

치주염증에 대한 마치현 및 금전초 에탄올 추출물의 억제 효과

박영미[#] · 이영래^{1#} · 박상훈 · 이봉근 · 박연주 · 오홍근 · 문대인 · 손민우 · 강양규² · 김옥진³ · 이석련⁴ · 이충훈⁵ · 김민석^{6*} · 이학용^{*}

(주)휴벳, 1: 원광대학교 대사기능제어연구센터 & 원광대학교 치과대학 구강생화학교실 & 생체재료·매식연구소, 2: (유)해원, 3: 원광대학교 애완동물학과, 4: 원광대학교 치과대학 보존학교실, 5: 태양전자연구소 & 차세대방사선산업기술 RIC, 6: 원광대학교 치과대학 구강생리학교실 & 생체재료·매식연구소

Inhibitory Effects of *Portulaca Oleracea* Ethanol Extract and *Glechoma Hederacea* Ethanol Extract on the Periodontitis

Young Mi Park[#], Young-Rae Lee^{1#}, Sang Hoon Park, Bong Gun Lee, Yeon Ju Park, Hong Geun Oh, Dae In Moon, Min Woo Son, Yang Gyu Kang², Ok jin Kim³, Seok-Ryun Lee⁴, Choong Hun Lee⁵, Min Seuk Kim^{6*}, Hak Yong Lee^{*}

Huvet Co. Ltd., 1: Center for Metabolic Function Regulation(CMFR), Wonkwang University, Department of Oral Biochemistry, and Institute of Biomaterial - Implant, College of Dentistry, Wonkwang University, 2: Heawon, Ltd., 3: Center for Animal Resources Development, Wonkwang University, 4: Department of Conservative Dentistry, College of Dentistry, Wonkwang University, 5: Microelectronics and Display Technology, Next Generation Industrial Radiation Technology RIC, Center for PV Human Resource Development, Wonkwang University, 6: Department of Oral Physiology, and Institute of Biomaterial - Implant, College of Dentistry, Wonkwang University

Both *Portulaca oleracea* (PO) and *Glechoma hederacea* (GH) have been used as traditional medicine due to the multiple pharmacological activities. However, the effects of PO and GH in the pathology of periodontitis is still elusive. In this study, we examined anti-microbial activity of PO ethanol extract (POEE) and GH ethanol extract (GHEE) *in vitro*, and physiological effects of POEE and GHEE on the cell inflammatory responses and the severity of periodontitis were determined using the rat periodontitis model. Our results indicate that POEE and GHEE had no effects on the proliferation of *streptococcus mutans* and on LPS-mediated inflammatory responses in gingival fibroblast cells. Notably, ingestion of POEE and GHEE resulted in attenuating the severity of periodontitis and population change of immune cells. These data suggests that PO and GH should be considered as candidates for relieving the severity of periodontitis.

keywords : *Portulaca oleracea*, periodontitis, *streptococcus mutans*

서 론

마치현(*Portulaca oleracea*) 및 금전초(*Glechoma hederacea*)는 전통의학에서 치료용 약제로서, 마치현의 경우 피부 내 항염제 및 설사, 세균성 이질 등에 사용되었으며 금전초는 주로 천식과 같

은 염증의 완화를 목적으로 사용되었다. 최근 이러한 전통약재 추출물들의 생체 내 약물 작용기전에 대한 많은 연구가 이뤄지고 있다. 마치현 성분 중 betacyanin 및 polysaccharide는 각각 노화에 의한 인식장애 증상과 피로감을 완화시키며¹⁾, 마치현 에탄올 추출물 (*Portulaca oleracea* ethanol extract: POEE)은 섬유아세포에서

Both authors contributed equally to this work

* Corresponding author

Hak Yong Lee, Huvet Co. Ltd., jeonbuk 570-749, Republic Korea

·E-mail : leeapf@nate.com ·Tel : +82-63-851-7061

Min Seuk Kim, Department of Oral Physiology, and Institute of Biomaterial - Implant, College of Dentistry, Wonkwang University, Iksan 570-749, Republic of Korea

·E-mail : happy1487@wku.ac.kr ·Tel : +82-63-850-6997

·Received : 2014/12/03 ·Revised : 2015/01/26 ·Accepted : 2015/02/13

© The Korean Society of Oriental Pathology, The Physiological Society of Korean Medicine

pISSN 1738-7698 eISSN 2288-2529 <http://dx.doi.org/10.15188/kjopp.2015.02.29.1.46>

Available online at http://society.kisti.re.kr/sv/SV_svjsj03L.do?method=list&poid=ksomp&kojic=DRSRDH&sVnc=v28n5&menuid=1&subid=13

UV에 의한 세포독성을 억제시키는 보고된 바 있다²⁾. 금전초 에탄올 추출물(*Glechoma hederacea* ethanol extract; GHEE)는 HepG2 세포 내 NF- κ B의 활성을 억제하며, 또한 대식세포 내 LPS에 의한 nitric oxide의 생성을 억제하는 기능이 보고되었다³⁾. 그러나 이들 추출물들의 치주 미생물에 대한 항균력 및 치주질환에서의 생리 활성에 대한 연구는 아직까지 이뤄지지 않고 있다.

치주염은 치주조직에서 발생하는 대표적 염증질환으로서, 치주조직 내 미생물의 이상증식 및 구강 내 환경변화와 같은 복합적인 요인에 의해 잇몸(gingiva) 및 치근막(periodontal ligament) 등의 연조직에서 최초 염증반응이 시작됨으로써 발생하는 것으로 알려져 있다⁴⁾. *Streptococcus mutans*(*S. mutans*)는 이러한 치주염을 유발하는 대표적 그람양성 세균으로써, 주로 치태 및 치은열구에 서식하며 젖산(lactic acid) 생성과 같은 물질대사를 통해 병리적 활성을 갖는다⁵⁾. 본 연구를 통해, POEE 및 GHEE의 *S. mutans*에 대한 항균력을 검사하고, 급성 치주염 동물모델에서의 생리적 활성을 확인함으로써 각 추출물들의 구강질환 치료제로서의 가능성을 제시하고자 한다.

재료 및 방법

1. 마치현 및 금전초 에탄올 추출

시험에 사용된 마치현(*Portulaca oleracea* L.) 추출물과 금전초(*Glechoma Hederacea*) 추출물은 건조된 시료 1 kg을 농도별 에탄올 (0%, 25%, 50%, 80%, 100%) 8 L에 70°C에서 3시간동안 추출 후 상층액을 8 μ m 여과지에 여과하였다. 이 후 78°C에서 진공 감압 농축하여 에탄올을 제거 후 각 추출물별 건조중량을 dimethyl sulfoxide에 희석하여 stock solution을 준비하였으며, 이를 증류수로 추출물의 농도가 동일하도록 희석하여 시험 물질로 사용하였다.

2. 실험동물

샘타코 바이오코리아(오산 한국)에서 Specific-pathogen free (SPF) 상태의 SD rat 6주령을 분양 받아 실험에 사용하였다. 식이는 일반 고형사료(Samtako, Gyunggi, Korea)를 급여하였다. 본 실험은 원광대학교의 동물실험윤리규정을 준수하여 수행하였다(WKU14-69). 실험군은 정상군(Normal group), 대조군(치주염 유발 및 saline 처리), 그리고 치주염 유발 후 POEE와 GHEE 추출물의 혼합비에 따라 8:2, 5:5, 2:8 실험군으로 구분하여 군당 10~14마리씩 실험에 사용하였다. 각 실험군별 시료 투여는 POEE와 GHEE 간의 혼합물과 음수를 10주간 제공하였으며 대조군은 음용수를 제공하였다.

3. *S. mutans* 미생물에 대한 항균력 분석 (minimum inhibitory concentration assay)

S. mutans (ATCC25175) 단일 균종을 BHI (brain heart infusion) 액상배양 배지에 접종 후 37°C에서 24시간 동안 배양하여 사용하였다 (O.D=1). 금전초(1 mg/ml) 및 마치현(1 mg/ml) 추출물을 지정한 비율로 혼합하여 각 well 당 100 μ l로 농도 별로 처

리하고 다시 37°C에서 24시간 동안 배양하였다. 이후 각 well의 optical density (absorbance = 600 nm)를 측정함으로써 각 추출물들의 *S. mutans*에 대한 항균력을 추출하였다.

4. 인공치아 내 생체막(biofilm) 형성 분석

인공치(Endura, Shofu inc., kyoto, Japan)에 BHI 액체배지와 마치현 추출물을 첨가한 후 5×10^5 CFU/ml/dish균이 되게 도포하였다. 37°C 배양기에서 24시간 배양 후 남은 액을 모두 제거하였다. 각각의 인공치에 증류수 1.5 ml씩 넣어서 세척한 뒤, 0.1%의 safranin으로 30초 동안 염색한 후 증류수에 두 번 세척 후 사진 촬영을 시행하였다.

5. Western blot

치은섬유아세포(1×10^6)에 마치현 추출물을 1시간 동안 전처리 후에 LPS (20 μ g/ml)를 처리하고 37°C 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 세포 내 단백질은 Mammalian Protein Extraction Reagent (M-PER; Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA)를 사용하여 분리 후 Bradford method을 사용하여 단백질 정량 하였다. 샘플 (20 μ g/well)은 10% acrylamide와 함께 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 사용하여 분리하였고, Hybond™-polyvinylidene fluoride membranes(GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, UK) 을 사용하여 이동하였다. 각각의 membrane은 2% bovine serum albumin 또는 5% skim milk 를 사용하여 2시간 동안 블로킹 하였고, 일차항체 처리 후 4°C 냉장고에서 overnight 하였다. 이차항체는 HRP-conjugated IgG(1:2000 dilution)를 사용하였다. 단백질 발현양은 image analyzer(Fuji-Film, Tokyo, Japan)를 사용하여 확인하였다.

6. 치주염 유발 및 임상점수 분석

치주염 유발은 총 10 주간 진행되었다. 실험군은 xylazine(렘폰, 바이엘동물약품)과 Ketamine(케타민, 유한양행)을 1:3으로 혼합 후 0.4 ml/250 g 비율로 근육 주사하여 마취를 유도하였다. 대조군 및 POEE, GHEE 처리 실험군의 3개의 어금니 중 가운데 어금니 주위로 코튼 실을 묶어 치은열구 내로 삽입하여 미생물의 점착을 유도하였다. 치주염 유발 5주차부터 6주간 6차례에 걸쳐 LPS를 치은 조직에 주사함으로써 염증 유발을 증폭시켰다. LPS 주사는 구강 전정(vestibular fornix)에서 치주 쪽으로 LPS 3 μ l (10 μ g/ μ l)를 주 3회 2주간(총 6회, 180 μ g of LPS) 주사하였으며 대조군은 실험군의 LPS 주사량과 동일한 증류수를 주사하였다.

치주염 유발여부를 확인하기 위하여 LPS 투여 1주차부터 주 1회 간격으로 치아 주위 조직을 관찰하여 치은지수와 치태지수를 계산하여 점수화하였다. 치주질환 임상 점수는 치은점수(협면 중앙부, 원심 협면, 근심 협면, 설면 등을 관찰)와 치태지수 (치태의 육안적인 두께를 관찰), 치은출혈(치간유두의 근심면과 원심면을 탐침하여 출혈 유무 및 양을 관찰), 치주낭 깊이(치아장축에 평행하여 치주낭의 기저부까지 삽입한 뒤 치은변연에서부터 깊이를 측정)를 평가하여 계산하였다. 각 군당 전체 치주염 임상점수는 개체별 점수의 평

균치로 구하였으며 치주질환 임상 점수(Table 1)에 대한 평가기준은 다음과 같다.

Table 1. Gingival index

Score	평가 기준
0	정상 치은. 치아가 부착되어 있지 않고 출혈이 없으며 치주낭의 깊이가 2 mm미만인 경우
1	경한 염증. 경미한 색조변화와 가벼운 부종, 치주 탐침에 의한 출혈 성향이 크지 않고 치은변연에 부착된 치태가 확인되며 치주낭의 깊이가 2 mm이상~3mm 미만인 경우
2	중등도 염증. 발적, 부종, 치은의 색조 변화, 과량의 치태가 붙어있고 치간 사이에는 치태가 부착되어 있지 않음. 또한 치주 탐침에 의한 출혈이 선상으로 유두 끝에서 확산되고, 치주낭의 깊이가 3 mm이상~5mm 미만인 경우
3	중증 염증. 상당한 발적과 부종, 궤양이 있으며 지속적인 출혈이 있고, 치은변연과 치간 사이에 치태가 침착되어 있음. 치간 유두 전체에 출혈이 확산되고 치주낭의 깊이가 5 mm이상인 경우

7. 일반 혈액학적 분석

치주염 유발 이후 혈액은 복대정맥에서 채혈하여 EDTA tube와 conical tube에 나눠 분석에 사용하였다. 혈액 분석은 혈액을 EDTA tube(DB Caribe, Ltd., USA)에 담아 Roll mixer에 약 30분 회전시킨 후 혈액분석기(Hemavet 950Fs, Drew scientific inc, TX, USA)를 이용하여 백혈구(WBC), 호중구(neutrophil), 임파구(lymphocyte), 단핵구(monocyte)를 측정하였다.

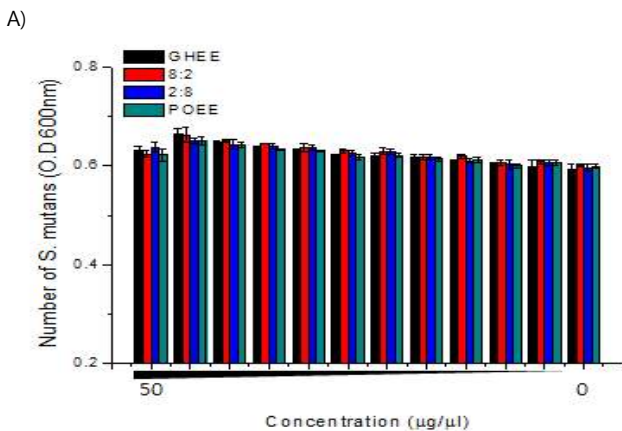
8. 통계분석

모든 분석결과의 통계적 유의성 검정에 따른 통계분석은 ANOVA(one-way analysis of variance test)를 실시한 후 유의성이 있는 경우, p<0.05일 때 Duncan's multiple range test로 사후 검정하였다.

결 과

1. *S. mutans*에 대한 POEE 및 GHEE의 항균 효과

마치현 및 금전초 추출물들의 *S. mutans*에 대한 직접적인 항균성을 분석하고자 minimal inhibitory concentration (MIC) test 및 인공치아를 이용한 생체막 형성도를 측정하였다. 실험결과, *S. mutans* 성장도 및 생체막 형성에서 유의적 차이를 나타내지 않음이 확인되었다(Fig. 1A, B).



B)

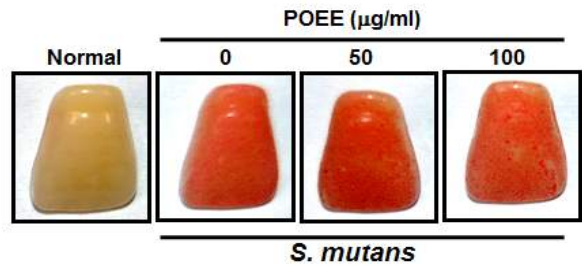
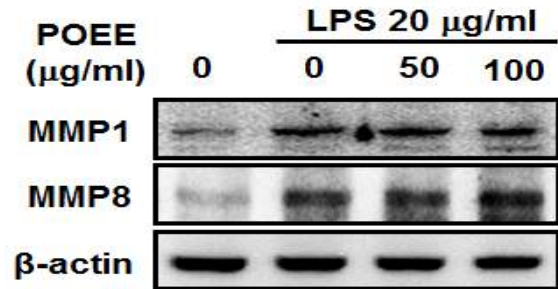


Fig. 1. Anti-microbial activities of POEE and GHEE. (A) 50 µg/well of POEE, GHEE, and mixture were treated, and the rest of the wells were then serially diluted to half concentration. *S. mutans* was then incubated for 24 hr. After incubation, number of *S. mutans* was determined by measuring optical density (absorbance at 600 nm). Data are presented as means ± SEM. (B) *S. mutans* was incubated with synthetic resin teeth under the indicated condition. Synthesized biofilm was then stained as described in "Materials and Methods". Incubation of synthetic resin teeth without *S. mutans* was used as negative control.

A)



B)

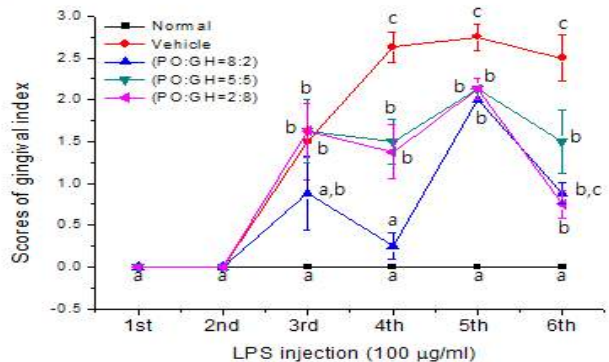


Fig. 2. Effects of POEE, GHEE, and mixture on MMP1, 8 expression in human gingival fibroblast and the severity of LPS-mediated periodontitis. (A) Following the pretreatment of POEE on human gingival fibroblast, LPS was treated to induce inflammatory response. After 24 hr incubation, the expression of MMP1 and 8 was evaluated respectively. β-actin was used for loading control. (B) During LPS injection period (6 weeks), inflammatory responses of each mouse were evaluated referring gingival index, and total score was presented. Data are presented as means ± SEM.

2. 치주염 병리기전에서 POEE 및 GHEE의 활성 분석

세포단위에서의 염증반응은 치주조직 내 연조직에서의 염증을 유발하고 이어 치주염을 유발하는 주원인으로, 마치현 및 금전초 추출물이 위 세포 내 MMP1, 8의 발현에 어떠한 영향을 미치는 지 확인함으로써 세포단위에서의 치주염 유발에서의 활성을 분석하고자

하였다. Fig. 2A에서 확인되듯이, LPS에 의한 세포 내 염증반응에서 마치현 및 금전초 혼합물이 유의적인 차이를 나타내지 않음을 알 수 있었다. 다음으로, 치주염 발생에서 마치현 및 금전초의 섭취가 어떠한 영향을 미치는지 치주염 동물모델을 이용하여 확인하였다. 10주간 코튼 실을 이용하여 미생물 점착을 유도하고 마지막 6주간 LPS를 잇몸조직에 직접 주사함으로써 염증반응을 극대화하였다. LPS 처리 기간 6주 동안 치은조직 내 염증발생 정도를 Table 1을 기준으로 임상점수를 체크함으로써 마치현 및 금전초 추출물의 섭취가 치주염 발생 정도에 미치는 영향을 비교 분석하였다. 실험결과, 대조군(치주염 유발)에서 LPS 주사 3주차부터 증가하기 시작하여 6주차까지 증가하는 결과에 비하여 마치현과 금전초 혼합물을 섭취한 실험군에서는 4, 5, 6주차 염증의 정도가 크게 감소함을 나타내었다(Fig. 2B). 또한, 8:2 (마치현:금전초) 혼합물을 섭취한 실험군에서는 LPS 주사 후 3, 4주차에서 거의 정상군에 가까운 수치를 나타내었는데, 이는 마치현 추출물 내 성분들이 염증 억제에 보다 효과적임을 나타낸다.

65.50±1.07%, 대조군에서 55.08±1.12%, 마치현과 금전초 추출물 2:8 실험군에서 57.86±2.15%, 마치현과 금전초 추출물 5:5 실험군에서 62.28±2.29%, 마치현과 금전초 추출물 8:2 실험군에서 58.03±0.50%로 조사되었다. 단핵구(MO)는 정상군에서 3.56±0.25%, 대조군에서 2.45±0.34%, 마치현과 금전초 추출물 2:8 실험군에서 2.71±0.37%, 마치현과 금전초 추출물 5:5 실험군에서 3.36±0.31%, 마치현과 금전초 추출물 8:2 실험군에서 58.03±0.50%로, 호산구(EO)는 정상군에서 0.67±0.16%, 대조군에서 0.59±0.09%, 마치현과 금전초 추출물 2:8 실험군에서 0.64±0.13%, 마치현과 금전초 추출물 5:5 실험군에서 0.87±0.13%, 마치현과 금전초 추출물 8:2 실험군에서 0.77±0.26%로 나타났다(Fig. 3A~D). 반면 호염구(BA)의 경우 각 실험군 별 유의적인 차이를 보이지 않았다(data not shown).

고 찰

*S. mutans*는 치은염 및 치주염을 유발하는 대표적 구강 내 미생물로서 치태형성 시 최초 점착 후 다른 미생물들의 점착을 유도하는 것으로 잘 알려져 있다⁶⁾. 이렇게 생성된 치태 및 치석은 생체막(biofilm)을 형성함으로써 지속적으로 치주조직 내 염증반응을 유도하며 치주염을 유발 하는 것으로 잘 알려져 있다⁷⁾. POEE가 구강 미생물 증식 및 생체막 형성에 미치는 영향을 분석하는 것은 구강 항상성에 미치는 일차적 효과를 가능하게 하기 매우 중요한 척도이다. 그러나 실험결과 POEE는 구강미생물 및 생체막 형성에 직접적인 영향을 미치지 않음을 확인하였다. 이러한 결과는 마치현 및 금전초 추출물 내 구성성분에는 미생물의 성장 및 생체막 형성 관련 기전을 억제하는 성분이 없으며, *S. mutans*에 대한 직접적으로 작용하지 않고 치주조직 내 세포 및 섭취에 의한 생체 내 전반적 영향을 미칠 수 있음을 간접적으로 증명하였다.

Gingival fibroblast 세포는 치주조직 내 잇몸을 구성하는 대표적인 세포로서 LPS 및 외부자극에 의해 세포 내 matrix metalloproteinase 1, 8 (MMP1, MMP8)의 발현이 증가되고 세포 염증반응을 유도함이 보고된 바 있다^{7,8)}. 이러한 세포단위에서의 염증반응은 치주조직 내 연조직에서의 염증을 유발하고 이어 치주염을 유발하는 주원인으로, POEE가 이러한 세포 내 유전자 발현에 어떠한 영향을 미치는 지 확인하였다. 실험결과들은 마치현 및 금전초 추출물이 세포 염증반응에는 직접적으로 영향을 미치지 않으며, 추출물들의 섭취에 의해서만 치주염 증상 억제 활성을 갖는다는 것을 나타낸다. 이는 추출물 내 특정성분이 치주조직 내 세포들에 직접적 영향이 아닌, 인체 내 염증반응 관련 다른 세포들에 영향을 가짐으로써 간접적으로 치주염 유발을 억제하고 있음을 짐작케 한다.

현재까지의 결과는 POEE와 GHEE의 섭취에 따른 간접적 효과로서 치주염의 염증 정도를 완화하고 있음을 제시하고 있다. 혈액 내에는 면역기능을 담당하는 백혈구 세포(white blood cell)가 존재하며 이러한 백혈구 세포에는 그 형태와 기능에 따라 단핵구(monocyte), 호중구(neutrophil), 임파구(lymphocyte), 호산구(eosinophil), 호염구(basophil) 5가지의 세포로 분류된다. 최근 연구보고에 따르면 외부인자에 의한 초기 염증반응 시 정상 상태에

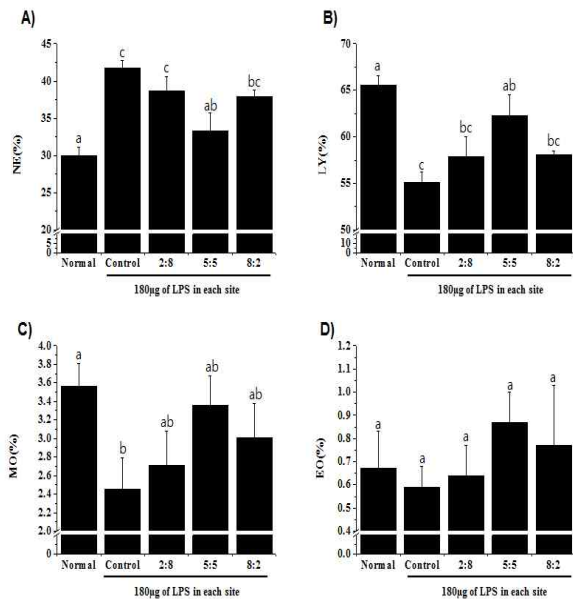


Fig. 3. Effects of POEE, GHEE, and mixture on the immune cell population. Blood was collected from each group, and the populations of (A) neutrophil (NE), (B) lymphocyte (LY), (C) monocyte (MO), and (D) eosinophil (EO) were measured. Data were presented as percentage of total white blood cells. Data are presented as means ± SEM

3. POEE 및 GHEE 섭취에 따른 면역관련 혈액 세포의 변화

본 연구에서 마치현과 금전초 추출물의 섭취가 생체 내 면역기능을 담당하는 백혈구 내 각 세포의 수에 어떠한 변화가 유발되는지 확인하고자, 치주염이 유발된 각 실험군 으로부터 혈액을 채취하여 혈액 내 해당 세포들의 수를 백혈구 전체 수를 기준으로 백분율로 환산하여 비교분석 하였다. 실험결과, 호중구(NE)는 정상군에서 30.03±1.13%, 대조군에서 41.70±1.03%, 마치현과 금전초 추출물 2:8 실험군에서 38.65±1.99%, 마치현과 금전초 추출물 5:5 실험군에서 33.33±2.43%, 마치현과 금전초 추출물 8:2 실험군에서 37.94±0.90%로 확인되었다. 또한 임파구(LY)는 정상군에서

비교하여 혈액 내 호중구(NE)의 함량은 증가하고 임파구(LY)의 함량은 감소한다고 알려져 있다⁹⁾. 본 연구에서 혈액 내 호중구와 임파구의 함량(백분율)을 비교하여보면 정상군에 비해 대조군의 호중구는 급격히 증가하였으나 임파구는 현저히 감소된 것으로 확인되었다. 반면 마치현과 금전초 추출물을 배합하여 처리한 실험군의 경우 모두 대조군에 비해 호중구의 함량은 낮고 임파구의 함량은 높은 경향을 보였는데, 이 중 마치현과 금전초의 배합비가 5:5인 실험군이 타 실험군과 비교하여 가장 정상군과 유사한 수준을 보이는 것으로 확인되었다. 이러한 결과는 마치현 및 금전초 추출물 섭취가 혈액 내 임파구와 호중구 함량을 변화시킴으로써 염증의 초기단계를 억제한다는 것을 나타내는데, 치주염 3주차부터 염증의 정도가 억제된다는 앞선 결과와 일치함을 알 수 있다. 마치현 및 금전초의 면역세포에의 영향은 비단 치주염뿐 아니라 인체 내 다양한 염증반응을 조절할 수 있음을 나타낸다. 앞으로 마치현 및 금전초가 각 세포에 미치는 분자수준의 작용기전에 대해서 좀 더 연구할 필요성이 있다.

결 론

전통의학에서 주로 사용되는 마치현 및 금전초의 에탄올 추출물을 이용하여 치주염 및 치주염 유발요인들에 대한 효과를 분석하였다. 각 추출물 및 혼합물은 *S. mutans*에 대한 항균력 및 인공치아에의 생체막 형성, 그리고 치주점유아세포 내 LPS에 의한 염증반응에 대한 직접적인 효과는 관찰되지 않았으나, 해당물질 섭취에 따라 치주염의 염증 정도가 억제되며, 혈액 내 백혈구 대비 면역세포들의 함량에 변화가 발생함을 확인하였다. 이러한 결과는 마치현 및 금전초가 섭취 시 생체 내 전반적인 염증반응에 작용할 수 있음을 제시함으로써 염증억제제로서의 사용 가능성을 나타내고 있다.

감사의 글

본 연구는 2013년도 중소기업청 “중소기업융복합기술개발사업” (과제번호: S2148082) 의 지원에 의해 이루어진 것이며, 이에 감사를 드립니다.

References

1. Wang, C.Q., Yang, G.Q. Betacyanins from *Portulaca oleracea* L. ameliorate cognition deficits and attenuate oxidative damage induced by D-galactose in the brains of senescent mice. *Phytomedicine*, 17: 527-532, 2010.
2. Lee, S., Kim, K.H., Park, C., Lee, J.S., Kim, Y.H. *Portulaca oleracea* extracts protect human keratinocytes and fibroblasts from UV-induced apoptosis. *Exp Dermatol*, 23 Suppl 1: 13-17, 2014.
3. Kim, J., Song, S., Lee, I., Kim, Y., Yoo, I., Ryoo, I., Bae, K. Anti-inflammatory activity of constituents from *Glechoma hederacea* var. *longituba*. *Bioorg Med Chem Lett*, 21: 3483-3487, 2011.
4. Nath, S.G., Raveendran, R. Microbial dysbiosis in periodontitis. *J Indian Soc Periodontol*, 17: 543-545, 2013.
5. Metwalli, K.H., Khan, S.A., Krom, B.P., Jabra-Rizk, M.A. *Streptococcus mutans*, *Candida albicans*, and the human mouth: a sticky situation. *PLoS Pathog*, 9:e1003616, 2013.
6. Matsumi, Y., Fujita, K., Takashima, Y., Yanagida, K., Morikawa, Y., Matsumoto-Nakano, M. Contribution of glucan-binding protein A to firm and stable biofilm formation by *Streptococcus mutans*. *Mol Oral Microbiol*, 2014.
7. Avila, M., Ojcius, D.M., Yilmaz, O. The oral microbiota: living with a permanent guest. *DNA Cell Biol*, 28: 405-411, 2009.
8. Sawada, S., Chosa, N., Ishisaki, A., Naruishi, K. Enhancement of gingival inflammation induced by synergism of IL-1beta and IL-6. *Biomed Res*, 34: 31-40, 2013.
9. Irshad, M., Scheres, N., Anssari Moin, D., Crielaard, W., Loos, B.G., Wismeijer, D., Laine, M.L. Cytokine and matrix metalloproteinase expression in fibroblasts from peri-implantitis lesions in response to viable *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontal Res*, 48: 647-656, 2013.
10. Ataseven, A., Bilgin, A.U., Kurtipek, G.S. The importance of neutrophil lymphocyte ratio in patients with psoriasis. *Mater Sociomed*, 26: 231-233, 2014.