

# 牛膝이 齒牙 및 齒周疾患에 미치는 影響\*

林錫麟\*\*

## The Effect of *Achyranthis Bidentatae Radix*(ABR) on Dental caries and Periodontal disease

Im Seok-in  
Dept. of Oriental Medicine  
Graduate School, Taejon University

### Abstract

*Achyranthis Bidentatae Radix*(ABR) is important prescriptions that have been used in oriental medicine for stomatitis and wound healing. The study was done to evaluate the inhibitory effects of cytotoxicity, formation of superoxide on the macrophage and neutrophil, prostaglandins(PGE<sub>2</sub>), interleukins(IL-1 $\beta$ ), collagenase activity and synthesis of collagen and DNA.

The results were obtained as follows:

1. ABR was not showed the proliferation difference of human fibroblast and monocyte in 0.01% and 0.001% concentrations to be experimented and in result, it was concluded that they have no cytotoxicity but showed cytotoxicity in 0.1% concentrations.

2. ABR inhibited the formation of superoxide to 48% at the concentration of 0.001% in the mouse monocyte.

3. ABR inhibited the formation of superoxide to 40% at 0.001%, 58% at 0.0001% as compared with control in the human monocyte.

4. ABR inhibited the formation of superoxide

to 58% at 0.0001%, 40% at 0.001% in the human neutrophil.

5. ABR was not showed the proliferation difference of human monocyte in all concentrations to be experimented and in result, it was concluded that they inhibited the formation of prostaglandins(PGE<sub>2</sub>) in the human monocyte stimulated with *E. coli*.

6. ABR showed the all concentration of inhibiting the production of interleukins(IL-1 $\beta$ ) in the human monocyte stimulated with *E. coli*.

7. ABR didn't influence on collagen synthesis and total protein in fibroblasts.

8. ABR inhibited the collagenase activity to 84% at 0.1%, 69% at 0.2%, 76% at 0.5%, 91% at 0.001% respectively.

### I. 緒 論

牛膝은 百倍, 懷牛膝, 鷄膠骨 등으로 불리우며 苋科(비름과)에 屬한 多年生草本인 牛膝(懷牛膝)과 麻牛膝 및 牯牛膝(川牛膝)의 뿌리를 乾燥한 것으로 性은 平·無毒하고 味는 甘苦酸하며, 肝·腎經으로 들어가며<sup>1-3)</sup>, 生用하면 散瘀血, 消癰腫, 破癥結하므로 齒痛, 喉痺, 癰腫惡瘡 등을 治療하고, 熟用하면 補肝腎, 強筋骨하므로 腰膝骨痛, 四肢拘攣 등을 治療하는 效能이 있다<sup>1-4)</sup>.

齒牙는 齒髓와 齒髓腔을 둘러싸고 있는 象牙質, 琺瑯質, 白堊質의 硬組織으로 構成되어 飲食物의 攝取와 咀嚼作用으로 飲食物에 唾液을 끌고루 碎

\* 이 논문은 대전대학교 교내 학술연구비 지원에 의한 것임

\*\* 大田大學校 韓醫科大學 藥用植物學專攻

이게 하여 消化作用의 一段階 機能을 하며 發音에도 補助的인 役割을 擔當하고 있다. 齒周組織은 齒牙를 둘러싸고 있는 組織들을 總稱하며 齒槽骨, 齒周韌帶, 白莖質, 齒齦 등으로 構成되어 齒牙를 支持한다<sup>5-7)</sup>.

齒牙에 대하여 《素問·宣明五氣篇》<sup>8)</sup>에서는 “五臟所主 …… 腎主骨”이라 하였고 《靈樞·五味論》<sup>8)</sup>에서는 “齒者 骨之所終也”라 하였으며, 《靈樞·雜病》<sup>8)</sup>에서는 “齒痛不惡清飲 取足陽明, 惡清飲 取手陽明”이라 하여 人體의 臟腑와 經絡, 특히 腎經, 足陽明胃經, 手陽明大腸經과 密接한 關係가 있음을 말하였다.

齒牙 및 齒周疾患은 그 症狀에 따라 齒痛, 牙宣, 牙疳, 齒衄, 齒癰 등으로 多樣하게 表現되고 있는데 齒槽骨을 싸고 있는 齒齦은 口腔組織과 隣接해 있어 歷代文獻에서는 口齒의 病變을 함께 包括하고 있는 境遇도 있으나 대부분 齒痛을 主된 症狀으로 하고 있어 狹議의 概念으로 齒痛의 範疇에서 說明되고 있다.

齒病의 病因으로는 胃熱, 脾腎虛로 인한 境遇가 가장 많았으며 그 외 虛熱, 血虛, 濕熱, 蟲, 風熱, 痰熱, 瘀血 등 齒牙 自體의 病變뿐만 아니라 五臟六腑의 病變으로 인하여 發生할 수 있으며<sup>9-10)</sup>, 治療는 症狀를 鑑別하여 清胃止痛, 滋陰補腎, 祛風清熱, 疏風散寒, 消痰, 祛瘀 등의 方法을 使用하였으며 含漱法, 擦法 등의 外治法도 竝行하였다<sup>11)</sup>.

齒周疾患이란 一般的으로 齒齦에만 局限되어 發生하는 齒齦疾患과 齒齦 出血과 腫脹, 齒周囊의 形成 및 齒槽骨의 破壞 등으로 慢性化되어 壯年期와 老年期 齒牙喪失의 重要한 原因이 되는 齒周疾患로 나뉜다<sup>5-7,12)</sup>.

齒牙 및 齒周疾患에 대한 研究로는 張<sup>13)</sup>이 齒痛의 針灸治療에 대한 文獻的 考察을 報告하였으며, 宋<sup>9)</sup>이 齒痛의 病因 病機에 대한 文獻的 考察을 報告하였고, 李<sup>10)</sup>가 齒病의 原因 및 治療에 대한 文獻的 考察을 報告하였으며, 齒牙가 屬한 口腔의 疾患에 대한 多數의 實驗的 研究 報告<sup>14-16)</sup>는 있었으나 牛膝과 直接的인 齒牙 및 齒周疾患에 대한 實驗的 研究는 아직 接하지 못하였다.

이에 著者는 牛膝이 齒牙 및 齒周疾患에 미치는

實驗的 研究를 위하여 in vitro 모델로 人體의 纖維芽細胞, 單核細胞, 中性白血球와 흰쥐의 單核細胞를 利用한 細胞毒性實驗, superoxide 生成 抑制效果, immunoassay를 利用한 prostaglandins(PGE<sub>2</sub>) 및 interleukins(IL-1β) 生成 抑制效果, <sup>14</sup>C-proline를 利用한 collagen 合成 및 <sup>3</sup>H-thymidine를 利用한 細胞增殖 促進效果인 DNA 合成, collagenase 活性 抑制效果를 測定하는 實驗을 하여 有意性 있는 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

## II. 實驗材料 및 方法

### 1. 材料

#### 1) 人體

單核細胞 및 中性白血球의 分離培養은 全身疾患이 없는 成人으로 부터 구연산을 抗凝固劑로 使用하여 320ml의 靜脈血液을 採集하였고, 纖維芽細胞 分離培養은 產婦人科에서 生後 3日된 幼兒의 包莖手術時 切開된 袍皮組織을 直徑 3.5mm petri dish에서 無菌的으로 細密하게 切開하여 使用하였다.

#### 2) 動物

生後 8週齡의 female hairless mouse(LG화학 기술원 바이오텍 연구소) 18마리를 溫度 24±3℃, 相對濕度 55±5%, 換氣回數 10-12回/hr, 照明(07:00-19:00), 照度 150-200 lux로 設定된 動物室에서 마우스용 固形飼料(퓨리나사료(주))를 自由給食시켰고 飲水는 상수도 물을 자유롭게 攝取시켰다. 動物入手 後 약 1週日間 動物室에서 順化시켰으며 順化期間中 一般狀態를 觀察하여 健康한 動物만을 實驗에 使用하였다.

#### 3) 藥材

實驗에 使用한 藥劑는 大田大學校 附屬韓方病院에서 購入한 後 精選하여 使用하였다.

### Prescription of Achyranthis Bidentatae Radix(ABR)

韓藥名	生藥名	重量(g)
牛膝	Achyranthis Bidentatae Radix	150

## 2. 方法

## 1) 檢液調劑

牛膝을 HBSS 緩衝液에 溶解시켜 試驗濃度는 各 試驗方法에 따라 0.1, 0.01, 0.001, 0.0001% 濃度を 製造하여 實驗에 使用하였다.

## 2) 採血 및 血清과 細胞分離培養

## ① 單核細胞의 分離培養

全身疾患이 없는 健康한 成人으로부터 구연산을 抗凝固劑로 使用하여 320ml의 靜脈血液을 採集하였다. 採集된 靜脈血液을 1200rpm에서 10分 동안 遠心分離한 後에 一次的으로 中層의 白血球 濃縮液을 回收하여 二次的으로 RPMI 1640 培地와 1:1의 比率로 稀釋한 後에 50ml의 遠心分離管에 ficoll-paque(pharmacia biotech) 12ml을 添加한 後에 稀釋된 血液 30ml을 中層이 되도록 주의깊게 添加하여 1600rpm에서 30分 동안 遠心分離한 後에 血清이 包含된 上層을 除去하고 單核細胞가 含有된 中層을 주의깊게 稀釋한 다음에 3배의 RPMI 1640 培地를 添加하고 800rpm에서 10分 동안 遠心分離 시킨 다음 上騰液을 버리고 RPMI 1640 培地를 10ml 添加하고 부드럽게 pipetting한 다음에 800rpm에서 10分 동안 遠心分離한 後에 上騰液을 버리고 RPMI 1640 培地를 添加하여 pipetting한 後에 24-well plate에  $10^6$  cell/well로 분주하고 95% 공기, 5%  $CO_2$ , 100% 濕度 條件下에서 無菌的으로 培養하였다.

## ② 中性白血球의 分離培養

全身疾患이 없는 健康한 成人으로부터 구연산을 抗凝固劑로 使用하여 320ml의 靜脈血液을 採集하였다. 採集된 靜脈血液을 1200rpm에서 10分 동안 遠心分離한 後에 一次的으로 中層의 白血球 濃縮液을 回收하여 二次的으로 RPMI 1640 培地와 1:1의 比率로 稀釋한 後에 50ml의 遠心分離管에 ficoll-paque(pharmacia biotech) 12ml을 添加한 後에 稀釋된 血液 30ml을 中層이 되도록 주의깊게 添加하여 1600rpm에서 30分 동안 遠心分離한 後에 血清이 包含된 上層液과 單核細胞 및 ficoll-paque를 除去하고 沈澱된 赤血球 및 中性白血球에 同一量의 RPMI 1640를 添加하고 PBS 緩衝液에 溶解시킨 3% dextran 20ml을 添加하여 10

分 동안 常溫에서 放置시킨 後에 中性白血球가 豊富한 上騰液을 取하여 1200rpm에서 10分 동안 遠心分離 시키고 上騰液을 버린다. 남아있는 赤血球를 除去하기 위하여 먼저 0.2%의 PBS 緩衝液 10ml을 30秒 동안 處理한 後에 1.6% PBS 緩衝液을 즉시 添加하여 等張液으로 回復시킨 後에 細胞浮遊物을 1200rpm에서 10分 동안 遠心分離 시킨 後에 上騰液을 버리는 方法으로 赤血球 溶血을 한번 더 反復한 後에 RPMI 1640 培地를 添加하여 pipetting한 後에 24-well plate에  $10^6$  cell/well로 분주하고 95% 공기, 5%  $CO_2$ , 100% 濕度 條件下에서 無菌的으로 培養하였다.

## ③ 纖維芽細胞의 分離培養

産婦人科에서 生後 3日된 乳兒의 包莖手術時 切開된 袍皮組織을 直徑 3.5mm petri dish에서 無菌的으로 細密하게 切開하여 penicillin, streptomycin, fetal bovine serum 10%를 含有하는 DEME 培地에서 2週 동안 培養한 後에, 바닥에 붙은 纖維芽細胞를 trypsin 溶液을 2번 處理하여 버리고 血清含有 培地를 添加하여 여러번 pipetting한 後에 새로운 culture bottle에 細胞를 분주하여 subculture 하였다.

## 3) Cytotoxicity test

生後 3日된 乳兒의 袍皮로 부터 primary culture한 纖維芽細胞 血液으로부터 純粹分離 培養한 monocyte를 24-well plate에  $10^6$  cell/well 되도록 분주한 다음 10% FBS가 含有된 DEME 및 RPMI 1640 培地에서 하루동안 培養한 다음날 既存의 培地를 新鮮한 培地로 交替하여 24時間 동안 培養한 後에 HBSS 緩衝液으로 바닥에 붙은 細胞層을 洗滌한 다음 血清이 包含되지 않은 MEM 培地 0.9ml를 添加한 다음, 牛膝을 試驗濃度  $100\mu$ 를 添加한 다음 24時間 培養한 後에 HBSS 緩衝液에 溶解시킨 MTT(methyl thiazol-2-yl-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)溶液 0.5ml을 各 well에 넣고 4時間 동안 培養한 後에 MTT 溶液을 除去하고 formazon 結晶을 溶解시키기 위하여 DMSO를  $500\mu$ 씩 添加하였다. Plate를 잘 흔든 後에 microplate reader로 570nm에서 吸光度를 測定하였다. 對照群으로는 매 實驗마다 實驗溶液이 들

어있지 않은 MEM 培養液 well을 사용하였다. 모든 實驗結果는 對照群에 對한 百分率로 計算하였다.

4) Macrophage 및 neutrophil의 superoxide 生成 測定

24-well plate를 사용하여 각 well당 HBSS 緩衝溶液에 稀釋시킨 사람의 macrophage 혹은 neutrophil, mouse macrophage(ATCC TIB 67)를  $10^6$ cell/well 되게 아래와 같이 添加하고 FMLP를 處理하고 37°C에서 15分 동안 培養하여 細胞를 刺戟한 다음에

- \*. macrophage  $10^6$ 개 0.45ml
- \*. FMLP  $10^{-6}$ M 0.05ml

cytochrome C, superoxide dismutase, HBSS를 다음과 같이 處理 한 後 37°C에서 10分間 保溫하고

- \*. 試驗物質  $\times 10$  濃縮 0.1ml
- \*. cytochrome C 80  $\mu$ M 0.1ml
- \*. superoxide dismutase 30 $\mu$ g 0.1ml
- \*. HBSS solution 1.01ml(總反應液)

刺戟物質인 opsonized zymosan A를 最終濃度 1.3 mg/ml 되게 1ml을 添加하고 振蕩하면서 37°C에서 90分間 保溫한 後에, 4°C에 10分間 넣어 反應을 停止시킨 다음에 4°C, 1500rpm, 10min. 동안 遠心分離한 後 上騰液을 550nm에서 optical density를 測定하고 superoxide anion의 生成量은 다음식에 의하여 計算된다.

$$O^{-2} \equiv \frac{\Delta O.D.}{21.0} \times 10^3 \text{ (nmoles/ } 10^6 \text{ cell. min)}$$

$$\Delta O.D. \equiv (B-D)-(A-C) \equiv (B+C)-(D+A)$$

	A	B(對照群)	B(藥效劑)	C	D
cells	0.5ml	0.45ml	0.45ml	0.5ml	0.45ml
cytochrome C	0.1ml	0.1ml	0.1ml	0.1ml	0.1ml
SOD	-	-	-	0.1ml	0.1ml
FMLP( $10^{-6}$ M)		0.05ml	0.05ml		0.05ml
zymosan	-	0.1ml	0.1ml	-	0.1ml
新規藥效劑	-	-	0.1ml	-	
反應液	0.4ml	0.3ml	0.2ml	0.3ml	0.2ml
總 合	1.00ml	1.00ml	1.00ml	1.00ml	1.00ml

5) 單核白血球의 prostaglandins(PGE<sub>2</sub>) 生成에 미치는 影響

血液에서 分離한 血液 單核白血球를 24-well plate에 0.8ml 添加하여  $10^6$ cell/well 되도록 분주하고 RPMI 1640 培地 200 $\mu$ l를 添加한 well을 對照群, E. coli LPS(250 ppm) 100 $\mu$ l와 牛膝(1, 0.1, 0.01, 0.001%) 100 $\mu$ l를 添加한 well을 實驗群으로 하여 24時間 동안 培養한 後, arachidonic acid 50 $\mu$ l를 添加하여 30分 동안 더 培養한다. 염소의 항-마우스 IgG를 附着시킨 96-well plate의 blank well에 50 $\mu$ l 緩衝溶液(0.9% NaCl, 0.1% 소 血清 albumin, 0.5% kathon을 含有하는 0.1M 磷酸 緩衝溶液)을 添加하고, 標準(0, 1, 2, 4, 8, 16, 32pg/well)well에는 50 $\mu$ l의 適當 濃度の 標準溶液을 添加한 다음 實驗群 well에 上記의 細胞培養液 50 $\mu$ l 添加하고, blank well을 除外한 모든 well에 50 $\mu$ l의 prostaglandins(PGE<sub>2</sub>)에 對한 抗體를 添加한 다음 4°C에서 3時間 동안 維持시킨 後 繼續해서 50 $\mu$ l의 prostaglandins(PGE<sub>2</sub>) conjugate peroxidase를 blank well을 除外한 모든 well에 添加하여 다시 4°C에서 1時間 동안 維持시킨 後 洗滌緩衝溶液(0.05% 트윈 20을 含有하는 磷酸 緩衝溶液: pH7.5)로 4번 洗滌하고 常溫에서 150 $\mu$ l의 酵素機質(20%의 디메틸포르마이드에 溶解된 3, 3', 5, 5' -테트라메틸벤지딘/과산화수소)를 즉시 添加하고 25°C에서 30分 동안 維持시키고 1M 황산 100 $\mu$ l를 添加한 後 microplate reader로 450nm에서 吸光度를 測定하여 實施例 혹은 比較例의 吸光度 값(T)에 blank의 吸光度 값(B)를 나눈 다음 100을 곱하여 % 값으로 標示하여 나타내었다.

6) 單核白血球의 interleukins(IL-1 $\beta$ ) 生成에 미치는 影響

血液에서 分離한 血液 單核白血球를 24-well plate에 0.8ml 添加하여  $10^6$ cell/well 되도록 분주하고 RPMI 1640 培地 200 $\mu$ l를 添加한 well을 對照群, E. coli LPS(250 ppm) 100 $\mu$ l를 添加한 well 및 LPS(250 ppm) 100 $\mu$ l와 indomethacin, LPS(250ppm) 100 $\mu$ l와 牛膝(1, 0.1, 0.01, 0.001%) 100 $\mu$ l를 添加한 well을 實驗群으로 하여 24時間 동안 培養한 後, arachidonic acid 50 $\mu$ l를 添加하여 30分 동안 더 培養한다. Interleukins(IL-1 $\beta$ )의 抗體가 附着된 96-well plate의 well에 標準溶液(0,

10.24, 25.6, 64, 160, 400pg/well)을 50 $\mu$ l 添加한 다음 實驗群 well에 上記의 細胞 培養液 50 $\mu$ l 添加하고, 모든 well에 50 $\mu$ l의 biotinylated antibody reagent를 添加한 다음 25 $^{\circ}$ C에서 3時間 동안 維持시킨 後 洗滌緩衝液으로 3回 洗滌하고, streptavidin-HRP conjugate를 모든 well에 添加하여 다시 25 $^{\circ}$ C에서 30分 동안 維持시킨 後 다시 洗滌緩衝液으로 3번 洗滌하고 100 $\mu$ l의 酵素機質을 즉시 添加하고 25 $^{\circ}$ C 暗室에서 plate의 뚜껑을 열어둔 채로 30分 동안 維持시키고 0.18M 황산 100 $\mu$ l를 添加한 後 microplate reader로 450nm에서 吸光度를 測定하여 標準溶液의 吸光度 값으로 standard curve를 作成하여 實驗群의 interleukins(IL-1 $\beta$ ) 生成量を 算定하였다.

#### 7) 纖維芽細胞의 total protein 및 collagen 合成 測定

生後 3日된 乳兒의 袍皮로부터 primary culture 한 纖維芽細胞를 24-well plate에 10<sup>6</sup>cell/well 되도록 분주한 다음 10% FBS가 含有된 DMEM 培地에서 하루 동안 培養한 다음날 既存의 培地를 新鮮한 培地로 交替하여 24時間 동안 培養한 後에 HBSS 緩衝液으로 바닥에 붙은 細胞層을 洗滌한 다음 血清과 proline이 包含되지 않은 MEM 培地 0.8ml를 添加한 다음 藥效劑로 ascorbic acid 및 牛膝을 各各 試驗濃度 添加한 다음 C<sup>14</sup>-proline(10 $\mu$  Ci)100 $\mu$ l를 包含한 培養液으로 細胞를 培養하였다. 24時間이 經過한 後에 總蛋白質과 collagen 蛋白質을 測定하였다. 먼저 細胞外 總蛋白質의 合成量を 測定하기 위하여 각 well의 培養液을 한쪽 끝이 封印된 透石管에 넣고 다른쪽 끝을 封印하여 cold buffer(Tris-Hcl 0.05mol/L, NaCl<sub>2</sub> 0.05mol/L, phenylmethylsulfonyl fluoride 0.3mN)로 24時間 透石을 完了한 다음 各各 100 $\mu$ l를 取하여 counting vial에 담아 10ml의 scintillation cocktail을 넣어 liquid scintillation counter(LSC)로 1分間 방사능을 測定하였다. 細胞內 總蛋白質의 合成量を 測定하기 위하여 細胞培養液을 除去한 各 well에 0.1N NaOH 및 phenylmethylsulfonyl fluoride 0.3mN를 添加한 다음 60 $^{\circ}$ C에서 30分 동안 維持하여 細胞膜을 破壞시

킨 後 細胞均質液을 한쪽 끝이 封印된 透石管에 넣고 다른쪽 끝을 封印하여 cold buffer(Tris-Hcl 0.05mol/L, NaCl 0.2mol/L, CaCl<sub>2</sub> 0.05mol/L, phenylmethylsulfonyl fluoride 0.3mN)로 24時間 透石을 完了한 다음 各各 100 $\mu$ l를 取하여 counting vial에 담아 10ml의 scintillation cocktail을 넣어 LSC로 1分間 방사능을 測定하였다. 細胞內·外 collagen 蛋白質의 合成量を 測定하기 위하여 透石을 完了한 細胞培養液 및 細胞均質液을 各各 100 $\mu$ l 取하여 1.5ml microtube에 넣고 collagenase buffer(0.05M Tris-Hcl, 1mM CaCl<sub>2</sub>, 0.3mM phenylmethylsulfonyl fluoride), collagenase 酵素(100ppm) 100 $\mu$ l를 添加한 後에 3時間 동안 37 $^{\circ}$ C에서 維持시켜 collagen을 완전히 分解시킨 다음에 分解되지 않은 蛋白質을 除去하기 위하여 50%의 trichloroacetic acid 및 1% tannic acid를 含有하는 溶液을 500 $\mu$ l 添加한 다음에 4 $^{\circ}$ C에서 30分 동안 沈澱시킨 後에 1000xg에서 5分間 遠心分離시킨 다음에 上騰液을 取한 다음에 100 $\mu$ l를 取하여 counting vial에 담아 10ml의 scintillation cocktail을 넣어 LSC로 1分間 방사능을 測定하였다.

#### 8) 細胞의 成長速度 測定

生後 3日된 乳兒의 袍皮로부터 primary culture 한 纖維芽細胞를 24-well plate에 10<sup>6</sup>cell/well 되도록 분주한 다음 10% FBS가 含有된 DMEM 培地에서 하루 동안 培養한 다음날 既存의 培地를 新鮮한 培地로 交替하여 24時間 동안 培養한 後에 HBSS 緩衝液으로 바닥에 붙은 細胞層을 洗滌한 다음 血清과 proline이 包含되지 않은 MEM 培地 0.8ml를 添加한 後 藥效劑로 ascorbic acid 과 牛膝을 各各 試驗濃度 100 $\mu$ l를 添加한 다음 H<sup>3</sup>-thymidine(10 $\mu$  Ci) 100 $\mu$ l를 包含한 培養液으로 細胞를 培養하였다. 24時間이 經過한 後에 各 well에 0.1N NaOH를 添加한 다음 60 $^{\circ}$ C에서 30分 동안 維持하여 細胞膜을 破壞시킨 後 各各 100 $\mu$ l를 取하여 counting vial에 담아 10ml의 scintillation cocktail을 넣어 LSC로 1分間 방사능을 測定하여 細胞의 成長速度를 測定하였다.

#### 9) Collagenase 活性 測定

25개의 1.5ml 에펜돌프튜브(ependorf)에 2%의 赤色 collagen 機質인 아조콜(azocoll)溶液 100 $\mu$ l를 各各 添加하여 한개의 에펜돌프튜브는 blank로 使用하고, 標準 活性度 曲線을 作成하기 위하여 3개의 튜브에는 Sigma로 부터 購入한 collagenase type I 인 標準酵素溶液(collagen 分解活性度: 315 units/mg)을 10, 100, 200ppm되게 添加하고 實驗 群으로 tetracycline 과 牛膝을 各各 試驗濃度 100  $\mu$ l씩 處理하고 collagenase(100ppm) 100 $\mu$ l씩 處理한 後 緩衝溶液(0.05M Tris-Hcl, 1nM CaCl<sub>2</sub>, 7.8)를 總反應液이 500 $\mu$ l되게 添加하여 37 $^{\circ}$ C 恒溫 器에서 18時間 동안 反應시키고 에펜돌프튜브를 10000g에서 5分 동안 遠心分離시켜 分解되지 않은 collagen은 沈澱시키고 分解된 collagen을 含有하는 上騰液을 取하여 520nm에서 吸光度를 測定하여 標準活性度 曲線을 作成하고 標準曲線으로부터 酵素의 活性濃度を 換算하여 實驗群과 對照群의 酵素活性度を 比較評價하였다.

### III. 實驗 成績

#### 1. Cytotoxicity test

1) 牛膝의 human fibroblast에 對한 細胞毒性에 미치는 影響

사람의 纖維芽細胞의 增殖에 對한 牛膝의 抑制 效果를 研究하기 위하여 0.001, 0.01, 0.1%의 濃度로 24時間 동안 處理한 結果, 實驗群은 모든 濃度에서 對照群과 纖維芽細胞의 增殖에서 차이가 없는 것으로 나타나 牛膝에는 細胞毒性이 없는 것으로 나타났다(Table I).

Table I. The effect of ABR on the cell cytotoxicity

Concentration Test Group	0.1%	0.01%	0.001%
control	0.118 $\pm$ 0.028		
ABR*	0.101 $\pm$ 0.027	0.184 $\pm$ 0.013	0.212 $\pm$ 0.010

P-value > 0.05

\* ABR : Achyranthis Bidentatae Radix

2) 牛膝이 human monocyte의 cytotoxicity에 미치는 影響

사람의 單核細胞 增殖에 對한 牛膝의 抑制 效果를 研究하기 위하여 0.001, 0.01, 0.1%의 濃度로 90分 동안 處理한 結果, 實驗群은 0.001, 0.01%의 濃度에서는 對照群과 monocyte의 cell viability에서 차이가 없는 것으로 나타나 牛膝은 細胞毒性이 없는 것으로 나타났고 특히 0.1% 濃度에서는 유의적인 毒性 效果가 있는 것으로 보인다(Table II).

Table II. The effect of ABR on the cell cytotoxicity in the human monocyte

Concentration Test Group	0.1%	0.01%	0.001%
control	0.286 $\pm$ 0.037		
ABR	0.085 $\pm$ 0.003	0.293 $\pm$ 0.003	0.315 $\pm$ 0.005
P-value > 0.05			

2. Macrophage 및 neutrophil의 superoxide 生成 測定

1) 牛膝이 mouse monocyte의 superoxide 生成에 미치는 影響

Zymosan A로 刺戟한 mouse monocyte의 superoxide 生成에 對한 牛膝의 效果를 0.01%와 0.001%의 濃度에서 實驗한 結果 0.001%의 濃度에서 83%의 抑制 效果가, 0.01%의 濃度에서는 57%의 억제 效果가 나타났다(Table III).

Table III. The effect of ABR on the formation of superoxide in mouse monocyte

NO	Treatment Group(%)	A (O.D.)	B (O.D.)	C (O.D.)	D (O.D.)	superoxide (nmols)	%
1	control	0.136	0.192	0.137	0.142	2.429	100
2	ABR 0.01	0.136	0.163	0.137	0.142	1.048	43
3	ABR 0.001	0.136	0.150	0.137	0.142	0.429	17

2) 牛膝이 human monocyte의 superoxide 生成에 미치는 影響

Zymosan A로 刺戟한 human monocyte의 superoxide 生成에 對한 牛膝의 效果를 0.001%와 0.0001%의 濃度에서 實驗한 結果 0.0001% 濃度에서 58%의 抑制 效果가, 0.001% 濃度에서는 40%의 抑制 效果가 있는 것으로 나타났다(Table IV).

Table IV. The effect of ABR on the formation of superoxide in human monocyte

NO	Treatment Group(%)	A (O.D.)	B (O.D.)	C (O.D.)	D (O.D.)	superoxide (nmoles)	%
1	control	0.566	0.692	0.540	0.488	8.476	100
2	ABR 0.001	0.566	0.622	0.540	0.488	5.143	60
3	ABR 0.0001	0.566	0.589	0.540	0.488	3.571	42

3) 牛膝이 human neutrophil의 superoxide 生成에 미치는 影響

Zymosan A로 刺戟한 human neutrophil superoxide 生成에 對한 牛膝의 效果를 0.001%와 0.0001%의 濃度에서 實驗한 結果 0.0001% 濃度에서 58%의 抑制效果가, 0.001% 濃度에서는 40%의 抑制效果가 있는 것으로 나타났다(Table V).

Table V. The effect of ABR on the formation of superoxide in human neutrophil

NO	Treatment Group(%)	A (O.D.)	B (O.D.)	C (O.D.)	D (O.D.)	superoxide (nmoles)	%
1	control	0.555	0.694	0.515	0.536	5.619	100
2	ABR 0.001	0.555	0.724	0.515	0.536	7.048	60
3	ABR 0.0001	0.555	0.783	0.515	0.536	0.536	42

3. 牛膝의 單核白血球의 prostaglandins(PGE<sub>2</sub>) 生成에 미치는 影響

E. coli LPS로 刺戟한 human monocyte의 prostaglandins(PGE<sub>2</sub>)의 生成에 對한 牛膝의 效能·效果를 試驗한 結果, 牛膝의 모든 濃度에서 生成 抑制效果가 없는 것으로 나타났다(Table VI).

Table VI. The effect of ABR on prostaglandins of human monocyte stimulated with E. coli LPS

Treatment Group (%)	平均(O.D.)	標準偏差 (S.D.)	PGE <sub>2</sub> (pg)	%
blank	0.010	0.018	240.534	101
control	0.012	0.011	236.670	100
indomethacin 0.01	0.187	0.030	57.223	24
indomethacin 0.001	0.046	0.012	179.229	76
indomethacin 0.0001	0.033	0.012	199.124	84
ABR 0.01	0.000	0.009	280.537	118
ABR 0.001	0.004	0.011	251.149	106
ABR 0.0001	0.004	0.008	251.149	106

P-value < 0.0005

4. 牛膝의 單核白血球의 interleukins(IL-1β) 生成에 미치는 影響

E. coli LPS로 刺戟한 human monocyte의 interleukins(IL-1β) 生成에 對한 牛膝의 效能·效果를 試驗한 結果, 모든 濃度에서 確실한 억제效果가 나타났고 특히 0.01% 濃度에서 탁월한 生成 抑制效果가 있는 것으로 나타났다(Table VII).

Table VII. The effect of ABR on interleukins of human monocyte stimulated with E. coli LPS

Treatment Group(%)	平均(O.D.)	標準偏差 (S.D.)	IL-1β (pg)	%
blank	0.194	0.019	624.889	33
control	0.579	0.023	1908.222	100
indomethacin 0.01	0.655	0.019	2196.000	114
indomethacin 0.001	0.571	0.011	1881.556	99
indomethacin 0.0001	0.530	0.011	1746.000	91
ABR 0.01	0.271	0.033	881.556	46
ABR 0.001	0.485	0.029	1597.111	82
ABR 0.0001	0.495	0.027	1628.222	85

5. 牛膝이 纖維芽細胞의 total protein 및 collagen 合成에 미치는 影響

人體의 纖維芽細胞에서 total protein 및 collagen 合成에 對한 牛膝의 效能·效果를 研究하기 위하여 <sup>14</sup>C-proline를 包含한 細胞培養液에 牛膝 0.01, 0.05, 0.2%의 濃度에서 24時間 處理한 結果 모든 濃度에서 促進시키는 效果가 없는 것으로 나타났다(Table VIII).

Table VIII. The effect of ABR on the synthesis of total protein and collagen in human fibroblast

Treatment Group (%)	total protein (cpm/10 <sup>6</sup> cell)	total protein (%)	collagen (cpm/10 <sup>6</sup> cell)	collagen (%)
control	3320	100	266	100
ascorbic acid 0.01	4046	121	324	121
ascorbic acid 0.05	2988	90	247	92
ascorbic acid 0.2	1457	43	124	40
ABR 0.01	2264	68	207	77
ABR 0.05	2247	67	178	66
ABR 0.2	994	29	88	33

6. 牛膝이 collagenase 活性에 미치는 影響

Collagenase 活性에 對한 抑制效果를 研究하기 위하여 牛膝을 0.01, 0.1, 0.2, 0.5%의 試驗濃度에서 18時間 동안 處理한 結果, positive control로 使用한 tetracycline은 0.1%의 濃度에서 80%의 抑制效

果를 나타내어 가장 높았고, 牛膝은 0.5%의 濃度에서 76%, 0.2%의 濃度에서는 69%, 0.001 濃度에서는 91%, 0.1%의 濃度에서는 84%의 抑制效果를 나타내었다(Table IX).

Table IX. The effect of ABR on the viability of collagenase in human fibroblast

Treatment Group(%)	平均 (O.D)	標準偏差 (S.D)	% activity of control	%
blank	0.005	0.004		
control	0.134	0.002	100.00	100
tetracycline 0.1	0.027	0.004	38.87	20
tetracycline 0.01	0.105	0.006	73.66	78
ABR 0.5	0.102	0.008	71.58 <sup>a</sup>	76
ABR 0.2	0.093	0.002	66.90 <sup>a</sup>	69
ABR 0.1	0.122	0.006	84.68 <sup>a</sup>	91
ABR 0.01	0.112	0.004	77.69 <sup>c</sup>	83

a : P-value < 0.0005  
 b : P-value < 0.001  
 c : P-value < 0.01

#### IV. 考 察

齒牙는 消化器系統의 첫 部分으로 口腔內에서 上顎骨과 下顎骨의 齒槽部 齒槽緣에 병렬로 박혀 있는 高度로 石灰化된 硬組織性 器官으로 飲食物의 攝取와 咀嚼作用으로 飲食物에 唾液이 곁고루 섞이게 하여 消化作用의 1단계 機能을 하며, 또한 正確한 發音을 내게 하는데 있어 重要한 役割을 하고 있다. 齒牙의 대부분은 象牙質이라고 하는 硬組織으로 形成되어 있으며 그 表面層의 齒冠部는 琺瑯質로, 齒根部는 白堊質로 덮여 있다. 또한 象牙質 內部에는 齒髓腔이 있고 齒根端을 향해서 根管이 뻗어 顎骨 안으로 통하고 있다. 齒髓腔을 채우고 있는 齒髓는 성긴 아교섬유조직으로서 많은 血管과 神經이 치아뿌리끝 구멍을 통해 들어와 分布하며, 象牙質과 접해 있는 齒牙髓의 주변에는 象牙質 生産에 關與하는 齒牙母細胞가 한 층으로 배열되어 있다<sup>5-7,17-18</sup>).

齒周組織은 齒牙를 둘러싸고 있는 4가지 組織을 總稱하는데 齒牙를 顎骨內에서 支持하는 齒槽骨,

齒槽骨과 齒牙를 連結하는 齒周韌帶, 齒周韌帶의 纖維를 保護하고 있는 白堊質, 齒槽骨을 싸고 있는 軟組織으로 外皮인 齒齦 등으로 構成되어 있으며, 齒牙를 支持하여 飲食物 咀嚼時 咬合壓에 適應하여 咀嚼를 圓滑하게 하는 機能을 하고 있다. 一般的으로 齒周組織에 發生하는 疾患을 齒周疾患이라 하며 齒齦에 局限되어 發生하는 炎症을 齒齦炎, 齒周韌帶·齒槽骨·白堊質 등 다른 組織에 일어나는 炎症을 齒周炎이라고 한다<sup>5-7,17-18</sup>).

韓醫學에서 齒牙는 五臟六腑의 機能 및 經絡과 密接한 聯關을 가진다. 齒牙와 臟腑와의 關係에 對하여 《素問·陰陽應象大論》<sup>8)</sup>에 “腎生骨髓”라 하였으며 《素問·六節臟象論》<sup>8)</sup>에 “腎者……其衝在骨”이라 하였고 趙<sup>19)</sup>는 “牙齒者 骨之所終 髓之所養也”라 하는 등 諸家들이 齒牙는 骨의 一部分이며 腎이 骨을 主한다 하여 齒牙와 腎과의 關係를 밝혔으며<sup>8,19-28)</sup> 腎은 骨髓를 生成하기 때문에 骨의 一部分인 齒牙가 骨髓의 滋養을 받는다<sup>8,19,22,28)</sup>고 하였으며 王<sup>23)</sup>은 “牙者骨之餘 養牙者血也”라 하여 血이 滋養한다는 獨특한 見解를 밝혔

다. 齒·齦과 經絡과의 關係에 對하여 《靈樞·經脈》<sup>8)</sup>에 “足少陰氣絕 則骨枯 少陰者 冬脈也 伏行而濡骨髓者也 故骨不濡……故齒長而垢”라 하였으며, 《靈樞·雜病》<sup>8)</sup>에 “齒痛不惡清飲 取足陽明, 惡清飲 取手陽明”라 하였고, 李<sup>20)</sup>는 “其牙齒 是手足陽明之所過 上齦 隸於坤土 乃足陽明胃之脈 所貫絡也 止而不動 下齦嚼物 動而不虧 手陽明大腸之脈 所貫絡也”라 하였고 이후 方<sup>21)</sup> 등 諸家들의 論도 이와 크게 다르지 않은바 齒·齦은 주로 足少陰腎經, 足陽明胃經, 手陽明大腸經과 關係가 있다<sup>8,19-22,24-28)</sup>

齒病을 일으키는 原因에 對하여 《黃帝內經》<sup>8)</sup>에서는 腎虛, 胃火, 蟲, 濕熱, 虛熱, 客熱 등을言及하였고, 方<sup>21)</sup>은 蟲, 胃熱, 濕熱, 腎虛, 大腸의 虛實 등 大部分의 原因을 實邪로 보았으며, 李<sup>22)</sup>는 濕熱, 脾腎虛, 血虛, 火熱, 蟲, 風熱, 寒邪, 痰熱, 血搏 등으로, 王<sup>23)</sup>은 瘀血, 馬<sup>29)</sup>는 胃火를, 張<sup>30)</sup>과 王<sup>27)</sup>은 “一曰火 病在齦 … 二曰蟲 病止在牙 … 三曰腎虛 病在臟”이라 하여 火, 蟲, 腎虛를 原因으로



보았다. 이를 綜合해 보면 齒病의 原因은 實證으로는 胃熱, 虛症으로는 脾腎虛가 가장 많았고 그의 虛熱, 血虛, 濕熱, 蟲, 風熱, 痰熱, 寒邪, 瘀血 등이 原因이 된다고 하였는데 熱邪가 齒病을 일으키는 重要한 原因으로 作用하고 있음을 알 수가 있다.

齒病의 治療에 대하여 李<sup>20)</sup>는 症狀의 寒熱의 偏差를 分別하여 寒症에는 羌活散이나 麻黃散으로 寒多熱少症에는 草豆蔻散으로 熱症에는 熱牙散 등으로 治療하였다. 張<sup>30)</sup>은 陽明熱로 인한 境遇는 清胃散 등으로 清火하고 腎虛로 인한 境遇는 玉女煎 등으로 補腎하는 治法을 爲主로 하였다. 李<sup>31)</sup>와 許<sup>32)</sup>는 牙痛을 7개로 分類하여 風熱痛에는 犀角升麻湯으로, 風冷痛에는 溫風散으로, 熱痛에는 涼膈散加味로 寒痛에는 羌活附子湯이나 細辛散으로, 毒痰痛에는 二陳湯加味로, 瘀血痛에는 犀角地黃湯으로, 蟲蝕痛에는 玉池散으로 治療하였다. 薛<sup>33)</sup>은 胃熱으로 인한 境遇는 清胃散 등으로 治療하고 腎虛로 인한 境遇는 六味地黃元 등으로 治療하며 특히 脾胃의 機能을 살피 脾虛한 境遇는 六君子湯이나 歸脾湯 등으로 治療하였다. 한편 齒病에는 刷牙, 擦法, 含漱法, 敷法, 搽法 등의 다양한 外治法이 應用되었는데 이 중에서 含漱法이 가장 많이 利用되었으며, 多用되는 藥物로는 小蘇(天日鹽)으로 나타났<sup>10)</sup>.

西洋醫學에서 齒牙齶蝕症은 齒科疾患에서 가장 많이 보는 대표적인 疾患의 하나로 齒牙 硬組織이 細菌에 의해 溶解 내지 破壞되어 發生한다. 症狀은 初期에는 별다른 症狀이 없다가 점차 知覺過敏 狀態가 되고 점차 痛症을 느끼며 齒髓가 化膿 단계가 되면 極甚한 痛症을 나타내게 되며 齒髓炎이 계속되어 齒髓의 膿이 齒根 밖으로 파급되어 齒周炎을 유발시키면 齒牙가 솟아올라 결국 齒牙를 喪失하게 된다. 治療는 痛症을 느끼기 전에 齶蝕齒質을 완전 삭제하고 각종 齒科 재료로 充填하는 것이 바람직하며 齒髓炎에 이른 境遇는 神經治療를 並行해야 한다. 齒牙齶蝕症은 豫防이 중요한데 口腔清潔은 齒牙齶蝕을 抑制하는 가장 효과적인 方法의 하나로 適切하고 올바른 이닦기가 要求되며, 치약에 넣는 方法, 정제로 먹는 方法, 불소화

합물 용액으로 양치하는 方法 등 불소가 齒牙齶蝕症의 豫防에 많이 利用되고 있다<sup>5,7,12,34)</sup>.

齒周疾患은 臨床의으로 齒齶炎症과 出血, 齒周囊의 形成 및 齒槽骨의 破壞 등으로 因하여 齒牙의 喪失을 가져오는 疾患을 말한다. 이러한 齒周疾患은 細菌의 집락형성 및 細菌의 齒周組織이 破壞되는 過程으로 進行되는데 먼저 口腔內的 唾液中의 唾液蛋白質이 象牙質과 珐瑯質 表面에 吸着되면서 皮膜을 形成하고 이러한 皮膜表面에 주로 Streptococcus 및 Actinomyces와 같은 細菌이 成長하면서 프라그를 形成하고 시간이 경과함에 따라 이러한 프라그가 齒根端 方向으로 移動함과 同時에 Bacteriodes와 Actinobacillus와 같은 嫌氣性 그람음성균이 成長하여 이러한 細菌, 細菌成分, 細菌産物들이 齒齶裂口上皮를 通하여 齒齶結合組織內로 浸透하여 齒周囊이 形成되고 이러한 細菌의 代謝結果 齒周組織에 有毒한 황화수소, 암모니아, 有毒한 아민과 같은 細胞의 毒素을 分泌함과 同時에 細胞壁構成分인 Lipopolysaccharide와 같은 內毒素에 의하여 生體免疫系를 刺戟하여 刺戟된 體液性 및 細胞性 免疫系의 여러 作用에 의하여 細胞外로 分泌된 Superoxide, Prostaglandins, Leukotriens, Histamine 및 Interleuckins와 같은 여러 種類의 Cytokines 등에 의하여 齒齶炎症이 誘發되고 직접 組織이 破壞되거나 細菌 및 白血球로부터 分泌된 Collagenase와 같은 酵素에 의하여 齒周組織의 機質인 Collagen이 分解되어 齒齶退縮이 일어나는 同時에 放置하게 되면 齒周疾患으로 進行된다. 齒周疾患의 症狀은 初期에는 齒齶出血이 생기며, 齒齶의 빛깔도 正常일 때보다 더욱 붉게 변하고, 齒齶이 腫脹되며 그 表面에 光澤이 생긴다. 炎症이 慢性的으로 進行되어 齒牙의 表面과 齒齶이 이루는 齒周囊이 점점 깊어지게 되면 齒周膿瘍이 생기며 齒牙를 둘러싸고 있는 齒槽骨이 흡수되고, 이것이 더욱 進行되면 齒牙가 動搖를 일으키게 된다. 이러한 齒周疾患을 豫防 및 治療하고자 는 노력의 일환으로 抗菌劑 및 炎症抑制劑가 使用되고 있다<sup>5,35-38)</sup>.

牛膝은 百倍, 懷牛膝, 鷄膠骨 등으로 불리우며<sup>1)</sup> 莧科(비름과)에 屬한 多年生草本인 牛膝(懷牛膝)과

麻牛膝 및 牯牛膝(川牛膝)의 뿌리를 乾燥한 것으로, 겨울철에 줄기와 잎이 마른 다음에 採取하여 泥土를 除去하고 曝乾하며, 우리나라에서는 쇠무늬(쇠무늬지기)의 뿌리를 乾燥하여 쓰고 있다<sup>2)</sup>.

藥理成分上 곤충변태 hormone인 ecdysterone  $C_{27}H_{44}O_7$  및 inokosterone  $C_{27}H_{44}O_7$ 과 sitosterol, stignasteral, amino acid, achyranthesaponin 등이 함유되어 있으며<sup>3)</sup>, 懷牛膝에는 triterpenoid saponin이 함유되어 있어 加水分解하면 oleanol酸을 얻을 수 있다. 또 多量의 칼슘鹽도 함유되어 있다<sup>2)</sup>.

氣味論的으로는 性은 平·無毒하고 味는 甘苦酸하며, 肝·腎經으로 들어가는데<sup>1-3)</sup>, 生用하면 散瘀血, 消癰腫, 破癥結하므로 喉痺, 齒痛, 癰腫惡瘡 등을 治療하고, 熟用하면 補肝腎, 強筋骨하므로 腰膝骨痛, 四肢拘攣 등을 治療한다. 또한 牛膝은 원래 補益하는 藥物로 氣血을 下行하게 하는 作用이 있는데, 下行이란 月經을 順調로히 하고 利尿作用 및 排便을 容易하게 하며 頭部나 上半身의 血液을 下方으로 誘導하여 身體上部의 充血을 輕減시키고, 다른 藥物의 藥效를 下方에 誘導하여 下半身に 到達시켜 下半身 疾患에 效果를 일으키게 한다<sup>4)</sup>.

歷代 文獻<sup>39-42)</sup>에서도 齒痛, 口瘡, 癰腫惡瘡, 喉痺, 癰疽惡瘡, 腰膝骨痛, 足痿筋攣 등 疾患에 牛膝을 使用하였고, 臨床的으로도 陰虛火旺에 의한 齒周炎이나 眞陰이 虧損되어 牙齒浮腫이 있으면서 흔들려 빠지려고 할 때, 虛火가 盛하여 渴症이 나고 牙齒腫痛이 있는 경우, 口中이나 舌上에 瘡가 생기고 潰爛되었을 때 單味 혹은 處方에 加減하여 使用하였다. 以上과 같이 散瘀血, 消癰腫, 破癥結하는 效能 때문에 齒周疾患이나 口瘡 등을 治療하는데 活用될 수 있으리라고 思慮된다.

이에 著者는 牛膝의 實驗的 研究를 위하여 in vitro 모델로 人體의 纖維芽細胞, 單核細胞, 中性白血球와 흰쥐의 單核細胞를 利用한 細胞毒性實驗, superoxide 生成 抑制效果, immunoassay를 利用한 prostaglandins( $PGE_2$ ) 및 interleukins(IL-1 $\beta$ ) 生成 抑制效果,  $^{14}C$ -proline를 利用한 collagen 合成 및  $^3H$ -thymidine를 利用한 細胞增殖 促進效果

인 DNA 合成, collagenase 活性 抑制效果를 測定하는 實驗을 하여 그 效能을 比較 檢討하였다.

牛膝의 細胞毒性을 알아보기 위하여 human fibroblast와 human monocyte 增殖에 대한 抑制效果를 測定하였는데 對照群과 實驗群의 0.001, 0.01%의 濃度에서는 對照群과 monocyte의 cell viability에서 차이가 없는 것으로 나타나 牛膝은 細胞毒性이 없는 것으로 나타났고 특히 0.1% 濃度에서는 유의적인 毒性效果가 있는 것으로 보인다(Table I, Table II).

炎症(inflammation)은 흔히 볼 수 있는 病變으로 局所에 加해진 炎症誘發性 刺戟과 組織傷害에 對한 血管 및 結合組織系의 自己防禦體系인 免疫過程의 一部分이다. 外部로부터 物理的, 化學的, 生物學的 損傷을 復舊하는 生體의 反應에 의하여 組織의 損傷과 더불어 炎症反應 즉 浮腫, 發熱, 疼痛이 나타나게 된다. 炎症이 일어난 組織에서는 먼저 血管反應이 나타나서 毛細血管이 擴張되고 血流가 增加하며 이어서 血管壁의 透過性이 增加하여 血漿 成分과 蛋白質 成分이 血管壁을 通해 間質組織으로 滲出된다. 이때에 細菌이나 傷害된 局所組織에서 由來하는 化學因子의 誘導에 의해 好中球, 多型核 白血球와 單核球가 아메바 運動을 通해 間質組織으로 나오고 이들에게서 遊離된 大食細胞가 滲出되어서 炎症 刺戟物을 貪食하게 되며, 炎症이 오래되면 림프구 및 形質細胞도 많이 나타나게 된다. 이러한 과정은 自然免疫 및 特殊 免疫系 抗體 一種에 의해서 크게 左右되며 炎症의 最終段階에는 傷害된 組織의 缺損을 修復하는 過程에서 局所의 纖維芽細胞 및 毛細血管이 增殖하여 肉芽組織이 形成되며, 組織에 따라서는 實質細胞로 再生되고 점차 癍痕을 남기며 炎症이 終熄된다<sup>43-45)</sup>.

炎症을 抑制하기 위해 使用되는 藥劑를 廣義의 抗炎症劑라 하며 嚴密히 細分하여 말한다면 浮腫에 對해 anti-inflammatory, 發熱에 對해 antipyretic, 疼痛에 對해 analgesic drug로 表現되어진다. 炎症反應時 細胞性 및 體液性 免疫反應이 關與되는데 이때 關與되는 物質에 對해서는 많은 研究가 되어 왔으며 superoxide,

prostaglandins(PGE<sub>2</sub>), interleukins(IL-1 $\beta$ ), collagenase 외에 histamin, bradykinin, plateletactivating factor, tumor necrosis factor 등이 關與하는 것으로 알려져 있다<sup>46-49</sup>.

炎症 및 免疫反應 誘發物質의 生産 抑制를 위하여 過去에는 스테로이드性 抗炎症劑를 使用한 結果 많은 副作用이 誘發되어 最近에는 비스테로이드性 抗炎症劑가 廣範圍하게 使用되고 있다. 이러한 비스테로이드性 抗炎症劑는 주로 纖維芽細胞 및 單核細胞와 多型核 白血球의 cyclooxygenase 酵素에 의하여 合成되는 prostaglandins(PGE<sub>2</sub>)의 生産을 抑制하는데 基本을 두고 있다<sup>50-53</sup>. Cyclooxygenase는 두종류의 isozyme인 cyclooxygenase-1과 cyclooxygenase-2가 있으며 細胞內에서 그 機能이 顯著히 다른 것으로 알려져 있다.

Cyclooxygenase-1은 constitutive enzyme으로 胃, 血管, 腎臟의 正常的인 機能을 維持하는데 關與하는 것으로 알려져 있으나, cyclooxygenase-2는 inducible enzyme으로 炎症反應, 細胞分化, 排卵過程에 關聯된 signal transduction에 關與하는 prostaglandins(PGE<sub>2</sub>)를 生成한다. 그리고 이 酵素 遺傳子의 발현은 growth factor, cytokine, hormone 등에 의해 調節되며 이 遺傳子의 발현은 glucocorticoid에 의해 遮斷되는 것으로 알려져 있다<sup>54-56</sup>.

最近의 研究에서는 prostaglandins(PGE<sub>2</sub>)의 生産이 細菌의 內毒素인 lipopolysaccharide에 의하여 誘發되는 interleukins(IL-1 $\beta$ )에 의하여 刺戟되는 것이 알려져 interleukins(IL-1 $\beta$ )의 細胞生産을 抑制하는 研究가 활발히 進行되고 있다<sup>57-59</sup>. 그리고 prostaglandins(PGE<sub>2</sub>)는 大食細胞와 多型核 白血球를 刺戟하여 結合組織의 基質인 collagen 蛋白質을 分解시키는 collagenase의 合成을 誘發시켜 結合組織을 破壞시킨다<sup>60-61</sup>. 또한 炎症進行 過程에서 血管이 擴張되어 上皮組織 아래의 結合組織에 血漿細胞 림프구, 單核細胞, 大食細胞, 中性 白血球 등을 包含하는 炎症細胞가 增加하게 되며, 이중 大食細胞와 單核細胞는 炎症의 媒介體에 의하여 細胞膜에 結合되어 있는 NADPH oxidase에

의하여 superoxide anion을 分泌하여 組織에 損傷을 誘發시킴으로 炎症을 誘發시키는데 중요한 役割을 한다. 이러한 superoxide는 또한 動脈硬化, 癌, 류마티스 關節炎, 老化 등에 關與한다고 알려져 있으며 好氣性 細胞는 細胞內에 superoxide dismutase와 catalase에 의하여 superoxide를 除去하여 自身을 保護하게 된다<sup>62-66</sup>.

炎症發生 過程에서 損傷된 組織의 再生에는 collagen의 合成이 중요한 役割을 하는 것으로 알려져 있는데, collagen 合成은 纖維芽細胞의 活性과 密接한 關聯이 있으며 年齡에 따라 collagen 合成이 減少하게 된다. 즉 어린 年齡의 皮膚에서는 collagen 合成이 활발하게 일어나고 老化된 皮膚에서는 減少하는 것으로 알려져 있다.

Collagen이 合成되는 過程은 먼저 collagen 遺傳子의 발현에 의하여 mRNA가 전사되고, mRNA는 細胞質內에서 procollagen peptide를 만들고 바로 hydroxylation과 glycosylation 過程을 거쳐 triple helix를 形成하게 된다. Procollagen 다발은 細胞 外部로 分泌되어 procollagen peptide 加水分解酵素에 의하여 除去되고 形成된 tropocollagen 分子들은 서로 엇갈린 配列로 組立되어 collagen 纖維를 形成하고, 이 纖維들은 lysin과 hydroxylation 殘期들의 交叉結合에 의하여 強化되어 組織의 再生에 중요한 collagen 蛋白質이 合成된다<sup>67-68</sup>. 따라서 炎症을 抑制시키거나 組織을 再生시키는 藥劑에 對한 研究가 활발하게 進行되고 있는데, 現在 炎症抑制劑로는 비스테로이드性 抗炎症劑인 aspirin, indomethacin, flurbiprofen 등과 같은 合成製劑 등이 널리 使用되고 있으며 生藥製劑로는 아직까지 研究가 미미한 實情이다<sup>69-70</sup>. 또한 superoxide 生成, interleukins(IL-1 $\beta$ ) 生成, collagenase 活性을 同時에 效果的으로 抑制할 수 있는 生藥製劑의 發見은 아직 이루어지지 못하고 있다.

Superoxide는 macrophage로 分化되는 monocyte 및 neutrophil의 phagocytosis 過程에서 發生되는 代謝産物로 高度의 反應性임으로 組織內에 많이 存在할 경우에 collagen, hyaluronic acid 및 proteoglycan과 같은 細胞外 基質成分의

depolymerization에 影響을 미칠 뿐만아니라, 細胞의 蛋白質, 核酸, 그리고 細胞膜 脂質 構成分의 破壞에 活性을 나타낼 수 있다<sup>71)</sup>. 특히 口腔에서는 細菌에 의해 形成된 프라그가 蓄積되어 10-20일이 經過하면 口內炎이 發生되어 齒齦이 붉어지고 그 結果 浮腫이 發生하며 軟組織에서 出血이 增加되어 齒齦上皮 아래의 結合組織에 血漿細胞, 림프구, 大食細胞로 分化되는 單核細胞, 中性白血球 등을 包含하는 炎症細胞가 增加하게 된다. 이중 單核細胞 및 中性白血球는 炎症誘發物質에 의하여 活性化되어 superoxide를 細胞外部로 放出하여 生體組織을 破壞시키는 主要한 原因으로 밝혀져 superoxide를 抑制할 수 있는 superoxide dismutase와 같은 抗酸化劑의 開發이 활발하게 進行되고 있다.

Zymosan A로 刺戟한 mouse monocyte의 superoxide 生成에 對한 牛膝의 效果를 0.01%와 0.001%의 濃度에서 實驗한 結果 牛膝은 0.001%의 濃度에서 83%의 抑制效果가, 0.01%의 濃度에서는 57%의 억제효과가 나타났다(Table III). 또한 human monocyte의 superoxide 生成에 對한 牛膝의 效果를 0.001%와 0.0001%의 濃度에서 實驗한 結果 0.0001% 濃度에서만 58%의 抑制效果가, 0.001% 濃度에서는 40%의 抑制效果가 있는 것으로 나타났다(Table IV), human neutrophil superoxide 生成에 對한 牛膝의 效果를 0.001%와 0.0001%의 濃度에서 實驗한 結果 0.0001% 濃度에서만 58%의 抑制效果가, 0.001% 濃度에서는 40%의 抑制效果가 있는 것으로 나타났다(Table V).

Prostaglandins(PGE<sub>2</sub>) 중에서 특히 PGE<sub>2</sub>는 細胞膜에 損傷을 입을시 arachidonic acid 代謝物의 一種으로 빠른 吸收에 깊이 關與하는 物質로 알려져 있다. Aspirin과 indomethacin은 cyclooxygenase-2의 強力한 抑制作用으로 prostaglandins(PGE<sub>2</sub>)의 生成을 抑制하는 것으로 알려져 있다<sup>52-54)</sup>. Indomethacin을 positive control로 牛膝의 prostaglandins(PGE<sub>2</sub>)의 生成 抑制效果를 比較한 結果 牛膝의 모든 濃度에서 生成 抑制效果가 없는 것으로 나타났다(Table VI).

Cytokines의 一種인 interleukins(IL-1 $\beta$ )는 炎

症部位의 細胞를 많이 모이게 하며 prostaglandins(PGE<sub>2</sub>)의 生成을 刺戟하는 것으로 알려져 있어 炎症에 關與하는 主要한 cytokine으로 最近에 interleukins(IL-1 $\beta$ )의 生成을 抑制하는 新規 藥效劑의 開發에 對한 研究가 활발히 進行되고 있으며<sup>57-59)</sup>, 生藥製劑 중에서는 天門冬, 五味子, 五倍子 및 大棗 抽出物이 炎症의 媒介物質인 cytokine의 生成 抑制에 效果가 있다고 報告된 바 있다<sup>72)</sup>. E. coli LPS로 刺戟한 human monocyte의 interleukins(IL-1 $\beta$ )의 生成에 對한 牛膝의 效能·效果를 試驗한 結果 모든 濃度에서 확실한 억제효과가 나타났고 특히 0.01% 濃度에서 탁월한 生成 抑制效果가 있는 것으로 나타났다(Table VII).

組織의 再生은 growth factor를 利用하여 細胞의 增殖을 促進하거나 collagen 蛋白質의 合成을 促進시키는 方向으로 研究되고 있다. 그러나 growth factor의 臨床適用段階는 아직 研究가 되어있지 않으며 다른 副作用에 대해서도 정확히 밝혀지지 않은 實情으로 上皮나 모든 種類의 組織의 成長을 促進시킴으로 組織 特異性이 약간 缺如되고 있다. 이에 長期的인 觀點에서 副作用이 적고 安全한 藥物의 必要性이 要求되고 있는 實情이다<sup>73-74)</sup>. 近來에 生藥에서 가장 널리 알려져 있는 centella asiatica의 asiaticoside로 齒周組織 再生劑로 使用되고 있으며<sup>75)</sup>, 大棗 抽出物이 collagen 蛋白質의 合成을 促進한다는 報告가 있다<sup>76)</sup>.

人體의 纖維芽細胞에서 total protein 및 collagen 合成에 對한 牛膝의 效果를 研究하기 위하여 <sup>14</sup>C-proline를 包含한 細胞培養液에 牛膝을 0.01, 0.05, 0.2%의 濃度에서 24時間 處理한 結果 牛膝 0.01, 0.05, 0.2%의 濃度에서 24時間 處理한 結果 모든 濃度에서 促進시키는 效果가 없는 것으로 나타났다(Table VIII).

Collagen 蛋白質을 分解시키는 collagenase는 炎症 뿐만아니라 老化和 關聯이 있으며, 주로 炎症 誘發 物質인 prostaglandins(PGE<sub>2</sub>)에 의하여 collagenase 遺傳子가 活性化 되어 細胞內에서 合成된 後 細胞外部로 分泌되는 collagenase는 metalloprotenase 중의 하나로 炎症部位에서 酵素 活性이 增加되는 것으로 알려져 있으며, 특히 口

腔 및 齒齦에 炎症이 있는 患者의 口腔粘膜炎과 齒齦裂溝液內에 酵素活性이 활발한 것으로 報告되고 있으며, 또한 年齡이 增加함에 따라 collagenase 活性이 增加되는 것으로 알려져 있다<sup>77-79)</sup>. Collagenase 活性 抑制劑로는 抗生劑인 tetracycline이 가장 널리 알려져 있으나<sup>80)</sup>, 長期間 使用할 때 抗生劑 耐性菌株의 出現等 副作用이 報告되어 最近에는 韓方 및 生藥製劑에 對한 研究가 활발히 進行中에 있으며 黃芩에서 collagenase 의 抑制效果가 있는 것으로 나타났<sup>81)</sup>.

Collagenase 活性에 對한 抑制效果를 研究하기 위하여 牛膝을 0.01, 0.1, 0.2, 0.5%의 試驗濃度에서 18時間 동안 處理한 結果 positive control로 使用한 tetracycline은 0.1%의 濃度에서 80%의 抑制效果를 나타내어 가장 높았고 牛膝은 0.5%의 濃度에서 76%, 0.2%의 濃度에서는 69%, 0.001 濃度에서는 91%, 0.1%의 濃度에서는 84%의 抑制效果를 나타내었다(Table IX).

以上の 結果를 綜合해 보면 牛膝은 正常的인 纖維芽細胞에 毒性이 없는 것으로 나타났으며 macrophage 및 neutrophil, monocyte의 superoxide 生成抑制와 prostaglandins(PGE<sub>2</sub>)과 interleukins(IL-1 $\beta$ )의 生成을 抑制하는 것으로 보아 여러 가지 化學因子가 放出되어서 血管擴張이나 液性滲出이 일어나는 炎症 I 期과 炎症의 原因物質이나 破壞된 組織等을 除去하기 위해 白血球가 血管外로 滲出되고 免疫系가 活動하기 始作하는 II 期<sup>82)</sup>에 效果가 있는 것으로 思慮되며, 또한 牛膝이 total protein 및 collagen 合成을 促進시키는 效果가 없으나 collagen protein을 分解시키는 collagenase 活性을 輕微하게 抑制하는 것으로 보아 起炎物質이나 炎症으로 傷害를 입은 組織을 體外로 排出하기 위하여 纖維芽細胞의 增殖이 始作되고 肉芽가 增殖하여 炎症의 局所가 漸次的으로 收復되는 炎症 III 期<sup>82)</sup>에도 어느 정도의 效果가 있는 것으로 思慮된다.

以上の 實驗結果로 牛膝은 散瘀血, 消癰腫, 破癥結 하는 效能이 있으므로 臨床에서 初期의 各種 口腔疾患 治療에 좋은 效果가 있을 것으로 思慮된다. 하지만 炎症末期의 肉芽組織 形成에 對해 뚜

렷한 效果를 보이지 않아서 보다 精確하고 客觀化된 實驗의 研究와 齒周疾患 및 口內炎에 對한 韓醫學의 研究가 폭넓게 이루어져야 할 것이다.

## V. 結 論

牛膝의 抗炎作用에 미치는 效果를 精明하기 위하여 in vitro 모델로 人體의 纖維芽細胞, 單核細胞, 中性白血球와 흰쥐의 單核細胞를 利用한 cytotoxicity, superoxide 生成 抑制效果, immunoassay를 利用한 prostaglandins(PGE<sub>2</sub>) 및 interleukins(IL-1 $\beta$ ) 生成 抑制效果, <sup>14</sup>C-proline를 利用한 collagen 合成 및 <sup>3</sup>H-thymidine를 利用한 細胞增殖 促進效果인 DNA 合成, collagenase 活性 抑制效果를 測定하는 實驗을 한 結果 아래와 같은 結論을 얻었다.

1. 牛膝은 0.001, 0.01%의 濃度에서는 對照群과 monocyte의 cell viability에서 차이가 없는 것으로 나타나 牛膝은 細胞毒性이 없는 것으로 나타났으나 특히 0.1% 濃度에서는 유의적인 毒性效果가 있는 것으로 보인다.

2. Mouse monocyte의 superoxide 生成에 對하여 牛膝은 0.001%의 濃度에서 48%의 superoxide 生成 抑制效果가 있는 것으로 나타났.

3. Human monocyte의 superoxide 生成에 對하여 牛膝이 0.0001% 濃度에서 58%의 抑制效果, 0.001% 濃度에서는 40%의 抑制效果가 있는 것으로 나타났.

4. Human neutrophil superoxide 生成에 對하여 牛膝은 0.0001% 濃度에서 58%의 抑制效果, 0.001% 濃度에서는 40%의 抑制效果가 있는 것으로 나타났.

5. E. coli LPS로 刺戟한 human monocyte의 prostaglandins (PGE<sub>2</sub>)의 生成에 對하여 牛膝의 모든 濃度에서 生成 抑制效果가 없는 것으로 나타났.

6. E. coli LPS로 刺戟한 human monocyte의 interleukins(IL-1 $\beta$ )의 生成에 對하여 牛膝 모든 濃度에서 確실한 억제효과가 나타났고 특히

0.01% 濃度에서 탁월한 生成 抑制效果가 있는 것으로 나타났다.

7. 牛膝은 纖維芽細胞의 total protein 및 collagen 合成을 促進시키는 效果가 없는 것으로 나타났다

8. Collagenase 活性에 對해 牛膝은 0.5%의 濃度에서 76%, 0.2%의 濃度에서는 69%, 0.001 濃度에서는 91%, 0.1%의 濃度에서는 84%의 抑制效果를 나타내었다

以上の 結果를 綜合해 보면 牛膝은 炎症의 I, II期의 抗炎作用에 效果가 있으며 특히 臨床에서도 初期의 齒齦에만 局限되어 發生하는 齒齦疾患과 齒齦 出血과 腫脹 口腔疾患에 널리 應用될 수 있을 것으로 思慮된다.

### 參 考 文 獻

1. 新文豐出版公司：新編中藥大辭典，臺北，新文豐出版公司，1972，pp.454-457.
2. 康秉秀 외：本草學，서울，永林社，1995，pp.427-428.
3. 陸昌洙：韓國本草學，서울，癸丑文化社，1981，p.274
4. 陸昌洙 외：漢藥의 藥理·成分·臨床應用，서울，癸丑文化社，1982，pp.645-647.
5. 李榮基：原色最新醫療大百科事典 권7，서울，圖書出版 新太陽社，p.127，pp.140-141 p.144，1991.
6. 황성민 외：구강조직학，서울，과학서적센터，pp.276-309，1996.
7. 권영혁 외：치주과학，서울，군자출판사，pp.5-68，121-178，371-384，1996.
8. 任應秋：黃帝內經章句索引，台北，人民衛生出版社，pp.8-9，p.22，p.49，p.125，p.132，pp.176-177，p.298，p.300，p.305，p.307，pp.334-335，p.340，p.345，p.359，p.427，p.455，1986.
9. 宋永林 외：齒痛의 病因 病機에 대한 文獻的 考察，大田大學校論文集，5(1):429-441.
10. 이건학 외：齒病의 原因 및 治療에 대한 文獻的 考察，大韓外官科學會誌，9(1):99-113，1996.

11. 김성원 외：韓方專門醫叢書 권4，서울，해동 의학사，pp. 169-183，1996.
12. 이승우 외：구강진단학，서울，신홍인터내셔널，pp.140-148，1996.
13. 張逸鎭 외：齒痛의 鍼灸治療에 대한 文獻的 考察，大田大學校論文集，1(2):123-144，1992.
14. 강승원：回春涼膈散과 龍石散이 口內炎과 組織再生에 미치는 研究，大田，大田大學校 大學院 博士學位論文，1997.
15. 辛相汶：黃柏散加味가 口瘡에 미치는 實驗的 研究，大田，大田大學校 大學院 碩士學位論文，1998.
16. 邢良起 외：口瘡，口疳，口糜，口臭，口乾의 外治法에 관한 文獻的 考察，大韓外官科學會誌，10(1):50-90，1997.
17. 정인혁：사람해부학，서울，아카데미 서적，p.243，p.249，1992.
18. 최월봉 외 5人：기본 인체해부학，서울，探求堂，p.324-325，1992.
19. 趙估：聖濟總錄，北京，人民衛生出版社，p.1992，1962.
20. 李杲 외：東垣十種醫書，서울，大星文化社，pp.185-189，1983.
21. 方賢：奇效良方，香港，商務印書館，pp.1302-1303，1977.
22. 李用粹：證治彙補，台北，旋風出版社，pp.254-258，1976.
23. 王勳臣：醫林改錯，台北，台聯國風出版社，pp.31-32，1975.
24. 陳復正：幼幼集成，上海，上海科學技術出版社，pp.195-196，1938.
25. 吳謙：醫宗金鑑，서울，翰琳社，(卷4) pp.139-140 (卷6) pp.155-156，1976.
26. 康命吉：濟衆新篇，서울，杏林書院，pp.128-129，1971.
27. 王新華：中醫歷代醫論選，서울，一中社，pp.850-852，1983.
28. 崔用泰：鍼灸學，서울，集文堂，p.1228，1988.
29. 馬康慈：中醫師臨床手冊，衆文圖書公司，p.695，1974.

30. 張介賓 : 景岳全書, 서울, 翰成社, pp.525-528, 1983.
31. 李 槌 : 醫學入門, 台北, 台聯國風出版社, 1979, p.399.
32. 許 浚 : 東醫寶鑑, 서울, 南山堂, pp.246-247, 252, 1989.
33. 薛 己 : 口齒類要(醫部全錄), 서울, 金泳出版社, p.1383, 1979.
34. 박기철 : 예방치과학, 서울, 정문각, pp.269-271, 277-286, 1997.
35. 申永基 編譯 : 臨床診斷學, 서울, 癸丑文化社, pp.219-222, 1987.
36. 西山茂夫 : 圖解 皮膚科學, 서울, 第一醫學, p.248, 1991.
37. 임창윤 : 구강병리학, 서울, 고려의학, pp.332-333, 346-348, 1992.
38. 白充基 : 口腔診斷學, 서울, 高文社, pp.310-335, 1983.
39. 陶弘景 : 名醫別錄, 北京, 人民衛生出版社, p.34, 1986.
40. 李時珍 : 本草綱目, 北京, 人民衛生出版社, pp.1027-1030, 1982.
41. 張錫純 : 醫學衷中參書錄, 서울, 大星文化社, pp.88-89, 1992.
42. 申佶求 : 申氏本草學(各論), 서울, 壽文社, pp.527-529, 1988.
43. 白充基 : 病理學, 서울, 高文社, p.23, 1988.
44. 이중달 : 그림으로 설명한 病理學, 서울, 고려의학, pp.27-34, 1990.
45. 李淵台 譯 : 最新免疫學, 서울, 集文堂, pp.355-358, 1989.
46. Socransky SS and Haffajee AD (1991). Microbial mechanisms in the pathogenesis of destructive periodontal diseases: a critical assesment. J. Periodont. Res. 26:195-212.
47. Page RC (1992). Host response tests for diagnosing periodontal diseases. J. Peridontal 63: 356-366.
48. Lamster IB (1992). The host response in gingival crevicular fluid: potential applications in periodontitis clinical trials. J. Peridontol 63: 1117-1123.
49. Polson AM and Goodson JM (1985). Periodontal diagnosis current status and future needs. J. Peridontol 56-1: 25-34.
50. Gerritsen MJP, Rulo HFC, Arnold WP and Van De Kerkhof PCM (1994). Response of the clinically uninvolved skin of psoriatic patients to repeated tape stripping during cyclosporin A treatment. B. J. of Dermatol 130: 181-188.
51. Marx J. (1995). How the glucocorticode suppress immunity. Science 270: 222-233.
52. Lee DH and Choi (1989). The comparative study of immunosuppressive drugs on the periodontal condition in renal transplant patients. J. of Ker Academ. of Peridontol. 19-1: 1-8.
53. Ting PC, Kaminski JJ, Sherlock MH, Tom WC, Lee JF, Bryant RW, Watnick AS and Mcphail AT (1990). Substituted 1,3-dihydro-2h-pyrrolo [2,3-b] pyridin-2-ones as pontential antinflammatory agents. J. Med. Chem. 33:2697-2706.
54. Seibert K, Zhang Y, Leahy K, Hauser S, Masferrer J, Perkins W, Lee L and Isakson P (1994). Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cycloxygenase 2 in inflammation and pain. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:12013-12017.
55. Wells I and Marnett LJB (1993). Inactivation of Prostaglandin endoperoxide synthase by acylation derivatives of indomethacin. Biochemistry 32: 2710-2716.
56. Autio P, Oikarinen A, Melkko J, Risteli J and Risteli L(1994). Systemic glucocorticoids decrease the sythesis of type I and type III collagen in human skin in vivo, whereas isotretinoin treatment has little effect. B. J. of Dermatology 131: 660-663.
57. Matsuki Y, Yamamoto T and Hara K (1993). Localization of interleukin-1 (IL-1)

mRNA-expressing macrophages in human inflamed gingiva and IL-1 activity in gingival crevicular fluid. *J. Periodont* 28: 35-42.

58. Poore TK, Johnson GK, Reinhardt RA and Organ CC (1995). The effects of smokeless tobacco on clinical parameters of inflammation and gingival crevicular fluid prostaglandin E<sub>2</sub> Interleukin -1  $\alpha$  and Interleukin-1  $\beta$ . *J. Periodontal* 66: 177-183.

59. Kupper TS and Groves RW (1995). The interleukin-1 axis and cutaneous inflammation. *J. of Invest. Derm.* 105-1:62s-66s.

60. Uitto VJ, Suomalainen K, Sorsa T (1990). Salivary collagenase. Origin characteristics and relationship to periodontal health. *J. Periodontal Res* 25: 135-142.

61. Lee W, Aitken S, Sodek J and McCulloch CAG (1995). Evidence of a direct relationship between neutrophil collagenase activity and periodontal tissue destruction in vivo: role of active enzyme in human periodontitis. *J. Periodont. Res* 30: 23-33.

62. Richard BJ, Cathleen AG, Zanvil AC (1978). Increased superoxide anion production by immunologically activated and chemically elicited macrophages. *J. Exp. Med* 148: 115-127.

63. Joseph CF, Peter AW (1982). Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reactions. *American J of Pathology* 107:397-418.

64. Lovelle B, Blaine LB (1984). The role of oxygen and its derivatives in microbial pathogenesis and host defense. *Reviews of microbiology* 38: 27-48.

65. Joe MM, Irwin F (1969). Superoxide dismutase. *J of biological chemistry* 244-22: 6049-6055.

66. William JJ, Philip AM, Robert DS, Dolph OA (1983). Sequential activation of murine mononuclear phagocytes for tumor cytotoxicity:

differential expression of markers by macrophages in the several stages of development. *Immunol* 131: 1038-1043.

67. Clark RAF: Cutaneous tissue repair: basic biologic considerations. I. *J. Am Acad Dermatol* 13:701-725, 1985.

68. Lynch Se, Colvin RB, Antoniades HN: Growth factors in wound healing: single and synergistic effects on partial thickness porcine skin wounds. *J. Clin Invest* 84: 640-646, 1989.

69. Mitchell JA, Akarasereenont P, Thiemermann C, Flower RJ and Vane JR (1994). Selectivity of nonsteroidal antiinflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:11693-11697.

70. Johnston RB, Lehmeyer JE and Guthrie LA (1976). Generation of superoxide anion and chemiluminescence by human monocytes during phagocytosis and on contact with surface-bound immunoglobulin G. *J. of Exp. Med.* 143:1551-1556.

71. Shingu M, Isayama T, Yasutake C, et al. (1994). Role of oxygen radicals and IL-6 in IL-1 dependent cartilage matrix degradation. *Inflammation* 18-6: 613-623.

72. Cho KY, Lee YM, Choi SM and Chung CP (1995). The effects of herbal extracts on production and activity of interleukin 1  $\beta$ . *The J. of Kor. Academy of Periodontol.* 25-2: 386-396.

73. Canalis E (1981) Effect of platelet-derived growth factor on DNA and protein synthesis in cultured rat calvaria. *Metabolism* 30: 970.

74. Matsuda N, Lin WL, Kumar NM, Cho MI and Genco RJ (1992). Mitogenic, chemotactic and synthetic responses of rat periodontal ligament fibroblast cells to polypeptide growth factors in vitro. *J. of Periodontol* 63: 515.

75. Rush WR, Murray GR and Graham DJM



(1993). The comparative steady-state bioavailability of ingredients Madecassol. Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet. 18-4:323-326.

76. Yang CH, Lee YM, Cho KY, Base KH and Chung CP (1994). Effect of Zizyphi Fructus extract on the biological activity of gingival fibroblast. J. of Kor. Acade. of Periodontol 24: 144-153.

77. Richards D, Rutherford RB (1990). Interleukin-1 regulation of procollagenase mRNA and protein in periodontal fibroblasts in vitro. J. Periodontal Res 25: 222-229.

78. Uitto J, Olsen DR and Fazio MJ (1989). Extracellular matrix of the skin: 50 years of progress. J. of Invest. Dermatol 92: 61s-77s.

79. Phillips CL, Combs SB and Pinnell SR (1994). Effects of ascorbic acid on proferation and collagen sythesis in relation to the donor age of human dermal fibroblast. J. of Invest. Dermatol 103: 228-232.

80. Gilberston BS, Powers EA Stamp CM, Scott PS, Wallac TL, Copeland J, Petzold G and Mitchell M, Ledbetter S, etal. (1995). The tetracycline analogs minocycline and doxycycline inhibit angiogenesis in vitro by a non-metalloproteinase-dependent mechanism. CancerChemot her. Pharmacol 36-5: 418-424.

81. Chung CP, Park JB and Bae KH (1995). Pharmacological effects of methanolic extract from the root of *Scutellaria baicalensis* and its Flavonoids on human gingival fibroblast. Plant Med. 61: 150-153.

82. 高本博天, 植木昭和, 岩田平太郎 : 圖解藥理學, 東京, 中外醫學社, pp.161-163, 1979.