

수종의 생약제제가 hFOB1의 염기성 인산분해 효소 활성화에 미치는 영향

장길용 · 현하나 · 김윤상 · 유형근* · 신형식

원광대학교 치과대학 치주과학교실

Effects of Several Natural Medicines on Alkaline Phosphatase Activity in hFOB1

Kil Young Jang, Ha Na Hyun, Yun Sang Kim, Hyung Keun You*, Hyung Shik Shin

Department of Periodontology, School of Dentistry, Wonkwang University

Recently, many natural medicines, which have advantage of less side effects and possibility of long-term use, have been studied for their capacity and effects of anti-bacterial, anti-inflammatory and regenerative potential for periodontal tissues. *Cortex Eucommiae*, *Eupoly phaga*, *Semen Cuscutae*, *Halloysitum Rubrum* have been traditionally used as medicines for treatment of bone disease in Korea. The objective of the present study is to examine the ability of alkaline phosphatase (ALP) activity in human fetal osteoblast cell line (hFOB1) with several natural medicines. hFOB1 added DMEM/F-12 were cultured with dexamethasone as a positive control, and with each natural medicine. ALP activity was measured by spectrophotometer for enzyme activity and naphthol AS-BI staining was performed for morphometry. All of the natural medicines induced a higher ALP activity compared to negative control, especially, *Cortex Eucommiae* increased an ALP activity in all experimental groups ($p<0.05$). In naphthol AS-BI staining, all of the natural medicines of this study increased the stained area compared to negative control. Especially, *Cortex Eucommiae* and *Eupoly phaga* showed statistical significance compared to negative control ($p<0.05$). These results indicate that *Cortex Eucommiae*, *Eupoly phaga*, *Semen Cuscutae*, *Halloysitum Rubrum* have an inducing ability of ALP synthesis on osteoblasts.

Key words : alkaline phosphatase activity, human fetal osteoblasts, *Cortex Eucommiae*, *Eupoly phaga*, *Semen Cuscutae*, *Halloysitum Rubrum*

서 론

치주질환은 치주병원균에 의한 감염질환으로 만성 염증에 의한 치주조직 파괴가 수반된다. 따라서 치주치료란 감염의 원인이 되는 치태 및 치석의 세균 요인을 물리적으로 제거하고, 염증성 치주질환으로 인해 상실된 치조골, 백악질, 치주인대 및 치은을 포함하는 치아지지조직들이 구조적, 기능적으로 새롭게 형성되는 치주조직재생을 포함하게 되며 이는 치주치료의 궁극적인 목표라 할 수 있다^{1,2)}. 그러나 치주조직은 치조골과 백악질이라는 두 경조직 사이에 연속적인 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 치근면처리술과 노출된 치근면을 피복하고 조직 재생을 도모하는 치관변위관막술, 차폐막을 사용하여 파괴된 조직결손부에 특정 세포를 선별적으로 이주, 증식케 하는 조직유도재생술, 골전도물질의 사용, 골유도물질 혹은 골원성물질을 사용한 치조골 재생술식 및 상기 술식의 복합처치 등으로 구분할 수 있다. 최근에는 이미 알려진 바와 같이 골조직의 재생 플리펩타이드로서 골형성단백(bone morphogenic proteins; BMPs)^{3,4)}이 골조직으로부터 추출되어 실험실에서 분리되어 검정을 받고 있으나 이들 물질의 대량 생산과정에서 유전공학적 방

* 교신저자 : 유형근, 전북 익산시 신용동 344-2, 원광대학교 치과대학
E-mail: hkperio@wonkwang.ac.kr, Tel: 063-850-6634
· 접수: 2002/08/05 · 수정: 2002/09/10 · 채택: 2002/10/04

법 개발이 아직 미흡함으로 골조직 및 치조골 재생제로는 활발한응용이 되지 못하고 있다. 최근에 동양의학에서 사용되던 몇몇 생약제제에 관한 전래의 효능 및 효과를 근거로 치주질환 치료제로서의 응용 가능성 즉 치주질환균에 대한 항염효과와 항균효과를 비롯하여 치주조직 재생능력, 특히 골 재생에 미치는 영향 등에 대한 과학적인 접근과 분석이 시행되고 있는데 이들은 부작용이 적고 장기간 사용이 가능하다는 점에서 관심이 모아지고 있다. 두충(杜仲, *Cortex Eucommiae*)은 두충나무과의 껍질로 신농본초경(神農本草經)에서는 간신경(肝腎經)에 작용하여 간신(肝腎)을 보하고 근골(筋骨)을 튼튼히 하여 허리와 등의 통증을 다스리고, 소아마비 후유증 치료(근력향상)등에 사용되기도 하며⁵⁾ 상기생(桑寄生), 당귀(當歸), 천궁(川芎)등과 배합하여 강근건골(強筋健骨), 활혈지통(活血止痛)의 효과를 증강시키기도 한다⁶⁾. 자충(蠟蟲, *Eupoly phaga*)은 바퀴과(Blattidae)의 몸체로 심장, 간, 비장에 작용하며 본초통현(本草通玄), 신농본초경(神農本草經)에서는 어혈, 적체를 제거하고 경락을 통하게 하여 절상의 치료 및 접골, 타박상에 특히 효과가 있다고 하였으며⁷⁾, 월경 이상과 중지, 산후 어혈 복통(藥性論), 궤양성 설염 등의 치료에 쓰였다. 토사자(菟絲子, *Semen Cuscutae*)는 메꽃과 식물의 씨로 간신경(肝腎經)에 작용하여 간신(肝腎)을 보하고 정수(精髓, 골수)를 익히며 시력감퇴를 치료하고 절상을 이어주며(主續絕傷)⁸⁾, 명의별록(名醫別錄)에서는 근골을 튼튼히 하는 효과가 있다고 하였다. 또, 적석지(赤石脂, *Halloysitum Rubrum*)는 규산염 광물의 일종으로 폐, 위, 대장에 작용하여 수렴, 지혈의 효과가 있으며 외용으로 사용하여 궤양 등의 치료에 사용되어왔다⁹⁾. 이에 착안하여 본 연구는 민간요법으로 활용되고 있는 위에 언급한 네 가지 생약 추출물(두충, 자충, 토사자, 적석지) (Table 1)을 각 농도별로 human fetal osteoblast 세포주 (hFOB1)에 투여, 배양한 후 염기성 인산분해효소 (alkaline phosphatase, ALP) 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 촉진시키는 데 효과적인 약제를 개발하기 위해 시행하였다.

Table 1. The List of Natural Products for This Study

Korean name	Scientific name	Family	Used parts	Major Components	Reference
두충	<i>Cortex Eucommiae</i>	Eucommiaceae	bark	6-10 % of gutta percha, glycoside, alkaloid, pectin, fat	중약대사전
자충	<i>Eupoly phaga</i>	Blattidae	body		*
토사자	<i>Semen Cuscutae</i>	Convolvulaceae	seed	resin, vitamin A, β -carotin, γ -carotin, taraxanthin	*
적석지	<i>Halloysitum Rubrum</i>	Halloisite		42.93% of silicone, 36.58% of aluminum, iron oxide, manganese	*

재료 및 방법

1. 세포배양

hFOB1(human fetal osteoblasts) 세포주를 10% fetal bovine

serum (FBS, Gibco BRL, USA)과 0.03 mg/ml의 G-418 (DUCHEFA, Netherlands)이 첨가된 Dulbecuo's Modified Eagle's Medium Nutrient Mixture F-12 HAM (DMEM/F-12 1:1 Mixture, Sigma, USA) 2 ml이 담긴 6-well 배양접시에 적정 세포(5×10^4 cell/well)를 분주하였다. 이를 34°C의 온도 및 100% 습도조건에서 95%의 공기와 5% CO₂를 계속 공급하면서 배양하였다. 배양액은 세포가 충분한 증식이 일어날 때까지 2-3일 간격으로 교환하였다.

2. 생약 추출물의 준비

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

3. 염기성 인산분해효소 활성 측정

hFOB1을 6-well plate에 1×10^5 cell/well이 되도록 분주한 후, 10% FBS가 첨가된 DMEM/F-12 1:1 Mixture에서 단일 밀생층이 형성될 때까지 34°C, 100% 습도, 5% CO₂ 공기 혼합 배양기에서 배양하였다. 단일 밀생층이 형성된 후 배지를 제거하고 DMEM/F-12 1:1 Mixture으로 2회 세척 후, 10% FBS, G-418 항생제, 50 μ g/ml ascorbic acid, 10mM sodium β -glycerophosphate가 첨가된 DMEM/F-12 1:1 Mixture에 음성 대조군에는 증류수를 첨가하였으며, 양성 대조군에는 10⁻⁷ M의 dexamethasone을 첨가하였고, 실험군은 적정 농도의 한약제를 첨가하여 분주한 후 3일 동안 추가 배양하였다. 일정 배양시간이 지난 후 배지를 제거하고, trypsin-EDTA로 세포를 분리시키고 1,500 rpm에서 6분간 원심분리하였다. 상층액을 제거하고 0.2 ml의 멸균된 증류수를 첨가하여 초음파 분쇄기로 현탁하였다. 각 세포 현탁액 0.1 ml에 0.1 M glycine NaOH buffer (pH 10.4) 0.2 ml, 15 mM의 p-nitrophenyl phosphate (pNPP ; Sigma, USA) 0.1 ml, 0.1% triton X-100/saline 0.1 ml와 멸균된 증류수 0.1 ml를 잘 혼합하여, 이 반응물을 37°C에서 30분간 배양하였다. 0.1 N NaOH를 0.6 ml 첨가함으로써 이들 반응을 중지시켰다. p-NPP의 가수분해는 410 nm 파장의 ELISA reader에서 흡광도의 차이로 나타나며, p-nitrophenol (p-NP ; Sigma, USA)을 기준값으로 이용했다. 단백질 농도는 BCA protein assay reagent (Pierce, USA)를 사용하여 측정하며, bovine serum albumin을 standard로 하였고, ALP 활성도는 nM/min/mg of protein으로 나타내었다.

4. 염기성 인산분해효소 합성의 계측분석을 위한 ALP 염색

6-well plate에 세포를 1×10^5 /well가 되도록 분주한 후, 실험군에는 적정 농도의 한약제를 첨가한 DMEM/F-12 1:1 Mixture 2 ml을 배양액으로 하고, 음성 대조군에는 한약제가

함유되지 않은 DMEM/F-12 1:1 Mixture 표준배양액을 배지로 이용하였고, 양성 대조군에는 10⁻⁷ M의 dexamethasone을 첨가하였다. 3일 동안 배양한 후, 배지를 제거하고 2% paraformaldehyde 고정액을 각 well 당 2 ml씩 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 ml씩 넣고 30분 동안 37℃ 배양기에 배양하였다. 배양 후 증류수로 철저히 세척한 다음 도립현미경으로 관찰, 촬영하였고 (×100), 염색에 양성반응을 보이는 적색 부위를 Image Pro II 영상분석장치(Media Cybernetics, USA)를 이용하여 그 면적을 측정하였다.

5. 통계분석

각각의 생약제제 내 대조군과 실험군 간의 차이 및 3일 사이의 차이를 알아보기 위하여 각각의 ALP 활성도 값을 unpaired t-Test로, ALP stain 면적을 ANOVA를 이용하여 실험결과에 유의성이 있는지를 통계적으로 검증하였다.

결 과

1. 두충에 대한 염기성 인산분해효소의 합성 계측

3일군에서 음성대조군에 비해 양성대조군, 실험군의 각 수치 모두 통계학적으로 유의한 증가를 보였으며, 실험군 중 특히 10 ng/ml, 100 ng/ml군이 뚜렷한 증가를 보였다 (Table 2).

Table 2. ALP Activity of hFOB1 treated with the Extracts of *Cortex Eucommiae* (Mean±S.D.)

	C	C ⁺	10 ng/ml	100ng/ml	1 μg/ml
<i>Cortex Eucommiae</i>	0.15±0.01	0.20±0.01*	0.19±0.00*	0.20±0.00*	0.17±0.01*

* : Statistically significant compared to negative control (p<0.05), C (negative control) ; added distilled water, C⁺ (positive control) ; added 10⁻⁷ M dexamethasone

2. 자충에 대한 염기성 인산분해효소의 합성 계측

3일군에서 음성대조군에 비해 양성대조군, 10 μg/ml의 실험군이 유의한 증가를 보였다(Table 3).

Table 3. ALP Activity of hFOB1 treated with the Extracts of *Eupoly phaga* (Mean±S.D.)

	C	C ⁺	100 ng/ml	1 μg/ml	10 μg/ml	100 μg/ml
<i>Eupoly phaga</i>	0.13±0.01	0.18±0.01*	0.13±0.01	0.14±0.02	0.15±0.01*	0.13±0.01

* : Statistically significant compared to negative control (p<0.05), C (negative control) ; added distilled water, C⁺ (positive control) ; added 10⁻⁷ M dexamethasone

3. 토사자에 대한 염기성 인산분해효소의 합성 계측

3일군에서 음성대조군에 비해 양성대조군과 1 μg/ml, 10 μg/ml의 실험군에서 유의한 증가를 보였다(Table 4).

Table 4. Alkaline Phosphatase Activity of hFOB1 treated with the Extracts of *Semen Cuscutae* (Mean±S.D.)

	DAY	C	C ⁺	100ng/ml	1 μg/ml	10 μg/ml	100 μg/ml
<i>Semen Cuscutae</i>	3	0.13±0.02	0.18±0.02*	0.15±0.02	0.17±0.01*	0.17±0.01*	0.13±0.01

* : Statistically significant compared to negative control (p<0.05), C (negative control) ; added distilled water, C⁺ (positive control) ; added 10⁻⁷ M dexamethasone

4. 적석지에 대한 염기성 인산분해효소의 합성 계측

3일군에서 음성대조군에 비해 양성대조군과 1 μg/ml, 10 μg/ml의 실험군이 유의한 증가를 보였다.(Table 5).

Table 5. ALP Activity of hFOB1 treated with the Extracts of *Halloysitum Rubrum* (Mean±S.D.)

	C	C ⁺	1 μg/ml	10 μg/ml	100 μg/ml	1 mg/ml
<i>Halloysitum Rubrum</i>	0.16±0.02	0.24±0.03*	0.23±0.03*	0.23±0.03*	0.20±0.03	0.17±0.03

* : Statistically significant compared to negative control (p<0.05), C (negative control) ; added distilled water, C⁺ (positive control) ; added 10⁻⁷ M dexamethasone

5. 두충, 자충, 토사자, 적석지에 대한 염기성 인산분해효소의 염색 계측

ALP 염색을 이용한 계측에서 대조군에 비하여 실험군 모두가 증가를 보였으며 특히 두충, 자충에서 유의한 증가를 보였다 (Table 6, Fig. 1, Photo 1, 2, 3, 4, 5, 6). 사진에서 적색으로 염색된 부위가 hFOB1에서 염기성 인산분해효소 합성이 일어난 부위이다(화살표).

Table 6. The stained area represent ALP Synthesis of hFOB1 treated with the Extracts of *Cortex Eucommiae*, *Eupoly phaga*, *Semen Cuscutae*, *Halloysitum Rubrum* (μm²)(Mean±S.D.)

C	C ⁺	<i>Cortex Eucommiae</i> (100 ng/ml)	<i>Eupoly phaga</i> (10 μg/ml)	<i>Semen Cuscutae</i> (1 μg/ml)	<i>Halloysitum Rubrum</i> (1 μg/ml)
0.83±0.43	1.10±0.45	2.06±0.90*	1.97±0.30*	1.63±0.56	1.75±0.69

* : Statistically significant compared to negative control (p<0.05), C (negative control) ; added distilled water, C⁺ (positive control) ; added 10⁻⁷ M dexamethasone

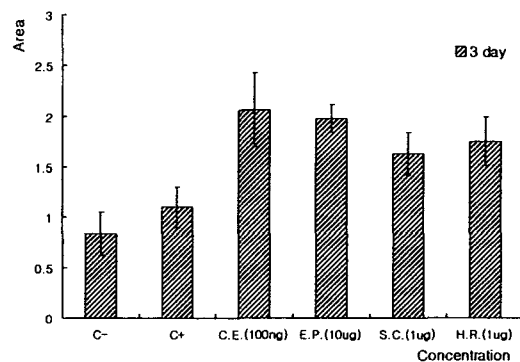


Fig. 1. The stained area which represent ALP Synthesis of hFOB1 treated with the Extracts of *Cortex Eucommiae*, *Eupoly phaga*, *Semen Cuscutae*, *Halloysitum Rubrum* (μm²). Vertical bars represent standard difference of each independent experiments. C (negative control) ; added distilled water, C⁺ (positive control) ; added 10⁻⁷ M dexamethasone, C.E. : *Cortex Eucommiae*, E.P. : *Eupoly phaga*, S.C. : *Semen Cuscutae*, H.R. : *Halloysitum Rubrum*

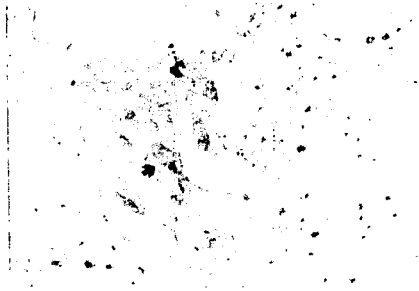


Photo 1. ALP synthesis with distilled water (negative control) expressed as red-colored area (arrow) in hFOB1 (Naphthol AS-BI method, $\times 100$).

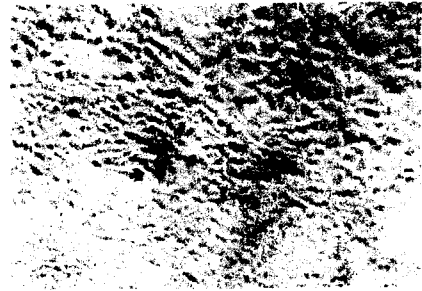


Photo 5. ALP synthesis with $1 \mu\text{g/ml}$ *Semen Cuscutae* expressed as red-colored area (arrow) in hFOB1 (Naphthol AS-BI method, $\times 100$).

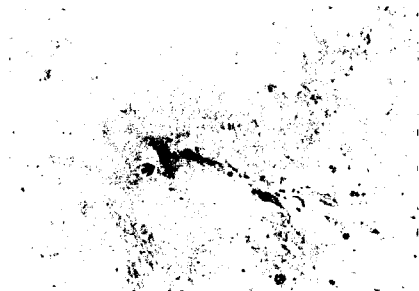


Photo 2. ALP synthesis with dexamethasone (positive control) expressed as red-colored area (arrow) in hFOB1 (Naphthol AS-BI method, $\times 100$).



Photo 6. ALP synthesis with $1 \mu\text{g/ml}$ *Halloysitum Rubrum* expressed as red-colored area (arrow) in hFOB1 (Naphthol AS-BI method, $\times 100$).



Photo 3. ALP synthesis with 100 ng/ml *Cortex Eucommiae* expressed as red-colored area (arrow) in hFOB1 (Naphthol AS-BI method, $\times 100$).

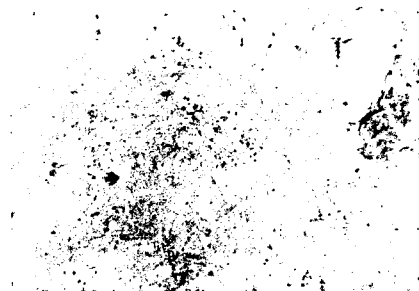


Photo 4. ALP synthesis with $10 \mu\text{g/ml}$ *Eupoly phaga* expressed as red-colored area (arrow) in hFOB1 (Naphthol AS-BI method, $\times 100$).

고 찰

치주질환은 인류의 역사와 같이 해왔다고 여겨지며, 이에 대한 치료법이 1970년대까지는 치은절제술, 치주관막수술, 골수술을 이용한 치주낭의 철저한 제거였다. 1980년대에는 이러한 술식들의 단점들을 알게 되어 비수술적 치주치료가 주를 이루었으나, 수술적 및 비수술적 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^{1,2)}. 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 확실적인 치료법은 없는 상태이며 각종 수술 후 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 개발이 무엇보다도 필요하다. 근대 서양의약은 세균성 질환과 같은 감염성 질환에 대해서는 기려한 바가 지대하나, 일부 만성적 소모성 질환에 대

해서도 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 적고 부작용이 거의 없는 것으로 인식되고 있음에도 불구하고, 서양의약에서는 이들 약물들의 동일성, 효능의 재현성 및 안정성의 부족으로 치료에는 거의 사용하지 않는 상태였으나, 최근 대체의학과 함께 생약제제에 대한 관심이 점점 증가하고 있는 추세이다. 현재 한방 제제와 각종 현대 의약과의 병용투여에서 나타난 보고들을 요약하면 한방 제제와 항암제를 비롯하여 스테로이드 제제와 난치병 의약품과의 병용 투여는 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 치료인구는 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. *Sanguinaria*는 현재 미국에서 Viadent® (Colgate-Palmolive Co., USA)라는 상품명으로 시판되고 있으며 실험실에서의 연구결과는 클로르헥시딘과 필적할만한 알칼로이드 추출물이지만 구강내에서 존재하는 철분과 결합시 쉽게 그 약효가 약화되므로 안정한 생약제로 보기 힘든 실정이다. Mullally 등(1995)⁷⁾은 생약제제로 된 치약을 사용한 경우 치태형성과 치은염에 미치는 효과에 대해 보고하였고, Daniela (1993)⁸⁾도 치은염의 소독과 염증완화에 대한 약초의 효과를 소개하였다. 현재 경험적인 동양의학의 한계를 넘어 전래되어 전해지는 여러 생약 제제들에 대한 성분별 분석과 이들의 효과에 대한 과학적인 접근이 시도되고 있고, 일부는 상당한 진척을 이루어 실제 임상에 사용할 수준에 이른 것들도 있다. 이들 생약 제제는 과거 상당기간 검증되어온 안정성과 함께 실제 임상 적용을 위한 경제적인 측면을 볼 때 응용 가능한 약제로 생각된다. 국내의 민간의학에서는 오래 전부터 홍화, 골채보, 자연동 등의 천연물이 골절의 치료에 사용되었는데 홍화씨 (*Carthami Flos*)는 국화와 식물의 씨앗으로 adenosine diphosphate에 의한 혈소판 응집억제를 통한 항응혈 효과와 항염 효과⁹⁾ 등이 확인된 바 있고, 조골세포의 기능적 활성화 효과와 신생골 형성에 유의한 효과¹⁰⁾가 밝혀지기도 하여 많은 연구가 이루어지고 있고, 골채보(*Drynariae Rhizoma*)는 수룡골과에 속하는 다년생 양치식물인 넝쿨고사리의 근경을 건조한 약제로서 Ma (1995) 등¹¹⁾은 골채보가 조류의 태아골세포의 석회화와 염기성 인산분해효소의 합성을 촉진한다고 하였다. 또한 증약대사전, 동의보감, 본경속소, 향약집성방 등의 고문헌에 의하면 조혈작용, 관절통 및 치통의 진통작용, 골절시 치유 및 신생골 형성 촉진제로 알려진 바 있다^{12,13)}. 본 연구에 이용된 수종의 약제는 골절과 골다공증, 골형성부전 등의 각종 골질환에 처방되고 있는 생약들로서 치주질환 재생과 관련있는 골세포에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 이용하였다. 염기성 인산분해효소 (ALP)는 유기인산 에스테르를 가수분해하여 석회화가 이루어지는 부위에서 국소적으로 인산이온의 농도를 증가시키는 효소로

서, 세포의 기질에 인산칼슘을 침착시켜 석회화를 유도하는 기능을 갖는다고 알려져 있다¹⁴⁾. De Bernard (1982)¹⁵⁾는 ALP가 국소적으로 인산이온 농도를 증가시켜 단백질을 인단백으로 전환시키고 이것이 칼슘결합 성향을 가지면서 석회화의 핵 역할을 한다고 하였다. 본 연구에서는 각 생약제제별로 다양한 농도로 조골세포에 투여하여 ALP 활성도에 영향을 미치는 농도를 얻었다. 이렇게 얻은 적정농도로 ALP의 합성량을 측정한 결과, 모든 제제가 음성대조군에 비해 증가를 보였다 (Table 2, 3, 4, 5). 두충은 음성대조군에 비하여 10 µg/ml, 100 ng/ml군이 유의한 증가를 보였으며 (p<0.05), 자충은 10 µg/ml군이 유의한 증가를 보였고 (p<0.05), 토사자, 적석지는 1 µg/ml, 10 µg/ml군이 유의한 증가를 보였다 (p<0.05). 본 연구에 이용된 모든 제제가 다소간에 차이는 보였으나 ALP 활성도에 영향을 미치는 것으로 생각할 수 있다. 본 연구의 양성대조군에 첨가한 dexamethasone은 조골유사세포를 분화시켜 골 형성을 증가시킨다고 하며¹⁶⁾, 쥐의 두개골과 골수에서 채취한 조골성 dexamethasone으로 처리한 경우 골 특이 단백질인 osteopontin과 ALP, osteocalcin 등의 합성이 증가된다고 하였다¹⁷⁾. 한편, dexamethasone이 부족한 배지에서는 치주인대세포 뿐만 아니라 조골유사세포도 골 결절이나 그와 유사한 치밀한 물질을 형성시키지 못한다고 하였다¹⁸⁾. 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 영상 분석기를 이용하여 측정한 결과 네 가지 모든 생약제제 실험군이 음성 대조군에 비해 증가하여 나타났으며, 특히 두충, 자충에서 유의성있게 증가하였다(p<0.05). 본 연구 결과 두충, 자충, 토사자, 적석지 등은 조골세포의 ALP 합성에 영향을 미치는 것으로 나타났으며, 앞으로 골형성과 관련된 다양한 측정법을 사용한다면 더욱 세밀한 평가가 이루어져야 할 것이다. 또한 이들 생약제제의 병용, 싸이토키인 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.

결 론

부작용이 적고 장기간 사용이 가능하다는 장점을 가진 생약제제들이 최근들어 항균, 항염증 및 치주조직의 재생능력에 대한 검증이 이루어지고 있다. 두충, 토사자, 자충, 적석지는 전통적으로 골질환 치료에 이용되어온 생약제제들로 본 연구는 적정 농도의 이 제제들을 사람 태아 골모세포주인 hFOB1에 투여 배양한 후, 염기성인산분해효소 (ALP) 합성능을 분광측정기 및 미세현미경 사진을 이용하여 측정한 결과, 두충 3일군에서 음성대조군에 비해 실험군의 각 수치 모두 유의한 증가를 보였으며, 실험

군 중 특히 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 100 ng/ml 군이 뚜렷한 증가를 보였고, 자충 3일군에서 음성대조군에 비해 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 실험군이 유의한 증가를 보였다. 토사자 3일군에서 음성대조군에 비해 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 실험군에서 유의한 증가를 보였고, 적석지 3일군에서 음성대조군에 비해 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 실험군에서 유의한 증가를 보였다. 그리고, ALP 염색을 이용한 계측에서 대조군에 비하여 실험군 모두가 증가를 보였으며 특히 두충, 자충에서 유의한 증가를 보였다.

이상과 같은 결과로 두충, 토사자, 자충, 적석지는 조골세포의 ALP 합성에 영향을 미치는 것으로 나타났으며, 이를 이용해 앞으로 임상적 활용 방안을 모색할 필요가 있으리라 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2000년도 원광대학교의 교비 지원에 의해서 수행됨

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. Piché J.E., Carness D.L. Jr., Graves D.T. : Initial characterization of cells derived from human periodontia. J Dent Res 68(5):761-767, 1989.
4. 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.
5. 신민교, 김창민, 이경순, 안덕균. 中藥大辭典, 1450-1454, 圖書出版 鼎談. 1998.
6. 신민교. 臨床本草學, 209-210, 영림사. 1997.
7. 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.
8. Daniela T. : Salvia officinalis L. I. Botanic characteristics, composition, use and cultivation. Cesk Farm 42(3):111-116, 1993.
9. Kutsuna H., Fujii S., Kitamura K., Komatsu K., Nakano M. : Identification and determination of platelet aggregation inhibitor from safflower. Yakukaku Zasshi 108: 1101-1103, 1988.
10. 강정구, 유형근, 신형식. : 홍화씨 추출물이 치주인대세포와 조골유사세포의 골 광물화 작용에 미치는 효과. 대한치주과 학회지 28: 475-489, 1998.
11. 이상인. 本草學, 89-90, 수서원. 1981.
12. 韓國科學技術資料大系. 醫藥學編 東醫寶鑑 外形編. 2卷: 202, 여강출판사. 1988.
13. 정보섭, 신민교. 圖解鄉藥大辭典, 73-74, 영림사. 1990.
14. Beertsen W., van den Bos T. : Calcification of dentinal collagen by cultured rabbit periosteum: The role of alkaline phosphatase. Matrix 9(2):159-171, 1989.
15. de Benard B. : Glycoproteins in the local mechanism of calcification. Clin Orthop 162:233-244, 1982.
16. Tenenbaum H.C., Heersche J.N. : Dexamethasone stimulates osteogenesis in chick periosteum in vitro. Endocrinology 117(5):2211-2217, 1985.
17. Owen T.A., Aronow M., Shalhoub V., Barone L.M., Wilming L., Tassinari M.S., Kennedy M.B., Pockwinse S., Lian J.B., 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(3):420-430, 1990.
18. 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.