

속단의 생리활성성분이 치은섬유아세포의 세포주기조절에 미치는 영향

유석주 · 장길용 · 윤호상 · 최호철 · 선기종 · 김현아 · 피성희 · 신형식 · 유형근

원광대학교 치과대학 치주과학교실

I. 서론

치은의 결합조직에 존재하는 섬유아세포는 총 세포성분의 65-85%를 차지하며, 치은섬유아세포는 정상적인 상태뿐만 아니라 치주질환의 발생과 노화 등 치주조직의 변화에 있어 중요한 역할을 수행하고 있다¹⁾. 치은섬유아세포는 결합조직을 형성하는 교원섬유, 옥시탈란 섬유, 탄성섬유를 합성한다. 특히, 치은섬유아세포는 교원섬유의 재생에 핵심적인 역할을 수행하는데, 전교원이라 불리는 전구물질을 만들어냄으로서 교원질을 합성하는 교원형성 능력을 가지고 있으며, 가수분해효소에 의하여 오래된 교원섬유를 탐식하여 제거하는 역할을 수행한다²⁾. 또한, 치은 결합조직 세포들이 생활할 수 있는 기질을 합성하므로 치주조직에 가해지는 압박 등에도 저항하고 탄력성을 유지하게 한다. 따라서, 치주조직 치유에 있어 치은섬유아세포의 증식은 필수적이며, 세포주기 진행 촉진물질에 의해 증식이 증가된다³⁾.

치주치료 후 재생을 위한 보조요법과 약물 개발에 대한 연구가 시도되고 있다. 몇몇의 성장인자(예를 들어, PDGF, IGF-1, TGF- β FGF, EGF 등)와 세포기질등이 치주치료후 조직의 치유 촉진에 도움을 주는

것으로 보고되고 있으며^{4,5)}, 그중에서 특히 골형성단백질(BMP)의 골유도능력을 근거로 BMP를 이용하여 치주조직을 재생시키려는 노력이 시도되고 있다⁵⁾. 이와 함께 생약제제로부터 치주치료물질을 개발하기 위한 많은 연구들이 수행 중에 있다. 일부 생약제제 또한 치주조직의 치유를 촉진시키는 것으로 알려졌다⁶⁾. 예를 들어 죽염(竹鹽), 길경(桔梗), 황백(黃柏), 형개(荊芥)등은 예전부터 한방에서 항염제, 살균제, 진통제, 해열제, 면역억제제로 많이 사용되어져 왔다⁶⁾. 생약제제들은 치주질환 치료제로서 치주질환균에 대한 항염효과와 항균효과를 비롯하여 치주조직 재생능력등에 대한 과학적인 접근과 분석이 시도되고 있다. 현재까지 치주질환과 연관되어 연구가 진행된 생약제제들 가운데는 옥수수 불검화 추출물은 치주염 치료를 위한 생물학적 기능개선에 효과가 있다고 보고되었⁷⁾, 이⁸⁾등은 후박 추출물이 *S.mutans* 및 다양한 세균에 항균, 항염 효과가 있다고 하였다.

본 실험에서 사용된 속단(續斷)은 식물성 생약제제로 그 기원이 나라에 따라 차이가 있는데 중국(중국약전, CP)에서는 토끼풀과(Dipsacaceae)의 천속단(*Dipsacus asper* Wall.)의 뿌리를, 한국(대한약전

*이 논문은 2004년도 원광대학교의 교비 지원에 의해서 수행됨

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

의 생약규격집, KHP)에서는 꿀풀과(Labiatae)의 속단 (*Phlomis umbrosa* Turcz.)의 뿌리를, 일본에서는 국화과(Compositae)의 *Cirsium*속 식물의 뿌리를 건조한 것이라고 명기되어왔다¹⁰⁾. 이 생약재는 통증을 제거하고 새살을 돋게하며 근골(筋骨)을 이어주는 작용이 있어 붙인 이름으로 천속단(川續斷), 속절(續折), 접골(接骨)등의 다른 이름으로 불리기도 하며, 강장, 진통, 소염약, 조직재생 촉진에 있는 것으로 알려져 있다. 특히, 근육과 뼈마디의 골막을 이롭게하고, 근육사이의 섬유조직을 단단하게 하여 골절을 예방하고, 골밀도를 높이며, 골절통이나 근육의 통증을 멎게하고 새살을 돋게하는 효능이 있으므로, 외상시 한방에서 많이 사용되어온 재료이다⁹⁾. 이와 같이 속단은 치유촉진 효과를 가진 성분을 포함하여 여러 다양한 생리활성 물질을 함유하고 있을 것으로 생각된다.

현재까지 속단의 실험실적 연구는 치주조직중 골 재생에 관련하여 몇몇 연구가 진행되어 왔으나¹⁰⁻¹³⁾, 그 외 다른 치주조직의 재생에 관한 연구는 부족한 실정이다. 그러므로, 본 연구의 목적은 속단(續斷)의 다양한 약리 효과 중 치주조직 치유에 대한 효과 및 작용기전에 대한 연구에 새로운 방법을 개발해 보고자 속단의 생리활성물질을 조제하여 치은의 치유과

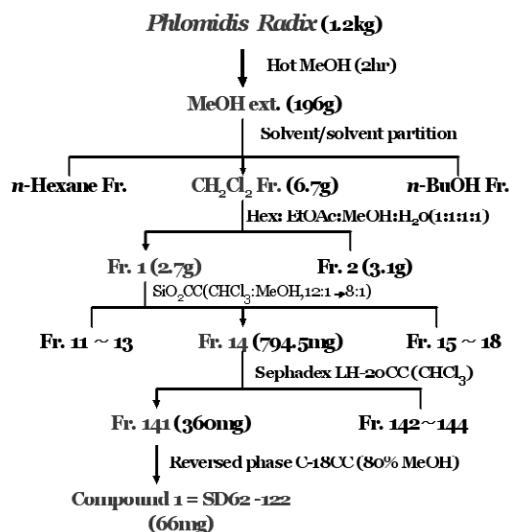
정에서 결합조직과 기질의 형성에서 중요한 역할을 하는 치은섬유아세포에 대한 세포증식과 그와 관련된 세포주기조절 단백질의 발현에 미치는 영향을 알아보기 위함이다. 또한, 치주조직 중 치은 조직의 치유를 촉진시키는 약제개발에 있어 속단의 생리활성 물질(SD62-122)의 적용가능성을 알아보고자 하였다.

II. 연구재료 및 방법

1. 속단추출물의 준비

본 연구에 사용된 속단은 2004년 1월 전북 익산시 한약전재상에서 구입하였고, 증거표본(WKS02-13)은 원광대학교 약학대학 표본실에 보관하였다.

건조후 세절한 속단(1.2kg)을 메탄올(5L)로 2시간 동안 2회 반복추출하여 여과한뒤 여액을 감압농축하였다. 추출된 메탄올 엑스(196g)는 수성메탄올(60%)로 용해시켜 n-hexane과 dichlormethane으로 차례대로 분배하였고, 수성메탄올(60%) 분획층은 다시 감압농축하여 증류수에 용해시킨 뒤, n-butanol을 사용하여 분배하였다. 감압농축기로 각 분획층의 용매를 제거하여, n-hexane 4.5g, dichlormethane 6.7g, n-butanol 56g의 분획물이 각각 추출되었다. 이들 분



Scheme 1. Isolated procedure of SD62-122 from *Phlomis Radix*.

획물중 dichloromethane 분획물을 n-hexane: EtOAc: MeOH:H₂O (1:1:1:1, 2L)로 분배하여 상층(분획물 1: 2.7g)과 하층(분획물 2: 3.1g)을 얻었다. 다시 분획물 1은 CHCl₃:MeOH(12:1~8:1)로 용매를 유출시켜 silica gel column chromatography를 실시하고 TLC상의 반점 형태에 따라 8개로 다시 소분획 하였다(분획물 11~18). 이중 분획물 14 (794.5 mg)는 다시 CHCl₃로 용매를 유출시켜 Sephadex LH-20 column chromatography를 실시하고 4개의 소분획물을 얻었다 (소분획물 141~144). 소분획물 중 분획물 141(360 mg)은 reverse-phase C-18 column chromatography를 실시하여 화합물 (SD62-122)을 얻었다. 본 실험에서는 배양골아세포의 골형성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 SD62-122 66mg을 사용하였다.

2. 치은섬유아세포의 배양

치은섬유아세포는 원광대학교 치과병원에 내원한 환자 중 치관연장술을 요하는 건강한 성인에서 절제한 치은조직으로부터 일차 배양하여 얻었다. 절제한 조직은 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Gibco Co., USA)이 담겨있는 15 ml tube에 담아 혈액이나 이물질을 제거하기 위해 3회 세척한 후, 미생물 오염을 방지하기 위해 10% 우태아혈청 (fetal bovine serum, Gibco Co., USA)과 1% 항생제 (Penicillin G 10,000 units/ml, Amphotericin B 25 µg/ml, Gibco Co., USA)가 첨가된 DMEM이 들어 있는 100 mm 조직 배양접시에 옮겨 No. 15 blade를 사용하여 1 mm로 세절하고, 60 mm 배양접시에 5~6개 조각을 고르게 분포시켰다. 약 30분간 37℃, 100% 습도, 5% CO₂ 배양기에서 배양하여 배양접시 바닥에 조직이 고르게 부착되도록 배양시킨 후, 각 배양접시당 10% 우태아혈청과 1% 항생제가 포함된 DMEM 3 ml를 첨가하였다. 단일세포층이 형성될 때까지 2~3일 간격으로 배양액을 교환하였다. 단층밀생이 형성된 후 배양액을 제거하고 2회 세척 후, 0.25% Trypsin/EDTA (1×, Gibco Co., USA)를 이용하여 세포배양 접시에 부착된 세포를 분리시킨 후 60 mm 조직배양용 접시에 분주하였다. 배양액은 세포의 충분한 증식이 나타날 때까지

2~3일 간격으로 교환하였고, 계대배양은 1:3~4의 비율로 시행하였다. 본 실험에서는 4~7회 계대배양된 치은섬유아세포를 사용하였다.

3. 세포 수 측정

배양접시에서 밀생에 도달한 단층의 세포들을 0.25% trypsin/EDTA 로 분리하였다. 이 세포들을 배양액으로 현탁시키고 6-well plate에 2×10⁴ 개의 세포수가 되도록 분주하였다. 24시간 후에 배양액을 제거하고 실험군에는 DMSO로 녹인 속단의 생리활성물질 10⁻⁶, 10⁻⁷, 10⁻⁸, 10⁻⁹, 10⁻¹⁰M을 첨가하였다. 그리고 양성 대조군에는 10⁻⁷M의 dexamethasone을 첨가하였고, 음성 대조군에는 동량의 DMSO를 넣었다. 2,3일 동안 37℃에서 배양한 후 혈구계수기를 이용하여 세포의 수를 계산하였다. 각각의 군에서 3번 배양을 시행했다.

4. MTT 측정

배양접시에서 단일 밀생에 도달한 치은섬유아세포들을 0.25% trypsin/EDTA 로 분리하였다. 혈구계수기로 세포 수를 세어 24-Well plate(Nunc, Naperville, IL, USA)에 각 well당 2×10⁴개의 세포가 들어가도록 분주하였다. 세포들이 부착할 수 있도록 1일간 5% CO₂, 95% 공기와 100% 습도에서 37℃ 상태에서 배양하였다. 그리고 24시간 후 부착되지 않은 세포들은 배지로 제거하였다. 실험군에는 10⁻⁶, 10⁻⁷, 10⁻⁸, 10⁻⁹, 10⁻¹⁰M의 속단의 생리활성물질을 첨가한 후 2,3일 동안 배양하였다. 일정기간 배양 후 300 µl의 MTT(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide ; Sigma, USA)을 각각의 Well에 넣어 formazan 염을 환원시키고, 200 µl의 dimethyl sulfoxide(DMSO; Junsei, Japan)를 첨가하여 형성된 formazan결정을 용해시킨 후 96-Well plate로 옮겼다. 배양접시를 잘 흔들어 용액을 균질화 시킨 후 ELISA 분석기(Spectra MAX 250, Molecular Devices Co., Sunnyvale, CA, USA)에 넣고 540 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

5. 세포주기 분석

Plate에 분주된 치은섬유아세포들은 24 시간 배양 후에 $10^{-6}M, 10^{-9}M$ 의 속단을 첨가한 후 3일간 배양하였다. 배양된 세포들은 trypsinization시킨 후 PBS로 세척하였다. 세포들은 $4^{\circ}C$ 에서 45분 동안 70% ethanol로 고정 후 $1 \mu g/ml$ RNase A($0.1mg/ml$)을 처리하여 RNA를 제거하였다. $50\mu g/ml$ 의 propidium iodide 용액으로 30분간 염색한 후 flow cytometer(Beckton-Dickenson, San Jose, CA, USA)로 $488nm$ 에서 propidium iodide-DNA complex에서 발생하는 형광을 측정하였다.

6. Western blot 분석

속단 추출물이 첨가된 배양액에서 3일간 배양된 치은섬유아세포를 PBS로 세척한 후, lysis buffer($10mM$ Na_2HPO_4 (pH 7.2), 0.9% NaCl, 1% Triton X-100, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 0.2% sodium azide, 0.004% sodium fluoride)로 세포 단백질을 추출하였고, BCA용액 (Bicinchoninic acid sol. Sigma Co., USA)에 Copper(II)sulfate(Sigma Co., USA)를 50:1로 혼합하여 단백질 농도를 측정하였다. 대조군과 실험군에서 추출된 단백질 $100\mu g$ 을 사용하여 15% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis를 시행한 PVDF membrane(Millipore Corp., Bedford, MA, USA)에 transfer 하였다. 비특이 항체의 결합을 막기 위하여 실온 상태에서 membrane을 각각의 차단 용액(Zymed, USA)에 1시간 동안 처리하였다. 그 후에 다음과 같은 1차 항체들을 이용하여 90분 동안 반응시켰다. 사용된 일차항체는 G1주기 전반부의 활성화를 관찰하기 위한 mouse anti-cyclin D1 monoclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), rabbit anti-cdk 4 polyclonal antibody(Oncogene science, Uniondale, NY, USA), rabbit anti-cdk 6 polyclonal antibody(Santa Cruz Biotechnology), G1주기 후반부의 활성화를 관찰하기 위한 mouse anti-cyclin E monoclonal antibody(Oncogene science), rabbit anti-cdk 2 polyclonal antibody(Santa Cruz Biotechnology), 세포주

기의 진행을 억제하는 세포주기조절단백질을 관찰하기 위해 mouse anti-p53 monoclonal antibody(Ab-2; Oncogene science), mouse anti-p21 monoclonal antibody(Santa Cruz Biotechnology)가 사용되었으며, mouse anti-pRb(IF8) monoclonal antibody(Santa Cruz Biotechnology)는 이런 세포주기조절단백질의 변화가 전사인자의 유리에 미치는 영향을 평가하기 위해 사용하였다. 1차 항체로 반응시킨 후 PBS로 2회 세척 후 그 막은 2차 항체(Santa Cruz Biotechnology)와 결합된 anti-mouse or anti-rabbit IgG-alkaline phosphatase로 60분간 처리한 후 다시 PBS로 7분 동안 2회에 걸쳐 세척을 한 후 ECL kit로 1분 동안 반응시켜 Hyperfilm-MP(Amersham, UK)에 노출시켰다.

7. 통계분석

통계학적 유의성은 SPSS 10.0 Version 프로그램을 사용하여 평균과 표준오차를 구하고, 이들의 통계학적 유의성은 일원분산분석법(ANOVA)을 이용하여 사전 검정하였으며, 사후 검정은 Tukey법을 사용하였다. ($p < 0.05$)

III. 연구결과

1. 세포증식 측정

1) 세포 수 측정

$10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}, 10^{-9}, 10^{-10}M$ 의 속단의 생리활성물질 (SD 62-122)을 치은섬유아세포에 투여한 뒤 각각 2, 3일간 배양하여 비교 측정한 세포 수 측정 검사에서는 2일째에 음성 대조군과 실험군 간에 세포수의 유의한 차이가 관찰되지 않았고, 3일째에 모든 실험군이 음성 대조군에 비하여 유의한 증가를 보였다. 그러나, 실험군간의 통계학적으로 유의한 차이는 발견되지 않았다. ($p < 0.05$) (Table 1, Figure 1)

2) MIT 측정

$10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}, 10^{-9}, 10^{-10}M$ 의 속단의 생리활성물질 (SD 62-122)을 치은섬유아세포에 투여한 뒤 각각 2,

Table 1. Cell proliferation of SD 62-122 on activity of human ginigival fibroblasts (HGFs). (Mean±S.D.) (× 10⁴)

Day	C	C ⁺	10 ⁻⁶ M	10 ⁻⁷ M	10 ⁻⁸ M	10 ⁻⁹ M	10 ⁻¹⁰ M
2	5,28±0,15	5,81±0,03*	5,43±0,16	5,50±0,11	5,67±0,16	5,78±0,06	5,78±0,11
3	9,28±0,08	10,31±0,24*	10,00±0,20*	10,39±0,09*	10,30±0,04*	10,50±0,04*	10,23±0,17*

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)

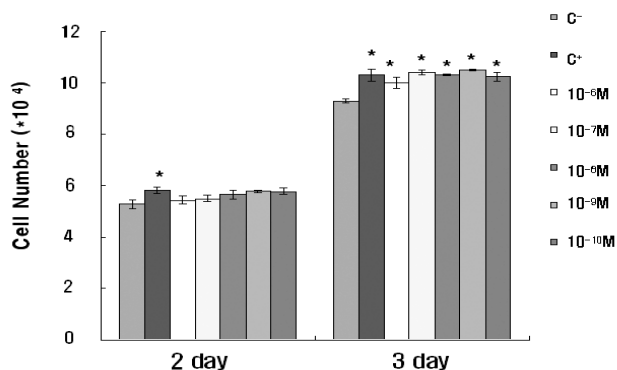


Figure 1. Cell proliferation of SD 62-122 on activity of human ginigival fibroblasts (HGFs).

Cell number counting was performed after 2,3 days incubation. Vertical bars represent standard deviation of each independent experiments. (C: negative control, C⁺: positive control, *:p <0,05)

Table 2. Effect of SD 62-122 on activity of human ginigival fibroblasts (HGFs). (Mean±S.D.)

Day	C	C ⁺	10 ⁻⁶ M	10 ⁻⁷ M	10 ⁻⁸ M	10 ⁻⁹ M	10 ⁻¹⁰ M
2	0,44±0,01	0,48±0,01	0,45±0,02	0,46±0,01	0,47±0,01	0,49±0,01	0,49±0,01
3	0,91±0,01	1,05±0,05*	1,00±0,00*	1,02±0,01*	1,05±0,05*	1,06±0,04*	1,04±0,03*

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)

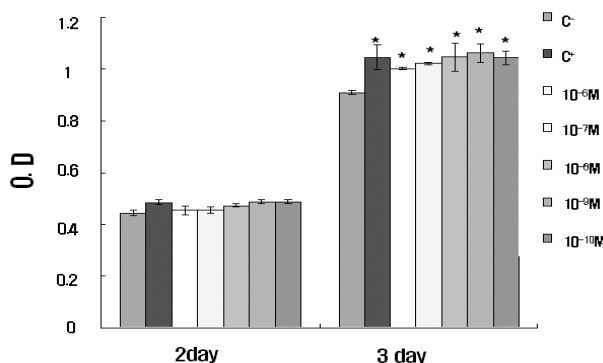


Figure 2. Effects of SD 62-122 on activity of human ginigival fibroblast (HGFs).

MTT assay was performed after 2, 3 days incubation. Vertical bars represent standard deviation of each independent experiments. (C-: negative control, C+: positive control, *:p <0,05)

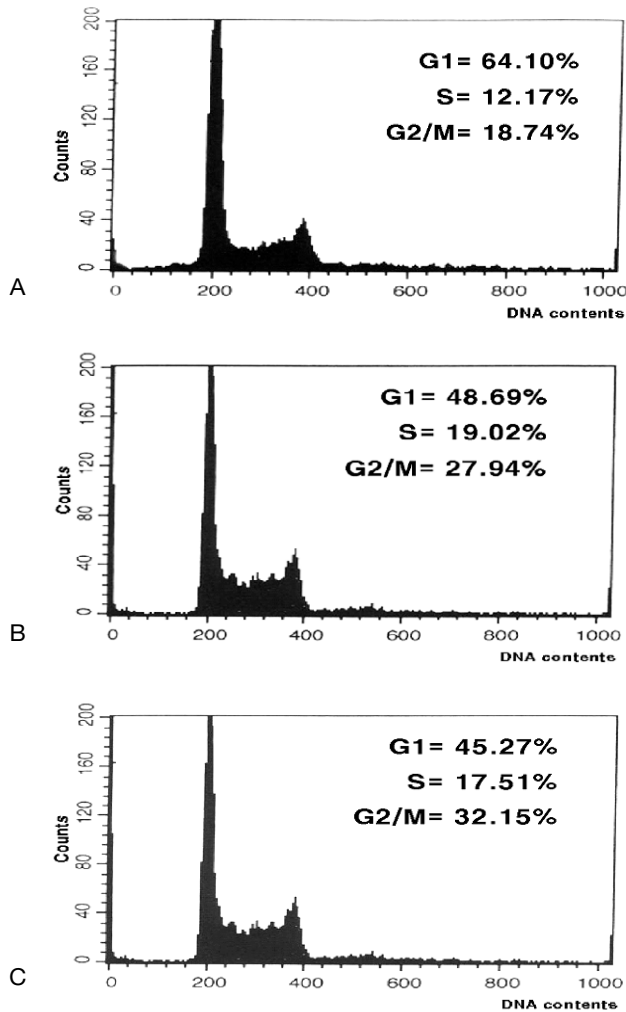


Figure 3. Effects of SD 62-122 on cell cycle progression of HGFs. The cell cycle analysis was performed after 3 days incubation (A; control group, B; 10^{-8} M experimental group, C; 10^{-9} M experimental group)

3일 간 배양하여 비교 측정한 세포활성도 검사에서는 2일 째에 음성 대조군과 실험군 간에 세포수의 유의한 차이가 관찰되지 않았고, 모든 실험군이 3일째에 음성 대조군에 비하여 유의한 증가를 보였다. 그러나, 실험군간의 통계학적으로 유의한 차이는 발견되지 않았다 ($p < 0.05$). (Table 2, Figure 2).

2. 세포주기 분석

속단의 생리활성물질(SD 62-122)이 치은섬유아세

포의 세포주기변화에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 10^{-8} M, 10^{-9} M의 속단의 생리활성물질(SD62-122)이 함유된 배양액에 치은섬유아세포를 3일 간 배양하여 세포주기를 분석하였다. 10^{-8} M μ g/ml의 속단의 생리활성물질(SD 62-122)를 첨가한 경우 S 주기는 12.74%에서 17.51%, 10^{-9} M 농도에서는 19.02%로 증가를 보였다. G1 주기는 10^{-8} M의 경우 64.10%에서 45.27%, 10^{-9} M 농도에서는 48.69%로 감소하였고, G2/M주기는 10^{-8} M의 경우 18.74%에서 32.15%, 10^{-9} M은 27.94%로 증가하였다. 이러한 결과로 속단의

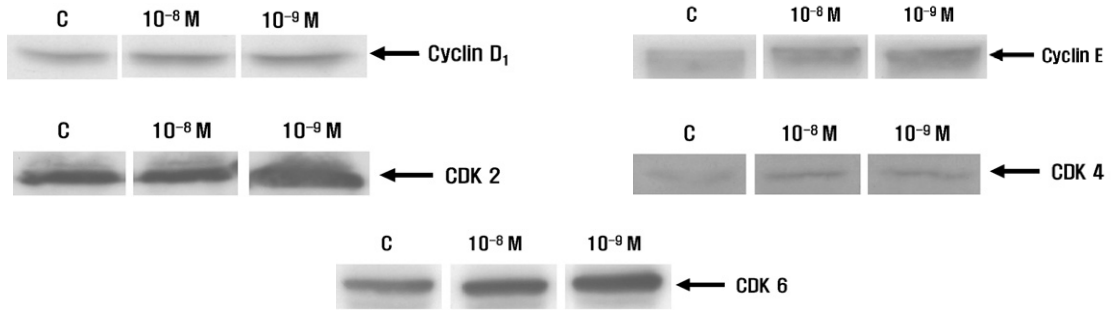


Figure 4. Western blot analysis for intracellular levels of cyclin D1, cyclin E, cdk 2, cdk 4, and cdk 6 in HGFs. Lane 1 is a control group, lane 2 is an experimental group that supplemented with 10^{-8} M of SD 62-122, and lane 3 is an experimental group that supplemented with 10^{-9} M of SD 62-122. Cell extract equivalent to 100 μ g/ml of total cellular protein of HGFs was electrophoresed by 15% SDS-PAGE and transferred to a PVDF membrane. The intracellular protein levels of cyclin D1, cyclin E, cdk 2, cdk 4, and cdk 6 in HGFs were probed with respective antibodies diluted by 1 : 1000

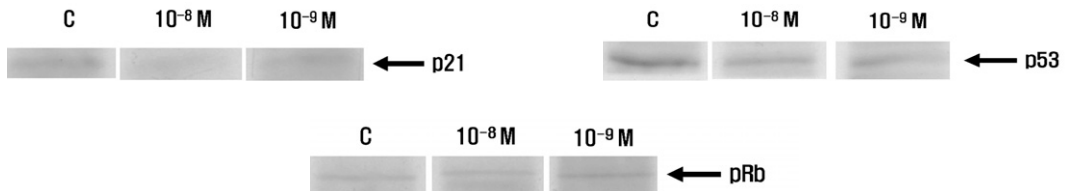


Figure 5. Western blot analysis for intracellular levels of p21, p53 and pRb in HGFs. Lane 1 is control group, lane 2 is an experimental group that supplemented with 10^{-8} M of SD62-122, and lane 3 is an experimental group that supplemented with 10^{-9} M of SD62-122. Cell extract equivalent to 100 μ g/ml of total cellular protein of HGFs were electrophoresed by 15% SDS-PAGE and transferred to a PVDF membrane. The intracellular protein levels of p21, p53, pRB in HGFs were probed with respective antibodies diluted by 1 : 1000

생리활성물질(SD 62-122)의 투여가 치은섬유아세포의 세포주기 진행을 촉진시킨다는것을 알 수 있었다 (Figure 3).

3. 세포주기조절단백질의 발현

1) cyclin D1, cyclin E, cdk 2, cdk 4, cdk 6의 발현

속단의 생리활성물질(SD 62-122)의 치은섬유아세포에 대한 세포주기조절기전을 연구하기 위하여, 세포주기조절단백질 cyclin D₁, cyclin E, cdk 2, cdk 4와 cdk 6의 발현을 관찰하였다. 10^{-8} M과 10^{-9} M의 속단 활성물질을 3일 간 투여한 결과, 대조군에 비하여 모두 증가하는 경향을 보였다 (Figure 4).

2) p53, p21과 pRb의 발현

속단의 생리활성물질(SD 62-122)의 치은섬유아세포에 대한 세포주기조절기전을 연구하기 위하여, 세포주기조절단백질 p53, p21과 pRB의 발현을 관찰하였다. 10^{-8} M과 10^{-9} M의 속단 활성물질을 3일 간 투여한 결과, p53, p21은 대조군에 비하여 모두 감소하는 경향을 보였다. 다만, pRb의 발현 중 SD62-122의 10^{-9} M에서만 대조군과 유사한 소견을 보였다 (Figure 5).

IV. 총괄 및 고찰

치주조직의 재생을 목적으로 여러 이식 재료가 어느 정도의 효과는 인정되고 있으나, 이런 이식재들은

각기 갖는 한계점으로 인하여 치주조직 재생을 위한 확실한 이식재는 아직 없는 실정이다. 서양의약의 약물요법은 세균성 감염 질환의 치료에 있어 좋은 효과를 보이는 반면, 만성 소모성 질환의 일부에는 효과가 그리 뛰어나지 않았으며, 일부 약물들이 부작용을 일으킨 경우가 종종 보고되고 있다. 이에 반해 전통 의학에서 사용하는 천연 약물은 독성과 부작용이 적은 것으로 알려졌지만, 과학적인 데이터가 부족하여 아직 치과치료에서 상품화되지는 못한 실정이다. 이를 보완하고자 최근에 국내 대학들에서는 치주 치료의 치료 보조제로 옥수수 불검파 추출물(*Zea mays* L.)¹⁴⁾, 홍화(紅花)¹⁵⁾, 인삼(人蔘)¹⁶⁾, 후박(Magnoliae cortex)¹⁴⁾ 등이 활발하게 연구 진행중이다.

본 연구에서 사용된 속단(續斷, *Phlomidis Radix*)은 *Turczaninow*(꿀풀과 *Labiatae*)의 다년생 초본 식물의 뿌리이며, 그 효능으로는 전신적으로 간과 신장의 기능을 증진시키고 혈액의 흐름을 원활히 하며 근과 골을 이어주는 효능과 함께 소염 진통, 배농, 지혈, 조직재생 촉진, 심장활동 강화, 혈소판 응집 억제 등의 효과가 있다고 알려져 있다¹⁷⁾.

그 동안 속단(續斷, *Phlomidis Radix*)으로 알려진 생약 제제를 이용하여 골모세포와 동물실험을 통하여 골형성에 대한 긍정적인 결과를 얻을 수 있었다. 따라서, 본 연구의 목적은 생약제재인 속단이 치주조직의 한 부분으로 치은의 주요 구성세포인 섬유아세포의 세포주기조절에 어떤 영향을 미치는가를 알아보고자 하였다.

속단을 재료로 시행한 최근의 결과들은 모두 골모세포들에서 이루어졌는데, 한¹⁰⁾ 등은 치조골모세포 실험에서 속단의 생리활성물질(SD62-122)이 교원질합성과 염기성 인산분해 효소에 유효한 효과를 보임으로써 골형성에 긍정적인 영향을 미칠 것이라는 가능성에 대하여 언급하였고, 김¹¹⁾ 등은 백서 두개골 결손부에서 속단의 생리활성물질(SD62-122)을 골이식재로 사용한 결과 대조군과 비교하여 증가된 신생골을 관찰하였다. 또한, 이¹²⁾ 등은 속단의 dichlormethane 분획물이 태아 골모세포의 골형성 유도에 있어 세포활성도와 염기성 인산분해효소 합성을 증가시키며, 골 결절 형성에도 유효하다고 하였다. 박¹³⁾ 등은 속단

의 생리활성물질(SD62-122)이 태아골모세포에서 염기성 인산분해효소 활성의 증가 및 골단백질 발현에 유효한 효과를 보인다고 보고하였다.

본 연구에서는 이전의 연구들을 통하여 속단 추출물 중 속단 활성물질(SD 62-122)이 세포 성장과 분화에 긍정적인 영향을 미친다는 것을 확인할 수 있었고¹⁰⁾, 예비 실험을 통하여 10^{-6} ~ 10^{-10} M의 농도가 좋은 결과를 보여 본 연구에 이용하였다.

본 연구에서는 세포 증식에 대한 속단의 생리활성물질(SD62-122)의 효과를 알아보기 위해 치은섬유아세포의 세포수 측정과 MTT 분석을 시행하였다. 두 실험 모두에서, 2일째에는 각각의 실험군들은 대조군과 비교하여 유의한 차이가 없었고, 3일째에는 각각의 실험군들은 음성 대조군과 비교하여 유의한 증가를 확인할 수 있었다. 10^{-9} M의 속단의 생리활성물질(SD62-122)이 가장 높은 세포 증식을 나타냈으나, 실험군간의 유의한 차이는 발견할 수 없었다(Figure 1,2). 김³²⁾ 등은 다른 생약제재인 고삼추출물을 가지고, 치은섬유아세포의 세포 증식능을 알아보기 위하여 세포수 측정과 MTT 분석을 시행하였다. 그 결과는 본 실험과 같이 2일째에는 대조군과 유의한 차이가 없으나, 4일째에 대조군과 비교하여 유의한 증가를 보임으로써 세포 증식효과를 확인할 수 있었다.

이 연구에서 glucocorticoid인 dexamethasone은 다양한 실험을 통하여 생체내에서는 골 형성을 감소시키고 골 흡수를 야기시키지만 골세포 배양시 첨가하면 osteoblast-like cell을 분화시켜 골 형성을 증가시켰다¹⁸⁾. 또한 이 결과와 유사하게 골 결절 형성 수 및 크기를 증진시키는 결과를 보이기도 하였다¹⁹⁾. 반면에 dexamethasone이 부족한 배지에서는 치주세포 뿐만 아니라 osteoblast-like cells에서 bone nodule이나 그와 유사한 물질을 형성시키지 못한다고 하였다²⁰⁾. 또한, dexamethasone은 성장인자와 병용시 세포기능을 조절하는 효과를 나타내어, 섬유아세포 성장인자의 세포 증식능을 증가시키나²¹⁾, 상피 성장 인자의 활성은 억제시키는 것으로 보고되었다²²⁾. 본 실험에서도 dexamethasone을 투여한 양성대조군은 2일과 3일째에 cell number counting이나 MTT assay에서 음성대조군과 비교하여 증가된 양상을 확

인할수 있었다.

세포주기 조절장치는 주로 섬유아세포 및 조혈세포를 통하여 많은 연구가 진행되어 왔다. 세포분열 주기는 분열기(M phase)와 간기(interphase)로 구분되며, 세포는 분열기에는 핵분열(mitosis)과 세포질 분열(cytokinesis)이 1시간 이내에 신속하게 일어나고 대부분의 시간을 간기에서 보내게 되다. 간기는 제1간기(G1 phase), 제2간기(G2 phase) 및 DNA 증식이 일어나는 합성기(S phase)로 구분된다²³⁻²⁴⁾.

본 연구에서는 세포증식률의 결과를 바탕으로 10^{-8} M과 10^{-9} M 농도의 속단의 생리활성물질(SD62-122)을 투여하여 세포주기 분석과 세포주기 조절물질의 발현을 연구하였다. 치은섬유아세포에 3일 처리한 후 세포주기를 분석한 결과 10^{-8} M과 10^{-9} M의 속단의 생리활성물질(SD 62-122)은 대조군과 비교하여, S 주기는 증가, G1주기는 감소, 그리고 G2/M주기는 증가하였다. 이러한 결과로 미루어 보아 속단의 생리활성물질(SD62-122)은 첫 번째 휴지기가 감소하고, 두 세포로 분열하기 위한 DNA의 합성이 증가했다는 것으로 3일째 증가된 세포 증식을 결과와도 일치하였다.

본 연구에서는 속단의 생리활성물질(SD62-122)을 치은섬유아세포에 투여하였을때 세포주기조절단백질의 발현을 알아보기 위하여 western blotting 분석법을 사용하였다.

western blotting 분석법은 수종의 단백질을 포함하고 있는 세포 혹은 조직의 추출물들을 전기 영동하여 그 속에 있는 단백질들을 크기별로 구분하여 흡착지에 옮기고, 조사하려는 단백질의 항체와 결합시켜 그 단백질의 존재유무와 크기 등을 밝히고자 하는 검사방법이다²⁵⁻²⁷⁾.

세포주기단백질인 cyclin D₁과 cdk 4,6는 세포 주기의 G1기 초기 또는 중기에 결합하여 세포 주기의 진행에 영향을 미치며, cyclin E와 cdk 2는 G1기의 말기에 결합을 하여 세포주기에 영향을 미치는 것으로 알려져 왔다.

본 연구에서는 속단의 생리활성물질(SD62-122)의 투여가 cyclin D₁, cyclin E, cdk 2, cdk 4, cdk 6의 발현을 촉진시키는 것으로 나타났다(Figure 4). 이러한 cdk와 cyclin과 같은 positive regulator의 증가된 발

현양상은 속단의 생리활성물질(SD 62-122)의 투여로 치은 섬유아세포의 세포주기실험에서 S주기가 증가하며 세포주기진행이 촉진되는 것과 같은 유사한 결과를 보인다고 생각된다.

cdk 억제제인 p21, p53, pRb는 이전의 연구에서 cyclin-cdk의 활성을 억제하여 G1-S기로의 진행을 조절하는 것으로 알려져 있다. 즉, cyclin-cdk 복합체에 결합을 하여 kinase 활성을 억제하는 기능을 가진 것이다²⁸⁻²⁹⁾.

이에 대한 발현 양상을 확인한 실험결과 p21, p53은 속단의 생리활성물질(SD62-122)투여시 대조군에 비하여 모두 감소된 발현 양상을 나타냈으며, 단지 pRb의 발현양상이 대조군과 별 차이가 없음을 나타냈다(Figure 5). 이러한 negative regulator의 감소된 발현양상은 cyclin과 cdk들의 활성이 더욱 활발하게 되어 결과적으로 치은섬유아세포의 세포주기 진행이 더욱 촉진된 것으로 생각된다.

본 연구의 결과는 생약제제를 가지고 세포 증식과 세포주기 진행에 미치는 영향을 알아본 실험중, 녹용 추출물을 가지고 치주인대세포에서 실험한 류³⁰⁾ 등의 연구, 녹용 추출물을 가지고 사람태아골모세포에서 실험한 양³¹⁾ 등의 연구, 그리고 인삼 추출물을 가지고 사람태아골모세포에서 실험한 김¹⁶⁾ 등의 연구와 일치하는 결과를 보였다. 또한, 그 기전은 cyclin E, cdk 2, cyclin D₁와 cdk 4나 6 복합체에 발현을 증가시키며, p21등의 발현 감소를 유발함으로써 이루어진다는 보고와 유사하다고 생각된다.

결론적으로 속단의 생리활성물질(SD62-122)을 치은섬유아세포에 반응시켰을때, 세포주기의 진행이 촉진되며, 그 기전은 세포주기 진행에 있어 중요한 것으로 사료되는 cdk2, cdk 4, cdk6, cyclin D₁, cyclin E와 같은 positive regulator의 발현을 증가시키고 세포주기 진행을 억제하는 p21, p53와 같은 negative regulator의 발현을 감소시켜 나타나는 것으로 생각된다.

본 실험의 결과는 속단의 생리활성물질(SD62-122)이 배양된 치은섬유아세포의 증식과 세포주기 조절에 미치는 영향은 cell number counting, MTT 검사, 세포주기분석, 세포주기조절단백질의 발현정도를 측정함으로써 확인할 수 있었다. 추후 연구의 초점은

적용시 서방형 제제로 서서히 일정하게 방출될 수 있는 송달체 및 보조장치의 개발이 필요하며, 아울러 부작용도 함께 연구되어야 할 것으로 생각된다.

V. 결론

본 연구는 생약제재인 속단 활성물질 (SD 62-122) 이 파괴된 치주조직 재생에 중요한 역할을 하는 치은 섬유아세포의 세포주기조절과 세포분열에 미치는 영향을 알아보기 위하여 실시되었다. 치은 섬유아세포의 배양액에 $10^{-6}M$, $10^{-7}M$, $10^{-8}M$, $10^{-9}M$, $10^{-10}M$ 농도의 속단 활성물질(SD 62-122)을 첨가하여 세포 증식을 측정하였고, 이중 세포 증식율이 높은 $10^{-8}M$, $10^{-9}M$ 농도의 속단의 생리활성물질(SD 62-122)을 처리하여 세포주기 및 세포주기조절 단백질 발현을 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 속단의 생리활성물질(SD62-122)을 투여한 경우 치은섬유아세포의 증식은 2일째 대조군과 비교하여 유의한 차이가 없었지만, 3일 째에 모든 실험군은 세포증식에서 유의한 효과가 있었다 ($p<0.05$).
2. 치은섬유아세포에 속단의 생리활성물질을 $10^{-8}M$ 과 $10^{-9}M$ 의 농도로 첨가하고 세포주기를 평가한 결과 둘다 대조군에 비해 S 주기는 약간 증가하고, G1 주기는 감소하는 경향을 보였다.
3. 치은섬유아세포에 속단의 생리활성물질을 $10^{-8}M$ 과 $10^{-9}M$ 의 농도로 첨가하고 세포주기단백질 발현 정도를 평가한 결과 cdk 2, cdk 4, cdk 6, cyclin D₁과 cyclin E의 발현은 증가하고 p21과 p53은 감소하였으며, $10^{-9}M$ 의 농도에서 pRb의 발현은 대조군과 차이가 없었다.

본 실험결과에 따르면, 속단의 생리활성물질 (SD62-122)은 cdk 2, cdk 4, cdk 6, cyclin D₁ 및 cyclin E의 발현증가와 p21과 p53의 발현감소를 유발함으로써 치은섬유아세포에 대한 세포활성을 증가시키고 세포 주기 진행을 촉진시키는 것으로 보인다. 그러므로, 속단의 생리활성물질(SD62-122)은 치

은섬유아세포의 활성화와 분화에 영향을 미칠수 있고, 치주조직 재생제로의 이용 가능성이 높다고 생각되며 앞으로 임상적으로 활용할 수 있는 여러 방법들 개발할 필요가 있다고 생각된다.

VI. 참고문헌

1. Cleaton-Jones P, Buskin SA, Volchansky A. : Surface ultrastructure of human gingiva. J Periodontal Res 1978;13:367-371.
2. Karring T. : Mitotic activity in the oral epithelium. J Periodontal Res Suppl. 1973; 13:1-47.
3. Karring T, Lang NP, Loe H. : The role of gingival connective tissue in determining epithelial differentiation. J Periodontal Res 1975;10:1-11.
4. Yamaguchi A, Katagiri T, Ikeda T. : Recombinant human bone morphogenetic protein-2 stimulate osteoblastic maturation and inhibits myogenic differentiation in vitro. J Cell Biol 1991;113:681-687.
5. Ripamonti U, Ma SS, van den Heever B, Reddi AH. : Osteogenin, a bone morphogenetic protein, adsorbed on porous hydroxyapatite substrata, induces rapid bone differentiation in calvarial defects of adult primates. Plast Reconst Surg 1992;90:382-393.
6. Mullally BH, James JA, Coulter WA, Linden GJ. : The efficacy of a herbal-based toothpaste on the control of plaque and gingivitis. J Clin Periodontol 1995;22: 686-689.
7. 민원기,이만섭. : Ascorbic acid와 ZeaMays L. 불검화 정량추출물이 치주염 치유에 미치는 영향에 관한 실험적 연구. 대한치주과학회지 1988;18:6-23.
8. 이승렬,정종평,최상목,배기환. : 천연물 추출물의 치주병인균에 대한 항균효과 및 세포독성에 관한 연구. 대한치주과학회지 1992;22: 515-526.
9. 김창민, 신민교, 안덕균, 이경순. : 완역 중약 대사전, 도서 출판 청암, 1997;2172-2477.

10. 한상현. : 속단 활성 성분이 일차 배양한 치조골 모세포의 골형성에 미치는 영향. 원광대학교 치의학 대학원 박사 논문, 2004.
11. 김형렬. : 백서 두개골 결손부 재생에 미치는 속단 활성 성분에 관한 연구. 원광대학교 치의학 대학원 석사 논문, 2003.
12. 이영준, 최희인, 김윤철, 신형식, 유형근. : 속단의 dichloromethane 분획물이 태아골모 세포의 골형성 유도에 미치는 효과. 대한치주과학회지 2003;33:259-269.
13. 박상기. : 속단의 골 형성 촉진 활성 성분에 관한 실험실적 연구. 원광대학교 치의학 대학원 박사 논문, 2003.
14. 김태일, 최은정, 정종평, 한수부, 구영. : 옥수수 불검화 추출물(Zea Mays L.)과 후박 (Magnoliae cortex)추출물 혼합물의 치주질환원인균에 대한 항균작용 및 치은섬유아세포 활성도에 미치는 영향. 대한치주과학회지 2002;32(1):249-255.
15. 허지선, 강정화, 유윤정, 김창성, 조규성, 최성호. : 홍화씨 분획 추출물이 치주인대 섬유아세포와 MC3T3-E1 세포에 미치는 영향. 대한치주과학회지 2001;31(4):833-846.
16. 김대겸, 유형근, 신형식 등. : 인삼이 사람태아골모 세포의 세포주기조절에 미치는 영향. 대한치주과학회지 2003;33:415-437.
17. 본초학(本草學). 한국생약교수협의회, 사단법인 대한 약사회. 2002:755-758.
18. Bellows CG, Aubin JE, Heersche JN, Antosz ME. : Mineralized bone nodules formed in vitro from enzymatically released rat calvaria cell populations. Calcif Tissue Int 1986;38:143-154.
19. Bellows CG, Heersche JN, Aubin JE. :Determination of the capacity for proliferation and differentiation of osteoprogenitor cells in the presence and absence of dexamethasone. Dev Biol 1990;140:132-138.
20. Arceo N, Sauk JJ, Moehring J, Foster RA, Somerman MJ. : Human periodontal cells initiate mineral-like nodules in vitro. J Periodontol 1991;62:499-503.
21. Sato S, Kim T, Arai T, Maruyama S, Tajima M, Utsumi N. :Comparison between the effects of dexamethasone and indomethacin on bone wound healing. Jpn J Pharmacol 1986;42:71-78.
22. Otto AM, Natoli C, Richmond KM, Iacobelli S, Jimenez de Asua L. : Glucocorticoids inhibit the stimulatory effect of epidermal growth factor on the initiation of DNA synthesis. J Cell Physiol 1981;107:155-163.
23. Sherr CJ. Mammalian : G1 cyclins. Cell. 1993;73:1059-1065.
24. DelSal G, Loda M, Pagano M. : Cell cycle and cancer: critical events at the G1 restriction point. Crit Rev Oncog 1996;7:127-142.
25. 최영길. : 임상 분자생물학 기법, 고려의학, 1993;73-205.
26. Leonard G, Davis, Mark C, Dibner, James F, Battey, Elsevier: Molecular biology 1986,311-314.
27. 이연태, 정원일. : 유전자 공학, 집문당, 1983,429-433.
28. Harper JW, Elledge SJ, Keyomarsi K, et al. : Inhibition of cyclin-dependent kinases by p21. Mol Biol Cell 1995;6:387-400.
29. Xiong Y, Zhang H, Beach D. : Subunit rearrangement of the cyclin-dependent kinases is associated with cellular transformation. Genes Dev 1993;7:1572-1583.
30. 유승한. : 녹용이 치주인대세포의 세포주기 조절에 미치는 영향. 원광대학교 치의학 대학원 박사 논문, 2002.
31. 양대승, 김현아, 현하나, 유형근, 김윤철, 신형식. : 녹용이 사람태아 골모세포의 세포주기 조절에 미치는 영향. 대한치주과학회지 2002;32:811-825.
32. 김홍식, 유형근, 신형식. : 고삼추출물이 치은섬유아세포의 세포주기 조절단백질 발현에 미치는 영향. 대한치주과학회지 2000;30:869-883.

Effect of the Physiologically Active Compounds in *Phlomis Radix* on Cell Cycle Regulation in Human Gingival Fibroblasts

Suk-Joo You, Kil Young Jang, Ho Sang Yoon, Ho Chul Choi, Ki Jong Sung, Hyun A Kim,
Sung-Hee Pi, Hyung-Shik Shin, Hyung-Keun You

Department of Periodontology, School of Dentistry, Wonkwang University

The purpose of present study was to investigate the effects of physiologically active compound (SD62-122) from *Phlomis Radix* on the cell cycle progression and its molecular mechanism in human gingival fibroblasts(HGFs). For this purpose, fibroblasts were isolated and cultured from excised gingiva during crown lengthening procedure in healthy adult. The following parameters were evaluated that there are cell number counting, MTT assay, cell cycle progression, western blot analysis.

The cell number and MTT assay of primary cultured fibroblast was not increased at 2 days but significantly increased compared to negative control at 3 days ($p < 0.05$). S phase was increased and G1 phase decreased in both 10^{-8} M and 10^{-9} M of SD62-122 in cell cycle analysis. The cell cycle regulation protein levels of Cyclin D₁, Cyclin E, cdk 2, cdk 4 and cdk 6 were increased compared to control in both 10^{-8} M and 10^{-9} M of SD62-122. The protein levels of p21 and p53 were decreased compared to control, but the level of pRb was not changed compared to control in 10^{-9} M of SD2-122.

These results suggested that physiologically active compound (SD62-122) isolated from *Phlomis Radix* increases the cell proliferation and cell cycle progression in HGFs, which is linked to increased cell cycle regulation protein levels of Cyclin D₁, Cyclin E, cdk 2, cdk 4 and cdk 6, and decreased the levels of p21, p53.