

치주 질환 예방 및 치료용 소재로서 수종의 생약성분 추출물에 관한 항균, 항염, 항산화 효능 연구

이동재 · 한일민 · 김우정[†] · 조인식
(주)에경 중앙연구소 개인용품파트

Anti-microbial, Anti-inflammatory and Anti-oxidative Effects of Herbal Medicine Extracts as Anti-gingivitis Ingredients

Dong-Jae Lee, Il-Min Han, Woo-Jung Kim[†] and In-Sik Cho
Aekyung Central Research Laboratories Personal-care Products Part

Abstract This study was to estimate the effect of herbal medicines on periodontal disease. To screen effective materials for periodontal disease, we performed a series of test for 15 herbal medicine extracts. MIC test for *P. gingivalis*, IL-1 α inhibition test, MMP-1 inhibition test and SOD activation test were carried out for herbal medicine extracts, respectively. The results are as followings : 1) Eunhang, Youkdoogu, Daewhang, Hoobak, Goojulcho, Yongacho, Mokhyang, Sesin, Sancho and Hoehyang extracts were effective for reduce *P. gingivalis*, 2) Eunhang, Jacyak, Youkdoogu, Hagocho, Hoobak, Guaru and Sanyak extracts showed high IL-1 α inhibition rates, 3) Eunhang and Youkdoogu extracts have effects on MMP-1 inhibition, 4) Eunhang, Sanyak and Youkdoogu extracts effectively activate SOD. Especially, Eunhang extract has high performance through all estimations and can effectively prevent and treat periodontal disease.

Key words *P. givalis*, MIC, IL-1 α , MMP-1, SOD, Eunhang(leaf) extract

서 론

치주질환은 흔히 풍치라고도 하는데, 병의 정도에 따라 치은염(gingivitis)과 치주염(periodontitis)으로 나뉜다. 비교적 가볍고 회복이 빠른 형태의 치주질환으로 잇몸 즉, 연조직에만 국한된 형태를 치은염이라 하고, 치주염은 치주과학에서 “치은열구 내에 존재하는 특정 세균 또는 특정 세균의 집단에 의해 발생하는 치주조직의 염증성 병변으로 치주낭이 형성되고 치은퇴축이 일어나며 치주인대와 치조골의 파괴가 일어나 정상적인 치아의 탈락을 일으키는 질환이다”라고 정의하고 있다¹⁾. 치주질환을 일으키는 주요한 원인은 구강 내 존재하는 세균으로, 치태 내에 존재하는 수종의 세균군에 의한 혼합감염으로 치주조직의 반응에 따른 염증진행에 의하여 치주질환이 발생된다^{2,15)}. 이러한 세균 중 특히 red complex에 속하는 *Porphyromonas gingivalis*가 치주질환의 가장 중요한 원인균으로 알려져 있다^{3,4,12)}. *P. gingivalis*는 그람 음성 혐

기성 세균으로 치주질환자의 병소에서 그 수가 증가되며 치주질환이 진행됨에 따라 열구상피에 침투하는 *P. gingivalis*가 종종 발견된다. *P. gingivalis*는 숙주조직과 세포에 부착 또는 침투하는 과정에서 대사산물 또는 독소를 만들어 치주조직에 직접 해를 미치기도 하지만 *P. gingivalis*와 반응하는 이들 세포에서 생산되는 사이토카인(cytokine), 그리고 사이토카인에 반응하는 숙주세포에서 생산된 물질이 치주조직을 더욱 파괴시킨다^{13,16)}.

치주질환자의 경우 일부 특정 세균에 의해 염증 반응 등이 유도되면 비활성형의 콜라게나제(collagenase)를 활성화시키거나 콜라게나제와 다른 매트릭스 메탈로프로테나제(matrix metalloproteinase, MMPs)의 분비를 자극하는 등의 반응이 일어난다. 매트릭스 메탈로프로테나제는 다형핵백혈구, 대식세포, 치은섬유아세포, 골세포와 같은 다양한 세포로부터 분비되는 칼슘 및 아연 의존 펩티다제로 중성의 pH에서 작용하며, 기질로서는 다양한 세포외 기질을 이용한다¹⁴⁾. 이들 효소의 생성 기작을 살펴보면 박테로이드(Bacteroids)와 악티노바실러스(Actinobacillus)와 같은 혐기성 그람 음성균의 세포벽 구성성분인 리포폴리사카라이드(Lipopolysaccharide)와 같은 내독소에 의하여 직접 조직이 파괴되거나, 생체 면역계를 자극하여 면

[†]Corresponding author
Tel: 010-3932-1934
Fax: 042-879-0208
E-mail: zenith@aekyung.kr

역계의 여러 작용에 의하여 세포 외부로 분비된 활성산소, 프로스타글란딘(Prostaglandins), 인터루킨(Interleukins)과 같은 여러 종류의 사이토카인 등에 의해 잇몸 염증이 유발되고, 이들 염증매개체의 자극에 의하여 분비된 콜라게나제 및 세균으로부터 분비된 콜라게나제에 의하여 치주조직의 기질인 콜라겐(collagen)이 분해되어 잇몸 퇴축이 일어나고, 계속 방치하게 되면 치주질환으로 진행된다^{5,6)}. 이는 치주조직의 질환뿐만 아니라 일상적인 치주조직의 재생, 발달 등에 기여하여 이를 파괴하는 것으로 알려져 있으며 이러한 역할을 하는 효소 중 대표적인 것이 매트릭스 메탈로프로테나제-1(MMP-1)과 매트릭스 메탈로프로테나제-8(MMP-8)로서, 치주질환에서 세포 외 기질 분해 즉, 치주조직의 콜라겐을 분해하여 약화시키는 작용을 한다. 매트릭스 메탈로프로테나제-1은 교원조직(connective tissue)의 재생을 조절하고 염증성 치주질환이 있는 부위에 특히 높은 농도로 존재한다. 이러한 부위의 콜라겐 분해를 막기 위해 MMPs를 억제하는 것은 치주질환을 예방하는데 매우 중요하다^{7,8)}.

치주질환의 원인 또는 진행 과정 중 발생하는 활성산소는 치주조직을 손상시켜 치주질환을 유발하거나 진행 중인 치주질환을 악화시키는 작용을 한다. 유해산소로 알려진 활성산소는 가장 안정한 형태인 삼중항산소($3O_2$)가 환원되면서, superoxide radical(O_2^-), 과산화수소(H_2O_2), 하이드록시기(-OH), 지질 과산화물(ROOH), 여기에서 생기는 유리기(free radical; ROO-, RO-) 등의 과산화지질을 형성하므로, 이러한 활성산소의 과산화지질이 정상적으로 소거되지 않았을 때, 유리기로 인한 산화적 스트레스가 생체 내에 가해지면 이들 활성산소는 세포구성 성분들인 지질, 단백질, 당, DNA 등에 대하여 비선택적, 비가역적인 파괴작용을 나타냄으로써 치주질환을 일으킨다.

최근 구강 내 질환의 예방 및 치료에 천연물을 활용하는 연구가 꾸준히 증가되고 있으며⁹⁻¹¹⁾ 본 연구에서는 수종의 천연물에 대해 항균 효과, MMPs 억제 효과, 항염 효과, 항산화 효과를 평가하여 치주질환의 예방 및 치료 효과를 규명하는 데에 그 목적이 있다.

재료 및 방법

1. 실험재료

본 실험에 사용된 천연물은 일반적으로 항균, 항염, 항산화 효과가 있다고 알려진 종으로서 Table 1에서 보는 바와 같다.

2. 실험방법

1) 항균력 평가

Tryptic Soy Agar (MERCK, Germany), Hemin (Fluka, 51280), Menadione (Aldrich, M57405) 5% Sheep blood (HANIL COMED CO., LTD, HK081152)에 혐기적으로

Table 1. List of herbal medicines tested

Serial No.	Korean name	Scientific name
1	Eunhang(leaf)	<i>Ginkgo biloba(leaf)</i>
2	Jacyak	<i>Paonia obovata Maxim</i>
3	Youkdoogu	<i>Mistica fragrans Hutt</i>
4	Mokdanpi	<i>Paonia suffruticosa Andrews</i>
5	Hagocho	<i>Leonurus sibiricus L</i>
6	Daewhang	<i>Rheum rhabarbarum</i>
7	Hoobak	<i>Machilus thunbergii</i>
8	Guaru	<i>Trichosanthes kirilowii</i>
9	Sanyak	<i>Disocorea batatas</i>
10	Goojulcho	<i>Chrysanthemum zawadskii var. latilobum</i>
11	Yongacho	<i>Agrimonia pilosa Ledeb.</i>
12	Mokhyang	<i>Inula helenium</i>
13	Sesin	<i>Scientific name</i>
14	Sancho	<i>Zanthoxylum schinifolium</i>
15	Hoehyang	<i>Foeniculum vulgare</i>

배양한(Anaerocult Gaspack system, Merck, Germany) P. gingivalis KCTC5352를 동일한 액체 배지에 접종한 후 180rpm 37°C에서 5일간 혐기성 배양하고(Anaerocult Gaspack system, Merck, Germany), 시험 시료를 단계적으로 희석하여 96-well plate에 접종하였다. 농도별로 희석된 시료에 배양된 균주를 액체배지로 희석하여 1×10^6 CFU/ml이 되도록 접종한 후, 37°C에서 5일간 혐기성 배양하고(Anaerocult Gaspack system, Merck, Germany), 600 nm의 파장에서 흡광을 측정하여 미생물 성장 유무를 판별하였다.

2) 인터루킨-1 α (IL-1 α) 생성 억제율 평가

DuoSet ELISA Development kit로 sandwich법을 이용한 ELISA의 원리로 mouse interleukin 1 alpha(IL-1 α)를 측정한다. 시험세포주 Raw254.7(mouse macrophage)를 사용하였다. 실험을 위해 96-well plate(Flat bottom)를 준비하고 Kit 내에 있는 capture antibody를 working solution으로 희석하여 준비한 후 2.0 μ g/ml 농도의 capture antibody를 각 well에 100 μ l씩 넣어주고 밀봉하여 상온에서 하룻밤 동안 배양한다. 이 후 capture antibody를 최대한 제거하고, 각 well에 400 μ l의 세척용 완충용액을 넣어주어 1분간 정지한 후, 용액이 완전히 제거될 수 있도록 종이 타월에 털어준다. 세척이 완료된 plate의 각 well에 300 μ l의 reagent diluent를 넣어주고 상온에서 최소 1시간 동안 blocking 시킨 후 반응 용액을 완전히 제거한다. 각 well에 대조군(in reagent diluents) 및 시료를 100 μ l씩 넣고 adhesive strip을 이용하여 덮어준 후, 2시간 동안 상온에서 반응시킨 후 반응용액을 완전히 제거한다. 각 well에 detection antibody를 reagent diluent로 희석하여 100 μ l씩 넣어주고 adhesive strip을 이용하여 덮어준 후, 2시간

동안 상온에서 반응시킨 후 반응용액을 완전히 제거한다. 각 well에 희석된 streptavidin-HRP를 100 µl씩 넣어주고 adhesive strip을 이용하여 덮어준 후, 20분간 상온에서 반응시킨 후 반응용액을 완전히 제거한다(암소에서 반응). 각 well에 기질을 100 µl씩 넣어주고 adhesive strip을 이용하여 덮어준 후, 20분간 상온에서 반응시키고(암소에서 반응) 각 well에 50 µl의 stop solution을 넣어주어 반응을 종결시킨 후, plate를 가볍게 흔들어 섞어준다. Microplate reader를 이용하여 450 nm에서 흡광을 측정한다.(wavelength correction : 540 or 570 nm)

3) 매트릭스 메탈로프로테나제-1 (MMP-1) 활성 억제율 평가

매트릭스 메탈로프로테나제-1의 활성 및 억제율 평가를 위해 미국 Biomol社의 Assay kit (AK-405)를 사용한다. Assay kit의 protocol에 따라 먼저 억제제, 기질, 효소를 각각 희석한다. 정해진 조성대로 억제제, 효소, 평가시료를 96-well microplate에 넣고 37°C에서 60분간 방치한다. 최종적으로 기질을 넣고 Ex/Em=328/393 조건에서 흡광도를 1분 간격으로 20분간 측정한다. 이렇게 측정된 흡광도 곡선에서 초기 직선 구간의 기울기를 대조군 대비 상대값으로 환산하여 평가시료의 매트릭스 메탈로프로테나제-1 활성 억제율을 얻는다.

4) 슈퍼옥사이드 디스뮤타제 (Superoxide dismutase, SOD) 활성 평가

슈퍼옥사이드 디스뮤타제의 활성 및 억제율 평가를 위해 일본 Dojindo社의 Assay kit (AK-405)를 사용한다. 먼저 YD-38 세포주 (잇몸세포, KCLB No. 60508)를 배양하여 평가시료를 처리하고 24시간이 경과한 후, 세포 파쇄 완충액을 사용하여 세포를 파쇄한다. 이렇게 얻은 세포 파쇄액을 원심분리하여 상층액만을 회수한 후, -20°C 이하에서 보관하며 평가시료로 사용한다. Assay kit의 실험순서에 따라 효소, 완충액, 효소용액, 발색 시약을 각각 희석하여 제조한다. 정해진 조성대로 각 용액과 평가시료를 96-well microplate에 넣고 37°C에서 20분간 방치한다. 450 nm 조건에서 흡광도를 측정하고 Blank 수치를 대입한 계산식으로 SOD activity를 얻는다.

결과 및 고찰

1. 항균력 평가

*P. gingivalis*에 대한 MIC test 결과 은행엽, 육두구, 대황, 후박, 구절초, 용아초, 목향, 세신, 산초, 회향 추출물에서 우수한 항균효과가 나타났다. 일반적으로 천연 추출물의 경우 어느 정도의 항균력을 지니는 것이 보통이다. 하지만 대표적인 치주질환의 원인균인 *P. gingivalis*와 같은 특성의 균주에 대하여 항균력을 나타내는 것은 제한되

Table 2. MIC test results of 15 herbal medicine extracts against *P. gingivalis*

Serial No.	Name	MIC(%)
		<i>P. gingivalis</i>
1	Eunhang(leaf)	0.078125
2	Jacyak	>2.5
3	Youkdoogu	0.004883
4	Mokdanpi	>0.2
5	Hagocho	1.150000
6	Daewhang	0.009281
7	Hoobak	0.003542
8	Guaru	>2.5
9	Sanyak	0.312500
10	Goojulcho	0.039403
11	Yongacho	0.028750
12	Mokhyang	0.028750
13	Sesin	0.057500
14	Sancho	0.028750
15	Hoehyang	0.043700

Table 3. IL-1α inhibition rate of 15 herbal medicine extracts

Serial No.	Name	IL-1 inhibition rate(%)	
		0.001%	0.01%
1	Eunhang(leaf)	65.8	71.4
2	Jacyak	95.3	93.6
3	Youkdoogu	32.7	42.4
4	Mokdanpi	-	-
5	Hagocho	33.9	44.9
6	Daewhang	-	-
7	Hoobak	16	27
8	Guaru	23.4	37.0
9	Sanyak	37.9	54.6
10	Goojulcho	-	-
11	Yongacho	-	-
12	Mokhyang	-	-
13	Sesin	-	-
14	Sancho	-	-
15	Hoehyang	-	-

어 있으며, 그 효능도 우수한 것을 선별해 내는 것은 어려운 과정이다. 상기 실험 재료들은 항균효과가 우수한 것으로 알려진 종으로 선별한 것이지만 *P. gingivalis*에 대한 항균력은 큰 차이를 나타냈으며 치주질환 개선에 직접적으로 관련이 있는 추출물을 1차적으로 선별할 수 있는 자료의 제공에 그 의미가 있다.

2. 인터루킨-1α (IL-1α) 생성 억제율 평가

IL-1α의 생성 억제율을 평가한 결과 은행엽, 작약, 육두구, 하고초, 후박, 과루, 산약 추출물의 0.001%, 0.01% 농

도에서 IL-1 α 생성 억제율이 나타났으며 이외의 추출물은 해당 농도에서는 IL-1 α 생성 억제 효과가 나타나지 않았다. 특히 은행엽과 작약의 추출물은 상당히 높은 수준의 IL-1 α 생성 억제 효과를 나타냈으며, 0.001%와 같은 저농도 조건에서도 그 효능이 나타났다.

3. 매트릭스 메탈로프로테나제-1 (MMP-1) 활성 억제율 평가

*P. gingivalis*에 대한 항균력과 IL-1 α 생성 억제율을 바탕으로 5종의 시료를 선정한 후 매트릭스 메탈로프로테나제-1의 활성 억제 정도를 평가하였다. 매트릭스 메탈로프로테나제-1의 활성 억제 정도를 평가하기 위해 효소 활성 평가 키트를 통해 각 천연 추출물(최종 농도로써 0.5%)의 억제 효과를 평가한 결과, 육두구, 은행엽 추출물이 효소 억제제인 NNGH (N-Isobutyl-N-(4-methoxyphenylsulfonyl)glycyl hydroxamic acid, 1.3 mM) 대비, 20% 이상의 효과를 나타냈다. 산약 추출물도 효소 억제제와 유사한 수준의 효소 활성 억제 효과를 나타냈다. 평가에 사용한 효소 억제제와 추출물의 농도 수준이 서로 상이하어 직접적인 비교, 평가는 다소 어려울 수 있으나 추출물 수준으로도 억제제에 상응하는 억제 효과를 얻을 수 있다는 점에서 의미를 찾을 수 있다. 따라서 잇몸 부위의 염증 반응, 세균 활동 등에 의해 생성된 매트릭스 메탈로프로테나제-1의 활성을 억제하여 잇몸 질환의 완화 및 예방하는데 있어서 육두구, 은행엽 추출물을 이용할 수 있을 것으로 기대된다.

4. 슈퍼옥사이드 디스무타제 (Superoxide dismutase, SOD) 활성 평가

YD-38 세포(잇몸 세포, KCLB No. 60508) 배양 과정에서 평가 시료(천연 추출물 용액, 최종 농도로 0.5%)를 처리하여 얻은 세포 파쇄액 내의 SOD 효소의 활성을 평가한 결과 Blank 대비, 은행엽, 산약 추출물이 상대적으로 우수한 효능을 보였고 육두구 추출물도 비교적 양호한 활성 효과를 나타냈다. 각 시료를 처리하여 얻은 세포 파

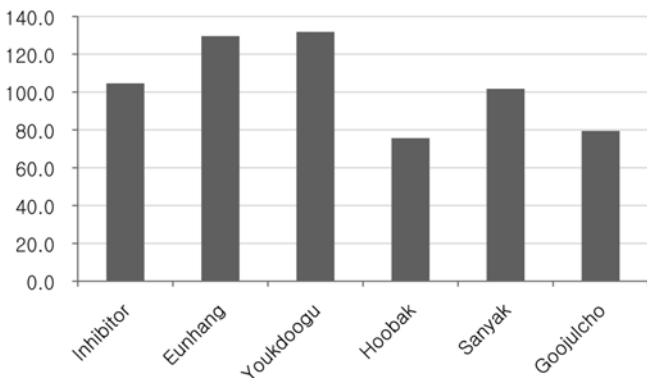


Fig. 1. The comparison of matrix metallo-protease(MMP-1) activity on treating with some natural plant extracts(0.5%) and chemical inhibitor(NNGH, 1.3 mM)

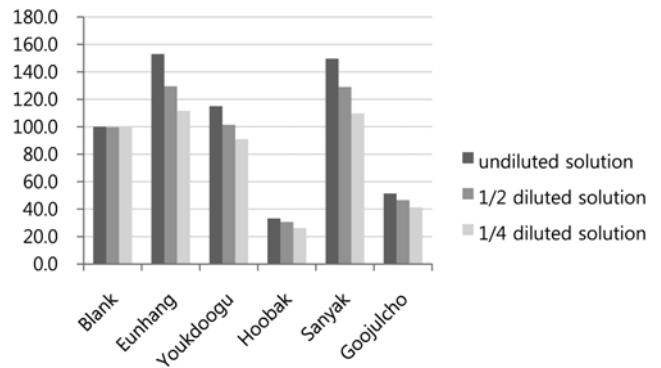


Fig. 2. Superoxide dismutase(SOD) activity changes in YD-38 cell culture by addition of some natural plant extracts

쇄액의 단계 희석을 통해 농도별로 SOD 활성을 측정 한 결과, 농도에 따라 효소 활성이 증가됨을 관찰했다. 따라서 은행엽, 산약 추출물을 적정 함량 포함한 조성물의 경우, 치주세포의 항산화력 강화에 도움을 줄 수 있을 것으로 판단된다.

수 중의 천연 추출물을 이용하여 치주질환과 연관되는 *P. gingivalis*에 대한 항균력 평가와 IL-1 α 생성 억제율 평가를 통해 5종의 천연 추출물을 선별한 후, MMP-1 활성 억제율 평가, SOD 활성 평가의 실험을 수행하였다. 대부분의 추출물들은 상기 평가 중 특정 부분에서만 효능을 나타내었지만 은행엽, 육두구 추출물은 모든 평가에서 고른 효능을 나타내었다. 추출물 여러 종을 혼합하여 사용하는 것도 일반적으로 적용되는 방법이며 광범위한 효과를 나타낼 수 있는 장점이 있지만, 구강용 제품의 특성상 치주질환에 특화된 추출물을 단독으로 사용하는 것이 경제성, 안전성 및 추출물의 정량 등을 고려하였을 경우 더욱 바람직한 접근일 것이다. 이러한 관점에서, 은행엽 추출물의 경우 대부분의 평가에서 상위의 평가 결과를 보여주고 있으므로 구강용 제품에 적용 시 우수한 치주질환 예방 및 치료 효과를 나타낼 수 있을 것으로 사료된다.

요 약

치주질환의 예방 및 치료 효과를 연구하기 위해 수 중의 천연물을 이용하여 *P. gingivalis*에 대한 항균력과 IL-1 α 생성 억제율을 평가하여 1차 선별한 후 MMP-1 활성 억제율 평가와 SOD 활성평가를 수행한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. *P. gingivalis*에 대한 항균력 평가 결과 은행엽, 육두구, 대황, 후박, 구절초, 용아초, 목향, 세신, 산초, 회향 추출물에서 우수한 항균효과가 나타났다.
2. 인터루킨-1 α (IL-1 α) 생성 억제율 평가 결과 은행엽, 작약, 육두구, 하고초, 후박, 과루, 산약 추출물이 우수한 IL-1 α 생성 억제율을 나타내었다.
3. 매트릭스 메탈로프로테나제-1(MMP-1)의 활성 억제

평가 결과, 육두구, 은행엽 추출물이 우수한 MMP-1 활성 억제율을 나타내었다.

4. 슈퍼록사이드 디스뮤타제 (Superoxide dismutase, SOD) 활성 평가 결과 은행엽, 산약, 육두구 추출물 서 우수한 SOD 활성을 나타내었다.
5. 구강용 제품에 적용 시 은행엽 추출물은 우수한 잇몸 질환 예방 및 치료 효능을 나타낼 수 있다.

참고문헌

1. The Korean Association for Periodontal Research: Periodontal research, Seoul, pp. 116, 2004.
2. Socransky SS et al.: Microbial complexes in subgingival plaque. J Clin Periodontol 25: 134-144, 1998.
3. Offenbacher S et al.: Periodontal disease at the biofilm-gingival interface. J Periodontol 78(10): 1911-1925, 2007.
4. Gurenlian, JoAnn R: The role of dental plaque biofilm in oral health. J Dent Hyg 81(5): 116, 2007.
5. Jeng AY et al.: Sulfonamide-based hydroxamic acids as potent inhibitors of mouse macrophage metalloelastase. Bioorg Med Chem Lett 8: 897, 1998.
6. Emingil G et al.: The gingival crevicular fluid and serum matrix metalloproteinase-8 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 levels in renal transplant patients undergoing different immunosuppressive therapy. J Clin Periodontol 35(3): 221-229, 2008.
7. Sorsa T, Soumalainen K, Uitto VJ: The role of gingival crevicular fluid and salivary interstitial collagenases in human periodontal interstitial collagenase in human periodontal diseases. Arch Oral Biol 35: 193-196, 1990.
8. Uitto VJ, Turto H, Saxen L: Extraction of collagenase from human gingival. J Periodont Res 12: 207-214, 1978.
9. Jeon ES, Yoon SH, Han MD: Antimicrobial activity of *Streptococcus mutans* by herbal medicine extracts. J Dent Hyg Sci 2(1): 31-38, 2002.
10. HJ Yoon et al.: Effects of medicinal plants against *Streptococcus sobrinus* B13 in hexane fraction. J Dent Hyg Sci 7(3): 197-200, 2007.
11. Kim CH et al.: Antimicrobial effect of *Puerariae thunbergiana* extracts against oral microorganism. J Dent Hyg Sci 4(1): 45-48, 2004.
12. Sreenivasan PK, Gaffar A: Antibacterials as anti-inflammatory agents. Dual action agents for oral health: Antonie Van Leeuwenhoek 93(3): 227-239, 2008.
13. Noda D et al.: Relationship between the presence of periodontopathic bacteria and the expression of chemokine receptor mRNA in inflamed gingival tissues. J Periodont Res 42(6): 566-571, 2007.
14. Katono T. et al.: Effects of nicotine and lipopolysaccharide on the expression of matrix metalloproteinases, plasminogen activators, and their inhibitors in human osteoblasts. Arch Oral Biol 54(2): 146-155, 2008.
15. Pradeep AR et al.: Gingival crevicular fluid and plasma levels of neuropeptide Substance-P in periodontal health, disease and after nonsurgical therapy. J Periodont Res 44(2): 232-237, 2008.
16. Dong Chen et al.: Anti-inflammatory activity of curcumin in macrophages stimulated by lipopolysaccharides from *porphyromonas gingivalis*. Pharmacology 82(4): 264-269, 2008.

(Received December 24, 2009; Revised February 12, 2010;
Accepted February 16, 2010)

