

# 백서 태자 두개관세포에서 인삼 사포닌에 의한 MMP-13 mRNA 발현 억제

김양이<sup>1</sup> · 최득철<sup>2,3</sup> · 김영준<sup>1,3</sup>

전남대학교 치과대학 치주과학교실<sup>1</sup>

전남대학교 대학원 치의학과<sup>2</sup> 및 치의학연구소<sup>3</sup>

## I. 서론

치주조직에 존재하는 세포외기질은 기저막 교원질, fibronectin, laminin 및 proteoglycan core protein 등의 단백질로 구성되어 있는데 치은에는 60% 이상, 치조골에는 유기질의 90% 이상이 교원질에 의한 세포외기질로 구성되어 있다.<sup>1)</sup>

치주질환은 치조골 흡수를 동반한 결합조직의 소실이 특징적인데, 이는 치은연하 치태 내 세균과 숙주의 염증반응의 결과로 분비되는 염증성 물질들이 치은섬유모세포, 치주인대 세포, 골모세포 등의 치주조직 내에 존재하는 세포들을 자극하여 교원질 분해 효소인 matrix metalloproteinases(MMPs)를 방출시키고 활성화시켜 치은의 결합조직을 분해하고 치조골의 파괴하기 때문이다.<sup>2-4)</sup>

세포간질 분해에 관여하는 MMPs는 정상적인 발생 과정, 혈관 생성 및 상처치유에 관여하고 세포간질의 파괴가 진행되는 전이암과 관절염, 치주염 등의 질병에 관여하는 것으로 알려져 있다.<sup>5,6)</sup> 이들 MMPs는 기질 특이성에 따라 interstitial collagenase(MMP-1, -8, -13), gelatinase(MMP-2, -9), stromelysin

(MMP-3, -10, -11)로 나누어진다.<sup>5-7)</sup> 이 중 치주질환 병소와 관련이 있는 것으로는 MMP-1, -2, -3, -8, -9, -13 등으로 알려져 있다.<sup>5,6)</sup>

MMP-13은 collagenases-3으로도 알려져 있으며 치주인대 세포,<sup>8)</sup> 연골모세포<sup>9)</sup>나 골모세포<sup>10)</sup>등에서 주로 분비된다. MMP-13의 기능은 골내 유기질의 주성분인 type I collagen뿐만 아니라 type II collagen의 분해에 관여하여 골 개조에 중요한 역할을 담당한다.<sup>11)</sup> MMP-13은 치주적으로 건강한 부위보다는 치주염증이 있는 부위에서 유의하게 더 높게 나타나며 특히 치은 출혈과 같은 임상적 지수와 양성의 상관관계가 있다.<sup>12,13)</sup> 또한 3 mm 이상의 골소실이 관찰되는 임플란트 주위 열구액 내의 MMP-13은 건강한 부위에서보다 유의하게 더 높게 나타나는 보고<sup>14)</sup>등으로 미루어 보아 MMP-13은 치주질환의 진행과 치조골 흡수에 관련이 있다고 생각된다. 따라서 이 MMP-13의 발현을 억제시키는 약물의 개발이나 발견은 치주질환과 periimplantitis의 진행을 차단시킬 수 있을 것으로 생각된다.

MMPs의 발현을 조절하는 대표적인 약물로는 tetracyclines을 들 수가 있다. Golub 등<sup>15)</sup>은 dox-

\* 교신저자: 김영준, 광주광역시 동구 학동 5 전남대학교 치과대학 치주과학교실, 우편번호: 501-757  
E-mail: youngjun@jnu.ac.kr

ycycline은 치은조직에서 MMP-8의 발현을 억제시키며 따라서 치주조직의 파괴를 차단시킬 수 있는 약물이라고 하였으며 Shlopov 등<sup>16)</sup>도 doxycycline이 연골아세포에서 MMP-13의 발현을 감소시키며 연골성 관절의 보호에 유효하다고 보고하였다. 그러나 tetracyclines의 장기복용은 상주균의 교란 및 기회감염의 위험성이 높고 전신적인 부작용이 나타날 수 있다.<sup>17,18)</sup> 따라서 전신적인 부작용과 독성이 없는 안전한 약물의 개발이 필요하며 최근 우리나라 고유의 생약제재의 항균, 항염증 효과 및 collagenase 활성 억제에 관한 연구가 이루어지고 있다.<sup>19-21)</sup>

고려인삼(Panax ginseng)은 약 2000년 전부터 식품으로 뿐만 아니라 약학적으로도 널리 사용되어 왔으며 현재는 한방, 의학적으로도 그 가치를 인정받고 있다. 인삼에 관한 꾸준한 연구로 현재까지 여러 활성 약리성분들이 밝혀졌으며, 또 이들 약리성분의 작용에 대한 활발한 연구가 진행되고 있다. 인삼의 약리학적 효능은 중추신경계, 심장혈관, 그리고 면역시스템에서 밝혀진 바 있으며, 이 뿐만 아니라 다른 많은 부분에 있어서도 그 약학적 효능이 있는 것으로 발표되고 있다.<sup>22-25)</sup>

분자 생물학의 발달과 함께 인삼의 효능에 대한 세포 수준의 유전자 발현 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다. 인삼사포닌이 면역세포나 간세포 유전자 발현에 미치는 효과가 glucocorticoid 신호 전달체계를 통하여 이루어지며 면역세포들의 cytokine mRNA의 발현에도 영향을 미친다.<sup>26)</sup> 따라서 지금까지 보고된 인삼사포닌의 여러 약리적 기능들을 고려할 때 전골모세포(preosteoblast)로 알려진 백서 태자 두개관세포에서 인삼사포닌이 pro-inflammatory cytokines와 다른 자극인자들에 의한 MMP-13의 발현을 조절할 수 있을 것으로 생각된다. 이에 본 연구에서는 인삼사포닌이 proinflammatory cytokine인 IL-1 $\beta$ 와 골흡수와 관련된 hormone인 parathyroid hormone으로 자극된 백서 두개관세포에서의 MMP-13 mRNA 발현에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

## II. 실험재료 및 방법

### 1. 백서 두개관세포의 분리 및 배양

백서 두개관세포는 McCarthy 등<sup>27)</sup>의 방법을 변형한 순차소화효소기법을 이용하여 분리 배양하였다. 태령 20-21일째의 백서 태자를 모체로부터 무균적으로 적출하고 태자의 두부로부터 두개관을 절제하여 골막과 연조직을 제거하였다. 절제한 두개관은 수술용 가위로 세절한 후 0.2% collagenase(Gibco BRL, U.S.A.)를 함유한 bone cell buffer(1 M NaCl, 0.3 M HEPES, 0.125 M CaCl<sub>2</sub>, 0.5 M Mannitol, 0.1 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; pH 7.4) 1.5 ml과 함께 교반하면서 37°C, 15분간 소화시켰다. 3번의 소화과정 중에 얻어진 세포 현탁액은 버리고 4번째와 5번째의 세포현탁액을 모아서 1000xg에서 10분간 원심분리한 후 Bone cell buffer로 세척하고 다시 원심분리하여 분리된 세포를 수집하여 배양하였다. 수집된 세포들은 75 ml 플라스크에 10% fetal bovine serum(FBS; GibcoBRL, U.S.A.) 및 1% antibiotic-antimycotic solution(GibcoBRL, U.S.A.)이 첨가된 BGJb media(GibcoBRL, U.S.A.)에 배양하였다. 배양액은 3일 간격으로 교환하였으며 배양시 습도는 100%, 온도는 37°C, 95%의 공기와 5%의 CO<sub>2</sub>를 계속 공급하였다. 실험에는 계대배양 1번째와 2번째 것을 이용하였다.

### 2. 배양접시내 인삼 사포닌의 적용

본 실험에서는 국내에서 재배한 6년생 수삼(Panax ginseng C.A. Meyer)으로 만든 홍삼(red ginseng; Ginseng radix rubra)에서 정제하여 추출한 글라이코사이드(glycoside) 일종인 인삼총사포닌(ginseng total saponins; total ginsenosides)을 연구재료로 사용하였으며, 한국인삼연구연구원(Korea Ginseng and Tobacco Research Institute, Daejeon, Korea)에서 제공받았다. 인삼 사포닌은 DMSO에 녹여서 사용하였다. 인삼 사포닌은 0~500mg/ml의 stock solution을 준비하였고, 배지 내 최종농도가

0, 10, 25, 50, 100, 250, 500  $\mu\text{g}/\text{i}$  되도록 하였다. 대조군은 인삼 사포닌을 적용하지 않은 군을, 실험군은 해당 농도의 인삼 사포닌을 적용한 군으로 하였다.

### 3. MTT assay

계대배양 1세대와 2세대의 백서 두개관세포를 0.25 % trypsin-EDTA(GibcoBRL, U.S.A.)용액으로 처리하여 분리한 후 well당  $1 \times 10^4$ 개의 세포수가 되게 하여 96 well plate에 접종한 후 배양하였다. 세포가 약 70%정도의 밀생에 도달되었을 때 2% FBS가 포함된 BGJb(GibcoBRL, U.S.A.) 배양액으로 교환하고 해당농도의 인삼 사포닌을 첨가하였다. 배양 1일 후와 3일 후에 MTT assay를 시행하였다. 각 well에서 배양액을 제거하고 생리식염수로 2회 세척 후 Non-Radioactive Cell Proliferation Assay kit(Promega, U.S.A.)를 이용하여 제조사의 지시대로 3-(4,5-dimethyl-thiazole-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide 용액 50  $\mu\text{l}$ 를 첨가하고 4시간 동안 배양하였다. 반응을 정지시키기 위하여 여기에 20 $\mu\text{l}$ 의 10% SDS를 첨가한 후 ELISA plate reader(Microplate manager<sup>®</sup> BioRad, U.S.A)로 파장 490nm에서의 흡광도를 측정하였다. 해당농도의 인삼 사포닌에 대한 세포활성도 평가는 대조군에 대한 백분율로 표시하였다.

### 4. mRNA 발현 검사

#### 1) 총 RNA 추출

100 mm dish(Corning, U.S.A)에 백서 두개관세포를 분주하고 10% FBS가 함유된 BGJb 배지에 배양하였다. 세포가 밀생에 도달하면 8시간 이상 deinduction 후에 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도의 인삼사포닌으로 1시간 동안 전처치를 시행하고 IL-1 $\beta$ (1.0 ng/ml)나 PTH (10 nM)를 첨가 후 16-18시간 동안 배양하였다.

RNA의 분리는 배양액을 제거하고 2.0ml의 Trizol<sup>®</sup>(Promega, U.S.A) 용액을 첨가하여 분리된 세

포를 1.8ml tube에 수집하였다. 200 $\mu\text{l}$ 의 chloroform을 첨가하여 RNA를 용해시킨 후 4 $^{\circ}\text{C}$ , 12,000 rpm에서 10분간 원심 분리하였다. 상층액을 취한 후 500  $\mu\text{l}$  isoprophyl alcohol을 첨가하여 RNA를 침전시키고 4 $^{\circ}\text{C}$ , 10,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 상층액을 제거하였다. 분리한 RNA는 Tris-EDTA buffer 40 $\mu\text{l}$ 에 녹인 후 Spectrophotometer(SmartSpec<sup>™</sup>, BioRad, U.S.A.)로 그 양을 측정하였으며 -70 $^{\circ}\text{C}$  냉동고에 보관하였다.

#### 2) 역전사 중합효소연쇄반응(Reverse transcriptase-polymerase chain reaction; RT-PCR)

추출된 총 RNA 중 5  $\mu\text{g}$ 을 Superscript II(GIBCOBRL, U.S.A.)를 이용하여 70  $^{\circ}\text{C}$ 에서 10분, 42  $^{\circ}\text{C}$ 에서 70분, 37  $^{\circ}\text{C}$ 에서 15분 동안 역전사 반응을 유도하여 cDNA를 합성하였다.

백서의 cDNA 염기서열에 의거하여 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(GAPDH), matrix metalloproteinase-13(MMP-13) primer를 제작한 후(Figure 1), PCR 완충용액 5  $\mu\text{l}$ , 1.5 mM  $\text{MgCl}_2$  3  $\mu\text{l}$ , 10 mM dNTP mix 1  $\mu\text{l}$ , 각각의 primer 2.5  $\mu\text{l}$ , 5 unit Taq polymerase 0.2  $\mu\text{l}$ , cDNA 2  $\mu\text{l}$ 와 3차 증류수를 넣어 50  $\mu\text{l}$ 가 되게 하여 Thermal cycler(Perkin Elmer, U.S.A.)를 이용하여 증폭하였다. 증폭된 PCR 산물들을 1.5% agarose gel에서 전기영동을 시행하여 얻은 유전자 영상을 Gel Image Analysis System(QualityOne<sup>®</sup>, BioRad, U.S.A)에서 house keeping gene인 GAPDH의 발현을 기준으로 각 primer의 유전자 발현 정도를 평가하였다.

### 5. 통계학적 분석

모든 실험은 3회 시행하였으며 실험에서 얻어진 수치는 one-way ANOVA와 Duncan 법을 시행하였다.

### PCR primers

Primer	Expected base pairs	Sequence (5'-3')
MMP-13-sense (+)	328	GACTTCACGATGGCATTGCTG
MMP-13-antisense (-)		GCATCAACCTGCTGAGGATGC
GAPDH-sense (+)	418	CACCATGGAGAAGGCCGGGG
GAPDH-antisense (-)		GACGGACACATTGGGGGTAG

### PCR programs

MMP-13	94 °C 1 min	94 °C 1 min	55 °C 2 min	72 °C 1 min	72 °C 10 min
	30 Cycles				
GAPDH	94 °C 1 min	94 °C 1 min	60 °C 2 min	72 °C 1 min	72 °C 10 min
	25 Cycles				

Figure 1. Amplification primer sets and conditions used in polymerase chain reaction. GAPDH indicates glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; MMP-13, matrix metalloproteinase-13.

## III. 결 과

### 1. 세포 활성화 검사

조골세포의 세포활성도 실험에서 인삼 사포닌 농도 1 $\mu$ g/ml에서는 24시간과 72시간에서 세포 활성이 대조군에 비해 다소 증가하는 경향을 보였고, 농도 10~100 $\mu$ g/ml에서는 24시간에 대조군에 비해 세포 활성이 감소하였지만, 그 차이가 유의하지는 않았다. 그러나 인삼 사포닌 농도 250 $\mu$ g/ml 이상에서 24~72시간에서 세포활성이 유의하게 저하되어 세포독성을 나타내었다( $p < 0.01$ ).

### 2. 인삼사포닌이 백서 두개관세포에서 MMP-13 mRNA 발현에 미치는 영향

IL-1 $\beta$ 와 PTH으로 자극된 백서 두개관세포는 MMP-13 mRNA 발현율이 대조군에 비하여 각각 3.5

배, 4배의 증가를 보였다. 인삼 사포닌 100  $\mu$ g/ml으로 전처리 후 IL-1 $\beta$ 로 자극시 대조군에 비하여 1.6배 증가하였으며 이는 IL-1 $\beta$ 로만 자극한 군(3.5배)과 비교하여 약 54% 감소되었다. 그러나 인삼 사포닌으로 전처리 후 PTH로 자극한 군에서 MMP-13 mRNA 발현은 PTH로만 자극한 군과 별다른 차이가 없었다.

## IV. 총괄 및 고찰

치주질환은 치은연하 세균에 의하여 시작되는데, 세균과 숙주간의 상호반응의 결과 치은 결합조직의 파괴가 일어나며 이때 분비되는 염증성 물질들에 의하여 치조골의 파괴가 일어난다.<sup>2-6)</sup> 치조골은 골형성과 골흡수가 계속적으로 일어나는 조직으로 여기에는 골모세포와 파괴세포가 관여한다. 이중 골모세포는 골형성에 중요한 역할을 담당하는 세포이지만, 또한 MMP-13과 같은 골흡수와 관련된 여러 가지 물질들을 분비한다.

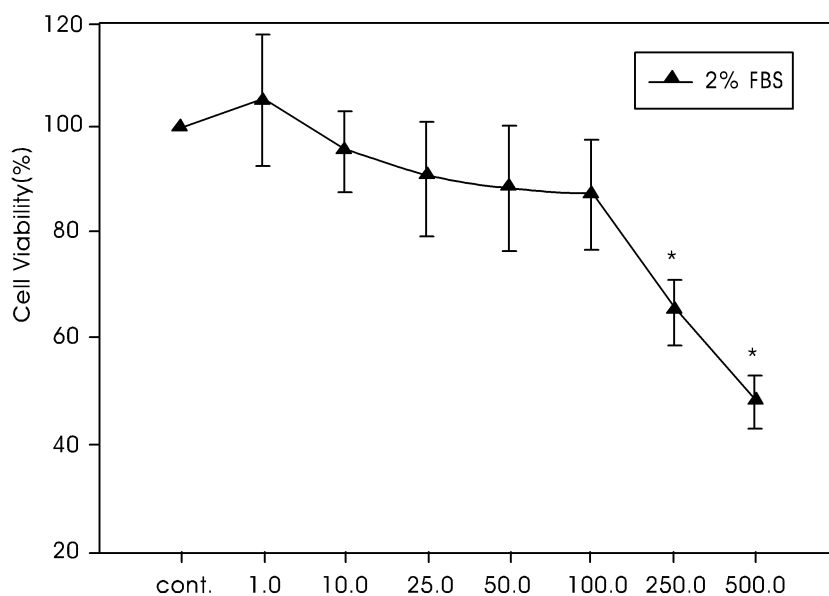


Figure 2. MTT assay for primary rat calvarial cell viability with Ginseng saponin(mg/ml) at 24 hours. \*: indicates significantly difference with control group( $p < 0.01$ ).

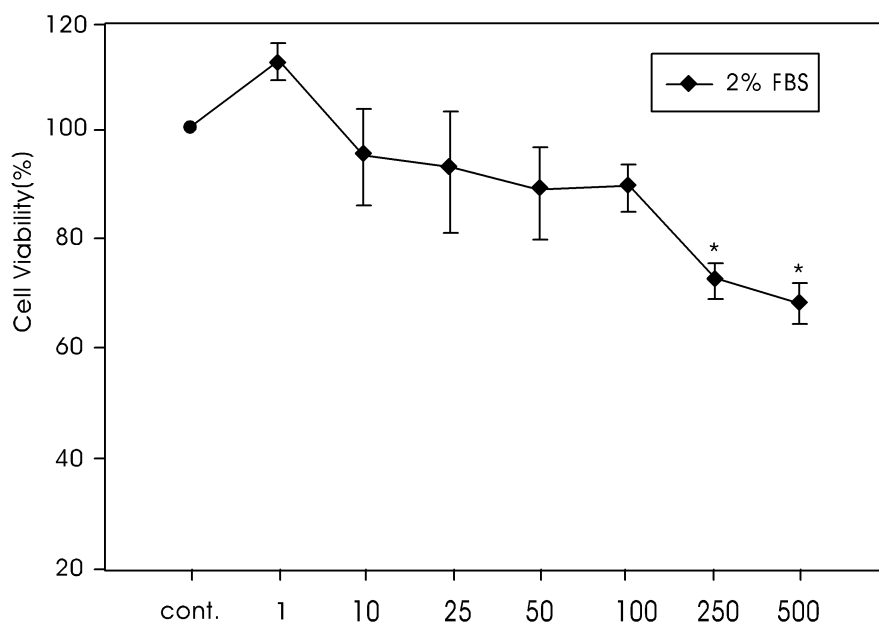


Figure 3 . MTT assay for primary rat calvarial cell viability with Ginseng saponin (mg/ml) at 72 hours. \*: indicates significantly difference with control group ( $p < 0.01$ ).

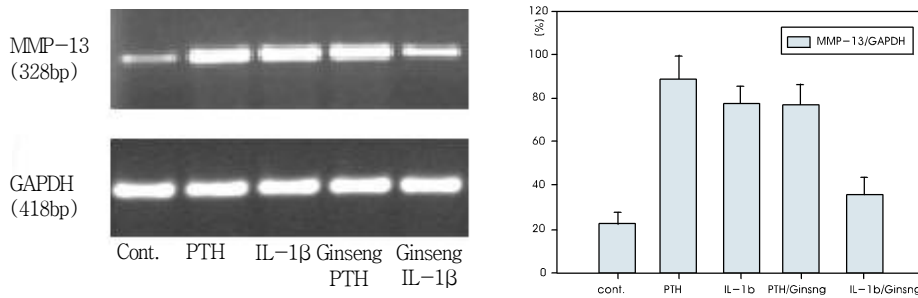


Figure 4. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction(RT-PCR) analysis of matrix metalloproteinase-13(MMP-13) and glyceral-dehyde-3-phosphate dehydrogenase(GAPDH) messenger RNA expression in primary rat calvarial cells.

MMP-13 mRNA 발현은 상피세포, 치주인대 세포, 골모세포 등 여러 세포에서 그 발현이 보고되었다. 대부분의 세포에서 정상적으로는 collagenase가 잘 발현되지 않지만, 여러 가지 자극인자들, 즉 성장인자, cytokines, tumor promoters, 그리고 골흡수 인자들에 의하여 그 발현이 조절되는 것으로 알려져 있다. 즉 insulin-like growth factor I과 II, TGF- $\beta$ 1 및 bone morphogenetic protein-2 등은 MMP-13의 발현을 억제<sup>28-30)</sup>시키고 다른 cytokines인 IL-1, IL-6, PTH, tumor necrosis factor  $\alpha$  등은 골모세포나 연골아세포에서 MMP-13의 발현을 증가<sup>31-33)</sup>시키는 것으로 알려져 있다. 이들 세포에 의한 MMP-13의 합성과 억제의 균형이 깨지는 경우에 연골이나 골의 파괴로 이어지며 따라서 MMP-13의 발현을 억제시키는 약물의 개발은 치주질환을 포함한 염증성 골질환 진행을 차단시킬 수 있을 것으로 생각된다.

MMP-13의 발현을 억제시키는 대표적인 약물로는 tetracyclines을 들 수가 있다. Shlopv 등<sup>16)</sup>은 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 doxycycline을 osteoarthritic chondrocyte에 적용시 MMP-13발현이 현저하게 억제되었다고 하였다. 또한 Li 등<sup>34)</sup>도 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 doxycycline을 인간의 각막 상피세포에 적용시 MMP-13 유전자 발현과 활성을 억제시켰다고 하여 각각의 세포에 따른 doxycycline 농도 차이가 있지만 MMP-13의 활성을 억제시킴을 알수가 있다. 그러나 doxycycline의 치주질환 원인균주에 대한 유효

항균 농도는 4-8  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 보고되며 따라서 Shlopv 등의 연구에 사용된 doxycycline의 농도는 치주질환에 적용하기에 높은 농도라고 할 수가 있다.

인삼은 중추신경계, 심장혈관계, 내분비계등에 다양한 기능을 나타내고 있으며, 특히 항염증 효과와 암세포의 활성화와 전이억제 효과 등 보호작용이 있는 것으로 알려져 있다.

인삼 사포닌은 여러 암세포에 대한 세포독성 효과가 있을 뿐만 아니라 MMP-2, MMP-9의 발현을 조절함으로써 고형암의 전이를 억제시키는데 이는 glucocorticoid receptor의 translocation을 통하여 조절된다.<sup>35,36)</sup> 또한 cytokine-induced MMP-9, MMP-1의 발현억제도 glucocorticoid와 관련된다는 보고<sup>37)</sup>도 있다. 따라서 인삼 사포닌에 의한 MMPs 억제와 관련된 연구들을 종합해 보면 인삼 사포닌이 골모세포에서 MMP-13의 억제효과도 있을 것으로 추정된다. 이에 본 연구는 인삼사포닌이 조골세포의 MMP-13 유전자 발현에 미치는 영향을 평가하여 치조골 흡수를 동반하는 치주질환 및 염증성 골질환을 억제시킬 수 있는 약물의 기능성을 평가하고자 하였다.

MTT assay 결과, 1일에 백서 두개관세포의 활성도는 인삼 사포닌 농도 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상에서는 대조군에 비해 유의한 감소를 보였으며 3일에서도 인삼 사포닌 농도 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상에서 세포활성도가 유의하게 감소하였다( $p < 0.01$ ). 이는 고농도의 인삼 사

포닌은 세포의 활성을 감소시키며 cytotoxic effect가 있음을 의미한다. 그러나 인삼 사포닌 농도 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 세포활성도가 대조군에 비해 다소 증가하는 경향을 보였다. 이는 인삼 사포닌 0.1~1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 사람의 치주인대 세포에 투여시 대조군에 비해 세포 활성이 증가하였다는 kim 등<sup>38)</sup>의 보고와 유사하였다. 또한 Kanzaki 등<sup>39)</sup>은 인삼사포닌이 피부 섬유모세포의 TGF- $\beta$  수용기에 변화를 주어 fibronectin의 합성을 증가시킨다고 보고하였는데, 이 fibronectin은 골모세포의 부착, 이주 및 증식을 선택적으로 촉진시킨다.<sup>40)</sup> 따라서 저농도(1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )의 인삼 사포닌의 투여시 백서 두개관세포의 활성이 증가했던 이유로는 fibronectin 합성 능력의 증가와 관련이 있는 것으로 생각된다. 그러나 이번 연구에서 고농도의 인삼 사포닌은 세포의 활성을 억제시키고 세포 독성을 나타내었으며 시간 경과에 따른 인삼 사포닌 투여 효과도 비슷한 경향을 보였다.

인삼사포닌이 백서 두개관세포에서 MMP-13 mRNA 발현에 미치는 영향을 RT-PCR로 관찰한 결과, IL-1 $\beta$ 와 PTH으로 자극된 두개관세포는 MMP-13 발현율이 대조군에 비하여 각각 3.5배, 4배의 증가를 보였다. 인삼 사포닌 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 으로 전처치 후 IL-1 $\beta$ 로 자극시 MMP-13 mRNA 발현율은 IL-1 $\beta$ 로만 자극한 군과 비교하여 54%의 감소율을 보였으나 인삼 사포닌으로 전처치 후 PTH로 자극한 군에서는 MMP-13 mRNA 발현율이 감소하지 않았다. 이는 인삼 사포닌이 IL-1 $\beta$ -induced MMP-13의 발현을 억제시키지만 PTH에 의한 MMP-13의 발현은 억제시키지 않음을 의미하며, 인삼 사포닌이 여러 다른 자극들에 대하여 서로 다른 반응을 나타냄을 의미한다. 본 실험에서는 인삼에 의한 IL-1 $\beta$ 에 의해 유도된 MMP-13의 발현이 억제되는 명확한 기전은 밝히지 못했다. 그러나 cytokine-induced MMP-9, MMP-1의 발현억제가 glucocorticoid 활성화에 의한 것이라는 보고들<sup>35,36)</sup>과, 인삼 사포닌이 glucocorticoid receptor 및 그와 관련된 신호체계를 통하여 영향을 준다는 보고<sup>23)</sup>로 미루어 보아 인삼 사포닌에 의한 IL-1 $\beta$ -induced

MMP-13 mRNA 발현 억제도 인삼 사포닌이 백서 두개관세포에 glucocorticoid와 유사한 작용을 증진시킨 결과 때문으로 추정된다. 그러나 Kanzaki 등<sup>39)</sup>에 의하면 인삼 사포닌은 TGF- $\beta$  수용기 및 TGF- $\beta$ 1의 양적인 증가를 유도하며 따라서 증가된 TGF- $\beta$ 에 의한 MMP-13 mRNA 발현 억제 가능성도 배제할 수가 없어 향후 정확한 억제 기전에 대한 연구가 필요하리라 생각된다. 인삼 사포닌은 PTH 유도 MMP-13 mRNA 발현에는 영향을 주지 않았는데 이는 인삼 사포닌이 백서 두개관세포에서 MMP-13 발현시 신호 전달 체계상에서 서로 다른 영향을 주기 때문으로 생각된다. 즉, 인삼 사포닌은 glucocorticoid와 유사한 양식으로 일부 특정한 responsive element를 통하여 작용하기 때문에, 여러 가지 서로 다른 자극인자에 의한 인삼 사포닌의 MMP-13 발현 조절 역시 서로 다른 신호 전달 경로를 따를 것으로 추정되지만 이와 관련된 더 많은 연구가 필요하리라 사료된다.

이 연구는 치대 세균에 대한 숙주의 면역반응 및 염증반응의 결과로 치은 및 치조골을 파괴시키는 교원질 분해효소인 MMP-13의 발현을 인삼 사포닌이 조절할 수 있는지를 평가하고자 하였다. 본 연구 결과 인삼 사포닌은 조골세포에서 proinflammatory cytokine인 IL-1 $\beta$ 유도 MMP-13 mRNA 발현을 억제시켰으며 이는 인삼 사포닌이 치조골의 흡수를 억제시키는 유용한 치료 약물이 될 수 있음을 시사하였다. 그러나 이 연구에서는 인삼 사포닌에 의한 MMP-13 발현 억제에 대한 자세한 기전을 규명하지는 못하였으므로 향후 인삼 사포닌에 의한 IL-1 $\beta$  유도 MMP-13 유전자 발현 억제와 관련된 세포 신호 전달 인자들의 규명이 필요하리라 생각된다.

## V. 결 론

치주질환은 세균의 내독소에 대한 숙주의 면역반응시 분비되는 여러 가지 교원질 분해 효소에 의하여 치은과 치조골의 파괴가 나타난다. 따라서 교원질 분해 효소의 발현을 억제시키는 약물의 개발은

치주질환의 진행을 차단시킬 수 있을 것으로 생각된다. 인삼 사포닌이 갖고 있는 여러 가지 약리학적 기능을 고려해볼 때 교원질 분해 효소인 matrix metalloproteinases의 발현을 조절할 수 있을 것으로 생각된다. 이에 본 연구에서는 인삼 사포닌이 치조골 파괴를 동반하는 치주염과 매식치 주위염의 진행에 중요한 MMP-13 mRNA 발현에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

인삼 사포닌의 농도는 1, 10, 25, 50, 100, 250, 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 하였으며 백서 두개관세포는 계대배양 1-2세대의 것을 이용하였다. 해당농도의 인삼 사포닌을 백서 두개관세포에 적용하고 1일과 3일 후에 세포 활성을 MTT assay를 통해 관찰하였으며 MMP-13 mRNA 발현을 RT-PCR을 통해 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 백서 두개관세포에 대한 세포독성은 인삼 사포닌의 농도 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서는 24시간과 72시간에 세포활성이 유의하게 감소하였다 ( $p<0.01$ ).
2. interleukin-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )과 parathyroid hormone(PTH)의 자극에 의하여 MMP-13 mRNA 발현이 아무 처리도 하지 않은 대조군에 비하여 각각 3.5배, 4배 증가하였다.
3. 인삼 사포닌(100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )으로 전처리시 IL-1 $\beta$  단독 처리에 의해 유도된 MMP-13 mRNA 발현에 비하여 50% 감소하였으나, PTH에 의해 유도된 MMP-13의 유전자 발현은 억제시키지 못했다.

이상의 결과 인삼 사포닌은 백서 두개관세포에서 IL-1 $\beta$ 에 의해 유도되는 MMP-13 발현을 조절하여 염증성 골흡수를 억제시키므로써 치주질환의 진행을 차단시킬 수 있을 것으로 생각된다.

## VI. 참고문헌

1. Wilson TG and Kornman KS: Fundamentals of periodontics. Quintessence

- publishing Co., Illinois 1996:61-107.
2. Meikle MC, Atkinson SJ, Ward RV, Murphy G, Reynolds JJ: Gingival fibroblasts degrade type I collagen films when stimulated with tumor necrosis factor and interleukin-1: Evidence that breakdown is mediated by metalloproteinases. J Periodont Res 1989;24:207-213.
3. Meikle MC, Heath JK, Reynolds JJ: Advances in understanding cell interactions in tissue resorption: Relevance to the pathogenesis of periodontal diseases and a new hypothesis. J Oral Pathol 1991;15:239-250.
4. Van der Zee, Everts V, Beertsen W: Cytokine-induced endogenous procollagenase stored in the extracellular matrix of soft connective tissue results in a burst of collagen breakdown following its activation. J Periodont Res 1996;31:483-488.
5. Birkedal-Hansen H: Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases. J Periodontol 1993;64:474-484.
6. Reynolds JJ and Meikle MC: Mechanism of connective tissue matrix destruction in periodontitis. Periodontology 2000 1997;14:144-157.
7. Mauviel A: Cytokine regulation of metalloproteinase expression. J Cell Biochem 1993;53:288-295.
8. Nishikawa M, Yamaguchi Y, Yoshitake K, Saeki Y: Effects of TNF alpha and prostaglandin E2 on the expression of MMPs in human periodontal ligament fibroblasts. J Periodontal Res 2002;37



- (3):167-76.
9. Tetlow LC and Woolley DE: Comparative immunolocalization studies of collagenase 1 and collagenase 3 production in the rheumatoid lesion, and by human chondrocytes and synoviocytes in vitro. *Br J Rheumatol* 1998;37:64-70.
  10. Rydziel S, Varghese S, Canalis E: Transforming growth factor  $\beta$ 1 inhibits collagenase 3 expression by transcriptional and post-transcriptional mechanisms in osteoblast cultures. *J Cell Physiol* 1997;170 :145-152.
  11. Kusano K, Miyaura C, Inada M, Tamura T, Ito A, Nagase H, Kamoi K, Suda T: Regulation of matrix metalloproteinases(MMP-2, -3, -9, and -13) by interleukin-1 and -6 in mouse calvaria: Association of MMP induction with bone resorption. *Endocrinology* 1998;139:1338-1345.
  12. Golub LM, Lee HM, Greenwald RA, Ryan ME, Sorsa T, Salo T, Giannobile WV: A matrix metalloproteinase inhibitor reduces bone-type collagen degradation fragments and specific collagenases in gingival crevicular fluid during adult periodontitis. *Inflamm Res* 1997; 46:310-319.
  13. Kiili M, Cox SW, Chen HY, Wahlgren J, Maisi P, Eley BM, Salo T, Sorsa T, Chen HW: Collagenase-2(MMP-8) and collagenase-3(MMP-13) in adult periodontitis: molecular forms and levels in gingival crevicular fluid and immunolocalisation in gingival tissue. *J Clin Periodonto* 2002;29:224-232.
  14. Ma J, Kitti U, Teronen O, Sorsa T, Husa V, Laine P, Ronka H, Salo T, Lindqvist C, Konttinen YT: Collagenases in different categories of periimplant vertical bone loss. *J Dent Res* 2000;79:1870-1873.
  15. Golub LM, Sorsa T, Lee HM, Ciancio S, Sorbi D, Ramamurthy NS, Gruber B, Salo T, Konttinen YT: Doxycycline inhibits neutrophil(PMN)-type matrix metalloproteinases in human adult periodontitis gingiva. *J Clin Periodontol* 1995 :22:100-109.
  16. Shlopov BV, Stuart JM, Gumanovskaya ML, Hasty KA: Regulation of cartilage collagenase by doxycycline. *J Rheumatol* 2001;28:835-842.
  17. Llavaneras A, Ramamurthy NS, Heikkilä P, Teronen O, Salo T, Rifkin BR, Ryan ME, Golub LM, Sorsa T.: A combination of a chemically modified doxycycline and a bisphosphonate synergistically inhibits endotoxin-induced periodontal breakdown in rats. *J Periodontol* 2001;72:1069-77.
  18. Rodrigues RM, Goncalves C, Souto R, Feres-Filho EJ, Uzeda M, Colombo AP.: Antibiotic resistance profile of the subgingival microbiota following systemic or local tetracycline therapy. *J Clin Periodontol* 2004;31:420-7.
  19. Osawa K, Matsumoto T, Yasuda H, Kato T, Naito Y, Okuda K: The inhibitory effect of palnt extracts on the collagenolytic activity and cytotoxicity of human gingival fibroblasts by *Porphyromonas gingivalis* crude enzyme. *Bull Tokyo Dent Coll.*1991;32:1-7.
  20. 장범석, 손성희, 정종평, 배기환: Magnolol과 Honokiol이 항균, 교원질분해효소, 세포독성

- 및 cytokine 생산에 미치는 영향. 대한치주과 학회지 1993;23:145-158.
21. 송기범, 공영환, 유형근, 신형식: 황련이 lipopolysaccharide를 처리한 치주인대 세포의 세포활성 및 IL-6 생산에 미치는 영향. 대한치주과학회지 1996;26:641-654.
22. 이승기: 고려인삼의 효능연구(최종 결과 보고서) 한국담배인삼공사 1996:81.
23. 이승기: 고려인삼의 효능연구(최종 결과 보고서) 한국담배인삼공사 1997:81.
24. 김낙두: 홍삼의 약리작용. J Ginseng Res 2001;25:2-10.
25. Kumar A: Immunomodulatory response induced by ginseng. J Ginseng Res 2003;27:115-119.
26. 조영동: 인삼성분의 임상적 효능과 생화학적 작용기전. J Ginseng Res 2001;25:19-25.
27. McCarthy TL, Centrella M, Canalis E: Further biochemical and molecular characterization of primary rat parietal bone cell culture. J Bone Min Res 1988;3:401-408.
28. Rydziel S, Delany AM, Canalis E: Insulinlike growth factor I inhibits the transcription of collagenase 3 in osteoblast cultures. J Cell Biochem 1997;67:176-183.
29. Rydziel S, Varghese S, Canalis E: Transforming growth factor beta 1 inhibits collagenase 3 expression by transcriptional and post-transcriptional mechanisms in osteoblast cultures. J Cell Physiol 1997;170:145-152.
30. Varghese S and Canalis E: Regulation of collagenase-3 by bone morphogenetic protein-2 in bone cell cultures. Endocrinology 1997;138:1035-1040.
31. Uchida M, Yamato H, Yamagiwa H, Fujieda A, Murayama H, Fukumoto S: Parathyroid hormone increases the expression level of matrix metalloproteinase-13 in vivo. J Bone Miner Metab 2001;19:207-212.
32. Mengshol JA, Vincenti MP, Coon Ci, Barchowsky A, Brinckerhoff CE: Interleukin-1 induction of collagenase 3 gene expression in chondrocytes requires p38, JNK, and nuclear factor  $\kappa$ B. Arthritis and Rheumatism 2000;43:801-811.
33. Tetlow LC, Adlam DJ, Woolley DE: Matrix metalloproteinase and proinflammatory cytokine production by chondrocytes of human osteoarthritic cartilage: associations with degenerative changes. Arthritis Rheum 2001;44:585-594.
34. Li de Q, Shang TY, Kim HS, Solomon A, Lokeshwar BL, Plugfelder SC: Regulated expression of collagenases MMP-1, -8, and -13 and stromelysins MMP-3, -10, and -11 by human corneal epithelial cells. Invest Ophthalmol Vis Sci 2003;44:2928-2936.
35. Park MT, Cha HJ, Jeong JW, Kim SI, Chung HY, Kim ND, Kim OH, Kim KW: Glucocorticoid receptor-induced down-regulation of MMP-9 by ginseng components, PD and PT contributes to inhibition of the invasive capacity of HT-1080 human fibrosarcoma cells. Mol Cells 1999;9:476-83.
36. Fujimoto J, Sakaguchi H, Aoki I, Toyoki H, Khatun S, Tamaya T: Inhibitory effect of ginsenoside-Rb2 on invasiveness of uterine endometrial cancer cells to the basement membrane. Eur J Gynaecol Oncol 2001;22:339-41.

37. Eberhardt W, Schulze M, Engels C, Klasmeier E, Pfeilschifter J: Glucocorticoid-mediated suppression of cytokine-induced matrix metalloproteinase-9 expression in rat mesangial cells: involvement of nuclear factor-kappaB and Ets transcription factors. *Mol Endocrinol* 2002;16:1752-1766.
38. Kim I, Kim Jk, Lee JH: The effect of Korean red ginseng saponin on the growth and differentiation of human periodontal ligament cell in culture. *J Korean Acad Periodontol* 1995;25:45-55.
39. Kanzaki T, Morisaki N, Shiina R, Saito Y. Role of transforming growth factor- $\beta$  pathway in the mechanism of wound healing by saponin from Ginseng Radix rubra. *Brit J Pharmacol* 1998;125:255-262.
40. Meyer U, Meyer T, Jones DB: Attachment kinetics, proliferation rates and vinculin assembly of bovine osteoblasts cultured on different pre-coated artificial substrates. *J Mater Sci Mater Med* 1998; 9:301-307.

## Inhibition of MMP-13 mRNA expression by ginseng saponin in fetal rat calvarial cells

Yang-Yi Kim<sup>1</sup> · De-Zhe Cui<sup>2,3</sup> · Young-Joon Kim<sup>1,3</sup>

Dept. of Periodontology<sup>1</sup>, Graduate School, Dept. of Dental Science<sup>2</sup>,  
and Dental Science Research institute<sup>3</sup>, Chonnam National University

There is a potential role of collagenase-3 in alveolar bone loss and periodontal disease progression, we need to develop or find chemotherapeutic drugs or herbal agents which may regulate the expression of MMP-13. Ginseng saponin, one of the major components of Korea ginseng (*panax ginseng*) root, has many various biologic effects, such as cytotoxic effect, tumoricidal effects, cytokine regulations, and protein biosynthesis effect. The purpose of this study was to determine the effects of Korea red ginseng saponin on MMP-13 gene expression in osteoblasts.

The experimental groups were cultured with ginseng saponin in concentration of 1.0, 10, 25, 50, 100, 250 and 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  for MTT assay. Primary rat calvarial cells were pre-treated for 1 hour with ginseng saponin (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) and then stimulated with IL-1 $\beta$  (1.0 ng/ml) and PTH (10 nM). MMP-13 gene expression was evaluated by RT-PCR.

### The results were as follows:

Ginseng saponin was cytotoxic to osteoblast at concentration exceeding 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$  for longer than 24 hours in tissue culture ( $p < 0.01$ ). In RT-PCR analysis, steady state MMP-13 mRNA levels were increased approximately 350% by IL-1 $\beta$ , and 400% by PTH when normalized to untreated control. IL-1 $\beta$ -induced MMP-13 mRNA expression was reduced 50% by pre-treatment with ginseng saponin. But ginseng saponin didn't inhibit MMP-13 expression from PTH stimulated cells.

This results suggest that ginseng saponin inhibit IL-1 $\beta$ -induced MMP-13 mRNA expression.

---

**keywords** : ginseng saponin, MMP-13, RT-PCR, primary rat calvarial cell