

치주염 동물모델을 이용한 해조류의 항염증 효과

윤현서^{1,3} · 박충무^{2,3*}

¹동의대학교 치위생학과 부교수, ²동의대학교 임상병리학과 부교수, ³건강기능성소재연구소 위원

Anti-inflammatory Effects of Seaweeds Using Periodontitic Animal Model

Hyun-Seo Yoon^{1,3}, Chung-Mu Park^{2,3*}

¹Dept. of Dental Hygiene, Dong-Eui University, Associate professor

²Dept. of Clinical Laboratory Science, Dong-Eui University, Associate professor

³The Research Institute Health for Functional Material, Committee member

Objectives: This study investigated the anti-inflammatory activity of four kinds of seaweeds (*Ecklonia cava*, *Saccharina japonica*, *Undaria pinnatifida*, and *Gelidium amansii*) in the RAW 264.7 cell line and in a mouse model of periodontitis.

Methods: The anti-inflammatory activity of prepared ethanol extracts of the seaweeds was screened in the RAW 264.7 cell line. A diet containing 5% of each seaweed was administered to the mice for 2 weeks, followed by lipopolysaccharide (LPS) injection into the periodontal tissue to induce inflammation. Nitric oxide (NO) production was analyzed by the Griess reaction and expression of inflammatory marker proteins was determined by western blotting.

Results: All four ethanol extracts inhibited NO production in a concentration-dependent manner without cytotoxicity. In addition, all four seaweed extracts inhibited inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase (COX)-2 expressions in periodontal tissues of LPS-injected C57BL/6 mice. The mouse group administered *U. pinnatifida* ethanol extract (UPEE) showed the strongest anti-inflammatory response.

Conclusions: The four seaweeds, *E. cava*, *S. japonica*, *U. pinnatifida*, and *G. amansii*, all exhibited anti-inflammatory activity in both the RAW 264.7 cell line and the LPS-induced periodontitic mouse model. UPEE showed the most potent anti-inflammatory activity. These seaweeds might be promising candidates for alleviating periodontal inflammation. Further research is needed to confirm their effectiveness as preventive agents for periodontal disease.

Keywords Periodontitis, Seaweed, *Undaria pinnatifida*, Anti-inflammatory, Periodontitic Animal Model

Received on Feb 10, 2020. Revised on Feb 22, 2020. Accepted on Feb 25, 2020.

* Corresponding Author (E-mail: cmpark@deu.ac.kr)

This work was supported by the National Research Foundation of Korea (NRF) grant funded by the Korea government (MSIT) (NRF-2017R1C1B5017311).

I. 서론

대표적인 구강 질환 중 하나인 치주질환은 당뇨병, 흡연, 식습관 등과 관련이 있는 것으로 보고되고 있고, 크게 치은염과 치주염으로 나뉘어진다[1][2]. 700 여종의 구강 상재균 중 *Porphyromonas gingivalis*가 치주질환을 일으키는 주요 원인균으로 알려져 있고[3], 이러한 치주질환은 프라그의 침착에서 시작하여 치은의 부종, 출혈 등을 유발하고, 치조골의 파괴를 동반하여 치아상실의 원인이 되기도 한다[4].

치은과 치주의 염증반응은 세균의 증식으로 발생한 산화 스트레스와[5] lipopolysaccharide (LPS)가 면역세포를 자극함으로

써 시작된다[6][7]. 이러한 염증반응은 초기 면역세포들의 반응으로 치유되는 경우가 많지만, 여러 원인에 의해 치유가 늦어지거나 면역세포들의 활동 범위와 활동량을 넘어서는 경우로는 만성으로 이행되어 다양한 질환을 유발되게 된다[8].

이러한 염증 반응을 초기에 완화시키기 위하여 다양한 항생제와 소염제가 사용되고 있으나 많은 부작용을 동반되고 있고, 특히 치주질환과 관련한 염증 치료에 사용되는 약물에 의해작열감, 착색, 동통 등 크고 작은 부작용이 지속적으로 발생되고 있다[8]. 또한, 과거 치료위주의 진료에서 예방에 대한 관심이 증가하고, 이러한 인식변화는 부작용이 적은 치주질환 치료제의 요구로 이어지고 있다[9]. 따라서 항염증, 항산화, 항균 효과가

있으면서 부작용이 적은 천연물에 대한 연구가 계속 증가하고 있고, 그중에서 섭취가 가능한 해조류에 관한 연구도 꾸준히 진행되고 있으며 연구의 결과를 이용한 다양한 형태의 제품화 또한 시도되고 있다[10-12].

삼면이 바다로 둘러싸인 우리나라는 해조류 자원이 풍부하고 이들은 다양한 종류의 비타민과 미네랄을 함유하고 있으며, 폴리페놀과 카로티노이드 성분도 포함되어 있어 영양면에서도 뛰어나다. 특히, *Porphyra yezoensis* [13], *Undaria pinnatifida* [14], *Saccharina japonica* [15], *Gelidium amansii* [16], *Ecklonia cava* [17] 등의 항염과 항산화 및 항암 효과에 대한 연구들은 꾸준히 이루어지고 있다. 최근 *P. yezoensis*나 *G. amansii* 등의 치주질환에 대한 항염효과를 입증하기 위하여 사람 치은 섬유모세포를 이용한 연구가 일부 이루어지고 있으나 *in vivo*에서 효과가 있는지에 대한 검증은 부족한 실정이다[18-20].

이에 본 연구에서는 기존에 항염효과가 검증된 해조류 중 *E. cava*(*Ecklonia cava*), *S. japonica*(*Saccharina japonica*), *U. pinnatifida*(*Undaria pinnatifida*), *G. amansii*(*Gelidium amansii*)의 에탄올 추출물을 이용하여, 생쥐 대식 세포주인 RAW 264.7 cell line에서 nitric oxide (NO) 생성 억제능과 세포생존율을 분석하고 치주염 동물모델에 적용하여 이들의 치주질환의 항염효과를 검증하고자 한다.

II. 연구방법

1. 세포배양 및 시료

실험에 사용한 생쥐 대식세포(murine macrophages, RAW 264.7 cell line)는 한국세포주은행(KCLB No. 40071; Seoul, Korea)에서 분양받아 10%의 fetal bovine serum (FBS, Hyclone, South Logan, UT, USA), 100 Unit Penicillin/Streptomycin (Hyclone)이 첨가된 DMEM 배지를 37°C, 5% CO₂ 가습된 조건의 incubator (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)에서 배양하였다. 사용된 해조류인 *E. cava* ethanol extract (ECEE), *S. japonica* ethanol extract (SJEE), *U. pinnatifida* ethanol extract (UPEE), *G. amansii* ethanol extract (GAEE)은 제주생물다양성 연구소(Jeju, Korea)에서 분양받았다. RAW 264.7 cell line의 염증을 유발하기 위한 LPS와 실험에 사용된 시약인 sodium dodecyl sulfate (SDS), dimethyl sulfoxide (DMSO)는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. 1차 항체인

iNOS, COX-2와 actin 그리고 2차 항체인 horseradish peroxidase (HRP)-conjugated IgG는 Cell Signaling Technology (Boston, MA, USA)에서 구입하여 시험분석에 사용하였다.

2. Nitric oxide (NO) 생성량 및 세포 생존율 측정

RAW 264.7 cell line을 24 well plate에 파종하고 24시간 동안 배양한 후 시료를 250 µg/ml와 500 µg/ml 농도로 처리하였다. 2시간 후 LPS를 1 µg/ml의 농도로 처리하고 다시 20시간 배양하였다. NO 생성량의 측정을 위해 상층액 100 µl를 취하고 1% sulfanilamide와 1% α-naphthylamide 동량혼합액인 Griess 시약 100 µl를 혼합하여 실온에서 5분간 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Sodium nitrite (NaNO₂)를 이용하여 흡광도의 표준곡선을 구한 후 측정된 시료의 NO농도를 산출하였다. 그리고 해조류 추출물의 세포독성을 측정하기 위하여 남은 1 ml의 배지에 EZ-Cytox 시약(EZ-Cytox cell viability assay kit, Daeil lab service, Seoul, Korea) 10 µl를 첨가하고 1시간 동안 배양한 후 480 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포생존율은 대조군에 대한 백분율로 표시하였다.

3. 치주염 동물 모델에서 해조류 추출물의 항염 효과

C57BL/6 mice (male, 6-week old)를 stainless steel cage에 2마리씩 1주일 동안 chow diet와 물로 적응시킨 후 평균 체중 30 g인 내외로 되었을 때 각 군당 10마리씩 6군으로 나누어 2주간 실험을 진행하였다. 실험군은 총 6군으로 음성대조군, 양성대조군, ECEE 식이군, SJEE 식이군, UPEE 식이군, GAEE 식이군으로 나누어 실시하였다. 실험식이 조성은 AIN-93을 기준으로 각 추출물을 5%씩 첨가하여 제조하였다. 2주일간 추출물 식이를 진행하면서 2주차에 PBS에 녹인 LPS를 50 µg/mouse의 농도로 실험동물의 하악에 0, 2, 4일차에 주사하고 6일차에 이산화탄소를 이용하여 희생하였다[21]. 그리고 치주염을 유발한 실험동물의 하악 치주조직을 절제한 후 protein lysis buffer (PRO-PREP, Intron Biotechnology, Seongnam, Korea)에 담근 후 homogenizer를 이용하여 균질화하고 균질화된 검체는 13,000 xg에서 10분동안 원심분리하여 상층을 분리한 후 Bradford 방법을 이용하여 단백질 농도를 정량하였다. 분리된 단백질 100 µg이 포함된 시료를 준비하고 10% SDS-polyacrylamide gel에 전기영동 후 polyvinylidene fluoride membrane (PVDF, Bio-rad)으로 이동시켰다. 그리고 PVDF membrane은 5% non-fat dry milk를 PBST에 녹여 1시간동안 실온에서 블로킹을 진행하였다. 그

후 1:1,000의 비율로 희석한 1차 항체와 섞은 후 4°C에서 24시간 동안 hybridization을 하였다. 1차 항체와의 hybridization이 끝난 PVDF membrane은 PBST로 3회 세척 후 다시 1:1,000으로 희석한 2차 항체와 실온에서 2시간 동안 hybridization을 하였다. 2차 항체까지 반응이 끝난 후 enhanced chemiluminescence solution (ECL, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)을 이용하여 효소 반응하여 film (ECL sensitive, GE Healthcare, Chicago, IL, USA)에 감광한 후 단백질의 발현 변화를 분석하였다.

4. 통계 분석

3회 반복 시행한 모든 실험 결과는 SPSS 통계 프로그램을 (version 25.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하였으며, 일원배치분산분석(one-way ANOVA)을 실시하여 시험군간의 유의성을 확인하고 평균 ± 표준편차(mean ±SD)를 나타내었다. 또한 사후 검증을 위하여 Duncan's multiple range test를 사용하였다.

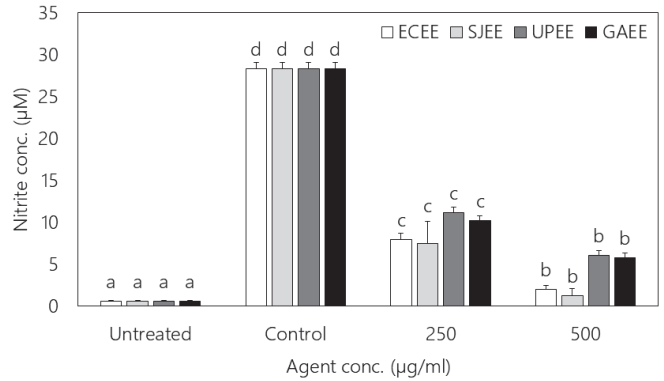
III. 연구결과

1. 해조류 추출물의 NO 생성 억제 효과 및 세포 독성에 미치는 영향

4종류의 해조류인 ECEE, SJEE, UPEE, GAEE의 항염증 효과를 알아보기 위하여 RAW 264.7 cell line에 각각 250, 500 µg/mL의 시료를 처리하고 1 µg/mL의 LPS로 염증을 유도한 결과 Figure 1에서 보는 바와 같이 농도 의존적으로 NO 생산을 유의적으로 억제하는 것을 확인할 수 있었다. 그리고 각 시료가 세포 생존율에 영향을 미치는지에 대해서도 확인한 결과 실험 농도에서는 세포 독성을 야기하지 않았다(Figure 2).

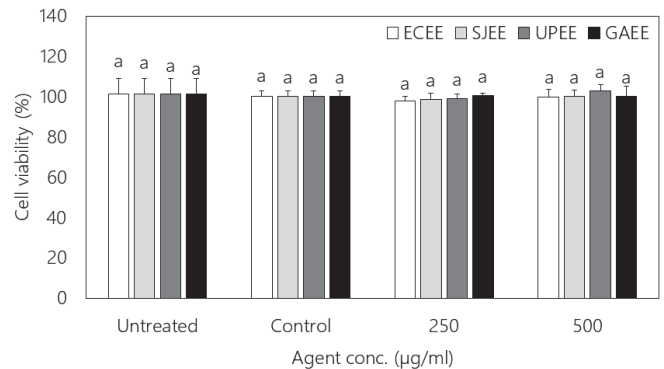
2. 치주염 동물모델에서 해조류 추출물의 항염증 효과

치주염 동물모델에서 해조류 추출물의 항염증 효과를 알아보기 위하여 2주 동안 ECEE, SJEE, UPEE, GAEE가 5% 포함된 식이를 제공하면서 2주차에 50 µg/mouse의 농도로 LPS를 실험 동물의 하악에 3회 주사하여 치주염을 유발하였다. 그리고 치주염이 유발되었는지의 여부를 확인하기 위하여 하악 치주조직을 절취한 후 단백질을 추출하고 Western blot analysis를 시행한



RAW 264.7 cell line was incubated with and without indicated concentrations of seaweed ethanol extracts for 2 h, and then incubated with LPS (1 µg/ml) for 20 h. Untreated means negative control without LPS treatment, while control means positive control with LPS treatment. Data represent the means±SD of triplicate experiments. One-way ANOVA and Duncan's multiple range test was applied to analyze the difference between experimental groups. A value sharing same superscript is not significantly different at $p < 0.05$.

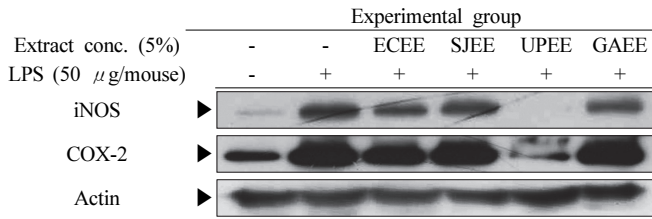
<Figure 1> Effects of four kinds of seaweed ethanol extracts on NO production in LPS-stimulated RAW 264.7 cell line.



RAW 264.7 cell line was incubated with and without indicated concentrations of seaweed ethanol extracts for 2h, and then incubated with LPS (1 µg/ml) for 20h. Untreated means negative control without LPS treatment, while control means positive control with LPS treatment. Data represent the means±SD of triplicate experiments. One-way ANOVA and Duncan's multiple range test was applied to analyze the difference between experimental groups. A value sharing same superscript is not significantly different at $p < 0.05$.

<Figure 2> Effects of four kinds of seaweed ethanol extracts on cell viability in LPS-stimulated RAW 264.7 cell line.

결과 <Figure 3>에서 보는 바와 같이 LPS injection으로 치주조직에 iNOS와 COX-2의 발현이 증가된 것으로 보아 치주염이 유발된 것을 확인할 수 있었다. 그리고 실험군에서 iNOS와 COX-2의 발현이 억제되는 것을 확인할 수 있었고, 특히 UPEE에서는 두드러지게 염증이 억제되는 것을 알 수 있었다. 이 결과를 통해 해조류 추출물은 치주염 동물 모델에서 치주염을 억제하는 활성이 있음을 알 수 있었다.



Protein expression levels of iNOS and COX-2 were analyzed by Western blot analysis. Actin was used as an internal control.

<Figure 3> Effects of four kinds of seaweed ethanol extract on iNOS and COX-2 protein expressions in periodontium of mice treated with LPS.

IV. 고찰 및 결론

사회가 고령화됨에 따라 치주질환자가 많이 발생하고 그 중 만성 치주질환자는 지속적으로 증가하고 있는 추세이다. 제7기 3차년도 국민건강영양조사 결과에 따르면 19세 이상 치주질환 유병률이 2012년 20.7%에서 2015년 26.4%, 2016년-2018년 23.2%로 보고되었고, 치주질환은 30대 이후 치아상실의 가장 큰 원인이며, 다양한 합병증을 유발하기도 한다[22]. 즉, 치은출혈, 치조골 소실, 통증, 흔들림을 거쳐 상실에 이르게 되며, 치아우식증과 달리 치주염은 한 치아에 국한되는 것이 아니라 여러 치아에 광범위하게 발병한다[4]. 최근 연구들에서는 치주염이 단순히 구강병에 국한되지 않고 다양한 만성질환에도 영향을 미치며, 특히 치매와도 밀접한 관련이 있는 것으로 보고되고 있다[23][24]. 이에 치주질환의 유병율을 낮추기 위하여 정부에서는 만 19세 이상의 성인을 대상으로 스케일링 보험급여화를 시행하고 있으나 여전히 치주염의 유병율은 높은 실정이다[25].

이러한 치주염을 예방하는 가장 좋은 방법은 칫솔질이고 치석 제거와 치근면활택 등의 시술에 의존하고 있다[26]. 시술 후 치주조직의 치유를 촉진하고 감염을 예방하기 위하여 약을 복용하고, chlorhexidine과 같은 약제를 사용하고 있으나 착색, 작열감, 동통 등의 다양한 부작용의 발생으로 인하여 천연 추출물에 대한 관심은 지속적으로 증가하고 있다[27]. 이에 치주염의 예방과 치료에 도움이 될 수 있는 천연 추출물에 대한 연구들이 꾸준히 이루어지고 있다. 한약제를 이용하여 *P. gignvalis*에 대한 항균력과 항염효과를 검증하거나 *P. yezoensis*, *G. amansii*, *Gracilaria textorii* 등의 해조류를 사람 치은 섬유모세포를 이용하여 항염과 항산화 효과를 입증하였다[28][18-20]. 이에 항염효과가 입증된 해조류를 이용하여 치주염 동물모델에 적용하여 항염효과를 검증하고자 하였다.

ECEE, SJEE, UPEE, GAEE를 RAW 264.7 cell line에 250, 500 μ g/ml로 처리한 후 NO 생성 억제능을 분석했고 이들 해조류는 농도 의존적으로 NO생산을 억제하였다. 이는 사람 치은 섬유모세포에서 *U. pinnatifida*, *S. japonica*, *G. amansii*의 항염과 항산화효과를 분석한 실험에서 농도 의존적으로 NOS의 활성을 억제하는 것과 동일한 양상의 결과를 보였다[14-17]. 그리고 유의적인 효과를 보인 250, 500 μ g/ml의 농도에서 실험에 사용한 시료 모두 세포독성을 야기하지 않았다. 이는 기존의 사람 치은 섬유모세포에서의 연구결과와 동일하였다[14-17].

RAW 264.7 cell line에서 NO 생성 억제 효과 확인 후 치주염 동물모델을 이용한 항염증 효과를 확인하고자 하였다. 해조류를 식이한 동물에 LPS를 injection하여 치주염을 유발하고 치주조직에서 염증 단백질을 분석한 결과 네 시료 모두 염증 매개 물질인 iNOS와 COX-2 모두 억제되는 결과를 볼 수 있었고, 특히 *U. pinnatifida*의 항염 활성이 두드러지게 높은 것을 알 수 있었다. 이는 사람 치은 섬유모세포 실험에서 *G. amansii*, *P. yezoensis* ethanol extract가 항염효과[18]를 보이는 것과 유사한 결과를 보였고, 치주염 동물모델을 이용한 한련초 추출물에서의 치주염 개선 효과[28]와 마치현 및 금전초 추출물에 대한 치주염증 억제 효과[29]와 유사한 결과를 보였다. 두 연구 모두 한약제를 이용하였으나, 치주염을 유발 방법은 rat을 이용하여 마취하에 1번 대구치 치경부에 멸균된 나일론실을 결찰하는 것과 LPS를 주입하는 다른 방법을 사용하였다. 또한 본 연구에서는 각 시료별 5%를 포함하는 식이를 제공한 반면, 박 등[28]의 연구에서는 한련초 추출물을 100 μ l씩 도포하였고 박 등[29]의 연구에서는 마치현과 금전초 에탄올 추출물을 음수에 혼합하여 사용하여 각기 방법은 달랐다.

본 연구에서는 약제가 아닌 식생활에서 널리 사용되는 해조류를 시료로 활용하였고, 함유량 또한 낮은 농도를 사용하여 가글이나 세치제 등으로 활용하기 위한 기반을 마련한 것으로 사료된다. 따라서 치주염증의 억제효과를 정확히 입증하기 위해서는 사료, 음수, 도포, 강제 식이와 같이 적용방법을 달리하는 추가실험을 통하여, 치주조직 단백질 분석 뿐만 아니라 혈액분석과 치조골 소실평가 등도 실시하여야 할 것으로 사료된다.

REFERENCES

1. Sousa V, Mardas N, Farias B, Petrie A, Needleman I, Spratt D, Donos N: A systematic review of implant outcomes in

- treated periodontitis patients. *Clin Oral Implants Res* 27(7):787-844, 2016.
DOI:10.1111/clar.12684. Epub 2015 Sep 18.
2. Turri A, Rossetti PH, Canullo L, Grusovin MG, Dahlin C; Prevalence of peri-implantitis in medically compromised patients and smokers: a systematic review. *Int J Oral Maxillofac Implants* 31(1):111-118, 2016.
DOI:10.11607/jomi.4149
 3. Hajishengallis G, Lamont RJ: Breaking bad: manipulation of the host response by *Porphyromonas gingivalis*. *Eur J Immunol* 44(2):328-338, 2014.
DOI:10.1002/eji.201344202.
 4. Kim HN: The relationship between periodontal disease prevalence and occupation among Korean adults aged 19-39 according to the 6th Korea National Health and Nutrition Survey. *J Korean Soc Dent Hyg* 18(5):631-41, 2018.
DOI:10.13065/jksdh.20180054
 5. Y. H. Kim, B. S. Park: Antioxidant effect of eugenol in human periodontal ligament fibroblasts. *Korean Journal of Physical Anthropology* 28(1):45-53, 2015.
DOI: <https://doi.org/10.11637/kjpa.2015.28.1.45>
 6. Kocgozlu L, Elkaim R, Tenenbaum H, Wemer S: Variable cell responses to *P. gingivalis* lipopolysaccharide. *J Dent Res* 88(8):741-745, 2009.
DOI:10.1177/0022034509341166.
 7. Graves DT, Oskoui M, Volejnikova S: Tumor necrosis factor modulates fibroblast apoptosis, PMN recruitment, and osteoclast formation in response to *P. gingivalis* infection. *J Dent Res* 80(10):1875-1879, 2001.
DOI:10.1177/00220345010800100301
 8. Kundu JK, Surh YJ: Inflammation: gearing the journey to cancer. *Mutat Res* 659(1-2):15-30, 2008.
DOI:10.1016/j.mrrev.2008.03.002.
 9. Kim MJ, Kim KBWR, Jang MR, et al: Inhibitory properties of *Gracilaria textorii* ethanol extract on the inflammatory immune response. *J Kor Soc Food Sci Nutr* 47(4): 387-394, 2018.
DOI:10.3746/jkfn.2018.47.4.387
 10. Kim JH, Kang HM, Lee SH, et al: Antioxidant and α -glucosidase inhibition activity of seaweed extracts. *Kor J Food Preserv* 22(2):290-296, 2015.
DOI:10.11002/kjfp.2015.22.2.290
 11. Kim SA, Kim J, Woo MK, et al: Antimutagenic and cytotoxic effects of ethanol extracts from five kinds of seaweeds. *J Kor Soc Food Sci Nutr* 34(4):451-459, 2005.
 12. Kim YH, Kim JH, Kim DH, Kim SH, Kim HR, Kim YM: Synergistic antimicrobial effect of *Sargassum serratifolium* (C. Agardh) C. Agardh extract against human skin pathogens. *Kor J Food Sci Technol* 48(3):241-246, 2016.
DOI:10.9721/KJFST.2016.48.3.241
 13. Lee JY, Choi JW, Lee MK, Kim YM, Kim IH, Nam TJ: Anti-inflammatory Effects of *Pyropia yezoensis* Extract in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. *Kor J Fish Aquat Sci* 47(6):757-764, 2014.
DOI:10.5657/KFAS.2014.0757
 14. Kang BK, Ahn NK, Choi YU et al: Anti-inflammatory Activity of Ethanol Extract of *Undaria pinnatifida* Root in RAW 264.7 Cells. *Kor J Fish Aquat Sci* 47(6):751-756, 2014.
DOI:10.5657/KFAS.2014.0751
 15. Jung KI, Kim BK, Kang JH, Oh GH, Kim IK, Kim MH: Antioxidant and Anti-inflammatory Activities of Water and the Fermentation Liquid of Sea Tangle (*Saccharina japonica*). *J of Life Science* 29(5):596-606, 2019.
DOI:10.5352/JLS.2019.29.5.596
 16. Kim SY, Sun HJ, Eun CH, Kim KN, Jeon YJ: Agar Hydrolysates Obtained from Jeju Island Attenuates the LPS-induced Inflammation in In Vitro and In Vivo Zebrafish Embryos. *J. Mar. Biosci. Biotechnol* 11(2):71-80, 2019.
DOI:10.15433/ksmb.2019.11.2.071
 17. Lee SS, Bang MH, Jeon HJ, Hwang TK, Yang SA: Anti-inflammatory and Anti-allergic Effects of Phlorofucofuroeckol A and Dieckol Isolated from *Ecklonia cava*. *J of Life Science* 28(10):1170-1178, 2018.
DOI:10.5352/JLS.2018.28.10.1170
 18. Park CM & Yoon HS: Anti-inflammatory effect of *Porphyra yezoensis* ethanol extract through the inhibited NF- κ B and JNK activation in LPS-PG stimulated HGF-1 cells. *J of the Korea Convergence Society* 9(12):81-88, 2018.
DOI:10.15207/JKCS.2018.9.12.081
 19. Park CM & Yoon HS: Anti-Inflammatory and Antioxidative Effects of *Gracilaria textorii* Ethanol Extract in LPS-PG-Stimulated Human Gingival Fibroblast-1 Cells. *J of Korean Society of Integrative Medicine* 7(4):61-69, 2019.
DOI:10.15268/ksim.2019.7.4.061
 20. Park CM & Yoon HS: Strengthened Antioxidative Potential by *Gelidium amansii* Ethanol Extract through the Induction of Phase II Enzymes in Human Gingival Fibroblast Cells. *Int J Clin Prev Dent* 14(3):157-161, 2018.
DOI:10.15236/ijcpd.2018.14.3.157

21. Matsumoto C, Ashida N, Yokoyama S et al: The protective effects of β -cryptoxanthin on inflammatory bone resorption in a mouse experimental model of periodontitis. *Biosci Biotechnol Biochem* 77(4):860-862, 2013.
22. Health and Nutrition Research Division Centers for Disease Control and Prevention, Centers for Disease Control: Key findings of the 7th Wave of the National Health and Nutrition Survey. Seoul: Ministry of Health and Welfare 17, 2019.
23. Ko HB, Kim MK, Kim JY, Kim HS, Park YS, Seo SH, Hwang SJ: The Relationship between Dementia and Oral Health in Some Elderly in Daejeon. *J Dent Hyg Sci* 16(6):481-487, 2016.
DOI:10.17135/jdhs.2016.16.6.481
24. Kim DH, Hwang SJ: Influence of the food intake ability and the number of remaining teeth on oral health related quality of life in some elderly people. *J Dent Hyg Sci* 16(1):53-61, 2016.
DOI:10.17135/jdhs.2016.16.1.53
25. Jung JY, Lim MH: Awareness and satisfaction toward health insurance coverage of scaling. *J Korean Soc Dent Hyg* 15(6):1107-1116, 2015.
DOI:10.13065/jksdh.2015.15.06.1107
26. Apatzidou DA, Kinane DF. Nonsurgical mechanical treatment strategies for periodontal disease. *Dent Clin North Am* 54(1):1-12, 2010.
DOI:10.1016/j.cden.2009.08.006.
27. Kapoor A1, Malhotra R, Grover V, Grover D: Systemic antibiotic therapy in periodontics. *Dent Res J (Isfahan)* 9(5):505-15, 2012.
28. Park JH, Lee HS, Yang WM: The effects of *Eclipta Prostrata L.*(*Ecliptae Herba*) on periodontitis rats. *J Korean Med* 39(1):63-74, 2017.
DOI:10.13048/jkm.18007
29. Park YM, Lee YR, Park SH et al: Inhibitory Effects of *P. oleracea* Oleracea Ethanol Extract and *Glechoma Hederacea* Ethanol Extract on the Periodontitis. *J Physiol & Pathol Korean Med* 29(1):46-50, 2015.
DOI:10.15188/kjopp.2015.02.29.1.46