

두충 추출물의 잇몸상피세포 염증에 대한 항염증 효과

김예진¹ · 허 응¹ · 최한석¹ · 강기성² · 황귀서² · 백지윤³ · 구본암^{1*} · 김현영^{3*}

¹한국콜마 생명과학연구소, ²가천대학교 한의과대학, ³경남과학기술대학교 식품과학부

Anti-inflammatory Effect of *Eucommia Ulmoides* Oliver Bark Extract on *P.gingivalis* LPS-induced YD-38 Cells

Ye-Jin Kim¹, Woong Heo¹, Han-Seok Choi¹, Ki Sung Kang², Gwi Seo Hwang², Ji Yun Baek³,
Bon Am Koo^{1*}, and Hyun Young Kim^{3*}

¹Laboratory of Life Science Research, Korea Kolmar Corporation, Sejong-si 30003, Korea

²College of Korean Medicine, Gachon University, Seongnam 13120, Korea

³Department of Food Science, Gyeongnam National University of Science and Technology, Jinju 52725, Korea

Abstract – Periodontitis is a chronic inflammatory disease and gums pull away from the teeth and form spaces. The main goal of treatment is to control the infection and anti-inflammation. *Eucommia ulmoides* Oliv. Bark (EU) is a traditional Korean herbal used for the treatment of arthritis and hypertension. In the present study, we investigated the anti-inflammatory properties of EU in *Porphyromonas gingivalis*-LPS (LPS-PG) induced YD-38 epithelial cells. We observed significant inhibition of nitric oxide (NO) production and the expression of interleukin-8 (IL-8), interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor alpha (TNF- α), cyclooxygenase-2 (COX-2) in LPS-PG-induced YD-38 cells. These results support that EU has an anti-inflammatory effects for the treatment of periodontitis.

Keywords – Periodontitis, *Eucommia ulmoides* oliv. bark (EU), Anti-inflammation, *Porphyromonas gingivalis*-lps (LPS-PG), YD-38 cells

두충(*Eucommia ulmoides* Oliver. Bark, Du-zhong, EU)은 두충나무의 줄기껍질로서 주피를 제거하여 말린 약재로 우리나라 중부 이남에 서식하며, 15~20년 된 두충나무 껍질을 약으로 사용한다. 두충에는 lignin 계열 화합물 pinosiol glucoside, pinosinol, cycloolivil 성분과 iridoid 계열 화합물인 aucubin, ulmoside 등이 있으며, phenolic compounds, steroids, terpenoids 등이 보고되어 있고 그 외 다당류 및 아미노산 등을 함유하고 있다.¹⁾ 약리작용으로는 항노화, 혈압강하, 항비만, 항염, 항우울, 항근작용 등이 알려져 있다.²⁻⁷⁾ 또한 파골세포의 조절을 하여 근골을 강화시켜 골다공증 및 관절염에도 효과가 있다고 보고되고 있다.⁸⁾

치아는 우리 몸에서 유일하게 밖으로 돌출되어 있는 뼈이며 잇몸 밖으로 나와있는 부분은 범랑질과 상아질로 구성되어 있고 치아의 중심부는 신경과 혈관이 있으며 치아의 뿌리는 치조골과 잇몸으로 둘러 쌓여 있다.^{9,10)} 치아는 박테

리아에 의해 설탕, 전분 등이 분해되면서 생기는 산에 의하여 범랑질이 손상을 받게 되면서 치주질환을 야기한다.¹¹⁾ 입속의 세균의 종류는 500종에 달하고 이 세균 막을 치태(plaque)라 부르며 평균적으로 치태 1g당 1000억 마리 정도의 세균이 존재한다고 보고되고 있다.¹²⁾ 이러한 세균막인 치태가 쌓이게 되면 잇몸과 치아 사이에 틈이 벌어져 치주낭(periodontal pocket)이라는 주머니가 형성된다. 치주낭 내에 증식된 세균에 의해 잇몸에 염증을 일으키게 되고 만성염증에 의한(gingivitis), 치주염(periodontitis)과 같은 치주질환이 유발되게 된다.¹³⁾

치태 세균의 독소 물질 중 치주염을 유발하는 물질은 *gingivalis* bacterial 중 *Porphyromonas gingivalis*(*P.gingivalis*)로 치주세포에서 bacterial lipopolysaccharides (LPS)를 분비하여 염증반응을 일으키고 면역세포들에 의한 면역 반응으로 cytokines와 chemokines이 분비되게 된다. *P.gingivalis*-LPS(LPS-PG)에 의해 염증이 유도된 상피세포에서는 염증에 관련된 cytokines인 interleukin-8(IL-8)과 interleukin-6(IL-6), TNF- α 와 같은 유전자가 분비되어 구강

*교신저자(E-mail): hykim@gntech.ac.kr, bakoo9@kolmar.co.kr
(Tel): +82-55-751-3277, +82-44-860-6600

상피세포에 염증을 증가 시킨다고 보고되어있다.^{14,15)} 또한 염증반응에 중요한 기능을 수행하는 Prostaglandin(PG)이 세포분열이나 증식에 영향을 준다고 보고되어 있으며 PG의 생합성에 관여하는 중요한 효소인 cyclooxygenase(COX)에 의해 촉진된다.¹⁶⁾ COX는 두 종류의 isoenzyme으로 존재하며 COX-1과 COX-2로 존재하는데 COX-1은 house keeping gene으로 혈소판 응집, 위 점막의 세포보호기능, 신장의 정상기능을 유지하는 역할을 하고 반면에 COX-2는 정상세포 내에서 매우 낮은 상태로 유지 하다 염증과 같은 자극원에 의해 발현되며 COX-2의 과도한 발현은 백혈구, 혈관의 평활근세포, 류마티스 활액세포 등을 생성하게 된다.¹⁷⁾ 구강 내에서 이러한 염증이 증가되게 되면 치주염 및 치은염이 발생하게 되고 이러한 구강 내 염증은 치주염 뿐만 아니라 동맥경화증이나 관상동맥 성 심장질환의 진행에도 영향을 줄 수 있다는 보고가 있으며, 흡연보다 더 위험성이 높은 뇌졸중의 위험인자로 분류하고 있는 추세이다.^{18,19)}

통계에 따르면 치주질환 환자의 수가 2011년 기준 7,996,459명이었고 2012년에는 8,358,569명, 2013년에는 10,825,914명으로 매년 환자 수가 증가하고 있는 질환 중의 하나이다.²⁰⁻²²⁾

이에 본 연구에서는 두층 추출물이 만성염증으로 인한 치주질환을 개선 가능성을 확인하고자, 치주질환을 일으키는 LPS-PG에 의해 유도되는 염증반응에 따른 pro-inflammation cytokines와 염증반응 매개물질 Nitric Oxide(NO)의 조절능력을 연구함으로써 두층 추출물의 치주염 개선 효과를 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

세포주 및 재료 - 인간 아랫잇몸상피세포(human lower gingiva epithelial cell)인 YD-38 cell(한국세포주은행, KCLB No. 60508)을 사용하였다. 세포의 배양 배지는 1% penicillin-streptomycin(GIBCO, Grand Island, NY, USA)과 10% fetal bovine serum(FBS) (GIBCO, Grand Island, NY, USA)을 첨가한 Roswell Park Memorial Institute(RPMI) 1640(GIBCO, Grand Island, NY, USA) 배지를 사용하였으며, 세포는 37°C, 5% CO₂ incubator(Thermo, Carlsbad, CA, USA)에서 배양하였다. LPS-PG(InvivoGen, San Diego, CA, USA)을 사용하였다.

두층 추출물 제조 및 성분 분석 - 본 연구에서 사용된 두층은 (주)광명당 제약(KMD medicinal herbs, Korea)에서 제공받아 사용하였으며, 두층 100 g에 1 L의 50% 에탄올로 80°C에서 3시간, 2회 환류추출 하였다. 추출물을 filter paper(No.42, Whatman, Kent, UK)로 여과하고 50°C에서 감압농축기로 농축하여 건조 분말하여 분말 시료를 본 연구에 사용하였다. 성분 분석을 위하여 두층 50% 에탄올 건조

물 39.58 mg에 50% 에탄올 10 ml를 넣은 후 5분간 초음파 추출 후 0.22 µm HLB-M 멤브레인 필터(FUTECS, Daejeon, Korea)하여 검액으로 사용하였다. 두층에 함유된 주요 성분은 geniposidic acid, geniposide이다. geniposidic acid (PubChem CID:443354, purity 98.2%, Wako, Osaka, Japan)는 약 2.14 mg에 메탄올(Honeywellinternational, Morris Plains, USA) 10 ml를 넣은 후 5분간 초음파 추출 후 0.22 µm HLB-M 멤브레인 필터(FUTECS, Daejeon, Korea)하여 geniposidic acid 표준액으로 사용하였다. geniposide (PubChem CID:107848, purity 98.3%, Aladdin reagent, Shanghai, China)는 약 2.09 mg에 에탄올(Honeywellinternational, Morris Plains, USA) 10 ml를 넣은 후 5분간 초음파 추출 후 0.22 µm HLB-M 멤브레인 필터 하여 geniposidic acid 표준액으로 사용하였다. 분석용 UPLC는 Waters system H Class를 사용하였고 Waters Acquity UPLC HSS T3 column(100 mm×2.1 mm, 1.8 µm, Milford, MA, USA)를 분석용 컬럼으로 사용하였다. 이동상 용매는 0.1% TFA(A) 및 Acetonitrile(0.1%TFA, B)를 사용하였으며, 용매의 농도구배는 0->20분(5->80%, B)이다. 유속은 0.5 mL/min, 컬럼 온도는 30°C 였으며 검출은 240 nm에서 수행하였다.

세포 생존율 평가 - YD-38 세포를 96-well plate에 1×10⁴ cells/well이 되도록 분주하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양 후 EU 추출물을 농도별로 처리하여 24시간 배양하였다. 세포 생존율 평가를 위하여 well당 10 µL의 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) MTT; Sigma-Aldrich CO., Louis, MO, USA)용액을 5 mg/mL 첨가하여 4시간 동안 반응시켰다. MTT 시약의 첨가로 생성된 formazan을 녹이기 위해서 dimethyl sulfoxide(Sigma-Aldrich Co.)를 100 µL씩 첨가하고 1시간 후 microplate reader를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Nitric Oxide (NO) 생성능 - YD-38 세포를 96-well plate에 1×10⁴ cells/well이 되도록 분주하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양 후 치주질환 염증을 유발시키기 위해 *P.gingivalis*-LPS(LPS-PG)을 20 µg/mL의 농도로 처리하여 염증을 유발 시키고 EU 추출물을 농도별로 처리하였다. 24시간 후에 배양 상등액 100 µL를 취하여 96 microplate로 옮긴 후 100 µL Griess Reagent(1% sulfanilamide, 0.1% naphthyl-ethylenediamine dihydrochloride/2.5% H₃PO₄)를 넣고 10분간 실온에서 방치한 후 ELISA reader를 사용하여 흡광도 540 nm에서 측정하였다. Sodium nitrite 표준검량선으로부터 흡광도 값을 넣어 NO 생성능을 계산하였다.

RNA 분리 - YD-38 세포를 6-well plate에 1×10⁶ cells/well이 되도록 분주하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간

간 동안 배양 후 치주질환 염증을 유발시키기 위해 *P. gingivalis*-LPS(LPS-PG)을 20 µg/mL의 농도로 처리하여 염증을 유발 시키고 EU 추출물을 농도별로 처리하였다. 24시간 후에 PBS로 2회 세척 후 RNA를 추출하기 위하여 Trizol reagent(Invitrogen Co., Carlsbad, CA) 300 µL를 넣고 scraper로 모아 균질화한 후 상온에 5분간 방치 후 tube에 넣은 뒤 chloroform(Sigma-Aldrich CO., Louis, MO, USA)을 200 µL 분주하여 섞어주고 12,000 rpm에서 15분간 원심분리 한다. 투명한 상층부를 취하여 새로운 튜브에 옮긴 다음 동일량의 isopropanol(Sigma-Aldrich CO., Louis, MO, USA) 200 µL을 넣고 섞어준 뒤에 상온에서 5분간 방치한 다음 12,000 rpm으로 15분간 원심분리를 하였다. pellet을 확인 한 후 용액을 건어낸 후 75% 에탄올을 1 mL 넣어 세척하고 12,000 rpm으로 10분간 원심분리를 한 후 에탄올을 제거하고 이 작업을 2회 반복 후 에탄올을 완전히 제거하기 위해 Hood 안에서 pellet을 말린 후 DEPC-Water(Sigma-

Aldrich CO., Louis, MO, USA) 20 µL를 넣어준 다음 nano drop에 RNA 1 µL를 260 nm, 280 nm에서의 흡광도를 측정하여 total RNA 양을 정량하였다.

Real-Time PCR – RNA는 2 µg/µL의 양으로 정량 한 후 cDNA synthesis mix 4 µL, RTase 1 µL를 넣고 nuclease free water로 20 µL로 맞춘 뒤 simpliamp thermal cycler (Applied biosystem, USA)을 이용하여 42°C에서 30분, 72°C에서 10분간 반응시켜 cDNA를 합성시켰다. 그 후 cDNA와 ROX가 포함된 2× SYBR green mix, primer를 각각 넣어 quant studio 3 real-time PCR(Applied biosystem, USA) 기기를 이용하였다. PCR 조건은 50°C 2분, 95°C 10분간 pre-denaturation 후 95°C 15초, 60°C 1분, 72°C 40초를 40 cycles 수행하였다. Internal standard로 GAPDH를 사용하여 target gene의 relative quantitative (RQ)는 real-time PCR analysis software로 분석하였다(Table I).

통계처리 – 실험 결과는 3회 반복하였으며, 가장 대표적인

Table I. Primer sequences of the Real-Time PCR

	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
COX-2	CCTCCTCCTGTGCCTGATG	ACAATCTCATTTGAATCAGGAAGCT
IL-8	AAGCTGGCCGTGGCTCTCTTG	AGCCCTCTTCAAAAACCTTCTC
IL-6	AATTCGGTACATCCTCGACGG	GGTTGTTTTCTGCCAGTGCC
TNF-α	CCCCAGGGACCTCTCTCTAATC	GGTTTGCTACAACATGGGCTACA
GAPDH	AGGGCTGCTTTAACTCTGGT	CCCCACTTGATTTTGGAGGGA

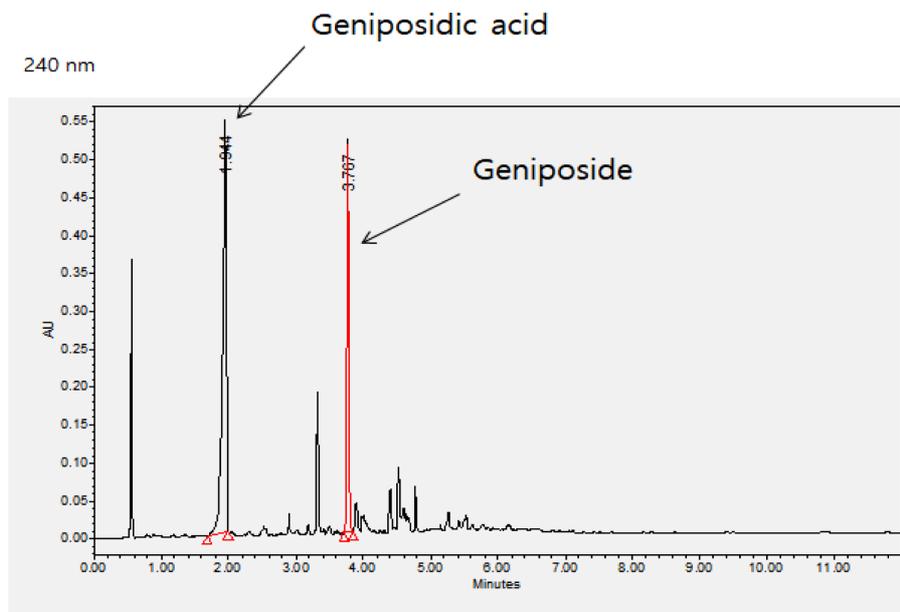


Fig. 1. UPLC chromatograms of *Eucommia ulmoides* Oliv. Bark (EU) extract. Column, Waters Acquity UPLC HSS T3 (100 mm x 2.1 mm, 1.8 µm, Milford, MA, USA); column temperature, 30°C; mobile phase, water (0.1% phosphoric acid)-acetonitrile as mobile phase in gradient manner (0-20min, 5-80% acetonitrile; post-run time, 5 min); flow-rate, 0.5 ml/min detected wavelength: 240 nm.

실험결과를 평균±표준편차(mean ± S.E.M)로 나타내었고, 유의 수준은 # $p<0.05$, * $p<0.05$ 와 ** $p<0.01$ 로 Student t'-test를 실시한 결과를 표시하였다.

결과 및 고찰

지표성분 분석 결과 - HPLC 분석결과 두종의 지표성분 geniposidic acid의 함량은 6.07% geniposide의 함량은 3.31%이었다(Fig. 1).

MTT 세포 생존율 측정 - EU 추출물의 세포독성을 측정하기 위해 YD-38 세포에 EU 추출물을 50, 100 µg/mL의 농도로 처리 후 24시간 뒤에 MTT 용액을 이용하여 세포 생존율을 평가하였다(Fig. 2). EU 추출물을 농도별로 처리하였을 때 유의적인 변화가 나타나지 않았으므로 YD-38 치주세포의 세포독성에 영향을 미치지 않은 것으로 판단되었다.

NO 분비 억제에 의한 항염증 효과 - 초기 염증에 관여하는 NO는 주로 LPS 또는 TNF- α 등의 염증 유발 물질에 의해 자극된 세포가 염증을 유발할 때 분비하는 염증반응 매개물질로 알려져있다. 이와 같은 NO의 생성은 L-arginine의 guanidino nitrogen이 산화에 의해 L-citrulline으로 변화하는 L-arginine-nitric oxide 경로를 통하여 생성되는데, 대식세포, 호중구 등의 면역세포와 섬유모세포, 혈관의 평활근, 및 기도 상피세포에 있는 inducible nitric oxide synthase (iNOS) 효소의 활성화에 의해 NO가 다량 생성되며 염증 반응을 증가시킨다고 알려져 있다. 본 연구에서는 EU 추출물의 항염증 효과를 확인하기 위하여 치주질환에서 치주염증을 일으키는 *P. gingivalis*-LPS(LPS-PG)를 이용하여 YD-38 잇몸상피세포에 염증을 유발한 뒤 EU 추출물을 처리하여 NO 생성의 조절을 확인하였다. 그 결과 LPS-PG 대비 EU 추출물 처리 시 NO 생성이 감소되는 것을 확인하였다(Fig. 3). MTT로 세포독성을 확인 한 후 세포독성이 없는 범위 내에서 NO를 확인함으로써 세포독성은 없으면서 염증을 억제시키는 효과가 있는지 확인하였다.

치주질환의 염증성 사이토카인 유전자의 발현 - 치주질환의 염증에 관여하는 염증 물질인 LPS-PG를 치주세포인 YD-38 세포에 처리하여 염증을 유발 한 뒤 EU 추출물을 농도별로 처리한 결과 치주질환에 관련된 염증성 사이토카인의 mRNA 발현을 확인하였다. 치주질환에 관련된 염증성 사이토카인으로는 IL-8과 IL-6, TNF- α , COX-2와 염증매개인자로 알려진 NO생성을 억제함으로써 EU의 항염증 효과를 확인하고자 하였다. 잇몸상피세포주에 LPS-PG에 의해 증가된 IL-8, IL-6, TNF- α , COX-2의 발현을 EU 추출물 처리시 대조군 대비 감소시키는 결과를 나타냈다(Fig. 4). 본 실험의 결과로 잇몸세포의 염증을 EU 추출물이 감소시킴으로써 EU 추출물의 항염증 효과를 확인할 수 있었다.

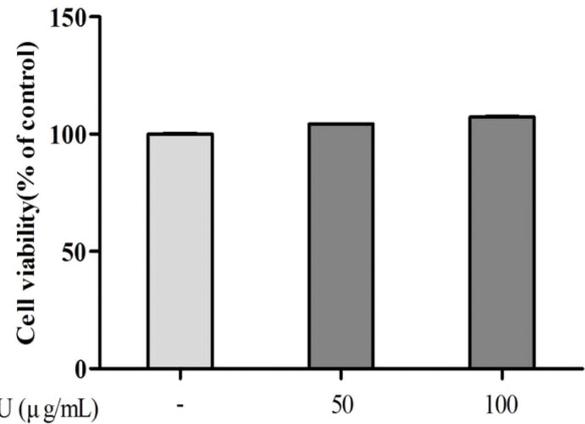


Fig. 2. Cell viability of *Eucommia ulmoides* extract on YD-38 cells. cells were treated with EU 50, 100 µg/mL for 24 h. Cell viability was determined by the MTT assay. Values are mean±S.E.M (n=4).

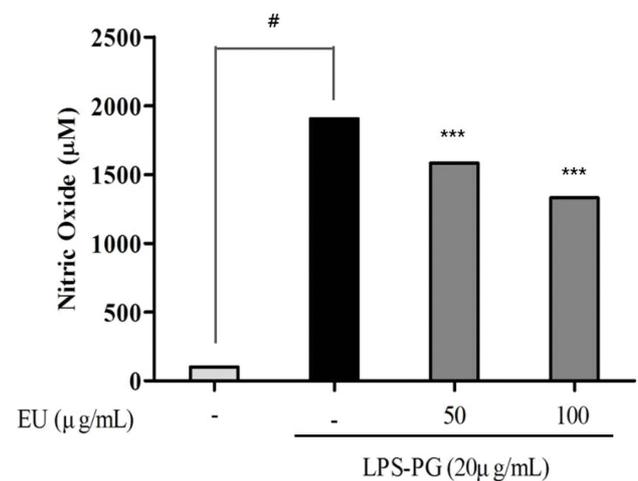


Fig. 3. The effect of EU on the production of NO by YD-38 cells in the presence of LPS-PG. YD-38 cells were treated with EU 50, 100 µg/mL in the presence of LPS-PG (20 µg/mL) for 24 h. The 24 hrs-conditioned media were collected for NO₂⁻ assay. The results are mean±S.E.M of triplicated from a representative experiment (# $p<0.05$; significantly different from the control, * $p<0.05$, ** $p<0.01$; significantly different from the LPS-PG-treated group).

결론

본 연구는 두충 추출물의 치주염개선 효과를 측정하기 위하여 인간 아랫잇몸상피세포인 YD-38 세포를 이용하여 치주염에 염증을 일으키는 유발 물질인 LPS-PG로 염증반응을 유발한 뒤 두충 추출물에 대한 염증성 사이토카인의 발현 정도를 평가하였으며, 염증매개인자인 NO, 염증성

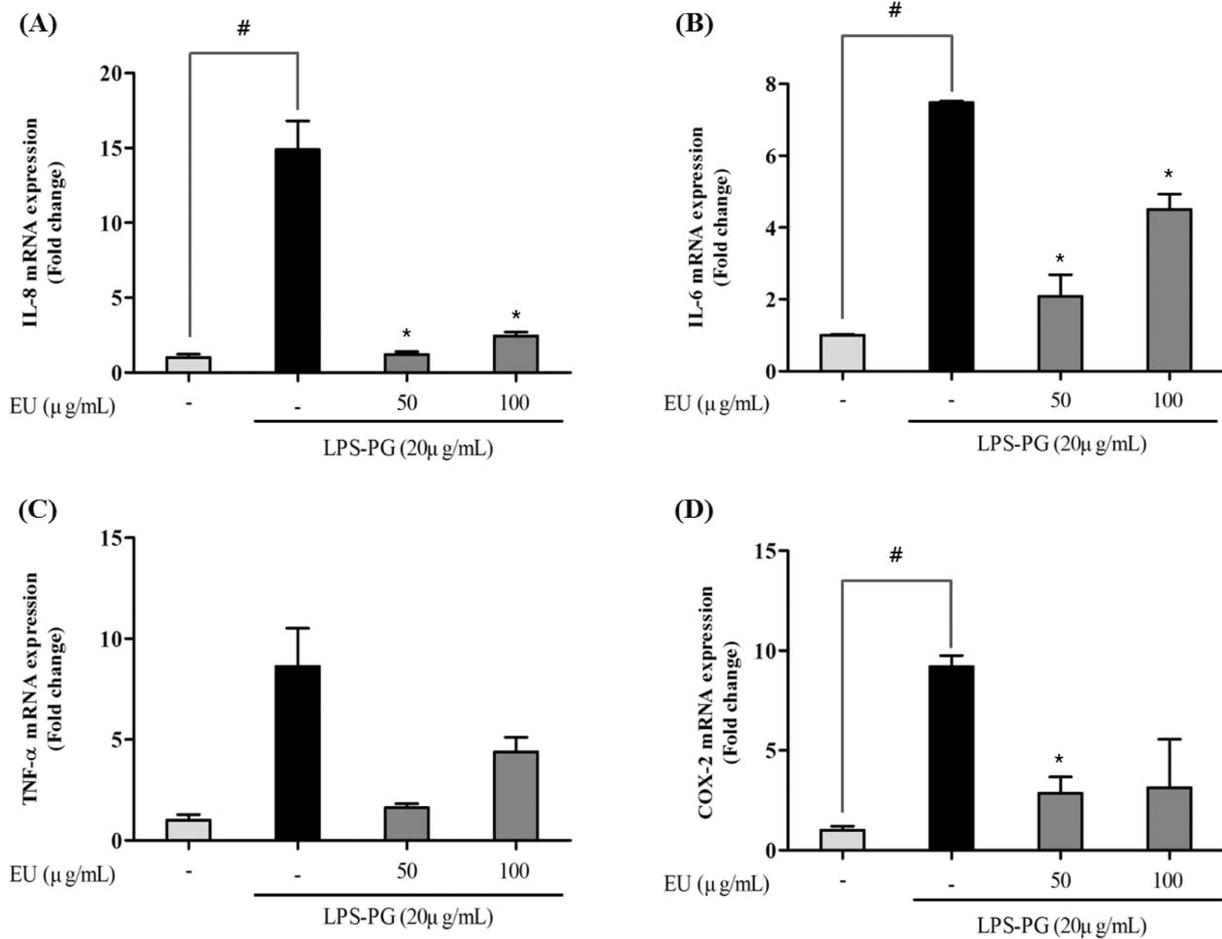


Fig. 4. Expression of IL-8, IL-6, TNF- α , COX-2 mRNA by real-time PCR. YD-38 cells were treated with EU 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ in the presence of LPS-PG (20 $\mu\text{g/mL}$) for 24 h. The control group was cultured without LPS-PG. The levels of IL-8 (A), IL-6 (B), TNF- α (C), COX-2 (D) mRNA expression were measured by quantitative real-time PCR. The expression was normalized as a ratio using GAPDH (house keeping gene). Values are expressed as mean \pm S.E.M of triplicated from a representative experiment (# $p < 0.05$; significantly different from the control, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; significantly different from the LPS-PG-treated group).

cytokines인 IL-8, IL-6, TNF- α , COX-2의 발현 조절을 함으로써 치주세포 염증에 대한 항염증 효과를 확인하였다. 두 층 추출물의 치주염 관련 인자의 발현을 억제함으로써 치주질환에 대한 치약 및 개선 소재로 사용될 수 있음을 시사한다고 할 수 있다.

인용문헌

- Hussain, T., Tan, B., Liu, G., Oladele, O. A., Rahu, N., Tosso, M. C. and Yin, Y. (2016) Health-promoting properties of *Eucommia ulmoides*: a review. *Evid Based Complement Alternat. Med.* **2016**: 5202908.
- Gu, H. A., Kim, H. S., Kim, M. J., Yu, E. R., Joe, G., Jang, J., Kim, B. and Park, S. N. (2013) Characterization and transdermal delivery of ethosomes loaded with *Eucommia ulmoides* extract. *Appl. Chem. Eng.* **24**: 639-644.
- Yongsheng, L., Shumei, L. and Guodong, W. (2014) Studies on resin purification process optimization of *Eucommia ulmoides* oliver and its antihypertensive effect mechanism. *Afr. J. Tradit. Complement Altern. Med.* **11**: 475-480.
- Fujikawa, T., Hirata, T., Hosoo, S., Nakajima, K., Wada, A., Yurugi, Y., Soya, H., Matsui, T., Yamaguchi, A. and Ogata, M. (2012) Asperuloside stimulates metabolic function in rats across several organs under high-fat diet condition, acting like the major ingredient of *Eucommia* leaves with anti-obesity activity. *J. Nutr. Sci.* **1**: e10.
- Kim, Y. O., Lee, S. W., Sohn, S. H., Kim, S. Y., Oh, M. S. and Kim, S. K. (2012) Anti-inflammatory effects of water extract of *Eucommia ulmoides* oliver on the LPS-induced RAW 264.7 cells. *Korean J. Medicinal Crop. Sci.* **20**: 381-386.
- Park, S. H., Sim, Y. B., Han, P. L., Lee, J. K. and Suh, H. W. (2010) Antidepressant-like effect of chlorogenic acid isolated

- from *Artemisia capillaris* thunb. *Anim. Cells and Syst.* **4**: 253-259.
7. Peng, W., Ge, S., Li, D., Mo, B., Daochun, Q. and Ohkoshi, M. (2014) Report: Molecular basis of antibacterial activities in extracts of *Eucommia ulmoides* wood. *Pak. J. Pharm. Sci.* **27**: 2133-2138.
 8. Zhang, R., Liu, Z. G., Li, C., Hu, S. J., Liu, L., Wang, J. P. and Mei, Q. B. (2009) Du-Zhong (*Eucommia ulmoides* oliv.) cortex extract prevent OVX-induced osteoporosis in rats. *Bone.* **45**: 553-559.
 9. Avery, J. K., Steele, P. F. and Avery, N. (2002) Oral development and histology. Thieme Medical Publishers, New York.
 10. Nanci, A. (2012) Ten cate's oral histology: development, structure, and function. Elsevier Health Sciences, Saint Louis.
 11. Sotolongo, J., Ruiz, J. and Fukata, M. (2012) The role of innate immunity in the host defense against intestinal bacterial pathogens. *Curr. Infect. Dis. Rep.* **14**: 15-23.
 12. Curtis, M. A., Zenobia, C. and Darveau, R. P. (2011) The relationship of the oral microbiota to periodontal health and disease. *Cell Host Microbe.* **10**: 302-306.
 13. Belkaid, Y. and Hand, T. W. (2014) Role of the microbiota in immunity and inflammation. *Cell.* **157**: 121-141.
 14. Dobrovolskaia, M. A., Medvedev, A. E., Thomas, K. E., Cuesta, N., Toshchakov, V., Ren, T., Cody, M. J., Michalek, S. M., Rice, N. R. and Vogel, S. N. (2003) Induction of in vitro reprogramming by Toll-like receptor (TLR2) and TLR4 agonists in murine macrophages: effects of TLR "homotolerance" versus "heterotolerance" on NF-kappa B signaling pathway components. *J. Immunol.* **170**: 508-519.
 15. Ulevitch, R. J. and Tobias, P. S. (1995) Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin. *Annu. Rev. Immunol.* **13**: 437-457.
 16. Ninnemann, J. L. 1984. Prostaglandins in inflammation and disease. *Immunology Today.* **5**: 173-175.
 17. Derek, A. W., Adrian, R. M., Paul, R. C. and Goldstein, J. L. (2000) Gastroduodenopathy associated with nonsteroidal use: from bench to bedside. *Digestive Disease Week.*
 18. Amar, S. and Han, X. (2003) The impact of periodontal infection on systemic diseases. *Med. Sci. Monit.* **9**: RA291-RA299.
 19. 2007 국민건강통계. (2008) 보건복지부 질병관리본부. 2007 국민건강통계 : 국민건강영양조사 제4기 1차년도 (2007), 6. 한국.
 20. 2010 건강보험통계. (2011) 보건복지부. 2010년 건강보험 통계연보, 558. 한국.
 21. 2011 건강보험통계. (2012) 보건복지부. 2011년 건강보험 통계연보, 552. 한국.
 22. 2012 건강보험통계. (2013) 보건복지부. 2012년 건강보험 통계연보, 556. 한국.
- (2019. 7. 10 접수; 2019. 8. 8 심사; 2019. 9. 18 게재확정)