

생약 추출물이 세포성장 및 cytokine 생산에 미치는 영향

서울대학교 치과대학 치주과학교실

*충남대학교 약학대학

류인철 · 손성희 · 정종평 · 배기환*

I. 서 론

정상적인 결합조직의 부착은 치은 및 치주인대의 섬유아세포¹⁾, 치은상피세포, 혈관내피세포, 신경세포돌기, 치조골 및 여러 세포외기질의 복합체이며, 조직재생에 필요한 생물학적 과정에는 치유부위로의 세포의 이동, 부착, 증식 및 상실된 구조의 수복을 위해 필요한 기질의 합성이 포함된다. 재생능력을 갖는 세포를 자극하는데 필수적인 요인에 대해서는 완전히 밝혀져 있지는 않으나 주변에서 유래한 단백질로 추정된다.

성장, 창상치유, 중앙형성 및 염증에 있어서²⁾ 생물학적 반응조절인자는 polypeptide growth factor(PGF)로 구조와 기능에 있어서 호르몬과 유사하며 생성부위와 표적세포(target cell)로의 이동양상이 호르몬에 비해 다양하다. 이것은 생성세포내에 저장되지 않고 지속적으로 유리되어 표적세포로 확산된다. 이의 작용에 대한 확실한 생화학 기전은 밝혀지지 않았지만 이들이 표적세포 표면 존재하는 친화력이 높은 수용기와 결합한 후 신호전달계(signal transduction)에 의해 증식반응이 야기되는 것으로 믿어지고 있다^{3,4,5)}. PGF는 성장

촉진외에도 거의 모든 세포의 증식, 분화, 이동 및 기질합성을 조절하는 정상적인 생물학적 매개물질로 연조직 및 경조직 창상의 치유에 관여함이 관찰되었으며 교원질, 골질, 백악질을 포함하는 간엽조직의 형성을 자극함으로써 치주조직 재생을 용이하게 하는 것으로 생각할 수 있다^{6,7,8)}. 이와같은 작용을 보이는 대표적인 PGF로 platelet derived growth factor(PDGF)와 insulin-like growth factor(IGF)를 들 수 있다^{9,10,11)}.

Pluronic polyols(Pluronic F-68)은 계면활성제로서 치약, 구강세척 및 외상세척에 사용되는데, Fitzpatrick¹²⁾에 의하면 상처부위에 사용할 경우 치유과정의 상처부위 강도가 현저히 증가함을 보고하였다. Centella asiatica L urban은 madagascar섬에 자생하는 식물에서 추출한 성분으로서 창상, 화상, 욕창 및 궤양 등의 치료에 효과가 있음이 보고되었다^{13,14)}. Scutellariae Radix는 속썩은풀(Scutellariae baicalensis)의 주피를 벗긴 뿌리로서 소염, 해열, 하리 및 복통 등을 수반하는 질병에 사용하는 생약이다¹⁵⁻¹⁹⁾.

치주질환 치료의 목적은 치주조직내 염증의 제거와 치주조직 파과의 중단이지만 궁극적인

이 연구는 1992년도 서울대학교 병원 지정연구비의 지원에 의한 결과임

목표는 치주질환으로 인해 파괴되어 소실된 치주조직의 원상회복이라고 볼 수 있다^{1,2,3}.

그러므로 본 연구는 성장인자 및 생약추출물이 치주조직의 재생에 관여하는 치은상피세포, 치은상유아세포 및 치주인대세포의 DNA 합성, 교원질 합성, 단백질 합성 및 cytokine의 생산에 미치는 영향을 살펴보고자 시행하였다.

II. 연구재료 및 방법

1. 연구재료

α -Minimum essential medium과 fetal bovine serum은 Gibco사(미국 이하 α -MEM과 FBS로 표기)제품을 사용하였고, 증류수를 용매로 사용한 Ginseng protein, Pluronic F-68, PDGF, 및 IGF(Genzyme사, U.S.A.), dimethyl sulfoxide(이하 DMSO로 표기)를 용매로 사용한 Scutellariae Radix, ethanol을 용매로 사용한 centella asiatica(Sigma사, U.S.A.)등을 사용하였다.

2. 연구방법

2-1. 세포배양

서울대학병원에 교정치료를 위하여 내원한 환자의 제일소구치의 치은에 내사면 절개를 가한 다음 정상 치은조직을 채취하였다. 치주인대조직을 채취하기 위하여 치근의 치경부측 1/3을 큐렛으로 치은조직 잔사를 제거한 후 제일소구치를 발거하여 100U/ml penicillin과 100 μ g/ml streptomycin이 첨가된 α -MEM 생검배지에 침수시켰다. 생검배지로 5회 세척 후 치근 중간 1/3부위의 치주인대를 큐렛으로 채취하여 세척한 다음 35mm 세포배양 접시에 고르게 분산시켜 100U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin 및 10% FBS가 첨가된 α -MEM을 이용하여 세포배양을 시행하였으며, 3일 간격으로 배양액을 교환해 주면서 밀생할 때까지 배양하였다. 배양시 습도는 95%, 온도는 37°C를 유지하면서 95%의 공기와 5%의

CO₂를 계속 공급하였다. 채취된 치은조직은 약 1mm³로 세척한 다음 100mm크기의 세포배양 접시에 넣어 상기의 방법으로 배양하였다. 치은 상피세포의 배양을 위해 정상 치은조직을 임상에서 채취하여 penicillin과 streptomycin이 함유되어 있으며 칼슘과 마그네슘 이온이 포함되어 있지 않은 Hank's balanced salt solution(Gibco, Grand Island, NY, 이하 CMF-HBSS로 표기)으로 4회 반복하여 세척한 후 가능한 결체조직층을 제거하였다. 그 후 치은조직에 collagenase(grade II, 150 units/ml)와 dispase(2.4mg/ml)가 함유된 CMF-HBSS를 첨가하여 37°C에서 배양한 다음 상피조직층만 분리하였다. 상피조직층을 가늘게 자른 후 0.05% trypsin-EDTA 용액을 첨가하고 교반시켜 상피 세포를 얻은 다음 CMF-HBSS로 수회 반복하여 세척하고 표준혈구계산기로 세포수를 세고 접종한 후 Keratinocyte Growth Medium(Clonetics Corp., San Diego, Ca.U.S.A.이하 KGM으로 표기)으로 세포배양을 실시하여 사람 구강각화세포를 얻었다.

2-2. 치은상피세포의 DNA 합성

세포가 confluent해지면 세포를 trypsinization시켜 24-well당 1×10⁴개의 세포를 접종하였다. KGM으로 3일간 배양하여 세포가 약 70% confluent해지면 일정농도의 Ginseng protein, Pluronic F-68, Centella asiatica, Suctellariae Radix, PDGF 및 IGF가 첨가된 KGM으로 24시간 더 세포배양을 실시하였고, 세포배양이 끝나기 2시간 전에 well당 5 Ci의 [³H]thymidine을 세포배양액에 첨가하였다. 그 후 배양액을 조심스럽게 제거하고, 각 well에 3ml의 냉 5% trichloroacetic acid(이하 TCA로 표기)를 첨가하여 4에서 10분간 세포를 고정하였다. 5% TCA를 제거하고 다시 냉 5% TCA로 4회 세척한 다음 1ml의 0.5N NaOH를 첨가하여 37°C에서 30분간 세포를 용해시켰다. 100ml의 세포용해물을 취하여 liquid scintillation counter(Beckman)로

radioactivity를 측정하여 DNA 합성을 측정하였다.

2-3. 치주인대세포의 세포활성

계대배양한 치주인대세포를 0.25% trypsin-EDTA 용액으로 처리한 후 원심 분리하여 배양액으로부터 세포부유액을 만들고 표준혈구 계산기로 well당 1×10^5 개의 세포수가 되게 하여 접종 후 배양하였다. 다음날 배양액을 교환하고 이틀째 되는 날 배양액을 제거한 후 HBSS로 세척하였다.

Ginseng protein, Pluronic F-68, PDGF 및 IGF는 증류수를 용매로 하고 *Centella asiatica*는 ethyl alcohol을 용매로 하며, *Scutellariae Radix*는 DMSO를 용매로 하여 녹인 다음 각 추출물과 배양액이 $200 \mu\text{l}$ 가 되게 하였다. 이들을 습도는 95%, 온도는 37°C 를 유지하면서 95%의 공기와 5%의 CO_2 를 계속 공급하면서 24시간 배양하고 배양이 끝난 후 생리식염수에 용해한 MTT (methyl thiazol-2-YL-2, 5-diphenyl tetrazolium bormide) 용액 $50 \mu\text{l}$ 를 각 well에 넣고 4시간동안 배양한 후 MTT 용액을 제거하고 formazon결정을 용해 시키기 위해 DMSO를 $50 \mu\text{l}$ 씩 첨가하였다. plate를 잘 흔든 후 ELISA reader (THERMO max, Molecular devices, U.S.A.)로 570nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군으로는 매 실험마다 실험용액이 들어있지 않은 α -MEM 배양액 well을 사용하였다. 모든 실험 결과는 대조군에 대한 백분율로 계산하였다.

2-4. 총단백질과 교원질 합성능

사람 치은섬유아세포를 24-well plates (Corning사, 미국)에 well당 1×10^5 개의 세포를 접종한 다음 10% FBS가 함유된 α -MEM에서 3일간 배양한 후 배양액을 제거하고 PBS로 세척하였다. 그 후 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ ascorbic acid와 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ β -aminopropionitril이 함유된 α -MEM으로 교환한 다음 $2\mu\text{Ci}[^3\text{H}]$ -proline과 Ginseng protein, Pluronic F-68,

Centella asiatica, *Scutellariae Radix*, PDGF, IGF를 첨가한 배양액으로 세포를 배양하였다. 24시간이 경과한 후 생성된 총 단백질과 교원질양을 Peterkofsky와 Diegelmann (1971) 방법으로 측정하였다. 간단히 설명하자면 각 well에 $250 \mu\text{l}$ 의 $5 \times$ collagenase buffer (0.25M Tris, 0.025M CaCl_2 와 0.012M N-ethylmaleimide함유, pH 7.4)를 첨가하고 얼음위에 놓고 30초간 초음파 분쇄기로 세포막을 파괴 시킨 후 세포균질액 1ml에 5mg/ml BSA $200 \mu\text{l}$ 와 50% trichloroacetic acid/5mM proline $300 \mu\text{l}$ 를 첨가한 후 잘 혼합하여 0°C 에서 5분간 방치한 다음 1000xg에서 5분간 원심하여 상층액을 버리고 5% TCA/mM proline으로 3회 세척하였다. 침전물 0.2N NaOH에 용해 시킨 후 1M N-2-Hydroxyethyl piperazine-N'-2-ethanesulfonic acid 완충액 (Sigma, U.S.A., 이하 HEPES 완충액 (pH 7.2)로 표기)를 첨가하여 중화시킨 후 $5 \times$ collagenase 완충액 $100 \mu\text{l}$ 를 첨가하였다. microfuge tube에 각 용액을 반으로 나누어 넣은 후 교원질 합성량을 측정하기 위한 microfuge tube에 15U collagenase가 함유된 collagenase buffer를 $15 \mu\text{l}$ 주입하고 총단백질 합성량을 측정하기 위한 microfuge tube에는 15U collagenase가 함유되지 않은 collagenase buffer를 $15 \mu\text{l}$ 주입하여 37°C 에서 90분간 배양한 다음 collagenase활성도를 정지 시키기 위해 0°C 로 냉각시키고 각 tube에 50% TCA/2.5% tannic acid를 첨가하여 4°C 에서 30분간 방치하였다.

교원질 합성량을 측정하기 위해서는 collagenase가 함유된 microfuge tube를 1000xg에서 5분간 원심 후 상층액과 5% TCA/1mM proline으로 세척한 세척액을 counting vial에 담아 10ml scintillation cocktail를 넣어 liquid scintillation counter (Packard, U.S.A.)로 5분간 방사능을 측정하였다. 총 단백질양을 측정하기 위해서 collagenase가 함유되지 않은 microfuge tube를 100xg에서 5분간 원심 후 상층액을 버리고 5% TCA/1mM proline으로 세척 후 침전물을 0.2N NaOH로 세포를 용해

시켜 counting vial에 담아 상기의 방법으로 방사능량을 측정하였다.

2-5. Cytokine 생산

표준혈구계산기로 세포수를 센 다음 24-well plate에 well당 5×10^5 개의 세포를 접종하였다. 24시간 배양한 다음 배양액을 제거하여 HBSS로 세척하였다. Ginseng protein, Pluronic F-68, Centella asiatica 및 Scutellariae Radix가 함유된 배양액으로 다시 24시간 배양한 후 배양액을 모으고 HBSS로 세척하여 이를 다시 모은 뒤 0.02% EDTA-2.5% trypsin-PBS(10 : 1 : 9)로 세포를 분리해서 이를 원심 분리하여 상층액을 모은 뒤 세포들은 따로 모은다. 세포속에 함유되어있는 IL-1 β 를 추출하기 위해 세포를 3회 냉동-해동 시킨다음 4°C에서 30분동안 0.5ml의 phosphate buffer (PBS, pH 7.2 13mM phosphate, 0.15 M NaCl)에 녹이고 suspend 시킨 뒤 2,000xg에서 10분동안 원심분리 하였다. Sample A라고 정한 상층액은 IL-1 β 의 정량분석에 사용하였고, 침전물은 branson sonifier cell disrupter B15(Fisher, U.S.A.)로 4°C에서 2분동안 sonication시킨 후 0.5ml의 PBS에 부유시켰다. 이 튜브를 원심 분리시키고 IL-1 β 결정을 위해서 상층액을 모았다(Sample B). 그리고 pellet은 냉동-해동 cycle을 통해서 0.5ml PBS에 다시 부유시킨 후 원심 분리 시켰다. 상층액은 다시 IL-1 β 의 결정을 위해서 모았다(Sample C). IL-1 β 를 함유한 sample A, B, C 총량을 더해서 IL-1 β 의 총량이라 하였다.

IL-1 β 의 농도는 민감도가 높은 Interleukin-1 β ELISA kit(Cistron Biotechnology, U. S.A.)를 이용하여 측정하였다. 상기 ELISA kit의 well에 Ginseng protein, Pluronic F-68, Centella asiatica, Scutellariae Radix 및 Standard, Control, non-specific binding (NSB) well을 복제로 측정하였다. 각 well에 100 μ l씩 첨가하고 NSB well을 zero standard로 하였다(Matrix with No IL-1 β). well을 덮고 plate를 37°C에서 20분간 배양하였다.

well을 wash buffer로 3회 세척하였다. 세척 과정 중 buffer로 각 well당 200-300 μ l를 dispense 한 뒤 30초후 aspiration하고 이를 반복하여 마지막 세척 후 clean paper towel로 잔존하는 wash buffer를 제거하였다. 각 well에 100 μ l IL-1 β antiserum (rabbit)을 첨가하고, 다시 37°C에서 20분간 배양하였다. 상기한 방법으로 반복 세척한 후 각 well에 100 μ l의 anti-rabbit Ig G-HRP conjugate를 첨가하였다. well을 덮은 뒤 plate를 실온에서 20분간 배양한 뒤 상기한 방법으로 세척하고 각 well에 100 μ l IL-1 β antiserum (rabbit)을 첨가한 채 실온에서 10분간 배양하였다. 각 well에 4N sulfuric acid를 50 μ l첨가하고 15분이내에 측정하였다. microtitration plate reader (THERMO max™, Molecular Devices Co., U.S.A.)를 450nm에 맞추고 흡광도를 측정하였다.

III. 연구성적

1. 수종의 약제가 상피세포의 DNA합성에 미치는 영향

Centella asiatica는 1 μ g/ml 농도에서 용매인 ethanol에 비해 DNA합성의 높은 증가를 보였으며 Scutellariae Radix는 1ng/ml 및 10 ng/ml 농도에서 용매인 DMSO에 비해 DNA합성의 높은 증가를 나타냈다. Ginseng protein은 10 μ g/ml 농도에서 상피세포의 DNA합성을 촉진하였으나 1 μ g/ml 농도에서는 상피세포의 DNA합성을 억제하였다. Pluronic F-68은 1 μ g/ml 및 10 μ g/ml 농도에서 매우 높은 DNA합성의 증가를 나타냈다. PDGF는 1 μ g/ml 농도에서 상피세포의 DNA합성에 영향을 미치지 않았으나 10 μ g/ml 농도에서는 강한 억제작용을 나타냈다. IGF는 10ng/ml 농도에서 DNA합성의 증가를 보였으나 1ng/ml 농도에서는 억제작용을 나타냈다. 그러나 추출물 중에서 Pluronic F-68이 가장 높은 상피세포의 DNA합성 증가를 나타냈다(Table 1).

Table 1. Effect of natural extracts on the [³H] thymidine incorporation into DNA of epithelial cells

| Natural extracts | conc. | mean(%) |
|-------------------|---------------|---------|
| KGM | | 100.00 |
| EtOH(0.1%) | | 68.33 |
| DMSO(0.1%) | | 68.08 |
| DDW(10%) | | 85.83 |
| Centella asiatica | 10 μ g/ml | 74.17 |
| | 1 μ g/ml | 87.67* |
| Scutellariae | 10ng/ml | 88.78* |
| Radix | 1ng/ml | 97.22* |
| Ginseng protein | 10 μ g/ml | 96.13* |
| | 1 μ g/ml | 66.78 |
| Pluronic F-68 | 10 μ g/ml | 118.17* |
| | 1 μ g/ml | 150.00* |
| PDGF | 10ng/ml | 54.16 |
| | 1ng/ml | 82.74 |
| IGF | 10ng/ml | 98.96* |
| | 1ng/ml | 62.06 |

2. 수종의 약제가 치주인대세포 활성에 미치는 영향

Centella asiatica는 1mg/ml 및 100 μ g/ml 농도에서 용매인 ethanol에 비해 치주인대세포의 활성을 감소시키는 것으로 나타났다. Scutellariae Radix는 10ng/ml 및 100ng/ml 농도에서 용매인 DMSO에 비해 치주인대세포의 활성을 약간 증가시켰다. Ginseng protein은 100 μ g/ml 및 1mg/ml 농도에서 용매인 DDW에 비해 치주인대세포 활성을 감소시키는 것으로 나타났다. Pluronic F-68은 100 μ g/ml 농도에서 치주인대세포의 활성을 증가시켰으나 1mg/ml 농도에서는 영향을 미치지 못했다. PDGF와 IGF는 사용한 모든 농도에서 치주인대세포의 활성을 증가시키는 것으로 나타났다(Table 2).

3. 수종의 약제가 치은섬유아세포의 총단백질 합성 및 교원질 합성에 미치는 영향

Centella asiatica는 100 μ g/ml 농도에서 용매인 ethanol에 비해 치은섬유아세포의 교원질

Table 2. Effect of natural extracts on the activity of periodontal ligament cells

| Natural extracts | conc. | mean(%) |
|-------------------|----------------|---------|
| α -MEM | | 100.00 |
| EtOH(0.1%) | | 91.70 |
| DMSO(0.1%) | | 87.62 |
| DDW(10%) | | 91.70 |
| Centella asiatica | 1mg/ml | 84.67 |
| | 100 μ g/ml | 81.65 |
| Scutellariae | 100ng/ml | 94.05* |
| Radix | 10ng/ml | 91.17* |
| Ginseng protein | 1mg/ml | 84.72 |
| | 100 μ g/ml | 80.34 |
| Pluronic F-68 | 1mg/ml | 94.76* |
| | 100 μ g/ml | 103.93* |
| PDGF | 100ng/ml | 103.52* |
| | 10ng/ml | 101.97* |
| | 1ng/ml | 91.27 |
| IGF | 20ng/ml | 106.90* |
| | 10mg/ml | 101.77* |
| | 1ng/ml | 99.52* |

합성의 증가를 보였으나 10 μ g/ml 농도에서는 교원질합성의 감소효과가 크게 나타났다. Scutellariae Radix는 10ng/ml 및 100ng/ml 농도에서 치은섬유아세포의 교원질합성의 높은 증가를 보였다. Ginseng protein은 100 μ g/ml 농도에서 교원질합성에 영향을 미치지 않았으나 10 μ g/ml 농도에서는 교원질합성의 감소효과가 크게 나타났다. Pluronic F-68, PDGF 및 IGF는 사용한 모든 농도에서 치은섬유아세포의 교원질합성을 감소시켰다. 총단백질 합성에 있어서는 100ng/ml 농도의 Scutellariae Radix, 20ng/ml 및 10ng/ml농도의 IGF가 단백질합성의 증가를 나타냈다. 그러나 다른 추출물에서는 단백질합성의 감소효과가 나타났다(Table 3).

4. 수종의 약제가 cytokine생산에 미치는 영향

Centella asiatica, Scutellariae Radix, Ginseng protein 및 Pluronic F-68은 LPS에 의한 IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 의 생산에 대해 억제효과를 나타냈다. 모든 추출물이 대조군에

Table 3. Effect of natural extracts on synthesis of collagen and total protein

| Natural extracts | conc. | collagen (cpm/well) | total protein (cpm/well) |
|-------------------|----------------|------------------------|-----------------------------|
| α -MEM | | 1441.50 | 10861.00 |
| EtOH(0.1%) | | 1406.75 | 9119.00 |
| DMSO(0.1%) | | 1406.25 | 10270.00 |
| DDW(10%) | | 1401.50 | 8800.80 |
| Centella asiatica | 100 μ g/ml | 1433.75* | 8094.25 |
| | 10 μ g/ml | 830.00 | 6487.80 |
| Scutellariae | 100 ng/ml | 1901.50* | 10665.00* |
| Radix | 10 ng/ml | 1620.00* | 9616.25 |
| Ginseng protein | 100 μ g/ml | 1395.75 | 5195.00 |
| | 10 μ g/ml | 637.00 | 3733.00 |
| Pluronic F-68 | 100 μ g/ml | 755.00 | 5910.00 |
| | 10 μ g/ml | 665.50 | 6068.25 |
| PDGF | 100 ng/ml | 1036.75 | 8784.00 |
| | 10 ng/ml | 962.30 | 8378.30 |
| IGF | 20 ng/ml | 1004.50 | 9736.75* |
| | 10 ng/ml | 972.50 | 9265.00* |

Table 4. Effect of natural extracts on production of IL-1 β , IL-6 and TNF- α

| Natural extracts | IL-1 β (pg/ml) | IL-6 (pg/ml) | TNF- α (pg/ml) |
|--------------------|----------------------|--------------|-----------------------|
| α -MEM | 210.0 | 60.0 | 129.0 |
| LPS | 232.5 | 592.0 | 387.3 |
| Centella asiatica | 207.5 | 403.0 | 304.0 |
| Scutellariae Radix | 202.5 | 459.0 | 280.7 |
| Ginseng protein | 207.5 | 409.0 | 268.7 |
| Pluronic F-68 | 210.0 | 407.0 | 287.0 |

비해 IL-1 β 생산을 감소시켰다. 그러나 IL-6 및 TNF- α 에서는 대조군에 비해 높은 IL-6의 생산을 증가시켰다. IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 의 생산에 대해 각 추출물간에 큰 차이를 보이지 않았다(Table 4).

IV. 총괄 및 고찰

치주질환 치료의 궁극적인 목표가 치주질환으로 인해 파괴되어 소실된 치주조직의 원상회복으로 볼 때 치주조직의 재생을 촉진하는 물질에 대한 연구는 매우 유익할 것으로 생각된다.

PGF는 단독 또는 복합적으로 고유의 세포면 수용기에 결합함으로써 세포증식을 촉진하는 생물학적 매개물질이다. PDGF와 IGF는

치유중인 상처부에서 다양한 요소들의 형성을 촉진하는 것으로 보고되었다. PDGF는 간엽조직의 세포에 대해 세포분열 및 주화성을 높여주고 단백질 합성을 촉진시킨다. 혈소판의 알파과립에 저장되었다가 혈액응고시 상처부위로 유리되며, 그 후에는 대식세포에 의해 국소적으로 합성될 수도 있다^{11,23)}. PDGF는 IGF와 함께 존재시 단독으로 작용할 때보다 세포분열 및 단백질합성의 높은 증가를 보였다²⁴⁻²⁷⁾.

교원질은 신체에 전반적으로 광범위하게 분포된 독특한 amino acid 성분과 분자구조를 가진 구조적인 단백질의 집단이다. 이것은 10개의 구성요소(type I-X)가 확인되었고 각각은 유전적, 화학적 및 면역학적으로 구별된다. 교원질은 결합조직 내에서 가장 두드러진 세포인 섬유아세포로부터 만들어진다.

상피세포의 DNA 합성 및 치주인대 세포의 활성화에 Pluronic F-68의 효과가 있는 것은 Fitzpatrick의 보고¹⁵⁾와 연관지어볼 수 있다. Pluronic F-68을 사용했을 때 초기에는 상처 강도가 조금 낮았으나 96시간 후에는 상당히 증가된 상처부강도를 볼 수 있었다. 아직 정확한 작용기전은 밝혀지지 않았으나 모세혈관의 혈행을 증가시키고 혈액 점성도를 감소시킨다고 보고되었다. 산소-헤모글로빈 곡선을 외상부의 혈관재생성을 증가시키는 쪽으로 전환시 작용하는 것으로 추측할 수 있다. 이러한 사실에 비추어 볼 때 Pluronic F-68은 초기 상처부위를 강화시키므로써 치주치료에 효과를 얻을 수 있을 것으로 생각된다.

*Centella asiatica*는 상피세포의 DNA 합성을 증가시키나 치주인대세포의 활성을 증가시키지 못하는 것으로 보아, 창상, 화상, 욕창 및 궤양 치료제로 적합한 것으로 추정된다. 이에 반해 *Scutellariae Radix*는 상피세포의 증식 및 치주인대세포의 활성을 증가시키는 것으로 보아 치주조직의 재생촉진제로서 좋은 조건을 갖고있는 것으로 생각된다.

치은섬유아세포의 증식에서 IGF의 효과는 앞에서 언급한 PGF의 작용으로 생각되며 *Scutellariae Radix*는 교원질 및 총단백질 합성을 증가시켰다. *Scutellariae Radix*의 성분은 baicalin(4.3%), baicalein, wogonin-glucuronide, skullcapflavone I, II 등의 flavonoids계이다. 약리작용을 살펴보면 *Scutellariae Radix* 엑스는 해열, 담즙분비 촉진, 위산분비 억제, 동맥경화 방지작용을 나타내고 baicalin과 baicalein은 I형 알러지 질환에 유효하며, baicalin부분에 antianaphylactic activity가 있는 papaverine에 유사한 작용이 있으며 disodium baicalein-6-monophosphate는 항염효과가 있고 antiallergic factor가 있다. *Scutellariae Radix* flavonoids는 과산화 지질형성의 억제작용, 항혈전작용, arachidonate대사, cyclic AMP phosphodiesterase에 대한 저해작용, 항염증작용, 인푸렌자 바이러스인 sialidase에 대한 저해작용 및 항인푸렌자 바이러스 작용이 있는 것으로 알려져

있다^{28,29,30)}.

Cytokine은 면역체제와 관련된 세포들에 의해 만들어지는 non-immunoglobulin substrate로서 parasite의 제거나 손상된 조직의 재생을 증진시키는데 영향을 주는 것으로 알려져 있다: 특히 치주질환에 영향을 미치는 cytokine으로 IL-1과 IL-6, TNF 등이 많이 알려져 있다^{31,32)}. 이러한 cytokine은 macrophage와 T-cell에 의해 주로 만들어진다. 이외에도 섬유아세포, 상피세포, 각화세포 등이 IL-1과 IL-6를 생산하고, NK 세포가 TNF- α 를 분비한다. IL-1과 TNF- α 는 파골세포를 활성화시켜 골흡수를 일으키고 신생골의 생성을 억제한다^{33,34,35)}. IL-1은 collagenase 합성을 유도하고 IL-6는 B cell stimulatory factor-2로 알려져 있다. 섬유아세포는 IL-1, IL-6, IL-8, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor 및 interferon- β 등의 cytokine을 만들어 낼 수 있다. LPS가 면역세포나 염증세포를 자극하여 만들어진 cytokine은 LPS가 섬유아세포를 자극할 때 IL-1을 생성할 수 있는 기폭제 역할을 한다. 이렇게 만들어진 IL-1은 다시 섬유아세포를 자극함으로써 교원질, 다른 기질, collagenase, PGE 2, IL-1, IL-6, IL-8 및 colony stimulating factors를 만들어낸다. 이러한 cytokine은 치주조직에서 염증세포와 면역세포를 활성화시키므로써 치조골 파괴를 일으킬 수 있다³⁶⁻⁴⁰⁾. IL은 염증시 GCF내에서 발견되고, 성인성 치주염 환자의 치조골 흡수를 자극하는 것으로 알려져 있으며 치은섬유아세포 PGE₂의 증가와 치주조직의 섬유아세포에 존재하는 procollagen내 mRNA의 증가와 치주염과의 관련성도 보고되었다.

Cytokine과 성장인자(EGF, TGF- α , TNF- α , IL-1 β)가 상피세포를 자극함으로써 type I과 IV 교원질을 분해할 수 있는 효소를 만들어 낸다^{41,42,43)}. 각화세포에서 matrix metalloproteinase를 자극하는 성인인자와 cytokine은 치은의 급성염증 상태나 치유과정에서 국소적으로 만들어진다. 치주염 환자에서 채취한 치은열구액에 높은 농도의 IL-1 α 와 IL-1 β 가 있는 것으로 보고되었다.

본 연구에서는 IL-1 β kit를 이용하여 생약 추출물들이 IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 의 생산 억제정도가 어느정도인지를 알아 본 바, 대조군에 비하여 cytokine생산을 증가시켰으나 LPS에 비해서는 cytokine 생산억제 효과가 있는 것으로 나타났다. Scutellariae Radix의 cytokine 생산 억제효과는 disodium baicalein-6-monophosphate의 항염작용, arachidonate 대사와 항인플루엔자바이러스작용등과 연관지어 생각해 볼 수 있다. 이상의 결과에서 치주조직의 재생에 관련된 세포들에 대한 약제들의 작용을 볼 때 치은상피세포, 치은섬유아세포, 치주인대세포의 증식에 좋은 반응을 보인 Scutellariae Radix는 치주치료 보조제로서의 사용가능성을 보여주었다고 할 수 있다. 이러한 작용을 나타내는 성분 만을 분리추출하여, 치주조직에 미치는 영향에 대해 보다 깊은 연구가 필요할 것으로 생각된다.

V. 결 론

치주질환의 진행에 의해 파괴된 치주조직의 재생에 영향을 줄 수 있는 생약추출물들의 효과를 관찰하기 위해 건강한 치은조직으로부터 치은섬유아세포, 치은상피세포 및 치주인대세포를 분리배양하여 Ginseng protein, Pluronic F-68, Scutellariae Radix, . centella asiatica, PDGF 및 IGF가 각 세포의 DNA합량, 총단백질 합성과 교원질 합성능 및 cytokine 생산에 미치는 영향을 연구하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 1 μ g/ml 농도의 Centella asiatica와 10 μ g/ml 농도의 Ginseng protein에서 치은상피세포의 증식을 유도하였고 Scutellariae Radix는 1ng/ml 및 10ng/ml 농도에서 상피세포의 증식을 일으켰다.
2. PDGF, IGF, Pluronic F-68 및 Scutellariae Radix는 치주인대 세포의 활성을 증가시켰다.
3. Scutellariae Radix는 비교적 높은 교원질 합성 증가를 보였으나 다른 추출물들은 영

향을 미치지 못했다.

4. IGF 와 Scutellariae Radix는 총 단백질 합성의 증가를 보였다.

REFERENCES

1. 서조영, 박준봉 : 치주인대세포와 치은섬유아세포의 성장에 관한 비교. 대한구강생물학회지, Vol.15, 118-122, 1991.
2. Sporn, M.B. and Roberts, A.B.: Peptide growth factors and inflammation, tissue repair, and cancer.: J. Clin. Invest., 78:329, 1986.
3. Gospodarowicz, D. and Moran, J.S.: Growth factors in mammalian cell culture. Annu Rev Biochem 45:53, 1976.
4. Antoniades, H.N., and Owen, A.J.: Growth factors and regulation of cell growth. Annu Rev Med 33:445, 1982.
5. Schreiber, A.B., Kenney, J., Kowalski, W., et al.: Interaction of endothelial cell growth factor with heparin: Characterization by receptor and antibody recognition. Proc. Natl. Acad Sci USA 82:6138, 1985.
6. Terranova VP, Wikesj UME. Extracellular matrices and polypeptide growth factors as mediators of functions of cells of the periodontium. J Periodontol 58:371-380, 1987.
7. Lynch SE, Williams RC, Polson A M, et al.: A combination of platelet-derived growth factor and insulin-like growth factors enhance periodontal regeneration. J Clin Periodontol 16:545-548, 1989.
8. Antoniades, H.N., and A.J. Owen.: Human platelet-derived growth factor In Hormonal proteins and Peptides. C.H.Li. editor.

- Vol. 7. Academic press., Inc., New York, 231-277, 1984.
9. Canalis, E.: Effect of platelet-derived growth factor on DNA and protein synthesis in cultured rat calvaria. *Metabolism*, 30: 970, 1981.
 10. Deuel, T.F. and Huang, J.S.: Platelet-derived growth factor: structure, function, and roles in normal and transformed cells. *J Clin Invest.* 74:669, 1984.
 11. 김기숙, 고성희, 백정화, 민병무, 김관식, 정동균 : Platelet-derived growth factor가 백서 두개관 세포군의 증식 및 교원합성에 미치는 영향. *대한구강생물학회지*, Vol.15, No.2, 1991.
 12. B.D. Fitzpatrick, D.M.D., U.S. Army Dental Activity, Fort Gordon. GA.: Enlargement of early wound healing with pluronic polyols F-68 and F-127.
 13. Fujimori R.: The effect of Madecassol ointment in wound healing. *Antenne Medicale* 7.3 (supplement) 1972 (41-42).
 14. Lawrence J.C.: The morphological and pharmacological effects of asiaticoside upon skin in vitro and in vivo. *Medical Research Council, England*, 1968.
 15. 현대석외 공저 : 생약학, 동명사. 서울 1988 : p235.
 16. Yasukawa, K., Takido, M, Takeuchi, M. and Nakagawa S.: Effect of chemical constituents from plants on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced inflammation in mice. *Chem. Pharm. Bull.* 37(4), 1071(1989)
 17. Kasai A., Okuda, H., and Arichi, S.: Studies on *Scutellariae Radix*, Effects of various flavonoids on arachidonate metabolism in leukocyte, *Planta Medica*, 51:132 (1985).
 19. Ryu, S., Ahn, B., and Pack, M.: The cytotoxic principle of *Scutellariae Radix* against L1210 cell, *Planta Medica*. 51, 462 (1985)
 20. Nyman S, Linde J, Karring, T, Rylander H.: New attachment following surgical treatment of human periodontal disease. *J Clin Periodontol* 9:290-296, 1982.
 21. Nyman S, Gottlow J, Linde J, Karring T, Wennstrom J.: New attachment formation by guided tissue regeneration. *J Periodont Res* 22:252-254, 1987.
 22. Egelberg J.: Regeneration and repair of periodontal tissues. *J Periodont Res* 233-242, 1987.
 23. Matsuda, N., Lin, W.L., N.M. Kumar, M.I. Cho, and R.J. Genco.: Mitogenic, chemotactic, and synthetic responses of rat periodontal ligament fibroblast cells to polypeptide growth factors in Vitro. *J Periodontol.* Vol. 63, 1992.
 24. Van Wyk, J.J.: The Somatomedins; Biological actions and physiologic control mechanisms. In hormonal proteins and peptides. C.H.Li. editor. Vol. 12. Academic press. Inc. New York, 81-125, 1984.
 25. Lynch, S.E., J.C. Nixon, R.B. Colvin, and H.N. Antoniades: Role of platelet-derived growth factor in wound healing: synergistic effect with other growth factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84:7696-7700, 1987.
 26. Ross. R.: Platelet-derived growth factor. *Annu. Rev. Med.* 38:71-79, 1987.
 27. Lynch, S.E., Colvin, R.B., and Antoniades, H.N.: Growth factors in wound healing; Single and synergistic effects on partial thickness porcine skin wounds, *J. Clin. Invest.* Vol. 84, 1989.
 28. Kimura, Y, Kubo, M. Tani. T, Arichis, Ohminami H, and Okuda H.: Studies on *Scutellariae Radix*.
 29. Effect on lipid metabolism in serum, liver and fat cells of rats. *Chem. Pharm. Bull.*,

- 29, 2308, 1991.
30. Antithrombic action of various flavonoids from *Scutellariae Radix*. *Chem. Pharm. Bull* 33(6) 2411 (1985).
 31. Akira S, T Hirano, T Taga and T Kishimoto: Biology of multifunctional cytokines: IL-6 and related molecules (IL-1 and TNF). *FASEBJ* 4:2860-2867, 1990.
 32. Hamblin AS *Lymphokines*, p1-71. Inmale (ed), In *Focus*, IPL Press, Oxford, 1988.
 33. Durum SK, JA Schmidt and JJ Oppenheim. Interleukin 1: An immunological perspective *Annu Rev Immunol* 3:263-287, 1985.
 34. Kunkel SL, DG Remick and RM strieter. Mechanisms that regulate the production and effects of tumor necrosis factor. *Critical Reviews in Immunology* 9:93-117, 1989.
 35. Kishimoto T and T Hirano. Molecular regulation of B lymphocytes response. *Annu Rev Immunol* 6:485-512, 1988.
 36. Huleihel M, A Douvdevani, S Segal and RN Apte. Regulation of interleukin-1 generation in immune-activated fibroblasts. *Eur J Immunol* 20:731-738, 1990.
 36. Huleihel M, A Douvdevani, S Segal and RN Apte. Regulation of interleukin-1 generation in immune-activated fibroblasts. *Eur J Immunol* 20:731-739, 1990.
 37. Kamagata Y, N Miyasaka, H Inoue, J Hashimoto and M Iida. Study of cytokine production in inflamed human gingival tissues in periodontitis. Interleukin-1 and tumor necrosis factor. *Jpn J Periodontol* 31:843-848, 1989.
 38. Kamagata Y, N Miyasaka, H Inoue, J Hashimoto and M Iida. Cytokine production in inflamed human gingival tissues-IL-6. *JPN J periodontol* 31:1081-1087.
 39. Masada MP, R Persoon, JS Kenney, SW Lee, RC Page and AC Allison. Measurement of interleukin 1 and 1 in gingival crevicular fluid: implications for the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontal Res* 25:156-163, 1990.
 40. Takada H, J Mihara, I Morisaki and Hamada. Induction of interleukin-1 and -6 in human gingival fibroblast cultures stimulated by *Bacteroides lipopolysaccharides* *Infect Immun* 59:295-301, 1991.
 41. Lin H-Y, Wells BR, Taylor RE and Birkedal-Hansen H. Degradation of type I collagen by rat mucosal keratinocytes. Evidence for secretion of a specific epithelial collagenase. *J Biol Chem* 262:6823-6831, 1987.
 42. Petersen MJ, Woodley DT, Stricklin GP and O Keefe EJ. Production of procollagenase by cultured human keratinocytes. *J Biol Chem* 262:835-840, 1987.
 43. Melcher AH and Chan J. Phagocytosis and digestion of collagen by gingival fibroblasts in vivo: a study of serial sections. *J Ultrastruct Res* 77:1-36, 1981.
 44. Masada MP, Persson R, Kenney JS, Lee SW, Page RC and Allison AC. Measurement of interleukin-1 and -1 in gingival crevicular fluid: implications for the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodont Res* 25: 129-192, 1990.

THE EFFECT OF NATURAL EXTRACTS ON CELL GROWTH AND CYTOKINE PRODUCTION

In - Cheol Ryu, Seong - Heui Son, Chong - Pyoung Chung, Ki - Hwan Bae*

Department of Periodontology, College of Dentistry, Seoul National University

**College of Pharmacy, Chung nam National University*

The native connective tissue attachment of the periodontium is known to be a complex consisting of gingival fibroblasts, periodontal ligament cells, gingival epithelial cells, cementum, alveolar bone and extensive extracellular matrix (collagen, glycoprotein and proteoglycans). The purpose of this study was to evaluate the effects of natural extracts on DNA, collagen and protein synthesis and inhibition of cytokine production in the gingival and periodontal ligament fibroblasts and gingival epithelial cells. Healthy gingival tissue was obtained from orthodontic treatment patients, and gingival epithelial cells, gingival fibroblasts and periodontal ligament cells were isolated and cultured from the samples. After treated with Ginseng protein, Pluronic F-68, Scutellariae Radix, centella asiatica, PDGF, IGF, DNA synthesis, total protein and collagen synthesis, and cytokine production of gingival epithelial cell, gingival fibroblast and periodontal ligament cells were measured. MTT method for DNA synthesis, Peterkofsky and Dingerman method for total protein and collagen synthesis, and IL-1 ELISA kit for cytokine production were used.

The proliferation of epithelial cells was enhanced in Centella asiatica, Ginseng protein, Pluronic F-68 and Scutellariae Radix. The activities of PDL cells were increased in PDGF, IGF, and Pluronic F-68. Higher collagen synthesis was observed in Scutellariae Radix and total protein synthesis was increased in Scutellariae Radix and PDGF. The inhibitory effects on IL-1, IL-6, TNF- α were observed in all extracts.

Key word: natural extracts, cytokine, gingival fibroblast, gingival epithelial cell, periodontal ligament cell, collagen synthesis, total protein synthesis.