

## 유향 추출물이 MC3T3-E1세포 활성화 및 분화에 미치는 영향

한상헌<sup>1</sup> · 김명동<sup>1</sup> · 유승한<sup>1</sup> · 유용옥<sup>2</sup> · 유형근<sup>1</sup> · 신형식<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 원광대학교 치과대학 치주과학교실

<sup>2</sup> 원광대학교 치과대학 구강생화학교실

### I. 서론

연령이 증가함에 따라 일반적으로 증가하는 치주 질환은 성인에 있어 그 빈도가 치아우식증에 비해 현저하게 높으며, 또한 치아상실의 주원인이 되고 있다. 치주질환은 치석과 치태내 치주 병인균에 의한 만성 감염성 질환이며, 치아 주위 조직의 염증과 치주인대의 파괴, 부착 상실, 치조골의 소실로 인한 깊은 치주낭의 형성 등으로 특징 지워지며, 치은, 치주인대, 백악질 및 치조골 등으로 구성되는 치주조직을 파괴시켜 치아를 상실하게 하는 질환이다. 따라서 치주 치료의 궁극적인 목적은 치주질환의 원인요소인 세균요인의 제거와 더불어 치주 질환에 의해 파괴된 치주인대, 백악질 그리고 치조골을 재생시키고, 치아의 기능을 회복시키는 것이다<sup>1)</sup>.

치주질환이 진행됨에 따라 발생하는 치조골 결손부 재생을 위해 전통적으로 사용되어온 치석제거술, 치근면활택술, 치주판막술, 삭제형 골수술 등을 통한 기계적 처치에 부가적으로 다양한 약제를 사용한 치근면 탈회, 골이식 물질의 이식, 조직유도재생술, 그리고 차폐막을 이용한 골이식 등이 응용되어왔다<sup>2-4)</sup>. 또한 최근에는 치주조직의 치유과정에 있어 치주조직 재생에 관련되는 세포의 증식과 분화를 조절할

수 있는 일부 성장인자에 관해 많은 관심이 모아지고 있다. 하지만 이들 성장인자들의 치주적 응용방법과 치주조직에 국소 투여시 발생할 수 있는 전신적 반응을 예측할 수 없고, 약물의 투여 방법과 용량 등에 대해서도 확실한 해답을 얻지 못하고 있어 치주조직 재생에 응용하기에는 아직 어려울 것으로 보인다.

현재까지 연구되고 있는 조직재생제로는 성장인자인 platelet derived growth factor(PDGF)<sup>5-6)</sup>, insulin-like growth factor(IGF- I)<sup>7)</sup>, transforming growth factor(TGF- $\beta$ )<sup>6,8,9)</sup> 및 pluronic F-68<sup>10)</sup> 등이 있으며, 생약제제로서 *Centella Asiatica*는 화상 등의 조직결손부에 쓰이며, 비교적 상피조직의 재생에는 유효하지만 결합조직, 치은섬유아세포, 치주인대세포에는 별다른 영향이 없었다<sup>11-12)</sup>. 이에 반해 *Scutellaria radix* 추출물은 상피세포의 성장에는 큰 영향을 주지 못하는 데 반해, 치은섬유아세포의 교원질 합성에 큰 영향을 주는 것으로 알려져<sup>13)</sup>, 이는 차후 치주조직 재생에 이용 가능성을 높이고 있다. 이러한 생약제제들은 대량생산이 가능하며 효능, 효과의 안전성이 높기 때문에 더욱 상품화의 이용도를 높이리라 생각된다.

치주질환의 치료에 전통적으로 사용되고 있는 생

\* 이 논문은 2000년도 원광대학교의 교비 지원에 의해서 연구 됨

교신저자: 신형식, 전북 익산시 신용동 344-2 원광대학교 치과대학 치주과학교실, 우편번호: 570-711

약을 이용한 많은 연구들이 행해지고 있으며, 전신적 부작용이 나타나지 않는 이들 천연추출물을 주성분으로 하여 항균 구강용제, 치약, 경구용 약제 등이 개발, 시판되어 사용되어 오고 있다. 이러한 생약의 대표적인 것으로는 Zea Mays L.이 있는데, 이는 치주인대의 재생, 치은의 각화도의 증진, 치아동요도의 감소, 치조골의 재생<sup>14-17)</sup>등의 효과가 기대되어 몇몇 상품화된 제제를 이용한 결과, 외과적 치주치료 후 임상적 상태를 개선시키며, 치주염 치료에도 많은 효과를 보고하고 있으나<sup>18)</sup>, 임상적 효과에 대한 신뢰성이 충분하지 않고 연구 내용상 과학적 근거가 빈약하여 전문적 처방은 미미한 실정이다.

또한 한방에서 오래 전부터 항염 및 항균 효과를 보이는 생약제제 중 현재 치과분야에서 연구되는 것으로, 후박(Magnoliae Cortex)에서 추출, 분리하여 정제한 magnolol과 honokiol이 있는데, 이들 물질은 안정성이 높고 항균효과와 교원질 분해효소의 활성을 어느 정도 억제하며<sup>19)</sup>, interleukin-1(IL-1 $\beta$ ) 및 prostaglandin E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>)의 생산 차단효과가<sup>20)</sup> 있음이 밝혀졌다. 또한 황금의 에탄올 추출물인 wogonin, badcalein, baicalin 등은 IL-1 $\beta$  생산차단, PGE<sub>2</sub> 생산차단, collagenase 활성도 차단 및 세포활성도 증강 효과를 보였으며<sup>21)</sup>, 대조(Zizyphi Fructus)도 또한 IL-1 $\beta$ 의 생성 억제효과 및 PGE<sub>2</sub> 생성 억제효과를 보였<sup>20)</sup>.

생약들 중 조직재생제로 많이 연구되고 있는 홍화는 동양의학에서 골질환 치료제로 전래되는 약제로서 골재생효과가 있는 것으로 알려져 있으며, 치주인대와 조골세포의 활성화를 보이며<sup>22)</sup>, alkaline phosphatase(ALP) 합성과 석회화 결절 형성 및 osteonectin 생성에 효과적 이어서 골광물화에 영향을 주는 것으로 밝혀졌으며<sup>23)</sup>, 백서의 두개골 결손부에서 신생골형성 촉진효과<sup>24)</sup>도 관찰되어, 앞으로 임상적 이용에 대한 연구가 필요한 상태이다.

이 외에도 김 등<sup>25)</sup>은 전통적으로 골질환 치료에 이용되어온 생약 중 유향, 몰약, 속단, 승마를 가지고 조골모세포에 대한 ALP 합성능을 분광측정기 및 미세현미경 사진을 이용하여 평가하였는데, 사용한 모든 제제가 음성대조군보다 유의한 증가를 보였다.

그 중 가장 좋은 결과를 보인 유향(*Olibanum*)<sup>26,27)</sup>은 감람나무과의 수간에서 얻은 수지성분으로 활혈, 지혈, 진통, 소염 등의 작용이 있는 것으로 알려져 있다. 그러나 유향이 MC3T3-E1세포의 활성화 및 골형성 능력에 영향을 미치는지는 아직 많이 알려져 있지 않다. 따라서 본 연구는 한국의 민간요법에 활용되고 있는 유향 추출물을 MC3T3-E1세포에 처리한 후, 세포활성 및 분화에 미치는 영향을 평가하기 위하여, 세포증식, 염기성 인산분해효소 활성도 측정을 하고, 초기 골 광물화에 관여하는지 평가하기 위해 시험관내 골형성능력측정을 시행하고, 비교원성 단백질에 의해 광물화가 일어날 수 있는 주형을 제공하며 골형성의 초기에 작용하는 교원성 단백질 중 type I collagen의 발현을 검색 하고자 한다.

## II. 연구재료 및 방법

### 1. 세포배양

골기질 단백을 만들어 내고 광화시킬 수 있는 생쥐 두개골의 MC3T3-E1(mouse calvarial osteoblasts)세포를 10% fetal bovine serum(FBS, GibcoBRL, USA)과 1% 항생제(Penicillin G sodium 10,000 units/ml, streptomycin sulfate 10,000  $\mu$ g/ml and Amphotericin B 25  $\mu$ g/ml in 0.85% saline, GibcoBRL, USA)가 첨가된  $\alpha$ -minimum essential medium( $\alpha$ -MEM, GibcoBRL, USA) 2 ml 가 담긴 6-well plate에 적정 세포( $5 \times 10^4$  cells/well)를 분주하였다. 이를 37°C의 온도 및 100% 습도조건에서 95%의 공기와 5% CO<sub>2</sub>를 계속 공급하면서 배양하였다. 배양액은 세포가 충분한 증식이 일어날 때까지 2-3일 간격으로 교환하였고, 1:3의 비율로 계대배양하여 5-6계대 배양된 세포를 사용하였다.

### 2. 생약 추출물의 준비

원광대학교 약학대학에 의뢰하여 유향 100 g을 분말형태로 분쇄하여 증류수 1 l 와 혼합하여 가열 여과한 후 1,500 rpm의 rotatory evaporator로 농축한 다음 freeze dryer로 동결 건조하여 얻어진 분말을 이

용하였다. 분말 1g을 증류수 10ml에 섞어 stock solution을 만들어 농도별로 희석한 후 0.2  $\mu$ m syringe filter(Nalge company, USA)로 여과 멸균한 후 사용하였다.

### 3. 세포활성도 측정

5, 6회 계대 배양된 MC3T3-E1세포를 0.25% Trypsin/EDTA로 떼어내어 혈구계수기로 세포수를 세어 24-well plate의 각 well당  $1 \times 10^4$ 개의 세포가 들어가도록 분주하였다. 세포들이 부착할 수 있도록 1일간 5% CO<sub>2</sub>, 100% 습도의 37°C 배양기에서 배양한 후 부착되지 않은 세포를 제거하기 위해 배지를 교환하고, 0.1  $\mu$ g/ml, 1  $\mu$ g/ml, 10  $\mu$ g/ml의 유향 추출물을 첨가하고 2, 4일 동안 배양하였으며, 대조군에는 증류수를 넣었다. 각각의 시간이 경과된 후 생리 식염수로 용해한 MTT(3-(4, 5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide ; No. M2128, Sigma Chemical Co. USA) 용액 300  $\mu$ l씩을 각각의 well에 첨가하여 4시간 동안 배양하였다. 배양 후 배지를 제거하고 200  $\mu$ l의 DMSO(dimethyl sulfoxide; Junsei, Japan)를 첨가하여 형성된 formazan 결정을 용해시킨 후, 세포활성도를 보기 위해 96-well plate 상으로 옮겨서 ELISA analyser(Spectra MAX 250, Molecular Devices Co., USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 4. 염기성 인산분해효소 측정

MC3T3-E1 세포를 6-well plate에 각 well당  $1 \times 10^5$  개 씩 분주한 후 10% FBS, 1% 항생제, 50  $\mu$ g/ml ascorbic acid, 10 mM sodium  $\beta$ -glycerophosphate가 첨가된  $\alpha$ -MEM으로 2, 4일간 100% 습도, 5% CO<sub>2</sub> 공기 혼합배양기에서 배양하였다. 배지를 제거한 후, 실험군은 0.1  $\mu$ g/ml, 1  $\mu$ g/ml, 10  $\mu$ g/ml의 유향 추출물을 배지와 함께 첨가하고, 양성대조군은 0.1  $\mu$ g/ml의 dexamethasone을, 음성대조군에는 증류수를 첨가한 후 각각 2, 4일 동안 배양하였다. 일정 배양시간이 지난 후 배지를 제거하고 trypsin/EDTA로 세포를

분리시키고 1500 rpm에서 6분간 원심분리하였다. 상층액을 제거하고 다시 10초 동안 15000 rpm으로 원심분리하였다. 완전히 상층액을 제거하고 0.5 ml의 멸균된 증류수를 첨가하여 현탁하였다. 각 세포 현탁액 0.1 ml에 0.1 M glycine NaOH buffer(pH 10.4) 0.2 ml, 15 mM pNPP(p-Nitrophenyl phosphate : Sigma, USA) 0.1 ml, 0.1% Triton X-100/saline 0.1 ml와 멸균된 증류수 0.1 ml를 잘 혼합하여 37°C에서 30분간 배양한 후, 0.1 N NaOH를 0.6 ml 첨가하여 이들의 반응을 중지시켰다. 96-well plate에 200  $\mu$ l씩 넣고 ELISA reader로 410 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

### 5. Von kossa 염색

석회화 결절 형성에 대한 유향 추출물의 영향을 알아보기 위하여 세포를 6-well plate에  $1 \times 10^5$  cells/well가 되도록 분주한 후, 50  $\mu$ g/ml ascorbic acid, 10 mM  $\beta$ -glycerophosphate가 함유된 10% FBS 배지를 사용하여 실험군에는 1  $\mu$ g/ml, 10  $\mu$ g/ml의 유향 추출물을 첨가하고, 양성대조군에는 0.1  $\mu$ g/ml의 dexamethasone을 음성대조군에는 증류수를 첨가하고, 2일마다 배지를 교환하면서 21일 동안 배양기에서 배양하였다. 일정 배양시간이 지난 후 각 well의 배지를 제거하였다. ice-cold PBS로 2번 세척하고, neutral buffered formalin(NBF)으로 4°C에서 48시간 동안 고정한 후, NBF를 제거하고 PBS로 다시 2회 세척하고, 5% silver nitrate를 첨가하여 뚜껑을 열고 약 30분 동안 직사광선에 노출하여 석회화 결절을 염색하였다. Silver nitrate를 제거 후 5% sodium thiosulfate로 세척하고 현미경으로 관찰하였다.

### 6. Immunocytochemistry

세포를  $1 \times 10^5$  개 씩 35 mm dish에 분주한 후, 음성대조군에는 증류수를 양성대조군에는 0.1  $\mu$ g/ml의 dexamethasone을 두 실험군에는 각각 1  $\mu$ g/ml, 10  $\mu$ g/ml의 유향 추출물을 첨가하고 4일 동안 배양한다. 일정한 시간이 경과하면 type I collagen의 일차

항체를 희석하여 준비하고 4% paraformaldehyde 1 ml로 5분간 고정한 후 100%, 90%, 80%, 70% ethanol로 15-20초간 처리하였다. 1×PBS로 5분간 3회 걸쳐 세척한 후 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 10분간 처리하고 다시 1×PBS로 5분간 3회에 걸쳐 세척하고 blocking을 시행하였다. 300:1로 희석한 일차 항체를 처리한 후 R/T에서 1시간 동안 배양하고, 2차 항체를 처리 후 R/T에서 20분간 배양하였다. Substrate를 처리한 후 도립현미경으로 관찰 후 사진 촬영을 하였다.

## 7. 통계분석

유향의 실험군과 대조군 간의 차이 및 2일과 4일 사이의 차이를 알아보기 위하여 MTT값과 ALP값을 일원분산분석법(ANOVA)으로 실험결과에 유의성이 있는지 유의수준 0.05에서 통계학적으로 검증하였다.

## III. 연구결과

### 1. 유향추출물에 대한 MC3T3-E1세포의 세포활성도 검사

MC3T3-E1세포에 대해 유향 추출물 0.1  $\mu$ g/ml, 1  $\mu$ g/ml, 10  $\mu$ g/ml과 대조군을 가지고 시행한 세포활성도의 실험 결과에서 2일째에는 1  $\mu$ g/ml군이 가장 많은 세포활성도를 보였고, 군간의 통계학적 유의성은 없었다(0.05(p)). 4일째에는 농도가 0.1  $\mu$ g/ml에서 1  $\mu$ g/ml로 증가하면서 세포활성도가 높았으나, 농도가 10  $\mu$ g/ml로 증가하면서 세포활성도가 낮아 dexamethasone을 사용한 대조군보다 더 낮은 결과를 나타내었고, 1  $\mu$ g/ml군이 대조군에 비해 통계학적으로 유의성이 있는 결과를 나타내었다(Table 1, Figure 1).

Table 1. Cellular activity of MC3T3-E1 cells treated with the extracts of *Olibanum* (Mean $\pm$ S.D.)

Day	control	0.1 $\mu$ g/ml	1 $\mu$ g/ml	10 $\mu$ g/ml
2	17.83 $\pm$ 0.32	21.87 $\pm$ 1.66	27.50 $\pm$ 2.27	18.60 $\pm$ 1.40
4	75.30 $\pm$ 2.71	82.87 $\pm$ 10.96	101.26 $\pm$ 5.68*	73.47 $\pm$ 4.80

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

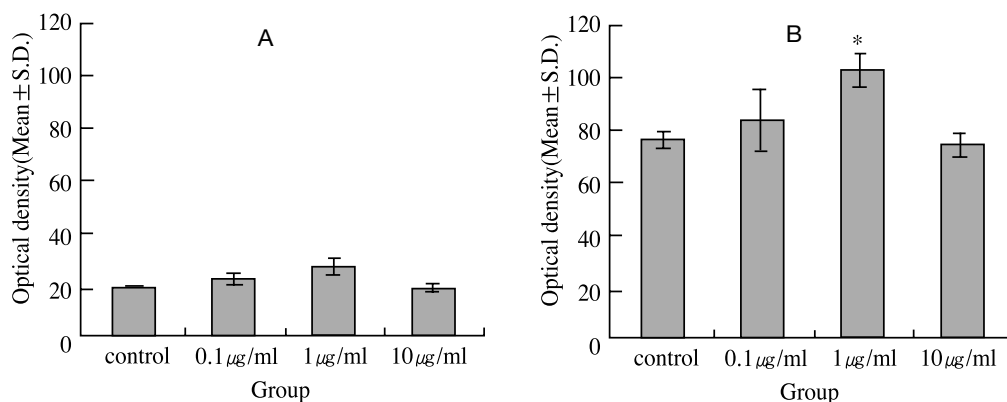


Figure 1. Cellular activity of MC3T3-E1 cells treated with the extracts of *Olibanum* at 2-day(A) and 4-day(B) of incubation

## 2. 유향 추출물에 대한 MC3T3-E1세포에서의 염기성 인산분해효소의 측정

유향 추출물 0.1  $\mu\text{g/ml}$ , 1  $\mu\text{g/ml}$ , 10  $\mu\text{g/ml}$ 을 MC3T3-E1 세포에 투여하여, 골재형성과 재생이 일어나는 부위에서 국소적 인산이온 농도를 증가시키는 ALP의 합성을 측정한 계측치는 Table 2와 같다. 2 일째에는 실험군과 대조군간 유의한 차이는 없었으나, 1  $\mu\text{g/ml}$ 군이 가장 높은 ALP합성을 보였고, 4일째에는 0.1  $\mu\text{g/ml}$ 에서 1  $\mu\text{g/ml}$ 으로 농도가 증가하면서 ALP합성이 증가하였으나 10  $\mu\text{g/ml}$ 으로 농도가 증가 시 ALP합성이 오히려 낮아졌으며, 1  $\mu\text{g/ml}$ 군이 음성 대조군과 비교시 통계적으로 유의한 군간 평균치 차이가 있는 것으로 나타났다(Table 2, Figure 2).

### 3. Von kossa 염색

1  $\mu\text{g/ml}$ , 10  $\mu\text{g/ml}$ 의 유향 추출물을 MC3T3-E1 세

포에 투여하고 21일 동안 배양한 후 각 군마다 석회화 골결절의 면적을 합산하여 각각의 측정치를 전체 면적으로 나누어 백분율로 환산한 결과는 그림 3과 같다. 음성 대조군에 비해 양성대조군 및 실험군에서 석회화 결절이 많이 관찰되었고, 1  $\mu\text{g/ml}$ 군에서 가장 많은 석회화 결절이 관찰되었으며 음성대조군에 비해 4배정도 증가된 면적을 보여주었다(Photo 1, Figure 3).

### 4. 교원질의 발현

골형성시 세포의 기질으로 작용하는 collagen의 발현을 보기 위하여 유향 추출물을 MC3T3-E1 세포에 투여하고 면역화학 검사를 시행하여 type I collagen이 발현된 염색 면적을 각각의 전체 면적으로 나누어 백분율로 나타낸 결과, 10  $\mu\text{g/ml}$ 군과 음성대조군이 적은 collagen 발현을 보였고, 양성대조군과 1  $\mu\text{g/ml}$ 군이 많은 collagen 발현을 보였으며, 1  $\mu\text{g/ml}$

Table 2. Alkaline phosphatase activity of MC3T3-E1 cells treated with the extracts of Olibanum(Mean $\pm$ S.D.)

Day	negative control	positive control	0.1 $\mu\text{g/ml}$	1 $\mu\text{g/mg}$	10 $\mu\text{g/ml}$
2	1,35 $\pm$ 0,07	1,85 $\pm$ 0,21	1,70 $\pm$ 0,00	2,00 $\pm$ 0,28	1,65 $\pm$ 0,07
4	3,60 $\pm$ 0,71	4,45 $\pm$ 0,50	4,30 $\pm$ 0,14	5,10 $\pm$ 0,28*	4,25 $\pm$ 0,07

\*Statistically significant compared to the negative control(p(0,05).

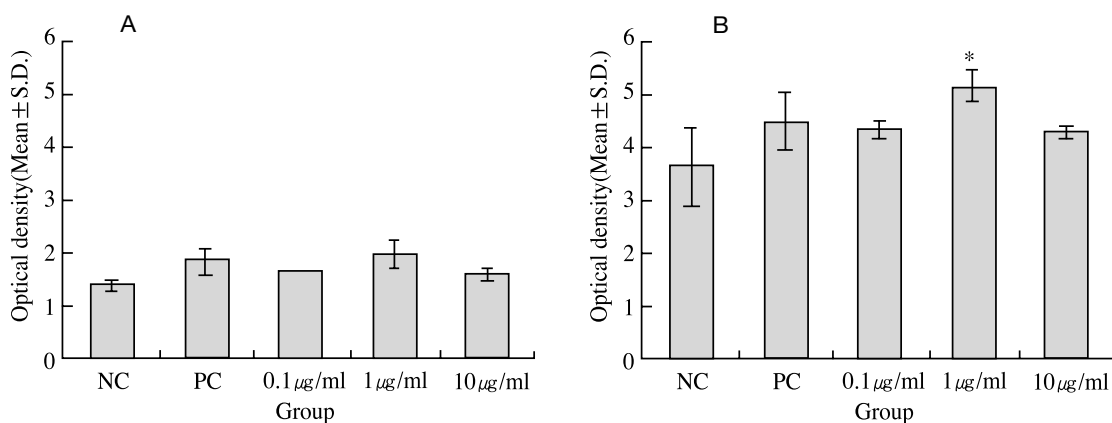


Figure 2. Alkaline phosphatase activity of MC3T3-E1 cells treated with the extracts of Olibanum at 2-day (A) and 4-day (B) of incubation.

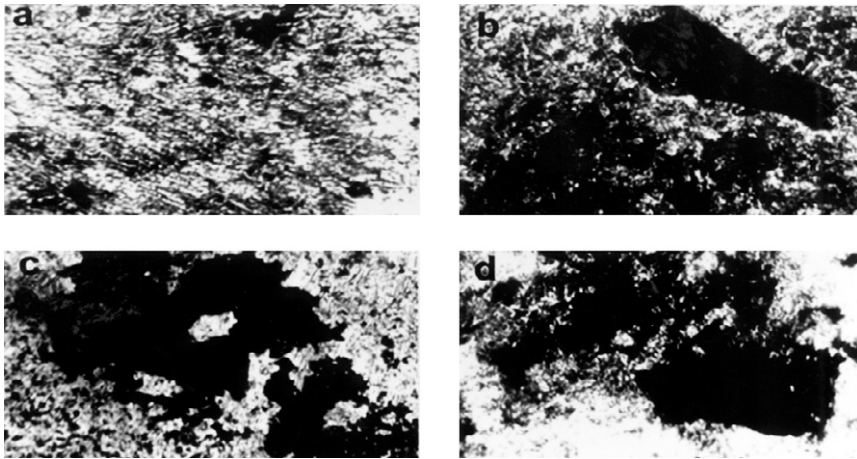


Photo 1. Microphotograph reveals bone nodules, expressed as black-colored area, of MC3-T3-E1 cells treated with the extracts of *Olibanum* (a. negative control, b. positive control, c. 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  group, d. 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  group).

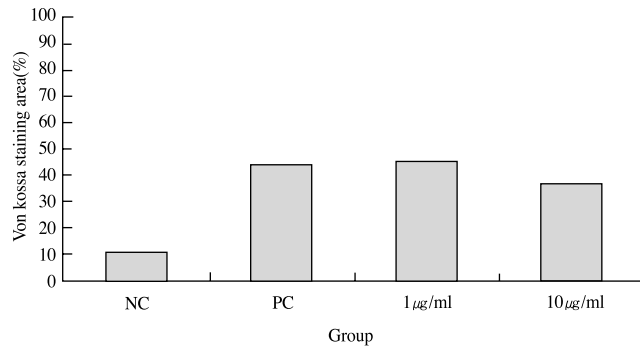


Figure 3. Percentage of Von kossa staining area according to concentration of *Olibanum* in MC3T3-E1 Cells

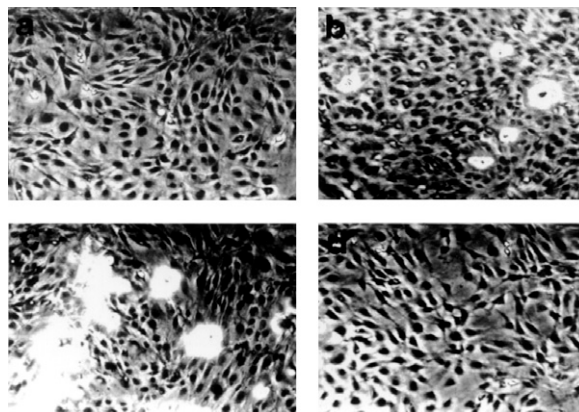


Photo 2. Microphotograph reveals type I collagen, expressed as white-colored area, of MC3-T3-E1 cells treated with the extracts of *Olibanum* (a. negative control, b. positive control, c. 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  group, d. 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  group).

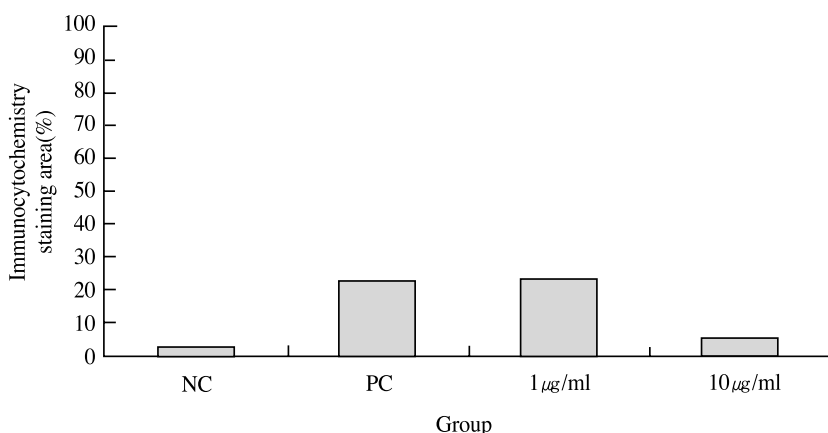


Figure 4. Percentage of immunocytochemistry staining area according to concentration of *Olibanum* in MC3T3-E1 cells

군이 가장 많은 collagen 발현을 보였다(Photo 2, Figure 4).

#### IV. 총괄 및 고찰

치주질환은 치주조직이 치아 주위와 치주낭내의 치태 세균의 감염으로 인해 파괴되고, 치태가 치근단 방향으로 확대되면서 점합상피가 치근단 방향으로 이동되고, 치주조직이 직, 간접적으로 파괴되어 결국은 치아가 상실되는 질환이다. 이런 치주질환에 의해 파괴된 조직을 치료하기 위해 과거에는 판막소과술을 통한 치주 환경 개선에 초점이 맞추어져 왔으나, 근래에는 파괴된 부분에 재생을 기대할 목적으로 여러 골 이식재의 사용과 차단막을 사용해서 치주인대세포 이외의 세포는 배제하여 재생을 기대하는 술식들이 사용되고 있으며, 여기에 부가적으로 성장인자를 이용한 조직재생에 관심을 보이고 있다.

또한 최근에는 동양의학에 대한 새로운 재평가와 함께 동양 전래의 생약에 대한 관심이 증가하여 이를 과학적으로 성분을 분석하고 그 효과를 증명하려는 노력이 이루어지고 있으며 이를 바탕으로 많은 결과들이 보고되고 있다. 치주질환 치료제로서 여러 생약제제들이 제시된 바 있고, 이들 천연추출물을 주성분으로 한 항균 구강용제, 치약, 경구용 약제 등이

개발 시판되어 사용되고 있다. 대표적인 치주질환 치료보조제로서 옥수수 불검화 추출물인 Zea Mays L.은 치은 각화도 증가, 치주낭의 전반적인 감소, 연조직내의 염증의 감소, 치아동요도의 감소<sup>18)</sup>등 연구를 바탕으로 상품화된 약으로 시판되고 있다. 그리고 아직은 상품화된 약으로 시판되고 있지는 않지만 파괴된 치주조직 재생의 보조제로 연구되고 있는 홍화는 동양의학에서 울혈을 위한 치료제로 전래되는 약제로서 골재생 효과가 있다고 여겨져 많은 연구들이 행해지고 있다. 그 결과들로 홍화추출물은 치주인대세포, 조골세포의 기능적 활성화 및 백서 두개골 결손부에서 신생골 형성 촉진효과를 확인한 바 있고<sup>22)</sup>, 홍화추출물 처리에 의한 증가된 ALP합성은 세포 외기질에 calcium phosphate를 침착시켜 골형성의 핵 역할을 함으로써 석회화를 유도하여 치주인대세포 및 조골세포의 분화와 성숙에 관여함이 밝혀졌다<sup>28)</sup>. 이 밖에도 여러 생약들이 연구되고 있으며 이들은 오랜기간 동양의학에서 사용되어 온 약제로서 경험적으로 그 안전성과 효과가 인정되어 사용되어 온 바 있으므로, 비교적 부작용 없이 경구투여가 가능한 약재로 기대된다고 할 수 있다.

본 연구에서 사용한 유향<sup>26,27)</sup>은 감람나무과의 수간에서 얻은 수지성분으로 활혈, 지혈, 진통, 소염등의 작용이 있는 것으로 알려져 있어, 유향 추출물이

치조골의 재생과 형성에 주된 작용을 하는 조골세포에 미치는 효과를 조사하기 위해서 조골모유사세포에 대한 MTT분석과 ALP를 측정하였고, 세포 수준에서 골결절 형성 능력을 측정하기 위해 Von kossa 염색하여 계측하였고, 골형성에 관여하는 세포외기질로 작용하는 collagen의 발현 영향을 알아보기 위해 면역세포화학적 분석으로 계측하였다.

세포활성도를 시험하기 위한 MTT 분석에서, 조골모유사세포에 유향 추출물을 처리하여 얻은 결과, MC3T3-E1세포에 대해 2일째에는 군간의 유의성이 없었으나 1  $\mu\text{g/ml}$ 군이 가장 많은 세포활성도를 보였다. 그리고 4일째에는 농도가 0.1  $\mu\text{g/ml}$ 에서 1  $\mu\text{g/ml}$ 으로 증가하면서 세포활성도가 높았으나, 농도가 10  $\mu\text{g/ml}$ 로 증가하면서 세포활성도가 낮아 dexamethasone을 사용한 대조군보다 유의성은 없었지만 더 낮은 결과를 나타내었고, 1  $\mu\text{g/ml}$ 군이 모든 군에 비해 유의성이 있는 결과를 나타내었다(Table 1, Figure 1). 이러한 세포활성도의 증가는 초기 세포의 증식단계에서 여러 층을 형성할 수 있다는 것을 나타내고 이는 골결절 형성의 초기에 도움을 줄 것으로 사료된다.

세포의 골기질은 교원성, 비교원성 단백질로 구성되며 비교원성 단백질 중 ALP는 160 kDa glycoprotein의 골세포 표식자로서 조골모유사세포, 전조골모유사세포, 골세포, 골육중세포에서 발현되며 유기인산 에스테르를 가수분해하여 석회화가 이루어지는 부위에서 국소적으로 인산이온의 농도를 증가시키는 효소<sup>29)</sup>로써, 세포의 기질에 calcium phosphate를 침착시킴으로써 석회화를 유도하는 기능<sup>30)</sup>을 갖는다. De Bernard<sup>31)</sup>는 ALP가 국소적으로 인산이온 농도를 증가시켜 단백질을 인단백으로 전환시키고 이것이 칼슘결합 성향을 가지면서 인단백질이 석회화의 핵으로서 역할을 한다고 하였다. 이러한 골관련 단백질은 칼슘염과 인산염에 결합하는 성질을 가지며 수산화인회석 결정체 형성의 핵으로 작용하고 핵의 성장과 용해와 같은 조절과정에도 관여할 것이다. 본 연구에서는 유향 추출물 0.1  $\mu\text{g/ml}$ , 1  $\mu\text{g/ml}$ , 10  $\mu\text{g/ml}$ 을 MC3T3-E1 세포에 투여하여, 골재형성과 재생이 일어나는 부위에서 국소적 인산이온 농도를

증가시키는 ALP의 합성을 측정한 결과 2일째에는 실험군과 대조군간 유의한 차이는 없었으나, 1  $\mu\text{g/ml}$ 군이 가장 높은 ALP합성을 보였고, 4일째에는 1  $\mu\text{g/ml}$ 군이 다른 군과 비교시 통계적 유의성을 보이며 가장 높은 ALP합성을 보였다(Table 2, Figure 2). 유향을 조골세포에 처리하여 증가된 ALP 합성은 세포외 기질에 calcium phosphate를 침착시켜 골 형성의 핵 역할을 함으로써 석회화를 유도하여 조골세포의 분화와 성숙에 중요한 기능을 할 것으로 사료된다.

Mukai 등<sup>32)</sup>의 실험에서는 결절내에 조골세포나 골세포와 유사한 세포들 및 교원기질과 기질낭포(matrix vesicle)가 존재하며, 이 결절이 수산화인회석의 결정구조를 가짐을 관찰하였다. 본 연구에서는 1  $\mu\text{g/ml}$ , 10  $\mu\text{g/ml}$ 의 유향 추출물을 MC3T3-E1 세포에 투여하고 21일 동안 배양한 후 석회화 골결절의 면적을 합산하여 각각의 측정치를 전체면적으로 나누어 백분율로 환산하였는데, 음성 대조군에 비해 양성대조군 및 실험군에서 석회화 결절이 많이 관찰되었고, 1  $\mu\text{g/ml}$ 군에서 가장 많은 석회화 결절이 관찰되었으며 음성대조군에 비해 4배정도 증가된 면적을 보여주었다(Photo 1, Figure 3).

조골모유사세포는 골기질을 합성하는 간엽세포로서 전조골세포(preosteoblast), 선조골세포(osteoprogenitor cell) 등에서 생성된다. 조골모유사세포는 골형성의 주된 세포 성분이며, 파골세포에 의한 골흡수 조절자로 작용하는 것으로 알려져 있다. 이러한 조골모유사세포의 증식과 분화에는 많은 인자들이 작용하는데, osteocalcin, osteonectin, bone sialoprotein, osteopontin과 같은 비교원성 단백질은 세포대사의 조절, 기질의 축적, 광물화 골개조를 조절하면서 골기질의 성숙과 석회화에 중요하게 작용한다. Type I collagen은 전체 세포의 기질의 90%이상을 차지하며 조골모유사세포에 의해서 합성되어 골양 조직에 침착되고 광물화작용에 관여한다. 이러한 교원성 단백질은 비교원성 단백질에 의해 광물화가 일어날 수 있는 주형을 제공하여 골형성의 초기에 작용하며, ALP와 같은 골기질은 조골모유사세포의 분화와 골기질의 성숙에 중요한 역할을 한다<sup>33)</sup>. 골형성시 세포의 기질으로 작용하는 collagen의 발현을 보



기 위하여 유항 추출물을 MC3T3-E1 세포에 투여하고 면역화학 검사를 시행하여 type I collagen 이 발현된 염색 면적을 각각의 전체 면적으로 나누어 백분율로 나타낸 결과, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 군과 음성대조군이 적은 collagen 발현을 보였고, 양성대조군과 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 군이 많은 collagen 발현을 보였으며, 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 군이 가장 많은 collagen 발현을 보였다(Photo 2, Figure 4).

최근 들어 경험적인 동양의학의 한계를 넘어, 전래되어 전해지는 여러 생약제제들에 대한 성분별 분획과 이들의 효과에 대한 과학적인 접근이 시도되고 있고, 일부는 상당한 진척을 이루어 실제 임상에 사용할 수준에 이른 것들도 있다. 따라서 본 연구에서 확인한 유항추출물의 조골세포에 대한 기능적 활성화, ALP생성의 증가, 골결절의 생성 및 type I collagen의 발현에 미치는 영향은 치주염에 의해 손상, 결손된 치주조직의 재생을 위한 약제로서의 응용가능성을 시사하는 것이라고 하겠다.

## V. 결론

전통적으로 이용되어 온 생약제제 중 활혈, 지혈, 진통, 소염 등의 작용이 있는 유항이 조골세포 활성화에 미치는 영향을 알아보고자, MC3T3-E1 세포를 이용하여 세포활성도 측정, 염기성 인산분해효소 활성도 측정과 시험관내 골형성 능력측정 및 광물화가 일어나는 부위에서 주형으로 작용하는 type I collagen의 발현도를 평가하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. MC3T3-E1 세포에 유항추출물을 투여하여 세포 활성도를 측정한 결과 4일째의 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 군이 대조군보다 세포활성도가 높았다( $p < 0.05$ ).
2. MC3T3-E1 세포에 유항추출물을 투여하여 염기성 인산분해효소의 활성을 측정한 실험에서 4일째 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  투여군이 음성대조군보다 염기성 인산분해효소 활성이 높았다( $p < 0.05$ ).
3. 세포수준에서 관찰한 골결절 형성의 Von kossa 염색 측정에서 각 측정치를 백분율로 환산한 결과 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  투여군이 가장 많은 염색을 보였

다.

4. 골 형성시 세포의 기질로 작용하는 collagen 발현을 보기 위한 면역세포화학 검사에서 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  투여군과 음성대조군이 적은 collagen 발현을 보였고, 양성대조군과 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  투여군이 많은 collagen 발현을 보였으며, 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  투여군이 가장 많은 collagen 발현을 보였다.

이상과 같은 소견으로 유항이 조골모유사세포에 대한 세포활성의 증가와 ALP 합성능의 증가 그리고 골조직의 재생에 있어 중요한 골결절의 형성과 세포의 기질로 작용하여 골 광물화에 기여하는 collagen의 발현에 영향을 미치는 점으로 미루어, 유항은 골세포의 활성화와 분화에 영향을 미칠 수 있고, 치주조직 재생제로의 이용가능성이 높다고 생각되며, 임상적 활용 방안을 모색할 필요가 있으리라 사료된다.

## VI. 참고문헌

1. Takata T. : Oral wound healing concepts in periodontology. Curr Opin Periodontol 119-127, 1994.
2. Brunsvold M.A., Mellonig J.T. : Bone grafts and periodontal regeneration. Periodontol 2000 1: 80-91, 1993.
3. Lowenguth R.A., Blieden T.M. : Periodontal regeneration : root surface demineralization. Periodontol 2000 1: 54-68, 1993.
4. Karring T., Nyman S., Gottlow J., Laurell L. : Development of the biological concept of guided tissue regeneration-animal and human studies. Periodontol 2000 1: 26-35, 1993.
5. Piche J.E., Graves D.T. : Study of the growth factor requirements of human bone-derived cells: a comparison with human fibroblasts. Bone 10(2): 131-138, 1989.
6. Terranova V.P., Wikesjo U.M. : Chemotaxis of cells isolated from periodontal tissues to different biological response modifiers. Adv Dent Res

- 2(2): 215-222, 1988.
7. Canalis E., Lian J.B. : Effects of bone associated growth factors on DNA, collagen and osteocalcin synthesis in cultured fetal rat calvariae. *Bone* 9(4): 243-246, 1988.
8. Hock J.M., Canalis E., Centrella M. : Transforming growth factor- $\beta$  stimulates bone matrix apposition and bone cell replication in cultured fetal rat calvariae. *Endocrinology* 126(1): 421-426, 1990.
9. Centrella M., McCarthy T.L., Canalis E. : Transforming growth factor-beta and remodeling of bone. *J Bone Joint Surg(USA)* 73A(9): 1418-1428, 1991.
10. Rodeheaver G.T., Kurtz L., Kircher B.J., Edlich R.F. : Pluronic F-68: a promising new skin wound cleanser. *Ann Emerg Med* 9(11): 572-576, 1980.
11. Maquart F.X., Bellon G., Gillery P., Wegrowski Y., Borel J.P. : Stimulation of collagen synthesis in fibroblast cultures by a triterpene extracted from *Centella asiatica*. *Connect Tissue Res* 24(2): 107-120, 1990.
12. Del Vecchio A., Senni I., Cossu G., Molinaro M. : Effect of *Centella asiatica* on the biosynthetic activity of fibroblasts in culture. *Farmco(Prat)* 39(10): 355-364, 1984.
13. Yasukawa K., Takido M., Takeuchi M., Nakagawa S. : Effect of chemical constituents from plants on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced inflammation in mice. *Chem Pharm bull(Tokyo)* 37(4): 1071-1073, 1989.
14. Chaput A., Krikorian A., Brion M., Labie C., Perrault M. : Action of insadol on the experimental parodontolysis in hamsters. *Rev Fr Odontostomatol* 18-9: 1145-1154, 1971.
15. Kerebel B., Clergeau-Guerithault S., Brion M. : Ultrastructural study of experimental parodontolysis in the golden hamster. *SSO Schweiz Monatsschr Zahnheilkd* 84: 145-154, 1974.
16. Porte J., Durand B., Libourel P., Perdrix G., Parret J. : Clinical and ultrastructural study of the action of unsaponifiable cornseed oil in a case of periodontolysis in man. *Osteocytic balance. Actual Odontostomatol(Paris)* 121: 125-139, 1978.
17. 최상묵, 한수부, 황광세 : Zea Mays L.의 불검화 정량추출물(DENTADOL)이 외과적 치주치료후 치유에 미치는 효과에 관한 임상적 연구. *대한치주과학회지* 19: 63-70, 1989.
18. 권영혁, 이만섭, 양승환, 김 영, 박준봉 : 치주수술 후 Zea Mays L. 투여가 치유과정에 미치는 영향에 대한 임상적 연구. *대한치주과학회지* 24:649-660, 1994
19. Chang B., Lee Y., Ku Y., Bae K., Chung C. : Antimicrobial activity of magnolol and honokiol against periodontopathic microorganisms. *Planta Med* 64(4): 367-9, 1998.
20. 이용무, 구영, 배기환, 정종평 : 후박 및 대조추출물이 골조직 재생에 미치는 영향. *대한치주과학회지* 27: 165-177, 1997.
21. Kimura Y., Okuda H., Arichi S. : Studies on *Scutellariae radix*; XIII. Effects of various flavonoids on arachidonate metabolism in leucocyte. *Planta Med* 51: 132-136, 1985.
22. 류인철, 이용무, 구영, 배기환, 정종평 : 홍화 추출물이 치주인대세포, 조골세포 활성화에 미치는 영향. *대한치주과학회지* 27: 867-882, 1997.
23. 강정구, 유형근, 신형식 : 홍화씨 추출물이 치주인대세포와 조골유사세포의 골 광물화 작용에 미치는 영향. *대한치주과학회지* 28: 475-489, 1988.
24. 김덕규, 홍성우, 유경태, 서재진, 김홍식, 유형근, 신형식 : 홍화씨 추출물의 국소투여가 백서 두개골 결손부 재생에 미치는 영향. *대한치주과학회지* 29: 297-310, 1999.
25. 김대겸, 김탁, 피성희, 김현아, 최광수, 유형근, 신형식 : 수 종의 생약제제가 MC3T3-E1 세포의 염

- 기성 인산분해효소 합성에 미치는 영향. 대한치주과학회지 29: 751-759, 1999.
26. 李尙仁, 安德均, 辛民校. 漢藥臨床應用, 서울, 成輔社 325-328, 308-309, 1982.
  27. 全國韓醫科大學 本草學教室. 本草學, 서울, 永林社 410-414, 1991.
  28. 이광수, 홍성우, 유경태, 유형근, 김윤철, 신형식 : 홍화씨 성분 분리 추출물이 치주인대세포와 조골모유사세포의 광물화에 미치는 영향. 대한치주과학회지 24: 745-754, 1998.
  29. Bellows C.G., Aubin J.E., Heersche J.N. : Initiation and progression of mineralization of bone nodules formed in vitro: the role of alkaline phosphatase and organic phosphate. Bone Miner 14: 27-40, 1991.
  30. Anderson H.C. : Mechanism of mineral formation in bone. Lab Invest 60: 320-330, 1989.
  31. De Bernard B. : Glycoproteins in the local mechanism of calcification. Clin Orthop 162: 233-244, 1982.
  32. Mukai M., Yoshimine Y., Akamine A., Maeda K. : Bone-like nodules formed in vitro by rat periodontal ligament cells. Cell Tissue Res 271: 453-460, 1993.
  33. Boskey A.L. : Noncollagenous matrix proteins and their role in mineralization. Bone Miner 6: 111-123, 1989.

## Effects of *Olibanum* Extracts on the Activity and Differentiation of MC3T3-E1 Cells

Sang-Heon Han<sup>1</sup>, Myoung-Dong Kim<sup>1</sup>, Seung-Han You<sup>1</sup>, Yong-Ouk You<sup>2</sup>,  
Hyung-Keun You<sup>1</sup>, Hyung-Shik Shin<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Periodontology, School of Dentistry, Wonkwang University

<sup>2</sup> Department of Oral Biochemistry, School of Dentistry, Wonkwang University

Recently, many natural medicines, which have advantage of less side effects and possibility of long-term use have been studied for their capacity of anti-bacterial, anti-inflammatory and regenerative potential of periodontal tissues. *Olibanum* has the effects to hemostasis, analgesic and anti-inflammatory, and it also has been traditionally used as a drug for the treatment of bone disease in oriental medicine. The purpose of the present study was to investigate the effects of *Olibanum* extracts on the activity and differentiation of MC3T3-E1 cells, alkaline phosphatase(ALP) synthesis, formation of bone nodules and expression of type I collagen of MC3T3-E1 cells. To examine the cellular activity, MC3T3-E1 cells were cultured with  $\alpha$ -MEM(control) and each concentration of *Olibanum* for 2 days and 4 days. To compare the ALP synthesis, MC3T3-E1 cells were cultured with  $\alpha$ -MEM(negative control), dexamethasone(positive control), and each concentration of *Olibanum* for 2 days and 4 days. To compare the bone nodule formation, MC3T3-E1 cells were cultured for 21 days, and to compare the type I collagen expression, MC3T3-E1 cells were cultured for 4 days. The cellular activity of MC3T3-E1 cells treated with 1  $\mu$ g/ml of *Olibanum* extracts was significantly increased at 4-day( $p < 0.05$ ) to control. The activity of ALP in MC3T3-E1 cells treated with 1  $\mu$ g/ml *Olibanum* extracts was significantly increased at 4-day( $p < 0.05$ ). All the experimental groups showed much more bone nodule formation than control groups. The group treated with 1  $\mu$ g/ml of *Olibanum* extracts was the highest bone nodule formation, and showed much more type I collagen expression than negative control.

These results indicate that *Olibanum* extracts may be considered effective in the activity and differentiation of MC3T3-E1 cells.