

Original Article

Int J Oral Biol 45:64-69, 2020
 pISSN: 1226-7155 • eISSN: 2287-6618
<https://doi.org/10.11620/IJOB.2020.45.2.64>

Short-chain fatty acids, including acetate, propionate, and butyrate, elicit differential regulation of intracellular Ca^{2+} mobilization, expression of IL-6 and IL-8, and cell viability in gingival fibroblast cells

So Hui Kim¹ and Min Seuk Kim^{2*}

¹Department of Carbon Convergence Engineering, College of Engineering, Wonkwang University, Iksan 54538, Republic of Korea

²Department of Oral Physiology and Institute of Biomaterial-Implant, School of Dentistry, Wonkwang University, Iksan 54538, Republic of Korea

Short-chain fatty acids (SCFAs) such as acetate, propionate, and butyrate are secondary metabolites produced by anaerobic fermentation of dietary fibers in the intestine. Intestinal SCFAs exert various beneficial effects on intestinal homeostasis, including energy metabolism, autophagy, cell proliferation, immune reaction, and inflammation, whereas contradictory roles of SCFAs in the oral cavity have been reported. Herein, we found that low and high concentrations of SCFAs induce differential regulation of intracellular Ca^{2+} mobilization and expression of pro-inflammatory cytokines, such as interleukin (IL)-6 and IL-8, respectively, in gingival fibroblast cells. Additionally, cell viability was found to be differentially regulated in response to low and high concentrations of SCFAs. These findings demonstrate that the physiological functions of SCFAs in various cellular responses are more likely dependent on their local concentration.

Keywords: Short-chain fatty acids, Ca^{2+} signaling, Pro-inflammatory cytokines, Periodontitis

Introduction

Acetate (C2), propionate (C3), butyrate (C4)를 포함하는 단사슬지방산(short-chain fatty acids)은 장 내 미생물의 이차대사산물로서 식이섬유의 혐기성 발효에 의해 생성된다[1]. 단사슬지방산은 주로 장 내에서 발견, 보고되고 있는데(결장 근위부 70–140 mM, 결장 원위부 20–70 mM)[2], 장 상피세포(intestinal epithelial cells) 및 면역세포 내 G 단백질 결합 수용체(G-protein coupled receptor) 활성 조절을 통해 장점막 염증 조절의 역할을 수행하고 있음이 보고된 바 있다[2]. Butyrate는 결장세포(colonic cell line) 내 G protein-coupled receptor 109A (GPR109A) 수용체에 결합함으로써 lipopolysac-

charide (LPS)-매개 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 의 활성을 억제하는 것으로 알려져 있으며, 단사슬지방산에 의한 G protein-coupled receptor 43 (GPR43) 및 GPR109A의 활성은 세포 내 K^+ 유출을 매개함으로써 결장상피세포(colonic epithelial cells) 내 염증반응에 대한 방어기전을 유도하는 등의 인체 내 다양한 생리활성을 매개함이 확인되고 있다[3].

장 이외 기타 조직에서도 millimolar 범위의 단사슬지방산이 존재하며 다양한 세포반응을 매개하는 것이 알려져 있는데[2], 정상인 치은열구(gingival crevice)에서 6.3–16.2 mM acetate, 1.2–3.1 mM propionate, 0.0–0.4 mM butyrate가 존재하며, 중증 치주염 환자의 경우 각각 14.0–38.4 mM, 4.0–12.9 mM, 0.9–4.2 mM의 농도로 증가되어 존재하는 것으로 확인되었다[4]. 장 내 미생물-유래 단사슬지

Received April 16, 2020; Revised April 22, 2020; Accepted April 22, 2020

*Correspondence to: Min Seuk Kim, E-mail: happy1487@wku.ac.kr  <https://orcid.org/0000-0003-0071-0830>

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.

방산의 다양한 생리활성들과는 달리, 구강 내 단사슬지방산은 주로 구강질환 발생에 연관되어 있는 것으로 알려져 있는데, *Porphyromonas gingivalis* 및 *Fusobacterium nucleatum*로부터 생성된 단사슬지방산은 치주조직세포 내 유전자 발현을 조절함으로써 카포시육종(Kaposi's sarcoma)과 같은 질병 발생에 연관되어 있음이 확인되었으며 [5], 치은 조직 내 butyric acids는 혈류 내부로 이동함으로써, 혈액 미토콘드리아 내 oxidative/endoplasmic reticulum (ER) stress를 매개하는 등의 인체 내 병리활성을 매개함이 확인되고 있다[6]. 단사슬지방산의 이러한 이중적인 역할에 대한 원인과 각각의 기전은 충분히 알려지지 않고 있으며, 구강 내 단사슬지방산의 이중 활성에 대한 정확한 이해는 치주질환을 극복하는 데 있어 새로운 전략을 제시할 것으로 기대된다.

본 연구를 통해 단사슬지방산 농도 변화에 따른 치은섬유아세포 내 칼슘신호변화 및 관련 분자기전에 대해 이해하고, 그에 따른 세포 활성에 대해 확인해 보고자 하였다.

Materials and Methods

1. 세포 배양 및 시약

치은섬유아세포(human gingival fibroblast; ATCC, PCS-201-018)는 10,000 units/mL penicillin, 10,000 µg/mL streptomycin, 10% fetal bovine serum이 함유된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (GE Healthcare Life Sciences, Chicago, IL, USA) 배양 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양되었다. Sodium acetate, sodium propionate, sodium butyrate, LPS from *Escherichia coli*는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)로부터 구매하였다.

2. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) assay

세포 내 RNAs는 Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 이용한 표준화된 실험방법에 의해 추출되었다. 배양 배지 제거 후 각 샘플에 1 mL Trizol을 처리한 뒤 원심분리하여 total RNA를 분리하였으며, BioSpec-nano (Shimadzu, Kyoto, Japan)을 이용하여 정량하였다. 최종 1 µg RNA로부터 cDNA를 합성하였으며, 합성된 cDNA를 대상으로 다음의 primer를 이용하여 각각의 유전자 발현 정도를 확인하였다(Interleukin (IL)-6: forward 5'-GAT TCC AAA GAT GTA GCC GCC C-3', reverse 5'-GCT GGA CTG CAG GAA CTC CTT A-3', IL-8: forward 5'-TCT TGG CAG CCT TCC TAG TTT CTG-3', reverse 5'-AGT TTT CCT TGG GGT CCA GAC AG-3', GAPDH: forward 5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3', reverse 5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3').

3. 세포 활성도 분석(cell viability assay)

세포 활성은 EZ-CYTOX kit (Daeillab Service Co. Ltd., Seoul, Korea)를 이용하여 제작사에서 제공하는 방법에 따라 측정하였다. 간략히 설명하면, 96 well plate에 세포를 분주한 뒤, 다음날 EZ-CYTOX 10 µL/well를 첨가한다. 30분간의 추가 배양 후 각 well의 optical density (450 nm)를 iMAX Microplate Reader (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 측정하였다.

4. 세포 내 칼슘 농도([Ca²⁺]_i) 측정

Cover glass (22 × 22 mm)에 분주된 세포는 12시간 배양 후 실험에 사용되었다. Fura-2/AM (TEFLabs, Austin, TX, USA)는 1

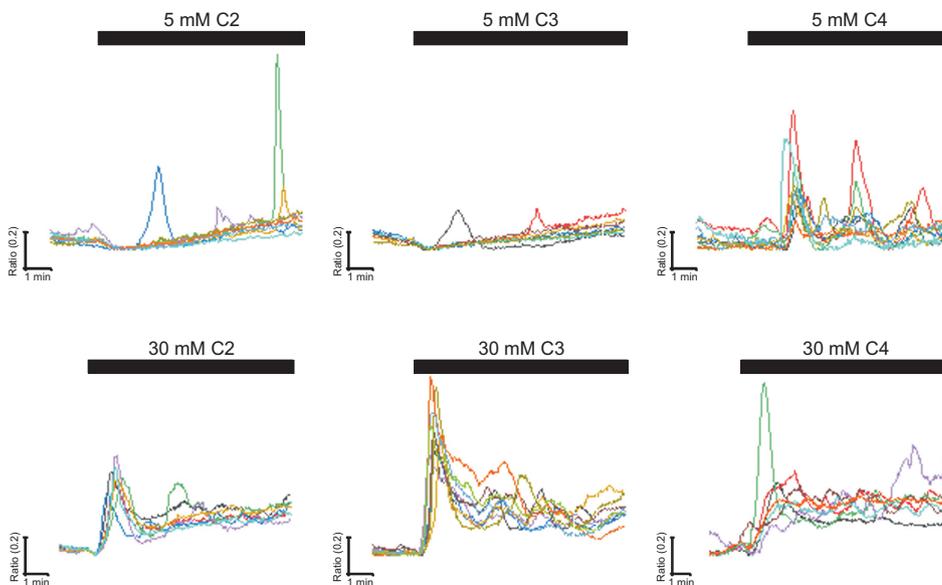


Fig. 1. Differential intracellular Ca²⁺ mobilizations in response to different concentrations of short-chain fatty acids (SCFAs). Human gingival fibroblast cells loaded with Fura-2/AM were acutely treated with indicated concentrations of SCFAs for designated time. Each trace present intracellular Ca²⁺ mobilization in each cell. C2, acetate; C3, propionate; C4, butyrate.

mL 배양 배지에 최종 5 μM의 농도로 처리하고, 세포배양기에서 1 시간 동안 추가 배양하였다. HEPES buffer (mmol/L: 10 HEPES, 140 NaCl, 5 KCl, 1 MgCl₂, 1 CaCl₂, and 10 glucose, pH7.4, 310 mOsm)를 세포에 관류시켜 세포 외부 잔류 Fura-2/AM을 씻어내고, 안정화시킨 뒤 [Ca²⁺]_i를 측정하였다. 세포질 내 칼슘 농도는 340/380 nm dual wavelength를 이용하여 excitation 시켰으며, 방출된 510 nm wavelength를 CCD camera (Zyla sCMOS; Belfast, UK)를 이용하여 측정하였으며, 결과는 ratio (F₃₄₀/F₃₈₀) 값으로 표시하였다.

5. 통계학적 유의성 검사

각 실험군 간 통계학적 유의성 검사에는 Origin 2020 프로그램 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA)이 사용되었다. 유의성 검증을 위해 one-way analysis of variance를 실시하였으며, Tukey's post hoc test로 사후 검증을 실시하였다. 통계적 유의성의 표준값은 *p* < 0.05로 설정하였다. 모든 결과는 독립된 3 이상의 실험 들로부터 도출되었으며, 평균 ± standard error of the mean으로 표시되었다.

Results

1. 단사슬지방산 농도 변화에 따른 치은섬유아세포 내 [Ca²⁺]_i 반응의 변화

C2 및 C3는 세포 내 GPR43을 활성화할 수 있는 것으로 알려져 있으며, 활성화된 GPR43은 Gi 또는 Gq 단백 경로를 활성화함으로써, cAMP 생산을 억제하며 [Ca²⁺]_i 증가를 유도한다 [7,8]. 우리는 단사슬 지방산이 치은섬유아세포에서 칼슘 반응을 유도하는지, 그리고 단사슬 지방산 농도에 따른 변화가 있는지 확인해보고자 Fura-2/AM을 이용하여 살아있는 세포 내 세포질 칼슘 농도를 측정하였다. 치은섬유아세포를 5 mM C2, C3, C4에 각각 노출시켰을 경우, C2, C3 처리된 세포 내 [Ca²⁺]_i 변화는 거의 확인할 수 없었으며, 간혹 1-2 peak의 일시적 [Ca²⁺]_i 증가만이 관찰된 반면, C4 처리된 세포에서는 주기적으로 증가와 감소가 반복하여 나타나는 [Ca²⁺]_i oscillation의 발생이 확인되었다. 반면, 고농도의 30 mM C2, C3, C4를 처리한 경우 [Ca²⁺]_i 농도가 일시적으로 증가한 후 다시 감소하는 biphasic [Ca²⁺]_i response가 확인되었는데, 감소된 후에도 세포질 내 기저 [Ca²⁺]_i의 농도보다 증가되어 유지됨이 확인되었다(Fig. 1). 위 결과를 통해 단사슬지방산 종류 및 농도에 따라 치은섬유아세포 내 칼슘 반응 양상이 다르게 나타남을 확인하였다.

2. 단사슬지방산 농도 변화에 따른 치은섬유아세포 내 전 염증 사이토카인(proinflammatory cytokines) 발현 변화

C4의 농도가 증가할수록 치은섬유아세포 내 IL-6, IL-8 발현이 공통적으로 증가됨이 보고된 바 있다[9]. 단사슬지방산 농도 변화에 따라 다

르게 나타나는 [Ca²⁺]_i 반응 분석에 이어, IL-6 및 IL-8 등의 전 염증 사이토카인의 발현에 변화가 있는지 확인하고자 RT-PCR 실험을 수행하였다. 치은섬유아세포에 단사슬지방산을 농도별로 처리하고 24시간 후 세포 내 total RNAs를 추출하여 IL-6, IL-8 발현 양상을 확인하였다. 5 mM C2, C3, C4에 의한 IL-6 및 IL-8의 발현은 control (deionized water treated)에 비해 증가 양상을 보였으나 유의한 차이는 보이지 않았으며, 30 mM C2, C3에 의한 IL-6 및 IL-8의 발현 역시 유의한 차이는 확인할 수 없었다(Fig. 2). 반면, 30 mM C4 처리한 그룹에서 IL-6, IL-8의 발현이 강하게 증가되어 있는 것을 확인할 수 있었으며, 이는 LPS에 의한 증가 정도와 유사한 수준임이 확인되었다(Fig. 2). 추가로 IL-1, IL-10, tumor necrosis factor-α (TNF-α) 발현 정도를 측정하였으나 유의한 결과는 확인되지 않았다(data not shown). 위 결과는 동일한 단사슬지방산의 농도 차에 따른 IL-6 및 IL-8의 발현 변화를 나타내며, 이는 단사슬지방산-매개 [Ca²⁺]_i 변화가 관련 있을 것으로 예상된다.

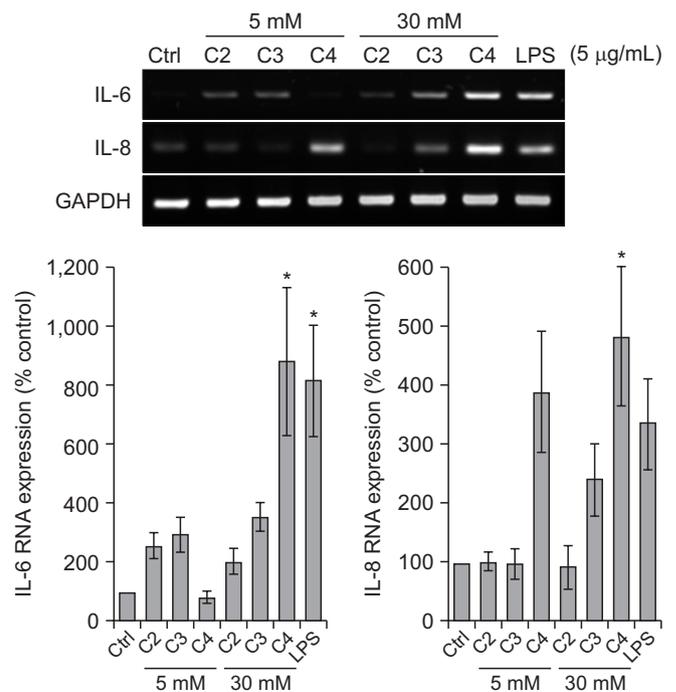


Fig. 2. Differential expression of interleukin (IL)-6 and IL-8 in response to different concentrations of short-chain fatty acids (SCFAs). Cells were cultured under the indicated conditions, and total RNAs were collected and used as template for synthesis of cDNA. Conventional reverse transcriptase-polymerase chain reaction was then performed. The upper panel shows RNA expression of IL-6 and IL-8 in response to SCFAs. The lower panel present statistic data showing fold increase of IL-6 and IL-8 expression compared to control (deionized water treated). Data are represented as mean ± standard error of the mean.

Ctrl, control; C2, acetate; C3, propionate; C4, butyrate; LPS, lipopolysaccharide; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase.

**p* < 0.05 in comparison to control.

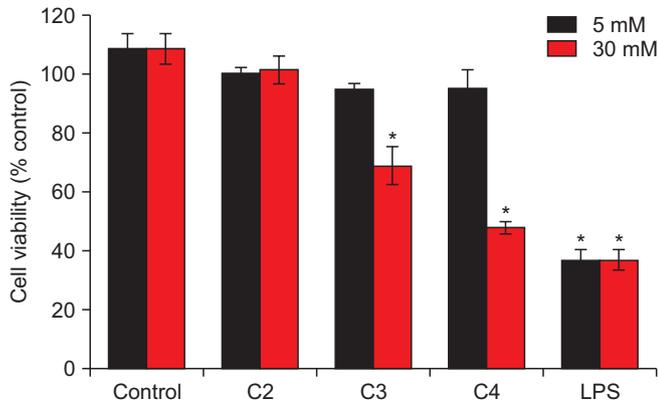


Fig. 3. Negative regulation of cell viability in response to different concentrations of short-chain fatty acids (SCFAs). Cells seeded on 96-well plate were treated with the indicated concentrations of SCFAs, and MTT assay was conducted. The statistics data shows fold change of cell viability compared to control (deionized water treated), and are represented as mean \pm standard error of the mean.

C2, acetate; C3, propionate; C4, butyrate; LPS, lipopolysaccharide.

* $p < 0.05$ in comparison to control.

3. 단사슬지방산 농도 변화에 따른 세포활성도 변화

장 내 염증반응에서 단사슬지방산의 다양한 이로운 활성(beneficial roles)들이 잘 알려져 있는 반면, 구강 내에서는 단사슬지방산의 해로운 활성(detrimental roles)들이 많이 보고되고 있다[10]. 특히, 구강 내 C4의 증가는 치은섬유아세포 내 TNF- α 발현을 증가시키며, 분비된 TNF- α 는 주변 치은섬유아세포에 작용함으로써 세포사멸을 촉진함이 보고된 바 있다[11]. 본 연구에서 단사슬지방산 농도 변화에 따른 치은섬유아세포의 세포활성도를 분석하고자 저농도(5 mM), 고농도(30 mM)의 단사슬지방산을 배양된 치은섬유아세포에 처리한 뒤, 72시간 동안 추가 배양하여 MTT assay를 수행하였다. 실험 결과, 용매만을 처리한 대조군에 비해 30 mM의 C3와 C4를 처리한 실험군에서 유의한 정도의 세포활성도 감소가 확인되었으며, 나머지 저농도의 단사슬지방산 및 고농도의 C2를 처리한 실험군에서는 세포활성도의 변화를 확인할 수 없었다(Fig. 3). 특히, 30 mM C4를 처리한 실험군은 LPS (5 μ g/mL)를 처리한 실험군과 비슷한 수준의 세포활성도를 나타냈다. 위 결과는 단사슬지방산의 농도에 따라서 세포활성도에 미치는 효과가 다르며, 고농도의 butyrate는 LPS와 비슷한 수준의 강한 세포독성을 가짐을 보여주었다.

Discussion

단사슬지방산은 장 상피조직 및 말단조직에의 영양분 공급원으로 작용하며, 장 상피조직 integrity 및 상처 치유를 촉진하는 생리활성을 가지는 것으로 보고된 바 있다[12]. 또한, 단사슬지방산은 신호전달물질의 활성을 가지며, 장 내 염증반응을 억제하고 심혈관 질환, 당뇨 질환 위험을 낮추는 등의 이로운 활성을 갖는 것으로 확인되었다[13-15].

구강 내 미생물에 의해서도 단사슬지방산은 생성되며, 종종 치주염 환자의 구강 내 단사슬지방산의 농도가 정상인에 비해서 유의적으로 높게 확인되는 등, 치주질환의 병리기전과 깊은 관련이 있는 것으로 확인되고 있다[5]. 이와 같이, 단사슬지방산은 앞서 말한 이로운 활성과는 모순적으로 해로운 활성 역시 나타내고 있음이 확인되고 있다. C4는 Jurkat T-cell 내 mitochondrial-dysfunction 및 ER stress에 의한 apoptosis를 유도하며[16], colon cancer 내 p21 유전자 발현을 조절함으로써 carcinogenesis에 관여함이 보고된 바 있다[17]. 특히, 치주질환 병리기전에서 단사슬지방산, 그 중에서도 C4의 역할이 자주 보고되고 있다. 앞서 언급한 바와 같이, 정상인의 구강 내 단사슬지방산 농도에 비해 치주질환 환자의 구강 내 단사슬지방산의 농도가 유의하게 증가되는 것이 관찰된 바 있는데, 이러한 단사슬지방산들은 장 상피세포 및 면역세포 내 발현되는 GPR41, GPR43, GPR109를 포함하는 GPCRs에 수용체-리간드 결합함으로써 다양한 세포활성을 매개한다[18]. 그 중, 단사슬지방산에 의한 GPR43 활성은 세포 내 칼슘반응을 유도하며, 나아가 장 조직 내 염증반응을 조절하는 것으로 보고되고 있다[19,20]. 본 연구를 통해 단사슬지방산의 농도 변화에 따라 치은섬유아세포 내 칼슘신호의 변화를 확인하였으며, 특히, 저농도의 C4 자극은 세포 내 $[Ca^{2+}]_i$ oscillation의 형태를 나타내는 것을 확인하였다. 이는 저농도의 C2 및 C3 자극에 따른 칼슘반응과 고농도의 C2, C3, C4 자극에 따른 칼슘반응과는 새로운 반응으로 염증반응 외에 다른 세포활성을 매개할 것으로 예상된다. 세포 내 칼슘반응 변화에 이어 단사슬지방산 농도 차에 의한 IL-6 및 IL-8의 전 염증 사이토카인 발현 변화를 확인하였으며, IL-6 및 IL-8의 발현은 대부분의 실험군에서 대조군의 그것과 유의미한 차이를 보이지 않은 반면, 고농도의 C4가 처리된 실험군에서만 유의미한 증가가 확인되었다. 주목할 점은, 고농도의 C2, C3, C4는 모두 비슷한 양상의 칼슘반응을 나타낸 것에 반해, 동일한 양상의 전 염증성 사이토카인 발현이 관찰되었다는 점과 $[Ca^{2+}]_i$ oscillation을 유도하는 저농도의 C4 자극과 biphasic Ca^{2+} response를 유도하는 고농도의 C4 자극이 전혀 다른 전 염증성 사이토카인 발현을 유도하였다는 점이다. 본 연구에서는 전 염증성 사이토카인 발현을 유도하지 않는 고농도의 C2, C3 그리고 저농도의 C4 자극이 매개하는 세포활성은 확인하지 못하였으나, GPR43의 생리활성과 관련된 기존 보고들을 고려할 때, 본 세포이동 및 상처 치유의 활성에 대한 추가 연구가 필요할 것으로 생각한다.

단사슬지방산 농도 변화에 따른 세포 내 신호기전 변화에 이어, 마지막으로 단사슬지방산 농도 변화에 따른 세포활성도 변화를 확인하고자 하였다. 앞서 언급한 바와 같이, 염증반응에서 단사슬지방산의 활성은 세포, 조직에 따라 상반된 결과를 보이며, 때로는 동일한 질병모델을 통한 실험에서도 실험조건에 따라 상반된 결과가 도출된 바 있다[21]. 본 연구를 통해 저농도의 단사슬지방산은 세포활성에 전혀 영향을 미치지 않으며, 30 mM 고농도의 단사슬지방산 가운데 C3와 C4 자극만이 유의미한 세포활성의 감소를 매개하였다. 앞서 세포 내 칼슘반응 결과를 고려할 때, 세포 내 지속적인 기저 칼슘증가가 세포활성을 억제하는 주원인으로 생각되며, 저농도의 C4와 같이 $[Ca^{2+}]_i$ oscillation을 매개하는 경우는 세포활성 억제와는 전혀 다른 세포 활성을 매개할 것으로 예

상된다.

종합해 볼 때, 우리는 본 연구를 통해 단사슬지방산은 치은섬유아세포에서 농도에 따라 다른 세포 내 칼슘반응을 매개하며, IL-6 및 IL-8과 같은 전 염증성 사이토카인의 발현을 다르게 매개하며, 저농도와 고농도의 단사슬지방산이 세포활성도를 다르게 조절함을 확인하였다. 이러한 결과는 단사슬지방산 생리활성의 상반되는 실험결과들을 보다 정확히 이해하는 데 새로운 근거를 제시할 것으로 기대된다.

Acknowledgements

이 논문은 2019년도 원광대학교 교내연구비 지원에 의해 수행되었음.

Conflicts of Interest

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

References

- Andoh A, Tsujikawa T, Fujiyama Y. Role of dietary fiber and short-chain fatty acids in the colon. *Curr Pharm Des* 2003;9:347-58. doi: 10.2174/1381612033391973.
- Parada Venegas D, De la Fuente MK, Landskron G, González MJ, Quera R, Dijkstra G, Harmsen HJM, Faber KN, Hermoso MA. Short chain fatty acids (SCFAs)-mediated gut epithelial and immune regulation and its relevance for inflammatory bowel diseases. *Front Immunol* 2019;10:277. doi: 10.3389/fimmu.2019.00277.
- Macia L, Tan J, Vieira AT, Leach K, Stanley D, Luong S, Maruya M, Ian McKenzie C, Hijikata A, Wong C, Binge L, Thorburn AN, Chevalier N, Ang C, Marino E, Robert R, Offermanns S, Teixeira MM, Moore RJ, Flavell RA, Fagarasan S, Mackay CR. Metabolite-sensing receptors GPR43 and GPR109A facilitate dietary fibre-induced gut homeostasis through regulation of the inflammasome. *Nat Commun* 2015;6:6734. doi: 10.1038/ncomms7734.
- Lu R, Meng H, Gao X, Xu L, Feng X. Effect of non-surgical periodontal treatment on short chain fatty acid levels in gingival crevicular fluid of patients with generalized aggressive periodontitis. *J Periodontol Res* 2014;49:574-83. doi: 10.1111/jre.12137.
- Yu X, Shahir AM, Sha J, Feng Z, Eapen B, Nithianantham S, Das B, Karn J, Weinberg A, Bissada NF, Ye F. Short-chain fatty acids from periodontal pathogens suppress histone deacetylases, EZH2, and SUV39H1 to promote Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus replication. *J Virol* 2014;88:4466-79. doi: 10.1128/JVI.03326-13.
- Cueno ME, Imai K, Matsukawa N, Tsukahara T, Kurita-Ochiai T, Ochiai K. Butyric acid retention in gingival tissue induces oxidative stress in jugular blood mitochondria. *Cell Stress Chaperones* 2013;18:661-5. doi: 10.1007/s12192-013-0409-z.
- Yang G, Chen S, Deng B, Tan C, Deng J, Zhu G, Yin Y, Ren W. Implication of G protein-coupled receptor 43 in intestinal inflammation: a mini-review. *Front Immunol* 2018;9:1434. doi: 10.3389/fimmu.2018.01434.
- Maslowski KM, Vieira AT, Ng A, Kranich J, Sierro F, Yu D, Schilter HC, Rolph MS, Mackay F, Artis D, Xavier RJ, Teixeira MM, Mackay CR. Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. *Nature* 2009;461:1282-6. doi: 10.1038/nature08530.
- Kurita-Ochiai T, Ochiai K, Suzuki N, Otsuka K, Fukushima K. Human gingival fibroblasts rescue butyric acid-induced T-cell apoptosis. *Infect Immun* 2002;70:2361-7. doi: 10.1128/iai.70.5.2361-2367.2002.
- Cueno ME, Ochiai K. Gingival periodontal disease (PD) level-butyric acid affects the systemic blood and brain organ: insights into the systemic inflammation of periodontal disease. *Front Immunol* 2018;9:1158. doi: 10.3389/fimmu.2018.01158.
- Shirasugi M, Nakagawa M, Nishioka K, Yamamoto T, Nakaya T, Kanamura N. Relationship between periodontal disease and butyric acid produced by periodontopathic bacteria. *Inflamm Regen* 2018;38:23. doi: 10.1186/s41232-018-0081-x.
- D'Souza WN, Douangpanya J, Mu S, Jaeckel P, Zhang M, Maxwell JR, Rottman JB, Labitzke K, Willee A, Beckmann H, Wang Y, Li Y, Schwandner R, Johnston JA, Towne JE, Hsu H. Differing roles for short chain fatty acids and GPR43 agonism in the regulation of intestinal barrier function and immune responses. *PLoS One* 2017;12:e0180190. doi: 10.1371/journal.pone.0180190.
- Donohoe DR, Garge N, Zhang X, Sun W, O'Connell TM, Bunger MK, Bultman SJ. The microbiome and butyrate regulate energy metabolism and autophagy in the mammalian colon. *Cell Metab* 2011;13:517-26. doi: 10.1016/j.cmet.2011.02.018.
- Mishiro T, Kusunoki R, Otani A, Ansary MM, Tongu M, Harashima N, Yamada T, Sato S, Amano Y, Itoh K, Ishihara S, Kinoshita Y. Butyric acid attenuates intestinal inflammation in murine DSS-induced colitis model via milk fat globule-EGF

- factor 8. *Lab Invest* 2013;93:834–43. doi: 10.1038/labinvest.2013.70.
15. Celasco G, Moro L, Aiello C, Mangano K, Milasi A, Quattrocchi C, Di Marco R. Calcium butyrate: anti-inflammatory effect on experimental colitis in rats and antitumor properties. *Biomed Rep* 2014;2:559–63. doi: 10.3892/br.2014.273.
16. Kurita-Ochiai T, Ochiai K. Butyric acid induces apoptosis via oxidative stress in Jurkat T-cells. *J Dent Res* 2010;89:689–94. doi: 10.1177/0022034510365456.
17. Hu S, Dong TS, Dalal SR, Wu F, Bissonnette M, Kwon JH, Chang EB. The microbe-derived short chain fatty acid butyrate targets miRNA-dependent p21 gene expression in human colon cancer. *PLoS One* 2011;6:e16221. doi: 10.1371/journal.pone.0016221.
18. Pluznick J. A novel SCFA receptor, the microbiota, and blood pressure regulation. *Gut Microbes* 2014;5:202–7. doi: 10.4161/gmic.27492.
19. Brown AJ, Goldsworthy SM, Barnes AA, Eilert MM, Tcheang L, Daniels D, Muir AI, Wigglesworth MJ, Kinghorn I, Fraser NJ, Pike NB, Strum JC, Steplewski KM, Murdock PR, Holder JC, Marshall FH, Szekeres PG, Wilson S, Ignar DM, Foord SM, Wise A, Dowell SJ. The orphan G protein-coupled receptors GPR41 and GPR43 are activated by propionate and other short chain carboxylic acids. *J Biol Chem* 2003;278:11312–9. doi: 10.1074/jbc.M211609200.
20. Le Poul E, Loison C, Struyf S, Springael JY, Lannoy V, Decobecq ME, Brezillon S, Dupriez V, Vassart G, Van Damme J, Parmentier M, Detheux M. Functional characterization of human receptors for short chain fatty acids and their role in polymorphonuclear cell activation. *J Biol Chem* 2003;278:25481–9. doi: 10.1074/jbc.M301403200.
21. Sina C, Gavrilova O, Förster M, Till A, Derer S, Hildebrand F, Raabe B, Chalaris A, Scheller J, Rehmann A, Franke A, Ott S, Häslér R, Nikolaus S, Fölsch UR, Rose-John S, Jiang HP, Li J, Schreiber S, Rosenstiel P. G protein-coupled receptor 43 is essential for neutrophil recruitment during intestinal inflammation. *J Immunol* 2009;183:7514–22. doi: 10.4049/jimmunol.0900063.