

UDCA를 함유한 생약추출물 혼합제제의 항염효과에 관한 연구

류인철¹ · 김상년² · 정종평¹

1. 서울대학교 치과대학 치주과학교실

2. LG화학 생활과학연구소

I. 서론

치주질환의 원인은 치은연하 치주낭 내에 존재하는 치태세균에 의한 것으로 연구되고 있다. 특히 진행성으로 나타나는 만성치은염, 성인형 치주염, 급속진행형 치주염, 국소유년형 치주염의 조직파괴는 이들 치태세균 중 그람 음성 혐기성 세균의 내독소, 생산독소 및 분해산물에 의한 염증시작과 조직면역반응의 결과라고 본다. 따라서 이들 세균에 의해 야기되는 염증의 억제에는 치주질환의 치료 및 예방에 중요한 요소로서 이에 대한 많은 연구가 진행되어 오고 있다.

이러한 치주질환 염증의 진행과 조직파괴와 관련된 중요한 요소로는 Interleukin-1 β , PGE₂ 및 Collagenase를 들 수 있다. 이들 산물은 세균의 내독소 및 기타 물질의 자극에 의하여 세포의 외벽 및 조직에 손상이 가해지면 세포벽에서 membrane phospholipid가 효소에 의하여 분해되며 free arachidonic acid가 유리되면서 PGE₂ 생성 및 matrix metalloproteinases가 생성되며 이들 효소중의 하나가 collagenase이다. 이러한 PGE₂ 및 matrix metalloproteinases의 생성을 자극하는 가장 기본물질로는 macrophage 및 fibroblast로부터 세균독성의 자극으로 생성되는 IL-1 β 이다⁽¹⁾. IL-1 β 는 치주염에 의한 조직 파괴 과정에 작용하는 국소 매개체로서 중등도 및 중증의 치주염을 가진 환자의 치은조직에 있는 대식세포에

의해 주로 만들어진다. 또한 이것은 치주인대 섬유아세포로부터 PGE₂의 생산을 증가시키며 PGE₂는 결합조직의 파괴와 골흡수를 일으킨다^(2,4).

우루소디옥시콜산(Ursodeoxycholic acid, UDCA)은 친수성의 쓸개즙산으로 면역기능과 관련된 간질환에 효과적인 약물로 사용되고 있다. UDCA는 면역조절 기능을 갖고 있으며 T세포로부터 IL-2, IL-4, INF- γ 의 분비를 억제하며 B세포로부터 면역글로블린 생산을 억제하는 기능을 갖고 있다^(5,6,7,8,9). 뿐만아니라 단핵세포와 대식세포에서 IL-1 β 가 분비되는 것도 차단하는 기능이 있는 것으로 보고되고 있다^(10,11).

한방에서 치주질환의 치료를 위해 면역억제, 항균, 항염, 진통, 해열효과를 나타내는 생약제제를 오래전부터 사용해 온 보고들이 있다. 황백(黃柏: Phellodendri Cortex)^(12,13,14,15,16), 길경(桔梗: Platycodia Radix)^(17,18), 형개(荊芥: Nepetae Spica)^(19,20,21) 등이 중요한 한약제로 사용되어 왔다. 죽염은 천일염을 대나무에 충전시켜 700C내지 1500C의 고온에서 반복 소성시켜 얻은 것으로 잇몸의 염증을 완화시킨다는 보고들이 있다.

본 연구의 목적은 염증의 발생 및 진행에 중요한 역할을 하는 IL-1 β , PGE₂ 생성 및 collagenase활성도에 대한 UDCA 단독 및 한약제와의 혼합제제들의 억제능력을 관찰하는 것이다.

II. 연구재료 및 방법

1. 연구재료

2종의 약제를 연구주제로 선정하였다. UDCA를 각각 다음과 같이 2.56nM로 부터 7680nM까지 각각 9가지 농도로 분류하여 각각 실험에 사용하였으며 또한 UDCA 각각의 농도에 생약제제로 길경, 형개의 추출물 및 죽엽을 혼합하여 각각 9가지 농도로 분류하여 실험에 사용하였다. 농도의 산정은 nM 단위를 퍼센트 단위로 환산하면 2.56nM(0.0001%), 10nM(0.0004%), 50nM(0.002%), 150nM(0.006%), 256nM(0.01%), 512nM(0.02%), 1536nM(0.06%), 2560nM(0.1%), 7680nM(0.3%)과 같다.

시험처리군

① UDCA 단독처리군

최종시험농도 : 2.56, 10, 50, 150, 256, 512, 1536, 2560, 7680nM

② UCDA 복합처리군

최종시험농도

- i) 황백 0.1%+길경 0.1%+형개 0.1%+죽엽 3%+UDCA 2.56nM
- ii) 황백 0.1%+길경 0.1%+형개 0.1%+죽엽 3%+UDCA 10nM
- iii) 황백 0.1%+길경 0.1%+형개 0.1%+죽엽 3%+UDCA 50nM
- iv) 황백 0.1%+길경 0.1%+형개 0.1%+죽엽 3%+UDCA 150nM
- v) 황백 0.1%+길경 0.1%+형개 0.1%+죽엽 3%+UDCA 256nM
- vi) 황백 0.1%+길경 0.1%+형개 0.1%+죽엽 3%+UDCA 512nM
- vii) 황백 0.1%+길경 0.1%+형개 0.1%+죽엽 3%+UDCA 1360nM
- viii) 황백 0.1%+길경 0.1%+형개 0.1%+죽엽 3%+UDCA 2560nM

iv) 황백 0.1%+길경 0.1%+형개 0.1%+죽엽 3%+UDCA 7680nM

2. 연구방법

1) 수종의 추출물이 IL-1 β 생성에 미치는 영향

① 단핵세포 분리배양

전신질환이 없는 건강한 성인으로부터 heparine을 항응고제로 사용하여 60-120ml의 정맥혈액을 채집한다. 채집된 정맥혈액을 Histopaque-1077(Sigma, U.S.A.)을 이용한 밀도차 원침법을 이용하여 단핵세포를 분리하였다. 분리된 단핵세포는 phosphate buffer solution(PBS)으로 2-3회 세척하여 10% fetal bovine serum(FBS), 100U/ml penicillin과 100ug/ml streptomycin이 함유된 RPMI 1640(Gibco, U.S.A.)에서 95% 공기, 5% 산소, 100% 습도조건하에서 무균적으로 배양하였다.

② 혈액단핵세포에서 생약추출물이 IL-1 β 생성에 미치는 영향

배양된 혈액단핵세포를 24well plate에 10⁶ cell/well로 분주하고 첨가물을 가하지 않은 RPMI 1640배지를 대조군으로 하고 E. coli lipopolysaccharide (LPS) (25ug/ml)를 첨가한 well 및 LPS(25ug/ml)와 predisolone(10nM/ml)을 첨가한 well 및 LPS(25ug/ml)와 수종의 추출물을 5농도로 하여 첨가한 well을 실험군으로 하여 48시간 동안 배양하였다. 배양 후 각 세포 부유액을 모아 400xg으로 10분간 원침시키고 상층액을 모아 측정전까지 -80℃상태로 동결 보관하였다. 생산된 IL-1 β 의 양은 IL-1 β enzyme-immunoassay system(Amersham, U.K.)을 이용하여 측정하여 ELISA reader로 450nm에서 비색정량하였다.

2) 수종의 추출물이 PGE₂ 생산에 미치는 영향

① 치은섬유아세포 배양

교정 목적의 제1소구치 발치시 치아주위의 건강한 치은을 내사면 절개하여 세척한 후 상피부분은 절제하

여 건강한 치은 결합조직만을 채집하여 1mm² 정도로 세절한 다음, 60mm culture dish에 부착시킨 후 100 U/ml penicillin, 100µg/ml streptomycin 및 10% FBS 가 함유된 α-MEM(Gibco, U.S.A.)로 dish가 충만할 때까지 5% CO₂, 95% 공기, 100% 습도 조건하에서 무균적으로 밀생 배양하였다. 배지는 3일마다 교환하면서 무균적으로 배양하는데 dish가 충만할 정도로 밀생되면 HBSS로 2-3회 세척한 후 0.25% Trypsin-EDTA를 이용하여 세포를 dish에서 부유시킨 후 세포부유액을 모아 1200 rpm으로 10분간 원심시킨 후 세포침전물을 α-MEM 배지로 세포부유액을 만들어 2차 계대 배양하였다. 같은 방법으로 5회내지 7회 계대배양하여 실험에 사용하였다.

② 치은섬유아세포에서 수종의 추출물에 의한 PGE₂ 생산에 미치는 영향

5회내지 7회 계대 배양된 치은섬유아세포를 24 well plate에 α-MEM으로 105 cell/well로 분주한 후 rhIL-1β(Genzyme, U.S.A.) 1ng/ml을 첨가하여 PGE₂ 생산을 유도하였는데, 아무런 첨가제를 가하지 않은 well을 대조군으로 하고 rhIL-1β 만을 첨가한 well과, rhIL-1β와 각 추출물을 첨가한 well을 실험군으로 하여 48시간 동안 무균적으로 배양하였다. 배양 후 각 well의 배지를 수집하여 배지내의 PGE₂의 양을 PGE₂ enzyme-immunoassay system(Amersham, U.K.)을 이용한 후 ELISA reader로 450nm에서 비색 정량하였다.

3) 수종의 추출물이 Collagenase의 분해 억제 효과에 미치는 영향

① Crude enzyme의 준비

Crude enzyme 준비는 1 liter 에 hemin 5µg과 Menadione 0.5µg이 첨가된 Trypticase soy broth에 3일 동안 anaerobic chamber (10% CO₂, 10% H₂, 80% N₂)에서 *P. gingivalis*를 배양하였다²³⁾. 이 세포들을 1200rpm으로 20분동안 원심분리한 후 상층액에 ammonium sulfate로 처리하였다. 침전물을 20분동안 12,000 rpm으로 원심분리한 후 5mM CaCl₂를 포함하는 Tris-HCl buffer(pH 7.5) 50mM 30ml에 용해시켰다. 이

suspension은 같은 buffer를 통해 투석시키며 투석된 crude enzyme은 filter(0.22µm)를 통과시켜 연구에 사용하였다.

② Collagenolytic activity의 측정방법

Collagenolytic activity는 Collageno kit CLN-100(Tokyo, Japan)²³⁾을 사용하였다. 이 방법은 소화된 collagen만이 선택적으로 35°C에서 변성되어 에탄올에 의해 추출된다는 사실에 기초를 두고 있다. 분석해야 할 혼합물은 50mM Tris-HCl buffer(pH 7.5) 0.1ml와 brown tube에서 0.05% fluoro-sceinisothiocyanate (FITC), conjugated collagen type I으로 구성된 0.2ml 용액으로 이루어져 있다. 효소의 활성은 *P. gingivalis* Crude enzyme 0.2ml 첨가함으로써 시작되고 Blank와 표준실험에서는 5mM CaCl₂를 함유한 Tris-HCl buffer (pH 7.5)가 crude enzyme 대신에 첨가하고 35°C에서 120분 동안 반응시켰다. 이 반응은 50% EtOH에 녹인 80mM-O-Phenanthroline 10ul를 첨가하여 반응을 중지시킨 후 70% EtOH 0.5ml를 첨가한 후 3,000rpm에서 10분간 원심분리를 시켰다. 부유물을 약 500ul 채취하여 520nm(EM)/495nm(EX)에서 형광강도를 spectrofluorphotometer로 측정하였다.

III. 결과

치은섬유아세포의 LPS 자극에 의한 IL-1β 생산에 대하여 UDCA가 얼마나 생산을 억제하는가에 대한 연구결과 대부분의 UDCA 단독처리군 및 UDCA 복합처리군에서 유의성 있는 IL-1β 생산 억제 효과를 보이고 있다. 이들의 IL-1β 생산억제 효과는 UDCA 단독처리군 및 UDCA 복합처리군 모두에서 0.0001% UDCA군을 제외하고는 모든 농도군에서 에서 양성대조군인 prednisolone 투여군보다유의성 있게 억제하는 것을 알 수 있었다. 특히 0.01% 이상의 농도군에서는 IL-1β의 생산을 현저히 억제하였다. 그리고 UDCA 복합 처리군이 UDCA군에 비해 IL-1β의 생산억제 효과 면에서 약간 우세한 경향을 보였다(그림 1, 2).

UDCA가 IL-1β에 의한 PGE₂ 생산 억제 정도에 관한 실험결과, UDCA 및 UDCA 복합처리군 모두에서

Figure 1. UDCA 군의 IL-1 β 생산억제효과

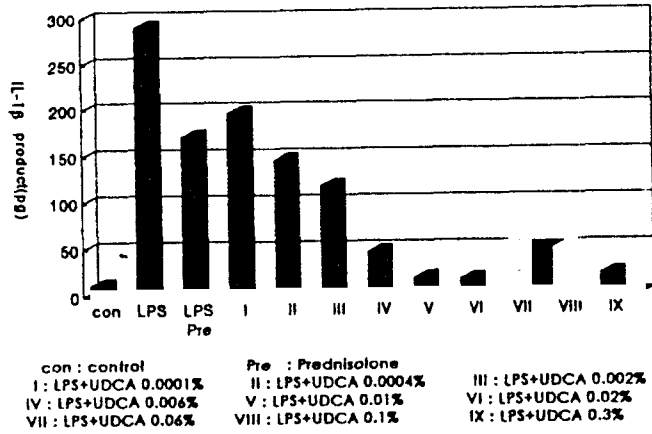


Figure 2. UDCA복합처리군의 IL-1 β 생산억제효과

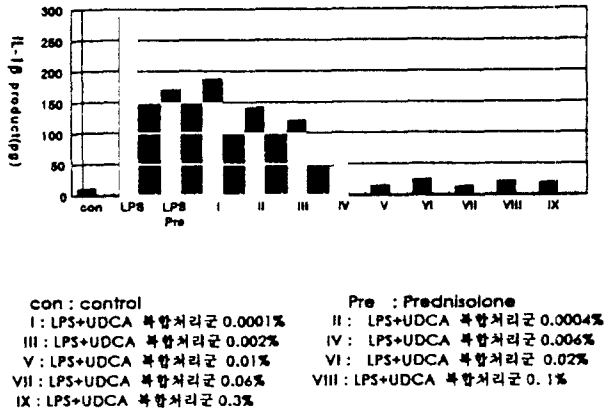
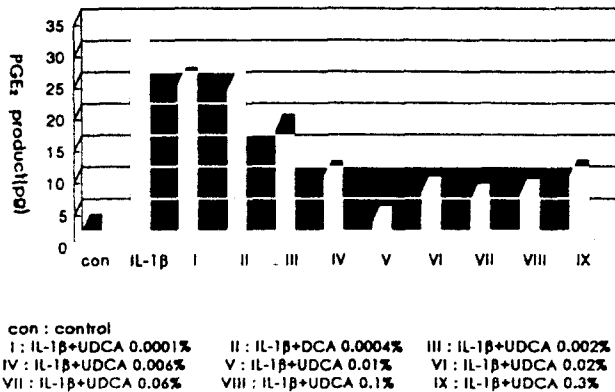


Figure 3. UDCA처리군의 PGE₂ 생산억제효과

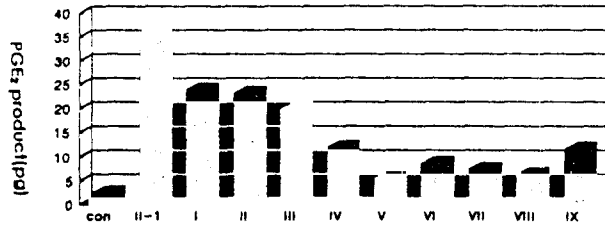


양성대조군인 IL-1 β 자극시의 PGE₂ 생산 효과에 비하여 높은 억제효과를 나타내었으며, UDCA군 및 UDCA 복합처리군 0.06% 이상에서 음성대조군과 유

사한 수준의 PGE₂ 생산을 나타냄으로써 PGE₂ 생산억제효과가 유의하게 큰 것으로 나타났다(그림 3, 4).

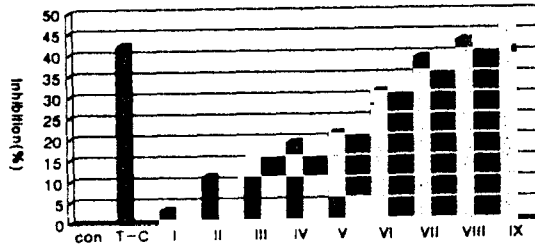
UDCA가 세균의 crude collagenase enzyme 활동에 의

Figure 4. UDCA 복합처리군의 PGE₂ 생산억제효과



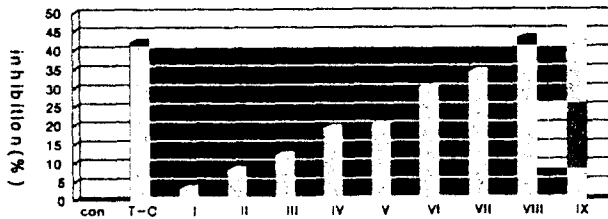
con : control
 I : IL-1 β +UDCA 복합처리군 0.0001% II : IL-1 β +UDCA 복합처리군 0.0004%
 III : IL-1 β +UDCA 복합처리군 0.002% IV : IL-1 β +UDCA 복합처리군 0.006%
 V : IL-1 β +UDCA 복합처리군 0.01% VI : IL-1 β +UDCA 복합처리군 0.02%
 VII : IL-1 β +UDCA 복합처리군 0.06% VIII : IL-1 β +UDCA 복합처리군 0.1%
 IX : IL-1 β +UDCA 복합처리군 0.3%

Figure 5. UDCA군의 Collagenase 분해억제효과



con : control T-C : Tetracycline III : UDCA 0.002%
 I : UDCA 0.0001% II : UDCA 0.0004% VI : UDCA 0.02%
 IV : UDCA 0.006% V : UDCA 0.01% VII : UDCA 0.06%
 VIII : UDCA 0.1% IX : UDCA 0.3%

Figure 6. 복합처리군의 Collagenase 분해억제효과



con : control T-C : Tetracycline
 I : UDCA 복합처리군 0.0001% II : UDCA 복합처리군 0.0004%
 III : UDCA 복합처리군 0.002% IV : UDCA 복합처리군 0.006%
 V : UDCA 복합처리군 0.01% VI : UDCA 복합처리군 0.02%
 VII : UDCA 복합처리군 0.06% VIII : UDCA 복합처리군 0.1%
 IX : UDCA 복합처리군 0.3%

한 type I collagenase 용해능력을 억제하는 효과에 있어 UDCA 단독투여군 및 UDCA 복합처리군 0.01% 이상 농도에서 20-50% 의 collagenase 활동을 억제하였으며, 특히 0.1% 및 0.3%의 UDCA군과 동일한 농도의 UDCA 복합처리군에서 양성대조군인 tetracycline의 collagenase 분해 억제효과와 유사한 정도의 효과를 나타내었다. UDCA의 농도가 증가함에 따라 collagenase 분해 억제효과가 높게 나타났다(그림 5, 6).

N. 결론

UDCA를 2.56nM로 부터 7680nM까지 각각 9가지 농도로 분류하여 실험에 사용하였으며 또한 UDCA 각각의 농도에 생약제제로 길경, 형개의 추출물 및 죽염을 혼합하여 9가지 농도로 분류하여 실험에 사용하였다. 이들이 IL-1 β 및 PGE₂의 생산 및 교원질분해 활성도에 미치는 영향을 평가하기 위하여, IL-1 β enzyme-immunoassay system, PGE₂ enzyme-immunoassay system, Collageno kit CLN-100을 이용한 실험 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. UDCA군과 UDCA복합처리군 모두에서 IL-1 β 의 생산을 억제하였으며, 그 중 UDCA 복합처리군이 UDCA군에 비해 다소 억제 효과가 높게 나타났다.
2. UDCA군과 UDCA복합처리군에서 PGE₂ 생산 억제효과를 보였으며 0.06% 이상의 농도군에서는 음성 대조군과 비슷한 정도의 억제효과를 보였다.
3. UDCA군과 UDCA복합처리군 모두에서 교원질 분해효소의 활성을 억제하였으며, 0.01% 이상의 농도군에서는 대조군에 비해 20-50% 정도의 억제효과를 나타내었다.

V. 총괄 및 고안

치은연하 치주낭 내의 치태세균에 의한 염증 및 면역반응 과정에서 대식세포와 단핵세포로부터 IL-1 β 가 다량 생성된다. IL-1 β 는 다기능의 cytokine으로 미생물의 침입, 염증, 면역반응, 조직손상에 대한 반응을 매개

하는 물질이다. IL-1 β 는 치은섬유아세포로부터 metalloproteinase, plasminogen activator, IL-6, PGE₂를 만들어 내게 한다. 또한 치주인대세포로부터 procollagenase와 PGE₂의 생성을 촉진한다. IL-1 β 는 염증중단계 효소인 group II phospholipase A₂를 자극하여 PGE₂ 생산을 증가시키는 것으로 알려져 있다. 이러한 매개물질은 결합조직의 파괴를 일으키게 되고 부착상실을 가져올 수도 있다^{1,2,3}.

UDCA에 의한 대식세포 또는 단핵세포로부터 IL-1 β 생산 억제는 glucocorticoid receptor-mediated 회로를 통해 일어난다. UDCA의 이러한 기능에 대한 정확한 작용기전은 밝혀져있지는 않지만, 다양한 면역조절 기능은 면역억제 작용이 있는 steroid glucocorticoid와 관련이 있는 것으로 생각된다^{4,11}.

생약혼합 추출물에 사용된 황백 추출물인 염기성 알칼로이드 phellodendrine은 세포면역억제, 살균 및 항염 기능을 가진 것으로 알려져 있다¹². 길경은 초롱꽃과 (Companuiaceae)에 속하는 도라지 (Platycodon grandiflorum A.)의 뿌리로서, 타액분비 촉진, 진통, 항염 및 항궤양 작용 등이 있는 것으로 보고되었다. 형개는 꿀풀과(Labiatae)에 속하는 것으로 추출물의 주성분은 항염작용이 있는 1-pulegone과 진통작용을 갖는 d-menthone으로서 해열작용도 있는 것으로 알려져 있다. 치주질환의 발생과 진행에 있어 치태세균에서 만들어진 독성물질에 의해 대식세포에서 IL-1 β 가 유리되고 이것이 치은 및 치주인대 섬유아세포로부터 PGE₂와 collagenase를 만들게 되어 치주조직의 파괴가 일어나게 된다. UDCA복합제제군이 UDCA를 단독으로 처리한 군보다 IL-1 β 생산 억제효과가 약간 우세하게 나타난 것으로 볼 때 함께 사용한 황백, 길경, 형개 및 죽염의 길항작용의 결과로 추정해볼 수 있다. 그러나 UDCA군과 UDCA복합제제군 모두에서 UDCA의 농도가 증가할 수록 IL-1 β 와 PGE₂ 생산억제효과가 증가하였으며 collagenase 분해능이 증가한 것으로 볼 때 이러한 항염 작용에는 UDCA가 주작용을 하는 것으로 생각된다. IL-1 β 와 PGE₂의 생산억제, collagenase 분해억제 효과를 적절히 나타내는 농도는 UDCA 0.001% 정도가 적당한 것으로 사료되며 in vivo에서의 안정성과 효능성을 고려한다면 더 많은 연구가 필요한 것으로 생각된다.

이러한 일련의 결과로 볼 때 UDCA 및 UDCA 혼합제제가 치주질환의 예방과 치료에 유용한 약제로서 개발될 가능성을 보여 주었다.

V. 참고문헌

- Matsuki, Y., Yamamoto, T., Hara, K.: Detection of inflammatory cytokine messenger RNA (mRNA)-expressing cells in human inflamed gingiva by combines in situ hybridization and immunohistochemistry. *Immunology*, 76:42-47, 1996.
- Richards, D., Rutherford, R.B.: The effects of Interleukin 1 on collagenolytic activity and prostaglandin-E secretion by human periodontal ligament and gingival fibroblast. *Arch. Oral Biol.*, 33:237-243, 1988.
- Offenbacher, S., Heasman, P.A., Collins, J.G.: Modulation of host PGE secretion as a determinant of periodontal disease expression. *J. Periodontol.*, 64:432-444, 1993.
- Tatakis, D.N.: Interleukin-1 bone metabolism : A review. *J. Periodontol.*, 64:416-431, 1993.
- Tanaka, H., Makino, Y., Miura, T., Hirano, F., Okamoto, K., Komura, K., Sato, Y., Makino, I. : Ligand-independent activation of the glucocorticoid receptor by ursodeoxycholic acid. Repression of the IFN-gamma-induced MHC class II gene expression via a glucocorticoid receptor-dependent pathway. *J. Immunology*, 156:1601-1608, 1996.
- Calmus, Y.P., Gane, P., Rouger and R. Poupon : Hepatic expression of class I or class II major histocompatibility complex molecules in primary biliary cirrhosis: effect of ursodeoxycholic acid. *Hepatology*. 16:358, 1990.
- Yoshikawa, M., Tsujii, K., Matsumura, I., Yamao, Y., Kubo H., Iscizaka, S.: Immunomodulatory effects of ursodeoxycholic acid on immune response. *Hepatology* 16:358, 1992.
- Calmus, Y.P., Podevin, P., Poupon, R. : Differential effects of chenodeoxycholic and ursodeoxycholic acid on interleukin-1, interleukin-6, and tumor necrosis factor- α production by monocytes. *Hepatology*. 16:710, 1992.
- Lacadle, F., K Paradis, K.: The immunosuppressive effect of ursodeoxycholic acid: a comparative in vitro study on human peripheral blood mononuclear cells. *Hepatology* 18:165, 1993.
- Calmus, Y., Weill, B., Ozier, Y., Chereau, C., Houssin, D., Poupon, R.: Immunosuppressive properties of chenodeoxycholic acid and ursodeoxycholic acids in the mouse. *Gastroenterology*. 103:617, 1992.
- Boupass, D., Pallogianni, T.F., Anastassiou, D., Balow, J.E.: Glucocorticoid action on the immune system: molecular and cellular aspects. *Clin. Exp. Rheumatol.* 9:413, 1991.
- Mori, H., Fuchimi, M., Inoue, N., Nagai, H., Koda, A., Nishioka, I.: Principle of the bark of *Phellodendron amurense* to suppress the cellular immune response. *Planta Med.* 60:445-449, 1994.
- Mori, H., Fuchimi, M., Inoue, N., Nagai, H., Koda, A., Nishioka, I. Meguro, K. : Principle of the bark of *Planta Med.* 61:45-49, 1995.
- Higaki, S., Hasegawa, Y., Morhashi, M. Takayoshi, Y. : The correlation of kampo formulations and their ingredients on anti-bacterial activities against *Propionibacterium acnes*. *H Dermatol*, 22:4-9, 1995.
- Uchiyama, T., Kamikawa, H., Ogita, Z. : Anti-ulcer effect of extract from *Phellodendri cortex*. *Yakugaku Zasshi*, 109: 672-676, 1989.
- Nakamoto, K., Sadamori, S., Hamada, T. : Effect of the crude drugs and breberine hydrochloride on the activities of fungi. *J. Prosthet. Dent.* 64: 691-694, 1990.
- 木村雄四郎: 和漢藥の世界, 創元社, p 53, 1974.
- 高木敬次郎: 日藥學雜誌, p. 951-969, 1972.
- 육창수: 현대방약합편, 계축문화사, p. 458, 1976.

20. Yamara, J. et al : Yakugaku Zasshi, 8(1) : 35. 1988.
21. 김민영, 서경숙, 전양현, 홍정표, 최유진, 하재몽: 죽염과 수종 생약성분을 배합한 치약이 치면세균막, 치은염 및 치석 침착에 미치는 영향에 관한 연구. 대한치과의사협회지 제 34권 제6호 p.433-442,1996.
22. Ono M, Okuda K, Takazoe. Oral Microbiol Immunol 2: 77-81:1987.
23. Nagai H, Hori H, Hattori T, Sunada Y, Terado K. Inflammation 4: 123-130:1984.

-Abstract-

Antiinflammatory effect of ursodeoxycholic acid and mixture of natural extracts combined with ursodeoxycholic acid

In-Cheol Rhyu¹, Sang-Nyun Kim², Chong-Pyoung Chung¹

1. Department of Periodontology, College of Dentistry, Seoul National University

2. LG Household and Health

There are many important factors in periodontal inflammation. IL-1 β , PGE₂ and collagenase are predominantly key factors. These inflammatory mediators induce gingival tissue and alveolar bone destruction. For the prevention and treatment of periodontal disease, it is necessary to inhibit IL-1 β , PGE₂ production and collagenase activity. Ursodeoxycholic acid(UDCA) has immunomodulatory properties, and there is evidence that some natural extracts show antiinflammatory activity to some degree.

The purpose of this study was to assess the inhibitory effect of UDCA and its mixture with natural extracts on IL-1 β , PGE₂ production and collagenase activity. Accordingly we assessed the effect of UDCA and its mixture combined with some natural extracts on inhibition of IL-1 β , PGE₂ production and collagenase activity.

For the IL-1 β inhibition study, cultured cells were exposed to 25 μ g/ml LPS. IL-1 β activity was measured by IL-1 β enzyme immunoassay system. Human gingival fibroblasts were prepared and cells (105/well) were seeded into culture plates. rhIL-1 β was added to induce PGE₂. The amount of PGE₂ in sample media was measured using enzyme immunoassay system. Crude collagenase was prepared from Porphyromonas gingivalis and collagenolytic activity was determined using a Collagene kit CLN-100. The test inhibitor was added to the assay mixture consisting of 0.1ml of 50mM Tris buffer(pH 7.5) and 0.2ml of substrate solution.

UDCA and UDCA combined with natural extracts generally inhibited IL-1 β production. groups above 0.01% UDCA strongly inhibited IL-1 β synthesis. Both groups inhibited IL-1 β -induced synthesis of PGE₂. In low concentration, the degree of inhibition was as same as prednisolone. In high concentration, each group was superior to prednisolone. UDCA group and UDCA mixture group exerted a moderate inhibition of collagenolytic enzyme.

The present study suggested that UDCA and its mixture with natural extracts could be further investigated as antiinflammatory drug for periodontal disease.

Key words: ursodeoxycholic acid, natural extracts, IL-1 β , PGE₂, collagenase