

황련이 Lipopolysaccharide를 처리한 치주인대세포의 세포활성 및 IL-6 생산에 미치는 영향

송기범 · 공영환 · 유형근 · 신형식

원광대학교 치과대학 치주과학교실

I. 서 론

치주염은 백혈구의 침윤, 결합조직의 소실, 치조골의 흡수, 그리고 치주낭의 형성 등을 특징으로 하는 만성 염증성 질환이다¹⁾. 이러한 치주염은 그 원인이 치근면에 부착된 치주병인균의 독소에 의해 유발되며, 이들 병인균의 조직내 침투에 의해 더욱 깊게 진행된다. 독소 및 병인균의 염증유발과 면역반응의 진행으로 여러 염증물질과 면역반응물질이 조직내에 유출되면서 치주조직의 파괴가 급, 만성으로 진행된다²⁾. 병인균의 대표적인 독소중 하나가 lipopolysaccharide(LPS)로서 이는 그람 음성 세균의 막구조를 형성하며 다당류, 인지질 및 소량의 단백질로 구성되어 있고³⁾ 세균의 급속한 성장시기나 세균의 외막이 손상된 경우에 유리되어⁴⁾ 숙주조직을 파괴시킬 수 있는 많은 생물학적 활성을 증대한다. LPS는 염증성 골 흡수 요소, prostaglandin E₂ 및 교원질분해 효소⁵⁾의 생산을 증가시키며, 또한 IL-1 β ⁶⁾와 TNF- α ⁷⁾의 생산을 증가시킨다. 그리고 최근에는 골모세포 유사세포⁸⁾와 치은 섬유모세포^{9~11)}에 의한 IL-1, IL-6 등의 cytokines의 생산을 촉진한다고 알려졌다.

다양한 염증세포 및 조직 구성세포들에서 생산되는 가용성 매개물을 총칭하여 cytokines라고 한다. 이러한 cytokines은 치주 질환과 같은 감염성 질환의 병인에 중요한 역할을 수행하는 것으로 알려졌다¹²⁾, 면역반응과 염증반응에 작용한다. 몇몇 cytokines은 치주염을 가진 환자의 치은조직과 치은열구액내에서 발견된다¹³⁾. Cytokines은 한때 한 가지 독특한 기능만을 수행하는 것으로 알려졌다¹⁴⁾ 그러나 최근의 연구에서 대부분의 cytokines이 다기능성이 밝혀졌으며, 여러 가지 종류가 동일한 target cells에 유사한 효과를 가지고 있음이 밝혀졌다¹⁴⁾. 치주염에 관계되는 cytokines에는 IL-1 α , IL-1 β , TNF- α , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IFN- γ 등이 있다¹³⁾. 이 중 IL-6는 초기에는 B-cell stimulatory factor 2, hepatocyte stimulatory factor, 또는 interferon-2 등으로 불렸으며¹⁵⁾, 급성시기의 면역반응을 조절하며 조절계의 기능에 관여한다¹⁶⁾. IL-6의 중요한 기능은 항체의 유도도 알려져왔으며¹⁷⁾, 염증조직의 파괴를 증대한다고 알려진 IL-1 및 TNF- α 와 같은 cytokine들과 중복되는 생물학적 효과를 갖는다. 또한 IL-6는 골흡수와 관련이 있는 것으로 보고되고 있다. 국소적 골 흡수를 보이는 류마티오

드 관절염환자의 관절낭액내에 높은 농도의 IL-6가 관찰되었으며¹⁸⁾, 부갑상선 호르몬, IL-1 β , TNF- α , 그리고 IFN- γ 와 같은 골흡수 물질에 의해 골모세포와 골모세포 유사세포에서 유도되었다^{8, 19-21)}. IL-6가 치주조직에서 생산되는가는 잘 알려져 있지 않다. 최근에 Kamagata 등²²⁾은 치은염이나 치주염에 이환된 환자의 치은조직 배양 상층액에 건강한 사람의 치은조직보다 높은 농도의 IL-6가 함유되어 있다는 사실을 보고하였다. 또한 유사한 결과에 대한 보고가 Bartold와 Haynes⁹⁾의 보고에서도 나타났는데 그들은 염증 치은조직에서 건강한 치은조직보다 더 강한 IL-6 염색을 보였다고 하였다. 그러나 치주인대 세포에서 IL-6가 생산되는지에 대한 문제는 아직 논란의 대상이 되고 있다.

만성 염증성 질환인 치주질환을 예방, 치료하는데 있어서는 치주병인균의 성장억제, 살균 및 이들 세균에 의해 기시되는 염증 및 면역반응의 매개물질 생산 억제 및 치주조직 세포 활성화에 따른 조직 재생물질의 생산 강화가 그 초점이 된다. 치주병인균의 성장억제 및 살균작용은 항생제가 주로 그 역할을 담당하고 있으며 염증 및 면역반응 매개물질 생산억제는 많은 비스테로이드성 항염제의 사용이 이를 담당하고 있다. 그러나 이러한 비스테로이드성 항염제는 주로 세포가 생산하는 염증매개 물질인 prostaglandin E₂의 생산차단에 그 기본을 두고 있다. 그러나 최근의 연구에서 이 prostaglandin E₂의 생산이 면역반응 물질인 IL-1에 의해 자극되는 것이 알려졌다²³⁻²⁵⁾.

따라서 prostaglandin E₂ 전단계에 생산되는 cytokines에 의한 치주조직에의 영향은 피할 수가 없으며 새로운 형태의 항염제가 필요하다. 황련(黃蓮, rhizoma coptidis)은 한의학에서 창상치유와 염증의 제거 및 부종감소, 지혈작용을 위해서 많이 쓰이는 약제로써 미나리아재비과에 속하는 다년생 초본이다. 주성분은

isoquinoline계 alkaloid인 berberine으로 그람 양성 및 음성균과 곰팡이 등에 대한 광범위한 항균작용을 가지며 항염증작용, 지혈작용, 혈압강하작용, 항암작용 등이 있는 것으로 알려져 있어서 피부염증, 화농증, 구내염, 비출혈 등에 사용된다²⁶⁻²⁸⁾.

본 연구에서는 한의학에서 사용되는 항염제인 황련이 치주인대 세포의 활성화에 어떤 영향을 미치며 염증 및 면역반응에서 분비되는 LPS를 투여한 치주인대 세포에서 골흡수에 관계되는 IL-6가 생산 되는가를 알아보고, 치주인대 세포에 LPS와 황련을 동시에 투여한 후 세포의 활성화와 IL-6의 생산에 대한 영향을 알아보고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험재료

(1) 치주인대 세포의 배양

치주인대세포는 교정치료를 위하여 발거한 소구치나 매복된 제3대구치의 치주인대로부터 얻었다. 간단히 설명하면, 발거한 치아를 HBSS(Hank's balanced salt solution, GIBCO/BRL, USA)로 3회 세척하여 잔존하는 혈액을 제거하였다. 세척한 치아를 100mm 조직배양용 접시에 옮기고 15번 blade를 이용하여 우태아 혈청(GIBCO/BRL, USA) 10%와 항생제(Penicillin G 10,000 units/ml, Steptomycin 10,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 및 Amphotericin B 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, GIBCO/BRL, USA) 1%를 포함한 α -MEM(mimimum essential medium, GIBCO/BRL, USA) 내에서 치근 중간 1/3에 있는 치주인대조직을 분리한 후 이들을 1 mm²으로 세척하여 60mm 조직배양용 접시에 5~6개의 조각을 위치시켰다. 그 후 약 30분간 37°C, 5% CO₂, 습도 100%의 배양기에서 배양접시 바닥에 조직이 고르게 부착되도록 배양시킨 후, 각 배양접시

당 10% 우태아 혈청과 1% 항생제가 첨가된 α -MEM 3 ml씩을 첨가하고, 단일세포층이 형성될 때까지 2-3일 간격으로 배양액을 교환하면서 계대배양을 실시하였다. 치주인대 세포성분중 전형적인 섬유모세포의 형태를 보이는 plate를 선택하여 사용하였으며 본 실험은 5~8회 계대배양된 치주인대세포를 이용하였다.

(2) 실험재료 준비

본 실험에 사용한 lipopolysaccharide는 *Fusobacterium nucleatum* 10953에서 분리한 것으로 세균의 배양은 Schaedler배지를 사용하여 냉동보관중인 균주를 혐기성 배양기 (80% N₂, 10% H₂, 10% CO₂ : COY Lab. Products, Ann Arbor, MI, USA)를 이용하여 37°C에서 통상적으로 36시간 혐기성으로 배양하였다. 배양된 세균은 원침(10,000 xg, 20min, 4°C)하여 멸균된 생리식염수로 3회 세척한 후 증류수로 1회 세척하여 냉동건조하였다. 건조시킨 균체를 Westphal 등²⁹⁾의 방법에 따라 68°C 증류수 1ml에 균체 200mg이 되도록하여 분산시킨 후 동일한 양의 90%, 68°C의 phenol(Merck)과 혼합하여 15분간 교반하면서 반응시켰다. 그후 얼음물에 10°C까지 식힌 후 10,000 xg으로 30분간 원침시킨후 상층 수용액부분을 채취하고 동일량의 증류수를 가하면서 2회 반복하여 수집된 수용액부분을 72시간 동안 투석시킨후 냉동건조하여 내독소를 분리하였다.

황련은 약재 50g에 증류수 1000 ml로 가열 추출한후, 여과하여 rotary evaporator로 농축한 다음 freeze dryer로 동결건조하여 6.2g의 분말을 얻어 사용하였으며 세포실험시에는 증류수에 용해시킨 뒤 직경 0.45 μ m의 membrane filter로 여과 멸균하여 사용하였다. 황련은 원광대학교 한의과 대학 약리학 교실에서 공급해 주셨으며 IL-6 ELISA kit는 미국 Genzyme사에서 구입하였다.

2. 실험방법

(1) 황련이 치주인대세포 활성도에 미치는 효과에 대한 예비실험

5~8회 계대배양한 단일세포층의 치주인대세포를 trypsinization한 다음 혈구계수기로 세포수를 세어 24-well plate의 well당 1×10^4 의 세포를 분주한 후 α -MEM이 함유된 배양액으로 하루 동안 세포배양을 실시하였다. 24시간 경과후 부착되지 않은 세포를 제거하기 위해 α -MEM으로 세 번 세척하고 황련 10⁻¹³ g/ml에서부터 10⁻³g/ml까지의 농도로 각군당 농도차가 10배가 되도록 배양액에 섞어 각 well에 첨가하고 1 및 2 일간 배양하였다. 대조군은 α -MEM에서 배양한 세포로 사용하였다. 각각의 배양기간이 경과된 후 부착되지 않은 세포를 제거하기 위해 배양액을 제거하고, 새 배양액 1ml을 각 well에 첨가하였다. 이어서 24-well plate에 부착되어 있는 세포의 양을 알아보기 위해 생리식염수에 용해한 MTT용액(3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide; Sigma Co., L.O., USA) 200 μ l을 각 well에 첨가한 후 3시간 동안 세포배양을 실시하였다. 세포배양 후 배양액을 제거하고 200 μ l의 DMSO(dimethyl sulfoxide, Sigma Co., USA)를 첨가하여 형성된 formazan 결정을 용해시킨 후 96-well plate상으로 옮겼다.

Plate를 잘 흔든 후 ELISA analyser(Model ETY-96, Toyo instruments Inc., Tokyo, Japan)로 파장 570nm에서 흡광도를 측정하였다. 매 실험마다 세포활성도는 대조군의 백분율로 산출하였고, 각 실험은 3회 반복하여 실시하였다.

$$\text{세포 활성도} = \frac{\text{실험군의 세포활성도}}{\text{대조군의 세포활성도}} \times 100$$

(2) 치주인대세포에 LPS와 황련을 동시에 투여한 경우의 세포활성도

5~8회 계대배양한 단일세포층의 치주인대세포를 trypsinization한 다음 혈구계수기로 세포수를 세어 24-well plate의 well당 1×10^4 의 세포를 분주한 후 α -MEM이 함유된 배양액으로 하루 동안 세포배양을 실시하였다. 24시간 경과 후 부착되지 않은 세포를 제거하기 위해 α -MEM으로 세 번 세척하고 예비실험에서 세포 활성도를 증가시키는 농도인 황련 10^{-6} g/ml, 10^{-9} g/ml, 및 10^{-12} g/ml과 LPS $0 \mu\text{g/ml}$, $5 \mu\text{g/ml}$ 및 $10 \mu\text{g/ml}$ 의 농도를 각각 조합하여 동시에 투여하고 1 및 2일간 배양하였다. 대조군은 α -MEM에서 배양한 세포로 사용하였다. 각각의 배양기간이 경과된 후 부착되지 않은 세포를 제거하기 위해 배양액을 제거하고, 새 배양액 1ml을 각 well에 첨가하였다.

이어서 24-well plate에 부착되어 있는 세포의 양을 알아보기 위해 생리식염수에 용해한 MTT용액(3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide; Sigma Co., L.O., USA) $200 \mu\text{l}$ 을 각 well에 첨가한 후 3시간 동안 세포배양을 실시하였다. 세포배양 후 배양액을 제거하고 $200 \mu\text{l}$ 의 DMSO(dimethyl sulfoxide, Sigma Co., USA)를 첨가하여 형성된 formazan 결정을 용해시킨 후 96-well plate상으로 옮겼다. Plate를 잘 흔든 후 ELISA analyser(Model ETY-96, Toyo instruments Inc., Tokyo, Japan)로 파장 570nm에서 흡광도를 측정하였다. 매 실험마다 세포활성도는 대조군의 백분율로 산출하였고, 각 실험은 3회 반복하여 실시하였다.

(3) LPS와 황련을 동시에 투여한 경우 치주인대세포의 IL-6의 생산에 미치는 영향

5~8회 계대배양한 단일세포층의 치주인대세포를 trypsinization한 다음 혈구계수기로 세포수를 세어 24-well plate의 well당 $1.5 \times$

10^4 의 세포를 분주한 후 α -MEM이 함유된 배양액으로 하루 동안 세포배양을 실시하였다. 24시간 경과 후 부착되지 않은 세포를 제거하기 위해 α -MEM으로 세 번 세척하고 세포 활성도 실험에서 가장 좋은 활성도를 보인 농도인 황련 10^{-9} g/ml를 LPS $0 \mu\text{g/ml}$, $5 \mu\text{g/ml}$ 및 $10 \mu\text{g/ml}$ 의 농도와 각각 동시에 투여하고 3, 6, 12 및 24 시간 동안 배양하였다. 대조군은 α -MEM에서 배양한 세포로 사용하였다. 각각의 배양기간이 경과된 후 배양 상층액 $100 \mu\text{l}$ 를 채취하여 IL-6 ELISA kit의 제작자의 사용방법에 따라 IL-6의 농도를 검사하였다. 즉 간단히 말하면, 먼저 15ml의 세척용액에 증류수를 첨가하여 총 용량이 1.5L가 되도록하고 2°C 에서 사용할때까지 보관하였다. 그리고 바닥에 IL-6항체가 coating되어 있는 plates의 각 well에 대조군의 배양액과 실험군의 배양액을 $100 \mu\text{l}$ 씩 채취하여 첨가하였다. 이어서 plate sealer로 test well을 덮고 37°C 에서 30분간 배양하였다. 배양이 끝난 후 배양액을 제거하고 미리 만들어 두었던 세척용액을 이용하여 well을 강하게 세척하였다. 세척은 5회반복 시행하였고 마지막 세척 후 잔존 용액을 완전히 제거하기 위해 종이 수건위에 plate를 덮어놓았다. 이어 biotinylated antibody $100 \mu\text{l}$ 를 각각의 test well에 첨가시킨 후 다시 plate sealer로 덮고 37°C 에서 30분간 배양하였다. 배양 후 앞선 방법과 마찬가지로 5회 반복 세척하고 Addin Reagent $100 \mu\text{l}$ 를 첨가하고 15분간 37°C 에서 배양 후 다시 5회에 걸쳐 세척하였다. 이어 substrate reagent A와 substrate reagent B를 동량으로 섞어 working substrate reagent를 만들어 각각의 well에 $100 \mu\text{l}$ 씩 첨가하고 실온에서 10분간 배양하고 나서 stop solution $100 \mu\text{l}$ 를 첨가하여 반응을 종료시켰다. 반응이 멈춘후 30분 이내에 96 well plates로 내용물을 옮겨 ELISA analyser를 이용하여 450nm의 파장에서 흡광도를 측

정하였다. 본 실험에서는 결과를 대조군에 대한 실험군의 백분율로 나타내었고 실험은 3회 반복 시행하였다.

III. 결 과

1. 황련이 치주인대세포 활성도에 미치는 효과에 대한 예비실험

치주인대세포에 황련을 투여하여 세포활성도를 조사한 실험에서 10^{-3} g/ml, 10^{-4} g/ml의 농도를 투여한 군에서는 1일, 2일군 모두 대조군에 비해 유의한 세포활성의 억제가 관찰되었으며 10^{-5} g/ml의 농도투여군에서는 2일군에서 대조군에 비해 유의하게 세포활성이 억

제되었다($P < 0.05$). 1일군에서는 10^{-5} g/ml투여군에서, 2일군에서는 10^{-6} g/ml투여군에서 대조군과 비슷한 세포활성을 보였으며 각각 그 이하의 농도에서는 세포활성의 유의한 증가를 보였다($P < 0.05$). 특히 1일군에서는 10^{-7} g/ml에서 가장 높은 세포활성도를 보였고 2일군에서는 10^{-11} g/ml에서 최대활성도를 보여 시간이 경과할수록 낮은 농도의 황련투여군에서 세포활성이 증가되는 것으로 나타났다 (Table 1).

2. 치주인대세포에 LPS와 황련을 동시에 투여한 경우의 세포활성도

치주인대세포에 lipopolysaccharide와 황련을 동시에 투여하여 세포활성을 측정 한 1일군 실험에서 황련 10^{-9} g/ml과 10^{-6} g/ml 만을 투여한 군에서 대조군에 비해 유의한 세포활성의 증가를 보였다($P < 0.05$). 또한 lipopolysaccharide $5 \mu\text{g/ml}$ 을 투여한 군에서는 황련 10^{-9} g/ml을 투여한 군에서 대조군에 비해 유의한 세포활성의 증가를 보였으며, lipopolysaccharide $10 \mu\text{g/ml}$ 을 투여한 군에서는 대조군에 비해 어떤 농도의 황련 투여군도 유의한 세포활성의 증가를 보이지 않았다(Table 2, $P < 0.05$). 따라서 lipopolysaccharide의 농도가 낮은 군에서 황련이 세포활성을 촉진하는 것으로 나타났다.

치주인대세포에 lipopolysaccharide와 황련을 동시에 투여하여 세포활성을 측정 한 2일군 실험에서 황련 10^{-12} g/ml과 10^{-9} g/ml을 투여한 군이 대조군에 비해 유의한 세포활성을 보였으며 lipopolysaccharide $10 \mu\text{g/ml}$ 과 황련 10^{-6} g/ml을 투여한 군에서는 유의한 세포활성의 감소를 보였다. 이외의 모든 실험군은 대조군과의 세포활성의 유의한 차이는 관찰되지 않았다(Table 3, $P < 0.05$).

Table 1. Effects of Rhizoma Coptidis on Cellular Activity of Periodontal Ligament Cells

day concentrations	1day	2day
0g/ml(control)	100.00±5.35	100.00±11.49
10^{-3} g/ml	27.63±0.29*	6.93±0.51*
10^{-4} g/ml	66.37±1.43*	44.37±1.05*
10^{-5} g/ml	98.30±6.68	84.43±1.40*
10^{-6} g/ml	114.83±2.08*	101.47±4.37
10^{-7} g/ml	135.03±3.71*	116.27±17.70*
10^{-8} g/ml	107.57±10.42	113.23±10.45
10^{-9} g/ml	118.83±4.14*	120.63±10.36*
10^{-10} g/ml	120.06±2.37*	120.36±6.01*
10^{-11} g/ml	123.93±1.43*	129.47±1.29 *
10^{-12} g/ml	128.40±4.98*	127.30±8.74*
10^{-13} g/ml	109.73±14.84	126.27±9.06*

*: Significantly different from the control($P < 0.05$)

Data were expressed as mean±SD(%) of 3 determinations

Table 2 Effects of Rhizoma Coptidis on Cellular Activity of LPS-treated Periodontal Ligament Cells (1st day)

Rhizoma Coptidis Lipopolysaccharide	Rhizoma Coptidis			
	0g/ml	10 ⁻¹² g/ml	10 ⁻⁹ g/ml	10 ⁻⁶ g/ml
0 $\mu\text{g/ml}$	100.00 \pm 8.35	99.83 \pm 2.71	128.03 \pm 5.92*	119.20 \pm 12.80*
5 $\mu\text{g/ml}$	110.57 \pm 3.74	109.23 \pm 8.39	125.50 \pm 12.26*	115.27 \pm 8.20
10 $\mu\text{g/ml}$	113.50 \pm 9.42	91.57 \pm 10.73	100.97 \pm 13.20	115.80 \pm 9.96

* : Significantly different from the control (P < 0,05)

Data were expressed as mean \pm SD(%) of 3 determinations

control : lipopolysaccharide 0 $\mu\text{g/ml}$, rhizoma coptidis 0g/ml

Table 3 Effects of Rhizoma Coptidis on Cellular Activity of LPS-treated Periodontal Ligament Cells (2nd day)

Rhizoma Coptidis Lipopolysaccharide	Rhizoma Coptidis			
	0g/ml	10 ⁻¹² g/ml	10 ⁻⁹ g/ml	10 ⁻⁶ g/ml
0 $\mu\text{g/ml}$	100.00 \pm 5.37	120.37 \pm 11.32*	120.63 \pm 0.60*	96.10 \pm 5.17
5 $\mu\text{g/ml}$	95.40 \pm 2.55	92.63 \pm 2.34	101.70 \pm 3.65	95.80 \pm 2.72
10 $\mu\text{g/ml}$	93.97 \pm 5.36	91.50 \pm 8.41	92.30 \pm 5.93	83.40 \pm 1.71*

* : Significantly different from the control (P < 0,05)

Data were expressed as mean \pm SD(%) of 3 determinations

control : lipopolysaccharide 0 $\mu\text{g/ml}$, rhizoma coptidis 0g/ml

Table 4 Effects of Rhizoma coptidis on IL-6 Production of LPS-treated Periodontal Ligament Cells

hour concentration	hour			
	3	6	12	24
LPS 0 $\mu\text{g/ml}$ RC 0g/ml	100.00 \pm 30.25	100.00 \pm 27.85	100.00 \pm 18.90	100.00 \pm 34.70
LPS 5 $\mu\text{g/ml}$ RC 0g/ml	76.63 \pm 10.96	117.20 \pm 46.73	127.30 \pm 41.50	203.20 \pm 56.70*
LPS 10 $\mu\text{g/ml}$ RC 0g/ml	98.20 \pm 21.13	93.20 \pm 9.07	98.07 \pm 16.46	211.80 \pm 18.00*
LPS 0 $\mu\text{g/ml}$ RC 10 ⁻⁹ g/ml	109.87 \pm 59.18	100.90 \pm 25.91	118.07 \pm 24.95	52.37 \pm 8.45
LPS 5 $\mu\text{g/ml}$ RC 10 ⁻⁹ g/ml	82.50 \pm 9.30	100.53 \pm 25.65	173.73 \pm 69.41	142.80 \pm 16.90
LPS 10 $\mu\text{g/ml}$ RC 10 ⁻⁹ g/ml	84.00 \pm 5.08	112.40 \pm 5.28	171.40 \pm 39.90	112.27 \pm 7.65

* : Significantly different from the control (P < 0,05)

Data were expressed as mean \pm SD (%) of 3 determinations

control : lipopolysaccharide 0 $\mu\text{g/ml}$, rhizoma coptidis 0 g/ml

LPS : lipopolysaccharide, RC : rhizoma coptidis

3. LPS와 황련을 동시에 투여한 경우 치주인대세포의 IL-6의 생산에 미치는 영향

치주인대 세포에 Lipopolysaccharide와 황련을 동시에 투여한 경우 24시간 배양군중 lipopolysaccharide 5 μ g/ml 및 10 μ g/ml을 투여하고 황련을 투여하지 않은 군에서 대조군에 비해 유의하게 높은 IL-6의 생산이 관찰되었다(P<0.05). 그러나 다른 실험군에서는 대조군과 유의한 차이가 없었다(Table 4).

IV. 총괄 및 고찰

치주염의 일차적 원인은 치태내의 세균에 의한 것이며 이 세균내의 LPS가 대식세포를 활성화시켜 다양한 cytokines을 분비한다. 치주염은 만성염증성 질환으로 질병진행에 많은 cytokines이 관여한다. IL-6는 면역반응에서 중요한 cytokines중 하나인데 B-세포의 항체생성세포로의 최종분화에 관여하며³⁰⁾, T-세포 증식을 촉진하고³¹⁾ 또한 보체 C3와 같은 급성기의 단백질 합성을 촉진한다³²⁾. 한편 최근에 골흡수에서의 IL-6의 역할에 대한 관심이 증가되고 있는데 류마티드 관절염환자의 관절낭액속에서 높은 농도의 IL-6가 검출되었다는 보고¹⁸⁾와 myeloma 세포에 의해 IL-6의 생산이 촉진되었다는 보고 등³³⁾이 있다. 이러한 질환들은 골 흡수를 동반하므로 IL-6가 병리학적 상태에서 골 흡수를 매개하는 것이 아닌가 추측된다.

치주인대는 백악질과 치조골의 두 개의 석회화 조직 사이에 위치하여 치아를 지지하는 기능을 갖는 비석회화 결합조직이며 또한 치주조직의 재형성과정에 관여한다. 치주인대의 형태학적, 조직학적 변화는 치주질환과 같은 염증에 의해 유도된다^{34, 35)}. 치주인대의 이러한 변화는 치근흡수와 주위 치조골의 흡수를 야기한다³⁶⁾. 최근에 치주인대세포의 기능과

조절에 대한 몇가지 연구가 있었다. Isatsu³⁷⁾은 치주인대세포와 치은 섬유모세포에서의 교원질 합성이 LPS에 의해 감소되며 치주인대세포에서 감소되는 양이 더 크다고 하였다. Shimizu 등³⁸⁾은 IL-1가 인체 치주인대세포에서 IL-6의 합성을 촉진하며 이들 치주인대세포는 인체 치은 섬유모세포보다 더 많은 IL-6 생산을 보인다고 하였다. 이러한 사실은 치주인대세포가 치주조직의 파괴에 관여함을 나타낸다.

근래에 한방에서 사용되어져 오는 생약제재 중에서 염증의 완화에 효과가 있다고 알려진 것을 중심으로 과학적인 접근을 위해 연구되고 있는데 장 등³⁹⁾은 생약제재중 magnolol이나 honokiol 등이 염증의 매개물질인 cytokines의 생산을 억제한다고 보고하였으며 류 등⁴⁰⁾도 생약제재의 cytokine생성 억제효과에 대하여 동일한 효과를 보고하고 있다. 또한 양 등²⁾도 단핵세포를 LPS로 기시시킨 후 대조추출물첨가시 IL-1 β 의 생산억제효과를 보인다고 함으로써 생약의 치주질환치료 적용에 기초를 형성하였다. 본 연구에서 사용된 황련(黃蓮, rhizoma coptidis)의 주성분은 isoquinoline계 alkaloid인 berberine이다. Berberine은 DNA, RNA, 단백질 및 지질의 생합성과 해당계를 뚜렷하게 저해하는 효과를 가지고 있어 탈분극과 재분극을 반복하는 흥분성 세포의 기능을 저해하게 되며 따라서 강압작용, 항콜린에스테르효소작용, 항균작용, 항종양작용 등을 나타내게 된다²⁶⁻²⁸⁾.

본 연구는 치주인대 세포에 세균 내독소인 LPS를 투여하여 IL-6가 생산되는 가를 알아 보고 만일 생산된다면 한의학에서 사용되고 있는 항염증제인 황련에 의해 생산이 조절되는가를 알아보며 황련이 치주인대 세포의 활성에 미치는 영향을 평가함으로써 임상에서의 사용가능성을 평가하기 위하여 시행하였다.

치주조직의 재생에 관여하는 세포로는 치은

상피세포, 치은 결합조직세포, 골세포, 치주인대세포 등이 있다. 이들 세포 중 Bower 등⁴¹⁾은 치은 섬유모세포가 치주조직 재생에 주로 관여한다고 주장한 바 있으나, Bokyo 등⁴²⁾은 치은 결합조직세포와 치조골세포가 치근면과 직접 접촉하였을 경우에는 치근 흡수와 골성강직을 초래한다고 주장하였고, Stahl⁴³⁾은 치은 상피세포의 빠른 증식에 의해 치주낭 내면에 재상피화가 일어나면 치근 흡수와 골성강직을 동시에 예방할 수 있으나 치주낭의 재형성 가능성이 높게 된다고 주장하였다. 이와는 달리 Melcher^{44, 45)}와 Isidor⁴⁶⁾는 치주인대에서 유래된 치주인대세포가 치근면과 접촉하여 새로운 백악질이 형성되며 기능적인 섬유 배열을 가진 치주인대의 재생이 일어나 바람직한 치유 형태가 나타난다고 보고하였다. 먼저 황련의 적정 투여 농도를 선택하기 위한 예비실험에서 황련 10^{-6} g/ml 이하의 농도에서 치주인대세포에 적용시 세포활성을 증가시킨다는 결과를 얻었다. 치주치료의 목적이 조직에 확산된 염증을 제거하고 질환으로 인하여 소실된 치주조직의 재생을 유도하는 과정 즉 치조골 및 백악질의 형성과 이를 피개하는 결합조직 부착을 형성하여 궁극적으로는 치주낭의 재형성을 막아 치주질환의 재발을 예방하는 것이며 치주치료후에 기대할 수 있는 이상적인 치유 형태는 시술후 치유 초기단계에서 결손부 주위의 치주인대로부터 유래된 세포가 치근면에 먼저 이주 증식하며 이들 세포내의 교원섬유와 기질이 합성되는 동시에 신생백악질 형성으로 치면과 재생골에 교원섬유가 함입되는 신부착이 형성되는 것⁴⁷⁾이라할 때 황련의 이와 같은 치주인대세포에 대한 증식 능력은 이상적인 치주치료에 도움을 줄 것으로 생각된다.

한편 LPS를 투여하여 인위적으로 치주인대세포에 염증반응을 유발하고 황련을 투여했을때의 세포활성을 평가하기 위한 실험에서 1일군에서는 $5\mu\text{g/ml}$ LPS를 투여한 군에서는

황련 10^{-9} g/ml의 농도에서 세포활성이 증가한 반면 $10\mu\text{g/ml}$ 의 LPS를 투여한 군에서는 어떤 농도의 황련에서도 세포활성이 대조군에 비해 유의하게 증가되지 않았고 2일군에서는 모든 LPS투여군에서 세포활성의 증가가 관찰되지 않았으며 오히려 LPS $10\mu\text{g/ml}$ 과 황련 10^{-6} g/ml을 동시에 투여한 군에서는 세포활성의 역제가 관찰되었다. 이러한 사실로 볼 때 황련은 짧은 시간에서 낮은 농도의 LPS노출에 대해서는 보상작용이 있으나 LPS의 높은 농도, 혹은 오랜기간 처리시에는 세포활성에 별 도움이 되지 않는 것으로 생각된다.

IL-6의 생산에 대한 연구에서는 24시간 군에서 황련을 투여하지 않고 LPS $5\mu\text{g/ml}$ 및 $10\mu\text{g/ml}$ 만을 투여한 군에서 대조군에 비해 유의하게 높아진 IL-6의 생산을 보였으며 3, 6 및 12시간 투여군에서는 대조군과 유의한 차이가 없었고 또한 황련과 동시에 투여한 군에서도 유의한 IL-6의 생산 차이는 없었다. 즉 LPS를 투여할 경우 치주인대세포에서 IL-6의 생산이 증가되며 황련과 동시에 투여하는 경우에는 IL-6의 생산이 감소됨을 의미한다. 이는 Naomi 등¹⁵⁾이 치주인대세포에 LPS를 투여했을 때 3시간부터 대조군에 비해 유의한 IL-6의 생산 증가를 보이며 LPS투여 시간 및 용량에 비례하여 IL-6의 생산이 증가된다고 보고한 내용과 시간적인 면에서 일치되지 않는다. 이러한 결과는 사용한 치주인대세포 수의 차이와 사용된 LPS의 종류가 다르기 때문으로 사료된다. Yamazaki 등¹¹⁾은 인체 치은 섬유모세포에 LPS를 투여하여 IL-6가 생산되는 것과 LPS를 투여하여 IL- 1β 가 함유되어진 배양액을 치은 섬유모세포에 재투여하여 IL-6가 생산되는 것을 비교하여 IL-6가 LPS에 의해 직접적으로 치은 섬유모세포로부터 생산되는 양보다는 IL- 1β 가 먼저 형성되어 이것이 치은 섬유모세포에 작용하여 IL-6를 간접적으로 생산하는 양이 더 많다고 보고하였다. 이는 본 연구에서 IL-6의 생산이

비교적 늦게 일어난 것을 설명해 줄 수 있다. 또한 IL-6가 직접적으로 생산되든지, 간접적으로 생산되든지간에 황련이 IL-6의 생산을 억제시켜줄 수 있음을 나타낸다.

따라서 본 실험에서 사용된 황련은 치주인대세포의 활성을 촉진하며 IL-6의 생산을 억제하는 것으로 밝혀졌으며 임상에서의 적용이 가능할 것으로 사료된다.

V. 결 론

한의학에서 사용되는 항염제인 황련이 치주인대 세포의 활성에 어떤 영향을 미치며 염증 및 면역반응에서 분비되는 LPS를 투여한 치주인대 세포에서 골흡수에 관계되는 IL-6가 생산 되는가를 알아보고, 치주인대 세포에 LPS와 황련을 동시에 투여했을 때 세포의 활성과 IL-6의 생산에 어떤 영향이 있는가를 알아보고자 시행한 실험에서 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 황련생약 50g에서 6.2g으로 추출하여 얻은 분말을 증류수에 녹여 사용한 실험에서 10^{-6} g/ml 이하의 저농도에서 세포활성의 유의한 증가를 얻었으며 1일군보다는 2일군에서 낮은 농도의 황련이 효과가 있었다.
2. 황련과 LPS를 동시에 투여한 경우 LPS $10\mu\text{g/ml}$ 을 투여한 군에서는 어떤 농도의 황련을 투여 한 경우에도 세포활성도의 유의한 증가를 관찰하지는 못했지만 LPS $5\mu\text{g/ml}$ 을 투여한 군에서는 황련 10^{-9} g/ml을 동시에 투여할 경우 유의하게 증가된 세포활성을 얻었다. 따라서 낮은 농도의 LPS에 대해서는 황련이 세포활성을 보상하는 것으로 생각된다.
3. 24시간 배양군에서 LPS $5\mu\text{g/ml}$ 및 $10\mu\text{g/ml}$ 만을 투여하고 황련을 투여하지 않은 군에서 유의 하게 높은 IL-6생산을 보였으며 황련이 첨가되거나, LPS가 첨가되

지 않은 군에서는 대조군과 비교하여 IL-6의 생산에 유의한 차이가 없었다.

참고문헌

1. Wahl SM, Costa GL, Mizel DE, Allen JB, Skaleric U, and Mangan DF. : Role of transforming growth factor beta in the pathophysiology of chronic inflammation. J Periodontol 64 : 450-455, 1993.
2. 양창호, 이용무, 조기영, 배기환, 정종평. : 대조추출분획이 치은 섬유아세포의 생물학적 활성 화에 미치는 영향. 대한치주과학회지 Vol, 24 No 1 : 144-153, 1994.
3. Morrison DC, Cuncan Jr JL, Goodman SA. : In vitro biological activities of endotoxin. In Bacterial Endotoxin, Alan R.Liss Inc. : 81-98, 1985.
4. Morrison DC, Ulevitch RJ. : A review-the interaction of bacterial endotoxins with cellular and humoral mediation system. Am J Path 93 : 527-618, 1978.
5. Heath JK, Atkinson SJ, Hembry RM, Reynolds JJ, Meikle MC. : Bacterial antigens induce collagenase and prostaglandin E_2 synthesis in human gingival fibroblasts through a primary effect on circulating mononuclear cells. Infect Immun 55 : 2148-2154, 1987.
6. Lindemann RA, Economou JS. : Actinobacillus actinomycetemcomitans and Bacteroides gingivalis activate human peripheral monocytes to produce interleukin-1 and tumor necrosis factor. J Periodontol 59 : 728-730, 1988.
7. Lindemann RA, Economou JS, Rothermel H. : Production of interleukin-1 and tumor necrosis factor by human peripheral monocytes : Activated by

- periodontal bacteria and extracted lipopolysaccharides. *J Dent Res* 67 : 1131-1135, 1988.
8. Ishimi Y, Miyaura C, Jin CH, Akatsu T, Abe E, Nakamura Y, Yamaguchi A, Yoshiki S, Matsuda T, Hirano T, Kishimoto T, Suda T. : IL-6 is produced by osteoblasts and induces bone resorption. *J Immunol* 145 : 3297-3303, 1990.
 9. Bartold PM, Haynes DR. : Interleukin-6 production by human gingival fibroblasts. *J Periodontal Res* 26 : 339-345, 1991.
 10. Takada H, Mihara J, Morisaki I, Hamada S. : Induction of interleukin-1 and -6 in human gingival fibroblast cultures stimulated with *Bacteroides lipopolysaccharides*. *Infect Immun* 59 : 295-301, 1991.
 11. Yamazaki K, Ikarashi F, Aoyagi T, Yakahashi K, Nakajima T, Hara K, Seymour GJ. : Direct and indirect effects of *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide on interleukin-6 production by human gingival fibroblasts. *Oral Microbiol Immunol* 7 : 218-224, 1992.
 12. Meikle MC, Heath JK, Reynolds JJ. : Advances in understanding cell interactions in tissue resorption: Relevance to the pathogenesis of periodontal diseases and a new hypothesis. *J Oral Pathol* 15 : 239-250, 1991.
 13. Mary BA, Petros DD. : The role of cytokines in the pathogenesis of periodontal disease. *Curr Opin Periodontol* : 39-53, 1994.
 14. Dinarello CA. : Biology of interleukin-1. *FASEB J* 2 : 108-115, 1988.
 15. Naomi O, Yasuko S, Yoshikazu K, Utako M, Mitsuo H, Tetsuo O, Hisashi T, Hirotsugu I, Yoshimitsu A. : Stimulation of interleukin-6 production of periodontal ligament cells by *porphyromonas endodontalis* lipopolysaccharide. *Biochem Med Meta Biol* 53 : 130-136, 1994.
 16. Kishimoto T, Hirano T. : A new interleukin with pleiotropic activities. *Bio Essays* 9 : 11-15, 1988.
 17. Hirano T. : Interleukin-6. In the cytokine handbook, edn 1. Edited by Thomson A. New York : Academic Press : 169-190, 1991.
 18. Hirano T, Matsuda T, Turner M, Miyasaka N, Buchan G, Tang B, Sato K, Shimizu M, Maini R, Feldmann M, Kishimoto T. : Excessive production of interleukin-6/B cell stimulatory factor-2 in rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol* 18 : 1797-1801, 1988.
 19. Shalaby MR, Waage A, Espevik T. : Cytokine regulation of interleukin-6 production by human endothelial cells. *Cell Immunol* 121 : 372-382, 1989.
 20. Feyen JHM, Elford P, di Padova FE, Trechsel U. : Interleukin-6 is produced by bone and modulated by parathyroid hormone. *J Bone Miner Res* 4 : 633-638, 1989.
 21. Linkhart TA, Linkhart SG, MacCharles DC, Long DL, Strong DD. : Interleukin-6 messenger RNA expression and interleukin-6 protein secretion in cells isolated from normal human bone : Regulation by interleukin-1. *J Bone Miner Res* 6 : 1285-1294, 1991.
 22. Kamagata Y, Miyasaka N, Inoue H, Hashimoto J, Iida M. : Cytokine

- production in inflamed human gingival tissue, interleukin-6. *J Jpn Assoc Periodontol* 31 : 1081-1087, 1989.
23. Masada MP, Person R, Kenney JS, Lee SW, Page RC, Allison AC. : Measurement of interleukin-1 and -6 in gingival crevicular fluid: implication for the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontal Res* 25 : 156-163, 1990.
 24. Richards D, Rutherford RB. : The effects of interleukin-1 on collagenolytic activity and prostaglandin-E secretion by human periodontal ligament and gingival fibroblast. *Archs Oral Biol* 33 : 237-243, 1988.
 25. Saito S, Ngan P, Saito M, Kim K, Lanese R, Shanfeld J, Davidovitch Z. : Effects of cytokines on prostaglandin E and c-AMP levels in human periodontal ligament fibroblasts in vitro. *Archs Oral Biol* 35 : 387-395, 1990.
 26. 山原條二. : Berberine형 알칼로이드의 행동약리학적 연구(제 1판), 황련 및 그 의 함유성분의 증추억제작용. *日藥理誌* 72 : 899-908, 1976.
 27. 内炭精一. : Berberine의 약리작용 지견 보유. *日藥理誌* 53 : 63-74, 1957.
 28. Fukuda H, Watanabe K, Kudo Y. : Some observations on the cardiovascular Effects of 9-substituted berberine. *Chem Pharm Bull* 18 : 1299-1304, 1970.
 29. Westphal O, Jann K. : Bacterial lipopolysaccharide : Extraction with phenol, water and further application of treatment procedure. *Methods in Carbohydrate Chem* 5, 83-91, 1965.
 30. Hirano T, Taga T, Tasukawa K, Nakajima K, Nakano N, Takatsuki F, Shimizu M, Murashima A, Tsunasawa S, Sakiyama F, Kishimoto T. : Human B-cell differentiation factor defined by an antipeptide antibody and its possible role in autoantibody production. *Proc Natl Acad Sci USA* 84 : 228-231, 1987.
 31. Lotz M, Jirik F, Kabouridis P, Tsoukas C, Hirano T, Kishimoto T, Carson DA. : B cell stimulating factor 2/interleukin-6 is a costimulant for human thymocytes and T lymphocytes. *J Exp Med* 167 : 1253-1258, 1988.
 32. Baumann H, Onorato V, Gauldie J, Jahreis GP. : Distinct sets of acute phase plasma proteins are stimulated by separate human hepatocyte-stimulating factors and monokines in rat hepatoma cells. *J Biol Chem* 262 : 9756-9768, 1987.
 33. Kawano M, Hirano T, Matsuda T, Taga T, Horii Y, Iwato K, Asaoku H, Tang B, Tanabe O, Tanaka H, Kuramoto A, Kishimoto T. : Autocrine generation and requirement of BSF-2/IL-6 for human multiple myelomas. *Nature* 332 : 83-85, 1988.
 34. Nishimura K, Noguchi Y, Shigeyama Y, Naito M, Fukazawa E, Yamaoka A. : An ultrastructural study comparing new gingival tissue attachment on chemically exposed fibrils and retained periodontal ligament. *J Osaka Dent Univ* 25 : 63-75, 1991.
 35. Kai K. : SEM study of vascular architecture of periodontal ligament under chronic marginal periodontitis. *Kanagawa Shigaku* 24 : 273-289, 1989.
 36. Moskow BS. : A histomorphologic study of the effects of periodontal inflammation on the maxillary sinus mucosa. *J*

- Periodontol 63 : 674-681, 1992.
37. Isatsu K. : Effect of transforming growth factor- and lipopolysaccharide on human periodontal ligament fibroblasts and human gingival fibroblasts. J Jpn Soc Periodont 36 : 102-113, 1994.
 38. Shimizu N, Ogura N, Tamaguchi M, Goseki T, Shibata Y, Abiko Y, Iwasawa T, Takiguchi H. : Stimulation by interleukin-1 of interleukin-6 production by human periodontal ligament cells. Arch Oral Biol 37 : 743-748, 1992.
 39. 장범석, 손성희, 정종평, 배기환. : Magnolol과 honokiol이 항균, 교원질 분해효소, 세포독성 및 cytokine생산에 미치는 영향. 대한치주과학회지 Vol 23, No 1 : 145-158, 1993.
 40. 류인철, 손성희, 정종평, 배기환. : 생약 추출물이 세포성장 및 cytokine 생산에 미치는 영향. 대한치주과학회지 Vol 23, No 1 : 37-47, 1993.
 41. Bowers GM, Schallhorn RG, and Melonig JT. : Histologic evaluation of new attachment in human intrabony defects. A literature review. J Periodontol 53 : 509-514, 1982.
 42. Bokyo GA, Melcher AH, and Brunette DM. : Formation of new periodontal ligament by periodontal ligament cells implanted in vivo after culture in vitro. A preliminary study of transplanted roots in the dog. J Periodont Res 16 : 73-88, 1981.
 43. Stahl SS. : Repair or regeneration following periodontal therapy? J Clin Periodontol 6 : 389-396, 1979.
 44. Melcher AH. : On the repair potential of periodontal tissues. J Periodontol 47 : 256-260, 1976.
 45. Melcher AH. : Repair of wounds in the periodontium of the rat. influence of periodontal ligament on osteogenesis. Arch Oral Biol 15 : 1183-1204, 1970.
 46. Isidor F, Karring T, and Nyman S, et al. : The significance of coronal growth of periodontal ligament tissue for new attachment formation. J Clin Periodontol 13 : 145-150, 1986.
 47. Garrett S, Crigger M, and Egelberg J. : Effects of citric acid on diseased root surface. J Periodontol 13 : 155-163, 1978.

Effects of Rhizoma Coptidis on Cellular Activity and IL-6 Production of LPS-treated Periodontal Ligament Cells

Ki-Bum Song, Young-Hwan Kong, Hyung-Keun You, Hyung-Shik Shin.
Dept. of Periodontology, College of Dentistry, Wonkwang University

In infectious disease, invasion of host tissue by bacteria or their products frequently induces a wide variety of inflammatory and immunopathologic reaction. Evidence indicates that cytokines are involved in the initiation and progression of chronic inflammatory diseases, such as periodontitis. Interleukin-6, which is a multifunctional cytokine, has important roles in acute and chronic inflammation and may also be implicated in bone resorption.

Periodontal diseases are characterized by chronic inflammation of the periodontium with alveolar bone resorption. A principal driving force behind this response appears to lie in the immune system's response to bacteria. Many of the cell components which have been shown to function as virulence factors in gram-negative bacteria are associated with the bacterial surface. Of these, lipopolysaccharide has been characterized as one that mediates a number of biological activities which can lead to the destruction of host tissue.

Non-steroidal antiinflammatory drug is used for reduce inflammation, and most of NSAIDs inhibit prostaglandine E₂ production, but it is shown that PGE₂ production is stimulated by

IL-1 in recent study. So, the influence of other cytokines except PGE₂ on periodontium can not be avoided. Therefore, new antiinflammatory drug is needed. Rhizoma coptidis is used in oriental medicine for anti-inflammation and antiseptics. In this present study, we examined the IL-6 release in periodontal ligament cells treated with the lipopolysaccharide, and also the effect of rhizoma coptidis on cellular activity and IL-6 production of periodontal ligament cells.

To evaluate the effect of rhizoma coptidis on cellular activity, the cells were seeded at a cell density of 1×10^4 cells/well in 24-well culture plates. After one day incubation, 10⁻⁶, 10⁻⁹ and 10⁻¹² g/ml of rhizoma coptidis and 5, 10 $\mu\text{g/ml}$ of LPS were added to the each well and incubated for 1 and 2 days, respectively. Then, MTT assay were carried out.

To evaluate the effect of rhizoma coptidis on IL-6 production, the cells were seeded at a cell density of 1.5×10^4 cells/well in 24-well culture plates. After one day incubation, 10⁻⁹ g/ml of rhizoma coptidis and 5, 10 $\mu\text{g/ml}$ of LPS were added to the each well and incubated for 3, 6, 12 and 24 hours. Then, amounts of IL-6 production is measured by IL-6 ELISA kit used.

The results were as follows :

1. Rhizoma coptidis(below to 10^{-6} g/ml) significantly increased cellular activity of periodontal ligament cells than control.
2. Rhizoma coptidis(10^{-9} g/ml) significantly increased cellular activity of LPS(5 μ g/ml)-treated periodontal ligament cells than control.
3. LPS(5 and 10 μ g/ml) significantly increased IL-6 production of periodontal ligament cells than control.
4. Rhizoma coptidis(10^{-9} g/ml) decreased IL-6 production of LPS(5 μ g/ml)-treated periodontal ligament cells than LPS only tested group.

These findings suggest that stimulation of the IL-6 release of periodontal ligament cells by LPS may have a role in the progression of inflammation and alveolar bone resorption in periodontal disease, and that inhibition of the IL-6 release of cells and stimulation of cellular activity by rhizoma coptidis may help the periodontal regeneration.