

죽염이 염증성 치은섬유모세포에 미치는 영향

오한나¹, 최충호^{2,3}¹원광보건대학교 치위생과, ²전남대학교 치의학전문대학원 예방치과학교실, ³치의학연구소

Effect of bamboo salt on human gingival fibroblasts

Han-Na Oh¹, Choong-Ho Choi^{2,3}¹Dental Hygiene, Wonkwang Health Science University, ²Department of Preventive & Public Health Dentistry, ³Dental Science Research Institute, Chonnam National University School of Dentistry, Gwanju, Korea

Received: May 19, 2014

Revised: June 13, 2014

Accepted: June 19, 2014

Corresponding Author: Choong-Ho Choi
Department of Preventive & Public Health
Dentistry, Chonnam National University
School of Dentistry, 33 Yongbong-ro,
Buk-gu, Gwangju 500-707, Korea
Tel: +82-62-530-5834
Fax: +82-62-530-5835
E-mail: hochoi@chonnam.ac.kr

Objectives: To evaluate the anti-inflammatory and cytotoxic activities of bamboo salt.**Methods:** Cytotoxicity of bamboo salt and bay salt (0.01%, 0.1%, and 1%) was evaluated using MTT assay. In addition, secretion of the pro-inflammatory cytokines interleukin (IL)-1 β and IL-6 from human gingival fibroblasts (HGFs) was measured after application of 0.01% and 0.1% concentrations by using real-time polymerase chain reaction.**Results:** Bamboo salt and bay salt at 1% concentration were cytotoxic to HGFs at 24 h; however, no such effect was observed at 0.01% or 0.1%. Bamboo salt showed a relatively low inhibitory effect. IL-1 β secretion was inhibited by a 0.1% solution of bamboo salt. IL-6 secretion was inhibited by both bamboo salt and bay salt at 0.1% concentration.**Conclusions:** The above results suggest that bamboo salt inhibits the release of IL-1 β and IL-6 from HGFs. Thus, bamboo salt may be a useful material for gingival inflammation.**Key Words:** Bamboo salt, Human gingival fibroblast, IL-1 β , IL-6

서론

구강 내 염증 질환인 치주질환은 치아주위 조직을 파괴하는 염증성 면역성 질환으로 2010년 구강보건 실태 조사 결과 만 30 세 이상 성인의 적어도 74.2%가 이환되어 있는 양대 구강병 중의 하나이다¹⁾. 염증은 여러 가지 형태의 감염이나 생체 내 대사산물 중의 자극성 물질에 대한 생체방어반응이며, 계통 발생론적으로 가장 오래된 방어기전으로 cytokines, PGE2, NO, lysosomal enzyme, free radicals 등 다양한 매개 물질이 관여하고 있다²⁾. 주요한 염증성 세포활성물질로는 tumor necrosis factor- α (TNF- α), IL-1 β , IL-6가 있는데 이들은 각종 염증 질환의 발생과 진행에 중요한 작용을 하는 것으로 보고되었다³⁾. TNF- α 는 면역계에 있어서 염증을 일으키는 주요 사이토카인으로 면역세포들에 의해 분

비되며, 특히 자극받은 대식세포에서 다량이 분비된다⁴⁾. IL-1은 IL-1 α 와 IL-1 β 2개의 단백질로 구성되어 있으며, 활성화된 여러 면역세포에서 분비된다⁵⁾. IL-6는 다기능성 사이토카인으로 염증 반응, 숙주반응과 조직손상과 관련되며 IL-1, TNF- α 와 같은 염증성 자극에 반응하여 다량 분비된다⁶⁾. 따라서 이들 사이토카인의 분비량에 대한 조절은 항 염증효과를 파악하는 기준이 된다.

죽염은 대나무 속에 간수를 뺀 천일염을 다져 넣고 황토반죽으로 입구를 막아 철가마에 넣고 소나무장작불로 800°C-900°C로 구운 후 대나무가 타고 남은 소금기둥을 분쇄하여 대나무에 넣고 동일한 과정을 8회 반복한 후 마지막 9회째는 1300°C 이상의 고열에서 용융시켜 얻어낸 물질이다. 또한 염증, 당뇨, 암 등에 효과가 있는 것으로 알려져 있으며^{7,8)}, 대나무의 유효성분과 천일염의 미량 원소 등에 의해 활성산소를 배출해 주고 산화방지 및 노화억

제 등 독소제거가 탁월하다고 알려져 있다⁹⁾.

죽염의 항염증효과에 관한 연구로 Shin 등¹⁰⁾은 phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)와 A23187로 자극된 인간비만세포에 죽염을 처리한 후 염증성 사이토카인의 분비 억제 효과와 이 활성물질의 단백질 발현억제효과 등을 보고하였고, Myung 등¹¹⁾은 죽염이 HEI-CO1 청각세포에서의 IL-6의 발현을 억제시켰다고 보고하였다.

구강 내 염증 효과에 관해서는 Kim 등¹²⁾은 죽염이 치은염증을 억제하는 효과를 나타내었다고 보고하였고, Min 등¹³⁾은 죽염과 수종의 생약성분을 배합한 세치제를 사용하여 2개월간 잇솔질을 하면 치은지수가 감소한다고 하였으며, Park과 Choi¹⁴⁾는 죽염과 수종의 한약재를 배합한 세치제를 3개월 사용한 결과 치태지수와 치은염지수가 유의하게 감소되어 치은염 억제 효과가 나타났다고 보고하였다. 이처럼 죽염을 함유한 세치제를 사용하여 치은염의 감소효과를 보고한 임상 연구뿐만 아니라 더 세부적으로 죽염이 치은염을 감소시키는 기전에 관한 연구도 필요할 것으로 생각된다.

따라서 본 연구에서는 죽염의 구강 내 염증성 질환에 대한 효과를 확인하기 위해 TNF- α 에 의해 유발된 염증성치은섬유모세포에 죽염을 처리 한 후 IL-1 β 와 IL-6 발현에 어떠한 영향을 미치는지를 살펴봄으로써 죽염이 염증성 사이토카인에 대한 억제효과를 기대할 수 있는지 알아보하고자 하였다.

연구대상 및 방법

1. 실험 용액

죽염은 9회 죽염(bamboo salt, Insan, Hamyang, Korea, 이 하 죽염)을 사용하였고, 천일염은 9회 죽염을 만드는 원료로 사용되는 천일염(bay salt, Tae pyeong saltern, Shinan, Korea)을 사용하였다. 실험용액은 각각 0.01%, 0.1%, 1% 농도로 제조하였다. 연구는 Fig. 1의 디자인에 따라 시행되었다.

2. 세포주 배양

사람의 치은 섬유모세포주(human gingival fibroblast, ATCC CRL2014)는 전남대학교 치의학전문대학원 치주과학교실에서 보관중인 것을 사용하였으며, 10% fetal bovine serum

(FBS, Gibco BRL, NY, USA)과 1% antibiotic/antimycotic agent (Penicillin-Streptomycin, Gibco BRL, NY, USA)이 함유된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Gibco BRL, MD, USA)에 분주한 후 37°C의 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 배양액은 2-3일에 한번 씩 교환하였다.

3. 세포독성검사

치은 섬유모세포를 1×10^4 cells/well이 되도록 96 well plate에 100 μ l씩 각각 분주한 후 37°C의 5% CO₂ 배양기에서 1일 동안 배양하였다. 다음날 2% FBS와 1% antibiotic/antimycotic agent를 포함하는 DMEM에 죽염과 천일염을 각각 0.01%, 0.1%, 1% 농도로 제조하여 처리 한 후 배양 1일 후와 3일 후 EZcytox (Daeillab, Seoul, Korea)를 넣은 다음 배양기에서 1시간 동안 배양 한 후 spectrophotometer (VERSA max microplate reader, Molecular Devices, USA)을 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 모든 실험은 3회 반복하여 시행하였다.

4. 치은섬유모세포에서 염증성 사이토카인의 발현억제효과 측정

4.1. TNF- α 및 실험용액 처리

세포배양방법과 동일하게 치은섬유모세포를 배양 한 후 대조군을 제외한 모든 군에 10 ng/ml TNF- α 를 처리하여 37°C의 5% CO₂ 배양기에서 추가로 1일간 더 배양한 후 0.01%, 0.1% 농도의 죽염과 천일염을 처리하였고 37°C의 5% CO₂ 배양기에서 1일간 배양하였다.

4.2. RNA 추출

배양한 치은섬유모세포는 4°C, 13,000 rpm으로 15분간 원심 분리하여 상층액은 버리고 남은 세포에 Trizol Max (Invitrogen life Tech.)용액을 넣은 다음 실온에서 5분간 방치하였다. Chloroform용액을 넣고 vortex 후 위와 동일한 조건으로 원심분리하였다. 상층액을 새로운 tube에 옮기고 상층액과 동량의 isopropyl alcohol을 넣은 후 실온에 10분간 방치하고 4°C, 13,000 rpm으로 10분간 원심분리하였다. 다시 상층액을 버린 후 pellet에 75% ethyl alcohol을 넣고 4°C, 13,000 rpm으로 15분간 원심분리하였다. 다시 상층액을 버린 후 5분정도 실온에 두어 건조시킨 다음 0.1% diethyl pyrocarbonate (DEPC)-H₂O 12 μ l를 넣은 후 65°C에서 15분 동안 pellet을 건조시켰다. RNA의 순도와 농도는 Nanodrop (Thermo scientific, Wilmington, DE, USA)을 사용하여 측정하였다.

4.3. 실시간 중합연쇄반응(Real-Time polymerase chain reaction; Real-Time PCR) 분석

Premix에 random primer 및 추출한 RNA를 넣은 후 멸균수를 혼합한 후 vortex한다. My genie 96 well thermal block (Bioneer)을 사용하여 RT-PCR을 시행하여 cDNA를 합성하였다. 반응용액은 1 \times SYBR green / PCR Master Mix, cDNA, 각 PCR primers와 멸균수를 넣었으며, 사용한 primer sequence

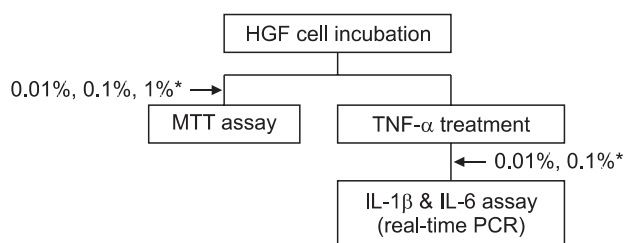


Fig. 1. Schematic diagram for experimental designs (*: Treatment of bamboo salt, NaCl and bay salt solutions, HGF: human gingival fibroblast).

Table 1. Nucleotide sequences for Real-Time PCR primers

Gene description	Direction	Nucleotide sequence (5'-3')
GAPDH	Forward	CGGAGTCAACGGATTTGGTTCGTAT
	Reverse	AGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGAC
IL-1 β	Forward	GATACAACTGATGAAGCTCGTCA
	Reverse	GAGATAGTGTTCACATCCTGA
IL-6	Forward	GAACAAGCCAGAGCTGTCCA
	Reverse	TGAGGTGCCCATGCTACATT

Table 2. The cytotoxicity assay of experimental solutions

Group	Concentration (%)	Cytotoxicity*
Control	-	2.41 \pm 0.02 ^a
Bamboo salt	0.01	2.27 \pm 0.07 ^{ab}
	0.1	2.23 \pm 0.07 ^{ab}
	1	0.21 \pm 0.01 ^d
Bay salt	0.01	2.09 \pm 0.12 ^{bc}
	0.1	1.86 \pm 0.04 ^c
	1	0.37 \pm 0.06 ^d

* $P < 0.01$, by Kruskal-Wallis test.

^{a,b,c,d}The letter indicates significant difference by Mann-Whitney test, at $\alpha = 0.05$.

는 Table 1과 같다. 반응 조건은 55°C에서 20초간 annealing과 extension과정을 거치도록 하고 총 44 cycle을 반복하도록 구성하였다. DNA증폭은 SYBR green 형광을 이용하여 측정하였다.

5. 자료 분석

자료분석은 치은섬유모세포에 대한 세포독성과 염증성 사이토카인의 발현을 나타낸 fold change값은 평균과 표준편차로 나타내었다. 세포독성, 염증성 사이토카인의 발현은 Kruskal-Wallis test를 시행하였으며, 두 군간 비교는 Mann-Whitney test를 시행하였다. 통계분석은 SPSS (Statistical Package for the Social Sciences 18.0. SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 통계프로그램을 이용하여 수행하였으며 자료분석시 통계적 유의성 판정을 위한 유의수준은 5%로 설정하였다.

연구성적

1. 세포독성

죽염이 치은섬유모세포의 증식을 억제하는지 알아보고자 세포독성검사를 시행하였다. 모든 실험용액의 1% 농도에서는 24 시간 후에 대조군과 비교하여 유의한 차이의 세포독성을 보였다. 0.1%와 0.01% 농도에서는 모든 군에서 세포의 증식을 저해하는 정도가 낮게 나타나 이 농도를 선택하여 항염실험에 사용하였다 (Table 2).

Table 3. Effects of various salts on the production of TNF α -induced inflammatory cytokines IL-1 β , IL-6 in human gingival fibroblast cells

Group	Salt concentration (%)	IL-1 β *	IL-6*
Control	-	1.00 \pm 0.57 ^a	1.00 \pm 0.05 ^a
TNF- α	-	4.80 \pm 0.86 ^b	13.09 \pm 0.19 ^d
TNF- α + Bamboo salt	0.01	2.61 \pm 0.95 ^{ab}	4.52 \pm 0.03 ^c
	0.1	0.08 \pm 0.53 ^a	2.56 \pm 0.07 ^{abc}
TNF- α + Bay salt	0.01	2.25 \pm 0.15 ^{ab}	3.24 \pm 0.03 ^{bc}
	0.1	1.90 \pm 0.02 ^{ab}	2.68 \pm 0.09 ^{abc}

* $P < 0.01$, by Kruskal-Wallis test.

^{a,b,c,d}The letter indicates significant difference by Mann-Whitney test, at $\alpha = 0.05$.

2. 종류별 소금이 치은섬유모세포로부터 염증성 사이토카인 발현에 미치는 영향

소금의 종류별 농도에 따른 염증성 사이토카인 IL-1 β 와 IL-6의 발현은 염증 유발 물질인 TNF- α 를 처리한 군에서 현저히 증가하였다. IL-1 β 의 발현에 대한 소금의 억제효과는 0.01% 농도와 0.1% 농도의 죽염과 천일염에서 나타났으며, 0.1% 농도의 죽염에서 가장 명확하게 나타났다. IL-6의 발현에 대한 소금의 억제효과는 0.1% 농도의 천일염과 죽염에서 나타났다(Table 3).

고 안

죽염은 예로부터 전해져온 한국 전통의 민간약제로 과학적으로 입증되지 않은 상태에서 민간적으로 여러 질환에 다양하게 사용되어져 왔고 현재까지 식염 및 건강보조 식품, 기타 여러 제품의 원료로 사용되어지고 있다. 죽염은 대나무에 천일염을 넣고 황토 반죽으로 막아 소나무 장작불로 9번 구워 나온 산물로 원료로는 천일염과 대나무, 황토 반죽이 사용된다⁷⁾. 굽는 횟수에 따라 1회 죽염, 3회 죽염, 9회 죽염으로 나뉘는데 굽는 과정을 거듭할수록 원재료인 천일염에 비해 다량의 미네랄 등이 증가하며, 수용액 상태에서 pH는 9 이상의 알칼리성을 보인다¹⁵⁾. 통상 죽염이라 함은 9회 죽염을 말하며 시중에 가장 많이 유통되고 있다.

Kim 등¹⁶⁾의 연구에서 죽염의 안전성을 확인하기 위하여 쥐를 대상으로 3개월 동안 반복투여하는 독성실험을 진행하였고, 대부분의 결과가 천일염과 유사하게 나타나 죽염 특이적인 독성학적 변화는 없는 것으로 보고되었다.

염증세포는 수많은 종류의 사이토카인을 생산해 내며 이들 물질은 염증의 여러단계에 작용한다. 사이토카인은 관절염이나 치주염과 같은 만성 염증성 질환의 개시와 진행에 관련이 있는 조절성 단백질로¹⁷⁾ 최근에는 치주질환의 개시와 진행 그리고 치료결과의 예측에서 사이토카인 유전자의 역할과 관련한 연구가 주목받고 있다¹⁸⁾. 대표적인 염증성 사이토카인인 IL-1에는 pro-inflammatory 단백질인 IL-1 α 와 IL-1 β 가 있으며, 내인성 antagonist 단백질로는 IL-1ra가 있다. IL-1 α 와 IL-1 β 의 생물학적 작용은 차이가 없는 것으로 알려져 있으며 IL-1 α 는 secreted

molecule로 작용하는 반면 IL-1 β 는 세포 결합성 분자로 간주된다¹⁹⁾. IL-1은 섬유모세포 증식, 골흡수, 연골분해 등에 작용한다. Go²⁰⁾는 IL-1은 치주염이 심한 환자의 치은열구액에서 많이 함유되어 있고, Hönig 등²¹⁾은 치은조직에 함유되어 있다고 보고하였다. Stashenko²²⁾는 치근단 병소에 많이 함유되어 있다고 보고하여 IL-1 β 가 골흡수를 유도하고 여러 염증성 질환에서 깊이 관여한다고 하였다.

IL-6는 다기능성 사이토카인으로 자발적으로 분비되지 않고 세균의 LPS나 IL-1 β , TNF- α 와 같은 사이토카인에 의해 자극받은 세포에서 분비된다⁵⁾. 치주조직에서 다양한 세포가 IL-6 유전자를 발현하는 것으로 알려져 있는데, IL-6 수준이 치주질환자의 염증성 조직, 치은열구액, 혈장 등에서 높게 관찰되며 치주치료 후에 유의하게 감소된다고 보고되었다^{23,24)}. IL-6는 치주질환과 관련된 염증반응과 골흡수 과정을 조절하는 주요인자로 여겨진다. 따라서 본 연구에서는 죽염이 이러한 염증성 사이토카인들의 발현에 어떠한 영향을 미치는지 알아보았다.

먼저 독성을 알아보기 위해 치은섬유모세포에 대한 세포독성 검사를 24시간 시행한 결과 1% 농도의 죽염과 천일염 모두에서 세포가 사멸하였다. 이는 생리식염수 내의 NaCl 농도가 약 0.9%임을 감안할 때 1% 농도에서 세포의 사멸은 용액 제조시 순수한 증류수가 아닌 2% FBS와 1% antibiotic/antimycotic agent를 포함하는 DMEM에 각각의 농도로 제조하였기 때문으로 배지 내에 있던 다른 성분들의 존재에 각 소금의 1%가 혼합되어 실제농도는 1% 이상의 삼투압 작용에 의해 세포가 사멸된 것으로 생각해 볼 수 있다. 따라서 1%를 제외한 0.1%, 0.01% 농도에서 죽염의 IL-1 β 와 IL-6 발현에 미치는 효과를 알아보았다. Shin¹⁰⁾의 연구에서도 9회 구운 자죽염을 인간비만세포에 처리한 결과 0.1%와 0.01% 농도에서는 인간비만세포의 생존도에 별다른 영향을 미치지 않았다고 보고하여 세포의 종류는 차이가 있지만 0.1% 이하의 농도를 가진 죽염은 세포의 생존에 영향을 미치지 않는 것으로 볼 수 있다.

정상 치은섬유모세포에 TNF- α 를 처리하면 치은염에서와 같이 IL-1 β 와 IL-6의 발현이 증가한다. 여기에 죽염과 죽염의 원료가 되는 천일염을 각각 0.01%와 0.1% 농도로 제조하여 1일간 배양한 결과 IL-1 β 의 발현은 0.1% 농도의 죽염에서 가장 높게 억제되었고, IL-6의 발현은 0.1% 농도의 죽염과 천일염 모두에서 억제효과를 보였다. Shin¹⁰⁾의 연구에서도 인간 비만세포에 염증을 유발한 후 IL-1 β 와 IL-6에 대한 죽염의 분비 억제 효과를 관찰한 결과 본 연구와 유사하게 0.1%를 처리한 죽염 군에서 가장 많은 억제효과를 보였고 0.01% 농도의 죽염을 처리한 군에서도 억제효과가 나타나 0.1% 농도의 NaCl 보다 죽염이 염증성 사이토카인을 더 억제하는 것으로 나타났다. 죽염을 이렇게 염증성 사이토카인의 발현이 억제되는 결과는 모두가 가지고 있는 Na⁺이온과 Cl⁻이온의 삼투압 작용인 것으로 생각되며, 죽염이 천일염에 비해 NaCl의 함량이 적음에도 염증성 사이토카인을 더 억제하는 이유는 천일염을 9번 굽는 과정에 생기는 다른 무기성분들의 영향이 있을 것으로 생각된다.

이상의 결과로 0.1% 농도의 죽염은 염증성 사이토카인인 IL-1 β 와 IL-6를 억제하여 치은염증을 감소시킬 수 있을 것으로 보인다. 본 연구의 제한점은 여러 염증 유발인자 중에 IL-1 β 와 IL-6에 관해서만 억제효과를 보았지만 이를 제외한 다른 염증성 사이토카인에도 적용하여 다른 염증유발물질과의 관계도 알아볼 필요가 있으며, 죽염의 여러 무기성분들 중 어떠한 성분이 염증유발물질을 억제하는데 영향을 미치는지에 관한 추후 연구가 필요할 것이다.

결론

본 연구는 치은섬유모세포에 대해 죽염의 농도별 독성평가와 염증성 사이토카인의 발현에 대한 억제 효과를 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 치은섬유모세포에 대한 소금의 독성평가 결과 24시간 후의 1% 농도에서는 모든 소금에서 세포독성이 나타났으며, 0.1% 농도의 천일염, 0.01% 농도의 천일염, 0.1% 농도의 죽염, 0.01% 농도의 죽염 순으로 세포의 활성을 저해하는 것으로 나타났다.

2. 소금의 종류별 농도에 따른 TNF- α 유도 염증성 사이토카인 IL-1 β 의 발현은 0.01% 농도와 0.1% 농도의 죽염과 천일염에서 모두 억제효과가 나타났으며, 0.1% 농도의 죽염에서 억제 효과가 가장 크게 나타났다. IL-6의 발현은 0.1% 농도의 죽염과 천일염에서 억제효과가 나타났으며, 0.1% 농도의 죽염에서 억제 효과가 약간 더 높게 나타났다.

이상의 결과로 죽염은 염증성 사이토카인인 IL-1 β 와 IL-6를 억제하여 치은염증을 감소시킬 수 있음을 알 수 있었다.

References

1. Ministry of Health and Welfare. 2010 Korean National Oral Health Survey: II. Survey results. Seoul:Ministry of Health and Welfare;2010:475.
2. Lim JH, Jung HJ, Kim SC, Jee SY. Anti-inflammation effects of the Gamroem *in vivo* and *in vitro*. The Journal of Korean Oriental Medical Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology 2010;23:13-26.
3. Murtaugh MP, Baarsch MJ, Zhou Y, Scamurra RW, Lin G. Inflammatory cytokines in animal health and disease. Vet Immunol Immunopathol. 1996;54:45-55.
4. Choi KW. Inhibition of TNF- α -induced adhesion molecule expression by diosgenin or discorea batatas extracts in vascular smooth muscle cells [master's thesis]. Seoul:Sungkyunkwan university;2011.[Korean]
5. Dinarello CA. Interleukin-1 and its biologically related cytokines. Adv Immunol 1989;44:153-205.
6. Kishimoto T. The biology of IL-6. Blood 1989;74:1-10.
7. Huh K, Kim YH, Jin DQ. Protective effect of an aged garlic-bamboo salt mixture on the rat with the alcohol-salicylate induced gastropathy. Yakhak Hoeji 2001;45:258-268.
8. Shin HY, Na HJ, Moon PD, Shin T, Shin TY, Kim SH, et al. Inhibition of mast cell-dependent immediate-type hypersensitivity reactions by purple bamboo salt. J Ethnopharmacol 2004;91:153-157.

9. Ju IO, Jung GT, Ryu J, Choi JS, Choi YG. Chemical components and physiological activities of bamboo (*Phyllostachys bambusoides* Starf) extracts prepared with different methods. *Korean J Food Sci. Technol* 2005;37:542-548.
10. Shin HY, Lee EH, Kim CY, Shin TY, Kim SD, Song YS, et al. Anti-inflammatory activity of Korean folk medicine purple bamboo salt. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2003;25:377-384.
11. Myung NY, Choi IH, Jeong HJ, Kim HM. Ameliorative effect of purple bamboo salt-pharmaceutical acupuncture on cisplatin-induced ototoxicity. *Acta Otolaryngol* 2011;131:14-21.
12. Kim CY, Chung SC, Sohn WS. Comparison of the anti-plaque and anti-inflammatory effect of the dentifrices containing NaCl and bamboo salt. *J Korean Acad Dent Health* 1991;15:269-280.
13. Min BS, Choi HY, Choi YJ, Hong JP, Chun YH, Kang NH. The reducing effects on dental plaque formation and gingivitis of toothpastes containing bamboo salt and several herb medicines. *J Korean Dent Asso* 1996;34:65-71.
14. Park KI, Choi EG. Dentifrice containing some oriental medicine and bamboo salt. *J Korean Acad Oral Health* 1994;18:390-400.
15. Kim YH, Ryu HI. Elements in a bamboo salt and comparison of its elemental contents with those in other salts. *Yakhak Hoeji* 2003;47:135-141.
16. Kim JG, Seo KW, Lee BH, Park MK, Park CW, Shin DW, et al. 3 Months repeated dose toxicity studies of the bamboo salt(Jukyum) in rats. *J Toxicol Pub Health* 2002;18:149-157.
17. Masada MP, Persson R, Kenney JS, Lee SW, Page RC, Allison AC. Measurement of interleukin-1 α and-1 β in gingival crevicular fluid: Implications for the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontol Res* 1990;25:156-163.
18. Takashiba S, Naruishi K. Gene polymorphisms in periodontal health and disease. *Periodontol* 2000 2006;40:94-106.
19. Yeom JH. Mechanisms of alveolar bone destruction by periodontal bacteria. [master's thesis]. Gwang ju:Chonnam National University;2009.[Korean]
20. Go YL. Relationship between Interleukin-1B gene makers and periodontal disease in Korean population[master's thesis]. Gangneung:Gangneung-Wonju National University;2008.[Korean]
21. Hönig J, Rordorf-Adam C, Siegmund C, Wiedemann W, Erard F. Increased interleukin-1 beta (IL-1 β) concentration in gingival tissue from periodontitis patients. *J Periodontol Res* 1989;24:362-367.
22. Stashenko P. The role of immune cytokines in the pathogenesis of periapical lesions. *Endod Dent Traumatol* 1990;6:89-96.
23. Irwin CR, Myrillas TT. The role of IL-6 in the pathogenesis of periodontal disease. *Oral Dis* 1998;4:43-47.
24. Takahashi K, Takashiba S, Nagai A, Takigawa M, Myoukai F, Kurihara H, et al. Assessment of interleukin-6 in the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontol* 1994;65:147-153.