

Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide stimulates vascular smooth muscle cell migration through signal transducer and activator of transcription 3-mediated matrix metalloproteinase-9 expression

Yeon Kim¹, Joo-Yeon Park¹, Hyun-Joo Park¹, Mi-Kyoung Kim¹, Yong-II Kim², Soo-Kyung Bae³, Hyung Joon Kim¹, and Moon-Kyoung Bae^{1*}

¹Department of Oral Physiology, School of Dentistry, Pusan National University, Yangsan 50612, Republic of Korea

²Department of Orthodontics, School of Dentistry, Pusan National University, Yangsan 50612, Republic of Korea

³Department of Dental Pharmacology, School of Dentistry, Pusan National University, Yangsan 50612, Republic of Korea

Periodontal diseases have been associated with the development of cardiovascular diseases. Accumulating evidences have indicated that *Porphyromonas gingivalis*, a major periodontopathic pathogen, plays a critical role in the pathogenesis of atherosclerosis. In the present study, we demonstrated that *P. gingivalis* lipopolysaccharide (LPS) increases the mRNA and protein expression of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in rat vascular smooth muscle cells. We showed that the MMP-9 expression induced by *P. gingivalis* LPS is mediated by the activation of signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) in vascular smooth muscle cells. Furthermore, the inhibition of STAT3 activity reduced *P. gingivalis* LPS-induced migration of vascular smooth muscle cells. Overall, our findings indicate that *P. gingivalis* LPS stimulates the migration of vascular smooth muscle cells via STAT3-mediated MMP-9 expression.

Keywords: *Porphyromonas gingivalis*, Vascular smooth muscle cells, Matrix metalloproteinase 9, STAT3 transcription factor

Introduction

치주질환과 심혈관계 질환은 서구화된 사회에서 높은 빈도로 유발하는 질병들로서 나이, 흡연, 당뇨와 같은 다양한 위험인자들에 의해 영향을 받는 만성 염증 질환이다[1]. 최근에는 치주질환이 심혈관계 질환의 위험도를 높이며 상관관계를 보인다는 다양한 역학 연구들이 보고되고 있다[2]. 심혈관계 질환에 있어 치주질환이 위험인자로서 작용할 수 있다는 분자적 기전이 두 가지로 설명되고 있는데, 치주질환 원인균이 혈관벽으로 침투하면서 나타나는 직접적인 영향과 치주질환 세균에 의해

증가한 염증성 매개 물질들의 혈류 분비를 통한 간접적인 영향이 제시되고 있다[3].

대표적인 그람음성세균 치주질환 원인균인 *Porphyromonas gingivalis*는 당뇨병, 조산, 죽상경화증과 같은 여러 가지 전신성 질환의 진행에 연관이 있는 것으로 알려져 있다[1,4]. *P. gingivalis* DNA는 사람의 심혈관계 조직에서 polymerase chain reaction (PCR)법에 의해 발견되었으며, 살아있는 *P. gingivalis*의 형태로 fluorescence *in situ* hybridization, 침윤분석법, 배양법 등에 의해 관찰되고, 사람의 죽상경화판에서도 관찰이 되는 것으로 보고되고 있다[5-7]. 염증반응

Received December 10, 2018; Revised January 22, 2019; Accepted February 7, 2019

*Correspondence to: Moon-Kyoung Bae, E-mail: mkbae@pusan.ac.kr <https://orcid.org/0000-0003-3948-4922>

Copyright © The Korean Academy of Oral Biology

© This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>), which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

은 *P. gingivalis*뿐만 아니라 pathogen associated molecular patterns (PAMPs)라 알려져 있는 분자들에 의해서도 유발된다. PAMP는 lipopolysaccharide (LPS), flagellin, fimbriin, peptidoglycan, gingipain 등을 포함한다[8]. 특히 *P. gingivalis* LPS는 *Escherichia coli* LPS와는 다른 독특한 lipid A 구조를 가지는 것으로 알려져 있다 [8].

혈관염증반응은 림프구, 호중구, 단핵구 등 염증성 세포의 혈관내피 세포, 혈관평활근세포로의 부착 및 이동과정을 포함한다[9]. 다양한 염증자극들에 의해 혈관내피세포와 혈관평활근세포는 세포부착인자, 성장인자, 시토카인, matrix metalloproteinases (MMPs)들의 발현을 조절하며 죽상경화증과 같은 심혈관계 질환의 진행을 촉진시킨다고 알려져 있다[10]. 또한 치주질환 원인균들은 백혈구의 침윤 및 이동을 유발시키며, 혈관내피세포에서 염증 매개 물질의 분비를 촉진시킨다고 한다[11,12]. 본 연구진은 *P. gingivalis* LPS가 혈관평활근세포의 이동능을 증가시킨다고 보고한 바 있다[13].

본 연구에서는 *P. gingivalis* LPS가 유도하는 혈관평활근세포의 이동에 있어 MMP-9의 역할과 그 기전을 조사하였다. *P. gingivalis* LPS는 signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) 전사인자를 통해 혈관평활근세포에서 MMP-9의 발현을 증가시키며 이것이 혈관평활근세포의 이동촉진을 매개하고 있음을 증명하였다.

Materials and Methods

1. 실험재료

P. gingivalis LPS와 AG490은 각각 InvivoGen (San Diego, CA, USA)과 Calbiochem (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. Anti-MMP-2와 anti-MMP-9는 Abcam (Cambridge, UK)에서 구매하였고, phospho-Janus kinase 2 (JAK2), JAK2, phospho-STAT3, STAT3 항체는 Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA) 제품을 사용하였다. Anti- β -Actin 항체와 Anti- α -Tubulin 항체는 Bioworld Technology (St. Louis Park, MN, USA)와 BioGenex (Fremont, CA, USA)에서 구입하여 사용하였다.

2. 혈관평활근세포배양

BDIX rat의 대동맥에서 분리한 혈관평활근세포 A7r5 cell은 ATCC (CRL-1444; Manassas, VA, USA)에서 구입하였으며, 5% CO₂가 공급되는 37°C 세포 배양기에서 배양하여 실험에 사용하였다. 세포는 10% FBS (GibcoBRL, Gaithersburg, MD, USA)와 1% penicillin-streptomycin (GibcoBRL), 5 μ g/mL Plasmocin (InvivoGen)을 함유한 성장배지 DMEM (Hyclone, Logan, UT, USA)하에 배양하면서 실험에 사용하였다.

3. RNA 분리와 역전사 중합효소연쇄반응(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)

혈관평활근세포에서 total RNA를 추출하기 위해 RiboEx reagent kit (GeneAll Biotechnology, Seoul, Korea)를 이용하였다. Reverse transcription kit (Promega, Madison, WI, USA)를 사용하여 1.5 μ g의 RNA로부터 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA는 β -Actin (sense: 5'-GACTACCTCATGAAGATC-3', antisense: 5'-GATCCACATCTGCTGGAA-3'), rat MMP-9 (sense: 5'-ACGGCAAGGATGGTCTACTG-3', antisense: 5'-CCCTCGAAGATGAATGGAAA-3')의 primer를 이용하여 RT-PCR을 시행하였다. 증폭이 끝난 PCR 결과를 2% agarose gel로 전기영동 한 후 ethidium bromide 0.5 μ g/mL로 염색하여 digital gel documentation (GDS200D; KBT, Seongnam, Korea)기기로 형광강도를 측정하였다.

4. 실시간 중합효소연쇄반응(real-time quantitative reverse transcription-PCR, real-time qRT-PCR)

Real-time PCR은 power SYBR Green (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 시약을 이용하여 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) 기기를 사용하여 실시하였다. PCR 반응 조건은 95°C에서 10분간 1주기, 변성(denaturation) 반응은 95°C에서 15초, 결합(annealing) 반응을 60°C에서 60초, 중합(extension) 반응을 72°C에서 7초간 40주기를 반복하여 반응시켰다. 유전자의 발현량 차이는 delta-delta-ct 방법으로 계산하여 대조 유전자 β -Actin에 대한 상대적인 값으로 나타내었으며, 각각의 primer는 다음과 같다. β -Actin (sense: 5'-AGGGAAATCGTGCCTGAC-3', antisense: 5'-CGCTCATTGCCGATAGTG-3'), rat MMP-2 (sense: 5'-ACCGTCGCCCATCATCAA-3', antisense: 5'-TTGCACTGCCAACTCTTTGTCT-3'), rat MMP-9 (sense: 5'-TCGAAGGC-GACCTCAAGTG-3', antisense: 5'-TTCCGGTGTAGCTTTGGATCCA-3').

5. Western immunoblot analysis

각 군의 혈관평활근세포를 2-3회 차가운 phosphate-buffered saline로 세척한 후 세포용해 용액(RIPA buffer, proteinase inhibitor, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 mM NaF 및 10 mM Na₃VO₄)으로 용해시켰다. 용해시킨 후 세포 용해액을 4°C에서 14,000 rpm으로 10분간 원심 분리하여 상층액을 -20°C에 보관하였고, 추출된 각 단백질의 양은 BCA (Sigma Aldrich) 정량법으로 측정하였다. 30 μ g의 전체 단백질을 8% SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)로 변성 분리하였고, 이를 nitrocellulose membrane (Amersham Pharmacia Biotech, USA) 막에 전이시켰다. 그리고 membrane을 5% skim milk가 함유된 Tris buffered saline with Tween-20 (TBS-T) 용액으로 상온에

서 1시간 동안 반응시켜 항체의 비특이적인 결합을 blocking한 후, 단백질 발현을 측정하기 위해 적절한 1차 항체를 4°C에서 16시간 동안 반응시켰다. 이어서 TBS-T 용액으로 10분 간격으로 3회 세척한 다음 horseradish peroxidase가 결합된 이차항체를 실온에서 2시간 반응시키고, 다시 TBS-T 용액으로 10분 간격으로 3회 세척한 다음 화학 발광제(ECL; Amersham Pharmacia Biotech)를 1분간 반응시킨 후 LAS4000 (GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Sweden) 기기를 이용하여 단백질 발현을 확인하였다.

6. 혈관평활근세포의 이동성 분석(scratch wound migration assay)

세포이동의 측정은 scratch wound migration법을 사용하였다. 1×10^5 개의 혈관평활근세포를 30 mm plate에 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 48시간 동안 배양하였다. 배양 후 scraper를 이용하여 세포 단층에 빈 공간을 만들고, scratch로 인해 부유된 세포는 10% FBS가 함유된 DMEM으로 1-2회 세척하여 제거하였다. Dimethyl sulfoxide 또는 AG490 (20 μM)을 1시간 동안 처리한 후 *P. gingivalis* LPS (5 μg/mL)를 첨가하여 48시간 동안 배양 후 세포의 이동능력을 현미경으로 관찰하여 계수하였다.

7. 통계처리

본 실험에 대한 실험 결과는 세 번 실험하여 얻어진 평균 및 평균의 표준편차로 표시하였고 그룹 간의 통계적 차이는 Student's t-test를 적용하여 분석하였다. 통계분석에는 SigmaPlot version 8.0 software (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA). 대조군과 비교하여 $p < 0.05$ 인 경우에 통계적으로 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

Results

1. *P. gingivalis* LPS가 혈관평활근세포의 MMP-9 발현에 미치는 영향

MMP-2 또는 MMP-9는 혈관평활근세포의 이동능 조절에 주된 역할을 하는 단백질 분해효소로 잘 알려져 있다[14]. 따라서 혈관평활근세포에서 *P. gingivalis* LPS가 MMP-2 및 MMP-9의 발현에 미치는 영향을 조사하기 위해 시간 별로 *P. gingivalis* LPS를 처리하여 MMP-2 mRNA 및 MMP-9 mRNA 발현을 real-time PCR으로 관찰하였다. Fig. 1A에서 보는 바와 같이 혈관평활근세포에 *P. gingivalis* LPS를 1, 2, 4, 8시간 째에 각각 처리하였을 때, MMP-2의 mRNA 발현은 8시간에 조금 증가하였으나, MMP-9의 발현은 시간이 지남에 따라 크게

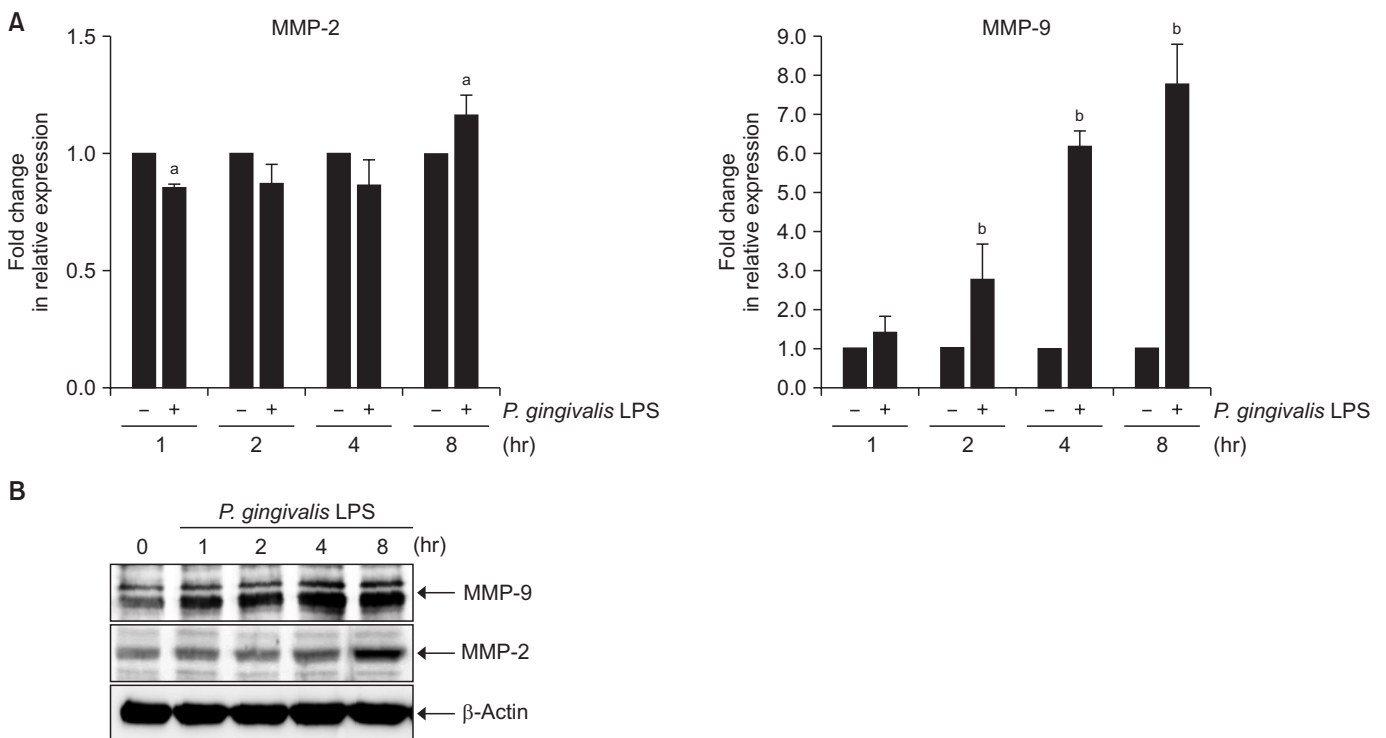


Fig. 1. Effect of *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide (LPS) on the matrix metalloproteinase (MMP)-9 mRNA and protein expression in A7r5 cells. (A) Vascular smooth muscle cells, A7r5 cells, were treated with *P. gingivalis* LPS (5 μg/mL) with indicated time points. Total RNAs were isolated and then analyzed by real-time polymerase chain reaction. The expression levels of rat MMP-2 and MMP-9 mRNA were quantified. The expression level of the control (untreated) was set to 1.0, and the values are normalized to the β-Actin mRNA levels. ^a $p < 0.05$ vs. control of MMP-2; ^b $p < 0.05$ vs. control of MMP-9. (B) MMP-9 protein level was examined by Western blotting using anti-MMP-9 antibody. β-Actin served as the loading control.

증가함을 관찰할 수 있었다. 그리고 *P. gingivalis* LPS를 혈관평활근세포에 처리하였을 때 대조군에 비해 MMP-9의 단백질 발현이 *P. gingivalis* LPS의 처리시간에 의존해서 증가되고 있음을 Western blot 분석법을 통해 확인할 수 있었고, MMP-2 단백질 발현은 *P. gingivalis* LPS 처리 8시간째에 증가되어 있었다 (Fig. 1B).

2. *P. gingivalis* LPS가 유도한 MMP-9의 발현에 JAK2/STAT3 신호전달기전의 관련성

혈관평활근세포 및 몇몇 세포들에서 JAK2/STAT3 신호전달 경로를 통해 MMP-9의 발현을 조절한다고 보고되고 있다[15]. 따라서 본 연구에서는 혈관평활근세포에서 *P. gingivalis* LPS가 JAK2 및 STAT3를 활성화시키는지를 알아보기 위해 *P. gingivalis* LPS를 혈관평활근세포에 처리하여 JAK2와 STAT3 단백질의 인산화를 Western blot 분석법으로 조사하였다. *P. gingivalis* LPS는 혈관평활근세포에서 JAK2 및 STAT3의 총단백질량에는 영향을 주지 않고, JAK2와 STAT3의 인산화를 5분만에 유도하여 활성화시키고 있음을 관찰하였다(Fig. 2A). 다음으로는 혈관평활근세포에서 *P. gingivalis* LPS가 유도하는 MMP-9의 발현에 JAK2/STAT3 신호전달 경로가 관여되는지를 알아보기 위해 혈

관평활근세포에 JAK2/STAT3 저해제인 AG490을 처리하여 MMP-9의 발현을 조사하였다. 혈관평활근세포에 AG490을 전처리하였을 때 *P. gingivalis* LPS에 의해 유도된 MMP-9 mRNA 발현이 감소되었다 (Fig. 2B). MMP-9 mRNA의 발현 차이를 정량적으로 비교하고자 real-time PCR을 수행한 결과에서도 AG490이 *P. gingivalis* LPS가 증가시켰던 MMP-9 mRNA 발현을 약 40% 크게 저해시켰으나, MMP-2 mRNA 발현은 AG490에 의해 크게 유의성 없이 약 10% 정도 감소되었다(Fig. 2C). 또한 *P. gingivalis* LPS에 의해 증가된 MMP-9 단백질 발현이 AG490으로 전처리한 후 *P. gingivalis* LPS로 자극한 혈관평활근세포군에서 증가된 MMP-9 발현이 감소되어 있음을 확인하였다(Fig. 2D).

3. JAK2/STAT3 저해제가 *P. gingivalis* LPS가 유도하는 혈관평활근세포의 이동능에 미치는 영향

P. gingivalis LPS가 촉진시키는 혈관평활근세포의 이동능에 JAK2/STAT3 신호전달 기전이 관련되어 있는지를 조사하기 위해 JAK2/STAT3 저해제인 AG490을 처리하여 *P. gingivalis* LPS가 증가시킨 이동능에 어떠한 영향을 미치는지 조사하였다. Scratch wound migra-

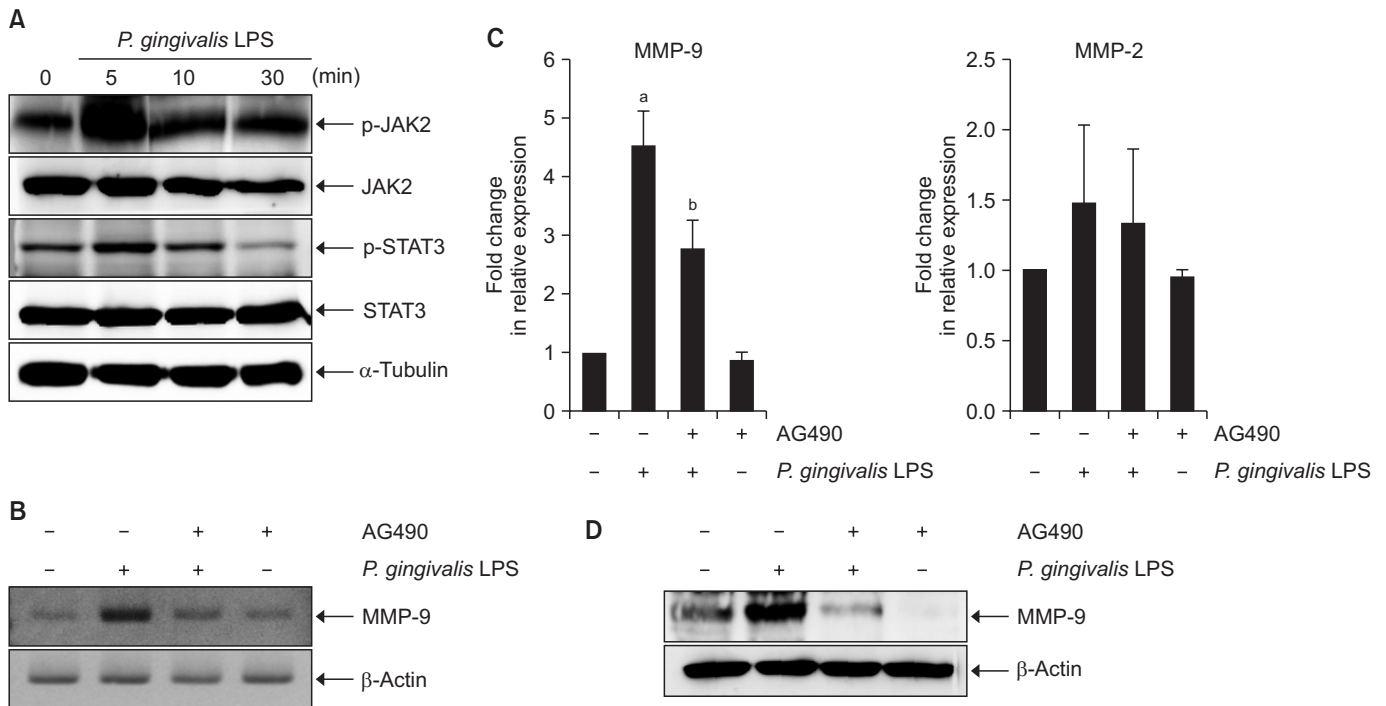


Fig. 2. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide (LPS)-induced matrix metalloproteinase (MMP)-9 expression is mediated by Janus kinase (JAK)2/ signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) signaling in A7r5 cells. (A) A7r5 cells were treated with *P. gingivalis* LPS (5 μ g/mL) for the indicated times. Western blots were probed with anti-phospho-JAK2, anti-JAK2, anti-phospho-STAT3 and anti-STAT3 antibodies. α -Tubulin served as the loading control. (B) A7r5 cells were pretreated for one hour with or without AG490 (20 μ M) prior to stimulation with *P. gingivalis* LPS (5 μ g/mL) for 8 hours. Total RNAs were isolated and then analyzed by reverse transcription-polymerase chain reaction (PCR) using specific primers to rat MMP-9. β -Actin served as an internal control. (C) After treat with *P. gingivalis* LPS (5 μ g/mL) for 8 hours, total RNAs were isolated. Using real-time PCR, the expression level of MMP-9 mRNA was quantified. The expression level of the control (untreated) was set to 1.0, and the values are normalized to the β -Actin mRNA levels. ^a $p < 0.01$ vs. control; ^b $p < 0.02$ vs. *P. gingivalis* LPS. (D) A7r5 cells were incubated with *P. gingivalis* LPS (5 μ g/mL) alone or in combination with AG490 (20 μ M) for 8 hours. MMP-9 protein level was examined by Western blotting using anti-MMP-9 antibody. β -Actin served as the loading control.

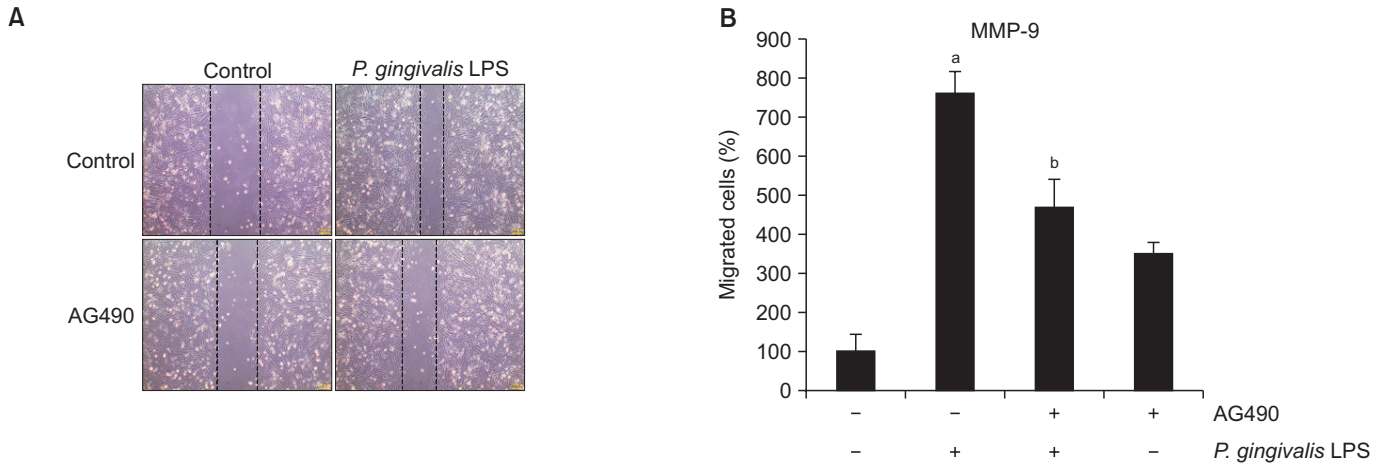


Fig. 3. Involvement of Janus kinase 2/signal transducer and activator of transcription 3 signaling on *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide (LPS)-induced vascular smooth muscle cell migration. (A) Scratch wound migration assays were performed on *P. gingivalis* LPS (5 μ g/mL)-treated A7r5 cells in the absence or presence of the AG490 (20 μ M). After incubation with *P. gingivalis* LPS (5 μ g/mL) for 48 hours, migrated cells were observed by a phase contrast microscope at $\times 100$ magnification. (B) The number of cells that migrated beyond the reference line was counted. Each result represents the mean value of triplicate experiments in each group ($\times 100$ magnification). ^a $p < 0.001$ vs. control; ^b $p < 0.01$ vs. *P. gingivalis* LPS alone.

tion 분석에서 *P. gingivalis* LPS는 혈관평활근세포의 이동을 촉진시켰고 AG490을 처리하였을 때는 그 이동되는 혈관평활근세포의 수가 감소되어 있음을 확인할 수 있었다(Fig. 3A). 결과는 혈관평활근세포를 계수하여 나타내었다(Fig. 3B).

Discussion

혈관평활근세포의 증식, 이동, 축적 등이 죽상경화증의 주요 단계로 알려져 있다[16]. 죽상경화증의 진행단계 동안 성장인자, 염증성 시토카인 등을 포함한 다양한 매개인자들이 혈관평활근세포의 증식과 종말에서 내막으로의 이동을 촉진시키고, 수축성 상태에서 염증성 상태로 혈관평활근세포의 고유의 특징을 변화시킨다[17]. 일차적으로 치주조직으로의 *P. gingivalis*의 감염이 일어나서 *P. gingivalis*가 혈류를 통해 침투하여 직접적으로 혈관염증에 영향을 미치거나 *P. gingivalis* LPS와 같은 내독소 등에 의해 증가된 다양한 염증성 인자들에 의해 죽상경화증의 진행에 영향을 주기도 한다[2]. 따라서 *P. gingivalis*가 혈관내피세포의 기능 이상에 미치는 영향에 대한 연구는 다양하게 시도되어 왔다[18]. 본 연구진도 *P. gingivalis* LPS가 혈관내피세포의 단핵구 부착을 촉진시키고, 혈관내피세포의 투과성을 증가시킨다는 사실을 보고한 바 있다[12,19]. 최근에는 *P. gingivalis*가 혈관평활근세포의 기능 이상에 미치는 영향에 대한 연구들이 보고되고 있다. *P. gingivalis*, *P. gingivalis* LPS, *P. gingivalis*에서 유래한 outer membrane vesicle 등이 혈관평활근세포의 석회화를 유발시킨다고 알려져 있다[20-22]. 또한 *P. gingivalis*의 gingipain이 혈관평활근세포의 증식에도 관여한다고 한다[23]. Apolipoprotein E 결손생쥐모델 및 low density lipoprotein receptor 결손생쥐모델에서 *P. gingivalis* 감염에 의해 죽상경화증이 가속화된다는 사실이 잘 알려져 있다[18]. 향후 *P. gingivalis*를 감염시킨 혈관계 질환 생쥐 모델의 혈관조직에서 혈관평활근세포의 병

인기전에 대한 심화연구가 필요할 것으로 생각한다.

MMP는 세포외기질의 여러 가지 구성요소들을 분해하는 단백질 분해효소로 잘 알려져 있으며, 상처 치유, 혈관 신생, 종양 형성, 염증 반응 등과 같은 다양한 생리적, 병리적 과정에 관여하는 효소이다[14]. MMP 중 기저막에 있는 콜라겐 타입 IV를 분해하는 젤라틴분해효소로 알려진 MMP-2와 MMP-9는 사람의 죽상경화판 조직 및 생쥐의 죽상경화증 모델에서 그 발현이 증가하는 것으로 알려져 있다[24,25]. 특히 MMP-9의 과다발현이 혈관평활근세포의 이동을 증가시키고 혈관평활근세포의 리모델링에도 관여하는 것으로 보고되고 있다[26]. 본 연구에서는 *P. gingivalis* LPS가 혈관평활근세포에서 STAT3의 활성을 통해 MMP-9의 발현을 조절하였다. MMP-9의 발현이 만성치주염 및 심혈관계 질환에 동시에 상관관계를 보인다고 알려져 있다[27]. 그리고 순환하는 *P. gingivalis* LPS가 MMP-9 의존적인 기전으로 염증성 반응을 조절하여 심혈관계 질환의 위험도를 높인다고 보고하고 있다[28]. MMPs의 프로모터에는 nuclear factor- κ B (NF- κ B), activator protein-1 (AP-1), polyoma enhancer activator 3, SP-1, STAT3 결합 부위들을 가지고 있다[29]. 특히 혈관평활근세포에서의 MMP-9의 발현에 NF- κ B 및 AP-1 전사인자들이 관여하고 있다고 보고된 바 있다[30]. 다양한 인간 암들에서 *P. gingivalis* LPS는 toll-like receptor를 경유해서 NF- κ B 전사인자를 활성화한다고 한다[4]. 그리고 STAT3와 NF- κ B간의 기능적 상호작용에 의해 암과정에서 염증성 반응을 일으키는 유전자들의 발현을 조절한다고 한다[31]. 그리고 실제로 tumor necrosis factor- α 및 insulin-like growth factor-1에 의해 자극 받은 혈관평활근세포에서 STAT3와 NF- κ B 단백질들 간의 결합이 관찰되었다[32]. 따라서 *P. gingivalis* LPS가 혈관평활근세포에서 STAT3 및 NF- κ B 전사인자가 MMP-9의 발현을 함께 조절할 수 있는 가능성에 대해서 추가연구가 필요할 것으로 생각한다.

Acknowledgements

This work was supported by a 2-Year Research Grant of Pusan National University (to Bae M-K).

Conflicts of Interest

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

References

- Hegde R, Awan KH. Effects of periodontal disease on systemic health. *Dis Mon* 2018. doi: 10.1016/j.disamonth.2018.09.011. [Epub ahead of print]
- Nguyen CM, Kim JW, Quan VH, Nguyen BH, Tran SD. Periodontal associations in cardiovascular diseases: the latest evidence and understanding. *J Oral Biol Craniofac Res* 2015;5:203–6. doi: 10.1016/j.jobcr.2015.06.008.
- Kholy KE, Genco RJ, Van Dyke TE. Oral infections and cardiovascular disease. *Trends Endocrinol Metab* 2015;26:315–21. doi: 10.1016/j.tem.2015.03.001.
- Gibson FC 3rd, Yumoto H, Takahashi Y, Chou HH, Genco CA. Innate immune signaling and *Porphyromonas gingivalis*-accelerated atherosclerosis. *J Dent Res* 2006;85:106–21. doi: 10.1177/154405910608500202.
- Haraszthy VI, Zambon JJ, Trevisan M, Zeid M, Genco RJ. Identification of periodontal pathogens in atheromatous plaques. *J Periodontol* 2000;71:1554–60. doi: 10.1902/jop.2000.71.10.1554.
- Fiehn NE, Larsen T, Christiansen N, Holmstrup P, Schroeder TV. Identification of periodontal pathogens in atherosclerotic vessels. *J Periodontol* 2005;76:731–6. doi: 10.1902/jop.2005.76.5.731.
- Kozarov EV, Dorn BR, Shelburne CE, Dunn WA Jr, Progulske-Fox A. Human atherosclerotic plaque contains viable invasive *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:e17–8. doi: 10.1161/01.ATV.0000155018.67835.1a.
- Jain S, Darveau RP. Contribution of *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide to periodontitis. *Periodontol* 2000 2010;54:53–70. doi: 10.1111/j.1600-0757.2009.00333.x.
- Rao RM, Yang L, Garcia-Cardena G, Lusinskas FW. Endothelial-dependent mechanisms of leukocyte recruitment to the vascular wall. *Circ Res* 2007;101:234–47. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.107.151860b.
- Sprague AH, Khalil RA. Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease. *Biochem Pharmacol* 2009;78:539–52. doi: 10.1016/j.bcp.2009.04.029.
- Pouliot M, Clish CB, Petasis NA, Van Dyke TE, Serhan CN. Lipoxin A(4) analogues inhibit leukocyte recruitment to *Porphyromonas gingivalis*: a role for cyclooxygenase-2 and lipoxins in periodontal disease. *Biochemistry* 2000;39:4761–8. doi: 10.1021/bi992551b.
- Choi EK, Kang MS, Oh BH, Kim SY, Kim SH, Kang IC. Aggregatibacter actinomycetemcomitans strongly stimulates endothelial cells to produce monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8. *Int J Oral Biol* 2012;37:137–45.
- Kim Y, Kim SJ, Kim MK, Park HJ, Kim HJ, Bae SK, Bae MK. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide regulates migration of vascular smooth muscle cells. *Int J Oral Biol* 2016;33:217–23. doi: 10.11620/IJOB.2016.41.4.217.
- Newby AC. Matrix metalloproteinases regulate migration, proliferation, and death of vascular smooth muscle cells by degrading matrix and non-matrix substrates. *Cardiovasc Res* 2006;69:614–24. doi: 10.1016/j.cardiores.2005.08.002.
- Ghosh A, Pechota A, Coleman D, Upchurch GR Jr, Eliason JL. Cigarette smoke-induced MMP2 and MMP9 secretion from aortic vascular smooth cells is mediated via the Jak/Stat pathway. *Hum Pathol* 2015;46:284–94. doi: 10.1016/j.humpath.2014.11.003.
- Dzau VJ, Braun-Dullaeus RC, Sedding DG. Vascular proliferation and atherosclerosis: new perspectives and therapeutic strategies. *Nat Med* 2002;8:1249–56. doi: 10.1038/nm1102-1249.
- Willis AI, Pierre-Paul D, Sumpio BE, Gahtan V. Vascular smooth muscle cell migration: current research and clinical implications. *Vasc Endovascular Surg* 2004;38:11–23. doi: 10.1177/153857440403800102.
- Chistiakov DA, Orekhov AN, Bobryshev YV. Links between atherosclerotic and periodontal disease. *Exp Mol Pathol* 2016;100:220–35. doi: 10.1016/j.yexmp.2016.01.006.
- Kim SR, Jeon HJ, Park HJ, Kim MK, Choi WS, Jang HO, Bae SK, Jeong CH, Bae MK. Glycyrrhetic acid inhibits *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide-induced vascular permeability via the suppression of interleukin-8. *Inflamm Res* 2013;62:145–54. doi: 10.1007/s00011-012-0560-5.
- Yang WW, Guo B, Jia WY, Jia Y. *Porphyromonas gingivalis*-derived outer membrane vesicles promote calcification of vascular smooth muscle cells through ERK1/2-RUNX2. *FEBS*

- Open Bio 2016;6:1310–9. doi: 10.1002/2211–5463.12151.
21. Liu G, Deng J, Zhang Q, Song W, Chen S, Lou X, Zhang P, Pan K. Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide stimulation of vascular smooth muscle cells activates proliferation and calcification. *J Periodontol* 2016;87:828–36. doi: 10.1902/jop.2016.150602.
 22. Chen TC, Lin CT, Chien SJ, Chang SF, Chen CN. Regulation of calcification in human aortic smooth muscle cells infected with high-glucose-treated Porphyromonas gingivalis. *J Cell Physiol* 2018;233:4759–69. doi: 10.1002/jcp.26268.
 23. Cao C, Ji X, Luo X, Zhong L. Gingipains from Porphyromonas gingivalis promote the transformation and proliferation of vascular smooth muscle cell phenotypes. *Int J Clin Exp Med* 2015;8:18327–34.
 24. Caird J, Napoli C, Taggart C, Farrell M, Bouchier-Hayes D. Matrix metalloproteinases 2 and 9 in human atherosclerotic and non-atherosclerotic cerebral aneurysms. *Eur J Neurol* 2006;13:1098–105. doi: 10.1111/j.1468–1331.2006.01469.x.
 25. Wågsäter D, Zhu C, Björkegren J, Skogsberg J, Eriksson P. MMP-2 and MMP-9 are prominent matrix metalloproteinases during atherosclerosis development in the Ldlr(–/–) Apob(100/100) mouse. *Int J Mol Med* 2011;28:247–53. doi: 10.3892/ijmm.2011.693.
 26. Mason DP, Kenagy RD, Hasenstab D, Bowen-Pope DF, Seifert RA, Coats S, Hawkins SM, Clowes AW. Matrix metalloproteinase-9 overexpression enhances vascular smooth muscle cell migration and alters remodeling in the injured rat carotid artery. *Circ Res* 1999;85:1179–85.
 27. Gu Y, Lee HM, Sorsa T, Salminen A, Ryan ME, Slepian MJ, Golub LM. Non-antibacterial tetracyclines modulate mediators of periodontitis and atherosclerotic cardiovascular disease: a mechanistic link between local and systemic inflammation. *Pharmacol Res* 2011;64:573–9. doi: 10.1016/j.phrs.2011.06.023.
 28. Deleon-Pennell KY, de Castro Brás LE, Lindsey ML. Circulating Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide resets cardiac homeostasis in mice through a matrix metalloproteinase-9-dependent mechanism. *Physiol Rep* 2013;1:e00079. doi: 10.1002/phy2.79.
 29. Vincenti MP, Brinckerhoff CE. Signal transduction and cell-type specific regulation of matrix metalloproteinase gene expression: can MMPs be good for you? *J Cell Physiol* 2007;213:355–64. doi: 10.1002/jcp.21208.
 30. Cheng G, Wei L, Xiurong W, Xiangzhen L, Shiguang Z, Songbin F. IL-17 stimulates migration of carotid artery vascular smooth muscle cells in an MMP-9 dependent manner via p38 MAPK and ERK1/2-dependent NF- κ B and AP-1 activation. *Cell Mol Neurobiol* 2009;29:1161–8. doi: 10.1007/s10571-009-9409-z.
 31. Grivennikov SI, Karin M. Dangerous liaisons: STAT3 and NF- κ B collaboration and crosstalk in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 2010;21:11–9. doi: 10.1016/j.cytogfr.2009.11.005.
 32. Dhar K, Rakesh K, Pankajakshan D, Agrawal DK. SOCS3 promoter hypermethylation and STAT3-NF- κ B interaction down-regulate SOCS3 expression in human coronary artery smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2013;304:H776–85. doi: 10.1152/ajpheart.00570.2012.