การพัฒนาที-เซลล์ไลน์จากเลือดที่มีความสัมพันธ์ต่อ *พอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิส* ในผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบรุนแรง

นางสาว แสงโสม ประจะเนย์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
ภาควิชาปริทันตวิทยา
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2539

ISBN 974-635-550-3

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ก 17162528

Establishment of human peripheral blood T-cell lines reactive with *Porphyromonas gingivalis* in severe periodontitis patients

Miss Sangsom Prachaney

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Department of Periodontology

Graduate School

Chulalongkorn University

Academic Year 1996

ISBN 974-635-550-3

Thesis Title : Establishment of human peripheral blood T-cell lines reactive with *Porphyromonas gingivalis* in severe periodontitis patients.

By : Miss Sangsom Prachaney

Department : Periodontology

Thesis advisor : Dr. Rangsini Mahanonda

Thesis co-advisor : Assistant Professor Suranan Tirawatnapong

.....

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

.....Dean of Graduate School

(Professor Supawat Chutivongse, M.D.)

Thesis Committee

.....Chairman

(Associated Professor Nophadol Suppipat)

.....Thesis Advisor

(Dr. Rangsini Mahanonda)

.....Thesis Co-advisor

(Assistant Professor Suranan Tirawatnapong)

.....Member

(Assistant Professor Dr. Mano Kuratana)

.....Member

(Dr. Sathit Pichyangkul)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

แสงโสม ประจะเนย์ : การพัฒนาที-เซลล์ไลน์จากเลือดที่มีความสัมพันธ์ต่อ *พอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิส* ในผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบรุนแรง (ESTABLISHMENT OF HUMAN PERIPHERAL BLOOD T-CELL LINES REACTIVE WITH *Porphyromonas gingivalis* IN SEVERE PERIODONTITIS PATIENTS) อาจารย์ที่ปรึกษา : อาจารย์ทันตแพทย์หญิง ดร. รังสินี มหานนท์, อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สุรนันท์ ตีระวัฒนพงษ์ , 109 หน้า. ISBN 974-635-550-3.

จุดมุ่งหมายการศึกษาเพื่อสร้างที-เซลล์ไลน์จากเลือดของผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบรุนแรง ที่มีความสัมพันธ์ต่อ *พอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิส* และตรวจสอบฟีโนไทป์บนผิวเซลล์, คุณสมบัติจำเพาะรวมทั้งชนิดของไซโตไคน์ เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียร์เซลล์ จากผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบรุนแรง 2 ราย ถูกกระตุ้นเป็นเวลา 9 วัน ด้วยแบคทีเรีย *พอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิส* ที่ถูกฆ่าด้วยความร้อน เซลล์ที่จำเพาะต่อแบคทีเรียชนิดนี้ถูกนำมาเลี้ยงต่อเป็นระยะเวลา 6-8 สัปดาห์ โดยมีช่วงพัก 1 สัปดาห์และกระตุ้น 1 สัปดาห์สลับกันไป ช่วงพัก เซลล์ถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ ที่มีรีคอมบิแนนอินเทอร์ลูคิน-2 และในช่วงกระตุ้น จะกระตุ้นด้วยไฟโตฮีแมกกลูตินิน เซลล์ไลน์ทั้งสองที่มีความจำเพาะต่อแบคทีเรียนี้ถูกตรวจวัดการแสดงความจำเพาะต่อ *พอร์ไฟโรโมแนส จินจิวาลิส* ด้วยวิธีโพรลิเฟอเรชัน และแอนติเจนบนผิวเซลล์เมื่อตรวจสอบด้วยการย้อมด้วย โมโนโคลนอล แอนติบอดี ที่ติดสลากด้วยสารเรืองแสงและวัดด้วยวิธีโฟลไซโตเมทรี พบว่าเซลล์ไลน์ของผู้ป่วยหนึ่งมี ที-เซลล์ชนิดที่เป็น ซีดี4 65% และ ซีดี8 35% ส่วนอีกเซลล์ไลน์หนึ่งมีที-เซลล์ชนิด ซีดี4 15% และ ซีดี8 75% การวัดไซโตไคน์ที่สร้างจากที-เซลล์ไลน์โดยวิธีอีไลซา พบว่าที-เซลล์ไลน์ทั้งสองผลิต อินเทอร์เฟอรอนแกมมา แต่ไม่ผลิต อินเทอร์ลูคิน-4 ซึ่งแสดงถึงความเป็นไปได้ที่มีที-เซลล์แบบ1 เป็นเซลล์เด่น อย่างไรก็ตามบทบาทของที-เซลล์แบบ1ในการเกิดโรคปริทันต์อักเสบยังคงต้องมีการศึกษาต่อไป

ภาควิชา ปริทันตวิทยา ลายมือชื่อนิสิต แสงโสม ประจะเนย์

สาขาวิชา ปริทันตศาสตร์ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

ปีการศึกษา 2539 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

C 765399 : MAJOR PERIODONTICS
KEY WORD: *Porphyromonas gingivalis* / T- CELL LINE / CYTOKINE / PERIODONTITIS
SANGSOM PRACHANEY : ESTABLISHMENT OF HUMAN PERIPHERAL BLOOD T- CELL LINES REACTIVE WITH *Porphyromonas gingivalis* IN SEVERE PERIODONTITIS PATIENTS. THESIS ADVISOR : DR. RANGSINI MAHANONDA. THESIS CO-ADVISOR : ASSISTANT PROFESSOR SURANAN TIRAWATNAPONG. 109 pp. ISBN 974-635-550-3

The aim of the study was to establish peripheral blood T-cell lines(TCLs) reactive with *Porphyromonas gingivalis* in severe adult periodontitis patients and also to investigate these cells in terms of their surface phenotypes, specificity and cytokine profiles. Peripheral blood mononuclear cells from 2 periodontitis subjects were activated by heat-killed whole cell *P. gingivalis* for 9 days and maintained subsequently through the cycle of 1 week rest in enriched medium and rIL-2, and 1 week stimulation with phytohaemagglutinin. The 2 TCLs reactive to *P. gingivalis* were established in culture up to 6-8 weeks. The specificity of each TCLs was assessed periodically by proliferation assay. Flow cytometric analysis of one TCL revealed approximately 65% CD4+ and 35% CD8+ cells, while the other TCL showed 15% CD4+ and 75% CD8+ cells. IL-4 and IFN-γ production by TCLs were measured with ELISA. Both TCLs reactive to *P. gingivalis* produced IFN-γ but none of IL-4, hence suggestive of a possible prominence of type 1 T-cells. The role of these cells for the immunopathogenesis of chronic inflammatory periodontal disease remained to be determined.

ภาควิชา ปริทันตวิทยา ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา ปริทันตศาสตร์ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2539 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my sincere gratitude and appreciation to my advisor, Dr. Rangsini Mahanonda, for her enthusiastic guidance, encouragement, supervision, suggestions, comments, and kindness throughout the course of my Master degree programme. I am extremely indebted to my co-advisor, Assist. Prof. Suranan Tirawatnapong for her guidance, suggestions, correction of this thesis, and invaluable technical advice.

Grateful thanks to Dr. Sathit Pichyangkul and Mrs. Panita Gosi of Immunology Unit, Armed Forces Research Institute of Medical Sciences (AFRIMS), for providing the facilities for flow cytometry and cytokines analysis. A special appreciation is extended to the staff of Gynaecology Department, Faculty of Medicine for providing the facilities for liquid scintillation counter and the staff of Radiology Department, Faculty of Medicine for cell radiation throughout this experiment.

I wish to thank Assoc. Prof. Jintakorn Kuwattanasuchat and Ms. Nonthaya Sirimas for their kindly provided bacteria used in this research. Grateful thanks to Assoc. Prof. Somporn Swasdison for providing the facilities for microscopic photoghaphs. I also would like to thank Ms. Pipan Pittayanon for her advice regarding statistical analysis.

I would like to acknowledge research grant from the Graduate School, Chulalongkorn University for the financial support for this thesis study. My sincere appreciation is also extended to the staff of Periodontology Department, Faculty of Dentistry for their kindness, guidance and encouragement. Thanks are also due to Dr. Orawan Charatkulangkun for assistance with the preparation of the presentation slides. Special thanks are given to my friends for their warm love and their help for my research.

Finally, I would like to express my profound gratitude and appreciation to my father, mother, grandmother and my sisters for their love, caring, understanding and encouragement.

Sangsom Prachaney

Table of contents

page

Abstract (Thai).....iv

Abstract (English).....v

Acknowledgements.....vi

List of tables.....x

List of figures.....xi

Abbreviations.....xii

Chapter

1. Introduction.....1

1.1 Background of present study.....1

1.2 Objectives.....9

1.3 Field of research.....9

1.4 Criteria inclusions.....9

1.5 Limitation of research.....10

1.6 Application and expectation of research.....10

2. Literature review.....12

2.1 Introduction.....12

2.2 Microbial aspects of CIPD.....12

2.2.1 Plaque bacteria.....12

2.2.2 *Porphyromonas gingivalis*.....16

2.2.2.1 Ability to adhere and colonize.....17

2.2.2.2 Immune-evasion of *P. gingivalis*.....19

page

2.2.2.3 Tissue destruction.....20
2.3 Immunological aspects of CIPD.....21
2.3.1 Introduction.....21
2.3.2 Immunoregulation of CIPD by T-cells.....23
2.3.3 Type 1 and type 2 T-cells.....26
2.3.4 Cytokines.....29
2.3.5 Cytokine profiles of gingival cells.....31
2.3.6 Immunopathogenesis of CIPD: hypothesis.....32

3. Materials and methods.....35
3.1 Bacterial preparation.....35
3.3.1 *Porphyromonas gingivalis*.....35
3.2 Subject selection.....36
3.3 Isolation of peripheral blood mononuclear cells (PBMC).....39
3.4 Establishment of Epstein-Barr Virus (EBV) transformed B lymphoblastoid cell line (LCLs).....39
3.4.1 Testing LCLs by immunofluorescence technique staining and flow cytometry.....39
3.4.2 Testing for an appropriate radiation dose for LCLs.....40
3.5 Establishment of T-cell lines (TCLs) from peripheral blood.....41
3.6 Specificity of TCLs.....43
3.7 Phenotypic study.....43
3.7.1 Staining of PBMC with monoclonal antibodies.....43
3.7.2 Flow cytometric analysis.....44
3.8 Cytokine study.....46

page

3.8.1 Testing for Interleukin 4 (IL-4).....46

3.8.2 Testing for Interferon-γ (IFN-γ).....47

4. Results.....49

4.1 LCLs as antigen presenting cells.....49

4.2 Specificity of TCLs.....55

4.3 Phenotypic analysis of TCLs.....56

4.4 Cytokine analysis.....59

5. Conclusions and discussion.....64

Bibliography.....71

Biography.....96

List of tables

Table page

1. Functional distinction of T-cells based on cytokine profile.....28
2. Monoclonal antibodies used for flow cytometric analysis.....44
3. Testing for appropriate irradiation dose for LCLs as antigen presenting cells without prior stimulation.....53
4. Testing for appropriate irradiation dose for LCLs as antigen presenting cells with *P. gingivalis* or PHA stimulation.....53
5. Phenotypic study of CC-TCLs and SA-TCLs.....56
5. IFN-γ production from CC-TCLs and SA-TCLs cultures as detected by ELISA (pg/ml).....60

List of figures

Figure page

1. Hypothetical cellular and molecular model of CIPD....8
2. Periodontal conditions of CC and SA....37
3. Radiographic appearance of CC and SA....38
4. Diagram of the establishment of *P. gingivalis* specific T-cell lines....42
5. CC-LCLs and SA-LCLs in 4 months culture....50
6. Immunofluorescence staining of CC-LCLs and SA-LCLs....51
7. Flow cytometric analysis of CC-LCLs and SA-LCLs....52
8. Testing for an appropriate radiation dose for CC-LCLs....54
9. Testing for an appropriate radiation dose for SA-LCLs....54
10. Proliferative response of CC-TCLs and SA-TCLs....55
11. Phenotypic analysis of CC-TCLs after second round of stimulation and rest....57
12. Phenotypic analysis of SA-TCLs after second round of stimulation and rest....58
13. IFN-γ production from CC-TCLs (Day 28)....61
14. IFN-γ production from CC-TCLs (Day 42)....61
15. IFN-γ production from SA-TCLs (Day 28)....62
16. IFN-γ production from SA-TCLs (Day 42)....62
17. IFN-γ production from SA-TCLs (Day 56)....63

Abbreviations

AMLR	autologous mixed lymphocyte reaction
APC	antigen presenting cell
CD	cluster of differentiation
CIPD	chronic inflammatory periodontal disease
CPM	counts per minute
CTL	cytotoxic T-Lymphocyte
DTH	delayed type hypersensitivity
EBV	Epstein-Barr virus
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FBS	foetal bovine serum
Gy	Gray
HLA	human leukocyte antigens
hr	hour
IFN-γ	interferon gamma
Ig(s)	immunoglobulin (s)
IL	interleukin
IU/ml	international unit/ml
LCLs	EBV transformed B lymphoblastoid cell lines
LPS	lipopolysaccharide
MAb	monoclonal antibody
MHC	major histocompatibility complex
OD	optical density
PBA	polyclonal B-cell activation
PBMC	peripheral blood mononuclear cell

PBS	phosphate buffered saline
PE	phycoerythrin
PHA	phytohaemagglutinin
PMN	polymorphonuclear leukocyte
PS	polysaccharide
PTL-P	proliferating T-lymphocyte precursor
PWM	pokeweed mitogen
rIL-2	recombinant IL-2
RPMI	RPMI 1640 supplemented with glutamine, penicillin and streptomycin
SEM	standard error of the mean
TCLs	T-cell lines
TCR	T-cell receptor
Th1	T-helper1
Th2	T-helper2
U/ml	unit/ml