

A-8. 녹용이 사람태아 골모세포의 세포주기조절에 미치는 영향

양대승*, 유형근, 신형식

원광대학교 치과대학 치주과학 교실

최근에 동양의학에서 사용되던 몇몇 생약제제에 관한 전래의 효능 및 효과를 근거로 치주질환 치료제로서의 응용 가능성 즉 치주질환균에 대한 항염효과와 항균효과를 비롯하여 치주조직 재생능력, 특히 골 재생에 미치는 영향 등에 대한 과학적인 접근과 분석이 시행되고 있는데 이들은 부작용이 적고 장기간 사용이 가능하다는 점에서 관심이 모아지고 있다. 녹용(Cervi Parvum Cornu)은 梅花鹿(Cervus nippon Temminck, Japanese deer) 또는 馬鹿(Cervus elaphus, Red deer) 및 동속 근연 동물(사슴과 Cervidae)의 털이 밀생되고 골질화되지 않은 어린 뿔로 정의된다. 크게 Elaphus계열, Nippon계열로 나누고 있으며 Cervus elaphus는 12아종이 있고 Cervus nippon은 13 아종이 있으며 봄 또는 초여름에 숫 사슴의 새로 돋아나 각화되지 아니한 뿔을 톱으로 자르거나 혹은 칼로 베어내고 끓는 물에 넣었다가 꺼낸 후別に 말린 것을 쓴다. 한의학에서 신농 본초경에 중품으로 분류, 수록된 이래로 동양 3국에서 귀한 약제로 사용되었으며 강장작용, 성장발육촉진작용, 조혈작용, 신경쇠약치료작용, 심부전증치료작용, 오장육부의 기능 항진 작용 등 다양한 효능이 있는 것으로 동의보감에 수록되어있다. 또한 의방류취, 명 의별록, 약성론 및 본초경소론에서는 노화방지, 당뇨증, 피부 소양감, 허리와 등의 통증에 효능이 있는 것으로 기록되어 있다. 현재까지 사슴뿔의 성장 및 석회화시 골단백기질의 발현 및 호르몬변화에 대한 연구가 진행되어 있을 뿐 실제로 녹용이 골형성에 관여하는 조골세포의 세포주기 조절에 어떠한 영향을 미치는 지 구체적으로 밝혀져 있지 않다. 따라서 치주치료에 활용이 될 수 있는 새로운 골형성 유도 물질의 개발을 목적으로 본 연구에서는 녹용 추출물을 분리한 후 이들 추출물을 사람 태아골모세포에 적용하는 세포단위의 생물학적 실험을 시행하였다.

연구방법

실험군에는 1 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$, 1 mg/ml 의 녹용 추출물을 첨가하고 대조군에는 증류수를 넣었다. 2, 4, 6일 동안 배양한 후 혈구계수기를 이용하여 살아있는 세포의 수와 MTT를 계산하였다. 세포주기 분석은 대조군에는 증류수를 넣고 실험군에는 10 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$, 1 mg/ml 의 녹용 추출물을 첨가하고 4, 6일 동안 배양한 후 propidium iodide 용액으로 30분간 염색한 후 flow cytometer (Becton, Dickinson, Mountain View, CA, USA)로 488 nM에서 propidium iodide-DNA complex에서 발생하는 형광을 측정하였다. Western blot 분석은 다음과 같은 1차 항체들을 이용하여 시행하였다. 1) a mouse anti-human monoclonal antibody for p21 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), 2) a rabbit anti-human polyclonal antibody for cdk 2 (Santa Cruz Biotechnology), 3) a rabbit anti-human polyclonal antibody for cdk 4 (Santa Cruz Biotechnology), 4) a rabbit anti-human polyclonal antibody for cdk 6 (Santa Cruz Biotechnology), 5) a mouse anti-human monoclonal antibody for cyclin D1 (Santa Cruz

Biotechnology), 6) a mouse anti-human monoclonal antibody for cyclin E (Oncogene Science, Uniondale, NY, USA), 7) a rabbit anti-human polyclonal antibody for p16 (Santa Cruz Biotechnology), 8) a mouse anti-human monoclonal antibody for RB (Santa Cruz Biotechnology), 9) a mouse anti-human monoclonal antibody for p53 (Oncogene science).

연구결과

2일, 4일 및 6일간 배양한 후 배양된 세포 수를 측정한 결과, 농도 의존적 양상은 보이지 않았으며 모든 배양 기간중 10 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 가장 높은 세포증식을 보였다. 특히 4일군의 1 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$ 과 6일군의 1 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$, 1 mg/ml에서 음성대조군에 비하여 유의성있는 증가를 보였다. MTT 분석으로 세포활성을 측정한 결과 농도 의존적 양상을 보이지 않았으나 모든 배양기간에서 10 $\mu\text{g/ml}$ 농도에 가장 높은 세포활성을 보였는데 특히 6일군의 10 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 유의성이 있었다. 이러한 소견으로 녹용처리에 따른 세포증식과 세포활성이 거의 동일한 결과를 보임을 알 수 있다. 세포주기 분석한 결과 4일군, 6일군의 모든 농도에서 대조군에 비하여 녹용 추출물을 처리한 세포군에서 G1, S는 큰 변화가 없었고 G2/M주기가 증가하였다. Western blot은 cyclin E와 cdk 2의 발현증가와 p53 과 p16의 발현 감소를 유발하였다. 이러한 결과로 녹용 추출물의 투여가 hFOB1의 세포주기 진행을 촉진시킨다는 것을 알 수 있었다.