

## 韓茵陳의 치주염세균에 대한 항균효과 및 항염효과

김영홍<sup>1#</sup>, 정미영<sup>2</sup>, 이나경<sup>1</sup>, 이진용<sup>3</sup>, 허익<sup>4</sup>, 이계현<sup>5</sup>, 임사비나<sup>1,2\*</sup>

1: 경희대학교 한의과대학 경혈학교실, 2: 경희대학교 WHO 전통의학연구협력센터 동서의학연구소,  
3: 경희대학교 치과대학 구강미생물학교실, 4: 경희대학교 치과대학 치주과학교실,  
5: 동국대학교 한의과대학 본초학교실

### Antimicrobial Effect on the Periodontal Pathogens and Anti-inflammatory Effect of *Artemisiae Iwayomogii* Herba

Young Hong Kim<sup>1#</sup>, Mi Young Jeong<sup>2</sup>, Na Kyung Lee<sup>1</sup>, Jin Yong Lee<sup>3</sup>, Yeek Herr<sup>4</sup>,  
Je Hyun Lee<sup>5</sup>, Sabina Lim<sup>1,2\*</sup>

1: Department of Meridian and Acupuncture, College of Eastern Medicine, Kyung Hee University,  
2: WHO Collaborating Center for Traditional Medicine, East-West Medical Research Institute, Kyung Hee University, 3: Department of Oral Microbiology, College of Dentistry, Kyung Hee University,  
4: Department of Periodontology, College of Dentistry, Kyung Hee University,  
5: Department of Herbology, College of Oriental Medicine, Dongguk University

#### ABSTRACT

**Objectives** : The purpose of this study was to evaluate on the antimicrobial effect on the periodontal pathogens and anti-inflammatory effect of *Artemisiae Iwayomogii* Herba. *Artemisiae Iwayomogii* Herba has been used for treating as *Artemisiae Capilaris* Herba in Korea.

**Methods** : *Artemisiae Iwayomogii* Herba was prepared by extracting medicinal herb with water. We investigated antimicrobial activity by the minimum inhibitory concentration (MIC) test. We also investigated inhibition of IL-1 $\beta$ -induced collagenase-1(MMP-1), stromelysin-1(MMP-3), interleukin-6 gene expression in human gingival fibroblasts.

**Results** : The antimicrobial effect of *Artemisiae Iwayomogii* Herba was evaluated with MIC against periodontopathogens: *Porphyromonas gingivalis* 2561, W50, A7A1-28, 9-14K-1, *Prevotella intermedia*28, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Y4. MICs of *Artemisiae Iwayomogii* Herba were 0.156 mg/ml, 0.625 mg/ml, 0.313 mg/ml, 1.25 mg/ml, 10 mg/ml and 10 mg/ml. The anti-inflammatory effect of *Artemisiae Iwayomogii* Herba was evaluated with influence of herbs on the IL-1 $\beta$ -induced expression of MMP-1, MMP-3, interleukin-6. IL-1 $\beta$  increased MMP-1, MMP-3, interleukin-6 mRNA levels. *Artemisiae Iwayomogii* Herba significantly inhibited IL-1 $\beta$ -induced MMP-1, MMP-3, interleukin-6 gene expressions in a dose-dependent manner.

**Conclusions** : These results suggested that *Artemisiae Iwayomogii* Herba might reduce the excessive

\* 교신저자 : 임사비나, 서울시 동대문구 회기동 1 경희대학교 WHO 전통의학연구협력센터 동서의학연구소

· Tel : 02-961-0324 · E-mail : lims@khu.ac.kr

# 제1저자 : 김영홍, 서울시 동대문구 회기동 1 경희대학교 한의과대학 경혈학교실

· Tel : 02-961-0338 · E-mail : kyh7831@hanafos.com

· 접수 : 2008년 4월 2일 · 수정 : 2008년 6월 11일 · 채택 : 2008년 6월 20일

proteolytic capacity of the gingival fibroblast during inflammation and could be developed a new drug in periodontitis.

**Key words** : Periodontitis, Artemisiae Iwayomogii Herba, collagenase-1(MMP-1), stromelysin-1(MMP-3), interleukin-6

## 서론

茵陳蒿는 국화과(Compositae) 식물인 사철쭉(*Artemisia capillaris* Thunberg)의 지상부를 건조한 것으로 淸熱利濕, 利膽退黃의 효능이 있으며 실험적으로 이담, 보간, 항종양, 항균, 항염 등의 약리작용이 보고되었다<sup>1)</sup>. 주성분은 6,7-dimethoxyquomarin이며  $\beta$ -pinene, capillene, capillone, capillin, capillarin, capillerisin 등의 정유성분을 함유하고 있다. 그러나 우리나라에서는 임상에서茵陳蒿의 대용으로 국화과에 속하는 더위지기(*Artemisia iwayomogi* Kitamura)의 지상부를 건조한韓茵陳(*Artemisiae Iwayomogii* Herba)을 사용하고 있다.茵陳蒿와韓茵陳에 대한 연구로 김 등은茵陳蒿가 관절조직에서 iNOS, PGE2, MMP-9을 저해함으로써 동물 모델에서의 관절염 치료에 효과가 있음을 발표하였고, 김 등은茵陳蒿가 사염화탄소에 의한 간 손상에 미치는 효과를 발표하였으며, 함 등은茵陳蒿와韓茵陳이 고지혈증 흰쥐에 대한 효과를 발표하였으며 이 등은 한인진 추출물의 간장보호 작용에 관한 연구를, 서는 한인진이 알콜 투여로 유발된 흰쥐의 고지혈증과 간 손상의 예방에 미치는 영향을 발표하였다<sup>2-6)</sup>.

치주염은 치주과학에서 “치은열구 내에 존재하는 특정 세균 또는 특정 세균의 집단에 의해 발생하는 치아주위조직의 염증성병변으로 치주낭이 형성되고 치은퇴축이 일어나며 치주 인대와 치조골의 파괴가 일어나 정상적인 치아의 탈락을 일으키는 질환이다”라고 정의하고 있다<sup>7)</sup>. 치주염의 약물치료에 대한 연구는 구강세균과 염증기전이 밝혀지면서 화학제제를 이용한 항생제, 항균제 및 항염제 등에 대하여 꾸준하게 있어왔으나 내성균 발현, 과민반응, 위장장애 치아 표면 착색, 박리성 치은염 유발 등의 부작용으로 인하여 현재 임상에서 치주질환에 대한 약물치료는 치석제거술, 치근면 활택술, 치주관막술 등의 국소적인 요인을 치료하는 기계적인 방법의 보조적인 수준에 머물고 있는 형편이다<sup>8-14)</sup>. 치주질환과 관련된 최근 한약제제 연구들을 살펴보면, 홍 등은 천연추출물

함유치약의 치태 및 치은염 억제효과를, 이 등은 홍화자 추출물이 골형성에 미치는 영향에 관한 연구를, 유 등은 숙단의 생리활성성분이 치은섬유아세포의 세포주기조절에 미치는 영향을, You Chan 등은 치주염에 사용되는 처방의 치주병원균에 대한 실험적 평가를 보고하였다<sup>15-18)</sup>.

Interleukin-1 $\beta$ 는 치은 연상 혹은 치은연하 치주낭에 존재하는 치주질환 원인균과 개체세포의 상호작용에 의해 대식세포, T-cell, B-cell, 섬유아세포, 골아세포 등에서 생성되며 단백질분해효소인 MMP의 활성을 촉진하여 결합조직 파괴 및 골흡수를 일으킨다<sup>19-22)</sup>.

이러한 선행연구를 바탕으로韓茵陳의 치주염세균에 대한 항균효과 및 항염효과를 알아보고자 치주염의 원인균들 중 혐기성 그람음성균인 *Porphyromonas gingivalis* 및 *Prevotella intermedia*와 통기성 그람음성균인 *Actinobacillus actinomycetemcomitans*에 대한韓茵陳의 항균효과를 조사하고, 치은 섬유아세포 활성도를 측정하기 위하여 치주염 병력이 없는 사람의 건강한 조직에서 채취한 사람치은섬유아세포(Human Gingival Fibroblast)를 배양하여 IL-1 $\beta$ 로 MMP-1, MMP-3, IL-6를 활성화시킨 후韓茵陳의 추출물을 처리하여 MMP-1과 MMP-3 및 IL-6 활성 억제 효과를 관찰하여 유의성 있는 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. 한인진 추출물 제조

본 실험에 사용한韓茵陳(*Artemisiae Iwayomogii* Herba, 원산지 한국)은 서울 노원구 상계동 소재 임수훈 약업사를 통해 구입하여 사용하였다. 한인진 92 g에 상수 1000 ml을 가하여 대응약탕기에 본탕과 재탕을 하는 방식으로 2회 추출하였다. 이렇게 얻어진 추출액을 농축하고 동결 건조하여 분말(수득률: 34.8%)을 얻었다. 추출물은 Dimethylsulfoxide (DMSO; Sigma,

St. Louis, MO, USA)에 20 mg/ml로 녹여서 실험시료로 사용하였다.

## 2. 치주염 유발균의 배양

*P. gingivalis* 2561, W50, A7A1-28, 9-14K-1와 *P. intermedia* 참고 균주를 80% N<sub>2</sub>, 10% H<sub>2</sub> 및 10% CO<sub>2</sub>를 함유한 37°C 혐기성 세균 배양기(Shelcon Manufacturing Inc., Cornelius, OR, USA)에서 hemin (5 µg/ml)과 vitamin K1 (0.2 µg/ml) 이 첨가된 half-strength BHI (HK-BHI) 배지에서 48시간 배양하여 사용하였고, *A. actinomycetemcomitans* 참고 균주를 10% CO<sub>2</sub> 배양기(Vision Co., Seoul, Korea)에서 thioglycollate (Difco LAB. Co., Detroit, MI, USA) 액체배지에 배양하여 사용하였다. 각 균주는 경희대학교 치의학전문대학원 미생물학교실에서 분양받아 사용하였다.

## 3. 항균활성 측정

*P. gingivalis*, *P. intermedia*, *A. actinomycetemcomitans* 균주와 추출물의 최소억제농도(minimum inhibitory concentration, MIC)를 측정하기 위해 액체배지 희석법을 이용하였다. 액체배양시킨 균주액을 희석하여 (1/25)하여 96 well plate에 0.1 ml 넣고 농도별로 준비한 약물 0.1 ml을 처리하여 *P. gingivalis*, *P. intermedia* 균주는 혐기성 세균 배양기에서 48시간 배양하고, *A. actinomycetemcomitans* 균주는 10% CO<sub>2</sub> 37°C 배양기에서 24시간 배양한다. 570 nm 파장에서 흡광도를 측정하고, 약물처리하지 않은 대조군의 값을 참조하여 MIC를 결정하였다. 또한 보다 정확히 하기 위하여 각각의 well에서 배양액을 일부 취하여 agar배지에 배양하였다. 48시간 37°C 혐기 배양한 후 결과를 관찰하여 흡광도 값으로 결정된 MIC 값을 보정하였다.

## 4. 치은섬유아세포 배양

사랑니 발치를 위하여 내원한 세 명의 환자의 제 3 소구치를 발치하면서 사전 동의하에 주위의 치은을 절제하였다. 절제한 치은은 40% 우태아 혈청(fetal bovine serum : FBS, Gibco Co., Grand Island, NY, USA)과 20% 항생제(penicillin G, streptomycin, amphotericin B 포함, Gibco Co., Grand Island, NY, USA)가 첨가된 α-minimum essential medium (α-MEM, L-glutamine 포함, Gibco Co., Grand Island,

NY, USA)에서 3회 세척하였다. 세척된 치은 조직을 60 mm 세포 배양용 Petri dish (Corning Co., Midland, MI, USA)로 옮기고 건조되지 않도록 주의하면서 No. 15 scalpel 두 개를 이용하여 1 mm<sup>2</sup>로 세절하였다. 세절한 치은조직은 조직의 가장자리가 잘 부착되도록 주의하면서 dish에 잘 퍼놓은 후 pipette을 이용하여 각 dish 당 2 ml의 배양액을 주입하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 습도 100% 배양기(Shel-Lab, Portland, Oregon, USA)에서 배양하였다. 배양액으로는 10% FBS와 1% 항생제를 첨가한 α-MEM을 사용하고 단일 세포층이 형성될 때까지 3일간격으로 교환하였다. Petri dish를 dish당 2 ml씩 놓고 3분간 bench상에서 방치한 후 Pasteur pipette을 이용해서 dish에 부착된 잔여세포를 기계적으로 분리시키고 원심분리용 시험관으로 옮겨서 1,200 rpm으로 10분간 원심분리 하였다. 상층액을 제거하고 원심분리를 이용하여 Hanks' balance salt solutions (HBSS; Gibco Co., Grand Island, NY, USA)로 2회 세척한 후 배양액을 넣고 세포 부유액을 만들어 60 mm petri dish에 분주하였다<sup>23)</sup>.

## 5. 치은섬유아세포 활성화 측정

치은 섬유아세포를 96 well tissue culture plates (Corning-Costar, Midland, MI, USA)에 12,500 cell/well로 분주하였다. 세포를 24-36시간 배양 후 10% FBS를 포함한 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM; Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) 배양액으로 교환하고 해당농도의 추출물을 첨가하였다. 배양 2일 후에 MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) assay를 시행하였다<sup>24)</sup>. 각 well에서 배양액을 제거하고 생리식염수로 2회 세척 후 Cell titer 96 aqueous cell proliferation assay kit (Promega, Madison, WI, USA)를 이용하여 제조사의 지시대로 MTS 용액 20 µl을 첨가하고 4시간 동안 배양하였다. 반응이 끝난 후 ELISA plate reader (Microplate manager, BioRad, USA)로 파장 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 실험을 3회 반복 시행하였으며 각각의 추출물 농도에 대한 세포활성도 효과는 O.D. 값으로 표시하였다.

## 6. RT-PCR

100 mm dish에 치은섬유아세포를 분주하고 10%

FBS 가 함유된 DMEM 배지에 배양하였다. 배양액은 세포가 밀생에 도달할 때까지 3일 간격으로 교환하였다. 세포가 밀생에 도달하면 10% FBS가 포함된 DMEM 배양액으로 교환하여 12-14시간 동안 다시 배양하였다. 사람치은섬유아세포에서 추출물에 의한 MMP-1, MMP-3, IL-6 유전자들의 억제 효과를 비교하기 위하여 5개 군으로 나누어 처치하였다. 아무것도 처치하지 않은 군을 음성대조군으로, IL-1 $\beta$ 만 적용한 군을 IL-1 $\beta$  자극군, 추출물의 농도별(100, 200, 500  $\mu$ g/ml)로 처치 후 IL-1 $\beta$ 로 자극한 군으로 하였으며 각 군들에 적절한 처치를 시행한 후 12시간 동안 배양하였다. 배양 후 Trizol-reagent (Promega, Madison, WI, USA)를 이용하여 RNA를 분리하였다. 분리한 RNA에서 reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)을 수행하여 cDNA를 합성하고, cDNA를 증폭하였다. 사용한 primer는 다음과 같다. MMP-1: 5'-CAC AGC TTT CCT CCA CTG CTG CTG C-3' (forward), 5'-GGC ATG GTC CAC ATC TGC TCT TGG C-3' (reverse): 396bp, MMP-3: 5'-GAA AGT CTG GGA AGA GGT GAC TCC AC-3' (forward), 5'-CAG TGT TGG CTG AGT GAA AGA GAC CC-3' (reverse): 284bp, IL-6: 5'-ATG AAC TCC TTC TCC ACA AGC GC-3' (forward), 5'-GAA GAG CCC TCA GGC TGG ACT G-3' (reverse): 628bp, GAPDH: 5'-GTC TTC ACC ACC ATG GAG AAG-3' (forward), 5'-GTT GTC ATG GAT GAC CTT GGC-3' (reverse): 210bp. 증폭한 PCR 산물은 ethidium bromide가 포함된 1% agarose로 전기영동하여 확인하였다.

## 7. 통계

모든 측정값은 평균값  $\pm$  표준오차 (Mean  $\pm$  standard error)로 나타내었으며, oneway - ANOVA로 통계 검정한 뒤 Newman-Keuls 방법을 사용하여 사후 분석하였다. 유의성은 P값이 0.05 미만인 경우에 인정하였다.

## 결 과

### 1. 한인진 추출물의 치주염 원인균에 대한 최소억제농도

치주병인균인 혐기성 그람음성균인 *P. gingivalis* 2561,

W 50, A7A1-28, 9-14K-1과 *Prevotella intermedia* 28, 통기성 그람음성균인 *A. actinomycetemcomitans* Y4에 대한 한인진의 MIC를 측정된 결과 각각 0.156 mg/ml, 0.625 mg/ml, 0.313 mg/ml, 1.25 mg/ml, 10 mg/ml, 10 mg/ml로 나타났다(Table 1).

Table 1. MIC of the Water Extracts from *Artemisiae Iwayomogii* Herba Against *P. Gingivalis*, *P. Intermedia*, and *A. Actinomycetemcomitans*

	MIC (mg/ml)
	<i>Artemisiae Iwayomogii</i> Herba
<i>P. gingivalis</i> 2561	0.156
<i>P. gingivalis</i> W 50	0.625
<i>P. gingivalis</i> A7A1-28	0.313
<i>P. gingivalis</i> 9-14K-1	1.250
<i>P. intermedia</i> 28	10.000
<i>A. actinomycetemcomitans</i> Y4	10.000

The MIC was determined as the lowest concentration of antibiotic inhibiting growth of the bacteria. The experiments were performed at least three times.

### 2. 한인진 추출물의 세포활성도 효과

한인진 추출물이 치은섬유아세포의 세포활성을 억제시키는지 알아보려고 MTS assay를 시행하였다. 한인진 500  $\mu$ g/ml 이하의 농도들에서 세포활성도가 유의한 변화를 나타내지 않았다. 따라서 본 연구에서는 세포활성을 저해하지 않는 것으로 확신할 수 있는 한인진 500  $\mu$ g/ml 이하의 농도를 적용하였다(Fig. 1).

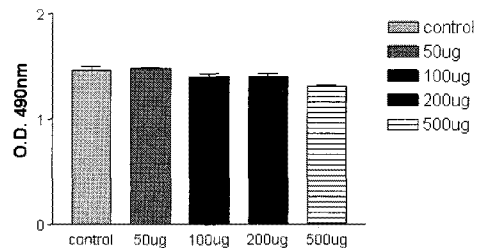


Fig. 1. MTS assay for human gingival fibroblasts viability with *Artemisiae Iwayomogii* Herba

Human gingival fibroblasts were cultured with several concentrations of *Artemisiae Iwayomogii* Herba for 48 h. Results are expressed as mean  $\pm$  S.D. in triplicate cultures.

### 3. 한인진에 의한 치은섬유아세포 MMP-1, MMP-3 mRNA 발현에 미치는 영향

사람의 치은섬유아세포에서 한인진에 의한 MMP-1

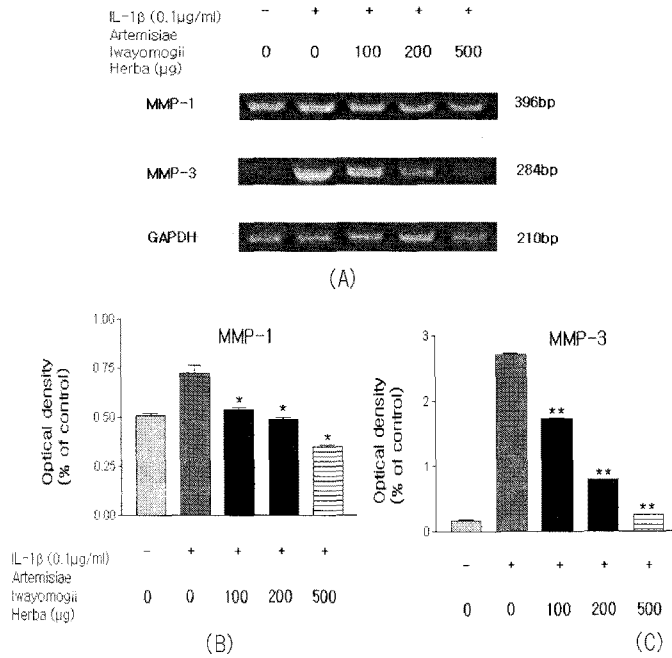


Fig. 2. Effect of Artemisiae Iwayomogii Herba on the IL-1 $\beta$ -induced MMP-1 and MMP-3 expression in human gingival fibroblasts  
Human gingival fibroblasts were pretreated with various concentrations of Artemisiae Iwayomogii Herba for 30 min before incubation with IL-1 $\beta$  for 12 h. Results are expressed as mean  $\pm$  S.D. in triplicate cultures. \* $p$ <0.05 and \*\* $p$ <0.001 compared to IL-1 $\beta$  control group.

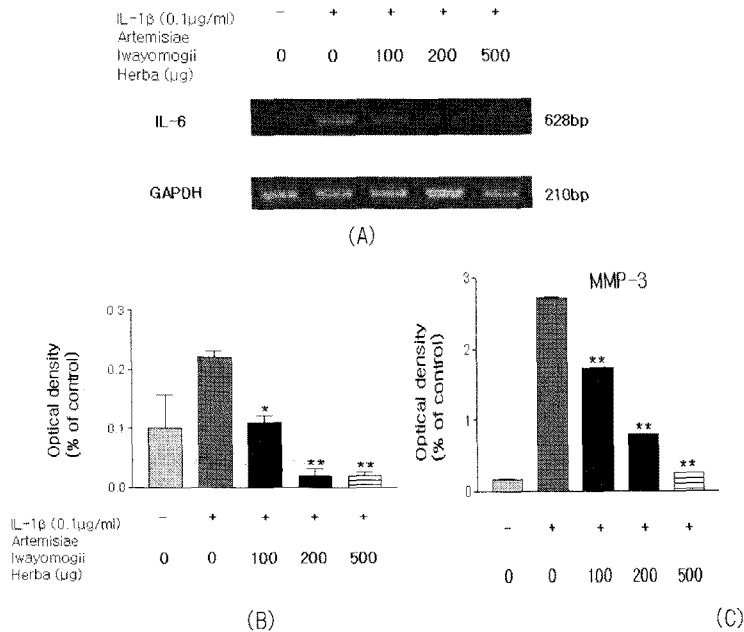


Fig. 3. Inhibition of IL-1 $\beta$ -induced IL-6 expression in human gingival fibroblasts by Artemisiae Iwayomogii Herba  
Human gingival fibroblasts were pretreated with various concentrations of Artemisiae Iwayomogii Herba for 30 min before incubation with IL-1 $\beta$  for 12 h. Results are expressed as mean  $\pm$  S.D. in triplicate cultures. \* $p$ <0.05 and \*\* $p$ <0.001 compared to IL-1 $\beta$  control group.

과 MMP-3 효소 활성 억제 효과를 관찰하기 위하여 아무것도 처치하지 않은 정상군, IL-1 $\beta$ 만 적용한 대조군, 한인진 100, 200 및 500  $\mu$ g/ml을 각각 농도별로 처치한 후 IL-1 $\beta$ 로 자극한 실험군 등 총 5개의 군으로 나누어 실험한 결과, MMP-1에 대해서는 IL-1 $\beta$ 처리 대조군에 비하여 실험군이 농도별로 각각 21.9%, 29.1%, 49.4%의 유의한 발현억제를 보였으며 ( $p < 0.05$ ), MMP-3에 대해서도 IL-1 $\beta$  처리 대조군에 비하여 농도별로 각각 36.1%, 71.0%, 90.7%의 억제율을 보였다( $p < 0.001$ )(Fig. 2).

#### 4. 한인진에 의한 치은섬유아세포 IL-6 cytokine mRNA 발현에 미치는 영향

사람의 치은섬유아세포에서 한인진에 의한 IL-6여 아무것도 처치하지 않은 정상군, IL-1 $\beta$ 만 적용한 cytokine mRNA 발현 억제 효과를 관찰하기 위하여 대조군, 한인진 100, 200 및 500  $\mu$ g/ml을 각각 농도별로 처치한 후 IL-1 $\beta$ 로 자극한 실험군 등 총 5개의 군으로 나누어 실험한 결과, IL-6에 대해서 IL-1 $\beta$ 처리 대조군에 비하여 실험군이 농도별로 각각 49.1% ( $p < 0.05$ ), 90.2%( $p < 0.001$ ), 94.0%( $p < 0.001$ )의 유의한 발현억제를 보였다(Fig. 3).

## 고찰

《實用東西醫學臨床總書》에서 “치주염은 한의학적으로 牙宣, 齒挺候, 齒動搖 등의 범주에 속한다”고 하였고 胃火熾盛證과 腎氣虛損證으로 辨證하여 各各 淸胃散과 金匱腎氣丸으로 처방을 제시하였다<sup>25)</sup>. 또한 치주염은 한의학적으로 구취·치통·아선·치아동요 등의 범주에 속하고 加減甘露飲·加減瀉白散·八味丸·環少丹·獨活散·淸胃散·金匱腎氣丸 등의 처방을 복용할 수 있다. 그 중에서 加減甘露飲은 熟地黃·生地黃·天門冬·黃芩·枳殼·枇杷葉·茵陳蒿·石斛·甘草·犀角 등으로 구성된 처방으로 《東醫寶鑑》에서도 胃熱口臭, 口瘡牙宣과 치통 중 瘀血痛을 치료한다고 하여 치주염을 치료할 수 있는 방제임을 알 수가 있다. 加減甘露飲의 처방을 구성하는 약제 중 茵陳蒿는 淸熱작용이 있는 약제로 動物 모델 관절조직에서 iNOS, PGE2, MMP-9을 저해하는 보고가 있다<sup>26)</sup>. 이에 착안하여 우리나라에서 茵陳蒿의 대용품으로 사용하고 있는 韓茵陳에 대한 치주질환의 유용성에 대한 연구를 수행하였다.

옥수수 불검화 추출물은 치주농루 및 치주염에 효과가 있는 것으로 알려져 치주염치료제로 제형화되었는데 치아동요도 감소, 치주낭 깊이 감소, 치은 출혈 감소 및 조골기능 활성화 등에 효과가 발표되었으나 기계적인 치료술식과 함께 병행한 연구였기에 그 효능에 대해서 의문이 제기 되는 경우가 있다. 옥수수 불검화 추출물의 효과를 강화하기 위하여 옥수수 불검화 추출물과 후박 추출물의 혼합물에 대한 항균작용 연구도 수행되었다<sup>27)</sup>.

치주염과 관련 있다고 알려진 병원균은 *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* 등을 들 수 있으며 이러한 치주 원인균이 밝혀지면서 항생제에 대한 연구가 활발해졌다. 본 연구에서는 한의학적으로 치주염과 관련이 있는 한인진의 약재를 선정하여 치주염 원인균에 대한 항균효과에 대하여 알아보기 위하여 혐기성 그람 음성균인 *Porphyromonas gingivalis* 2561, W 50, A7A1-28, 9-14K-1, *Prevotella intermedia*28, 통기성 그람 음성균인 *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Y4에 대한 최소성장억제농도(MIC)를 측정하였는데 *Porphyromonas gingivalis*에서는 MIC가 0.156-1.25 mg/ml로 최소 억제 효과가 나타났으며 *Prevotella intermedia*와 *Actinobacillus actinomycetemcomitans*에서는 10mg/ml 이상으로 항균효과를 인정할 수가 없었다.

비스테로이드성 항염증제(nonsteroidal anti-inflammatory drugs; NSAIDs)는 생체 내에 고르게 분포하는 COX 활성을 차단함으로써 염증성 prostaglandin의 생성을 억제하여 소염, 진통효과를 나타내는데 위점막 손상, 신장기능이상 등의 부작용이 있다는 한계가 있다. Flurbiprofen등의 비스테로이드성 소염제 계통의 약제들이 PGE2 생산억제 효과와 저농도 장기복용으로 골재생의 효과를 보인다는 보고가 있고 구강위생용약제인 chlorhexidine은 농도별로 치은섬유아세포의 기능이상이나 세포의 용해가 일어나는 독성이 발견되었다<sup>28,29)</sup>. 치주염이 미생물과 관련이 있다고 알려진 이래 수십여 년 동안 항균에 대한 연구가 주로 진행이 되어 왔고 항염제에 의한 PGE2 생산억제 등에 대해서도 연구되었지만 최근에는 질병 진행과정에 대한 숙주관련 인자에 대해 많이 알려지게 되면서 염증성 cytokine과 MMPs에 대한 연구가 활발하다. MMP-1은 Type, II, III 교원질의 helix를 제한적으로 분열시켜 분해를 개시하고 gelatinase와 stromelysin에 의해 추가적인 분해가 진행된다<sup>30)</sup>. MMP-3는 치주염, 류마티드 관절염 및 골관절염 등 만성염증성 질환에서 결체조직 파괴에 관여하는 것으로 알려졌다

다<sup>31)</sup>. Interleukin-6(IL-6)는 만성치주염 환자의 치은 열구액에서 활성이 확인이 되어서 치주염에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되고 있다<sup>32)</sup>.

본 연구에서 韓茵陳 추출물이 치주인대 및 치은의 파괴와 치조골의 흡수와 관련이 있는 cytokine인 IL-1 $\beta$ 로 활성화시킨 사람의 치은섬유아세포에서 MMP-1, MMP-3의 활성화도 억제 대한 실험을 진행하였는데, IL-1 $\beta$ 로 사람의 치은섬유아세포에서 MMP-1과 MMP-3가 활성화 된다는 것은 이미 밝혀졌는데<sup>33)</sup> 본 실험에서도 배양한 치은섬유아세포에 IL-1 $\beta$ 를 투여하여 MMP-1과 MMP-3의 활성화가 확인 되었고, 韓茵陳 추출물을 처리하여 MMP-1와 MMP-3의 활성이 억제되는 것을 확인 하였다. 이는 韓茵陳이 치주염에서 치주조직의 파괴를 억제함으로써 염증을 조절할 수 있음을 의미한다. 본 연구에서는 IL-1 $\beta$ 로 배양된 사람의 치은섬유아세포에서 IL-6가 활성화 되는 것도 확인할 수가 있었으며 한 인진이 IL-6의 활성화도 억제하는 것도 확인할 수가 있었다. 이 역시 치주질환에서 치주 염증의 억제를 확인 해 주는 결과라 할 수 있다.

이상의 韓茵陳에 대한 항균실험 결과와 치간섬유아세포에서의 MMP-1, MMP-3, IL-6활성 억제에 대한 실험결과를 볼 때 韓茵陳은 MMP-1, MMP-3, IL-6의 활성 억제와 약한 항균작용을 가진 약재로서 치주염의 치료 효과가 인정되며 치주염 치료제로서의 개발가능성을 시사한다.

## 결 론

韓茵陳의 치주염치료제의 가능성을 알아보고자 치주염 원인균에 대한 항균효과와 치주조직 파괴 및 치조골 흡수에 관여하는 효소인 MMP-1과 MMP-3와 cytokine 중 IL-6의 활성 억제에 대한 실험을 시행하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

첫째, 韓茵陳은 치주염병원균인 *P. gingivalis*에서는 MIC가 0.156-1.25 mg/ml로 최소 억제 효과가 나타났다.

둘째, 배양된 사람의 치은섬유아세포에 IL-1 $\beta$ 로 MMP-1과 MMP-3를 활성화 시킨 후 韓茵陳을 처리한 결과 MMP-1과 MMP-3의 활성이 유의하게 억제되었다.

셋째, 배양된 사람의 치은섬유아세포에서 IL-1 $\beta$ 로 IL-6를 활성화 시킨 후 韓茵陳을 처리한 결과 IL-6 활성이 유의하게 억제되었다. 이상의 결과로 한인진

은 치주염병원균인 *P. gingivalis*에 대한 항균작용과 MMP-1과 MMP-3 효소 및 IL-6 cytokine과 관련된 항염작용이 있는 것으로 확인 되었다.

## 참고문헌

1. 한기중, 김기영. 한방약리학. 서울 : 의성당. 2004. 257-60.
2. 김시나, 김희석, 남경숙, 황성완, 황성연. 인진 추출물의 소염진통작용. 생약학회지. 2005 ; 36(4) : 338-43.
3. 김길수, 박준형. 사염화탄소에 의한 랫드의 간손상에 미치는 인진호 추출물의 영향. 대한수의학회지. 1992 ; 32(3) : 347-56.
4. 함인혜, 정성은, 이경진 등.茵陳蒿와 韓茵陳이 Triton WR-1339로 유도된 고지혈증 흰쥐에 미치는 영향. 대한본초학회지. 2005 ; 20(1) : 45-52.
5. 이순복, 조태순, 윤기욱, 이종찬, 이선미, 심성보. 한인진 추출물의 간장보호 작용에 관한 연구. 응용약물학회지. 1998 ; 6 : 119-29.
6. 서부일. 韓茵陳이 알콜투여로 유발된 흰쥐의 고지혈증과 간 손상의 예방에 미치는 영향. 대한본초학회지. 2007 ; 22(1) : 103-10.
7. 전국치주과학교수협의회. 치주과학. 서울: 군자출판사. 2004 : 116.
8. Emingil G, Atilla G, Sorsa T, Luoto H, Kirilmaz L, Baylas H. The effect of adjunctive low-dose doxycycline therapy on clinical parameters and gingival crevicular fluid matrix metalloproteinase-8 levels in chronic periodontitis. J Periodontol. 2004 ; Jan75(1) ; 106-15.
9. Dong-Hoon Choi, Ik-Sang Moon, Bong-Kyu Choi, Jeong-Won Paik, Yoon-Sik Kim, Seong-Ho Choi, Chong-Kwan Kim. Effect of sub-antimicrobial dose doxycycline therapy on crevicular fluid MMP-8, and gingival tissue MMP-9, TIMP-1 and IL-6 levels in chronic periodontitis. J Periodont Res. 2004 ; 39 : 20-6.
10. 장현선, 박문규, 국중기, 김화숙, 김병욱. Cefixime의 치주 병원성 세균 6종에 대한 항균효과. 대한치주과학회지. 2005 ; 35(2) : 401-11.
11. 박성표, 정현주, 김영준, 김옥수. 치은섬유모세포에서 Triclosan에 의한 Prostaglandin E2 합성억제. 대한치주과학회지. 2004 ; 34(2) : 345-56.

12. 김종관, 채중규, 조규성, 문익상, 최성호. Zea Mays L. 불검화 정량추출물의 치주염 치료효과에 대한 임상적 연구. 대한치주과학회지. 1991 ; 21(2) : 225-34.
13. Helgeland K, Heyden G, Rolla G. Effect of chlorhexidine on animal cells *in vitro*. Scan J Dent Res. 1971 ; 79 : 209-15.
14. Pucher JJ, Daniel JC. The effects of chlorhexidine digluconate on human fibroblasts *in vitro*. J Periodont. 1993 ; 62 : 526-32.
15. 홍지연, 김상년, 하원호, 장석운, 장인권, 박지은, 정성원, 엄유정, 최성호, 김종관. 천연추출물 Curcuma xanthorriza oil 함유치약의 치태 및 치은염 억제효과. 대한치주과학회지. 2005 ; 35(4) : 1053-71.
16. 이성진, 최호철, 선기종, 송제봉, 피성희, 유형근, 신형식. 홍화인 추출물이 골형성에 미치는 영향에 관한 실험실적 연구. 대한치주과학회지. 2005 ; 35(2) : 461-74.
17. 유석주, 장길용, 윤호상, 최호철, 선기종, 김현아, 피성희, 신형식, 유형근. 속단의 생리활성성분이 치은섬유아세포의 세포주기조절에 미치는 영향. 대한치주과학회지. 2005 ; 35(1) : 87-98.
18. You Chan, Chern-Hsiung Lai, Hui-Wen Yang, Yuh-Yie Lin and Chi-Ho Chan. The Evaluation of Chinese Herbal Medicine Effectiveness on Periodontal Pathogens. Am J Chinese Med. 2003 ; 31(5) : 751-61.
19. Tataka DN. Interleukin-1 bone metabolism, a review. J Periodontol. 1993 ; 64 : 416-31.
20. Delaieu N, Bickel M. Interleukin-1 beta and interleukin 18 ; regulation and activity in local inflammation. Periodontol. 2004 ; 35 : 42-52.
21. Makela M, Salo T, Uitto VJ, Larjava H. Matrix metalloproteinase(MMP-2 and MMP-9) of the oral cavity ; cellular origin and relationship to periodontal status. J Dent Res. 1994 ; 73 : 1397-1406.
22. Richards D, Rutherford RB. The effect of interleukin 1 on collagenolytic activity and prostaglandin-E secretion by human periodontal ligament and gingival fibroblast. Arch Oral Biol. 1988 ; 33 : 237-43.
23. Modeer T, Dahllof G, Otteskog P. The effect of the phenytoin metabolite p-HPPH on proliferation of gingival fibroblasts *in vitro*. Acta Odontol Scand. 1982 ; 40 : 353-57.
24. Goodwin CJ, Holt SJ, Downes S, Marshall NJ. Microculture tetrazolium assays: a comparison between two new tetrazolium salts, XTT and MTS. J Immunol Methods. 1995 ; 179 : 95-103.
25. 김갑성 등. 實用東西醫學臨床總書. 서울. 도서출판 정담. 2001 : 396-401.
26. 김시나, 김희석, 남경숙, 황성완, 황성연. 인진 추출물의 소염진통작용. 생약학회지. 2005 ; 36(4) : 338-43.
27. 김태일, 최은정, 정종평, 한수부, 구영. 옥수수 불검화 추출물(Zea Mays L.)과 후박(Magnoliae cortex) 추출물 혼합물의 치주질환원인균에 대한 항균작용 및 치은섬유아세포 활성도에 미치는 영향. 대한치주과학회지. 2002 ; 32(1) : 249-55
28. Heasman PA, Seymour RA. The effect of a systemically-administered non-steroidal anti-inflammatory drug(flurbiprofen) on experimental gingivitis in humans. Clin Periodontol. 1989 ; 16(9) : 551-6.
29. Gendron R, Grenier D, Sorsa T, Mayrand D. Inhibition of the activities of matrix metalloproteinases 2,8 and 9 by chlorhexidine. Clin Diagn Lab Immunol. 1999 ; 6(3) : 437-9.
30. Gregory I Goldberg, Scott M Wilhelm, Annemarie Kronberger, Eugene A Bauer, Gregory A Grant and Arthur Z Eisen. Human Fibroblast Collagenase. Complete primary structure and homology to an oncology transformation-induced rat protein. J Biol Chem. 1986 ; 261(14) : 6600-5.
31. 김성조, 최은영, 최인순, 이주연, 최점일, 김종관. Prevotella intermedia의 세균내 독소가 치은섬유아세포와 치주인대세포에서의 matrix metalloproteinase 및 tissue inhibitor of metalloproteinase의 발현에 미치는 영향. 대한치주과학회지. 2005 ; 35(1) : 21-30.
32. Shih-Jung Lin, Yung-Li Chen, Yen-Bin Kuo, Chuan-Li Li, Hsein-Kun Lu. Measurement of gp130 cytokines-Oncostatin M and IL-6 in gingival crevicular fluid of patients with chronic periodontitis. Cytokine. 2005 ; 30(4) : 160-7.
33. Bruno Gogly, William Hornebeck, Nicole Groult, Gaston Godeau and Bernard Pellat. Influence of Heparin(s) on the Interleukin-1-β-Induced Expression of Collagenase, Stromelysin-1 and Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 in Human Gingival Fibroblasts. Biochem Pharmacol. 1998 ; 56 : 1447-54.