

녹용이 치주인대세포의 세포주기조절에 미치는 영향

유승한 · 최희인 · 김현아 · 김윤상 · 신형식 · 유형근*

원광대학교 치과대학 치주과학교실

Effects of Cervi Parvum Cornu on the Cell Cycle Regulation in Human Periodontal Ligament Cells

Seung Han You, Hee In Choi, Hyun A Kim, Yun Sang Kim, Hyung Shik Shin, Hyung Keun You*

Department of Periodontology, School of Dentistry, Wonkwang University

Cervi Parvum Cornu(CPC) is that the young horn of deer family and has been traditionally used as a medicine in Eastern. The purpose of present study was to investigate the effects of CPC on cell cycle progression and its molecular mechanism in human periodontal ligament cells (HPDLC). In cell proliferation assay, 1 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml, 1 μ g/ml and 10 μ g/ml of CPC were used, all treatment groups increased the cell growth. Maximal cell proliferation was observed in cells exposed to 100 ng/ml of CPC at 4 day, and 10 ng/ml and 100 ng/ml of CPC at 6 days. S phase was increased and G1 phase was decreased in the group treated with 100 ng/ml of CPC in cell cycle analysis. The protein levels of cyclin D1 were not changed, but the levels of cyclin E, cdk 2, cdk 4 and cdk 6 were increased. The protein levels of p21, pRb were decreased as compared to that of control group, but the levels of p53 was not changed in the cells both treated with CPC and untreated. These results suggested that CPC increases the cell proliferation and cell cycle progression in HPDLC, which is linked to an increased cellular levels of cyclin E, cdk 2, cdk 4 and cdk 6, and decreased the levels of p53, p21.

Key words : Cervi Parvum Cornu, Periodontal ligament cell, Cell cycle regulation

서 론

치주염은 치은 염증과 치아 주위의 지지 치조골과 결합조직의 상실을 동반한 치주낭 형성으로 특징 지워진다¹⁾. 치주치료에 있어서 치주낭 제거, 원인요소 제거, 치주조직 성형, 상실된 치주조직 재건 등의 목적들이 있지만 치주조직의 재생이 가장 기본적인 목적이다. 치주 질환으로 인해 상실된 치주조직을 재생하기 위해서는 골 이식술^{2,3)}, 치근면 처리술^{4,5)}, 조직유도 재생술^{6,7)} 등과 같은 여러 가지의 술식을 적용해 왔다. 특히 조직유도 재생술은 치주인대에서 유래되는 전구세포들이 백악질과 치주인대, 골 등과 같은 조직을 재생시킬 수 있는 능력을 가졌다는 이론을 전제로 하고 있기 때문에^{8,9)}, 치주인대 세포가 치주조직 재생에 중요한 역할을 하고 있으며 여기에는 이 세포들의 이주와 증식이 필요한 것으로 여겨지고 있고 이 과정은 성장인자나 화학주성

요인들에 의해서 영향을 받고 조절되어 질 수 있다. Melcher⁹⁾는 치주인대세포들이 치주인대와 치조골과 연관된 치주병소의 치유에서 중요한 역할을 한다고 제시하였다. 조직유도재생술에서 치주손상부위로 상피조직과 치은결합조직세포의 근단이동을 막음으로서 치주인대세포들이 치근표면에 재구성되며 새로운 부착 기구가 생성된다. 이런 치주인대세포의 증식은 세포주기 진행 촉진물질에 의해 증가하며 증식이 빠를수록 재생속도나 능력이 증가되는 것이다. 그래서 치주조직재생에 여러 성장인자들과 세포기질들이 작용을 하며 최근에는 생약추출물들이 많이 연구되고 있다. 지난 수십년간 성장 인자라고 알려진 물질들에 대한 연구가 활발하게 진행되어 왔다. 이러한 성장인자 중 치주조직의 치유에 영향을 주는 대표적인 인자로서, platelet derived growth factor(PDGF)¹⁰⁾, transforming growth factor(TGF)¹¹⁾, fibroblast growth factor(FGF), insulin-like growth factor(IGF)¹²⁾, epidermal growth factor(EGF)와 bone morphogenetic protein(BMP) 등이 있다. 조직의 치유와 관계된 이러한 인자들은 화학주성, 증식, 분화와 세포외 기질 단백질의 생성을 포함하는 다양

* 교신저자 : 유형근, 전북 익산시 신용동 344-2, 원광대학교 치과대학
E-mail : hkperio@wonkwang.ac.kr, Tel:063-850-6634
· 접수 : 2002/11/20 · 수정 : 2002/12/19 · 채택 : 2003/01/27

한 역할을 가지고 있다. 한편 위와 같은 성장인자와 더불어 한의학에서 치주조직을 재생시키는 물질의 연구가 이루어져왔다. 한방에서의 치주질환에 대한 관심은 오래전부터 시작되었던 것으로 나타나고 있는데 치주질환은 황제내경에서 처음으로 수록된 증상으로 구창이라고 알려져 왔다. 구창을 치료하기 위한 많은 한약처방과 함께 각각의 한약제가 면역 억제제, 항염제, 살균제, 항진균제, 진통제, 해열제, 케약억제제, 타액분비촉진제 등으로 사용되고 있다는 다수의 보고가 있으며, 황백(黃柏:Phellodendri Cortex), 길경(桔梗:Platycodia Radix), 형개(荊芥:Nepetae Spica), 응담(熊膽:Fel Uris)의 유사성분 등은 그 중에서도 비교적 중요한 약재로 사용되어 왔다^{13,14}. 또한 창상 치유와 염증의 제거 및 부종 감소, 지혈 작용을 위해서 많이 쓰이는 약재로는 인삼(radix ginseng), 감초(radix glycyrrhizae), 황금(radix scutellariae), 황련(rhizoma coptidis), 괴화(flos sophorae), 백금(tuber blattellae) 등이 알려져 있다^{15,16}. 녹용(Cervi Parvum Cornu)은 매화록(梅花鹿, Cervus nippon Temminck), 마록(馬鹿, C. elaphus L.) 및 그 밖의 동속 근연동물(사슴과 Cervidae)의 털이 밀생되고 골질화되지 않은 어린 뿔로 만든 것이다¹⁷. 녹용은 강장작용, 성장발육촉진작용, 조혈작용, 신경쇠약치료작용, 심부전증치료작용, 오장육부의 기능항진작용 등 다양한 효능이 있는 것으로 동의보감에 수록되어 있으며¹⁸, 장양보신, 신체활력증강 및 심근운동개선 등의 효과와 피로 회복, 신체저항력증진, 건뇌안신효과 등이 문헌에 기록되어 있다¹⁹. 동물을 이용한 효능에 관한 연구는 백서의 성장촉진작용, 조혈작용, 혈청 콜레스테롤 저하작용, 단백질 합성 촉진작용, 노화방지효과, 백서의 척추신경 효소활성 증가효과, 진통작용, 항피로효과, 면역활성 증가작용 및 진정작용 등이 있음이 보고되어 있다^{20,21}. 본 연구의 목적은 녹용이 치주조직재생을 일으키는 치주인대 세포의 증식과 세포주기조절 단백질들에 미치는 영향을 알아보기 위함이며, 이를 토대로 치주조직 재생과정을 촉진시키는 약제를 개발하려고 한다.

재료 및 방법

1. 녹용의 준비

원광대학교 약학대학에 의뢰하여 각각의 녹용 50 g을 분말 형태로 분쇄하여 증류수 1 l와 혼합하여 가열 여과한 후 1,500 rpm의 rotatory evaporator로 농축한 다음 동결 건조하여 얻어진 분말을 이용하였다. 분말 1 g을 증류수 10 ml에 섞어 stock solution을 만들어 농도별로 희석한 후 0.2 µm syringe filter (Nalgene Company, Naperville, IL, USA)로 여과 멸균한 후 사용하였다.

2. 치주인대세포의 배양

본 연구에 사용된 치주인대 세포는 교정 목적으로 발치한 건강한 소구치에서 얻어졌다. 발치에 앞서 치은의 건강상태는 임상 및 방사선학적으로 평가되었다. 발치한 치아의 치근 1/3에서 절제한 치주인대조직은 10% 우태아 혈청 (Fetal bovine serum, Gibco Co., USA)과 1% 항생제(Penicillin G Streptomycin

Amphotericin B 포함, Gibco Co.)를 가한 α-MEM(Minimal Essential Medium, Gibco Co.) 으로 3회 세척하였다. 치주인대 조직을 세척한 후 약 1mm² 로 세절하여 60-mm 세포 배양용 배양 접시(Nunc, Naperville, IL, USA)로 옮겼다. 세절한 조직은 20 분간 37°C, 5% CO₂, 습도 100% 배양기(Bantex 1820 IR, SHELL-LAB, USA)에서 배양 접시에 고르게 부착이 되도록 배양시킨 후, 각 plate 당 2 ml의 10% 우태아혈청과 1% 항생제를 포함한 α-MEM을 가하고 단일세포층이 형성될 때까지 2일 간격으로 배양액을 교환하였다. 2일간 배양후 배양접시내의 배양액을 제거하고 PBS(Gibco Co.)로 2회 세척하여 부착되지 않은 세포를 제거하였다. 부착된 세포의 분리를 위해 PBS(Gibco Co.)를 제거한 후 0.25% trypsin/EDTA (Gibco Co.)를 배양 접시당 2 ml 씩 넣고 3분간 원심 분리용 시험관으로 옮겨 1,200 rpm으로 10 분간 원심하였다. 원심후 상청액을 제거하고 PBS를 가하여 세척한 후 Vortex mixer로 혼합하고 세포 부유액을 만들어 60-mm 배양접시에 분주하였다. 배양액은 세포의 충분한 증식이 명확히 나타날 때까지 2 혹은 3일 간격으로 교환하였다. 본 실험에서는 4~7 계대 배양한 치주인대세포를 사용하였다.

3. 세포 수 측정

배양접시에서 밀생에 도달한 단층의 세포들을 0.25% trypsin/EDTA 로 분리해 내었다. 이 세포들을 배양액으로 현탁시키고 6-well plate에 1×10⁴ 개의 세포수가 되도록 분주하였다. 24시간 후에 배양액을 제거하고 실험군에는 1 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml의 녹용을 첨가하고 대조군에는 증류수를 넣었다. 2, 4, 6일 동안 37°C에서 배양한 후 혈구계수기를 이용하여 세포의 수를 계산하였다. 시간마다 각 그룹에서 3번 배양을 시행했다.

4. MTT 측정

배양접시에서 5 계대 배양된 밀생에 도달한 단층의 치주인대세포들을 0.25% trypsin/EDTA 로 분리해 내었다. 혈구계수기로 세포 수를 세어 96-well plate(Nunc, Naperville, IL, USA)에 각 well당 2×10³개의 세포가 들어가도록 분주하였다. 세포들이 부착할 수 있도록 1일간 5% CO₂, 95% 공기와 100% 습도에서 37°C 상태에서 배양하였다. 그리고 24시간 후 부착되지 않은 세포들은 교환배지에 의해 제거되었다. 실험군에는 1 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml의 녹용을 첨가하고 대조군에는 증류수를 넣었다. 2, 4, 6일 동안 배양한 후, MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide ; Sigma, USA) 용액 100 µl 을 각각의 well 에 첨가되었으며 그 후 4시간동안 배양되었다. 배양후 배지를 제거하고 200 µl의 dimethyl sulfoxide (DMSO; Junsei, Japan)를 첨가하여 형성된 formazan 결정의 용해를 위해 plate를 흔들었다. ELISA 분석기 (Spectra MAX 250, Molecular Devices Co., Sunnyvale, CA, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

5. 세포주기 분석

Plate에 분주된 치주인대 세포들은 24 시간 후에 1 $\mu\text{g/ml}$, 100 ng/ml의 녹용을 첨가한 후 4 일간 배양하였다. 배양된 세포들은 trypsinization시킨 후 PBS로 세척하였다. 세포들은 4°C에서 45분 동안 70% ethanol로 고정 후 1 $\mu\text{g/ml}$ RNase A가 포함된 TSP solution (0.1% Triton X-100, 0.1% sodium citrate, 0.005% propidium iodide)으로 재고정 후 실온에서 30분 동안 배양되었다. 세포주기 상태는 FACScan flow cytometer(Beckton-Dickenson, San Jose, CA, USA)로 분석하였으며, 두 번 반복 실험하였다.

6. Western blot 분석

배양된 치주인대세포를 3일 후에 10 $\mu\text{g/ml}$ 와 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 녹용에 노출시켰다. 100-mm 배양 접시에서 자란 세포들은 15분 동안 저온에서 lysis buffer [10mM Na₂HPO₄ (pH 7.2), 0.9% NaCl, 1% Triton X-100, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 0.2% sodium azide, 0.004% sodium fluoride]로 용해시켰다. 세포 용해산물을 20분간 15,000 x g에서 원심분리 시켜서 1mg/ml의 단백질을 함유한 상층액을 3분간 끓여서 변성시켰다. 100 μg 의 단백질을 함유한 변성된 상층액의 일부를 15% SDS-polyacrylamide gel에서 전기영동 시킨 후 PDVF membrane (Millipore Corp., Bedford, MA, USA)에 transfer 하였다. 실온에서 60분동안 차단액(Zymed, San Francisco, CA, USA)에서 배양 후 이 막을 다음의 일차 항체(diluted 1/1000)에 90분간 노출시켰다. G1주기 전반부의 활성화를 관찰하기 위한 mouse anti-cyclin D1 monoclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), rabbit anti-cdk 4 polyclonal antibody (Oncogene science, Uniondale, NY, USA), rabbit anti-cdk 6 polyclonal antibody(Santa Cruz Biotechnology), G1주기 후반부의 활성화를 관찰하기 위한 mouse anti-cyclin E monoclonal antibody(Oncogene science), rabbit anti-cdk 2 polyclonal antibody(Santa Cruz Biotechnology), 세포주기의 진행을 억제하는 세포주기조절단백질을 관찰하기 위해 mouse anti-p53 monoclonal antibody(Ab-2; Oncogene science), mouse anti-p21 monoclonal antibody(Santa Cruz Biotechnology)가 사용되었으며, mouse anti-pRb(IF8) monoclonal antibody(Santa Cruz Biotechnology)는 이런 세포주기조절단백질의 변화가 전사인자의 유리에 영향을 주는 가를 평가하기 위해 사용하였다.

1차 항체로 반응시킨 후 PBS로 2회 세척 후 그 막은 2차 항체(Santa Cruz Biotechnology)와 결합된 anti-mouse or anti-rabbit IgG-alkaline phosphatase로 60분간 처리된 후 다시 PBS로 7분 동안 2회에 걸쳐 세척을 한 후 ECL kit로 1분 동안 반응시켜 Hyperfilm-MP(Amersham, UK)에 노출시켰다. 사용된 단백질이 동일한 양인지를 확인하기 위하여 membrane을 1x Ponceau S 용액(Sigma Co., USA)에 염색한 후 발현 정도를 서로 비교하였다.

7. 통계분석

실험결과와 분석은 SPSS WIN version 10.0 을 사용하여 평

균과 표준 편차를 구하고, 이들의 통계학적 유의성은 일원 분산 분석법(One-way ANOVA)을 이용하여 처리하였다(p<0.05).

결 과

1. 녹용의 치주인대세포에 대한 세포 증식

1) 세포 수 측정

치주인대세포에 대한 녹용 1ng/ml, 10ng/ml, 100ng/ml, 1 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$ 을 배양액에 첨가후 2, 4, 6일간 배양하여 살아있는 세포수를 측정하였다. 실험 결과에서 대조군에 비해 2일째에는 100ng/ml, 1 $\mu\text{g/ml}$ 군이 유의한 세포증식을 보였으나 실험군 간의 통계학적 유의성은 없었다. 4일째에는 1ng/ml을 제외한 모든 실험군들이 유의한 많은 세포증식을 보였다. 6일째에는 1 $\mu\text{g/ml}$ 녹용 첨가 실험군에서 대조군에 비해 유의한 증가한 세포증식을 보였으나 실험군간의 통계학적 유의성은 없었다(Fig. 1).

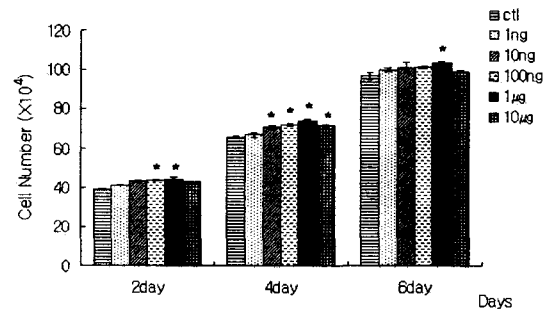


Fig. 1. Effect of Cervi Parvum Cornu on cell proliferation of HPDLCs between control group and experimental group (1 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml, 1 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$). Cell counting was performed after 2, 4, 6 day incubation (mean \pm S.D.). Vertical bars represent standard deviation of each independent experiments. * : Significantly different from the control(p<0.05), ctl : Control group

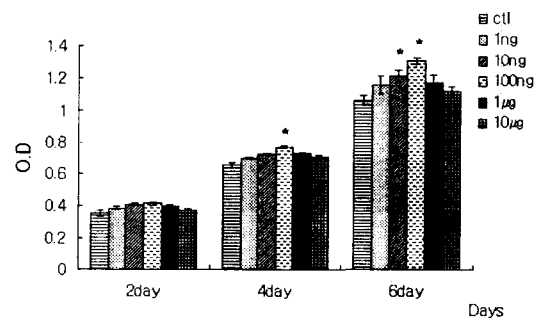


Fig. 2. Effect of Cervi Parvum Cornu on cell growth of HPDLCs between control group and experimental group(1 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml, 1 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$). MTT assay was performed after 2, 4, 6 day incubation(mean \pm S.D.). Vertical bars represent standard deviation of three or four independent experiment. * : Significantly different from the control(p<0.05), ctl : Control group

2. 세포주기 분석

녹용이 치주인대세포의 세포주기변화에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 100 ng/ml, 1 µg/ml의 녹용이 함유된 배양액에 치주인대세포를 4일간 배양하여 세포주기를 분석하였다. 1 µg/ml의 녹용을 첨가한 경우 S 주기는 8.04%에서 8.07%로 거의 변화가 없었으나, 100 ng/ml 농도에서는 14.44%로 뚜렷한 증가를 보였다. G1 주기는 1µg/ml의 경우 81%에서 83.74%로 증가하였으나 100 ng/ml 농도에서는 78.00%로 감소하였고, G2/M주기는 1 µg/ml의 경우 8.64%에서 6.38%, 100 ng/ml 은 6.45%로 감소하였다. 이러한 결과로 녹용의 투여가 치주인대세포의 세포주기 진행을 증가시키는 것을 알 수 있었으며, 특히 100 ng/ml 농도의 녹용에서 세포주기 진행을 더욱 더 증가시켰다(Fig. 3).

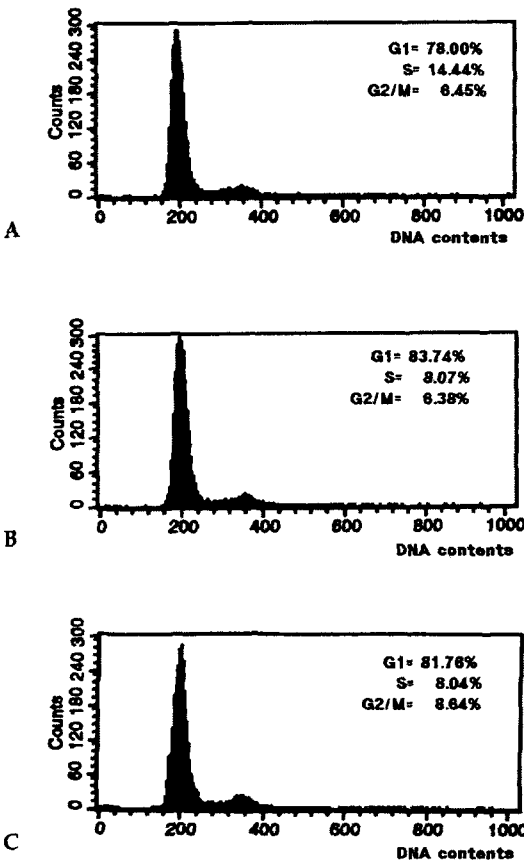


Fig. 3. Effect of Cervi Parvum Cornu on cell cycle progression of HPDLCs. The cell cycle analysis was performed after 4 days incubation (A: control group, B: 100 ng/ml experimental group, C: 1 µg/ml experimental group)

3. cyclin E, cdk 2, cdk 4, cyclin D1와 cdk 6의 발현

녹용의 치주인대세포에 대한 세포주기조절기전을 연구하기 위하여, 세포주기조절단백질 cyclin E, cdk 2, cdk 4, cyclin D1과 cdk 6의 발현을 관찰하였다. 1 µg/ml과 100 ng/ml의 녹용 투여 후, cyclin D1의 발현은 1µg/ml에서 약간 감소한 반면, 100 ng/ml에서는 변화가 없었으며, cdk 2는 100 ng/ml에서 증가하였고, cdk 4와 cdk 6과 cyclin E의 발현은 두 농도에서 모두 증가하는 경향을 보였다(Fig. 4).

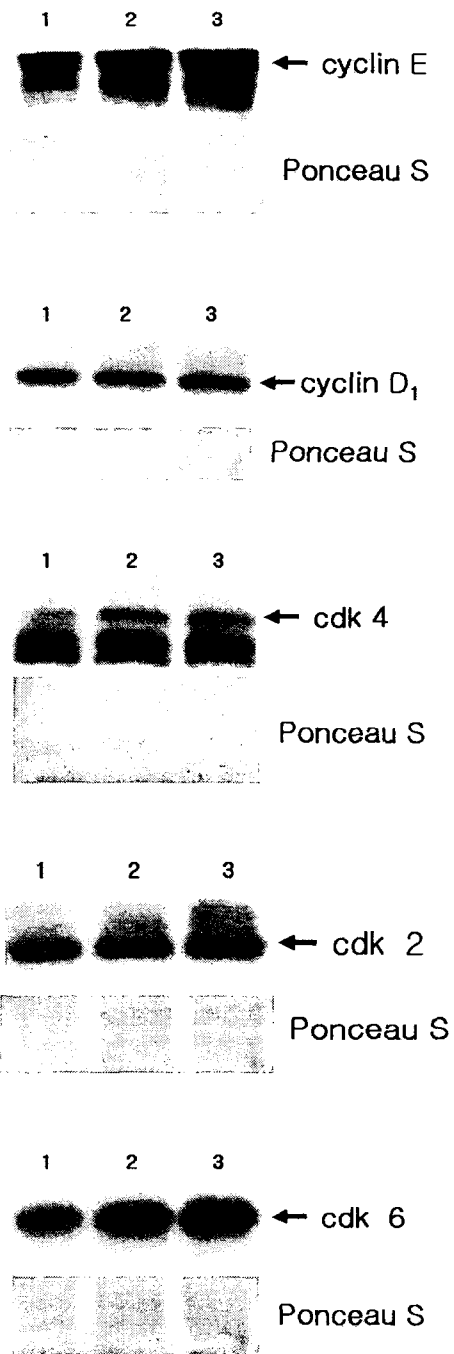


Fig. 4. Western blot analysis for intracellular levels of cyclin E, cdk 2, cdk 4, cyclin D1 and cdk 6 in culture HPDLC. Lane 1 is a control group, lane 2 is an experimental group that supplemented with 1 µg/ml of CPC, and Lane 3 is an experimental group that supplemented with 100 ng/ml of CPC for 2 days. Cell extract equivalent to 50 µg/ml of total cellular protein of HPDLC was electrophoresed by 15% SDS-PAGE and transferred to a PVDF membrane. The intracellular protein levels of cyclin E, cdk 2, cdk 4, cyclin D1 and cdk 6 in HPDLCs were probed with respective antibodies diluted by 1 : 1000. After probing, the membrane was stained with 1×Ponceus S stain for 10 min to reveal the total cellular protein loaded per each lane.

4. p53, p21과 pRb의 발현

녹용의 치주인대세포에 대한 세포주기조절기전을 연구하기

위하여, 세포주기조절단백질 p53, p21과 pRb의 발현을 관찰하였다. 1 $\mu\text{g/ml}$ 과 100 ng/ml의 녹용을 투여 후, p21의 발현은 1 $\mu\text{g/ml}$ 에서 약간 증가한 반면 100 ng/ml에서는 감소하였으며, 두 농도 모두에서 p53의 발현은 변화가 없었으며 pRb의 발현은 감소하였다(Fig. 5).

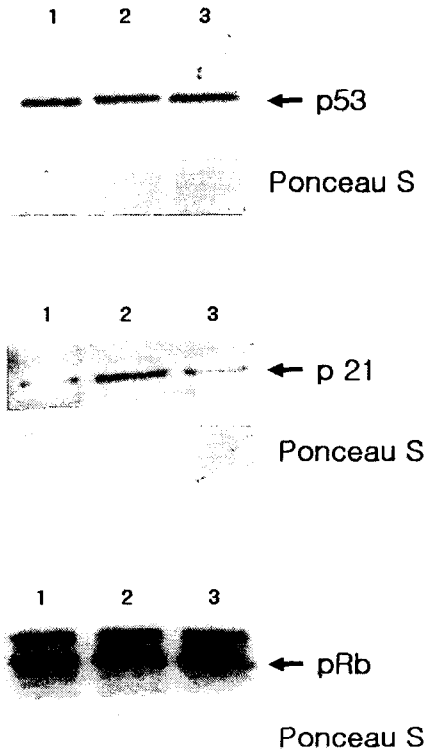


Fig. 5. Western blot analysis for intracellular levels of p53, p21 and pRb in culture HPDLC. Lane 1 is control group and lane 2 is an experimental group that supplemented with 1 $\mu\text{g/ml}$ of CPC, and Lane 3 is an experimental group that supplemented with 100 ng/ml of CPC for 2 days. Cell extract equivalent to 50 $\mu\text{g/ml}$ of total cellular protein of HPDLC was electrophoresed by 15% SDS-PAGE and transferred to a PVDF membrane. The intracellular protein levels of p53, p21, pRb in HPDLCs were probed with respective antibodies diluted by 1 : 1000. After probing, the membrane was stained with 1 \times Ponceus S stain for 10 min to reveal the total cellular protein loaded per each lane.

고찰

파괴된 치주조직의 재생을 위하여 여러 치료 방법들이 사용되고 있으나 최근에 조직 유도 재생술이 발전되고 있으며 치유를 촉진시키기 위한 보조요법과 약물개발이 이루어지고 있다. 이런 재생 과정 중에서 이주해온 세포들의 성상에 따라 치유양상이 다르게 나타나는데 치은결체조직에서 유래된 세포는 치아의 재부착을 촉진시키지 못하고, 치근 흡수를 야기하는데 치주인대에서 유래된 세포는 이환된 치근면에 산생백악질을 형성하고 교원질 섬유가 매몰되어 신부착을 가능하게 한다. 이렇게 치주조직의 재생에서 특히 치주인대세포 풍부한 세포의 기질 합성을 갖는 고도로 조직화된 세포내 기관을 가진 세포극성을 가지고 있으며²²⁾, 또한 매우 높은 교원질 합성율을 보이고 신생 교원질 분

자의 증합에 가장 효과적이며, 조골 기능을 가지며, 백악질 생성에 관여하는 기능을 갖는다고 알려져 있다^{23,26)}. 치주적인 재생이 일어나기 위해서는 치주인대의 전구 세포가 노출된 치근면에 이주되어 부착되어야 하며, 조직화되고 기능적인 섬유성 부착기구 내로 증식, 성숙되어야 한다. 이와 유사한 방법으로 골세포의 전구 세포 또한 재생 중인 치주인대세포와 연결하여 이주, 증식, 성숙되어야만 한다. 이와 같은 이유로 본 실험에서는 4-7 계대배양한 치주인대세포를 이용하였다. 본 연구에서는 세포 증식에 대한 녹용의 효과를 알아보기 위해 치주인대세포에서 연구되었다. 세포수 측정과 MTT 분석에서 치주인대세포에 1 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml, 1 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 녹용을 처리하여 2일, 4일, 6일에 걸쳐서 조사되었다. 세포수 측정에서는 각각의 대조군에 비해 2일째에 100 ng/ml과 1 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 유의한 차이를 보였으며, 4일째에는 1 ng/ml 농도를 제외한 모든 실험군이 차이를 보였으며, 6일군에서는 1 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 유의한 차이를 보였다. 실험군 간의 유의한 차이는 보이지 않았고 대조군 보다는 모두 증가된 양상을 나타냈다. 즉, 실험기간 동안 1 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 지속적인 세포수의 증식이 있었음을 알 수 있었다(Fig. 1). MTT 분석에서는 2일째에 군간의 유의한 차이가 없었고 4일째에 100 ng/ml 농도에서, 6일째에는 10 ng/ml과 100 ng/ml의 농도에서 대조군에 비해 유의한 차이를 보였다. 특히 100 ng/ml 농도 실험군에서 시간이 지날수록 다른 실험군보다 뚜렷하게 증가되는 양상을 보였다(Fig 2). 이들 결과들은 10 ng/ml, 100 ng/ml, 1 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 세포 증식율이 높은 것을 보여주지만 대조군과 큰 차이를 보이지 않았으며, MTT 결과에서 100 ng/ml 농도의 녹용 처리군이 유의한 증가를 지속적으로 나타낸 것은 세포 수 측정 결과와는 약간 다른 것을 알 수 있었다.

최근 치주질환을 치료하기 위하여 많은 치료법들이 개발, 발전되어 오고 있다. 그 중에도 생약제제는 고대로부터 연구되어오는 방법들 중 하나이다. 고 서적에서도 생약으로부터 추출된 약물이 인체에 안전하며 효능, 효과가 지속적임을 증명하고 있다. 치주질환 치료 및 예방제 중 치태억제, 치태세균에 대한 항균효과에 대한 연구가 주로 되어 오고 있었으며 생약제제에 대한 많은 연구가 이루어지지 못하고 있었다. 생약제제는 경험적인 동양 의학의 한계를 넘어, 전래되어 전해지는 여러 생약제제들에 대한 성분별 분획과 이들의 효과에 대한 과학적인 접근이 이루어져 있고, 일부는 상당한 진척을 이루어 실제 임상에 사용할 수준에 이른 것도 있다. 이들 생약제제는 과거 상당기간 검증되어온 안정성과 함께, 실제 임상 적용을 위한 경제적인 측면을 볼 때, 응용 가능한 약제로 생각된다. 현재 연구되고 있는 생약제제들의 효능을 살펴보면 염증의 감소, 조직의 치유촉진, 치주질환의 치료 등을 들 수 있다. 이러한 녹용의 작용이 치주인대 세포의 주기조절에 어떤 영향을 미치는지 알아보기 위해 이전 세포 증식을 알아본 실험 중 4일군에서 가장 좋은 결과를 보인 1 $\mu\text{g/ml}$ 과 100 ng/ml 농도의 녹용을 처리한 치주인대 세포의 세포주기 변화를 관찰하였다. 세포의 성장은 세포주기에 따라 이루어지며 세포주기의 진행은 외부적 또는 내부적인 신호의 전달을 이어받아 순차적으로 진행된다. 세포주기는 G1, S, G2 및 M기로 이루어져

있다. 세포의 증식은 세포주기 상 G1 주기에 머물러 있던 세포가 S주기로 전이되어 유사분열이 일어나서 발생하는 것이다²⁷⁾. G1 기는 첫 번째 휴지기로 세포가 분열된 직후 다음의 성장과정을 시작하기 이전에 필요한 세포내 인자를 준비하는 기간이며, S기에서는 핵에 있는 유전정보를 가진 DNA의 복제가 이루어지는 시기로서 한 염색체에서 동일한 두 염색체로 되는 시기이다. 이후 세포는 G2기로 넘어가는데 필요로 하는 세포질의 인자들이 생산되면서 한 세포가 두 세포로 분열되는데 필요한 인자들이 모두 만들어지는 시기이다. M기에서는 세포질의 분열이 일어나며 세포벽이 생기면서 한 세포가 두 세포로 실제로 나뉘어지는 시기이다. 치주인대세포에 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 과 100 ng/ml 농도의 녹용을 처리한 후 세포주기를 분석한 결과 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 G1주기는 81%에서 83.74%로, S주기는 8.04%에서 8.07%로 약간 증가하였다. 100 ng/ml 에서 G1 주기는 78%로 감소하였으며 S주기는 14.44%로 유의하게 증가하였다(Fig 3). 이것은 100 ng/ml 농도의 녹용 처리군에서 첫 번째 휴지기가 감소하고 두 세포로 분열하기 위한 DNA의 합성이 증가했다는 것으로 증가된 세포 증식을 결과와도 일치한다. 세포의 증식은 여러 가지 자극에 의해 결정되며, 자극의 종류와 전달 기전에 따라 세포분열이 일어나거나 멈추게 된다. 또한 특정 기능을 보유하도록 분화가 일어나기도 한다. 이런 세포주기의 진행과 억제에는 여러 세포 주기 관련 단백질이 관련되어있다. 이런 단백질로는 세포주기 진행에 중요한 역할을 하는 인산화효소인 cyclin dependent kinase(cdk)와 여기에 결합하여 활성을 조절하는 cyclin, 그리고 이 복합체에 결합하여 그 활성을 저해하는 세포주기 억제 단백질을 들 수 있다²⁸⁾. 이들 세포주기조절단백질은 세포활성촉진인자 혹은 세포활성억제인자에 의해 발현이 달라져 세포분열이 촉진되거나, 억제된다.

본 연구에서 세포증식율의 결과를 바탕으로 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 과 100 ng/ml 농도의 녹용을 투여하여 세포주기 조절물질들의 발현을 연구하였다. 세포주기에 작용하는 많은 세포주기조절단백질이 발견되고 있으나, 그 역할이 규명된 것은 많지 않다. 그러나 세포 증식 촉진인자인 mitogen 들의 최종 표적 중의 하나가 cyclin D이며, cyclin E도 관여할 것으로 보인다²⁹⁾. 세포의 핵 내에는 cyclin이라는 단백질이 주기적으로 증가, 감소하고 있으며, mitogen 들에 의해 cyclin D의 발현이 촉진되어 cyclin의 증가에 의하여 cdk 가 활성화되고, cyclin E와 cdk 2의 결합, cyclin D와 cdk 4 혹은 cdk 6의 결합을 통해 cdk activating kinase cdk의 threonine을 인산화 시켜서 활성화된 cdk 는 pRB의 serine 및 threonine을 인산화시킨다. cyclin E-cdk 2 복합체가 활성화됨으로서 cyclin D가 더욱더 pRB의 인산화를 가속시키고 그 결과 pRB가 억제하고 있던 E2F나 c-Abl, Elf-1과 같은 전사인자들이 활성화 되면서 세포주기는 G1에서 S주기로 들어가게 되고 세포는 증식하게 된다³⁰⁻³²⁾. 본 연구에서는 녹용의 투여가 cyclin E, cdk 2, cdk 4, cdk 6의 발현을 촉진시켰으나, cyclin D1에는 영향을 주지 않았다. cyclin D1이 cdk 4나 cdk 6과 결합하여 pRb의 인산화를 증가시키지만 녹용은 cyclin E, cdk 2, cdk 4, cdk 6의 발현을 증가시켜서 세포주기진행을 촉진시키는 것으로 사료된다(Fig.4). 100 ng/ml 에서 세포주기진행을 촉진시키는 단백질이 더

욱 뚜렷하게 나타나서 세포주기 실험에서와 같이 S주기가 증가한 것과 같은 결과를 보인다고 사료된다. 세포 주기의 정확한 조절을 위해서 세포는 cyclin이나 cdk같은 positive regulator 이외에도 p53, p16 및 p21 등의 cdk inhibitor (CKI)들을 가지고 있는데 이들이 negative regulator 로서 필수적인 인자들이다³³⁾. p53은 p21을 활성화시키는 세포주기조절단백질이고 p21은 cyclin E와 cdk 2, cyclin D와 cdk 4나 6 복합체의 활성을 억제한다. 이들에 대한 실험 결과는 p21이 감소하였고 p53은 거의 변화가 없었다. p21은 p53에 의존하여 그 활성이 증가하는 것으로 알려져 있지만³⁴⁾, 이 연구에서 사용된 두가지 농도 중 100 ng/ml 에서 p53의 발현 억제 없이 p21의 발현이 감소하였다(Fig. 5). 이와 같은 p53에 대한 비의존적인 p21의 발현 억제를 보인 연구들이 있으며 일부 암세포에 대한 연구에서도 관찰되었다³⁵⁻³⁷⁾. 결론적으로 녹용을 치주인대세포의 배양액에 첨가하였을 때, 세포주기의 진행이 촉진되며 그 기전으로는 세포주기 진행에서 중요한 cdk 2, cdk 4, cdk 6, cyclin E의 발현을 증가시키고 세포주기진행을 억제하는 p21의 발현을 감소시켜 나타난다고 보여지며 특히 100 ng/ml 농도에서 가장 뚜렷하였다.

결론

본 연구는 강장작용, 성장발육촉진, 심근운동개선, 신체활동증강 및 오장육부의 기능항진작용 등을 보이는 녹용이 파괴된 치주조직 재생에 중요한 역할을 하는 치주인대세포의 세포주기조절에 어떠한 영향을 주어 세포 분열을 촉진시키는지 알아보기 위하여 실시되었다. 치주인대세포의 배양액에 1 ng/ml , 10 ng/ml , 100 ng/ml , 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 녹용을 첨가하여 세포증식을 측정하였으며, 이 중 세포증식율이 높은 100 ng/ml 과 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 녹용을 처리하여 치주인대세포의 세포주기 및 세포주기조절단백질 발현을 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다. 녹용을 투여한 경우 치주인대 세포의 증식이 일어났으며, 특히 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 와 100 ng/ml 의 농도에서 유의한 효과가 있었다($p>0.05$). 치주인대세포에 녹용을 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 과 100 ng/ml 의 농도로 첨가하고 세포주기를 평가한 결과 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 은 대조군에 비해 S 주기는 약간 증가하고, G1 주기는 증가하는 경향을 보였으나 100 ng/ml 에서는 S 주기가 뚜렷하게 증가하고 G1 주기는 감소하는 경향을 보였다. 치주인대세포에 녹용을 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 과 100 ng/ml 의 농도로 첨가하고 세포주기단백질 발현정도를 평가한 결과 cdk 2, cdk 4, cdk 6과 cyclin E의 발현은 증가하고 p21과 pRB는 감소하였으며, cyclin D1과 p53의 발현은 큰 변화가 없었다.

이러한 실험결과는 녹용이 치주인대세포에 대한 세포활성의 증가와 세포주기 진행을 촉진시키며, 그 기전은 cdk 2, cdk 4, cdk 6 및 cyclin E의 발현증가와 p21과 pRB의 발현감소를 유발함으로써 이루어지는 것으로 보이며 녹용이 치주인대세포의 활성화와 분화에 영향을 미칠 수 있으며 치주조직 재생제로의 이용 가능성이 높다고 생각되며 앞으로 임상적으로 활용할 수 있는 여러 방법을 모색할 필요가 있다고 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2001년도 원광대학교의 교비 지원에 의해서 수행됨

참고문헌

1. Caton, J.G. and Quinones, C.R. : Etiology of periodontal diseases. *Curr Opin Dent* 1:17-28, 1991.
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. Terranova, V.P. and Wikesjo, U.M.E. ; Extracellular matrices and polypeptide growth factors as mediators of functions of cells the periodontium. A review. *J Periodontol* 58:371-380, 1987.
5. Hanes, P.J. and Polson, A.M. ; Cell and fiber attachment to demineralized cementum from normal root surfaces. *J Periodontol* 60: 188-198, 1989.
6. Blumenthal, N.M. ; The use of collagen membranes to guide regeneration of new connective tissue attachment in dogs. *J Periodontol* 59:830-839, 1988.
7. 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.
8. 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.
9. Melcher, A.H. ; On the repair potential of periodontal tissues. *J Periodontol* 47:256-260, 1976.
10. Rutherford, R.B., TrailSmith, M.D., Ryan, M.E. and Charette, M.F. : Synergistic effects of dexametasone on platelet-derived growth factor mitogenesis in vitro. *Arch Oral Biol* 37(2):139-145, 1992.
11. Centrella, M., McCarthy, T.L. and Canalis, E. : Transforming growth factor- β and remodeling of bone. *J Bone Joint Surg(USA)* 73A(9):1418-1428, 1991.
12. The potential role of growth and differential factors in periodontal regeneration. *J Periodontol* 67(5):545-553, 1996.
13. 木村雄四郎 : 和漢藥의 世界, 創元社, 53, 1974.
14. 陸昌洙 : 現代方藥合編, 계축문화사, 458, 1976.
15. 生藥學研究會 : 現代生藥學, 學窓社, 1994.
16. 陸昌洙, 金成萬 : 漢藥의 藥理, 成分, 臨床應用, 癸丑文化社, 1982.
17. 本草學(본초학). 대한생약학교수협의회. 사단법인 대한약사회. 742-747, 1995.
18. 허준. 東醫寶鑑. 增刷發行. 南山堂. 698, 1981.
19. 中藥大辭典. 4, 2786, 1985.
20. Wang, B., Zhao, X., Qi, S., Yang, X., Kaneko, S., Hatori, M., Namba, T. and Nomura, Y. : Stimulating effect of deer antler extract on protein synthesis in senescence-accelerated mice in vivo. *Chem Pharm Bull* 36, 2593-2598, 1988.
21. Wang, B., Zhao, X., Qi, S., Kaneko, S., Hatori, M., Namba, T. and Nomura, Y. : Effects of repeated administration of deer antler extracts on biochemical changes related to aging in senescence-accelerated mice. *Chem Pharm Bull* 36, 2587-2592, 1988.
22. Krzysztof, H., Wlodarski and A.H. Reddi : Alkaline phosphatase as a marker of osteoinductive cells. *Calcif Tissue int* 39:382-285, 1986.
23. Nyman S., Karring T., Lindhe J., Planten S. : Healing following implantation of periodontitis affected roots into gingival connective tissue. *J Clin Periodontol* 7:394-401, 1980.
24. Nyman S., Gottlow J., Karring T. and Lindhe J. : The regenerative potential of the periodontal ligament : An experimental study in the monkey. *J Clin Periodontol* 9:257-265, 1982.
25. Caffese R.G., Dominguez L.E., Nasjleti C.E., Castelli W.A., Morrison E.C. and Smith, B.A. : Furcation defects in dogs treated by guided tissue regeneration(GTR). *J Periodontol* 61:45-50, 1990.
26. Chung K.H., Salkin L.M., Stern M.D. and Freedman A.L.: Clinical evaluation of a biodegradable collagen membrane in guided tissue regeneration. *J Periodontol* 61:732-736, 1990.
27. Nurse P. : Ordering S phase and M phase in the cell cycle. *Cell* 79:547-550, 1994.
28. Kato J.A., Matsuoka M., Strom D., Sherr C. : Regulation of cyclin D-dependent kinase 4 (cdk4) by cdk4-activating kinase. *Mol Cell Biol* 14: 2713-1721, 1994.
29. Ohtsubo M., Theodoras A.M., Schumacher J., Roberts J.M., Pagano M. : Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G1-to-S phase transition. *Mol Cell Biol* 15:2612-2624, 1995 .
30. Sherr C.J. : Mammalian G1 cyclins *Cell* 73:1059-1065, 1993.
31. Ewen M.E., Sluss H.K., Sherr C.J., Matsushime H., Kato J., Livingston D.M. : Functional interactions of the retinoblastoma protein with mammalian D-type cyclins. *Cell* 73:487-497, 1993.
32. Wang J.Y., Knudsen E.S., Welch P.J. : The retinoblastoma tumor suppressor protein. *Adv Cancer Res* 64:25-85, 1994.
33. Sherr C.J., Roberts J.M. : Inhibitors of mammalian G1

- cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* 9:1149-1163, 1995.
34. Kim T.K. : in vitro Transcriptional activation of p21 promoter by p53. *Biochem Biophys Res Commun* 234:300-302, 1997.
 35. Xiao H., Hasegawa T., Miyaish O., Ohkusu K., Isobe K.: Sodium butyrate induces NIH3T3 cells to senescence-like state and enhances promoter activity of p21WAF/CIP1 in p53-Independent manner. *Biochem Biophys Res Commun* 237:457-460, 1997.
 36. Haapajarvi T., Kivinen L., Heiskanen A., des Bordes C., Datto M.B., Wang X.F., Laiho M. : UV Radiation is a transcriptional inducer of p21Cipl/Waf1Cyclin-Kinase inhibitor in a p53-Independent manner. *Exp Cell Res* 248:272-279, 1999.
 37. Kaye P.V., Radebold K., Isaacs S., Dent D.M. : Expression of p53 and p21waf1/cipl in gastric carcinoma : lack of inter-relationship or correlation with prognosis. *Eur J Surg Oncol* 26:36-43, 2000.