

## 속단의 dichloromethane 분획물이 마우스 두개골 세포의 분화에 미치는 영향

김동진<sup>1</sup> · 윤정호<sup>1</sup> · 정의원<sup>1</sup> · 유윤정<sup>2</sup> · 김윤철<sup>3</sup> · 유형근<sup>4</sup> · 김종관<sup>5</sup> · 최성호<sup>5</sup>

<sup>1</sup>연세대학교 치과대학 치주과학 교실, <sup>2</sup>연세대학교 치과대학 구강생물학교실,

<sup>3</sup>원광대학교 약학대학, <sup>4</sup>원광대학교 치과대학 치주과학교실

<sup>5</sup>연세대학교 치과대학 치주과학 교실, BK21 의과학 사업단

### I. 서론

치주질환은 치태내 치주병원균에 의한 만성질환으로서 치아주위조직의 염증과 부착상실, 치조골과 결합조직의 상실을 동반한 치주낭 형성 등의 치주조직 파괴가 수반된다<sup>1)</sup>. 따라서 치주치료의 목적은 치주 질환을 정지시키는 것뿐만 아니라, 최종적으로는 치주 조직을 재생시키고 치아의 기능을 회복시키는 데 있다<sup>2)</sup>.

이러한 재생 술식으로는 치은 박리 소파술 등의 기계적인 치주치료, 차폐막을 사용하는 조직 재생 유도술, 골대체 물질의 이식, 성장인자와 bone morphogenetic protein을 이용한 유도성 조직 재생술 등이 있다.

최근에는 분자생물학의 발전으로 세포의 증식, 분화, 이주를 조절하는 성장인자를 조직재생에 응용하기에 이르렀다<sup>3)</sup>. platelet derived growth factor(PDGF)와 insulin-like growth factor(IGF)의 혼합사용 시 치주조직이 재생됨을 보고 되었고<sup>4)</sup>, transforming growth factor- $\beta$ (TGF- $\beta$ )가 쥐의 장골 파절 부위에서 골형성을 유도함을 보고하였다<sup>5)</sup>. 1965년 Urist가 BMP를 처음 소개한 이후 많은 연구에서

BMP가 골조직의 치유 및 재생 효과를 지님을 보고 하였다<sup>6-12)</sup>.

최근까지도 성장인자의 임상 적용을 위한 연구가 꾸준히 계속되고 있으나 그 투여 용량과 적당한 매개체가 아직 결정되지 않았다.

성장인자의 이런 제한점에 반해 부작용이 적고, 장기적 사용, 경구 투여가 가능하며 안전하고 경제적인 장점을 가진 여러 가지 생약제제들이 주목 받고 있다. 특히, 홍화씨, 후박, 황금, 대조, 황백, 죽염, 황련, 은행엽, 옥수수 추출물 등이 치주염에 효과적인 생약제제로 알려져 있으며<sup>13)</sup>, 이 중 몇몇 제제는 실험실 및 생체실험에서 골재생을 유도함이 보고 되었다<sup>14-18)</sup>. 특히 홍화씨는 가장 활발히 연구되고 있으며 여러 *in vitro* 및 *in vivo*에서 치주조직 재생에 대한 가능성이 제시 되어 있다<sup>9-25)</sup>.

최근에 속단에 대한 연구가 진행되고 있다. 속단(Phlomidis 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 통증을 제거하고 새살이 돋게하며 근골(筋骨)을 이어주는 작용이 있어 붙인 이름으로 관절이 퇴행성으로 변화된

\* 이 연구는 2004년도 연세대학교의 연구비지원의 결과임

교신저자: 최성호, 서울특별시 서대문구 신촌동 134 연세대학교 치과대학 치주과학교실, 우편번호: 120-752

상대에 풍습사기(風濕邪氣)가 침입했을 때 두충(杜仲)과 같이 사용할 경우 상승효과가 나타나 강근골(強筋骨)하며 활혈(活血)의 특징이 있다. 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<sup>22)</sup>. 그 외에 전남본초(瀋南本草)에 의하면 속단은 새 혈(血)을 생성하고 어혈을 없애며 사태(死胎)를 내려오게 하고 적백변탁(赤白便濁, 소변백탁, 혈뇨)을 치료하는 효과가 있다고 한다. 2003년 이 등은 속단의 dichloromethane 분획물에 대한 연구에서 속단이 골의 형성을 촉진한다는 것을 보고한바 있다<sup>27)</sup>.

이에 본 연구는 속단의 dichloromethane 분획물이 조골모세포의 분화에 미치는 영향을 평가하고자 한다.

## II. 연구 재료 및 연구 방법

### 1. 연구 재료

1) 속단의 Dichloromethane 분획물(Dichloromethane fraction of Phlomidis Radix, DFPR)의 조제

건조하여 세절한 속단(1.2Kg)을 메탄올(5L)로 2시간 동안 2회 가열하여 추출하고 여과하여 여액을 감압농축하였다. 얻어진 메탄올 엑스(196g)는 60% 수성메탄올에 용해시키고 n-hexane과 dichloromethane으로 순차적으로 분배하였다. 60% 수성메탄올층은 다시 감압농축한 후 증류수에 용해시키고 buthanol로 분배하였다. 각 용매분획은 감압농축기로 용매를 제거하였으며, n-hexane, dichloromethane 및 buthanol 분획물이 각각 4.5g, 6.7g, 56.0g 얻어졌다. 본 실험에서는 dichloromethane 분획물(d-분획물)을 사용하였다.

2) 마우스 두개골 세포 배양

마우스 두개골 세포는 생후 1일된 ICR 마우스에서 분리하여 배양하였다.

### 2. 연구 방법

1) 마우스 두개골 세포의 분리 및 배양

생후 1-2일된 ICR 마우스를 에탄올 용액에 담가 희생시킨 후 핀셋을 이용하여 두피를 벗기고, 마우스 두개골에서 Y자 봉합을 확인하여 포함되게 적출하였다. 적출된 두개골을 washing solution에서 씻은 후, 10ml 효소 용액(0.2% collagenase와 0.1% dispase가 함유된  $\alpha$ -MEM)에 넣었다. 37°C water bath에서 20분간 shaking을 하는데 첫 번째 상층액은 버리고, 이를 3회 반복하여 두 번째, 세 번째, 네 번째 상층액을 모아 총 30ml를 만들었다. 이를 1500rpm에서 원심분리하고 상층액을 제거하였다. 여기에 10% FBS  $\alpha$ -MEM을 10ml 첨가하여 이를 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 배양하고 2-3일마다 배지를 바꿔주었다.

2) 실험군 설정

$\alpha$ -minimum essential medium ( $\alpha$ -MEM)에 10% Fetal bovine serum (FBS), 10mM  $\beta$ -glycerophosphate, 50  $\mu$ g/ml ascorbic acid를 기본배양액(osteogenic medium, 조골배양액)으로 하여 대조군은 조골배양액, 실험1군은 10 nM dexamethasone을 첨가한 군, 실험2군은 DFPR을 첨가한 군, 실험3군은 10 nM dexamethasone과 DFPR을 첨가한 군 이상 네 군으로 나누어 실험하였다.

3) 실험 농도의 결정

(1) MIT test에 의한 생체적합성의 평가

96well의 배양접시에 세포를  $1 \times 10^4$ 개씩 분주하고 대조군과 실험군으로 구분하여 동일조건하에서 배양하였다. 배양 3일후 각각 배양접시에서 배양액을 제거하고 대조군에는 새로운 10% FBS가 함유된  $\alpha$ -MEM 배양액 200 $\mu$ 를, 실험군에는 각각 10  $\mu$ g/ml, 1  $\mu$ g/ml, 100ng/ml의 DFPR을 첨가하였다. 3일간 배양한 뒤, 각각의 plate에서 배지를 제거하고 10%FBS  $\alpha$ -MEM으로 배지를 교체하고 생리식염수로 용해한 3-(4,5-dimethylthiozole-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MIT) 용액 50 $\mu$ 를 각 well에 첨가한 후 4시간동안 방치하였다. 반응액을 제거한 후 200 $\mu$ 의

Dimethyl sulfoxide(DMSO)를 첨가하여 형성된 formazan 결정을 용해시키고 배양접시를 잘 흔든 후 ELISA reader로 파장 570nm로 흡광도를 측정하여 MTT 분석을 시행하였다.

## (2) ALP staining

24well plate에 마우스 두개골 세포를  $0.3 \times 10^4/cm^2$  개씩 분주한 후 속단의 농도를 10  $\mu g/ml$ , 1  $\mu g/ml$ , 100 ng/ml로 각각 달리하여서 5일간 배양한 뒤, ALP staining kit를 이용하여 염색하고 광학현미경하에서 관찰하였다.

## (3) Reverse transcription - polymerase chain reaction

### A. RNA 분리 및 농도확인

6well plate에 마우스 두개골 세포를  $0.3 \times 10^4/cm^2$  개씩 분주한 후 대조군과 실험2군의 DFPR의 농도를 10  $\mu g/ml$ , 1  $\mu g/ml$ , 100 ng/ml로 각각 달리하여서 5일간 배양한 뒤 배양액을 제거하고 1 ml의 TRIzol을 첨가하여 각 군의 탈리된 세포를 1.5ml eppendorf tube에 수집하였다. 0.2ml chloroform을 첨가하여 RNA를 용해시킨 후 4°C, 12,000g에서 15분간 원심분리 하였다. 상층액을 취한 후 0.5ml isopropylalcohol을 첨가하여 RNA를 침전시키고 4°C, 12,000g에서 10분간 원심분리하여 상층액을 제거하였다. 70% ethanol을 첨가한 후 4°C, 7,500g에서 원심분리 후 상층액을 제거한 뒤 공기중에 5분간 방치한 후 0.1% diethyl pyrocarbomate(DEPC)-treated distilled water를 50  $\mu l$  첨가하고 vortexing후 55°C에서 10분간 정치하였다.

RNA의 농도는 spectrophotometer를 사용하여 260nm에서 흡광도를 측정하였다.

### B. Reverse transcription - polymerase chain reaction(RT-PCR)

RT-PCR은 Accupower® RT/PCR premix를 사용하여 시행하였다. RNA가 1  $\mu g$ 이 되도록 정량한 뒤 해당 부위에 reverse primer 20 pmole를 첨가하고 70°C 5분간 유지한 뒤 얼음에 정치시킨다. forward primer 20 pmole과 0.1% DEPC treated distilled water를 사용하

여 50  $\mu l$ 로 채운 뒤 vortexing 시킨 뒤 Reverse transcription을 42°C, 60분간 시행하고 94°C, 5분간 reverse transcriptase를 불활성화시켰다. glyceraldehyde-3-phosphatase(GAPDH), Alkaline phosphatase에 대하여 denturing 94°C 30초, annealing 56°C 30초, extension 72°C 30초, 34 cycle로 시행하였다.

증폭된 RT-PCR product 10  $\mu l$ 를 취하여 2% agarose ethidium bromide gel에 50V에서 90분간 running하여 분석하였다.

### 4) 세포활성도 측정

96well plate에 마우스 두개골 세포를  $0.3 \times 10^4/cm^2$ 개씩 분주한 후 실험군 설정에 따라 10nM Dexamethasone, DFPR 10  $\mu g/ml$ 을 첨가하였다. 8, 12, 16일간 배양한 뒤, 각각의 plate에서 배지를 제거하고 10%FBS  $\alpha$ -MEM으로 배지를 교체하고 생리식염수로 용해한 3-(4,5-dimethylthiozole-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT) 용액 50  $\mu l$ 를 각 well에 첨가한 후 4시간동안 방치하였다. 반응액을 제거한 후 200  $\mu l$ 의 Dimethyl sulfoxide(DMSO)를 첨가하여 형성된 formazan 결정을 용해시키고 배양접시를 잘 흔든 후 ELISA reader로 파장 570nm로 흡광도를 측정하여 MTT 분석을 시행하였다.

### 5) Reverse transcription - polymerase chain reaction (RT-PCR)

RT-PCR은 속단 농도결정단계에서와 동일한 방법을 통하여 이루어졌다. marker는 glyceraldehyde-3-phosphatase(GAPDH), Alkaline phosphatase (ALP), Osteocalcin(OCN), Osteopontin(OPN), Collagen type- I (COL)을 사용하였다(Table 1). 배양 4, 8, 12, 16일에서의 marker의 변화를 관찰하였다.

GAPDH, ALP, OCN은 denturing 94°C 30초, annealing 56°C 30초, extension 72°C 30초, 34 cycle로 시행하였고, osteopontin은 denturing 94°C 30초, annealing 58°C 30초, extension 72°C 30초, 34 cycle로 시행하였으며 COL은 denturing 94°C 30초, annealing 60°C 30초, extension 72°C 1분 30 cycle로 시행하였다.

증폭된 RT-PCR product 10  $\mu l$ 를 취하여 2%

Table 1. Synthetic oligonucleotide primers used for RT-PCR

Target gene	Primer sequence	Length of PCR product (base pairs)
ALP*	Forward: 5' -TTAAGGGCCAGCTACACCAC-3' Reverse: 5' -GATAGGCGATGTCCITGCAG-3'	401
OPN*	Forward: 5' -AGAGGAGAAGGCGCATTACA-3' Reverse: 5' -GCAACTGGGATGACCTTGAT-3'	497
OCN*	Forward: 5' -AGAGGAGAAGGCGCATTACA-3' Reverse: 5' -GCAACTGGGATGACCTTGAT-3'	274
COL**	Forward: 5' -AACGATGGTGCCAAGGGTGAT-3' Reverse: 5' -ATTCTTGCCAGCAGGACCAAC-3'	1077
GAPDH <sup>§</sup>	Forward: 5' -TGAAGGTCGGTGTGAACGGATTGGC-3' Reverse: 5' -CATGTAGGCCATGAGGTCCACCAC-3'	983

\* Yoshiko et al, 2003

\*\* Paik et al, 2004

§ Uchida et al, 2000

agarose ethidium bromide gel에 50V에서 90분간 running하여 분석하였다.

상태에서 육안으로 균 간의 차이를 관찰하였다.

### III. 연구 결과

#### 6) Von Kossa staining

16일간 배양한 6well에 배양한 대조군, 실험1, 2, 3 균을 Phosphate buffered saline으로 2회 세척 후 10% neutral formaldehyde로 고정 한 후, 5% silver nitrate 용액으로 30분간 처리하고 강한 햇빛 아래에서 검은 색 석회화 결절이 형성되면 용액을 제거하고 건조된

#### 1. 실험농도의 결정

##### 1) 세포독성실험

DFPR의 농도를 10 µg/ml, 1 µg/ml, 100ng/ml로 변화를 주어 3일간 배양후 MTT test를 시행한 결과 균간

Table 2. Cytotoxic test at 3 day.

group	Control	10 g/ml	1 g/ml	100ng/ml
O.D.	1.46±0.07	1.44±0.08	1.39±0.06	1.40±0.05

\* No statistically significant difference was observed.

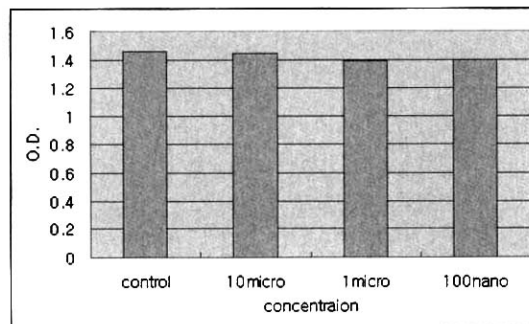


Figure 1. Cytotoxic test at 3 day.

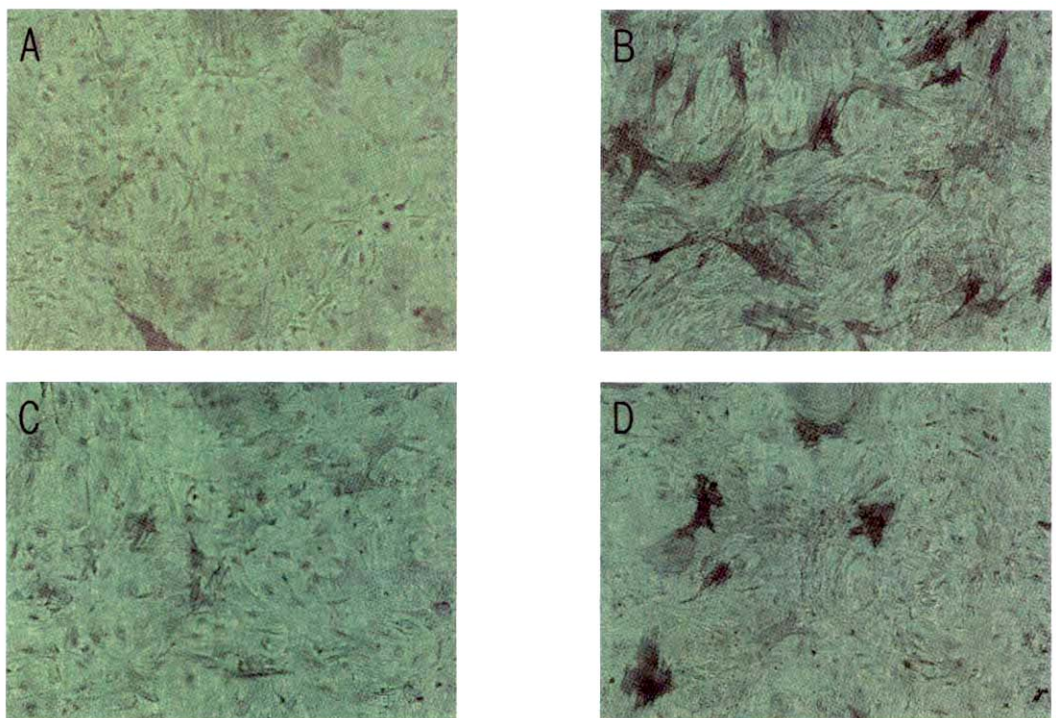


Figure 2, Alkaline phosphatase staining result at 5 day of culture.  
 (A) Control, (B) DFPR 10 µg/ml, (C) DFPR 1 µg/ml, (D) DFPR 100ng/ml

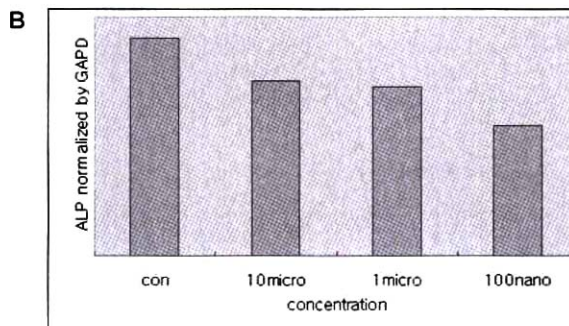
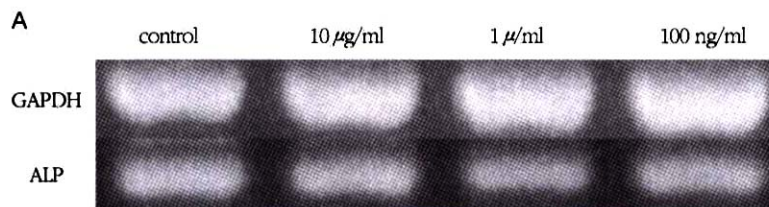


Figure 3. Effect of variation in concentration of DFPR on expression ALP mRNA.  
 A: RT-PCR    B: Densitometric analysis

Table 3. cellular activity of rat calvarial cell at 4, 8, 12, 16 days

group	control	EXP1	EXP2	EXP3
O.D.				
Dex	-	+	-	+
DFPR	-	-	+	+
8 day	1,154±0,379	1,239±0,253	1,379±0,236	1,144±0,135
12 day	1,764±0,464	1,490±0,393	1,820±0,382	1,867±0,284
16 day	2,184±0,326	1,927±0,397	2,397±0,543	2,295±0,427

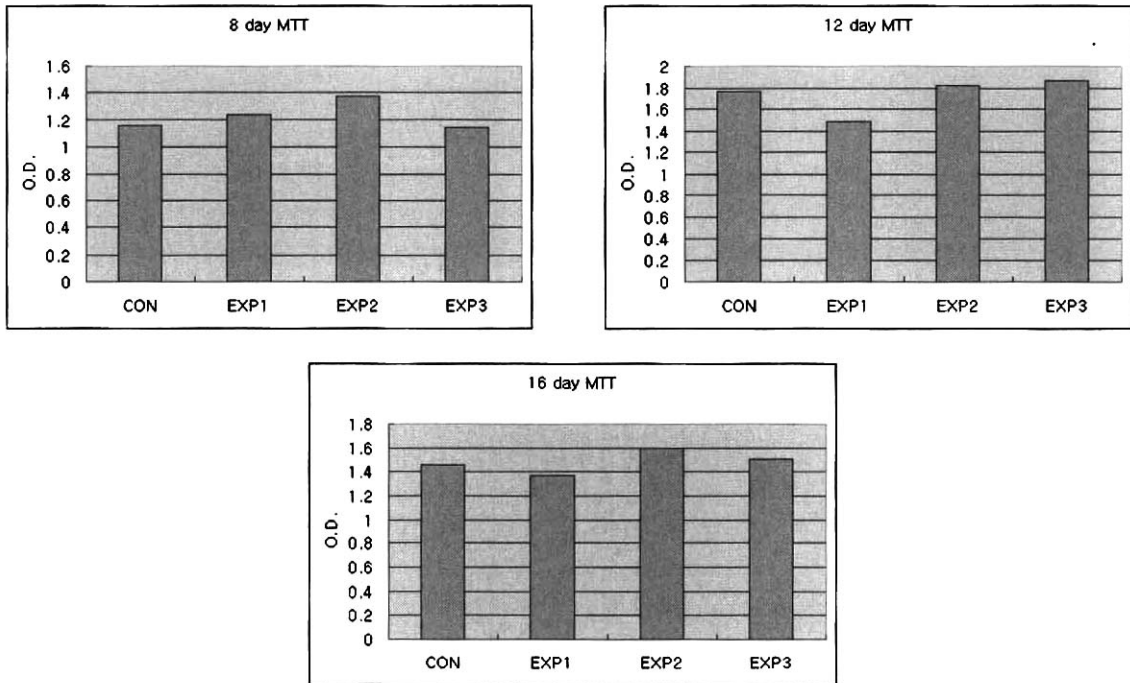


Figure 4. cellular activity of Rat calvarial cell at 8, 12, 16 day

에 유의한 차이를 보이지 않았으므로(ANOVA test) 해당농도에서 세포독성은 없었다(Table 2, Figure 1).

### 2) Alkaline phosphatase staining

DFPR의 농도를 10  $\mu\text{g/ml}$ , 1  $\mu\text{g/ml}$ , 100  $\text{ng/ml}$ 로 각각 달리하여서 5일간 배양 후 염색 후 광학현미경 하에서 관찰한 결과 농도가 증가할수록 염색된 부위가 증가하는 것을 확인할 수 있었다(Figure 2).

### 3) Alkalline phosphatase mRNA 발현 (RT-PCR)

DFPR의 농도를 10  $\mu\text{g/ml}$ , 1  $\mu\text{g/ml}$ , 100  $\text{ng/ml}$ 로

각각 달리하여서 5일간 배양한 후 mRNA를 분리하여 ALP의 발현을 RT-PCR을 통하여 비교해 본 결과 10  $\mu\text{g/ml}$ 에서 ALP mRNA가 가장 많이 발현되는 것을 확인할 수 있었다(Figure 3). 이상의 결과를 바탕으로 속단의 농도를 10  $\mu\text{g/ml}$ 로 정하였다.

## 2. 세포 활성도측정

각 군에 대하여 8, 12, 16일에 MTT test를 통하여 세포활성도를 측정하였다(Table 3, Figure 4). 각 군 간에 세포활성도의 유의한 차이는 보이지 않았다.

### 3. Alkaline phosphatase, osteocalcin, osteopontin, collagen type - 1 의 mRNA 발현의 측정 (RT-PCR)

전체적으로 marker들의 발현시기의 차이를 나타내지는 않는 것으로 관찰되었다. Alkaline phosphatase와 collagen type 1은 대조군이 가장 많은 양의 발현을 나타내었고 실험1군이 다음으로 나타났다. 실험2군과 실험3군은 유사한 양상을 나타내었다. osteocalcin은

대조군에서 가장 많은 발현을 나타내었고 특이적으로 4일에서 많은 양의 발현을 나타내었다. 실험1, 2, 3군은 서로 유사한 양상을 나타내었다. osteopontin은 4, 16일에서 대조군이 많은 양을 나타내었지만 전체적으로 군간에 유사한 양상을 나타내고 있다(Figure 5).

### 4. Von Kossa staining

Von Kossa staining 후 육안으로 결과를 확인한 결

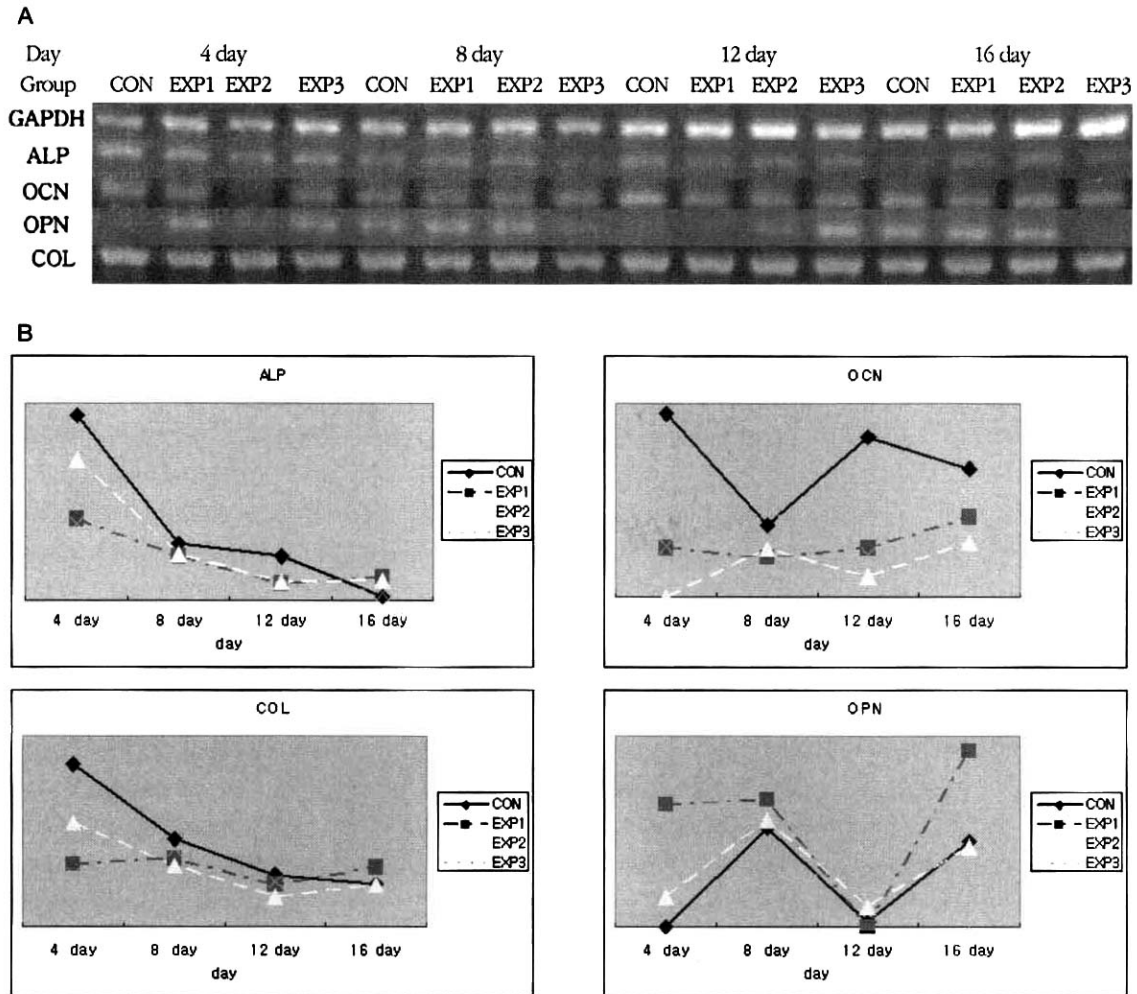


Figure 5.

A. Expression of GAPDH, OCN, OPN and COL at different time points of rat calvarial cells. The total RNA was isolated from culture at indicated time points and subjected to RT-PCR.

B. Densitometric analysis on ALP, OCN, OPN and COL.

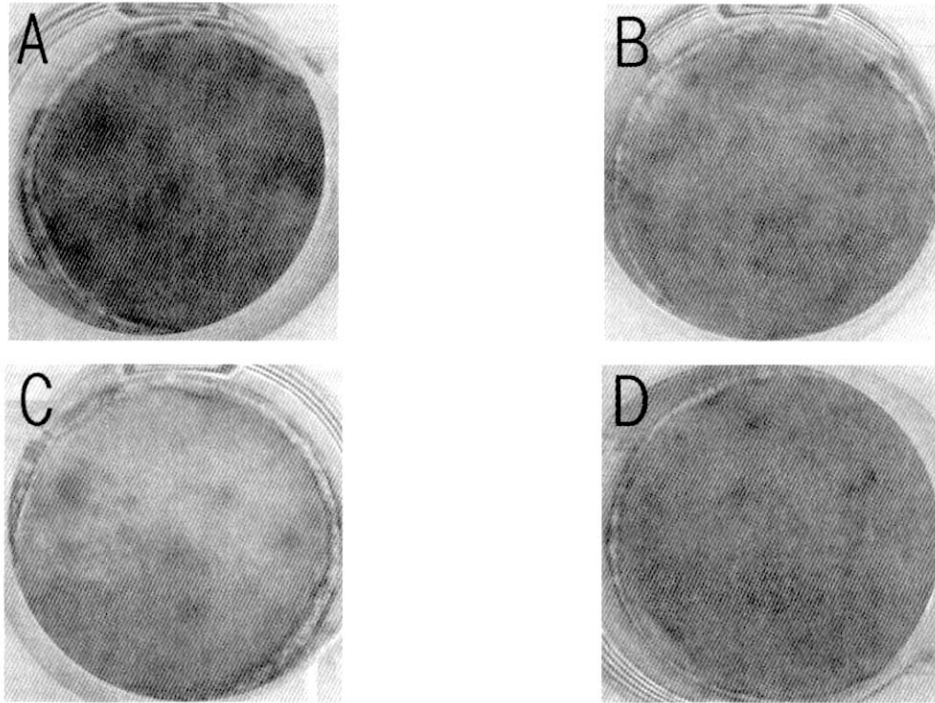


Figure 6. Von Kossa staining result at 16 day of culture

- (A) Osteogenic medium only
- (B) Osteogenic medium + 10 nM Dexamethasone
- (C) Osteogenic medium + DFPR 10 µg/ml
- (D) Osteogenic medium + DFPR 10 µg/ml + 10 nM Dexamethasone

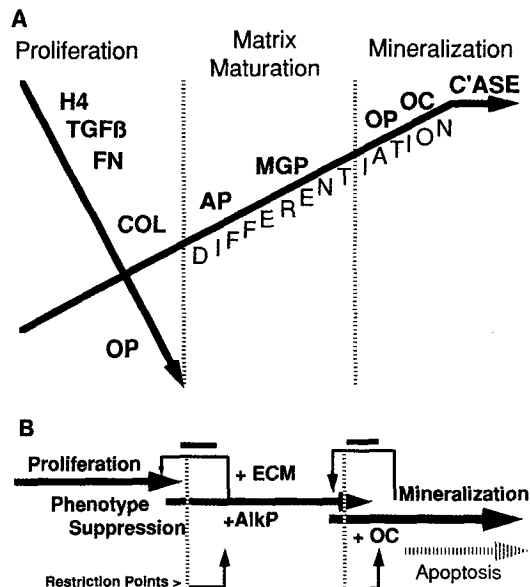


Figure 7. Reciprocal and functionally coupled relationship between cell growth and differentiation-related gene expression, (Adopted from John et al, Principles of Bone biology 1996, p71 Academic press)



과 조골배양액만을 사용한 대조군에서 가장 많은 석회화 결절이 관찰되었고 다음으로 dexamethasone을 첨가한 실험1군과 dexamethasone과 DFPR을 동시에 첨가한 실험3군이 유사한 양상을 보였으며, DFPR만을 첨가한 실험2군에서 가장 적은 석회화 결절이 관찰되었다(Figure 6).

#### IV. 총괄 및 고찰

생약제제를 이용한 동양의학에 대한 새로운 재평가와 함께 생약제제에 대한 관심이 증가하여 이를 과학적으로 성분을 분석하고 그 효과를 증명하려는 노력이 이루어지고 있으며 이를 바탕으로 여러 결과들이 보고 되고 있다.

최근까지 연구된 대표적인 생약제제로는 홍화씨가 있다<sup>19-26)</sup>. 합성된 성장인자들보다 전신 투여시의 위험성, 장기간 투여 시 합병증 검증되어 있으므로 많은 생약제들이 파괴된 치주조직의 재생에 적용하기 위하여 활발히 연구가 되고 있다.

본 연구에서는 이중 속단의 근육절상(筋骨折傷)에 속근(續筋)하고 접골(接骨)하는 작용을 고려하여 그 영향을 관찰하였다.

본 연구에 사용된 DFPR의 농도는 이전의 연구<sup>27)</sup>에서 DFPR의 실험농도를 10 µg/ml을 사용하였으나 사용된 세포가 태아골모세포주(FOB1 1.19; American Type Culture Collection, Manassas, VA)로 본 연구의 세포와는 달라 실험농도를 결정하기 위하여 10 µg/ml, 1 µg/ml, 100ng/ml로 달리하여 사용하여 검증하였다. 우선 MTT test로 독성을 검사하여 모든 농도에서 독성이 없음을 나타내었고 그 효과를 알아보기 위하여 marker로는 Alkaine phosphatase(ALP)의 발현을 사용하였다. ALP mRNA의 발현이 대조군에서 가장 많이 발현되기는 하였으나, ALP staining과 ALP의 mRNA의 발현이 10 µg/ml에서 가장 크게 나타났으므로 실험농도를 10 µg/ml으로 설정하였다.

본 연구에서 사용된 세포는 마우스 두개골 세포(rat calvarial cell)로 heterogenous population을 가지고 있지만 전구 조골세포로의 특성을 가지고 있다.

전구조골세포를 조골세포로 분화시키는 능력있는 조골배양액(osteogenic medium)을 사용하였고 그 조성은  $\alpha$ -minimum essential medium ( $\alpha$ -MEM)에 10% Fetal bovine serum (FBS), 10mM  $\beta$ -glycerophosphate, 50 µg/ml ascorbic acid를 이다.

세포의 분주는 plate에  $0.3 \times 10^4/cm^2$ 로 시행하였다. 이는 subconfluent한 조건으로 이는 조골세포의 분화단계에서 증식기의 차이를 관찰하기 위해서이다. 조골세포의 분화단계는 일반적으로 세포의 활성화에 따라서 증식기, 세포외기질 성숙기, 기질광화의 3단계로 구분되며 시기별 특징은 다음과 같다<sup>28)</sup>.

초기에 osteoprogenitor cell은 증식능이 매우 높고 collagen type I, fibronectin, transforming growth factor- $\beta$ 가 가장 많이 발현되며 세포외기질 성숙기에는 세포가 단층에서 복층으로 변화하면서 증식속도는 감소하게 되고 alkaline phosphatase의 발현이 증가하게 되며<sup>29-31)</sup>, 기질광화단계에서는 결절형태의 세포들이 세포외기질을 광화시키기 시작하고 osteocalcin과 bone sialoprotein의 발현이 증가하게 되며<sup>29,32)</sup> alkaline phosphatase의 발현이 감소하게 된다<sup>30,31)</sup>(참조 Figure 7).

본 연구에서는 DFPR의 전구조골세포의 초기 분화에 미치는 영향을 평가하기 위하여 조골세포의 분화과정 중에 나타나는 marker인 Collagen type-1(COL), Alkaline phosphatase(ALP), Osteopontin(OPN), Osteocalcin(OCN)을 이용하였다. COL은 골의 기본적인 기질로 골의 유기질 중 90% 이상을 차지하는 물질로 pre-osteoblast 단계에서 발현되며, ALP는 분화초기에 발현되며 분화단계 중에서는 pre-osteoblast에서 나타나며 다른 collagen이외의 골기질들(Osteocalcin)이 발현되기 전에 발현된다. OPN은 pre-osteoblast 단계에서 발현되기 시작하며 완전히 분화된 osteoblast에서 강하게 발현되는 2단계의 발현 형태를 가진다. OCN은 완전히 분화된 osteoblast에서 발현된다. 분화단계 중 가장 늦게 발현되는 marker로 pre-osteoblast 단계에서는 발현되지 않는다. 후기의 광화과정을 평가하기 위하여 Von Kossa staining을 사용하였다.

본 연구에서 DFPR의 효과를 평가하기 위한 양성대

조군으로 10 nM dexamethasone을 사용하였다. dexamethasone은 합성된 glucocorticoid로 in vitro 상에서 bone marrow stromal stem cell(BMSCs)의 조골세포로의 분화를 유도시키며<sup>33,36)</sup>, 지속적으로 투여한 경우에 alkaline phosphatase의 활성을 증가시키고<sup>33,34,37)</sup>, osteocalcin, bone sialoprotein의 발현을 증가시키고<sup>37-40)</sup>, 기질의 광화를 촉진시키는 것으로 보고 되고 있어<sup>33,34,40,41)</sup> dexamethasone의 첨가가 널리 골결절의 형성을 유도하는 실험에서 널리 사용되고 있다.

그러나 그 효과에 대해서는 아직 논란의 여지가 있는 상태이다. dexamethasone가 사용된 세포, 배양액의 조건, 세포의 분화단계, 용량, 처리기간에 따라서 조골세포의 분화에 상반되는 영향을 미친다는 연구 결과도 다수 보고되고 있다<sup>42-44)</sup>. 그러므로 osteoprogenitor cell의 증식과 분화에 대한 dexamethasone의 효과는 처리 용량과 시기에 따라 변화되는 것으로 보고 되고 있다<sup>36,40,45)</sup>. 본 연구에서의 실험의 조건이 dexamethasone의 처리 시에 세포의 분화단계가 marker의 발현을 저해하였던 것으로 여겨진다.

실험군은 조골배양액만을 가한 대조군과 양성대조군으로 10 nM dexamethasone을 첨가한 실험1군과 DFPR 10 µg/ml을 첨가한 실험2군과 10 nM dexamethasone과 DFPR 10 µg/ml을 첨가하였을 때 상호효과가 있는지를 평가하기 위한 실험3군으로 설정하고 실험을 진행하였다.

세포활성도 측정은 MTT test를 통하여 8, 12, 16일에 시행하였다. 실험군 간에 유의성 있는 차이를 나타내지는 않았다.

DFPR의 전구조골세포의 분화 촉진을 평가하기 위하여 본 연구에서 사용된 세포는 primary rat calvarial cell이다. heterogeneous population으로 ALP가 발현된 군과 발현되지 않은 군으로 구성되어 있는 heterogenous population임을 고려해볼 때<sup>46)</sup> 4일의 발현양상에서 초기의 marker와 후기의 marker가 혼재되는 mRNA 발현 형태(Figure 5)로 실험에 사용된 population은 pre-osteoblast와 mature osteoblast의 혼합된 양상임을 알 수 있다.

COL의 발현과 ALP의 발현과 유사한 양상을 나타내고 있어 대조군에서 가장 높은 발현을 보였고 시

간에 따라 점차 감소하는 양상을 보이고 있다. OPN의 발현은 실험1군 4, 16일에서만 다른 군에 비하여 높은 발현을 나타내며 대조군, 실험2, 3군은 유사한 정도를 나타낸다. OCN의 발현은 대조군에서 가장 높은 발현을 유지하며 시간에 따라 점차 증가하는 양상을 보였다. 이런 결과로 실험군 간에 분화의 속도의 차이는 크게 없는 것으로 여겨진다. 대조군에서 ALP, COL의 mRNA의 발현도 다른 군보다 높은 정도를 유지하므로 Von Kossa staining에서 대조군에서 가장 많은 골결절을 형성한 것과 일치한다.

이상의 결과로 DFPR은 마우스 두개골 세포의 분화에 큰 영향은 없는 것으로 추정되며 대조군과의 비교시에 골기질단백질의 mRNA의 발현을 감소시키므로 단백질의 생산도 감소되고 골결절의 형성도 감소시키는 것으로 추정된다. 이런 결과는 이전의 연구<sup>23)</sup>와는 다른 결과를 나타낸다. 다른 결과를 나타내는 원인으로는 연구에 사용된 세포가 다른 것이 원인으로 여겨진다.

이전의 연구<sup>23)</sup>에서 사용된 세포는 cell line으로 태아골모세포주(hFOB1 1.19 ; American Type Culture Collection, Manassas, VA)이고 본 연구에서 사용된 세포는 primary rat calvarial cell이다. 세포 분화의 특성상 태아골모세포주 보다 primary rat calvarial cell은 분화가 더 진행된 세포이다. 이러한 세포의 분화의 단계의 차이로 DFPR의 자극이 가해진 시기의 차이로 인하여 DFPR에 의한 효과가 상반된 결과를 나타낸 것으로 여겨지며, 조골세포의 분화에 대한 대표적인 in vitro 연구모델인 primary rat calvarial cell과 MC3T3-E1의 차이점으로 BMP-3b가 마우스 두개골 세포에서는 발현되지만 MC3T3-E1에서는 발현되지 않는다는 연구가 있었다<sup>47)</sup>. hFOB에서 BMP-3b의 발현에 대한 보고는 없으나 이점은 실험 결과의 차이를 설명하는 근거가 될 수 있다.

이전의 연구<sup>23)</sup>나 본 연구에서 공통적으로 10 nM dexamethasone를 처리한 양성대조군과 DFPR을 처리한 군이 동일한 양상을 나타낸다. 그러므로 DFPR이 조골세포에 미치는 영향은 dexamethasone와 유사한 양상을 지니는 거나, DFPR중에 dexamethasone의 성분이 포함되어 있을 것으로 여겨진다.

DFPR의 조골세포의 분화에 미치는 영향을 적절히 평가하기 위해서는 다양한 조골세포의 분화연구에 이용할 수 있는 세포와 배지의 조건을 달리한 *in vitro* 실험이 필요하며 *in vivo*에서 골형성을 평가하기 위한 critical size rat calvarial defect을 이용한 연구가 부가적으로 필요할 것으로 여겨진다. 또한 혈관형성은 골의 성장을 유지, 파절부위의 치유, 골의 재형성에 필수적인 과정이고 골의 신형성을 위해서는 전구세포의 분화와 골형성 능력이외에도 혈관형성이 중요한 요소이다. DFPR은 한의학 문헌상에서 활혈(活血), 혈맥을 통리(通利)하는 효능, 혈(血)의 생성, 어혈제거의 효능도 보고 되므로, 골형성을 촉진하는 것 이외에도 혈류를 증가, 혈액의 생성을 촉진하는 등 혈관에도 영향을 미치는 것으로 나타나므로, DFPR이 혈관신생에 미치는 영향에 대한 *in vitro* 실험도 필요할 것으로 여겨진다.

## V. 결론

속단의 Dichloromethane 분획물(DFPR)의 마우스 두개골 세포의 분화에 미치는 영향을 평가하기 위하여 마우스 두개골 세포의 활성도와 세포외기질의 mRNA 발현의 관찰, 골형성정도를 평가하기 위하여 Von Kossa staining을 시행하였다.

1. DFPR은 10 µg/ml의 농도에서 마우스 두개골 세포의 세포외기질의 발현이 감소하였다.
2. DFPR은 10 µg/ml의 농도에서 골결절의 형성이 감소하였다.

이상의 연구 결과로 볼 때, DFPR은 10 µg/ml은 마우스 두개골 세포의 분화를 억제하고 골형성도 억제하는 것으로 관찰되었다. DFPR의 골재생능력을 평가하기 위해서는 계속적인 *In vitro* 실험과 *in vivo* 실험을 시행해야만 할 것이다.

## VI. 참고 문헌

1. Caton JG, Quinones CR. Etiology of periodontal

- disease. *Curr Opin Dent* 1991;1: 17-28.
2. Froum SJ, Gomez C. Periodontal regeneration. *Curr Opin Periodontol* 1993;64: 744-753.
3. Clark RAF, Henson PM. The molecular and cellular biology of wound repair. New York: Plenum Press 1988.
4. Lynch SE, Williams RC, Polson AM, Howell TH, Reddy MS, Zapa UE, Antoniades HN. A combination of platelet derived and insulin-like growth factors enhances periodontal regeneration. *J Clin Periodontol* 1989;16:545-548.
5. Joyce ME, Robert AB, Sporn MB, Bolander ME. Transforming growth factor-β and the initiation of chondrogenesis and osteogenesis in the rat femur. *J Cell Biol* 1990;110:2195-2207.
6. Urist MR. Bone formation by autoinduction. *Science* 1965;150:893-899.
7. Mizutani H, Urist MR. The nature of bone morphogenetic protein fractions derived from bovine bone. *Clin Orthop* 1982;171:213-223.
8. Sigurdsson TJ, Lee MB, Kubota K, Turek TJ, Wozney JM, Wikesjö UME. Periodontal repair in dogs. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 significantly enhances periodontal regeneration. *J Periodontol* 1995;66:131-138.
9. Urist MR, Lietze A, Mizutani H, Takagi K, DeLange R, Termine J, Finerman GA. A bovine low molecular weight bone morphogenetic protein fraction. *Clin Orthop* 1982;162:219-232.
10. Wang EA, Rosin V, Cordes P, Harada T, Hewick RM, Kerns KM, LaPan P, Luxenburg DP, McQuaid D, Moutsatos IK, Nove J, Wozney JM. Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:2220-2224.
11. Wikesjö UME, Guglielmoni P, Promsudthi A, Cho KS, Trombelli L, Selvig KA, Jin L, Wozney JM. Periodontal repair in dogs. Effect of rhBMP-2 concentration on regeneration of alveolar

- bone and periodontal attachment. *J Clin Periodontol* 1999;26: 392-400.
12. Wozney JM. The potential role of bone morphogenetic proteins in periodontal reconstruction. *J Periodontol* 1995;66:506-510.
  13. 한국생약교수협의회. 본초학. 사단법인 약사회, 1995;553-555.
  14. 김종관, 채중규, 조규성, 문익상, 최성호. Zea Mays L. 불검화 정량 추출물의 치주염 치료효과에 대한 임상적 연구. *대한치주과학회지* 1991;21:225-234.
  15. 송기범, 공영환, 유형근, 신형식. 황련이 Lipopolysaccharide를 처리한 치주인대세포의 세포활성 및 IL-6 생산에 미치는 영향. *대한치주과학회지* 1996;26:641-653.
  16. 유형근. 황련과 *Centella asiatica* 추출물이 치은 섬유모세포에 미치는 영향. *대한치주과학회지* 1996;26:681-688.
  17. 이용무, 구영, 배기환, 정종평. 후박 및 대조 추출 혼합물이 골조직 재생에 미치는 영향. *대한치주과학회지* 1997;27:165-178.
  18. 최상묵, 한수부, 황광세. Zea Mays L.의 불검화 정량 추출물(DENTADOL®)이 외과적 치주치료 후의 치유에 미치는 효과에 관한 임상적 연구. *대한치주과학회지* 1989;19:63-69.
  19. 김성태, 전길자, 임소형, 조규성, 김종관, 최성호. 백서 두개골 결손부에 홍화씨 추출물이 골조직 재생 유도 효과. *대한치주과학회지* 2000;30:835-852.
  20. 허지선, 강정화, 유윤정, 김창성, 조규성, 최성호: 홍화씨 분획 추출물이 치주인대 섬유아세포와 MC3T3-E1 세포에 미치는 영향. *대한치주과학회지* 2001;31:833-846.
  21. 정의원. 백서두개골 결손부에서 키토산의 골조직 재생 유도 효과. *대한치주과학회지* 2000;30(4):851-868.
  22. 강정구, 유형근, 신형식: 홍화씨 추출물이 치주인대세포와 조골유사세포의 골광물화 작용에 미치는 효과. *대한치주과학회지* 1998;28:475-489.
  23. 신승윤, 이용무, 구영, 배기환, 정종평. 후박 및 홍화종자 추출혼합물이 치주인대세포 및 골아세포의 활성화 및 백서의 두개골재생에 미치는 영향. *대한치주과학회지* 1998;28:545-559.
  24. 김덕규, 홍성우, 유경태, 서재진, 김홍식, 유형근, 신형식. 홍화씨 추출물의 국소투여가 백서 두개골 결손부 재생에 미치는 영향. *대한치주과학회지* 1998;28:297-313.
  25. 서재진, 김탁, 피성희, 윤기연, 유형근, 신형식. 홍화씨 추출물 및 우골유도합성골이 성견골 결손부 재생에 미치는 영향. *대한치주과학회지* 2000;30:553-569.
  26. 김재익. 임상본초학강좌(臨床本草學講座). *대성의학사* 2000;132-134.
  27. 이영준, 최희인, 김윤철, 신형식, 유형근. 속단의 Dichloromethane 분획물이 태아골모세포의 골형성유도에 미치는 효과. *대한치주과학회지* 2003;33:259-269.
  28. Lian JB, Stein GS. Concepts of osteoblast growth and differentiation: Basis for modulation of bone cell development and tissue formation. *Crit Rev Oral Biol Med* 1992;3:269-305.
  29. Owen TA, Aronow M, Shalhoub V, Barone LM, Wilming L, Tassinari MS, Kennedy MB, Pockwinse S, Lian JB, Stein GS. Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: Reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. *J Cell Physiol* 1990;143:420-430.
  30. Turksen K, Aubin JE. Positive and negative immunoselection for enrichment of two classes of osteoprogenitor cells. *J Cell Biol* 1991;114:373-384.
  31. Malaval L, Modrowski D, Gupta AK, Aubin JE. Cellular expression of bone-related proteins during in vitro osteogenesis in rat bone marrow stromal cell cultures. *J Cell Physiol* 1994;158:555-

- 572.
32. Pockwinse SM, Wilming LG, Conlon DM, Stein GS, Lian JB. Expression of cell growth and bone specific genes at single cell resolution during development of bone tissue-like organization in primary osteoblast cultures. *J Cell Biochem* 1992;49:310-3232.
  33. Maniopoulos C, Sodek J, Melcher AH: Bone formation in vitro by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats. *Cell Tissue Res* 254 : 317-330, 1988.
  34. Cheng SL, Zhang SF, Avioli LV. Expression of bone matrix proteins during dexamethasone-induced mineralization of human bone marrow stromal cells. *J Cell Biochem* 1996;61:182-193.
  35. Peter SJ, Liang CR, Kim DJ, Widmer MS, Mikos AG. Osteoblastic phenotype of rat marrow stromal cells cultured in the presence of dexamethasone, beta-glycerolphosphate, and L-ascorbic acid. *J Cell Biochem* 1998;71:55-62.
  36. Atmani H, Audrain C, Mercier L, Chappard D, Basle MF. Phenotypic effects of continuous or discontinuous treatment with dexamethasone and/or calcitriol on osteoblasts differentiated from rat bone marrow stromal cells. *J Cell Biochem* 2002;85:640-650.
  37. Rickard DJ, Sullivan TA, Shenker BJ, Leboy PS, Kazhdan I. Induction of rapid osteoblast differentiation in rat bone marrow stromal cell cultures by dexamethasone and BMP-2. *Dev Biol* 1994;161:218-228.
  38. Kasugai S, Todescan R Jr, Nagata T, Yao KL, Butler WT, Sodek J. Expression of bone matrix proteins associated with mineralized tissue formation by adult rat bone marrow cells in vitro: Inductive effects of dexamethasone on the osteoblastic phenotype. *J Cell Physiol* 1991;147:111-120.
  39. Leboy PS, Beresford JN, Devlin C, Owen ME. Dexamethasone induction of osteoblast mRNAs in rat marrow stromal cell cultures. *J Cell Physiol* 1991;146:370-378.
  40. Aubin JE. Osteoprogenitor cell frequency in rat bone marrow stromal populations: Role for heterotypic cell-cell interactions in osteoblast differentiation. *J Cell Biochem* 1999;72:396-410.
  41. Dieudonne SC, Kerr JM, Xu T, Sommer B, DeRubeis AR, Kuznetsov SA, Kim IS, Ghebr Robey P, Young MF. Differential display of human marrow stromal cells reveals unique mRNA expression patterns in response to dexamethasone. *J Cell Biochem* 1999;76:231-243.
  42. M. TAIRA, H. NAKAO, J. TAKAHASHI, Y. ARAKI. Effects of two vitamins, two growth factors and dexamethasone on the proliferation of rat bone marrow stromal cells and osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Journal of Oral Rehabilitation* 2003;30:697-701.
  43. Jane B. Lian, Victoria Shalhoub, Fauzia Aslam, Baruch Frenkel, Jack Green, Michael Hamrah, Gary S. Stein and Janet L. Stein. Species-Specific Glucocorticoid and 1,25-Dihydroxyvitamin D Responsiveness in Mouse MC3T3-E1 Osteoblasts: Dexamethasone Inhibits Osteoblast Differentiation and Vitamin D Down-Regulates Osteocalcin Gene Expression. *Endocrinology* 1997;138(5):2117-2127.
  44. Victoria Shalhoub, Fauzia Aslam, Ellen Breen, Andre van Wijnen, Rita Bortell, Gary S. Stein, Janet L. Stein, and Jane B Lian. Multiple Levels of Steroid Hormone - Dependent Control of Osteocalcin During Osteoblast Differentiation : Glucocorticoid Regulation of Basal and Vitamin D Stimulated Gene Expression. *Journal of Cellular Biochemistry* 1998;69:154-168.
  45. Beresford JN, Bennett JH, Devlin C, Leboy PS, Owen ME. Evidence for an inverse relationship between the differentiation of adipocytic and

osteogenic cells in rat marrow stromal cell cultures. *J Cell Sci* 1992;102(Pt 2):341-351.

46. John P. Bilezikian, Lawrence G. Raisz, Gideon A. Rodan, Principles of Bone Biology. Academic press P 39-86 1996.

47. Jun Hino, Hisayuki Matsuo, Kenji Kangawa.

Bone Morphogenetic Protein-3b (BMP-3b) Gene expression is correlated with differentiation in Rat Calvarial Osteoblast. *Biophysical and Biochemical Research Communications* 1999;256:419-424

## The Effects of Dichloromethane fraction of *Phlomis Radix*(DFPR) on differentiation of Mouse Calvarial Cell

Dong-Jin Kim<sup>1</sup>, Jeong-Ho Yun<sup>1</sup>, Ui-Won Jung<sup>1</sup>, Yun-Jung Yoo<sup>2</sup>, Yun-Chul Kim<sup>3</sup>,  
Hyung-Keun You<sup>4</sup>, Chong-Kwan Kim<sup>5</sup>, Sung-Ho Choi<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Department of periodontology, College of Dentistry, Yonsei University,

<sup>2</sup>Department of Oral Biology, College of Dentistry, Yonsei University,

<sup>3</sup>Department of Pharmacy, Pharmacy College, Wonkwang University ,

<sup>4</sup>Department of periodontology, School of Dentistry, Wonkwang University,

<sup>5</sup>Department of periodontology, College of Dentistry, Yonsei University, Brain Korea 21 Project for Medical science

The purpose of this study was to evaluate the effects of DFPR on differentiation of mouse calvarial cell *in vitro*, to examine the possibility for periodontal regeneration. 10  $\mu\text{g/ml}$  of DFPR was used as experimental concentration. osteogenic medium only was assigned as control, Experimental 1 was supplemented with 10nM dexamethasone, Experimental 2 with 10  $\mu\text{g/ml}$  DFPR and Experimental 3 with 10nM dexamethasone + 10  $\mu\text{g/ml}$  DFPR. cellular activity was evaluated by MTT method at 8, 12, 16 days, expression of mRNA of ALP, osteopontin, osteocalcin, collagen type-1 was detected by RT-PCR method at 4, 8, 12, 16 days of culture . extent of mineralization was observed by Von Kossa staining at 16 day of culture.

The results are as follows 1)Any acceleration of differentiation was not observed at expression of differentiation marker, 2) Decrease in expression of extracellular matrix and in bone nodule formation was observed

The results suggested that DFPR have negative effect on the rate of differentiation on rat calvarial cell, decrease extracellular matrix formation ,decrease bone nodule formation. Ongoing studies are necessary in order to determine effect of DFPR on periodontal regeneration.