홍화씨 분획 추출물이 치주인대 섬유아세포와 MC3T3-E1 세포에 미치는 영향

연세대학교 대학원

치 의 학 과

허 지 선

홍화씨 분획 추출물이 치주인대 섬유아세포와 MC3T3-E1 세포에 미치는 영향

지도 최 성 호 교수

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2001년 12월 일

연세대학교 대학원

치 의 학 과

허 지 선

허지선의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2001년 12월 일

감사의 글

아직 부족하지만 여러분의 도움으로 한 편의 논문을 완성하게 되었습니다. 실험의 첫 시작에서부터 논문을 마치기까지 아낌없는 지도를 해주신 최성호 교수님께 감사드립니다. 귀한 조언을 해주신 김종관 교수님, 채중규 교수님, 조규성 교수님, 유윤정 교수님, 김창성 선생님께도 감사드립니다.

실험하는 내내 물심양면으로 도와주신 이현정 선생님과 강정화 선생님께 감사드립니다. 또한 실험하면서 힘들고 지칠 때마다 큰 힘이 되어준 백정원 선생님, 교정 작업을 도와준 인턴 선생님들과 관심어린 눈으로 지켜봐주신 모든 의국원들께 감사드립니다.

큰 사랑으로 독려해주신 부모님과 원서오빠께 이 논문을 바칩니다.

2001년 12월

저자 씀

차 례

그림 및 표 차례

국문 요약

홍화씨 분획 추출물이 치주인대 섬유아세포와 MC3T3-E1 세포에 미치는 영향

최근 치주 영역에서 생약제제에 대한 관심이 증가되고 있으며 특히 홍화씨, 후박, 황금, 대조, 황백, 죽염, 황련, 은행엽, 옥수수 추출물 등이 치주염에 효과적인 생약제제로 알려져 있다.

이 중 홍화(safflower, *Carthamus tinctorius L.*)의 씨는 골절, 골다공증 등의 골질환 치료제로 쓰여 오면서 경험적으로 그 효능을 입증받은 제제로 수 년 전부터 치주 영역에서도 국내산 홍화씨에 대한 연구가 활발히 진행되어 홍화씨 추출물이 치주인대 섬유아세포와 조골세포의 활성도 증가, alkaline phosphatase(ALP) 활성도 증가, 골광물화 작용 증진에 효과적임이 보고되었으며 동물 실험에서도 홍화씨 추출물을 경구 투여했을 때 신생골 형성이 촉진됨을 보였다.

기존의 홍화씨 추출 방법은 한두 개의 용매를 이용하여 홍화씨의 전체 성분을 추출한 것이었으며 골조직 재생 효과를 극대화하기 위해서는 골조직 재생에 효과적인 성분만을 고농도로 추출하는 방법이 필요하였다. 이에 홍화씨 성분 중 골형성능 증진에 가장 효과적인 성분을 찾기 위한 노력으로 다양한 용매를 이용하여 홍화씨 성분을 다단계 추출하여 여러 홍화씨 분획 추출물을 얻었으며 이 중 methanol과 물로 차례로 추출한 saf-M-W 분획이 조골세포의 골형성능 증진에 가장 효과적이었다.

이에 본 연구에서는 홍화씨 분획 추출물 saf-M-W를 이용하여 이것이 치주인대 섬유아세포와 조골세포 전구세포주인 MC3T3-E1 세포의 성장 및 분화에 미치는 영향을 알아보았다. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT) test로 두 가지 세포에 대한 독성을 측정하였으며 치주인대 섬유아세포에서 발색 반응을 이용한 ALP 활성도 검사를 시행하였다. 또한

MC3T3-E1 세포에서는 Northern blot 분석을 통해 ALP 및 bone sialoprotein (BSP) mRNA 발현을, von Kossa 염색과 위상차 현미경으로 석회화 결절 형성을 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. saf-M-W 농도 10㎍/㎖ 이하에서는 치주인대 섬유아세포와 MC3T3-E1 세포 모두에서 세포독성은 나타나지 않았다.

2. 치주인대 섬유아세포에서 saf-M-W 농도 변화에 따른 ALP 활성도 차이는 없었다.

3. MC3T3-E1 세포에서 10㎍/㎖ 농도의 saf-M-W 처리군의 ALP 및 BSP mRNA 발현이 대조군에 비해 현저히 증가하였다.

4. MC3T3-E1 세포에서 대조군에서는 석회화 결절이 형성되지 않은 반면 10㎍/㎖ 농도의 saf-M-W 처리군에서는 다량의 석회화 결절이 형성되었다.

이상의 결과는 홍화씨 분획 추출물 saf-M-W가 10㎍/㎖ 이하의 농도에서 치주인대 섬유아세포와 MC3T3-E1 세포에 대해 독성을 나타내지 않으며 MC3T3-E1 세포의 분화 및 골형성을 효과적으로 촉진할 수 있음을 시사한다.

핵심되는 말: 홍화씨 분획 추출물, 치주인대 섬유아세포, MC3T3-E1

홍화씨 분획 추출물이 치주인대 섬유아세포와 MC3T3-E1 세포에 미치는 영향

연세대학교 대학원 치의학과
(지도 최성호 교수)
허 지 선

Ⅰ. 서론

치주 치료의 궁극적 목적은 치주조직의 재생에 있다. 치주조직 재생에 가장 중요한 역할을 하는 것은 치주인대 섬유아세포로 백악질, 골, 치주인대를 재생시킬 수 있는 능력을 가지고 있다[7,12]. 이 원리를 이용하여 치주조직 유도 재생술(guided tissue regeneration)[4,5,10,20]이 개발, 사용되어 왔으나 이는 차단막을 이용하여 치은 세포를 배제하는 것일 뿐 재생에 필요한 세포 과정을 촉진하는 것은 아니다.

재생 술식으로 가장 많이 사용되는 것이 골이식술로 자가골, 동종골, 이종골, 합성골 등이 사용된다[8]. 이 중 이종골, 합성골은 골전도체로 숙주골이 자라들어올 수 있는 공간만 유지해 주는 역할을 한다[8]. 동종골의 대표격인 탈회 동결 건조골은 bone morphogenetic protein(BMP)을 함유하여 골유도 작용을 한다고 하나[8] 골은행별로, 또한 같은 골은행에서도 표본별로 골유도능에는 상당한 차이를 보인다고 한다[17]. 자가골은 골형성능에 있어서는 우수하지만 별도의 공여부를 필요로 하며 다량을 얻기 어려운 제한점이 있고 이식부에서 치근흡수나 골유착이 일어나

는 경우가 있다[2].

최근에는 분자생물학의 발전으로 세포의 증식, 분화, 이주를 조절하는 성장인자를 조직 재생에 응용하기에 이르렀다[1]. 1989년 Lynch 등은 platelet derived growth factor(PDGF)와 insulin-like growth factor(IGF)의 혼합 사용 시 치주조직이 재생됨을 보고하였고[6], 1990년 Joyce 등은 transforming growth factor-β(TGF-β)가 장골 파절 부위에서 골형성을 유도함을 보고하였다[3]. 1965년 Urist[21]가 BMP를 처음 소개한 이후 많은 연구에서 BMP가 골조직의 치유 및 재생 효과를 지님을 보고하였다[9,18,22-25]. 최근까지도 성장인자의 임상 적용을 위한 연구가 꾸준히 계속되고 있으나 그 투여 용량과 적당한 매개체가 아직 결정되지 않았으며 국소 투여 시 인체 내 타 기관에의 영향이 미지수이고 경제적인 면에서도 단점을 가진다.

성장인자의 이런 제한점에 반해 부작용이 적고, 장기적 사용, 경구 투여가 가능하며 안전하고 경제적이라는 장점을 가진 여러 가지 생약제제들이 주목받고 있다. 특히, 홍화씨, 후박, 황금, 대조, 황백, 죽염, 황련, 은행엽, 옥수수 추출물 등이 치주염에 효과적인 생약제제로 알려져 있으며[38], 이 중 몇몇 제제는 실험실 및 생체 실험에서 골재생을 유도함이 보고되었다[28,31,32,35,37].

이 중 홍화(safflower, *Carthamus tinctorius L.*)의 씨는 골절, 골다공증 등의 골질환 치료제로 쓰여 오면서 경험적으로 그 효능을 입증받았으며 그 외에도 고혈압, 동맥경화증, 척추디스크, 신경통, 혈액순환 촉진에도 효과적이라 한다[38]. 또한 그 성분인 adenosine diphosphate가 혈소판 응집을 억제하여 항응혈 효과와 항염 효과 등을 나타낸다고 확인된 바 있다[36,38]. 1998년 이 등[36]은 홍화씨에 함유된 유기 백금 성분이 골절 부위에서 양전기와 음전기의 교류 작용을 활발하게 하여 백혈구의 이주를 촉진하고 골재생을 일으킨다고 하였으며 홍화씨에는 뼈의 주된 성분인 칼슘과 골세포를 서로 연결시켜주는 구리 성분도 함유되어 있어 골절 치유에 효과가 있다고 하였다.

수 년 전부터 치주 영역에서도 국내산 홍화씨의 효능을 과학적으로 입증하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다. 1997년 두 등[29], 1997년 류 등[30], 1998년 강 등[26], 1998년 이 등[34], 1998년 윤 등[33]의 연구에서 홍화씨 추출물이 치주인대 섬유아

세포와 조골세포의 활성도 증가, alkaline phosphatase(ALP) 활성도 증가, 골광물화 작용 증진에 효과가 있음을 보였으며 1997년 류 등[30]은 백서 두개골 결손부를 이용한 생체 실험을 통해 홍화씨 추출물을 경구 투여했을 때 신생골 형성이 촉진됨을 보였다. 이들은 홍화씨 추출물을 얻기 위해 증류수에 홍화씨 분말을 넣고 가열, 여과하여 추출한 것을 냉동 건조하는 방법과 이것을 다시 부탄올로 추출하여 수층과 부탄올층으로 나누는 방법, 70% ethanol 단일 용매로 환류, 추출하는 방법 등을 사용하였다.

기존의 홍화씨 추출 방법은 한두 개의 용매를 이용하여 홍화씨의 전체 성분을 추출한 것이었으며 골조직 재생 효과를 극대화하기 위해서는 골조직 재생에 효과적인 성분만을 고농도로 추출하는 방법이 필요하였다. 홍화씨 성분 중 골형성능 증진에 가장 효과적인 성분을 찾기 위한 노력으로 예비 실험을 한 결과 다양한 용매를 이용하여 홍화씨 성분을 다단계 추출하여 여러 홍화씨 분획 추출물을 얻었으며 이 중 methanol과 물로 차례로 추출한 saf-M-W 분획이 조골세포의 골형성능 증가에 가장 효과적이었다.

이에 본 연구에서는 홍화씨 분획 추출물 saf-M-W를 처리하였을 때 치주인대 섬유아세포에 대한 세포독성, ALP 활성도에 미치는 영향 및 조골세포 전구세포주인 MC3T3-E1 세포에 대한 세포독성, ALP 및 bone sialoprotein(BSP) mRNA 발현 정도, 석회화 결절 형성을 관찰함으로써 홍화씨 분획 추출물 saf-M-W가 치주인대 섬유아세포와 조골세포의 증식 및 분화에 미치는 영향을 알아보았다.

Ⅱ. 연구 재료 및 방법

가. 연구 재료

1. 홍화씨 분획 추출물

홍화씨 분말을 n-hexane으로 추출하고 다시 남은 잔사를 차례로 chloroform, methanol, 70% ethanol로 추출하여 그 각각을 saf-H, saf-C, saf-M, saf-E라 명명하였다. 이 중 methanol 추출물인 saf-M을 chloroform 층(saf-M-C)과 물 층(saf-M-W), 그리고 그 두 가지 모두에 녹지 않는 불용성 층으로 나누었다. 본 실험에서는 saf-M-W 분획을 사용하였다(Figure 1).

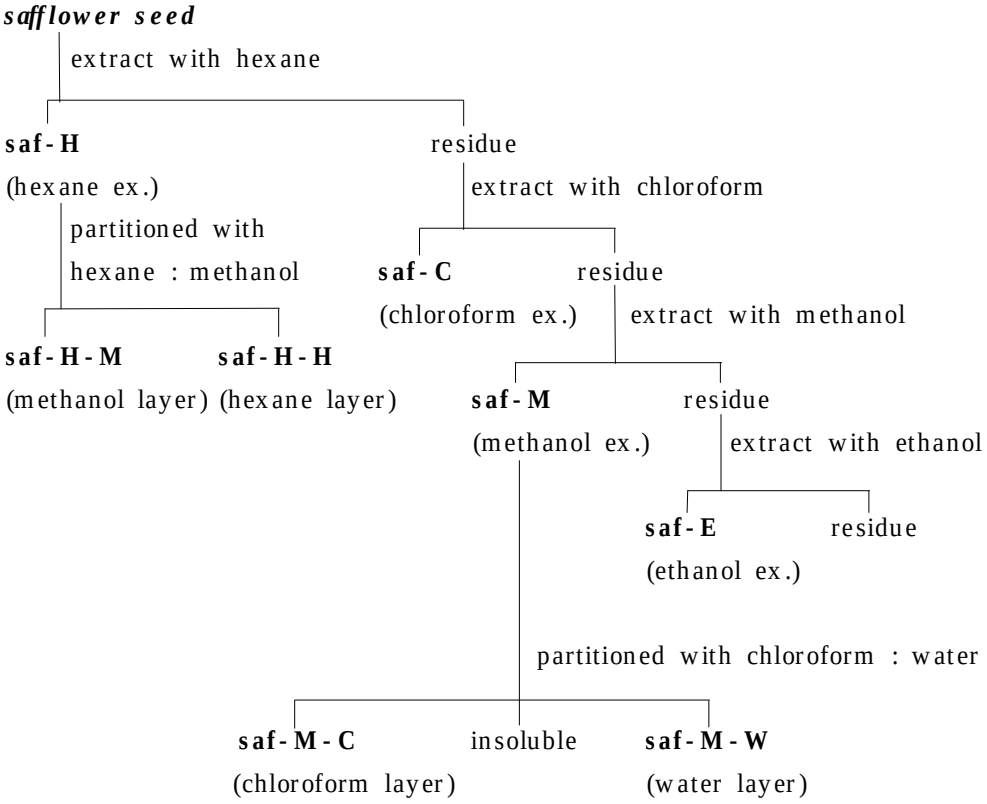

Figure 1. The method of safflower seed fraction extracting

2. 치주인대 섬유아세포, MC3T3-E1 세포

교정 치료를 목적으로 발거한 건강한 소구치에서 치주인대 섬유아세포(human periodontal ligament fibroblast; hPDLF)를 채취하였으며 세포주로 조골세포 전구세포주인 MC3T3-E1 세포를 사용하였다.

나. 연구 방법

1. 실험군 설정

α-minimal essential medium(α-MEM)에서 배양한 세포를 대조군으로 하고, saf-M-W를 넣어 배양한 군을 실험군으로 하였다. 이때 실험군의 saf-M-W 농도는 1, 5, 10, 20㎍/㎖의 네 군으로 나누어 실험하였다.

2. 세포 배양

1) 치주인대 섬유아세포

교정 치료를 목적으로 발거한 건강한 소구치에서 치주인대 섬유아세포를 채취하여 배양하였다. 발거 전에 큐렛을 이용하여 치태와 치석을 제거한 후 치아를 발거하고 Hank's balanced salt solution(HBSS)으로 3회 세척하여 잔존 혈액을 제거한 다음 치근 중앙 1/3 부위에서 치주인대 조직을 채취하였다. 10% fetal bovine serum(FBS), 100unit/㎖ penicillin, 100㎎/㎖ streptomycin, 0.5㎎/㎖ amphotericin-B가 포함된 α-MEM을 배양액으로 사용하였고 37℃, 100% 습도, 5% CO_2 공기혼합 배양기에서 배양하였다. 배양액을 3일 간격으로 교환하면서 밀생단일층이 얻어질 때까지 배양하였다.

2) MC3T3-E1 세포

조골세포 전구세포주인 MC3T3-E1 세포를 사용하였다. 10% FBS, 100unit/㎖ penicillin, 100㎎/㎖ streptomycin, 0.5㎎/㎖ amphotericin-B가 포함된 α-MEM을 배양액으로 사용하였고 37℃, 100% 습도, 5% CO_2 공기혼합 배양기에서 배양하였다.

3. 세포독성 측정

96well 배양 접시에 치주인대 섬유아세포를 분주하고 10% FBS가 함유된 α-MEM 배양액 200㎕를 넣은 후 배양기에서 배양하였다. 세포가 각 well에 가득 찼을 때 배양액을 제거하고 대조군과 실험군으로 구분하여 대조군에는 10% FBS가 함유된 α-MEM 배양액 200㎕를 재주입하고, 실험군에는 각 농도별로 saf-M-W가 함유된 배양액 200㎕를 주입하여 동일조건 하에서 배양하였다.

배양 1일, 3일 후 생리식염수로 용해한 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT) 용액(5㎎/㎖) 50㎕를 각 well에 첨가한 후 4시간동안 배양기에서 배양하였다. 반응액을 제거하고 200㎕의 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 첨가하여 세포 내에 형성된 formazan 결정을 용해한 후 ELISA reader를 이용하여 570㎚ 파장에서 흡광도를 측정하였다.

MC3T3-E1 세포에 대해서도 같은 과정으로 세포독성을 측정하였다.

4. ALP 활성도 측정

직경 35㎜ 배양 접시에 치주인대 섬유아세포를 분주하고 대조군과 실험군으로 구분하여 동일조건 하에서 배양하였다. 이 때 세포독성 실험에서 독성이 나타난 농도는 배제하였다. 배양 시 10mM β-glycerophosphate와 50㎍/㎖ L-ascorbic acid를 첨가하였으며 2-3일 간격으로 배지를 교환하였다. 5일 후 배양된 세포를 수집하여 ALP 활성도를 측정하였다. 각각의 배양 접시에서 배양액을 제거하고 세포를 분리한 후 세포부유액을 4℃, 8000rpm에서 10분 동안 원심분리하였다. 상층액을 제거하고 phosphate buffered saline(PBS)으로 2회 세척하였다. 분리한 세포를 얼음에 옮긴 후 0.5% triton X-100 100㎕, PBS 200㎕를 첨가하여 1시간 동안 두면서 세포막을 파괴하였다. PBS 200㎕를 첨가하고 4℃, 8000rpm에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 모아 ALP 활성도 측정에 사용하였다. 30℃에서 세포액 20㎕를 1㎖의 ALP 시약과 혼합하였다. 30℃에서 30초간 반응시킨 후 405㎚에서 흡광도를 측정하였다(Initial data). 30℃에서 계속 반응시켜 2분 경과 후 흡광도를 측정함으로써(Final data) 생성된 p-nitrophenol의 양을 측정하였다. 2분간의 흡광도 변화를 이용하여 다음과 같이 ALP 농도를 계산하였다.

$$ALP(U/L) = \frac{(Final\ data - Initial\ data)/2 \times total\ volume \times 1000}{18.45 \times sample\ volume \times lightpath}$$

$$= (Final\ data - Initial\ data) \times 1382$$

96well 배양 접시의 각 well에 bovine serum albumin(BSA) standard 0, 125, 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000㎍/㎖와 각 군별 세포액 5㎕씩을 넣었다. Coomassie blue 250㎕씩을 각 well에 넣고 즉시 ELISA reader를 이용하여 570㎚에서 흡광도를 읽었다. BSA standard의 흡광도를 이용하여 단백질 농도와 흡광도 간 관계식을 작성하고 이를 이용하여 각 군별 세포액의 단백질 농도를 계산하였다. ALP 농도를 단백질 농도로 나누어 ALP 활성도를 계산하였다.

5. Northern blot

직경 35㎜ 배양 접시에 MC3T3-E1 세포를 분주하고 대조군과 실험군으로 구분하여 동일조건 하에서 배양하였다. 실험군의 saf-M-W 농도는 세포독성 실험에서 독성이 나타나지 않으면서 가장 고농도인 10㎍/㎖로 하였다. 배양 시 10mM β-glycerophosphate와 50㎍/㎖ L-ascorbic acid를 첨가하였으며 2-3일 간격으로 배지를 교환하였다. 20일 후 TRIzol용액을 이용하여 RNA를 분리하였다.

분리한 RNA 20㎍을 formaldehyde가 함유된 1% agarose gel 상에서 전기영동하고 나일론 막에 전이시킨 후 자외선을 조사하여 RNA를 고정하였다. RNA가 부착된 막을 tube에 넣고 hybridization buffer(0.1㎎/㎖의 salmon sperm DNA가 함유된 50% formamide/5×Denhardt's 용액/5×SSC/0.5% SDS 용액)를 가하고 42℃가 유지되는 hybrid minihybridization oven에서 30분간 prehybrid를 실시하였다. 동위원소로 표지된 ALP, BSP 유전자 표식자를 첨가하여 42℃에서 15시간 동안 hybridization을 실시하였다. RNA 표식자는 아래와 같은 cDNA를 이용하여 [^{32}P]dCTP로 표지하였으며 random primed DNA labeling kit를 이용하여 합성하였다(2.4kbp의 rat ALP cDNA insert, 1.165kbp의 rat BSP cDNA insert). 나일론 막을 세척액으로 세척하고 -70℃에서 필름에 감광시킨 후 현상하였다. 전기영동한 mRNA의 농도는 GAPDH를 기준으로 분석하였다.

6. 석회화 결절 형성

직경 100㎜ 배양 접시에 MC3T3-E1 세포를 분주하고 대조군과 실험군으로 구분하여 동일조건 하에서 배양하였다. 실험군의 saf-M-W 농도는 세포독성 실험에서 독성이 나타나지 않으면서 가장 고농도인 10㎍/㎖로 하였다. 배양 시 10mM β-glycerophosphate와 50㎍/㎖ L-ascorbic acid를 첨가하였으며 2-3일 간격으로 배지를 교환하였다. 21일 후 von Kossa 염색하여 석회화 결절을 확인하였다. 각 배양 접시의 배양액을 모두 제거하고 10% neutral formaldehyde 용액으로 고정하였다. 2.5% silver nitrate 용액으로 30분간 처리한 후 세척하였다. 세포를 다시 sodium carbonate formaldehyde 용액으로 2-3분간 처리하고 세척한 후 염색된 석회화 결절을 관찰하였다. 또한 위상차 현미경을 이용하여 형성된 석회화 결절을 관찰하였다.

7. 통계처리

각 군 간 통계학적 유의성은 Kruskal-Wallis test와 Mann-Whitney test로 검정하였다.

Ⅲ. 연구 결과

1. 세포독성

1) 치주인대 섬유아세포

1일째에 대조군의 흡광도는 1.857±0.086, saf-M-W 농도 1, 5, 10, 20㎍/㎖ 군의 흡광도는 각각 1.813±0.128, 1.827±0.068, 1.749±0.068, 1.609±0.080이었다. 3일째에는 대조군의 흡광도는 2.228±0.212, saf-M-W 농도 1, 5, 10, 20㎍/㎖ 군의 흡광도는 각각 2.150±0.106, 2.131±0.064, 2.069±0.032, 1.860±0.053이었다. 1일, 3일째 모두 saf-M-W 농도 증가에 따라 대조군에 비해 그 흡광도가 약간 감소하는 경향을 보였으며 20㎍/㎖ 군에서 대조군에 비해 통계학적으로 유의한 세포독성이 나타났다(Table 1, Figure 2).

Table 1. Effect of saf-M-W on proliferation of hPDLF

saf-M-W conc.(㎍/㎖)		control(0)	1	5	10	20
absorbance	1 day	1.857±0.086	1.813±0.128	1.827±0.068	1.749±0.068	1.609±0.080*
(mean±SD)	3 days	2.228±0.212	2.150±0.106	2.131±0.064	2.069±0.032	1.860±0.053*

* Statistically significant difference compared with the control group($p<0.05$)

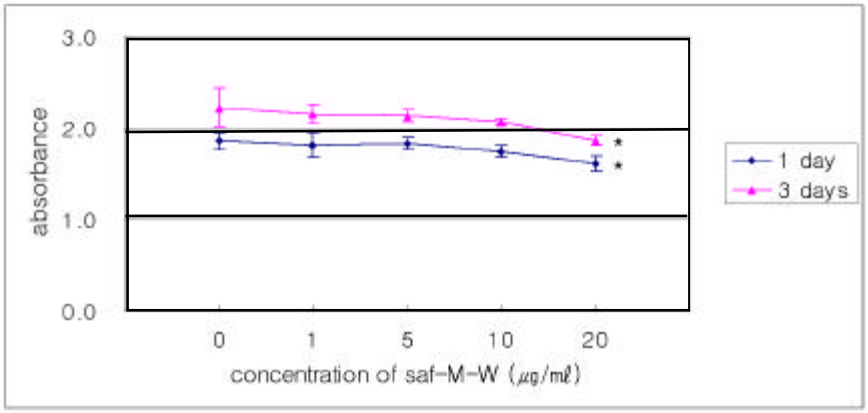

Figure 2. Effect of saf-M-W on proliferation of hPDLF

* Statistically significant difference compared with the control group($p<0.05$)

2) MC3T3-E1 세포

1일째에 대조군과 saf-M-W 농도 1, 5, 10, 20㎍/㎖ 군의 흡광도는 각각 2.557±0.078, 2.680±0.060, 2.697±0.143, 2.540±0.084, 2.273±0.126으로 농도 1, 5㎍/㎖ 군에서는 대조군에 비해 약간 증가하였으며 농도 20㎍/㎖ 군에서 대조군에 비해 통계학적으로 유의한 세포독성을 보였다. 3일째에 대조군과 saf-M-W 농도 1, 5, 10, 20㎍/㎖ 군의 흡광도는 각각 2.828±0.546, 2.996±0.303, 2.915±0.285, 2.905±0.197, 2.755±0.265로 농도 1, 5, 10㎍/㎖ 군에서 대조군에 비해 약간의 증가를 보였으나 통계학적으로 유의한 차이는 없었다(Table 2, Figure 3).

Table 2. Effect of saf-M-W on proliferation of MC3T3-E1 cell

saf-M-W conc.(㎍/㎖)		control(0)	1	5	10	20
absorbance	1 day	2.557±0.078	2.680±0.060	2.697±0.143	2.540±0.084	2.273±0.126*
(mean±SD)	3 days	2.828±0.546	2.996±0.303	2.915±0.285	2.905±0.197	2.755±0.265

* Statistically significant difference compared with the control group($p<0.05$)

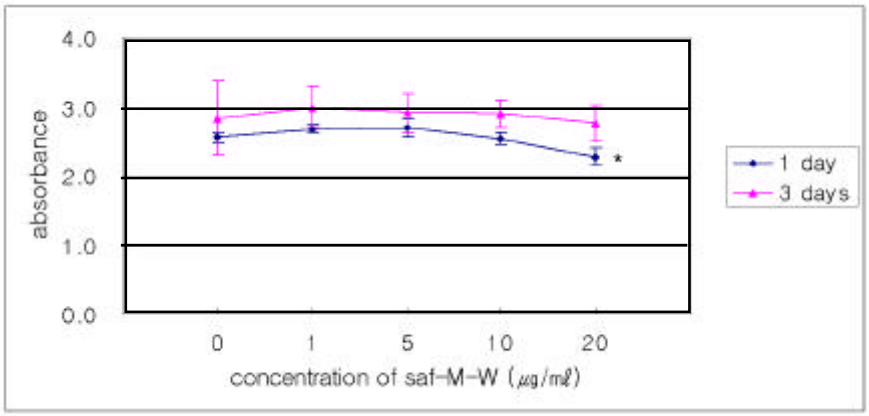

Figure 3. Effect of saf-M-W on proliferation of MC3T3-E1 cell

* Statistically significant difference compared with the control group($p<0.05$)

2. ALP 활성도

치주인대 섬유아세포의 ALP **활성도 측정 결과 대조군과** saf-M-W **농도** 1, 5, 10㎍/㎖ **군의** ALP **활성도는 각각** 0.131±0.019, 0.116±0.011, 0.128±0.014, 0.124±0.013U/㎎**이었다. 농도 변화에 따른** ALP **활성도 증가나 감소 경향은 없었으며 각 군간 통계학적으로 유의한 차이도 보이지 않았다**(Table 3, Figure 4).

Table 3. Effect of saf-M-W on ALP activity of hPDLF

saf-M-W conc.(㎍/㎖)	control(0)	1	5	10
ALP(U/㎎)	0.131±0.019	0.116±0.011	0.128±0.014	0.124±0.013

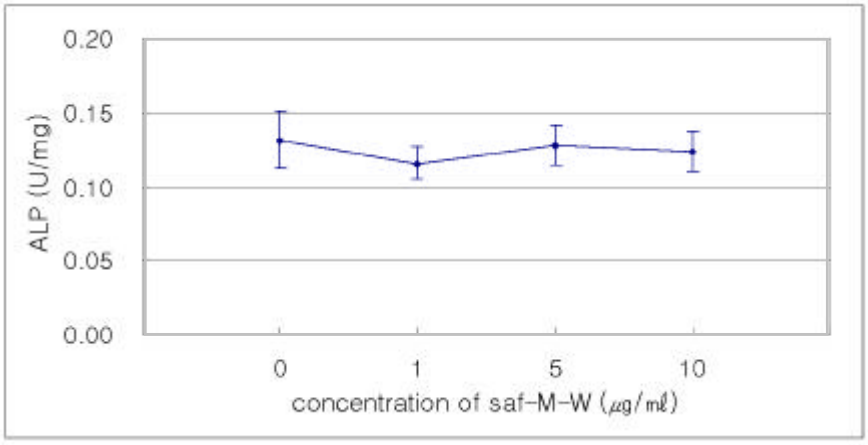

Figure 4. Effect of saf-M-W on ALP activity of hPDLF

3. ALP, BSP mRNA 발현

Northern blot 분석을 통해 MC3T3-E1 세포에서 대조군과 saf-M-W 농도 10㎍/㎖ 군의 ALP 및 BSP mRNA 발현 정도를 분석하였다. 대조군에서는 ALP mRNA가 약하게 발현되었고 BSP mRNA는 거의 발현되지 않았으며 10㎍/㎖ saf-M-W 처리군에서는 ALP와 BSP mRNA가 모두 뚜렷하게 발현되었다(Figure 5). 젤 분석 프로그램을 이용하여 GAPDH mRNA에 대한 상대적인 밀도를 분석한 결과 대조군과 saf-M-W 처리군의 ALP mRNA 양은 각각 24.9, 72.0%, BSP mRNA 양은 각각 4.7, 92.1%였다(Table 4).

ALP	
BSP	
GAPDH	
GP/AA	+ +
saf-M-W(10㎍/㎖)	- +

Figure 5. Effect of saf-M-W on ALP and BSP mRNA expression of MC3T3-E1 cell
GP;β-glycerophosphate, AA;L-ascorbic acid

Table 4. Relative densitometric analysis of Northern blot

saf-M-W conc.(㎍/㎖)	control(0)	10
ALP/GAPDH	24.9%	72.0%
BSP/GAPDH	4.7%	92.1%

4. MC3T3-E1 세포의 석회화 결절 형성

Von Kossa 염색하여 대조군과 10㎍/㎖ saf-M-W 처리군의 석회화 결절 형성 정도를 관찰하였다. 대조군에서는 석회화 결절이 형성되지 않았으며 10㎍/㎖ saf-M-W 처리군에서는 다량의 석회화 결절이 형성되었다(Figure 6).

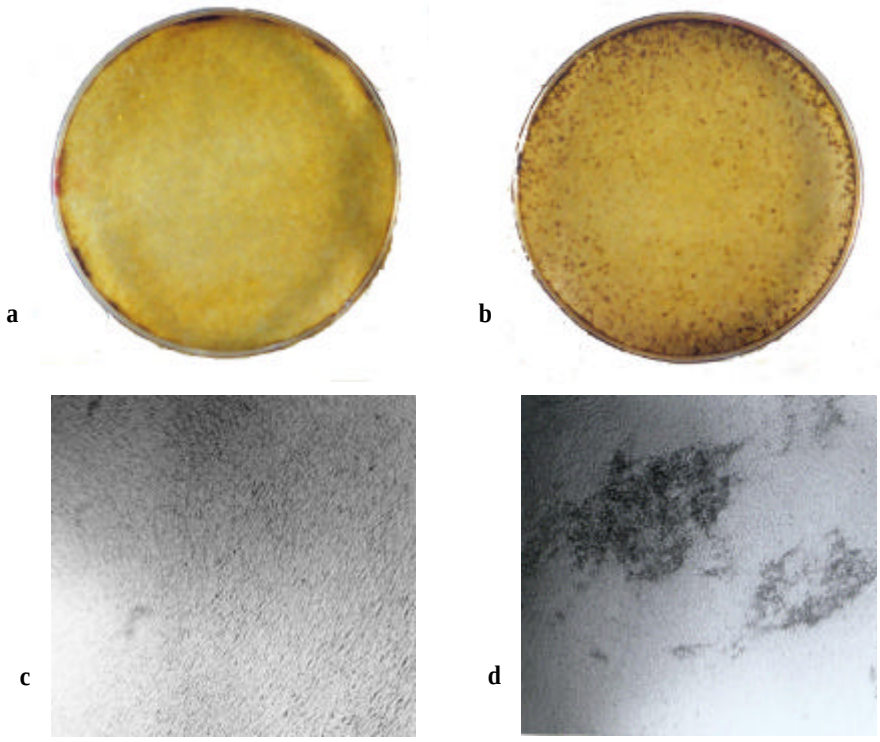

Figure 6. Effect of saf-M-W on mineralized nodule formation in MC3T3-E1 cell. a, b: von Kossa staining(a: control, b: saf-M-W 10㎍/㎖ treated group), c, d: phase contrast microscopic view(c: control, d: saf-M-W 10㎍/㎖ treated group)

Ⅳ. 총괄 및 고찰

이 연구에서는 홍화씨 분획 추출물 saf-M-W가 치주인대 섬유아세포와 조골세포 전구세포주인 MC3T3-E1 세포의 성장 및 분화에 미치는 영향을 알아보았다. 이를 위해 MTT test로 두 가지 세포에 대한 세포독성을 측정하였으며 치주인대 섬유아세포에서 발색 반응을 이용한 ALP 활성도 검사를 시행하였다. 또한 MC3T3-E1 세포에서는 Northern blot 분석을 통해 ALP 및 BSP mRNA 발현을, von Kossa 염색과 위상차 현미경을 이용하여 석회화 결절 형성을 관찰하였다.

MTT test는 세포의 미토콘드리아 효소에 의해 MTT 용액으로부터 생성되는 formazan 결정의 양을 측정함으로써 살아있는 세포의 수를 간접적으로 측정하는 것으로 세포독성을 측정하는 데 있어 간단하면서도 정확한 방법이다[11].

이 실험에서는 1, 5, 10, 20㎍/㎖ 네 가지 농도의 saf-M-W로 치주인대 섬유아세포와 MC3T3-E1 세포에 대한 세포독성 검사를 시행하였다. 그 중 세포독성을 나타내지 않는 농도 범위에서 치주인대 섬유아세포의 ALP 활성도를 측정하였으며 마찬가지로 세포독성을 나타내지 않는 한도 내에서 가장 높은 농도인 10㎍/㎖에 대해 MC3T3-E1 세포의 ALP 및 BSP mRNA 발현과 석회화 결절 형성을 관찰하였다.

MTT test 결과 치주인대 섬유아세포에서는 saf-M-W 농도 증가에 따라 흡광도 감소를 보였으며 20㎍/㎖에서 통계학적으로 유의한 세포독성을 나타내었다. MC3T3-E1 세포에서는 저농도에서 약간의 흡광도 증가를 보였으나 통계학적으로 유의한 차이는 없었고 20㎍/㎖에서 흡광도 감소를 보였으며 특히 1일째에는 대조군과 통계학적으로 유의한 차이를 보였다. 1997년 두 등[29], 1998년 이 등[34]은 홍화씨 추출물 농도 1000㎍/㎖에서 치주인대 섬유아세포의 활성도가 대조군에 비해 증가함을 보고하였고, 1998년 윤 등[33]은 역시 홍화씨 추출물 농도 1000㎍/㎖에서 대조군에 비해 쥐의 두개골 세포의 활성도가 증가함을 보고하였다. 이는 이 실험에서 농도 20㎍/㎖군의 흡광도가 대조군에 비해 감소한 것과는 다소 다른 결과로서 이러한 차이는 홍화씨 추출 방법의 차이에서 기인한 것으로 생각된다. 기존의 홍

화씨 추출 방법은 홍화씨 분말을 증류수와 함께 가열한 후 여과하여 얻거나 에탄올 단일 용매 혹은 물과 부탄올 두 가지 용매를 이용하여 간단하게 추출하여 얻은 것이었던 반면 이 실험에서 사용한 방법은 여러 가지 용매를 이용하여 단계적으로 추출하여 얻은 것으로 홍화씨 분획 추출물 saf-M-W에는 기존의 방법으로 얻은 추출물에 비해 특정 성분이 훨씬 고농도로 존재하게 되기 때문이다.

치주인대 섬유아세포는 조골세포나 치은 섬유아세포와 유사한 표현형으로 분화할 수 있는 잠재력을 지닌 세포이다[13]. 치은 섬유아세포에 비해 단백질, 교원질 합성능이 뛰어나고 치은 섬유아세포에서는 발현되지 않는 ALP를 분비하는 등 조골세포 유사 특성을 보인다[19]. 여기에서는 치주인대 섬유아세포가 조골모유사세포로 분화하는 데에 saf-M-W가 어떤 영향을 미치는지 알기 위해 ALP 활성도를 측정하였다.

ALP 활성도 측정의 원리는 p-nitrophenyl phosphate(pNPP)가 p-nitrophenol과 phosphate로 가수분해되는 반응을 ALP가 촉매하는 것을 이용하여 흡광도 측정을 통해 p-nitrophenol의 양을 측정함으로써 ALP의 농도를 간접적으로 측정하는 것이다. 이 때 세포수의 차이가 ALP 활성도에 영향을 미칠 수 있으므로 총 단백질량을 측정하여 그 값으로 ALP 농도를 나누어줌으로써 단위 세포수당 ALP 활성도를 산출할 수 있었다.

치주인대 섬유아세포의 ALP 활성도 측정 결과 대조군에서 ALP 활성도를 보여 치주인대 섬유아세포가 조골모유사세포로 분화함을 확인할 수 있었으나 농도 변화에 따른 증가나 감소 경향은 보이지 않았으며 어떤 군 간에도 통계학적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다. 1997년 류 등[30], 1998년 강 등[26], 1998년 이 등[34], 1998년 윤 등[33]은 치주인대 섬유아세포에 홍화씨 추출물 처리 시 대조군에 비해 증가된 ALP 활성도를 보여주었는데 이 연구에서는 이전의 연구와는 차이를 나타내었다. 이 또한 홍화씨 추출 방법상의 차이로 인해 이 실험에서 사용한 saf-M-W 분획에는 치주인대 섬유아세포의 분화를 특별히 촉진하는 성분은 결여되어 있는 것으로 생각된다.

MC3T3-E1 세포는 쥐의 두개골에서 분리된 조골세포 전구세포주로 명확한 증식, 분화기를 거쳐 조골세포에 이르므로 조골세포의 발생을 연구하기 위한 모형으

로 사용되어지고 있다[14]. 이 실험에서는 MC3T3-E1 세포의 분화도를 보기 위해 조골세포로의 분화 표시자인 ALP와 BSP의 mRNA 발현 정도를 Northern blot을 통해 분석하고 석회화 결절 형성을 관찰하였다. β-glycerophosphate와 L-ascorbic acid를 첨가하여 배양할 때 MC3T3-E1 세포는 그 분화 과정 중에 골기질 형성에 필요한 몇 가지 단백질을 순차적으로 발현한다. 가장 먼저 1형 교원질, secreted protein, acidic and rich in cysteine(SPARC), osteogenic protein mRNA가 발현되고, 다음으로 조골세포 표시자인 BSP, ALP mRNA가 발현되며 마지막으로 osteocalcin mRNA가 발현된다[15].

Northern blot 분석을 통해서는 진핵세포 유전자에서 전사된 RNA의 크기와 양을 동시에 측정할 수 있으며 다른 방법으로는 다수의 RNA로부터 이같은 정보를 동시에 얻어낼 수 없다[16]. Northern blot 분석을 통해 ALP와 BSP mRNA 발현을 관찰한 결과 대조군에서는 BSP mRNA가 거의 발현되지 않았고, ALP mRNA가 약하게 발현되었으며 실험군에서는 ALP와 BSP mRNA가 모두 뚜렷하게 발현되었다.

석회화 결절 형성에 있어서도 실험군은 다량의 석회화 결절 형성을 보인 반면 대조군에서는 석회화 결절이 전혀 형성되지 않았다. 이는 MG63 세포에 홍화씨 추출물 처리 시 대조군에 비해 증가된 ALP 활성도를 보인 1997년 류 등[30], 태생기 쥐의 두개골에서 분리한 조골모유사세포에서 홍화씨 추출물 처리군의 ALP 활성도와 석회화 결절 형성이 대조군에 비해 증가함을 보고한 1998년 강 등[26], 1998년 이 등[34]의 연구 결과와 유사한 것이다. 또한 2000년 김 등[27]은 백서 두개골 결손부 모형을 이용한 생체 실험에서 saf-M-W 분획을 적용한 경우 대조군에 비해 치유 초기 골밀도와 신생골 면적이 증가하며 그 이후에는 신생골 길이와 면적이 증가함을 이미 보인 바 있다. MC3T3-E1 세포에 대한 이상의 결과에서 볼 때 saf-M-W는 조골세포의 분화를 촉진하는 제제로 생각된다.

이 실험의 또 하나의 의의는 조골세포의 분화 촉진에 가장 효과적인 성분이 농축된 특정 홍화씨 분획 추출물의 존재를 입증한 데 있다. 앞서 밝혔듯이 기존의 방법은 홍화씨의 전체 성분을 한꺼번에 추출하는 것이었다. 반면 이 실험에서 사용한 홍화씨 분획 추출물은 n-hexane, chloroform, methanol, 70% ethanol, 물 등

여러 가지 용매로 다단계 추출하여 각각의 용매에 녹는 분획들로 나눈 중 methanol과 물에 의해 추출된 saf-M-W 분획이다. 이 실험에 사용된 saf-M-W 농도는 10㎍/㎖로 이전의 연구에서 사용된 농도의 1/25-1/100에 해당하는 저농도임에도 불구하고 비슷한 조골세포 분화 촉진 효과를 보였다. 이는 saf-M-W 분획에 조골세포 분화를 촉진하는 특정 성분이 고농도로 농축되어 있음을 의미하는 것이라 할 수 있다.

이상의 결과는 홍화씨 분획 추출물 saf-M-W가 10㎍/㎖ 이하의 농도에서 치주인대 섬유아세포와 MC3T3-E1 세포에 대해 독성을 나타내지 않으며 MC3T3-E1 세포의 분화 및 골형성을 효과적으로 촉진함을 시사한다. 앞으로 조골세포의 분화를 촉진하는 saf-M-W의 특정 성분을 밝히고 그 작용 기전을 규명하기 위한 연구가 필요할 것이며 그 안전성과 효용성 검증 및 임상 전 모형, 임상 모형을 채택한 생체 실험 등 일련의 연구를 통해 홍화씨 분획 추출물 saf-M-W의 골조직 재생 효과를 입증해야 할 것이다.

Ⅴ. 결론

이 연구에서는 홍화씨 분획 추출물 saf-M-W가 치주인대 섬유아세포와 조골세포 전구세포주인 MC3T3-E1 세포의 성장 및 분화에 미치는 영향을 알아보았다. MTT test로 두 가지 세포에 대한 독성을 측정하였으며 치주인대 섬유아세포에서 발색 반응을 이용한 ALP 활성도 검사를 시행하였다. 또한 MC3T3-E1 세포에서는 Northern blot 분석을 통해 ALP 및 BSP mRNA 발현을, von Kossa 염색과 위상차 현미경으로 석회화 결절 형성을 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. saf-M-W 농도 10㎍/㎖ 이하에서는 치주인대 섬유아세포와 MC3T3-E1 세포 모두에서 세포독성은 나타나지 않았다.

2. 치주인대 섬유아세포에서 saf-M-W 농도 변화에 따른 ALP 활성도 차이는 없었다.

3. MC3T3-E1 세포에서 10㎍/㎖ 농도의 saf-M-W 처리군의 ALP 및 BSP mRNA 발현이 대조군에 비해 현저히 증가하였다.

4. MC3T3-E1 세포에서 대조군에서는 석회화 결절이 형성되지 않은 반면 10㎍/㎖ 농도의 saf-M-W 처리군에서는 다량의 석회화 결절이 형성되었다.

이상의 결과는 홍화씨 분획 추출물 saf-M-W가 10㎍/㎖ 이하의 농도에서 치주인대 섬유아세포와 MC3T3-E1 세포에 대해 독성을 나타내지 않으며 MC3T3-E1 세포의 분화 및 골형성을 효과적으로 촉진함을 시사한다.

참고문헌

1. Clark RAF, Henson PM. The molecular and cellular biology of wound repair. New York: Plenum Press, 1988.
2. Hislop WS, Finlay PM, Moos KP. A preliminary study into the uses of anorganic bone in oral and maxillofacial surgery. Br J Oral Maxillofac Surg, 31: 149-153, 1993.
3. 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, 110: 2195-2207, 1990.
4. Kim CK, Choi EJ, Cho KS, Chai JK, Wikesjö UME. Periodontal repair in intrabony defects treated with a calcium carbonate implant and guided tissue regeneration. J Periodontol, 67: 1301-1306, 1996.
5. Kim CK, Kim HY, Choi EJ, Chai JK, Cho KS, Moon IS, Choi SH, Sottosanti JS, Wikesjö UME. Effect of calcium sulfate implant with calcium sulfate barrier on periodontal healing in 3-wall intrabony defects in dogs. J Periodontol, 69: 982-988, 1998.
6. Lynch SE, Wiliams 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, 16: 545-548, 1989.
7. Melcher AH. On the repair potential of periodontal tissues. J Periodontol, 53: 509-512, 1976.
8. Misch CE, Dietsh F. Bone-grafting materials in implant dentistry. Implant Dent, 2: 158-167, 1993.
9. Mizutani H, Urist MR. The nature of bone morphogenetic protein fractions derived from bovine bone. Clin Orthop, 171: 213-223, 1982.

10. Moon IS, Chai JK, Cho KS, Wikesjö UME, Kim CK. Effects of polyglactin mesh combined with resorbable calcium carbonate or replamineform hydroxyapatite on periodontal repair in dogs. J Clin Periodontol, 23: 945-951, 1996.
11. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods, 65: 55-63, 1983.
12. Nyman S, Gottlow J, Karring T, Lindhe J. The regenerative potential of the periodontal ligament. An experimental study in the monkey. J Clin Periodontol, 9: 257-265, 1982.
13. Piche JE, Carnes DL, Graves DT. Initial characterization of cells derived from human periodontia. J Dent Res, 68: 761-767, 1989.
14. Quarles LD, Yohay DA, Lever LW, Caton R, Wenstrup RJ. Distinct proliferative and differentiated stages of murine MC3T3-E1 cells in culture: An in vitro model of osteoblast development. J Bone Mineral Res, 7: 683-692, 1992.
15. Roth JA, Kim BG, Lin WL, Cho MI. Melatonin promotes osteoblast differentiation and bone formation. J Bio Chem, 274: 22041-22047, 1999.
16. Sambrook J, Russell DW. Molecular cloning. A laboratory manual. 3rd edition. Cold spring harbor laboratory press, 1: 7.21-7.26, 1993.
17. Schwartz Z, Mellonig MT, Carnes DL Jr, De La Fontaine J, Cocharan DL, Dean DD, Boyan BD. Ability of commercial demineralized freeze-dried bone allograft to induce new bone formation. J Periodontol, 67: 918-926, 1996.
18. 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, 66: 131-138, 1995.

19. Somerman MJ, Archer SY, Imm GR, Foster RA. A comparative study of human periodontal ligament cells and gingival fibroblast in vitro. J Dent Res, 67: 66-70, 1988.
20. Trombelli L, Kim CK, Zimmerman GJ, Wikesjö UME. Retrospective analysis of factors related to clinical outcome of guided tissue regeneration procedures in intrabony defects. J Clin Periodontol, 24: 366-371, 1997.
21. Urist MR. Bone formation by autoinduction. Science, 150: 893-899, 1965.
22. 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, 162: 219-232, 1982.
23. 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, 87: 2220-2224, 1990.
24. 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, 26: 392-400, 1999.
25. Wozney JM. The potential role of bone morphogenetic proteins in periodontal reconstruction. J Periodontol, 66: 506-510, 1995.
26. **강정구, 유형근, 신형식. 홍화씨 추출물이 치주인대세포와 조골유사세포의 골광물화 작용에 미치는 효과. 대한치주과학회지**, 28: 475-489, 1998.
27. **김성태, 전길자, 임소형, 조규성, 김종관, 최성호. 백서 두개골 결손부에서 홍화씨 추출물의 골조직 재생 유도 효과. 대한치주과학회지**, 30: 835-850, 2000.
28. **김종관, 채중규, 조규성, 문익상, 최성호.** Zea Mays L. **불검화 정량 추출물의 치주염 치료효과에 대한 임상적 연구. 대한치주과학회지**, 21: 225-234, 1991.
29. **두진수, 강정구, 유형근, 신형식. 생약 제제가 세포활성도에 미치는 효과. 대한치주과학회지**, 27: 459-468, 1997.

30. 류인철, 이용무, 구영, 배기환, 정종평. 홍화추출물이 치주인대세포, 조골세포 활성도에 미치는 영향. 대한치주과학회지, 27: 867-882, 1997.
31. 송기범, 공영환, 유형근, 신형식. 황련이 Lipopolysaccharide를 처리한 치주인대세포의 세포활성 및 IL-6 생산에 미치는 영향. 대한치주과학회지, 26: 641-653, 1996.
32. 유형근. 황련과 Centella asiatica 추출물이 치은 섬유모세포에 미치는 영향. 대한치주과학회지, 26: 681-688, 1996.
33. 윤동환, 이승철, 김명은, 김은철, 유형근, 김윤철, 신형식. 홍화씨 추출물이 조골모유사세포활성 및 골재생에 미치는 영향. 대한치주과학회지, 28: 769-784, 1998.
34. 이광수, 홍성우, 유경태, 유형근, 김윤철, 신형식. 홍화씨 성분 분리 추출물이 치주인대세포와 조골모유사세포의 광물화에 미치는 영향. 대한치주과학회지, 28: 745-754, 1998.
35. 이용무, 구영, 배기환, 정종평. 후박 및 대조 추출 혼합물이 골조직 재생에 미치는 영향. 대한치주과학회지, 27: 165-178, 1997.
36. 이인우, 최진규. 홍화씨 건강법. 태일 출판사, 45-70, 1998.
37. 최상묵, 한수부, 황광세. Zea Mays L.의 불검화 정량 추출물(DENTADOL®)이 외과적 치주치료 후의 치유에 미치는 효과에 관한 임상적 연구. 대한치주과학회지, 19: 63-69, 1989.
38. 한국생약교수협의회. 본초학. 사단법인 약사회, 553-555, 1995.

ABSTRACT

The Effect of Safflower Seed Fraction Extract on Periodontal Ligament Fibroblast and MC3T3-E1 Cell *in vitro*

Ji Sun Huh, D.D.S.

Department of Dental Science, Graduate School, Yonsei University

(Directed by Associate Prof. Seong Ho Choi, D.D.S., M.S.D., Ph.D.)

Recently, use of natural medicine is getting more attention, and some of them are believed to be effective in the treatment of periodontitis.

Among them, the seeds of safflower(*Carthamus tinctorius L.*) have been proven to be effective through its use in bone diseases such as fracture and osteoporosis. During the last few years, studies using the seeds of safflower grown in Korea have been active, and it has been reported that safflower seed extract increase the proliferation and the alkaline phosphatase(ALP) activity of human periodontal ligament fibroblast(hPDLF), osteoblast, and that they promote the mineralization process. In animal studies, when safflower seed extract were administered orally new bone formation was promoted.

Recently, in an effort to find out the most effective osteogenic components, among many components of the safflower seed, various safflower seed fraction extracts were obtained by multistep extraction of the safflower components using various solvents. Among these, saf-M-W fraction extracted by methanol and water was most effective in increasing osteogenic potential of osteoblasts.

In this study, the effect of safflower seed fraction extract, saf-M-W, on the

growth and differentiation of hPDLF and MC3T3-E1 cell was investigated. The toxicity of saf-M-W on both cells was measured using MTT test, and ALP activity was measured using the colorimetric assay of hPDLF. In addition, in MC3T3-E1 cells, the expression of ALP, bone sialoprotein(BSP) mRNA was observed using Northern blot, and the mineralized nodule formation was observed using von Kossa stain and phase-contrast microscope.

1. In concentrations below 10㎍/㎖, saf-M-W didn't show any toxicity on hPDLF and MC3T3-E1 cell.

2. The change in saf-M-W concentration had no effect on the ALP activity of hPDLF.

3. In MC3T3-E1 cells, mRNA expressions of ALP and BSP were greater in the experimental group treated with 10㎍/㎖ concentration of saf-M-W compared with the control group.

4. In MC3T3-E1 cells, abundance of mineralized nodules were formed in the experimental group treated with 10㎍/㎖ concentration of saf-M-W, while no mineralized nodule was formed in the control group.

These results suggest that safflower seed fraction extract, saf-M-W, didn't show any toxicity on hPDLF and MC3T3-E1 cell at concentrations below 10㎍/㎖ and effectively enhanced the differentiation and osteogenic potential of MC3T3-E1 cell.

---

key words: safflower seed fraction extract, periodontal ligement fibroblast, MC3T3-E1