응의 강화, 골흡수 자극 등이 치수 및 치근단질환의 병인에 관여한다고 할 수 있다. IL-1은 섬유아세포에 의해

생산되는 prostaglandin E_2와 collagenase의 생산을 자극하며, 조골세포의 증식과 파골세포의 활성과 깊은 연관이 있다[11,13,14]. 최근 들어 endogenous pyrogen, lymphocyte activating factor, leukocytic endogenous mediator, mononuclear cell factor, synovial factor, catabolite, proteolysis inducing factor, exodermal cell derived thymocyte activating factor등이 IL-1 group에 속한다고 알려져 있다[15]. Molecular cloning에 관한 연구에 의해 IL-1의 두 가지형이 확립되었는데 이들은 각각 IL-1α, IL-1β로 알려져 있으며, 두 가지의 다른 유전자에 의해 만들어진다. 이들은 30% 이하의 structural homology를 갖지만 동일한 세포수용기와 결합하고, 동일한 생물학적 작용을 나타낸다[9,16,17]. TNF-α의 생물학적 작용중에서는 osteoclast-activating function이 치수 및 치근단질환의 병인에 관여한다고 할 수 있다. TNF-α는 골조직에서 calcium의 유리를 유도하여 골조직흡수를 동반하는 염증성 질환에서 중요한 역할을 한다[12].

이들 cytokine들은 bacterial endotoxin lipopolysaccharide(LPS)에 대해 반응하는 대식세포와 단핵세포에 의해 생성되므로, LPS-producing bacteria가 염증성 치수 및 치근단질환의 병리에 관여한다고 할 수 있으며[11,12,17,18], 염증성 치수 및 치근단질환에서는 cytokine의 분포가 높게 나타나는데, 이는 대식세포가 많이 존재하기 때문이다.

이러한 IL-1과 TNF-α와 관련된 기전들은 치수 및 치근단질환에서 염증과정과 골 및 결합조직의 파괴에 중요한 역할을 한다. 그러므로 치수 및 치근단질환에서 생성되는 이들 cytokine들의 분포를 측정하는 것은 매우 중요하다. 하지만 불행하게도, 세포 증식과 같은 생물학적 반응에 기초를 둔 검출 방법들은 이들 cytokine들 뿐만 아니라 다른 요소에 의해서도 영향을 받을 수 있기 때문에 적절하지 않다. 예를 들면 이들 cytokine 분석에 사용되는 갑상선 세포는 IL-2, IL-6, IL-7에 의해서도 영향을 받을 수 있고, 섬유아세포는 fibroblast growth factor에 의해서 자극 받을 수 있다[19]. 특이성과 민감도가 우수한 enzyme linked immunosorbent assay(ELISA)의 발달로 이러한 bioassay의 단점을 극복할 수 있었는데, 이 면역학적 분석 방법은 검출하고자 하는 cytokine의 검출과 정량을 가능하게 했다[9,20].

ELISA(Enzyme Linked Immunosorbent Assay)는 프랑스의 S. Avrameas와 B. Guilbert, 스웨덴의 E. Engvall과 P. Perlmann, 그리고 네덜란드의 B. van Weemen과 H. Schuurs 등에 의해서 1971년에 처음으로 소개되었다. ELISA는 항원의 정량과 항체의 적정에 사용되어 왔는데, 이는 항원-항체 복합체와, 결합되지 않은 항원이나 항체를 분리하기 위해서, 항원 또는 항체를 solid phase에 고정시키는 방법을 필요로 한다. 항체를 검출하기 위해서는 solid phase에 항원을 고정시키고 환자의 혈청과 반응시킨 후 enzyme-conjugated antiglobulin을 첨가한 후 적절한 substrate와 반응시켜 발색되게 하여 항체의 양을 측정한다[21].

본 연구에서는 건강한 치아와 치수염이 있는 치아에서 발수된 치수와, 치근단질환이 있는 치아에서 치근단 절제술 시행후 얻어낸 치근단병소를 ELISA로 검색하여 각각의 조직에서의 cytokine들의 분포를 측정하고 이를 비교하여 다소의 지견을 얻었기에 이를 보고하는 바이다.

II. 연구재료 및 방법

서울대학교병원 치과진료부 보존과에 내원한 환자의 28개의 치아에서 통상의 근관치료중 발수한 치수조직과 18개의 치아에서 통상의 치근단수술중 얻은 치근단병소를 이용하였다.

1) 표본 추출

① 치수조직 추출

Rubber dam을 적용하여 치아를 분리시키고, 통상의 근관와동 개방을 시행하였다. 치수를 얻기 쉽고 비교적 넓은 근관-상악대구치의 구개근관, 하악대구치의 원심근관, 또는 단근치의 근관-에 barbed broach를 삽입하여 발수하였고, 발수된 치수를 liquid N_2에 보관하였다. 각 치아들은 다음과 같은 임상 검사를 거쳐 임상적 진단을 내린 후 발수하였다. (1) 얼음을 이용한

한냉검사; (2) 가열한 gutta-percha를 이용한 온열검사; (3) 전기치수검사기를 이용한 치수 생활력 검사; (4) 동통의 지속 정도와 강도를 포함한 동통의 병력 문진; (5) 치주낭침을 사용한 치주낭 깊이 검사; (6) 타진반응검사.

한냉, 온열, 타진반응, 전기치수생활력검사 등에서 정상 범위에 속하고 동통의 병력이 없는 치아에서 발수한 9개의 치수조직을 정상치수로 임상진단을 내리고 대조군(정상치수군)으로 사용하였다. 한냉검사 또는 온열검사에서 민감하게 반응하며, 심한 자발통을 호소하고 전기치수생활력검사에서 정상치아보다 낮은 전류에서 반응하는 9개의 치아를 급성치수염군으로 분류하였고, 한냉검사 또는 온열검사에서 반응이 없거나 미약하며, 전기치수생활력검사에서 정상치아보다 높은 전류에서 반응하거나 전혀 반응하지 않는 10개의 치아를 만성치수염군으로 분류하였다.

② 치근단병소 추출

치근단 수술시 소파술을 통해 얻어낸 18개의 치근단병소(육아조직, 육아종, 낭 등)를 liquid N_2에 보관하였다.

2) 추출물 처리

치수 및 치근단 병소를 scalpel로 잘게 다지고, 0.5mℓ homogenizing buffer[22](0.1 mol/L potassium chloride, 0.02 mol/L TRIS; pH=7.6)에 두 시간 놓아 둔 후 glass homogenizer로 균일하게 간다. 이런 과정에 의해 조직이 완전히 분산되고 세포가 용해되어 세포내, 세포간 성분에서 cytokine이 유리되게 된다. 잔사는 원심분리로 제거하고 추출물을 얻었다.

3) ELISA

추출물은 R&D사(Minneapolis, USA)의 ELISA kit를 이용해 분석하였다. 각각의 cytokine에 대한 ELISA는 각각의 cytokine에 대한 특이한 단일클론성 항체를 포함하는 일련의 결합과정으로 이루어져 있다. 이 과정은 네 단계로서 각각의 cytokine에 대한 단일클론성 항체로 coating되어 있는 microtiter plate내에서 행해졌다.

첫 번째 단계로, standard와 실험용 sample을 각각 200μℓ씩 microtiter plate의 각각의 well에 담고, adhesive strip으로 덮은 후 실온에서 2시간 놓아두었다. 조심스럽고 빠른 동작으로 plate를 뒤집고 흔들어 주어 각각의 well을 비우고 수세용 buffer로 수세하는 과정을 세 번 반복하였다. 두 번째 단계로, 각각의 cytokine에 대한 conjugate를 200μℓ씩 각각의 well에 담고 adhesive strip으로 덮어놓은 후 실온에 1시간 동안 놓아 둔 후 수세과정을 세 번 시행하였다. 세 번째 단계로, 각각의 well에 기질 용액을 200μℓ씩 담고 실온에서 20분간 놓아두었고, 마지막으로 각각의 well에 stop solution을 50μℓ첨가한 후 바로 450nm로 setting된 microtiter plate reader에서 optical density를 측정하였다.

여기에서 사용된 conjugate는 horseradish peroxidase를 결합시켜 놓은, 각각의 cytokine에 대한 다클론성 항체이며, 기질 용액은 hydrogen peroxide이고, color reagent는 2N 황산이다.

4) 통계 분석

Mann-Whitney U test와 t test를 통하여 분석하였다.

Ⅲ. 연구 결과

각 실험군에서 측정된 각각의 cytokine의 양은 표 1, 2, 3, 4에서와 같았고, 각 실험군의 평균은 표 5와 같았다.

대조군보다 급성 또는 만성치수염군과 치근단병소군 모두에서 각각의 cytokine의 평균값이 유의성 있게 높았으며($p<0.05$), IL-1α의 경우 치근단병소군이 가장 높은 수치를 나타내었고 다음으로 급성치수염군, 만성치수염군의 순으로 나타났으나 이들 군간의 통계적 유의성은 없었고($p>0.05$), IL-1β의 경우 급성치수염군에서 가장 높은 값을 나타내었고, 다음으로 만성치수염군이었으며, 치근단병소군에서 가장 낮은 수치를 나타내었으나 이들간에도 통계적 유의성은 없었다($p>0.05$). TNF-α의 경우에는 만성치수염군에서 치근단병소군보다 유의성 있게 높은 값을 나타내었으나($p<0.05$), 나머지 군

Table 1. Concentrations of each cytokine in normal pulp tissues. (pg/mg tissue)

Sample	IL-1α	IL-1β	TNF-α
1	0	1.38	0
2	0	0	1.53
3	0	0	1.09
4	0	0	0.86
5	0	0	0
6	0	0	0
7	0	0	0
8	0	0	0
9	0	0	0

Table 2. Concentrations of each cytokine in pulp tissues diagnosed as acute pulpitis. (pg/mg tissue)

Sample	IL-1α	IL-1β	TNF-α
1	63.96	1	0
2	16.33	16.25	4.21
3	15.12	15.55	10.58
4	14.31	9.40	0
5	13.50	10.25	4.25
6	4.71	35.42	4.22
7	0.88	5.5	2.71
8	0	1.47	7.83
9	0	0	0

Table 3. Concentrations of each cytokine in pulp tissues diagnosed as chronic pulpitis. (pg/mg tissue)

Sample	IL-1α	IL-1β	TNF-α
1	38.88	3.46	15
2	8.12	0	0
3	7.67	63.33	0
4	5.67	7.04	7.96
5	1.83	2.5	2.17
6	1.04	13	1.92
7	0.63	0.88	3.21
8	0	1.83	6.08
9	0	0.42	6.04
10	0	3.96	7.38

Table 4. Concentrations of each cytokine in periapical lesions (pg/mg tissue)

Sample	IL-1α	IL-1β	TNF-α
1	79.75	27.63	0
2	66.67	2.15	2.58
3	66.38	25.92	0.92
4	56.92	1.63	1.5
5	56.42	68.75	1.92
6	49.54	7.79	0
7	33.45	4.92	0.86
8	22.04	1.88	0
9	16.08	10.58	0
10	6.54	1.04	1.67
11	6.25	1.92	3.58
12	0.83	2.17	3.38
13	0.56	5.63	0
14	0.46	3.29	0.83
15	0.29	2.25	1.71
16	0.08	0.46	0
17	0	3	2.67
18	0	0.75	0

Table 5. Mean concentrations of each cytokine (pg/mg tissue)

group		mean concentration± *SEM		
		IL-1α	IL-1β	TNF-α
control group	normal pulp	0	0.15± 0.15	0.39± 0.20
experimental group	acute pulpitis	14.31± 10.25	9.94± 5.66	4.22± 1.75
	chronic pulpitis	6.38± 3.75	9.64± 6.09	4.98± 1.44
	periapical lesion	25.68± 6.08	9.54± 3.96	1.20± 0.29

*SEM (Standard Error of Mean)

들간의 통계적 유의성은 없었다($p>0.05$).

급성치수염군 내에서는 IL-1α가 가장 많이 발견되었고, 다음으로 IL-1β, TNF-α순이었으며, 치근단병소군 내에서도 같은 양상으로 나타났다. 만성치수염군 내에서는 IL-1β가 가장 많이 발견되었고, 다음으로 IL-1α와 TNF-α순이었다.

Ⅳ. 총괄 및 고안

세균이나 세균성 항원이 치수로 유입되면 면역반응의 진행을 암시하는 염증부위에 임파구, 형질세포, 대식세포 등의 침윤이 일어난다. 세균성 항원은 면역반응유발성이 매우 높으며 단핵세포나 대식세포로 하여금 염증전달물질인 cytokine을 생산하게 한다. 이들 cytokine들 중 IL-1α, IL-1β, TNF-α 등이 치수 및 치근단 또는 치주질환과 관련이 있다고 알려져 왔다.

IL-1은 여러 가지 생물학적 작용을 picomolar (10^{-12}M), femtomolar(10^{-15}M) 농도수준에서도 나타낼 수 있는 매우 강력한 cytokine으로

염증반응과 면역반응의 주요한 조절인자이며, 거의 모든 종류의 세포가 IL-1과 반응한다. 대식세포, 단핵 세포, 각질 세포, 상피 세포, 섬유아세포, 내피 세포, B 세포, T 세포, 평활근 세포들이 이 cytokine을 생성한다고 알려져 있다. 이들 세포로부터의 IL-1의 생성은 세균의 lipopolysaccharide와 같은 다양한 자극물질에 대한 반응으로 일어난다고 생각되어지는데, 이는 IL-1이 지속적으로 생성되는 물질이 아니기 때문이다[17,23,24].

IL-1은 임파구 활성, 대식 세포 활성, natural killer 세포 자극, prostaglandin 합성 유도, 발열 유도, acute phase 단백질 유리, adrenocorticotropin 유리, corticosteroid 유리, cytokine gene expression (IL-1, TNF, IL-6) 등의 생물학적 작용을 나타낸다. 또한, 간접적으로는 다른 단백질(예를 들면 다른 cytokine)들의 발현과 arachidonic acid metabolites의 합성을 자극한다[25-27].

IL-1은 생화학적으로 명백히 구분되는 두 가지 형, 즉 IL-1α와 IL-1β로 나누어 진다[24,28]. 이 두 가지형의 상대적인 잠재력에 대한 연구들은 많은 논란을 보이고 있는데, (IL-1β가 더 강력한 효과를 나타낸다는 주장[29,30], IL-1α가 더 강력한 효과를 나타낸다는 주장[31], 동일한 효과를 나타낸다는 주장[32]) 이는 아마도 종과 분석법이 다르기 때문일 것으로 생각된다[17].

IL-1은 결합조직내의 섬유아세포를 자극하여 다른 cytokine들이나 matrix-degrading enzyme과 prostaglandin E_2(PGE_2)의 생성을 유도하며 이러한 인자들이 결합조직의 파괴에 중요한 역할을 하게 된다[23]. IL-1의 조직에 대한 작용중 많은 부분은 이러한 반응으로 생성되는 prostaglandin(PG)에 의해 조절되며 PG는 골대사에 매우 중요한 역할을 한다. IL-1에 의해 야기되는 골흡수에 있어서의 PG의 역할에 대한 연구도 많은 논란을 보이고 있다. 몇몇의 in vitro 연구에 의하면 PG 합성의 차단이 IL-1의 골흡수작용에 아무런 영향도 미치지 않았다고 보고하였고[33-35], 다른 연구에서는 PG 합성의 차단이 IL-1의 골흡수작용을 부분적으로 차단한다고 보고하였다[36-38]. 이에 대해 Garrett등은[39] 쥐의 두개골을 이용하여 in vitro에서 실험한 결과 PG가 IL-1의 효과를 증대시켜 결국 골흡수 과정에 기여하기는 하지만, IL-1은 골흡수작용을 나타내는데 있어서 PG를 반드시 필요로 하지는 않는다고 보고하였다. 이러한 결과는 골흡수에 있어서 IL-1과 PG는 상승작용을 가진다는 연구와 일치한다[40]. IL-1의 골흡수에 대한 작용은 osteotropic hormone과의 상호작용에 의해서도 부분적으로 조절되는데, IL-1과 parathyroid hormone 사이에는 강력한 상승작용이 나타난다고 보고되었다[41].

TNF-α는 대식 세포와 임파구가 세균의 lipopolysaccharide에 대해 반응하여 생성되어 섬유아세포와 골세포를 자극하여 collagenase, PGE_2, IL-6을 생성시켜, 결합조직을 파괴하고 골흡수를 자극하는 cytokine으로 IL-1과 비슷한 생물학적 작용을 나타낸다[23,42]. IL-1과 마찬가지로 TNF-α도 in vivo와 in vitro실험에서 골흡수를 촉진한다고 보고되었으나[43-45], IL-1보다는 100배에서 1000배 정도 약한 효과를 나타낸다[42]. Stashenko 등과[30] Ozaki등은[46] IL-1과 TNF-α의 상승작용에 대해 연구하였는데, IL-1α와 TNF-α간, IL-1β와 TNF-α간의 상승작용이 일어난다는 것을 보고하였지만, 이 기전에 대해서는 알려진 바가 적다. 하지만, IL-1과 TNF-α 각각의 효과는 indomethacin에 의해 부분적으로 차단되는 반면, 이들간의 상승작용은 indomethacin에 의해 완전하게 차단된다는 사실은 이 상승작용이 PG-dependent pathway에 의해 발생된다고 추론할 수 있게 한다[6,30].

Cytokine은 생물학적 특성을 이용하는 방법, 면역학적 특성을 이용하는 방법, 수용기에 대해 경쟁적으로 결합하는 특성을 이용하는 방법, 그리고 mRNA의 전사를 추론하는 방법 등으로 분석되어질 수 있다. 대체적으로 생물학적 분석(bioassay)은 매우 민감하고 cytokine의 생물학적 작용을 암시하는 장점이 있긴 하지만 재현성과 특이성이 떨어진다는 단점이 있다. 생물학적 분석과는 달리 면역학적 분석(immunoassay)은 재현성과 특이성이 우수하다고 알려져 있다. 면역학적 분석은 분석하고자 하는 cytokine에 직접적으로 연관된 다클론성항체와

단일클론성항체의 조합을 이용하여 cytokine을 검출해 내는 방법이다. 주로 사용되는 방법에는 두 가지 종류가 있는데, enzyme linked immunosorbent assay(ELISA)와 immunoradiometric assay(IRMA)가 그것이다. 하지만 immunoradiometric assay는 방사성 동위원소를 이용하는 것이므로 손쉽게 다룰 수 없고 특별한 장치가 필요하며, 보관 기간이 매우 짧다는 단점 때문에 ELISA가 더 많이 사용되고 있다[20].

Stashenko 등[22]은 치주질환에 이환된 조직에서 IL-1α, IL-1β, TNF-α 등의 농도를 ELISA를 이용해 연구한 결과 이들의 농도가 정상조직에 비해 유의성 있게 높게 나타났다고 보고하였고, Lim 등[7]은 IL-1β와 치근단 염증과의 관계에 대해 연구하였는데 염증이 있는 조직에서 정상조직보다 유의성있게 높은 농도의 IL-1β가 발견된다고 하였고, 증상이 있는 치근단 병소에서 증상이 없는 치근단 병소보다 더 높은 농도의 IL-1β가 발견된다고 하였으나 통계적 유의성은 없다고 하였다. Barkhordar 등[47]은 IL-1β와 치근단 병소의 방사선 상의 크기와의 관계에 대해서 연구하였는데 연구에 사용된 모든 치근단 병소에서 IL-1β가 발견되었으며, IL-1β의 농도와 방사선 상의 크기와는 관계가 없다고 보고하였다. 본 실험에서도 정상으로 진단된 치수조직에 비해서 급성 또는 만성치수염으로 진단된 치수조직과 치근단병소 조직에서 IL-1α, IL-1β, TNF-α 모두 유의성 있게 높은 농도를 나타내었다.

Yavuzyilmaz 등[11]은 치은열구액에서 IL-1β, TNF-α에 대해 연구하였는데, IL-1β는 실험에 사용된 모든 조직에서 검출되었으나 TNF-α는 실험에 사용된 조직중 절반에서만 검출되었다고 보고하였다. 본 실험에서는 치근단병소의 경우 IL-1β는 모든 조직에서 검출되었고 IL-1α는 18예중 16예에서, 그리고 TNF-α는 18예중 11예에서 검출되었으며, 치수염을 가진 치수조직의 경우에는 IL-1β는 19예중 17예에서 검출되었고, IL-1α와 TNF-α는 19예중 14예에서 검출되었다(표 2,3,4). 즉 IL-1β가 가장 많은 예에서 검출되었고 그 다음으로 IL-1α와 TNF-α순으로, Yavuzyilmaz의 연구와 유사한 결과를 볼 수 있었다.

Matsuo 등[1]은 근관치료중 얻은 치근단 삼출액에서의 IL-1α, IL-1β의 농도에 대해 연구하였는데, 치근단 삼출액에서 IL-1β의 농도가 IL-1α의 농도보다 두 배정도 높았으며, IL-1α의 경우 농을 포함한 삼출액에서 농을 포함하지 않은 삼출액에 비해 유의성 있게 높은 농도를 나타내었는데, 이는 IL-1β와는 달리 IL-1α는 세포와 결합된 형태로 존재하기 때문에 세포를 많이 함유하고 있는 농에서 그렇지 않은 삼출액에 비해 높은 농도를 나타내는 것이라고 하였다.

Wang 등[2]은 염증의 active stage에서 감염의 결과로 나타나는 치근단 골흡수 촉진 인자에 대한 연구를 통해 active stage에서는 IL-1α가 IL-1β에 비해 유의성 있게 높은 농도를 나타낸 바 IL-1α가 가장 중요한 역할을 한다고 보고하였는데 본 실험에서 염증의 active stage인 급성치수염군의 경우에서-통계적 유의성은 없었지만- IL-1α의 농도가 더 높게 나온 것과 일치하는 결과라 할 수 있다.

IL-1α와 IL-1β를 비교한 연구에 있어서는 계속 논란이 있어 왔는데, Matsuo 등[1]의 치근단 삼출액을 이용한 실험과 Stashenko 등[22]의 치주질환에 이환된 조직을 이용한 실험에서는 IL-1α의 농도에 비해서 IL-1β의 농도가 높게 나타났고, March 등[48]은 활성화된 단핵세포가 IL-1α mRNA보다 10배 많은 IL-1β mRNA를 생성한다고 보고한 반면, 치은열구액을 이용하여 IL-1α과 IL-1β의 농도를 비교한 Masada 등[9]의 연구에서는 검출된 빈도 수에 있어서는 IL-1β가 높았으나 농도에 있어서는 IL-1α가 유의성 있게 높았다고 보고하였다. 이런 불일치한 결과에 대한 설명으로 Masada 등[9]은 IL-1의 생성에 관여하는 각질 세포의 역할을 제시하였다. 즉 상피 세포내에 존재하는 각질 세포는 IL-1을 생성하는데 이 IL-1 중 IL-1α가 대부분을 차지한다[49,50]. 본 실험에서는 표 5에서 보는바와 같이 급성치수염군과 만성치수염군에서는 IL-1α과 IL-1β의 농도가 큰 차이 없이 나타났으나, 치근단 병소군에서는 -비록 통계적 유의성은 없었지만- IL-1α의 농도가 높게 나타났다. 치근

단병소군에는 낭 또는 낭으로 이행하는 육아종이 포함되어 있으므로 상피세포가 존재할 것으로 생각되며, 이들 상피 내의 각질 세포가 IL-1α을 생성하기 때문에 이런 결과가 나온 것이라고 추정된다.

Stashenko는(personally communicated, 1997) IL-1 및 TNF-α는 염증성 조직에서 질병 상태에 큰 영향을 받지 않고 동등한 결과를 나타낸다고 하였고, Rossomando 등[42] 은 TNF-α의 경우 질환이 심해질수록 오히려 조직내 농도가 감소한다고 보고하여 TNF-α가 질환의 초기 상태를 나타내주는 marker라고 하였다. 본 실험에서 IL-1은 각군간에, 즉 질병 상태간에 유의할 만한 차이가 없었으므로, Stashenko의 견해와 일치하는 결과를 보였다. 또한 TNF-α는 급성치수염군과 만성치수염군에서 치근단병소군보다 높은 농도를 보였으므로, 초기 질환에서의 농도가 질환이 심화되고 난 후의 농도보다 높다는 Rossomando의 결과와 일치하는 결과를 보였지만, 각 군 모두의 농도가 비교적 낮아 ($<$ 5pg/mg tissue) 비록 통계학적으로는 유의성 있는 차이를 보였을지 모르나, 생물학적으로는 의미가 없다고 생각할 수도 있겠다.(Stashenko, personally communicated, 1997)

상관 관계에 있어서는 치근단 병소군에서의 IL-1α와 IL-1β사이에서만 상관 관계가 있는 것으로 나타났고, 다른 경우에 있어서는 그렇지 않은 것으로 나타났다. 이 결과는 Stashenko등[22] 이, 치주 질환에 대한 연구에서, IL-1β와 TNF-α사이에 상관 관계가 있다고 보고한 것과는 다른 결과이다. 따라서 이 부분에 대한 보다 많은 연구가 필요할 것으로 생각된다.

본 실험에서 염증성 치수 및 치근단 병소에서의 IL-1α, IL-β, TNF-α의 분포를 ELISA를 이용하여 분석한 결과, 세가지 모두 염증에 이환된 조직에서 정상 조직에 비해 유의성 있게 높은 농도를 나타낸다는 것을 알 수 있었다. 하지만 치수 및 치근단 질환에서 이들 cytokine 각각의 작용의 차이와 질병 상태에 따른 분포의 차이, 그리고 disease activity와 관련된 효과의 차이에 있어서는 아직 논란의 여지가 많고, 밝혀진 바가 적다. 따라서 이런 것들에 대하여 앞으로 더욱 심화된 연구가 필요할 것으로 생각되며, 골조직의 재조합에 관여하는 이들 cytokine들과 그 밖의 다른 인자들 간의 상호작용에 대한 연구도 필요할 것으로 생각된다.

V. 결 론

본 연구의 목적은 치수 및 치근단 병소내의 IL-1α, IL-1β, TNF-α의 분포를 관찰하고, 이들의 치수 및 치근단 질환의 염증상태에 따른 분포의 차이를 규명하는 것으로, 임상적 진단에 따라 정상치수군(대조군), 급성치수염군, 만성치수염군, 치근단병소군 등으로 분류된 병소들로부터 얻은 조직을 실험대상으로 하였다. 얻어진 조직은 liquid N_2에 보관하였다가, homogenizing buffer에 넣어둔 후 grinding하고 원심분리를 거쳐 얻은 상층액을 ELISA kit(R&D Co., Minneapolis, USA)로 분석하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. IL-1α는 모든 실험군의 농도가 대조군보다 유의성 있게 높았으며($p<0.05$), 치근단병소군의 농도가 치수염군들에 비해 다소 높게 나타났으나 통계적 유의성은 없었다 ($p>0.05$).
2. IL-1β는 모든 실험군의 농도가 대조군보다 유의성 있게 높았으며($p<0.05$), 각 실험군들은 서로 유사한 결과를 나타냈다.
3. TNF-α는 모든 실험군의 농도가 대조군보다 높았으나, 만성치수염군과 대조군간의 차이에서만 통계적 유의성이 나타났다($p<0.05$). 또한 각 실험군간의 결과를 비교해 보면, 급성치수염군과 만성치수염군이 치근단병소군에 비해 높은 농도를 나타냈으나, 만성치수염군과 치근단병소군간의 차이에서만 통계적 유의성이 나타났다($p<0.05$).
4. 상관관계에 있어서는 치근단병소군에서의 IL-1α와 IL-1β 사이에서만 통계적 유의성이 있었다($p<0.05$).

참 고 문 헌

1. Matsuo T, Ebisu S, Nakanishi T, Yone-

mura K, Harada Y, Okada H. : Interleukin-1α and interleukin-1β in periapical exudates of infected root canals : Correlation with the clinical findings of the involved teeth. J Endodon, 20(9) : 432-435, 1994.

2. Wang CY, Stashenko P. : The role of interleukin-1α inthe pathogenesis of periapical bone destruction in a rat model system. Oral Microbiol Immunol, 8 : 50-56, 1993.
3. Miller GA, DeMayo T, Hutter JW. : Production of interleukin-1 by polymorphonuclear leukocytes resident in periradicular tissue. J Endod, 22(7) : 346-351, 1996.
4. Yu SM, Stashenko P. : Identification of inflammatory cells in developing rat periapical lesions. J Endod, 13(11) : 535-540, 1987.
5. Bergenholtz G. : Pathogenic mechanisms in pulpal disease. J Endod, 16(2) : 98-101, 1990.
6. Wang CY, Stashenko P. : Characterization of bone-resorbing activity in human periapical lesions. J Endod, 19(3) : 107-111, 1993.
7. Lim GC, Torabinejad MT, Kettering J, Linkhardt TA, Finkelman RD. : Interleukin-1β in symptomatic and asymptomatic human periradicular lesions. J Endodon, 20 (5) : 225-227, 1994.
8. Wang CY, Stashenko P. : Kinetics of bone-resorbing activity in developing periapical lesions. J Dent Res, 70(10) : 1362-1366, 1991.
9. Masada MP, Persson R, Kemmey JS. : Measurement of Interleukin-1α and -1β in gingival crevicular fluid, J Perio Res, 25 : 156-163, 1989
10. H nig J, Rordorf-Adam C, Siegmund C, Wiedemann W, Erard F. : Increased interleukin-1 β concentration gingival tissue from periodontitis patients. J Perio Res, 24 : 362-367, 1989.
11. Yavuzyilmaz E, Yamalik N. : The gingival crevicular fluid Interleukin-1β and tumor necrosis factor-α levels in patients with rapidly progressive periodontitis. Australian Dent J, 40(1) : 46-9, 1995.
12. Safavi KE, Rossomando EF. : Tumor necrosis factor identified in periapical tissue exudates of teeth with apical periodontitis. J Endod, 17(1) : 12-14, 1991.
13. D'Souza R, Brown R, Newland JR, Levy BM, Lachman LB. : Detection and characterization of interleukin-1 in human dental pulps. Archs Oral Biol, 34(5) : 307-313, 1989.
14. Jandinski JJ, Stashenko P, Feder LS, Leung CC, Peros WJ, Rynar JE, Deasy MJ. : Localization of Interleukin-1β in human periodontal tissue. J Periodont, 62 : 36-43, 1991.
15. Gaffney EV, Anderson AE, Pfanenstiel YT. Koch GA. : Antibodies and their role in IL-1 research. Immunol Rev, 119 : 181-199, 1991.
16. Dinarello CA. : Biology of interleukin-1. FASEB J, 2 : 108-115, 1988.
17. Tatakis DN. : IL-1 and bone metabolism : A review. J periodontol, 64 : 416-431, 1993.
18. Burchett SK, Weaver WM, Westall JA, Larsen A, Kronheim S, Wilson CB. : Regulation of tumor necrosis factor/cachectin and interleukin-1 secretion in human mononuclear phagocytes. J Immunol, 140 : 34 73-3481, 1988.
19. Kenney JS, Masada MP, Eugui EM. : Monoclonal antibodies to human recombinant interleukin 1β : Quantitation of interleukin 1β and inhibition of biological activity. J Immunol, 138 : 4236, 1987.
20. Brennan FM, Haworth C. : Cytokine assays. In: Roitt IM, Delves PJ. : Encyclope-

dia of immunology. Academic press, 430-433, 1992.

21. Avrameas S, Ternynck T. : Enzyme linked immunosorbent assay. In: Roitt IM, Delves PJ. : Encyclopedia of immunology. Academic press, 508-510, 1992.
22. Stashenko P, Jandinski JJ, Fujiyoshi P, Rynar J, Socransky SS : Tissue levels of bone resorptive cytokines in periodontal disease. J Periodontol, 62 : 504-509, 1991.
23. Alexander MB, Damoulis PD. : The role of cytokines in the pathogenesis of periodontal disease. Current Opinion in Periodontology, 39-53, 1994.
24. Wiebe H, Hafezi M, Sandhu HS, Sims SM, Dixon SJ. : Osteoclast activation in inflammatory periodontal diseases. Oral Diseases, 2 : 167-180, 1996.
25. Durum SK, Oppenheim JJ, Neta R. : Immunophysiologic role of interleukin-1. In: Oppenheim JJ, Shevach EM, eds. Immunophysiology: The role of cells and cytokines in immunity and inflammation. New York:Oxford University Press, 210-225, 1990.
26. Cavaillon J-M, Haeffner-Cavaillon N. : Signals involved in interleukin 1 synthesis and release by lipopolysaccharide-stimulated monocytes/macrophages. Cytokine, 2 : 313-329, 1990.
27. Dinarello CA. : IL-1 and IL-1 antagonism. Blood, 77 : 1627-1652, 1991.
28. Lomedico PT, Kilian PL, Gubler U, Stern AS, Chzzonite R. : Molecular biology of interleukin-1. Cold Spring Harbor Symp Quant Biol, 51 : 631-639, 1986.
29. Cosman DJ, Deeley MC, Kronheim SR. : IL-1α:Cloning ,expression and biological activities. In: Gillis, S., ed. Recombinant lymphokines and their receptors. New york: Marcel Dekker, Inc., 125, 1987.
30. Stashenko P, Dewhirst FE, Peros WJ, Kent RL, Ago JM. : Synergistic interaction between interleukin 1, tumor necrosis factor, and lymphotoxin in bone resorption. J Immunol, 138 : 1464-1468, 1987.
31. Bosma T, Levine L, Tashijian AH, Jr. : Recombinant human interleukin 1 alpha and-1-beta: comparative activities and actions on neonatal mouse calvaria. J Bone Miner Res, 3(Suppl. 1) : S196(Abstr.510), 1988.
32. Rupp EA, Cameron PM, Ranawat CS. : Specific bioactivities of monocyte-derived interleukin 1 alpha and interleukin 1 beta are similar to each other on cultured murine thymocytes and on cultured human connective tissue cells. J Clin Invest, 78 : 836, 1986.
33. Gowen M, Wood DD, Ihrie EJ, McGuire MK, Russel RC. : An interleukin-1 like factor stimulates bone resorption in vitro. Nature, 306 : 378-380, 1983.
34. Gowen M, Mumdy GR. : Actions of recombinant interleukin 1, interleukin-2, and interferon-gamma on bone resorption in vitro. J Immunol, 136 : 2478-2482, 1986.
35. Thomson BM, Saklatvala J, Chambers TJ. : Osteoblasts mediate interleukin-1 stimulation of bone resorption by rat osteoclasts. J Exp Med, 164 : 104-112, 1986.
36. Heath JK, Saklatvala J, Meikle MC, Atkinson SJ, Reynolds JJ. : Pig interleukin-1 is a potent stimulator of bone resorption in vitro. Calcif Tissue Int, 37 : 95-97, 1985.
37. Sato K, Fujii Y, Kasono K, Saji M, Tsushima T, Shizume K. : Stimulation of prostaglandin E2 and bone resorption by recombinant human interleukin 1 alpha in fetal mouse bones. Biochem Biophys REs Commun, 138 : 618-624, 1986.
38. Nishihara T, Ishihara Y, Noguchu T, Koga T. : Membrane IL-1 induced bone resorption in organ culture. J Immunol, 143 :

1881-1886, 1988.
39. Garrett IR, Mundy GR. : Relationship between interleukin-1 and prostaglandins in resorbing neonatal calvaria. J Bone Miner Res, 4 : 789-794, 1989.
40. Dewhirst FE, Ago JM, Stashenko P. : Interleukin-1 and prostaglandin E2 are synergistic in stimulating bone resorption. J Dent Res, 66(Spec. Issue) : 122(Abstr. 123), 1987.
41. Dewhirst FE, Ago JM, Peros WJ, Stashenko P. : Synergism between parathyroid hormone and interleukin-1 in stimulating bone resorption in organ culture. J Bone Miner Res, 2 : 127-134, 1987.
42. Rossomando EF, Kennedy JE, Hadjimichael J. : TNF-α in gingival crevicular fluid as a possible indicator of periodontal disease in humans. Archis Oral Biol, 35 (6) : 431-434, 1990.
43. Bertolini DR, Nedwin GE, Bringman TS, Smith DD, Mundy GR : Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation in vitro by human tumor necrosis factors. Nature, 319 : 516-518, 1986.
44. Van der Pluijm G, Most W, Van der Wee-Pals L, De Groot H, Parapoulos S, Lowik C : Two distinct effects of recombinant human tumor necrosis factor-α on osteoclast development and subsequent resorption of mineralized matrix. Endocrinology, 129 : 1596-1604, 1991.
45. Johnson RA, Boyce BF, Mundy GR, Roodman GD : Tumors producing human tumor necrosis factor induce hypercalcemia and osteoclastic bone resorption in nude mice. Endocrinology, 124 : 1424-1427, 1989.
46. Ozaki K, Hanazawa A, Takeshita A, Chen Y, Watanabe A, Nishida K, Miyata Y, Kitano S. : Interleukin-1β and tumor necrosis factor-α stimulate synergistically the expression of monocyte chemoattractant protein-1 in fibroblastic cells derived from human periodontal ligament. Oral Microbiol Immunol, 11 : 109-114, 1996.
47. Barkhardar RA, Hussain MZ, Hayashi C. : Detection of interleukin-1β in human periapical lesions. Oral Surg Oral Medi Oral Pathol, 83 : 334-336, 1992.
48. March CJ, Mosley B, Larsen A. : Cloning, sequence and expression of two distinct human interleukin-1 complementary DNAs. Nature, 315 : 641, 1985.
49. Kupper TS, Ballard DW, Chua AO. : Human keratinocytes contain mRNA indistinguishable from monocyte interleukin 1 alpha and beta mRNA. Keratinocyte epidermal cell-derived thymocyte-activating factor is identical to interleukin 1. J Exp Methods, 164 : 2095, 1986.
50. Ansel JC, Luger TA, Lowry D, Perry P, Roop DR, Mountz JD. : The expression and modulation of interleukin-1α in murine keratinocytes. J Immunol, 140 : 2274-77, 1988.