

속단의 dichloromethane 분획물이 태아골모세포의 골형성 유도에 미치는 효과

이영준¹ · 최희인¹ · 김윤철² · 신형식¹ · 유형근¹

원광대학교 치과대학 치주과학교실¹, 약학대학²

I. 서론

치주질환은 치태세균에 의한 직접적인 작용 또는 세균에 대한 염증 및 면역반응에 의하여 치주조직이 파괴되는 질환으로서 치아주위조직의 염증과 치주인대의 파괴, 부착 상실, 치조골의 소실로 인한 깊은 치주낭의 형성 등과 같은 양상이 특징적이며, 치은, 치주인대, 백악질 및 치조골 등으로 구성되는 치아주위조직을 파괴시켜 결과적으로 치아를 상실케 하는 질환이다¹⁾. 따라서 치주조직의 재생이란 염증성 질환으로 인해 상실된, 치조골, 치주인대, 백악질 및 치은을 포함하는 치아지지조직들이 구조적, 기능적으로 새롭게 형성되는 것을 의미하며, 이는 치주치료의 이상적인 목표라 할 수 있다^{2,3)}.

치주질환이 진행됨에 따라 발생하는 치주조직 결손부의 재건이나 재생을 위하여 이용된 술식으로는 치근면 자체를 특정한 약물로 처리해 상아세관의 교원질을 노출시키고 치근표면의 세균들을 제거하거나 줄이는 산을 이용한 치근면 처리술과^{4,5)} 차폐막을 사용하여 파괴된 조직결손부에 특정세포를 선별적으로 이주, 증식케하는 조직유도재생술^{6,7)}, 골유도물질 혹은 골원성물질의 사용⁸⁾, 노출된 치근면을 피복하고 조직재생을 도모하는 치관변위관막술⁹⁾ 및 상

기 술식의 복합 처치 등으로 구분할 수 있다.

또한 최근에는 치주조직의 치유과정에 있어 치주조직재생에 관련되는 세포의 증식과 분화를 조절할 수 있는 일부 성장 인자에 대해 많은 관심이 모아지고 있으며 치주조직의 재생관련세포의 증식 및 분화를 유도할 수 있는 것으로 밝혀지고 있는 일부 성장인자 등에 관한 연구가 이루어지고 있으며 성장인자가 치주조직의 재생에 필요한 치주인대세포, 백악아세포, 조골세포의 증식과 이주과정에서 유효한 효과를 나타낼 수 있다는 가능성이 제시되었다¹⁰⁾.

성장인자는 염증부위에서 분비되는 폴리펩티드분자로서 상처치유과정에서 일어나는 사건들을 조절하며, 이것들은 혈류내로는 분비되지 않고, 결합조직세포의 이주와 단백질의 성장과 합성 그리고 세포외 물질의 다른 요소들을 조절한다¹¹⁾.

현재 임상에서의 적용을 위한 치주조직 재생제제로는 Platelet Derived Growth Factor(PDGF), Insulin-like Growth Factor(IGF)등^{12,13)}과 세포외기질의 성분인 fibronectin등이^{14,16)} 있으나 이러한 인자들의 임상에서의 이용은 실용화되기에 경제적으로 저렴하지 않고, 국소조직에 이용시 신체 타 기관에 미치는 영향이나 손상조직에 이용시 각종 분해효소에 의한 효과차단 등에 관한 문제점들, 그리고 응용

*이 논문은 2003년도 원광대학교 교비 지원에 의해서 수행됨.

교신저자 : 유형근, 전북 익산시 신용동 344-2 원광대학교 치과대학 치주과학 교실, 우편번호: 570-749

방법의 개발비용 등으로 상품화되기에는 아직 경제성등이 문제가 되고있는 현실이다.

최근에는 성장인자외에 한방에서 사용되고있는 생약제제의 치주조직 재생능력이 관심의 대상이 되고 있는데 몇몇 생약제제에 관한 전래의 효과 및 효능을 근거로 치주질환 치료제로서 치주질환균에 대한 항염효과와 항균효과를 비롯하여 치주조직재생 능력에 미치는 영향 등에 대한 과학적인 접근과 분석이 시도되고 있다.

현재 치과분야에서 연구되어지는 대표적인 생약제제로는 황련, 후박, 대조, 홍화씨 및 속단 등을 들 수 있는데, 황련은 그람 양성 및 음성균과 곰팡이 등에 광범위한 항균작용을 가지며 항염증 작용, 지혈 작용, 항암 작용등이 있는 것으로 알려져 있어 구내염, 화농증, 피부염증, 비출혈 등에 사용되며^{17,18)} 후박에서 추출, 분리하여 정제한 magnolol과 honokiol은 안정성이 높고 항균 효과, IL-1 β 및 PGE₂ 생산차단효과 그리고 collagenase 활동 억제 효과등이 확인된 바 있고¹⁹⁾, 대조추출물은 IL-1 β 및 PGE₂ 생산차단효과 그리고 collagenase 활동억제효과 그리고 치은섬유아세포 활성화 증진 효과등이 확인된 바 있으며^{20,21)}, 특히 홍화는 adenosine diphosphate에 의한 혈소판 응집 억제를 통한 항응혈 효과와 항염 효과등이 확인되었고 조골세포의 기능적 활성화 효과와 신생골 형성에 유의한 효과²²⁻²⁷⁾가 밝혀지기도 하여 많은 연구가 이루어지고 있다.

속단은 통증을 제거하고 새살이 돋게하며 근육(筋骨)을 이어주는 작용이 있어 붙인 이름으로 관절이 퇴행성으로 변화된 상태에 풍습사기(風濕邪氣)가 침입했을 때 두충(杜冲)과 같이 사용할 경우 상승효과가 나타나 강근골(强筋骨)하며 활혈(活血)의 특징이 있다²⁸⁾.

본 연구는 위에 언급한 속단을 dichloromethane층(CH₂Cl₂ layer)으로 성분 분리한 후 치주조직재생에 관여하는 태아골모세포에 투여하여 이 약제가 세포활성도 및 염기성 인산분해효소 활성도, 골 광물화 과정에 미치는 영향을 알아보고 이를 토대로 상기 추출물의 임상적 응용 가능성을 가늠하기 위해 시행하였다.

II. 연구 재료 및 방법

1. 세포배양

태아골모세포주(hFOB1 1.19 ; American Type Culture Collection, Manassas, VA)를 10% fetal bovine serum (FBS, GibcoBRL, Grand island, NY, USA)와 0.03 mg/ml G-418 (Duchefa, Netherlands)가 첨가된 DMEM : F-12 HAM 1:1 Mixture (Sigma, St.Louis, MO, USA) 2 ml이 담긴 6-well 배양접시에 적정세포(5 x 10⁴ cell/well)를 분주하였다. 이를 34°C의 온도 및 100% 습도조건에서 95%의 공기와 5% CO₂를 계속 공급하면서 배양하였다. 배양액은 세포가 충분한 증식이 일어날 때까지 2일 간격으로 교환하였고 계대 배양은 1:3의 비율로 시행하였다.

2. 속단 추출물의 준비

실험에 사용한 속단은 2002년 1월 전북 익산시 한약건재상에서 구입하였으며, 증거표본(WKS02-13)은 원광대학교 약학대학 표본실에 보관되어 있다. 건조하여 세절한 속단(1.2 kg)을 메탄올(5 L)로 2시간 동안 2회 가열 추출하고 여과하여 여액을 감압농축하였다. 얻어진 메탄올 엑스(196 g)는 60% 수성 메탄올에 용해시키고 n-hexane과 dichloromethane으로 순차적으로 분배하였다. 60% 수성 메탄올 층은 다시 감압농축한 후 증류수에 용해시키고 butanol로 분배하였다. 각 용매 분획은 감압농축기로 용매를 제거하였으며, n-hexane, dichloromethane 및 butanol 분획물이 각각 4.5 g, 6.7 g, 56.0 g 얻어졌다. 본 실험에서는 dichloromethane 분획물(d-분획물)을 사용하였다.

3. 세포활성도 측정

태아골모세포를 hemocytometer로 세포수를 세어 96-well 배양접시(Falcon, Division of Becton Dickinson and Co., Lincoln Park, NJ, USA)의 각 well 당 2 x 10³의 세포가 들어가도록 분주하였다. 이를

34°C의 온도 및 100% 습도조건에서 95%의 공기와 5% CO₂를 계속 공급하면서 배양한 후 부착되지 않은 세포를 제거하기 위해 배지를 교환하고 실험군에는 100 ng/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml의 d-분획물을 첨가하고 대조군은 DMSO(dimethyl sulfoxide; Junsei, Japan)를 넣어 2일, 4일, 6일간 배양하였다. 일정한 시간이 경과한 후 MTT(3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide ; No. M2128, Sigma, USA) 용액 200 µl씩을 각각의 well에 첨가하여 4시간동안 배양하였다. 세포 배양 후 배양액을 제거하고 형성된 formazan 결정을 용해시키기 위해 DMSO 200 µl를 넣은 후 ELISA analyser(Spectra MAX 250, Molecular Devices Co., USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4. 염기성 인산분해효소 측정

태아골모세포를 6-well 배양접시에 1 × 10⁵ cell/well이 되도록 분주한 후, 10% FBS가 첨가된 DMEM/F-12 1:1 Mixture에서 단일 밀생층이 형성될 때까지 34°C, 100% 습도, 5% CO₂ 공기 혼합 배양기에서 배양하였다. 단일 밀생층이 형성된 후 배지를 제거하고 DMEM/F-12 1:1 Mixture으로 2회 세척 후, 10% FBS, G-418 항생제, 50 µl/ml ascorbic acid, 10 mM sodium β-glycerophosphate가 첨가된 DMEM/F-12 1:1 Mixture에 음성 대조군에는 d-분획물을 첨가시키지 않고 분주하였으며, 양성 대조군에는 10⁻⁷ M의 dexamethasone을 첨가하였고, 실험군은 100 ng/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml의 d-분획물을 첨가하여 분주한 후 3일 동안 각각 배양하였다. 일정배양시간이 지난 후 배지를 제거하고, trypsin-EDTA로 세포를 분리시키고 1,500 rpm에서 6분간 원심 분리하였다. 상층액을 제거하고 0.2 ml의 멸균된 증류수를 첨가하여 초음파 분쇄기로 현탁하였다. 각 세포 현탁액 0.1 ml에 0.1M glycine NaOH buffer(pH 10.4) 0.2 ml, 15 mM의 p-nitrophenyl phosphate(pNPP ; Sigma, USA) 0.1 ml, 0.1% triton X-100/saline 0.1 ml와 멸균된 증류수 0.1 ml를 잘 혼합하여, 이 반응물을 37°C에서 30분간 배양하였다. 0.1 N NaOH를 0.6 ml 첨가함

으로써 이들 반응을 중지시켰다. 배양된 세포는 96-well 배양접시에 옮겨졌고 p-NPP의 가수분해는 410 nm 파장의 ELISA reader에서 흡광도의 차이로 나타나며, p-nitrophenol (p-NP ; Sigma, USA)을 기준 값으로 이용했다. 단백질농도는 BCA protein assay reagent (Pierce, USA)를 사용하여 측정하며, ALP 활성도는 nM/30 min/mg of protein 으로 나타내었다.

5. 석회화 결절 관찰

6-Well 배양접시에 1 × 10⁵개의 세포가 들어가도록 분주한 후 각각 적정농도로 21일간 배양하였다. Extracellular matrix mineralization을 유도하기 위해 21일 배양기간이 되기 이틀 전에 4 mmole/L NaHPO₄를 첨가해서 배양하였으며 Alizarin red-S(AR-S) 염색은 Stanford et al.²⁹⁾의 방법을 사용하였다. 21일이 지난 후 배지를 제거하고, phosphate-buffered saline(PBS)로 세척하였다. Ice-cold 70% ethanol로 한시간 동안 4°C에서 고정하고 ethanol를 제거한 후 40 mmole/L AR-S(pH 4.2)로 실온에서 10분 동안 염색하였다. AR-S 용액을 제거하고 멸균증류수로 조심스럽게 3회에 걸쳐 세척하였다. 염색된 부분을 사진촬영하고 난 후 10 mmole/L sodium phosphate(pH 7.0)에 10%(w/v) cetylpyridinium chloride가 녹아있는 용액을 이용해 염색부위를 녹여 AR-S의 농도를 562nm의 흡광도에서 읽었으며 AR-S standard cuve는 같은 용액을 사용하였다.

6. 통계분석

통계학적 유의성은 일원분산분석법(ANOVA)와 t-test를 이용하여 p < 0.05 수준에서 분석하였다.

III. 연구 결과

1. Dichloromethane 분획물에 대한 세포활성도 검사

태아골모세포에 대해 d-분획물 100 ng/ml, 1 µg/

Table 1. Cellular activity of hFOB1 treated with the dichloromethane fraction of *Phlomis Radix*(DFPR)(Mean±S.D.)

Day	control	100 ng/ml	1 µg/ml	10 µg/ml
2	0,218±0,02	0,250±0,02	0,236±0,01	0,233±0,01
4	0,584±0,06	0,648±0,01	0,634±0,01	0,632±0,01
6	1,028±0,05	1,162±0,10 *	1,080±0,04	1,062±0,09

* Statistically significant compared to the control(p<0,05).

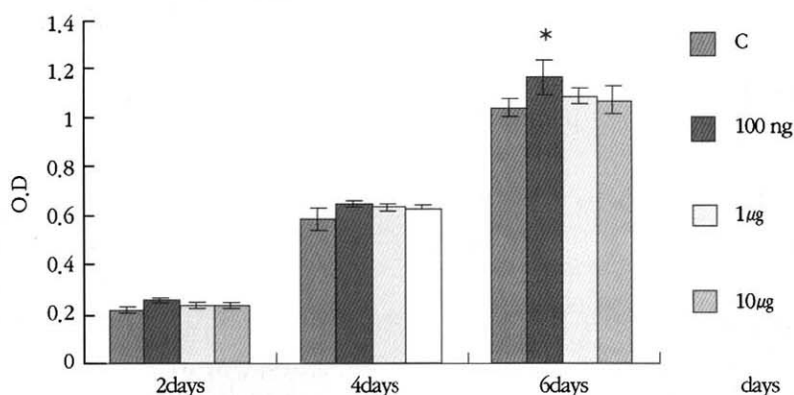


Figure 1. Cellular activity of hFOB1 treated with the dichloromethane fraction of *Phlomis Radix*(DFPR) at 2-days, 4-days and 6-days of incubation

Table 2. Alkaline phosphatase activity of hFOB1 treated with the dichloromethane fraction of *Phlomis Radix*(DFPR)(Mean±S.D.)

negative control	positive control	100 ng/ml	1 µg/ml	10 µg/ml
0,199±0,01	0,279±0,02 *	0,260±0,01 *	0,266±0,01 *	0,278±0,01 *

* Statistically significant compared to the negative control(p<0,05).

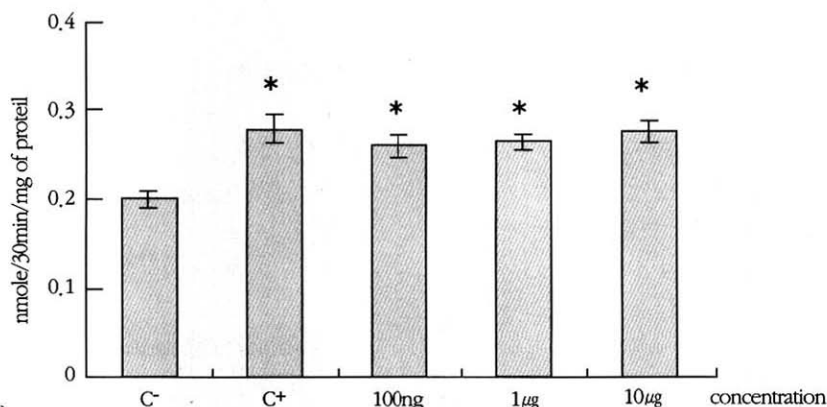


Figure 2. Alkaline phosphatase activity of hFOB1 treated with the dichloromethane fraction of *Phlomis Radix*(DFPR)

ml, 10 $\mu\text{g/ml}$ 과 대조군을 가지고 시행한 세포활성도의 실험 결과에서 2일, 4일, 6일째에 모두 100 ng/ml 군이 가장 높은 세포활성도를 보였다. 2일군과 4일군에서는 통계학적으로 유의성이 있는 결과는 나타나지 않았으나 6일군의 경우 100 ng/ml의 농도에서 통계학적으로 유의성이 있는 결과를 나타냈다 ($p < 0.05$)(Table 1, Figure 1).

2. Dichloromethane 분획물에 대한 염기성 인산분해효소의 측정

d-분획물 100 ng/ml, 1 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$ 을 태아골모세포에 투여하여, 골재형성과 재생이 일어나는 부위에서 국소적 인산이온 농도를 증가시키는 ALP의 합성을 측정된 결과 음성대조군에 비하여 모든 군에서 통계학적으로 유의성이 있는 결과를 나타냈으며 농도가 증가하면서 ALP 합성능이 증가하여 10 $\mu\text{g/ml}$ 에서 가장 높은 ALP 합성을 보였다($p < 0.05$)(Table 2, Figure 2).

3. 석회화 결절 관찰

태아골모세포에 d-분획물 10 $\mu\text{g/ml}$ 을 투여하고 21일 동안 배양한 후 석회화된 결절을 관찰한 결과 양성대조군과 10 $\mu\text{g/ml}$ 처리군 모두에서 음성대조군에 비하여 석회화 결절이 증가하는 결과가 나타났으며 이 결과는 통계학적으로 유의성을 나타냈다 ($p < 0.05$)(Table 3, Figure 3, Figure 4).

IV. 총괄 및 고찰

치주질환에 의해 파괴된 치주조직 재생을 위한 치료방법으로는 과거에는 판막술을 통한 치주 환경 개선에 초점이 맞추어져 왔으나, 근래에는 파괴된 부분에 재생을 기대할 목적으로 여러 골 이식재의 사용과 차단막을 사용해서 치주인대 세포이외의 세포는 배제하여 재생을 기대하는 술식들이 사용되고 있으며, 여기에 부가적으로 치주조직 재생과 직접적으로 관련이 있는 골아세포 및 치주인대세포의 증식 및

Table 3. Mineralization assay of hFOB1 treated with the dichloromethane fraction of *Phlomis Radix*(DFPR)(Mean \pm S.D.)

Day	negative control	positive control	10 $\mu\text{g/ml}$
21	164.5 \pm 17.68	280 \pm 12.73 *	317.5 \pm 9.19 *

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

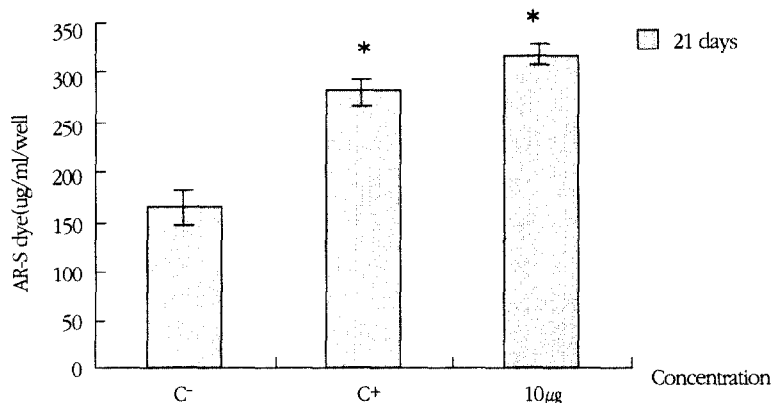


Figure 3. Mineralization assay of hFOB1 treated with the dichloromethane fraction of *Phlomis Radix*(DFPR) at 21-days of incubation

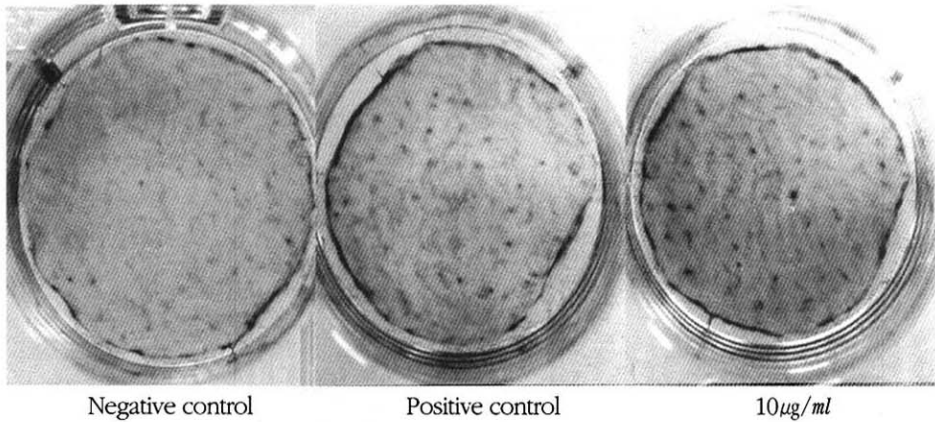


Figure 4. Alizarin Red Stain of hFOB1 treated with the dichloromethane fraction of *Phlomis Radix*(DFPR) at 21-days of incubation. The mineralized matrix was stained with Alizarin Red-s for calcium. Stained cells were photographed

유주를 증강시키는 약물의 조직 결손부 투입에 의한 적극적인 재생법에 관심을 보이고 있다.

또한 생약제재를 이용한 동양의학에 대한 새로운 재평가와 함께 생약제재에 대한 관심이 증가하여 이를 과학적으로 성분을 분석하고 그 효과를 증명하려는 노력이 이루어지고 있으며 이를 바탕으로 여러 결과들이 보고되고 있다. 그동안 보고된 바로는 천연추출물을 주성분으로 한 항균 구강용제, 치약, 경구용 약제 등이 개발 시판되었으며 대표적인 치주질환 치료 보조제로서 옥수수 불검화 추출물인 *Zea Mays L.*은 치은 각화도 증가, 치주낭의 전반적인 감소, 연조직내의 염증의 감소, 치아동요도의 감소³⁰⁾ 등의 연구결과를 바탕으로 하여 상품화되어 시판되고 있다.

그리고 아직까지는 상품화되어 시판되진 않지만 파괴된 치주조직 재생의 보조제로 활발히 연구되고 있는 홍화를 들 수가 있다. 최근까지 진행된 홍화에 관한 연구결과로는 홍화추출물이 치주인대세포와 조골세포의 기능적 활성화 및 백서 두개골 결손부에서 신생골의 형성 촉진효과를 확인한 바 있고³¹⁾, 홍화추출물 처리에 의해 증가된 ALP의 합성은 세포의 기질에 calcium phosphate를 침착시켜 골형성의 핵 역할을 함으로써 석회화를 유도하여 치주인대세포 및 조골세포의 분화와 성숙에 관여함이 밝혀졌다²³⁾. 이

밖에도 여러 생약제재들이 치주질환 치료제로 사용되기 위해 연구되어지고 있으며 이들은 오랜 기간 동양의학에서 사용되어온 약제로서 그동안 경험적으로 안전성과 효과가 인정되어 비교적 부작용 없이 경구투여가 가능한 약재로 기대된다고 할 수 있다.

본 연구에서 사용한 속단(*Phlomis Radix*)은 *Phlomis umbrosa Turczaninow*(꿀풀과 Labiatae)의 뿌리줄기 및 뿌리로써 처방용명에는 속단(續斷), 천단(川斷), 천단육(川斷肉), 천속단(川續斷)등으로 사용된다. 속단은 강근건골(強筋健骨)하며 혈맥을 통리(通利)하는 효능이 있으며 질타손상(跌打損傷), 근골절상(筋骨折傷)에는 속근(續筋)하고 접골(接骨)하는 효능이 있다.³²⁾ 그 외에 전남본초(滇南本草)에 의하면 속단은 새 혈(血)을 생성하고 어혈을 없애며 사태(死胎)를 내려오게 하고 적백변탁(赤白便濁, 소변 백탁, 혈뇨)을 치료하는 효과가 있다고 한다.

본 연구에서 세포활성도를 시험하기 위한 MTT 분석 결과, 태아골모세포에 대해 2일째, 4일째에는 군간의 통계학적 유의성은 없었으나 100 ng/ml에서 가장 많은 세포활성도를 보였다. 그리고 6일째에는 역시 100 ng/ml에서 가장 많은 세포활성도를 보였으며 이 결과는 통계학적으로 유의성을 나타냈다(Table 1, Figure 1).

이러한 결과에서 보여지듯 태아골모세포에 대한

d-분획물의 처리로 인한 세포활성도의 증가는 초기 세포의 증식단계에서 여러 층을 형성할 수 있다는 것을 나타내고 이는 골결절 형성의 초기에 도움을 줄 것으로 사료된다.

세포의 골기질은 교원성, 비교원성 단백질로 구성되며 비교원성 단백질 중 Alkaline phosphatase(ALP)는 160 kDa glycoprotein의 골세포 표식자로서 조골모유사세포, 전조골모유사세포, 골세포, 골육종세포에서 발견되며 유기인산 에스테르를 가수분해하여 석회화가 이루어지는 부위에서 국소적으로 인산이온의 농도를 증가시키는 효소³³⁾로써, 세포의 기질에 calcium phosphate를 침착 시킴으로써 석회화를 유도하는 기능³⁴⁾을 갖는다. De Bernard(1982)³⁵⁾는 염기성 인산분해효소가 국소적으로 인산이온농도를 증가시켜 단백질을 인단백으로 전환시키고 이것이 칼슘결합성향을 가지면서 인단백질이 석회화의 핵으로서의 역할을 한다고 하였다. 이러한 골관련 단백질은 칼슘염과 인산염에 결합하는 성질을 가지며 수산화인회석에 대한 친화성이 높은 특징을 보이기 때문에, 수산화인회석 결정체 형성의 핵으로 작용하고 핵의 성장과 용해와 같은 조절과정에도 관여할 것이다.

본 연구에서는 d-분획물 100 ng/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml을 태아골모세포에 투여하여, 골재형성과 재생이 일어나는 부위에서 국소적 인산이온 농도를 증가시키는 염기성 인산분해효소의 합성량을 측정한 결과 태아골모세포에서는 d-분획물의 농도가 증가할수록 염기성 인산분해효소 합성이 증가되는 경향을 나타내서 10 µg/ml을 투여한 경우에서 가장 많은 증가를 보였고 음성대조군에 비하여 모든 군에서 통계학적으로 유의성이 있는 결과가 나타났다(Table 2, Figure 2).

Krzysztof 등³⁶⁾의 연구 결과에 의하면 골 형성 능력을 가진 세포에서는 ALP 활성이 높은 반면, 골 형성 능력이 없는 세포에서는 ALP 활성이 낮다고 보고했다. 즉 ALP가 골 형성 능력을 가진 세포에 대한 표식자로 유용하다고 주장했다.

d-분획물을 태아골모세포에 처리하여 증가된 염기성 인산분해효소 합성은 세포의 기질에 calcium

phosphate를 침착시켜 골형성의 핵 역할을 함으로써 석회화를 유도하여 조골세포의 분화와 성숙에 중요한 기능을 할 것으로 사료된다.

Mukai등(1993)의 실험에서는 결절내에 조골세포나 골세포와 유사한 세포들 및 교원기질과 기질낭포(matrix vesicle)가 존재하며, 이 결절이 수산화인회석의 결정구조를 갖음을 관찰하고, 치주인대세포내에는 조골세포로 분화하여 골과 유사한 조직을 형성할 수 있는 골전구세포(osteoprogenitor cell)가 존재한다고 주장하였고³⁷⁾, Ramakrishnan 등(1995)은 석회화 결절형성과정을 네단계로 구분하여, 배양용기내 세포밀도가 치밀한 단층을 이룬 다음, 계속적인 세포의 분열로 세포가 중층을 이루는 부위가 나타나게 된다고 하였다³⁸⁾.

본 연구에서는 d-분획물 10 µg/ml을 태아골모세포에 처리한 후 21일간 배양하여 생성되는 석회화 결절을 관찰하였는데 양성대조군과 실험군 모두에서 음성대조군에 비하여 석회화 결절이 증가하는 결과가 나타났으며 이 결과는 통계학적으로 유의성을 나타냈다(Table 3, Figure 3, Figure 4).

석회화 결절을 관찰하기 위해 사용한 Alizarin red S 염색법은 세포의 형태학적 특성 분석 즉 세포의 경계부위를 염색하여 세포의 밀도, 면적, 주변둘레, 한 변의 길이 등을 광학현미경으로 촬영 후 분석할 수 있다³⁹⁻⁴¹⁾. 또한 Alizarin red S 염색법은 von Kossa 염색법에 비해 칼슘을 확인하는데 있어서 효과적인데⁴²⁾, 이는 Alizarin red S 염색법은 칼슘에 특이하게 반응하여 칼슘과 칼슘간에 reddish-orange complex를 형성하기 때문인 반면에 von Kossa 염색법은 음이온인 phosphate와 carbonate, salts를 증명하는 silver reduction technique으로써⁴³⁾, Alizarin red S 염색법은 소량의 칼슘도 확인이 용이하다는 장점을 갖는다.

본 연구결과 속단의 d-분획물은 태아골모세포의 세포증식과 염기성 인산분해효소 합성을 증가시키고, 골결절의 생성에 유효한 효과를 보임으로써 골의 형성과 재생 및 치유과정에 효과가 있음을 알 수 있었고 치주질환으로 파괴된 골조직의 재생제로 이용 가능성이 있다고 사료된다.

앞으로 속단의 d-분획물에 대한 정확한 분석과 골

형성을 측정하는 다양한 방법이 모색되어야 할 것이며 나아가 속단의 임상적 응용, 장기간의 투여에 따른 기간별, 농도별의 안정성 여부와 더욱 개선된 조직학적 관찰에 대한 추가적인 연구가 요구되어진다.

V. 결론

최근들어 부작용이 적고 장기간 사용이 가능하다는 장점으로 인해 전통적으로 사용되어오던 생약제재에 대한 많은 연구가 이루어지고 있으며, 이러한 생약제재들이 가지고있는 치주조직 재생 능력에 대한 검증이 활발히 이루어지고 있다. 본 연구는 실험적으로 태아골모세포에 있어서 속단의 dichloromethane 분획물의 효과를 평가하기 위하여 세포활성도 검사, 염기성 인산분해효소활성 검사, 석회화 결절 관찰을 시행하였으며 그 결과는 다음과 같다.

1. 태아골모세포에 d-분획물을 투여하여 세포활성도를 측정한 결과 세포활성도는 2일, 4일, 6일군 모두 대조군에 비하여 증가된 세포활성도를 보였는데 이중 6일 군 100 ng/ml에서 통계학적으로 유의성이 있는 증가를 보였다(p<0.05).
2. 태아골모세포에 d-분획물을 투여하여 염기성 인산분해효소 활성을 측정한 실험에서 태아골모세포는 d-분획물의 농도가 증가할수록 염기성 인산분해효소 합성이 증가되는 경향을 나타내서 10 µg/ml을 투여한 경우에서 가장 많은 증가를 보였고 음성대조군에 비하여 모든 군에서 통계학적으로 유의성이 있는 증가를 보였다(p<0.05).
3. 태아골모세포에 d-분획물 10 µg/ml을 투여한 후 Alizarin red S 방법에 의한 염색 후 석회화 결절을 관찰한 결과 양성대조군과 실험군 모두에서 음성대조군에 비해 증가된 석회화 결절을 확인할 수 있었으며 모든 군에서 통계학적으로 유의성이 있는 증가를 보였다(p<0.05).

총괄적으로 본 연구를 통해 속단의 dichloromethane 분획물이 태아골모세포에 대한 세포활성의 증가와 염

기성 인산분해효소 활성의 증가, 그리고 골조직의 재생에 있어서 중요한 골결절의 형성에 유효한 영향을 미치는 점으로 미루어, 속단의 dichloromethane 분획물은 골세포의 활성화와 분화에 영향을 미칠 수 있고, 치주질환으로 파괴된 골조직의 재생제로 이용가능성이 있다고 사료된다.

VI. 참고문헌

1. Takata T. : Oral wound healing concepts in periodontology. *Current Opinion Periodontol* : 119-127, 1994.
2. Froum SJ., Gomez C. : Periodontal regeneration. *Current Opinion Periodontol* : 111-128, 1993.
3. Page RC. : Periodontal therapy : Prospects for the future. *J Periodontol* 64 : 744-753, 1993.
4. Terranova VP., Frauzetti LC., Hic S., Wikesjö UME. : Biochemically mediated periodontal regeneration. *J Periodont Res* 22 : 248-251, 1987.
5. Wikesjö UM., Claffey N., Nilvéus R., Egelberg J. : Periodontal repair in dogs : Effect of root surface treatment with stannous fluoride or citric acid on root resorption. *J Periodontol* 62 : 180-184, 1991.
6. 손희용, 조무현, 박광범, 서조영, 박준봉. : Polytetrafluoroethylene membrane이 성견 치주조직 재생에 미치는 영향. *대한치주과학회지* 22 : 96-111, 1992.
7. 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 : 159-163, 1992.
8. Garrett S., Loos B., Chamberlian D., Egelberg J. : Treatment of intraosseous periodontal defects with combined adjunctive therapy of citric conditioning, bone grafting, and placement of collagenous membranes. *J Clin Periodontol* 15 : 383-389, 1988.

9. Gantes B., Martin M., Garrett S., Egelberg J. : Treatment of periodontal furcation defects. *J Periodontol* 15 : 232-239, 1988.
10. Terranova VP., Wikesjö UME. : Extracellular matrices and polypeptide growth factors as mediators of functions of cells of the periodontium. *J Periodontol* 58 : 371-380, 1987.
11. Fremin A., Carranza JR. : Reconstructive osseous surgery. *Clinical Periodontology* 8 : 622-639, 1996.
12. Rutherford RB., Niekrash CE., Kennedy LE., Charette MF. : Platelet-derived and insulin-like growth factors stimulate regeneration of periodontal attachment in monkeys. *J Periodont Res* 27 : 285-290, 1992.
13. Graves DT., Cochran DL. : Periodontal regeneration with polypeptide growth factor. *Current Opinion Periodontol* : 178-186, 1994.
14. Ripamonti U., Petit JC., Lemmer J., Austin JC. : Regeneration of the connective tissue attachment on surgically exposed roots using a fibrin-fibronectin adhesive system : An experimental study on the Baboon(*Papio Ursinus*). *J Periodont Res* 22 : 320-326, 1987.
15. Warrer K., Karring T. : Effect of Tisseel on healing after periodontal flap surgery. *J Clin Periodontol* 19 : 449-454, 1992.
16. Caffesse RG., Nasjleti CE., Anderson GB., Lopatin DE., Smith BA., Morrison EC. : Periodontal healing following guided tissue regeneration with citric acid and fibronectin application. *J Periodontol* 62 : 21-29, 1991.
17. 山原條二. : Berberine 형 알칼로이드의 행동약리학적 연구(제1판), 황련 및 그의 함유성분의 중추억제 작용. *日藥理誌* 72 : 899-908, 1976.
18. Fukuda H., Watanabe K., Kudo Y. : Some observation on the cardiovascular Effects of 9-substitued berberine. *Chem Pharm Bull* 18 : 1299-1304, 1970.
19. 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 *Porphyromonas gingivalis* crude enzyme. *Bull Tokyo Dent Coll* 32 : 1-7, 1991.
20. 양창호, 이용무, 조기영, 배기환, 정종평. : 대조추출물이 치은섬유아세포의 생물학적활성화에 미치는 영향. *대한치주과학회지* 24 : 144-154, 1994.
21. 양창호, 류인철, 최상목, 정종평. : 치은섬유아세포와 치주인대세포의 형태와 화학주성에 미치는 대조추출물의 효과에 관한 연구. *대한치주과학회지* 25 : 279-289, 1995.
22. 강정구, 유형근, 신형식. : 홍화씨추출물이 치주인대세포와 조골모유사세포의 골 광물화 작용에 미치는 효과. *대한치주과학회지* 28 : 475-489, 1998.
23. 이광수, 홍성우, 유경태, 유형근, 김윤철, 신형식. : 홍화씨 성분분리추출물이 치주인대세포와 조골모유사세포의 광물화에 미치는 영향. *대한치주과학회지* 28 : 745-753, 1998.
24. 윤동환, 이승철, 김명은, 김은철, 유형근, 김윤철, 신형식. : 홍화씨 추출물이 조골모유사세포활성 및 골재생에 미치는 영향. *대한치주과학회지* 28 : 769-784, 1998.
25. 김덕규, 홍성우, 유경태, 서재진, 김홍식, 유형근, 신형식. : 홍화씨 추출물의 국소투여가 백서 두개골 결손부 재생에 미치는 영향. *대한치주과학회지* 29 : 297-310, 1999.
26. 유경태, 최광수, 윤기연, 김은철, 유형근, 신형식. : 백서 두개골 결손부의 골대체 물 이식과 홍화씨 섭취 후의 치유양상. *대한치주과학회지* 30 : 91-103, 2000.
27. 서재진, 김탁, 피성희, 윤기연, 유형근, 신형식. : 홍화씨 추출물 및 우골유도합성 골이 성견골 결손부 재생에 미치는 영향. *대한치주과학회지* 30 : 553-567, 2000. 28. 임상본초학강좌(臨床本草學講座). 김재익, 대성의학사. 132-134, 2000.

29. Stanford CM., Jacobson PA., Eanes ED., Lembke LA., Midura RJ. Rapidly forming apatitic mineral in an osteoblastic cell line (UMR 106-01 BSP). *J Biol Chem* 270 : 9420-9428, 1995.
30. 권영혁, 이만섭, 양승환, 김영, 박준봉: 치주수술 후 *Zea Mays L.* 투여가 치유과정에 미치는 영향에 대한 임상적 연구. *대한치주과학회지* 24 : 649-660, 1994.
31. 류인철, 이용무, 구영, 배기환, 정종평 : 홍화 추출물이 치주인대세포, 조골세포 활성화에 미치는 영향. *대한치주과학회지* 27 : 867-882, 1997.
32. 본초학(本草學). 한국생약교수협의회, 사단법인 대한약사회. 755-758, 2002.
33. Bellows CG., Aubin JE., Heersche JN. : Initiation and progression of mineralization of bone nodules formed in vitro : the role of alkaline phosphatase and organic phosphate. *Bone Miner* 14 : 27-40, 1991.
34. Anderson HC. : Mechanism of mineral formation in bone. *Lab Invest* 60 : 320-330, 1989.
35. De Bernard B. : Glycoproteins in the local mechanism of calcification. *Clin Orthop* 162 : 233-244, 1982.
36. Krzysztow H., Wlodarski and A.H. Reddi. : Alkaline phosphatase as a marker of osteoinductive cells. *Calcif Tissue int* 39 : 382-385, 1986.
37. Mukai M., Yoshimine Y., Akamine A., Maeda K. : Bone-like nodules formed in vitro by periodontal ligament cells. *Cell Tissue Res* 271 : 453-460, 1993.
38. Ramakrishnan PR., Lin WL., Sodek J., Cho MI. : Synthesis of noncollagenous extracellular matrix proteins during development of mineralized nodules by rat periodontal ligament cells in vitro. *Calcif Tissue Int* 57 : 52-59, 1995.
39. 백종민, 김기산 : 접안형 경면현미경과 Alizarin red S 염색에 의한 가토 각막내 피세포의 형태학적 차이. *J Korean Ophthalmol Soc* 32 : 31-34, 1991.
40. 김근태, 김기산 : 엑시머레이저 각막 절제술 후 각막내피세포의 손상. *J Korean Ophthalmol Soc* 37 : 17-25, 1996.
41. Seung Hye Paek., Yong Hyun Kim., Do Won Kim., Jae Bok Jun., Sang Lip Chung. : Subepidermal Calcified Nodule. *Annals of Dermatology* 8 : 269-271, 1996.
42. Woods B., Kellaway TD. : Cutaneous calculi-subepidermal calcified nodules. *Br J Dermatol* 75 : 1-11, 1963.
43. Demis DJ. : Clinical dermatology, 22nd revision. Lippincott-Raven publishers, Philadelphia New York, unit 12-12, : 1-17, 1995.

Effects of Dichloromethane Fraction of *Phlomis Radix* on Bone Formation in Human Fetal Osteoblasts

Young-Joon Lee¹, Hee-In Choi¹, Yun-Chul Kim², Hyung-Keun You¹, Hyung-Shik Shin¹

¹Department of Periodontology, School of Dentistry, Wonkwang University

²Department of Pharmacy, Pharmacy College, Wonkwang University

The ideal goal of periodontal therapy is the regeneration of periodontal tissue and repair of function. Although it is very difficult to attain this goal, recent advances in periodontal wound healing concepts encourage hope reaching it.

Recently many efforts are concentrated on the regeneration potential of material used in traditional Korean medicine. *Phlomis Radix* has been used for the treatment of blood stasis, bone fracture and osteoporosis in traditional Korean medicine.

The purpose of this study is to examine effects of dichloromethane fraction *Phlomis Radix* on Bone Formation in Human Fetal Osteoblasts. Human fetal osteoblastic cell line(hFOB1 1,19 ; American Type Culture Collection, Manassas, VA) were used and cells were cultured containing DMEM and dichloromethane fraction *Phlomis Radix*(100 ng/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml) at 34°C with 5% CO₂ in 100% humidity. MTT was performed to examine the viability of the cell, and alkaline phosphatase activity was analyzed to examine the mineralization. Also bone calcification nodules were evaluated.

The cellular activity of hFOB1 was increased in 100 ng/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml of dichloromethane fraction of *Phlomis Radix* and especially significant increment was showed in 100 ng/ml of dichloromethane fraction of *Phlomis Radix* at 6days (p<0.05).

ALP level of hFOB1 was significantly increased in 100 ng/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml of dichloromethane fraction of *Phlomis Radix* and especially more increment was showed in 10 µg/ml of dichloromethane fraction of *Phlomis Radix* (p<0.05). Calcification nodules of hFOB1 significantly increased in 10 µg/ml of dichloromethane fraction of *Phlomis Radix* at 21days of incubation (p<0.05).

These results indicate that dichloromethane fraction of *Phlomis Radix* has excellent effects on mineralization of hFOB1.

Key word : *Phlomis Radix*, dichloromethane, hFOB1, mineralization