

원저

대한구강보건학회지 : 제 29권 제 4호, 2005
J Korean Acad Dent Health Vol. 29, No. 4, 2005

Curcuma xanthorrhiza oil 및 죽염배합세치제의 치은염억제효과

황수정, 김상년¹, 장석윤¹, 하원호¹, 김인수, 진보형, 백대일, 김현덕
서울대학교 치과대학 예방치학교실, ¹LG생활건강기술연구원

색인 : 세치제, 실험치은염모형, 치은염, Curcuma xanthorrhiza, Matrix metalloproteinase

1. 서 론

치은염은 치주조직병의 시초단계이며 치은에서 발생된 염증을 말한다. 치은염의 대표적인 증상은 치은발적과 출혈이며 치은염을 방치하여 진전되었을 경우 치주조직염으로 이행될 수도 있다¹⁾. 2000년 국민구강건강실태조사에 따르면 12세 청소년의 54%에서 치은염 및 치주조직염이 발생되었고, 35~44세 성인에서는 90%였다. 치주조직병 이환 평균삼분약수는 12세 청소년에서 이미 1.3개의 삼분약(전체의 21.7%)이 경미한 치주조직병에 이환되어 있으며 35~44세에 이르면 3.7개의 삼분약(전체의 61.7%)이 치주조직병에 이환되어 있다고 하였다²⁾. 그러므로 국민 대다수가 이환되어 있는 치주조직병을 예방, 치료하기 위해서 철저한 치면세균막관리가 필요하다¹⁾.

치주조직병을 일으킨다고 알려져 있는 치면세균막을 관리하기 위해 여러 방법의 잇솔질이 고안되어 교육되고 있으며 세치제 또한 다양한 물질을 배합하여, 치은염 및 치아우식증예방에 힘쓰고 있다. 여러 선행된 연구에서 죽염은 치은염완화에 효과가 있다고 하였으며^{3,8)}, 인도네시아의 약용식물인 쿠르쿠마 잔토리자(Curcuma xanthorrhiza)는 항염효과를 가지고 있으며 염증에 관여하는 prostaglandin 합성효소인 cyclooxygenase-2 및 nitric oxide synthase의 발현을 현저히 억제함을 보여 주었다는 보고가 있다^{9,10)}.

이러한 배경에서 죽염, 우르소테스옥시콜린산, 글리시리진산디칼륨, 쿠르쿠마잔토리자유(Curcuma xanthorrhiza oil)를 배합한 세치제가 치은염을 예방할 목적으로 개발되었다. 그러나, 실제 생체에서 죽염, 우르소테스옥시콜린산, 글리시리진산디칼륨,

연락처 : 김현덕, 우110-749 서울특별시 중로구 연건동 28 서울대학교 치과대학 예방치학교실

전화: (02)740-8684 전송: (02)765-1722 e-mail : hyundkim@snu.ac.kr

이 연구는 LG생활건강에서 연구비를 지원하였고 서울대학교 치과병원 기관연구윤리심의위원회(IRB)에서 승인을 받았습니다.

쿠르쿠마잔토리자유를 배합한 세치제가 치은염을 억제할 것인지에 관한 연구보고는 없다. 따라서 본 연구의 목적은 죽염, 우르소데스옥시콜린산, 글리시리진산디칼륨, 쿠르쿠마잔토리자유를 배합한 세치제의 치은염억제효과를 임상적으로 평가하고, 치은염관련 생체지표인 Matrix metalloproteinase (MMPs) 억제효과를 실험실 및 임상적으로 평가함에 있다.

연구목적달성을 위한 연구가설은 다음과 같았다.

첫째, 실험실 연구에서 우르소데스옥시콜린산, 글리시리진산디칼륨, 쿠르쿠마잔토리자유를 배합한 제제는 MMP-2 양을 억제한다.

둘째, 죽염, 우르소데스옥시콜린산, 글리시리진산디칼륨, 쿠르쿠마잔토리자유를 배합한 세치제는 치은염 발생을 임상적으로 억제한다.

셋째, 죽염, 우르소데스옥시콜린산, 글리시리진산디칼륨, 쿠르쿠마잔토리자유를 배합한 세치제는 임상적으로 MMP-9 양을 억제한다.

2. 연구대상 및 방법

본 연구의 3가지 연구가설을 입증하기 위하여, 1개의 실험실실험(*In vitro*) 연구와 2개의 임상개입(*In vivo*) 연구로 설계되었다. 임상개입연구(clinical intervention study)는 편의(bias)를 줄이기 위해 무작위할당 이중맹검 임상실험(randomized double blinded clinical trial; RCT)으로 설계되었으며, 세 집단간의 비교를 위하여 factorial design을 사용하였다.

2.1. 실험실연구

2.1.1. 실험재료

(1) 쿠르쿠마잔토리자유 및 혼합약효성분

유럽 약전에 등재된 Turmeric, Javanese (*Curcuma xanthorrhizae rhizome*⁷⁾인 쿠르쿠마잔

토리자의 건조된 뿌리를 분말화하고 n-헥산을 첨가하여 상온에서 24시간 추출한 다음 여과하고, 여과한 추출원액을 감압농축하고, n-헥산과 에칠아세테이트 혼합액(100:1)을 전개용매로 하여 컬럼크로마토그래프를 수행하였다. 실리카 부피의 2배 전개용매까지는 버리고, 2~4배의 전개용매를 취한 후 감압 농축하여 액상의 쿠르쿠마잔토리자유를 얻어 사용하였다. 본 실험에서는 잔토리졸 함량이 40%인 것을 사용하였다. 약효 성분 혼합을 얻기 위해 UDCA(Ursodeoxycholic acid, Sigma, USA), 쿠르쿠마잔토리자유, DPG(Dipotassium Glycyrrhizinate, 95% 이상)를 중량비로 각각 1:1.25:2의 비율로 혼합하여 제조하였다.

2.1.2. 실험방법

(1) 세균 배양(Bacterial culture)

Porphyromonas gingivalis(ATCC 53978)는 hemin(5 g/ml), menadion(0.5 g/ml)을 함유한 brain heart infusion broth에서 농도가 O.D. 660이 0.6~0.7이 되도록 배양한 뒤 원심분리(10,000 × g, 10 min)로 모아진 상등액을 0.2 μm 멤브레인 필터를 거쳐 멸균하고 -80℃에 사용 시까지 보관하였다.

(2) 치주 인대 세포 배양(Cultures of Periodontal Ligament(PDL) cells)

교정치료를 위해 발거된 소구치를 FBS(Fetal bovine serum, Gibco Co., USA) 10%, 항생제(Penicillin G 100 g/ml, streptomycin 0.25 g/ml, amphotericin 25 g/ml)가 첨가된 α-minimal-essential medium(α-MEM)이 들어있는 100 mm 접시에 옮겨 큐벳으로 치근 중간 1/3부위의 치주인대 조직을 떼어낸 후 잘게 세절하였다. 이들 세절조직을 25 mm² tissue culture flasks에 넣고 20% heat-inactivated FBS와 상기 항생제가 들어 있는 α-MEM 배지로 배양하였다(37℃ in 5% CO₂). 치주 인대세포

Table 1. Composition of 3 test dentifrices(%)

Composition	CX(Test1) ⁺	BS(Test2) [‡]	Placebo
dental-type silica(NF)	20,0	20,0	20,0
NaF(KP)	0,22	0,22	0,22
Aminocaproic Acid(KP)	0,05	0,05	0,05
Dipotassium glycyrrhizinate	0,04	0,04	-
Ursodeoxycholic acid(KP)	0,02	0,02	-
bamboo salt*	3,0	3,0	-
Curcuma xanthorrhiza oil**	0,025	-	-
sorbitol solution(BP)	50-55	50-55	50-55

* bamboo salt - The sun-dried salt in bamboo was baked 9 times over 1000°C in the furnace and pulverized according to Korean traditional method.

**Curcuma xanthorrhiza oil - After Curcuma Xanthorrhiza was extracted as n-hexane, the solution was condensed by chromatography. The concentrated solution contained Xanthorrhizol(C₁₅H₂₂O:218,33) 40%.

†CX - The dentifrice group containing Curcuma xanthorrhiza and Bamboo salt

‡BS - The dentifrice group containing Bamboo salt

의 단층 밀생이 형성된 후 배양액을 제거하고 2회 세척 후 0.24% Trypsin/EDTA를 이용하여 세포를 분리한 후 1:3~1:4의 비율로 계대 배양 하였다.

(3) 약효 성분 혼합의 Type IV Collagenase/72-kDa gelatinase(MMP-2) 발현 억제 효과

본 실험에서는 4~8회 계대배양된 치주 인대 세포를 사용하였는데 일단 단층 밀생 형성 후 DMSO (Dimethyl Sulphoxide, Sigma, USA)에 준비된 약효 성분 혼합을 -MEM 배지 내 농도가 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 µg/ml 되도록 처리한 뒤 1시간 후 상기 *Porphyromonas gingivalis* 배양액을 15 m/ml로 배지에 직접 투여하여 3일간 배양하였다.

(4) 젤라틴 자이모그래피(Gelatin zymography)

0.2% gelatin 함유 8% SDS-polyacrylamide gel에 치주인대 세포 배양액 15 l 와 완충용액 2.5%(w/v) SDS, 50 mM Tris HCl(pH 6.8), 0.005% bromophenol blue, 3% sucrose의 1:1혼합액을 전기영동 하였다. 분리 후 gel을 2.5% Triton X-100 함유 50 mM Tris-HCl(pH 7.5) 용액에서 서서히 교반하여 각 30분씩 2회 세척한 뒤 반응 완충용액 50 mM Tris-HCl(pH 7.5), 10 mM CaCl₂, 150 mM NaCl

에서 18시간 반응하였다. 반응된 gel을 0.05% Coomassie brilliant blue R-250(10% isopropyl alcohol 및 10% acetic acid)로 염색한 뒤 Coomassie blue가 제거된 염색용액으로 stain 제거를 하였다. 젤라틴이 분해된 밴드가 투명하게 나오며 이 밴드의 강도를 이미지 분석기(BIORAD Multiimager)를 통해 정량분석하였다.

2.2. 임상개입실험

2.2.1. 연구설계

2종류의 *In vivo* 실험연구를 위하여 분할구강모형(split mouth method)이 사용되었다. 한쪽 반악은 기존의 일상적인 잇솔질을 5주 동안 계속 시행한 세치제사용실용실험을 하였고, 다른 쪽 반악은 혼란요인이 될 수 있는 잇솔질을 배제한 Loe 등¹⁶⁾의 실험치은염연구모형(experimental gingivitis model)^{12,16)}을 사용하였다. 실험대상자 및 연구관찰자 모두 이중맹검(double blind)으로 실험군인지 대조군인지 알지 못하도록 조치하였다. 실험대상자는 흡연, 음주, 연령을 고려한 무작위군등할당(randomization)을 하였다. 이 실험은 서울대학교 치과병원 기관연구윤리심의위원회(IRB)의 사전심의를 받았다.

Table 2. Characteristics of the subjects

	Total	CX [†]	BS [‡]	Placebo	p-value
N	57	18	20	19	
Age(year)	23.6±3.0	23.8±2.0	23.6±3.3	23.4±3.4	0.891*
Smoking(%)					0.906**
No	57.9	61.1	55.0	57.9	
Past	12.3	16.7	10.0	10.5	
Present	29.8	22.2	35.0	31.6	
Drinking(%)					0.835**
No	7	11.1	5.0	5.3	
Past	10.5	5.6	15.0	10.5	
Present	82.5	83.3	80.0	84.2	
Gingivitis prevalence(%)	52.6	72.2	50	36.8	0.094*
proportion of subjects with dental plaque(%)	57.9	72.2	65.0	36.8	0.068*

*: ANOVA **: χ^2 -test

[†] CX - The dentifrice group containing Curcuma xanthorrhiza and Bamboo salt

[‡] BS - The dentifrice group containing Bamboo salt

2.2.2. 연구대상 세치제 종류

연구대상 세치제의 성분은 표 1에 보는 바와 같았다.

임상실험에서 사용된 세치제에 포함된 쿠르쿠마 잔토리자유의 농도는 280 ppm으로 실험실실험 최대농도 50 ppm보다 높았다. 이는 세포실험과는 달리 세치제는 구강 내에서 타액 등에 의해 희석되고 세치제가 구강 내에 잔류하는 시간이 짧기 때문에 고농도로 조정하였다.

2.2.3. 연구대상자

18~30세의 연구대상자로 실험부위에 치아우식증이 없고, 3.5 mm 이상의 치주낭이 없는 전신적으로 건강하고 최근 3개월 이내에 항생제를 투여 받은 적이 없으며, 사전에 충분히 고지된 연구동의서 (informed consent)에 서면 동의한 성인남자 67명을 실험대상자로 선정하였으나, 실험과정 중에 탈락한 사람이 10명으로 참여한 사람은 57명이었다. 보다 엄격한 실험을 위하여, 실험치은염연구모형 실험대상자는 전체 57명의 실험대상자 중, 실험대상치아인 하악 제1, 2소구치의 치은염지수가 0인 실험치아

치은건강자 27명을 분석대상으로 하였다. 연구대상자의 평균연령은 23.6세이었고 최저연령은 18세, 최고는 30세이었다. 실험치은염연구모형 실험대상자의 연령, 흡연 및 음주의 특성은 전체 실험대상자의 특성과 차이가 없었다. 전체 연구대상자의 분포 및 특성은 표 2와 같다.

2.2.4. 연구방법

(1) 실험과정

1) 2주전 사전교육 및 처치

실험 시작 2주 전에 실험에 동의한 대상자를 대상으로 치아우식증 및 치주조직병 검사를 하고 설문조사를 한 후 실험부위(하악 편측 제1, 2소구치) toothshield를 만들기 위해 인상을 채득하였다. 실험대상자가 모두 회전법 잇솔질을 실천할 수 있도록 구강보건교육을 실시하였으며 대상자 중 치석제거 및 치면세마가 필요한 47명의 경우 치석제거나 치면세마를 실시하였다. 대상자 중 10명은 실험시작 전에 4~5 mm의 천치주낭이 일부 치아에 존재하여 치석제거 및 치면세마 후 CPI probe로 3.5 mm 이하의 치주낭깊이가 된 후 실험을 시작하였다.

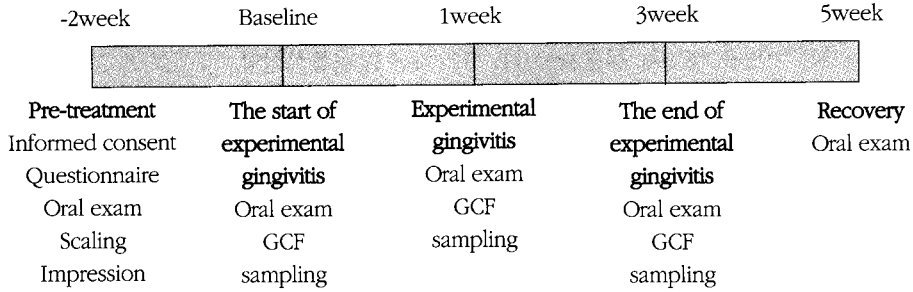


Fig 1. Flow of the experiment in vivo

2) Toothshield의 제작¹²⁻¹⁶⁾

Toothshield는 인상체에 세치제가 들어갈 수 있는 공간을 만들기 위해 실험부위를 1 mm base plate wax로 하악 제1, 2소구치의 협설면을 block out 한 후 0.75 mm splint용 plate를 사용하여 Omnivac으로 찍었다. Toothshield는 고정점을 만들기 위해 치은연 하방 1 mm, 인접한 건치의 원심쪽 1 mm, 인접한 제 1대구치의 근심쪽 1 mm 정도에서 다듬었다.

3) Toothshield의 적용

실험대상자와 실험관찰자 모두에게 실험군인지 대조군인지 알 수 없도록 조치하고, 실험 시작 후 3주 동안 실험대상자는 이를 닦을 때 Toothshield 내에 세치제 약 0.5 g을 짜 넣은 후 실험부위에 장착하게 하고 이를 장착한 채 Toothsheild에 사용한 동일한 세치제로 나머지 부위를 닦은 후 Toothshield를 제거하고 세치제가 제거될 수 있도록 충분히 입을 행구게 하였다. 실험치은염모형에서 발생된 치은염이 정상치은으로 회복될 수 있도록 3주 후에는 Toothshield를 끼지 않고 이를 닦도록 하였다. 이단계는 1일 2회 회당 3분 정도로 교육하였다.

실험에 사용된 세치제는 위약실험세치제(Placebo), 쿠르쿠마잔토리자유 및 죽염배합세치제(CX) 및 죽염배합세치제(BS)이었고, 각 세치제의 성분은 위의 표 1에서 보여주었다.

4) 구강검진 및 시료채취

실험시작시점과 1, 3주차 및 회복기간인 5주차에

실험치아에서 치은지수 및 치면세균막지수를 측정하였다. Cotton roll로 방습하고 에어서린지로 건조시킨 후 #25 paperpoint 3개로 실험치아인 하악 제 1 소구치 협측 원심면에서 치은열구액을 30초 간 흡수시켰다¹⁷⁾.

(2) 구강검진기준

1) 치은지수검사

실험대상자의 치은염 정도는 Löe-Silness의 치은염평점기준¹⁸⁾에 따라, 각 실험대상자의 치아를 둘러싸고 있는 협설측 치은연을 각각 근심 원심 중앙치은연으로 구분하여 6개 부위를 측정하고, 개인의 치은염지수는 각 부위별 측정치의 합계를 검사대상치면수로 나누어 구하였다. 그리고, 측정대상치아는 하악 제1, 2소구치 4개 치아이며 측정시점은 실험시작시점과 1주, 3주 및 회복기간인 5주차이다.

〈 Löe-Silness의 치은지수 〉

0: 염증없음

1: 경미 치은염(색조의 약한 변화 및 약한 부종)-

치주낭심측정시 출혈없음

2: 중등 치은염(발적, 부종) - 치주낭심측정시 출혈

3: 고도 치은염(궤양) - 저절로 출혈되는 경향

2) 치면세균막지수검사

치은지수의 보정변수로 사용하기 위하여 치면세균막지수를 측정하였다. 실험대상자의 치면세균막

정도는 Turesky Modification of the Quingley-Hein Index¹⁹⁾의 기준에 따라 치면을 협면과 설면으로 나누는 후 측정하고 각 부위별 합계를 치면수로 나누었다. 그리고, 측정대상치아는 하악 제1, 2소구치 4개 치아이며 측정시점은 실험시작시점과, 1주, 3주 및 회복기간인 5주차이다.

〈Turesky Modification of the Quingley-Hein Index〉

- 0: 치면세균막 없음
- 1: 치은연에 점상으로 있음(≤1 mm)
- 2: 치은연에 선상으로 있음(≤1 mm)
- 3: 치아표면의 1/3이하에 있음
- 4: 치아표면의 1/3-2/3에 있음
- 5: 치아표면의 ≥2/3에 있음

(3) MMP-9 정량분석

치은염이나 치주염이 발생할 경우 치은열구액 및 타액내에 MMP-9이 증가할 수 있다는 선행연구결과²⁰⁾에 따라 MMP-9을 정량분석하였다. 치은열구액을 흡수시킨 paperpoint 3개를 1 ml PBS에 넣어 vortexing 한 후 그중 100 μl을 따서 Quantikine human MMP-9(R&D systems, Minneapolis, USA)을 사용하였다. 각 well에 Assay Diluent RD1-34 100 μl를 넣고 Standard와 Sample 100 μl를 각 well에 넣었다. 약 500 rpm의 microplate shaker위에서 실온에서 2시간 동안 두었다가 well을 흡입하고 4번 씻어냈다. 각 well에 MMP-9 Conjugate 200 μl를 넣고 Shaker위에서 1시간 동안 두었다. 다시 well을 흡입하고 4번 씻어냈다. 각 well에 Substrate Solution 200 μl를 넣고 빛이 들어가지 않게 하고 실온에서 30분간 두었다. Stop Solution 50 μl를 넣고 450 nm에서 microplate reader로 OD값을 측정했다. MMP-9의 양은 실험시작시점과, 1주, 3주차에 측정하였다.

2.3. 통계분석

2.3.1. 실험실실험

용량-반응효과(Dose-Response effect) 분석을 위해서, 3회 반복 실험을 통해 얻어진 결과를 paired t-test로 분석하였다.

2.3.2. 임상개입실험

임상개입실험의 기초시점에서 실험군간의 치면세균막 보유와 구성에 차이가 있었으므로, 군간 분석 시에는 기초시점의 치면세균막지수와 치은지수를 보정할 필요가 있었다. 따라서, 집단간 분석 시에는 치면세균막지수를 보정한 후 ANCOVA를 사용하였다. 그리고, MMP-9자료의 분포가 정규분포를 하지 않았으므로 분산분석을 위하여 정규분포하도록 MMP-9 자료를 자연 log로 치환하여 사용하였다. 시간경과에 따른 임상실험의 비교에는 repeated measure ANCOVA가 사용되었으며 1종오류는 0.05로 하였다.

3. 연구성적

3.1. 실험실 실험

3.1.1. 쿠르쿠마잔토리자유등 약효성분혼합에 의한 MMP-2 발현 억제효과

Porphyromonas gingivalis 배양액으로 처리된 치주인대 세포배양 상등액에서 72 kDa 크기의 젤라틴 분해 역가 밴드가 확인되었으며 이의 활성화된 62 kDa가 약하게 보임에 따라 분자량에 의거하여 MMP-2가 발현되는 것을 알 수 있었다. Fig 2에서 보듯이 약효성분 혼합물을 5, 10, 15, 20, 25, 30 μg/ml 처리군에서는 비처리군 대비 농도 의존적인 MMP-2의 생산억제를 보였으며 억제 효과는 각각 평균 19, 24, 29, 61, 82, 84%로 처리군에서 유의한 억제율을 나타내었다.

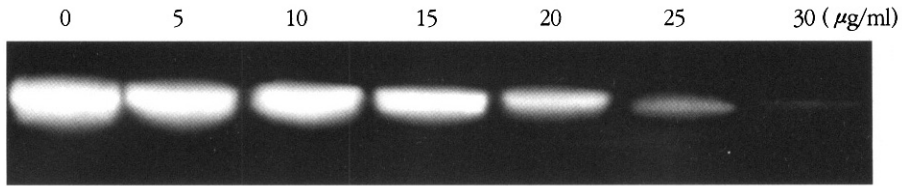


Fig 2. Amount of MMP-2 according to the dose of *C. xanthorrhiza* (gelatin zymography)

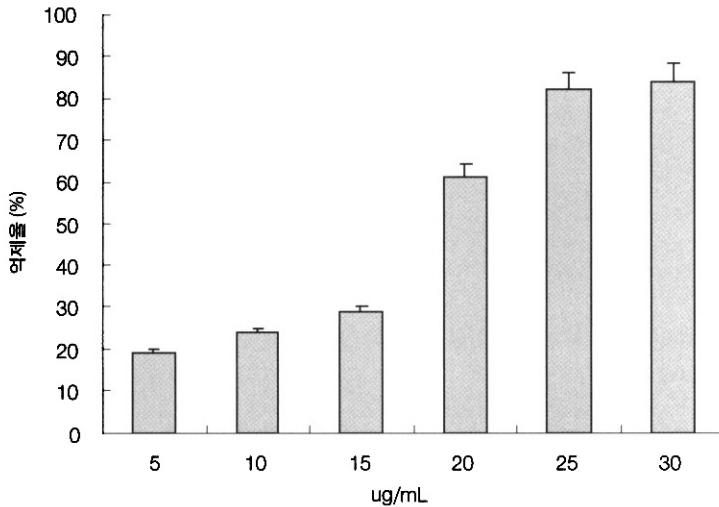


Fig 3. Percentage of MMP-2 reduction according to the dose of *C. xanthorrhiza*

Table 3. Gingival Index by the experimental dentifrices across the 5-week time interval in tooth-brushing model

	n	0week	3week	5week	p-value*
CX [†]	18	0.17±0.18	0.13±0.19	0.04±0.08	0.024** 0.003
BS [‡]	20	0.18±0.24	0.11±0.17	0.08±0.14	
Placebo	19	0.14±0.19	0.11±0.18	0.10±0.12	

*: repeated measure ANCOVA with Plaque Index(at the baseline)
 **: ANCOVA with Plaque Index and Gingival Index(at the baseline)
 † CX - The dentifrice group containing Curcuma xanthorrhiza and Bamboo salt
 ‡ BS - The dentifrice group containing Bamboo salt

3.2. 임상개입실험

3.2.1. 잇솔질사용 임상실험시험의 시간경과별 치은지수

잇솔질사용 실험실험에서 CX군, BS군, Placebo군에서 모두 시간경과에 따른 치은염 억제효과를 보였다 (repeated measure ANCOVA, p=0.003). 5주 경과 후 CX군에서 76.4%, 위약실험군에서 28.5%의 감소를 보여, CX세척제가 위약실험세척제보다 47.9%의 치은염 억제효과를 나타냈다 (ANCOVA

p=0.024).

3.2.2. 실험치은염모형 임상실험의 시간경과별 치은지수

기초시점의 치은염무병자를 대상으로 한 Toothshield 사용 실험에서 실험군 및 위약실험군의 치은지수가 유의한 증가를 보였다 (repeated measure ANCOVA, p=0.03). 1주 후 실험군에서 위약실험군보다 치은지수의 증가가 적었고, 38.1%의

Table 4. Gingival index across the 3-week interval in the Toothshield model

	n	0week	1week	3week	5week	p-value*
CX [†] +BS [‡]	15	0,00	0,13±0,17	0,11±0,13	< 0,01	0,03
Placebo	12	0,00	0,21±0,21	0,16±0,17	< 0,01	

* : repeated measure ANCOVA with Plaque Index(at the Baseline)

† CX - The dentifrice group containing Curcuma xanthorrhiza and Bamboo salt

‡ BS - The dentifrice group containing Bamboo salt

Table 5. Amount of MMP-9 by the dentifrice across the 3-week interval in the tooth shield model(log[MMP-9]ng/ml)

	n	0week	1week	3week	p-value*
CX [†] +BS [‡]	15	2,45±0,48	1,90±0,94	2,09±0,71	0,015
Placebo	12	2,33±0,58	2,12±0,80	2,03±0,38	

* : repeated measure ANCOVA with Plaque Index(at the Baseline)

† CX - The dentifrice group containing Curcuma xanthorrhiza and Bamboo salt

‡ BS - The dentifrice group containing Bamboo salt

치은염증가 억제양상을 보였으나, 통계학적으로 유의하지는 않았다(ANCOVA, p=0.30).

3.2.3. 실험치은염모형을 실시한 부위의 MMP-9의 양

기초시점의 치은염무병자를 대상으로 한 실험치은염모형에서 실험군과 위약실험군 모두에서 시간경과에 따라 MMP-9가 유의하게 감소한 후 회복되는 경향을 보였다. 1주차에서 실험군의 감소량은 22.4%이고, 위약실험군의 감소량은 9%로 실험군이 위약실험군에 비해 13.4%의 MMP-9 억제효과를 나타내었으나, 개별치면세균막지수를 공변량으로 보정한 ANCOVA분석에서는 집단간 차이는 유의성이 없었다(p=0.12).

4. 고 안

최근 치면세균막관리를 통한 치주조직병 예방법 외에도 다양한 약제나 물질을 섭취하거나 치은에 도포하거나 양치하거나 세치제에 배합함으로써 치주조직병을 예방하려는 다각적인 노력이 잇따르고 있다. 이러한 노력의 결과 최근 죽염, 우르소데스옥시

콜린산, 글리시리진산디칼륨, 쿠르쿠마 잔토리자유를 배합한 세치제가 개발되었다. 따라서 본 연구는 새로 개발된 세치제가 치은염예방에 효과가 있는지 검증하기 위해 3단계의 실험을 계획하였다. 첫째, 실험실(*In vitro*)실험을 통하여 새로운 세치제의 MMP억제에 대한 용량-반응효과를 파악하였다. 둘째, 일상적인 잇솔질시 새로운 세치제에 의한 치은염억제효과를 시간경과별로 파악하였다. 셋째, 치은염 억제효과의 내부기구를 파악하기 위하여 MMP-9 양의 변화를 실험치은염모형으로 파악하였다. 따라서, 이번 연구는 *In vitro*와 *In vivo*가 결합되고, 특히 국내 최초로 Toothshield모형을 이용한 의미있는 연구로 사료되었다. 이번 연구 결과, 임상실험시험에서 대조세치제에 비해 유의한 치은지수 감소를 보여 주었으며, 실험치은염모형에서도 대조세치제에 비해 치은염발생 감소효과를 보여주었다. 이는 죽염이 치은염예방에 효과가 있다는 기존의 연구결과와 일치하였다^{3,8)}. 강 등⁶⁾, 박과 최⁷⁾는 3개월 후 치은지수감소효과를 보고하였으나, 본 연구에서는 5주간 사용 시 유의한 차이를 보여주었다. 특히 쿠르쿠마잔토리자유를 배합한 세치제의 치은염감소효과를 위약실험세치제와 비교하였을 때 5주에서 유의

하였으나, 죽염배합세치제와는 통계학적으로 차이를 보이지 않았다. 따라서, 시간이 더욱 경과한다면 쿠르쿠마잔토리자유를 배합한 세치제의 치은염 억제효과는 기존의 죽염배합세치제보다 통계학적으로 유의한 차이를 나타낼 가능성이 있다고 검토되었고, 이러한 가능성은 추후 보다 장기간의 연구에서 밝혀질 것으로 사료되었다.

치주조직병의 발생이나 진행의 정확한 요인들이 밝혀져 있지는 않지만 치주염증의 진행과 조직 파괴와 관련된 중요한 인자가 cytokine, collagenase, prostaglandin 등으로 염증발생시 치주인대섬유아세포 및 치주인대세포로부터 조직파괴효소인 Matrix metalloproteinase(MMP)생성을 촉진하여 결합조직 주성분인 Collagen의 파괴와 골흡수 즉 치주염을 촉진하게 된다고 알려져 있다²¹⁻²⁴⁾. MMP는 치주염을 포함한 여러 병리학적으로 의미있는 결합조직 파괴에 관련된 endopeptidase를 일컫는 용어로 MMP-1, MMP-2, MMP-8, MMP-9 등의 다양한 부류를 포함하고 있다. 이번 실험에서는 치은염의 발생이나 진행을 평가하기 위해 실험실 연구에서는 MMP-2양을, 실험치은염모형에서는 MMP-9 양을 평가하였다. 실험실 실험에서는 쿠르쿠마잔토리자유, 글리시리진산디칼륨, 우르소데스옥시콜린산을 혼합한 제제가 농도의존적인 MMP-2 억제효과를 보였다. 이러한 결과는 이 등²⁵⁾이 쿠르쿠마잔토리자의 항염효과를 보여준 연구결과와 일치한다. Toothshield 모형에서도 MMP-9 양의 억제효과는 볼 수 있었지만 통계학적으로 유의하지는 않았다. 최 등²⁶⁾이 Mouse lung metastasis model에서의 MMP-9과 Cyclooxygenase-2의 억제를 보여주어 잇몸 염증 관여 콜라겐 보호 역할이 기대된다고 한 주장과는 차이가 있었다.

쿠르쿠마잔토리자의 구강균주에 대한 탁월한 효능은 황 등^{10,11)}에 의해 국내에 처음 알려지기 시작하였고, 김 등²⁷⁾은 잔토리졸이 구강내 유해균에 대한

선택적 항균력, 잔류에 의한 지속적 항균효과등을 가지고 있음을 보고하였다. 그러나 현재까지 국내에서 쿠르쿠마잔토리자유를 배합한 세치제의 치은염 예방효과에 관한 연구는 보고되지 않았다. 그래서 이번 연구는 죽염, 우르소데스옥시콜린산, 글리시리진산디칼륨, 쿠르쿠마 잔토리자유를 배합한 세치제가 치은염을 억제하는 양상을 보여준 국내 최초의 연구이다.

이번 실험에서 연구대상자 할당시에 치은지수와 치면세균막지수를 고려하지 않아 실험군에 비해 대조군의 치은상태가 양호한 것도 실험결과에 영향을 미쳤을 것으로 사료되었다. 그러나 기초시점의 치은지수와 치면세균막지수의 집단별 차이가 유의하지는 않아 통계학적 분석시에 문제가 되지는 않았다. 그럼에도 불구하고, 집단간 경향성의 차이를 보다 엄밀하게 평가하기 위해 기초시점의 치은지수나 치면세균막지수를 공변량으로 사용하여 보정하였다.

Toothshield 실험치은염모형에서 MMP-9의 경우 치은염이 있는 실험대상자에서 치은염이 이미 존재하는 실험부위에 부가적인 부담을 가했을 때 MMP-9의 양이 개개인에 따라 일정치 않은 파동현상을 보였고, 개인에 따라 평균값의 2배 이상 큰 편차를 보였다(비발표자료). 치주조직병의 경우 치면세균막이 주원인으로 생각되어지나, 다른 원인들에 의해서도 진행되고 억제되므로 치은염이 이미 존재하는 실험대상자의 경우 더 많은 요인들이 실험결과에 영향을 미쳤을 것으로 생각된다. 그러나, 기초시점에서 치은염이 없는 대상자들은 MMP-9의 양이 일관성 있는 변화를 보여주었다. 따라서 MMP-9 양의 임상적 변화 평가시 기초시점때 치은염이 없던 실험대상자들만을 대상으로 하였고 이로 인해 표본수가 감소하여 치은염유발억제효과는 볼 수 있었지만 통계적 유의성을 확보할 수 없었다. 표본수의 감소로 죽염, 우르소데스옥시콜린산, 글리시리진산디칼륨, 쿠르쿠마잔토리자유를 배합한 세치제를 쓴 CX군과 죽

염, 우르소테스옥시콜린산, 글리시리진산디칼륨을 배합한 세치제를 쓴 BS군을 합쳐 실험군으로 설정한 것도 표본수가 줄어서 나타난 이 실험의 한계이다. 따라서, 향후 추가적인 실험을 통하여 보다 많은 표본수를 확보한다면 죽염, 우르소테스옥시콜린산, 글리시리진산디칼륨, 쿠르쿠마잔토리자유를 배합한 세치제의 MMP-9 감소에 대한 통계적으로 유의한 차이를 보일 수 있을 것으로 검토되었다.

일반적인 실험치은염모형에 의한 세치제에 대한 효과실험시 반약의 구치부에 Toothshield를 장착하도록 하나 실험대상자들의 구강건강악화를 염려하여 이번 실험에서는 대구치를 제외하고 하악 제 1소구치와 제 2소구치에만 Toothshield를 장착하도록 하였으므로, Toothshield 후방 치아를 닦을 때 Toothshield가 약간 움직이는 경향이 있어 조작의 오차가 발생하였을 가능성을 배제할 수 없다. 그럼에도 불구하고, Toothshield model을 적용해서 발생한 치은염 정도가 1주보다 3주가 더 낮은 이유에 대해서는 아직 확실한 이유를 찾을 수는 없었지만, 이는 다른 실험치은염모형의 연구결과도 치은염이 직선형으로 증가되지 않다는 기존의 연구 결과와 일치하였다¹⁶⁾. 특히 실험치은염모형에서 과도한 치은염의 발생에 대한 우려와는 달리, Toothshield model을 적용해서 발생한 치은염 정도가 Tooth-

brushing model의 0주 값과 거의 차이가 없는 정도로 낮아서, 3주 동안 치은염이 많이 진행되지는 않았으며, 치아우식증이 발생하지도 않아서, 실험치은염모형은 새로운 약제나 세치제의 임상효과평가를 위한 타당한 모형으로 사료되었다.

5. 결 론

새로 개발된 죽염, 우르소테스옥시콜린산, 글리시리진산디칼륨, 쿠르쿠마잔토리자유를 배합한 세치제에 대한 치은염억제효과를 평가하기 위해 실험실 연구와 임상개입실험을 한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 쿠르쿠마잔토리자유, 글리시리진산디칼륨, 우르소테스옥시콜린산을 혼합한 제제는 *In Vitro*에서 MMP-2 억제의 용량-반응 효과가 있었다.
2. 죽염, 우르소테스옥시콜린산, 글리시리진산디칼륨, 쿠르쿠마잔토리자유를 배합한 세치제는 잇솔질을 실시한 임상실험에서 대조세치제에 비해 5주 경과시점에서 치은염을 유의하게 감소시켰다. 종합적으로 보아, 죽염, 우르소테스옥시콜린산, 글리시리진산디칼륨, 쿠르쿠마잔토리자유를 배합한 세치제는 치은염예방에 유용할 수 있다고 사료되었다.

참고문헌

1. 김종배, 최유진, 문혁수 외 4인. 공중구강보건학. 서울:고문사; 2004:87-89.
2. 보건복지부. 2000년도 국민구강건강실태조사결과 평가분석 연구보고서. 2001.
3. 손우성, 유윤정, 김종렬. 죽염과 식염의 구강내 세균중식염 효과에 관한 연구. 대한구강보건학회지 1991;15(2):255-268.
4. 김종렬, 정성철, 손우성. 죽염과 식염을 함유한 치약의 치태억제 및 치은염증 감소효과에 관한 연구. 대한구강보건학회지 1991;15(2):269-280.
5. 마득상, 진보형, 박덕영, 김종배, 백대일, 문혁수. Mono-fluorophosphate와 죽염과 allantoin chlorohydroxy aluminum 및 dl- α tocopherol acetate를 배합한 특수세치제의 치아우식 예방효과와 치은염치유효과에 관한 실험실적 연구. 대한구강보건학회지 1994;18(2):554-563.
6. 강명신, 김형규, 권호근, 김종렬. 죽염과 염화 세틸피리디늄배합양치액의 치은염 억제에 미치는 영향에 관한 임상 실험 연구. 대한구강보건학회지 1995;19(2):219-228.
7. 박경일, 최유진. 수중 한약제 및 죽염 함유치약이 치태 및 치은염에 미치는 영향에 관한 임상적 연구. 대한구강보건학회지 1994;18(1):390-400.
8. 김종배, 백대일, 문혁수, 진보형, 박덕영. Cetyl-pyridinium Chloride 및 죽염배합양치용액의 구강다형연쇄상구균수 및 치면세균막형성에 미치는 영향에 관한 실험실적 연구. 대한구강보건학회지 1993;17(1):176-187.

9. Claeson P, Panthong A, Tuchinda P, et al. Three non-phenolic diarylheptanoids with anti-inflammatory activity from *Curcuma xanthorrhiza*. *Planta Med* 1993;59(5):451-454.
10. Hwang JK, Shim JS, Pyun YR. Antibacterial activity of xanthorrhizol from *Curcuma xanthorrhiza* against oral pathogens. *Fiterapia* 2000;71(3):321-323.
11. Hwang JK, Shim JS, Baek NI, Pyun YR. Xanthorrhizol: a potential antibacterial agent from *Curcuma xanthorrhiza* against *Streptococcus mutans*. *Planta Med* 2000;66(2):196-197.
12. Sekino S, Ramberg P, Lindhe J. The effect of systemic administration of ibuprofen in the experimental gingivitis model. *J Clin Periodontol* 2005;32(2):182-187.
13. Wright HJ, Chapple IL, Matthews JB. Levels of TGF β 1 in gingival crevicular fluid during a 21-day experimental model of gingivitis. *Oral Dis* 2003;9(2):88-94.
14. Oates TW, Graves DT, Cochran DL. Clinical, radiographic and biochemical assessment of IL-1/TNF- α antagonist inhibition of bone loss in experimental periodontitis. *J Clin Periodontol* 2002;29(2):137-143.
15. Nogueira-Filho GR, Toledo S, Cury JA. Effect of 3 dentifrices containing triclosan and various additives: an experimental gingivitis study. *J Clin Periodontol* 2000; 27(7):494-498.
16. Loe H, Theilade E, Jensen SB. Experimental gingivitis in man. *J Periodontol* 1965;36:177-187.
17. Song SE, Choi BK, Kim SN, et al. Inhibitory effect of procyanidin oligomer from elm cortex on the matrix metalloproteinases and proteases of periodontopathogens. *J Periodontal Res* 2003;38(3):282-289.
18. Loe H. The gingival index, the plaque index and the retention index systems. *J Periodontol* 1967;38(6):610-616.
19. Stean H, Forward GC. Measurement of plaque growth following toothbrushing. *Community Dent Oral Epidemiol* 1980;8(8):420-423.
20. Birkedal-Hansen H. Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases. *J Periodontol* 1993;64(5 Suppl):474-484.
21. Matsuki Y, Yamamoto T, Hara K. Detection of inflammatory cytokine messenger RNA (mRNA)-expressing cells in human inflamed gingiva by combines in situ hybridization and immunohistochemistry. *Immunology* 1996;76:42-47.
22. Richards D, Rutherford RB. The effects of interleukin 1 on collagenolytic activity and prostaglandin-E secretion by human periodontal ligament and gingival fibroblast. *Arch Oral Biol* 1988;33(4):237-243.
23. Tataka DN. Interleukin-1 bone metabolism: a review. *J Periodontol* 1993;64(5 Suppl):416-431.
24. 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. *J Dent Res* 1994;73(8):1397-1406.
25. Lee SK, Hong CH, Hur SK, et al. Suppressive effect of natural sesquiterpenoids on inducible cyclooxygenase (COX-2) and nitric oxide synthase(iNOS) activity in mouse macrophage cells. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 2002;21(2):141-148.
26. Choi MA, Kim SH, Chung WY, Hwang JK, Park KK. Xanthorrhizol, a natural sesquiterpenoid from *Curcuma xanthorrhiza*, has an anti-metastatic potential in experimental mouse lung metastasis model. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;326(1):210-217.
27. 김백일, 김상년, 장석윤 외 7인. *Curcuma xanthorrhiza* 추출물 및 함유 치약의 구취 억제효과와 구강유해균에 대한 선택적 항균효과. *대한구강보건학회지* 2005;29(2):222-237.

Abstract

Gingivitis suppression effect of the de novo dentifrice containing *Curcuma xanthorrhiza*, bamboo salt and various additives

Soo-Jeong Hwang, Sang-Nyun Kim¹, Sug-Youn Chang¹,

Won-Ho Ha¹, Ihn-Soo Kim, Bo-Hyoung Jin, Dai-Il Paik, Hyun-Duck Kim

Department of Preventive and Public Health Dentistry, School of Dentistry, Seoul National University

¹LG Household & Health Care R&D Institute

key words: *Curcuma xanthorrhiza* oil, dentifrice, experimental gingivitis model, gingivitis, Matrix metalloproteinase

Objectives: This study aimed to evaluate the gingivitis suppression effect of the dentifrice containing bamboo salt, *Curcuma Xanthorrhiza*, Dipotassium glycyrrhizinate, Ursodeoxycholic acid and various additives clinically and to estimate Matrix metalloproteinases *in Vitro* and *in Vivo*

Methods: 1. *In vitro* : PDL cells which were cultured succeeding a generation were treated by the mixture of *Curcuma Xanthorrhiza*, Dipotassium glycyrrhizinate and Ursodeoxycholic acid. After the treatment of porphyromonas gingivallis culture fluid(15 m/ml), they were cultured for 3 days. Gelatin zymography quantified the amount of MMP-2. 2. *In vivo* clinical intervention study : This study was designed as a randomized blinded clinical trial with factorial design using split mouth method and experimental gingivitis model. 3. Subjects : 57 Korean male adults participated this study by a written consent. All subjects were randomized into 3 groups. Twice-a-day tooth brushing was recommended for 5 weeks, and plaque index and gingival index were evaluated at the baseline, 1st, 3rd, 5th weeks. In Toothshield model, the Toothshield was used for 3 weeks to evaluate gingival index and collect gingival crevicular fluid in the shielded sulcus. For the recovery the usual tooth-brushing was recommended for 2 weeks. Repeated measure ANCOVA was used for the time series comparison and ANCOVA for the comparison between the groups.

Results: The de novo dentifrice suppressed the amount of MMP-2 dose-dependently *in vitro*. In tooth-brushing model using the dentifrices, the de novo toothpaste reduced gingival index more 49.9% compared with placebo(p=0.024). In toothshield model, the de novo toothpaste reduced more 38.1% for gingival index and more 13.4% for MMP-9 than placebo, which were not statistically significant.

Conclusion: The dentifrice containing bamboo salt, *Curcuma Xanthorrhiza*, Dipotassium glycyrrhizinate, Ursodeoxycholic acid and various additives could be a useful dentifrice for reducing gingivitis.