

마우스에서 히알루론산 나트륨이 항염효과에 미치는 영향에 관한 연구

김상균 · 이형석 · 변광섭¹ · 이영주¹ · 홍순민¹ · 최미라² · 박준우¹

한림대학교 의학과 대학원생, 한림대학교 의과대학 강동성심병원 ¹구강악안면외과, ²보철과

Abstract (J. Kor. Oral Maxillofac. Surg. 2010;36:16-22)

The effect of hyaluronic acid on anti-inflammatory action in mouse

Sang-Kyun Kim, Hyung-Seok Lee, Kwang-Seob Byeon¹,

Young-Joo Lee¹, Soon-Min Hong¹, Mee-Ra Choi², Jun-Woo Park¹

Graduate student of Hallym University, ¹Department of Oral and Maxillofacial Surgery, ²Department of Prosthodontics, Kangdong Sacred Heart Hospital, College of Medicine, Hallym University

Purpose: The purpose of this study was not only to evaluate the relative mRNA expression of interleukin-1 β (IL-1 β), cyclooxygenase2 (COX-2) and prostaglandin E2 (PGE2) by RT-PCR analysis but to observe pattern of edema by light microscopic and electron microscope after topical apply of hyaluronic acid in inflammation-guided mouse.

Material and methods: Mice of this study were divided into 4 groups: Control group (no inflammation guided), Positive control (inflammation guided + vaselin apply), Protopic group (inflammation guided + protopic apply), Hyaluronic group (inflammation guided + hyaluronic acid apply).

Results: Hyaluronic group showed less expressions of IL-1 β , COX-2, PGE2 than those of positive control & protopic group. Hyaluronic group revealed a decreased inflammation than positive control & protopic group in Light Microscope.

Hyaluronic group appeared decreased edema of ear compare to positive control & protopic group in Electron Microscope.

Conclusion: It was considered that hyaluronic acid has an antiinflammatory effect for intercepting the gene expression of cytokines related to inflammation.

Key words: Hyaluronic acid, Anti-inflammatory agent, Mice

(원고접수일 2009. 10. 26 / 1차수정일 2009. 11. 24 / 2차수정일 2009. 12. 22 / 게재확정일 2010. 1. 29)

I. 서 론

치은염 및 치주염이 진행되면서 치아 주위의 치조골의 파괴 및 치아상실을 초래할 수 있다. 질환 초기의 과정 중에 적절한 치료가 동반된다면 치조골의 파괴 및 장기적이고 지속적인 치료가 필요한 경우까지 가지 않을 수 있다. 치주질환은 잇몸의 초기 염증부터 시작한다. 생체 내에서 발생하는 모든 염증의 단계에는 면역세포들이 관여하는데, 이 중에서 가장 많이 관여되는 대표적인 염증전구물질로는 Interleukin-1 β (IL-1 β), Tumor Necrotic Factor (TNF- α) 등과 같은 사이토카인으로 알려져 있다. 그 외에도 Interleukin-

4, Interleukin-6, Interleukin-10과 같은 많은 사이토카인들이 염증에 전반적으로 관여하고 있다. Cyclooxygenase (COX-2)는 IL-1 β 등의 cytokine에 의해 유도되며 염증반응과정에서 핵심적인 역할을 하며, prostaglandin E2 (PGE2)의 촉진제 역할로서 알려져 있다. 이와 같은 많은 염증전구인자의 발현에 초점을 맞추어져서 신약 개발 및 염증치료제를 개발하였고, 개발진행중에 있다.

그 중에서도 히알루론산은 점도가 높은 고분자의 점액다당류(mucopolysaccharide)의 일종으로 관절액을 구성하는 성분물질로 알려져 있으며, 관절을 부드럽게 해주며 윤활 작용을 도와주는 기능이 있는 물질로 잘 알려져 있다¹. 이러한 작용 때문에 정형외과, 피부과 그리고 안과영역에서 염증과정의 치유에 있어서 히알루론산의 역할에 대해 효과가 이미 입증되어 있다. 특히 백내장 수술², 퇴행성 관절염³, 방사선 상피염(Radio-epithelitis)⁴ 무릎관절의 관절염치료^{5,6}에 있어서 유의성 있는 개선 효과가 있음이 임상 지표로 보고되어 있다⁷. 그러나 치과영역에서는 염증치료제로 쓰이는 히알루론산 제제의 염증 및 재생에 관한 연구는 결

박 준 우

134-010 서울특별시 강동구 길동 445

한림대학교 강동성심병원 구강악안면외과

Jun-Woo Park

Department of Oral and Maxillofacial Surgery, College of Medicine, Hallym University

Gil-Dong 445, Gangdong-Gu, Seoul, 134-010, Korea

Tel: +82-2-2224-2333 Fax: +82-2-483-9647

E-mail: junpark@hanafos.com

여되어 있다. 본 연구에서는 히알루론산이 염증에 관련된 사이토카인 중에서 초기 염증의 단계에서 많은 관여를 하고있는 IL-1 β , COX-2, PGE2와 같은 유전자 발현에 어떤 영향을 미치는지 염증이 유발된 동물 마우스 모델을 이용한 실험과, 마우스의 조직 검사 및 전자현미경 검사를 통하여 조직 내의 상태를 알아보고자 하였다.

II. 연구재료 및 방법

1. 실험동물 및 실험재료

20 g 내외 6주령 수컷 ICR mouse (샘타코, 청주, 한국) 28 마리를 사용하였다. 실험기간 중 고형사료와 물은 자유롭게 공급하였고 사육실은 온도 $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 습도 $50 \pm 5\%$ 로 유지하였으며 일정한 조도와 광주기 및 암주기를 12시간 조절하여 생활주기에 맞추어 1주일간 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 각각의 실험군은 아무것도 처리하지 않은 control군(negative), 염증유발 후 바세린을 도포한 control군(positive), 프로토폭 도포군, 히알루론산 도포군 등 4군으로 나누어 각 군마다 7마리씩 실험하였다.

본 실험에 사용한 물질로는 젠지겔(Gengigel, hyaluronic acid, 0.2%, SIGMAR Italia S.R.L, Italy Via Sombreno, 11-ALME' -BG), 프로토폭 연고(halobetasol propionate cream, 0.03%, Ultravate, Bristol Myers Squibb Compsoyavatincetonav NJ, U.S.A)을 사용하였고, TRI Reagent Total RNA extraction My Kit (atmega, CA, USA), chlofetom, isopropanol alcohol, yethanol, yActone (MERCK Inc., yHA, Germsoy), Oligonucleotide (제노텍, 대전, 한국), 4% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich, CA, U.S.A), Diethyl Pyrocarbonate (Sigma, CA, USA), Maxime RT-PCR PreMix kit (iNtRON BIOTECHNOLOGY, 서울, 한국), agate, e (Bio-Rad, SPIAN), TAE buffer (Tris-Acetic-EDTA buffer) 및 DNFB (2,4-DINITRO-FLUORO BENZENE. St. Louis, MO, USA)와 같은 재료를 사용하였다.

유전자 발현을 확인하기 위하여 전기영동 kit을 사용하였으며, UV illuminate에서 확인하였다. Spectrophotometer (Bio-Rad, California, USA)를 사용하여, 260 nm에 농도를 확인하였다.

2. 마우스 염증유발 및 연고 도포 실험

마우스에 염증을 유발하기 위하여 DNFB가 함유된 oil을 매일 아침저녁 두 번 마우스의 귀 중앙부위의 앞뒤로 도포하여 경과를 지켜보았다. 실험에 사용한 시약은 히알루론산제제 젠지겔(한미약품, 서울, 한국)을 제공받아 사용하였다. 대조군으로 사용된 프로토폭(한국 아스텔라스제약, 서울, 한국)제제는 타크로리무스 수화물류의 제제로서 제공받아 사용하였다. Diethyl Pyrocarbonate-DNFB (Sigma,

CA USA)는 마우스의 염증을 유발하는데 사용하였다. DNFB를 마우스에 처리하기 위하여 olive oil (Sigma, CA USA)을 이용하였다.(Fig. 1-4.) 마우스에 7일 간 DNFB가 함유된 oil을 도포하고 마우스의 각 실험군에서 귀 부종(ear swelling)과 귀의 조직학적 형태변화를 측정하고 관찰하고 캘리퍼스를 이용하여 귀 두께를 측정하였다. 또한 마우스 외관의 염증 및 피부의 괴사와 같은 외형적인 손상에 대한 관찰을 하였다. Negative control을 제외한 나머지 3개의 군 각각에 7일 동안 바세린, 히알루론산 및 프로토폭제제를 하루에 두 번 아침저녁으로 마우스의 염증 유발된 귀에 도포하였다. 7일째 되는 날 경추탈골(cervical dislocation)하여 mouse를 희생시킨 후 귀 조직을 채취하였다. 마우스의 귀 조직에 대한 실험을 진행하기 위하여 귀 부분의 1/2 은액화 질소(LN₂)에 급속 보관하였으며, 보관된 조직을 이용하여 mRNA 발현을 보고자 하였다. 나머지 1/2 조직은 4% paraformaldehyde에 보관하였다.

3. RNA 추출

경추탈골법으로 희생시킨 mouse의 귀 조직을 채취하여 액화질소에 넣어 동결시켜 막사사발에서 powder 형태로 만든 후 tube에 보관했다. 채취한 귀 조직에 TRI Reagent 800 μl 첨가하여 잘 혼합한 다음 chloroform 100 μl 을 추가하고 진탕(vortexing)하여 11,000 rpm에서 20 min동안 원심분리를 실시 후 상층액을 새 tube에 옮기고 동량의 isopropanol을 넣은 후 inverting을 실시 한후 실온에 10분간 두었다. 10분 후 10,000 rpm에서 10 min동안 원심분리를 실시 한후 침전물(pellet)외에 상층액은 버린다. 70% diethyl pyrocarbonate (DEPC) 에탄올을 1 mL를 첨가하여 잘 혼합하여 씻어준 다음 10,000 rpm에서 10 min정도 washing하고 실온에서 건조시킨 후 DEPC 증류수를 100 μl 넣어 RNA pellet을 녹였다. 녹인 RNA sample은 각각 새 tube에서 RNA 농도를 측정하기 위하여 Spectrophotometer를 이용하여 260 nm에서 흡광도를 측정하여 RNA 정량분석을 하였다.

4. 조직검사실험

4% paraformaldehyde에서 고정 보관된 조직을 파라핀 포매를 실시하여 포매된 조직을 조직을 파라핀 포매를 실시하여 포매된 조직을 4 μm 두께로 마이크로톰(Leica, LA, USA)을 이용하여 박절하였다. 절편에서 파라핀을 제거한 다음 함수과정을 거쳐 증류수로 수세하였다. 절편을 100% 알코올에서 탈수한 후 실온에서 1분간 드라이 시킨 뒤에 eosin 용액에 5분 동안 침수하여 반응을 유도한 다음 꺼내어서 100% 알코올에서 수 차례 담구어서 탈수를 유도하였다. Hematoxylin에 5분간 반응을 유도한 다음 xylene에 몇 차례 수세하고 봉입하고 현미경(Olympus, Tokyo, Japan)을 이용하여 조직을 관찰하였다.

5. RT-PCR (reverse transcriptase-polymerase chain reaction)을 이용한 유전자 발현 실험

Spectrophotometer (Bio-RAD, CA, USA)를 사용하여 얻어진 정량 값을 이용하여 cDNA를 template로 사용하여 PCR을 수행하였다.(Table 1.) cDNA template는 1.0 ug, dNTP (2.5 mM each) 5.0 uL, 10X i-Taq DNA polymerase Plus Buffer 5.0 uL, Forward primer 1.0 uL, Reverse primer 1.0 uL, Taq DNA polymerase 0.5 uL, Ddwater 32 uL (Roche, CA, USA)을 사용하여 PCR을 수행하였다. PCR은 PCR machine (Hybaid, NY, USA)을 사용하였다. PCR 사이클은 초기 1 사이클은 94°C에 10분 동안 진행하였으며, 다음 사이클로는 94°C에 30초, 58°C에 30초, 72°C에 40초 동안 30 사이클을 수행하였다. 마지막 extension 과정에서 72°C에 10분 동안 1회의 사이클을 하였다.

PCR 과정이 끝난 마이크로 tube의 PCR product의 발현량을 보기 위하여 1.5% agarose gel (Bio-Rad, CA, USA)을 이용하여 발현패턴 및 밴드양상을 실험하였다. Agarose gel 실험을 진행하기 위하여 TAE buffer (Sigma, CA, USA)을 사용하였다. 전기영동은 100 voltage에서 20분 동안 진행하였으며, 전기영동이 끝난 agarose gel (Bio-Rad, USA)은 ethidium bromide 염색을 실시하여 UV illuminate (Bio-Rad, CA, USA)을 이용하여 밴드를 확인하였다. 밴드는 Image Processing and Analysis in Java (NIH, Maryland, USA) 프로그램을 이용하여 DNA의 정량값을 얻을 수 있었으며, 각 그룹 7번씩 실험하여 평균값을 실험을 진행하여 평균값을 얻을 수 있었으며, 이에 대한 평균값은 SigmaPlot (Systat Software, Inc., CA, USA)프로그램을 이용하여 얻을 수 있었다.

6. 전자현미경 실험

원형의 유리커버글라스(직경 24 mm) 위에 조직 시료를 고정시킨 후 인산완충용액 phosphate buffer, pH 6.8을 이용하여 세척한 후 실온에서 조직을 건조시켰다. 전자현미경 실험조건을 유지하기 위하여 완충용액의 농도, pH, 온도, 시간을 정확하게 유지하였다. 고정이 끝난 시료는 동일한

인산완충용액으로 충분히 세척한 후 충분히 건조시킨 후 ion coater (Jeol, Tokyo, Japan)을 사용하여 2분 동안 7 mM 진공상태에서 금 코팅을 실시하였다. 그런 다음 20.0[Kv], 1.0 K에서 조직의 피사 및 염증 부위를 관찰하였다.

Ⅲ. 연구 결과

1. 염증소견 결과

마우스의 귀 전체의 두께를 측정한 결과 혈관이 충혈되고 부종이 생겼으며 외관의 염증 및 표피의 괴사와 같은 외형적인 손상이 보였다.(Fig. 1, 2.)

2. 조직학적 소견

프로토픽 연고로 처리한 군(Fig. 9-11.)에서는 히알루론산 연고로 처리한 군(Fig. 12-14.)보다 염증세포가 더 많이 관찰되었으며 땀샘의 비대도 관찰되었다.

3. RT-PCR 소견

1) Interleukin- 1 β (IL-1 β)

Fig. 5는 interleukin- 1 β 발현양에 대한 DNA 사진으로서 GAPDH는 house keeping 유전자로서 실험조건을 설정하기 위하여 유전자 발현을 확인하였다. 각각의 군에 대한 발현양을 control (negative)과의 비교로서 상대적인 발현양을 확인하였다. Control군은 염증을 유도하지 않았기 때문에 interleukin- 1 β 의 발현을 확인할 수 없었다. Positive control 군(바세린으로 처리한 군)에서는 interleukin- 1 β 가 발현되어 있는 것을 확인할 수 있었다. 프로토픽군에서는 interleukin- 1 β 의 발현이 positive control군보다는 감소가 되어 나타났고, 히알루론산군에서는 positive control군이나 프로토픽군보다 interleukin- 1 β 의 발현이 50% 이상 감소되어 나타났다.(Fig. 5, 6.)

2) Cyclooxygenase II (COX-2)

바세린군보다는 프로토픽 연고군에서 COX-2 발현량이 상대적으로 감소되었으나 히알루론산 연고를 처리한 군에서 제일 많은 감소를 보였다.(Fig. 7.)

3) Prostaglandin E2 (PGE2)

히알루론산 군에서 평균 값이($P < 0.05$) positive control 군이나 프로토픽군보다 상대적으로 감소된 것으로 나타났다.(Fig. 8.)

4. 전자현미경적 소견

고리처럼 생긴 것이 세포와 세포를 이어주는 결합조직으

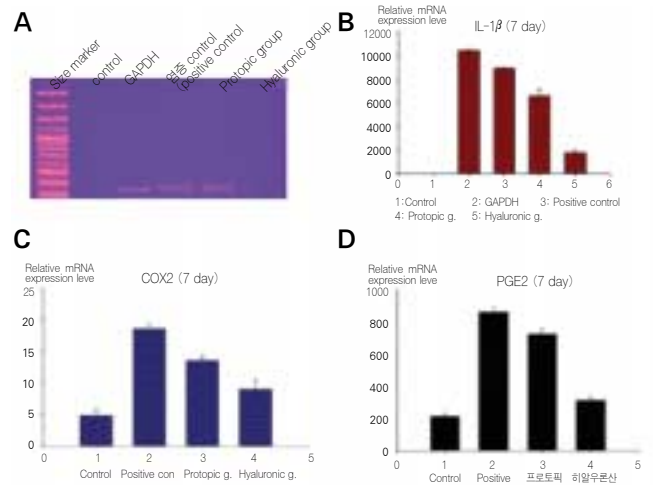
Table 1. PCR.

GENE	SEQUENCE (5' -3')	Product size (bp)
INTERLEUKIN-1 β -F	GAG CCA GTA CAG CTC ACC AA	505
INTERLEUKIN-1 β -R	TGA AAT GGG TGT CAG TGA GC	
COX-2-F	CGGGTAAGCATTGTTCTGA	151
COX-2-R	AGATGAACCTAAACCCTTCCT	
PGE2-F	GTGCCCTCAAGACCTACCTG	505
PGE2-R	TACACTGCCAGGTGACGAAG	



Fig. 1.

- A. Photograph showing mouse with normal ear.
 B. Photograph showing mouse with inflammation induced ear.
 C. Photograph showing 0.2% hyaluronic gel (Gingigel®) which was used in this study.
 D. Photograph showing 0.1% tacrolimus ointment (Protopic®) which was used in this study.



(IL-1β: interleukin-1β, COX2: cyclooxygenase2, PGE2: prostaglandin E2)

Fig. 2.

- A. mRNA expression of IL-1β.
 B. T-test value of relative mRNA expression level of IL-1β.
 C. T-test value of relative mRNA expression level of COX2.
 D. T-test value of relative mRNA expression level of PGE2.

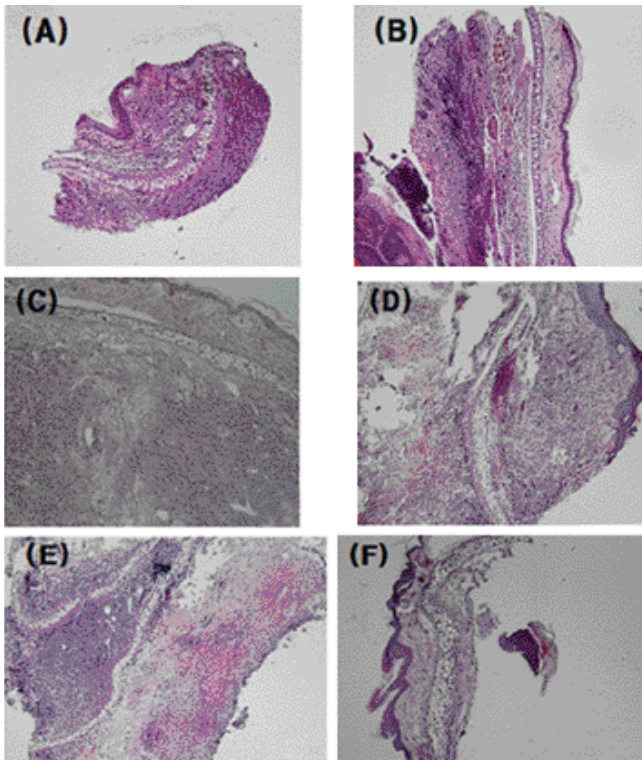


Fig. 3.

- A-C. Light microscopy showing lots of inflammatory cells and capillaries, protopic group, sagittal section and HE stain X 100.
 D-F. Light microscopy showing less inflammatory cells in hyaluronic group than in protopic group also showing reduction of sweat gland, hyaluronic group, sagittal section and HE stain X 100.

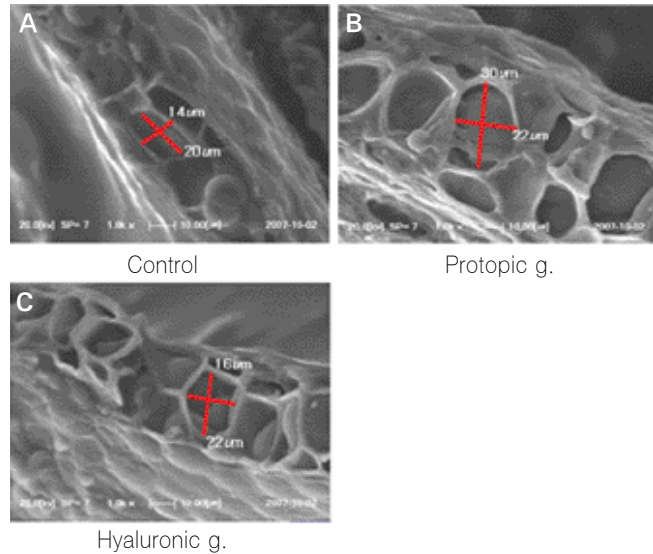


Fig. 4.

- A. Scanning electron microscopy showing size of ear tissue (14 × 20 μm), control group, sagittal section × 1000.
 B. Scanning electron microscopy showing size of edematous ear tissue (22 × 30 μm), protopic group, sagittal section × 1000.
 C. Scanning electron microscopy showing size of edematous ear tissue (16 × 22 μm), hyaluronic group, sagittal section × 1000.

로서 부종이 생기면서 마우스의 조직이 부풀어 올라 커진 것을 볼 수 있다. Control (negative)군이 정상조직이며(Fig. 15.) 프로토폭 연고로 처리한 군에서는 control군보다 두배 이상의 부종을 보이고 있으며(Fig. 16.) 히알루론산 연고로 처리한 군은 control군과 비교하여 약간의 차이가 있으나 프로토폭 연고로 처리한 군보다는 70% 이상 부종이 감소한 것을 볼 수 있었다.(Fig. 17.) (Fig. 15-17. :20.0[Kv], 1.0K)

IV. 고 찰

마우스의 유전자 서열은 인간의 유전자 서열과 99%가 일치한다고 보고되고 있다. 그러한 이유로 질환 및 유전자적인 변이 등과 같은 인간 질환에 대한 연구가 마우스로 많이 이루어지고 있으며, 이에 대한 결과도 많이 보고되고 있다. 특히 마우스의 귀 조직은 구강조직처럼 혈관이 풍부하여 치은염증과 같은 환경을 만들어 연구하기에 좋은 동물 모델이다.

구강 내 조직은 많은 혈관 분포와 함께 점막으로 구성되어 있어서 외상 등으로 인한 손상을 입었을 때 인체의 다른 부위의 조직에 비해 치유속도가 빠른 것이 특징이다. 구강 내에서의 치은의 역할은 현재까지 알려진 바로는 치아의 뿌리를 감싸면서 치아를 보호하는 일차적인 방어막이라고 할 수 있다^{8,9}. 그렇기 때문에 치은의 일차적인 세균감염이나 외부적인 손상에 의한 손실 및 염증과 같은 질환은 치아 손실까지 염려되는 부분이라고 할 수 있다. 또한 치은질환은 나이에 상관없이 면역기능이 떨어지거나 불량한 구강 위생 및 스트레스 등에서도 흔히 나타날 수 있는 질환이기에 초기 빠른 치유는 큰 손실을 막는 역할을 할 수 있다¹⁰.

치은염이나 치주염과 같은 염증이 생긴 경우 히알루론산 도포효과에 대해 Vangelisti¹¹ 및 Pagnacco¹²는 예비 임상 시험(preliminary clinical trials)으로 보고하였으며, Rabasseda¹³ 및 Jentsch¹⁴는 치주질환의 치유에 있어서 히알루론산의 역할에 대해 보고하였다. 또한 치은염에 히알루론산 제제를 사용한 치료효과에 대한 논문도 보고되었다¹⁵.

히알루론산은 음이온의 점액다당류로서 1973년 Toole가 히알루론산이 세포의 기능을 조절하는 역할을 가지고 있다고 보고한 이래로¹⁶ 염증반응과 세포의 기질 축적 등 치유 과정에서 매우 중요한 인자로 인식되어 왔다.

히알루론산은 1934년 소년의 유리액으로부터 Meyer와 Palmer에 의해 처음으로 발견되었고, 1964년 처음으로 합성되었다¹⁷. 또한 치은조직 및 구강 점막조직에서도 히알루론산이 발견되었다. 히알루론산은 섬유모세포 및 각화상 피세포에 의하여 합성되고, 표피세포를 포함하여 대부분의 세포는 소량의 히알루론산을 합성할 수 있는 것으로 알려져 있다^{18,19}.

히알루론산은 전하를 띤 많은 가지들을 이용하여 삼투압 유지 등을 통한 체내 수분의 균형을 유도하고 피부의 항상성

을 유지한다²⁰. 히알루론산을 점막상피가 벗겨진 상처부위에 도포하면 많은 양의 수분이 상처부위를 감싸서 다른 물질에 의한 자극으로부터 상처부위를 보호해주고 통증을 감소시키며, 상처부위에 침착되어 혈관형성기전을 강화함으로써 빠른 치유를 도모한다²¹.

LeBeouf 등²²은 초기 염증 단계에서 히알루론산의 다양한 역할에 대해 보고하였고, Wheeler 등²³은 창상 드레싱시 하이드로젤의 풍부한 수분과 대사물질의 투습성 및 감염방지 효과 등으로 창상 치유에 도움이 된다고 보고하였다.

생체 내에서 발생하는 모든 염증의 단계에서 가장 많이 관여되는 대표적인 염증전구물질인 interleukin-1 β 는 다른 사이토카인과 마찬가지로 chromosome 2번에 위치하고 있으며 alzheimer's disease, apoptosis, cytokine-cytokine receptor interaction, MAPK signaling pathway 등 인체 면역시스템 전반에 걸쳐 관련되어 있다. interleukin-1 β 는 염증성 사이토카인이라고도 불리며, 염증이 발생하면 과발현과 체온 상승 등의 작용을 하며, 면역과정에서 초기 가장 중요한 작용을 하는 것으로 알려져 있다.

1933년 Goldblatt에 의해 처음으로 소개된 prostaglandin²⁴은 전립선에서 합성되는 화학성분이라고 불려진 이름으로서 일반적인 PGE2의 합성과정은 외상 후 세포막 성분인 인지질로부터 불포화지방산인 arachidonic acid가 phospholipase A의 효소작용에 의해서 생화학적으로 염증반응의 매개체를 형성한 후 cyclooxygenase에 의해서 prostaglandin이 생성된다²⁵. PGE2는 이미 잘 알려진 염증 반응의 매개체로서의 역할 뿐만 아니라 Th2 면역반응을 촉진하고, Th1 면역반응은 억제하고, TNF- α , IL-1 β , IL-12등과 같은 염증성 사이토카인의 생성과도 관련을 한다.

COX-2는 염증반응과정에서 핵심적인 역할을 하며, 프로스타글란딘(PGE2)의 촉진제 역할로서 알려져 있으며, NSAIDs 약물의 효능이 Cox-2의 억제에 있는 만큼 염증반응단계에서 가장 중요한 역할을 하는 것으로 보고되고 있다. 최근에는 초기 암조직에서 가장 많이 발현되는 유전자로 알려져 있다.

포유류의 cyclooxygenase (COX)는 COX-1과 COX-2의 두 가지 형태가 있다. COX-1은 조직의 항상성에 중요한 역할을 하며 COX-2는 IL-1 β 등의 cytokine에 의해 유도되며 염증에 중요한 역할을 한다. Acetylsalicylate (aspirin), ibuprofen과 같은 NSAID(Non-steroid antiinflammatory drug)는 이러한 COX에 목표를 두고 있다. COX는 prostaglandin의 생산에 중요한 효소이기 때문에 NSAID는 prostaglandin의 합성을 억제하여 염증반응을 억제한다고 알려져 있다²⁶.

본 연구에서는 히알루론산 제제가 가진 염증억제 및 이와 관련된 사이토카인의 발현에 대한 연구를 염증을 유발시킨 마우스를 이용하여 실험을 디자인 하였다. 마우스에 염증을 유발하기 위하여 먼저 마우스 조직 중에서 가장 잇몸과 비슷하며, 조직특성상 혈관이 많이 분포되며, 논문에서 가장 많이 인용이 된 마우스의 귀에 염증을 유발하였다.

염증을 유발시키는 제제는 폐놀계통의 유기용매가 사용되었으며, 일주일 정도 약물에 노출되면, 귀의 부종이 50% 이상 부풀어 오르며, 혈관이 노출되고, 조직이 파괴된다. 이러한 인위적인 염증을 유발시킨 마우스에 바세린, 히알루론산 젤((0.2% HA gel): 한미약품) 및 프로토펙((0.1% tacrolimus) 연고: 한국 아스텔라스제약)이라는 스테로이드 계통의 연고를 IL-1 β 는 초기 염증반응에서 활성화되어 과발현이 되며, 이것을 시작으로 다른 사이토카인 및 면역 관련 시그널을 보내면서 면역체계를 활성화 시키는 것으로 보고가 되고 있다. 그러므로 초기 염증에 관련된 IL-1 β 를 검사하므로써 염증 유발된 마우스에 히알루론산 연고 제제 및 프로토펙 연고제제가 염증반응을 억제하는지 알 수 있었다.

IL-1 β , Cox-2, PGE2의 발현양상은 PCR 기법을 이용하여 검증하였다. PCR 기법은 조직 안에 존재하는 유전자 중에서 IL-1 β , Cox-2, PGE2 만을 specific하게 발현을 시켜주는 방법으로 조직 내에 존재하는 유전자의 copy수에 따라 발현양상을 확인하는 기법이다. 본 연구에서는 염증의 병인으로서 잘 알려진 IL-1 β , Cox-2, PGE2에 대한 발현양을 조사함으로써 선택적인 약물이 염증의 감소에 얼마나 특이적인 작용을 하는지를 IL-1 β , Cox-2, PGE2의 mRNA 발현 RT-PCR 실험을 통하여 알 수 있었다. 정상조직인 대조군의 경우 염증 유발시에만 발현하는 IL-1 β , Cox-2, PGE2의 발현이 거의 확인되지 않았으며, 염증을 유발시킨 후 바세린으로 처리한 positive control 마우스 군의 경우 IL-1 β , Cox-2, PGE2의 대폭적인 발현 증가된 것을 확인할 수 있었다. 프로토펙으로 처리한 마우스군은 positive control군보다는 적은 IL-1 β , Cox-2, PGE2의 발현양을 확인할 수 있었으나 히알루론산 처리군보다는 50% 이상 증가된 발현양을 확인할 수 있었다 프로토펙 처리한 군과 히알루론산 처리군 사이의 각 유전자 발현양을 서로 통계학적으로 비교한 결과 유의한 차이를 보여주었다. ($P < 0.05$) 이와 같은 결과로 볼 때 히알루론산은 프로토펙에 비하여 치은염증을 더 많이 감소시킬 수 있을 것으로 기대할 수 있다고 사료된다.

V. 결 론

마우스 귀에 염증을 유발시킨 후 대조군, positive control 군, 프로토펙 도포군 및 히알루론산 도포군으로 실험동물을 배정 후 히알루론산의 항염증효과를 관찰하기 위하여 조직학적 및 분자생물학적 연구를 통하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 대조군(negative control)은 interleukin-1 β , Cox-2, PGE2의 발현이 거의 없었고 바세린군(positive control)에서는 interleukin-1 β , Cox-2, PGE2의 발현이 과발현된 것을 확인할 수 있었다.
2. 프로토펙군에서의 interleukin-1 β , Cox-2, PGE2의 발현 양은 바세린군(positive control)의 interleukin-1 β , Cox-2,

PGE2의 발현양보다는 적게 나타났다.

3. 히알루론산군의 interleukin-1 β , Cox-2, PGE2 발현양은 대조군(control) interleukin-1 β , Cox-2, PGE2의 발현양보다는 높게 나왔지만, positive control군이나 프로토펙군보다는 현저하게 감소된 것을 확인할 수 있었다.
4. 조직검사를 이용한 H&E 염색에서 프로토펙군보다 히알루론산군에서 세포의 괴사 및 비대와 같은 조직상의 염증이 현저하게 감소되었다.
5. 전자현미경 사진에서 히알루론산군의 귀 부종이 대조군(control)과 별 차이가 없을 정도로 감소된 것을 확인하였다. 히알루론산이 염증과 동시에 부종의 감소를 유도한 것을 확인할 수 있었다.

이상의 결과에서 히알루론산 약제는 염증 관련 사이토카인의 발현을 차단해서 히알루론산 약제의 항염증 효과를 가져오는 것으로 사료되어 장기간 사용시 부작용 등에 관한 연구가 필요하겠지만 치은염 등 구강점막의 염증치료제로서 활용이 기대된다.

참고문헌

1. Altman RD, Moskowitz R. A randomized clinical trial of intra-articular sodium hyaluronate in patients with osteoarthritis of the knee: a summary. Am J Orthop (Belle Mead NJ) 1999;28:3-4.
2. Caporossi A, Baiocchi S, Sforzi C, Frezzotti R. Healon GV versus Healon in demanding cataract surgery. J Cataract Refract Surg 1995;21:710-3.
3. Matsuno H, Yudoh K, Kondo M, Goto M, Kimura T. Biochemical effect of intra-articular injections of high molecular weight hyaluronate in rheumatoid arthritis patients. Inflamm Res 1999;48:154-9.
4. Liguori V, Guillemin C, Pesce GF, Mirimanoff RO, Bernier J. Double-blind, randomized clinical study comparing hyaluronic acid cream to placebo in patients treated with radiotherapy. Radiother Oncol 1997;42:155-61.
5. Huskisson EC, Donnelly S. Hyaluronic acid in the treatment of osteoarthritis of the knee. Rheumatology (Oxford) 1999;38:602-7.
6. Adams ME, Atkinson MH, Lussier Aj, Schulz JI, Siminovitch KA, Wade JP, et al. The role of viscosupplementation with hylan G-F 20 (Synvisc) in the treatment of osteoarthritis of the knee: a Canadian multicenter trial comparing hylan G-F 20 alone, hylan G-F 20 with non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and NSAIDs alone. Osteoarthritis Cartilage 1995;3:213-25.
7. Kim HJ, Shin CH, Hong J, Choi JH. The effects of hyaluronic acid gel on the healing of oral mucosa. J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg 2007;33:359-66.
8. Rosa DS, Aranha AC, Eduardo Cde P, Aoki A. Esthetic treatment of gingival melanin hyperpigmentation with Er:YAG laser: short-term clinical observations and patient follow-up. J. Periodontol. 2007 Oct;78(10):2018-25.
9. Pradeep AR, Kumar MS, Ramachandraprasad MV, Shikha C. Gingival crevicular fluid levels of neopterin in healthy subjects and in patients with different periodontal diseases. J Periodontol 2007;78:1962-7.
10. Villa AA. Clinical, biochemical and histopathological correlation in diabetic patients with periodontal disease. Rev Fac Cien Med Univ Nac Cordoba 2006;63(2S):50-5.
11. Vangelisti R, Pagnacco O, Erra C. Hyaluronic acid in the topical treatment of gingival inflammations: preliminary clinical trial. Attualita Terapeutica Int 1997;15:2-3.
12. Pagnacco A, Vangelisti R, Erra C, Poma A. Double-blind clinical

- trial vs. placebo of a new sodium-hyaluronate-based gingival gel. *Attualita Terapeutica Int* 1997;15:1-7.
13. Rabasseda X. The role of hyaluronic acid in the management of periodontal disease. *Drugs Today (Barc)* 2000;36(S):1-20.
14. Jentsch H, Pomowski R, Kundt G, Gocke R. Treatment of gingivitis with hyaluronan. *J Clin Periodontol* 2003;30:159-64.
15. Pistorius A, Martin M, Willershausen B, Rockmann P. The clinical application of hyaluronic acid in gingivitis therapy. *Quintessence Int* 2005;36:531-8.
16. Toole BP, Jackson G, Gross J. Hyaluronate in morphogenesis: inhibition of chondrogenesis in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1972;69:1384-6.
17. Meyer K, Palmer JW. The polysaccharide of the vitreous humor. *J Biol Chem* 1934;107:629-34.
18. Heldin P, Laurent TC, Heldin CH. Effect of growth factors on hyaluronan synthesis in cultured human fibroblasts. *Biochem J* 1989;258:919-22.
19. Ghosh K, Ren XD, Shu XZ, Prestwich GD, Clark RA. Fibronectin functional domains coupled to hyaluronan stimulate adult human dermal fibroblast responses critical for wound healing. *Tissue Eng* 2006;12:601-13.
20. Voinchet V, Vasseur P, Kern J. Efficacy and safety of hyaluronic acid in the management of acute wounds. *Am J Clin Dermatol* 2006;7:353-7.
21. Nolan A, Baillie C, Badminton J, Rudralingham M, Seymour RA. The efficacy of topical hyaluronic acid in the management of recurrent aphthous ulceration. *J Oral Pathol Med* 2006;35:461-5.
22. LeBeouf RD, Gregg R, Weigel PH, Fuller GM. Effects of hyaluronic acid and other glycosaminoglycans on fibrin polymer formation. *Biochemistry* 1987;26:6052-7.
23. Wheeler JC, Woods JA, Cox MJ, Cantrell RW, Watkins FH, Edlich RF. Evolution of hydrogel polymers as contact lenses, surface coatings, dressings, and drug delivery systems. *J Long Term Eff Med Implants* 1996;6:207-17.
24. Jaffe BM. The role of prostaglandins, thromboxane, and leukotrienes in surgery. In: Sabiston DC Jr, ed. *Textbook of surgery: the biological basis of modern surgical practice*. 14th ed. Philadelphia: WB Saunders; 1991:465-9.
25. Davidson EM, Rae SA, Smith MJ. Leukotriene B₄, a mediator of inflammation present in synovial fluid in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1983;42:677-9.
26. Smith WL, Meade EA, Dewitt DL. Interaction of PGH synthase isozymes-1 and -2 with nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Adv Exp Med Biol* 1997;400A:189-96.