

나노 에멀전이 잇몸 염증의 예방 및 치료에 미치는 효과에 대한 연구

채창훈 · 박준우*

나노큐어텍 나노-바이오 퓨전 부설연구소, *한림대학교 의과대학 구강악안면외과학교실

Abstract (J. Kor. Oral Maxillofac. Surg. 2007;33:419-425)

THE STUDY ON THE EFFECT OF NANOEMULSION FOR THE PREVENTION AND TREATMENT OF GINGIVAL INFLAMMATION

Chang-Hoon Chae, Jun-Woo Park*

Institute of Nano-Bio Fusion Technology, NanoCureTech Inc,

**Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, College of Medicine, Hallym University*

We have found out the relationship of nanoemulsion containing nano vitamin C, E and propolis and gingival disease. We've confirmed effect of nanoemulsion through the experiment of *in vivo* and *in vitro*. We tested cell viability of gingival fibroblast cells by MTT assay and mRNA appearance of interleukin-1 β , using mouse that was guided inflammation. Anti-microbial activity for Antibacterial effect's experiment was carried out by using *S.aureus* and *E.coli*. In addition, inflammation tissue has been observed with scanning electrical microscopy. In this study, expression of interleukin-1 β was decreased after adding nanoemulsion containing nanovitamin C, E and propolis. We've also obtained good results from the test of Antibacterial effect against *S.aureus* and *E.coli*. Also, swelling of inflammation tissues observed by scanning electrical microscopy has gone down.

In conclusion, we have gained confidence that nanoemulsion containing nano vitamin C, E and propolis has very high Antibacterial effect against bacteria in oral. And it made us guess that inflammation of gingival reduces after decreasing interleukin-1 β .

Thus, we expect that nanoemulsion containing nano vitamin C, E and propolis gives good effects to patient having gingival disease.

Key words: Inflammation, Nano-vitamin C, E, Propolis, Interleukin-1 β , Gingival fibroblast cell

I. 서 론

구강 내에는 여러 종류의 원인에 의해서 구강 질환이 발생하며, 그 구강 질환 중에는 잇몸 질환 및 치주 질환이 가장 높은 발병률을 나타낸다. 일반적으로 구강 내 발생 질환은 외부적인 요인 즉 흡연 및 환경에 의하여 구강암과 같은 질환 및 잇몸질환이 발생한다^{1,5)}. 특히 잇몸질환은 식생활의 서구화 및 바쁜 현대 생활에서의 오는 스트레스에 대한 잇몸질환의 유병률이 높아지고 있으며, 노인성 질환으로 나이가 들면서 잇몸을 지지하는 뼈의 약화 및 잇몸의 손상으로 일상 생활을 하는데 있어서 많은 불편을 가져오는 질환으로 인식되고 있다^{6,7)}.

이러한 잇몸질환을 간단하게나마 보호하고 균형을 맞추면서 치료할 수 있는 것이 아직까지 비스테로이드(NSAIDs) 호르몬과 같은 약물들이 대부분을 차지하고 있다⁸⁻¹⁰⁾. 이와 같은 약물은 전통적으로 효과가 검증되고 많은 임상을 거쳐 많은 사람들이 사용되고 있다. 그러나 약물이 가지고 있는 또 다른 부작용도 있어 이에 대한 보완 및 대체가 되는 약물이 필요하다고 할 수 있다. 이러한 부작용이 없고 잇몸 질환에만 효과가 있는 약물을 개발하고자 많은 나라에서는 막대한 투자를 하면서 연구를 하고 있다¹¹⁻¹²⁾.

잇몸 염증의 발생시에 다른 인체의 방어 기작과 마찬가지로 인체의 방어 시스템이 가장 중요한 역할을 한다¹³⁾. 염증의 발생에는 다음과 같은 원인이 존재한다. 국소성 손상에 의한 염증 반응, 미생물 감염, 과민반응, 물리적 반응, 화학적 반응, 조직의 과사 및 정신적 스트레스에 대한 복합적인 요인 및 많은 요인에 의하여 염증에 대한 생체의 대응 이라고 할 수 있으며, 혈관과 혈구 세포를 중심으로 발생하는 과정중의 하나이다^{14,15)}. 특히 잇몸과 같은 구강 내의 습한 환경에서는 플라그나 치석 안에 존재하는 세균들이 만들어 내는 독소가 잇몸 속으로 침

박준우

134-010 서울특별시 강동구 길동 445

한림대학교 강동성심병원 치과/한림대 임상치의학대학원

Jun-Woo Park

Dept. of OMFS, Kang Dong Sacred Heart Hospital, Hallym Univ.

445 Gil-dong, Gangdong-gu, Seoul, 134-010, Korea

Tel: 82-2-2224-2332 Fax: 82-2-483-9647

E-mail: junpark@hanafos.com

* 본 연구는 나노큐어텍 공동연구개발 연구비로 이루어졌음.

투하여 잇몸에 염증을 유발 시킬 수도 있다¹⁶⁾. 또한 40대 이후에는 인체 저항력이 떨어지고 조직 재생 능력이 감소하면서 세균의 활동이 더욱 활발하게 활동하기 때문에 생활수준의 향상에 따른 인구의 고령화가 될수록 유병율이 높아지는 질환이라고 할 수 있다. 또한 잇몸질환은 본인이 자각을 못할 정도로 서서히 진행되다가 본인이 통증을 느낄 때면 치아를 빼야 할 정도로 잇몸이 손상이 심각하게 진행되어 있는 경우가 많이 있다¹⁷⁻¹⁸⁾.

본 연구의 목적은 부작용이 없으면서도, 생체친화적인 성분을 이용하여 잇몸 질환에 나노에멀전이 신속하게 흡수되어 효과를 발휘할 수 있는 나노 비타민C, E 프로폴리스 복합 성분의 효능에 관한 연구이다. 이와 같은 연구를 하기 위하여 인간 치주잇몸세포를 이용한 *in vitro* 실험과 염증 유도 마우스를 이용한 *in vivo* 실험을 하였으며, 전자현미경 사진 및 대장균 및 황색포도상구균에 대한 항균 테스트를 실시하여 잇몸 질환의 염증 회복 및 항균력에 대하여 알아보고자 하였다.

II. 실험 및 방법

1. *In vitro* Human Gingival Fibroblast (HGF) 세포 실험

본 실험에 사용된 HGF 인체 잇몸유래 상피세포는 (ATCC No CRL-2014) ATCC(ATCC, Manassas, VA, USA)으로부터 구입하였다. 10% fetal bovine serum이 포함된 DMEM (Gibco, Grand Island, NY, USA)를 사용하여 온도 37°C 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 80%의 confluency에서 0.01% trypsin-EDTA를 사용하여 계대배양하였다. 헤모사이트메타를 사용하여 세포수를 측정하였으며, interleukin-1 β (Santacruz, CA, USA)는 상기회사에서 구입하였다. sodium nitroprusside (SNP, Simga-Aldrich, Louis, MI, USA)을 사용하여, 멸균된 증류수에 녹여 10mM stock 용액으로 제조한 뒤 적정 농도로 희석하여 실험에 사용하였다. SNP는 산화성 손상을 일으키는 강력한 물질로 알려져 있다. 각각의 세포에 최종 농도는 100 μ M을 사용하였으며, SNP를 처리하고 1시간 뒤에 각각의 실험군을 처리하여 세포 반응을 관찰하였다.

2. MTT assay를 이용한 세포생존률 검사

세포의 활성 및 생존률을 검사하기 위하여 MTT celltiter 96 Aqueous one solution cell proliferation assay kit(Promega, Madison, WI, USA)를 사용하여 측정을 실시하였다. HGF 세포를 4 \times 10⁵ 개를 96well plate에 분주한 뒤 24시간 동안 안정화 시켰다. 각각의 well에 100 μ M의 SNP를 첨가하여 1시간 동안 반응을 유도하였다. 그런다음 각각의 well에 실험군을 처리하였다 24시간 동안 반응을 유도한 후 ELISA reader(Modecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 사용하여 540nm에서 흡광도를 측정하였다. 모두 세 번의 실험을 실시하였으며, 그에 대한 평균값과 오차를 Sigma Plot 4.0프로그램(SPSS Ins, CA USA)를 사용하여 값을 계산하였다.

3. *In vivo* 염증 유도된 마우스 실험

20g 내외 6주령 수컷 ICR mouse(샘타코, 청주, 한국)를 구입하여 실험기간 중 고형사료와 물은 자유롭게 공급하였고 사육실은 온도 22 \pm 2°C, 습도 50 \pm 5%로 유지하였으며 일정한 조도와 광주기 및 암 주기를 12시간 조절하여 생활주기에 맞추어 1주일간 적응시킨 후 실험에 사용하였다. TRI Reagent Total RNA Extraction Kit(Promega, CA, USA), chloroform, isopropanol alcohol, Ethanol, Actone (MERCK Inc., HA, Germany), 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), agarose(BIO-RAD, CA, USA), TAE buffer(Tris-Acetic-EDTA buffer)을 사용하였고 DNFB(2,4-DINITROFLUORO BENZENE, St. Louis, MO, USA)와 같은 재료를 실험에 사용하였다. DNFB는 염증을 유발하는 강력한 화합물로 알려져 있다. 유전자 발현을 확인하기 위하여 전기영동 kit을 사용하였으며, UV illuminate(Bio-Rad, CA, USA)에서 확인하였다. Spectrophotometer(Bio-RAD, USA)제품을 사용하여, 260nm에 농도를 확인하였다.

4. RNA extraction and RT-PCR

경추탈골법으로 희생시킨 mouse의 귀 조직을 채취하여 액화질소에 넣어 동결시켜 막자사발에서 powder 형태로 만든 후 tube에 보관한다. 채취한 귀 조직에 TRI Reagent 800 μ l 첨가하여 잘 혼합한 다음 여기에 chloroform 100 μ l을 추가하여 넣고 vortexing하여 11,000rpm에서 20min분 동안 원심분리를 실시한다. 원심분리가 끝난 후 상층액을 새 tube에 옮기고 동량의 isopropanol을 넣은 후 inverting을 실시 한 후 실온에 10분간 둔다. 10분 후 10,000rpm에서 10min동안 원심분리를 실시 한 후 pellet외에 상층액은 버린다. 70% DEPC에 탄을 1ml을 첨가하여 잘 혼합하여 씻어준 다음 10,000rpm에서 10min정도 washing한다. 실온에서 dry 시킨 후 DEPC증류수를 100 μ l 넣어 RNA pellet을 녹인다. 녹인 RNA sample은 각각 새 tube에서 RNA 농도를 측정하기 위하여 Spectrophotometer를 이용하여 260nm에서 흡광도를 측정하여 RNA 농도를 확인한다. Maxime RT-PCR PreMix tubes (iNtRON BIOTECHNOLOGY Inc., Seoul, Korea)에 샘플 total RNA이 주형과 Interleukin-1 β primer를 넣는다. Maxime RT-PCR PreMix tubes tube별로 RNA 농도가 1 μ g이 되도록 DW와 total RNA sample을 넣은 후 Interleukin-1 β primer(10pmol/ μ l) 2 μ l 넣어 total 24 μ l을 만든다. 그런 뒤 같은 조건으로 PCR machine (Hybaid, CA, USA)를 사용하여 반응을 시킨다. RT-PCR이 끝나면 1.5% Agarose gel에 loading 한 후 100voltage에서 30분 동안 반응을 시킨 후 반응이 끝난 gel을 ET-BR 염색시약에서 10분 동안 반응시켜 Interleukin-1 β DNA 유전자의 발현 양상을 관찰한다. gel을 UV Illuminate 램프 IL-1 β 의 발현을 확인한다.

5. 항균테스트 실험

항균테스트에 사용된 실험균은 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*, ATCC 6538)이며, 실험전에 황색포도상구균을 37°C에서 습도 50%에서 충분히 24시간 동안 진탕 배양하여 세균의 활동성 및 기능을 왕성하도록 유도하였다. 그런 다음 세균의 균수가 2×10^6 개가 되도록 처리하였다. 항균테스트를 측정하기 위하여 agar혼합 페트리디쉬에 황색포도상구균을 도말 하여 도포하고, 37°C 인큐베이터 에서 1시간 동안 방치하였다. 세균이 도말된 페트리디쉬에 일정한 크기의 원형의 지름 7mm 폭 3.5mm 의 zone을 만들어서 실험군 및 대조군의 샘플 200uL을 처리하여 37°C 인큐베이터에서 16시간 방치하여 항균력을 측정하였다. 샘플이 처리된 플레이트의 zone에서의 항균력의 범위를 측정하였다.

6. 전자현미경 사진

세포의 사이즈가 가진 기능 및 구조의 관계를 더욱 자세히 알아보고자 전자현미경 관찰을 실시하였다. 원형의 유리코팅된 커버글라스(직경 12 mm) 위에서 시료를 유도시킨 후 커

버글라스 전체를 4% paraformaldehyde-glutaraldehyde (4 C, 0.1M phosphate buffer, pH 6.8)에 1시간 동안 전 고정하고, 인산완충용액 (4 C, 0.1 M phosphate buffer, pH 6.8)으로 몇 번 세척한 후, 얼음 위에서 1% OsO(0.1 M phosphate buffer, pH 6.8)로 1시간 동안 후 고정하였다. 고정액과 완충용액의 농도, pH, 온도, 고정시간을 항상 정확하게 유지하였다. 모든 고정이 끝난 시료는 동일 인산완충용액으로 충분히 세척한 후, ethanol 농도 상승 순으로 탈수하였다. 그런 다음 Ion coater를 사용하여 2분 동안 7mM에서 금 코팅을 하였다.

III. 결 과

1. MTT assay 분석

세포 생존률 검사를 이용하여 HGF 세포에 대한 SNP의 영향을 조사하였다. 세포 생존률 검사에서 540nm의 파장에서 최대가 되며, 이 파장에서 측정된 흡광도는 세포의 생존률 나타내며, 대사가 왕성한 세포의 농도를 반영하므로 조사 대상 세포의 증식기에 미치는 특정 물질의 영향을 비교하여 세포수의 생존률을 측정하였다. Fig. 1에 나타난 바와 같이 HGF 세포에

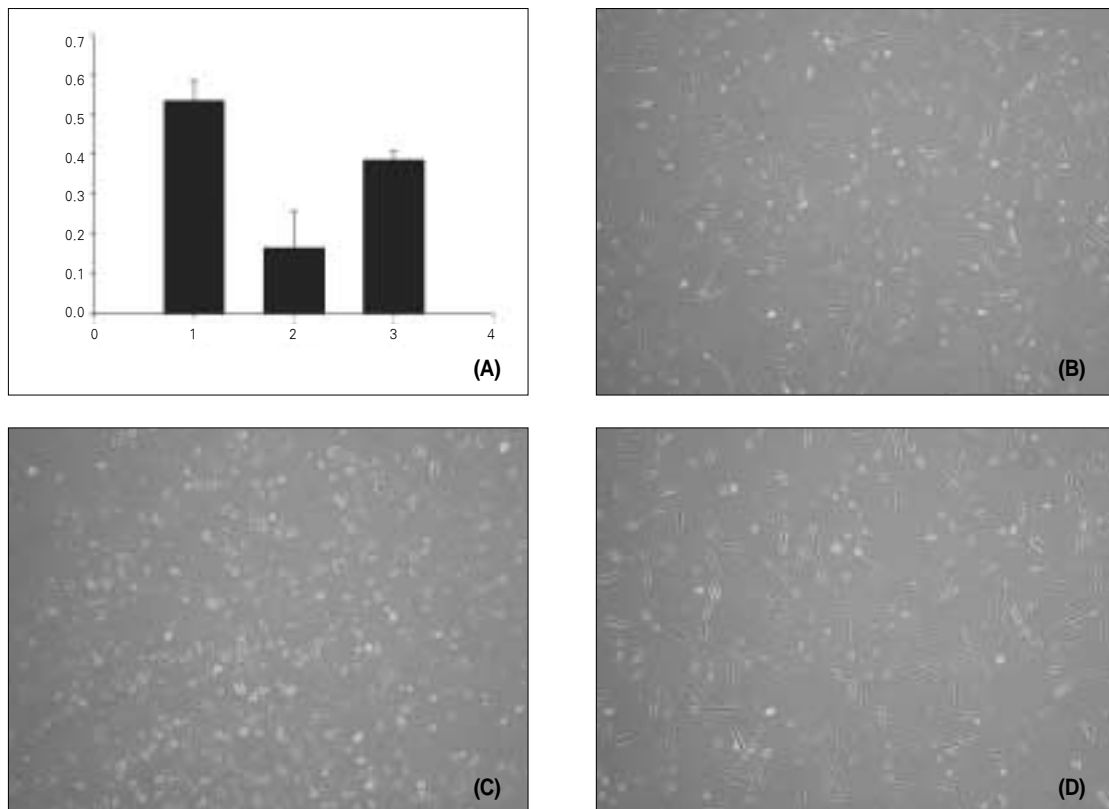


Fig. 1. The results of MTT assay showed a little decreased in viable cell number in No 3, whereas No 2 is significant decreased in viable cell number. (A): 1. control, 2. SNP treated, 3. Nano emulsion. (B),(C),(D): The morphology of cultured cells by phase contrast microscopy. (B) control of HGF fibroblast cell, (C) HGF fibroblast cell treated SNP (D) HGF fibroblast cell was treated by SNP and nano emulsion.

대한 SNP의 처리에서 24시간 후 SNP만 처리한 세포보다 나노에멀전 처리한 군에서 유의할만한 감소를 보이지 않으므로 나노에멀전이 SNP와 같은 산화성 손상을 유발하는 독성 물질의 존재 하에서도 세포의 감소를 억제하는 효과를 볼 수 있었다.

2. Interleukin-1 β 의 mRNA 발현 분석

염증의 병인으로서 잘 알려진 Interleukin-1 β 에 대한 발현 양을 조사 함으로서 선택적인 약물이 염증을 감소에 얼마나 특이적인 작용을 하는지를 Interleukin-1 β 의 mRNA 발현 RT-PCR 실험을 통하여 알 수 있었다. 염증유발 chemical을 이용하여 7일 동안 염증을 유발시킨 마우스에 각각의 실험군을 아침 저녁

두 번 도포하여 5일 동안 실험을 진행하였다. 1번 정상조직의 경우 염증 유발 시에만 발현되는 interleukin-1 β 의 발현이 거의 확인 되지 않았으며, 2번 염증을 유발시킨 후 아무것도 처리하지 않은 마우스의 경우 interleukin-1 β 의 발현을 증가된 것을 확인할 수 있었다. 3번은 positive 대조군 으로서 염증만 유발시킨 2번과 동일한 발현 양을 확인할 수 있었다. 4번 나노에멀전의 경우 2번 3번보다 50%이상 감소된 발현 양을 확인할 수 있었으며, 1번 정상과 비교해서 거의 차이가 나지 않을 만큼 interleukin-1 β 의 감소를 확인할 수 있었다. 이와 같은 결과로 볼 때 염증 전구 물질의 감소는 염증이 감소되어 있다는 것을 나타낸 것이라고 할 수 있다.

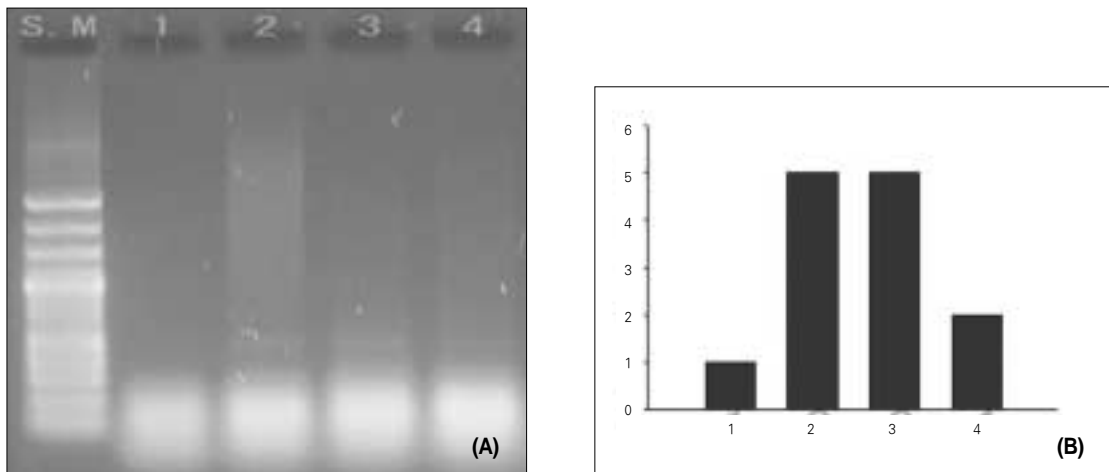


Fig. 2. A: The expression of Interleukin-1 β DNA pattern, B: The grape of Interleukin -1 β pattern, S.M: size marker, 1. control 2. treated by DNFB 3. treated by Vaseline 4. treated by Nano emulsion. Nano emulsion was decreased in DNA expression level. But Vaseline and positive control were increased in expression level.

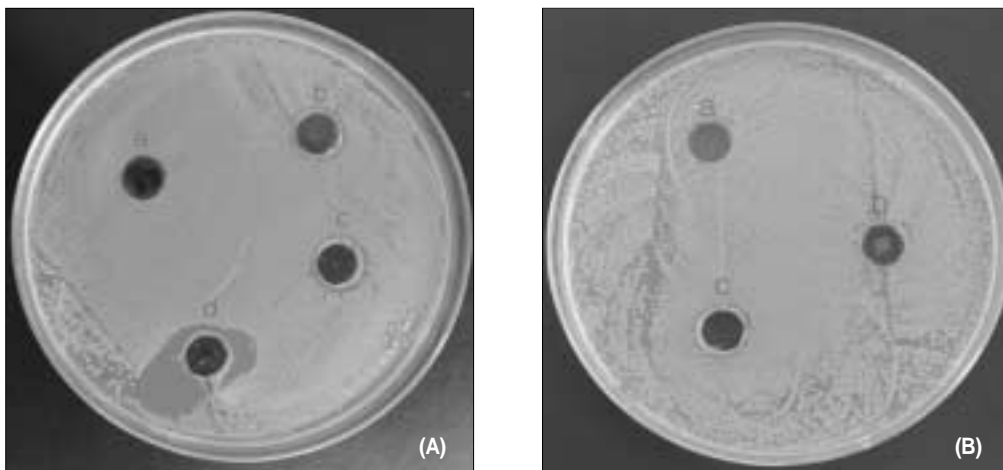


Fig. 3. Antibacterial effect of *S.aureus* and *E.coli*. (A): *S.aureus*, a. control, b. nano emulsion 50ul, c. nano emulsion 100ul d. nano emulsion 200ul, (B) *E.coli*. a. control, b. nano emulsion 50ul c. nano emulsion 100ul.

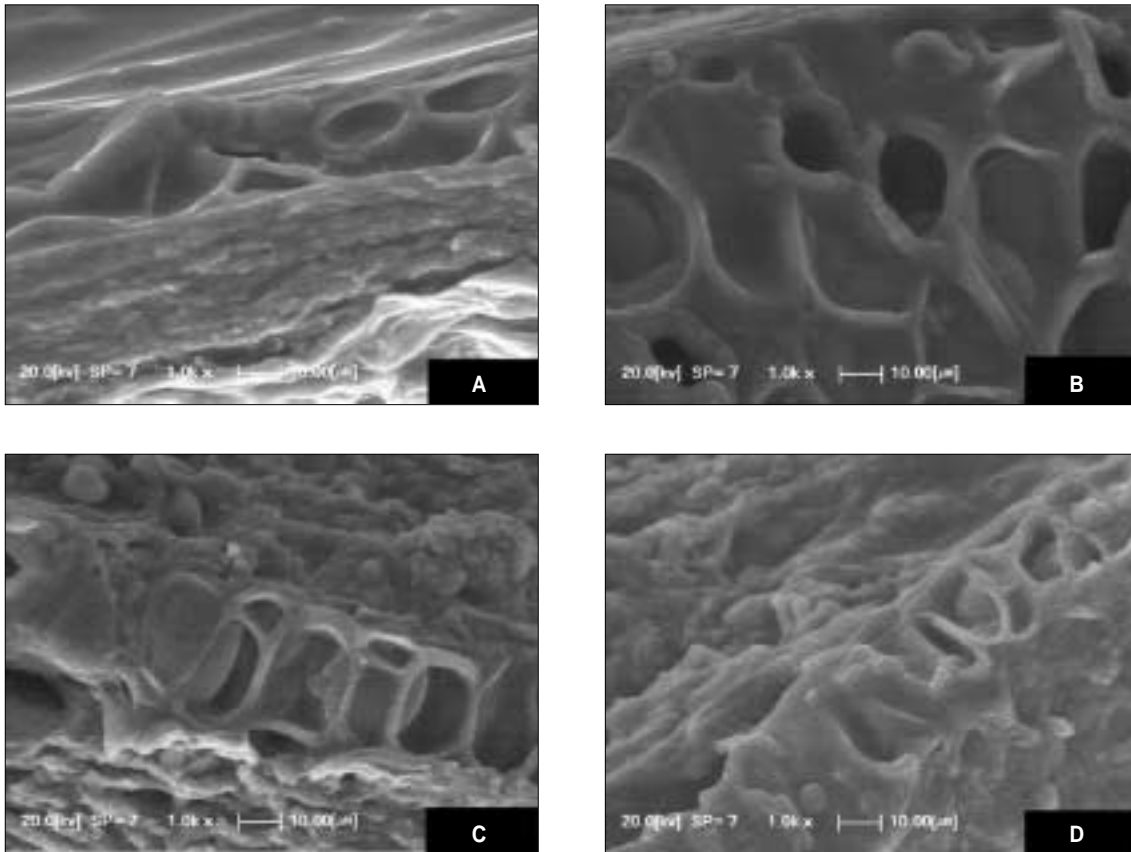


Fig. 4. This pictures shows SEM. ear's skin was a little bit swelled but it was recovered to normal condition after being treated nano emulsion. A. control, B. treated by DNFB, C. treated by Vaseline, D. treated by nano emulsion.

3. 항균테스트

나노에멀전 처리에 의한 황색포도상구균 및 대장균의 항균 효과에 대한 상관성을 알아보기 위하여 대표적인 Gram +, Gram -의 대표적인 세균인 황색포도상구균 및 대장균에 대하여 항균테스트를 실시하였다. 일반적으로 사용되고 있는 agar 배양접시에 일차적으로 세균들을 각각 도말하여 37°C 항온기에서 1시간 방치하여 세균의 안정을 유도한 후 각각의 실험군을 처리하였다. Fig. 3에서 보듯이 농도 의존적으로 항균능력이 증가되는 것을 볼 수 있었다.

특히 황색포도상구균의 항균실험에서 200ul 나노에멀전 조건에서 유의할 만하게 높은 항균효과를 나타내었다.

4. 주사전자현미경 관찰

각각의 조직이 염증이 생기면서 피부조직의 부풀어오름과 같은 부종의 크기를 관찰하고, 조직의 부종에 대한 현미경적 관찰을 하였다. 고리처럼 생긴 것이 세포와 세포를 이어주는

결합조직으로서 부종이 생기면서 마우스의 조직이 부풀어올라 커진 것을 볼 수 있다(Fig. 4). Fig. 4의 a는 정상조직이며, b는 염증 유발 군으로서 조직이 크기가 정상보다 커진것을 확인할 수 있으며, c도 b와 마찬가지로 조직의 크기가 커져있음을 확인할 수 있었고, d는 b, c보다 조직의 감소를 확인할 수 있었다. 결론적으로 Fig. 4에서 조직의 부종도 전자현미경 관찰 사진으로 감소되어 있는 것을 확인할 수 있었다.

IV. 결론 및 토의

구강 내의 잇몸이라는 특수한 환경에서의 잇몸 질환 치료의 어려움을 가질 수 밖에 없다. 반면 환자가 쉽게 잇몸 손상의 보호 및 치료는 더욱 불가능하다. 잇몸 질환에 대한 효과적인 치료시 가장 우선시 되어야 하는 것이 빠른 침투 및 안정적인 도포에 있을 수 있다. 이런 장점을 만족하기 위하여 최근에는 일부 의학분야에서 나노물질에 대한 제품 및 제형으로의 시도 및 응용이 되고 있다¹⁹⁾. 나노 사이즈가 가진 특수한 경우가 잇몸 속으로 빨리 침투할 수 있기 때문이다. 그러나 나노 사이즈

의 물질을 의학적인 치료에 접목 시키는 것은 새로운 기술을 요구하는 것이고, 생체친화적인 물질이 사용되어야만 하는 한계가 있다. 최근의 가장 주목하는 기술이 나노-바이오 퓨전 기술이라고 할 수 있다¹⁹⁾. 가장 먼저 접목이 된 것이 암 진단 및 유전 질환의 진단 마커로서 나노와 바이오의 기술이 만들어져 유전자칩이라는 새로운 응용 제품이 나와있다²⁰⁾. 또한 나노 항암제 코팅과 같은 치료약물 전달 시스템에서도 나노를 이용한 의학치료 기술이 나오고 있다²¹⁾. 나노와 바이오의 기술의 접목을 통한 새로운 치료제가 많이 시도되고 응용되고 있지만 아직 검증시스템 및 부작용에 대한 결론이 없는 상황이다²²⁾. 나노비타민 C, E의 경우에는 이미 생체친화적이고, 현재까지 밝혀진 연구로는 면역 기능 및 항산화 작용 등 많은 부분 인체 활성 촉진 물질로서 알려져 있다²³⁻²⁴⁾. 이와 같은 물질의 빠른 흡수는 잇몸 질환의 긍정적인 효과를 수행할 수 있을 것 이라고 예상할 수 있다.

본 실험 결과를 결론적으로 보면, 나노에멀전 성분이 염증관련 사이토카인의 발현을 현저하게 감소시켰으며, 이와 같은 결과에는 나노사이즈의 비타민 및 복합성분이 효과적으로 신속하게 작용 되었을 것이라고 보고 있다. 또한 항균효과가 농도의존성 하게 항균효과를 나타내었으며, 마우스의 귀 부종도 또한 감소되었다. 본 나노에멀전 성분은 잇몸질환에 있어 잇몸질환을 감소 시킬 뿐만 아니라 항균효과도 같이 나타내어 잇몸질환환자에게 우수한 효능을 가질 것이라고 보고 있다.

결론적으로 잇몸 질환으로 유도된 HGF 세포주 및 염증 질환으로 유도된 마우스에 대한 염증 치료 효과에서 대조군에 비하여 우수한 항염증 효과를 관찰할 수 있었고, 분자생물학적인 mRNA 발현 실험을 통하여 interleukin-1 β 의 감소로서 확인할 수 있었다. 아직 정확한 원리에 대해서는 계속 연구를 해야겠지만 전자현미경적인 관찰에서 부종의 감소되는 원인에서 일차적인 부종의 감소를 가져오고, 염증 관련 사이토카인의 발현을 차단하는 것으로서 항염증 효과를 가져오는 것으로 사료된다. 또한 잇몸 질환의 한가지 원인으로 알고 있는 세균에 대한 항균 테스트 결과 효과적으로 세균을 억제하는 것으로 밝혀졌다. 이와 같은 결과는 항염증 효과와 더불어서 복합적인 원인에 의한 잇몸 질환의 발생에도 효과적으로 나노에멀전이 잇몸의 보호 및 치료가 가능하다는 결론을 얻을 수 있었다.

1. 염증 유도된 마우스의 귀의 부종을 유의할만하게 감소하는 결과를 가져왔다.
2. 염증 유도된 마우스에 나노 에멀전 처리 후의 interleukin-1 β 의 mRNA 발현량의 감소로 염증관련 사이토카인의 억제를 확인할 수 있었다.
3. 인간 잇몸 세포(Human Gingival fibroblast)에 대한 산화성 손상 물질인 SNP toxic chemical처리 후의 세포생존률 조사에서 세포 죽음을 억제 시키는 결과를 가져왔다. 항산화 작용을 확인할 수 있었다.
4. 황색포도상구균 및 대장균의 항균테스트 결과 농도 의존적으로 항균 효과가 있음을 알 수 있었다.

5. 염증 유도된 마우스의 귀의 전자현미경 실험결과 부종의 감소로 염증이 감소되었다.
6. 나노에멀전이 가진 잇몸치료 효과 기작에 대해서는 계속 연구가 지속되어야 될 것 이라고 사료된다.

참고문헌

1. Shojiro Kitajima, et al.: Role of Cks1 Overexpression in Oral Squamous Cell Carcinomas Cooperation with Skp2 in Promoting p27 Degradation. *Am J Pathol* 2004;165(6):2147-2155.
2. Crispian Scully and Stephen Porter. *Oral cancer West J Med.* 2001;174(5):348-351.
3. Jon Sudb: Novel Management of Oral Cancer: A Paradigm of Predictive Oncology. *Clin Med Res.* 2004;2(4):233-242.
4. E Benjamin, et al.: Malignant fibrous histiocytomas of salivary glands. *Clin Pathol* 1982; 35(9):946-953.
5. SANGEETA GAJENDRA, GUSTAVO D. CRUZ, and JAYANTH V KUMAR: Oral Cancer Prevention and Early Detection: Knowledge, Practices, and Opinions of Oral Health Care Providers in New York State. *J Cancer Educ.* Author manuscript; available in PMC 2007 June 20.
6. Yan-min Wu, Jie Yan, Li-li Chen, Wei-lian Sun, and Zhi-yuan Gu: Infection frequency of Epstein-Barr virus in subgingival samples from patients with different periodontal status and its correlation with clinical parameters. *Zhejiang Univ Sci B* 2006;7(11):876-883. Published online 2006 October 17.
7. Uros Skaleric, et al.: Proinflammatory and Antimicrobial Nitric Oxide in Gingival Fluid of Diabetic Patients with Periodontal Disease. *Infect Immun* 2006;74(12):7010-7013. Published online 2006 October 2.
8. Lorna Mason, et al.: Topical NSAIDs for chronic musculoskeletal pain: systematic review and meta-analysis. *BMC Musculoskelet Disord* 2004;5:28. Published online 2004 August 19.
9. Ong KS and Seymour RA: Maximizing the safety of nonsteroidal anti-inflammatory drug use for postoperative dental pain: an evidence-based approach. *Anesth Prog* 2003;50(2):62-74.
10. Lands L, Stanojevic S: Oral non-steroidal anti-inflammatory drug therapy for cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev* 2007; 17(4):CD001505.
11. Anna Holdgate and Tamara Pollock: Systematic review of the relative efficacy of non-steroidal anti-inflammatory drugs and opioids in the treatment of acute renal colic. *BMJ* 2004 June 12; 328(7453): 1401.
12. Joshi HN: Drug development and imperfect design. *Int J Pharm* 2007;1:343(1-2):1-3. Epub 2007 Jul 4.
13. Schrier RD, McCutchan JA, and Wiley CA: Mechanisms of immune activation of human immunodeficiency virus in monocytes/macrophages. *J Virol* 1993;67(10):5713-5720.
14. Garner A, Rahi AH, and Wright JE: Lymphoproliferative disorders of the orbit: an immunological approach to diagnosis and pathogenesis. *Br J Ophthalmol* 1983;67(9):561-569.
15. Nicholas P Restifo: Building better vaccines: how apoptotic cell death can induce inflammation and activate innate and adaptive immunity. *Curr Opin Immunol* Author manuscript; available in PMC 2007 August 29.
16. Singer RE and Buckner BA: Butyrate and propionate: important components of toxic dental plaque extracts. *Infect Immun* 1981; 32(2):458-463.
17. Tanzer JM, Slee AM, Kamay B, and Scheer ER: In Vitro Evaluation of Three Iodine-Containing Compounds as Antiplatelet Agents. *Antimicrob Agents Chemother* 1977;12(1):107-113.
18. Tsai CC, et al.: Extraction and partial characterization of a leukotoxin from a plaque-derived Gram-negative microorganism. *Infect Immun* 1979;25(1):427-439.
19. Ming Jiang: Review of "Glossary of Biotechnology and Nanobio-

- technology Terms” by Kimball Nill. Biomed Eng Online 2007;6:5. Published online 2007 January 31.
20. Junbai Wang, et al.: Tumor classification and marker gene prediction by feature selection and fuzzy c-means clustering using microarray data. BMC Bioinformatics 2003;4:60.
 21. Laura De Laporte and Lonnie D. Shea.: Matrices and Scaffolds for DNA Delivery in Tissue Engineering. Adv Drug Deliv Rev. Author manuscript; available in PMC 2007 August 16.
 22. Salata OV: Applications of nanoparticles in biology and medicine. J Nanobiotechnology. 2004;2:3. Published online 2004 April 30.
 23. Levine M, et al.: Vitamin C pharmacokinetics in healthy volunteers: evidence for a recommended dietary allowance. Proc Natl Acad Sci USA. 1996;16;93(8):3704-3709.
 24. Frei B, England L, and Ames BN: Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma. Proc Natl Acad Sci USA. 1989;86(16):6377-6381.