

八味地黄丸 및 五倍子 추출물이 뼈모유사세포와 치주인대섬유모세포의 증식, Alkaline Phosphatase의 활성 및 단백질 합성능에 미치는 影響

김천중, 안영민, 안세영, 두호경
경희대학교 부속한방병원 신계내과교실

The Effects of *Palmijihwang-hwan* (*Baweidehuang-wan*) and *Obaeja* (*Galla Rhois*) on Proliferation Activity of Alkaline Phosphatase and the Synthetic Ability of Protein in Osteoblast-like Cell Lines and Periodontal Ligament Fibroblasts

Cheon-Jong Kim, Young-Min Ahn, Se-Young Ahn, Ho Kyung Doo

6th Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Kyung Hee University, Seoul, Korea

Objective : This study was performed to evaluate the effects of *Palmijihwang-hwan* (*Baweidehuang-wan*) and *Obaeja* (*Galla Rhois*) on the regeneration of periodontal tissue.

Methods : In this study, we used MC3T3-E1 cells, such as osteoblast-like cell lines and human periodontal ligament fibroblasts, for experimental material.

We separated each type of cells into a control group and an experimental group.

In the control group, the cells were cultivated for 48 hours with distilled water and media which contained 10% fetal bovine serum (FBS) and penicillin (100unit/ml)-streptomycin (100 μ g/ml) at 37 $^{\circ}$ in 5% CO₂ gas. In the experimental group, the cells were cultivated for 48 hours with *Palmijihwang-hwan* extract and *Obaeja* extract (concentrations 1 μ g/ml, 25 μ g/ml, 50 μ g/ml) under the same conditions as the control group.

Investigating the regeneration of periodontal tissue was performed by evaluating proliferation, the activity of alkaline phosphatase and the synthetic ability of proteins using those cultivated cells by means of microculture tetrazolium (MTT) assay, alkaline phosphatase substrate kit and protein assay kit.

Results :

1. In vitro, *Palmijihwang-hwan* extract increased the proliferation of MC3T3-E1 cells.
2. In vitro, *Obaeja* extract increased the activity of alkaline phosphatase and the synthetic ability of protein in MC3T3-E1 cells and human periodontal ligament fibroblasts depending on *Obaeja* extract's concentration.

Conclusion : *Obaeja* extract can be developed as a subsidiary medicine for the regeneration of periodontal tissue. Further studies to evaluate the different concentrations the *Obaeja* extract and clinical trials in vivo are suggested. (*J Korean Oriental Med* 2003;24(3):35-44)

Key Words: *Palmijihwang-hwan* (*Baweidehuang-wan*), *Obaeja* (*Galla Rhois*), Osteoblast-like cells, Periodontal ligament fibroblasts

서론

치주질환은 치아우식증과 함께 구강 내 2대 질환으로 치은, 치조골, 치주인대, 백악질 등으로 구성된 치아주위 조직에 급성 또는 만성으로 병변을 야기하는데, 치료하지 않고 방치하면 치조골의 파괴 및 치아의 동요가 동반되어 결국에는 치아상실을 초래하는 질환이다¹⁾.

치주질환에 대한 치료는 치은절제술, 치관변위관막술²⁾, 치근면 처리술⁴⁾, 조직유도재생술⁷⁻⁹⁾ 등 외과적인 수술을 시행하나 수술 후에도 치주조직의 재생이 비정상적으로 이루어져 치주질환의 재발이 빈번한 편이다.

그런데 현재 치주질환의 치료에 사용되는 약제 중에 항생제, 구강함수제, 소독제, 진통제, 신경안정제¹⁰⁾ 외에 치주조직 재생에 관한 약제는 거의 없으므로 개발이 시급한 실정이다.

최근 치주조직 재생에 관한 수종의 약제들이 국내외에서 연구되고 있고, 생약제로는 Pluronic polyols¹¹⁾, Centella asiatica L. Urban^{12,13)}, Zea Mays L.¹⁴⁾, 大棗 (Zizyphi Inermis Fructus), 黃芩(Scutellariae Radix)¹⁵⁾, 骨碎補(Drynariae Rhizoma) 등 다수의 연구가 있으나 아직 효과는 미흡한 실정이며 복합제제로서의 한약 처방에 대한 연구는 거의 없는 편이다.

이에 저자는 한의학 문헌 중 李梴의《醫學入門》에서 “牙齒骨屬，腎之標也，精完則齒堅，腎衰則齒豁...齒齦宜露動搖者，腎元虛也，宜滋陰補腎，八味丸”¹⁶⁾이라 한 것처럼 補腎虛하는 처방인 八味地黃丸과 繆希雍의《神農本草經疏》에서 “五倍子《本經》主齒宣疳蝨”¹⁷⁾와 唐宗海의《血證論》에서 “齒衄，外治之法...宜用五倍子...同爲末糝，更能固牙”¹⁸⁾에 근거한 五倍子를 실험약제로 선정하여 이들 추출물이 치주조직의 재생에 미치는 작용을 알아보고자 하였다.

그리고 치주조직 재생에 중심적인 역할을 하는 뼈모유사세포와 치주인대섬유모세포¹⁹⁾를 지표로 선정하고, 실험약제가 이들의 세포 활성도와 뼈의 생성능력을 알려주는 지표인 알칼리성인산효소 활성도²⁰⁾ 및 단백질 합성능에 미치는 영향을 평가하는 방법으로

본 실험을 시행하여 유의한 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

실험재료 및 방법

1. 실험대상

1) 세포

실험에 사용된 세포는 마우스 두개관으로부터 얻은 뼈모유사세포(osteoblast-like cell line)인 MC3T3-E1 세포와 사람의 치주인대섬유모세포(Human periodontal ligament fibroblast)를 이용하였다. 사람의 치주인대섬유모세포는 교정 목적으로 발거된 소구치를 발거한 즉시 항생제가 포함된 Dulbecco's Modified Eagle Media(DMEM; Gibco, USA)로 3회 세척하고, 잇몸조직이나 치주조직에 의해 오염되지 않도록 치아뿌리의 중간 1/3부위를 면도날로 긁어 치주인대 조직을 얻었다. 이렇게 얻어진 치주인대 조직을 배양접시에 넣고, 10% fetal bovine serum(FBS; Gibco, USA)이 포함된 DMEM으로 37℃, 5% CO2 조건하에서 배양하였다. 세포가 어느 정도 자라 나오면 원래의 조직은 떼어 내고 세포가 한 층으로 배양접시에 가득 찰 때까지 동일한 배양액으로 배양하였다. 세포가 배양접시에 가득 차면 Hank's balanced salt solution(HBSS; Gibco, USA)으로 수세하고, trypsin-EDTA용액(Gibco, USA)으로 세포를 분리하여 계대 배양하였다. 배양액은 동일하며 주 3회 교환하였다. 이렇게 얻은 세포 중 6-8대의 세포를 실험에 사용하였다.

2) 실험 약제

본 실험에 사용한 약제는 경희의료원 한방병원 약제부에서 구입하여 정선한 후 사용하였으며, 처방은 동의보감에 기재된 八味地黃丸으로 처방내용과 분량은 다음과 같다. 추출과정은 八味地黃丸은 용량 54g에 85% MeOH 700ml을 넣고 24시간 냉침 후 2시간 sonication한 뒤 Filter Paper로 여과하여 농축한 다음 동결건조하여 9.44g을 얻었고(수율 17.48%), 五倍子는 용량 30g에 85% MeOH 700ml을 넣고 24시간 냉침 후 2시간 sonication한 뒤 Filter Paper로 여과하여

농축한 다음 동결건조하여 19.64g을 얻었다(수율 65.17%). 각 추출물을 증류수로 용해시켜 0.10%, 0.25% 및 0.50%로 만들어서 0.2 μ m filter를 이용하여 여과 멸균하여 사용하였다.

A. 八味地黃丸

藥物名	生藥名	重量(g)
熟地黃	Rehmanniae Radix	16
山藥	Dioscoreae Radix	8
山茱萸	Corni Fructus	8
白茯苓	Hoelen	6
牡丹皮	Moutan Cortex Radicis	6
澤瀉	Alismatis Rhizoma	6
肉桂	Cassiae Cortex	2
附子	Aconiti Tuber	2
Total amount		54

B. 五倍子

藥物名	生藥名	重量(g)
五倍子	Chinensis	Galla 30

2. 실험방법

1) 한약제 투여

24-well 배양판(Falcon, USA)에 well당 세포 활성화도 평가의 경우는 뼈모유사세포인 MC3T3-E1 세포는 5 \times 10⁵개, 치주인대섬유모세포는 2 \times 10⁵개가 되도록 분주하였고, 알칼리성인산효소 활성화도 평가의 경우에는 E1세포는 5 \times 10⁵개, 치주인대섬유모세포는 2 \times 10⁵개로 분주하여 10% FBS와 penicillin(100unit/ml)-streptomycin(100 μ g/ml) (Gibco, USA)이 포함된 각각의 배양액으로 24시간 배양하여 배양판 바닥에 세포가 부착되도록 하였다. 그 후 동일 배양액으로 교환하고 대조군은 배양액과 증류수를 250 μ l씩 투여하여 세포를 배양하고, 실험군은 각 농도의 한약제(0.10%, 0.25%, 0.50%)를 각 well당 250 μ l씩 투여하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 조건하에서 48시간 배양하였다.

2) 세포 활성화도 평가

(1) 세포활성의 평가

세포활성의 평가를 위해 Microculture Tetrazolium (MTT) assay를 시행하였다. 먼저 각 세포를 24-well 배양판(Falcon, USA)에 세포의 수가 well당 뼈모유사세포인 MC3T3-E1 세포는 5 \times 10⁵개, 치주인대섬유모세포는 2 \times 10⁵개가 되도록 분주하고, 10% FBS가 포

함된 배양액으로 24시간 배양하여 배양판 바닥에 세포가 부착되도록 하였다. 그 후 동일한 배양액으로 교환하고 배양된 세포에 각각 0.10%, 0.25% 및 0.50% 농도의 한약제를 투여한 후 48시간동안 동일 조건에서 배양하였다. 이렇게 배양하는 중 마지막 4시간은 0.01M phosphate buffered saline(PBS)에 5mg/ml의 농도로 녹인 MTT(Sigma, USA) 용액을 필터로 여과하여 well당 50 μ l씩 첨가하여 함께 배양하였다. 그 후 배양액을 제거하고 0.04N 염산이 포함된 isopropanol을 well당 500 μ l씩 첨가한 후, 96-well 배양판으로 옮겨 microplate reader(Model 550, Bio-Rad, USA)로 630nm 파장을 기준으로 하여 570nm의 파장에서 측정하였다.

(2) 알칼리성인산효소 활성의 평가

알칼리성인산효소 활성의 평가를 위해 alkaline phosphatase substrate Kit(Bio-Rad, USA)를 이용하여 측정하였다. 먼저 각 세포를 24-well 배양판(Falcon, USA)에 세포의 수가 well당 MC3T3-E1 세포는 5 \times 10⁵개, 치주인대섬유모세포는 2 \times 10⁵개 분주하고, 10% FBS가 포함된 배양액으로 24시간 배양한 후, 동일한 배양액으로 교환하고 배양된 세포에 각각 0.10%, 0.25% 및 0.50% 농도의 한약제를 첨가하고 48시간동안 동일조건에서 배양하였다. 배양액을 제거한 후 세포층을 PBS로 2회 수세하였다. 그 후 각 well 당 생리식염수에 0.1%의 농도로 희석한 Triton X-100(Polyscience, USA)을 150 μ l씩 첨가하고 실온에서 30분간 방치하였다. 그 후 4ml의 증류수와 diethanolamine buffer(5 \times) 1ml를 섞은 후 substrate tablet 1개를 녹여서 substrate solution을 만들고, 이를 각 well에 150 μ l씩 첨가한 후 37 $^{\circ}$ C에서 20분간 배양하였다. 그 후 96-well 배양판으로 옮겨 microplate reader(Model 550, Bio-Rad, USA)로 405nm의 파장에서 측정하였다.

(3) 단백질 합성능의 평가

단백질 합성능의 평가를 위해 protein assay kit(Bio-Rad, USA)를 이용하여 총단백질 합성량을 측정하였다. 알칼리성인산효소 활성을 평가한 경우와 동일하게 세포를 분주하고 24시간동안 세포가 부착되도록

배양한 후, 동일한 배양액으로 교환하고 배양된 세포에 각각 0.10%, 0.25% 및 0.50% 농도의 한약재를 첨가하고 48시간 동안 동일조건에서 배양하였다. 그 후 각 well에서 10μl씩 배양액을 취하여 96-well 배양판에 넣고 protein assay dye를 200μl씩 첨가한 후 실온에서 20분간 방치하였다. 그 후 microplate reader (Model 550, Bio-Rad, USA)로 595nm의 파장에서 측정하였다.

3. 통계처리

통계처리는 PRISM 2.0 version(Graphpad Software incorporated)의 independent sample t-test법으로 검증하였고, p<0.05인 경우 유의한 것으로 간주하였다.

고 찰

역학적으로 치주질환의 빈도와 심도는 연령증가에 따라 증가하며, 남자가 여자에 비해 높고, 교육수준과 역비례하는 경향을 보인다¹⁾.

치주질환은 다양한 임상증상을 나타내는데, 치은 출혈과 종창, 치은염에서 치주낭 형성 및 치근 주위의 치조골 파괴 등을 유발하여 치아상실을 초래하게 된다²⁾.

치주질환의 원인으로는 치태, 치석, 외상성교합, 전신건강이나 영양상태, 내분비이상 등의 전신적 인자와 기타의 국소적 인자가 있는데, 치주질환의 발생기전은 아직 확실하지는 않다³⁾.

치주질환의 치료방법은 과거에는 질환의 원인을 제거하기 위한 단순한 절제술이 주를 이루었으나 절제로 인한 조직손실로 기능적 혹은 심미적 후유증을 유발하게 되어, 근래에는 노출된 치근면을 피개하기 위한 치관변위판막술⁴⁾, 연조직의 부착을 촉진시키는 약제의 치근면 처리술^{4,6)}, 조직증식을 선택적으로 유도하는 조직유도재생술^{7,9)} 등의 상실된 치주조직의 재생을 위한 시술법을 중심으로 연구하고 임상에서도 응용하고 있다.

그런데 치주조직 재생을 위한 외과적 수술 후에도 대부분의 경우에 치조골의 과형성으로 인해 골성 강

직이 야기되기도 하고 치은조직의 섬유아세포의 신속한 증식으로 인해 치근면의 외흡수를 초래하기도 하며, 무엇보다 빈발하는 후유증으로, 치은상피세포가 다른 세포보다 먼저 치근면에 하방 증식하게 되어 치주질환이 빈번하게 재발하곤 한다.

이러한 후유증을 감소시키기 위해서는 치주조직 재생의 초기단계에 치주인대세포의 이주 및 증식과 이들의 기질요소 합성으로 인한 빠른 치주인대의 재생이 필요하고, 후기단계에 신생백악질과 골 형성을 위한 조백악세포 및 조골세포의 분화가 필요한데^{22,23)}, 이러한 조직재생 과정을 보조하여 이상적인 치유를 유도할 수 있는 약제의 개발이 시급한 실정이다.

현재 치주질환의 치료에 사용되는 약제로는 외과적 처치에 따라 전신적인 질환이 있는 환자에게 이차감염의 예방 혹은 특정병원체의 조절을 위해 보조적으로 사용하는 항생제와 구강내 병원성 세균의 수를 감소시키는 구강함수제 외에 소독제, 진통제, 신경안정제 등¹⁰⁾이 있으나 치주조직 재생에 관한 약제는 거의 없는 실정이다.

최근에는 치주조직재생에 도움이 되는 수종의 약제들이 외국에서 개발되어 국내에도 소개되었는데, 천연물에 대한 연구로는 Fitzpatrick이 계면활성제인 Pluronic polyols (Pluronic F-68)를 상처부위에 사용할 경우 치유과정에 상처부위의 강도가 현저히 증가함을 보고⁹⁾한 바 있고, Centella asiatica L. Urban 추출물은 창상, 화상, 욕창 및 궤양 등의 치료에 효과가 있음이 보고^{12,13)}되었다.

국내에서는 옥수수로부터 추출한 불검화 정량추출물인 Zea Mays L.이 치주치료에 보조적 가치가 있는 것으로 보고¹⁴⁾되었고, 또한 tea catechin 추출물, 大蘗, 黃芩(Scutellaria Radix)¹⁵⁾, 骨碎補(Drynariac Rhizoma) 등이 치주질환으로 소실된 조직의 재생 치료제로 연구되고 있는 등 단방의 생약제에 대한 연구는 다수 있으나 복합제제로서의 한약처방에 대한 연구는 미미한 실정이다.

이에 저자는 한의학 문헌에서 치주질환에 활용된 수많은 약제와 처방을 검토한 후, 八味地黃丸과 五倍子を 실험약제로 선정하여, 이들 추출물이 뼈모유사

세포와 치주인대 섬유모세포의 세포 활성도와 알칼리성 인산효소 활성도 및 단백질 합성능에 미치는 영향을 평가하는 방법으로, 치주조직 재생에 효과가 있는지를 알아보려고 본 실험을 시행하게 되었다.

먼저 마우스 두개관으로부터 얻은 뼈모유사세포 (osteoblast-like cell line)인 MC3T3-E1 세포와 사람의 치주인대섬유모세포(Human periodontal ligament fibroblast)를 실험 재료로 하여, 八味地黃丸과 五倍子 추출물과 배양액을 가한 군을 실험군으로 하고, 증류수와 배양액을 가한 군을 대조군으로 하여 세포 활성도와 알칼리성 인산효소 활성도 및 단백질 합성능에 미치는 영향을 비교 관찰하였다.

실험 재료로 치주인대 섬유모세포를 선택한 이유는 섬유모세포가 구강조직 외에도 신체의 모든 결합 조직에 존재하여 결합조직을 생성, 유지시키고 조직 손상 시 재생을 담당하는 등 다양한 기능을 가지며, 또한 치주인대는 세포외 기질 요소들의 효율적인 합성활동을 제공하는 세포성 기구를 가지고 있고, 고도의 세포 극성을 띠고 교원질 합성이 왕성하며 높은 alkaline phosphatase 활성도를 가져 조골적인 특성으로 백악질 형성에 관여하는 등 치주조직 재생에 중심적인 역할을 하는 것으로 알려져 있기 때문이다^{22,23}.

그리고 뼈모유사세포를 선택한 이유는 골에서 유래한 세포들이 골 표면에 신생결합조직을 형성하는데 관여하고, 치주조직 재생의 후기단계에서 신생백악질과 골 형성을 위한 조백악세포 및 조골세포로 분화되어 치주조직 재생에 관여하기 때문이다^{22,23}.

또한 치주질환이나 외과적 처치 후 재생 시에 형성되는 치주인대와 치조골, 백악질은 모두 치주인대에 존재하는 세포들로부터 생성이 가능한 것으로 사료되고¹⁹, 섬유모세포는 배양이 용이하고 배양 시 성장의 특징이나 여러 생화학적 특징들이 많이 알려져 있어서 임상 및 기초연구에 널리 사용되며, 치주조직에 존재하는 치주인대, 치은 섬유모세포들이 그 세포의 기원, 배양시의 특징, 여러 효소의 활성도, 합성해내는 단백질, 부착단백질이나 성장인자들에 대해 반응에 차이를 보이는 것도^{24,25} 선택의 이유가 된다.

실험방법은 뼈모유사세포와 치주인대섬유모세포

의 활성에 미치는 영향을 알아보기 위해서 대조군과 실험군으로 나누어 세포 활성도와 알칼리성인산효소 활성도 및 단백질 합성능을 평가하는 방법을 채택하였다.

먼저 세포 활성도를 알아보기 위해 Microculture Tetrazolium(MTT) assay를 시행하였는데, 이는 치과 영역에서 여러 재료의 독성을 평가하는 데에 최근 많이 행해지고 있는 것으로²⁶⁻²⁸ MTT 용액 속에 있는 tetrazolium ring이 활성화된 미토콘드리아 내에 있는 dehydrogenase와 반응하여 비용해성의 짙은 색 MTT formazon을 형성하게 되면 이러한 색의 변화정도를 ELISA reader를 이용하여 감지시켜서 흡광도를 측정하여 살아있는 세포 수나 활성정도를 알 수 있게 해주는 방법으로서, 다른 세포 수 산정이나 방사성 동위원소 등을 이용한 것보다 정확하고 간단하게 측정할 수 있는 방법이다²⁹.

다음으로 뼈의 생성능력을 알아보기 위해서 뼈의 생성을 알려주는 지표인 알칼리성인산효소(alkaline phosphatase)의 활성과 osteocalcin을 측정하는 방법이 있는데, 본 실험에서는 알칼리성인산효소를 측정하는 방법을 선택하였다. 이 효소는 유기인산 에스테르를 가수분해하여 국소적으로 인산이온 농도를 증가시켜 세포기질에 calcium phosphate 침착을 유도하는 효소로 광물화 과정에 중요한 기능을 하는 것으로 밝혀져 있다³⁰. 또한 이 효소는 조골세포, 연골세포, 조상아세포 및 조백악세포와 같은 광물화 조직을 형성하는 세포로 분화하는 초기 지시자로 이용할 수 있다는 보고도 있다²⁹. 따라서 알칼리성인산효소의 활성이 증가하면 조백악세포나 조골세포와 같은 광물화조직을 형성하는 세포로 세포분화가 증진된 것으로 볼 수 있다.

마지막으로 단백질 합성량을 측정한 이유는 섬유모세포가 치주조직의 재생에서 교원섬유나 탄성섬유, 옥시탈란섬유 등의 섬유성 단백질을 합성하고, 단백질(proteoglycan)이나 당단백(glycoprotein) 등의 비교원성 기질과 DNA, 단백질 등을 생성하여 손상된 결합조직 성분을 보충하는 기능을 하는 것^{30,31}으로 알려져 있으므로 protein assay kit를 이용하여 치주조

직 재생을 위한 총단백질 합성량을 측정하였다.

치은 출혈과 종창, 치은염에서 치주낭 형성 및 치조골의 파괴 등의 증상을 보이는 치주질환을 동양의 학적으로 고찰해보면 齒痛, 牙宣, 牙疳, 齒衄, 牙癰 등³²⁾의 범주에 해당한다고 할 수 있다.

牙齒의 病理에 대해서는《仁齋直指方》에 “齒者骨之所終, 髓之所養, 腎實主之. 故腎衰則齒豁, 精盛則齒堅, 虛熱則齒動”³³⁾이라 하고,《諸病源候論》에 “牙齒痛者, 是牙齒相引痛, 牙齒是骨之所終, 髓之所養.....手陽明足陽明之脈, 皆入於齒”³⁴⁾라 하고,《脈因證治》에서는 “夫齒乃腎之標, 骨之餘, 腎衰則豁, 腎固則堅”³⁵⁾라 하고,《三因極一病證方論》에서는 “齒爲關門 腎之榮 骨之餘也 腎衰則齒豁 精固則齒堅”³⁶⁾라 하여 腎의 盛衰로 설명하였다.

牙齒疾患에 사용된 처방으로는 細辛湯, 白芷湯, 清胃散, 玉池散, 八味地黃丸 등이 있는데, 위에서 살펴본 바대로 주로 齒牙疾患과 腎의 관련성이 높아서 《古今醫鑑》에서 “尺脈洪大而虛者, 腎虛, 主齒動搖疎豁, 相火上炎而痛.....有痛而動搖者, 腎元虛也.....上片牙痛, 亦屬足少陰腎經虛熱, 宜細辛湯”³⁷⁾이라 하고,《口齒類要》에서 “其動搖脫落, 本足少陰經.....腎經虛熱而痛者, 六味丸補之, 腎經虛寒而痛者, 還少丹補之, 重則八味丸主之”³⁸⁾라 하고,《醫學入門》에 “牙齒骨, 屬腎之標也, 精完則齒堅, 腎衰則齒豁, 虛熱則齒動.....大抵齒齦, 宣露動搖者, 腎元虛也, 宜滋陰補腎, 八味丸, 三味安腎丸, 虎潛丸”¹⁶⁾이라 하고,《醫貫》에서 “腎經虛寒者, 安腎丸, 還少丹, 重則八味丸主之”³⁹⁾라고 서술하였듯이 牙齒疾患은 腎病證의 범주에 해당된다고 볼 수 있다.

이에 저자는 腎虛로 인한 牙齒疾患에 활용되는 처방 중에서 “益火之原, 以消陰翳”하는 대표적 방제인 八味地黃丸을 선정하였다. 八味地黃丸의 약물구성은 熟地黃 8兩, 山藥, 山茱萸 各4兩, 白茯苓, 牡丹皮, 澤瀉 各3兩, 肉桂, 附子炮 各1兩³⁹⁾으로 六味地黃丸에 補腎陽·命門火의 효능이 있는 附子和 溫裏祛寒·補腎陽의 효능이 있는 肉桂를 배합하여 眞陰과 精血을 滋養·滋潤·補充하는 처방이다.

牙齒疾患에 대한 단미약으로는 白礬, 升麻, 石膏, 細辛, 五倍子 등³⁷⁾이 활용되었는데, 주로 疼痛除去,

齒齦出血防止, 浮腫除去, 排膿, 口臭除去, 齒牙固定 및 消炎 등의 목적으로 사용되었으며, 한방약제와 현대 약물이 화학성분으로 보아 유사성이 있다고 보고⁴⁰⁾되고 있다.

여러 단미약 중에서 五倍子에 대해서는《血證論》에서 “齒衄, 外治之法 宜用冷水嗽口.....醋嗽.....百草霜糝, 十灰散糝.....枯礬五倍子 蚯 蚓, 同爲末糝, 更能固牙”¹⁸⁾라 하고,《開寶本草》에서는 “療齒宣疳糝, 肺臟風毒流溢皮膚作風濕瘡, 瘡瘍膿水, 五痔下血不止, 小兒面鼻疳瘡”⁴⁷⁾이라 하고,《本草衍義》에서는 “口瘡以末摻之”⁴²⁾라 하였으며,《神農本草經疏》에서는 “五倍子《本經》主齒宣疳糝, 風濕癬瘡, 及小兒面鼻疳瘡者, 皆從外治, 取其苦能殺蟲, 酸平能斂浮熱, 性燥能主風濕, 瘡瘍膿水”⁴³⁾라고 서술되어 있듯이 齒衄, 齒宣疳糝, 口瘡 등에 활용되었다.

五倍子(Rhois Galla)는 漆樹科(Anacardiaceae) 鹽膚木 *Rhus chinensis* Mill.의 葉上의 蟲癭 혹은 青麩楊 *Rhus potanini* Maxim.의 葉上의 蟲癭을 乾燥한 것으로 蟲癭이란 오배자벌레가 植物의 잎을 刺戟하여 만들어진 囊狀의 寄生物이다. 味는 酸鹹, 性寒하고 肺, 腎, 大腸經으로 歸經하며 斂肺降火, 澀腸止瀉, 斂汗, 止血의 作用이 있다⁴⁴⁾.

전술한 내용을 바탕으로 본 실험을 시행한 결과, 세포 활성도에서 八味地黃丸 추출물은 0.10%, 0.25%, 0.50% 농도에서 뼈모유사세포의 활성을 유의하게 증가시켰는데, 이는 뼈모유사세포의 증식에 유의한 효과를 나타내었음을 시사한다.

五倍子 추출물은 뼈모유사세포와 치주인대섬유모세포의 활성을 0.10%, 0.25%, 0.50%의 모든 농도에서 유의하게 감소시켰으나, 농도 의존성으로 증가하는 추세에 있으므로 추가적인 농도 실험이 필요하겠다.

알칼리성인산효소 활성도에서 八味地黃丸 추출물은 0.10%, 0.25% 농도에서 뼈모유사세포의 활성을 증가시켰으나 통계학적 유의성은 없었고, 치주인대섬유모세포의 활성을 0.50% 농도에서 유의하게 감소시켰으나 저농도일 수록 증가하는 경향을 보이므로 0.10% 이하의 농도에서 유의한 효과가 있을 것으로 추측된다.

Table 1. The Activating Effects of *Palmijihwang-hwan*(*baweidehuang-wan*) on the MC3T3-E1 cell.

Group	MTT ^a	ALP ^a	PA ^a
control	0.3243±0.0049	0.5428±0.0168	1.5077±0.0020
<i>Palmijihwang-hwan</i>			
0.10% con.	1.1984±1.6543**	0.5979±0.0080	1.5286±0.0038
0.25% con.	1.0565±1.4961*	0.5760±0.0065	1.4776±0.0086
0.50% con.	0.9900±1.4642*	0.5289±0.0109	1.5188±0.0031

a : Mean±S.D.
* p<0.05
** p<0.01

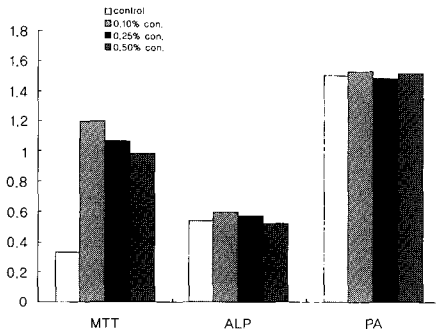


Fig. 1. The Activating Effects of *Palmijihwang-hwan* (*baweidehuang-wan*) on the MC3T3-E1 cell.

五倍子 추출물은 0.25%, 0.50% 농도에서 뼈모유사세포의 활성을 유의하게 증가시켰고, 0.10%, 0.25%, 0.50% 농도에서 치주인대섬유모세포의 활성을 유의하게 증가시킨 것으로 보아 뼈의 생성능력에 유의한 효과를 보이는 것으로 사료된다.

단백질 합성능에서 八味地黃丸 추출물은 0.10%, 0.25%, 0.50% 농도에서 뼈모유사세포와 치주인대섬유모세포의 단백질 합성을 증가시키지 못하고 대조군과 비슷한 효과를 보였다.

五倍子 추출물은 0.10%, 0.25%, 0.50% 농도에서 뼈모유사세포의 단백질 합성능을 유의하게 증가시켰고, 0.50% 농도에서 치주인대섬유모세포의 단백질 합성능을 유의하게 증가시켰으므로 치주조직 재생을 위한 단백질 합성에 효과를 보여주었다.

이상의 실험 결과를 고찰해 보면 五倍子 추출물은 알칼리성 인산효소의 활성과 단백질 합성능에 뚜렷한 효과를 보여주므로 치주조직 재생제로서 개발 가능성이 있다고 사료되고, 八味地黃丸은 세포활성도

증가 이외에는 그다지 뚜렷한 효과를 보여주지 못했지만 본 실험이 뼈모유사세포와 치주인대섬유모세포를 사용한 세포 수준에서 시행된 것이므로 한방처방의 특성상 腎虛로 辨證되는 치주질환 환자에게 투여해 볼 필요가 있으며, 앞으로 단미약제 뿐만 아니라 복합적인 한방처방으로 치주조직 재생에 관한 연구가 필요하리라 생각된다.

결 과

1. 八味地黃丸 추출물이 뼈모유사세포의 활성에 미치는 영향

세포 활성도 분석에서 八味地黃丸 추출물은 뼈모유사세포의 활성을 유의하게 증가시켰다. (Table 1, Fig. 1)

알칼리성인산효소 활성도 분석에서 八味地黃丸 추출물은 알칼리성인산효소의 활성도를 증가시켰으나 통계학적 유의성은 없었다. (Table 1, Fig. 1)

단백질 합성능 분석에서 八味地黃丸 추출물은 단백질 합성 증가를 보였으나 통계학적 유의성은 없었다. (Table 1, Fig. 1)

2. 八味地黃丸 추출물이 치주인대 섬유모세포의 활성에 미치는 영향

세포 활성도 분석에서 八味地黃丸 추출물은 치주인대 섬유모세포의 활성을 감소시켰다. (Table 2, Fig. 2)

알칼리성인산효소 활성도 분석에서 八味地黃丸 추출물은 알칼리성인산효소의 활성을 감소시켰으나 통계학적 유의성은 없었다. (Table 2, Fig. 2)

단백질 합성능 분석에서 八味地黃丸 추출물은 단백질 합성 감소를 보였으나 통계학적 유의성은 없었

Table 2. The Activating Effects of *Palmijihwang-hwan*(*baweidehuang-wan*) on the Periodontal ligament fibroblast.

Group	MTT ^a	ALP ^a	PA ^a
control	0.2006±0.0039	0.5919±0.0181	1.5249±0.0025
<i>Palmijihwang-hwan</i>			
0.10% con.	0.1813±1.6542	0.6086±0.0151	1.4947±0.0039
0.25% con.	0.1414±0.0023*	0.5383±0.0080	1.5163±0.0046
0.50% con.	0.1428±0.0039*	0.4808±0.0104*	1.5208±0.0004

a : Mean±S.D.
* p<0.05

Table 3. The Activating Effects of *Obaeja*(*Galla rhois*) on the MC3T3-E1 cell.

Group	MTT ^a	ALP ^a	PA ^a
control	0.3243±0.0049	0.5428±0.0168	1.5077±0.0020
<i>Palmijihwang-hwan</i>			
0.10% con.	0.0463±0.0002***	0.5439±0.0214	1.6194±0.0019***
0.25% con.	0.0936±0.0008***	0.7633±0.0243**	1.7308±0.0022***
0.50% con.	0.2298±0.0028**	1.4795±0.0621***	1.8476±0.0045***

a : Mean±S.D.
* p<0.05
** p<0.01
*** p<0.0001

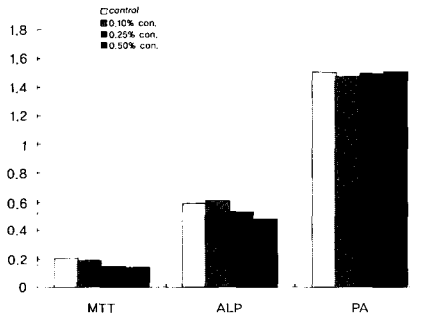


Fig. 2. The Activating Effects of *Palmijihwang-hwan* (*baweidehuang-wan*) on the Periodontal ligament fibroblast.

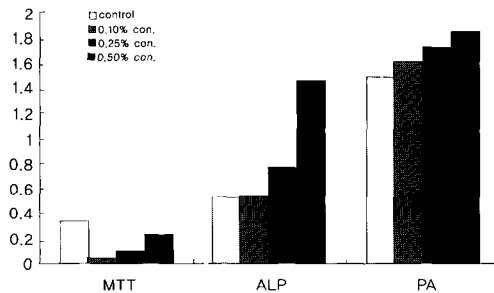


Fig. 3. The Activating Effects of *Obaeja*(*Galla Rhois*) on the MC3T3-E1 cell.

다. (Table 2, Fig. 2)

3. 五倍子 추출물이 뼈모유사세포의 활성화에 미치는 영향

세포 활성화도 분석에서 五倍子 추출물은 뼈모유사세포의 활성을 감소시켰다. (Table III, Fig. 3)

알칼리성인산효소 활성화도 분석에서 五倍子 추출물은 알칼리성인산효소의 활성도를 유의하게 증가시켰다. (Table 3, Fig. 3)

단백질 합성능 분석에서 五倍子 추출물은 단백질 합성능을 유의하게 증가시켰다. (Table 3, Fig. 3)

4. 五倍子 추출물이 치주인대 섬유모세포의 활성화에 미치는 영향

세포 활성화도 분석에서 五倍子 추출물은 치주인대 섬유모세포의 활성을 감소시켰다. (Table IV, Fig. 4)

알칼리성인산효소 활성화도 분석에서 五倍子 추출물은 알칼리성인산효소의 활성도를 유의하게 증가시켰다. (Table 4, Fig. 4)

단백질 합성능 분석에서 五倍子 추출물은 단백질 합성능을 유의하게 증가시켰다. (Table 4, Fig. 4)

Table 4. The Activating Effects of *Obaeja*(*Galla rhois*) on the Periodontal ligament fibroblast

Group	MTT ^a	ALP ^a	PA ^a
control	0.2006±0.0039	0.5920±0.0181	1.5249±0.0025
<i>Obaeja</i>			
0.10% con.	0.0453±0.0001***	0.7035±0.0143*	1.5333±0.0259
0.25% con.	0.1396±0.0013**	0.8893±0.0111***	1.5652±0.0209
0.50% con.	0.2181±0.0081	1.1176±0.0064***	1.6835±0.0053***

a : Mean±S.D.

* p<0.05

** p<0.01

*** p<0.0001

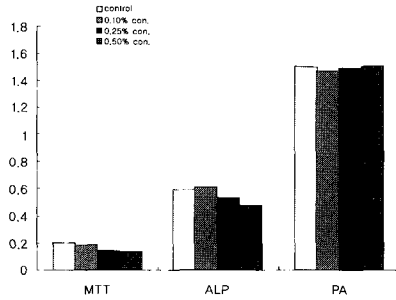


Fig. 4. The Activating Effects of *Obaeja*(*Galla Rhois*) on the Periodontal ligament fibroblast

결론

八味地黃丸과 五倍子 추출물이 치주질환에 미치는 효능을 알아보고자 치주조직 재생에 중심적 역할을 하는 뼈모유사세포와 치주인대섬유모세포를 실험재료로 선정하여 세포활성과 알칼리성인산효소의 활성, 단백질의 합성능에 대하여 실험한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 八味地黃丸 추출물은 뼈모유사세포의 세포활성도를 유의하게 증가시켰다.
2. 五倍子 추출물은 뼈모유사세포와 치주인대 섬유모세포의 알칼리성 인산효소 활성도와 단백질 합성능을 농도 의존적으로 유의하게 상승시켰다.

참고문헌

1. 김중관 외. 기초 및 임상치주과학. 서울:신홍인터내셔널. 1999:173.
2. Ramfjord SP, Nissle RR. The modified Widman flap.

- Journal of Periodontol. 1974;45:601-7.
3. Ramfjord SP. Present status of the modified Widman flap procedure. J. Periodontol. 1977;48:558-61.
4. Terranova VP, Hic S, Lyall RM, Wikejo UME. A biochemical approach to periodontal regeneration, AFSCM, Assay for specific cell migration. J. Periodontol. 1987;58:247-59.
5. Terranova VP, Goldman HM, Listgarten MA. The periodontal attachment apparatus, structure, function and chemistry, cited in Genco RJ, Goldman HM, Cohen DW. Contemporary periodontics. The C.V. Mosby Co. Toronto. 1990; 51-4.
6. Wikejo UME, Claffey N, Nilveus RE, Egelberg J. Periodontal repair in dogs, effect of root surface treatment with stannous fluoride or citric acid on root resorption. J. Periodontol. 1991;62:180-4.
7. Blumenthal NM. The use of collagen membranes to guide regeneration of new connective tissue attachment in dogs. J. Periodontol. 1988;59:830-6.
8. Caffesse RG, Smith BA, Castelli WA, Nasjleti CE. New attachment achieved by guided tissue regeneration in beagle dogs. J. Periodontol. 1988;59:589-94.
9. Pontoriero R, Nyman S, Ericsson I, Lindhe J. Guided tissue regeneration insurgically-produced furcation defects, an experimental study in the beagle dog. J. Clin. Periodontol. 1992;19:159-63.
10. 권영혁, 박준봉. 치주과학. 서울: 군자출판사. 1997: 85-9.
11. Fitzpatrick BD, U.S. Army Dental Activity, Fort Gordon. GA. Enlargement of early wound healing with pluonic polyols F-68 and F-127.
12. Fujimori R. The effect of Madecassol ointment in wound healing. Antenne Medicale 7.3(supplement). 1972;41-42.
13. Lawrence JC. The morphological and pharmacological

- effects of asiaticoside upon skin in vitro and in vivo. Medical Research Council. England. 1968.
14. 권영혁, 이만섭, 양승환, 김영, 박준봉. 치주수술후 *Zea Mays* L. 투여가 치유과정에 미치는 영향에 대한 임상적 연구. 대한치주과학회지. 1994;24(3):649-60.
 15. 박준봉, 허익, 권영혁, 배기환, 정종평. 황금의 에타놀 추출물이 백서 치조골 형성에 미치는 영향. 대한치주과학회지. 1997;27:443-57.
 16. 李挺. 編註醫學入門. 서울:大成文化社. 1989:369.
 17. 繆希雍. 神農本草經疏. 북경:中國中醫藥出版社. 1997:207.
 18. 唐容川. 血證論. 상해:上海人民出版社. 1977:49-50.
 19. Pitaru S, McCulloch CAG, Narayanan SA. Cellular origins and differentiation control mechanisms during periodontal development and wound healing. J Periodont Res. 1994;29:81-94.
 20. Khokher MA, Dandona p. Fluoride stimulates[3H] thymidine incorporation and alkaline phosphatase production by human osteoblasts. Metabolism 1990; 39(11): 1118-21,1990.
 21. 치주과학교수협의회. 齒周科學. 서울: 군자출판사. 1996:150.
 22. Arceo N, Sauk JJ, Moering J, Foster RA, Somerman MJ. Human periodontal cells initiate mineral-like nodules in vitro. J. Periodontol. 1991;62:499-503.
 23. Cho MI, Lin WL, Genco RJ. Platelet-derived growth factor-modulated guided tissue regeneration therapy. J. Periodontol. 1995;66:522-30.
 24. Ogata Y, Niisato N, Sakurai T, Furuyama S, Sugiya H. Comparison of characteristics of human gingival fibroblasts and periodontal ligament cells. J Periodontol. 1995;66:1025-31.
 25. Thomas NR. Collagen as the generator of tooth eruption, the eruption and occlusion of teeth (poole D. F. G. and Stack, M. V. eds). Butterworths. London. 1976;209-301.
 26. 임미경, 김은철, 유수경, 김강주. 레진 배양액의 세포 독성에 관한 연구. 대한치과보존학회지. 1993;18:369-76.
 27. Wataha JC, Craig R G, Hank CT. Precision of and new methods for testing in vitro allyly cytotoxicity. Dent. Master. 1992;8:65-71.
 28. Kasugai S, Hasegawa N, Ogura H. Application of the MTT colorimetric assay to measure cytotoxic effects of phenolic compounds on established rat dental pulp cells. J. Dent. Res.1991;70:127-30.
 29. Matsuda N, Kumar NM, Ramakrishnan PR, Lin WL, Genco RJ, Cho MI. Evidence for up-regulation of epidermal growth-factor receptors on rat periodontal ligament fibroblast cells associated with stabilization of phenotype in vitro. Arch, Oral Biol. 1993;38(7):559-69.
 30. Allen TD, Schor SI. The contraction of collagen matrices by dermal fibroblasts. J Ultra Res. 1993; 83:205.
 31. Clark RA F. Basics of cutaneous wound Repair. J Dermatol Oncol. 1993;19: 693-706.
 32. 盧石善. 原色眼耳鼻喉科學. 서울:一中社. 1999:80-7.
 33. 清陳夢雷等. 醫部全錄. 북경:人民衛生出版社. 1983:1375-90.
 34. 巢元方. 巢氏諸病源候論. 서울:大成文化社. 1992:212-3.
 35. 朱丹溪. 脈因證治. 상해:上海科學技術出版社. 1986: 157.
 36. 陳無擇. 三因極一病證方論. 서울:一中社. 1992:228.
 37. 清陳夢雷等. 醫部全錄. 북경:人民衛生出版社. 1983:1375-90.
 38. 趙獻可. 醫貫. 북경:人民衛生出版社. 1982:72.
 39. 許俊. 東醫寶鑑. 서울:大成文化社. 1992:153,358-61.
 40. 이공우. 치주질환에 이용되는 한방약제의 문헌적 연구. 서울:경희대학교치과대학원. 1979:20.
 41. 김창민 등 역. 완역중약대사전. 서울: 도서출판정담. 1998:3969-75.
 42. 寇宗奭. 本草衍義. 북경:人民衛生出版社. 1990:77.
 43. 繆希雍. 神農本草經疏. 북경:中國中醫藥出版社. 1997:207.
 44. 李尙仁等編譯. 漢藥臨床應用. 서울:傳統醫學研究所. 1998:400-1.