

## 대조 추출물분획이 치은 섬유아세포의 생물학적 활성화에 미치는 영향

서울대학교 치과대학 치주과학교실<sup>1</sup>, 충남대학교 약학대학<sup>2</sup>  
양창호<sup>1</sup> · 이용무<sup>1</sup> · 조기영<sup>1</sup> · 배기환<sup>2</sup> · 정종평<sup>1</sup>

### I. 서 론

치주질환은 치아를 둘러싸고 있는 치주인대, 치조골 및 치은조직의 염증에 의한 조직파괴와 골조직의 흡수, 이로인한 치아의 동요 및 탈락을 야기하는 질환을 말한다. 치주질환은 사춘기에 발생하는 국소유년형, 청년기에 급속히 발생하여 많은 치아의 탈락을 야기시키는 급속진행형, 재생 및 수복이 어려운 재발성치주염, 성인에서 만성으로 조직파괴를 야기하는 성인형 치주염 등으로 나뉜다. 이러한 치주염은 그 원인이 치근면에 부착된 치주병인균의 독소에 의하여 유발되며<sup>1-5)</sup> 이들 병인균의 조직내 침투에 의해 더욱 깊이 진행된다. 독소 및 병인균의 염증유발과 면역반응의 진행으로 여러 염증물질과 면역반응물질이 조직내에 유출되면서 치주조직의 파괴는 급, 만성으로 진행되게 된다. 따라서 치주질환의 예방 및 치료에 있어서는 치주병인균의 성장억제, 살균 및 이들 세균에 의하여 기시되는 염증 및 면역반응의 매체물질생산 억제 및 치주조직 세포 활성화에 따른 조직재생 물질의 생산강화가 그 초점이 된다. 치주병인균의 성장억제 및 살균작용은 항생제 및 살균작용을 가진 생약제제를 이용한 화학요법을 이용하고 있다. 염증 및 면역반응 매체물질 생산억제는 많은 비스테로이드성 항염제를 주축으로 사용하고 있다. 그러나 이러한 비스테로이드성 항염제는 주로 세포가 생산하는 염증매체 물질인 PGE<sub>2</sub>의 생산차단<sup>6)</sup>에 그 기본을 두고 있다. 그러나 최근의 연구에서 이 PGE<sub>2</sub>의 생산이 면역반응 물질인 IL-1β에

의해 자극되는 것<sup>6-10)</sup>이 알려져서 이 IL-1β의 세포생산을 억제하는 연구<sup>11)</sup>가 활발하다. 또한 세균 및 혈액세포 중 특히 다형핵백혈구와 대식세포는 콜라젠 분해효소를 만들어서 조직내 콜라젠 파괴를 기시하고 있다.

따라서 PGE<sub>2</sub>의 생산억제제로서는 주로 비스테로이드성 항염제제인 Indomethacin, Flurbiprofen, Naproxen 제제등이 사용되고 있으나 생약제제로 이러한 효능, 효과를 위하여 개발된 것이 없다. 또한 PGE<sub>2</sub>, IL-1β생산억제와 collagenase생산억제를 동시에 효과적으로 행할 수 있는 생약제제의 발견은 이루어지지 못하고 있다. 치주치료에 있어서 골조직 및 치주인대 조직의 재생을 그 주안점<sup>12)</sup>으로 두고있는데 이중 골조직 재생은 골형성유도인자 및 골대사 조절인자에 의하여 주로 관여되고 있으며 또한 골재생은 골대사시 콜라젠형성 촉진의 영향을 크게 받는다고 본다. 치주인대 조직재생은 치주인대 섬유아세포의 세포활성화 및 콜라젠 합성촉진이 주안점으로 야기되고 있는바 이에 대한 세포 성장촉진인자로 알려진 혈소판 유도성장인자(PDGF-BB) 및 인슈린형 성장인자(IGF)에 대한 연구<sup>12-16)</sup>가 많이 진행되고 있다. 그러나 이러한 제제는 생체내에서 만들어지는 성장인자로서 현재는 실험동물이외에는 사용이 금지되고 있다. 치주질환의 예방 및 치료제에 대한 개발에서 치주병인균의 제거를 위한 항균제 개발을 제외한 항염제 및 치주조직 재생제에 대한 생약추출물에서의 연구가 활발히 진행되어 있으며 몇몇 생약 추출물들은 상품화되어 있다. 그러나 이런 물

\* 본 논문은 1993년도 서울대학교 병원 임상연구비(02-93-232)지원에 의한 결과임.

질들의 생물학적 연구결과는 우리가 얻고자 하는 결과에 미흡한 단계이다.

본 연구는 여러 생약물질중 대추 추출물의 치은 섬유아세포에 대한 생물학적 활성화와 기타 작용에 미치는 연구를 통하여 일차적인 영향력을 조사하였고 이 생약성분을 각종 방법으로 유효성분을 추출하여 치주조직재생에 영향을 끼치는 콜라겐 형성이나 단백질합성능력 세포활성도에 끼치는 효과, 세균의 콜라겐분해 효소의 억제작용에 미치는 효과 및 세포의 II-1 $\beta$  및 PGE<sub>2</sub> 생산에 미치는 영향을 밝히고자 하는데 그 목적이 있다.

## II. 연구재료 및 방법

### 1. 연구재료

약제의 준비 및 대추(Zizyph Fructus)의 분획과정

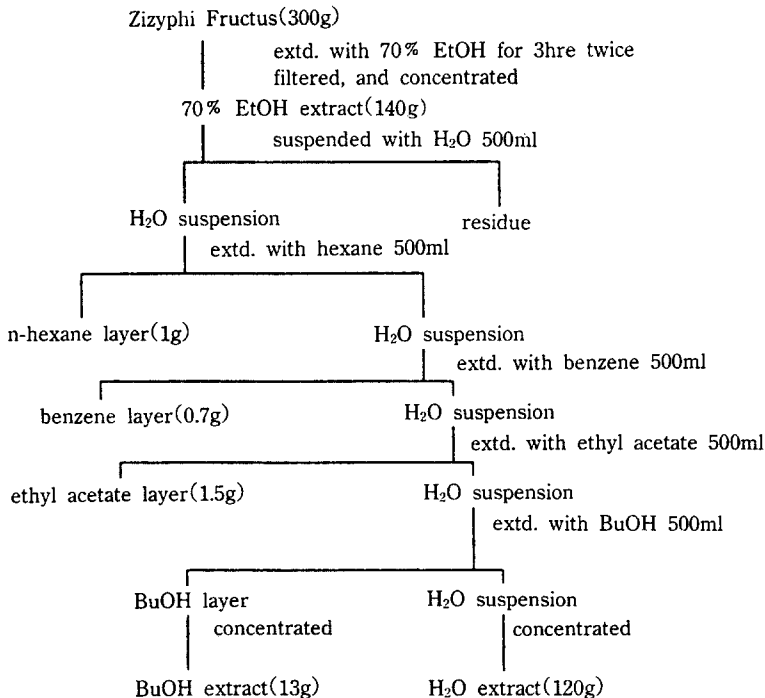
대추(Zizyph Fructus) 300g을 70% EtOH로 수욕상에서 3시간씩 2회 환류, 추출한다. 추출되어진 EtOH용액을 여과, 여액을 감압농축하여 EtOH extract (140g)를 얻는다. EtOH extract(140g)를 증류수 500ml에 현탁, 증류수현탁액을 만든 후 이것에

Hexane 500ml로 3회 진탕 추출하여 Hexane fraction을 얻는다. 이것을 농축하여 Hexane extract(1g)를 얻는다. 남아있는 증류수 현탁액에 benzene 500ml로 3회 진탕 추출하여 benzene fraction을 얻고, 이것을 농축하여 benzene extract(0.7g)을 얻는다. 계속하여 남아있는 증류수현탁액의 ethyl acetate 500ml로 3회 진탕 추출하여 ethyl acetate fraction을 얻고, 이것을 농축하여 ethyl acetate extract(1.5g)을 얻는다. 계속하여 남아있는 증류수현탁액에 BuOH 500ml로서 3회 진탕 추출하여 BuOH fraction을 얻고, 이것을 농축하여 BuOH extract(13g)을 얻는다. 마지막으로 남아있는 증류수현탁액을 농축하여 H<sub>2</sub>O extract(120g)를 얻는다.

### 2. 연구방법

#### 2-1. 세포배양

세포배양을 위하여 여러가지 표본채취방법이 시행<sup>19,20)</sup>되고 있다. 본 실험에서도 서울대학병원에 교정 치료를 위하여 내원한 환자를 대상으로 제일 소구치의 치은 부위를 채취하였다. 채취직전에 큐렛을 이용하여 치석 및 치태등을 제거하고 생리 식염수로 여러번 씻어 내었다. 국소마취를 실시하고 치간부



위에 내사면 절제를 가한다음 정상치은조직을 채취 하였다. 채취한 조직편을 100U/ml Penicillin과 100 µg/ml Streptomycin이 첨가된 α-MEM 생검배지에 침수 시켰다. 채취된 치은조직을 약 1mm<sup>2</sup>로 세절한 다음 35mm세포배양 접시에 고르게 분산시켜 100U/ml Penicillin과 100µg/ml Streptomycin 및 10% FBS가 첨가된 α-MEM을 이용하여 세포배양을 시행하였으며 3일 간격으로 배양액을 교환해 주면서 5세대 배양시켰다. 배양시 습도는 95%, 온도는 37℃를 유지하면서 95%의 공기와 5%의 CO<sub>2</sub>를 계속 공급하였다.

## 2-2. 교원질 분해효소억제능역 측정

### 2-2-1. Crude Enzyme의 추출

Crude Enzyme은 Ono의 방법<sup>21)</sup>을 약간 변형하여 추출하였다.

1ml당 hemin 5µg과 menadione 0.5µg이 첨가된 Trypticase soy broth(BBL)에 3일간 37℃의 혐기성 배양기(10% CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>, and 80% N<sub>2</sub>)에서 P.gingivalis (W50)를 배양하였다. 이 세포들은 12,000xg에서 20분 동안 원심 분리를 통해 제거되고 그 상층액을 침전시켜 최종농도가 80% 되게 한다. 침전물은 12,000xg에서 20분 동안 원심분리하여 2mM CaCl<sub>2</sub>를 포함하는 Tris-HCl buffer(pH 7.5) 50mM 30ml에 용해시킨다. 이 부유액을 같은 buffer에 완전히 투석시키며 투석된 crude enzyme은 0.22µm filter에 통과 시켜 본 연구에 사용하였다.

2-2-2. 생약 추출물의 교원질 분해효소억제에 관한 분석.

교원질분해효소 억제능력측정은 Nagai등<sup>22)</sup>의 Collagenkit CLN-100(Collagen Technological Co.)를 사용하여 결정하였다.

분석할 혼합물은 50mM Tris-HCl buffer(pH 7.5) 0.1ml와 brown tube에서 0.05% fluoresceinisothiocyanate(FITC)-conjugated collagen type I으로 구성된 substrate solution 0.2ml로 이루어져 있다. 효소 반응은 crude enzymes 0.2ml를 각각 첨가하여 실행한다. blank실험 및 표준실험에서는 5mM CaCl<sub>2</sub>를 함유한 50mM Tris-HCl buffer(pH 7.5)를 crude enzyme대신 사용하였다. 분석하고자 하는 이들 제제의 혼합물들은 35℃에서 120분 동안 배양하였다. 양성 대조 실험제제로는 혈소판 유도성장인자(PDGF-BB)

및 인슈린형 성장인자(IGF)를 사용하였다. 이 반응은 50% ethanol에 80mM o-phenanthroline 10ul를 첨가하여 중단시킨다. 그리고 나서 이 혼합물을 37℃에서 60분간 더 배양하였고 표준튜브는 80℃에서 10분간 가열하였다. 70% ethanol 0.5mM을 첨가한 후 각 혼합물을 흔들고 나서 바로 3,000rpm에서 10분간 원심분리 하였다. 부유물의 형광정도(Fluorescence Intensity : F1)는 520nm(Em)/495nm(Ex)에서 spectrofluorophotometer로 측정하였다. collagenase activity(U/ml)는 다음의 공식에 따라 계산 하였다.

$$1U = \frac{F1 \text{ enzyme} - F1 \text{ bland}}{F1 \text{ standard} - F1 \text{ bland}} \times 100(\mu\text{g})$$

$$\times \frac{1}{120(\text{min})} \times \frac{1}{0.2(\text{ml})}$$

위 공식에서 1U는 분(min)당 1µg의 교원질을 소화하는 것을 나타낸다.

## 3. 치은섬유아세포의 세포활성도에 미치는 효과 측정

세대배양한 치은섬유아세포를 0.25% Trypsin-EDTA용액으로 처리한 후 원심분리하여 배양액으로부터 세포부유액을 만들고 표준혈구 계산기로 well당 1×10<sup>5</sup>개의 세포수가 되게하여 접종 후 배양하였다. 다음날 배양액을 교환하고 이틀째 되는 날 배양액을 제거한 후 HBSS로 세척하였다. 양성대조 실험제제인 혈소판 유도성장인자(PDGF-BB) 및 인슈린형 성장인자(IGF)는 증류수를 용매로 하고 대조 추출물은 DMSO를 용매로 하여 녹인다음 각 추출물과 배양액이 200µl가 되게 하였다. 이들은 습도는 95%, 온도는 37℃를 유지하면서 95%의 공기와 5%의 CO<sub>2</sub>를 계속공급하면서 24시간 배양하고 배양이 끝난 후 생리식염수에 용해한 MTT(methyl thiazol-2-YL-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide)용액 50µl를 각 well에 넣고 4시간동안 배양한 후 MTT용액을 제거하고 formazon 결정을 용해시키기 위해 DMSO를 50µl씩 첨가하였다. Plate를 잘 흔든 후 ELISA reader(THERMO max, Molecular devices, 미국)로 570nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군

으로는 매실험마다 실험용액이 들어있지 않은  $\alpha$ -MEM배양액 well을 사용하였다. 모든 실험결과를 대조군에 대한 백분율로 계산 하였다.

#### 4. 치은섬유아세포의 총단백질 및 교원질 합성능력에 미치는 효과측정

사람 치은섬유아세포를 24-well plates(Corning 사, 미국)에 well당  $1 \times 10^5$ 개의 세포를 접종한 다음 10% FBS가 함유된  $\alpha$ -MEM에서 3일간 배양한 후 배양액을 제거하고 PBS로 세척하였다. 그 후 50 $\mu$ g/ml ascorbic acid와 50 $\mu$ g/ml  $\beta$ -aminopropionitril이 함유된  $\alpha$ -MEM으로 교환한 다음 2uCi[ $^3$ H]-proline과 대조추출물, 혈소판 유도성장인자(PDGF-BB), 인슈린형 성장인자(IGF)를 첨가한 배양액으로 세포를 배양하였다. 24시간이 경과한 후 생성된 총 단백질과 교원질양을 Peterkofsky와 Diegelmann(1971) 방법으로 측정하였다. 간단히 설명하면 각 well에 250 $\mu$ l의 5 $\times$ collagenase buffer (0.25M Tris, 0.025M CaCl $_2$ 와 0.012M N-ethylmaleimide 함유, pH 7.4)를 첨가하고 얼음위에 놓고 30초간 초음파 분쇄기로 세포막을 파괴시킨후 세포균질액 1ml에 5mg/ml BSA, 200 $\mu$ l와 50% trichloroacetic acid/5mM proline 300 $\mu$ l를 첨가한 후 잘 혼합하여 0 $^\circ$ C에서 5분간 방치한 다음 1000 $\times$ g에서 5분간 원침하여 상층액을 버리고 5% TCA/mMproline으로 3회 세척하였다. 침전물 0.2 N NaOH에 용해 시킨 후 1M N-2-Hydroxyethyl piperazine-N-2-ethanesulfonic acid 완충액(Sigma, U. S. A.,이하 HEPES완충액 (pH 7.2)로 표기)를 첨가하여 중화시킨 후 5 $\times$ collagenase완충액 100 $\mu$ l를 첨가하였다. Microfuge tube에 각 용액을 반으로 나누어 넣은 후 교원질 합성량을 측정하기 위한 microfuge tube에 15U collagenase가 함유된 collagenase buffer를 15 $\mu$ l 주입하고 총단백질 합성량을 측정하기 위한 microfuge tube에는 15U collagenase가 함유되지 않은 collagenase buffer를 15 $\mu$ l 주입하여 37 $^\circ$ C에서 90분간 배양한 다음 collagenase 활성도를 정지시키기 위해 0 $^\circ$ C로 냉각 시키고 각 tube에 50% TCA/2.5% tannic acid를 첨가하여 4 $^\circ$ C에서 30분간 방치하였다. 교원질 합성량을 측정하기 위해서는 collagenase가 함유된 microfuge tube를 1000 $\times$ g에서 5분간 원침 후 상층액과 5% TCA/1mM proline으로 세척한 세척액을 counting vial에 담아 10ml scintilla-

tion cocktail를 넣어 liquid scintillation dounter(Packard, U. S. A.)로 5분간 방사능을 측정하였다. 총 단백질양을 측정하기 위해서 collagenase가 함유되지 않은 microfuge tube를 100 $\times$ g에서 5분간 원침 후 상층액을 버리고 5% TCA/1mM proline으로 세척후 침전물을 0.2N NaOH로 세포를 용해시켜 counting vial에 담가 상기의 방법으로 방사능량을 측정하였다.

#### 5. 생약 추출물의 IL-1 $\beta$ 생성에 미치는 영향

##### 5-1. 단핵세포 분리배양

전신질환이 없는 건강한 성인으로부터 heparin을 항응고제로 사용하여 60-120ml의 정맥혈액을 채집하였다. 채집된 정맥혈액을 Histopaque-1077(Sigma사, 미국)을 이용한 밀도차 원침법(Fisher와 Koren)이용하여 단핵세포를 분리하였다. 분리된 단핵세포는 phosphate buffer solution(PBS)으로 2-3회 세척하여 10% fetal bovine solution(FBS), 100U/ml penicillin과 100 $\mu$ g/ml streptomycin이 함유된 RPMI 1640배지(GIBCO사, 미국)으로 95% 공기, 5% CO $_2$ , 100% 습도 조건하에서 무균적으로 배양하였다.

##### 5-2. 혈액단핵세포에서 생약추출물이 IL-1 $\beta$ 생성에 미치는 영향.

배양된 혈액단핵세포를 24well plate에 10 $^6$  cell/well로 분주하고 첨가물을 가지지 않은 RPMI 1640 배지를 대조군으로 하고 E.coli LPS(25 $\mu$ g/ml)를 첨가한 well과, LPS(25 $\mu$ g/ml)와 prednisolone(10nM/ml)을 첨가한 well 및 LPS(25 $\mu$ g/ml)와 각 생약추출물(10 $\mu$ l)첨가한 well을 실험군으로 하여 48시간 동안 부유배양 하였다. 배양후 각 세포부유액을 모아 400 $\times$ g으로 10분간 원침시키고 상층액을 모아 측정 전까지 -80 $^\circ$ C상태로 동결 보관하였다. 생산된 IL-1 $\beta$ 의 양은 thymocyte stimulation assay로 측정하였다. 4-6주된 C3H/HeJ mice를 희생시켜 thymus를 무균적으로 적출하여 PBS로 세척한 후 RPMI 1640 배지가 담긴 Petridish에 놓고 소독된 ground glass slide로 가볍게 비벼 부셨다. cell suspension을 10분간 100xg으로 원침시킨후 cell을 모아 신선한 배지로 10 $^7$ cell/ml로 cell suspension을 만들고 96 well plate에 10 $^6$  cell/well(100 $\mu$ l)로 분주하였다. 분주된 각 well에 앞서 준비된 sample을 각각 첨가하여 72시간 동안 무균적으로 배양하였다. 배양중 마지막

18시간전에  $0.5\mu\text{Ci}[3\text{H}]\text{-thymidine}$ 을 각 well에 첨가하여 배양시킨후 세포를 cell harvester(Skotron사, 미국)를 사용하여 모은후 filter disc를 건조시켜서 cocktail solution에 용해시키고 liquid scintillation counter(Beckman사, 미국)으로 방사능을 측정하였다.

5-3. 치은섬유아세포에서 생약추출물에 의한  $\text{PGE}_2$  생성에 미치는 영향

5회 내지 7회 계대배양된 치은섬유아세포를 24 well plate에  $\alpha\text{-MEM}$ 배지에서  $10^6$  cell/well(1/ml)로 분주한 후 rHuIL- $1\beta$ (Genzyme사, 미국) 1ng/ml을 첨가하여  $\text{PGE}_2$  생성을 유도하였는데, 아무런 첨가제를 가하지 않은 well을 실험군으로 하여 48시간동안 무균적으로 배양하였다. 배양후 각 well의 배지를 수집하여 배지내의  $\text{PGE}_2$ 를  $\text{PGE}_2$  enzyme immunoassay system(Amersham사, 영국)을 이용하여 ELISA reader로 450nm에서 비색정량하였다.

### III. 연구 성적

#### 1. 교원질 분해효소의 억제효과 측정

*P.gingivalis* crude enzyme을 이용하여 교원질 분해효과를 측정하였으며 crude enzyme의 교원질 분해활성에 대한 대조추출물 분획 및 Tetracycline의 억제효과는 시험물질이 없는 대조군의 억제정도와 비교하여 백분율로 표시 하였다(표1).

분해효소만을 사용한 대조군에서는  $2632.8 \pm 26.5$ 의 활성도를 보이는데 비해  $10\mu\text{g/ml}$ 의 농도의 Tetracycline에서는  $1565.4 \pm 27.3$ 의 활성도로 40.5%의 억제

효과를 나타내었고 *Zizyphi Fructus* 추출물은 약간의 차이가 있었는데 그중 Benzene Ext는  $1678.3 \pm 22.4$ 을 나타냄으로써 36.2%의 억제 효과를 보였다. 세 물질중 Tetracycline이 가장 큰 억제효과를 보였으나 대조추출물(*Zizyphi Fructus*)도 상당한 억제 효과를 보였는데 그중 Benzene Ext가 가장 큰 효과를 보였다.

#### 2. 세포활성도

세포활성도 관련 영향은 0.5% EtOH에서의 활성도를 100으로 하여 각각 물질의 효과를 백분율로 나타내었다(표2).

아무 물질을 섞지 않고 0.5% EtOH용액만의 효과를 대조군으로 하여 측정했을시 대조군의 세포활성도는  $96.8 \pm 4.7$ 를 나타내었고 PDGF, IGF는 각각  $110.5 \pm 5.8$ ,  $111.4 \pm 3.2$ 의 세포활성도를 보였으며 이는 각각 14.6% 15.6%의 세포활성증진 효과를 보인 것이다. 본 실험에서는, 세포활성촉진효과가 알려져 있는 PDGF, IGF에 비해 *Zizyphi Fructus*가 더 좋은 효과를 보였는데 그중  $\text{H}_2\text{O}$  추출물이  $130.6 \pm 4.2$ 로 31.3%의 활성증진으로 가장 큰 세포활성도 촉진효과가 있는 것으로 나타났다.

#### 3. 교원질 합성 능력과 총 단백질 합성능력에 대한 효과

교원질 합성 능력과 총 단백질 합성능력은 표3과 같다.

배지인  $\alpha\text{-MEM}$ 만에서의 교원질 합성 및 총 단백질 합성능력을 100으로 한 백분율로 나타낸 결과 교원질

표1. 대조추출물 분획의 교원질 분해활동 차단효과(N=4)

sample(10 $\mu\text{g/ml}$ )	activity(mU/ml)	inhibition(%)
control(P.g. enzyme only)	$2632.8 \pm 26.5$	—
P.g enzyme + Tetracycline HC1	$1565.4 \pm 27.3^*$	40.5
P.g enzyme + zizyphi Fructus		
70% EtOH Ext	$1742.2 \pm 21.1^*$	33.8
Benzene Ext	$1678.3 \pm 22.4^*$	36.2
BuOH Ext	$1795.5 \pm 18.2^*$	31.8
Hexane Ext	$1745.7 \pm 25.7^*$	33.7
Ethyl acetate Ext	$1695.4 \pm 31.5^*$	35.6
$\text{H}_2\text{O}$ Ext	$1731.6 \pm 17.3^*$	34.2

표2. 대조추출물의 세포활성도에 미치는 영향 (N=4)

sample(10 $\mu$ g/ml)	cell activity(%)	% increase
control (0.5% EtOH)	96.8 $\pm$ 4.7	0
Zizyphi Fructus		
70% EtOH Ext	123.1 $\pm$ 4.1*	28.1
Benzene Ext	117.2 $\pm$ 4.6*	21.9
BuOH Ext	115.5 $\pm$ 5.2*	19.7
Hexane Ext	120.7 $\pm$ 5.9*	25.0
Ethyl acetate Ext	124.3 $\pm$ 6.8*	29.2
H <sub>2</sub> O Ext	130.6 $\pm$ 4.2*	31.3
PDGF(100ng/ml)	110.5 $\pm$ 5.8*	14.6
IGF(20ng/ml)	111.4 $\pm$ 3.2*	15.6

표3. 대조추출물의 교원질 및 총 단백질 합성능력에 대한 영향

sample(10 $\mu$ g/ml)	Collaen synthesis (cpm/well)	% increase	total protein synthesis (cpm/ml)	% increase
control(a-MEM)	948.5 $\pm$ 23.3	—	6942.4 $\pm$ 176.5	—
Zizyphi Fructus				
70% ExOH Ext	1378.7 $\pm$ 82.4*	45.4	9324.7 $\pm$ 92.5*	34.3
Benzene Ext	1302.5 $\pm$ 58.6*	37.3	8958.5 $\pm$ 68.5*	29.1
BuOH Ext	1274.3 $\pm$ 78.2*	34.4	9116.3 $\pm$ 65.2*	31.1
Hexane Ext	1232.4 $\pm$ 93.2*	30.0	8814.2 $\pm$ 87.2*	27.0
Ethyl acetate Ext	1197.5 $\pm$ 42.4*	26.3	8795.5 $\pm$ 112.7*	26.7
H <sub>2</sub> O Ext	1268.3 $\pm$ 82.5*	33.8	8856.7 $\pm$ 83.6*	27.6
PDGF(100ng/ml)	1047.5 $\pm$ 86.3	10.4	8682.2 $\pm$ 121.4*	25.1
IGF(20ng/ml)	1026.7 $\pm$ 74.5	8.2	9147.4 $\pm$ 172.5*	31.8

\*P<0.05 significancy between control group and experimental group

합성에 있어서는 대조군인  $\alpha$ -MEM만의 948.5 $\pm$ 23.3에 비해 100ng/ml농도의 PDGF와 20ng/ml의 IGF는 1047.5 $\pm$ 86.3, 1026.7 $\pm$ 74.5로서 10.4%, 8.2%의 증가를 보였다. Zizyphi Fructus는 PDGF나 IGF과 유사한 교원질합성효과의 증진을 가져 왔으며 그중 70% EtOH Ext와 Benzene Ext가 가장 우수한 것으로 나타났다. 총 단백질 합성능력에서는 a-MEM만을 넣은 대조군에 비해 100ng/ml농도의 PDGF는 8682.2%121.4으로 25.1%, 20ng/ml의 IGF는 9147.4 $\pm$ 172.5으로 31.8%의 증가를 보였으며 Zizyphi Fructus 분획중 70% EtOH Ext는 9324.7 $\pm$ 92.5로써 34.3%의 가장 큰 증가를 보였으며 BuOH Ext는 9116.3 $\pm$ 65.2로 31.1%의 증가효과로써 IGF와 유사한 효과를 보였다.

#### 4. 대조추출물의 매체 생산억제 능력

##### 4-1. 대조추출물의 IL-1 $\beta$ 생산 억제효과(N=4)

말초 혈액단핵 백혈구로 부터의 IL-1 $\beta$  생산억제 효과를 실험한 결과 P.gingivalis 381의 LPS(내독소)로 자극시를 양성대조군으로 하여 비교한 결과 LPS와 Zizyphi Fructus를 동시에 투여하였을때 IL-1 $\beta$ 의 생산이 현저히 감소되고 있으며 LPS와 Prednisolone을 동시에 투여한 경우의 효과보다 더 우수하였다.

##### 4-2. 대조추출물의 PGE<sub>2</sub> 생산 억제효과(N=4)

치은섬유아세포를 IL-1 $\beta$ 로 자극하여 생산된 PGE<sub>2</sub>의 양을 양성 대조군으로 볼때 IL-1 $\beta$ 와 Zizyphi Fructus를 동시에 투여시 생산된 PGE<sub>2</sub>의 양은 대조군에 비하여 70% 이상 PGE<sub>2</sub> 생산억제 효과를 보인다.

4-1. 대조추출물의 IL-1 $\beta$  생산 억제효과(N=4)

sample(10 $\mu$ g/ml)	3H-thymidine incorporation(cpm)	% inhibition
control	282.2 $\pm$ 7.1	—
LPS(stimulater)	1283.5 $\pm$ 21.5	0
LPS+prednisolone	518.2 $\pm$ 22.5	60
LPS+ Zizyphi Fructus		
70% ETOH Ext.	386.1 $\pm$ 11.2	70
BuOH Ext.	402.7 $\pm$ 29.5	69
Benzene Ext.	413.6 $\pm$ 7.3	68
Hexane Ext.	421.3 $\pm$ 14.7	67
Ethyl acetate Ext.	394.5 $\pm$ 17.4	69
H <sub>2</sub> O Ext.	417.2 $\pm$ 11.1	67

P<0.05

4-2. 대조추출물의 PGE<sub>2</sub> 생산 억제효과(N=4)

sample(10 $\mu$ g/ml)	PGE <sub>2</sub> production(pg)	% inhibition
control(non-stimulate)	18.1 $\pm$ 1.8	—
IL-1 $\beta$ stimulation	62.4 $\pm$ 2.6	0
IL-1 $\beta$ + Indomeatacin(0.01%)	6.1 $\pm$ 0.4	90.2
IL-1 $\beta$ + Zizyphi Fructus		
70% ETOH Ext.	19.3 $\pm$ 1.6	69.8
BuOH Ext.	17.8 $\pm$ 0.9	71.3
Benzene Ext.	20.4 $\pm$ 1.4	67.1
Hexane Ext.	22.1 $\pm$ 2.1	64.4
Ethyl acetate Ext.	16.6 $\pm$ 1.6	73.3
H <sub>2</sub> O Ext.	25.3 $\pm$ 2.7	59.3

P<0.05

IV. 총괄 및 고안

치주질환의 일차적 원인으로는 치태내의 세균에 의한 것인데 이 세균내의 여러 성분중 LPS는 대식세포를 활성화 시켜 IL-1, TNF- $\alpha$ , Prostaglandin등을 생성하게 된다. IL-1 $\beta$ 은 염증부위의 세포를 많이 모이게 하며, 대식세포와 치은 섬유아세포를 자극하여 PGE<sub>2</sub>를 생성하며 이 PGE<sub>2</sub>는 혈관을 확장시키는<sup>23,24)</sup> 등 염증반응을 진행시키므로 강력한 염증전구성 물질이라 하겠다. 이렇게 염증의 진행으로 말미암아 파괴된 치주조직의 재생을 위하여 구연산<sup>25)</sup>이나 tetracyclin<sup>26)</sup>을 이용한 치근면치리로 부착도 증가나 합성골 대체물<sup>27,28)</sup>을 이용한 소실된 골조직의 재생

쪽에서 연구가 되어왔다. 완전한 부착의 형성을 위하여는 치주인대세포가 계재된 부착회복이 요구되며 이를 위해 Guided Tissue Regeneration쪽이 연구되고 있다.

이에 더하여 조직재생의 활성화를 위하여 Fibronectin<sup>29,30)</sup>이나 Growth factor를 이용하여 효과의 증진을 기하는 방향으로 연구되고 있다. PDGF-BB, IGF등은 치주인대 세포나 치은섬유아세포의 이주나 분열 촉진등에 큰 효과가 이는 것으로 알려져 있으며<sup>31)</sup> 그중 PDGF-BB가 더 큰 효과가 있으며 이는 세포막에 PDGF에 대한 수용체와 반응하여 이루어지는데<sup>32)</sup> 그중  $\beta$ -수용체는 화학주성반응에도 관여한다고 알려져 있다<sup>33)</sup>.

하나 Growth factor의 임상적용단계에는 아직 연구가 되어있지 않으며 다른 side effect에 대하여도 미지의 상태이고 상피나 모든 종류의 조직의 성장을 촉진함으로써 조직 특이성이 약간 결여 되고 있다. 이에 장기적인 관점에서 부작용이 적고 안전한 약물의 필요성이 요구된다 하겠다. 근래에 한방에서 사용되어져 오는 생약제제중에서 염증의 완화나 다른 부분에 효과가 알려져 있는 것을 중심으로 과학적인 접근을 위해 연구되고 있는데 장<sup>34)</sup> 등은 생약제제중 magnolol이나 holokiol등이 염증의 매개 물질인 cytokin의 생산억제를 보고하였으며 류<sup>35)</sup> 등도 생약제제의 cytokine생성 억제효과에 대하여 동일한 효과를 보고하고 있다. 조<sup>36)</sup> 등도 단핵세포를 LPS로 기시시킨후 여러약제가 IL-1 $\beta$ 억제 효과에 대하여 비교시 대조 추출물이 가장 좋은 효과를 나타내었다고 하였는데 그 결과는 본 실험결과와 유사성을 나타낸다. 조직재생의 관점에서 볼때 상피의 성장속도에 비해 치주인대세포의 성장촉진과 골조직세포의 성장촉진이 필요한데 본 실험에서는 천문동추출물과 대조추출물이 치주인대세포와 치은섬유아세포에 대해 Growth factor에 버금가는 성장촉진효과를 보이고 있다. 또한 천문동 추출물은 항염효과<sup>37)</sup>와 항균효과<sup>38)</sup> 그리고 항 간독성효과<sup>39)</sup>에 대하여 밝혀져 있으며 대조추출물도 항균효과, 항염효과 그리고 항진균효과<sup>40)</sup>를 보이고 있는 것으로 알려져 있다. 그러나 치주병원 인균에 대한 직접적인 항균작용에 대한 것이 아니며 치주영역에서 직접적인 항균작용에 대하여는 미지수이나 간접적으로 적용가능성에 대하여 생각해 볼 수 있는데 이는 차후에 치주원인균에 대한 연구가 요구되는 영역이다.

생약제제중 Magnolol과 Holokiol등이 chlorohexidine에 버금가는 치주원인균에 대한 항균효과를 나타내고 있고 Sangninarine, listerine<sup>®</sup> 몰약, 인삼사포닌 등도 항균효과에 대하여 알려져 있다<sup>41)</sup>. 이 생약제제가 chlorohexidine 보다는 약간 떨어지는 항균효과를 나타내지만 세포독성을 강하게 나타내는 chlorohexidine에 비해 세포성장 촉진효과가 있어 복합적인 면에서 더 좋은 효과를 기대할 수 있으며 또한 여러 생약제제사이의 길항작용을 살펴 봄으로써 몇가지 생약 제제의 동시 투여에 대한 가능성을 살펴보는것이 좋은 임상적 결과를 위해 필요하리라 사료되며 이로써 복합적인 효과의 증진을 기대할 수

있겠다. 치주인대세포나 치은섬유아세포의 성장촉진효과가 알려진 생약제제를 중심으로 임상적으로 투여 및 적용방향의 연구가 필요한 실정이며 각 세포에 대하여 화학주성효과에 대하여도 그 효과가 기대되고 있다.

## 참고문헌

- Gibbons, R. J. : Adhesion fo bacteria to the surface of the mouth, in microbial adhesion to surfaces, pp.351. Edited by R. C. W. Berceley, J. M. Lynch, J. Melling, P. R. Rutter and B. Vincent. Ellis Horwood, Coichester. 1980.
- Gillett, R. Johnson, N. W. : Bacterial invasion of the periodontium in a case of juvenile periodontitis. J. Clin. Periodontol. 9 : 93, 1982.
- Loesche, W. J. Syed, S. A., Laughon, B. E. Stoll, J. : The bacteriology of acute necrotizing ulcerative gingivitis. J. Periodontol. 53 : 223, 1982.
- Saglie, R., Newman, M. G., Carranza Jr., F. A. pattison, G. L. : Bacterial invasions of advanced periodontitis in humans. J. Periodontol. 53 : 217, 1982.
- Slots, J., Genco. R. J. : Black-pigmented bacteroides species, Capnocytophaga species and Actinabacillus actinomycetemcomitans in human periodontal disease : Virulences factors in colonization, survival and tissue destruction. J. Dnet. Res. 63 : 412, 1984.
- Masada MP, R Person, JS Kenney, SW Lee, RC Page and AC Allison. : Measurement of interleukin-1 and 6 in gingival crevicular fluid : implication for the pathogenesis of periodontal disease. J. Periodontal Res. 25 : 156, 1990.
- Richards D, Rutherford RB. : The effects of interleukin-1 on collagenolytic activity and prostaglandin-E secretion by human periodontal ligament and gingival fibroblast. Archs oral Bio. 33 : 237, 1988.
- Saito S, Saito M, Ngan P, Lanese R, Shanfeld J. Davidovitch Z. : Effects of parathyroid hor-



- mone and cytokines on prostaglandin E synthesis and bone resorption by human periodontal ligament fibroblasts. *Archs oral Biol.* 35 : 845, 1990.
9. Saito S, Ngan P, Saito M, Kim K, Lanese R, Shanfeld J, Davidovitch Z. : Effects of cytokines on prostaglandin E and c-AMP levels in human periodontal ligament fibroblasts in vitro. *Archs Oral Biol.* 35 : 387, 1990.
  10. Robert C, Newton G, Covington M. : The activation of human fibroblasts prostaglandin E Production by interleukin 1. *Cellular Immunology* 110 : 338, 1987.
  11. Egelberg J. : Regeneration and Repair of Periodontal tissue. *J. Periodont. Res.* 223, 1987.
  12. Canalis, E. : Effect of platelet-derived growth factor on DNA and protein synthesis in cultured rat calvaria. *Metabolism*, 30 : 970, 1981.
  13. 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.
  14. 김기숙, 고성희, 백정화, 민병무, 김관식, 정동균 : Platelet-derived growth factor가 백서 두개관 세포군의 증식 및 교원 합성에 미치는 영향, 대한 구강 생물학회지, Vol. 15, No. 2, 1991.
  15. Lynch SE, Williams RC, Polson A M, et al. : A combination fo platelet-deruved growth factor and insulin-like growth factors enhance periodontal regeneration. *J. Clin. Periodontol.* 16 : 545, 1989.
  16. Matsuda, N., Lin, W. L., N, M. Kumar, M. I. Cho, and R. J. Genco : Mitogenic, chemotatic. and synthetic responses of rat periodontal ligament fibroblast cells to polypeptide growth factors in vitro, *J. Periodontol.* Vol. 63, 1992.
  17. Huleihel M, A. Douvdevani, S Segal and RN Apte. : Regulation of interleukin-1 generation in immune-activated fibroblasts. *Eur J. Immunol.* 20 : 731, 1990.
  18. Page RC. : The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease. *J. Periodont. Res.* 26 : 230, 1991.
  19. Somerman M. J. Archer S. Y. Imm G. R, and Foster R. A. : A Comparative study of Human periodontal Ligament Cells and Gingival Fibroblasts in vitro. *JDR* 76 : 66, 1988.
  20. Blomlof. L. & Otteskog, P. : Composition of human periodontal ligament cells in tissue culture. *Scand. J. Dent. Res.* 89 : 43, 1981.
  21. Ono M, Okuda K, and Tkazoe I. : Purification and chararcterization fo a thiolprotease from *Bacteroides gingivalis* strain 381. *Oral Microbiol Immunol* 2 : 77, 1987.
  22. Nagai H, Hori H, Hattori T, Sunada Y, and Terado K. L. : A micro-assay method of collagenase activity and its application in the study of collagen metabolism in pathological tissues. *Inflammation* 4, 123(in Japanese), 1984.
  23. Benilacqua MP. Pober JS. Mendrick DL. Cotran RS. Gimbrone MA Jr : Identification of aninducible endothelial leukocyte adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci USA.* 84 : 9238, 1987.
  24. Bevilacqua MP. Pober JS. Wheeler ME. Cotran RS. Gimbrone MA Jr : Interleukin-1 acts on cultured human vascular endothelium to increase the adhesion of polymorphonuclear leukocytes, monocytes and related leukocyte cell lines. *J Clin Invest* 76 : 2003, 1985.
  25. William Jar-Liang Liu. Charles W. Solt : A Surgical procedure for the treatment of localized gingival recession in conjunction with root surface citric acid conditioning. *JOP* 51 : 505, 1980.
  26. Bret L. Dyer, Paul G. Caffesse, Carlos E. Nasjleti, and Edith C. Morrison : Guided tissue regeneration with dentin biomodification. *JOP* 64 : 1052, 1993.
  27. Quintero G, Mellonig J. T, Gambil V. M, and Pelleu G. B. : A six-month clinical evaluation of decalcified freeze-dried bone allografts in periodontal osseous defects. *JOP* 53 : 726, 1982.

28. Roland M. M, Jeffery R. T, Kent M. H and Carol N. B. : Hydroxyapatite as an Alloplastic Graft in the Treatment of Human Periodontal Osseous Defects. JOP 56 : 63, 1985.
29. Postlethwyte AE, Keski-Oja J, Bolian G, Kang A. : Induction of fibroblast chemotaxis by fibronectin. Localization of a chemotactic region to a 140,000 molecular weight non-gelatin binding fragment. J Exp Med 153L 494, 1981.
30. Pitaru S, Noff M, Grosskopf A, Moses O, Tal H, and Sarion N. : Heparin sulfate and fibronectin improve the capacity of collagen barriers to prevent apical migration of the junctional epithelium. JOP 62 : 598, 1991.
31. Matsuda N, Lin W. L., Kumar N. M., Cho M. I., and Genco R. J. : Mitogenic, chemotactic, and synthetic response of rat periodontal ligament fibroblastic cells to polypeptide growth factors In Vitro. JOP 63 : 515, 1992.
32. Williams LT. : Signal transduction by the platelet-derived growth factor receptor. Science 243 : 1564-1570, 1987.
33. Watermark B, Siegbahn A, Heldin CH, Claesson-welsh L. : b-type receptro for platelet-derived growth factor mediates a chemotactic response by mesns of ligand-induced activity of the receptor proteintyrosisne kinase. Proc Nat Aacd Sci(USA) 87 : 128, 1990.
34. 장범석, 손성희, 정종평, 배기환 : Magnolol과 Hlnokiol이 항균, 교원질 분해효소, 세포독성 및 Cytokine 생산에 미치는 영향. 대한치주과 학회지 Vol 23, No 1, 1993.
35. 류인철, 손성희, 정종평, 배기환 : 생약 추출물이 세포성장 및 cytokine 생산에 미치는 영향. 대한치주과학회지 Vol 23, No 1, 1993.
36. 조기영, 최상묵 : 생약 추출물이 Interleukin 1 b의 생성 및 활성에 미치는 영향.
37. Chen, CP. Lin, CC. Namba, T. : Screening fo Taiwanse Crude drugs for antibacterial activity against streptococcus mutans. J Ethnopharmacol 27 3 : 285-295, 1989.
38. Han, BH : Chi, HJ : Han, YN. : Tyu. KS. Screening on the anti-inflammatory activity of crude drugs. Korean J Pharmacog 43 : 205-209, 1972.
39. Yus, HS., Chang, IM. : Plants with liver protective activities, Korean J Pharmacog 8 : 125-129, 1977.
40. Shah, AH. Al-Bekajri, AM. Qureshi, S. Ageel, AM. : Zizyphus sativa fruits : Evaluation of some Biological Activities and Toxicity. Phytother Res. 3 : 61 : 232, 1989.
41. 이승렬, 정종평, 최상묵, 배기환 : 천연물 추출물의 치주병인균에 대한 항균효과 및 세포독성에 관한 연구, 대한치주학회지 Vol 22, No 3, 1992.

## EFFECT OF ZIZYPHI FRUCTUS EXTRACT ON THE BIOLOGICAL ACTIVITY OF GINGIVAL FIBROBLAST

Chang-Ho Yang<sup>1</sup>, Yong-Moo Lee<sup>1</sup>, Ki-Yeong Cho<sup>1</sup>, Ki-Hwan Bae<sup>2</sup>, Chong-Pyoung Chung<sup>1</sup>

*Department of Periodontology, College of Dentistry, Seoul National University<sup>1</sup>,  
College of Pharmacy, Chung-Nam National University<sup>2</sup>*

Final goal of periodontal treatment is to reconstruct the destructed periodontal tissue as well as to remove the necrotic pathologic elements.

The purpose of this study is to investigate on the effect of Zizyphi extract to the inhibitory ability on collagenolytic activity of *P. gingivalis*, biologic activity of gingival fibroblasts, and on the collagen and protein synthesis of gingival fibroblasts.

Gingival fibroblast from gingiva of first bicuspid from patient for orthodontic treatment were used and cultured. For the measurement of inhibitory ability of collagenolytic activity, crude enzyme was extracted and used on the basis of modified Ono's method. On the inhibition of collagenolytic enzyme from herbal extracts, collagenokit CLN-100 were used. The cellular activity of gingival fibroblast, were studied using MTT solution and measured optical density on 570nm by ELISA reader. To measure the effects on the ability of whole protein and collagen synthesis, cell membrane was destructed with ultrasonic grinder after culturing, centrifuged and counted by liquid scintillation counter. The inhibitory effects on producing of IL-1 $\beta$  by monocyte, after promotion of producing IL-1 $\beta$  by LPS, were compared with the mixture of herbal extracts and other drugs using thymocyte stimulation assay. About inhibitory effects of PGE<sub>2</sub> by gingival fibroblasts, herbal extract was compared with the addition of the other control groups using enzyme immunoassay.

On the inhibition of collagenolytic activity by *P. gingivalis*, benzene extracts showed the most efficient inhibitory effects among the 19 $\mu$ g/ml of the compared extracts and 40.5% by Tetracycline. On the cellular activity promoting effects, compared extracts showed a bit of more effects than PDGF of 100 $\mu$ g/ml concentration and IGF of 20 $\mu$ g/ml concentration. All of the PDGF, IGF, Zizyphi Fructus extract should increase in collagen synthesis, but especially 70% ethylalcohol extracts of Zizyphi Fructus showed comparably high effects among the compared extracts.

Effects on whole protein synthesis were slightly increased on every extract but especially 70% ethylalcohol extract showed significantly effective than any other extract. On the inhibitory effects of Zizyphi Fructus IL-1 $\beta$  production by monocyte, compared extracts showed 70% of highly inhibitory effect than that of 60% inhibition effects on controlled group and each extracts showed no significant difference. In PGE<sub>2</sub> production inhibitory effect of Zizyphi Fructus gingival fibroblasts, Herbal extracts showed 70% of inhibition comparing with that of 90.2% of controlled group, but each extracts showed similar effects excluding the H<sub>2</sub>O extracts.

These results suggested that Zizyphi Fructus might be useful medicine for inhibition of inflammatory mediator including IL-1 $\beta$  and PGE<sub>2</sub>.

Key word : Zizyphi extract, Gingival fibroblast, Collagen synthesis, Total protein synthesis, collagenolytic enzyme inhibition.