

폐경기 여성호르몬 치료가 질내 정상세균총에 미치는 영향

이근화¹, 박다희¹, 김영리², 박철민³, 김성엽³

¹제주대학교 의학전문대학원 미생물학교실, ²진단검사의학교실, ³산부인과학교실

Abstract

The effects of estrogen on normal menopausal vaginal flora

Keun-Hwa Lee¹, Da-Hee Park¹, Young Ree Kim², Chul-Min Park³, Sung yob Kim³

¹Department of Microbiology, ²Laboratory Medicine, and ³Obstetric and Gynecology, Jeju National University School of Medicine, Jeju, Korea

A study was conducted to determine the effects of estrogen on vaginal flora. Ten postmenopausal women (57–73 years of age) participated in the study. Vaginal flora were evaluated before treatment and after receiving estrogen (2 mg/day) for 2 months. Prior to treatment, 4 *Lactobacilli* were found in vaginal cultures, whereas after 2 months of treatment, 12 *Lactobacilli* were found in vaginal flora. No side effects were reported. Estrogen has the potential to be highly useful for restoring the vaginal normal flora. (J Med Life Sci 2009;7:252–254)

Key Words : Estrogen, Hormone-replacement therapy, Bacterial vaginosis, normal menopausal vagina flora

서론

Lactobacillus species는 가임기 및 정상 여성 질 내 다수종으로 존재하며 골반 염증방지와 몸의 항상성 유지에 중요한 역할을 하는 세균이다¹⁾. 여아의 경우 태어나면서 *Lactobacillus* species가 6주까지 우점종으로 집락화를 하나 모체에서 받은 에스트로겐이 감소하면서 *Lactobacillus* species 대신에 *Staphylococcus* species, *Streptococcus* species 그리고 *Enterobacteriaceae* 등이 나타나는 질 내 세균총의 변화가 일어난다. 그러나 사춘기가 되면서 에스트로겐이 생성되면서 사라졌던 *Lactobacillus* species가 나타나게 된다. 새로이 나타난 *Lactobacillus* species는 건강한 여성 및 가임기의 여성의 질 내에서 다수의 우점종으로 존재하여 질 내의 pH를 산성으로 유지시키며, 생식기 감염을 막는 것으로 알려져 있으며 임신에도 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다²⁾.

폐경기 여성의 경우 *Lactobacillus* species가 감소하며 이로 인하여 질 내 세균총의 균형이 깨지게 된다³⁾. 따라서 estrogen과 질 내 *Lactobacillus* species와의 상관관계가 있을 것으로 추정되지만 이에 대한 직접적인 연구는 별로 없다. 이에 폐경기 여성

에서 에스트로겐의 감소로 인한 증상 완화와 호르몬 감소로 인한 위축성질염 치료를 위해 치료의 목적으로 투여하는 에스트로겐이 질 내 *Lactobacillus* species의 변화를 관찰해보기로 했다⁴⁾.

본 연구에서는 본원 산부인과에 내원한 환자 중 국소 에스트로겐 투여물인 콜맥스질 연질 캡셀과 경구적 호르몬 대체요법사 용자를 대상으로 치료한 환자에서 치료 전과 치료 후의 질 내 상재균(vaginal commensal flora, 특히 *Lactobacillus* species)의 종류 및 수가 어떻게 변화하는지 살펴보고자 한다.

재료 및 방법

1) 시료

본 연구에 사용한 환자의 vaginal swab 수집은 제주대학교병원 산부인과에 내원한 환자 10명(환자군 7명, 대조군 3명)에 대해서 환자의 동의를 구한 후 콜맥스질 연질 캡셀 투여 전과 투여 후 vaginal swab을 실시하였다.

2) 시료(vaginal swab) 처리

본 연구에서는 vaginal swab시 멸균된 증류수를 이용하여 희석시킨 후 희석액에서 질 내 세균의 DNA를 추출 및 분리하였다.

3) 질내 세균 DNA 추출 및 분리

Bead beater phenol (BB/P) 방법을 이용하여 세균의 DNA를 추출하였다. 먼저 vaginal swab을 멸균수로 희석후, TEN buffer (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, NaCl 100 mM; pH 8.0)에 부

Address for correspondence : Sung yob Kim
Department of Obstetric and Gynecology, Jeju National University
School of Medicine, 66 Jejudaehakno, 690-756, Jeju, Korea
E-mail : kimsy@jejunu.ac.kr

This work was supported by the research grant of the Jeju National University in 2009.

유사킨 후에 직경 0.1 mm 초자구(diameter 0.1 mm: Biospec Products, Bartlesville, Okla., U.S.A.) 100 μ l (packing volume) 와 phenol: chloroform: isopropylalcohol (50:49:1) 용액 100 μ l 를 함께 부유시켜 mini beater로 1 분간 진탕하여 균체를 파쇄하였다. 균 파쇄액은 12000 rpm으로 5분간 원심분리하고 상층액 (100 μ l)을 새로운 tube에 옮긴 후, 60 μ l의 isopropylalcohol을 섞고, 다시 15000 rpm으로 15분간 원심 분리하였다. 침전물은 70% 에탄올로 세척한 후 TE (pH 8.0, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) buffer 60 μ l로 DNA를 회수하였다4).

4) 중합효소연쇄반응에 의한 세균의 16S rDNA 유전자 증폭

세균의 16S rDNA를 증폭할 수 있는 forward primer와 reverse primer를 사용하였다. 중합효소연쇄반응은 2 단위의 Taq polymerase, 10 mM dNTP, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 1.5 mM MgCl₂을 포함하는 AccuPower PCR PreMix (Bioneer, Korea)을 이용하였다. 주형 DNA 50 ng, primer SRPOF1, SRPOR2 각각 20 pmol 넣고, 증류수를 최종 부피가 20 μ l가 되도록 첨가하여 혼합물을 만들었다. 중합효소연쇄반응은 first denature 95 $^{\circ}$ C로 5분, 30 cycle로 denaturation 95 $^{\circ}$ C 1분 anealing 62 $^{\circ}$ C 45초 extention 72 $^{\circ}$ C 1분 30초, final extention 72 $^{\circ}$ C 5분으로 수행하였다(Model 9600 thermocycler, Perkin-Elmer cetus). 중합효소연쇄반응 후, 1% agarose gel에 전기 영동하여 1,600 bp의 반응산물을 확인하였다4).

5) 중합효소연쇄반응 산물의 정제

1.2% gel에 전기영동 후, 16S 유전자 산물 부위의 젤을 자른 다음 새로운 tube에 옮겨 DNA를 추출 및 분리하였다. DNA 추출 및 정제는 Qiaex (Qiagen, Germany) system을 이용하였다. Gel solubilizing solution QX1 500 μ l을 gel 을 포함한 tube에 첨가한 후 50 $^{\circ}$ C에 15분간 방치하여 gel을 완전히 녹였다. 그 후 gel bead를 10 μ l을 첨가하여 완전히 섞은 후에 50 $^{\circ}$ C에 15분간 방치하였다. 그 사이 1분 간격으로 tube를 10초씩 vortex를 수행하여 bead가 골고루 퍼지도록 하였다. 이 후 QX1으로 1번, QF 로 2번 세척한 후 45 $^{\circ}$ C에서 10분간 말린 후 TE buffer 20 μ l로 DNA를 회수하였다.

6) TA 클로닝

회수한 16S rDNA산물에 어떠한 종류의 세균의 16S rDNA 유전자가 존재하는지 확인하기 위해 TA 클로닝 키트를 이용하여 클로닝 후 대장균에 형질전환(transformation) 후 16S rDNA를 회수하였다.

7) 자동염기서열 분석

TA 클로닝, 및 대장균에 형질전환 시킨 후 회수한 16S rDNA 유전자는 자동 염기서열분석법으로 분석하였다. 자동염기서열 분석은 젤 elution 산물을 주형 DNA로 사용하였다. 주형 DNA 60

ng, primer 1.2 pmol, BigDye Terminator Cycle Sequencing kit (PE Appied Biosystems) 2 μ l을 섞고, 증류수를 첨가하여 총 부피 10 μ l로 제조함. 반응은 Perkin Elmer Cetus 9600을 사용하여, 95 $^{\circ}$ C 10초, 60 $^{\circ}$ C 10초, 60 $^{\circ}$ C 4분으로 25 cycle로 실시하였다. 반응이 끝난 sample은 에탄올 침전방법으로 DNA를 정제하였다. 즉, 증류수 180 μ l, 3 M sodium Acetate 10 μ l을 첨가하여 총 200 μ l로 만든 후, 이 혼합물에 2배 부피의 100 % 에탄올을 첨가하여 잘 섞은 다음 15000 rpm으로 20분간 원심 분리하여 DNA를 침전시켰다. 그 후 70% 에탄올 500 μ l을 첨가한 후 15,000 rpm으로 20분간 원심 분리하여 DNA를 세척하였다. 그 후 DNA를 Deionized Formimide (PE Appied Biosystems)로 회수하였다. 이렇게 정제된 DNA를 95 $^{\circ}$ C로 5분간 반응하여 단일가닥 DNA로 만든 후, ABI 3100 system을 이용하여 2시간 30분 동안 전기 영동하여 염기서열을 분석하였다.

8) 16S rDNA 유전자 염기서열의 배열 분석

자동 염기서열 분석방법에 의해 분석 되어진 16S rDNA 유전자 염기서열은 DNASTAR 소프트웨어의 Megalign 프로그램 및 NCBI의 Blast를 이용하여 다정렬(multialignment) 및 어떠한 세균인지를 동정한 후 질 내의 세균 16S rDNA유전자 데이터베이스를 구축하였다.

결과 및 고찰

본 연구에서는 제주대학교병원 산부인과에 내원한 환자에 대해서 콜맥스질 연질 캡셀 치료 전과 치료 두 달 후 질 내 상재균의 변화가 있는지에 대해서 대조군(콜맥스질 연질 캡셀을 투여하지 않은 군) 3 case와 환자군 7 case를 비교 하였다. 연구결과 환자군의 경우 *Lactobacillus* species의 경우 치료 전 9개에서 12개로 증가하였으며 *Veillonella* species는 1개에서 4개로 증가했으며 치료 전 대조군에서 발견된 *Streptococcus* species는 치료 후에는 확인되지 않았다5-8). *Megasphaera* species는 치료 전에는 발견되지 않았지만 치료 후 1개가 발견되었다(Table 1). 환자군 중 콜맥스질 연질 캡셀을 경구 투여한 강O일 환자는 치료 전에는 발견되지 않았던 *Lactobacillus* species가 치료 후에는 *Lactobacillus* species(*Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus iners*)가 발견이 되었다(Table 2).

Table 1. Alternation in vaginal flora at treatment group(n=7)

	Pre-treatment	After 2 months of treatment
<i>Lactobacillus</i> spp.	9	12
<i>Veillonella</i> spp.	1	4
<i>Streptococcus</i> spp.	1	0
Uncultured <i>Megasphaera</i> spp.	0	1

참 고 문 헌

대조군의 경우 *Lactobacillus* species의 경우 두 달 전에는 6개, 두 달 후에는 4개가 확인이 되었으며 *Veillonella* species는 4개에서 두 달 후에는 발견되지 않았다. *Aerococcus* species 5개가 증가했으며, *Megasphaera* species는 두 달 후에 1개가 발견되었다(Table 3).

이러한 연구결과는 콜맥스질 연질 캡셀을 치료한 환자군의 경우 대조군 보다 낮은 비율이지만 *Lactobacillus* species가 증가함을 보여준다. 특히 경구로 치료한 강O월 환자의 경우에는 *Lactobacillus* species가 높은 비율로 증가를 하였다⁵⁻⁸⁾.

또한 무산소균 그람 양성균으로 정상인의 구강, 상기도, 질에서 발견 되는 *Veillonella* species군이 치료 후 증가하였다. 따라서 질 내에서 잠재적 기회 감염균의 집락화를 막는데 중요한 역할을 하는 *Lactobacilli* species가 콜맥스질 연질 캡셀 치료 후에 낮은 비율 이지만 증가함을 보여주는 결과로서 앞으로 보다 많은 연구를 통하여 따라서 폐경기 여성에 대한 호르몬 치료 시 질 내 상재균을 회복시킬 수 있는 중요한 임상적 지표를 마련하는 근거가 될 것으로 생각된다. 또한 비병원성 세균으로 알려져 있지만 치료 후 증가한 *Veillonella* species에 대해서도 보다 많은 연구가 있어야 할 것이다⁹⁻¹²⁾.

Table 2. The frequencies of detection of *Lactobacillus* spp. at p.o treatment-patient

	Pre-treatment	After 2 months of treatment
<i>Lactobacillus</i> spp.	(-)	(+)
		<i>Lactobacillus</i> scripsatus
		<i>Lactobacillus</i> iners

Table 3. Alternation in vaginal flora at non-treatment group(n=3)

	Pre-treatment	After 2 months of non-treatment
<i>Lactobacillus</i> spp.	6	4
<i>Veillonella</i> spp.	4	0
<i>Aerococcus</i> spp.	0	5
Uncultured <i>Megasphaera</i> spp.	0	1

- 1) Speroff L, Glass R, Kase N. Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility, 6th edition. Baltimore: Williams & Wilkins, 1999:643-780 Chapters 17, Menopause and
- 2) Kiss H,K ler B , Petricevic L, Sauerzapf I, Klayraung S, Domig K, Viernstein H, Kneifel W. Vaginal *Lactobacillus* microbiota of healthy women in the late first trimester of pregnancy. BJOG 2007 Nov;114(11):1402-7.
- 3)Yoshimura T, Okamura H. Short term oral estriol treatment restores normal premenopausal vaginal flora to elderly women. Maturitas. 2001 Sep 28;39(3):253-7.
- 4) Lee KH, Cho MJ, Yamaoka Y, Graham DY, Yun YJ, Woo SY, Lim CY, Ko KS, Kim BJ, Jung HC, Lee WK,Rhee KH, Kook YH. Alanine-threonine polymorphism of *Helicobacter pylori* RpoB is correlated with differential induction of interleukin-8 in MKN45 cells. J Clin Microbiol. 2004 Aug;42(8):3518-24.
- 5) Brandberg A, Mellstrom D, Samsioe G. Low dose oral estriol treatment inelderly women with urogenital infections. Acta Obstet Gynecol Scand Suppl 1987;140:33-8.
- 6) Nishibe A, Morimoto S, Hirota K, Shimizu M, Okuma H, Fukuo K, YasudaO, Onishi T, Ogihara T. Comparison of effects of estriol on bone mineral density of vertebrae between elderly and postmenopausal women. J Bone Miner Metab 1998;16:21-6.
- 7) Englund DE, Johansson EDB. Endometrial effect of oral estriol treatment in postmenopausal women. Acta Obstet Gynecol Scand 1980;59:449-51.
- 8) Punnonen R, Soderstrom KO. The effect of oral estriol succinate therapy on the endometrial morphology in postcaumenopausal women: The significance of fractionation of the dose. Europ J Obstet Gynec Reprod Biol 1983;14:217-24.
- 9) Brook I. Veillonella Infections in Children. J Clin Microbiol 1996;34(5):1283-5.
- 10) Finegold SM. 1977. Anaerobic bacteria in human disease, p. 182-201. Academic Press, Inc., New York.
- 11) Branhart RA, Weitecamp MR, Aber RC. Osteomyelitis caused by Veillonella. Am J Med 1983;74:902-4.
- 12) Brook, I. 1989. Pediatric anaerobic infection: diagnosis and management. The C. V. Mosby Co., St. Louis.