

# 홍화씨 추출물이 치주인대세포와 조골유사세포의 골 광물화 작용에 미치는 효과

강정구 · 유형근 · 신형식

원광대학교 치과대학 치주과학교실

## I. 서론

치주치료의 궁극적인 목적은 소실된 백악질, 골, 결합조직 등을 재생시키는 것으로써 많은 임상적, 조직학적 연구에서 소실된 치주 구조를 회복시키는 것이 가능하다고 하였다<sup>1-4)</sup>. 치주질환으로 상실된 치주 조직을 재생시키기 위해서는 골이식술<sup>5-7)</sup>, 치근면 처리술<sup>8-10)</sup>, 조직 유도 재생술<sup>11-14)</sup> 등과 같은 여러 가지의 술식이 사용되어져 왔다. 이러한 치료 방법의 가능성은 많은 연구를 통해 이루어졌으며 특히 조직 유도 재생술은 치주인대에서 유래되는 전구 세포들이 백악질과 치주인대, 골 등과 같은 조직을 재생시킬 수 있는 능력을 가졌다는 가설을 전제로 하고 있기 때문에 치주인대 섬유모세포가 치주 조직 재생에 중요한 역할을 하고 있으며 여기에는 치주인대 세포의 이주와 증식이 필요한 것으로 여겨지고 있고 이러한 과정은 신체내의 성장 인자 등에 의해서 영향을 받으며 조절되어 질 수 있다.

치주조직의 재생 과정에서 치주조직내 특정세포의 역할에 관해서 McCulloch(1985)<sup>15)</sup>와 Gould 등(1977)<sup>16)</sup>은 치주조직의 재생에 관여하는 전구세포들은 치주인대의 혈관 주위에 존재한다고 하였고, McCulloch와 Melcher (1983)<sup>17)</sup>, 그리고 Aukhil 등(1986)<sup>18)</sup>은 이들 전구세포가 치조골과 백악질 쪽으로 이동하면서 조골유사세포와 조백악세포로 분화

한다고 하였으며, 한편 McCulloch 등(1987)<sup>19)</sup>과 Melcher(1986)<sup>20)</sup>은 골내막강에서 기원하는 세포가 혈관을 통해 치주인대 조직 내로 이동하여 조골유사세포가 조백악세포로 분화한다고 주장하였다. 그러나 최근 Herr 등(1995)<sup>21)</sup>은 혈관 근접세포나 골내막 세포는 치주조직의 재생에 크게 기여하지 않는다고 하는 등 아직 확립되지는 않았지만, 혈관주위의 세포 활성화 뿐 만 아니라 잔존하는 건강한 치주인대 부위의 세포활성을 통하여 치주조직 재생이 증진된다는 최근의 개념이 있기도 하다<sup>22-24)</sup>. 성공적인 치주조직의 재생을 위해서는 이와 같은 치주인대 세포의 역할이 반드시 필요할 뿐 만 아니라, 골세포의 증식과 분화 또한 필요한 과정이 될 것이다.

골조직은 독특한 성장과 기능적 특징을 지니는 결합조직이다. 골조직의 성장과 개조에 관여하는 조골유사세포, 파골세포 및 전구세포의 증식, 분화와 활성화는 여러 가지 호르몬 등의 전신적 인자와 cytokine과 같은 국소적 인자에 의하여 조절되고 있다<sup>25)</sup>.

조골유사세포는 골기질을 합성하는 간엽세포로서 조상골세포(osteoprogenitor cell), 전조골세포(preosteoblast) 등에서 생성된다. 조골유사세포는 골형성의 주된 세포 성분으로, 또는 파골세포에 의한 골흡수의 조절자로 작용하는 것으로 알려져 있다<sup>26)</sup>. 조골유사세포의 골기질 합성은 증식과 분화를 조절하는 여러 인자들에 의해 좌우되며, osteopontin,

osteonectin, alkaline phosphatase(ALP), osteocalcin, type I procollagen 같은 조골유사세포의 생산물은 골기질 합성에 중요한 역할을 한다. 많은 전신적 호르몬들이 조골유사세포의 증식과 분화기능을 조절하는데, 이에 osteopetretic 호르몬, 스테로이드 호르몬, 성호르몬, 성장호르몬 등이 포함된다. 호르몬은 특수 수용체를 경유하여 직접적으로 조골유사세포에 영향을 주거나 cytokine에 의하여 영향을 미칠 수 있다. 세포들의 조골유사세포 특성에 대한 기준으로 1) 골기질 구성 성분인 ALP 등과 같은 골과 관련된 물질의 분비 여부 2) 특징적인 골 항상성 조절 호르몬에 대한 반응; 예를 들어 부갑상선 호르몬에 대한 cyclic adenosine monophosphate(cAMP) 생성의 증가와 1,25 dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>에 대한 골 관련 호르몬의 합성 증가 3) 골형성 유도 능력 등을 들 수 있다<sup>27)</sup>. 치주인대 세포는 높은 ALP 활성도를 보이고<sup>27-28)</sup>, 골 조직 특징 중의 하나인 제1형 교원질의 증가된 생성을 보인다. 또한, 부갑상선 호르몬에 대한 반응으로 cAMP생성이 증가하고, osteonectin, biglycan, bone gla protein과 같은 골 관련 단백질을 생합성하는 등 조골유사세포와 유사한 성질을 보인다<sup>29)</sup>. 또한 치주인대세포는 세포의 기질 요소들의 효율적인 합성 활동을 제공하는 잘 조직화된 세포성 기구를 가지며 고도의 세포극성을 띠고 조골적 성격과 백악질 형성에 관여하는 등 치주조직 창상 치유에 가장 중요한 세포중 하나이다. 그러나 치주인대와 골에서 유래한 섬유모세포양 세포 중 어느 것이 백악아세포와 조골세포로 각각 치유 후반기에 분화하는 지는 아직 확실하게 밝혀지지 않았다<sup>27, 30)</sup>.

한편 위와 같은 치주조직 재생과 관련된 많은 연구와 더불어 한의학에서도 치주조직을 재생시키는 물질의 연구가 다각적으로 이루어져 왔다. 한의학에서 구창(口瘡)이라고 알려져 있는 치주질환을 치료하기 위해, 또한 창상 치유와 염증의 제거 및 부종 감소, 지혈 작용을 위해서 한의학에서 많은 약제가 사용되고 있다<sup>31-32)</sup>. 이 중 홍화씨는 골절과 골다공증 등의 골질환에 많이 쓰이고 있고<sup>33-35)</sup>, 율혈을 위한 치료제로써 adenosine diphosphate에 의한 혈소판 응집억제를 통해 항응혈효과와 항염효과 등이 확인된 바

있다<sup>36-38)</sup>. 이와 최(1998)<sup>39)</sup>는 홍화씨에서 골절 치유 작용을 하는 것은 백금 성분이라고 하였는데, 이 백금은 골절 부위에서 양전기와 음전기의 교류작용이 활발하게 일어나게 하여 뼈의 재생을 촉진시킨다고 하였다. 또한 홍화씨에는 뼈의 주된 성분인 칼슘과 골세포를 서로 연결시켜주는 구리 성분도 많이 함유되어 있어서 골절 치유에 효과가 있다고 하였다. 한편 최근의 연구에서 두 등(1997)<sup>40)</sup>은 홍화씨가 치주인대와 골세포의 세포활성도에 유의한 증가를 보여 치주조직의 재생과 재건에 기여할 수 있을 것이라고 하였다.

이 연구는 치주조직 재생에 가장 관련이 있는 치주인대세포와 조골유사세포 등에 골질환시 민간요법으로 사용하는 홍화씨를 투여하여, 이 약제가 세포들의 골 광물화 과정에 미치는 영향을 알아보기 위하여 시행하였다.

## II. 연구재료 및 방법

### 1. 치주인대 세포의 배양

이 연구에 사용된 치주인대 세포는 원광대학교 치과병원에 내원한 환자중 교정치료를 위해 발거된 소구치의 치주인대조직으로부터 얻어졌다. 발거된 치아는 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM, Gibco Co., USA)이 담겨있는 15 ml tube에 담아 혈액이나 이물질을 제거하기 위해 3회 세척하였다. 세척된 치아를 10% FBS(fetal bovine serum, Gibco Co., USA)와 1% 항생제(Penicillin G 10,000 units/ml, Amphotericin B 25  $\mu$ g/ml, Gibco Co., USA)가 첨가된 DMEM이 들어 있는 100mm 조직배양 접시에 옮겨 No. 15 blade를 사용하여 치근 중간 1/3부위의 치주인대 조직을 떼어 낸 후 1mm<sup>2</sup>으로 세절하고, 60 mm 배양접시에 5~6개 조각을 고르게 분포시켰다. 약 30분간 37℃, 100%습도, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하여 배양접시 바닥에 조직이 고르게 부착되도록 배양시킨 후, 각 배양접시당 10% FBS와 1% 항생제가 포함된 DMEM 3ml를 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 60mm 조직배양용 접시에 분주하였다. 배양액은 세포의 충분한 증식이 나타날 때까지 2~3일 간격으로 교환하였고 계대배양은 1:3~4의 비율로 시행하였다. 본 실험에서는 4~8회 계대배양된 치주인대 세포를 사용하였다.

## 2. 조골유사세포의 배양

이 연구에서 사용한 조골유사세포는 임신 19일째의 흰쥐를 마취시킨후 태생기 쥐의 두개골을 분리해 얻었으며, Hank's balanced salt solution(HBSS)로 세척한 후 1.5 ml의 enzyme solution(0.1% collagenase, 0.05% trypsin, 0.5 mM EDTA)을 첨가하여 10분간 교반한 후, 얻어진 cell 부유액에 1.5 ml의 ice-cold FBS를 첨가하여 4℃에서 6분 동안 원심 분리하였다. 위의 과정을 4회 반복하여 얻어진 세포 침전물을 HBSS로 한번 세척 한 후 10% FBS, 1% 항생제가 포함된 DMEM으로 현탁시킨 후 100 mm dish에 분주하고 37℃, 100% 습도, 95% 공기와 5% CO<sub>2</sub>의 조건하에서 배양하였다. 세포들은 3일마다 계대배양하였고, 본 실험에서는 3-5계대의 조골유사세포를 사용하였다.

## 3. 홍화씨 추출물의 준비

홍화씨 100g을 분말형태로 분쇄하여 증류수 1000 ml과 혼합하여 가열 여과한 후 1500 rpm의 rotary evaporator로 농축한 다음 freeze dryer로 동결건조하여 얻어진 분말을 이용하였다. 분말 1g을 증류수 10 ml에 섞어 stock solution을 만들어 농도별로 희석한 후 0.2 $\mu$ m syringe filter(Nalge company, USA)로 여과 멸균한 후 사용하였다.

이 연구에서 비교군으로는 Zea Mays L.(동국제약)과 dexamethasone(Sigma, USA)을 사용하였는데, Zea Mays L.은 에탄올로 용해한 후 농도별 희석하여 사용하였고, dexamethasone은 stock solution을 만들어 희석하여 사용하였다.

## 4. ALP 분석

치주인대 세포와 조골유사세포를 60mm petridish에  $5 \times 10^4$  cell/dish가 되도록 분주한 후, 10% FBS가 첨가된 DMEM으로 1일 동안 37℃, 100% 습도, 5% CO<sub>2</sub> 공기혼합배양기에서 배양하였다.

1일 후 배지를 제거하고, 홍화씨  $10^{-3}$ ,  $10^{-6}$ g/ml, Zea Mays L.  $10^{-3}$ ,  $10^{-6}$ g/ml을 첨가한 후, 1일과 3일 동안 각각 배양하였다. 일정 배양시간이 지난 후 배지를 제거하고 trypsin-EDTA로 세포를 분리시키고 1500 rpm에서 8분간 원심 분리하였다. 상층액을 제거하고 0.2 ml의 멸균된 증류수를 첨가하여 현탁하였다. 각 세포현탁액 0.1 ml에 0.1 M glycine NaOH buffer(pH 10.4) 0.2 ml, 15 mM pNPP 0.1 ml, 0.1% Triton X-100/saline 0.1 ml과 멸균된 증류수 0.1 ml을 잘 혼합하여 37℃에서 30분간 배양한 후, 0.1 N NaOH를 0.6ml 첨가하였다. 그 후 분광측광기(Beckman DU-650, USA)로 410 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였으며 각각의 측정치를 대조군에 대한 백분율로 환산하였으며 통계학적 유의성은 일원 분산분석법(ANOVA)를 이용하여 P<0.05 수준에서 분석하였다.

## 5. 석회화 결절의 측정

석회화 결절 형성에 대한 홍화씨와 Zea Mays L., dexamethasone의 영향을 알아보기 위하여 세포를 35 mm dish에  $1 \times 10^5$  cell/dish가 되도록 분주한 후 10% FBS, 1% antibiotic, 50  $\mu$ g/ml ascorbic acid, 10 mM sodium  $\beta$ -glycerophosphate가 첨가된 DMEM에 홍화씨  $10^{-3}$ ,  $10^{-6}$ g/ml, Zea Mays L.  $10^{-3}$ ,  $10^{-6}$ g/ml, dexamethasone 100 nM을 각각 처리하고 3일마다 배지를 교환하면서 21일 동안 배양기에서 배양하였다. Cell은 neutral buffered formalin(NBF) 3ml에서 96시간 동안 고정한 후, Von kossa method로 염색하였다. 이를 위해 여과된 5% silver nitrate 용액을 넣어 직사광선에서 15-30분간 반응시켜 석회화 결절을 염색하였다. 염색이 완료된 후 광학현미경상에서 석회화 결절을 계수하였다.

## 6. Western blotting analysis

치주인대세포와 조골유사세포를 100 mm dish에  $4 \times 10^5$  cell/dish로 분주한 다음 홍화씨  $10^{-3}$ g/ml, Zea Mays L.  $10^{-6}$ g/ml, dexamethasone 100nM을 처리하고 CO<sub>2</sub> 배양기에서 3일간 배양하였다. Tri reagent (Molecular Research Center, USA)로 단백질을 추출한 후 Lowry 방법으로 단백질을 정량분석하였으며, 이를 기준으로 100  $\mu$ g의 단백질을 전기영동시에 사용하였다. Pre-stained protein marker(Bio-rad, USA)와 loading buffer를 혼합한 각 protein sample을 95℃에서 5분간 denaturation하고 12.5% SDS-PAGE gel에 전기영동한 후 18시간 동안 nitrocellulose membrane(Bio-rad, USA)에 transfer 하였다. Transfer된 nitrocellulose membrane을 membrane blocking solution(Zymed, USA)에서 한 시간 동안 blocking 한 후, osteonectin을 400:1로 blocking solution에 희석하여 90분간 반응시켰다. 그 후 이차항체(HRP-conjugated anti-mouse Ig-G, Santa Cruz Biotechnology, USA)를 1시간 동안 반응시킨 후 ECL chemiluminescence detection kit (Amersham, USA)를 이용하여 detection하였다.

## III. 연구결과

### 1. 홍화씨에 대한 치주인대세포에서의 ALP 측정

홍화씨  $10^{-3}$ g/ml과  $10^{-6}$ g/ml을 치주인대세포에 투여하고 1, 3일 동안 배양한 후 ALP를 측정하여 각각의 측정치를 대조군에 대한 백분율로 환산한 결과는

표 1 Effect of extract of seeds of *Carthamus tinctorius* L. on ALP synthesis in PDL cells

Days Conc.	1	3
$10^{-3}$ g/ml	117.12 $\pm$ 3.94*	251.37 $\pm$ 3.99*
$10^{-6}$ g/ml	104.86 $\pm$ 2.05	109.29 $\pm$ 3.99*

\*: Significantly different from the control (p<0.05), (N=6)

표 1과 같다. 홍화씨를 투여하고 1일 후의 ALP 합성은 2가지 농도 모두 증가하였으며, 특히  $10^{-3}$ g/ml에서 통계학적으로 유의성 있는 증가가 나타났다. 3일 동안 배양한 결과에서도 두 농도 모두 유의하게 증가하였으며,  $10^{-3}$ g/ml을 투여한 경우에 가장 많은 증가를 가져왔다(p<0.05).

### 2. Zea Mays L.에 대한 치주인대세포에서의 ALP 측정

Zea Mays L.  $10^{-3}$ g/ml과  $10^{-6}$ g/ml을 조골유사세포에 투여하고, 1, 3일 동안 배양한 후 ALP를 측정하여 각각의 측정치를 대조군에 대한 백분율로 환산한 결과는 표 2와 같다. Zea Mays L.을 투여하고 1일과 3일 후의 ALP합성은 두 농도 모두 유의성있게 감소하였지만 대조군에 비해 많은 차이는 없었다(p<0.05).

표 2 Effect of Zea Mays L. on ALP synthesis in PDL cells

Days Conc.	1	3
$10^{-3}$ g/ml	94.27 $\pm$ 1.82*	99.53 $\pm$ 4.96
$10^{-6}$ g/ml	95.23 $\pm$ 2.01	91.51 $\pm$ 3.27*

\*: Significantly different from the control (p<0.05), (N=6)

### 3. 홍화씨에 대한 조골유사세포에서의 ALP 측정

홍화씨  $10^{-3}$ g/ml과  $10^{-6}$ g/ml을 조골유사세포에 투여하고 1, 3일 동안 배양한 후 ALP를 측정하여 각각

표 3 Effect of extract of seeds of *Carthamus tinctorius* L. on ALP synthesis in osteoblastic cells

Days Conc.	1	3
$10^{-3}$ g/ml	131.73 $\pm$ 1.42*	148.66 $\pm$ 3.15*
$10^{-6}$ g/ml	114.04 $\pm$ 2.97*	105.36 $\pm$ 0.49

\*: Significantly different from the control (p<0.05), (N=6)

의 측정치를 대조군에 대한 백분율로 환산한 결과는 표 3과 같다. 홍화씨를 투여하고 1일 후의 ALP 합성은 2가지 농도 모두 통계학적으로 유의한 증가를 나타냈다. 3일 동안 배양한 결과에서도 두 농도 모두 증가하였으며, 특히 10<sup>-3</sup>g/ml을 투여한 경우에 가장 많은 증가를 가져왔다(p<0.05).

#### 4. Zea Mays L.에 대한 조골유사세포에서의 ALP 측정

Zea Mays L. 10<sup>-3</sup>g/ml과 10<sup>-6</sup>g/ml을 조골유사세포에 투여하고, 1, 3일 동안 배양한 후 ALP를 측정하여 각각의 측정치를 대조군에 대한 백분율로 환산한 결과는 표 4와 같다. Zea Mays L.을 투여하고 1일 후의 ALP합성은 두 농도 모두 대조군과 거의 차이가 없었다. 3일 동안 배양한 결과에서 10<sup>-3</sup>g/ml의 경우는 대조군의 약 61%정도로 ALP합성이 감소하였으며, 10<sup>-6</sup>g/ml은 대조군과 거의 차이가 없었다(p<0.05).

표 4 Effect of Zea Mays L. on ALP synthesis in osteoblastic cells

Conc.	Days	1	3
10 <sup>-3</sup> g/ml		99.99±1.39	60.85±0.30*
10 <sup>-6</sup> g/ml		99.99±4.74	99.62±5.73

\*: Significantly different from the control (p<0.05), (N=6)

#### 5. 치주인대세포에서 석회화 결절 수의 관찰

치주인대세포에 홍화씨 10<sup>-3</sup>g/ml, Zea Mays L. 10<sup>-6</sup>g/ml, dexamethasone 100nM을 투여하고 21일 동안 배양한 후 석회화된 결절의 수를 측정하였다(그림 1, 사진 1-4). 홍화씨에서 가장 많은 결절의 수를 볼 수 있었으며, Zea Mays L.은 대조군과 거의 비슷한 수를 보였고, dexamethasone은 대조군에서 보다 약간 적은 결절의 수를 볼 수 있었다.

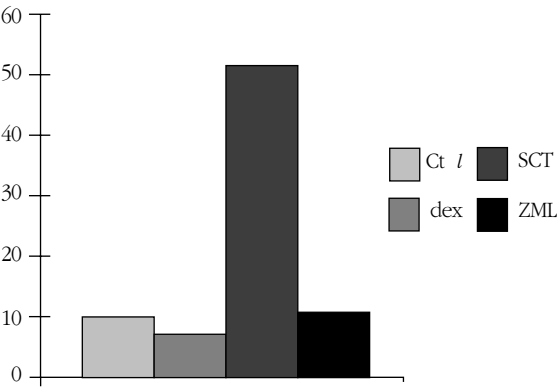


그림 1 Number of mineralized calcification nodules in PDL cells  
(Ctl: control, dex: dexamethasone, SCT: seeds of *Carthamus tinctorius* L., ZML: Zea Mays L.)

#### 6. 조골유사세포에서 석회화 결절 수의 관찰

조골유사세포에 홍화씨 10<sup>-3</sup>g/ml, Zea Mays L. 10<sup>-6</sup>g/ml, dexamethasone 100 nM을 투여하고 21일 동안 배양한 후 석회화된 결절의 수를 측정하였다(그림 2, 사진 5-8). 홍화씨를 투여한 경우에 다른 군에 비해 결절의 수가 많았으며, Zea Mays L.과 dexamethasone을 투여한 경우도 대조군보다 결절

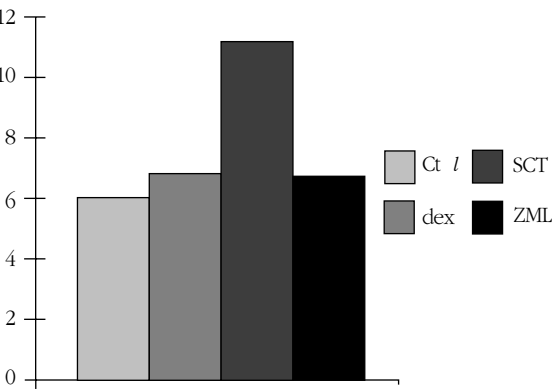


그림 2 Number of mineralized calcification nodules in osteoblastic cells  
(Ctl: control, dex: dexamethasone, SCT: seeds of *Carthamus tinctorius* L., ZML: Zea Mays L.)

의 수가 약간 많았다.

## 7. Western blot analysis

치주인대세포와 조골유사세포에서 osteonectin을 이용하여 western blot을 한 결과는 그림 3과 같다. 두 세포 모두 홍화씨를 투여한 경우의 단백질 발현이 대조군보다 뚜렷이 증가하였으며, dexamethasone을 투여한 경우도 대조군에 비해 단백질 발현이 약간 증가하였다. Zea Mays L.을 투여한 경우는 대조군과 거의 차이가 없었다.

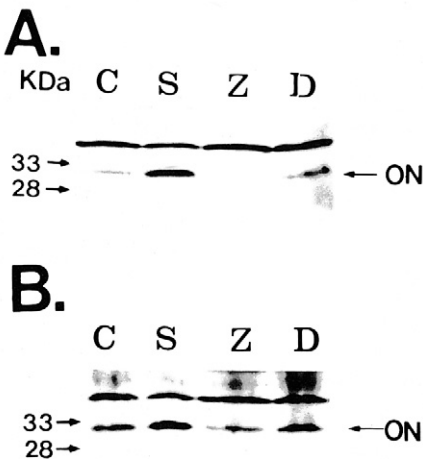


그림 3. Osteonectin expression by western blot analysis in osteoblastic cells and PDL cells(A: osteoblastic cells, B: PDL cells, ON: osteonectin)

## IV. 총괄 및 고찰

치주조직의 재생은 치주인대, 백악질, 치조골 및 결합조직과 같은 치아 지지조직의 치유를 필요로 하는 복잡한 현상이다. 치주창상의 초기에 잔존 치주인대와 골에서 유래한 전구세포들이 결손부의 혈병, 혈청, 염증세포로부터 나온 mitogen에 대한 반응으로 증식하며, 새로 분열한 치주인대 섬유모세포중 일부는 치근면을 따라 치관부로 이주하여 치근면에 섬유성 결합조직 형성을 시작하고 골에서 유래한 세포들은 골 표면에 신생 결합조직을 형성하는데 관여

한다. 따라서 초기단계에서는 치주인대세포의 이주 및 증식과 이들에 의한 기질요소의 합성으로 빠른 치주인대 재생이 필요하며 치주재생의 후기에서는 조백악세포와 조골유사세포의 분화가 신생백악질과 골 형성을 위해서 필요하다. 치주인대 세포는 섬유모세포, 조골유사세포, 파골세포, 백악아세포, 미분화중배엽 세포들을 함유하고 있으며, 치유 과정 중 치주인대 세포만이 기능적으로 배열된 sharpey' fiber가 신생백악질과 치조골에 삽입되는 신부착을 형성하여 치주조직의 재생에 기여한다고 알려져 있다.

최근 생약제제의 이용에 있어 Mullaly 등(1995)<sup>41)</sup>은 치태형성과 치은염에 미치는 효과에 대해 보고하였고, Daniela(1993)<sup>42)</sup>도 치은염의 소독과 염증완화에 대한 약초의 효과를 소개하였다. 경험적인 동양의학의 한계를 넘어, 전래되어 전해지는 여러 생약제제들에 대한 성분별 분획과 이들의 효과에 대한 과학적인 접근이 이루어져 있고, 일부는 상당한 진척을 이루어 실제 임상에 사용할 수준에 이른 것들도 있다. 이들 생약제제는 과거 상당기간 검증되어온 안정성과 함께, 실제 임상에 적용을 위한 경제적인 측면을 볼 때, 응용 가능한 약제로 생각된다. 본 연구에 이용된 홍화씨는 과거에 특별히 연구된 바는 없으나 최근 골절과 골다공증, 골형성부전증 등의 각종 골질환에 탁월한 효능을 보인다고 하여 치주조직의 재생에 관여하는 치주인대세포와 조골유사세포에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 이용하였다. 이전의 연구에서 두 등(1997)<sup>40)</sup>은 홍화씨가 치은섬유모세포와 치주인대세포, 조골유사세포 모두에서 세포활성도의 유의한 증가를 보이고, 교원질 합성능도 유의한 증가를 보인다고 보고하여 홍화씨가 치주조직의 재생과 재건에 기여할 수 있을 것이라고 하였다.

Alkaline phosphatase (ALP)는 유기인산 에스테르를 가수분해하여 석회화가 이루어지는 부위에서 국소적으로 인산이온의 농도를 증가시키는 효소로써, 세포외기질에 calcium phosphate를 침착시켜 석회화를 유도하는 기능을 갖는다고 알려져 있다<sup>43-45)</sup>. De Bernard (1982)<sup>46)</sup>는 ALP가 국소적으로 인산이온 농도를 증가시켜 단백질을 인단백으로 전환시키고

이것이 칼슘결합 성향을 가지면서 석회화의 핵으로 역할을 한다고 하였다. 본 연구에서 홍화씨와 Zea Mays L.에 대한 ALP의 합성량을 측정한 결과, 치주인대세포에서 홍화씨  $10^{-3}$ g/ml 농도는 합성량이 상당히 많이 증가하였는데, 특히 1일 보다 3일째에 많은 증가가 있었던 것으로 보아 홍화씨의 작용이 시간이 흐를수록 증가한다고 볼 수 있겠다. 그러나  $10^{-6}$ g/ml 농도에서는 대조군과 별 차이가 없는 것으로 보아 홍화씨  $10^{-3}$ g/ml 농도가 가장 적절한 농도로 생각되며 이 농도에서 가장 적절한 광물화 작용을 나타낼 것으로 여겨져 석회화 결절 수 측정시에는  $10^{-3}$ g/ml의 농도를 사용하였다. 그리고 홍화씨는 조골유사세포에서도  $10^{-3}$ g/ml 농도에서 많은 합성증가를 가져왔다. 조골유사세포에서도 역시 1일 보다 3일째에 ALP 합성량이 증가하여 시간이 지날수록 더 많은 ALP를 합성해 낼 것으로 예상된다. 한편 홍화씨와의 효과를 비교하기 위하여 사용한 Zea Mays L.은 치주인대세포와 조골유사세포 모두에서 대조군에 비해 별 다른 차이가 없었다.

본 연구에서 세포를 장기간 배양하여 생성되는 석회화 결절을 관찰하기 위해서 홍화씨, Zea Mays L., dexamethasone을 사용하였는데, 이 실험에서도 홍화씨는 다른 약제들보다 더 많은 석회화 결절을 형성하였다.

Dexamethasone이나 Zea Mays L.은 치주인대세포와 조골유사세포에서 대조군과 거의 비슷하거나 조금 더 많은 수의 석회화 결절을 형성하였으나, 홍화씨는 조골유사세포 뿐 만 아니라, 특히 치주인대세포에서 많은 수의 석회화 결절을 형성하였다. 이와 같이 홍화씨의 효과가 조골유사세포에서 보다 치주인대세포에서 더 많이 나타나는 것은, 세포의 기원이 서로 달라서 사람 치주인대세포가 흰쥐 조골유사세포보다 민감하게 반응하는 것으로 여겨지며, 이와 같은 결과는 사람세포와 cell line을 이용한 류 등 (1997)<sup>47)</sup>의 연구결과와도 일치한다.

Osteonectin을 사용한 western blot 분석에서도 홍화씨를 투여한 2가지 세포에서 다른 약제에 비해 단백질 발현이 뚜렷이 증가하였다. 즉 홍화씨는 ALP 합성과 석회화 결절 형성 및 osteonectin 생성 및 분

비에서 다른 약제들보다 월등히 우수한 효과를 나타냈으며, 특히 치주인대세포에서 좋은 효과를 보이는 것으로 나타났다.

Dexamethasone은 조골유사세포를 분화시켜 골형성을 증가시킨다고 하며<sup>48-49)</sup>, 쥐의 두개골과 골수에서 채취한 조골성 dexamethasone으로 처리한 경우 골 특이성의 표지 단백질인 osteopontin과 ALP, osteocalcin 등의 합성이 증가한다고 하였다<sup>50-52)</sup>. 한편, dexamethasone이 부족한 배지에서는 치주인대세포 뿐만 아니라 조골유사세포도 결절이나 그와 유사한 치밀한 물질을 형성시키지 못한다고 하였다<sup>27)</sup>. 그러나 다른 연구에서는 dexamethasone을 처리한 치주인대세포는 dexamethasone을 처리하지 않은 경우와 비교시 세포 형태의 차이를 발견하지 못했으며, specific protein을 찾기 위한 분석에서도 osteopontin, ALP, osteocalcin, bone sialoprotein의 단백질발현은 나타나지 않았으며, dexamethasone은 광물화과정동안 DNA content를 변화시키지도 않았고 광물화의 양과 형태에 유의성 있는 변화도 없었다고 보고하였다<sup>53)</sup>. 이 연구에서 dexamethasone을 처리하여 석회화 결절을 측정한 결과는 두 세포 모두 대조군과 거의 차이가 없는 것으로 나타났으나, osteonectin에 대한 western blot 분석에서는 대조군에 비해 단백질 발현이 약간 증가하는 것으로 나타났다. 즉, 실험 조건에 따라 광물화 과정에 영향을 미칠 수도 있지만, 홍화씨만큼 많은 영향을 주지는 못하는 것으로 생각된다.

Zea Mays L.은 Thiers 등(1958)<sup>54)</sup>에 의해 옥수수로부터 추출된 불검화 정량추출물로서 화농의 개선과 치주염에 효과가 있는 점이 발견되었다. 이 Zea Mays L.에 대하여 Chaput (1964)<sup>55)</sup>는 국소적 치료와 병행해서 규칙적으로 계속 복용시 치조골 흡수 및 치주인대 파괴에 대한 예방 및 재생효과가 있다고 보고하였으며, 1970년대에 이르러 연구방법론의 개선으로 명확한 결과를 얻기에 이르렀다. De Morgues(1970)<sup>56)</sup>는 이 약제가 치주염환자에서 치아동요도와 치조골 흡수를 감소시키는 것을 관찰하였는데, 국소치료를 시행한 후 이 약제를 투여하여 약 80% 정도에서 골의 염증성 분해 과정이 중지됨을 보

고하여 *Zea Mays* L. 이 골의 치유과정에 유용하게 작용하므로써 치주질환을 완화시켜 치료한다고 주장하였다. 그러나, 본 연구에서 *Zea Mays* L. 은 석회화 결절 형성에서만 대조군 보다 약간 증가한 경향을 나타내었으며, ALP 합성도와 osteonectin을 이용한 western blot 분석에서는 별다른 효과를 나타내지 못하였다. 하지만 *Zea Mays* L. 은 많은 임상연구에서 좋은 효과를 나타내는 것으로 알려져 있어서 이에 대한 더 많은 연구가 필요할 것으로 생각된다.

본 연구 결과 홍화씨는 치주인대세포와 조골유사세포의 골 광물화 과정에 많은 영향을 미치는 것으로 나타났으며, 앞으로 골 형성과 관련된 다양한 측정법을 사용한 더욱 세밀한 평가가 이뤄져야 할 것이다. 또한 여러 cytokine과 성장인자 등 골개조와 관련된 물질들 간의 상호작용 및 생물학적인 작용을 분석하여 홍화씨와 이들 물질들을 복합적으로 사용했을 때 치주조직의 재생에 있어 상승효과를 나타낼 수 있는지에 대해서도 향후 심도 있는 연구가 필요하리라 생각되며, 더 나아가 임상적 유용성의 방안을 모색할 필요성이 있다.

## V. 결론

치주조직의 재생은 치주치료의 궁극적인 목표라 할 수 있고, 치주인대에서 기원하는 세포가 결합조직 뿐만 아니라 경조직 형성에도 관여하는 것으로 알려져 있다. 골절과 골다공증, 골형성부전증 등 각종 골질환에 이용되는 민간요법의 홍화씨가 치주조직 재생에 미치는 영향을 알아보기 위해 치주인대세포 및 조골유사세포에서 ALP 합성과 석회화 결절 형성능, 그리고 osteonectin에 대한 단백질 발현을 western blot 분석으로 비교 연구하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 홍화씨를 투여한 치주인대세포의 ALP 생성은 1 일군과 3 일군에서  $10^3$ g/ml와  $10^6$ g/ml의 농도에서 유의성 있는 증가를 보였다( $P < 0.05$ ).
2. 홍화씨를 투여한 조골유사세포의 ALP 생성은 1 일군과 3 일군에서  $10^3$ g/ml와  $10^6$ g/ml의 농도에

서 유의성 있는 증가를 보였다( $P < 0.05$ ).

3. 홍화씨를 투여한 경우에 치주인대세포의 석회화 결절 형성능은 대조군 및 다른 약제를 투여한 군에서 보다 크게 높았으며, 조골유사세포에서도 다른 약제에 비해 많은 결절을 형성하였다.
4. 치주인대세포와 조골유사세포에서 각 약제 투여에 따른 osteonectin의 단백질 발현은 홍화씨의 경우에 더 증가된 양상을 볼 수 있었다.

이상과 같은 결과로 홍화씨가 ALP 분석과 석회화 결절 생성 등에서 dexamethasone과 *Zea Mays* L. 을 사용한 경우보다 증가된 효과를 나타냈으며, osteonectin을 이용한 western blot 분석에서도 증가된 발현을 나타내어 홍화씨가 골 광물화 과정에 우수한 효과가 있을 것으로 생각된다.

## VI. 참고문헌

1. Becker, W., Becker, B., Berg, L., Prichard, J., Caffessee, R., and Rosenberg, E. : New attachment after treatment with root isolation procedures : Report for treated class II and class II furcation and vertical osseous defects. Int. J. Periodontics Restorative Dent., 8(3): 2-16, 1988.
2. Pontoriero, R., Lindhe, J., Nyman, S., Karring, T., Rosenberg, E., and Sanavi, F. : Guided tissue regeneration in degree II furcation involved mandibular molars. J. Clin. Periodontol., 15: 247-254, 1988.
3. Schanllhorn, R. and McClain, P. : Combined osseous composite grafting, root conditioning, and guided tissue regeneration. Int. J. Periodontics Restorative Dent., 8: 9-32, 1988.
4. Bowers, G.M., Ganet, M., Stevens, M., Emerson, J., Corio, R., Mellonig, J., Lewis, S.B., Peltzman, B., Romberg, E., and Risom, L. : Histological evaluation of new attachment

- in humans. *J. Periodontol.*, 56: 381-396, 1985.
5. Schallhorn, R.G. and Hiatt, W.H. : Human allografts of iliac cancellous bone and marrow in periodontal osseous defects. II. Clinical observations. *J. Periodontol.*, 43: 67-81, 1972.
6. Drago, M.R. and Sullivan, H.C. : Clinical and histological evaluation of autogenous iliac bone grafts in humans. Part I. Wound healing 2 to 8 months. *J. Periodontol.*, 44: 599-613, 1973.
7. Bowers, G.M., Schallhorn, R.G., and Mellonig, J.T. : Histologic evaluation of new attachment in human intrabony defects. A literature review. *J. Periodontol.*, 53: 509-514, 1982.
8. Cole, R.T., Crigger, M., Bogle, G., Egelberg, J., and Selvic, K.A. : Connective tissue regeneration to periodontally diseased teeth. A histological study. *J. Periodont. Res.*, 15: 1-9, 1980.
9. Terranova, V.P. and Wikesjo, U.M.E. : Extracellular matrices and polypeptide growth factors as mediators of functions of cells of the periodontium. A review. *J. Periodontol.*, 58: 371-380, 1987.
10. Hanes, P.J. and Polson, A.M. : Cell and fiber attachment to demineralized cementum from normal root surfaces. *J. Periodontol.*, 60: 188-198, 1989.
11. Gottlow, J., Nyman, S., Karring, T., and Lindhe, J. : New attachment formation as the result of controlled tissue regeneration. *J. Clin. Periodontol.*, 11: 494-503, 1984.
12. Magnusson, I., Nyman, S., Karring, T., and Egelberg, J. : Connective tissue attachment formation following exclusion of gingival connective tissue and epithelium during healing. *J. Periodont. Res.*, 20: 201-208, 1985.
13. Blumental, N.M. : The use of collagen membranes to guide regeneration of new connective tissue attachment in dogs. *J. Periodontol.*, 59: 830-839, 1988.
14. Caffesse, R.G., Smith, B.A., Castelle, W.A., and Nasjleti, C.E. : New attachment achieved by guided tissue regeneration in beagle dogs. *J. Periodontol.*, 59: 589-594, 1988.
15. McCulloch, C.A.G. : Progenitor cell populations in the periodontal ligament of mice. *Anat. Rec.*, 211: 258-262, 1985.
16. Gould, T.R.L., Melcher, A.H., and Brunett, D.M. : Location of progenitor cells in periodontal ligament of mouse molar stimulated by wounding. *Anat. Rec.*, 188: 133-142, 1977.
17. McCulloch, C.A.G. and Melcher, A.H. : Cell density and cell generation in the periodontal ligament of mice. *Am. J. Anat.*, 167 : 43-58, 1993.
18. Aukhil, I., Simpson, D.M., Suggs, C., and Petterson, E. : In vivo differentiation of progenitor cells of the periodontal ligament. *J. Clin. Periodontol.*, 13 : 862-868, 1986.
19. McCulloch, C.A.G., Nemeth, E., Lowenberg, B., and Melcher, A.H. : Paravascular cells in endosteal spaces of alveolar bone contribute to periodontal ligament population. *Anat. Rec.*, 219 : 234-242, 1987.
20. Melcher, A.H., Cheong, T., Cox, J., Nemeth, E., and Shiga, A. : Synthesis of cementum-like tissue in vitro by cells cultured from bone: a light electron microscopic study. *J. Periodont. Res.*, 21 : 592-612, 1986.
21. Herr, Y., Matsuura, M., Lin, W.L., and Genco, R.J. : The origin of fibroblasts and their role in the early stages of horizontal furcation defects healing in the beagle dogs. *J. Periodontol.*, 66: 716-730, 1995.
22. McCulloch, C.A.G. : Basic considerations in

- periodontal wound healing to achieve regeneration. *Periodontol* 2000., 1: 16-25, 1993.
23. O' Neal, R., Wang, H.L., MacNeil R.L., and Somerman, M.J. : Cells and materials involved in guided tissue regeneration. *Curr. Opin. Periodontol.*, 141-156, 1994.
24. Pitaru, S., McCulloch, C.A.G., and Narayanan, A.S. : Cellular origins and differentiation control mechanisms during periodontal development and wound healing. *J. Periodont. Res.*, 29: 81-94, 1994.
25. Martin, T.J., Ng, K.W., and Suda, T. : Bone cell physiology. *Endocrinol. Met. Clin. AM.*, 18: 833-858, 1989.
26. Zheng, M.H. : What's new in the role of cytokines on osteoblast proliferation and differentiation. *Path. Res. Pract.*, 188: 1104-1121, 1992.
27. Arceo, N., Sauk, J.J., Moehring, J., Foster, R.A., and Somerman, M.J. : Human periodontal cells initiate mineral-like nodules in vitro. *J. Periodontol.*, 62: 499-503, 1991.
28. Yamashita, Y., Sato, M., and Noguchi, T. : Alkaline phosphatase in the periodontal ligament of the rabbit and macaque monkey. *Oral Biol.*, 32: 677-678, 1987.
29. Somerman, M.J., Young, M.F., Foster, R.F., Moehring, J.M., Imm, G., and Sauk, J.J. : Characteristics of human periodontal ligament cells in vitro. *Archs. Oral Biol.*, 35: 240-247, 1990.
30. Cho, M.I., Lin, W.L., and Genco, R.J. : Platelet-derived growth factor-modulated guided tissue regeneration therapy. *J. periodontol.*, 66: 522-530, 1995.
31. 高木敬次郎: 日藥學雜誌, 1972, p 951-969.
32. 陸昌洙: 現代韓方方藥合編, 契軸文化社, 1976, p 458.
33. 韓藥調製資格取得本叢書2. 東醫學研究所 編著, 1993, p 610-613.
34. 本草學. 東醫學研究所, 1993, p 319-320.
35. 한국생약교수협의회 편저, 本草學, 사단법인 대한약사회, 1995, p 553-555
36. 조기영, 이용무, 최상묵, 정종평. : 생약 추출물이 IL-1 $\beta$  생성 및 활성화에 미치는 영향. 대한치주과학회지, 25(2): 386-396, 1995.
37. 이용무, 구영, 배기환, 정종평. : 후박 및 대조추출 혼합물이 골조직 재생에 미치는 영향. 대한치주과학회지, 27(1): 165-178, 1997.
38. Kutsuna, H., Fujii, S., Kitamura, K., Komatsu, K., and Nakano, M. : Identification and determination of platelet aggregation inhibitor from safflower(*Carthamus tinctorius* Linne). *Yakukaku Zasshi.*, 108: 1101-1103, 1988.
39. 이인우, 최진규. : 홍화씨 건강법. 태일 출판사., 1998, 45-70.
40. 두진수, 강정구, 유형근, 신형식. : 생약 제제가 세포활성도에 미치는 효과. 대한치주과학회지, 27(3): 459-468, 1997.
41. Mullally, B.H., James, J.A., Coulter, W.A., and Linden, G.J. : The efficacy of a herbal-based toothpaste on the control of plaque and gingivitis. *J. Clin. Periodontol.*, 22: 686-689, 1995.
42. Daniela, T. : *Salvia officinalis* 1. I. Botanic characteristics, composition, and cultivation. *Cesk Farm.*, 42(3) : 111-116, 1993.
43. Beertsen, W. and Theo Van Den Bos. : Calcification of dentinal collagen by cultured rabbit periosteum: The role of alkaline phosphatase. *Matrix.*, 9: 159-171, 1989.
44. Anderson, H.C. : Mechanism of mineral formation in bone. *Lab. Invest.*, 60: 320-330, 1989.
45. Bellows, C.G., Aubin, J. E., and Heershe, J.N.M. : Initiation and progression of mineralization of bone nodules formed in

- vitro: the role of alkaline phosphatase and organic phosphate. *Bone and Mineral*, 14: 27-40, 1991.
46. De Bernard, B. : Glycoproteins in the local mechanism of calcification. *Clin. Orthop.*, 162: 233-244, 1982.
  47. 류인철, 이용무, 구 영, 배기환, 정종평. : 홍화 추출물이 치주인대세포, 조골세포 활성도에 미치는 영향. *대한 치주과학회지*, 27(4): 867-882, 1998.
  48. Bellow, C.G., Aubin, J.E., Heersche, J.N.M., and Antosz, M.E. : Mineralized bone nodules formed in vitro from enzymatically released rat calvaria cell populations. *Calcif. Tissue Int.*, 38: 143-154, 1986.
  49. Tenenbaum, H.C. and Heersche, J.N.M. : Dexamethasone stimulates osteogenesis in chick periosteum in vitro. *Endocrinology*, 117: 2211-2217, 1985.
  50. Kasugai, S., Zhang, Q., Overall, C.M., Wrana, J.L., Butler, W.T., and Sodek, J. : Differential regulation of the 55 and 44kDa forms of secreted phosphoprotein I(SPP-I, osteopontin) in normal and transformed rat bone cells by osteotropic hormones, growth factors and a tumor promotor. *Bone and Mineral*, 13: 235-250, 1991.
  51. Nagata, T., Bellows, C.G., Kasugai, S., Butler, W.T., and Sodek, J. : Biosynthesis of bone proteins [SPP-I(secreted phosphoprotein-I, osteopontin), BSP(bone sialoprotein) and SPARC(osteonectin)] in associatin with mineralized tissue formation by fetal rat-calcarial cells in culture. *J. Biochem.*, 274: 513-520, 1991.
  52. Owen, T.A., Aronow, M., Shalhoub, V., Barone, L.M., Wilming, L., Tassiinari, M.S., Kennedy, M.B., Pockwinse, S., Lian, J.B., and Stein, G.S. : Progressive development of the rat osteoblast in vitro : Reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. *J. Cell. Physiol.*, 143 : 420-430, 1990.
  53. McCauley, L.K., Koh, A.J., and Somerman, M.J. : Expression of Extracellular Matrix protein in Human Periodontal Ligament Cells During Mineralization In Vitro. *J. periodontol.*, 68: 320-327, 1997.
  54. Thiers, Jouanneteau, and Zwingelstein. : The maize germ oil insaponifiable its therapeutical indications. *Presse Medicale*, 26: 1293- 1294, 1958.
  55. Chaput, A. : Insadol and Parodontolyses. *L' Information Dentaire*, 23: 2148-2153, 1964.
  56. De Mourgues, F. : A double blind study of Insadol. *Minerva Stomatol.*, 19:293-298, 1970.

## 사진부도 설명

- 그림 1. Formation of calcification nodules in PDL cells at control group(×40)
- 그림 2. Formation of calcification nodules in PDL cells by dexamethaxone(×40)
- 그림 3. Formation of calcification nodules in PDL cells by extract of seeds of *Carthamus tinctorius L.*(×40)
- 그림 4. Formation of calcification nodules in PDL cells by Zea May L.(×40)
- 그림 5. Formation of calcification nodules in osteoblastic cells at control group(×40)
- 그림 6. Formation of calcification nodules in osteoblastic cells by dexamethasone(×40)
- 그림 7. Formation of calcification nodules in osteoblastic cells by extract of seeds *Carthamus tinctorius L.*(×40)
- 그림 8. Formation of calcification nodules in osteoblastic cells by Zea Mays L.(×40)

## 사진부도( 1 )

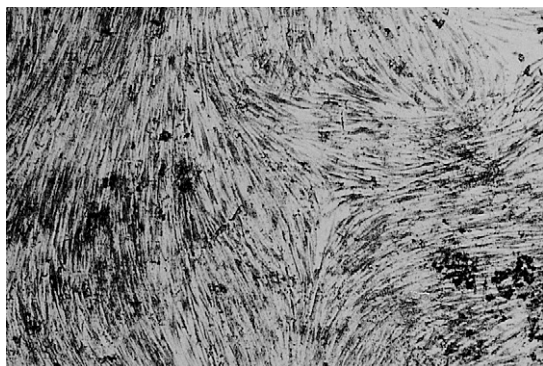


그림 1. Formation of calcification nodules in PDL cells at control group(×40)

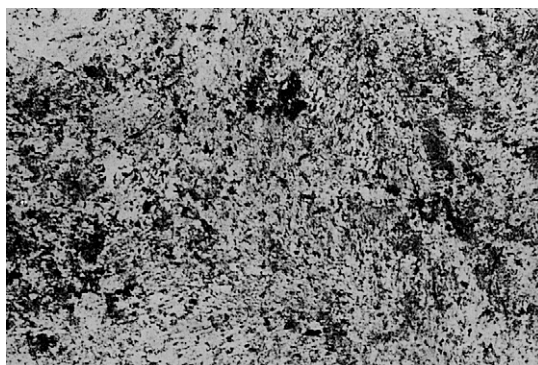


그림 2. Formation of calcification nodules in PDL cells by dexamethasone(×40)

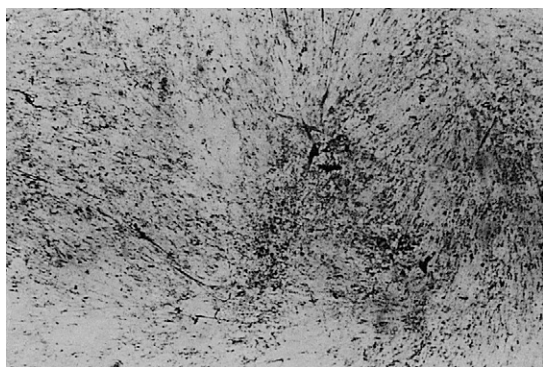


그림 3. Formation of calcification nodules in PDL cells by extract of seeds of *Carthamus tinctorius* L.(×40)

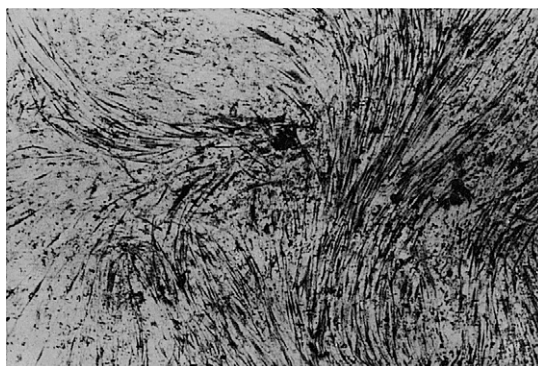


그림 4. Formation of calcification nodules in PDL cells by Zea May L.(×40)

## 사진부도( Ⅱ )

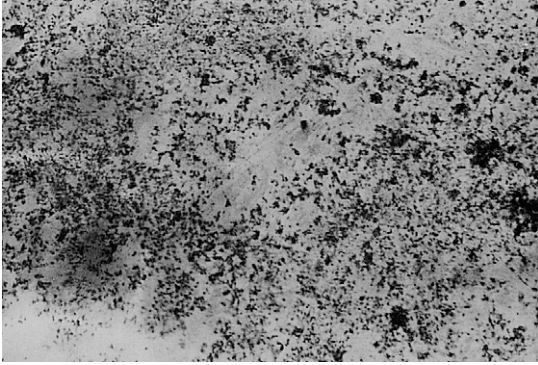


그림 5. Formation of calcification nodules in osteoblastic cells at control group(×40)

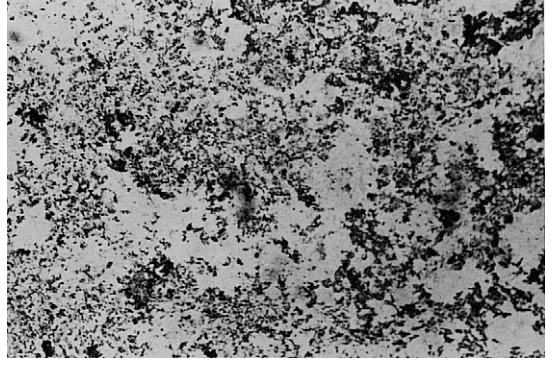


그림 6. Formation of calcification nodules in osteoblastic cells by dexamethasone(×40)

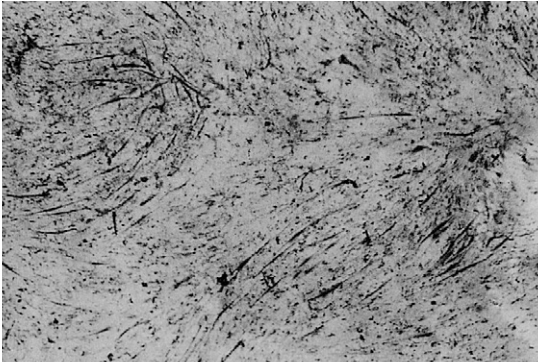


그림 7. Formation of calcification nodules in osteoblastic cells by extract of seeds *Carthamus tinctorius* L.(×40)

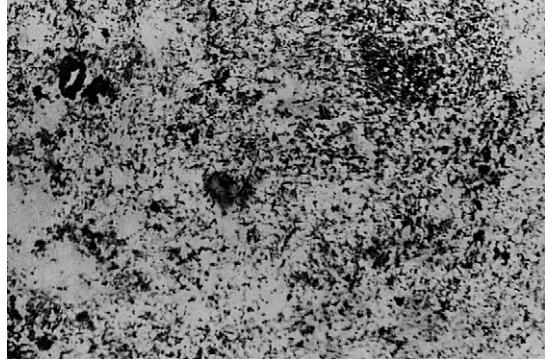


그림 8. Formation of calcification nodules in osteoblastic cells by *Zea Mays* L.(×40)

## Effect of Extract of Seeds of *Carthamus tinctorius L.* on Mineralization in Periodontal Ligament Cells and Osteoblastic Cells

Jung-Goo Kang, Hyung-Keun You, Hyung-Shik Shin

Department of Periodontology, College of Dentistry, Wonkwang University

The main goal for the treatment of periodontal diseases is the regeneration of lost cementum, bone and connective tissue. Clinical and histological research suggests that it is possible to restore periodontal structures.

Seeds of *Carthamus tinctorius L.* has been used for the treatment of bone fracture and osteoporosis in traditional Korean medicine. The purpose of this study is to examine the effect of extract of seeds of *Carthamus tinctorius L.* on mineralization in periodontal ligament cells and osteoblastic cells. Periodontal ligament cells were primarily obtained from a extracted premolars with non-periodontal diseases. Osteoblastic cells were obtained from calvariae of a fetal rat. Cells were cultured with DMEM at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> in 100% humidity incubator. Alkaline phosphatase(ALP) level and the number of calcification nodules were examined and western blot analysis using osteonectin was performed.

Measurements of ALP levels and calcification nodules showed that extract of seeds of *Carthamus tinctorius L.* had significantly higher activity than control in all of both cells. In western blot analysis, protein expression of osteonectin indicated that extract of seeds of *Carthamus tinctorius L.* showed an increased pattern than control in all of both cells.

From the above results, it seems that extract of seeds of *Carthamus tinctorius L.* has excellent effect on mineralization in periodontal ligament cells and osteoblastic cells.