

홍화 추출물이 치주인대세포, 조골세포 활성도에 미치는 영향

류인철¹ · 이용무¹ · 구 영¹ · 배기환² · 정종평¹

¹서울대학교 치과대학 치주과학교실

²충남대학교 약학대학

I. 서론

치주질환은 치태내 치주병원균에 의한 감염성 질환으로, 만성염증에 의한 조직파괴가 수반된다. 따라서 치주질환치료의 목표는 치주질환의 원인요소인 세균요인의 기계적 제거와 더불어, 치주인대세포와 골조직세포의 증식을 통한 치주조직의 재생을 도모하여, 기능적인 회복을 이루는 것이라 할 수 있다^{1, 2)}. 최근의 치주조직재생에 관련한 최근의 연구 경향은, 차폐막을 통한 치주인대세포의 선택적 분화 및 유주를 도모하는 기계적 방법의 조직유도재생술과 함께, 치주조직재생 관련 세포의 증식 및 분화를 유도할 수 있는 것으로 밝혀지고 있는 일부 성장인자등에 관한 연구에 초점이 맞추어지고 있다. 하지만 이들 성장인자들의 치주치료에서의 응용방법에 대해서는, 치주조직에 국소적인 투여시 발생 가능한 전신적인 반응을 예측할 수 없는 상황이고, 투여용량이나 투여방법 등에 관한 아직은 해결되지 않은 많은 문제들이 남아 있어서, 단시일 내에 치주임상에 응용되기에는 어려울 것으로 보인다.

치주질환 치료제로서 여러 생약제제들이 제시된 바 있고, 이들 천연추출물을 주성분으로 한 항균 구강용제, 치약, 경구용 약제 등이 개발되어 시판, 사용되고 있다. 특히 익히 알려진 치주질환 치료보조제로서 옥수수 추출물이 치주인대의 재생, 치은의 각화도 증진, 치아동요도의 감소 및 치조골의 재생 등의 작용³⁻⁷⁾으로 해서 몇몇 상품화된 제제까지 시판되고 있으나, 그 연구 내용상 과학적 근거가 박약하고 임상적 효과에 대한 신뢰도 충분치 않아 치주전문의에 의한 전문적 처방은 미미한 실정이다. 최근에, 몇몇 생약제제에 관한 전래의 효능 및 효과를 근거로, 치주질환 치료제로서의 응용 가능성, 즉 치주질환균에 대한 항균효과 및 항염효과와 치주조직 재생능력에 미치는 영향 등에 대한 과학적인 접근과 분석이 진행되고 있다. 대표적인 생약제제로서 후박, 대조 및 은행엽 등을 들 수 있는데, 후박추출물은 항균효과, IL-1 β 및 PGE₂ 생산차단효과 그리고 collagenase 활동억제효과 등⁸⁻¹³⁾이 확인된바 있고, 대조추출물은 IL-1 β 및 PGE₂ 생산차단효과, collagenase 활동억제효과 그리고 치은섬유아세포 활성화 증진

* 이 연구는 1996년도 한국학술진흥재단 공모과제 연구비의 지원에 의하여 이루어졌음

효과 등이 확인된 바 있으며¹⁴⁻¹⁶⁾, 은행엽 추출물도 치주질환세균에 대한 항균효과가 확인된 바 있다¹³⁾. 또한 이들 실험실적 연구결과를 근거로, 본 저자들은 후박 및 대조추출 혼합물의 경구투여시 쥐의 두개골 결손부에서 골재생 촉진효과를 확인한 바 있다¹⁷⁾.

홍화(紅花, Safflower : *Carthamus tinctorius* Linné)는 항응혈 효과^{18, 19)}, 항염효과²⁰⁾ 등이 확인된 바 있고, 동양의학에서 울혈(blood stasis)을 위한 치료제로 전래되는 약제로서 골재생효과가 있는 것으로 알려져 골다공증 등의 민간요법으로 사용되고 있고, 속단(續斷, *Dipsasi Radix*)은 타박 및 접골시에 사용되어 온 생약제제이다²¹⁾. 이들 생약제는 오랜 기간 동양의학에서 사용되어 온 약제로서, 경험적으로 그 안전성과 효과가 인정되어 사용되어 온 바 있으므로, 비교적 부작용 없이 경구투여가 가능한 약제로 기대된다고 할 수 있다.

본 연구에서는 조직재생측면에서 홍화추출물 및 속단추출물의 효과를 알아보고자, 치주인대세포 및 조골세포의 기능적 세포활성에 미치는 효과와, 경구투여시 쥐의 두개골 결손부 치유에 미치는 효과를 평가하였다.

II. 연구재료 및 방법

1. 약제의 준비

홍화(紅花, Safflower : *Carthamus tinctorius* Linné)의 꽃 및 종자, 그리고 속단(續斷, *Dipsasi Radix*) 300g을 70% EtOH 수용상에서 60°C 3시간씩 2회 환류, 추출하였다. 추출된 EtOH용액을 여과하고 여액을 감압한 후, 각각의 EtOH extract(140g)을 얻었다. 양성대조군으로 옥수수물검화추출물(*Zea Mays* L) 및 PDGF-BB(Genzyme, USA)를 사용하였고, 실험군으로는 홍화꽃추출물(safflower blossom extract, SBE), 홍화종자추출물(safflower seed extract, SSE) 및 속단추출물(*Dipsasi Radix*

extract, DRE)을 사용하였다. 각 추출물의 농도는 예비실험을 통하여 결정된 125, 250 및 500 µg/ml로 하여 실험하였다.

2. 치주인대세포 및 조골세포의 준비

치주인대세포(PDL cell)는, 교정치료를 위하여 발거한 제 1소구치 치근의 치근중간 1/3 부위의 치주인대를 큐렛으로 채취하여 세절한 다음, 35mm세포배양 접시에 부착시키고, Penicillin, streptomycin 및 amphotericin-B 가 함유된 1% antibacterial-antifungal solution (Gibco, USA)과 10% FBS(Gibco, USA)를 첨가한 α -MEM(Gibco, USA)을 배지로 하여, 3일 간격으로 배양액을 교환해 주면서 5세대 까지 배양하여 실험에 사용하였다. 배양시 습도는 95%, 온도는 37°C을 유지하면서 95% 공기, 5% CO₂를 계속 공급하였다. 조골세포로는 ATCC MG63 human osteosarcoma cell (MG63 cell)을 이용하였다.

3. 세포활성도 평가

계대배양한 치주인대세포 및 MG63 cell을 0.25% trypsin-EDTA(Gibco, USA)용액으로 처리한 후 원심분리하여 얻은 후, 배양액으로 세포부유액을 만들고 표준혈구계산기로 well 당 1x10⁵개의 세포수가 되게 하여 96 well plate(Nunc, USA)에 접종한 후 배양하였다. 24시간 후 배양액을 제거한 후 Hank's balanced salt solution(Gibco, USA)으로 세척한다. 각 약제에 의한 세포활성도는 rapid colorimetric MTT assay²²⁾로 평가하였다. 대조군 및 각 약제가 농도별로 함유된 배양액이 200µl가 되게 하여 24시간 배양한 후, 배양액을 제거하고 생리식염수에 용해한 methyl thiazol-2-YL-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT)(Sigma, USA)용액 50µl를 각 well에 넣고 4시간 동안 배양한 후 MTT용액

을 제거하고 formazon결정을 용해시키기 위해 dimethyl sulfoxide(Sigma, USA)를 50 μ 씩 첨가하였다. Plate를 잘 흔든후 ELISA reader(Thermo max, molecular devices, MelanoPark, CA., USA)로 570nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 약제에 의한 세포활성효과는 대조군에 대한 백분율로 표시하였다.

4. Alkaline phosphatase활성도 측정

초기 밀생상태의 치주인대 세포 및 MG63 cell을 96 well culture plate에 well당 1x10⁴세포를 접종하고 24시간 배양하고, 각약제가 함유된 배지로 교환하여 48시간 배양하였다. 배양액을 제거하고 1% Triton X-100으로 세포를 용해하고 sonication하였다. 0.4mM Tris-HCl, 2mM MgCl₂, 4mM p-nitrophenol phosphate(PNPP)이 함유된 완충용액 50 μ l/well을 가한후 30분간 반응시키고 150 μ l의 1N NaOH를 가하여 반응을 중지시킨 후 분해된 p-nitro phenol(PNP)을 405nm에서 Beckman 25 spectrophotometer(Beckman Ins., CA., USA)로 비색정량하였다. ALPase의 활성도의 단위는 단백질양을 기본으로 하였다.

5. ¹²⁵I-PDGF-BB binding assay

Graves등의 방법²³⁾에 따라 binding assay를 실시하였다. 약술하면, 치주인대세포 및 MG63 cell을 24 well plate(10⁵ cell/well)에 접종하고 밀생 배양하고, depletion medium (0.5% FBS)으로 교환후 72시간 배양하였다. 5U/ml의 IL- β 와 각 약제를 농도별로 가하여 20시간 전배양한 후, 10 ng/ml의 ¹²⁵I-PDGF-BB를 가하고 4°C에서 3시간 배양하였다. 배양 후 배지를 제거하고 1% SDS로 ¹²⁵I-PDGF-BB를 추출하였다. 추출된 ¹²⁵I-PDGF-BB는 Packard Model 6230 gamma scintillation counter(Packard Ins., CT., USA)로 측정하였다.

5. 세포화학주성 평가

세포화학주성 평가는 Adelman-Grill 과 Cully의 방법²⁴⁾에 따라 5mg/ml gelatin solution으로 완전히 피복된 8 μ m pore polycarbonate막으로 상하 chamber로 양분되어 있는 48well microchemotaxis chamber를 사용하였다. 각 well의 하부에 대조군으로 약제가 포함되지 않은 배지를 사용하였고, 실험군으로는 PDGF-BB 및 각 약제가 농도별로 포함된 배지를 위치시킨다. 그리고 상부에는 5x10⁵cell/ml의 MG63 cell 및 치주인대세포의 세포부유액을 가하여 5% CO₂, 95%공기와 37°C에서 4시간동안 배양하였다. 배양 후 chamber에서 filter를 제거하여 유주된 cell을 고정하고, Giemsa염색 후 현미경상에서 유주한 세포의 수를 조사하였다.

6. 백서 두개골 결손부 치유에 미치는 영향

체중 300-350g의 백서를 Entobar(Hanlim Pharm Co., Seoul, Korea)를 사용하여 intraperitoneal(30mg/kg)로 마취하고 두부의 털을 깎은 후 0.5% chlorhexidine으로 수술부위를 소독하였다. 수술중의 안정과 편리를 위해 백서의 머리를 두부고정기(cephlost)에 고정하고, 전두골 앞쪽에서 후두골 후방부까지 정중부를 따라 절개하고 피부와 점막부위를 바깥쪽으로 젖힌 후 두개골을 노출시켰다. 측두골에 trephine bur(31 implant innovation, From USA)를 사용하여 뇌막 등에 손상을 주지 않도록 하여 직경 8mm의 골결손부를 형성하고 봉합하였다. 실험백서의 사료에 각 약제를 용량별(0.02, 0.1, 0.35g/kg, day)로 혼합하여 3주간 사육한 후 실험동물을 희생시키고 두개골을 절제해 내어 조직소견을 관찰하였다. 절제된 표본은 formalin에 고정하고 탈회한 후 Masson-trichrome염색을 하여 광학

현미경으로 조직소견을 관찰하고, Image analysis system(Global Lab Image, Data Tanslation, MA., USA)이 내장된 컴퓨터에 연결하여 재생된 신생골의 면적을 측정한다.

III. 연구결과

1. 홍화 및 속단추출물이 MG63 cell 및 치주인대세포의 세포활성도에 미치는 영향

각 약제에 의한 세포활성도를 측정한 결과(표 1), MG63 cell에 대해서는 홍화꽃추출물(SBE), 홍화종자추출물(SSE), 속단추출물(DRE) 및 옥수수불검화추출물(ZML) 모두에서 세포활성 증진효과를 보였다. 홍화꽃추출

표 1 Effects of safflower extracts and Dipsasi Radix extracts on the growth and survival of ATCC MG63 human osteosarcoma cells and human periodontal ligament cells(by rapid colorimetric MTT assay)

Group	growth and survival rate (%) ^a	
	MG63 cell	PDL cell
control	100	100
PDGF-BB(10ng/ml)	135.5	118.3
ZML(125µg/ml)	118.8	97.7
ZML(250µg/ml)	117.9	102.7
ZML(500µg/ml)	114.1	92.9
SBE(125µg/ml)	133.2	109.2
SBE(250µg/ml)	143.9	121.5
SBE(500µg/ml)	147.5	126.9
SSE(125µg/ml)	114.8	109.5
SSE(250µg/ml)	119.1	111.4
SSE(500µg/ml)	129.9	114.5
DRE(125µg/ml)	128.7	101.9
DRE(250µg/ml)	129.5	100.1
DRE(500µg/ml)	125.3	102.2

ZML : Zea Mays L, SBE: safflower blossom extract, SSE : safflower seel extract DRE: Dipsasi Radix extract

^a(mean O.D. of each test group/mean O.D. of control group)×100 %.

물의 세포활성 증진효과가 각 농도군에서 모든 실험군중 가장 높았고, 250-500µg/ml의 농도범위에서는 PDGF-BB(10ng/ml)보다도 높은 활성을 보였다. 옥수수불검화추출물은 약한 세포활성증진 효과를 보였으나 그 정도는 다른 실험군에 비해 가장 낮았다. 치주인대세포에 대해서는 홍화꽃 및 종자추출물에서 세포활성 증진효과를 보이고 있으나, MG63 cell에 비해서는 활성증진효과가 약하였고, 옥수수불검화추출물 및 속단추출물은 별다른 효과를 보이고 있지 않았다. MG63 cell에서도 치주인대세포의 경우와 같이, 250-500µg/ml의 농도범위의 홍화꽃추출물이 높은 세포활성증진효과를 보여, PDGF-BB(10ng/ml)의 효과보다 높은 활성을 보였다. MG63 cell 및 치주인대세포 모두에서 홍화꽃추출물의 활성증진효과가 가장 높았고, 125-500µg/ml의 농도범위에서 농도증가에 따라 세포활성 증진효과가 증가하였다.

2. 홍화 및 속단추출물이 MG63 cell 및 치주인대세포의 ALPase 활성도에 미치는 영향

각 약제에 의한 MG63 cell 및 치주인대세포의 ALPase 활성화효과를 측정한 결과(표 2), MG63 cell에 대해서는, 홍화꽃추출물의 ALPase활성 증진효과가 가장 높게 나타났으며, 125-500µg/ml의 농도범위에서 농도증가에 따라 ALPase활성 증진효과가 약간씩 증가하여 250 및 500µg/ml의 농도에서 유의한 활성화효과를 보였다. 치주인대세포에 대해서는, 홍화꽃(500µg/ml) 및 종자추출물 (250, 500µg/ml)과 속단추출물(250µg/ml)에서 유의한 ALPase활성 증진효과가 보이고 있다. 이 중에서 홍화종자추출물의 증진효과가 가장 두드러진데, 농도증가에 따라 증진효과가 증가하여 250µg/ml, 및 500µg/ml의 농도에서 유의한 증진효과를 확인할 수 있었다. 옥수수불검화

표 2 Effects of safflower extracts and Dipsasi Radix extracts on the ALPase activities of ATCC MG63 human osteosarcoma cells and human periodontal ligament cells

Group	ALPase activity ^a (nM/30min/mg protein)	
	MG63	PDL
control	334.5±18.7	276.4±13.7
ZML (125µg/ml)	366.6±16.0*	281.9±15.7
ZML (250µg/ml)	347.1±16.5	276.7±21.3
ZML (500µg/ml)	342.3±17.5	274.7±11.6
SBE (125µg/ml)	362.2±31.5	287.1±23.5
SBE (250µg/ml)	369.8±17.4*	292.2±12.5
SBE (500µg/ml)	371.5±22.2*	302.8±16.7*
SBE (125µg/ml)	341.6±28.8	297.5±16.9
SSE (250µg/ml)	337.9±35.3	312.6±22.5*
SSE (500µg/ml)	342.2±22.2	316.5± 9.7**
DRE (125µg/ml)	342.5±24.9	301.4±44.2
DRE (250µg/ml)	344.3±14.0	298.1±16.4*
DRE (500µg/ml)	344.7±16.3	286.5±19.9

ZML : Zea Mays L, SBE: safflower blossom extract, SSE: safflower seed extract, DRE: Dipsasi Radix extract ^amean±s.d., *P<0,05 : vs. control, **P<0,01 : vs. control

추출물의 ALPase 활성증진효과는 MG63 cell 및 치주인대세포 모두에서, 125-500µg/ml의 농도 범위에서 대부분 유의한 변화를 보이지 않았다.

3. 홍화 및 속단추출물이 MG63 cell 및 치주인대세포의 PDGF-BB 수용체 발현에 미치는 영향

MG63 cell 과 치주인대세포 모두에서 IL1-β 투여에 의해 유의한 PDGF-BB 수용체의 발현 저하를 보였고, 각 약제에 투여에 의한 수용체발현의 변화정도는 표 3과 같다. MG63 cell에서는 홍화꽃(125, 250µg/ml) 및 홍화종자추출물(125-500µg/ml)에서 PDGF-BB 수용체의 유의한 발현증가가 나타났다. 치주인대세포에서도 홍화꽃 및 홍화종자추출물에서

PDGF-BB 수용체의 발현증가가 나타났지만, 500µg/ml 홍화꽃추출물 투여군과 125 및 250µg/ml의 홍화종자추출물에서만 유의한 증가효과를 보였고, MG63 cell에서 보다는 그 효과가 낮았다. 옥수수불검화추출물의 경우에는

표 3 Effects of safflower extracts and Dipsasi Radix extracts on the expression of ATCC MG63 human osteosarcoma cells and human periodontal ligament cells(by ¹²⁵I-PDGF-BB Binding assay).

Group	thymidine incorporation ^a (cpm)	
	MG63	PDL
¹²⁵ I-PDGF-BB	6833±536	5386±176
IL1-β+ ¹²⁵ I-PDGF-BB (10ng/ml)	5154±146 ⁺⁺	4401±181 ⁺⁺
IL1-β+ ¹²⁵ I-PDGF-BB+ ZML (125µg/ml)	5537±494	4881±221 ^{**}
IL1-β+ ¹²⁵ I-PDGF-BB+ ZML (250µg/ml)	5617±281 [*]	4089±331
IL1-β+ ¹²⁵ I-PDGF-BB+ ZML (500µg/ml)	5668±459	4669±269
IL1-β+ ¹²⁵ I-PDGF-BB+ SBE (125µg/ml)	6085±289 ^{**}	4848±164
IL1-β+ ¹²⁵ I-PDGF-BB+ SBE (250µg/ml)	6943±349 ^{**}	4812±424
IL1-β+ ¹²⁵ I-PDGF-BB+ SBE (500µg/ml)	5524±548	5073±520 [*]
IL1-β+ ¹²⁵ I-PDGF-BB+ SSE (125µg/ml)	5745±344 [*]	4722±56 [*]
IL1-β+ ¹²⁵ I-PDGF-BB+ SSE (250µg/ml)	6347±399 ^{**}	4930±308 [*]
IL1-β+ ¹²⁵ I-PDGF-BB+ SSE (500µg/ml)	6575±600 ^{**}	4714±393
IL1-β+ ¹²⁵ I-PDGF-BB+ DRE (125µg/ml)	5257±244	4709±292
IL1-β+ ¹²⁵ I-PDGF-BB+ DRE (250µg/ml)	5429±248	4951±590
IL1-β+ ¹²⁵ I-PDGF-BB+ DRE (500µg/ml)	5826±396 [*]	4487±380

ZML : Zea Mays L, SBE: safflower blossom extract, SSE: safflower seed extract DRE: Dipsasi Radix extract ^amean±s.d., ⁺⁺P<0,01 : vs. ¹²⁵I-PDGF-BB, *P<0,05 : vs. IL1-β+¹²⁵I-PDGF-BB, **P<0,01 : vs. IL1-β+¹²⁵I-PDGF-BB

MG63 cell에서는 500 μ g/ml투여군 그리고 치주인대세포에 대해서는 125 μ g/ml만이 투여군에서 유의한 증가효과를 보였으나 증가량은 많지 않다.

4. 홍화 및 속단추출물이 MG63 cell 및 치주인대세포의 화학주성에 미치는 영향

홍화 및 속단추출물에 의한 MG63 cell 및 치주인대세포에 대한 화학주성효과는 표 4와 같다. MG63 cell 에 대해, 홍화중자추출물은 125-500 μ g/ml 농도범위에서 대조군에 비해 유의한 화학주성효과를 보였으나 PDGF-BB에 비해서는 그 효과가 약하였다. 치주인대세포에 대해서도 홍화중자추출물에서 대조군에

표 4 Effects of safflower extracts and Dipsasi Radix extracts on the chemotacticresponse of ATCC MG63 human osteosarcoma cells and human periodontal ligament cells(in Boyden-type chamber)

Group	cell number ^a	
	MG63	PDL
control	10.3±2.4	9.7±2.1
PDGF-BB(20ng/ml)	31.0±5.1**	34.2±6.2**
ZML(125 μ g/ml)	9.7±2.6	12.5±2.7
ZML(250 μ g/ml)	8.0±3.1	8.8±3.5
ZML(500 μ g/ml)	9.3±2.4	8.3±3.3
SBE(125 μ g/ml)	10.3±2.2	13.1±3.4
SBE(250 μ g/ml)	7.0±2.3	9.7±2.6
SBE(500 μ g/ml)	11.3±3.2	21.4±3.2**
SSE(125 μ g/ml)	19.0±2.6*	21.6±2.6**
SSE(250 μ g/ml)	14.0±1.8*	14.5±2.1*
SSE(500 μ g/ml)	14.8±2.0*	26.2±4.3**
DRE(125 μ g/ml)	8.5±3.7	10.3±3.4
DRE(250 μ g/ml)	10.0±2.7	9.7±3.6
DRE(500 μ g/ml)	15.5±3.3	12.3±3.8

ZML : Zea Mays L, SBE: safflower blossom extract, SSE: safflower seed extract, DRE: Dipsasi Radix extract, ^amean±s.d., *P<0,05 : vs. control, **P<0,01 : vs. control

비해 유의한 화학주성효과를 보였다. 홍화중자추출물의 화학주성효과는 MG63 cell에서 보다는 치주인대세포에서 더 뚜렷하지만, PDGF-BB에 비해서는 역시 낮은 효과를 보이고 있다.

5. 홍화 및 속단추출물이 백서 두개골 결손부의 치유에 미치는 영향

각 약제의 경구투여에 의한 백서 두개골 결손부의 치유에 미치는 영향을 알아본 결과(표 5), 홍화중자추출물 0.35g/kg, day 투여군에서만 유의할 만한 신생골형성의 촉진효과가 확인되었다. 옥수수불검화추출물의 경구투여시, 대조군과 비교하여 신생골형성에서의 유의한 차이는 없었다. 홍화꽃추출물 및 속단추출물투여군에서도 신생골 형성에서 유의한 차이는 없었다.

약제 경구투여후 3주의 조직학적소견을 보면, 대조군, 홍화꽃추출물 및 속단추출물투여

표 5 Effects of safflower extracts and Dipsasi Radix extracts on the regeneration of rat calvarial defect(by histomorphometric analysis)

Group	3weeks, induced bone formation(mm ²) ^a
control	0.823±0.234
ZML 0.35g ⁺	0.852±0.257
SBE 0.02g	1.158±0.191
SBE 0.1g	1.071±0.243
SBE 0.35g	1.017±0.264
SSE 0.02g	0.768±0.267
SSE 0.1g	0.932±0.215
SSE 0.35g	1.845±0.225**
DRE 0.02g	0.784±0.283
DRE 0.1g	0.729±0.169
DRE 0.35g	0.864±0.313

ZML : Zea Mays L, SBE: safflower blossom extract, SSE: safflower seed extract, DRE: Dipsasi Radix extract, ⁺g/weight kg, day, ^amean±s.d., **P<0,01 : vs. control

군에서 결손부 내부에는 대부분 섬유성 결합 조직으로 치유되고 있으며 기존 골조직주변으로 약간의 신생골이 형성되고 있다(그림 1-3, 5). 홍화종자 추출물 0.35g/kg, day 투여군의 소견에서는, 골결손부 단면에서부터 중앙층으로 신생골 형성이 활발히 일어나고 있고, 중앙부의 섬유성결합조직으로 신생골이 자라면서 골유합이 진행되고 있다(그림 4).

IV. 총괄 및 고찰

본 연구에서는 홍화꽃 및 종자, 그리고 속단추출물이 조직재생측면에서 세포의 기능적 활성화에 미치는 효과를 평가하기 위하여, 치주인대세포와 조골세포의 표현형을 보이는 ATCC osteosarcoma MG63에 대한 세포활성도, ALPase활성도, PDGF-BB 수용체의 발현과 화학주성에 미치는 영향을 조사하였고, 골조직 치유증진효과를 알아보기 위하여, 인위적으로 두개골결손부를 형성한 백서에 각 약제를 경구 투여한 후 신생골 형성정도를 평가하였다. 실험결과, 홍화꽃 및 종자추출물에서 조골세포 및 치주인대세포의 기능적 활성화에 증진효과를 확인하였고, 홍화종자추출물에서 백서 두개골결손부의 신생골형성 촉진효과를 관찰하였다.

결손된 치주조직의 재생을 위해서는 치주인대세포의 증식 및 분화에 의한 신생골 형성 및 신생백악질의 형성, 그리고 기능적으로 배열된 치주인대의 재생이 필수적이라 하겠다. 이러한 측면에서 치주결체조직 내의 중요한 치유원인 치주인대세포 및 조골세포에 대한 기능적 활성화는 결손 치주조직의 재생에 필수적인 요소라고 할 수 있다. 따라서 본 연구에서 확인한 홍화추출물의 치주인대 및 조골세포의 기능적 활성화 및 골치유증진효과는 치주염에 의해 손상, 결손된 치주조직의 재생을 위한 약제로서의 응용가능성을 시사하는 것이라 하겠다. 홍화는 울혈(blood stasis)을

위한 치료제로써 오랜 기간 동양의학에서 전래되어 사용되어온 생약제제로, adenosine diphosphate에 의한 혈소판 응집억제를 통한 항응혈효과^{16, 17)}와 항염효과¹⁸⁾ 등이 확인된 바 있다. 이에 더해, 본 연구에서 확인된 세포의 기능적 활성화 효과와 신생골 형성촉진효과를 미루어 생각하면, 효과적인 치주조직의 재생제제로서의 효과를 기대할 수 있을 것으로 생각된다. 치주염이 염증질환이고 조직 파괴가 수반되는 만성질환임을 생각할 때, 홍화추출물의 이러한 효과는 치주염치료의 고전적인 기계적 해결방법에 더해 보조적으로 응용 가능한 경구투여약제로서의 시험가능성이 보인다고 할 수 있겠다. 속단은 동양의학에서 타박, 접골시나, 산부인과의 난산후¹⁹⁾ 등에 사용되어온 약제이나, 본 연구에서는 약간의 세포활성 증진효과가 확인되었을 뿐, 치주인대세포 및 조골세포의 조직재생측면의 기능적 활성화도에 별다른 효과가 확인되지 않았고, 골조직치유증진에도 유의한 효과를 발견할 수 없었다. 본 연구에서 양성대조군으로 사용한 옥수수불검화추출물의 경우 치주인대세포 및 조골세포에 대한 기능적 활성화 효과가 뚜렷하지 않을 뿐더러, 그동안 보고된 바³⁻⁵⁾와는 달리 골조직의 치유증진에도 별다른 효과가 확인되지 않고 있다. 이는 본 연구자들의 이전의 연구에 의해서도 확인된 바¹⁵⁾ 있고, 실제 임상적으로도 치주염치료제로서의 효과에 대한 신뢰성은 부족한 것으로 생각된다.

치주조직재생에 관련한 연구들의 중심은, 치주조직 치유원이 되는 치주인대세포 및 조골세포의 유주, 분화 및 기능적 활성화를 유도할 수 있는 인자들의 개발 및 임상적응용에 관련된 주제에 모아지고 있다. 치주조직 부착기구의 재생을 이해하기 위해서 많은 연구자들이 치주인대세포 및 골세포 등 치유원이 되는 세포들에 대한 세포수준의 연구를 통해, 조직재생을 위한 가장 중요한 세포작용은 세포의 증식, 분화, 유주 및 대사과정에 있

음을 이해하기 시작하고, 이런 과정을 조절하는 성장인자라 불리는 단백질의 존재를 확인하기에 이르렀다. 과거 10여년 동안 이런 성장인자의 분리 및 동정이 진척되어 치주조직 재생을 유도할 수 있는 물질로서의 응용에 관한 연구들이 진척되고 있다. 특히 여러 성장인자중, PDGF, IGF-1, 및 TGF- β 등이 단독 혹은 함께 작용하여, 치주인대세포와 치은 섬유아세포의 증식에 촉진효과가 있음이 알려지게 되었다²⁵⁻²⁷). 한편, IL-1 β , TNF- α 등의 염증매개인자에 의해 조골세포와 치주인대세포의 PDGF에 대한 반응성이 저하되며, 이것은 PDGF에 대한 수용체의 발현저하와 관련되는 것으로 이해되고 있다^{28, 29}). 결국 여러 성장인자들이 복합적으로 서로의 작용을 조절하며, 이들의 작용은 cytokine 등의 염증요인에 의해 저하될 수 있음을 알 수 있다. 본 연구의 결과를 보면, 홍화추출물이 치주인대세포 및 조골세포의 증식 및 활성화에 PDGF-BB에 비견할 증진효과를 보이고 있고, 화학주성에도 일부 효과를 나타내고 있으며, IL-1 β 에 의한 PDGF-BB receptor의 발현저하에 대해 회복효과도 나타내고 있는데, 이는 치주조직재생의 치유원인 치주인대세포와 조골세포의 재생기전에 중요한 부분을 담당할 수 있음을 보여주는 것이라 볼 수 있다. 성장인자를 이용한 치주치료의 응용방법으로 실제 치주수술시 국소적으로 투여하여 효과적인 결과를 얻은 동물실험의 보고들이 있지만, 투여용량이나, 투여담체, 그리고 타기관에 미칠 수 있는 영향 등에 관한 평가가 아직은 미진하고, 실제임상에서의 사용을 위한 경제성 등도 문제로 남아 있다. 이런 측면에서 생각할 때, 본 연구에서 평가한 홍화추출물과 같은 생약제제들은 안전하고 경제적이라는 점에서 장점을 가진다고 보겠다.

최근에 들어 경험적인 동양의학의 한계를 넘어, 전래되어 전해지는 여러 생약제제들에 대한 성분별 분획과 이들의 효과에 대한 과

학적인 접근이 시도되고 있고, 일부는 상당한 진척을 이루어 실제 임상에 사용할 수준에 이른 것들도 있다. 이들 생약제제는 과거 상당기간 검증되어온 안전성과 함께, 실제 임상 적용을 위한 경제적인 측면을 볼 때, 응용 가능한 약제로 생각된다. 본 연구에서는 실험실적으로 홍화추출물의 치주인대세포 및 조골세포에 대한 효과를 관찰하였고, 경구투여 후 골조직재생의 효과를 알아보았지만, 보다 조절된 결과를 위해서는 홍화꽃 및 종자추출물의 분획들에 대한 정확한 분석이 필요하며, 투여용량의 재조정에 의한 효과분석 그리고 두 추출물의 혼합투여시의 효과변화 등을 알아보는 것이 중요하다고 보겠다. 또한, 치주질환이 치주병원균에 의한 감염성 질환이라는 특성상, 치주질환세균에 대한 작용이나, 염증 발현 및 진행 등에 대한 영향 등이 평가되어야 할 것으로 생각된다.

V. 결론

홍화 및 속단추출물의 세포활성에 미치는 영향을 알아보고자, 치주인대세포 및 ATCC MG63 human osteosarcoma cell을 이용하여 각 약제의 투여에 의한 세포활성도, ALPase 활성도, PDGF-BB 수용체 발현도, 및 화학주성에 대한 각 약제의 효과를 평가하였고, 백서의 두개골 결손부 치유에 미치는 각 생약추출물의 골재생효과를 평가하여, 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. MG63 cell에 대해 125-500 μ g/ml의 홍화꽃 및 종자추출물과 속단추출물이 세포활성 증진효과를 보였으며, 치주인대세포에 대해서는 250-500 μ g/ml의 홍화꽃 및 종자추출물에서 세포활성증진 효과를 보였다. MG63 cell 및 PDL cell 모두 홍화추출물의 세포활성 증진효과가 가장 높았다.

2. MG63 cell에 대해 250 및 500 μ g/ml의 홍화꽃추출물이 유의한 ALPase활성 증진 효과를 보였으며, 치주인대세포에 대해서는, 250 및 500 μ g/ml의 홍화종자추출물에서 ALPase활성 증진효과를 보였다.
3. MG63 cell에서는 125 및 250 μ g/ml의 홍화꽃추출물과 250 및 500 μ g/ml의 홍화종자추출물이 유의한 PDGF-BB 수용체의 발현증가를 보였고, 치주인대세포에서는 500 μ g/ml 홍화꽃추출물과 250 및 500 μ g/ml의 홍화종자추출물이 유의한 효과를 보였다.
4. 125-500 μ g/ml 농도범위에서 홍화종자추출물이 MG63 cell 및 치주인대세포에 대한 유의한 화학구성효과를 보였다.
5. 백서 두개골 결손부의 치유에 미치는 영향에서, 홍화종자 추출물 0.35g/kg, day 투여군에서 유의한 신생골형성 촉진효과를 보였다.

본 연구에서 관찰된 홍화추출물의 치주인대 세포 및 조골세포에 대한 기능적 활성화효과와 골조직재생 촉진효과를 미루어 생각할 때, 치주조직재생을 위한 제제로서 홍화추출물의 응용가능성을 기대할 수 있을 것으로 생각된다.

VI. 참고문헌

1. Takata T : Oral wound healing concepts in periodontology. *Curr Opin Periodontol* 1994:119-127
2. Garrett S : Early wound healing stability and its importance in periodontal regeneration, pp41-51 In AM Polson(ed), *Periodontal regeneration : Current status and Directions*, Quintessence Publishing Co., U.S.A. 1994
3. Chaput A, Krikorian K, Brion M, Labie

- C, Perrault M : Effect of Insadol on experimental periodontal disease in hamster. *Revue Francaise d'odontostomatologiques* 1971, 18-9: 1145-1154
4. Kerebel B, Cleargeau-Guerithault S, Brion M : Ultrastructural study of experimental periodontal disease in golden hamster. *Rev Mens Suisse Odonto-Stomatol* 1974, 84:145-154
5. Porte J, Durand B, Libourel P, Perdrix G, Parret J : Clinical and ultrastructural study of the action of unsaponifiable cornseed oil in a case of periodontolysis in man. *Osteocytic balance. Actual Odontostomatol(Paris)* 1978, 121:125-139.
6. 민원기, 이만섭 : Ascorbic acid 와 Zea Mays L의 불검화 정량추출물이 치주염 치유에 미치는 영향에 관한 실험적 연구. *대한치주학회지* 1988, 18:6-23
7. 최상묵, 한수부, 황광세 : Zea Mays L의 불검화 정량추출물(DENTADOL)이 외과적 치주치료후 치유에 미치는 효과에 관한 임상적 연구. *대한치주학회지* 1989, 19:63-70
8. 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
9. Osawa K, Matsumoto T, Yasuda H, Kato T, Naito Y, 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

10. 이승렬, 정종평, 최상묵, 배기환 : 천연물추출물의 치주병인균에 대한 항균효과 및 세포독성에 관한 연구. 대한치주과학회지 1992, 22:515-526
11. 장범석, 손성희, 정종평, 배기환 : Magnolol 과 Honokiol이 항균, 교원질분해효소, 세포독성 및 cytokine 생산에 미치는 영향. 대한치주과학회지 1993, 23:145-158
12. Chang BS, Lee YM, Ku Y, Bae KH, Chung CP : The antibacterial activities of magnolol and honokiol against periodontopathic microorganism. Planta Med In Press.
13. 정종평, 구영, 배기환 : 후박 및 은행엽추출물의 항균, 항염 및 세포활성도에 미치는 영향. 대한치주과학회지 1995, 25:478-486
14. 양창호, 이용무, 조기영, 배기환, 정종평 : 대조추출물이 치은섬유아세포의 생물학적 활성화에 미치는 영향. 대한치주과학회지 1994, 24:144-154
15. 양창호, 류인철, 최상묵, 정종평 : 치은섬유아세포와 치주인대세포의 형태와 화학주성에 미치는 대조추출물의 효과에 관한 연구. 대한치주과학회지 1995, 25:279-289
16. 조기영, 이용무, 최상묵, 정종평 : 생약추출물이 IL-1 β 의 생성 및 활성화에 미치는 영향. 대한치주과학회지 1995, 25:386-396
17. 이용무, 구영, 배기환, 정종평 : 후박 및 대조추출 혼합물이 골조직 재생에 미치는 영향. 대한치주과학회지 1997, 27:165-178
18. Hiroshi Kutsuna, Seisiro Fujii, Kenji Kitamura, Kazuo Komatsu, Motokyo Nakano : Identification and determination of platelet aggregation inhibitor from safflower(*Carthamus tinctorius* Linné. Yakukaku Zasshi 1988, 108:1101-1103
19. Shen D, Shen L, Wang AL : Effect of xiaoyu pian on new platelet aggregation defect. Chung Kuo Chung Hsi Chieh Ho Tsa Chih 1994, 10:589-591.
20. Akihisa T, Yasukawa K, Onimura H, Kasahara Y, Yamanouchi S, Takido M, Kumaki K, Tamura T : Triterpene alcohols from the flowers of compositae and their anti-inflammatory effects. Phytochemistry 1996, 43:1225-1260.
21. 難波 恒雄, 和漢藥百科圖監, 保育社, 大板 1993 pp185-186.
22. Mosmann T : Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : application to proliferation and cytotoxic assays. J Immunol Methods 1983, 65:55-63
23. Graves DT, Antonades N, Williams SR, Owen AJ : Evidence for functional platelet-driven growth factor receptors on MG-63 human osteosarcoma cells. Cancer Res 1984, 44:2966-2970.
24. Adellmann-Grill BC, Cully Z : Signal perception of fibroblast for directional migration to platelet-driven growth factor in Boyden-type chambers J Cell Physiol 1990, 143:172-177.
25. Oates TW, Rouse CA, Cochran DL : Mitogenic effects of growth factors on human periodontal ligament cells in vitro J Periodontol 1993, 643:142-148.
26. Piche JE, Graves DT : Study of the growth factor requirement of human bone driven cells : a comparison with human fibroblast. Bone 1989, 10:131-138
27. Dennison DK, Vallone DR, Pinero GJ,

- Rittman B, Caffesse RG : Differential effect of TGF- β 1 and PDGF on proliferation of periodontal ligament cells and gingival fibroblast. J Periodontol 1994, 65:641-648.
28. Kose KN, Xie JF, Graves DT : The inhibition of PDGF- α receptor expression by interleukin-1(IL-1) in osteoblastic cells is enhanced by tumor necrosis factor J Dent Res 1995, 74(special issue):319.
29. Oates T, Tran M, Cochran D : IL-1 modulation of the effect of PDGF-AA on human periodontal ligament cell J Dent Res 1995, 74(special issue):377.

사진부도 설명

그림 1 control after 3 weeks of healing.

Between the wound edges, the defect is filled with a thin loosely organized connective tissue. Limited bony repair is localized to the defect rim. OB=old bone of the defect rim, NB=new bone, CT=connective tissue(Masson-trichrome stain: original magnification ×5)

그림 2 unsaponifiable Zea Mays L.(0.35g/kg, day) after 3 weeks of healing.

The main part of the defect is still filled with a loose, fibrous connective tissue. Limited bony repair is localized to the defect rim. OB=old bone of the defect rim, NB=new bone, CT=connective tissue, V=mid-sagittal vessel(Masson-trichrome stain: original magnification ×5)

그림 3 safflower blossom extract(0.35g/kg, day) after 3 weeks of healing.

A little new bone from the margin is growing into the defect center. However, the main part of the defect is still filled with a loose, fibrous connective tissue. OB=old bone of the defect rim, NB=new bone, CT=connective tissue(Masson-trichrome stain: original magnification ×5)

그림 4 safflower seed extract(0.35g/kg, day) after 3 weeks of healing.

The significant bone regeneration has advanced from the margin. The newly formed bone is substituting for connective tissue which was filled with the defect. OB=old bone of the defect rim, NB=new bone, CT=connective tissue, V=mid-sagittal vessel (Masson-trichrome stain: original magnification ×5)

그림 5 Dipsasi Radix extract(0.35g/kg, day) after 3 weeks of healing.

A little new bone has advanced from the margin. However, the main part of the defect is still filled with a loose, fibrous connective tissue. OB=old bone of the defect rim, NB=new bone, CT=connective tissue, V=mid-sagittal vessel (Masson-trichrome stain: original magnification ×5)

사진부도(1)



그림 1

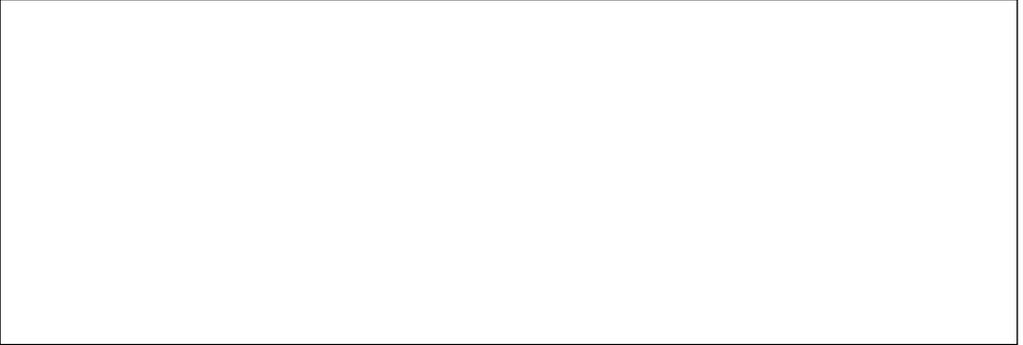


그림 2

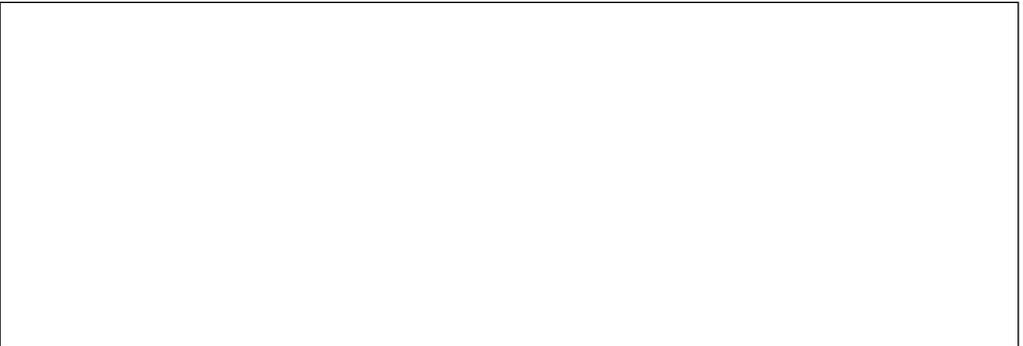


그림 3

사진부도(Ⅱ)



그림 4

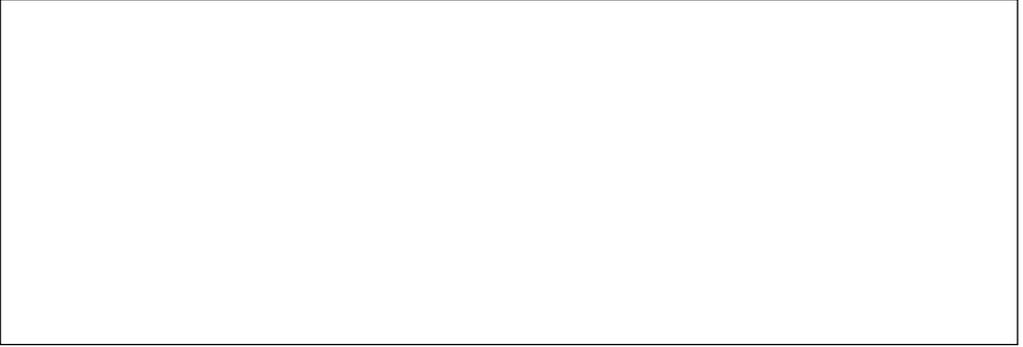


그림 5

The biologic effects of safflower(*Carthamus tinctorius* Linné) extract and Dipsasi Radix extract on periodontal ligament cells and osteoblastic cells

In-Chul Rhyu¹, Yong-Moo Lee¹, Young Ku¹, Ki-Whan Bae² and Chong-Pyoung Chung¹

¹Department of Periodontology, College of Dentistry, Seoul National University

²College of Pharmacy, Chung-Nam National University

Safflower(*Carthamus tinctorius* Linné) has been traditionally used for the treatment of blood stasis, and Dipsasi Radix has been used as a drug for fracture in Chinese medicine. The purpose of present study was to examine the biologic effects of safflower extract and Disasi radix extracts on the periodontal ligament cells and osteoblastic cells and on the wound healing of rat calvarial defect. The ethanolic extract of safflower blossom, safflower seed and Dipsasi Radix(125, 250, and 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$) were prepared as test group, and PDGF-BB(10ng/ml) and unsaponifiable fraction of Zea Mays L.(125, 250, and 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$) were employed as positive control. The effects of each agents on the growth and survival, ALPase activity, expression of PDGF-BB receptor, chemotactic response of PDL cell and ATCC human osteosarcoma MG63 cells in vitro were examined. The tissue regenerative effect of each extracts was evaluated by histomorphometric measuring of newly formed bone on the 8mm defect in rat calvaria after oral administration of 3 different dosages groups : 0.02, 0.1 and 0.35g/kg, per day. It was also employed the same dosages of unsaponifiable fraction of Zea Mays L. as positive controls. Safflower blossom extract, safflower seed extract, and Dipsasi Radix extract stimulate the cellular activity of MG63 cells in concentration range of 125-500 $\mu\text{g}/\text{ml}$, and safflower bolssom extract and safflower seed extract stimulate also the cellular activity of periodontal ligament cells in concentration range of 250-500 $\mu\text{g}/\text{ml}$. In activity of ALPase, 250-500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of safflower blossom extracts showed significant stimulating effects on MG63 cells, and the same concentration range of safflower seed extracts showed significant effect on periodontal ligament cells. In the recovery on PDGF-BB receptor expression which was depressed by IL-1 β , 125-250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of safflower blossom extracts and 250-500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of safflower seed extracts showed significant increasing effect on MG63 cells, and 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of safflower blossom extract and 250-500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of safflower seed extracts showed significant effect on periodontal ligament cells. In chemotactic response, among all tested group, safflower seed extracts only were chemotactic to MG63 cells and periodontal ligament cells in concentration range of 125-500 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Also in the view of bone regeneration in rat calvarial defect model, the only group that was orally administrated 0.35g/kg, day of safflower seed

extract showed significant new bone formation. These results suggested that safflower extracts might have a potential possibilities as an useful drug for adjunct to treatment for regeneration of periodontal defect.

key word: safflower(*Carthamus tinctorius Linné*), blossom extract, seed extract; Dipsasi Radix extract; cellular activity, ALPase activity, PDGF-BB receptor expression, chemotactic activity; bone regeneration; drug, periodontal regeneration.