

정향 꽃봉오리 에탄올 추출물의 *Porphyromonas gingivalis* 내독소를 처리한 사람 치은섬유모세포에 대한 항염 효과

임윤경^{1,+}, 유소영^{2,+}, 오하나², 이대성², 국중기^{1,*}

¹조선대학교 치과대학 한국구강미생물자원은행 및 구강생화학교실
²주식회사 메디바이오랩

Anti-inflammatory effects of ethanol extracts of the flower buds of *Syzygium aromaticum* L. on human gingival fibroblast cells treated with *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide

Yun Kyong Lim^{1,+}, So Young Yoo^{2,+}, Ha Na Oh²,
Dae Sung Lee², Joong-Ki Kook^{1,*}

¹Korean Collection for Oral Microbiology and Department of Oral Biochemistry,
School of Dentistry, Chosun University, Gwangju, Republic of Korea

²Medi Bio Lab Co., Ltd., Seoul, Republic of Korea

⁺These authors contributed equally to this work

This study was conducted to evaluate the cytotoxic and anti-inflammatory effects of the ethanol extract of *Syzygium aromaticum* L. (clove) buds. The cytotoxicity test was performed by cell counting method using hTERT-hNOF cells, a human immortalized gingival fibroblast cell line. To test the anti-inflammatory effects, the hTERT-hNOF cells were treated with lipopolysaccharide (LPS) extracted from *Porphyromonas gingivalis* KCOM 2804 (PgLPS) and ethanol extract of clove buds. The expression levels of PGE₂, IL-6, and IL-8 were measured by enzyme-linked immunosorbent assay. The cytotoxicity test data showed a cell viability of $\geq 82\%$ in hTERT-hNOF cells treated with 10 to 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of the ethanol extract of clove buds. The anti-inflammatory test data showed that the expression of PGE₂ by PgLPS treatment was reduced to the level of the negative control group by treatment with 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ or more of the ethanol extract of clove buds. In group treated with PgLPS and 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of clove bud ethanol extract, the expression levels of IL-6 and IL-8 in were inhibited by 75% and 77%, respectively ($p < 0.05$), compared to the positive control (PgLPS treatment) group. These results suggest that the ethanol extract of clove buds can be used in developing oral hygiene products for preventing periodontal disease.

Keywords : Anti-inflammation, Clove flower buds, Lipopolysaccharide, *Porphyromonas gingivalis*

Yun Kyong Lim (ORCID: 0000-0002-6215-8204)
So Young Yoo (ORCID: 0000-0002-1933-3978)
Ha Na Oh (ORCID: 0000-001-7653-5151)
Dae Sung Lee (ORCID: 0000-0003-2317-7848)

*Correspondence: Joong-Ki Kook (ORCID: 0000-0003-2628-2870)
309 Pilmun-daero, Gwangju 61452, Republic of Korea
Affiliation: Department of Oral Biochemistry, School of Dentistry,
Chosun University, Gwangju, Republic of Korea
Tel: +82-62-230-6877
E-mail: jkkook@chosun.ac.kr

Received: Jan. 03, 2023; Revised: Jan. 28, 2023; Accepted: Jan. 28, 2023

서론

치주질환은 치은연하에 축적된 다양한 치태세균에 의한 감염성 질환이며 주된 원인균 중 그람 음성간균인 *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) 감염 후 염증반응의 결과로 치은출혈과 치은퇴축 그리고 치주낭 형성 및 치조골 파괴와 골흡수로 이어져 궁극적으로 치아 상실을 초래할 수 있다(1). *P. gingivalis* 세포벽의 외막 구성성분인 지질다당류(LPS)는 interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6 및 종양괴사인자- α (TNF- α)와 같은 염증성 사이토카인의 생성을 유도하여 염증유발에 핵심적인 역할을 한다(2). 따라서 염증의 화학적 매개체를 제어하여 염증 반응을 억제할 수 있는 새로운 물질을 찾는 것이 가장 중요하다. 치주질환의 예방 및 치료를 위해 항생제, 항균제 및 항염제를 사용하지만, 이들에 대한 내성을 갖는 세균 출현이나 과민반응 및 위장장애 등의 부작용을 가지고 있다(3). 그러므로, 이를 대체할 수 있는 천연물에 대한 연구가 많이 이루어지고 있다(4).

정향(학명: *Syzygium aromaticum* L.)은 인도의 모루카섬이 원산지이며 브라질, 말레이시아, 아프리카 등에서 많이 재배되고 있는 식물로, 특유의 강한 향 때문에 식품의 향신료, 화장품 및 의약품 등의 분야에서 방향성 소재로서 널리 사용되고 있다(5). 정향의 주된 향기성분으로 정유 성분인 eugenol이 알려져 있으며 항균, 항염, 항산화, 항암, 항진균, 항알레르기 등 여러 생리 활성작용을 하여 천연기능 소재로 보고되고 있다(6-8). 하지만 정향의 꽃봉오리 추출물을 이용한 치주질환에 관한 연구는 다소 미비한 실정이다. 그러므로 본 연구에서는 정향 꽃봉오리 에탄올 추출물에 대한 항염능을 조사하여 천연물로서 치주질환 예방 및 치료 보조제로 사용 가능성을 알아보고자 시행하였다.

재료 및 방법

1. 실험 재료

본 실험에서 사용한 정향 꽃봉오리는 (주)대호양행(Hwaseong-si, Korea)으로 부터 건조된 시료를 구입하여 사용하였다. 정향 꽃봉오리를 물로 세척한 후에 70% 에탄올

을 용매로 하여 75 °C에서 8시간 동안 2회 추출하고, 1 μ m Cartridge Filter를 이용하여 여과한 다음 85 °C에서 40분 살균하였다. 살균한 시료는 분무 건조기(Mehyun Engineering Co., Ltd., Anyang, Korea)를 사용하였으며, 이때 분무건조 조건은 주입온도 180 °C, 방출온도 80 °C로 설정하여 건조한 다음 시료로 사용하였다(Figure 1).

2. 세포 독성 시험

사람 유래 불멸화된 치은섬유모세포인 hTERT-hNOF 세포 주(연세대학교 치과대학 김진 교수님으로부터 분양 받음)를 이용하여 실시하였다. hTERT-hNOF 세포는 F medium [Dulbecco's Modified Eagles Medium [DMEM] (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)와 Ham's Nutrient Mixture F-12 (Gibco BRL)가 3:1로 혼합됨]에 10% fetal bovine serum (Hyclone, Logan, UT, USA)와 1% penicillin/streptomycin (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)이 첨가된 배지(9)를 이용하

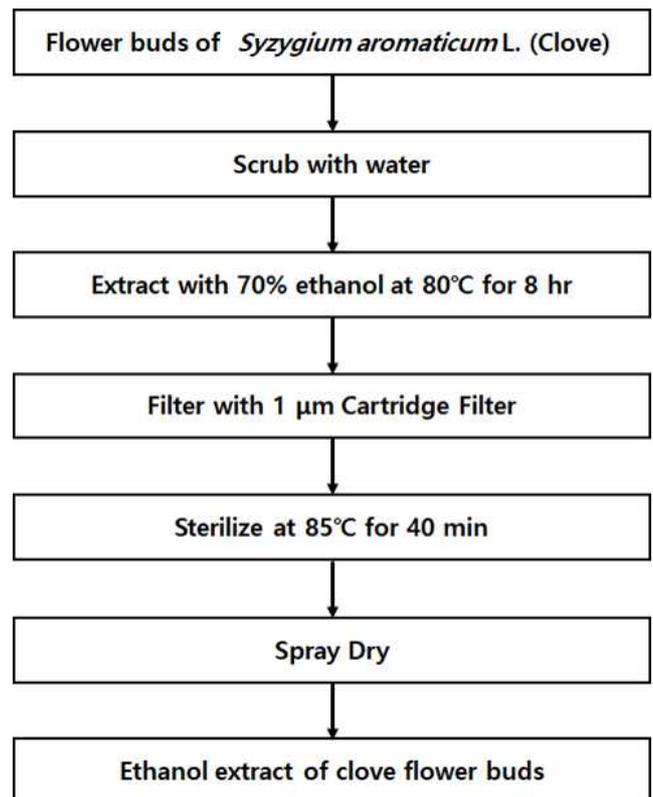


Figure 1. Schematic diagram for preparation of ethanol extracts from the flower buds of *Syzygium aromaticum* L.

여, 37 °C, 5% CO₂, 100% 습도가 유지되는 세포 배양기에서 배양하였다. hTERT-hNOF 세포를 24-well plate에 4×10⁴이 되도록 seeding 하여 배양한 후 80% confluence 했을 때, 1% DMSO 또는 10, 20, 40, 80, 120, 160 µg/mL 농도의 정향 꽃봉오리 에탄올 추출물 농도가 되도록, DMSO와 정향 꽃봉오리 에탄올 추출물을 첨가하여 배양하였다. 24시간 후, 0.25% Trypsin-EDTA (Welgene, Gyeongsan, Korea)를 이용하여 세포를 수확한 뒤 10% FBS가 함유된 배지에 세포를 현탁하여 세포 수를 측정하였다. 각 반응은 3회 반복 실시하였으며 세포의 수는 세포계수기를 이용하여 측정하였다. 결과값은 1% DMSO를 첨가하여 배양한 대조군에 대한 백분율을 산출하여 평균 및 표준편차로 제시하였다.

3. 지질다당류(lipopolysaccharide, LPS) 추출

P. gingivalis KCOM 2804 균주의 지질다당류는 인트론사(Seongnam, Korea)의 LPS extraction kit를 이용하여 추출하였다. 추출된 *P. gingivalis* KCOM 2804 균주 유래 LPS (PgLPS)는 동결 건조하여 무게를 측정한 뒤 실험에 사용하였다.

4. 항염 시험

정향 꽃봉오리 에탄올 추출물의 항염능을 알아보기 위해 hTERT-hNOF 세포를 사용하여 염증성사이토카인인 PGE₂, IL-6 및 IL-8의 발현 변화를 관찰하였다. hTERT-hNOF 세포를 24-well plate에 6×10⁴ cells/well이 되도록 하여 24시간 배양한 후 80% confluence 했을 때 1% DMSO 또는 10, 20, 40, 80, 120, 160 µg/mL 농도의 정향 꽃봉오리 에탄올 추출물을 처리하였다. 이를 30분 반응시킨 뒤 100 ng/ml 농도의 PgLPS를 첨가하였으며, PgLPS에 대한 hTERT-hNOF의 반응성을 높이기 위해 200 ng/ml CD14 (R&D systems, Minneapolis, MN, USA)와 50 ng/ml LPS-binding protein [LBP] (R&D systems)을 함께 첨가하였다. 이를 24시간 반응시킨 다음 세포배양액을 채취하여 IL-6, IL-8 및 PGE₂ 단백질 발현 변화를 human IL-6 ELISA kit (Biolegend, San Diego, CA, USA), human IL-8 ELISA kit (Biolegend), human PGE₂ ELISA kit (Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA)를 사용해 측정하였다. 동봉된 프로토콜대로 시행하고 각 반응

은 3회 반복 실시하였다. 음성 대조군은 정향 꽃봉오리 에탄올 추출물 분말 용매인 DMSO가 1% 첨가된 배지만으로 키운 것이고, 양성 대조군은 1% DMSO와 LPS, CD14, LPB를 첨가하여 키운 것으로 모든 실험 결과는 각각의 대조군에 대한 백분율로 계산하였다.

5. Statistics

데이터의 통계분석은 SPSS (SPSS 12.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 통계분석 시스템을 사용하였다. 대조군과 실험군의 두 집단이 통계적 유의 수준에서 차이가 있는지를 검증하기 위해 대응 표본 T검정을 실시하였다. 두 집단 간의 통계적 유의성은 95% 신뢰수준에서 분석하였다. 이때 p<0.05일 경우, 두 집단 간의 유의미한 차이가 있음을 의미한다.

결과 및 고찰

정향 꽃봉오리 에탄올 추출물의 hTERT-hNOF 세포 주에 대한 독성실험 결과, 10~80 µg/mL 농도에서 음성 대조군에 비하여 약 80% 또는 그 이상의 세포 생존율을 보였다(Figure 2). 따라서 이 결과를 토대로 정향 꽃봉오리 에탄올 추출물의 항염능 조사 시, 160 µg/mL 이하의 농도로 처리하여 사용하였다. 정향 꽃봉오리 에탄올 추출물은 마우스 대식세포 RAW 264.7 세포에서 세포 독성 평가 결과, 50 µg/mL 이하의 농도에서 80% 이상 세포 생존율을 보여 세포 독성을 보이지 않았다고 하였다(10). 이러한 두 연구 결과에서 정향 꽃봉오리 에탄올 추출물에 의한 세포 독성을 보이는 농도의 차이는 실험에 사용된 세포 기원에 따른 차이에 의한 것으로 생각된다.

PgLPS로 처리한 hTERT-hNOF 세포에 대한 정향 꽃봉오리 에탄올 추출물의 항염 효과를 확인하기 위해 염증성 사이토카인 PGE₂, IL-6 및 IL-8 발현량을 측정하였다. PGE₂ 발현 변화를 측정한 실험 결과, PgLPS를 처리한 양성 대조군은 음성 대조군에 비하여 높은 PGE₂ 발현량이 약 33배 증가하였다(Figure 3). 정향 꽃봉오리 에탄올 추출물 10, 20, 40, 80, 120, 160 µg/mL 농도로 처리 시, 양성 대조군에

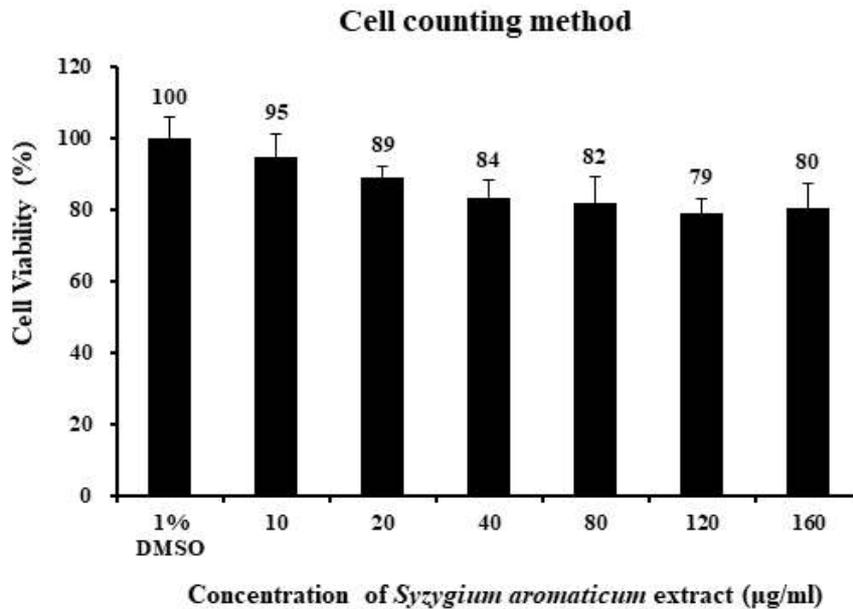


Figure 2. Cell viability hTERT-hNOF cells after treatment with ethanol extracts of the flower buds of *Syzygium aromaticum*. The data of all experimental groups were expressed as a percentage compared to the control group.

비해 모든 실험군에서 PGE₂ 발현이 98% 이상 현저하게 감소하여, 음성대조군과 거의 동일한 발현량을 보였다(Fig. 3). 정향의 주된 향기 성분인 eugenol은 20 µg/mL 농도에서 염증 유발 효소인 cyclooxygenase 2 (COX-2) 발현을 85.35% 강한 저해활성으로 나타냄이 보고되었다(11). 따라서 정향의 eugenol 성분이 COX-2 발현을 억제함으로써 PGE₂의 생합성을 저해하는 것으로 여겨진다. 선행연구에 의하면, 본 연구에 사용된 hTERT-hNOF 세포에서는 PgLPS 투여에 의해 COX-2의 발현량이 차이가 없었다(데이터 제시 생략). 이러한 이유로 본 연구에서는 COX-2의 발현량을 측정하지 않았다. 치주질환원인균에 의한 염증반응에서 주요하게 발현되는 것으로 알려진 염증성 사이토카인인 IL-6 (12) 발현 결과, 정향 꽃봉오리 에탄올 추출물 40, 80, 120, 160 µg/mL 농도에서 양성 대조군에 비해 IL-6 발현량이 75~86% 감소함을 보였다(Figure 3). 이러한 결과는 LPS로 유도된 RAW 264.7 세포에 대해 정향 꽃봉오리 에탄올 추출물 50 µg/mL 농도에서 72% 이상의 IL-6 억제 활성을 보였다는 것과 유사하였다(13). 만성염증질환의 시작과 진행에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 염증성 사이토카인인 IL-8 (14) 발현 결과, 정향 꽃봉오리 에탄올 추출물 40, 80, 120, 160 µg/mL 농도에서 양성대조군에 비해 77~93%의

강한 억제 활성을 보여 IL-6 발현 결과와 비슷한 경향을 나타내었다(Figure 3). 그러므로, 정향 꽃봉오리 에탄올 추출물은 40~160 µg/mL 범위에서, PgLPS 투여에 의한 hTERT-hNOF 세포에서의 PGE₂, IL-6 및 IL-8의 발현 억제를 통해 항염능을 부여하는 것으로 생각된다. 하지만, 향후 연구에서 정향 꽃봉오리 에탄올 추출물의 어떤 성분에 의해 항염능이 부여되는 지에 대한 연구가 진행되어야 할 것으로 생각된다.

결론

본 연구는 정향 꽃봉오리 에탄올 추출물이 주요한 치주질환원인균으로 알려진 *P. gingivalis* (KCOM 2804) 균주에서 추출한 LPS를 처리한 사람 유래 치은섬유모세포인 hTERT-hNOF 세포에서 항염능을 갖는지를 평가하기 위해 시행하였다. 그 결과, 정향 꽃봉오리 에탄올 추출물은 10~80 µg/mL 농도에서 세포독성이 없으면서, 구강 세균의 감염에 의해 구강 섬유모세포에서 유도되는 염증성 사이토카인인 PGE₂, IL-6 및 IL-8 등의 발현을 억제하여, 치주질환 예방 및 치료보조제로 사용 가능할 것으로 생각된다.

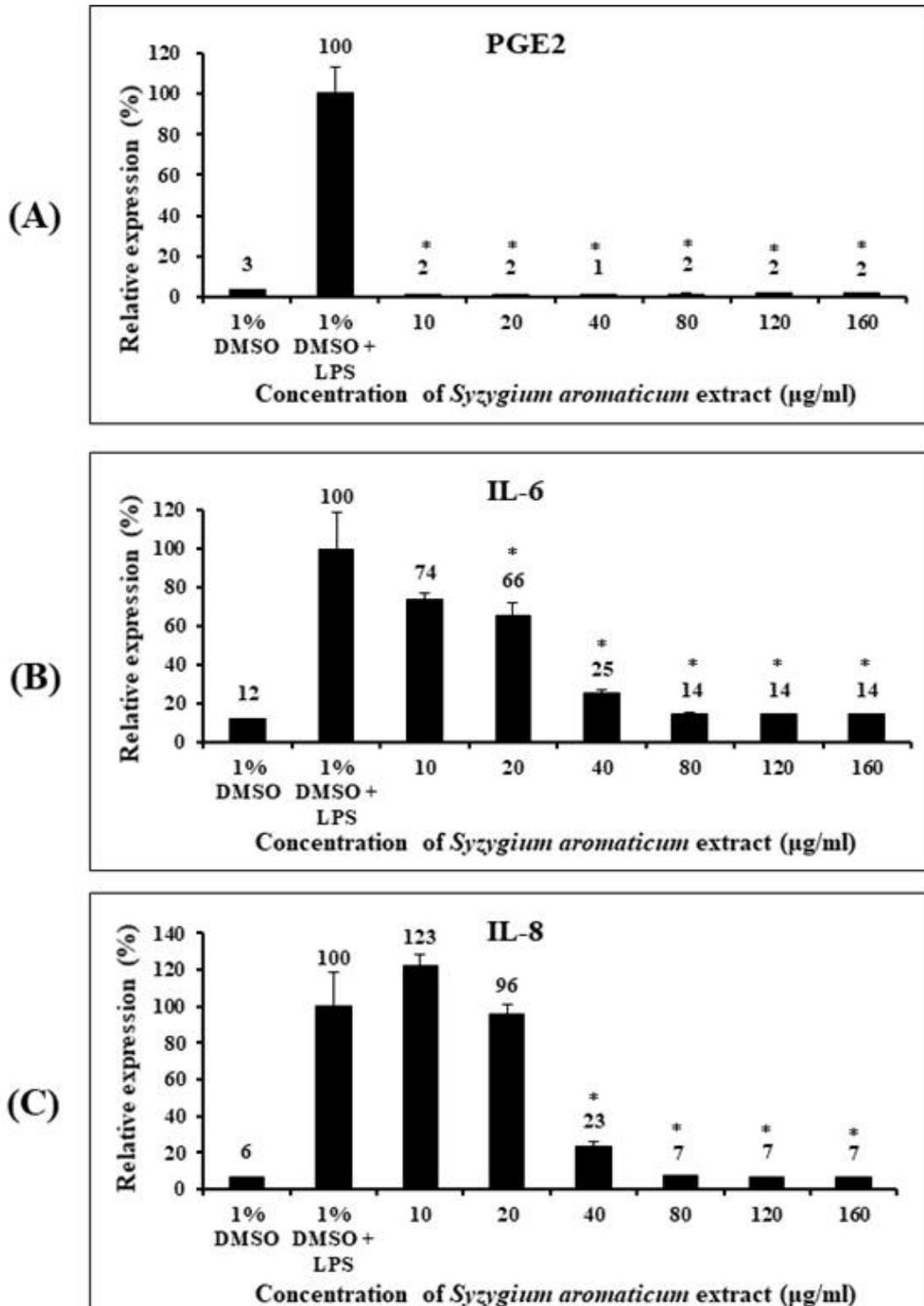


Figure 3. Effect of ethanol extracts of the flower buds of *Syzygium aromaticum* on expression change of PGE2 (A), IL-6 (B), and IL-8 (C) in *Porphyromonas gingivalis* KCOM 2804 LPS-treated hTERT-hNOF cells. The data of all experimental groups were expressed as a percentage compared to the control group. *p<0.05.

사 사

Dae Sung Lee, So-Young Yoo, and Ha Na Oh are co-applicants on patent application 10-2022-0156793 entitled "Composition for preventing, improving or treating comprising *Syzygium aromaticum* L. extract". The other authors have no conflict of interest.

본 연구는 (주)메디바이오랩의 연구지원비(2020-0535)에 의해 수행한 결과임.

참고문헌

1. Madianos P, Bobetsis Y, Kinane D. Generation of inflammatory stimuli: how bacteria set up inflammatory responses in the gingiva. *J Clin Periodontol*. 2005;32(6):57-71.
2. Zhang D, Chen L, Li S, Gu Z, Yan J. Lipopolysaccharide (LPS) of *Porphyromonas gingivalis* induces IL-1 β , TNF- α and IL-6 production by THP-1 cells in a way different from that of *Escherichia coli* LPS. *Innate Immun*. 2008;4(2):99-107.
3. Kim TI, Choi EJ, Jeong JP, Han SB, Gu Y. Antimicrobial effect of Zea Mays L. and Magnoliae cortex extract mixtures on periodontal pathogen and effect on human gingival fibroblasts. *J Kor Academy Periodontol*. 2002;32(1):249-55.
4. Van Strydonck DA, Timmerman MF, van der Velden U, van der Weijden GA. Plaque inhibition of two commercially available chlorhexidine mouthrinses. *J Clin Periodontol*. 2005;32(3):305-9.
5. Cortés-Rojas DF, de Souza CRF, Oliveira WP. Clove (*Syzygium aromaticum*): a precious spice. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2014;4(2):90-6.
6. Kaur G, Athar M, Alam M. Eugenol precludes cutaneous chemical carcinogenesis in mouse by preventing oxidative stress and inflammation and by inducing apoptosis. *Mol Carcinog*. 2010;49(3):290-301.
7. Rana IS, Rana AS, Rajak RC. Evaluation of antifungal activity in essential oil of the *Syzygium aromaticum* (L.) by extraction, purification and analysis of its main component eugenol. *Braz J Microbiol*. 2011;42(4):1269-77.
8. Rusmana D, Elisabeth M, Widowati W, Fauziah N and Maesaroh M. Inhibition of inflammatory agent production by ethanol extract and eugenol of *Syzygium aromaticum* (L.) flower bud (clove) in LPS-stimulated Raw 264.7 cells. *Res J Medicinal Plant*. 2015;9(6):264-74.
9. Kwon JS, Illeperuma RP, Kim J, Kim KM, Kim KN. Cytotoxicity evaluation of zinc oxide-eugenol and non-eugenol cements using different fibroblast cell lines. *Acta Odontol Scand*. 2014;72(1):64-70.
10. Jang Y-A, Lee JM, Choi Y-S, Kim B-A. Anti-inflammatory effect of ethanol extract of *Syzygium aromaticum*. *Journal of the Korean Applied Science and Technology*. 2020;37(3):429-37.
11. Leem HH, Kim EO, Seo MJ, Cho SW. Antioxidant and anti-inflammatory activities of eugenol and its derivatives from clove (*Eugenia caryophyllata* Thunb.). *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2011;40(10):1361-70.
12. Okada N, Kobayashi M, Mugikura K, Okamoto Y, Hanazawa S, Kitano S, Hasegawa K. Interleukin-6 production in human fibroblasts derived from periodontal tissues is differentially regulated by cytokines and a glucocorticoid. *J Periodontol Res*. 1997;32(7):559-69.
13. Djaja R, Mariska E, Wahyu W, Nurul F, Maesaroh M. Inhibition of inflammatory agent production by ethanol extract and eugenol of *Syzygium aromaticum* (L.) flower bud (clove) in LPS-stimulated Raw 264.7 cells. *Res J Med Plant*. 2015;9(6):264-74.
14. Fujita Y, Ito H, Sekino S, Numabe Y. Correlations between pentraxin 3 or cytokine levels in gingival crevicular fluid and clinical parameters of chronic periodontitis. *Odontology*. 2012;100(2):215-21.

정향 꽃봉오리 에탄올 추출물의 *Porphyromonas gingivalis* 내독소를 처리한 사람 치은섬유모세포에 대한 항염 효과

임윤경^{1,+}, 유소영^{2,+}, 오하나², 이대성², 국중기^{1,*}

¹조선대학교 치과대학 한국구강미생물자원은행 및 구강생화학교실

²주식회사 메디바이오랩

본 연구는 정향 꽃봉오리 에탄올 추출물의 세포독성과 항염증 효과를 평가하고자 수행하였다. 세포 독성 시험은 사람 유래 불멸화된 치은섬유모세포인 hTERT-hNOF 세포 주를 이용하여 세포계수법으로 시행하였다. 항염 시험은 *Porphyromonas gingivalis* KCOM 2804 균주에서 추출한 지질다당류(lipopolysaccharide, LPS) (PgLPS)와 정향 꽃봉오리 에탄올 추출물을 hTERT-hNOF 세포 주에 처리하여, 염증성 사이토카인 PGE₂, IL-6 및 IL-8의 발현량 변화를 효소면역분석법으로 측정하였다. 세포 독성 시험 결과, 정향 꽃봉오리 에탄올 추출물 10~80 µg/mL 농도에서, hTERT-hNOF 세포는 82% 이상의 세포 생존율을 보였다. 항염 시험 결과, 정향 꽃봉오리 에탄올 추출물 10 µg/mL 이상의 농도에서 PgLPS 처리에 의한 PGE₂ 발현이 음성대조군 수준으로 감소되었다. PgLPS와 정향 꽃봉오리 에탄올 추출물 40 µg/mL를 투여한 군에서의 IL-6 및 IL-8 발현량은 양성 대조군(PgLPS 처리)에 비해 각각 75% 및 77% 억제되었다(p<0.05). 이러한 결과는 정향 꽃봉오리 에탄올 추출물이 치주질환 예방 및 치료보조제로 사용 가능할 것으로 생각된다.

색인단어 : 항염, 정향 꽃봉오리, 지질다당류, *Porphyromonas gingivalis*
