

ABSTRACT

The development of T helper1 (Th1)- versus Th2-type response is known as fundamental important in determining whether the response to infectious pathogens will be protective or no protective. The Th1 or Th2 response, on the other hand that continues unabated may cause overproduction of cytokines leading to damage of host normal tissues. High levels of inflammatory mediators as well as numerous infiltrated T and B cells are the characteristics of periodontitis, the advanced form of periodontal disease. Accumulating data regarding Th1- and Th2-type response in periodontitis are however in conflict. This inconclusive piece of information is crucial in the pathogenesis of periodontitis and still lacking. To date, dendritic cells (DCs) have been well recognized for the critical role not only in the initiation of naïve T cell priming but also in controlling the type of Th response. The mechanisms of how DCs induce Th1 and Th2-type response have been the subject of intense investigation. Several determined factors in Th differentiation include interleukin (IL)-12, IL-10, ICAM-1 expression, dose of antigen, Notch ligands and DC subsets.

In periodontitis, *Porphyromonas gingivalis* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* are key pathogens. They habitat as microbial plaque biofilms adjacent to gingiva which are found to be enriched by antigen presenting cells (APCs). Langerhans cells are presence in gingival epithelium while tissue DCs are presence in lamina propria. Significant up-regulation of CD83 (mature DC antigen) and co-stimulatory molecule expression on DCs and gingival B cells was detected in periodontitis tissues. These CD83⁺ cells were associated with clusters of CD4⁺ T cells, thus indicating close interaction of T cells and APCs in gingival microenvironment. In this study we investigated the effects of lipopolysaccharide (LPS) from *P. gingivalis* and *A. actinomycetemcomitans* on human monocyte-derived dendritic cells (Mo-DCs) with regards to co-stimulatory molecule expression, cytokine production and the induction of Th cell differentiation. Human mixed-leukocyte reaction (MLR) and *in vivo* ovalbumin (OVA)-specific T cell response in mouse model were used to explore the type of Th response induced by LPS of the two plaque bacterial pathogens in comparison with *Escherichia coli* LPS.

DCs were generated from flow cytometrically-sorted CD14⁺ monocytes from healthy donors. The monocytes were differentiated into immature DCs by culturing in RPMI1640 medium containing 10% heat-inactivated autologous serum and the cytokines, GM-CSF and IL-4. The phenotype of immature DCs was found to be CD1a⁺, CD14⁺, CD40⁺, CD80⁺, CD83⁺ and HLA-DR⁺. Immature Mo-DCs were stimulated with different concentrations of LPS from *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, and *E. coli* (0, 100, 300, 1000 ng/mL) for 24 hrs. Culture supernatants were analyzed for tumor necrosis factor (TNF)- α , IL-10 and IL-12 p70 production using ELISA. The cells were harvested to measure CD40, CD80, CD83 and HLA-DR by flow cytometry. Unlike *E. coli* LPS and *A. actinomycetemcomitans* LPS, *P. gingivalis* LPS induced low levels of co-stimulatory molecule

(CD40, CD80), HLA-DR and maturation marker (CD83) expression. Both *P. gingivalis* LPS and *A. actinomycetemcomitans* LPS induced low levels of TNF- α and negligible amounts of IL-10 as compared with *E. coli* LPS. All the bacterial LPS induced minimal or no IL-12 p70 production. We next evaluated the ability of *P. gingivalis* LPS and *A. actinomycetemcomitans* LPS-stimulated Mo-DCs to prime human naïve CD4⁺ T cells and to promote the development of Th1 or Th2 response. In line with the weak cytokine induction, *P. gingivalis* LPS and *A. actinomycetemcomitans* LPS-stimulated Mo-DCs induced a poor allogeneic naïve CD4⁺ T cell response as compared with *E. coli* LPS-stimulated Mo-DCs. Lower levels of IFN- γ production were detected in MLR cultures with *P. gingivalis* LPS and *A. actinomycetemcomitans* LPS-stimulated Mo-DCs as compared with higher IFN- γ levels in those MLR cultures with *E. coli* LPS-stimulated Mo-DCs. Similar low levels of IL-5 production were detected in all MLR cultures.

Due to the low frequency of antigen-specific T cells in human peripheral blood lymphocytes, the *in vivo* antigen-specific T cell experiment in mouse model was set up in order to investigate the ability of LPS from *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* and *E. coli* in the induction of OVA-specific Th response. As expected, the splenocytes from Th2 control group (Montanide ISA720 + OVA) produced low amount of antigen-specific IFN- γ and high amount of antigen-specific IL-5 as compared to the positive Th1 control group; Montanide ISA720 + CpG ODN 1826 + OVA. Mice that immunized with LPS from *P. gingivalis* or *A. actinomycetemcomitans* combined with Montanide ISA720 + OVA showed lower levels of antigen-specific IFN- γ production and higher levels of antigen-specific IL-5 production than the positive Th1 control group. It should be noted that mice that immunized with Montanide ISA720 + *E. coli* LPS + OVA showed to produce low amount of both antigen-specific IFN- γ and IL-5. In conclusion, our study showed that *P. gingivalis* and *A. actinomycetemcomitans* LPS poorly activated human Mo-DCs. Data from human MLR and antigen-specific T cell response in mouse model suggest that LPS from the two plaque bacteria seem to drive Th2-bias.

บทคัดย่อ

การพัฒนาการของการตอบสนองของทีเซลล์เพอร์ (T helper) แบบที่ 1 (Th1) กับ ทีเซลล์เพอร์แบบที่ 2 (Th2) เป็นที่ทราบว่าเป็นรากฐานสำคัญในการกำหนดว่าการตอบสนองต่อเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคนั้นจะเป็นไปในทางการป้องกันหรือไม่ป้องกัน ในทางตรงกันข้ามหากการตอบสนองของทีเซลล์เพอร์แบบที่ 1 หรือ ทีเซลล์เพอร์แบบที่ 2 ดำเนินต่อไปอย่างไม่สิ้นสุดอาจเป็นสาเหตุของการผลิตไซโตไคน์ (cytokines) มากเกิน อันจะนำไปสู่การเสียหายของเนื้อเยื่อปกติได้ โดยที่ปริมาณของสารสื่อกลางการอักเสบ (inflammatory mediators) ที่มาก เช่นเดียวกับทีเซลล์ (T cells) และบีเซลล์ (B cells) ที่แทรกซึมมาจำนวนมากเป็นลักษณะของโรคปริทันต์อักเสบขั้นรุนแรง การรวบรวมข้อมูลเกี่ยวกับการตอบสนองของทีเซลล์เพอร์แบบที่ 1 กับ ทีเซลล์เพอร์แบบที่ 2 ในโรคปริทันต์อักเสบยังมีความขัดแย้งกันอยู่ ส่วนของข้อมูลที่ยังไม่มีผลสรุปที่ชัดเจนเหล่านี้มีความสำคัญในพยาธิสภาพของโรคปริทันต์อักเสบและยังคงไม่เพียงพอ ปัจจุบัน เซลล์เดนดริติก (dendritic cells, DCs) ได้รับการยอมรับเป็นอย่างดีว่ามีบทบาทที่สำคัญไม่เฉพาะในการเริ่มการกระตุ้นนาอีฟ ทีเซลล์ (naïve T cells) นอกจากนั้นยังควบคุมชนิดของการตอบสนองของทีเซลล์เพอร์ด้วย กระบวนการที่เดนดริติกเซลล์ไปชักนำการตอบสนองของทีเซลล์เพอร์แบบที่ 1 และ ทีเซลล์เพอร์แบบที่ 2 อย่างไรนั้น เป็นหัวข้อที่ได้รับความสนใจอย่างมาก มีหลายปัจจัยที่เป็นตัวกำหนดการเปลี่ยนแปลงของทีเซลล์เพอร์อันรวมถึง อินเตอร์ลูคิน-12, อินเตอร์ลูคิน-10, การแสดงออกของไอแคม-1 (ICAM-1), ปริมาณของแอนติเจน, เนื้อห ไลแกนด์ (Notch ligands) และชนิดของเดนดริติกเซลล์

พอร์ไฟโรโมนาส จินจิวาไลส (Porphyromonas gingivalis) และ *แอคตินไมเซียมคอมมิแทน (Actinobacillus actinomycetemcomitans)* เป็นกุญแจสำคัญในการเกิดโรคปริทันต์อักเสบ แบคทีเรียพวกนี้อาศัยอยู่ในรูปของคราบจุลินทรีย์ในไบโอฟิล์ม (microbial plaque biofilms) ที่อยู่ติดกับเหงือกซึ่งพบว่าเต็มไปด้วยแอนติเจนพรีเซ็นติงเซลล์ (antigen presenting cells (APCs)) พบแลงเกอฮานส์เซลล์ (langerhans cells) ในชั้นเยื่อเมือกเหงือก ขณะที่เดนดริติกเซลล์ในเนื้อเยื่อถูกพบในลามินา โพรเพรีย (lamina propria) มีการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญของ ซีดี83 (CD83) (แอนติเจนของเดนดริติกเซลล์ที่เจริญเต็มที่) และการแสดงออกของโค-สติมูลาโทรโมเลกุล (co-stimulatory molecules) บนเซลล์เดนดริติกและบีเซลล์ในเนื้อเยื่อปริทันต์ เซลล์ซีดี83 (CD83+) เหล่านี้เชื่อมโยงอยู่กับกลุ่มของทีเซลล์ที่แสดงซีดี4 (CD4+) ดังนั้นจึงเป็นการชี้ให้เห็นการทำงานร่วมกันอย่างใกล้ชิดของทีเซลล์และแอนติเจนพรีเซ็นติงเซลล์ในสภาพแวดล้อมของเหงือก ในการศึกษาครั้งนี้ คณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับผลของไลโปโพลีแซคคารายด์ (แอลพีเอส) (lipopolysaccharide, LPS) จาก *พอร์ไฟโรโมนาส จินจิวาไลส* และ *แอคตินไมเซียมคอมมิแทน* ต่อเซลล์เดนดริติกที่เตรียมมาจากโมโนไซต์ของมนุษย์ (human monocyte-derived dendritic cells, Mo-DCs) โดยพิจารณาว่าการแสดงออกของโค-สติมูลาโทรโมเลกุล, การผลิตไซโตไคน์ และการชักนำของการเปลี่ยนแปลงของทีเซลล์เพอร์ การทดสอบ mixed-leukocyte reaction (MLR) ในมนุษย์ และการทดลองในสิ่งมีชีวิตของการตอบสนองของทีเซลล์ที่จำเพาะเจาะจงต่อ ovalbumin (OVA) ในหนูทดลอง (mouse model) ซึ่งถูกใช้ในการตรวจสอบชนิดของการตอบสนองของทีเซลล์เพอร์ที่ชักนำโดย LPS จากแบคทีเรียที่ก่อโรคทั้งสองชนิดในคราบจุลินทรีย์เปรียบเทียบกับไลโปโพลีแซคคารายด์ของ *เอสเชอริเชีย คอลิ (Escherichia coli)* LPS)

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์เดนดริติกจาก ซีดี14 โมโนไซต์ (CD14+ monocytes) ที่แยกโดยวิธีทางฟลูออริเมตริก (flow cytometrically-sorted) ที่ได้มาจากผู้บริจาคที่มีสุขภาพสมบูรณ์ โมโนไซต์จะถูกทำให้เปลี่ยนแปลงไปเป็นเดนดริติกเซลล์ที่ยังไม่เจริญเต็มที่ (immature DCs) โดยการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ (RPMI-1640) ที่ประกอบด้วย 10 % ของซีรัมของผู้

บริจาค และไซโตไคน์ GM-CSF และอินเตอร์ลิวคิน-4 พบว่าลักษณะภายนอกของเดนดริติกเซลล์ที่ยังไม่เจริญเต็มที่ที่มี CD1a+, CD14+, CD40+, CD80+, CD83+ และ HLA-DR+ เดนดริติกเซลล์ที่ยังไม่เจริญเต็มที่ซึ่งเตรียมมาจากโมโนไซต์ (immature Mo-DCs) จะถูกกระตุ้นด้วย LPS ที่มีความเข้มข้นที่แตกต่างกันของ พอร์ไฟโรไมแนส จินจิवालิส, แอคติโนเบซิลัส แอคติโนไมซิ เตมคอมมิแทน และ เอสเชอริเชีย คอลิ (0, 100, 300, 1000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบการผลิตของ ทุเมอร์ เนโครติซ แฟคเตอร์ (TNF)-อัลฟา, อินเตอร์ลิวคิน-10 และ อินเตอร์ลิวคิน-12 พี 70 (IL-12 p70) ในสารละลายที่หลั่งออกมาในอาหารเลี้ยงเซลล์ (culture supernatants) ด้วยวิธีอีไลซ่า (ELISA) ส่วนเซลล์จะถูกนำไปวัด CD40, CD80, CD83 และ HLA-DR โดยโฟลไซโตมิเตอร์ (flow cytometry) พอร์ไฟโรไมแนส จินจิवालิส LPS ชักนำการแสดงออกของโค-สติมูเลทรีโมเลกุล (CD40, CD80), HLA-DR และ CD83 ในระดับต่ำ ซึ่งแตกต่างกับ เอสเชอริเชีย คอลิ LPS และ แอคติโนเบซิลัส แอคติโนไมซิ เตมคอมมิแทน LPS ทั้ง พอร์ไฟโรไมแนส จินจิवालิส LPS และ แอคติโนเบซิลัส แอคติโนไมซิ เตมคอมมิแทน LPS ชักนำการผลิต ทีเอ็นเอฟ-อัลฟา ในปริมาณน้อย และแทบไม่พบ อินเตอร์ลิวคิน-10 เมื่อเปรียบเทียบกับ เอสเชอริเชีย คอลิ LPS ซึ่ง LPS จากแบคทีเรียทั้ง 3 ชักนำการผลิต อินเตอร์ลิวคิน-12 พี70 เพียงเล็กน้อย หรือไม่มีเลย คณะผู้วิจัยทำการประเมินผลต่อไปถึงความสามารถของ พอร์ไฟโรไมแนส จินจิवालิส LPS และ แอคติโนเบซิลัส แอคติโนไมซิ เตมคอมมิแทน LPS ในการกระตุ้นเดนดริติกเซลล์ที่ยังไม่เจริญเต็มที่ซึ่งเตรียมมาจากโมโนไซต์เพื่อเริ่มการกระตุ้นเนอีฟ ซีดี4+ ทีเซลล์ (naïve CD4+ T cells) ของมนุษย์ และมีส่วนช่วยในการพัฒนาของการตอบสนองของทีเซลล์เพอร์แบบที่ 1 หรือ ทีเซลล์เพอร์แบบที่ 2 ที่เกี่ยวกับการชักนำการผลิตไซโตไคน์ที่ไม่ดีนั้น ในการกระตุ้นที่เซลล์เดนดริติกที่ยังไม่เจริญเต็มที่ซึ่งเตรียมมาจากโมโนไซต์ของ พอร์ไฟโรไมแนส จินจิवालิส LPS และ แอคติโนเบซิลัส แอคติโนไมซิ เตมคอมมิแทน LPS จะชักนำการตอบสนองของเนอีฟ ทีเซลล์ที่มาจากต่างคนกันได้ไม่ดี (allogeneic naïve CD4+ T cells) เมื่อเปรียบเทียบกับ เอสเชอริเชีย คอลิ LPS ในการกระตุ้นเซลล์เดนดริติกที่ยังไม่เจริญเต็มที่ซึ่งเตรียมมาจากโมโนไซต์ พบการผลิตอินเทอเฟรอน แกมมา (IFN- γ) ในระดับต่ำในการทดลอง MLR ของ พอร์ไฟโรไมแนส จินจิवालิส LPS และ แอคติโนเบซิลัส แอคติโนไมซิ เตมคอมมิแทน LPS ในการกระตุ้นเซลล์เดนดริติกที่ยังไม่เจริญเต็มที่ซึ่งเตรียมมาจากโมโนไซต์ เมื่อเทียบกับการทดลอง MLR ของ เอสเชอริเชีย คอลิ LPS ในการกระตุ้นเซลล์เดนดริติกที่ยังไม่เจริญเต็มที่ซึ่งเตรียมมาจากโมโนไซต์ ซึ่งพบการผลิตอินเทอเฟรอน แกมมา ในปริมาณที่สูง ส่วนการผลิต อินเตอร์ลิวคิน-5 ถูกตรวจพบในปริมาณต่ำเหมือนกันในทุกการทดลอง MLR

เนื่องจาก การมีทีเซลล์ที่มีความจำเพาะต่อแอนติเจนในอัตราที่ต่ำในเซลล์เม็ดเลือดขาวในกระแสเลือดของมนุษย์ การทดลองในสิ่งมีชีวิตเกี่ยวกับทีเซลล์ที่มีความจำเพาะต่อแอนติเจนจึงถูกสร้างขึ้นเพื่อตรวจสอบความสามารถของ LPS จาก พอร์ไฟโรไมแนส จินจิवालิส และ แอคติโนเบซิลัส แอคติโนไมซิ เตมคอมมิแทน และ เอสเชอริเชีย คอลิ ในการชักนำของการตอบสนองของทีเซลล์ที่จำเพาะเจาะจงต่อ OVA โดยทำการทดลองในหนู ดังที่คาดไว้ splenocytes จากกลุ่มควบคุมที่เป็นทีเซลล์เพอร์แบบที่ 2 (Montanide ISA720 + OVA) จะผลิตแอนติเจนที่จำเพาะต่ออินเทอเฟรอน แกมมาจำนวนน้อย และแอนติเจนที่จำเพาะต่ออินเตอร์ลิวคิน -5 จำนวนมาก เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เป็นทีเซลล์เพอร์แบบที่ 1; Montanide ISA720 + CpG ODN 1826 + OVA. หนูทดลองที่ได้รับการฉีดด้วย LPS จาก พอร์ไฟโรไมแนส จินจิवालิส หรือ แอคติโนเบซิลัส แอคติโนไมซิ เตมคอมมิแทน กับ Montanide ISA720 + OVA แสดงการมีแอนติเจนที่จำเพาะต่ออินเทอเฟรอน แกมมาจำนวนน้อย และแอนติเจนที่จำเพาะต่ออินเตอร์ลิวคิน -5 จำนวนมากกว่ากลุ่มควบคุมที่เป็นทีเซลล์เพอร์แบบที่ 1 เป็นที่น่าสังเกตว่าหนูทดลองซึ่งฉีดด้วย Montanide ISA720 + เอสเชอริเชีย คอลิ LPS + OVA นั้นผลิตแอนติเจนที่จำเพาะต่ออินเทอเฟรอน แกมมาและอินเตอร์ลิวคิน -5 ในปริมาณ ต่ำ โดยสรุป งานของคณะผู้วิจัยได้แสดงว่า พอร์ไฟโรไมแนส จินจิवालิส และ

แอสคิตินเบซิส แอสคิตินไมซิเตมคอมมิแทน LPS เป็นตัวกระตุ้นที่ไม่ดีในเซลล์เดนดริติกที่ยังไม่เจริญเต็มที่ซึ่งเตรียมมาจากโมโนไซต์ที่ได้จากมนุษย์ ข้อมูลจากการทดลอง MLR ในมนุษย์ และการตอบสนองของทีเซลล์ที่มีความจำเพาะต่อแอนติเจนในหนูทดลอง แสดงให้เห็นว่า LPS จากแบคทีเรียในครัวเรือนทั้ง 2 ชนิด ดูเหมือนจะผลักดันการแสดงออกที่เฮลเพอร์ 2 ในแบบที่ 2