

# *Fusobacterium nucleatum* 추출물이 사람 치은 섬유아세포와 HOS 941세포의 성장과 마우스 비장세포의 TNF- $\alpha$ 생성에 미치는 효과

전북대학교 치과대학 구강내과학교실<sup>1</sup>, 구강미생물학교실<sup>2</sup>, 구강생체과학연구소<sup>3</sup>

오희명<sup>1</sup> · 송요한<sup>2,3</sup> · 신금백<sup>1,3</sup>

## 목 차

- I. 서 론
- II. 재료 및 방법
- III. 결 과
- IV. 고 찰
- V. 결 론
- 참고문헌
- 영문초록

## I. 서 론

*Fusobacterium nucleatum*은 치은염의 원인균으로서 가장 빈번히 검출되며 치주조직의 파괴에도 중요한 원인균중의 하나로 작용하는 그람음성 혐기성 세균이다<sup>1)</sup>. *F. nucleatum*은 치주질환이 없는 건강한 조직의 치은연하 치태에서도 가장 빈번히 검출되는 세균들중의 하나이며, 치주질환이 있는 조직에서는 그 수가 약 10배 정도 증가되어 검출된다고 보고되었다<sup>1-4)</sup>. *F. nucleatum*은 위장관이나 비노생식기관과 같은 부위의 상주균으로서도 발견되며<sup>5)</sup> 혐기성 균혈증, 수막염, 농양, 상치부위 그리고 복강 또는 산부인과영역의 감염 등에서 검출되기도 한다<sup>6, 7)</sup>. 또한 *F. nucleatum*이 면역계에 미치는 영향에

관한 연구로서, 림프구분열의 강한 inducer로 작용하고<sup>8)</sup>, B림프구의 polyclonal activator로 작용하며<sup>9)</sup>, 치주질환이 있는 부위에서 림프구의 비특이적 활성을 야기한다고 보고되었다<sup>10)</sup>. 비록 fusobacteria와 림프구간 부착에 대한 분자수준에서의 기전은 대부분이 알려져 있지 않지만, *F. nucleatum* 191균주가 lectin-like moiety를 발현하며 이 moiety가 부착에 관여하여 림프구를 활성화시킨다는 보고가 있다<sup>8)</sup>. Tumor necrosis factor alpha(TNF- $\alpha$ )는 그람음성 세균의 지질다당체에 의하여 유도되는 cytokine의 하나로서, 주로 지질다당체에 의해 자극된 mononuclear phagocyte에 의하여 생성되나 항원에 의해 자극된 T세포, NK세포 및 비만세포에 의해서도 생성된다고 알려져 있으며, 염증반응의 중요한 매개체로 작용한다<sup>11-14)</sup>.

치주염은 특정 세균에 의하여 야기되는 만성적인 염증성 질환이다. 세균은 치주조직의 염증반응을 활성화시켜 치주조직의 collagen이나 골의 파괴를 야기한다. 세균이 치주염을 일으키는 데 절대적이긴 하지만 어떠한 종류의 세균이 얼마만큼 존재해야 특정 치주질환을 야기하는지는 아직 알려지지 않은 사실이 많으며, 많은 만성질환에 있어서 비록 질병을 처음에 일으키지는 않지만 질병의 심도에 변화를 줄 수 있는 인자로

cytokine을 들 수 있다. 치주질환을 야기하는 세균은 주로 그람음성 혐기성 세균이며, 이러한 그람음성 세균의 세포벽에 존재하는 물질들이 여러 가지 면역세포를 자극하여 cytokine을 생성시킨다. 이에 관한 연구로는 *Actinobacillus actinomycesemcomitans*와 *Porphyromonas gingivalis* 등 치주질환을 야기하는 세균들의 세포성분이 여러 면역세포들을 자극하여 interleukin-1(IL-1), TNF- $\alpha$ , interferon 및 metalloproteinases 등의 생성을 야기하는데<sup>15-24)</sup> 그 중에서도 IL-1과 TNF- $\alpha$ 가 골흡수를 포함하는 치주조직의 파괴에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다<sup>25-30)</sup>. 그리고 IL-1과 TNF- $\alpha$ 는 neutrophil의 기능 이상을 초래하기도 하며<sup>31)</sup>, 역으로 만성 염증조직으로부터 유래된 neutrophil은 이들 cytokine의 발현을 증가시킨다고 하였다<sup>32)</sup>. 또한 최근에는 IL-1과 TNF- $\alpha$ 의 antagonist가 실험적으로 야기된 치주염에서 염증반응과 골흡수를 감소 또는 차단시킨다고 보고되었다<sup>33, 34)</sup>. TNF- $\alpha$ 는 주로 macrophage와 T세포에서 생성되는데<sup>35)</sup>, 당뇨병이 있는 치주염환자<sup>36, 37)</sup>와 흡연을 하는 치주염환자<sup>38)</sup>에서도 대조군의 치주염환자에 비해 그 생성이 증가된다고 보고되었으며, 치주질환환자에서 치주질환이 임상적으로 관찰되기 이전에 검출되어 치주질환을 진단하는 indicator로서 TNF- $\alpha$ 가 이용될 수 있다고 보고된 바 있으며<sup>16)</sup>, 만성 성인형 치주염에서 그 mRNA의 발현이 유의성있게 증가되어 그 중요성이 입증된바 있다<sup>39)</sup>. 따라서 IL-1과 TNF- $\alpha$ 는 치주질환의 진행에 있어서 매우 중요한 요인으로 간주되고 있다. 또한 치주질환을 야기 하는 주요한 세균중의 하나인 *P. gingivalis*의 세포추출물이 사람 치은 섬유아세포에 세포독성을 나타내고 cytokine의 생성을 야기한다는 보고가 있으며<sup>40-43)</sup>, 근래에는 *P. gingivalis*의 배양상청액으로 유리되는 세포외막 vesicle이 섬유아세포에서 세포독성을 나타내고<sup>44, 45)</sup>, 부착에 관여하며<sup>46)</sup>, 단백질분해효소와 관계가 있는 등<sup>44, 47)</sup>의 새로운 사실들이 밝혀지고 있다. 그러나 이러한 세포독성 물질에 관한 연구는 주로 *P. gingivalis*의 초음파추출물이나 지질다당체가 사람 치은 섬유아세포에 미치는 영

향에 집중되어 있는 형편이며, 세포외막이나 세포외막vesicle의 세포독성에 관한 연구는 미미한 실정이다. 또한 최근에 *F. nucleatum*의 초음파처리물질이 치수로부터 유래된 accessory cells의 기능에 영향을 미친다고 보고된 바 있으나<sup>48)</sup>, *F. nucleatum*의 세포벽성분 또는 세균추출물에 따른 사람 치은 섬유아세포에 대한 영향은 조사되어 있지 않으며, 이러한 성분들이 치주질환에 중요하게 관여하는 TNF- $\alpha$ 생성에 미치는 영향도 조사되어 있지 않은 실정이다.

따라서 저자는 이러한 점에 착안하여 치주질환과 관련된 주요 세균중의 하나인 *F. nucleatum*의 병원성 규명 차원에서, *F. nucleatum* 25586 균주로부터 세포외막과 지질다당체를, 그리고 그 세균배양액으로부터 세포외막vesicle을 추출하여, 첫째 이들 성분들 중에서 어느 성분이 얼마만큼 세포독성을 나타내는지를 알아보기 위하여 사람 치은 섬유아세포, 그리고 조골세포의 표현형을 갖는 human osteosarcoma cell line ATCC 941(HOS 941)세포를 대상으로 MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] assay를 통해 세포성장억제효과를 조사하였으며, 둘째 치주질환을 악화시키는데 중요한 역할을 하는 cytokine인 TNF- $\alpha$ 의 생성과 발현에 이들 추출물이 얼마나 영향을 미치는지를 알아보기 위하여 마우스 비장세포를 대상으로 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)법과 역전사중합효소연쇄반응(reverse transcription-polymerase chain reaction: RT-PCR)법을 통해 이들 추출물에 의한 TNF- $\alpha$  생성량과 TNF- $\alpha$  mRNA의 발현양상을 조사하여 다소의 지견을 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 세균 및 배양

실험을 위해 *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586 균주를 사용하였으며, 배양은 Kaur와 Falkler<sup>49)</sup>의 방법에 따라 다음과 같이 시

행하였다. 즉, 냉동건조된 세균을 5 $\mu$ g/ml의 hemin과 1 $\mu$ g/ml의 menadione(vitamin K)이 포함된 brain heart infusion broth(BHI) 배지에서 85% 질소, 10% 수소, 5% 이산화탄소 가스가 들어있는 혐기성 배양기를 이용하여 37 $^{\circ}$ C에서 48시간 배양하였으며, 배양시에는 항상 전 배양한 후 계대배양하여 사용하였고, 그람염색을 시행하여 확인하였다.

## 2. 세균 세포벽 성분의 추출

### (1) 세포외막 추출

세포외막의 추출은 Boyd와 McBride<sup>50)</sup>의 방법에 따라 다음과 같이 시행하였다. 즉, *F. nucleatum* 25586 균주를 5liter씩 48시간 배양하고 10,000xg로 15분간 원심분리한 후 침전된 세균을 0.15M NaCl로 2회 세척한 다음 0.15M NaCl 과 0.01M EDTA가 포함된 0.05M sodium phosphate 완충액(pH 7.4) 75ml에 현탁한 후 상온에서 30분 동안 방치하였다. 그 후 현탁액을 26G 주사바늘에 손힘으로 수회 통과시킨 다음 10,000xg로 20분간 원심분리하였다. 원심분리한 상청액을 80,000xg로 2시간 동안 원심분리한 후 침전물을 모아 증류수로 2회 세척한 후 냉동건조하였다.

### (2) 세포외막vesicle 추출

세포외막vesicle의 추출은 Grenier와 Mayland<sup>51)</sup>의 방법에 따라 다음과 같이 시행하였다. 즉, *F. nucleatum* 25586 균주를 5liter씩 48시간 배양한 후, 그 배양상청액에 ammonium sulfate를 liter당 240g을 첨가하고 그 혼합물을 20,000xg로 40분간 원심분리하였다. 원심분리한 침전물을 0.5mM dithiothreitol이 포함된 50mM Tris-HCl 완충액(pH 9.5) 30ml에 현탁한 후 16시간 동안 같은 완충액으로 투석하고 27,000xg로 40분간 원심분리하였다. 그 후 0.5mM dithiothreitol이 포함된 50mM Tris-HCl 완충액(pH 7.2)에 다시 현탁하여 27,000xg로 40분간 원심분리한 후 50mM Tris-HCl 완충액(pH 7.2) 1.5ml에 현탁한 후 냉동건조하였다.

### (3) 지질다당체 추출

지질다당체의 추출은 Westphal과 Jann<sup>52)</sup>의 방법에 따라 다음과 같이 시행하였다. 즉, *F. nucleatum* 25586 균주를 5liter씩 48시간 배양하여 10,000xg로 15분간 원심분리한 후 0.15M NaCl로 세척하고 냉동건조한 후 끓인 증류수를 건조된 세균에 최종 용량이 350ml이 되도록 첨가하여 현탁한 후 같은 양의 90% phenol액을 첨가하고 온도를 유지하도록 하였다. 15분 후에 그 혼합액을 얼음에 담가 급격히 식힌 다음 1,500xg로 20분간 원심분리하여 위층을 분리한 후 아래층에 350ml의 따뜻한 물(68 $^{\circ}$ C)을 넣어 같은 방법으로 재추출하였다. 그 후 모아진 첫 번째, 두 번째 추출물을 증류수로 투석하였고 투석한 시료를 100,000xg에서 2시간 동안 원심분리한 후 증류수에 2회 세척한 후 냉동건조하였다.

## 3. 세포주 및 배양

실험을 위해 사람 치은 섬유아세포와 human osteosarcoma cell line ATCC 941(HOS 941)세포를 사용하였으며, RPMI-1640 배지에 10%의 fetal bovine serum(FBS, Gibco), 100U/ml의 penicillin, 100 $\mu$ g/ml의 streptomycin을 첨가하여, 5% CO<sub>2</sub>, 37 $^{\circ}$ C, 100% 습도 조건의 배양기에서 배양하였다.

## 4. MTT assay

세포 성장억제 실험을 위해 Carmichael등<sup>53)</sup>과 Loosdrecht등<sup>54)</sup>의 방법에 따라 다음과 같이 MTT assay를 시행하였다. 즉, 전 배양된 사람 치은 섬유아세포와 HOS 941세포를 96-well microtiter plate를 이용하여 well당 5 $\times$ 10<sup>4</sup>이 되게 분주한 후, *F. nucleatum* 25586 균주의 추출물을 10, 50, 200 $\mu$ g/ml의 농도로 첨가한 다음 12시간 배양한 후, 각 well에 2mg/ml농도의 MTT 용액을 50 $\mu$ l씩 넣어 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 조건의 배양기에서 4시간 반응시킨 후, 배지는 제거하고 DMSO를 well당 100 $\mu$ l씩 넣어서 5분에 걸쳐 blue formazan결정을 용해시킨 다음 ELISA

reader로 540nm에서 흡광도를 측정하였다. 한편 *F. nucleatum* 25586 균주의 추출물을 첨가하지 않은 균을 대조군으로 하였다.

## 5. 마우스 비장세포의 준비

마우스 비장세포는 Delvine등<sup>55)</sup>의 방법에 따라 다음과 같이 준비하였다. 즉, 약 8주령의 암컷 BALB/c 마우스를 경추탈구법으로 희생시켜 비장을 무균적으로 적출한 후 멸균된 슬라이드글라스를 이용하여, 비장세포를 10% FBS가 포함된 RPMI배지에 유리시킨 후 멸균된 거즈를 통과시켜 세포피나 debris를 제거하였다. 그 후 이 세포현탁액을 50ml 원심용 시험관(Falcon, CA, USA)에 옮겨 200xg로 10분간 원침한 후 cell pellet을 ACK buffer(Tris-buffered ammonium chloride)에 5분간 현탁시켜 적혈구를 제거하였으며, 0.2% Trypan blue로 염색하여 살아있는 세포수가 95% 이상임을 확인하였다. 그 후 동일한 RPMI배지에  $1 \times 10^6$  cells/ml의 농도로 부유시켜 실험에 이용하였다.

## 6. *F. nucleatum* 추출물이 마우스 비장세포의 TNF- $\alpha$ 생성에 미치는 영향

준비된 마우스 비장세포를 96-well microtiter plate를 이용하여 well당  $2 \times 10^5$ 이 되게 분주한 후, *F. nucleatum* 25586 균주의 추출물을 10, 50  $\mu$ g/ml의 농도로 첨가하였으며, 또한 모든 군에 T 림프구의 mitogen인 concanavalin A를 20U/ml 농도로 첨가하였다. 그 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건의 배양기에서 12, 24, 48시간 배양하였으며, 세포배양상청액을 TNF- $\alpha$  측정에 이용하였다. TNF- $\alpha$  측정은 R & D systems사의 마우스 TNF 측정 kit(TNF, Catalog No., MTA00, Minneapolis, USA)를 이용, 제조사의 지시에 따라 ELISA를 시행하였다.

## 7. 마우스 비장세포로부터 RNA의 분리

마우스 비장세포로부터의 RNA의 분리는

Chomczynski등<sup>56)</sup>의 방법에 따라 다음과 같이 시행하였다. 즉,  $1 \times 10^6$ /ml 농도의 마우스 비장세포 3ml를 4,000rpm에서 5분간 원심분리한 후 침전물을 PBS(pH 7.2)로 세척하여 solution D(4M Guanidium Thiocyanate, 25mM Sodium Citrate /pH 7.0, 0.5% Sarcosyl, 0.1M 2-mercaptoethanol) 500 $\mu$ l, 2M sodium acetate(pH 4.0) 50  $\mu$ l, phenol 500 $\mu$ l(pH 4.0), chloroform-isoamyl alcohol(49:1) 100 $\mu$ l를 차례대로 넣고 30초 동안 혼합한 후 얼음속에서 15분 동안 방치하였다. 그 후 원심분리하여(10,000xg, 20min, 4°C) 상층액에 동량의 phenol을 넣고 혼합하여 원심분리한 후(10,000rpm, 10min)상층액을 옮겼다. 여기에 동량의 chloroform을 잘 혼합하여 같은 방법으로 원심분리하고 상층액을 동량의 isopropanol로 침전시키고 75% 에탄올로 2회 세척(7,500rpm, 8min)한 후 말려서 0.1% diethyl pyrocarbonate (DEPC)가 첨가된 증류수에 녹였다. 이것을 UV spectrophotometer (Perkin-Elmer)를 이용하여 정량하였고 나머지는 RT-PCR에 이용하였다.

## 8. 역전사 증합 효소 연쇄반응(RT-PCR)

PCR 시험관을 이용하여 얼음속에서 준비된 RNA 2 $\mu$ l(1 $\mu$ g)에 Oligo(dT) 15 primer 2 $\mu$ l(0.5  $\mu$ g), RNase-free water 6 $\mu$ l를 넣고 70°C에서 5분간 열처리 한 다음 상온으로 식힌 후, 10 $\times$  reverse transcription buffer 2 $\mu$ l, 25mM MgCl<sub>2</sub> 4 $\mu$ l, 10mM dNTP 2 $\mu$ l, RNAase inhibitor 0.5 $\mu$ l, AMV reverse transcriptase 0.7 $\mu$ l, nuclease-free water 0.8 $\mu$ l를 가하여 총 20 $\mu$ l가 되게 한 다음 혼합한 후, 42°C에서 30분간 반응시켜 상보 cDNA를 합성시켰고, 99°C에서 5분간, 5°C에서 5분간 반응시켜 역전사효소를 불활성화시키고 cDNA로의 부착을 억제시킨 후 증합효소연쇄반응을 시행하였다.

PCR반응혼합액의 구성은 다음과 같았다. 즉, cDNA 4 $\mu$ l(TNF- $\alpha$  2 : -actin 1), upstream primer 2 $\mu$ l ; TNF (actin은 1 $\mu$ l), downstream primer 2 $\mu$ l ; TNF (actin은 1 $\mu$ l), 2.5mM dNTP 2 $\mu$ l, 10 $\times$  reaction B 2 $\mu$ l, 10mM Mgcl<sub>2</sub> 1 $\mu$ l, Taq

polymerase 0.5 $\mu$ l(stock ; 5U, TaKaRa)를 넣은 후 nuclease-free water를 총 20 $\mu$ l가 되게 가하였다. 반응은 Perkin-Elmer Cetus thermocycler (Cetus Corp., Emeryville, Coleman, U.S.A)를 이용하였으며, 반응조건은 94°C에서 4분 동안 pre-denaturation한 후, 94°C에서 30초 동안 변성반응(denaturation), 55°C에서 30초 동안 결합반응(annealing), 그리고 72°C에서 30초 동안 중합반응(extension)을 25회 반복하고, 마지막으로 72°C에서 7분동안 dwelling하였다. 증폭된 상보 DNA는 1.0% agarose gel상에서 1X TAE buffer로 90 volt에서 전기영동한 후 관찰하였으며, RT-PCR에 이용한 마우스 TNF- $\alpha$ 와  $\beta$ -actin primer의 sequences는 다음과 같았다.

TNF- $\alpha$

upper primer : 5'-CCT GTA GCC CAC GTC  
GTA GC-3'

lower primer : 5'-TTG ACC TCA GCG CTG  
AGT TG-3'

$\beta$ -actin

upper primer : 5'-GGC ACC ACA CCT TCT  
ACA ATG AG-3'

lower primer : 5'-TGT CCC TGT ATG CCT  
CTG GTC GTA-3'

### III. 결 과

#### 1. *F. nucleatum* 추출물이 사람 치은 섬유아 세포와 HOS 941세포의 성장에 미치는 영향

*F. nucleatum* 추출물이 사람 치은 섬유아 세포와 HOS 941세포의 성장에 미치는 영향에 관해서는, 표 1에서와 같이 사람 치은 섬유아 세포의 경우 *F. nucleatum* 25586 균주 추출물의 성분 에 따라 세포외막균의 경우 73~84%, 세포외막 vesicle균의 경우 78~95%, 지질다당체균의 경우 84~96%의 세포생존율을 보였으며, 추출물의 농도에 따라서는 농도가 증가함에 따라 세포생존율이 감소하였으나 농도에 크게 영향받지는 않았다. 한편 HOS 941세포의 경우에는 표 2에서

와 같이 *F. nucleatum* 25586 균주 추출물의 성분 에 따라 세포외막균의 경우 72~88%, 세포외막 vesicle균의 경우 83~98%, 지질다당체균의 경우 82~100%의 세포생존율을 보였으며, 대체적으로 사람 치은 섬유아세포에서와 비슷한 양상을 보였다.

#### 2. *F. nucleatum* 추출물이 마우스 비장세포의 TNF- $\alpha$ 생성에 미치는 영향

*F. nucleatum* 25586 균주의 추출물이 마우스 비장세포의 TNF- $\alpha$  생성에 미치는 영향에 관해서는, 그림 1, 2에서와 같이 자극을 시키지 않은 대조군의 경우 TNF- $\alpha$ 의 생성이 아주 낮게 나타났다. 그리고 추출물의 성분 에 따라서는 세포외막균의 경우 세포외막vesicle균과 지질다당체균의 경우에서 보다 TNF- $\alpha$  생성이 높게 나타났으며, 세포외막vesicle균의 경우 가장 낮게 나타났다. 또한 12, 24, 48시간 동안 배양하면서 시간대별로 조사한 결과 전반적으로 큰 차이를 보이지 않아, *F. nucleatum* 25586 균주의 추출물 에 의한 TNF- $\alpha$ 의 생성이 12시간 이전에 이루어짐을 알 수 있었다. 그리고 *F. nucleatum* 25586 균주 추출물의 농도 10 $\mu$ g/ml의 경우 세포외막균에서 TNF- $\alpha$  생성이 가장 높게 나타났으나, 50 $\mu$ g/ml의 경우에는 세균 전 세포군에서 가장 높게 나타났다. 한편 *F. nucleatum* 25586 균주 추출물의 농도 10 $\mu$ g/ml와 50 $\mu$ g/ml 사이에 TNF- $\alpha$  생성량에 있어서 큰 차이는 보이지 않았다.

#### 3. *F. nucleatum* 추출물이 마우스 비장세포의 TNF- $\alpha$ mRNA발현에 미치는 영향

*F. nucleatum* 25586 균주의 추출물이 마우스 비장세포의 TNF- $\alpha$  mRNA발현에 미치는 영향에 관해서는, 그림 3에서와 같이 TNF- $\alpha$  mRNA band가 *F. nucleatum* 25586 균주 추출물의 모든 균에서 관찰되었으며, 대조군에서는 아주 희미하게 관찰되었다. TNF- $\alpha$  mRNA가 가장 높게 발현된 균은 세균 전세포군과 세포외막균이었으며, 세포외막vesicle균에서 가장 낮게

**Table 1.** Cytotoxic activity of bacterial extracts from *F. nucleatum* ATCC 25586 strain on the human gingival fibroblasts

Bacterial extract	Concentration ( $\mu\text{g}$ dry weight/ml)	% viability <sup>a</sup>
		<i>F. nucleatum</i> ATCC 25586 strain
Outer membrane	10	84.2 $\pm$ 2.0**
	50	79.4 $\pm$ 9.5*
	200	72.9 $\pm$ 6.8**
Outer membrane-vesicle	10	95.2 $\pm$ 4.3
	50	86.7 $\pm$ 3.9*
	200	78.0 $\pm$ 7.2*
Lipopolysaccharide	10	95.9 $\pm$ 4.1
	50	89.4 $\pm$ 3.5*
	200	84.2 $\pm$ 3.9*

Outer membrane, outer membrane-vesicle and lipopolysaccharide were prepared from *F. nucleatum* ATCC 25586 strain. The human gingival fibroblasts were incubated with/without the extracts of *F. nucleatum* ATCC 25586 strain at 37°C, CO<sub>2</sub> incubator for 12 hours. <sup>a</sup>Each value was expressed as the average percentage  $\pm$  standard deviation. Significance was determined by Student's t-test and is expressed as: \*, p<0.05 \*\*, p<0.01.

**Table 2.** Cytotoxic activity of bacterial extracts from *F. nucleatum* ATCC 25586 strain on the human osteosarcoma 941 cell line

Bacterial extract	Concentration ( $\mu\text{g}$ dry weight/ml)	% viability <sup>a</sup>
		<i>F. nucleatum</i> ATCC 25586 strain
Outer membrane	10	87.8 $\pm$ 2.4
	50	81.5 $\pm$ 9.2
	200	71.7 $\pm$ 1.6**
Outer membrane -vesicle	10	97.7 $\pm$ 5.5
	50	93.4 $\pm$ 4.7
	200	83.1 $\pm$ 7.9
Lipopolysaccharide	10	100.2 $\pm$ 6.4
	50	95.3 $\pm$ 7.8
	200	82.0 $\pm$ 5.3*

Outer membrane, outer membrane-vesicle and lipopolysaccharide were prepared from *F. nucleatum* ATCC 25586 strain. The human osteosarcoma 941 cell line were incubated with/without the extracts of *F. nucleatum* ATCC 25586 strain at 37°C, CO<sub>2</sub> incubator for 12 hours. <sup>a</sup>Each value was expressed as the average percentage  $\pm$  standard deviation. Significance was determined by Student's t-test and is expressed as: \*, p<0.05 \*\*, p<0.01.

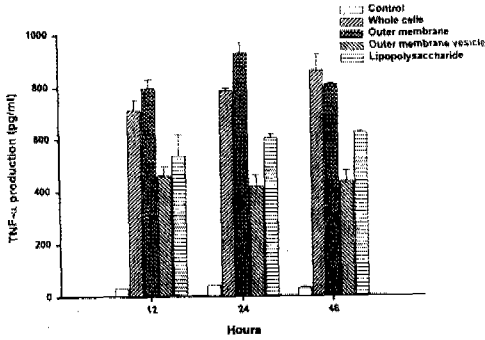


Fig. 1. Effects of bacterial extracts from *F. nucleatum* ATCC 25586 strain on the TNF- $\alpha$  production of the BALB/c mouse splenocytes treated with 20U/ml of concanavalin A. The splenocytes ( $1 \times 10^6$  cells/ml) were cultured in complete RPMI-10 medium with  $10 \mu\text{g/ml}$  of bacterial extracts and maintained at  $37^\circ\text{C}$  for 12, 24, and 48 hours in 5%  $\text{CO}_2$  incubator. The quantitative assay of TNF- $\alpha$  production was performed by the method of R & D system. The amounts of TNF- $\alpha$  were mean  $\pm$  S.D. by one experiment in triplicates. Significance was determined by Student's t-test and all values of experimental groups were significant.

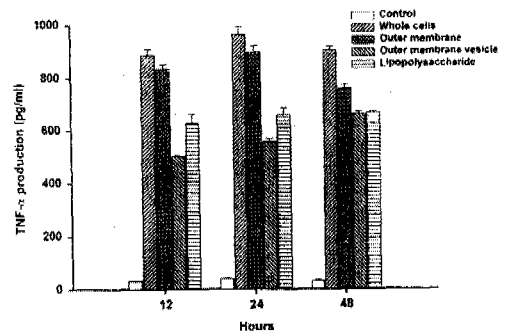


Fig. 2. Effects of bacterial extracts from *F. nucleatum* ATCC 25586 strain on the TNF- $\alpha$  production of the BALB/c mouse splenocytes treated with 50U/ml of concanavalin A. The splenocytes ( $1 \times 10^6$  cells/ml) were cultured in complete RPMI-10 medium with  $50 \mu\text{g/ml}$  of bacterial extracts and maintained at  $37^\circ\text{C}$  for 12, 24, and 48 hours in 5%  $\text{CO}_2$  incubator. The quantitative assay of TNF- $\alpha$  production was performed by the method of R & D system. The amounts of TNF- $\alpha$  were mean  $\pm$  S.D. by one experiment in triplicates. Significance was determined by Student's t-test and values of experimental groups were significant.

발현되었다. *F. nucleatum* 25586 균주 추출물의 농도( $10, 50 \mu\text{g/ml}$ )에 따른 TNF- $\alpha$  mRNA 발현 정도는 세포외막vesicle 균을 제외하고는 농도에 비례하지 않았으나, 대체적으로  $10 \mu\text{g/ml}$  농도에서 보다  $50 \mu\text{g/ml}$  농도에서 그 발현 정도가 약간 높게 나타났다. 한편 세포외막vesicle 균에서는 농도에 거의 비례하여 발현되었으며, 대조군으로 이용한  $\beta$ -actin의 발현 정도는 대체적으로 안정된 양상을 나타내었다.

#### IV. 고 찰

치주질환은 여러 종류의 미생물들이 복합적으

로 작용하여 야기되는데, 이들 미생물들중에서 *F. nucleatum*은 치은연상 그리고 치은연하 치태에서 가장 빈번히 검출되는 세균들 중의 하나이며, 치은염과 치은염 후속으로 이어지는 치주조직의 파괴에 가장 관계가 깊은 세균들중의 하나이다<sup>1-4)</sup>. 또한 치주질환은 인체의 면역체계에 복잡한 관계를 이루며 진행된다. 미생물의 독력인자들이 인체의 면역체계에 큰 영향을 미치며, 면역체계를 활성화시키는 cytokine의 생성을 유발하는데, 특히 IL-1과 TNF- $\alpha$ 가 치주조직의 파괴에 가장 관련이 깊은 cytokine으로 알려져 있다<sup>25-30)</sup>. 현재까지 치주질환에 관련되는 원인균들이 많이 알려져 있으며, 이중에서도 *P. gingivalis*가

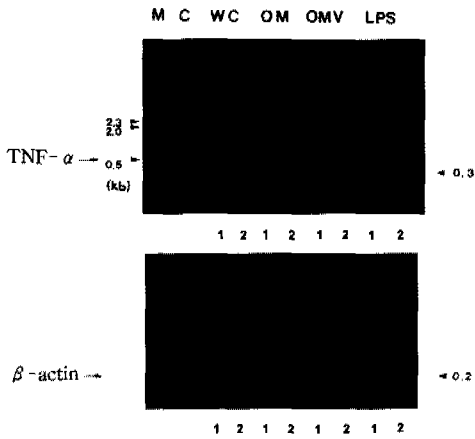


Fig. 3. RT-PCR amplification of TNF- $\alpha$  mRNA from mouse splenocytes after reaction with bacterial extracts of *F. nucleatum* 25586 strain for 12 hours. C: control, WC: bacterial whole cells, OM: outer membrane, OMV: outer membrane vesicle, LPS: lipopolysaccharide. 1 and 2: bacterial extracts at the concentration of 10 and 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , respectively.

가장 독력이 강한 것으로 알려져 있고 가장 많은 연구가 되어져 있으며<sup>1-4)</sup>, 세포독성이나 cytokine 생성에 미치는 영향에 관해서도 여러 보고가 있으나<sup>17, 19, 40-43)</sup> *F. nucleatum*에 대해서는 연구되어 있지 않은 실정이다. 따라서 본 연구에서는 이 점에 착안하여 *F. nucleatum* ATCC 25586 균주로부터 세포외막과 지질다당체를, 세균배양액으로부터 세포외막vesicle을 추출한 후, 이 추출물들이 사람 치은 섬유아세포와 HOS 941세포에 미치는 세포독성을 조사하였으며, 또한 이들 성분이 치주질환을 악화시키는데 중요한 역할을 하는 cytokine인 TNF- $\alpha$ 의 발현 및 생성에 얼마나 영향을 미치는지를 알아보기 위하여 마우스 비장세포를 대상으로 TNF- $\alpha$  mRNA의 발현과 TNF- $\alpha$  단백질의 생성량을 조사하였다.

*F. nucleatum* ATCC 25586 균주 추출물이 사람 치은 섬유아세포의 성장에 미치는 영향에 관해서는, 실험에 이용한 세 가지 추출물의 성분과

농도(0, 10, 50, 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )에 관계없이 73%~96%의 세포생존율을 보여 비교적 고른 세포독성을 나타내었다(표 1 참조). 이에 비교되는 연구로 *P. gingivalis*로부터 세포외막, 지질다당체, fimbriae 및 세포외막vesicle을 추출하여 세포독성실험을 한 Morioka등<sup>42)</sup>의 연구를 들 수 있는데, 그들의 보고에서는 농도(50, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 측면에서 비교해 볼 때 세포외막vesicle의 경우를 제외하고는 세포생존율이 84%~100%로 오히려 본 연구에서 보다 높은 세포생존율을 보였으나, 세포외막 vesicle의 경우에는 세포생존율이 38%~42%로 아주 강한 세포독성을 보였으며, 지질다당체의 경우에는 거의 세포독성을 보이지 않았다. 즉, 세포외막vesicle의 경우를 제외하고는 근소한 차이이긴 하지만 *F. nucleatum*이 *P. gingivalis* 보다 더 높은 세포독성을 나타내었으며, 양쪽 모두의 연구에서 세포외막vesicle의 세포독성은 높게 나타났다. 또한 세포생존율에 있어서 본 연구에서나 Morioka등<sup>42)</sup>의 연구에서 농도에 큰 영향을 받지 않았는데, 이는 이러한 성분들이 실제 감염시 세포독성에 직접적인 영향은 비교적 약하게 미친다는 것을 시사해 준다. *F. nucleatum* ATCC 25586 균주 추출물이 조골세포에 대해 미치는 영향을 간접적으로나마 조사하고자, 조골세포의 표현형을 갖는 HOS 941 세포를 대상으로 성장억제효과에 관해 조사한 결과, 대체적으로 사람 치은 섬유아세포의 성장에 미치는 영향과 비슷한 양상을 보였으며 세균 추출물의 성분에 따라 좀 더 많은 차이를 보였다(표 2 참조).

Tuttle등<sup>8)</sup>은 *F. nucleatum*의 전 세포가 림프구에 부착하여 림프구의 분열을 야기시킨다고 하였는데, 전 세포의 수가 많을수록 림프구의 분열도 증가한다고 보고하였다. 또한 Yoshida등<sup>48)</sup>은 *F. nucleatum*의 초음파 처리 물질이 저농도( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )에서는 비장세포를 증식시키나 그 이상의 농도에서는 증식을 억제시킨다고 보고하였다. 따라서 본 연구에서는 *F. nucleatum*의 추출물들을 좀 더 세분화시키고 이러한 추출물들이 면역계에 미치는 영향중에서도 치주질환의 진행에 큰 영향을 미치는 TNF- $\alpha$ 의 발현 및 생성에 어떤



영향을 미치는지를 조사하고자, *F. nucleatum* ATCC 25586 균주를 이용하여 마우스 비장세포를 대상으로 ELISA를 시행하였다. 그 결과 자극을 시키지 않은 대조군에서는 TNF- $\alpha$ 의 생성이 아주 낮았는데, 알려진 바와 같이 항원이 없을 때는 면역세포를 자극시키지 못함을 확인하였다. *F. nucleatum* ATCC 25586 균주 추출물들 중에서는 10, 50  $\mu\text{g/ml}$  농도 모두에서 세균 전 세포와 세포외막추출물이 세포외막vesicle과 지질다당체 추출물보다 TNF- $\alpha$ 의 생성을 증가시켰으며 세포외막vesicle이 가장 낮게 TNF- $\alpha$ 의 생성을 야기하였는데, 이러한 결과는 한 균주를 대상으로 조사하였기 때문에 모든 *F. nucleatum* 세균이 같은 특성을 나타내리라고 단언할 수는 없다고 사료된다. 그러나 적어도 TNF- $\alpha$ 를 생성시키는 inducer로 알려져 있는 지질다당체<sup>11, 13)</sup>보다 세균 전 세포와 세포외막추출물이 TNF- $\alpha$ 의 형성을 더 많이 시킨다는 것을 보여 주며, 그만큼 치주질환에 크게 작용할 것으로 생각된다. 그러나 실제 치주질환의 진행시에 존재하는 각 추출물들의 양을 정확히 측정할 수 없다는 점을 간과해서는 안될 것으로 사료된다. 그리고 12, 24, 48시간동안 배양하면서 시간대별로 TNF- $\alpha$ 의 생성량을 조사한 결과, 전반적으로 배양시간대에 따른 큰 차이를 보이지 않아 *F. nucleatum* ATCC 25586 균주 추출물에 의한 TNF- $\alpha$ 의 생성이 최소한 12시간 이전에 모두 이루어짐을 알 수 있었으며, 세균 추출물의 농도 10 $\mu\text{g/ml}$ 와 50 $\mu\text{g/ml}$  사이의 TNF- $\alpha$  생성량에 있어서 큰 차이는 보이지 않았다. 이러한 결과는 *F. nucleatum* 전 세포가 림프구를 증식시킨다는 Tuttle등<sup>8)</sup>의 보고와 유사한 경향을 보였다(그림 1, 2 참조).

또한 *F. nucleatum* ATCC 25586 균주 추출물이 마우스 비장세포의 TNF- $\alpha$  생성에 미치는 영향을 조사한 후, 세포 수준에서 mRNA발현을 확인하기 위하여 마우스 비장세포로부터 mRNA를 분리하고 역전사증합 효소연쇄반응(RT-PCR)법을 이용하여 조사한 결과, TNF- $\alpha$  mRNA band가 *F. nucleatum* ATCC 25586 균주의 모든 추출물군에서 관찰되었으며 대조군에서는 아주 희미하게 관찰되었다(그림 3 참조). 그

리고 mRNA가 가장 높게 발현된 군은 세균 전 세포군과 세포외막군이었으며, 세포외막vesicle 군의 경우에서 가장 낮게 발현되었다(그림 3 참조). 이러한 결과는 단백질수준에서의 결과(그림 1, 2 참조)와 유사한 양상을 보였다. *F. nucleatum* ATCC 25586 균주 추출물의 농도(10, 50  $\mu\text{g/ml}$ )에 따른 TNF- $\alpha$  mRNA 발현 정도도 세포외막vesicle 군을 제외하고는 농도에 비례하지 않았으며, 대체로 10 $\mu\text{g/ml}$  농도에서 보다 50  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 그 발현 정도가 약간 높았다(그림 3 참조). 이러한 결과 역시 단백질수준에서와 유사한 결과를 나타내었다. 한편 세포외막vesicle 군에서는 농도에 거의 비례하여 발현되었다(그림 3 참조).

따라서 본 연구결과로 미루어 보아, *F. nucleatum*이 적어도 직접적인 세포독성 및 간접적인 TNF- $\alpha$  생성을 통해 치주질환의 발병 및 진행에 기여하는 것으로 사료되며, 향후 좀 더 많은 균주를 대상으로 조사가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

## V. 결 론

치주질환 관련 주요 세균중의 하나인 *Fusobacterium nucleatum*의 병원성 규명 차원에서, *F. nucleatum* ATCC 25586 균주로부터 세포외막, 세포외막vesicle 및 지질다당체를 추출하여, 첫째 이들 성분들의 세포독성을 알아보기 위하여 사람 치은 섬유아세포, 그리고 조골세포의 표현형을 갖는 human osteosarcoma cell line ATCC 941(HOS 941)세포를 대상으로 MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide] assay를 통해 성장억제효과를 조사하고, 둘째 이들 성분들이 치주질환을 악화시키는데 중요한 역할을 하는 tumor necrosis factor alpha(TNF- $\alpha$ )의 발현 및 생성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 마우스 비장세포를 대상으로 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)법과 역전사증합효소연쇄반응(reverse transcription-polymerase chain reaction: RT-PCR)법을 통해 이들 성분들에 의

한 TNF- $\alpha$ 의 생성량과 TNF- $\alpha$  mRNA의 발현 양상을 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. *F. nucleatum* ATCC 25586 균주의 세 가지 추출물 모두가 사람 치은 섬유아세포와 HOS 941세포에 대해 비교적 고른 세포독성을 보였으며, 추출물의 농도가 증가함에 따라 세포생존율이 감소하였으나 농도에 따라 크게 영향받지는 않았다.
2. *F. nucleatum* ATCC 25586 균주의 세 가지 추출물 모두가 마우스 비장세포의 TNF- $\alpha$  생성을 야기하였으며, 세포외막추출물이 세포외막 vesicle과 지질다당체 추출물보다 TNF- $\alpha$ 의 생성을 증가시켰고, 또한 TNF- $\alpha$ 의 생성은 12시간 이전에 이루어졌으며, TNF- $\alpha$  생성량은 추출물의 농도에 따라 크게 영향받지는 않았다.
3. *F. nucleatum* ATCC 25586 균주의 세 가지 추출물 모두가 마우스 비장세포의 TNF- $\alpha$  mRNA 발현을 야기하였으며, TNF- $\alpha$  mRNA의 발현 정도는 TNF- $\alpha$  생성 양상과 유사하였다.

따라서 본 연구결과로 미루어 보아, *F. nucleatum*이 적어도 직접적 세포독성 및 간접적인 TNF- $\alpha$  생성을 통해 치주질환의 발병 및 진행에 기여하는 것으로 사료된다.

### 참 고 문 헌

1. Walker CB, Ratliff D, Muller D, Mandell R, and Socransky SS. Medium for selective isolation of *Fusobacterium nucleatum* from human periodontal pockets. *J Clin Microbiol.* 10 : 844-849, 1979.
2. Beck JD, Koch GG, Jambon JJ, Genco RJ, and Tudor GE. Evaluation of oral bacteria as risk indicators for periodontitis in older adults. *J Periodontol.* 63 : 93-99, 1992.
3. Vincent JW, Cornett WC, Falkler WA Jr, and Montoya RG. Biological activity of Type I and Type II *Fusobacterium nucleatum* isolates from

clinically characterized sites. *J Periodontol.* 56 : 334-339, 1985.

4. Moore WEC, Moore LVH, Ranney RR, Simbert RM, Burmeister JA, and Schenkein. The microflora of periodontal sites showing active destructive progression. *J Clin Periodontol.* 18 : 729-739, 1991.
5. Drasar BS and Duerden BI. Anaerobes in the normal flora of man. In : Duerden BI and Drasar BS, ed. *Anaerobes in human disease.* New York : Wiley-Liss, 162-179, 1991.
6. Brook I. Recovery of anaerobic bacteria from clinical specimens in 12 years at two military hospitals. *J Clin Microbiol.* 26(6) : 1181-1188, 1988.
7. O'Grady LR, Ralph ED. Anaerobic meningitis and bacteremia caused by *Fusobacterium* species. *Am J Dis Child.* 130 : 871-873, 1976.
8. Tuttle RS and Mangan DF. Interaction of *F. nucleatum* 191 with human peripheral blood lymphocytes. *J Periodont Res.* 25 : 364-371, 1990.
9. Mangan DF and Lopatin DE. Polyclonal activation of human peripheral blood B lymphocytes by *F. nucleatum.* *Infect Immun.* 40 : 1104-1111, 1983.
10. Tew J, Engel D, and Mangan DF. Polyclonal B-cell activation in periodontitis. *J Periodont Res.* 24 : 225-241, 1989.
11. Thomson A. *The cytokine handbook,* Academic Press Sandiego, 241-56, 1991.
12. Beutler B, Milsark IW, and Cerami AC. Passive immunization against cachectin/tumor necrosis factor protects mice from lethal effect of endotoxin. *Science* 229 : 869-871, 1985.
13. Tracey KJ and Cerami A. Tumor necrosis factor : An updated review of its biology. *Crit Care Med.* 21 : S415-422, 1993.
14. Tracey KJ, Fong Y, Hesse DG, Manogue KR, Lee AT, Kuo GC, Lowry SF, and Cerami A. Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia. *Nature* 330 : 662-664, 1987.
15. Lindemann RA and Economou JS. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Bacteroides gingivalis* activate human peripheral monocytes to

- produce interleukin-1 and tumor necrosis factor. *J Periodontol.* 59(11) : 728-730, 1988.
16. Rossomando EF, Kennedy JE, and Hadjimichael J. Tumor necrosis factor- $\alpha$  in gingival crevicular fluid as a possible indicator of periodontal disease in humans. *Arch Oral Biol.* 35(6) : 431-434, 1990.
  17. Hirose K, Isogai E, Miura H, and Ueda I. Levels of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae and inflammatory cytokines in gingival crevicular fluid from adult human subjects. *Microbiol Immunol.* 41(1) : 21-26, 1997.
  18. Tani Y, Tani M, and Kato I. Extracellular 37-KDa antigenic protein from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* induces TNF- $\alpha$ , IL-1 beta, and IL-6 in murine macrophages. *J Dent Res.* 76(9) : 1538-1547, 1997.
  19. Lindemann RA, Economou JS, and Rothermel H. Production of interleukin-1 and tumor necrosis factor by human peripheral monocytes activated by periodontal bacteria and extracted lipopolysaccharides. *J Dent Res.* 67(8) : 1131-1135, 1988.
  20. McFarlane CG, Reynolds JJ, and Meikle MC. The release of interleukin-1, tumor necrosis factor- $\alpha$  and interferon- $\gamma$  by cultured peripheral blood mononuclear cells from patients with periodontitis. *J Periodontol Res.* 25(4) : 207-214, 1990.
  21. Birkedal-Hansen H. Role of cytokines and inflammatory mediators in tissue destruction. *J Periodontol Res.* 28(6 Pt 2) : 500-510, 1993.
  22. Alexander MB and Darnoulis PD. The role of cytokines in the pathogenesis of periodontal disease. *Curr Opin Periodontol.* 39-53, 1994.
  23. Wilson M, Reddi K, and Henderson B. Cytokine-inducing components of periodontopathogenic bacteria. *J Periodontol Res.* 31(6) : 393-407, 1996.
  24. Tokoro Y, Matsuki Y, Yamamoto T, Suzuki T, and Hara K. Relevance of local Th2-type cytokine mRNA expression in immunocompetent infiltrates in inflamed gingival tissue to periodontal diseases. *Clin Exp Immunol.* 107(1) : 166-174, 1997.
  25. Stashenko P, Jandinski JJ, Fujiyoshi P, Rynar J, and Socransky SS. Tissue levels of bone resorptive cytokines in periodontal disease. *J Periodontol.* 62(8) : 504-509, 1991.
  26. Yavuzyilmaz E, Yamalik N, Bulut S, Ozen S, Ersoy F, and Saatci U. The gingival crevicular fluid interleukin-1 beta and tumour necrosis factor- $\alpha$  levels in patients with rapidly progressive periodontitis. *Aust Dent J.* 40(1) : 46-49, 1995.
  27. Wiebe SH, Hafezi M, Sandhu HS, Sims SM, and Dixon SJ. Osteoclast activation in inflammatory periodontal diseases. *Oral Dis.* 2(2) : 167-180, 1996.
  28. Wang CY, Tani-Ishii N, and Stashenko P. Bone-resorptive cytokine gene expression in periapical lesions in the rat. *Oral Microbiol Immunol.* 12(2) : 65-71, 1997.
  29. Galbraith GM, Hagan C, Steed RB, Sanders JJ, and Javed T. Cytokine production by oral and peripheral blood neutrophils in adult periodontitis. *J Periodontol.* 68(9) : 832-838, 1997.
  30. Korman KS and Giovine FS. Genetic variations in cytokine expression : a risk factor for severity of adult periodontitis. *Ann Periodontol.* 3(1) : 327-338, 1998.
  31. Agarwal S, Suzuki JB, and Ricelli AE. Role of cytokines in the modulation of neutrophil chemotaxis in localized juvenile periodontitis. *J Periodontol Res.* 29(2) : 127-137, 1994.
  32. Takeichi O, Saito I, Tsurumachi T, Saito T, and Moro I. Human polymorphonuclear leukocytes derived from chronically inflamed tissue express inflammatory cytokines in vivo. *Cell Immunol.* 156(2) : 296-309, 1994.
  33. Assuma R, Oates T, Cochral D, Amar S, and Graves DT. IL-1 and TNF antagonists inhibit the inflammatory response and bone loss in experimental periodontitis. *J Immunol.* 160(1) : 403-409, 1998.
  34. Graves DT, Delima AJ, Assuma R, Amar S, Oates T, and Cochran D. Interleukin-1 and tumor necrosis factor antagonists inhibit the progression of inflammatory cell infiltration toward alveolar bone in experimental periodontitis[In Process Citation]. *J Periodontol.* 69(12) : 1419-1425, 1998.
  35. Matsuki Y, Yamamoto T, and Hara K. Detection

- of inflammatory cytokine messenger RNA (mRNA)-expressing cells in human inflamed gingiva by combined in situ hybridization and immunohistochemistry. *Immunology* 76(1) : 42-47, 1992.
36. Salvi GE, Collins JG, Yalda B, Arnold RR, Lang NP, and Offenbacher S. Monocytic TNF alpha secretion patterns in IDDM patients with periodontal diseases. *J Clin Periodontol.* 24(1) : 8-16, 1997.
  37. Salvi GE, Beck JD, and Offenbacher S. PGE2, IL-1 beta, and TNF-alpha responses in diabetics as modifiers of periodontal disease expression. *Ann Periodontol.* 3(1) : 40-50, 1998.
  38. Bostrom L, Linder LE, and Bergstrom J. Clinical expression of TNF-alpha in smoking-associated periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 25(10) : 767-773, 1998.
  39. Roberts FA, McCaffery KA, and Michalek SM. Profile of cytokine mRNA expression in chronic adult periodontitis. *J Dent Res.* 76(12) : 1833-1839, 1997.
  40. Layman DL and Diedrich DL. Growth inhibitory effects of endotoxins from *Bacteroides gingivalis* and *intermedius* on human gingival fibroblasts in vitro. *J Periodontol.* 58 : 387-392, 1987.
  41. Larjava H, Uitto V, Eerola E, and Haapasalo M. Inhibition of gingival fibroblast growth by *Bacteroides gingivalis*. *Infect Immun.* 55(1) : 201-205, 1987.
  42. Morioka M, Hinode D, Nagata A, Hayashi H, Ichimiya S, Ueda M, Kido R, and Nakamura R. Cytotoxicity of *Porphyromonas gingivalis* toward cultured human gingival fibroblasts. *Oral Microbiol Immunol.* 8 : 203-207, 1993.
  43. Tamura M, Tokuda M, Nagaoka S, and Takada H. Lipopolysaccharides of *Bacteroides intermedius* (*Prevotella intermedia*) and *Bacteroides (Porphyromonas) gingivalis* induce interleukin-8 gene expression in human fibroblast cultures. *Infect Immun.* 60 : 4932-4937, 1992.
  44. Smalley JW, Birss AJ, McKee AS, and Marsh PD. Haemin-restriction influences haemin-binding, haemagglutination and protease activity of cells and extracellular membrane vesicles of *Porphyromonas gingivalis* W50. *FEMS Microbiol Lett.* 15 : 69(1), 63-67, 1991.
  45. Guigand M, Pellen P, Mouton C, and Bonnaure-Mallet M. Cytotoxic effect of vesicles produced by *Porphyromonas gingivalis* on fibroblasts in culture. *J Periodontal Res.* 30(2) : 141-143, 1995.
  46. Duchesne P, Grenier D, and Mayrand D. Demonstration of adherence properties of *Porphyromonas gingivalis* outer membrane vesicles using a new microassay. *Oral Microbiol Immunol.* 10(2) : 76-80, 1995.
  47. Hinode D, Masuda K, Yoshioka M, Hayashi H, Nakamura R, Grenier D, and Mayrand D. Biological and antigenic characterization of three BApNA-hydrolyzing proteases from the culture supernatant of *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiol Immunol.* 11(1) : 8-14, 1996.
  48. Yoshida H, Jontell M, Sundqvist, and Bergenholtz. Effect of sonicated material from *Fusobacterium nucleatum* on the functional capacity of accessory cells derived from dental pulp. *Oral Microbiol Immunol.* 10 : 208-212, 1995.
  49. Kaur M and Falkler WA Jr. Characterization of shared antigens of *Fusobacterium nucleatum* and *Fusobacterium necrophorum*. *Oral Microbiol Immunol.* 7 : 291-298, 1992.
  50. Boyd J, McBride BC. Fractionation of hemagglutinating and bacterial binding adhesins of *Bacteroides gingivalis*. *Infect Immun.* 45 : 403-409, 1984
  51. Grenier D, Mayrand D. Functional characterization of extracellular vesicles produced by *Bacteroides gingivalis*. *Infect Immun.* 55 : 111-117, 1987.
  52. Westphal O, Jann K. bacterial lipopolysaccharide. Extraction with phenol-water and further application of the procedure. In: Wistler RC, ed. *Methods in carbohydrate chemistry.* New York: Academic Press, 1965: 83-92.
  53. Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD and Mitchell JB. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay : Assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* 47 : 936-942, 1987.

- 
54. Loosdrecht AA, Nennie E, Ossenkopple GT, Beelen RHJ, and Langenhuijsen MMAC. Cell mediated cytotoxicity against U 937 cells by human monocytes and macrophages in a modified colorimetric MTT assay : A methodological study. *J Immunol Methods* 141 : 15-22, 1991.
55. Delvine RG, Schwartz NL, Mackey HK, and Baronowsky PE. The effects of cyclophosphamide and cyclophosphamide plus acetylcysteine on the in vitro and in vivo mixed lymphocyte reaction. *Transplantation* 17 : 70-74, 1974.
56. Chomczynski and Nicoletta Sacchi. Single-step Method of RNA Isolation by Acid Guanidium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. *Analytical Biochem* 162, 156-159, 1987.

---

Effects of Extracts from *Fusobacterium nucleatum*  
on the Growth of Human Gingival Fibroblasts  
and HOS 941 Cells, and on the TNF- $\alpha$  Production of Mouse  
Splenocytes

Hee-Myung Oh, D.D.S., M.S.D.,<sup>1</sup> Yo-Han Song, D.D.S., M.S.D., Ph.D.,<sup>2,3</sup>  
Keum-Back Shin, D.D.S., M.S.D., Ph.D.<sup>1,3</sup>

*Department of Oral Medicine*<sup>1</sup>, *Department of Oral Microbiology*<sup>2</sup>,  
*College of Dentistry and Institute of Oral Bioscience*<sup>3</sup>, Chonbuk National University

*F. nucleatum* is a gram-negative obligate anaerobe which is the principal and most frequent cause of gingival inflammation and is the predominant pathogen isolated in subsequent periodontal breakdown. It is also one of the most numerous bacteria found in subgingival plaque samples from healthy sites; its numbers are about 10-fold greater in plaque from periodontally diseased sites. The purpose of this study is to examine the effects of outer membrane(OM), outer membrane vesicle(OMV), and lipopolysaccharide(LPS) from *F. nucleatum* ATCC 25586 strain on the growth of human gingival fibroblasts and HOS 941 cells, and on the TNF- $\alpha$  production / TNF- $\alpha$  mRNA expression of mouse splenocytes. For the examination of cytotoxic effects, TNF- $\alpha$  production and TNF- $\alpha$  mRNA expression, the MTT assay, the ELISA and the RT-PCR were performed, respectively. All extracts of *F. nucleatum* tested were cytotoxic to both of human gingival fibroblasts and HOS 941 cells, and the significant difference of cytotoxic activity among the extracts was not observed. In the effects of these extracts on the TNF- $\alpha$  production / TNF- $\alpha$  mRNA expression of mouse splenocytes, all extracts of *F. nucleatum* tested also stimulated the TNF- $\alpha$  production / TNF- $\alpha$  mRNA expression, but the effects of the OM extracts on the TNF- $\alpha$  production / TNF- $\alpha$  mRNA expression were higher than those of the OMV and the LPS extracts. The pattern of the TNF- $\alpha$  mRNA expression was similar to that of the TNF- $\alpha$  production. These results indicate that *F. nucleatum* seems to contribute to the pathogenesis of periodontal diseases at least by its cytotoxicity, directly and its TNF- $\alpha$  production, indirectly.

---

Key Words : *Fusobacterium nucleatum*, human gingival fibroblast, HOS cell, TNF- $\alpha$