

Magnoli과 Honoki이 항균, 교원질 분해효소, 세포독성 및 Cytokine생산에 미치는 영향

서울대학교 치과대학 치주과학교실
충남대학교 약학대학*

장범석 · 손성희 · 정종평 · 배기환*

I. 서 론

치주질환을 일으키는 국소적인 요인은 치태가 치주낭내에 축적되면 주변에 존재하는 세균들의 서식처가 되며 이러한 서식은 호기성, 통기성 그람양성 세균에서 점차 혐기성 그람음성 세균으로 이행되고, 증식된 혐기성 그람음성 세균의 독소 및 산물이 직접 조직을 파괴하거나 면역계를 자극하여 자극된 면역계에서부터 다양한 작용에 의해 치주조직 파괴와 더불어 염증을 유발하게 된다. 그러나 근원적인 국소적 병인인 혐기성 그람음성 세균에 대한 항균 작용 및 정균작용과 이들 세균의 독성산물을 제거시키는 것이 치주질환의 예방 및 치료에 중요한 관건이 된다고 본다.

치은연하 치주낭내 존재하는 병인균 중 가장 많이 알려진 것으로 *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* 등을 들 수 있다¹⁻⁵⁾. 이들 균에 대한 항균 및 정균작용을 하는 제제는 이들 세균들의 배양 및 검정이 활발해진 1970년도 이후에야 본격적으로 개발되기 이르

렀다. 현재까지의 치주질환 예방 및 치료제로는 항생제 및 항균제 등을 주로 개발하여 왔으며 그 중, 항생제는 장기간 사용시 구강내 내성균의 발현 및 균 교대현상 등이 나타나는 문제점이 있다. 따라서 치주질환의 예방제로서의 항생제의 사용은 피하고 있으며 치료제로서 제한적으로 사용하고 있다.

항균제는 화학요법제로서 치은연하 치태의 감소 및 항균효과를 내게 되는 것으로서 bisbiguanides제제, phenolic compound제제, quaternary ammonium compound등이 주로 사용되고 있다. 이 중 phenolic compound 제제인 Listerine®(Warner-Lambart, K.K., Co. U.S.A.)은 일시적인 효과 내지는 미약한 정균효과를 보이는 정도이고⁶⁻⁸⁾, quaternary ammonium compound 제제인 cethylpyridinium chloride와 benzalkonium chloride 등은 일시적인 효과 이외에는 장기간 사용시 안전성이 미흡하여 여러 부작용들이 보고되었다⁹⁾. bisbiguanide제제 중 가장 널리 사용되는 chlorhexidine 제제는 강력한 항균 및 정균효과를 나타내고 있으나¹⁰⁻¹²⁾, 부작용으로 치아

이 연구는 1992년도 서울대학교 병원 임상 연구비의 지원에 대한 결과임

및 보철물에 착색을 일으키고¹³⁾, 쓴 맛 및 미각 이상^{14,15)}, 구강상피의 박리성 탈락¹⁶⁾, 균내성 발현¹⁷⁾, 장기간 사용시 발암성¹⁸⁾의 우려 등이 문제가 되므로 장기간 고농도의 사용은 금지되고 있다.

이상에서 살펴보면 치주질환의 병인균에 대해 선택적인 항균작용을 나타내면서 장기간 사용시 균교대 현상이나 균내성 발현, 치주조직의 박리성 탈락, 발암성 등이 완전히 배제될 수 있는 새로운 제제의 출현이 필요하다고 생각된다. 최근 수년간 생약에서 부터 추출된 항균성 물질의 관심이 높아지면서 이들 물질을 이용한 치주질환 예방 및 치료제 개발의 필요성이 강조되어오고 있는 바 이러한 물질중 후박(Magnoliae Cortex)에서 추출, 분리, 정제된 magnolol 및 honokiol은 안전도가 높고 항균효과, 항염효과가 높은 것이 증명되고^{19,20)} 이들 약제들의 치주질환과 관련된 표준균주에 대한 항균효과, 교원질 분해효소 활성을 억제시키는 정도 및 치은섬유아세포 및 치은상피세포, 치주인대세포에 대한 독성효과를 chlorhexidine 제제와 비교하고 cytokine 합성 억제 정도를 알아보고자 본 연구를 시행하였다.

II. 재료 및 방법

1. 항균효과의 검정

1) 항균제제

chlorhexidine digluconate는 Sigma 화학주식회사(미국)로 부터 구입하였고 honokiol과 magnolol은 생약제제인 후박에서 추출한 것으로 충남대학교 약학대학에서 기증받았다.

2) 실험 치주병인균의 배양 및 실험조건

혐기성 그람음성균인 *Porphyromonas gingivalis* 381, W 50, A7A1-27, *Prevotella intermedia* 25611, 9336, G8-9K-3, 통기성 그람음성균인 *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Y4, 67, 75.를 사용하였다. 이 세균들은 Trypticase soy agar(BBL, Co.Ltd.

U.S.A.)가 든 한천혈액배지(5% defibrinated rabbit blood)에 5 μ g/ml hemin과 0.5 μ g/ml menadione을 첨가하여 이 배지를 각각 혐기성 배양기 및 CO₂ 배양기에서 24시간 보관한 후에 혐기성 및 통기성 균을 각각 접종시켜 4-7일간 각각 순수 배양하였다. 혐기성 세균 배양으로는 37°C에 10%, CO₂, 10% H₂ 및 80% N₂가 혼합된 기체를 충전시킨 혐기성 배양기를 이용하였고 통기성 세균배양은 10% CO₂가 든 세균배양기를 사용하였다.

3) 항균효과의 검정

chlorhexidine digluconate, magnolol 및 honokiol은 최종농도가 각각 8 μ g/ml 되게 한 후 70% ethyl alcohol을 이용하여 2배씩 희석하여 사용하였다^{21,22)}. 희석된 작용액은 Millex GV filter(0.22 μ m, Millipore, U.S.A.)로 멸균하여 배지에 혼합사용하였다. 멸균된 한천배지 19ml에 1ml의 멸균, 희석된 항균제제를 첨가한 후 멸균된 혈액을 혼합하여 한천혈액배지를 제작하였다. 대조군 한천혈액배지로는 19ml의 한천배지에 1ml의 증류수 및 ethyl alcohol을 첨가하여 한천혈액배지를 제작한 후 사용하였다.

한천혈액배지에서 4-7일간 순수배양된 혐기성 및 통기성 세균을 각각 Trypticase soy broth에 접종하여 48-72시간 키워 세균수가 10⁷ cells/ml이 되도록 배양하였다.

이들 배양세균은 multi-inoculator를 이용하여 15 μ l씩을 각각 항균제가 들어있는 한천혈액배지에 접종시켰다. 이 접종배지는 혐기성 배양기 및 10% CO₂ 배양기에서 3-5일간 배양하여 세균의 성장 유무를 확인한 후 항균효과를 최소균성장 억제농도(minimum inhibitory concentration(MIC))로 표시하여 판정하였다²³⁾.

2. Crude Enzyme의 추출

crude enzyme은 Ono의 방법을 다음과 같이 변형하여 추출하였다²⁴⁾. 1 ml당 hemin 5 μ g과

menadione 0.5 μ g이 첨가된 Trypticase soy broth(BBL)에 3일간 37°C의 혐기성 배양기 (10% CO₂, H₂, and 80% N₂)에서 *P. gingivalis* (W50), *P. intermedia* (G8-9K-3), *A. actinomycetemcomitans* (AaY4)를 배양하였다.

이 세포들은 12,000xg에서 20분 동안 원심분리를 통해 제거되고 그 상층액을 침전시켜 최종농도가 80% 되게 한다. 침전물은 12,000xg에서 20분 동안 원심분리하여 2mM CaCl₂를 포함하는 Tris-HCl buffer (pH 7.5) 50 mM 30 ml에 용해시킨다. 이 suspension을 같은 buffer에 완전히 투석시키며 투석된 crude enzyme는 0.22 μ m filter에 통과시켜 본 연구에 사용하였다. crude enzyme의 단백질 함유량은 Lowry법에 의한 정량분석결과 392 μ g/ml이었다²⁵.

3. 교원질 분해 활성에 대한 분석

교원질분해활성은 Nagai등²⁶의 Collgenokit CLN-100(Collagen Technological Co.)를 사용하여 결정하였다.

분석할 혼합물은 50mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) 0.1 ml와 brown tube에서 0.05% fluoresceinisothiocyanate (FITC)-conjugated collagen type I으로 구성된 substrate solution 0.2 ml로 이루어져 있다. 효소반응은 crude enzymes 0.2 ml를 각각 첨가하여 실행한다. blank실험 및 표준실험에서는 5mM CaCl₂를 함유한 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5)를 crude enzyme 대신 사용하였다. 분석하고자 하는 이들 혼합물들은 35°C에서 120분 동안 배양하였다. 이 반응은 50% ethanol에 80 mM σ -phenanthroline 10 μ l를 첨가하여 중단시킨다. 그리고 나서 이 혼합물을 37°C에서 60분간 더 배양하였고 표준튜브는 80°C에서 10분간 가열하였다. 70% ethanol 0.5 mM을 첨가한 후 각 혼합물들을 세계 흔들고 나서 바로 3,000rpm에서 10분간 원심분리하였다. 부유물의 형광정도(Fluorescence Intensity : FI)는

520nm(Em)/495nm(Ex)에서 spectrofluorophotometer로 측정하였다. collagenase activity(U/ml)는 다음의 공식에 따라 계산하였다.

$$1U = \frac{FI \text{ enzyme} - FI \text{ blank}}{FI \text{ standard} - FI \text{ blank}} \times 100 (\mu\text{g}) \\ \times \frac{1}{120 (\text{min})} \times \frac{1}{0.2 (\text{ml})}$$

위 공식에서 1U는 분(分)당 1 μ g의 교원질을 소화하는 것을 나타낸다.

교원질 분해 활성이 억제에 관한 연구는 위의 분석 system에서 50mM Tris-HCl buffer 대신 50mM Tris-HCl buffer에 0.1ml sample 용액 0.1 ml을 혼합하여 사용하였다. 억제 정도는 시험물질이 없는 대조군의 억제 정도와 비교하여 백분율로 표시하였다^{27,28}.

4. 섬유아세포 배양과 독성검사

본 연구에서는 정상 인체 섬유아세포가 사용되었다. 세포들은 10% fetal bovine serum (FBS), 100IU/ml penicillin, 그리고 100 μ g/ml streptomycin sulfate가 첨가된 α -minimum essential medium(α -MEM)이 들어있는 37°C의 5% CO₂ 플라스틱 병에서 배양하였다. 섬유아세포는 편평한 세포층을 형성할 때까지 배양하였고, 0.02% EDTA-2.5% trypsin-PBS(10:1:9)가 들어 있는 플라스틱 병에서 분리해 내었다. 이 세포들은 α -MEM FBS 10% medium으로 세척하고 같은 medium에서 1 \times 10⁵ cells/ml로 조정하였다. 다음날 배양액을 교환하고 이틀째 되는 날 배양액을 제거해서 Hank's balanced salt solution(HBSS)으로 세척하였다. 각 약제들을 가한 배양액을 200 μ l씩 첨가하였다. 이들을 37°C, 5% CO₂ 습도 95% 배양기에서 24시간 배양하였고, 배양이 끝난 후 생리식염수에 용해한 MTT(Methyl Thiazol-2-YL-2,5-diphenyl Tetrazolium bromide)용액 50 μ l를 각 well에 넣고 4시간 동안 배양한 후 MTT용액을 버리고 form-

azon 결정을 용해시키기 위해 dimethyl sulfonide(DMSO)를 50 μ l씩 첨가하였다. plate를 잘 흔든 후 ELISA reader(THERMO max™, Molecular Devices Co., CA, U.S.A.)로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군으로는 매 실험마다 실험용액이 들어있지 않은 α -MEM 배양액 well(control)을 사용하였다.

모든 실험결과는 대조군에 대한 백분율로 계산하였다.

5. 치은상피세포 배양과 독성검사

서울대학병원에 교정치료를 위하여 내원한 환자의 제일 소구치의 치은에서 정상치은조직을 채취하여 항생제(penicillin-streptomycin)가 함유된 calcium and magnesium-free Hank's balanced salt solution(CMF-HBSS, Gibco, Grand Island, NY)으로 4회 반복하여 세척한 후 가능한 결체조직층을 제거하였다. 그후 치은조직에 collagenase(grade II, 150 units/ml)와 dispase(2.4 mg/ml)가 함유된 CMF-HBSS를 첨가하여 37°C에서 배양한 다음 상피조직층만을 분리하였다. 상피조직층을 가늘게 자른후 0.05% trypsin-EDTA용액을 첨가하고 교반시켜 상피세포를 얻은 다음 CMF-HBSS로 수회 반복하여 세척하고 표준혈구 계산기로 세포수를 세고 접종한 후 keratinocyte growth medium(KGM, Clonetics Corp., San Diego, Ca. U.S.A.)으로 세포 배양을 실시하여 구강각화상피세포를 얻었다. 세포가 표면에 연속한 상태가되면 세포배양을 실시하여 24-well plate에 well당 1 \times 10⁴개의 세포를 접종한 후 KGM으로 배양하여 세포가 약 70% 정도 표면에 연속한 상태가 된다음 [³H]-thymidine incorporation(DNA합성)에 미치는 magnolol, honokiol, chlorhexidine의 영향을 liquid scintillation counter(LS 5000 TA, Beckman)로 측정하였다.

6. 치주인대세포 배양과 독성검사

치주인대 조직을 채취하기 위하여 서울대학병원에 교정치료를 위하여 내원한 환자의 제일 소구치 치근의 치경부측 1/3을 큐렛으로 치은 조직을 제거한 후 발거하여 100 U/ml penicillin과 100 μ g/ml streptomycin이 첨가된 α -MEM생검 배지에 침수시켰다. 생검배지로 5회 세척후 치근 중간 1/3부위의 치주인대를 채취하여 세절한 다음 세포배양접시에 고르게 분산시켜 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin 및 10% FBS가 첨가된 α -MEM을 이용하였다. 세포배양을 시행하였으며 3일 간격으로 배양액을 교환해 주면서 밀생할 때까지 배양하였다. 배양시 습도는 95%, 온도는 37°C를 유지하면서 95%의 공기와 5%의 CO₂를 계속 공급하였다. 계대 배양한 치주인대 세포를 0.25% Trypsin-EDTA용액으로 처리한 후 원심 분리하여 배양액으로부터 세포부유액을 만들고 표준혈구 계산기로 well당 1 \times 10⁵개의 세포수가 되게하여 접종 후 배양하였다. 다음날 배양액을 교환하고 이틀째 되는 날 배양액을 제거해서 HBSS로 세척하였다. chlorhexidine과 honokiol은 ethyl alcohol을 용매로 하여, magnolol은 DMSO를 용매로 하여 녹인다음 각 추출물과 배양액이 200 μ l가 되게 하였다. 이들을 습도는 95% 온도는 37°C를 유지하면서 95%의 공기와 5%의 CO₂를 계속 공급하면서 24시간 배양하고 배양이 끝난 후 생리 식염수에 용해한 MTT용액 50 μ l를 각 well에 넣고 4시간 동안 배양한 후 MTT용액을 제거하고 formazon결정을 용해시키기 위해 DMSO를 50 μ l씩 첨가한다. plate를 잘 흔든 후 ELISA reader로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군으로는 매 실험마다 실험용액이 들어있지 않은 α -MEM 배양액 well을 사용하였다. 실험결과는 대조군에 대한 백분율로 계산하였다.

7. Cytokine생산 억제능력 분석

(1) 세포의 준비 및 취급

표준혈구 계산기로 세포수를 센다음 24 well plate에 well당 5×10^5 개의 세포를 접종하였다. 24시간 동안 배양한 후 배양액을 제거하여 HBSS로 세척하였다. 그리고 lipopolysaccharides(LPS) $10 \mu\text{g/ml}$ 과 honokiol, magnolol, chlorhexidine을 넣고 다시 24시간 배양한 후 배양액을 모으고 HBSS로 세척하여 이를 다시 모은 뒤 0.02% EDTA-2.5% trypsin-PBS (10 : 1 : 9)로 세포를 분리해서 이를 원심분리하여 상층액을 모은 뒤 세포들은 따로 모은다. 세포속에 함유되어 있는 cytokine을 추출하기 위해 세포를 3회 냉동-해동시킨 다음 세포들을 4°C 에서 30분 동안 0.5 ml sterile phosphate buffer(PBS, pH 7.2, 13mM phosphate, 0.15 M NaCl)에 녹이고 부유시킨 뒤 2,000xg에서 10분 동안 원심분리시켰다. Sample A라고 정한 상층액을 cytokine 결정을 위해서 모아 두었다. 침전물은 branson sonifier cell disrupter B15(Fisher, U.S.A.)를 사용해서 4°C 에서 2분동안 sonication시킨 후 0.5 ml PBS에 다시 부유시켰다. 이 튜브를 원심분리시키고 cytokine 결정을 위해서 상층액을 모았다(Sample B). 그리고 pellet은 냉동(-20°C), 해동(37°C)을 통해서 0.5 ml PBS에 다시 부유시킨 후 원심분리시켰다. 상층액은 다시 cytokine의 결정을 위해서 모았다(Sample C). cytokine을 함유한 Sample A, B, C 총량을 더해서 cytokine의 총량이라 하였다.

(2) IL- 1β , IL-6, TNF- α 의 정량화

IL- 1β 의 농도는 high sensitivity Interleukin- 1β ELISA kit(Cistron Biotechnology)를 이용하여 측정하였다. 상기 ELISA kit의 well에 honokiol, magnolol, chlorhexidine 및 α -MEM, LPS, non-specific binding(NSB) well을 복제로 측정하였다. 각 well에 $100 \mu\text{l}$ 씩 첨가하고 NSB well은 zero standard로 하였다(Matrix with No IL- 1β). well을 덮고 plate를 37°C 에서 20분간 배양하였다. well을 wash buffer로 3회 철저히 세척하였다. 세척 과정 중 wash buffer로 각 well당 $200\text{-}300 \mu\text{l}$ 를 dispended한 뒤 30초후 aspiration하고 이를

반복하여 마지막 세척후 깨끗한 종이수건으로 excess wash buffer를 제거한 후 각 well에 $100 \mu\text{l}$ IL- 1β antiserum(rabbit)을 첨가하고, 다시 37°C 에서 20분간 배양하였다. 상기한 방법으로 반복 세척한 후 각 well에 $100 \mu\text{l}$ 의 anti-rabbit Ig G-GRP conjugate를 첨가하였다. well을 덮은 뒤 plate를 실온에서 20분간 배양한 뒤 상기한 방법으로 세척하고 각 well에 4N sulfuric acid를 $50 \mu\text{l}$ 첨가하고 15분 안에 reading하도록 하였다. ELISA reader를 450 nm 에 맞추고 흡광도를 측정하였다. IL-6 및 TNF- α 의 농도도 동일한 방법으로 interleukin-6, TNF- α ELISA kit(Genzyme)을 이용하여 측정하였다.

III. 연구성적

chlorhexidine, magnolol 및 honokiol의 치주병인균에 대한 최소균 성장 억제농도는 chlorhexidine이 가장 저농도($1\text{-}20 \mu\text{g/ml}$)에서 그람 음성 혐기성 및 통기성 균의 성장을 억제하고 있으며 honokiol은 중증도의 농도($20\text{-}160 \mu\text{g/ml}$)에서 최소균 성장 억제 효과가 나타났고 magnolol은 $20\text{-}640 \mu\text{g/ml}$ 까지 넓은 폭으로 최소균 성장 억제 효과가 나타났다(표 1).

표 1. Minimum inhibitory concentrations of chlorhexidine, magnolol and honokiol

organism	minimum inhibitory concentration($\mu\text{g/ml}$)		
	magnolol	honokiol	C-H
<i>P. gin</i> 381	320	160	5
W 50	40	20	1
A7A1-28	40	20	10
<i>P. int</i> 25611	80	20	10
9336	320	160	20
G8-9K-3	40	40	10
<i>A. a</i> Y4	40	40	20
67	20	80	1
75	640	80	20

crude enzyme의 교원질 분해 활성에 대한 honokiol, magnolol 및 chlorhexidine의 억제 효과는 시험물질이 없는 대조균의 억제 정도와

비교하여 백분율로 표시하였다(표 2). 1000 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 chlorhexidine, honokiol 및 magnolol은 각각 52%, 47%, 41%이었고 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 각각 43%, 42%, 37%의 억제효과를 보였다. chlorhexidine이 억제효과가 가장 컸으며 honokiol, magnolol 순이었다.

표 2. Inhibitory effects of magnolol, honokiol and chlorhexidine on collagenolytic activity

sample	conc. ($\mu\text{g/ml}$)	activity (mU/ml)	inhibition (%)
control	-	2634.8	-
magnolol	1,000	1562.2	41
	100	1658.4	37
honokiol	1,000	1396.4	47
	100	1528.2	42
chlorhexidine	1,000	1264.7	52
	100	1501.8	43

honokiol과 magnolol 그리고 chlorhexidine의 섬유아세포에 대한 영향을 검정한 결과는 표 3과 같다. 세포 배양액인 α -MEM에서의 활성을 100으로 한 백분율로 나타낸 결과 honokiol, magnolol, chlorhexidine은 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 각각 50.85%, 49.93%, 31.81%, 그리고 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 각각 51.09%, 48.81%, 32.26%의 세포활성도를 나타냈다.

lipopolysaccharides(LPS)를 첨가한 경우 honokiol과 chlorhexidine의 경우 모두 LPS를 첨가하지 않은 경우에 비해 세포활성이 약간 감소하였다. 그러나 magnolol의 경우 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 LPS를 첨가한 경우는 감소하였으나 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 오히려 증가하였다. 이상의 결과에서 보면 세포의 활성은 LPS에 의해 억제되나 이를 magnolol이나 honokiol이 LPS의 세포활성억제 작용을 약화시켜주며 그 효과는 magnolol이 가장 우수하며 그 다음이 honokiol 그리고 chlorhexidine 순으로 나타났다.

표 3. Cell cytotoxicity of honokiol, magnolol and chlorhexidine on human gingival fibroblasts

sample	conc.	mean (%)	mean(+LPS) (%)
LPS control(α -MEM)	100 $\mu\text{g/ml}$		28.56
		100	
honokiol	100 $\mu\text{g/ml}$	50.85	49.70
	50 $\mu\text{g/ml}$	51.09	45.01
chlorhexidine	100 $\mu\text{g/ml}$	31.81	30.06
	50 $\mu\text{g/ml}$	31.26	29.50
magnolol	100 $\mu\text{g/ml}$	49.93	56.55
	50 $\mu\text{g/ml}$	48.81	43.93

honokiol과 magnolol이 치주인대세포에 대한 영향을 검정하기 위한 MTT 측정결과는 표 4와 같다. α -MEM에서의 세포활성을 100으로 한 백분율로 나타낸 결과 honokiol, magnolol, chlorhexidine은 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 85.03%, 78.24%, 72.99%, 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 87.37%, 82.22%, 74.88%의 세포활성도를 나타냈다. honokiol에서 치주인대 세포의 활성이 가장 높았고 chlorhexidine에서 가장 낮았다.

LPS를 첨가한 경우 모든약제에서 LPS를 첨가하지 않은 경우에 비해 세포 활성이 감소하였다. LPS의 세포에 대한 독성을 모든 약제가 억제 시켜주며 그 효과는 honokiol, magnolol, chlorhexidine 순으로 나타났다.

표 4. Cell cytotoxicity of honokiol, magnolol and chlorhexidine on human periodontal ligament cells

sample	conc.	mean (%)	mean(+LPS) (%)
LPS Control(α -MEM)	100 $\mu\text{g/ml}$		25.54
		100	
honokiol	100 $\mu\text{g/ml}$	85.03	62.25
	50 $\mu\text{g/ml}$	87.37	68.57
chlorhexidine	100 $\mu\text{g/ml}$	72.99	53.71
	50 $\mu\text{g/ml}$	74.88	48.14
magnolol	100 $\mu\text{g/ml}$	78.24	61.22
	50 $\mu\text{g/ml}$	82.2	65.33

honokiol, magnolol 및 chlorhexidine의 치은상피세포에 대한 독성검사는 Liquid Scintillation Counter (LS 5000TA, Beckman)를 이용하여 측정된 결과 표 5와 같은 결과를 얻었다.

KGM에서의 세포의 활성을 100으로 한 백분율로 나타낸 결과 honokiol, magnolol, chlorhexidine은 10 μ g/ml의 농도에서 1.16%, 2.30%, 0.33%, 1 μ g/ml의 농도에서 24.83%, 59.00%, 12.30%의 세포 활성도를 나타냈다. chlorhexidine이 상피세포에 대한 독성이 가장 강하였고, honokiol, magnolol순이었다.

표 5. Cell cytotoxicity of honokiol, magnolol and chlorhexidine on human gingival epithelial cells

sample	conc. (μ g/ml)	mean (%)
honokiol	10	1.16
	1	24.83
chlorhexidine	10	0.33
	1	24.83
magnolol	10	2.30
	1	59.00

honokiol과 magnolol의 cytokine합성에 미치는 영향은 Interleukin-1 β ELISA kit (Cistron·Biotechnology)를 이용하여 측정된 결과 표 6과 같았다.

IL-1 β 의 함량은 LPS의 경우 가장 높게 나타났으며 세약제간에는 큰 차이는 없었고 세약제모두가 생산을 억제하는 것으로 나타났다.

표 6. Inhibition of interleukin-1 β synthesis

sample	optical density	conc. (pg/ml)
α -MEM	0.050	210.0
LPS	0.059	232.5
honokiol	0.046	205.0
magnolol	0.048	205.0
chlorhexidine	0.049	207.5

honokiol과 magnolol의 cytokine합성에 미치는 영향은 Interleukin-6 ELISA kit (Gen-

zyme)를 이용하여 측정된 결과 표 7과 같았다.

표 7. Inhibition of interleukin-6 synthesis

sample	optical density	conc. (pg/ml)
α -MEM	0.0725	60
LPS	0.349	592
honokiol	0.271	441
magnolol	0.281	460
chlorhexidine	0.258	417

control인 α -MEM에 비해서 LPS에서 가장 많이 생성되었고 그다음에 magnolol, honokiol, chlorhexidine순으로 나타났다. 세약제가 모두 IL-6의 생성을 억제하였다.

honokiol과 magnolol의 cytokine 합성에 미치는 영향은 TNF- α ELISA kit (Genzyme)를 이용하여 측정된 결과 표 8과 같았다.

표 8. Inhibition of tumor necrosis factor- α synthesis

sample	optical density	conc. (pg/ml)
α -MEM	0.425	129
LPS	1.200	387.3
honokiol	0.966	309.3
magnolol	0.955	305.7
chlorhexidine	1.092	351.3

다른 cytokine과 유사하게 LPS에서 가장 많이 생성이 되었고 그다음에 chlorhexidine, honokiol, magnolol 순으로 나타났다.

IV. 총괄 및 고안

치주질환 예방 및 치료를 위해 오랫동안 효과적으로 사용되어온 약제의 대표적인 것으로 chlorhexidine을 들 수 있는데 이에 대한 부작용으로 치아 및 보철물에 착색을 일으키고¹²⁾, 쓴 맛 및 미각 이상^{14,15)}, 구강상피의 박리성 탈락¹⁶⁾, 균 내성 발현¹⁷⁾, 장기간 사용시 발암성의 우려¹⁸⁾ 등이 문제가 되어 이를 대체할 수 있는 새로운 항균제제의 필요성이 대두되었다.

후박이라는 한약재에서 추출한 magnolol 및 honokiol이 충치 원인균인 *Streptococcus mutans*에 대한 항균 효과를 가지고 있다는 것은 이미 실험을 통해 입증된 바 있고^{21,22)} 이들 물질의 치주질환의 대표적 병원균인 *P. gingivalis*, *P. intermedius* 그리고 *A. actinomycetemcomitans*에 대해서 항균 효과를 검정한 결과 chlorhexidine이 가장 저농도 (1-20 $\mu\text{g/ml}$)에서 그람 음성 혐기성 및 통기성균의 성장을 억제하고 있으며 honokiol은 중증도의 농도 (20-160 $\mu\text{g/ml}$)에서 최소균 성장 억제 효과가 나타났고 magnolol은 20-540 $\mu\text{g/ml}$ 까지 넓은 폭으로 최소균 성장 억제 효과가 나타나 우수한 항균 효과를 보이는 것으로 본 연구에서 나타났다. 기존의 항균제인 chlorhexidine보다는 강력하지는 않지만 상당한 정도의 항균 효과를 나타냈다.

chlorhexidine의 독성에 대한 연구는 오랫동안 사용해 오면서 연구도 활발히 진행되어 왔다. chlorhexidine은 치은상피 세포³⁰⁾, 치은 섬유아세포 및 신생 섬유아세포³¹⁾에 독성 효과가 있는 것으로 알려져 있으며 Gabler 등은 호중구는 chlorhexidine의 농도가 100 $\mu\text{g/ml}$ 이상이 되면 세포 용해가 일어난다고 보고하였으며³²⁾, Helgeland 등은 25 $\mu\text{g/ml}$ 이상이 되면 상피 세포의 성장을 억제한다고 보고하였고³⁰⁾, 치은 섬유아 세포는 40 $\mu\text{g/ml}$ 이상이 되면 세포 기능 이상이나 세포가 죽는다고 보고하였다³³⁾. chlorhexidine의 창상 치유 과정에 미치는 영향으로 창상치유를 지연시킨다는 보고도 있고³³⁻³⁵⁾ 또 오히려 세균을 죽임으로서 창상 치유에 도움이 된다는 보고도 있다³⁶⁾. 또 chlorhexidine의 세포독성으로 인하여 결합조직에 직접 노출이 되지 않도록 주의 해야 한다³⁷⁾.

honokiol, magnolol 및 chlorhexidine의 치은 섬유아 세포, 상피 세포, 치주인대세포에 대한 독성을 검사한 결과 모든 세포에서 chlorhexidine이 가장 독성이 심한 것으로 나타났다. 이러한 독성의 기전에 의해 장기간 사용시 구강내 점막에 궤양을 일으키는 것으로 생각되며 치주조직 창상 치유에 미치는 영향에

대한 연구가 더 필요할 것으로 생각된다.

교원효소는 치주염에서 보이는 대부분의 조직 파괴와 연관되어 있는 metalloproteinase 효소군에 속한다³⁸⁾. 치은 조직이나 치은열구내에 존재하는 교원질 분해 활성은 염증의 정도가 증가함에 따라 거의 비례하여 그 양이 증가하는 것으로 보고되었다³⁹⁻⁴¹⁾. 또한 치주낭 깊이나 치조골 소실의 증가와 관련하여 치은열구액내 교원질 분해 활성이 증가하고⁴²⁻⁴⁶⁾ 병소 부위에서는 건강하거나 치료를 받은 부위에 비해 총효소와 활성효소의 양이 유의성있게 증가하는 반면 효소 억제인자의 활성은 낮아지는 것으로 보고되었다⁴⁷⁾.

*P. gingivalis*는 성인성 치주염, 급성 진행성 치주염과 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져 있는데⁴⁸⁻⁵⁰⁾, 이 세균의 교원효소는 조직 교원질을 직접 파괴시킬 수 있고⁵¹⁾ 치은 섬유아세포의 증식을 억제할 수 있기 때문에⁵²⁻⁵⁴⁾ 치주질환의 발생과 진전에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.

이 연구에서는 후박에서 추출한 honokiol과 magnolol과 같은 생약제제가 이러한 교원질 분해 효소 활성을 어느 정도 억제할 수 있는지를 알아보는데 honokiol과 magnolol과 같은 생약제제가 이미 잘 알려진 우수한 항균제인 chlorhexidine에 가까운 수준의 억제효과를 나타내는 것으로 본 연구에서 관찰되었다. 후박은 한약제로서 오랜동안 사용되었고 무독성의 생약제로 간주되어 왔으므로 여기서 추출한 honokiol과 magnolol은 세포독성이 chlorhexidine에 비해 낮았다.

cytokine은 면역체계와 관련된 세포들에 의해 만들어지는데 이 물질을 분비하는 세포는 단핵세포, 임파구, 섬유아세포, 대식세포, 조골세포등이다⁵⁵⁾. 현재까지 약 50여종에 이르며 이들 cytokine은 세포와 세포사이의 생리학적, 병리생리학적 과정의 중요한 전달 기능을 하며 세포의 성장, 분화에 관련된 생물학적 과정을 조절하거나 중개한다⁵⁶⁾. 특히 치주질환에 영향을 미치는 cytokine으로 interleukin-1(IL-1)과, tumor necrosis factor(TNF) 등이 많이 알려져 있다. IL-1 β 나 TNF- α 는 치주질환 세

균을 포함한 세균의 lipopolysaccharides (LPS)에 반응하여 대식세포나 단핵세포에 의하여 분비되는 cytokine이며⁵⁷⁾, 섬유아세포를 자극하여⁵⁸⁾ 치주조직 파괴에 중요한 효소인 교원효소를 생산하게 하고⁵⁹⁻⁶¹⁾ 치조골 흡수를 야기하며⁶²⁾, 염증이 진행되는 치주조직에서 나타나고 있다⁶³⁾. 이러한 치조 조직 파괴에 영향을 미치는 cytokine의 생성을 억제하는 정도를 보기 위해 IL-1 β kit(Cistron Biotechnology Inc.) IL-6, TNF- α kit(Genzyme)를 이용하여 생약제제들이 Interleukin-1 β , IL-6, TNF- α 의 생성 억제정도가 어느 정도인지를 알아본 결과 IL- β 의 경우에는 honokiol이나 magnolol이 chlorhexidine보다 생성을 억제하였고 IL-6의 경우에는 chlorhexidine이 가장 생성을 억제하였고 그 다음이 honokiol, magnolol순이었으며 TNF- α 의 경우에는 magnolol이 가장 생성을 억제하였고 다음이 honokiol, chlorhexidine의 순으로 나타났다. 이상의 결과로서는 어느 한 약제가 cytokine 생성을 효과적으로 억제 한다고 할 수는 없었지만 cytokine 생성을 자극하는 LPS에 비해서는 모든 약제가 cytokine생성을 억제하였다.

그러나 IL-1 β 는 이미 치주질환과 관련하여 많은 연구가 진행되었으며 치주질환과 밀접한 관련이 있는 것으로 판명이 되었으나 IL-6, TNF- α 에 대해서는 앞으로 더욱 치주질환과의 연관성에 대한 연구가 필요하다고 생각되어진다.

이상에서와 같이, 치주질환의 예방과 치료제로서 honokiol과 magnolol과 같은 생약제제는 부작용을 최소화하면서도 우수한 항균·항염작용을 나타내는 것으로 관찰되었고 앞으로 이생약제제를 이용하여 실제 임상적인 실험을 통한 이 분야의 더 많은 연구가 필요할 것으로 생각한다.

V. 결 론

후박에서 추출한 honokiol과 magnolol이 치주병인균에 대한 항균, 교원질 분해효소, 독성 그리고 cytokine 합성에 미치는 영향에 관하여

chlorhexidine과 비교 연구한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. honokiol은 magnolol에 비해 강한 항균효과를 보였으며 chlorhexidine에 비해서는 항균효과가 약하게 나타났다.
2. *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *A. actinomycetemcomitans*의 crude enzyme의 교원질 분해활성은 chlorhexidine, honokiol, magnolol의 순으로 억제되었다.
3. honokiol과 magnolol은 chlorhexidine에 비해 치은 섬유아 세포, 치주인대세포 및 치은상피세포에 독성을 적체 미치는 것으로 나타났다.
4. bacterial LPS에 의한 세포독성의 억제효과는 chlorhexidine보다 magnolol 및 honokiol에서 더 강력하게 나타났다.
5. honokiol, magnolol, chlorhexidine은 bacterial LPS에 비해 IL-1 β , IL-6, TNF- α 의 생성억제 능력이 우수하였고 세 약제간의 큰 차이는 없었다.

REFERENCES

1. Rodenburg JP, AJ van Winkelhoff, EG Winkel, RJ Goene, F Abbas and J De Graaff. Occurrence of *B. gingivalis*, *B. intermedius* and *A. actinomycetemcomitans* in progressive periodontal disease in relation to age. J Clin Periodont 17:6;392-399, 1990.
2. Slots J, Bragd L, Wickstrom M and Dahlen G. The occurrence of *A. actinomycetemcomitans*, *B. gingivalis* and *B. intermedius* in destructive periodontal disease in adults. J Clin Periodont 13:570-577, 1986.
3. Slots J and Listgarten MA. *B. gingivalis*, *B. intermedius* and *A. actinomycetemcomitans* in human periodontal disease. J Clin Periodont 15:85-93, 1988.
4. Dahlen G, Manji F, Baelum V and Fejerskov

- O. BPB species and *A. actinomycetemcomitans* in subgingival plaque of adult Kenyans. *J Clin Periodontol* 16:305-310, 1989.
5. Wennstrom JL, Dahlen G, Svensson L and Nyman S. *A. actinomycetemcomitans*, *B. gingivalis* and *B. intermedius* predictors of attachment loss? *Oral Microbiol Immunol* 2:158-163, 1987.
 6. Gordon JM, Lamster IB, Seiger MC. Efficacy of Listerine antiseptic in inhibiting the development of plaque and gingivitis. *J Clin Periodontol* 12:697, 1985.
 7. Kornman KS. The role of supragingival plaque in the prevention and treatment of periodontal disease. A review of current concepts. *J Periodontal Res* 21:5, 1986.
 8. De Paola L, Overholser D, Meiller T, Minah C & Nichaus C. Chemotherapeutic reduction of plaque and gingivitis. *J Dent Res (Spec. Issue)* 65:274 (Abstr 941), 1986.
 9. Bonesvoll P, Gjermo P. A comparison between chlorhexidine and some quaternary ammonium compounds with to retention, salivary concentration and plaque inhibiting effect in the human mouth after mouth-rinses. *Archs Oral Biol.* 23:289, 1978.
 10. Lander PE, Newcomb GM, Seymour GJ and Powell RN. The antimicrobial and clinical effects of a single subgingival irrigation of chlorhexidine in advanced periodontal lesions. *J Clin Periodontol* 13:74-80, 1986.
 11. Mouth rinses in the treatment and prevention of gingivitis. Proceedings of a symposium, 11 December, 1987. *J Clin Periodontol* 15:485, 1988.
 12. Lang NP and Brex MC. Chlorhexidine digluconate-an agent for chemical plaque control and prevention of gingival inflammation. *J Periodontal Res* 21 (Suppl. 16): 74, 1986.
 13. Greenstein G, Berman C, Jaffin R. Chlorhexidine. An adjunct to periodontal therapy. *J Periodontol* 57:370, 1986.
 14. Case DE. Safety of Hibitane. I. Laboratory experiments. *J Clin Periodontol* 4:66, 1977.
 15. Gjermo P. Chlorhexidine in dental practice. *J Clin Periodontol* 1:143, 1974.
 16. Goldschmidt P, Cogen R, Taubman S. Cytopathologic effects of chlorhexidine on human cells. *J Periodontol* 48:4:212-215, 1977.
 17. Hamp SE, Lindhe J and Loe H. Long-term effect of chlorhexidine on developing gingivitis in the beagle dog. *J Periodont Res* 8:63, 1973.
 18. Bioassay of p-chloroaniline for possible carcinogenicity. U.S. Department of Health, Education and Welfare. Public Health Service, National Institutes of Health. DHEW publication No. (NIH) 79-1745, 1979.
 19. Bae KH and Oh HR. Synergistic effect of lysozyme on bacterial activity of magnolol and honokiol against a cariogenic bacterium, *Streptococcus mutans* OMZ 176. *Archives of Pharmacal Research*, 13(1), 117-119, (1990).
 20. Bae KH. The antibacterial activities of the components isolated from the stem bark of *Magnolia Obovata* against a cariogenic bacterium, *Streptococcus mutans* OMZ 176. 7th Symposium on Organic Chemistry Abstract, 34 (1987).
 21. Bae KH.: Proc. 2nd Int. Symposium on recent advances in natural products research. 221, 1989.
 22. Bae KH, Seo WJ, Park TJ. The antibacterial activities of p-phenylphenold derivatives against a cariogenic bacterium *Streptococcus mutans* Yakhak Hoeji, 35(1), 7-10 (1991).
 23. Guggenheim B, Schmid R. Chemical plaque

- control: What in vitro and animal test system are appropriate? *J Dent Res* 68 (special issue): 1645, 1989.
24. Ono M, Okuda K, and Takazoe I. Purification and characterization of a thiolprotease from *Bacteroides gingivalis* strain 381. *Oral Microbiol Immunol* 2, 77-81, 1987.
 25. Lowry OH, Rose Brogh NJ. Protein measurement with the Florin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193:65-275.
 26. Nagai H, Hori H, Hattori T, Sunada Y, and Terado K. A micro-assay method of collagenase activity and its application in the study of collagen metabolism in pathological tissues. *Inflammation* 4,123-130. (in Japanese), 1984.
 27. Osawa K, Matsumoto T, Maruyama T, Naito Y, Okuda K, and Takazoe I. Inhibitory effects of aqueous extract of cacao bean husk on collagenase of *Bacteroides gingivalis*. *The bulletin of Tokyo Dental College* Vol. 31, 125-128, 1990.
 28. Osawa K, Matsumoto T, Yasuda H, Kato T, Naito Y, Okuda K. The inhibitory effect of plant extracts on the collagenolytic activity and cytotoxicity of human gingival fibroblasts by *Porphyromonas gingivalis* crude enzyme. *The bulletin of Tokyo Dental College* Vol. 32 (No. 1) pp. 1-7, 1991.
 29. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immun. Methods.* 65:55-63, 1983.
 30. Helgeland K, Heyden G, Rolla G. Effect of chlorhexidine on animal cells in vitro. *Scand J Dent Res* 1971; 79:209-215.
 31. Goldschmidt P, Cogen R, Taubman S. Cytopathologic effects of chlorhexidine on human cells. *J Periodontol* 1977; 48:212-215.
 32. Gabler WL, Roberts D, Harold W. The effects of chlorhexidine on blood cells. *J Periodont Res* 1987; 22:150-155.
 33. Mobacken H, Wengstrom C. Interference with healing of rat skin incisions treated with chlorhexidine. *Acta Dermatovener* 1974; 54:29-34.
 34. Bassetti C, Kallenberger A. Influence of chlorhexidine rinsing on the healing of oral mucosa and osseous lesions. *J Clin Periodontol* 1980; 7:443-456.
 35. Saatman RA, Carlton WW, Hubben K, Spencer Streett C, Tuckosh JR, DeBaecke PJ. A wound healing study of chlorhexidine digluconate in guinea pigs. *Fund Appl Toxicol* 1986; 6:1-6.
 36. Sanchez IR, Swaim SF, Nusbaum KE, Hale AS, Henderson RA, McGuire JA. Effects of chlorhexidine diacetate and povidone-iodine on wound healing in dogs. *Vet Surg* 1988; 17:291-295.
 37. Pucher JJ, Daniel JC. The effects of chlorhexidine digluconate on human fibroblasts in vitro. *J Periodontol* 1992; 62:526-532.
 38. Page RC. The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodont Res* 26:230-242, 1991.
 39. Kowashi Y, Jaccard F, Cimasoni G. Increase of free collagenase and neutral protease activities in the gingival crevice during experimental gingivitis in man. *Arch Oral Biol* 24:645-650, 1979.
 40. Lamster IB, Vogel RI, Hartley LJ, DeGeorge CA, Gordon JM. Lactate dehydrogenase, β -glucuronidase and arylsulfatase activity in gingival crevicular fluid associated with experimental gingivitis in man. *J Periodontol* 56:139-147, 1985.
 41. Overall CM, Wiekin OW, Thonard JC.

- Demonstration of tissue collagenase activity in vivo and its relationship to inflammation severity in human gingiva. *J Periodont Res* 22:81-88, 1987.
42. Villela B, Cogen RB, Bartolucci AA, Birke-dal-Hansen H. Collagenolytic activity in crevicular fluid from patients with chronic adult periodontitis, localized juvenile periodontitis and gingivitis and from healthy control subjects. *J Periodont Res* 22:381-389, 1987.
 43. Larivee J, Sodek J, Ferrier JM. Collagenase and collagenase inhibitor activities in crevicular fluid of patients receiving treatment for localized juvenile periodontitis. *J Periodont Res* 21:702-715, 1986.
 44. Overall CM, Sodek J. Initial characterization of a neutral metallo-proteinase, active on native 3/4-collagen fragments, synthesized by ROS 17/2.8 osteoblastic cells, periodontal fibroblasts and identified in gingival crevicular fluid. *J Dent Res* 66: 1271-1282, 1987.
 45. Golub LM, Seigel K, Rammurthy NS, Mandel ID. Some characteristics of collagenase activity in gingival crevicular fluid and its relationship to gingival disease in humans. *J Dent Res* 55:2049-1057, 1976.
 46. Hakkarainen K, Uitto V-J, Ainamo J. Collagenase activity and protein content of sulcular fluid after scaling and occlusal adjustment of teeth with deep periodontal pockets. *J Periodont Res* 23:204-210, 1988.
 47. Hamada S, Holt S, McGhee JR. Periodontal disease: Pathogens & Host Immune Response. Quintessence Publishing Co., Ltd., 1991.
 48. Moore WEC, Holdman LV, Smibert RM, Hash DE, Burmeister JA and Ranney RR. Bacteriology of severe periodontitis in young adult humans. *Infect Immun* 22:215-218, 1982.
 49. White D and Mayrand D. Association of oral *Bacteroides* with gingivitis and adult periodontitis. *J Dental Health* 35:636-637 (in Japanese) 1981.
 50. Zambon JJ, Reynolds HS and Slots J. Black pigmented *Bacteroides* spp. in the human oral cavity. *Infect Immun* 32:198-203, 1981.
 51. Gibbons RJ and MacDonald B. Degradation of collagenous substrates by *Bacteroides melaninogenicus*. *J Bacterial* 81:614-621, 1961.
 52. Hanazawa S, Ohmori Y, Nishihara H, Fujiwara S, Saitoh K and Kitano S. Inhibition of proliferation of fibroblast cell line by culture of *Bacteroides gingivalis*. *Jpn J Oral Biol* 26:269-272, 1984.
 53. Maehara R, Terai H, Morioka M, Hinode D, Matsuda N, Tanaka T and Nakamura R. Cytotoxic activity for collagenolytic enzyme from *Bacteroides gingivalis* and the effect of inhibitors on human gingival fibroblasts. *J Dent Health* 38:594-595. (in Japanese) 1988.
 54. Nakamura R, Hinode D, Terai H, Morioka M, Maehara R, Sato M, Tanaka T, Matsuda N and Nakamura M. Isolation of a collagenase inhibitory substance from soybean which is specifically active on the enzyme from *Bacteroides gingivalis* and its effect on the cell culture of human gingival fibroblast. *J Dental Health* 39:329-329. (in Japanese). 1989.
 55. Geryl and Waksman BH. Potentiation of the T-lymphocyte response to mitogens. The cellular source of potentiating mediators. *J Exp Med.* 136:143, 1972.

56. Le J and Vilcek J. Tumor necrosis factor and interleukin 1. *Lab. invest.* 56(3). 234, 1987.
57. Lindermann RA, Economou JS and Rothermel H. Production of interleukin-1 and tumor necrosis factor by human peripheral monocytes activated by periodontal bacteria and extracted lipopolysaccharides. *J Dent Res* 68:1131, 1988.
58. Dayer JM, Beutler B and Cerami A. Cachectin/tumor necrosis factor stimulates collagenase and prostaglandin E₂ production by human synovial cells and dermal fibroblasts. *J Exp Med.* 162:163, 1985.
59. Rossomando EF, Gronwicz TG, Handjimaedl J, Rutherford RB. TNF induced shape changes in dental fibroblasts. *J Leuk Biol* 42:558, 1987.
60. Meikle MC, Alkinson SJ, Ward RV, Murphy J and Reynolds JJ. Gingival fibroblasts degrade type I collagen films when stimulated by metalloproteinase. *J Periodont Res* 24:207, 1989.
61. Meikle MC, Heath JK and Reynolds JJ. Advances in understanding cell interactions in tissue resorption. Relevance to the pathogenesis of periodontal disease and a new hypothesis. *J Oral Path* 15:239, 1988.
62. Bertolini DR, Nedwin GE, Bringman TS, Smith DD, Mundy GR. Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation in vitro by human tumor necrosis factors. *Nature*, 319:516, 1986.
63. Offenbacher S, Pinnix K and Odle B. Measurement of tumor necrosis factor in inflamed periodontal tissue. *J Dent Res* 67:156, 1988.

- Abstract -

THE EFFECTS OF HONOKIOL AND MAGNOLOL ON THE ANTIMICROBIAL, BACTERIAL COLLAGENASE ACTIVITY, CYTOTOXICITY AND CYTOKINE PRODUCTION

Beom - Seok Jang, Chong - Pyoung Chung, Seong - Heai Son, Ki - Hwan Bae*

Department of Periodontology, College of Dentistry, Seoul National University

**College of Pharmacy, Chung nam National University*

The oral microbiota such as *P. gingivalis*, *P. intermedia* and *A. actinomycetemcomitans* play a primary role in the initiation and progression of the periodontal disease. The purpose of this study was to evaluate the antimicrobial effects and inhibitory effects of honokiol and magnolol on the bacterial collagenase activity, cytotoxicity and cytokine production of periodontopathic microorganisms. The antimicrobial activities of honokiol and magnolol was evaluated with minimum inhibition concentration. Honokiol was more active than magnolol, but less than chlorhexidine on antimicrobial activity. The inhibitory effects of magnolol and honokiol on the collagenolytic activity and cytotoxicity were evaluated using a Collagenokit CLN-100 and rapid colorimetric assay (MTT method) for cellular growth and survival of gingival fibroblast and periodontalligament cell and [³H]-thymidine incorporation for the gingival epithelial cell. The inhibitory effects on the collagenolytic activity was the highest in chlorhexidine, and the lowest in magnolol. Magnolol had the lowest cytotoxic effect and chlorhexidine had the highest. The inhibitory effects on cytokine production was evaluated using interleukin-1 β ELISA kit (Cistron Biotech.), IL-6, TNF- α ELISA kit (Genzyme) and inhibitory effects were higher than bacterial LPS and there is no difference among the honokiol, magnolol and chlorhexidine.

From these results, the antimicrobial and antienzymatic activities of honokiol and magnolol were seemed to inhibit bacterial growth and enzyme activities with lesser cytotoxic activities. Therefore, it was suggested that honokiol and magnolol are very effective antimicrobial agents on periodontal pathogens.

Key words: Chlorhexidine, Magnolol, Honokiol, Antimicrobial agent