수종의 생약추출물이 MC3T3 - E1 세포의 염기성 인산분해 효소 활성에 미치는 영향

박상기 · 김대겸 · 유승한 · 김현아 · 김명동 · 유형근 · 신형식

원광대학교 치과대학 치주과학교실

I. 서론

치주질환은 치주병원균에 의한 감염질환으로 만성 염증에 의한 치주조직 파괴가 수반된다. 따라서 치주치료란 감염의 원인이 되는 치태 및 치석의 세균 요인을 물리적으로 제거하고, 염증성 치주질환으로 인해 상실된 치조골, 백악질, 치주인대 및 치은을 포함하는 치아지지조직들이 구조적, 기능적으로 새롭게 형성되는 치주조직재생을 포함하게 된다.[1)]

치주조직의 재건이나 재생을 위하여 이용된 술식으로는 치근면 처리술[2,3)], 골전도물질[4)], 골유도물질 혹은 골원성물질[5)]을 사용한 치조골 재생술식, 차폐막을 사용하여 파괴된 조직결손부에 특정 세포를 선별적으로 이주, 증식케 하는 조직유도재생술[6)] 및 최근에는 치주조직재생과 관련된 세포의 증식 및 분화를 유도할 수 있는 것으로 밝혀지고 있는 일부 성장인자에 관해 연구의 초점이 맞혀지고 있다.

Graves 와 Cochran[7)]은 미분화된 중배엽세포의 분화에 관계하는 폴리펩타이드계 성장인자로써 혈소판유래성장인자(platelet - derived growth factor, PDGF), 변형성장인자(trans - forming growth factor, TGF), 섬유아세포성장인자(fibroblast growth factor, FGF), 인슐린유사성장인자(insulin - like growth factor, IGF), 상피성장인자(epidermal growth fac - tor) 등이 있다고 보고하였다. 특히 이들 중 PDGF의 골에 대한 영향으로 Piche와 Graves(1998)[8)]는 골유래세포 배양시 PDGF를 첨가한 경우 세포의 증식율이 촉진되었다고 보고하였고, Rutherford(1992)[9)] 등은 치수, 치은 및 치주인대로부터 유래된 섬유아세포를 대상으로 PDGF의 효과를 규명한 실험에서 각 세포의 증식에 유효하였다고 보고하였다. 그리고 IGF - 1의 연구로 Canalis등[10)]이 IGF - 1은 조골세포에서 DNA 합성을 촉진한다고 보고하였고, Linkhart 와 Mohan[11)]은 MC3T3 - E1 세포에서 IGF는 교원합성은 촉진시키나 골세포 증식은 오히려 억제시킨다고 보고하였다. 여러 연구의 근거로 PDGF와 IGF가 치주조직재생에 많은 가능성이 제시되기도 하였다. 그러나 이러한 성장인자의 사용은 아직까지 정확한 투여용량 및 용법이 알려지지 않고 있고, 치주조직재생을 위하여 국소적으로 사용할 경우 전신적 영향에 대한 검증이 확인되지 않고 있다.

최근에 동양의학에서 사용되던 몇몇 생약제제에 관한 전래의 효능 및 효과를 근거로 치주질환 치료제로서의 응용 가능성 즉 치주질환균에 대한 항염효과와 항균효과를 비롯하여 치주

조직 재생능력에 미치는 영향 등에 대한 과학적인 접근과 분석이 시행되고 있다. 대표적인 생약제제로서 후박, 대조, 황금 및 은행엽 등을 들 수 있는데, 후박에서 추출, 분리하여 정제한 magnolol과 honokiol은 안정성이 높고 항균효과, IL - 1β및 PGE_2 생산차단효과 그리고 collagenase 활동억제효과 등[12]이 확인된 바 있고, 대조추출물은 IL - 1β및 PGE_2 생산차단효과, collagenase 활동억제효과 그리고 치은섬유아세포 활성화 증진효과 등[13,14]이 확인된 바 있으며, 황금은 소염작용 및 해열작용이 확인되었고[15], 은행엽 추출물도 치주질환세균에 대한 항균효과가 확인된 바 있다[16]. 특히 홍화는 adenosine diphosphate에 의한 혈소판 응집억제를 통한 항응혈 효과와 항염 효과[17] 등이 확인된 바 있고, 조골세포의 기능적 활성화 효과와 신생골 형성에 유의한 효과[18]가 밝혀지기도 하여 많은 연구가 이루어지고 있다.

이 외에도 치과영역에서 아직 연구는 되지 않았지만 옛부터 한방에서 사용되던 천궁(*Cnidii Rhizoma*)은 미나리과에 속하며 뿌리를 건조한 것으로 진경(鎭痙), 진정최면, 체온강하, 혈관확장, 동공축소, 진통, 항균, 항진균의 효과가 있다고 한다.[19] 서각(*Rhinocerotis Cornu*)은 물소의 뿔을 이르며 강심, 혈관확장, 승압, 백혈구감소 및 림프구 증가, 해열, 진정의 효가가 있다고 한다.[20] 골쇄보(*Drynariae Rhizoma*)는 수룡골과에 속하는 다년생 양치식물인 넉줄고사리의 근경을 건조한 약제로서 Ma(1995)등[21]은 골쇄보가 조류의 태아골세포의 석회화와 염기성 인산분해효소의 합성을 촉진한다는 사실을 발표한 바 있다. 또한 중약대사전, 동의보감, 본경속소, 향약집성방 등의 고문헌에 의하면 조혈작용, 관절통 및 치통의 진통작용, 골절시 치유 및 신생골 형성 촉진제로 알려진 바 있다[22,23].

본 연구는 동양의학에서 활용되고 있는 위에 언급한 세가지 생약 추출물을 각 농도별로 MC3T3 - E1 세포주에 투약, 배양한 후 분광측정기를 이용한 염기성 인산분해효소 활성도 측정 및 염색을 이용한 계측을 통해 그 활성도를 알아보고, 이를 토대로 상기 추출물의 임상적 응용가능성을 가늠하기 위해 세포 단위의 생물학적 실험을 시행, 치주조직 재생과정을 촉진시키는데 효과적인 약제를 개발하기 위해 시행하였다.

II. 연구재료 및 방법

1. 세포배양

Table 1. The list of natural products for this study

Korean name	Scientific name	Family	Used parts[a)]	Major Components	Reference
천궁	Cnidium officinale Makino (Cnidii Rhizoma)	Umbelliferae	Ro	1 - 2% of essential oil, cnidilide, neocnidilide, cnidium lactone, cnidimic acid, ligustilide, butylphthalide, butylidenephthalide, sedanoic acid, *d* - glucose, *d* - fructose, sucrose, amino acid	19
서각	Rhinoceros bicornis L. (Rhinocerotis Cornu)	Rhinocerotidae	Ho	calcium carbonate, calcium phosphate, tyrosine, cystein, thiolactic acid	20
골쇄보	Drynaria fortunei (Drynariae Rhizoma)	Polypodiaceae	Ro	not known	21 - 23

[a)] ; Ho; horn, Ro; root

골기질 단백을 만들어 내고 강화시킬 수 있는 생쥐 두개골의 MC3T3-E1(mouse calvaria osteoblasts)세포를 10% fetal bovine serum(FBS, Gibco BRL, USA)과 1% 항생제(Penicillin G sodium 10,000 units/ml, streptomycin sulfate 10,000 μg/mℓ and Amphotericin B 25 μg/ml in 0.85% saline, GibcoBRL, USA)가 첨가된 α-Minimum Essential Medium(α-MEM, GibcoBRL, USA) 2 mℓ이 담긴 6-well plate에 적정 세포(5×10^4 cells/well)를 분주하였다. 이를 37℃의 온도 및 100% 습도조건에서 95%의 공기와 5% CO_2를 계속 공급하면서 배양하였다. 배양액은 세포가 충분한 증식이 일어날 때까지 2-3일 간격으로 교환하였다.

2. 생약 추출물의 준비

원광대학교 약학대학에 의뢰하여 각각의 생약 100 g을 분말형태로 분쇄하여 증류수 1 ℓ와 혼합하여 가열 여과한 후 1,500 rpm의 rotatory evaporator로 농축한 다음 freeze dryer로 동결 건조하여 얻어진 분말을 이용하였다. 분말 1 g을 증류수 10 mℓ에 섞어 stock solution을 만들어 농도별로 희석한 후 0.2 μm syringe filter(Nalge company, USA)로 여과 멸균한 후 사용하였다.

3. 염기성 인산분해효소 측정

MC3T3-E1 세포를 6-well plate에 1×10^5cells/well이 되도록 분주한 후, 10% FBS가 첨가된 α-MEM으로 1일 동안 37℃, 100% 습도, 5% CO2 공기 혼합배양기에서 배양하였다. 1일 후 배지를 제거하고 0% α-MEM으로 2회 세척 후, 10% FBS, 1% 항생제, 50 μg/mℓ ascorbic acid, 10 mM Sodium β-glycerophosphate가 첨가된 α-MEM에 음성 대조군에는 한약제를 첨가시키지 않고 분주하였으며, 양성 대조군에는 10^{-7} M의 dexamethasone을 첨가하였고, 실험군은 적정 농도의 한약제를 첨가하여 분주한 후 3일과 5일동안 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 Diagnotics, USA) 0.1 mℓ, 0.1% triton X-100/saline 0.1 mℓ과 멸균된 증류수 0.1 mℓ을 잘 혼합하여, 이 반응물을 37℃에서 30분간 배양하였다. 0.1 N NaOH를 0.6 mℓ 첨가함으로서 이들 반응을 중지시켰다. p-NPP의 가수분해는 410 nm 파장의 분광측정기(Beckman DU-650, USA)에서 흡광도의 차이로 나타나며, p-nitrophenol(p-NP ; Sigma Diagnostics, USA)을 기준값으로 이용했다. 각각의 측정치를 대조군에 대한 백분율로 환산하였으며 통계학적 분석을 시행하였다.

4. 염기성 인산분해효소 염색법에 의한 골세포활성 측정

6-well plate에 세포를 1×10^5/well가 되도록 분주한 후, 실험군에는 적정 농도의 한약제를 첨가한 α-MEM 2 mℓ을 배양액으로 하고, 음성 대조군에는 한약제가 함유되지 않은 α-MEM 표준배양액을 배지로 이용하였고, 양성 대조군에는 10^{-7} M의 dexamethasone을 첨가하였다.

3일 및 5일 동안 배양한 후, 배지를 제거하고 2% paraformaldehyde 고정액을 각 well 당 2 ml씩 첨가해서 30분 동안 4℃에 보관하였다. 고정액을 제거하고 증류수로 2회 가볍게 세척한 후 naphthol AS-MX 용액과 fast red violet LB salt(Sigma Chemical Co., USA)가 혼

Table 2. Alkaline phosphatase absorbance of MC3T3-E1 cells treated with the extracts of *Cnidii Rhizoma* (Mean±S.D.)

Day	Negative control	Positive control	10^{-7} g/ml	10^{-6} g/ml
3	2.60±0.42	3.35±0.21	3.30±0.14	3.85±0.49
5	3.80±0.28	4.40±0.57	3.90±0.42	4.50±0.28

Table 3. The stained area which represent alkaline phosphatase synthesis of MC3T3-E1 cells treated with the extracts of *Cnidii Rhizoma* (㎛²) (Mean±S.D)

Day	Negative control	Positive control	10^{-7} g/ml	10^{-6} g/ml
3	30.97±3.56	41.41±9.36	47.44±9.24	58.08±8.54*
5	39.02±7.00	57.46±10.45	55.51±8.99	63.45±9.97*

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

합된 용액을 각 well 당 1 ㎖씩 넣고 30분 동안 37℃ 배양기에 배양하였다. 배양 후 증류수로 철저히 세척한 다음 도립현미경으로 관찰, 촬영하였고(×100), 염색에 양성반응을 보이는 적색 부위를 Image Pro II 영상분석장치(Media Cybernetrics, USA)를 이용하여 그 면적을 계측하였다.

5. 통계분석

각각의 생약제 내 대조군과 실험군 간의 차이 및 3일과 5일의 배양기간의 차이를 알아보기 위하여 각각의 ALP 값을 일원분산분석법(one way ANOVA)으로 실험결과에 유의성이 있는지를 통계적으로 검증하였다($p<0.05$).

III. 연구결과

1. 천궁에 대한 염기성인산분해효소의 합성 및 염색 계측

3일군, 5일군 모두에서 대조군 및 실험군간에 유의한 차이는 없었으며, 배양일에 따른 유의한 차이도 없었다($p<0.05$)(Table 2).

이에 반해 염기성 인산분해효소 염색법을 이용한 계측에서는 3일, 5일 모두 10^{-6}g/ml이 음성대조군에 비해 유의한 증가를 보였고, 배양일에 따른 유의한 차이는 없었다($p<0.05$)(Table 3, Figure 1).

Table 4. Alkaline phosphatase absorbance of MC3T3-E1 cells treated with the extracts of *Rhinocerotis* Cornu (Mean±S.D.)

Day	Negative control	Positive control	10^{-7} g/ml	10^{-6} g/ml
3	1.45±0.07	1.80±0.00*	1.50±0.00¥	1.95±0.07*§
5	3.15±0.21$	3.40±0.00	3.45±0.21$	3.85±0.41

* Statistically significant compared to negative control($p<0.05$).
¥ Statistically significant compared to positive control($p<0.05$).
$ Statistically significant compared to 3 days($p<0.05$).
§ Statistically significant compared to 10^{-7} g/ml group($p<0.05$).

Table 5. The stained area which represent alkaline phosphatase synthesis of MC3T3 - E1 cells treated with the extracts of *Rhinocerotis Cornu* (㎛²) (Mean±S.D.)

Day	Negative control	Positive control	10^{-7} g/ml	10^{-6} g/ml
3	44.94±9.04	62.19±6.28	69.72±0.00*	70.02±0.73*
5	32.86±4.18	48.91±6.57*	52.21±5.60*$	66.53±5.57*

* Statistically significant compared to negative control($p<0.05$).
$ Statistically significant compared to 3 days($p<0.05$).

Table 6. Alkaline phosphatase absorbance of MC3T3 - E1 cells treated with the extracts of *Drynariae Rhizoma* (Mean±S.D.)

Day	Negative control	Positive control	10^{-7} g/ml	10^{-6} g/ml
3	1.75±0.07	1.85±0.07	2.35±0.07*¥	2.45±0.07*¥
5	2.05±0.21	2.15±0.21	2.55±0.07	2.65±0.77

* Statistically significant compared to negative control($p<0.05$).
¥ Statistically significant compared to positive control($p<0.05$).

Table 7. The stained area which represent alkaline phosphatase synthesis of MC3T3 - E1 cells Treated with the extracts of *Drynariae Rhizoma* (㎛²) (Mean±S.D.)

Day	Negative control	Positive control	10^{-7} g/ml	10^{-6} g/ml
3	25.36±3.94	40.96±5.64	47.84±6.37*	44.31±7.98*
5	26.71±4.03	31.45±8.12	46.46±5.17*	41.64±3.67*

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

2. 오서각에 대한 염기성인산분해효소의 합성 및 염색계측

3일군에서 음성대조군에 비해 양성대조군이, 10^{-7} g/ml군에 비해 10^{-6} g/ml군이 유의한 증가를 보였으며, 10^{-6} g/ml군이 음성대조군에 비해 활성도가 컸으며, 10^{-7} g/ml군이 양성대조군에 비해 작았다. 5일군에서는 서로간에 유의한 차이가 없었다. 배양일에 따른 차이면에서 음성대조군 및 10^{-7} g/ml군이 3일에 비해 5일째 증가하였다($p<0.05$)(Table 4).

염기성 인산분해효소 염색법을 이용한 계측에서는 3일, 5일 모두 두 실험군이 음성대조군에 비해 유의한 증가를 보였으며, 10^{-7} g/ml 군의 경우 3일에 비해 5일째 유의한 증가를 보였다($p<0.05$)(Table 5, Figure 2).

3. 골쇄보에 대한 염기성인산분해효소의 합성 및 염색 계측

3일군에서 모든 실험군은 음성 및 양성 대조군 모두에 비해 유의한 증가를 보였으나, 5일 군에서는 서로간에 유의한 차이가 없었다. 3일과 5일 사이 두 배양일 차이에 의한 유의한 차이는 없었다($p<0.05$) (Table 6).

염기성 인산분해효소 염색법을 이용한 계측에서는 3일, 5일 모두 두 실험군이 음성대조군에 비해 유의한 증가를 보였다($p<0.05$)(Table 7, Figure 3).

IV. 총괄 및 고찰

치주질환은 부착치은의 소실과 함께 치주낭의 형성과 지지조직인 치은결합조직, 백악질, 치주인대 그리고 치조골의 파괴를 수반하고 임상적으로 증상이 뚜렷하지 않아 일반적으로 질환이 심화된 후에 내원하게 된다. 이런 파괴된 치주조직에 대해 재생에 관여하는 치주조직은 치은, 치주인대, 백악질과 치조골이며, 이 중 골조직의 재형성은 골흡수와 골형성의 복잡한 과정으로 일어나고, 이러한 활동은 여러 가지 호르몬, 성장인자, cytokines 등에 의해서 조절된다. 골조직은 유기질과 무기질을 포함하는 세포간질과 골세포, 조골세포, 파골세포 등으로 구성되며, 골조직은 단단하지만 안정된 상태는 아니고 항상 변화하는 상태로 골의 성분은 끊임없이 소실되고 다시 첨가되어 흡수와 침착이 균형을 이루고 있다. 치조골은 치주질환으로 인하여 소실되기도 하며, 경우에 따라서는 파괴된 치조골을 재생하기 위해 조골기능이 증강하여야 할 필요성도 있다.

최근까지 알려진 치주조직 재건 및 재생을 위하여 이용된 술식들은 다음과 같다. 첫째 치은연조직으로 부터 증식된 세포들이 치근면으로 용이하게 이주, 부착이 증진되도록 치근면 자체를 구연산 테트라싸이클린, fibronectin과 같은 치근면 처리제를 사용하여 처리하는 방법이다[24]. 둘째로 그들 자체가 생물학적 활성이 없으면서 골이식 후 주변 골조직에 어떠한 영향을 주지 않고 단순한 골결손부를 채워주어 신생조직 성장에 충진제(filler) 역할을 하는 hydroxyapatite같은 골전도 물질의 사용이다[25]. 셋째 탈회동결건조골이나 골혼화 및 골수 등, 숙주의 결체조직 혹은 골세포를 자극하거나, 생활성 골형성세포를 제공하는 골유도물질 혹은 골원성 물질을 사용한 골이식술이다[5]. 네번째로 생체내에서 흡수성 비흡수성 차폐막을 사용하여 다른 세포는 배제하고 특정 세포를 선별적으로 이주, 증식시켜 결손부를 보충하게 하는 조직유도 재생술의 도입이다[26].

아직은 초기단계이지만 국소적으로 다양한 성장인자를 투여해 재생을 획득하는 방법이 많이 연구되고 있다. 폴리펩타이드계 성장인자들에 대해 Hanks[27]등은 배양한 쥐의 두개골 세포에 PDGF를 적용한 실험에서 새로운 단백질의 형성이 자극되는 것으로 보아 상해부위에서 혈관밖으로 나온 혈액내에 존재하는 PDGF가 정상적인 골막하에서 골의 축적을 자극할 수 있다고 보고하였으며, Centrella[28]등은 PDGF-BB를 태생쥐의 두정골에서 채취한 골아세포에 적용시 핵산, 교원성 단백질 및 비교원성 단백질의 합성을 증가시킴을 보고하였다.

상기 여러 연구의 근거로 PDGF 및 여러 성장인자의 치주조직재생에 많은 가능성이 제시되기도 하였다. 그러나 이들 성장인자는 대부분의 인체를 구성하는 전반적인 섬유아세포의 성장과 증식에 괄목할 만한 영향을 미치므로 특정 조직의 재생에는 임상시술과정에 고도의 기술을 요하게 된다. 또한 각종 종양조직에서 다량 발견되어 임상적용을 위한 안정성 연구가 부족하고 부작용에 관해 명확히 규명되어 있지 않기 때문에 아직까지 실용 임상화 단계에는 미치지 못하고 있다.

따라서 상실된 치조골, 치주인대, 백악질, 치은이 모두 생성되는 완전한 치주조직재생법은 없는 상태이며, 각종 외과적 치료 후에 백악질과 치조골사이 치주인대의 재생과 결손부가 골조직으로 완전한 재생이 되도록 부작용과 독성이 없으면서 안전하게 장시간 사용이 가능하며 치주인대세포 및 골세포의 활성을 증가시킬 수 있는 약제의 개발은 무엇보다 중요하다.

MC3T3-E1 세포는 Kodama[29]등에 의하면 신생쥐의 두개골에서 분리된 조골세포이며, 섬유아세포의 형태를 보이다가 장기간 배양시 높은 ALP활성을 보이며, 조골세포와 골세포로 분화 가능하며 골기질의 석회화를 일으키는 세포로 알려져 있다.[30] ALP가 석회화 과정에 관여하는 정확한 과정은 잘 알려져 있지 않지만,

Krzysztof[31]등은 칼슘과 인 대사에 관여하는 효소로 조골세포의 중요한 지표로서 생산, 분비되는 특징적인 생화학적 산물로 비교적 높은 pH인 8 - 10 정도에서 monoester phosphate를 가수분해해서 주로 뼈가 형성될 때 높은 농도로 발현된다고 보고하였으며, Stein[32] 등은 골세포의 분화정도를 알기 위해 염기성 인산분해효소 활성도를 측정해보아야 하며, 높은 ALP활성도는 골세포 분화의 표지인자라고 보고하였다. 또한 염기성 인산분해효소는 유기인산 에스테르를 가수분해하여 석회화가 이루어지는 부위에서 국소적으로 인산이온의 농도를 증가시키는 효소로서, 세포외기질에 인산칼슘을 침착시켜 석회화를 유도하는 기능을 갖는다고 알려져 있다[33].

본 연구에서는 각 생약제제별로 다양한 농도로 조골모세포에 투여하여 조골세포의 ALP 활성도에 영향을 미칠 수 있는 농도를 두 세가지 정한 다음 염기성 인산분해효소의 합성량을 측정한 결과, 천궁을 제외한 모든 제제가 음성대조군에 비해 유의한 증가를 보인 반면($p<0.05$)(Table 2, 4, 6), 골쇄보만이 dexamethasone이 첨가된 양성대조군에 비해 유의한 증가를 보였으며, 골쇄보가 가장 큰 수치를 보였다($p<0.05$)(Table 6). 즉, 염기성 인산분해효소 활성도에 있어 천궁을 제외한 모든 제제가 유의한 효과를 보였다. 그러나 dexamethasone을 처리한 양성 대조군에 비해 유의한 효과를 보인 제제는 한 가지에 지나지 않았다. 배양 기간에 따른 차이면에 있어서 천궁, 오서각, 골쇄보는 3일과 5일 사이에 유의한 차가 없었으나, 오서각의 10^{-7} g/ml 군만 유의한 차이를 보였다($p<0.05$)(Table 4).

본 연구의 양성대조군에 첨가한 dexamathasone은 조골유사세포를 분화시켜 골 형성을 증가시킨다고 하며[34], 쥐의 두개골과 골수에서 채취한 조골성 dexamathasone으로 처리한 경우 골 특이 단백질인 osteopontin과 염기성 인산분해효소, osteocalcin 등의 합성이 증가한다고 하였다[35]. 한편, dexamathasone이 부족한 배지에서는 치주인대세포 뿐만 아니라 조골유사세포도 결절이나 그와 유사한 치밀한 물질을 형성시키지 못한다고 하였다[36]. 본 연구에서 dexamathasone을 처리한 양성대조군의 경우 염기성 인산분해효소 활성도가 골쇄보 보다는 작았다($p<0.05$). 그 외 나머지 약제와는 통계학적으로 유의한 차이가 없었다.

염기성 인산분해효소를 확인할 수 있는 또 다른 방법으로 염색을 이용하는 방법이 있다. 본 연구에서는 Azo 색소법(Burstone 법)을 이용하였다. Naphthol AS - BI phosphate 기질은 조직내 존재하는 염기성 인산분해효소에 의해 가수분해되어 orthophosphate와 naphthol이 유도체로 유리된다. 유리된 naphthol은 반응액에 함유되어 있는 diazonium 염과 즉시 결합하여 azo dye를 형성하여 적색의 효소 활성 부위를 나타내게 된다. 적색으로 나타난 부위를 영상분석기를 이용하여 계측한 결과 3 가지 모든 생약제제 실험군이 음성 대조군에 비해 유의하게 크게 나타났으나, 양성 대조군과는 유의한 차이가 없었다(Table 3, 5, 7, Figure 1 - 3). 3일에 비해 5일째 더 크게나온 것은 오서각이었다(Table 5, Figure 2).

본 연구 결과 수 종의 생약제제는 조골세포의 염기성 인산분해효소 합성에 영향을 미치는 것으로 나타났으며, 앞으로 골형성과 관련된 다양한 측정법을 사용하고, 생약제제에 대한 세포독성과 활성 등 더욱 세밀한 평가가 이루어져야 할 것이다. 또한 이들 생약제간의 병용, cytokine 및 성장인자 등 골개조와 관련된 물질과 생약의 병용시 상승효과에 관한 연구 및 더 나아가 임상적 유용성에 대한 연구가 더 필요하리라 사료된다.

V. 결론

부작용이 적고 장기간 사용이 가능하다는 장점을 가진 생약제제에 대하여 최근들어 많은

연구가 이루어지고 있으며, 이러한 약제들이 가지고 있는 항균, 항염증 및 치주조직의 재생능력에 대한 검증이 이루어 지고 있다. 천궁, 오서각, 골쇄보는 전통적으로 골질환 치료에 이용되어온 생약제제들이다. 본 연구의 목적은 적정농도의 이들 제제들을 쥐의 골모세포주(MC3T3 - E1 cell)에 투여 배양한 후, 이들 세포의 염기성인산분해효소 합성능을 검증하는데 있다. 염기성 인산분해효소 합성능을 분광측광기 및 미세현미경 사진을 이용하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 분광측정기를 이용한 결과 천궁을 제외한 모든 제제가 음성대조군과 양성대조군에 비해 증가를 보였다($p<0.05$)(Table 2, 4, 6). 특히 골쇄보는 양성대조군에 비해 유의한 증가를 보였고, 가장 큰 차이를 나타냈다($p<0.05$).
2. 천궁, 오서각, 골쇄보는 3일과 5일 사이에 유의한 차가 없었으나, 오서각의 10^{-7}g/ml 군이 3일에 비해 5일에서 유의한 증가를 보였다($p<0.05$).
3. 염기성 인산분해효소 염색법에 의한 활성부위 계측 결과 모든 실험군이 음성 대조군에 비해 유의하게 크게 나타났으나, 양성 대조군과는 유의한 차이가 없었다($p<0.05$).
4. 염기성 인산분해효소 염색에 의한 활성 부위 계측 결과 3일에 비해 5일째 더 크게나온 것은 오서각이었다($p<0.05$).

이상과 같은 결과로 수 종의 생약제제는 조골세포의 염기성 인산분해효소 합성에 영향을 미치는 것으로 나타났으며, 이를 이용해 앞으로 임상적 유용성의 방안을 모색할 필요가 있으리라 사료된다.

VI. 참고 문헌

1. Takata T. : Oral wound healing concepts in periodontology. Curr Opin Periodontol 119 - 127, 1994.
2. Terranova V.P., Franzetti L.C., Hic S., Wikesjo U.M. : Biochemically mediated periodontal regeneration. J periodont Res 22: 248 - 251, 1987.
3. Wikesjo U.M., Claffey N., Nilveus R., Egelberg J. : Periodontal repair in dogs: effect of root surface treatment with stannous fluoride or citric acid on root resorption. J periodontol 62(3): 180 - 184, 1991.
4. Schepers E.J., Ducheyne P., Barbier L., Schepers S. : Bioactive glass particles of narrow size range : a new material for the repair of bone defects. Implant Dent 2(3): 151 - 156, 1993.
5. Garrett S., Loos B., Chamberlain D., Egelberg J. : Treatment of intraosseous periodontal defects with a combined adjunctive therapy of citric acid conditioning, bone grafting, and placement of collagenous membranes. J Clin Periodontol 15(6): 383 - 389, 1988.
6. Pontoriero R., Nyman S., Ericsson I., Lindhe J. : Guided tissue regeneration in surgically - produced furcation defects. An experimental study in the beagle dog. J Clin Periodontol 19(3): 159 - 163, 1992.
7. Graves D.T., Cochran D.L. : Mesenchymal cell growth factors. *Crit Rev* Oral Biol Med 1: 17 - 36, 1990.
8. Piche J.E., Graves D.T. : Study of the growth factor requirements of human bone - derived cells: a comparison with human fibroblasts. Bone 10(2): 131 - 138, 1989.

9. Rutherford R.B., Trail Smith M.D., Ryan M.E., Charette M.F. : Synergistic effects of dexamethasone on platelet - derived growth factor mitogenesis in vitro. Arch Oral Biol 37(2): 139 - 145, 1992.
10. Canalis E., Pash J., Gabbitas B., Rydziel S., Varghese S. : Growth factors regulate the synthesis of insulin - like growth factor - I in bone cell culture. Endocrinology 133: 33 - 38, 1993.
11. Linkhart T.A., Mohan S. : Parathyroid hormone stimulates release of IGF - I and IGF - II from neonatal mouse calvaria in organ culture. Endocrinology 125: 1484 - 1491, 1989.
12. Osawa K., Matsumoto T., Yasuda H., Kato T., Naito Y., Okuda K. : The inhibitory effect of plant extracts on the collagenolytic activity and cytotoxicity of human gingival fibroblasts by Porphy - romonas gingivalis crude enzyme. Bull Tokyo Dent Coll 32: 1 - 7, 1991.
13. 양창호, 이용무, 조기영, 배기환, 정종평 : 대조추출물이 치은섬유아세포의 생물학적 활성화에 미치는 영향. 대한치주과학회지 24: 144 - 154, 1994
14. 양창호, 류인철, 최상묵, 정종평 : 치은섬유아세포와 치주인대세포의 형태와 화학주성에 미치는 대조추출물의 효과에 관한 연구. 대한치주과학회지 25: 279 - 289, 1995
15. Yasukawa K., Takido M., Takeuchi M., Nakagawa S. : Effect of chemical constituents from plants on 12 - 0 - tetradecanoylphorbol - 13 - acetate - induced inflammation in mice. Chem Pharm Bull(Tokyo) 37(4): 1071 - 1073, 1989.
16. 정종평, 구영, 배기환 : 후박 및 은행엽 추출물의 항균, 항염 및 세포활성도에 미치는 영향. 대한치주과학회지 25: 478 - 486, 1995.
17. 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.
18. 강정구, 유형근, 신형식. : 홍화씨 추출물이 치주인대세포와 조골유사세포의 골 광물화 작용에 미치는 효과. 대한치주과학회지 28: 475 - 489, 1998.
19. 新豊文出版公社, 中藥大辭典(下), 臺北 2806 - 2808, 1982.
20. 韓大錫. 生藥學 서울, 東明社 165 - 168, 365 - 367, 417 - 419, 1988
21. 이상인 : 本草學.개정판. 89 - 90. 수서원. 1981.
22. 韓國科學技術資料大系. 醫藥學編 東醫寶鑑 外形編 여강출판사 2卷: 202, 1988.

23. 정보섭, 신민교. 圖解鄕藥大辭典 초판 영림사 73 - 74, 1990.
24. Caffesse R.G., Kerry G.J., Chaves E.S., McLean T.N., Morrison E.C., Lopatin D.E., Caffesse E.R., Stults D.L. : Clinical evaluation of use of citric and autologous fibronectin in periodontal surgery. J Periodontol 59: 565 - 569, 1988.
25. Schepers, E.J.G., Pinruethal P. : A comparative study of bioactive glass and porous hydroxyapatite particles in periodontal lesions. Bioceramics 6: 113 - 116, 1993.
26. Gottlow J., Nyman S., Lindhe J., Karring T., Wennstrom J. : New attachment formation in the human periodontium by guided tissue regeneration. Case report. J Clin Periodontol 13: 604 - 616, 1986.
27. Hanks C.T., Kim J.S., Edwards C.A. : Growth control of cultured rat calvarium cells by platelet - derived growth factor. J Oral Pathol 15: 476 - 483, 1986.
28. Centrella M., McCarthy T.L., Kusmik W.F., Canalis E. : Relative binding and biochemical effects of heterodimeric and homodimeric isoforms of platelet - derived growth factor in osteoblast - enriched culture from fetal rat bone. J Cell Physiol 147: 420 - 426, 1991.
29. Kodama H., Amaga Y., Sudo H., Kasai S., Yamamoto S. : Establishment of a clonal osteogenic cell line from newborn mouse calvaria. Jpn J Oral Biol 23: 899 - 910, 1981.
30. Kurihara N., Ishizuka S., Kiyoki M., Haketa Y., Ikeda K., Kumegawa M. : Effects of 1,25 - dihydroxyvitamin D3 on osteoblastic MC3T3 - E1 cells. Endocrinology 118: 940 - 947, 1986.
31. Wlodarski K.H., Reddi A.H. : Alkaline phosphatase as a marker of osteoinductive cells. Calcif Tissue Int 39: 382 - 385, 1986.
32. Stein G.S., Lian J.B., Owen T.A. : Relationship of cell growth to the regulation of tissue - specific gene expression during osteoblast differentiation. FASEB J 4: 3111 - 3123, 1990.
33. 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 phosphate. Bone Miner 14(1): 27 - 40, 1991.
34. Bellows C.G., Aubin J.E., Heersche J.N., Antosz M.E. : Mineralized bone nodules formed in vitro from enzymatically released rat calvaria cell populations. Calcif Tissue Int 38(3): 143 - 154, 1986.
35. Owen T.A., Aronow M., Shalhoub V., Barone L.M., Wilming L., Tassinari M.S., Kennedy M.B., Pockwinse S., Lian J.B., Stein G.S. : Progressive development of the rat osteoblast in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. J Cell Physiol 143(3): 420 - 430, 1990.
36. Yamashita Y., Sato M., Noguchi T. : Alkaline phosphatase in the periodontal ligament of the rabbit and macaque monkey. Arch Oral Biol 32(9): 677 - 8, 1987.

사진부도

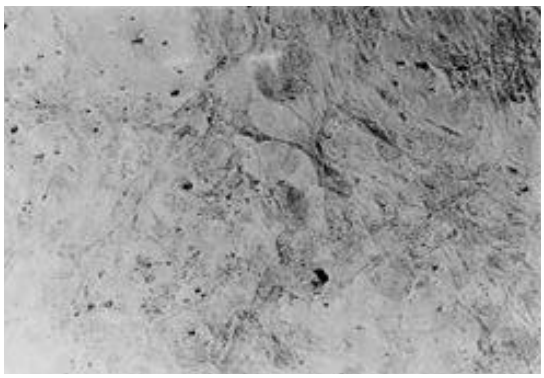

Figure 1 - 1

Figure 1 - 2

Figure 2 - 1

Figure 2 - 2

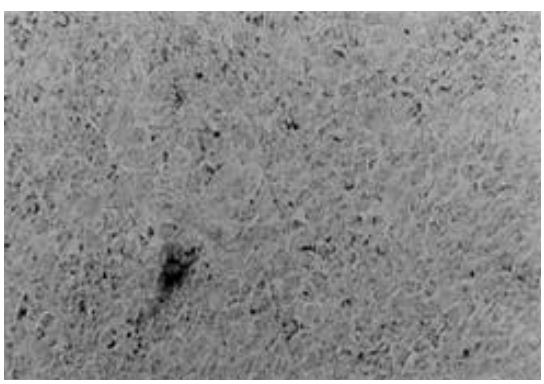

Figure 3 - 1

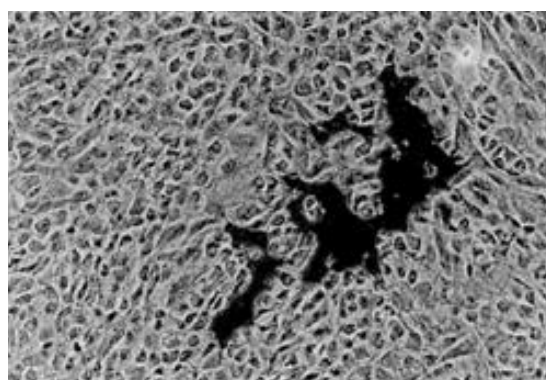

Figure 3 - 2

사진부도 설명

Figure 1 - 1. Microphotoghaph reveals ALP synthesis expressed as red - colored area of MC3T3 - E1 cells treated with the extracts of *Cnidii Rhizoma*(negative control, Naphthol AS - BI method, ×100).

Figure 1 - 2. Microphotoghaph reveals ALP synthesis expressed as red - colored area of MC3T3 - E1 cells treated with the extracts of *Cnidii Rhizoma*(10^{-6}g/ml group, Naphthol AS - BI method, ×100).

Figure 2 - 1. Microphotoghaph reveals ALP synthesis expressed as red - colored area of MC3T3 - E1 cells treated with the extracts of *Rhinocerotis Cornu*(negative control, Naphthol AS - BI method, ×100).

Figure 2 - 2. Microphotoghaph reveals ALP synthesis expressed as red - colored area of MC3T3 - E1 cells treated with the extracts of *Rhinocerotis Cornu*(10^{-6}g/ml group, Naphthol AS - BI method, ×100).

Figure 3 - 1. Microphotoghaph reveals ALP synthesis expressed as red - colored area of MC3T3 - E1 cells treated with the extracts of *Drynariae Rhizoma*(negative control, Naphthol AS - BI method, ×100).

Figure 3 - 2. Microphotoghaph reveals ALP synthesis expressed as red - colored area of MC3T3 - E1 cells treated with the extracts of *Drynariae Rhizoma*(10^{-7}g/ml group, Naphthol AS - BI method, ×100).

Effects of Extracts of Natural Products on Alkaline Phos - phatase Activity of MC3T3 - E1 Cells

Sang - Kee Park, Dae - Kyum Kim, Seung - Han You, Hyun - A Kim, Myoung - Dong Kim,
Hyung - Keun You, Hyung - Shik Shin

Department of Periodontology, College of Dentistry, Wonkwang University.

Several growth factors and polypeptides were studied for the regeneration of peri - odontal supporting tissues which had been lost due to periodontal disease. But these are not commonly 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. Recent - ly, many natural products, which have advantage of less side effects and possibili - ty of long - term use, have been studied for their capacity and effects of anti - bacterial, anti - inflammatory and regenerative poten - tial of periodontal tissues. *Cnidii Rhizoma*, *Rhinocerotis Cornu* and *Drynariae Rhizoma* have been traditionally used as a drug for treatment of bone disease in oriental medi - cine. The purpose of this study was to examine the ability of alkaline phosphatase synthesis of MC3T3 - E1 cells when above medicines were supplimented. MC3T3 - E1 cells were cultured with α- MEM(negative control), dexamethasone(positive control), and each natural products for 3 and 5 days. And then ALP synthesis was measured by spectrophotometer for enzyme activity and by naphthol AS - BI staining for morphome - try. Except *Cnidii Rhizoma*, all of the natural products of this study induced higher activ - ity of ALP synthesis than controls. Among them *Drynariae Rhizoma* induced the high - est activity. In the aspects of culturing time, all medicines did not showed the difference between 3 and 5 days, but 10^{-7}g/ml group of *Rhinocerotis Cornu* showed significant increase at 3 days than at 5 days. These results indicate that several natural prod - ucts have a inducing ability of ALP synthe - sis on osteoblasts.