대한치주과학회지 : Vol. 29, No. 4, 1999

수 종의 생약제제가 MC3T3 - E1 세포의 염기성 인산분해효소 합성에 미치는 영향

김대겸 · 김 탁 · 피성희 · 김현아 · 최광수 · 유형근 · 신형식

원광대학교 치과대학 치주과학교실

I. 서론

치주조직 재생이란 염증성 치주질환으로 인해 상실된 치조골, 치주인대, 백악질 및 치은을 포함하는 치아지지조직들이 구조적, 기능적으로 새롭게 형성되는 것을 의미하며, 이는 치주치료의 궁극적인 목표라 할 수 있다[1,2]. 그러나 치주조직은 치조골과 백악질이라는 두 경조직 사이에 연조직인 치주인대가 위치하는 특이한 구조적 특성을 가지고 있기 때문에, 과거의 전통적인 치료방법으로는 조직재생을 얻기 어려웠다.

최근까지 치주조직의 재건이나 재생을 위하여 이용된 술식으로는 치근면 자체를 특정한 약물로 처리해 상아세관의 교원질을 노출시키고 치근표면의 세균들을 제거하거나 줄이는 산을 이용한 치근면처리술[3, 4]과, 차폐막을 사용하여 파괴된 조직결손부에 특정 세포를 선별적으로 이주, 증식케 하는 조직유도재생술[5, 6], 골전도물질의 사용[7], 골유도물질 혹은 골원성물질의 사용[8], 노출된 치근면을 피복하고 조직 재생을 도모하는 치관변위판막술[9], 성장인자 유도성 조직재생술[10, 11] 및 상기 술식의 복합처치 등으로 구분할 수 있다.

이미 알려진 바와 같이 골조직의 재생 폴리펩타이드로서 골형성단백(bone morphogenic proteins; BMPs)[12, 13]이 골조직으로부터 추출되어 실험실에서 분리되어 검정을 받고 있으나 이들 물질의 대량 생산과정에서의 유전공학적 방법 개발이 아직 미흡함으로서 골조직 및 치조골 재생제로는 응용이 되지 못하고 있다.

폴리펩타이드 성장인자 중 혈소판유래 성장인자(platelet - derived growth factor; PDGF)에 관한 연구에서 Piche와 Graves(1988)[14]는 골유래세포 배양시 PDGF를 첨가한 경우 세포의 증식율이 촉진되었다고 보고하였고, Rutherford(1992)[15]등은 치수, 치은 및 치주인대로부터 유래된 섬유아세포를 대상으로 PDGF의 효과를 규명한 실험에서 각 세포의 증식에 유효하였다고 보고하였다. 제반의 연구를 근거로 PDGF와 인슐린유사 성장인자(IGF; insulin - like growth factor)가 치주조직재생에 많은 가능성이 제시되기도 하였다[16, 17]. 그러나 이들 성장인자는 인체를 구성하는 모든 섬유아세포의 성장과 증식에 많은 영향을 미치게 되므로 특정조직의 재생에는 임상시술과정에서 고도의 기술을 요하게 된다. 또한 각종 종양조직에서 다량 발견되고 있어 임상적용을 위한 안정성 연구가 부족하고 부작용에 관해 명확히 규명되어 있지 않기 때문에 아직 연

구단계에 있는 실정이다.

현재까지 연구되고 있는 조직재생제로는 성장인자인 PDGF[14, 15], IGF - Ⅰ[18], TGF - β[19, 20] 및 pluronic F - 68[21] 등이 있으며, 생약제제로서 병풀(Centella asiatica)은 화상 등의 조직결손부에 쓰이며, 비교적 상피조직의 재생에는 유효하지만 결합조직, 치은섬유아세포, 치주인대세포에는 별다른 영향이 없었다[22, 23]. 이에 반해 황금(Scutellaria radix) 추출물은 상피세포의 성장에는 큰 영향을 주지 못하는 데 반해, 치은섬유아세포의 교원질 합성에 큰 영향을 주는 것으로 알려져[24], 이는 차후 치주조직 재생에 이용 가능성을 높이고 있다. 이러한 생약제제들은 대량생산이 가능하며 효능, 효과의 안전성이 높기 때문에 더욱 상품화의 이용도를 높이리라 생각된다.

최근 수년간 생약에서 추출된 새로운 제제들이 연구, 개발되고 있는데 이들은 부작용이 적고 장기간 사용이 가능하다는 점에서 관심이 모아지고 있다. 한방에서 오래전부터 항균 및 항염, 진통 해열작용으로 사용해 온 생약제제들에 대한 연구들이 치과영역에서 이루어져 왔다. 후박(Magnoliae Cortex)에서 추출, 분리하여 정제한 magnolol과 honokiol은 안전성이 높고 항염효과가 높은 것으로 밝혀졌으며[25], 황금은 소염작용 및 해열작용이 확인되었고[24], 이들은 모두 IL - 1β의 생성을 억제하는 것으로 나타났다[26].

이 외에도 치과영역에서 아직 연구는 되지 않았지만 옛 부터 한방에서 소염과 진통작용에 특이한 주목을 끌고 있는 유향과 몰약[27]은 감람나무과의 수간에서 얻은 수지성분으로 유향(Olibanum)은 활혈, 지혈, 진통, 소염등의 작용이 있으며, 몰약(Myrrha)은 활혈거어지통(活血ㅊ瘀止痛), 소염, 진균억제, 결핵균 억제등의 효과가 있는 것으로 알려져 있다[28].

속단(Phlomis Radix)은 꿀풀과에 속하는 다년생 초본 식물의 뿌리를 이르며, 간과 신장의 기능을 증진시키고 혈액의 흐름을 원활히 하며 근과 골을 이어주는 효능으로 임상에 널리 이용되어 온 한약재이며, 속단의 다른 이름으로 신농본초경에 속절(續折)이라 하였으며, 그 외 문헌에 접골(接骨), 속단(速斷), 천속단(川續斷) 등으로 기재되어 있어, 대부분 끊어진 뼈를 잇는다는 의미에서 명명되었다고 할 수 있다[29]. 그 외에도 소염 진통, 배농, 지혈, 조직재생 촉진, 심장활동 강화, 혈소판 응집 억제의 효과가 있다고 한다[30].

승마(Cimicifugae Rhizoma)는 미나리아재비과(Ranunculaceae)에 속하는 식물로서 뿌

Table 1. The List of The Natural Medicines for This Study

Korean name	Scientific name	Family	Used parts[a)]	Major Components	Reference
유향	*Boswellia carterii* (olibanum; Birdwood)	Burseraceae	Re	60 - 70% of resin, boswellic acid, olibanoresene, boswellinic acid, prinene	27
몰약	*Commiphora myrrha* Engler (Myrrha)	Burseraceae	Re	24 - 25% of resin, 2.5 - 8% of essential oil, 57 - 61% of gum, terpene, sesquiterpene, esters, cinnamic aldehyde, eugenol, glucose	27, 28
속단	*Phlomis umbrosa* Turczaninow (Phlomis Radix)	Labiatae	Ro	iridoid glycoside(8 - 0 - acetyl - shanzhiside) methylester, shanzhiside methylester	29, 30

리줄기를 건조한 것을 이른다. 해열, 해독 및 진통작용이 있으며 결핵균, 피부진균의 성장을 억제한다고 한다. 에탄올 분획은 진정, 부종 억제 작용, 부탄올 분획은 체온강하, 진통작용, 물분획은 부종억제, 항궤양 작용이 있다고 한다[28].

본 연구는 민간요법으로 활용되고 있는 위에 언급한 네가지 생약 추출물을 각 농도별로 MC3T3-E1 세포주에 투약, 배양한 후 분광측정기를 이용한 염기성 인산분해효소 활성도 측정 및 염색을 이용한 계측을 통해 그 활성도를 알아보고, 이를 토대로 상기 추출물의 임상적 응용 가능성을 가늠하기 위해 세포 단위의 생물학적 실험을 시행, 치주조직 재생과정을 촉진시키는데 효과적인 약제를 개발하기 위해 시행하였다.

II. 재료 및 방법

1. 세포배양

쥐 두개골로부터 유래한 MC3T3-E1(mouse calvaria osteoblasts) 세포주를 10% fetal bovine serum(FBS, Gibco BRL, USA)과 1% 항생제(penicillin G sodium 10,000 units/ml, streptomycin sulfate 10,000 μg/mℓ, and amphotericin B 25μg/ml in 0.85% saline, Gibco BRL, USA)가 첨가된 α-minimum essential medium(α-MEM, Gibco BRL, USA)2mℓ이 담긴 6-well 플레이트에 적정 세포(5×10^4cell/well)를 분주하였다. 이를 37℃의 온도 및 100% 습도조건에서 95%의 공기와 5% CO_2를 계속 공급하면서 배양하였다. 배양액은 세포가 충분한 증식이 일어날 때까지 2-3일 간격으로 교환하였다.

2. 생약 추출물의 준비

원광대학교 약학대학에 의뢰하여 각각의 생약 100 g을 분말형태로 분쇄하여 증류수 1ℓ와 혼합하여 가열 여과한 후 1,500rpm의 rotatory evaporator로 농축한 다음 동결 건조하여 얻어진 분말을 이용하였다. 분말 1g을 증류수 10mℓ에 섞어 stock solution을 만들어 농도별로 희석한 후 0.2μm syringe filter(Nalge Company, USA)로 여과 멸균한 후 사용하였다.

3. 염기성 인산분해효소 측정

MC3T3-E1 세포를 6-well plate에 1×10^5cell/well이 되도록 분주한 후, 10% FBS가 첨가된 α-MEM으로 1일 동안 37℃, 100% 습도, 5% CO_2 공기 혼합배양기에서 배양하였다. 1일 후 배지를 제거하고 0% α-MEM으로 2회 세척 후, 10% FBS, 1% 항생제, 50 μg/mℓ ascorbic acid, 10mM sodium β-glycerophosphate가 첨가된 α-MEM에 음성 대조군에는 한약제를 첨가시키지 않고 분주하였으며, 양성 대조군에는 10^{-7}M의dexamethasone을 첨가하였고, 실험군은 적정 농도의 한약제를 첨가하여 분주한 후 3일과 5일동안 각각 배양하였다. 일정 배양시간이 지난 후 배지를 제거하고, trypsin-EDTA로 세포를 분리시키고 1,500rpm에서 6분간 원심분리하였다. 상층액을 제거하고 0.2mℓ의 멸균된 증류수를 첨가하여 초음파 분쇄기로 현탁하였다. 각 세포 현탁액 0.1mℓ에 0.1 M glycine NaOH buffer(pH 10.4) 0.2mℓ, 15 mM의 p-nitrophenyl phosphate(pNPP ; Sigma, USA) 0.1mℓ, 0.1% triton X-100/saline 0.1 mℓ와 멸균된 증류수 0.1 mℓ를 잘 혼합하여, 이 반응물을 37℃에서 30분간 배양하였다. 0.1 N NaOH를 0.6mℓ 첨가함으로서 이들 반응을 중지시켰다. p-NPP의 가수분해는 410 nm 파장의 분광측정기(Beckman DU-650, USA)에서 흡광도의 차이로 나타나며, p-nitrophenol(p-NP ; Sigma, USA)을 기준 값으로 이용했다.

4. 염기성 인산분해효소 합성의 계측분석을 위한 ALP 염색

6-well plate에 세포를 1×10^5/well가 되도록 분주한 후, 실험군에는 적정 농도의 한약제를 첨가한 α-MEM 2㎖을 배양액으로 하고, 음성 대조군에는 한약제가 함유되지 않은 α-MEM 표준배양액을 배지로 이용하였고, 양성 대조군에는 10^{-7}M의dexamethasone을 첨가하였다.

3일 및 5일 동안 배양한 후, 배지를 제거하고 2% paraformaldehyde 고정액을 각 well 당 2ml씩 첨가해서 30분 동안 4℃에 보관하였다. 고정액을 제거하고 증류수로 2회 가볍게 세척한 후 naphthol AS-MX phosphate 용액과 fast red violet LB salt(Sigma, USA)가 혼합된 용액을 각 well 당 1㎖ 씩 넣고 30분 동안 37℃ 배양기에 배양하였다. 배양 후 증류수로 철저히 세척한 다음 도립현미경으로 관찰, 촬영하였고(×100), 염색에 양성반응을 보이는적색 부위를 Image Pro II 영상분석장치(Media Cybernetrics, USA)를 이용하여 그 면적을 계측하였다.

5. 통계분석

각각의 생약제 내 대조군과 실험군 간의 차이 및 3일과 5일 사이의 차이를 알아보기 위하여 각각의 ALP 값을 일원분산분석법(one way ANOVA)으로 실험결과에 유의성이 있는지를 통계적으로 검증하였다($p<0.05$).

III. 결과

1. 유향에 대한 염기성 인산분해효소의 합성 및 염색 계측

3일군에서 음성대조군에 비해 양성대조군 및 실험군 중 10^{-6}g/ml군에서 유의한 증가를 보였으며, 양성대조군에 비해서는 10^{-6}g/ml군만이 유의한 증가를 보였고, 실험군에서도 10^{-7}g/ml군 보다 고농도인 10^{-6}g/ml군이 증가를 보였다. 5일군에서는 군간에 유의한 차이가 없었다. 배양기간에 따른 차이를 보면, 10^{-6}g/ml군이 3일에 비해 5일째 유의한 증가를 보였다($p<0.05$)(Table 2).

Table 2. Alkaline Phosphatase Activity of MC3T3-E1 Cells Treated with the Extracts of *Olibanum* (Mean±S.D.) (μg/㎖)

Day	Negative control	Positive control	10^{-7}g/ml	10^{-6}g/ml
3	1.80±0.00	2.05±0.07*	1.95±0.07	2.55±0.07*¥§
5	4.25±0.08$	4.15±0.07	4.75±0.07	5.35±0.49$

* Statistically significant compared to negative control ($p<0.05$).
¥ Statistically significant compared to positive control ($p<0.05$).
§ Statistically significant compared to 10^{-7}g/ml group ($p<0.05$).

Table 3. The Stained Area which Represent Alkaline Phosphatase Synthesis of MC3T3-E1 Cells Treated with the Extracts of *Olibanum* (㎛²)(Mean±S.D.)

Day	Negative control	Positive control	10^{-7}g/ml	10^{-6}g/ml
3	21.64±4.11	29.93±2.20	31.57±3.93*	35.21±5.48*
5	25.20±5.19	32.55±9.43	34.65±7.86	37.67±5.43

*Statistically significant compared to negative control($p<0.05$).

Table 4. Alkaline Phosphatase Activity of MC3T3 - E1 Cells Treated with the Extracts of *Myrrha*(Mean± S.D.)(μg/mℓ)

Day	Negative control	Positive control	10^{-7}g/ml	10^{-6}g/ml
3	1.80±0.14	2.20±0.14	2.70±0.00*	2.30±0.28
5	3.65±0.35$	4.25±0.21$	5.10±0.14*	4.30±0.14$

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

Table 5. The Stained Area which Represent Alkaline Phosphatase Synthesis of MC3T3 - E1 Cells Treated with the Extracts of *Myrrha*(μm²)(Mean±S.D.)

Day	Negative control	Positive control	10^{-7}g/ml	10^{-6}g/ml
3	33.14±9.94	35.22±0.77	46.79±3.00	39.36±10.69
5	42.17±7.53	51.48±9.89$	72.67±5.95*$	53.28±13.25

* Statistically significant compared to negative control (p<0.05).
$ Statistically significant compared to 3 days (p<0.05).

ALP 염색을 통한 면적계측에 의하면, 실험군 두 군 모두 3일째에는 음성대조군에 비해 유의한 증가를 보였으나(p<0.05), 5일째에는 유의한 차이가 없었다(Table 3, Figure 1).

2. 몰약에 대한 염기성 인산분해효소의 합성 및 염색 계측

3일군에서는 10^{-7}g/ml의 실험군만이 음성대조군에 비해 유의한 증가를 보였으며, 5일군에서도 10^{-7}g/ml의 실험군만이 음성대조군에 비해 유의한 증가를 보였다. 10^{-6}g/ml 군에서 3일 배양한 것에 비해 5일 배양한 것이 유의한 증가를 보여 배양일에 따른 차이를 보였다(p<0.05)(Table 4).

ALP 염색을 이용한 계측에서도 5일째 실험

Table 6. Alkaline Phosphatase Activity of MC3T3 - E1 Cells Treated with the Extracts of *Phlomis Radix* (Mean±S.D.)(μg/mℓ)

Day	Negative control	Positive control	10^{-6}g/ml	10^{-5}g/ml
3	2.25±0.21	2.50±0.14	3.35±0.12	2.85±0.21
5	2.10±0.14	2.70±0.00*	2.90±0.14*	2.65±0.07*

Table 7. The Stained Area which Represent Alkaline Phosphatase Synthesis of MC3T3 - E1 Cells Treated with the Extracts of *Phlomis Radix* (μm²)(Mean±S.D.)

Day	Negative control	Positive control	10^{-6}g/ml	10^{-5}g/ml
3	38.04±6.20	44.27±7.86	51.38±4.26	42.66±7.26
5	41.54±7.48	54.62±9.18	63.24±5.60*$	48.41±7.48

*Statistically significant compared to negative control (p<0.05).
$Statistically significant compared to 3 days (p<0.05).

Table 8. Alkaline Phosphatase Activity of MC3T3-E1 Cells Treated with the Extracts of *Cimicifugae Rhizoma*(Mean±S.D.)(㎍/㎖)

Day	Negative control	Positive control	10^{-7}g/ml	10^{-6}g/ml
3	1.15±0.07	3.85±0.49*	2.40±0.42*¥	2.15±0.07¥
5	3.20±0.85	4.50±0.28	4.25±0.07$	3.45±0.07

*Statistically significant compared to negative control(p<0.05).
¥Statistically significant compared to positive control(p<0.05).
$Statistically significant compared to 3 days(p<0.05).

Table 9. The Stained Area which Represent Alkaline Phosphatase Synthesis of MC3T3-E1 Cells Treated with the Extracts of *Cimicifugae Rhizoma*(㎛²)(Mean±S.D.)

Day	Negative control	Positive control	10^{-7}g/ml	10^{-6}g/ml
3	24.92±2.51	34.14±9.23	43.33±9.34*	36.18±5.04
5	31.47±4.62$	37.33±2.46	43.27±10.04	33.90±13.22

*Statistically significant compared to negative control(p<0.05).
$Statistically significant compared to 3 days(p<0.05).

군 중 10^{-7}g/ml 군이 음성대조군 및 3일군에 비해 유의한 증가를 보였다(p<0.05)(Table 5, Figure 2).

3. 속단에 대한 염기성 인산분해효소의 합성 및 염색 계측

3일군 내에서는 군간에 유의한 차이가 없었으며, 5일군에서 음성대조군에 비해 모든 군에서 유의한 증가를 보였다. 배양일에 따른 유의한 차이는 모든 군에서 보이지 않았다(p<0.05)(Table 6).

ALP 염색을 이용한 계측에서 5일째 실험군 중 10^{-6}g/ml 군이 음성대조군 및 3일군에 비해 유의한 증가를 보였다(p<0.05)(Table 7, Figure 3).

4. 승마에 대한 염기성 인산분해효소의 합성 및 염색 계측

3일군에서 음성대조군에 비해 양성대조군 및 10^{-7} g/ml군이 유의한 증가를 보였으나, 실험군 모두 양성대조군에 비해서는 낮은 수치를 보였다. 5일군에서는 군간에 유의한 차이가 없었으나, 3일군에서처럼 양성대조군이 가장 높은 수치를 보였다. 10^{-7}g/ml군이 3일에 비해 5일째 유의한 증가를 보였다(p<0.05)(Table 8).

ALP 염색을 이용한 계측에서는 3일째 실험군 중 10^{-7}g/ml 군이 음성대조군에 비해 유의한 증가를 보였다(p<0.05)(Table 9, Figure 4).

Ⅳ. 총괄 및 고찰

치주질환은 인류의 역사와 같이 해왔다고 여겨지며, 이에 대한 치료법이 1970년대까지는 치은절제술, 치주판막수술, 골수술을 이용한 치주낭의 철저한 제거였다. 이러한 치료법의 단점은 치주조직의 과도한 희생과 재생의 결핍 및 임상적으로 치아가 길어 보일 수 있다는 것이다. 1980년대에는 이러한 단점들을 알게되어 비외과적 치주치료가 주를 이루었으나, 외과적

및 비외과적 치주치료 결과를 종단학적으로 비교한 연구에 의하면 두 치료 모두 제한된 양의 재생과 긴 접합상피를 가지는 치유결과를 보인다는 것이다. 그리하여 1990년대에 들어 조직유도재생술, 이식재료 등을 이용한 치주조직의 재생에 초점이 맞추어졌다.

아직은 초기단계이지만 국소적으로 다양한 성장인자를 투여해 재생을 얻는 방법이 각광을 받고 있다. 그러나 이들 성장인자는 대부분의 인체를 구성하는 전반적인 섬유아세포의 성장과 증식에 많은 영향을 미치므로 특정조직의 재생에는 임상시술과정에 고도의 기술을 요하게 된다. 또한 각종 종양조직에서 다량 발견되어 임상적용을 위한 안정성 연구가 부족하고 부작용에 관해 명확히 규명되어 있지 않기 때문에 아직 연구단계에 있는 실정이다. 따라서 아직 치주조직재생을 위한 획일적인 치료법은 없는 상태이며 각종 외과적 수술후 치조골과 백악질 사이의 결합조직인 치주인대의 신속한 증식과 결손된 골조직의 재생이 완전히 이루어질 수 있도록 부작용과 독성이 없으면서 치주인대세포 및 조골세포의 활성을 증가시킬 수 있는 약제의 개발은 무엇보다도 필요하다.

근대 서양의약은 세균성 질환과 같은 감염성 질환에 대해서는 기여한 바가 지대하나, 일부 만성적 소모성 질환에 대해서도 효과가 뛰어난 것은 아니었으며, 더구나 일부 합성 약물이 부작용을 일으킨다는 것이 최근에 보고되고 있다. 이에 반해 전통의약에 쓰이고 있는 약물들은 대부분 천연식물을 조제해 처방하고 있어 대부분 독성이 보다 적고 부작용이 거의 없는 것으로 인식되고 있음에도 불구하고, 서양의약에서는 이들 약물들의 동일성, 효능의 재현성, 안전성 및 안정성의 부족으로 치료에는 거의 사용하지 않는 상태였으나, 최근 대체의학과 함께 생약제제에 대한 관심이 점점 증가하고 있는 추세이다. 현재 한방제제와 각종 현대의약과의 병용투여에서 나타난 보고들을 요약하면 한방제제와 항암제를 비롯하여 스테로이드제제와 난치병 의약품과의 병용투여는 좋은 결과를 얻고 있다. 그러나 작용 기전을 아직도 과학적으로 설명할 수 없는 부분이 많고, 임상적 효능과 안전성에 대한 통계학적 규명이 아직 미흡한 상태임에도 불구하고 우리나라에서 한약 치료 인구는 꾸준히 유지되고 있는 상태이다.

생약제제를 이용한 치주질환 치료 및 예방제 개발의 경우를 보면, 1980년대 초반에 sanguinaria 추출물의 치주 병인균에 대한 항균효능 실험결과가 나오면서 생약제제에 대한 관심이 높아지게 되었다. Sangunaria는 현재 미국에서 Viadent®(Colgate - Palmolive Co., USA)라는 상품명으로 시판되고 있으며 실험실에서의 연구결과는 chlorhexidine과 필적할 만한 alkaloid 추출물이지만 구강내에서 존재하는 철분과 결합시 쉽게 그 약효가 약화되므로 안정한 생약제로 보기 힘든 실정이다. Mullally 등(1995)[31]은 치태형성과 치은염에 미치는 효과에 대해 보고하였고, Daniela(1993)[32]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 검증되어 온 안정성과 함께 실제 임상 적용을 위한 경제적인 측면을 볼 때 응용 가능한 약제로 생각된다. 본 연구에 이용된 수종의 약제는 골절과 골다공증, 골형성부전 등의 각종 골질환에 처방되고 있는 생약들로서 골세포에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 이용하였다.

염기성 인산분해효소(ALP)는 유기인산 에스테르를 가수분해하여 석회화가 이루어지는 부위에서 국소적으로 인산이온의 농도를 증가시키는 효소로서, 세포외기질에 인산칼슘을 침착시켜 석회화를 유도하는 기능을 갖는다고 알려져 있다[33]. De Bernard(1982)[34]는 ALP가 국소적으로 인산이온 농도를 증가시켜 단백질

을 인단백으로 전환시키고 이것이 칼슘결합 성향을 가지면서 석회화의 핵 역할을 한다고 하였다. 본 연구에서는 각 생약제제별로 다양한 농도로 조골세포에 투여하여 ALP 활성도에 영향을 미치는 두 가지 농도를 얻었다. 이렇게 얻은 두 가지의 적정농도로 ALP의 합성량을 측정한 결과, 모든 제제가 음성대조군에 비해 유의한 증가를 보였다(Table 2, 4, 6, 8). 특히 유향은 양성대조군과도 유의한 차이를 보였다(p<0.05)(Table 2). 배양 기간에 따른 차이면에 있어서, 속단을 제외한 모든 제제가 3일과 비교시 5일째 유의한 증가를 보였다(p<0.05)(Table 2, 4, 6, 8). 즉, 본 연구에 이용된 모든 제제가 다소간에 차이는 보였으나 ALP 활성도에 영향을 미치는 것으로 생각할 수 있다. 본 연구의 양성대조군에 첨가한 dexamethasone은 조골유사세포를 분화시켜 골형성을 증가시킨다고 하며[35], 쥐의 두개골과 골수에서 채취한 조골성 dexamethasone으로 처리한 경우 골 특이 단백질인 osteopontin과 ALP, osteocalcin 등의 합성이 증가한다고 하였다[36]. 한편, dexamethasone이 부족한 배지에서는 치주인대세포 뿐만 아니라 조골유사세포도 결절이나 그와 유사한 치밀한 물질을 형성시키지 못한다고 하였다[37]. 본 연구에서 dexamethasone을 처리한 양성대조군의 경우 몰약, 속단을 처리한 실험군과는 유의한 차이가 없었으며(p<0.05)(Table4, 6), 유향을 처리한 실험군보다는 작았고(p<0.05)(Table 2), 승마를 처리한 군보다는 컸다(p<0.05)(Table 8).

염기성 인산분해효소를 확인할 수 있는 또 다른 방법으로 염색을 이용하는 방법이 있다.본 연구에서는 Azo 색소법(Burstone 법)을 이용하였다. Naphthol AS-BI phosphate 기질은 조직내 존재하는 염기성 인산분해효소에 의해 가수분해되어 orthophosphate와 naphthol이 유도체로 유리된다. 유리된 naphthol은 반응액에 함유되어 있는 diazonium 염과 즉시 결합하여 azo dye를 형성하여 적색의 효소 활성 부위를 나타내게 된다. 적색으로 나타난 부위를 영상분석기를 이용하여 계측한 결과 네 가지 모든 생약제제 실험군이 음성 대조군에 비해 유의하게 크게 나타났으나, 양성 대조군과는 유의한 차이가 없었다(p<0.05)(Table 3, 5, 7, 9, Figure 1-4). 3일에 비해 5일째 더 크게나온 것은 몰약, 속단이었다(p<0.05)(Table 5, 7, Figure 2, 3).

본 연구 결과 수 종의 생약제제는 조골세포의 ALP 합성에 영향을 미치는 것으로 나타났으며, 앞으로 골형성과 관련된 다양한 측정법을 사용한 더욱 세밀한 평가가 이루어져야 할 것이다. 또한 이들 생약제간의 병용, cytokine 및 성장인자 등 골개조와 관련된 물질과 생약의 병용시 상승효과를 나타낼 수 있는지에 대해서도 향후 심도있는 연구가 필요하리라 생각되며, 더 나아가 임상적 활용 방안을 모색할 필요가 있으리라 사료된다.

V. 결론

부작용이 적고 장기간 사용이 가능하다는 장점을 가진 생약제제들이 최근들어 많은 연구가 이루어지고 있으며, 이러한 약제들이 가지고 있는 항균, 항염증 및 치주조직의 재생능력에 대한 검증이 이루어 지고 있다. 유향, 몰약, 속단, 승마는 전통적으로 골질환 치료에 이용되어온 생약제제들이다. 본 연구의 목적은 적정 농도의 이들 제제들을 쥐의 골모세포주(MC3T3-E1 cell)에 투여 배양한 후, 이들 세포의 염기성인산분해효소(ALP) 합성능을 검증하는데 있다. ALP 합성능을 분광측광기 및 미세현미경 사진을 이용하여 측정한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 분광측정기를 이용한 결과 모든 제제가 음성대조군에 비해 유의한 증가를 보였다(p<0.05). 특히 유향은 양성대조군과도 유의한 차이를 보였다(p<0.05).
2. 분광측정기를 이용한 결과 배양 기간

에 따른 차이면에 있어서, 속단을 제외한 모든 제제가 3일과 비교시 5일째 유의한 증가를 보였다($p<0.05$).

3. ALP 염색에 의한 활성 부위 계측 결과 모든 실험군이 음성 대조군에 비해 유의하게 크게 나타났으나, 양성 대조군과는 유의한 차이가 없었다($p<0.05$).
4. ALP 염색에 의한 활성 부위 계측 결과 3일에 비해 5일째 더 크게 나온 것은 몰약, 속단이었다($p<0.05$).

이상과 같은 결과로 수 종의 생약제제는 조골세포의 ALP 합성에 영향을 미치는 것으로 나타났으며, 이를 이용해 앞으로 임상적 활용 방안을 모색할 필요가 있으리라 사료된다.

VI. 참고문헌

1. Froum S.J., Gomez C. : Periodontal regeneration. Current Opinion Periodontol 1:111 - 128, 1993.
2. Page R.C. : Periodontal therapy : Prospects for the future. J Periodontol 64:744 - 753, 1993.
3. Terranova V.P., Frauzetti L.C., Hic S., Wikesj U.M. : Biochemically mediated periodontal regeneration. J Periodont Res 22:248 - 251, 1987.
4. Wikesj U.M., Claffey N., Nilv us R., Egelberg J. : Periodontal repair in dogs : Effect of root surface treatment with stannous fluoride or citric acid on root resorption. J Periodontol 62(3):180 - 184, 1991.
5. 손희용, 조무현, 박광범, 서조영, 박준봉. Polytetrafluoroethylene membrane이 성견 치주조직 재생에 미치는 영향. 대한치주과학회지 22:96 - 111, 1992.
6. Pontoriero R., Nyman S., Ericsson I., Lindhe J. : Guided tissue regeneration in surgically - produced furcation defects. An experimental study in the beagle dog. J Clin Periodontol 19(3):159 - 163, 1992.
7. Schepers E.J., Ducheyne P., Barbier L., Schpers S. : Bioactive glass particles of narrow size range ; a new material for the repair of bone defects. Implant Dent 2(3):151 - 156, 1993.
8. Garrett S., Loos B., Chamberlian D., Egelberg J. ; Treatment of intraosseous periodontal defects with combined adjunctive therapy of citric conditioning, bone grafting, and placement of collage - nous membranes. J Clin Periodontol 15(6):383 - 389, 1988.
9. Gantes B., Martin M., Garrett S., Egelberg J. : Treatment of periodontal furcation defects. J Periodontol 15(4):232 - 239, 1988.
10. Rutherford R.B., Ryan M.E., Kennedy J.E., Tucker M.M., Charette M.F. : Platelet - derived growth factor and dexamethasone combined with a collagen matrix induce regeneration of the periodontium in monkeys. J Clin Periodontol 20(7):537 - 544, 1993.
11. Park J.B., Matsuura M., Han K.Y., Norderyd O., Lin W.L., Genco R.J., Cho M.I. : Periodontal regeneration in class III furcation defects of beagle dogs using guided tissue regenerative therapy with platelet - derived growth factor. J Periodontol 66(6):462 - 477, 1995.
12. Kingsley D.M. : The TGF - β superfamily : New members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. Genes

Dev 8(2):133 - 146, 1994.
13. Vainio S., Karavanova I., Jowett A., Thesleff I. : Identification of BMP - 4 as a signal mediating secondary induction between epithelial and mesenchymal tissues during early tooth development. Cell 75(1):45 - 58, 1993.
14. Pich 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.
15. Rutherford R.B., TrailSmith M.D., Ryan M.E., Charette M.F. : Synergistic effects of dexamethasone on platelet - derived growth factor mitogenesis in vitro. Arch Oral Biol 37(2):139 - 145, 1992.
16. The potential role of growth and differential factors in periodontal regen - eration. J Periodontol 67(5):545 - 553, 1996.
17. Kiritsy C.P., Lynch S.E. : The role of growth factors in cutaneous wound healing. Crit Rev Oral Biol Med 4(5):729 - 760, 1993.
18. Canalis E., Lian J.B. : Effects of bone associated growth factors on DNA, collagen and osteocalcin systhesis in cultured fetal rat calvariae. Bone 9(4):243 - 246, 1988.
19. Hock J.M., Canalis E., Centrella M. : Transforming growth factor - βstimu - lates bone matrix apposition and bone cell replication in cultured fetal rat cal - variae. Endocrinology 126(1):421 - 426, 1990.
20. Centrella M., McCarthy T.L., Canalis E. : Transforming growth fac - tor - beta and remodeling of bone. J Bone Joint Surg(USA) 73A(9):1418 - 1428, 1991.
21. 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.
22. Kim Y.N., Park Y.S., Kim H.K., Jeon B.C., Youn S.E., Lee H.Y. : Enhancement of the attachment on microcarriers and tPA production by fibroblast cells in a serum - free medium by the addition of the extracts of Centella asiatica. Cytotechnology 13(3):221 - 226, 1993.
23. 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.
24. Yasukawa K., Takido M., Takeuchi M., Nakagawa S. : Effect of chemical constituents from plants on 12 - 0 - tetradecanoylphorbol - 13 - acetate - induced inflammation in mice. Chem Pharm bull(Tokyo) 37(4):1071 - 1073, 1989.
25. 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.
26. 장범석, 손성희, 정종평, 배기환. : Magnolol과 Honokiol이 항균, 교원질 분해효소, 세포독성 및 cytokine 생산에 미치는 영향. 대한치주과학회지 23:145 - 158, 1993.
27. 全國韓醫科大學 本草學敎室. 本草學, 서울, 永林社 410 - 414, 1991.
28. 韓大錫. 生藥學 서울, 東明社 165 - 168, 365 - 367, 417 - 419, 1988.
29. 李時珍. 本草綱目, 서울, 高文社 566 - 567, 1985.
30. 許 源. 中藥之 灸, 台北, 新醫藥出版社, 105 - 106, 1980.
31. Mullally B.H., James J.A., Coulter W.A., Linden G.J. : The efficacy of a herbal - based toothpaste on the control of plaque and gingivitis. J Clin Periodontol 22(9):686 - 689, 1995.
32. Daniela T. : Salvia officinalis 1. Ⅰ. Botanic characteristics, composition, use and cultivation. Cesk Farm 42(3):111 - 116, 1993.
33. 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 phosphatate. Bone and Mineral 14(1):27 - 40, 1991.
34. de Benard B. : Glycoproteins in the local mechanism of calcification. Clin Orthop 162:233 - 244, 1982.
35. Bellows C.G., Aubin J.E., Heersche J.N., Antosz M.E. : Mineralized bone nodules formed in vitro from enzymatically released rat calvaria cell populations. Calcif Tissue Int 38(3):143 - 154, 1986.
36. Kasugai S., Zhang Q., Overall C.M., Wrana J.L., Butler W.T., 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 Miner 13(3):235 - 250, 1991.
37. Yamashita Y., Sato M., Noguchi T. : Alkaline phosphatase in the periodontal ligament of the rabbit and macaque monkey. Arch Oral Biol 32(9):677 - 8, 1987.

사진부도 설명

사진부도 설명(I)

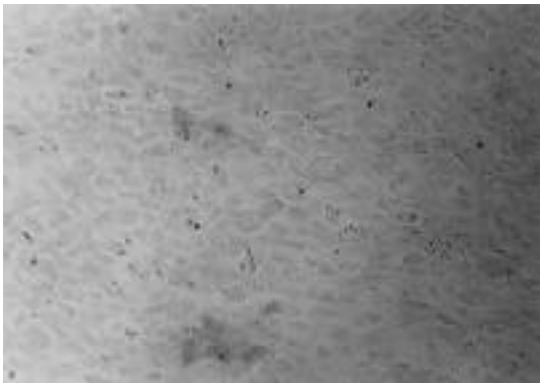

Photo 1 - 1

Photo 1 - 2

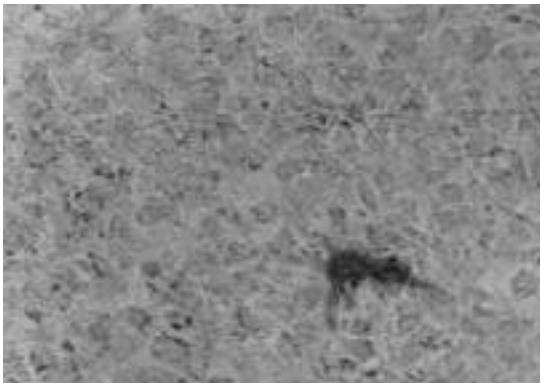

Photo 2 - 1

Photo 2 - 2

사진부도 설명(Ⅱ)

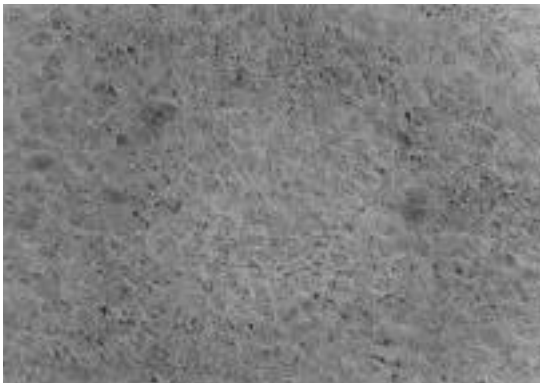

Photo 3 - 1

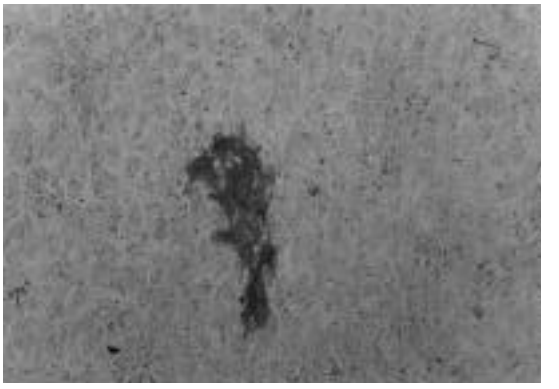

Photo 3 - 2

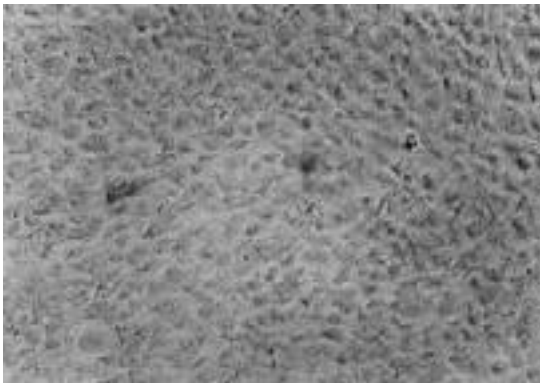

Photo 4 - 1

Photo 4 - 2

Photo 1 - 1. Microphotograph reveals ALP synthesis expressed as red - colored area of MC3T3 - E1 cells treated with the extracts of *Olibanum*(negative control, Naphthol AS - BI method, × 100).

Photo 1 - 2. Microphotograph reveals ALP synthesis expressed as red - colored area of MC3T3 - E1 cells treated with the extracts of *Olibanum*(10^{-6} g/ml group, Naphthol AS - BI method, × 100).

Photo 2 - 1. Microphotograph reveals ALP synthesis expressed as red - colored area of MC3T3 - E1 cells treated with the extracts of *Myrrha*(negative control,Naphthol AS - BI method, × 100)

Photo 2 - 2. Microphotograph reveals ALP synthesis expressed as red - colored area of MC3T3 - E1 cells treated with the extracts of *Myrrha*(10^{-7} g/ml group,Naphthol AS - BI method, × 100)

Photo 3 - 1. Microphotograph reveals ALP synthesis expressed as red - colored area of MC3T3 - E1 cells treated with the extracts of *Phlomis Radix*(negative control, Naphthol AS - BI method, × 100).

Photo 3 - 2. Microphotograph reveals ALP synthesis expressed as red - colored area of MC3T3 - E1 cells treated with the extracts of *Phlomis Radix*(10^{-6} g/ml group, Naphthol AS - BI method, × 100).

Photo 4 - 1. Microphotograph reveals ALP synthesis expressed as red - colored area of MC3T3 - E1 cells treated with the extracts of *Cimicifugae Rhizoma*(negative control, Naphthol AS - BI method, × 100).

Photo 4 - 2. Microphotograph reveals ALP synthesis expressed as red - colored area of MC3T3 - E1 cells treated with the extracts of *Cimicifugae Rhizoma*(10^{-7} g/ml group, Naphthol AS - BI method, × 100).

- Abstract -

Effects of Several Natural Medicines on Alkaline Phosphatase Synthesis in MC3T3 - E1 Cells

Dae - Kyum Kim, Tak Kim, Sung - Hee Pi, Hyun - A Kim, Kwang - Soo Choi, Hyung - Keun You, Hyung - Shik Shin
Department of Periodontology, School of Dentistry, Wonkwang University

Several growth factors and polypeptides are not commonly yet used for regenera - tors of bone tissue or alveolar bone because of the insufficiency of studies on their side effects, genetic engineering for mass pro - duction and stability for clinical application. Recently, many natural medicines, which have advantage of less side effects and possibility of long - term use, have been studied for their capacity and effects of anti - bacterial, anti - inflammatory and regenerative potential of periodontal tis - sues. *Olibanum, Myrrha, Phlomis Radix,* and *Cimicifugae Rhizoma* have been traditionally used as a drug for treatment of bone dis - ease in oriental medicine.

The objective of this study was to exam - ine the ability of alkaline phosphatase(ALP) synthesis of rat calvarial osteoblast(MC3T3 - E1) when several nat - ural medicines were supplemented. MC3T3 - E1 cells were cultured with α-MEM(negative control), dexamethasone(positive control), and each natural medicines for 3 and 5 days. And then ALP synthesis was measured by spectrophotometer for enzyme activity and by naphthol AS - BI staining for morphome - try.

All of the natural medicines induced high - er activity of ALP synthesis than the nega - tive controls. Especially *Olibanum* induced the higher activity than the positive con - trols($p<0.05$). In the aspects of culturing time, except *Cimicifugae Rhizoma*, the nat - ural medicines induced higher activity of ALP synthesis at 5 days than at 3 days($p<0.05$). In morphometry, all of the natural medicines showed statistical signif - icance compared to the negative control($p<0.05$). *Myrrha* and *Phlomis Radix* showed larger positively stained area at 5 days than at 3 days, whereas the others did not showed the difference between at 5 and at 3 days($p<0.05$).

These results indicate that several natural medicines have an inducing ability of ALP synthesis in MC3T3 - E1 cells.