

The Lipopolysaccharide from *Porphyromonas gingivalis* Induces Vascular Permeability

Su-Ryun Kim^{1†}, Seong-Kyoon Jeong^{1†}, Woo-Sik Kim¹, Hwa-Jin Jeon¹, Hyun-Joo Park¹,
Mi-Kyoung Kim¹, Hye-Ock Jang², Il Yun², Soo-Kyung Bae², and Moon-Kyoung Bae^{1*}

¹Department of Oral Physiology, ²Department of Dental Pharmacology, School of Dentistry, Pusan National University, Yangsan 626-870, Korea

(received January 4, 2011 ; revised January 28, 2011 ; accepted February 11, 2011)

Porphyromonas gingivalis, one of the major periodontal pathogens, is implicated in the initiation and progression of periodontal disease. The initial stages of periodontal inflammation are accompanied by vascular hyperpermeability. In our present study, we report that the *P. gingivalis* lipopolysaccharide (LPS) increases the mRNA expression of interleukin-8 (IL-8), a major inducer of vascular permeability, in vascular endothelial cells. *P. gingivalis* LPS also stimulated the induction of IL-8 secretion in endothelial cells. The *P. gingivalis* LPS-induced expression of IL-8 was primarily modulated by nuclear factor- κ B (NF- κ B). *P. gingivalis* LPS significantly enhanced the vascular permeability both *in vitro* and *in vivo*, and a blockade of the IL-8 receptor decreased the *P. gingivalis* LPS-induced vascular permeability. Taken together, these results suggest that *P. gingivalis* LPS increases vascular permeability through the NF- κ B-dependent production of IL-8 in vascular endothelial cells.

Key words: human vascular endothelial cells, interleukin-8, *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide, vascular permeability.

서 론

혈관을 둘러싼 혈관내피세포는 혈관벽을 유지하고, 혈류에서 간질액으로 유체, 분비성 인자, 면역세포들의 이동을

조절하는데 중요한 역할을 하고 있다(Stevens 등, 2000). 증가된 혈관내피세포의 투과성은 혈관신생의 초기 단계의 특징이며, 상처치유, 암, 당뇨병성 망막증, 동맥경화증등과 같은 여러가지 생리적, 병리적 상황에서 관찰되는 염증성 과정의 특징으로 잘 알려져 있다(Bates와 Harper, 2002; Weis, 2008).

*Porphyromonas gingivalis*는 그람음성 혐기성 세균으로 대표적 만성염증 질환인 치주질환의 시작 및 진행에 주된 원인균으로 알려져 있다(Slots와 Ting, 1999). 특히 *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide (LPS)는 혈관내피세포의 염증성 표지자인 ICAM-1과 VCAM-1 같은 세포부착인자들의 발현을 증가시킨다(Park 등, 2009; Kim 등 2008). 그리고 *P. gingivalis* LPS는 혈관내피세포의 이동, 침윤, 관형성을 증가함으로써 혈관신생능을 촉진시킨다(Koo 등, 2007). 하지만 *P. gingivalis* LPS가 혈관투과성에 어떠한 영향을 미치는 지에 대해서는 전혀 알려져 있지 않다.

Interleukin-8 (IL-8)는 CXC 케모카인들 중 하나로써 원래 호중구의 화학주화성 인자로 알려졌다(Baggiolini 등, 1994). IL-8은 다양한 자극원에 반응하여 백혈구뿐만 아니라 혈관내피세포와 섬유아세포에서 분비된다고 알려져 있다(Hoffmann 등, 2002). 그리고 IL-8은 혈관내피세포에 존재하는 수용체에 작용하여 혈관내피세포의 이상을 초래하고 혈관염증과 혈관신생을 촉진시킨다고 한다(Li 등, 2003; Reutershan 등, 2006). 또한 최근에는 IL-8이 혈관신생 초기단계에서 혈관내피세포의 투과성인자로 작용한다고 보고되었다(Biffi 등, 1995; Petreaca 등, 2007). 그러나 혈관투과성 증가과정 중 IL-8 발현을 조절하는 상위 자극원에 대해서는 잘 알려져 있지 않다.

본 연구에서는 *P. gingivalis* LPS가 혈관내피세포의 IL-8의 발현에 어떠한 영향을 미치는 지 조사하고 그 기전을

*Corresponding author: Moon-Kyoung Bae, Department of Oral Physiology, School of Dentistry, Pusan National University, Yangsan 626-870, Korea

Tel.: +82-51-510-8239; Fax.: +82-51-510-8239

E-mail: mkb@pusan.ac.kr

[†]Denotes co-first authors

알아보았다. 그리고 실제로 *P. gingivalis* LPS가 혈관투과성을 증가시키는 지 확인하고 이 과정에 IL-8이 관여하는 지에 대하여 연구하였다.

실험재료 및 방법

실험재료

Porphyromonas gingivalis LPS를 Invivogen (San Diego, CA, USA)에서 구입하여 사용하였다. Pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC)와 repertaxin은 Sigma (St Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Mouse monoclonal anti-I κ B α , pI κ B α 와 rabbit polyclonal anti-IKK α / β , pIKK α / β 및 horse radish peroxidase (HRP)가 결합된 anti-mouse IgG 혹은 anti-rabbit IgG 항체들은 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였다. Mouse monoclonal anti-PECAM과 anti- α -tubulin 항체들은 BD Biosciences (San Diego, CA, USA)와 Biogenex (San Ramon, CA, USA)에서 구입하였다. FITC가 결합된 anti-mouse IgG는 Jackson Immunoresearch (West Grove, PA, USA)에서 구매하여 사용하였다.

세포배양

실험에 사용한 human microvascular endothelial cells (HMECs)를 미국 CDC (Atlanta, GA)에서 획득하여 37°C, 95% 습도, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 세포는 10% FBS (Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada)에 1% antibiotics (Hyclon, Logan, Utah, USA)와 1 μ g/ml hydrocortisone (Sigma, St Louis, MO, USA) 및 10 ng/ml hEGF (Invitrogen, Gaithersburg, MD, USA)를 함유한 성장배지 MCDB (Invitrogen, Gaithersburg, MD, USA) 하에서 배양하면서 실험에 이용하였다. Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs)는 CLONECTICS (Walker Sville, MD, USA)에서 구매하여 5-8 세대 사이의 세포를 실험에 사용하였다. 0.2% gelatin이 도말된 세포 배양 접시에 10% FBS가 함유된 EGM-2 (CLONECTICS, Walker Sville, MD, USA) 성장 배지를 사용하여 배양하였다.

역전사-중합효소연쇄반응(RT-PCR)

혈관내피세포에서 전체 RNA를 추출하기 위해 TRIzol reagent kit (Invitrogen, Gaithersburg, MD, USA)를 이용하였다. cDNA를 합성하기 위하여 3 μ g의 total RNA를 사용하여 역전사 반응을 시행하였으며, reverse transcription kit (Promega, Madsion, WI, USA)를 이용하였다. 합성된 cDNA를 β -actin (sense: 5'-GACTACCTCATGAAGATC-3' antisense: 5'-GATCCACATCTGCTGGAA-3')과 인간 IL-8 (sense: 5'-GAAGGTGCAGTTTTGCCAAG-3' antisense: 5'-ACCCTCTGCACCCAGTTTTTC-3') primer를 이용하여

중합효소연쇄반응(PCR)을 시행하였다.

효소결합면역흡착분석법(Enzyme-linked immunosorbent assays: ELISA)

혈관내피세포에 *P. gingivalis* LPS를 12시간 동안 처리한 후 배양액을 수집하였다. 이 배양액을 4°C에서 원심 분리하여 상층액을 얻었다. 효소결합면역흡착검사키트(BioLegend, San Diego, CA, USA) 및 포함된 제품 설명서에 의거하여 배양액에 분비된 IL-8 단백질의 농도를 측정하였다.

Transient transfection과 reporter gene analysis

일시적인 형질주입(transient transfection)을 위해서, 혈관내피세포를 24 well plate에 배양한 후 사람 IL-8 발현조절 영역부위 (전사 시작부위 -416 에서 +44 부위)를 pGL3-Basic reporter vector (Promega, Madison, WI, USA)에 연결하여 제작한 luciferase vector를 lipofectamine plus transfection 방법을 이용하여 도입하였다. 형질주입 48시간 후 분석 키트(Promega, Madsion, WI, USA)를 사용하여 세포를 용해시키고, luciferase vector의 활성을 luminometer (Tuner Biosystems, Sunnyvale, CA, USA)를 사용하여 측정하였다.

Western immunoblot analysis

수확한 세포를 2-3회 차가운 PBS로 세척한 후 세포용해 용액(40 mM Tris-Cl, 10 mM EDTA, 120 mM NaCl, 0.1% NP-40 및 단백질 분해억제 시약)으로 용해시켰다. 각 단백질의 양은 BCA (Sigma, St Louis, MO, USA) 정량법으로 측정하였다. 30 μ g의 전체 단백질을 SDS-PAGE (poly acrylamide gel electrophoresis)로 변성 분리하였고, 이를 nitrocellulose membrane (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA) 막에 전이시켰다. Membrane의 blocking을 5% skim milk가 함유된 PBS-T (PBS, 0.1% Tween 20) 용액으로 상온에서 1시간 동안 실시한 후, 단백질의 발현을 측정하기 위해 적절한 1차 항체를 4°C에서 16시간 동안 반응시켰다. Horseradish peroxidase가 결합된 이차항체를 실온에서 1시간 반응시키고, 화학발광제(ECL: Amersham PharmaciaBiotech, Piscataway, NJ, USA)를 반응시킨 후 X-선 필름현상으로 단백질 발현을 확인하였다.

면역세포화학염색법(Immunocytochemistry)

Poly-L-lysine을 입힌 coverslip을 넣은 24 well plate에 세포를 배양하고 4% paraformaldehyde로 10분간 세포를 고정한 후 적절한 일차 항체와 FITC가 부착된 이차항체를 반응시켰다. DAPI를 함유한 Vectastain (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)으로 coverslip을 봉입(mounting)하였다. 제작된 표본은 형광현미경(Nikon, Tokyo, Japan)을 이용하여 관찰하였다.

In vivo 혈관투과성 분석(*in vivo* vascular permeability assay)

In vivo 혈관투과성은 Miles 법을 이용하여 분석하였다 (Weis, 2008). C57BL/6 마우스는 샘타코 (오산, 한국)에서 구입하였고, 부산대학교 양산캠퍼스 실험동물센터에서 사육하였다. 본 연구는 부산대학교 실험동물위원회의 승인을 얻었으며, 규정을 준수하여 진행하였다. 100 μ l 양의 Evans blue (0.9% NaCl에 1%로 희석) 용액을 마우스 꼬리정맥을 통해 주입하였다. 10분 후에 마우스 등의 피부 내로 *P. gingivalis* LPS를 주입하였다. 30분 후 마우스를 해부하여 등 피부 부분을 추출하였다. 떼어낸 피부는 formamide 용액에 담근 후 620 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다.

In vitro 혈관내피세포 투과성 분석(*In vitro* endothelial cell permeability assay)

혈관내피세포의 단층 투과도는 3 μ m 굵기와 12 mm 반지름 길이를 가진 Transwell (Corning-Costar, Corning, NY, USA)을 이용하여 측정하였다. 2×10^5 개의 세포를 upper chamber에 배양하고 *P. gingivalis* LPS와 repertaxin

을 처리하였다. 72시간 후 3-kDa 크기의 FITC-labeled dextran (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) 10 μ g/ml 을 upper chamber에 처리하고 37°C 에서 1시간 동안 반응시켰다. Perkin-Elmer fluorometer (490-nm excitation, 530-nm emission)를 사용하여 형광을 측정하여 이동한 dextran의 양을 정량하였다.

결 과

혈관내피세포에서 *P. gingivalis* LPS는 IL-8 mRNA 발현과 단백질 분비를 증가시킨다.

혈관내피세포인 HMEC에서 *P. gingivalis* LPS에 의한 IL-8 mRNA 발현 증가를 조사하기 위하여 RT-PCR 분석을 시행하였다. HMEC에 0, 1, 5, 10 및 20 μ g/ml 농도의 *P. gingivalis* LPS를 4시간 동안 처리한 결과, IL-8 mRNA의 발현양이 10 μ g/ml 농도에서 3.2배까지 증가하는 것을 확인하였다(Fig. 1A). 다음으로 *P. gingivalis* LPS (10 μ g/ml)를 0, 1, 2, 4 및 8시간 동안 처리한 후 IL-8

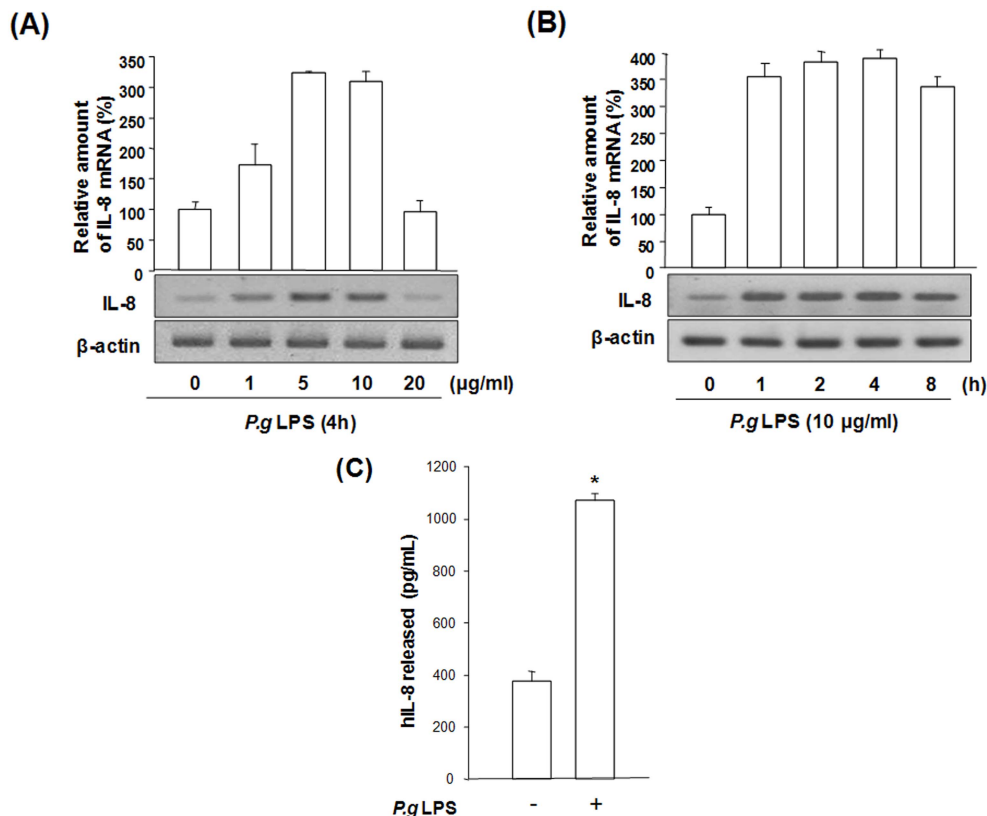


Fig. 1. Effect of *P. gingivalis* LPS on the IL-8 mRNA and protein in human vascular endothelial cells. (A) HMECs were stimulated for 4 h with the indicated concentrations or (B) with *P. gingivalis* LPS (10 μ g/ml) for the indicated times. Total RNA was isolated and then analyzed by RT-PCR using specific primers for human IL-8. β -actin was used as the internal control. The graph showed densitometric analysis assessing the relative mRNA levels from at least three independent experiments. Relative IL-8 mRNA levels were normalized to β -actin mRNA levels. The density of the control bands (untreated) was set to 100%. (C) HMECs were treated with *P. gingivalis* LPS (10 μ g/ml) for 12 h. The amount of IL-8 protein secreted was measured by ELISA. The results shown are representative of at least three independent experiments. * $P < 0.01$ compared to control.

mRNA의 발현양을 조사하였다. 그 결과, *P. gingivalis* LPS를 4시간 처리했을 때 IL-8 mRNA의 발현양이 가장 많이 증가되는 것으로 확인하였다(Fig. 1B).

또한, *P. gingivalis* LPS를 처리한 HMEC에서 IL-8 단백질의 분비를 효소결합면역흡착분석법으로 조사하였다. HMEC에 *P. gingivalis* LPS (10 µg/ml)를 12시간 처리한 후 세포 배양액을 모았다. RT-PCR 분석결과와 같이, *P. gingivalis* LPS를 처리했을 때 세포배양액에 분비된 IL-8 단백질 분비양이 증가되었다. 이상의 실험 결과들은 HMEC에서 *P. gingivalis* LPS가 IL-8 mRNA와 단백질 발현을 증가시킴을 보여준다.

혈관내피세포에서 *P. gingivalis* LPS는 NF-κB 활성을 통해 IL-8의 발현을 조절한다.

P. gingivalis LPS에 의해 IL-8의 발현이 증가되는 과정에 관여하는 전사조절인자를 찾기 위해 IL-8 프로모터 (전사 시작부위 -416에서 +44 부위)를 포함하는 luciferase vector를 사용하였다. HMEC에 제작된 luciferase vector를 주입하고 *P. gingivalis* LPS를 처리한 결과, *P. gingivalis* LPS (10 µg/ml)가 IL-8 프로모터 활성을 2.5배 증가시켰다(Fig. 2A). 게다가, NF-κB 억제물질인 pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC)를 전처리한 혈관내피세포의 경우 *P. gingivalis* LPS에 의한 IL-8 프로모터 활성 증가가 억제되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2A).

세포질에서 NF-κB와 결합하고 있는 inhibitory kappa B (IκB) 단백질이 분해되면 NF-κB는 핵으로 이동하여 타겟 유전자의 발현을 조절시킬 수 있다(Beinke와 Ley, 2004). IκB 상위의 인산화효소인 IKKα와 IKKβ는 IκB-α를 인산화시키며 이렇게 인산화된 IκB-α는 26S proteasome에 의해 분해된다(Zandi 등, 1997) 따라서 *P. gingivalis* LPS가

IKKα/β와 IκB-α의 인산화를 유도하는지 조사하기 위하여 Western immunoblot analysis를 시행하였다. 그 결과 *P. gingivalis* LPS (10 µg/ml)를 처리한 HMEC에서 IKKα/β와 IκB-α 단백질의 인산화가 증가되며, IκB-α 단백질양은 감소함을 확인하였다(Fig. 2B). 이상의 결과를 통해 HMEC에서 *P. gingivalis* LPS는 NF-κB 경로를 활성화시켜 IL-8 유전자 발현을 증가시킴을 알 수 있다.

P. gingivalis LPS가 유도하는 혈관투과성 증가에 IL-8이 매개한다.

IL-8은 혈관내피세포에 작용하여 혈관투과성의 증가를 유도하는 대표적인 혈관투과성 인자로 잘 알려져 있다(Fukumoto 등, 1998; Gavard 등, 2009). 본 연구에서 *P. gingivalis* LPS가 혈관내피세포에서 IL-8의 발현을 증가시키는 것을 확인하였다. 따라서 *P. gingivalis* LPS가 혈관투과성에 어떠한 영향을 미치는지, 나아가서는 이를 IL-8이 매개하는 지에 대해서 조사하였다. 먼저 HMEC에 IL-8 수용체 CXCR1과 CXCR2 억제제인 repertaxin을 전처리 한 후, *P. gingivalis* LPS를 처리해 혈관투과성의 변화를 조사하였다. 그 결과, *P. gingivalis* LPS (10 µg/ml)를 처리했을 때 혈관내피세포들 사이에서 틈 형성이 증가되는 것을 혈관내피세포 표면에서 구조적으로 발현되는 PECAM-1 단백질의 면역세포화학염색을 통해 확인하였다(Newman, 1997). 그리고 이러한 현상은 repertaxin (10 µM)을 처리한 경우 회복되었다(Fig. 3A). 또한 혈관내피세포의 단층 투과도를 FITC-dextran의 이동을 측정함으로써 혈관투과성 정도를 확인하였다. *P. gingivalis* LPS를 처리한 경우는 FITC-dextran의 혈관내피세포 투과도가 증가되었으며, repertaxin (10 µM)을 처리한 세포층의 경우 *P. gingivalis* LPS에 의해 증가된 혈관내피세포의 투과도가 감소되었다

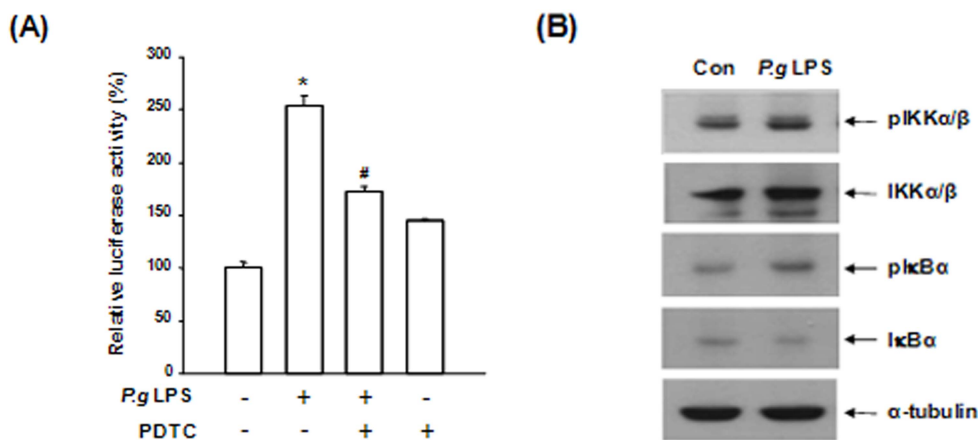


Fig. 2. NF-κB activation is essential for *P. gingivalis* LPS-induced IL-8 expression. (A) HMECs were transiently transfected with the IL-8 luciferase vectors, and then treated with *P. gingivalis* LPS (10 µg/ml) for 12 h in presence or absence of PDTC (100 µM). Data is the mean ± SE of triplicate experiments relative to the luciferase light units in the untreated cells (set at 100%). * $P < 0.01$ compared to the control; # $P < 0.01$ compared to *P. gingivalis* LPS. (B) HMECs were treated with *P. gingivalis* LPS (10 µg/ml) for 30 min. The Western blots were probed with the anti-phospho-IKKα/β, anti-IKKα/β, anti-phospho-IκBα, and anti-IκBα antibodies. α-tubulin was used as the loading control.

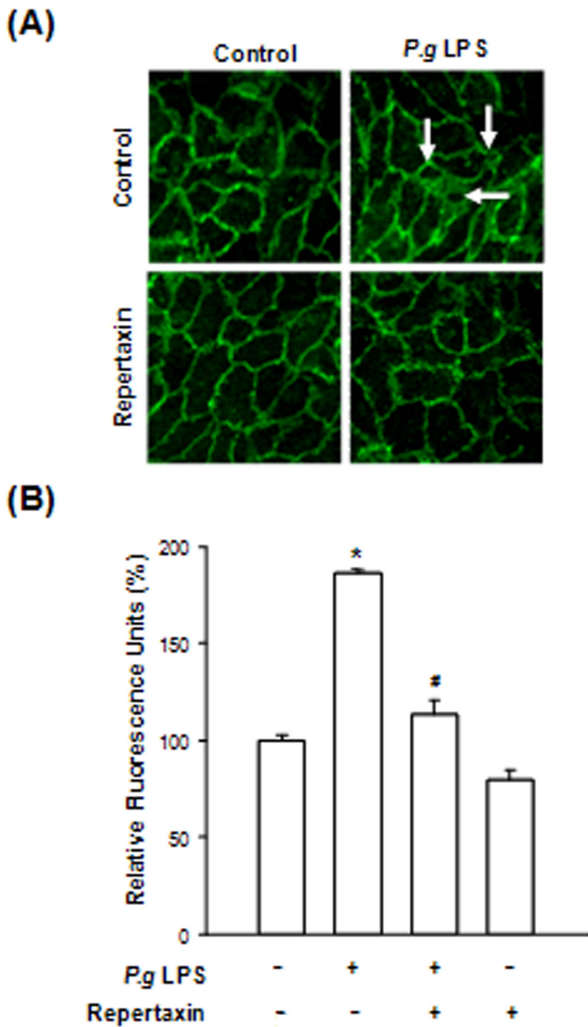


Fig. 3. Effect of IL-8 receptor inhibitor on the *P. gingivalis* LPS-induced *in vitro* vascular permeability (A) Vascular endothelial cells were preincubated with the repertaxin (10 μ M) before exposure to *P. gingivalis* LPS (10 μ g/ml) for 12 h. Immunocytochemical analysis of PECAM-1 was performed as described in “Materials and methods”. The arrows indicate the position of the paracellular gaps. (B) The endothelial monolayer permeability was measured using a Transwell system with a fluorescence-labeled dextran tracer. The HUVECs were pretreated with the repertaxin (10 μ M) and then with *P. gingivalis* LPS (10 μ g/ml) for 12 h. The results shown are representative of at least three independent experiments. * P < 0.01 compared to the control; # P < 0.01 compared to *P. gingivalis* LPS.

(Fig. 3B). 다음은 *P. gingivalis* LPS에 의한 혈관투과성 및 repertaxin의 효과를 *in vivo* 혈관투과성 모델에서 확인하였다. Evans blue 염료의 혈관의 유출상태로 보아 *P. gingivalis* LPS (10 μ g/100 μ l in endotoxin-free distilled water)는 생쥐 피부의 혈관투과도를 증가시켰으며, 이러한 현상 역시 repertaxin (1.3 μ g/100 μ l in DMSO) 처리에 의해 감소되는 것을 확인하였다(Fig. 4A). 혈관의 유출의 정도는 떼어낸 피부를 포르마미드에서 추출한 Evans blue를 흡광도로 정량화 하였다(Fig. 4B). 이상의 실험 결과들은

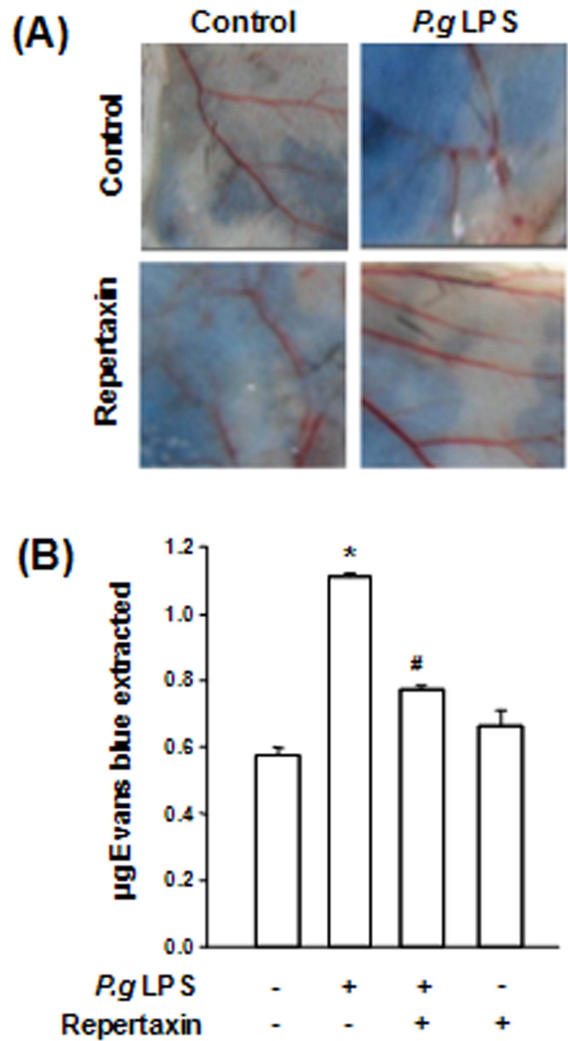


Fig. 4. Effect of IL-8 receptor inhibitor on the *P. gingivalis* LPS-induced *in vivo* vascular permeability (A) Mice were injected i.v. with Evans blue dye and then intradermally into the skin of C57BL/6 mice with *P. gingivalis* LPS (10 μ g/100 μ l in endotoxin-free D.W) in the presence or absence of repertaxin (1.3 μ g/100 μ l in DMSO) as described in “Materials and Method”. (B) The quantification of Evans blue dye extracted from the skin. The results shown are representative of at least three independent experiments. * P < 0.01 compared to the control; # P < 0.01 compared to *P. gingivalis* LPS.

P. gingivalis LPS가 IL-8을 매개하여 혈관 투과도를 높임을 시사한다.

고찰

치주질환은 치주 내 혈관이 풍부한 결합조직에서 발생되는 대표적인 만성염증질환으로써 구강세균과 이에 대한 구강내 반응이 주요원인으로 알려져 있다(Egelberg, 1966; Yun 등, 2005). 주된 치주질환 발병세균인 *P. gingivalis*에 의해 분비되는 LPS는 치주염 발병에 주된 인자로 알려져

있다(Wang와 Ohura, 2002). 또한 *P. gingivalis* LPS는 혈관내피세포의 세포부착인자들의 발현을 높임으로써 혈관내피세포의 이상현상을 일으키고(Mao 등, 2004; Nakamura 등, 2008) 이는 혈관을 둘러싼 혈관내피세포의 투과도를 증가시켜 백혈구의 이동을 촉진하여 혈관의 치주조직으로의 백혈구 누출을 초래한다고 알려져 있다. 하지만 *P. gingivalis* LPS가 실제로 혈관투과성에 어떠한 영향을 미치며, 관련 기전에 대해서는 알려져 있지 않다. 이에 본 연구는 *P. gingivalis* LPS가 IL-8의 발현 및 분비를 높이고, 증가된 IL-8이 혈관내피세포에 작용하여 혈관투과성을 증가시킨다는 사실을 증명하였다.

혈관신생의 초기단계는 증가된 혈관투과성을 수반한다고 알려져 있다(Libby, 2002). 그리고 이러한 과정들은 염증 과정을 더욱 심화시킨다고 한다. 본 연구실에서는 *P. gingivalis* LPS가 혈관내피세포에 직접적으로 작용하여 ERK 신호전달 경로를 거쳐 혈관내피세포의 이동, 침윤, 관형성을 증가시켜 혈관신생능을 촉진시킨다는 사실을 보고하였다(Koo 등, 2007). 따라서 *P. gingivalis* LPS가 유도하는 혈관투과성 및 과다혈관신생이 *P. gingivalis* LPS가 관여하는 치주염 진행과정을 더욱 촉진시킬 것으로 생각된다.

그람 음성 세균의 LPS는 포유류에 존재하는 Toll-like receptors (TLRs)에 결합하여 세포내 신호전달기전을 활성화시킨다(Wang와 Ohura, 2002). 특히 혈관내피세포는 단핵세포보다 높은 TLR4/TLR2의 비율을 가지며, 세균의 구성물이 TLR4에 주로 결합한다(Faure 등, 2000). 그리고 과다 발현된 TLR4가 발현세포의 NF- κ B와 AP-1을 활성화 한다고 알려져 있다(Medzhitov 등, 1998; Muzio 등, 1998). 따라서 *P. gingivalis* LPS는 혈관내피세포에 있는 TLR-4를 경유하여 전사인자인 NF- κ B 또는 AP-1의 발현 및 활성을 유도할 것으로 추정된다. 하지만 *P. gingivalis* LPS가 유도하는 혈관투과성에 혈관내피세포에 존재하는 TLR-4가 관여하는 지에 대한 여부는 추가적인 연구가 필요할 것이다.

치주질환 환자의 경우 구강세균이 순환계 경로를 이용해서 전신으로 순환되는 것으로 알려져 있다(Amar와 Han, 2003). 균혈증의 결과로 *P. gingivalis* LPS는 혈관으로 전달되며 이는 혈관내피세포에 직접적으로 영향을 끼치고, 결국 혈관과 심장에 전신성 염증반응을 일으킨다(Amar와 Han, 2003; Lee 등, 2008). 여러 역학조사를 통해 치주질환과 죽상동맥경화증과는 매우 관계가 깊은 것으로 보고되고 있다(Beck 등, 1996). 과다한 혈관투과성 및 혈관신생으로 인해 죽상동맥경화 플라크의 확장과 파열, 혈전증의 요인이 되기도 한다(van der Wal and Becker, 1999). 그리고 *P. gingivalis*를 포함하는 여러 치주질환균들이 죽상동맥경화 플라크에서 발견되기도 하였다(Chiu, 1999). 그러나 치주질환 원인균이 죽상동맥경화증의 발병을 일으키는 기전에 대해서는 잘 알려져 있지 않다. 본 연구 및 선행연구에서 *P. gingivalis* LPS는 과다 혈관신생 및 혈관투

과성을 일으켰다. 이러한 결과로 미루어 보아 죽상동맥경화증의 진행에 *P. gingivalis*가 유도하는 혈관신생 및 혈관투과성이 중요한 역할을 할 것으로 생각된다. 그러나 *P. gingivalis*에 의존적인 혈관신생 및 혈관투과성이 심혈관계의 혈관내피세포의 활성 및 동맥경화유발과정에 실제로 어떠한 영향을 미치는 지에 대한 연구는 더 진행해야 할 과제로 생각된다.

결론적으로 이상의 결과는 *P. gingivalis* LPS가 혈관내피세포에서 NF- κ B에 의존적인 IL-8의 분비를 증가시킴으로써 혈관투과성을 증가시킨다는 사실을 증명하였다.

감사의 글

이 논문은 부산대학교 자유과제 학술연구비(2년)에 의하여 연구되었음.

참 고 문 헌

- Amar S, Han X. The impact of periodontal infection on systemic diseases. *Med Sci Monit*. 2003;9:RA291-9.
- Baggiolini M, Dewald B, Moser B. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines--CXC and CC chemokines. *Adv Immunol*. 1994;55:97-179.
- Bates DO, Harper SJ. Regulation of vascular permeability by vascular endothelial growth factors. *Vascul Pharmacol*. 2002;39:225-37.
- Beck J, Garcia R, Heiss G, Vokonas PS, Offenbacher S. Periodontal disease and cardiovascular disease. *J Periodontol*. 1996;67:1123-37.
- Beinke S, Ley SC. Functions of NF-kappaB1 and NF-kappaB2 in immune cell biology. *Biochem J*. 2004;382:393-409.
- Biffi WL, Moore EE, Moore FA, Carl VS, Franciose RJ, Banerjee A. Interleukin-8 increases endothelial permeability independent of neutrophils. *J Trauma*. 1995;39:98,102; discussion 102-3.
- Chiu B. Multiple infections in carotid atherosclerotic plaques. *Am Heart J*. 1999;138:S534-6.
- Egelberg J. The blood vessels of the dento-gingival junction. *J Periodontal Res*. 1966;1:163-79.
- Faure E, Equils O, Sieling PA, Thomas L, Zhang FX, Kirschning CJ, Polentarutti N, Muzio M, Arditi M. Bacterial lipopolysaccharide activates NF-kappaB through toll-like receptor 4 (TLR-4) in cultured human dermal endothelial cells. differential expression of TLR-4 and TLR-2 in endothelial cells. *J Biol Chem*. 2000;275:11058-63.
- Fukumoto T, Matsukawa A, Yoshimura T, Edamitsu S, Ohkawara S, Takagi K, Yoshinaga M. IL-8 is an essential mediator of the increased delayed-phase vascular permeability in LPS-induced rabbit pleurisy. *J Leukoc Biol*. 1998;63:584-90.
- Gavard J, Hou X, Qu Y, Masedunskas A, Martin D, Weigert R, Li X, Gutkind JS. A role for a CXCR2/phosphatidylinositol

- 3-kinase gamma signaling axis in acute and chronic vascular permeability. *Mol Cell Biol.* 2009;29:2469-80.
- Hoffmann E, Dittrich-Breiholz O, Holtmann H, Kracht M. Multiple control of interleukin-8 gene expression. *J Leukoc Biol.* 2002;72:847-55.
- Kim SR, Park HJ, Bae SK, Park JH, Kim HS, Koo TH, Bae MK. Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide increases monocyte adhesion to microvascular endothelium by induction of adhesion molecules. *Int J Oral Biol.* 2008;33:149-54.
- Koo TH, Jun HO, Bae SK, Kim SR, Moon CP, Jeong SK, Kim WS, Kim GC, Jang HO, Yun I, Kim KW, Bae MK. Porphyromonas gingivalis, periodontal pathogen, lipopolysaccharide induces angiogenesis via extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation in human vascular endothelial cells. *Arch Pharm Res.* 2007;30:34-42.
- Lee SM, Lee HW, Lee JY. Porphyromonas gingivalis invasion of human aortic smooth muscle cells. *Int J Oral Biol.* 2008;33:163-77.
- Li A, Dubey S, Varney ML, Dave BJ, Singh RK. IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis. *J Immunol.* 2003;170:3369-76.
- Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature.* 2002;420:868-74.
- Mao S, Maeno N, Matayoshi S, Yoshiie K, Fujimura T, Oda H. The induction of intercellular adhesion molecule-1 on human umbilical vein endothelial cells by a heat-stable component of porphyromonas gingivalis. *Curr Microbiol.* 2004;48:108-12.
- Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Kopp E, Stadlen A, Chen C, Ghosh S, Janeway CA, Jr. MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Mol Cell.* 1998;2:253-8.
- Muzio M, Natoli G, Saccani S, Levrero M, Mantovani A. The human toll signaling pathway: Divergence of nuclear factor kappaB and JNK/SAPK activation upstream of tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6). *J Exp Med.* 1998;187:2097-101.
- Nakamura N, Yoshida M, Umeda M, Huang Y, Kitajima S, Inoue Y, Ishikawa I, Iwai T. Extended exposure of lipopolysaccharide fraction from porphyromonas gingivalis facilitates mononuclear cell adhesion to vascular endothelium via toll-like receptor-2 dependent mechanism. *Atherosclerosis.* 2008;196:59-67.
- Newman PJ. The biology of PECAM-1. *J Clin Invest.* 1997;100:S25-9.
- Park HJ, Jeong SK, Kim SR, Bae SK, Kim WS, Jin SD, Koo TH, Jang HO, Yun I, Kim KW, Bae MK. Resveratrol inhibits porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide-induced endothelial adhesion molecule expression by suppressing NF-kappaB activation. *Arch Pharm Res.* 2009;32:583-91.
- Petreaca ML, Yao M, Liu Y, Defea K, Martins-Green M. Transactivation of vascular endothelial growth factor receptor-2 by interleukin-8 (IL-8/CXCL8) is required for IL-8/CXCL8-induced endothelial permeability. *Mol Biol Cell.* 2007;18:5014-23.
- Reutershan J, Morris MA, Burcin TL, Smith DF, Chang D, Saprito MS, Ley K. Critical role of endothelial CXCR2 in LPS-induced neutrophil migration into the lung. *J Clin Invest.* 2006;116:695-702.
- Slots J, Ting M. Actinobacillus actinomycetemcomitans and porphyromonas gingivalis in human periodontal disease: Occurrence and treatment. *Periodontol 2000.* 1999;20:82-121.
- Stevens T, Garcia JG, Shasby DM, Bhattacharya J, Malik AB. Mechanisms regulating endothelial cell barrier function. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2000;279:L419-22.
- van der Wal AC, Becker AE. Atherosclerotic plaque rupture--pathologic basis of plaque stability and instability. *Cardiovasc Res.* 1999;41:334-44.
- Wang PL, Ohura K. Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide signaling in gingival fibroblasts-CD14 and toll-like receptors. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2002;13:132-42.
- Weis SM. Vascular permeability in cardiovascular disease and cancer. *Curr Opin Hematol.* 2008;15:243-9.
- Weis SM. Chapter 5. evaluating vascular leak in vivo. *Methods Enzymol.* 2008;444:99-114.
- Yun PL, Decarlo AA, Chapple CC, Hunter N. Functional implication of the hydrolysis of platelet endothelial cell adhesion molecule 1 (CD31) by gingipains of porphyromonas gingivalis for the pathology of periodontal disease. *Infect Immun.* 2005;73:1386-98.
- Zandi E, Rothwarf DM, Delhase M, Hayakawa M, Karin M. The IkappaB kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKKalpha and IKKbeta, necessary for IkappaB phosphorylation and NF-kappaB activation. *Cell.* 1997;91:243-52.