

Porphyromonas Gingivalis Invasion of Human Aortic Smooth Muscle Cells

Seoung-Man Lee¹, Hyeon-Woo Lee^{2,3}, Jin-Yong Lee^{1,3*}

¹Department of Oral Microbiology, School of Dentistry, Kyung Hee University, Seoul 130-701, Korea,

²Department of Pharmacology, School of Dentistry, Kyung Hee University, Seoul 130-701, Korea

³Institute of Oral Biology, Kyung Hee University, Seoul, 130-701, Korea

(Received November 24, 2008 ; Revised December 3, 2008 ; Accepted December 5, 2008)

Periodontal disease, a form of chronic inflammatory bacterial infectious disease, is known to be a risk factor for cardiovascular disease (CVD). *Porphyromonas gingivalis* has been implicated in periodontal disease and widely studied for its role in the pathogenesis of CVD. A previous study demonstrating that periodontopathic *P. gingivalis* is involved in CVD showed that invasion of endothelial cells by the bacterium is accompanied by an increase in cytokine production, which may result in vascular atherosclerotic changes. The present study was performed in order to further elucidate the role of *P. gingivalis* in the process of atherosclerosis and CVD. For this purpose, invasion of human aortic smooth muscle cells (HASMC) by *P. gingivalis* 381 and its isogenic mutants of KDP150 (*fimA*), CW120 (*ppk*) and KS7 (*relA*) was assessed using a metronidazole protection assay. Wild type *P. gingivalis* invaded HASMCs with an efficiency of 0.12 %. In contrast, KDP150 failed to demonstrate any invasive ability. CW120 and KS7 showed relatively higher invasion efficiencies, but results for these variants were still negligible when compared to the wild type invasiveness. These results suggest that fimbriae are required for invasion and that energy metabolism in association with regulatory genes involved in stress and stringent response may also be important for this process. ELISA assays revealed that the invasive *P. gingivalis* 381 increased production of the proinflammatory cytokine interleukin (IL)-1 β , and the chemotactic cytokines (chemokine) IL (interleukin)-8 and monocyte chemotactic

(MCP) protein-1 during the 30-90 min incubation periods ($P < 0.05$). Expression of RANTES (regulation upon activation, normal T cell expressed and secreted) and Toll-like receptor (TLR)-4, a pattern recognition receptor (PRR), was increased in HASMCs infected with *P. gingivalis* 381 by RT-PCR analysis. *P. gingivalis* infection did not alter interferon- γ -inducible protein-10 expression in HASMCs. HASMC nonspecific necrosis and apoptotic cell death were measured by lactate dehydrogenase (LDH) and caspase activity assays, respectively. LDH release from HASMCs and HASMC caspase activity were significantly higher after a 90 min incubation with *P. gingivalis* 381. Taken together, *P. gingivalis* invasion of HASMCs induces inflammatory cytokine production, apoptotic cell death, and expression of TLR-4, a PRR which may react with the bacterial molecules and induce the expression of the chemokines IL-8, MCP-1 and RANTES. Overall, these results suggest that invasive *P. gingivalis* may participate in the pathogenesis of atherosclerosis, leading to CVD.

Key words : *P. gingivalis*, periodontal disease, human aortic smooth muscle cells, cardiovascular disease

서 론

치주질환은 사람에게 가장 빈번하게 나타나는 만성염증성 세균감염질환이다. 세균들은 치주조직을 자극하여 cytokine, chemokine을 분비하도록 유도하고 이들 분비물로 인해 염증이 유발되어 결과적으로 치주조직을 파괴한다. 치주병소에 존재하는 세균에 의해 계속적으로 자극을 받는 치주조직은 만성염증상태에서 파괴가 더욱 진행된다. 동시에 이들 만성염증반응과정에서 계속적으로 분

*Corresponding author: Dr. Jin-Yong Lee, Department of Oral Microbiology, School of Dentistry, Kyung Hee University, Seoul 130-701, Korea. Tel.: +82-2-961-0598; Fax.: +82-2-960-2838; E-mail: ljinyong@khu.ac.kr

비되는 cytokine, chemokine 등은 멀리 떨어져 있는 다른 신체부위의 조직세포에도 영향을 미치면서 결과적으로 다양한 전신적 질환을 유발할 수 있다. 최근 많은 연구들은 치주질환이 심장질환, 뇌졸중, 저체중미숙아 출산, 당뇨병, 류마티스성 관절염 등과 같은 전신질환의 중요한 원인으로 작용한다고 보고하고 있다 (Gaffar *et al.*, 2004). 관동맥 심질환 (Coronary heart disease)은 선진국의 사망원인 1위이다 (Streblow *et al.*, 2001). 따라서 만성염증으로 인해 유발될 수 있는 전신질환 중에서 관동맥 심질환은 치주질환과 관련지어 가장 많은 관심을 끌며 연구되고 있는 대상이다.

심근경색증으로 대표되는 관동맥 심질환은 관상동맥이 경화되고 혈전이 형성됨으로써 야기되고 (Burke *et al.*, 2007) 이로 인해 심장근육으로 공급되는 산소가 부족하여 허혈성 심장마비가 나타날 수 있다. 최근 들어 동맥경화는 만성염증질환이라고 인식되고 있다 (Stoll *et al.*, 2004). 동맥경화 병소는 혈관내피세포와 혈관벽 평활근세포에 가해지는 자극에 대한 과도한 염증성 섬유증식반응에 의해 형성된다. 혈관 세포들을 자극하여 염증을 유도할 수 있는 인자들, 즉 관동맥 심질환의 유발위험인자로는 흡연, 고혈압, 고 콜레스테롤, 특히 혈관내피세포 표면에 존재하는 산화 low density lipoprotein (LDL) 등이 잘 알려져 있다 (Cohen *et al.*, 1998). 이들 자극에 의해 혈관내피세포가 손상을 받으면서 growth factor, cytokine, chemokine 등이 분비되어 단핵/대식세포, 혈소판이 손상부위로 모이게 된다. 대식세포는 지질이 축적되면서 foam cell로 변하고 T cell과 평활근과 함께 지방줄무늬 (fatty streak)를 형성한다. 이 부위는 혈전으로 발전하고 혈소판과 평활근세포가 이곳으로 이동해 오면 이들로부터 다양한 growth factor, cytokine, chemokine이 분비되어 혈관의 경화현상이 심화되고 결국 섬유판 (fibrous plaque)으로 진행된다 (Streblow *et al.*, 2001). 그러나 이들 위험 자극인자만으로는 관동맥 심질환의 모든 임상적, 역학적 특징들을 설명하기 어렵다 (Pooling Project Research Group, 1978). 이로 인해 또 다른 만성염증의 자극원인 미생물 감염이 관여하는 지에 대해 연구가 시작되었고, 연구결과 *Chlamydia pneumoniae* (Thom *et al.*, 1992), 바이러스 (Vercellotti *et al.*, 1995), *Helicobacter pylori* (Morgando *et al.*, 1995) 같은 미생물의 감염이 관동맥 심질환과 연관성이 있다고 밝혀졌다.

이런 상황 속에서 1989년 Mattila 등은 치아건강이 급성 심근경색증과 연관성이 있다고 최초로 발표하였다 (Mattila *et al.*, 1989). 이후 구강질환 중에서도 만성염증을 동반하는 치주질환이 관동맥 심질환의 위험인자로서 중요하다는 것이 보고되기 시작하였다 (Cohen *et al.*, 1998 ; Mattila *et al.*, 1993). 치주염 환자는 치주가 정상인 사람보다 관동맥 심질환 이병률이 25% 높은 것으로 밝혀져, 관동맥 심질환은 치주염 환자에서 가장 흔하

게 볼 수 있는 전신질환 중에 하나로 인식되고 있다 (DeStefano *et al.*, 1993; Genco *et al.*, 1998; Umino *et al.*, 1993). 관상동맥질환이 있는 사람은 치주염이 더 깊고 부착상실 (attachment loss)도 더 심하다 (Nonnenmacher *et al.*, 2007). 따라서 치주질환의 정도가 심해질수록 동맥경화증으로 인해 발생하는 급성 심근경색증뿐만 아니라 같은 혈관질환인 뇌졸중의 발생 위험도 증가할 수 있다 (Genco *et al.*, 2002).

치주질환이 관동맥 심질환에 관계가 있다는 것은 치주병소 내 치은연하치태의 세균들 때문이다. 치주병소는 염증상태로 인해 치은혈관이 충혈되어 있어 작은 자극에도 쉽게 균혈증을 유발한다. 이들 세균 또는 세균산물은 혈류에 유입된 후 특정부위의 혈관과 직접 반응함으로써 동맥경화의 발생이나 진행에 관여할 수 있다 (Ford *et al.*, 2006). 실제 경동맥의 동맥경화 plaque를 polymerase chain reaction (PCR) 방법으로 관찰하였을 때 치주질환 원인균들의 존재가 확인되고 있다 (Haraszthy *et al.*, 2000).

P. gingivalis 는 치주질환의 원인균 중에 하나이며 치주질환이 진행될수록 *P. gingivalis* 이환율과 치은연하치태 세균 중 점유율이 증가하는 등 치주질환과 가장 연관성이 높은 세균으로 밝혀져 있다 (Boutaga *et al.*, 2006; Nonnenmacher *et al.*, 2005). 한편, 동맥경화 plaque에서도 발견됨으로써 (Haraszthy *et al.*, 2000; Ford *et al.*, 2006; Pucar *et al.*, 2007) *P. gingivalis*는 동맥경화에 따른 심혈관질환에 관여할 것이라는 가능성을 높이고 있다.

세균이 조직에 부착하는 것은 세균감염과정의 첫 번째 단계에서 나타나는 현상이며 감염과정 중 가장 결정적인 단계이다 (Gibbons *et al.*, 1989). 조직에 부착한 세균중 중에 일부는 조직 내로 침투하는 데 이것은 숙주의 면역체계를 피하는 데 효과적인 전략이고 (Falkow *et al.*, 1991), 따라서 그 세균의 병원성에 기여하는 중요한 인자이다 (Socransky *et al.*, 1991). 면역조직화학법으로 관찰한 결과 조직 내에 치주질환 원인균 *P. gingivalis*이 존재하는 것이 발견되었다. 이는 *P. gingivalis*가 상피세포 방호벽을 뚫고 침입했다는 것을 시사한다 (Saglio *et al.*, 1988). 연구 결과 *P. gingivalis*는 구강조직에 부착할 수 있으며, 이어 치은상피세포 (Belton *et al.*, 1999; Lamont *et al.*, 1992; Weinberg *et al.*, 1997), 점막상피세포 (Papananou *et al.*, 1994), 치주낭 상피세포 (Sandros *et al.*, 1994)에 침투할 수 있으며 이들 세포 속에서 증식하고 지속적으로 존재할 수 있는 것으로 밝혀졌다 (Lamont *et al.*, 1995; Madianos *et al.*, 1996).

Deshpande 등 (Deshpande *et al.*, 1998)은 최초로 *P. gingivalis*가 혈관내피세포에 침투하는 것을 관찰하였다. 본 교실에서도 *P. gingivalis*가 관상동맥내피세포에 침투하며 이로 인해 내피세포는 핵막을 소실하는 등 심각한 형태변화가 나타나는 것을 관찰하였다 (Lee *et al.*, 2000).

*P. gingivalis*가 혈관세포에 침투하는 과정에서 다양한 세포반응이 유도될 수 있을 것으로 예상된다. 임상적으로 그람음성세균에 의한 패혈증이 있을 경우, 전신적인 혈관 허탈 (vascular collapse), 광범위한 혈관 내 응고, 혈관 누수증후군 (vascular leak syndrome)이 동반되는 데 이것은 그람음성세균에 의한 내피세포의 손상 또는 기능저하와 연관이 있다 (Stoll *et al.*, 2004). 이런 현상은 동맥경화 유발과 연관된다. 따라서 그람음성세균인 *P. gingivalis*가 치주병소에 존재하다가 세균혈증으로 혈류에 유입되면 정도의 차이는 있겠지만 패혈증 때와 비슷한 현상을 유도할 수 있다는 것은 쉽게 예상할 수 있다. 실제 *P. gingivalis*에 감염된 ApoE(+/-) mice의 대동맥, 간 및 심장에서는 *P. gingivalis*의 핵산이 발견되고, 대동맥의 경우 동맥경화병소가 증가하며 (Li *et al.*, 2002) 죽상경화판 (atherosclerotic plaque)의 석회화 현상을 관찰할 수 있다 (Genco *et al.*, 2002). 반면, *P. gingivalis*로 면역이 된 mice는 *P. gingivalis*에 의한 동맥경화를 예방할 수 있다 (Li *et al.*, 2002).

혈관 세포와 반응하는 과정에서 *P. gingivalis*는 염증반응을 유도한다 (Darveau *et al.*, 1995). *P. gingivalis*의 세포표면에 있는 platelet-aggregation-associated protein은 혈소판을 응집시키는 역할을 하고 (Herzberg *et al.*, 1994; Sharma *et al.*, 2000), 혈소판의 응집은 결과적으로 동맥경화 및 동맥혈전을 유발한다 (Roth *et al.*, 2006; Steinhubl *et al.*, 2005; Weber *et al.*, 2005). *P. gingivalis*는 혈관내피세포의 apoptosis를 유도하고 (Roth *et al.*) 이 apoptosis는 죽상경화판의 까집현상(plaque erosion)과 혈전을 유발할 수 있다 (McCarthy *et al.*, 2000). 동맥경화나 혈전형성 과정에는 다양한 cytokine, chemokine, growth factor 및 혈관조절물질들이 개입된다 (Ross *et al.*, 1993). *P. gingivalis*는 LDL을 산화시키고, 섬유유착 (fibrous cap)를 분해하고 matrix metalloproteinase-9 (MMP-9)을 분비하여 죽상경화판을 파열시킨다 (Kuramitsu *et al.*, 2001). 이것은 결과적으로 심혈관질환을 악화시킨다.

*P. gingivalis*의 혈관내피세포 침투에는 fimbriae가 관여한다 (Deshpande *et al.*, 1998). *P. gingivalis*의 fimbriae는 내피세포로 하여금 백혈구와 내피세포간의 부착을 돕는 intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1), CD11b, P-selectin 및 E-selectin의 발현을 증가시켜 백혈구가 염증 부위로 이동할 수 있도록 도와줌으로써 동맥경화에 기여한다. Fimbriae는 대식세포의 TLR, CD14, CD11b/CD18과 반응하여 화학주성물질 (chemokine)인 interleukin-8 (IL-8)분비를 유도한다 (Hajishengalis *et al.*, 2004). *P. gingivalis*의 fimbriae와 lipopolysaccharide (LPS)는 pathogen-associated molecular patterns (PAMP)이며 (Hajishengalis *et al.*, 2002; Hajishengalis *et al.*, 2004; Yumoto *et al.*, 2005) 이들 PAMP는 혈관내피세포에 작

용하여 Toll-like receptor 4 (TLR-4)의 발현을 증가시키고 (Gibson *et al.*, 2004) PAMP를 감지하는 pattern recognition receptor (PRR)로서 TLR-4는 fimbriae와 반응하여 (Hajishengalis *et al.*, 2002; Yumoto *et al.*, 2005) IL-8과 monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1) 분비를 유도한다 (Chou *et al.*, 2005; Hirose *et al.*, 2000; Kang *et al.*, 2002). Fimbriae와 LPS는 또 하나의 PRP인 CD-14 (Hajishengalis *et al.*, 2002; Hajishengalis *et al.*, 2004)와도 반응하여 혈관내피세포의 IL-8, MCP-1의 발현을 증가시킬 수 있다 (Mao *et al.*, 2002) 또한 *P. gingivalis*의 LPS는 대식세포를 foam cell로 전환시키는데도 관여한다 (Kuramitsu *et al.*, 2004; Kuramitsu *et al.*, 2001). *P. gingivalis* 감염은 내피세포의 IL-6 생산을 증가시킨다 (Chou *et al.*, 2005). *P. gingivalis* fimbriae는 단핵세포의 IL-6 분비를 증가시킬 수 있다 (Hajishengalis *et al.*, 2004). 이 IL-6의 자극에 의해 간세포는 C-reactive protein (CRP)를 분비하고, 이 결과 단핵세포가 세균과 혈관 세포가 반응하는 장소로 더 많이 모이고, cytokine 분비가 증가하는 등 동맥경화의 진행과정에 기여한다 (Khuseyinova *et al.*, 2006). CRP는 지수는 심혈관질환, 뇌졸중을 예측하는 표지물질로서 중요한데 (Khuseyinova *et al.*, 2006) 치주질환이 있을 때 혈청 내 CRP는 증가하고 치주질환을 치료할 경우에는 CRP가 감소한다 (Offenbacher *et al.*, 2005).

이외에도 *P. gingivalis*는 혈관내피세포와 반응하여 tumor necrosis factor- α (TNF- α) 발현을 증가시키고 (Lee *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2007), 단핵/대식세포와 반응하여 IL-1b와 TNF-a를 증가시키며 (Hajishengalis *et al.*, 2004; Sugano *et al.*, 2004), 분비된 이들 proinflammatory cytokine은 동맥경화, 심혈관질환에 기여한다 (Ross *et al.*, 1993).

동맥경화에 있어서 혈관내피세포뿐만 아니라 평활근세포도 매우 중요하다. 평활근세포의 증식과 혈관내막으로의 이동은 혈관내막을 두껍게 하고 섬유화를 초래하기 때문에 동맥경화과정에 있어 결정적인 단계이며 결과적으로 혈관을 폐쇄시켜 (Ross *et al.*, 1993; Streblov *et al.*, 2001) 심근경색증과 같은 관동맥 심질환 등 다양한 심혈관 및 뇌혈관질환을 유발시킨다. 평활근세포도 역시 미생물의 자극을 받을 수 있고, 이로 인해 동맥경화 과정에 기여한다. Cytomegalovirus (CMV)에 감염된 대동맥 평활근세포는 증식하고 혈관내막으로 이동하며 platelet-derived growth factor (PDGF) β -receptor의 발현이 증가하고 (Zhou *et al.*, 1999), chemokine인 RANTES (regulation upon activation, normal T cell expressed and secreted; CCL5)와 interferon- γ -inducible protein 10 (IP-10)의 발현도 증가한다 (Grave *et al.*, 2005). 관상동맥 평활근세포는 내피세포보다 대장균 LPS에 더 예민하게 반응하여 세포막 CD14의 발현이 증가한다 (Stoll *et*

al., 2004). 디프테리아 독소의 수용기를 발현하는 형질전환 mice를 디프테리아 독소로 처리했을 때 평활근세포의 apoptosis가 나타나고, 그 결과 섬유덩개가 얇아지고, 기질과 collagen이 상실되고, 세포파편이 축적되고 혈관내막에 심한 염증이 나타난다 (Clarke et al., 2006). 이 때문에 동맥경화가 이미 진행되고 있을 경우 평활근세포의 apoptosis는 죽상경화관 파열 (atherosclerotic plaque rupture)을 초래하고, 응고 (혈전), 염증, 석회화와 같은 결과가 뒤따르기 때문에 (Clarke et al., 2006) 혈관수축이나 동맥류 (aneurysm)와 같은 위험한 상황도 초래할 수 있다 (Clarke et al., 2006). 또한 apoptosis가 일어난 평활근세포에서는 IL-1가 유리되고, IL-8과 MCP-1의 분비도 증가한다 (Clarke et al., 2006).

치주질환과 심혈관질환과의 연관성을 연구하기 위해서는 치주질환 원인균, 특히 가장 중요한 원인균인 *P. gingivalis*가 평활근세포에 미치는 영향을 관찰하는 것은 매우 중요하다. *P. gingivalis*는 평활근세포도 침투하는 것으로 보고되고 있다 (Dorn et al., 1999). 그러나 침투에 따라 평활근세포에서 동맥경화와 관련해서 어떤 반응이 일어나는 지에 대해서는 아직까지 보고된 바가 없다. 최근 근관감염균인 *Porphyromonas endodontalis*가 내피세포와 평활근세포에 침투하는 것이 관찰되었다 (Dorn et al., 2002). *P. endodontalis*는 *P. gingivalis*와 가장 유사한 세균이기 때문에 *P. gingivalis*도 마찬가지로 평활근세포에 침투할 수 있으며 이 과정 속에서 동맥경화를 유발하거나 진행하는 데 중요한 cytokine, chemokine들의 발현이 평활근세포에서 증가할 것이라는 가정 하에 본 연구를 진행하였다.

실험재료 및 방법

실험균주와 배양조건

P. gingivalis 381, *P. gingivalis* 381과 유전적으로 같은 균주인 *P. gingivalis* ATCC33277의 유전자 동일형인 fimbriae 유전자 (*fimA*)-결여 돌연변이 KDP150, 381의 유전자 동일형인 polyphosphate kinase 유전자(*ppk*)-결여 돌연변이 CW120, 그리고 381의 유전자 동일형인 RelA 유전자 (*relA*)-결여 돌연변이 KS7을 실험균주로 사용하였다. 이들 실험균주는 yeast extract (5 mg/ml), hemin (5 µg/ml), vitamin K1 (0.2 µg/ml)이 첨가된 half-strength (18.5 mg/ml) brain heart infusion broth (BHI 액체배지; Difco, pH 7.4), 또는 Tryptic Soy (TS) 배지 (Difco)에 1.5 % agar, 5 % 면양적혈구를 첨가한 TS 한천배지에 접종한 후 혐기성 배양기 (85 % N₂, 10 % H₂, 5 % CO₂)에서 37 °C로 배양하였다.

혈관평활근세포

실험을 위해 사람에서 유래된 대동맥 평활근세포 (fibroblast)의 primary cell line인 CRL-1999를 American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, VA, U.S.A.)에서 구입하여 사용하였다. 이 평활근세포 CRL-1999의 증식과 실험을 위해 ATCC의 지시에 따라 Ham's F12K medium (F12K)을 Kaighn이 조성을 변화시킨 배지를 사용하였다. 즉 F-12K 배지에 2 mM L-glutamine, 1.5 g/L sodium bicarbonate가 첨가된 기본배지 (F-12K Plain Medium)에 10 % fetal bovine serum, 0.01 mg/ml insulin, 0.01 mg/ml transferrin, 10 ng/ml sodium selenite, 0.03 mg/ml Endothelial Cell Growth Supplement, 0.05 mg/ml ascorbic acid, 10 mM HEPES, 10 mM TES를 첨가한 배지인 ATCC Complete Growth Medium을 사용하였다. 실험에 사용했을 때 CRL-1999는 10 population doublings을 넘지 않도록 제한하였고, 5 % CO₂ 하에서 37 °C로 배양하였다.

평활근세포 내 세균 침투실험

실험균주가 CLR-1999 평활근세포에 침투하는 것을 관찰하기 위해 antibiotic protection assay를 시행하였다. 이를 위해 CLR-1999를 24-well plate에 접종하고 Complete Growth Medium 1 ml을 첨가, 배양하여 세포가 confluent 하게 되었을 때 Plain Medium으로 세정한 다음 각 well에 Plain Medium 900 µl씩 분주하였다. 실험균주를 첨가하기에 앞서 BHI broth에서 성장대수기로 배양한 각 균주를 F-12K Plain Medium으로 세정하고 균농도를 흡광도로 0.3 (600 nm)으로 조정하였다. 균액 100 µl (생균수 1.5~2 × 10⁷)를 CRL-1999가 있는 각 well에 넣고 90분간 배양한 다음 각 well의 CRL-1999를 Plain Medium으로 세정한 다음 metronidazole을 100 µg 첨가한 Plain Medium 1 ml씩 분주하고 1시간 추가로 배양함으로써 CRL-1999 표면에 붙어있는 실험균주를 사멸시켰다. PBS (pH 7.2)로 CRL-1999를 세정한 후 각 well에 멸균증류수를 1 ml씩 분주하고 30분 후 진탕하여 CRL-1999를 용해시켰다. 용해질 (lysate)을 1:10 단계희석해서 TS 한천배지에 100 µl씩 적하한 다음 혐기적으로 3~4일간 37 °C에서 배양하였다. 배양 후 나타난 *P. gingivalis* 균주의 집락수를 세어 생균수 즉, CRL-1999에 침투한 실험균주의 수를 계산하였다.

Enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA)

P. gingivalis 381로 감염시킨 평활근 세포 CRL-1999에서 염증 및 동맥경화와 연관성이 알려져 있는 cytokine인 IL-1b, chemokine인 IL-8와 MCP-1, 그리고 PRR인 CD14 단백질의 발현양이 변하는 지를 Immunoassay Kit (BioSource International, Carmarillo, CA, U.S.A.)를 사

용하여 제조사가 지시한 방법에 따라 측정하였다. 위에서 같이 실험관주들을 접종하고 90분간 배양한 CRL-1999의 배양액을 각 well로부터 수집한 후 4°C에서 원심분리하여 상층액을 얻었다. 상층액을 50 µl, biotin-conjugate (biotinylated anti-IL-1b, IL-8 antibody)를 100 µl씩 총 150 µl를 BioSource 96-well plate의 각 well에 넣고 상온에서 2시간 배양하였다. MCP-1의 ELISA 측정을 위해서는, Incubation Buffer 50 µl, Standard Dilution Buffer로 1:4 희석한 시료 50 µl, biotin-conjugate 50 µl를 각 well에 넣고 배양하였다. Washing Buffer (PBS-0.05 % Tween 20)로 4회 세정하고 나서 Streptavidin-Horseradish Peroxidase Working Solution을 100 µl 적하하여 상온에서 30분간 배양하였다. Washing Buffer로 4회 세정한 다음 Stabilized Chromogen 100 µl를 적하한 후 상온에서 빛을 차단한 채 30분간 배양하여 발색하였다. 30분 후 Stop Solution을 100 µl 적하하여 발색의 진행을 중단시킨 다음 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

P. gingivalis 381로 감염시킨 평활근 세포 CRL-1999에서 염증과 동맥경화에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 물질 중에서 PRR인 TLR-4, chemokine인 IP-10과 RANTES 발현에 변화가 있는가를 관찰하기 위해 RT-PCR을 시행하였다.

1) Total RNA분리

Complete Growth Medium을 10 ml 분주한 100-mm petri dish에 CRL-1999를 배양하여 confluent한 상태로 증식시켰다. Petri dish에서 배양된 CRL-1999를 PBS로 세정한 다음 새 Plain Medium을 9 ml 분주하였다. 다음, 혐기적으로 배양한 *P. gingivalis* 381을 Plain Medium으로 세정하고 600 nm에서 흡광도를 0.3으로 조정할 후 균액 1 ml을 petri dish에 분주한 다음 30분간 5 % CO₂ 하에서 37°C로 배양하였다. Petri dish에 TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, U.S.A.)을 1 ml 첨가하여 CRL-1999 세포를 용해시킨 다음 microcentrifuge tube에 옮겨 담고 chloroform을 200 µl 첨가하여 15초간 위 아래로 뒤집기 동작을 반복하여 진탕한 후 -20°C에서 20분간 정치시켰다. 정치 후, 4°C에서 12,000 rpm으로 tube를 5분간 원심분리하여 얻은 상층액을 새 tube에 수집하였다. 이 tube에 동량의 isopropanol을 넣고 -20°C에서 1시간 정치시켰다. 다음 4°C에서 12,000 rpm으로 tube를 5분간 원심분리하여 isopropanol을 제거하고 침전된 pellet은 75 % 냉 DEPC-ethanol과 함께 4°C에서 12,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 ethanol을 제거하였다. 침전되어있는 RNA pellet을 건조시킨 다음 DEPC물에 부유시켰다. 오염되어 있는 DNA를 제거하기 위해 DNase로 처리하였

다. 이를 위해 우선 total RNA 50 µg, DNase I (5 unit/ml) 3 µl (Takara Biomedicals, Shiga, Japan), 10X Buffer 5 µl, RNase inhibitor (QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA) 2 µl (40 units), 나머지는 DEPC물을 첨가하여 최종량이 50 µl되도록 조절하였다. 이 혼합액을 37°C에서 1시간 배양한 후 DEPC물을 150 µl 첨가하고 나서 동량 (200 µl)의 phenol/chloroform (1:1)을 넣고 vortex로 진탕한 다음 상온에서 11,000 rpm으로 7분간 원심분리하였다. 상층액을 수집한 다음 동량의 chloroform (1:1)을 첨가하고 vortex로 진탕하고 상온에서 11,000 rpm으로 7분간 원심분리하였다. 상층액을 다시 수집하고 나서 DEPC물에 용해시킨 3 M sodium acetate를 상층액의 1/10, 냉 ethanol은 상층액의 2.5 vol을 첨가하고 혼합한 다음 -80°C에서 1시간 정치시켰다. 혼합액이 들어있는 microcentrifuge tube를 4°C에서 15,000 rpm으로 15분간 원심분리하여 침전물인 RNA를 얻었다. RNA가 침전되어 있는 tube에 75 % ethanol-DEPC물을 첨가한 후 4°C에서 15,000 rpm으로 15분간 원심분리하여 얻은 순수한 RNA 침전물을 건조시킨 다음 RNase free water에 용해시켜 UV spectrophotometer에서 260 nm 파장으로 측정하여 RNA를 정량하였다.

2) RT

cDNA를 합성하기 위해 RT를 시행하였다. Qiuagen RT-PCR Kit (Valencia, CA, U.S.A.)를 사용하여 RT를 시행하였다. Total RNA (2.5 µg), RNase inhibitor 2.5 µl (50 units), 2 mM dNTPs 5 µl, random hexamer 100 ng, 10X Buffer 2.5 µl, RTase 0.5 µl (10 units)를 혼합하고 증류수로 최종량을 25 µl로 조절하였다. 이들 RT혼합액을 41°C에서 1시간, 80°C에서 15분간 시행하고 4°C에서 반응을 정지시켜 cDNA를 얻었다.

3) PCR

PCR에 앞서 TLR-4, IP-10, RANTES 유전자 염기서열을 토대로 하여 forward, reverse primer를 제작하였다. TLR-4는 Faure 등(2000)이 보고한 primer sequence에 따라, IP-10, RANTES, 그리고 internal calibration 즉, 동량의 RNA를 사용하는지를 확인하기 위한 대조 유전자로 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3P-DH)는 Setsuda 등(1999)이 보고한 primer sequence에 따라 제작하였다 (Table 1). PCR를 위해 cDNA (10~50 ng/µl) 1~5 µl, primer 각각 10 pmol, Taq DNA polymerase (5 Units/µl; TaKaRa Korea) 0.25 µl, 2 mM dNTP 2~5 µl, 그리고 나머지는 10× buffer, MgCl₂ (2~5 mM), 증류수를 합쳐 총 50 µl의 용량으로 조절하였다. PCR혼합액을 94°C에서 5분간 변성시킨 다음, PCR cycle은 94°C에서 45초, 54~65°C (Table 1)에서 45초, primer extension을 위해 72°C에서 60초로 35회 반복하

Table 1. Primers used in the study and PCR conditions.

PCR product	Product size	Primer sequence (5' → 3')	Cycles	Annealing temp.(°C)
TLR4	548	TGGATACGTTTCCTTATAAG GAAATGGAGGCACCCCTTC	35	54
IP-10	108	GGAACCTCCAGTCTCAGCACC GCGTACGGTCTAGAGAGAGGTAC	35	57
RANTES	130	GGCACGCCTCGCTGTCATCTCA CTTGATGTGGGCACGGGGCAGTG	35	65
G3PDH	78	GCCACATCGCTAAGACACCATGGG CCTGGTGACCAGGCGCCCAAT	35	59

TLR-4, Toll-like receptor-4; IP-10, interferon-g-inducible protein 10; RANTES (CCL5), regulation upon activation, normal T cell expressed and secreted.

였고, 72 °C에서 10분간 처리한 후 4 °C에서 PCR반응을 정지하여 PCR산물을 얻었다. PCR산물은 1 % agarose gel에 전기영동한 후 ethidium bromide (0.5 µg/ml)로 염색한 다음 UV 광선 하에서 관찰하여 크기를 확인하였고, 확인한 결과는 사진촬영으로 기록하였다.

Lactate dehydrogenase (LDH) assay

*P. gingivalis*가 침투하는 과정에서 생겨날 수 있는 평활근세포의 세포막 손상을 관찰하기 위해 세포가 용해될 때 세포질에서 유리되어 나오는 LDH 양을 측정하는 LDH assay를 In vitro Toxicology Assay Kit (Tox-7; Sigma Chemicals, Saint Louis, MO, U.S.A.)를 사용하여 제조사의 지시대로 수행하였다. 우선 CRL-1999 평활근세포 (1 ml)를 24 well plate에 접종하고 confluent한 상태로 성장할 때까지 배양하였다. PBS로 세정한 다음 각 well에 Plain Media F-12K를 1 ml씩 첨가하였다. 대수증식기의 *P. gingivalis* 381을 600 nm파장에서 Plain Medium으로 흡광도를 0.3으로 조절한 후 균액 100 ml를 각 well에 첨가하고 0, 10, 30, 90분간 배양하였다. Lysis Solution을 각 well에 1/10 volume을 첨가하고 45분간 250 x g로, 4분간 원심분리한 후 용해 상층액 500 ml를 새로운 24 well-plate의 각 well에 옮겨 담았다. Tox-7 LDH Assay Substrate, Cofactor, Dye Solution을 동량으로 섞은 reaction solution 1 ml를 각 well에 첨가한 다음, 빛을 차단한 상태로 20~30분간 반응시켰다. 반응 후 1N HCl을 전체용량의 1/10을 첨가하여 반응을 정지시킨 다음 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Apoptosis assay

*P. gingivalis*의 침투에 의한 평활근세포의 apoptosis 가능성을 확인하기 위해 CaspaTag™ Pan-Caspase In Situ Assay Kit, Fluorescein (CHEMICON® International, Temecula, CA, U.S.A.)을 사용하여 apoptosis assay를 제조사의 지시대로 수행하였다. 우선, Complete Growth Medium으로 배양용기에서 confluent한 상태로 배양한

CRL-1999를 PBS로 세정하고 배양용기에 Plain Medium을 첨가하였다. 대수증식기의 *P. gingivalis* 381을 Plain Medium으로 세정하고 600 nm 파장에서 흡광도 0.3으로 조절한 다음 CRL-1999 배양용기에 첨가된 Plain Medium의 1/10용량으로 균액을 첨가하고 30, 60, 90분간 배양하였다. 대조군으로는 첨가한 균액과 동량의 Plain Medium을 첨가하였다. *P. gingivalis*와 배양한 CRL-1999를 PBS로 세정하고 나서 Trypsin-EDTA (GibcoBRL, Life Technology, Grand Island, NY, U.S.A.)를 1 ml을 넣고 37 °C에서 3분간동안 배양하였다. Plain Medium 10 ml을 배양용기에 넣고 부드럽게 pipetting하여 배양용기에서 CRL-1999를 분리시켰다. 분리된 CRL-1999를 15 ml tube에 옮긴 다음 125 x g에서 7분간 원심분리하고 나서 상층액을 버렸다. 세포 pellet를 부유시켜 세포수가 ~2 x 10⁷ cells/ml이 되도록 조절하였다. 새 tube에 세포부유액 290 µl를 옮겨 담고 나서 30X Chemicon® FLICA Reagent 10 µl를 첨가하고 tube를 가볍게 흔들어 세포와 섞었다. 빛을 차단한 상태에서 37 °C에서 1시간 배양한 다음 각 tube에 1X Washing Buffer를 2 ml씩 넣고 섞은 후 400 x g로 5분간 상온에서 원심분리하였다. 상층액을 조심해서 버린 후 세포가 엉키지 않도록 vortex로 가볍게 진탕하였다. 위에서와 같이 1X Washing Buffer를 사용하여 세포를 세정한 다음 다시 1X Washing Buffer 1 ml에 부유시켰다. 각 tube에서 50 ml씩 취하여 450 ml PBS와 혼합한 후 *P. gingivalis*와 함께 배양시킨 세포와 대조군 세포 수를 hemocytometer로 비교하였다. 세포 수를 동일하게 조절한 다음 세포를 400 x g로 5분간 원심분리한 다음 PBS를 400 ml씩 첨가하고 나서 1개의 세포시료 당 검정색 Chemicon® microtiter plate의 두 개의 well에 각각 100 ml씩을 취하여 거품이 생기지 않도록 조심하면서 넣었다. 형광 microplate reader (Triad; Dynex Technologies, Chantilly, VA, U.S.A.)로 excitation wavelength는 490 nm, emission wavelength는 520 nm에서 흡광도를 측정하였다.

결 과

혈관 평활근세포 CRL-1999에 대한 *P. gingivalis* 균주들의 침투력을 비교하였다 (Table 2). 야생형인 *P. gingivalis* 381은 초기 접종 세균수 1.55×10^7 중에서 1.82×10^4 이 CRL-1999에 침투함으로써 0.12%의 침투율을 보여 가장 효율적으로 나타났고 돌연변이 *P. gingivalis* 균주들 보다 통계적으로 유의한 차이를 보였다. 반면 *fimA* 돌연변이인 KDP150은 초기 접종 세균수 대비 0.0003%만 침투하여 가장 낮은 침투율을 보였다. *ppk* 돌연변이인 CW120은 0.0046%, *relA* 돌연변이 KS7은 0.0056%의 침투율을 보였다. 이들 돌연변이 균주들 사이에 나타난 침투율의 차이는 통계적 유의성이 없었다.

P. gingivalis 381의 침투과정, 즉 30~90분 감염되었을 때 CRL-1999 평활근세포에서 동맥경화현상에 관여하는 cytokine의 분비에 변화가 있는지를 ELISA로 관찰하였다. Proinflammatory cytokine으로서 중요한 IL-1 β 의 분비는 30~90분 배양했을 때 시간에 따라 Plain Medium만 첨가한 대조군 CRL-1999나 *P. gingivalis*이 감염된 실험군 CRL-1999 모두 시간이 지남에 따라 증가하는 것으로 관찰되었다. 그러나 30, 60, 90분 배양시간 대비 대조군 CRL-1999의 IL-1 β 분비 증가량에 비해 감염된 CRL-1999의 IL-1 β 증가량이 훨씬 커서 모두 통계적으로 유의한 차이를 보였다 ($P < 0.05$). 특히 90분에 대조군 CRL-1999 (125.0%)에 비해 감염 CRL-1999는 크게 증가하여 378.5% 증가를 보였다 (Fig. 1).

ELISA로 관찰한 결과, CRL-1999는 IL-1 β 에 비해 미약하지만 중요한 chemokine인 IL-8도 분비하는 것으로 나타났다. 대조군이나 감염 CRL-1999 모두 배양시간이 증가함에 따라 IL-8의 분비도 크게 증가하였다. 대조군의 경우 30분에 0시간 대비 233.8%, 60분에 357.7%, 90분에 496.2% 증가한 반면, 감염 CRL-1999는 30분에 925.8%, 60분에 996.2%, 90분에 1211.5% 증가하여 모든 배양시간대에서 유의성이 있는 차이를 보였다 ($P < 0.05$; Fig. 2). CRL-1999 평활근세포는 *P. gingivalis* 381 감염 시 또 하나의 중요한 chemokine인 MCP-1의 분비도

증가하였다. IL-1 β , IL-8과 마찬가지로 감염 여부와 상관없이 MCP-1의 분비는 증가하였으나 감염 시의 분비량이 더 많은 것으로 관찰되었다. 그러나 30, 60분간의 감염에서는 통계적으로 대조군과 차이가 없었던 반면, 90분 감염 시 CRL-1999 (0시간 대비 342.1% 증가)는 대조군 CRL-1999 (160.0% 증가)보다 MCP-1의 분비가 훨씬 증가되어 통계적 유의성을 보였다 ($P < 0.05$; Fig. 3).

P. gingivalis 381이 침투하는 초기 과정, 즉 30분 감염했을 때 CRL-1999 평활근세포에서 동맥경화현상에 관여하는 IP-10, RANTES, TLR-4 발현에 변화가 있는지를 RT-PCR로 관찰하였다. Chemokine인 IP-10의 발현은 *P. gingivalis*로 감염시켜도 차이가 없었다. 반면 또 다른 chemokine인 RANTES는 *P. gingivalis*가 감염하였을 때 발현이 크게 증가하였다. 한편 PRR인 TLR-4의 발현도 *P. gingivalis*로 감염되었을 때 크게 증가하는 것으로 나타났다 (Fig. 4).

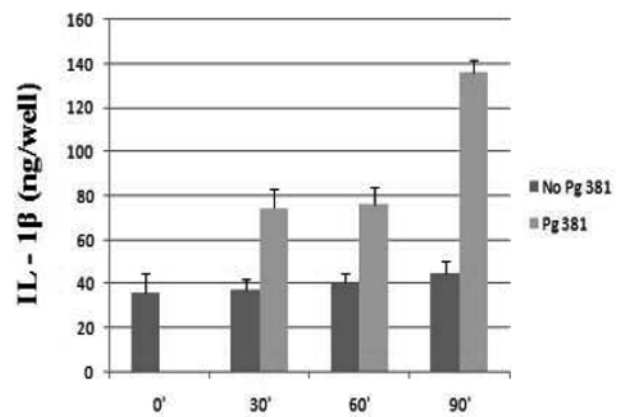


Fig. 1. ELISA measurement of proinflammatory cytokine IL-1 β produced by CRL-1999 human aortic smooth muscle cells infected with *P. gingivalis* 381. The supernatant of CRL-1999 infected with *P. gingivalis* for 30, 60 and 90 min was collected and added to anti-IL-1 β antibody-coated microplate (BioSource International, Carmarillo, CA, U.S.A.). The CRL-1999 was incubated with biotin-conjugate (biotinylated anti-IL-1 β antibody) for 2 h at room temperature, followed by Streptavidin-Horseradish Peroxidase for 30 min. The bound biotin-conjugate was visualized by adding Stabilized Chromogen.

Table 2. Invasion of human aortic smooth muscle cells by *P. gingivalis* strains

Strains	No. of bacteria added(10^7) ^a	No. of bacteria invading(10^4) \pm S.D.	Invading bacteria (%) \pm S.D. ^b
381 (wild type)	1.55	1.820 ± 0.500	0.1174 ± 0.0323
KDP150 (<i>fimA</i>)	1.87	0.006 ± 0.004	$0.0003 \pm 0.0002^*$
CW120 (<i>ppk</i>)	1.73	0.087 ± 0.012	$0.0046 \pm 0.0006^*$
KS7 (<i>relA</i>)	1.89	0.096 ± 0.016	$0.0056 \pm 0.0008^*$

^a Defined as the actual number of viable cells of *P. gingivalis* inoculum as determined by plating method. Bacterial cell suspension had been adjusted to optical density of 0.3 at 600 nm and 100 μ l of the suspension added to each well (1 ml) of a 24-well plate.

^b Defined as the percentage of *P. gingivalis* inoculum protected from metronidazole killing, which represents invading bacterial cells, after the infection period. Values are means (\pm standard deviation) of triplicate.

* Invasive ability of mutants of *P. gingivalis* demonstrated to be significantly lower than that of the wild type strain 381 ($P < 0.05$).

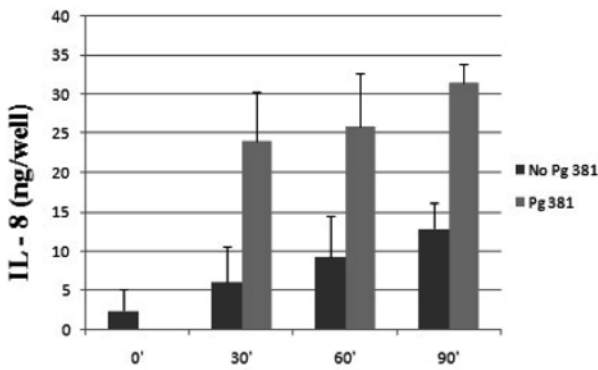


Fig. 2. ELISA measurement of chemokine IL-8 produced by CRL-1999 human aortic smooth muscle cells infected with *P. gingivalis* 381. The supernatant of CRL-1999 infected with *P. gingivalis* for 30, 60 and 90 min was collected and added to anti-IL-8 antibody-coated microplate (BioSource International, Carmarillo, CA, U.S.A.). The CRL-1999 was incubated with biotin-conjugate (biotinylated anti-IL-8 antibody) for 2 h at room temperature, followed by Streptavidin-Horseradish Peroxidase for 30 min. The bound biotin-conjugate was visualized by adding Stabilized Chromogen.

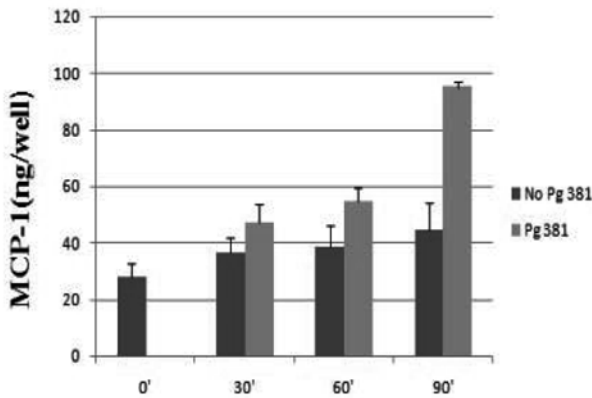


Fig. 3. ELISA measurement of chemokine MCP-1 produced by CRL-1999 human aortic smooth muscle cells infected with *P. gingivalis* 381. The supernatant of CRL-1999 infected with *P. gingivalis* for 30, 60 and 90 min was collected and added to anti-MCP-1 antibody-coated microplate (BioSource International, Carmarillo, CA, U.S.A.). The CRL-1999 was incubated with biotin-conjugate (biotinylated anti-MCP-1 antibody) for 2 h at room temperature, followed by Streptavidin-Horseradish Peroxidase for 30 min. The bound biotin-conjugate was visualized by adding Stabilized Chromogen.

*P. gingivalis*가 침투하면서 CRL-1999 평활근세포이 괴사되어 세포막이 손상된 상태 (용해)에서 LDH가 유리되는 지를 LDH assay로 관찰하였다. *P. gingivalis*의 감염이 없을 때는 CRL-1999의 LDH 유리량에 변화가 없었다. 반면 *P. gingivalis*이 침투하는 과정 중에는 LDH의 유리량이 조금씩 증가하다가 90분에서 크게 증가하여 LDH 유리가 같은 시간대에서 측정된 *P. gingivalis* 없이 배양한 CRL-1999의 LDH 값 대비 약 50% 증가하여 유의

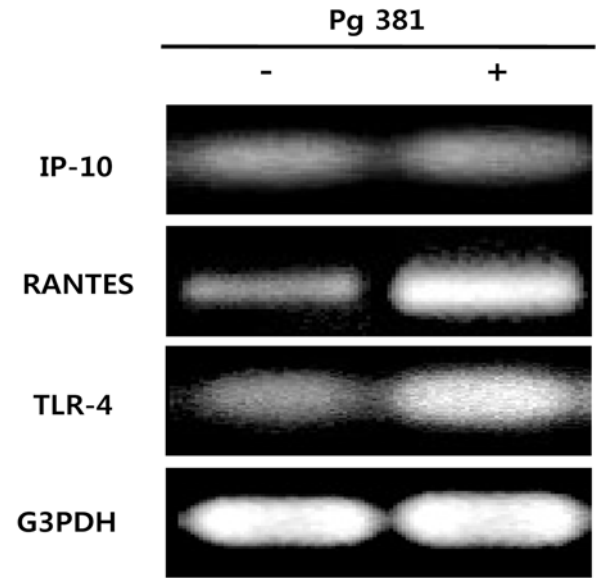


Fig. 4. RT-PCR analysis of expression of IP-10, RANTES and TLR-4 by CRL-1999 human aortic smooth muscle cells infected with *P. gingivalis* 381 for 30 min. Total RNA was extracted from the cells with or without *P. gingivalis* infection by TRIzol treatment, followed by chloroform. The cDNA was synthesized from the RNA by RT and amplified by PCR using sequence specific primers for IP-10, RANTES and TLR-4. The PCR products were electrophoresed on a 1% agarose gel and visualized under UV light after stained with ethidium bromide.

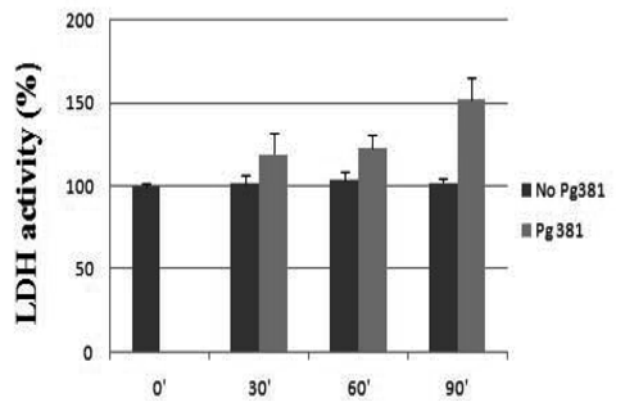


Fig. 5. Release of LDH from CRL-1999 human aortic smooth muscle cells infected with *P. gingivalis* 381. Percentage of LDH release relative to LDH release from CRL-1999 at baseline was calculated after *P. gingivalis* infection by colorimetric measurement using In vitro Toxicology Assay Kit (Tox-7, Sigma Chemicals) at 490 nm.

성 있는 차이를 보였다 ($P < 0.05$, Fig. 5).

*P. gingivalis*가 침투하는 과정에서 평활근세포에 apoptosis가 유발되는 지를 관찰하기 위해 caspase 활성을 측정하였다. *P. gingivalis*의 감염이 없었던 CRL-1999는 배양 시간에 따라 약간의 증가를 보여 배양개시 기초 caspase 활성도에 비해 90분에서 17.2% 증가하였다. 반면 *P.*

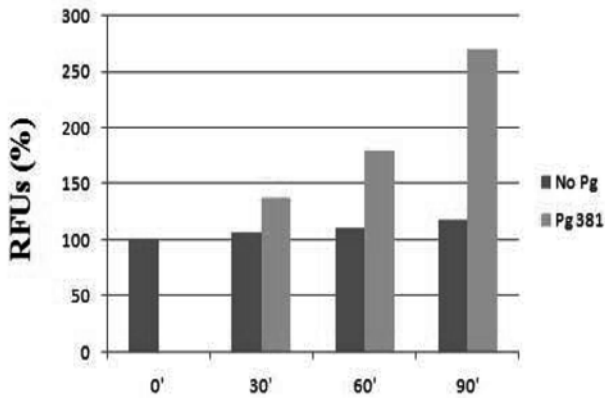


Fig. 6. Apoptotic cell death of CRL-1999 human aortic smooth muscle cells by invading *P. gingivalis* 381. Caspase activity of the apoptotic cells caused by infection with *P. gingivalis* for 30, 60 and 90 min was measured by using CHEMICON® CaspaTag™ Pan-Caspase In Situ Assay Kit.

*gingivalis*에 감염되고 침투되는 과정에서는 CRL-1999는 caspase의 활성이 배양개시 기초 caspase 활성도에 비해 30분에 36.9%, 60분에 79.5%가 증가하였고, 90분에는 증가폭이 더욱 커져서 170.5% 증가하였다 (Fig. 6).

고 찰

대다수의 성인들이 경험했거나 경험하는 치주질환은 세균감염질환으로 성인에서 치아상실을 초래하는 가장 중요한 요인이다 (Socransky *et al.*, 1992). 최근 많은 연구를 통해 치주질환은 다른 감염의 위험인자로서 중요할 뿐만 아니라 심혈관질환 (Cohen *et al.*, 1998; Genco *et al.*, 1998), 뇌혈관질환(뇌졸중) (Drfer *et al.*, 2004), 저체중미숙아 출산 (Offenbacher *et al.*, 1999), 당뇨병 (Mealey *et al.*, 2006), 류마티스성 관절염 (Al-Katma *et al.*, 2007) 등과 같은 전신질환을 유발하거나 악화시키는데 중요한 원인으로 밝혀지고 있다. 이들 전신질환은 만성적인 염증이 원인이 되고 있는데 치주질환은 만성적인 염증의 제공처가 될 수 있고 치주질환의 만성적인 염증의 근본적인 원인은 치은연하 치태 세균이다 (Genco *et al.*, 2002).

치주질환 원인균이 전신질환에 관여하는 기전에 관해서 많은 연구가 진행되고 있고 그 중에서도 심혈관질환에 있어서 *P. gingivalis*의 역할과 관련된 연구가 가장 많이 이루어지고 있다. *P. gingivalis*는 혈관내피세포를 침투하면서 내피세포의 형태에 변화를 가져오고 (Lee *et al.*, 2000) apoptosis를 초래한다 (Roth *et al.*, 2007). 이 과정에서 심혈관질환을 초래하는 근본 원인인 동맥경화와 관련된 많은 분자면역생물학적 반응이 *P. gingivalis*와 내피세포 사이에서 발생한다. 내피세포에 침투하는 *P.*

*gingivalis*로 인해 PRR의 하나인 TLR-2, 4의 발현이 증가한다 (Gibson *et al.*, 2004). LPS와 fimbriae는 혈관세포들, 단핵세포들의 TLR, 또 다른 PRR인 CD-14와 반응하여 chemokine인 IL-8, MCP-1의 분비를 증가시킨다 (Chou *et al.*, 2005; Hirose *et al.*, 2000; Kang *et al.*, 2002). 이들 chemokine에 의해 이동한 대식세포는 foam cell로 변화하여 (Kuramitsu *et al.*, 2004; Kuramitsu *et al.*, 2001; Qi *et al.*, 2003) 동맥경화에 기여하게 된다. *P. gingivalis*에 반응하여 내피세포나 단핵세포는 IL-6 생산을 증가시킨다 (Chou *et al.*, 2005; Hirose *et al.*, 2000). 이 IL-6은 간에서의 CRP 생산을 증가시키고 CRP는 더 많은 세포를 *P. gingivalis* 감염부위로 불러 모으고 이로 인해 더 많은 cytokine이 분비됨으로써 동맥경화가 진행된다 (Khuseyinova *et al.*, 2006).

이렇게 동맥경화가 진행되어 실제 심혈관질환을 유발하는 과정에서는 필연적으로 내피세포 하부에 존재하는 평활근세포가 관여하게 된다. 평활근세포의 참여, 즉 cytokine에 의해 증식하고 동맥경화가 진행되는 부위로 이동함으로써 혈관내막을 두껍게 하고 섬유화를 초래하기 때문에 동맥경화과정에 있어 결정적인 단계이며 결과적으로 혈관을 폐쇄시켜 (Ross *et al.*, 1993; Streblov *et al.*, 2001) 심근경색증과 같은 관동맥 심질환 등 다양한 심혈관 및 뇌혈관질환을 유발시킨다. 평활근세포 역시 미생물의 자극을 받을 수 있는 것으로 알려져 있다 (Gravel *et al.*, 2005; Stoll *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 1999). *P. gingivalis*가 혈관내피세포로 침투할 수 있고 그 결과로 내피세포가 동맥경화의 병변을 유도한다는 증거가 많이 있지만 아직도 구강세균인 *P. gingivalis*가 심혈관질환에 깊이 관여하고 있다고 받아들이기에는 아직 더 많은 증거가 필요하다. 본 연구의 목적은 *P. gingivalis*가 혈관 평활근세포에 침투하면서 동맥경화에 기여할 수 있는 cytokine, PRR의 발현에 미치는 영향을 관찰함으로써 *P. gingivalis*가 심혈관질환에 기여할 수 있다는 가능성을 더욱 확고히 제시하는데 있다.

사람의 대동맥 평활근세포의 primary cell line인 CRL-1999를 *P. gingivalis*로 90분간 감염시킨 후 metronidazole protection assay로 관찰한 결과 초기 접종한 *P. gingivalis* 381 중(1.55×10^7)에서 0.12% (1.82×10^4)가 세포 내로 침투한 것으로 나타났다 (Table 2). Dorn 등 (Dorn *et al.*, 1999)의 보고에 의하면 *P. gingivalis* 381은 관상동맥 평활근세포에 대한 침투율은 초기 접종 수에 대비 2.7%로 본 연구에서 관찰한 침투율 보다는 훨씬 높게 나타났다. 이 같은 차이는 실험에 사용한 세포가 다르기 때문에 나타난 결과일 수도 있다. 같은 primary cell line이지만 채취부위가 다른 상피세포를 대상으로 *P. gingivalis* 381의 침투를 관찰한 실험에서, 예를 들어 치은세포를 사용한 Njoroge 등 (Njoroge *et al.*, 1997) 과 치주낭상피세포를 사용한 Sandro 등 (Sandro *et al.*, 1994)이 관

찰한 침투율은 각각 6%와 0.65%로 큰 차이를 보이고 있다. 실제 평활근세포는 숙주의 종류에 따라, 그리고 혈관이 자리하는 인체부위에 따라 다양한 표현형적 (phenotypic) 이질성을 보인다 (Hao *et al.*, 2003). Dorn 등 (Dorn *et al.*, 1999)은 초기 접종 세균수를 흡광도에 기준으로 해서 예측하고 그 예측한 수를 기준으로 침투율을 계산했다. 본 구강미생물연구실의 경험에 의하면 흡광도를 기준으로 *P. gingivalis* 세균수를 조절하고 나서 실제 생균수를 측정하면 흡광도로 예측했을 때 보다 높게 나타난다. 따라서 이들의 실험에 사용한 초기 접종 *P. gingivalis* 수는 실제 보다 많았을 가능성을 배제할 수 없다.

P. gingivalis ATCC33277의 *fimA* 돌연변이인 KDP150의 평활근세포 침투력을 관찰한 결과 초기 접종 세균수 1.87×10^7 중에서 약 6×10^4 만이 침투하는 것으로 나타나 Dorn 등 (Dorn *et al.*, 2000)의 분류에 따르면 비침투세균으로 간주되었다. ATCC33277은 381과 유전학적으로 동일한 균주이기 때문에 본 연구에서 관찰한 381과 KDP150의 침투력 차이는 *fimA* 야생형과 *fimA* 돌연변이의 침투력의 차이를 대변하는 것이라고 볼 수 있다. 따라서 본 연구결과로 미루어 평활근세포에 침투하기 위해서는 *P. gingivalis* 표면에 부착물질인 fimbriae가 반드시 필요한 것으로 판단된다. *P. gingivalis*가 세포에 효율적으로 침투하기 위해서는 fimbriae가 필요하다는 것은 상피세포 (Genco *et al.*, 1998; Dorn *et al.*, 2000)에서 이미 관찰된 바 있다. *P. gingivalis*는 숙주세포에 접촉할 때 fimbriae는 숙주세포 표면에 존재하는 특정 수용기와 반응하면서 숙주세포의 신호전달체계를 활성화시키거나 *P. gingivalis* 표면에 침투를 위해 필요한 물질을 생성함으로써 세포내로 침입할 수 있는 것으로 보인다 (Weinberg *et al.*, 1997). Nakagawa 등 (Nakagawa *et al.*, 2002)은 치주염환자에서 가장 많이 발견되는 *P. gingivalis* *fimA* genotype II에 속하는 균주의 fimbriae가 다른 genotype에 속하는 fimbriae보다 상피세포에 부착하고 침투하는 것이 더 효율적이라고 보고하였다. 또한 이들의 연구에서 숙주세포는 $\alpha 5\beta 1$ integrin을 통해 *P. gingivalis*를 함입하는 것으로 나타났다 (Nakagawa *et al.*, 2002). Type II fimbriae에 의해 침투가 유발되면 *P. gingivalis*는 이어 Arg-gingipain으로 상피세포의 신호전달체계에 중요한 adaptor 물질인 paxillin을 분해시킨다. 이로 인해 *P. gingivalis*의 침투는 결과적으로 치주조직 파괴를 유도하는 것으로 판단된다 (Nakagawa *et al.*, 2006). 이 같은 현상은 혈관의 내피세포나 평활근세포에서도 비슷하게 발생할 것으로 보이기 때문에 혈관 세포들에 대한 *P. gingivalis* 침투는 혈관세포에 손상을 주고 이로 인해 동맥경화, 심혈관질환으로 진행될 수 있기 때문에 발병기전에서 중요한 단계라고 생각된다.

*P. gingivalis*의 숙주세포 침투력은 *fimA*의 genotype에 따라서도 다르지만 같은 genotype에 속하더라도 균주에

따라 침투력이 다르기 때문에 fimbriae는 침투에 필요한 것이지만 절대적 단일 인자는 아닌 것으로 보인다 (Dorn *et al.*, 2000). 침투에 있어 숙주세포와 침투세균의 에너지대사도 중요한 역할을 하는 것으로 보인다. 이들의 에너지대사, 특히 *P. gingivalis*의 대사가 억제될 때는 침투가 거의 완전히 억제되는 것으로 나타났다 (Deshpande *et al.*, 2000). 본 연구에서 *ppk*와 *relA* 돌연변이 *P. gingivalis*의 침투력도 관찰하였다. 흥미롭게도 두 돌연변이 균주 모두 *fimA* 돌연변이보다는 침투력이 높지만 야생형 381에 비해서는 약 1/20에 불과하였다. PPK는 세균이 스트레스나 긴축상황에서 내성을 갖는 데에 기여하고 있다 (Brown *et al.*, 2004). PPK는 세균이 영양분이 충분할 때 ATP를 polyphosphate (polyP)로 저장하고 영양분이 없을 때 polyP로부터 PPK가 ATP를 생산하는 것이 기본적인 기능이다 (Kornberg *et al.*, 2004). PPK는 RNA를 분해하는 degradosome에 존재하면서 polyP를 분해하여 ATP를 재생산하는 데 기여하고 있다 (Blum *et al.*, 1997). 따라서 *ppk* 돌연변이 *P. gingivalis*로서는 비교적 배양조건이 좋지 않은 assay system에서 침투에 필요한 에너지대사가 원활하지 않기 때문에 침투력이 낮게 나타났을 가능성이 있다. 대장균에서는 *ppk* 돌연변이에 따라 RpoS의 발현이 억제되고 RpoS 지배 하의 유전자들, 즉 영양부족상태에서 생존하는 데 필요한 50개 이상의 유전자가 영향을 받기 때문에 향후 *ppk*로 인해 영향을 받는 유전자들에 대한 폭넓은 연구도 같이 이루어져야 *ppk* *P. gingivalis*의 침투력이 저하된 이유를 이해할 수 있을 것이다.

세균은 아미노산 같은 영양분이 부족한 긴축상황에서 ppGpp를 합성한다. RelA에 의해 합성되는 ppGpp는 성장조절 유전자의 발현에 직, 간접적으로 관여하여 스트레스 상황에 대처하게 된다. 본 실험에서 사용한 *relA* *P. gingivalis*인 KS7은 fimbriae의 발현이 감소하는 것으로 나타났다 (Sen *et al.*, 2004). 아마도 이 같은 사실이 KS7의 저하된 침투력을 일부 설명할 수 있을 것으로 생각된다.

혈관세포와 단핵세포들로부터 분비되는 다양한 cytokine과 growth factor들이 동맥경화 유발과정에 기여한다 (Ross *et al.*, 2004) 세균감염에 대한 반응으로 숙주세포에서 분비되는 IL-1은 백혈구의 혈관 부착 및 혈관 투과성, 대식세포 활성화, 내피세포와 평활근세포의 증식, 단백질분해효소로 촉발된 죽상경화판 파열현상을 증가시킴으로써 동맥경화 전단계 과정에 중요한 proinflammatory cytokine이다 (Hoge *et al.*, 2007). 한편, IL-8와 MCP-1은 단핵/대식세포를 손상이나 감염이 발생한 부위의 혈관벽으로 이동시키는 chemokine으로서 이 후 이들 세포가 foam cell로 변화하는 계기가 됨으로써 동맥경화를 유도하고, 죽상경화판도 취약하게 하는 등 동맥경화과정에 중요한 인자이다 (Ito *et al.*, 2003). ELISA 분석에서 *P. gingivalis*

381로 감염된 CRL-1999 평활근세포는 중요한 proinflammatory cytokine인 IL-1 β , chemokine인 IL-8과 MCP-1의 분비가 증가하는 것으로 나타났다 (Fig. 1,2,3). CRL-1999의 IL-1 β 와 IL-8분비는 *P. gingivalis* 감염이 없을 때 보다 감염 시 30, 60, 90분에서 모두 유의하게 증가하였다. MCP-1은 초기에는 큰 차이가 없었으나 90분에서는 *P. gingivalis*로 감염된 CRL-1999에서 분비량이 급격히 증가하였다.

아직까지는 *P. gingivalis* 감염, 침투에 따른 평활근세포의 cytokine 발현, 또는 분비에 대한 보고가 없고 일반 미생물 감염에 대한 평활근세포의 cytokine 반응을 관찰한 연구도 많지 않은 터라 *P. gingivalis*와 연관된 평활근세포에 관한 최초의 보고인 본 연구를 비교평가하기가 어려운 상황이다. CMV로 감염시킨 평활근세포에서는 IL-1 β 가 유리되고 이 cytokine은 paracrine으로 작용하여 혈관부착물질들의 발현을 증가시키는 것으로 알려져 있다 (Dengler *et al.*, 2007). 한편, Stoll 등 (Stoll *et al.*, 2004)의 보고에 의하면 대장균의 LPS를 첨가했을 때 관상동맥 평활근세포의 IL-8과 MCP-1 분비가 증가한다. 따라서 평활근세포의 미생물감염은 대체로 이들 cytokine의 분비를 증가시키는 것으로 판단된다. 마찬가지로 혈관 내피세포에서도 *P. gingivalis*의 침투는 IL-1 β , IL-8, MCP-1의 분비를 증가시키는 것으로 보고되고 있다 (Takahashi *et al.*, 2006).

CRL-1999에서 또 다른 chemokine인 IP-10과 RANTES의 발현이 *P. gingivalis*의 감염에 의해 변하는 지를 관찰하였다. IP-10은 큰 차이가 없었으나 RANTES는 감염에 의해 발현이 크게 증가하는 것으로 나타났다 (Fig. 4). CMV에 감염된 대동맥 평활근세포의 경우도 IP-10, RANTES의 발현이 증가하며 이 두 chemokine은 CMV에 감염된 평활근세포의 상층액에 가장 많이 나타나는 물질로 알려지고 있다 (Gravel *et al.*, 2005). RANTES가 T 세포, 림프구, 대식세포의 화학유인물질이고 동맥경화 병소의 크기에 영향을 미치는 중요한 cytokine이기 때문에 본 연구 결과는 결국 *P. gingivalis*의 평활근세포 침투는 동맥경화에 크게 기여하게 될 것임을 시사한다.

한편 PRR로 중요한 TLR-4의 발현을 RT-PCR로 관찰하였다. TLR-4를 통하여 *P. gingivalis*의 fimbriae는 내피세포에서 IL-8과 MCP-1 분비를 유도하는 것으로 보고되고 있고 (Chou *et al.*, 2005; Hirose *et al.*, 2000; Kang *et al.*, 2002) 위의 결과에서 봤듯이 평활근세포에서도 *P. gingivalis*에 의해 IL-8과 MCP-1의 증가하였기 때문에 TLR-4의 발현도 증가할 것으로 예상되었다. 관찰한 결과, 예상과 같이 CRL-1999 평활근세포는 30분간 *P. gingivalis*와 함께 배양했을 때 TLR-4가 크게 증가하였다. 앞으로 *fimA* KDP150을 감염시켰을 때 과연 평활근세포에서는 아무런 변화도 없는 지, 예를 들어 TLR-4, IL-8, MCP-1 등의 발현에 변화가 없는 지를 관찰하

는 것은 흥미로운 것으로 생각된다. 다만 KDP150은 침투력이 없기 때문에, 발현에 변화가 없는 것이 침투가 없어서 그런 것인지 fimbriae가 없어 변화가 없는 것인지를 구별하기 위해 대조군으로 침투력은 있으나 fimbriae가 아주 적게 나타나는 *P. gingivalis* 균주, 열이나 formalin으로 사멸시킨 381/ATCC33277을 함께 사용하는 것이 필요할 것이다.

이전 연구에서 *P. gingivalis*의 침투가 혈관내피세포의 구조를 크게 변화시키는 것을 관찰하였고 (Lee *et al.*, 2000). 이런 변화는 세포의 사멸을 가져올 수 있을 것으로 예상하여 이번 연구에서는 *P. gingivalis* 침투에 따른 평활근세포의 사멸 여부를 측정하였다. 세포막 통합성의 손상, 즉 비특이성 세포괴사를 측정하는 LDH assay에서 CRL-1999는 *P. gingivalis* 감염 시 30, 60분에는 차이가 없었으나 90분이 경과했을 때 *P. gingivalis* 없이 배양했을 때보다 LDH 유리량이 증가하였다. 따라서 *P. gingivalis* 381은 강하지는 않지만 세포독성효과가 있는 것으로 판단된다. 한편 programmed cell death를 지칭하는 apoptosis의 가능성도 caspase 활성도로 관찰하였다. 그 결과 *P. gingivalis*가 없는 상태에서는 caspase 활성도에 변화가 없었으나 *P. gingivalis*와 함께 배양했을 때는 caspase의 활성도가 시간에 따라 꾸준히 증가하였고 90분이 되었을 때는 더욱 증가하여 *P. gingivalis* 감염이 없는 CRL-1999 caspase 활성도의 2배로 증가하였다. 따라서 *P. gingivalis*는 평활근세포에 대해 직접적인 세포독성보다는 apoptosis를 통해 세포의 사멸을 유도하는 것으로 판단된다. Roth 등 (Roth *et al.*)은 대동맥 내피세포를 대상으로 *P. gingivalis* 381을 감염시켰을 때 LDH의 유리에는 차이가 없으나 apoptosis는 증가하는 것으로 보고하였다. 이 결과는 *P. gingivalis* 감염이 혈관세포들에게 apoptosis를 유발할 가능성이 높다는 것을 시사한다.

혈관 평활근세포가 증식하면 혈관내막을 두껍게 하고 섬유화를 초래하기 때문에 결과적으로 혈관을 폐쇄시켜 (Ross *et al.*, 1993; Streblov *et al.*, 2001) 심근경색증과 같은 관동맥 심질환 등 다양한 심혈관 및 뇌혈관질환을 유발시킨다. 따라서 평활근세포의 apoptosis는 동맥경화를 악화시킬 수 있다고 생각할 수 있다. 그러나 apoptosis가 일어난 세포의 표면에 노출된 phosphatidylserine은 thrombin을 생성을 위한 기질로 사용될 수 있고, 응고과정을 활성화시켜 혈전을 야기하고, 죽상경화판의 까집현상(plaque erosion)과 aneurysm, 염증과 석회화를 유발하여 더 큰 위험을 예상해야 한다 (Clarke *et al.*, 2006; McCarthy *et al.*, 2000). 한편 혈관 평활근세포의 apoptosis는 IL-1, IL-8, MCP-1의 분비를 증가시킨다고 보고되고 있다 (Clarke *et al.*, 2006; McCarthy *et al.*, 2000). 이런 사실은 *P. gingivalis*에 감염된 혈관 평활근세포에서 IL-1 β , IL-8, MCP-1 분비가 증가함과 동시에 apoptosis가 증가한 본 연구 결과와 일치한다.

위의 결과들로 미루어 *P. gingivalis*는 평활근세포를 침투함으로써 세포로 하여금 IL-1 β 와 같은 proinflammatory cytokine의 분비를 촉진시키고 PRR인 TLR-4의 발현을 증가시키거나 apoptosis를 유도하여 IL-8, MCP-1, RANTES와 같은 chemokine을 분비를 증가시킴으로써 동맥경화, 나아가서 심혈관질환을 진행시키는 데에 기여할 수 있는 것으로 판단된다.

결론

치주질환은 사람에게 가장 빈번하게 나타나는 만성염증성 세균감염질환으로, 최근 동맥경화, 심혈관질환의 위험인자로 밝혀졌다. 치주질환에 가장 중요한 원인균인 *Porphyromonas gingivalis*가 동맥경화에 관여하고 있다는 증거는 혈관내피세포 침투능력, 침투과정 중 내피세포에서 다양한 cytokine의 발현이 증가한다는 연구결과에 나타나 있다. 그러나 동맥경화가 심혈관질환으로 진행되기 위해서는 평활근세포도 관여한다. 본 연구의 목적은 *P. gingivalis*가 대동맥 평활근세포 CRL-1999를 침투할 수 있는지를 관찰하고, 침투과정 중에 평활근세포에 나타나는 변화를 분석하여 동맥경화, 심혈관질환에 *P. gingivalis*가 관여할 수 있다는 가능성을 제시하는 데 있다. *P. gingivalis* 381과 *P. gingivalis* 381-유전자 동질형 돌연변이의 평활근세포 침투능력을 관찰하기 위해 metronidazole protection assay, 침투과정 중 평활근세포에서 동맥경화와 관련된 cytokine과 수용기가 발현되는 정도를 측정하기 위해 ELISA와 reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), 평활근세포의 비특이적 세포괴사를 관찰하기 위해 lactate dehydrogenase (LDH) release assay, apoptosis를 관찰하기 위해 caspase 활성도를 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 배양 90분에 측정된 야생형 *P. gingivalis* 381의 평활근세포 침투율은 초기 접종세균수 대비 0.12%로 높게 나타난 반면, fimbriae 유전자결핍 (*fimA*) 돌연변이 KDP150은 0.0003%로 측정되어 비침투 균주로 판단되었다. 한편 polyphosphate kinase 유전자결핍 (*ppk*) 돌연변이 CW120과 RelA 유전자결핍 (*relA*) 돌연변이 KS7은 침투율이 각각 0.0046, 0.0056%로 약하게 나타났다.

2. *P. gingivalis* 381로 감염되지 않은 평활근세포와 비교했을 때, 감염 30~90분 동안에 평활근세포는 ELISA 분석결과 proinflammatory cytokine인 interleukin (IL)-1 β , chemotactic cytokine (chemokine)인 IL-8과 monocyte chemotactic protein (MCP)-1의 발현이 유의하게 증가하였다($P < 0.05$).

3. *P. gingivalis* 381로 감염되지 않은 평활근세포와 비교했을 때, 감염 30분에 평활근세포는 RT-PCR 분석결과 RANTES (regulation upon activation, normal T cell

expressed and secreted)와 pattern recognition receptor (PRR)인 Toll-like receptor (TLR)-4의 발현이 증가하였다. 그러나 interferon- γ -inducible protein-10의 발현에는 차이가 없었다.

4. *P. gingivalis* 381로 감염되지 않은 평활근세포와 비교했을 때, 감염 30~90분 동안에 평활근세포의 LDH 유리양은 서서히 증가하여 90분에서는 52% 증가하였고, caspase 활성도는 감염 30~90분 동안에 계속 증가하여 90분대에서는 감염되지 않았을 때 보다 2배의 활성도를 보였다.

위의 결과들로 미루어 *P. gingivalis*는 평활근세포를 침투할 수 있으며, 침투에는 fimbriae가 필요하고 또한 에너지대사나 스트레스, 긴축상황과 관계가 있는 유전자도 관여하는 것으로 생각된다. *P. gingivalis*의 침투는 평활근세포로 하여금 IL-1 β 와 같은 proinflammatory cytokine의 분비를 촉진시키고, PRR인 TLR-4의 발현을 증가시키거나 apoptosis를 유도하여 IL-8, MCP-1, RANTES와 같은 chemokine의 분비를 증가시킴으로써 동맥경화, 나아가서 심혈관질환을 진행시키는 데에 기여할 수 있는 것으로 판단된다.

감사의 글

이 논문은 경희대학교 개교 55주년 기념 연구지원비와 2005년 보건 의료기술연구사업 21 R&D (A050028) 연구비로 수행되었음.

참고 문헌

- Al-Katma MK, Bissada NF, Bordeaux JM, Sue J, Askari AD. Control of periodontal infection reduces the severity of active rheumatoid arthritis. *J Clin Rheumatol*. 2007;13:134-137.
- Barkocy-Gallagher GA, Han N, Patti JM, Whitlock J, Progulsk-Fox A, Lantz MS. Analysis of the *prtP* gene encoding porphypain, a cysteine proteinase of *Porphyromonas gingivalis*. *J Bacteriol*. 1996;178:2734-2741.
- Belton CM, Izutsu KT, Goodwin PC, Park YS, Lamont RJ. Fluorescence image analysis of the association between *Porphyromonas gingivalis* and gingival epithelial cells. *Cell Microbiol*. 1999;1:215-223.
- Blum E, Py B, Carpousis AJ, Higgins CF. Polyphosphate kinase is a component of the *Escherichia coli* RNA degradosome. *Mol Microbiol*. 1997;26:387-398.
- Boutaga K, van Winkelhoff AJ, Vandenbroucke-Grauls CM, Savelkoul PH. The additional value of real-time PCR in the quantitative detection of periodontal pathogens. *J Clin Periodontol*. 2006;33:427-433.
- Brown MR, Kornberg A. Inorganic polyphosphate in the origin and survival of species. *Proc Natl Acad Sci USA*.

- 2004;101:16085-16087.
- Burke AP, Virmani R. Pathophysiology of acute myocardial infarction. *Med Clin North Am.* 2007;91:553-572.
- Chen W, Palmer RJ, Kuramitsu HK. Role of polyphosphate kinase in biofilm formation by *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun.* 2002;70:4708-4715.
- Chou HH, Yumoto H, Davey M, Takahashi Y, Miyamoto T, Gibson FC III, Genco CA. *Porphyromonas gingivalis* fimbria-dependent activation of inflammatory genes in human aortic endothelial cells. *Infect Immun.* 2005;73:5367-5378.
- Ciornei CD, Tapper H, Bjartell A, Sternby NH, Bodelsson M. Human antimicrobial peptide LL-37 is present in atherosclerotic plaques and induces death of vascular smooth muscle cells: a laboratory study. *BMC Cardiovasc Disord.* 2006;6:49-60.
- Clarke M, Bennett M. Defining the role of vascular smooth muscle cell apoptosis in atherosclerosis. *Cell Cycle.* 2006;5:2329-2331.
- Clarke M, Bennett M. The emerging role of vascular smooth muscle cell apoptosis in atherosclerosis and plaque stability. *Am J Nephrol.* 2006;26:531-535.
- Clarke MCH, Figg N, Maguire JJ, Davenport AP, Goddard M, Littlewood TD, Bennett MR. Apoptosis of vascular smooth muscle cells induces features of plaque vulnerability in atherosclerosis. *Nat Med.* 2006;12:1075-1080.
- Cohen DW, Rose LF. The periodontal-medical risk relationship. *Compend Contin Educ Dent.* 1998;19(suppl.):11-24.
- Darveau RP, Cunningham MD, Bailey T, Seachord C, Ratcliffe K, Bainbridge B, Dietsch M, Page RC, Aruffo A. Ability of bacteria associated with chronic inflammatory disease to stimulate E-selectin expression and promote neutrophil adhesion. *Infect Immun.* 1995;63:1311-1317.
- Dengler TJ, Raftery MJ, Werle M, Zimmermann R, Schonrich G. Cytomegalovirus infection of vascular cells induces expression of pro-inflammatory adhesion molecules by paracrine action of secreted interleukin-1 β . *Transplantation.* 2000;69:1160-1168.
- Deshpande RG, Khan MB, Genco CA. Invasion of aortic and heart endothelial cells by *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun.* 1998;66:5337-5343.
- DeStefano F, Anda RF, Kahn HS, Williamson DF, Russell CM. Dental disease and risk of coronary heart disease and mortality. *BMJ.* 1993;306:688-691.
- Dorn BR, Burks JN, Seifert KN, Progulsk-Fox A. Invasion of endothelial and epithelial cells by strains of *Porphyromonas gingivalis*. *FEMS Microbiol Lett.* 2000;187:139-144.
- Dorn BR, Dunn WA Jr, Progulsk-Fox A. Invasion of coronary artery cells by periodontal pathogens. *Infect Immun.* 1999;67:5792-5798.
- Dorn BR, Harris LJ, Wujick CT, Vertucci FJ, Progulsk-Fox A. Invasion of vascular cells in vitro by *Porphyromonas endodontalis*. *Int Endod J.* 2002;35:366-371.
- Dörfer CE, Becher H, Ziegler CM, Kaiser C, Lutz R, Jorss D, Lichy C, Buggle F, Bultmann S, Preusch M, Grau AJ. The association of gingivitis and periodontitis with ischemic stroke. *J Clin Periodontol.* 2004;31:396-401.
- Falkow S. Bacterial entry into eucaryotic cells. *Cell.* 1991;65:1099-1102.
- Faure E, Equils O, Sieling PA, Thomas L, Zhang FX, Kirschning CJ, Polentarutti N, Muzio M, Arditi M. Bacterial lipopolysaccharide activates NF- κ B 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;275:11058-11063.
- Ford PJ, Gemmell E, Chan A, Carter CL, Walker PJ, Bird PS, West MJ, Cullinan MP, Seymour GJ. Inflammation, heat shock proteins and periodontal pathogens in atherosclerosis: an immunohistologic study. *Oral Microbiol Immunol.* 2006;21:206-211.
- Gaffar A, Volpe AR. Inflammation, periodontal diseases, and systemic health. *Compend Contin Educ Dent* 2004;25(7 Suppl 1):4-6.
- Genco R, Offenbacher S, Beck J. Periodontal disease and cardiovascular disease: epidemiology and possible mechanisms. *J Am Dent Assoc.* 2002;133(Suppl):14S-22S.
- Genco RJ, Glurich I, Haraszthy V, Zambon J, DeNardin E. Overview of risk factors for periodontal disease and implications for diabetes and cardiovascular disease. *Compend Contin Educ Dent.* 1998;19(suppl.):40-45.
- Gibbons RJ. Bacterial adhesion to oral tissues: a model for infectious diseases. *J Dent Res.* 1989;68:750-760.
- Gibson FC III, Hong C, Chou HH, Yumoto H, Chen J, Lien E, Wong J, Genco CA. Innate immune recognition of invasive bacteria accelerates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation.* 2004;109:2801-2806.
- Gravel SP, Servant MJ. Roles of an IkappaB kinase-related pathway in human cytomegalovirus-infected vascular smooth muscle cells: a molecular link in pathogen-induced proatherosclerotic conditions. *J Biol Chem.* 2005;280:7477-7486.
- Hajishengallis G, Sharma A, Russell MW, Genco RJ. Interactions of oral pathogens with toll-like receptors: possible role in atherosclerosis. *Ann Periodontol.* 2002;7:72-78.
- Hajishengallis G, Sojar H, Genco RJ, DeNardin E. Intracellular signaling and cytokine induction upon interactions of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae with pattern-recognition receptor. *Immunol Invest.* 2004;33:157-172.
- Hao H, Gabbiani G, Bochaton-Piallat M-L. Arterial smooth muscle cell heterogeneity. Implications for atherosclerosis and restenosis development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:1510-1520.
- Haraszthy VI, Zambon JJ, Trevisan M, Zeid M, Genco RJ. Identification of periodontal pathogens in atheromatous plaques. *J Periodontol.* 2000;71:1554-1560.
- Herzberg MC, MacFarlane GD, Liu P, Erickson PR. The platelet as an inflammatory cell in periodontal diseases: interaction with *Porphyromonas gingivalis*. In: *Molecular Pathogenesis of periodontal Disease*, Genco R, Hamada S, Lehner T, McGhee J, Mergenhagen S (ed.), p. 247-255. American Society for Microbiology, Washington DC, 1994.
- Hirose K, Isogai E, Ueda I. *Porphyromonas gingivalis* fimbriae induce adhesion of monocytic cell line U937 to endothelial cells. *Microbiol Immunol.* 2000;44:17-22.
- Hoge M, Amar S. Role of interleukin-1 in bacterial atherogenesis. *Timely Top Med Cardiovasc Dis.* 2007;11:E5.

- Ito T, Ikeda U. Inflammatory cytokines and cardiovascular disease. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. 2003;2:257-265.
- Kang I-C, Kuramitsu HK. Induction of monocyte chemoattractant protein-1 by *Porphyromonas gingivalis* in human endothelial cells. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2002;34:311-317.
- Khlgatian M, Nassar H, Chou HH, Gibson FC III, Genco CA. Fimbria-dependent activation of cell adhesion molecule expression in *Porphyromonas gingivalis*-infected endothelial cells. *Infect Immun*. 2002;70:257-267.
- Khuseyinova N, Koenig W. Biomarkers of outcome from cardiovascular disease. *Curr Opin Crit Care*. 2006;12:412-419.
- Kornberg A, Rao NN, Ault-Riché D. Inorganic polyphosphate: a molecule of many functions. *Ann Rev Biochem*. 1999;68:89-125.
- Kuramitsu HK, Kang I-C, Qi M. Interactions of *Porphyromonas gingivalis* with host cells: implication for cardiovascular diseases. *J Periodontol*. 2003;74:85-89.
- Kuramitsu HK, Qi M, Kang IC, Chen W. Role for periodontal bacteria in cardiovascular diseases. *Ann Periodontol*. 2001;6:41-47.
- Lamont RJ, Chan A, Belton CM, Izutsu KT, Vasel D, Weinberg A. *Porphyromonas gingivalis* invasion of gingival epithelial cells. *Infect Immun*. 1995;63:3878-3885.
- Lamont RJ, Oda D, Persson RE, Persson GR. Interaction of *Porphyromonas gingivalis* with gingival epithelial cells maintained in culture. *Oral Microbiol Immunol*. 1992;7:364-367.
- Lee J-Y, Park B-L, Yun H-K, Park E-A, Shin E-A, Jue S-S, Shin J-W. Possibility of involvement of *Porphyromonas gingivalis* in coronary heart disease. *J Korean Soc Microbiol*. 2000;35:203-214.
- Lee J-Y, Sojar HT, Amano A, Genco RJ. Purification of major fimbrial proteins of *Porphyromonas gingivalis*. *Prot Expr Purif*. 1995;6:496-500.
- Li L, Messas E, Bastista EL Jr, Levine RA, Amar S. *Porphyromonas gingivalis* accelerates the progression of atherosclerosis in a heterozygous apolipoprotein E-deficient murine model. *Circulation*. 2002;105:861-867.
- McCarthy NJ, Bennett MR. The regulation of vascular smooth muscle cell apoptosis. *Cardiovasc Res*. 2000;45:747-755.
- Madianos PN, Papapanou PN, Nannmark U, Dahlén G, Sandros J. *Porphyromonas gingivalis* FDC381 multiplies and persists within human oral epithelial cells *in vitro*. *Infect Immun*. 1996;64:660-664.
- Mao S, Maeno N, Yoshiie K, Matayoshi S, Fujimura T, Oda H. CD14-mediated induction of interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1 by a heat-resistant constituent of *Porphyromonas gingivalis* in endothelial cells. *Scand J Immunol*. 2002;56:484-491.
- Mattila KJ. Dental infections as a risk factor for acute myocardial infarction. *Eur Heart J*. 1993;14(Suppl. K):51-53.
- Mattila KJ, Nieminen MS, Valtonen VV, Rasi VP, Kesaniemi YA, Syrjala SL, Jungell PS, Isoluoma M, Hietaniemi K, Jokinen MJ. Association between dental health and acute myocardial infarction. *BMJ*. 1989;298:779-781.
- Mealey BL, Oates TW. Diabetes mellitus and periodontal diseases. *J Periodontol*. 2006; 77:1289-1303.
- Morgando A, Sanseverino P, Perotto C, Molino F, Gai V, Ponzetto A. *Helicobacter pylori* seropositivity in myocardial infection. *Lancet*. 1995;345: 1380.
- Nakagawa I, Amano A, Kuboniwa M, Nakamura T, Kawabata S, Hamada S. Functional differences among FimA variants of *Porphyromonas gingivalis* and their effects on adhesion to and invasion of human epithelial cells. *Infect Immun*. 2002;70:277-285.
- Nakagawa I, Inaba H, Yamamura T, Kato T, Kawai S, Ooshima T, Amano A. Invasion of epithelial cells and proteolysis of cellular focal adhesion components by distinct types of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae. *Infect Immun*. 2006;74:3773-3782.
- Nassar H, Chou HH, Khlgatian M, Gibson FC III, Van Dyke TE, Genco CA. Role for fimbriae and lysine-specific cysteine proteinase gingipain K in expression of interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein in *Porphyromonas gingivalis*-infected endothelial cells. *Infect Immun*. 2002;70:268-276.
- Njoroge T, Genco RJ, Sojar HT, Hamada N, Genco CA. A role for fimbriae in *Porphyromonas gingivalis* invasion of oral epithelial cells. *Infect Immun*. 1997;65:1980-1984.
- Nonnenmacher C, Dalpke A, Rochon J, Flores-de-Jacoby L, Mutters R, Heeg K. Real-time polymerase chain reaction for detection and quantification of bacteria in periodontal patients. *J Periodontol*. 2005;76:1542-1549.
- Nonnenmacher C, Stelzel M, Susin C, Sattler AM, Schaefer JR, Maisch B, Mutters R, Flores-de-Jacoby L. Periodontal microbiota in patients with coronary artery disease measured by real-time polymerase chain reaction: a case-control study. *J Periodontol*. 2007;78:1724-1730.
- Offenbacher S, Beck JD. Periodontitis: a potential risk factor for spontaneous preterm birth. *Compen Cont Educ Dent*. 1998;19(suppl.):32-39.
- Offenbacher S, Beck JD. A perspective on the potential cardioprotective benefits of periodontal therapy. *Am Heart J*. 2005;149:950-954.
- Papapanou PN, Sandros J, Lindberg K, Duncan MJ, Niederman R, Nannmark U. *Porphyromonas gingivalis* may multiply and advance within stratified human junctional epithelium *in vitro*. *J Periodontal Res*. 1994;29:374-375.
- Pooling Project Research Group. Relationship of blood pressure, serum cholesterol, smoking habit, relative weight and ECG abnormalities to incidence of major coronary events: final report of the pooling project. *J Chronic Dis*. 1978;31:201-306.
- Pucar A, Milasin J, Lekovic V, Vukadinovic M, Ristic M, Putnik S, Kenney EB. Correlation between atherosclerosis and periodontal putative pathogenic bacterial infections in coronary and internal mammary arteries. *J Periodontol*. 2007;78:677-682.
- Qi M, Miyakawa H, Kuramitsu HK. *Porphyromonas gingivalis* induces murine macrophage foam cell formation. *Microb Pathog*. 2003;35:259-267.
- Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*. 1993;362:801-809.
- Roth GA, Ankersmit HJ, Brown VB, Papapanou PN, Schmidt AM, Lalla E. *Porphyromonas gingivalis* infection and cell

- death in human aortic endothelial cells. *FEMS Microbiol Lett.* 2007;272:106-113.
- Roth GA, Moser B, Huang SJ, Brandt JS, Huang Y, Papapanou PN, Schmidt AM, Lalla E. Infection with a periodontal pathogen induces procoagulant effects in human aortic endothelial cells. *J Thromb Haemost.* 2006;4:2256-2261.
- Saglia FR, Marfany A, Camargo P. Intragingival occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Bacteroides gingivalis* in active destructive periodontal lesions. *J Periodontol.* 1988;59:259-265.
- Sandros J, Papapanou P, Dahlén G. *Porphyromonas gingivalis* invades oral epithelial cells *in vitro*. *J Periodontol Res.* 1993;28:219-226.
- Sandros J, Papapanou PN, Nannmark U, Dahlén G. *Porphyromonas gingivalis* invades human pocket epithelium *in vitro*. *J Periodontol Res.* 1994;29:62-69.
- Sawada N, Ogawa T, Asai Y, Makimura Y, Sugiyama A. Toll-like receptor 4-dependent recognition of structurally different forms of chemically synthesized lipid A of *Porphyromonas gingivalis*. *Clin Exp Immunol.* 2007;148:529-536.
- Sen K, Hayashi J, Kuramitsu HK. Characterization of the *relA* gene of *Porphyromonas gingivalis*. *J Bacteriol.* 2000;182:3302-3304.
- Setsuda J, Teruya-Feldstein J, Harris NL, Ferry JA, Sorbara L, Gupta G, Jaffe ES, Tosato G. Interleukin-18, interferon- γ , IP-10, and Mig expression in Epstein-Barr virus-induced infectious mononucleosis and posttransplant lymphoproliferative disease. *Am J Pathol.* 1999;155:257-265.
- Sharma A, Novak EK, Sojar HT, Swank RT, Kuramitsu HK, Genco RJ. *Porphyromonas gingivalis* platelet aggregation activity: outer membrane vesicles are potent activators of murine platelets. *Oral Microbiol Immunol.* 2000;15:393-396.
- Socransky SS, Haffajee AD. Microbial mechanisms in the pathogenesis of destructive Periodontal diseases: a critical assessment. *J Periodontol Res.* 1991;26:195-212.
- Socransky SS, Haffajee AD. Bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. *J Periodontol.* 1992;63(suppl.):322-331.
- Steinhuyl SR, Moliterno DJ. The role of the platelet in the pathogenesis of atherothrombosis. *Am J Cardiovasc Drugs.* 2005;5:399-408.
- Stoll LL, Denning GM, Li WG, Rice JB, Harrelson AL, Romig SA, Gunnlaugsson ST, Miller FJ Jr, Weintraub NL. Regulation of endotoxin-induced proinflammatory activation in human coronary artery cells: expression of functional membrane-bound CD14 by human coronary artery smooth muscle cells. *J Immunol.* 2004;173:1336-1343.
- Stoll LL, Denning GM, Weintraub NL. Potential role of endotoxin as a proinflammatory mediator of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24:2227-2236.
- Streblow DN, Orloff SL, Nelson JA. Do pathogens accelerate atherosclerosis? *J Nutr.* 2001;131:2798S-2804S.
- Sugano N, Ikeda K, Oshikawa M, Sawamoto Y, Tanaka H, Ito K. Differential cytokine induction by two types of *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiol Immunol.* 2004;19:121-123.
- Takahashi Y, Davey M, Yumoto H, Gibson FC III, Genco CA. Fimbria-dependent activation of pro-inflammatory molecules in *Porphyromonas gingivalis* infected human aortic endothelial cells. *Cell Microbiol.* 2006;8:738-757.
- Thom DH, Grayston JT, Siscovick DS, Wang S, Weiss NS, Darling JR. Association for prior infection with *Chlamydia pneumoniae* and angiographically demonstrated coronary artery disease. *J Am Med Assoc.* 1992;268:68-72.
- Ueshima J, Shoji M, Ratnayake DB, Abe K, Yoshida S, Yamamoto K, Nakayama K. Purification, gene cloning, gene expression, and mutants of Dps from the obligate anaerobe *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun.* 2003;71:1170-1178.
- Umino M, Nagao M. Systemic disease in elderly dental patients. *Int Dent J.* 1993;43:213-218.
- Vercellotti GM. Potential role of viruses in thrombosis and atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med.* 1995;5:128-133.
- Weber C. Platelets and chemokines in atherosclerosis: partners in crime. *Circ Res.* 2005;96:612-616.
- Weinberg A, Belton CM, Park YS, Lamont RJ. Role of fimbriae in *Porphyromonas gingivalis* invasion of gingival epithelial cells. *Infect Immun.* 1997;65:313-316.
- Wu YM, Chen LL, Yan J, Zhuang CY, Gu ZY. Effect of *Porphyromonas gingivalis* PrtC on cytokine expression in ECV304 endothelial cells and its level in subgingival plaques from patients with chronic periodontitis. *Acta Pharmacol Sin.* 2007;28:1015-1023.
- Yumoto H, Chou HH, Takahashi Y, Davey M, Gibson FC III, Genco CA. Sensitization of human aortic endothelial cells to lipopolysaccharide via regulation of Toll-like receptor 4 by bacterial fimbria-dependent invasion. *Infect Immun.* 2005;73:8050-8059.
- Zhou YF, Yu ZX, Wanishawad C, Shou M, Epstein SE. The immediate early gene products of human cytomegalovirus increase vascular smooth muscle cell migration, proliferation, and expression of PDGF beta-receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;256:608-613.