백서 두개골 결손부에서 홍화씨 추출물의 골조직 재생 유도 효과

김성태[1] · 전길자[2] · 임소형[2] · 조규성[1] · 김종관[1] · 최성호[1]

[1]연세대학교 치과대학 치주과학교실, 치주조직 재생연구소
[2]이화여자대학교 자연과학대학 화학과, 분자생명과학부

I. 서론

치주질환은 치태내 치주병원균에 의해 생기는 감염성 질환으로 치아주위 치주조직을 파괴시켜 결국 치아상실을 야기하게 된다. 치주치료는 크게 절제형 술식과 재생 술식으로 나뉘고 전자에는 치은절제술, 삭제형 치조골외과술, 치근절제술 등이 있고 후자에는 치근활택술, 치은연하소파술, 치은박리소파술, 골대체물질 이식술식, 조직유도재생술식 그밖에 치근면 처치, 성장인자를 이용한 술식이 있다[1-3].

치주치료의 궁극적 목표는 치주질환에 의해 소실된 치주조직의 재생이다. 치주조직의 재생이란 치주치료 후에 상아질 표면에 새로운 무세포성 백악질이 침착되고, 신생 치조골에 매입된 치주인대가 이 백악질에 수직으로 배열되는 치유양상을 말한다[4].

1987년 Terranova가 시행한 성장인자의 생물학적 역할에 대한 연구에서 성장인자가 치주조직 재생에 필요한 치주인대세포, 백악아세포, 조골세포의 증식과 이주과정에서 도구로 사용될 수 있는 가능성이 제시되었다[5]. 현재까지 Platelet Derived Growth Factor(PDGF), Insulin Growth Factor(IGF), Bone Morphogenetic Protein(BMP)등에 대한 연구가 진행되어 왔다[6-8]. 많은 연구에서 이러한 성장인자들에 의한 치주조직의 재생을 보고하고 있지만 임상에 적용하기 위해서는 국소조직에 이용시 타 기관에 미치는 영향, 응용방법, 경제적인 실용성 등에 관한 문제들이 해결되어야 한다.

최근 성장인자 외에 생약제재의 치주조직 재생능력이 관심의 대상이 되고 있다. 대표적인 생약제재로 옥수수 불검화 추출물, 황련, 후박, 대조 및 은행엽, 홍화씨 등이 있고 이중 몇몇 제재에서는 *in vitro, in vivo* 실험에서 골재생을 관찰했다는 보고가 있다[9-13].

특히 국내산 약초 중 홍화(잇꽃, safflower, Carthamus tinctorius L.)의 씨가 금이 가거나 다친 뼈를 빠르고 튼튼하게 회복시키는 등 뼈 질환에 뛰어난 효과가 있다고 알려지면서 민간요법에 사용되기 시작하였다. 홍화씨 요법은 골다공증, 관절염, 요통, 골형성부전증, 고혈압, 동맥경화증, 척추디스크, 무혈성괴사 등에 효과가 있다고 알려져 왔다. 또한 울혈을 위한 치료제로 전래되는 약제로서 adenosine diphosphate에 의한 혈소판 응집억제를 통한 항응혈 효과와 항염효과 등이 확인된 바 있다[14, 15]. 1998년 최 등은 홍화씨에 들어있는 유기백금

교신저자: 최성호 서울시서대문구신촌동 134번지연세대학교치과대학 치주과학교실 우편번호 120-752

은 금속백금에 비해 독성이 없으며, 항암작용이 뛰어나고, 골절과 골다공증에 약성을 지닌다고 하였는데, 이 백금은 골절 부위에서 양전기와 음전기의 교류작용을 활발하게 하여 백혈구의 이주를 촉진시키고 골재생을 일으킨다고 하였으며 홍화씨에는 뼈의 주된 성분인 칼슘과 골세포를 서로 연결시켜주는 구리성분도 함유되어 있어서 골절치유에 효과가 있다고 하였다[15]. 이에 국내의 몇 연구팀들이 골절치료의 민간요법으로 사용되고 있는 홍화의 효능을 과학적으로 확인하는 연구를 시행하였다. 그 결과, 홍화씨 혹은 홍화씨 추출물의 섭취 및 국소투여가 쥐의 골절상 및 골결손에서의 치유에 유의성 있는 효과를 나타낸다고 하였다[16-18].

1997년 류 등은 홍화씨의 에탄올 환류추출물을 치주인대세포와 조골세포에 투여시 세포활성도, 화학주성, alkaline phosphatase(ALP) activity가 증가됨을 밝혔고 이 추출물을 경구 투여했을 때 백서 두개골 결손부의 치유에서 신생골 형성을 보고한 바 있다[17]. 1998년 강 등은 치주인대세포와 조골유사세포에 증류수로 가열여과 후 얻은 홍화씨 추출물을 투여했을 때 치주인대세포가 증가하고 조골유사세포의 alkaline phosphatase(ALP) activity가 증가된다고 보고하였고[16], 1998년 윤 등은 증류수로 가열여과 후 얻은 홍화씨 추출물을 경구 투여했을 때 백서 두개골 결손부의 치유에서 신생골 형성을 보고한 바 있으며[18], 1999년 김 등은 증류수로 가열여과 후 얻은 홍화씨 추출물을 백서 두개골 결손부에 국소 투여했을 때 신생골 형성을 보고하였다[19].

최근에는 홍화씨의 성분을 분석해서 골재생에 특히 영향을 미치는 성분과 농도 또 그 기전을 알아보고자 하는 연구가 여러 연구기관에서 진행중이다. 2000년 전 등은 홍화씨 분말을 여러 가지 유기용매로 추출한 분획을 준비하여 조골세포에 투여하면서 n-hexane과 chloroform으로 추출한 잔사를 MeOH로 추출한 수용성 분획이 조골세포에 가장 활성을 보임을 발견하였다[20].

이에 본 연구에서는 골생성에 뛰어난 효과를 보인 홍화씨를 n-hexane과 chloroform으로 추출한 잔사를 MeOH로 추출한 수용성 분획이 Sprague - Dawley rat의 두개골에 형성된 결손부의 치유에 주는 영향을 연구한 결과 다소의 지견을 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

II. 연구재료 및 방법

1. 연구재료

1) 실험동물

본 연구에서는 체중 300-350g의 수컷 Sprague-Dawley rat 30마리를 사용하였다. 실험동물은 연세 임상의학연구센터에 의한 관리에 따랐다.

2) 실험재료

이화여자대학교 자연과학대학에 의뢰하여 여러 용매로 추출한 홍화씨 추출물의 분획중 실험실에서 조골세포에 가장 활발한 활성을 보이는 saf-M-W 분획(n-hexane과 chloroform으로 추출한 잔사를 MeOH로 추출한 수용성 분획)을 사용하였다. 그분획의 추출방법은 다음과 같다(Figure 1).

2. 연구방법

1) 실험군 설정

두개골 결손부에 아무 것도 이식하지 않은 군을 대조군으로, 홍화씨 추출물을 이식한 군을 실험군으로 설정하였다. 각 군당 15마리씩이며 술후 2주, 4주, 8주 각 주당 5마리씩 설정하였다.

†케타민, Ketalar,Yuhan Co
‡trephine bur, 3i, FL, USA

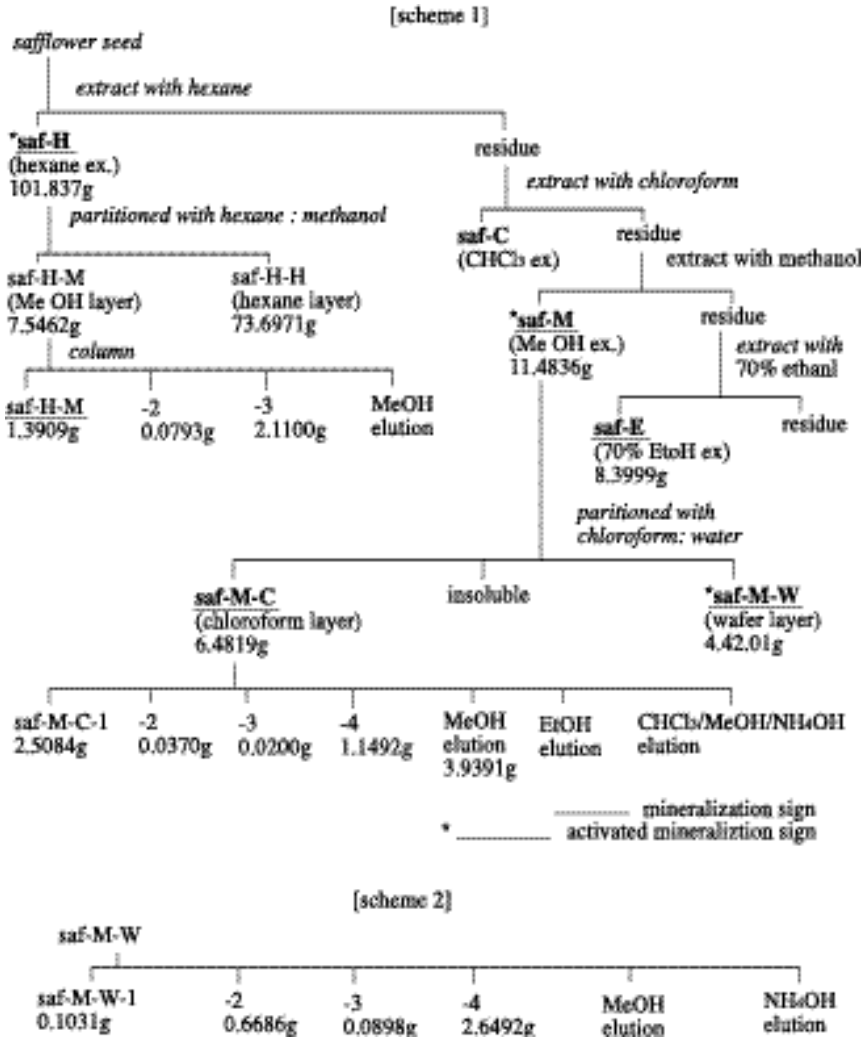


Figure 1. The method of safflower seed extracting

2) 골 결손부 형성 및 외과적 처치

각 군의 백서에 염산 케타민(50mg/ml)†을 근육주사(70mg/kg)하여 마취하였다. 두부의 털을 깎고 povidone iodine으로 소독한 후 고정하였다. 수술부위를 소량의 2% lido - caine(1:10만 epi.함유)으로 침윤마취한 후 전두골 전방부에서 후두골 후방부까지 정중부를 따라 두피를 절개하여 두개골의 상면을 노출시켰다. 8mm trephine bur‡를 이용하여 뇌막에 손상을 주지 않도록 하면서 지름 8mm의 원형 defect를 형성하였다(Figure 6 - 7). 대조군에는 아무 것도 이식하지 않고 실험군에는 홍화씨 추출물 50mg을 식염수에 적셔 겔 상태로 위치시킨 후 두피를 덮어 Ethilon®¶으로 봉합하였다. 1주일 후 발사하였으며 실험 후 2주, 4주, 8주 각 군당 5마리씩 실험동물을 희생시키고

¶Ethilon®, Ethicon, Edinburgh, Scotland, UK
Image - Pro Plu®, Media Cybernetics, Silver Spring,

두개관을 절제하였다.

3) 조직학적 관찰

절제해낸 조직을 10% formalin에 고정한 후 5% nitric acid에 넣어 탈회시킨 후 파라핀 포매하였다. 이 블록을 3㎛두께로 결손부의 중앙부에서 관상면으로 절단하여 블록 당 4장의 슬라이드를 제작하였다. 이를 Hematoxylin - Eosin(H - E) 염색법으로 염색하고, 광학현미경으로 관찰하였다.

4) 조직 계측학적 관찰

100배 배율로 확대된 조직 표본 상을 컴퓨터 모니터 상에 재현하고 Image Pro®#를 이용하여 두개골 결손부의 신생골 조직의 변연부로부터 말단까지의 거리, 신생골 면적(μm^2)을 계측하였다. 이 값을 각 주별로 평균 내어 군간 비교하였다.

5) 방사선 계측학적 관찰

관전압 70Kvp, 노출시간 0.1초, 조사관으로부터의 거리 10cm로 조건을 표준화하여 Digora§로 촬영한 후 Brain3dsp®*를 이용하여 결손부내 골밀도 평균을 산출하였다. 이 값을 각 주별로 평균 내어 군간 비교하였다(Figure 2). 결손부내 골밀도는 그림과 같이, 결손부의 중앙점을 0으로, 결손부 변연부에서 바깥쪽 0.4mm까지의 골밀도를 100으로 설정하였다. 이런 설정 하에, 결손부 중앙점에서 방사상으로 8 방향의 선을 지정하고 변연부에서 중심을 향한 2mm 선상의 골밀도를 평균 내어 백분율로 나타내었다. 이는 골형성이 결손부의 변연부에서부터 이루어지고, 결손부의 중앙부위에 골재생이 가장 이루어지지 않는다는 가정하에 설정한 것이다.

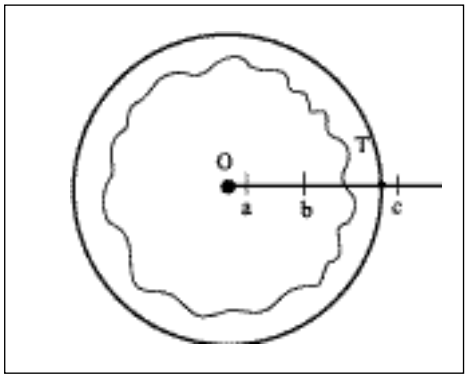
6) 통계학적 분석

조직 계측학적 분석 결과(신생골 길이와 면적)와 방사선 계측학적 분석 결과(골밀도)에 대해 two way ANOVA를 이용하여 군과 시간 두 변수간의 상호작용이 없음을 확인한 후 t-test를 이용하여 군간, 시간간 유의할 만한 차이가 존재하는지를 검증하였다($P<0.05$).

III. 연구성적

1. 조직학적 관찰

1) 대조군



$\overline{Oa} = \overline{OT}/10$: low densitometric reference area
$\overline{Tc} = \overline{OT}/10$: high densitometric reference area
$\overline{bT} = \overline{OT}/2$: Region of Interest
Relative bone fill(%) = (mean(bT) - mean(Oa)) / mean(Tc) - mean(Oa)) × 100
이와같은공식으로상대적 골밀도를측정하였다.

O : The center of defect

Figure 2. A schematic diagram depicting radiodensitometric analysis using computer assisted image analysis program

§Digora®, Soredex, Orion Co., Helsinki, Finland.
* Brain3dsp®, NosDIAtech, Seoul, Korea

① 2주 소견

신생골은 조골세포에 의해 둘러 싸여 있고 주위로 염증세포가 관찰되었다. 연조직 치유와 신생골 형성이 계속 진행됨을 알 수 있었다(Figure 10).

② 4주 소견

결합조직이 더 균일한 밀도를 보이고 골막과 경막이 연속적으로 이어져 있는 양상과 함께 혈관이 더 많이 증식해 있는 것을 볼 수 있었다. 잘 정돈된 섬유 다발 사이로 방추형의 섬유아세포가 많이 관찰되었다. 골 생성량은 더 증가된 양상을 보였다. 결손부 변연의 신생골은 신생골 말단부에 비해 균일하고 성숙해지는 소견을 관찰할 수 있었다. 신생골 말단에는 미숙골이 관찰되고 그 전방으로 조골세포가 열지어 있었다(Figure 8, Figure 11).

③ 8주 소견

잘 정돈되고 균일한 섬유성 결합조직에 의해 신생골이 둘러싸여 있고 결손부의 중앙부는 역시 성긴 결합조직에 의해 채워져 있었다. 신생골은 골막부위로는 성숙된 양상을 보이고 경막쪽은 미성숙한 채로 넓은 골수강을 관찰할 수 있었다. 신생골 말단에는 조골세포가 열지어 있지만 미숙골은 관찰되지 않았다(Figure 12).

2) 실험군

① 2주 소견

창상 부위에 출혈 및 육아조직이 관찰되었고, 결손부는 대조군에 비해 두껍고 치밀한 섬유성 결합조직에 의해 채워져 있었다. 신생골은 대조군에 비해 결손부 변연과 하방 경막, 상방 골막 주위로 두껍게 형성되어 있는 것을 관찰할 수 있었다. 연조직의 치유는 아직 진행 중이었으며 대조군에 비해 많은 조골세포와 미숙골이 관찰되었고 많은 양의 섬유아세포가 관찰되었다. 염증세포도 관찰되었다(Figure 13 , Figure 14).

② 4주 소견

염증세포, 출혈, 육아조직의 감소를 보였다. 결합조직은 더 균일한 밀도를 보이고 골막과 경막이 연속적으로 이어져 있는 양상과 함께 혈관이 더 많이 증식해 있었다. 신생골의 전방에는 많은 양의 조골세포와 골양물질이 관찰되며 신생골 형성이 계속 진행되고 있는 것을 볼 수 있었다. 신생골은 두께성장 뿐 아니라 길이 성장도 하고 있는 양상을 보이며 골 생성량도 증가하였다. 결손부 변연의 신생골은 신생골 말단부에 비해 균일하고 성숙해 지는 소견을 관찰할 수 있었다. 결손부의 대부분은 성긴 결합조직으로 채워져 있었다(Figure 9, Figure 15).

③ 8주 소견

잘 정돈되고 균일한 섬유성 결합조직에 의해 신생골이 둘러싸여 있고 결손부의 중앙부는 역시 성긴 결합조직에 의해 채워져 있었다. 신생골 말단에는 조골세포가 열지어 있었고 골양물질도 관찰되었다. 결손부 부위에서는 골 개조가 일어나는 양상을 보였다. 훨씬 성숙된 양상의 신생골을 보였다(Figure 16, Figure 17).

Table 1. Histomorphometric analysis of new bone formation(Length)

(mean±standard deviation; n=5, ㎛)

	2Weeks	4Weeks	8Weeks
Control	102.91±22.05	130.95±39.24	181.53±76.35
Exp.	178.29±24.40*	242.62±50.33*	240.36±22.00

*: Statistical significance between experimental and control group($P<0.05$)
Control; Non - application of safflower seed extract
Exp.; Application of safflower seeds extract

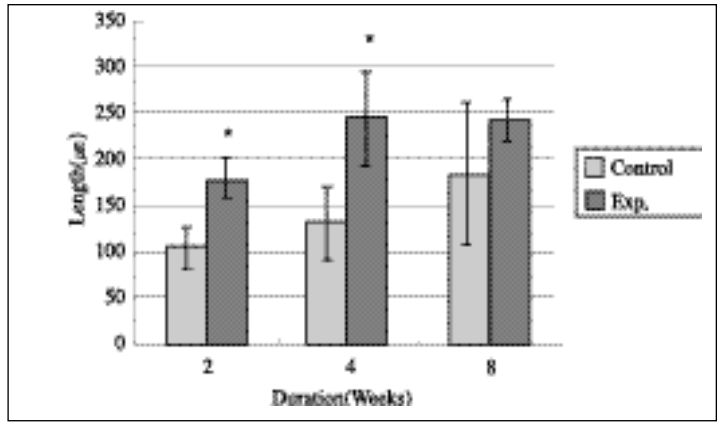


Figure 3. Histomorphometric analysis of newly formed bone length

Table 2. Histomorphometric analysis of new bone formation(Area)
(mean±standard deviation; n=5, μm²)

	2Weeks	4Weeks	8Weeks
Control	2962.06±1284.48	5103.25±1375.88	8046.02±818.99
Exp.	10648.35±1631.84*	9706.78±1481.81*	12057.06±3740.47*

*: Statistical significance between experimental and control group(P<0.05)
Control; Non - application of safflower seed extract
Exp.; Application of safflower seeds extract

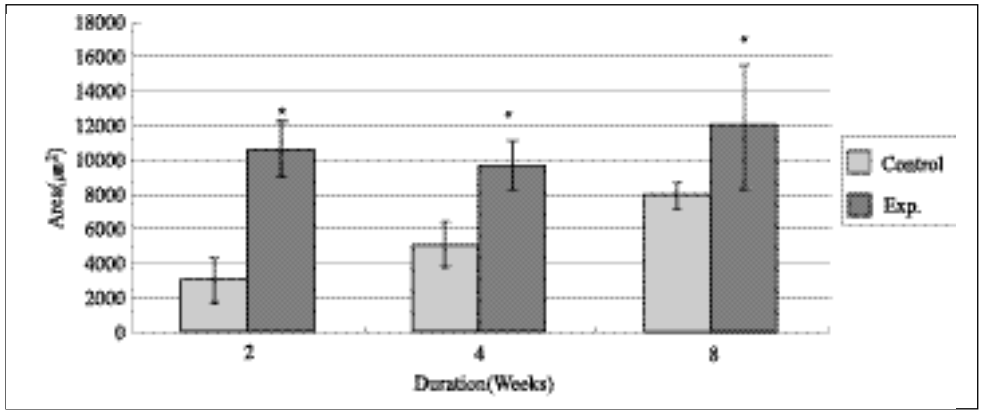


Figure 4. Histomorphometric analysis of newly formed bone area

2. 조직 계측학적 관찰

1) 두개골 결손부내 신생골 형성 길이

백서 두개관 결손부내 신생골 길이는 대조군, 실험군에서 각각 술후2주에 102.91±22.05, 178.29±24.40을 보였고 4주에 130.95±39.24, 242.62±50.33을 보였으며 8주에 181.53±76.35, 240.36±22.00을 보였다(단위, μm). 2주, 4주에는 유의성 있는 차이를 보였지만 8주에는 유의성 있는 차이를 보이지 않

Table 3. Radiodensitometric analysis
(mean±standard deviation; n=5, %)

	2Weeks	4Weeks	8Weeks
Control	14.26±6.33	20.06±9.07	22.99±3.76
Exp.	*25.47±4.33	26.61±2.78	27.29±1.54

*: Statistical significance between experimental and control group(P<0.05)
Control; Non - application of safflower seed extract
Exp.; Application of safflower seeds extract

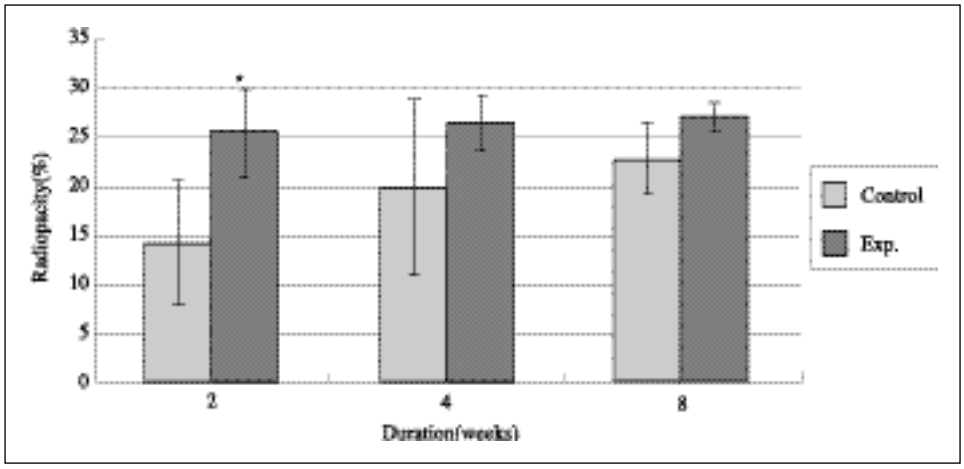


Figure 5. Radiodensitometric analysis of defect

았다(P<0.05)(Table 1, Figure 3).

2) 두개골 결손부내 신생골 형성 면적

신생골 면적은 대조군, 실험군에서 각각 2주째 2962.06±1284.48, 10648.35±1284.48을 보였고 4주째 5103.25±1375.88, 9706.78±1481.81을 보였으며 8주째 8046.02±818.99, 12057.06±3740.47을 보였다(단위, μm^2). 각 주에서 실험군과 대조군은 유의성 있는 차이를 보였다(P<0.05)(Table 2, Figure 4).

3. 방사선 계측학적 관찰

1) 두개골 결손부내 신생골 밀도

신생골 밀도는 대조군, 실험군에서 각각 술후 2주에 14.26±6.33, 25.47±4.33을 보였고 4주에 20.06±9.07, 26.61±2.78을 보였으며 8주에 22.99±3.76, 27.29±1.54를 보였다(단위, %). 2주에서만 유의성 있는 차이를 나타냈다(P<0.05)(Table 3, Figure 5).

2) 형태학적 관찰

대조군에서는 술후 2주(Figure18 - a), 4주(Figure18 - b), 8주(Figure18 - c)에 시간이 지남에 따라 결손부가 원형을 잘 유지하며 약간의 크기 감소를 나타냈다.

실험군에서 2주(Figure18 - d), 4주(Figure18 - e), 8주(Figure18 - f)에서 시간이 지남에 따라 전반적인 결손부의 형태가 불규칙하게 변하면서 크기가 현저하게 감소되는 양상을 보였다.

IV. 총괄 및 고찰

치주치료의 궁극적 목표는 치주질환에 의해 소실된 치주조직의 구조적인 재생과 기능회복이다. 치주조직의 재생을 위해 감염성, 염증성 질환에 이환된 치근면에 신생 백악질의 침착, 신생골의 형성과 함께 새로운 치주인대 섬유의 기능적인 삽입, 배열, 그리고 치은조직의 구조화가 필요하다[4]. 이러한 치주조직의 재생을 위하여 자가골 및 다양한 생체재료를 이용한 골이식술과 차단막을 이용한 조직유도재생술이 사용되고 있다.

또한 분자생물학의 발전으로 조직의 치유에 관여하는 성장인자라는 매개물질을 조직재생에 응용하게 되었다[21]. 성장인자는 세포의 증식, 분화, 이주와 기질합성에 영향을 미침으로써 성장을 촉진하고 생활력을 유지하는 생물학적 반응 물질이다[5, 22]. 많은 연구에서 유의성 있는 차이를 보이는 치주조직재생을 관찰할 수 있었다. 이러한 성공적인 결과가 있지만 임상에 적용하기 위해서는 국소조직에 이용 시 타 기관에 미치는 영향, 응용방법, 경제적인 실용성 등에 관한 문제들이 해결되어야 한다.

최근에는 생약제재의 치주조직 재생능력이 관심의 대상이 되고 있다. 대표적인 생약제재로 옥수수 불검화 추출물, 황련, 후박, 대조 및 은행엽, 홍화씨 등이 있고 *in vitro, in vivo* 실험에서 골재생을 관찰했다는 보고가 있다[9-13].

특히, 골재생에 효과가 있다고 알려진 홍화씨에 대해 이의 성분을 분석해서 골재생에 특히 영향을 미치는 성분과 농도, 또 그 기전을 알아보고자 하는 연구가 여러 연구기관에서 진행중이다. 전 등[20]은 홍화씨 분말을 여러 가지 유기용매로 추출한 분획을 준비하여 조골세포에 투여하면서 n-hexane과 chloroform으로 추출한 잔사를 MeOH로 추출한 수용성 분획이 조골세포에 가장 활성을 보임을 발견하였다. 먼저 홍화씨 1.7kg에서 홍화씨 분말을 n-hexane으로 추출하고, 남은 잔사를 차례로 chloroform, methanol, 70% ethanol로 추출하여, 각각을 saf-H, saf-C, saf-M, saf-E라 명명하였고 hexane extract인 saf-H는 hexane과 methanol에 녹여 비교적 비극성인 분획(saf-H-H)과 상대적으로 극성인 분획(saf-H-M)으로 나누었고, 같은 방법으로 methanol extract인 saf-M은 chloroform(saf-M-C)과 water layer(saf-M-W), 그리고 두 가지 모두에 녹지 않는 insoluble layer로 나누었다. 이 분획들을 세포에 투여하여 석회화 결절(calcification nodule)이 형성되는 정도를 관찰하면서 활성이 나타나는 분획들을 silica gel column chromatography를 통해 분리하였다. 이 실험에서 홍화씨 추출물의 분획중 몇 가지가 유의한 골형성 효과를 나타냄을 확인하였고 특히 saf-M-W 분획은 양성대조군으로 사용한 멜라토닌에 비해 석회화 결절(calcification nodule)의 개수가 5배 이상 증가함을 보였다.

본 연구에서는 이렇게 골형성 효과를 나타내었던 saf-M-W 분획을 백서 두개골 결손부에 적용하여 신생골의 면적과 길이, 광화정도를 평가하였다. *in vitro* 실험을 통해서 적정농도를 결정하였으며 세포독성을 보이지 않으면서 ALP activity가 대조군에 비해 높게 나타난 농도가 10^{-2}mg/ml 였다. 그러나, 이 실험에서는 홍화씨 추출물을 국소 적용하였기 때문에 일정기간 농도가 유지되기 위해서는 더 많은 양을 넣어주어야 했다. 또한 재료를 적용할 때 송달체를 사용하지 않았고, 연조직의 침투를 막으며 재료의 위치도 고정시킬 수 있는 차폐막을 사용하지 않았기 때문에 한층 더 많은 양을 넣어주어야 했다. 그리고 결손부에서 유지될 수 있는 물성이 필요했으므로 50mg을 겔 상태로 적용하였다.

동물실험에서 사용하는 실험 모형 중 하나로 Sprague - Dawley rat의 두개골에서 임계 크기 결손을 형성하여 사용하는 것이 있다. 백서의 두개골에서의 임계크기 결손에 대한 연구는

Freeman과 Turnbull등[23]에 의해 처음 시도되었으며 그후 Tagaki와 Urist 등[24] 은 Sprague - Dawley rat에 8mm의 결손부를 형성하였을 때 4주 뒤에 5mm로 감소하고 12주가 지나도 더 이상의 치유가 일어나지 않음을 관찰하였다[25-28]. 홍화씨의 골재생 유도 능력을 평가하기 위해 이 백서 두개골 결손부 실험 모델을 선택하였다. 암컷의 경우 호르몬 변화나 임신등에 의해 실험 결과에 영향을 줄 수 있으므로 수컷만을 실험에 포함시켰다. 미성숙한 동물은 성장이 완료된 동물에 비해 치유능이 더 우수하기 때문에 홍화씨 추출물의 고유한 골재생 유도 능력을 평가하기 위해 완전히 성숙한 동물을 선택하였다.

Schmitz 등[29]에 의해 보고된 백서의 두개골에 형성된 8mm 결손부에서 이루어지는 치유 양상을 보면 골 치유는 지속적으로 경막 부위를 향해 국소화 되며 주변부에 생긴 적은 양의 골과 섬유성 결합조직이 발견되면서 양쪽이 결합되지 않았다. 10일 정도 지났을 때 주변부의 골형성이 명확하게 나타났고, 광화된 앞쪽을 갖는 bony peninsulas를 보였다. Hydroxyapatite같은 결정을 포함하는 기질 소포가 관찰되며 중앙 지역에서는 연골 유사 세포들의 여러 섬들이 관찰되었다. 14일후 관찰된 투과 전자현미경 소견에서는 교원 섬유다발을 침투하는 기질 소포를 갖는 치밀한 교원성의 세포외기질을 발견할 수 있었다. 이 교원성 기질에서 어떠한 석회화도 발견할 수 없었고 기질 소포체에서 결정형성도 관찰할 수 없었다. 21일 후에 결손부의 중앙과 주변에서는 치밀한 섬유성 결합조직과 불활성의 섬유아세포가 관찰되었고 양쪽이 결합하지 않음을 발견할 수 있었다. 42일후에는 교원질이 더욱 치밀하여졌다. 불활성의 섬유아세포가 관찰되었다. 이렇듯 결손부가 불완전하게 치유되는 이유는 성장인자나 분화인자의 부족으로 기질을 석회화 시킬 세포가 부족하기 때문으로 추정되었다.

본 실험에서 얻은 조직학적 소견도 대조군에서는 비슷한 양상을 나타내었다. 실험군에서는 이와 다른 양상을 보였는데 신생골이 8주 이후에도 계속 생기는 것으로 관찰되었고, 대조군에서 경막에 국한되어 신생골이 생기는 반면에 실험군에서는 길이 성장을 동반하여 경막과 골막 양쪽에서 두께 성장이 일어났다. 또한 특징적으로 실험군에서 두꺼운 결합조직을 보이고 그 안에 많은 섬유아세포를 보였는데 이로 인해 앞으로 진행될 치유의 방향을 예측할 수 있었다.

조직학적 계측에서 길이는 2주, 4주에 유의성 있는 차이를 나타냈고 8주에는 유의성 있는 차이를 보이지 못했다. 면적은 각 주마다 유의성 있는 차이를 보였다. 신생골이 형성되는 신생골 말단부의 양상을 보면 알 수 있듯이 실험군에서 많은 골아세포가 있었지만 계속적으로 진행되어 길이 성장이 일어나지 못했다. 이는 연조직이 침투하여 골형성을 방해하였기 때문이라 생각된다. 전반적인 조직학적 소견에서 짐작할 수 있듯이 시간이 지나면서 길이의 성장보다는 두께의 성장이 더 확연하게 관찰되었다. 그러므로 연조직의 침투를 막는 방법을 이용하면 많은 길이성장을 유도할 것으로 사료된다. 이런 방법으로는 차폐막의 사용, 골이식재의 사용, 송달체의 이용을 고려할 수 있을 것으로 생각된다.

방사선 계측 결과 골밀도는 시간이 지남에 따라, 또 같은 시기에서 대조군에 비해 증가된 양상을 보였지만 오직 2주에서 유의성 있는 차이를 보였다. 시간이 지남에 따라 생기는 신생골은 점점 성숙되는 양상을 보이는데 이 과정에서 미성숙 골은 방사선학적 계측에서 간과될 수 있다.

전반적으로 같은 실험모형에서 다른 재료를 사용한 이전 논문보다 신생골형성은 떨어지고 양쪽 결손부로부터 자라온 골이 만나는 소견도 보이지 않았는데 이는 재료를 적용할 때 송달체를 사용하지 않았고 연조직의 침투를 막는 차폐막을 사용하지 않았기 때문으로 추정된다. 또한 원형결손부의 치유를 평가하는데 있어서

정 중앙의 단면만을 살펴보았는데 전체적으로 균일한 치유가 일어나지 않으므로 특정 표본은 과장되거나 축소되었기 때문으로 사료된다.

방사선 계측학적 비교는 골 성숙도를 평가하기 위한 것으로 신생골 광화정도를 비교한 것이다. 이 실험에서는 여러 개체를 시간별로 희생하여 관찰하였다. 방사선 계측을 시행할 때 이 개체들의 조건을 표준화 해주어야만 서로간의 비교가 가능하다. 각 개체의 방사선 상을 표준화하기 위해 같은 조사량과 노출 하에, image plate type digital X - ray system의 Digora®를 이용하여 현상 조건을 표준화하였다. 방사선 상을 분석하기 위해 이 실험에서는 새로운 방법인 computer assisted image analysis program을 이용하였다. 결손부내 골밀도는 그림과 같이(Figure 2) 결손부의 중앙점을 0으로, 결손부 변연부에서 바깥쪽 0.4mm까지의 골밀도를 100으로 설정하였다. 이런 설정 하에, 결손부 중앙점에서 방사상으로 8방향의 선을 지정하고 변연부에서 중심을 향한 2mm 선상의 골밀도를 평균 내어 백분율로 나타내었다. 이는 골형성이 결손부의 변연부에서부터 이루어지고, 결손부의 중앙부위에 골재생이 가장 이루어지지 않는다는 가정하에 설정한 것이다. 방사선학적 평가에 의한 골밀도 검사에서 대조군에 비해 실험군이 증가된 양상을 보이기는 하였지만 통계학적으로 유의성을 보이지 못했다. 이는 신생골의 밀도가 방사선학적으로 차이를 나타낼 정도로 증가하지 못했기 때문일 것이다. 또한, 전반적으로 표본수가 작은 것이 통계학적인 유의성을 나타내지 못한 원인으로 사료된다.

생약제재의 약효가 부각되면서 이에 대한 과학적 접근이 이루어지고 있으며 그 제재 중 특별한 구조나 성분이 특이한 작용을 나타낸다고 추정되고 있다. 이에 이 성분의 분석 및 추출, 정확한 작용기전을 밝히는 것에 연구의 초점을 맞추어야 할 것으로 사료된다. 국소 적용시 서서히 방출될 수 있고 공간을 유지시킬 수 있는 적절한 송달체 및 보조장치의 개발이 필요할 것이고 적정 농도를 찾아내서 장기간 일정 농도로 유지하며 지속적인 효과를 낼 수 있어야 한다. 또한 그 제재의 부작용도 함께 연구되어야 할 것으로 사료된다.

V. 결론

본 연구는 백서 두개골 결손부에서 홍화씨 추출물을 적용했을 때 결손부의 재생과 치유에 미치는 영향을 평가하기 위하여 실시되었다. 300 - 350g의 Sprague - Dawley rat의 두개골에서 임계 크기 결손부인 8mm를 실험적으로 형성한 후 봉합한 군을 대조군으로, 홍화씨 추출물 50mg을 이식한 군을 실험군으로 설정하여 실험하고 술 후 2주, 4주, 8주에 치유결과를 조직학적으로 비교 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 신생골 길이는 대조군, 실험군에서 각각 술후 2주에 102.91±22.05, 178.29±24.40을 보였고 4주에 130.95±39.24, 242.62±50.33을 보였으며 8주에 181.53±76.35, 240.36±22.00 을 보였다(단위, μm). 2주, 4주에서 대조군과 비교해 유의성 있는 차이를 보였다 ($P<0.05$).
2. 신생골 면적은 대조군, 실험군에서 각각 술후 2주에 2962.06± 1284.48, 10648.35±1284.48을 보였고 4주에 5103.25±1375.88, 9706.78±1481.81을 보였으며 8주에 8046.02±818.99, 12057.06±3740.47을 보였다(단위, μm^2). 2주, 4주, 8주에서 대조군과 비교해 유의성 있는 차이를 보였다($P<0.05$).
3. 신생골 밀도는 대조군, 실험군에서 각각 술후 2주에 14.26±6.33, 25.47±4.33을 보였고 4주에 20.06±9.07, 26.61±2.78을 보였으며 8주에 22.99±3.76, 27.29±

1.54를 보였다(단위, %). 2주에서 유의성 있는 차이를 보였다($P<0.05$).

이상의 결과에서 볼 때 백서 두개골 결손부에 홍화씨 추출물을 사용한 경우, 초기에는 골밀도, 면적, 길이를 증가시킬 수 있으며, 그 이후에는 면적과 길이를 증가시킬 수 있다고 사료된다.

VI. 참고문헌

1. Melcher A.H. : On the repair potential of periodontal tissues, J. Periodontol., 47 : 256 - 260, 1976.
2. Nabers C.L., O'Leary T.J. : Autogenous bone grafts(case report), Periodontics, 5 : 251 - 256, 1967.
3. Strub J.R., Gaberthal T.W., Firstone A.R.. : Comparision of tricalcium phosphate and frozen allogenic bone implants in man, J. Periodontol. 50 : 624 - 630, 1979.
4. G ran Zellin : Growth factors and bone regeneration, Swedish dental journal supplement., 129 : 7 - 45, 1998.
5. Terranova V., Wikesjo U.M.E. : Extracellular matrices and polypeptide growth factors as mediators of functions of cells of the periodontium. J. Periodontol., 58 : 371 - 380, 1987.
6. Lynch S.E, de Custila G.R., Williams R.C., Kinsty C.P., Howell H., Reddy M.S., Antoniades H.N., The effect of short - term application of a combination of Platelet Derived and Insulin like Growth Factors on periodontal wound healing, J. Periodontol. 62 : 458 - 463, 1991.
7. Ripamonti U., Heliotis M., van den Heever B., Reddi A.H. : Bone morphogenetic proteins induce periodontal regeneration in the baboon, J. Perio. Res., 29 : 439 - 445, 1994.
8. Urist M.R. : Bone formation by autoinduction. science, 150 : 893 - 899, 1965.
9. 김종관, 채중규, 조규성, 문익상, 최성호 : Zea Mays L. 불검화 정량 추출물의 치주염 치료효과에 대한 임상적 연구, 대한치주과학지, 8(2) : 225 - 234, 1991.
10. 송기범, 공영환, 유형근, 신형식 : 황련이 Lipopolysaccharide를 처리한 치주인대 세포의 세포활성 및 IL - 6생산에 미치는 영향, 대한치주과학회지 26(3): 641 - 653,

1996.
11. 유형근 : 황련과 Centella asiatica 추출물이 치은 섬유모세포에 미치는 영향. 대한치주과학회지 26(3): 681 - 688, 1996.
12. 이용무, 구영, 배기환, 정종평 : 후박 및 대조 추출 혼합물이 골조직 재생에 미치는 영향. 대한치주과학회지, 27(1) : 165 - 178, 1997.
13. 최상묵, 한수부, 황광세 : Zea Mays L.의 불검화 정량 추출물(DENTADOL®)이 외과적 치주치료 후의 치유에 미치는 효과에 관한 임상적 연구, 대한치주과학회지, 19(1): 63 - 69, 1989.
14. 본초학, 한국 생약교수 협의회 편저, 사단법인 대한 약사회, 553 - 555, 1995
15. 이인우, 최진규 : 홍화씨 건강법. 태일 출판사, 45 - 70, 1998.
16. 강정구, 유형근, 신형식 : 홍화씨 추출물이 치주인대세포와 조골유사세포의 골 광물화 작용에 미치는 효과, 대한치주과학회지, 28(3) : 475 - 489, 1998.
17. 류인철, 이용무, 구영, 배기환, 정종평 : 홍화추출물이 치주인대세포, 조골세포 활성도에 미치는 영향, 대한치주과학회지, 27(4) : 867 - 882, 1997.
18. 윤동환, 이승철, 김명은, 김은철, 유형근, 김윤철, 신형식 : 홍화씨 추출물이 조골모유사세포활성 및 골재생에 미치는 영향. 대한치주과학회지: 28(4): 769 - 784, 1998.
19. 김덕규, 홍성우, 유경태, 서재진, 김흥식, 유형근, 신형식 : 홍화씨 추출물의 국소투여가 백서 두개골 결손부 재생에 미치는 영향, 대한치주과학회지, 29(2) : 297 - 310, 1999.
20. 전길자 : 홍화씨 추출물이 조골세포의 골 광물화 작용에 미치는 효과 . 출판예정.
21. Clark R.A.F., Henson P.M. : The molecular and cellular biology of wound repair, New York : Plenum Press, 1988.
22. Terranova V.P., Wikesjo U.M.E. : Chemotaxis of cells from periodontal tissue to different biologic response modifiers, Adv. Dent. Res., 2 : 215 - 222, 1988.
23. Freeman E., Turnbull R.S. : The role of osseous coagulum as a graft material, J. Perio. Res., 8 : 229 - 235, 1973.
24. Takagi K., Urist M.R. : The reaction of the dura to Bone Morphogenetic Protein(BMP) in repair of skull defects. Ann. Surg., 196 : 100 - 109, 1982.
25. Frame J.W. : A convenient animal model for testing bone substitute materials, J. Oral Surg., 38 : 176 - 182, 1980.
26. Rowe N.L. : Nonunion of mandible and maxilla, J. Oral Surg., 27 : 520 - 526, 1969.
27. Sirola K. : Regeneration of defects in the calvaria. An experimental study, Annals of Medicine and Experimental Biology of Finland, 38(Suppl. 2) : 1 - 7, 1960.
28. Turnbull R.S., Freeman E. : Use of wounds in the parietal bone of the rat for evaluating bone marrow for grafting into periodontal defects. J. Periodont. Res., 9 : 39, 1974.
29. John P. Schmitz, Zvi Schwarz, Jeffrey O. Hollinger, Barbara D. Boyan : Characterization of rat calvarial nonunion defects. Acta Aanat., 138 : 185 - 192, 1990.

사진부도 설명

Figure 6. The calvarial defect was produced to measure 8 mm in diameter with a

사진부도 (I)

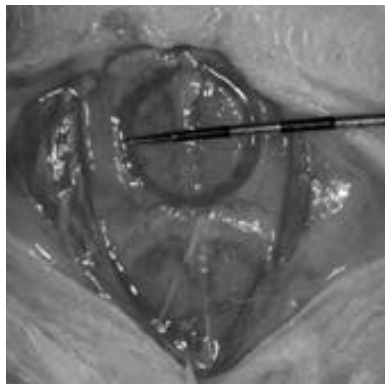


Figure 6. Defect formation

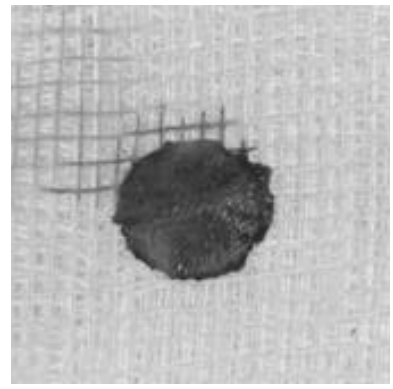


Figure 7. Romoved bone

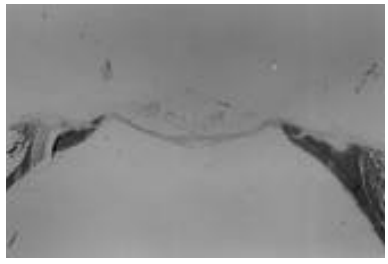


Figure 8. Control 4 weeks(H - E×10)

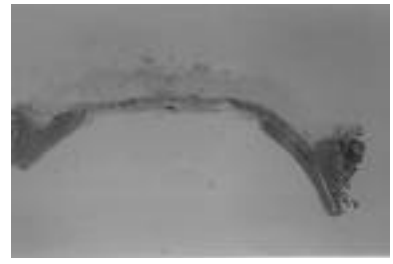


Figure 9. Experimental 4weeks(H - E×10)

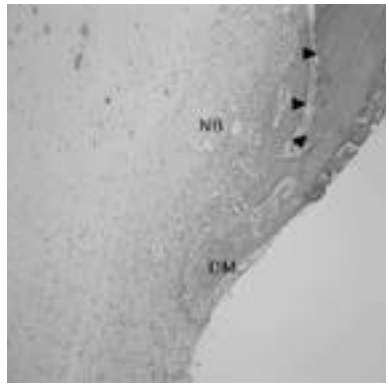


Figure 10. Control 2 weeks(H - E×100)

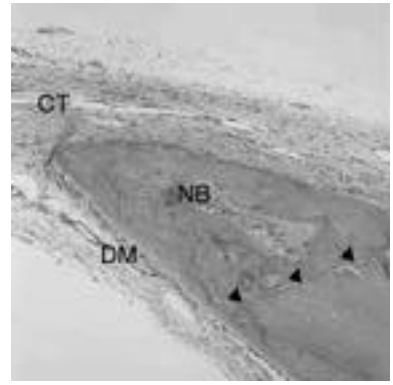


Figure 11. Control 4 weeks(H - E×100)

사진부도 (Ⅱ)

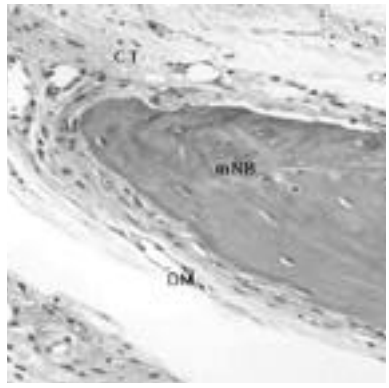


Figure 12. Control 8 weeks(H - E×400)

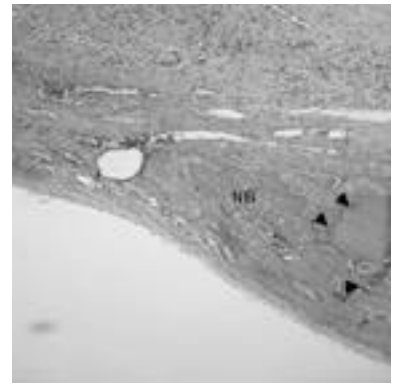


Figure 13. Exp. 2 weeks(H - E×

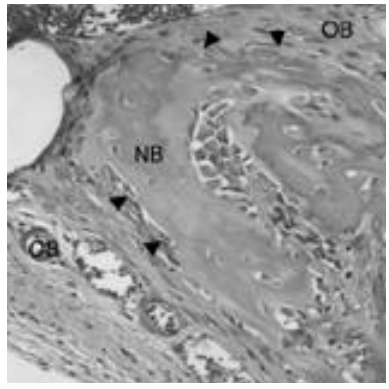


Figure 14. Exp. 2 weeks(H - E×400)

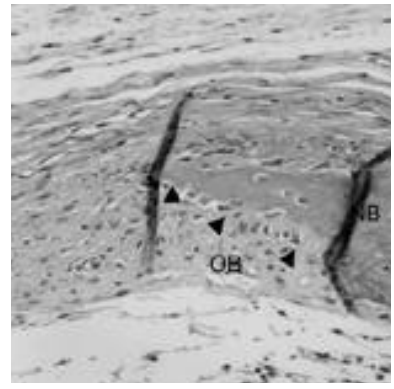


Figure 15. Exp. 4 weeks(H - E×400)

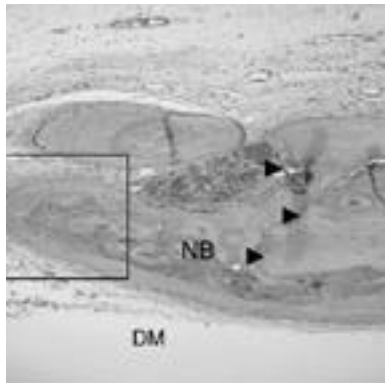


Figure 16. Exp. 8 weeks(H - E×100)

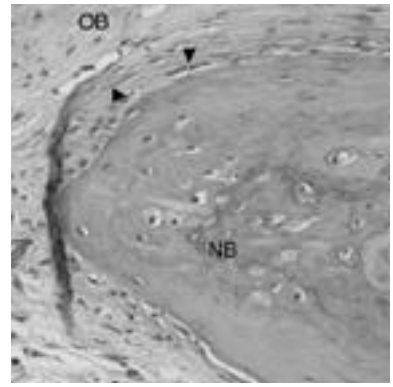


Figure 17. Exp. 8 weeks(H - E×400)

사진부도 (Ⅲ)

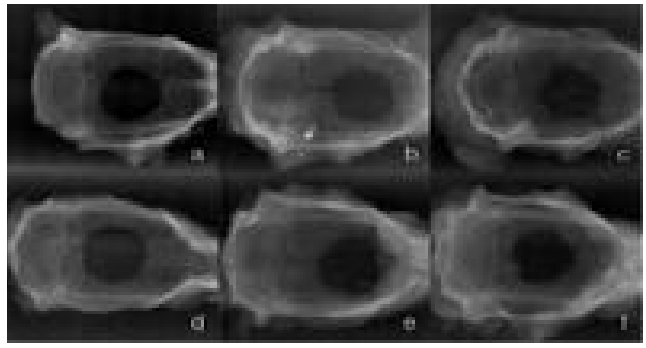


Figure 18. Digital images taken by Digora®

trephine bur.

Figure 7 Removed bone from the calvarial defect.

Figure 8 Untreated control defect, 4 weeks after operation.(H - E ×10)

Figure 9. Safflower seed extract applied experimental defect, 4 weeks after operation.(H - E ×10)

Figure 10. Control group, 2 weeks after operation. Arrows indicate the interface between the existing bone and the newly formed bone. The new bone formed around the margin of defect and in the deep layer of the dura mater.(NB: new bone, DM: dura mater).(H - E ×100)

Figure 11. Control group, 4 weeks after operation. The dura mater and the periosteum were intact and well organized. Surrounding connective tissue was also well organized. Many osteoblasts are arranged on the side of dura mater(CT: connective tissue).(H - E ×100)

Figure 12. Control group, 8 weeks after operation. The newly formed bone matured(mNB: mature new bone).(H - E×400)

Figure 13. Experimental group, 2 weeks after operation. Arrows indicate the interface between existing bone and newly formed bone.(H - E×100)

Figure 14. Experimental group, 2 weeks after operation. Note diffuse distribution of osteoblasts and blood vessels in the near of new bone.(H - E×400)

Figure 15. Experimental group, 4 weeks after operation. Osteoblasts was arranged in the outer margin of newly formed bone. Osteogenesis was still proceeding.(H - E×400)

Figure 16. Experimental group, 8 weeks after operation. Arrows indicate the surface between existing bone and matured new bone.(H - E×100)

Figure 17. Experimental group, 8 weeks after operation. Many osteoblasts are arranged on the newly formed bone margin. Osteogenesis seemed still proceeding.(H - E×400)

Figure 18. Digital images taken by Digora® (a: control group, 2 weeks; b: control group, 4 weeks; c: control group, 8 weeks; d: experimental group, 2 weeks; e: experimental group, 4 weeks; f: experimental group, 8 weeks)

- Abstract -

The Effect of Safflower Seed Extract on the Bone Forma - tion of Calvarial Bone Model in Sprague Dawley rat

Sung - Tae Kim[1], Gil - Ja Jhon[2], So - Hyoung Lim[2], Kyoo - Sung Cho[1], Chong - Kwan Kim[1], Seong - Ho Choi[1]

[1]Department of Periodontology, College of Dentistry, Yonsei University
Reasearch Institute for Periodontal Regen - eration
[2]Department of Chemistry, Division of Mol - ecular and Life Science, Ewha Womans University

The ultimate goal of periodontal therapy is the regeneration of periodontal tissue and repair of function. For more than a decade there have been many efforts to develop materials and methods of treatment to pro - mote periodontal wound healing. Recently many efforts are concentrated on the regeneration potential of material used in oriental medicine. In some *in vitro* and *in vivo* experiments, there have been many evidences that these materials have an effect on bone regeneration.

The purpose of this study was to evaluate histologically and radiologically in Sprague - Dawley rats the effects of safflower seed extracts on the regeneration of the calvarial defects surgically produced.

So in this study, the critical size defects were surgically produced in the calvarial bone of 30 Sprague - Dawley rats using the 8mm trephine bur. The safflower seed extract was applied into the defect of each rat in experimental group, whereas nothing was applied into the defect of each rat in control group. Rats were sacrificed at 2, 4, 8 weeks following operation and histomor - phometric and radiodensitometric analysis were performed.

1. The newly formed bone length was 102.91±22.05, 178.29±24.40 at 2 week in the each control, experimental group, 130.95±39.24, 242.62±50.33 at 4 week and 181.53±76.35, 240.36 ±22.00 at 8 week(unit, μm). In the 2, 4 week, there were statistically signifi - cant difference between control and experimental group($P<0.05$).
2. The newly formed bone area was 2962.06± 1284.48, 10648.35± 1284.48 at 2 week, 5103.25±1375.88, 9706.78±1481.81 at 4 week, 8046.02 ±818.99, 12057.06± 740.47 at 8 week(unit, μm^2). In every week, there were statistically significant difference between control and experimental group($P<0.05$).
3. The radiopacity was 14.26± .33, 25.47 ±4.33 at 2 week, 20.06±9.07, 26.61± 2.78 at 4 week, 22.99±3.76, 27.29± 1.54 at 8 week(unit, %). In the 2 week, there was statistically significant dif - ference between control and experi - mental group($P<0.05$).

In conclusion, the results of the present study suggest that safflower seed extract

initially has an effect on the newly formed bone area, length and radiopacity when it is applied to the calvarial defect of Sprague - Dawley rat. Then. the material has an effect on newly formed bone area and length.

Key words : Periodontal regeneration, saf - flower seed , calvarial defect