

## Functional Characterization of the Major Surface Protein of *Treponema maltophilum* in Human Gingival Fibroblasts

Sung-Hoon Lee<sup>1</sup> and Bong-Kyu Choi<sup>1,2,\*</sup>

Department of Oromaxillofacial Infection and Immunity<sup>1</sup> and Dental Research Institute<sup>2</sup>, College of Dentistry, Seoul National University

(Received March 2, 2005 ; Accepted March 20, 2005)

*Treponema maltophilum*, a Group IV oral spirochete, is associated with periodontitis and endodontic infections. In this study we analyzed the functional role of the major surface protein of this organism (MspA) in human gingival fibroblasts (HGFs). The full-length gene encoding MspA was cloned and expressed in *Escherichia coli* by using the expression vector pQE-30. The recombinant protein (rMspA) was purified by affinity chromatography with nickel-nitrilotriacetic acid agarose and possible contamination of *E. coli* endotoxin in rMspA was removed by using polymyxin B-agarose. rMspA significantly induced the expression of proinflammatory cytokines like IL-6 and IL-8 and intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 in HGFs, when analyzed by reverse transcription-PCR, flow cytometry, and enzyme-linked immunosorbent assay. Our results indicate that MspA of *T. maltophilum* may play an important role in amplifying the local immune response by upregulating the expression of proinflammatory cytokines and ICAM-1.

**Keywords:** *Treponema maltophilum*, Major surface protein, Proinflammatory cytokines, ICAM-1

### 서 론

구강에는 매우 다양한 세균이 존재하며 치은열구에 존재하는 수종의 그람음성 세균은 치주질환의 원인으로서

치주조직의 파괴나 골흡수를 유도한다. 치주병원균으로 알려진 그람음성 세균에는 *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Fusobacterium nucleatum*, *Tannerella forsythensis*, 나선균 등이 있다.

*Treponema* 속에 속하는 구강 나선균은 치주염환자의 치은연하치태세균을 현미경으로 관찰할 때 높은 비율로 존재하나 (Choi *et al.*, 1994; Dewhirst *et al.*, 2000) 배양이 까다로워 다른 치주병원균에 비해서 연구가 더디게 진행되고 있다. 다양한 기술과 배지를 이용하여 지금까지 10종의 구강나선균이 배양 분리 되었지만, 병원성에 대한 연구는 *Treponema denticola*에 대해서만 집중적으로 이루어지고 있으며, 또한 이 세균의 유전체 정보가 최근 밝혀졌다 (Seshadri *et al.*, 2004). 만성 및 급속파괴성 치주염환자에서 16S rRNA에 의거한 probe를 사용하여 분석한 분자적 역학 연구에서 새로 배양된 균주인 *T. lecithinolyticum* 및 *T. maltophilum*의 분포가 *T. denticola* 보다 훨씬 더 높다는 결과를 얻었다 (Moter *et al.*, 1998, Wyss *et al.*, 1999). *T. maltophilum*은 *T. lecithinolyticum* 과 같이 Group IV 구강 나선균에 속한다 (Choi *et al.*, 1994). *T. maltophilum*의 주외막 단백질인 MspA (575 aa)와 *T. lecithinolyticum*의 주외막 단백질 MspTL (590 aa)은 53%의 상동성과 59%의 유사성을 나타내며 (Heuner *et al.*, 1999; Park *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2002), 사람 단핵세포주와 치주인대세포에서 염증성 사이토카인과 세포 부착인자의 하나인 intercellular adhesion molecule (ICAM)-1의 발현을 유도하였다 (Lee *et al.*, 2005).

치은섬유아세포는 치은결합조직의 주요구성 세포로서 결합조직의 세포외기질단백질을 비롯한 여러 가지 성분을 만드는데 있어서 중요한 역할을 한다. 따라서 침투성이

\*Corresponding author: Department of Oromaxillofacial Infection and Immunity, College of Dentistry, Seoul National University, 28 Yongon-Dong, Chongno-Gu, Seoul 110-749, Korea, Tel.: +82-2-740-8640, Fax.: +82-2-743-0311, E-mail: bongchoi@snu.ac.kr

있는 세균, 또는 세균산물은 치은결합조직에 염증유발을 일으키며 조직파괴를 가져올 수 있다.

본 연구에서는 *mspA* 유전자를 발현벡터 pQE-30을 사용하여 *Escherichia coli*에 클로닝하여 재조합단백질 형태로 얻은 후 치은섬유아세포에 자극한 뒤 염증성 cytokine과 ICAM-1의 발현조절 양상을 평가하였다.

## 실험재료 및 방법

### 세균 및 배양

*T. maltophilum* ATCC 51939는 OMIZ-Pat 액체배지를 사용하여 혐기상태 (10% CO<sub>2</sub>, 5% H<sub>2</sub>, 85% N<sub>2</sub>)에서 배양하였다 (Wyss C *et al.*, 1999).

TA cloning을 위한 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ -T1 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)과 *MspA*발현을 위한 *E. coli* M15는 ampicillin (100  $\mu$ g/ml)이 첨가된 Luria-Bertani (LB) 배지와 ampicillin (100  $\mu$ g/ml) 및 kanamycin (25  $\mu$ g/ml)이 첨가된 LB 배지를 각각 사용하여 호기 상태에서 배양하였다.

### 재조합 주의막단백질 발현

*T. maltophilum*의 DNA는 phenol/chloroform를 이용하여 추출하였으며, 주의막 단백질 *MspA*를 발현하는 유전자를 얻기 위해 *T. maltophilum*의 DNA로부터 primer TMexpF (5'-AACTGGATCCGCCGAACCTGCTGCCGAG-3': 밑줄친 부분은 BamHI의 인식부위)와 TMexpR (5'-CCCGGAGCTCTTACAGAGCGATTTTCGCTTT-3': 밑줄친 부분은 SacI의 인식부위)을 사용하여 중합효소 연쇄반응 (PCR)을 수행하였다. 각 primer는 클로닝을 위해 BamHI과 SacI 인식부위를 넣었다. PCR산물을 TOPO TA cloning kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 벡터 pCR2.1-TOPO에 삽입하고 *E. coli* DH5 $\alpha$ -T1에 클로닝하였다. Plasmid를 정제하여 제한효소 BamHI과 SacI으로 동시에 절단하고 agarose gel에서 전기영동한 후 추출하여 *mspA* 유전자를 대량으로 얻었다. 이 유전자를 BamHI과 SacI으로 절단한 발현벡터 pQE-30 (Qiagen, Valencia, CA, USA)에 삽입하고 *E. coli* M15에 클로닝한 후 LB 한천배지 (25  $\mu$ g/ml kanamycin과 100  $\mu$ g/ml ampicillin를 첨가)에서 자란 단일 집락을 먼저 5 ml LB broth (25  $\mu$ g/ml kanamycin과 100  $\mu$ g/ml ampicillin를 첨가) (LB-K-A)에 접종하여 37°C에서 배양하였다. 균 부유액을 10 ml LB-K-A에 접종하여 밤샘 배양한 후 500 ml의 새 배지에 접종하여 흡광도가 660 nm에서 0.5될 때까지 배양한 다음 1 mM isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG)를 넣고 4시간 더 배양하여 단백질 발현을 유도하였다. 그 후 4,000  $\times$  g에서 10분간 원심분리하여 균침전물을 얻었다.

### 재조합 주의막단백질 (rMspA) 분리 및 정제

균침전물에 4 ml의 inclusion body (IB) 세척완충용액 (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM EDTA, 1% Triton X-100)을 넣고 lysozyme (100  $\mu$ g/ml)을 첨가하여 얼음에 10분간 방치한 후, 세포분쇄기 (출력 17-20 W로 10초간 초음파 처리와 2초 휴식의 과정을 6회 반복)로 분쇄하였다. 세포분쇄액에 26 ml의 IB 세척완충용액을 더 첨가한 후, 4°C, 6,500  $\times$  g에서 10분간 원심분리하여 세포 잔여물을 제거하였다. 다시 동일한 양의 IB 세척완충용액을 넣고 섞어 준 뒤 같은 조건에서 원심분리하여 불용성 물질을 얻었다. 침전물의 무게 (g) 당 15 ml의 IB 수용화완충용액 (50 mM CAPS, pH 11.0)을 넣고, 0.3% N-lauroylsarcosine과 1 mM DTT를 첨가하여 섞은 후에 6,500  $\times$  g에서 10분간 원심분리하였다. 상층액을 투석막에 넣고 24시간 동안 한번에 1 l의 투석완충용액 (20 mM CAPS, pH 11.0)을 사용하고 4°C에서 적어도 3번의 투석을 수행하여 단백질을 refolding하였다.

재조합 단백질은 N 말단에 부착된 6개의 histidine (HisTag)과 nickel-nitrilotriacetic acid (Ni-NTA) agarose (Qiagen, Valencia, CA, USA)의 결합에 의한 원리를 이용하여 정제하였다. 단백질 부유액 15 ml을 2 ml Ni-NTA와 4°C에서 1시간 동안 회전시키면서 결합시킨 다음 column에 걸러 10 ml의 세척용액 (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole, pH 8.0)으로 5회 씻어준 후 Ni-NTA agarose에 결합된 재조합단백질을 1 ml 용출용액 (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 250 mM imidazole, pH 8.0)으로 5회 용출하였다. 이렇게 정제한 재조합 주의막단백질 (rMspA)은 *E. coli* 내독소의 오염이 예상되어 내독소가 polymyxin-B에 부착하는 원리를 이용, polymyxin-B agarose (Sigma, St. Louis, MO, USA) column에 rMspA를 내려 내독소를 제거하였다. 재조합단백질의 확실한 탈변성을 위해 인산완충용액 (pH 7.4)으로 4°C에서 12시간씩 3회 투석하였다. 재조합단백질의 순도를 확인하기 위해서 세척용액 및 용출용액으로 얻은 분획의 일부 (10  $\mu$ l)를 취해 SDS-PAGE 및 immunoblot으로 확인하였다. Immunoblot에 사용한 항체는 *T. maltophilum*의 whole cell lysate를 닭 (White Leghorn)에 피하주사한 뒤 얻은 난황에서 분리한 immunoglobulin (anti-*T. maltophilum* IgY)과 이차항체로 alkaline phosphatase (AP)-labeled goat anti-chicken IgY (Jackson Immuno Research Laboratories, West Grove, PA, USA)였다 (Park *et al.*, 2002). AP의 기질로 66  $\mu$ l의 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (50 mg/ml)와 33  $\mu$ l의 nitro blue tetrazolium (50 mg/ml)을 10 ml의 AP 완충용액 (100 mM Tris-HCl pH 9.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>)에 혼합한 것을 사용하여 나타나는 발색반응을 관찰하였다. rMspA는 bicinchoninic acid 단백질 정량 kit (Pierce, Rockford, IL, USA)을 사용하여 정량하였다.

### 세포 배양

치은섬유아세포는 건강한 사람으로부터 치은조직을 채취하여 Hank's balanced salt 용액 (100 µg/ml penicillin G, 0.25 µg/ml streptomycin, 85 µg/ml amphotericin B 첨가)으로 3회 세척하여 잔존하는 혈액을 제거한 다음 세척하였다. 조직세편을 배양접시에 부착시킨 후 10% 우태아혈청을 함유한  $\alpha$ -minimal essential medium ( $\alpha$ -MEM)을 사용하여 치은섬유아세포가 조직세편으로부터 증식되어 단층이 형성될 때까지 세포배양기에서 배양하였다. Trypsin-EDTA로 처리하여 배양접시로부터 세포를 떼어내 새 배양접시에 분주하여 계대배양 하였으며 계대배양 5~6 세대의 세포를 실험에 사용하였다. 세포배양접시 (35-mm diameter)에  $1 \times 10^5$  개/ml의 치은섬유아세포를 분주한 후 10% 우태아 혈청이 함유된  $\alpha$ -MEM을 사용하여 단일층으로 배양하고 혈청이 없는 배지로 교환한 뒤 rMspA (10 µg/ml)를 처리하여 24시간 배양하였다. 세포는 RT-PCR을 수행하기 위한 RNA 추출 및 유세포 분석에 사용하였으며, 배양액은 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)로 사이토카인을 정량하기 위해 -70°C에 보관하였다. 자극하지 않은 세포를 음성대조군, IL-1 $\beta$  (300 pg/ml)를 처리한 세포를 양성대조군으로 하였다. 재조합 단백질이 나타내는 활성이 오염된 *E. coli* LPS와 사용한 시약에 의한 활성인지를 확인하기 위하여 유전자가 삽입되지 않은 pQE-30 벡터를 클로닝한 *E. coli*로부터 rMspA를 분리 정제할 때 사용한 동일한 시약과 방법으로 얻은 분획을 mock control로 사용하였다.

### 역전사 중합효소 연쇄반응 (Reverse transcription-Polymerase chain reaction)

rMspA를 처리한 세포로부터 Trizol 용액 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 이용하여 RNA를 분리하였다. RNA (1 µg)를 200 pmol의 oligo(dT)와 혼합하여 70°C에서 5분간 열처리하고 얼음에 넣어 식힌 후 RT-premix

(Bioneer, Daejun, Korea)와 혼합하여 42°C에서 1시간, 94°C에서 5분 열처리하여 cDNA를 합성하였다. 합성한 cDNA를 이용하여 염증성 사이토카인과 ICAM-1에 대한 primer (Table 1)를 사용하여 중합효소연쇄반응을 수행하였다.

### 유세포 측정분석 (Flow cytometric analysis)

rMspA로 24시간 동안 자극한 치은섬유세포를 세포분리용액 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)을 이용하여 배양접시로부터 떼어낸 후,  $1 \times 10^5$  세포를 5 ml의 Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS)을 이용하여 세척하였다. 세포를 100 µl의 DPBS에 부유시킨 뒤 0.5 µl (0.5 mg/ml)의 mouse anti-human ICAM-1 monoclonal Ab (BD Biosciences, Sanjose, CA, USA)와 4°C에서 30분간 반응시켰다. 세포를 DPBS로 세척한 후 0.5 µl (0.5 mg/ml)의 fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated goat anti-mouse IgG (BD Biosciences, Sanjose, CA, USA)와 4°C에서 30분간 반응시켰다. DPBS로 2회 세척 후 fluorescence-activated cell sorter (FACScalibur, BD, SanJose, CA, USA)를 이용하여 ICAM-1의 발현을 관찰하였다.

### ELISA

rMspA로 자극한 치은섬유아세포가 분비한 사이토카인을 ELISA로 측정하였다. IL-1 $\beta$ 와 IL-8의 정량은 R&D Systems<sup>TM</sup> (Minneapolis, MN, USA)의 ELISA kit를 이용하였고, IL-6의 정량은 Pierce<sup>TM</sup> (Rockford, IL, USA)의 ELISA kit를 사용하였다.

### 통계분석

rMspA를 처리한 것과 처리하지 않은 세포가 분비하는 사이토카인의 양이 유의한 차이를 나타내는지를 일원배치 분산분석 (ANOVA)과 비모수 Mann-Whitney test를

Table 1. PCR primer sequences

Molecules		Sequences(5' to 3')	Product sizes (bp)*	Annealing temperature (°C)**
ICAM-1	sense	AGAAATTGG CTCCATGGTGATCTC	390	60
	anti-sense	ACATGCAGCACCTCCTGTGACCA		
IL-1 $\beta$	sense	GATAAGCCCACTCTACAGCT	443	60
	anti-sense	ATTG GCCCTGAAAGGAGAGA		
IL-6	sense	ATGAACCTCTTCT CCACAAGCGC	540	65
	anti-sense	GAAGAGCCCTCAGGCTGGACTG		
IL-8	sense	ATGACTTCCAAGCTGGCCGTGGCT	224	60
	anti-sense	TCTCAGCCC TCTTCAAAAATTCTC		
GAPDH	sense	CACTGACACGTTGGCAGTGG	415	62
	anti-sense	CATGGAGAAGGCTGGGGCTC		

\*PCR product size in base pairs

\*\*Annealing temperature for PCR using the primer pairs

이용하여 평가하였다. 결과는 유의성 있는 차이를 나타내었다( $P < 0.05$ ).

## 실험 결과

### 제조합단백질의 발현 및 정제

PCR과 TA 클로닝으로 증폭하고 분리한 *mSpA* 유전자를 발현벡터 pQE-30을 이용, *E. coli*에 성공적으로 발현시켰으며 이를 Ni-NTA agarose를 이용하여 정제하였다. MspA는 *E. coli*에서 inclusion body를 형성하였으며 이를 세정제를 사용하여 수용화시킨 후 투석을 통해 탈변성시켰다. rMspA는 약 62 kDa의 단백질로서, 6개의 histidine을 비롯하여 pQE-30 유래의 아미노산 때문에 SDS-PAGE 수행 후 gel 상에서 자연상태의 단백질 (약 60 kDa)보다 약간 높은 위치의 밴드로 나타났다 (Fig. 1).

### 치은섬유아세포에서 rMspA에 의한 ICAM-1과 사이토카인의 mRNA 발현

치은섬유아세포를 rMspA로 24시간 처리한 후 ICAM-1과 염증유발 사이토카인을 RT-PCR에 의해서 분석하였다. ICAM-1과 IL-1 $\beta$ 의 mRNA는 자극하지 않은 세포에 비해 약간의 증가를 보였고, IL-6와 IL-8 mRNA의 발현은 높은 발현증가를 보였다 (Fig. 2). 양성대조군으로 IL-1 $\beta$ 를 사용하였으며 내독소 오염여부를 확인하기 위하여 처리한 mock control은 자극하지 않은 음성대조군과 같

은 양상을 보였다.

### 유세포 측정법을 이용한 ICAM-1 발현

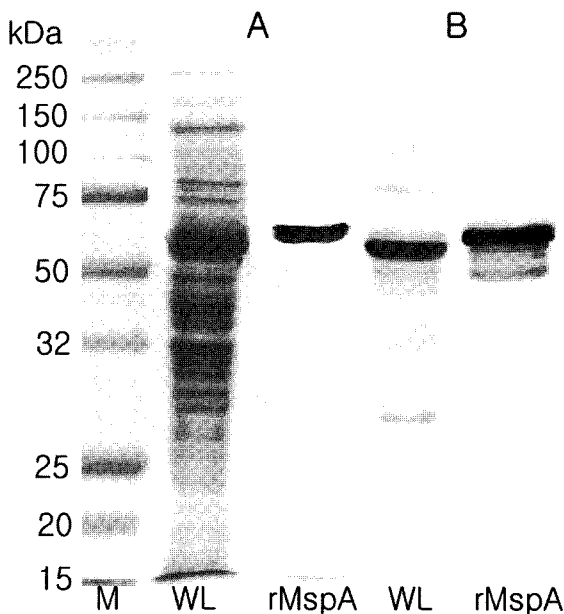
rMspA에 의한 치은섬유아세포의 ICAM-1 발현을 형광으로 표지된 항체를 사용하여 flow cytometry를 이용하여 관찰하였다. IL-1 $\beta$ 를 처리한 것과 rMspA를 처리한 치은섬유아세포에서는 처리하지 않은 세포에 비해 ICAM-1 발현이 증가되는 것이 관찰되었으며, 내독소 오염여부를 확인하기 위하여 처리한 mock control은 자극하지 않은 대조군과 같이 발현을 보이지 않았다 (Fig. 3)

### rMspA에 의한 IL-1 $\beta$ , IL-6 및 IL-8 분비

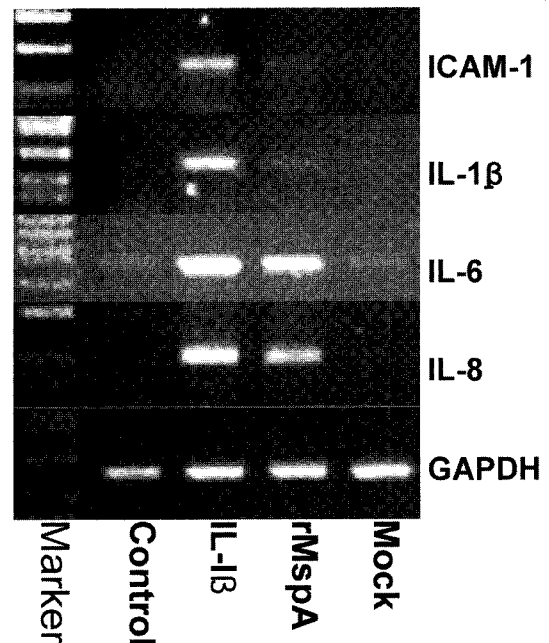
rMspA에 의한 치은섬유아세포의 사이토카인 분비량을 ELISA로 분석한 결과 IL-1 $\beta$ 는 측정한계 이하였으며 ( $< 3.9$  pg/ml), IL-6와 IL-8의 분비량은 자극하지 않은 세포와 mock control에 비해 유의한 차이를 보이며 증가하였다 ( $P < 0.05$ ) (Fig. 4).

## 고 찰

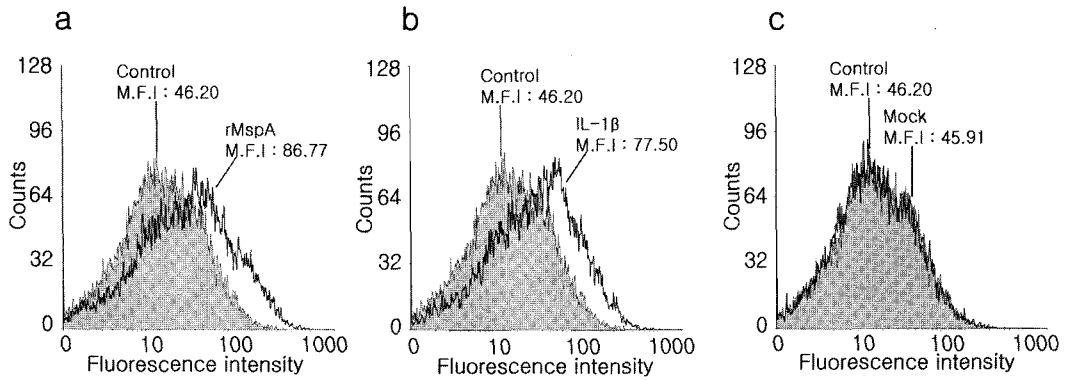
치주염환자의 치은연하치태에는 나선균이 높은 비율을 차지하고 있지만 이들의 병원성에 대한 연구는 배양이 잘 되는 *T. denticola*에 대해서만 집중적으로 진행되어



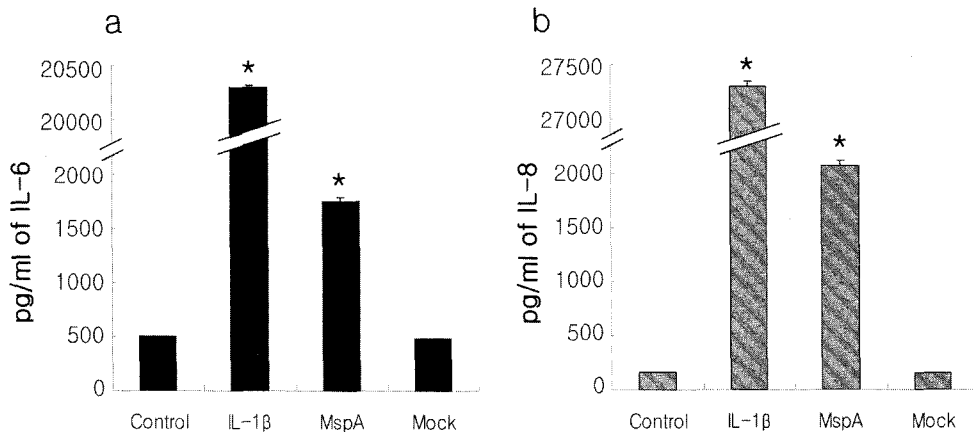
**Fig. 1.** SDS-PAGE (A) and western blot (B) of whole cell lysate (WL) and rMspA of *T. maltophilum*. Whole cell lysates (20  $\mu$ g/ml) and purified rMspA (5  $\mu$ g/ml) were separated by SDS-PAGE (10% polyacrylamide gel), transferred to a nitrocellulose membrane, and reacted with anti-*T. maltophilum* IgY.



**Fig. 2.** mRNA expression of ICAM-1 and proinflammatory cytokines in HGFs. HGFs were stimulated with rMspA (10  $\mu$ g/ml), IL-1 $\beta$  (300 pg/ml) or mock extract for 24 h. The total RNA was isolated from the cells, and the levels of mRNA for ICAM-1, IL-1 $\beta$ , IL-6, and IL-8 were determined by RT-PCR. Non-stimulated cells were included as a negative control. GAPDH, glutaraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.



**Fig. 3.** Flow cytometric analysis of ICAM-1 expression on HGFs. HGFs were stimulated with rMspA (a, 10 µg/ml), IL-1β (b, 300 pg/ml) or mock extract (c) for 24 h. ICAM-1 expression was analyzed by FACS using anti-human ICAM-1 MAb and FITC-labeled IgG. Non-stimulated cells were included as a negative control. M.F.I, mean fluorescence intensity.



**Fig. 4.** IL-6 and IL-8 levels secreted from HGFs. HGFs were stimulated with rMspA (10 µg/ml), IL-1β (300 pg/ml) or mock extract for 24 h. The conditioned medium was assayed for IL-6 (a) and IL-8 (b) by ELISA. Non-stimulated cells were included as a negative control. The asterisks indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) for IL-6 and IL-8 compared with the nontreated control values.

왔다. 지금까지 *T. denticola* 대한 다양한 병원성 인자, 즉 부착인자, 단백질분해효소, 세포독성인자 등이 밝혀졌으며 (Fenno *et al.*, 1998b; Wang *et al.*, 2001), 최근에는 유전체정보가 밝혀져 이 세균의 생리 및 병원성인자에 대한 연구가 가속화되고 있다 (Seshadri *et al.*, 2004). *T. denticola*의 주외막단백질인 53 kDa Msp의 역할로서 세포부착, 숙주세포에 pore형성, 그리고 칼슘저장고로부터 작용물질에 의한 칼슘방출의 억제 기능이 규명되었다 (Fenno *et al.*, 1998a, Wang *et al.*, 2002). 최근 치주염 환자에서 *T. denticola*보다 더 높은 빈도로 검출되는 *T. lecithinolyticum*과 *T. maltophilum*의 외막단백질에 대한 역할규명은 상동성이 높은 두 단백질의 공통적 기능을 제시함으로써 구강나선균의 병인론에 대해 더 많은 이해를 가져왔다 (Lee *et al.*, 2005). 본 연구에서는 *T. maltophilum*의 치주병인론에 대한 이해를 넓히고자 이 세균 외막에 있는 주단백질인 MspA의 유전자를 *E. coli*에 클로닝하여 얻은 재조합단백질을 이용하여 치은섬유아세

포에서 병원성과 관련된 역할을 규명하였다. 재조합 단백질을 만드는 과정에서 *E. coli* 내독소 오염이 예상되어 polymyxin-B agarose를 이용하여 내독소를 제거함으로써 내독소에 의한 숙주세포 면역반응을 배제할 수 있었다. 세균의 주외막단백질은 감염 시 숙주세포와 가장 먼저 접촉하는 부위로서 세균에 따라 항원성을 나타내기도 하고 숙주세포에 결합하여 집락을 형성하는데 관여하며, 또한 숙주세포를 자극하여 여러 가지 병인성기작을 유도하는 것으로 알려져 있다 (Fenno *et al.*, 1998b; Schenkein *et al.*, 1999).

치은섬유아세포는 치은에 가장 많은 부분을 구성하고 있는 세포로 치주균에 의해 자극을 받아서 면역반응을 나타내어 염증유도 및 질환의 진행을 담당한다. *T. maltophilum*이 숙주내에 존재함에 있어서 세포외막단백질 중 주를 이루는 단백질인 MspA는 치은섬유아세포와의 접촉이 많을 것이라 추측할 수 있다. 특히 구강나선균의 외막은 세포로부터 쉽게 유리될 수 있으며 이로써

치은조직으로 침투가 용이하다. rMspA는 사람단핵구세포 및 치주인대세포를 사용한 이전의 연구결과와 같이 (Lee *et al.*, 2005) 치은섬유아세포에서도 IL-6, IL-8 및 ICAM-1의 발현을 증가시켰다. IL-1 $\beta$ 의 경우 mRNA 발현은 약간 증가하였으나 ELISA로 정량하였을 경우는 측정한 계 이하였으며 이는 이전의 치주인대세포에서 관찰된 결과와 일치한다.

IL-6는 다기능 사이토카인으로서 면역세포 자극, 파골세포 형성 그리고 섬유아세포로부터 IL-2를 분비시킨다 (Dennison *et al.*, 1997). 특히 IL-6는 직접 또는 간접적으로 파골세포에 의한 골파괴를 자극하며 (Schwartz *et al.*, 1997), 염증성 치은이나 병변조직에서 증가하는 것으로 알려져 있다 (Irwin *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 1995). 기존에 많은 연구에서 그람음성 세균의 lipopolysaccharide에 의해 IL-6가 분비되며 이에 의해 골흡수가 일어난다는 보고 (Yuko *et al.*, 1997)에 비추어보면 *T. maltophilum*의 주외막단백질에 의한 IL-6 분비유도가 골흡수와도 연관성이 있음을 시사한다.

IL-8은 chemokine superfamily의 구성원으로 주로 LPS에 의해서 대식세포, 접합상피세포 그리고 내피세포에서 분비되는 것으로 알려져 있다 (Kornman *et al.*, 1997). IL-8은 중성구를 감염부위로 유도하여 염증반응을 유발한다 (Page *et al.*, 1997). rMspA는 치은섬유아세포에서 IL-8 분비를 촉진하여 염증세포가 감염부위로 이동하는 것을 도와 국소적 과잉 면역반응을 일으켜 치주염의 발병과 진행에 영향을 줄 것으로 생각된다.

ICAM-1은 세포표면 부착인자로서 백혈구를 혈관내피세포에 부착시킨 후 내피세포 밖으로 유출시켜 염증부위로 유도한다. 치은섬유아세포에서 치주병원균에 의한 ICAM-1 발현에 관련된 것으로는 *P. gingivalis*의 LPS와 fimbriae, *P. intermedia*의 glycoprotein, *Eikenella corrodens*의 N-acetyl-D-galactosamine-specific lectin-like substance 등이 있다 (Masaka *et al.*, 1999; Sugiyama *et al.*, 2002; Yamada *et al.*, 2002). 또한 ICAM-1은 lymphocyte function-associated antigen-1에 ligand로 작용하여 세포활성 면역조절 사이토카인생산 등 여러 가지 면역반응을 조절한다 (Hayashi *et al.*, 1994).

본 연구에서 얻은 결과를 요약하면 치주염 및 근관내염과 관련있는 *T. maltophilum*의 주외막단백질 MspA는 치은섬유아세포에서 IL-6, IL-8, ICAM-1의 발현을 증가시켰다. 이로써 *T. maltophilum*이 감염부위로 염증세포의 이동을 유도하고 또한 염증세포의 체류를 도와 염증반응을 촉진할 것으로 생각된다.

## 감사의 글

본 연구는 보건복지부 보건의료기술진흥사업 연구비 (03-

PJ1-PG3-20200-0004) 및 서울대학교 신임교수 연구정착금 지원사업 연구비로 수행되었음.

## Reference

- Choi BK, Paster BJ, Dewhirst FE, and Göbel UB: Diversity of cultivable and uncultivable oral spirochetes from a patient with severe destructive periodontitis. *Infect Immun.* **62**: 1889-1895, 1994.
- Dennison DK and Van Dyke TE: The acute inflammatory response and the role of phagocytic cells in periodontal health and disease. *Periodontol* **2000**. **14**: 54-78, 1997.
- Dewhirst FE, Tamer MA, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA, Boches SK, Galvin JL, and Pater BJ: The diversity of periodontal spirochetes by 16S rRNA analysis. *Oral Microbiol Immunol.* **15**: 196-202, 2000.
- Fenno JC, Hannam PM, Leung WK, Tamura M, Uitto VJ, and McBride BC: Cytopathic effects of the major surface protein and the chymotrypsinlike protease of *Treponema denticola*. *Infect Immun.* **66**: 1869-1877, 1998a.
- Fenno JC and McBride BC: Virulence factors of oral treponemes. *Anaerobe* **4**: 1-17, 1998b.
- Graves DT: The potential role of chemokines and inflammatory cytokines in periodontal disease progression. *Clin Infect Dis.* **28**: 82-90, 1999.
- Hayashi J, Saito I, Ishikawa I, and Miyasaka N: Effects of cytokines and periodontopathic bacteria on the leukocyte function-associated antigen 1/intercellular adhesion molecule 1 pathway in gingival fibroblasts in adult periodontitis. *Infect Immun.* **62**: 5205-5212, 1994.
- Heuner K, Choi BK, Schade R, Moter A, Otto A, and Göbel UB: Cloning and characterization of a gene (*mSpA*) encoding the major sheath protein of *Treponema maltophilum* ATCC 51939. *J Bacteriol.* **181**: 1025-1029, 1999.
- Irwin CR and Myrillas TT: The role of IL-6 in the pathogenesis of periodontal disease. *Oral Dis.* **4**: 43-47, 1998.
- Kim CK, Yoo YJ, Kim YH, and Choi BK: Functional characterization of the major outer membrane protein (MspTL) of *Treponema lecithinolyticum*. *J Bacteriol Virol.* **32**: 47-54, 2002.
- Kornman KS, Page RC, and Tonetti MS: The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players. *Periodontol* **2000**. **14**: 33-53, 1997.
- Lee HJ, Kang IK, Chung CP, and Choi SM: The subgingival microflora and gingival crevicular fluid cytokines in refractory periodontitis. *J Clin Periodontol.* **22**: 885-890, 1995.
- Lee SH, Kim KK, and Choi BK: Upregulation of intercellular adhesion molecule 1 and proinflammatory cytokines by the major surface proteins of *Treponema maltophilum* and *Treponema lecithinolyticum*, the phylogenetic group IV oral spirochetes associated with periodontitis and endodontic infections. *Infect Immun.* **73**: 268-276, 2005.
- Masaka T, Hayashi J, and Ishikawa I: Soluble CD14-dependent intercellular adhesion molecular-1 induction by *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide in human

- gingival fibroblasts. *J Periodontol.* **70**: 772-8, 1999.
- Moter A, Hoenig C, Choi BK, Riep B, and Göbel UB: Molecular epidemiology of oral treponemes associated with periodontal disease. *J Clin Microbiol.* **36**: 1399-1403, 1998.
- Page RC, Offenbacher S, Schroeder HE, Seymour GJ, and Kornman KS: Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. *Periodontol 2000.* **14**: 216-48, 1997.
- Park KK, Heuner K, Gobel UB, Yoo YJ, Kim CK, and Choi BK: Cloning and characterization of a major surface protein (MspTL) of *Treponema lecithinolyticum* associated with rapidly progressive periodontitis. *FEMS Microbiol Lett.* **207**: 185-192, 2002.
- Roodman GD: Role of cytokines in the regulation of bone resorption. *Calcif Tissue Int.* **53**: 94-98, 1992.
- Seshadri R, Myers GS, Tettelin H, Eisen JA, Heidelberg JF, Dodson RJ, Davidsen TM, DeBoy RT, Fouts DE, Haft DH, Selengut J, Ren Q, Brinkac LM, Madupu R, Kolonay J, Durkin SA, Daugherty SC, Shetty J, Shvartsbeyn A, Gebregeorgis E, Geer K, Tsegaye G, Malek J, Ayodeji B, Shatsman S, McLeod MP, Smajs D, Howell JK, Pal S, Amin A, Vashisth P, McNeill TZ, Xiang Q, Sodergren E, Baca E, Weinstock GM, Norris SJ, Fraser CM, and Paulsen IT: Comparison of the genome of the oral pathogen *Treponema denticola* with other spirochete genomes. *PNAS.* **101**: 5646-5151, 2004.
- Schwartz Z, Goultchin J, Dean DD, Boyan BD. Mechanisms of alveolar bone destruction in periodontitis. *Periodontol 2000.* **14**: 158-172, 1997.
- Sugiyama A, Uehara A, Iki K, Matsushita K, Nakamura R, Ogawa T, Sugawara S, and Takada H: Activation of human gingival epithelial cells by cell-surface components of black-pigmented bacteria: augmentation of production of interleukin-8, granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and expression of intercellular adhesion molecule 1. *J Med Microbiol.* **51**: 27-33, 2002.
- Wang Q, Ko KS, Kapus A, McCulloch CA, and Ellen R: A spirochete surface protein uncouples store-operated calcium channels in fibroblasts: a novel cytotoxic mechanism. *J Biol Chem.* **276**: 23056-23064, 2001.
- Wyss C, Choi BK, Schupbach P, Moter A, Heuner K, Guggenheim B, and Göbel UB: *Treponema lecithinolyticum* sp. Nov., a small saccharolytic spirochete with phospholipase a and C activities associated with periodontal diseases. *Int J Syst Bacteriol.* **49**: 1329-1339, 1999.
- Wyss C, Choi BK, Schupbach P, Guggenheim B, Göbel UB. *Treponema maltophilum* sp. nov., a small oral spirochete isolated from human periodontal lesions. *Int J Syst Bacteriol.* **46**: 745-752, 1996
- Yamada M, Nakae H, Yumoto H, Shinohara C, Ebisu S, and Matsuo T: N-acetyl-D-galactosamine specific lectin of *Eikenella corrodens* induces intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) production by human oral epithelial cells. *J Med Microbiol.* **51**: 1080-1089, 2002.
- Yuko M, Hiroyuki T, Shigeo K, and Shigemasa H: *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide-stimulated bone resorption via CD14 is inhibited by broad-spectrum antibiotics. *Infect Immun.* **65**: 3513-3519, 1997.