

한련초 추출물의 치주염 개선 효과에 관한 연구

박준혁, 이해수, 양웅모
경희대학교한의과대학

The effects of *Eclipta Prostrata* L.(*Ecliptae Herba*) on periodontitis rats

Jun Hyuk Park, Haesu Lee, Woong Mo Yang

Department of Convergence Korean Medical Science, College of Korean Medicine, Kyung Hee University

Objectives: Periodontitis is an inflammatory disease with the destruction of periodontal ligament, alveolar bone loss and inflammation of gingiva, leading to teeth loss. *Eclipta prostrata* L. (*Ecliptae Herba*) has been used to treat the inflammatory disease as a Korean traditional medicine. The aim of this study is to investigate the effects of *E. prostrata* L. on periodontitis.

Methods: *E. prostrata* L. was extracted with water and lyophilized. The aqueous extract of *E. prostrata* L. (EP) was topically applied to the periodontal lesion for 2 weeks. To induce the periodontitis, a 3-0 nylon ligature was placed around the cervix of the lower first molar in rat. Rats were divided into 3 groups (n = 7); NL group (non-ligatured and non-treated), L group (ligatured and vehicle-treated) and EP group (ligatured and EP-treated). After sacrifice, the mandibles was dissected and stained with methylene blue solution to analyze the alveolar bone loss. The expression of MMP-9 was determined in gingival tissues. To confirm the effect of EP on recovery of gingiva, mRNA expressions of type I pro-collagen and MMP-9 levels were investigated in LPS-treated HS68 fibroblast cells. In addition, inflammatory mediators were evaluated in LPS-treated RAW264.7 cells.

Results: Alveolar bone loss was significantly inhibited by EP treatment. The mRNA expression of MMP-9 was attenuated in rats treated with EP. In addition, treatment with EP increased the expression of type I pro-collagen, while the expression of MMP-9 was decreased in LPS-stimulated HS68 fibroblast cells. Furthermore, EP down-regulated the LPS-induced IL-6, TNF- α , COX-2 and iNOS production in RAW264.7 cells.

Conclusions: These results suggest that EP have ameliorative effects on periodontitis through inhibiting alveolar bone loss and modulating the inflammatory mediators. Therefore, *E. prostrata* L. may be an alternative on patients with periodontitis.

Key Words : *Eclipta prostrata* L., periodontitis, MMP-9, collagen, inflammation

서론

치주질환은 치은염, 치주염으로 분류되며, 치주염은 치아를 지지하고 있는 주위 조직에 염증이 발생하는 질환으로 염증이 잇몸에 국한된 치은염이 악화되어 발병한다¹⁾. 치주염은 오랜 기간에 걸쳐 진행되

며, 심각한 치주 조직의 파괴 및 잇몸 염증, 치주낭 깊이 증가, 잇몸 출혈, 치아 흔들림 등의 증상이 나타난다²⁾. 보건복지부 국민건강영양조사에 따르면 치주질환은 2016년 만 19세 이상 성인에게서 29.8%의 유병률을 보이며 30세 이상 성인에게서 35.4%의 높은 유병률을 보이는 것으로 보고되었다³⁾.

• Received : 20 November 2017 • Revised : 7 March 2018 • Accepted : 26 March 2018
• Correspondence to : 양웅모(Woong Mo Yang)
서울시 동대문구 회기동 1번지 경희대학교한의과대학
Tel : +82-2-961-2209, E-mail : wmyang@khu.ac.kr

치아 표면에 부착된 탄수화물 층과 결합한 생물막을 치태(plaque)라고 하며, 치태 내의 세균은 빠르게 증식하여 주변 조직과 치아 지지 조직에 염증, 즉, 치주염을 유발한다⁴⁾. 치태 내 세균에 의한 반복적인 감염과 이에 따른 만성 염증은 콜라겐분해 효소 및 염증매개물질의 분비를 촉진한다⁵⁾. 치주 조직으로부터 유래된 pro-inflammatory mediator와 Matrix metalloproteinase (MMPs)와 같은 단백분해효소를 포함하는 cytokine이 결합 조직과 골의 대사를 변화시켜 치주 인대의 파괴와 치조골의 흡수를 일으킨다⁶⁾.

현재 치주질환의 치료를 위하여 임상에서는 스케일링이나 치근활택술과 같이 치아 주변의 병원성 세균을 물리적으로 제거하는 방법이 사용된다⁷⁾. 다만, 염증반응을 일으키는 일부 세균들은 연조직이나 해부학적으로 접근하기 어려운 곳에 위치하기 때문에 염증반응을 완전히 제거하지 못하는 한계점이 있다⁸⁾. 따라서 항생제와 항균제가 보조적으로 사용되고 있으나, 장기 사용으로 인한 위장 과민증, 세균의 항생제 내성 증가와 같은 부작용으로 인해 제한적으로 사용된다^{9,10)}. 이러한 한계점을 극복하기 위하여 최근 치주 질환의 예방과 치료에 효과적이면서 장기 사용에도 부작용이 적은 천연물 치료제에 대한 관심이 증가하고 있다.

<東醫寶鑑> 外形篇卷之二牙·齒門에서는 齒痛, 有風熱·風冷·熱痛·寒痛·毒痰·瘀血·蟲蝕이라 하여 치통의 종류를 구분하였으며 통증과 출혈, 치아의 손실 등 치주염의 증상을 언급하고 있다¹¹⁾. 旱蓮草(Ecliptae Herba)는 국화과(菊科, Compositae)에 속한 一年生本草인 *Eclipta prostrata* Linné의 전초로, 한국, 중국, 일본을 비롯한 여러 아시아 국가에 널리 분포하며 전통적인 약재로 사용되어왔다. 여름과 가을에 채취하여 햇볕이나 그늘에서 말려 사용하며性は 寒하고, 味는 甘酸하며 補腎益陰, 涼血止血의 효과가 있다. 주로 牙齒鬆動, 鬚髮早白, 眩暈耳鳴, 牛膝酸軟, 陰虛血熱, 衄血, 尿血, 血痢, 崩漏下血, 外傷出血등에 內服과 外用하여 활용되어 왔으며 肝火旺으로 인한 出血등과 같은 肝腎陰虛證에 사용하는 약재

이다¹²⁾. 한련초의 대표적인 성분으로는 ecliptin, wedelolactone, phytosteroid, saponin, α -terthienylmethanol 등이 있으며, wedelolactone은 NF- κ B 조절 작용을 통해 항염증 효과가 있는 것으로 알려져 있다¹³⁾. 또한, 최근 연구에 따르면 동물 실험에서 한련초 추출물의 경구 투여시 항염증 효과를 확인하였으며, RAW264.7 대식 세포주를 대상으로 한 세포 실험 결과 iNOS 및 COX-2 mRNA 발현의 하향 조절을 통한 NO 및 PGE2 방출 억제 효과로 항염증 작용을 나타내는 것으로 보고된 바 있다^{14,15)}. 그러나 한련초 추출물이 치주 질환 개선 효과에 관한 연구는 보고되지 않았다.

따라서 본 연구에서는 치주염을 유발한 동물모델에서 한련초 추출물 처리 후, 치주조직의 재생 능력 및 항염 효능을 통한 치주염 개선 효능과 그에 따른 분자학적 작용 기전을 평가하였다.

실험 재료 및 방법

1. 약물의 조제

경상북도 영천에서 채취하여 완전 건조한 한련초(*Eclipta prostrata* L.) 지상부를 정도생약국(Seoul, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 한련초 50g을 500 ml의 증류수에 넣은 후 상온에서 24시간 동안 추출하였다. 추출이 된 여액은 여과지(Quantitative filter paper, 185mm)로 불순물을 제거하고, 감압 농축 후 동결 건조하여 4.56g의 한련초 동결 건조품을 얻었다(yield rate: 9.12%). 최종 동결 건조품인 한련초 추출물표본(Voucher specimen: #EPW100)은 -20°C에 보관 하였다. 실험에 사용된 한련초 동결 건조품은 샘플의 점도를 향상시키기 위해 처리 직전 1% carboxymethyl cellulose에 혼합되어 사용되었다¹⁶⁾.

2. 실험동물

실험동물은 7 주령 수컷 Sprague-Dawley계 백서를 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 동물 실험 과정은 경희대학교 동물실험윤리위원회의 승인 (Permit Number: KHUASP(SE)-16-045)을 받아 National Institutes of Health의 실험동물관리 규정 (Principle of Laboratory Animal Care)에 의거하여 수행되었다.

3. 치주염 실험 모델 유발 및 샘플 처리

실험동물은 치주염을 유발하지 않은 정상대조군 (NL, non-ligatured and non-treated), 치주염을 유발한 음성대조군(L, ligatured and vehicle-treated), 치주염 유발과 한련초 추출물을 처리한 샘플 처리군 (EP, ligatured and Eclipta prostrata-treated)으로 그룹 당 7 마리씩 3개의 군으로 나누었다. 정상대조군을 제외한 모든 그룹의 백서는 tiletamine/zolazepam 혼합액(Zoletil 50, Virbac Lab, Carroscedex, France)으로 전신 마취 후 하악 제 1 대구치에 멸균된 봉합사(3-0, nylon thread)로 결찰하여 치주염을 유발하였다(Fig. 1). 이후 샘플 처리군에는 치주염이 유발된 동일 부위에 한련초 추출물(100mg/ml, in 1% carboxymethyl cellulose)을 100 μ L씩 도포하였으며, 정상대조군과 음성대조군에는 1% carboxymethyl cellulose가 포함된 증류수를 동일하게 100 μ L씩 도포하였다. 샘플 처리 및 대조군 처리는 하루에 한 번씩 2 주 동안 처리 되었다. 2 주 후 백서를 희생하여 획득한 치조골에서 조직형태학적, 분자학적 지표를 분

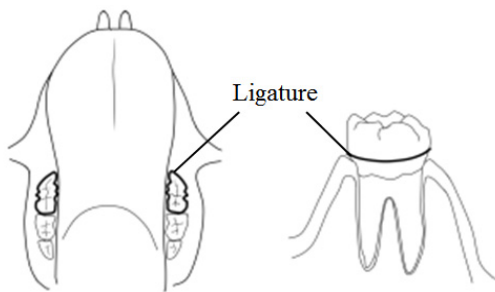


Fig. 1. Experimental design for induction of periodontitis. Ligature was placed around the cervix of the bilateral mandibular first molars of rats.

석하였다.

4. 치조골 소실(alveolar bone loss) 평가

백서로부터 분리된 좌측 하악골은 끓인 증류수에 담가 주변조직을 불린 후 정리하고, 10% paraformaldehyde에서 24시간 동안 조직을 고정하였다. 충분히 고정된 하악골을 완전히 건조를 시킨 후, 1% aqueous methylene blue (Sigma, USA)로 5분 동안 염색 하였다. 염색된 좌측 하악골은 스마트 현미경(Canon digital camera, 100mm macro lens)에 의해 촬영되었다. 치조골의 손실(alveolar bone loss, ABL)의 평가를 위해 첫 번째 대구치 3개의 뿌리 축을 치아의 시멘트질과 에나멜질의 경계(cementoenamel junction, CEJ)에서 (alveolar bone crest, ABC)까지의 거리를 Image J (NIH, Bethesda, USA)로 측정하였다.

5. HS68 섬유아세포 배양 및 샘플 처리

HS68 섬유아세포(human foreskin fibroblast)는 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco)에 10% Fetal bovine serum (FBS, Gibco)과 1% penicillin-streptomycin (Gibco)이 함유된 배지에서 2 \times 10⁵/ml 농도로 6 well plate에 분주 후 24시간 동안 안정화하였다. Serum-free DMEM 배지에 한련초 추출물을 100 μ g/ml로 하여 처리하고 2시간 후 정상대조군을 제외하고 lipopolysaccharide (LPS) 1 μ g/ml를 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 처리가 완료된 세포는 기존 배지를 제거한 후 차가운 phosphate Buffer Solution (PBS)로 세척 후 RNA 추출에 사용되었다.

6. RNA 추출

분리된 잇몸조직(gingiva)과 HS68 섬유아세포의 ribonucleic acid (RNA)추출을 위해 각각의 얻어진 조직에 1ml의 TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 첨가하여 분쇄하였다. 분쇄된 잇몸 조직과 HS68 섬유아세포는 각각 chloroform 200 μ l (per 1ml of Trizol)을 넣고 약 15초간 inverting 하였다. 원심

분리(12,000rpm, 5min)하여 상층액을 걷어 isopropanol 과 혼합 후, 다시 원심 분리(12,000rpm, 10min)하여 RNA pellet을 모았다. 얻어진 RNA pellet을 75% 에 탄올 1ml로 세척하고, 원심분리(12,000rpm, 10min) 후 상층액을 제거 후 최종 RNA pellet을 얻었다. 추출된 각각의 RNA pellet을 diethyl pyrocarbonate 용액에 녹여 microplate reading instrument (Molecular Devices, PA)로 농도와 순도(260nm/280nm)를 측정하였다.

7. 역전사 중합 연쇄반응(Reverse transcription polymerase chain reaction)

잇몸조직 및 HS68 섬유아세포에서 얻어진 총 1µg RNA를 cDNA synthesis kits (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA) 제조사의 지시에 따라 샘플을 만들어 45°C에서 60분, 90°C에서 5분의 과정을 거쳐 complementary DNA (cDNA) 합성을 하였다. 합성된 cDNA로부터 MMP-9, 제1형 프로콜라겐과 GAPDH 를 증폭시키기 위하여 Maxime PCR PreMix Kit (iNtRON, biotechnology, Korea)를 사용하였다. PCR PreMix Kit 튜브에 2µl cDNA, 2µl 5'primer와 2µl 3'primer, 14µl 증류수 혼합하여 thermal cycler (Perkin Elmer 2400, USA)에서 증폭되었다. MMP-9 은 94°C에서 20초, 55°C에서 30초, 72°C에서 2분, 35 cycle, 제1형 프로콜라겐은 94°C에서 20초, 51.4°C 에서 30초, 72°C에서 2분, 40 cycle, GAPDH는 94° 에서 20초, 60°C에서 30초, 72°C에서 2분, 35 cycle 으로 실행되었다. Polymerase chain reaction (PCR) 에 사용된 sequences는 Table 1과 같다. 증폭된 cDNA는 1% agarose gel에서 전기영동하고 ethidium

bromide로 염색하여 matrix metalloproteinases (MMP)-9, 제1형 프로콜라겐(Type I pro-collagen), GAPDH band를 확인 하였다. 각각의 mRNA 발현정도는 Image J (NIH, Bethesda, USA)에 의해 측정되었으며, GAPDH를 loading control로 사용하여 정량하였다.

8. 효소면역분석법 (Enzyme-linked immunosorbent assay)

RAW264.7 cells은 DMEM에 10% FBS와 1% PS 가 함유된 배지에서 2×10⁵/ml 농도로 6 well plate에 분주하여 배양하였다. 기존 배지를 제거 후 한련초 추출물 100µg/ml을 serum-free DMEM 배지에 녹여 2시간 처리 후, 정상대조군을 제외한 LPS군과 한련초 추출물군에 1µg/ml LPS를 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 정상대조군, LPS 단독처리군, 한련초 추출물과 LPS가 처리군의 각각의 배지를 12,000 rpm 에서 3분간 원심 분리한 상층액(cell culture supernatant)에서 인터루킨-6와 TNF-α를 측정하였다. 인터루킨(interleukin)-6와 tumor necrosis factor (TNF)-α enzyme-linked immunosorbent assay kit (BD Biosciences, Inc., CA)을 이용하여 측정하였다. 인터루킨-6, TNF-α capture antibody를 각각의 coating buffer로 희석하여 분주하고 냉장상태로 overnight 하였다. Wash buffer (0.05% tween-20 in 1×PBS)를 이용하여 plate를 3회 세척 후 blocking serum (10% FBS in 1X PBS) 200µl씩 분주하여 실온에 2시간 동안 비특이적 결합을 차단하였다. 각각의 standard와 세포의 상등액을 각각 100µl/well로 분주하고 상온에서 2시간 반응시켰다. Plate를 세척

Table 1. RT-PCR Sequence of Target Designed by the Software of Applied Bioscience Prism 7000 System.

Target gene	Amino acid sequences	Amplicon size (bp)
MMP-9	(forward) GGG ACG CAG ACA TCG TCA TC (reverse) TCG TCA TCG TCG AAA TGG GC	300-500
Type I pro-collagen	(forward) TCT ACT GGC GAA ACC TGT ATC CG (reverse) CAA GGA AGG GCA GGC GTG AT	2000
GAPDH	(forward) CCA TCA TCT TCC AGG AG (reverse) CCT GCT TCA CCA CCT TCT TG	576

후, 10% FBS in 1X PBS에 horseradish peroxidase가 결합된 인터루킨-6와 TNF- α 항체를 희석하여 100 μ l 첨가하고 실온에서 1시간 반응시켰다. TMB (substrate reagent set A: B=1:1) 100 μ l 씩 분주한 후 약 30분 동안 발색 정도를 확인하여 stop solution (2M H₂SOP₄)으로 반응을 종료하였다. 반응이 종료된 후, 인터루킨-6과 TNF- α cytokine의 농도는 microplate reading instrument (Molecular Devices, PA)를 이용하여 450nm 파장에서 분석되었으며, 표준 흡광도 값으로부터 얻어진 선형 회귀식을 이용하여 계산하였다.

9. Western blotting assay

RAW264.7 cells은 2 \times 10⁵/ml 농도로 6 well plate에 분주하였다. 세포가 충분히 안정화된 후 serum-free DMEM에 한련초 추출물 100 μ l/ml을 처리하고, 2시간 후 정상대조군을 제외한 LPS군과 한련초 추출물군에 1 μ g/ml LPS를 4시간 처리하였다. 기존 배지의 제거 후 세포를 ice PBS로 3회 세척한 후, 1ml trypsin-EDTA로 부착된 세포를 걷어 내고, 원심분리(15,000rpm, 15min)하여 세포를 수집하였다. 얻어진 세포에 protease inhibitor가 들어간 RIPA buffer [50mM Tris-HCl (pH 7.5), 150mM NaCl, 2mM EDTA, 1mM EGTA, 1mM NaVO₃ 10mM NaR 1% Nonidet P40, 1mM dithiothreitol, 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride] 300 μ l를 넣어 용해시켰다. 원심분리(15,000rpm, 15min)하여 얻은 상층액은 bovine serum albumin (BSA)로 표준화하여 정량하였다. 30 μ g의 단백질을 10% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis에서 전기 영동하여 분리하고, polyvinyl difluoride membrane (Bio-Rad, USA)에 300mA로 2시간 동안 transfer하였다. Membrane의 blocking은 5% BSA가 함유된 TBST (TBS in 0.1% Tween 20)로 상온에서 2시간 동안 실시하였다. Cyclooxygenase (COX)-2, iNOS의 발현량을 측정하기 위해 1차 항체로서 anti-mouse

COX-2, inducible nitric oxide synthase (iNOS), β -actin (1:1000, Santa-Cruz, USA)을 TBST 용액에서 희석하여 4°C에서 overnight 반응시킨 후 TBST로 세정하였다. 2차 항체로 horseradish peroxidase가 결합된 anti-mouse IgG (1:2000, Santa-Cruz, USA)를 상온에서 2시간 반응시켰다. Enhanced chemiluminescence detection reagent (Amersham Pharmacia, NJ, USA)과 반응시킨 후 LAS 4,000 기기로 촬영되었다. COX-2, iNOS 단백질의 발현양은 Image J (NIH, Bethesda, USA)로 측정되었으며, β -actin을 loading control로 사용하였다.

9. 통계처리

실험결과와 모든 분석은 각 그룹의 측정값을 평균 \pm 표준오차(mean \pm standard error) 값으로 표시 하였다. 통계적 분석은 ANOVA (analysis of variance)을 이용하여 Dunnett's test를 사용하였다. p 값이 0.05 미만인 경우 통계적으로 유의성을 인정하였다.

결 과

1. 한련초 추출물이 치조골 소실 회복에 미치는 영향

치주염 유발에 따라 음성대조군(L, 1.74 \pm 0.16mm)은 정상대조군(NL, 1.35 \pm 0.13mm)에 비해 치조골의 손상이 증가되었다(^{###} $p < 0.001$). 이에 반해, 한련초 추출물(EP) 처리군의 치조골 손상은 1.62 \pm 0.16mm로 치주염 유발한 군(L)에 비해 유의적으로 억제되었다(Fig. 2, ^{**} $p < 0.01$).

2. 한련초 추출물의 잇몸조직 내 MMP-9 mRNA 발현 저해 효능

치주염이 유발된 백서의 잇몸조직에서 세포외 기질을 파괴하는 MMP-9 mRNA의 발현은 정상대조군(NL)군 비해 약 2.2배 유의하게 증가 하였다(^{###} $p < 0.001$). 한련초 추출물의 외용 도포는 치주염 유도도

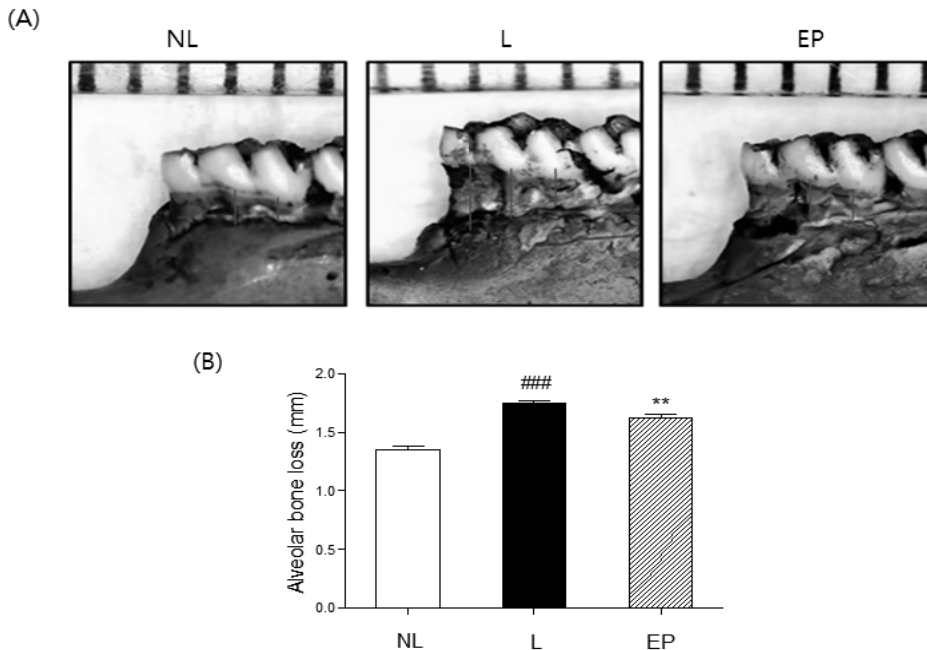


Fig. 2. Effects of EP on alveolar bone loss. (A) Representative images and (B) quantified values of alveolar bone loss. The red lines represent the distance from the cemento-enamel junction to the alveolar bone crest. ^{###} $p < 0.001$ vs. NL; ^{**} $p < 0.01$ vs. L. NL, non-ligatured and non-treated; L, ligatured and vehicle-treated; EP, ligatured and Eclipta prostrata-treated.

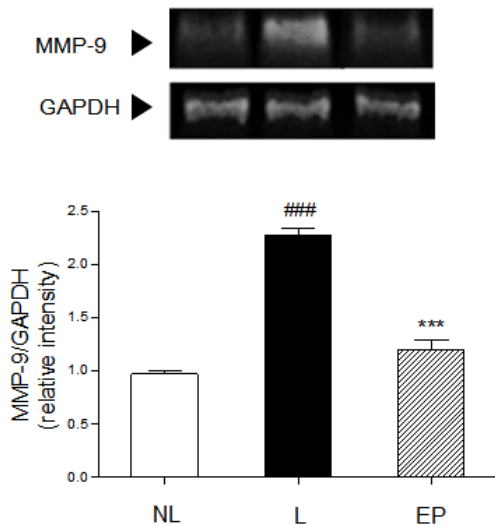


Fig. 3. Effects of EP on the MMP-9 expression in gingival tissues. GAPDH has been used as loading control. ^{###} $p < 0.001$ vs. NL; ^{***} $p < 0.001$ vs. L. NL, non-ligatured and non-treated; L, ligatured and vehicle-treated; EP, ligatured and Eclipta prostrata-treated.

인한 MMP-9 mRNA의 증가를 유의적으로 감소시켰다(Fig. 3, ^{***} $p < 0.001$).

3. 한련초 추출물의 type I collagen 및 MMP-9 mRNA 발현 저해 효능

HS68 섬유아세포에서 LPS 자극 후 세포외 기질을 구성하는 제1형 프로콜라겐 mRNA 및 세포 외 기질을 파괴하는 MMP-9의 발현을 측정하였다. LPS 처리 시 정상군에 비해 제1형 프로콜라겐 mRNA 발현이 유의하게 감소되었으며(^{###} $p < 0.001$), 한련초 추출물 처리군에서 감소된 제1형 프로콜라겐 mRNA의 발현은 유의적으로 약 2.6배 증가되었다(Fig. 4A, ^{***} $p < 0.001$).

또한, LPS 처리군에서 MMP-9 mRNA의 발현이 증가되었으며([#] $p < 0.01$), 한련초 추출물 처리에 의해 MMP-9의 발현이 약 36% 억제되었다(Fig. 4B, ^{*} $p <$

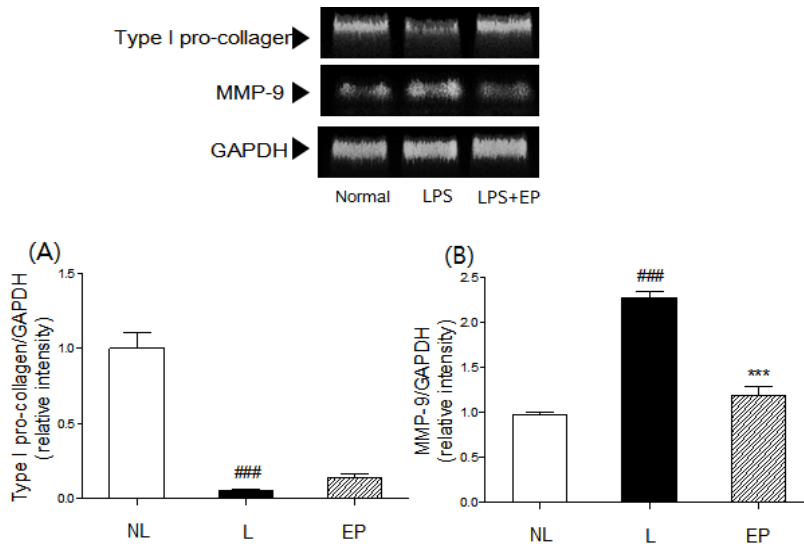


Fig. 4. Effects of EP on the expressions of type I pro-collagen and MMP-9 in LPS-stimulated HS68 fibroblast cells, (A) Type I pro-collagen and (B) MMP-9 expressions, GAPDH has been used as loading control. ### $p < 0.001$ vs. normal; *** $p < 0.001$ or * $p < 0.05$ vs. LPS, EP; Eclipta prostrata L. extract.

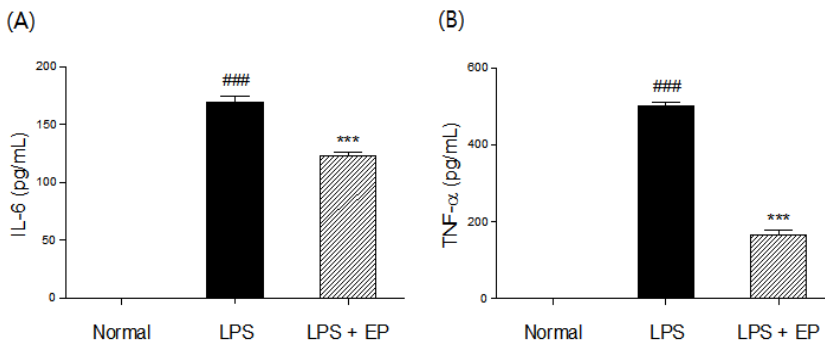


Fig. 5. Effects of EP on the expressions of IL-6 and TNF- α in LPS-stimulated RAW264.7 macrophage cells, (A) IL-6 and (B) TNF- α expressions, ### $p < 0.001$ vs. normal; *** $p < 0.001$ vs. LPS, EP; Eclipta prostrata L. extract.

0.05).

4. 한련초 추출물의 인터루킨-6 및 TNF- α 발현 저해 효능

한련초 추출물이 염증 반응에 미치는 영향을 확인하기 위해, RAW264.7 대식세포에 LPS로 자극 후 배양액 내의 전염증성 사이토카인 인터루킨-6 및 TNF- α 의 발현을 측정하였다. 인터루킨-6의 경우,

LPS 단독 처리군은 169.2 ± 10.5 pg/ml로 normal군에 비해 증가되었으며(### $p < 0.001$), 한련초 추출물 처리군에서 122.9 ± 6.8 pg/ml로 약 27.4% 감소되었다 (Fig. 5A, ** $p < 0.001$).

TNF- α 의 경우, 정상군에 비해 LPS에 염증 유발시 TNF- α 의 발현이 유의적으로 증가되었으며 (501.4 ± 21.6 , ### $p < 0.001$), 한련초 추출물 처리군에서 약 66.6%의 감소율을 나타내었다(167.3 ± 24.4 , Fig. 5B,

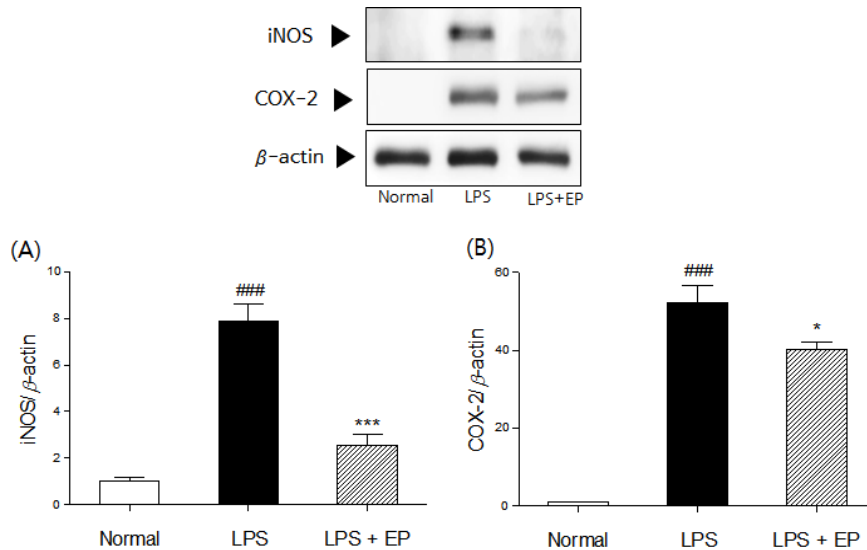


Fig. 6. Effects of EP on the expressions of iNOS and COX-2 in LPS-stimulated RAW264,7 macrophage cells, (A) iNOS and (B) COX-2 expressions, β -actin has been used as loading control, ### $p < 0.001$ vs, normal; *** $p < 0.001$ vs, LPS; * $p < 0.05$ vs, LPS, EP; Eclipta prostrata L, extract.

*** $p < 0.001$).

5. 한련초 추출물의 iNOS와 COX-2 단백질 발현 저해 효능

LPS로 유도된 RAW264.7 대식세포에서 한련초 추출물 처리가 iNOS, COX-2의 단백질 발현에 미치는 영향을 측정하였다. iNOS 발현은 정상군에 비해 LPS 처리군에서 약 8배 증가하였으며, 한련초 추출물 처리군에서 LPS로 유도된 iNOS 단백질 발현이 유의적으로 억제되었다(Fig. 6A, *** $p < 0.001$).

COX-2 단백질 발현 또한 LPS 처리군에서 정상군에 비해 유의적인 증가를 나타내었으며, LPS로 유도된 COX-2의 과발현은 한련초 추출물 처리에 의해 감소된 것을 확인하였다(Fig. 6B, * $p < 0.05$).

고 찰

본 실험은 한련초의 치주염 개선 효과를 확인하기 위해, 1번 대구치 치경부에 멸균된 나일론실을 묶어 치주염을 유발한 랫드를 사용하였다. 치실 결찰에 의

해 약화된 조직은 세균 증식 및 치태 형성을 촉진해 면역반응을 일으키고 이는 치조골 손실로 이어진다¹⁷⁾. 치조골 손실 정도는 치주염의 심각도를 측정하는 지표 중 하나이다¹⁸⁾. 본 실험에서는 치주염의 심각도를 측정하기 위해 쥐 어금니의 법랑질-시멘트 경계부(CEJ)에서 치조성까지의 거리를 측정하여 치조골 손실 정도를 조사하였다. 실험 결과, 한련초 추출물 외용 도포 처리는 치주염 유발로 증가된 치조골 손실 정도를 유의하게 회복시켰다.

치주질환에서는 일부 특정 세균에 의해 염증 반응 등이 유도되어 비활성형의 콜라게나제(collagenase)를 활성화시키거나 콜라게나제와 다른 MMPs의 분비를 자극하는 등의 반응이 일어난다. 그 중에서도 콜라겐분해효소 중 하나인 MMP-9는 염증성 질환에서 조직 파괴 과정에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다¹⁹⁾. MMP-9는 파립구, 대식세포, 섬유아세포, 상피세포, 구강 내 병원성 세균 등으로부터 유래되며, 치주염이 진행되어 염증이 발생하면 MMP-9의 발현이 증가한다^{19,20)}. 대부분의 치조골 소실은 MMPs와 같은 파괴적인 효소 또는 인테루킨과 같은 염증

매개물질에 의해 촉발되는 염증반응에 의해 일어나게 된다²¹⁾. 따라서 MMP-9의 억제와 같은 요인들은 치주염의 병리기전을 파악하는데 중요하게 작용할 뿐 아니라 치료 전략과도 직접적인 관련이 있다고 할 수 있다²²⁾. 본 연구에서는 랫드의 치은 조직에서 MMP-9의 발현 정도를 비교해보았다. 실험 결과 정상군에 비해 치주염 유발군에서 MMP-9의 발현이 유의하게 증가하였으며, 한련초 외용도포 처리군에서는 치주염 유발군에 비해 MMP-9의 발현이 유의하게 억제되는 것을 확인할 수 있었다.

제1형 프로콜라겐은 치주인대의 세포 외 기질에 존재하는 주된 단백질이다²³⁾. 치조골 골형성 과정에서 치주인대의 대부분을 구성하는 섬유아세포의 콜라겐 분자 생성은 필수적이다^{24,25)}. 또한, 치주인대 내의 콜라겐 섬유를 용해하여 치주 결합의 손실을 일으키는 MMP-9도 치주염 진행에 관여된다²⁶⁾. 본 연구에서는 HS68 섬유아세포를 LPS로 자극하여 제1형 프로콜라겐 단백질과 MMP-9의 발현을 비교하였다. 실험 결과 정상군에 비해 LPS군에서 제1형 프로콜라겐 발현이 유의하게 감소하였으며, 한련초 추출물 처리군에서 LPS군에 비해 제1형 프로콜라겐 발현이 유의하게 증가하는 것으로 나타났다. 또한, LPS에 자극된 섬유아세포에서 정상군에 비해 MMP-9의 발현이 유의하게 증가하였으며, 한련초 추출물 처리에 의해 LPS로 유도된 MMP-9의 발현은 유의하게 감소되었다. 이를 통해, 한련초 추출물의 잇몸 조직 분해 억제 및 합성 촉진 효능을 확인하였다.

인터루킨-6와 TNF- α 등은 일반적으로 염증성 사이토카인으로 분류되며 염증반응에 관여할 뿐 아니라 치조골의 재흡수를 촉진하기 때문에 치주염의 발병과 진행에 밀접한 관련이 있다²⁷⁾. 인터루킨-6은 다기능성 사이토카인으로 T 림프구나 대식세포에서 분비되어 초기 면역반응에 관여한다²⁸⁾. 기존 연구에 따르면 치주염 유발 모델에서 일어난 염증반응에서 인터루킨-6의 농도는 유의하게 상승하는 것이 관찰된다²⁹⁾. 또한, 치주염 환자들의 치은열구액(Gingival Crevicular Fluid) 내에서 인터루킨-6 및 TNF- α 의 농도가 증가되어 있는 것으로 관찰된다^{30,31)}. TNF- α 는

치주염 초기 염증성 사이토카인 중 하나로 주로 단핵구나 대식세포에서 분비되며 골 대사를 촉진해 치조골의 손실을 유발한다³²⁾. 본 연구에서 LPS로 활성화된 RAW264.7 대식세포의 인터루킨-6과 TNF- α 의 발현을 비교해보았다. 실험결과 LPS군에서 정상군에 비해 유의하게 높은 인터루킨-6과 TNF- α 발현이 관찰되었으며, 한련초 처리군에서 유의하게 억제되었다.

iNOS와 COX-2는 세포자멸, 종양형성, 자가 면역 및 염증반응에 중요한 역할을 하는 산화 매개 물질이다³³⁾. Nitric oxide (NO)는 혈관 확장, 신경 전달 및 숙주 방어와 같은 다양한 생리기능의 조절에 중요한 분자이다^{34,35)}. 유도형 NO 생성효소인 iNOS는 대식세포에서 발현되어 다량의 NO의 형성과 방출을 촉진하며 염증 반응과 밀접한 관련이 있어 질병의 병리생리에 중요한 역할을 한다³⁶⁾. 염증성 사이토카인에 의해 유도된 섬유아세포 모델이나 치주염 유발 흰쥐 모델에서 NO의 증가가 관찰되며, 이는 NO와 치주염과의 연관성을 뒷받침한다³⁷⁾. COX-2는 염증 부위에서 염증 유발 사이토카인에 의해 대식세포 및 내피세포에서 유도돼 프로스타글란딘 E2의 합성을 담당한다³⁸⁾. 기존 연구에 따르면 COX-2의 발현은 염증이 있는 치주 조직에서 유의하게 증가하는 것으로 나타난다³⁹⁾. 또한, 선택적 COX-2 억제는 실험적으로 유도된 쥐의 치주염 진행을 조절할 수 있다는 것이 알려져 있다⁴⁰⁾. 따라서 iNOS 및 COX-2의 발현 수준은 염증의 정도를 반영하며 염증 과정에 대한 약물의 효과를 평가하는 수단으로 사용할 수 있다. 본 연구의 실험 결과 LPS로 활성화된 RAW264.7 대식 세포에서 정상군에 비해 COX-2와 iNOS 발현이 유의하게 높았으며, 한련초 처리군에서 유의하게 억제되었다.

결론

1. 한련초 추출물의 외용도포로 인한 치조골 손실 감소
2. 한련초 추출물의 외용도포로 인한 치주 조직 내 MMP-9 발현 감소

3. LPS로 자극된 섬유아세포 내 한련초 추출물로 인한 제1형 프로콜라겐 증가 및 MMP-9 감소
4. LPS로 자극된 RAW264.7 대식세포 내 한련초 추출물로 인한 인터루킨-6, TNF- α , COX-2 및 iNOS 발현 감소

결론적으로 한련초는 치주질환에서 치조골 손실 개선 효능을 보였으며, 향후 치주질환에 대한 외용 치료 소재로의 활용 가능성을 보였다.

참고문헌

1. Petersen PE, Ogawa H. The global burden of periodontal disease: towards integration with chronic disease prevention and control. *Periodontology* 2000. 2012;60(1):15-39.
2. Renvert S, Persson GR. A systematic review on the use of residual probing depth, bleeding on probing and furcation status following initial periodontal therapy to predict further attachment and tooth loss. *Journal of clinical periodontology*. 2002;29(3):82-89.
3. Korea National Health and Nutrition Examination Survey. Ministry of Health, Welfare and Family Affairs. 2015.
4. Bartold PM, Van Dyke TE. Periodontitis: a host-mediated disruption of microbial homeostasis. *Unlearning learned concepts*. *Periodontology* 2000. 2013;62(1):203-217.
5. Socransky SS, Haffajee AD. Evidence of bacterial etiology: a historical perspective. *Periodontology* 2000. 1994;5(1):7-25.
6. Boyce BE, Li P, Yao Z, Zhang Q, Badell IR, Schwarz EM, et al. TNF- α and pathologic bone resorption. *The Keio journal of medicine*. 2005;54(3):127-131.
7. Apatzidou DA, Kinane DF. Nonsurgical mechanical treatment strategies for periodontal disease. *Dental Clinics of North America*. 2010;54(1):1-12.
8. Winkelhoff AJV, Rams TE, Slots J. Systemic antibiotic therapy in periodontics. *Periodontology* 2000. 1996;10(1):45-78.
9. Quirynen M, Teughels W, Soete MD, Steenberghe DV. Topical antiseptics and antibiotics in the initial therapy of chronic adult periodontitis: microbiological aspects. *Periodontology* 2000. 2002;28(1):72-90.
10. Kapoor A, Malhotra R, Grover V, Grover D. Systemic antibiotic therapy in periodontics. *Dental research journal*. 2012;9(5):505.
11. Heo J. Donguibogam. 1st ed. Seoul: Bubinmunhwasa. 1999:617-632.
12. Editing commission of herbal medicine. *Herbal medicine*. 1st ed. Seoul: Youngrimsa. 2010:658.
13. Yuan F, Chen J, Sun PP, Guan S, Xu J. Wedelolactone inhibits LPS-induced pro-inflammation via NF- κ B pathway in RAW264.7 cells. *Journal of biomedical science*. 2013;20(1):84.
14. Arunachalam, G, Subramanian N, Pazhani GP, Ravichandran V. Anti-inflammatory activity of methanolic extract of *Eclipta prostrata* L (Asteraceae). *African journal of pharmacy and pharmacology*. 2009;3(3):097-100.
15. Tewtrakul S, Subhadhirasakul S, Tansakul P, Cheenpracha S, Karalai C. Antiinflammatory constituents from *Eclipta prostrata* using RAW 264.7 macrophage cells. *Phytotherapy research*. 2011;25(9):1313-1316.
16. Kim MH, Choi YY, Lee HJ, Lee HS, Park JC, Yang WM. Topical application of herbal formula for the treatment of ligature-induced periodontitis. *Journal of periodontal & implant science*. 2015;45(4):145-151.
17. Lohinai Z, Benedek P, Feher E, Gyor A, Rosival F, Fazeka IA, et al. Protective effects of

- mercaptoethylguanidine, a selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase, in ligature-induced periodontitis in the rat. *British journal of pharmacology*. 1998;123(3):353-360.
18. Mine T, Wactawski-Wende J, Grossi SG, Ho AW, Dunford R, Genco RJ. The relationship between bone mineral density and periodontitis in postmenopausal women. *Journal of Periodontology*. 2000;71(9):1492-1498.
 19. Makela M, Salo T, Uitto VJ, Larjava H. Matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) of the oral cavity: cellular origin and relationship to periodontal status. *Journal of dental research*. 1994;73(8):1397-1406.
 20. Marcaccini AM, Novaes Jr AB, Meschiari CA, Souza SL, Palioto DB, Sorgi CA, et al. Circulating matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) and MMP-9 are increased in chronic periodontal disease and decrease after non-surgical periodontal therapy. *Clinica Chimica Acta*. 2009;409(1): 117-122.
 21. Elavarasu S, Sekar S, Murugan T. Host modulation by therapeutic agents. *Journal of pharmacy & bioallied sciences*. 2012;4(Suppl 2):S256.
 22. Choi DH, Moon IS, Choi BK, Paik JW, Kim YS, Choi SH, et al. Effects of sub-antimicrobial dose doxycycline therapy on crevicular fluid MMP-8, and gingival tissue MMP-9, TIMP-1 and IL-6 levels in chronic periodontitis. *Journal of periodontal research*. 2004;39(1):20-26.
 23. Paul B, Sage H. Structurally distinct collagen types. *Annual review of biochemistry*. 1980; 49(1):957-1003.
 24. Bumann A, Carvalho RS, Schwarzer CL, Yen EHK. Collagen synthesis from human PDL cells following orthodontic tooth movement. *European journal of orthodontics*. 1997;19(1):29-37.
 25. Böhl MV, Maltha J, Hoff HVD, Muijpers-jagtman AM. Changes in the periodontal ligament after experimental tooth movement using high and low continuous forces in beagle dogs. *The Angle orthodontist*. 2004;74(1):16-25.
 26. Havemose-Poulsen A, Holmstrup P, Stoltze K, Birkedal-Hansen H. Dissolution of type I collagen fibrils by gingival fibroblasts isolated from patients of various periodontitis categories. *Journal of periodontal research*. 1998;33(3): 280-291.
 27. Okada H, Murakami S. Cytokine expression in periodontal health and disease. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*. 1998;9(3):248-266.
 28. Nibali L, Fedele S, Daiuto F, Donos N. Interleukin-6 in oral diseases: a review. *Oral diseases*. 2012;18(3):236-243.
 29. Matsuda Y, Katoo T, Takahashi N. Ligature-induced periodontitis in mice induces elevated levels of circulating interleukin-6 but shows only weak effects on adipose and liver tissues. *Journal of periodontal research*. 2016;51(5): 639-646.
 30. Geivelis M, Turner DW, Pederson ED, Lamberts BL. Measurements of interleukin-6 in gingival crevicular fluid from adults with destructive periodontal disease. *Journal of periodontology*. 1993;64(10):980-983.
 31. Rossomando EF, Kennedy JE, Hadjimichael J. Tumour necrosis factor alpha in gingival crevicular fluid as a possible indicator of periodontal disease in humans. *Archives of oral biology*. 1990;35(6):431-434.
 32. Boyce BE, Li P, Yao Z, Zhang Q, Badell IR, Schwarz EM, et al. TNF- α and pathologic bone resorption. *The Keio journal of medicine*. 2005;54(3):127-131.
 33. Lawrence T, Gilroy DW, Colville-Nash PR,

- Willoughby DA. Possible new role for NF- κ B in the resolution of inflammation. *Nature medicine*. 2001;7(12):1291-1297.
34. Moncada S, Palmer RML, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacological reviews*. 1991;43(2):109-142.
35. MacMicking J, Xie Q, Nathan C. Nitric oxide and macrophage function. *Annual review of immunology*. 1997;15(1):323-350.
36. Tunctan B, Uluda O, Altu S, Abacio N. Effects of nitric oxide synthase inhibition in lipopolysaccharide-induced sepsis in mice. *Pharmacological research*. 1998;38(5):405-411.
37. Daghigh F, Borghaei RC, Thornton RD, Bee JH. Human gingival fibroblasts produce nitric oxide in response to proinflammatory cytokines. *Journal of periodontology*. 2002;73(4):392-400.
38. Lohinai Z, Stachlewitz R, Virag L, Szekely AD, Hasko G, Szabo C. Evidence for reactive nitrogen species formation in the gingivomucosal tissue. *Journal of dental research*. 2001;80(2):470-475.
39. Morton RS, Dongari-Bagtzoglou AI. Cyclooxygenase-2 is upregulated in inflamed gingival tissues. *Journal of periodontology*. 2001;72(4):461-469.
40. Holzhausen M, Rossa Jr C, Marcantonio Jr E, Nassar PO, Spolidorio DMP, Spolidorio LC. Effect of selective cyclooxygenase-2 inhibition on the development of ligature-induced periodontitis in rats. *Journal of periodontology*. 2002;73(9):1030-1036.

ORCID

Jun Hyuk Park <https://orcid.org/0000-0003-4388-6190>

Haesu Lee <https://orcid.org/0000-0002-2750-8811>

Woong Mo Yang <https://orcid.org/0000-0001-5308-2386>