홍화씨 추출물이 조골모유사세포활성 및 골재생에 미치는 영향

윤동환[1] · 이승철[1] · 김명은[1] · 김은철[2] · 유형근[1] · 김윤철[3], 신형식[1]

[1]원광대학교 치과대학 치주과학교실
[2]구강병리학교실, [3]약학대학

I. 서론

치주질환은 치태내 치주병원균에 의한 감염성 질환이며 외부환경에 노출되는 구강 내 치주조직의 연조직과 그 하부 경조직에 발생하는 만성 염증성 질환으로 병원체에 대해서 숙주의 면역 저항력이 감소될 때 일어난다[1-8].

치주질환에 이환된 치주조직을 치료하기 위해서는 치주질환을 유발하는 원인인자를 제거하여 염증을 억제하며, 면역매개물질의 생산 억제 및 치주조직 세포 활성화에 따른 조직의 재생과정을 유도하는 것이 기본 개념이다[9]. 치주질환으로 상실된 치주조직을 회복하기 위해서 치석제거술, 치근면 활택술, 치근면 처리술, 골이식술, 조직유도재생술등과 같은 다양한 술식을 통한 소실된 백악질, 골, 결합조직을 재생시키는 것이 가장 이상적인 치주치료이며, 이러한 치주조직의 재생을 유도하는 특정세포에 관한 많은 연구가 시도되어져 왔다. 또한 치아를 지지하는 치조골의 기원 세포로 작용하는 치주인대세포가 조골모유사세포(osteoblastic cells)와 조백악세포(cementoblastic cells)로 분화하여 치주질환으로 소실된 치주조직을 재생하는데 중요한 역할을 한다고 알려졌다[10-17].

조골모유사세포는 골기질을 합성하는 간엽세포로서 선조골세포(osteoprogenitor cell), 전조골세포(preosteoblast)등에서 생성된다. 조골모유사세포는 골형성의 주된 세포 성분이며 파골세포에 의한 골흡수 조절자로 작용하는 것으로 알려져 있다. 이러한 조골모유사세포의 증식과 분화에는 많은 인자들이 작용하는데, osteonectin, osteocalcin, osteopontin, bone sialoprotein과 같은 비교원성 단백질은 세포대사의 조절, 기질의 축적, 광물화 골개조를 조절하면서 골기질의 성숙과 석회화에 중요하게 작용한다. Type I 교원성 단백질은 전체 세포외 기질의 90%이상을 차지하며 조골모유사세포에 의해서 합성되어 골양조직에 침착되고 광물화작용에 관여한다. 이러한 교원성 단백질은 비교원성 단백질에 의해 광물화가 일어날 수 있는 주형을 제공하여 골형성의 초기에 작용하며, alkaline phosphatase(ALP)와 같은 골기질은 조골모유사세포의 분화와 골기질의 성숙에 중요한 역할을 한다[18,19].

치조골 기질을 형성하는 조골모유사세포의 분화와 증식은 여러 가지 호르몬과 같은 전신적인 인자, cytokine과 성장인자와 같은 국소적인 인자에 의하여 조절된다[20,21]. 스테로이드 호르몬, 성 호르몬, 성장 호르몬등은 특수 수용체를 경유하여 직접적으로 조골모유사세포의

분화와 증식에 영향을 미친다. IL - 1 α, IL - 1 β, TNF - α, IL - 2, IL - 4, IL - 5, IL - 6, IL - 8, INF - γ와 같은 cytokines은 면역반응과 염증반응을 동반하는 다기능성으로 조골모유사세포의 분화와 증식에 영향을 미치며, 또한 platelet - derived growth factor(PDGF), transforming growth factor(TGF), fibroblast growth factor(FGF), insulin - like growth factor(IGF)등의 성장인자들도 단독 혹은 복합 투여함으로서 조골모유사세포에 영향을 미칠 수 있다[22 - 29].

상기의 다양한 인자와 더불어 손상된 치주조직을 재생시키기 위한 새로운 재료들이 개발되어져 왔으며 최근 수종의 생약제가 치주질환균에 대한 항균작용을 하며 항염 및 치주조직 재생 효과를 나타낸다고 보고되었다. 이러한 생약제는 숙주의 내성증가와 저항성 세균의 발현과 같은 부작용이 적을 것으로 사료되며 이에 대한 임상적 응용에 대한 연구가 진행되고 있다. 대표적인 생약제로서, 후박과 대조 추출물은 항균효과와 IL - 1β 및 prostaglandin E_2 생산과 collagenase의 활동을 억제하고 치은섬유아세포의 활성을 증진시키며 항균작용에 효과적이라고 하였다. *Scutellaria Radix*(황금)과 *Zea Mays L.*은 상피재생, 결합조직 증식, 조골모유사세포의 증식과 분화를 촉진시키며 치주수술 후 *Zea Mays L.*을 투여하면 치은지수, 치아동요도의 감소와 치조백선이 현저하게 개선된다고 보고되었다[30 - 38].

홍화씨는 한의학에서 활혈거여약(活血祛瘀藥)으로 분류되며 국화과에 속하는 1년생 초본식물인 씨앗으로 골절과 골다공증 등의 골질환에 많이 사용되고 있다[39]. 홍화씨에서 골형성과 재생에 작용을 하는 성분으로는 β - carotene, adenosine, tocopherol, cystine, lysine, methionine, arginine, linoleic acid와 다양한 지방산등으로 손상된 치주조직의 염증치료와 재생에 부가적인 치료제로 효과적일 것으로 사료되나 아직까지 과학적인 접근과 보고는 미미하다[40 - 43]. 또한 홍화씨에는 금속이온이 존재하는데 백금성분은 전기적 교류작용을 유발하여 골절시에 조골모유사세포의 증식과 분화를 촉진시켜 골 재생을 촉진하며, 또한 구리성분은 골의 주된 성분인 칼슘을 다양한 골세포와 서로 연결시킨다. 최근 두 등(1997)과 정 등(1998)은 홍화씨가 치주인대세포와 조골모유사세포의 세포활성도에 유의성있는 증가를 보이고 석회화결정 형성을 유도한다고 보고하였다[44, 45].

본 연구에서는 홍화씨 추출물이 골형성과 재생에 미치는 영향을 알아보기 위해서 생체 외 연구로 조골모유사세포에 홍화씨 추출물을 처리하여 세포증식과 ALP 검사를 시행하였고, 생체 내 연구로는 백서의 두개골에 골결손부를 형성한 후 홍화씨 추출물을 경구 투여하여 일반 조직학적 검사 및 골형성과 재생에서 나타나는 TGF - β와 osteonectin을 이용한 면역조직화학적 검사를 실시하였다.

Ⅱ. 실험재료 및 방법

1. 실험재료

(1) 약물의 추출

원광대학교 약학대학에 의뢰하여 홍화씨(Safflower seed) 100g을 분쇄기로 제분하여 10배의 증류수를 넣고 저으면서 추출한 후 가열 여과한 후 rotary evaporator로 농축한 다음 freeze dryer로 동결 건조하여 얻어진 분말을 이용하였다.

(2) 조골모유사세포의 배양

연구에 사용된 조골모유사세포는 임신 19일째의 백서를 마취시킨 후 태생기 쥐의 두개골을 분리해 얻었으며, Hank's balanced salt solution(HBSS)로 세척한 후 1.5㎖의 enzyme solution(0.1% collagenase, 0.05% trypsin, 0.5mM EDTA)을 첨가하여 10분간 교반했다.

위의 과정을 4회 반복하여 마지막에서 얻어진 세포 부유액에 1.5㎖의 ice - cold FBS를 첨가하여 4℃에서 6분 동안 원심 분리하였다. 세포 침전물을 HBSS로 한번 세척 한 후 10% FBS, 1% 항생제가 포함된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM, GIBCO/BRL, USA)으로 현탁시킨 후 100mm culture dish에 분주하고 37℃, 100% 습도, 95% 공기와 5% CO_2의 조건하에서 배양하였다. 세포들은 3일마다 계대 배양하였고, 본 실험에서는 3 - 5계대의 조골모유사세포를 사용하였다.

(3) 실험 동물

실험동물로는 체중 250g 내외의 생후 3개월된 Sprague - Dawly계 백서 24마리를 두 군으로 나누었다. 골 결손부를 봉합한 후 실험군은 홍화씨 추출물을 사료(0.35g/kg/day)에 포함시켰으며 대조군은 홍화씨 추출물을 포함시키지 않은 일반적인 사료로 사육하였다.

2. 실험 방법

(1) 세포증식 측정

3, 4계대 배양한 단일 세포층의 조골모유사세포를 trypsinization한 다음 혈구계수기로 세포수를 세어 24 - well plate의 well당 1×10^4cell이 되도록 세포를 분주한 후 10% FBS가 함유된 DMEM으로 하루 동안 세포배양을 실시하였다. 24시간 경과 후 부착되지 않은 세포를 제거하기 위해 PBS로 1회 세척하였고 홍화씨 추출물을 10^{-3}, 10^{-6}g/㎖의 농도가 되도록 1㎖ 배양액에 생약제를 배지에 섞어 투여하고, 배양액을 첨가한 군을 대조군으로 사용하였다. 처리된 배지는 3일 동안 각각 배양하였다. 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) 250㎕을 각 1㎖의 배지에 첨가한 후 각 plate들을 aluminium foil로 싸서 4시간동안 37℃, 5% CO_2 공기혼합 배양기에서 세포배양을 실시하였다. 세포배양 후 배양액을 제거하고 형성된 formazan 결정을 용해시키기 위해서 200㎕의 DMSO (dimethyl sulfoxide, Sigma Co., USA)를 첨가하여 plate를 잘 흔든 후 ELISA analyzer(Spectra MAX 250, Molecular Devices Co.)로 파장 570nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 실험은 4회 반복 실시하여 세포활성도를 측정하였다.

(2) 알칼리성 인산효소 활성화 분석(Alkaline Phosphatase activity assay)

조골모유사세포를 60㎜ Petri dish에 5×10^4 cell/dish가 되도록 분주한 후, 10% FBS가 첨가된 DMEM으로 1일 동안 37℃, 100% 습도, 5% CO_2 공기혼합 배양기에서 배양하였다. 1일 후 배지를 제거하고 홍화씨 추출물을 처리하지 않은 군을 대조군으로 하여 홍화씨 추출물 10^{-3}, 10^{-6}g/㎖을 첨가한 후, 3일 동안 각각 배양하였다. 일정 배양시간이 지난 후 배지를 제거하고 trypsin - EDTA로 세포를 분리시키고 1500 rpm에서 8분간 원심 분리하였다. 상층액을 제거하고 0.2㎖의 배양액을 첨가하여 현탁하였다. 각 세포 현탁액 0.1㎖에 0.1M glycine NaOH buffer(pH 10.4) 0.2㎖, 15mM pNPP 0.1㎖, 0.1% Triton X - 100/saline 0.1㎖과 멸균된 증류수 0.1㎖을 잘 혼합하여 37℃에서 30분간 배양한 후, 0.1N NaOH를 0.6㎖첨가하였다. 그 후 분광측광기(Beckman DU - 650, USA)로 410㎚의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

(3) 백서 두개골 결손부 치유에 대한 평가

① 두개골 결손부 형성

실험동물을 ketamine HCl(Ketalar, Yuhan Co., Seoul, Korea)을 근육 주사하여 전신마취를 유도하였으며 ether를 이용하여 전신마취를 유지하였다. 통법에 따라 두부 제모와 포타딘을

이용한 소독을 통하여 무균적 수술시야를 확보하였다. 각 실험군과 대조군의 두개골에 골막을 박리하고 round bur(HP-8, SS White Burs, Inc., USA)을 사용하여 5×5㎜ 크기의 골 결손부를 형성한 후 이상적인 치유를 유도하기 위해서 층별 봉합을 시행하고 kanamycin sulfate(Kanamycin, SF Co., Seoul Korea)를 근육 주사하였다.

② 조직학적 관찰

조직검사를 위하여 실험 후 1주, 4주, 8주로 나누어 실험동물을 희생한 후 주위조직을 포함하여 결손부를 채취하고, 10% 중성 포르말린 용액에 2일간 고정하였다. 각각의 표본은 formic acid-sodium citrate방법으로 탈석회화를 시행한 후, paraffin으로 포매하고, 4㎛두께로 조직 절편을 만들어, Hematoxyline-Eosin 염색과 Modified Masson-Trichrome(Goldner's method)염색을 실시하고 광학현미경을 통하여 수술부위의 염증세포 침윤, 신생모세혈관 증식, 섬유화, 파골 및 골모세포 활성, 신생골 형성, 골성숙 정도를 － (음성)에서 ± (경미), ＋ (약양성), ＋＋ (중양성), ＋＋＋ (강양성)까지 5단계로 구분하여 검경하였다. 조직학적 계측은 Masson's trichrome 염색한 조직표본의 현미경 화상을 Image Pro II 영상분석장치(Media Cybernetrics, USA)를 이용하여 신생골의 형태계측 변량을 5부위 이상 측정하였다.

③ 면역조직화학적 관찰

면역조직화학적 염색은 LSAB kit를 이용하였고 조직을 박절하여 Probe on Plus 슬라이드(Fisher, USA)에 부착시켜 슬라이드를 맞대어서 생기는 capillary gap action의 원리를 이용하여 Microprobe System (Fisher, USA)으로 염색하였다. 이미 제작된 파라핀 절편을 탈파라핀화 후 수화시키고 일차 항체인 osteonectin은 1/40, TGF-β는 1/30로 희석하여 30분간 반응시킨 후 이차항체로 anti-mouse IgG를 20분간 처리하였다. aminoethyl carbazole(AEC, Zymed Co, USA)을 이용하여 발색시킨 후 Hematoxyline-Eosin 염색하였다. 검경은 glycerin을 도포한 후 시행하였다. 음성 대조군을 위하여는 일차 항체 대신 생리식염수를 사용하고 동일한 방법으로 염색을 하였다.

Osteonectin과 TGF-β의 발현 정도는 결손부에서 치유된 골과 숙주골을 구분하여 부위에 따른 분포양상을 알아보기 위하여 각 부위를 저배율로 관찰하여 염색 양상이 미만성인가 혹은 특정부위에 국한된 것인가를 판별하고 고배율로 세포의 어느 부위가 양성으로 나타나는지를 관찰하였다. 반정량적 분석을 위하여 저배율에서 염색의 강도가 비교적 강한 부위를 선택하여 염색 정도를 － (음성)에서 ± (경미), ＋

Table 1. Effects of Safflower Seed Extract on Cell Proliferation and Alkaline Phosphatase Activity of

	MTT Assay	Alkaline Phosphatase Activity(μg/μℓ)
Control	3.35±0.17[c]	4.43±0.40[bc]
SSE(10^{-6}g/ml)	3.57±0.21	9.63±1.37[ac]

[a] : Significant difference compared to control group(Distilled Water)($p<0.05$)
[b] : Significant difference compared to 10^{-6}g/ml SSE group($p<0.05$)
[c] : Significant difference compared to 10^{-3}g/ml SSE group($p<0.05$).
SSE : Safflower Seed Extract

Table 2. Effects of Safflower Seed Extract on Histologic Finding of Rat Calvarial Defects

	Control			SSE		
	1 week	4 weeks	8 weeks	1 week	4 weeks	8 weeks
Inflammatory cell	+++	±	±	++	±	±
Angiogenesis	±	±	±	++	±	±
Osteoclastic activity	++	±	±	±	±	±
Osteoblastic activity	±	+	+	++	+	+
Fibrosis in defect	+	++	+++	++	±	±
New bone formation	±	+	++	+	+++	+++
Bone maturation	±	+	+	±	+++	+++

−; negative, ±; rare, +; mild, ++; moderate, +++; severe.
SSE : Safflower Seed Extract.

(약양성), ++ (중양성), +++ (강양성)까지 5단계로 구분하였다.

3. 통계분석

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

Ⅲ. 연구결과

1. 홍화씨 추출물에 대한 조골모유사세포의 세포증식과 ALP 측정

세포증식은 홍화씨 추출물의 두 농도 모두에서 약간씩 증가하였다. 세포 수준에서의 골 광물화 과정을 알아보기 위하여 측정한 ALP는 홍화씨 추출물 두 농도에서 크게 증가하였는데, 특히 10-3g/㎖군은 대조군에 비하여 약 5배 정도 증가하였다(Table 1).

2. 백서 두개골 결손부의 조직학적 소견

(1) 대조군

실험 1주에서는 결손부 내부에 많은 출혈 및 육아조직이 관찰되었고 결손부 변연에서 골모세포의 활성이나 신생골 형성은 미약하게 관찰되었으며 파골세포의 활성은 현저히 나타났다(Fig 1, Table 2).

4주에서는 1주에 비하여 염증세포 침윤이 현저히 감소되었으며 파골세포의 출현도 없고 골결손부 변연과 내부에서 신생골이 관찰되었으며 염증 및 신생혈관은 거의 없는 성숙된 섬유조직으로 신생골을 둘러싸고 있었다(Fig 3, Table 2).

8주에서도 결손부 주위에 염증 및 파골세포는 거의 사라졌으며 골 결손부에 조골세포의 활성은 뚜렷하지 않았으나 신생골 형성이 4주에 비해 증가되어 있다. 결손부는 전체적으로 Masson's trichrome(MT)염색에서 청색의 골조직과 일부 섬유조직으로 채워져 있었다(Fig 5, Table 2).

(2) 홍화씨 추출물 투여 실험군

실험 1주에서는 대조군보다 염증세포 침윤이 적었고 골결손부 주위의 섬유성 결체조직의 성숙 및 섬유화가 많이 보였다. 대조군과는 다르게 골손상부에서 신생골 형성이나 조골세포 활성은 현저하게 많이 관찰되었으며 파골세포 출현도 대조군보다 훨씬 적었다(Fig 2, Table 2).

4주에서는 대조군에서 관찰되는 손상부의 섬유조직이 관찰되지 않고 골조직으로 손상부를

Table 3. Effcts of Safflower Seed Extract on New Bone Area of Rat Calvarial Defects by

Group / Duration	Control	SSE
1 week	123.25±97.91	870.27±450.89*
4 weeks	1016.30±385.97	1963.89±575.50*
8 weeks	1223.87±307.25	3201.87±1050.44*

* : Significant difference compared to control group($p<0.05$).
SSE : Safflower Seed Extract.

Table 4. Effects of Safflower Seed Extract on Expression of TGF-β of RAt Calvarial Defects by

	Bone defect		Adjacent bone	
	Control	SSE	Control	SSE
1 week	±	+	+	+
4 weeks	++	++	++	++
8 weeks	++	++	++	++

−; negative, ±; rare, +; mild, ++; moderate, +++; severe.
SSE : Safflower Seed Extract.

Table 5. Effect of Safflower Seed Extract on Expression of Osteonectin of Rat Calvarial Defects by

	Bone defect		Adjacent bone	
	Control	SSE	Control	SSE
1 week	+	++	++	++
4 weeks	++	++	++	++
8 weeks	++	++	++	++

−; negative, ±; rare, +; mild, ++; moderate, +++; severe.
SSE : Safflower Seed Extract.

채우고 골 자체도 대조군에 비해 성숙한 양상을 보였다. 이물반응 및 염증반응은 거의 없이 대조군과 유사하였으며 골결손부 주위에서 신생골 형성 즉 골전도 현상과 골유도 현상이 혼합되어 뚜렷하게 관찰되었다 (Fig 4, Table 2).

8주군에서도 4주군과 유사하게 이물반응이나 염증세포 침윤은 없었고, 신생골 형성으로 결손부가 모두 채워져 있으며 대조군에서 보이는 섬유결체조직은 없으나 대조군보다 성숙한 골의 양태를 보였다 (Fig 6, Table 2).

3. 백서 두개골 결손부의 조직계측학적 관찰

대조군은 실험 1주에서 신생골 형성면적이 123.25±97.91㎛²이지만 홍화씨 추출물 투여군에서는 870.27±450.89㎛²로 약 7배 가량 신생골 형성량이 많이 관찰되었고, 실험 4주에

는 1016.30±385.97㎛²에서 1963.89±575.50㎛²으로 약 1.9배, 실험 8주에는 1223.87±307.25㎛²에서 3201.87±1050.44㎛²로 약 2.7배 가량 홍화씨 추출물 투여군에서 신생골 형성량이 많이 나타났으며 모든 군에서 통계학적으로 유의하였다(Table 3).

4. 백서 두개골 결손부의 면역조직학적 관찰

(1) TGF - β발현

실험 1주에서, 홍화씨 추출물 투여군과 대조군은 결손부 모두에서 TGF - β의 발현이 적었으나 홍화씨 추출물 투여군에서 약간 많았고 주로 파골 및 조골세포에 발현되었다. 결손부 주위 숙주골에서도 TGF - β가 대조군과 홍화씨 추출물 투여군에서 모두 약양성의 발현을 보였다(Fig 7, Table 3).

실험 4주와 8주에서는 대조군의 숙주골에서 골기질과 골세포와 조골세포에서 TGF - β의 발현이 관찰되기 시작하였으나, 결손부의 섬유결체조직에서는 중등도의 발현을 보였고 홍화씨 추출물 투여군의 골개조 부위에서와 큰 차이가 없었다(Fig 9, 10, Table 4).

(2) Osteonectin발현

실험 1주 조직 소견에서 홍화씨 추출물 투여군과 대조군 모두에서 TGF - β보다는 많은 발현을 볼 수 있었는데 결손부나 결손부 주위 숙주골에서 발현이 중등도로 나타났으며 숙주골의 골세포나 조골세포에서 또는 손상부의 신생골 주위 조골세포에서 발현이 주로 나타나 홍화씨 추출물 투여군에서 대조군보다 많았다(Fig 11, 12).

실험 4주와 8주는 전반적으로 유사한 소견을 보였는데 대조군의 손상부 섬유조직에서도 osteonectin발현이 되었고, 주위골에서도 중등도의 발현을 보였으며 홍화씨 추출물 투여군간의 차이는 미약하였으며, 손상부에서는 신생골로 대체되어 대조군 및 홍화씨 추출물 투여군간에 군간의 차이없이 유사한 양상으로 나타났다(Fig 13, 14, Table 5).

Ⅳ. 총괄 및 고찰

치주질환에 이환된 치주조직을 치료하기 위해서 비외과적 혹은 외과적 치주치료와 부가적인 화학요법제가 이용되어져 왔다. 비외과적 치주치료는 구강양치액의 사용이나 잇솔질과 같은 환자에 의한 자가치료와 치석제거술과 치근면활택술과 같은 전문가에 의한 치료가 있다. 외과적 치주치료는 질환에 이환된 연조직과 하부 치조골을 절제하고 성형하는 방법과 다양한 골 이식재료를 사용한 치조골 재건술이 있으며 치주인대세포의 다양한 분화능력을 이용한 가장 이상적인 치유형태인 조직유도 재생술 등이 있다. 화학요법제로는 다양한 항생제가 이용되고 있으며, 이는 치주질환을 일으키는 원인 세균에 감수성있게 작용하여 염증을 완화시키므로 치주치료 후 치유에 도움을 주며 손상된 치주조직의 재생과 회복에 유용하다.

최근 치주질환의 치료연구는 예로부터 한의학에서 사용되어진 한약제제가 관심의 대상이 되고 있다. 죽염(竹鹽), 길경(桔慶), 황백(黃柏), 형개(荊芥)등은 한방에서 항염제, 살균제, 진통제, 해열제, 면역억제효과로 많이 사용되어져 왔다[32-34]. 홍화씨는 골절, 골다공증, 골형성부전등의 각종 골질환에 탁월한 효능을 보인다고 하였으며 피를 잘 통하게 하고 항염증작용이 있다고 하였다. 홍화씨에 골형성과 재생 작용을 하는 성분으로는 β - carotene, adenosine, tocopherol, cystine, lysine, methionine, arginine, linoleic acid와 다양한 지방산과 금속이온등이 있다. β - carotene은 0.1 - 1μM로 투여시 ALP를 활성시키며 osteopontin의 발현을 증가시키고 adenosine bisphosphate는 hydroxyapatitie와 강한 친화성으로 골 침착을 유도하는 것으로 알려져 있다. Lysine은 골형

성에 필요한 세포외 기질의 교원질형성에서 교차결합을 이루게 하는 성분이며 arginine은 성장호르몬과 nitric oxide synthesis을 조절하여 조골모유사세포의 활성을 촉진시키거나 파골세포에 의한 골흡수을 억제시켜 골개조에 관여한다[40-43].

골의 재생과 형성은 인체내의 호르몬과 국소성장인자에 의하여 조절되는 일련의 복합적인 과정이며 또한 골형성과 파괴의 상호 균형으로 이루어지고 있다. 이러한 균형을 유지하는 기전으로는 신체내에서 칼슘과 인의 균형을 조절하는 호르몬과 국소적으로 골 형성에 있어서 autocrine 또는 paracrine효과를 지닌 성장 인자의 작용으로 유지되고 있다[46-48].

골대사의 기본적인 방법은 골형성(Osteogenesis)을 통하여 기존에 존재하는 분화된 또는 결정된 선조골세포(Osteoprogenitor cell)에 의하여 골이 형성되는 것으로 자가골 또는 골수이식에서 볼 수 있는 방법과 유도자극이 있을 때 미분화된 결체조직이 골형성세포로 분화되어 골 형성을 유도하는 골유도(Osteoinduction)기전이 있으며, 골전도(Osteoconduction)는 직접적으로 골형성을 못하고 자극에 반응하지 않지만 혈관이 증식되게 하고 부복 치환(Creeping substitution)에 의하여 새로운 골형성을 하는 방법이다[49].

세포 역학적인 연구에서 골결절을 형성하고 골재생이 성공적으로 일어나려면; 1) 세포의 여러층을 형성하는 세포 증식단계, 2) 세포가 분화되면서 세포표면의 변화, 3) 기질형성과 성숙, 세포함입과정을 동반한 세포활성, 4) 활성화된 골표면과 성숙된 골세포를 동반한 피질골의 석회화가 일어나야 한다[50].

세포외 골기질은 교원성, 비교원성 단백질로 구성되며 비교원성 단백질 중 ALP은 160kDa glycoprotein의 골세포 표식자로서 조골모유사세포, 전조골모유사세포, 골세포, 골육종세포에서 발현되며 유기인산 에스테르를 가수분해하여 골형성과 재생이 일어나는 부위의 국소적 인산이온의 농도를 증가시킨다[51-55].

본 연구는 홍화씨 추출물이 치조골의 재생과 형성에 주된 작용을 하는 조골세포에 미치는 효과를 조사하기 위해서 조골모유사세포에 대한 세포증식과 ALP를 측정하였고 골조직의 치유증진효과와 골재생에 미치는 효과를 알아보기 위해서 백서의 두개골에 골 결손부를 형성한 후 홍화씨를 경구 투여하여 신생골의 형성정도와 염증반응을 조직학적 및 면역조직학적으로 분석 계측하였다.

조골모유사세포에 홍화씨 추출물을 처리한 본 연구에서 고농도의 홍화씨 추출물인 10^{-3}g/mℓ군에서 대조군과 10^{-6}g/mℓ의 저농도 보다 MTT assay와 ALP 검사에서 유의성 있는 증가를 나타낸다. 이러한 세포활성도의 증가는 초기 세포의 증식단계에서 여러 층을 형성할 수 있다는 것을 나타내고 이는 골결절 형성의 초기에 도움을 줄 것으로 사료되며, 증가된 ALP 합성은 세포외기질에 calcium phosphate를 침착시켜 골형성의 핵 역할을 함으로써 석회화를 유도하여 조골세포의 분화와 성숙에 중요한 기능을 할 것으로 사료된다.

Hosney(1985)등은 Masson's trichrome 염색을 하여 특징적인 골침착선과 유골조직의 형성과 조골세포를 관찰하여 유도 골성장을 평가하였고 기존의 골은 적색으로, 신생골은 조골세포층에 둘러싸인 청색으로 보이며 골내의 청색이 광물화 정도를 나타낸다고 하였는데[56], 본 연구에서도 유사한 실험을 통하여 신생골 형성정도를 평가할 수 있었으며, 조직학적 계측결과 실험 1주에서 약 7배, 실험 4주에는 1.9배, 실험 8주에는 2.7배 가량으로 홍화씨 추출물를 투여한 군에서 대조군보다 신생골 형성량이 많음을 볼 수 있었다.

염증세포 침윤, 파골세포 활성, 조골세포 활성, 골조직의 성숙, 골유도 및 골전도를 병리조직 검사와 면역조직화학 검사로 확인한 결과 홍화씨 추출물 투여시 염증세포 침윤 및 파골

세포 활성은 대조군 실험 1주에 비해 현저히 적었고, 4주 이후에는 군간의 차이가 없었다. 골결손 내부도 대조군의 경우 섬유성 결체조직과 함께 신생골이 4주 이후에 관찰된 반면 홍화씨 추출물 투여군은 섬유조직 형성 없이 신생골로만 이루어져 골개조를 촉진하는 것으로 사료된다. 두개골 결손부내로 혈관과 섬유조직의 침윤 및 성장이 관찰되며, 이런 섬유조직의 유입이나 성숙이 홍화씨 추출물 투여군에 많이 나타나지 않은 것으로 보아 홍화씨 추출물이 섬유모세포에서 섬유조직이 형성되는 기전에 영향을 미치기 보다는 대신 조골세포 활성이나 파골세포 억제에 더 영향을 준다고 여겨졌다. 골유도의 평가에서 홍화씨 추출물 투여시 골의 형성을 자극하고 실험 1주에서 신생골의 형성이 보이면서 정상적인 골조직으로 빠르게 재생되는 과정을 볼 수 있었으나 골전도 측면에서는 홍화씨 추출물 투여군과 대조군간에 큰 차이를 보이지 않았다.

골형성이나 재생에 직접 혹은 간접적으로 작용하는 조절인자로 알려진 것으로는 성장 분화인자(Growth and differentiation factors), 호르몬, 세포의 기질, cytokines 등이 알려져 있다. 골의 성장분화 인자로 알려진 것으로는 IGF-I과 -II, TGF - β, aFGF, bFGF, PDGF, BMP등이 있다[57-59]. 여러 성장인자 중 최근 TGF-β에 대한 관심이 높아지고 있으며, 그 역할에 대하여 활발히 연구되고 있다. TGF-β는 분자량이 25kDa이며, 가장 흔한 근원은 골과 혈소판으로서, 여러 세포에 광범위한 작용을 가지고 있는데 기질 전구세포, 연골세포, 골모세포, 파골세포 등의 증식과 분화에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다[60-63].

본 연구에서도 면역조직화학 검사를 통하여, 홍화씨 추출물 투여군에서 TGF-β발현은 골손상부에서 대조군에 비하여 실험 초기에만 많았으나 인접 숙주골에서는 실험군간에 차이가 없었다. 또한 이런 성장인자의 발현은 주로 조골세포에만 발현되었기 때문에 홍화씨 추출물 투여는 조골세포의 증식에 자극원으로 작용하는 것으로 사료된다. 골형성과 재생과정에는 TGF-β의 증가 뿐만 아니라 골조직의 견고성 유지에 필요한 섬유조직을 합성시키면서 면역염색에서 관찰되는 제1형 교원질이나 osteonectin, osteopontin, bone sialoprotein, diglycan, fibronectin과 같은 비교원성 단백질의 증가가 필요하다. osteonectin은 35-45kDa의 인산화된 glycoprotein으로 조골모유사세포와 모세혈관을 구성하는 내피세포에 의해서 생산된다. 이는 2개의 칼슘결합부가 존재하여 hydroxyapatitie와 제1형 교원질에 매우 높은 친화성을 나타내며 석회화단계에서 핵의 형성을 제공하고 bone morphogenesis와 remodeling에 관여하는 조골모유사세포나 과성장을 하는 연골세포에서 발견된다[60-63]. 본 연구의 osteonectin발현 검사에서 홍화씨 추출물 투여군의 골결손 부위는 실험기간 동안 대조군보다 증가되었으나, 인접 숙주골에서는 별다른 차이가 없었다. 따라서 골손상 초기에 주로 성장인자가 발현됨에 비해 치유과정의 진행에 따라 비교원성 단백질인 osteonectin의 생성이 증가된다는 것을 미루어 알 수 있었다[64.65]. 또한 4주 이후에 홍화씨 추출물 투여군과 대조군 간에 발현 차이가 크지 않은 것은 골결손부가 4주에 이미 신생골로 채워져 조골세포는 거의 없는 상태이고, 골기질도 초기의 형성시기에서 골의 석회화가 일어나는 시기로 전환되었기 때문에 많은 차이를 보이지 않았다고 사료된다.

본 연구결과 홍화씨 추출물은 조골모유사세포의 세포증식과 ALP 합성을 증가시키고, 백서의 두개골 창상부위에서는 골세포에 자극을 주어 미분화 간엽세포에서 조골세포로 분화를 촉진하는 동시에 염증반응 감소 및 파골세포 억제 작용을 하고, TGF-β와 osteonectin의 발현 증가로 신생골의 형성과 성숙을 촉진시켜 골의 형성과 재생 및 치유과정에 우수한 효과가 있음을 알 수 있었다. 앞으로 홍화씨의 임상

적 응용, 장기간의 투여에 따른 기간별, 농도별의 안정성 여부와 더욱 개선된 조직학적 관찰에 대한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

V. 결론

홍화씨 추출물이 골형성에 미치는 영향을 알아보기 위해 조골모유사세포의 세포증식과 ALP 합성 분석, 백서 두개골에 골결손부 형성 후 투여하여 골 대사에 미치는 영향 등을 알아보고자 조직, 세포 및 단백질 수준에서 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 조골모유사세포의 세포증식 검사와 ALP 합성 분석에서 고농도의 홍화씨 추출물(10^{-3}g/mℓ)에서 가장 높은 증가를 보였다($p<0.05$).
2. 염증세포 침윤이나 파골세포 활성은 대조군보다 홍화씨 추출물 투여군에서 골손상 초기에 적었다.
3. 신생골 자체가 4주 이후에는 대조군보다 홍화씨 추출물 투여군에서 빨리 성숙되었다.
4. 골전도는 대조군 및 홍화씨 추출물 투여군간에 큰 차이가 없었다.
5. 조직계측에 의한 신생골 형성 면적은 홍화씨 추출물 투여군에서 대조군보다 실험기간 모두 증가되었으며 통계학적으로 유의하였다($p<0.05$).
6. TGF - β osteonectin에 대한 면역 조직화학적 발현은 골손상부에서 대조군에 비하여 실험 초기에는 홍화씨 추출물 투여군에서 많았으나 인접 숙주골에서는 실험군간에 차이가 없었으며 4주 이후에는 군간에 차이가 없었다.

이상과 같은 소견으로 골 손상시 홍화씨 추출물의 투여는 초기염증 반응 감소 및 간엽세포 증식을 가져와 골유도에 효과가 있는 것으로 밝혀져 치조골 결손부 회복시 임상적 적용이 가능할 것으로 생각된다.

VI. 참고문헌

1. Newman, M,G., Socransky, S.S. : Predominant cultivable microbiota in periodontosis. J Periodont Res 12 : 120 - 128, 1977.
2. Brown, L,J., Loe, H. : Prevalence, extent, severity and progression of periodontal disease. Periodontol 2000 2 : 57 - 51, 1993.
3. Goodson, J.M., Tanner, A.C.R., Haffajee, A.D. : Patterns of progression and regression of advanced destructive periodontal disease. J Clin Periodontol 9 : 472 - 481, 1982.
4. Manson, J.D., Nicholson, K. : The distribution of bone defects in chronic periodontitis. J Periodontol 45 : 88 - 92, 1974.
5. Philistrom, B.L., McHugh, R.B., Oilphant, T.H. : Comparison of surgical and nonsurgical treatment of periodontal disease. J Clin Periodontol 10 : 524 - 541, 1983.
6. Lindhe, J., Westfelt, E., Nyman, S., Socransky, S.S., Haffajee, A.D. : Long - term effect of surgical/nonsurgical treatment of periodontal disease. J Clin Periodontol 11 : 448 - 458, 1984.
7. Socransky, S.S. : New concept of destructive periodontal disease. J Clin Periodontol 11 : 21 - 32, 1984.
8. Manson, J.D. : Bone morphology and bone loss in periodontal disease. J Clin Periodontol 3 : 14 - 22, 1976.

9. Schroeder, H.E., Munzel - Pedrassoli, S., Page, R.C. : Correlated morphometric and biochemical analysis of gingival tis - sue in early chronic gingivitis in man. Arch Oral Biol 18 : 899 - 923, 1973.
10. Schallhorn, R.G., Haitt, W.H. : Human allografts of iliac cancellous bone and marrow in periodontal osseous defects II. Clinical observations. J Periodontol 43 : 67 - 81, 1972.
11, Dragoo, M.R., Sullivan, H.C. : Clinical and histological evaluation of autoge - nous iliac bone grafts in humans. Part I. Wound healing 2 to 8 months. J Periodontol 44 : 599 - 613, 1973.
12. Cole, R.T., Crigger, M., Bogle, G., Egelberg, J., Selvig, K.A. : Connective tissue regeneration to periodontally diseased teeth. A histological study. J Periodont Res 15 : 1 - 9, 1980.
13. Terranova, V.P., Wikesjö U.M.E. : Extracellular matrices and polypeptide growth factors as mediators of func - tions of cells of the periodontium. A review. J Periodontol 58 : 371 - 380, 1987.
14. Hanse, P.J., and Polson, A.M. : Cell and fiber attachment to demineralized cementum from normal root surface. J Periodontol 60 : 188 - 198, 1989.
15. Caffesse, R.G., Smith, B.A., Castelle, W.A., Nasjleti, C.E. : New attachment achieved by guided tissue regenera - tion in beagle dogs. J Periodontol 59 : 589 - 594, 1988.
16. McCulloch, C.A.G. : Progenitor cell populations in the periodontal ligament of mice. Anat Rec 211 : 258 - 262, 1985.
17. Gottlow, J., Nyman, S., Karring, T., Lindhe, J. : New attachment formation as the result of controlled tissue regeneration. J Clin Periodontol 11 : 494 - 503, 1984.
18. Boskey, A.L. : Non - collagenous matix proteins and their role in mineraliza - tion. Bone Miner 6 : 111 - 123, 1989.
19. Robey, P.G., Bianco, P., Termine, J.D. : The cellular biology and molecular biochemistry of bone formation. In Coe, F.L., Favus, M.J., eds. Disorders of Mineral Metabolism. New York, Raven Press, 241 - 263, 1992.
20. Martin, T.J., Ng, K.W., Suda, T. : Bone cell physiology. Endocrinol Met Clin North AM 18 : 833 - 858, 1989.
21. Nijweide, P.J., Burger, E.H., Feyen, J.H.M. : Cells of bone. Proliferation, Differentiation, and Hormonal Regulation. Physiol Rev 66 : 855 - 886, 1986.
22. Piche, J.E., Carnes, D.L.Jr., Graves, D.T. : Initial characterization of cells derived from human periodontia. J Dent Res 68 : 761 - 767, 1989.
23. Oates, T.W., Rouse, C.A., Cochran, D.L. : Mitogenic effects of growth factors on human periodontal ligament cells in vitro. J Periodontol 64 : 142 - 148, 1993.
24. Sporn, M.B., Roberts, A.B. : Transforming growth factor - β : recent progress and new challenges. J Cell Biol 119 : 1017 - 1021, 1992.
25. Basilico, C. Moscatelli, D. : The FGF family of growth factors and onco - genes. Adv Cancer Res 59 : 115 - 165, 1992.

26. Terranova, P.V., Odziemiec, C., Tweden, K.S., Spadone, D.P. : Repopulation of dentin surfaces by periodontal ligament cells and endothelial cells. Effect of basic fibroblast growth factor. J Periodontol 60 : 293 - 301, 1989.
27. Mohan, S. : Insulin - like growth factor binding proteins in bone cell regulation. Growth Regul 3 : 67 - 70, 1993.
28. Blom, S., Holmstrup, P., Dabelsteen, E. : The effect of insulin - like growth factor - 1 and human growth hormone on periodontal ligament fibroblast morphology, growth pattern, DNA systhesis, and receptor binding. J Periodontol 63 : 960 - 968, 1992.
29. Alexander, M.B., Damoulis, P.D. : The role of cytokines in the pathogenesis of periodontal disease. Curr Opin Periodontol 39 - 53, 1994.
30. 이승렬, 정종평, 최상묵, 배기환 : 천연물 추출물의 치주병인균에 대한 항균효과 및 세포독성에 관한 연구. 대한치주과학회지 22 : 515 - 526, 1992.
31. 정종평, 구영, 배기환 : 후박 및 은행엽추출물의 항균, 항염 및 세포활성도에 미치는 영향. 25 : 478 - 486, 1995.
32. 이용무, 구영, 배기환, 정종평 : 후박 및 대조추출 혼합물이 골조직 재생에 미치는 영향. 대한치주과학회지 27 : 165 - 178, 1997.
33. 조기영, 이용무, 최상묵, 정종평 : 생약 추출물이 IL - 1β의 생성 및 활성에 미치는 영향. 대한치주과학회지 25 : 386 - 396, 1995.
34. 양창호, 류인철, 최상묵, 정종평 : 치은섬유아세포와 치주인대세포의 형태와 화학주성에 미치는 대조추출물의 효과에 관한 연구. 대한치주과학회지 25 : 279 - 289, 1995.
35. 이만섭, 임명수, 박준봉 : 치과질환치료에 이용된 한약제에 관한 조사. 경희대논문집 1 : 27 - 35, 1979.
36. 민원기, 이만섭 : Ascorbic acid와 Zea Mays L.의 불검화 정량추출물이 치주염 치유에 미치는 영향에 관한 실험적 연구. 대한치주과학회지 18(2) : 6 - 23, 1988.
37. 최상묵, 한수부, 황광세 : Zea Mays L.의 불검화 정량추출물이 외과적 치주치료후의 치유에 미치는 효과에 관한 임상적 연구. 대한치주과학회지, 19(1) : 73 - 70, 1989.
38. 김종관, 채중규, 조규성, 문의상, 최성호 : Zea Mays L. 불검화 정량추출물의 치주염 치료효과에 대한 임상적 연구. 대한치주과학회지, 21(2) : 225 - 234, 1991.
39. 본초학(本草學). 학국생약교수협의회, 사단법인 대한 약사회. 553 - 555, 1995.
40. Park, C.K., Ishimi, Y. Ohmura, M., Yamaguchi, M., Ikegami, S. : Vitamine A and carotenoids stimulate differentiation of mouse osteoblastic cells. Nutr Sci Vitaminol(Tokyo) 43 : 281 - 296, 1997.
41. Bell, N.H., Johnson, R.H. : Bisphosphates in the treatment of osteoporosis. AADE Ed J 6 : 203 - 206, 1997.
42. Feres - Filho, E.J., Menassa, G.B., Trackman, P.C. : Regulation of lysyl oxidase by basic fibroblast growth factor in osteoblastic MC3T3 - E1 cells. J Biol Chem 271 : 6411 - 6416, 1996.
43. Visser, J.J., Hoekman, K. : Arginine supplementation in the prevention and treatment of osteoporosis. Med

사진부도(I)

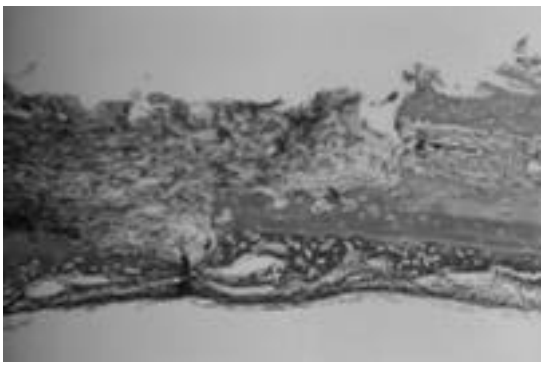

Fig 1. Microphotography of bone remodeling according to healing at 1 week on control groups(modified Masson - Trichrome stain

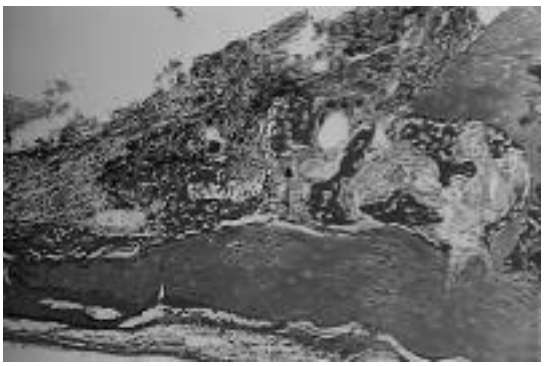

Fig 2. Microphotography of bone remodeling according to healing at 1 week on saf - flower seed extract groups (modified

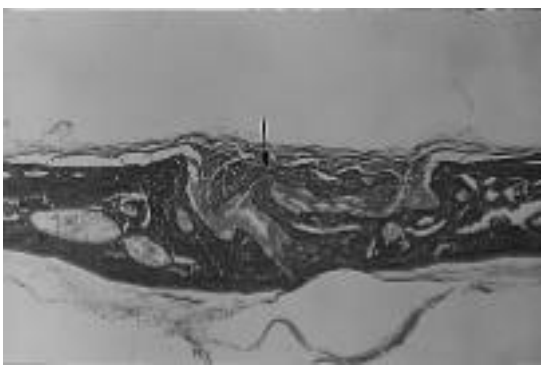

Fig 3. Microphotography of bone remodeling according to healing at 4 weeks on con - trol groups(modified Masson - Trichrome

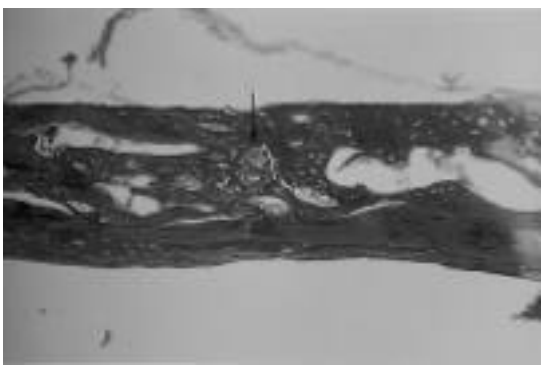

Fig 4. Microphotography of bone remodeling according to healing at 4 weeks on saf - flower seed extract groups (modified

Fig 5. Microphotography of bone remodeling according to healing at 8 weeks on con - trol groups(Hmodified Masson - Trichrome

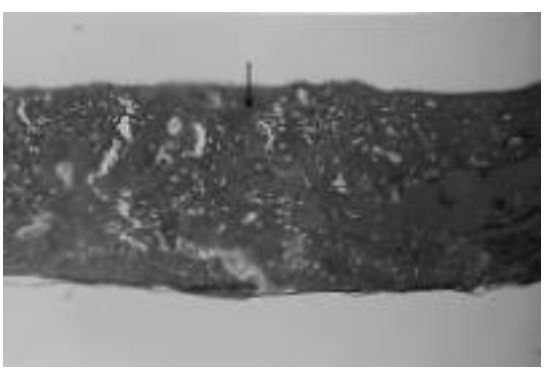

Fig 6. Microphotography of bone remodeling according to healing at 8 weeks on saf - flower seed extract groups (modified

사진부도(Ⅱ)

Fig 7. Immunohistochemistry expression of TGF-β according to healing at 1 week on

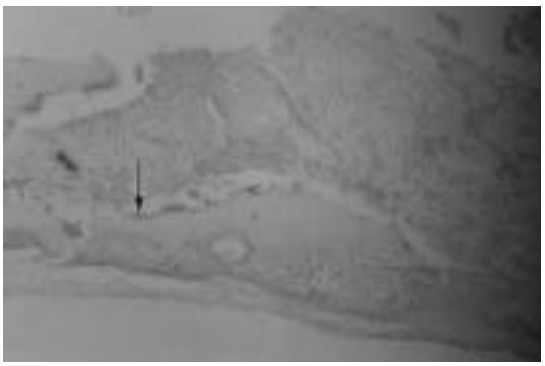

Fig 8. Immunohistochemistry expression TGF-β according to healing at 1 week on safflower seed extract groups(×100).

Fig 9. Immunohistochemistry expression of TGF-β according to healing at 8 weeks on

Fig 10. Immunohistochemistry expression of TGF-b according to healing at 8 weeks on safflower seed extract groups(×40).

Fig 11. Immunohistochemistry expression of osteonectin according to healing at 1 week on control groups(×100).

Fig 12. Immunohistochemistry expression of osteonectin according to healing at 1 week on safflower seed extract groups(×

사진부도(Ⅲ)

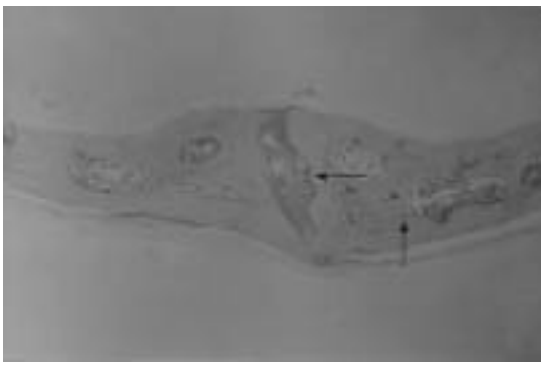

Fig 13. Immunohistochemistry expression of osteonectin according to healing at 8 weeks on control groups(×40).

Fig 14. Immunohistochemistry expression of osteonectin according to healing at 8 weeks on safflower seed extract

Hypotheses 43 : 339 - 342, 1994.
44. 류인철, 이용무, 구 영, 배기환, 정종평 : 홍화 추출물이 치주인대세포, 조골세포 활성도에 미치는 영향. 대한치주과학회지 27(4) : 867 - 882, 1997.
45. 두진수, 강정구, 유형근, 신형식 : 생약제제가 세포활성도에 미치는 효과. 대한치주과학회지, 27(3): 459 - 468, 1997.
46. Canalis, E., McCarthy T, Centrella, M. : Growth factors and The regulation of bone remodeling. J Clin Invest 81: 277 - 281, 1988.
47. Gusthilo, R.B. : Overview of fracture management. In Lane, J. M.(Ed.) : Fracture healing. London, Churchill Livingstone 3 - 21, 1987.
48. Linkhart, T.A., Mohan, S.J.C., Farley, J.C., Farley, J.R., Baylink, D.J. : Skeletal growth factor. In Li, C. H.(Ed) : Hormonal proteins and peptides. New York. Academic Press. 279 - 298, 1984.
49. Lane, J.M., Sandhu, H.S. : Current approaches to experimental bone grafting. Orthop Clin North Am 18 : 213 - 225, 1987.
50. Nefussi, J.R. : Sequential expression of bone matrix proteins during rat calvaria osteoblast differentiation and bone nodule formation in vitro. J Histochem Cytochem 45 : 493 - 503, 1997.
51. Beertsen, W. Theo Van Den Bos. : Calcification of dentinal collagen by cultured rabbit periosteum: The role of alkaline phosphatase. Matrix 9 : 159 - 171, 1989.
52. Bellow, C.G., Aubin, J.E., Heersche, J.N.M. : Initiation and progression of mineralization of bone nodules formed in vitro : The role of alkaline phosphatase and organic phosphate. Bone and Mineral 14 : 27 - 40, 1991.
53. De Bernard, B. : Glycoproteins in the local mechanism of calcification. Clin Orthop 162 : 233 - 244, 1982.
54. Sommer, B., Bickel, M., Hofstetter, W., Wetterwald, A. : Expression of matrix proteins during the development of minerlized tissues. Bone 19 : 371 - 380, 1996.
55. Ingram, R.T., Clarke, B.T., Fisher, L.W., Fitzpatrick, L.A. : Distribution of noncollagenous proteins in the matrix of adult human bone: Evidence of anatomic and functional heterogeneity. J Bone and Mineral Res 8 : 1019 - 1029, 1993.
56. Hosny, M., Sharawy, M. : Osteoinduction in young and old rats using demineralized bone powder allografts. J Oral Maxillofac Surg 43 : 925 - 931, 1985.
57. Kahn, A.J., Partridge, N.C. : New concepts in bone remodelling. An expanding role for the osteoblast. Am J Otolaryngol 8 : 258 - 264, 1987.
58. Mulliken, J.B., Glowacki, J, Kaban, L.B., Folkman, J., Murray, J.E. : Use of demineralized allogeneic bone implants for the correction of maxillocraniofacial deformities. Ann Surg 194 : 366 - 372, 1981.
59. Reichert, T., Stoerkel, S., Becker, K., and Fisher, L.W. : The role of osteonectin in human tooth development: An Immunohistological study. Calcif Tissue Int 50 : 468 - 472, 1992
60. Assoian, R.K., Komoriya, A., Meyers, C.A., Miller, D.M., Sporn, M.B. : Transforming

growth factor beta in human platelets. J Biol Chem 258 : 7155 - 7160, 1983.
61. Frolik, C.A., Dart, L.L., Meyerw, C.A., Smith, D.M., Sporn, M.B. : Purification and initial characterization of a type beta transforming growth factor from human placenta. Proc Natl Acad Sci USA 80 : 3676 - 3680, 1983.
62. Roberts, A.B., Anzano, M.A., Meyers C.A. : Purification and properties of a type beta transforming growth factor from bovine kidney. Biochem 22 : 5692 - 5698, 1983.
63. Ignotz, R., Massague, I. : Transforming growth factor - beta stimulate the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into extracellular matrix. J Biol Chem 261 : 4337 - 4345, 1986.
64. Noda, M., Yoon, K., Prince, C.W., Butler, W.T., Rodan, G.A. : Transcriptional Reulation of Osteopontin Production in Rat Osteosarcoma Cells by Type β Tansforming Growth Factor. J Biol Chem 263 : 13916 - 13921, 1988.
65. Thompson, N.L., Flanders, K.C., Smith, J.M., Ellingsworth, L.R., Roberts, A.B., Sporn, M.B. : Expression of Transforming Growth Factor - β1 in Specific Cells and Tissues of Adult and Neonatal Mice. J Cell Biology 108 : 661 - 669, 1989.

- Abstract -

Effects of Safflower Seed Extract on the Osteoblastic Activity and Bone Regeneration

Dong - Hwan Yoon[1], Seoung - Cheul Lee[1], Myung - Eun Kim[1], Eun - Cheol Kim[2], Hyung - Keun You[1], Youn - Chul Kim[3], Hyung - Shik Shin[1]
[1]Department of Periodontology, [2]Department of Oral Pathology, College of Dentistry, [3]College of Pharmacy, Wonkwang University

The purpose of the present study is to examine the effect of cell proliferation and alkaline phosphatase activity in osteoblastic cells and to compare the bone healing ability of rat calvarial defects between the control group and the safflower seed extract treat - ed group. Osteoblastic cells were obtained from calvariae of a fetal rat. Cells were cul - tured containing DMEM and safflower seed extract(10^{-6}g/mℓ, 10^{-3}g/mℓ) at 37℃ with 5% CO_2 in 100% humidity for 3 days. MTT was performed to examine the viability of the cells, and alkaline phosphatase activity was analyzed to examine the mineralization in vitro. Rat calvarial defects(5×5mm) in 250g Sprague - Dawly were made using round bur. Rats were administrated with safflower seed extract(0.35g/kg/day) for experimental periods. Calvarial defects were studied histopathologically and

immunohistochemically at 1, 4, and 8 weeks. High concentration group(10^{-3}g/mℓ) of safflower seed extract significantly increased in the cell proliferation and alkaline phosphatase synthesis in osteoblastic cells. The infiltration of inflammatory cells and osteoclastic activities were decreased in the safflower seed extract treated group as compared with control group. Bone maturation was accelerated in the safflower seed extract treated group as compared to control group. No difference in osteoinductive process was observed between the control and the safflower seed extract treated group. Immunohistochemical observation revealed that protein expression of TGF-β and osteonectin during early healing phase in the safflower seed extract treated group was slightly increased as compared to control group. These results indicate that safflower seed extract promotes the healing process in bony defect of rat calvariae, and retains a potential applicability as an adjuvant therapeutic modality for regeneration of periodontal bony defect.