

*Prevotella intermedia*와 *Prevotella nigrescens*의 세균내독소에 대한 연구 - 화학적 분석 및 면역생물학적 활성 평가 -

김성조

부산대학교 치과대학 치주과학교실

I. 서론

세균내독소 (bacterial endotoxin)는 그람음성 세균의 세포벽 외막에 존재하는 lipopolysaccharide (LPS) 성분으로, 염증의 유발을 비롯한 다양한 생물학적 작용을 가지고 있으며, 구강 내에서는 치태, 타액, 치은 삼출액, 염증치은조직, 치석, 그리고 치주질환에 이환된 백악질 등에 세균내독소가 존재한다¹⁻³⁾. Gibbons 등⁴⁾은 치은열구 내에 세균내독소를 방출할 수 있는 다수의 그람음성 세균이 존재함을 보고하였고, 치주질환에 있어 특정 병원체로서의 다양한 그람음성 세균들에 대한 관심이 증대됨에 따라, 이들 세균의 세균내독소의 구조 및 독성을 규명하기 위한 몇몇 연구도 있었다⁵⁻⁷⁾.

*Prevotella intermedia*와 *Prevotella nigrescens*는 그람음성 간균으로 착색을 형성하는 혐기성 세균이다. *P. nigrescens*는 *P. intermedia*와 밀접한 연관을 가지고 있으며, 생화학적 특성 등에 의거하여 Shah와 Gharbia⁸⁾에 의해 *Prevotella*종 내의 별도의 새로운 종으로 분류된 바 있고, type strain은 ATCC 33563이다. *P. intermedia*와 *P. nigrescens*는 용혈 및 혈구응집 작용⁹⁾, 효소활성¹⁰⁾, 그리고

beta-lactamase 생성 및 항균제에 대한 감수성¹¹⁻¹³⁾ 등에 있어 상이함이 보고된 바 있고, 이 두가지 균종은 SDS-PAGE와 PCR 등의 방법에 의해 구분될 수 있다¹⁴⁻¹⁸⁾.

*P. intermedia*는 치주질환의 주요 병인 균주 중의 하나로서, 성인성치주염 환자의 치주낭 내에서 우세하게 존재한다¹⁹⁻²¹⁾. 또한, 이 균주는 급성괴사성궤양성치은염²²⁾과 임신성치은염²³⁾ 환자의 치은연하에서 빈번하게 검출된다. *P. nigrescens*는 치은염²⁴⁾과 성인성치주염^{25,26)} 환자의 치은연하에서 빈번하게 검출되는 병인균주이다. 이 균주는 근관감염^{14,27)}과 임플란트주위염²⁸⁾과도 연관이 있는 것으로 알려져 있다.

*P. intermedia*와 *P. nigrescens*는 염증성 치주질환 등 구강 내 감염에 있어 주요 병인균주임에도 불구하고 이들 균주의 독성 및 조직파괴 기전에 관하여는 많은 것이 알려져 있지 않다. 본 연구에서는 *P. intermedia*와 *P. nigrescens*의 세균내독소의 각종 생물학적 활성을 비교 분석하고자 한다. 이는 치주질환과 치수질환 등 구강 내 감염에 있어 이들 균주와 그들의 세균내독소의 역할을 규명하는데 있어 중요한 의미가 있으리라 사료된다.

“이 논문은 2001년도 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구되었음” (KRF-2001-041-F00251)

교신저자: 김성조, 부산광역시 서구 아미동 1-10, 부산대학교 치과대학 치주과학교실, 우편번호: 602-739

II. 연구대상 및 방법

1. 균주 및 배양조건

Prevotella intermedia ATCC 25611, *Prevotella nigrescens* ATCC 33563, 그리고 *Prevotella nigrescens* ATCC 25261을 연구대상으로 하였다. 이들 균주를 통법에 따라, 1 µg/ml menadione과 5 µg/ml hemin을 포함하고 있는, enriched trypticase soy agar 또는 GAM broth (Nissui, Tokyo, Japan)를 이용하여 37℃의 혐기성 조건 (10% H₂/10% CO₂/80% N₂)에서 배양하였다. 액체배지에서 24시간 배양한 early stationary phase의 균주를 4℃에서 12,000 × g로 20분간 원심분리하여 회수하고, phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.2)로 3회 세척한 후 동결건조 하였다.

2. 세균내독소 (lipopolysaccharide; LPS)의 분리

Westphal과 Jann²⁹⁾의 hot phenol-water 방법에 의하여 LPS를 동결건조한 균주로부터 추출하였다. 간략히 소개하면, 균주를 소독된 증류수에 녹인 후 90 % phenol을 가하여 68℃에서 20분간 2회 추출하고 냉각한 후, 7,000 × g에서 15분간 원심분리하여 aqueous phase를 수집하고, 4℃에서 증류수로 철저히 투석하였다. 투석 후 105,000 × g에서 3시간 원심분리하여 동결건조한 crude LPS를 0.1 M Tris (pH 8.0)에 녹인 DNase (25 µg/ml; Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA)와 RNase (25 µg/ml; Sigma)로 37℃에서 밤새 배양하여 핵산을 제거하였으며, proteinase K (50 µg/ml)를 첨가하여 60℃에서 1시간 가열하고 37℃에서 밤새 배양하여 오염된 단백질을 제거하였다. 순수분리한 LPS의 단백질 함량은, Markwell 등³⁰⁾의 방법에 의해 측정된 바에 의하면, 0.1 % 미만이었다. Sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel에 과량의 분리한 LPS를 가하여 전기영동한 후 Coomassie blue로 염색한 결과 단백질 밴드는 보이지 않았다 (자료제시 않함).

Salmonella typhimurium LPS (phenol extract)는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo, USA)에서 구입하였다.

3. KDO 및 단백질 함량의 분석

2-keto-3-deoxyoctonic acid (KDO) 함량은 Karkhanis 등³¹⁾의 방법에 의해 결정하였으며, 단백질의 정량은 Markwell 등³⁰⁾의 방법에 의하였다.

4. B cell mitogenicity의 측정

in vitro에서 BALB/C 마우스의 비장세포에 대한 LPS의 mitogenicity를 측정하였다. 간략히 소개하면, 6-8주의 자성 BALB/C 마우스의 비장세포 (well 당 100 µl에 5 × 10⁵ 세포수)를 96-well microculture plate에서 다양한 농도의 LPS (0.1 µg, 1 µg, 그리고 10 µg/ml)와 함께 37℃의 5% CO₂ 배양기에서 72시간 배양 후, MTT assay를 이용하여 세포증식을 측정하였다. 이를 위해, 세포 배양 후 0.5 mg/ml 농도가 되도록 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)를 가하여 37℃의 5% CO₂ 배양기에서 2시간 배양한 후 상층액을 제거하고, 세포를 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 녹였다. 그 후 Spectra Max 250 ELISA Reader (Molecular Devices, USA)를 이용하여 570 nm에서의 흡광도를 측정하여 MTT가 formazan으로 환원된 정도를 평가하였다. 결과는 대조군에 대한 백분율로 표시하였다.

5. RAW264.7 세포의 배양

마우스의 macrophage-like cell line인 RAW264.7 (American Type Culture Collection, Rockville, MD.)을 37℃의 5% CO₂/95% air 배양기에서 10% [v/v] heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 100U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 10 mM HEPES, 2 mM L-glutamine, 0.2% NaHCO₃, 그리고 1 mM sodium pyruvate이 포함된 Dulbecco's modified Eagle's

medium (DMEM)으로 배양하였다. Confluence 상태에서 배지와 비부착세포를 제거하고 새로운 배지를 가하여 24시간 배양 후, rubber policeman으로 세포를 모아, 3회 수세하고 생존세포의 수를 세었다. Well 당 1×10^6 의 세포수로 24 well에 분주한 후, 2시간 이상 배양하여 plate에 세포가 부착되도록 하였다. 그 후 다양한 농도의 LPS를 가하여 지정된 시간 동안 배양하고, 상층액을 수집하여 NO assay 및 TNF- α assay를 위해 -70°C 에 보관하였다.

6. Nitric oxide (NO) assay

NO의 농도는 배양 상층액 내의 nitrite (NO_2^-) 농도를 측정하여 결정하였다³²⁾. 간략히 소개하면, 96-well flat-bottomed microtiter plate에서 배양 상층액 100 μl 와 동일 부피의 Griess reagent (1% sulfanilamide, 0.1% naphthylethylene diamine dihydrochloride, and 2.5% phosphoric acid) (Sigma)를 혼합한 후 실온에서 10분간 방치하고, Spectra Max 250 ELISA Reader (Molecular Devices, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 배양액으로 연속 희석한 NaNO_2 (Sigma)로 제작한 표준 곡선으로부터 nitrite의 농도를 결정하였다.

7. Immunoblot analysis for inducible nitric oxide synthase (iNOS)

세포를 sample buffer (50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 20% glycerol, and 10% 2-mercaptoethanol)에서 가열하여 whole cell lysate을 조제하였다. Cell lysate 내의 단백질을 SDS-PAGE에 의해 분리하고, nitrocellulose paper에 transfer하였다. 5% skim milk (in PBS-Tween-20)에서 1시간 동안 membrane을 blocking한 후 anti-iNOS antibody와 배양하였다. 그 후 PBS-Tween-20으로 3회 세척하고, secondary antibody와 30분 배양한 후, enhanced chemiluminescence detection system (ECL) (Amersham Pharmacia Biotech, USA)을 이용하여 antibody-specific protein을 관찰하였다.

8. TNF- α assay

Mouse TNF- α ELISA set (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA)을 이용하여 배양액 상층액 내의 TNF- α 농도를 결정하였다. 제조자의 지시에 의거하여, monoclonal antibody로 microtiter plate를 coating하고, quantitative solid-phase sandwich enzyme immunoassay를 시행하여, 배양액 ml 당 TNF- α 의 양을 결정하였다.

9. Reverse transcription-polymerase chain reaction과 PCR product의 분석

세포 (2×10^7 cells/dish)를 100 mm tissue culture dish에 넣고, 1 $\mu\text{g/ml}$ 의 LPS를 가하여 지정된 시간 동안 배양하였다. 배양 후 세포를 PBS로 2회 수세하고 원심분리 하여 세포를 회수하였다. 제조자의 지시에 따라 RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA)을 활용하여 total RNA를 분리하였다. AccuPower RT/PCR Premix kit (Bioneer, Korea)과 thermal cycler (GeneAmp PCR system 2400; PE Applied Biosystems, USA)를 이용하여, 추출한 RNA로부터 cDNA를 합성하고, reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)을 수행하여 cDNA를 증폭하였다. Internal control로는 β -actin을 활용하였다. 동일 시험관 내에서 iNOS 또는 TNF- α 와 β -actin에 특이성을 갖는 primer를 이용하여 cDNA를 PCR 증폭하였다. Nonsaturating PCR condition을 위한 cycle 수는 예비실험을 통해 결정하였다. iNOS와 TNF- α 를 위한 PCR 증폭은 95°C 에서 1 분간, 62°C 에서 1 분간, 그리고 72°C 에서 1 분간 35 cycle과 94°C 에서 1 분간, 62°C 에서 1 분간, 그리고 72°C 에서 3 분간 35 cycle로 각각 수행되었다. 사용된 oligonucleotide primer는 다음과 같다: iNOS, 5'-TCACTGGGACAGCACAGAAT-3' (sense) and 5'-TGTGTCTGCAGATGTGCTGA-3' (antisense) (corresponding to positions 348-367 and 857-838, respectively, of the published mouse iNOS mRNA sequence), yielding a 510-bp product; TNF- α , 5'-GTGACAAGCCTGTAGCCCA-3'

(sense) and 5'-AAAGTAGACCTGCCCGGAC-3' (antisense) (corresponding to positions 419-437 and 846-828, respectively, of the published mouse TNF- α mRNA sequence), yielding a 428-bp product; β -actin, 5'-TCCTTCGTTGCCGGTCCACA-3' (sense) and 5'-CGTCTCCGGAGTCCATCACA-3' (antisense) (corresponding to positions 44-63 and 553-534, respectively, of the published mouse actin mRNA sequence), yielding a 508-bp product. PCR-amplified product를 ethidium bromide를 포함하고 있는 1.5% agarose gel에서 전기영동하여 자외선 하에서 관찰하였다.

III. 연구결과

1. LPS의 KDO 및 단백질 함량

LPS의 수율은 동결건조한 세포를 기준으로 하여 0.26%에서 0.99%에 이르렀고, *P. nigrescens*가 *P. intermedia*에 비해 높은 수율을 보였다 (Table 1). 순수분리한 LPS의 KDO 함량은 9.4%에서 17.9%에 달하였으며, *P. intermedia* LPS가 *P. nigrescens* LPS에 비해 KDO 함량이 더 많았다 (Table 1). LPS의 단백질 함량은 3종의 균주 모두에서 0.1% 미만이었다 (자료제시 않함).

2. B cell mitogenic activity

BALB/C 마우스의 비장세포에 대한 *P. intermedia* 및 *P. nigrescens* LPS의 증식효과가 Figure 1에 제시되어 있다. *P. intermedia*와 *P. nigrescens*의 LPS는 대조군에 비해 현저한 세포증식을 유발하였으며, 저농도에서는 *P. nigrescens* ATCC 33563 LPS에 의한 세포증식이 가장 현저하였다.

Table 1. Yield and KDO content of LPSs from *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens*

Lipopolysaccharide	Yield (%)	KDO (%)
<i>P. intermedia</i> ATCC 25611	0.26	17.9
<i>P. nigrescens</i> ATCC 25261	0.88	9.4
<i>P. nigrescens</i> ATCC 33563	0.99	9.9

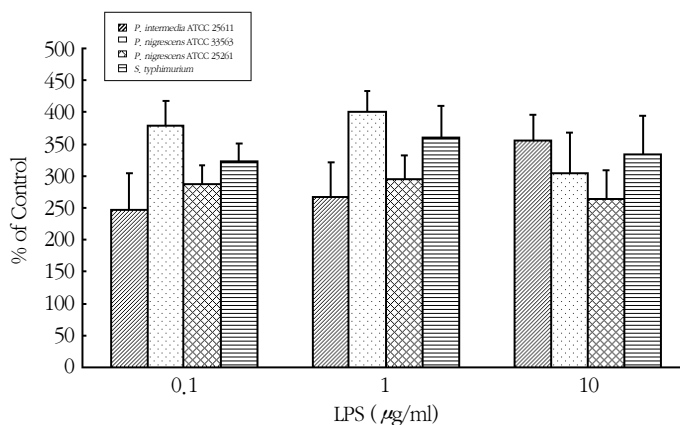


Figure 1. Mitogenic activity of LPS on spleen cells of BALB/C mouse. 5×10^5 prepared cells in $100 \mu\text{l}$ per well were cultured in microculture plates with various concentration of each LPS. *S. typhimurium* LPS were used as the positive controls. The results are expressed as the mean \pm standard deviation of four culture wells.

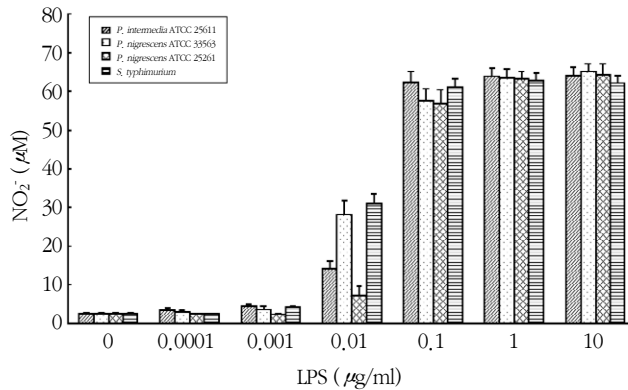


Figure 2. Dose response of NO production by RAW264.7 cells stimulated with LPS isolated from *P. intermedia* or *P. nigrescens*. *S. typhimurium* LPS was used as a control. Cells were incubated with increasing concentrations of LPS and supernatants were removed after 24 h and assayed for NO. The results are means \pm standard deviation of four experiments.

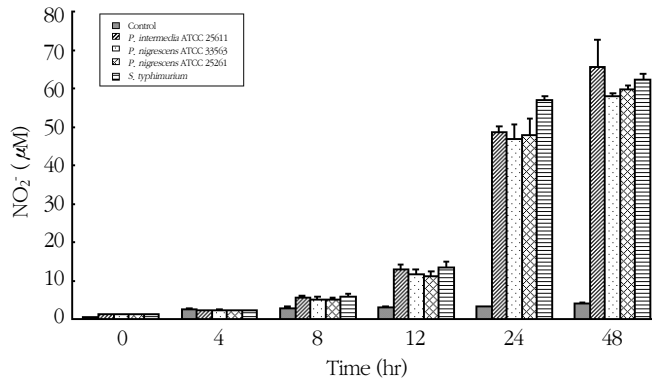


Figure 3. Time course of NO production by RAW264.7 cells stimulated with LPS isolated from *P. intermedia* or *P. nigrescens*. Cells were incubated with 1 μ g/ml of LPS. Other details as in Figure 2.

3. NO 생성

다양한 농도의 LPS를 RAW264.7 세포에 가하고 나서 24시간 후 배양 상층액 내의 nitrite 농도를 측정하였다. 3종의 *P. intermedia* 및 *P. nigrescens* LPS는 0.1 ng/ml-10 μ g/ml에 걸쳐 RAW264.7 세포로부터 NO의 분비를 유발하였다 (Figure 2). LPS에 의한 자극이 없이도 약 3 μ M의 nitrite가 RAW264.7 세포로부터 분비되었다. 10 ng/ml의 농도에서부터 유의한 농도의 NO가 분비되었으며, 10 μ g/ml에서 최대의 NO 생성 (약 65 μ M)을 보였다. 양성 대조군으로 사

용된 *S. typhimurium* LPS의 활성은 최소 자극용량과 최대 NO 생산량의 측면에서 *P. intermedia* 및 *P. nigrescens* LPS와 유사하였다. 다만, 10 ng/ml의 농도에서, *S. typhimurium* LPS와 *P. nigrescens* ATCC 33563 LPS의 활성이 현저히 높았다.

RAW264.7 세포에 1 μ g/ml의 각종 LPS를 가하고, 시간의 경과에 따른 NO 생성을 평가하였다 (Figure 3). *P. intermedia* 및 *P. nigrescens* LPS는, 4시간의 정체가 후, 8시간에서 48시간까지 NO 생성을 지속적으로 증가시켰다. *S. typhimurium* LPS도 24시간까지 지속적으로 NO 생성을 증가시켰다.

4. iNOS 단백질과 mRNA의 발현

RAW264.7 세포에서의 *P. intermedia* 및 *P. nigrescens* LPS에 의한 NO 생성이 iNOS 단백질의 발현에 의한 것인지를 확인하기 위하여, *P. intermedia* 및 *P. nigrescens* LPS가 iNOS 단백질의 발현에 미치는 영향을 평가하였다. 이들 LPS로 자극된 세포에서는 iNOS에 대한 특이 항체와 반응하는 약 130 kDa의 단백질이 발현되었다 (Figure 4). RAW264.7 세포를 다양한 농도의 LPS에 노출시켰을 때, iNOS의 발현이 농도 의존적으로 증가하였다 (Figure 4A). iNOS 단백질은 1 ng/ml의 LPS에서부터 발현되기 시작하여, 10 μ g/ml에서 최대의 발현을 보였다. Figure 4B에는 1 μ g/ml의 *P. intermedia* 및 *P. nigrescens* LPS를 가한 후 시간의 경과에 따른 iNOS 단백질 발현 양상을 보여주고 있다. iNOS 단백질은 4시간에서부터 발현

되기 시작하여 24시간에 최대의 발현을 보였다.

P. intermedia 및 *P. nigrescens* LPS가 iNOS 전사와 iNOS mRNA의 발현에 미치는 영향을 RT-PCR에 의해 확인하였다. RAW264.7 세포를 1 μ g/ml의 LPS에 노출시켰을 때 iNOS mRNA가 발현되었다 (Figure 5). *P. intermedia* ATCC 25611과 *P. nigrescens* ATCC 33563 LPS는 2시간에서 24시간에 걸쳐 지속적으로 iNOS mRNA의 발현을 증가시켰다 (Figure 5A와 B). *P. nigrescens* ATCC 25261 LPS는 8시간에 최대의 iNOS mRNA 발현을 보였다 (Figure 5C). LPS를 가하지 않은 RAW264.7 세포는 iNOS mRNA를 발현하지 않았다.

5. Polymyxin B가 NO 생성에 미치는 영향

Polymyxin B는 LPS의 lipid A domain에 결합하여

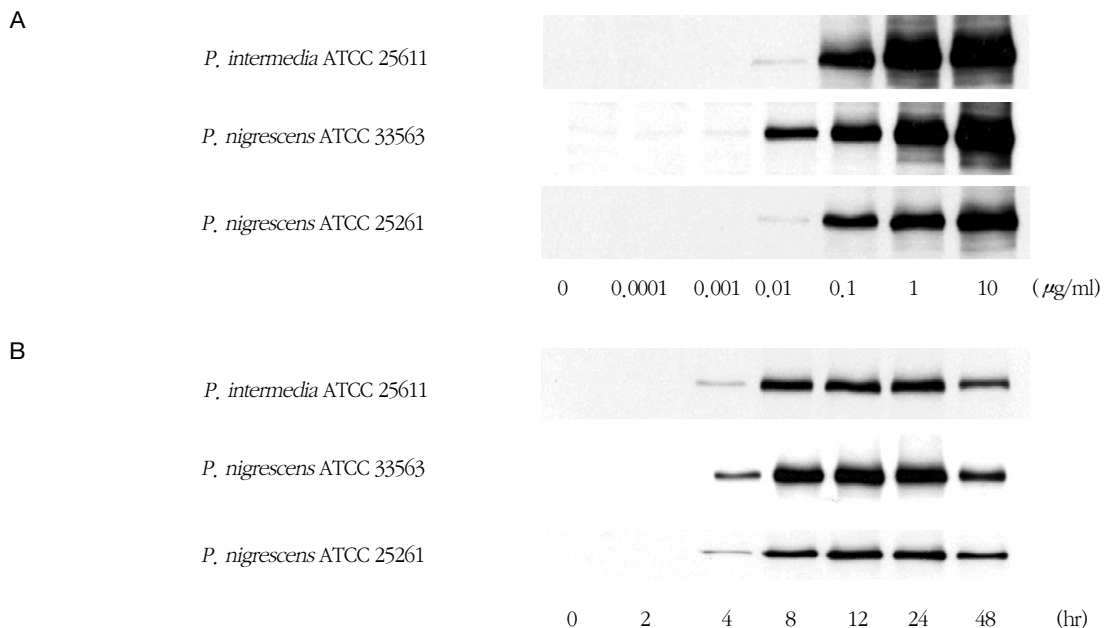


Figure 4. Dose response (A) and time course (B) of iNOS protein expression in RAW264.7 cells stimulated with LPS isolated from *P. intermedia* or *P. nigrescens*. iNOS protein synthesis was measured by immunoblot analysis of cell lysates using iNOS-specific antibody. A representative immunoblot from two separate experiments with similar results is shown. (A) Cells were incubated with different concentrations of LPS from *P. intermedia* or *P. nigrescens* for 24 h. (B) Cells were incubated in the presence of 1 μ g/ml of LPS from *P. intermedia* or *P. nigrescens* for different times.

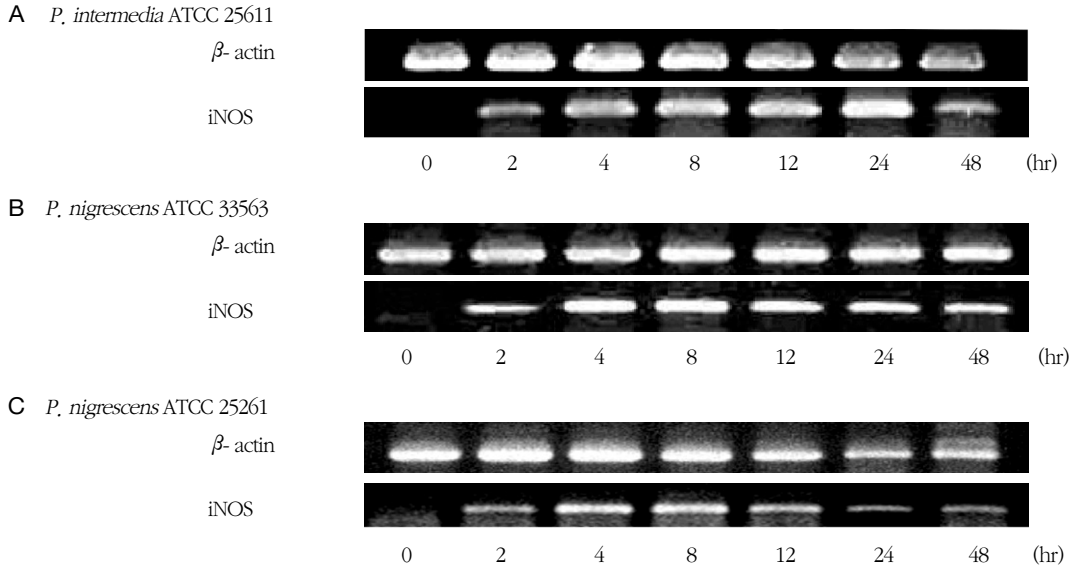


Figure 5. Time course of iNOS mRNA expression in RAW264.7 cells stimulated with LPS isolated from *P. intermedia* or *P. nigrescens*. Cells were incubated in the presence of 1 μ g/ml of LPS from *P. intermedia* or *P. nigrescens* for different time periods. See Materials and methods for further details. The PCR bands on a gel photograph in one of two separate experiments yielding similar results are shown.

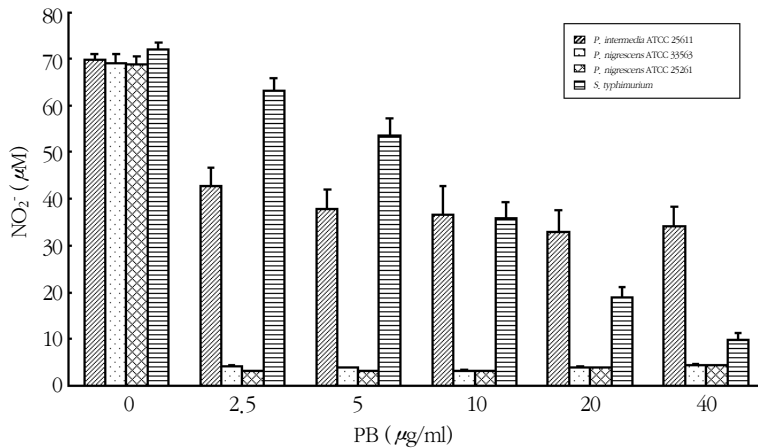


Figure 6. Influences of polymyxin B (PB) on the NO-inducing activity of LPS isolated from *P. intermedia* or *P. nigrescens*. 1 μ g/ml of LPS from *P. intermedia* or *P. nigrescens* was incubated with the indicated concentrations of PB at 37°C for 60 min and then subjected to cultures with RAW264.7 cells. Supernatants were removed after 24 h and assayed for NO. *S. typhimurium* LPS was used as a control. The results are means \pm standard deviation of four experiments.

LPS의 생물학적 활성을 중화할 수 있다. Polymyxin B가 *P. intermedia* 및 *P. nigrescens* LPS에 의한 NO 형성에 미치는 영향을 평가하였다. Polymyxin B는

P. nigrescens LPS에 의한 RAW264.7 세포에서의 NO 형성을 완전히 억제하였다 (Figure 6). 그러나, *P. intermedia* LPS에 의한 NO 생성은 polymyxin B에

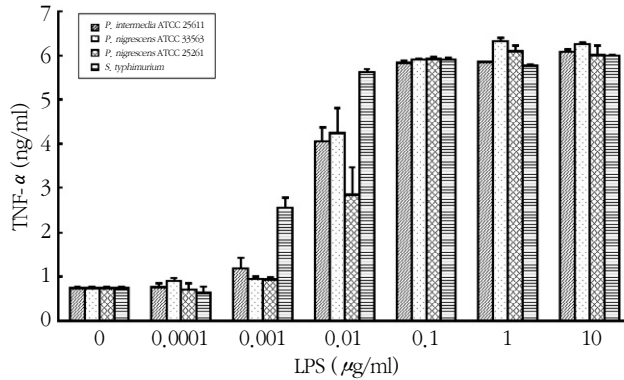


Figure 7. Dose response of TNF- α production by RAW264.7 cells stimulated with LPS isolated from *P. intermedia* or *P. nigrescens*. *S. typhimurium* LPS was used as a control. Cells were incubated with increasing concentrations of LPS and supernatants were removed after 24 h and assayed for TNF- α . The results are means \pm standard deviation of four experiments.

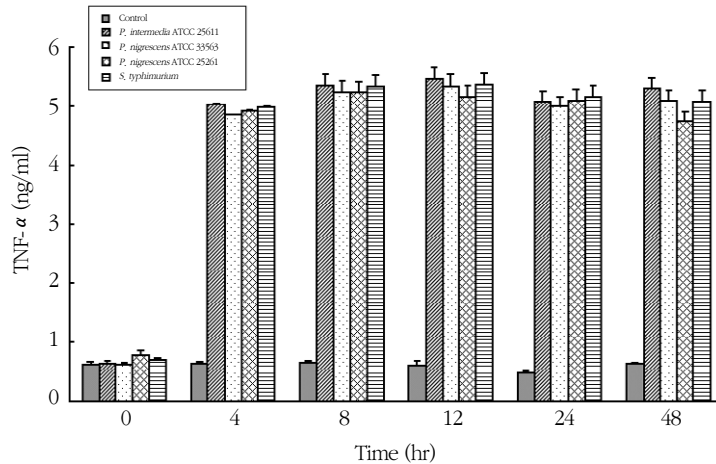


Figure 8. Time course of TNF- α production by RAW264.7 cells stimulated with LPS isolated from *P. intermedia* or *P. nigrescens*. Cells were incubated with 1 μ g/ml of LPS. Other details as in Figure 7.

의해 단지 부분적으로 억제되었다

6. TNF- α 생성

다양한 농도의 LPS를 RAW264.7 세포에 가하고 24 시간 후에 TNF- α 농도를 측정하였다. *P. intermedia* 및 *P. nigrescens* LPS는 0.1 ng/ml-10 μ g/ml에 걸쳐 RAW264.7 세포로부터 TNF- α 의 분비를 유발하였다 (Figure 7). LPS에 의한 자극이 없이도 약 0.7 ng/ml의 TNF- α 가 RAW264.7 세포로부터 분비되었다. *P.*

intermedia 및 *P. nigrescens* LPS는 10 ng/ml의 농도에서부터 유의한 농도의 TNF- α 의 분비를 유발하였으며, 10 μ g/ml에서 최대의 TNF- α 생성 (약 6 ng/ml)을 보였다. 양성 대조군으로 사용된 *S. typhimurium* LPS의 활성은 최소 자극용량과 최대 TNF- α 생산량의 측면에서 *P. intermedia* 및 *P. nigrescens* LPS와 유사하였다. 다만, 10 ng/ml의 농도에서, *S. typhimurium* LPS의 활성이 현저히 높았고, *P. nigrescens* ATCC 25261 LPS의 활성이 현저히 낮았다.

RAW264.7 세포에 1 μ g/ml의 각종 LPS를 가하고,

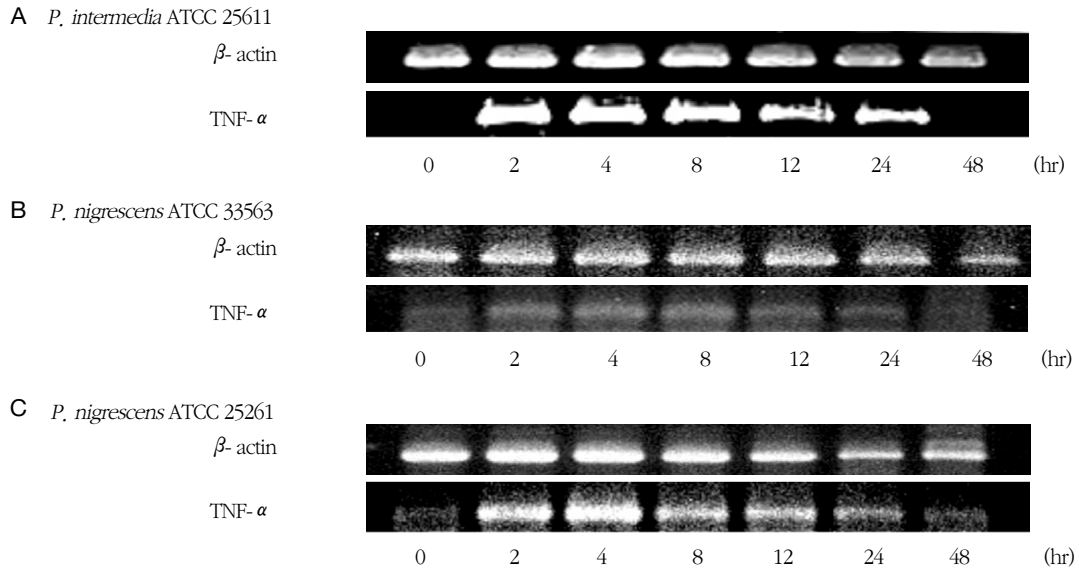


Figure 9. Time course of TNF- α mRNA expression in RAW264.7 cells stimulated with LPS isolated from *P. intermedia* or *P. nigrescens*. Cells were incubated in the presence of 1 μ g/ml of LPS from *P. intermedia* or *P. nigrescens* for different time periods. See Materials and methods for further details. The PCR bands on a gel photograph in one of two separate experiments yielding similar results are shown.

시간의 경과에 따른 TNF- α 생성을 평가하였다 (Figure 8). *P. intermedia* 및 *P. nigrescens* LPS는 4시간 경과 후 현저한 TNF- α 생성을 유발하였고, 그 후 48시간까지는 TNF- α 생성이 현저히 증대되지는 않았다. *S. typhimurium* LPS에 의한 TNF- α 생성도 유사한 양상을 보였다.

7. TNF- α mRNA의 발현

P. intermedia 및 *P. nigrescens* LPS가 TNF- α mRNA의 발현에 미치는 영향을 RT-PCR에 의해 확인하였다. RAW264.7 세포를 1 μ g/ml의 LPS에 노출시켰을 때 TNF- α mRNA가 발현되었다 (Figure 9). *P. intermedia* ATCC 25611과 *P. nigrescens* ATCC 33563 LPS는 2시간에서 8시간에 걸쳐 지속적으로 TNF- α mRNA의 발현을 증가시켰다 (Figure 9A와 B). *P. nigrescens* ATCC 25261 LPS는 4시간에 최대의 TNF- α mRNA 발현을 보였다 (Figure 9C). LPS를 가하지 않은 RAW264.7 세포는 TNF- α mRNA를 발

현하지 않았다.

IV. 총괄 및 고찰

본 연구는 *P. intermedia*와 *P. nigrescens* LPS의 각종 생물학적 활성을 분석하여, 치주질환과 치수질환 등 구강 내 감염에 있어서의 이들 균주의 역할을 규명하기 위해 수행되었다. KDO는 *P. intermedia*와 *P. nigrescens* LPS에서 9.4%에서 17.9%의 함량으로 존재하였으며, 이는 이들 균주가 온전한 LPS를 소유하고 있음을 제시하고 있다. *P. intermedia*는 *P. nigrescens*에 비해 매우 강력한 KDO 시그널을 가지고 있는 것으로 보여진다. LPS에 함유되어 있는 단백질에 의해 LPS의 각종 생물학적 활성이 증진될 가능성을 배제하기 위하여, 본 연구에서는 LPS를 proteinase K로 처리하였으며, 순수분리한 LPS의 단백질 함량은 0.1% 미만이었다. 이는 본 연구에서의 LPS의 각종 생물학적 활성이 전적으로 LPS에 의한 것임을 의미한다.

대부분이 B-세포로 이루어져 있는 비장세포에 대해 *P. intermedia* 및 *P. nigrescens* LPS가 현저한 증식 효과를 가지고 있음을 본 연구는 제시하고 있다. B-세포 및 형질세포가 활성기 치주질환 병소에 우세하게 존재하는 것으로 알려져 있는 바³³⁾, 이들 균주의 LPS가 치주질환의 병리에 있어 주요한 역할을 할 가능성이 있다.

NO는 새로운 유형의 염증 매개물질로 주목을 받고 있다³⁴⁾. NOS 활성화와 NO 생성을 억제함으로써 골관절염, 사구체 신염, 그리고 대장염 등 염증성 질환의 진행과 심도를 억제할 수 있음이 밝혀진 바도 있다^{35,36)}. NO는 다른 염증성 질환에서와 마찬가지로 염증성 치주질환에 있어서도 중요한 역할을 하는 것으로 여겨진다. 치주질환 시 NO의 생성이 증가하며³⁷⁾, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*의 LPS가 대식세포에서 현저하게 NO 형성을 유발함이 보고된 바 있다^{38,39)}. 또한, 만성치주염 환자의 치은조직 내에는, 건강한 치주조직에 비해, iNOS 단백질과 mRNA가 고농도로 존재한다⁴⁰⁻⁴³⁾. 치주조직 내에서의 iNOS의 주 공급원으로는 대식세포, 다형핵 백혈구, 섬유아세포, 그리고 혈관 내피세포를 들 수 있다⁴⁰⁻⁴³⁾.

이에 본 연구에서는 치주질환과 근관감염 등에 있어 주요 병인균주 중의 하나인 *P. intermedia*와 *P. nigrescens*의 LPS가 마우스의 macrophage-like cell line인 RAW264.7에서의 NO 형성과 iNOS 발현에 미치는 영향을 평가하였다. *P. intermedia* 및 *P. nigrescens* LPS가 대식세포에서 NO 생성을 유발할 수 있는 능력은 양성 대조군으로 활용한 *S. typhimurium* LPS와 유사하였다. NO 형성에 있어 iNOS가 촉매효소로 작용하므로, 본 연구에서는 *P. intermedia* 및 *P. nigrescens* LPS가 iNOS 단백질과 mRNA의 발현에 미치는 영향을 평가하였으며, iNOS 단백질과 mRNA의 발현이 immunoblotting과 RT-PCR에 의해 각각 증명되었다. *P. intermedia* 및 *P. nigrescens* LPS는 주로 전사 수준에서 iNOS 발현을 유발하는 것으로 여겨진다. *P. intermedia* 및 *P. nigrescens* LPS가, interferon- γ 등에 의한 부가적인 자극이 없이도, 마우스 대식세포에서 iNOS의 발현을 유발하여 NO 형성을 초래할 수 있음이 본 연구에서

최초로 제시되었다. 한편, *P. intermedia* LPS는 *P. nigrescens* LPS에 비해 polymyxin B에 대해 덜 민감한 것으로 여겨진다.

NO는, 직접적인 영향에 의하거나 염증성 사이토카인의 생성을 조절하여, 치주질환의 발병과 진행 그리고 그로 인한 골소실에 있어 중요할 수 있다⁴⁴⁾. *P. intermedia* 및 *P. nigrescens* LPS가 NO 생성을 유도하는 자세한 기전은 추후 밝혀져야 할 것이다.

TNF- α , IL-1 β , IL-6, 그리고 IL-8 등의 염증성 사이토카인은 염증성 치주질환에 있어 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다^{45,46)}. 염증에 이환된 치주조직 내에서 이들 사이토카인이 국소적으로 생성될 수 있다. *P. intermedia* 및 *P. nigrescens* LPS는 RAW264.7 세포에서 TNF- α 의 생성을 유발하였다. 이들 LPS가 대식세포에서 TNF- α 의 생성을 유발할 수 있는 능력은 *S. typhimurium* LPS와 유사한 것으로 여겨진다. 또한, 이들 LPS는 주로 전사 수준에서 TNF- α 의 발현을 유발하는 것으로 여겨진다.

전반적으로 *P. intermedia* LPS와 *P. nigrescens* LPS는 제반 생물학적 활성에 있어 유사하였다. 종합하여 보면, *P. intermedia* 및 *P. nigrescens* LPS는 B-세포의 증식을 초래하며, 대식세포에서 iNOS의 발현에 의한 NO 생성을 유발하고, 숙주의 사이토카인 네트워크를 활성화하여 TNF- α 등의 염증 매개물질의 생성을 촉진함으로써, 치주질환과 치수질환 등 구강 내 감염에 중요한 역할을 하는 것으로 사료된다.

V. 결론

본 연구는 *P. intermedia*와 *P. nigrescens* LPS의 각종 생물학적 활성을 분석하여, 치주질환과 치수질환 등 구강 내 감염에 있어서의 이들 균주의 역할을 규명하기 위해 수행되었다. 순수분리한 *P. intermedia* 및 *P. nigrescens* LPS의 KDO 함량은 9.4%에서 17.9%에 달하였으며, *P. intermedia* LPS에서 KDO 함량이 더 많았다. *P. intermedia* 및 *P. nigrescens* LPS는 비장세포에 대해 현저한 증식효과를 보였다. *P. intermedia* 및 *P. nigrescens* LPS는 마우스 대식세포에서, interferon- γ 등에 의한 부가적인 자극이 없

이도, iNOS의 발현에 의한 NO 생성과 TNF- α 의 생성을 각각 유발할 수 있음이 본 연구에서 최초로 제시되었다. 전반적으로 *P. intermedia* LPS와 *P. nigrescens* LPS는 제반 생물학적 활성에 있어 유사하였다. 종합하여 보면, *P. intermedia* 및 *P. nigrescens* LPS는 B-세포의 증식을 초래하며, 대식세포에서 iNOS의 발현에 의한 NO 생성을 유발하고, 숙주의 싸이토카인 네트워크를 활성화하여 TNF- α 등의 염증 매개물질의 생성을 촉진함으로써, 치주질환과 치수 질환 등 구강 내 감염에 중요한 역할을 하는 것으로 사료된다.

VI. 참고문헌

1. Maidwell-Smith MA, Wilson M, Kieser JB. Lipopolysaccharide (endotoxin) from periodontally involved teeth. J Clin Periodontol 1987;14:453-456.
2. Shapiro L, Lodato FM Jr, Courant PR, Stallard RE. Endotoxin determination in gingival inflammation. J Periodontol 1972;43:591-596.
3. Simon BI, Goldman HM, Ruben MP, Baker E. The role of endotoxin in periodontal disease. I. A reproducible, quantitative method for determining the amount of endotoxin in human gingival exudate. J Periodontol 1969;40:695-701.
4. Gibbons RJ, Socransky SS, Sawyer S, Kapsimalis B, MacDonald JB. The microbiota of the gingival crevice area of man. II. The predominant cultivable organisms. Arch Oral Biol 1963;8:281-289.
5. Koga T, Nishihara T, Fujiwara T et al. Biochemical and immunobiological properties of lipopolysaccharide (LPS) from *Bacteroides gingivalis* and comparison with LPS from *Escherichia coli*. Infect Immun 1985;47:638-647.
6. Bramanti TE, Wong GG, Weintraub ST, Holt SC. Chemical characterization and biological properties of lipopolysaccharide from *Bacteriodes gingivalis* strains W50, W83, and ATCC 33277. Oral Microbiol Immunol 1989;4:183-192.
7. Kim SJ, Kato T, Naito Y et al. B-cell mitogenicity and IL-1 beta production of lipopolysaccharides from various *Capnocytophaga* strains. Bull Tokyo Dent Coll 1994;35: 79-83
8. Shah HN, Gharbia SE. Biochemical and chemical studies on strains designated *Prevotella intermedia* and proposal of a new pigmented species, *Prevotella nigrescens* sp. nov. Int J Syst Bacteriol 1992;42:542-546.
9. Okamoto M, Maeda N, Kondo K, Leung KP. Hemolytic and hemagglutinating activities of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens*. FEMS Microbiol Lett 1999;178:299-304.
10. Stubbs S, Lewis MA, Waddington RJ, Embery G. Hydrolytic and depolymerising enzyme activity of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens*. Oral Dis 1996;2:272-278.
11. Matto J, Asikainen S, Vaisanen ML et al. Beta-lactamase production in *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, and *Prevotella pallens* genotypes and in vitro susceptibilities to selected antimicrobial agents. Antimicrob Agents Chemother 1999;43: 2383-2388.
12. Andres MT, Chung WO, Roberts MC, Fierro JF. Antimicrobial susceptibilities of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, and *Prevotella nigrescens* spp. isolated in Spain. Antimicrob Agents Chemother 1998;42:3022-3023.
13. Bernal LA, Guillot E, Paquet C, Mouton C. Beta-Lactamase-producing strains in the species *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens*. Oral Microbiol Immunol 1998;13:36-40.
14. Baumgartner JC, Bae KS, Xia T, Whitt J, David LL. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and polymerase chain reaction for differentiation of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens*. J Endod 1999;25:324-328.

15. Premaraj T, Kato N, Fukui K, Kato H, Watanabe K. Use of PCR and sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis techniques for differentiation of *Prevotella intermedia* sensu stricto and *Prevotella nigrescens*. J Clin Microbiol 1999;37:1057-1061.
16. Guillot E, Mouton C. PCR-DNA probe assays for identification and detection of *Prevotella intermedia* sensu stricto and *Prevotella nigrescens*. J Clin Microbiol 1997;35:1876-1882.
17. Conrads G, Pelz K, Hughes B, Seyfarth I, Devine DA. Optimized oligonucleotides for the differentiation of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens*. Oral Microbiol Immunol 1997;12:117-120.
18. Matto J, Saarela M, von Troil-Linden B et al. Similarity of salivary and subgingival *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* isolates by arbitrarily primed polymerase chain reaction. Oral Microbiol Immunol 1996;11:395-401.
19. Socransky SS, Haffajee AD. The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. J Periodontol 1992;63:322-331.
20. Slots J, Bragd L, Wikstrom M, Dahlen G. The occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides gingivalis* and *Bacteroides intermedius* in destructive periodontal disease in adults. J Clin Periodontol 1986;13:570-577.
21. Tanner ACR, Haffer C, Bratthall GT, Visconti RA, Socransky SS. A study of the bacteria associated with advancing periodontitis in man. J Clin Periodontol 1979;6:278-307.
22. Chung CP, Nisengard RJ, Slots J, Genco RJ. Bacterial IgG and IgM antibody titers in acute necrotizing ulcerative gingivitis. J Periodontol 1983;54:557-562.
23. Kornman KS, Loesche WJ. The subgingival microbial flora during pregnancy. J Periodont Res 1980;15:111-122.
24. Lie MA, van der Weijden GA, Timmerman MF et al. Occurrence of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* in relation to gingival health. J Clin Periodontol 2001;28:189-193.
25. Ximenez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS. Microbial composition of supra and subgingival plaque in subjects with adult periodontitis. J Clin Periodontol 2000;27:722-732.
26. Teanpaisan R, Douglas CW, Walsh TF. Characterization of black-pigmented anaerobes isolated from diseased and healthy periodontal sites. J Periodont Res 1995;30:245-251.
27. Bae KS, Baumgartner JC, Shearer TR, David LL. Occurrence of *Prevotella nigrescens* and *Prevotella intermedia* in infections of endodontic origin. J Endod 1997; 23:620-623.
28. Salcetti JM, Moriarty JD, Cooper LF. et al. The clinical, microbial, and host response characteristics of the failing implant. Int J Oral Maxillofac Implants 1997;12:32-42.
29. Westphal O, Jann K. Bacterial lipopolysaccharides: extraction with phenol-water and further applications of the procedure., p. 83-91. In RL Whistler (ed), Methods in carbohydrate chemistry. Academic Press, Inc, New York, NY. 1965.
30. Markwell MA, Haas SM, Bieber LL, Tolbert NE. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. Anal Biochem 1978;87:206-210.
31. Karkhanis YD, Zeltner J, Jackson JJ, Carlo DJ. A new and improved microassay to determine 2-keto-3-deoxyoctonate in lipopolysaccharide of gram-negative bacteria. Anal Biochem 1978;85:595-601.
32. Green LC, Wagner DA, Glogowski J et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. Anal Biochem 1982;126:131-138.
33. Seymour GJ, Greenspan JS. The phenotypic

- characterization of lymphocyte populations in established human periodontal disease. *J Periodnt Res* 1979;4:39-46.
34. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991;43:109-142.
 35. Southey A, Tanaka S, Murakami T et al. Pathophysiological role of nitric oxide in rat experimental colitis. *Int J Immunopharmacol* 1997;19:669-676.
 36. Weinberg JB, Granger DL, Pisetsky DS et al. The role of nitric oxide in the pathogenesis of spontaneous murine autoimmune disease: increased nitric oxide production and nitric oxide synthase expression in MRL-lpr/lpr mice, and reduction of spontaneous glomerulonephritis and arthritis by orally administered NG-monomethyl-L-arginine. *J Exp Med* 1994;179:651-660.
 37. Matejka M, Partyka L, Ulm C, Solar P, Sinzinger H. Nitric oxide synthesis is increased in periodontal disease. *J Periodont Res* 33:517-518,1998.
 38. Blix IJ, Helgeland K. LPS from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and production of nitric oxide in murine macrophages J774. *Eur J Oral Sci* 1998;106:576-581.
 39. Sosroseno W, Barid I, Herminajeng E, Susilowati H. Nitric oxide production by a murine macrophage cell line (RAW264.7) stimulated with lipopolysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Oral Microbiol Immunol* 2002;17:72-78.
 40. Batista AC, Silva TA, Chun JH, Lara VS. Nitric oxide synthesis and severity of human periodontal disease. *Oral Diseases* 2002;8:254-260.
 41. Hirose M, Ishihara K, Saito A et al. Expression of cytokines and inducible nitric oxide synthase in inflamed gingival tissue. *J Periodontol* 2001;72:590-597.
 42. Kendall HK, Haase HR, Li H, Xiao Y, Bartold PM. Nitric oxide synthase type-II is synthesized by human gingival tissue and cultured human gingival fibroblasts. *J Periodont Res* 2000;35:194-200.
 43. Lappin DF, Kjeldsen M, Sander L, Kinane DF. Inducible nitric oxide synthase expression in periodontitis. *J Periodont Res* 2000;35:369-373.
 44. Brennan PA, Thomas GJ, Langdon JD. The role of nitric oxide in oral diseases. *Arch Oral Biol* 2003; 48: 93-100.
 45. Honig J, Rordorf-Adam C, Siegmund C, Wiedemann W, Erard F. Increased interleukin-1 beta concentration in gingival tissue from periodontitis patients. *J Periodont Res* 1989;24:362-367.
 46. Stashenko P, Jandinski JJ, Fujiyoshi P, Rynar J, Socranski SS. Tissue levels of bone resorptive cytokines in periodontal disease. *J Periodontol* 1991;62:504-509.

Chemical and Immunobiological Characterization of Lipopolysaccharides from *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens*

Sung-Jo Kim

Department of Periodontology, College of Dentistry, Pusan National University

The purpose of this study was to assess some biological activities of lipopolysaccharides (LPSs) from *P. intermedia* and *P. nigrescens*. LPS was prepared by the standard hot phenol-water method. NO production was assayed by measuring the accumulation of nitrite in culture supernatants. TNF- α production was determined by enzyme-linked immunosorbent assay. Western blot analysis of iNOS and analysis of reverse transcription (RT)-PCR products were carried out. LPS from *P. intermedia* demonstrated higher KDO content than those from two strains of *P. nigrescens*. LPSs from *P. intermedia* and *P. nigrescens* were mitogenic for spleen cells of BALB/C mouse. The present study clearly shows that LPSs from *P. intermedia* and *P. nigrescens* fully induced iNOS expression and NO production in RAW264.7 cells in the absence of other stimuli. Moreover, LPSs from *P. intermedia* and *P. nigrescens* clearly induced TNF- α production in RAW264.7 cells. The biological activities of LPS from *P. intermedia* was found to be comparable to those of *P. nigrescens* LPS. The ability of LPSs from *P. intermedia* and *P. nigrescens* to promote the production of NO and TNF- α may be important in the pathogenesis of inflammatory periodontal disease.

Key words: *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, Lipopolysaccharide, B-cell mitogenicity, Nitric oxide, iNOS, TNF- α