

재발성 아프타성 궤양 환자에서  
*Helicobacter pylori*의 발현정도 및  
병인과의 상관성

연세대학교 대학원

치 의 학 과

김 현 철

재발성 아프타성 궤양 환자에서  
*Helicobacter pylori*의 발현정도 및  
병인과의 상관성

지도 김 종 열 교수

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함

2002년 6월 일

연세대학교 대학원

치 의 학 과

김 현 철

# 김현철의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

연세대학교 대학원

2002년 6월 일

## 감사의 글

본 논문이 있기까지 시종일관 아낌없는 배려와 세심한 지도를 해주신 김종열 교수님께 진심으로 감사드리며, 그 동안 논문 작성과 심사의 지도편달과 많은 격려와 조언을 아끼지 않으셨던 박광균 교수님, 서정택 교수님, 최종훈 교수님, 신경진 교수님께도 진심으로 감사드립니다. 아울러 바쁜 일과 속에서도 많은 도움을 주셨던 김재홍, 이상섭 선생님과 지금의 저를 있게 해준 구강내과학 교실 및 교실원 여러분, 원활한 실험이 가능하게 해준 구강내과 분자생물학 연구실과 연진회에도 감사드립니다.

또, 함께 진료하며 바쁜 와중에서도 면학에 열중할 수 있도록 온갖 배려를 아끼지 않았던 친우 김윤식, 박준호, 윤홍철 원장님과 연세베스트덴 치과의 모든 직원분들에게도 고마움을 표시합니다. 저에게 배움의 기회를 허락하시고 끝없는 후원을 아끼지 않으신 부모님과 친자식처럼 보살펴 주시는 장인, 장모님과도 작은 기쁨을 나누고 싶습니다.

마지막으로 인생의 동반자로서, 한 아이의 엄마로서, 변함없는 내조와 저에게 항상 든든한 디딤돌이 되어준 사랑하는 아내 최상명과 귀염둥이 아영에게 아빠로서의 미안함과 고마움을 전하며 이 논문을 바칩니다.

2002년 6월

# 차 례

그림 차례 .....	iii
표차례 .....	iv
국문 요약 .....	v
<b>I. 서 론</b> .....	<b>1</b>
<b>II. 연구대상 및 방법</b> .....	<b>5</b>
1. 연구 대상 .....	5
2. 연구 방법 .....	7
가. DNA의 추출 .....	7
나. 프라이머 설정 .....	8
다. 중합효소 연쇄반응 .....	10
라. 중합효소 연쇄반응 산물의 검출 .....	11
마. 염기서열 결정반응 .....	11
바. 분석 및 통계 .....	12

III. 연구 결과 .....	13
1. H. pylori 유전자의 PCR 증폭 .....	13
2. 증폭산물의 염기서열분석 .....	14
3. 병소균, 병력균, 대조균에서 H. pylori 유전자의 양성빈도 .....	16
4. 병소균, 병력균, 대조균에서 H. pylori 유전자의 발현빈도 비교 .....	18
5. 병소균, 병력균, 대조균의 협점막 표본에서 H. pylori 유전자의 발현빈도 비교 .....	19
6. 병소균, 병력균, 대조균의 치태 표본에서 H. pylori 유전자의 발현빈도 비교 .....	20
IV. 고    찰 .....	21
V.    결    론 .....	26
참고 문헌 .....	28
영문 요약 .....	35

## 그림 차례

Fig. 1. Location of EHC and ET primers in genomic DNA of <i>H. pylori</i> .....	9
Fig. 2. Electrophoretic patterns of PCR amplification products of <i>H. pylori</i> gene .....	13
Fig. 3. Sequence analysis of the nested PCR products (230bp) .....	15

## 표 차례

Table 1. Nucleotide sequences of primers used in nested PCR .....	9
Table 2. Comparison of coincidence between sequences of PCR products and two different strains of <i>H. pylori</i> from GeneBank .....	16
Table 3. The distribution of incidence of <i>H. pylori</i> in RAU, History, and Control group .....	17
Table 4. Statistical significance of incidence rate of <i>H. pylori</i> between RAU, History, and Control group .....	18
Table 5. Statistical significance of incidence rate of <i>H. pylori</i> between RAU, History, and Control group in buccal mucosa .....	19
Table 6. Statistical significance of incidence rate of <i>H. pylori</i> between RAU, History, and Control group in plaque .....	20



## 재발성 아프타성 궤양 환자에서 *Helicobacter pylori*의 발현정도 및 병인과의 상관성

구강점막을 침범하는 모든 유형의 비외상성 궤양 중 재발성 아프타성 궤양 (recurrent aphthous ulcerations, RAU)은 가장 흔히 볼 수 있는 궤양성 질환으로 현재 이의 명확한 원인은 밝혀져 있지 않다. 미생물학적 원인의 경우 구강 및 위장에서 발견되는 *H. pylori*가 서로 동일한 염기서열로 이루어져 있고 구강내 궤양 및 위 궤양의 조직학적인 양상이 서로 유사하므로, 따라서 재발성 아프타성 궤양의 형성에 있어 *H. pylori*가 영향을 끼친다는 가설의 설정이 가능하리라 사료된다.

이에 *H. pylori*의 구강내 저장소 및 재발성 아프타성 궤양의 원인으로서 *H. pylori*의 연관성을 평가하여 보고자 연세대학교 치과대학병원에 재발성 아프타성 궤양으로 내원한 환자를 대상으로 협점막의 궤양병소와 정상 협점막 및 치은연상 치태 내의 *H. pylori*의 유무 및 검출빈도를 PCR을 이용하여 분석평가한 후 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 재발성 아프타성 궤양 환자로부터 얻은 표본의 경우 32.5%의 *H. pylori* 양성결과를 보였고 그 중 협점막 궤양 병소는 35.0%, 치태는 30.0%의 양성결과를 보였다. 궤양병력 환자로부터 얻은 표본의 경우 15.0%의 *H. pylori* 양성결과를 보였고 그 중 협점막은 5.0%, 치태는 25.0%의 양성결과를 보였다. 대조군으로부터 얻은 표본의 경우 7.5%의 *H. pylori* 양성결과를 보였고 그 중 협점막은 10.0%, 치태는 5.0%의 양성결과를 보였다.

2. 궤양 표본과 대조군 표본의 *H. pylori* 유전자 발현빈도의 비교에서 유의차를 보였으며 ( $P<0.01$ ), 궤양 표본과 궤양병력 표본 및 궤양병력 표본과 대조군 표본의 비교에서는 유의차를 보이지 않았다.

3. 협점막 표본의 경우 궤양 표본과 궤양병력 표본의 *H. pylori* 유전자 발현빈도의 비교에서 유의차를 보였으며 ( $P<0.05$ ), 궤양 표본과 대조군 표본 및 궤양병력 표본과 대조군 표본의 비교에서는 유의차를 보이지 않았다.

4. 치태 표본의 경우 궤양 표본과 대조군 표본의 *H. pylori* 유전자 발현빈도의 비교에서 유의차를 보였으며 ( $P<0.05$ ), 궤양 표본과 궤양병력 표본 및 궤양병력 표본과 대조군 표본의 비교에서는 유의차를 보이지 않았다.

이상의 연구를 종합하여 보았을 때 재발성 아프타성 궤양의 발생 원인 중의 하나로 *H. pylori*의 가능성을 제시할 수 있을 것으로 사료되며, *H. pylori*의 구강내 저장소로서 치태의 역할에 대한 가설을 성립시킬 수 있는 근거를 마련하였다. 향후 더 많은 표본을 대상으로 면역학적, 미생물학적, 분자생물학적 연구 등 정밀하고 광범위한 연구의 필요성이 있으며, 또한 *H. pylori*가 원인이 된 위궤양 환자에서 재발성 아프타성 궤양과 위궤양 발생과의 상호 연관성에 대한 추가적인 연구도 가치가 있을 것으로 사료되는 바이다.

---

핵심되는 말 : 재발성 아프타성 궤양, *Helicobacter pylori*, 치은연상 치태, PCR

# 재발성 아프타성 궤양 환자에서 *Helicobacter pylori*의 발현정도 및 병인과의 상관성

( 지도 김 종 열 교수 )

연세대학교 대학원 치의학과

김 현 철

## I. 서 론

구강점막을 침범하는 모든 유형의 비외상성 궤양 중 재발성 아프타성 궤양 (recurrent aphthous ulcerations, RAU)은 가장 흔히 볼 수 있는 궤양성 질환이다. 이는 구강 점막에 주기적으로 나타나는 하나 또는 그 이상의 통증성 궤양 병소로 정의될 수 있다. 재발성 아프타성 궤양은 임상적인 기준에 따라 소아프타성 궤양 (minor aphthous ulcerations), 대아프타성 궤양(major aphthous ulcerations), 헤르페스성 궤양(herpetiform aphthous ulcerations)으로 분류된다. 한편, 재발성 아프타성 궤양은 베체트 질환(Behçet's disease)의 진단에 있어 가장 중요한 일련의 임상적 기준으로 사용될 수 있다 (Regezi and Sciubba, 1999).

하지만, 구강 점막에 가장 흔히 이환되는 질환임에도 불구하고 불행하게도 현재 까지 이의 명확한 원인은 밝혀져 있지 않다. 궤양성 병소의 주기에 따라 helper T cell(CD4<sup>+</sup>) 및 suppressor T cell(CD8<sup>+</sup>) 비의 변화(Savage 등, 1988)가 관찰되었으며, cytokine의 일종으로 중요한 면역 매개체로 생각되고 있는 TNF(Tumor Necrosis Factor)- $\alpha$ 의 증가(Natah 등, 2000)가 확인되어 면역학적 원인이 제시되고 있다. 한편,

재발성 아프타성 궤양에서 HLA(Human Leukocyte Antigen)-B12의 증가(Challacombe 등, 1977) 및 베체트 증후군에서 HLA(Human Leukocyte Antigen)-B5의 증가(Ersoy 등, 1977)가 관찰되었으며, 병소 주기에 따른 MHC(Major Histocompatibility) 항원의 증가(Savage 등, 1988)를 보여 유전학적 원인 또한 고려되고 있다. 그 외 혈액학적 원인, 미생물학적 원인 및 기타 호르몬 변화, 스트레스, 외상, 알레르기 등 가능한 여러 가지 원인이 제시되고 있을 따름이다 (Challacombe 등, 1977, Scully 등, 1989).

미생물학적인 원인의 경우 과거 재발성 아프타성 궤양은 재발성 단순 포진 바이러스 감염의 일종으로 생각되었으나, 많은 연구(Griffin, 1963, Lennette and Magoffin, 1973)를 통해 단순 포진 바이러스에 의하여 재발성 아프타성 궤양이 발생하지 않는다는 것을 확인하였다. 한편, Pedersen과 Hornsleth (1993), Leimola-Virtanen 등 (1995) 및 Sun 등(1996)은 혈청학적 연구 및 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)을 이용하여 재발성 아프타성 궤양과 varicella zoster virus(VZV) 및 cytomegalovirus(CMV)의 관련성을 연구하였다.

이에 비하여 현재 재발성 아프타성 궤양과 세균과의 관련성에 대하여 밝혀진 연구는 매우 제한적이다. Donatsky 등(1977)은 세균 배양을 통하여 재발성 아프타성 궤양과 알파 용혈성 연쇄상구균( $\alpha$ -hemolytic streptococcus), 응고효소 음성 포도상구균(coagulase-negative staphylococcus) 및 *Neisseria*의 관련성을 제시한 바 있다. 한편, Barile 등(1963)은 재발성 아프타성 궤양 병소로부터 *Streptococcus sanguis* (현재 *Streptococcus oralis*라고 명명)를 분리하였다고 하였으며, *Streptococcus sanguis*가 궤양성 피부 병소를 유발한다고 보고하였다. Narikawa 등(1995)은 베체트 질환 환자에서 *Streptococcus sanguis*를 높은 빈도로 분리하였다고 하였다. 하지만, PCR을 이용한 *Streptococcus oralis* 검출에 있어 유의한 결과를 얻지 못하였고 (Riggio 등, 2000) 정상적인 구강점막에서도 *Streptococcus oralis*가 검출되며 세균 항원에 의한 과민반응이 관찰되지 않으므로, 현재 이들 세균은 재발성 아프타성 궤양의 원인으로서는 받아들여

지지 않고 있다.

*Helicobacter pylori* (*H. pylori*)는 미세 호기성 및 그람 음성의 특징을 지니고 있는 나선형의 운동성 세균으로서 만성 활동성 B형 위염과 위궤양 질환 및 위암 발생과 관련을 가지고 있는 것으로 여겨지고 있다. *H. Pylori*는 위점막, 위 분비물, 대변, 타액, 치태 및 치은열구 등에서 발견되며, *H. Pylori* 감염은 전세계적으로 만연이 되어 있고 연령에 따라 증가하는 경향을 보이고 있기는 하지만, 그 정확한 감염 경로는 현재까지 밝혀진 바가 없다 (Goodwin 등, 1997). 가능한 전파 경로로 오염된 식수, 구강과 구강의 접촉 및 위와 구강의 접촉에 의한 감염(Li 등, 1996)과 대변에 의한 구강의 오염 등이 제시되고 있다 (Leung 등, 1999).

위장 내의 *H. pylori*의 진단학적 검출을 위하여 다양한 방법이 시행되어 왔다. *H. pylori*에 대한 IgG 항체를 검출하는 혈청학적 검사 및 *H. pylori* urease에 의해 유리되는 CO<sub>2</sub>를 이용하는 urea breath test가 제시되었다 (Kosunen and Megroud, 1995). 그 외 생검조직을 이용한 배양, 조직화학 염색 및 urease test(CLO test) 등이 이용되어 왔다 (Fabre 등, 1994). 하지만, 구강 내의 경우 배양을 통한 검출을 하기에는 충분한 수의 *H. pylori*가 존재하지 않을 뿐만 아니라 구강 내의 정상 세균총의 억제작용으로 인하여 만족할 만한 결과를 얻기가 힘들고 (Madinier 등, 1997, Nguyen 등, 1995), 구강은 위장과는 달리 정상 세균총 내에 urease를 형성하는 많은 세균이 존재하는 것으로 알려져 있기 때문에 구강내 표본의 경우 이러한 방법을 이용하여 만족할 만한 결과를 얻기는 힘든 것으로 알려져 있다.

이러한 문제점을 극복하기 위하여 구강 내에서도 PCR을 이용한 *H. pylori* 검출 방법이 연구되기 시작하였다. PCR의 경우 다른 방법에 비하여 상대적으로 민감도 (sensitivity) 및 특이도(specificity)가 높아 타액 및 치태를 대상으로 하는 많은 연구가 시행되어 왔다. (Hammer 등, 1992, Chong 등, 1996, Vallentine 등, 1991, Wahlfors 등, 1995)

구강 및 위장에서 발견되는 *H. pylori*가 서로 동일한 염기서열로 이루어진 strain

이며 (Shames 등, 1989) 구강내 궤양 및 위궤양의 조직학적인 양상이 서로 유사하고 (Birek 등, 1999) 재발성 아프타성 궤양의 경우 테트라사이클린과 같은 광범위 항생제 치료에 효과적이므로, 따라서 재발성 아프타성 궤양의 형성에 있어서도 *H. pylori*가 영향을 끼친다는 가설의 설정이 가능하리라 사료된다. 이에 비하여 재발성 아프타성 궤양과 *H. pylori*에 대한 국외의 연구는 희소하고 그 연구 결과도 서로 많은 상이점을 보일 뿐만 아니라, 게다가 국내의 경우 이에 관한 어떠한 특기할 만한 연구가 진행이 되지 않은 바 이에 대한 실험연구의 필요성이 상당히 제기되고 있다.

이에 본 연구에서는 연세대학교 치과대학 병원에 재발성 아프타성 궤양으로 내원한 환자를 대상으로 궤양 병소 및 치태 내의 *H. pylori*의 유무 및 검출 빈도를 PCR을 이용하여 평가하고, 나아가 *H. pylori*의 구강내 저장소 및 재발성 아프타성 궤양의 원인으로서 *H. pylori*의 연관성에 관한 기초적 자료를 제시함으로써 향후 재발성 아프타성 궤양의 병인론적 진단 및 효과적인 치료방향 설정에 도움을 주고자 하는데 그 목적을 두었다.

## II. 연구대상 및 방법

### 1. 연구대상

연세대학교 치과대학병원 구강내과에 위염 및 위궤양의 병력을 포함한 전신적인 질환이 없고 투약 중이지 않은 재발성 아프타성 궤양으로 내원한 환자 20명(11세-68세)과 재발성 아프타성 궤양의 병력이 있지만 현재 진행중인 궤양성 병소는 없는 환자 20명(26세-58세), 그리고 대조군으로 재발성 아프타성 궤양의 병력이 없는 환자 20명(17세-64세)을 무작위로 선정하였다. 이들로부터 DNA를 추출하고자 궤양 환자의 경우 소독된 면봉으로 협점막 궤양 병소를 긁어 구강상피세포를 채취한 후 1.5ml microcentrifuge tube에 넣었고, 소독된 핀셋으로 치은연상 치태를 채취하여 phosphate buffered saline (PBS)이 들어 있는 1.5ml microcentrifuge tube에 희석하였다. microcentrifuge tube의 뚜껑을 닫은 후 DNA를 추출할 때까지 -20℃ 냉동고에 보관하였다. 궤양병력 환자 및 대조군의 경우 위와 동일한 방법으로 협점막 및 치은연상 치태를 채취하여 -20℃ 냉동고에 보관하였다.

재발성 아프타성 궤양 환자로부터 얻은 전체표본을 RAU군 (병소군, n=40)이라 하였고, 이를 다시 RAU 1군 (협점막 궤양 병소로부터 얻은 표본, n=20)과 RAU 2군 (치태 표본, n=20)으로 구분하였다 (RAU군 = RAU 1군 + RAU 2군). 또한, 궤양병력 환자로부터 얻은 전체표본을 History군 (병력군, n=40)이라 하였고, 이를 다시 History 1군 (협점막으로부터 얻은 표본, n=20)과 History 2군 (치태 표본, n=20)으로 구분하였다 (History군 = History 1군 + History 2군). 마찬가지로 대조군으로부터 얻은 전체표본을 Control군 (대조군, n=40)이라 하였고, 이를 다시 Control 1군 (협점막으로부터 얻은 표본, n=20)과 Control 2군 (치태 표본, n=20)으로 구분하였다 (Control군 = Control 1군 + Control 2군).

실험의 양성 대조군(positive control)의 확보를 위하여 연세대학교 의과대학 소화기내과에 의뢰하여 *H. pylori* 감염이 확진된 환자의 위점막을 조직생검을 통하여 채취한 후 -70℃ 냉동고에 보관하였다.



## 2. 연구방법

구강상피세포와 치태로부터 DNA를 추출하여 *H. pylori*의 genomic DNA를 PCR을 이용하여 증폭한 후 전기영동하여 그 결과를 분석하였다.

### 가. DNA의 추출

수집된 시료로부터 QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany)를 이용하여 다음과 같이 DNA를 추출하였다. 먼저 400 $\mu$ l의 phosphate buffered saline (PBS), 20 $\mu$ l의 QIAGEN Protease, 400 $\mu$ l의 Buffer AL을 면봉이 담겨 있는 1.5ml microcentrifuge tube에 넣어 혼합한 다음 즉시 15초간 vortexing하였다. 56 $^{\circ}$ C 순환항온수조에서 10분간 반응시킨 후 짧게 원심분리한 다음 다시 400 $\mu$ l의 100% 에탄올을 첨가하고 vortexing한 후 짧게 원심분리하였다. 이렇게 혼합된 용액으로부터 700 $\mu$ l를 취하여 QIAamp spin column에 옮긴 후 6000 $\times$ g로 1분간 원심분리하여 여과된 용액은 버렸다. 이러한 과정을 남아 있는 혼합액이 없어질 때까지 반복하였다. 500 $\mu$ l의 Buffer AW1을 넣고 6000 $\times$ g로 1분간 원심분리, 500 $\mu$ l의 Buffer AW2를 넣고 20000 $\times$ g로 3분간 원심분리, 그리고 여과된 용액을 버리고 20000 $\times$ g로 다시 1분간 원심분리하였다. 150 $\mu$ l의 Buffer AE를 넣고 상온에서 1분간 반응시킨 후 6000 $\times$ g로 1분간 원심분리한 후 여과된 용액을 증합효소 연쇄반응에 사용하기 전까지 -20 $^{\circ}$ C 냉동고에 보관하였다 (QIAGEN, Hilden, Germany).

위점막에서 채취한 시료의 경우 400 $\mu$ l의 phosphate buffered saline (PBS), 20 $\mu$ l의 QIAGEN Protease, 400 $\mu$ l의 Buffer ATL을 시료가 담겨 있는 1.5ml microcentrifuge tube에 넣어 혼합한 다음 즉시 15초간 vortexing한 후 56 $^{\circ}$ C 순환항온수조에서 3시간 동안 반응시킨 후 짧게 원심분리하였고, 나머지 과정은 헛점막 시료의 DNA 추출 방법과 동일하게 시행하였다 (QIAGEN, Hilden, Germany).

## 나. 프라이머 설정

Musich등(1995) 및 Song등(1999, 2000a, 2000b)이 제시한 *H. pylori*의 860bp genomic DNA 염기서열을 이용하여 프라이머 (Bioneer, Daejeon, Korea)를 합성하였고 그 염기서열은 표 1 및 그림 1과 같다.

nested 중합효소 연쇄반응을 통하여 목적하는 염기서열의 극대화를 도모하였으며, 첫 번째 중합효소 연쇄반응에 사용한 프라이머는 EHC-U 및 EHC-L이었고 두 번째 중합효소 연쇄반응에 사용한 프라이머는 ET-5U 및 ET-5L이었다.

Table 1. Nucleotide sequences of primers used in nested PCR

Name	Sequence
EHC primers*	
EHC-U	5'-CCCTCACGCCATCAGTCCCAAAAA-3'
EHC-L	5'-AAGAAGTCAAAAACGCCCAAAAAC-3'
ET primers*	
ET-5U	5'-GCCAAATCATAAGTCCGCAGAA-3'
ET-5L	5'-TGAGACTTTCCTAGAAGCGGTGTT-3'

\* Identical to EHC and ET primers reported by Song *et al*, 1999

80041	CACAAACATG	GGGGTGAGTT	TCACCCCTGC	TTTACCCCTC	ACGCCATCAG	TCCCAAAAAAT
80101	TTTCATCGTT	ATAAAATACC	TTTTAAACTA	TTTTTAATCA	ATTTTTAGAT	AGAATTATGC
80161	CAAATTTTAC	ATTACAAAGG	GATTAACA	AGGCTATGC	AAATCATAAG	TCCGCAGAAA
80221	AGCGAATCAG	ACAGACCATT	AAGAGAACCG	AACGCAACAG	GTTCTATAAA	ACTAAAATTA
80281	AAAATATCAT	TAAAGCCGTG	CGTGAAGCCG	TTGCTGTCAA	TGATGTAGCA	AAAGCTCAAG
80341	AGCGTTTGAA	AATCGCTAAT	AAAGAGTTGC	ATAAATTTGT	CAGCAAGGGG	ATTTTAAAGA
80401	AAAACACCGC	TTCTAGGAAA	GTCTCAAGGC	TTAACGCTTC	AGTGAAAAAA	ATCGCTCTCG
80461	CTTAGTTTTG	TGGCGTTTTC	AACTTCTTTA	AGCTCAGTAA	TGGGTTTTTA	TTATTGGGCT

Fig 1. Location of EHC and ET primers in genomic DNA of *H. pylori*

The diagram is partial sequences of *H. pylori* strain 26695 that is registered in the GeneBank (GeneBank Accession No. AE000511). The sequences of designed forward and reverse primers of EHC are lightly shadowed. And the sequences of those of ET are darkly shadowed.

#### 다. 중합효소연쇄반응

*H. pylori* genomic DNA의 첫 번째 PCR을 위한 혼합물은 10mM Tris-HCl (pH 9.0), 40mM KCl, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 250 $\mu$ M의 dNTP, 그리고 1U의 *Taq* DNA polymerase가 포함된 AccuPower PCR Premix (Bioneer, Daejeon, Korea)에 1 $\mu$ l의 주형 DNA와 각각 0.5 $\mu$ M의 EHC-U 및 EHC-L primer를 포함하여 최종 부피가 20  $\mu$ l가 되도록 하였다 (Bioneer, <http://www.bioneer.co.kr>). 모든 PCR은 첫 온도순환에 앞서 95 $^{\circ}$ C에서 5분간 가열한 다음 94 $^{\circ}$ C에서 45초, 59 $^{\circ}$ C에서 30초, 72 $^{\circ}$ C에서 45초로 이루어진 총 40회의 온도순환 후 72 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응시켰다.

*H. pylori* genomic DNA의 두 번째 PCR을 위한 혼합물은 10mM Tris-HCl (pH 9.0), 40mM KCl, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 250 $\mu$ M의 dNTP, 그리고 1U의 *Taq* DNA polymerase가 포함된 AccuPower PCR Premix (Bioneer, Daejeon, Korea)에 1 $\mu$ l의 첫 번째 PCR 산물과 각각 0.5 $\mu$ M의 ET-5U 및 ET-5L primer를 포함하여 최종 부피가 20 $\mu$ l가 되도록 하였다 (Bioneer, <http://www.bioneer.co.kr>). 모든 PCR은 첫 온도순환에 앞서 95 $^{\circ}$ C에서 5분간 가열한 다음 94 $^{\circ}$ C에서 45초, 59 $^{\circ}$ C에서 30초, 72 $^{\circ}$ C에서 45초로 이루어진 총 25회의 온도순환 후 72 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응시켰다.

한편, 모든 PCR 증폭 시에 먼저  $\beta$ -globin primer를 이용하여 PCR을 시행함으로써 DNA의 존재여부를 확인하였으며, 음성 대조군(negative control)도 매번 동시에 증폭하여 오염여부를 추적하였다. 양성 대조군(positive control)으로는 *H. pylori* 감염이 확인된 환자의 위점막에서 추출한 DNA를 이용함으로써 위양성의 가능성을 배제하였다. 또한, 각 PCR 산물간 또는 시료간의 교차오염을 방지하기 위하여 PCR 혼합물의 제조와 PCR 수행 및 PCR 산물의 검출은 서로 격리된 공간에서 수행하였다. 모든 PCR 과정은 DNA Engine PTC-0200D (MJ Research, U.S.A.)에서 수행하였다.

#### 라. 중합효소연쇄반응 산물의 검출

0.5 $\mu$ g/ml의 비율로 ethidium bromide가 포함된 1% agarose gel 상에 5 $\mu$ l의 PCR 산물을 전기영동하여 산물의 크기에 따른 이동거리를 비교함으로써 이의 크기를 예측하였다. DNA의 크기 인식자료는 100bp DNA ladder (Bioneer, Korea)를 이용하였다. 모든 전기영동 과정은 RunOne Electrophoresis System EP2000 (Embitec, San Diego, U.S.A.)에서 수행하였다.

전기영동이 종료된 후 UVivue Transilluminator STX 20M (UVItec, Cambridge, England)을 이용하여 gel에 312nm의 자외선을 조사함으로써 PCR 산물을 검출하였으며, 그 결과는 Polaroid GelCam (Polaroid corporation, Cambridge, U.S.A.)으로 촬영하여 기록하였다.

#### 마. 염기서열 결정반응

증폭된 각각의 산물을 1% agarose gel 상에서 전기영동하여 증폭여부를 확인한 후 QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, Hilden, Germany)을 이용하여 정제하여 최종 부피가 50 $\mu$ l가 되도록 하였다. 정제된 DNA를 주형으로 하여 PCR 증폭에 사용된 편측 primer와 BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit V2.0 (Applied Biosystems, CA., U.S.A.)을 이용하여 염기서열 결정반응을 수행하였다. 염기서열 결정반응 혼합물은 2 $\mu$ l Terminator Ready Reaction Mix, 1 $\mu$ l primer(3.2pmole), 5 $\mu$ l template DNA를 포함하여 최종 부피가 10 $\mu$ l가 되도록 하였으며, 염기서열 결정반응을 위한 PCR은 96 $^{\circ}$ C에서 10초, 50 $^{\circ}$ C에서 5초, 60 $^{\circ}$ C에서 2분으로 이루어진 총 30회의 온도순환으로 수행하였다.

반응산물은 에탄올 침전법을 사용하여 정제하고 탈이온화된 formamide와 혼합한 후 95 $^{\circ}$ C에서 3분간 가열하여 얼음에서 급냉하여 DNA을 denaturation시켜 ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, CA., U.S.A.) 자동 염기서열 분석

기를 이용하여 전기영동하였다. 전기영동 중에 발생하는 정보는 실시간으로 ABI Prism 310 Data Collection Software 1.2 (Applied Biosystems, CA., U.S.A.)에 입력시킨 후 Sequencing Analysis Software 3.4 (Applied Biosystems, CA., U.S.A.)을 이용하여 염기서열을 결정하였다. 각각의 염기서열은 Sequence Navigator Software 1.0 (Applied Biosystems, CA., U.S.A.)를 이용하여 유전자 은행의 Accession No. AE001439의 *Helicobacter* J99 Strain과 Accession No. AE000511의 *Helicobacter* 26695의 염기서열과 비교분석하였다.

#### 바. 분석 및 통계

- 1) RAU군, History군, Control군과 RAU 1군, History 1군, Control 1군 및 RAU 2군, History 2군, Control 2군 각각의 *H. pylori* 유전자의 양성빈도를 조사하였다.
- 2) RAU군, History군, Control군간 *H. pylori* 유전자의 양성빈도의 차이를 Wilcoxon rank sum test를 이용하여 비교 평가하였다.
- 3) RAU 1군, History 1군, Control 1군간 *H. pylori* 유전자의 양성빈도의 차이를 Wilcoxon rank sum test를 이용하여 비교 평가하였다.
- 4) RAU 2군, History 2군, Control 2군간 *H. pylori* 유전자의 양성빈도의 차이를 Wilcoxon rank sum test를 이용하여 비교 평가하였다.

이상의 과정에서 통계처리는 SAS program 8.1 version (SAS institute, U.S.A.)을 이용하여 시행하였다.

### Ⅲ. 연구결과

#### 1. *H. pylori* 유전자의 PCR 증폭

연구대상 60명 (표본수 120개)으로부터 추출된 DNA를 주형으로 한 PCR 증폭이 수행되었다. 첫 번째 PCR 수행 결과 그림 2의 A와 같이 양성 대조군에서만 417bp의 PCR 증폭산물을 관찰할 수 있었으며, 첫 번째 PCR 증폭산물을 주형으로 한 nested PCR에서 그림 B와 같이 양성 대조군을 비롯한 표본에서 230bp의 최종산물을 검출할 수 있었다.



A



B

Fig. 2. Electrophoretic patterns of PCR amplification products of *H. pylori* gene.

A. The first PCR products (417bp)

B. The nested PCR products (230bp)

The amplified products were separated in 1% agarose gel and directly visualized with ethidium bromide under U.V. light..

M : 100bp DNA ladder

Aa1, Aa2 : Samples from the lesion of RAU patients

Ap1, Ap2 : Samples from the plaque of RAU patients

Hb1, Hb2 : Samples from the buccal mucosa of RAU history patients

Hp1, Hp2 : Samples from the plaque of RAU history patients

Nb1, Nb2 : Samples from the buccal mucosa of normal individuals

Np1, Np2 : Sample of Plaque of normal patient

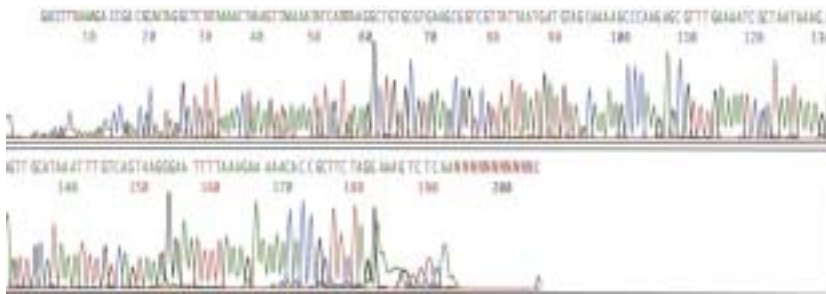
P : Positive control

N : Negative control

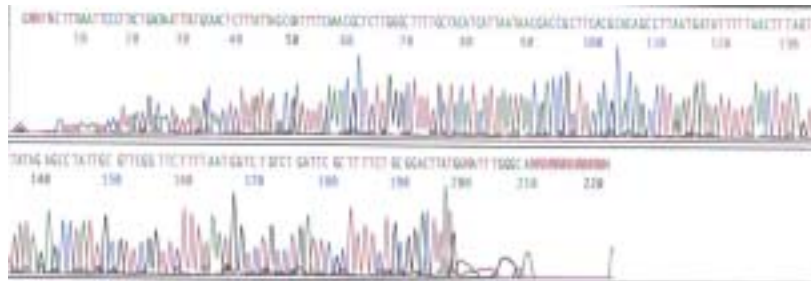
## 2. 증폭산물의 염기서열분석

PCR 증폭산물의 염기서열을 분석하였으며 (그림 3), 이를 Genebank의 *H. pylori* 의 염기서열과 비교 분석한 결과 strain J99와는 95%, strain 26695와는 92%의 일치율을 보였다 (표 2).





A



B

Fig 3. Sequence analysis of the nested PCR products (230bp)

A : Forward sequence

B : Reverse sequence

Table 2. Comparison of coincidence between sequences of PCR products and two different strains of *H. pylori* from GeneBank

<i>H. pylori</i> strain	J99	26695
GeneBank Accession No.	AE001439	AE000511
Area of coincidence	77750-77932	80220-80402
Rate of coincidence	174/183	169/183
(%)	95%	92%

### 3. 병소군, 병력군, 대조군에서 *H. pylori* 유전자의 양성빈도

RAU군에서 13개(32.5%), History군에서 6개(15.0%), Control군에서 3개(7.5%)의 *H. pylori* 양성결과를 보였다.

한편, RAU군의 경우 RAU 1군에서 7개(35.0%), RAU 2군에서 6개(30.0%)의 *H. pylori* 양성결과를 보였고, History군의 경우 History 1군에서 1개(5.0%), History 2군에서 5개(25.0%)의 양성결과를 보였다. Control군의 경우에는 Control 1군에서 2개(10.0%), Control 2군에서 1개(5.0%)의 양성결과를 보였다 (표 3).

Table 3. The incidence of *H. pylori* in RAU, History, and Control group

Group*	Frequency	(%)
RAU (n=40)	13	32.5
RAU 1 (n=20)	7	35.0
RAU 2 (n=20)	6	30.0
History (n=40)	6	15.0
History 1 (n=20)	1	5.0
History 2 (n=20)	5	25.0
Control (n=40)	3	7.5
Control 1 (n=20)	2	10.0
Control 2 (n=20)	1	5.0

\* RAU : Samples from both the lesion and plaque of RAU patients

RAU 1 : Samples from the lesion of RAU patients

RAU 2 : Samples from the plaque of RAU patients

History : Samples from both the buccal mucosa and plaque of RAU  
history patients

History 1 : Samples from the buccal mucosa of RAU history patients

History 2 : Samples from the plaque of RAU history patients

Control : Samples from both the buccal mucosa and plaque of normal  
individuals

Control 1 : Samples from the buccal mucosa of normal individuals

Control 2 : Samples from the plaque of normal individuals

#### 4. 병소군, 병력군, 대조군에서 *H. pylori* 유전자의 발현빈도 비교

RAU군, History군, Control군에서 *H.pylori* 유전자의 발현빈도는 RAU군과 Control군의 비교에서 유의차를 보였으나 ( $P < 0.01$ ), RAU군과 History군 및 History군과 Control군의 비교에서는 유의차를 보이지 않았다 (표 4).

Table 4. Statistical significance of incidence rate of *H. pylori* between RAU, History, and Control group

Group	P value
RAU - History	0.0676
RAU - Control	0.0055*
History - Control	0.2915

\* : significant difference ( $P < 0.01$ )

5. 병소군, 병력군, 대조군의 협점막 표본에서 *H. pylori* 유전자의 발현빈도 비교

협점막 표본의 경우 RAU 1군과 History 1군의 비교에서 유의차를 보였으며 ( $P < 0.05$ ), RAU 1군과 Control 1군 및 History 1군과 Control 1군의 비교에서는 유의차를 보이지 않았다 (표 5).

Table 5. Statistical significance of incidence rate of *H. pylori* between RAU, History, and Control group in buccal mucosa

Group	P value
RAU 1 - History 1	0.0192*
RAU 1 - Control 1	0.0616
History 1 - Control 1	0.5533

\* : significant difference ( $P < 0.05$ )

6. 병소군, 병력군, 대조군의 치태 표본에서 *H. pylori* 유전자의 발현빈도 비교

치태 표본의 경우 RAU 2군과 Control 2군의 비교에서 유의차를 보였으며 ( $P < 0.05$ ), RAU 2군과 History 2군 및 History 2군과 Control 2군의 비교에서는 유의차를 보이지 않았다 (표 6).

Table 6. Statistical significance of incidence rate of *H. pylori* between RAU, History, and Control group in plaque

Group	P value
RAU 2 - History 2	0.7266
RAU 2 - Control 2	0.0399*
History 2 - Control 2	0.0803

\* : significant difference ( $P < 0.05$ )

## IV. 고 찰

*H. pylori* 감염은 전세계적으로 만연이 되어 있지만, 사람 외에 *H. pylori*는 거의 관찰되지 않는 것으로 알려져 있으며 대부분의 경우 *H. pylori* 감염은 유년기에 얻어진다. 선진국의 경우 젊은 성인에서는 10%의 혈청 양성반응을 보이지만 노인에서는 70%까지의 양성반응을 보이고 있으며, 감염율은 건강한 경우 10-40%이지만 위염의 경우 80%, 위궤양 또는 십이지장 궤양의 경우 100%를 나타내고 있다. 개발도상국의 경우 거의 모든 어린이가 10세 이전에 *H. pylori*에 감염되는 것으로 알려져 있으며, 인구의 80% 이상이 감염되어 있다고 보고되었다 (Holcombe 등, 1992)

*H. pylori*는 영양분 고갈, 오랜 잠복기 또는 항생제 치료로 인하여 스트레스를 받는 경우 간균에서 구균형태로 전환됨에 따라 배양검사 시 양성반응이 현저히 감소하게 된다. 구균은 일반적인 방법으로는 배양이 불가능하지만, 여전히 생활력이 존재하고 감염의 위험성을 가지고 있다. 즉, 구균은 *H. pylori*의 전파와, 간균은 만성감염과 관련이 있는 것으로 추정되고 있다. 구균에서 RNA 및 DNA integrity의 현저한 감소와 세포막 전위의 소실이 관찰되며, 이러한 형태학적인 변화는 산성 환경에 대한 저항성과 관련이 있다 (Krajden 등, 1989, Moshkowitz 등, 1994).

Mapstone 등(1993)은 *H. pylori* 위염을 가진 31명의 환자중 28명(90%)의 대변에서 *H. pylori*를 검출하였다고 하였다. 하지만, Li 등(1996)은 *H. pylori* 위염을 가진 61명중 15명(25%)의 대변에서만 *H. pylori*를 검출할 수 있었다고 하였으며, van Zwet 등(1994)은 *H. pylori* 위염을 가진 24명 모두의 대변에서 *H. pylori*를 검출할 수 없었다고 하였다. Shimada 등(1994)의 일본인을 대상으로 한 연구에서도 79명중 한 명의 빈도로 대변에서 *H. Pylori*를 발견했다고 보고하였다. 대변에 의한 구강의 오염은 개발도상국의 경우 중요한 전파수단이 될 수 있으나, 특히 선진국의 경우에는 그 중요성이 많이 감소되어 구강과 구강의 접촉에 의한 감염이 더 중요한 원인이라고 생

각된다.

즉, 구강은 *H. pylori* 감염의 저장소로 점차 관심을 끌고 있는 부위로 치태 및 타액이 *H. pylori*의 가능한 구강내 저장소로 생각되고 있다 (Desai 등, 1991, Kim 등, 2000, Majumdar 등, 1990, Musich 등, 1995, Nguyen 등, 1995, Pavelic 등, 2000). Kraiden 등(1989)은 *H. pylori* 감염이 확인된 환자의 치태로부터, Ferguson 등(1993)은 타액으로부터 배양검사를 통하여 *H. pylori*를 검출하였다. 하지만, Bernander 등(1993)은 위 생검조직에 대한 배양검사서 양성이 확인된 환자로부터 얻은 치태 및 타액의 배양검사에서는 *H. pylori*를 검출할 수 없었다고 보고하였고 Cammarota 등(1996)도 유사한 결과를 보고하였다. Li 등(1996)은 위 생검조직의 배양 및 조직학적 염색을 통하여 *H. pylori* 감염이 확인된 환자 68명중 57명(84%)의 타액에서 PCR을 이용하여 *H. pylori* DNA를 확인하였다고 보고하였다. Banatvala 등(1994)은 위 생검조직의 배양검사서 양성을 보인 환자 39명중 29명(74%)의 치태에서 PCR을 이용하여 *H. pylori*를 검출하였다. Albenque 등(1990)은 유아에게 음식물을 씹어 먹이는 경우 *H. pylori* 감염율의 증가가 있다고 보고하면서 타액이 *H. pylori*를 전파하는 매개로 역할할 수 있다고 하였다. 한편, *Fusobacterium*은 치태내 비집합성 세균의 연결에 중요한 역할을 하고, *Fusobacterium*에 *H. pylori*가 선택적으로 부착되므로 (Andersen 등, 1998), *H. pylori*가 치태 내에 존재할 수 있는 것으로 알려져 있다.

구강내 *H. pylori*의 중합효소 연쇄반응을 위한 표적으로 urease A 유전자, urease C 유전자, 860bp genomic DNA, 26kDa 단백질 유전자 및 16S rRNA 유전자 등이 이용되어 왔다. Nguyen 등(1993)은 16S rRNA 유전자에 대한 프라이머를 이용하여 *H. pylori* 위염을 가진 18명의 환자 중 7명(38.8%)의 치태에서 *H. pylori*를 검출하였지만, Hardo 등(1995)은 동일한 프라이머를 이용하여 62명중 단지 1명(1.6%)의 치태에서만 *H. pylori*를 검출하였다. Birac 등(1992)은 26kDa 단백질을 표적으로 124명중 12명(9.8%)의 치태에서 *H. pylori*를 검출했다고 하였지만, Wadstrom 등(1992)은 10명중 9명(90%)에서 *H. pylori* 양성을 보고하였다. Bickley 등(1993)은



urease C 유전자에 대한 primer를 이용하여 10명의 치태를 조사했으나 *H. pylori*를 검출하지 못했다고 하였다 (Asikainen 등, 1994, Banatvala 등, 1994). Song 등(1999)은 40명의 환자의 치태를 이용하여 urease A 유전자와 16S rRNA 유전자 및 860bp genomic DNA를 표적으로 하여 각각의 프라이머의 검출능을 비교하였는데 각각 26.5%, 78.9%, 100%의 양성반응이 나타났다고 보고하였다. 이에 본 연구에서는 비교적 *H.pylori* 유전자에 대한 검출능이 우수한 것으로 알려진 860bp genomic DNA를 표적으로 하는 EHC primer를 선택하였다. 한편, Musich 등(1995)은 nested PCR과 같이 일차 PCR 산물을 표적으로 하는 primer를 이용하여 이차 PCR을 시행하는 경우 유전자에 대한 검출능이 더 우수하다고 하였으며, 따라서 본 연구에서는 417bp 크기의 일차 PCR 산물을 표적으로 하는 ET primer를 이용하여 nested PCR을 시행하였다.

Birek 등(1999)은 39명의 재발성 아프타성 궤양을 가진 환자중 32명(71.8%)에서 *H. pylori* 양성을 보였다고 하면서 재발성 아프타성 궤양과 *H. pylori*의 관련성을 제시하였다. Riggio 등(2000)은 28명의 재발성 아프타성 궤양 환자중 3명(11%)에서 *H. pylori*를 검출하였다고 보고하였다. 한편, 재발성 아프타성 궤양을 가진 환자를 대상으로 시행한 혈청학적 검사에서는 유의성 있는 차이를 발견하지 못하였다 (Potter 등, 1997, Shimoyama 등, 2000).

본 연구에서는 협점막 표본의 경우 궤양 표본과 궤양병력 표본의 비교에서 유의차를 보였고 ( $P<0.05$ ), 궤양 표본과 대조군 표본의 비교에서는 유의차를 보이지 않았지만 ( $P=0.0616$ ) 그 유의성을 배제할 수는 없었다. 즉, 궤양 발생과 *H. pylori*의 직접적인 점막 부착과의 관련성을 제시할 수 있으리라 본다. 한편, 치태 표본의 경우 궤양 표본군과 대조군 표본의 비교에서 유의차를 보였고 ( $P<0.05$ ), 궤양병력 표본과 대조군 표본의 비교에서는 유의차를 보이지 않았지만 ( $P=0.0803$ ) 그 유의성을 배제할 수는 없었다. 현재 궤양이 존재하는 환자 모두에서 향후 궤양이 다시 발생할 수 있는 가능성을 항상 가지고 있다고 보므로 잠재적으로 궤양이 발생 가능한 환자에서

*H. pylori*를 공급하는 저장소로 치태가 역할하는 것으로 생각된다. 구강 내에서 *H. pylori*는 감염력은 없이 배양이 되지 않는 구균형태로 존재하며, 특정조건 하에서 균집이 형성될 수 있다 (Shimoyama 등, 2000). 한편, Young 등(2001)은 주사전자현미경을 이용하여 구강 및 위에서 간균 및 구균형태의 *H. pylori*를 관찰할 수 있었다고 보고하였다. 즉, 접촉으로 인하여 치태에 *H. pylori*가 부착되고, 이러한 *H. pylori*가 구강점막에 부착됨으로써 재발성 아프타성 궤양의 발생에 보조인자로 작용하는 것이 아닌가 추론할 수 있다.

일반적으로 연구에 따라 *H. pylori*의 검출율이 서로 상이한 이유로 몇 가지 사항을 고려할 수 있다. Nguyen 등(1993)은 *H. pylori*가 구강 내에 균일하게 분포하고 있지 않기 때문에 동일인의 서로 다른 부위로부터 얻은 치태 표본 중 단지 한 부위에서만 *H. pylori*가 검출되었다고 하였다. 따라서, 표본채취 방법에 따른 연구결과의 차이를 배제할 수 없을 것으로 생각된다. 또한, 구강내 정상 세균총에 의하여 형성되는 억제인자의 존재를 고려할 수 있다. Nguyen 등(1993)은 음성을 보이는 치태에 *H. pylori* 특이 핵산을 가하였을 때 모두 양성으로 전환되기는 하였으나, 서로 다른 검출강도를 보여 억제인자의 존재를 제시하였다. 한편, 구강위생 상태와 *H. pylori* 양성반응 사이에는 서로 상관관계가 존재하여 불량한 위생상태인 경우 양호한 경우에 비하여 CLO (*Campylobacter-like organism*) 검사에서 유의하게 높은 *H. pylori* 검출율을 보였다고 하였다 (Avcu 등, 2001). 이는 치태 형성부위의 경우 산화-환원반응 전위가 낮아 통성 혐기성 세균 (facultative anaerobes)의 증식을 일으키고 이러한 세균이 음식물내 탄수화물을 발효시켜 pH를 낮춤으로써 *H. pylori*의 성장에 유리한 산성환경을 만들기 때문인 것으로 알려져 있다. 따라서, 치주치료 병력과 *H. pylori* 양성빈도 사이의 연관성을 배제할 수 없을 것으로 생각된다.

*H. pylori*가 조직손상을 야기하는 정확한 기전은 아직 밝혀져 있지 않다. *H. pylori*에 의하여 유도되는 면역기전은 *H. pylori*가 lymphokine, 특히 IL(interleukin)-8의 생성을 자극하고 특정 T lymphocyte subpopulation의 형성과 함께 lymphocyte

chemotactic factor의 분비를 유도하는 것으로 알려져 있다. *H. pylori*에 의하여 활성화된 호중구는 세포독성이 있는 reactive oxygen metabolite를 형성하고, *H. pylori*에 의하여 생성된 암모니아 또한 점막손상을 심하게 일으킴으로써 세포자살(apoptosis)을 일으킬 수 있다. 한편, Guruge 등(1998)은 점막 수용체에 대한 세균부착은 감염 경로를 변화시켜 숙주의 면역반응을 자가면역 방향으로 유도할 수 있다고 보고하였다. 한편, 구강 내 환경변화는 국소적인 점막변화를 일으키고, 이로 인하여 *H. pylori*가 구강점막 내 당단백질의 탄수화물 epitope에 쉽게 부착함으로써 epitope에 대한 자가항체가 생성되는 것으로 알려져 있다 (Van den Brink 등, 2000). 즉, *H. pylori*가 직접적인 조직손상을 일으키기보다는 오히려 자가면역 반응을 유도하고 촉진하는 보조적인 인자로 작용한다고 볼 수 있다. 한편, gastric *H. pylori*의 경우 위점막에 *H. pylori*가 부착되어 감작(sensitization)됨으로써 아프타성 궤양의 발생에 있어서도 *H. pylori*가 보조적인 인자로 작용하고 있는 것으로 생각되고 있다 (Birek 등, 1999).

한편, 본 실험연구에서 얻은 중합효소 연쇄반응 산물의 염기서열을 분석한 결과 J99 strain과는 95%의 일치율을 보였고, 26695 strain과는 92%의 일치율을 보여 PCR 산물이 *H. pylori*라는 것을 확인할 수 있었다. 각 strain간 염기서열이 정확히 일치하는 경우는 드물며, 따라서 염기서열 분석에서 실제 100%의 일치율을 얻기는 힘들다. 향후 국내환자를 대상으로 높은 빈도로 검출되는 *Helicobacter* strain의 조사확인 및 전체 염기서열을 분석하는 것 또한 가치있는 연구로 사료된다.

이상의 연구를 종합하여 보았을 때 *H. pylori*와 재발성 아프타성 궤양 발생의 상관관계를 제시할 수 있을 것으로 생각되며, *H. pylori*의 구강내 저장소로서 치태에 대한 가능성을 고려할 수 있을 것으로 사료된다. 향후 더 많은 표본을 대상으로 정밀하고 광범위하게 연구할 필요가 있을 것으로 생각되며, 궤양발생 후 이차적으로 *H. pylori*가 부착될 가능성 또한 배제할 수 없으므로 *H. pylori*와 관련된 면역학적 기전에 대한 깊이 있는 연구 또한 시행될 필요가 있을 것으로 사료된다. 한편, *H. pylori*에 의한 위궤양 환자에서 재발성 아프타성 궤양 발생과의 상호 연관성에 대한 추가적인 연구도 가치가 있을 것으로 사료되는 바이다.

## V. 결 론

*H. pylori*의 구강내 저장소 및 재발성 아프타성 궤양의 원인으로서 *H. pylori*의 연관성을 평가하여 보고자 연세대학교 치과대학병원에 재발성 아프타성 궤양으로 내원한 환자를 대상으로 협점막의 궤양병소와 정상 협점막 및 치은연상 치태 내의 *H. Pylori*의 유무 및 검출빈도를 중합효소연쇄반응을 이용하여 분석평가한 후 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 재발성 아프타성 궤양 환자로부터 얻은 표본의 경우 32.5%의 *H. pylori* 양성결과를 보였고 그 중 협점막 궤양 병소는 35.0%, 치태는 30.0%의 양성결과를 보였다. 궤양병력 환자로부터 얻은 표본의 경우 15.0%의 *H. pylori* 양성결과를 보였고 그 중 협점막은 5.0%, 치태는 25.0%의 양성결과를 보였다. 대조군으로부터 얻은 표본의 경우 7.5%의 *H. pylori* 양성결과를 보였고 그 중 협점막은 10.0%, 치태는 5.0%의 양성결과를 보였다.

2. 궤양 표본과 대조군 표본의 *H. pylori* 유전자 발현빈도의 비교에서 유의차를 보였으며 ( $P<0.01$ ), 궤양 표본과 궤양병력 표본 및 궤양병력 표본과 대조군 표본의 비교에서는 유의차를 보이지 않았다.

3. 협점막 표본의 경우 궤양 표본과 궤양병력 표본의 *H. pylori* 유전자 발현빈도의 비교에서 유의차를 보였으며 ( $P<0.05$ ), 궤양 표본과 대조군 표본 및 궤양병력 표본과 대조군 표본의 비교에서는 유의차를 보이지 않았다.

4. 치태 표본의 경우 궤양 표본과 대조군 표본의 *H. pylori* 유전자 발현빈도의 비

교에서 유의차를 보였으며 ( $P < 0.05$ ), 궤양 표본과 궤양병력 표본 및 궤양병력 표본과 대조군 표본의 비교에서는 유의차를 보이지 않았다.

이상의 연구를 종합하여 보았을 때 재발성 아프타성 궤양의 발생 원인 중의 하나로 *H. pylori*의 가능성을 제시할 수 있을 것으로 사료되며, *H. pylori*의 구강내 저장소로서 치태의 역할에 대한 가설을 성립시킬 수 있는 근거를 마련하였다. 향후 더 많은 표본을 대상으로 면역학적, 미생물학적, 분자생물학적 연구 등 정밀하고 광범위한 연구의 필요성이 있으며, 또한 *H. pylori*가 원인이 된 위궤양 환자에서 재발성 아프타성 궤양과 위궤양 발생과의 상호 연관성에 대한 추가적인 연구도 가치가 있을 것으로 사료되는 바이다.

## 참 고 문 헌

Albenque M., Tall F., Dabis F., Megraud F. 1990. "Epidemiological study of *Helicobacter pylori* transmission from mother to child in Africa". *Rev Esp Enf Dig.* 78(suppl 1): 48.

Andersen R. N., Ganeshkumar N., Kolenbrander P. E. 1998. "*Helicobacter pylori* adheres selectively to *Fusobacterium* spp.". *Oral Microbiol Immunol.* 13: 51-4.

Asikainen S., Chen C., Slots J. 1994. "Absence of *Helicobacter pylori* in subgingival samples determined by polymerase chain reaction". *Oral Microbiol Immunol.* 9: 318-20.

Avcu N., Avcu F., Beyan C., Ural A. U., Kaptan K., Özyurt M., Nevruz O., Yalçın A. 2001. "The relationship between gastric-oral *Helicobacter pylori* and oral hygiene in patients with vitamin B<sub>12</sub>-deficiency anemia". *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 92: 166-9.

Banatvala N., Lopez C. R., Owen R. J. 1994. "Use of the polymerase chain reaction to detect *Helicobacter pylori* in the dental plaque of healthy and symptomatic individuals". *Microb Ecol Health Dis.* 7: 1-8.

Barile M. F., Graykowski E. A., Driscoll E. J., Riggs D. B. 1963. "L form of bacteria isolated from recurrent aphthous stomatitis lesions". *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 16: 1395-1402.

Bernander S., Dalen J., Gastrin B., Hedenborg L., Lamke L. O., Ohm R. 1993. "Absence of *Helicobacter pylori* in dental plaques in *H. pylori* positive dyspeptic patients". *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 12: 282-5.

Bickley J., Owen R. J., Fraser A. G., Pounder R. E. 1993. "Evaluation of the polymerase chain reaction for detecting the urease C gene of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy samples and dental plaque". *J Med Microbiol.* 39: 338-44.

Bioneer, [www.bioneer.co.kr/product/search\\_default.jsp?body=/product/](http://www.bioneer.co.kr/product/search_default.jsp?body=/product/)

Birac C., Tall F., Albenque M., Labigne A., Megraud F. 1992. "PCR to detect *Helicobacter pylori* in the mouth". *Ir J Med Sci.* 161: suppl.(28): S28

Birek C., Grandhi R., McNeill K., Singer D., Ficarra G., Bowden G. 1999. "Detection of *Helicobacter pylori* in oral aphthous ulcers". *J Oral Pathol Med.* 28: 197-203.

Cammarota G., Tursi A., Montalto M., Papa A., Veneto G., Bernardi S., Boari A., Colizzi V., Fedeli G., Gasbarrini G. 1996. "Role of dental plaque in the transmission of *Helicobacter pylori* infection". *J Clin Gastroenterol.* 22: 174-7.

Challacombe S. J., Batchelor J. R., Kennedy L. A., Lehner T. 1977. "HLA antigens in recurrent oral ulceration". *Arch Dermatol.* 113: 1717-9

Chong S. K., Lou Q., Fitzgerald J. F., Lee C. H. 1996. "Evaluation of 16S rRNA gene PCR with primers Hp1 and Hp2 for detection of *Helicobacter pylori*". *J Clin Microbiol.* 34: 2728-30.

Desai H. G., Gill H. H., Shankaran K., Mehta P. R., Prabhu S. R. 1991. "Dental plaque: A permanent reservoir *Helicobacter pylori*?". *Scand J Gastroenterol.* 26: 1205-8.

Ersoy F., Berkel I., Firat T., Kazokoglu H. 1977. "HLA antigens associated with Behçet's disease". *Arch Dermatol.* 113: 1720-1

Fabre R., Sobhani I., Laurent-Puig P., Hedef N., Yazigi N., Vissuzaine C., Rodde I., Potet F., Mignon M., Etienne J. P., Braquet M. 1994. "Polymerase chain reaction assay for the detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy specimens: Comparison with culture, rapid urease test, and histopathological tests". *Gut.* 905-8.

Ferguson D. A., Li C., Patel N. R., Mayberry W. R., Chi D. S., Thomas E. 1993.

- "Isolation of *Helicobacter pylori* from saliva". *J Clin Microbiol.* 31: 2802-4.
- Griffin J. W. 1963. "Fluorescent antibody study of herpes simplex virus lesions and recurrent aphthae". *Oral Surg.* 16: 945
- Goodwin C. S., Mendall M. M., Northfield T. C. 1997. "*Helicobacter pylori* infection". *Lancet.* 349: 265-9.
- Guruge J. L., Falk P. G., Lorenz R. G., Dans M., Wirth H. P., Blaser M. J., Berg D. E., Gordon J. I. 1998. Epithelial attachment alters the outcome of *Helicobacter pylori* infection. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95: 3925-30
- Hammar M., Tyszkiewicz T., Wadström T., O'Toole P. W. 1992. "Rapid detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy material by polymerase chain reaction". *Journal of Clinical microbiology.* 30: 54-8.
- Hardo P. G., Tugnait A., Hassan F., Lynch D. A., West A. P., Mapstone N. P., Quirke P., Chalmers D. M., Kowolik M. J., Axon A. T. 1995. "*Helicobacter pylori* infection and dental care". *Gut.* 37: 44-6.
- Holcombe C., Omotara B. A., Eldridge J., Jones D. M. 1992. "*H. pylori*, the most common bacterial in Africa: A random serological study". *Am J Gastroenterol.* 87: 28-30.
- Kim N. Y., Lim S. H., Lee K. H., You J. Y., Kim J. M., Lee N. R., Jung H. C., Song I. S., Kim C. Y. 2000 "*Helicobacter pylori* in dental plaque and saliva". *The Korean Journal of Internal Medicine.* 15: 187-94
- Kosunen T. U., Megraud F. 1995. "Diagnosis of *Helicobacter pylori*". *Curr Opin Gastroenterol.* 11: 5-10.
- Krajden S., Fuksa M., Anderson J., Kempston J., Boccia A., Petrea C., Babida C., Karmali M., Penner J. L. 1989. "Examination of human stomach biopsies, saliva, and dental plaque for *Campylobacter pylori*". *J Clin Microbiol.* 27: 1397-8.



- Leimola-Virtanen R. E., Happonen R. P., Syrjänen S. M. 1995. "Cytomegalovirus(CMV) and *Helicobacter pylori*(HP) found in oral mucosal ulcers". *J Oral Pathol Med.* 24: 14-7.
- Lennette E. H., Magoffin R. L. 1973. "Virologic and immunologic aspects of major oral ulcerations. *J Am Dent Assoc.* 87: 1055
- Leung W. K., Sung J. J., Ling T. K., Siu K. L., Cheng A. F. 1999. "Use of chopsticks for eating and *Helicobacter pylori* infection". *Dig Dis Sci.* 44: 1173-6.
- Li C., Ha T., Ferguson D. A., Chi D. S., Zhao R., Patel N. R., Krishnaswamy G., Thomas E. 1996. "A newly developed PCR assay of *H. pylori* in gastric biopsy, saliva, and feces: Evidence of high prevalence of *H. pylori* in saliva supports oral transmission". *Dig Dis Sci.* 41: 2142-9.
- Madinier I. M., Fosse T. M., Monteil R. A. 1997. "Oral carriage of *Helicobacter pylori*: A review". *J Periodontol.* 68: suppl.(1): 2-6.
- Majumdar P., Shah S. M., Dhunjibhoy K. R., Desai H. G. 1990 "Isolation of *Helicobacter pylori* from dental plaques in healthy volunteers" *Indian J Gastroenterol.* 4: 271-272
- Mapstone N. P., Lynch D. A. F., Lewis F. A., Axon A. T., Tompkins D. S., Dixon M. F., Qurike P. 1993. "PCR identification of *Helicobacter pylori* in feces from gastritis patients". *Lancet.* 341: 447.
- Moshkowitz M., Gorea A., Alber N., Konikoff F., Berger S., Gilat T. 1994 "Morphological transformation of *Helicobacter Pylori* during prolonged incubation : association with decreased acid resistance". *J Clin pathol.* 47: 172-174
- Musich P. R., Li C., Ha T., Ferguson D. A. Jr., Patel N. R., Chi D. S., Thomas E. 1995. "High prevalence of *Helicobacter pylori* in saliva demonstrated by a novel PCR assay". *J Clin Pathol.* 48: 662-66.

- Narikawa S., Suzuki Y., Takahashi M., Furukawa A., Sakane T., Mizushima Y. 1995. "*Streptococcus oralis* previously identified as uncommon '*Streptococcus sanguis*' in Behçet' disease". *Arch Oral Biol.* 40: 685-90.
- Natah S. S., Häyrynen-Immonen R., Hietanen J., Malmström M., Konttinen Y. J. 2000. "Immunolocalization of tumor necrosis factor- $\alpha$  expressing cells in recurrent aphthous ulcer lesions(RAU). *J Oral Pathol Med.* 29: 19-25
- Nguyen A. M., Engstrand L., Genta R. M., Graham D. Y., El-Zaatari F. A. 1993. "Detection of *Helicobacter pylori* in dental plaque by reverse transcription-polymerase chain reaction". *J Clin Microbiol.* 31: 783-7.
- Nguyen A. M. H., El-Zaatari F. A. K., Graham D. Y. 1995. "*Helicobacter pylori* in the oral cavity". *Oral surg oral med oral pathol oral radiol endod.* 76: 705-9.
- Pavelić J., Gall-Trošelj K., Jurak I., Mravak-Stipetić M. 2000. "*Helicobacter pylori* in oral aphthous ulcers". *J Oral Pathol Med.* 29: 523-5.
- Pedersen A., Hornsleth A. 1993. "Recurrent aphthous ulceration: A possible clinical manifestation of reactivation of varicella zoster or cytomegalovirus infection". *J Oral Pathol Med.* 22: 64-8.
- Porter S. R., Barker G. R., Scully C., Macfarlane G., Bain L. 1997. "Serum IgG antibodies to *Helicobacter pylori* in patients with recurrent aphthous stomatitis and other oral disorders". *Oral surg Oral med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 83: 325-8.
- QIAGEN. 2001. "Buccal Swab Protocol" In QIAamp DNA Mini Kit and QIAamp DNA **Blood** Mini Kit HandBook. Hilden, Germany: QIAGEN
- Regezi J. A., Sciubba J. 1999. "Ulcerative conditions". In *Oral pathology Clinical-pathologic correlations* edited by Regezi J. A., Sciubba J. Philadelphia: WB Saunders.
- Riggio M. P., Lennon A., Ghodrathnama F., Wray D. 2000. "Lack of association

between *Streptococcus oralis* and recurrent aphthous stomatitis". *J Oral Pathol Med.* 29: 26-32.

Riggio M. P., Lennon A., Wray D. 2000. "Detection of *Helicobacter pylori* DNA in recurrent aphthous stomatitis tissue by PCR". *J Oral Pathol Med.* 29: 507-13.

Savage N. W., Mahanonda R., Seymour G. J., Bryson G. J., Collins R. J. 1988. "The proportion of suppressor-inducer T-lymphocytes is reduced in recurrent aphthous stomatitis". *J Oral Pathol.* 17: 293-7

Scully C., Porter SR. 1989. "Recurrent Aphthous Stomatitis : current concept of etiology, pathogenesis and management". *J Oral Pathol Med.* 18: 21-27

Shames B., Krajden S., Fuksa M., Babida C., Penner J. L. 1989. "Evidence for the occurrence of the same strain of *Campylobacter pylori* in the stomach and the dental plaque". *J Clin Microbiol.* 27: 2849-2850

Shimada T., Ogura K., Ota S., Terano A., Takahashi M., Hamada E., Omata M., Sumino S., Sassa R. 1994. "Identification of *Helicobacter pylori* in gastric specimens, gastric juice, saliva, and faeces of Japanese patients". *Lancet.* 343: 1636-7.

Shimoyama T., Horie N., Kato T., Kaneko T., Komiyama K. 2000. "*Helicobacter pylori* in oral ulcerations". *Journal of Oral Science.* 42: 225-9.

Song Q., Haller B., Schmid R. M., Adler G., Bode G. 1999. "*Helicobacter pylori* in dental plaque: A comparison of different PCR primer sets". *Dig Dis Sci.* 44: 479-84.

Song Q., Lange A., Spahr A., Adler G., Bode G. 2000a. "Characteristic distribution pattern of *Helicobacter pylori* in dental plaque and saliva detected with nested PCR". *J Med Microbiol.* 49: 349-53.

Song Q., Spahr A., Schmid R. M., Adler G., Bode G. 2000b. "*Helicobacter pylori* in the oral cavity: High prevalence and great DNA diversity". *Dig Dis Sci.* 45:

2162-7.

Sun A., Chang J. G., Kao C. L. 1996. "Human cytomegalovirus as potential etiologic agent in recurrent aphthous ulcers and Behçet's disease". *J Oral Pathol Med.* 25: 212-8.

Valentine J. L., Arthur R. R., Mobley H. L., Dick J. D. 1991. "Detection of *Helicobacter pylori* by using the polymerase chain reaction". *Journal of Clinical microbiology.* 29: 689-95.

Van den Brink G. R., Tytgat K. M. A. J., Van der Hulst R. W. M., Van der Loos C. M., Einerhand A. W. C., Büller H. A., Dekker J. 2000. "*H pylori* colocalises with MUC5AC in the human stomach". *Gut.* 46: 601-7.

Van Zwet A. A., Thijs J. C., Kooistra Smid A. M., Schirm J., Snijder J. A. M. 1994. "Use of PCR with feces for detection of *Helicobacter pylori* infections in patients". *J Clin Microbiol.* 32: 1346-8.

Wadstrom T., Tyszkiewicz T., Bergen Zaun P., Olsson K. 1992. "*H. pylori* in gastric juice aspirates and dental plaque". *Ir J Med Sci.* 161: 27-8

Wahlfors J., Meurman J. H., Toskala J., Korhonen A., Alakuijala P., Janatuinen E., Karkkkainen U. M., Nuutinen P., Janne J. 1995. "Development of a rapid PCR method for identification of *Helicobacter pylori* in dental plaque and gastric biopsy specimens". *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 14: 780-6

Young K. A., Allaker R. P., Hardie J. M. 2001. "Morphological analysis of *Helicobacter pylori* from gastric biopsies and dental plaque by scanning electron microscopy". *Oral Microbiol Immunol.* 16: 178-81.

ABSTRACT

## **Incidence of *Helicobacter pylori* detected by PCR and its Relation to the Potential Etiology of Recurrent Aphthous Ulcerations**

Hyeon-Cheol Kim, D.D.S., M.S.D.

*Department of Dentistry, The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Prof. Chong-Youl Kim, D.D.S., M.S.D., Ph.D.)

Patients, referred to the Department of Oral Diagnosis & Oral Medicine, College of Dentistry, Yonsei University, for recurrent aphthous ulcer (RAU), were subjected to analysis and evaluation of the presence and the detection rate of *H. pylori*, obtained from ulcer lesion on buccal mucosa, from normal buccal mucosa, and from supragingival plaques, with the use of polymerase chain reaction(PCR), to assess the role of *H. pylori* as an oral reservoir as well as an etiologic factor for RAU. The results are summarized as follows.

1. In a sample of the RAU group (RAU patients), 32.5% was *H. pylori* positive, of which ulcer lesion on buccal mucosa and plaques showed 35.0% and 30.0% of positivity respectively. In a sample of the history group (patients with history of RAU), 15.0% proved positive of *H. pylori*, in which buccal mucosa and plaques indicated 5.0% and 25.0% respectively. Finally, in a sample of the control group, only 7.5% tested positive for *H. pylori*, in which buccal mucosa and

plaque were positively identified with 10.0% and 5.0% respectively.

2. The RAU group and the control group showed statistically significant difference ( $P < 0.01$ ), whereas no difference was found between the RAU and the history group, or between the history and the control group.

3. Significant difference ( $P < 0.05$ ) was found when the buccal mucosa of the RAU group and that of the history group were compared. However, there was no evidence of significant difference between the RAU group and the control group, or between the history and the control group.

4. Significant difference ( $P < 0.05$ ) was also shown between plaques of the RAU group and those of the control group, when there was no difference between the RAU and the history group, or between the history and the control group.

Based on the data stated above, this investigation supports the hypothesis that *H. pylori* can be considered as a possible etiological factor for RAU, and that plaques play a role as an oral reservoir of *H. pylori*. However, need for more profound and comprehensive study (such as immunology, microbiology, molecular cell biology, etc.) can be required, using more subjects. Additionally, the investigation of the relationship between the RAU and the gastric ulcer, of which *H. pylori* is the cause, is considered to be of value.

---

Key Words : recurrent aphthous ulcerations, *Helicobacter pylori*, supragingival plaques, PCR