Korean Journal of Clinical Dental Hygiene

Original Article

Microcosm Biofilm 성숙도에 따른 법랑질 초기우식병소 변화

김영석
경북대학교 치위생학과

Changes in Early Caries Lesions on Enamel according to Microcosm Biofilm Maturity

Young-Seok Kim
Department of Dental Hygiene, College of Science & Technology, Kyungpook National University, Sangju, 37224, Korea

*Corresponding Author: 김영석, (37224) 경상북도 상주시 경상대로 2559 경북대학교 상주캠퍼스 치위생학과, Tel: (054) 530-1424, Fax: (054) 530-1429, E-mail: young1224@knu.ac.kr

Received: August 30, 2024
Revised: October 23, 2024
Accepted: October 28, 2024

Abstract

Objective: In this study, we attempt to mature biofilms using a microcosm biofilm model and analyze early carious lesions formed on enamel based on the degree of biofilm maturation. **Methods:** Bovine tooth specimens were inoculated with saliva, immersed in basal mucin medium containing 1% sucrose, and cultured in an anaerobic pack. The Red/Green and ΔF values of biofilms and lower carious lesion images captured on days 7, 10, and 14 using QLF-D were analyzed. **Results:** The biofilms show darker red fluorescence over time. The carious lesion under the biofilm indicate a ΔF of -7.33±1.10 at 14 d. However, no demineralization is observed after 7 or 10 d. **Conclusions:** Artificial carious lesions utilizing microcosm biofilms are expected to facilitate similar studies involving actual carious lesions containing bacteria.

Keywords: Artificial carious lesion, Microcosm biofilm, Quantitative light-induced fluorescence-digital

색 인: 인공우식병소, 미세생태계 바이오필름, 정량광형광기

1. 서론

바이오필름은 자연계 어디에나 존재하는 세균들의 집합체이다(1). 구강 내에도 수백종의 미생물들이 서식하며 치면세균막이라고 부르는 복합체를 이루며 살아가고 있다(2). 치면세균막은 구강 양대병인 치아우식증과 치주질환을 일으키는 주요원인으로 치면세균막의 구성과 생리에 대한 연구가 꾸준히 이루어지고 있다. 이렇게 다양한 미생물로 구성된 치면세균막을 실제 연구에 활용하기 위해서 사람의 구강

Copyright © 2024 by Korean Journal of Clinical Dental Hygiene. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License(http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0)

내에 장치를 부착하거나 구강위생관리를 중단하여 구강 내의 치면세균막의 변화를 살펴보는 방식이 많이 활용되고 있다(3,4). 이러한 in situ 방식의 연구는 사람에게 실시하기 때문에 실제와 같은 환경에서 연구를 시행할 수 있다는 장점이 있지만 윤리적인 문제와 구강 내 환경의 복잡성때문에 제약이 많다. 이러한 문제점을 극복하기 위해 실험실에서 특정 균주들만을 배양하여 바이오필름을 만드는 방법도 사용되지만 소수 균주만을 사용하기 때문에 실제 구강 내 치면세균막의 복잡성을 모사하기에 어렵다는 단점이 있다(5).

이러한 방법들의 단점들을 보완한 방법 중에 microcosm biofilm 모델은 사람의 타액을 이용하여 다양한 세균을 시편에 접종한 뒤 배지를 이용하여 성숙시키는 방법으로 실제 구강 내 바이오필름을 모사한 방법으로 알려져 있다(6). 이 모델은 구강 내 바이오필름의 복잡성을 유지하면서 실험실에서 사용할 수 있다는 장점이 있으며, 조작과 제어가 가능하기 때문에 구강의 미생물 생태를 연구하기 위한 현실적이고 유용한 도구로 인정받고 있다(7, 8).

구강 내 치면세균막에 의해 발생하는 질환 중 치아우식증은 그 유병률이 감소하기는 했지만 여전히 예방과 치료를 위해 다양한 연구가 이루어지고 있다(9). 치아우식증 연구 역시 실제 치아우식증을 모사하기위해 사람의 구강 내에 치아시편을 장착한 장치를 사용하는 방법이 있지만 시간, 비용적인 문제와 윤리적인 문제로 제약이 많다. 이러한 제약을 보완하기 위해 실험실에서 다양한 인공 초기우식병소를 만드는 방법이 연구되었다. 그 중 초기우식병소의 표면층을 보존하기 위해 점액질의 카보폴이 포함된 탈회용액에 침적하는 방법이 주로 사용되고 있다(10, 11). 이 방법은 실제 초기우식병소와 유사한 병소를 재현할 수 있다는 장점이 있지만, 세균이 포함되어 있지 않기 때문에 비활성 우식병소라고 할 수 있겠다.

실제 구강 내 미생물 복합체를 모사한 microcosm biofilm을 이용하면 바이오필름 내의 산 생성균에 의해서 자연스럽게 우식병소를 얻을 수 있을 것이며 이렇게 생성된 우식병소는 활성 우식병소의 형태가 될 것이다. 따라서 microcosm biofilm을 이용해 균일한 인공 초기우식병소를 만들어낼 수 있다면 윤리적인 문제없이 다양한 환경을 조정하여 우식병소를 실험할 수 있는 기회를 제공하는 데 도움이 될 수 있다.

이를 위해 본 연구에서는 microcosm biofilm 모델을 이용하여 바이오필름을 성숙시키고 성숙정도에 따라 생성된 법랑질 인공 초기우식병소가 균일하게 형성되는지 확인해보고자 하였다.

2. 연구재료 및 방법

2.1. 법랑질 시편 제작

육안으로 보아 마모, 침식, 균열이 없고 건전한 우치의 중절치와 측절치를 사용하였다. 순면을 원형 다이아몬드 디스크(Diamond discs, NTI-Kahla GmbH, Kahla, Germany)을 이용하여 지름 7.5 mm의 원기둥으로 절단하여 총 24개의 시편을 얻었다. 시편을 냉각수 공급 하에서 연마지(Silicon carbide paper, Daesung, Seoul, Korea)를 이용하여 400, 800, 1000, 1200 grit까지 단계적으로 연마하여 편평하고 법랑질 표면을 형성하였다. 이후 연마된 시편은 지름 8 mm의 원형 아크릴 몰드에 치과교정장치용 레진(Ortho-Jet, Lang Dental, IL, USA)을 이용하여 매몰하였다.

2.2. 성장 배지 준비

바이오필름은 0.5% sucrose가 포함된 BMM (Basal Medium Mucin)에서 배양하였다. BMM (pH 7.0)은 2.5 g/l porcine mucin (Type III, Sigma Chemicals, IL, USA), 10.0 g/l proteose peptone, 5.0 g/l trypticase peptone, 5.0 g/l yeast extract, 2.5 g/l KCL, 1 mmol/l urea, 5 mg/l haemin, 1 mg/l menadione을 함유하였다.

2.3. 바이오필름 형성

microcosm biofilm 모델을 이용하기 위해 먼저 활성 우식이나 치주 질환이 없는 한 기증자로부터 하루 동안 구강 위생을 자제하고 파라핀 왁스를 씹어 자극성 타액 30 ml를 채취하였다. 24 well microplates (No. 30024, SPL Life science, Pocheon, Korea)의 각 well마다 하나씩 시편을 위치시키고 준비된 타액(1.6 ml)에 침적하여 36°C 배양기에서 4시간동안 접종하였다. 이후 타액은 부드럽게 흡인하고 0.5% sucrose가 포함된 BMM 배지(1.6 ml)를 첨가하였다. 24 well microplate는 혐기성 배양을 위해 가스팩(MGC AneaeroPack, Biomed, MGC, AneroPak, Mitsubishi Gas Chemical Co., Tokyo, Japan)에 밀봉하여 넣은 뒤 36°C의 배양기에 넣었다. BMM 배지는 매일 교체하였으며, 배양 7, 10, 14일 마다 시편을 8개씩 꺼내 탈회정도를 확인하였다.

2.4. QLF-D 영상 촬영 및 분석

바이오필름의 적색 형광은 Quantitative Light-induced Fluorescence-Digital (QLF-D Biluminator, Inspektor Research systems BV, Amsterdam, Netherlands)을 통해 매일 평가되었다. 일반 백색광 이미지와 형광 이미지를 순차적으로 촬영하였다. 카메라 렌즈와 시편의 바이오필름 사이의 거리는 일정하게 유지하였다. Proprietary software (C3 v1.16, Inspektor Research Systems BV, Amsterdam, Netherlands)를 사용하여 모든 디지털 이미지를 캡처하고 저장하였다. 각각 7, 10, 14일차에 촬영된 바이오필름의 성숙도를 확인하기 위하여 붉은 형광정도를 이용하였다. 붉은 형광정도는 이미지 분석 소프트웨어(Image J 1.46r, Wayne Rasband, MD, USA)를 사용하여 바이오필름의 R, G 값을 구한 뒤, R/G 값을 계산하였다. 또한, 7, 10, 14일 배양한 바이오필름을 깨끗이 제거한 뒤, 시편의 탈회된 법랑질 표면을 같은 방법으로 촬영하고 영상 분석 소프트웨어(QA2 v1.21, Inspektor Research Systems BV, Amsterdam, Netherlands)를 사용하여 탈회된 부위를 지정하고 건정법랑질 대비 형광 소실값(ΔF)을 측정하였다. 모든 분석은 한 명의 훈련된 검사자에 의해 수행하였다.

2.5. 통계분석

바이오필름 배양 시간 경과에 따른 시편의 초기 인공우식병소 형광 소실값(ΔF)을 비교하기 위해 독립표본 one-way ANOVA를 시행하였고 Tukey를 이용해 사후검정을 하였다. 데이터분석은 IBM SPSS version 27.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA)를 이용하여 실시하였으며, 통계적 유의수준은 0.05로 설정하였다.

3. 연구결과

3.1. 바이오필름의 형광(R/G ratio) 변화

총 7, 10, 14일 동안 배양한 microcosm biofilm의 형광 이미지를 확인해본 결과 모든 시편에서 배양 3일 후부터 붉은 형광이 나타나며, 시간이 지남에 따라 점점 그 정도가 진해지는 것을 관찰할 수 있었다(Figure 1). 이미지 분석을 통한 R/G 값을 확인한 결과 4일째부터 R/G 값이 1.04로 1을 넘었으며, 7일째에 1.28로 최대값을 나타냈고, 이후 14일까지는 포화된 것으로 나타났다(Figure 2).

https://doi.org/10.12972/kjcdh.20240022

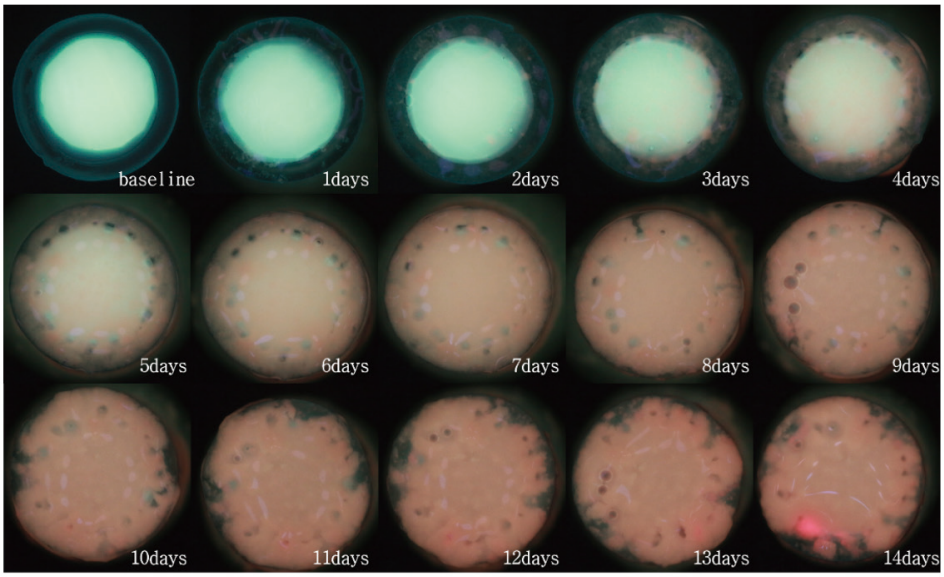


Figure 1. Representative QLF-D fluorescence images of dental microcosm biofilms formed on bovine enamel discs within 14 d.

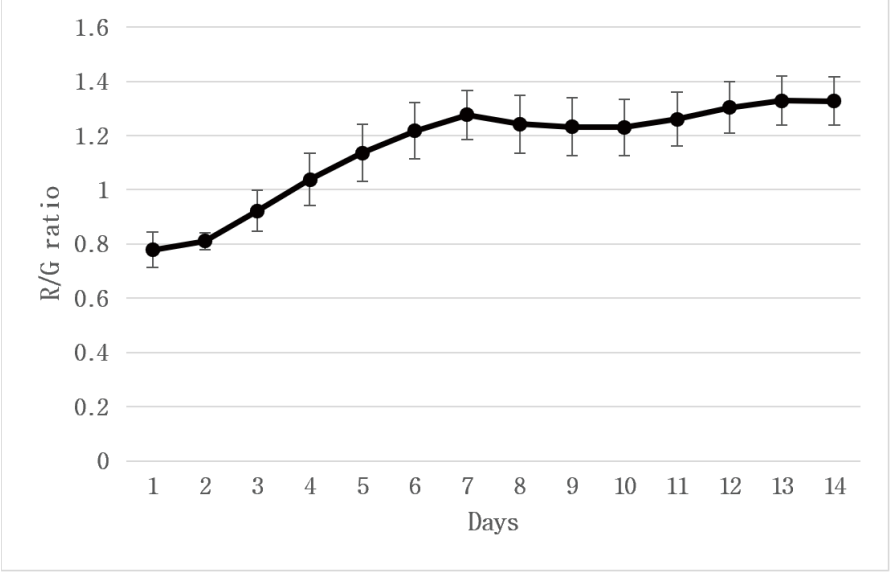


Figure 2. Changes in R/G ratio over 14 d.

3.2. 초기 인공우식병소의 형광 소실 값(ΔF) 변화

배양 7일과 10일 후 바이오필름을 제거하고 하방의 초기 인공우식병소를 확인한 결과, 탈회가 되지 않은 것으로 나타났다. 하지만 14일 후 바이오필름을 제거한 하방에서는 우식병소가 나타난 것으로 확인되었으며, 붉은 형광이 같이 나타나는 것이 관찰되었다(Figure 3). ΔF 값은 평균 -7.33±1.10으로 나타났다(Table 1). 14일째 형광 소실값은 7, 10일째의 형광 소실값에 비해 통계학적으로 유의하게 감소한 것으로 나타났다(p<0.001).

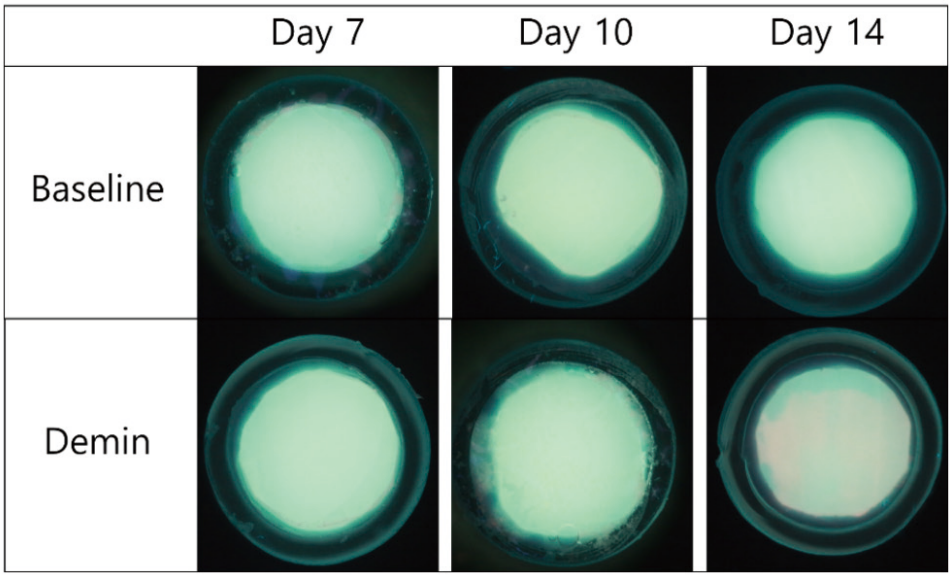


Figure 3. Demineralization of bovine enamel for 7, 10, and 14 d.

Table 1. ΔF value of early artificial carious lesion (n = 8)

	Day 7	Day 10	Day 14	p-value
ΔF	0[a]	0[a]	-7.33±1.10[b]	<0.001

[a, b] same letter are not significantly different at the 5% level of significance.

4. 고안

실험실에서 인공우식병소를 재현하기 위한 연구는 끊임없이 시행되고 있다(10-12). 국내에서 많이 사용하고 있는 방법 중 하나인 카보폴을 이용하는 방법은 효과적으로 법랑질의 표면층을 보존해주면서 초기우식병소를 모사할 수 있다(11). 하지만 이 방법은 세균이 게재되어 있지 않기 때문에 엄밀히 따지면 비활성 우식병소라고 할 수 있다. 이번 연구에서는 실제 사람타액을 이용하여 다양한 세균을 배양해 구강 내 바이오필름을 모사하는 microcosm biofilm을 이용하여 세균이 게재된 인공우식병소를 형성할 수 있는지 평가해보고자 하였다. 특히 이번 연구에서는 기존에 질소가 포함된 혐기성 배양기가 아닌 질소 없이 이산화탄소만 배출되고 간단하게 사용할 수 있는 파우치 형태의 혐기성 배양팩을 이용하였지만, 연구 결과 바이오필름의 성숙과정은 선행연구와 동일한 결과가 나타난 것을 확인할 수 있었다(13, 14). 이번 연구에서도 microcosm biofilm을 사용했을 때 선행연구의 바이오필름의 변화처럼 시간이 지남에 따라 바이오필름이 두꺼워지면서 하방의 시편을 덮는 양상을 보였으며, QLF-D에서도 붉은색 형광이 점점 진해지는 것으로 나타났다. 또한 4일째부터 R/G 값이 1.04로 1을 넘었으며, 7일째에 1.28로 최대값을 보이고 이후 값이 일정하게 유지되는 것도 동일하게 나타났다. 이를 통해 이산화탄소 배양팩을 사

용해도 실제와 유사한 바이오필름을 형성할 수 있는 것으로 보인다.

바이오필름 하방에 생성되는 인공우식병소로 확인해본 결과, 14일이 지난 이후 법랑질 표면에 초기 인공우식병소가 형성된 것을 확인할 수 있었다. 특히 법랑질 표면에는 바이오필름을 제거했음에도 붉은색 형광이 남아있는 것으로 나타났다. 이는 법랑질 하방으로 세균이나 세균의 대사산물인 포르피린이 침투해 붉은 형광을 나타내는 것으로 보인다(15). 이러한 형광 이미지는 활성 병소에서 관찰할 수 있는 것으로 기존에 세균없이 탈회용액만을 이용하여 초기 인공우식병소를 유발한 방법에서 나타난 병소와는 다르게 나타난 것을 확인할 수 있었다.

하지만 이번 연구에서는 바이오필름 형성 7, 10일째에는 법랑질의 탈회가 전혀 일어나지 않았던 것으로 나타났다. 이에 가장 큰 영향을 미친 것은 바이오필름의 세균 구성일 것으로 사료된다. 선행연구나 이번 연구의 파일럿 연구를 시행했을 때는 바이오필름의 붉은 형광색이 좀 더 밝고 진한 색으로 나타났지만 본 연구에서는 붉기는 해도 약간 어두운 색으로 나타났다(14). 비록 R/G의 값은 선행연구와 동일하게 진행되었지만 채도가 더 낮아졌다는 것은 이전 바이오필름과 세균의 구성이 달라졌음을 시사하는 것이다(13). 세균들이 나타내는 형광색은 종류에 따라 다른데 바이오필름 내의 세균들의 비율에 따라 붉은형광의 채도가 달라지는 것이고 세균들이 얼마나 빠른 시간내에 산을 생성하느냐에 따라 시간에 따른 초기인공 우식병소의 진행정도가 달라질 것이다(16). 따라서 microcosm biofilm을 이용한 초기 인공우식병소를 활용하고자 한다면 매 실험마다 우식성 세균의 비율이 항상 유사하게 맞춰져야 균일한 병소를 얻을 수 있을 것으로 보인다.

다만 어느 정도 바이오필름이 성숙되었을 때 원하는 만큼의 병소깊이를 얻을 수 있을지에 대해서는 추가적인 연구가 필요할 것으로 보인다. 이를 위해 향후 연구에서는 바이오필름의 R/G 값뿐만 아니라 채도값도 고려한 형광값이 하방의 초기 인공우식병소의 탈회정도와 연관성이 있는지 확인해보아야 할 것이다.

본 연구를 통해 실험실에서 우식과 관련된 연구를 시행할 때 윤리적인 문제를 줄이면서 실제 구강을 모사한 microcosm biofilm을 활용한 초기 인공우식병소를 이용하면 좀 더 정밀하고 실제와 유사한 연구를 시행할 수 있을 것으로 기대된다.

5. 결론

본 연구는 microcosm biofilm 모델을 이용하여 바이오필름을 성숙시키고 성숙정도에 따라 생성된 법랑질 초기 인공우식병소를 분석해보고자 하였다.

혐기성팩을 이용해 microcosm biofilm을 14일간 배양한 결과, 시간의 흐름에 따라 바이오필름이 두껍게 성숙하는 것을 확인할 수 있었다.

바이오필름의 R/G 값은 4일째에 1.04로 1을 넘었으며, 7일째에 1.28로 최대값을 보인 후 일정하게 유지되었다.

바이오필름 하방의 초기 인공우식병소는 14일째 바이오필름 하방에서 관찰할 수 있었으며, ΔF 값은 평균 -7.33±1.10으로 7, 10일째의 시편에 비해 통계학적으로 유의하게 낮게 나타났다(p<0.001).

연구결과 microcosm biofilm 모델로 14일간 배양한 바이오필름 하방에 균일하게 초기 우식우식병소가 형성되는 것을 확인할 수 있었으며, microcosm biofilm 모델을 활용하여 실제 구강과 비슷한 상황에서 인공우식병소에 대한 연구를 시행할 수 있을 것으로 사료된다.

Author contributions

Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Funding acquisition, Investigation, Methodology, Supervision, Validation, Writing—original draft, Writing—review & editing: YS Kim

References

1. Nobile CJ, Mitchell AP. Microbial biofilms: e pluribus unum. Curr Biol 2007;17(10):R349-R353. 10.1016/j.cub.2007.02.035.
2. Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. Periodontol 2000 2002;28(1):12-55. 10.1034/j.1600-0757.2002.280102.x.
3. Sousa RP, Zanin IC, Lima JP, Vasconcelos SM, Melo MA, Beltrão HC, et al. In situ effects of restorative materials on dental biofilm and enamel demineralisation. J Dent 2009;37(1):44-51. 10.1016/j.jdent.2008.08.009.
4. Aires CP, Tabchoury CP, Del Bel Cury AA, Koo H, Cury JA. Effect of sucrose concentration on dental biofilm formed in situ and on enamel demineralization. Caries Res 2005;40(1):28-32. 10.1159/000088902.
5. Contreras-Guerrero P, Ortiz-Magdaleno M, Urcuyo-Alvarado MS, Cepeda-Bravo JA, Leyva-Del Rio D, Pérez-López JE, et al. Effect of dental restorative materials surface roughness on the in vitro biofilm formation of *Streptococcus mutans* biofilm. Am J Dent 2020;33(2):59-63.
6. Azevedo MS, van de Sande FH, Romano AR, Cenci MS. Microcosm biofilms originating from children with different caries experience have similar cariogenicity under successive sucrose challenges. Caries Res 2011;45(6):510-517. 10.1159/000331210.
7. Filoche SK, Soma KJ, Sissons CH. Caries‐related plaque microcosm biofilms developed in microplates. Oral Microbiol Immunol 2007;22(2):73-79. 10.1111/j.1399-302X.2007.00323.x.
8. Wong L, Sissions C. A comparison of human dental plaque microcosm biofilms grown in an undefined medium and a chemically defined artificial saliva. Arch Oral Biol 2001;46(6):477-486. 10.1016/s0003-9969(01)00016-4.
9. Hollanders ACC, Kuper NK, Maske TT, Huysmans MDNJM. Secondary caries in situ models: a systematic review. Caries Res 2018;52(6):454-462. 10.1159/000487200.
10. Kim YS. Comparison of the effect of artificial early caries lesion formation according to carbopol type. Korean J Clin Dent Hyg 2023;11(1):31-37. 10.12972/kjcdh.20230004.
11. Kim BR, Kim HE, Kwon HK, Kim BI. Effect of polyacrylic acid concentration on producing artificial carious enamel lesions. J Korean Acad Oral Health 2011;35(1):23-31.
12. Gängler P, Kremniczky T, Arnold WH. In vitro effect of fluoride oral hygiene tablets on artificial caries lesion formation and remineralization in human enamel. BMC Oral Health 2009;9:1-7. 10.1186/1472-6831-9-25.
13. Lee ES, Kang SM, Ko HY, Kwon HK, Kim BI. Association between the cariogenicity of a dental microcosm biofilm and its red fluorescence detected by Quantitative Light-induced Fluorescence-Digital (QLF-D). J Dent 2013;41(12):1264-1270. 10.1016/j.jdent.2013.08.021.
14. Kim YS, Lee ES, Kwon HK, Kim BI. Monitoring the maturation process of a dental microcosm biofilm using the Quantitative Light-induced Fluorescence-Digital (QLF-D). J Dent 2014;42(6):691-696. 10.1016/j.jdent.2014.03.006.
15. Oh SH, Lee SR, Choi JY, Choi YS, Kim SH, Yoon HC, et al. Detection of dental caries and cracks with quantitative light-induced fluorescence in comparison to radiographic and visual examination: a retrospective case study. Sensors 2021;21(5):1741. 10.3390/s21051741.
16. Lennon AM, Buchalla W, Brune L, Zimmermann O, Gross U, Attin T. The ability of selected oral microorganisms to emit red fluorescence. Caries Res 2006;40(1):2-5. 10.1159/000088898.