การปรับเปลี่ยนการตอบสนองทางด้านภูมิคุ้มกันของ บี-เซลล์โดย พอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิส และ อินเตอร์ลูคิน-10

นางสาว จันทรกร แจ่มไพบูลย์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาปริทันตศาสตร์ ภาควิชาปริทันตวิทยา
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2541

ISBN 974-639-605-6

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

THE IMMUNE MODULATION OF B-CELL RESPONSE BY *PORPHYROMONAS GINGIVALIS* AND INTERLEUKIN-10

Miss Chantrakorn Champaiboon

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Periodontics
Department of Periodontology
Graduate School
Chulalongkorn University
Academic Year 1998

ISBN 974-639-605-6

Thesis Title	: The immune modulation of B-cell response by *Porphyromonas gingivalis* and interleukin-10
By	: Miss Chantrakorn Champaiboon
Department	: Periodontology
Thesis Advisor	: Dr. Rangsini Mahanonda
Thesis Co-advisor	: Dr. Sathit Pichyangkul

.....

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirement for the Master's Degree

..... Dean of Graduate School

(Professor Supawat Chutivongse, M.D.)

THESIS COMMITTEE

..... Chairman

(Associated Professor Naulchavee Hongprasong)

..... Thesis Advisor

(Dr. Rangsini Mahanonda)

..... Thesis Co-advisor

(Dr. Sathit Pichyangkul)

..... Member

(Assistant Professor Dr. Paitoon Sanvarinda)

..... Member

(Assistant Professor Dr. Mano Kuratana)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

จันทรกร แจ่มไพบูลย์ : การปรับเปลี่ยนการตอบสนองทางด้านภูมิคุ้มกันของ บี-เซลล์โดย *พอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิส* และ อินเตอร์ลูคิน-10 (THE IMMUNE MODULATION OF B-CELL RESPONSE BY *PORPHYROMONAS GINGIVALIS* AND INTERLEUKIN-10) อ. ที่ปรึกษา : อ. ทพญ. ดร. รังสินี มหานนท์, อ. ที่ปรึกษาร่วม : ดร. สาธิต พิชญางกูร, 87 หน้า. ISBN 974-639-605-6.

ลักษณะเด่นของรอยโรคปริทันต์อักเสบคือ มีการสะสมของบี-เซลล์และพลาสม่าเซลล์เป็นจำนวนมาก การกระตุ้นบี-เซลล์หลาย ๆ กลุ่ม ซึ่งถูกชักนำโดยแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคปริทันต์นั้น ถือว่าเป็นสิ่งสำคัญที่ทำให้เกิดการตอบสนองของบี-เซลล์สูงขึ้น อย่างไรก็ตาม กลไกที่แท้จริงในเรื่องนี้ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด การศึกษาเบื้องต้นของงานวิจัยครั้งนี้ ได้ตรวจดูโมโนนิวเคลียร์เซลล์ที่ได้จากเหงือกของผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบ พบว่า มีบี-เซลล์เป็นเซลล์หลัก และมักจะอยู่ในภาวะที่ถูกกระตุ้น (คือเป็นเซลล์ที่มีซีดี69+ และซีดี19+) ดังนั้นเพื่อศึกษาถึงกลไกการกระตุ้นเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งบี-เซลล์ ซึ่งเกิดจากจุลินทรีย์ในคราบจุลินทรีย์ จึงได้ทำการตรวจสอบดูผลที่เกิดขึ้นเมื่อโมโนนิวเคลียร์เซลล์จากเลือดของคนปกติ (ในสภาพที่ยังไม่ได้แยกเป็นกลุ่มเซลล์ชนิดต่าง ๆ และที่แยกเฉพาะกลุ่มต่าง ๆ) ได้รับการกระตุ้นโดยแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคปริทันต์ คือ *พอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิส* จากการวิเคราะห์โดยใช้โฟล ไซโตเมตรี พบว่าสารสกัดจาก *พอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิส* สามารถกระตุ้นกลุ่มต่าง ๆ ของโมโนนิวเคลียร์เซลล์ ให้เพิ่มจำนวนของเซลล์ที่แสดงซีดี69 (ซึ่งเป็นแอนติเจนที่แสดงออกในช่วงแรกของการกระตุ้น) มากขึ้นตามความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้ กลุ่มที่ถูกกระตุ้นมากได้แก่ บี-เซลล์, เอ็นเคเซลล์ และแกมม่าเดลต้าที-เซลล์ ส่วนอัลฟ่าเบต้าที-เซลล์นั้น พบการเปลี่ยนแปลงน้อยกว่า เมื่อทดลองแยกเซลล์ชนิดต่าง ๆ ออกจากกัน ก็พบว่ามีเพียงบี-เซลล์เท่านั้น ที่ถูกกระตุ้นโดยตรงจากสารสกัดที่ได้จากแบคทีเรีย ส่วนเซลล์อีกสามชนิดไม่ถูกกระตุ้น ผลอันนี้ยังบ่งชี้ด้วยว่าเป็นการตอบสนองแบบไม่จำเพาะเจาะจงของบี-เซลล์ต่อ *พอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิส* นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาการสร้างไซโตคายน์ที่ควบคุมการทำงานของบี-เซลล์คือ อินเตอร์ลูคิน-10, อินเตอร์ลูคิน-12 และ อินเตอร์ลูคิน-15 ในโมโนนิวเคลียร์เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย *พอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิส* โดยใช้วิธีอิไลซ่า พบว่ามีการผลิตอินเตอร์ลูคิน-10 เป็นจำนวนมาก แต่ไม่พบอินเตอร์ลูคิน-12 และ อินเตอร์ลูคิน-15 ในของเหลวที่ได้จากการเพาะเลี้ยงโมโนนิวเคลียร์เซลล์ การวิเคราะห์ว่าเซลล์ชนิดใดมีบทบาทสำคัญในการผลิตอินเตอร์ลูคิน-10 โดยตัดเซลล์ออกจากการทดลองทีละกลุ่ม พบว่าโมโนไซต์เป็นเซลล์หลักที่ผลิตอินเตอร์ลูคิน-10 ส่วนบี-เซลล์และที-เซลล์ ไม่มีส่วนสำคัญในเรื่องนี้ นอกจากนี้การแยกเซลล์ออกมากระตุ้นทีละกลุ่ม ก็ยืนยันว่าโมโนไซต์เป็นกลุ่มที่มีการผลิตอินเตอร์ลูคิน-10 จำนวนมาก อินเตอร์ลูคิน-10 นั้นถือว่าเป็นสารที่ยับยั้งการสร้างไซโตคายน์ และยังเป็นสารที่กระตุ้นการเจริญและการพัฒนาเปลี่ยนแปลงของบี-เซลล์ ผลการทดลองครั้งนี้สนับสนุนงานวิจัยที่ผ่านมาเกี่ยวกับการพบอินเตอร์ลูคิน-10 จำนวนมากในรอยโรคปริทันต์อักเสบ ว่าอาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับการดำเนินของโรค และการทดลองครั้งนี้ยังพบว่าการกระตุ้นบี-เซลล์ด้วย *พอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิส* และอินเตอร์ลูคิน-10 นั้น ทำให้เกิดการเพิ่มจำนวนของบี-เซลล์ได้อย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นอินเตอร์ลูคิน-10 น่าจะเป็น ไซโตคายน์ตัวสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นบี-เซลล์หลายกลุ่ม อันเป็นลักษณะสำคัญของโรคปริทันต์

ภาควิชา ปริทันตวิทยา ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา ปริทันตวิทยา ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2541 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

#3970241032 : MAJOR PERIODONTICS
KEY WORD: *PORPHYROMONAS GINGIVALIS* / B-CELL / PERIODONTAL DISEASE / IL-10
CHANTRAKORN CHAMPAIBOON : THE IMMUNE MODULATION OF B-CELL RESPONSE BY *PORPHYROMONAS GINGIVALIS* AND INTERLEUKIN-10. THESIS ADVISOR : DR. RANGSINI MAHANONDA. THESIS CO-ADVISOR : DR. SATHIT PICHYANGKUL. 87pp. ISBN 974-639-605-6

A unique characteristic of advanced periodontal lesion is the accumulation of a large number of B-cells and plasma cells. Polyclonal B-cell activation induced by periodontopathic bacteria has been cited as being important for these elevated B-cell responses, however, the exact mechanisms underlying this event remain unknown. Our preliminary study of gingival mononuclear cell populations in periodontitis tissues revealed the majority of activated B-cells (CD69+ CD19+). In order to investigate the mechanisms of how immune cells, in particular B-cells, become activated by microorganisms in dental plaque, we examined the activation parameters of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and purified cell populations after stimulation with periodontopathic bacteria, ***Porphyromonas gingivalis***, in healthy periodontal subjects. PBMC cultures derived from these healthy donors incubated with sonicated extracts of ***P. gingivalis*** led to a dose-dependent activation of different lymphocyte subpopulations as monitored by a flow cytometric analysis of CD69 expression, a very early activation antigen. Large increase in number of CD69+ cells was consistently observed in B, NK and γδ T-cells, and to a lesser degree in αβ T-cells. When flow cytometric sorted cells were used, it was found that only B-cells but not αβ, γδ T-cells or NK cells were directly activated by the bacterial extracts, thus being suggestive of non specific B-cell activation by ***P. gingivalis***. Furthermore, production of B-cell regulatory cytokines e.g., IL-10, IL-12 and IL-15 was assessed by ELISA in ***P. gingivalis***-stimulated PBMC cultures. Large amount of IL-10 was detected in culture supernatants but none of IL-12 and IL-15. By using cell depletion experiments, the major source of IL-10 in ***P. gingivalis***-stimulated PBMC was monocytes, not B-cells or αβ T-cells. In addition, stimulation of sorted monocytes by these microorganisms induced high level of IL-10 production. IL-10 is initially described as a cytokine synthesis inhibition factor and also a potent growth and differentiation factor for B-cells. Our results support recent reports of high level of IL-10 in periodontitis lesion which may be linked to the pathogenesis of periodontal disease. Upon exposure of B-cells with ***P. gingivalis*** and the cytokine IL-10, proliferative response of B-cells was significantly increased. Therefore, IL-10 may prove to be the critical cytokine involved in polyclonal B-cell activation associated with periodontal disease.

ภาควิชา ปริทันตวิทยา ลายมือชื่อนิสิต _____

สาขาวิชา ปริทันตศาสตร์ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา _____

ปีการศึกษา 2541 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม _____

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my gratitude and appreciation to my advisor, Dr. Rangsini Mahanonda, for her guidance, encouragement, supervision, suggestions and kindness throughout the course of my Master degree program. I am extremely indebted to my co-advisor, Dr. Sathit Pichyangkul, Department of Immunology and Medicines, US Army Medical Component, AFRIMS, for providing the laboratory facilities and for his grateful guidance, supervision, valuable technical advice and correction of this thesis.

I wish to thank my thesis committee members; Assoc. Prof. Nophadol Suppipat, Assoc. Prof. Naulchavee Hongprasong, Assoc. Prof. Chanin T. Vitaya, Assist. Prof. Dr. Paitoon Sanvarinda and Assist. Prof. Dr. Mano Kuratana for their suggestions and kindness in being committee members.

Sincere appreciation is expressed to Ms. Panita Gosi and Mr. Kosol Yongvanitchit for their grateful advice and technical assistance. Grateful thanks to Ms. Nantana Aroonrerk for her kindly provided bacteria used in this thesis. I also would like to thank Mr. Noppadol Sa-Ard-Iam for his assistance in making appointment with donors and preparing this manuscript.

I would like to acknowledge research grant from the Graduate School, Chulalongkorn University for the partial financial support for this study. My sincere appreciation is also extended to the staff of Periodontology, Department, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University for their kindness, guidance and encouragement. Finally, I would like to express my appreciation to my father, mother, and my brother for their love, caring, understanding and encouragement.

TABLE OF CONTENTS

Page

Abstract (Thai).....iv

Abstract (English).....v

Acknowledgements.....vi

Table of contents.....vii

List of tables.....xiii

List of figures.....xiv

Abbreviations.....xv

Chapter

1. Introduction.....1

1.1 Background of present study.....1

1.2 Objectives.....7

1.3 Hypothesis.....7

1.4 Field of research.....7

1.5 Criteria inclusions.....7

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Page

1.6 Limitation of research.....8

1.7 Application and expectation of research.....8

2. Literature review.....10

2.1 Introduction.....10

2.2 Microbial aspects of periodontal disease.....11

2.2.1 Periodontopathic bacteria.....11

2.2.2 *Porphyromonas gingivalis*.....11

2.3 Host response to plague microorganisms.....13

2.4 Role of B-cells in periodontal disease.....14

2.4.1 Introduction.....14

2.4.2 T-dependent and T- independent antigens.....15

2.4.3 Polyclonal B-cell activation in periodontal disease.17

Page

2.5 Cytokine involvement in pathogenesis of periodontal disease.....19

2.5.1 Introduction.....19

2.5.2 Cytokines that mediate the immunoinflammatory response on periodontal disease.....20

3. Materials and methods.....23

3.1 Materials.....23

3.1.1 Chemical reagents.....23

3.1.2 Medium.....23

3.1.3 Monoclonal antibodies.....23

3.2 Bacterial preparation.....25

3.3 Phenotypic characterization of mononuclear cells recovered from periodontitis lesions.....26

3.3.1 Gingival tissue samples..... .26

Page

3.3.2 Preparation of gingival cells.....26

3.3.3 Phenotypic analysis of gingival cells by flow cytometry.....27

3.4 *In vitro* studies of peripheral blood mononuclear cells from healthy subjects.....28

3.4.1. Subject selection 28

3.4.2 Peripheral blood mononuclear cell preparation.....28

3.4.3 Purification of monocytes, αβ T-cells, γδ T-cells, NK cells and B-cells.....28

3.4.4 Stimulation of PBMC cultures with *P. gingivalis*...29

3.4.5 Studies of *P. gingivalis*-stimulated purified αβ T-cells, γδ T-cells, NK cells and B-cells.....29

3.4.6 Kinetic studies of IL-10 production by *P. gingivalis*- stimulated PBMC.....30

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Page

3.4.7 Cellular source of IL-10 in *P. gingivalis*-stimulated PBMC cultures.....30

3.4.8 Effects of *P. gingivalis* and IL-10 on purified B-cells.....31

3.4.9 Detection of cytokines.....31

3.4.10 Flow cytometric analysis.....32

3.5 Statistic analysis.....32

4. Results.....33

4.1 Phenotypic characterization of mononuclear cells recovered from periodontitis lesions.....33

4.2 Activation of mononuclear cell populations in *P. gingivalis*-stimulated PBMC cultures.....36

4.3 Cytokine production by PBMC stimulated with *P. gingivalis*.....39

4.4 Cellular source of IL-10 from *P. gingivalis*-stimulated PBMC cultures.....41

Page

4.5 Effect of *P. gingivalis* and IL-10 on B-cell activation.....43

5. Discussion and conclusion.....45

References.....50

Biography.....71

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF TABLES

Table Page

1. Monoclonal antibodies used for flow cytometric analysis and cell sorting.....24

2. Phenotypic characterization of mononuclear cells recovered from periodontitis lesions.....34

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURES

Figure Page

1. Flow cytometric analysis of mononuclear cells from periodontitis lesions.....35

2. Flow cytometric analysis of CD69 expression on lymphocyte subpopulations in PBMC stimulated with *P. gingivalis*.....37

3. Flow cytometric analysis of CD69 expression on purified αβ T-cells, γδ T-cells, NK cells and B-cells in response to sonicated extracts of *P. gingivalis* 38

4. Cytokine production by *P. gingivalis* treated PBMC.....40

5. Kinetic study of IL-10 production from *P. gingivalis*-stimulated PBMC cultures 40

6. Effect of cell depletion in PBMC on IL-10 production in response to *P. gingivalis* stimulation.....42

7. Analysis of IL-10 production from sorted monocytes, αβ T-cells, and B-cells in response to *P. gingivalis* stimulation.....42

8. The proliferative response of *P. gingivalis* and IL-10 treated purified B-cells.....44

ABBREVIATIONS

Aa.	*Actinobacillus actinomycetemcomitans*
αβ T-cells	alpha beta T-cells
APCs	antigen presenting cells
CD	cluster of differentiation
CPM	counts per minute
CSF	colony stimulating factor
DMSO	dimethyl sulphoxide
DNA	deoxyribonucleic acid
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FCS	fetal calf serum
FSC	forward scatter
FITC	fluorescein isothiocyanate
γδ T-cells	gamma delta T-cells
GCF	gingival crevicular fluid
IFN-γ	interferon gamma
Ig	immunoglobulin
IL	interleukin
IFN	interferon
LPS	lipopolysaccharide
mAbs	monoclonal antibodies

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

MHC	major histocompatibility complex
mRNA	messenger ribonucleic acid
NK cells	natural killer cells
PBA	polyclonal B-cell activation
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PBS	phosphate-buffered saline
PE	phycoerythrin
P. gingivalis	*Porphyromonas gingivalis*
rIL-10	recombinant interleukin-10
S.E.	standard error
SLE	systemic lupus erythematosus
SSC	side scatter
TCR	T-cell receptor
Th1	T-helper1
Th2	T-helper2
[^{3}H] thymidine	Tritiated thymidine
TNF	Tumor necrosis factor

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย