

# *Prevotella intermedia* 및 *Prevotella nigrescens*의 지질다당질이 대식 세포에서의 *Interleukin-8* 생성에 미치는 영향

김성조\*

부산대학교 치과대학 치주과학교실

Interleukin-8 production and interleukin-8 mRNA expression induced by lipopolysaccharides from *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* in monocyte-derived macrophages

Sung-Jo Kim\*

Department of Periodontology, College of Dentistry, Pusan National University

## ABSTRACT

**Purpose:** Interleukin-8 (IL-8) is an important mediator of immune and inflammatory reactions and is produced by a variety of different cell types. This study was undertaken to investigate the effects of lipopolysaccharides (LPSs) from *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens*, the major causes of inflammatory periodontal disease, on the production of IL-8 and the expression of IL-8 mRNA in differentiated THP-1 cells, a human monocytic cell line.

**Methods:** LPSs from *P. intermedia* ATCC 25611 and *P. nigrescens* ATCC 33563 were prepared by the standard hot phenol-water method. THP-1 cells were incubated in the medium supplemented with phorbol myristate acetate to induce differentiation into macrophage-like cells.

**Results:** We found that LPS preparations from *P. intermedia* and *P. nigrescens* can induce IL-8 mRNA expression and stimulate the release of IL-8 in differentiated THP-1 cells without additional stimuli.

**Conclusions:** There are no previous reports of the ability of *P. intermedia* and *P. nigrescens* LPS to stimulate the release of IL-8, and the present study clearly shows, for the first time, that LPSs from *P. intermedia* and *P. nigrescens* fully induced IL-8 mRNA expression and IL-8 production in differentiated human monocytic cell line THP-1. The ability of *P. intermedia* and *P. nigrescens* LPS to promote the production of IL-8 may be important in the pathogenesis of inflammatory periodontal disease. (*J Korean Acad Periodontol* 2009;39:177-184)

**KEY WORDS:** interleukin-8; lipopolysaccharide; *Prevotella intermedia*; *Prevotella nigrescens*

## 서론

치주질환은 치은결체조직과 치조골의 파괴를 유발하여 치아의 상실을 초래할 수 있는 만성 염증성 질환이다. 치주 질환의 직접적인 원인은 치은연하에 서식하는 몇몇 그람 음성 혐기성 세균이다<sup>1)</sup>. *Prevotella intermedia*는 성인성 치주염 환자의 치주낭 내에 우세하게 존재하는 치주질환 주요

병원균 중의 하나이며<sup>2,3)</sup>, 급성괴사성 궤양성 치은염과 임신성 치은염 환자의 치은연하치태에도 빈번히 존재한다<sup>4,5)</sup>. *Prevotella nigrescens*는 치은염과 성인성 치주염 환자의 치은연하에 빈번히 존재하며<sup>6-8)</sup>, 근관감염과 임플란트 주위염과도 연관이 있는 것으로 알려져 있다<sup>9,10)</sup>.

*P. intermedia*와 *P. nigrescens*를 비롯한 치주질환 병원균들은 치주조직에 직접 침투하지는 않으며, 균주의 각종 구성요소 또는 산물들이 조직 내로 침투되어 염증 및 조직 파괴를 유발하는 것으로 알려져 있다. 이들 병원균들은 단백질 분해효소를 분비하여 숙주세포의 개입 없이 직접 치주조직의 파괴를 유발하거나, 각종 효소와 지질다당질 등 병원균의 산물들이 숙주세포를 활성화시켜 아라키돈산 대

\* Correspondence: Sung-Jo Kim

Department of Periodontology, College of Dentistry, Pusan National University, 1-10 Ami-dong, Seo-gu, Busan 602-739, Korea.

E-mail: sungjokim@pusan.ac.kr, Tel: 82-51-240-7461,

Fax: 82-51-245-8388

\* 이 논문은 부산대학교 자유과제 학술연구비(2년)에 의하여 연구되었음.  
Received: May. 12, 2009; Accepted: Jun. 13, 2009

사산물, 각종 사이토카인, 그리고 단백질 분해효소 등의 생물학적 활성물질을 생성하도록 함으로써 간접적으로 조직과 괴를 유발할 수 있다.

지질다당질(lipopolysaccharide; LPS)은 *P. intermedia*와 *P. nigrescens*와 같은 그람음성 세균의 세포벽 외막에 존재하는 주요 성분 중의 하나로, 구강 내에서는 치태, 타액, 치은열구액, 염증 치은조직, 치석, 그리고 치주질환에 이환된 백악질 등에 존재한다<sup>11-13)</sup>. LPS는 대식세포를 포함한 다양한 숙주세포를 자극하여 interleukin-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, 그리고 tumor necrosis factor alpha와 같은 다양한 염증성 사이토카인의 생성과 분비를 유도할 수 있다<sup>14)</sup>.

세포특이 화학주성 사이토카인인 케모카인은 염증세포에 대해 화학유인물질로 작용하는 일련의 저분자량의 폴리펩티드를 말하며, 혈액세포의 이동을 위한 신호로서의 역할을 한다. 케모카인은 백혈구의 축적을 조절할 뿐만 아니라, 림프구 trafficking, T helper (Th)1/Th2 발생, 그리고 창상 치유에도 관여한다<sup>15,16)</sup>. 케모카인은 활성화된 단핵구, 대식세포, 내피세포, 그리고 섬유모세포 등에 의해 생성되며, 표적세포의 표면에 존재하는 특정 수용체에 결합하여 영향력을 발휘한다<sup>15,16)</sup>.

구조, 기능, 그리고 유전적 기준에 의거하여 4종의 케모카인 소집단이 존재하며, 그들 중 CXC 및 CC 케모카인이 주요 소집단이다. CXC 케모카인은 주로 중성구를 유인하여 활성화하며, CC 케모카인은 단핵구, 림프구, 호염기구, 호산구, 자연살세포, 그리고 수지상세포를 유인하여 활성화한다<sup>17)</sup>. 중성구는 감염부위에 최초로 동원되는 면역세포이며, 단핵구는 적절한 자극을 가했을 때 다량의 케모카인을 분비할 수 있다. 케모카인은 면역 및 염증반응의 유발과 지속에 있어 중요한 역할을 한다.

IL-8은 CXC 케모카인 소집단에 속하며 염증 시 중성구의 모충과 활성화에 있어 중요한 역할을 하는 강력한 염증성 사이토카인이다. IL-8은 중성구에 다양한 영향을 미치는 데 여기에는 형태의 변화, 리소솜성 효소의 분비, 생활성 지질의 생성, 그리고 부착분자의 발현 등이 포함된다<sup>18-20)</sup>.

*P. intermedia*와 *P. nigrescens* LPS는 숙주세포를 자극하여 케모카인의 생성과 분비를 유발함으로써 염증성 치주질환의 발병과 진행에 있어 독성인자로서 중요한 역할을 할 수 있다. 본 연구는 *P. intermedia*와 *P. nigrescens* LPS가 대식세포에서의 IL-8의 생성과 IL-8 mRNA의 발현에 미치는 영향을 평가하기 위해 수행되었다.

## 재료 및 방법

### 1. 균주 및 배양 조건

*P. intermedia* ATCC 25611와 *P. nigrescens* ATCC 33563을 통법에 따라 1  $\mu$ g/ml menadione과 5  $\mu$ g/ml hem-in을 포함하고 있는 enriched trypticase soy agar 또는 GAM broth (Nissui, Tokyo, Japan)를 이용하여 37°C의 혐기성 조건(5% H<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>/90% N<sub>2</sub>)에서 배양하였다. 액체 배지에서 24시간 배양한 초기 정지기의 균주를 4°C에서 12,000 $\times$ g로 20분 원심 분리하여 회수하고, 인산염완충 식염수(PBS, pH 7.2)로 3회 세척한 후 동결 건조하였다.

### 2. LPS의 분리

LPS는 동결 건조된 균주로 부터 Westphal과 Jann<sup>21)</sup>의 hot phenol-water법에 의거하여 추출되었다. 간략히 소개하면, 균주를 소독된 증류수에 녹인 후 90% phenol을 가하고, 68°C에서 20분간 2회 추출하여 냉각한 후, 7,000 $\times$ g에서 15분간 원심 분리하여 aqueous phase를 수집하고, 4°C에서 증류수로 철저히 투석하였다. 투석 후 105,000 $\times$ g에서 원심분리한 후 동결 건조한 LPS를 0.1 M Tris(pH 8.0)에 녹인 DNase (25  $\mu$ g/ml; Sigma Chemical, St Louis, MO, USA)와 RNase (25  $\mu$ g/ml; Sigma)로 37°C에서 밤새 배양하여 핵산을 제거하였으며, proteinase K (50  $\mu$ g/ml; Sigma)를 가하여 60°C에서 1시간 가열한 후 37°C에서 밤새 배양하여 오염된 단백질을 제거하였다. LPS의 수율은 약 0.26%이었으며, 순수 분리한 LPS의 단백질 함량은 Markwell 등<sup>22)</sup>의 방법에 의해 측정된 바에 의하면 0.1% 미만이었다. 또한, sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel에 분리한 LPS를 과량 가하여 전기영동하고 Coomassie blue로 염색한 결과 단백질 밴드는 관찰되지 않았다(자료제시 없음). *Salmonella typhimurium* LPS (phenol 추출)은 Sigma에서 구입하였다.

### 3. 세포배양

인체 단핵구 세포주인 THP-1 (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA)은 Nunc 플라스크와 10% [v/v] heat inactivated FBS, 50  $\mu$ M 2-mercaptoethanol,

1 mM sodium pyruvate, 25 mM HEPES, 100 U/ml penicillin, 그리고 100  $\mu$ g/ml streptomycin을 포함하고 있는 RPMI 1640 배지를 이용하여 37°C의 5% CO<sub>2</sub>/95% air 배양기에서 배양하였다. 대식세포로의 분화를 유도하기 위해 24-well 배양 plate에 세포 (5×10<sup>5</sup> cells/ml/well)를 분주한 후 50 ng/ml 농도로 phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)를 가하였다. 세포가 분화하여 plastic plate에 부착되도록 72시간 동안 배양한 후 배지로 3회 세척하였으며, 그 후 다양한 농도의 LPS를 가하여 지정된 시간 동안 배양하고, 상층액을 수집하여 IL-8의 농도를 측정하였다.

#### 4. IL-8 농도의 측정

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) set (OptEIA BD Pharmingen, San Diego, CA, USA)을 활용하여 배양 상층액 내의 IL-8 농도를 제조사의 지시에 의거하여 결정하였다.

#### 5. Reverse transcription-polymerase chain reaction 및 PCR 산물의 분석

세포를 100 mm 배양접시에 접시당 5×10<sup>6</sup>의 세포수로 분주하고, 다양한 농도의 *P. intermedia* LPS를 가하여 지정된 시간 동안 배양하였다. 배양 후 세포를 PBS로 2회 세척하고 원심분리하여 회수하였다. Total RNA는 RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA)를 사용하여 제조사의 지시에 의거하여 분리되었다. AccuPower RT/PCR Premix kit (Bioneer, Korea)를 이용하여 추출한 RNA로부터 cDNA를 합성하고, thermal cycler (GeneAmp PCR system 2400; PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)로 reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)을 수행하여 증폭하였다. Internal control로는  $\beta$ -actin을 활용하였다. Nonsaturating PCR 조건을 위한 cycle 수는 예비실험을 통해 결정하였다. IL-8을 위한 PCR 증폭을 위해서는 94°C에서 1분, 60°C에서 1분, 그리고 72°C에서 1분간의 총 35 cycle을 수행하였다. 사용된 oligonucleotide primer는 다음과 같다: IL-8, 5'-GAAACTGGGTGCAGAGGGT-3' (sense) and 5'-TCGATATTCCTCTGGCCCT-3' (antisense) (인간의 IL-8 mRNA 서열의 345-364와 730-711 위치에 각각 해당

하며, 386-bp의 산물을 생성함);  $\beta$ -actin, 5'-AAGAGAGGCATCCTCACCCT-3' (sense) and 5'-TACATGGCTGGGTGTTGAA-3' (antisense) (인간의 actin mRNA 서열의 222-241와 439-420 위치에 각각 해당하며, 218-bp의 산물을 생성함). 증폭된 PCR 산물들을 ethidium bromide를 포함하고 있는 1.5% agarose gel에서 전기영동하여 자외선 하에서 관찰하였다. Gel 사진 상의 PCR 밴드의 강도는 음영계측을 수행하여 평가하였다.

#### 6. 통계분석

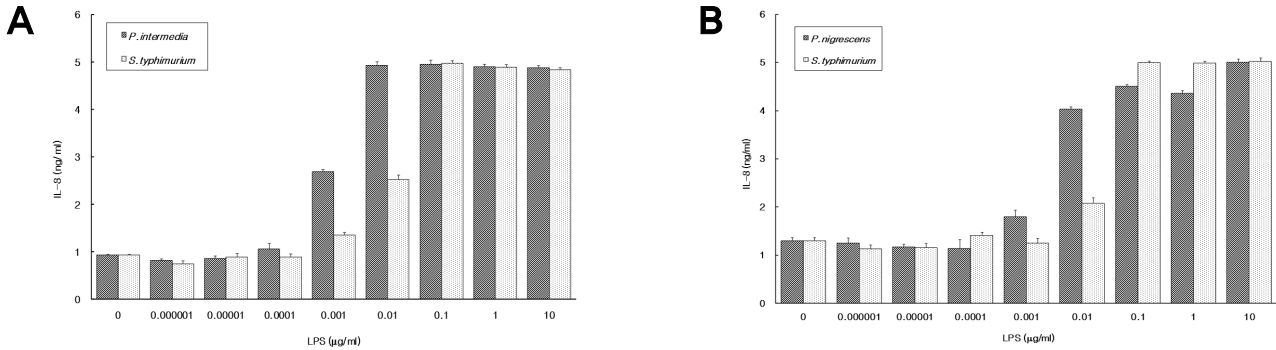
통계분석은 student's paired t-test에 의거하였다. 자료는 2회 또는 4회의 독립적인 실험의 평균과 표준편차로 표시하였다.

### 결과

#### 1. *P. intermedia*와 *P. nigrescens* LPS가 IL-8 생성에 미치는 영향

분화시킨 THP-1 세포에 다양한 농도의 *P. intermedia*과 *P. nigrescens* ATCC LPS를 각각 가하여 24시간 배양한 후 IL-8의 농도를 결정하였다. THP-1 세포는 LPS를 가하지 않은 상태에서도 약 1 ng/ml의 IL-8을 생성하였으며, *P. intermedia* LPS는 1 ng/ml-10  $\mu$ g/ml의 범주에서 세포로부터 IL-8의 생성을 유발하였다(Fig. 1A). 1 ng/ml에서부터 유효한 농도의 IL-8을 생성하기 시작하여 10 ng/ml에서부터 최대의 IL-8 생성을 보였으며 그 농도는 약 4.9 ng/ml이었다. 대조군으로 사용한 *S. typhimurium* LPS도 최대 4.98 ng/ml의 IL-8의 생성을 유도하였다. 최소 유발농도의 측면에서는 *P. intermedia* LPS와 *S. typhimurium* LPS가 유사하였으나, 1 ng/ml과 10 ng/ml에서 *P. intermedia* LPS가 *S. typhimurium* LPS에 비해 현저히 높은 IL-8의 생성을 보였다.

*P. nigrescens* LPS는 1 ng/ml~10  $\mu$ g/ml의 범주에서 세포로부터 IL-8의 생성을 유발하였다(Fig. 1B). 1 ng/ml에서부터 유효한 농도의 IL-8을 생성하기 시작하여 10  $\mu$ g/ml에서 최대의 IL-8 생성을 보였으며 그 농도는 약 5 ng/ml이었다. 대조군으로 사용한 *S. typhimurium* LPS도 최대 5



**Figure 1.** Dose response of IL-8 production by differentiated THP-1 cells stimulated with *P. intermedia* (A) and *P. nigrescens* LPS (B). *S. typhimurium* LPS was used as a control. Cells were incubated with increasing concentrations of LPS and supernatants were removed after 24 h and assayed for IL-8. The results are means  $\pm$  standard deviation of four experiments.

ng/ml의 IL-8를 생성을 유도하였으며, 최소 유발농도는 10 ng/ml이었고, 1 ng/ml과 10 ng/ml에서 *P. nigrescens* LPS가 *S. typhimurium* LPS에 비해 현저히 높은 IL-8의 생성을 보였다.

## 2. *P. intermedia*와 *P. nigrescens* LPS가 IL-8 mRNA의 발현에 미치는 영향

RT-PCR을 수행하여 *P. intermedia*와 *P. nigrescens* LPS가 IL-8의 전사와 IL-8 mRNA의 축적에 미치는 영향을 평가하였다. *P. intermedia*와 *P. nigrescens* LPS에 각각 노출된 THP-1 세포에서 IL-8 mRNA가 발현되었다 (Fig. 2, 3). 다양한 농도의 LPS를 THP-1 세포에 가하였을 때 IL-8 mRNA의 발현이 농도 의존적으로 증가하였다 (Fig. 2A, 3A). *P. intermedia*와 *P. nigrescens* LPS는 각각 1 μg/ml와 10 μg/ml에서 최대의 발현을 보였다. Fig. 2B, 3B는 10 μg/ml의 *P. intermedia*와 *P. nigrescens* LPS를 THP-1 세포에 각각 가한 후 시간의 경과에 따른 IL-8 mRNA의 발현 양상을 보여주고 있다. IL-8 mRNA는 4시간 경과 후 최대로 발현되었다

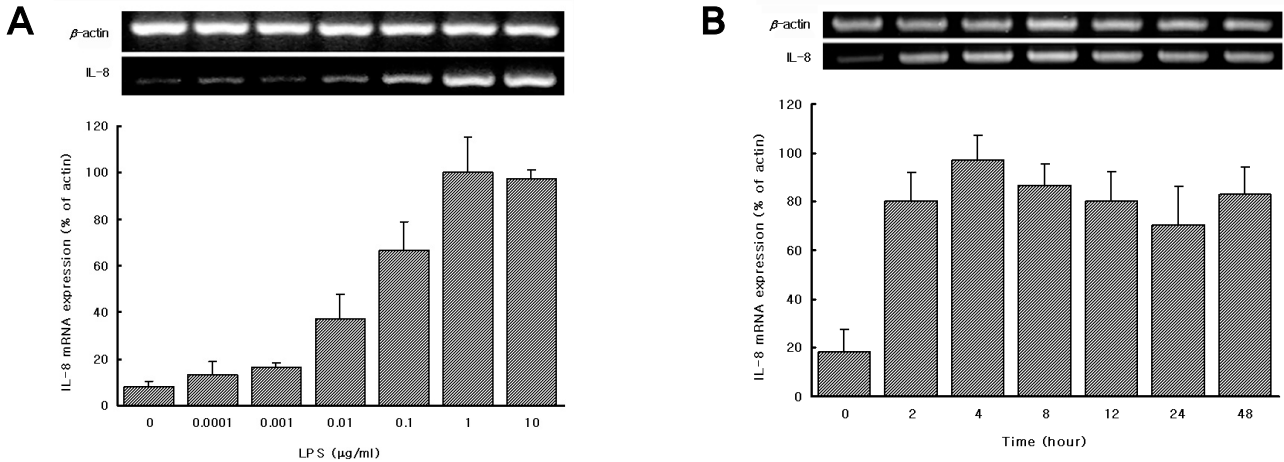
## 고찰

본 연구에서는 염증성 치주질환의 주요 병인균주인 *P. intermedia*와 *P. nigrescens*의 LPS가 대식세포에서의 IL-8의 생성과 IL-8 mRNA의 발현에 미치는 영향을 평가하였다. 치주질환 이환 치은 결체조직에는 대식세포를 포함한

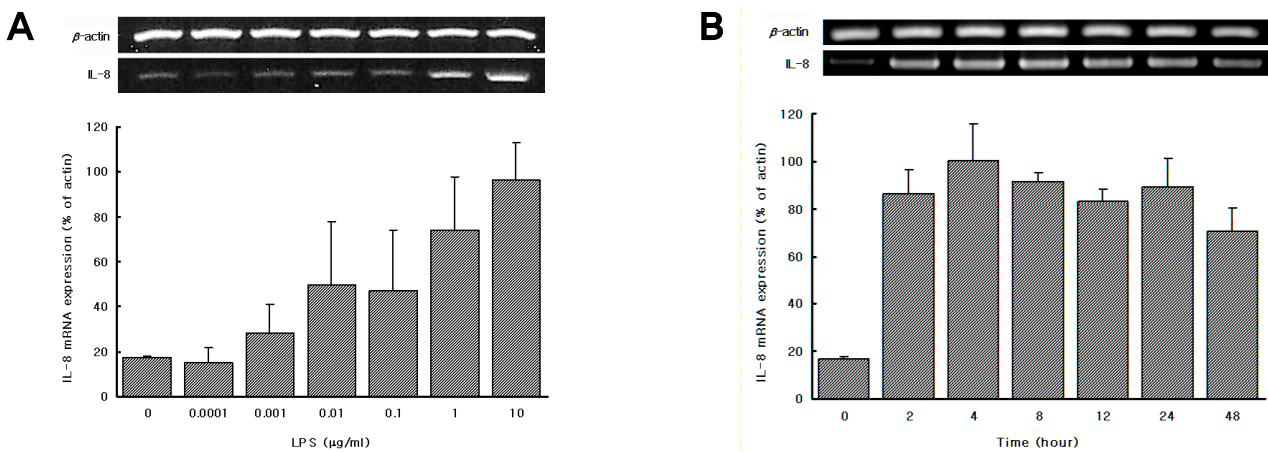
염증세포가 높은 밀도로 침윤되어 있으며, IL-8과 같은 케모카인에 의해 특정 유형의 백혈구가 염증에 이환된 치주조직 내로 이동하여 활성화될 수 있다. 본 연구에서는 분리한 *P. intermedia*와 *P. nigrescens* LPS를 proteinase K로 처리하여 오염된 단백질이 대식세포에서의 IL-8의 발현에 미치는 영향을 최소화 하였다. 본 연구에서 대조군으로 사용한 *S. typhimurium* LPS의 단백질 함량은 약 3%였다.

본 연구에서는 *P. intermedia*와 *P. nigrescens* LPS에 의한 IL-8 생성을 *S. typhimurium* LPS와 비교하였다. Hamada 등<sup>23)</sup>에 의하면 *P. intermedia*와 같은 구강 내 흑색 색소세균의 LPS는 화학구조와 면역생물학적 활성의 측면에 있어 *Escherichia coli*와 *Salmonella*종과 같은 장내세균의 LPS와는 매우 다른 것으로 알려져 있다. Kirikae 등<sup>24)</sup>도 *P. intermedia* LPS는 활성 분자와 작용 방식이 *Salmonella* LPS와 매우 상이함을 제시한 바 있다. 예를 들어, *P. gingivalis*와 *P. intermedia* LPS는 그것의 독특한 구조로 인해 LPS-responsive C<sub>3</sub>H/HeN 마우스 뿐만 아니라 non-LPS-responsive C<sub>3</sub>H/HeJ (TLR4 mutant) 마우스에서 유래한 대식세포와 임파구도 활성화시킨다. 이는 이 균주의 LPS가 TLR4 이외의 분자와 반응함을 의미한다. 한편, 장내세균의 LPS와 lipid A의 생물학적 활성은 polymyxin B에 의해 완전히 차단되지만, *P. gingivalis*와 *P. intermedia*의 LPS는 polymyxin B에 의해 활성이 억제되지 않는다. 이는 *P. gingivalis*와 *P. intermedia* LPS의 다당류와 지방산이 장내세균의 LPS와 상이한 것에 기인하는 것으로 여겨진다.

IL-8은 치주염 환자의 치은열구액과 치은조직 내에서 확인되었고, 치은조직 내 IL-8 mRNA의 발현은 치주염의 심



**Figure 2** Dose response (A) and time course (B) of IL-8 mRNA expression in differentiated THP-1 cells stimulated with *P. intermedia* LPS. See Materials and methods for further details. The PCR bands on a gel photograph in one of two separate experiments yielding similar results are shown. (A) Cells were incubated with different concentrations of *P. intermedia* LPS for 4 h. (B) Cells were incubated in the presence of 10 µg/mL of *P. intermedia* LPS for different periods of time.



**Figure 3** Dose response (A) and time course (B) of IL-8 mRNA expression in differentiated THP-1 cells stimulated with *P. nigrescens* LPS. See Materials and methods for further details. The PCR bands on a gel photograph in one of two separate experiments yielding similar results are shown. (A) Cells were incubated with different concentrations of *P. nigrescens* LPS for 4 h. (B) Cells were incubated in the presence of 10 µg/mL of *P. nigrescens* LPS for different periods of time.

도와 일치하였다<sup>25,26</sup>. 한편, Tamura 등<sup>27</sup>은 Bacteroides LPS에 의해 정상 인간 치은섬유모세포에서 IL-8 유전자가 발현됨을 보고한 바 있다. 또한, *P. gingivalis* 감염에 의해 말초혈액 단핵구에서 IL-8이 분비되었으며, 치은 상피세포와 내피세포에서 IL-8 mRNA의 발현이 증가되었다<sup>28-30</sup>.

*P. nigrescens*는 *P. intermedia*와 밀접한 연관을 가지고 있으며, Shah와 Gharbia<sup>31</sup>에 의해 과거 *P. intermedia*로 분류되었던 균주들 중에서, 생화학적 특성 등에 의거하여, Prevotella속 내의 별도의 새로운 종으로 분류된 바 있다. *P. intermedia*와 *P. nigrescens*는 용혈 및 혈구응집 활성

그리고 beta-lactamase 생성 및 항균제에 대한 감수성 등에 있어 상이함이 보고된 바 있고<sup>32-34</sup>, 이 두 균종은 SDS-PAGE와 PCR 등의 방법에 의해 구분될 수 있다.

문헌 고찰에 의하면 치주질환 주요 병인균주인 *P. intermedia*와 *P. nigrescens*의 LPS가 대식세포에서의 IL-8의 생성과 IL-8 mRNA의 발현에 미치는 영향에 관해 보고된 바가 없다. 본 연구의 결과에 의하면, 분화된 THP-1 세포에서 *P. intermedia*와 *P. nigrescens* LPS는 IL-8의 생성을 각각 유도하였다. 또한, *P. intermedia*와 *P. nigrescens* LPS가 주로 전사수준에서 IL-8의 발현을 유발하는 것이 본

연구에서 확인되었다.

치주조직은 *P. intermedia*와 *P. nigrescens*와 같은 치주 질환 병인균주에 의해 생성된 LPS에 항시 노출되어 있다. 치주질환 시 IL-8의 증가는 주로 치주조직 내의 대식세포 침윤에 기인한 것일 수 있다. IL-8은 치주질환의 진행과 그로 인한 치조골 소실에 직접적으로 작용하거나, matrix metalloproteinase 등의 생성을 촉진하여 간접적으로 관여할 수 있다. 따라서, *P. intermedia*와 *P. nigrescens* LPS에 의한 IL-8의 생성은 골조직 파괴를 동반하는 염증성 치주질환 병소의 유발에 있어 중요할 수 있다. *P. intermedia*와 *P. nigrescens* LPS에 의한 대식세포에서의 IL-8의 생성기전에 관한 연구가 현재 진행 중이다.

### 참고문헌

1. Zambon JJ. Periodontal diseases: microbial factor. Ann Periodontol 1996;1:879-925.
2. Slots J, Bragd L, Wikstrom M, Dahlen G. The occurrence of Actinobacillus actinomycetemcomitans, Bacteroides gingivalis and Bacteroides intermedius in destructive periodontal disease in adults. J Clin Periodontol 1986;13: 570-577.
3. Tanner ACR, Haffer C, Bratthall GT, Visconti RA, Socransky SS. A study of the bacteria associated with advancing periodontitis in man. J Clin Periodontol 1979;6: 278-307.
4. Chung CP, Nisengard RJ, Slots J, Genco RJ. Bacterial IgG and IgM antibody titers in acute necrotizing ulcerative gingivitis. J Periodontol 1983;54:557-562.
5. Kornman KS, Loesche WJ. The subgingival microbial flora during pregnancy. J Periodont Res 1980;15:111-122.
6. Lie MA, van der Weijden GA, Timmerman MF, Loos BG, van Steenberghe TJM, van der Velden U. Occurrence of Prevotella intermedia and Prevotella nigrescens in relation to gingival health. J Clin Periodontol 2001;28:189-193.
7. Ximenez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS. Microbial composition of supra and subgingival plaque in subjects with adult periodontitis. J Clin Periodontol 2000;27:722-732.
8. Teanpaisan, R, Douglas CW and Walsh TF. Characterization of black-pigmented anaerobes isolated from diseased and healthy periodontal sites. J Periodont Res 1995;30:245-251.
9. Bae KS, Baumgartner JC, Shearer TR, David LL. Occurrence of Prevotella nigrescens and Prevotella intermedia in infections of endodontic origin. J Endod 1997; 23:620-623.
10. Salcetti JM, Moriarty JD, Cooper LF et al. The clinical, microbial, and host response characteristics of the failing implant. Int J Oral Maxillofac Implants 1997;12:32-42.
11. Simon BI, Goldman HM, Ruben MP, Baker E. The role of endotoxin in periodontal disease. I. A reproducible, quantitative method for determining the amount of endotoxin in human gingival exudate. J Periodontol 1969;40:695-701.
12. Shapiro L, Lodato FM Jr, Courant PR, Stallard RE. Endotoxin determination in gingival inflammation. J Periodontol 1972;43:591-596.
13. Maidwell-Smith MA, Wilson M, Kieser JB Lipopolysaccharide (endotoxin) from periodontally involved teeth. J Clin Periodontol 1987;14:453-456.
14. Morrison DC, Ryan JL. Endotoxins and disease mechanisms. Annu Rev Med 1987;38:417-432.
15. Rossi D, Zlotnik A. The biology of chemokines and their receptors. Annu Rev Immunol 2000;18:217-242.
16. Baggiolini M. Chemokines in pathology and medicine. J Int Med 2001;250:91-104.
17. Wuyts A, Proost P, Damme J. Interleukin-8 and other CXC chemokines. In: Thomson A, ed. The cytokine handbook, 3rd edn., Chapter 10. London: Academic Press, 1988.
18. Thelen M, Peveri P, Kernen P, von Tscharaner V, Walz A, Baggiolini M. Mechanism of neutrophil activation by NAF, a novel monocyte-derived peptide agonist. FASEB J 1988;2: 2702-2706.
19. Peveri P, Walz A, Dewald B, Baggiolini M. A novel neutrophil-activating factor produced by human mononuclear phagocytes. J Exp Med 1988;167:1547-1559.
20. Detmers PA, Lo SK, Olsen EE et al. Neutrophil-activating protein 1/interleukin 8 stimulates the binding activity of the leukocyte adhesion receptor CD11b/CD18 on human neutrophils. J Exp Med 1990;171:1155-1162.
21. Westphal O, Jann K. Bacterial lipopolysaccharides: extraction with phenol-water and further applications of the procedure. In: RL Whistler eds. Methods in carbohydrate chemistry. New York: Academic Press, 1965:83-91.
22. Markwell MA, Haas SM, Bieber LL, Tolbert NE. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. Anal

- Biochem 1978;87:206-210.
23. Hamada S, Takada H, Ogawa T, Fujiwara T, Mihara J. Lipopolysaccharides of oral anaerobes associated with chronic inflammation: chemical and immunomodulating properties. Int Rev Immunol 1990;6:247-261.
  24. Kirikae T, Nitta T, Kirikae F, Suda Y, Kusumoto S, Qureshi N & Nakano M. Lipopolysaccharides (LPS) of oral black-pigmented bacteria induce tumor necrosis factor production by LPS-refractory C3H/HeJ macrophages in a way different from that of Salmonella LPS. Infect Immun 1999;67:1736-1742.
  25. Fitzgerald JE, Kreutzer DL. Localization of interleukin-8 in human gingival tissues. Oral Microbiol Immunol 1995; 10:297-303.
  26. Tonetti MS, Imboden MA, Gerber L, Lang NP, Laissue J, Mueller C. Localized expression of mRNA for phagocyte-specific chemotactic cytokines in human periodontal infections. Infect Immun 1994;62:4005-4014.
  27. Tamura M, Tokuda M, Nagaoka S, Takada H. Lipopolysaccharides of Bacteroides intermedius (Prevotella intermedia) and Bacteroides (Porphyromonas) gingivalis induce interleukin-8 gene expression in human gingival fibroblast cultures. Infect Immun 1992;60:4932-4937.
  28. Darveau RP, Belton CM, Reife RA, Lamont RJ. Local chemokine paralysis, a novel pathogenic mechanism for Porphyromonas gingivalis. Infect Immun 1998;66:1660-1665.
  29. Madianos PN, Papapanou PN, Sandros J. Porphyromonas gingivalis infection of oral epithelium inhibits neutrophil transepithelial migration. Infect Immun 1997;65:3983-3990.
  30. Watanabe A, Takeshita A, Kitano S, Hanazawa S. CD14-mediated signal pathway of Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide in human gingival fibroblasts. Infect Immun 1996;64:4488-4494.
  31. Shah HN, Gharbia SE. Proposal of a new species Prevotella nigrescens sp. nov. among strains previously classified as P. intermedia. FEMS Immunol Med Microbiol 1993;6:97.
  32. Okamoto M, Maeda N, Kondo K, Leung KP. Hemolytic and hemagglutinating activities of Prevotella intermedia and Prevotella nigrescens. FEMS Microbiol Lett 1999;178:299-304.
  33. Matto J, Asikainen S, Vaisanen ML et al. Beta-lactamase production in Prevotella intermedia, Prevotella nigrescens, and Prevotella pallens genotypes and in vitro susceptibilities to selected antimicrobial agents. Antimicrob Agents Chemother 1999;43:2383-2388.
  34. Andres MT, Chung WO, Roberts MC, Fierro JF. Antimicrobial susceptibilities of Porphyromonas gingivalis, Prevotella intermedia, and Prevotella nigrescens spp. isolated in Spain. Antimicrob Agents Chemother 1998;42: 3022-3023.