

황련과 *Centella asiatica* 추출물이 치은 섬유모세포에 미치는 영향

유형근

원광대학교 치과대학 치주과학교실

I. 서론

치주 조직의 재생은 치주 치료의 가장 중요하고도 기본적인 목적이다. 치주 질환으로 인해 상실된 치주 조직을 재생하기 위해서는 골 이식술¹⁻³⁾, 치근면 처리술⁴⁻⁶⁾, 조직 유도 재생술⁷⁻¹⁰⁾ 등과 같은 여러 가지의 술식이 사용되어져 왔으며, 이러한 치료 형태의 임상적 가능성은 많은 연구를 통해 이루어졌다. 특히 조직 유도 재생술은 치주 인대에서 유래되는 전구 세포들이 백악질과 치주 인대, 골 등과 같은 조직을 재생시킬 수 있는 능력을 가졌다는 가설을 전제로 하고 있기 때문에^{11, 12)}, 치주인대 섬유모 세포가 치주 조직 재생에 중요한 역할을 하고 있으며 여기에는 치주인대 세포의 이주와 증식이 필요한 것으로 여겨지고 있고 이 과정은 성장 인자에 의해서 영향을 받고 조절되어 질 수 있다. 치주 조직의 치유와 재생에 많은 영향을 미치는 성장 인자로는 여러 가지의 cytokine과 growth factor들이 알려져 있으며, 이들을 단독 투여하여 사용하거나 또는 복합 투여로 상승 효과를 얻어내기도 한다.

황련(黃蓮, *Rhizoma coptidis*)은 한의학에서 창상 치유와 염증의 제거 및 부종 감소, 지혈 작용을 위해서 많이 쓰이는 미나리아재비과에 속하는 다년생 초본으로써 주성분은 isoquinoline계 alkaloid인 berberin이며 그람 양성 및 음성균과 곰팡이 등에 대한 광범위한 항균작용을 가지고 있고, 항염증 작용, 지혈 작용, 혈압 강하 작용, 항암 작용 등이 있는 것으로 알려져 있어서 피부 염증, 화농증, 구내염, 비출혈 등에 사용한다¹³⁻¹⁶⁾.

*Centella asiatica*는 Apiaceae 계열의 한 종류로써 인도, 남아프리카, 중남미 등의 따뜻한 지역에서 자라는 식물이며 이 지역에서 민속 의약품으로 종양, 궤양, 기관지염, 천식 등에 사용하였으며¹⁷⁾, 근래에 들어 많은 연구에 의해 과학적으로도 그 효능을 인정받고 있다. 즉, 외과적 병소와 perineal obstetrical wounds와 같은 피부 표면 창상의 치유를 촉진하며^{18, 19)}, 각막 궤양과 다리 부위의 궤양, 방사선 치료 후의 궤양 등의 치료에도 효과가 있었다²⁰⁾. 또한 피부과 영역에서는 leprosy sore, slow-healing wound, keloid 등의 치료에도 사용하였다²¹⁾.

본 연구는 치주조직 재생 과정에 관련있는 치은 섬유모세포에 한의학에서 창상 치유와 염증제거 시 등에 사용하는 황련과 피부의 창상, 화상, 궤양 등의 상처가 있을 때 사용하며 부위가 치유되는 과정에 관여하여 육아조직의 형성을 도와주는 *Centella asiatica* 정량 추출물을 이용하여 이 두 약물이 세포 증식에 미치는 효과를 알아보기 위하여 실시하였다.

II. 재료 및 방법

1. 세포배양

본 연구에서 사용된 치은 섬유모세포는 교정적 이유로 발거된 소구치의 치은을 절제하여 얻었다. 발치에 앞서 치은의 건강 상태를 임상 및 방사선학적으로 평가하였다.

발거한 치아를 fetal bovine serum(FBS, Gibco, USA) 10%와 항생제(10,000units/ml Penicillin G, 10,000 μ g/ml Steptomycin, 25 μ g/ml Amphotericin B 포함, Gibco, USA) 1%가 들어 있는 α -MEM(Gibco, USA)에 3회 세척한 후 치아를 100mm 조직 배양용 접시에 옮겨 No.15 blade를 사용하여 치경부에 붙어 있는 치은 조직을 떼어 낸 후 이들을 1mm²으로 세절하여 60mm 조직 배양용 접시에 5-6개 정도 위치시켰다. 그 후 약 30분 간 37°C, 5% CO₂, 습도 100%의 배양기에서 조직이 고르게 부착되도록 배양시킨 후, 위의 α -MEM을 3ml 씩 첨가하고 단일 세포층이 형성될 때까지 2-3일 간격으로 배양액을 교환하였다.

단일 세포층이 confluency에 도달했을 때 배양액을 제거하고 부착되지 않은 세포를 제거하기 위해 HBSS(H6136, Hank's Balanced Salt Solution, Gibco, USA)로 2회 세척하였다. 부착이 안 된 세포와 HBSS를 제거하고 0.25% Trypsin/EDTA(10 \times , Gibco, USA)를 2ml씩 넣고 3분 간 clean bench에서 방치하여

부착 세포를 분리시킨 후 15ml 원심 분리용 시험관으로 옮겨 1,200 rpm으로 10분 간 원침하였다. 원침 후 상층액을 따라내고 HBSS를 가하여 Vortex mixer로 혼합하여 세척한 후 다시 1,200rpm으로 10분 간 원침하였다. 다시 상층액을 따라내고 α -MEM을 첨가하여 Vortex mixer로 혼합하여 세포 부유액을 만들고 이를 60mm 배양 접시에 분주하였다. 배양액은 세포의 충분한 증식이 나타날 때까지 2-3일 간격으로 교환하였고, 계대 배양은 1:3-4의 비율로 시행하였다.

본 실험에서는 8~9회 계대 배양된 치은 섬유모세포를 사용하였다.

2. [³H]-thymidine을 이용한 DNA 합성 측정

황련은 원광대학교 한의과대학 약리학 교실로부터 기증받았는데 이는 1,000g 씩 플라스크에 증류수 1,000ml와 함께 넣은 다음 가열, 여과한 후 1,500rpm으로 15분 간 원심분리하고 감압 농축하여 갈색의 건조 분말로 추출되어진 상태였다.

분말 1g을 증류수 10ml에 섞어 stock solution으로 만든 후 10⁻⁹, 10⁻¹²g/ml의 농도로 희석하여 사용하였으며, *Centella asiatica* (Madecassol, 동국제약)는 1, 10ng/ml로 희석하였다.

24-well plate의 각 well당 2 \times 10⁴의 세포가 들어 가도록 분주한 후 각 농도의 시약을 각각 또는 혼합하여 첨가하고 2일 또는 3일 동안 배양하고, 배양 마지막 2시간 전에 [³H]-thymidine(S.A : 87.0Ci/mmol, 1 μ Ci/ml, Sigma, USA)을 첨가 하였다. 그 후 배지를 제거하고 4°C에서 4% PBS로 3번 세척한 후 5% TCA로 4번 세척하고, 0.1% NaOH/0.1% SDS를 500 μ l 첨가한다. 이 용액 중 500 μ l를 취하여 scintillation vial에 담은 후 4ml cocktail solution(Ready-safe, Beckman)을 첨가하고 Liquid Scintillation Counter(LS 6500,

Beckman)을 이용하여 counts per minute(CPM)단위로 측정된 후 대조군에 대한 백분율로 계산하였다.

3. 세포 수 측정

세포 증식을 알기 위한 또 하나의 방법으로 세포 수를 측정하였는데, 1×10^4 cell/35mm dish에 위의 각 농도의 시약을 첨가하고 3일간 배양한 후 hemocytometer를 이용하여 inverted microscope으로 측정하였다. 그리고 trypan blue exclusion test로 cell viability도 측정하였다.

4. 각 실험 결과에 대해 student t-test를 실시하였다.

III. 결과

황련을 투여하고 2일 후의 DNA합성 결과는 표 1과 같다. 대조군에 비해 10^{-9} g/ml은 약 14% 더 많이 합성하였으며, 10^{-12} g/ml은 약 11% 정도 더 증가하였으나 유의성있는 차이는 없었다. *Centella asiatica*는 각 농도(1, 10 ng/ml)에서 대조군에 비해 오히려 감소하였다(table 1).

황련과 *Centella asiatica*를 혼합 투여하고 2일 후의 DNA 합성을 본 결과는 table 2이며, 대조군에 비해 모두 감소하였으며, 특히 황련 10^{-9} g/ml에 *Centella asiatica* 10ng/ml을 혼합투여한 군과 황련 10^{-12} g/ml에 *Centella asiatica* 1, 10ng/ml을 혼합 투여한 군에서는 유의성

있는 감소를 하였다($P < 0.05$). 그러나 황련 10^{-9} g/ml과 *Centella asiatica* 1ng/ml을 혼합 투여한 군에서는 대조군과 별 차이가 없었다.

황련과 *Centella asiatica*를 혼합 투여한 3일 후의 DNA 합성 결과 2일에 합성이 감소하였던 군에서는 역시 계속하여 감소하였으나, 황련 10^{-9} g/ml과 *Centella asiatica* 1ng/ml을 혼합 투여한 군에서는 $177.40 \pm 0.52\%$ 로 대조군에 비해서 상당히 많이 증가하였다(table 3, $P < 0.05$).

황련 투여 3일 후의 전체 세포수($\times 10^4$)는 대조군 9.96 ± 0.66 , 10^{-9} g/ml 11.04 ± 0.53 , 10^{-12} g/ml 10.13 ± 0.34 이었으며 10^{-9} g/ml에서는 유의성있는 차이를 보였다(table 4, $P < 0.05$). Trypan blue로 염색한 후의 세포수는 대조군 6.21 ± 0.49 , 10^{-9} g/ml 7.29 ± 0.51 , 10^{-12} g/ml 6.67 ± 0.49 이었으며 10^{-9} g/ml에서는 유의성있는 차이를 보였다($P < 0.05$). *Centella asiatica* 투여 3일 후의 전체 세포 수($\times 10^4$)는 대조군 7.83 ± 0.54 , 1ng/ml 9.33 ± 0.47 , 10ng/ml 8.21 ± 0.43 이었고, 1ng/ml에서는 유의한 차이를 보였다(table 5, $P < 0.05$). Trypan blue로 염색한 후의 세포수는 대조군 5.42 ± 0.54 , 1ng/ml 6.17 ± 0.26 , 10ng/ml 5.25 ± 0.35 이었고, 1ng/ml에서는 유의한 차이를 보였다($P < 0.05$).

전체 세포 수와 dye exclusion test를 바탕으로 한 cell viability는 table 6과 같다.

황련은 대조군에 비해 viability가 높았으며, *Centella asiatica*는 대조군에 비해 viability가 낮아서 DNA 합성 정도와 일치되는 결과를 볼 수 있다.

Table 1 황련과 *Centella asiatica* 투여 2일 후의 DNA 합성(Mean \pm S.D. % control)

	황련(g/ml)			<i>Centella asiatica</i> (ng/ml)		
	0	10^{-9}	10^{-12}	0	1	10
2일	100.00 ± 14.14	113.58 ± 15.07	110.76 ± 10.25	100.00 ± 16.62	96.66 ± 2.95	90.64 ± 17.42

Table 2 황련과 *Centella asiatica*의 혼합 투여 2일 후의 DNA 합성(% control)

		Centella asiatica(ng/ml)	
		1	10
황 련 (g/ml)	10 ⁻⁹	99.92±5.02	60.66±4.66*
	10 ⁻¹²	71.30±1.84*	67.86±2.58*
대조군		100.00±0.70	

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

Table 3 황련과 *Centella asiatica*의 혼합 투여 3일 후의 DNA 합성(% control)

		Centella asiatica(ng/ml)	
		1	10
황 련 (g/ml)	10 ⁻⁹	177.40±0.52*	53.48±2.61*
	10 ⁻¹²	57.92±2.09*	63.74±4.24*
대조군		100.00±3.47	

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

Table 4 황련 투여 3일 후의 전체 및 dye exclusion 후의 세포 수 (Mean±S.D.×10⁶)

	전체세포수(g/ml)			dye exclusion 세포수(g/ml)		
	0	10 ⁻⁹	10 ⁻¹²	0	10 ⁻⁹	10 ⁻¹²
3일	9.96±0.66	11.04±0.53*	10.13±0.34	6.21±0.49	7.29±0.51*	6.67±0.49

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

Table 5 *Centella asiatica* 투여 3일 후의 전체 및 dye exclusion 후의 세포 수(Mean±S.D.)

	전체세포수(ng/ml)			dye exclusion 세포수(ng/ml)		
	0	1	10	0	1	10
3일	7.83±0.54	9.33±0.47*	8.21±0.43	5.42±0.54	6.17±0.26*	5.25±0.35

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

Table 6 황련과 *Centella asiatica* 투여 3일 후의 cell viability(Mean±S.D. %)

	황련(g/ml)			Centella asiatica(ng/ml)		
	0	10 ⁻⁹	10 ⁻¹²	0	1	10
3일	62.76±8.42	66.31±7.19	65.91±5.47	69.50±9.06	66.27±5.40	64.18±6.64

IV. 총괄 및 고찰

치주 조직의 재생을 위한 노력은 최근의 치주학에서 관심있게 다루어지는 분야이다. 그 중에서도 특히 조직유도 재생술을 이용한 치주 인대 세포의 성장과 그에 따른 치은 조직의 치유 과정에 대해서는 많은 연구들이 이루어지고 있다. 본 연구는 한의학에서 염증 소실과 창상 치유시에 많이 사용하는 황련(黃蓮, *Rhizoma coptidis*)과 피부 손상시에 일반적으로 많이 사용하는 *Centella asiatica*(상품명; 마데카솔)이 치은 섬유모세포의 증식에 미치는 영향을 알아 보기 위해 실시하였다. 실험 결과 황련은 세포 증식을 증진시켰으며, *Centella asiatica*는 세포 증식을 오히려 감소시켰다.

세포 증식 정도를 알아보기 위해 본 연구에서는 DNA 합성과 직접 세포 수를 세는 방법을 사용하였는데, 황련의 경우 두 방법 모두에서 수치가 증가함을 알 수 있었다. 2일 후의 DNA 합성이 황련은 대조군에 비해 약 14%, 11% 정도씩 증가하였으나 *Centella asiatica*는 대조군 보다 약간 낮았으며(table 1), 3일 후의 세포수에 있어서도 대조군에 비해 황련을 투여했을 때에 많이 증가하였으며, 특히 10⁻⁹g/ml에서 전체 세포수 및 trypan blue dye exclusion 후의 세포 수가 유의성 있게 증가한 것은 상당한 의미가 있는 것으로 받아들여진다(table 4). 황련 농도 10⁻⁹g/ml에서 두 방법 모두 증가한 것은 이 농도에서의 황련이 치은섬유모세포에 대한 세포 독성도 없을 뿐 만 아니라 세포 증식과 활성화, 나아가

서는 치은 조직의 재생까지도 가능함을 추측할 수 있겠다. 또한 3일 후의 cell viability도 약 66%로 대조군 63% 보다 높게 나타나서 이와 같은 가정을 잘 뒷받침 해 주고 있다(table 6). 수종의 생약을 이용한 이전의 연구²²⁾에서 인삼(*radix ginseng*)은 약간의 유의성 있는 증가를 보였으며, 황금(*radix scutellariae*)과 백급(*tuber bletillae*)은 별다른 영향을 못 미쳤으며, 황련과 감초(*radix glycyrrhizae*)는 치은 섬유모세포의 증식에 효과를 나타냈다. 이 연구에서는 창상 치유와 소염 작용 및 지혈 작용에 많이 쓰이는 위와 같은 약재들에 MTT를 처리하여 ELISA reader를 이용하여 세포 증식 정도를 알아보았으며, 그 결과를 바탕으로 본 연구를 하게 되었다. 세포 증식 정도를 측정하기 위해 두 연구에서는 서로 다른 방법을 사용하였으나 황련은 두 가지 방법 모두에서 일치되는 결과를 나타냈다. 이로써 황련은 어느 일정 농도(이전의 연구에서는 10⁻¹⁰g/ml, 본 연구에서는 10⁻⁹g/ml)에서는 치은 섬유모세포의 증식을 증가시킴을 알 수 있었다.

한편 황련의 주 성분인 berberine을 치주인대 세포와 치은 섬유모세포에 투여한 연구²³⁾에서 berberine은 치주인대 세포에서는 10ng/ml의 농도에서만 세포 활성도를 조금 증가시켰을 뿐 그 외의 농도에서는 별 다른 효과를 나타내지 못했으며, 치은 섬유모 세포에서는 실험 3일 째에 1, 10ng/ml 등의 농도에서 유의성 있는 커다란 증가를 가져왔다.

*Centella asiatica*는 외과적 병소나 피부 창상이 있을 때에 사용하는 약재로써 이를 투여

했을 때의 DNA 합성은 대조군에 비해 오히려 감소하였고(table 1), 3일 후에 측정된 cell viability에서도 각 농도별로 대조군에 비해 3-5% 감소한 것으로 보아(table 6) *Centella asiatica*는 치은 섬유모세포의 증식을 증진시키지 못하는 것으로 생각되어진다. 그러나 투여 3일 후의 전체 세포 수 및 dye exclusion 후의 세포 수에 있어서는 DNA 합성과 cell viability 결과와는 다른 경향을 나타냈는데, cell viability에서는 각 농도마다 감소하는 경향이고 세포 수에 있어서는 증가하는 경향인 것은 세포 수 측정시에 문제가 있었던 것으로 여겨진다.

한편 본 연구에서는 황련과 *Centella asiatica*의 상승 효과 가능성을 알아보기 위해 혼합투여를 하여 DNA 합성을 측정하였는데, 2일 후의 합성 정도와 3일 후의 합성 정도가 대부분 모두 크게 감소한 것으로 보아 두 약제의 혼합 투여는 치은 섬유모세포에 좋지 않은 영향을 미치는 것으로 생각된다. 또한 황련 $10^{-9}g/ml$ 에 *Centella asiatica* $1ng/ml$ 을 혼합 투여한 3일 후의 DNA 합성이 크게 증가하였지만, 같은 황련 농도에 *Centella asiatica* $10ng/ml$ 을 투여하고 2, 3일 간 합성을 측정한 결과는 계속 감소한 것으로 보아 이 수치의 의미에 대해서는 앞으로 더 많은 연구가 필요하겠다.

본 연구에서 황련은 치은 섬유모 세포의 세포 증식을 증가시키는 것으로 나타났으며, 이 약제를 치의학 분야에서도 사용할 수 있는 근거를 마련하기 위해 주 성분에 대한 분석과 치주 조직 재생에 중요한 역할을 하는 치주인대 세포에 미치는 영향에 대해서 더 많은 연구가 필요한 것으로 생각된다.

IV. 결 론

한의학에서 창상 치유와 소염 작용에 많이 쓰이는 황련과 외과적 병소나 피부 창상 시

에 쓰이는 *Centella asiatica*(Madecassol, 동국 제약)를 이용하여 이들이 치주조직의 치유 과정과 재생에 관련 있는 치은 섬유모세포의 활성에 미치는 영향을 알아보기 위해 건강한 말치 치근에서 치은 조직을 떼어 내어 세포 배양한 후 [3H]-thymidine을 이용한 DNA 합성 측정과 세포 수 측정 등을 실시하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 황련은 $10^{-9}g/ml$ 에서 치은 섬유모세포의 세포 증식을 증가시켰다.
2. *Centella asiatica*는 치은 섬유모세포의 세포 증식을 감소시켰다.
3. 황련과 *Centella asiatica*의 혼합 투여는 치은 섬유모세포의 세포 증식을 감소시키는 경향이 있다.

참고 문헌

1. Schallhorn, R.G. and Hiatt, W.H. ; Human allografts of iliac cancellous bone and marrow in periodontal osseous defects. II. Clinical observations. J. Periodontol. 43, 67-81, 1972.
2. Drago, M.R. and Sullivan, H.C. ; Clinical and histological evaluation of autogenous iliac bone grafts in humans. Part I. Wound healing 2 to 8 months. J. Periodontol. 44, 599-613, 1973.
3. Bowers, G.M., Schallhorn, R.G. and Mellonig, J.T. ; Histologic evaluation of new attachment in human intrabony defects. A literature review. J. Periodontol. 53, 509-514, 1982.
4. Cole, R.T., Crigger, M., Bogle, G., Egelberg, J., and Selvic, K.A. ; Connective tissue regeneration to periodontally diseased teeth. A histological study. J. Periodont. Res. 15, 1-9, 1980.

5. Terranova, V.P. and Wikesjo, U.M.E. ; Extracellular matrices and polypeptide growth factors as mediators of functions of cells of the periodontium. A review. J. Periodontol. 58, 371-380, 1987.
6. Hanes, P.J. and Polson, A.M. ; Cell and fiber attachment to demineralized cementum from normal root surfaces. J. Periodontol. 60, 188-198, 1989.
7. Gottlow, J., Nyman, S., Karring, T., and Lindhe, J. ; New attachment formation as the result of controlled tissue regeneration. J. Clin. Periodontol. 11, 494-503, 1984.
8. Magnusson, I., Nyman, S., Karring, T., and Egelberg, J. ; Connective tissue attachment formation following exclusion of gingival connective tissue and epithelium during healing. J. Periodon Res. 20, 201-208, 1985.
9. Blumenthal, N.M. ; The use of collagen membranes to guide regeneration of new connective tissue attachment in dogs. J. Periodontol. 59, 830-839, 1988
10. Caffesse, R.G., Smith, B.A., Castelli, W.A. and Nasjleti, C.E. ; New attachment achieved by guided tissue regeneration in beagle dogs. J. Periodontol. 59, 589-594, 1988.
11. Melcher, A.H. ; On the repair potential of periodontal tissues. J. Periodontol. 47, 256-260, 1976.
12. Nyman, S., Lindhe, J., Karring, T. and Rylander, H. ; New attachment following surgical treatment of human periodontal disease. J. Clin. Periodontol. 9, 290-296, 1982.
13. 신민효 ; 臨床本草學, 1986, 南山堂
14. 高木敬次郎 등 ; 和漢藥物學, 제 1판, 1982, 南山堂
15. 生藥學 硏究會 ; 現代 生藥學, 1994, 學窓社
16. 陸昌洙, 金成萬 ; 漢藥의 藥理, 成分, 臨床應用, 1982, 癸丑文化社
17. Hausen, B.M. ; *Centella asiatica* (Indian pennywort), an effective therapeutic but a weak sensitizer
18. Theirs H., Fayolle J., Boiteau P., Ratsimamanga AR. ; L'asiaticoside, principe actif de *Centella asiatica*. Lyon Med. 17, 389-395, 1957.
19. Kiesswetter H ; Erfahrungsbericht uber Behandlung von Wunden mit Asiaticosid. Wien Med Wochenschr. 114, 124-126, 1964.
20. Labeye R. ; Utilisation de l'asiaticoside en radiotherapie. Ann Radiol 5, 891-894, 1962.
21. El-Hefnawi H. ; Treatment of keloids with asiaticoside. Dermatol 125, 387-392, 1962.
22. 유형근, 박경근 ; 수 종의 생약이 치은 섬유모세포에 미치는 영향. 원광치의학, 6(1)181-190, 1996.
23. 신형식, 유형근 ; Berberine이 치주 인대 및 치은 섬유모 세포에 미치는 영향. 원광치의학, 6(1)313-321, 1996

The effect of *Rhizoma coptidis* and *Centella asiatica* extracts on human gingival fibroblasts

Hyung-Keun You

Department of Periodontology, School of Dentistry, Wonkwang University

Periodontal regeneration requires the migration and proliferation of gingival fibroblasts and periodontal ligament cells. These cellular events are influenced and regulated by growth factors and some drugs. The purpose of this study is to examine the effect of *Rhizoma coptidis* and *Centella asiatica* extracts on human gingival fibroblasts. Gingival fibroblasts were primarily cultured from extracted premolar with non-periodontal diseases. Cells were cultured with

α -MEM at 37°C, 5% CO₂, 100% humidity incubator for 2 or 3 days, as a measure of cell proliferation potential, it was examined that the DNA synthesis using [³H]-thymidine incorporation, the cell numbers(with or without dye), and cell viabilities. *Rhizoma coptidis* is increased the proliferation of gingival fibroblasts at concentration of 10⁻⁹g/ml, but *Centella asiatica* is decreased the proliferation at all concentrations. This study demonstrated that *Rhizoma coptidis* is a potential mitogen for human gingival fibroblasts in vitro, and we can expect the usefulness of this drug in periodontal regeneration.

Key words : *Rhizoma coptidis* : gingival fibroblast : cell proliferation : *Centella asiatica* : periodontal regeneration