

홍화인 추출물이 골 형성에 미치는 영향에 관한 실험실적 연구

이성진 · 최호철 · 선기종 · 송제봉 · 피성희 · 유형근 · 신형식

원광대학교 치과대학 치주과학교실

I. 서론

치주질환 치료의 목적은 치주조직 내 염증의 제거와 치주조직 파괴의 중단은 물론이고 치주질환으로 인해 파괴되어 소실된 치주조직의 원상회복이라고 볼 수 있다.¹⁾

치주질환이 진행됨에 따라 발생하는 치조골 결손부의 재생을 위해 사용되고 있는 술식으로는 질환에 이환된 연조직과 하부 치조골을 절제하고 성형하여 생체의 자가 재생능력을 기대하는 방법과 골조직이나 골 대체물을 이식하는 방법, 그리고 치주인대세포의 다양한 분화능력을 이용한 치유형태인 조직유도 재생술등이 있다.²⁾

골 이식술은 1980년대에 인공 이식재의 개발로 인하여 술식이 비교적 간단해졌으며, 이식재의 종류도 다양해져 임상에 급속히 보급되어 사용되고 있다.³⁾

골 이식술에 사용되는 골 이식재를 공급원에 따라 분류하면, 자가골, 동종골, 이종골, 합성골로 나눌 수 있다. 자가골 이식술은 가장 이상적이나 골 채취량의 한계, 부가적 수술, 골 채취 시 공여 부위의 손

상 및 시술 후 합병증 발생 가능성 등의 단점이 있다.⁴⁾

동종골은 사체의 골을 동결, 동결건조, 탈회동결 건조 및 방사선 조사를 통하여 제조된 골로써 공여부는 불필요하고, 충분한 양을 공급받을 수 있다는 점에서 자가골의 단점을 보완하고 있으나,⁵⁾ 다른 개체의 조직을 사용함으로 인한 질병전염의 가능성이 논란이 되고 있고, 숙주의 면역기능에 의한 거부 반응이 보고 되기도 한다.⁶⁾ 이종골과 합성골은 구조와 성분이 골과 유사하지만 성장인자나 골 형성 촉진인자를 가지고 있지 않아서 골 이식술시 골 형성 능력이 적다고 알려져 있다.⁷⁾

골 형성의 주된 세포성분으로 알려진 골모세포는 골 기질을 합성하는 간엽세포로서 파골세포에 의한 골 흡수 조절자로 알려져 있으며 치조골 기질을 형성하는 골모세포의 분화와 증식은 여러 가지 호르몬과 같은 전신적인 인자, 그리고 cytokine, 성장인자와 같은 국소적인 인자에 의하여 조절된다.⁸⁾ 치주조직재생에 관여하는 세포의 증식과 분화에 관여하는 전신적, 국소적 인자와 더불어 최근에는 손상된 치주조직을 재생시키기 위한 새로운 생약제제에 대한

* 이 논문은 2004년도 원광대학교의 교비 지원에 의해서 수행됨.

교신저자 : 신형식, 전북 익산시 신용동 344-2 원광대학교 치과대학 치주과학 교실, 우편번호 : 570-749

관심이 증가되고 있는데 이를 이용하여 치주조직을 재생시키는 물질의 연구가 이루어지고 있다.

치주 영역에서 사용할 수 있는 생약제제들은 옥수수불검화 추출물^{9,10)} 치주인대의 재생, 치은의 각화도 증진, 치아동요도의 감소 및 치조골 재생의 효과가 있음이 알려졌으며, Sanguinaria 추출물¹¹⁾ 연구되어 치약 등에 함유물로 사용되고 있으나 임상 효과에 대해서는 여전히 논란의 대상이 되고 있다. 최근에는 후박, 대조, 은행잎 등의 항균효과, IL-1 β 및 PGE2 생산차단효과, 치은섬유아세포활성화 증진의 효과가 확인된바 있다.¹²⁾

본 연구에 사용된 홍화인은 홍화(잇꽃, Safflower, *Carthamus tinctorius* L.)의 씨로써, 울혈을 위한 치료제로 오랜기간 동양의학에서 전래되어 사용되어온 생약제제로 골절, 파골, 쇄골은 물론 각종 골 질환과 연관한 뼈의 강화에 놀라운 효과를 발휘하는 것으로 알려져 민간요법으로 사용되고 있다^{13,14)}. 또한 홍화는 혈소판 응고를 억제하고 출혈시간을 지연시키는 작용이 있을 뿐 아니라 linoleic acid의 함량이 높아 혈중 콜레스테롤 저하작용을 나타낸다고 보고 되고 있다.¹⁵⁾

류 등¹⁶⁾은 홍화인의 에탄올 환류추출물을 치주인대세포와 조골세포에 투여시 세포활성도, 화학구성, 알칼리성 인산분해효소 활성이 증가됨을 밝혔고 이 추출물을 경구 투여했을 때 백서 두개골 결손부의 치유에서 신생골 형성을 보고하였다. 또한 김 등¹⁷⁾은 백서 두개골에 골결손부를 형성하고 홍화인 추출물을 국소투여 하였을 때 창상치유와 신생골 형성에 효과적으로 작용함을 보고하였고, 송 등¹⁸⁾은 홍화인식이균에서 혈장의 Ca/P ratio가 낮게 유지됨으로써 홍화인의 섭취가 골의 Ca침착을 도와주어 신생골이 촉진되었음을 보고하였다.

본 연구의 목적은 상기와 같은 홍화인 추출물의 다양한 약리 효과 중 골 조직의 형성에 미치는 영향을 태아 골모세포에 홍화인을 적용하여 간접적으로 알아보고, 나아가 이를 토대로 치주조직 재생 과정을 촉진시키는 약제개발에 있어서 홍화씨의 적용 가능성을 알아보기 위하여 시행하였다.

II. 연구 재료 및 방법

1. 연구재료

1) 세포배양

사람의 태아골모세포주(hFOB 1.19 ; American Type Culture Collection, Manassas, VA)를 10 % fetal bovine serum(FBS, GibcoBRL, Grand island, NY, USA)과 0.03 mg/ml G-418(Duchefa, Netherlands)이 첨가된 DMEM : F-12 HAM 1:1 Mixture(Sigma, St.Louis, MO, USA) 2ml가 담긴 6-well 배양접시에 적정세포(5×10^4 cell/well)를 분주하였다. 이를 34°C의 온도 및 100% 습도조건에서 95%의 공기와 5% CO₂를 계속 공급하면서 배양하였다. 배양액은 세포가 충분한 증식이 일어날 때까지 2일 간격으로 교환하였고 계대 배양은 1:3의 비율로 시행하였다.

2) 홍화인 추출물의 준비

건조한 홍화인 100g을 분말형태로 분쇄하여 프라스크에 증류수 1000ml에 넣고 가열, 여과한 후 1500rpm의 rotary evaporator로 농축한 다음 냉동건조기로 동결건조하여 8.3g의 분말을 얻어 사용하였다. 분말 1g을 증류수 10ml에 섞어 stock solution을 만들어 농도별로 희석하였으며 직경 0.2 μ m의 syringe filter(Nalgen company, USA)로 여과, 멸균하여 사용하였다.

2. 연구방법

1) 세포증식 측정

배양접시에서 배양된 밀생에 도달한 단층의 세포들을 0.25% trypsin/EDTA로 분리해 내었다. 혈구계수기로 세포 수를 세어 24-well plate에 각 well당 2×10^4 개의 세포가 들어가도록 분주하였다. 사람의 태아골모세포주는 24시간 동안 34°C의 온도 및 100% 습도, 95% 공기와 5% CO₂를 계속 공급하면서 배양하였고 24시간 후 부착되지 않은 세포들

은 교환배지에 의해 제거되었다. 약제처리 후 1, 3, 7일 동안 배양한 후, MTT(3-[4,5 - dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide; Sigma, USA)용액 300 μ l를 각각의 well 에 첨가하였으며 그 후 4시간 동안 배양되었다. 배양 후 배지를 제거하고 200 μ l의 dimethyl sulfoxide (DMSO; Junsei, Japan)를 첨가하여 형성된 formazan 결정을 용해시킨 후, 96-well plate 상으로 옮겨서 ELISA 분석기(Spectra MAX 250, Molecular Devices Co., Sunnyvale, CA, USA)로 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

매 실험마다 세포활성도를 대조군에 대한 백분율로 산출하였으며, 각각의 실험은 3회 반복시행하였다.

2) Cell spreading 측정

각각의 조건에 맞게 준비된 hFOB 1.19를 fibronectin으로 coating된 plate에 2 \times 10⁵개씩 들어가도록 분주한 뒤 34 $^{\circ}$ C incubator에서 45분간 배양하였다. 배양된 세포를 1 \times PBS로 세척하고 2 \times Fixation Solution(8% formaldehyde, 10% sucrose in PBS)으로 30분 동안 고정시켰다. 고정 후 1 \times PBS로 여러 번 세척한 다음, 50 μ l boric acid에 crystal violet이 녹아 있는 용액을 50ml씩 넣어 주고 15분 동안 실온에서 염색하였다. 멸균된 증류수로 조심스럽게 세척하여 공기 중에서 건조시키고 현미경을 이용하여 spreading된 세포 수를 각각 측정하였다.

3) 교원질 합성량 측정

사람의 태아골모세포주의 총 교원질 합성량을 측정하기 위해 hydroxyproline 함량이 측정되었다. 세포 내 각각의 hydroxyproline을 측정하기 위해 Rojkind(1979)등의 방법을 변형하여 실시하였다.¹⁹⁾

6-well 배양접시에 각각 1 \times 10⁶개의 세포가 들어가도록 분주한 후 10% FBS와 0.03mg/ml G-418이 첨가된 DMEM : F-12 HAM 1:1 Mixture를 단일 밀생층에 도달할 때까지 2일 간격으로 교환하면서 배양하였다. 단일밀생층에 도달한 상태에서 각각의 실험

군(1 μ g, 10 μ g, 100 μ g, 1mg)을 3일 동안 배양하였다. 일정기간 배양된 세포를 각 재료별로 배양한 배지와 세포를 구분지어 수거하였고, 배양 배지내에 죽은 세포를 제거하기 위해 1,500rpm에서 5분간 원심 분리한 후 10N HCl 3ml를 첨가하고, 각 세포는 trypsin-EDTA로 분리시켜 원심 분리한 후 상층액은 제거하고 3ml 6N HCl을 첨가하였다. 110 $^{\circ}$ C에서 10-24 시간 가수분해 시킨 다음 각 시료를 여과하였다. 시료는 duplication하여 100 μ l씩 취하였다. 완전히 건조시킨 다음 methanol 50 μ l을 가하고 남아있는 염산이 제거될 때까지 60 $^{\circ}$ C에서 incubation하였다. 1.2ml 50% isopropanol을 넣어 남은 침전물을 용해하고, 200 μ l chloramin-T 용액과 섞어 10분간 방치하였다. 1.2ml의 Ehrlich 반응 시약을 넣어 섞은 후, 50 $^{\circ}$ C에서 90분간 배양한 다음 상온에서 식힌다. 교원질 합성량 측정은 standard curve(0.0, 0.2, 0.4, 0.8, 1.0, 1.5 μ g/ml)을 표준 지표로 하여 558nm에서 흡광도를 spectrophotometer(Beckman, DU-650, USA)로 측정하였다.

4) 염기성 인산분해효소(Alkaline Phosphatase, ALP) 활성 측정

사람의 태아골모세포주를 6-well 배양접시에 1 \times 10⁵cell/well이 되도록 분주한 후, 10% FBS가 첨가된 DMEM/F-12 1:1 Mixture에서 단일 밀생층이 형성될 때까지 34 $^{\circ}$ C, 100% 습도, 5% CO₂ 공기 혼합 배양기에서 배양하였다. 단일 밀생층이 형성된 후 배지를 제거하였다. DMEM/F-12 1:1 Mixture로 2회 세척 후, 10% FBS, G-418 항생제, 50 μ l/ml ascorbic acid, 10mM sodium β -glycerophosphate가 첨가된 DMEM/F-12 1:1 Mixture에 음성 대조군에는 증류수를 첨가하고, 양성대조군에는 10 $^{-7}$ M dexamethasone을 첨가하고, 실험군은 1 μ g, 10 μ g, 100 μ g, 1mg농도의 홍화인 추출물을 첨가한 후 추가로 3일 동안 각각 배양하였다. 일정배양시간이 지난 후 배지를 제거하고, trypsin-EDTA로 세포를 분리 후, 1,500rpm에서 6분간 원심 분리하였다. 상층액을 제거하고 0.2ml의 멸균된 증류수를 첨가하여

Alkaline phosphatase (475bp)	5'-CGTTCTCATACCAGGAAATGAGCTT-3' 5'-CTCTCCAGAACATCACCCCTGCC-3'
Osteocalcin (310bp)	5'-CATGAGAGCCCTCACA-3' 5'-AGAGCGACACCCTAGAC-3'

Table 1. Uucleotide sequence of the primer used for RT-PCR.

	Temp.	Time
Predenaturation	94℃	5min
Denaturation	94℃	1min
Annealing	55℃	2min
Polymerization	72℃	1min
	25cycle	

Table 2. The PCR condition used in this study

초음파 분쇄기로 현탁하였다. 각 세포 현탁액 0.1mℓ에 0.1M glycine NaOH buffer(pH 10.4) 0.2mℓ, 15mM 의 p-nitrophenyl phosphate(pNPP;Sigma, USA) 0.1mℓ, 0.1% triton X-100/saline 0.1 mℓ와 멸균된 증류수 0.1mℓ를 잘 혼합하여, 이 반응물을 37℃에서 30분간 배양하였다. 0.1N NaOH를 0.6 mℓ 첨가함으로써 이들 반응을 중지시켰다. 배양된 세포는 96-well 배양접시에 옮기고, p-NPP의 가수분해는 410nm 파장의 ELISA reader에서 흡광도의 차이로 나타내며, p-nitrophenol(p-NP;Sigma, U-SA)을 기준 값으로 이용하였다. 단백질농도는 BCA protein assay reagent(Pierce, USA)를 사용하여 측정하였으며, AL- P 활성도는 nM/30min/mg of protein으로 표시하였다.

5) 칼슘축적 측정

6-Well 배양접시에 1×10^5 개의 세포가 들어가도록 분주한 후 각각 적정농도로 21일간 배양하였다. Extracellular matrix mineralization을 유도하기 위해 19일째 되는 날, 4mM/L NaHPO_4 를 첨가해서 배양하였으며 Alizarin red sulfate(AR-S, Sigma) 염색 방법을 사용하였다. 21일이 된 배지를 제거하고, PBS로 세척하였다. Ice-cold 70% ethanol로 한시간 동안 4℃에서 고정하고 ethanol를 제거한 후

40mM/L AR-S(pH 4.2)로 실온에서 10분 동안 염색하였다. AR-S 용액을 제거하고 멸균증류수로 조심스럽게 3회에 걸쳐 세척하였다. 염색된 부분을 육안으로 비교 관찰하기 위하여 digital color camera (Nikon E995, Nikon Corporation, Japan)로 촬영을 한 후, 이를 계량적으로 비교하기 위하여 10 mM/L sodium phosphate(pH 7.0)에 10%(w/v) cetylpyridinium chloride가 녹아있는 용액을 이용해 염색부위를 녹여 AR-S의 농도를 562nm의 흡광도에서 읽었으며 AR-S standard curve는 같은 용액을 사용하였다.

6) 역전사 중합효소 반응(Reverse transcriptase polymerase chain reaction, RT-PCR)

6 well plate의 hFOB 1.19에 10^{-7} M dexamethasone, $100 \mu\text{g}/\text{mℓ}$ 홍화인 추출물을 넣어 일정시간 배양 후 Trireagent(Invitrogen, USA)로 total RNA를 추출하였다. 추출한 RNA $1.0 \mu\text{g}$ 과 Oligo dT primer $1.0 \mu\text{g}$ 을 혼합한 뒤 70℃에서 5분간 두고 얼음 위에서 식힌 뒤 증류수를 더 해 $50 \mu\text{ℓ}$ 로 만들어 RT PreMix tube에 옮겼다. 이것을 cDNA 합성을 위해 42℃에서 60분간, Reverse transcriptase 비활성화를 위해 94℃에서 5분간 반응시켜 cDNA를 합성하였다.

Table 3. MTT assay on safflower seed extract in hFOB 1.19. (Mean±S.E.)

Day	C ⁻	C ⁺	1μg/ml	10μg/ml	100μg/ml	1mg/ml
1	0.25±0.00	0.29±0.00*	0.26±0.01	0.26±0.01	0.27±0.01	0.27±0.00
3	0.68±0.01	0.79±0.03*	0.76±0.02	0.77±0.02*	0.79±0.00*	0.77±0.01*
7	0.94±0.01	1.00±0.01	1.00±0.01	1.05±0.03*	1.05±0.03*	1.06±0.02*

*Statistically significant compared to the negative control(p<0.05).

C⁻(negative control): added distilled water

C⁺(positive control): added 10⁻⁷ M dexamethasone

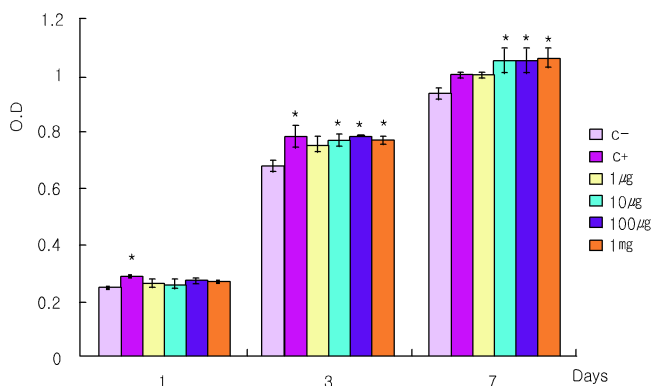


Figure 1. MTT assay on safflower seed extract in hFOB 1.19.

MTT assay was performed after 1, 3 and 7 day incubation.

Vertical bars represent standard error of each independent experiments.

C⁻(negative control) : added distilled water

C⁺(positive control) : added 10⁻⁷ M dexamethasone

* : Statistically significant difference compared with the negative control(p<0.05).

이렇게 얻은 cDNA 4μl와 20pmole의 primer를 DNA polymerase, dNTPs 및 reaction buffer 등이 포함된 Premix Taq에 넣고 증류수를 더해 50 μl로 만들어 thermal cycler로 polymerase chain reaction(PCR)을 시행하였다. 사용된 primer의 염기서열과 크기, PCR조건은 아래와 같다(Table 1, 2). PCR 생성물은 2% agarose gel상에서 전기영동을 시행하고 0.5μg/ml ethidium bromide로 염색하여 Transilluminators UV(Vilber Loutmat, TFX- 20.M, FRANCE)으로 확인하였다.

7)통계분석

실험결과의 분석은 SPSS WIN version 10.0을 사용하여 평균과 표준 오차를 구하고, 이들의 통계학적 유의성은 일원 분산분석법(One-way ANOVA)을 이용하여 사전 검정하였으며 사후 검정은 Tukey test를 이용하여 처리하였다(p<0.05).

III. 연구 성적

1. 세포증식 측정

홍화인 추출물 1μg/ml, 10μg/ml, 100μg/ml, 1mg/ml를 사람의 태아골모세포주에 투여하여, 1일, 3일, 7일 세포의 증식 정도를 평가한 결과 1일군에서는 유의한 차이는 없었지만 3일군과 7일군에서는 10 μg/ml, 100μg/ml, 1mg/ml의 홍화인 추출물을 투여한 실험군에서 유의한 수준의 증가를 나타내었다.(Table 3, Figure 1)

2. Cell spreading 측정

홍화인 추출물 1μg/ml, 10μg/ml, 100μg/ml, 1mg/ml를 사람의 태아골모세포주에 투여하여, 1일, 3일, 7일의 spreading된 세포의 수를 각각 측정한다.

Table 4. Cell spreading of hFOB 1.19 treated with safflower seed extract(Mean±S.E.) (relative number of spread cells)

Day	C ⁻	C ⁺	1μg/ml	10μg/ml	100μg/ml	1mg/ml
1	33.67±1.47	39.00±0.70	35.67±2.86	36.67±0.82	38.67±1.08	37.33±1.08
3	49.67±1.47	57.00±1.87	54.00±2.55	55.33±2.27	58.67±0.82*	56.33±2.68
7	67.00±2.12	84.00±1.87*	80.33±2.94*	82.33±0.82*	83.33±0.82*	79.33±1.47*

* Statistically significant compared to the negative control(p<0.05).

C⁻(negative control): added distilled water

C⁺(positive control): added 10⁻⁷ M dexamethasone

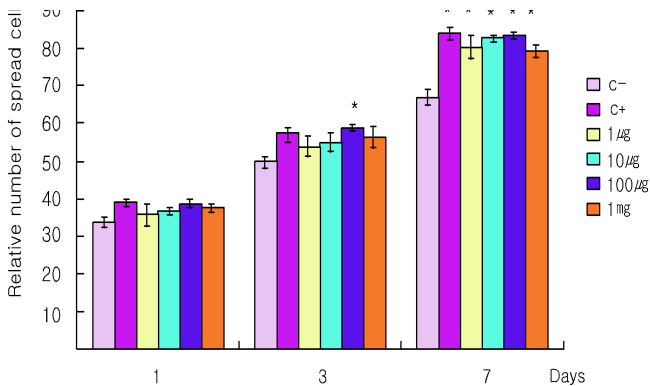


Figure 2. Cell spreading of hFOB 1.19 treated with safflower seed extract

Cell spreading assay was performed after 1, 3, 7 day incubation.

Vertical bars represent standard deviation of each independent experiments.

C⁻(negative control): added distilled water
C⁺(positive control): added 10⁻⁷ M dex-
amethasone

* : Statistically significant difference com-
pared with the negative control(p<0.05).

결과 1일군에서는 유의한 차이를 보이지 않았으며, 3일군에서는 100μg/ml에서, 7일군에서는 모든 농도에서 유의한 증가를 보였다.(Table 4, Figure 2)

3. Collagen synthesis analysis

홍화인 추출물 1μg/ml, 10μg/ml, 100μg/ml, 1mg /ml를 투여하여 3일동안 배양한 사람의 태아골모세포주 의 교원질 합성능 실험결과에서 10μg/ml, 100μg/ml, 1mg/ml의 홍화인 추출물을 투여한 실험군에서 유의한 수준의 증가를 나타내었다(Table 5, Figure 3).

4. 염기성 인산분해효소의 활성화도 측정

홍화인 추출물 1μg/ml, 10μg/ml, 100μg/ml, 1mg /ml를 사람의 태아골모세포주에 투여하여, 국소적

인산이온 농도를 증가시키는 ALP의 합성을 측정한 결과 홍화인 추출물 10μg/ml, 100μg/ml를 투여한 실험군에서 유의한 수준의 증가를 보였다.(Table 6, Figure 4)

5. 칼슘 측정

사람의 태아골모세포주에 홍화인 추출물 10μg/ml, 100μg/ml를 투여한 뒤 석회화된 결절을 계량화한 결과 음성대조군에 비하여 10μg/ml, 100μg/ml 처리군에서 유의하게 증가하였다(p<0.05).(Table 7, Figure 5)

그리고, AR-S로 염색된 석회화 결절을 육안으로 비교하였을 때, 음성대조군과 비교하여 양성대조군 과 10μg/ml, 100μg/ml 처리군에서 증가된 결절의 수를 보인다(Figure 6).

Table 5. Collagen synthesis of hFOB 1.19 treated with safflower seed extract.(Mean±S.E.)

C ⁻	C ⁺	1μg/ml	10μg/ml	100μg/ml	1mg/ml
5.1±0.15	7.93±0.33*	6.01±0.21	6.72±0.22*	7.82±0.28*	7.78±0.48*

* Statistically significant compared to the negative control(p<0.05).

C⁻(negative control): added distilled water

C⁺(positive control): added 10⁻⁷ M dexamethasone

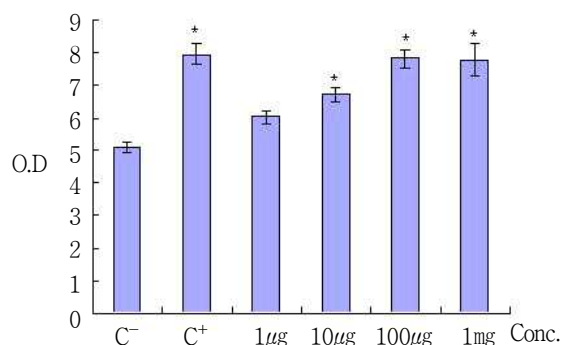


Figure 3. Collagen synthesis of hFOB 1.19 treated with safflower seed extract(μg/mg/ml).

Vertical bars represent standard error of each independent experiments.

C⁻(negative control): added distilled water

C⁺(positive control): added 10⁻⁷ M dexamethasone

* : Statistically significant difference compared with the negative control(p<0.05).

Table 6. ALP activity on safflower seed extract in hFOB 1.19(nmole/30min/mg of protein) (Mean±S.E.).

C ⁻	C ⁺	1μg/ml	10μg/ml	100μg/ml	1mg/ml
0.12±0.01	0.17±0.00*	0.14±0.01	0.16±0.01*	0.18±0.01*	0.15±0.01

* Statistically significant compared to the negative control(p<0.05).

C⁻(negative control): added distilled water

C⁺(positive control): added 10⁻⁷ M dexamethasone

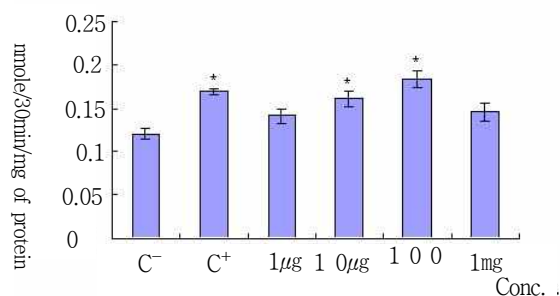


Figure 4. ALP Activity on safflower seed extract in hFOB 1.19. ALP activity was performed at 3 day after confluence. Vertical bars represent standard error of each independent experiments. C⁻(negative control) : added distilled water. C⁺(positive control) : added 10⁻⁷ M dexamethasone. * : Statistically significant difference compared with the negative control (p<0.05).

Table 7. Calcium accumulation assay of hFOB 1.19 exposed to safflower seed extract (Mean±S.E.)

C ⁻	C ⁺	10µg/ml	100µg/ml
161.76±21.82	335.45±15.17*	260.88±26.41*	337.72±13.28*

*Statistically significant compared to the negative control(p<0.05).

C⁻(negative control): added distilled water

C⁺(positive control): added 10⁻⁷ M dexamethasone

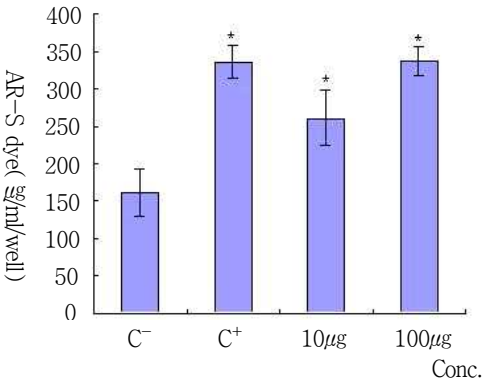


Figure 5. Calcium accumulation assay of hFOB 1.19 exposed to safflower seed extract.

Vertical bars represent standard error of each independent experiments.

C⁻(negative control): added distilled water

C⁺(positive control): added 10⁻⁷ M dexamethasone

* : Statistically significant difference compared with the negative control(p<0.05).

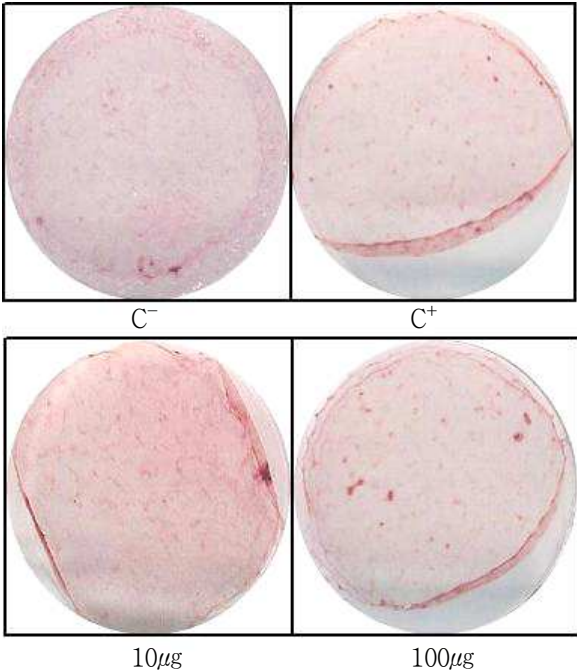


Figure 6. AR-S staining of hFOB 1.19 exposed to Safflower Seed Extract.

The mineralized matrix was stained with AR-S for calcium accumulation.

C⁻: negative control

C⁺: positive control

6. RT-PCR

RT-PCR 생성물의 agarose gel 상에서의 전기영동 결과는 Figure 6과 같다. 태아골모세포에 홍화인 추출물 100 μ g/ml를 투여한 실험군에서 알칼리성 인산분해효소(ALP, Figure A), osteocalcin (Figure B)의 mRNA발현을 관찰할 수 있었다.

IV. 총괄 및 고찰

치주치료는 치주질환에 의해 상실된 치조골, 치주인대, 백악질 및 치운을 포함하는 치주조직을 재생 시킴으로써 본래의 기능을 회복하고 유지할 수 있는 정상적인 구조적 환경을 형성해 주는데 목표를 두고 있다.²⁰⁾

치조골 결손부를 재생시키기 위해 많은 술식들이 이용되고 있으며 좀 더 빠르고 적절한 골의 회복을 위해 골 이식술과 치주조직의 재생을 유도하는 특정 세포에 관한 많은 연구가 시도되어져 왔다.²⁾

현재는 국소적으로 다양한 성장인자를 투여해 재생을 획득하는 방법이 많이 연구되고 있고 bone morphogenetic protein(BMP)를 이용하여 치주조직을 재생시키려는 노력이 시도되고 있다.²¹⁾ 하지만 이와 같은 성장인자를 도포하거나 주입하여 세포의 분화를 활성화시켜 치주조직을 재생시키기 위해서는 생체 내에서 상당히 고농도를 필요로 하며, 이런 고농도에 생체에 대한 전신적인 부작용이 알려진 바가 없어 사용이 자제되고 있다.

오랜기간 동양의학에서 사용되어온 생약제재는 경험적으로 안전성과 효과가 인정되어 이에 대한 관심이 증가하고 있으며 과학적으로 성분을 분석하고 그 효과를 증명하려는 노력이 이루어지고 있다. 특히 골 재생에 효과가 있다고 알려진 홍화인에 대해 이의 성분을 분석해서 골 재생에 영향을 미치는 성분과 농도, 또 그 기전을 알아보고자 하는 연구가 진행 중이다.

본 실험에서 사람의 태아골모세포주에 홍화인 추출물을 투여한 후 세포 증식은 10 μ g/ml, 100 μ g/ml,

1mg/ml의 홍화인 추출물을 투여한 3일군과 7일군에서 유의한 수준의 증가를 나타내었다($p < 0.05$). 위의 두개골에서 채취한 골아세포에 홍화인 추출물을 투여하여 세포증식을 연구한 두 등²²⁾과 윤 등²³⁾의 연구와 유사한 결과를 보였으며 세포증식의 증가는 세포의 증식단계에서 여러 층을 형성할 수 있다는 것을 나타내므로 이는 골 형성의 초기에 도움을 줄 것으로 사료되었다.

조직내의 세포는 fibronectin, collagen, vitronectin, laminin, tenascin 등의 다양한 세포외 기질(extracellular matrix, ECM)과 접하고 있으며, 이러한 세포-ECM 간의 상호작용은 여러 가지 생물학적 현상의 조절에 중요한 역할을 한다. 세포와 ECM간의 상호작용은 세포막에 있는 ECM에 대한 수용체에 의해 이루어지는데 이는 세포외에서는 수용체-ECM간, 세포 내에서의 수용체-ECM간, 세포내에서의 수용체-세포 내 골격간의 상호작용의 transmembrane 과정으로서 in vitro에서는 attachment, spreading, 그리고 focal adhesion의 형성 등의 3단계로 구분할 수 있다.²⁴⁾ Attachment는 세포막에 존재하는 수용체와 ECM 분자간의 비교적 약한 친화력에 의한 결합과정으로서 세포가 ECM 분자를 초기에 인지하는 과정이다. ECM을 인지한 수용체는 세포막 상에서 서로 응집되는 clustering이 일어나고 그 결과 ECM 분자와 세포내 골격간의 상호작용을 유도하여 부착된 세포가 현미경하에서 기질을 덮고 있는 세포의 면적이 증가하는 현상인 spreading을 유도한다. 기질에 spreading된 세포는 ECM 분자가 그 수용체를 통하여 세포내 골격과 연결되는 부위인 focal adhesion을 형성하여 세포가 기질에 고정된다. 많은 정상세포의 경우 성장과정은 세포가 ECM 분자에 부착(attachment)되어 spreading되는 과정을 요구하는데, 만일 spreading을 억제하면 세포의 성장도 억제된다.²⁵⁾ 본 연구의 cell spreading assay에서 3일군에서는 홍화인 추출물 100 μ g/ml를 첨가한 실험군에서 7일군에서는 모든 농도에서 유의한 수준의 증가를 보인바($p < 0.05$) 세포의 성장과정에 홍화인 추



Figure 6. A : mRNA expression of ALP on Safflower Seed Extract, B : mRNA expression of osteocalcin on Safflower Seed Extract.

출물이 긍정적인 효과를 나타낸 것으로 사료되었다.

경조직의 형성과정은 알칼리성 인산분해효소(alkaline phosphatase, ALP) 활성이 높은 세포가 무기질(mineral)이 침착될, I형 교원질이 주성분인 유기기질(organic matrix)을 혈액공급이 풍부한 상태에서 형성하는 것으로 요약할 수 있다.²⁶⁾ ALP는 유기인산 에스테르를 가수분해하여 석회화가 이루어지는 부위에서 국소적으로 인산이온의 농도를 증가시키는 효소로써, 세포외기질에 calcium phosphate를 침착시켜 석회화를 유도하는 기능을 갖는다고 알려져 있다.²⁷⁾ 1998년 윤 등²²⁾은 쥐의 두개골에서 채취된 조골모 유사세포에 홍화인 추출물을 처리한 ALP 합성의 연구에서 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ 군은 대조군에 비해 약 2배 정도, $1\text{mg}/\text{mL}$ 군은 약 5배 정도 유의한 증가를 보인다고 보고한바 있는데, 본 실험에서는 사람의 태아골모세포주에 홍화인 추출물 $10\mu\text{g}/\text{mL}$, $100\mu\text{g}/\text{mL}$ 를 투여한 실험군에서 유의한 수준의 증가를 보였다. ALP와 더불어 경조직 형성에 중요한 기질로 작용하는 교원질 생성에 홍화인이 미치는 영향을 알아보기 위해 hydroxyproline을 이용하여 간접적으로 측정한 결과 홍화인 추출물을 투여한 실험군에서 유의한 수준의 증가를 나타내었으며 이렇게 증가된 ALP 합성과 교원질 합성은 세포외기질에 calcium phosphate를 침착시켜 골 형성의 핵역할을 함으로써 석회화를 유도하여 조골 세포의 분화와 성숙에 중요한 역할을 할 것으로 생각되었다.

본 연구에서 골 광물화 과정 중 칼슘축적 정도를 알아내기 위하여 AR-S 염색법을 사용하였는데, 홍화인 추출물을 투여한 군에서 석회화 결절을 계량한 결과 유의하게 증가하였으며 육안으로 증가된 석회

화 결절을 관찰 할 수 있었다. 이 염색법은 세포의 형태학적 특성 분석 즉 세포의 경계부위를 염색하여 세포의 밀도, 면적, 주변둘레, 한 변의 길이 등을 광학 현미경으로 촬영 후 분석할 수 있다. 특히 AR-S 염색법은 칼슘염에 특이하게 반응하여 칼슘과 칼슘간에 reddish-orange complex를 형성하는 건본에서 적은 양의 칼슘을 알아내는데 유용하다.²⁸⁾ 본 연구를 통해 홍화인 추출물이 골 재형성 과정 중 골모세포의 광물화 과정에 긍정적인 영향을 미치는 것으로 사료되었다.

면역조직화학적 연구들에서 bone sialoprotein (BSP), osteopontin(OP), osteocalcin(OC) 같은 비교원질성 골단백질들이 치주조직 내에서 독특한 분포를 가짐을 보여주고 있다. 이러한 단백질들은 골 세포 분화단계에서 교원질과 ALP가 초기 단계에서 발현되며, 후기 분화단계로 가면서 OP, OC, BSP 등으로 발현된다. OP와 OC, BSP는 골성 세포 분화의 각기 다른 단계에서 분비된다.²⁹⁾ BSP는 mineralization의 기시과정에서 역할 하는 것으로 알려져 있고 OC는 mineralization 초기단계에서 crystal growth를 조절하는 기능을 담당할 것으로 여겨지고 있다. OP는 BSP나 OC에 비해 그 기능이 명확하게 밝혀져 있지 않지만 crystal growth의 조절과, 골생성 혹은 골흡수 부위로의 세포 이동과 부착의 촉진인자로 여겨지고 있다. 또한 OC는 골조직의 세포외 기질 단백질의 하나로 석회화에 있어 기능을 담당하는 것으로 보인다. 이러한 단백질이 치주조직 내에서 경조직 형성능력을 가져 골 재생할 수 있는 세포들의 지표 물질이 될 수 있을 것이다.³⁰⁾

본 연구에서 ALP와 OC는 100 μ g/ml의 홍화인의 추출물을 첨가한 실험군에서 mRNA 발현을 보였다. ALP mRNA는 음성 대조군, 양성 대조군, 홍화인의 추출물을 첨가한 실험군 모두에서 발현을 보였지만 ALP는 여러 가지 결체조직세포에 존재하는 효소이기 때문에 조골세포의 특이형질을 나타내는 확실한 지표로 단정 지을 수는 없지만³¹⁾ 조골세포의 분화와 골광화에 있어 중요한 기능을 담당하는 단백질 중의 하나인 osteocalcin의 mRNA 발현은 홍화인 추출물이 경조직 형성에 긍정적인 영향을 미칠 것으로 사료되었다.

본 실험에 사용된 양성대조군은 Dexamethasone(Dex)를 첨가한 것으로 Dex는 long-acting glucocorticoid 합성물의 일종이며, 다른 glucocorticoid와 마찬가지로 다양한 세포 효과를 조절, 다른 호르몬의 세포수용기를 중재하며, 골모전구세포의 증식을 자극하고 골수 기질세포를 골모세포로 분화시키는 것으로 알려져 있다.³²⁾ 그러나 glucocorticoid는 과다할 경우 골 형성감소와 골 흡수 증가등을 일으켜 전체 골량을 감소시키며, 골모전구세포의 성숙골아세포로의 전환을 감소시켜 골 성장을 억제한다.³³⁾ 아직 Dex와 같은 항염증약물 사용시, 골재생에 대한 견해가 다르며 초기치유과정에서 성장과 석회화에 관여하는 것으로 알려진 골기질 단백질에 대한 연구도 미흡한 실정이다. 또한 본 연구에서 홍화인 추출물을 투여한 실험군에 비해 Dex를 투여한 양성대조군에서 좋은 결과를 보이고 있지만, 임상에서 인체 투여시 많은 부작용을 보이고 있어 in vivo 실험에는 사용할 수 없다.

본 실험 결과 홍화인 추출물이 골의 형성과 재생에 우수한 효과가 있음을 알 수 있었으며 임상적인 응용, 장기간 투여에 따른 기간별, 농도별의 안정성 여부에 대한 연구가 필요할 것으로 생각되었다.

V. 결론

최근 들어 부작용이 적고 장기간 사용이 가능하다는 장점으로 인해 전통적으로 사용되어오던 생약제

제에 대한 많은 연구가 이루어지고 있으며, 이러한 생약제재들의 치주조직 재생 능력에 대한 검증이 활발히 이루어지고 있다. 본 연구는 실험실적으로 홍화인 추출물의 골 재생효과를 평가하기 위해 사람 태아골모세포에서 세포 증식 및 분화 과정을 여러 가지 분석 방법으로 평가하여 다음의 결론을 얻었다.

1. 세포의 증식 정도를 평가한 결과 1일군에서는 유의한 차이는 없었고 3일군과 7일군에서는 10 μ g/ml, 100 μ g/ml, 1mg/ml의 홍화인 추출물을 투여한 실험군에서 음성대조군에 비해 유의한 수준의 증가를 나타내었다($p < 0.05$).
2. Cell spreading assay에서는 3일군에서는 100 μ g/ml에서, 7일군에서는 모든 농도에서 음성대조군에 비해 유의한 증가를 보였다($p < 0.05$).
3. 교원질 합성능 실험결과에서 10 μ g/ml, 100 μ g/ml, 1mg/ml의 홍화인 추출물을 투여한 실험군에서 음성대조군에 비해 유의한 수준의 증가를 나타내었다($p < 0.05$).
4. ALP의 합성을 측정한 결과 홍화인 추출물 10 μ g/ml, 100 μ g/ml를 투여한 실험군에서 음성대조군에 비해 유의한 수준의 증가를 보였다($p < 0.05$).
5. 칼슘측정은 음성대조군에 비하여 10 μ g/ml, 100 μ g/ml 처리군에서 유의하게 증가하였다. ($p < 0.05$). 그리고, AR-S로 염색된 석회화 결절을 육안으로 비교하였을 때, 음성대조군과 비교하여 10 μ g/ml, 100 μ g/ml 처리군에서 증가된 결절 수를 보였다.
6. RT-PCR 결과 홍화인 추출물 100 μ g/ml를 투여한 실험군에서 ALP와 OC의 mRNA 발현이 관찰되었다.

본 연구를 통해 홍화인 추출물이 사람의 태아골모세포주에 세포증식, cell spreading, ALP 와 collagen 합성을 증가시키고 석회화 기능이 있는 osteocalcin의 mRNA 발현이 유도되며, AR-S를 통

한 염색법으로 칼슘 축적의 결과를 보여줌으로써 홍화씨 추출물이 골세포의 활성을 촉진시켰으며, 치주 질환으로 파괴된 골조직의 재생제로 이용 가능성이 높다고 사료되었다.

VI. 참고문헌

- Schroeder, H.E., Munzel Pedrassoli, S., and Page, R.C. : Correlated morphometric and biochemical analysis of gingival tissue in early chronic gingivitis in man. Arch Oral Biol 18:899-923, 1973.
- Listgarten M.A., and Rosenberg M.M. : Histological study of repair following new attachment procedures in human periodontal lesions. J Periodontol 50:333-344, 1979.
- Schallhorn RG. : Present status of osseous grafting procedures. J Periodontol 48:570-576, 1977.
- Sullivan H, Vito A, and Melcher A. : A histological evaluation of the use of hemopoietic marrow in intrabony periodontal defects. Int Assoc Dent Res abstracts 171, 1971.
- Mish CE., and Dietsh F. : Bone grafting materials in implant dentistry. Implant Dent 2 : 158-167, 1993.
- Garraway R., Young WG., Daley T., Harbrow D., and Bartold PM. : An assessment of the osteoinductive potential of commercial demineralized freeze-dried bone in the murine thigh muscle implantation model. J Periodontol 69: 1325-1336, 1998.
- Berglundh T., and Lindhe J. : Healing around implants placed in bone defects treated with Bio-oss. An experimental study in the dog. Clin Oral Implant Res 8:117-124, 1997.
- Nijweide, P.J., Burger, E.H., Feyen, and J.H.M. : Cells of Bone. Proliferation, Differentiation, and Hormonal Regulation. Physiol Rev 66:855-886, 1986.
- Son S. : Influence of standard extract of the unsaponifiable fraction of Zea Mays L. on periodontal disease. Quintessence Int'l, 8:1-7, 1982.
- 민원기, 이만섭 : Ascorbic acid 와 Zea Mays L의 불검화 정량추출물이 치주염 치유에 미치는 영향에 관한 실험적 연구. 대한치주학회지, 18: 6-23, 1988.
- Kopczyk RA., et al. : Clinical and microbiological effects of a sanguinaria containing mouthrinse and dentifrice with and without fluoride during 6 months of use. J Periodontol, 62:612-622, 1991.
- Osawa K., et al. : 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, 32:1-7, 1991.
- 韓藥調製資格取得本叢書2. 東醫學研究所編著, 610-613, 1993.
- 本草學, 東醫學研究所, 319-320, 1993.
- Nast HG., et al. Effects of fertilization and papulation ratespacing on Safflower yield and other characteristics. Agron. J.:70, 1978.
- 류인철, 이용무, 구영, 배기환, 정종평 : 홍화추출물이 치주인대세포, 조골세포 활성도에 미치는 영향, 대한치주과학회지, 27(4):867-882, 1997.
- 김덕규, 유형근, 신형식 : 홍화씨 추출물의 국소투여가 백서 두개골 결손부 재생에 미치는 영향. 대한치주과학회지, 29:297-310, 1999.

18. 송해룡, 라도경, 김종수등 : 홍화씨가 신생골 형성이 미치는 영향. J Ver Clin 19(1) : 66-72, 2002.
19. Rojkind M: Chemistry and biosynthesis of collagen. A review. Bull. Rheum. Dis., 30:1006-1010, 1979-80.
20. Page, R. C. : Periodontal therapy : Prospects for the future. J. Periodontol., 64:744-753, 1993.
21. Terranova, V.P., and Wikesj, U.M.E.: Extracellular matrices and polypeptide growth factors as mediators of functions of cells of the periodontium. J. Periodontol., 58:371-380, 1987.
22. 두진수, 신형식 : 홍화씨가 치은섬유모세포, 치주인대세포 및 골아세포에 미치는 효과 Journal of Wonkwang Dental Research Institute, 8(1). 41-53, 1998.
23. 윤동환, 유형근, 김윤철, 신형식 : 홍화씨 추출물이 조골모유사세포활성 및 골재생에 미치는 영향. 대한치주과학회지, Vol. 28, No 4, 769-787. 1998.
24. Burridge et al. : Focal adhesion: Transmembrane junctions between the extracellular matrix and the cytoskeleton. Ann. Rev. Cell Biol. 4:487-525, 1988.
25. Forkman, J., and Moscona, A. : Role of cell shape in growth control. Nature (London). 273:345-349, 1978.
26. A. R. Ten Cate, Oral Histology 111-119, 1994.
27. Beertesn, W., and Theo Van Den Bos. : Calcification of dentinal collagen by cultured rabbit periosteum : The role of alkaline phosphatase matrix., 9:159-171, 1989.
28. Bancroft JD, and Stevens A. : Theory and practice of histological techniques, 3rd edition. Churchill Livingstone, New York 245-267, 1990.
29. Yao KL, Todescan R, and Sodek J. : Temporal changes in matrix protein synthesis and mRNA expression during mineralized tissue formation by adult rat bone marrow cells in culture. J Bone Miner Res.:9:231-24, 1994.
30. Boskey AL. Matrix proteins and mineralization : an overview. Connect Tissue Res.:35:357-36, 1996.
31. Lian J, and Stein GS. : Concepts of osteoblast growth and differentiation : Basic for modulation of bone cell development and tissue formation. Crit Rev Oral Biol Med.:3:269-305, 1992.
32. Invanovic, V., and Weinstein, I. B. : Glucocorticoids and benzopyrene have opposing effects on EGF receptor binding. Nature, 293 : 404-406, 1981.
33. Dietrich, J. W., Canalis, E., Mania, D. M., and Raisz, L. G. : Effects of glucocorticoids on fetal rat bone collagen synthesis in vitro. Endocrinology, 104 : 715-721, 1979.

A Study of Safflower Seed Extracts on Bone Formation in Vitro

Seong-jin Lee · Ho-Chul Choi · Ki-Jong Sun · Jae-Bong Song · Sung-Hee Pi
Hyung-Keun You · Hyung-Shik Shin.

Department of Periodontology, School of Dentistry, Wonkwang University

The ultimate goal of periodontal therapy is the regeneration of periodontal tissue and the repair of function. For more than a decade there have been many efforts to develop materials and methods of treatment to promote periodontal tissue regeneration. Recently many efforts are concentrated on the regeneration potential of material used in traditional medicine. Safflower(*Carthamus tinctorius* L.) seed extract(SSE) have long clinically used in Korea to promote bone formation and prevent osteoporosis.

The purpose of this study was to examine the effects of SSE on bone formation in human osteoblastic cell line. Human fetal osteoblastic cell line(hFOB 1.19) was cultured with DMEM and SSE(1 μ g/ml, 10 μ g/ml, 100 μ g/ml, 1mg/ml) at 34°C with 5% CO₂ in 100% humidity. The proliferation, differentiation of the cell was evaluated by several experiments.

Cell proliferation was significantly increased at 10 μ g/ml, 100 μ g/ml, 1mg/ml of SSE after 3 and 7 days incubation(p<0.05). Cell spreading assay was significantly increased at 100 μ g/ml of SSE after 3 days and 1 μ g/ml, 10 μ g/ml, 100 μ g/ml, 1mg/ml of SSE after 7 days(p<0.05). Alkaline Phosphatase(ALP) level was significantly increased in 10 μ g/ml, 100 μ g/ml of SSE(p<0.05). Collagen synthesis was significantly increased at 10 μ g/ml, 100 μ g/ml, 1mg/ml of SSE(p<0.05). A quantified calcium accumulation was significantly increased at 10 μ g/ml, 100 μ g/ml of SSE(p<0.05). ALP and osteocalcin mRNA was expressed in 100 μ g/ml of SSE by RT-PCR.

These results indicate that SSE are capable of increasing osteoblasts mineralization and may play an important role in bone formation.

key words : Safflower Seed Extracts, hFOB 1.19, bone formation