대한치주과학회지 : Vol. 28, No. 2, 1998

Drynariae Rhizoma추출물이 백서 두개관세포 및 골수세포 성상에 미치는 영향

임경석* · 권영혁* · 박준봉* · 김성진 · 정세영*** · 박건구*****

***경희대학교 치과대학 치주과학교실, **경희대학교 치과대학 치과약리학교실**
*****경희대학교 약학대학 위생화화교실, ****아산 생명과학 연구소**

I. 서론

치주질환은 치주조직에 염증이 발생하여 조직파괴는 물론 골조직 흡수, 치아동요가 초래되고 궁극적으로는 치아탈락을 야기하는 만성질환이다. 질환의 진행기전은 세균성 치태내에 존재하는 독소와 세균 그 자체로 인해 치은염증이 발생하고 만성화하여 골파괴가 진행된다. 일반적으로 40대이상 성인의 경우 발생빈도가 높고, 자각증상이 발현되는 시기에는 이미 중증이상으로 질환이 진행되어 연조직은 물론 지지골조직 소실이 동반되는 것이 전형적인 증상이다.

연령 증가와 더불어 질환의 지표로 알려진 각종 지수들이 증가하는 경향이 보고되고 있다[1] .

치주치료는 단계에 따라 염증의 제거, 이환부절제, 조직 재생등의 방향으로 시술되어 왔으며, 소실된 치주조직의 회복을 위해 고안된 치료법으로 첫째 Terranova(1987)[2]와 Caffesse(1988)등[3]이 세포부착능 향상을 위한 치근면 처치제의 사용과 골결손부의 재생을 위한 Yuktanandana(1959)[4]가 소개한 시행한 골이식술이 있다. 이 골이식술은 현재도 임상에 시행되고 있으나 술후 이차감염, 치근흡수와 강직, 골공급자로부터의 질환의 전염 가능성 및 신생골 형성의 유도능력등의 문제점이 남아 있다. 세번째로는 Gottlow(1982, 1984)등[5, 6],과 Blumenthal(1988)[7] 및 Magnusson(1985, 1988)[8, 9] 등이 특정 세포의 선별적 이주를 이용한 조직유도재생술식이 있으나 비흡수성 차폐막을 사용한 경우에는 이를 제거하기 위한 2차수술이 요구되는 불편함이 있고 흡수성 차폐막인 경우에는 흡수과정에서 염증의 야기라는 새로운 문제점이 제기되고 있다. 네번째는 질환이 이환되기 이전의 조직위치를 재건하기위한 목적으로 Gantes(1988)[10] 등이 제시한 치관변위판막술이 있으며, 마지막으로는 최근 골원성물질의 개발과 polypeptide growth factor의 임상도입이 연구의 대상이 되고 있는 실정이다[11].

Piche'와 Graves(1989)[12], Graves와 Cochran (1990)[13], Lynch(1992)[14], Kiritsy와 Lynch(1993)[15], Lynch와 Giannobile(1994)[16], Howell등(1996)[17]은 분자 및 세포생물학적인 연구를 도입하여 치유와 재생에 관여하는 폴리펩타이드계 성장인자와 세포분화인자의 기전을 연구한 결과 치주

조직을 포함한 모든 조직의 창상 치유에 효과가 있음을 보고하였다. 그러나 이들 성장인자는 세포성장과 증식에 괄목할 만한 영향을 미치며 암조직에서 다량 발견되어 임상적용을 위한 안정성 연구가 아직 부족하고 부작용에 관해 명확히 규명되어 있지 않기 때문에 아직까지 실용 임상화 단계에는 미치지 못하고 있다.

2개의 경조직이 그 사이에 개재하는 결합조직으로 연결되는 치주조직의 특수한 구조적 특성을 근거로한 치주조직의 이상적인 치유에는 치아와 치조골을 연결하는 치주인대의 재형성이 필수적이므로 치주인대세포가 치면으로 우선 부착이 절대적으로 요구되며 연이어 조골세포의 증식이 필요하다[1, 18, 19]. 이를 위해서는 외과적 시술후 세포가 치주인대를 재형성하는데 영향을 미칠 수 있는 미세환경의 개선과 부작용과 독성이 없으면서도 치주인대세포 및 조골세포의 활성을 증가시킬 수 있는 약제의 개발은 무엇보다도 필요하다.

근래 세포생물학의 발전은 단위세포의 배양이 가능해진 후로 세포화학적, 물리학적 분석법, 세포주기 분석법, 동조배양법 등으로 발전하여 의학 발전 속도가 괄목하게 두드러졌다.

최근 여러 학자들이 골수세포를 배양하여 연골이나 골형성 세포로 분화하여 태생기에 골형성을 유도 한다는 사실을 밝혀내고 이러한 골수유래 전구세포를 간엽세포라 하여 이 세포내에는 수종의 간엽 표현형을 갖고 있다고 보고하였다[20 - 24]. 그리고 이들 간엽 세포는 골조직, 골수, 근육, 결체조직, 인대, 연골 등으로 다양하게 분화 가능하다고 알려지게 되었다. 이러한 결과는 Ogushi(1989)등[25], 박(1992)등[26]에 의해 배양 조건의 변화에 의해 발현되는 세포 표현형에 차이가 나타나는 것으로 보고 되었다.

최근에 들어 치주질환의 치료에 응용 가능한 생약제의 개발에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. Makimura(1993)등[27]은 tea catechin 추출물이 collagenase의 활성을 억제하여 치주염 치료 및 예방에 효과적임을 보고하였고, 양(1994)등[28], 정(1995)등[29]은 한약제인 대조, 황금을 이용한 실험 연구에서 이들 약제가 치주인대 및 골세포의 성장을 촉진한다고 보고하였으며, Chung(1995)등[30]은 Scutellaria baicalensis가 항염 작용 및 치은섬유아세포의 활성 을 촉진한다고 보고 한바 있다.

골쇄보(骨碎補;Drynariae Rhizoma)는 수룡골과에 속하는 다년생 양치식물인 넉줄고사리의 근경을 건조한 약제[32]로 Ma(1995)등[31]은 Drynariae Rhizoma가 조류의 태아골세포의 석회화와 alkaline phosphatase활성도를 증진시키고 proteoglycan의 합성을 촉진한다는 사실을 발표한 바 있다. 또한 중약대사전(中葯大辭典)[33], 동의보감(東醫寶鑑)[34], 본경속소(本經續蔬)[35], 향약집성방(鄕藥集成方)[37] 등의 고문헌에 의해 조혈작용, 관절통 및 치통의 진통작용, 골절시 치유 및 신생골형성 촉진제로 알려진 바 있다[31, 33 - 37].

이와 같은 문헌적 자료를 근거로 저자는 Drynariae Rhizoma 추출물이 치주질환으로 인해 소실된 조직재생 치료제로서의 임상응용 가능성 여부를 판정하여 세포단위의 생물학적 실험을 근거로한 기초자료를 얻고 이를 이용하여 치주조직의 재생과정을 촉진시키는데 효과적인 약제개발을 위하여 본 연구를 실시하였다.

Ⅱ. 연구 재료 및 방법

1. 연구재료 및 시료의 추출

본 연구에 사용된 생약제는 시중 건재상으로부터 구입한 골쇄보(Drynariae Rhizoma)를

재료로 하였고 표준엑기스와 표준분획 제조법에 따라 제조하였다.

총추출물의 제조는 30gm의 골쇄보를 80%의 Methanol을 용액으로 환류냉각하에서 3시간씩 3회를 환류 추출하여 수거된 용액을 농축하여 시료로 하였다. 시료는 감압농축 및 동결건조하여 extract로 제조하여 실험에 사용할 때까지 ependorf tube에 넣어 -20℃의 냉장고에 보관하였다.

본실험에서 세포에 감작시킬 경우에는 설정된 예정일에 ependorf tube에 10% FBS(fetal bovine serum)와 100U/ml penicillin, 100μg/ml streptomycin이 포함된 DMEM과 함께 혼합하여 5분간 vortex 한후 사용하였다.

2. 세포의 배양

(1) 백서 두개관세포의 배양

백서 두개관세포를 배양하기 위해서 무게 100그램 전후의 백서를 Pentobarbital Sodium(Tokyo Industrial Chem., Japan)으로 복강 마취한 후 70% 알콜로 두피를 세척 소독하고 두경부를 탈락시켜 희생하였다. 외과용 가위로 하악을 상악골에서 분리하고 두피를 박리하고 구개관을 분리하고 연조직을 완전히 제거한 후 세절하여 200μ/ml penicillin(Gibco, USA)과 200μmg/ml steptomycin(Gibco, USA) 이 첨가된 Dulbeco's Modified Eagle's Medium(DMEM, Gibco, USA)에 5회 세척한 후 세절한 다음 35mm 세포 배양 접시에 고르게 분산 시킨 후 초기 배양액인 20% Fetal Bovine Serum(FBS)와 100U/ml penicillin, 100μg/ml streptomycin(Gibco, USA)이 포함된 DMEM을 넣고 37 ℃, 습도 100%, 5% CO_2 공기혼합배양기(Vision, Korea)에서 배양하고 2세대가 경과 후 계대 배양액인 10% FBS와 100U/ml penicillin, 100μg/ml streptomycin이 포함된 DMEM으로 3일 간격으로 배양액을 교환하면서 밀생될 때까지 배양했다.

(2) 백서 골수세포의 배양

백서를 Pentobarbital Sodium을 100g 당 5mg을 복강 마취하여 희생시킨 후 대퇴부 근육과 골막을 제거하고 경골을 채집하였다. 경골단을 수술도로 절단한 후 절단면을 통해 초기 배양액을 25G 주사기로 왕복운동을 하면서 골수를 세척하여 세포현탁액을 수거하고 이를 1500rpm으로 5분간 원심분리하였다. 상층액을 제거한 후 세포덩이를 재현탁액으로 만들어 100unit/ml의 penicillin, 100μg/ml의 streptomycin, 0.5μg/ml의 amphotericin-B가 포함된 10% FBS 를 함유하는 DMEM을 넣고 혼합하여 배양하였다.

3. 연구방법

(1) 세포증식속도 측정

24 well 배양접시(Corning Co., USA)에 1×10^4개의 두개관세포와 골수세포를 가진 배양액 0.5ml를 넣은 후 배양기에서 배양하였다. 배양 24시간 후 세포가 배양접시 바닥에 완전히 부착된 상태를 확인한 후 상층액을 제거하고, 실험군에는 Drynariae Rhizoma를 DMEM 1ml 당 0.1, 1, 5, 10, 50μg을 산정하여 주입하고, 대조군에는 계대배양액으로 하여 배양하였다. 배양 1, 3, 7, 14, 21, 30일 후에 배양액을 버리고 Phosphate Buffered Saline(이하 PBS으로 표기)으로 세척하고 0.05% Trypsin/0.02% EDTA(Gibco, USA)로 처리한 후 세포를 배양접시로부터 완전히 분리수거하여 Trypan Blue로 염색하고 도립현미경(Olympus Co., Japan)상에서 혈구세포 측정기

를 이용하여 세포수를 측정하였다.

(2) 총단백질량 측정

초기 밀생상태의 두개관세포와 골수세포를 trypsin 처리하여 그 수를 측정한 후 24 well tissue culture plates(Corning Co., USA)에 각 well 당 1×10^4개 세포를 접종하였다.

대조군에는 Drynariae Rhizoma가 함유되지 않은 상태에서 접종하였으며, 실험군에는 DMEM 1ml 당 0.1, 1, 5, 10μg의 Drynariae Rhizoma를 혼합 접종하고 DMEM에서 2, 4일간 배양한 후 배양액을 버리고 PBS로 3회 세척한 다음 세포층에 lysis완충용액(0.02% Nonodent F - 40)을 1ml 첨가하여 30초간 초음파 분쇄기(Ultrsonic Dismembrator Model - 300, Fisher Co., USA)로 분쇄한 다음 200μℓ 를 취하여 단백질양을 Bradford법에 의해 측정하였다. 골수세포 실험에서는 대조군과 5μg/ml의 농도에서 배양한 실험군을 각각 3, 6일에 측정하였다.

(3) Alkaline Phosphatase 활성도 측정

초기 밀생상태의 두개관세포와 골수세포를 trypsin 처리하여 그 수를 측정한 후 24 well tissue cultire plates(Corning Co., USA)에 각 well 당 1×10^4개 세포를 접종하고 대조군에는 Drynariae Rhizoma가 함유되지 않은 상태에서 접종하였으며, 실험군에는 DMEM 1ml 당 0.1, 1, 5, 10μg의 Drynariae Rhizoma를 혼합하여 접종하고 10% FBS가 함유된 DMEM에서 2, 4일간 배양한 후 배양액을 버리고 PBS로 3회 세척한 다음 세포층에 lysis 완충액(0.02% Nonident F - 40)을 1ml 첨가하여 30초간 초음파 분쇄기(Ultrasonic Dismembrator Model - 300, Fisher Co., USA)로 분쇄한 다음 300ul를 취하여 Bessay 등과 Burch등의 방법에 의하여 Alkaline Phosphatase활성도를 측정하였다. 표준용액으로는 paranitrophenol을 넣고 37℃에서 30분간 반응시킨 뒤 1N NAOH를 넣어 반응을 중단시켰다. 이것을 500㎚에서 Spectrophotometer(Shimatsu Co., Japan)로 흡광도를 측정하여 nmol/30min/mg protein의 단위로 Alkaline phosphatase의 활성치를 나타내었다. 골수세포는 대조군과 5μg/ml농도의 실험군을 배양 3, 6일에 측정 비교하였다.

(4) 석회화 결절의 관찰

백서 두개관세포를 5μg/ml의 Drynariae Rhizoma를 함유한 군과 함유하지 않은 군 그리고 10ng/ml의 혈소판 유래 성장인자(PDGF)가 함유된 군으로 설정하여 배양 3일과 5일에 배양액을 버리고 PBS로 세척하여 10% Neutral formalin solution에 30분간 고정한다. 증류수로 2회 세척하고 Hematoxylin solution으로 10초 염색한 다음 흐르는 물에 10분간 세척한 후 Eosin solution에 수초간 재염색하여 통법에 따라 세척 건조하여 봉입 관찰한다. 또한 석회화 정도를 판정하기 위한 염색 방법으로 칼슘과 chelate반응을 하는 McGee - Russel의 Alizarin red S염색을 하였다. 10% Neutral formalin solution에 30분간 고정한후 세척하여 Alizarin red S 용액에 30초 염색하고 여과지로 염색액을 제거한 후 통법에 의하여 탈수하고 Xylene에 처리하여 봉입한다. 이때 칼슘염은 오렌지 혹은 붉은 색조로 농염된다. 도립현미경하에서 관찰한 후, 1.5×1.5 cm^{2}의 격자내의 염색된 결절수를 측정 비교하였다.

Ⅲ. 연구 성적

1. 세포의 증식속도

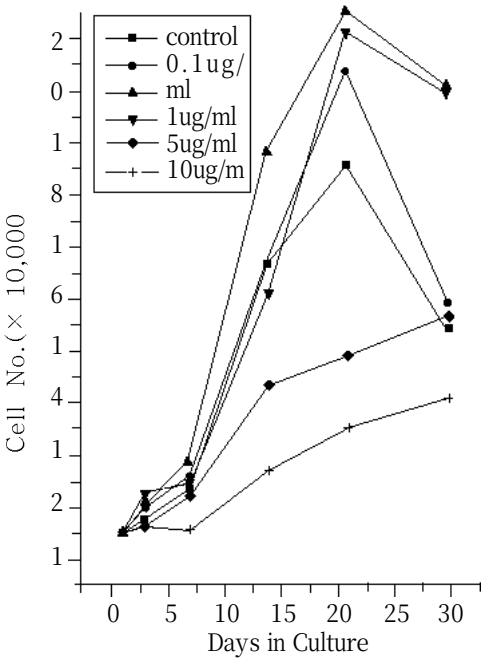

그림 1 The effect of the Drynariae Rhizoma on the proliferation of rat calvaria cells

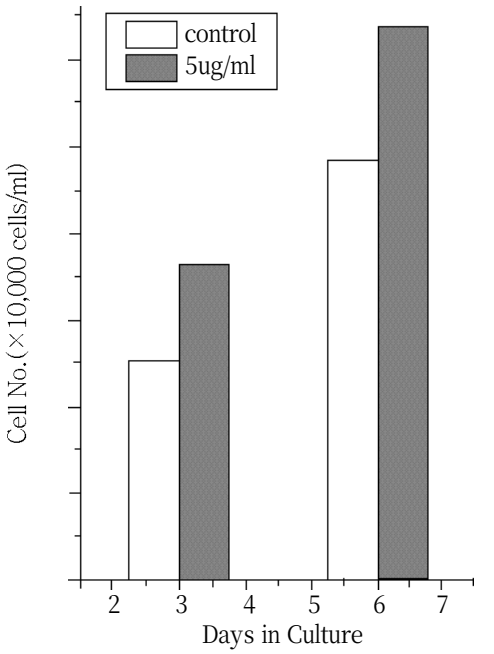

그림 2 The effect of Drynariae Thixpozoma on the proliferation of rat bone marrow cells

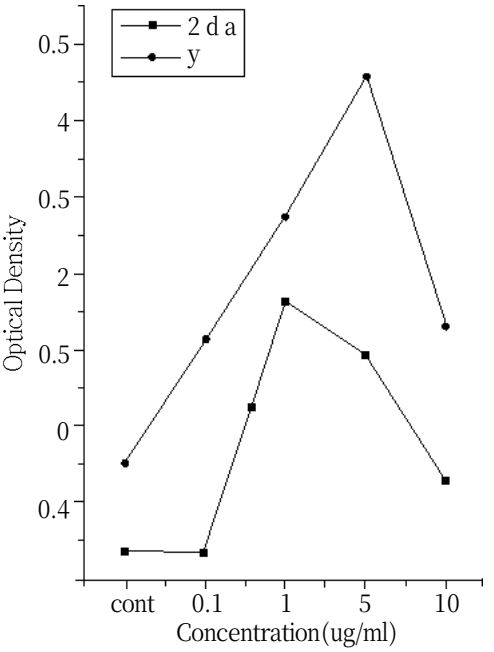

그림 3 Protein determination of rat calvaria cellis treated with the extract of Drynariae Rhizoma

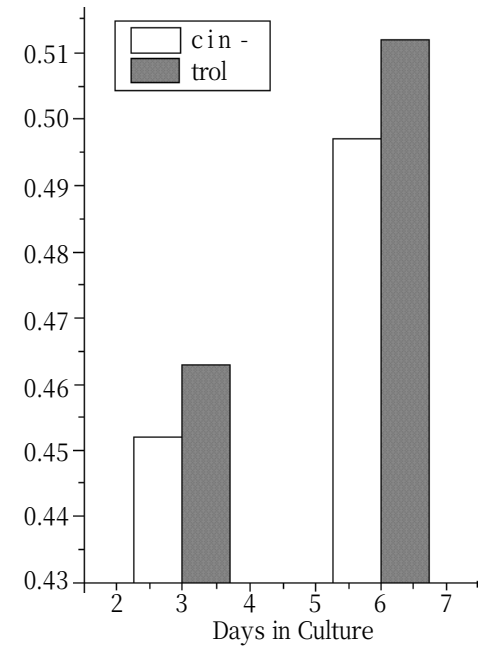

그림 4 Protein determination of rat bone marrow cell treated with the extract of Drynariae Rhizoma

배양한 백서 두개관 세포를 Drynariae Rhizoma 추출물을 넣지 않은 대조군과 ml당 0.1, 1, 5, 10, 50 μg을 접종 배양한 실험군의 세포 증식률을 배양 1, 3, 7, 14, 21, 30일에 측정하여 비교하였다. 배양 7일까지는 세포수의 증가가 다소 완만하였고 7일 부터 세포수가 증가하기 시작하여 21일에 최대의 증가를 보였다. 초기 접종 세포수는 1.0×10^4cells/ml이었으나, 대조군의 경우 7일과 21일에 각각 2.7×10^4 cells/ml, 15.2×10^4cells/ml로 세포수가 증가하였다.

5μg/ml이하의 농도의 Drynariae Rhozoma 추출액을 투여한 실험군에서는 대조군에서보다 세포의 증식이 증가하였는데, 1μg/ml투여군은 7일과 21일에 3.8×10^4cells/ml, 21.0×10^4cells/ml 로, 5μg/ml두여군은 3.1×10^4cells/ml, 20.0×10^4cells/ml로 증가하였다. 반면 10μg/ml과 50μg/ml투여군에서는 21일에 각각 7.7×10^4cells/ml, 4.9×10^4cells/ml 로 대조군보다 낮은 증식률을 보였다(그림 1).

골수 세포를 배양하여 대조군과 5μg/ml의 Drynariae Rhizoma추출액을 투여한 실험군과 3, 6일에 세포수를 측정 비교하였다. 초기 세포수는 2.0×10^4cells/ml이었으나, 3일에 대조군, 실험군이 각각 2.5×10^4cells/ml, 3.7×10^4cells/ml이었고 6일에는 대조군, 실험군이 각각 4.8×10^4cells/ml, 6.4×10^4 cells/ml로 실험군에서 세포의 증식이 많이 일어났다.

Rhizoma추출액을 투여하여 배양한 세포군이 세포의 증식이 많이 일어나는 것으로 보아 이 약제가 세포의 성장에 영향을 갖는 물질을 함유하고 있다고 보여 진다(그림 2).

2. 총단백질양

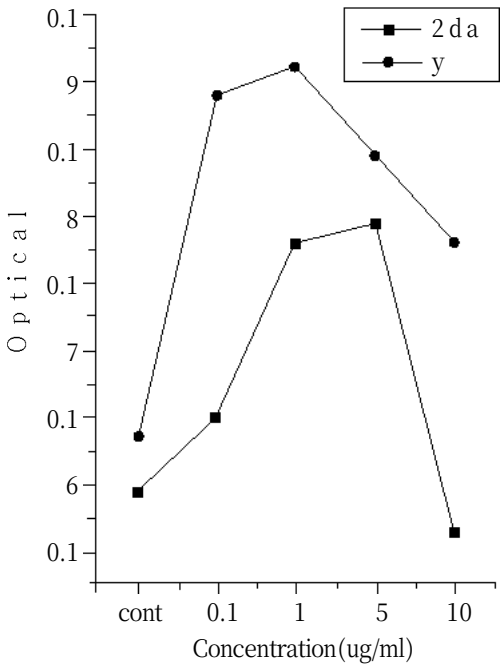

그림 5 Alkaline phosphatese activity of rat calvaria cell treated with the extract of Drynariae Rhizoma

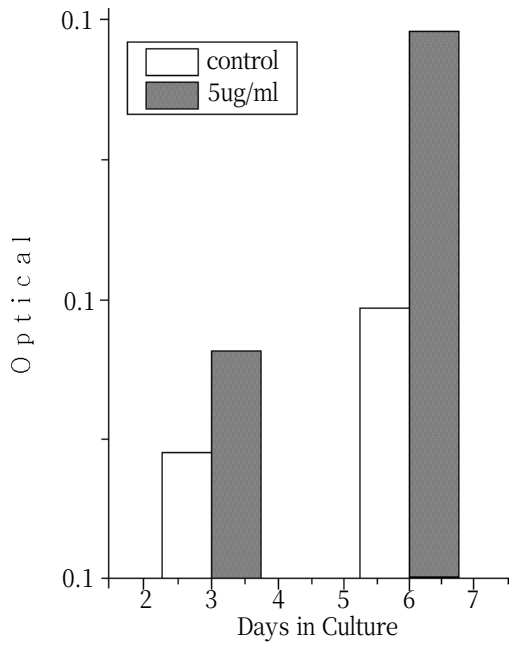

그림 6 Alkaline phosphatase activity of rat bone marrow cells treated with the extract of Drynariae

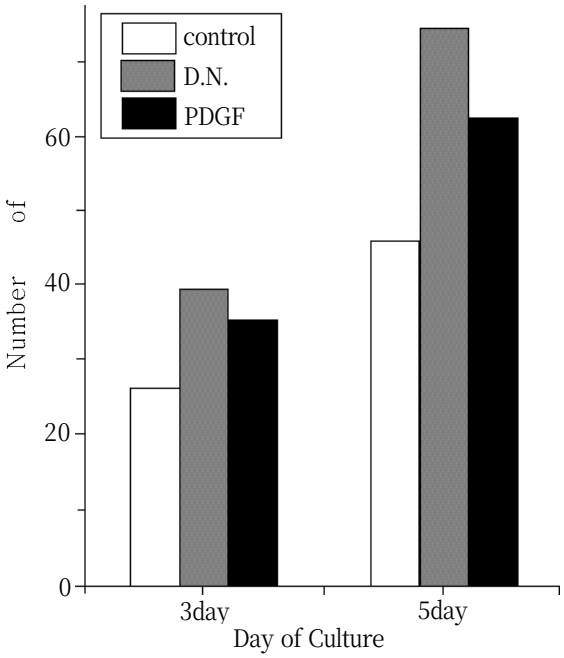

그림 7 The effect of Drynariae Rhizoma on the nodule of formation

두개관세포를 ml 당 0.1, 1, 5, 10μg의 추출액을 투여한 실험군과 대조군과 배양 2, 4일에 측정한 단백질양은 실험군에서 높게 나타났다. 배양 2일에 대조군과 실험군 (0.1, 1, 5, 10)에서 각각 0.407, 0.406, 0.473, 0.459, 0.426였으며, 4일에는 각각 0.431, 0.460, 0.495, 0.536, 0.471로 나타났고 5μg/ml 투여군이 총 단백질양이 최대로 나타났다(그림 3).

골수세포를 대조군과 5μg/ml투여군을 실험군으로 배양하여 단백질양을 측정한 결과 3일에 대조군, 실험군이 각각 0.451, 0.463이었고 6일에는 각각 0.497, 0.512으로 실험군이 단백질 합성양이 많아 Drynariae Rhizoma 추출액을 투여할 때 세포의 단백질합성능이 높은 것으로 나타났다(그림 4).

3. alkaline phosphatase의 활성도

두개관세포의 alkaline phosphatase 활성도는 배양 2일에 대조군, 0.1, 1, 5, 10μg/ml투여군이 각각 0.119, 0.130, 0.156, 0.159, 0.113로 10μg/ml투여군을 제외하고는 실험군이 높은 활성도를 보였고, 4일에는 각각 0.127, 0.178, 0.181, 0.169, 0.165으로 실험군이 높았다(그림 5).

골수세포 실험에서 대조군과 5μg/ml를 투여한 실험군의 활성도는 3일에 각각 0.1489, 0.1563으로 6일에는 0.1594, 0.1790로 실험군이 대조군에 비하여 전반적으로 높은 alkaline phosphatase의 활성도를 보였다(그림 6).

4. 석회화 결절의 관찰

도립 현미경하에서 석회화 결절의 형성을 관찰하였다. 결절은 원형으로 주위에 세포가 밀집되어 있었으며, 결절 중앙부위가 농염되고 주위로 연하게 염색되었다. 1.5×1.5 cm의 장방형 격자를 이용하여 각 군의 결절수를 비교한 결과 대조군은 배양 3일에 26.3개였으며, Drynariae Rhizoma 투여군은 39.5, PDGF 투여군은 35.4개로 나타나 Drynariae Rhizoma 투여군의 결절형성이 많았으며, 5일에도 각각 46, 74.5, 62.5개로 나타나서 Drynariae Rhizoma가 배양세포의 석회화 결절 형성에 대조군 뿐만 아니라 PDGF군보다도 많은 수의 석회화결절이 나타났다(그림 7).

Ⅳ. 총괄 및 고찰

치주인대는 인체의 타부위에서는 발견할 수 없는 높은 경도의 경조직 즉 백악질과 치조골의 사이에 존재하는 치밀한 결합조직으로 치아를 경조직인 치조골에 연결하고 있을 뿐만 아니라 다양한 세포들로 구성되어 복합적인 잠재기능을 가지고 있어 그 해부학적 특성으로 인

해 소실된 조직의 재생을 위한 임상적 환경설정이 복잡하다.

치주질환은 부착치은의 소실과 함께 치주낭 형성과 지지조직인 치은결합조직, 백악질, 치주인대 그리고 치조골의 파괴를 수반하고 임상적으로 증상이 뚜렷하지 않음으로 인해 내원시 대부분 중증이상으로 진행되는게 일반적이다.

치조골내에는 조골세포와 파골세포가 동시에 존재하며 조골세포의 작용이 증가하거나 파골세포의 작용 능력이 감소하는 경우 신생골의 형성이 시작된다. 치조골은 치주질환으로 인하여 소실되기도 하며, 매식치 시술시 많은 양의 골조직이 필요하기 때문에 조골기능은 경우에 따라 증강하여야 할 필요가 있다.

최근까지 알려진 치주질환의 치료법은 다음과 같다, 첫째 치은 연조직으로 부터의 증식된 세포들이 치근면으로 용이하게 이주, 부착이 증진되도록 치근면 자체를 특정한 약물로서 처리하는 방법이다. 이때에 주로 사용된 약제는 구연산이나 테트라싸이클린 그리고 fibronectin과 같은 치근면 처리제이다. 치근면 처리제는 치근면을 탈회하여 상아세관의 콜라젠을 노출시키는 현상과 치근표면의 세균들을 제거하거나 줄이는 작용을 근거로한 술식이었다[2, 3].

둘째로는 Teflon이나 콜라젠 혹은 polylactic acid membrane 과 같은 생체내에서 비분해 혹 분해되는 차폐막을 사용하여 파괴된 조직결손부에 특정 세포를 선별적으로 이주, 증식시켜 결손부를 보충하게 하는 조직유도재생술의 도입이다[5 - 9].

셋째는 그들 자체로는 생물학적 물성을 가지지 않으나 인접조직으로부터 소요되는 신생조직 성장에 충진제(filler) 혹은 비계역할을 하는 hydroxyapatite나 β - Tricalcium phosphate, natural coral, bioglass등의 골전도물질의 사용이다[38 - 40].

네 번째로Garrets(1988)등[41]은 탈회동결건조골이나 골혼화 및 골수등, 숙주의 결체조직 혹은 골세포를 자극하거나, 생활성 골형성세포를 제공하는 골유도물질 혹은 골원성 물질을 활용하였다.

그리고 마지막으로는 Gantes(1988)등[10]이 제안한 노출된 치근면을 피복할 목적으로 임상술식 자체를 개선하여 조직 재생을 도모하는 치관변위판막술을 열거할 수 있다.

그러나 최근 polypeptide growth factor 중 platelet - derived growth factor (PDGF)에 관한 연구에서 Pich와 Graves (1989)[12]는 골유래세포 배양시 PDGF 를 첨가한 경우 세포의 증식율이 촉진되었다고 보고하였고, Rutherford(1992)등[42]은 치수, 치은 및 치주인대로부터 유래된 섬유아세포를 대상으로 PDGF의 효과를 규명한 실험에서 각 세포의 증식에 유효하다고 보고하였다. 상기 연구를 근거로 PDGF와 insulin - like growth factor가 치주조직재생에 많은

가능성을 제시되기도 하였다[11, 14 - 16, 43]. 그러나 이들 성장인자는 대부분의 인체를 구성하는 전반적인 섬유아세포의 성장과 증식에 괄목할 만한 영향을 미치므로 특정조직의 재생에는 임상시술과정에 고도의 기술을 요하게 된다. 또한 각종 종양조직에서 다량 발견되어 임상적용을 위한 안정성 연구가 부족하고 부작용에 관해 명확히 규명되어 있지 않기 때문에 아직 연구단계에 있는 실정이다.

따라서 아직 치주조직재생을 위한 획일한 치료법은 없는 상태이며 각종 외과적 수술후 치조골과 백악질 사이의 결합조직인 치주인대의 신속한 증식과 결손된 골조직의 재생이 완전이 이루어질 수 있도록 부작용과 독성이 없으면서 치주인대세포 및 조골세포의 활성을 증가시킬 수 있는 약제의 개발은 무엇보다도 필요하다.

본 연구에 사용된 골쇄보는 수룡골과 즉 고사리과(Polypodiaceae)에 속하는 다년생 양치식물인 넉줄고사리의 근경을 건조한 약제이다. 중약대사전(中葯大辭典)[33]에 의하면 골쇄보(Drynariae Rhizoma)는 신장을 튼튼하게 하는 약물로 조혈 및 지혈을 목적으로 사용하는데 관절통, 치통 등을 치료하는 것으로 알려져 있다. 한의학적으로 신장은 골화과정에 가장 중요한 역할을 하는 장기로 분류되어 신장기증의 강화는 조골작용의 기본이 된다는 원리에 근거를 두고 사용되기도 한다.

동의 보감(東醫寶鑑)[34]에는 직접 치주질환 치료제로 사용한 바 치아의 동요와 출혈이 있는 경우에 환부에 직접 문질러서 견고하게 하며 동통을 완화한다고 기록되어 있다. 또한 수분을 많이 함유하는 성질이 있고 속을 견고하게 한다는 내용으로 골조직의 성장과 관련이 있으리라고 사료된다. 또한 골쇄보는 신장, 관절을 포함한 골, 치주염의 증상이 있는 치아 질환에 사용한다고 기록되어 있다. 그 효과로 치은출혈이 없어지고 동요도가 소실되어 통증이 사라진다고 하였다.

특히 고대중국 의서인 본경속소에 기록된 바 Drynariae Rhizoma는 강한 생명력을 지녀서 뭉친 피(어혈)를 잘 흐르게 한다하여 골절을 포함한 창상치유에 사용하면 효과가 있다고 전한다.

골쇄보는 지혈 작용이 우수하고 손상된 부위의 치유를 촉진하여 골절시 신생골의 형성을 유도하는 약물로 본경속소(本經續蔬)[35]에 전하고 있다.

상기 한의학의 문헌적 내용[31, 33-37]을 종합하여 보면 골쇄보는 치주질환 치료제로 한방에서 이용한 약제이며, 그 중에서도 골조직 재생과 관련한 약제로 사료되어 본 연구의 재료로 선정하였다.

본 연구는 생약 추출물이 갖는 치주 조직 재생 작용의 메카니즘 연구에 기초가 될 것이며, 생약 추출액중 소량의 물질로도 효과적인 재생과정을 촉진 시킬 수 있는 물질의 개발을 위해 시도되었다.

본 연구의 긍국적인 목적은 조골세포의 석회과정에 대한 기전 확인과 소실된 지지골조직 재생방법의 개발을 위한 기초적 자료를 얻기 위하여, in vitro 상에서 증식분화된 경골 골수세포를 이용하여 석회화 과정을 규명하고, 특수한 해부학적 구조를 지닌 치주조직의 이상적인 조직재생을 도모하기 위하여 치주조직의 구성세포를 대상으로 세포배합율의 변화에 따른 석회화과정에 영향을 규명하는데 그 목적이 있다.

연구방법으로는 먼저 각종 문헌의 자료를 중심으로 구강 질환에 이용되는 천연물을 조사하여 치주조직 재생효능성이 있다고 예상되는 약재를 선정하고 이들의 추출물을 얻어 in vitro 실험을 통해 그 효과검증을 시행한다.

최근에 들어와 Bruder와 Caplan(1989)등[20]을 비롯한 여러 학자들이 골수세포를 배양하여 연골이나 골형성 세포로 분화하여 태생기의 골형성을 한다는 사실을 밝혀내고 이러한 골수유래전구세포를 mesenchymal stem cell이라 하고 이 세포는 배양조건의 변화에 의해 발현되는 세포표현형에 차이가 있어 수종의 간엽 표현형을 갖고 있다고 보고하였다. 그리고 Ogushi와 Caplan(1989)[25]은 이들 mesenchymal stem cell은 다양한 조직으로 분화가 가능하다고 발표하였다. 이와 같은 세포의 분화기능을 분석하기 위해 골수세포를 이용 in vitro 실험을 실시하였다.

조직재생의 세포이용 연구과정에서 많은 학자에 의해 단위세포의 배양이 가능한 후로 Cloning 이 가능해졌다는 사실은 세포의 화학적, 물리학적 분석법, 세포주기의 분석법, 동조

배양법등으로 발전하여 왔다. 세포배양법의 특징은 인간조직의 실험이 가능해졌다는 중요한 의미를 갖는다. 과거 예상하지 못했던 분야의 연구가 가능하여 특히 세포유합기술은 2 종 세포의 잡종세포(Hybrid)의 형성을 가능하게 하였고 염색체지도라든가 유전자 발현기전의 해석, Hybridoma 형성에 이용되고 있다. 최근의 유전자도입기술(Transfaction)은 유전자의 동정, 그 기능의 해석, 유전자 발현기전의 설명등 분자유전학의 중요한 연구 수단이 되었다[22, 44, 45].

치의학 분야에서도 세포생물학의 발전은 연구방법론과 정확한 기전들의 규명에도 많은 기여를 하여왔다. 서 (1991)[47]등 과 Ohshima(1988)[48]등은 인간의 배양 치은섬유아세포와 치주인대세포의 생화학적 성상을 비교검토한 in vitro 연구에서 치주인대세포가 높은 alkaline phosphatase activity를 나타낸다고 보고 하였고, 原田(1992)[49]은 토끼의 치주인대세포가 in vitro 상에서 Alizarin red에 농염되는 석회화물질을 형성하는 것으로 보고 하였다. 또한 Melcher 등(1986, 1987)[50, 51]은 치근막인대세포를 골기질 상및 상아질 기질상에 배양하면 신생골양조직이 형성된다고 보고하고 있다.

본 연구에서 골수세포를 대상으로 실험한 이유는 Nojima(1990)[52]등과 Arceo(1991)[53]등 일부 학자들이 치주인대세포를 골원성섬유아세포 또는 osteoblastic fibroblast라고 명명한데서 그 원인이 있다. 즉 치주조직의 주구성세포인 치주인대세포는 섬유아세포의 성격을 지니고 있고 또 치조골 재형성 능력에 대한 연구를 근간으로 하였기 때문이다. 최근에 들어와 여러 학자들이 골수세포를 배양하여 연골이나 골형성 세포로 분화하여 태생기의 골형성을 한다는 사실을 밝혀내고 이러한 골수유래전구세포를 간엽세포라 하고 이 세포내에는 수종의 간엽 표현형을 갖고 있다고 보고하였다[20-24]. 그 리 고 Caplan (1990)[20]과 Nakahara(1990)[44]는 이 간엽세포가 골조직, 골수, 진피, 지방조직, 근육, 결체조직, 인대, 건, 연골등으로 다양하게 분화가능하다고 발표하였다.

이러한 결과는 Ogushi(1989)[25]등과 박(1992)[26]등 일부 학자들이 배양조건의 변화에 의해 발현되는 세포표현형이 차이가 나는 것으로 보고 하였다.

조골세포의 기원이 되는 두개관세포와 골수세포를 시험관에서 배양하고 Drynariae Rhizoma를 생약으로부터 추출하여 예비실험을 통해 설정된 약제의 농도를 적절하게 희석하고 이를 세포배양액에 혼합하여 양 세포를 배양하였다. 세포에 대한 Drynariae Rhizoma의 영향 평가는 세포의 증식속도측정과 총단백질 형성량의 측정, alkaline phosphatase활성도 측정 및 궁극적인 석회화 결절형성의 확인 등의 과정으로 진행하였다.

본 연구에 나타난 세포의 증식속도는 다음과 같다. 배양한 백서 두개관 세포를 Drynariae Rhizoma 추출물을 넣지않은 대조군과 혼합배양한 실험군의 세포 증식률은 배양 21일에 최대의 증가를 보였다(그림 1). 골수 세포인 경우 대조군과 5μg/ml의 Drynariae Rhizoma추출액을 투여한 실험군과 3, 6일에 세포수를 측정 비교 하였다(그림 2). 백서두개관세포의 증식속도는 배양 21일까지는 약제의 농도와는 무관하게 증가하는 양상을 보였다. 그러나 배양 30일째에서는 대조군도 세포수의 감소추세를 나타내어 배양기내에 밀생상태까지 증식된 것으로 생각된다. 약제가 포함된 경우에는 5μg을 함유한 경우에 가장 높은 증식율을 보였고 10μg인 경우에는 증가폭이 대조군보다도 낮았다. 이는

고농도의 약제가 세포에 독성을 미쳤기 때문으로 생각된다.

골수세포인 경우 Drynariae Rhizoma추출액을 투여한 군에서 세포의 증식이 많이 일어나는 것으로 보아 본 약제가 세포의 성장에 영향을 갖는 물질을 함유하고 있다고 보여진다.

본 연구에 나타난 총단백질 형성능은 다음과 같다. 두개관 세포에 약제 추출액을 투여한 실험군이 대조군에 비해 배양 2, 4일에서 단백질양은 실험군에서 높게 나타났으며 5 ㎍/ml 투여군이 총단백질양이 최대로 나타났다(그림 3). 골수세포인 경우도 대조군에 비해 실험군이 전반적으로 단백질 형성능이 높은것으로 나타났다(그림 4). 이와같이 총단백질 형성량이 Drynariae Rhizoma 투여군에서 더 높게 나타난 것은 조직재생과정에 본 약제가 영향을 미쳐 더 우수한 재생능력이 있다는 것을 의미한다.

본 연구에 나타난 alkaline phosophatase활성도의 결과는 다음과 같다. 두개관 세포의 alkaline phosphatase 활성도는 Drynariae Rhizoma 추출액 투여군이 10μg/ml 투여군을 제외하고는 높은 활성도를 보였고 4일에서도 실험군이 높게 나타났다(그림 5). 골수세포인 경우 역시 실험군이 대조군에 비하여 전반적으로 높은 활성도를 보였다(그림 6). Ma등[32]은 Drynariae Rhizoma가 조류의 태아골세포의 alkaline phosphatase활성도를 증진시키고 proteoglycan의 합성을 촉진한다는 사실을 발표한 바 있어 동일한 경향을 확인할 수 있었다. alkaline phosphatase는 석회화가 형성되는 부위의 국소적 인산이온농도를 증가시키는 효소로 세포외기질에 calcium phosphate를 침착시킴으로서 석회화를 유도하는 기능을 갖는다[54, 55]. De Bernard(1982)[56]는 Alkaline phosphatase가 석회화가 이루어지는 부위에서 인산이온 농도를 증가시켜 단백질을 인단백질로 전환하고 칼슘결합 성향을 갖음으로서 인단백질이 석회화의 핵으로서의 역할을 한다고 주장하였다. 따라서 alkaline phosphatase의 활성도가 증가된다는 것은 석회화가 촉진된다는 사실을 입증하는 지표가 될 수 있다.

본 실험에서 나타난 석회화 결절형성능의 관찰은 배양된 세포에 조건배양액을 투입한 후 배양 3일과 5일에 도립 현미경하에서 형성된 석회화 결절수를 측정하였다. Bellows (1985, 1986)[57]는 백서의 두개관으로부터 골세포를 배양하여 glucocorticoids의 투여가 골수세포의 석회결정형성에 중요한 역할을 한다고 보고하기도 하여 석회물질 결정에 여러 요인이 작용함을 제시하였다. 배양액 결정에 있어 in vitro에서 형성된 골양조직은 유기질내에 포함된 phosphate ion의 에 의해 광물화(mineralize)되므로 적당한 농도의 phosphate ion이 필요하다. 이는 생체내에서 인의 농도가 증가하면 골화가 촉진된다는 선학들의 연구보고를 근거로 β-Glycerophosphate를 배양액에 포함하였다[22, 44, 45, 46]. 본 연구에서도 선학들이 제시한 바 대로 배양액에 dexamethasone을 포함시켜 석회화결절 형성을 확인하였다.

결절은 원형으로 주위에 세포가 밀집되어 있었으며, 결절 중앙부위가 염색액에 농염되고 주위로 연하게 염색되었다. 그 결과 대조군은 배양 3일에 26.3개였으며, Drynariae Rhizoma 투여군은 39.5, PDGF 투여군은 35.4개로 나타나 Drynariae Rhizoma 투여군의 결절 형성이 많았으며, 5일에도 각각 46, 74.5, 62.5개로 나타나서 Drynariae Rhizoma가 배양세포의 석회화 결절 형성에 대조군 뿐 아니라 PDGF군보다도 많은 수의 석회화 결절이 나타났다(그림 7).

이와 같은 결과는 Ma등[32]이 발표한

Drynariae Rhizoma가 조류의 태아골세포의 석회화를 증가한다는 사실과 동일한 결과를 나타내어 Drynariae Rhizoma가 백서의 골세포에서도 석회화과정에 영향을 미친다는 사실을 알 수 있었다.

골세포의 궁극적인 목적은 골조직재생의 기본이 되는 석회화능력의 존재유무확인이 가장 중요하다. 세포의 석회화를 촉구하는 많은 연구들이 진행되어 氏家(1993)[58]는 치조골로부터 배양한 세포에 Laser를 조사하여 조사 횟수가 많을수록 세포증가가 빨라졌으며 alkaline phosphatase activity의 활성이 증진되고 석회화물질형성이 촉진됨을 발견하였다. 최근의 연구동향을 보면 in vitro 상에서 배양세포의 배양조건에 따라 표현형의 차이가 있고 또 이들 배양세포를 이용한 조직재생방법을 모색하는 추세로 세포생물학의 임상화가 추진되고 있는 실정이다[59, 60].

본 연구에 사용된 Alizarin red S 염색법은 anthraquinone 염료로 조직표면의 calcium 의 존재를 chelate반응으로 증명해주는 방법이며 이 염료는 magnesium, mangan, barium, strontium, iron등에도 반응하므로 calcium에 대한 특이적인 염색은 아니나 세포내 calcium 외에 다른 성분이 많지 않기 때문에 문제되지 않는다. 두개관세포의 석회화과정에서 나타나게되는 세포외기질형성이 석회결절의 추이변화 측정에서 Drynariae Rhizoma 추출물을 적용한 세포군에서 결절의 수가 증가하는 것으로 보아 Drynariae Rhizoma가 석회화 결절형성에 효과가 있는 것으로 보여 진다.

파괴된 치주조직을 치료 방법중 골조직회복이 가장 중요한 문제이며 연령의 증가로 인한 골소공증의 예방 및 치료분야의 연구에서도 조골기전의 규명이 아직 미해결인 상태로 남아있다. 의학의 분야에서 조골과정 연구에 세포생물학의 발전은 연구방법론과 정확한 기전들의 규명하는데 많은 기여를 하여왔다. 치의학 분야 특히 치주과학 영역에서도 이러한 노력들이 진행되어 Oshima(1988)[48]등이 시행한 인간의 배양 치은섬유아세포와 치주인대세포의 생화학적 성상을 비교검토한 연구와 原田(1992)[49] 등이 토끼의 치주인대세포가 in vitro 상에서 석회화물질을 형성한다고 보고한 바 있다. 또한 Melcher등은 (1986, 1987)[62, 63] 치근막인대세포를 골기질 상및 상아질 기질상에 배양하면 신생골양조직이 형성된다고 보고하고 있다.

국내에서는 아직 세포배양술의 기술축적이 되어 있지 않아 치의학 영역에 많은 연구가 부족한 실정이나 최근들의 생명공학분야와 생물학, 농업등에서 신품종 개발에 세포배양법을 이용해 좋은 결과가 보고되고 있다. 치의학 영역에서는 단위세포의 배양을 시도해 그들의 형태관찰과 치은세포의 치근에의 부착양상 관찰및 각종 호르몬들의 세포내의 영향을 관찰하는등 점진적으로 세포생물학을 기초로한 연구들이 부분적으로 진행되고 있는 실정인다[47, 61, 62, 63].

국내 특히 치의학 영역에서는 세포생물학을 이용한 구강내조직의 분석이나 새로운 약제및 재의 개발을 위한 기술축적이 미흡한 실정이다. 현재 임상에서 사용되고 있는 골대체물의 사용은 모두 외국에서 시판되는 상품을 수입한 재료들이어서 막대한 외화의 손실을 가져오고 있고 또한 재료에 대한 근본 기전이 밝혀지지 않은 채 임상에서 사용하게 되는 경우가 대부분이므로 정확한 임상적용기준을 설정할 수 있으리라 생각된다.

본 연구는 조직재생과정에 나타나는 세포반응에 근거를 둔 소량의 물질로도 효과적인 치주조직 재생을 촉진 시킬 수 있는 약제의 개발을 위해 시도되었다. 본 연구를 위해 먼저 각종 문헌의 자료를 중심으로 구강 질환에 이용되는

천연물을 조사 하여 추출물을 얻고 in vitro 실험을 통해 새로운 약제 개발을 시행 하고자 한다.

일반적인 골치료방법 선택기준의 기본적 개념은 치조골은 충분히 재생된다는 점과 그러나 치조골 재생은 극히 어렵다는 점이다. 이 두가지 중 어느 방법을 선택하느냐는 것은 치조골 결손의 형태, 정도, 잔존치의 상태, 동요도, 환자의 연령, 협조도등의 인자를 종합적으로 해석하여 시행하여야 한다. 골절제수술은 어디까지나 골재생이 어렵고, 치태조절을 하기 쉬운 치조골, 치은 형태를 만들려는 술식이다. 또 감염된 치근표면을 표적으로해서 골면의 적극적 처치를 하지 않는 술식은 언젠가는 골이 재생이 된다는 생각에 근거한다. 최근에는 치주치료학의 방향이 기본적으로 치조골의 제거치료에서부터 골의 재생을 위한 치료로 변하고 있다. 즉 펩타이드계 성장인자의 임상응용 도입을 추구하고 있다. 최근 성장인자를 이용한 조직치유방법을 개발하려는 연구가 많이 진행되고 있으나, 성장 인자에 대한 안정성의 문제가 미해결로 남아 임상적용단계에는 아직 연구되어 있지 않은 상태이다. 그러나 natural biologic mediator로서 거의 모든 세포의 증식, 분화, 기질합성을 조절하는 미래의 연조직 및 경조직의 치유연구에 중요한 역할을 하리라고 기대되고 있다.

본 연구결과 치은섬유아세포의 증식속도는 골수세포의 증식속도보다 빠른 것으로 나타났다.

이러한 결과는 일반적으로 창상치유과정의 조직내에서 치은섬유아세포가 치근면에 우선 부착하여 치근흡수를 야기하는 근본적 기전설명을 뒷받침하는 결과라 생각된다. 혼합배양시의 세포증식에 대한 실험에서 세포수가 골수세포만 배양한 경우보다 통계학적 유의성을 인정할 수 없는 정도로 다소 높게 나타났으나 이는 세포가 혼합되어 있어 어떤 세포의 증식이 더 신속한가를 분리 측정할 수 없었기 때문으로 차후 세포박리를 시간 차이로 분리하여 측정해야하리라 생각된다.

그러나 전체적 세포수는 두세포의 증식속도 범위내에 있기 때문에 혼합배양으로 인한 상승효과는 인정할 수 없었다.

골수세포의 조골작용기전의 이해와 아울러 최근 임상에 응용하고 있는 골대체물과의 혼용가능성을 찾아내며, 이러한 확인과정과 분석과정에서 규명된 골대체물의 골형성과정에 대한 기전의 설명은 물론, 본 연구에서 축적된 기술은 차후 새로운 재료의 개발과정에 활용할 수 있는 좋은 자료가 되리라 사료되는 바이다.

본 연구는 장기적인 관점에서 부작용이 적고 안전한 약물의 필요성이 요구되어 최근에 한방에서 사용해 온 생약제를 이용하여 치주염치료제의 개발을 위한 과학적인 접근이 다방면으로 시도되고있다.

본 연구 결과 Drynariae Rhizoma는 치주조직의 주구성조직인 골세포에 대해 증식, 단백질형성, alkaline phosphatase활성도 및 석회화과정에 많은 영향을 미치는 것으로 나타났다. 이러한 결과와 연구방법을 근거로 차후 다른 생약제의 동일효과 검색과 아울러 새로운 조직재생치료제로의 개발에 대한 생체실험이 계속 지속되어야 할 것으로 사료된다.

V. 결론

치주질환으로 인해 소실된 치주조직을 재생시킬 수 있는 생약재의 개발을 위해 수룡골과 식물인 Drynariae Rhizoma를 메타놀로 추출하여 이를 두개관세포와 골수세포에 적용하여 세포증식율, 총단백질량, alkaline phos -

phatase 활성도 및 석회화결절 형성능을 분석하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 두개관세포의 증식속도는 5μg/ml이하에서 실험군이 7일과 21사이에 최대의 증가를 보였으며, 골수세포 증식속도는 대조군 실험군이 6일에 각각 5.865×10^4 cells/ml, 6.375×10^4cells/ml로 실험군이 높게 나타났다.
2. 총단백질양은 두개관세포에서 1μg/ml와 5μg/ml에서 배양한 실험군이 높게 나타났으며, 골수세포에서는 6일에 대조군 실험군이 각각 0.497, 0.512로 실험군이 높게 나타났다.
3. alkaline phosphatase activity는 두개관세포에서 4일에 대조군이 0.127, 5μg/ml 투여군이 0.169, 1μg/ml 투여군이 0.181로 최대의 활성도를 보였으며, 골수세포에서도 실험군이 높게 나타났다.
4. 석회화 결절의 형성능력은 배양 5일에 Drynariae Rhizoma 투여군이 74.5개, 성장인자 투여군이 62.5개, 대조군이 46개로 Drynariae Rhizoma 투여군이 가장 높은 것으로 나타났다.

이러한 연구결과로 보아 Drynariae Rhizoma는 골세포의 증식, 단백질합성능, alkaline phosphatase의 활성도 및 석회화 결절을 형성하는 세포의 활성을 촉진시켰으며, 향후 치주인대세포를 이용한 실험과 동물실험 등을 시행하여 그 효능을 검증하여 치주조직의 재생을 유도하는 약제로의 개발이 가능하리라고 생각된다.

Ⅵ. 참고 문헌

1. 한경윤, 박준봉, 정진형, 정종평 : 한국인의 치주조직상태에 관한 역학조사. 대한치주과학회지 24(3):458 - 471, 1994.
2. Terranova, V.P. and Wikesjo, U.M.E. : Extracellular matrices and polypeptide growth factors as mediators of functions of cells of the periodontium., J. Periodontol., 58:371 - 374.1987.
3. Caffesse, R.G., Kerry, G.J., Chaves, E.S. : Clinical evaluation of use of citric acid and autologous fibronectin in periodontal surgery., J. Periodontol., 59:494 - 499, 1988
4. Yuktanandana I : Bone graft in the treatment of periodontal pocket in dogs., J.Periodontol ., 30: 17 - 26, 1959.
5. Gottlow, J., Nyman, S., Lindhe, J., Karring, T. and Wennstrom, J. : New attachment formation in the human periodontium by guided tissue regeneration. Case report., J. Clin. Periodontol., 13:604 - 616, 1982.
6. Gottlow, J., Nyman, S., Karring, T. and Lindhe, J. : New attachment formation as the result of controlled tissue regeneration., J.Clin Periodontol., 11:494 - 498, 1984.
7. Blumenthal, N.M. : The use of collagen membranes to guide regeneration of new connective tissue attachment in dogs., J. Periodontol., 59:830 - 836, 1988.
8. Magnusson, I., Nyman, S., Karring, T. and Egelberg, J.: Connective tissue attachment formation following

exclusion gingival connective tissue and epithelium during healing., J. Periodontal Res., 20:201 - 208,1985.

9. Magnusson, I., Batich, C. and Collins, B.R. : New attachment formation following controlled tissue regeneration using biodegradable membranes., J.Periodontol., 59:1 - 4, 1988.
10. Gantes, B., Martin, M., Garret, S. and Egelberg, J. : Trearment of periodontal furcation defects., J. Periodontol., 15:232 - 236, 1988.
11. The potential role of growth and differential factors in periodontal regeneration., J. Periodontol., 67: 545 - 553, 1996.
12. Piche', J.E. and Graves, D.T. : Study of the growth factor requirements of human bone - derived cells: A comparision with human fibroblasts, Bone, 10: 131 - 138, 1989.
13. Graves, D.T., Cochran, D.L. : Mesenchymal cell growth factors., Crit Rev Oral Biol Med., 1:17 - 36, 1990.
14. Lynch, S. E. : Methods for evaluation of regenerative procedures., J. Periodontol., 63:1085 - 92, 1992.tepair.
15. Kiritsy, C.P. Lynch, S.E. : The role of growth factors in cutaneous wound healing., Crit Rev Oral Biol Med., 5:21 - 52.1993.
16. Lynch, S.E., Giannobile, W.V. : Polypeptide growth factors ; Molecular mediators of tissue repair. Am Society for Molecular Biology Press., 415 - 425.1994.
17. Howell, T.H., Martuscelli, G & Oringer, R.J. : Polypeptide growth factors for periodontal regeneration., Current Opinion in Periodontology., 3:149 - 156.1996.
18. Melcher, A. H. : On the repair potential of periodotal tissues., J. Periodontol., 47:256 - 260. 1976.
19. Caton, J.G., DeFuria, E.L., Polson, A.M. and Nyman, S. : Periodontal Regeneration via selective cell population., J. Periodontol., 58:546 - 552, 1987.
20. Bruder, S.P and Calpan, A.I. : First bone formation and dissection of an osteogenic lineage in the embryonic chick tibia is revealed by monoclonal antibodies against osteoblast., Bone, 10:359 - 375,1989.
21. Haynesworth, S.E., Baber, M.A. and Caplan, A.I. : Cell surface antigens on human marrow - derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies., Bone, 13:359 - 375, 1992.
23. Tenenbaum, H. C. et al : Differentiation of osteoblasts and formation of mineralized bone in vitro. Calcif. Tissue Int., 34 : 76 - 79, 1982.
24. Williams, D.C., Boder,G.B. Toomy, R.E. : Mineralization and metabolic response in serially passaged adult rat bone cells., Calcif. Tissue. Int. 34:76 - 79, 1982.
25. Ohgushi, H., Goldberg, V.M. and

caplan,A.I. : Heterotopic osteogenesis in porous ceramics induced by marrow cells., J. Orthop. REs., 7:568 - 578, 1989.

26. 박준봉, 서조영, 김해동 : Tricalcium phosphate가 치주인대세포의 성장에 미치는 영향., 대한치주과학회지. 22(3):484 - 498, 1992.
27. Makimura, M., Hiraswa, M., Kobayashi, K., Indo, J., Sakanaka, S., Taguchi, T. & Otake, S. : Inhibitory effect of tea catechins on collagenase activity., J. Periodontol., 64:630 - 636, 1993.
28. 양창호, 이용무, 조기영, 배기환, 정종평 : 대조 추출물분획이 치은 섬유아세포의 생물학적 활성화에 미치는 영향., 대한치주과학회지., 24: 144 - 153, 1994.
29. 정종평, 구 영, 배기환 : 황금의 에타놀추출물과 플라보노이드 성분들의 독성평가., 대한 치주과학회지., 25:470 - 476, 1995.
30. Chung, C. P., Park, J. B. & Bae, K. H. : Pharmacological effects of methanolic extract from the root of Scutellaria baicalensis and its flavonoids on humam gingival fibroblast., Planta. Med., 61:150 - 153, 1995.
31. 이상인 : 本草學. 개정판. 89 - 90. 수서원. 1981.
32. Ma, K, Zhu, T., Liu, X. and Liu, W : Promoting effects of rhizoma Drynariae on the calcification of culti - vated chick embryo bone primordium., Chung Kuo Chung Yao Tsa Chih., 20(3) : 178 - 180, 1995.
33. 中葯大辭典 . 下冊 : 1658 - 1660. 상해과학기술출판사, 1979.
34. 韓國科學技術資料大系. 醫藥學篇. 東醫寶鑑. 外形篇.卷 2 : 202, 여강출판사, 1988.
35. 本經續疎. 卷 6 : 123 - 124. 상해과학기술출판사, 1991.

36. 정보섭, 신민교 : 圖解 鄕藥 大辭典.초판., 73 - 74. 영림사, 1990.
37. 신민교, 박경, 맹웅재 : 국역향약집성방(상권), 치아문, 777 - 805, 영림사, 1989.
38. Schepers, E.J.P. EJP : A comparative study of bioactive glass and porous hydroxyap - atite particles in periodontal bone lesions., Bioceramic 6: 113 - 116, 1993
39. Ouhayoun, J.P., Shabana, A.H.M., Issahakian, S., Patat, J.L., Guillemin, G., Sawaf, M.H. and Forest, N. : Histological evaluation of natural coral skeleton as a grafting material in miniature swine mandible. J, Mat Scien Med., 3:222 - 228, 1992.
40. Beresford, J. N.et al. : Formation of mineralized nodules by bone derived cells in vitro ; A model of bone formation ?, Am. J. Medical Genetics., 45 : 163 - 178, 1993.
41. Garrets, S., Loos, B., Chamberlin, D. and Egelberg, J. : Treatment of intraosseous peri - odontal defects with combined adjunctive therapy of citric conditioning, bone grafting, and placement of collagenous membranes., J. Clin. Periodontol., 15:383 - 387, 1988.
42. Rutherford, R.B., TrilSmith, M.D., Ryan, M.E. and Charette, M.F. : Synergistic effects of dexamethasone on platelet - derived growth factor mitogenesis in vitro, Arch. Oral. Biol., 37: 139 - 145, 1992.
43. Lynch, S. E : Methods for evaluation of regenerative procedures., J. Periodontol., 63:1085 - 92. 1992.tepair.
44. Nakahara, H., Bruder, S.P., Haynesworth, S.E., Holecek, J.J., Baber, M.A., Goldberg, V.M. and Caplan, A.I. : Bone and cartilage formation in diffusion chambers by subcul - tured cells derived from the periosteum. Bone 11:181 - 188, 1990.
45. McSheehy, P.M.H. and Chambeers, T.J. : Osteoblastic cells mediate osteoblastic responsiveness parathyroid hormone. Endocriol. 118:824 - 828, 1986.
46. Nakamura, O. and Caplan, A.I. : Noncollagenous matrix protein - enhanced mineral deposition in osteoblast - like cell culture., J. Bone. Miner. Met. 12:17 - 25, 1994.
47. 서조영, 최제용, 유현모, 박준봉, 조준승 : 치은 섬유아세포와 치주인대세포의 세포성장에 관한연구. 대한구강생물학회지. 15(1):14 - 27, 1991.
48. Oshima, M., Kuwata, F., Otsuka, K. Saito, R. Sato, K. Shioji, S and Suzuki, K. : Alkaline phosphate activity of cultured human periodontal ligament cells., J. Nihon Univ. Sch. Dent. 30:208 - 217, 1988
49. 原田秀郎 :ウサキの歯根膜細胞の 細胞特性 I. 石灰貨物形成およひ フ ォスフアタ 活性.1992.
50. Melcher, A.H., Cheong, T., Cox, J., Nemeth, E. and Shiga, E. : Synthesis of cementum - like tissue in vitro by cell culture from bone: a Light and electron microscopic study., J. Periodont. Res., 21:592 - 612, 1986.
51. Melcher, A.H.,Cheong, T., Mcculloch, C.A.G., Nemeth, E. and Shiga, E. : Cells from bone synthesize cementum - like and bone - like tissue in vitro., J. Periodont. Res., 22:246 - 247, 1987.

52. Nojima, M., Kobayashi, M. Shinomo, M., Takahashi, N., Suda, T. and Hasegawa, K. : Fibroblastic cells derived from bovine periodontal ligaments have thephenotypes of osteoblasts., J. Periodont. Res., 25:179 - 185, 1990.
53. Arceo, N., Sauk, J.J., Moehring, J., Foster, R.A. and Somerman, M.J. : Human periodon - tal cells initiate mineral - like nodules in vitro., J. Periodontol., 62:499 - 503, 1991.
54. Beertsen, W., and Theo Van Den Bos : Calcification of dentinal collagen by cultured rabbit periosteum; The role of Alkaline phosphatase. Matrix, 9:m 159 - 171, 1989.
55. Anderson, H. C. : Mechanism of mineral formation in bone. Lab. Invest., 60: 320 - 330, 1989.
56. Bellows, C. G., Aubin, J. E., and Heersche, J. N. M. : Initiation and progression of min - eralization of bone nodules formed in vitro; the role of alkaline phosphatase
57. Bellows, C.G., Aubin, J.E., Heersche, J.N.M. and Antoz, M.E. : Mineralized bone nodules formed in vitro from enzymatically released ral calvaria cell population., Calcif. Tissue Int.,38:143 - 154.1993.
58. 氏家久 : He - Ne レサ 照射かヒト 齒槽骨由來細胞に及ほす影響に 關する 硏究 とくに細胞 增殖, 生活ぉよひ nodule形成 について. 日齒周誌. 35(1):54 - 62, 1993.
59. 地田賀剛 : 人工骨移植材のヒト骨芽細胞樣細胞に對する親和性 - 移植材周圍の 接着性蛋白質の 經時的 變化. 日齒周誌. 35(1):84 - 94,1993.
60. 松原茂 : 齒根膜細胞の 分化調節に關する 實驗的 硏究 - Transforming Growth factor - βの 影響について . 日齒周誌. 35(2):333 - 346, 1993.
61. 조혜연, 강선주, 고재승, 황성명 : Tumor necrosis Factor - α에 의하여 저칼슘식이 생쥐골수 세포에서 분화된 파골세포양세포의 상아질 흡수., 대한구강해부학회지. 17(1):99 - 112, 1993.
62. 이종원, 김관식, 정동균 : 백서 두 개관 배양시 Prostaglandin E2가 용해소체효소 유리에 미치는 영향. 대한구강생물학회지. 7:25 - 31,1993
63. 이향, 서조영, 박준봉 : 치주인대세포의 부착과 전개에 관한 형태학적 관찰. 경북치대논문집. 6(1):23 - 36, 1989.

- Abstract -

EFFECTS OF EXTRACTS OF DRYNARIAE RHIZOMA ON THE CHARACTERISTICS OF RAT CALARIA AND BONE MARROW CELLS

Kyung - Seok Lim*, Young - Hyuk Kwon*,
Joon - Bong Park*,
Sung - Jin Kim**, Se - Young Choung***,
Kun - koo Park****

*Department of Periodontology, College of Dentistry, Kyung - Hee University
**Department of Dental Pharmacology, College of Dentistry, Kyung - Hee University
***Department of Hygienic Chemistry, College of Pharmacology, Kyung - Hee University
****Asan Institute for Life Sciences

This study was performed to evaluate the effects of extracts of Drynariae Rhizoma on the characteristics of rat calvaria cells(RCV) and bone marrow cells(RBM) which have the important role on the bone formation in vitro. Drynariae Rhizoma has been known as the useful herbal medica - ment for treatment of the wound healing including regeneration of bone fracture, and also has been used to treat the periodontal lesions, tooth mobility, gingival bleeding and pus discharge via sulcus in Oriental Medicine. In control group, the cells were cultured alone with Dulbeco 's Modified Eagle's Medium contained with 10% fetal bovine serum, 100U/ml penicillin, 100μg/ml streptomycin, 0.5μg/ml amphotericin - B. In experimental group, extracts of Drynariae Rhizoma(0.1, 1, 5, 10, 50μg/ml) were added into the above culture condition. And then each group was characterized by examing the cell proliferation at 1, 3, 7, 14, 21, 30th day, the amount of total protein synthesis and alkaline phosphatase activity of RCV at 2,4th day and those of RBM at 3, 6th day. And also, the calcified nodule of RCV was examed at 3, 5th day in three goup, control, experimental, culture with the PDGF group.

The results were as follow ;

1. Both RCV and RBM cells in Drynariae Rhizoma - treated experimental group proliferated more rapidly than non - treated control group. The experimen - tal group below 5μg/ml Drynariae Rhizoma - treated showed more promi - nent cell proliferation from the 7th day to the 21st day than the control group and above 10 μg/ml treated group in RCV.
2. Amount of total protein synthesis was more increased in Drynariae Rhizoma - treated group than in control group. In 5μg/ml Drynariae Rhizoma - treated group showed most prominent protein synthesis of the any other exrperi - mental group and control group.

3. Alkaline phosphatase activity also more increased in Drynariae Rhizoma - treated group than control group.
4. Mineralized nodules in Drynariae Rhizoma - treated group were more than not in control group but also in PDGF - treated group.

From the above results, Drynariae Rhizoma appeared to enhanced the proliferation, protein synthesis, alkaline phosphatase activity and cellular ability of mineralized nodule formation than PDGF. So that, we conclude that Drynariae Rhizoma enhances the activities of bone cells which have the important role on the periodontal regeneration and optimal application of Drynariae Rhizoma was thought to be useful as the means in bone regeneration.