

녹용이 사람 태아 골모세포의 세포주기 조절에 미치는 영향

양대승¹ · 김현아¹ · 현하나¹ · 유형근¹ · 김윤철² · 신형식¹

원광대학교 치과대학 치주과학교실¹, 약학대학²

I. 서론

최근 경험적인 동양의학의 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 상당 기간 검증되어온 안정성과 함께, 실제 임상에 적용을 위한 경제적인 측면을 볼 때, 응용 가능한 약제로 생각된다. 현재 연구되고 있는 대표적 생약제제들의 효능을 살펴보면 염증의 감소, 조직의 치유촉진, 골조직의 재생 등을 들 수 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 골질화 되지 않은 어린 뿔로 정의된다¹⁾. 크게 *Elaphus*계열, *Nippon*계열로 나누고 있으며 *Cervus elaphus*는 12 아종이 있고 *Cervus nippon*은 13아종이 있으며 봄 또는 초여름에 숫사슴의 새로 돌아나 각화되지 아니한 뿔을 톱으로 자르거나 혹은 칼로 베어내고 끓는 물에 넣었다가 꺼낸 후別に 말린 것을 쓴다. 한의학에서 신농본초경에 중품으로 분류, 수록된 이래로 동양 3국에서 귀한 약제로 사용되었

으며 강장작용, 성장발육촉진작용, 조혈작용, 신경쇠약치료작용, 심부전증치료작용, 오장육부의 기능 향진 작용 등 다양한 효능이 있는 것으로 동의보감에 수록되어있다. 또한 의방유취, 명의별록, 약성론 및 본초경소론에서는 노화방지, 당뇨증, 피부 소양감, 허리와 등의 통증에 효능이 있는 것으로 기록되어 있다²⁾.

동물을 이용한 효능에 관한 연구는 백서의 성장촉진작용, 조혈작용, 혈청 cholesterol 저하작용, 단백질합성 촉진작용, 노화방지효과, 백서의 척추신경 효소활성 증가효과, 진통작용, 항 피로효과, 면역활성 증가작용 및 진정작용 등이 있음이 보고되어 있다³⁻⁷⁾.

녹용에는 다당체, 단백질, 지질 및 무기물등 다양한 성분이 함유되어 있으며 지질성분으로는 prostaglandin 유사물질, phospholipid, glycolipid 및 ganglioside가 함유되어 있다^{8,9)}. 다당체는 궤양예방 효과가 있으며¹⁰⁾, 68개의 아미노산으로 이루어진 단백질은 항염작용이 있는 것으로¹¹⁾, 또한 정제하지 않은 녹용추출물은 노화방지효과가 있으며¹²⁾, 녹용의 ethanol 추출물은 식균세포의 식균작용을 촉진시키고, 당뇨병시 증가되는 혈당을 감소시키며¹³⁾, 소수성 물질은 *Candida albicans*의 균사형성을 선택적으로

* 이 논문은 2000년도 원광대학교 승산연구비 지원에 의해서 수행됨.

억제하는 것으로 보고되었다⁴⁾. 이와 같이 아직 그 구조가 확실히 밝혀지지 않았으나 녹용은 다양한 효능을 나타내는 성분을 함유하고 있다.

또한 일부 약전에서 녹용이 이와 뼈를 튼튼하게 하는 것으로 기록되어 있는 것으로 보아²⁾ 녹용에는 골의 성장 및 석회화를 조절하는 성분이 함유되어 있을 것으로 추정된다. 실제로 사슴의 뿔은 몇 해에 한번 씩 새로 나며 이때 섬유성조직과 연골조직 그리고 맥관들로 이루어져 있는 유년조직이 자라 나오게 되며 밑 부분이 차츰 연골로 변하고 나중에는 석회화 과정을 거쳐 단단한 뼈조직으로 성장하게 된다. 이와 같이 사슴뿔은 절단 후 다시 성장하므로 포유동물의 골격의 성장 및 분화기전을 연구하는데 좋은 모델로 제시되었다^{5,16)}.

세포의 성장은 세포주기에 따라 이루어지며 세포주기의 진행은 외부적 또는 내부적인 신호의 전달을 이어서 순차적으로 진행된다. 세포주기는 G1, S, G2 및 M 기로 이루어져 있다. G1기는 첫번째 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.

이들 각 세포주기에는 이를 주관하는 관련인자들이 있으며 이들의 기능에 따라 세포주기의 진행이 조절되는데 관련 인자로는 cyclin, cyclin-dependent kinases(cdks)와 cdk inhibitor(CKI)가 있다¹⁷⁻²²⁾. cyclin은 다양한 cdks와 반응할 수 있으며 cdks는 serine/threonine protein kinase로서 이들은 cyclin과 복합체를 이룰 때 기능을 하게 된다. cyclin E와 cdk 2의 결합, cyclin D와 cdk 4, cdk 6의 결합을 통해 pRB와 E2F간의 결합을 유리시켜 G1주기가 S주기로 이행되도록 한다²³⁾. p21은 cyclin E와 cdk 2, cyclin D와 cdk 4 또는 cdk 6 복합체의 활성을 억제하며 p16은 cyclin D와 cdk 4 복합체의 활성도를 억제하는데 그 기전은 cyclin D가 cdk 4에 결합하는 장소에 경쟁적으로 작용함으로 이루어지는 것으로 알려져 있다²⁴⁾(Figure 1). 본 연구에서는 cyclin E, cdk2, cyclin D, cdk4, cdk6, p21, pRB, p16 등의 세포주기 조절단백

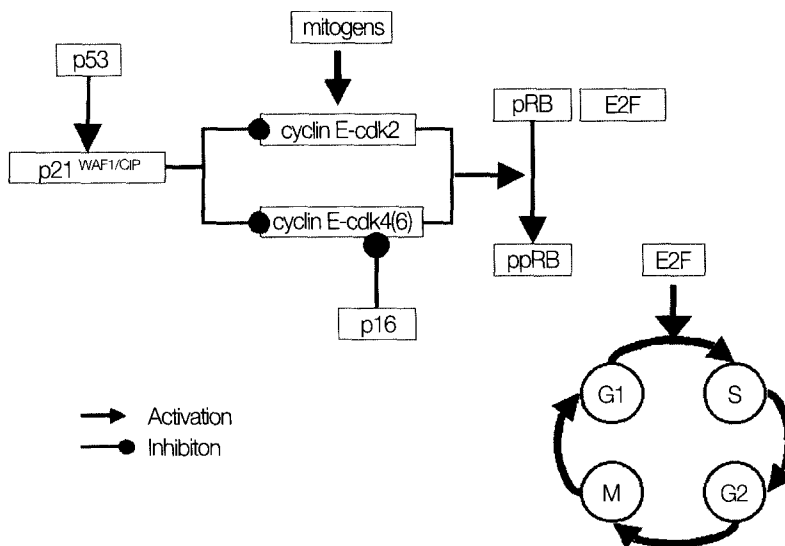


Figure 1. Regulatory proteins of cell cycle

질의 발현을 측정하였다.

현재까지 시슴샘의 성장 및 석회화시 골단백기질의 발현 및 호르몬변화에 대한 연구가 진행되어 있을 뿐²⁵⁻³⁰⁾ 실제로 녹용이 골형성에 관여하는 조골세포의 세포주기 조절에 어떠한 영향을 미치는지 구체적으로 밝혀져 있지 않다. 따라서 치주치료에 활용이 될 수 있는 새로운 골형성 유도물질의 개발을 목적으로 본 연구에서는 녹용 추출물을 분리한 후 이들 추출물을 사람 태아골모세포에 적용하여 세포증식과 그와 관련된 세포주기 조절인자들을 알아보기 위하여 실험을 시행하였다.

II. 연구재료 및 방법

1. 녹용 추출

원광대학교 약학대학에 의뢰하여 각각의 녹용 50g을 분말형태로 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 μ m syringe filter (Nalgene Company, Naperville, IL, USA)로 여과 멸균한 후 사용하였다.

2. 세포 배양

hFOB1 세포주 (human fetal osteoblast cell line 1.19 ; American Type Culture Collection, Manassas, VA)를 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco BRL, USA)과 0.03 mg/ml의 G-418 (DUCHEFA, Netherlands)이 첨가된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium Nutrient Mixture F-12 HAM (DMEM/F-12 1:1 Mixture, Sigma, USA) 2 ml이 담긴 6-well 배양접시에 적정 세포(5×10^4 cell/well)를 분주하였다. 이를 34°C의 온도 및 100% 습도조건에서 95%의 공기와 5% CO₂를 계속 공급하면서 배양하였다. 배양액은 세포가 충분한 증식이 일어날 때까지 2-3일 간격으로 교환하였다.

3. 세포 수 측정

배양접시에서 밀생에 도달한 단층의 세포들을 0.25% trypsin/EDTA로 분리해 내었다. 이 세포들을 배양액으로 현탁시키고 6-well plate에 1×10^4 개의 세포 수가 되도록 분주하였다. 24 시간 후 배양액을 제거하고 실험군에는 1 μ g/ml, 10 μ g/ml, 100 μ g/ml, 1 mg/ml의 녹용 추출물을 첨가하고 대조군에는 증류수를 넣었다. 2, 4, 6일 동안 배양한 후 혈구계수기를 이용하여 살아있는 세포의 수를 계산하였다. 각각의 실험은 4회 반복 시행하였다.

4. MTT 분석

5, 6회 계대 배양된 hFOB1을 0.25% Trypsin/EDTA로 떼어내어 혈구계수기로 세포 수를 세어 96-well plate의 각 well당 2×10^4 개의 세포가 들어가도록 분주하였다. 세포들이 부착할 수 있도록 1일간 5% CO₂, 100% 습도의 37°C 배양기에서 배양한 후 부착되지 않은 세포를 제거하기 위해 배지를 교환하고, 1 μ g/ml, 10 μ g/ml, 100 μ g/ml, 1 mg/ml의 녹용 추출물을 첨가하고, 2, 4, 6일 동안 배양하였으며 대조군에는 증류수를 넣었다.

각각의 시간이 경과된 후 생리 식염수로 용해한 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide ; Sigma) 용액 300 μ 씩을 각각의 well에 첨가하여 4시간 동안 배양하였다. 배양 후 배지를 제거하고 200 μ 의 DMSO (Junsei, Japan)를 첨가하여 형성된 formazan 결정을 용해시킨 후 96-well plate 상으로 옮겨서 ELISA analyser (Spectra MAX 250, Molecular Devices Co., USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 매 실험마다 세포 활성도를 대조군에 대한 백분율로 산출하였으며, 각각의 실험은 4회 반복 시행하였다.

5. 세포주기 분석

대조군에는 증류수를 넣고 실험군에는 10 μ g/ml, 100 μ g/ml의 녹용 추출물을 첨가하고 4, 6일 동안 배

양하였다. 배양액에서 배양된 세포를 trypsinization 하여 혈구계수기로 세포수를 측정하고 다음 3×10^5 개의 세포수를 phosphate buffered saline (PBS)으로 세척하고 70% ethanol로 고정시킨 후, RNase A (0.1 mg/ml)을 처리하여 RNA를 제거하였다. 50 μ g/ml의 propidium iodide 용액으로 30분간 염색한 후 Flow cytometer (Becton-Dickenson, San Jose, CA, USA)로 488 nm에서 propidium iodide-DNA complex에서 발생하는 형광을 측정하였다.

6. Western blot 분석

대조군에는 증류수를 넣고 실험군에는 10 μ g/ml, 100 μ g/ml 녹용 추출물을 첨가한 배양액에서 4일간 배양된 세포를 PBS로 2회 세척한 후, lysis buffer로 세포 단백질을 추출하고, BCA 용액(Sigma)에 Copper (II) sulfate (Sigma)를 50 : 1로 혼합하여 단백질 농도를 측정하였다. 각 실험군 별로 추출된 단백질 50 μ g씩을 사용하여 15% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)를 시행한 후 PVDF (Immobilon-P membrane, Milipore Corp., Bedford, MA, USA)에 transfer하였다. 비특이 항체의 결합을 막기 위하여 실온 상태에서 membrane을 각각의 blocking 용액 (Western star, Tropix Inc., Bedford, MA, USA)에 1시간 동안 처리하였다. 그 후에 다음과 같은 1차 항체들을 이용하여 60분 동안 반응시켰다. 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 mono-

clonal antibody for RB (Santa Cruz Biotechnology), 9) a mouse anti-human monoclonal antibody for p53 (Oncogene science). 1차 항체로 반응시킨 후 blocking buffer로 2회 세척해 내고, anti-mouse or anti-rabbit IgG-alkaline phosphatase conjugated secondary antibody (Santa Cruz Biotechnology)로 실온에서 20분 동안 반응시킨 후 blocking buffer로 세척하였다. $1 \times$ assay buffer로 2분 동안 2회에 걸쳐 세척을 해 준 후에 membrane을 Western Star Substrate 용액으로 반응시키고 Hyperfilm-MP (Amersham Corp., Arlington Heights, IL, USA)에 노출시켰다. 사용된 단백질이 동일한 양인지를 확인하기 위하여 membrane을 $1 \times$ Ponceau S 용액(Sigma)에 염색한 후 발현 정도를 서로 비교하였다.

7. 통계분석

측정한 세포 수와 백분율로 환산된 MTT 분석의 평균과 표준 편차를 구하고, 이들의 통계학적 유의성은 일원분산분석법(ANOVA)을 이용하여 처리하였다.

III. 연구 결과

1. hFOB1에 대한 녹용의 세포증식 효과

녹용추출물이 hFOB1의 증식에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 hFOB1에 1 μ g/ml, 10 μ g/ml, 100 μ g/ml, 1 mg/ml의 녹용추출물을 첨가하고 2일, 4일 및 6일간 배양한 후 세포 수를 측정하고, 농도 의존적 양상은 보이지 않았지만, 모든 배양 기간중 10 μ g/ml에서 가장 높은 세포증식을 보였다. 특히 4일군의 1 μ g/ml, 10 μ g/ml, 100 μ g/ml과 6일군의 1 μ g/ml, 10 μ g/ml, 100 μ g/ml, 1 mg/ml에서 음성대조군에 비하여 유의성있는 세포 증식을 보였다(Figure 2, Table 1).

MTT 분석에서는 세포 수 측정과 달리 여러 농도에서 유의한 증가를 가져오지는 못하였지만, 6일째의 10 μ g/ml에서는 유의한 증가를 보였다(Figure 3, Table 2). 이상의 소견으로 녹용은, 특히 10 μ g/ml에

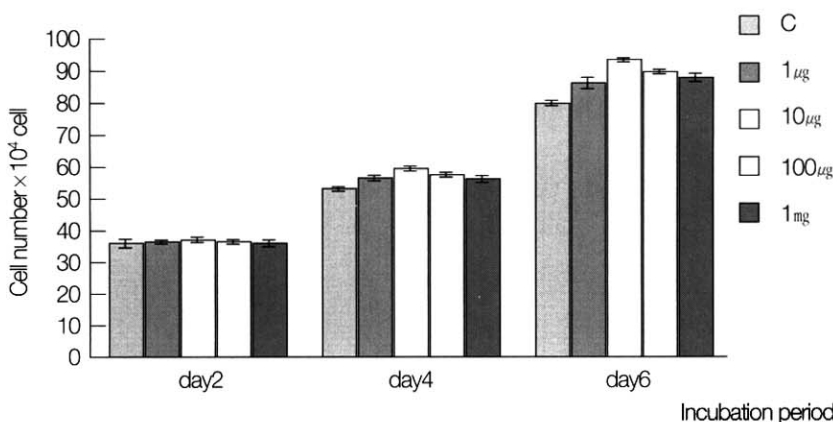


Figure 2. Effects of CPC extracts on cell number counting of hFOB1. Cell numbers were counted by hemocytometer after 2, 4 and 6 day incubation (Mean±S.D.). Vertical bars represent standard deviation of four independent experiments.

Table 1. Effects of CPC extracts on cell number counting of hFOB1. Cell numbers were counted by hemocytometer after 2, 4 and 6 day incubation (Mean±S.D.).

	control	1 µg/ml	10 µg/ml	100 µg/ml	1 mg/ml
2day	36,25±1,95	36,44±1,20	37,11±1,18	36,56±0,52	36,19±1,14
4day	52,69±0,97	56,13±0,83*	59,14±0,50*	57,19±0,90*	55,69±1,43
6day	79,56±1,39	85,75±2,63*	92,81±0,75*	89,00±0,83*	87,25±1,71*

* : Statistically significant difference compared to control group (p<0,05)

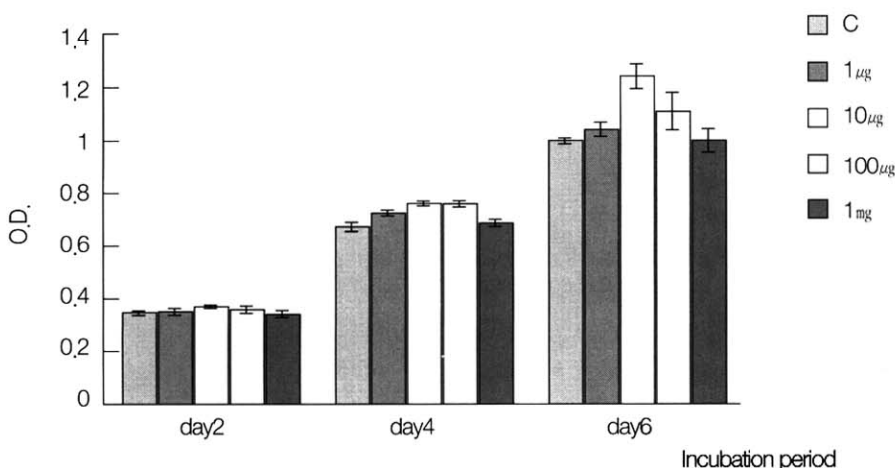


Figure 3. Effects of CPC extracts on MTT analysis of hFOB1. MTT assay was performed after 2, 4 day and 6 day incubation (Mean± S.D.). Vertical bars represent standard deviation of four independent experiments.

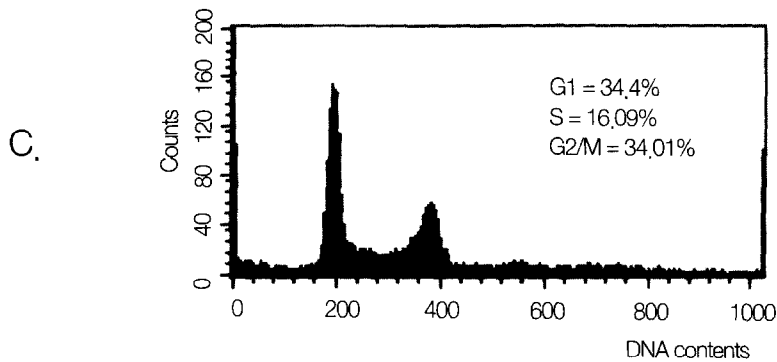
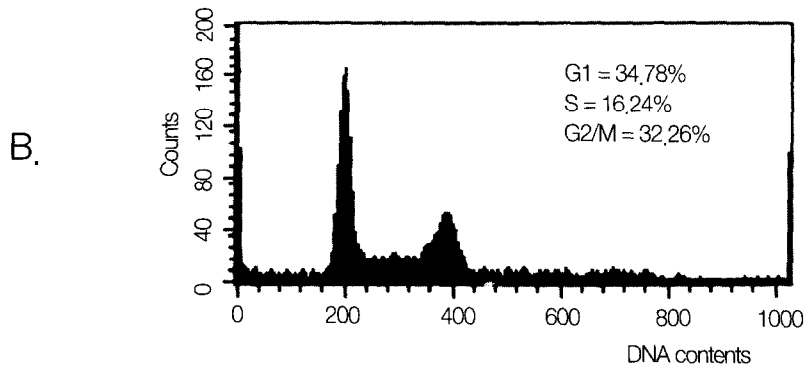
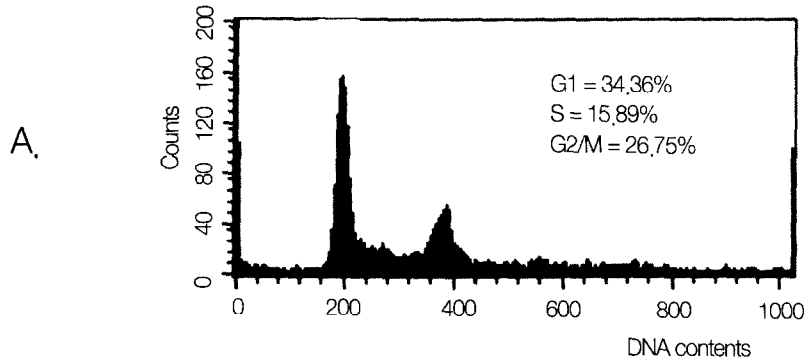
O.D. ; Optical density

Table 2. Effects of CPC extracts on of MTT analysis of hFOB1

	control	1 μ g/ml	10 μ g/ml	100 μ g/ml	1mg/ml
2day	0,35 \pm 0,01	0,35 \pm 0,02	0,37 \pm 0,01	0,36 \pm 0,01	0,34 \pm 0,02
4day	0,67 \pm 0,03	0,72 \pm 0,02	0,76 \pm 0,02	0,76 \pm 0,02	0,69 \pm 0,01
6day	1,00 \pm 0,01	1,04 \pm 0,06	1,24 \pm 0,08*	1,10 \pm 0,11	1,00 \pm 0,07

MTT assay was performed after 2, 4 and 6 day incubation (Mean \pm S.D.).

*:Statistically significant difference compared to control group (p(0,05)



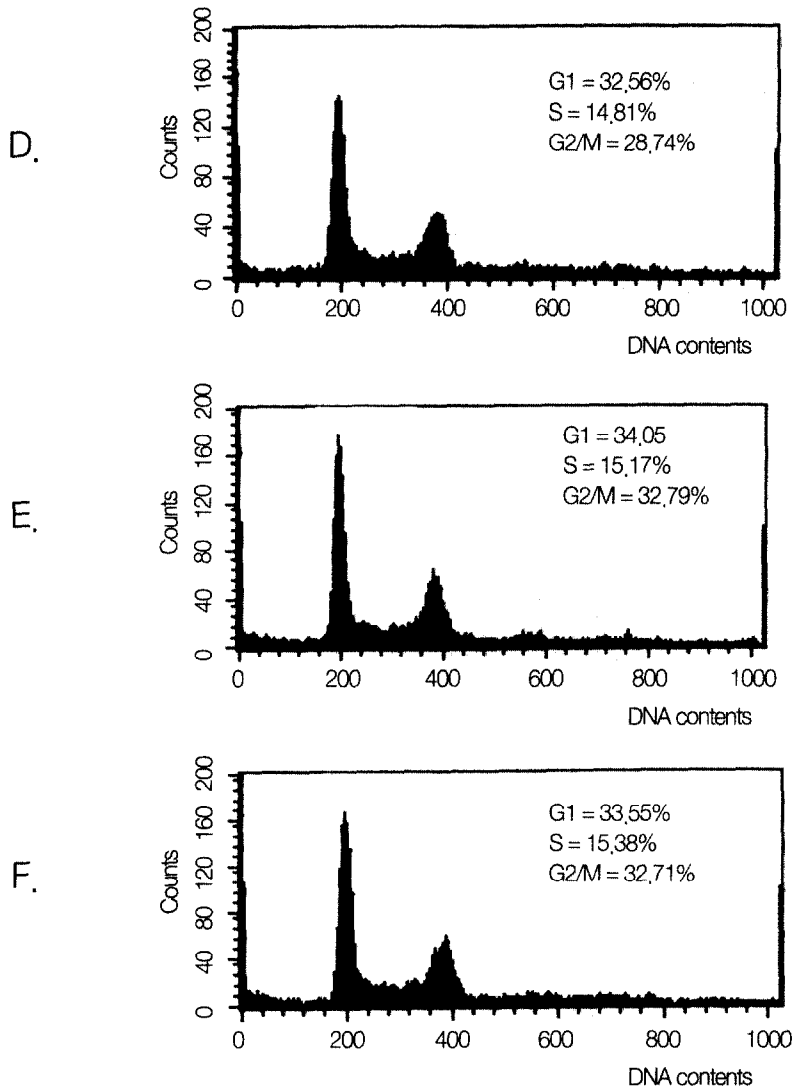


Figure 4. Effects of CPC extracts on cell cycle progression of hFOB1. The cell cycle analysis was performed in hFOB1 after treatment without (A) or with 10 $\mu\text{g/ml}$ (B), 100 $\mu\text{g/ml}$ (C) of CPC after 4 days incubation, and without (D) with 10 $\mu\text{g/ml}$ (E), and 100 $\mu\text{g/ml}$ (F) of CPC after 6 days incubation.

서, 사람 태아 골모세포주의 세포증식을 일으킴을 알 수 있었다.

2. 세포주기 분석

녹용추출물이 hFOB1의 세포주기 변화에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 10 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 녹

용 추출물이 함유된 배양액에 hFOB1를 4일 및 6일 간 배양하여 세포주기를 분석한 결과 4일군, 6일군의 모든 농도에서 대조군에 비하여 G1, S 주기에는 큰 변화가 없었고, G2/M주기가 증가하였다. 이러한 결과로 녹용 추출물의 투여가 hFOB1의 세포주기 진행을 촉진시킨다는 것을 알 수 있었다(Figure 4).

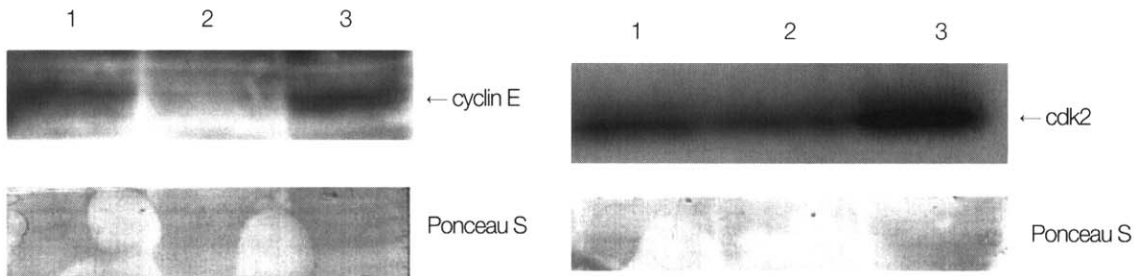


Figure 5. Western blot analysis for intracellular levels of cyclin E and cdk 2 in cultured hFOB1 Cervi Parvum Cornu extracts supplemented with for 4 days. Cell extract equivalent to 50 μg of total cellular protein of hFOB1 was electrophoresed by 15% SDS-PAGE and transferred to a PVDF membrane. The intracellular protein levels of cyclin E and cdk 2 in hFOB1 were probed with respective antibodies diluted by 1 : 1000. After probing, the membrane was stained with 1 \times Ponceau S stain for 10 min to reveal the total cellular protein loaded per each lane. (1 : control, 2 : 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 3 : 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

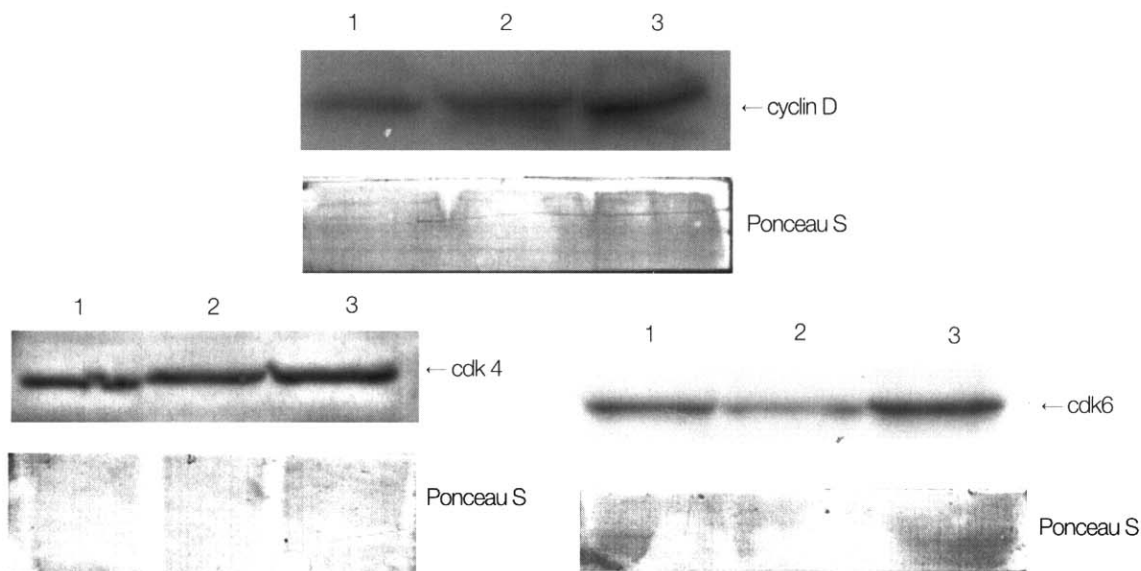


Figure 6. Western blot analysis for intracellular levels of cyclin D and cdk 4, cdk 6 in cultured hFOB1 Cervi Parvum Cornu extracts supplemented with for 4 days. Cell extract equivalent to 50 μg of total cellular protein of hFOB1 was electrophoresed by 15% SDS-PAGE and transferred to a PVDF membrane. The intracellular protein levels of cyclin D and cdk 4, cdk 6 in hFOB1 were probed with respective antibodies diluted by 1 : 1000. After probing, the membrane was stained with 1 \times Ponceau S stain for 10 min to reveal the total cellular protein loaded per each lane. (1 : control, 2 : 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 3 : 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

3. cyclin E 및 cdk 2 의 발현

cyclin E와 cdk 2는 세포주기 진행에 있어서 G1기의 후기에 관여하는데 녹용추출물을 투여한 hFOB1

에서 이들 단백질의 발현을 알아보코자 Western blot analysis를 시행하였다. 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 녹용 추출물을 4일간 투여한 결과 cyclin E와 cdk 2의 발현이 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서는 대조군에 비해

발현이 감소하였으나 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 대조군에 비하여 발현이 증가하는 경향을 보였다(Figure 5). 이러한 결과는 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 녹용추출물이 hFOB1의 세포주기 진행을 촉진시키는 작용이 cyclin E와 cdk 2 발현을 증가시킴으로써 이루어지는 것으로 판단된다.

4. cyclin D, cdk 4 및 cdk 6의 발현

cyclin D는 cdk 4 또는 cdk 6와 결합하여, 세포주기 G1기의 중반기에 관여하므로 녹용추출물을 투여한 hFOB1에서 이들 단백질의 발현을 알아보고자 Western blot analysis를 시행하였다. 10 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 녹용 추출물을 4일간 배양한 결과 cyclin D, cdk 4의 모든 농도에서 발현이 대조군에 비해 증가하는 경향을 보였으나 cdk 6의 경우

100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 대조군에 비하여 발현이 감소된 반면 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 대조군에 비하여 발현이 증가되었다(Figure 6). 이러한 결과는 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 녹용추출물이 hFOB1의 세포주기 진행을 촉진시키는 작용이 cyclin D와 cdk 4, cdk 6 발현을 증가시킴으로써 이루어진다는 것을 알려준다.

5. p21^{WAF1/CIP1}, p16 및 pRb의 발현

p21^{WAF1/CIP1}은 cyclin-cdk 복합체에 결합해 이들 복합체의 활동을 억제할 수 있다. 10 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 녹용 추출물을 4일간 배양한 결과 p21^{WAF1/CIP1}의 양은 모든 농도에서 대조군에 비해 발현이 감소하는 경향을 보였다. p16 및 pRb의 발현 양상은 대조군과 유사한 양상을 보였다(Figure 7). 이러한 실험 결과는 녹용추출물이 hFOB1의 세포주기 진

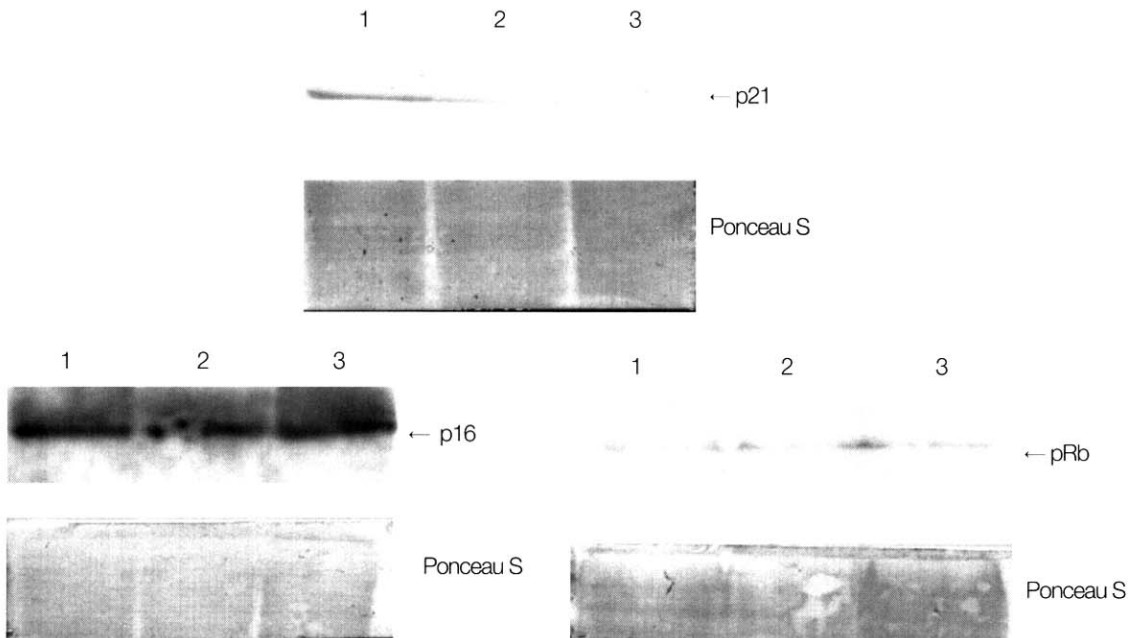


Figure 7. Western blot analysis for intracellular levels of p21, p16 and pRb in cultured hFOB1. Cervi Parvum Cornu extracts supplemented with for 4 days. Cell extract equivalent to 50 μg of total cellular protein of hFOB1 was electrophoresed by 15% SDS-PAGE and transferred to a PVDF membrane. The intracellular protein levels of p21, p16 and pRb in hFOB1 were probed with respective antibodies diluted by 1 : 1000. After probing, the membrane was stained with 1 \times Ponceau S stain for 10 min to reveal the total cellular protein loaded per each lane. (1 : control, 2 : 100 $\mu\text{g/ml}$, 3: 10 $\mu\text{g/ml}$).

행을 촉진시키는 작용이 p21의 발현을 억제하므로써 이루어지지만, p16과 pRB의 작용에는 영향을 미치지 않는다는 것을 나타낸다.

IV. 총괄 및 고찰

치주치료의 목표는 원인이 되는 치태의 기계적 제거와 더불어, 치주인대세포와 골조직세포의 증식 및 분화를 도모하여, 손상된 조직의 회복을 이루는 것이다. 이를 위하여 1990년대에 들어 조직유도재생술, 이식재료 등을 이용한 치주조직의 재생에 초점이 맞추어졌으며 아직은 초기단계이지만 국소적으로 다양한 성장인자를 투여해 재생을 얻는 방법이 각광을 받고 있다^{31,32}). 그러나 이들 성장인자는 대부분의 인체를 구성하는 전방적인 섬유아세포의 성장과 증식에 많은 영향을 미치므로 특정조직의 재생에는 임상 시술과정에 고도의 기술을 요하게 된다. 또한 각종 중앙조직에서 다량 발견되어 임상적용을 위한 안정성 연구가 부족하고 부작용에 관해 명확히 규명되어 있지 않기 때문에 아직 연구단계에 있는 실정이다. 따라서 아직 치주조직재생을 위한 획일적인 치료법은 없는 상태이며 각종 수술 후 치조골과 백악질 사이의 결합조직인 치주인대의 신속한 증식과 결손된 골조직의 재생이 완전히 이루어질 수 있도록 부작용과 독성이 없으면서 치주인대세포 및 골모세포의 활성을 증가시킬 수 있는 약제의 개발은 무엇보다도 필요하다.

인간에서의 골형성은 골모세포에 의하여 유도되며, 골모세포의 분화는 BMP³³), insulin-like growth factor (IGF)³⁴), melatonin³⁵) 및 estradiol³⁶)과 같은 다양한 성장인자들에 의하여 조절된다. 사슴뿔의 성장 시 골모세포의 분화표식인자인 alkaline phosphatase (ALP) 및 osteocalcin (OC)의 농도가 증가하며³⁷), 골형성유도 인자인 BMP가 발현되며³⁸) melatonin의 생성도 증가하는³⁹) 것으로 보고되었다. 또한 난소가 제거된 사슴에 estradiol 투여시 뿔의 성장이 촉진되며⁴⁰) 뿔에서 분리된 세포를 IGF로 처리한 경우 ALP의 발현 및 증식능이 증가하는 것으로 보고되었다³⁹). 또 녹용의 골모세포 분화유도능을 입증한 최근의 보고

가 있다⁴¹).

세포의 성장은 세포주기에 따라 이루어지며 세포 주기의 진행은 외부적 또는 내부적인 신호의 전달을 이어받아 순차적으로 진행된다. 세포주기는 G1, S, G2 및 M 기로 이루어져 있다. G1기는 첫번째 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. hFOB1에 녹용추출물을 처리한 후 세포주기를 분석한 결과 G1주기, S주기에는 변화가 없었고 G2/M주기가 증가하였다. 이와 유사한 연구로 사슴의 뿔로 만든 녹각교(Cervi Cornus Colla)가 치주인대세포의 세포주기조절에 미치는 영향에 관한 연구에서 세포증식 및 활성화에 영향을 준 10 μ g/ml, 100 μ g/ml의 녹각교를 치주인대세포에 투여하여 3일, 5일간의 세포주기변화를 관찰한 결과, 3, 5일군 모두에서 S기와 G2/M기의 세포주기 진행이 증가했다는 보고가 있다⁴²).

세포의 핵 내에는 cyclin이 주기적으로 증가, 감소하며 이들은 크게 M기형(M기 사이클린)과 G1기형(G1·S기형, G1사이클린)의 서브패밀리가 있으며, 전자에는 A와 B, 후자에는 A와 D-G의 유형이 있다. 각 포유동물의 cyclin은 다양한 cdk와 반응할 수 있으며 cdk는 serine/threonine protein kinase로서 이들은 cyclin과 복합체를 이룰 때 기능을 하게 된다. 세포주기에 작용하는 많은 세포주기 조절단백질이 발견되고 있으나, 그 역할이 규명된 것은 많지 않다. 그러나, cyclin E와 cdk 2의 결합, cyclin D와 cdk 4, cdk 6의 결합을 통해 pRB와 E2F간의 결합을 유리시켜 G1주기가 S주기로 이행되도록 한다⁴³). 세포증식 촉진인자인 mitogen들의 최종 표적 중의 하나가 cyclin D이며⁴³) mitogen들에 의해 cyclin D의 발현이 촉진되어 일정량에 이르게 되면 cyclin D는 cdk 4 혹

은 cdk 6와 결합하고 cdk activating kinase가 cdk의 threonine을 인산화시켜서 cdk가 활성을 띠게 되면, cdk는 pRB를 인산화시켜 불활성화시킨다⁴⁴⁾. Cyclin E는 G1주기의 말기에 발현되는데 cdk 2와 결합하여 G1과 S 전이기에 cdk 2의 활성도가 최고조에 달하는 것을 돕는다. cyclin E-cdk 2 복합체가 활성화됨으로써 cyclin D에 있어서 pRB의 인산화를 더욱 가속시키게 되고 결국은 pRB에 의해 억제되고 있던 E2F, Elf-1, c-Abl 등의 transcription factor들이 활성을 띠게 되어 S 기로 이행하게 된다⁴⁵⁾. 세포의 주기를 정확히 조절하기 위해서 세포는 cyclin이나 cdk같은 positive regulator 이외에도 p16 및 p21 등의 cdk inhibitor (CKI)들을 가지고 있으며, 이들 CKI의 작용은 적절한 세포주기 조절에 negative regulator로서 필수적인 인자들이다. pRB의 인산화가 촉진되면 여러 가지 유전자의 전사가 증가하게 되는데 주로 DNA 합성에 관여하는 유전자의 발현이 증가되고, 그 뿐만 아니라 p16의 발현이 증가되어, 합성된 p16은 cdk 4 및 6와 결합하고 그 결과 cyclin D는 cdk의 보호를 받지 못하고 따로 떨어져서 분해되고 사라진다. 비슷한 원리로 자외선이나 화학물질, 기타 원인에 의해 세포의 DNA에 손상이 오게 되면 p53 항암단백질의 발현이 증가되어, p21의 발현을 촉진시키고, p21은 cyclin E-cdk 2, cyclin D-cdk4 및 기타 cdk들을 억제하여 pRB의 인산화를 억제함으로써 세포를 G1기에 정지시키고, 동시에 p53, GADD45 등의 DNA수리 체계들에 의해 손상된 DNA가 복구되게 된다. 또한 p53 단백질은 직접 DNA 복제에 관여하는 단백질 (RPA: replication protein A)과 결합하여 DNA 복제 및 세포주기 S기로의 진행을 저해한다는 보고도 있다 (Figure 1).

본 연구에서 세포증식의 결과를 바탕으로 10 μ g/ml, 100 μ g/ml의 녹용추출물을 hFOB1에 투여하여 cyclin E, cdk2, cyclin D, cdk4, cdk6, p21, pRB, p16 등의 세포주기 조절단백질의 발현을 측정하였다. 그 결과 녹용추출물의 투여가 cyclin E와 cdk 2, cyclin D, cdk 4와 cdk 6의 발현을 증가시켰으나, p21의 발현은 감소시켰으며, p16과 pRb의 발현에는 영향을 주지 않았다. 유사한 연구로 치주인대세포의 세포주

기 조절에 관한 연구에서 녹각교는 농도의 증가에 따라 녹용과는 달리 cyclin D, cdk 6의 발현에는 큰 영향을 주지 않았다. 그러나, cyclin E 와 cdk 2, cdk 4의 발현을 증가시키고, Rb의 발현에는 큰 영향을 주지 않았다는 것은 본 연구 결과와 유사하였다. 본 연구 결과는 10 μ g/ml의 녹용 추출물은 사람태아골모세포의 증식에 가장 효과가 좋은 것으로 나타났다. 세포증식을 측정된 결과에서도 이 농도가 가장 적절함을 알 수 있었으며, Western blot결과에서도 100 μ g/ml의 농도보다도 단백질 발현이 더욱 확실히 나타남을 알 수 있었다. 이상의 연구결과, 녹용은 골모세포 분화유도능력뿐 아니라 세포증식에도 많은 영향을 주는 것으로 밝혀져, 치주치료에 활용될 수 있는 새로운 골 형성 유도물질 개발의 대상이 될 수 있음을 시사한다 하겠다.

V. 결론

본 연구는 생약제재인 녹용추출물을 hFOB1에 첨가 배양하여 세포증식측정, 세포활성도 및 세포주기 분석을 시행하고, 세포주기조절단백질의 발현을 측정하여 세포주기조절기전에 미치는 영향을 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. hFOB1의 세포증식은 농도 의존적 양상은 보이지 않았지만, 10 μ g/ml의 농도에서 유의한 증가를 보였다($p < 0.05$).
2. hFOB1에 녹용추출물을 10 μ g/ml, 100 μ g/ml의 농도로 투여시 세포주기분석을 시행한 결과 대조군에 비하여 G1주기, S주기에는 변화가 없었으나 G2/M주기가 증가하는 경향을 보였다($p < 0.05$).
3. hFOB1에 녹용추출물을 10 μ g/ml, 100 μ g/ml의 농도로 투여시 cyclin E 및 cdk 2의 발현은 10 μ g/ml에서는 대조군에 비해 증가하였다.
4. hFOB1에 녹용추출물을 10 μ g/ml, 100 μ g/ml의 농도로 투여시 cyclin D, cdk 4의 발현은 모든 농도에서 대조군에 비해 증가하는 경향을 보였으며, cdk6의 발현은 10 μ g/ml에서 증가하는 경

향을 보였다.

5. hFOB1에 녹용추출물을 10 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 투여시 p21의 발현은 감소하였으나 pRB, p16의 발현에는 큰변화가 없었다.

이러한 실험결과는 녹용추출물이 hFOB1의 세포 증식 및 세포주기 진행을 촉진시키며, 그 기전은 cyclin E, cdk 2, cyclin D, cdk 4 와 cdk 6의 발현 증가와 p21의 발현 감소를 유발함으로써 이루어지는 것으로 생각된다.

VI. 참고 문헌

1. 대한약전(1992) 6판. 한국 메디칼인텍스사.
2. 권혁세: 만병을 다스리는 민간약술 88, 제1판, 하나로, 서울, 1997;172-187.
3. 신국현, 이은방, 김재현, 정명숙, 조성익: 분말 녹용의 약물활성 연구(I). 생약학회지 1989;20: 180-187.
4. 용재익: 實驗的 家兔貧血에 미치는 鹿茸投與의 影響. 약학회지 1964;8: 6-11.
5. Wang. B., Zhao. X., Qi, Yang, X., Koneko, S., Hattori, M., Namba, T. and Nomura, Y.: Stimulating effect of deer antler extract on protein synthesis in senescence-accelerated mice in Vivo. Chem Pharm Bull 1988;36: 2593-2598.
6. Wang. B., Zhao. X., Qi, Koneko, S., Hattori, M., Namba, T. and Nomura, Y.: Effect of repeated administration of deer antler extract on biochemical changes related to aging in senescence-accelerated mice. Chem Pharm Bull 1988;36: 2587-2592.
7. 허금, 최숙현, 이히빈, 정규찬, 고돈이: 鹿茸에 관한 研究(第 2 報): 鹿茸이 實驗用 白鼠의 成長에 미치는 影響에 對하여. 약학회지 1960;5: 10-15.
8. Ivankina NF, Isay SV, Busarova NG, Mischenko TY: Prostaglandin-like activity, fatty acid and Phospholipid composition of Sika deer(*Cervus nippon*) antlers at different growth stages. Comp Biochem Physiol 1993;106: 159-162.
9. Jhon GJ, Park SY, Han SY, Lee S, Kim Y, Chang YS: Studies of the chemical structure of gangliosides in Deer Antler, *Cervus nippon*. Chem pharm Bull 47: 1999;123-127.
10. Wang BX, Liu AJ, Cheng XJ, Wang QG, Wei GR, Cui JC: Anti-ulcer action of the polysaccharides isolated from pilose antler. Tao Hsueh Hsueh Pao 1985;20: 321-325.
11. Zhang ZQ Wang Y, Zhang H, Zhang W, Zhang Y, Wang BX: Anti-inflammatory effects of pilose antler peptide. Chung Kuo Yao Li Hsueh Pao 1994;15: 282-284.
12. Son NW, Shin MK, Lee HI: The effects of deer antler on the neuro response of starved mice. korean J Oriental Medicine 1986;7: 174-183.
13. Cho HJ, Jhon GJ: Changes of gangliosides metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats and effect of deer antler. J Appl Pharm 1994;2: 223-228.
14. Park HS, Jhon GJ, Choi W: Deer antler extract selectively suppresses hyphal growth in dimorphic fungus, *Candida albicans*. J Microbiol Biothechnol 1998;8: 291-294.
15. Van Der Eems KL, Brown RD, Gundberg CM: Circulating levels of 1,25 dihydroxyvitamin D, alkaline phosphatase, hydroxyproline, and osteocalcin associated with antler growth in white-tailed deer. Acta Endocrinol 1988;118: 407-414.
16. Bubenik GA, Sempere AJ, Hamr J: Developing antlers, a model for endocrine regulation of bone growth. Concentration gradient of T3, T4, and alkaline phosphatase in the antlers, jugular, and the sapherous veins. Calcif Tissue Int 1987;41: 38-43.
17. Nurse, P.: Ordering S phase and M phase in the cell cycle. Cell 1994;79: 547-550.
18. Sherr, C.: G1 phase progression: cycling on cue.

- Cell 1994;79: 551-555.
19. Kato, J.A., Matsuoka, M., Strom, D. and Sherr, C.: Regulation of cyclin D-dependent kinase 4 (cdk4) by cdk4-activating kinase. *Mol Cell Biol* 1994;14: 2713-2721.
 20. 김 탁, 김재호, 피성희, 김은철, 유용욱, 유형근, 신형식: 니코틴이 치은섬유아세포의 세포주기 조절 단백질 발현에 미치는 영향. *대한치주과학회지* 2001;30: 597-609.
 21. 박영채, 양대승, 김재호, 김현아, 유용욱, 유형근, 신형식: 치은섬유아세포의 복제노화가 세포주기 조절에 미치는 영향. *대한치주과학회지* 2001;31: 135-146.
 22. 피성희, 김대점, 김 탁, 유용욱, 유형근, 신형식: Cyclosporin A가 치은섬유아세포의 세포주기 조절에 미치는 영향. *대한치주과학회지* 2001;31: 611-622.
 23. Sherr C. J.: Mammalian G1 cyclins. *Cell* 1993;73 : 1059-1065.
 24. Serrano M., Hannon G.J., Beach D.: A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 1993;366: 704-707.
 25. Bubenik GA, Smith PS: Circadian and circannual rhythms of melatonin in plasma of male white-tailed deer and the effect of oral administration of melatonin. *J Exp Zool* 1987;241: 81-89.
 26. Eiben B, Scharla S, Fischer K, Schmidt-Gayk H: Seasonal variations of serum 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and alkaline phosphatase in relation to the antler formation in the fallow deer (*Dama dama* L.), *Acta Endocrinol* 1984;107: 141-144.
 27. Barling PM, Gupta DK, Lim CE: Involvement of Phosphodiesterase I in mineralization: histochemical studies using antler from red deer (*Cervus elaphus*) as a model. *Calcif tissue Int* 1999;65: 384-389.
 28. Lincoln GA, Tyler NJ: Role of oestradiol in the regulation of the seasonal antler cycle in female reindeer, *Rangifer tarandus*. *J Reprod Fertil* 1999;115: 167-174.
 29. Price JS, Oyajobi BO, Oreffo RO, Russell RG: Cells cultured from the growing tip of red deer antler express alkaline phosphatase and proliferate in response to insulin-like growth factor-I. *J Endocrinol* 1994;143: R9-16.
 30. Li C, Littlejohn RP, Suttic JM: Effects of insulin-like growth factor 1 and testosterone on the proliferation of antlergenic cells in vitro. *J Exp Zool* 1999;284: 82-90.
 31. Lynch S.E., de Castilla G.R., Williams R.C., Kiristy C.P., Howell T.H., Reddy M.S., Antoniadis H.N.: The effects of short-term application of a combination of platelet-derived and insulin-like growth factors on periodontal wound healing. *J Periodontol* 1991;62: 458-467.
 32. Sigurdsson T.J., Tatakis D.N., Lee M.B., Wikesjo U.M.: Periodontal regenerative potential of space-providing expanded polytetrafluoroethylene membranes and recombinant human bone morphogenetic proteins. *J Periodontol* 1995;66: 511-521.
 33. Barboza E, Caula A, Machado F: Potential of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in bone regeneration. *Implant Dent* 1999;8: 360-367.
 34. Ohlsson C, Vidal O: Effects of growth hormone and insulin-like growth factors on human osteoblasts. *Eur J Clin invest* 1998;28: 184-186.
 35. Roth JA, Kim BG, Lin WL, Cho MI: Melatonin promotes osteoblast differentiation and bone formation. *J Biol Chem* 1999;274: 22041-22047.
 36. Ernst M, Health JK, Schmid C, Froesch RE, Rodan GA: Evidence for a direct effect of estrogen on bone cells in vitro. *J Steroid Biochem* 1989;34: 279-284.
 37. Van Der Eems KL, Brown RD, Gundberg CM: Circulating levels of 1,25 dihydroxyvitamin D,

- alkaline phosphatase, hydroxyproline, and osteocalcin associated with antler growth in white-tailed deer. *Acta Endocrinol* 1988;118: 407-414.
38. Feng JQ, Chen D, Esparza J, Harris SE: Deer antler tissue contains two types of bone morphogenetic protein 4 mRNA transcripts. *Biochim Biophys Acta* 1995;1263: 163-168.
39. Bubenik GA, Smith PS: Circadian and circannual rhythms of melatonin in plasma of male white-tailed deer and the effect of oral administration of melatonin. *J Exp Zool* 1987;241: 81-89.
40. Lincoln GA, Tyler NJ: Role of oestradiol in the regulation of the seasonal antler cycle in female reindeer, *Rangifer tarandus*. *J Reprod Fertil* 1999;115: 167-174.
41. 유윤정, 이현정, 임소형, 강정화, 이은희, 옥승호, 최봉규, 전길자: 녹용 추출물에 의한 MC3T3세포의 분화촉진. *대한치주과학회지* 2000;30: 885-893.
42. 윤기연, 유형근, 신형식: 녹각교가 치주인대세포의 세포 주기 조절에 미치는 영향. *원광대학교 치과대학 대학원 박사논문*, 2002.
43. Waga, S., Hannon, G.J., and Beach, D. and Stillman B.: The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature (London)* 1994;369: 574-578.
44. Xiong, Y., Zhang, H. and Beach, D.: Subunit rearrangement of the cyclin-dependent kinases is associated with cellular transformation. *Genes Dev* 1993;7: 1572-1583.
45. Chen, X., Bargonetti, J. and Prives, C.: p53, through p21(WAF1/CIP1), induces cyclin D1 synthesis. *Cancer Res* 1995;55(10): 4257-4263.

Effects of Cervi Parvum Cornu on Cell Cycle Regulation in Human Fetal Osteoblasts

Dae-Seung Yang¹, Hyun-A Kim¹, Ha-Na Hyun¹, Hyung-Keun You¹, Youn-Chul Kim², Hyung-Shik Shin¹

¹Department of Periodontology, School of Dentistry,

²College of Pharmacy, Wonkwang University

Recently, many natural medicines, whose advantages are less side effects and possibility of long-term use, have been studied for their capacity, their anti-bacterial and anti-inflammatory effects and regenerative potential of periodontal tissues. Cervi Parvum Cornu(CPC) have been traditionally used as an hale, growth, hematogenous, anti-aging, back pain in Eastern medicine. The purpose of present study was to investigate the effects of CPC extract on cell cycle progression and its molecular mechanism in human fetal osteoblasts. CPC extracts (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) increased cell proliferation in the human fetal osteoblasts as compared to non-supplemented control. There was no significant change in the G1 and S phase, but a increase in the G2/M phase in 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of CPC extracts group as compared to non-supplemented control. The protein expression of cyclin E, cdk 2, cyclin D, cdk 4, and cdk 6 was higher than that of control group. The level of p21 was lower than that of control. But that of pRb and p16 was not distinguished from control. These results indicate that the increase of cell proliferation by CPC extracts may be due to the increased expression of cyclin E , cdk 2, cyclin D, cdk 4 and cdk 6, and the decreased expression of p21 in human fetal osteoblasts .