

Cumin(*Cuminum cyminum* L.) seed로부터 정제한 2-hydroxyethyl-β-undecenate의 항치주염 효과의 효소학적 평가

류일환¹ · 강은주^{2,*} · 이갑상¹ · 박정순²

¹원광대학교 생명자원과학대학, ²원광보건대학 치위생과

Enzymatic Assessment of 2-Hydroxyethyl-β-undecenate Purified from Cumin (*Cuminum cyminum* L.) Seed for Anti-periodontitis

Il-Hwan Ryu¹, Eun-Ju Kang^{2,*}, Kap-Sang Lee¹, and Chung-Soon Park²

¹College of Life Science and Natural Resources, Wonkwang University

²Department of Dental Hygiene, Wonkwang Health Science College

Abstract The present study was conducted to explore the anti-inflammatory action of 2-hydroxyethyl-β-undecenate (HPS) purified from Cumin (*Cuminum cyminum* L.) seed against periodontitis. From the study in which human leukocyte was employed to detect the inhibiting effects of 5-lipoxygenase and cyclooxygenase, enzymes generating carriers of infection like LTB₄ and PGs, as well as of collagenase and elastase, organ-destroying enzymes, following conclusions could be drawn: HPS was found to inhibit leukotrien B₄ biosynthesis by stimulating more than 97% of human polymorphonuclear leukocyte (PMNL) with addition of 5×10^{-2} M when IC₅₀ was set at 2×10^{-4} M. Ninety-two percent of enzyme activation turned out to be inhibited when 5×10^{-2} M was added in a test to prove inhibiting effects of HPS against activation of PMNL 5-lipoxygenase from homogeneous humans and purified 5-lipoxygenase on the market. Besides, IC₅₀ for enzyme activation was valued at 2.5×10^{-4} M, while the value of IC₅₀ for purified 5-lipoxygenase was 2.3×10^{-4} M. The IC₅₀ values of COX-activated leukocyte and purified collagenase were 5.1×10^{-4} M and 2.3×10^{-4} M, respectively. Moreover, the value of IC₅₀ for activation of leukocyte collagenase was 2×10^{-3} M, whereas that for purified collagenase was 5×10^{-2} M. In case of leukocyte elastase, addition of 5×10^{-2} M inhibited its activation by 66%. In case of purified one, however, activation of enzyme was inhibited by 25% with addition of 5×10^{-2} M. Furthermore, the IC₅₀ value for activation of leukocyte elastase was revealed to be 7.5×10^{-3} M. From the virulence test with human gingiva cell, it was shown that, on the second day of cultivation, 47.83% of the cell had been activated when HPS was added by 5×10^{-2} M. Even the addition of HPS by 1×10^{-2} M featured 68.53% of cell activation, suggesting relatively strong toxicity of the substance against gingiva cell.

Key words: 2-hydroxyethyl-β-undecenate (HPS), cumin (*Cuminum cyminum* L.) seed, periodontitis, leukocyte elastase

서 론

치주질환의 일종인 치은염과 치주염은 세균에 의해 유발되는 염증성 질환으로 잘 알려져 있다(1). 치은염은 구강 균열 부위에서 세균양의 증가에 의해 비특이적으로 발생되며, 치은에만 영향을 미치는 염증성 질환이다. 치주염은 구강 균열 부위에서 발견되는 특정 그람음성의 세균종 증식에 의해 특이적으로 발생되며, 치주인대와 치조골을 포함한 치아 지지 조직 전반에 영향을 미치는 염증성 질환이다(2). 혐기성 그람음성 세균은 치주염의 1차 원인 요소이며, 조직의 파괴는 세균의 침입에 대한 숙주세포의 대응에 의해 발생된다고 볼 수 있다(3). 이때, 혐기성 그람음성 세균과 병원성 인자는 숙주세포를 matrix metalloproteinase 같은

조직파괴 효소에 노출되도록 하고, 림프구와 대식세포에 의해 cytokine을 방출하는 면역대응을 하도록 유도하여 plasminogen의 존성 식세포 경로와 다형핵 serine분해형 단백분해효소 및 치조골 파괴 등 하나 이상의 파괴 경로를 활성화시키는 것으로 알려져 있다(4). 치주염의 가장 특징적 변화의 하나가 교원질 분해효소, 중성의 단백질 분해효소와 lysosomal cathepsin 양의 증가로 인한 치아주위조직의 세포 외 기질의 파괴와 교원질의 파괴이기 때문이다(5). 이것은 세포 내·외 교원질 분해의 증가와 관련된 효소전구체를 활성형으로 전환시키거나, 생성을 촉진하는 cytokine의 생산에 의해 유발되는 면역계의 활성화에 의해 일어난다는 것은 주지의 사실이다(6). 이 cytokine의 하나인 IL-1, 특히 IL-1β형은 치주질환을 가진 환자의 치은액과 조직에서 흔히 발견되고 있다(7). 이것은 metalloproteinase의 발현을 유도하는 매개물이다. 즉, 단핵세포에 의한 기질 metalloproteinase의 생산은 LPS나 lymphokine 같은 초기 자극제에 의해 유도되는 반응기전(cascade system)을 포함하는 PGE-cAMP경로를 거쳐 매개됨을 의미한다(8). Pyrogenic cytokine IL-1은 림프구, 대식세포, 섬유아세포를 포함한 많은 세포에서 생산되는 중요한 면역 매개물이고, 골 파괴 촉진물이며, 섬유아세포의 분열인자이다(9). 즉, 그람음성 세균에

*Corresponding author: Eun-Ju Kang, Dept. of Dental Hygiene, Wonkwang Health Science College, Iksan, Jeonbuk 570-750, Korea

Tel: 82-63-840-1266

Fax: 82-63-840-1269

E-mail: ejkang@wkhc.ac.kr

Received August 21, 2007; accepted October 17, 2007

의해 식이단백질이 대사되어 생성되는 CH_3SH 같은 대사산물의 양이 증가시 cytokine IL-1을 생산하는 단핵세포가 자극되고, 생성된 cytokine에 의해 collagenase, cyclooxygenase, elastase 같은 metalloproteinase 및 serine proteinase가 활성화되어, 조직 및 골 파괴가 유발된다고 할 수 있다.

또한, aspartate proteinase인 cathepsin B와 serine proteinase인 elastase는 구강 조직에서 다형핵 백혈구로부터 유도되는 세포 외 효소로 교원질의 telopeptide를 절단하여 수용성을 증가시키고 교원질의 분해를 가속화시킨다. 구강 열구액 내 총 elastase 활성은 치주질환의 활성과 동일하고, 치주질환자의 타액 내 elastase 활성은 정상인에 비해 현저히 증가된다(10). 이외에도, cyclooxygenase 경로의 arachidonic acid 대사산물이며, 염증 생성의 매개물질인 prostaglandins(PGs) 또한 치주질환자에게서 현저히 높은 농도를 나타낸다(11).

이러한 특성을 갖고 있는 치주염에 대하여, 장시간 사용이 금지되어 있는 chlorhexidine을 비롯한 화학합성제 대신 식물기원의 조성을 갖는 많은 산물들이 대체 제제로 제시되고 있다. Kitagaki 등(12)은 *in vitro*에서 카모마일과 몰약의 색소가 특정 혐기성 미생물에 대하여 chlorhexidine 정도의 항균효과가 있음을 보고하였고, Willerhausen 등(13)은 echinacea, rhatany, soja 같은 식물 추출물이 항균활성 및 항염증 활성이 있음을 보고하였다. 그러나, Bhaskar 등(14), Lobene 등(15) 및 Schonfeld 등(16)이 *Samuinaria canadensis* L.의 근경에서 분리한 benzophenanthridine alkaloid sanuinaria의 항치석 및 항치주염 효과를 보고하였으나, Siegrist 등(17), Etamadzadeh와 Ainamo(18) 및 Gazi 등(19)은 항우식 효과가 미미한 것으로 보고하는 등 신뢰성 있는 결과를 찾기가 어렵다. 또한, *Lippia sidoides*의 essential oil을 이용하여 개의 치은염 감소효과를 보고한 Girao 등(20)의 보고와 같이 개나 쥐를 사용한 임상적 연구가 주를 이루고 있어, 항염증 효과에 대한 메카니즘적 연구는 aloe vera를 이용한 Park 등(21)의 보고 외에 그 예를 찾기가 쉽지 않다.

본 연구자들은 Cumin seed로부터 *Fusobacterium nucleatum* 및 *Porphyromonas gingivalis*에 대하여 항균활성을 나타내며, 구취의 주원인물질이며, 치주염의 유발물질인 CH_3SH 같은 휘발성 황화합물의 생성을 차단하는 HPS를 분리 정제하여 보고하였다(22). 또한 이 화합물의 치아우식 원인균인 *Streptococcus mutans*에 대한 항균 메카니즘을 규명하였다.

따라서, 본 연구는 동일 화합물의 항치주염 활성을 사람의 백혈구를 이용하여 염증 매개물질 LTB_4 및 PGs의 생성 효소인 5-lipoxygenase와 cyclooxygenase, 및 조직파괴 효소인 collagenase와 elastase의 저해 효과를 규명하여 보고하는 바이다.

재료 및 방법

재료

2-Hydroxyethyl β -undecenate(HPS)는 전보(22)에서 보고한 바와 같이 분리·정제하여 사용하였고, 사람의 백혈구는 말초혈로부터 분리·정제하여 사용하였다. 또한 5-lipoxygenase와 cyclooxygenase, collagenase, elastase 및 효소의 활성측정에 사용되는 Sue-Ala-Ala-Ala-4Na, PZ, *NNN'*-tetramethyl-*p*-phenylenediamine dichloride 및 arachidonate 등은 Sigma Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다.

백혈구 추출

사람의 말초혈로부터 백혈구의 추출은 Garcia 등(23)의 방법에

준하여 행하였다. 말초혈 5 mL에 6%의 dextran이 포함된 생리식염수 1.5 mL를 첨가하여 조심스럽게 혼합한 후, 37°C, 30분간 정치하여 침전물을 침강시켰다. 다형핵 백혈구가 풍부한 상등액을 모으고, 500 × g에서 10분간 원심 분리하였다. 원심 분리 후 침전물에 포함된 적혈구를 제거하기 위하여 0.8% NH_4Cl 용액 1 mL를 첨가하여 용해시키고, 동일 조건에서 다시 원심 분리하여 백혈구를 모으고 phosphate-buffered saline(PBS)에 재현탁하여 보관하면서, 사용 직전 세포 농도를 5×10^6 cell/mL로 조절하여 사용하였다.

사람의 PMNL의 leukotriene B₄ 생합성 저해

HPS의 LTB_4 생합성에 미치는 저해 효과는 Safahi 등(24) 및 Betts 등(25)의 방법을 변형하여 사용하였다. 5×10^6 cell/mL의 PMNL을 test tube에 넣고 37°C, 5분간 예온한 후, 5×10^{-4} - 5×10^{-2} M 농도의 HPS 10 μL 및 methanol(control) 10 μL 를 각각 첨가 한 후 37°C, 10분간 반응시켰다. 반응 후 LTB_4 를 생산시키기 위하여 arachidonic acid(10 $\mu\text{mol/L}$ final volume)와 calcium ionophore A23187(5 $\mu\text{mol/L}$ final volume)와 Ca^{2+} (1.8 mmol/L final volume)을 첨가하여 PMNL을 자극시켰다. 동일 온도에서 5분간 반응 후 생성된 LTB_4 의 양을 274 nm에서 흡광도를 측정 후, 표준 곡선으로부터 구하였다.

5-lipoxygenase 활성 저해

HPS의 백혈구 균질화 세포 및 정제 5-lipoxygenase(EC 1.13.11, 34)활성에 미치는 저해 효과를 Hernandez 등(26)의 방법에 준하여 측정하였다. 사람의 말초혈에서 추출한 백혈구 세포(2×10^7 cell/mL)는 냉장 반응조 내에서 온도의 상승을 방지하면서 초음파 분쇄(3 time × 5 sec)시켜 세포를 파쇄하였다. 파쇄시킨 세포를 10,000 × g에서 10분간 원심 분리하여 세포 파쇄물을 제거하고 상등액을 20,000 × g에서 30분간 재 원심 분리하여 상등액을 모았다. 이렇게 준비한 백혈구 homogenate와 정제 5-lipoxygenase(Sigma Co.)를 1 mM EDTA가 포함된 PBS 960 μL 에 각각 현탁시킨 후, 100 mM ATP 20 μL 와 180 mM Ca^{2+} 20 μL 를 첨가하여 최종량을 1 mL로 조정하고 37°C에서 5분간 예온시켰다. 예온 후 5×10^{-4} - 5×10^{-2} M 농도의 HPS를 첨가하고 37°C에서 5분간 전 반응시켰다. 전 반응 후 20 μM 의 arachidonic acid를 첨가하고 5분간 반응 후, 생성되는 과산화수소의 양을 500 nm에서 비색정량 후, 표준곡선으로부터 구하였다.

Cyclooxygenase-2 활성 저해

HPS의 백혈구 세포 및 정제 cyclooxygenase-2(EC 1.14.99.1)의 활성은 Collier(27)의 방법에 준하여 측정하였다. 즉 100 μL 의 효소, 10 μL 의 20 μM hematin, 100 μL 의 시료 및 0.1 M Tris 완충액(pH 8.0)을 넣어 총 액량이 1 mL가 되도록 하였다. 5×10^{-4} - 5×10^{-2} M 농도의 HPS를 첨가하고 37°C, 5분간 방치한 후 여기에 10 μL 의 20 mM *NNN'*-tetramethyl-*p*-phenylenediamine dichloride 및 10 μL 의 arachidonic acid를 넣고 611 nm에서 흡광도의 변화속도를 측정하였다. 비특이적인 흡광도 변화는 위의 반응 혼합물 중에서 arachidonate를 제외한 효소 반응으로 측정하여 이것을 보정해 주었다.

Cyclooxygenase-2의 활성 1 unit는 1분 동안 1 μmol 의 *NNN'*-tetramethyl-*p*-phenylenediamine dichloride를 산화시키는데 필요한 효소량으로 정하고 흡광도 변화에서 unit 산출은 다음과 같은 공식을 사용하였다.

$$\text{Unit(s)} = (\Delta A_{611}/\text{min})/13.5$$

ΔA_{611} : 파장 611 nm에서 흡광도 변화

13.5: *NNN'*-tetramethyl-*p*-phenylenediamine dichloride 산화형과 환원형간의 millimolar extinction coefficient

Cyclooxygenase-2의 specific activity는 단백질 mg당 unit 수로 나타내었으며, 단백질량은 280 nm에서의 흡광도로 측정하였다.

Elastase 활성 저해

HPS의 백혈구 세포 및 정제 elastase(EC 3,4,21,37) 활성 측정에는 Tschesch 등(28)의 방법에 준하여 실시하였다. 즉 백혈구와 정제 백혈구 elastase(Sigma Co.)를 1 M NaCl-0.1% Brij 35를 함유한 Tris 완충액으로 희석하여 단백질 농도가 1-2 mg/mL가 되도록 하여 제조하였다. 효소의 활성 측정은 400 μ L의 triethanolamine 완충액(TEA, 0.5 mol/L, pH 8.0; 0.05% NaN_3 , 0.25% polyethylene oxide 6000)과 사전에 준비한 백혈구 elastase 용액 100 μ L, 증류수 300 μ L 및 5×10^{-4} - 5×10^{-2} M 농도의 HPS를 시험관에 담고 플라스틱 spatula를 이용하여 조심스럽게 혼합한 후 기질인 Sue-Ala-Ala-Ala-4Na 용액(3 mM/L of dimethylsulfoxide) 100 μ L를 첨가하였다. 그 후 플라스틱 spatula를 이용하여 조심스럽게 혼합하여 5분간 반응시키고 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 효소의 1 unit는 분당 1 μ Lmol 4-nitroaniline이 생성되는 것으로 정의하였다.

Collagenase 활성 저해

HPS의 백혈구 세포 및 정제 collagenase(EC 3,4,21,35) 활성 저해 효과는 Brown과 Pollock(29)의 방법에 준하여 측정하였다. 기질 용액은 20 mM CaCl_2 가 함유된 0.1 M Tris aminomethan 완충액(pH 7.1)에 PZ 1 mg을 용해시켜 제조하였으며 효소 용액은 1 mL 증류수에 백혈구 세포 및 정제 collagenase(Sigma Co.) 0.15 unit를 용해시켜 제조하였다. 효소의 활성 측정은 다음과 같이 5×10^{-4} - 5×10^{-2} M 농도의 HPS 0.05 mL와 기질 용액 0.4 mL를 37°C에서 3분간 사전 반응시킨 후 0.05 mL의 효소 용액을 첨가하고 37°C에서 30분간 반응시켰다. 반응 후 25 mM citric acid 용액 1 mL를 첨가하여 효소 반응을 정지시킨 다음, ethyl acetate 5 mL로 친유성 물질을 추출하여 비색 정량하였다. 효소의 저해 활성은 다음의 수식에 따라 퍼센트로 환산하여 산출하였다.

인체 치은세포 독성 시험

HPS가 인체 치은 섬유 모세포의 활성화에 미치는 영향을 측정하기 위하여 Jang(30)의 방법에 준하여 측정하였다. 계대배양을 통하여 활성화시킨 인체 치은 모세포를 trypsin EDTA(0.05% trypsin, 0.53 mM EDTA, Gibco/BRL, Grand Island, USA)용액으로 처리하여 세포 부유액을 만든 다음 원심 분리하여 single cell들을 회수하였다. 회수된 cell을 microtest plate well(1×10^4 cell/well)에 옮겨 1% FBS (fetal bovin serum, Gibco/BRL)가 포함된 DMEM(dulbecco's modified eagle medium, Gibco/BRL)으로 CO_2 incubator에서 37°C, CO_2 5%, 습도 100%의 조건에서 48시간 동안 배양하였다. 배양액 중 부착되지 않는 세포를 제거하기 위하여 FBS가 포함되지 않은 DMEM으로 세척한 후, 일정 농도의 HPS가 첨가된 DMEM(1% FBS 포함)과 함께 배양하였다. 배양 후 생리식염수에 용해한 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl), 5-diphenyl tetrazolium bromide, Sigma Co.)용액을 300 μ L씩 각 well에 넣고 4시간 동안 CO_2 incubator에서 배양하였다. 배양액 중 MTT

용액을 제거하고, 형성된 결정을 용해시키기 위하여 DMSO(dimethyl silfoxide, Sigma Co.)를 200 μ L씩 첨가한 후 96 well plate로 옮겨 ELISA analyser(Spectra MAX 250, Molecular Devices Co., Sunnyvale, CA, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하여 독성을 평가하였다. 실험결과는 대조군에 대한 백분율로 다음 식에 준하여 계산하였고 SAS system program에 의해 통계 처리하였다.

$$\text{세포활성도(\%)} = \frac{\text{실험 well의 흡광도}}{\text{대조 well의 흡광도}} \times 100$$

결과 및 고찰

사람의 PMNL의 leukotriene B₄ 생합성 저해

HPS의 PMNL로부터 LTB_4 생합성에 미치는 영향을 검토한 결과 Fig. 1과 같다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 IC_{50} 값은 2×10^{-4} M이었으며, 1×10^{-3} M 첨가 시 85% LTB_4 의 생합성이 저해되었으며, 5×10^{-2} M 첨가 시 97%의 LTB_4 생합성이 저해되었다. 이 결과는 에스테르화된 지방산은 세포 내 지방대사효소계의 작용을 받지 않으며, 비에스테르화된 지방산만이 효소적 대사 경로의 기질로 작용하고, 에스테르화 지방산은 대사경로의 길항 작용한다는 Funk 등(31)의 보고와 같이 HPS의 LTB_4 생합성 저해 효과는 구조적으로 에스테르화 지방산과 구조적 유사성으로 인해 세포지방산대사효소계의 길항 작용하는 것으로 판단된다. 이는 홍화씨유가 LTB_4 의 생합성을 감소시켰다는 Ohhashi 등(32)의 보고 및 녹색잎 홍합의 지질 분획인 lyprinol의 유도체들이 LTB_4 의 생합성을 저해하였다는 Whitehouse(33)의 보고와도 잘 일치하는 결과를 보였다.

HPS의 LTB_4 의 생합성 저해활성은 scandenolide같은 sesquiterpene lactone의 IC_{50} 값이 20 μ M이었다는 Ysrael과 Croft(34)의 보고 및 dehydrocostic acid의 IC_{50} 값이 22 μ M이었다는 Hernandez(35)의 보고, Tornhamre 등(36)이 보고한 helenalin(IC_{50} value = 70 μ M), Hernandez 등(26)이 보고한 inuviscoide(IC_{50} value = 94 μ M) 및 Thomet 등(37)이 보고한 petasin(IC_{50} value = 75 μ M)에 비해 높은 저해 농도를 나타내었으나 Patrignani 등(38)이 보고한 Nafazatron(IC_{50} value = 17 mM) 및 Cater 등(39)이 보고한 zileuton(IC_{50} value = 0.4 mM)에 비해 낮은 농도에서 LTB_4 생합성을 효과적으로 저해하였다.

HPS에 의해 생합성이 저해된 LTB_4 는 5-lipoxygenase의 작용에 의해 arachidonic acid로부터 유도된 dihydroxy fatty acid로서(40),

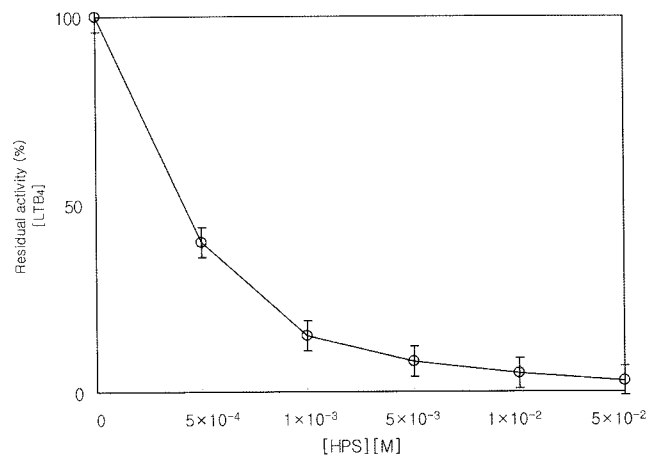


Fig. 1. Inhibitory effect of HPS on LTB_4 generation from PMNL.

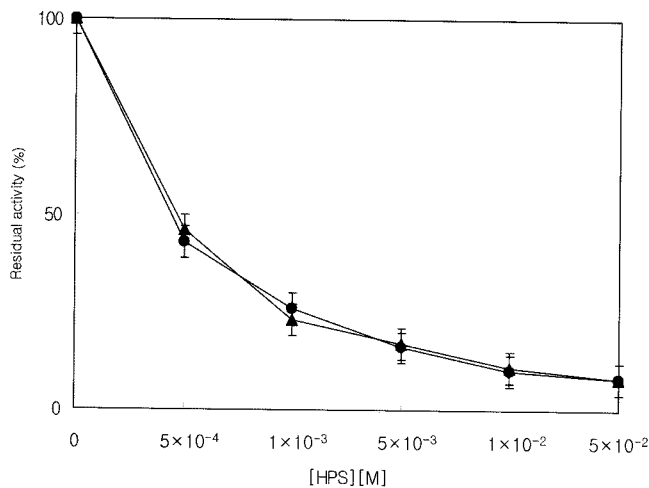


Fig. 2. Inhibitory effect of HPS on 5-lipoxygenase activity. -●-: leukocyte enzyme, -▲-: purified enzyme.

백혈구에 대하여 강력한 유주성 특성을 갖는 성분으로 알려져 있으며, 치주염, 류마티스 관절염 및 다수의 염증성 질환에 핵심적 기능을 하는 인자이다(41). 그러나, 실제적으로는 LTB_4 는 arachidonic acid의 5-carbon을 산화시키는 5-lipoxygenase의 작용에 의하여 arachidonic acid가 leukotriene $A_4(LTA_4)$ 로 산화되고, 이 LTA_4 가 LTA_4 hydase의 작용에 의해 LTB_4 로 가수분해 되어진다(42). 이렇게 생합성 되어진 LTB_4 가 염증의 매개물질로 작용하게 된다. 따라서 이러한 LTB_4 생합성의 강력한 저해는 염증을 갖는 치주염의 예방과 치료에 효과적이라고 판단된다.

5-lipoxygenase 활성 저해

균질화된 사람의 PMNL 5-lipoxygenase 및 시판 정제 5-lipoxygenase(EC 1.13.11.34) 활성에 대한 HPS의 저해효과를 측정된 결과는 Fig. 2와 같다.

Fig. 2에서 보는 바와 같이 5-lipoxygenase pathway의 효소 복합체중 5-lipoxygenase에 직접적으로 저해하여 5×10^{-3} M 첨가 시 83% 효소활성이 저해되었으며, 5×10^{-2} M 첨가 시 92%의 효소활성이 저해되었다. 또한 효소활성에 대한 IC_{50} 값은 2.5×10^{-4} M이었으며, 정제 5-lipoxygenase에 대한 IC_{50} 값은 2.3×10^{-4} M이었다. 이 결과는 HPS가 5-lipoxygenase에 직접 작용하여 LTB_4 의 생합성을 저해한다는 것을 확인할 수 있었다. LTB_4 의 생합성 저해에서의 결과와 같이 에스테르화된 HPS의 구조적 특성으로 인해 5-lipoxygenase의 길항 작용하는 것으로 판단된다. 이는 sesquiterpene 화합물인 dehydrocostic acid의 경우 LTB_4 의 생합성을 강하게 저해한 반면($IC_{50} = 22 \mu M$), 5-lipoxygenase의 활성은 오히려 12% 증가하였다는 Hernandez 등(35)의 상반된 결과와 비교해 볼 때 저해제의 구조적 특성이 큰 역할을 하는 것으로 판단된다. 또한 이 결과로부터 HPS의 강력한 염증성 매개 물질인 LTB_4 의 생합성 저해기전은 arachidonic acid 대사에 직접 저해작용을 하는 것으로 판단된다.

또한 최근 인체 암의 발병과 진전에 5-lipoxygenase 활성이 큰 영향을 미치는 것으로 밝혀져 많은 관심을 받고 있다(43). Gunning 등(44) 및 Ghosh-Myers(45)는 5-lipoxygenase의 활성 저해 물질이 폐암 및 전립선암 세포의 성장을 저해하였다고 보고하는 등, 그 유용성에 대하여 주목받고 있다.

따라서 이러한 다양한 보고를 기준으로 본 연구에 이용된 HPS

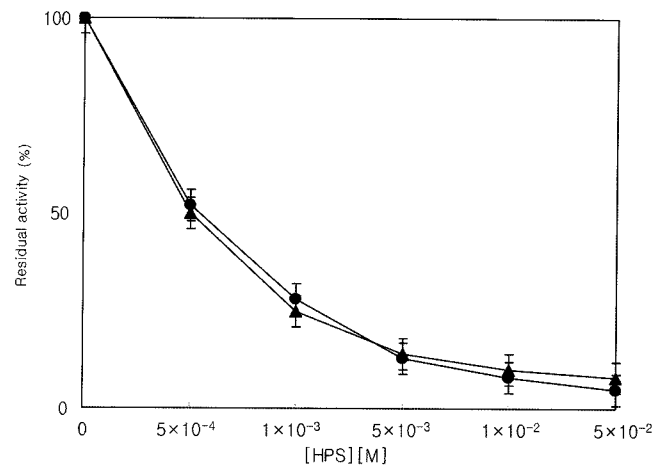


Fig. 3. Inhibitory effect of HPS on the cyclooxygenase-2 activity. -●-: leukocyte enzyme, -▲-: purified enzyme.

는 염증의 진전은 물론 암의 진전에도 유용한 효과를 얻을 수 있을 것으로 예상된다.

Cyclooxygenase-2 활성 저해

PGs 합성의 윗속 단계를 촉매하는 효소로 arachidonic acid를 PGs H_1 으로 전환하는 효소인 cyclooxygenase(COX, EC 1.14.99.1) 활성에 대한 HPS의 저해 효과를 측정된 결과는 Fig. 3과 같다.

Fig. 3에서 보는 바와 같이 백혈구 및 정제 효소 모두 5×10^{-2} M 첨가 시 95%의 효소 활성이 저해되었다. 또한 백혈구 COX 활성에 대한 IC_{50} 값은 5.1×10^{-4} M이었으며, 정제 COX에 대한 IC_{50} 값은 4.8×10^{-4} M이었다. 이 결과는 앞의 LTB_4 의 생합성 및 5-LOX의 결과와 일치하는 것으로 HPS가 arachidonic acid 대사 경로의 길항 작용하는 것을 반증하는 것이다. 이는 녹색잎 추출이 COX와 LOX의 활성 모두를 저해하였다는 Whitehouse(33)의 보고와 같은 결과를 나타내었다. 반면, LTB_4 의 생합성은 저농도에서 저해 효과를 보이나 COX와 LOX의 활성에는 영향을 미치지 않는 dehydrocostic acid의 경우 Hernandez 등(35)은 arachidonic acid 대사 경로가 아닌 인지질의 파괴에 의한 것이라는 보고와 같다고 볼 수 있다. 이는 HPS가 가지고 있는 구조에 의해 aspirin을 비롯한 ester화합물들이 COX-2의 c말단으로부터 70번째 아미노산인 serine 잔기의 hydroxyl기를 선택적으로 acetylation 시켜 활성을 저해하는 것과 같은 기작에 의해 COX-2의 활성을 저해하는 것으로 판단된다(46).

실제, COX는 COX-1과 COX-2의 2종의 이성체로 존재한다. 이 COX-1과 -2는 PGs 합성에서 arachidonic acid를 PGs H_1 으로 전환하여 궁극적으로 PGs $E_2(PGE_2)$, PGD_2 및 다른 eicosanoid로 대사시키는 효소이다(31,32). COX-1은 일상적인 작용에 필요한 PGs를 필요로 한 거의 모든 조직에서 발견되며, COX-1의 작용에 의해 합성되는 PGs는 조직을 보호하고, 위내벽 보호, 손상된 신장 내 일상적인 기능의 유지에 이용되는 반면(47), COX-2는 염증조직의 특정조건 하에서 나타나며 cytokine, bacterial lipopolysaccharide(LPS)나 성장 인자에 의해 활성화되며 염증의 진전 과정에서 과량의 PGs를 생산하는 특성을 갖고 있다(48). 이 PGs가 구강염증과 치조골의 파괴를 매개하여 치주염을 유발한다(49). 그러나 COX-2의 저해에 의한 염증진행의 차단은 COX-1의 저해를 동시에 유발할 수 있는 가능성을 배제할 수 없다. COX-1의 저해에 의한 위와 신장 기능의 저하 가능성도 있다.

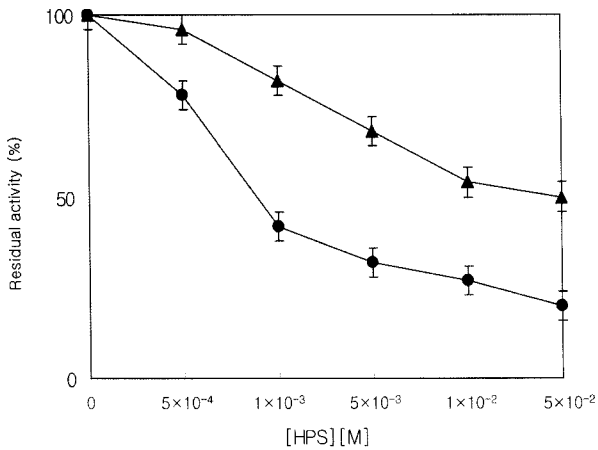


Fig. 4. Inhibitory effect of HPS on the collagenase activity. -●-: leukocyte enzyme, -▲-: purified enzyme.

그러나 COX-2의 저해는 염증의 발병과 진전에 가장 효과적인 방법이라 할 수 있다. 따라서 HPS는 지방산 대사에서 생성되는 PGs의 양을 효과적으로 저하시킴으로써 치주염의 예방 및 치료에 효과적이라고 판단된다.

Collagenase 활성 저해

세균성 병원체에 의한 숙주조직의 손상은 교원질을 비롯한 구조 단백질의 손상으로부터 시작되며, 염증의 진전 과정에서 PMNL에 의해 분비된 각종 효소에 의해 손상이 심화된다(50). 치주염 같은 만성 염증성 질환에서 교원질 분해 기전에 대한 연구는 숙주세포의 collagenase에 의해 유발되는 결합조직 파괴모델을 주로 사용한다(51). 이러한 관점에서 본 연구는 백혈구로부터 분비되어 cytokine과 성장 인자에 의해 활성화되는 세포의 백혈구 collagenase와 정제 collagenase(EC 3.4.21.35)의 활성에 미치는 HPS의 저해효과를 측정하여 보고한 결과, Fig. 4와 같다.

백혈구 collagenase의 경우 5×10^{-2} M 첨가 시 80%의 활성이 저해된 반면 정제 collagenase의 경우 5×10^{-2} M 첨가 시 50%의 효소활성이 저해되었다. 또한 백혈구 collagenase 활성에 대한 IC_{50} 값은 2×10^{-3} M이었으며, 정제 collagenase에 대한 IC_{50} 값은 5×10^{-2} M이었다. 이 결과는 앞의 LTB_4 의 생합성, 5-LOX 및 COX-2의 결과와 다른 양상을 나타내는 것이다. 정제효소가 백혈구 효소에 비해 활성저해 정도가 낮은 것은 직접적으로 효소의 활성에 관여하는 정도가 낮은 것으로 판단되며, 또한 HPS의 세포 독성에 의한 사멸에 의해 정제효소에 비해 저해정도가 큰 것으로 판단된다.

이 결과 녹색잎 홍합이 collagenase의 활성을 저해하였으나 COX나 LOX 보다는 저해정도가 낮았다는 Whitehouse(33)의 보고와 유사한 결과를 나타내었다. 반면, zinc를 포함하는 lactone체의 경우 비교적 우수한 효소 저해 활성($CH1766$: $IC_{50}=34 \mu M$, $CH6631$: $IC_{50}=80 \mu M$)을 보였다는 Ramamurthy 등(52)의 보고에서도 이러한 결론을 유도할 수 있다. 그러나, 실제 효소에 작용하여 활성을 저해하는 정도는 낮으나 효소의 활성화를 차단함으로써 유사한 정도의 저해 정도를 나타내어 염증의 발병 및 진전과, 조직의 파괴를 차단할 수 있음이 규명되었다.

Elastase 활성 저해

가장 강력한 백혈구 protease이면서, 치주염, 류마티스 관절염,

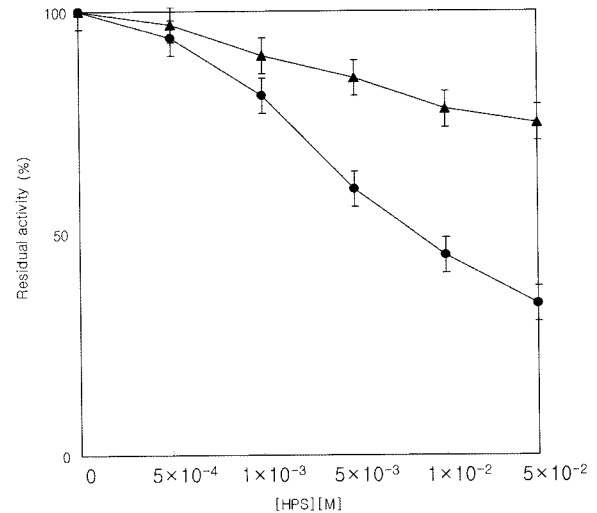


Fig. 5. Inhibitory effect of HPS on the elastase activity. -●-: leukocyte enzyme, -▲-: purified enzyme.

낭종성섬유증 및 다른 염증성 질환의 주원인 효소인 백혈구 elastase와 정제 elastase(EC 3.4.21.37)의 활성에 미치는 HPS의 저해 효과를 측정하여 보고한 결과, Fig. 5와 같다.

백혈구 elastase의 경우 5×10^{-2} M 첨가 시 66%의 활성이 저해된 반면 정제 elastase의 경우 5×10^{-2} M 첨가 시 25%의 효소활성이 저해되었다. 또한 백혈구 elastase 활성에 대한 IC_{50} 값은 7.5×10^{-3} M이었다. 정제효소가 백혈구 효소에 비해 활성저해 정도가 낮은 것은 직접적으로 효소의 활성에 관여하는 정도가 낮은 것으로 판단되며, 그 저해 정도는 Siedle 등(53)이 보고한 sesquiterpene lactone(IC_{50} value = $50 \mu M$), Boc-Ala-Ala-Ala-NHO-Bz($k_i=128 M^{-1} \cdot sec^{-1}$)(54)의 경우에 비해 높은 값을 나타내었다. 그러나 염증의 활성에 비해 elastase 저해 정도가 낮은 것은, 화합물의 구조에 따라 작용 부위가 다를 것이라고 보고한 Hernandez(26)와 같이 한다고 볼 수 있다. 이 elastase는 체내의 elastin을 분해하는 백혈구 과립 효소 중의 하나로 정상 조직에서는 주로 저해 인자와 결합하여 불활성형으로 존재하나, 이상 조직에서는 활성형으로 전환이 되는 복잡한 효소이다. 아직 단독으로 조절이 어려운 효소이며, 역으로 염증성 전구체를 감소시키고, 항염증성 peptide를 방출하는 등 다양한 기능을 하는 효소이다.

따라서 HPS의 elastase에 대한 저해효능은 실제 효소에 작용하여 활성을 저해하는 정도는 비교적 낮으나, 효소의 활성화를 차단함으로써 collagenase의 경우와 마찬가지로 유사한 정도의 저해 정도를 나타내어 염증의 발병 및 진전과, 조직의 파괴를 차단할 수 있음이 규명되었다.

인체 치은세포 독성 시험

항우식 및 항치주염 활성이 있는 것으로 평가된 HPS가 인체 치은세포 모세포에 대한 독성을 평가하기 위하여 측정하여 보고한 결과는 Table 1과 같다.

Table 1에서 보는 바와 같이 5×10^{-2} M의 HPS 첨가 시 세포의 활성은 대조군에 비해, 배양 1일째 47.65%, 배양 2일째 47.83%로 나타났으며, 70% 이상을 저해하는 1×10^{-2} M의 HPS 첨가 시에도 76.88% 및 68.53%로 나타나 비교적 세포독성이 강한 것으로 나타났다. 이는 현재까지 치아우식 및 치주병 예방치료제로서 사용되고 있는 항균물질들이 공통적으로 갖고 있는 세

Table 1. Cell activity of HPS on the human gingival fibroblast cell

| | Time (hr) | 1 | 2 | 3 | Average | % | Variation | Error |
|----------------------|-----------|-------|-------|-------|---------|-------|-----------|-------|
| 0 | 24 | 0.543 | 0.508 | 0.523 | 0.527 | 100 | 0.013 | 0.036 |
| | 48 | 0.796 | 0.758 | 0.798 | 0.784 | 100 | 0.018 | 0.004 |
| 1×10^{-2} M | 24 | 0.399 | 0.402 | 0.410 | 0.405 | 76.85 | 0.005 | 0.101 |
| | 48 | 0.522 | 0.553 | 0.537 | 0.537 | 68.49 | 0.012 | 0.033 |
| 5×10^{-2} M | 24 | 0.237 | 0.259 | 0.256 | 0.251 | 47.63 | 0.008 | 0.101 |
| | 48 | 0.477 | 0.485 | 0.463 | 0.375 | 47.83 | 0.009 | 0.058 |
| 1×10^{-1} M | 24 | 0.220 | 0.228 | 0.216 | 0.217 | 41.18 | 0.007 | 0.047 |
| | 48 | 0.213 | 0.234 | 0.209 | 0.218 | 28.81 | 0.009 | 0.055 |
| 1 M | 24 | 0.071 | 0.079 | 0.082 | 0.080 | 15.18 | 0.006 | 0.060 |
| | 48 | 0.044 | 0.062 | 0.049 | 0.053 | 6.76 | 0.007 | 0.041 |

포독성의 문제점을 개선하지 못하는 아쉬운 결과이다. 그러나 현재 치아우식 및 치주병 예방치료제로 가장 널리 사용되고 있는 chlorhexidine의 경우 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 인 항균농도보다 훨씬 낮은 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 및 10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 인체 치은세포의 활성을 75.2% 및 99.7% 감소시키는 것으로 보고되어 있다(30). 이에 비해 본 연구에서 이용된 HPS의 경우 농도가 감소함에 따라 독성의 정도가 급격히 감소하고 있는 것으로 나타나, 부작용 및 작용기의 변이 등 부수적인 연구가 수반된다면 chlorhexidine의 대체 예방제제로 가능성이 있는 것으로 판단된다.

요 약

본 연구자들은 Cumin(*Cuminum cyminum* L.) seed로부터 정제한 2-hydroxyethyl- β -undecenate의 항치주염 활성을 사람의 백혈구를 이용하여 염증 매개물질 LTB_4 및 PGs의 생성 효소인 5-lipoxygenase와 cyclooxygenase, 및 조직파괴 효소인 collagenase와 elastase의 저해 효과를 규명하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

HPS의 항치주염 활성을 사람의 백혈구를 이용하여 염증 매개물질 LTB_4 및 PGs의 생성 효소인 5-lipoxygenase와 cyclooxygenase 및 조직 파괴효소인 collagenase와 elastase의 저해효과를 규명한 결과, HPS는 5×10^{-2} M 첨가 시 97%의 PMNL로부터 LTB_4 생성성이 저해되었으며 이때 IC_{50} 값은 2×10^{-4} M이었다.

균질화된 사람의 PMNL 5-lipoxygenase 및 시판 정제 5-lipoxygenase 활성에 대한 HPS의 저해 효과는 5×10^{-2} M 첨가 시 92%의 효소 활성이 저해되었다. 또한 효소 활성에 대한 IC_{50} 값은 2.5×10^{-4} M이었으며, 정제 5-lipoxygenase에 대한 IC_{50} 값은 2.3×10^{-4} M이었다. 또한 백혈구 COX 활성에 대한 IC_{50} 값은 5.1×10^{-4} M이었으며, 정제 COX에 대한 IC_{50} 값은 2.3×10^{-4} M이었으며, 백혈구 collagenase 활성에 대한 IC_{50} 값은 2×10^{-3} M이었으며 정제 collagenase에 대한 IC_{50} 값은 5×10^{-2} M이었다. 백혈구 elastase의 경우 5×10^{-2} M 첨가 시 66%의 활성이 저해된 반면 정제 elastase의 경우 5×10^{-2} M 첨가 시 25%의 효소 활성이 저해되었다. 또한 백혈구 elastase 활성에 대한 IC_{50} 값은 7.5×10^{-3} M이었다. 인체 치은세포에 대한 독성 시험 결과 5×10^{-2} M의 HPS 첨가시 세포의 활성은 배양 2일째 47.83%로 나타났으며, 1×10^{-2} M의 HPS 첨가시에도 68.53%로 나타나 비교적 세포독성이 강한 것으로 나타났다.

감사의 글

본 논문은 2007년도 원광보건대학 교내연구비 지원에 의한 것임.

문 헌

- Gendron R, Grenier D, Maheu-Robert L. The oral cavity as a reservoir of bacterial pathogens for forcal infection. *Microbes Infect.* 2: 897-906 (2000)
- Darveau RP, Tanner A, Page RC. The microbial challenge in periodontitis. *Periodontol.* 2000 14: 12-32 (1997)
- Kornman DS, Page RC, Tonetti MS. The host response to the microbial challenge in periodontitis; assembling the players. *Periodontol.* 2000 14: 33-53 (1997)
- Flemmig T, Nachnami S. Bacteremia following subgingival irrigation and scaling and root planing. *J. Periodontol.* 62: 602-607 (1991)
- Eisenhauer DA, Hutchinson R, Javed T, McDonald JK. Identification of a cathepsin B-like protease in the crevicular fluid of gingivitis patients. *J. Dent. Res.* 62: 917-921 (1983)
- Birkedal-Hansen H. Role of matrix metallo-proteinases in human periodontal disease. *J. Periodontol.* 64: 474-484 (1993)
- Wilton JMA, Bampton JLM, Griffiths GS, Curtis MA, Life HS, Johnson NW, Powell HR, Harrap GJ, Critchley P. Interleukin-1 beta (IL-1 β) levels in gingival crevicular fluid from adults with previous evidence of destructive periodontitis; a cross sectional study. *J. Clin. Periodontol.* 19: 53-57 (1992)
- Wahl LM, Concoran ML. Regulation of monocyte/macrophage metalloproteinase production by cytokines. *J. Periodontol.* 64: 467-473 (1993)
- Giovine FS, Duff GW. Interleukin 1; the first interleukin. *Immunol. Today* 11: 13-16 (1990)
- Nieminen A, Nordlund L, Uitto VJ. The effect of treatment on the activity of salivary proteases and glycosidases in adults with advanced periodontitis. *J. Periodontol.* 64: 297-301 (1993)
- Sengupta S, Fine J, Wu-Wang CY, Gordon J, Murty VLN, Slomiany A, Slomiany BL. The relationship of prostaglandins to cAMP, IgG, IgM, and α_2 -macroglobulin in gingival crevicular fluid in chronic adult periodontitis. *Arch. Oral Biol.* 35: 593-596 (1990)
- Kitagaki K, Natsumae A, Ghoda A. Efficacy of therapeutic agents against gingivitis and periodontal disease: *In vitro* antibacterial activity against strictly anaerobic periodontopathic bacteria. *J. Antibacter. Antifung. Ag.* 11: 451-457 (1983)
- Willerhausen B, Gruber Y, Hamm G. The influence of herbal ingredients on the plaque index and bleeding tendency of the gingiva. *J. Clin. Dent.* 2: 72-75 (1991)
- Bhaskar SN. Clinical use of toothpaste and oral rinse containing sanguinaria. *Comp. Cont. Educ. Suppl.* 5: S87-S90 (1984)
- Lobene RR, Soparkar PM, Newman MB. The effects of a sanguinaria dentifrice on plaque and gingivitis. *Comp. Cont. Educ. Suppl.* 7: S185-S193 (1986)
- Schonfeld SE, Farnoush A, Wilson SG. *In vivo* antiplaque activity of a Sanguinarine-containing dentifrice: Comparison with conventional tooth pastes. *J. Periodontal Res.* 21: 298-305 (1986)
- Siegrist BE, Gustberti FA, Brex HP. Efficacy of supervised rinsing with chlorhexidine digluconate in comparison to phenolic and

- plant alkaloid compounds. *J. Periodontol. Res.* 21: 60-66 (1986)
18. Etamadzadeh H, Ainamo J. Lacking anti-plaque efficacy of 2 sanguinarine mouth rinses. *J. Clin. Periodontol.* 14: 176-184 (1987)
 19. Gazi MI. Photographic assessment of the antiplaque properties of sanguinarine and chlorhexidine. *J. Clin. Periodontol.* 15: 106-111 (1988)
 20. Girao VCC, Nunes-Pinheiro DCS, Morai SM, Sequeira JL, Gioso MAA. Clinical trial of the effect of a mouth-rinse prepared with *Lippia sidoides* chen essential oil in dogs with mild gingival disease. *Prev. Vet. Med.* 59: 95-102 (2002)
 21. Park CS, Ryu IH, Lee KS. Enzymological evaluation of oral inflammation inhibitory activity by *Aloe vera* peel extract. *Korean J. Food Sci. Technol.* 33: 753-759 (2001)
 22. Kang EJ, Ryu IH, Lee KS. Purification and properties of HPS (halitosis prevention substance) isolated from Cumin(*Cuminum cymium* L.) seed. *Food Sci. Biotechnol.* 14: 621-627 (2005)
 23. Garcia A, NiuBo J, Benítez MA, Viqueira M, Perez JL. Comparison of two leukocyte extraction methods for cytomegalovirus Antigenemia Assay. *J. Clin. Microbiol.* 34: 182-184 (1996)
 24. Safahi H, Sailer ER, Ammon HP. Mechanism of 5-lipoxygenase inhibition by acetyl-11-keto-beta-boswellic acid. *Mol. Pharmacol.* 47: 1212-1216 (1995)
 25. Betts WH, Hurst NP, Murphy GA, Cleland LG. Auranofin stimulates LTA hydrolase and inhibits 5-lipoxygenase/LTA synthase activity of isolated human neutrophils. *Biochem. Pharmacol.* 39: 1233-1237 (1990)
 26. Hernandez V, Recio MC, Manez S, Prieto JM, Giner RM, Rios JL. A mechanistic approach to the *in vivo* anti-inflammatory activity of sesquiterpenoid compounds isolated from *Inula Viscosa*. *Planta Med.* 67: 726-731 (2001)
 27. Collier JG, Flower RJ. Effect of aspirin on human seminal prostaglandin. *Lancet.* 298: 852-853 (1971)
 28. Tschesch H, Engelbrecht S, Wenzel HR. Leukocyte Elastase Method of Enzymatic Analysis. 3rd ed. Verlag Chem., Weinheim, Germany. pp. 176-184 (1986)
 29. Brown JH, Pollock SH. Inhibition of elastase and collagenase by anti-inflammatory drugs. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 135: 792-797 (1970)
 30. Jang BS, Son SH, Jeong JP, Bae KH. The effects of honokiol and magnolol on the antimicrobial bacterial collagenase activity, cytotoxicity, and cytokine production. *J. Korean Acad. Periodont.* 23: 145-157 (1993)
 31. Funk CD. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science* 294: 1871-1875 (2001)
 32. Ohhashi K, Takahashi T, Watanabe S, Kobayashi T, Kuyama H. Possible mechanisms for the differential effects of high linoleate safflower oil and high alpha-linolenate perilla oil diets on platelet-activating factor production by rat polymorphonuclear leukocytes. *J. Lipid Mediat. Cell* 17: 207-220 (1997)
 33. Whitehouse MW, Macrides TA, Kalafatis N, Betts WH, Haynes DR, Broadbent J. Anti-inflammatory activity of a lipid fraction (Lyprinol) from the NZ Green-lipped Mussel. *Inflammopharmacology* 5: 237-246 (1997)
 34. Ysrael MC, Croft KD. Inhibition of leukotriene and platelet activating factor synthesis in leukocytes by the sesquiterpene lactone scandanolide. *Planta Med.* 56: 268-270 (1990)
 35. Hernandez V, Manez MC, Recio RM, Rios JL. Anti-inflammatory profile of dehydrocortic acid, a novel sesquiterpene acid with a phamacophoric conjugated diene. *Eur. J. Pharm. Sci.* 26: 1-8 (2005)
 36. Tornhamre S, Schmidt TJ, Nasman-Glaser B, Ericsson I, Lindgren JA. Inhibitory effects of helenalin and related compounds on 5-lipoxygenase and leukotriene C₄ synthase in human blood cells. *Biochem. Pharmacol.* 62: 903-911 (2001)
 37. Thomet OA, Wiesmann UN, Schapowal A, Bizer C, Simon HU. Role of petasin in the potential anti-inflammatory activity of a plant extract of *Petasites hybridus*. *Biochem. Pharmacol.* 61: 1041-1047 (2001)
 38. Patrignami P, Canet SR. Biosynthesis, characterization, and inhibition of leukotriene B₄ in human whole blood. *Prostaglandins* 33: 539-551 (1987)
 39. Cater GW, Young PR, Albert DH, Bouska J, Dyer R, Bell RL, Summers JB, Brooks DW. 5-lipoxygenase inhibitory activity of zileuton. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 256: 929-937 (1991)
 40. McGee J, Fitzpatrick F. Enzymatic hydration leukotriene A₄. *J. Biol. Chem.* 260: 12832-12837 (1985)
 41. Griffiths RJ, Pettipher ER, Koch K, Farrell CA, Breslow R, Conklyn J, Smith MA. Leukotriene B₂ plays a critical role in the progression of collagen-induced arthritis. *P. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 517-521 (1995)
 42. Cao Y, Prescott SM. Many actions of cyclooxygenase-2 in cellular dynamics and in cancer. *J. Cell Physiol.* 190: 279-286 (2002)
 43. Steele VE, Holmes CA, Hawk ET, Kopelovich L, Lubet RA, Crowell JA, Sigman CC, Kelloff GJ. Lipoxygenase inhibitors as potential cancer chemopreventives. *Cancer Epidem. Biomar.* 8: 467-483 (1999)
 44. Gunning WT, Kramer PM, Steele VE, Pereira MA. Chemoprevention by lipoxygenase and leukotriene pathway inhibitors of vinyl carbamate-induced lung tumors in mice. *Cancer Res.* 62: 4199-4201 (2002)
 45. Ghosh J, Myers CE. Central role of arachidonate 5-lipoxygenase in the regulation of cell growth and apoptosis in human prostate cancer cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* 469: 577-582 (1999)
 46. Roth GJ and Majerus PW. The mechanism of effect of aspirin on human platelets: 1 acetylation of a particulate fraction protein. *J. Clin. Invest.* 56: 624-632 (1975)
 47. Vane JR, Bakhle YS, Botting RM. Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu. Rev. Pharmacol.* 38: 97-120 (1998)
 48. Williams CS, Mann M, DuBois RN. The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer, and development. *Oncogenesis* 18: 7908-7916 (1999)
 49. Howell TH, Williams RC. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs as inhibitors of periodontal disease progression. *Crit. Rev. Oral Biol. M.* 4: 177-196 (1993)
 50. Romanelli R, Nancini S, Laschinger C, Overall CM, Sodek J, McCulloch CAG. Activation of neutrophil collagenase in periodontitis. *Infect. Immun.* 67: 2319-2326 (1999)
 51. Lee W, Aitken S, Sodek J, McCulloch CA. Evidence of a direct relationship between neutrophil collagenase activity and periodontal tissue destruction *in vivo*: role of active enzyme in human periodontitis. *J. Periodontol. Res.* 30: 23-33 (1995)
 52. Ramamurthy NS, Xu JW, Bird J, Baxter A, Bhogal R, Wills R, Watson B, Owen D, Wolff M, Greenwald RA. Inhibition of alveolar bone loss by matrix metalloproteinase inhibitors in experimental periodontal disease. *J. Periodontol. Res.* 37: 1-7 (2002)
 53. Siedle B, Cisielski S, Murillo R, Loser B, Castro V, Klaas CA, Hucke O, Labahn A, Melzig MF, Merforty I. Sesquiterpene lactones as inhibitors of human neutrophil elastase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 10: 2855-2861 (2002)
 54. Schmidt C, Schmidt R, Demuth HU. pp. 761-762. In: Peptides. 100. Giralt E, Andreu D (eds). ESCOM Science, Amsterdam, Netherlands (1991)