

치주질환 예방 및 개선제로서 숲개밀 추출물의 효능

문성희^{1,2}, 손주리³, 신성진¹, 오승한^{1,2}, 김성환⁴, 배지명^{1,2*}

¹원광대학교 치과대학 치과생체재료학교실

²원광대학교 생체재료·매식연구소

³원광보건대학교 치위생과

⁴한국화학연구원 신약개발본부 신약개발플랫폼연구센터

Efficacy of the extract of *Brachypodium sylvaticum* as a preventive and an improving agent of periodontal disease

Seong-Hee Moon^{1,2}, Ju-Lee Son³, Seong-Jin Shin¹,
Seunghan Oh^{1,2}, Seong Hwan Kim⁴, Ji-Myung Bae^{1,2*}

¹Department of Dental Biomaterials, College of Dentistry, Wonkwang University, Iksan-si, Republic of Korea

²Institute of Biomaterial-Implant, Wonkwang University, Iksan-si, Republic of Korea

³Department of Dental Hygiene, Wonkwang Health Science University, Iksan-si, Republic of Korea

⁴Drug Discovery Platform Research Center, Department of Drug discovery,
Korea Research Institute of Chemical Technology, Daejeon, Republic of Korea

We evaluated the antibacterial, anti-inflammatory, and inhibitory effect of osteoclast differentiation of *Brachypodium sylvaticum* (BS) to find out the possibility of preventing periodontal disease. The inhibition of *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) growth by BS and the sustainability of the antibacterial activity was assessed. The production of pro-inflammatory cytokines from lipopolysaccharide (LPS)-induced RAW 264.7 cells were measured using enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA), and the production of nitric oxide (NO) and cell viability were measured. Osteoclast differentiation was evaluated by Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) staining, and TRAP activity. BS showed significant antibacterial activity and sustainable antibacterial activity in *P. gingivalis*. We also found out that the BS significantly decreased secretion of pro-inflammatory cytokines [tumor necrosis factor (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6)] and NO production without cytotoxicity. Furthermore, BS inhibited the differentiation of bone marrow macrophages (BMMs) obtained from mouse bone marrow cells into osteoclasts without cytotoxicity. Taken together, BS can be a promising candidate for a preventive and improving agent of periodontal disease having antibacterial, anti-inflammatory, and inhibitory effects of osteoclast differentiation.

Key words: *Brachypodium sylvaticum*, Periodontal disease, Antibacterial activity, Anti-inflammation, Osteoclast differentiation

Seong-Hee Moon (ORCID: 0000-0003-0170-0677)

Ju-Lee Son (ORCID: 0000-0003-4611-8891)

Seong-Jin Shin (ORCID: 0000-0002-4140-5157)

Seunghan Oh (ORCID: 0000-0002-7250-721X)

Seong Hwan Kim (ORCID: 0000-0002-3540-0448)

Correspondence: Ji-Myung Bae (ORCID: 0000-0002-8607-8604)

460 Iksan-daero, Iksan-si, Jeonbuk 54538, Republic of Korea

Affiliation: Department of Dental Biomaterials and Institute of Biomaterials·Implant, College of Dentistry, Wonkwang University, Iksan-si, Republic of Korea

Tel: +82-63-850-6859, Fax: +82-63-850-6859

E-mail: baejimy@wku.ac.kr

Received: Oct, 28, 2020; Revised: Dec, 22, 2020; Accepted: Dec, 23, 2020

서론

2019년 외래 다빈도 질병 통계 결과에 따르면 치은염 및 치주질환은 총 환자 수 1,673만 명과 요양급여비용 총액 1조 5,321억 원으로 환자 수와 요양 급여비 총액에 있어 모두 1위를 차지하며(1), 치주질환에 대한 치료 및 개선에 대한 수요가 급증하고 있는 실정이다. 치주질환은 치면 세균막으로 인해 시작하여 세균에 의한 독소와 숙주의 면역반응으로 치주조직의 파괴를 일으키는 흔한 감염성질환으로서 병의 정도에 따라 치은염(gingivitis)과 치주염(periodontitis)으로 나뉜다(2, 3). 치주염이 심할수록 치주낭의 깊이가 깊어지며, 이로 인해 치주인대에 염증이 유발되며, 치면세균막내에 존재하는 *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*)에 의해 분비되는 lipopolysaccharide (LPS)와 같은 인자에 의해 파골세포 분화가 촉진되어 치조골 소실이 일어나게 된다(4, 5). 이렇듯 병의 진행정도가 계속되면, 단순 구취나 입안 염증 및 치조골 파괴의 문제로만 끝나지 않고, 치아 상실과 같은 구강건강 이상으로 영양불균형을 초래할 수도 있다. 나아가 당뇨병, 심혈관계 질환 등 전신질환과의 연관성이 있는 것으로 보고되어 치주질환은 예방과 조기 치료가 중요하다(6, 7).

임상에서 치주질환을 치료하기 위해 항생제 및 비스테로이드 항염증제(Non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs)가 주로 사용된다(8). 항생제를 오랜 기간 사용하게 되면 내성균 발현, 및 기회 감염이 생길 수 있다(9). NSAIDs를 장기간 복용하게 되면 위장장애, 신독성 및 간독성 등의 부작용이 나타날 수 있다(10). 약물 사용의 위험성과 합병증을 예방하기 위해 안전성이 높은 천연물 개발에 관한 연구가 각광받고 있다(11-13). 또한 전신적 약물 사용의 단점을 해결하기 위해 국소적 약물 전달시스템(drug delivery system)이 발달하였다(14).

본 연구에서는 부작용이 적고 안전성이 높으면서 치주질환에 효과적인 천연물을 찾기 위해 문헌 조사와 한국식물추출물은행의 자원을 이용하여 스크리닝을 실시하였고, 다른 후보균에 비하여 항균 효능이 우수한 숲개밀(*Brachypodium sylvaticum*, BS)을 선별하였다. 숲개밀은 벼과(*Gramineae*), 숲개밀속(*Brachypodium*)에 속하는 다년초 식물로, 국내 중부 이남에서 서식하고 있다. 잎은 편평하지

만 안쪽으로 꼬이고 넓은 선형의 형태이며, 줄기의 마디에 털이 있으며 잎과 더불어 한쪽으로 처지는 특징을 가진다(15, 16). 숲개밀은 가축의 사료로 활용되고 있음이 알려져 있으나, 숲개밀의 다양한 약리학적 특성이나 성분, 특히, 구강질환 또는 골질환의 예방 및 치료 또는 개선 효과는 알려진 바가 없다. 따라서 본 연구에서는 숲개밀 추출물의 항균 및 항염증 활성과 파골세포 분화 억제 활성능을 밝혀서 구강질환 또는 골질환의 예방 및 치료에 적용할 수 있는지 알아보고자 하였다. 귀무가설은 대조군과 비교하여 숲개밀을 적용한 실험군의 항균 및 항염증 활성과 파골세포 분화 억제 효과의 차이가 없는 것이다.

재료 및 방법

1. 추출물의 제조

본 실험에 사용된 숲개밀(BS) 추출물은 한국식물추출물은행에서 숲개밀(전초)을 메탄올 99.9%로 추출한 것을 분양받아 Dimethyl sulfoxide (DMSO; VWR Life Science, Solon, OH, USA)에 희석하여 50 mg/mL의 농도로 만든 후 실험에 사용하였으며, 사용 전까지 -20℃에 보관하였다.

2. 항균 활성 측정

1) *P. gingivalis*의 배양 및 성장 억제 측정

숲개밀 추출물의 구강 항균 활성을 평가하기 위해 사용한 *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*, ATCC33277)균은 한국생명공학연구원의 생물자원센터(Jeongeup, Korea)로부터 분양받았다. 1% 헤민(hemin, Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, Germany)과 1% 메나디온(menadione, Sigma, St. Louis, MO, USA)을 포함한 Brain heart infusion (BHI; BD, Sparks, MD, USA) broth를 배지로 사용하여 *P. gingivalis*균을 활성화시키고, 37℃, CO₂ 인큐베이터에서 72시간 동안 배양한 후, 96-well 플레이트에 균을 90 µL씩 넣고, 숲개밀 추출물 10 µL을 넣었다. 대조군은 세균만 100 µL를 넣은 것을 사용하였으며, 각각의 웰에 BHI broth를 100 µL를 추가로 넣어 숲개밀 추출물의 최종 농도가 125 µg/mL, 250 µg/mL 및 500 µg/mL가 되도록 하였다. 이후,

시료를 72시간 동안 배양하였다. 흡광도는 600 nm에서 microplate reader (Spectramax250, Molecular Devices Co. Sunnyvale, CA, USA)로 측정하여 균의 성장이 억제된 농도를 결정하였다.

2) 항균의 지속성 측정

실험에 사용된 불소바니쉬(fluoride varnish, FV)는 45 wt% 로진(KR-610, Arakawa Co, Tokyo, Japan), 50 wt% ethyl alcohol (99.7%, Merck, Kenilworth, NJ, USA), 5 wt% NaF (Sigma, St. Louis, MO, USA) 를 넣어 90°C에서 물로 증탕하여 hot plate (RCH-3, Tokyo Rikakikai Co., Ltd., Tokyo, Japan) 위에서 over-head stirrer (RW20DZM, IKA, Seoul, Korea)로 30분 동안 240 rpm으로 혼합하여 제작하였다(17). 직경 5 mm 디스크 형태의 OHP 필름을 멸균포장지에 담아 EO 가스로 소독한 후, 다음과 같이 필름자체(음성대조군), 불소바니쉬와 클로로헥시딘(헥사메딘; Bukwang, Ansan-si, Korea) 원액을 1:1로 혼합한 균(양성대조군), 불소바니쉬(FV), 불소바니쉬와 숲개밀 추출물(50 mg/mL)을 1:1로 혼합한 균(FV+BS)으로 나누어, 준비된 시료를 필름 표면에 편평하게 전면이 짝 차도록 도포하였다. 이때, 시료 당 3개의 필름을 만들어 직경 35 mm의 페트리디쉬에 넣고, 클린벤치내에서 UV를 쬐어 30분간 살균 및 건조시킨 후, 멸균된 증류수 2 mL을 넣어 시료가 물에 용출될 수 있도록 시료가 도포된 면이 아래를 향하도록 하였다. 5일 동안 37°C, 진탕항온조(shaking water bath, JSSI-100C, JSR Co. Tokyo, Japan)에서 80 rpm으로 보관 후, 한천확산법(agar diffusion test)을 이용하여 항균력을 평가하였다. 한천확산법은 다음과 같이 수행하였다. Broth 배지에서 배양한 *P. gingivalis*를 base agar가 깔린 한천배지 위에 접종하여 top agar가 굳고 난 후, 시료가 도포된 필름의 면이 아래로 향하게 한천배지와 접합시켜 72시간 동안 배양하여 필름 주변에 형성된 *P. gingivalis* 억제대의 직경(mm)을 직각 방향으로 측정하여 그 평균을 억제존(inhibition zone)으로 판단하였다.

3. 항염 활성 측정

1) 전염증성 사이토카인 및 산화질소 생성능 측정

쥐의 대식세포인 RAW264.7 세포를 ATCC (Rockville, MD, USA)에서 구입하여, 10% 태아소혈청(fetal bovine serum, FBS, HyClone Logaa, UT, USA), 스트렙토마이신 (100 µg/mL), 및 페니실린(100 U/mL; Pen Strep, Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)이 첨가된 성장 배지(DMEM, HyClone, Logan, UT, USA)에 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 60 mm 세포배양 디쉬에 1×10⁶의 세포를 배양한 후, 숲개밀 추출물을 농도별(0, 3, 10 및 30 µg/mL)로 처리하였다. 2시간후, lipopolysaccharide LPS (1 µg/mL, Sigma, St. Louis, MO, USA)를 첨가하여 6시간 동안 배양하였다. 세포배양액 내 Tumor necrosis factor- α (TNF- α)와 interleukin-6 (IL-6)의 분비량은 제조사의 매뉴얼에 따라 ELISA kit (R&D, Minneapolis, MN, USA)를 이용하여 측정하였다. 산화 질소의 분비량을 측정하기 위해 60 mm 세포배양 디쉬에 1×10⁶의 세포를 배양한 후, 숲개밀 추출물을 농도별 (0, 3, 10, 30 µg/mL)로 처리하고, 2시간 후 1 µg/mL의 LPS를 첨가하였다. 24시간 배양 후, 산화질소(Nitric oxide, NO) 수준을 그리스 반응(Griess reaction)을 이용하여 분석하였다. 세포 배양액(100 µL)을 그리스 시약과 혼합하고, 10분 동안 실온에서 배양하였다. 흡광도는 540 nm에서 microplate reader (VERSA max, Molecular Devices Co. Sunnyvale, CA, USA) 로 측정하였다. 모든 실험에서 블랭크(blank)로서, 새로운 배양 배지를 사용하였다. 아질산염(nitrite; NO₂)은 아질산 나트륨(sodium nitrite; NaNO₂, Merck, Kenilworth, NJ, USA)를 이용한 표준 곡선으로 측정하였다.

2) 세포생존을 측정

4×10³개의 RAW264.7 세포를 96-well 플레이트에 넣어 24시간 배양한 후, LPS (1 µg/mL)와 숲개밀 추출물을 농도별 (0, 3, 10 및 30 µg/mL)로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 세포 생존율(cell viability, %)은 제조사의 매뉴얼에 따라 Cell Counting Kit-8 (CCK-8, Dojindo, Rockville, MD, USA)를 이용하여 3회 측정하였다. 흡광도는 450 nm 파장에서 microplate reader (VERSA max, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 측정하였다.

4. 파골세포 분화 억제 활성 평가

1) 골수세포의 분리 및 배양

5주령의 수컷 ICR mouse (Daejeon Science, Daejeon, Korea)의 대퇴골과 경골을 이용한 골수세포의 분리는 한국 화학연구원 동물실험 표준 프로토콜의 권고 사항에 따라 엄격하게 수행되었다. 프로토콜(ID No. 7D-M1)은 한국화학연구원의 동물관리 및 사용위원회의 승인을 받았다. 수집한 골수세포를 10% 태아소혈청, 10 ng/mL macrophage-colony stimulating factor (M-CSF, Peprotech, London, UK)가 첨가된 α -minimum essential medium (α -MEM, Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) 배지에서 3일간 배양하였다(18). 3일 후, 미부착 세포를 α -MEM으로 세척하여 대식세포(bone marrow macrophage, BMM) 로 사용하기 위해 1×10^5 cells/well가 되도록 96-well 플레이트에 분주하고 30 ng/mL M-CSF가 첨가된 α -MEM에 배양하였다. 24시간 후 30 ng/mL M-CSF, 50 ng/mL RANKL (receptor activator of nuclear factor kB ligand, Peprotech, London, UK)와 함께 숲개밀 추출물을 0, 3, 10 및 30 μ g/mL의 농도로 처리하였으며, 3일 후 신선한 배양액으로 교체하였다.

2) Tartrate-resistant acid phosphate (TRAP) 염색 및 활성도 측정

배양이 종결된 plate는 10% 중성 포르말린(Sigma, St. Louis, MO, USA)에 10분간 고정 후 시판되는 TRAP kit (tartrate-resistant acid phosphatase, Sigma, St. Louis, MO, USA)를 사용하여 Fast Garnet GBC base 용액, sodium nitrite 용액, naphthol AS-BI phosphate 용액, acetate 용액, tartrate 용액 등을 혼합하여 37°C에서 30분간 반응시켰다. 증류수로 세척 후 hematoxylin (Sigma, St. Louis, MO, USA) 용액으로 대조 염색하여 건조시킨 후 광학현미경하에서 관찰하였다. TRAP 활성도를 측정하기 위해 배양을 완료한 후 PBS (Phosphate Buffered Saline, HyClone Logan, UT, USA)로 세척하고, 포름알데하이드(formaldehyde, Sigma, St. Louis, MO, USA)로 고정한 세포에 기질용액(1.35 mg/mL 4-nitrophenyl phosphate disodium salt, 10 mM tartrate, 50 mM citrate buffer, Sigma, St. Louis, MO, USA)을 가하여 37°C에서 10분간 반응시켰다. 반응 후 0.1 N 수산화나트륨

(NaOH, Merck, Kenilworth, NJ, USA)으로 반응을 중지시켜 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3) 세포생존을 측정

1×10^4 개의 BMM을 96-well 플레이트에 넣어 24시간 배양한 후, 30 ng/mL M-CSF와 숲개밀 추출물을 농도별(0, 3, 10 및 30 μ g/mL)로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 세포 생존율(cell viability, %)은 제조사의 매뉴얼에 따라 CCK-8을 이용하여 450 nm 파장에서 microplate reader로 흡광도를 측정하였다.

5. 통계 분석

본 연구에서 각각의 실험은 3회 이상 반복 수행하였으며, 결과는 mean \pm SD로 표시하였다. SPSS프로그램(SPSS 24.0; IBM Corporation, Armonk, NY, USA)을 이용하여 통계분석을 수행하였다. 정량적인 결과의 통계는 one-way ANOVA로 분석하였으며, Duncan의 다중비교법을 이용하여 사후 검정을 실시하였다($\alpha = 0.05$).

결 과

1. *P. gingivalis*에 대한 숲개밀 추출물의 항균 효과

숲개밀 추출물을 각각 125 μ g/mL, 250 μ g/mL, 500 μ g/mL의 처리한 경우 *P. gingivalis*의 성장을 억제하는 것을 확인하였다(Figure 1A). 숲개밀 추출물 500 μ g/mL은 125 μ g/mL보다 유의성있게 항균효과가 높았으나($P < 0.05$), 250 μ g/mL와는 유의성있는 차이가 없었다($P > 0.05$). 숲개밀 추출물의 항균능이 5일까지 지속되는지를 항균의 지속성 시험을 통한 inhibition zone으로 확인하였다(Figure 1B, Figure 1C). 음성대조군을 제외한 모든 군에서 5일차에 항균의 지속성이 관찰되었고, 불소바니쉬와 숲개밀 혼합물 처리군의 경우 불소바니쉬 처리군에 비해서 유의성있게 높은 항균성을 유지하였다($P < 0.05$).

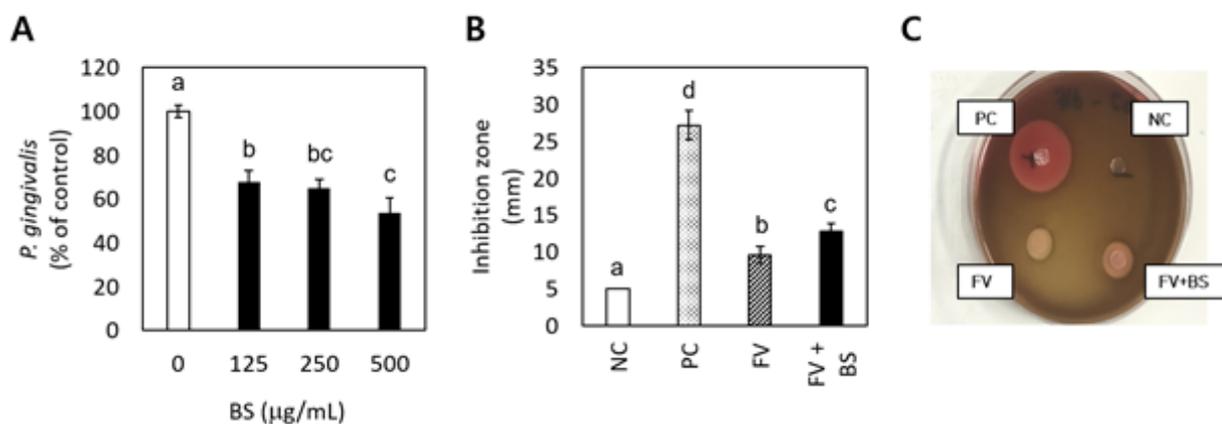


Figure 1. Antibacterial activity on methanol extracts of *Brachypodium sylvaticum* (BS) against *P. gingivalis*. (A) The growth of *P. gingivalis* was inhibited according to the concentration of BS. (B) Sustainability of antibacterial activities after 5 days. (C) Agar diffusion test after cycling in a shaking water bath for 5 days. Different lowercase letters indicate significant differences between groups according to the ANOVA and Duncan's multiple range test at $\alpha=0.05$. NC (film disc with a diameter of 5 mm), PC (FV + chlorhexidine), FV (fluoride varnish), and FV+BS.

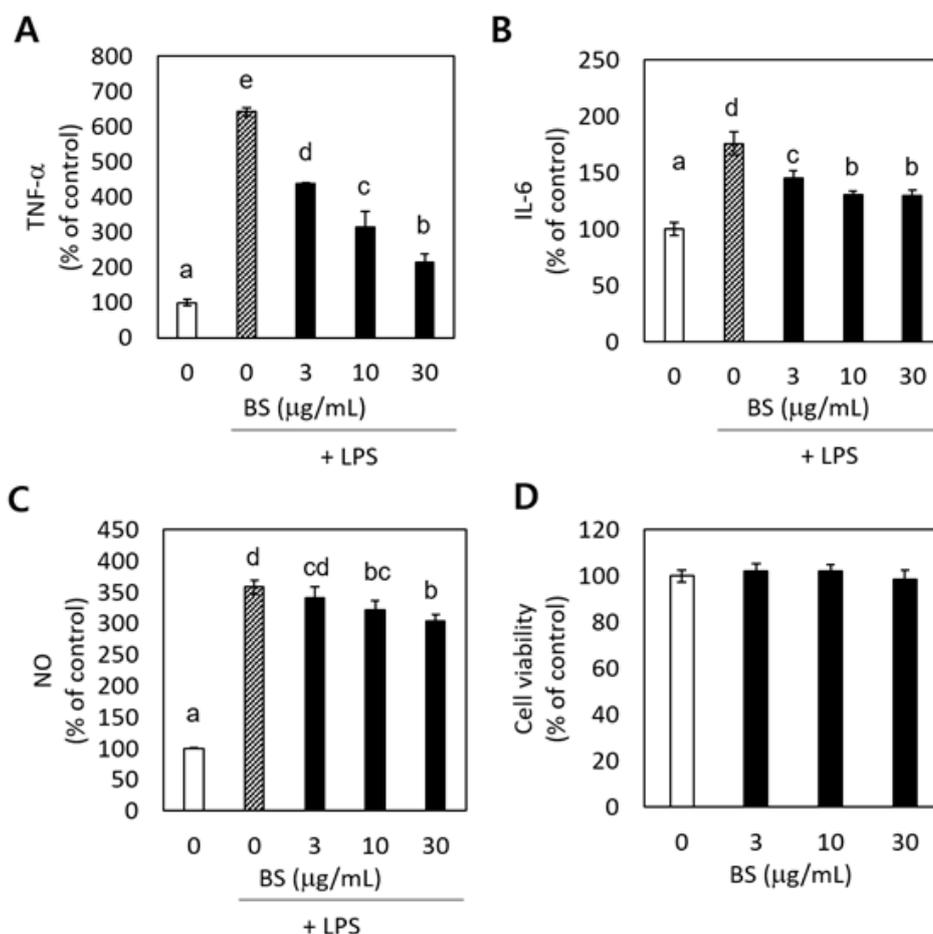


Figure 2. Effects of BS on the production of (A) tumor necrosis factor- α (TNF- α), (B) interleukin-6 (IL-6), and (C) nitric oxide (NO). (D) Cell viability in lipopolysaccharides (LPS)-induced RAW 264.7 cells. Different lowercase letters mean the significant differences among the groups by ANOVA and Duncan's multiple range test at $\alpha=0.05$.

2. 항염증에 대한 숲개밀 추출물의 효과

숲개밀 추출물의 전염증성 사이토카인의 분비능을 확인한 결과, LPS만 첨가한 경우 LPS를 첨가하지 않은 대조군에 비해 TNF- α 는 증가되었고, 숲개밀 추출물의 처리 농도에 따라 TNF- α 의 분비량은 대조군에 비해 농도의존적으로 유의성있게 감소되었다($P < 0.05$)(Figure 2A). IL-6 분비량도 LPS에 의해 증가하였고, 숲개밀 추출물이 IL-6 분비를 유의성있게 억제시켰다($P < 0.05$)(Figure 2B). 숲개밀 추출물의 NO 생성 저해능은 LPS만 첨가한 군이 LPS를 첨가하지 않은 대조군에 비해 증가하였고, 숲개밀 추출물 처리군에 의해 NO 생성량이 유의성있게 억제되었다($P < 0.05$)(Figure 2C). 또한 숲개밀 추출물의 세포생존율을 확인한 결과, 모든 농도에서 세포독성을 나타내지 않았다($P > 0.05$)(Figure 2D).

3. 숲개밀 추출물의 파골세포 분화 억제 및 TRAP 활성 저해

숲개밀 추출물이 RANKL에 의한 파골세포 분화를 억제시키는 효과를 측정하기 위해 BMM에 M-CSF와 RANKL을 처리하고 숲개밀 추출물을 농도별로 처리하여 TRAP staining을 한 결과, 대조군은 TRAP 양성 다핵성 파골세포로 분화가 진행되었으나 숲개밀 추출물을 처리한 군에서는 농도 의존적으로 다핵성 파골세포의 분화가 억제됨을 형태학적으로 확인하였다(Figure 3A). 하지만 숲개밀 추출물의 TRAP 활성도를 측정한 결과, 숲개밀 추출물 처리군에서 농도별로 감소하는 경향이 있었지만 통계적 유의성은 관찰되지 않았다($P > 0.05$)(Figure 3B). 숲개밀 추출물처리군의 모든 농도에서 세포독성은 나타나지 않았다($P > 0.05$)(Figure 3C).

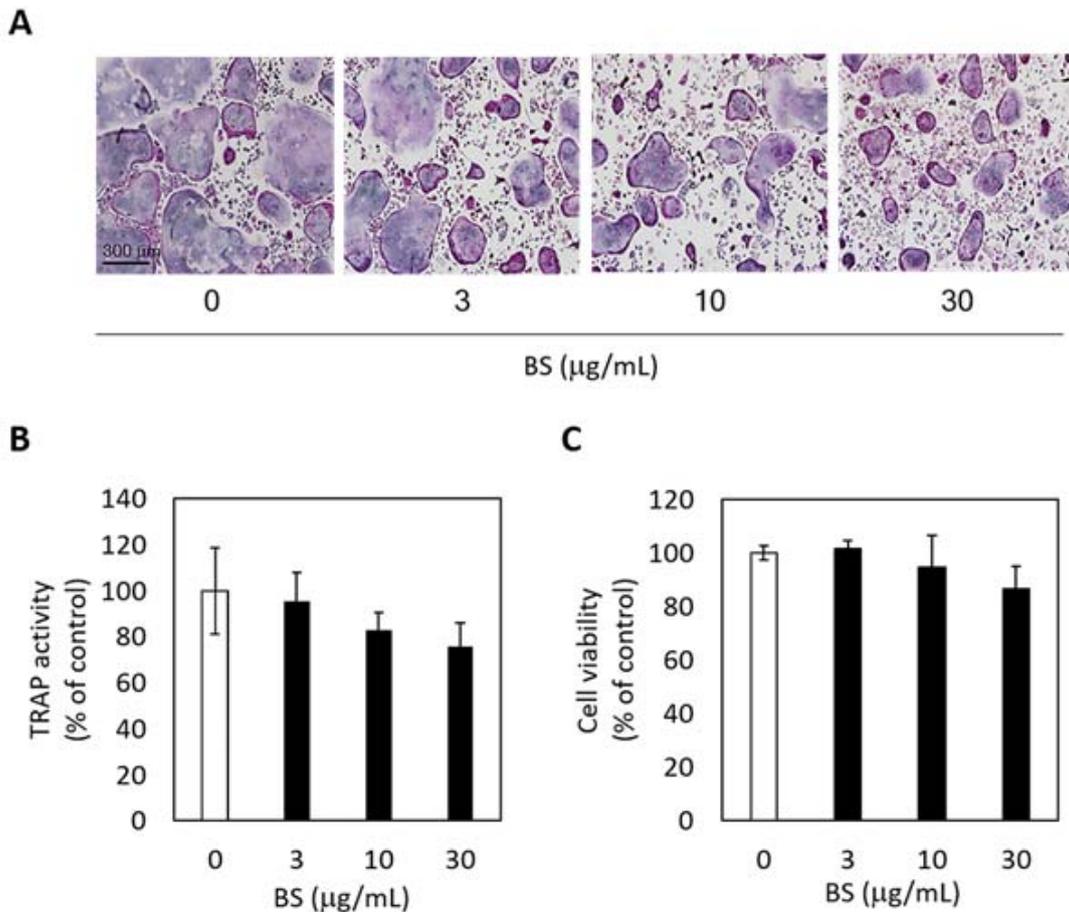


Figure 3. Inhibition of receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL)-induced osteoclast differentiation by BS. (A) Photographs of tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) stained cells under a light microscope (magnification, X100). (B) TRAP activity measured at 405 nm by microplate reader. (C) Cell viability determined with the Cell Counting Kit-8 (CCK-8) assay reagent.

고 찰

본 실험의 목적은 숲개밀 추출물(BS)의 치주질환 개선 효능을 알아보기 위해 *P. gingivalis*에 대한 항균 및 RAW264.7에 대한 항염증 활성과 파골세포로의 분화 억제 활성능을 평가하는 것이었다. 숲개밀 추출물은 대조군에 비해 항균 및 항염증 효과가 유의성있게 높아 귀무가설은 기각되었다.

치주염의 원인 균주인 *P. gingivalis*에 대한 숲개밀 추출물의 항균력은 숲개밀 추출물의 농도가 증가할수록 *P. gingivalis*의 성장이 현저하게 억제되었다. 항균의 지속성은 불소바니쉬와 혼합한 숲개밀 추출물 처리군의 경우 불소바니쉬 처리군에 비해서 유의성있는 항균 지속 효과를 나타내었다. 항균의 지속성 시험의 양성대조군으로 사용된 클로록시딘은 고전적인 소독제이며 구강 소독제와 양치용액으로도 사용되고 있는데, 항균 활성은 뛰어나나 장기간 사용 시 구강 내 조직과 혀 및 보철물 등에 착색과 구강점막의 작열감 등을 일으키는 부작용이 있다(19, 20). 이에 최근 천연물을 이용한 항균물질에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있으며, 본 연구에서는 천연물인 숲개밀 추출물에 불소바니쉬를 적용하여 항균에 대한 지속적인 효능을 확인하였다. 불소바니쉬를 숲개밀 추출물의 운반체(carrier)로 사용하였으며, 불소바니쉬는 치아에 항균물질을 전달하는 효과적인 carrier가 될 수 있을 것이다(17, 21). 본 연구에서는 불소바니쉬와 혼합한 숲개밀 추출물 처리군의 항균의 지속력을 5일까지 측정하였으나 이에 대한 항균의 지속력이 얼마나 오래 유지되는지에 대한 추가 연구가 필요하다.

숲개밀 추출물은 세포독성 없이 LPS에 의해 유도된 RAW 264.7 세포에서 전염증성 사이토카인인 TNF- α 와 IL-6의 분비 및 NO의 생성을 감소시켰다. LPS는 염증을 유발하는 대표적인 자극원으로, LPS에 의해 자극된 대식세포는 NO를 비롯하여 IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α , M-CSF 등의 세포독성물질을 유도함으로써 궁극적으로 염증을 일으키게 된다(22, 23). LPS에 의해 자극된 TNF- α 와 IL-6과 같은 전염증성 사이토카인은 골 형성을 유발하는 염증 반응에서 중요한 역할을 하며, 특히 염증이 발생하기 쉬운 치주 부위에서 분비량이 많아진다(24, 25). TNF- α 는 활성화된 단핵구, 대식세포 및 T 림프구에 의해 합성되는 염증성 사이토카인이며 치주 질환에서

중요한 염증 반응을 촉진하는 것으로 알려져 있다(25). 또한 TNF- α 는 IL-1 β 및 IL-6의 분비를 유도하며, 질병이 발생한 위치에서 TNF- α 분비량의 증가는 골 흡수와 매우 관련이 있다(25). 뿐만 아니라, LPS는 대식세포에서 NO 생성 효소인 iNOS 뿐만 아니라 다양한 염증 유발 사이토카인의 발현을 유도한다(23, 26). 특히, LPS에 의해 생성된 다량의 NO는 염증반응이 일어나는 동안 세포독성을 일으켜 급성 또는 만성 염증을 유발하는 주요 원인이 되는데(25), 숲개밀 추출물은 이러한 LPS에 의해 유도된 NO의 생성을 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 약 26% 정도 감소시켰다. 같은 조건하에서 세포 활성도를 측정한 결과 모든 농도에서 세포독성을 나타내지 않았다. 최근 이러한 TNF- α 와 IL-6 및 NO와 같은 염증매개물질의 분비량과 활성을 억제함으로써 염증 질환을 치료할 수 있는 치료제 개발에 대한 연구가 많이 보고되고 있다(27, 28). 따라서 이상의 결과는 숲개밀 추출물이 세포독성 없이 염증성 사이토카인인 TNF- α 및 IL-6의 분비능을 억제하고 NO 생성을 저해함으로써 항염증 효과가 있음을 보여주는 것을 시사한다.

숲개밀 추출물이 파골세포의 생성에 미치는 영향을 관찰하기 위해 숲개밀 추출물을 3, 10, 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 처리한 후 파골세포의 대표적인 세포화학적 표지효소인 TRAP 염색을 통해 양성 다핵세포의 형성을 관찰하였다. 파골세포의 분화를 유도하는 사이토카인인 M-CSF와 RANKL은 대식세포가 양성 다핵 파골세포로의 분화를 유도한다(29). 숲개밀 추출물 처리군에서는 양성 다핵 파골세포의 분화가 억제되어 양성 다핵 파골세포의 크기와 수가 감소하는 것을 형태학적으로 확인할 수 있었다. 파골세포의 분화에서 TRAP 활성도를 측정한 결과, 농도 의존적으로 TRAP 활성도가 감소하는 경향을 보이나, 대조군과 유의성 있는 차이가 없었다. TRAP 활성도는 흡광도로 간접적으로 측정하는 방법이고, 대조군의 편차가 커서 통계적으로 유의차가 없는 것으로 나타난 것으로 사료된다. 하지만 TRAP 양성 다핵 파골세포가 골의 재흡수를 일으키므로 파골세포 분화 억제능을 확인하는데 있어 더 명확한 지표는 TRAP 양성 다핵 파골세포의 크기와 수가 감소하는 것이므로 TRAP 염색 결과가 보다 직접적이고 정확한 결과로 사료된다. 또한 세포독성 실험을 통해 숲개밀 추출물이 대식세포에 대한 강력한 독성이 나타나지 않은 것을 확인함으로써 세포독성으로 인한 파골세포 분화가

억제되지 않은 것을 확인할 수 있었다. 이상의 결과에서 숲개밀 추출물은 세포독성 없이 파골세포의 분화를 억제함으로써 뼈의 대사에 영향을 미치는 것으로 사료되며, 치주질환으로 인한 골 소실을 예방할 수 있는 잠재력을 확인하였다. 추후 연구에서는 숲개밀 추출물의 약리학적 특성을 규명하기 위해 추출물을 분리 및 정제하여 지표성분과 유효성분을 밝히고 이를 통해 유효성분의 항균, 항염증 및 파골세포 분화를 억제하는 기전을 규명하는 추가적인 연구가 필요하다. 본 연구에서는 숲개밀 추출물이 *P. gingivalis*에 대한 항균능을 확인하였으며, 불소바니쉬와 혼합할 시 항균의 지속성을 5일까지 유지했다. 또한, RAW264.7에서 LPS로 유도한 전염증성 사이토카인 및 산화질소의 생성을 저해하며, 파골세포로의 분화 억제능을 통해 치주질환의 예방 및 개선제로써의 적용 가능성을 확인하였다.

결론

숲개밀(BS) 추출물은 구강질환을 야기하는 균주에 대하여 우수한 항균 효과 및 항균 지속 효과를 나타내었고, 대식세포에 대한 세포독성없이 전염증성 사이토카인 및 산화질소의 생성과 파골세포로의 분화를 억제함으로써 치주질환의 치료 및 개선제로서 가능성이 있는 물질로 사료된다.

사사

이 성과는 2018년도 정부(과학기술정보통신부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(No. 2018R1A2B6002088). SHK는 한국화학연구원의 재원(KK1703-F02, KK1803-F00, KK1932-20)으로 수행한 연구임.

참고문헌

1. 보건의료빅데이터개방시스템[Internet]. 건강보험심사평가원. 다빈도 질병 통계; 2020 [cited 2020 Jan 6]. Available form: <http://opendata.hira.or.kr/op/opc/>

olapHifrqSickInfo.do.

2. Listgarten MA. The role of dental plaque in gingivitis and periodontitis. *J Clin Periodontol*. 1988;15(8):485-7.
3. Loesche WJ, Grossman NS. Periodontal Disease as a Specific, albeit Chronic, Infection: Diagnosis and Treatment. *Clin Microbiol Rev*. 2001;14(4):727.
4. Ahn J, Segers S, Hayes RB. Periodontal disease, Porphyromonas gingivalis serum antibody levels and orodigestive cancer mortality. *Carcinogenesis*. 2012;33(5):1055-8.
5. Mysak J, Podzimek S, Sommerova P, Lyuya-Mi Y, Bartova J, Janatova T, et al. Porphyromonas gingivalis: Major Periodontopathic Pathogen Overview. *J Immunol Res*. 2014;2014:476068.
6. Beck JD, Offenbacher S. Systemic Effects of Periodontitis: Epidemiology of Periodontal Disease and Cardiovascular Disease. *J Periodontol*. 2005;76(11S):2089-100.
7. Mealey BL. Periodontal disease and diabetes: A two-way street. *J Am Dent Assoc*. 2006;137:S26-S31.
8. Leszczyńska A, Buczek P, Buczek W, Pietruska M. Periodontal pharmacotherapy – an updated review. *Adv Med Sci*. 2011;56(2):123-31.
9. Jepsen K, Jepsen S. Antibiotics/antimicrobials: systemic and local administration in the therapy of mild to moderately advanced periodontitis. *Periodontol 2000*. 2016;71(1):82-112.
10. Rainsford KD. Profile and mechanisms of gastrointestinal and other side effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). *Am J Med*. 1999;107(6):27-35.
11. Lazar V, Saviuc C-M, Carmen Chifiriuc M. Periodontitis and Periodontal Disease - Innovative Strategies for Reversing the Chronic Infectious and Inflammatory Condition by Natural Products. *Curr Pharm Design*. 2015;22(2):230-7.
12. Pimentel SP, Casati MZ, Ribeiro FV, Corrêa MG, Franck

- FC, Benatti BB, et al. Impact of natural curcumin on the progression of experimental periodontitis in diabetic rats. *J Periodontal Res.* 2020;55(1):41-50.
13. Yang H, Wen Q, Xue J, Ding Y. Alveolar bone regeneration potential of a traditional Chinese medicine, Bu-Shen-Gu-Chi-Wan, in experimental periodontitis. *J Periodontal Res.* 2014;49(3):382-9.
 14. H.R R, Dhamecha D, Jagwani S, Rao M, Jadhav K, Shaikh S, et al. Local drug delivery systems in the management of periodontitis: A scientific review. *J Control Release.* 2019;307:393-409.
 15. 이창복. *원색 대한식물도감(하)*. 서울: 향문사; 2003. 516.
 16. 이우철. *韓國植物名考=Lineamenta florum Koreae*. 서울: 아카데미서적; 1996. 1336.
 17. Son JL, Kim AJ, Oh S, Bae JM. Inhibitory effects on *Streptococcus mutans* of antibacterial agents mixed with experimental fluoride varnish. *Dent Mater J.* 2020; 39(4):690-5.
 18. Moon SH, Choi SW, Kim SH. In vitro anti-osteoclastogenic activity of p38 inhibitor doramipimod via inhibiting migration of pre-osteoclasts and NFATc1 activity. *J Pharmacol Sci.* 2015;129(3):135-42.
 19. Son JL, Kim AJ, Oh SH, Bae JM. Minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration of antibacterial fluoride varnish. *Korean J Dent Mater.* 2018;45(2):139-46.
 20. Kim MH, Hwang M, Lee WY, Park YJ, Song HJ. Characteristics of Antibacterial Chlorhexidine-Containing Hydroxyapatite Coated on Titanium. *Korean J Dent Mater.* 2017;44(3):263-72.
 21. Son JL, Bae JM. Sustainability of the antibacterial activity of experimental fluoride varnish mixed with antibacterial agents against *Streptococcus mutans*. *Korean J Dent Mater.* 2020;47(2):63-70.
 22. Taira M, Sasaki M, Kimura S, Araki Y. Dose-dependent effects of Ni (II) ions on production of three inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β and IL-6), superoxide dismutase (SOD) and free radical NO by murine macrophage-like RAW264 cells with or without LPS-stimulation. *J Mater Sci Mater Med.* 2008;19(5): 2173-8.
 23. Espinassous Q, Garcia-de-Paco E, Garcia-Verdugo I, Synguelakis M, von Aulock S, Sallenave J-M, et al. IL-33 Enhances Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Cytokine Production from Mouse Macrophages by Regulating Lipopolysaccharide Receptor Complex. *J Immunol.* 2009;183(2):1446.
 24. Schett G. Effects of inflammatory and anti-inflammatory cytokines on the bone. *Eur J Clin Invest.* 2011;41(12):1361-6.
 25. Cochran DL. Inflammation and Bone Loss in Periodontal Disease. *J Periodontol.* 2008;79(8S): 1569-76.
 26. Aramaki Y, Matsuno R, Tsuchiya S. Involvement of p38 MAP Kinase in the Inhibitory Effects of Phosphatidylserine Liposomes on Nitric Oxide Production from Macrophages Stimulated with LPS. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;280(4):982-7.
 27. Yoon S-B, Lee Y-J, Park SK, Kim H-C, Bae H, Kim HM, et al. Anti-inflammatory effects of *Scutellaria baicalensis* water extract on LPS-activated RAW 264.7 macrophages. *J Ethnopharmacol.* 2009;125(2):286-90.
 28. Moro C, Palacios I, Lozano M, D'Arrigo M, Guillamón E, Villares A, et al. Anti-inflammatory activity of methanolic extracts from edible mushrooms in LPS activated RAW 264.7 macrophages. *Food Chem.* 2012;130(2):350-5.
 29. Oddie GW, Schenk G, Angel NZ, Walsh N, Guddat LW, de Jersey J, et al. Structure, function, and regulation of tartrate-resistant acid phosphatase. *Bone.* 2000;27(5):575-84.

치주질환 예방 및 개선제로서 숲개밀 추출물의 효능

문성희^{1,2}, 손주리³, 신성진¹, 오승한^{1,2}, 김성환⁴, 배지명^{1,2*}

¹원광대학교 치과대학 치과생체재료학교실

²원광대학교 생체재료·매식연구소

³원광보건대학교 치위생과

⁴한국화학연구원 신약개발본부 신약개발플랫폼연구센터

본 논문에서는 치주질환 개선제로서 숲개밀(*Brachypodium sylvaticum*, BS) 추출물의 활용가능성을 확인하기 위해, 항균, 항염증 및 파골세포 분화 억제 활성에 관한 효능을 평가하였다. 숲개밀 추출물의 *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*)의 성장 저해능과 항균의 지속성을 평가하였다. 숲개밀의 항염증 활성을 확인하기 위해 lipopolysaccharide (LPS) 처리에 의해 활성화된 RAW264.7 세포에서 전염증성 사이토카인의 분비량을 효소결합면역측정법(Enzyme-linked immunosorbent assay)으로 측정하였고, 산화질소의 생성능과 세포생존율을 측정하였다. 또한 Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) 염색과 활성으로 파골세포 분화능을 평가하였다. 숲개밀 추출물은 *P. gingivalis*에 대해서 유의성있는 항균활성 및 항균의 지속성을 나타내었다. 또한 숲개밀 추출물은 세포독성없이 전염증성 사이토카인인 tumor necrosis factor (TNF- α) 와 interleukin-6 (IL-6) 분비를 유의성있게 감소시켰고, 산화질소 생성능을 현저히 저해시키는 것을 확인하였다. 또한, 숲개밀 추출물은 생쥐의 골수세포에서 얻어진 bone marrow macrophages (BMMs)에서의 파골세포로의 분화를 세포독성 없이 억제하였다. 결론적으로 숲개밀 추출물은 항균, 항염 및 파골세포 분화 억제능을 보였고, 이는 치주질환 치료 및 개선제의 유력한 후보 물질이 될 수 있다.

색인 단어 : 숲개밀, 치주질환, 항균, 항염, 파골세포분화
