

Amylase가 Hydroxyapatite 탈회에 미치는 영향

연세대학교 치과대학 소아치과학교실, 연세대학교 구강과학연구소*

이인환 · 서정택* · 최병재 · 이종갑

Abstract

EFFECTS OF AMYLASE ON THE DEMINERALIZATION IN HYDROXYAPATITE

In-Hwan Lee, Jeong-Taeg Seo*, Byung-Jai Choi, Jong-Gap Lee

Department of Pediatric Dentistry, Oral Science Research Center, Yonsei University*

Salivary proteins which are produced in the salivary acinar cells have been known to be involved in the Calcium and phosphate metabolism. The acquired pellicle resulting from such metabolism is considered as a secondary defence membrane against tooth caries. In this respect, some proteins included in saliva probably play an important role in the prevention of demineralization in enamel. On the other hand, fluoride has long been known to prevent the demineralization of enamel by the inhibition of the growth of *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) and by the chemical reaction with calcium and phosphate. Therefore, I have examined the roles of amylase and albumin in the demineralization of enamel and compared these proteins with fluoride in terms of anticariogenic effect.

1. The demineralization caused by *S. mutans* occurred slowly and progressively for the first 60 min, then the rate of demineralization was accelerated afterwards.
2. pH decreased continuously during the entire period of each experiment.
3. The demineralization was significantly inhibited by the pretreatment of amylase and fluoride but albumin had little effect on it.
4. An addition of 0.1 mM lactic acid (final concentration 0.1 μ M) caused a rapid increase in calcium concentration reaching a maximum within 10 min.
5. pH decreased rapidly by the addition of 0.1 mM lactic acid and reached a minimum within a few seconds followed by an increase in pH. pH reached a plateau within 10 min.
6. Fluoride, amylase and albumin played little role in the 0.1 mM lactic acid-induced demineralization.

7. A slow infusion of 0.1 M lactic acid at a rate of 5 μ l/min caused a slower increase in calcium concentration compared with the bolus addition of lactic acid.

8. Fluoride had an inhibitory effect on the calcium release caused by slow infusion of lactic acid while amylase and albumin had no effect on it.

These results suggest that fluoride inhibits demineralization by protecting the HA from the acid attack whereas amylase has a direct effect on *S. mutans* to prevent demineralization.

Key words : amylase, calcium, fluoride, hydroxyapatite, pH, salivary protein, *Streptococcus mutans*

I. 서 론

경조직 우식으로 발생하는 치아우식증은 파괴를 동반한 감염성 질환(progressively infectious disease)으로, 치태내 세균, 음식물, 타액의 상호작용에 의하여 유발되는 다인성 질환으로서 치태내 세균 중에서도 *Streptococcus mutans*(*S. mutans*)가 주 원인균이며(Hamada 등, 1984;Loesche,1986;Hamada 및 Slade, 1980) *S. mutans*는 치면에 부착, 증식 및 산 생성 과정을 거쳐 치아우식을 유발한다. 즉, *S. mutans*는 치면의 획득 피막에 부착한 후 glucosyl-transferase에 의하여 자당(sucrose)으로부터 포도당 중합체(glucose polymer)인 비수용성 mutan을 합성한다(Koga 등,1986;Clark 및 Gibbons,1977). 합성된 mutan은 치면에서 증식하는 세균간의 결합을 증가시키며, 이렇게 하여 치면에 부착한 *S. mutans*는 치면에 국소적으로 자리잡아 점착성 gelatinous mat인 bacterial plaque 형태로 치아의 특수한 부위에 응집됨으로써 치아우식증이 발생하는 일차적인 원인을 제공한다고 보고 있다. 이런 치아우식 유발성 물질인 cariogenic plaque에는 대단히 많은 양(2×10^8)의 균이 포함되어 있으며, 이 결과 자당이 포도당과 과당으로 분해되고 pH가 5.5 이하로 떨어져 경조직인 치아를 탈회시킬 수 있는 조건이 조성된다. 즉 pH 감소에 의한 산생성 과정이 반복되면 법랑질의 미세한 분해가 이어지면서 탈회가 일어나 치아우식 병소(caries lesion)가 발생하는 것이다(Taubman, 1992;Cole 및 Eastoe, 1988;Houte, 1994). 이와 같이 치아우식증은 세균에 의한 감염성 질환이며, 여기에 섭취한 음식물의 종류, 그리고 시간에 의한 변수가 가세되어 이 질환

의 진행 정도가 결정되지만, host factor로써 치아 자체가 지니고 있는 탈회에 대한 저항력과, 크고 작은 타액선으로부터 흘러나오는 타액이 치아우식증 진행을 예방하는 중요한 인자로 평가되고 있다. 이처럼 치아우식은 원천적으로 치아자체의 탈회에 대한 저항력이나 타액의 세정작용으로 발생 초기에 억제될 것으로 생각되나, 그럼에도 불구하고 치아우식증은 계속 증가추세에 있기 때문에 여러 가지 다른 요인들이 복합적으로 작용하는 다인자성 질환으로 생각하고 있다.

따라서 이런 치아우식증을 억제하기 위하여 여러 가지 방법이 이용되어 왔다. 치아우식을 예방하기 위한 가장 기본적인 것은 칫솔질을 하여 기계적으로 치태를 제거하는 방법이다. 그러나 칫솔질은 행동이 부자유한 소아나 신체 장애자에게 적용하기에는 어려운 점이 있으며, 치면의 열구(groove)나 와(sulcus)에 있는 세균을 제거하기에는 한계가 있으므로 부수적인 치아우식 예방법에 대해 관심을 갖게 되었고, 이외에도 불소치법, 면역법, 항생제 투여법, 아니면 천연추출물을 이용하여 치아우식을 억제하고자 하는 시도가 진행되고 있다. 이 중 불소요법은 현재까지 가장 널리 이용되고 있는 방법으로 불소가 탈회를 억제하고 재광화를 촉진하는 물질로 알려져 있을 뿐 아니라(Murray, 1996), 실제 항균효과도 있어(Hamilton, 1977;Marquis, 1990; Tenovuo 및 Soderling, 1992), 치아우식증 예방에 좋은 면을 가지고 있는 것으로 생각된다. 하지만 불소를 사용하면 치아에 흰색 반점을 나타나게 하는 이른바 불소증(dental fluorosis)이 발생된다는 역학 연구결과 때문에(Brunelle, 1989;Ismail 등, 1990;Riordan, 1993), 현재 사용되고

있는 불소의 농도에 대한 논란이 계속되고 있다 (Rozier, 1991; Horowitz, 1991). 불소요법 이외에 치아우식이 세균에 의한 질환이므로 원인균에 대한 예방접종을 실시하여 치아우식을 예방하려는 시도가 진행되어 왔으며, 연구 결과 *S. mutans* 자체나 이 세균이 생성하는 glucosyltransferase를 동물에 접종시켰을 때 치아우식 발생률이 감소하는 것으로 나타나, 면역학적인 방법으로도 치아우식을 예방할 수 있음이 입증되었다 (McGhee 및 Michalek, 1981; Hamada 등, 1991; Smith 등, 1982). 그러나 *S. mutans*가 사람의 심장조직과 유사한 항원 구조를 가지고 있어, 이 균주에 대하여 형성된 항체가 사람의 심장조직에 결합하여 심장조직을 파괴시킬 가능성이 제시되어 (Ferretti 등, 1980; Hughes 등, 1980; Van de Rijn 등, 1976), 면역학적인 치아우식 예방법을 사람에게 적용하기 위해서는 정상조직과의 교차반응을 해결해야만 하는 또 다른 문제점이 대두될 수 있다.

이와같이 치아우식을 예방하려는 노력과 더불어 타액 중 타액단백질도 치아우식증과 연관된 중요한 인자로 평가하고 있다 (Scannapieco, 1994). 타액선 선세포에서 합성하는 단백질이 직접 범랑질의 calcium (Ca^{2+})과 인 (phosphate) 대사에 관여하며 이로부터 형성되는 acquired pellicle은 치아우식을 억제하는 이차 방어막으로 보고 있어 치질 탈회의 근본적인 원인 중 하나로 타액내 단백질의 조성을 들 수 있다. 타액은 구강내에 존재하는 액성물질로 여러 종류의 전해질과 단백질로 구성되어 있으며, 각기 다른 타액선으로부터 분비된다. 그러나 질병 (Sjogren's syndrome), 두경부 방사선조사, 특정약물투여 (antihypertensive, antidepressants, antihistamines) (Valdez 및 Fox, 1993) 등으로 타액이 정상적으로 분비되지 않으면 (hyposalivation 혹은 xerostomia), 혀와 점막의 통증, 맛감각, 연하, 저작 그리고 발음 등의 문제, 우식증, 차아상실 등의 문제를 야기하며, 세균에 대한 감염율도 증가한다 (Vissink, 1985; Fox 등, 1985; Mandel, 1989; Axell, 1992). 즉 타액은 그 자체 fluid가 지니고 있는 물리, 화학적 성질에 의하여 구강을 세척하는 clearance action을 나타내지만 (Ericson 등, 1975; Mandel, 1979; Mandel 및 Ellison, 1985; Ligtenberg 등, 1992) 그 밖에 타액내 존재하는 다양한 종류의 단백질은

항균작용 (antibacterial effects)을 보이기도 하고, 때로는 세균이 치질에 부착되는 것을 촉진하는 작용도 가지고 있어, 타액의 기능은 실로 다양하다 (Lumikari 등, 1991). 더욱이 최근에는 타액에 존재하는 새로운 단백질이 속속 밝혀지고 있어 타액내 단백질에 대한 연구가 단백질 그 자체는 물론 치아우식증과의 관련성 등과 맞물려 연구자들간에 커다란 관심의 대상이 되고 있다.

이와 같이 타액 단백질의 역할이 구강내 항상성 유지에 중요하고 그 역할이 다양하지만, 타액내 존재하는 단백질은 크게 histatin과 acidic proline-rich proteins 같이 타액에만 존재하는 단백질, 다른 체액에도 존재하는 단백질 (예: lysozyme, mucins, immunoglobulins), 그리고 침샘이 아닌 혈장과 같은 다른 기원의 단백질 (예: amylase, albumin, Zn-alpha2-glycoprotein)로 나눌 수 있다.

먼저 histatin은 histidine을 많이 함유하고 있는 중성 혹은 염기성의 펩타이드로서 이하선에서 주로 분비되나 소량 악하선에서도 분비되는데 (Oppenheim 등, 1988; Sabatini 등, 1989), *S. mutans* 계열 중 몇 종류에 대하여 항균효과를 가지고 있으며, Porphyromonas gingivalis의 hemagglutination을 억제한다 (Nishikita 등, 1989; Murakami 등, 1992). 또한 그람 음성 박테리아의 외막에 존재하는 내독소 lipopolysaccharides를 중화시켜 숙주방어기전에 도움을 주고 (Sugiyama, 1993), Candida albicans의 성장과 발생을 억제할 수 있는 능력을 가지고 있는데 (Xu 등, 1991), 이러한 histatin의 살균 (bactericidal) 혹은 살진균 (fungicidal) 효과는 양전하를 띠는 histatin이 생체막에 결합해서 그 구조를 파괴시키거나 투과도를 변화시키기 때문이라 여겨진다. 항미생물효과 이외도 histatin은 구강내에서 획득피막 (acquired pellicle) 형성과 석회화 과정에도 기여하며 (Oppenheim, 1989), 비만세포 (mast cell)로부터 histamine이 분비되는 것을 막아 구강염유발을 억제하는 기능도 가지고 있다 (Sugiyama 등, 1990). 한편 proline-rich proteins (PRPs)는 이종 (heterogenous) 단백질로 구성되어 있으며, 기능적인 측면에서 acidic PRPs는 Ca^{2+} 과 강하게 결합하여 피막 (pellicle)을 형성, 타액내 Ca^{2+} 항상성 유지, 타석형성 억제 등의 역할과 치표면에 부착하여 무기질의 성장 위치를 막아 apatic crystal의 성장을 억제한다

(Bennick 등, 1983; Aoba 등, 1984; Saitoh 등, 1989). Histatin이나 acidic proline-rich proteins 이외에 다른 점액에도 존재하는 타액선 단백질에는 대표적으로 statherin을 들 수 있는데, 이하선, 악하선, 그리고 Von Ebner's gland에서는 분비되나, 입술샘(labial saliva)에는 존재하지 않는다(Hay 등, 1984; Azen 등, 1990). 그리고 statherin은 acidic PRPs와 마찬가지로 타액내 칼슘 항상성에 관여하는데(Hay 등, 1988; Raj 등, 1992), hydroxyapatite의 표면에 흡착된 statherin은 *P. gingivalis*나 *Actinomyces viscosus* 등의 미생물의 부착이 더 잘 일어나게 하며(Amano 등, 1994), 피막성분으로서 statherin은 구강표면의 유효작용에도 기여한다(Douglas 등, 1991). 한편 mucin은 모든 점액에 점탄성(visco-elastic character)을 부여하는 단백질로 (Balmer 및 Hirsch, 1978; Watermann 등, 1988; Van der Reijden 등, 1993), glycosylation되어 있기 때문에 protease에 의해 잘 분해되지 않는다(Scannapieco, 1992). 따라서 mucin은 미생물에 의한 단백질 분해 작용을 억제함으로써 세포보호, 유효작용을 하며, 이외에 탈수억제, 분비물질의 점탄성을 유지시키는데도 관여한다(Levine 등, 1987; Tabak, 1991). 이밖에도 동물조직이나 체액에는 단백질 대사를 조절하기 위해서, 혹은 외부 박테리아나 바이러스에 의한 단백질분해로부터 조직을 보호하기 위해서 여러 종류의 단백질분해 억제물질을 가지고 있다(Abrahamson, 1988). 이런 단백질 분해억제 물질 중 타액내 존재하는 cystatin(cystein proteinase inhibitors의 일종)은 mucin과 마찬가지로 단백질집단을 형성하고 있고, 치은염이나 치주염과 같은 염증반응시 분비되어 cystein proteinases를 차단함으로써 바이러스로부터 조직을 보호해 준다. 특히 cystatin은 전신적인 암세포의 증식과 침투를 조절하는 역할을 할 뿐 아니라 hydroxyapatite와 결합하여 획득피막의 형성에 관여하는 한편 hydroxyapatite의 결정 성장을 억제하기도 한다.

이외 췌장에서도 분비되는 α -amylase는 타액내에 매우 풍부한 효소로 glycosylation이 되어있는 형태와 되어 있지 않은 형태 두 가지가 있는데 사람 이하선의 경우 100-2600 μ g/ml의 amylase를 분비하고 있다. 이러한 amylase의 활성화에는 칼슘이 반드시 필요하며 주로 전분(starch)의 α 1,4 결합을

끊어 glucose와 maltose로 분리시켜 탄수화물의 흡수를 촉진시키는 역할을 수행한다. 그러나 amylase는 이외 여러 종류의 세균 증식을 억제한다고 하며 특히 *Neisseria gonorrhoeae*와 *Legionella pneumophila*의 증식억제 효과는 크다는 보고가 있다(Mellersh 등, 1979). 또한 amylase는 법랑질의 탈회억제 즉, Ca^{2+} 과 강하게 결합하여 피막(pellicle)을 형성, 타액내 Ca^{2+} 항상성유지, 타석형성억제 등의 역할과 치표면에 부착하여 무기질의 성장위치를 막아 apatic crystal의 성장을 억제한다고 하나 정확한 기전은 아직까지 밝혀지지 않은 상태이다.

이와같이 치아우식증을 유발시키는 요인으로는 host factor로써 치아 및 타액, microflora, 그리고 기질(substrate) 혹은 음식물(diet) 등이 포함되며 이들의 상호 작용에 의하여 치아우식증이 발생한다고 알려져 있으나 정확한 기전에 대하여서는 모르고 있다. 다만 치아우식증의 초기 발현(initiation)이나 병변의 진행 속도(rate of progress)가 시간과 주위의 조건(environmental condition)에 따라 결정되는 것으로 보아, 타액 및 host의 방어기전(defense mechanism)의 이상이 치아우식증을 유발하는 일차적인 원인일 가능성이 매우 높은 것으로 분석된다. 특히 타액은 mineralization과 demineralization을 유도할 수 있는 도구(mechanics)로, 타액의 상태가 액체라는 점만 제외하면 타액은 법랑질과 유사한 물질로 간주될 수 있으며(타액은 calcium과 phosphate로 과포화되어 있기 때문에), calcium과 phosphate에 의하여 과포화되어 있어, 법랑아질표면에 지속적으로 ion을 공급하고 있으며 타액내 buffer에 의하여 pH 변동을 막아준다. 그렇지만 타액의 이러한 효과는 타액내 단백질에 기인하는 것으로 타액선 선세포에서 합성하는 단백질이 직접 calcium과 phosphate 대사에 관여하며 이로부터 형성되는 acquired pellicle은 치아우식을 억제하는 이차 방어막으로 보고 있다(Scannapieco, 1994). 이와 같이 최근의 진행되고 있는 일련의 연구결과를 종합하여 볼 때 치질의 탈회의 근본적인 원인 중 하나로 타액내 단백질의 조성을 들 수 있으나, 이런 타액단백질의 역할은 대부분 세균의 치질 부착 및 항균효과에 초점을 맞추어 왔기 때문에 타액 단백질이 치질의 탈회에 직접적으로 어떤 영향을 미치는지를 명백히 밝혀진 바 없다. 더욱이 치아우식증

의 발생기전 또한 단순한 탈회(demineralization) 과정이 아니라, 치태에서 만들어진 유기산이 법랑질 표면의 소공을 통해 확산되어 치태용액의 법랑질 인회석에 대한 포화도, pH, 산농도 등의 특정조건 하에서 표면층의 초기용해가 일어나면서 DCPD(dicalcium phosphate dihydrate)의 침전물과 불화된 수산화인회석(fluoridated hydroxyapatite)을 형성한다. 표면층의 국소적인 평형관계가 유지되면 유기산이 thermodynamic driving force에 의해 내부로 더욱 확산되어 하부 법랑질이 용해되고 이 용해산물은 다시 역확산되어 표층부의 광물상의 침전을 일으켜 이른바 재광화(reminerlization)가 되어 표면층이 건전하게 보여지게 되는 것이다(이, 1992). 이와 같이 치아우식은 법랑질의 탈회와 재광화가 역동적으로 일어나는 과정이므로 타액내 단백질의 역할은 위의 두가지 측면에서 동적으로 관찰되어져야 할 것으로 생각된다.

따라서 본 연구에서는 타액단백질중 amylase와 albumin이 *S. mutans*에 의해 유도된 법랑질 탈회에 미치는 영향, 불소가 *S. mutans*에 의해 유도된 법랑질 탈회에 미치는 효과, amylase와 alumin 및 불소가 *S. mutans*에 의해 유도된 법랑질 탈회에 미치는 영향 등을 Ca²⁺ sensitive electrode를 이용하여 측정함으로써, 타액단백질과 불소의 구강내 물리화학적 역할을 구명하고자 한다.

II. 실험 재료 및 방법

1. 실험 재료

법랑질의 주성분인 하이드록시아파타이트(hydroxyapatite:HA)는 Chemika(Switzerland)에서 구입하였으며, 형태는 spheroidal 로서 0.08-0.20 mm 크기의 비드를 사용하였고, 구입 후 즉시 표면에 묻어있는 오염물질을 제거하기 위해 2-3 차례 증류수로 세척한 후 열건조기에서 완전 건조시켰다.

NaH₂PO₄, NaHCO₃, KCl, MgCl₂, CaCl₂, sucrose 등은 Sigma(St. Louis, USA)에서 구입하여 사용하였으며, 타액 단백질로서 amylase, 그리고 탈회용 용액인 lactic acid 역시 Sigma에서 구입하였다. 불소는 NaF(Sigma)를 사용하였다.

S. mutans 균주는 한국과학기술원(KAIST)내 유전공학연구소에서 분양 받은 KCTC 3065(ATCC

25175)를 Brain heart infusion(BHI) 액체배지에 배양하여 실험에 사용하였다.

2. 실험 방법

가. 타액과 전해질 조성이 동일한 용액(인공타액)의 제조본 실험을 위해 타액과 동일한 전해질 조성을 가진 용액을 제조하여 사용하였는데 NaH₂PO₄ 5.5mM, NaHCO₃ 2.5mM, KCl 20.7mM, MgCl₂ 0.3mM 등을 포함시켰으며 이 용액에 30mg의 HA bead를 첨가한 후 안정상태에 도달하였을 때의 용액내 Ca²⁺ 농도가 0.1mM이므로 CaCl₂ 0.1mM을 용액내 포함시켰다. 또한 *S. mutans*의 대사활동이 타액과 유사한 용액내에서 가능하도록 sucrose 5% (W/V)를 첨가시켰다.

나. *S. mutans*의 배양 및 spectrophotometer에 의한 *S. mutans*의 정량화

1) BHI(Brain Heart Infusion) 고체배지 만들기

BHI powder 11.1g과 agar 6g을 넣고 증류수를 넣어 총 용적이 300ml가 되도록 한 다음 잘 혼합한 후 혼합되어진 조성물의 pH를 7.4가 되게 하며 1.5 기압, 121°C에서 20분간 멸균기를 이용하여 멸균하였다. 멸균 후 만일 petridish에 물기가 있으면 멸균할 때의 상태 그대로 dry oven에서 건조시켰다.

2) *S. mutans*의 배양 및 성장도 측정

균주는 호기상태(aerobic condition)에서 배지에 도달하여 16 시간 배양 후 4°C에 보관되어 있는 *Streptococcus mutans* KCTC 3065(ATCC 25175)를 꺼내 하나의 colony를 따서 액체배지에 도달하여 19 시간 배양했다. 액체배지에서 배양 후 2,000rpm에서 20 분간 원심분리를 시행하는데 이는 배지를 제외한 균만을 얻기 위해서다. 원심분리 즉시 상층액을 제거한 후, 균만을 이미 멸균된 80% glycerin에 동량의 멸균된 BHI배지를 혼합한 40% glycerin BHI 배지에 적당량 분주 하였다 그리고 냉동할 균을 충분히 pipetting하여 microcentrifuge tube 나 eppendorf tube에 0.5-1.0ml씩 분주하여 -70°C에 보관하며, 임의의 균을 선택한 후 고체배지에 도달 하여 오염 여부를 확인했다.

배양된 균의 시간에 따른 활성도를 측정하기 위하여 균의 성장도 측정을 시행하였다(Fig. 1).

3) 세균수 측정

세균을 4°C, 12,000rpm(Jouan high speed cen-

trifuge)에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 버리고 30ml의 무균 인산완충 용액(phosphate buffered solution)으로 clean bench 내에서 세번 세척한 후 spectrophotometer를 이용하여 세균의 optical density(O.D.) 값을 흡광도 600nm에서 측정했다. 균액을 순서적으로 희석시킨 후 각 액체 배지 농도에 따라 일정량을 취한 다음 다시 고체배지에 도말하여 증식한 colony 개수를 측정하여 액체배지 농도에 따른 O.D. 값에 맞추어 표준곡선을 완성시켜 O.D. 값에 따른 균수를 정량화했다(Fig. 2).

다. 타액단백질과 불소가 *S. mutans*에 의해 유도된 법랑질 탈회에 미치는 효과

1) 구강모델(mouth model) 제작

HA bead에서 유리되는 칼슘의 양과 pH 변화를 측정하기 위해 우선 구강모델을 제작하였다. 모델의 중앙에는 인공 타액과 HA, 그리고 *S. mutans* 등이 위치될 수 있는 원통형의 chamber를 만들었는데 chamber의 크기는 내경 3.6cm 높이 6cm, 총 용적 60ml로서 acryl로 제작하였으며 구강내에서와 같이 37°C를 유지하기 위해 열순환기(thermo-circulator)가 부착되도록 양 측면에 출입구를 만들었고, 이 부위를 열순환기와 연결하여 항상 일정 온도가 유지되도록 하였다. 한편 구강모델은 자석교

반기 위에 위치하도록 하여 인공타액과 실험시약이 균일하게 섞이도록 하였다.

2) 구강모델에서 칼슘 농도와 pH 변화의 측정 Chamber내에서 유리되는 칼슘의 양과 pH의 변화는 ORION(모델 920A) ion electrode를 이용하여 측정하였는데, 각각 calcium electrode와 pH electrode를 사용하였다. HA와 단백질, 불소, 그리고 lactic acid 등이 균일하게 섞이도록 하기 위하여 섞임자석을 chamber 내에 넣고 회전속도를 일정하게 유지하도록 하였다. 유리된 칼슘과 수소이온 변화는 electrometer에서 physiography(Biopac)를 거친 후 아날로그-디지털 변환기(analog-digital converter, A/D converter)를 통해 personal computer(PC)로 연결되도록 하여 연속적인 유리칼슘 농도의 변화를 측정할 수 있도록 하였다. 기록된 측정치가 전압값(mV)이므로 Ca^{2+} 의 농도(mM)로 환산하기 위해서 인공타액내 Ca^{2+} 농도가 0.1, 0.5, 1, 2, 5, 10mM이 되도록 하고 이때의 mV 값을 기록하여 표준곡선을 만들고 이때 만들어진 직선회귀방정식을 이용하여 Ca^{2+} 농도를 계산한다(Fig. 3).

3) Amylase, albumin, 불소가 *S. mutans*에 의해 유도된 법랑질 탈회에 미치는 효과

실험방법(나)에 의해 정량화된 *S. mutans*를 4°C에

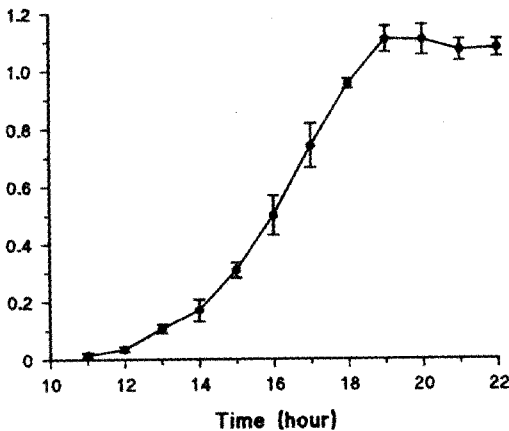


Fig. 1. Growth curve of *S. mutans*.

The number of *S. mutans* increased as a function of time and reached maximum within 19 hour. Averaged data are plotted as mean s.e.m.(n = 4).

O.D.:optical density

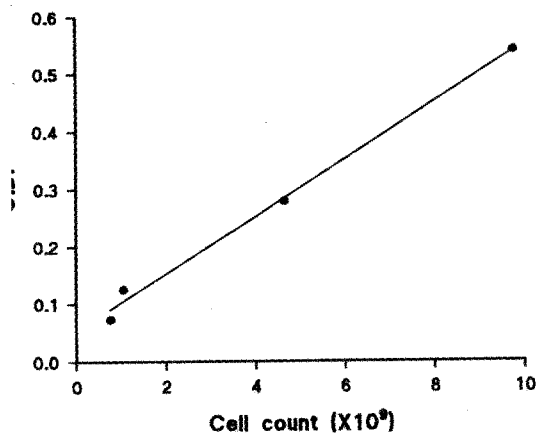


Fig. 2. Calibration of optical density as a function of cell count.

S. mutans was prepared with serial dilution and optical density was measured at 600 nm in the spectrophotometer.

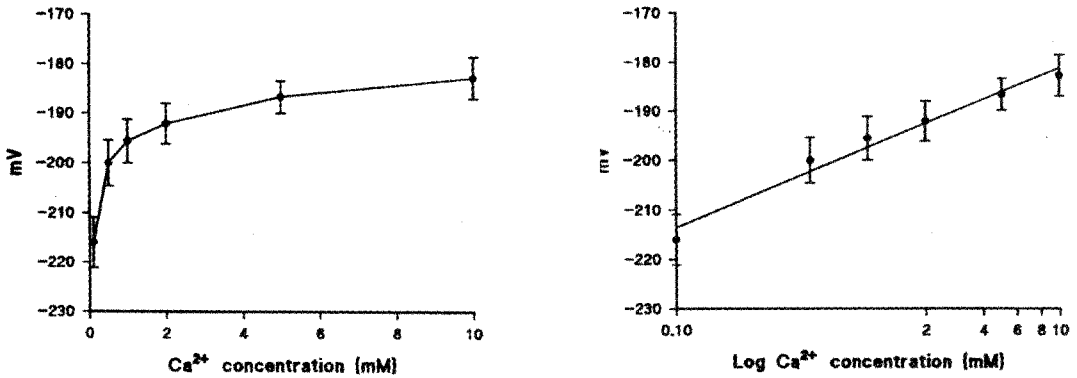


Fig. 3. Calibration of mV values as a function of Ca²⁺ concentration(mM).

Ca²⁺ concentration of artificial saliva was stepped between values from 0.1 mM to 0.5, 1, 2, 5 and 10 mM. In lower pannel, the values of X-axis were converted to log values.

서 12,000 rpm으로 10분간 원심분리한 후 인공타액으로 세척하였는데, 이 과정을 2회 시행하였다. 한편 구강모델 chamber내에는 인공타액 30ml와 HA 30mg, 그리고 amylase을 넣고 20분간 전해질의 평형상태가 이루어지도록 기다린 후, 평형상태가 되면 인공타액 소량을 세척된 50ml 튜브 안에 있는 *S. mutans*에 넣고 2-3차례 힘차게 pipetting 하여 균이 완전히 섞이도록 한 다음 chamber내로 조심스럽게 주입시켰다. 먼저 HA, 인공 타액 용액, 그리고 *S. mutans*만을 chamber 내에 넣고 칼슘유리양을 측정하여 대조군으로 하였으며, amylase를 주입한 후 칼슘유리양을 측정하여 대조군과 분석, 비교하였다. 한편 albumin 및 불소를 인공타액에 포함시켜 *S. mutans*에 의해 유도된 HA 탈회에 미치는 영향을 유리 칼슘량과 pH의 변화를 통해 측정, 분석하였다.

4) Amylase, albumin, 불소가 lactic acid에 의해 유도된 법랑질 탈회에 미치는 효과 0.1M lactic acid 300 μ 를 일시에 인공타액내에 첨가시켰을 때와 0.1 M lactic acid를 인공타액에 주입펌프(infusion pump)를 이용하여 시간경과에 따라 분당 5 μ 씩 서서히 주입했을 때에 인공타액내 칼슘농도의 변화와 pH의 변화를 측정하였으며 amylase, albumin 및 불소를 인공타액에 포함시켜 lactic acid 투여에 의해 유도된 HA 탈회에 이들이 어떤 영향을 미치는지 분석하였다.

3. 실험 자료의 분석

각 약물에 대한 효과는 비모수검정법의 연속형인 Mann-whitney test를 시행하였으며 P 값 0.05 이하를 통계적으로 유의한 차이로 판정하였다.

III. 실험 결과

1. *S. mutans*에 의한 HA bead의 탈회

인공타액과 HA bead를 구강모델 안에 넣고 일정한 속도로 섞어주면서 pH를 측정하면 6.62 0.02(n=16)로서 정상상태의 구강내 pH와 비슷한 값을 보인다. 약 30분 후 *S. mutans*를 용액내에 넣어주면 용액내 pH가 점차 감소하기 시작하여 150분 후에는 4.78 0.08(n=4)에 도달하였으며 용액내 칼슘농도는 *S. mutans*를 투여한 후 천천히 증가하여 처음에 0.1mM에서 60분 후에는 0.50 0.37mM로 증가하였고 이 이후 부터 더욱 빠른 속도로 증가하여 150분 후에는 3.27 0.28mM에 도달하였다(Fig. 4)

2. 불소, amylase 및 albumin이 *S. mutans*에 의한 HA bead의 탈회에 미치는 영향

HA bead를 포함하고 있는 인공타액내에 *S. mutans*를 넣기 전에 불소, amylase 또는 albumin을 전처치하였으며 이때 용액내 pH 및 칼슘농도에는 큰 변동이 없었다. 불소를 전처치하고 *S. mutans*를 넣어주면 용액내 칼슘농도가 증가하여 초기에는 불

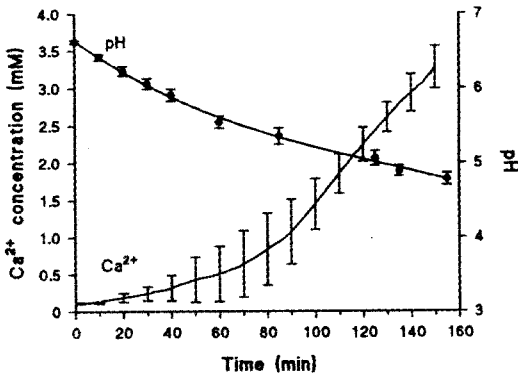


Fig. 4. Demineralization of hydroxyapatite caused by *S. mutans*.

Ca²⁺ concentration measured in the artificial saliva was used as an index of the amount of demineralization. The amount of acid production from *S. mutans* was represented by the changes in pH.

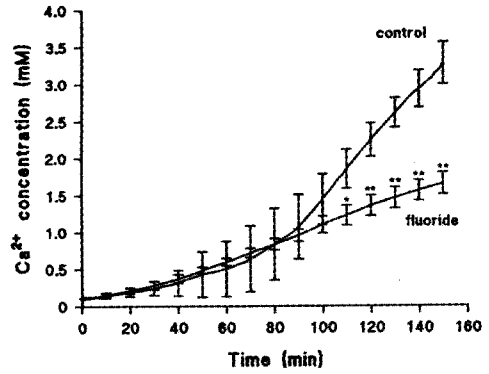


Fig. 5. The effect of fluoride on the demineralization caused by *S. mutans*.

Fluoride inhibited demineralization from 110 min after the addition of *S. mutans*.

* < 0.05 ** < 0.01

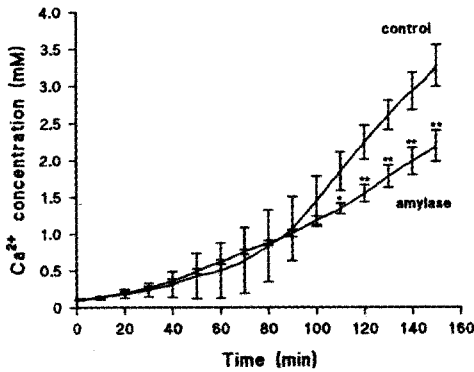


Fig. 6. The effect of amylase on the demineralization caused by *S. mutans*. Amylase inhibited demineralization from 110 min after the addition of *S. mutans*.

* < 0.05 ** < 0.01

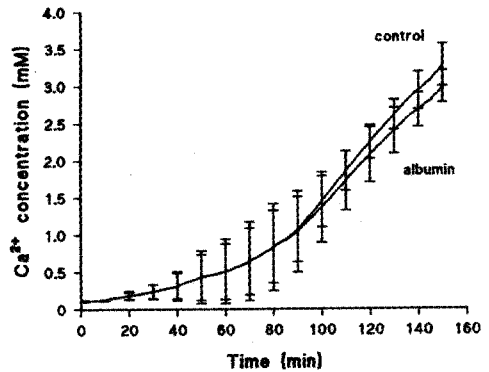


Fig. 7. The effect of albumin on the demineralization caused by *S. mutans*. albumin had little effect on the demineralization caused by *S. mutans*.

소를 투여하지 않은 경우와 비교하여 큰 변화가 없었으나 *S. mutans*를 넣고 110분이 지난 후부터 불소를 처치하지 않은 경우와 비교하여 용액내 칼슘농도 증가가 현저하게 억제되었다(n=4, p<0.05; Fig. 5). Amylase를 전처치하고 *S. mutans*를 넣어준 경우에도 비슷한 양상을 보여 용액내 칼슘농도 증

가를 억제하였으나(n=4, p<0.05), 불소에 의한 칼슘농도 증가억제효과 보다 강도가 크지는 않았다(Fig. 6).

Albumin 전처치에 의해서는 *S. mutans*에 의한 용액내 칼슘증가가 억제되지 않았다(n=4; Fig. 7).

3. 볼스 amylase 및 albumin이 lactic acid 투여에 의한 HA bead의 탈회에 미치는 영향

가. 고농도의 lactic acid를 일시에 투여한 경우
HA bead를 포함하고 있는 인공타액에 0.1M lactic acid 300 μ 를 투여하면 용액내 칼슘농도가 즉각 증가하여 10분 후에 2.13 0.15mM(n=5)에 도달하였고 이 이후부터는 증가속도가 현저히 감소하였

다(Fig. 8). 용액내 pH는 lactic acid 투여로 즉각 감소하여 수 초 내에 최소치에 도달하였는데(3.36 0.01 pH unit) 이 이후부터 다시 증가하여 10분 후에는 4.15 0.02pH unit 이었으며 이때부터 pH의 변화는 거의 관찰되지 않았다. Amylase(n=4) 및 albumin(n=5) 등의 타액단백질은 0.1M lactic acid 300 μ 투여로 인한 인공타액내 칼슘농도 변화에 큰 영

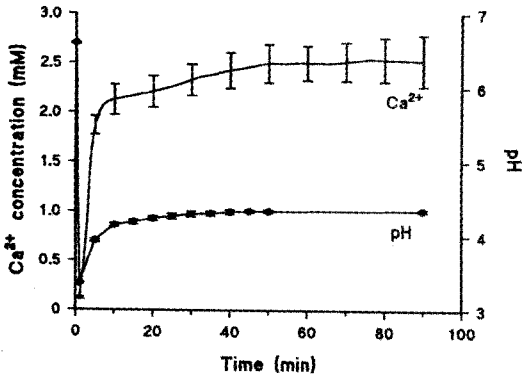


Fig. 8. Demineralization of hydroxyapatite caused by bolus administration of lactic acid, 300 μ of 0.1 M lactic acid was added into 30 ml artificial saliva. Ca^{2+} concentration in the artificial saliva increased rapidly within 10 min followed by a slow increases. A transient decrease in pH was observed followed by a slow recovery. pH values reached plateau in 10 min.

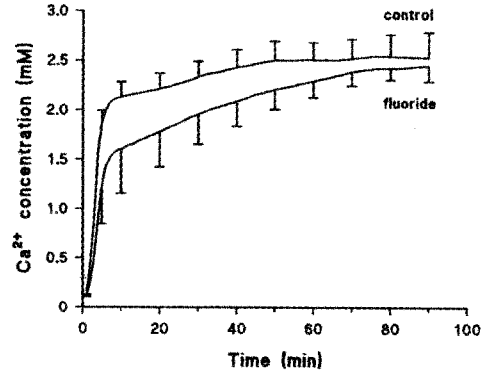


Fig. 9. The effect of fluoride on the demineralization caused by bolus administration of lactic acid. Fluoride did not show any significant changes in Ca^{2+} concentration.

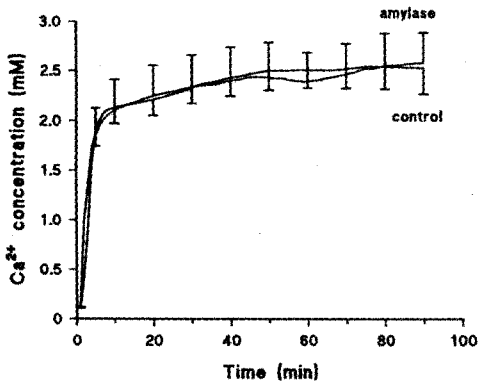


Fig. 10. The effect of amylase on the demineralization caused by bolus administration of lactic acid. Amylase did not show any significant changes in Ca^{2+} concentration.

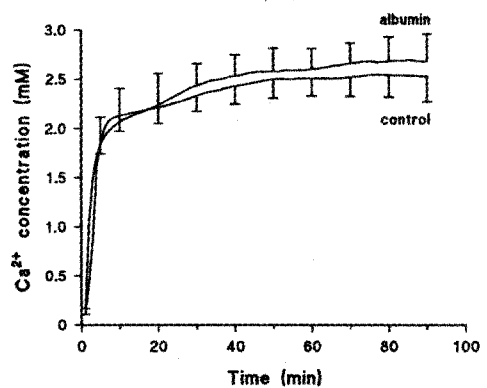


Fig. 11. The effect of albumin on the demineralization caused by bolus administration of lactic acid. Albumin did not show any significant changes in Ca^{2+} concentration.

향을 미치지 못하였으며(Fig. 10과 11), 불소를 전처치한 경우에는 인공타액내 칼슘농도 증가속도가 감소된 양상을 보였으나 통계적으로 유의한 효과는 아니었다($n=4$;Fig. 9).

나. 저농도의 lactic acid를 천천히 주입한 경우
HA bead를 포함하고 있는 인공타액에 0.1M lactic acid를 주입펌프를 이용하여 분당 5μ 씩 주입하고 인공타액내 칼슘농도를 측정하면 칼슘농도가 초기에 빠르게 증가하다가 점차 증가속도가 감소하였다($n=4$;Fig. 12). 반면 인공타액내 pH는 초기

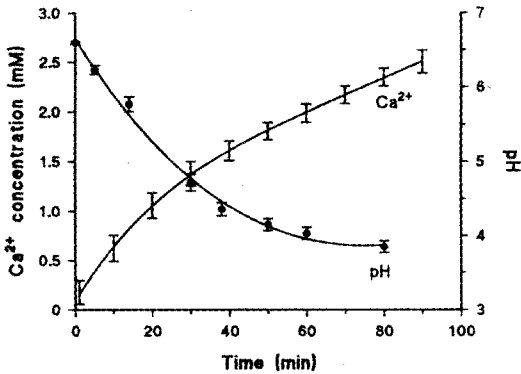


Fig. 12. Demineralization of hydroxyapatite caused by slow infusion of lactic acid, 0.1 M Lactic acid was slowly infused at a rate of 5μ /min for 80 min. Ca^{2+} concentration in the artificial saliva continuously increased, pH of the artificial saliva decreased progressively.

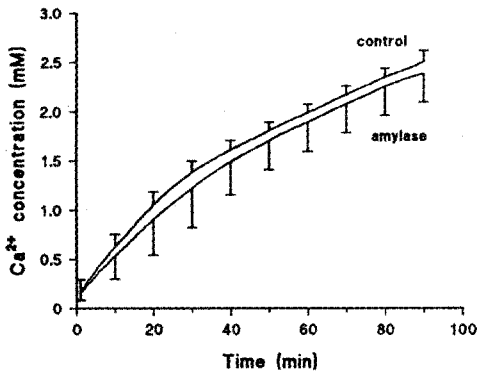


Fig. 14. The effect of amylase on the demineralization caused by slow infusion of lactic acid. Amylase did not show any significant changes in Ca^{2+} concentration.

에는 빨리 감소하다가 점진적으로 감소속도가 줄어드는 양상을 보였다. 고농도의 lactic acid를 일시에 투여했을 때와는 다르게 저농도의 lactic acid를 천천히 주입한 경우에는 불소의 전처치에 의해 초기부터 인공타액내 칼슘농도의 증가가 현저히 억제되었다($n=4$, $p<0.05$;Fig. 13). 그러나 amylase($n=4$)와 albumin($n=4$)의 전처치로는 저농도의 lactic acid를 천천히 주입하여 유도된 인공타액내 칼슘농도 증가에도 영향을 미치지 못하였다(Fig. 14와 15).

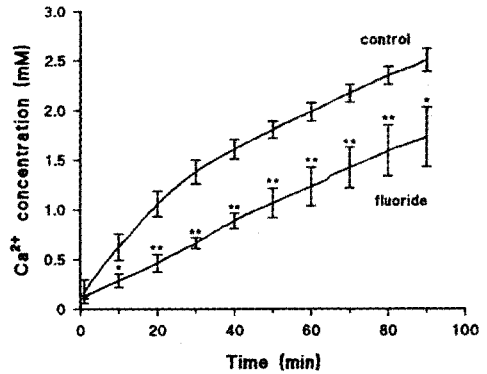


Fig. 13. The effect of fluoride on the demineralization caused by slow infusion of lactic acid. Fluoride had an inhibitory effect on the calcium release caused by slow infusion of lactic acid from the early stage. * < 0.05 ** < 0.01

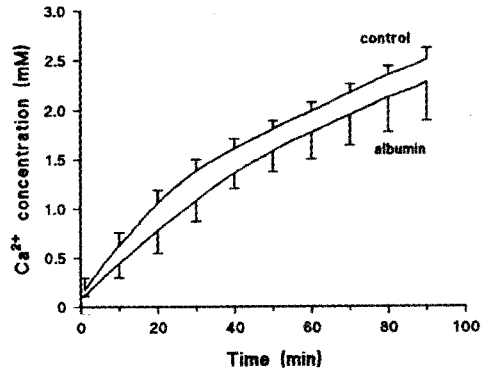


Fig. 15. The effect of albumin on the demineralization caused by slow infusion of lactic acid. Albumin did not show any significant changes in Ca^{2+} concentration.

IV. 고 찰

구강에서 발생하는 질환중 치아우식증은 아직도 이환율이 높은 질병으로 인식되고 있다. 그동안 이를 예방하기 위한 노력의 일환으로 여러 가지 형태의 fluoride를 사용하여 치아우식증의 발생이 다소 감소되었다고 하지만(미국이나 서구 유럽), 우리나라의 경우 치아우식증이 아직도 어린이를 비롯하여 성인에서 빈번하게 발생하기 때문에 치과 영역에서 해결되어야 할 중요한 질환으로 간주하고 있다.

치아우식증은 파괴를 동반한 감염성 질환(progressively infectious disease)으로 이를 일으키는 균이 국소적으로 자리잡아 점착성 gelatinous mat인 bacterial plaque 형태로 치아의 특수한 부위에 응집됨으로써 이 질환의 발생이 유발된다고 보고 있다. 이런 치아우식 유발성 물질인 cariogenic plaque에는 대단히 많은 양(2×10^8)의 균이 포함되어 있으며, 이 결과 자당이 포도당과 과당으로 분해되고 pH가 5.5 이하로 떨어져 경조직인 치아를 탈회시킬 수 있는 조건이 조성된다. 즉 pH 감소에 의한 산생성 과정이 반복되면 법랑질의 미세한 분해가 이어지면서 탈회가 일어나 치아우식 병소(caries lesion)가 발생하는 것이다. 본 실험을 통하여 치아우식증의 원인균인 *S. mutans*를 HA bead가 들어있는 인공타액에 넣어주면 인공타액내 pH가 점차적으로 감소하고 이에 따라 칼슘농도도 함께 증가하여 미생물에 의한 탈회는 미생물로 부터의 산 발생과 밀접한 관계가 있음을 알 수 있다. 그러나 HA bead로 부터의 탈회는 시간이 지남에 따라 서서히 증가하는 추세를 보이나 인공타액내 pH는 감소속도가 점차적으로 줄어드는 경향을 보이므로써 인공타액내 pH 변화와 탈회속도가 완전히 비례하지는 않았다. 이와 같은 현상은 HA bead로 부터 탈회가 될 때 유리되는 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 에 의해 산이 중화되기 때문인 것으로 생각된다. 즉 HA bead로 부터의 탈회는 초기 60분 동안에는 천천히 일어나다가 그 이후에 탈회속도가 더욱 빨리 진행되는 사실로 미루어 실제 미생물로 부터의 산 발생은 시간이 지날수록 증가하지만 HA bead로 부터의 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 유리가 증가하여 미생물로 부터 생성되는 산을 중화시켜 pH의 감소속도가 줄어들었을

것으로 보인다.

HA bead에서 탈회되는 속도가 시간이 지남에 따라 점차 증가하는 것은 *S. mutans*가 주입된 후 점차로 활성도가 증가하기 때문인 것으로 생각된다. 즉 *S. mutans*는 -70°C 로 보관하다가 구강모델에 주입하기 바로 전에 4°C 에서 원심분리한 후 37°C 의 인공타액내로 주입되기 때문에 초기에는 세균의 활성도가 매우 낮아 탈회가 천천히 진행되고 시간이 지남에 따라 세균의 활성도가 높아지면 탈회진행속도가 증가하는 것으로 보인다. 치아의 탈회를 억제하여 치아 우식증을 예방하는 데 있어 현재까지 가장 널리 이용되고 있는 방법으로 불소도포를 들 수 있다. 불소는 탈회를 억제하고 재광화를 촉진하는 물질로 알려져 있을 뿐 아니라(Murray, 1996), 실제 항균효과도 있어(Hamilton, 1977; Marquis, 1990; Tenovuo 및 Soderling, 1992), 치아우식증 예방에 좋은 면을 가지고 있는 것으로 생각된다. 또한 최근 진행되고 있는 일련의 연구결과를 종합하여 볼 때 치질의 탈회를 억제하는 요인중 하나로 타액내 단백질의 조성을 들 수 있으나, 이런 타액단백질의 역할은 대부분 세균의 치질 부착 및 항균효과에 초점을 맞추어 왔기 때문에 타액 단백질이 치질의 탈회에 직접적으로 어떤 영향을 미치는지는 아직까지 명백히 밝혀진 바 없다. 따라서 타액에 가장 높은 농도로 존재하고 있으면서도 아직까지 탈회과정에 미치는 역할을 정확히 알지 못하고 있는 amylase가 *S. mutans*에 의해 유발된 HA bead의 탈회를 억제하는지를 체액에도 존재하는 단백질인 albumin과 비교해서 살펴보고 탈회를 억제하는 효과가 있다면 불소의 효과와 비교해서 어느 정도인지를 비교하고자 하였다.

불소를 전처치한 경우 *S. mutans*에 의해 유발된 HA bead의 탈회가 강력하게 억제되었는데 이러한 현상은 특히 탈회가 빨리 이루어 지기 시작한 후반부에서 현저하게 관찰되었다. Amylase도 *S. mutans*에 의해 유발된 HA bead의 탈회를 억제하였는데 이러한 효과는 albumin을 전처치 했을 때에는 관찰되지 않아 모든 단백질에 의한 일반적인 효과가 아닌 amylase의 특이적인 효과라고 여겨진다. 불소와 amylase가 탈회를 억제하는 작용이 *S. mutans*에 직접적으로 작용하여 이 세균을 불활성화 내지 사멸시켰기 때문인지 혹은 *S. mutans*에는

작용을 하지 않고 치면의 산에 대한 저항도를 증가시킨 때문인지를 알아보기 위해 *S. mutans*를 주입하는 대신 lactic acid를 투여하여 불소와 amylase의 효과를 비교하였다.

우선 0.1 M lactic acid 300 μ l를 투여하여 탈회 양상과 인공타액내 pH 변화양상을 관찰하였다. HA bead의 탈회는 lactic acid 투여 즉시 시작되어 10분 이내에 거의 최고치에 도달한 후 유지되는 양상을 보였다. 이는 인공타액내 pH가 lactic acid 투여 즉시 크게 감소하였기 때문에 야기된 당연한 결과라 하겠다. 인공타액내 pH는 lactic acid 투여로 크게 감소한 후 즉시 증가하기 시작하였는데 이는 역시 HA bead 탈회로 Ca(OH)₂가 대량 유리되어 나타난 현상으로 여겨진다. 인공타액내 pH의 증가가 10분 경과 후부터 거의 멈춘 것도 탈회가 이시간 부터 거의 일어나자 않아 Ca(OH)₂의 유리가 크게 줄었기 때문인 것으로 보인다. 이와 같이 대량의 lactic acid를 일시에 투여했을 때 불소 및 amylase가 탈회를 억제할 수 있는지 살펴보기 위해 lactic acid 투여 전에 불소 및 amylase를 전처치하고 인공타액내 칼슘농도의 변화를 살펴보았다. Lactic acid 투여로 인한 탈회는 불소와 amylase에 의해 억제되지 않은 결과를 보였다. 다만, 불소를 전처치한 경우 탈회되는 속도가 저하되는 양상을 보였으나 통계적으로 유의있는 효과는 아니었다. 그러나 이와 같은 결과가 불소와 amylase가 lactic acid로 유발된 탈회를 억제하지 못한다고 결론을 내리기에는 *S. mutans*에 의해 유발되는 탈회 양상과 lactic acid의 투여로 유발된 투여의 양상에 너무 큰 차이가 있다. 즉 *S. mutans*에 의해 유발된 HA bead의 탈회는 매우 천천히 유발되는 데 비해 lactic acid 투여에 의한 탈회는 매우 빠르게 진행된 후 유지되는 양상을 보여 불소와 amylase의 효과를 비교하는데 적절하지 않은 것으로 판단된다. 따라서 *S. mutans*에 의해 유발되는 탈회양상과 비슷한 조건을 부여하기 위하여 0.1M의 lactic acid를 분당 5 μ l 씩 주입하였다. 비록 초기 탈회속도가 *S. mutans*에 의해 유발된 HA bead의 탈회속도에 비해서는 빨랐지만 이는 *S. mutans*가 초기에는 활성화 정도가 낮아서 산생성을 적게 하였기 때문으로 생각되며, 전체적인 탈회 양상과 pH 변화 양상이 lactic acid를 한꺼번에 투여했을 때보다는 훨씬 *S. mutans*

에 의해 유발된 HA bead의 탈회 양상과 pH 변화 양상에 가까워졌다. 이러한 상황에서 불소와 amylase의 효과를 관찰해 보면 불소는 초기부터 lactic acid에 의한 HA bead의 탈회를 억제하였으나 amylase는 albumin과 함께 HA bead의 탈회에 아무런 영향도 미치지 못하였다. 이와 같은 결과는 결국 불소는 치아의 산에 대한 저항성을 증가시킨다는 것을 보여주는 반면 amylase는 이러한 효과가 없다는 것을 보여준다. 불소를 전처치한 후 lactic acid를 대량, 일시에 투여했을 때에는 HA bead의 탈회를 억제하지 못하고 천천히 소량씩 투여했을 경우에만 탈회를 억제한 이유는 정확히 설명하기 어렵다. 다만, 생각할 수 있는 것은 불소가 급격한 pH 감소에는 효과를 나타내지 못하고 pH가 천천히 감소할 때에만 효과를 보일 가능성이 있다. 특히 불소투여 후 lactic acid를 투여할 때까지 10분의 간격만을 부여하였기 때문에 이 기간동안 불소가 HA bead의 칼슘과 충분히 결합하지 못했을 가능성이 있다. 따라서 lactic acid를 일시에 대량을 투여했을 때에는 탈회를 억제하지 못하였고 소량씩 천천히 주입한 경우에만 효과를 보였을 수도 있다.

지금까지의 실험을 통해서 비록 불소가 항우식 효과를 갖는 기전이 치질의 산에 대한 저항성을 증가시키기 때문임을 확인하였지만 세균에 직접 작용하여 그 활성을 줄였을 가능성을 배제할 수는 없다. 즉, 불소가 *S. mutans*에 의해 유발된 HA bead의 탈회를 억제한 결과에는 lactic acid에 의해 유발된 탈회 억제 결과 외에 세균에 대한 직접적인 활성 억제 효과가 포함되었을 가능성이 있다. 실제로 많은 연구자들이 불소의 항우식효과는 치면의 산에 대한 저항성 증가와 더불어 세균에 대한 직접적인 효과가 함께 나타난 결과라고 하였다.

이에 비하여 amylase의 효과는 주로 세균에 대한 직접적인 활성억제 효과때문인 것으로 생각된다. 즉 *S. mutans*에 의해 유발된 HA bead의 탈회는 amylase에 의해 억제되지만 lactic acid에 의해 유발되는 탈회에는 아무런 효과를 보이지 않으므로써 amylase가 직접적으로 세균에 작용하여 항우식 효과를 갖는다고 할 수 있다. Amylase가 세균에 어떻게 작용하여 산 생성을 억제하는지 본 실험으로는 분명히 알 수는 없다. Amylase가 구강내 세균

에 어떻게 작용하는지 그리고 결과적으로 치아우식에 어떤 효과를 보이는지에 대해서 여러 가지 가설이 제시되었다. 우선 amylase가 획득피막과 치태에서 세균의 부착을 용이하게 하고 세균과 결합한 amylase가 전분을 포도당으로 전환시킴에 따라 세균의 대사가 증가하여 대사산물로 lactic acid가 생성되어 치아우식을 야기한다는 보고가 있다 (Tseng 등, 1992; Scannapieco 등, 1993). 그러나 이와는 달리 amylase가 구강내에서 세균에 대해 세정작용이 있다는 보고도 있어 (Kilian 등, 1989; Nyvad 및 Kilian, 1990) amylase가 치아우식을 억제한다는 견해도 있다. 타액을 구성하는 단백질 중에서 가장 고농도로 존재하고 있고 다양한 종류의 amylase가 순수 분리되어 상품화 되어있으므로 실험하기에 용이한데도 불구하고 amylase가 이와 같이 서로 상반된 효과를 보이는 것으로 보고가 된 것은 구강내에서 amylase의 작용이 매우 다양하기 때문일 수도 있다. 실제로 amylase가 치아 우식증을 유발시키는 경우는 주로 효소로서의 작용 즉 전분을 포도당으로 전환시켜 세균의 대사를 증가시키기 때문으로 이는 구강내 산도가 높지 않은 상태에서 일어난다. 즉 타액내 amylase는 pH가 6.9-7.1일 때 가장 활성도가 크므로 실제 치아 우식이 일어나는 범위 즉 pH 5.5 이하에서는 효소로서의 작용과는 다른 특이한 작용을 보일 가능성이 더욱 크다고 하겠다. 실제로 본 실험에서 amylase 전처리 후 *S. mutans*를 투여한 경우 HA bead의 탈회가 촉진되기 보다는 탈회가 억제됨을 보임으로써 amylase가 전형적인 효소작용에 의해 세균의 대사를 증가시켜 탈회를 촉진시키기 보다는 또다른 작용을 통해 세균에 의한 탈회를 억제하는 것으로 믿어진다. 그러나 이와 같은 작용이 타액을 구성하는 단백질의 공통적인 작용때문은 아니다. 이는 타액내에서 존재하는 또다른 단백질인 albumin의 경우에는 *S. mutans*에 의해 유발된 HA bead의 탈회를 전혀 억제하지 못한 결과를 보임으로써 확인할 수 있다. 따라서 amylase이 항탈회 효과는 효소로서의 작용도 아니고 타액 단백질의 공통적인 작용도 아닌 amylase 특이의 작용때문일 것으로 추측된다. 또한 amylase가 세균에 의한 HA bead의 탈회는 억제하지만 lactic acid에 의해 유도된 탈회는 억제하지 못하는 것으로 볼 때 amylase의 항 탈

회효과는 HA bead에 대한 보호효과가 아닌 세균에 대한 직접적인 효과에 의한다고 할 수 있다. 그러나 본 실험에서 amylase가 *S. mutans*에 의해 유발된 HA bead의 탈회를 억제한 것은 이미 보고된 바와 같은 세균에 대한 단순한 세정작용 (Kilian 등, 1989; Nyvad 및 Kilian, 1990)으로는 설명하기는 어렵다. 만약 amylase가 세균을 구강내로 부터 씻어 주는 작용만을 가지고 있다면 본 실험에 사용한 인공구강모델은 인공타액이 실험 시작부터 끝날 때까지 교체되지 않기 때문에 탈회를 억제하는 효과를 보이지 못했을 것이다. 따라서 amylase는 정확히 어느 단계에 작용하는지는 알 수 없으나 세균의 산생성을 억제하여 탈회를 억제할 것으로 생각된다.

결론적으로 불소는 주로 HA와 결합하여 산에 의한 HA bead의 탈회를 억제하지만 amylase는 HA bead에 대한 보호작용은 나타내지 않고 *S. mutans*의 활성화를 억제함으로써 산 생성을 줄여서 탈회를 억제하는 것으로 생각된다.

V. 결 론

타액선 선세포에서 합성하는 단백질이 직접 법랑질의 calcium(Ca^{2+})과 인(phosphate) 대사에 관여하며 이로부터 형성되는 acquired pellicle은 치아우식을 억제하는 이차 방어막으로 보고 있어 치질의 탈회를 억제하는 근본적인 요인의 하나로 타액내 단백질의 조성을 들 수 있어 타액단백질인 amylase가 법랑질 탈회에 미치는 영향을 구명하고자 하였다. 이와 더불어 치아우식증을 예방하는데 널리 사용되어온 불소는 *Streptococcus mutans* (*S. mutans*)의 대사과정을 억제함과 동시에 법랑질 탈회와 긴밀히 연계된 것으로 여겨져 불소가 *S. mutans*에 의한 법랑질 탈회에 미치는 변화를 알아보고자 하였다.

인공타액과 hydroxyapatite(HA) bead를 구강모델 chamber에 위치시키고 배양한 *S. mutans*를 넣은 후 타액 단백질인 amylase와 albumin이 *S. mutans*에 의해 유도된 법랑질 탈회에 미치는 영향, 불소가 *S. mutans*에 의해 유도된 법랑질 탈회에 미치는 효과, amylase와 albumin 및 불소가 lactic acid에 의해 유도된 법랑질 탈회에 미치는 영향 등을 비교 분

석하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

참고문헌

1. *S. mutans*에 의한 HA bead의 탈회는 초기 60분 동안에는 천천히 지속적으로 이루어 지다가 60분 부터 150분 까지는 탈회가 더욱 빨리 이루어지는 양상을 보였다.
2. *S. mutans*에 의해 탈회가 진행되는 전 기간 동안 pH는 지속적으로 천천히 감소하였다.
3. *S. mutans*에 의한 탈회는 불소와 amylase 처치에 의해 통계적으로 유의있게 억제되었으나($p < 0.01$), albumin에 의해서는 억제되지 않았다.
4. HA bead 가 포함된 인공타액에 0.1M lactic acid를 300 μ l 투여한 경우 탈회가 즉각적으로 빠르게 진행되어 10분 안에 거의 평형상태에 도달하였다.
5. 0.1M lactic acid 300 μ l 투여로 인공타액내 pH도 즉각 감소하여 수 초 안에 최저치에 도달한 후 다시 증가하기 시작하였으며 약 10분 후 부터는 증가속도가 현저히 감소하였다.
6. 불소, amylase, albumin 모두 0.1M lactic acid 300 μ l 투여로 인한 탈회를 억제하지 못하였다.
7. 0.1M lactic acid를 분당 5 μ l 씩 천천히 주입한 경우 탈회가 빠르게 시작되어 점차적으로 느려지는 양상을 보였으며 인공타액내 pH는 빠르게 감소하기 시작하여 점차적으로 느려지는 양상을 보였다.
8. 0.1M lactic acid를 분당 5 μ l 씩 천천히 주입하여 야기된 탈회는 불소에 의해서는 억제되었으나($p < 0.05$), amylase와 albumin에 의해서는 억제되지 않았다.

이상의 결과로 미루어 불소와 amylase는 *S. mutans*에 의해 야기된 법랑질 탈회 억제효과를 나타내는 반면 albumin은 탈회억제효과가 없었다. 불소와 amylase가 탈회억제 효과를 갖는 기전은

불소는 치아우식 단계 중 법랑질이 산에 의해 탈회되는 과정을 억제하여 치아우식 예방효과를 나타내지만 amylase는 산에 의한 법랑질 탈회에는 영향을 미치지 않고 세균에 대해 직접적으로 효과를 나타내어 치아우식 예방효과를 갖는 것으로 생각된다.

1. 이찬영:산원충용액을 이용한 인공치아우식형성. 연세치대 논문집 7:34-41, 1992
2. Abrahamson M:Human cysteine protease inhibitors:isolation, physiological importance, inhibitory mechanism, gene structure and relation to hereditary cerebral haemorrhage. Scand J Clin Lab Invest 48(suppl 191):21-31, 1988
3. Amano A, Sojar HT, Lee-Y Sharma A, Levine MJ, Genco RJ:Salivary receptors for recombinant fimbriin of Porphyromonas gingivalis. Infect Immun 62:3372-3380, 1994
4. Aoba T, Moreno E, Hay DI:Inhibition of apatite crystal growth by the amino-terminal segment of human salivary acidic proline-rich proteins. Calcif Tissue Int 36:651-658, 1984
5. Axell T:The oral mucosa as a mirror of general health of disease. Scand J Dent Res 100: 9-16, 1992
6. Azen EA, Hellekant G, Sabatini LM, Warner TF:mRNAs for PRPs, statherin and histatins in Von Ebner's gland tissue. J Dent Res 69:1724-1730, 1990
7. Balmer RT, Hirsch SR:The non-Newtonian behaviour of human saliva. AICHE Symp Ser Bioheol 74:125-129, 1978.
8. Bennick A, Chau G, Goodlin R et al.:The role of human salivary acidic proline-rich proteins in the formation of acquired dental pellicle in vivo andj their fate after absorption to the human enamel surface. Arch Oral Biol 28:19-27, 1983
9. Brunelle JA:The prevalence of dental fluorosis in US children, 1987. J Dent Res 68:995, 1989
10. Clark WB, Gibbons RJ:Influence of salivary components and extracellular polysaccharide synthesis from sucrose on the attachment of *Streptococcus mutans* 6715 to hydroxyapatite surfaces. Infect Immun 18:51, 1977.
11. Cole AS, Eastoe JE:The formation and properties of dental plaque. In:Biochemistry and Oral Biology 2nd edit:Butterworth &Co Ltd 490.

1988

12. Douglis WH, Reeh ES, Ramasubbu N et al.: Statherin-A major boundary lubricant of human saliva. *Biochem Biophys Res Commun* 180:91-97, 1991
13. Ericson T, Pruitt K, Wedel H.: The reaction of salivary substance with bacteria. *J Oral Pathol Med* 4:307- 323, 1975.
14. Ferretti JJ, Shea C, Humphery MW: Cross-reactivity of *Streptococcus mutans* and human heart tissue. *Infect Immun* 30:69, 1980.
15. Fox PC, Van der PF, sonies BB et al.: Xerostomia: Evaluation of a Symptom with increasing significance. *J Am Dent Assoc* 110:519-525, 1985
16. Hamada S, Koga T, Ooshima T: Virulent factors of *Streptococcus mutans* and dental caries prevention *J Dent Res* 63:407, 1984.
17. Hamade S and Slade HD: Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*, *Microbial Rev* 44:331, 1980.
18. Hamada ST, Horkoshi T, Minami S et al.: Oral passive immunization against dental caries in rats by use of hen egg yolk antibodies specific for cell-associated glucosyltransferase of *Streptococcus mutans*, *Infect Immun* 59:4161, 1991.
19. Hamilton IR: Effects of fluoride on enzymatic regulation of bacterial carbohydrate metabolism. *Caries Res* 11:262, 1977.
20. Hay DI, Smith DJ, Schluckebier SK, Moreno EC: Relationship between concentration of human salivary statherin and inhibition of calcium phosphate precipitation in stimulated human parotid saliva. *J Dent Res* 63:857-863, 1984.
21. Hay DI, Schluckebier SK, Moreno EC: Saturation of human salivary secretions with respect to calcium and inhibition of calcium carbonate precipitation by salivary constituents. *Calcit Tissue int* 39:151-160, 1988
22. Horowitz HS: Appropriate uses of fluoride: Consideration for the 90s-summary. *J Public Health Dent* 51:60, 1991
23. Houte JV: Role of Microorganisms in Caries Etiology. *J Dent Res* 73:672, 1994.
24. Hughes M, MacHardy SM, Sheppard AJ et al.: Evidence for an immunological relationship between *Streptococcus mutans* and human cardiac tissue. *Infect Immun* 27:576, 1980
25. Koga T, Asakawa H, Okahashi N, Hamada S: Sucrose-dependent cell adherence and cariogenicity of serotype c *Streptococcus mutans*. *J Gen Microbiol* 132: 2873, 1986.
26. Killian M, Mestecky J, Schohenloher, RE: Taxonomic study of Viridans Streptococci: Description of *Streptococcus gordonii* sp. nov. and emended description of *Streptococcus sanguis* (White and Niven, 1946), *Streptococcus oreis* (Bridge and Sneath, 1982) and *Streptococcus mitis* (Andrews and Horder, 1906). *Int J System Bacteriol* 39: 471-484, 1989.
27. Ismail AI, Brodeur JM, Kanvanagh M et al.: Prevalence of dental caries and dental fluorosis in students, 11-17 years of age, in fluoridated and non-fluoridated cities in Quebec. *Caries Res* 245:190, 1990.
28. Levine MJ, Reddy MS, Tabak LA et al.: Structural aspects of salivary glycoproteins. *J Dent Res* 66:436-441, 1987
29. Loesche WJ: Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev* 50:353, 1986.
30. Lumikari M, Soukka T, Numio S, Tenovuo JO: Inhibition of the growth of *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sorbinus* and *Lactobacillus casei* by oral peroxidase systems in human saliva. *Arch Oral Biol* 36:155-160, 1991.
32. Mandel ID: Defense of the oral cavity. In: *Saliva and dental caries* (Spec suppl, Microbiology Abstracts). Kleinberg I, Ellison SA, Mandel ID (editors, Washington, DC: Information Retrieval, Inc, PP. 473-491, 1979.
33. Mandel ID: The role of saliva in maintaining oral homeostasis. *J Am Dent Assoc* 119:298-304, 1989
34. Mandel ID, Ellison SA: The biological significance

- of the nonimmunoglobulin defense factors. In: *The lactoperoxidase system: chemistry and biological significance*. Pruitt KM, Tenovuo JO, editors. Basel, New York: Marcel Dekker Inc., PP 1-14, 1985
35. Marquis RE: Diminished acid tolerance of plaque bacteria caused by fluoride. *J Dent Res* 69:672, 1990.
 36. McGhee JR, Michalek SM: Immunobiology of dental caries: Microbial aspects and local immunity. *Ann Rev Microbiol* 35:595, 1981.
 37. Meller A, Clark A, Hafiz S: Inhibition of *Nisseria gonorrhoeae* by human normal saliva. *Br J Venereal Disease* 55:20-23, 1979
 38. Murakami Y, Tagagawa H, Shizukuishi S et al.: Biological role of an arginine-residue present in histidine-rich peptide which inhibits hemagglutination of *Porphyromonas gingivalis*. *FEMS Microbiol Lett* 98:201-204, 1992.
 39. Murray JJ: Appropriate use of fluorides for human health. Geneva WHO. 1996.
 40. Nishikita M, Kanehira T, Oh H, Tazaki M, Kuboki Y: Salivary histatin as an inhibitor of a protease by the oral bacterium *Bacteroides gingivalis*. *Biochem Biophys Res Commun* 174:625-630, 1989.
 41. Nyvad B, Kilian M: Comprision of the initial streptococcal microflora on dental enamel in caries active and caries inactive individuals. *Caries Res* 24:267-272, 1990.
 42. Oppenheim FG: Salivary histidine-rich protein. In: *Human saliva: Clinical chemistry and microbiology*. Tenovuo JO. editor. Boca Raton: CRC Press, PP. 151-160, 1989.
 43. Oppenheim FG, Xu T, Mcmillan FM et al.: Histatins, a novel family of histidine-rich proteins in human parotid secretion. *J Biol Chem* 263:7472-7477, 1988.
 44. Raj PA, Johnsson M, Levine MJ, Nancollas GH: Salivary statherin. *J Biol Chem* 267:5968-5976, 1992.
 45. Riordan JJ: Dental fluorosis, Dental caries and fluoride exposure among 7-year-olds. *Caries Res* 27:71, 1993.
 46. Rozier RG: Reaction paper: Apporiate uses of fluoride-consideration for the '90s. *J Public Health Dent* 51:56, 1991.
 47. Sabatini LM, WArnar TF, Saitoh E, Azen EA: Tissue distribution of RNA's for cystatins, histatins, statherin, and proline-rich salivary proteins in humans and macaques. *J Dent Res* 68:1138-1145, 1989.
 48. Saitoh E, Isemura S, Sanada K: Inhibition of calcium-carbonate precipitation by human salivary proline-rich phosphoproteins. *Arch Oral Biol* 30:641-643, 1989.
 49. Scannapieco FA: Saliva-bacterium interactions in oral microbialecolgy. *Crit Rev Oral Biol Med* 5: 203-248, 1994
 50. Scannapieco FA, Torres G, Levine MJ: Salivary α -amylase: Role in dental palque and caries formation. *Crit Rev Oral Biol Med* 4:301-307, 1993
 51. Smith DJ, Taubman MA, Ebersole JL: Effects of local immunization with glucosyltransferase on colonization hamsters by *Strptococcus mutans*. *Infect Immun* 37:656, 1982.
 52. Sugiyama K: Anti-lipopolysaccharide activity of histatins, peptides from human saliva. *Experientia* 49:1095-1097, 1993.
 53. Sugiyama K, Ogino T, Ogata K: Rapid purification and characterization of histatins (histidine-rich polypeptides) from human whole saliva. *Arch Oral Biol* 35:415-419, 1990.
 54. Tabak LA: Genetic control of salivary mucin formation. In: *Frontiers of oral biology*. Vol. 8. Ferguson DB, editio. Basel: Karger, PP. 77-94, 1991.
 55. Taubman MA: Immunological aspects of detal caries In: Slots J and Taubmand MA, eds. *Contemporary oral microbiology and immunology*. 1st edit, St Louis: Mosby-Year Book, 533, 1992.
 56. Tenovuo J, Soderling E: Chemical aids in the

- prevention of dental disease in the elderly. *Internation Dent J* 42:355, 1992.
57. Tseng CC, Scannapieco FA, Levine MJ: Use of a replica plate assay of the rapid assessment of salivary protein-bacteria interactios. *Oral Microbiol Immunol* 7: 271-277, 1993.
 58. Van de Rijn J , Bleiweis AS: Zarbriskie JB: Antigens in *Streptococcus mutans* cross reactive with human heart muscle. *J Dent Res* 55:C59, 1976.
 59. Vand der Reijden WA, Veerman ECI, Nieuw Amerongen AV: Shear rate dependent viscoelastic behavior human glanular salivas. *Biochology* 30:141-152, 1993.
 60. Vissink A: Xerostomia, Development , properties and application of a mucin containing saliva substitute(dissertation). Groningen, the Netherlands, University of Groningen, 1985.
 61. Waterman HA, Blom C, Holterman HJ, Gravenmade EJ, Mellema M: Rheological properties of human saliva. *Arch Oral Biol* 33:589-596, 1988.
 62. Xu T, Levitz SM, Diamond RD, Oppenheim FG: Anticandidal activity of major human Salivary histatins. *Infect Immun* 59:2549-2554, 1991.