

# *Porphyromonas gingivalis*의 각종 표면성분이 사이토카인 형성에 미치는 영향

성 조

부산대학교 치과대학 치주과학교실

## I.

만성염증성 치주질환은 치조골 파괴를 일으켜 치아의 상실을 초래할 수 있으며, *Porphyromonas gingivalis*를 포함한 그람 음성 혐기성 세균이 주요 병원균이다<sup>1)</sup>. 이들 병원균들은 치주조직에 직접 침투하지는 않으며, 균주의 각종 구성요소 또는 산물들이 조직 내로 침투하여 염증 및 조직파괴를 유발하는 것으로 알려져 있다.

장내세균에서의 독성인자에 대한 연구에서와 마찬가지로, 치주질환 병원균에서의 독성인자에 대한 기존의 연구는 주로 각종 병원균주의 lipopolysaccharide(LPS)에 집중되어 왔다<sup>2)</sup>. 그러나, LPS 뿐만 아니라, 표면 연관 물질(surface-associated material: SAM)과 lipid A 연관 단백질(lipid A-associated proteins : LAP) 등도 숙주세포로부터 사이토카인 등의 형성을 유발하여 면역조절작용을 발휘하는 것으로 알려져 있다<sup>3-9)</sup>.

SAM은 세균의 세포 외 성분으로, 생리식염수 내에서 세균을 조심스럽게 교반함으로써 표면으로부터

제거된다<sup>5,10)</sup>. SAM은 세균의 capsule과 세포벽의 외측에 느슨하게 결합되어있는 기타 성분으로 이루어져 있다<sup>6)</sup>. SAM은 세균의 표면에 존재하므로 세균과 숙주세포간의 상호작용에 있어 중요한 역할을 할 수 있다.

몇몇 치주질환 병원균주의 SAM은 in vitro에서 포유류 세포에 대해 일련의 강력한 활성을 보이는 것으로 알려져 있다. *Actinobacillus actinomyces* *temcomitans*, *P. gingivalis* 그리고 *Eikenella corrodens*의 SAM은 염증성 사이토카인의 생성을 매우 강력하게 유발하였으며<sup>6,7)</sup>, *A. actinomycetemcomitans*의 LPS는 예상과는 달리 염증성 사이토카인의 생성의 유발에 있어 SAM에 비해 현저히 낮은 활성을 보였다<sup>7)</sup>. 또한, 몇몇 치주질환 병원균주의 SAM은 쥐의 두개관과 골아세포에서 DNA와 교원질 합성을 현저하게 억제하였으며<sup>11)</sup>, in vitro에서 골 흡수를 유발하였다<sup>12)</sup>. 치주질환 병원균주의 SAM은 섬유아세포, 단핵세포 그리고 외피세포에서도 DNA 합성을 농도 의존적으로 억제하였다<sup>10)</sup>. 한편, 국소유전형 치주염 환자에 있어 *A. actinomycetemcomi-*

*mitans* SAM에 대한 혈장 내 IgG 항체의 역가가 현저히 증가되었으며<sup>8)</sup>, 급속 진행성 치주염 환자에서는 *P. gingivalis* SAM에 대한 항체 역가가 뚜렷이 증가되었다<sup>9)</sup>. Herminajeng 등<sup>9)</sup>은 *A. actinomycetemcomitans* SAM에 대한 항체가 opsonin으로 작용하여 치주질환 시 방어적 역할을 할 수 있음을 제시한 바도 있다. 이상의 보고들은 치주질환 병원균주의 SAM이 염증성 치주질환의 발병과 진행 그리고 그로 인한 조직파괴에 있어 중요한 역할을 할 수 있음을 제시하고 있다.

세균내독소(endotoxin)의 단백질 성분으로 endotoxin-associated proteins이라고도 불리는 LAP는 그람음성 세균의 세포벽 내에서 결합되어 있는 일련의 단백질 군을 말한다<sup>13)</sup>. LPS에 반응하지 않는 C3H/HeJ 마우스에서의 *Escherichia coli* 세균내독소에 대한 B cell mitogenic activity가 세균내독소의 단백질 함량에 의해 좌우된다는 발견이 계기가 되어 LAP의 존재가 최초로 확인되었다<sup>14,15)</sup>. LPS 추출에 이용된 방법의 종류에 따라서는 LAP가 LPS와 함께 추출되어 LPS의 생물학적 활성에 기여할 수 있다. 장내 세균의 LAP의 강력한 면역조절 활성 그리고 열과 단백질 분해효소에 대한 안정성 등을 고려해 볼 때, 치주질환 병원균주의 LAP도 염증성 치주질환에서의 조직파괴 과정을 매개하는데 있어 중요한 역할을 할 수 있을 것으로 여겨진다.

Reddi 등<sup>16)</sup>은 *P. gingivalis*와 *Prevotella intermedia*의 LAP가 인간의 치은 섬유아세포 또는 myelomonocytic cell line인 Mono-Mac-6를 자극하여 interleukin-6(IL-6)의 생성을 유발할 수 있음을 보고하였다. 치은 섬유아세포에서의 IL-6 생성의 유발에 있어 *P. gingivalis* LPS는 LAP에 비해 낮은 활성을 보였다<sup>16)</sup>. 또한, *A. actinomycetemcomitans* LAP도 사이토카인의 생성을 유발하는데 있어 LPS에 비해 현저히 높은 활성을 갖고 있음이 보고된 바도 있다<sup>7)</sup>. Sharp 등<sup>17)</sup>은 치주질환 병원균주인 *P. gingivalis*의 LAP의 특성을 분석하였으며, LAP의 단백질 중 사이토카인의 생성을 유발하는 활성 성분을 확인한 바 있다. 또한, *A. actinomycetemcomi-*

*tans*, *P. gingivalis* 그리고 *E. corrodens*의 LAP는 배양골의 파괴를 촉진하였다<sup>18)</sup>. 이상의 보고들은 치주질환 병원균주의 LAP가 염증성 치주질환의 병리에 있어 중요한 역할을 할 수 있음을 제시하고 있다.

염증성 사이토카인과 NO는 치은의 염증을 매개하고 치조골의 흡수를 자극하는 등 치주질환의 발병과 진행에 있어 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 그러나, 숙주세포를 자극하여 사이토카인과 NO의 분비를 유발하는 측면에 있어, 병원균주의 표면에 존재하는 각종 독성인자들의 활성에 대한 비교평가가 치주질환 주요 병원균주 중의 하나인 *P. gingivalis*에서 수행된 바는 없다. 본 연구에서는 치주질환 주요 병원균주 중의 하나인 *P. gingivalis*의 표면에 존재하는 SAM, LAP, 그리고 LPS가 대식세포에서 tumor necrosis factor alpha(TNF-α)와 IL-6 등의 염증성 사이토카인과 NO의 형성을 유도하는 능력 등을 비교 평가하고자 한다.

## II. 연구대상 및 방법

### 1. 및 배양조건

*P. gingivalis* 381을 연구대상으로 하였다. 이 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 하에서 배양하였으며, 세균의 성장은 660nm 파장에서의 흡광도를 측정하여 결정하였다.

### 2. SAM의 추출

Wilson 등<sup>19)</sup>의 방법에 의거하였다. 각각의 소개하면, 동결건조한 균주를 0.85%(w/v) NaCl에 녹인 후 4℃에서 1시간 조심스럽게 교반하고, 원심분리하여 상층액을 수집하였다. 추출과정은 2회에 걸쳐 수행하였으며, 모든 상층액에 5배 부피의 -20℃ acetone을 가하고, dry ice-ethanol bath에서 30분간 방치한

\*이 논문은 2002년도 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구되었음 (KRF-2002-041-E00227)

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

뒤, 원심분리하여 건조하고, 증류수에 녹여 48시간 투석한 후 동결건조하였다.

### 3. 추출

세균내독소는 Morrison와 Leive<sup>20)</sup>의 butanol 추출법에 의거하여 SAM을 제거한 *P. gingivalis*로부터 분리하였다. 간략히 소개하면, 세균을 4°C의 0.15 M NaCl에 용해한 후 동일 부피의 butanol을 가하여, 4°C에서 10분간 철저히 혼합하고, 35,000 x g 에서 20분간 원심분리 하였다. 수용층을 제거하고, 불용성의 잔사를 포함한 butanol층에 최초의 부피의 1/2 가량의 식염수를 가하여 추출을 2회 반복하였다. 그 후, 수용층을 모아 원심분리하여 불용성 물질을 제거하고, 4°C의 증류수에서 48시간 투석한 후 동결건조 하였다. LAP와 LPS를 포함하고 있는 동결건조된 세균내독소를 다시 물에 녹인 후 105,000 × g에서 3 시간 썩 2회 원심분리하고 동결건조 하였다.

### 4. LAP의 추출

LAP는 통상적인 hot phenol-water법에 의거하여 동결건조된 세균내독소로부터 분리되었다<sup>21)</sup>. 간략히 소개하면, 동결건조한 세균내독소를 증류수에 녹인 후 90% phenol을 가하여 68°C에서 20분간 추출하고, 35,000 × g에서 20분간 원심분리하여 LAP를 포함하고 있는 phenol층을 분리하였다. Phenol층을 증류수로 2회 반복하여 추출하여, 4°C의 증류수에서 96시간 투석한 후 동결건조 하였다.

### 5. LPS의 추출

LPS는 통상적인 hot phenol-water법에 의거하여 동결건조된 세균내독소로부터 분리되었다<sup>21)</sup>. 간략히 소개하면, 동결건조한 세균내독소를 증류수에 녹인 후 90% phenol을 가하여 68°C에서 20분간 2회 반복하여 추출하고, 35,000 × g에서 20분간 원심분리하여 수용성층을 분리하였다. 수용성층을 모아

4°C에서 증류수로 철저히 투석한 후, 105,000 × g에서 3시간 원심분리하여 동결건조하고, 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°C에서 밤새 배양하여 핵산을 제거하였으며, proteinase K(50 µg/ml; Sigma)를 첨가하여 60°C에서 1시간 가열한 후 37°C에서 밤새 배양하여 오염된 단백질을 제거하였다. 그 후, 4°C에서 증류수로 철저히 투석하여, 105,000 × g에서 3시간 원심분리하고 동결건조하였다.

### 6. RAW264.7 세포의 배양

Murine macrophage cell line인 RAW264.7 (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA)을 100 U/ml of penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 10 mM HEPES, 2 mM L-glutamine, 0.2% NaHCO<sub>3</sub>, 1 mM sodium pyruvate, 그리고 10% (v/v) heat-inactivated FBS를 포함하는 Dulbecco's modified Eagles medium(DMEM)을 이용하여, 37°C에서 5% CO<sub>2</sub>/95% air 하에서, Nunc flask를 이용하여 배양하였다. Confluence 상태가 되었을 때, 배지와 비부착 세포를 제거하고 배양액을 새로 보충하였다. 그 후 24시간 배양하고, rubber policeman을 이용하여 세포를 회수하여 3회 수세하고, 생존 세포의 수를 결정하였다. 24-well culture plate에 5×10<sup>5</sup> cells/well로 세포를 분주하고, 2시간 이상 배양하여 세포가 plate에 부착되도록 하였다. 배지로 3회 수세 후, 다양한 농도의 SAM, LAP 또는 LPS를 가하여 지정된 시간 동안 배양하였으며, 배양 상층액을 수집하여 -70°C에 보관하고, 항 후 cytokine 및 NO의 농도를 결정하였다.

### 7. 싸이토카인 정량

Mouse TNF-α 및 IL-6 ELISA set(BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA)을 이용하여 배양액 상층액 내의 싸이토카인 농도를 결정하였

다. 제조자의 지시에 의거하여, monoclonal antibody로 microtiter plate를 coating하고, quantitative solid-phase sandwich enzyme immunoassay를 시행하여, 배양액 ml 당 TNF-α 또는 IL-6 양을 결정하였다.

### 8. NO 정량

배양 상층액에서의 sodium nitrite 농도를 Griess reagent를 이용하여 측정하였다<sup>22)</sup>. 간략히 소개하면, 96-well flat-bottomed microtiter plate에서 배양 상층액 100 µl와 동일 부피의 Griess reagent(1% sulfanilamide, 0.1% naphthylethylene diamine dihydrochloride, and 2.5% phosphoric acid) (Sigma)를 혼합한 후 실온에서 10분간 배양하였다. 그 후 plate reader를 이용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. Sodium nitrite를 표준으로 하여 nitrite 농도를 결정하였다.

### 9. iNOS의 immunoblot 분석

세포를 60mm tissue culture dish에 2×10<sup>6</sup> cells/dish의 밀도로 분주한 후 다양한 농도의 SAM, LAP 또는 LPS를 가하여 지정된 시간 동안 배양하였다. 배양 후 세포를 ice-cold PBS로 3회 세척하고, protease inhibitor(1 mM PMSF, 5 mg/ml aprotinin, 5 mg/ml pepstatin A, and 5 mg/ml leupeptin)를 포함하고 있는 200 µl의 lysis buffer (50 mM Tris-Cl(pH 8.0), 150mM NaCl, 0.002% sodium azide, 0.1% SDS, 1% Nonidet P-40)를 이용하여 용해하였다. Cell lysate 내의 단백질을 SDS-PAGE에 의해 분리하고, nitrocellulose paper에 transfer하였다. 5% skim milk(in PBS-Tween-20)에서 1시간 동안 membrane을 blocking 한 후 anti-iNOS antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)와 incubation하였다. 그 후 PBS-Tween-20으로 3회 세척하고, secondary antibody(Santa

Cruz Biotechnology)와 30분 incubation한 후, enhanced chemiluminescence detection system(ECL) (Amersham Pharmacia Biotech, USA)을 이용하여 antibody-specific protein을 관찰하였다.

### 10. Reverse transcriptase PCR

세포(2×10<sup>7</sup> cells/dish)를 100 mm tissue culture dish에 넣고, 다양한 농도의 SAM, LAP 또는 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. Nonsaturating PCR condition을 위한 cycle 수는 예비실험을 통해 결정하였다. TNF-α와 iNOS를 위한 PCR amplification은 95°C에서 1 분간, 62°C에서 1 분간, 그리고 72°C에서 1 분간 35 cycle로 수행되었다. 사용된 oligonucleotide primer는 다음과 같다: iNOS, 5'-TCACTGGGACAGCAGACAGAAT-3'(sense) and 5'-TGTCGTCTGCAGATGTGCTGA-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'-TCC-

TTCTGTTGCCGGTCCACA-3'(sense) and 5'-C-GTCTCCGGAGTCCATCACA-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. Gel 사진 상의PCR band의 강도는 densitometry를 이용하여 평가하였다.

### III.

#### 1. TNF- $\alpha$ 미치는 영향

다양한 농도의 *P. gingivalis* SAM, LAP, 그리고 LPS를 RAW264.7 세포에 가하고 24시간 경과 후 배양 상층액 내의 TNF- $\alpha$  농도를 측정하였다(Figure 1). *P. gingivalis* SAM, LAP, 그리고 LPS는 1 ng/ml-10  $\mu$ g/ml의 농도 범위에서 RAW264.7 세포로부터 TNF- $\alpha$  분비를 유발하였으며, 0.1  $\mu$ g/ml에서부터 basal level을 증가하는 TNF- $\alpha$  생성을 보이기 시작하여 10  $\mu$ g/ml에서 최대의 NO 생성을 보였다. SAM, LAP, 그리고 LPS는 10  $\mu$ g/ml에서 약 9.5 ng/ml, 9.4 ng/ml 그리고 10 ng/ml의 TNF- $\alpha$ 를 각각 생성하였다. 한편, *P. gingivalis* SAM, LAP, 그리고 LPS는 RAW264.7 세포로부터 IL-6의 분비를 유발하지 못하였다(자료 제시 안함).

#### 2. TNF- $\alpha$ mRNA 발현에 미치는 영향

*P. gingivalis* SAM, LAP, 그리고 LPS가 TNF- $\alpha$  전사 and TNF- $\alpha$  mRNA의 축적에 미치는 영향을 RT-PCR을 수행하여 확인하였다. RAW264.7 세포는 *P. gingivalis* SAM, LAP, 그리고 LPS를 가하지 않은 상태에서도 TNF- $\alpha$  mRNA를 발현하였으며, SAM, LAP, 그리고 LPS의 농도가 증가됨에 따라 TNF- $\alpha$  mRNA의 발현이 증진되었다(Figure 2).

#### 3. NO 생성에 미치는 영향

다양한 농도의 *P. gingivalis* SAM, LAP, 그리고 LPS를 RAW264.7 세포에 가하고 24시간 경과 후 배양 상층액 내의 NO 농도를 nitrite의 농도를 측정하여 평가하였다(Figure 3). *P. gingivalis* SAM, LAP, 그리고 LPS는 1 ng/ml-10  $\mu$ g/ml의 농도 범위에서 RAW264.7 세포로부터 NO 분비를 유발하였으며, 1  $\mu$ g/ml에서부터 basal level을 증가하는 NO 생성을 보이기 시작하여 10  $\mu$ g/ml에서 최대의 NO 생성을 보였다. SAM, LAP, 그리고 LPS는 10  $\mu$ g/ml에서 약 18.9  $\mu$ M, 16.1  $\mu$ M, 그리고 14.7  $\mu$ M의 NO를 각각 생성하였다.

#### 4. iNOS 단백질 발현에 미치는 영향

*P. gingivalis* SAM, LAP, 그리고 LPS에 의한 NO 생성이 iNOS 단백질의 증가에 의한 것인지를 결정하기 위해 이들이 iNOS 단백질의 발현에 미치는 영향을 평가하였다. SAM, LAP, 그리고 LPS는 RAW264.7 세포에서 약 130 kDa의 단백질을 각각 발현하였으며, 이는 iNOS에 대한 특이 항체에 의해 확인되었다(Figure 4). SAM과 LAP는 0.01  $\mu$ g/ml에서부터 iNOS 단백질을 발현하여 100  $\mu$ g/ml에서 최대의 발현을 보였으며, LPS는 10  $\mu$ g/ml에서부터 iNOS 단백질을 발현하여 100  $\mu$ g/ml에서 최대의 발현을 보였다(Figure 4). 대조군 세포는 iNOS 밴드를 보이지 않았다.

#### 5. iNOS mRNA 발현에 미치는 영향

*P. gingivalis* SAM, LAP, 그리고 LPS가 iNOS 전사 and iNOS mRNA의 축적에 미치는 영향을 RT-PCR을 수행하여 확인하였다. RAW264.7 세포를 다양한 농도의 *P. gingivalis* SAM, LAP, 그리고 LPS에 노출시켰을 때, iNOS mRNA의 발현이 농도 의존적으로 증진되었다(Figure 5). 대조군 세포는 매우 약한 시그널만 보였다.

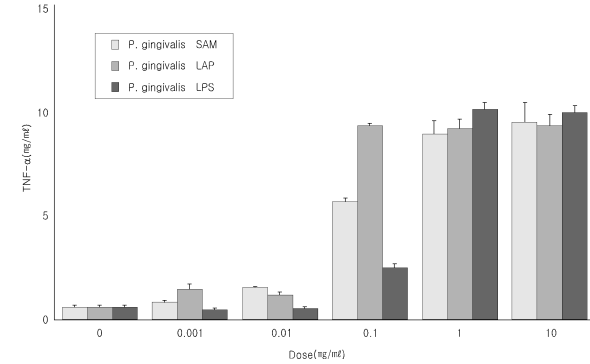


Figure 1. Dose response of TNF- $\alpha$  production by RAW264.7 cells stimulated with *P. gingivalis* surface components. Cells were incubated with increasing concentrations of surface components and supernatants were removed after 24 h and assayed for TNF- $\alpha$ . The results are means  $\pm$  standard deviation of four experiments.

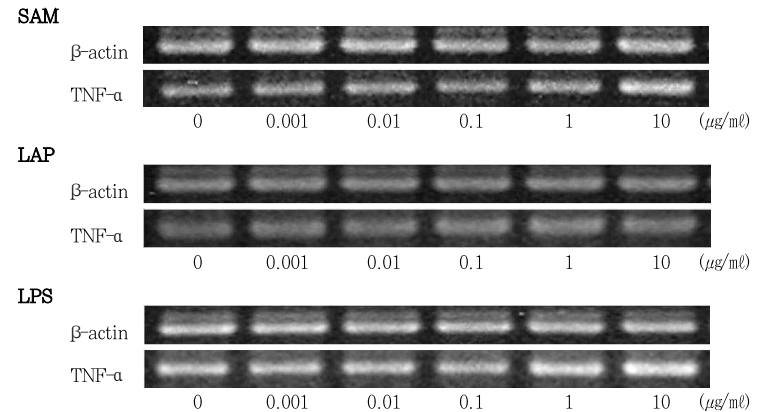


Figure 2. Dose response of TNF- $\alpha$  mRNA expression in RAW264.7 cells stimulated with *P. gingivalis* surface components. Cells were incubated with different concentrations of surface components for 24 h. See Materials and methods for further details.

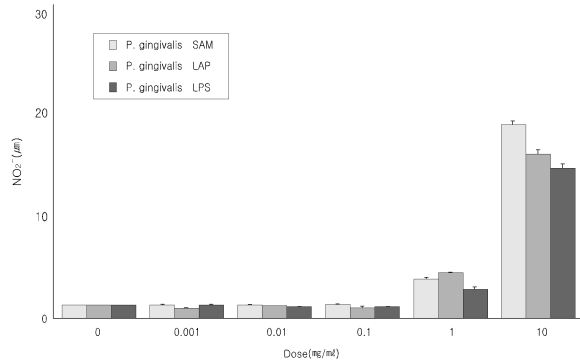


Figure 3. Dose response of NO production by RAW264.7 cells stimulated with *P. gingivalis* surface components. Cells were incubated with increasing concentrations of surface components and supernatants were removed after 24 h and assayed for NO. The results are means±standard deviation of four experiments.

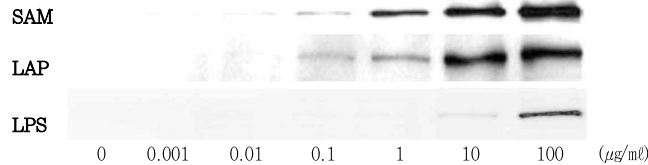


Figure 4. Dose response of iNOS protein expression in RAW264.7 cells stimulated with *P. gingivalis* surface components. Cells were incubated with different concentrations of surface components for 24 h. iNOS protein synthesis was measured by immunoblot analysis of cell lysates using iNOS-specific antibody. A representative immunoblot from two separate experiments with similar results is shown.

#### IV. 및 고찰

본 연구는 치주질환 주요 병원균 중의 하나인 *P. gingivalis*의 표면에 존재하는 SAM, LAP, 그리고 LPS가 대식세포에서 IL-6와 TNF-α 등의 염증성 사이토카인과 NO의 형성을 유도하는 능력을 비교 평가하기 위해 수행되었다. SAM, LAP, 그리고 LPS는 세균의 표면에 존재하므로 세균과 숙주세포간의 상호

작용에 있어 주요한 역할을 할 수 있다. 이들은 숙주세포를 자극하여 염증 매개물질의 생성과 분비를 유발하여, 염증성 치주질환의 발병과 진행에 있어 독성인자로서 중요할 수 있다. 치은 섬유아세포에서의 IL-6 생성의 유발에 있어 *P. gingivalis* LPS는 LAP에 비해 낮은 활성을 갖는다고 보고된 바 있다<sup>16)</sup>. 또한, *A. actinomycetemcomitans*의 SAM과 LAP도 사이토카인의 생성을 유발하는데 있어 LPS에 비해 현저히

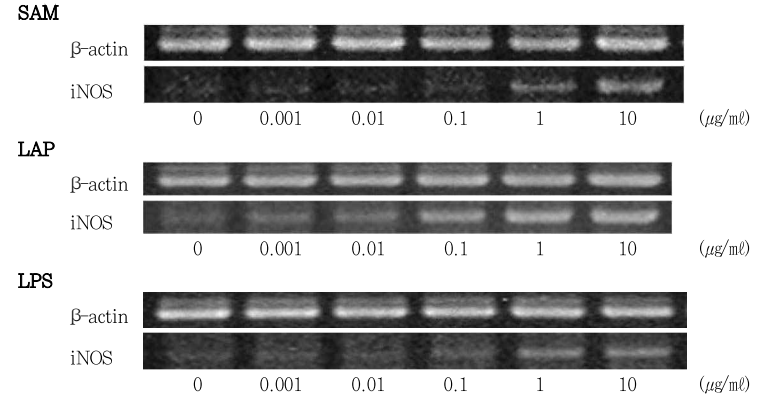


Figure 5. Dose response of iNOS mRNA expression in RAW264.7 cells stimulated with *P. gingivalis* surface components. Cells were incubated with different concentrations of surface components for 24 h. See Materials and methods for further details.

높은 활성을 갖고 있음이 보고된 바도 있다<sup>7)</sup>. 그러나, 본 연구에서는 *P. gingivalis*의 SAM, LAP, 그리고 LPS는 RAW264.7 세포에서 TNF-α와 NO의 생성을 유사한 수준으로 유발하였다.

IL-1, IL-6, IL-8, 그리고 TNF-α 등의 염증성 사이토카인은 치은의 염증을 매개하고 치조골의 흡수를 자극하는 등 치주질환의 발병과 진행에 있어 주요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다<sup>23,24)</sup>. 이들 염증성 사이토카인은 염증에 이환된 치주조직 내에서 국소적으로 생성될 수 있다. 즉, 세균의 구성요소와 염증 매개물질 등이 치은 섬유아세포와 침윤 백혈구 등 치은의 상주세포를 자극하여 염증성 사이토카인의 생성과 분비를 유발할 수 있다.

NO는 대식세포와 같은 면역세포에 의해 생성되어 각종 생리 및 병리적 과정에 있어 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다<sup>25)</sup>. NO는 각종 조직에 존재하는 nitric oxide synthase(NOS)에 의해 L-arginine으로부터 생성된다<sup>26)</sup>. Neuronal NOS, endothelial NOS, 그리고 inducible NOS(iNOS) 등 3종의 NOS가 존재하며<sup>26)</sup>, 이 중 NOS-2라고도 불리

는 iNOS는 세균 감염 시 LPS와 각종 염증성 사이토카인 등의 염증성 자극에 의해 대식세포를 포함한 다양한 세포에서 발현된다<sup>27,28)</sup>. iNOS가 일단 발현되면 장기간 다량의 NO가 생성되어 염증 시의 세포독성에 관여하는 것으로 여겨진다<sup>29)</sup>.

NO는 새로운 유형의 염증 매개물질로 주목받고 있다<sup>25)</sup>. NOS 활성과 NO 생성을 억제함으로써 골관절염, 사구체 신염, 그리고 대장염 등 염증성 질환의 진행과 심도를 억제할 수 있음이 밝혀진 바도 있다<sup>29,30)</sup>. NO는 다른 염증성 질환에서와 마찬가지로 염증성 치주질환에 있어서도 중요한 역할을 하는 것으로 여겨진다. 치주질환 시 NO의 생성이 증가하며<sup>31)</sup>, 치주질환 병인균 중의 하나인 *A. actinomycetemcomitans*의 LPS가 대식세포에서 NO의 생성을 유발함이 보고된 바 있다<sup>32,33)</sup>. 또한, 치주질환 병인균인 *Prevotella intermedia*와 *Prevotella nigrescens*의 세균내독소는 대식세포에서 NO 생성과 iNOS의 발현을 유발하였다<sup>34,35)</sup>. 한편, 만성치주염에 이환된 치은조직 내에는 iNOS 단백질과 mRNA가 건강한 치주조직에 비해 고농도로 존재하며<sup>36-39)</sup>, 치주조직 내에서의

iNOS의 주 공급원으로는 대식세포, 다형핵 백혈구, 섬유아세포, 그리고 혈관 내피세포 등을 들 수 있다 (36-39).

본 연구에서 RAW264.7 세포는 *P. gingivalis* SAM, LAP, 그리고 LPS를 가지지 않은 상태에서도  $\beta$ -actin에 대해 66-78 % 정도로 TNF- $\alpha$  mRNA를 발현하였다. RAW264.7 세포는 부가적인 자극이 없는 상태에서, TNF- $\alpha$ 를 유의한 수준으로 생성하지는 않으나, 상당한 수준의 TNF- $\alpha$  유전자를 발현하는 것으로 여겨진다. 본 연구에서 *P. gingivalis* SAM, LAP, 그리고 LPS는 농도 의존적으로 iNOS 단백질과 mRNA의 발현을 유발하였다. 다만, SAM과 LAP는 0.1  $\mu$ g/ml에서부터 NO 생성의 촉매효소로 작용하는 iNOS 단백질을 발현하였으나 LPS는 10  $\mu$ g/ml에서부터 iNOS 단백질을 발현하였고, LPS가 SAM과 LAP에 비해  $\beta$ -actin에 대해 낮은 백분율의 iNOS mRNA 발현을 보였는 바, *P. gingivalis* LPS는 SAM과 LAP에 비해 iNOS 단백질과 mRNA의 발현을 유도하는 활성이 현저히 낮은 것으로 여겨진다.

종합하여 보면, *P. gingivalis*의 SAM, LAP, 그리고 LPS는 대식세포에서 TNF- $\alpha$ 의 생성을 촉진하고, iNOS의 발현에 의한 NO 생성을 유발함으로써 치주질환 등 구강 내 감염에 중요한 역할을 하는 것으로 사료된다. 이들의 생물학적 활성은 화학적 구조와 밀접한 관련이 있을 수 있다. 항 후에 대한 심도 있는 연구가 수행되어야 하리라 사료된다.

## V.

본 연구는 치주질환 주요 병원균주 중의 하나인 *P. gingivalis*의 표면에 존재하는 SAM, LAP, 그리고 LPS가 대식세포에서 각종 염증성 사이토카인과 NO의 형성을 유도하는 능력 등을 비교 평가하기 위해 수행되었다. *P. gingivalis*의 SAM, LAP, 그리고 LPS는 RAW264.7 세포에서 TNF- $\alpha$ 와 NO의 생성을 유사한 수준으로 유발하였다. RAW264.7 세포는 *P. gingivalis*의 SAM, LAP, 그리고 LPS를 가지지 않은 상태에서도 TNF- $\alpha$  mRNA를 발현하였으며,

SAM, LAP, 그리고 LPS의 농도가 증가됨에 따라 TNF- $\alpha$  mRNA의 발현이 증진되었다. *P. gingivalis*의 SAM, LAP, 그리고 LPS는 농도 의존적으로 iNOS 단백질과 mRNA의 발현을 유발하였다. 다만, *P. gingivalis* LPS는 SAM과 LAP에 비해 iNOS 단백질과 mRNA 발현을 유도하는 활성이 현저히 낮은 것으로 여겨진다.

## VI. 참고문헌

1. Slots J, Listgarten MA. *Bacteroides gingivalis*, *Bacteroides intermedius* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal diseases. J Clin Periodontol 1988;15:85-93.
2. Wilson M. Biological activities of lipopolysaccharide and endotoxin. In Shah HN, Mayrand D, Genco RJ(eds) Biology of the species *Porphyromonas gingivalis*. CDC Press pp 171-198,1993.
3. Hitchcock PJ, Morrison DC. The protein components of bacterial endotoxins. In Rietchel ET (ed) Handbook of Endotoxins, vol 1: Chemistry of Endotoxin. Elsevier: North Holland, pp 339-375,1984.
4. Porat R, Yanoov M, Johns MA, Shibolet S, Michalevicz R. Effects of endotoxin-associated protein on hematopoiesis. Infect Immun 1992;60:1756-1760.
5. Wilson M, Meghji S, Barber P, Henderson B. Biological activities of surface-associated material from *Porphyromonas gingivalis*. FEMS Immunol Med Microbiol 1993;6:147-156.
6. Reddi K, Wilson M, Nair S, Poole S, Henderson B. Comparison of the pro-inflammatory cytokine-stimulating activity of the surface-associated proteins of perio-

dontopathic bacteria. J Periodont Res 1996;31:120-130.

7. Reddi K, Wilson M, Poole S, Meghji S, Henderson B. Relative cytokine-stimulating activities of surface components of the oral periodontopathogenic bacterium *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Cytokine 1995;7:534-541.
8. Meghji S, Henderson B, Kirby A, Newman HN, Wilson M. Serum antibody response to surface-associated material from periodontopathogenic bacteria. FEMS Immunol Med Microbiol 1995;10:101-108.
9. Herminajeng E, Asmara W, Yuswanto A, Barid I, Sosroseno W. Protective humoral immunity induced by surface-associated material from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in mice. Microbes Infect 2001;3:997-1003.
10. Meghji S, Wilson M, Henderson B, Kinane D. Anti-proliferative and cytotoxic activity of surface-associated material from periodontopathogenic bacteria. Arch Oral Biol 1992;37:637-644.
11. Meghji S, Henderson B, Nair S, Wilson M. Inhibition of bone DNA and collagen production by surface-associated material from bacteria implicated in the pathology of periodontal diseases. J Periodontol 1992;63:736742.
12. Meghji S, Wilson M, Barber P, Henderson B. Bone resorbing activity of surface-associated material from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Eikenella corrodens*. J Med Microbiol 1994;41:197-203.
13. Bjornson BH, Agura E, Harvey J et al. Endotoxin-associated protein: a potent

stimulus for human granulopoietic activity which may be accessory cell independent. Infect Immun 1988;56:1602-1607.

14. Sultz BM. Genetic factors in leukocyte responses to endotoxin: further studies in mice. J Immunol 1969;103:32-38.
15. Sultz BM, Goodman GW. Endotoxin protein: a B cell mitogen and polyclonal activator of C3H/HeJ lymphocytes. J Exp Med 1976;144:821-827.
16. Reddi K, Poole S, Nair S et al. Lipid A-associated proteins from periodontopathogenic bacteria induce interleukin-6 production by human gingival fibroblasts and monocytes. FEMS Immunol Med Microbiol 1995;11:137-144.
17. Sharp L, Poole S, Reddi K et al. A lipid A-associated protein of *Porphyromonas gingivalis*, derived from the haemagglutinating domain of the RI protease gene family, is a potent stimulator of interleukin 6 synthesis. Microbiology 1998;144:3019-3026.
18. Reddi K, Meghji S, Wilson M, Henderson B. Comparison of the osteolytic activity of surface-associated proteins of bacteria implicated in periodontal disease. Oral Dis 1995;1:26-31.
19. Wilson M, Kamin S, Harvey W. Bone resorbing activity of purified capsular material from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. J Periodont Res 1985;20:484-491.
20. Morrison DC, Leive L. Fractions of lipopolysaccharides from *E. coli* 0111:B4 prepared by two extraction procedures. J Biol Chem 1975;250:2911-2919.
21. Westphal O, Jann K.(1965) Bacterial

- lipopolysaccharides: extraction with phenol-water and further applications of the procedure. In: RL Whistler eds. *Methods in carbohydrate chemistry*. New York: Academic Press, 83-91.
22. Green LC, Wagner DA, Glogowski J et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 1982;126:131-138.
23. 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.
24. 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.
25. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991;43:109-142.
26. Nathan C, Xie QW. Nitric oxide synthases: roles, tolls and controls. *Cell* 1994;78:915-918.
27. Geller DA, Nussler AK, Di Silvio M et al. Cytokines, endotoxin, and glucocorticoids regulate the expression of inducible nitric oxide synthase in hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:522-526.
28. Nathan C, Xie QW. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J Biol Chem* 1994;269:13725-13728.
29. Southey A, Tanaka S, Murakami T et al. Pathophysiological role of nitric oxide in rat experimental colitis. *Int J Immunopharmacol* 1997;19:669-676.
30. 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.
31. Matejka M, Partyka L, Ulm C, Solar P, Sinzinger H. Nitric oxide synthesis is increased in periodontal disease. *J Periodont Res* 1998;33:517-518.
32. 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.
33. 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.
34. Kim SJ, Ha MS, Choi EY, Choi JI, Choi IS. *Prevotella intermedia* lipopolysaccharide stimulates release of nitric oxide by inducing expression of inducible nitric oxide synthase. *J Periodont Res* 2004;39:424-431.
35. Kim SJ, Ha MS, Choi EY, Choi JI, Choi IS. Nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase expression induced by *Prevotella nigrescens* lipopolysaccharide. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2005;43:51-58.
36. Batista AC, Silva TA, Chun JH, Lara VS. Nitric oxide synthesis and severity of human periodontal disease. *Oral Dis* 2002;8:254-260.
37. 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.
38. 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.
39. Lappin DF, Kjeldsen M, Sander L, Kinane DF. Inducible nitric oxide synthase expression in periodontitis. *J Periodont Res* 2000;35:369-373.

## The cytokine-inducing activities of surface components of the periodontopathogenic bacterium *Porphyromonas gingivalis*

Sung-Jo Kim

Department of Periodontology, College of Dentistry, Pusan National University

This study was carried out to examine the potency of the three surface components from *Porphyromonas gingivalis* to stimulate the murine macrophage cell line RAW264.7 to synthesize the pro-inflammatory cytokine tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) and nitric oxide (NO). Lipopolysaccharide (LPS), lipid A-associated proteins (LAP) and saline-extractable surface-associated material (SAM) were isolated from *P. gingivalis* 381. TNF- $\alpha$  release into culture supernatants was determined by two-site ELISA. NO production was assayed by measuring the accumulation of nitrite in culture supernatants. Western blot analysis of iNOS and analysis of reverse transcription (RT)-PCR products were carried out. The surface components extracted from this bacterium were almost equally potent in stimulating release of TNF- $\alpha$  and NO by RAW264.7 cells. TNF- $\alpha$  that was being measured immunologically was due to activation of TNF- $\alpha$  gene transcription. The present study clearly shows that *P. gingivalis* surface components fully induced iNOS expression in RAW264.7 cells in the absence of other stimuli. The ability of *P. gingivalis* surface components to promote the production of TNF- $\alpha$  and NO may be important in the pathogenesis of inflammatory periodontal disease.

**Key words:** *Porphyromonas gingivalis*, Surface-associated material, Lipid A-associated proteins, Lipopolysaccharide, TNF- $\alpha$ , Nitric oxide, iNOS