

Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide의 전신적 투여에 의한 생쥐 뇌에서 염증 유발

정보현, 이희수, 유기연[†]

강릉원주대학교 치과대학 해부학교실 및 구강과학연구소

접수: 2020년 11월 20일/ 수정접수: 2020년 12월 14일/ 게재 승인: 2020년 12월 15일/ 출간: 2020년 12월 31일

치주질환을 일으키는 세균인 *Porphyromonas gingivalis*의 lipopolysaccharide (PG-LPS)가 뇌의 혈액뇌 장벽(blood-brain-barrier)을 통과 할 가능성이 제기되었지만, 뇌의 신경 염증 유발과 관련된 직접적인 연관성은 명확하게 알려져 있지 않다. 따라서 본 연구에서 PG-LPS가 뇌에서 염증과 관련되어 어떤 영향을 미치는지 확인하고자 하였다. 본 연구에서는 PG-LPS 투여 후 12 시간과 24 시간 후에 면역조직화학 염색을 통해 뇌 조직의 변화를 확인 하였다. 면역조직화학 염색 결과, PG-LPS를 투여 한 마우스의 뇌에서 염증관련 인자들이 발현되는 것이 관찰되었다. 이와 같은 결과는 구강 내 치주질환을 유발하는 PG-LPS는 뇌에서 신경염증 유발과 밀접한 연관이 있음을 시사한다.

주제어: *Porphyromonas gingivalis*, 지질다당질, 뇌, 염증, 사이토카인

[†] 교신저자: 유기연

강릉원주대학교 치과대학 해부학교실 및 구강과학연구소

Tel: 82-33-640-2456, E-mail: kyyoo@gwnu.ac.kr

서론

구강의 2대 질환인 치주질환은 치주세균에 대한 숙주 반응의 결과로 치주조직의 염증변화로 인해 치은, 치주인대 및 치조골이 파괴되는 질환이다^{1,2}. 치주질환을 발병시키는 세균은 조직에 침입이 가능한 그람 음성 세균으로, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia*, *Porphyromonas gingivalis* 및 *Treponema denticola* 가 주요 세균이다^{3,4}.

이 중 *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*)는 성인 치주질환에서 핵심적인 그람 음성 세균으로⁵ 이 세균은 지질다당류 (lipopolysaccharide; LPS), gingipain, fimbriae, hemagglutinins 및 outer membrane vesicles (OMVs)에 중요한 독성 인자를 다수 가지고 있다⁶. 이 중 LPS는 그람 음성 세균의 외막에 위치하며 숙주의 면역 신호 전달 경로를 강하게 자극할 뿐만 아니라⁷ 뼈 및 상피세포 장벽 파괴 등을 유발할 수 있는 것으로 알려져 있다^{8,9}.

최근 연구에서는 다수의 치주질환 발병 세균들이 죽상경화판 (atherosclerotic plaque)에서 관찰되었다고 보고되었다^{10,11}. 치주질환 발병 세균은 혈류에 들어갈 수 있으며¹²⁻¹⁴, 만성 치주질환의 경우 순환계에 염증을 지속적으로 증가시킨다고 보고되었다¹⁵. 이처럼 구강 내 세균들이 전신 순환을 통해 인체의 각 영역에서 어떤 영향을 미치는지 지속적으로 연구되고 있으며, 최근에는 치주질환 유발 세균들이 뇌에서 신경염증을 유발하며, 이러한 결과가 알츠하이머성 치매 발병과 연관성이 있다는 주장이 제기되고 있다. 특히 치주질환 발생과 밀접한 관련이 있는 *P. gingivalis*는 LPS 및 gingipain을 통해 치주조직에서의 염증을 유발하는 것으로 알려져 있다¹⁶.

P. gingivalis LPS (PG-LPS)는 장벽 붕괴를 유발하기 위해 환경 조건 및 세포 유형에 따라 TLR2 및 TLR4를 조절하여 치은 상피장벽을 파괴할 뿐

만 아니라 구강 각질세포에서 염증성 사이토카인 (cytokine)의 발현에 관여한다¹⁷⁻²⁰. 다수의 연구들에 따르면 PG-LPS가 TLR2와 TLR4 작용제 및 길항제 모두로 작용할 수 있다고 밝혀져 두 수용체가 PG-LPS에 의한 염증 기전을 활성화시킬 수 있는 것으로 보고되었다^{9,21,22}. 하지만 아직까지 PG-LPS에 의한 TLR2 활성화 기전은 명확하지 않다.

이전의 연구들을 통해 뇌에서 *Escherichia coli* LPS (EC-LPS)에 의해 TLR4 활성화가 발생한다는 것이 보고되었다. 장관 내에 영향을 미치는 그람 음성 세균인 EC-LPS를 투여하여 뇌의 해마 (hippocampus)에서의 전 염증 반응을 연구한 결과, LPS 투여 후 미세아교세포 (microglia) 마커인 Iba1의 발현이 활성화되었을 뿐만 아니라 LPS 수용체인 TLR4 발현을 유도하는 것으로 나타났다²³.

PG-LPS의 경우 치주질환 발생에 의해 전신적 감염 가능성이 충분하며, 뇌의 혈액뇌장벽 (blood-brain-barrier)를 통과할 수 있다는 가능성이 제기되었지만¹⁵, 아직까지 직접적으로 뇌 신경 염증 유발에 대해서는 알려져 있지 않으며, 뇌에서의 작용은 관련 연구가 아직까지 EC-LPS에 비교하면 부족한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 PG-LPS의 전신적 투여가 뇌에서 조직학적으로 일부 염증인자들의 발현 확인을 통해 신경염증 유발과 직접적인 관계가 있는지 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

실험동물

본 연구를 위해 6주령의 수컷 흰 마우스 (ICR mice)(18~20 g)를 오리엔트 바이오로부터 구입하여 컨벤셔널 시스템에서 사육하여 이용하였다. 실험동물들은 12 시간 낮/밤 주기와 물과 사료를 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였으며, 온도 (22 °C

)와 습도 (50%)로 유지되는 곳에서 사육되었다. 본 실험의 모든 절차는 강릉원주대학교 동물실험 윤리위원회(Institutional Animal Care and Use Committee)의 승인 하에 (Approval No. GWNU-2020-27) 표준작업 지침서에 따라 수행하였다.

본 연구에서 실험동물군은 정상군 (control group) (n=8), LPS 투여 12시간 후 실험군 (LPS-12H group) (n=8)과 LPS 투여 24시간 후 실험군 (LPS-24H group) (n=8)으로 각각 구분하였다.

PG-LPS 투여

이전의 EC-LPS 투여 연구 중 TLR4 수용체를 통해 최적의 LPS 농도를 적용한 연구를 참고하였다¹³⁾. 본 연구에서 PG-LPS (InvivoGen, HK) (0.1 ml, 100 μ l / kg) 를 PBS에 희석하여 꼬리 정맥을 통해 투여하였다.

조직 처리

조직학적 분석을 위하여 실험동물의 조직 처리는 모두 동일한 조건에서 진행하였다. 조직의 고정 및 적출을 위하여 호흡마취를 한 후 흉곽을 개방하여 0.9% 식염수로 관류세척 후 4% paraformaldehyde가 포함된 PBS (pH 7.5)로 관류 고정하였다. 관류 고정이 끝난 마우스의 뇌를 적출하여 동일한 고정액에 8시간 후고정 하였다. 이후, 4% sucrose에 24 시간 고정 후 동결조직 절편을 제작하였다.

뇌 조직 분석방법

(1) 면역조직화학염색

절편한 뇌 조직은 0.01M PBS (pH 7.3)로 10분간 3회 세척하였다. 0.3% 과산화수소(H_2O_2)가 들어있는 0.01M PBS (pH 7.3) 용액으로 30분간 조직을 처리한 후 0.01M PBS (pH 7.3)로 10분간 3회 세척하였다. 세척이 끝난 조직은 5% normal goat

serum이 들어있는 0.01M PBS (pH 7.3)를 뿌리고 60분간 처리하였다. 처리가 끝난 조직은 세척하지 않고 Anti-rabbit Iba-1(diluted 1:1000)이 들어있는 0.01M PBS(pH7.3) 용액을 후 4°C에서 하루 동안 처리한다. 처리 후 0.01M PBS (pH 7.3)로 10분간 3회 세척하고, 일차항체와 반응시킨 조직은 0.01M PBS (pH 7.3)에 1:250으로 희석한 biotinylated rabbit anti-goat에 120분 동안 처리한다. 반응이 끝난 조직은 0.01M PBS (pH 7.3)로 10분간 3회 세척한 후, Avidin-biotin complex(ABC) kit(VECTOR, USA)에 차례로 90분 동안 반응시킨다. 반응이 끝난 조직은 0.01M PBS (pH 7.3)에 10분간 3회씩 세척한다. 세척이 끝난 조직은 1% 3,3'-diaminobenzidine(DAB)과 0.3% H_2O_2 가 각각 250 μ l 들어있는 5ml의 0.01M PBS (pH 7.3)를 이용하여 발색한 후 0.01M PBS (pH 7.3)로 10분간 3회 세척한다. 이 후 gelatin 코팅 된 슬라이드에 뇌 조직을 붙인 후, 37 °C 오븐에서 건조시킨다. 건조가 끝난 조직 슬라이드는 증류수로 10분간 3회 세척한 후 탈수와 청명화 과정을 거쳐 Canada balsam (Kanto, Japan)을 이용하여 봉입하였다. 완성된 슬라이드는 현미경(Axio Imager A2, Zeiss, Germany)에서 관찰하였다.

각 면역조직화학 염색 결과에 대한 정량적 분석을 위하여 동물당 120 μ m 간격으로 6장의 절편을 선택하였으며, 각 면역조직화학염색의 이미지는 디지털 카메라 (AxioCam, Zeiss, Germany)가 부착된 현미경(Axio Imager A2, Zeiss, Germany)에서 촬영하였다. 이전 연구방법을 참고하여²⁴⁾ 촬영된 이미지는 정상군 및 실험군의 해마 영역에서 140 x 140 μ m 조직면역을 512 x 512 픽셀로 표준화하였다. 각 면역조직화학에서 면역반응을 보이는 구조들의 밀도는 상대적광학밀도(relative optical density, ROD)로 측정하였다. 각 항체들에 대한 면역반응성을 보이는 구조에 대한 광학밀도(optical

density, OD)는 NIH Image 1.59 software를 이용하여 회색값수준(mean gray level, 0~256) 측정하고 이 값을 이용한 공식($OD = \log(256/\text{mean gray level})$)을 통해 얻었다. 최종적으로, OD값의 비율은 정상군의 OD값에 대한 %(ROD)로 환산하여 나타내었다.

(2) 통계 분석

본 연구에서 표시된 값은 평균치 ± 표준오차로 이루어졌다. 각 실험군 간의 값의 차이는 SPSS 프로그램을 이용한 ANOVA with Duncan's post hoc test를 이용하여 통계학적으로 분석하였으며, 통계학적으로 *p* 값이 0.05 이하면 통계적으로 유의하다고 판단하였다.

결과

Iba-1 면역조직화학 염색

뇌조직에서 면역을 담당하고 있는 미세아교세포의 활성화를 확인하기 위하여 Iba-1 항체를 이용하여 면역조직화학 염색을 수행하였다.

아무런 처치하지 않은 정상군에서는 Iba-1 면역 반응 세포는 돌기가 가늘고 약간 Iba-1 면역반응을 나타내어 휴지기 상태의 미세아교세포 형태로 관찰되었다 (그림. 1A). 그러나 LPS 투여 12시간 후 그룹에서는 Iba-1 면역반응을 보이는 미세아교세포에서 두드러진 변화가 관찰되었다. 이 세포들은 세포체의 크기가 커졌으며, 돌기가 두꺼워지고 가지가 많아졌으며 강한 Iba-1 면역반응을 보이는 활성화된 미세아교세포의 형태를 나타내었다 (그림. 1B). LPS 투여 24시간 후 그룹에서도 미세아교세포에 Iba-1 면역 반응 세포가 관찰되었지만 (그림. 1C), 12 시간 후 그룹 보다는 Iba-1 면역 반응성이 감소하였으며, 세포질과 돌기가 활성화 형태보다는 휴지기 형태에 가깝게 관찰되었다. ROD 분석 결과, LPS 투여 12시간 후 그룹에서 가장 많은 Iba-1 면역 반응이 나타난 것을 확인하였다 (그림. 1D). LPS 투여 24시간 후 그룹은 정상군 보다 많은 Iba-1 면역 반응이 관찰되었지만, 12시간 후 그룹보다는 적은 면역반응이 나타난 것을 확인하였다 (그림. 1D).

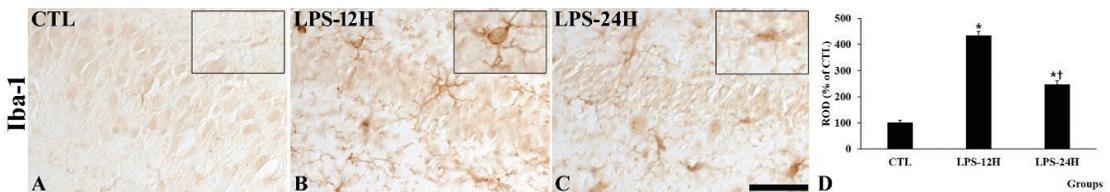


Fig 1. Iba-1 immunohistochemistry in brain of the control (A) group, LPS-12H (B) group and LPS-24H (C) group. Scale Bar = 100 μm. (D) ROD as % of Iba-1-immunoreactive structures in the hippocampus after Pg-LGS injection (n=7 at each group). Bars indicate the means ± SEM. **P*<0.05 vs. control group; †*P*<0.05 vs. previous group. (A) In the control group, Iba-1 immunoreactive cells are not observed in brain. (B and C) However, LPS-12H and LPS 24H group, Iba-1 immunoreactive cells are increased in brain than that of control group. Especially, LPS-12H group, Iba-1 immunoreactive cells are significantly increased in brain than that of control group.

TLR4 면역조직화학 염색

그람 음성 세균의 LPS에 의해 유도되는 신호 전달의 반응을 확인하기 위해 TLR4 항체를 이용하여 면역조직화학 염색을 수행하였다.

아무런 처치하지 않은 정상군에서는 TLR4 항체에 면역 반응하는 세포가 관찰되지 않았다 (그림. 2A). 그러나 LPS 투여 12시간 후 그룹에서 별아교

세포 (astrocyte) 및 혈관 주변에서 TLR4 면역 반응 세포가 두드러지게 관찰되었다 (그림. 2B, 2D). LPS 투여 24시간 후 그룹에서도 별아교세포 및 혈관 주변에서 TLR4 면역 반응 세포가 정상군과는 비교했을 때보다 더 많이 관찰되었지만, 12 시간 후 그룹 보다는 그 수 및 정도가 약한 것이 관찰되었다 (그림. 2C, 2D).

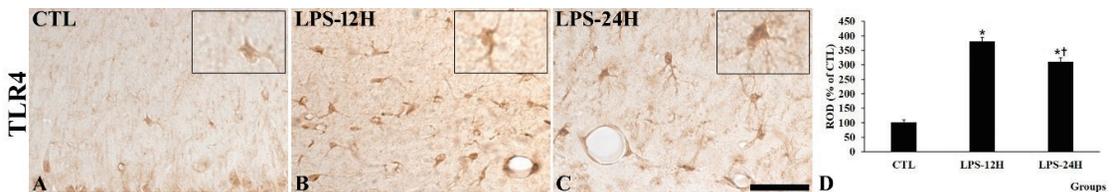


Fig 2. TLR4 immunohistochemistry in brain of the control (A) group, LPS-12H (B) group and LPS-24H (C) group. Scale Bar = 100 μ m. (D) ROD as % of TLR4-immunoreactive structures in the hippocampus after Pg-LGS injection (n=7 at each group). Bars indicate the means \pm SEM. *P<0.05 vs. control group; †P<0.05 vs. previous group. (A) In the control group, TLR4 immunoreactive cells are not observed in brain. (B and C) However, LPS-12H and LPS 24H group, TLR4 immunoreactive cells are increased in brain than that of control group. Especially, LPS-12H group, TLR4 immunoreactive cells are significantly increased in brain than that of control group.

IL-1 β 면역조직화학 염색

사이토카인에 의한 염증 반응 및 apoptosis 등의 세포 활동을 확인하기 위해 IL-1 β 항체를 이용하여 면역조직화학 염색을 수행하였다.

아무런 처치하지 않은 정상군에서는 IL-1 β 항체에 면역 반응하는 세포가 관찰되지 않았다 (그림. 3A).

그러나 LPS 투여 12시간 후 그룹에서는 IL-1 β 항체에 면역 반응하는 세포가 정상군 보다 더 많이 관찰되었다 (그림. 3B, 3D). LPS 투여 24시간 후 그룹에서는 정상군과 마찬가지로 IL-1 β 항체에 면역 반응하는 세포가 관찰되지 않았다 (그림. 3C, 3D).

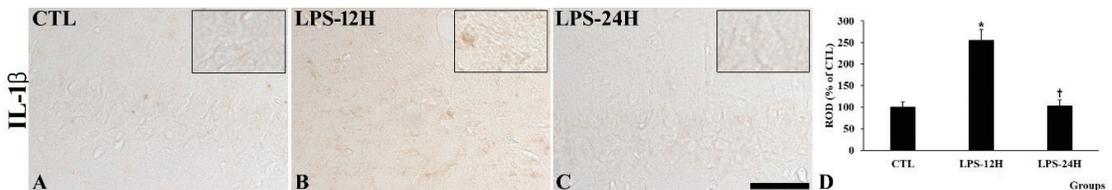


Fig 3. IL-1 β immunohistochemistry in brain of the control (A) group, LPS-12H (B) group and LPS-24H (C) group. Scale Bar = 100 μ m. (D) ROD as % of IL-1 β -immunoreactive structures in the hippocampus after Pg-LGS injection (n=7 at each group). Bars indicate the means \pm SEM. *P<0.05 vs. control group; †P<0.05 vs. previous group. (A and C) In the control and LPS-24H group, IL-1 β immunoreactive cells are not observed in brain. (B) However, LPS-12H group, IL-1 β immunoreactive cells are significantly increased in brain than that of control group.

총괄 및 고안

EC-LPS의 경우 순환계통을 통하여 뇌에 도달해 뇌에서 TLR4를 유도하는 것으로 나타났으며²⁵⁾, 뇌 척수막, 뇌실벽 및 뇌실주위기관, 미세아교세포 등에서 TLR4의 발현이 관찰되었다²⁶⁾. 이렇듯 TLR4는 뇌의 염증 발생 시 필수적으로 발현되는 단백질로, 뇌 염증 발생 시 TLR4의 발현 증가는 다양한 연구를 통해 나타났다^{23,26)}. 또한 이전의 연구에서 EC-LPS 투여 후 해마의 미세아교세포의 변화를 관찰한 결과, LPS 투여 마우스 해마에서 활성화된 Iba-1 미세아교세포가 관찰된 것으로 나타났²³⁾. 따라서 본 연구에서 관찰된 PG-LPS 투여 마우스 뇌에서의 전반적인 TLR4 발현은 뇌 염증 발생의 증상을 나타내는 것이며, 이 결과는 구강 내 치주질환 세균인 *P. gingivalis*의 존재가 뇌 염증을 야기할 가능성이 있다는 것을 나타낸다.

미세아교세포는 감염에 대한 방어를 포함, 중추 신경계통에서 생리학적 과정을 조정하는 차등반응이며^{27,28)}, LPS 투여로 인한 뇌의 면역 반응은 중추 신경계통의 특정 구조 또는 세포의 염증성 사이토카인 및 케모카인 (chemokine)을 유도한다²⁹⁾. 본 연구에서도 Iba-1 항체를 이용하여 PG-LPS 투여 후 마우스 뇌의 미세아교세포 면역 반응을 확인한 결과, PG-LPS 투여한 마우스 뇌에서 전반적으로 Iba-1 면역 반응 미세아교세포가 더 많이 나타났다. 이 결과로 보아 PG-LPS는 뇌의 미세아교세포를 활성화시켜 염증성 사이토카인을 유도함을 나타낸다.

LPS는 미세아교세포를 활성화시켜 IL-1 β 와 같은 사이토카인의 방출을 초래한다는 연구 결과가 나타났다³⁰⁾. 본 연구에서 PG-LPS가 미세아교세포를 활성화시킨다는 것을 확인하였기에, IL-1 β 항체를 이용하여 PG-LPS가 사이토카인에 의한 조직 손상을 나타내는지 확인하였다. 그 결과 PG-LPS 투여 12시간 후 마우스의 뇌에서 IL-1 β 반응 세포

가 나타난 것을 확인하였다. 이는 PG-LPS가 투여 후 12시간 동안 사이토카인을 방출시키는 것으로 뇌 조직 손상이 발생했다는 것을 나타낸다.

다만, Chung 등 (2009)의 연구에서는 LPS 투여 24시간 후 마우스에서 TLR4의 발현이 가장 높았는데, 본 연구에서는 PG-LPS 투여 12시간 후 마우스 그룹이 가장 발현이 높은 것으로 나타났다. 이것은 EC-LPS와 PG-LPS가 신경계통에 침투하여 염증을 발생시키는 결정점(peak)이 달라 나타나는 결과로 사료된다.

PG-LPS 투여 24시간 후 마우스 뇌에서 Iba-1 반응 세포 결과와 달리 IL-1 β 반응 세포가 적은 것은 미세아교세포가 활성화된 것이 아니라 휴지 상태이거나 일반적인 반응성 미세아교세포일 것으로 사료된다. 반응성 미세아교세포는 일반적으로 구형의 형태를 나타내며, 활성화된 미세아교세포는 휴지 미세아교세포 보다 더 큰 세포체를 갖기 때문이다³¹⁻³³⁾. 결과적으로 PG-LPS의 정맥 투여는 뇌에서 TLR4 발현을 유도하며 미세아교세포를 활성화시켜 염증성 사이토카인의 방출을 초래하기 때문에, PG-LPS는 뇌에 염증으로 인한 손상을 발생시킬 수 있다.

*P. gingivalis*에 따르는 gingipain은 알츠하이머의 발병 이전에 영향을 미친다고 보고되고 있다. 알츠하이머 병 환자의 뇌에서는 amyloid plaque가 발견되는데, 이 plaque의 주성분은 Amyloid beta ($A\beta$)로, $A\beta$ 는 알츠하이머 병에 직접적으로 관여하는 성분이다. *P. gingivalis*에 의해 뇌가 만성적으로 감염되었을 경우 $A\beta$ 수치가 지속적으로 높게 나타나는 것으로 보고되었으며, 마우스를 이용한 연구에서 생체 내에 gingipain을 억제한 결과 gingipain으로 유도되는 신경 변성 및 $A\beta$ 가 현저하게 감소된 것이 보고되었다³⁴⁾. 또한 알츠하이머로 인해 병리학적으로 취약해진 뇌 영역에서는 염증 반응이 나타날 수 있으며, 이러한 염증 반응으로 알츠하이머

가 가속화될 수 있음이 보고되었다^{35,36}. 이전에 보고된 gingipain 외에 *P. gingivalis*가 만들어내는 또 다른 독소인 PG-LPS도 뇌 조직에서 염증관련 인자들을 발현시키는 것으로 미루어 보아 신경염증과 관련된 뇌질환과 관련성이 매우 높은 것으로 사료된다.

결론

이상의 결과를 종합해 보면, 구강 내 치주질환을 발병시키는 *P. gingivalis*는 뇌 신경에 영향을 미치는 것으로 사료된다. PG-LPS는 마우스 뇌에서 전반적인 뇌 염증을 발생시키며, 뇌의 미세아교세포를 활성화시켜 염증성 사이토카인의 방출을 유도한다. 따라서 치주질환을 예방하고 치료하는 것은 구강 건강뿐만 아니라 뇌질환 예방에 긍정적인 영향을 줄 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2019년도 강릉원주대학교 학술연구 조성비 지원에 의하여 수행되었음.

참고문헌

- Page RC and Schroeder HE: Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. *Lab Invest* 34:235-249, 1976.
- Saini R, Marawar PP, Shete S and Saini S: Periodontitis, a true infection. *Journal of global infectious diseases* 1(2):149-150, 2009. DOI: 10.4103/0974-777X.56251
- Socransky SS, Haffajee AD and Cugini MA, Smith C and Kent Jr. RL: Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 25:134-144, 1998.
- Socransky SS and Haffajee AD: Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol* 28:12-55, 2003. DOI: 10.1034/j.1600-0757.2002.280102.x
- Hajishengallis G, Darveau RP, and Curtis MA: The keystone-pathogen hypothesis. *Nature Reviews Microbiology* 10(10):717-725, 2012. DOI: 10.1038/nrmicro2873
- How KY, Song KP and Chan KG: *Porphyromonas gingivalis*: an overview of periodontopathic pathogen below the gum line. *Front Microbiol* 7:53, 2016. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00053
- Beutler B: Endotoxin, toll-like receptor 4, and the afferent limb of innate immunity. *Curr Opin Microbiol* 3(1):23-28, 2003. DOI: 10.1016/s1369-5274(99)00046-6
- Herath TD, Darveau RP, Seneviratne CJ, Wang CY, Wang Y and Jin L: Tetra- and penta-acylated lipid A structures of *Porphyromonas gingivalis* LPS differentially activate TLR4-mediated NF- κ B signal transduction cascade and immuno-inflammatory response in human gingival fibroblasts. *PLoS One* 8(3):e58496, 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0058496
- Reife RA, Shapiro RA, Bamber BA, Berry KK, Mick GE and Darveau RP: *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide is poorly recognized by molecular components of innate host defense in a mouse model of early inflammation. *Infect Immun* 63(12):4686-4694, 1995.
- Reyes L, Herrera D, Kozarov E, Roldán S and Progulsk-Fox A: Periodontal bacterial invasion and infection: contribution to atherosclerotic pathology. *J Periodontol* 84:S30-50, 2013. DOI: 10.1111/jcpe.12079
- Rivera MF, Lee JY, Aneja M, Goswami V, Liu L, Velsko IM, Chukkapalli SS, Bhattacharyya I, Chen H, Lucas AR and Kesavalu LN: Polymicrobial infection with major periodontal pathogens induced periodontal disease and aortic atherosclerosis in hyperlipidemic ApoE(null) mice. *PloS one* 8: e57178, 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0057178
- Page RC: The pathobiology of periodontal diseases may affect systemic diseases: inversion of a paradigm. *Ann Periodontol* 3:108-120, 1998.
- Offenbacher S: Periodontal diseases: pathogenesis.

- Ann Periodontol 1: 821–878, 1996.
14. Amar S and Han X: The impact of periodontal infection on systemic diseases. *Int Med J Exp Clin Res* 9:RA291–299, 2003.
 15. Loos BG: Systemic markers of inflammation in periodontitis. *J Periodontol* 76: 2106–2115, 2005. DOI: 10.1902/jop.2005.76.11-S.2106
 16. Cerajewska TL, Davies M and West NX: Periodontitis: a potential risk factor for Alzheimer's disease. *British dental journal* 218(1):29, 2015. DOI: 10.1038/sj.bdj.2014.1137
 17. Al-Qutub MN, Braham PH, Karimi-Naser LM, Liu X, Genco CA and Dareau RP: Hemin-dependent modulation of the lipid A structure of *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide. *Infect Immun* 74(8):4474–4485, 2006. DOI: 10.1128/IAI.01924-05
 18. Herath TD, Wang Y, Seneviratne CJ, Darveau RP, Wang CY and Jin L: The expression and regulation of matrix metalloproteinase-3 is critically modulated by *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide with heterogeneous lipid A structures in human gingival fibroblasts. *BMC Microbiol* 13:73, 2013. DOI: 10.1186/1471-2180-13-73
 19. Reife RA, Coats SR, Al-Qutub M, Dixon DM, Braham PA, Billharz RJ, Howald WN and Darveau RP: *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide lipid A heterogeneity: differential activities of tetra- and penta-acylated lipid A structures on E-selectin expression and TLR4 recognition. *Cell Microbiol* 8(5):857–868, 2006. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2005.00672.x
 20. Ding PH, Darveau RP, Wang CY, and Jin L: 3LPS-binding protein and its interactions with *P. gingivalis* LPS modulate pro-inflammatory response and Toll-like receptor signaling in human oral keratinocytes. *PLoS One* 12(4):e0173223, 2017. DOI: 10.1371/journal.pone.0173223
 21. Kocgozlu L, Elkaim R, Tenenbaum H and Werner S: Variable cell responses to *P. gingivalis* lipopolysaccharide. *J Dent Res* 88(8):741–745, 2009. DOI: 10.1177/0022034509341166
 22. Darveau RP, Belton CM, Reife RA and Lamont RJ: Local chemokine paralysis, a novel pathogenic mechanism for *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun* 66(4):1660–1665, 1998.
 23. Chung DW, Yoo KY, Hwang IG, Kim DW, Chung JY, Lee CH, Choi JH, Choi SY, Youn HY, Lee IS and Won MH: Systemic administration of lipopolysaccharide induces cyclooxygenase-2 immunoreactivity in endothelium and increases microglia in the mouse hippocampus. *Cellular and molecular neurobiology* 30(4):531–541, 2010. DOI: 10.1007/s10571-009-9477-0
 24. Park JH, Shin BN, Ahn JH, Cho JH, Kim IH, Kim DW, Won MH, Hong S, Cho JH and Lee CH: Ischemia-induced changes of PRAS40 and p-PRAS40 immunoreactivities in the gerbil hippocampal CA1 region after transient cerebral ischemia. *Cellular and Molecular Neurobiology* 36:821–828, 2016. DOI: 10.1007/s10571-015-0265-8
 25. Laflamme N and Rivest S: Toll-like receptor 4: the missing link of the cerebral innate immune response triggered by circulating gram-negative bacterial cell wall components. *FASEB J* 15:155–163, 2001. DOI: 10.1096/fj.00-0339com
 26. Chakravarty S and Herkenham M: Toll-like receptor 4 on non hematopoietic cells sustains CNS inflammation during endotoxemia, independent of systemic cytokines. *J Neurosci* 25:1788–1796, 2005. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4268-04.2005
 27. Raivich G, Bohatschek M, Kloss CU, Werner A, Jones LL and Kreutzberg GW: Neuroglia activation repertoire in the injured brain: graded response, molecular mechanisms and cues to physiological function. *Brain Res Rev* 30:77–105, 1999.
 28. Liberto CM, Albrecht PJ, Herx LM, Young VW and Levison SW: Pro-regenerative properties of cytokine-activated astrocytes. *J Neurochem* 89:1092–1100, 2004. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2004.02420.x
 29. Quan N, Whiteside M and Herkenham M: Time course and localization patterns of interleukin-1b messenger RNA expression in brain and pituitary after peripheral administration of lipopolysaccharide. *Neuroscience* 83:281–293, 1988.
 30. Quan N, Sundar SK and Weiss JM: Induction of inter-

- leukin-1 in various brain regions after peripheral and central injections of lipopolysaccharide. *J Neuroimmunol* 49:125–134, 1994.
31. Davis EJ, Foster TD and Thomas WE: Cellular forms and functions of brain microglia. *Brain Res Bull* 34:73–78, 1994.
 32. Kaur C, Ling EA and Wong WC: Transformation of amoeboid microglial cells into microglia in the corpus callosum of the postnatal rat brain. An electron microscopical study. *Arch Histol Jpn* 48:17–25, 1985.
 33. Dheen ST, Kaur C and Ling EA: Microglial activation and its implications in the brain diseases. *Curr Med Chem* 14:1189–1197, 2007. DOI: 10.2174/092986707780597961
 34. Dominy SS, Lynch C, Ermini F, Benedyk M, Marczyk A, Konradi A, Nguyen M, Haditsch U, Raha D, Griffin C, Holsinger LJ, Arastu-Kapur S, Kaba S, Lee A, Ryder MI, Potempa B, Mydel P, Hellvard A, Adamowicz K, Hasturk H, Walker GD, Reynolds EC, Faull RLM, Curtis MA, Dragunow M and Potempa J: *Porphyromonas gingivalis* in Alzheimer's disease brains: Evidence for disease causation and treatment with small-molecule inhibitors. *Sci Adv* 5(1):eaau3333, 2019. DOI: 10.1126/sciadv.aau3333
 35. Akiyama H, Barger S, Barnum S, Bradt B, Bauer J, Cole GM, Cooper NR, Eikelenboom P, Emmerling M, Fiebich BL, Finch CE, Frautschy S, Griffin WS, Hempel H, Hull M, Landreth G, Lue L, Mrak R, Mackenzie IR, McGeer PL, O'Banion MK, Pachter J, Pasinetti G, Plata-Salaman C, Rogers J, Rydel R, Shen Y, Streit W, Strohmeyer R, Tooyoma I, Van Muiswinkel FL, Veerhuis R, Walker D, Webster S, Wegrzyniak B, Wenk G and Wyss-Coray T: Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 21(3):383–421, 2000. DOI: 10.1016/s0197-4580(00)00124-x
 36. Kinney JW, Bemiller SM, Murtishaw AS, Leisgang AM, Salazar AM and Lamb BT: Inflammation as a central mechanism in Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement (NY)* 4:575–590, 2018. DOI: 10.1016/j.trci.2018.06.014

ABSTRACT

Systemic injection of *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide induces inflammation in the mouse brain

Bo Hyun Jung, Hee Su Lee, Ki-Yeon Yoo

*Department of Anatomy, College of Dentistry and Research Institute of Oral Science,
Gangneung-Wonju National University*

Porphyromonas gingivalis is a Gram-negative bacterium that causes periodontal disease in the oral cavity. The possibility that *P. gingivalis* lipopolysaccharide (PG-LPS) can pass through the blood – brain barrier has been restored; however, it is not known whether it leads to neuroinflammation in the brain. Therefore, in this study, we tried to determine if PG-LPS affects the brain. In this study, inflammatory changes in brain tissues were confirmed through immunohistochemistry 12 h and 24 h after PG-LPS administration. In result, inflammation and cytokine expression were observed in the brain of PG-LPS-administered mice. These results suggest that *P. gingivalis* can influence inflammation in the brain.

Keywords: *Porphyromonas gingivalis*, Lipopolysaccharide, Brain, Inflammation, Cytokine