

녹차추출물의 잇몸 질환 원인균에 대한 항염증 효능 연구

민대진[†] · 이성원 · 이성훈 · 김승섭 · 김찬호* · 이존환* · 배지현 · 김한곤

(주)아모레퍼시픽 기술연구원 피부과학연구소, *화장품연구소
(2011년 3월 3일 접수, 2011년 3월 16일 수정, 2011년 3월 20일 채택)

The Anti-inflammatory Effect of Green Tea Extract Against *Prevotella intermedia*

Dae Jin Min[†], Sung Won Yi, Sung Hoon Lee, Seung Seob Kim, Chan Ho Kim*,
John Hwan Lee*, Ji Hyun Bae, and Han Kon Kim

Amorepacific Corporation R&D Center, 314-1 Bora-dong, Giheung-gu, Yongin-si, Gyeonggi-do 446-729, Korea
(Received March 3, 2011; Revised March 16, 2011; Accepted March 20, 2011)

요약: 치아의 세균들은 잇몸에서 염증반응을 일으켜서 치은염과 치주염같은 잇몸 질환의 원인이 된다. 따라서 잇몸질환의 예방과 치료를 위해서는 치아 세균에 의한 염증반응을 조절하는 것이 가장 효과적인 방법이다. 현재 대부분의 구강 관리 제품들은 살균제를 이용하여 구강 세균을 제거하는 방법을 사용하고 있다. 하지만 최근의 연구들은 심지어 열처리로 사멸된 구강 세균도 염증반응을 일으킬 수 있다는 사실을 보고하고 있다. 따라서 보다 효과적인 잇몸 염증반응 억제제를 위해서는 살균제를 이용한 방법에 대한 개선이 필요하다. 또한 아직까지 구강 세균에 의한 잇몸 염증반응의 기작과 효과적인 천연 염증 억제 물질들은 보고되어 있지 않다. 본 연구에서는 대표적인 치은염, 치주염 유발세균인 *Prevotella intermedia*와 인간의 잇몸상피세포를 이용하여, 실제로 잇몸에서 일어나는 염증반응의 기작을 연구하고, 이를 통해 효과적인 천연 잇몸 염증 완화 물질을 도출하려고 하였다. 실험 결과, *Prevotella intermedia*는 잇몸상피세포를 자극하여 염증매개인자인 IL-8을 분비하게 함으로써 잇몸 염증반응을 개시하였다. 또한 *Prevotella intermedia*에 의한 잇몸 염증반응은 기전적으로 COX-2, AP-1, TNF- α 와 연관되어 있었으며, 녹차추출물은 *Prevotella intermedia*에 의한 잇몸 염증반응을 효과적으로 억제할 수 있음을 확인하였다. 따라서 본 연구는 치아 세균에 의한 잇몸 염증반응의 기전 연구를 통해서 효과적인 천연 잇몸질환 개선 물질을 도출했다는 점에서 중요한 의미를 가진다.

Abstract: Dental bacteria can cause gum diseases, i.e. gingivitis and periodontitis, by inducing inflammation in human gingiva. Therefore, the most effective way to prevent and treat gum diseases is the control of the inflammatory reactions induced by dental bacteria. Almost all present dental care products contain anti-bacterial agents to eliminate dental bacteria. However, recent studies report that even heat-killed dental bacteria can induce the inflammation responses in oral cells. Therefore, the method using anti-bacterial agents should be improved for better anti-inflammatory effect and the effective natural anti-inflammatory substances need to be found. In addition, the mechanisms of gingival inflammation should be elucidated. In this study, we tried to find out the mechanism of the gingival inflammation and effective natural anti-inflammatory substances with human gingival epithelial cells and *Prevotella intermedia* which is well known as a typical dental bacteria inducing gingivitis and periodontitis. In results, *Prevotella intermedia* initiated the gingival inflammation response by stimulating gingival epithelial cells to release an inflammatory cytokine, IL-8. Furthermore, the inflammation by *Prevotella intermedia* is related to COX-2, AP-1, and TNF- α pathways. Green tea extract could effectively suppress the inflammatory responses induced by *Prevotella intermedia*. We find out the effective natural substance for the improvement of gum diseases by studying the mechanism of the gingival inflammation induced by dental bacteria.

Keywords: *Prevotella intermedia*, green tea extract, anti-inflammation, gum disease, IL-8

[†] 주 저자 (e-mail: djmin@amorepacific.com)

1. 서 론

구강(oral cavity)은 호흡과 음식물 섭취를 위해서 매우 중요한 기관이지만, 공기와 음식물을 통해서 끊임없이 외부 항원(antigen)들에 노출되는 기관이기도 하다. 양치질 등의 과정을 통해서 구강의 청결이 유지되지 않으면, 치아와 잇몸(치은) 주변부에서 치태(dental plaque)가 생성되고, 생성된 치태는 점차 석회화되어 치아의 표면에 치석(dental calculus)을 형성하게 된다. 치태와 치석은 구강세균의 증식 거점이 되어 치은염(gingivitis), 치주염(periodontitis)과 같은 잇몸 염증질환을 일으킨다는 점에서 병리학적으로 매우 중요한 의미를 가진다.

치은염과 치주염은 치은연상과 치은연하에 인접한 치아 표면에 축적된 치태에 서식하는 치태 세균의 활동에 의해 발생한다. 치태 세균의 주요 항원인 lipopolysaccharide (LPS)와 내독소(endotoxin)는 치은 조직에서 염증 반응을 일으키고, 이 염증 반응을 제거하기 위해서 치은 조직 내부에서는 면역세포들에 의한 면역반응이 일어난다. 이와 같은 염증-면역반응 과정에서 다양한 염증매개 인자(inflammatory cytokine)들과 matrix metalloproteases (MMPs)와 같은 기질파괴효소들이 발현되고, 이들의 활동으로 인하여 치은 조직 내부의 세포외기질(extracellular matrix, ECM)의 파괴가 나타난다. 이 반응이 심화되면 치은 조직은 심각한 내부 손상을 입게 되고, 그 결과 치은염, 치주염과 같은 잇몸 질환이 발생하게 된다[1-3].

이와 같은 관점에서, 지금까지의 구강용 조성물들은 주로 치태 세균을 제거하기 위한 살균제 원료들에 의존하여 왔으며, 효능평가도 치태 세균에 대한 살균력 평가에 치중되었다. 또한 구강 세포를 이용한 세포수준에서의 연구도, 주로 잇몸 내부에서 기질파괴효소들을 분비하는 구강 섬유아세포(gingival fibroblast)에 구강균이나 LPS를 자극원으로 처리하고 문헌적으로 보고된 몇 가지 대표적인 염증성 사이토카인(inflammatory cytokine)들의 발현을 비교하는 방법을 사용하여 왔다[4,5]. 하지만 가열하여 살균 처리된 치태 세균도 구강 세포에서 염증 반응을 일으킬 수 있으며[6], 잇몸 염증반응은 치태 세균과 직접 접촉하는 잇몸 상피세포에서 시작된다는 점에서, 더욱 효과적인 잇몸염증 억제용 조성물의 제작을 위해서는 지금까지의 연구들에 대한 보완이 필요하다.

본 연구에서는 이와 같은 기존 연구들의 한계를 극복하기 위해서, 치은염과 치주염의 주원인 세균으로 알려진 *Prevotella intermedia* (*P. intermedia*)가 구강상피세포

에서 일으키는 염증반응을 사이토카인 어레이(cytokine array) 방법을 이용하여 총체적으로 분석하여 치태 세균에 의한 잇몸염증반응의 핵심 염증인자를 도출하였다. 또한 효능이 입증된 항염증제(anti-inflammatory drug)들을 이용하여 *P. intermedia*-구강상피세포 염증반응의 기전적 특성을 관찰하였으며, 최종적으로는 녹차추출물이 잇몸염증에 미치는 효능을 평가하였다.

2. 재료 및 실험

2.1. 녹차추출물의 제조

녹차추출물은 (주)바이오랜드(충청남도, 한국)로부터 구매한 녹차추출액을 물에 희석하여 사용하였다. 녹차추출액의 간단한 제조 방법은 다음과 같다. 제주산 차나무(*Thea sinensis* Linne)로부터 얻은 찻잎을 80 ~ 100 °C의 물에서 2 ~ 3 h 동안 가열한 다음 여과한다. 여과액을 60 ~ 70 °C에서 감압 농축하여 녹차추출액을 얻는다.

2.2. *Prevotella intermedia* (*P. intermedia*)의 배양

대표적 치은염, 치주염 유발 구강세균인 *Prevotella intermedia* (KCTC 3692)는 한국생명공학연구원 미생물 자원센터에서 구매하여 사용하였으며, 10 % calf serum이 첨가된 brain heart infusion 배지(Difco, USA)에서 3일간 배양하여 증식시킨 후 실험에 사용하였다. 배양은 CO₂와 H₂가 각각 5 % 조성인 혼합가스를 사용하는 anaerobic chamber에서 수행하였다.

2.3. 세포 처리를 위한 잇몸균 시료의 준비

배양된 *P. intermedia*를 원심분리하여 세포와 배지를 분리한다. 분리된 배지를 제거하고, 생성된 *P. intermedia* pellet에 PBS (phosphate-buffered saline, WelGENE, 한국)를 넣고 vortexing하여 pellet을 완전히 풀어준다. *P. intermedia*-PBS 현탁액을 다시 원심분리하여 세포와 PBS를 분리하고, PBS는 다시 완전히 제거한다. 이 과정을 2회 더 반복하여 *P. intermedia* 이외의 배양배지에서 유래한 불순물들을 완전히 제거한다. 불순물이 완전히 제거된 *P. intermedia* pellet에 적정량의 PBS를 가하고 재부유시켜 세포의 농도가 2.0×10^7 /mL이 되게 맞춘다.

이와 같은 방법으로 정제된 *P. intermedia*를 100 °C에서 10 min 동안 가열하고 -70 °C deep freezer (Ultra low temperature freezer, (주)일신바이오베이스, 한국)에서 급속 냉동하여, 보관과정에서 발생할 수 있는 추가적인 세포의 파괴나 단백질의 변성을 막아 향후 항염평가에

필요한 항원성(antigenicity)을 유지하게 한다. 정제된 *P. intermedia*는 소량으로 epi-tube (AXYGEN, USA)에 분주하여 -70 °C에서 보관하며, 실험 시에만 해동하여 세포에 처리하였다. 한 번 해동한 *P. intermedia* 시료는 재냉동 및 재사용하지 않고 1회만 사용하였다.

2.4. 인간 유래 잇몸상피세포의 배양

인간 아랫잇몸상피세포(human lower gingiva epithelial cell)인 YD-38 cell (KCLB No, 60508)은 한국세포주은행에서 구매하여 사용하였으며, 세포주은행의 배양 조건을 따라 RPMI 1640 (Lonza, USA)에 L-glutamine (300 mg/L, GIBCO, USA), 25 mM HEPES (Sigma, USA), 25 mM NaHCO₃ (Sigma, USA), 10 % fetal bovine serum (FBS, GIBCO, USA)가 첨가된 배지로 37 °C, 5 % CO₂ 조건에서 배양하였다.

2.5. *P. intermedia*에 의해 유발되는 염증매개인자 분석 (Inflammatory Cytokine Array)

실제 잇몸에서 *P. intermedia*에 의한 염증반응을 일으키는 주요 염증매개인자들을 도출하기 위해서, 인간 잇몸상피세포인 YD-38에 *P. intermedia*를 24 h 동안 처리하여 염증반응을 유도하였다. *P. intermedia* 자극에 의해서 잇몸상피세포에서 배양배지로 분비(release)된 염증매개인자들은, 36종의 염증성 사이토카인들을 동시에 분석할 수 있는 사이토카인 어레이(cytokine array) 방법을 통해서 검출되었으며, 각 spot들의 강도(intensity) 분석과정을 통해 정량화되어 *P. intermedia*에 의한 잇몸 염증반응의 주요 염증매개인자들을 도출하였다.

실험의 세부 과정은 다음과 같다. 6 well dish에 YD-38 세포를 각 well 당 3.0 × 10⁵개로 분주하고 하룻밤 동안 배양한다. 배양한 세포의 배지를 FBS 농도를 2 %로 낮은 assay용 배지로 교환하고 3 h 동안 배양하여 세포를 적응시킨다. 적응이 끝난 세포에 명시된 농도의 *P. intermedia*와 LPS (LPS from *Escherichia coli* O127:B8, L4516, Sigma, USA)를 처리하고, 24 h 후에 배지를 수거한다. 수거한 배지를 Human Cytokine Array Panel A Array Kit (ARY005, R&D Systems, USA)을 이용하여 배지 내부의 염증매개인자(inflammatory cytokine)들을 분석하였다. 실험의 세부 사항은 제조사가 제공한 protocol을 따랐으며, 결과의 도출과 분석은 LAS 3000 image analyzer (Fujifilm, Japan)와 Multi Gauge 3.0 program (Fujifilm, Japan)을 이용하여 수행하였다.

2.6. 세포 외부로 배출된 IL-8의 측정(IL-8 ELISA)

24 well dish에 YD-38 세포를 각 well 당 1.0 × 10⁵개로 분주하고 하룻밤 동안 배양한다. 배양한 세포의 배지를 녹차추출물 및 관련 시약들이 첨가된 assay 배지(2 % FBS 배지)로 교환하고, 3 h 동안 배양해서 후보 물질들을 전처리한다. 전처리한 세포에 0.1 % 농도로 *P. intermedia*를 처리하여 염증반응을 유도하고, 24 h 후에 배지를 수거한다. 수거한 배지 내 IL-8의 농도는 human CXCL8/IL-8 DuoSet^(R) kit (DY208, R&D Systems, USA)을 이용하여 분석하였으며, 실험의 세부사항은 제조사가 제공한 protocol을 따랐다. 배지를 수거하고 dish에 남은 세포들에는 WST-1 시약(Cell Proliferation Reagent WST-1, Roche, Germany)을 이용하여 세포 독성을 평가하였다. IL-8 측정값은 WST-1 결과를 바탕으로 세포 독성이 나타나지 않은 실험군만을 선별하여 사용하였다. *P. intermedia*에 의한 염증반응의 기전연구를 위해 사용된 dexamethasone, indomethacin, celecoxib 시약들은 모두 시그마(Sigma, USA)에서 구매하여 사용하였다.

2.7. 면역형광염색법(Immuno-fluorescence)을 이용한 IL-8 관찰

YD-38 세포는 각 well 당 3.0 × 10⁴개로 μ -Slide 8 well (ibidi, Germany)에 분주하였으며, 녹차추출물 및 관련 시약들은 실험방법 2.6와 동일하게 처리하였다. 물질처리가 끝난 세포는 PBS로 4 %로 희석한 포름알데하이드 수용액(F8775, Sigma, USA)을 이용하여 1 h 동안 고정하였으며, 고정이 끝난 후 wash buffer (0.05 % Tween-20 in PBS)로 두 번 세척하여 포름알데하이드를 완전히 제거하였다. 고정된 세포는 permeabilization buffer (0.1 % Triton X-100 in PBS)를 10 min 동안 처리하여 세포막의 투과성을 확보하고, blocking solution (1 % BSA in PBS)을 30 min 동안 처리하여 항체의 비특이적 결합(non-specific binding)을 방지하였다. 이와 같은 방법으로 처리된 세포 내의 IL-8 단백질은 anti-human CXCL8/IL-8 항체(R&D Systems, USA)를 이용하여 표지되었으며, 표지된 단백질은 Alexa Fluor^(R) 594 donkey anti-goat IgG (Invitrogen, USA) 항체와 공초점 현미경(Zeiss LSM 510, Carl-Zeiss, Germany)을 이용하여 관찰하였다.

2.8. 통계처리

실험은 3회 이상 반복하여 평균값과 표준 오차를 구하고, 미니탭(MINITAB^(R) release 14.2, LEAD Technolo-

gies, Inc., USA) 통계프로그램의 2표본 t 검정 항목을 이용하여 데이터의 유의수준을 평가하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. *P. intermedia*에 의한 잇몸 염증반응의 주요 염증매개 인자 도출

*P. intermedia*가 잇몸 상피세포에서 유도하는 염증반응을 관찰하기 위하여, 실험 방법 2.5에서 기술한 사이토카인 어레이 방법으로 염증매개인자들의 변화를 분석하였다.

실험 결과, *P. intermedia* 자극에 의해 잇몸상피세포에서 분비되는 염증매개인자들은 GRO α , sICAM-1, IL-8, IL-6, Serpin E1, MIF의 6종이었으며, 이 중 IL-8이 유의적이며 가장 높은 증가를 보여 *P. intermedia*에 의한 잇몸 염증반응의 주 매개인자임을 알 수 있었다(Figure 1). LPS를 자극원으로 처리한 비교실험에서도 *P. intermedia* 처리와 비슷한 결과를 얻을 수 있었는데, IL-8과 함께 GRO α 가 동시에 증가한다는 점에서는 차이를 보였다. 하지만 GRO α 역시 세포막의 IL-8 수용체들에 결합하여 염증반응을 유도한다는 점에서, IL-8이 잇몸상피세포에서 *P. intermedia*과 LPS 자극에 의한 염증반응을 일으키는 주 매개인자라는 사실은 분명해진다[7].

IL-8은 대식세포(macrophage)와 상피세포(epithelial cell)들이 항원과 접촉했을 때 분비하는 주 염증매개인자로서, 면역반응에 관계된 세포들을 불러들여서 염증반응을 개시(initiation)하는 역할을 한다[8,9]. 따라서 본 실험의 결과는 *P. intermedia*에 의한 잇몸 염증반응이 잇몸 상피세포로부터 배출된 IL-8에 의해서 개시된다는 사실을 보여주고 있다.

3.2. ELISA 방법을 이용한 *P. intermedia*에 의한 IL-8 발현 검증

사이토카인 어레이 방법을 통하여 *P. intermedia*에 의한 잇몸 염증반응의 주 매개인자로 도출된 IL-8에 대하여, 보다 엄밀한 분석 방법인 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) 방법을 적용하여 결과의 신뢰도를 검증하였다. *P. intermedia* 농도에 대한 염증반응의 의존성을 평가하기 위해서, 잇몸상피세포에는 0.01, 0.1, 1.0 %로 *P. intermedia*의 농도를 증가시키며 처리하였고, 자극 시간은 어레이와 동일하게 24 h로 유지하였다. *P. intermedia* 자극에 의해 잇몸상피세포에서 분비된 IL-8은 배양 배지를 ELISA 방법으로 분석함으로써 정

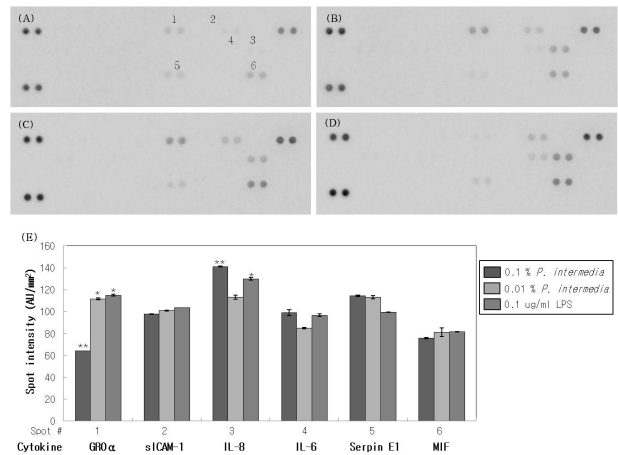


Figure 1. Inflammatory cytokines induced by LPS and *P. intermedia* in YD-38 cells. YD-38 cells were treated with LPS or *P. intermedia* for 24 h and released inflammatory cytokines were measured as described in "Materials and Methods". (A ~ D) The array results were shown as the images of array membranes: (A) control, (B) 0.1 ug/mL of LPS, (C) 0.01 % of *P. intermedia*, (D) 0.1 % of *P. intermedia*. (E) Then, images were analyzed and the major inflammatory cytokines induced by each stimulation were identified. The values are the compensated means of duplicate spots \pm S.D. and the significance of data were tested by comparing with control. * $0.01 < p < 0.05$, and ** $p < 0.01$.

량화하였다.

분석 결과, 잇몸상피세포에서 0.1 %까지는 *P. intermedia*의 농도에 비례하여 IL-8 분비가 증가됨이 확인되었으며, 1.0 %에서는 분비가 감소됨을 확인하였다(Figure 2). 1.0 %에서 나타나는 IL-8의 감소는 *P. intermedia* 자극이 적정 수준을 초과해서 나타난 현상이라고 판단되며, 세포독성에 의한 것은 아님을 WST-1을 이용한 독성평가로 확인하였다(data 생략). 이상의 결과로 IL-8이 *P. intermedia* 자극에 의해서 잇몸상피세포에서 분비되는 잇몸 염증반응의 주 매개인자임을 검증하였으며, 잇몸상피세포에서의 염증반응 유발을 위한 *P. intermedia*의 적정 농도는 0.1 %임을 알 수 있었다. 이 평가방법은 이후 실시된 항염효능평가들에 동일하게 적용되었다.

3.3. *P. intermedia*에 의해 잇몸상피세포에서 일어나는 염증반응의 특성 연구

P. intermedia-잇몸상피세포 염증반응의 기전적 특성을 관찰하기 위해서, 잘 알려진 3종의 항염증제들을 이

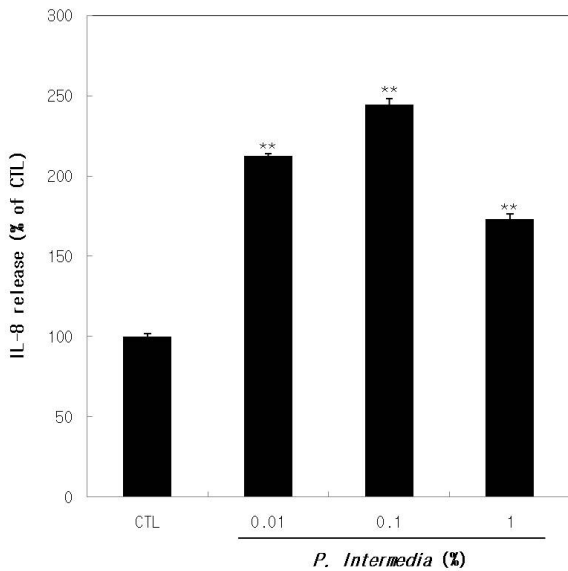


Figure 2. The release of IL-8 according to the stimulation of *P. intermedia*. YD-38 cells were treated with *P. intermedia* of various concentrations for 24 h. Then, culture media were harvested and subjected to the ELISA for the measurement of IL-8 released from stimulated cells. Data represents the means \pm S.D. of triplicate wells and the significance of data were tested by comparing with control. ** $p < 0.01$.

용하였다. Dexamethasone은 스테로이드성 항염증제 (anti-inflammatory glucocorticoid)로써 광범위한 항염증 및 면역억제 효능이 보고되어 있다[10-12]. Indomethacin과 celecoxib은 비스테로이드계열 항염증제(non-steroidal anti-inflammatory drug, NSAID)로써, Indomethacin은 염증을 유도하는 효소인 Cyclooxygenase-1 (COX-1)을, celecoxib는 COX-2를 선택적으로 억제하여 항염증 효능을 나타낸다고 보고되어 있다[13]. 재료 및 실험에서 서술한 바와 같이 잇몸상피세포에 이 물질들을 전처리한 후, *P. intermedia*를 처리하고 IL-8의 발현 변화를 관찰함으로써 *P. intermedia*에 의한 염증반응의 기전적 특이성을 관찰하였다.

실험결과, dexamethasone 처리군에서 가장 강한 IL-8 증가 억제 효능이 관찰되었으며, celecoxib 처리군에서는 약하지만 통계적으로 유의성 있는 억제 효능이 관찰되었다. 하지만 indomethacin 처리군에서는 IL-8 억제가 관찰되지 않았다(Figure 3). 이 결과는 *P. intermedia*에 의한 잇몸상피세포에서의 염증반응이 COX-2 경로와는 연관되어 있지만, COX-1 경로와는 연관되어 있지 않음을 보여준다. 또한 dexamethasone은 AP-1이나 TNF- α 와

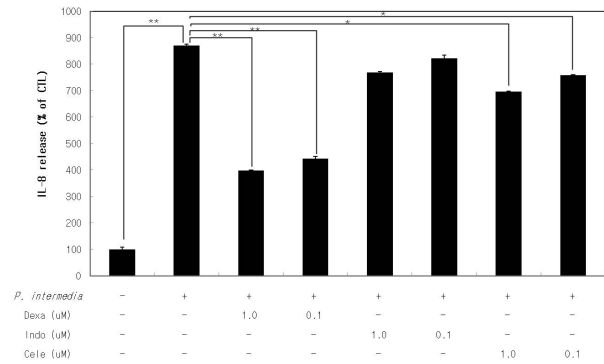


Figure 3. The anti-inflammatory effect of Dexamethasone, Indomethacin, and Celecoxib on the inflammatory response induced by *P. intermedia*. Three well-known anti-inflammatory drugs were pre-treated 3 h before *P. intermedia* treatment, and 0.1 % of *P. intermedia* was added in the culture medium to induce the inflammatory response. After 24 h, the anti-inflammatory effect of each drug was evaluated by measuring IL-8 levels in the culture media by ELISA. Data represents the means \pm S.D. of triplicate wells and the significance of data were tested by comparing with control. * $0.01 < p < 0.05$, and ** $p < 0.01$.

같은 염증 유발 전사인자(inflammatory transcriptional factor)들의 활동을 억제하므로, *P. intermedia*에 의한 잇몸상피세포 내부의 염증반응은 AP-1, TNF- α 경로와 강하게 연관되어 있음을 유추할 수 있다. 추가적인 실험을 통해서 *P. intermedia*과 이 전사인자들과의 관계를 규명한다면, 더욱 구체적인 염증반응의 기전을 규명하고 이를 통해서 더욱 효과적인 잇몸 염증반응 예방법을 도출할 수 있다고 판단된다.

3.4. 녹차추출물의 잇몸 염증반응 억제 효능 평가

카테킨(catechin)성분에 의한 녹차잎의 항균, 항염증 효능은 기존 연구들을 통하여 보고되어 있다[14,15]. 본 논문의 연구자들은 이런 녹차잎의 항염증 효능에 주목하고, 녹차추출물이 *P. intermedia*에 의한 잇몸상피세포에서의 염증반응을 억제할 수 있는지 평가하였다. 평가는 세포 밖으로 배출된 IL-8의 변화를 정량적으로 측정할 수 있는 ELISA 방법과, 세포 내부 IL-8 단백질의 변화를 시각적으로 관찰할 수 있는 면역형광염색을 동시에 진행하여 결과의 신뢰도를 높였다.

평가 결과, 녹차추출물은 *P. intermedia* 자극에 의한 잇몸상피세포에서의 IL-8의 분비 증가를 효과적으로 억제하였다(Figure 4A). 또한 IL-8 면역형광염색의 결과,

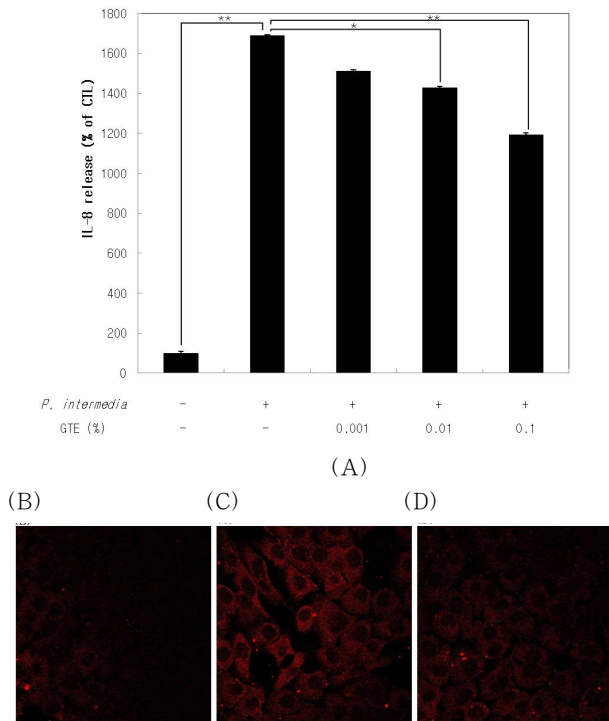


Figure 4. The anti-inflammatory effect of Green Tea Extract against *P. intermedia*. YD-38 cells were pre-treated with green tea extract (GTE) with various concentrations for 3 h. Then, 0.1 % of *P. intermedia* was added in the medium of extract pre-treated cells and incubated for another 24 h. (A) After the treatment, the cell's medium was harvested and subjected to the ELISA of IL-8. Data represents the means \pm S.D. of triplicate wells and the significance of data were tested by comparing with control. * $0.01 < p < 0.05$, and ** $p < 0.01$. (B ~ D) Confocal microscope images of YD-38 cells. YD-38 cells were treated with GTE and *P. intermedia* as the same manner as ELISA and visualized using the immuno-fluorescence technique. (B) control, (C) 0.1 % of *P. intermedia*, (D) 0.1 % of *P. intermedia* + 0.1 % of GTE.

녹차추출물은 *P. intermedia* 자극에 의해서 잇몸상피세포 내부에서 일어나는 IL-8 단백질의 발현(expression) 증가를 억제하는 것을 관찰할 수 있었다(Figure 4 B-D). 이상의 결과들은 *P. intermedia*가 잇몸상피세포를 자극하여 IL-8 단백질의 발현을 증가시키고, 발현이 증가된 단백질들이 잇몸상피세포 밖으로 배출되어 주변 세포들에서 연쇄적인 염증반응을 유도하는 *P. intermedia*에 의한 잇몸 염증 반응의 기작과, 이에 대한 녹차추출물의 IL-8 발현 증가 억제를 통한 항염증 효능을 보여주고 있다(Figure 5). 따라서 녹차추출물의 항염증 효능은 *P.*

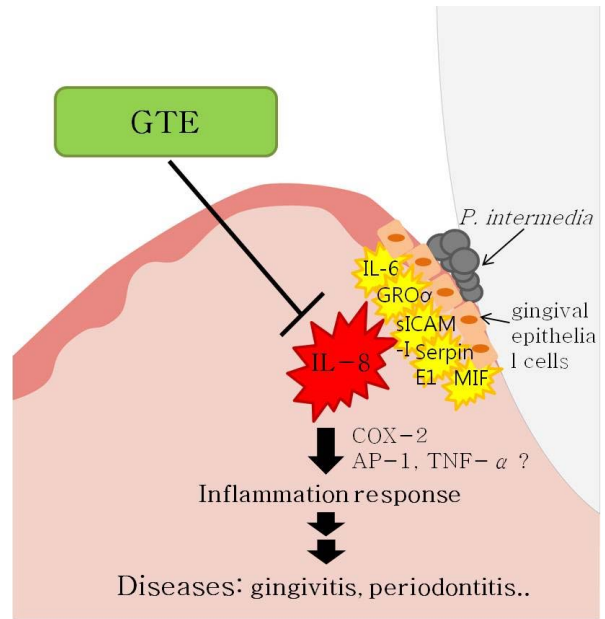


Figure 5. The mechanism of gingival inflammatory reaction induced by *P. intermedia* and the suppression of inflammation by green tea extract (GTE).

intermedia 자극에 의해서 잇몸상피세포에서 일어나는 염증반응을 억제할 수 있으며, 이런 항염증 효능은 *P. intermedia*에 의해서 유도되는 치주염과 치은염 같은 잇몸 질환의 예방과 치료에 기여할 수 있다고 판단된다.

4. 결 론

본 연구는 잇몸에서 치주염과 치은염과 같은 잇몸 질환을 일으키는 대표적인 세균인 *P. intermedia*와 구강세균들과 잇몸에서 직접 접촉하는 잇몸상피세포를 이용하여, *P. intermedia*에 의해 잇몸에서 일어나는 염증반응의 특징과 잇몸 염증반응을 억제할 수 있는 효능물질을 도출하는 것을 목적으로 진행되었다.

실험 결과, *P. intermedia*는 잇몸상피세포를 자극하여 GRO α , sICAM-1, IL-8, IL-6, Serpin E1, MIF와 같은 염증매개인자들의 분비를 유도하였고, 그 중 IL-8이 가장 핵심적인 염증매개인자로 판명되었다. 또한 항염증 효능이 입증된 3종의 항염증제들을 이용한 실험으로 *P. intermedia*에 의한 염증반응의 기작이 TNF- α , AP-1과 같은 염증매개 전사인자들과 COX-2 염증 유발 효소와 연관되어 있음을 밝혔다. 최종적으로는, 녹차추출물을 전처리한 잇몸상피세포에서 *P. intermedia*에 의한 염증반응이 현저히 감소함을 관찰함으로써, 녹차추출물이 잇

몸염증반응 억제에도 효과가 있음을 실험적으로 입증하였다.

결론적으로, *P. intermedia*는 잇몸상피세포를 자극하여 IL-8을 분비하게 함으로써 잇몸 내부에서의 염증반응을 개시(initiation)시키며, 녹차추출물은 구강상피세포에서 IL-8의 과발현과 분비를 억제하여 *P. intermedia*에 의한 잇몸염증반응을 완화시킨다. 따라서 녹차추출물은 치약, 구강청정제와 같은 제형화 과정을 거쳐서 구강에 정기적으로 적용한다면, 염증반응억제를 통한 잇몸질환 예방 및 치료에 효과를 나타낼 수 있고, 본 논문의 결과들은 그 효능을 과학적으로 입증하였다는 점에서 중요한 의미를 갖는다.

참 고 문 헌

1. R. Romanelli, S. Mancini, C. Laschinger, C. M. Overall, J. Sodek, and C. A. G. McCulloch, Activation of neutrophil collagenase in periodontitis, *Infection and Immunity*, **67**(5), 2319 (1999).
2. T. Honda, H. Domon, T. Okui, K. Kajita, R. Amanuma, and K. Yamaza, Balance of inflammatory response in stable gingivitis and progressive periodontitis lesions, *Clinical and Experimental Immunology*, **144**, 35 (2006).
3. E. Gemmell, C. L. Carter, and G. J. Seymour, Chemokines in human periodontal disease tissue, *Clinical and Experimental Immunology*, **125**, 134 (2001).
4. T. Yucel-Lindberg, S. Nilsson, and T. Mod'eer, Signal transduction pathways involved in the synergistic stimulation of prostaglandin production by Interleukin-1 β and tumor necrosis factor α in human gingival fibroblast, *J. Dent. Res*, **78**(1), 61 (1999).
5. D. Jansson, S. Amisten, G. Bratthall, A. Holm, and B.-O. Nilsson, LPS induces GRO α chemokine production via NF- κ B in oral fibroblast, *Inflamm. Research*, **58**, 791 (2009).
6. P. G. Stathopoulou, M. R. Benakanakere, J. C. Galicia, and D. F. Kinane, Epithelial cell pro-inflammatory cytokine response differs across dental plaque bacterial species, *J. Clin. Periodontol.*, **37**, 24 (2010).
7. T. Geiser, B. Dewald, M. U. Ehrenguber, I. Clark-Lewis, and M. Baggiolini, The Interleukin-8-related chemotactic cytokines GRO α , GRO β , and GRO γ activate human neutrophil and basophil leukocyte, *The Journal of Biological Chemistry*, **268**(21), 15419 (1999).
8. A. Harada, N. Sekido, T. Akahoshi, T. Wada, N. Mukaida, and K. Matsushima, Essential involvement of interleukin-8 (IL-8) in acute inflammation, *Journal of Leukocyte Biology*, **56**, 559 (1994).
9. K. E. Driscoll, J. M. Carter, D. G. Hassenbein, and B. Howard, Cytokines and particle-induced inflammatory cell recruitment, *Environmental Health Perspectives*, **105**(5), 1159 (1997).
10. J. S. Myung, G. D. Aaker, and S. Kis, Treatment of noninfectious posterior uveitis with dexamethasone intravitreal implant, *Clinical Ophthalmology*, **4**, 1423 (2010).
11. D. T.W. Chang, M. C. Herceg, R. A. Bilonick, L. Camejo, J. S. Schuman, and R. J. Noecker, Intracamerular dexamethasone reduces inflammation on the first postoperative day after cataract surgery in eyes with and without glaucoma, *Clinical Ophthalmology*, **3**, 345 (2009).
12. A. D. Lazar, O. Shpilberg, M. Shalkai, and O. Bairey, Salvage chemotherapy with dexamethasone, etoposide, ifosfamide and cisplatin (DVIP) for relapsing and refractory non-Hodgkin's lymphoma, *Israel Medical Association Journal*, **1**, 16 (2009).
13. M. G. Perrone, A. Scilimati, L. Simone, and P. Vitale, Selective COX-1 inhibition: a therapeutic target to be considered, *Current Medicinal Chemistry*, **17**(32), 3769 (2010).
14. J. M. Song and B. L. Seong, Tea catechins as a potential alternative anti-infectious agent, *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, **5**(3), 497 (2007).
15. J. D. Lambert, S. Sang, and C. S. Yang, Biotransformation of green tea polyphenols and biological activities of those metabolites, *Mol. Pharmacology*, **4**(6), 819 (2007).