

Original Article

## 숙지황(熟地黃) 추출물의 치주염 개선 효과 연구

백희경<sup>1,#</sup>, 김미혜<sup>2</sup>, 양웅모<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>경희대학교 한의과대학, <sup>2</sup>우석대학교 한의과대학

### Inhibitory effects of the steamed radix of *Rehmanniae glutinosa* against ligature-induced periodontitis

Hee Kyung Baek<sup>1,#</sup>, Mi Hye Kim<sup>2</sup>, Woong Mo Yang<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Convergence Korean Medical Science, College of Korean Medicine, Kyung Hee University  
<sup>2</sup>Department of Biomedical Science, College of Korean Medicine, Woosuk University

**Objectives** : The purpose of this study was to investigate the anti-inflammatory effects of the aqueous extract of the steamed radix of *Rehmanniae glutinosa* (SRG) on periodontitis in ligature-induced rat model.

**Methods**: To induce the periodontitis, ligature was placed around the lower first molar in rats. Rats were divided into 4 groups (n = 7), NL (non-ligatured and vehicle-treated), L (ligatured and vehicle-treated), SRG1 (ligatured and 1 mg/kg SRG-treated) and SRG100 (ligatured and 100 mg/kg SRG-treated). Vehicle or SRG solution was applied daily for 14 days and then all experimental rats were sacrificed. To examine the effect of SRG solution on periodontitis, the level of alveolar bone loss, cementum regeneration, gingival tissue degradation, and osteoclast cell numbers were analyzed.

**Results**: Alveolar bone loss was inhibited in ligature-induced periodontitis rats treated with SRG treatment. Histopathological cementum was recovered in SRG1 and SRG100 groups. SRG extract inhibited gingival tissue degradation induced by ligature. In addition, the numbers of osteoclast cells were decreased by treatment SRG in periodontitis rats.

**Conclusion**: Taken together, these results suggest that SRG have inhibitory effects against periodontitis. Therefore, the steamed radix of *Rehmanniae glutinosa* has may be a potential alternative for periodontitis.

**Keywords** : Periodontitis, steamed radix of *Rehmanniae glutinosa*, Alveolar bone loss, gingival tissue

\* Corresponding author: Woong Mo Yang, Department of Convergence Korean Medical Science, College of Korean Medicine, Kyung Hee University, 26 Kyungheedaero, Dongdaemun-gu, Seoul 02447, Republic of Korea,

· Tel : +82-2-961-2209 · E-mail : wmyang@khu.ac.kr

# First author: Hee Kyung Baek, Department of Convergence Korean Medical Science, College of Korean Medicine, Kyung Hee University, 26 Kyungheedaero, Dongdaemun-gu, Seoul 02447, Republic of Korea,

· Tel : +82-2-961-2221 · E-mail : bhkbjk@khu.ac.kr

· Received : 31 Aug 2022

· Revised : 29 Nov 2022

· Accepted : 26 Dec 2022

## 서론

치주질환은 발병 부위와 증상의 정도에 따라 치은염(gingivitis)과 치주염(periodontitis)으로 구분된다. 치은염은 잇몸 등 연조직에만 나타나는 가벼운 증상의 치주질환이며, 치주염은 병원성 미생물 등에 의해 잇몸뿐만 아니라 잇몸뼈 등 치아에 인접한 조직에 발생하는 치주조직의 염증성 병변이다<sup>1)</sup>. 치주질환이 발병되면 치은 부종, 출혈, 치통, 궤양, 치조골 소실 등의 현상이 일어나며, 병증이 심한 경우 치아를 상실할 수 있다<sup>2)</sup>. 치주질환의 발병 원인으로서는 세균 내독소, 효소 등에 의해 치아를 둘러싼 조직에 염증이 발생하는 경우나 소화기, 순환기 등의 기능 부전과 같이 전신적인 숙주반응에 의한 경우가 있다<sup>3)</sup>. 건강보험심사평가원에서 진행한 2021년 외래 다빈도 상병 통계 지표에 따르면, 외래 다빈도 상병 중 치은염 및 치주질환으로 치료받은 환자가 가장 많은 것으로 확인됐다<sup>4)</sup>.

치주질환을 치료하기 위해 클로로헥시딘 (Chlorohexidine), 트리클로산 (Triclosan)과 같은 항균제와 화학 치료제 등이 치료제로서 사용되고 있다. 하지만 이들은 폐포 대식세포와 폐 상피 내벽에 치료제가 부적절한 농도로 도달하거나 높은 내성이 나타날 뿐만 아니라, 치주질환의 다양한 병인과 복잡한 질병 기전에 의해 치료제로서 한계가 있다고 보고되었다<sup>5-7)</sup>. 이러한 단점을 극복하고자 최근 천연물 추출물을 기존 의약품에 비해 안전성이 높고 생물학적 활성이 광범위하여 복잡한 기전의 질병의 예방 및 치료에 사용하기 적합하다<sup>7)</sup>. 한의학에서는 치과질환을 치통(齒痛), 치동요(齒動搖) 등의 병증으로 표현하며, 이러한 질병을 치료하기 위해 거풍(祛風), 청열(淸熱), 이습(利濕)하는 처방들을 사용하였다<sup>8)</sup>. 최근에는 천연물 치료제를 활용한 치주질환 치료 효과 연구를 많이 진행하고 있다<sup>9-12)</sup>.

숙지황(熟地黃, the steamed radix of *Rehmanniae glutinosa*, SRG)은 현삼과 (Scrophulariaceae) 지황(*Rehmannia glutinosa* Liboschitz ex Steudel)의 뿌리를 포제 가공한 것으로, 지황의 근경에 술을 고루 섞어 구증구포한 것이다<sup>13)</sup>. 지황의 약성은 차고, 청열(淸熱), 양혈(涼血), 생진(生津)의 효능을 가지고 있다. 이를 술, 사인, 진피 등을 보료로 하여 찌서 말리기를 9번 반복하여 얻어지는 숙지황은 미온한 약성을 나타내며, 양혈자음(涼血滋陰), 보정익수(補精益髓)하는 약효를 가져 다양한 소모성 질환에 반응된다<sup>13-14)</sup>. 최근 숙지황 관련 연구에서는 골질환, 당뇨병, 피로 등의 병증 완화 효과가 밝혀졌다<sup>15-17)</sup>. 이러한 연구 결과는 숙지황 추출물의 항염 효과 등을 입증하였으나, 아직 치주질환에 대입하여 숙지황 추출물의 효과를 검증한 사례는 존재하지 않았다. 이에 본 연구에서는 치주염을 유발한 랫드 모델에 숙지황 추출물을 적용한 후, 치주조직의 손상 회복 효능을 통한 치주염 개선 효과를 확인하였다.

## 재료 및 방법

### 2.1. 약물의 조제

숙지황(SRG)은 지황(*Rehmannia glutinosa*)을 구증구포한 것으로 동양허브(Dong-Yang Herb Inc., Seoul, Korea)에서 구입하였다. 숙지황 100 g을 1000 mL의 증류수에 100°C에서 2시간 동안 추출하였다. 추출액은 10 μm 여과지를 사용하여 여과하였고, 회전진공농축기로 감압 농축하였다. 이후 동결건조기로 건조하여 50.12 g의 숙지황 동결 건조품을 얻었다(수율: 50.12%). 최종 동결건조품은 -20°C에서 사용 전까지 보관하였다.

### 2.2. 실험동물

실험동물은 7주령 수컷 Sprague-Dawley 계 랫드를 라온바이오(RaonBio Inc., Yongin, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 온도 22.2°C, 습도 55~66 %, 명암주기 12 시간으로 자동 조절되는 실험 환경에서 일반 실험용 동물 사료와 물을 충분히 공급하였으며, 일주일간의 적응기 후 실험에 사용되었다. 모든 동물실험 과정은 경희대학교 동물실험윤리위원회의 승인(KHUASP(SE)-14-029)을 받아 National Institutes of Health의 실험동물관리 규정(Principle of Laboratory Animal Care)에 의거하여 수행되었다.

### 2.3. 치주염 실험 모델 유발 및 샘플 처리

치주질환을 유발하기 위하여 적응기 이후 음성대조군과 샘플 처리군은 tiletamine / zolazepam 혼합액(Zoletil 50, Virbac Lab, Carroscedex)으로 전신 마취 후 실험동물의 하악 제1 대구치와 제2 대구치 사이에 치실(ligature)을 매듭지어 2 주간 고정시켰다. 실험동물은 치주염을 유발하지 않은 정상대조군(NL, non-ligatured and vehicle-treated), 치주염을 유발한 음성대조군(L, ligatured and vehicle-treated), 치주염 유발과 숙지황 추출물을 1 mg/kg으로 처리한 샘플 처리군(SRG1, ligatured and 1 mg/kg the steamed radix of Rehmanniae glutinosa-treated), 치주염 유발과 숙지황 추출물을 100 mg/kg으로 처리한 샘플 처리군(SRG100, ligatured and 100 mg/kg the steamed radix of Rehmanniae glutinosa-treated)으로 군당 7 마리씩 4개의 군으로 나누었다. 이후 정상대조군과 음성대조군에는 하악 제1 대구치와 제2 대구치 사이에 1 % carboxymethyl cellulose가 포함된 증류수를 동일하게 개체별로 각 100 µl씩 도포하였고, 샘플 처리군에는 동일 부위에 숙지황 추출물 각 1 mg/kg, 100 mg/kg (1 mg/mL, 100 mg/mL SRG in 1 % carboxymethyl cellulose)을 각 100 µl씩 도포하였다. 대조군 처리 및 샘플 처리는

하루에 한 번씩 2 주간 진행되었다. 샘플 처리 2 주 후 랫드를 희생하여 양측 하악골을 채득하였다. 채득한 치조골에서 조직형태학적 지표를 분석하였다.

### 2.4. 치조골 소실(Alveolar bone loss) 저해 효능 평가

랫드로부터 분리된 좌측 하악골은 끓인 증류수에 담가 불린 후 정리하고, 10% 파라포름알데히드(paraformaldehyde)에서 24시간 동안 조직을 고정하였다. 충분히 고정된 하악골은 완전히 건조시킨 후, 1% aqueous methylene blue (Sigma, USA)로 5분 동안 염색하였다. 염색된 좌측 하악골은 스마트 현미경(Canon digital camera, 100 mm macro lens)에 의해 촬영되었다. 치조골의 손실(alveolar bone loss)의 평가를 위해 첫 번째 대구치 3개의 뿌리 축을 치아의 백악질과 법랑질이 맞닿아 있는 백악법랑경계(cementoenamel junction, CEJ)과 치조골정(alveolar bone crest, ABC) 사이 거리를 Image J (NIH, Bethesda, USA)로 측정하였다.

### 2.5. 백악질 및 치은조직의 조직학적 평가

우측 하악골은 10 % 중성 포름알데히드(Formaldehyde)에서 18시간 동안 고정 한 다음, 0.1 M 에틸렌다이아민테트라아세트산(Ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)에서 2달간 탈회시켰다. 에탄올(Ethanol)과 자일렌(Xylene)을 이용하여 탈수 후, 파라핀(paraffin)에 고정하였다. 백악질과 치은조직의 회복능을 평가하기 위해 파라핀에 고정한 하악골을 7 µm 두께의 박편으로 제작하여 Hematoxylin and Eosin 용액(H&E)으로 염색하였다. 광학 현미경을 통하여 400배의 배율로 확대하여 Leica Application Suite microscope software (Leica Microsystems, Buffalo Grove, IL, USA)로 이미징화한 후, 하악골 구조의 integrity를 확인하고 각 조직의 변성 여부를 파악하였다.

## 2.6. 파골세포 분화 억제 효능 평가

7 μm로 박피한 조직을 TRAP (tartrate-resistant acid phosphatase, Sigma, MO, USA) 염색하였고, TRAP 염색 세포와 핵을 구분하고자 hematoxylin으로 염색하였다. TRAP 양성 파골세포는 400배로 관찰하여 면역조직화학적 변화를 확인하였다. 상아질파괴세포와 뼈파괴세포의 형성을 나타내는 인자인 TRAP에 대한 염색 후 TRAP 양성 다핵 세포의 수를 세어 평가하였다. 광학현미경을 이용하여 제1 대구치의 치근을 따라 형성된 TRAP 양성 다핵의 상아질파괴세포(핵 3개 이상)와 치조골 표면을 따라 형성된 TRAP 양성 다핵의 뼈파괴세포(핵 3개 이상)의 수를 세었다. 세포의 수는 측정된 치근면의 길이 또는 치조골 표면의 길이로 나누어 (세포 수/mm)의 단위로 나타냈다.

## 2.7. 통계처리

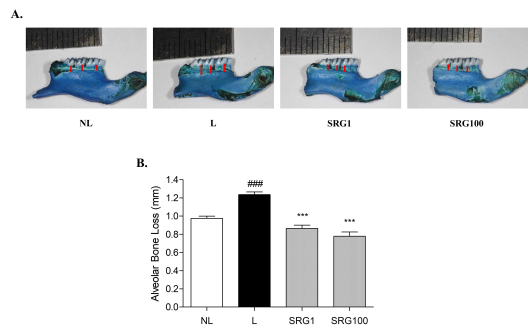
실험결과와 모든 분석은 각 그룹의 측정값을 평균±표준오차(mean±standard error) 값으로 표시하였다. 통계적 분석은 Analysis of Variance (ANOVA)를 이용하여 Dunnett's test를 사용하였다. p 값이 0.05 미만인 경우 통계적으로 유의성을 인정하였다.

# 결 과

## 3.1. 숙지황 추출물의 치조골 소실 회복 효능

첫 번째 대구치 3개의 뿌리의 치주염 유발 정도를 평가하기 위해 치근의 흡수 정도를 파악할 수 있는 원심부의 백악법랑경계(CEJ)에서 치조골정(ABC)까지의 거리를 측정하였고, 측정 부위를 선으로 나타내었다(Fig. 1A). 정상대조군(NL)에 비해 치주염을 유발한 대조군(L)의 치조골은 약 26.88 % 손실되었다. 치주염이 유도된 랫드에 숙지황 추출물 1 mg/kg 처리한

경우(SRG1)에는 0.87±0.12 mm로 치주염 유발군(L)에 비해 손실된 치조골이 30.13 % 회복되었으며, 100 mg/kg의 숙지황 추출물 처리 시(SRG100) 대구치 뿌리 축의 거리는 0.78±0.15 mm로 치조골의 소실 정도가 음성 대조군(L)과 비교하였을 때 37.09 % 억제되었다(Fig. 1B).

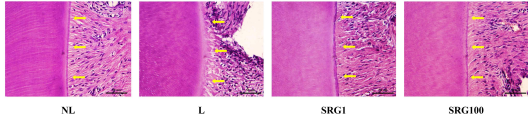


**Figure 1. Effects of SRGs on Alveolar Bone Loss (ABL).** (A) Macroscopic tissue images using a ruler and (B) quantified values of ABL. The red lines represent the distance from Cementoenamel Junction (CEJ) to the Alveolar Bone Crest (ABC). ###*p* < 0.001 compared to NL; \*\*\**p* < 0.001 compared to L, NL, non-ligatured and vehicle-treated; L, Ligatured and vehicle-treated; SRG1, ligatured and 1 mg/kg steamed radix of *Rehmanniae glutinosa* treated; SRG100, ligatured and 100 mg/kg steamed radix of *Rehmanniae glutinosa* treated.

## 3.2. 숙지황 추출물의 백악질 회복 효능

숙지황 추출물이 치주염을 유발한 결과 백악질의 변성된 정도와 회복 여부를 파악하기 위해 H&E 염색을 통해 조직을 관찰하였고, 변화하였거나 비교할 수 있는 치주인대 부분을 화살표로 표시하였다. 정상대조군(NL)의 백악질과 비교했을 때 치주염이 유발된 군(L)의 백악질의 구조가 변성된 것을 확인할 수 있었다. 치주염 유발 후 숙지황 추출물을 도포했을 때, 1 mg/kg (SRG1), 100 mg/kg (SRG100) 두 농도

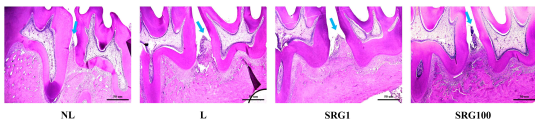
모두 치주에 도포한 경우, 변성되어 소실된 백악질을 회복시켰다(Fig. 2).



**Figure 2. Effects of SRGs on histological assessment for periodontal ligament and cementum regeneration.** Hematoxylin and Eosin (H&E)-stained images of cementum (the yellow arrows). NL, non-ligatured and vehicle-treated; L, Ligatured and vehicle-treated; SRG1, ligatured and 1 mg/kg steamed radix of *Rehmanniae glutinosa* treated; SRG100, ligatured and 100 mg/kg steamed radix of *Rehmanniae glutinosa* treated.

### 3.3. 숙지황 추출물의 치은조직 재생 효능

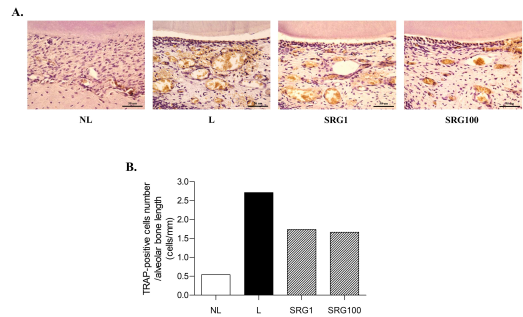
치주염을 유도하지 않은 정상군(N)에 비하여 치주를 결찰한 군(L)에서 치은조직이 손상된 것을 확인할 수 있다. 저농도 및 고농도의 숙지황 추출물을 유도한 경우(SRG1, SRG100), 음성대조군에 비해 치은조직의 손상이 회복된 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3).



**Figure 3. Effects of SRGs on H&E-stained microphotographs of gingival tissues.** The blue arrows indicate gingival tissues.  $###p < 0.001$  compared to NL;  $*p < 0.01$  compared to L, NL, non-ligatured and vehicle-treated; L, Ligatured and vehicle-treated; SRG1, ligatured and 1 mg/kg steamed radix of *Rehmanniae glutinosa* treated; SRG100, ligatured and 100 mg/kg steamed radix of *Rehmanniae glutinosa* treated.

### 3.4. 숙지황 추출물의 파골세포 분화 억제 효능

대구치의 치근과 치조골 표면을 따라 형성된 TRAP 양성 파골세포의 수를 세었다. 세포의 수를 측정된 치근면의 길이 또는 치조골 표면의 길이로 나누어 나타낸 결과, NL 군은 0.5418 cells/mm, L 군은 2.7149 cells/mm로 나타나 치주염 유발 시 단위길이당 TRAP 양성 파골세포의 수가 증가하는 것을 알 수 있었다. SRG1군과 SRG100군의 경우 각각 1.7385, 1.6656 cells/mm로 음성대조군에 비해 파골세포의 수가 감소한 것을 확인하였다(Fig. 4).



**Figure 4. Effects of SRGs on TRAP-positive osteoclast cells.**

## 고찰

본 연구는 숙지황 추출물을 치주에 도포하였을 때 랫드에서 실험적으로 유발된 치주염에 미치는 효과를 알아보기 위한 실험으로, 치조골 소실 정도, 백악질 회복 정도, 치은조직 재생 정도 및 TRAP 양성 파골세포 수의 변화를 평가하였다.

치조골 손실(Alveolar Bone Loss, ABL)은 치주염에 의한 염증 반응 중 하나이다. 치실로 하악 제1 대구치와 제2 대구치 사이를 매듭지어 결찰시키면 치주 조직이 약화됨에 따라 세

균 증식반응과 치태 형성 정도가 가속화되어 면역반응을 일으켜 치조골이 손실되게 된다. 이를 평가하기 위해 백악법랑경계와 치조골 사이의 거리(CEJ-ABC)를 측정하는 방법을 사용하였다. 랫드의 하악골 조직의 변화 정도를 백악법랑경계(CEJ)와 치조골(ABC) 사이의 거리를 기준으로 파악하였다. 실험 결과, 숙지황 추출물 처리 시 치조골 손실 정도가 유의성 있게 완화되었다.

치주질환이 나타나면 치주 조직의 손상 및 파괴가 일어나며, 질병이 치료되는 경우 손실된 조직이 회복되고 재생되는 과정을 거치게 된다. 치주질환의 회복 평가 기준은 일반적으로 새로운 치조골이 합성되어 손상 전 치조골의 높이만큼 자라나고, 염증으로 괴사된 백악질이 신생 백악질의 형성에 의해 치주염에 의해 드러났던 치근면을 다시 덮이는 것이라고 할 수 있다<sup>18)</sup>. 이에 따라 본 실험에서 치주염이 유발된 조직에 숙지황 추출물 도포 시 백악질과 치은조직의 변성 정도를 확인한 결과, 음성 대조군에 비해 변성 정도가 감소하여 회복된 것을 확인할 수 있었다.

파골세포는 조혈모세포로부터 monocyte/macrophage lineage의 전구세포로 분화되고 RANKL에 의해 뼈를 흡수하는 활성을 가지는 다핵세포인 성체 파골세포로 분화하게 된다<sup>19)</sup>. 대구치의 치근과 치조골 표면을 따라 형성된 TRAP 양성 파골세포의 수를 측정함으로써 치주와 치조골의 흡수 정도를 파악할 수 있음에 따라 3개 이상의 핵을 가지는 TRAP 양성 파골세포는 치주염의 유발 정도를 파악하는 지표 역할을 한다<sup>20,21)</sup>. TRAP 염색 후 양성 파골세포의 수를 치조골의 길이로 나누어 수치화한 결과, 숙지황 추출물은 파골세포 분화를 억제하는 데에 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

**결론**

본 연구에서는 숙지황 추출물이 치주질환 치료에 효과가 있는지 확인하고자 하였다. 랫

드 모델의 하악 대구치에 치실로 결찰시켜 치주염을 유발한 후, 숙지황 추출물을 도포하였고, 치주염에 의해 손상된 치조골, 백악질 및 치주조직의 회복, TRAP 양성 파골세포의 수 변화를 통해 그 효과를 파악하였다. 이를 통하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 숙지황 추출물의 외용도포로 인한 치조골 손실 감소
2. 숙지황 추출물의 외용도포로 인한 백악질 변성 회복
3. 숙지황 추출물의 외용도포로 인한 치은조직 손상 회복
4. 숙지황 추출물의 외용도포로 인한 치주 내 TRAP 양성 파골세포의 수 감소

결론적으로 숙지황 추출물이 치주염이 유발된 대구치 부근에 도포하였을 때 병변이 완화된 것을 확인할 수 있었다. 추후 숙지황 추출물의 *in vitro*에서의 효능, 인체에서의 효능 등을 확인하는 추가연구를 진행한다면, 향후 치주질환의 천연물 치료제로서의 발전 가능성이 크다고 사료된다.

**감사의 말씀**

This work was supported by the National Research Foundation of Korea (NRF) grant funded by a National Research Foundation of Korea Grant funded by the Korean government (NRF-2019R111A2A01063598).

**이해관계**

The authors declare no conflict of interest.

**참고문헌**

1) Pihlstrom BL, et. al, Periodontal diseases.

- The Lancet, 2005;366(9499): 1809-1820.
- 2) Armitage GC, Clinical evaluation of periodontal diseases. *Periodontology*, 1995;2000 7(1):39-53.
  - 3) Jeong JP, Causes and Types of Periodontitis. *The Journal of the Korean dental association* 1989;27(2):105-115.
  - 4) Health and Health Review and Assessment Service 2021 Outpatient Divergence Disease Statistics. *Healthcare bigdata Hub*, <https://opendata.hira.or.kr/home.do>, 2021.
  - 5) Heta SI, Robo, The Side Effects of the Most Commonly Used Group of Antibiotics in Periodontal Treatments. *Medical Sciences*, 2018;6(1):6.
  - 6) Tambekar D, et. al, Antibacterial potentials of some herbal preparations available in India. *Res J Med Med Sci*, 2009;4:224-227.
  - 7) Ramesh A, et al., Herbs as an antioxidant arsenal for periodontal diseases. *Journal of intercultural ethnopharmacology*, 2016;5(1):92.
  - 8) Pa가 BC, A Study on Clinical treatments of Oriental Medicine for dental dis eases. *The Society of Korean Medicine Rehabilitation*, 1998;8(2):297-314.
  - 9) Sezer U, et. al, Protective effects of ginkgo biloba extract on ligature-induced periodontitis in rats. *Acta Odontologica Scandinavica*, 2013;71(1):38-44.
  - 10) Saderi H, et. al, Antimicrobial Effects of Chamomile Extract and Essential Oil on Clinically Isolated *Porphyromonas gingivalis* from Periodontitis. *Acta Hort* 6, 2004
  - 11) Sasaki et. al, 18  $\beta$ -glycyrrhetic acid inhibits periodontitis via glucocorticoid-independent nuclear factor- $\kappa$ B inactivation in interleukin-10-deficient mice. *J Periodontal Res*, 2010;45(6):757-763.
  - 12) Yamanaka A, et. al, Inhibitory effect of cranberry polyphenol on biofilm formation and cysteine proteases of *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontal Res*, 2007;42(6): 589-592.
  - 13) National Editorial Committee on Oriental Medicine. *Yeongnimsa*, 2006.
  - 14) 임지선, Changes of Biological Activities of *Rehmanniae Radix Preparata* (R.R.P.) During Preparation and Comparison of Biological Activities Between Commercial Products. Master's thesis at Chonnam National University, 2008.
  - 15) Xia T, et. al, Metabolomics Profiling Reveals *Rehmanniae Radix Preparata* Extract Protects against Glucocorticoid-Induced Osteoporosis Mainly via Intervening Steroid Hormone Biosynthesis. *Molecules*, 2019;24(2):253.
  - 16) Liu C, et. al, *Rehmanniae Radix* in osteoporosis: A review of traditional Chinese medicinal uses, phytochemistry, pharmacokinetics and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*, 2017;198 :351-362.
  - 17) Tan W, et. al, Anti-fatigue activity of polysaccharides extract from *Radix Rehmanniae Preparata*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2012;50(1):59-62.
  - 18) Toshiharu, A, et al, Optimization of the ligature-induced periodontitis model in mice. *Journal of Immunological Methods*, 2013;394(1-2):49-54.
  - 19) Park BR, Inhibitory Effect of *Paeoniae Radix Alba* Ethanol Extract on Osteoclast Differentiation and Formation. *Korean J. Oriental Physiology & Pathology*, 2015;29(1):51-57.

- 20) Lee DE, et. al, Periodontitis mainly increases osteoclast formation via enhancing the differentiation of quiescent osteoclast precursors into osteoclasts. J Periodont Res, 2015;50(2):256-264.
- 21) Fukada SY, et. al, iNOS -derived Nitric Oxide Modulates Infection-stimulated Bone Loss. Journal of Dental Research, 2008; 87(12):1155-1159.