

# Porphyromonas gingivalis 바이오필름에 의한 숙주 면역반응의 교란

전우석 · 김성조 · 최점일

부산대학교 치과대학 치주과학교실

## I. 서론

세균성 바이오필름은 항균물질이나 탐식세포에 저항할 수 있게 하는 당단백질로 표면구조를 이루고 있고, 하부에 순환성 영양물질, 대사성 물질, 산소 등이 대류하고 있다<sup>1)</sup>. 치주질환은 일차적으로 복합적인 바이오필름 덩어리로 구성된 혼합된 세균성 공동 응집체에 의해 시작된다<sup>2,3)</sup>. 복합성 바이오필름을 구성하는 치주미생물 중에서 *Porphyromonas gingivalis* (*P.gingivalis*)는 파괴성 치주질환을 야기하는 주요 병원균이다<sup>4)</sup>. 그러나 *P.gingivalis*에 관한 대부분의 미생물학적, 면역학적 연구는 plankton식 배양법에 의해 증식시킨 세균에 대해서 주로 행해져 왔다<sup>4,6)</sup>. *P.gingivalis* 바이오필름에 대한 연구는 성장 특성과 항미생물제 저항성에 관하여 극히 제한적인 소수의 연구만이 수행되어 왔다<sup>3,7)</sup>.

*P.gingivalis* 바이오필름이 이용하는 독성기전과 생존전략에 대한 보다 광범위한 이해를 위하여 세균 유전학, 단백질학, 면역학적 측면에 대한 연구가 수행되어야 할 것이다. *P.gingivalis* 바이오필름에 있어 다르게 발현되는 유전자 또는 단백질을 동정하기 위한 연구가 결핍되어 있음을 고려할 때, 이 분야에 있어서 집중된 연구의 필요성이 대두되며, *P.gingivalis*

바이오필름이 숙주반응을 회피하고 숙주반응을 교란하는 기전을 밝히는 것은 항미생물제 저항성을 이해하고 나아가 효과적인 화학요법제를 고안하는데 있어 강력한 잠재적 가치를 가질 것이다. 또한, 단일 세균 뿐만 아니라 혼합된 세균성 바이오필름 상태로 배양된 *P.gingivalis*에 관한 숙주면역반응의 특성을 규명하는 것이 치은연하의 복합적인 미생물 바이오필름 내에 존재하는 *P.gingivalis* 바이오필름의 독특한 행동기전을 이해하는데 있어서 가치 있는 정보를 제공할 것이다.

*Fusobacterium nucleatum* (*F.nucleatum*)은 치주질환에 있어 핵심적인 병원균 중의 하나이며<sup>8,9)</sup>, 치은연하부위에서 미생물의 상호응집<sup>2,8,10)</sup>과 혼합성 바이오필름 형성<sup>3,7)</sup>에 중심적인 역할을 한다. *F.nucleatum*은 또한 독성에 있어서, *P.gingivalis*와 상협작용하고<sup>11)</sup> *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (*A.actinomycetemcomitans*)를 면역학적으로 변조시킨다<sup>2)</sup>. 정확한 기전이 명백하게 규명되지는 않았지만, 최근에 쥐에 plankton식 배양으로 증식시킨 *F.nucleatum*을 먼저 면역시키고 이어서 *P.gingivalis*로 면역하였을 때 *F.nucleatum*이 면역혈청의 항 *P.gingivalis* 항체기능과 숙주의 *P.gingivalis*에 대한 세포성<sup>13)</sup> 또는 체액성 면역반응<sup>14)</sup>을 변조시킨다는

점이 시사되었다.

현재까지, 구강미생물 바이오필름에 대한 숙주반응은 광범위하게 연구되지는 않았다. 바이오필름식으로 배양한 세균세포를 동물에 면역하였을 때 T 임파구와 B 임파구가 어떻게 반응하는지를 평가하고, 실험실적 면역혈청 기능과 생체적 방어분석을 평가하는 것은 흥미로운 일일 것이다.

본 연구는 동물에 면역시킨 *P.gingivalis* 바이오필름에 어떻게 세포성, 체액성 면역반응이 교란되는지를 평가하기 위해 수행하였다.

## II. 연구재료 및 방법

### 1. *P.gingivalis* 바이오필름의 배양- 단일성 또는 복합성

*P.gingivalis* 381 (Dr.Schiffertle 제공, SUNY at Buffalo, Buffalo, NY)과 *F.nucleatum* ATCC 10953 (American Type Culture Collection, Manassus, VA)을 각각 hemin(5 $\mu$ g/ml)과 menadion(0.5  $\mu$ g/ml)이 첨가된 tryptic soy broth(Difco, MI)에 혐기성 배양기내에서 섭씨 37도하에 배양시켰다. 밤새 성장한 *P.gingivalis* 세균을 polystyrene이나 mixed cellulose esters로 coating된 3종류의 서로 다른 고체형 조직 배양 plate (cell culture dish, 6-well cell culture plate, membrane filter)에 접종하여 단일 바이오필름을 형성시켰다 (pure *P.gingivalis*). 6-well culture plate를 이용하여 *P.gingivalis*와 *F.nucleatum*의 혼합성 바이오필름 배양을 유도하였다 (mixed *P.gingivalis*+*F.nucleatum*), plankton식으로 배양한 *P.gingivalis*와 *F.nucleatum*을 각각 대조군으로 삼았다.

### 2. 단일 또는 혼합된 *P.gingivalis* biofilm에 의한 쥐의 면역

각 그룹당 10마리의 Balb/c쥐에 각기  $1 \times 10^7$  cells의 세균세포를 면역시켰다. plankton식으로 배양한 *P.gingivalis* 381로 면역한 군은 1군 (*Pg*-planktonic group), 바이오필름으로 배양한 순수 *P.gingivalis*

381로 면역한 군은 2군 (pure *Pg*-biofilm group), 바이오필름식 혼합배양한 *P.gingivalis* 381+*F.nucleatum* 10953으로 면역한 군은 3군 (mixed *Pg*+*Fn*-biofilm group), plankton식으로 배양한 *F.nucleatum* 10953으로 면역한 군은 4군 (*Fn*-planktonic group)으로 하였다. 세균세포를 과거에 발표된 방법<sup>13)</sup> 따라 미리 환원된 1/2 강도의 링거액으로 3회 세척하였다. 쥐의 복강 내에 피하로 1주 간격으로 3번 주사하여 면역시켰다. 10마리의 BALB/c 쥐는 phosphate-buffer saline(PBS)로 면역시켜 음성 대조군(negative control group)으로 삼았다.

### 3. 항 *P.gingivalis* 항체 역가의 측정

면역혈청을 채득하기 위해 cardiac puncture로 말초혈액을 채취하였다. enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)방법으로 항 *P.gingivalis* IgG 항체 역가를 결정하기 위해 microtiter plate를 *P.gingivalis* 세균세포로 coating하고 4°C에서 하루 밤 동안 배양하였다<sup>13,14)</sup>. 0.05% Tween 20을 함유한 PBS(PBS/Tween)로 plate를 3회 세척한 후 PBS/Tween으로 일련의 희석한 쥐의 혈청을 첨가하고 실온에서 2시간 동안 배양하였다. 이후 PBS/Tween으로 plate를 3회 세척하고 100  $\mu$ l의 peroxidase-conjugated rabbit anti-mouse IgG (H+L)(Jackson ImmunoResearch Laboratories, West, Grove, PA)를 첨가해서 실온에서 2시간 동안 배양하였다. PBS/Tween으로 plate를 3회 세척한 후 100  $\mu$ l의 tetramethylbenzidine(Kierkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, MD)를 첨가하여 실온에서 15분 간 배양한 후 반응을 중지시키기 위해 0.18M의 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>을 첨가 하였다. 파장 450 nm에서의 흡광도(optical density)와 혈청희석요소의 상호관계를 회귀 분석하였다. 대조군 혈청중의 하나를 ELISA unit 100으로 설정하고, 다른 대조군과 실험군의 혈청 IgG 역가를 회귀분석을 이용하여 산출하였다. 각 군간의 항체수준을 통계적으로 비교하기 위하여 analysis of variance(ANOVA)를 시행하였다.

#### 4. *P.gingivalis*-특이성 T-세포 line의 확립

최종 면역 7일 후 이전에 보고된 방법<sup>13)</sup>에 따라서 모든 그룹의 쥐의 비장을 분리하여 T 인과구 enrichment column(R & D Systems, Minneapolis, MN)을 이용하여 T-세포를 분리 정제시켰다. 정제된 T-세포는  $1 \times 10^6$ 개의 *P.gingivalis*와 더불어 배양하였다. 면역하지 않은 쥐의 비장세포를 Mitomycin C로 처리하여 항원전달세포(antigen presenting cell)로 첨가하였다. 2주간 배양 후 T 세포를 세척하고 항원전달 세포나 세균항원을 첨가하지 않고 1주간 휴지기를 가졌다. 휴지기 후 이전에 설명된 방법<sup>13,14)</sup>에 따라서 T-세포 증식을 유도하기 위하여 항원전달세포와 세균항원을 첨가하여 *P.gingivalis*-특이성 T-세포 line을 확립하였다. 배양 상등액(culture supernatants)을 채취하여 싸이토카인 분석을 위해  $-20^\circ\text{C}$ 에 보관하였다.

#### 5. T-세포 line의 표현형 특성화

T-세포 line을 FITC-conjugated hamster anti-mouse 또는 T-cell receptor(TCR) monoclonal antibody(PharMingen, San Diego, CA)와 FITC-conjugated rabbit antimouse CD4 또는 CD8 monoclonal antibody(PharMingen, San Diego, CA)로 염색하였다. 각 T-세포 line의 표현형 발현은 flow cytometry(Coulter Epics Elite XL Cytometry, Coulter, Hialeah, FL)를 이용하여 검사 하였다.

#### 6. 싸이토카인 농도의 결정

Mitomycin C로 처리된 항원 전달 세포( $1 \times 10^7$  cells/well)와 *P.gingivalis*( $1 \times 10^8$  cells/well)과 더불어 각 line의 T-세포( $5 \times 10^6$  cells/well)를 72 시간 배양한 후 배양 상등액을 채취하여 이전에 설명된 방법<sup>13)</sup>에 따라서 ELISA에 의해 싸이토카인 수준을 결정 하였다. 요약하면, 96-well plate(Corning, Coning, WY)를  $4^\circ\text{C}$ 에서 하루 밤 동안 sodium carbonate buffer에 희석시킨 rat anti-mouse INF- $\gamma$  IL-4, IL-10(PharMingen,

San Diego, CA)으로 각각 coating하였다. PBS/Tween으로 3회 세척한 후 well은 실온에서 30 분간 PBS+10% fetal bovine serum(PBS/FBS)으로 blocking 한 다음 PBS/Tween으로 다시 3회 세척하였다. PBS/FBS+0.05% Tween20으로 희석된 각 표본과 standard recombinant mouse INF- $\gamma$  IL-4, IL-10,이 각각 첨가되었다. 실온에서 3시간 동안 배양 후 plate를 PBS/Tween으로 3회 세척하고 biotinylated rat anti-mouse INF- $\gamma$  IL-4, IL-10를 각각 첨가하여 실온에서 1시간 동안 배양하였다. plate를 PBS/Tween으로 4회 세척한 후 hydroperoxidase-conjugated streptavidin을 첨가해서  $37^\circ\text{C}$ 에서 30분간 배양하였다. PBS/Tween으로 plate를 8회 세척한 후 o-phenylenediamine(1 mg/ml in 0.1M citrate buffer, pH 4.5)을 첨가하고 실온에서 20분간 배양하였다. 발색반응을 중지하기 위하여 4 N  $\text{H}_2\text{SO}_4$ 를 첨가하였고, 490 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 표준 싸이토카인의 흡광도는 희석요소에 대하여 plotting한 후 각 표본의 싸이토카인 농도를 결정하였다. 각 군간의 싸이토카인 농도를 통계적으로 비교하기 위하여 analysis of variance(ANOVA)를 시행하였다.

#### 7. 항체 결합성(Avidity)의 측정

*P.gingivalis*에 대한 상대적인 항체 결합성(avidity)을 측정하기 위하여 이전에 설명된 방법<sup>15,16)</sup>에 따라서 microtiter plate를 *P.gingivalis*로 coating하고 이어서 쥐의 면역 혈청을 두 번 희석하여 적용한다. 혈청  $37^\circ\text{C}$ 에서 1시간 동안 배양한 후 plate를 PBS/Tween으로 세척하였다. 멸균된 증류수에 연속배수의 농도(0-5 M)로 희석된  $\text{NH}_4\text{SCN}$ 를 첨가하여  $37^\circ\text{C}$ 에서 30 분간 배양한 후, 같은 방법으로  $\text{NH}_4\text{SCN}$ 을 반복 적용하였다. plate를 세척하고 결합된 항체에 100 $\mu\text{l}$ 의 HRP-conjugated rabbit anti-mouse IgG (Zymed, San Francisco, CA)첨가하였다. tetramethylbenzidine (Kierkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD)을 첨가하여 발색반응을 유도하였다. 결합지수(avidity index)는 결합된 항체의 50%를 추출하기 위하여 소요되는  $\text{NH}_4\text{SCN}$ 의 몰 농도로서 계측되었다.

Table 1. Anti-*P. gingivalis* IgG titer of immune sera obtained from each group(mean  $\pm$  s.d.), avidity index and opsonophagocytosis index

Group	IgG titer	Avidity
Pg-planktonic group(N=10)	400,3 $\pm$ 83,6	4,0 $\pm$ 0,1
pure Pg-biofilm group(N=10)	403,2 $\pm$ 91,4	2,9 $\pm$ 0,0
mixed Pg+Fn biofilm group(N=10)	414,5 $\pm$ 38,9	2,6 $\pm$ 0,0
Fn-planktonic group(N=10)	409,3 $\pm$ 13,0	2,8 $\pm$ 0,1
Control group(N=10)	100,4 $\pm$ 8,9	0,9 $\pm$ 0,1

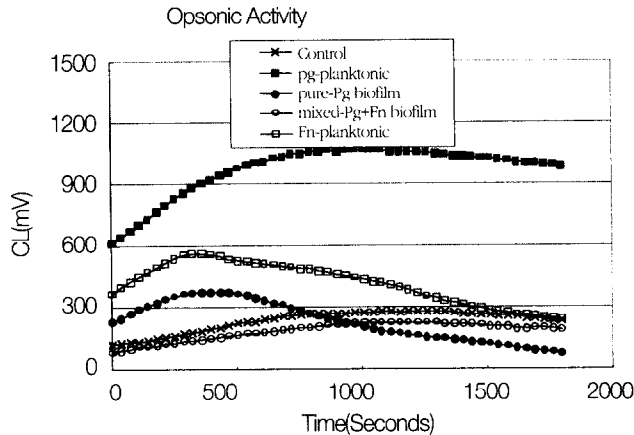


Figure 1. Diagrammatic representation of mean opsonophagocytosis titers of immune sera obtained from each group that was expressed as chemiluminescence intensity (Y-axis) according to reaction time (X-axis).

항체의 결합지수를 실험군 간에 비교하기 위하여 analysis of variance(ANOVA)를 시행하였다.

### 8. 오폐소닌 식작용 기능(opsonophagocytosis function)의 측정

오폐소닌 식작용 기능(opsonophagocytosis function)은 이전에 보고된 방법<sup>19)</sup>을 약간 변형하여 측정하였다. 인체 말초혈액에서 분리한 다형핵백혈구를 면역혈청과 더불어 배양한 다음 보체와 표적 세균을 첨가하여 배양시켰다. 비 면역 쥐에서 채득한 혈청이 대조군으로 사용되었다. 최종적으로 luminol (5mM)이 chemiluminescence 반응을 위해 첨가되었다. 각 군간의 통계적인 비교를 위하여 이요인 분산 분석(two way analysis of variance)을 시행하였다.

## III. 연구 성적

### 1. 항 *P.gingivalis* 항체 역가

각 군으로부터 얻어진 면역 혈청의 항 *P.gingivalis* 항체 역가는 각각 1군(Pg-planktonic group)에서는 400.3 $\pm$ 83.6, 2군(pure Pg-biofilm group)에서는 403.2 $\pm$ 91.4, 3군(mixed Pg+Fn biofilm group)에서는 414.5 $\pm$ 38.9, 4군(Fn-planktonic group)에서는 409.3 $\pm$ 13.0이었고 PBS로 면역시킨 음성 대조군에서는 100.4 $\pm$ 8.9였으며, 각 군간 유의성 있는 차이는 없었다(Table 1).

### 2. 항체 결합력(avidity)

*P.gingivalis*에 대한 avidity결과는 표 1에서 보여주

Table 2. Cytokine concentrations of culture supernatants from *P. gingivalis*-specific T cell lines established from each group (mean  $\pm$  s.d.)

Group	INF- $\gamma$	IL-4	IL-10
Pg-planktonic group	0.29 $\pm$ 0.03	-	-
pure Pg-biofilm group	0.15 $\pm$ 0.04	-	-
mixed Pg+Fn biofilm group	0.12 $\pm$ 0.12	-	-
Fn-planktonic group	0.11 $\pm$ 0.10	-	-

\*cytokine concentration(ng/ml)

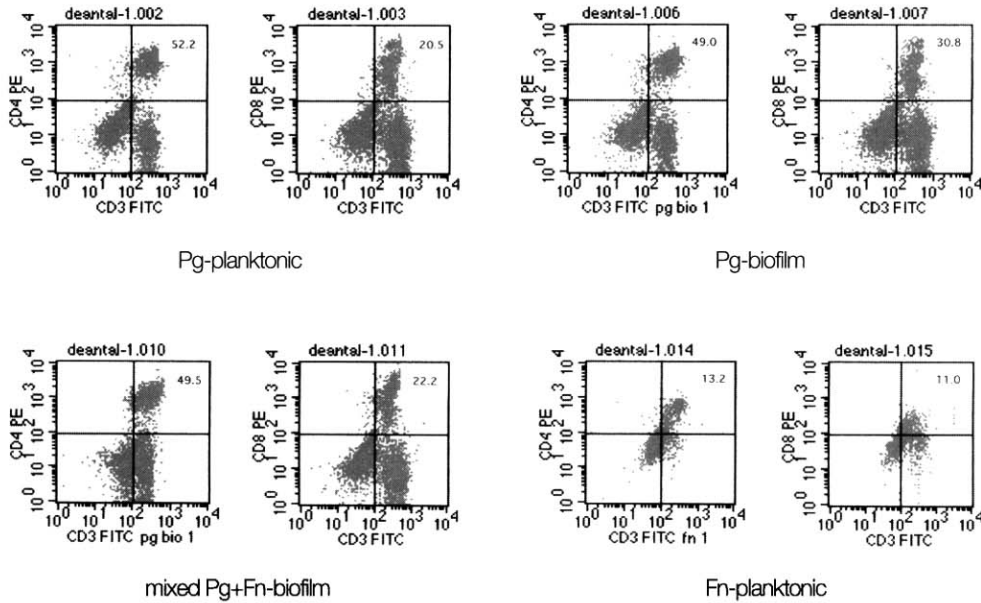


Figure 2. Flow cytometric analysis of *P. gingivalis*-specific T cell lines

는 바와 같이 1군에서는  $4.0 \pm 0.1$ , 2군에서는  $2.9 \pm 0.1$ , 3군에서는  $2.6 \pm 0.0$ , 4군에서는  $2.8 \pm 0.1$  이었다. 1군(Pg-planktonic group)이 다른 군에 비해 유의성 있게 높은 항체 결합력을 보였다( $p < 0.01$ ).

### 3. 옵소닌 식작용(opsonophagocytosis)

각 군으로부터 얻어진 면역혈청의 *P. gingivalis* 381에 대한 옵소닌 식작용 기능은 1군(Pg-planktonic group)이 다른 바이오필름 군이나 plankton식 배양 *F. nucleatum* 군에 비해 유의성 있게 높았다( $p < 0.0001$ )(Figure 1).

### 4. T-세포 line의 표현형 특성

*P. gingivalis*-특이성 T-세포 line의 표현형을 Flow cytometry를 이용하여 검사한 결과 1군(Pg-planktonic group)에서는 helper T-세포(CD4) 비율이 52.2%, cytotoxic T-세포(CD8)비율이 20.5% 였고, 2군(Pg-biofilm group)에서는 CD4가 49.0%, CD8이 30.8% 이며, 3군(mixed Pg+Fn-biofilm group)에서는 CD4가 49.5%, CD8이 22.2% 이고, 4군(Fn-planktonic group)에서는 CD4가 13.2%, CD8이 11.0% 였다 (Figure 2).

## 5. *P.gingivalis*-특이성 T-세포 line 배양 상층액 내의 싸이토카인 정량분석

비장으로부터 T-세포를 분리하고 *P.gingivalis*로 자극하여 *P.gingivalis*-특이성 T-세포 line을 수립하였다. 수립된 *P.gingivalis*-특이성 T-세포 line의 싸이토카인 농도를 측정된 결과 T-세포 line 의해 생산된 INF- $\gamma$  농도가 1군(*Pg-planktonic group*)에서 나머지 3군보다 유의성 있게 높았다( $p < 0.01$ )(Table 2).

## IV. 총괄 및 고안

치주질환은 단일 미생물이 아니라 복합세균으로 구성된 혼합세균성 바이오필름 공동 응집체에 의해 기시된다<sup>2,3</sup>. 이러한 구강미생물 바이오필름 구성세균 중 *P.gingivalis*가 파괴적인 치주질환을 야기하는 주요한 병원균으로 알려져 왔다<sup>9</sup>. 그러나, 현재까지 *P.gingivalis*에 대한 연구의 대부분은 plankton식 배양법으로 증식시킨 세균에 대해 행해져 왔으므로, 실제 치은연하의 바이오필름 상태의 세균의 행동양태를 적절히 반영하지 못 하였다. 이에 본 연구는 바이오필름 상태의 *P.gingivalis*를 배양하여 Balb/c쥐에 면역시켰을 경우 숙주의 세포성 및 체액성 면역 반응이 어떻게 교란되는지를 평가하고자 시도하였다.

*P.gingivalis* 바이오필름으로 쥐를 면역시키기 전에 각기 다른 조직 배양 plate를 이용하여 바이오필름 배양 적정방법의 표준화를 확립한 후, 일정한 방법으로 유도된 *P.gingivalis* 바이오필름으로 쥐를 면역시켰으며, 성공적인 면역을 유도하기 위하여 피하 주사를 반복하는 booster immunization법을 시도하였다.

*P.gingivalis* 바이오필름의 면역 변조능력을 이해하고 T-세포 line의 항 세균성 방어 및 파괴능력을 이해하기 위해 *P.gingivalis*-특이성 T-세포 line을 확립하고 특성적 표현형을 검사하였으며, 싸이토카인의 농도를 측정하였다.

치주질환자에 있어 병원균에 대해 상승된 항체는 만족스러운 세균방어 기능을 반영하지 못하고 있다<sup>6,18,20,21</sup>. 그 이유는 명백하지 않지만, 아마도 helper T

세포의 분극화와 면역혈청<sup>13,14</sup>에 대한 면역 변조를 야기하는 치주병원균간의 교차 항원 때문 일 것으로 추정된다<sup>6,13</sup>. *P.gingivalis*의 단독 바이오필름 또는 다른 세균과의 복합 바이오필름이 어떻게 숙주반응을 교란하여 면역이탈로 이끄는지를 살펴보는 것은 아주 중요한 일일 것이다. 본 연구에서는 *P.gingivalis* 단독(2군) 또는 혼합(*P.gingivalis*+*F.nucleatum*) 바이오필름(3군)을 실험군으로, *P.gingivalis*-planktonic group(1군)과 *F.nucleatum*-planktonic group(4군)을 대조군으로 삼았다. 각 군에 있어서 항체 기능의 지표로서의 면역 혈청 결합력과 옥소닌 능력을 측정하였다. 각 군간의 항 *P.gingivalis* 항체 역가는 유의성 있는 차이를 보이지 않았다. *P.gingivalis*에 대한 항체 결합력에 있어서 1군(*Pg-planktonic group*)이 다른 군(biofilm group)에 비해 유의성 있게 높은 항체 결합력을 나타내었다. 또한 옥소닌 식작용 기능도 plankton식 *P.gingivalis*로 면역한 1군에서 바이오필름으로 면역한 실험군들에 비해 유의성 있게 높았다. 그리고 수립된 *P.gingivalis*-특이성 T-세포 line의 배양상층액 내의 싸이토카인 농도를 측정된 결과 INF- $\gamma$  농도가 바이오필름군에서 수립된 T세포 라인에서 상당히 낮게 나타났다. 이는 plankton식 배양 군에 비해 바이오필름 배양 군에서 저하된 숙주 면역기능을 시사하는 것으로서 *P.gingivalis* biofilm에 의한 교란된 숙주면역반응을 의미한다. 다시 말하면, 바이오필름으로 배양한 순수 *P.gingivalis*나 *P.gingivalis*+*F.nucleatum* 혼합바이오필름으로 면역했을 경우 *P.gingivalis*-특이성 T-세포 line의 INF- $\gamma$ 분비량이 상당량 감소되었다. 또 각 군간에 항 *P.gingivalis* IgG의 수준이 유사함에도 불구하고 *P.gingivalis* 바이오필름으로 면역한 군에서 plankton식 *F.nucleatum* 단독 면역군에서 관찰된 *P.gingivalis*에 대한 혈청항체 결합력과 옥소닌 식작용 기능과 유사하였다. *P.gingivalis* 바이오필름으로 면역한 군에서 얻어진 T-세포 line의 INF- $\gamma$  생성감소 현상과 면역혈청의 세균결합력 및 옥소닌 식작용 저하는 이전 연구들의 보고와 같이,<sup>13,11,22</sup> 치주질환에 있어서 Th1 clone의 우세한 방어기능을 확인해 주는 결과라고 할 수 있다. 더군다나, 혼합성 *Pg+Fn* 바이오 필름으로 면역한 군에서

얻어진 면역 항체의 저하된 기능은 복합세균총에서의 *F.nucleatum*의 면역 변조효과와 관련된 것으로 보여진다<sup>3)</sup>. 그리고 향후 바이오필름 특이성 발현 세균 유전자들이<sup>23,24)</sup> 어떻게 숙주반응을 조절하는 지에 대해서도 고찰해야 할 것이다.

최근에 *P.gingivalis*로 단독면역한 동물군과 *F.nucleatum* 면역 후 *P.gingivalis*로 면역한 동물군에서 채득한 면역혈청의 *P.gingivalis* biofilm 내 침투력에 대한 연구가 발표된 바<sup>15)</sup>, 이를 토대로 향후 plankton식 배양세균으로 면역한 쥐의 항혈청과 바이오필름으로 면역한 항혈청의 쥐의 혈청을 가지고 인공적으로 조성한 *P.gingivalis* 바이오필름 내 혈청 침투능력을 비교해 보는 것도 매우 흥미로운 일일 것이다.

## V. 결론

본 연구는 바이오필름 형태의 *P.gingivalis*를 유도하여 Balb/c 쥐에 면역시켰을 경우 숙주의 세포성 및 체액성 면역반응이 어떻게 교란되는 지를 평가하고자 수행하였다. 바이오필름을 *P.gingivalis* 단독(순수) 또는 *F.nucleatum*과의 복합형으로 형성시켜 면역한 동물군을 각각 2개의 실험군으로, plankton식 배양 *P.gingivalis*나 *F.nucleatum*으로 면역한 동물군을 각각 대조군으로 삼아서, 면역 혈청의 항 *P.gingivalis* 항체 역가, 항체 결합성(avidity), 옵소닌 식작용 기능을 평가하고, *P.gingivalis*-특이성 T-세포 line의 확립 및 표현형의 특성을 규명하였으며, 세포배양 후 상등액의 T-세포 싸이토카인 농도를 측정하였다. 그 결과 다음의 결론을 얻었다.

1. 항 *P.gingivalis* 항체 역가는 각 군간 유의성 있는 차이가 없었다.
2. 1군(Pg-planktonic group)이 다른 바이오필름 군이나 plankton식 배양 *F.nucleatum* 군에 비해 유의성 있게 높은 항체 결합성을 보였다.
3. 각 군으로부터 얻어진 면역혈청의 *P.gingivalis* 381에 대한 옵소닌 식작용은 1군 (Pg-planktonic group)에서 유의성 있게 높았으며 바이오필

름 군이나 plankton 식 *F.nucleatum* 군은 실제적인 감소를 보였다.

4. *P.gingivalis*-특이성 T-세포 line에 의해 분비된 INF- $\gamma$  농도가 바이오필름 군에서 수립된 T-세포 line에서 상당히 낮게 나타났다.
5. *P.gingivalis* biofilm은 치주질환에 있어서 세포성 및 체액성 면역반응을 교란시킨다고 결론 내릴 수 있었다.

## VI. 참고 문헌

1. Costerton JW, Cook G, Lamont R. : The community architecture of biofilms: Dynamic structures and mechanisms, p. 5-14. In Newman HN, Wilson M (ed.), Dental plaque revisited-Oral biofilms in health and disease, BioLine, Cardiff, 1999
2. Kolenbrander PE, Andersen RN, Clemans DL, Whittaker CJ, Klier CM. : Potential role of functionally similar coaggregation mediators in bacterial succession, p. 171-186. In Newman HN, Wilson M (ed.), Dental plaque revisited-Oral biofilms in health and disease, BioLine, Cardiff, 1999
3. Marsh PD, Bradshaw DJ. : Microbial community aspects of dental plaque, p. 237-254. In Newman HN, Wilson M (ed.), Dental plaque revisited-Oral biofilms in health and disease, BioLine, Cardiff, 1999
4. Holt SC, Kesavalu L, Walker S, Genco CA. : Virulence factors of *Porphyromonas gingivalis*. Periodontol. 2000. 20:168-238, 1999
5. Ebersole JL, Taubman MA. : The protective nature of host responses in periodontal diseases. Periodontol. 2000. 5:112-41, 1994
6. Ebersole JL, Cappeli D, Holt SC. : Periodontal diseases: to protect or not to protect is the question? Acta, Odontol. Scand. 59:161-6, 2001
7. Marsh PD, Bradshaw DJ, Watson DK, Allison C.

- : Role of *Fusobacterium nucleatum* in anaerobe survival in microbial communities. J. Dent. Res. 76: 226 (Abstr #1700), 1997
8. Bolstad AI, Jensen HB, Bakken V. : Taxonomy, biology, and periodontal aspects of *Fusobacterium nucleatum*. Clin. Microbiol. Rev. 9:55-71, 1996
  9. Moore WE, Moore LV. : The bacteria of periodontal diseases. Periodontol. 2000. 5: 66-77, 2000
  10. Kolenbrander PE, London J. : Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence. J. Bacteriol. 175: 3247-3252, 1993
  11. Feuille F, Ebersole JL, Kesavalu L, Steffen MJ, Holt SC. : Mixed infection with *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum* in a murine lesion model: potential effects on virulence. Infect. Immun. 64: 2094-2100, 2001
  12. Tew JG, Thomas SS, Ranney RR. : *Fusobacterium nucleatum*-mediated immunomodulation of in vitro secondary antibody response to tetanus toxoid and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. J. Periodont. Res. 22: 506-512, 1987
  13. Choi JI, Borrello MA, Smith E, Zauderer M. : Polarization of *Porphyromonas gingivalis*-specific helper T cell subsets by prior immunization with *Fusobacterium nucleatum*. Oral. Microbiol. Immunol. 15:181-187, 2000
  14. Choi JI, Borrello MA, Smith E, Cutler CW, Sojar H, Zauderer M. : Prior exposure of mice to *Fusobacterium nucleatum* modulates host response to *Porphyromonas gingivalis*. Oral. Microbiol. Immunol. 16:338-344, 2001a
  15. Choi JI, Kim SJ, Kim SJ. : *Fusobacterium nucleatum* modulates serum binding to *Porphyromonas gingivalis* biofilm. J. Korean. Acad. Periodontol. 31:661-668, 2001b
  16. Lopatin DE, LaBelle D, Lee SW. : Measurement of relative avidity of antibodies reactive with *Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis* in the sera of subjects having adult periodontitis. J. Periodont. Res. 26:167-175, 1991
  17. Choi JI, Schifferle RE, Yoshimura F, Kim BW. : Capsular polysaccharide-fimbrial protein conjugate vaccine protects against *Porphyromonas gingivalis* infection in SCID mice reconstituted with human peripheral blood lymphocytes. Infect. Immun. 66: 391-393, 1998
  18. Baker PJ, Carter S, Dixon M, Evans RT, Roopenian DC. : Serum antibody response to oral infection precedes but does not prevent *Porphyromonas gingivalis*-induced alveolar bone loss in mice. Oral. Microbiol. Immunol. 14:194-196, 1999
  19. Fan Q, Sims T, Sojar H, Genco R, Page RC. : Fimbriae of *Porphyromonas gingivalis* induce opsonic antibodies that significantly enhance phagocytosis and killing by human polymorphonuclear leukocytes. Oral. Microbiol. Immunol. 16:144-152, 2001
  20. Sjostrom K, Darveau R, Page R, Whitney C, Engel D. : Opsonic antibody activity against *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in patients with rapidly progressive periodontitis. Infect. Immun. 60:4819-4825, 1992
  21. Whitney C, Ant J, Mocla B, Johnson B, Page RC, Engel D. : Serum immunoglobulin G antibody to *Porphyromonas gingivalis* in rapidly progressive periodontitis: titer, avidity, and subclass distribution. Infect. Immun. 60:2194-2200, 1992
  22. Gemmell E, Marshall RI, Seymour GJ : Cytokine and prostaglandins in immune homeostasis and tissue destruction in periodontal disease. Periodontol. 2000. 14:112-143, 1997
  23. Becker P, Hufnagle W, Peters G, Herrmann M : Detection of differential gene expression in biofilm-forming versus planktonic populations of *Staphylococcus aureus* using micro-represen-



tational-difference analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:2958-2965, 2001

24. Whiteley M, Bangera MG, Bumgarner RE, Parssek MR, Teitzel GM, Lory S, Greenberg EP :

Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms, *Nature* 413:860-864, 2001

## Perturbation of host responses by *Porphyromonas gingivalis* biofilm

Woo-Seok Jeon, Sung-Jo Kim, Jeom-Il Choi

Department of Periodontology, College of Dentistry, Pusan National University

The present study was performed to evaluate how cellular and humoral immune responses were perturbed by immunization of mixed periodontal bacterial biofilms. Each group of mice was immunized with 1) *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) grown as a planktonic culture, 2) *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*), 3) *P. gingivalis* grown as a biofilm, or 4) mixed *P. gingivalis* plus *F. nucleatum* grown as a biofilm culture, respectively. Immune mouse sera were collected from each mouse. Spleens were harvested to isolate T cells and consequently stimulated with antigen presenting cells and *P. gingivalis* whole cell antigen to establish *P. gingivalis*-specific T cell lines. There were no significant differences in the mean anti-*P. gingivalis* IgG antibody titers among mouse groups. Immunization of mice with pure *P. gingivalis* biofilm or mixed *P. gingivalis* plus *F. nucleatum* biofilm resulted in significant reduction of antibody avidity and opsonophagocytosis function. INF- $\gamma$  production by *P. gingivalis*-specific T cell lines was also substantially reduced in mouse groups immunized with the biofilm. It was concluded that *P. gingivalis* biofilm perturbs the cellular and humoral immune responses in periodontal disease.

---

Key words ; T-cell line, bacterial biofilm, cytokine, cellular immune response