

행인 추출물이 고포도당 상태의 치은섬유아세포 및 치주인대세포에 미치는 영향

나성윤 · 권영혁 · 박준봉 · 허익 · 김성진

경희대학교 치과대학 치주과학교실

I. 서론

급속히 변하는 현대사회는 빠른 정보의 공유로 동시대를 사는 현대인들에게 상호보완적인 삶을 제공할 뿐만 아니라 정신적, 물질적 스트레스도 함께 제공하고 있으며 이러한 사회의 변화는 수질 및 대기 오염등과 같은 환경적 변화와 식생활에도 큰 영향을 미치게 되었다. 이와같은 변화는 서구화된 식단을 우리의 가정으로 끌어들이며 결과적으로 비만환자 및 당뇨병 환자의 증가등과 같은 선진국형 대사질환의 발현을 증가시키고 있다. 특히 당뇨병 환자의 수가 급격히 늘어나는 추세에 있으며 이들 당뇨병 환자는 혈당조절이 잘 이루어지지 않을 경우 인슐린의 불충분한 분비, 감소된 글루코스 내성, 모세혈관 이상, 신경증, 동맥경화증등 여러 가지 전신적인 합병증을 일으키는 것으로 알려져 있다¹⁾.

당뇨병을 가지고 있는 환자에서의 치주질환 발병 빈도에 대해서도 많은 연구들이 보고되었으며, 당뇨병 환자가 정상인에 비하여 더 높은 치주질환 발병 빈도를 보이는 것으로 보고되었다²⁻⁷⁾. Campbell (1972)⁸⁾은 유사한 국소적 자극에 대해서 당뇨병 환자가 정상인에 비해서 부착상실, 탐침시 출혈, 치아동요등을 포함한 치주질환의 임상적 증상들이 더욱 심하게 나타나며, 그 빈도도 더 많다고 보고하였으며, Ureles(1983)⁹⁾는 비조절성 당뇨병 환자가 치주

염을 포함하는구강내 감염에 감수성이 높으며, 치주질환의 발병율이 환자의 연령 증가와 사춘기후 당뇨병의 경우 증가된다고 하였다. 또한 Hugoson등(1989)¹⁰⁾은 당뇨병의 지속기간에 관계없이 당뇨병 환자가 정상인에 비해 치은염에 이환된 비율이 높다고 하였으며, 특히 45세 이하의 환자에서 4-5mm의 치주낭깊이와 심각한 골소실을 보인다고 하였다. Nelson등(1990)¹¹⁾과 Grossi등(1993)¹²⁾은 인슐린 비의존성 당뇨병 환자의 치주질환 이환율이 정상인에 비해 2-3배 높게 나타나며 당뇨병이 치주질환에서 중요한 위험인자로 작용한다고 하였으며, 최근에 Collin등(1998)¹³⁾은 장기간의 인슐린 비의존형 당뇨병 환자들이 정상인에 비해 보다 많은 빈도의 진행된 치주염을 나타낸다고 보고하였다.

Bridges등(1996)¹⁴⁾은 당뇨병 환자가 정상인에 비해 치태지수, 치은지수, 치은출혈지수, 치주낭깊이, 부착상실 등 여러 가지 치주지표(periodontal parameter)에 대해 높은 수치를 나타내고 당뇨병의 기간과는 상관관계가 없다고 하였다. Karjalainen과 Knuuttila(1996)¹⁵⁾은 인슐린 의존성 당뇨병 환자를 대상으로 조사한 결과 당뇨병으로 인한 과혈당증과 불량한 대사조절로 숙주방어기전이 감소하여 치은출혈을 증가시킨다고 하였으며 당뇨병 환자에서 치은염증을 예방하기 위하여 치태조절이 중요하다는 것을 강조하였다. 한편 Nishimura등(1996)¹⁶⁾은 고혈

당이 치주인대세포의 이주를 감소시켜서 치주염의 치유를 악화시킨다고 하였으며, 정등(1997)¹⁷⁾은 당뇨와 같은 고농도의 glucose를 치주조직세포에 투여하면 세포활성이 떨어지고 prostaglandin E₂의 생성이 증가되는 등 염증상태를 악화시킨다고 보고하였다.

당뇨병 치료에서 혈당량을 저하시키기 위해 가장 일반적으로 사용되고 있는 대표적인 약제는 인슐린이다. 그러나 인슐린은 당뇨병 자체를 근본적으로 치유시키는 것이 아니기 때문에 일생을 통해 투여해야만 하며, 투여방법도 주사에 의한 비경구적 투여방법을 사용해야 하는 불편함이 있다. 이밖에 다른 화학적 혈당강하제들은 저혈당, 알레르기, 지방대사장애 등과 같은 부작용이 있다¹⁸⁾. 이와같은 부작용을 해소하고자 하는 노력들이 천연 생합성약물에 대한 연구로 이어져, 최근에 송등(1999)¹⁹⁾은 두릅나무와 황백피의 혼합추출물을 투여한 실험에서 정상상태의 치은섬유아세포 및 치주인대세포의 활성이 증가될 뿐만 아니라 당뇨병의 합병증으로 야기될 수 있는 치주조직의 염증이 억제될 수 있다고 보고한 바 있다.

본 연구에서 사용될 약제는 진통, 소염작용 등을 나타내는 생합성 약물의 일종인 살구나무씨(Armeniaca Semen, 행인(杏仁)) 추출물로서 장미과에 속한 살구나무의 果實인 살구의 核仁이며, 한방에서는 호흡기계 질환 즉, 기관지염, 기관지천식, 기관지확장증, 해소, 호흡곤란등의 치료에 이용되고 있다. 그 성분은 amygdalin 약 3%, 함유율 30-50%의 효소 emulsion이 공존하며, amygdalin은 emulsion에 의해 mandelonitrile과 glucose로 분해되고 이어 HCN과 benaldehyde를 생성하며 무기산에 의해서는 직접 가수분해된다. 또한 amygdalin은 D-form과 L-form이 있는데 D-mandelonitrile-β-D-gentiobioside와 L-mandelonitrile-β-D-gentiobioside가 공존하는 것으로 알려져 있다.

본 연구는 살구나무씨(이하 행인) 추출물을 이용하여 치주조직을 구성하는 치은섬유아세포 및 치주인대세포를 대상으로 표준배양액 상태와 당뇨병과 같은 고농도의 포도당을 투여한 상태에서 세포수, 단

백질 함량, 알칼리성 인산분해효소 활성도를 측정하여 이 약물이 치은섬유아세포 및 치주인대세포 활성에는 어떠한 영향을 미치는지에 대해서 알아보고자 시행하였다.

II. 연구재료 및 방법

1. 연구재료

본 연구에서 사용된 행인 추출물은 행인 500g과 메탄올 2 l를 혼합하여 Soxhlet추출기를 이용하여 추출, 여과한 후에 이 여액을 Rotary Evaporator로 2회 증류하고, Freeze-dryer로 동결 건조시켜 분말화하여 사용하였다.

연구대상으로는 전신건강이 양호한 성인을 대상으로부터 임상적으로 염증이 없는 건강한 치주조직에서 초기 배양한 치은섬유아세포와 치주인대세포를 이용하였다. 치은섬유아세포와 치주인대세포의 배양은 Somerman등(1988)²⁰⁾의 방법에 의하여 시행하였다.

1) 치은섬유아세포의 배양

교정치료를 목적으로 내원한 환자로부터 제1소구치 발치시 건강한 치은조직을 채취하여 200 unit/ml penicillin(Gibco, U.S.A.), 200 μg/ml streptomycin(Gibco, U.S.A.)과 1 μg/ml amphotericin-B(Gibco, U.S.A.)가 첨가된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(Gibco, U.S.A.)로 구성된 생검배지로 4회 세척하였다. 조직편을 약 1mm³의 크기로 세절하여 직경 35mm의 배양접시에 10-15조각 정도를 고르게 분포시킨 다음 10% Fetal bovine serum(FBS, Gibco, U.S.A.)과 100 unit/ml penicillin, 100 μg/ml streptomycin, 0.5 μg/ml amphotericin-B가 포함된 DMEM으로 구성된 배양액을 넣고, 37℃, 100% 습도, 5% CO₂ 공기혼합 배양기(Vision Scientific Co., Korea)에서 배양하였다.

치은섬유아세포가 조직절편으로부터 증식되어 배양접시를 완전히 덮는 단층이 형성되면 0.05% Trypsin/0.02% EDTA를 처리하여 배양접시로부터

세포를 박리하고 1:3 계대배양하여 4-7세대의 세포를 실험에 사용하였다.

2) 치주인대세포의 배양

교정치료를 목적으로 발거한 제1소구치를 치은조직을 세척한 것과 동일한 생검배지로 4회 세척하였다. 치근의 치관측 $\frac{1}{3}$ 부위와 치근단측 $\frac{1}{3}$ 부위를 제외한 중앙 $\frac{1}{3}$ 부위에서 치주인대 조직을 blade로 채취하여 직경 35mm의 배양접시에 고르게 분포시킨 다음 치주인대세포 배양에서와 같은 방법으로 배양하여 4-7세대의 세포를 실험에 사용하였다.

2. 연구방법

1) 대조군 및 실험군 설정

〈고포도당 배양액 상태〉

고농도의 포도당을 투여한 상태에서의 행인 추출물의 효과를 알아보기 위한 실험으로 10% FBS와 100 unit/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin, 0.5 μ g/ml amphotericin -B가 포함된 DMEM으로 구성된 배양액에 포도당을 400 mg/dl의 농도로 투여한 군을 실험군으로 하였으며, 이 배양액에 행인 추출물의 농도를 증가시킨 군을 실험군으로 하였다. 행인 추출물 1 μ g/ml의 농도로 투여한 군을 실험 제 1 군, 10 μ g/ml의 농도로 투여한 군을 제 2 군으로 하였으며 총세포수는 대조군과 실험군 모두 동일하게 하였다.

2) 세포수 측정

치은섬유아세포와 치주인대세포를 각각 직경 35mm의 배양접시에 4.5×10^4 cells/ml의 세포가 되도록 하여 10% FBS와 100 unit/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin, 0.5 μ g/ml amphotericin -B가 포함된 DMEM으로 구성된 배지에서, 37°C, 100% 습도, 5% CO₂ 공기혼합 배양기에서 대조군, 실험군에 각각 3개씩 27개의 배양접시에 배양하였다. 세포가 부착 완료한 1일 후부터 각 군에 해당하는 배양액으로 배양하였으며, 이때부터 배양 1일, 2일, 5일째에 0.05% Trypsin/ 0.02% EDTA로 처리하여 세포를 박리한 다음 hemocytometer를 이용하여 도립현미경하에서

세포수를 측정하였다.

3) 단백질함량 측정

치은섬유아세포와 치주인대세포를 각각 직경 35mm의 배양접시에 4.5×10^4 cells/ml의 세포가 되도록 하여 세포수 측정에서와 같이 배양한 후, 배양 2일, 5일에 인산완충생리식염수(Phosphate buffered saline)로 2회 세척하여 0.05% Trypsin/0.02% EDTA로 처리하고 세포를 박리한 다음 원심분리하여 얻은 cell pellet을 0.5ml deionized distilled water에 넣고 혼합하였다. 초음파세포분쇄기로 세포막을 분쇄하고 이중 100 μ l를 취하여 protein assay kit 시약(BIO-RAD, U.S.A)을 5ml 넣고 혼합후 UV-VIS spectrophotometer로 595nm에서 흡광도를 측정하고 정규곡선을 이용하여 세포내의 단백질함량을 측정하였다.

4) Alkaline phosphatase 활성도 측정

치주인대세포를 직경 35mm의 배양접시에 4.5×10^4 cells/ml의 세포가 되도록 하여 세포수 측정에서와 같이 배양한 후, 배양 2일, 5일에 인산완충생리식염수(Phosphate buffered saline)로 2회 세척하여 0.05% Trypsin/0.02% EDTA로 처리하고 세포를 박리한 다음 원심분리하여 얻은 cell pellet을 0.5ml deionized distilled water에 넣고 혼합하였다. 초음파세포분쇄기로 세포막을 분쇄하고 이중 50 μ l를 취하여 Kind-King method를 이용하여 UV- VIS spectrophotometer로 500nm에서 흡광도를 측정하고 정규곡선을 이용하여 alkaline phosphatase의 활성도를 측정하였다.

5) 통계분석

One Way ANOVA Test를 이용하여 $P < 0.05$ 수준으로 유의성을 검증하였다.

III. 연구성적

1. 세포수 측정

Table 1. Effect of *Armeniacae Semen* extracts on the proliferation of human gingival fibroblasts under the high glucose condition

group \ time	cell number($\times 10^4$ cells/ml)		
	1day	2day	5day
GC	4.80 ± 0.38	5.71 ± 0.51	8.50 ± 0.81
GT1	4.59 ± 0.59	5.13 ± 0.24	7.79 ± 1.11
GT2	4.45 ± 0.25	$4.64 \pm 0.44^*$	$6.54 \pm 0.51^*$

Values are the mean \pm S.D. n=3

GC; control, glucose 400mg/dl, T1; A.S. $1\mu\text{g/ml}$ +glucose 400mg/dl, T2; A.S. $10\mu\text{g/ml}$ +glucose 400mg/dl

* Significantly different from the control at each day(P<0,05 by one-way ANOVA)

Table 2. Effect of *Armeniacae Semen* extracts on the proliferation of human periodontal ligament cell under the high glucose condition

group \ time	cell number($\times 10^4$ cells/ml)		
	1day	2day	5day
GC	4.41 ± 0.49	5.42 ± 0.59	7.09 ± 0.75
GT1	4.09 ± 0.59	5.59 ± 0.68	7.20 ± 0.30
GT2	4.38 ± 0.37	6.17 ± 0.43	$9.02 \pm 0.96^*$

Values are the mean \pm S.D. n=3

GC; control, glucose 400mg/dl, T1; A.S. $1\mu\text{g/ml}$ +glucose 400mg/dl, T2; A.S. $10\mu\text{g/ml}$ +glucose 400mg/dl

* Significantly different from the control at each day(P<0,05 by one-way ANOVA)

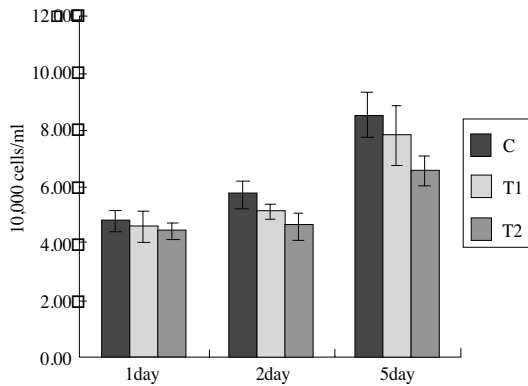


Figure 1. Effect of *Armeniacae Semen* extracts on the proliferation of human gingival fibroblasts under the high glucose condition

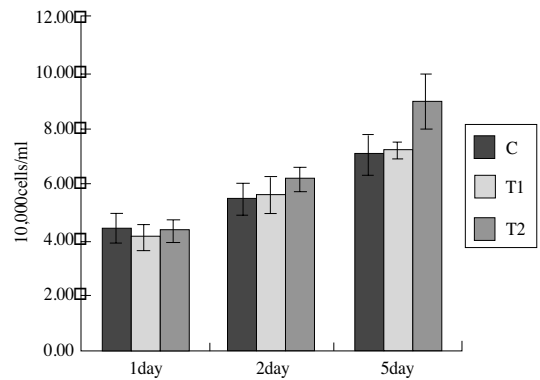


Figure 2. Effect of *Armeniacae Semen* extracts on the proliferation of human periodontal ligament cells under the high glucose condition

1) 고포도당 배양액 상태

고농도의 포도당을 투여한 상태에서의 행인 추출물의 효과를 알아보기 위한 실험으로 치은섬유아세포와 치주인대세포 모두 시간이 경과함에 따라 세포

수가 전반적으로 증가하는 양상을 보였으며, 치은섬유아세포에 비해 치주인대세포의 실험군에서 많은 증가를 보였다.

치주인대세포는 1일에서는 모든 군이 유사한 양상

을 보였으나 2일, 5일로 갈수록 대조군에 비치은섬유 아세포는 1일에서는 모든 군이 유사한 양상을 보였으나 2일, 5일로 갈수록 대조군에 비하여 실험군의 세포수가 감소하였다. 시간별 각 군의 세포수를 보면 2일에는 대조군, 실험 제 1 군, 실험 제 2 군이 각각 5.71 ± 0.51 , 5.13 ± 0.24 , 4.64 ± 0.44 로 행인 추출

물의 농도가 증가함에 따라, 실험 제 1, 2군이 각각 5.42 ± 0.59 , 5.59 ± 0.68 , 6.17 ± 0.43 로 행인 추출물의 농도가 증가함에 따라 세포수가 증가하는 경향을 보였고, 5일에서도 7.09 ± 0.75 , 7.20 ± 0.30 , 9.02 ± 0.96 로 2일째와 비슷한 양상으로 증가하였지만 대조군에 비해 유의성 있는 차이를 보이지는 않았다(Table 2,

Table 3. Effect of *Armeniacae Semen* extracts on the protein amounts of human gingival fibroblasts under the high glucose condition

time \ group	Protein($\mu\text{g/ml}$)		
	GC	GT1	GT2
2day	19.49 ± 0.73	19.63 ± 0.63	20.37 ± 1.51
5day	28.54 ± 1.26	26.45 ± 0.71	$25.31 \pm 1.11^*$

Values are the mean \pm S.D, n=3

GC; control, glucose 400mg/dl, T1; A.S. $1\mu\text{g/ml}$ +glucose 400mg/dl, T2; A.S. $10\mu\text{g/ml}$ +glucose 400mg/dl

* Significantly different from the control at each day(P<0.05 by one-way ANOVA)

Table 4. Effect of *Armeniacae Semen* extracts on the protein amounts of human periodontal ligament cells under the high glucose condition

time \ group	Protein($\mu\text{g/ml}$)		
	GC	GT1	GT2
2day	18.25 ± 0.86	17.15 ± 0.94	18.83 ± 0.77
5day	29.38 ± 1.33	30.05 ± 1.38	$33.20 \pm 2.46^*$

Values are the mean \pm S.D, n=3

GC; control, glucose 400mg/dl, T1; A.S. $1\mu\text{g/ml}$ +glucose 400mg/dl, T2; A.S. $10\mu\text{g/ml}$ +glucose 400mg/dl

* Significantly different from the control at each day(P<0.05 by one-way ANOVA)

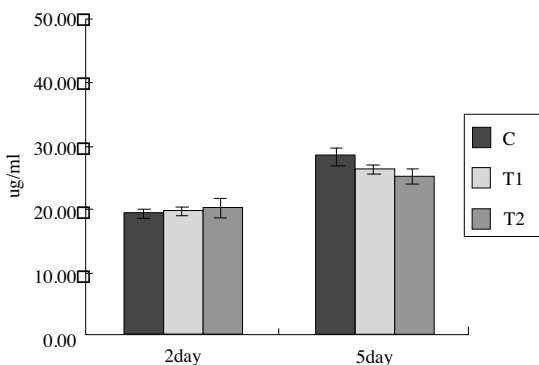


Figure 3. Effect of *Armeniacae Semen* extracts on the protein levels of human gingival fibroblasts under the high glucose condition

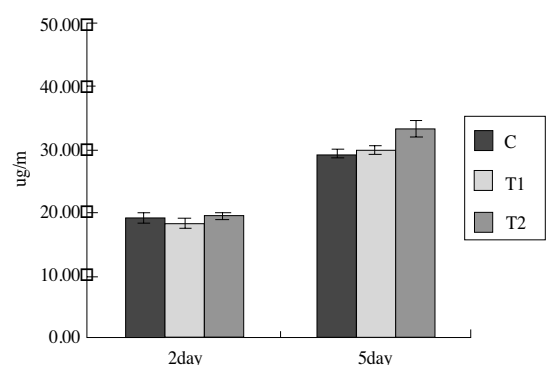


Figure 4. Effect of *Armeniacae Semen* extracts on the protein levels of human periodontal ligament cells under the high glucose condition

Table 5. Effect of *Armeniacae Semen* extracts on alkaline phosphatase activity of human periodontal ligament cells under the high glucose condition

time \ group	ALP		
	GC	GT1	GT2
2day	40.68±1.35	43.85±0.44	41.84±1.46
5day	44.56±0.45	51.55±1.03*	48.04±0.65*

Values are the mean ± S.D. n=3

GC; control, glucose 400mg/dl, T1; A.S. 1 μ g/ml+glucose 400mg/dl, T2; A.S. 10 μ g/ml+glucose 400mg/dl

* Significantly different from the control at each day(P<0.05 by one-way ANOVA)

Figure 2).

1) 고포도당 배양액 상태

고농도의 포도당을 투여한 상태에서 행인 추출물의 효과를 알아보기 위한 실험에서 대조군과 실험 제 1, 2 군을 2, 5일에 단백질함량을 측정한 결과, 치은섬유아세포에서는 2일의 측정치가 대조군, 실험 제 1, 2 군이 각각 19.49±0.73, 19.63±0.63, 20.37±1.51로 대조군, 실험 제 1 군, 실험 제 2 군 순으로 나타났다. 반면 5일째의 결과에서는 대조군, 실험 제 1, 2 군이 각각 28.54±1.26, 26.45±0.71, 25.31±1.11로 실험 제 2 군, 실험 제 1 군, 대조군 순으로 나타났다. 5일째 2 군에서 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다(Table 3, Figure 3). 치주인대세포에서는 2 일째 대조군, 실험 제 1, 2 군이 각각 18.25±0.86, 17.15±0.94, 18.83±0.77로 실험 제 1 군, 대조군, 실험 제 2 군 순으로 나타났고, 5일째의 결과에서는 대조군, 실험 제 1, 2 군이 각각 29.38±1.33, 30.05±1.38, 33.20±2.46으로 대조군, 실험 제 1 군, 실험 제 2 군 순으로 결과를 보였다. 실험군 모두에서 대조군에 비하여 유의성 있는 차이를 보이지는 않았다 (Table 4, Figure 4).

3. Alkaline phosphatase 활성도 측정

1) 고포도당 배양액 상태

고농도의 포도당을 투여한 상태에서 행인 추출물이 치주인대세포의 알칼리성 인산분해효소 활성에 미치는 효과를 알아보기 위한 실험으로 대조군과 실험 제 1, 2 군을 2, 5일에 알칼리성 인산분해효소 활성도를 측정한 결과, 2일의 측정치가 대조군, 실험 제 1, 2 군이 각각 40.68±1.35, 43.85±0.44, 41.84±1.46으로 대조군, 실험 제 2 군, 실험 제 1 군 순으로 나타났다. 5일째의 결과에서는 대조군, 실험 제 1, 2 군이 각각 44.56±0.45, 51.55±1.03, 48.04±0.65로 2일째와 비슷한 결과를 보였다. 5일째는 1, 2 군 모두가 대조군에 비하여 유의성 있게 증가하였다(Table 5, Figure 5).

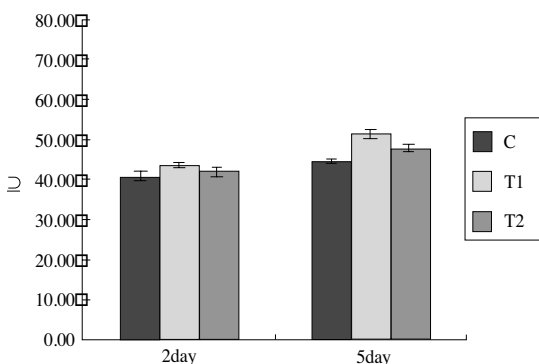


Figure 5. Effect of *Armeniacae Semen* extracts on alkaline phosphatase activity of human periodontal ligament cells under the high glucose condition

IV. 총괄 및 고찰

생활수준의 향상과 더불어 식생활의 변화는 우리나라 국민들의 질병 변화추세를 선진국형으로 변화시켜 각종 성인병의 증가와 함께 특히 당뇨병 환자의 증가를 초래하였다. 당뇨병은 단순히 당 대사의 이상에 의해서만 야기되는 것이 아니라 당, 지방 및

단백질 대사, 수분과 전해질 대사등의 전반적인 장애에 의한 전신성 대사성 질병이라고 할 수 있다. 이러한 대사이상은 인슐린의 절대적 결핍 또는 상대적 부족과 후천적, 선천적 및 유전적 요소가 복잡하게 얽혀 발생하는 것으로 밝혀졌다^{21,22)}.

당뇨병은 발생시기, 원인 및 특성에 따라 2종류로 나뉜다. 첫째로 제1형 또는 인슐린 의존성 당뇨병으로서 20세 이하의 청소년기에 발병하며 원인은 췌장의 β -cell이 파괴되어 인슐린의 분비가 되지 않아 결과적으로 인슐린의 주효과인 혈당조절이 일어나지 않게 되어 유발된 당뇨병이다. 따라서 제1형 당뇨병 환자의 혈당조절은 규칙적인 인슐린주사로 가능하다. 이와 달리 제2형 또는 인슐린 비의존성 당뇨병은 주로 40세 이후에 발병하며 췌장의 β -cell은 파괴되지 않아 인슐린 분비가 거의 정상에 가깝거나 혹은 적은 경우에도 제1형 당뇨병 환자보다 훨씬 나은 상태이지만, 분비된 인슐린이 표적장기에 그 효과를 나타내지 못함으로써 유발되는 당뇨병이다. 따라서 제2형 당뇨병의 치료는 환자에 따라 식이요법, 운동요법, 인슐린주사 및 경구용 혈당강하제의 투여와 같이 매우 복잡적이며, 그 방법 또한 어렵다²³⁾.

당뇨병 환자는 혈당조절이 잘 이루어지지 않을 경우 인슐린의 불충분한 분비, 감소된 글루코즈 내성, 모세혈관 이상, 신경증, 동맥경화증등 여러 가지 전신적인 합병증을 일으키는 것으로 알려져 있으며¹⁾, 당뇨병을 가지고 있는 환자에서의 치주질환 발병빈도에 대해 연구한 보고에 의하면 당뇨병 환자가 정상인에 비하여 더 높은 치주질환 발병빈도를 보였다고 하였다²⁻⁷⁾. Campbell(1972)⁸⁾은 유사한 국소적 자극에 대해서 당뇨병 환자가 정상인에 비해서 부착상실, 탐침시 출혈, 치아동요도등을 포함한 치주질환의 임상적 증상들이 더욱 심하게 나타나며 그 빈도도 더 많다고 보고하였으며, Ureles(1983)⁹⁾은 비조절성 당뇨병 환자가 치주염을 포함하는구강내 감염에감수성이 높으며, 치주질환의 발병율이 환자의 연령 증가와 사춘기후 당뇨병의 경우 증가된다고 하였다. Hugoson등(1989)¹⁰⁾은 당뇨병의 지속기간에 관계없이 당뇨병 환자가 정상인에 비해 치은염에 이환된 비율이 높다고 하였으며, 특히 45세 이하의 환자에서 45mm의 치주

낭깊이와 심각한 골소실을 보인다고 하였다. Nelson등(1990)¹¹⁾과 Grossi등(1993)¹²⁾은 인슐린 비의존성 당뇨병 환자의 치주질환 이환율을 정상인과 비교한 결과 정상인에 비해 2-3배 높게 나타나며 당뇨병이 치주질환에서 중요한 위험인자로 작용한다고 하였으며, 최근에 Collin등(1998)¹³⁾은 장기간의 인슐린 비의존성 당뇨병 환자들이 정상인에 비해 보다 많은 빈도의 진행된 치주염을 나타낸다고 보고하였다.

Ficara등(1975)²⁴⁾은 치태지수와 치은지수가 같은 비슷한 상태에서 비당뇨인에 비해 당뇨병 환자에서 치은열구액과 혈당 농도가 더 높으며 이로 인해 당뇨병에서 치은염증이 증가된다고 하였다. 그리고 조절성 당뇨병 환자에 비해 비조절성 당뇨병 환자에서 부착기구의 소실 및 골소실이 보다 광범위하게 이루어지며 심지어 오랜기간 당뇨병을 앓은 환자의 경우보다 더 많은 부착소실을 보였다고 보고되었다^{25,26)}. Bridges등(1996)¹⁴⁾은 당뇨병 환자가 정상인에 비해 치태지수, 치은지수, 치은출혈지수, 치주낭깊이, 부착상실등 여러 가지 치주지표(periodontal parameter)에 대해 높은 수치를 나타내고 당뇨병의 기간과는 상관관계가 없다고 하였다. 그리고 Karjalainen과 Knuuttila(1996)¹⁵⁾은 인슐린 의존성 당뇨병 환자를 대상으로 조사한 결과 당뇨병으로 인한 과혈당증과 불량한 대사조절로 숙주방어기전이 감소하여 치은출혈을 증가시킨다고 하였으며 당뇨병 환자에서 치은염증을 예방하기 위하여 치태조절이 중요하다는 것을 강조하였다.

한편, Nishimura등(1996)¹⁶⁾은 고혈당이 치주인대 세포의 이주를 감소시켜서 치주염의 치유를 악화시킨다고 하였으며, Sorsa등(1992)²⁷⁾은 당뇨병 환자의 치은조직과 치은열구액 내에서 collagenase의 활성도가 증가하여 조직파괴가 증가된다고 보고하였다. Seppälä 등(1997)²⁸⁾은 당뇨병 환자의 경우가 정상인에 비해 치은결합조직의 교원질 양이 보다 적고 혈관막의 증식이 발견되며 형질세포가 많이 침윤되는 등의 양상을 보인다고 하였다. 한편 정등(1997)¹⁷⁾은 당뇨와 같은 고농도의 포도당을 치주조직세포에 투여하면 세포활성이 떨어지고 prostaglandin E₂의 생성이 증가되는 등 염증상태를 악화시킨다고 보고하

였으며, Salvi등(1997)²⁹⁾은 비슷한 정도의 치주염 상태를 보이는 당뇨병 환자와 비당뇨병 환자를 대상으로 치은열구액 내의 PGE₂와 IL-1 β 와 같은 염증 매개 물질의 농도를 조사한 결과 당뇨병 환자에서 유의성 있게 증가되는 것을 발견하여, 이 물질이 치주염의 상태를 더욱 악화시키는 것으로 보고하였다.

당뇨병 환자에서 높은 치주질환 발병율을 나타내는 원인에 대해서는 periodontal flora의 영향, 중성구 기능의 이상, 과도한 염증반응, 교원질 대사의 이상, 그리고 상처치유의 이상등이 제시되고 있다³⁰⁾. 또한 당뇨병이 치주조직에서 임파구, 대식세포, cytokine, arachidonic acid 대사물질, 그 외의 국소인자들에게 영향을 미칠 것으로 추측되지만 아직까지 그 기전은 확실하게 규명되어 있지 않다. Arachidonic acid 대사물질인 prostaglandin은 혈소판 응집, 중성구의 화학주성, 혈관투과성의 증가 그리고 골흡수 등을 나타내며 치주조직에서 치은염과 치조골흡수를 유발하는 물질로 알려져 있다^{31,32)}. 이중 특히 PGE₂는 염증 반응, 결합조직파괴 그리고 골흡수 등의 작용을 하는 것으로 보고되고 있다³³⁻³⁶⁾. 또 치은열구액과 치은조직표본을 이용한 실험에서도 치주질환을 가지고 있는 염증성치은의 PGE₂ 함량이 건강한 치은조직에 비해 높게 나타나는 것으로 알려졌다^{35,37-41)}.

치은결합조직을 구성하는 주요세포인 치은섬유아세포와 치주인대를 구성하는 치주인대세포는 여러 가지 자극에 의해 PGE₂를 생산한다. Garrison등(1988)⁴²⁾과 Sismey등(1991)⁴³⁾은 치은섬유아세포가 lipopolysaccharide에 의해 자극을 받으면 PGE₂를 생산한다고 하였으며, Arai등(1995)⁴⁴⁾은 prostaglandin이 세포의 증식, DNA합성, 교원질합성 그리고 비교원성단백질 합성을 억제하는 작용을 통해 치은섬유아세포에 이화작용을 나타낸다고 하였다. Koka등(1997)⁴⁵⁾도 치은섬유아세포와 치주인대세포가 *P. gingivalis*에서 유래된 lipopolysaccharide에 대한 반응으로 PGE₂의 생성이 증가되고 특히 치주인대세포에서 더 많은 생성을 보인다고 하였다. 또한 치은섬유아세포와 치주인대세포는 interleukin-1, interleukin-1 β , tumor necrosis factor α , 그리고 parathyroid hormone에 의해서도 prostaglandin 생성이 증

가한다고 알려져 있다^{46,47)}. 최근에 정등(1997)¹³⁾은 in vitro 실험에서 당뇨와 같은 고농도의 포도당을 치은섬유아세포 및 치주인대세포에 투여하여 세포활성과 PGE₂의 생성을 조사한 결과, 고농도의 glucose를 투여한 군에서 세포수와 단백질함량은 감소되는 반면 PGE₂의 양은 증가됨을 보고하였다. 또한 송등(1999)¹⁹⁾은 두릅나무와 황백피의 혼합추출물을 투여한 실험에서 정상상태 뿐만 아니라 고농도의 포도당을 투여한 군 모두에서 치은섬유아세포 및 치주인대세포의 활성이 증가되었다고 보고하면서 이와 같은 결과가 고농도의 포도당 투여로 인해 발생하는 PGE₂ 등과 같은 염증매개물질의 활성을 억제하는 작용에 의한 것이라고 추측하였다.

고농도의 포도당을 투여한 본 연구에서 치은섬유아세포의 경우 대조군에 비해 실험군의 세포활성이 감소되는 양상으로 나타난 반면, 치주인대세포는 대조군에 비하여 실험군에서 세포활성이 증가되는 양상을 보였다.

세포수 측정에 대한 실험 결과, 대조군의 경우 치은섬유아세포와 치주인대세포 모두에서 고농도의 포도당으로 인해 세포증식이 저하되는 양상을 보였으며, 치은섬유아세포는 행인 추출물의 농도가 증가할수록 저하된 대조군에 비해서 더욱더 감소하는 양상을 보였으나 치주인대세포는 실험 군에서 행인의 농도가 증가함에 따라감소되지 않고 증가되는 양상을 보였다.

단백질함량 측정에 대한 실험 결과, 세포수 측정결과와 유사하게 나타났다. 치은섬유아세포의 경우 대조군보다 실험군에서 단백질함량이 낮게 나타났다. 치주인대세포는 행인 추출물의 농도가 증가할수록 단백질함량이 높게 나타났으며, 알칼리성 인산분해효소 활성도의 경우도 증가량이 많지는 않으나 대조군에 비하여 실험군에서 증가하였고 1, 2 군 모두에서 유의성 있게 증가하였다.

이상의 결과는 행인 추출물이 선택적으로 치주인대세포에 작용하여 고농도의 포도당을 투여한 상태에서 세포작용을 증가시켜 주는 어떤 작용을 할 뿐만 아니라, PGE₂ 등과 같은 염증 매개 물질의 활성을 억제하는 작용을 하는 것이 아닌가 추측된다. 또한 세

포수와 단백질함량은 행인 추출물 1 $\mu\text{g/ml}$ 를 투여한 1 군보다 10 $\mu\text{g/ml}$ 투여한 2 군에서 가장 많은 증가를 보였으나 알칼리성 인산분해효소 활성도는 10 $\mu\text{g/ml}$ 를 투여한 2 군에서는 약간 감소하는 경향을 보여 너무 많은 양의 행인 추출물이 오히려 세포활성을 저해할 수도 있다는 것에 대해서도 연구의 여지가 있다고 하겠다.

본 연구의 결과를 요약하면, 호흡기계 염증성질환의 치료제로서 사용되고 있는 행인 추출물이 고농도의 포도당을 투여한 상태에서 치주인대세포 활성을 증가시킬 뿐만 아니라 당뇨병의 합병증으로 야기될 수 있는 치주조직의 염증을 억제할 수 있으며 나아가 염증으로 파괴된 치주조직에 선택적으로 작용하여 조직 재생을 촉진시킬 수 있는 가능성이 있는 것으로 여겨진다. 하지만 염증 억제 및 세포활성의 정확한 기전과 적정 농도에 대한 더욱 많은 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

V. 결론

항염증 작용이 있는 것으로 알려진 천연 행인 추출물이 치은섬유아세포 및 치주인대세포의 활성화에는 어떠한 영향을 미치는지 조사해 보고자 본 연구를 시행하였다.

전신건강이 양호한 성인을 대상으로부터 초기 배양한 치은섬유아세포와 치주인대세포를 대상으로 실험을 시행하였다. 실험은 고농도의 포도당을 투여한 상태에서 행인 추출물의 효과를 알아보기 위한 실험으로 세포에 고혈당상태를 유지하기 위해 각각의 배지에 400 mg/dl 농도의 포도당을 첨가한 후 행인 추출물을 각각 1, 10 $\mu\text{g/ml}$ 를 투여한 군을 제 1, 2 실험군으로 하고 투여하지 않은 군을 대조군으로 하여 치은섬유아세포에서는 세포수, 단백질함량을 치주인대세포에서는 세포증식율, 단백질함량, 알칼리성 인산분해효소 활성도를 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 고농도의 포도당을 투여한 상태에서

1) 세포수는 치은섬유아세포의 경우 약물의 농도

가 증가할수록 감소하였으며 5일째 2군에서 유의성 있게 감소하였다($P<0.05$). 반면 치주인대세포의 경우 약물의 농도가 증가할수록 증가하였으나 대조군과 비교시 유의성있는 차이를 보이지 않았다($P<0.05$).

2) 단백질함량은 세포수와 마찬가지로 치은섬유아세포의 경우 약물의 농도가 증가할수록 감소하였으며 5일째 2군에서 유의성 있게 감소하였다($P<0.05$). 반면 치주인대세포의 경우 약물의 농도가 증가할수록 증가하였으나 대조군과 비교시 유의성 있는 차이를 보이지 않았다($P<0.05$).

3) 치주인대세포의 알칼리성 인산분해효소 활성도는 약물의 농도가 증가할수록 약간 감소하였으나 5일째 1, 2군 모두에서 유의성 있게 증가하였다($P<0.05$).

결론적으로 적정농도의 행인 추출물이 고농도의 포도당을 투여한 상태에서 선택적으로 치주인대세포의 활성을 증가시켜 염증으로 파괴된 치주조직의 재생을 촉진시킬 수 있는 가능성이 있을 것으로 사료된다.

V. 참고문헌

1. 민현기 : 한국인 당뇨병의 임상적 특성. 당뇨병, 16 : 163, 1992.
2. De Pommereau, V., Dargent-Pare, C., Robert, J. J., and Brion, M. : Periodontal status in insulin-dependent diabetic adolescents. J. Clin. Periodontol., 19 : 628-632, 1992.
3. Emrich, L. J., Shlossman, M., and Genco, R. J. : Periodontal disease in noninsulin-dependent diabetes mellitus. J. Periodontol., 62 : 123-130, 1991.
4. Novaes, A. B. Jr., Pereira, A. L. A., de Moraes, N., and Novaes, A. B. : Manifestations of insulin-dependent diabetes mellitus in the periodontium of young Brazilian patients. J. Periodontol., 62 : 116-122, 1991.
5. Thorstensson, H. and Hugosson, A. :

- Periodontal disease experience in adult long-duration insulin-dependent diabetics. *J. Clin. Periodontol.*, 20 : 352-358, 1993.
6. Sznajden, N., Carraro, J. J., Rugna, S., and Sere day, M. : Periodontal findings in diabetic and non-diabetic patients. *J. Periodontol.*, 49 : 445-448, 1978.
 7. Rylander, H., Ranberg, P., Blohme, G., and Lindhe, J. : Prevalence of periodontal disease in young diabetics. *J. Clin. Periodontol.*, 14 : 38-43, 1987.
 8. Campbell, M. J. A. : Epidemiology of periodontal disease in the diabetic and nondiabetic. *Aust. Dent. J.*, 17 : 274, 1972.
 9. Ureles, S. D. : A patient with severe periodontitis in conjunction with adult-onset diabetes. *Comendium Cont. Educ. Dent.*, 4 : 522-528, 1983.
 10. Hugoson, A., Thorstensson, H., Falk, H., and Kuylenstierna, J. : Periodontal conditions in insulin-dependent diabetes. *J. Clin. Periodontol.*, 16 : 215-223, 1989.
 11. Nelson, R. G., Shlossman, M., Budding, L. M., Pettitt, D. J., Saad, M. F., Genco, R. J., and Knowler, W. C. : Periodontal disease and NIDDM in Pima Indians. *Diabetes Care.*, 13 : 836-840, 1990.
 12. Grossi, S. G., Zambon, J. J., Norderyd, O. M., Dunford, R. G., Ho, A. W., Machtei, E. E., Preus, H., and Genco, R. G. : Microbiological risk indicators for periodontal disease. *J. Dent. Res.*, 72 : 206, 1993.
 13. Collin, H. L., Uusitupa, M., and Niskanen, L. et al. : Periodontal findings in elderly patients with non-insulin dependent diabetes mellitus. *J. Periodontol.*, 69 : 962-966, 1998.
 14. Bridges, R. B., Anderson, J. W., Saxe, S. R., Gregory, K., and Bridges, S. R. : Periodontal status of diabetic and non-diabetic men. *J. Periodontol.*, 67 : 1185-1192, 1996.
 15. Karjalainen, K. M. and Knuuttila, M. L. E. : The onset of diabetes and poor metabolic control increases gingival bleeding in children and adolescents with insulin-dependent diabetes mellitus. *J. Clin. Periodontol.*, 23 : 1060-1067, 1996.
 16. Nishimura, F., Terranova, V., Foo, H., Kurihara, M., Kurihara, H., and Murayama, Y. : Glucose-mediated alteration of cellular function in human periodontal ligament cell. *J. Dent. Res.*, 75: 1664-1671, 1996.
 17. 정종혁, 권영혁, 이만섭, 박준봉, 허익, 김성진 : 고농도의 포도당이 치은섬유아세포 및 치주인대 세포의 Prostaglandin E₂ 생성에 미치는 영향. *대한치주과학회지*, 27 : 909-922, 1997.
 18. Ferrannini, E., Haffner, S. M., Mitchell, B. D., and Stern, M. P. : Hyperinsulinemia, the key feature of a cardiovascular and metabolic syndrom. *Diabetologia*, 34 : 416, 1992.
 19. 송영보, 이만섭, 권영혁, 박준봉, 허익, 김성진 : *Aralia cortex*와 *Phellodendron cortex*의 혼합추출물이 치주조직세포 활성화에 미치는 영향. *대한치주과학회지*, 28 : 15-30, 1999.
 20. Somerman, M. J., Archer, S. Y., Imm, G. R., and Foster, R. A. : A comparative study of human periodntal ligament cells and gingival fibroblasts in vitro. *J. Dent. Res.*, 67 : 66-70, 1988.
 21. Khan, C. R. : Insulin resistance : A common feature of diabetes mellitus. *N. Eng. J. Med.*, 315 : 252, 1986.
 22. Rayficed, E. J. and Ishinura, K. : Environmental factors and insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Metab. Rev.*, 925, 1987.
 23. National diabetes data group. : Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. *Diabetes*, 28 : 1039, 1979.
 24. Ficara, A. I., Levin, M., Grover, M. F., and Kramer, G. D. : A comparison of the glucose

- and protein content of gingival fluid from diabetics and nondiabetics. *J. Periodont. Res.*, 10 : 171, 1975.
25. Safkan-Seppala, B., and Ainamo, J. : Periodontal conditions in insulin-dependent diabetes mellitus. *J. Clin. Periodontol.* 19 : 24-29, 1992.
 26. Tervonen, T., Olver, R. C., Bereuter, J., Anderson, L. A., and Aepli, D. M. : Prevalence of periodontal pathogens with varying metabolic control of diabetes mellitus. *J. Clin. Periodontol.*, 21 : 375-379, 1994.
 27. Sorsa, T., Ingman, T., and Suomalainen, K. : Cellular source and tetracycline-inhibition of gingival crevicular fluid collagenase of patients with labile diabetes mellitus. *J. Clin. Periodontol.*, 19 : 146-149, 1992.
 28. Seppälä B., Sorss, T., and Ainamo, J. : Morphogenetic analysis of cellular and vascular changes in gingival connective tissue in long-term insulin-dependent diabetics. *J. Periodontol.*, 68 : 1237-1245, 1997.
 29. Salvi, G. E., Yulda, B., Collins, J. G., Jones, B. H., Smith, F. W., Arnold, R. R., and Offenbacher, S. : Inflammatory mediator response as a potential risk marker for periodontal disease in insulin-dependent diabetes mellitus patients. *J. Periodontol.*, 68 : 127-135, 1997.
 30. Yalda, B., Offenbacher, S., and Collins, J. G. : Diabetes as a modifier of periodontal disease expression. *Periodontology* 2000, 6 : 37-49, 1994.
 31. Goodson, J. M., McClathy, K., and Revell, C. : Prostaglandin-induced resorption of adult rat calvarium. *J. Dent. Res.*, 53 : 670-677, 1974.
 32. Howell, T. H. : Blocking periodontal disease progression with anti-inflammatory agents. *J. Periodontol.*, 64 : 828-833, 1993.
 33. Dietrich, J., Goodson, J. M., and Raisz, L. G. : Stimulation of bone resorption by various prostaglandins in organ culture. *Prostaglandins*, 10 : 231-238, 1975.
 34. Goldhaber, P., Rabadjija, L., Beyer, W. R., and Kornhauser, A. : Bone resorption in tissue culture and its relevance to periodontal disease. *J. Am. Dent. Assoc.*, 87 : 1027-1033, 1973.
 35. Goodson, J. M., Dewhirst, F. E., and Brunetti, A. : Prostaglandin E₂ levels and human periodontal disease. *Prostaglandins*, 6 : 81-85, 1974.
 36. Salmon, J. A. and Riggs, G. A. : Prostaglandins and leukotrienes as inflammatory mediators. *Br. Med. Bull.*, 43 : 285-296, 1987.
 37. Dewhirst, F., Moss, D., Offenbacher, S., and Goodson, J. M. : Levels of prostaglandin E₂, thromboxane, and prostacyclin in periodontal tissues. *J. Periodont. Res.*, 18 : 156-163, 1983.
 38. El Attar, T. M. A. and Lin, H. S. : Prostaglandins in gingiva of patients with periodontal disease. *J. Periodontol.*, 52 : 16-19, 1981.
 39. Offenbacher, S., Farr, D. H., and Goodson, J. M. : Measurement of prostaglandin E in crevicular fluid. *J. Clin. Periodontol.*, 8 : 359-367, 1981.
 40. Offenbacher, S., Odle, B. M., Gray, R. C., and Van Dyke, T. E. : Crevicular fluid prostaglandin E levels as a measure of the periodontal disease status of adult and juvenile periodontitis patients. *J. Periodont. Res.*, 19 : 1-13, 1984.
 41. Offenbacher, S., Odle, B. M., and Van Dyke, T. E. : The use of crevicular fluid prostaglandin E₂ levels as a predictor of periodontal attachment loss. *J. Periodont. Res.*, 21 : 101-112, 1986.
 42. Garrison, S., Holt, S., and Nichols, F. : Lipopolysaccharide-stimulated PGE₂ release from human monocytes. *J. Periodontol.*, 59 : 684-687, 1988.
 43. Sismey-Durrant, H. J., and Hopps, R. M. : Effect of lipopolysaccharide from *Porphyromonas gingivalis* on prostaglandin E₂ and interleukin-1- β release from rat periosteal and human gingival fibroblasts in vitro. *Oral Microbiol. Immunol.*, 6 :

- 378-380, 1991.
44. Arai, H., Nomura, Y., Kinoshita, M., Shimizu, H., Ono, K., Goto, H., Takigawa, M., Nishimura, F., Washio, N., Kurihara, H., and Murayama, Y. : Response of human gingival fibroblasts to prostaglandins. *J. Periodont. Res.*, 30 : 303-311, 1995.
 45. Koka, S., and Reinhardt, R. A. : Periodontal pathogen-related stimulation indicates unique phenotype of primary cultured human fibroblasts from gingiva and periodontal ligament. Implications for oral health disease. *J. Prosthet. Dent.*, 77 : 191-196, 1997.
 46. Richards, D., and Rutherford, R. B. : The effects of interleukin-I on collagenolytic activity and prostaglandin-E secretion by human periodontal ligament and gingival fibroblast. *Arch. Oral Biol.*, 33 : 237-243, 1988.
 47. Saito, S., Rosol, T. J., Saito, M., Ngan, P. W., Shanfeld, J., and Davidovitch, Z. : Bone-resorbing activity and prostaglandin E produced by human periodontal ligament cells in vitro. *J.*

Bone Mineral Res., 5 : 1013- 1018, 1990.