

수종의 생약제제가 human fetal osteoblasts의 염기성 인산분해 효소 활성에 미치는 영향

이명구 · 최희인 · 유형근 · 신형식

원광대학교 치과대학 치주과학교실

I. 서론

치주염은 치은 염증과 치아 주위의 지지 치조골과 결합조직의 상실을 동반한 치주낭 형성으로 특징 지워진다¹⁾. 이렇게 상실된 치주조직의 재생이란 염증성 치주질환으로 인해 상실된 치조골, 치주인대, 백악질 및 치은을 포함하는 치아지지조직들이 구조적, 기능적으로 새롭게 형성되는 것을 의미하며, 이는 치주치료의 궁극적인 목표라 할 수 있다³⁾.

이런 치주조직 재생을 위한 여러 치료방법들이 있는데 차폐막을 사용하는 전통적인 조직유도재생술과 골전도물질, 골유도 물질 혹은 골원성 물질의 사용, 성장인자 유도성 조직재생술 및 술식의 복합치치 등이 상실된 치주조직 재생에 많이 쓰인다.

치주조직의 치유에 대한 연구는, 전통적인 치주처치가 재생보다는 회복의 결과를 초래한다고 보고하고 있다^{4,5)}. 이러한 회복의 개념은 통상 치은 결합조직과 치근면 사이의 치은상피의 근단부 이동으로 설명된다. 이러한 상피의 개재는 노출된 치근의 치주인대 세포의 부착을 방해하고 따라서 치주조직의 재생을 방해한다. 치주조직의 재생은 상피 세포, 골아 세포, 치주인대세포, 치은결합조직의 섬유모세포를 포함하는 다양한 세포들에 의해 이루어지기 때문에 매우 복잡하다.

지난 수십년간 성장 인자라고 알려진 물질들에 대

한 연구가 활발하게 진행되어 왔다. 이러한 성장인자 중 치주조직의 치유에 영향을 주는 대표적인 인자로서, platelet derived growth factor(PDGF), transforming growth factor(TGF), fibroblast growth factor(FGF), insulin-like growth factor(IGF), epidermal growth factor(EGF)와 bone morphogenetic protein(BMP) 등이 있다. 조직의 치유와 관계된 이러한 인자들은 화학주성, 증식, 분화와 세포외 기질 단백질의 생성을 포함하는 다양한 역할을 가지고 있다. 그 중 골조직의 재생 폴리펩타이드로서 BMP는 여러 논문들에서 뛰어난 골 생성능을 보였다고 하였다^{6,9)}.

최근 수년간 생약에서 추출된 새로운 제제들이 연구, 개발되고 있는데 이들은 부작용이 적고 장기간 사용이 가능하다는 점에서 관심이 모아지고 있다. 한방에서 오래전부터 향균 및 항염, 진통 해열작용으로 사용해 온 생약제제들에 대한 연구들이 치과영역에서 이루어져 왔다.

예를 들어 후박(Magnoliae Cortex)에서 추출, 분리하여 정제한 magnolol과 honokiol은 높은 안전성과 항염효과를⁹⁾, 황금은 소염과 해열작용을 보였으며¹⁰⁾, 이들은 모두 IL-1 β 의 생성을 억제하였다^{11,12)}. 대조추출물은 IL-1 β 및 PGE2 생산차단효과, collagenase 활동억제효과 그리고 치은섬유아세포 활성화 증진효과 등^{12,13)}이, 은행엽 추출물은 치주질환세균에 대한 항균효과가 확인된 바 있다⁴⁾. 특히 홍화는

adenosine diphosphate에 의한 혈소판 응집억제를 통한 항응혈 효과와 항염 효과¹⁵⁾와, 조골세포의 기능적 활성화 및 신생골 형성에 유의한 효과¹⁶⁾가 밝혀졌다.

또한 감람나무과의 수간에서 얻은 수지성분 중 유향(Olibanum)은 활혈, 지혈, 진통, 소염 등의 작용이 있으며, 몰약(Myrrha)은 활혈거어지통(活血祛瘀止痛), 소염, 진균억제, 결핵균 억제 등의 효과가 있다^{17,18)}. 이 밖에 속단(Phlomis Radix)은 간, 신장의 기능증진과 골절에 효과가 있으며 소염, 진통, 배농, 지혈, 조직재생촉진, 심장활동 강화, 혈소판 응집 억제효과도 있다고 보고된다¹⁹⁾.

본 연구에서 여러 알려진 생약 제제 중 본초학²⁰⁾에 명시되어있는 근골과 관절을 튼튼하게 하며 골절에 효능을 보이는 파극천, 금모구척, 합환피, 육종용이란 생약제제를 사용하였다.

파극천(Morinda Radix)은 초과(草果, 꼭두서니과: Rubiaceae) 식물인 파극천(*Morinda officinalis* How)의 뿌리를 이르며, 비타민 C와 당류가 함유되어있고 온신보양(溫腎補陽)과, 뼈와 근육을 튼튼하게 하고 한기와 습기를 제거하는 효능이 있다.

금모구척(*Cibotium barometz* (L.))은 방각렬과(蚌殼蕨科; Dieksoniaceae)에 속한 대형고사리류의 상록초본(常綠抄本)인 금모구척의 뿌리줄기로서 뿌리가 길고 가지가 많아 구척과 흡사하여 구척이라 하였으며 뿌리줄기에 금황색의 섬모가 많아 광택이나므로 황구(黃狗)의 털과 같다고 한다. 간과 신장을 보호하고 허리와 척추를 튼튼하게 하며 관절에 이롭게 하는 효능이 있어 신장이 허하고 요통이 있는 경우, 척추통증, 다리와 무릎이 연약한 경우, 소변을 가리지 못하는 경우, 부인병등의 병증에 치료하는데 사용된다.

합환피(*Albizia Cortex*)는 자귀나무 *Albizia julibrissin* Durazzini 및 동속식물(콩과 Leguminosae)의 수피이다. 이 약은 우울증, 불면증에 쓰이며 통증을 그치게 하고 새살을 낳게 하는 효과가 있어 골절이나 배농, 상처난 곳에 쓰인다.

육종용(*Cistanchis Herba*)은 육종용 *Cistanchis deserticola* Y. C. Ma 및 동속근연식물 (열당과

Orobanchaceae)의 육질경(肉質莖)이다. 허리와 무릎의 냉통증과 근육과 골의 연약한 경우에 사용되며 신장과 간에 작용하여 진액이 고갈되어 생기는 변비에 사용된다.

본 연구는 민간요법으로 활용되고 있는 위에 언급한 네가지 생약 추출물을 각 농도별로 세포주에 투약, 배양한 후 분광 측정기를 이용한 염기성 인산분해효소 활성화도 측정 및 염색을 이용한 계측을 통해 그 활성도를 알아보고, 이를 토대로 상기 추출물의 임상적 응용 가능성을 알아보고자 세포 단위의 생물학적 실험을 시행하여 치주조직 재생과정을 촉진시키는 데 효과적인 약제개발을 위해 시행하였다.

II. 연구재료 및 방법

1. 세포배양

태아골모세포주(hFOB1 1.19 ; American Type Culture Collection, Manassas, VA)를 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco BRL, GibcoBRL, Grand island, NY, USA)과 0.03 mg/ml의 G-418 (Duchefa, Netherlands)이 첨가된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium Nutrient Mixture F-12 HAM (DMEM/F-12 1:1 Mixture, Sigma, St. Louis, MO, USA) 2 ml이 담긴 6-well 배양접시에 well당 5×10^4 개의 세포를 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 교환하였으며 계대 배양은 1:3의 비율로 시행하였다.

2. 생약 추출물의 준비

원광대학교 약학대학에 의뢰하여 각각의 생약 100g을 분말형태로 분쇄하여 MeOH 1 l 와 혼합하여 가열 여과한 후 1,500 rpm의 rotatory evaporator로 농축한 다음 동결 건조하여 얻어진 분말을 이용하였다. 분말 1g을 MeOH 10 ml에 섞어 stock solution을 만들어 농도별로 희석한 후 0.2 μm syringe filter

(Nalgene Company, Naperville, IL, USA)로 여과 멸균한 후 사용하였다.

3. 염기성 인산분해효소 측정

태아골모세포를 6-well plate에 1×10^5 cell/well이 되도록 분주한 후, 10% FBS가 첨가된 DMEM/F-12 1:1 Mixture에서 단일 밀생층(mono layer)이 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 µg/ml ascorbic acid, 10 mM sodium β-glycerophosphate가 첨가된 DMEM/F-12 1:1 Mixture에 음성 대조군에는 한약제를 첨가시키지 않고 분주하였으며, 양성 대조군에는 10⁻⁷ M의 dexamethasone을 첨가하였고, 실험군은 적정 농도의 한약제를 첨가하여 분주한 후 3일 동안 각각 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 표준으로

하였고, ALP 활성도는 nM/30min/mg of protein으로 나타내었다.

4. Mineralization Assay(AR-S staining)

6-well plate에 1×10^5 개의 세포가 들어가도록 분주한 후 각각 파극천 10 ng/ml, 금모구척 1 µg/ml, 합환피 10 ng/ml, 육종용 10 ng/ml의 농도로 적용하였다. extracellular matrix mineralization을 유도하기 위해 21일 배양기간이 되기 이전에는 4 mmole/L NaHPO₄를 첨가해서 배양하였으며 Alizarin red-S(AR-S) 염색은 Stanford et al³⁰⁾의 방법을 사용하였다. 21일이 지난 후 배지를 제거하고, phosphate-buffered saline(PBS)로 세척하였다, ice-cold 70% ethanol로 한시간 동안 4°C에서 고정하고 ethanol를 제거한 후 40 mmole/L AR-S(pH 4.2)로 실온에서 10분동안 염색하였다. AR-S 용액을 제거하고 멸균증류수로 조심스럽게 3회에 걸쳐 세척하였다. 염색된 부분을 사진촬영하고 10 mmole/L sodium phosphate(pH7.0)에 10%(w/v) cetylpyridinium chloride가 녹아있는 용액을 이용해 염색부위를 녹여 AR-S의 농도를 562 nm의 흡광도에서 읽었으며 AR-S 표준곡선은 같은 용액을 사용하였다.

5. 통계분석

각각의 생약제제 내 대조군과 실험군 간의 차이 및 3일 사이의 차이를 알아보기 위하여 각각의 ALP 활성도 값을 unpaired t-Test와 일원분산분석법(ANOVA)을 이용하여 실험결과에 유의성이 있는지를 p<0.05 수준에서 통계적으로 검증하였다.

Table 1. Alkaline Phosphatase Activity of hFOB1 treated with the Extracts of Morindae Radix (Mean±S.D.)

	C-	C+	10ng/ml	100ng/ml	1µg/ml
Morindae Radix	0.21±0.02	0.29±0.03*	0.29±0.03*	0.27±0.02	0.28±0.02*

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

C (negative control) ; added distilled water

C+ (positive control) ; added 10⁻⁷ M dexamethasone

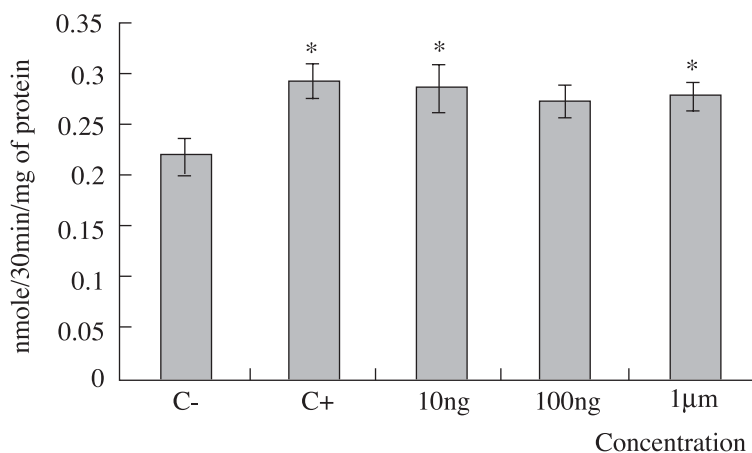


Figure 1. Effect of Morindae Radix on ALP activity of hFOB1

hFOB1s were plated in 6-well plates at 1×10^5 cells/well and cultured in F-12 HAM:DMEM until cells reached a confluence. After that, 10 ng/ml, 100 ng/ml, 1 µg/ml of Morindae Radix and dexamethasone as a positive control were added and cultured for another 3 days more. Values represent averages from four independent experiments and standard deviation, (C : negative control, C⁺ : positive control, * : p(0,05)

Table 2. Alkaline Phosphatase Activity of hFOB1 treated with the Extracts of Cibotium Barometz (L.) (Mean±S.D.)

	C	C ⁺	10ng	100ng	1µg
Cibotium Barometz (L.)	0,22±0,03	0,33±0,03*	0,29±0,03*	0,31±0,03*	0,31±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

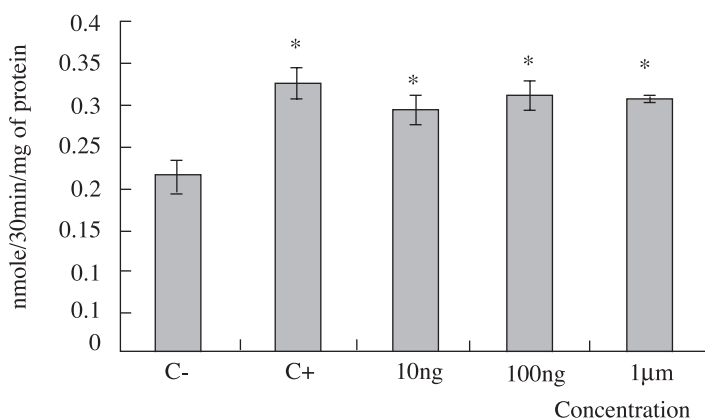


Figure 2. Effect of Cibotium Barometz on ALP activity of hFOB1

hFOB1s were plated in 6-well plates at 1×10^5 cells/well and cultured in F-12 HAM:DMEM until cells reached a confluence. After that, 10 ng/ml, 100 ng/ml, 1 µg/ml of Cibotium Barometz and dexamethasone as a positive control were added and cultured for another 3 days more. Values represent averages from four independent experiments and standard deviation, (C : negative control, C⁺ : positive control, * : p(0,05)

III. 결과

1. 파극전에 대한 염기성 인산분해효소의 합성 계측

3일군에서 음성대조군에 비해 양성대조군, 실험군의 각 수치 모두 유의한 증가를 보였으며, 실험군 중 특히 10 ng/ml, 1 μg/ml 군이 통계학적으로 뚜렷한 증가를 보였다. 그러나 양성대조군과 각 실험군간의 유의한 차이를 보이지 않았다(Table 1, Figure 1).

2. 금모구척에 대한 염기성 인산분해효소의 합성 계측

3일군에서 음성대조군에 비해 양성대조군과 모든 실험군에서 유의한 통계학적 차이를 보였으며 실험군 모두 양성대조군에 비해 낮은 합성량을 보였으나 실험군간 유의한 차이를 보이지 않았다(Table 2,

Figure 2).

3. 합환피에 대한 염기성 인산분해효소의 합성 계측

3일군 내에서 음성대조군에 비해 양성대조군과 모든 실험군이 증가된 합성량을 보였으나 양성 대조군만이 통계적으로 유의한 증가를 보였다(Table 3, Figure 3).

4. 육종용에 대한 염기성 인산분해효소의 합성 계측

3일군에서 음성대조군에 비해 양성대조군과 모든 실험군에서 증가된 합성량을 보였으며 특히 양성대조군과 10 μg/ml이 통계학적으로 유의한 증가를 보였다. 그러나 양성대조군과 실험군간의 유의한 차이를 보이지 않았다(Table 4, Figure 4).

Table 3. Alkaline Phosphatase Activity of hFOB1 treated with the Extracts of Albizziae Cortex (Mean±S.D.)

	C	C ⁺	1ng	10ng	100ng	1μg
Albizziae Cortex	0.20±0.02	0.30±0.02*	0.22±0.03	0.25±0.03	0.23±0.04	0.22±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

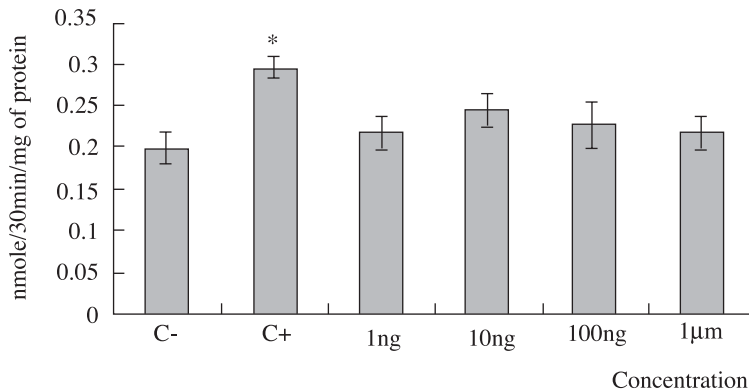


Figure 3. Effect of Albizziae Cortex on ALP activity of hFOB1

hFOB1s were plated in 6-well plates at 1×10⁵ cells/well and cultured in F-12 HAM:DMEM until cells reached a confluence. After that, 1 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml, 1 μg/ml of Albizziae Cortex and dexamethasone as a positive control were added and cultured for another 3 days more. Values represent averages from four independent experiments and standard deviation. (C : negative control, C⁺ : positive control, * : p<0.05)

Table 4. Alkaline Phosphatase Activity of hFOB1 treated with the Extracts of Cistanchis Herba (Mean±S.D.)

	C-	C+	1ng	10ng	100ng	1μg
Cistanchis Herba	0.13±0.02	0.20±0.01*	0.17±0.02	0.18±0.0*	0.17±0.01	0.16±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

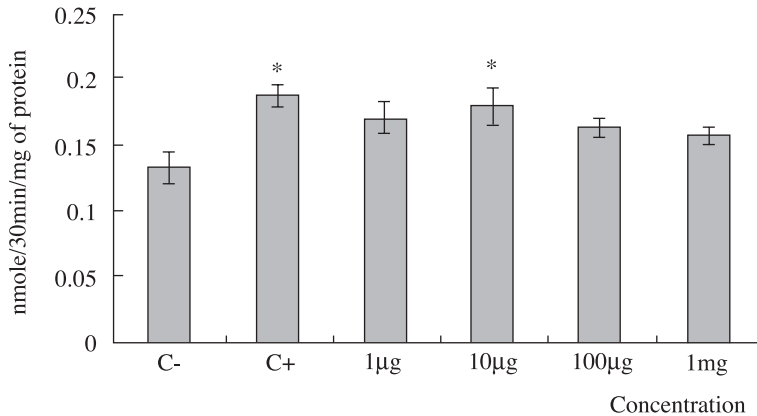


Figure 4. Effect of Cistanchis Herba on ALP activity of hFOB1

hFOB1 were plated in 6-well plates at 1×10⁵ cells/well and cultured in F-12 HAM:DMEM until cells reached a confluence. After that, 1 μg/ml, 10 μg/ml, 100 μg/ml, 1 mg/ml of Cistanchis Herba and dexamethasone as a positive control were added and cultured for another 3 days more. Values represent averages from four independent experiments and standard deviation. (C : negative control, C+ : positive control, * : p<0.05)

Table 5. The stained area which represent Alkaline Phosphatase Synthesis of hFOB1 treated with the Extracts of Albizziae Cortex, Morindae Radix, Cistanchis Herba, Cibotium Barometz (L.) (μg/ml/well)(Mean±S.D.)

C-	C+	Albizziae Cortex 10ng/ml	Morindae Radix 10ng/ml	Cistanchis Herba 10μg/ml	Cibotium Barometz (L.) 1μg/ml
178,00±16,00	293,50±8,00*	248,00±4,24*†	258,63±145,30*†	294,13±22,80*	296,38±7,60*

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

†; Statistically significant compared to positive control (p<0.05)

C (negative control) ; added distilled water

C+ (positive control) ; added 10⁻⁷ M dexamethasone

5. 파극천, 금모구척, 합환피, 육종용에 대한 염기성 인산분해효소의 염색 계측

ALP 염색을 이용한 계측에서 대조군에 비하여 양성대조군과 실험군 모두가 통계학적으로 유의한 증가를 보였으며 특히 양성대조군, 육종용 10 μg/ml,

금모구척 1 μg/ml인 세 개의 실험군이 합환피 10 ng/ml, 파극천 10 ng/ml과 유의한 차이를 보였다 (Table 5, Figure 5, 6). Figure 6 에서 진하게 염색된 부위는 hFOB1에서 염기성 인산분해 효소 합성이 일어난 부위이다.

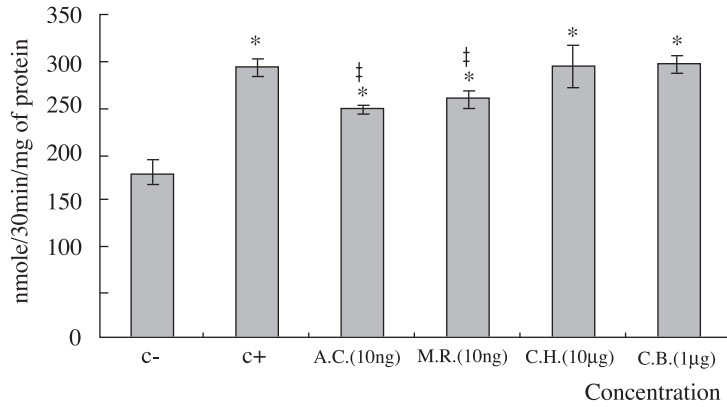


Figure 5. The stained area which represent Alkaline Phosphatase Synthesis of hFOB1 treated with Albizziae Cortex, Morindae Radix, Cistanchis Herba, Cibotium Barometz (L.). Vertical bars represent standard difference of each independent experiments.

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

†; Statistically significant compared to positive control ($p < 0.05$)

C(negative control) ; added distilled water

C⁺(positive control) ; added 10⁻⁷ M dexamethasone

A,C. : *Albizziae Cortex*

M,R. : *Morindae Radix*

C,H. : *Cistanchis Herba*

C,B. : *Cibotium Barometz (L.)*

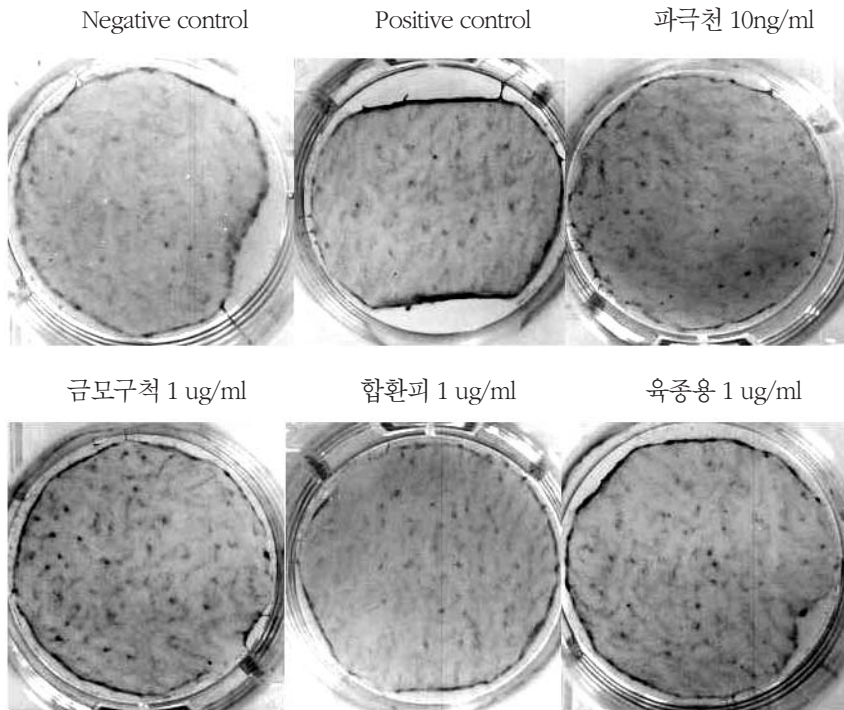


Figure 6. Alizarin red S stain photographs for ALP synthesis

IV. 총괄 및 고찰

생약제제는 고대로부터 연구되어오는 방법들 중 하나이다. 고 서적에서도 생약으로부터 추출된 약물이 인체에 안전하며 효능, 효과가 지속적임을 증명하고 있다. 생약제제는 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 것도 있다. 이들 생약제제는 과거 상당기간 검증되어온 안정성과 함께, 실제 임상에 적용을 위한 경제적인 측면을 볼 때, 응용 가능한 약제로 생각된다. 현재 연구되고 있는 생약제제들의 효능을 살펴보면 염증의 감소, 조직의 치유촉진, 치주질환의 치료 등을 들 수 있다. 대표적인 치주질환 치료 보조제로는 옥수수 불검화 추출물인 Zea Mays L.은 치은 각화도 증가, 치주낭의 전반적인 감소, 연조직내의 염증 감소, 치아 동요도 감소²²⁾ 등의 연구 결과를 바탕으로 상품화 되어있다. 홍화는 아직 상품화 되지 않았으나 치주인대세포, 조골세포의 기능적 활성화 및 백서 두개골 결손부에서 신생골 형성 촉진효과를 확인되었고 증가된 ALP 합성이 세포의 기질에 calcium phosphate를 침착시켜 석회화를 유도하여 치주인대세포, 조골세포의 분화 및 성숙에 관련됨이 보고되었다²³⁾. 이 밖에 80년대 초반에 sanguinaria 추출물은 실험실에서의 연구결과는 chlorhexidine과 필적할만한 alkaloid 추출물이지만 구강내에서 존재하는 철분과 결합시 쉽게 그 약효가 약화된다. 치태형성과 치은염에 미치는 효과²⁴⁾와 치은염의 소독과 염증완화에 대한 약초의 효과가 소개되었다²⁵⁾.

ALP 합성량 분석에서 양성대조군으로 처리한 dexamethasone은 골아세포를 분화시켜 골 형성을 증가시킨다²⁶⁾. 생쥐의 두개골에서 얻은 dexamethasone을 적용하였을 때는 osteopontin, ALP, osteocalcin과 같은 bone specific indicator protein 합성이 증가된다²⁷⁾. 반면에 dexamethasone이 불충분한 culture medium은 치주세포같은 골아세포나 bone nodule 등을 형성할 수 없다²⁸⁾.

염기성 인산분해효소 (ALP)는 유기인산 에스테르를 가수분해하여 석회화가 이루어지는 부위에서 국소적으로 인산이온의 농도를 증가시키는 효소로서, 세포외기질에 인산칼슘을 침착시켜 석회화를 유도하는 기능을 갖는다고 알려져 있다²⁹⁾. De Bernard (1982)³⁰⁾는 ALP가 국소적으로 인산이온 농도를 증가시켜 단백질을 인단백으로 전환시키고 이것이 칼슘 결합 성향을 가지면서 석회화의 핵 역할을 한다고 하여 이것이 막에 부착하는 효소로서 골 형성과 석회화에서 중요성이 강조되고 있다. Krzysztof 등³¹⁾의 연구 결과에 의하면 골 형성 능력을 가진 세포에서는 ALP 활성이 높은 반면, 골 형성 능력이 없는 세포에서는 ALP 활성이 낮다고 보고했다. 즉 ALP가 골 형성 능력을 가진 세포에 대한 표식자로 유용하다고 주장했다. 본 연구에서는 각 생약제제별로 다양한 농도로 조골세포에 처리하여 ALP 활성도에 영향을 미치는 농도를 얻어서 이런 적정 농도를 바탕으로 ALP 합성량을 측정하였다.

즉 파극천, 금모구척, 합환피는 10 ng/ml, 100 ng/ml, 1 μ g/ml의 농도를 사용하였으며 육종용은 1 μ g/ml, 10 μ g/ml, 100 μ g/ml, 1 mg/ml의 농도를 사용하였다. 파극천은 음성대조군에 비하여 양성대조군과 10 ng/ml, 1 μ g/ml에서 유의한 증가를 보였으며 실험군 간의 통계학적으로 유의한 차이를 보이지 않았다(Table 1, Figure 1). 금모구척은 모든 실험군이 음성대조군보다 유의한 증가를 보였으며 100 ng/ml이 가장 높았고 실험군간의 통계학적으로 유의한 차이는 없었다(Table 2, Figure 2). 합환피는 음성대조군과 모든 실험군은 약간의 증가를 보였으나 양성대조군만이 유의한 증가를 보였고 실험군 간의 통계학적 차이는 보이지 않았다(Table 3, Figure 3). 육종용은 음성대조군에 비하여 양성대조군과 10 μ g/ml에서 유의한 증가를 보였고 다른 실험군도 약간의 증가를 보였으나 실험군간의 통계학적으로 유의한 차이는 보이지 않았다(Table 4, Figure 4). 이들 결과들은 네 가지 생약제제들이 모두 ALP 활성도에 영향을 미친다고 보여지며 파극천, 금모구척, 육종용은 뚜렷한 ALP 활성 증가를 보였으나 합환피는 통계적으로 유의한 증가를 보이지 않았다. 유향, 몰약, 속단, 승마

를 쥐의 골모세포주(MC3T3-E1 cell)에 적용한 연구에서는 ALP 활성도에서는 유향이 가장 유의한 증가를 보였다³²⁾. 같은 골모세포주에 천궁, 오서각, 골쇄보를 적용한 연구에서는 ALP 활성도가 오서각과 골쇄보가 유의한 증가를 보였다³³⁾. 같은 골모세포주에 유향 추출물을 적용한 연구에서는 1 $\mu\text{g/ml}$ 에서 세포 활성도와 ALP 활성도와 골 결정 형성능에서 유의한 효과를 보였다³⁴⁾.

본 실험은 동물실험 등이나 생체염색방법으로 많이 쓰이고 있는 Alizarin red S 염색법을 사용하였는데 세포의 형태학적 특성 분석 즉 세포의 경계부위를 염색하여 세포의 밀도, 면적, 주변둘레, 한변의 길이 등을 광학현미경으로 촬영 후 분석할 수 있다. von Kossa와 alizarin red S 으로 염색하는 것은 칼슘을 증명하는데 유용하지만 von Kossa 염색법은 항상 그러하지는 않다³⁵⁾. 왜냐하면 alizarin red S 염색법은 칼슘에 특이하게 반응하는데 칼슘과 칼슘간에 red-dish-orange complex를 형성하기 때문인 반면에 von Kossa 염색법은 음이온인 주로 phosphate와 carbonate, salts를 증명하는 silver reduction 기술이다³⁶⁾. 이러한 Alizarin red S 염색법은 특히 적은 양의 칼슘도 알아내는데 유용하므로 견본에서 아주 적은 양의 칼슘에도 적합하다³⁷⁾. 본 연구에서 사용된 네가지 생약제제들의 ALP 분석에서 가장 통계적으로 유의한 증가를 보인 파극천 10 ng/ml, 금모구척 1 $\mu\text{g/ml}$, 합환피 10 ng/ml, 육종용 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도를 골라서 Alizarin red S 염색법으로 처리한 결과 모든 실험군에서 음성 대조군에 비해 뚜렷한 차이를 보였으며 특히 육종용 10 $\mu\text{g/ml}$ 과 금모구척 1 $\mu\text{g/ml}$ 실험군이 합환피 10 ng/ml과 파극천 10 ng/ml 실험군과 통계학적으로 유의한 차이로 더 많이 염색이 되었다. 이는 이전에 네가지 생약제제들의 각각의 ALP 활성도 측정에서 나타난대로 합환피에서 가장 적은 양을 보였으나 네가지 생약제제 모두 증가된 유의한 차이를 보여주었다.

본 연구에서 ALP 활성도가 높게 나타난 육종용과 금모구척 중 육종용은 미량의 알칼로이드 및 결정성 중성 물질이 함유되어 있으며 신농본초경소(神農本草經疏)에서 신(腎)을 자양하고 정혈(精血)을 풍부하

게 하는 약재라 하였으며 본경(本經)에서는 오로칠상(五勞七傷)을 치료하며 중기(中氣)를 보하고 음경의 한열통(寒熱痛)을 제거하며 오장을 양(養)하고 음정(陰精)을 돋우며 정기(精氣)를 북돋우고 부인 징하(癥瘕)를 치료한다고 하였다. 금모구척은 간과 신장을 보호하고 허리와 척추를 튼튼하게 하며 관절에 이롭게 하는 효능이 있어 신장이 허하고 요통이 있는 경우, 척추통증, 다리와 무릎이 연약한 경우, 소변을 가리지 못하는 경우, 부인병 등의 병증에 치료하는데 사용된다.

본 연구 결과 수종의 생약제제는 조골세포의 ALP 합성에 영향을 미치는 것으로 나타났으며, 앞으로 골형성과 관련된 다양한 실험에 의한 더욱 세밀한 평가와 골재생의 기전, 임상평가가 이루어져야 할 것이다.

또한 이들 제제의 성상에 따른 효과, 생약제 간의 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. 또한 이러한 생약제제들은 대량생산이 가능하며 효능, 효과의 안전성이 높기 때문에 더욱 상품화의 이용도를 높이리라 생각된다.

V. 결론

부작용이 적고 장기간 사용이 가능하다는 장점을 가진 생약제제들이 최근들어 항균, 항염증 및 치주 조직의 재생능력에 대한 검증이 이루어지고 있다. 파극천, 금모구척, 합환피, 육종용은 전통적으로 연약한 골과 관절, 골절 치료 등에 이용되어온 생약제제들로 본 연구는 적정 농도의 이 제제들을 사람 태아 골모세포주인 hFOB1에 투여 배양한 후, 염기성 인산분해효소(ALP) 합성능을 분광측광기 및 미세현미경 사진을 이용하여 측정한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 파극천은 음성대조군에 비해 실험군의 각 수치 모두 증가를 보였으며, 특히 10 ng/ml, 1 $\mu\text{g/ml}$ 군

- 이 통계적으로 뚜렷한 증가를 보였다(P<0.05).
2. 금모구척은 음성대조군에 비해 모든 실험군이 통계적으로 유의한 증가를 보였으나, 실험군간의 유의한 차이는 보이지 않았다(P<0.05).
 3. 육종용은 음성대조군에 비해 10 μ g/ml 실험군이 통계적으로 유의한 증가를 보였으며 나머지 실험군도 증가를 보였다(P<0.05).
 4. ALP 염색을 이용한 계측에서 대조군에 비하여 양성 대조군과 실험군 모두가 통계적으로 유의한 증가를 보였으며 특히 육종용, 금모구척에서 유의한 증가를 보였다(P<0.05).

이상과 같은 결과로 파극천, 금모구척, 육종용은 조골세포의 ALP 합성에 영향을 미치는 것으로 나타났으며, 이를 이용해 앞으로 임상적 활용 방안을 모색할 필요가 있으리라 사료된다.

VI. 참고문헌

1. Caton JG, Quinones CR : Etiology of periodontal diseases. *Curr Opin Dent* 1:17-28, 1991.
2. Page RC : Periodontal therapy : Prospects for the future. *J Periodontol* 64:744-753, 1993.
3. Froum SJ, Gomez C : Periodontal regeneration. *Current Opinion Periodontol* 1:111-128, 1993.
4. Caton JG, Nyman S, Zander HA : Histometric evaluation of periodontal surgery II. Connective tissue attachment levels after four regeneration procedures. *J Clin Periodontol* 7:22-27, 1980.
5. Listgarten MA, Rosenberg MM : Histological study of repair following new attachment procedures in human periodontal lesions. *J Periodontol* 50:333-344, 1979.
6. Toriumi DM, Kotler HS, Luxenberg DP, Holtrop ME, Wang EA : Mandibular reconstruction with a recombinant bone-inducing factor : functional, histologic, and biomechanical evaluation in calvarial defects in adult primates. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 117(10):1101-1112, 1991.
7. Ripamonti U, MA S, Van Den Heever B, Reddi AH : Osteogenin, a bone morphogenetic protein, adsorbed on porous hydroxyapatite substrate, induces rapid bone differentiation in calvarial defects in adult primates. *Plast Reconstr Surg* 90:382-393, 1992.
8. Bowers G, Felton F, Middleton C, Glynn D, Sharp S, Mellonig J, Corio R, Emerson J, Park S, Suzuki J, et al. : Histologic comparison of regeneration in human intrabony defects. *J Periodontol* 62:690-702, 1992.
9. Chang B, Lee Y, Ku Y, Bae K, Chung Cs : Antimicrobial activity of magnolol and honokiol against periodontopathic microorganisms. *Planta Med* 64(4):367-9, 1998.
10. Yasukawa K, Takido M, Takeuchi M, Nakagawa S : Effect of chemical constituents from plants on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced inflammation in mice. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 37(4):1071-1073, 1989.
11. 장범석, 손성희, 정종평, 배기환 : Magnolol과 Honokiol이 항균, 교원질 분해효소, 세포독성 및 cytokine 생산에 미치는 영향. *대한치주과학회지* 23:145-158, 1993.
12. 양창호, 이용무, 조기영, 배기환, 정종평 : 대조추출물이 치은섬유아세포의 생물학적 활성화에 미치는 영향. *대한치주과학회지* 24:144-154, 1994.
13. 양창호, 류인철, 최상목, 정종평 : 치은섬유아세포와 치주인대세포의 형태와 화학주성에 미치는 대조추출물의 효과에 관한 연구. *대한치주과학회지* 25:279-289, 1995.
14. 정종평, 구영, 배기환 : 후박 및 은행엽 추출물의 항균, 항염 및 세포활성도에 미치는 영향. *대한치주과학회지* 25:478-486, 1995.
15. 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.
16. 강정구, 유형근, 신형식 : 홍화씨 추출물이 치주

- 인대세포와 조골유사세포의 골 광물화 작용에 미치는 효과. 대한치주과학회지 28:475-489, 1998.
17. 全國韓醫科大學 本草學教室. 本草學, 서울, 永林社 410-414, 1991.
 18. 韓大錫. 生藥學 서울, 東明社 165-168, 365-367, 417-419, 1988.
 19. 許禎源. 中藥之炮炙, 台北, 新醫藥出版社, 105-106, 1980.
 20. 本草學(본초학). 대한생약학교수협의회. 사단법인 대한약사회. 1995.
 21. Stanford CM Jacobson P A Eanes ED Lembke, L A and Midura R J Rapidly forming apatitic mineral in an osteoblasts cell line (UMR 106-01 BSP). J Biol Chem 270:9420-9428, 1995.
 22. 권영혁, 이만섭, 양승환, 김영, 박준봉 : 치주수술 후 Zea Mays L. 투여가 치유과정에 미치는 영향에 대한 임상적 연구. 대한치주과학회지 24:649-660, 1994.
 23. 이광수, 홍성우, 유경태, 유형근, 김윤철, 신형식 : 홍화씨 성분 분리 추출물이 치주인대세포와 조골모유사세포의 광물화에 미치는 영향. 대한치주과학회지 24:745-754, 1998.
 24. Mullally BH James JA Coulter WA Linden GJ : The efficacy of a herbal-based toothpaste on the control of plaque and gingivitis. J Clin Periodontol 22(9):686-689, 1995.
 25. Daniela T : *Salvia officinalis* L. Botanic characteristics, composition, use and cultivation. Cesk Farm 42(3):111-116, 1993.
 26. Bellow CG Aubin, J E Heersche J NM, Antosz, M E : Mineralized bone nodules formed in vitro from enzymatically released rat calvaria cell populations. Calcif Tissue Int 38:143-154, 1986.
 27. Kasugai S Nagata T Sodek J : Temporal studies on the tissue compartmentalization of bone sialoprotein (BSP), osteopontin (OPN), and SPARC protein during bone formation in vitro. J Cell Physiol 152:467-477, 1992.
 28. Arceo N, Sauk J J, Moehring J, Foster R A, Somerman M J : Human periodontal cells initiate mineral - like nodules in vitro. J Periodontol 62:499-503, 1991.
 29. 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.
 30. De Benard B : Glycoproteins in the local mechanism of calcification. Clin Orthop 162:233-244, 1982.
 31. Wlodarski KH, Reddi : AH: Alkaline phosphatase as a marker of osteoinductive cells. Calcif Tissue int 39:382-385, 1986.
 32. 김대겸, 김탁, 피성희, 김현아, 최광수, 유형근, 신형식 : 수종의 생약제제가 MC3T3-E1 세포의 염기성 인산분해효소 합성에 미치는 영향. 대한치주과학회지29(4):751-764, 1999.
 33. 박상기, 김대겸, 유승환, 김현아, 김명동, 유형근, 신형식 : 수종의 생약추출물이 MC3T3-E1 세포의 염기성 인산분해효소 활성에 미치는 영향. 대한치주과학회지 31(1):123-134, 2001.
 34. 한상현, 김명동, 유승환, 유용욱, 유형근, 신형식 : 유향 추출물이 MC3T3-E1 세포 활성 및 분화에 미치는 영향. 대한치주과학회지 31(2):287-298, 2001.
 35. Woods B, Kellaway TD : Cutaneous calculi subepidermal calcified nodules. Br J Dermatol 75:1-11, 1963.
 36. Dermis DJ : Clinical dermatology, 22nd revision. Lippincott-Raven publishers, Philadelphia New York, unit 12-12. 1-17, 1995.
 37. Bancroft JD, Stevens A: Theory and practice of histological techniques, 3rd edition, Churchill Livingstone, New York. 245-267, 1990.

Effects of Several Herbal Medicines on Alkaline Phosphatase Activity in Human Fetal Osteoblasts

Myoung-Ku Lee, Hee-In 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 regenerators of bone tissue or alveolar bone because of the insufficiency of studies on their side effects, genetic engineering for mass production and stability for clinical application. Recently, many herbal 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 tissues. *Morindae Radix*, *Cibotium Barometz* (L.), *Albiziae Cortex*, *Cistanchis Herba* have been traditionally used as medicines for treatment of bone disease in Eastern medicine.

The objective of the present study is to examine the ability of alkaline phosphatase (ALP) activity of human fetal osteoblast (hFOB1) when several natural medicines were supplemented. hFOB1 were cultured with Dulbecuo's Modified Eagle's Medium Nutrient Mixture F-12 HAM (DMEM/F-12 1:1 Mixture, Sigma, USA) and negative control, dexamethasone (positive control), and each natural medicines for 3 days. And then ALP activity was measured by spectrophotometer for enzyme activity and Alizarin red S staining for morphometry.

Among the natural medicines of this study, *Morindae Radix*, *Cibotium Barometz* (L.) and *Cistanchis Herba* induced higher activity of ALP synthesis than negative controls in all experimental group. *Albiziae Cortex* showed mild increases than negative control group. According to measurement of positively stained area, all of the natural medicines of this study increased compared to negative control. Especially, *Cibotium Barometz* (L.) and *Cistanchis Herba* showed statistical significance compared to negative control ($p < 0.05$).

These results indicate that *Morindae Radix*, *Cibotium Barometz* (L.), *Albiziae Cortex*, *Cistanchis Herba* have an inducing ability of ALP synthesis on osteoblast.