

## 생약추출물이 Interleukin-1 $\beta$ 의 생성 및 활성화에 미치는 영향

조기영 · 이용무 · 최상묵 · 정종평  
서울대학교 치과대학 치주과학교실

### I. 서 론

세균의 숙주 조직내 침입은 그 상태에 따라 다양한 염증반응과 면역병리학적 반응을 일으킨다. 병인균의 항원에 대응하여 숙주세포들은 여러가지 cytokine을 생성하게 되고 이 cytokine들은 류마티스성 관절염이나 치주질환과 같은 만성 염증성 질환의 진행에 중요한 요인으로 관여한다<sup>1-3</sup>. interleukin-1(IL-1)은 cytokine중에서 핵심이 되는 염증반응의 매개체로서<sup>4,5</sup> 대식세포에서 가장 많이 생성되며<sup>4</sup> 섬유아세포, 단핵구, 내피세포, 각질세포, 임파구 등 여러 종류의 세포에서<sup>6-9</sup>, 특정한 염증자극을 받았을 때 그 반응의 결과로 생성된다고 밝혀졌으며 IL-1의 생물학적 특성과 치주 질환의 병소에서 나타나는 발현 현상의 유사성으로 인해 치주 질환의 병인론과의 연관성이 연구되어 왔다. IL-1은 세포배양시 치은섬유아세포를 자극하여 교원분해효소와 prostaglandin(PG)을 생성하는데<sup>10-13</sup>, 이들이 치주조직의 파괴를 가중시킨다고 밝혀졌다. 또한 IL-1은 in vitro와 in vivo 에서 골흡수를 유발하는 골탈퇴화의 강력한 유도체로 작용하며, Tumor necrosis factor(TNF)와 같은 cytokine과 길항작용을 하여 골흡수를 촉진시키며, 골형성을 억제하는 작용도 한다고 밝혀졌다<sup>14-18</sup>. 성인성 치주염 환자에서 염증이 있는 부위의 치은열구액에서는 건강한 부위의 치은열구액에서보다 많은 양의

IL-1이 측정되며 IL-1의 활성화도도 높은 것으로 밝혀졌다<sup>19-23</sup>.

IL-1은 유전자구조에 따라 IL-1 $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$ 로 구분되는데<sup>24,25</sup>, 말초혈액 내의 단핵구에서 골골세포활성인자 활성화도의 60% 이상을 IL-1 $\beta$ 가 차지하고 있으며<sup>26,27</sup>, 골흡수의 활성화에 있어 IL-1 $\beta$ 는 IL-1 $\alpha$  보다 15배 강력하며 TNF- $\alpha$ 보다 500배 이상 강력하다고 밝혀졌다<sup>14,28,29</sup>. 치주질환의 질환활성도를 보이는 조직면에서는 비활성도를 보이는 조직면에서 보다 높은 IL-1 $\beta$ 농도를 나타내며<sup>30-32</sup>, 염증이 많은 치은 조직면에서 IL-1 $\beta$ 를 함유하는 세포가 많이 나타났다고 보고되는 등<sup>33</sup> 치주질환에 있어 IL-1 $\beta$ 의 작용은 중요한 요인으로 생각되고 있다.

치주질환의 치료와 예방에 사용되는 화학요법 제제는 항생제와 항균제가 주로 쓰여왔으나, 항생제는 장기간 사용시 나타나는 내성균의 발현과 균 교대현상등으로 인해, 그리고 가장 널리 쓰이고 있는 항균제인 chlorohexidine은 치아 변색이나 미각이상, 구강상피의 박리성 탈락, 균 내성 발현등으로 인해 장기간 고농도의 사용에는 적합하지 않다고 알려졌다<sup>34-37</sup>.

최근 수년간 생약에서 추출된 새로운 제제들이 연구, 개발되고 있는데 이들은 부작용이 적고 장기간 사용 가능하다는 점에서 관심이 모아지고 있다. 한방에서 오래 전부터 항균 및 항염, 진통 해열작용으로 사용해 온 생약제제들에 대한

\* 본 논문은 1993년도 서울대학교병원 지정연구비(02-93-238) 지원에 의한 결과임.

연구들이 치과영역에서 이루어져 왔다. 후박(Magnoliae Cortex)에서 추출, 분리하여 정제된 magnolol과 honokiol은 안전성이 높고 항균 및 항염효과가 높은 것으로 밝혀졌으며<sup>38,39)</sup> 황금(Scutellariae Radix)은 소염작용 및 해열작용이 확인되었고<sup>40)</sup> 이들은 모두 IL-1 $\beta$ 의 생성을 억제하는 것으로 나타났다<sup>41,42)</sup>. 또한 녹차(Theae Folium), 상백피(Mori radicis Cortex), 승마(Cimicifugae Rhizoma), 인삼사포닌(Ginseng Saponin) 등은 구강내 염증 완화, 소염, 진통등의 효과가 있는 것으로 보고되었다<sup>43,44)</sup>. 이 외에도 치과영역에서 아직 연구되지 않았지만 오미자(Schizandrae Fructus)는 진통 및 항염작용이 있고 이의 추출물 gomisins A는 간염 치료제로 사용되고 있으며<sup>45,46)</sup>, 대조(Zizyphi Fructus)는 진통 및 진정작용이 있고 항알레르기 작용이 있는 것으로 밝혀졌으며<sup>47,48)</sup>, 천문동(Asparagi Radix)은 항염 및 진해작용이 있는 것으로 알려져<sup>49)</sup> 이들을 사용하여 유사한 효과를 얻을 수 있을 것이라 추정할 수 있겠다.

본 연구의 목적은 치주질환에 있어 치주조직의 파괴에 중요한 인자인 IL-1 $\beta$ 의 생성과 활성화 과정에 미치는 생약추출물의 효과를 밝히기 위하여, 말초혈액으로 부터 분리 배양된 단핵세포가 lipopolysaccharide(LPS)를 촉진제로 하여 IL-1 $\beta$ 를 생성하는 과정에서 여러가지의 생약추출물이 억제효과가 있는지를 정량분석하고, 배양한 치은섬유아세포가 IL-1 $\beta$ 에 의해 prostaglandin E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>)를 생성하는 과정에서 이 생약추출물들의 영향을 정량분석하고, 쥐의 두개골을 배양하여 IL-1 $\beta$ 의 골흡수 유도과정에서의 영향을 조사하였다.

## II. 연구재료 및 방법

### 1. 약제의 준비

한방에서 소염작용이 있는 것으로 알려진<sup>50)</sup> 생약중 Glycyrrhizae Radix, Theae Folium, Zeae Stigma, Alpiniae Officinarum Rhizoma, Bupleuri Radix, Astragali Radix, Ginseng Radix,

Mori Cortex Radicis, Artemisiae capillaris Herba, Asparagi Radix, Zizyphi Fructus, Rhei Rhizoma, Rhois Galla, Lycii Fructus, Epimedii Herba, Schizandrae Fructus, Achyranthis Radix, Scutellariae Radix를 사용하여 혈액단핵세포에서의 IL-1 $\beta$ 의 생성과 치은섬유아세포에서의 PGE<sub>2</sub> 생성에 미치는 영향을 측정한 기초실험을 통하여 비교적 효과가 있는 것으로 나타난 천문동(Asparagi Radix), 오미자(Schizandrae Fructus), 대조(Zizyphi Fructus) 및 오배자(Rhois Galla)를 본 실험에 사용하였다.

실험에 사용한 생약추출물은 다음과 같은 방법으로 제조하였다. 각 생약제제 30g을 flask(500ml)에 넣어 물 200ml을 가하여 1시간 온침, 열시여과, 잔사에 물 200ml을 가하여 다시 30분간 끓여 잔사에 물 100ml로 씻어 합하였다. 여액에 농염산(36% HCl)을 1%가 되도록 가하여 하루 방치한후 석출물을 흡입여과하고 수세후 건조하였다. 이것을 flask(200ml)에 옮겨 methyl alcohol 150ml를 2회 온침(각 30분), 열시여과, 여액을 감압 농축하고 뚜껑을 덮어 방치하였다. 석출한 결정을 흡입여과하고 건조후 60% ethyl alcohol로 10%농도로 용해하여 사용하였다.

### 2. 생약 추출물의 IL-1 $\beta$ 생성에 미치는 영향

#### 1) 단핵세포 분리배양

전신질환이 없는 건강한 성인으로부터 heparin을 항응고제로 사용하여 60-120 ml의 정맥혈액을 채집하였다. 채집된 정맥혈액을 Histopaque-1077(Sigma사, 미국)을 이용한 밀도차 원침법을 이용하여 단핵세포를 분리하였다. 분리된 단핵세포는 phosphate buffer solution(PBS)으로 2-3회 세척하여 10% fetal bovine solution(FBS), 100U/ml penicillin과 100 $\mu$ g/ml streptomycin 이 함유된 RPMI 1640 배지(GIBCO사, 미국)로 95% 공기, 5% CO<sub>2</sub>, 100% 습도 조건하에서 무균적으로 배양하였다.

2) 혈액단핵세포에서 생약추출물이 IL-1 $\beta$  생성에 미치는 영향

배양된 혈액단핵세포를 24 well plate 에 10<sup>6</sup> cell/well 로 분주하고 첨가물을 가하지 않은 RPMI 1640 배지를 대조군으로 하고 E. coli LPS(25 $\mu$ g/ml)를 첨가한 well과, LPS(25 $\mu$ g/ml)와 prednisolone(10nM/ml)을 첨가한 well 및 LPS(25 $\mu$ g/ml)와 각 생약추출물(10 $\mu$ l)을 첨가한 well을 실험군으로 하여 48시간 동안 부유 배양하였다. 배양후 각 세포부유액을 모아 400xg으로 10분간 원침시키고 상층액을 모아 측정전까지 -80°C 상태로 동결 보관하였다. 생산된 IL-1 $\beta$ 의 양은 thymocyte stimulation assay 로 측정하였다. 4-6주된 C3H/HeJ mice를 희생시켜 thymus를 무균적으로 적출하여 PBS로 세척한 후 RPMI 1640배지가 담긴 Petridish에 놓고 소독된 ground glass slide 로 가볍게 비벼 부셨다. cell suspension 을 10분간 100xg으로 원침시킨후 cell을 모아 신선한 배지로 10<sup>7</sup> cell/ml로 cell suspension 을 만들고 96 well plate 에 10<sup>6</sup> cell/well(100 $\mu$ l)로 분주하였다. 분주된 각 well에 앞서 준비된 sample을 각각 첨가하여 72시간 동안 무균적으로 배양하였다. 배양중 마지막 18시간전에 0.5 $\mu$ Ci[<sup>3</sup>H]-thymidine을 각 well에 첨가하여 배양시킨 후 세포를 cell harvester(Skotron사,미국)를 사용하여 모은후 filter disc 를 건조시켜서 cocktail solution에 용해시키고 liquid scintillation counter(Beckman사,미국)으로 방사능을 측정하였다.

3. 생약추출물이 IL-1 $\beta$  활성에 미치는 영향

1) 치은섬유아세포에서의 PGE<sub>2</sub> 생성에 미치는 영향

가) 치은섬유아세포 배양

교정목적의 제 1 소구치 발거시 발치창 주위의 건강한 치은을 내사면 절개하여 세척한 후 상피부분은 절제하여 건강한 치은 결합조직만을 채집하여 1mm<sup>2</sup> 정도로 세절한 다음, 60mm Culture dish에 부착시킨 후 100 U/ml penicillin, 100  $\mu$ g/ml streptomycin 및 10% FBS가 함유된  $\alpha$ -MEM배지(GIBCO사,미국)로 dish가 충만할

때까지 5% CO<sub>2</sub>, 95% 공기, 100% 습도 조건하에서 무균적으로 밀생배양하였다. 배지는 3일마다 교환하면서 무균적으로 배양하는데 dish가 충만할 정도로 밀생배양되면 PBS로 2-3회 세척한 후 0.25% Trypsin-EDTA를 이용하여 세포를 dish에서 탈락시킨 후 세포부유액을 모아 1200 rpm 으로 10분간 원침시킨 후 세포침전물만을  $\alpha$ -MEM배지로 세포부유액을 만들어 2차 계대배양하였다. 같은 방법으로 5회 내지 7회 계대배양하여 실험에 사용하였다.

나) 치은섬유아세포에서 생약추출물에 의한 PGE<sub>2</sub> 생성에 미치는 영향

5회 내지 7회 계대배양된 치은섬유아세포를 24 well plate 에  $\alpha$ -MEM배지에서 10<sup>5</sup> cell/well (1/ml)로 분주한 후 rHuIL-1 $\beta$ (Genzyme사,미국) 1ng/ml을 첨가하여 PGE<sub>2</sub> 생성을 유도하였는데, 아무런 첨가제를 가하지 않은 well을 대조군으로 하고 rHuIL-1 $\beta$  (1ng/ml)만을 첨가한 well과, rHuIL-1 $\beta$ (1ng/ml)와 각 생약추출물(10 $\mu$ l)을 첨가한 well을 실험군으로 하여 48시간동안 무균적으로 배양하였다. 배양후 각 well의 배지를 수집하여 배지내의 PGE<sub>2</sub>를 PGE<sub>2</sub> enzyme immunoassay system(Amersham사,영국)을 이용하여 ELISA reader 로 450nm에서 비색정량하였다.

2) 신생쥐 두개골에서 골 흡수에 미치는 영향

생후 1-2일된 신생쥐에 1 $\mu$ Ci <sup>45</sup>CaCl<sub>2</sub> 를 피하 주사하고 4-5일 후 쥐를 희생시켜 두개골을 무균적으로 적출하여 조직잔사는 제거하고 PBS로 깨끗이 세척하였다. 적출된 두개골을 5% FBS, 100U/ml penicillin, 100 $\mu$ g/ml streptomycin 및 25mM의 glutamine이 첨가된 BGJb배지로 5% CO<sub>2</sub>, 95% 공기, 100% 습도 조건하에서 24시간동안 전배양하여 골조직에 결합되지 않은 <sup>45</sup>CaCl<sub>2</sub>를 유리시켰다. 전배양후 배지는 모아버리고 두개골을 24 well plate에 0.5ml의 BGJb배지에서 배양한 대조군 및 rHuIL-1 $\beta$ (Genzyme) 10<sup>-9</sup>M만을 첨가한 실험군과, rHuIL-1 $\beta$ (10<sup>-9</sup>M)와 각 생약추출물(10 $\mu$ l)을 동시에 첨가한 실험군으로 나누어 48시간동안 배양하였다. 배양후 두개골은 수거하여 완전히 건조시킨 후 0.5ml의

90% 개미산으로 60°C에서 완전히 용해시켰다. 각 실험군들의 배지와 개미산으로 용해한 두개 꿀 용해액을 각각 cocktail solution에 녹인후 liquid scintillation counter(Backman)를 이용하여 방사능 측정하였다. 골흡수정도는 전체골에 표지된  $^{45}\text{Ca}$ 양에 대한, 배지로 유리된  $^{45}\text{Ca}$  양의 백분율로서 표시하였다.

#### 4. 통계분석

연구결과의 분석은 5% 와 1% 유의도의 paired-t test를 이용하여 대조군 및 각 실험군 간의 차이를 검정하였다.

### III. 연구결과

말초혈액에서 분리하여 배양한 단핵세포에 의한 IL-1 $\beta$  생성에는 사용한 각 생약 추출물들이 유의한 억제효과가 있는 것으로 나타났다(표 1).

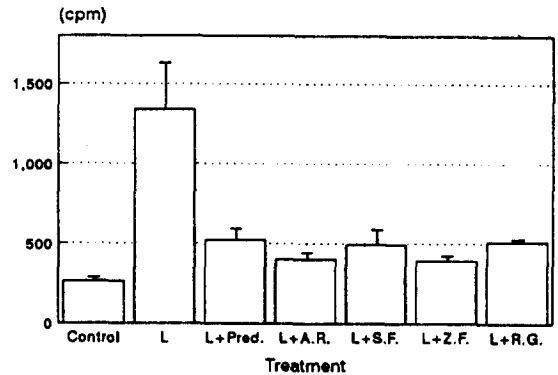
대조군으로 사용한 PRMI 1640 배지에서 단핵세포가 생성한 IL-1 $\beta$ 는 261 $\pm$ 10 cpm으로 측정되었고, 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 LPS를 첨가하여 자극을 주었을 때 1339 $\pm$ 292 cpm으로 측정되었다. LPS에 10nM/ml prednisolone을 첨가한 경우 IL-1 $\beta$ 의 양은 523 $\pm$ 75 cpm으로 측정되어 IL-1 $\beta$ 의 생성 억제효과를 보였고, LPS와 각 생약추출물 Asparagi Radix, Schizandrae Fructus, Zizyphi Fructus 및 Rhois Galla를 첨가했을 때 각각 402 $\pm$ 43, 494 $\pm$ 92, 392 $\pm$ 34, 512 $\pm$ 11 cpm으로 측정되어 유의한 IL-1 $\beta$ 의 생성 억제효과가 있는 것으로 나타났으며, 특히 Asparagi Radix 와 Zizyphi Fructus의 효과가 큰 것으로 나타났다.

치은섬유아세포의 PGE $_2$  생성 억제효과는 PGE $_2$  enzyme-immunoassay system을 사용하여 측정하였다. 표2에서 나타난 바와 같이 배양전 치은섬유아세포는 IL-1 $\beta$ 의 자극이 없는 상태에서 13 pg의 PGE $_2$ 를 생성하며, rHu IL-1 $\beta$  1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 첨가되었을 때 64 pg의 PGE $_2$ 를 생성하지만 각 생약추출물 Asparagi Radix, Schizandrae Fructus, Zizyphi Fructus 및 Rhois Galla를 첨가하였을 때 17, 25, 25 pg의 PGE $_2$ 를 생성하여 IL-1 $\beta$ 가 치은섬유아세포를 자극하여

**Table 1.** The effect of herbal extracts on production of IL-1 $\beta$  by human blood monocyte

Treatment	$^3\text{H}$ -thymidine incorporation (cpm) (mean $\pm$ S.D.)
control	261 $\pm$ 10
LPS	1339 $\pm$ 292
LPS+ Prednisolone	523 $\pm$ 75*
LPS+ Asparagi Radix	402 $\pm$ 43*
LPS+ Schizandrae Fructus	494 $\pm$ 92*
LPS+ Zizyphi Fructus	392 $\pm$ 34*
LPS+ Rhois Galla	512 $\pm$ 11*

\*P < 0.01 vs. LPS

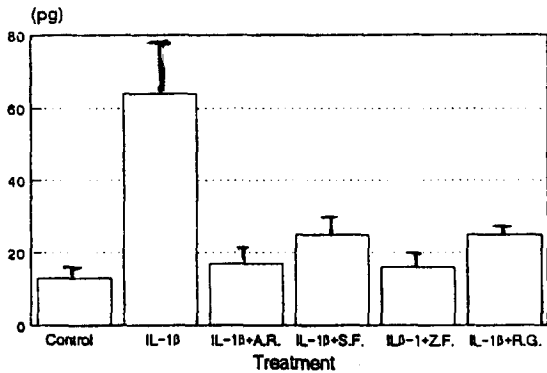


**Fig. 1** The effect of herbal extracts on production of IL-1 $\beta$

L : Lipopolysaccharide, Pred.: prednisolone, A.R. : Asparagi Radix, S.F.: Schizandrae Fructus, Z.F. : Zizyphi Fructus, R.G.: Rhois Galla

**Table 2.** The effect of herbal extracts on inhibition of PGE $_2$  production by gingival fibroblast

Treatment	PGE $_2$ (pg)
control	13
rHuIL-1 $\beta$	64
rHuIL-1 $\beta$ + Asparagi Radix	17
rHuIL-1 $\beta$ + Schizandrae Fructus	25
rHuIL-1 $\beta$ + Zizyphi Fructus	16
rHuIL-1 $\beta$ + Rhois Galla	25



**Fig.2** The effect of herbal extracts on inhibition of PGE<sub>2</sub> production by gingival fibroblast  
 A.R.:Asparagi Radix, S.F.:Schizandrae Fructus,  
 Z.F.:Zizyphi Fructus, R.G.:Rhois Galla

PGE<sub>2</sub>를 생성하는데 이들 생약추출물들이 억제 효과가 있음을 나타내었다.

각 생약추출물의 신생쥐 두개골 골흡수에 미치는 영향은 두개골 크기의 한계성으로 각 생약추출물은 각각 다른 대조군을 사용하였으므로 그 결과는 세분화하여 나타내었다(표 3,4,5,6).

Asparagi Radix의 신생쥐 두개골 흡수에 미치는 영향은 대조군에 있어  $11.68 \pm 0.82\%$ 의 골흡수를 나타내었으며 IL-1 $\beta$ 로 골흡수를 유도하였을 때  $17.31 \pm 2.79\%$ 로 측정되어 골흡수가 증가되었음을 보였으며, Asparagi Radix를 첨가하였을 때  $16.19 \pm 1.68\%$ 의 골흡수를 보여 수치상 골흡수 억제효과를 보였으나 통계학적 유의성은 없었다(표 3).

**Table 3.** The effect of Asparagi Radix on inhibition of bone resorption by IL-1 $\beta$

Treatment	% <sup>45</sup> Ca release (mean $\pm$ S.D.)
control	11.68 $\pm$ 0.82
IL-1 $\beta$	17.31 $\pm$ 2.79
IL-1 $\beta$ + Asparagi Radix	16.19 $\pm$ 1.68

Schizandrae Fructus의 신생쥐 두개골 흡수에

미치는 영향은, 대조군에서  $15.09 \pm 4.28\%$ 의 골흡수를 보였으며 IL-1 $\beta$ 를 첨가했을 때  $20.83 \pm 3.78\%$ 의 골흡수를 보여 골흡수 유도효과가 나타났으나 여기에 Schizandrae Fructus를 첨가했을 때  $18.36 \pm 2.26\%$ 의 골흡수를 보여 골흡수 억제 효과는 통계학적 유의성이 없었다(표4).

**Table 4.** The effects of Schizandrae Fructus on inhibition of bone resorption by IL-1 $\beta$

Treatment	% <sup>45</sup> Ca release (mean $\pm$ S.D.)
control	15.09 $\pm$ 4.28
IL-1 $\beta$	20.83 $\pm$ 3.78
IL-1 $\beta$ + Schizandrae Fructus	18.36 $\pm$ 2.26

Zizyphi Fructus의 신생쥐 두개골 흡수에 미치는 영향은 대조군에서  $8.75 \pm 1.39\%$ 의 골흡수를 보였으며 IL-1 $\beta$ 로 골흡수를 유도하였을 때  $15.00 \pm 1.09\%$ 의 골흡수를 보여 골흡수가 증가되는 것으로 나타났으나 Zizyphi Fructus를 첨가하였을 때  $14.48 \pm 1.43\%$ 의 골흡수를 나타내어 골흡수 억제효과는 통계학적 유의성이 없었다(표5).

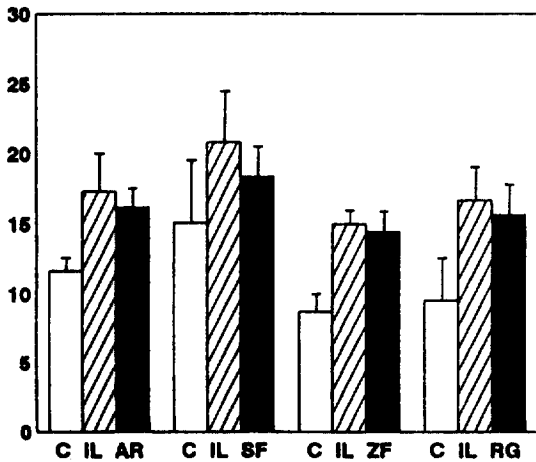
**Table 5** The effects of Zizyphi Fructus on inhibition of bone resorption by IL-1 $\beta$

Treatment	% <sup>45</sup> Ca release (mean $\pm$ S.D.)
control	8.75 $\pm$ 1.39
IL-1 $\beta$	15.00 $\pm$ 1.09
IL-1 $\beta$ + Zizyphi Fructus	14.48 $\pm$ 1.43

Rhois Galla의 신생쥐 두개골 흡수에 미치는 영향은 표6 에서와 같이 통계학적 유의성을 보이지 않았다.

**Table 6.** The effects of Rhois Galla on inhibition of bone resorption by IL-1 $\beta$

Treatment	% <sup>45</sup> Ca release (mean $\pm$ S.D.)
control	9.55 $\pm$ 2.93
IL-1 $\beta$	16.69 $\pm$ 2.51
IL-1 $\beta$ + Rhois Galla	15.66 $\pm$ 2.29



**Fig.3** The effect of natural extracts on inhibition of bone resorption by IL-1 $\beta$

C:Control, IL :Interleukin 1 $\beta$ ,  
AR:Asparagi Radix, SF :Schizandrae Fructus,  
ZF:ZIZyphi Fructus, RG :Rhois Galla

## V. 총괄 및 고안

치주질환은 세균에 의해 시작되며 그 결과, 치조골의 파괴와 치주결체조직의 파괴로 나타난다. 이때 세균은 숙주의 방어세포들을 활성화시켜서, 치조골과 치주결체조직을 파괴하는 요인들을 자극하는 매개체를 생성한다<sup>51</sup>. 세균의 여러 성분중 특히 LPS는 대식세포를 활성화시켜서 IL-1, TNF- $\alpha$ , prostaglandin과 hydrolytic enzyme 등을 생성하게 된다. IL-1은 내피세포에 작용하여 호중구와 단핵구의 부착을 증가시켜 염증부위에 이들 세포가 많이 모이게 하고<sup>52,53</sup>, 대식세포와 치은 섬유아세포를 자극하여 PGE<sub>2</sub>를 생성하며 이 PGE<sub>2</sub>는 혈관을 확장시키고 혈관

투과도를 증가시키므로, 결국 IL-1은 강력한 염증증진구성 활성으로 치주조직 파괴의 주도적인 역할을 하게 된다. IL-1은 해리효과를 갖는데 in vitro에서 TNF- $\alpha$ 나 parathyroid hormone(PTH) 또는 PGE<sub>2</sub> 보다 10배 이상의 골 탈회화 유도 효과가 있고, PTH와 TNF- $\alpha$  등과 상승작용을 하여 골 흡수를 촉진시키며<sup>54</sup>, 또한 파골세포를 활성화시키거나 새로운 파골세포를 만들게하여 골 흡수를 유발한다<sup>55</sup>. 또한 mesenchymal origin의 세포에서부터 collagenase, elastase, 그리고 acid protease 등의 proteinase를 유도하므로 이런 IL-1의 해리효과는 치주질환에서 치조골과 결체조직의 파괴를 유도하게 된다<sup>56,57</sup>. 세균의 LPS의 자극으로 일단 IL-1이 생산되면 IL-1의 자가 자극으로 IL-1생산이 증폭, 지속되게 되는데 interferon- $\gamma$ (INF- $\gamma$ )와 PGE<sub>2</sub>는 이 작용을 억제하는 역할을 하기도 한다<sup>58</sup>. 이와같이 염증으로 조직파괴가 일어나는 부위에서는 이런 cytokine들과 그 관련물질들의 상호작용을 통해 조직세포들은 서로 기능을 조절하게 된다. IL-1의 치주질환에서의 작용은 비교적 많이 밝혀져 왔으며 이런 근거로 치주질환 병소 부위에서의 활성여부를 알 수 있는 지표로 사용하기 위한 연구들이 많이 시행되어왔다<sup>19-23</sup>. 치은열구액에서 IL-1의 농도가 염증부위에서는 높게 나타나고, 효과적으로 치주치료가 된 후에는 크게 감소하며, 임상적으로 건강한 부위에서 낮은 농도를 보인다. 이때 치은열구액에서의 IL-1농도 변화가 골흡수, 치주낭 깊이, 부착상실 등의 임상적 지수와 일치하지 않는 것은 이 임상질환지수들이 질환 활성도와 일치하지 않는다는 것을 의미한다. 치주조직 추출액에서 질환 활성도와 IL-1 $\beta$ 의 상관관계는 치주질환 활성을 갖는 부위에서 건강한 부위나 비활성 부위보다 높은 IL-1 $\beta$  농도를 보이며 특히 IL-1 $\beta$ 의 농도가 IL-1 $\alpha$ 의 농도보다 현저히 높은 농도를 나타내었다<sup>30,31</sup>. 또한 치주염에 감수성이 큰 환자의 말초혈액에서 분리, 배양한 단핵세포에서는 치주염에 저항성이 큰 환자의 단핵세포에서보다 LPS의 자극에 대해 많은 양의 IL-1 $\beta$ 를 생산한다는 보고도 있었다<sup>22</sup>.

이상과 같이 IL-1 $\beta$ 는 치주질환의 질환진행에 중요한 역할을 하는 인자이므로 IL-1 $\beta$ 의 생성과

활성을 차단하는 가능성이 있는 약제를 개발하기 위하여 각종의 생약추출물을 사용하였다. 생약추출물은 기초 실험을 통하여 비교적 우수한 IL-1 $\beta$ 의 생성 억제효과를 보인 Asparagi Radix, Schizandrae Fructus, Zizyphi Fructus 및 Rhois Galla를 선택하였다. 말초혈액에서 분리배양한 단핵세포에 LPS로 자극하였을 때 생성되는 IL-1 $\beta$ 의 생약추출물에 의한 생성 억제효과는 우수한 것으로 나타났다. prednisolone은 IL-1 $\beta$ 의 생성을 차단하는 것으로 알려진 물질로<sup>59-61</sup> Uehara등에 의하면 단핵세포의 IL-1 $\beta$ 의 생성 억제효과는 10 $\mu$ M의 농도에서 가장 큰 것으로 밝혀졌으므로<sup>59</sup> 본 실험에서는 10nM의 prednisolone을 사용하여 생약추출물의 억제효과와 비교하였다. Asparagi Radix와 Zizyphi Fructus는 prednisolone보다 큰 억제효과를 보였으며, Schizandrae Fructus와 Rhois Galla는 prednisolone과 유사한 정도의 억제효과를 보였다. 실험 방법에 있어, 최근 연구에 의하면 활성화된 혈액단핵세포가 생산하는 IL-1 inhibitor에 의해 IL-1의 활성이 영향을 받는다고 알려졌으므로<sup>62</sup> 본 연구에서는 ELISA에 의한 정량법을 사용하지 않고 thymocyte stimulation assay를 사용하여 방사능 측정으로 IL-1 $\beta$ 의 생산량을 측정하였다.

Prostaglandin(PG)은 arachidonic acid에서 생성되는 물질로서 혈관 확장 효과가 있고 호중구와 단핵구에 대한 화학주성으로 염증부위에 이들이 많이 모이게 하며, 혈관투과도를 증가시키는 등의 염증 전구성 활성이 있고<sup>63</sup>, 골 흡수의 강력한 유도체로서<sup>64</sup> 치주질환에서 치주조직 파괴에 관련이 있다. 특히 PGE<sub>2</sub>는 염증이 있는 치주조직에서 많이 발견되며 치주질환 활성이 있는 부위의 치은열구액에서 더 많이 분비된다. IL-1은 대식세포와 섬유아세포를 자극하여 PGE<sub>2</sub>를 생성하게 되는데 본 실험에서는 치은섬유아세포에 recombinant human IL-1 $\beta$  1 $\mu$ g/ml을 첨가하여 PGE<sub>2</sub> 생성을 유도하고 각 생약추출물로 PGE<sub>2</sub> 생산 억제효과를 ELISA로 정량분석하였다. 각 생약추출물은 PGE<sub>2</sub> 생산 억제효과를 보였고, 특히 Asparagi Radix와 Zizyphi Fructus는 강력한 PGE<sub>2</sub> 생성 억제효과를 나타내었다.

생약추출물의 골흡수 억제효과는 본 실험에서

대조군과 비교하여 유의한 효과를 나타내지는 못하였다. PGE<sub>2</sub>는 강력한 골흡수 촉진인자로 알려져 있고, 본 연구에서의 치은섬유아세포의 PGE<sub>2</sub> 생성 억제효과로 볼때, 본 실험에서 사용한 생약제들이 어느정도 골흡수 기전에 영향을 줄 수 있을 가능성을 생각할 수 있다. 하지만 본 연구에서 확인한 바로는 신생쥐의 골조직 장기배양을 통한 골흡수 모델에서는 별다른 효과를 확인할 수는 없었다.

IL-1에 의한 골흡수 유도기전에 PG가 매개되는지에 대해서는 여러 보고에서 상반된 보고를 보이고 있긴 하지만 Garret과 Mundy에 의하면 신생쥐의 골조직 배양실험모델에서 PG가 IL-1의 골흡수효과를 촉진하긴 하지만, 실제로 IL-1의 골흡수 유도작용이 반드시 PG의 생산에 의존하지는 않는다고 하였다<sup>65</sup>. 따라서 Garret과 Mundy의 보고에 근거해서 볼 때, 본 실험에서 사용한 생약제가 치은섬유아세포의 PGE<sub>2</sub>생성억제효과를 보인 반면 골흡수 유도기전에 별다른 영향을 보이지 않은 것은 아마도 IL-1에 의한 골흡수 유도효과가 골조직내의 내인성 PG의 생산에 기인하지는 않기 때문인 것으로 생각된다.

이상에서 살펴본 바와 같이 본 실험에서 사용된 생약추출물들은 IL-1 $\beta$ 의 생성 억제효과 및 PGE<sub>2</sub> 생성 억제효과가 뚜렷하였으나, 골흡수 차단 효과는 유의한 성적을 보이지 못하였다. 본 연구를 통하여, 이들 생약추출물들은 치주질환 치료의 보조제로서 그 가능성이 확인되었으며 이들 생약추출물을 정제, 분리하여 각 약제의 구성성분에 대한 치주조직에의 영향에 관하여 보다 깊은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## V. 결 론

한방 영역에서 소염작용이 있는 것으로 알려진 약제의 생약 추출물들 중에서 기초 실험을 통하여 IL-1 $\beta$  생성 억제효과를 갖는 Asparagi Radix, Schizandrae Fructus, Zizyphi Fructus 및 Rhois Galla를 사용하여 이들의 IL-1 $\beta$  생성 억제효과와 IL-1 $\beta$  활동 억제효과를 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. Asparagi Radix, Schizandrae Fructus, Zizyphi Fructus 및 Rhois Galla 는 혈액 단핵 세포가 LPS의 자극으로 IL-1 $\beta$ 를 생성하는 과정을 억제하는 효과를 보였다.
2. Asparagi Radix, Schizandrae Fructus, Zizyphi Fructus 및 Rhois Galla 는 치은 점유아 세포가 IL-1 $\beta$ 의 자극으로 PGE<sub>2</sub>를 생성하는 과정을 억제하는 효과를 나타내었다.
3. Asparagi Radix, Schizandrae Fructus, Zizyphi Fructus 및 Rhois Galla 는 신생쥐의 두개골에서 IL-1 $\beta$ 에 의한 골흡수 유도과정에 영향을 미치지 못하였다.

본 연구를 통하여, 이들 생약추출물들이 치주 질환 치료의 보조제로서 응용 가능성이 확인되었으며 앞으로 이러한 효과를 나타내는 성분을 분리, 추출하여 치주조직에 미치는 영향에 관한 연구가 더 필요할 것으로 사료된다.

## REFERENCES

- 1) Mizel SB, Dayer JM, Mergenhagen SE : Stimulation of rheumatoid synovial cell collagenase and prostaglandin production by partially purified lymphocyte activating factor. *Proc Natl Acad-Sci (USA)*78:2474, 1981.
- 2) Bendtzen K : Interleukin 1, interleukin 6 and tumor necrosis factor in infection, inflammation and immunity. *Immunol Lett* 119: 183,1988.
- 3) di Giovine FS, Duff GW : Interleukin 1. The first interleukin. *Immunol Today* 11: 13,1990.
- 4) Dinarello CA : Interleukin-1 and its biologically related cytokines. *Adv immunol* 44: 153,1989.
- 5) Oppenheim JJ, Kovacs EJ, Matsushima K, Durum SK : There is more than one interleukin-1. *Immunol Today* 7: 45,1986.
- 6) Le J, Weinstein D, Gubler U, Vilcek J : Induction of membrane-associated interleukin 1 by tumor necrosis factor in human fibroblast. *J Immunol* 138: 1237,1987.
- 7) Matsushima K, Procopio G, Abe G, Ortal do JR, Oppenheim JJ : Production of interleukin-1 activity by normal human peripheral blood B lymphocyte. *J Immunol* 135: 1132,1985.
- 8) Miossec P, Cavender D, Ziffi M : Production of interleukin-1 by human endothelial cells. *J Immunol* 136: 2486,1986.
- 9) Kupper TS, Ballard DW, Chua AO : Human keratocytes contain mRNA indistinguishable from monocyte Interleukin-1 and mRNA. *J Exp Med* 164: 2095, 1986.
- 10) Richards D, Rutherford RB : The effects of interleukin-1 on collagenolytic activity and prostaglandin-E secretion by human periodontal ligament and gingival fibroblast. *Archs Oral Bio* 33: 237,1988.
- 11) Saito S, Saito M, Ngan P, Lanese R, Shanfeld J, Davidovitch Z: Effects of parathyroid hormone and cytokines on prostaglandin E synthesis and bone resorption by human periodontal ligament fibroblasts. *Archs oral Biol* 35: 845, 1990.
- 12) Saito S, Ngan P, Saito M, Kim K, Lanese R, Shanfeld J, Davidovitch Z: Effects of cytokines on prostaglandin E and cAMP levels in human periodontal ligament fibroblasts in vitro. *Archs oral Biol* 35: 387,1990.
- 13) Robert C, Newton G, Covington M: The activation of human fibroblast prostaglandin E production by interleukin 1. *Cellular Immunology* 110: 338,1987.
- 14) Stashenko P, Dewhirst FE, Persos WJ, Kent RL, Ago JM : Synergistic interactions between interleukin 1, tumor necrosis factor, and lymphotoxin in bone resorption. *J Immunol* 138: 1464,1987.
- 15) Gowen M, Wood DD, Ihrie EJ, McGuire MKB, Russell GG : An interleukin 1 like factor stimulates bone resorption in vitro. *Nature* 306: 378,1983.
- 16) Tatakis DN, Schnecherger G, Aziak R : Recombinant interleukin-1 stimulates prostaglandin E2 production by osteoblastic cells: Synergy with parathyroid hormone. *Calcif Tissue Int* 41: 358,1988.
- 17) 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.
- 18) Konig A, Muhlbauer RC, Fleisch H : Tumor necrosis factor  $\alpha$  and interleukin 1 stimulate bone resorption in vivo as measured by urinary (<sup>3</sup>H) tetracycline excretion from prelabeled mice. *J bone Min Res* 6: 621, 1988.
- 19) Masada MP, Persson R, Kennedy JJ : Measurement of interleukin-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in gingival crevicular fluid: Implications for the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodont Res* 25: 156,1990.
- 20) Wilton JMA, Bampton JLM, Hurst TJ, Caves J, Powell JR : Interleukin-1 $\beta$  and IgG subclass concentrations in gingival crevicular fluid from patients with adult periodontitis. *Archs Oral Biol* 38: 55,1993.
- 21) Kinane DF, Winstanley FP, Adonogianaki E, Mougal NA : Bioassay of interleukin 1 (IL-1) in human



- gingival crevicular fluid during experimental gingivitis. *Archs oral Biol* 37: 153,1992.
- 22) McFarlane CG, Reynolds JJ, Meikle MC : The release of interleukin-1 $\beta$ , tumor necrosis factor- $\alpha$  and interferon- $\gamma$  by cultured peripheral blood mononuclear cells from patients with periodontitis. *J Periodont Res* 25: 207,1990.
  - 23) Matsuki Y, Yamamoto T, Hara K : Localization of interleukin-1 (IL-1) mRNA-expressing macrophages in human inflamed gingiva and IL-1 activity in gingival crevicular fluid. *J Periodont Res* 28: 35,1993.
  - 24) Auron PE, Webb AC, Rosenwasser LJ : Nucleotide sequence of human monocyte interleukin-1 precursor DNA. *Proc Natl Acad Sci(USA)* 81: 7907,1984.
  - 25) March CJ, Mosley B, Larson : Cloning, Sequence and expression of two distinct human interleukin-1 complementary DNAs. *Nature* 315: 641,1985.
  - 26) Dewhirst FE, Stashenko P, Mole JE, Tsurumachi T : Purification and partial sequence of human osteoclast-activating factor: Identity with interleukin 1 $\beta$ . *J Immunol* 135: 2562,1985.
  - 27) Lorenzo JA, Sousa SL, Alander C, Raisz LG, Dinarello CA : Comparison of the bone resorbing activity in the supernatants from phytohemagglutinin-stimulated human peripheral blood mononuclear cells with that of cytokines through use of an antiserum to interleukin 1. *Endocrinology* 121: 1164,1987.
  - 28) Stashenko P, Dewhirst FE, Rooney ML, Desjardins LA, Heeley JD : Interleukin 1 $\beta$  is a potent inhibitor of bone resorption in vitro. *J Bone Min Res* 2: 559,1987.
  - 29) Nguyen L, Dewhirst FE, Hauschka PV, Stashenko P : Interleukin 1 $\beta$  stimulates bone resorption and inhibits bone formation in vivo. *lymphokine Cytokine Res* 10: 15,1991.
  - 30) Stashenko P, Fujiyoshi P, Obernesser MS, Prostack L, Haffajee AD, Socransky SS : Levels of interleukin 1 $\beta$  in tissue from sites of active periodontal disease. *J Clin Periodontol* 5: 548,1991.
  - 31) Stashenko P, Jandinski JJ, Fujiyoshi P, Rynar J and Socransky SS: Tissue levels of bone resorptive cytokines in periodontal disease. *J Periodontol* 62: 504,1991.
  - 32) Honig J, Rordorf-Adam C, Siegmund C, Wiedemann W, Erard F: Interleukin-1 beta(IL-1 $\beta$ ) concentration in gingival tissue from periodontitis patients and healthy control subjects. *J Periodont Res* 24: 362, 1989.
  - 33) Jandinski JJ, Stashenko P, Feder LS : Localization of interleukin 1 $\beta$  in human periodontal tissue. *J Periodontol* 62: 36,1991.
  - 34) Greenstein G, Berman C, Jaffin R: Chlorhexidine.An adjunct to periodontal therapy. *J Periodontol* 57: 370, 1986.
  - 35) Case DE: Safety of hibitane. I. Laboratory experiments. *J.Clin Periodontol* 4: 66,1977.
  - 36) Goldschmidt P, Cogen R, Taubman S: Cytopathologic effects of chlorhexidine on human cells. *J Peri odontol* 48: 212,1977.
  - 37) Hamp SE, Lindhe J, Loe H: Longterm effect of chlorhexidine on developing gingivitis in the beagle dog. *J Periodant Res* 8: 63,1973.
  - 38) Namba T, Tsunozuka M, Bae K, Hattori M: Studies on dental caries prevention by traditional Chinese medicine (part1), Screening of crude drug for antibacterial action against Streptococcus mutans. *Shoyakugaku Zasshi* 35,1981.
  - 39) Bae K, Oh H : Synergistic effect of lysozyme on bactericidal activity of magnolol and honokiol against a cariogenic bacterium, Streptococcus mutans OMZ 176. *Arch Phaun Res* 13: 117,1990.
  - 40) Yasukawa K, Takido M, Takeuchi M, Nakagawa S: Effect of chemical constituents from plants on 12-0-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate-induced inflammation in mice. *Chem Pharm bull* 37: 1071,1989.
  - 41) 장법석, 손성희, 정종평, 배기환: Magnolol과 Honokiol 이 항균, 교원질 분해효소, 세포독성 및 cytokine 생산에 미치는 영향. *대한치주과학회지* 23: 145,1993.
  - 42) 류인철, 손성희, 정종평, 배기환: 생약추출물이 세포성장 및 cytokine 생산에 미치는 영향. *대한치주과 학회지* 23: 37,1993.
  - 43) 김종원 외 : 현대생약학, 45, 248, 338, 277. 학창사, 1981.
  - 44) 한대석 외 : 생약학, 385, 연지사, 1983.
  - 45) Takeda A, Arai I, Kase Y, Ohkura Y, Hasegawa M, Sektgucht Y, Sudo K, Aburada M, Hosoya E: Pharmacological studies on antihepatotoxic action of (+)-(6S,7S,R-Biar)-5,6,7,8-tetrahydro-1,2,3,12-tetramethoxy-6,7-dimethyl-10,11-methylenedioxy-6-dibenzo[a,c]cyclooctenol(TJN-101), a Lignan component of Schisandra Fruits. Influences of Resolvents on the Efficacy of TJN-101 in the Experimental Acute Hepatic Injuries. *Yakugaku Zasshi* 1070: 517,1987.
  - 46) Taguchi H, Ikeya Y : The Constituents of Schizandra chinensis Baill. The Structures of Two New Lignans, Pre-gomisin and Gomisin J. *Chem Pharm Bull* 26 : 682,1978.
  - 47) Yagi A, Koda A, Inagaki N, Haraguchi Y, Noda K, Okamura N, Nishioka I : Studies on the constituents of Zizyphi Fructus. IV. Isolation of an anti-allergic component, ethyl alpha-D-fructofuranoside from EtOH extract of Zizyphi Fructus. *Yakugaku-Zasshi* 101 :

- 700,1981.
- 48) Hattori T, Nagamatsu T, Ito M, Suzuki Y : Studies on antinephritic effect of TJ-8014, a new Japanese herbal medicine and its mechanisms (1) : Effects on original type anti-GBM nephritis in rats on platelet aggregation. *Jpn J Pharmacol* 50 : 477,1989.
  - 49) 신민교 : 임상본초학, 231, 남산당, 1986.
  - 50) 신민교 : 임상본초학, 497, 남산당, 1986.
  - 51) Meikle MC, Heath JK, Reynolds JJ: Advances in understanding cell interactions in tissue resorption. Relevance to the pathogenesis of periodontal diseases and a new hypothesis. *J Oral Pathol* 15: 239, 1986.
  - 52) Bevilacqua MP, Pober JS, Mendrick DL, Cotran RS, Gimbrone MA Jr : Identification of an inducible endothelial leukocyte adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 9238,1987.
  - 53) Bevilacqua MP, Pober JS, Wheeler ME, Cotran RS, Gimbrone MA Jr : Interleukin 1 acts on cultured human vascular endothelium to increase the adhesion of polymorphonuclear leukocytes, monocytes and related leukocyte cell lines. *J Clin Invest* 76: 2003, 1985.
  - 54) Stashenko P, Dewhirst FE, Peros WJ, Kent RI, Ago JM : Synergistic interactions between interleukin-1, tumor necrosis factor, and lymphotoxin in bone resorption. *J Immunol* 138: 1464,1987.
  - 55) Pfeilschifter J, Seyedin SM, Mundy GR : Transforming growth factor beta inhibits bone resorption in fetal rat long bone culture. *J Clin Invest* 82: 680,1988.
  - 56) Richards D, Rutherford RB : The effects of interleukin-1 on collagenolytic activity and prostaglandin-E secretion by human periodontal ligament and gingival fibroblast. *Arch Oral Biol* 33: 237,1988.
  - 57) Richards D, Rutherford RB : Interleukin-1 regulation of procollagenase mRNA and protein in periodontal fibroblasts in vitro. *J Periodont Res* 25 : 222, 1990.
  - 58) Dinarello CA : Interleukin-1 and its biologically related cytokines. In: Cohen S, ed. *Lymphokines and the immune response*. Boca Raton, FL : CRC Press. 145,1990.
  - 59) Uehara A, Kohda H, Sekiya C, Talca sugi Y, Namiki M : Inhibition of interleukin-1 beta release from cultured human peripheral blood mononuclear cells. *Experientia* 45: 116,1981.
  - 60) Lew W, Oppenheim JJ, Matsushima K: Analysis of the suppression of IL-1 production in human peripheral blood mononuclear adherent cells by a glucocorticoid hormone. *J Immunol* 140: 1985,1988.
  - 61) Lee SW, Tsou A, Chan H, Thomas J, Petrie K, Eugi EM, Allison AC : Glucocorticoids selectively inhibit the transcription of the interleukin 1 gene and decrease the stability of interleukin 1 mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 1204,1988.
  - 62) Arend Wp, Joslin FG, Massoni RJ : Effects of immune complex on production by human monocytes of interleukin 1 or an interleukin 1 inhibitor. *J Immunol* 134: 3868,1985.
  - 63) Allison AC : Role of macrophage activation in the pathogenesis of chronic inflammation and its pharmacological control. In: Otterness I, Capetola R, Wong S, eds. *Advances in inflammation research*, vol. 7. New York: *Raven Press* 201,1984.
  - 64) Klein DC, Raisz LG: Prostaglandins: stimulation of bone resorption in tissue culture. *Endocrinology* 86: 1436,1970.
  - 65) Garret IR, Mundy GR : Relationship between interleukin-1 and prostaglandins in resorbing neonatal calvaria. *J Bone Miner Res* 4: 789,1989.

## THE EFFECTS OF HERBAL EXTRACTS ON PRODUCTION AND ACTIVITY OF INTERLEUKIN 1 $\beta$

Ki-Yeong Cho, Yong-Moo Lee, Sang-Mook Choi, Chong-Pyoung Chung  
*Department of Periodontology, College of Dentistry, Seoul National Univeristy*

Interleukin 1 $\beta$  is a potent bone resorptive cytokine which mediates soft tissue destruction through the stimulation of prostaglandin production and the induction of collagenase. This constellation of activities suggests a role of IL-1 $\beta$  in the pathogenesis of periodontal disease.

The purpose of this study was to evaluate the effects of herbal extracts on production and activity of IL-1 $\beta$ . When LPS was added to cultured human blood monocytes, the effects of herbal extracts on the production of IL-1 $\beta$  was evaluated by thymocyte stimulation assay. When rHuIL-1 $\beta$  was added to cultured human gingival fibroblasts, the effects of herbal extracts on production of PGE<sub>2</sub> was evaluated by ELISA and when it was added to cultured mouse calvaria, the effects on bone resorption was estimated by <sup>45</sup>Ca-release bone resorption assay.

The herbal extracts that had been used in this study were as follows: Asparagi Radix, Schizandrae Fractus, Zizyphi Fractus and Rhois Galla.

The following results were obtained from this study.

1. All these extracts effectively inhibited the production of IL-1 $\beta$  on cultured human blood monocytes.
2. All these extracts effectively inhibited the production of PGE<sub>2</sub> on cultured human gingival fibroblasts.
3. All these extracts did not effectively inhibit the bone resorption induced by rHuIL-1 $\beta$  on cultured mouse calvaria.