

## 홍화씨 성분 분리 추출물이 치주인대세포와 조골모유사세포의 광물화에 미치는 영향

이광수<sup>1</sup> · 홍성우<sup>1</sup> · 유경태<sup>1</sup> · 유형근<sup>1</sup> · 김윤철<sup>2</sup> · 신형식<sup>1</sup>

<sup>1</sup>원광대학교 치과대학 치주과학교실

<sup>2</sup>원광대학교 약학대학

### I. 서론

치주염은 치태축적으로 인한 치은염이 진행되어 발생하는 것으로 지지조직 파괴와 치아상실의 주 원 인증 하나이다<sup>1)</sup>. 이러한 치주염은 그 원인이 치근면 에 부착된 치주병인균의 독소에 의해 유발되며, 이들 병인균의 조직내 침투에 의해 더욱 깊게 진행된다. 독소 및 병인균의 염증유발과 면역반응의 진행으로 여러 염증물질과 면역반응물질이 조직 내에 유출되 면서 치주조직의 파괴가 급, 만성으로 진행된다<sup>2)</sup>. 치 주치료의 목적은 손상 받은 치주조직에 있어서 구조 와 기능의 완전한 수복이다. 이러한 치주치료의 목 적은 원인요소 제거를 통한 자발적인 조직재생, 치주 인대세포의 증식을 선택적으로 유도하는 조직유도 재생, 최근의 세포생물학을 통한 조직재생의 유도에 의해 치주치료의 목적이 달성될 수 있다<sup>3)</sup>. 치주조직 재생능력 증가를 위하여 선택적으로 치주조직 재생 관련 세포의 증식, 유주 및 분화유도를 얻고자 하는 연구들이 실험실적 연구와 동물실험을 통해 성공적 인 가능성들이 제시되고 있기는 하나, 아직 임상에서 의 응용은 미비한 상태이다<sup>4, 5)</sup>.

1976년 Melcher가 치주조직의 재생 잠재성에 관한 가설을 발표한 이후<sup>6)</sup>, 치주인대세포가 치주조직 재 생에 가장 중요한 세포라는 것이 입증되었고<sup>7-10)</sup>, 1986년 Gottlow가 조직유도재생술이라는 용어를 처

음 사용하였다<sup>11)</sup>. 조직유도재생술에 사용되는 차단 막의 재료는 흡수성과 비흡수성으로 구별되며, 비흡 수성 차단막인 polytetrafluoroethylene(PTFE)이 가 장 많이 사용되고 있고, 흡수성 차단막으로는 calcium sulfate가 연구되고 있다.

이러한 차폐막을 통한 치주인대 세포의 선택적 분 화 및 유주를 도모하는 기계적 방법의 조직유도재생 술과 함께, 치주조직 재생 관련 세포의 증식 및 분화 를 유도할 수 있는 것으로 밝혀지고 있는 일부 성장 인자등에 관한 연구가 이루어지고 있다. 성장인자<sup>12)</sup> 는 염증 지역의 세포에서 분비되는 폴리펩티드 분자 로써 상처 치유에서 일어나는 사건들을 조절하며, 이 것들은 혈류내로는 분비되지 않고, 결합조직 세포의 이주와 단백질의 성장과 합성 그리고 세포의 물질의 다른 요소들을 조절한다. 대식세포, 내피세포, 섬유 아세포와 혈소판에서 분비되는 이 효소는 platelet-derived growth factor(PDGF), insulins-like growth factor(IGF), basic fibroblastic growth factor(bFGF) 그리고 transforming growth factor(TGF)- $\alpha$ 와- $\beta$  등 이다. 성장인자는 치주조직 치유동안에 일어나는 사 건들을 조절하는데 사용될 수 있다. Lynch는 PDGF 와 IGF-1을 같이 사용하는 것이 치주조직의 모든 구 성 요소들의 성장을 촉진하는데 효과적이라고 하였 다<sup>3)</sup>. 그러나, 이러한 인자들의 임상에서의 이용은 국소조직에 이용시 타기관에 미치는 영향이나 실용

화되기까지의 응용방법 등의 문제점, 경제적인 측면에서의 실용성 등으로 아직 상품화되기까지는 문제가 되고 있다.

최근에 몇몇 생약제제에 관한 효능 및 효과를 근거로 치주질환 치료제로서 치주질환균에 대한 항균효과 및 항염효과와 치주조직 재생능력에 미치는 영향 등에 대해 많은 연구가 이루어지고 있다. 대표적인 생약제제로서 황련, 황금, 후박, 대조 및 은행엽 등을 들 수 있는데, 황련은 그람 양성 및 음성균과 곰팡이 등에 광범위한 항균작용을 가지며 항염증작용, 지혈작용, 항암작용 등이 있는 것으로 알려져 있어 구내염, 화농증, 피부염증, 비출혈 등에 사용되며<sup>14, 15)</sup>, 송(1996) 등은 황련이 치주인대세포의 활성을 촉진하고, IL-6의 생산을 억제한다고 보고하였다<sup>16)</sup>. 황금은 항염증작용이 있으며, 황금의 에타놀 추출물이 치조골 재형성의 창상치유과정에 보조적인 약제로서 가능성이 높다고 보고하였고<sup>17)</sup>, 후박 추출물은 항균효과, IL-1 $\beta$  및 PGE<sub>2</sub> 생산차단효과, collagenase 활동억제효과 등<sup>18-22)</sup>이 확인된바 있고, 대조추출물은 후박 추출물의 효과에 덧붙여 치은섬유아세포 활성화 증진효과 등이 확인된 바 있으며<sup>23-25)</sup>, 은행엽추출물도 치주질환 세균에 대한 항균효과가 확인된 바 있다<sup>22)</sup>.

홍화씨는 골절과 골다공증 등의 골질환에 많이 이용되고 있으며<sup>26-28)</sup>, 울혈을 위한 치료제로 전래되는 약제로서 adenosine diphosphate에 의한 혈소판 응집억제를 통한 항응혈효과와 항염효과 등이 확인된 바 있다<sup>24, 25, 29)</sup>. 이와 최(1998)는 홍화씨에 들어 있는 유기 백금은 금속 백금에 비해 독성이 없으며, 항암작용이 뛰어나고, 골절과 골다공증에 약성을 지닌다고 하였는데, 이 백금은 골절부위에서 양전기와 음전기의 교류작용이 활발하게 일어나게 하여 백혈구의 이주를 촉진시켜 뼈의 재생을 일으킨다고 하였으며, 홍화씨에는 뼈의 주된 성분인 칼슘과 골세포를 서로 연결시켜주는 구리 성분도 함유되어 있어서 골절 치유에 효과가 있다고 하였다<sup>30)</sup>. 한편 최근의 연구에서 두(1997) 등은 홍화씨가 치주인대와 골세포의 세포활성도에 유의한 증가를 보여 치주조직의 재생에 기여할 수 있을 것이라고 하였고<sup>31)</sup>, 강(1998) 등은 홍화씨가 치주인대세포와 조골유사세포의 골 광물화 과

정에 작용하여 치주조직 재생에 기여할 수 있을 것이라고 보고하였다<sup>32)</sup>.

이 연구는 최근의 연구를 토대로 홍화씨를 수층(H<sub>2</sub>O layer)과 부탄올층(Butanol layer)으로 성분 분리한 후 치주조직 재생에 관여하는 치주인대세포와 조골모유사세포에 투여하여 이 약제가 세포의 세포활성도 및 골광물화 과정에 미치는 영향을 알아보기 위하여 시행하였다.

## II. 연구재료 및 방법

### 1. 치주인대 세포의 배양

이 연구에 사용된 치주인대세포는 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, 60mm 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 3ml을 첨가하였다. 단일세포층이 형성될 때까지 2~3일 간격으로 배양액을 교환하였다. 단층 밀생이 형성된 후 배양액을 제거하고 2회 세척 후, Trypsin-EDTA(0.05% Trypsin, 0.53mM EDTA, GIBCO/BEL, 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 치주인대세포를 사용하였다.

## 2. 조골모유사세포의 배양

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

## 3. 홍화씨 추출물의 준비

진조한 홍화씨 분말 100g을 증류수 1 l 에 넣고 100℃에 3시간 가열하여 여과하고 여액을 감압 농축한 후 동결건조 하여 홍화씨 물 추출물을 8g을 얻었다. 이 가운데 6g을 증류수 200ml에 현탁시킨 후 n-BuOH 150ml를 가하여 진탕하고 n-BuOH층을 취하고(3회 반복) 각각의 분획을 감압농축하여 n-BuOH 가용부(부탄올층)와 수층을 각각 2.5g, 3.5g씩 얻었다.

## 4. 세포활성도 측정

5-8회 계대배양된 치주인대세포, 조골모유사세포를 Trypsin-EDTA(0.05% Trypsin, 0.53 mM EDTA, GIBCO/BRL, USA)로 떼어내어 trypan blue로 염색한 후 hemocytometer로 세포수를 세어 24-well plate의 각 well당  $1 \times 10^4$ 의 세포가 들어가도록 분주하였다. 세포들이 부착할 수 있도록 1일간 37℃, 5% CO<sub>2</sub>, 100% 습도의 배양기에서 배양한 후 부착되지 않은 세포를 제거하기 위해 배지를 제거하고 PBS로 한번

세척 후 새 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, GIBCO/BRL, USA)을 각각의 well에 첨가하였다. 홍화씨 추출물의 수층과 부탄올층 각각을  $10^{-3}$ ,  $10^{-6}$ g/ml가 되도록 각 well에 희석하여 첨가하였으며, 증류수를 첨가한 군은 대조군으로 하여 3일 동안 배양하였다. 각각의 시간이 경과된 후 PBS로 용해한 MTT(3-(4, 5-dimethylthiazol-2 -yl)-2 , 5-diphenyl tetrazolium bromide; No. M2128, Sigma, USA) 용액 250μl 씩을 각각의 well에 첨가하여 4시간동안 CO<sub>2</sub> 배양기에 배양하였다. 배양 후 배지를 제거하고 200 μl의 DMSO(Dimethyl sulfoxide, D5879, Sigma, USA)와 25μl의 glycine buffer를 첨가하여 형성된 formazan결정을 용해시키고 Plate를 잘 흔든 후 ELISA analyser(Spectra, MAX 250, Molecular Devices Co. USA)에 plate를 넣고 570nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

## 5. ALP 분석

치주인대 세포와 조골모유사세포를 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 추출물의 수층과 부탄올층 각각을  $10^{-3}$ ,  $10^{-6}$  g/ml가 되도록 배지와 함께 희석하여 첨가한 후, 3일 동안 배양하였다. 일정 배양시간이 지난 후 배지를 제거하고 trypsin-EDTA로 세포를 분리시키고 1500rpm에서 8분간 원심 분리하였다. 상층액을 제거하고 0.2ml의 멸균된 증류수를 첨가하여 현탁하였다. 각 세포현탁액 0.1ml에 0.1M glycine NaOH buffer(pH 10.4) 0.2ml, 15mM pNPP 0.1ml, 0.1% Triton X-100/saline 0.1ml과 멸균된 증류수 0.1ml를 잘 혼합하여 37℃에서 30분간 배양한 후, 0.1N NaOH를 0.6ml 첨가하였다. 그 후 분광측광기(Beckman DU-650, USA)로 410nm의 파장에서 흡광도를 측정하였으며 각각의 측정치를 대조군에 대한 백분율로 환산하였으며 통계학적 유의성은 일원분산분석법(ANOVA)을 이용하여 P<0.05 수준에서 분석하였다.

## 6. 석회화 결절의 측정

석회화 결절 형성에 대해 여러 가지 추출방법을 이용하여 추출한 홍화씨 추출물의 영향을 알아보기 위하여 세포를 6well dish에  $1 \times 10^5$  cell/well가 되도록 분주한 후 10% FBS, 1% antibiotic, 50  $\mu$ g/ml ascorbic acid, 10mM sodium  $\beta$ - glycerophosphate가 첨가된 DMEM에 홍화씨 추출물의 수층과 부탄올층 각각을 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-6</sup> g/ml가 되도록 배지와 함께 처리하고 3일마다 배지를 교환하면서 21일 동안 배양기에서 배양하였다. 일정 배양시간이 지난 후 각 well의 배지를 제거하고, cell은 3ml의 neutral buffered formalin(NBF)으로 40℃에서 48시간 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 계수 하였다.

## III. 연구결과

### 1. 홍화씨 추출물의 수층과 부탄올층에 대한 치주인대세포의 세포활성도

치주인대세포에 대해 홍화씨 추출물의 수층과 부탄올층 10<sup>-3</sup>g/ml과 10<sup>-6</sup>g/ml 를 가지고 시행한 세포활성도의 실험결과는 Table 1과 같다. 수층과 부탄올층 모두에서 대조군에 비해 10<sup>-3</sup>g/ml과 10<sup>-6</sup>g/ml 에서 유의성 있는 세포활성도의 증가를 보였다(p<0.05).

### 2. 홍화씨 추출물의 수층과 부탄올층에

Table 1. Cellular activity of PDL cells on each H<sub>2</sub>O & Butanol layer of Safflower seeds

conc.	H <sub>2</sub> O layer	Butanol layer
Con	2.05±0.06	1.84±0.01
10 <sup>-3</sup> g/ml	2.49±0.20*	2.02±0.06*
10 <sup>-6</sup> g/ml	2.63±0.11*	2.02±0.10*

\* : Significantly different from the control(p<0.05),(N=5)

Table 2. Cellular activity of osteoblastic cells on each H<sub>2</sub>O & Butanol layer of Safflower seeds

conc.	H <sub>2</sub> O layer	Butanol layer
Con	3.41±0.17	3.58±0.18
10 <sup>-3</sup> g/ml	3.74±0.03*	3.72±0.01
10 <sup>-6</sup> g/ml	3.68±0.05*	3.57±0.21

\* : Significantly different from the control(p<0.05),(N=5)

Table 3. ALP synthesis on H<sub>2</sub>O & Butanol layer of Safflower seeds in PDL cells

conc.	H <sub>2</sub> O layer	Butanol layer
Control	100.00±0.00	100.00±0.00
10 <sup>-3</sup> g/ml	154.38±13.30*	118.13±4.96*
10 <sup>-6</sup> g/ml	98.13±5.73	95.00±7.10

\* : Significantly different from the control(p<0.05),(N=5)

## 대한 조골모유사세포의 세포활성도

조골모유사세포에 대해 홍화씨 추출물의 수층과 부탄올층 10<sup>-3</sup>g/ml과 10<sup>-6</sup>g/ml 를 가지고 시행한 세포활성도의 실험결과는 Table 2와 같다. 수층의 경우 10<sup>-3</sup>g/ml과 10<sup>-6</sup>g/ml 모두에서 유의성 있는 세포활성도를 보였으나 부탄올층의 경우 유의성 있는 세포활성도를 보이지 않았다(p<0.05).

### 3. 홍화씨 추출물의 수층과 부탄올층에 대한 치주인대세포에서의 ALP 측정

홍화씨 추출물의 수층과 부탄올층 10<sup>-3</sup>g/ml과 10<sup>-6</sup>g/ml를 치주인대세포에 투여하고 ALP를 측정하여 각각의 측정치를 대조군에 대한 백분율로 환산한 결과는 Table 3과 같다. 대조군에 비해 수층과 부탄올층의 10<sup>-3</sup>g/ml에서 유의성 있는 증가를 보였다(p<0.05).

### 4. 홍화씨 추출물의 수층과 부탄올층에 대한 조골모유사세포에서의 ALP 측정

홍화씨 추출물의 수층과 부탄올층 10<sup>-3</sup>g/ml과 10<sup>-6</sup>g/ml를 조골모유사세포에 투여하고 ALP를 측정하여 각각의 측정치를 대조군에 대한 백분율로 환산한 결과는 Table 4와 같다. 대조군에 비해 수층의 10<sup>-3</sup>g/ml과 10<sup>-6</sup>g/ml에서 유의성 있는 증가를 보였다(p<0.05). 부탄올층의 경우 10<sup>-3</sup>g/ml에서 유의성 있는 증가를 보였으나 10<sup>-6</sup>g/ml에서는 유의성 있는 증가를 보이지 않았다(p<0.05).

Table 4. ALP synthesis on H<sub>2</sub>O & Butanol layer of Safflower seeds in osteoblastic cells

conc.	H <sub>2</sub> O layer	Butanol layer
Control	100.00±0.00	100.00±0.00
10 <sup>-3</sup> g/ml	498.50±39.91*	139.10±6.89
10 <sup>-6</sup> g/ml	217.29±30.79*	89.47±42.64

\* : Significantly different from the control(p<0.05),(N=5)

6g/ml를 조골모유사세포에 투여하고 ALP를 측정하여 각각의 측정치를 대조군에 대한 백분율로 환산한 결과는 Table 4과 같다. 대조군에 비해 수층의 각 농도에서 유의성 있는 증가를 보였으며, 특히 10<sup>-3</sup>g/ml를 투여한 경우에 가장 많은 증가를 보였으나, 부탄올층에서는 대조군과 거의 차이가 없었다(p<0.05).

#### 5. 치주인대세포에서 석회화 결절 수의 관찰

치주인대세포에 홍화씨 추출물의 수층과 부탄올층 10<sup>-3</sup>g/ml과 10<sup>-6</sup>g/ml를 투여하고 21일 동안 배양한 후 석회화된 결절 수를 측정하였다(Table 5). 수층과 부탄올층의 10<sup>-3</sup>g/ml에서 대조군에 비해 약간의 증가를 볼 수 있었으며, 10<sup>-6</sup>g/ml에서는 대조군과 거의

의 비슷한 수를 보였다.

#### 6. 조골모유사세포에서 석회화 결절 수 관찰

조골모유사세포에 홍화씨 추출물 수층과 부탄올층의 10<sup>-3</sup>g/ml과 10<sup>-6</sup>g/ml를 투여하고 21일 동안 배양한 후 석회화된 결절의 수를 측정하였다(Table 6). 수층의 두 농도에서 대조군과 비교시 약간의 증가된 결절 수를 볼 수 있으며, 부탄올층의 경우는 두 농도에서 대조군과 거의 비슷한 수를 보였다.

### IV. 총괄 및 고찰

치주조직의 재생을 위한 치료방법은 질환의 원인이 되는 치태, 치석 등의 세균요인과 염증조직 및 기타 불필요한 감염 조직을 제거함으로써 지속적인 조직의 파괴와 골 흡수를 저지하여 생체의 자가 재생능력을 기대함과 더불어 파괴된 조직부위의 재생을 위하여 이식재를 이식하며, 동시에 치주조직 재생과 직접적으로 관련이 있는 치주인대세포와 골세포의 증식 및 유주를 증가시키는 약물의 조직 결손부 투입에 의한 재생법을 생각할 수 있다. 결손된 치주조직의 재생을 위해서는 치주인대세포의 증식 및 분화

Table 5. Number of mineralized calcification nodules according to the concentration of both layer in PDL cells

	H <sub>2</sub> O layer			Butanol layer		
	Control	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-6</sup>	Control	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-6</sup>
Total	5	9	5	5	8	4

※ Concentration Unit: g/ml

Table 6. Number of mineralized calcification nodules according to the concentrations of both layer in osteoblast cells

	H <sub>2</sub> O layer			Butanol layer		
	Control	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-6</sup>	Control	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-6</sup>
Total	6	13	10	6	7	5

※ Concentration Unit: g/ml

에 의한 신생백악질 형성 및 신생골 형성, 치주인대의 재생이 필수적이다. 이러한 측면에서 치주결체조직 내의 중요한 치유원인 치주인대세포 및 골세포에 대한 기능적 활성화는 결손 치주조직의 재생에 필수적 요소라 할 수 있다.

최근에 몇몇 생약제제에 관한 효능 및 효과를 근거로 치주질환 치료제로서 치주질환균에 대한 항균효과 및 항염효과와 치주조직 재생능력에 미치는 영향 등에 대해 많은 연구가 이루어지고 있는데, 대표적인 생약제제로서 황련, 황금, 후박 대조 및 은행엽, 홍화씨 등을 들 수 있다.

홍화씨는 어혈, 부인냉병, 신경통, 홍역, 무월경, 동맥경화 등의 민간요법으로 이용되고 있으며<sup>30)</sup>, 골절과 골다공증 등의 골질환에 탁월한 효능을 갖는다<sup>26-28)</sup>. 또한 홍화씨 기름에는 고혈압과 동맥경화 유발의 원인이 된다는 콜레스테롤 농도저하에 효과가 큰 다가불포화지방산(linoleic acid)이 75% 다량 함유됨으로써 동맥경화 예방과 치료에 효과가 크다고 알려져 있으며, 노화를 막아주는 것으로 알려진 비타민 E도 90ml나 들어있다고 알려져 있다<sup>30)</sup>.

본 연구에서는 홍화씨 추출물의 수층과 부탄올층이 치주인대세포와 조골모유사세포의 세포활성에 미치는 효과를 알아보기 위하여 세포활성도를 측정하였는데, 치주인대세포에 대해 홍화씨 추출물의 수층과 부탄올층 모두에서 대조군에 비해  $10^{-3}\text{g/ml}$ 과  $10^{-6}\text{g/ml}$ 에서 유의성 있는 세포활성도의 증가를 보였고, 수층과 부탄올층 모두  $10^{-3}\text{g/ml}$  보다  $10^{-6}\text{g/ml}$ 에서 약간 더 증가된 세포활성도를 나타내었다. 조골모유사세포에 대한 수층과 부탄올층의 세포활성도에서는 수층의 경우  $10^{-3}\text{g/ml}$ 과  $10^{-6}\text{g/ml}$  모두에서 유의성 있는 세포활성도를 보였으나, 부탄올층의 경우 유의성 있는 세포활성도를 보이지 않았다. 즉 치주인대세포와 조골모유사세포에서 수층이 부탄올층 보다 더욱 높은 세포활성 증진효과를 보였는데, 치주인대세포에서는 수층의  $10^{-6}\text{g/ml}$ 에서, 조골모유사세포에서는 수층의  $10^{-3}\text{g/ml}$ 에서 가장 높은 세포활성 증진효과를 보였다.

Alkaline phosphatase(ALP)는 유기인산 에스테르를 가수분해하여 석회화가 이루어지는 부위에서 국

소적으로 인산이온의 농도를 증가시키는 효소로써, 세포외 기질에 calcium phosphate를 침착시킴으로써 석회화를 유도하는 기능을 갖는다<sup>33-35)</sup>. De Bernard(1982)는 ALP가 국소적으로 인산이온 농도를 증가시켜 단백질을 인단백으로 전환시키고 이것이 칼슘결합 성향을 가지면서 인단백질이 석회화의 핵으로서의 역할을 한다고 하였다<sup>36)</sup>. 이러한 골관련 단백질은 칼슘염과 인산염에 결합하는 성질을 가지며 수산화인회석에 대한 친화성이 높은 특징을 보이기 때문에, 수산화인회석 결정체 형성의 핵으로 작용하고 핵의 성장과 용해와 같은 조절과정에도 관여할 것이다<sup>37)</sup>. 본 연구에서 홍화씨 추출물의 수층과 부탄올층에 대한 ALP의 합성량을 측정한 결과, 치주인대세포에서는 대조군에 비해 수층과 부탄올층 모두  $10^{-3}\text{g/ml}$ 에서 유의성 있는 증가를 보였지만,  $10^{-6}\text{g/ml}$ 에서는 유의성 있는 증가를 보이지 않았다. 수층이 부탄올층 보다 약간 더 증가를 보였지만, 모두  $10^{-3}\text{g/ml}$ 가 가장 적절한 농도로 생각된다. 조골모유사세포에서는 수층의 두 농도 모두에서 유의성 있는 증가를 보였으며, 특히  $10^{-3}\text{g/ml}$ 을 투여한 경우에 가장 많은 증가를 보였고, 부탄올층에서는 대조군과 차이가 없었다. 즉 치주인대세포와 조골모유사세포의 ALP 합성량 측정에서도 세포활성도와 마찬가지로 수층이 부탄올층 보다 더욱 높은 효과를 보였으며,  $10^{-6}\text{g/ml}$ 보다  $10^{-3}\text{g/ml}$ 에서 증가된 효과를 나타내었다.

Mukai등(1993)의 실험에서는 결절내에 조골세포나 골세포와 유사한 세포들 및 교원기질과 기질낭포(matrix vesicle)가 존재하며, 이 결절이 수산화인회석의 결정구조를 갖음을 관찰하고, 치주인대세포내에는 조골세포로 분화하여 골과 유사한 조직을 형성할 수 있는 골전구세포(osteoprogenitor cell)가 존재한다고 주장하였다<sup>38)</sup>. Ramakrishnan등(1995)은 석회화 결절 형성과정을 네단계로 구분하여, 배양요기 내 세포밀도가 치밀한 단층을 이룬 다음, 계속적인 세포의 분열로 세포가 중층을 이루는 부위가 나타나게 된다고 하였다. 다음 단계에서는 세포가 밀접된 부위에 기질이 석회화되어 완전히 석회화된 결절형성이 이루어지게 된다고 하였다<sup>39)</sup>. 본 연구에서 세포를 장기간 배양하여 생성되는 석회화 결절 수를 관

찰하였는데, 치주인대세포와 조골모유사세포 모두에서 수층이 부탄올층 보다 약간 더 증가된 결절 수를 볼 수 있었고, 수층의  $10^3\text{g/ml}$ 가  $10^6\text{g/ml}$  보다 증가된 효과를 관찰할 수 있었다.

본 연구 결과 홍화씨 추출물인 수층과 부탄올층이 치주인대세포나 조골모유사세포의 세포활성도나 ALP 합성량에 효과를 보인다고 나타났으며, 석회화 결절 형성에서는 수층이 부탄올층 보다 큰 효과를 보이는 것으로 나타났다. 앞으로 추출물들에 대한 정확한 분석이 필요하리라 여겨지며, 골 형성을 측정하는 다양한 방법이 모색되어야 할 것이다. 또한 치주질환이 병원균에 의한 감염성 질환이라는 특성상, 치주질환 세균에 대한 효과나, 염증발현 등이 평가되어야 할 것으로 사료된다.

## V. 결론

최근 골절과 골다공증 등 각종 골질환에 민간요법의 약제로 사용되고 있는 홍화씨가 치주조직 재생에 미치는 영향을 알아보기 위해 홍화씨 추출물의 수층과 부탄올층을 치주인대세포와 조골모유사세포에 처리했을 경우 세포활성도와 ALP 합성 그리고 석회화 결절 형성능을 비교 연구하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 홍화씨 추출물의 수층과 부탄올층을 투여한 치주인대세포의 세포활성도는 두 층 모두에서 대조군에 비해  $10^3\text{g/ml}$ 과  $10^6\text{g/ml}$ 에서 유의성 있는 증가를 보였다( $p<0.05$ ).
2. 홍화씨 추출물의 수층과 부탄올층을 투여한 조골모유사세포의 세포활성도는 수층의  $10^3\text{g/ml}$ 과  $10^6\text{g/ml}$ 에서 대조군에 비해 유의성 있는 증가를 보였으며, 부탄올층의 경우 두 농도 모두에서 대조군과 비교시 유의한 차이는 없었다( $p<0.05$ ).
3. 홍화씨 추출물의 수층과 부탄올층을 투여한 치주인대세포의 ALP 생성은 수층과 부탄올층의  $10^3\text{g/ml}$ 에서 대조군에 비해 유의성 있는 증가를 보였다( $p<0.05$ ).

4. 홍화씨 추출물의 수층과 부탄올층을 투여한 조골모유사세포의 ALP 생성은 수층의 경우 두 농도 모두에서 유의성 있는 증가를 보였으며, 특히  $10^3\text{g/ml}$ 에서 가장 많은 증가를 보였으나, 부탄올층에서는 두 농도 모두에서 대조군과 거의 차이가 없었다( $p<0.05$ ).
5. 석회화 결절 형성은 치주인대세포의 경우 수층과 부탄올층의  $10^3\text{g/ml}$ 에서 대조군과 비교시 약간의 증가를 보였고, 조골모유사세포의 경우는 수층의 두 농도 모두에서 대조군과 비교시 약간의 증가된 결절 수를 보였다.

이상과 같은 결과로 홍화씨 추출물의 수층과 부탄올층은 치주인대세포와 조골모유사세포에 대한 세포활성의 증가와 ALP 합성능의 증가 그리고 골조직 재생 촉진효과를 나타내어 치주조직재생을 위한 제제로서 응용가능성을 기대할 수 있을 것으로 생각된다.

## VI. 참고문헌

1. Genco, R.J., Goldman, H.M. and Cohen, D.W. : Contemporary periodontics, C.V. Mosby, St. Louis, 47-54, 1990.
2. Wahl, S.M., Costa, G.L., Mizel, D.E., Allen, J.B., Skaleric, U. and Mangan, D.F. : Role of transforming growth factor beta in the pathophysiology of chronic inflammation, J. Periodontol., 64 : 450-455, 1993.
3. Takata, T. : Oral Wound Healing concepts in periodontology, Curr. Opin. Periodontol., 119-127, 1994.
4. Amar, S., Chung, K.M. : Clinical implications of cellular biologic advances in periodontal regeneration, Curr. Opin. Periodontol., 128-140, 1994.
5. O'neal, R., Wang, H.L., MacNeil, R.L., Somerman, M.J. : Cell and materials involved in guided tissue regeneration, Curr. Opin.

- Periodontol. 141-156, 1994.
6. Melcher, A.H. : On the repair potential of periodontal tissue. J. Periodontol., 47: 256-260, 1976.
  7. Nyman, S., Gottlow, J., Karring, T. and Lindhe, J. : The regenerative potentials of the periodontal ligament. An experimental study in the monkey. J. Clin. Periodontol., 9: 257-265, 1982.
  8. Magnusson, I., Nyman, S., karring, T. and Egelberg, J. : Connective tissue attachment formation following exclusion of gingival connective tissue and epithelium during healing. J. periodontal Res., 20 : 201-208, 1985.
  9. Caton, J.G., DeFuria, E.L., Polson, A.M. and Nyman, S. : Periodontal regeneration via selective cell population. J. Periodontol., 58 : 546-552, 1987.
  10. Aukhil, I. and Iglhaut, J. : Periodontal ligament cell kinetics following experimental regenerative procedures. J. Clin. Periodontol., 15 : 374-382, 1988.
  11. Gottlow, J., Nyman, S., Karring, T., Lindhe, J. : New attachment formation in the human periodontium by guided tissue regeneration. J. Clin. Periodontol. 13: 604-616, 1986.
  12. Fremin, A., Carranza, J.R. : Reconstructive osseous surgery. Clinical Periodontology, 8 : 622-639. 1996.
  13. Lynch, S.E. : The role of growth factor in periodontal repair and regeneration. In Polson AM, ed. Periodontal Repair and Regeneration. Current Status and Directions. Chicago, Quintessence Books, 1994.
  14. 山原條二. : Berberine형 알칼로이드의 행동약리학적 연구(제 1판), 황련 및 그의 함유성분의 중추억제 작용. 日藥理誌 72 : 899-908, 1976.
  15. Fukuda, H., Watanable, K., Kudo, Y. : Some observation on the cardiovascular Effects of 9-substituted berberine. Chem. Pharm. Bull., 18 : 1299-1304, 1970.
  16. 송기범, 공영환, 유형근, 신형식. : 황련이 Lipopolysaccharide를 처리한 치주인대 세포의 세포활성 및 IL-6 생산에 미치는 영향. 대한치주과학회지, 26 : 641-654, 1996.
  17. 박준봉, 허 익, 권영혁, 배기환, 정종평. : 황금 (Scutellaria Radix)의 에타놀 추출물이 백서 치조골 형성에 미치는 영향, 대한치주과학회지, 27 : 443-457, 1997.
  18. Bae, K.H. and Oh, H.R. : Synergistic effect of lysozyme on bacterial activity of magnolol and honokiol against a cariogenic bacterium, Streptococcus mutans OMZ 176. Arch. Pharm. Res., 13 : 117-119, 1990.
  19. Osawa, K., Matsumoto, T., Yasuda, H., Kato, T., Naito, Y., Okuda, K. : The inhibitory effect of plant extracts on the collagenolytic activity and cytotoxicity of human gingival fibroblasts by Porphyromonas gingivalis crude enzyme. Bull. Tokyo Dent. Coll., 32 : 1-7, 1991.
  20. 이승렬, 정종평, 최상목, 배기환. : 천연물추출물의 치주병인균에 대한 항균효과 및 세포독성에 관한 연구. 대한치주과학회지, 22 : 515-526, 1992.
  21. 장범석, 손성희, 정종평, 배기환. : Magnolol과 Honokiol이 항균, 교원질분해효소, 세포독성 및 cytokine 생산에 미치는 영향. 대한치주과학회지, 23 : 145-158, 1993.
  22. 정종평, 구영, 배기환. : 후박 및 은행엽 추출물의 항균 및 세포 활성도에 미치는 영향. 대한치주과학회지, 25 : 478-486, 1995.
  23. 양창호, 이용무, 조기영, 배기환, 정종평. : 대조 추출물이 치은섬유아세포의 생물학적 활성화에 미치는 영향. 대한치주과학회지, 24 : 144-154, 1994.
  24. 조기영, 이용무, 최상목, 정종평 : 생약추출물이 IL-1 $\beta$ 의 생성 및 활성화에 미치는 영향. 대한



- 치주과학회지, 25 : 386-396, 1995.
25. 이용무, 구영, 배기환, 정종평. : 후박 및 대조추출 혼합물이 골조직 재생에 미치는 영향. 대한치주과학회지, 27 : 165-178, 1997.
  26. 韓藥調製資格取得本叢書 2. 東醫學研究所 編著, 610-613, 1993.
  27. 本草學, 東醫學研究所, 319-320, 1993.
  28. 本草學, 한국생약교수협의회 편저, 사단법인 대한약사회, 553-555, 1995.
  29. 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.
  30. 이인우, 최진규. : 홍화씨 건강법. 태일 출판사, 45-70, 1998.
  31. 두진수, 강정구, 유형근, 신형식. : 생약제제가 세포활성도에 미치는 효과. 대한 치주과학회지, 27: 459-468, 1997.
  32. 강정구, 유형근, 신형식. : 홍화씨 추출물이 치주인대세포와 조골유사세포의 골 광물화 작용에 미치는 효과. 대한치주과학회지, 28: 475-489, 1998.
  33. Beertsen, W. and Van den Bos, T. : Calcification of dentinal collagen by cultured rabbit periosteum: The role of alkaline phosphatase. Matrix, 9: 159-171, 1989.
  34. Anderson, H.C. : Mechanism of mineral formation in bone. Lab. Invest., 60: 320-330, 1989.
  35. 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. Mineral., 14: 27-40, 1991.
  36. de Bernard, B. : Glycoproteins in the local mechanism of calcification. Clin. Orthop., 162: 233-244, 1982.
  37. Nagata, T., Bellows, C.G., Kasugai, S., Butler, W.T. and Sodek, J. : Biosynthesis of bone protein [SPP-1(secreted phosphoprotein-1, osteopontin), BSP(bone sialoprotein) and SPARC(osteonectin)] in association with mineralized-tissue formation by fetal-rat calvarial cells in culture. Biochem. J., 274: 513-520, 1991.
  38. Mukai, M., Yoshimine, Y., Akamine, A. and Maeda, K. : Bone-like nodules formed in vitro by rat periodontal ligament cells. Cell. Tissue. Res., 271: 453-460, 1993.
  39. Ramakrishnan, P.R., Lin, W.L, Sodek, J. and Cho, M.I. : Synthesis of noncollagenous extracellular matrix proteins during development of mineralized nodules by rat periodontal ligament cells in vitro. Calcif. Tissue. Int., 57 : 52-59, 1995.

## Effects of the Isolated Extracts from Safflower Seeds on Mineralization of Periodontal Ligament Cells and Osteoblastic Cells

Kwang-Soo Lee<sup>1</sup>, Sung-Woo Hong<sup>1</sup>, Kyung-Tae You<sup>1</sup>, Hyung-Keum You<sup>1</sup>

Youn-Chul Kim<sup>2</sup>, Hyung-Shik Shin<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Periodontology, College of Dentistry, <sup>2</sup> : College of Pharmacy, Wonkwang University

The aim of periodontal treatments is the complete restoration of the structure and function of damaged periodontal tissues. Although it is very difficult to attain this goal, recent advances in periodontal wound healing concepts encourage hope reaching it.

Safflower seeds has been used for the treatment of blood stasis, bone fracture and osteoporosis in traditional Korean medicine. The purpose of this study is to examine effects of the isolated extracts from Safflower seeds on mineralization of 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. Safflower seeds were isolated into the H<sub>2</sub>O layer and the butanol layer. MTT assay and alkaline phosphatase(ALP) level were examined.

Also the number of bone calcification nodules were evaluated.

The obtained results were as follows :

1. The cellular activity of periodontal ligament cells was significantly increased in 10<sup>-3</sup>g/ml, 10<sup>-6</sup>g/ml of both H<sub>2</sub>O layer and butanol layer of Safflower seeds.
2. The cellular activity of osteoblastic cells was significantly increased in 10<sup>-3</sup>g/ml, 10<sup>-6</sup>g/ml of H<sub>2</sub>O layer of Safflower seeds.
3. ALP level of periodontal ligament cells was significantly increased in 10<sup>-3</sup>g/ml of both H<sub>2</sub>O layer and butanol layer of Safflower seeds.
4. ALP level of osteoblastic cells was significantly increased in 10<sup>-3</sup>g/ml, 10<sup>-6</sup>g/ml of H<sub>2</sub>O layer and especilly more increaton was showed in 10<sup>-3</sup>g/ml of H<sub>2</sub>O layer.
5. Calcification nodules of periodontal ligament cells slightly increased in 10<sup>-3</sup>g/ml of both H<sub>2</sub>O layer and butanol layer of Safflower seeds.
6. Calcification nodules of osteoblastic cells slightly increased in 10<sup>-3</sup>g/ml, 10<sup>-6</sup>g/ ml of H<sub>2</sub>O layer of Safflower seeds.

These results indicate that H<sub>2</sub>O layer and butanol layer of the isolated extracts from Safflower seeds has excellent effects on mineralization of periodontal cells and osteoblastic cells.