

## Aralia cortex와 Phellodendron cortex의 혼합 추출물이 치주조직세포 활성화에 미치는 영향

송영보\* · 이만섭\* · 권영혁\* · 박준봉\* · 허 익\* · 김성진\*\*

경희대학교 치과대학 치주과학교실\*

경희대학교 치과대학 약리학교실\*\*

### I. 서론

고도의 산업사회에 살게 되면서 정신적 스트레스, 식생활의 서구화로 인한 비만환자의 증가, 수질 및 대기오염으로 인한 환경적 변화 등 예전에는 볼 수 없었던 사회환경의 급격한 변화로 인하여 우리 나라의 질병의 발현 추세도 선진국형으로 변화하여 특히 당뇨병 환자의 수가 급격히 늘어나는 추세에 있으며 이들 당뇨병 환자는 혈당조절이 잘 이루어지지 않을 경우 여러 가지 전신적인 합병증을 일으키는 것으로 알려져 있다<sup>1)</sup>.

당뇨병을 가지고 있는 환자에서의 치주질환 발병 빈도에 대해서도 많은 연구들이 보고되었으며, 당뇨병 환자가 정상인에 비하여 더 높은 치주질환 발병 빈도를 보이는 것으로 보고되었다<sup>2-7)</sup>. Hugoson 등(1989)<sup>8)</sup>은 당뇨병의 지속기간에 관계없이 당뇨병 환자가 정상인에 비해 치은염에 이환된 비율이 높다고 하였으며, 특히 45세 이하의 환자에서 4-5mm의 치주낭깊이와 심각한 골소실을 보인다고 하였다. Nelson 등(1990)<sup>9)</sup>과 Grossi 등(1993)<sup>10)</sup>은 인슐린 비의존성 당뇨병 환자의 치주질환 이환율을 정상인과 비교한 결과 정상인에 비해 2-3배 높게 나타나며 당뇨병이 치주질환에서 중요한 위험인자로 작용한다고 하였다. Bridges 등(1996)<sup>11)</sup>은 당뇨병 환자가 정상인에 비해 치태지수, 치은지수, 치은출혈지수, 치주낭

깊이, 부착상실 등 여러 가지 치주지표(periodontal parameter)에 대해 높은 수치를 나타내고 당뇨병의 기간과는 상관관계가 없다고 하였다. Karjalainen과 Knuuttila(1996)<sup>12)</sup>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. 정등(1997)<sup>13)</sup>은 당뇨와 같은 고농도의 글루코오스를 치주조직세포에 투여하면 세포활성이 떨어지고 prostaglandin E<sub>2</sub>의 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 사용하는 불편함이 있다. 이밖에 다른 화학적 혈당강하제들은 저혈당, 알레르기, 지방대사장애 등과 같은 부작용이 있다<sup>14)</sup>.

본 연구에서 사용될 약제는 항고혈당 작용을 나타내는 두릅나무(Aralia cortex)와 황백피(Phellodendron cortex)의 혼합추출물로서 두릅나무와 황백피의 혼합물을 물로 추출하여 얻는다. 두릅나무는 다년생 초본으로 한방에서는 소염, 류마티스

성 관절염, 급·만성 간염, 건위, 신장염 등의 치료에 이용되고 있고, oleanolic acid을 함유한  $\alpha$  및  $\beta$ -teralin, araloside A, B, C 등과 protocatechulic acid, choline 등의 성분이 함유되어 있는 것으로 알려져 있다. Yoshigawa등(1994, 1996)<sup>15,16)</sup>은 백서를 대상으로 한 연구에서 두릅나무의 추출 성분이 혈장내의 glucose의 증가를 억제하는 것으로 보고하였다. 황백피는 다년생 목본으로 한방에서는 골절환이나 소염성 수렴약으로서 정장, 위장염, 복통, 황달 등의 치료에 이용되고 있다. 주성분은 berberine이며, 그밖에 palmitine, magnoflorine, guanidine, jateorrhizine, phellodendrine, candicine 등과 obakunone 및 obakulactone 등의 성분이 있으며, 이들 성분은 강한 항균 및 항염작용 등이 있는 것으로 알려져 있다. Uchiyama등(1989)<sup>17)</sup>은 황백피 추출물이 항염증 작용이 있다고 보고하였으며, Mori등(1995)<sup>18)</sup>은 세포성 면역반응을 억제하는 것으로 보고하였다. 또한 이들 각각의 추출물은 극히 미미한 혈당강하효과를 나타내지만 이들을 혼합하여 물로 추출하여 얻은 혼합추출물은 각각의 추출물에 비해 월등히 우수한 상승적 혈당강하효과를 나타내었다.

본 연구는 새로운 당뇨병 치료제로서 연구되고 있는 두릅나무와 황백피의 혼합추출물을 이용하여 치주인대세포와 치은섬유아세포를 대상으로 정상상태와 당뇨병과 같은 고농도의 glucose를 투여한 상태에서 세포수, 단백질 함량, 알칼리성인산분해효소 활성도를 측정하여 이 약물이 치주조직세포 활성화에는 어떠한 영향을 미치는지에 대해서 알아보고자 시행하였다.

## II. 연구재료 및 방법

### 1. 연구재료

본 연구에서 사용된 두릅나무와 황백피의 혼합추출물(이하 P55A)은 두릅나무 가지와 황백피를 중량을 기준 하여 1:1로 혼합한 후 분쇄하고, 증류수를 가하여 교반하면서 추출하여 여과한 후에 이 여액을 증기압에 포화시켜 생긴 침전물은 원심 분리하여 제

거하고 남은 용액을 여과, 정제한 후 동결 건조시켜 분말화하여 사용하였다.

연구대상으로는 전신건강이 양호한 성인을 대상으로부터 임상적으로 염증이 없는 건강한 치주조직에서 초기 배양한 치은섬유아세포와 치주인대세포를 이용하였다. 치은섬유아세포와 치주인대세포의 배양은 Somerman등(1988)<sup>19)</sup>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  $\mu$ g/ml streptomycin(Gibco, U.S.A.)과 1  $\mu$ g/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 1mm<sup>3</sup>의 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  $\mu$ g/ml streptomycin, 0.5  $\mu$ g/ml amphotericin-B가 포함된 DMEM으로 구성된 배양액을 넣고, 37°C, 100% 습도, 5%CO<sub>2</sub> 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 1/3 부위와 치근단측 1/3 부위를 제외한 중앙 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

#### 〈실험 1〉

정상상태에서의 P55A의 효과를 알아보기 위한 실험으로 10% FBS와 100 unit/ml penicillin, 100 $\mu$ g/ml streptomycin, 0.5 $\mu$ g/ml amphotericin-B가 포함된 DMEM으로 구성된 배양액으로 세포를 배양한 군을 대조군으로 하였으며, 이 배양액에 P55A의 농도를 증가시킨 군을 실험군으로 하였다. P55A를 0.1 $\mu$ g/ml의 농도로 투여한 군을 실험 제 1 군, 1 $\mu$ g/ml의 농도로 투여한 군을 제 2 군, 10 $\mu$ g/ml의 농도로 투여한 군을 제 3 군으로 하였으며 총세포수는 대조군과 실험군 모두 동일하게 하였다.

#### 〈실험 2〉

고농도의 glucose를 투여한 상태에서의 P55A의 효과를 알아보기 위한 실험으로 실험 1과 같은 상태의 배양액에 glucose를 200mg/dl의 농도로 각 군에 동일하게 투여하였다.

### (2) 세포수 측정

치은섬유아세포와 치주인대세포를 각각 직경 35mm의 배양접시에  $4.5 \times 10^4$  cells/ml의 세포가 되도록 하여 10% FBS와 100 unit/ml penicillin, 100 $\mu$ g/ml streptomycin, 0.5 $\mu$ g/ml amphotericin -B가 포함된 DMEM으로 구성된 배지에서, 37 $^{\circ}$ C, 100% 습도, 5% CO<sub>2</sub> 공기혼합 배양기에서 대조군, 실험군에 각각 3개씩 36개의 배양접시에 배양하였다. 세포가 부착 완료한 1일 후부터 각 군에 해당하는 배양액으로 배양하였으며, 이때부터 배양 12시간, 2일, 5일째에 0.05% Trypsin/ 0.02% EDTA로 처리하여 세포를 박리한 다음 hemocytometer를 이용하여 도립현미경 하에서 세포수를 측정하였다.

### (3) 단백질함량 측정

치은섬유아세포와 치주인대세포를 각각 직경 35mm의 배양접시에  $4.5 \times 10^4$  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 $\mu$ 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  $4.5 \times 10^4$  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. 초음파 세포분쇄기로 세포막을 분쇄하고 이중 50 $\mu$ l를 취하여 Kind-King method를 이용하여 UV- VIS spectrophotometer로 500 nm에서 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

#### (1) 실험 1

정상상태에서의 P55A의 효과를 알아보기 위한 실험에서 대조군과 실험 제 1, 2, 3 군을  $\frac{1}{2}$ , 2, 5일에 세포수를 측정한 결과 치은섬유아세포와 치주인대세포 모두 시간이 경과함에 따라 모든 군에서 세포수가 전반적으로 증가하는 양상을 보였으며, 제 2 군에

Table 1. Effect of P55A on the proliferation of human gingival fibroblasts

group	time	cell number ( $\times 10^4$ cells/ml)		
		1/2 day	2 day	5 day
C		4.69 $\pm$ 0.22	10.58 $\pm$ 0.26	15.92 $\pm$ 0.58
T1		4.81 $\pm$ 0.59	12.46 $\pm$ 0.48	20.98 $\pm$ 0.24
T2		5.40 $\pm$ 0.35	13.94 $\pm$ 0.36*	27.25 $\pm$ 0.66*
T3		4.73 $\pm$ 0.16	11.77 $\pm$ 0.23	21.77 $\pm$ 0.48*

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

C; control, T1; P55A 0.1  $\mu$ g/ml, T2; P55A 1  $\mu$ g/ml, T3; P55A 10  $\mu$ g/ml

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

Table 2. Effect of P55A on the proliferation of human periodontal ligament cells

group	time	cell number ( $\times 10^4$ cells/ml)		
		1/2 day	2 day	5 day
C		4.23 $\pm$ 0.31	8.65 $\pm$ 0.35	12.77 $\pm$ 0.38
T1		4.67 $\pm$ 0.39	10.38 $\pm$ 0.54	15.04 $\pm$ 0.48
T2		5.16 $\pm$ 0.25	12.71 $\pm$ 0.46	19.25 $\pm$ 0.56*
T3		5.00 $\pm$ 0.13	11.92 $\pm$ 0.33	18.27 $\pm$ 0.68*

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

C; control, T1; P55A 0.1  $\mu$ g/ml, T2; P55A 1  $\mu$ g/ml, T3; P55A 10  $\mu$ g/ml

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

서 가장 많이 증가하였다. 치은섬유아세포는 1/2일에서는 모든 군이 비슷한 증가를 보였으나 2일, 5일로 갈수록 대조군에 비하여 실험군의 세포수가 증가하였다. 시간별 각 군의 세포수를 보면 2일에는 대조군, 실험 제 1 군, 실험 제 2 군, 실험 제 3 군이 각각 10.58 $\pm$ 0.26, 12.46 $\pm$ 0.48, 13.94 $\pm$ 0.36, 11.77 $\pm$ 0.23으로 P55A의 농도가 증가함에 따라 세포수가 증가하였다가 약간 감소하는 경향을 보였다. 5일에서도 각 군의 세포수가 15.92 $\pm$ 0.58, 20.98 $\pm$ 0.24, 27.25 $\pm$ 0.66, 21.77 $\pm$ 0.48로 P55A의 농도가 증가함에 따라 세포수가 증가되었다가 약간 감소하는 경향을 보였다. 또한 2일째 2군에서, 5일째 2군과 3군에서 대조군에 비하여 유의성 있는 증가를 보였다(Table 1, Figure 1).

치주인대세포도 1/2일에서 모든 군이 비슷하였으나 2일, 5일로 갈수록 대조군에 비하여 실험군의 세

포수가 증가하는 양상을 보였다. 시간별 각 군의 세포수를 보면 2일에는 대조군, 실험 제 1, 2, 3 군이 각각 8.65 $\pm$ 0.35, 10.38 $\pm$ 0.54, 12.71 $\pm$ 0.46, 11.92 $\pm$ 0.33으로 P55A의 농도가 증가함에 따라 세포수가 증가하였다가 약간 감소하는 경향을 보였다. 5일에서도 각 군의 세포수가 12.77 $\pm$ 0.38, 15.04 $\pm$ 0.48, 19.25 $\pm$ 0.56, 18.27 $\pm$ 0.68로 2일째와 비슷한 양상을 보였다. 그리고 5일째 2군과 3군에서 대조군에 비하여 유의성 있는 증가를 보였다(Table 2, Figure 2).

## (2) 실험 2

고농도의 glucose를 투여한 상태에서의 P55A의 효과를 알아보기 위한 실험에서도 정상상태에 비하여 전체적으로 세포수의 증가량이 감소하였다. 치은섬유아세포와 치주인대세포 모두 시간이 경과함에 따라 대조군은 거의 변화가 없었으나 실험군에서는

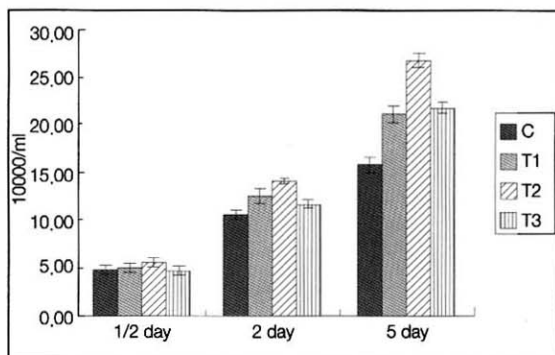


Fig 1. Effect of P55A on the proliferation of human gingival fibroblasts

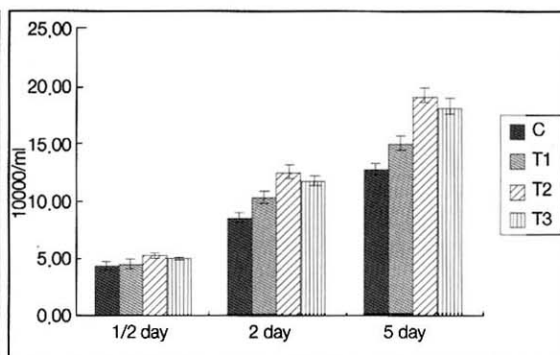


Fig 2. Effect of P55A on the proliferation of human periodontal ligament cells

세포수가 전반적으로 증가하는 양상을 보였으며, 제 2군에서 가장 많은 증가를 보였다. 치은섬유아세포는 1/2일에서는 모든 군이 유사한 양상을 보였으나 2일, 5일로 갈수록 대조군에 비하여 실험군의 세포수가 증가하여 정상상태에서 실험한 것과 비슷한 결과를 나타내었다. 시간별 각 군의 세포수를 보면 2일에는 대조군, 실험 제 1 군, 실험 제 2 군, 실험 제 3 군이 각각  $6.35 \pm 0.27$ ,  $7.88 \pm 0.33$ ,  $9.23 \pm 0.36$ ,  $7.04 \pm 0.33$ 으로 P55A의 농도가 증가함에 따라 세포수가 증가하였다가 약간 감소하는 경향을 보였다. 5일에서도 각 군의 세포수가  $8.52 \pm 0.23$ ,  $11.40 \pm 0.27$ ,  $13.48 \pm 0.35$ ,  $11.21 \pm 0.29$ 로 2일째와 비슷한 경향을 보였으며, 2일째 2군에서, 5일째 2군과 3군에서 대조군에 비하여 유의성 있는 증가를 보였다(Table 3, Figure 3).

치주인대세포도 전체적으로 치은섬유아세포와 비

슷한 결과를 보여 1/2일에서는 모든 군이 유사한 양상을 보였으나 2일, 5일로 갈수록 대조군에 비하여 실험군의 세포수가 증가하는 양상을 보였다. 시간별 각 군의 세포수를 보면 2일에는 대조군, 실험 제 1, 2, 3 군이 각각  $6.25 \pm 0.33$ ,  $7.83 \pm 0.35$ ,  $9.21 \pm 0.42$ ,  $8.75 \pm 0.25$ 로 P55A의 농도가 증가함에 따라 세포수가 증가하였다가 약간 감소하는 경향을 보였고, 5일에서도  $7.56 \pm 0.52$ ,  $10.42 \pm 0.54$ ,  $12.98 \pm 0.46$ ,  $12.29 \pm 0.38$ 로 2일째와 비슷한 양상을 보였다. 2일째 2군에서, 5일째 2군과 3군에서 대조군에 비하여 유의성 있게 증가하였다(Table 4, Figure 4).

## 2. 단백질함량 측정

### (1) 실험 1

Table 3. Effect of P55A on the proliferation of human gingival fibroblasts in high glucose condition

group	time	cell number ( $\times 10^4$ cells/ml)		
		1/2 day	2 day	5 day
GC		$4.10 \pm 0.27$	$6.35 \pm 0.27$	$8.52 \pm 0.23$
GT1		$4.58 \pm 0.41$	$7.88 \pm 0.33$	$11.40 \pm 0.27$
GT2		$5.31 \pm 0.34$	$9.23 \pm 0.36^*$	$13.48 \pm 0.35^*$
GT3		$4.29 \pm 0.31$	$7.04 \pm 0.33$	$11.21 \pm 0.29^*$

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

GC; control, glucose 200mg/dl, T1; P55A 0.1  $\mu$ g/ml+glucose 200mg/dl, T2; P55A 1  $\mu$ g/ml+glucose 200mg/dl, T3; P55A 10  $\mu$ g/ml+glucose 200mg/dl

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

Table 4. Effect of P55A on the proliferation of human periodontal ligament cells in high glucose condition

group	time	cell number( $\times 10^4$ cells/ml)		
		1/2 day	2 day	5 day
GC		4.10 $\pm$ 0.31	6.25 $\pm$ 0.33	7.56 $\pm$ 0.52
GT1		4.50 $\pm$ 0.32	7.83 $\pm$ 0.35	10.42 $\pm$ 0.54
GT2		5.08 $\pm$ 0.33	9.21 $\pm$ 0.42*	12.98 $\pm$ 0.46*
GT3		4.71 $\pm$ 0.15	8.75 $\pm$ 0.25	12.29 $\pm$ 0.38*

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

GC; control, glucose 200mg/dl, T1; P55A 0.1 $\mu$ g/ml+glucose 200mg/dl, T2; P55A 1 $\mu$ g/ml+glucose 200mg/dl, T3; P55A 10 $\mu$ g/ml+glucose 200mg/dl

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

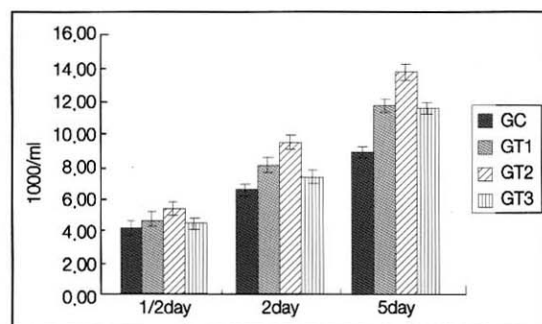


Fig 3. Effect of P55A on the proliferation of human gingival fibroblasts in high glucose condition

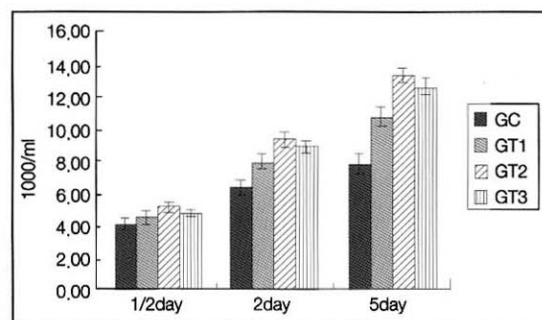


Fig 4. Effect of P55A on the proliferation of human periodontal ligament cells in high glucose condition

정상상태에서의 P55A의 효과를 알아보기 위한 실험에서 대조군과 실험 제 1, 2, 3 군을 2, 5일에 단백질 함량을 측정하고 치은섬유아세포에서는 2일의

측정치가 대조군에서 24.95 $\pm$ 1.59, 실험 제 1 군에서 36.74 $\pm$ 0.90, 실험 제 2 군에서 44.07 $\pm$ 0.72, 실험 제 3 군에서 36.42 $\pm$ 1.00로 대조군, 실험 제 1 군, 실험 제 2 군 순으로 나타났다. 5일째의 결과에서는 대조군에서 33.29 $\pm$ 0.85, 실험 제 1 군에서 47.84 $\pm$ 0.86, 실험 제 2 군에서 60.75 $\pm$ 1.07, 실험 제 3 군에서 47.84 $\pm$ 0.28로 2일째와 비슷한 결과를 보였다. 2일째와 5일째에서 실험군 모두가 대조군에 비하여 유의성 있게 증가하였다(Table 5, Figure 5).

치주인대세포에서는 2일째 대조군, 실험 제 1, 2, 3 군이 각각 20.82 $\pm$ 1.34, 28.38 $\pm$ 1.09, 33.64 $\pm$ 1.72, 32.11 $\pm$ 2.28로 대조군, 실험 제 1 군, 실험 제 3 군, 실험 제 2 군 순으로 나타났고, 5일째의 결과에서는 대조군, 실험 제 1, 2, 3 군이 각각 27.56 $\pm$ 1.57, 37.35 $\pm$ 1.85, 46.95 $\pm$ 1.67, 45.31 $\pm$ 2.01로 대조군, 실험 제 1 군, 실험 제 3 군, 실험 제 2 군의 순으로 나타났다. 2일째와 5일째에서 실험 제 2, 3 군이 대조군에 비하여 유의성 있게 증가하였다(Table 6, Figure 6).

## (2) 실험 2

고농도의 glucose를 투여한 상태에서의 P55A의 효과를 알아보기 위한 실험에서 대조군과 실험 제 1, 2, 3 군을 2, 5일에 단백질 함량을 측정하고 치은섬유아세포에서는 2일의 측정치가 대조군, 실험 제 1, 2, 3 군이 각각 20.06 $\pm$ 1.79, 21.75 $\pm$ 1.32, 24.22 $\pm$ 1.38, 25.61 $\pm$ 1.34로 대조군, 실험 제 1 군, 실험 제 2

Table 5. Effect of P55A on the protein amounts of human gingival fibroblasts

time \ group	Protein( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )			
	C	T1	T2	T3
2 day	24.95 $\pm$ 1.59	36.74 $\pm$ 0.90*	44.07 $\pm$ 0.72*	36.42 $\pm$ 1.00*
5 day	33.29 $\pm$ 0.85	47.84 $\pm$ 0.86*	60.75 $\pm$ 1.07*	47.84 $\pm$ 0.28*

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

GC; control, glucose 200mg/dl, T1; P55A 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , T3; P55A 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

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

Table 6. Effect of P55A on the protein amounts of human periodontal ligament cells

time \ group	Protein( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )			
	C	T1	T2	T3
2 day	20.82 $\pm$ 1.34	28.38 $\pm$ 1.09	33.64 $\pm$ 1.72*	32.11 $\pm$ 2.28*
5 day	27.56 $\pm$ 1.57	37.35 $\pm$ 1.85	46.95 $\pm$ 1.67*	45.31 $\pm$ 2.01*

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

GC; control, glucose 200mg/dl, T1; P55A 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , T3; P55A 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

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

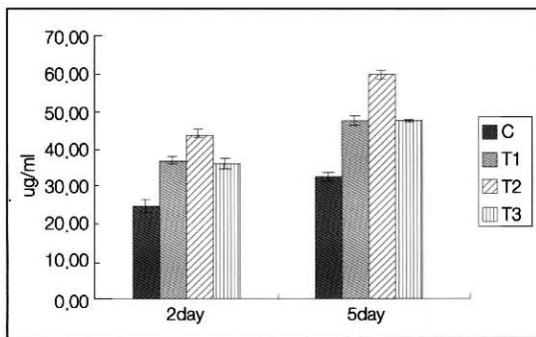


Fig 5. Effect of P55A on the protein amounts of human gingival fibroblasts

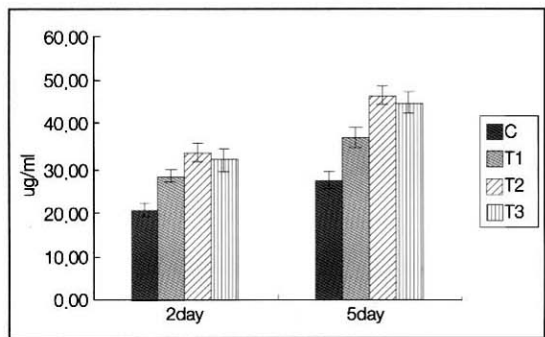


Fig 5. Effect of P55A on the protein amounts of human periodontal ligament cells

군, 실험 제 3 군 순으로 나타났다. 5일째의 결과에서는 대조군, 실험 제 1, 2, 3 군이 각각 23.23 $\pm$ 1.79, 31.98 $\pm$ 0.58, 43.90 $\pm$ 1.11, 32.04 $\pm$ 1.04로 대조군, 실험 제 1 군, 실험 제 3 군, 실험 제 2 군 순으로 나타났다. 2일째는 2, 3 군이, 5일째에는 실험군 모두가 대조군에 비하여 유의성 있게 증가하였다(Table 7, Figure 7).

치주인대세포에서는 2일째 대조군, 실험 제 1, 2, 3 군이 각각 18.67 $\pm$ 0.84, 22.88 $\pm$ 1.46, 26.93 $\pm$ 0.85, 26.85 $\pm$ 0.93로 대조군, 실험 제 1 군, 실험 제 3 군, 실험 제 2 군 순으로 나타났고, 5일째의 결과에서는 대조군, 실험 제 1, 2, 3 군이 각각 20.02 $\pm$ 1.31, 22.88 $\pm$ 0.66, 39.13 $\pm$ 0.74, 38.14 $\pm$ 0.52로 2일째와 비슷한 결과를 보였다. 2일째와 5일째에서 실험 제 2, 3 군이

Table 7. Effect of P55A on the protein amounts of human gingival fibroblasts in high glucose condition

time \ group	Protein( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )			
	GC	GT1	GT2	GT3
2 day	20.06 $\pm$ 1.79	21.75 $\pm$ 1.32	24.22 $\pm$ 1.38*	25.61 $\pm$ 1.34*
5 day	23.23 $\pm$ 0.66	31.98 $\pm$ 0.58*	43.90 $\pm$ 1.11*	32.04 $\pm$ 1.04*

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

GC; control, glucose 200mg/dl, T1; P55A 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ +glucose 200mg/dl, T2; P55A 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ +glucose 200mg/dl, T3; P55A 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ +glucose 200mg/dl

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

Table 8. Effect of P55A on the protein amounts of human periodontal ligament cells in high glucose condition

time \ group	Protein( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )			
	GC	GT1	GT2	GT3
2 day	18.67 $\pm$ 0.84	22.88 $\pm$ 1.46	26.93 $\pm$ 0.85*	26.85 $\pm$ 0.93*
5 day	20.32 $\pm$ 1.31	22.88 $\pm$ 0.66	39.13 $\pm$ 0.74*	38.14 $\pm$ 0.52*

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

GC; control, glucose 200mg/dl, T1; P55A 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ +glucose 200mg/dl, T2; P55A 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ +glucose 200mg/dl, T3; P55A 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ +glucose 200mg/dl

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

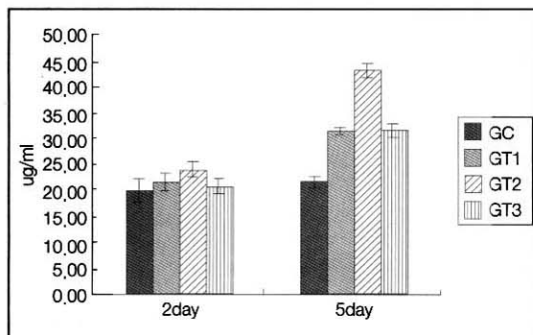


Fig 7. Effect of P55A on the protein levels of human gingival fibroblasts in high glucose condition

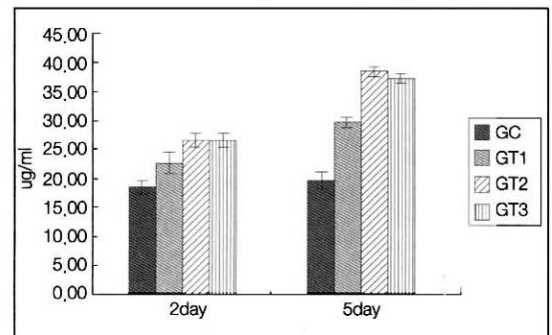


Fig 8. Effect of P55A on the protein levels of human periodontal ligament cells in high glucose condition

대조군에 비하여 유의성 있게 증가하였다(Table 8, Figure 8).

### 3. Alkaline phosphatase 활성도 측정

#### (1) 실험 1

정상상태에서의 P55A가 치주인대세포의 알칼리성 인산분해효소의 활성에 미치는 효과를 알아보기 위한 실험에서 대조군과 실험 제 1, 2, 3군을 2, 5일에 알칼리성 인산분해효소 활성도를 측정한 결과, 2일의 측정치가 대조군, 실험 제 1, 2, 3 군이 각각 43.74  $\pm$  1.44, 50.81 $\pm$ 0.32, 56.28 $\pm$ 0.11, 55.93 $\pm$ 0.28로 대



Table 9. Effect of P55A on alkaline phosphatase activity of human periodontal ligament cells

time \ group	ALP(IU)			
	C	T1	T2	T3
2 day	43.74±1.44	50.81±0.32	56.28±0.11	55.93±0.28
5 day	51.61±0.53	58.75±0.85	67.86±0.43*	66.60±0.45*

Values are the mean ± S.D. n=3

C; control, T1; P55A 0.1μg/ml, T2; P55A 1μg/ml, T3; P55A 10μg/ml

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

Table 10. Effect of P55A on alkaline phosphatase activity of human periodontal ligament cells in high glucose condition

time \ group	ALP(IU)			
	GC	GT1	GT2	GT3
2 day	42.94±0.86	44.06±0.32	50.19±1.87*	48.80±1.28*
5 day	43.41±0.71	53.24±0.62*	57.51±0.48*	57.09±0.41*

Values are the mean ± S.D. n=3

GC; control, glucose 200mg/dl, T1; P55A 0.1μg/ml+glucose 200mg/dl, T2; P55A 1μg/ml+glucose 200mg/dl, T3; P55A 10μg/ml+glucose 200mg/dl

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

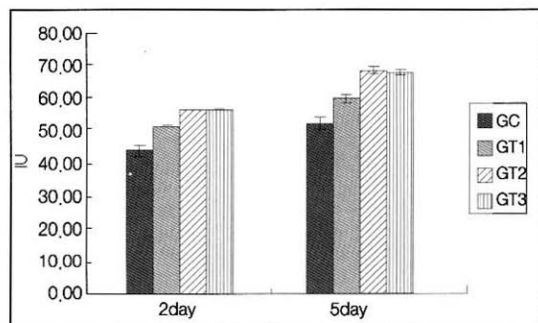


Fig 9. Effect of P55A on alkaline phosphatase activity of human periodontal ligament cells

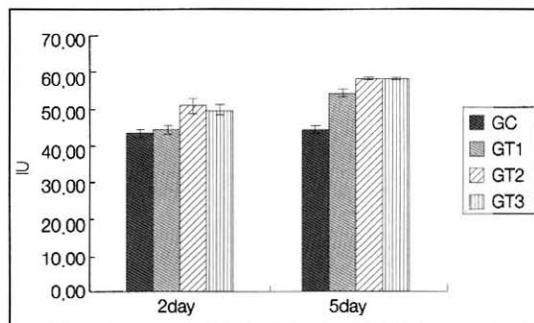


Fig 10. Effect of P55A on alkaline phosphatase activity of human periodontal ligament cells in high glucose condition

조군, 실험 제 1 군, 실험 제 3 군, 실험 제 2 군 순으로 나타났다. 5일째의 결과에서도 대조군, 실험 제 1, 2, 3 군이 각각 51.61±0.53, 58.75±0.85, 67.86±0.43, 66.60±0.45로 2일째와 비슷한 결과를 보였다. 5일째에 2군과 3군이 대조군에 비하여 유의성 있게 증가하였다(Table 9, Figure 9).

## (2) 실험 2

고농도의 glucose를 투여한 상태에서의 P55A가 치주인대세포의 알칼리성 인산분해효소의 활성화에 미치는 효과를 알아보기 위한 실험에서 대조군과 실험 제 1, 2, 3 군을 2, 5일에 알칼리성 인산분해효소 활성도를 측정한 결과, 2일의 측정치가 대조군, 실험

제 1, 2, 3 군이 각각  $42.94 \pm 0.86$ ,  $44.06 \pm 0.32$ ,  $50.91 \pm 1.87$ ,  $48.80 \pm 1.28$ 로 대조군, 실험 제 1 군, 실험 제 3 군, 실험 제 2 군 순으로 나타났다. 5일째의 결과에서는 대조군, 실험 제 1, 2, 3 군이 각각  $43.41 \pm 0.71$ ,  $53.24 \pm 0.62$ ,  $57.51 \pm 0.48$ ,  $57.09 \pm 0.41$ 로 2일째와 비슷한 결과를 보였다. 2일째 2, 3군에서 5일째는 1, 2, 3군 모두가 대조군에 비하여 유의성 있게 증가하였다(Table 10, Figure 10).

#### IV. 총괄 및 고찰

고도 산업화에 따라 우리 나라도 질병의 변화추세가 선진국형으로 변화하면서 각종 성인병의 증가와 함께 특히 당뇨병 환자의 수가 늘어나고 있다. 당뇨병은 단순히 당 대사의 이상에 의해서만 야기되는 것이 아니라 당, 지방 및 단백질 대사, 수분과 전해질 대사 등의 전반적인 장애에 의한 전신성 대사성 질병이라고 할 수 있다. 이러한 대사 이상은 인슐린의 절대적 결핍 또는 상대적 부족과 후천적, 선천적 및 유전적 요소가 복잡하게 얽혀 발생하는 것으로 밝혀졌다<sup>20,21)</sup>.

당뇨병의 주된 인자인 인슐린은 동화 호르몬으로서 주된 표적장기는 근육, 간, 지방조직이며 뇌세포와 적혈구는 인슐린의 작용을 받지 않는다. 인슐린이 당의 대사에 관여하여 혈당을 저하시키는 것은 glucose의 이용을 촉진하고 표적세포에 대한 glucose의 공급과 이용을 증가하는 한편, glucose의 생산을 억제하고 glycogen 분해 및 아미노산 전구체들로부터 glucose의 생성을 억제하는 작용에 기인하는 것이다<sup>22)</sup>. 당뇨병은 발생시기, 원인 및 특성에 따라 2종류로 나뉜다. 첫째로 제1형 또는 인슐린 의존성 당뇨병으로서 20세 이하의 청소년기에 발병하며 원인은 췌장의  $\beta$ -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  $\beta$ -cell은 파괴되지 않아 인슐린 분비는 거의 정상에 가깝

거나 혹은 적은 경우에도 제1형 당뇨병 환자보다 훨씬 나은 상태이나, 분비된 인슐린이 표적장기에 그 효과를 나타내지 못함으로써 유발되는 당뇨병이다. 따라서 제2형 당뇨병의 치료는 환자에 따라 식이요법, 운동요법, 인슐린주사 및 경구용 혈당강하제의 투여와 같이 매우 복잡적이고 치료방법도 어렵다.<sup>23)</sup>

당뇨병 환자는 혈당조절이 잘 이루어지지 않을 경우 여러 가지 전신적인 합병증을 일으키는 것으로 알려져 있으며,<sup>1)</sup> 당뇨병을 가지고 있는 환자에서의 치주질환 발병빈도에 대해 연구한 보고에 의하면 당뇨병 환자가 정상인에 비하여 더 높은 치주질환 발병빈도를 보였다고 하였다.<sup>2-7)</sup> Hugoson등(1989)<sup>8)</sup>은 당뇨병의 지속기간에 관계없이 당뇨병환자가 정상인에 비하여 치은염에 이환된 비율이 높다고 하였다. Nelson등(1990)<sup>9)</sup>과 Grossi등(1993)<sup>10)</sup>은 인슐린 비의존성 당뇨병 환자의 치주질환 이환율이 정상인에 비해 2-3배정도 높게 나타나며 당뇨병이 치주질환에서 중요한 위험인자로 작용한다고 하였다. 또, Bridges등(1996)<sup>11)</sup>은 당뇨병환자가 정상인에 비해 치태지수, 치은지수, 출혈지수, 치주낭깊이, 부착상실 등에 대해 높은 수치를 나타낸다고 하였으며, Karjalainen과 Knuuttila(1996)<sup>13)</sup>는 인슐린 의존성 당뇨병환자를 대상으로 조사한 결과 당뇨병으로 인한 과혈당증과 불량한 대사조절로 숙주방어기능이 감소하여 치은출혈을 증가시킨다고 하였으며 당뇨병 환자에서 치은염증을 예방하기 위하여 치태조절이 중요하다는 것을 강조하였다. 그리고 당뇨병 환자의 경우가 정상인에 비해 치은의 결합조직에서 교원질의 양이 적고 혈관막의 증식이 발견되며 형질세포가 많이 침윤되는 등의 양상이 보였다는 보고도 있다.<sup>24)</sup> Sorsa등(1992)<sup>25)</sup>은 당뇨병 환자의 치은 조직과 치은열구액 내에서 collagenase의 활성도가 증가하여 조직파괴가 증가된다고 보고하였으며, Salvi등(1997)<sup>26)</sup>은 비슷한 정도의 치주염 상태를 보이는 당뇨병 환자와 비당뇨병 환자를 대상으로 치은열구액 내의 PGE<sub>2</sub>와 IL-1 $\beta$ 와 같은 염증 매개 물질의 농도를 조사한 결과 당뇨병 환자에서 유의성 있게 증가되는 것을 발견하여, 이 물질이 치주염의 상태를 더욱 악화시키는 것으로 보고하였다.

Prostaglandin은 arachidonic acid로부터 cyclooxygenase의 효소작용에 의해 생성되는 물질로서 혈소판 응집, 중성구의 화학주성, 혈관투과성의 증가 그리고 골흡수 등을 나타내며 이러한 증상들은 치은염과 치주골흡수에서 나타난다<sup>27,28)</sup>. 특히 PGE<sub>2</sub>는 염증반응, 결합조직파괴 그리고 골흡수에 있어 중요한 요소로 작용한다고 알려져 있다<sup>29,32)</sup>. 치주질환의 진행에 있어 prostaglandin은 치은열구액과 치은조직표본을 이용한 실험에서도 치주질환을 가지고 있는 염증성치은의 PGE<sub>2</sub> 함량이 건강한 치은조직에 비해 높게 나타나는 것으로 알려졌다<sup>31,33-37)</sup>. PGE<sub>2</sub>가 치주조직에 미치는 작용으로는 치은섬유아세포의 증식, DNA 합성, 단백질합성의 억제 등이 알려져있다.<sup>38)</sup> 치은결합조직은 세포와 교원질, 비교원성단백질, glycosaminoglycan같은 세포의 기질로 구성되어 있고, 치은섬유아세포는 세포의 기질을 생산하는 주요 세포이기 때문에 치은결합조직의 대사에 중요한 역할을 한다. Arai등 (1995)<sup>39)</sup>은 여러 가지 prostaglandin에 대한 치은섬유아세포의 반응에 대한 실험을 통해 prostaglandin이 세포의 증식, DNA 합성, 교원질합성 그리고 비교원성단백질 합성을 억제하는 작용을 통해 치은섬유아세포에 이화작용을 나타낸다고 하였다. 최근에 정(1997)<sup>13)</sup>등은 in vitro 실험에서 당뇨와 같은 고농도의 glucose를 치주조직 세포에 투여하여 세포활성과 PGE<sub>2</sub>의 생성을 조사한 결과, 고농도의 glucose를 투여한 군에서 세포수와 단백질함량은 감소되고 PGE<sub>2</sub>의 양은 증가됨을 관찰하였다. 그리고 이들은 PGE<sub>2</sub>가 염증반응, 결합조직 파괴 그리고 골흡수에 있어 중요한 요소로 작용한다고 알려져 있는 바<sup>28,31)</sup>, 이러한 결과는 고농도의 glucose를 투여한 군에서 생성된 PGE<sub>2</sub>의 영향에 의한 것으로 추측된다고 보고하였다.

본 연구에서 정상상태에서 두릅나무와 황백피의 혼합 추출물(P55A)을 투여하여 치은섬유아세포의 활성을 알아본 결과 투여하지 않은 대조군보다 실험군이 세포수, 단백질함량이 증가되어 나타났으며 치주인대세포의 경우도 실험군에서 세포수, 단백질함량, 알칼리성 인산분해효소 활성도가 증가되어 나타났다. 뿐만 아니라 고농도의 glucose를 투여한 상태

에서도 치은섬유아세포와 치주인대세포 모두 대조군에 비하여 실험군에서 세포 활성이 증가되는 양상을 보였다.

세포수 측정에 대한 실험 결과, 정상상태에서 치은섬유아세포와 치주인대세포 모두 P55A의 농도가 증가할수록 세포증식이 증가되는 양상을 보였다. 더욱이 고농도의 glucose를 투여한 결과 정 등의 연구에서처럼 대조군은 세포증식이 저하되는 양상을 보였으나 P55A를 투여한 군에서는 농도가 증가함에 따라 감소되지 않고 증가되는 양상을 보였다.

단백질함량 측정에 대한 실험 결과, 세포수 측정결과와 유사하게 나타났다. 치은섬유아세포의 경우 정상상태와 glucose를 투여한 상태 모두에서 대조군보다 실험군에서 단백질함량이 높게 나타났다. 치주인대세포도 정상상태와 고농도의 glucose를 투여한 상태 모두 P55A의 농도가 증가할수록 단백질함량이 높게 나타났으며, 알칼리성 인산분해효소 활성도의 경우도 증가량이 많지는 않으나 대조군에 비하여 실험군에서 증가되었고, 2군과 3군에서 유의성 있게 증가되었다.

이상의 결과는 P55A가 정상상태에서 치주조직세포의 활성을 증가시켜 주는 어떤 작용을 할 뿐 아니라, 앞서 살펴 본 것처럼 고농도의 glucose 투여로 인한 PGE<sub>2</sub> 등과 같은 염증 매개 물질의 활성을 억제하는 작용을 하는 것이 아닌가 추측된다. 또한 세포수, 단백질함량, 알칼리성 인산분해효소 활성도 모두 P55A를 0.1 $\mu$ g/ml 투여한 1 군보다 1 $\mu$ g/ml 투여한 2 군에서 가장 많은 증가를 보였으며, 10 $\mu$ g/ml를 투여한 3군에서는 약간 감소하는 경향을 보여 너무 많은 양의 P55A는 오히려 세포활성을 저해할 수도 있다는 것에 대해서도 연구의 여지가 있다고 하겠다.

본 연구의 결과를 요약하면, 당뇨병 치료제로 연구되고 있는 두릅나무와 황백피의 혼합 추출물이 정상상태의 치주조직세포의 활성을 증가시킬 뿐만 아니라 당뇨병의 합병증으로 야기될 수 있는 치주조직의 염증을 억제할 수 있으며 나아가 염증으로 파괴된 치주조직의 재생을 촉진시킬 수 있는 가능성이 있는 것으로 여겨진다. 그러나 염증 억제의 정확한 기전과 적정 농도에 대한 더욱 많은 연구가 진행되

어야 할 것으로 사료된다.

## V. 결론

새로운 당뇨병 치료제로서 연구되고 있는 두릅나무와 황백피의 혼합추출물(P55A)이 치주조직세포의 활성화에는 어떠한 영향을 미치는지 조사해 보고자 본 연구를 시행하였다.

전신건강이 양호한 성인을 대상으로부터 초기 배양한 치주섬유아세포와 치주인대세포를 대상으로 두 가지 실험을 시행하였다. 첫 번째 실험은 정상상태에서의 P55A의 효과를 알아보기 위한 실험으로 P55A를 각각 0.1, 1, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 투여한 군을 제 1, 2, 3 실험군으로 하고 투여하지 않은 것을 대조군으로 하여 치주섬유아세포에서는 세포수, 단백질합량을 치주인대세포에서는 세포증식율, 단백질합량, 알칼리성인산분해효소 활성도를 측정하였고, 두 번째 실험은 고농도의 포도당을 투여한 상태에서의 P55A의 효과를 알아보기 위한 실험으로 세포에 고혈당상태를 유지하기 위해 첫 번째 실험과 같은 실험조건에서 각각의 배지에 200mg/dl 농도의 glucose를 첨가하여 각 항목을 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 정상상태에서 두릅나무와 황백피의 혼합 추출물이 치주조직세포에 미치는 영향을 알아본 결과
  - 1) 세포수는 치주인대세포와 치주섬유아세포 모두에서 약물의 농도가 증가할수록 증가하였으며 2일째 2군에서, 5일째 2, 3군에서 유의성 있게 증가하였다( $P<0.05$ ).
  - 2) 단백질합량은 치주인대세포와 치주섬유아세포 모두에서 약물의 농도가 증가할수록 증가하였으며 치주섬유아세포는 2일, 5일째 1, 2, 3군 모두에서, 치주인대세포는 2, 3군에서 유의성 있게 증가하였다( $P<0.05$ ).
  - 3) 치주인대세포의 알칼리성인산분해효소 활성도는 약물의 농도가 증가할수록 증가하였으며 5일째 2, 3군에서 유의성 있게 증가하였다( $P<0.05$ ).

2. 고농도의 glucose를 투여한 상태에서는

- 1) 세포수는 치주인대세포와 치주섬유아세포 모두에서 약물의 농도가 증가할수록 증가하였으며 2일째 2군에서, 5일째 2, 3군에서 유의성 있게 증가하였다( $P<0.05$ ).
- 2) 단백질합량은 치주인대세포와 치주섬유아세포 모두에서 약물의 농도가 증가할수록 증가하였으며 치주섬유아세포는 2일째 3군에서, 5일째는 1, 2, 3군 모두에서 유의성 있게 증가하였으며, 치주인대세포는 2, 5일째 2, 3군에서 유의성 있게 증가하였다( $P<0.05$ ).
- 3) 치주인대세포의 알칼리성인산분해효소 활성도는 약물의 농도가 증가할수록 증가하였으며 2일째 2, 3군에서 5일째는 1, 2, 3군 모두에서 유의성 있게 증가하였다( $P<0.05$ ).

결론적으로 적정농도의 두릅나무와 황백피의 혼합추출물이 정상상태는 물론 고농도의 glucose를 투여한 상태에서도 치주조직세포의 활성을 증가시켜 염증으로 파괴된 치주조직의 재생을 촉진시킬 수 있는 가능성이 있는 것으로 사료된다.

## VI. 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 Serey, 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. Hugosson, A., Thorstensson, H., Falk, H., and Kuylenskierna, J. : Periodontal conditions in insulin-dependent diabetes. *J. Clin. Periodontol.*, 16 : 215-223, 1989.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. 정종혁, 권영혁, 이만섭, 박준봉, 허익, 김성진 : 고농도의 포도당이 치은섬유아세포 및 치주인대세포의 Prostaglandin E<sub>2</sub> 생성에 미치는 영향. *대한치주과학회지*, 27 : 909-922, 1997.
14. Ferrannini, E., Haffner, S. M., Mitchell, B. D., and Stern, M. P. : Hyperinsulinemia, the key feature of a cardiovascular and metabolic syndrome. *Diabetologia*, 34 : 416, 1992.
15. Yoshikawa, M., Matsuda, H., Harada, E., Murakami, T., Wariishi, N., Yamahara, J., and Murakami, N. : Elatoside E, a new hypoglycemic principle from the root cortex of *Aralia elata* Seem. : structure-related hypoglycemic activity of oleanolic acid glycosides. *Chem. Pharm. Bull.*, 42 : 1345-1356, 1994.
16. Yoshikawa, M., Murakami, T., Harada, E., Murakami, N., Yamahara, J., and Matsuda, H. : Bioactive saponins and glycosides. VII. On the hypoglycemic principles from the root cortex of *Aralia elata* Seem. : structure-related hypoglycemic activity of oleanolic acid oligoglycosides. *Chem. Pharm. Bull.*, 44 : 1923-1927, 1996.
17. Uchiyama, T., Kamikawa, H., and Ogita, Z. : Anti-ulcer effect of extract from *Phellodendron cortex*. *Yakugaku Zasshi*, 109 : 672-676, 1989. (in abstract)
18. Mori, H., Fuchigami, M., Inoue, N., Nagai, H., Koda, A., Nishioka, I., and Meguro, K. : Principle of the bark of *Phellodendron amurense* to suppress the cellular immune response : effect of phellodendrine on cellular and humoral immune responses. *Planta. Med.*, 61 : 45-49, 1995.
19. Somerman, M. J., Archer, S. Y., Imm, G. R., and Foster, R. A. : A comparative study of human periodontal ligament cells and gingival fibroblasts in vitro. *J. Dent. Res.*, 67 : 66-70, 1988.
20. Khan, C. R. : Insulin resistance : A common feature of diabetes mellitus. *N. Eng. J. Med.*, 315 : 252, 1986.

21. Rayfield, E. J. and Ishinura, K. : Environmental factors and insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Metab. Rev.*, 925, 1987.
22. Exton, J. H. : Hormonal control of gluconeogenesis. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 11 : 125, 1979.
23. National diabetes data group. : Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. *Diabetes*, 28 : 1039, 1979.
24. 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.
25. 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.
26. 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.
27. Goodson, J. M., McClathy, K., and Revell, C. : Prostaglandin-induced resorption of adult rat calvarium. *J. Dent. Res.*, 53 : 670-677, 1974.
28. Howell, T. H. : Blocking periodontal disease progression with anti-inflammatory agents. *J. Periodontol.*, 64 : 828-833, 1993.
29. Dietrich, J., Goodson, J. M., and Raisz, L. G. : Stimulation of bone resorption by various prostaglandins in organ culture. *Prostaglandins*, 10 : 231-238, 1975.
30. 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.
31. Goodson, J. M., Dewhirst, F. E., and Brunetti, A. : Prostaglandin E<sub>2</sub> levels and human periodontal disease. *Prostaglandins*, 6 : 81-85, 1974.
32. Salmon, J. A. and Riggs, G. A. : Prostaglandins and leukotrienes as inflammatory mediators. *Br. Med. Bull.*, 43 : 285-296, 1987.
33. Dewhirst, F., Moss, D., Offenbacher, S., and Goodson, J. M. : Levels of prostaglandin E<sub>2</sub>, thromboxane, and prostacyclin in periodontal tissues. *J. Periodont. Res.*, 18 : 156-163, 1983.
34. El Attar, T. M. A. and Lin, H. S. : Prostaglandins in gingiva of patients with periodontal disease. *J. Periodontol.*, 52 : 16-19, 1981.
35. Offenbacher, S., Farr, D. H., and Goodson, J. M. : Measurement of prostaglandin E in crevicular fluid. *J. Clin. Periodontol.*, 8 : 359-367, 1981.
36. 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.
37. Offenbacher, S., Odle, B. M., and Van Dyke, T. E. : The use of crevicular fluid prostaglandin E<sub>2</sub> levels as a predictor of periodontal attachment loss. *J. Periodont. Res.*, 21 : 101-112, 1986.
38. Ko, S. D., Page, R. C., and Narayanan, A. S. : Fibroblast heterogeneity and prostaglandin regulation of subpopulations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74 : 3429-3432, 1977.
39. 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.

## Effect of mixed extracts of aralia cortex and phellodendron cortex on human periodontal tissue cells

Young-Bo Song\*, Man-Sup Lee\*, Young-Hyuk Kwon\*, Jun-Bong Park\*, Yeek Herr\*, Sung-Jin Kim\*\*

Department of Periodontology, College of Dentistry, Kyung Hee University\*

Department of Pharmacology, College of Dentistry, Kyung Hee University\*\*

The purpose of this study was to evaluate the effect of mixed extracts of aralia cortex and phellodendron cortex (P55A) on activities of human gingival fibroblasts and periodontal ligament cells in vitro.

First experiment was done to evaluate the effect of P55A in normal condition. In control group, the cells ( $4.5 \times 10^4$  cells/ml) were cultured with Dulbecco's Modified Eagle's Medium contained with 10% fetal bovine serum. In experimental groups, P55A was added to the above culture condition at the final concentrations of 0.1  $\mu\text{g/ml}$  (Test group 1), 1  $\mu\text{g/ml}$  (Test group 2) and 10  $\mu\text{g/ml}$  (Test group 3). Then each group was tested for the cell proliferation rate at  $\frac{1}{2}$ , 2, 5 days, protein levels at 2, 5 days, and alkaline phosphatase activity at 2, 5 days.

Second experiment was done to evaluate the effect of P55A in high glucose condition, 200  $\text{mg/dl}$  glucose was added to the same culture condition of all groups in first experiment. Then each group was tested for the cell proliferation rate at  $\frac{1}{2}$ , 2, 5 days, protein levels at 2, 5 days, and alkaline phosphatase activity at 2, 5 days.

The results were as follows ;

### 1. First experiment

- 1) As P55A concentration increased, cell proliferation rate increased significantly in test group 2 at 2 days, and test group 2 and 3 at 5 days in human gingival fibroblasts and periodontal ligament cells ( $P < 0.05$ ).
- 2) In human gingival fibroblasts, all test groups showed significantly increased protein levels as compared to control group at 5 days. In periodontal ligament cells, test group 2 and 3 showed significantly increased protein levels as compared to control group at 2, 5 days ( $P < 0.05$ ).
- 3) Alkaline phosphatase activity of human periodontal ligament cells increased as P55A concentration increased. The test group 2 and 3 showed significant increase as compared to control group at 5 days ( $P < 0.05$ ).

### 2. Second experiment

- 1) As P55A concentration increased, cell proliferation rate increased significantly in test group 2 at 2 days, and test group 2 and 3 at 5 days in human gingival fibroblasts and periodontal ligament cells ( $P < 0.05$ ).
- 2) In human gingival fibroblasts, test group 3 showed significantly increased protein levels as compared to control group at 2 days, and all test groups at 5 days. In periodontal ligament cells, test group 2 and 3 showed significantly increased protein levels as compared to control group at 2, 5 days ( $P < 0.05$ ).
- 3) Alkaline phosphatase activity of human periodontal ligament cells increased as P55A concentration

increased. The test group 2 and 3 showed significant increase as compared to control group at 2 days, and all test groups at 5 days( $P<0.05$ ).

From the above results, mixed extracts of aralia cortex and phellodendron cortex appeared to enhance cellular activities including cell proliferation rate, protein levels and alkaline phosphatase activity of human gingival fibroblasts and periodontal ligament cells in normal and high glucose condition. This study suggests that mixed extracts of aralia cortex and phellodendron cortex seem to be able to subside the inflammation of periodontal tissue and regenerate the destructed periodontal tissue.