

이질풀 추출물의 항산화 효능에 관한 연구

이 선 영[†] · 김 현 주 · 최 신 욱

(주)래디안

(2011년 1월 14일 접수, 2011년 2월 18일 수정, 2011년 2월 22일 채택)

Study on the Antioxidant Activity of *Geranium nepalense* subsp. *thunbergii* Extract

Sun Young Lee[†], Hyun Ju Kim, and Shin Wook Choi

RADIANT INC., 1143, Geodu-ri, Dongnae-myeon, Chuncheon, Gangwon-do 200-883, Korea

(Received January 14, 2011; Revised February 18, 2011; Accepted February 22, 2011)

요약: 본 연구는 이질풀 추출물의 항산화 효능에 관한 연구로, 항산화 및 항노화의 기능성 화장품 소재로서의 개발 가능성을 확인하고자 하였다. 이질풀의 주요 성분으로는 tannin, (-)epicatechin, kaempferitin, kaempferol-7-rhamnoside, brevifolin, corilagin, pyrogallol, ellagitannin, geraniin, gallic acid, succinic acid, quercetin, protocatechuic acid 등이 보고되어 있다. DPPH 라디칼 소거능 평가를 통한 이질풀 추출물의 항산화 효능을 측정된 결과, 대조군인 quercetin과 비교하여 우수한 소거 활성을 확인할 수 있었다. 동일 농도(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)를 처리하였을 때 이질풀 추출물의 DPPH 라디칼 소거능은 약 98.33 %로 측정되었으며, quercetin의 경우 78.05 %로 측정되었다. Human keratinocyte (HaCaT)에 이질풀 추출물을 처리하여 세포 내 Reactive Oxygen Species (ROS) 생성 저해능을 측정된 결과, IC₅₀값은 이질풀 추출물과 quercetin에서 각각 43.22, 102.35 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 측정되어 이질풀 추출물의 우수한 항산화 효능을 확인할 수 있었다. 또한 피부 자극 테스트 및 세포 독성 평가를 통하여 이질풀 추출물이 피부에 자극을 유발시키지 않는 안전한 소재임을 확인하였다.

Abstract: Antioxidant activity of *Geranium nepalense* subsp. *thunbergii* extract was evaluated by DPPH free radical scavenging assay. *Geranium nepalense* subsp. *thunbergii* extract contains tannin, (-)epicatechin, kaempferitin, kaempferol-7-rhamnoside, brevifolin, corilagin, pyrogallol, ellagitannin, geraniin, gallic acid, succinic acid, quercetin, protocatechuic acid, etc. *Geranium nepalense* subsp. *thunbergii* showed excellent antioxidant activity compared to positive control, quercetin. *Geranium nepalense* subsp. *thunbergii* extract showed a 98.33 % inhibition of DPPH radical at a concentration of 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Quercetin showed a 78.05 % inhibition of DPPH radical at the same concentration. To investigate reactive oxygen species (ROS) scavenging activity, *Geranium nepalense* subsp. *thunbergii* extract was treated to human keratinocytes (HaCaT). IC₅₀ value of *Geranium nepalense* subsp. *thunbergii* extract was 43.22 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and IC₅₀ value of quercetin was 102.35 $\mu\text{g}/\text{mL}$. *Geranium nepalense* subsp. *thunbergii* extract showed excellent antioxidant activity. Skin irritation test and cytotoxicity test suggested that *Geranium nepalense* subsp. *thunbergii* extract is a safe antioxidant ingredient for cosmetics.

Keywords: *Geranium nepalense* subsp. *thunbergii*, antioxidant activity, reactive oxygen species, anti-aging

1. 서 론

노화 과정은 시간에 따라 여러 기능이 저하되는 과정으로, 생물체 내외의 여러 요인으로부터 초래되는 산화적 스트레

스를 견뎌낼 수 있는 능력을 상실하게 되고, 세포 내의 항산성을 잃게 되어 노화가 진행된다[1].

생체 내에서 에너지 생산을 위한 산화 과정 중에 상당량의 활성 산소들이 생성된다. 이들 활성산소는 생체 내 제거 기작에 의해 대부분 소멸되지만 순간적으로 활성산소가 다량으로 발생되거나 만성적으로 활성산소가 발생되어 항산화

[†] 주 저자 (e-mail: riolovea@gmail.com)

방어계와의 균형이 깨지면 각종 질환의 원인이 된다[2]. 산소는 대사과정 중 일부가 superoxide radical ($O_2^{\cdot -}$), 과산화수소(H_2O_2), Hydroxyradical (HO^{\cdot}), singlet oxygen (O_2^{\cdot})과 같은 활성 유해 산소로 변환되는데, 이들은 피부세포 및 조직의 손상은 물론이며 항산화 효소와 비효소적 항산화제들로 구성된 산화제와 항산화제 균형을 파괴하고 지질 과산화, 단백질 산화, 콜라겐과 엘라스틴의 사슬절단 및 멜라닌 생성반응의 촉진, DNA의 산화와 같은 생체 구성 성분들의 손상을 야기시킨다. 이에 따라 피부 탄력 감소, 주름살 및 기미·주근깨 등으로 특징 지워지는 피부 노화가 가속화된다. 따라서 피부 노화를 지연시키고 억제하기 위해서는 생체 내 뿐만 아니라 피부에서의 과잉의 활성 산소종을 억제하고 또한 활성산소를 효율적으로 제거할 수 있는 항산화 방어 시스템이 필요하다[3].

피부는 항상 산소와 접촉하고 자외선에 노출되어 있어 활성 산소종에 의한 피부의 광산화적 손상 위험이 항상 존재한다. 활성 산소종이란 반응성이 매우 큰 $^1O_2^{\cdot}$ 및 OH를 비롯하여 $O_2^{\cdot -}$, H_2O_2 , ROO^{\cdot} , RO^{\cdot} , $ROOH$ 및 HOCl 등을 포함한다. 이들은 고에너지 복사선, 광증감 반응 및 몇 가지 효소 반응을 포함하는 다양한 과정을 거쳐서 세포 및 조직 중에서 생성될 수 있다. 이들 활성 산소종 중에서 O_2^{\cdot} 및 $\cdot OH$ 은 피부 광손상에 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 이들은 피부 항산화제 파괴, 지질 과산화 반응의 개시, 단백질의 산화, DNA 산화, 결합조직 성분인 콜라겐, 히아루론산 등의 사슬 절단 및 비정상적인 교차 결합에 의한 주름 생성, 멜라닌 생성 과정 등에 참여하는 등 피부 노화를 가속화시킨다[4-10].

사람 피부 세포에 있어서 지질, 단백질 및 DNA 등 생체 구성 성분의 산화 손상뿐만 아니라 UVA (320 ~ 380 nm) 의존성 세포 사멸이나 유전자 활성화에도 활성 산소종이 포함되는 것으로 기술되고 있다. 피부 노화에 있어 콜라겐은 피부 진피층의 매트릭스를 이루는 성분 중 가장 많은 부분이기 때문에 콜라겐의 생합성과 분해의 조절은 피부 노화 과정에서 핵심이 되고 있다. 사람 피부 섬유아세포에서 O_2^{\cdot} 를 비롯한 ROS가 Matrix metalloproteinases (MMPs)의 발현을 유발시키며, UVA로 유도된 MMP-1 (collagenase)의 합성을 O_2^{\cdot} 가 매개할 수 있다는 보고도 있다[11].

이질풀(*Geranium nepalense* subsp. *thunbergii*)은 쥐손이풀과 식물로 8 ~ 9월에 연한 홍색 또는 홍자색으로 개화하며, 별칭으로는 개발초, 오염초, 오판화, 천강초, 방우아, 현초, 노학초, 서장초 등 여러 이름으로 불리고 있다. 생약명은 현초(玄草-이질풀 및 동속식물의 전초)이며, 우리나라에는 제주, 전남, 경남, 경북, 강원, 경기, 황해, 함남에 야생하

며, 일본에도 분포한다. 어린 순을 나물로 식용하며, 해독 효능이 있고, 류머티즘에 의한 경련과 마비 증상 및 타박상, 장염, 화농성 종양, 이질을 치료한다고 알려져 있다. 또한 이질풀의 주요 성분으로는 tannin, (-)epicatechin, kaempferitin, kaempferol-7-rhamnoside, brevifolin, corilagin, pyrogallol, ellagitannin, geraniin, gallic acid, succinic acid, quercetin, protocatechuic acid 등이 보고되었다[12,13].

본 연구는, 강력한 항산화 물질로 알려져 있는 성분인 quercetin을 함유하고 있는 이질풀을 추출하여 항산화 활성 및 세포 내 ROS 생성 저해능을 확인하고, 피부 임상 자극 평가를 통하여 피부 안전성을 확인하여 항노화 화장품 소재로서 적용 가능성을 보고자 한다.

2. 재료 및 실험

2.1. 기기 및 시약

실험에 사용한 시약은 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH, Sigma, USA), 3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl-2-tetrazolium bromide (MTT, Sigma, USA)을 사용하였다. 실험에 사용된 세포주는 HaCaT (Human keratinocyte)을 미국 세포주은행(American Type culture collection: ATCC, USA)에서 분양 받아 사용하였다. 세포 배양을 위해 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), Fetal bovine serum (FBS), antibiotics (penicillin 100 unit/mL, streptomycin 100 unit/mL)은 HyClone® (Thermo, USA)에서 구입하여 실험에 사용하였다. 피부 자극 실험을 위하여 Finn Chamber (Alpharma AS, Norway)를 사용하였고, EILSA reader는 PerkinElmer사의 VICTOR3®를 사용하였다. 형광발현을 위한 2',7'-dichlorofluorescein-diacetate (DCFH-DA)는 Invitrogen사의 Molecular Probes®를 사용하였다.

2.2. 이질풀의 유효성분 추출

건조된 이질풀 50 g을 분쇄하여 분말화한 후, 95 % 메탄올 1 L를 첨가하여 추출을 수행하였다. 추출이 완료된 후, 부직포를 이용하여 1차 여과를 수행하고 4,500 rpm에서 60 min 동안 원심분리하였다. 상층액을 회수하여 1 μ m 크기의 여과지를 이용하여 감압 여과하였다. 회수한 여과액을 감압 농축하여 파우더를 얻었다.

2.3. 세포 배양

실험에 사용된 세포는 HaCaT을 사용하였으며, 10 % FBS, penicillin (100 unit/mL), Strptomycin (100 unit/mL)

이 첨가된 DMEM 배지로 5 % CO₂, 37°C에서 배양하였다.

2.4. 이질풀 추출물의 세포 생존율 평가

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 정량은 Mosmann[14]의 방법을 변형하여 실시하였다. 실험에 사용된 세포로는 HaCaT을 이용하였다. HaCaT을 1 × 10⁵ cells/well의 농도로 준비한 96-well plate에 이질풀 추출물을 농도 별로 투여하여 CO₂ 배양기에 서 24 h 동안 배양하였다. MTT 용액(5 mg/mL)을 첨가하 고 4 h 후 배양액을 제거하고 100 μL acid-isopropanol (0.04 N HCl in isopropanol)를 첨가한 후 570 nm에서 ELISA reader로 흡광을 측정하였다.

2.5. 이질풀 추출물의 항산화 효능 측정

이질풀 추출물에 대한 자유 라디칼 소거능을 DPPH 방법 을 변형하여 측정하였다[15]. 간단히 기술하면, 이질풀 추출 물 및 양성 대조군인 quercetin을 24-well plate의 각 well에 500 uL씩 넣은 후, 메탄올에 0.1 mM 농도로 녹인 DPPH 용액을 1 mL씩 첨가하여 상온에서 15 min 동안 방치한 후 ELISA reader를 이용하여 565 nm에서 흡광을 측정하였다. 이때 대조군으로는 추출물 대신 메탄올을 사용하였다. 실험 군과 대조군에 대한 흡광을 측정 후, DPPH 라디칼 소거 효 능을 환산하여 그 결과를 나타내었다.

$$\begin{aligned} & \text{자유라디칼 소거활성(\%)} \\ & = (1 - \text{실험군 흡광도} / \text{대조군 흡광도}) \times 100 \end{aligned}$$

2.6. 이질풀 추출물의 세포 내 ROS 생성 저해능 평가

세포 내에 생성되는 ROS의 생성 저해능을 평가하는 방법 으로 DCFH-DA에 의한 형광법을 이용하였다. 간단히 기술 하면, ROS의 생성은 DCF를 이용한 형광물질 발생의 강도 를 가지고 측정하며, reduced 또는 acetylated된 형태의 DCF는 세포 내에 있는 esterase와 세포 내에 생성되는 ROS 들의 산화작용에 의해 아세테이트 그룹이 제거되면 형광물 질(fluorescein isothiocyanate, FITC)을 방출하는 원리를 이용한다. 실험에 사용된 세포로는 HaCaT을 이용하였다. HaCaT을 5 × 10⁵ cells /well의 농도로 준비한 96-well plate에 이질풀 추출물을 농도별로 투여하여 CO₂ 배양기에 서 24 h 동안 배양하였다. PBS로 각 well을 세척하고 20 uM의 농도로 희석된 DCFH-DA를 넣어준 후 incubator에 서 20 min간 배양하였다. DCFH-DA를 제거하고 PBS로 각 well을 세척한 후, 100 uM의 H₂O₂를 넣어 incubator에서 1 h 배양한 후 ELISA reader를 이용하여 485/535 nm에서

흡광값을 측정하였다.

$$\begin{aligned} \text{ROS 생성 저해능(\%)} & = 100 - \\ & \frac{\text{control의 흡광값 평균} - \text{시료의 흡광 값}}{\text{control의 흡광값의 평균} - \text{H}_2\text{O}_2 \text{ 처리한 흡광값의 평균}} \times 100 \end{aligned}$$

2.7. 이질풀 추출물의 피부 자극 유발 여부 평가

이질풀 추출물의 피부 자극 유발 여부를 평가하기 위하여 인체 첩포 시험(Human patch test)을 통하여 인체에 대한 1차 자극 시험을 수행하였다.

건강한 성인 남녀 20명을 대상으로 CTFA 가이드라인 (The Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association, Inc. Washington, D.C., 20036, 1991)에 따라 실시하였다. Finn chamber에 1 mg/mL의 농도로 희석된 시료 20 μL를 적하 시킨 후, 이를 시험 부위인 인체의 팔 한쪽에 첩포하고 테이 프로 고정시켰다.

1차 피부 자극시험은 24 h 동안 첩포한 후, 첩포를 제거하 고 다시 4, 24 h 경과한 후의 시험부위의 피부 반응을 확인 하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 이질풀 추출물의 세포 생존율 평가

HaCaT세포에 이질풀 추출물을 농도별로 처리한 후, 농도 증가에 따른 세포 생존율에 미치는 영향을 측정하였다. 그 결과, 최고 시료 처리 농도인 100 μg/mL까지 처리하였을 때에도 세포 독성은 보이지 않았고, 따라서 이질풀 추출물의 세포 독성은 없거나 미미하다고 사료된다(Figure 1).

3.2. 이질풀 추출물의 항산화 효능 측정

활성산소는 세포구성 성분들인 지질, 단백질, 당, DNA 등 에 대하여 비선택적, 비가역적인 파괴 작용을 함으로써 노화 는 물론 암을 비롯하여 뇌졸중, 파킨슨병 등의 노질환과 심 장질환, 동맥경화, 피부질환, 소화기질환, 염증, 류마티스, 자 가면역질환 등의 각종 질병을 일으키는 것으로 보고되었다. 불안정한 자유 라디칼의 특성에도 불구하고 다소 안정한 특 성을 지닌 DPPH와의 반응을 통하여 시료의 항산화 효능을 알아볼 수 있다.

이질풀 추출물을 50 μg/mL의 농도로 처리하였을 때, 98.33 %의 DPPH 라디칼 소거능을 나타내었고, 양성 대조 군인 quercetin의 경우 동일 농도 처리 시 78.05 %의 DPPH 라디칼 소거능을 나타내었다. 100 μg/mL 이상의 농도를 처 리하였을 때 시험군과 대조군 모두 우수한 DPPH 라디칼 소

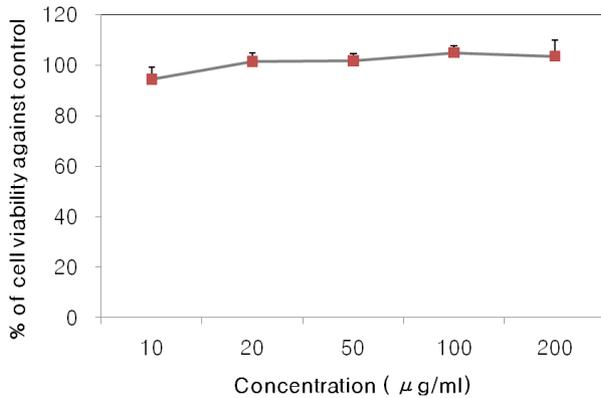


Figure 1. The cytotoxicity of *Geranium nepalense* subsp. *thunbergii* extract in HaCaT cells by MTT assay. The cells were treated with various concentrations of *Geranium nepalense* subsp. *thunbergii* extract for 24 h.

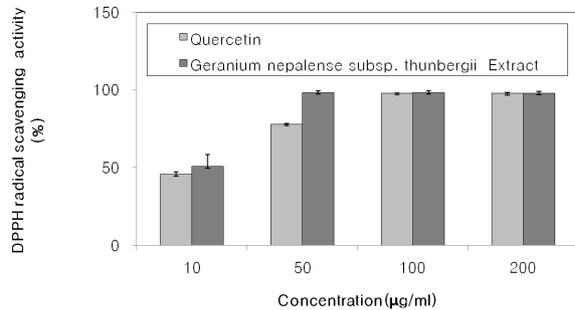


Figure 2. DPPH radical scavenging activity of *Geranium nepalense* subsp. *thunbergii* extract.

거능을 확인할 수 있었다(Figure 2).

3.3. 이질풀 추출물의 세포 내 ROS 생성 저해능 평가

이질풀의 세포 내 ROS 생성 저해능을 측정하기 위하여 DCFH-DA를 이용한 형광법을 이용하였으며, 형광 물질의 발생 강도를 ELISA reader를 이용하여 측정하였다. 양성 대조군으로는 quercetin을 사용하였다. Quercetin의 독성 여부를 판단하기 위하여 일차적으로 MTT assay 법을 이용하여 세포 독성 평가를 수행하였고(Figure 3), 시험 농도를 결정하여 ROS 생성 저해능 평가를 수행하였다. 평가 결과, 이질풀 추출물과 quercetin 모두 농도 의존적인 ROS 생성 저해능을 확인할 수 있었다. 시험군과 대조군을 비교하여 보면, 시험 농도 내(10 ~ 100 µg/mL)에서 이질풀 추출물이 양성 대조군인 quercetin 보다 우수한 ROS 생성 저해능을 나타내었다. IC₅₀값은 이질풀 추출물이 43.22 µg/mL, quercetin이 102.35 µg/mL로 측정되었다(Figure 4).

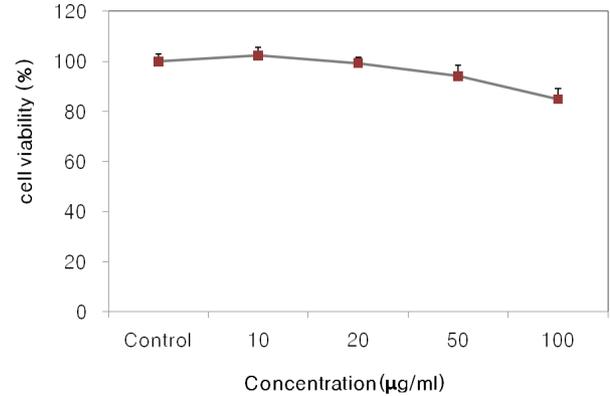


Figure 3. The cytotoxicity of quercetin in HaCaT cells by MTT assay.

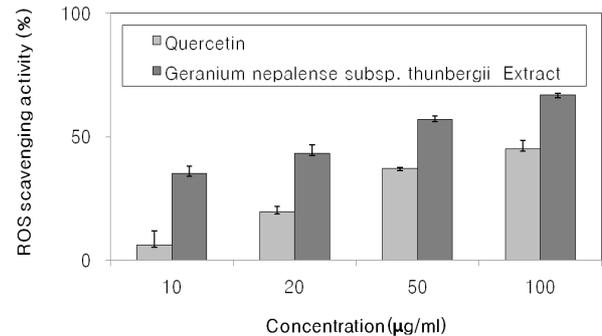


Figure 4. Reactive oxygen species scavenging activity of *Geranium nepalense* subsp. *thunbergii* extract in HaCaT cells.

3.4. 이질풀 추출물의 피부 자극 유발 여부 평가

피부 질환 및 기타 질환을 나타내지 않은 건강한 성인 남녀 20명을 대상으로 인체에 대한 피부 자극 시험을 평가한 결과, patch를 철폐하지 않은 부위와 비교하여 이질풀 추출물을 처리한 부위에 자극이 유발되지 않았으며 피부에 적용하기에 안전한 소재임을 확인할 수 있었다(Table 1). 이는 이질풀 추출물이 피부에 직접적으로 도포되는 화장품 소재로 적용하기에 안전한 소재일 것으로 판단된다.

4. 결 론

본 연구에서는 신규 천연 화장품 소재 개발을 위하여 이질풀 추출물(*Geranium nepalense* subsp. *thunbergii* Extracts)을 이용하여 항산화 효능 여부 및 화장품 소재로서의 응용 가능성에 대한 연구를 하였다. 이질풀은 항산화 성분인 quercetin을 비롯하여 tannin, (-)epicatechin, kaempferitin, kaepferol-7-rhamnoside, brevifolin, corilagin,

Table 1. Patch Test of *Geranium nepalense* subsp. thunbergii Extract on Human Inner-Arm for 24 h

Sample	Volunteers	Resut				EI*
		++	+	±	-	
Test group	20	-	-	-	20	0
Control	20	-	-	-	20	0

* EI : Erythema Index

a. Sample

Test group : 1 mg/mL of *Geranium nepalense* subsp. thunbergii extract

Control : Distilled water

b. Visual grade

- : negative reaction

± : doubtful reaction

+ : weak positive reaction

++ : strong positive reaction

c. Calculation method

$$EI = \frac{[\text{number of } (\pm) \times 1] + [\text{number of } (+) \times 2] + [\text{number of } (++) \times 3]}{\text{number of volunteer}}$$

pyrogallol, ellagitannin, geraniin, gallic acid, succinic acid, quercetin, protocatechuic acid 등 다양한 생리활성 성분을 전초에 포함하고 있으며, 전국 각지에 분포하고 있어 손쉽게 얻을 수 있다는 장점을 가지고 있다. 이질풀 추출물을 사람의 피부 각질 형성 세포인 HaCaT에 농도별로 처리하여 세포 독성 여부를 확인하였으며, 시험 농도 내(10 ~ 100 µg/mL)에서 이질풀 추출물은 세포 독성을 나타내지 않았다. 항산화 효능을 확인하기 위하여 이질풀 추출물에 대한 자유 라디칼 소거능을 DPPH 방법을 변형하여 측정하였다. 시험군과 대조군에 대한 흡광을 측정한 후 DPPH 라디칼 소거 효능을 환산한 결과, 대조군인 quercetin과 비교하여 우수한 DPPH 라디칼 소거 활성을 확인할 수 있었다. 동일 농도(50 µg/mL)를 처리하였을 때 이질풀 추출물의 DPPH 라디칼 소거능은 약 98.33 %로 측정되었으며, quercetin의 경우 78.05 %로 측정되었다. 또한, 이질풀 추출물의 세포 내 ROS 생성 저해능을 확인하기 위하여, DCFH-DA를 이용한 형광법을 이용하였다. HaCaT 세포에 이질풀 추출물을 처리하여 세포 내 ROS 생성 저해능을 측정한 결과, IC₅₀값은 이질풀 추출물과 quercetin에서 각각 43.22, 102.35 µg/mL로 측정되어 이질풀 추출물의 우수한 항산화 효능을 확인할 수 있었다. 또한 피부 임상 자극 평가를 통하여 이질풀 추출물이 피부에 자극을 유발시키지 않는 안전한 소재임을 확인하였다. 이상의 결과로서 이질풀 추출물은 항산화 효능에 있어

서 우수한 효능을 나타냄을 확인하였으며, 따라서 항산화 및 항노화의 기능성 화장품 소재로서의 적용이 가능할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Biotech Information Portal, <http://www.bioin.or.kr>.
2. J.-H. Kim, S.-J. Yoon, K.-H. Lee, H.-J. Kwon, S.-S. Chun, T.-W. Kim, and Y.-J. Cho, Screening of biological activities of the extracts from *Basil (OcimumbasilicumL.)*, *J. Korean, Soc, Appl, Biol, Chem.*, **48**(2), 173 (2005).
3. I. S. Rhu, A study of dermal bioactive properties of the ethanol extracts from flowers of *Lespedeza-bicolor*, Ph. D. Dissertation, Dept. of Orientalmedical, Wonkwang University, Seoul (2006).
4. J. C. Fantone and P. A. Ward, Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte dependent inflammatory reaction, *Ann J. Path*, **107**, 397 (1982).
5. K. J. A. Davies, Protein damage and degradation by oxygen radical, *J. Biol. Chem.*, **262**, 9895 (1987).
6. C. S. Foote, Photosensitized oxidation and singlet oxygen; consequences in biological systems, ed. W. A. Pryor, **2**, 85. Academicpress, NewYork (1976).
7. S. N. Park, Ph. D. Dissertation, Seoul National Univ., Seoul, Korea (1989).
8. S. N. Park, Skin aging and antioxidant, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **23**, 75 (1997).
9. S. N. Park, Protective effect of isoflavone, genistein from soybean on singlet oxygen induced photohemolysis of human erythrocytes, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **35**(3), 510 (2003).
10. S. N. Park, Antioxidative properties of baicalein, component from *Scutellaria baicalensis* Georgi and its application to cosmetics (I), *J. KoreanInd. Eng. Chem.*, **14**(5), 657 (2003).
11. K. Scharffetter-Kochanek, Photoaging of the connective tissue of skin: its prevention and therapy, antioxidants in disease mechanism and therapy, ed. H. Sies, **38**, 639 (1997).
12. Medical plants of Korea, www.medicalplant.org.
13. Korea Food & Drug Administration (KFDA) search

- engine (2004), <http://fse.foodnara.go.kr/origin/>.
14. T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for the cellular growth and survival : application to proliferation and cytotoxic assay, *J. Immun. Methods.*, **65**, 55 (1983).
 15. Y. Shimada, H. Tai, A. Tanaka, I. Ikezawa-Suzuki, K. Takagi, Y. Yoshida, and H. Yoshie, Effects of ascorbic acid on gingival melanin pigmentation *in vitro* and *in vivo*, *J. Periodontol.*, **80**, 317 (2009).