

백두옹 추출물의 치주조직 세포에 활성화 및 항염 효과에 관한 연구

정진광 · 정진형 · 임성빈 · 김정근 · 소은희

단국대학교 치과대학 치주과학교실

I. 서론

치주질환은 세균을 주성분으로 하는 치태와 치석에 의해 치주조직이 파괴되는 질환으로서 중년이 이후에 빈발하는 치아상실의 주원인으로 알려져 있다. 치태의 형성을 억제하기 위한 수단으로 칫솔, 치실 등 물리적 방법 이외에 화학요법제의 사용이 이용되고 있다¹⁻³⁾.

화학요법제는 항세균성 물질로 리스트린(Listerine)과 같은 페놀 복합제(phenolic compounds), 클로로헥시딘(chlorhexidine)과 같은 비스구아니드(bisguanides)제제, 헥시딘(hexidine)과 같은 피리미딘(pyrimidine) 유도제제, 센구아나린(sanguinarine)과 같은 식물성 알카로이드 제제, 4급 암모니움 화합물 제제, 불소와 같은 장력 작용제 및 각종 항생제제 등이 알려져 있어 이에 대한 많은 연구가 발표된 바 있다⁴⁻⁸⁾.

그러나 이러한 약제들은 대부분 구강 내에서 적절한 농도를 유지하기 어렵고 내성균의 출현이나 조직 내 과민반응, 치아의 착색이나 미각의 훼손 등의 단점이 있어 이상적 화학요법제라고 할 수 없다^{4, 7-8)}. 따라서 치주질환의 병인균에 대해 장기간 강력한 항균작용을 나타내면서 구강세균의 자연적 평형성을 파괴하지 않고 내성균주를 형성하지 않을 뿐 아니라 신체 부작용이 없는 약제 개발의 필요성이 대두되었

다. 최근에는 안정성이 높고 내성균주의 출현 및 조직의 위해 작용이 적은 천연 추출물에 대한 연구가 진행되어 왔다.

최근 수년간 생약에서 추출된 새로운 약제들이 연구, 개발되고 있는데 이들은 부작용이 적고 장기간 사용이 가능하다는 점에서 주목을 받고 있다. 치주질환의 생약제재로는 옥수수로부터 추출된 옥수수 불검화 추출물(*Zea Mays L.*), 은행엽 추출물, 후박 등이 발표된 바 있다⁹⁻¹¹⁾. 한방 약재로 쓰이는 후박(*Magnoliae cortex*)에서 추출한 물질인 magnolol 및 honokiol은 항우식 효과 및 치태세균의 항균효과를 물론 치주질환의 병인균에 대해 효과적인 항균효과를 나타내고 있으며, 치은 섬유아세포에서 교원질 분해효소의 생산을 억제하는 효과를 보이고 있음이 발표되었다⁹⁻¹⁰⁾.

순환기 장애 예방을 위해 사용되는 은행엽 추출물은 ginkgo flavonglycoside, ginkgolide, 유기산 등의 성분을 함유하여 교원질 분해효소의 억제 효과를 가지며 치은 섬유아세포의 교원질 합성과 총 단백질 합성의 촉진효과를 보이는 좋은 결과를 보이고 있음이 보고되었다¹¹⁾.

치주질환과 같은 만성 염증성 질환에서 특정 염증 자극을 받았을 때 그 반응의 결과로 생성되는 cytokine의 일종인 interleukin-1(IL-1)은 대식세포를 비롯하여 섬유아세포 등 많은 세포에서 생성되는 물

질로 IL-1의 생물학적 특성과 치주질환의 병소에서 나타나는 현상과의 유사성으로 인해 치주질환 병인론과의 연관성이 연구되어 왔다. IL-1은 세포배양 시 치은 섬유아세포를 자극하여 교원질 분해효소와 prostaglandin(PG)을 생성하여 염증의 증상과 더불어 치주조직의 파괴를 가중시킨다고 밝혀졌다¹²⁻¹⁵⁾. 생약제재 중 황금(*Scutellariae radix*)은 소염작용 및 해열작용이 확인되었고¹⁶⁾, 후박, 황금 모두 IL-1의 생성을 억제하는 것으로 발표되었다¹⁷⁻¹⁸⁾.

백두옹(白頭翁, *Pulsatilla Koreana*)은 미나리과(ranunculaceae)에 속하는 다년초로써 우리 나라 뿐만 아니라 중국 동북부 지방에서도 야생하는 식물로 통상 치통, 해열, 수종, 소염, 수렴, 지혈, 이질, 청열해독, 음낭대하, 항균, 진정 및 항암 등의 효과를 갖는 것으로 알려져 있다¹⁹⁻²³⁾. 백두옹은 주성분인 사포닌(saponin), 체조 활성 물질인 11-호кса데카노산(11-hoxadecanoic acid), 14-메틸펜타데카노산(14-methylpentadecanoic acid), 1,2-벤젠디카르복산(1,2-benzenedicarboxylic acid), 6-옥타데카노산(6-octadecanoic acid), 15-메틸-헵타데카노산(15-methyl-heptade-canoic acid) 및 독성 물질인 아네모닌(anemonin)을 함유하고 있는데, 사포닌은 소염작용을 갖고 있고 가수분해되어 트리터펜(triterpen)형의 제닌(genin), 글루코즈(glucose), 람노즈(rhamnose) 및 미지의 당으로 전환되는 것으로 알려졌다²⁴⁻²⁵⁾.

백두옹의 항균 효과에 대한 실험은 정 등²⁶⁾의 연구에 의해 치태 세균뿐만 아니라 치주질환 병인균에 대해서도 광범위하게 작용하는 것으로 밝혀졌다. 그러나 이 물질이 치주조직 세포에 대한 독성이 있는지 알려진 바가 없고 항염 효과에 대해서도 아직 밝혀진 바가 없어 치주질환의 예방 및 치료제로의 가능성을 알기 위해 치은 섬유아세포와 치주인대 세포에 대한 독성 및 IL-1 및 PGE₂를 이용하여 항염 효과를 나타내는지 확인하고자 본 실험을 시행하였다.

II. 연구재료 및 방법

1. 약재의 준비

1) 백두옹

시중에서 판매되고 있는 잘 건조된 한국산 백두옹(*Pulsatilla koreana*)을 이용하였다.

2) 시료의 추출

백두옹 150 mg을 homogenizer로 마쇄한 후 석유에테르(ether)로 탈지하고 100 % 메탄올(MeOH) 100 ml로 3회 반복하여 추출하고 여과지로 얻어진 여액을 진공증발(TYPE N-N, EYELA, Japan)하여 잔유물과 메탄올(MeOH) 추출로 메탄올(MeOH) 추출물을 얻은 다음 클로르포름(CHCl₃)과 물(H₂O)을 사용하여 수회 반복 분액하였다. 이를 클로르포름층과 물층으로 분리하고 상기 물층에 남은 층을 에틸아세테이트/물로 수회 반복 분액하여 이를 에틸아세테이트층과 물층으로 나누고 에틸아세테이트층에 있는 것을 농축하여 실험재료로 사용하기 위해 일부 4 ℃에 보관하였다. 다시 상기 물층에 남은 것을 부틸알콜/물로 수회 반복 분액하여 물층과 부틸알콜층으로 나누고 부틸알콜층에 남은 것을 농축하여 4 ℃에 보관하였다.(Figure 1)

2. 치은 섬유아세포 및 치주인대 세포에 대한 독성 실험

1) 치은 섬유아세포의 배양과 독성검사

본 연구에서는 정상 인체 섬유아세포가 사용되었다. 세포들은 10 % FBS(fetal bovine serum, GIBCO, USA), 100 U/ml penicillin(GIBCO, USA), 100 µg/ml streptomycin(GIBCO, USA)이 첨가된 α-MEM(α-minimum essential medium, GIBCO, USA)이 들어있는 37 ℃의 5 % CO₂ 플라스틱 병에서 배양하였다. 섬유아세포는 단층을 이룰 때까지 배양하였고, 0.02 % EDTA(ethylene diamine tetra acetic acid, GIBCO, USA)-2.5 % trypsin-PBS(phosphate buffer solution, GIBCO, USA)가 10:1:9로 들어있는 플라스틱 병에서 분리해 내었다. 이 세포들은 α-MEM/ 10 % FBS 배양액으로 세척하고 같은 배양액에서 1 × 10⁵ cells/ml로 조정하였다. 다음날 배양액을 교환하고 이틀째 되는 날 배양액을 제거해서 Hank's balanced salt solu-

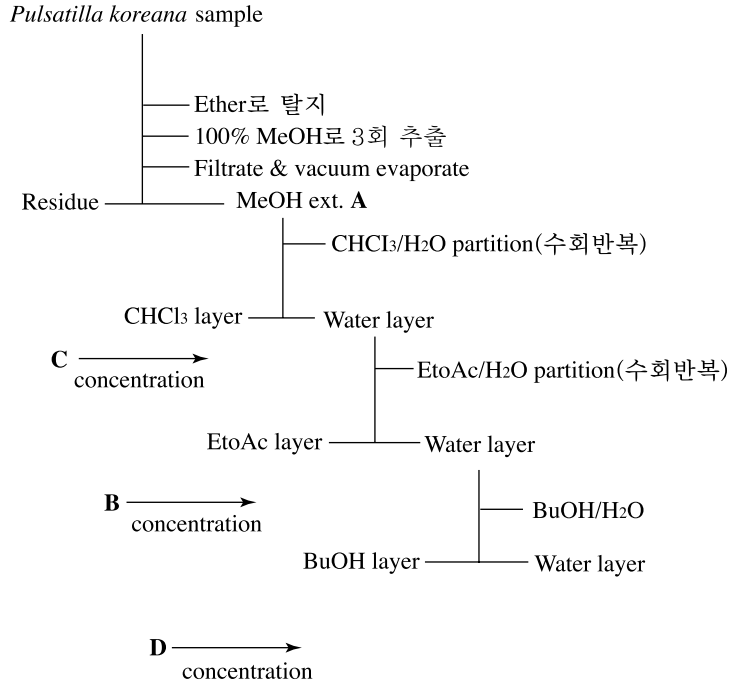


Figure 1. The extracts process of *Pulsatilla koreana*

tion(HBSS, GIBCO, USA)으로 세척하였다. 이들을 37 °C, 5 % CO₂ 및 습도 95 % 배양기에서 24시간 배양하였고, 배양이 끝난 후 생리식염수에 용해한 MTT(Methyl Thiazol-2-YL-2, 5-diphenyl Tetrazolium bromide, GIBCO, USA)용액 50 µl를 각 well에 넣고 4시간동안 배양한 후 MTT용액을 버리고 formazon 결정을 용해시키기 위해 DMSO(dimethyl sulfonide, Sigma, USA)를 50 µl씩 첨가하였다. plate를 잘 흔든 후 ELISA reader(THERMO max™, Molecular Devices Co., CA, USA)로 570 nm에서 흡광도로 측정하였다. 대조군으로는 매 실험마다 실험용액이 들어 있지 않은 α-MEM 배양액을 사용하였다. 모든 실험 결과는 대조군에 대한 백분율로 계산하였다.

2) 치주인대세포의 배양과 독성검사

치주인대 조직을 채취하기 위하여 교정치료를 위하여 내원한 환자의 제일 소구치 치근의 치경부측 1/3을 큐렛으로 치은조직을 제거한 후 발거하여 100

U/ml penicillin과 100 µg/ml streptomycin이 첨가된 α-MEM 배양액에 침수시켰다. 배양액으로 5회 세척 후 치근 중간 1/3부위의 치주인대를 채취하여 세절한 다음 세포배양접시에 고르게 분산시켜 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin 및 10 % FBS가 첨가된 α-MEM을 이용하여 배양하였다. 세포배양을 시행하였으며 3일 간격으로 배양액을 교환해 주면서 밀생 할 때까지 배양하였다. 배양 시 습도는 95 %, 온도는 37 °C를 유지하면서 95 %의 공기와 5 %의 CO₂를 계속 공급하였다. 계대 배양하기 위하여 치주인대 세포를 0.25 % Trypsin-EDTA(GIBCO, USA)용액으로 처리한 후 원심분리하여 배양액으로부터 세포부유액을 만들고 표준혈구 계산기로 well당 1 × 10⁵개의 세포수가 되게 하여 분주 후 배양하였다. 다음날 배양액을 교환하고 이틀째 되는 날 배양액을 제거해서 HBSS로 세척하였다. 추출물과 배양액이 200 µl가 되게 하였다. 이들을 습도는 95 % 온도는 37 °C를 유지하면서 95 %의 공기와 5 %의 CO₂를 계

속 공급하면서 24시간 배양하고 배양이 끝난 후 생리 식염수에 용해한 MTT용액 50 μ l를 각 well에 넣고 4 시간 동안 배양한 후 MTT용액을 제거하고 formazon 결정을 용해시키기 위해 DMSO를 50 μ l씩 첨가한다. plate를 잘 흔든 후 ELISA reader로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군으로는 매 실험마다 실험용액이 들어 있지 않은 α -MEM 배양액을 사용하였다. 실험결과는 대조군에 대한 백분율로 계산하였다.

3. IL-1 β 생성에 미치는 영향

1) 혈액 단핵세포 분리배양

전신질환이 없는 건강한 성인으로부터 heparin을 항응고제로 사용하여 60-120 ml의 정맥혈액을 채집하였다. 채집된 정맥혈액을 Histopaque-1077(Sigma, USA)을 이용한 밀도차 원침법을 이용하여 단핵세포를 분리하였다. 분리된 단핵세포는 PBS로 2-3회 세척하여 10 % FBS, 100 U/ml penicillin과 100 μ g/ml

streptomycin이 함유된 RPMI 1640(GIBCO, USA)에서 95 % 공기, 5 % 산소, 100 % 습도조건하에서 무균적으로 배양하였다.

2) 혈액단핵세포에서 생약추출물이 IL-1 생성에 미치는 영향

배양된 혈액단핵세포를 24-well plate에 10^6 cell/well로 분주하고 첨가물을 가하지 않은 RPMI 1640배지를 대조군으로 하고 E. coli LPS (lipopolysaccharide, Sigma, USA) 25 μ g/ml를 첨가한 well 및 LPS 25 μ g/ml와 수종의 추출물을 8가지의 농도로 하여 첨가한 well을 실험군으로 하여 48시간 동안 배양하였다. 배양 후 각 세포부유액을 모아 400 xg로 10분간 원침시키고 상청액을 모아 측정전까지 -80 $^{\circ}$ C에서 동결 보관하였다. 생산된 IL-1 β 의 양은 IL-1 β EIA system(Amersham, UK)을 이용하여 측정하여 ELISA reader로 450 nm에서 비색정량하였다.

Table 1. Cell cytotoxicity of Pulsatilla koreana on human gingival fibroblasts

Sample		Cellular Activity(%)	
		Gingival Fibroblast	
		Percentage	Optical density
Control		100	0.372 \pm 0.035
BuOH Extract	0.01%	102.4	0.381 \pm 0.015
	0.02%	100	0.372 \pm 0.022
	0.04%	100.3	0.373 \pm 0.033
	0.1%	92.2	0.343 \pm 0.020
	0.2%	97.8	0.364 \pm 0.011
	0.4%	95.4	0.355 \pm 0.021
	1%	90.4	0.336 \pm 0.019
	2%	87.8	0.327 \pm 0.026**
EtoAc Extract	0.01%	93.2	0.347 \pm 0.017
	0.02%	89.8	0.334 \pm 0.042
	0.04%	76.1	0.283 \pm 0.039**
	0.1%	81.2	0.302 \pm 0.033**
	0.2%	68.8	0.256 \pm 0.046**
	0.4%	69.3	0.258 \pm 0.042**
	1%	67.5	0.251 \pm 0.163**
	2%	63.2	0.237 \pm 0.022**

**: Significantly different from control group. (p<0.05)

4. PGE₂ 생성에 미치는 영향

1) 치은섬유아세포의 배양

교정목적의 제1소구치 발치 시 치아주위의 건강한 치은을 내사면 절개하여 세척한 후 상피부분은 절제하여 건강한 치은 결합조직만을 채집하여 1 mm²정도로 세절한 다음 60 mm culture dish에 부착시킨 후 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin 및 10 % FBS가 함유된 α-MEM(GIBCO, USA)로 dish가 충만할 때까지 5 % CO₂, 95 % 공기, 100 % 습도조건하에서 무균적으로 밀생 배양하였다. 배지는 3일마다 교환하면서 무균적으로 배양하는데 dish가 충만할 정도로 밀생되면 HBSS로 2-3회 세척한 후 0.25 % Trypsin-EDTA를 이용하여 세포를 dish에서 부유시킨 후 세포부유액을 모아 1200 xg로 10분간 원심분리 후 세포침전물을 α-MEM 배지로 세포부유액을 만들어 2차 계대 배양하였다. 같은 방법으로 5회 내지 7회 계대배양하여 실험에 사용하였다.

2) 치은섬유아세포에서 수종의 추출물에 의한 PGE₂ 생산에 미치는 영향

5회 내지 7회 계대 배양된 치은섬유아세포를 24-well plate에 α-MEM으로 10⁵ cell/well로 분주한 후 rhIL-1β(Genzyme, USA) 1 ng/ml을 첨가하여 PGE₂ 생산을 유도하였는데 아무런 첨가제를 가하지 않은 well을 대조군으로 하고 rhIL-1β만을 첨가한 well과 rhIL-1β와 추출물을 첨가한 well을 실험군으로 하여 48시간 동안 무균적으로 배양하였다. 배양 후 well의 배지를 수집하여 배지내의 PGE₂의 양을 PGE₂ EIA system(Amersham, UK)을 이용한 후 ELISA reader로 450 nm에서 비색정량하였다.

5. 통계학적 분석

치은 섬유아세포와 치주인대 세포의 세포활성도를 대조군과 비교해서 통계학적 유의성이 있는지 검사하기 위해 Wilcoxon Signed Ranks Test를 시행하

Table 2. Cell cytotoxicity of *Pulsatilla koreana* on periodontal ligament cells

Sample		Cellular Activity(%)	
		Periodontal Ligament cells	
		Percentage	Optical density
Control		100	0.372±0.035
BuOH Extract	0.01%	93.9	1.01±0.035
	0.02%	88.5	0.948±0.079
	0.04%	89.3	0.894±0.059
	0.1%	87.9	0.902±0.086
	0.2%	81.8	0.826±0.049
	0.4%	79.1	0.0798±0.025
	1%	80.2	0.810±0.029
	2%	78.3	0.791±0.027
EtoAc Extract	0.01%	84.7	0.855±0.031
	0.02%	81.4	0.822±0.037
	0.04%	74.5	0.752±0.024
	0.1%	71.3	0.720±0.025
	0.2%	67.1	0.678±0.025
	0.4%	61.1	0.617±0.023
	1%	58.2	0.588±0.026
	2%	56.3	0.569±0.021

Table 3. Inhibition of interleukin-1 β synthesis

Sample		Optical Density	IL-1 β reduction(pg)
Control		0.262 \pm 0.007	20.4
LPS		0.556 \pm 0.018	83.0
LPS+Prednisolone			48.8
LPS+BuOH Extract	0.01%	0.462 \pm 0.085	63.0
	0.02%	0.481 \pm 0.017	67.1
	0.04%	0.470 \pm 0.071	64.7
	0.1%	0.468 \pm 0.014	67.3
	0.2%	0.430 \pm 0.028	56.2
	0.4%	0.386 \pm 0.014	46.8
	1%	0.365 \pm 0.017	42.0
	2%	0.375 \pm 0.057	44.5
LPS+EtoAc Extract	0.01%	0.454 \pm 0.021	61.3
	0.02%	0.457 \pm 0.011	61.9
	0.04%	0.462 \pm 0.057	63.0
	0.1%	0.367 \pm 0.013	42.7
	0.2%	0.371 \pm 0.085	43.6
	0.4%	0.349 \pm 0.071	38.6
	1%	0.331 \pm 0.016	35.1
	2%	0.337 \pm 0.042	36.4

였다. 0.05%의 유의도를 선택하였다.

III. 연구결과

1. 백두옹 추출물의 세포활성도 효과

*Pulsatilla koreana*의 섬유아세포 대한 영향을 검사하기 위한 MTT 측정결과는 Table 1과 같다. α -MEM에서의 세포활성을 100으로 한 백분율로 나타낸 결과 백두옹의 부틸알콜 추출물의 0.01 %, 0.02 %, 0.04 %, 0.1 %, 0.2 %, 0.4 %, 1 %, 2 %의 농도에서 102.4 %, 100 %, 100.3 %, 92.2 %, 97.8 %, 95.4 %, 90.4 %, 87.8 %의 세포활성도를 나타냈다. 백두옹의 에틸아세테이트 추출물의 0.01 %, 0.02 %, 0.04 %, 0.1 %, 0.2 %, 0.4 %, 1 %, 2 %의 농도에서 93.2 %, 89.8 %, 76.1 %, 81.2 %, 68.8 %, 69.3 %, 67.5 %, 63.2 %의 세포활성도를 나타냈다. 부틸알콜 추출물의 2 %와 에틸아세테이트 추출물의 0.04 %, 0.1 %, 0.2 %,

0.4 %, 1 %, 2 %의 농도에서 대조군에 비해 유의한 감소를 나타냈다.($p < 0.05$)

*Pulsatilla koreana*의 치주인대세포에 대한 영향을 검사하기 위한 MTT 측정결과는 표 2과 같다. α -MEM에서의 세포활성을 100으로 한 백분율로 나타낸 결과 백두옹의 부틸알콜 추출물의 0.01 %, 0.02 %, 0.04 %, 0.1 %, 0.2 %, 0.4 %, 1 %, 2 %의 농도에서 93.9 %, 88.5 %, 89.3 %, 87.9 %, 81.8 %, 79.1 %, 80.2 %, 78.3 %의 세포활성도를 나타냈고 에틸아세테이트 추출물의 0.01 %, 0.02 %, 0.04 %, 0.1 %, 0.2 %, 0.4 %, 1 %, 2 %의 농도에서 84.7 %, 81.4 %, 74.5 %, 71.3 %, 67.1 %, 61.1 %, 58.2 %, 56.3 %의 세포활성도를 나타냈다. 대조군에 비해 통계학적으로 유의한 차이를 나타내지는 않았지만 부틸알콜 추출물의 0.02 %, 0.04 %, 0.1 %, 0.2 %, 0.4 %, 1 %, 2 %와 에틸아세테이트 추출물의 모든 농도에서 대조군에 비해 감소가 나타났다($p=0.068$).

2. IL-1 β 의 생산 억제 효과

백두옹 추출물의 cytokine 합성에 미치는 영향을 측정한 결과는 Table 3과 같다. IL-1 β 의 함량은 LPS의 경우 가장 높게 나타났으며 농도가 증가할수록 함량이 낮게 나타났으며 prednisolone과 비교해서 유사하거나 더 낮은 함량을 나타내는 농도도 보였다. 전반적으로 에틸아세테이트 추출물이 부틸알콜 추출물보다 낮은 함량을 나타냈으며 특히 부틸알콜 추출물의 0.4 % 이상의 농도에서 현저히 낮은 함량을 나타냈고, 에틸아세테이트 추출물의 0.1 % 이상의 농도에서 현저히 낮은 함량을 나타냈다.

3. PGE₂ 생산 억제 효과

백두옹의 IL-1 β 에 의한 PGE₂ 생산 억제 정도에 관한 실험결과는 표 4와 같다. 에틸아세테이트, 부틸알콜 추출물 모두에서 IL-1 β 자극시의 PGE₂ 생산 효과에 비하여 높은 억제효과를 나타내었으며, 특히 부틸알콜 추출물의 0.1 % 이상의 농도와 에틸아세테이트

추출물의 0.02 % 이상의 농도에서 현저히 낮은 ?량을 나타냈다.

IV. 총괄 및 고찰

본 연구는 민간요법으로 활용되어 온 생약제제 중 백두옹 추출물에 대한 항염효과 및 세포활성도를 밝혀 치주질환 치료제로서의 효용 및 안전도를 확인하고자 실험을 진행하였다. 정 등²⁶⁾의 연구에서 밝혀진 바에 의하면 백두옹 추출물 중 에틸아세테이트 및 부틸알콜 추출물에서 광범위한 항균 효과가 있는 것으로 보고되었으며 특히 부틸알콜 추출물의 경우 가장 좋은 항균 효과를 보인바 있다. 이러한 항균 효과가 있는 약재의 경우 세포에 대해 위해작용이 있는지 확인하기 위하여 구강 위생용 약재로 사용될 수 있는 안정성의 검증이 요구된다. 아직 백두옹 추출물에 대한 항염효과에 대해서는 조사된바가 없어 항염효과에 대한 효과를 밝혀보고자 실험을 시행하였다.

항염 및 항균효과를 가지면서 치조골 재생에 좋은

Table 4. Inhibition of PGE₂ synthesis

Sample		Optical Density	PGE
Control		0.482±0.007	32
IL-1 β		0.292±0.018	120
LPS+BuOH Extract	0.01%	0.346±0.013	94
	0.02%	0.363±0.031	86
	0.04%	0.387±0.030	80
	0.1%	0.399±0.041	66
	0.2%	0.401±0.017	64
	0.4%	0.411±0.020	58
	1%	0.418±0.099	52
	2%	0.420±0.058	50
LPS+EtoAc Extract	0.01%	0.389±0.054	76
	0.02%	0.397±0.057	68
	0.04%	0.405±0.044	62
	0.1%	0.401±0.038	64
	0.2%	0.411±0.016	58
	0.4%	0.407±0.011	60
	1%	0.413±0.025	56
	2%	0.416±0.042	54

효과를 보이는 제제로서 flurbiprofen과 tetracycline을 들 수 있으며²⁷⁻³²⁾, flurbiprofen 등의 비스테로이드성 소염제 계통의 약제들이 PGE₂생산억제효과를 보이면서, 저농도의 장기 복용으로 골재생의 효과를 보인 연구결과도 있고 tetracycline은 항균효과와 더불어 collagenase와 gelatinase의 활동을 억제함으로서 이로 인한 골조직의 재생에 간접적으로 작용한다는 연구결과가 있다. 하지만 그 효과 및 부작용에 관하여는 아직도 계속적인 연구가 진행되고 있다. 현재 치주질환 치료 시 널리 사용되고 있는 구강 위생용 약제로는 chlorhexidine을 들 수 있는데 chlorhexidine의 세포독성에 관한 연구를 살펴보면, Gabler 등³³⁾은 chlorhexidine의 농도가 100 mg/ml 이상이 되면 세포의 용해가 일어난다고 보고하였으며 Helgeland 등³⁴⁾은 25 mg/ml 이상이 되면 상피세포의 생장이 억제된다고 보고하였고 Mobacken 등³⁵⁾은 40 mg/ml 이상이 되면 치은섬유아세포의 기능이상이나 세포의 용해가 일어난다고 보고하였다. 이러한 성장인자와 약제의 효능, 효과를 나타낼 수 있는 생약제제를 개발한다면 안전하고 경제적인 가치가 있다고 사료된다. 실제 생약제제를 이용한 제제로서 옥수수 불검화추출물 등의 일부 상품화된 제제를 들 수 있다. 옥수수 불검화추출물은 1958년 Thiers 등³⁶⁾이 경화성 피부염, 골단염, Paget씨병 및 다발성 관절염을 치료하는데 이용하는 과정에서 치주농루 및 치주염에 효과가 있음을 발견하였다. 1971년 Chaput³⁷⁾과 1974년 Kerebe 등³⁸⁾은 hamster에서 치주질환을 유발한 후 옥수수 불검화추출물을 투여해서 치조골 및 치주인대의 재생을 관찰했다고 보고한 바 있다. 그 외의 생약 추출물 실험으로서 후박 및 대조를 들 수 있는데 후박추출물의 항균효과, IL-1 β 및 PGE₂생성 차단효과 그리고 collagenase 활동억제효과 등이 확인된 바 있고 대조 추출물은 IL-1 β 및 PGE₂생산 차단효과 그리고 collagenase 활동억제효과 그리고 치은섬유아세포활성도 증진효과 등이 확인된 바 있다³⁹⁻⁴⁶⁾.

은행엽추출물과 후박추출물의 혼합물을 이용한 실험에서는 은행엽추출물은 자체로는 미약한 항균효과를 나타내나 후박추출물과 혼합 시 후박이 높은 항균효과를 그대로 유지하게 하며 은행엽추출물 단

독에서 나타나는 세포활성도와 비슷한 정도의 높은 활성도를 보인다고 알려진 바 있다⁴⁷⁾.

백두옹의 성분은 뿌리에 saponin(C₄₅H₇₆O₂₀)이 약 9 % 함유되어 있다. 이것을 가수분해하면 tripenoid형인 genin(C₃₀H₇₆O₄), glucose, rhamnose 및 그 밖의 당이 생성된다. 이밖에 anemomin도 함유되어 있으며 뿌리는 심장에 강하게 해를 끼치지만 뿌리를 제거한 전초에는 강심작용이 있는 것으로 중약대사전 및 신농본초경 등에 언급되어졌다²⁴⁾.

백두옹의 약리작용으로는 항아메바원충작용, 항트리코모나스 및 항균작용이 있다고 또한 언급된 바 있다²²⁾.

최근의 약리작용에 대한 연구로 김 등⁴⁸⁾은 백두옹 추출물인 SB-31 β 가 각종 고형암에 독성이 적으면서 강력한 항암효과를 갖는다고 하였고, methanol추출물이 alloxan투여에 의해 현저히 증가하는 혈당량과 혈청 중 total cholesterol함량을 저하시켜 정상치로 회복시킨다는 보고를 하였다.

동식물 연구로 Martin 등^{25, 49-50)}은 *Pulsatilla alpina*가 in vitro에서 진균작용, 해열작용 및 진정작용을 갖는다고 보고하였고, Mahato 등⁵¹⁾은 triterpenoid saponin은 소염작용을 갖고 있음을 보고한 바 있다. 또한 생약제제들을 이용해서 치주질환의 치료제로 사용하고자 하는 연구들이 있어 왔는데 장 등¹⁷⁾은 생약제제 중 magnolol이나 honokiol 등이 염증의 매개물질인 cytokine 생성억제효과를 보고하였으며, 이 등⁵²⁾은 Sanguinarine, Listerin, 몰약, 인삼사포닌 등은 항균효과가 있음을 보고하였다.

치은연하 치주낭 내의 치대세균에 의한 염증 및 면역기전 과정에서 대식세포와 단핵세포로부터 IL-1 β 가 다량 생성된다. IL-1 β 는 여러 가지 기능을 갖고 있는 cytokine으로 미생물의 침입, 염증, 면역반응, 조직손상에 대한 반응을 매개하는 물질이다. IL-1 β 는 치은섬유아세포로부터 metalloproteinase, plasminogen activator, IL-9, PGE₂를 생성하게 한다. 또한 치주인대세포로부터 procollagenase와 PGE₂의 생성을 촉진한다. IL-1 β 는 염증 전 단계 효소인 group II phospholipase A₂를 자극하여 PGE₂생성을 중지시키는 것으로 알려져 있다. 이러한 매개물질은 결체

조직의 파괴를 일으키게 되고 부착상실을 가져 올 수도 있다^{12, 53-54)}.

관중과 chlorhexidine의 세포활성도 실험논문⁵⁶⁾과 비교하면, 치은섬유아세포의 경우 α -MEM을 대조군으로 하여 0.1 %의 농도에서 관중의 경우 94.6 %의 세포활성도가 나타났고, chlorhexidine의 경우엔 45.10 %로 나타났다. 또한 본 실험에서의 백두옹의 부틸알콜추출물과 에틸아세테이트추출물의 0.1 %에서 92.2 %, 82 %로 세포활성도가 나타났다. 후박과 대조 추출혼합물에서의 세포활성도는 후박 2000 $\mu\text{g/ml}$ 와 대조 20 $\mu\text{g/ml}$ 혼합추출물 즉 0.02 %에서 105.3 ± 3.7 의 활성도를 나타냈고 후박 2000 $\mu\text{g/ml}$ 와 대조 2000 $\mu\text{g/ml}$ 의 혼합추출물, 즉 농도 0.4 %에서 110.5 ± 3.4 의 세포활성도를 나타냈다⁵⁷⁾.

우루소디옥시콜산(Ursodexoycholicacid)를 함유한 생약추출물의 항염효과에 관한 연구논문⁵⁸⁾과 비교하면, 참고로 우루소디옥시콜산은 친수성 쓸개즙산으로 면역기능을 갖고 있으며 T세포로부터 IL-2, IL-4, Interferon(IFN)- γ 의 분비를 억제하며 B세포로부터 면역글로블린 생성을 억제하는 기능을 갖고 있다⁵⁹⁻⁶³⁾. 이는 한방에서 치주질환의 치료를 위해 면역억제, 항균, 항염, 진통, 해열효과를 나타내는 생약제제를 오래 전부터 사용해온 보고들이 있다. 치은섬유아세포의 LPS자극에 의한 IL-1 β 생성에 대하여 우루소디옥시콜산은 각 농도 0.1 %에서 83 %의 억제효과를 보였고 부틸알콜 추출물은 20 %를, 에틸아세테이트 추출액은 49 %의 억제를 보였다. 또한 PGE₂생성억제효과에서는 0.1 %의 농도에서 우루소디옥시콜산은 75 %, 부틸알콜 추출물에서는 45 %로 에틸아세테이트 추출물에서는 47 %의 억제효과를 보였다.

백두옹 추출물은 후박과 대조 혼합추출물과의 세포활성도 비교에서는 다소 낮은 세포활성도를 보였으나 관중과 chlorhexidine보다 거의 모든 농도에서 높은 세포활성도를 나타냈다. 항염실험의 비교에서는 우루소디옥시콜산과 비교 시 낮은 농도에서는 우루소디옥시콜산의 항염효과가 탁월하나 농도가 증가할수록 백두옹 추출물의 항염효과가 우루소디옥시콜산의 항염효과와 수치와 근접함을 보였다.

결론적으로 백두옹 추출물이 세포독성이 상대적

으로 낮고 비교적 안정성이 뛰어나며 항염효과가 있는 것으로 사료된다.

V. 결론

본 연구는 민간요법으로 활용되어 온 생약제제 중 백두옹 추출물의 IL-1 β 와 PGE₂에 대한 항염효과 및 치은 섬유아세포와 치주인대세포에 대한 세포활성도를 밝힘으로서 치주질환 치료제로서의 효용 및 안전도를 간접적으로 확인하여 치주질환의 예방 및 치료제로의 가능성을 알아보기 위해 본 실험을 시행하였다.

백두옹의 에틸아세테이트와 부틸알콜 추출물을 준비하여 각각 0.1 %, 0.2 %, 0.4 %, 0.01 %, 0.02 %, 0.04 %, 1 %, 2 %의 농도를 실험에 사용하였다.

치은 섬유아세포와 치주인대세포를 배양하여 MTT용액을 사용하여 ELISA reader로 독성검사를 실시하고 혈액단핵세포를 분리, 배양하여 IL-1 β EIA system을 이용하여 IL-1 β 의 생성에 관한 검사를 시행하고 치은섬유아세포를 배양하여 PGE₂ EIA system을 이용하여 PGE₂ 생성에 관한 검사를 시행하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 섬유아세포에 대한 세포활성도 검사결과 부틸알콜 추출물의 2 %와 에틸아세테이트 추출물의 0.04 %, 0.1 %, 0.2 %, 0.4 %, 1 %, 2 %의 농도에서 대조군에 비해 유의한 감소를 나타냈다 ($p < 0.05$).
2. 치주인대세포에 대한 세포활성도 검사결과 통계학적으로 유의한 차이를 나타내지는 않았지만 부틸알콜 추출물의 0.01 %를 제외한 부틸알콜과 에틸아세테이트 추출물의 모든 농도에서 낮은 세포활성도를 나타냈다.
3. 백두옹에서 추출된 에틸아세테이트와 부틸알콜 추출물 모두에서 IL-1 β 의 생성을 억제하는 경향을 보였고 부틸알콜 추출물보다 에틸아세테이트 추출물에서 억제효과가 높게 나타났다.
4. 백두옹에서 추출된 에틸아세테이트와 부틸알콜 추출물 모두에서 PGE₂ 생성을 억제하는 경

향을 보였으며 부틸알콜 추출물보다 에틸아세테이트 추출물에서 억제효과가 높게 나타났다.

이상의 결과로 백두옹에서 추출된 부틸알콜 추출물과 에틸아세테이트 추출물은 세포에 다소 독성이 있는 것으로 보이며 IL-1 β 와 PGE₂ 생성을 억제하는 것으로 보아 항염효과가 있는 것으로 나타났으므로 앞으로 치주질환의 치료제로 개발 가능성이 있을 것으로 사료된다.

VI. 참고 문헌

1. Massler M: Gingivitis in young adult males. Lack of effective use of a permissive program of tooth brushing. J Periodontol 1957; 28: 111-124.
2. Lindhe J and Koch G: The effect of supervised oral hygiene on the gingivae of children. Lack of prolonged effect of supervision. J Periodont Res 1967; 2: 215-220.
3. Khocht A, Spindel L and Person P: A comparative clinical study of the safety and efficacy of three toothbrushes. J Periodontol 1992; 63: 603-610.
4. Addy M: Chlorhexidine compared with other locally delivered antimicrobials. A short review. J Clin Periodontol 1986; 13: 957-964.
5. Hull P: Chemical inhibition of plaque. J Clin Periodontol 1980; 7: 431-442.
6. Goodsen JM: Pharmacokinetic principles controlling efficacy of oral therapy. J Dent Res 1989; 68: 1625-1632.
7. Johnson JR, Gjermo P and Eriksen HM: Effect of 2 years use of chlorhexidine-containing dentifrices on plaque, gingivitis and caries. Scand J dent Res 1975; 83: 288-292.
8. Van der Ouderaa FJ and Cummins D: Chlorhexidine interactions with sodium Lauryl sulfate in vivo. J Dent Res 1989; 68: 1722-1723.
9. Chang BS, Lee YM, Ku Y, Bae KH and Chung CP: The antibacterial activities of Magnolol and Honokiol against of Magnolol and Honokiol against periodontopathic microorganism. Planta Med 1998; 64: 367-369.
10. Jones CL, Ritchie JA, March PD and Van der Ouderaa F: The effect of longterm use of a dentifrice containing zinc citrate and a non-ionic agent on the oral flora J. Dent. 1988; 67: 46-50.
11. Scheie AA: Modes of action of currently known chemical antiplaque agents other than chlorhexidine J Dent Res 1989; 68: 1609-1616.
12. Richards D and Rutherford RB: The effects of interleukin-1 on collagenolytic activity and prostaglandin-E secretion by human periodontal ligament and gingival fibroblast. Archs Oral Bio 1988; 33: 237-243.
13. Saito S, Saito M, Ngan P, Lanese R, Shanfeld J and Davidovitch Z: Effects of parathyroid hormone and cytokines on prostaglandin E synthesis and bone resorption by human periodontal ligament fibroblasts. Arch Oral Biol 1990; 35: 845-855.
14. Robert C, Newton G and Covington M: The activation of human fibroblast prostaglandin E production by interleukin 1. Cellular Immunology 1987; 110: 338-349.
15. Stashenko P, Dewhirst FE, Persos WJ, Kent RL and Ago JM: Synergistic interactions between interleukin 1, tumor necrosis factor and lymphotoxin in bone resorption. J Immunol 1987; 138: 1464-1468.
16. Yasukawa K, Takido M, Takeuchi M and Nakagawa S: Effect of chemical constituents from plants on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced inflammation in mice. Chem Pharm Bull 1989; 37(4): 1071-1073.
17. 장범석, 손성희, 정종평, 배기환: Magnolol과 Honokiol이 항균, 교원질분해효소, 세포독성 및 cytokine 생산에 미치는 영향. 대한치주학회지.

- 1993; 23: 145-158.
18. 류인철, 손성희, 정종평, 배기환: 생약추출물이 세포성장 및 cytokine 생산에 미치는 영향. 대한 치주과 학회지 1993; 23: 37-47.
19. 難汲恒雄: 和漢藥百科圖鑑.(株)保育社. 大阪. 1980; 462-463
20. 赤松金芳: 新訂 花漢藥. 醫齒藥出版株式會社. 東京. 1980; 57-58
21. Chang HM and But PH : Pharmacology and applications of chinese materia medica, Oriental Healing Arts Institute, Long Beach, 1986; 226.
22. 王浴生: 中藥藥理與應用. 人民 生出版社. 北京. 1983; 330-337
23. 上海科學誌技術: 中藥大辭典(第3卷).(株)小學館. 東京. 1985; 2084-2087.
24. 정형진, 김진우, 김형동: 백두옹(*Pulsatilla koreana Nakai*)뿌리로부터 제조활성물질의 분리. 한국자원식물학회지. 1996; 9: 47-57.
25. Matin ML, Moran A and Roman LS: Pharmacologic screening of *Pulsatilla alpina subsp.* J Ethnopharmacol 1987; 21(2): 201-206.
26. 정성화, 김정근, 임성빈, 정진형: 백두옹 추출물의 치주 병인균에 대한 항균 효과. In-press
27. Williams RC, Jeffcoat MK, Wechter WJ, Johnson HG, Kaplan ML and Goldhaber P: Non-steroidal anti-inflammatory drug treatment of periodontitis in beagles. J Periodont Res 1984; 19: 633-637.
28. Jeffcoat MK, Williams RC, Johnson HG, Gandrup JS and Goldhaber P: Flurbiprofen treatment of periodontal disease in Beagles. J Periodont Res 1986; 21: 624-633.
29. Jeffcoat MK, Williams RC, Reddy MS, English R and Goldhaber P: Flurbiprofen treatment of human periodontitis: Effect of alveolar bone height and metabolism. J Periodont Res 1988; 23: 381-385.
30. Terranova VP, Franzetti LC and Hic S: A biochemical approach to periodontal regeneration: Tetracycline treatment of dentin promotes fibroblast adhesion and growth. J Periodont Res 1986; 21: 330-337.
31. Rifkin BR, Vernillo AT and Golub LM: Blocking periodontal disease progression by inhibiting tissue destructive enzyme: J Periodontol 1993; 64: 819-827.
32. Greenwald RA, Moak SA, Ramamurthy NS and Golub LM: Tetracyclines suppress metalloproteinase activity in adjuvant arthritis, and in combination with flurbiprofen, ameliorate bone damage. J Rheumatol 1992; 19: 927-938.
33. Gabler WL, Roberts D and Harold W: The effects of chlorhexidine on blood cells. J Periodont Res 1987; 22: 150-155.
34. Helgeland K, Heyden G and Rolla G: The effect of chlorhexidine on animal cells in vitro. Scand J Dent Res 1971; 79: 209-215.
35. Mobaken H and Wengstrom C: Interference with healing of rat skin incisions treated with chlorhexidine. Acta Dermatovener 1974; 54: 29-34.
36. Thiers, Jouannetea and Zwingelstein: The Maize germ oil insaponifiable its therapeutical indications. Presse Medicale 1958; 66: 1293-1294.
37. Chaput A, Krikorian K, Brion M, Labie C and Perrault M: Effect of Insadol on experimental Periodontal disease in hamster. Revue Francaise d'odonto-stoma-tologiques 1971; 18(9): 1145-1154.
38. Kerebel B, Cleargeau-Guerphaut S and Brion M: Ultrastructural study of experimental periodontal disease in the golden hamster. Rev Mens suisse Odonto-Stomatol 1974; 27: 867-882.
39. Namba T, Tsunozuka M, Bae KH and Hattori M: Studies on dental caries prevention by traditional chinese medicine. Shoyakugaku Zasshi 1981; 35: 2965-2972.
40. Bae KH: The study on the antibacterial components of higher plants against a cariogenic bac-

- terium, *Streptococcus mutans*. Proc. 2nd Int. Sym. on Recent Advances in Natural Products Research 1989; 12-14.
41. Bae KH and Oh HR: Synergistic effect of lysozyme on bacterial activity of magnolol and honokiol against a cariogenic bacterium, *Streptococcus mutans* OMZ 176. Arch Pharm Res 1990; 13: 117-119.
 42. Osawa K, Matsumoto T, Yasuda H, Kato T, Naito Y and Okuda K: The inhibitory effect of plant extracts on the collagenolytic activity and cytotoxicity of human gingival fibroblasts by *Porphyromonas gingivalis* crude enzyme. The bulletin of Tokyo Dental College 1991; 32: 1-7.
 43. 이승렬, 정종평, 최상묵, 배기환: 천연물추출물의 치주병인균에 대한 항균효과 및 세포독성에 관한 연구. 대한치주학회지 1992; 22: 515-526.
 44. 양창호, 조기영, 이용무, 배기환, 정종평: 대조추출물이 치은섬유아세포의 생물학적 활성화에 미치는 영향. 대한치주과학회지 1994; 24: 144-154.
 45. 조기영, 이용무, 최상묵, 정종평: 생약추출물이 IL-1 β 의 생성 및 활성화에 미치는 영향. 대한치주학회지 1995; 25: 386-396.
 46. Chung CP, Park JB and Bae KH: Pharmacological effects of methanolic extract from the root of *Scutellaria baicalensis* and its flavonoids on human gingival fibroblast. Planta Med 1995; 61: 150-153.
 47. 정종평, 구영, 배기환: 은행엽추출물이 치은섬유아세포에 미치는 생물학적 영향 대한치주학회지 1995; 13: 469-477.
 48. Kim SY and Kim SB: Anti-tumor effects of extracts of *Pulsatilla koreana*(SB-31 β) in vitro. J Kor Cancer 1994; 26: 959-963.
 49. Martin ML, Roman LS and Dominguez A: In vitro activity of protoanemonin, an antifungal agent. Planta Med 1990; 56: 66-69.
 50. Martin ML, Ortiz de Urbina AV, Montero MJ, R Carron and Roman LS: Pharmacologic effects of lactones isolated from *Pulsatilla alpina subsp. apiifolia*. J Ethnopharmacol 1988; 24(2-3): 185-191.
 51. Mahato SB, Sarkar SK and Podder G: Triterpenoid saponins. Phytochemistry 1988; 27(10) : 3037-3067.
 52. Kopczyk RA, Abramas H, Brown AT, Mateny JL and Kaplan AL: clinical and microbiological effects of a *sanguinaria*-containing mouthrinse and dentifrice with and without fluoride during 6 months of use. J Periodontol 1991; 62: 612-622.
 53. 이승렬, 정종평, 최상묵, 배기환: 천연물 추출물의 치주병인균에 대한 항균효과 및 세포독성에 관한 연구 대한치주과학회지 1992; 22: 1-12.
 54. Matsuki Y, Yamamoto T and 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.
 55. Offenbacher S, Heasman PA and Collins JG: Modulation of host PGE secretion as a determinant of periodontal disease expression. J Periodontol 1993; 64: 432-444.
 56. 김승남, 구영, 류인철외 다수: 관중의 항균작용 및 세포독성에 관한 연구 대한치주과학회지 2000; 30(1): 65-76.
 57. 류인철, 김상년, 정종평: UDCA를 함유한 생약추출물 혼합제제의 항염효과에 관한 연구 대한치주과학회지 1996; 26(4): 1013-1020.
 58. Tanaka H, Makino Y, Miura T, Hirano F, Okamoto K, Komura K, Sato Y and Makino I: Ligand-independent activation of the glucocorticoid receptor by ursodeoxycholic acid. Repression of the IFN-gamma-induced MHC class II gene expression via a glucocorticoid receptor-dependent pathway. J Immunology 1996; 156: 1601-1608.
 59. Calmus YP, Gane P, Rouger and Poupon R:

- Hepatic expression of class I or class II major histocompatibility complex molecules in primary biliary cirrhosis: effect of ursodeoxycholic acid. *Hepatology* 1990; 11(1): 12-15.
60. Yoshikawa M, Tsujii k, Matsumura I, Yamao Y, Kubo H and Isizaka S: Immunomodulatory effects of ursodeoxycholic acid on immune response. *Hepatology* 1992; 16: 358-364.
 61. Calmus YP, Podevin P and Poupun R: Differential effects of chenodeoxycholic and ursodeoxycholic acid on interleukin-1, interleukin-6, and tumor necrosis factor- α production by monocytes. *Hepatology* 1992; 16: 719-723.
 62. Lacadle FK, Paradis K: The immunosuppressive effect of ursodeoxycholic acid: a comparative in vitro study on human peripheral blood mononuclear cells. *Hepatology* 1993; 18: 165-172.
 63. 이용무, 구영, 배기환, 정종평: 후박 및 대조 추출 혼합물이 골조직 재생에 미치는 영향. *대한치주과학회지* 1997; 27(1): 165-178.

The Effects of *Pulsatilla Koreana* for Anti-Inflammatory and Cellular Activity of Periodontal Tissue

Jin-Gwang Jung, Chin-Hyung Chung, Sung-Bin Lim, Jung-Keun Kim, Eun-Hee So

Department. of Periodontology, College of Dentistry, Dan-kook National University

This study was performed to define the cytotoxicity and the anti-inflammatory action of *Pulsatilla koreana* extracts.

To analyze cytotoxic effects, gingival and periodontal ligament fibroblasts were used, and anti-inflammatory actions related to reduction of IL-1 β and PGE₂ production were performed *in vitro*, for the suggestion of efficacy and safety on periodontal therapeutic use of *Pulsatilla koreana* extracts.

We extracted ethylacetate and butylalcohol from well-dried and ground *Pulsatilla koreana* throughout multiple processing, then used different concentration solution(0.1 %, 0.2 %, 0.4 %, 0.01 %, 0.02 %, 0.04 %, 1 %, 2 %) of ethylacetate and butylalcohol extracts to examine cytotoxic effects and anti-inflammatory actions

Cytotoxic effects were examined by ELISA reader using MTT(Methyl Thiazol-2-YL-2, 5-diphenyl Tetrazolium bromide)solution following culture of human gingival and periodontal ligament fibroblasts. Synthesis of IL-1 β was examined by IL-1 β enzyme-immunoassay(EIA)system after separation and culture of monocyte, and PGE₂ was examined by PGE₂ EIA system after culture of gingival fibroblasts.

The results were as follows:

1. In the MTT test of gingival fibroblasts, the change of optical density was decreased significantly at 2 % of butylalcohol extracts and 0.04 %, 0.1 %, 0.2 %, 0.4 %, 1 %, 2 % of ethylacetate extracts. (p<0.05)
2. In the MTT test of periodontal ligament cells, the change of optical density were not differ significantly, but butylalcohol and ethylacetate extracts except from butylalcohol 0.01 % showed high cell cytotoxicity.
3. Both ethylacetate and butylalcohol extracts from *Pulsatilla koreana* inhibited the synthesis of IL-1 β and inhibition effect of ethylacetate extracts were higher than butylalcohol extracts.
4. Both ethylacetate and butylalcohol extracts from *Pulsatilla koreana* inhibited the synthesis of PGE₂, and ethylacetate extracts were higher than butylalcohol extracts.

In conclusion, ethylacetate and butylalcohol extracts from *Pulsatilla koreana* showed little cell cytotoxicity for gingival and periodontal ligament fibroblasts, and the inhibition of IL-1 β and PGE₂ synthesis, therefore it is considered that these extracts can be developed as the therapeutics of the periodontal disease.