

인삼이 사람태아골모세포의 세포주기조절에 미치는 영향

김대겸¹ · 이용배¹ · 박상기¹ · 유형근¹ · 유경태¹ · 김윤철² · 신형식¹

¹원광대학교 치과대학 치주과학교실, ²약학대학 약학과

I. 서론

치주질환은 치석과 치태내 치주병인균에 의한 만성 감염성질환으로서 성인에 있어서 연령이 증가함에 따라 일반적으로 증가하는 경향을 보이며 치아 상실의 주원인으로서 치은염증과 치아주위의 지지 치조골과 결합조직의 상실을 동반한 치주낭 형성이 특징적으로 나타난다¹⁾. 치주질환을 유발하는 원인인자를 제거하여 염증을 억제하며, 면역매개물질의 생산 억제 및 치주조직 활성화에 따른 조직의 재생과정을 유도하는 것이 치주질환에 이환된 치주조직치료의 기본 개념이다²⁾. 치주질환이 진행됨에 따라 발생하는 치주조직 결손부를 재생시키기 위해 전통적으로 사용되어온 치석 제거술, 치근면 활택술, 치주판막술, 삭제형 골수술등을 통한 기계적 처치에 부가적으로 다양한 약제를 사용한 치근면 탈회, 골 이식물질의 충전, 조직유도 재생술, 그리고 차폐막을 이용한 골 이식술 등이 발전되어왔다³⁻⁵⁾.

이상과 같이 치주질환을 치료하기 위한 외과적, 비외과적 술식들이 많이 발전하였음에도 불구하고 치주질환에 의해 파괴된 조직을 재생하는데 있어 가장 필수적인 요소는 재생에 관여하는 세포가 질환에 의

해 파괴된 결손부에 군집되어야 한다는 것이며⁶⁾, 이러한 치주조직의 재생을 유도하는 특정세포에 관한 많은 연구가 시도되어져 치아를 지지하는 치조골의 기원 세포로 작용하는 치주인대세포가 조골모유세포와 조백악세포로 분화하여 치주질환으로 소실된 치주조직을 재생하는데 중요한 역할을 한다고 알려져 왔다⁸⁾.

골 형성의 주된 세포성분으로 알려진 골모세포는 골 기질을 합성하는 간엽세포로서 파골세포에 의한 골 흡수 조절자로 알려져 있으며 치조골 기질을 형성하는 골모세포의 분화와 증식은 여러 가지 호르몬과 같은 전신적인 인자, 그리고 cytokine 과 성장인자와 같은 국소적인 인자에 의하여 조절된다^{9,10)}. 치주조직재생에 관여하는 세포의 증식과 분화에 관여하는 전신적, 국소적 인자와 더불어 최근에는 손상된 치주조직을 재생시키기 위한 새로운 생약제재에 대한 관심이 증가되어 한의학에서 치주조직을 재생시키는 물질의 연구가 이루어지고 있다.

한의학에서 오래 전부터 항염 및 항균 효과를 보이는 생약제재 중 후박(厚朴, Magnoliae Cortex)에서 추출, 분리 정제한 magnolol과 honokiol 성분은 안정성이 높고 항균효과와 교원질 분해효소의 활성을

*이 논문은 2002년도 원광대학교 교비 지원에 의해서 수행됨.

교신저자 : 신형식, 전북 익산시 신용동 344-2 원광대학교 치과대학 치주과학 교실, 우편번호: 570-749

억제하며¹¹⁾, interleukin-1 및 prostaglandin E₂의 생산 차단 효과가 있음이 밝혀졌다¹²⁾. 황금(黃芩, *Scutellaria baicalensis*)의 에탄올 추출물인 wogonin, baicalein 등은 interleukin-1 및 prostaglandin E₂의 생산 차단 효과, collagenase 활성도 차단 및 세포활성도 증강 효과를 보였으며¹³⁾, 대조(大棗, *Zizyphi fructus*) 또한 interleukin-1 및 prostaglandin E₂의 생성 억제 효과를 보였다¹⁴⁾. 최근 들어 골조직 재생제로 많이 연구되고있는 홍화(紅花, *Carthamus tinctorius*)는 한의학에서 골질환 치료제로 전래되고있는 약제로서 골재생 효과가 있는 것으로 알려져 있으며, 치주인대세포와 골모세포의 활성화에 유효한 영향을 미치며¹⁴⁾, alkaline phosphatase(ALP) 합성과 석회화 결절 형성 및 osteonectin 생성에 효과적이어서 골광물화에 영향을 주는 것으로 밝혀졌다¹⁵⁾.

이러한 생약재제와 더불어 인삼(人蔘, Ginseng Radix)은 오래 전부터 한의학에서 널리 신비의 영약으로 알려져 왔으며, 인삼에 대한 역사적 첫 기록은 중국 전한 원제(前漢 元帝)시대(BC 48-BC 33) 사유(史遊)의 급취장(急就章)에 삼(參)이라 나와 있고, 후한 헌제(後漢 獻帝) 건안연대(AD 196-220) 장중경(張仲景)의 상한론(傷寒論)에도 인삼의 처방에 관한 기록이 있다. 또한 서기 200년경에 만병통치약(panacea)이란 별명으로 기술된 자료가 보존되어 있으며, 그 후 중국, 한국, 일본 등의 동양권에서는 건강증진, 불로장수의 영약으로 간주되었으며 최근까지 전래한 인삼의 다양한 한방적 효능이 국내외 학자들의 현대 과학적 연구를 통하여 다양한 인삼의 효능이 보고되고 있다¹⁶⁻¹⁸⁾.

인삼의 약리적 효능으로는 위장기능 조절, 대사 촉진, 항 콜레스테롤, 당 대사 조절, 항 피로 및 조혈촉진 기능이 있는 것으로 알려져 있으며^{19,20)}, 최근 들어 인삼의 주성분인 사포닌이 항암효과를 가지고 있다고 보고되고 있다^{21,22)}.

치의학 영역에서 인삼의 약리적 효능에 관한 연구로는 이 등²³⁾이 인삼 사포닌성분을 배양중인 치주인대세포에 처리하여 치주인대세포의 성장 및 분화에 미치는 영향을 알아본 실험에서 인삼 사포닌 성분의 처리는 치주인대세포에서 ALP 활성도를 증가시키

며, 골결절 형성을 유도하며 세포의 성장 및 분화를 촉진시킨다는 보고를 하였다.

본 연구의 목적은 상기와 같은 인삼추출물의 다양한 약리 효과 중 골 조직의 형성에 관한 효과 및 작용 기전에 대한 연구에 새로운 방법을 모색해 보고자 세포수준에서 간접적으로 인삼 추출물을 사람태아 골모세포에 적용하여 세포 증식과 그와 관련된 세포 주기조절 단백질들에 미치는 영향을 알아보기 위함이며, 나아가 이를 토대로 치주조직 재생 과정을 촉진시키는 약제개발에 있어서 인삼의 적용 가능성을 알아보기 위함이다.

II. 연구재료 및 방법

1. 인삼의 추출

원광대학교 약학대학에 의뢰하여 건조한 인삼 분말(20 g)을 플라스크에 넣고 증류수 300 ml를 가한 후 100℃에서 2시간 가열하여 여과하였다. 여액은 감압 농축 후 동결건조하여 인삼 물 추출물 3.5 g을 얻었다. 물 추출물은 다시 증류수 300 ml에 용해시키고 n-BuOH 200 ml를 이용하여 2회 반복 분배하여 n-BuOH 가용부(300 mg)와 증류수 가용부(3.0 g)를 얻었다. 실험에는 물 추출물, n-BuOH 가용부 및 증류수 가용부를 각각 인삼-1, -2, -3으로 표시하여 사용하였다.

2. 사람태아골모세포의 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 Dulbecuo's Modified Eagle's Medium Nutrient Mixture F-12 HAM (DMEM/F-12 1:1 Mixture, Sigma, USA) 2 ml가 담긴 6-well 배양접시에 적정 세포(5×10^4 cell/well)를 분주하였다. 이를 34℃의 온도 및 100% 습도조건에서 95%의 공기와 5% CO₂를 계속 공급하면서 배양하였다. 배양액은

세포가 충분한 증식이 일어날 때까지 2-3일 간격으로 교환하였다.

3. MTT 측정

5, 6회 계대 배양된 사람태아골모세포를 0.25% trypsin/EDTA로 떼어낸 후, 혈구계수기로 세포수를 세어 24-well plate의 각 well당 2×10^4 개의 세포가 들어가도록 분주하였다. 세포들이 부착할 수 있도록 1일간 5% CO₂ 100% 습도의 34℃ 배양기에 배양한 후 부착되지 않은 세포를 제거하기 위하여 배지를 교환하였고, 100 µg/ml, 10 µg/ml, 1 µg/ml, 100 ng/ml, 10 ng/ml 씩 5가지 농도로 각각의 인삼-1, 인삼-2, 인삼-3 추출물을 첨가하고 대조군에는 증류수를 넣었다. 각각 12 h, 24 h, 48 h 동안 배양한 후, 생리 식염수에 용해한 MTT[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide; Sigma, USA] 용액 300 µl 씩을 각각의 well에 첨가하여 4시간 동안 배양하였다. 배양 후 배지를 제거하고 200 µl의 dimethyl sulfoxide(DMSO; Junsei, Japan)를 첨가하여 형성된 formazan 결정을 용해시킨 후, 96-well plate 상으로 옮겨서 ELISA 분석기(Spectra Max 250, Molecular Devices Co., USA)로 540nm에서 흡광도를 측정하였다. 매 실험마다 세포활성도를 대조군에 대한 백분율로 산출하였으며, 각각의 실험은 4회 반복 시행하였다.

4. 세포주기 분석

인삼-1, -2, -3 추출물에서 MTT 결과 세포증식을 가장 증가시킨 두 농도씩을 선택하여 본 실험에 사용하였다. 100 ng/ml, 1 µg/ml의 인삼-1 추출물, 10 µg/ml, 1 µg/ml의 인삼-2 추출물, 100 µg/ml, 10 µg/ml의 인삼-3 추출물을 첨가한 배양액에서 24 h 동안 배양된 세포와 대조군의 세포를 trypsin 처리하여 혈구계수기로 세포수를 측정한다. 다음 3×10^5 개의 세포를 인산완충용액(Phosphate buffered saline, Gibco Co., USA)으로 세척하고 70% 에탄올로 고정시킨 후, RNase A (0.1 mg/ml)를 처리하여 RNA를 제거하였

다. 50 µg/ml의 propidium iodide 용액으로 30분간 염색한 후, 유식세포분석기(Becton & Dickinson, Mountain View, CA., USA)로 488nm에서 propidium iodide-DNA 복합체가 발색하는 형광을 측정하였다.

5. Western blot 분석

인삼-1, -2, -3 추출물에서 MTT 결과 세포증식을 가장 증가시킨 두 농도씩을 선택하여 본 실험에 사용하였다. 100 ng/ml, 1 µg/ml의 인삼-1 추출물, 10 µg/ml, 1 µg/ml의 인삼-2 추출물, 100 µg/ml, 10 µg/ml의 인삼-3 추출물을 첨가한 배양액에서 24 h 동안 배양된 세포를 인산완충용액으로 2회 세척한 후, lysis buffer로 세포단백질을 추출하고, BCA 용액(Bicinchoninic acid sol, Sigma, USA)에 Copper(II) sulfate(Sigma, USA)를 50 : 1로 혼합하여 단백질농도를 측정하였다. 각 실험군 별로 추출된 단백질 50 µl 씩을 사용하여 15% sodium dodecyl sulfate(SDS)-polyacrylamide gel 전기영동을 시행한 후 PVDF(Immobilon™-P transfermembrane, Milipore Co., Bedford, MA, USA)에 옮겼다.

비특이 항체의 결합을 막기 위하여 실온상태에서 membrane을 각각의 membrane blocking 용액(Zymed, USA)에 1시간 동안 처리한 후, 다음과 같은 1차 항체들(Santa Cruz Biotechnology, USA)을 이용하여 90분 동안 반응시켰다.

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 blocking buffer로 2회 세척해내고, 2차 항체로 염기성 인산분해효소가 결합된 anti-mouse와 anti-rabbit IgG(Santa Cruz Biotechnology, USA)를 실온에서 60분 동안 반응시켰고, 인산 완충용액(1xPBS)으로 세척하였다. ECL 용액(Amersham, UK) A, B를 1:1로 혼합하여 반응시키고, Hyperfilm-MP(Amersham, UK)에 노출시켰다.

사용된 단백질이 동일한 양인지를 확인하기 위하여 membrane을 1 x Ponceau S 용액(Sigma, USA)에 염색한 후 발현정도를 서로 비교하였다.

6. 통계 분석

실험결과와 분석은 SPSS WIN version 10.0 을 사용하여 평균과 표준 편차를 구하고, 이들의 통계학적 유의성은 일원 분산분석법(One-way ANOVA)을 이용하여 처리하였다($p < 0.05$).

Table 1. MTT assay of human fetal osteoblast(hFOB) treated with GR-1 (Mean \pm S.D.)

Hour	ctl	100 μ g/ml	10 μ g/ml	1 μ g/ml	100 ng/ml	10 ng/ml
12	0.53 \pm 0.01	0.62 \pm 0.04	0.64 \pm 0.05	0.63 \pm 0.03	0.71 \pm 0.05 *	0.67 \pm 0.04 *
24	0.69 \pm 0.01	0.77 \pm 0.02	0.79 \pm 0.02	0.79 \pm 0.02	0.84 \pm 0.02 *	0.81 \pm 0.01 *
48	0.74 \pm 0.03	0.80 \pm 0.07	0.80 \pm 0.08	0.90 \pm 0.02 *	0.82 \pm 0.04	0.79 \pm 0.03

* : Significantly different from the control($p < 0.05$)

ctl : Control group

GR : Ginseng Radix

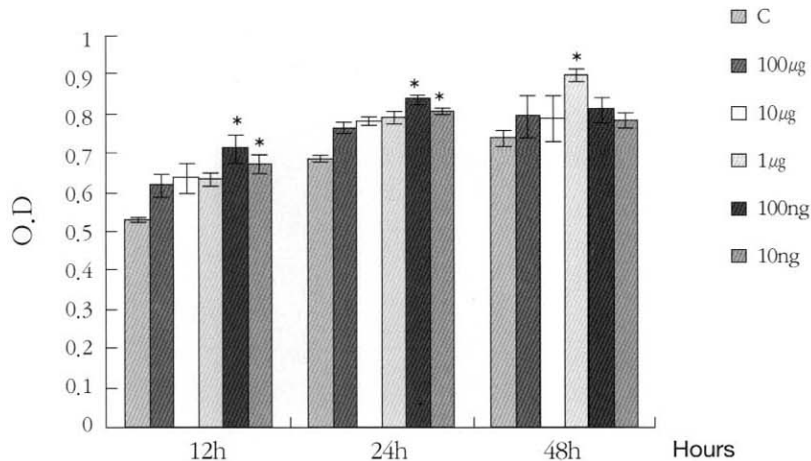


Figure 1. Effects of GR-1 on cell proliferation of hFOB between control group and experimental groups (100 μ g/ml, 10 μ g/ml, 1 μ g/ml, 100 ng/ml, 10 ng/ml). Cell counting was performed after 12, 24, 48 hours incubation (mean \pm S.D.). Vertical bars represent standard deviation of each independent experiments.

* : Significantly different from the control($p < 0.05$)

c : Control group

GR : Ginseng Radix

hFOB : human fetal osteoblast

III. 연구결과

1. 인삼의 사람태아골모세포에 대한 세포 증식 효과

1) 인삼-1 추출물

인삼-1 추출물 100 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$, 100 ng/ml , 10 ng/ml 을 배양액에 첨가한 후 12 h, 24 h, 48 h 동안 배양하여 살아있는 세포성장률을 대조군과 비교하였다. 실험 결과에서 12 h 때에는 100 ng/ml , 10 ng/ml 농도의 실험군에서 대조군과 비교

하여 통계학적으로 유의한 세포성장률을 보였고, 24 h 때에는 역시 100 ng/ml , 10 ng/ml 농도의 실험군에서 대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 세포성장률을 보였다. 48 h 때에는 1 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 실험군에서 대조군에 비해 유의한 수준의 세포성장률을 보였다(Table 1, Figure 1).

2) 인삼-2 추출물

인삼-2 추출물 100 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$, 100 ng/ml , 10 ng/ml 을 배양액에 첨가한 후 12 h, 24 h, 48 h 동안 배양하여 살아있는 세포성장률을 대조군

Table 2. MTT assay of human fetal osteoblast(hFOB) treated with GR-2 (Mean \pm S.D.)

Hour	ctl	100 $\mu\text{g/ml}$	10 $\mu\text{g/ml}$	1 $\mu\text{g/ml}$	100 ng/ml	10 ng/ml
12	0.53 \pm 0.01	0.57 \pm 0.02	0.64 \pm 0.02*	0.70 \pm 0.09*	0.62 \pm 0.03	0.59 \pm 0.06
24	0.64 \pm 0.02	0.86 \pm 0.02*	0.94 \pm 0.00*	0.99 \pm 0.01*	0.94 \pm 0.03*	0.88 \pm 0.04*
48	0.75 \pm 0.03	0.67 \pm 0.02	0.67 \pm 0.03	0.74 \pm 0.01	0.76 \pm 0.06	0.76 \pm 0.02

* : Significantly different from the control($p < 0.05$)

ctl : Control group

GR : Ginseng Radix

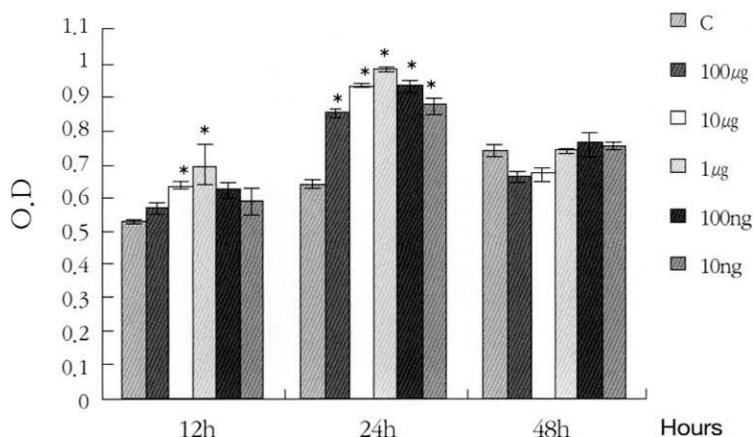


Figure 2. Effects of GR-2 on cell proliferation of hFOB between control group and experimental groups (100 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$, 100 ng/ml , 10 ng/ml). Cell counting was performed after 12, 24, 48 hours incubation (mean \pm S.D.). Vertical bars represent standard deviation of each independent experiments.

* : Significantly different from the control($p < 0.05$)

c : Control group

GR : Ginseng Radix

hFOB : human fetal osteoblast

과 비교하였다. 실험 결과에서 12 h 쯤에는 100 μ g/ml, 10 μ g/ml 농도의 실험군에서 대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 세포성장률을 보였고, 24 h 쯤에는 모든 농도의 실험군에서 대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 세포성장률을 보였다. 48 h 쯤에는 실험군에서 대조군에 비해 유의할 수준의 세포 성장률의 변화는 나타나지 않았다.

3) 인삼-3 추출물

인삼-3 추출물 100 μ g/ml, 10 μ g/ml, 1 μ g/ml, 100 ng/ml, 10 ng/ml을 배양액에 첨가한 후 12 h, 24 h,

48 h 동안 배양하여 살아있는 세포성장률을 대조군과 비교하였다. 실험 결과에서 12 h 쯤에는 모든 농도의 실험군에서 대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 세포성장률을 보였고, 24 h 쯤에도 역시 모든 농도의 실험군에서 대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 세포성장률을 보였다. 48 h 쯤에는 실험군에서 대조군에 비해 유의할 수준의 세포성장률의 변화는 나타나지 않았다.

2. 세포주기 분석

Table 3. MTT assay of human fetal osteoblast(hFOB) treated with GR-3

Hour	ctl	100 μ g/ml	10 μ g/ml	1 μ g/ml	100 ng/ml	10 ng/ml
12	0.53 \pm 0.08	0.67 \pm 0.03*	0.66 \pm 0.03*	0.64 \pm 0.02*	0.64 \pm 0.02*	0.64 \pm 0.04*
24	0.64 \pm 0.02	0.84 \pm 0.01*	0.83 \pm 0.04*	0.81 \pm 0.01*	0.81 \pm 0.01*	0.77 \pm 0.02*
48	0.74 \pm 0.03	0.77 \pm 0.14	0.78 \pm 0.05	0.79 \pm 0.03	0.81 \pm 0.04	0.81 \pm 0.03

* : Significantly different from the control(p<0.05)

ctl : Control group

GR : Ginseng Radix

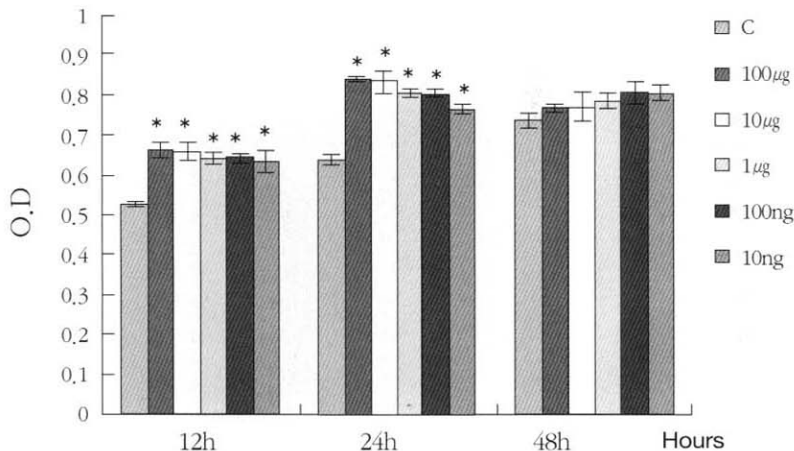


Figure 3. Effects of GR-3 on cell proliferation of hFOB between control group and experimental groups (100 μ g/ml, 10 μ g/ml, 1 μ g/ml, 100 ng/ml, 10 ng/ml). Cell counting was performed after 12, 24, 48 hours incubation (mean \pm S.D.). Vertical bars represent standard deviation of each independent experiments.

* : Significantly different from the control(p<0.05)

c : Control group

GR : Ginseng Radix

hFOB : human fetal osteoblast

1) 인삼-1 추출물

인삼-1 추출물이 사람태아골모세포의 세포주기변화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 100 ng/ml의 인삼추출물이 함유된 배양액에 사람태아골모세포를 24 h 간 배양하여 세포주기를 분석하였다.

100 ng/ml의 농도의 인삼-1을 첨가한 경우 S 주기는 대조군 14.44%에 비하여 20.70%로 증가를 나타냈으며 G1 주기는 20.06%에서 25.77%로 증가하였으며 G2/M 주기는 54.47%에서 43.46%로 감소치를 나타냈다. 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도의 인삼-1을 첨가한 경우 S 주기

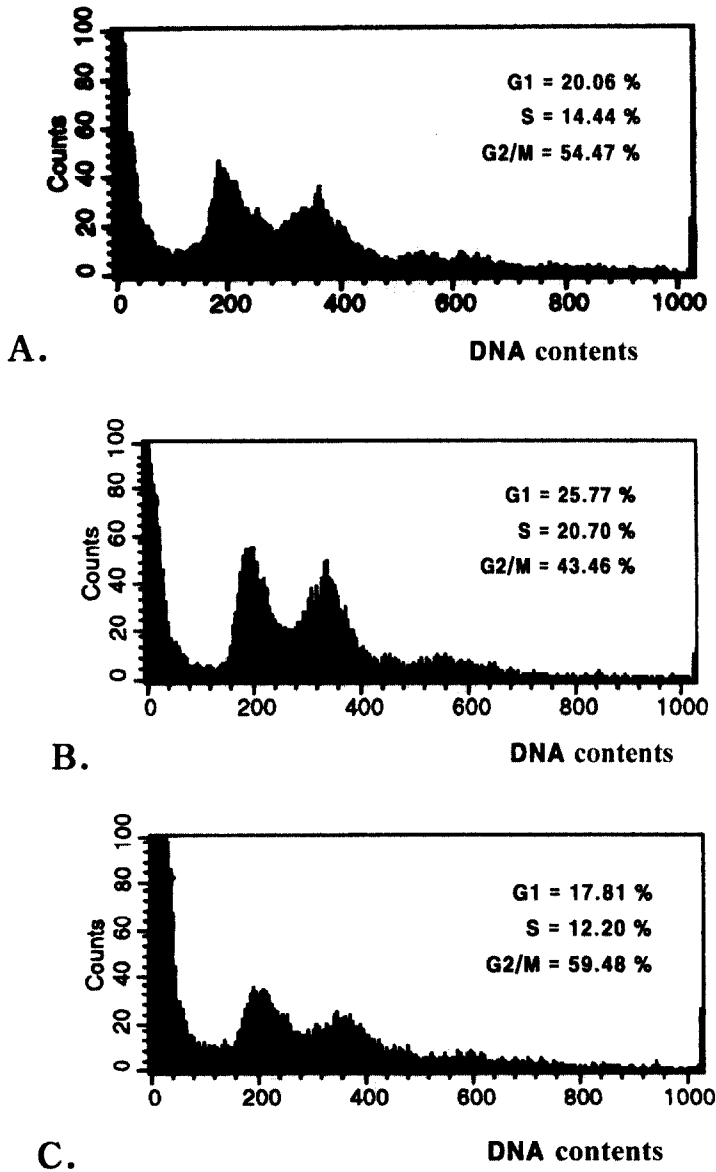


Figure 4. Effects of GR-1 on cell cycle progression of hFOB. The cell cycle analysis was performed after 24 hours incubation (A ; control group, B ; 100 ng/ml experimental group, C ; 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ experimental group).
GR : Ginseng Radix, hFOB : human fetal osteoblast

는 대조군 14.44%에 비하여 12.20%로 감소하였고 G1 주기는 20.06%에서 17.81%로 감소하였으며 G2/M 주기는 54.47%에서 59.48%로 증가하였다. 이러한 결과로 100 ng/ml 농도의 인삼-1의 투여는 사람 태아골모세포의 세포주기진행을 증가시키는 것으

로 나타났으며 1 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 인삼-1의 투여는 사람 태아골모세포의 세포주기진행에 유의한 영향을 미치는 못하는 것으로 나타났다(Figure 4).

2) 인삼-2 추출물

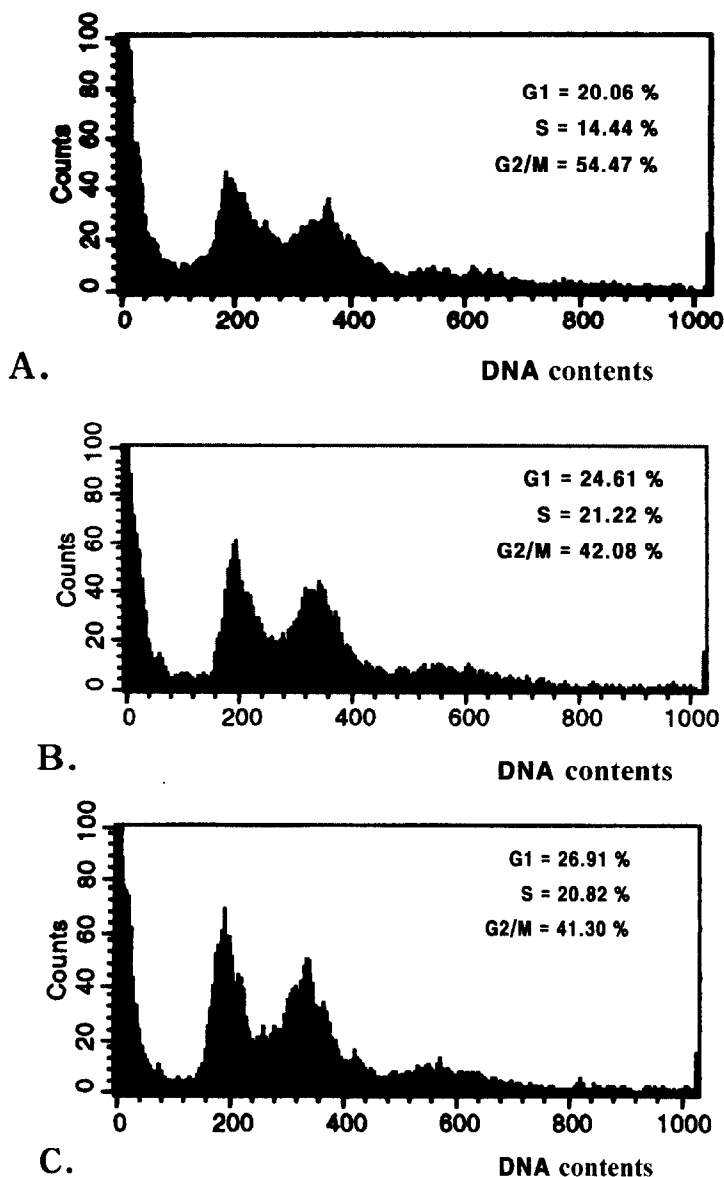


Figure 5. Effects of GR-2 on cell cycle progression of hFOB. The cell cycle analysis was performed after 24 hours incubation (A ; control group, B ; 1 $\mu\text{g/ml}$ experimental group, C ; 10 $\mu\text{g/ml}$ experimental group). GR : Ginseng Radix, hFOB : human fetal osteoblast

인삼-2 추출물이 사람태아골모세포의 세포주기변화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 1 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 인삼추출물이 함유된 배양액에 사람태아골모세포를 24 h 간 배양하여 세포주기를 분석하였다. 1 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 인삼-2를 첨가한 경우 S 주기는 대조군

14.44%에 비하여 21.22%로 증가를 나타냈으며 G1 주기는 20.06%에서 24.61%로 증가하였으며 G2/M 주기는 54.47%에서 42.08%로 감소치를 나타냈다. 10 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 인삼-2를 첨가한 경우 S 주기는 대조군 14.44%에 비하여 20.82%로 증가하였고 G1 주

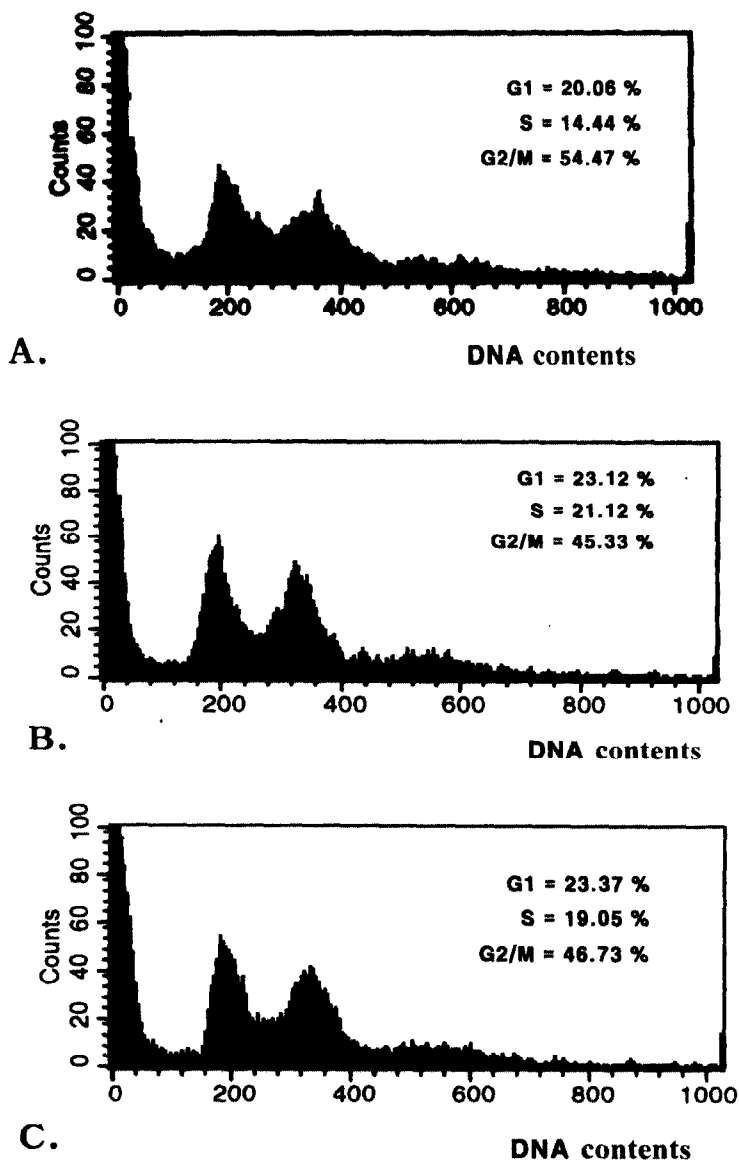


Figure 6. Effects of GR-3 on cell cycle progression of hFOB. The cell cycle analysis was performed after 24 hours incubation (A ; control group, B ; 100 $\mu\text{g/ml}$ experimental group, C ; 10 $\mu\text{g/ml}$ experimental group). GR : Ginseng Radix, hFOB : human fetal osteoblast

기는 20.06%에서 26.91%로 증가하였으며 G2/M 주기는 54.47%에서 41.30%로 감소하였다. 이러한 결과로 1 μ g/ml, 10 μ g/ml 농도의 인삼-2의 투여는 사람 태아골모세포의 세포주기진행을 증가시키는 것으로 나타났다(Figure 5).

3) 인삼-3 추출물

인삼-3 추출물이 사람태아골모세포의 세포주기변화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 100 μ g/ml, 10 μ g/ml의 인삼추출물이 함유된 배양액에 사람태아골모세포를 24 h 간 배양하여 세포주기를 분석하였다. 100 μ g/ml 농도의 인삼-3을 첨가한 경우 S 주기는 대조군 14.44 %에 비하여 21.12 %로 증가를 나타냈으며 G1 주기는 20.06%에서 23.12%로 증가하였으며 G2/M 주기는 54.47%에서 45.33%로 감소치를 나타냈다. 10 μ g/ml 농도의 인삼-3을 첨가한 경우 S 주기는 대조군 14.44%에 비하여 19.05%로 증가하였고 G1 주기는 20.06%에서 23.37%로 증가하였으며 G2/M 주기는 54.47%에서 46.73%로 감소하였다. 이러한 결과로 100 μ g/ml, 10 μ g/ml 농도의 인삼-3의 투여는 사람태아골모세포의 세포주기진행을 증가시키는 것으로 나타났다(Figure 6).

3. 세포주기조절단백질의 발현

1) Cyclin E의 발현

인삼의 사람태아골모세포에 대한 세포주기조절기전을 연구하기 위하여, 100 ng/ml, 1 μ g/ml의 인삼-1 추출물과 1 μ g/ml, 10 μ g/ml의 인삼-2 추출물, 10 μ g/ml, 100 μ g/ml의 인삼-3 추출물을 투여한 후 세포주기조절단백질 Cyclin E의 발현을 관찰하였다. 실험 결과 모든 농도의 인삼 추출물 투여 실험군에서 대조군과 비교하여 Cyclin E가 증가된 발현 양상을 나타냈다(Figure 7).

2) Cyclin D1의 발현

인삼의 사람태아골모세포에 대한 세포주기조절기전을 연구하기 위하여, 100 ng/ml, 1 μ g/ml의 인삼-1 추출물과 1 μ g/ml, 10 μ g/ml의 인삼-2 추출물, 10 μ g/ml, 100 μ g/ml의 인삼-3 추출물을 투여한 후 세포주기조절단백질 Cyclin D1의 발현을 관찰하였다. 실험 결과 모든 농도의 인삼 추출물 투여 실험군에서 대조군과 비교하여 Cyclin D1이 증가된 발현 양상을 나타냈다(Figure 8).

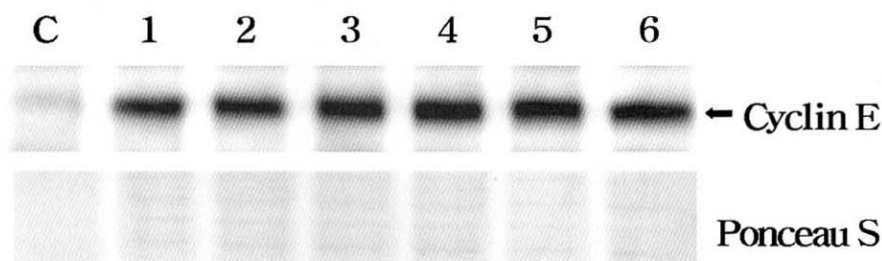


Figure 7. Western blot analysis for intracellular levels of Cyclin E in human fetal osteoblast(HFOB). Lane C is a control group, lane 1 is an experimental group that supplemented with 100 ng/ml of GR-1, and lane 2 is an experimental group that supplemented with 1 μ g/ml of GR-1, and lane 3 is an experimental group that supplemented with 1 μ g/ml of GR-2, and lane 4 is an experimental group that supplemented with 10 μ g/ml of GR-2, and lane 5 is an experimental group that supplemented with 10 μ g/ml of GR-3, and lane 6 is an experimental group that supplemented with 100 μ g/ml of GR-3. Cell extract equivalent to 50 μ g/ml of total cellular protein of HFOB was electrophoresed by 15% SDS-PAGE and transferred to a PVDF membrane. The intracellular protein levels of Cyclin E in HFOB were probed with respective antibodies diluted by 1 : 1000. After probing, the membrane was stained with 1 x Ponceau S stain for 10 min to reveal the total cellular protein loaded per each lane.

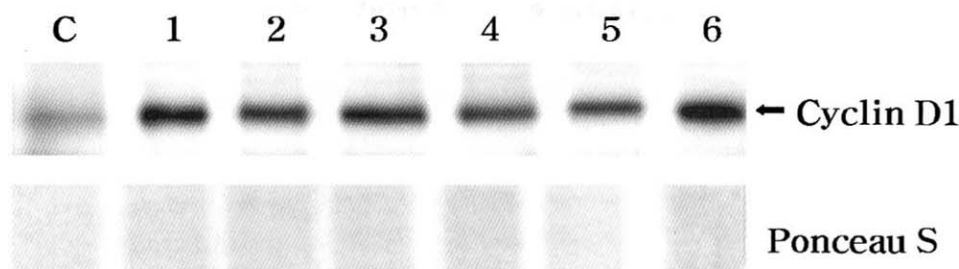


Figure 8. Western blot analysis for intracellular levels of Cyclin D1 in human fetal osteoblast(HFOB). Lane C is a control group, lane 1 is an experimental group that supplemented with 100 ng/ml of GR-1, and lane 2 is an experimental group that supplemented with 1 μ g/ml of GR-1, and lane 3 is an experimental group that supplemented with 1 μ g/ml of GR-2, and lane 4 is an experimental group that supplemented with 10 μ g/ml of GR-2, and lane 5 is an experimental group that supplemented with 10 μ g/ml of GR-3, and lane 6 is an experimental group that supplemented with 100 μ g/ml of GR-3. Cell extract equivalent to 50 μ g/ml of total cellular protein of HFOB was electrophoresed by 15% SDS-PAGE and transferred to a PVDF membrane. The intracellular protein levels of Cyclin D1 in HFOB were probed with respective antibodies diluted by 1 : 1000. After probing, the membrane was stained with 1 x Ponceau S stain for 10 min to reveal the total cellular protein loaded per each lane.

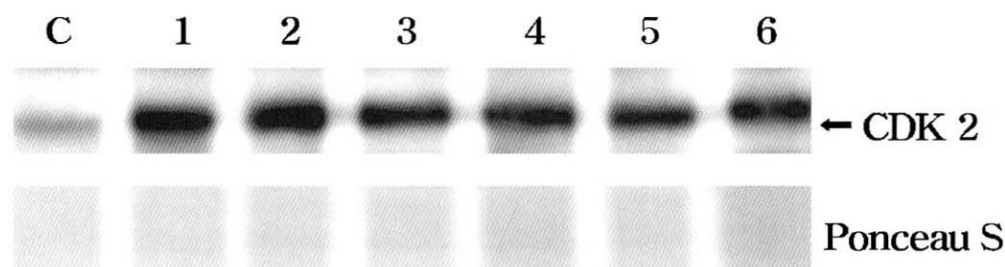


Figure 9. Western blot analysis for intracellular levels of CDK 2 in human fetal osteoblast(HFOB). Lane C is a control group, lane 1 is an experimental group that supplemented with 100 ng/ml of GR-1, and lane 2 is an experimental group that supplemented with 1 μ g/ml of GR-1, and lane 3 is an experimental group that supplemented with 1 μ g/ml of GR-2, and lane 4 is an experimental group that supplemented with 10 μ g/ml of GR-2, and lane 5 is an experimental group that supplemented with 10 μ g/ml of GR-3, and lane 6 is an experimental group that supplemented with 100 μ g/ml of GR-3. Cell extract equivalent to 50 μ g/ml of total cellular protein of HFOB was electrophoresed by 15% SDS-PAGE and transferred to a PVDF membrane. The intracellular protein levels of CDK 2 in HFOB were probed with respective antibodies diluted by 1 : 1000. After probing, the membrane was stained with 1 x Ponceau S stain for 10 min to reveal the total cellular protein loaded per each lane.

3) CDK 2의 발현

인삼의 사람태아골모세포에 대한 세포주기조절기전을 연구하기 위하여, 100 ng/ml, 1 μ g/ml의 인삼-1 추출물과 1 μ g/ml, 10 μ g/ml의 인삼-2 추출물, 10 μ g/ml, 100 μ g/ml의 인삼-3 추출물을 투여한 후 세포주기조절 단백질 CDK 2의 발현을 관찰하였다. 실험 결과 모든

농도의 인삼 추출물 투여 실험군에서 대조군에 비하여 CDK 2의 발현이 증가된 양상을 나타냈다(Figure 9).

4) CDK 4의 발현

인삼의 사람태아골모세포에 대한 세포주기조절기전을 연구하기 위하여, 100 ng/ml, 1 μ g/ml의 인삼-1

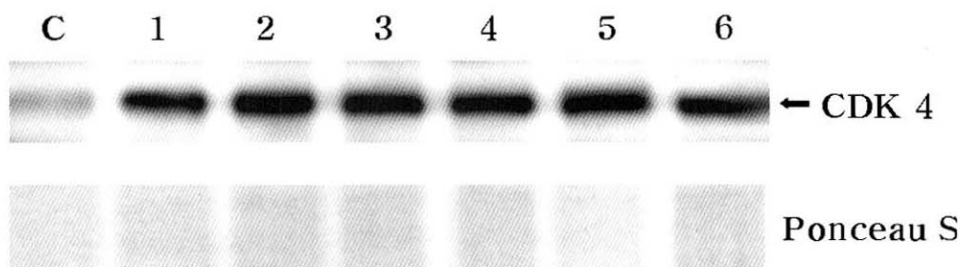


Figure 10. Western blot analysis for intracellular levels of CDK 4 in human fetal osteoblast(HFOB). Lane C is a control group, lane 1 is an experimental group that supplemented with 100 ng/ml of GR-1, and lane 2 is an experimental group that supplemented with 1 μ g/ml of GR-1, and lane 3 is an experimental group that supplemented with 1 μ g/ml of GR-2, and lane 4 is an experimental group that supplemented with 10 μ g/ml of GR-2, and lane 5 is an experimental group that supplemented with 10 μ g/ml of GR-3, and lane 6 is an experimental group that supplemented with 100 μ g/ml of GR-3. Cell extract equivalent to 50 μ g/ml of total cellular protein of HFOB was electrophoresed by 15% SDS-PAGE and transferred to a PVDF membrane. The intracellular protein levels of CDK 4 in HFOB were probed with respective antibodies diluted by 1 : 1000. After probing, the membrane was stained with 1 x Ponceau S stain for 10 min to reveal the total cellular protein loaded per each lane.

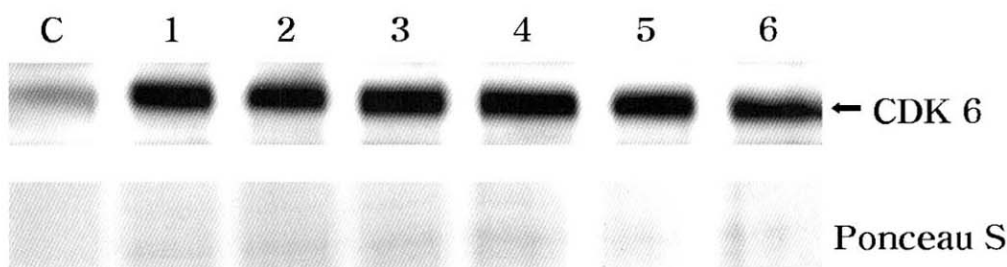


Figure 11. Western blot analysis for intracellular levels of CDK 6 in human fetal osteoblast(HFOB). Lane C is a control group, lane 1 is an experimental group that supplemented with 100 ng/ml of GR-1, and lane 2 is an experimental group that supplemented with 1 μ g/ml of GR-1, and lane 3 is an experimental group that supplemented with 1 μ g/ml of GR-2, and lane 4 is an experimental group that supplemented with 10 μ g/ml of GR-2, and lane 5 is an experimental group that supplemented with 10 μ g/ml of GR-3, and lane 6 is an experimental group that supplemented with 100 μ g/ml of GR-3. Cell extract equivalent to 50 μ g/ml of total cellular protein of HFOB was electrophoresed by 15% SDS-PAGE and transferred to a PVDF membrane. The intracellular protein levels of CDK 6 in HFOB were probed with respective antibodies diluted by 1 : 1000. After probing, the membrane was stained with 1 x Ponceau S stain for 10 min to reveal the total cellular protein loaded per each lane.

추출물과 1 μ g/ml, 10 μ g/ml의 인삼-2 추출물, 10 μ g/ml, 100 μ g/ml의 인삼-3 추출물을 투여한 후 세포주기조절단백질 CDK 4의 발현을 관찰하였다. 실험 결과 모든 농도의 인삼 추출물 투여 실험군에서 대조군과 비교하여 CDK 4가 증가된 발현 양상을 나타냈다(Figure 10).

5) CDK 6의 발현

인삼의 사람태아골모세포에 대한 세포주기조절기전을 연구하기 위하여, 100 ng/ml, 1 μ g/ml의 인삼-1 추출물과 1 μ g/ml, 10 μ g/ml의 인삼-2 추출물, 10 μ g/ml, 100 μ g/ml의 인삼-3 추출물을 투여한 후 세포주기조절단백질 CDK 6의 발현을 관찰하였다. 실험 결과 모든

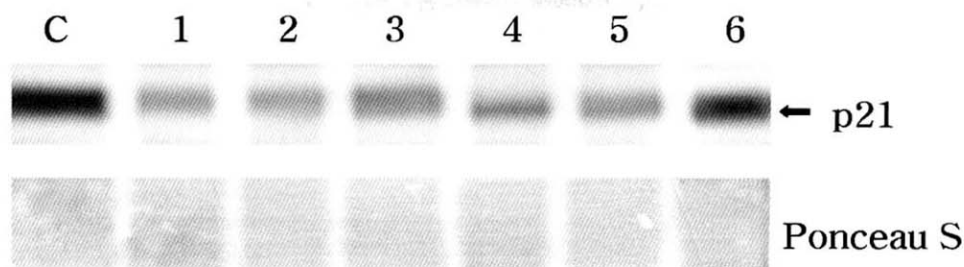


Figure 12. Western blot analysis for intracellular levels of p21 in human fetal osteoblast(HFOB). Lane C is a control group, lane 1 is an experimental group that supplemented with 100 ng/ml of GR-1, and lane 2 is an experimental group that supplemented with 1 μ g/ml of GR-1, and lane 3 is an experimental group that supplemented with 1 μ g/ml of GR-2, and lane 4 is an experimental group that supplemented with 10 μ g/ml of GR-2, and lane 5 is an experimental group that supplemented with 10 μ g/ml of GR-3, and lane 6 is an experimental group that supplemented with 100 μ g/ml of GR-3. Cell extract equivalent to 50 μ g/ml of total cellular protein of HFOB was electrophoresed by 15% SDS-PAGE and transferred to a PVDF membrane. The intracellular protein levels of p21 in HFOB were probed with respective antibodies diluted by 1 : 1000. After probing, the membrane was stained with 1 x Ponceau S stain for 10 min to reveal the total cellular protein loaded per each lane.

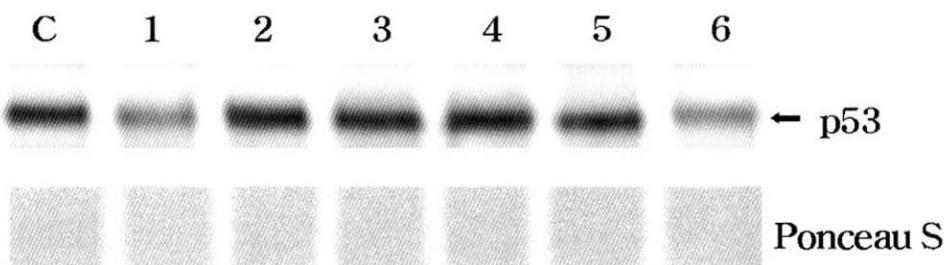


Figure 13. Western blot analysis for intracellular levels of p53 in human fetal osteoblast(HFOB). Lane C is a control group, lane 1 is an experimental group that supplemented with 100 ng/ml of GR-1, and lane 2 is an experimental group that supplemented with 1 μ g/ml of GR-1, and lane 3 is an experimental group that supplemented with 1 μ g/ml of GR-2, and lane 4 is an experimental group that supplemented with 10 μ g/ml of GR-2, and lane 5 is an experimental group that supplemented with 10 μ g/ml of GR-3, and lane 6 is an experimental group that supplemented with 100 μ g/ml of GR-3. Cell extract equivalent to 50 μ g/ml of total cellular protein of HFOB was electrophoresed by 15% SDS-PAGE and transferred to a PVDF membrane. The intracellular protein levels of p53 in HFOB were probed with respective antibodies diluted by 1 : 1000. After probing, the membrane was stained with 1 x Ponceau S stain for 10 min to reveal the total cellular protein loaded per each lane.

농도의 인삼 추출물 투여 실험군에서 대조군과 비교하여 CDK 6가 증가된 발현 양상을 나타냈다(Figure 11).

6) p21의 발현

인삼의 사람태아골모세포에 대한 세포주기조절기전을 연구하기 위하여, 100 ng/ml, 1 μ g/ml의 인삼-1

추출물과 1 μ g/ml, 10 μ g/ml의 인삼-2 추출물, 10 μ g/ml, 100 μ g/ml의 인삼-3 추출물을 투여한 후 세포주기조절단백질 p21의 발현을 관찰하였다. 실험 결과 인삼-1 추출물의 경우, 대조군에 비하여 감소된 발현 양상을 나타냈으며 인삼-2 추출물의 경우 10 μ g/ml 농도 투여시 1 μ g/ml 농도에 비하여 더욱 감소된 발현 양

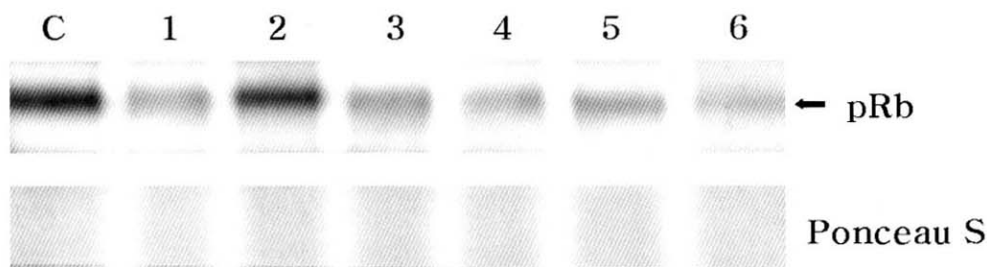


Figure 14. Western blot analysis for intracellular levels of pRb in human fetal osteoblast(HFOB). Lane C is a control group, lane 1 is an experimental group that supplemented with 100 ng/ml of GR-1, and lane 2 is an experimental group that supplemented with 1 μ g/ml of GR-1, and lane 3 is an experimental group that supplemented with 1 μ g/ml of GR-2, and lane 4 is an experimental group that supplemented with 10 μ g/ml of GR-2, and lane 5 is an experimental group that supplemented with 10 μ g/ml of GR-3, and lane 6 is an experimental group that supplemented with 100 μ g/ml of GR-3. Cell extract equivalent to 50 μ g/ml of total cellular protein of HFOB was electrophoresed by 15% SDS-PAGE and transferred to a PVDF membrane. The intracellular protein levels of pRb in HFOB were probed with respective antibodies diluted by 1 : 1000. After probing, the membrane was stained with 1 x Ponceau S stain for 10 min to reveal the total cellular protein loaded per each lane.

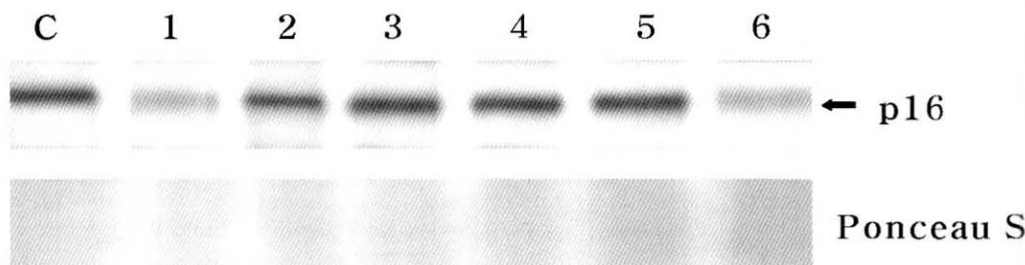


Figure 15. Western blot analysis for intracellular levels of p16 in human fetal osteoblast(HFOB). Lane C is a control group, lane 1 is an experimental group that supplemented with 100 ng/ml of GR-1, and lane 2 is an experimental group that supplemented with 1 μ g/ml of GR-1, and lane 3 is an experimental group that supplemented with 1 μ g/ml of GR-2, and lane 4 is an experimental group that supplemented with 10 μ g/ml of GR-2, and lane 5 is an experimental group that supplemented with 10 μ g/ml of GR-3, and lane 6 is an experimental group that supplemented with 100 μ g/ml of GR-3. Cell extract equivalent to 50 μ g/ml of total cellular protein of HFOB was electrophoresed by 15% SDS-PAGE and transferred to a PVDF membrane. The intracellular protein levels of p16 in HFOB were probed with respective antibodies diluted by 1 : 1000. After probing, the membrane was stained with 1 x Ponceau S stain for 10 min to reveal the total cellular protein loaded per each lane.

상을 나타냈고 인삼-3 추출물의 경우 10 μ g/ml 농도 투여시 발현양상이 감소되었으나 100 μ g/ml 농도에 서는 발현양상의 변화가 나타나지 않았다(Figure 12).

7) p53의 발현

인삼의 사람태아골모세포에 대한 세포주기조절기

전을 연구하기 위하여, 100 ng/ml, 1 μ g/ml의 인삼-1 추출물과 1 μ g/ml, 10 μ g/ml의 인삼-2 추출물, 10 μ g/ml, 100 μ g/ml의 인삼-3 추출물을 투여한 후 세포주기조절단백질 p53의 발현을 관찰하였다. 실험 결과 인삼-1 추출물의 경우, 100 ng/ml 농도에서 대조군에 비하여 감소된 발현양상을 나타냈으나 1 μ g/ml 농도

에서는 발현양상의 변화가 나타나지 않았고 인삼-2 추출물의 경우에도 발현양상의 변화는 나타나지 않았다. 인삼-3 추출물의 경우 10 $\mu\text{g/ml}$ 농도 투여시 발현양상의 변화는 나타나지 않았으나 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서는 대조군에 비하여 감소된 발현양상이 나타났다(Figure 13).

8) pRb의 발현

인삼의 사람태아골모세포에 대한 세포주기조절기전을 연구하기 위하여, 100 ng/ml, 1 $\mu\text{g/ml}$ 의 인삼-1 추출물과 1 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 인삼-2 추출물, 10 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 인삼-3 추출물을 투여한 후 세포주기조절단백질 pRb의 발현을 관찰하였다. 실험 결과 인삼-1 추출물의 경우, 100 ng/ml 농도에서 대조군에 비하여 감소된 발현양상을 나타냈으나 1 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서는 발현양상의 변화가 나타나지 않았고 인삼-2 추출물과 인삼-3 추출물의 경우에는 대조군과 비교하여 발현양상이 감소되어 나타났다(Figure 14).

9) p16의 발현

인삼의 사람태아골모세포에 대한 세포주기조절기전을 연구하기 위하여, 100 ng/ml, 1 $\mu\text{g/ml}$ 의 인삼-1 추출물과 1 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 인삼-2 추출물, 10 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 인삼-3 추출물을 투여한 후 세포주기조절단백질 p16의 발현을 관찰하였다. 실험 결과 인삼-1 추출물의 경우, 100 ng/ml 농도에서 대조군에 비하여 감소된 발현양상을 나타냈으나 1 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서는 발현양상의 변화가 나타나지 않았고 인삼-2 추출물의 경우에도 대조군과 비교하여 발현양상의 변화는 나타나지 않았다. 인삼-3 추출물의 경우에는 10 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서는 발현양상의 변화는 나타나지 않았으나, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 대조군과 비교하여 발현양상이 감소되어 나타났다(Figure 15).

IV. 총괄 및 고찰

치주질환을 치료하기 위한 외과적 술식들이 많이 발전하였음에도 불구하고 치주치료 후 치유를 촉진시키기 위한 보조요법과 약물개발에 대한 연구는 아

직은 미약하다. 최근 몇몇 연구에 의하면 성장인자와 세포 기질등이 치주치료 후 치주조직의 치유를 촉진시킨다고 보고된 바 있으며 일부 생약제재가 치주조직의 치유를 촉진하는 것으로 알려져 있다.

한의학에서 치주질환은 황제내경에서 처음에 구창이라는 증상으로 알려져 왔으며 구창을 치료하기 위한 많은 한약처방과 함께 각각의 한약재가 면역억제제, 항염제, 살균제, 항진균제, 진통제, 해열제, 궤양억제제, 타액분비촉진제 등으로 사용되고 있으며, 황백(黃柏, *Phellodendri Cortex*), 길경(桔梗, *Platycodi Radix*), 형개(荊芥, *Nepetae Spica*), 웅담(熊膽, *Fel Ursi*) 등은 그 중에서도 비교적 중요한 약재로 사용되어왔다^{24,25}. 또한 창상치유와 염증의 제거 및 부종 감소, 지혈작용을 위해서 많이 사용된 생약제재로는 인삼(人蔘, *Ginseng Radix*), 감초(甘草, *Glycyrrhizae Radix*), 황금(黃芩, *Scutellariae Radix*), 황련(黃連, *Coptidis Rhizoma*), 괴화(槐花, *Sophorae Flos*), 백급(白及, *Bletillae Tuber*) 등이 알려져 있다^{26,27}.

인삼은 오가과(五加科; *Araliaceae*)에 속하는 다년생의 낙엽성 식물로써, 생산되는 지역에 따라 크게 다섯 종류로 분류할 수 있다²⁸. 즉, 한국에서 재배되는 고려인삼(高麗人蔘; *Panax ginseng* C.A. Meyer), 중국의 *Panax notoginseng* F.H. Chen, 일본의 *Panax japonicus* C.A. Meyer, 미국의 동북부지역에서 산출되는 *Panax quinquefolius* Linne, 시베리아와 동아시아 지역에서 주로 생산되는 시베리아 인삼(*Eleutherococcus senticosus*) 등으로 나눌 수 있다.

인삼의 효능에 관한 연구는 Garriques가 미국인삼 뿌리에서 얻은 panaquilon 이란 성분을 분리한 이래 인삼 성분의 화학적 연구와 더불어 생리학적, 약리학 적 연구가 계속되어 왔다²⁹. Brekhman 등은 인삼의 효능은 인체의 비특이적 저항력을 증가시킴으로써 나타난다고 하였으며, 이러한 효과를 나타내는 물질을 adaptogen 이라고 명명하였다³⁰.

인삼에는 organic acid, panacene, sapogenin, 사포닌, 아미노산, 함유탄소, 지질, 비타민, antioxidants 등의 여러 성분이 들어있으며 그 중에서 사포닌은 골다공증의 예방 및 치료에 효과가 있는 것으로 알려졌다³¹, 어떤 기전에 의해 골격형성에 영향을 미

치는지에 대해서는 알려진 바가 없다. 과학적 연구를 통하여 입증된 인삼의 효능으로는 단백질 및 RNA 합성 촉진³²⁾, 혈압조절과 조혈 작용³³⁾, 체내 기초대사 항진 및 중추 신경계를 강화하고 스트레스에 대한 방어작용³⁴⁾ 등이 있으며 골절치유의 초기단계에 효과가 있는 것³⁵⁾으로 알려졌다. Hiai 등³⁶⁾은 인삼이 RNA polymerase의 활성을 증가시켜 단백질 합성을 촉진시킨다고 보고함으로써 인삼의 효과를 세포단위에서 설명하였으며, 합성된 단백질 또는 효소는 분자수준에서 전사인자(transcription factor)로 작용하여 특정 유전자의 발현을 조절하며 각종 물질대사에 영향을 미칠 것으로 사료된다.

본 실험에서는 인삼의 사람태아골모세포에 대한 세포증식 효과를 알아보았는데 100 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$, 100 ng/ml, 10 ng/ml 농도의 인삼-1, -2, -3 추출물을 배양액에 첨가한 후 12 h, 24 h, 48 h 동안 배양하여 살아있는 세포증식률을 대조군과 비교하였다. 실험 결과 인삼-1 추출물 투여시 12 h 쯤에는 100 ng/ml, 10 ng/ml 농도의 실험군에서 대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 세포증식률을 보였고, 24 h 쯤에도 역시 100 ng/ml, 10 ng/ml 농도의 실험군에서 대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 세포증식률을 보였다(Table 1, Figure 1). 즉 비교적 배양시간이 짧은 12 h 과 24 h 에서는 100 ng/ml, 10 ng/ml 농도의 실험군에서 증가된 세포증식률이 나타난 반면 상대적으로 배양시간이 길었던 48 h 쯤에는 1 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 실험군에서 대조군에 비해 유의할 수준의 세포증식률을 보임으로써 배양시간에 따른 세포증식에 유효한 적정 농도의 수준을 알 수 있었다. 인삼-2 추출물에서는 12 h 쯤에는 100 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 실험군에서 대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 세포증식률을 보였고, 24 h 쯤에는 모든 농도의 실험군에서 대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 세포증식률을 보였다. 48 h 쯤에는 실험군에서 대조군에 비해 유의할 수준의 세포증식률의 변화는 나타나지 않았다(Table 2, Figure 2). 이는 인삼-2 추출물의 경우 상대적으로 배양시간이 짧은 12 h 과 24 h 의 경우에 초기세포증식에 유효한 영향을 미치는 것으로 사료된다. 인삼-3 추출물에서

는 실험 결과에서 12 h 쯤에는 모든 농도의 실험군에서 대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 세포증식률을 보였고, 24 h 쯤에도 역시 모든 농도의 실험군에서 대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 세포증식률을 보였으나 48 h 쯤에는 실험군에서 대조군에 비해 유의할 수준의 세포증식률의 변화는 나타나지 않았다(Table 3, Figure 3). 이는 인삼-3 추출물의 경우 실험군중 상대적으로 배양시간이 짧은 12 h, 24 h 쯤에 세포증식에 유효한 효과를 나타내며 이때 인삼-1 추출물과는 달리 세포증식에 유효한 특정 농도 수준은 나타나지 않는 것으로 사료된다. 한편, 3일 동안 MTT를 측정한 예비실험 결과의 경우, 2일 이후의 시간에서는 세포증식이 거의 일어나지 않고, 특히 3일 쯤에는 대조군과 비슷하거나 또는 더 감소하는 경향을 보였다. 이러한 결과는 본 실험에 사용한 인삼 추출물이 빠른 시간내에 세포증식은 일으키지만, 시간이 지나 상대적으로 장시간 인삼에 노출이 되면 오히려 세포독성을 일으켜 골모세포의 활성을 감소시키는 것으로 사료된다. 인삼 추출물이 골모세포의 세포증식에 미치는 다른 연구결과로 성 등³⁷⁾은 쥐의 두개골 골모세포의 배양실험에서 인삼 사포닌은 골모세포의 부착성을 증가시켜 골 간질의 형성을 증가시키며 골모세포의 증식을 증가시켜 골모세포의 분화 및 골 형성을 증가시켰다고 보고하였다.

또한 전 등³⁸⁾은 인삼 추출물을 배양 회소돌기아교세포에 2시간 동안 전처리한 결과 산소자유기만을 처리하였을 때 세포증식률은 대조군에 비하여 46%로 낮게 나타났으나 인삼 추출물을 처리한 경우 세포증식률은 80%이상으로 높게 나타났으며 따라서 인삼추출물이 항산화제와 같은 약리적 활성을 가진다고 보고하였다. 그리고 정 등³⁹⁾은 인삼 사포닌에 대한 세포 독성 실험으로 백서 골모세포를 배양한 후 각각의 인삼 사포닌 농도(0-1000 $\mu\text{g/ml}$)를 처리한 결과 500 $\mu\text{g/ml}$, 1000 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 죽은 골모세포의 수가 증가하여 높은 농도에서 세포독성이 있으며, 사포닌 농도 31.25 $\mu\text{g/ml}$ 에서 골모세포의 활성도가 가장 높았다고 보고하였다.

그 외에 박 등⁴⁰⁾은 환경호르몬에 의해 손상된 백서 골모세포에 대한 인삼의 영향을 알아본 실험에서

환경호르몬 Bisphenol A 처리 전 인삼 추출물 처리 결과 Bisphenol A 만을 처리한 경우 세포생존율은 32.6% 였으나, 50 mg/ml와 100 μ g/ml 의 인삼 추출물 처리군에서는 세포생존율이 각각 78.5%와 86.3%로 증가되어 나타났으며, 골모세포의 단백질 합성 또한 유의성있게 증가시켜 인삼 추출물이 Bisphenol A 의 골모세포 독성 작용을 방어하는데 효과적이라는 결과를 보고하였다.

세포주기란 일종의 시계와 같은 것으로 전형적으로 4개의 phase(G1-S-G2-M)로 나누어진다¹¹⁾. DNA가 합성되는 시기인 S(synthesis) phase와 두개의 딸세포로 분열이 일어나는 M(mitosis) phase가 있고 이들 두 phase 전후에 현미경적으로는 아무 변화도 관찰되지 않는 G1, G2(휴지기) phase가 존재한다. 이미 성장하고 분화하여 더 이상 분열하지 않는 대부분의 세포는 바로 G1 phase에 해당하며, 분열이 장기간 일어나지 않는 상태를 특별히 G0 상태로 서술한다. S, G2, M phase에 소요되는 시간은 세포에 따라 별 차이가 없으나 G1 phase는 세포에 따라 큰 차이가 있어 세포분열에 소요되는 시간을 결정짓는 요인이 된다. 형태적으로 큰 변화가 없음에도 불구하고 G1 및 G2 phase는 정작 세포주기의 핵심조절기구가 작동하는 시기로서 성장인자(growth factor)와 같은 외부신호는 바로 이시기를 통해 세포분열이 출발, 혹은 정지할지의 여부를 결정짓곤 한다. 따라서 세포성장과 관련해서 G1, G1/S, G2/M phase에 일어나는 분자적 기전이 세포주기 연구의 관건이 되고 있다. 본 연구에서 세포증식률의 결과를 바탕으로 1 μ g/ml, 100 ng/ml 의 인삼-1 추출물을 사람태아골모세포에 24 h 처리한 후 세포주기를 분석한 결과 100 ng/ml의 농도의 인삼-1 추출물을 첨가한 경우 S 주기는 대조군 14.44%에 비하여 20.70%로 증가를 나타냈으며 G1 주기는 20.06%에서 25.77%로 증가하였으며 G2/M 주기는 54.47%에서 43.46%로 감소치를 나타냈다(Figure 4). 이는 첫 번째 휴지기는 증가하였으나 G2/M 주기는 감소하였으며 S 주기의 증가로 하나의 세포가 두 세포로 분열하기 위한 DNA의 합성이 증가했다는 것을 의미하며 증가된 세포증식률의 결과와도 일치한다고 사료된다. 1 μ g/ml의 농도의 인삼-1

추출물을 첨가한 경우 S 주기는 대조군 14.44%에 비하여 12.20%로 감소하였고 G1 주기는 20.06%에서 17.81%로 감소하였으며 G2/M 주기는 54.47%에서 59.48%로 증가하였고 이는 증가된 세포증식률의 결과와는 일치하지 않는 것으로 나타났다(Figure 4). 이러한 결과로 100 ng/ml 농도의 인삼-1 추출물의 투여는 사람태아골모세포의 세포주기진행을 증가시키는 것으로 나타나며 1 μ g/ml 농도의 인삼-1 추출물의 투여는 사람태아골모세포의 세포주기진행에는 유효한 영향을 미치지 못하는 것으로 보여진다.

인삼-2 추출물 투여시 1 μ g/ml의 농도에서 S 주기는 대조군 14.44%에 비하여 21.22%로 증가를 나타냈으며 G1 주기는 20.06%에서 24.61%로 증가하였으며 G2/M 주기는 54.47%에서 42.08%로 감소치를 나타냈다(Figure 5). 이는 첫 번째 휴지기는 증가하였으나 G2/M 주기가 크게 감소하였고 단일 세포가 두 개의 세포로 분화하기 위한 DNA 합성이 이루어지는 S 주기의 증가가 큰 폭으로 나타남에 따라 증가한 세포증식률 실험 결과와 일치하는 것으로 여겨진다. 10 μ g/ml의 농도의 인삼-2 추출물을 첨가한 경우 S 주기는 대조군 14.44%에 비하여 20.82%로 증가하였고 G1 주기는 20.06%에서 26.91%로 증가하였으며 G2/M 주기는 54.47%에서 41.30%로 감소하였다(Figure 5). 증가된 S 주기와 감소된 G2/M 주기는 세포증식률이 증가한 실험결과와 일치하며 이러한 결과를 토대로 1 μ g/ml, 10 μ g/ml 농도의 인삼-2 추출물의 투여는 사람태아골모세포의 세포주기진행을 증가시키는 것으로 보여진다. 인삼-3 추출물은 100 μ g/ml 농도의 경우 S 주기는 대조군 14.44 %에 비하여 21.12 %로 증가를 나타냈으며 G1 주기는 20.06%에서 23.12%로 증가하였으며 G2/M 주기는 54.47%에서 45.33%로 감소치를 나타냈으며(Figure 6). 감소된 G2/M 주기와 증가된 S 주기는 세포증식률 실험에서 유효한 효과를 미치는 것으로 나타난 실험 결과와 일치하는 것으로 보여진다. 10 μ g/ml의 농도의 인삼-3 추출물을 첨가한 경우 S 주기는 대조군 14.44%에 비하여 19.05%로 증가하였고 G1 주기는 20.06%에서 23.37%로 증가하였으며 G2/M 주기는 54.47%에서 46.73%로 감소하였다(Figure 6). S 주기가 증가하

며 G2/M 주기는 감소하는 양상은 실험결과 증가하는 것으로 나타난 세포증식률과 일치하는 것으로 보여진다. 따라서 100 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 인삼-3 추출물의 투여는 사람태아골모세포의 세포주기진행을 증가시키는 것으로 사료된다.

만약 세포가 어떤 자극에 의해 '분열' 하기로 결정하면 세포내의 일련의 효소와 그의 조절 단백질이 소집되고 이들로부터 세포주기조절기구(cell cycle machinery)가 구성된다. 이중 세포주기의 핵심 인자는 'CDK(Cyclin Dependent Kinase)' 라고 하는 serine/threonine kinase로서 세포주기가 진행하는데 있어 엔진의 역할을 한다⁴²⁾. 이 효소는 이미 이름에서 시사하듯 조절단위로 Cyclin 이라는 분자를 파트너로 하여 복합체를 이룰 때 활성화된다. 지금까지 8종류의 CDK가 알려졌고, 이들은 각각 CDK 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 로 명명되고 있다. Cyclin 도 A, B, C, D, E, F, G, H, I 타입이 있고 이중 D 타입 Cyclin은 다시 D1, D2, D3의 세 종류로 구분되고 있다. CDK들은 각 세포단계에서 Cyclin 분자와 고유의 조합을 이루어 활성화되고 세포주기를 담당하게 된다. Cyclin은 특정 세포단계에서 합성되기 시작하여 세포 내에서 축적되었다가 특정 CDK와 결합을 이루고 CDK를 활성화시킨 이후에 분해되는, 합성-분해의 과정을 반복하는 방식으로 작용한다. Cyclin은 세포의 핵내에서 주기적으로 증가, 감소하고 있으며 mitogene 들에 의해 Cyclin D의 발현이 촉진되어 Cyclin의 증가에 의하여 CDK가 활성화되며, Cyclin E와 CDK 2의 결합, Cyclin D와 CDK 4 혹은 CDK 6의 결합을 통해 CDK activating kinase 가 CDK의 threonine을 인산화시켜서 활성화된 CDK는 pRb의 serine 및 threonine을 인산화시킨다. Cyclin E-CDK 2복합체가 활성화됨으로서 Cyclin D가 더욱더 pRb의 인산화를 가속시키고 그 결과 pRb가 억제하고있던 E2F나 C-Abl, E1f-1과 같은 전사 인자들이 활성화되면서 세포주기는 G1 주기에서 S 주기로 들어가게 되고 세포는 증식하게된다^{43,44)}. 종류에 따라 약간의 차이는 있지만 포유동물세포의 초기 G1 주기에는 주로 Cyclin D와 CDK 2, 4, 6 등이 결합된 복합체들이 활성화되고, 이보다 더 늦은 G1 주기에는 Cyclin E가 합성되기 시작, CDK 2와 결합하여

G1/S 주기이행을 담당한다⁴⁵⁾.

본 연구에서는 인삼추출물을 사람태아골모세포에 투여하였을 때 세포주기조절단백질의 발현을 알아보기 위하여 웨스턴 블롯팅(western Blotting)을 사용하였다. 웨스턴 블롯팅(western Blotting)은 여러 가지 단백질을 포함하고있는 세포 또는 조직의 추출물을 전기 영동하여 그 속에 들어있는 단백질을 크기 별로 구분한 다음 흡착지에 옮겨놓고, 조사하고자 하는 단백질의 항체와 결합시켜 그 단백질의 존재유무와 크기등을 밝히는 검사이다⁴⁶⁻⁴⁸⁾. PCR(Polymerase Chain Reaction)과 비교하여 단백질 검출의 민감도가 높으므로 어떤 단백질이 세포 속에 발현되고 있는가를 확인하거나 그 발현되는 단백질의 크기변화를 관찰하는데 이용된다. 본 연구에서는 각각의 농도의 인삼-1 추출물, 인삼-2 추출물, 인삼-3 추출물을 투여한 결과 Cyclin E, Cyclin D1, CDK 2, CDK 4, CDK 6 과 같은 세포주기조절 단백질의 발현이 모두 증가된 양상으로 나타났다(Figure 7, 8, 9, 10, 11). 이러한 CDK와 Cyclin과 같은 positive regulator의 증가된 발현양상은 인삼추출물의 투여로 사람태아골모세포의 세포주기실험에서 S 주기가 증가하며 세포주기진행이 더욱 촉진되는 것과 유사한 결과를 보인다고 사료된다.

세포주기의 정확한 조절을 위해서 세포는 Cyclin 이나 CDK 같은 positive regulator 이외에도 p53, p16 및 p21 등의 CDK inhibitor(CKI) 들을 가지고 있는데 이들이 negative regulator 로서 필수적인 인자들이다⁴⁹⁾. p53은 p21을 활성화시키는 세포주기조절단백질이고 p21은 Cyclin E와 CDK 2, Cyclin D와 CDK 4나 6 복합체의 활성을 억제한다. 이들에 대한 발현양상을 확인한 실험결과 p21은 인삼-1추출물, 인삼-2 추출물 투여시 대조군에 비하여 모두 감소된 발현양상을 나타냈으며 인삼-3 추출물에서는 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서는 발현양상의 변화가 나타나지 않았으나 10 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서는 감소된 발현양상을 나타냈다(Figure 12). 또한 p53과 p16의 경우 인삼-1 추출물의 100 ng/ml 농도와 인삼-3 추출물의 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 대조군에 비하여 발현양상이 감소되는 것으로 나타났다(Figure 13, 15). pRb의 경우 인삼-1 추출물의 1 $\mu\text{g/ml}$ 농도를 제외한 나머지 실험군에서 대조군에 비

하여 발현양상이 감소되는 것으로 나타났다(Figure 14). 이러한 negative regulator의 감소된 발현양상은 Cyclin 과 CDK 들의 활성이 더욱 활발해지게 되어 결과적으로 사람태아골모세포의 세포주기진행이 더욱 촉진되는 것으로 사료된다.

이상과 같은 실험 결과는 양 등⁵⁰⁾ 이 사람태아골모세포에 녹용 추출물을 처리하여 세포 증식 및 세포주기진행에 미치는 영향을 알아본 실험 결과 녹용 추출물과 같은 생약제제는 사람태아골모세포의 증식 및 세포주기 진행을 촉진시키며, 그 기전은 Cyclin E와 CDK 2, Cyclin D와 CDK 4나 6 복합체의 발현 양상 증가와 p21의 발현 감소를 유발함으로써 이루어진다는 보고와 유사하다고 사료된다.

negative regulator 중 p21은 p53에 의존하여 활성이 증가하는 것으로 알려져 있으나⁵¹⁾, 본 실험에 사용된 인삼-1 추출물, 인삼-2 추출물, 인삼-3 추출물을 사람태아골모세포의 배양액에 첨가하였을 때, p21과 p53은 상호 비의존적인 발현양상을 나타냈으며, 이와 같은 p53에 대한 p21의 비의존적인 발현양상은 일부 암세포에 대한 연구들에서 관찰되기도 한다⁵²⁻⁵⁴⁾. 또한 Rosemary 등⁵⁵⁾ 은 MCF-7과 MDA-MB-231 인체 유방암 세포주에 인삼 농축액을 처리한 실험에서 negative regulator인 p21의 발현의 증가가 유방암 세포의 증식을 억제하는 기전으로 일부분 역할을 한다고 보고하였다.

결론적으로 인삼-1 추출물, 인삼-2 추출물, 인삼-3 추출물을 사람태아골모세포의 배양액에 첨가하였을 때, 세포주기의 진행이 촉진되며 그 기전으로는 세포주기진행에 있어서 positive regulator로 작용하는 CDK 2, CDK 4, CDK 6, Cyclin D1, Cyclin E의 발현을 증가시키며 세포주기진행을 억제하는 negative regulator로서 p21과 pRb의 발현을 감소시켜 나타난다고 보여진다.

V. 결론

본 연구는 단백질 및 RNA 합성 촉진, 체내 기초대사 항진 및 중추 신경계를 강화하고 스트레스에 대한 방어작용과 골절치유의 초기단계에 효과가 있는

것으로 알려져 있는 인삼이 파괴된 치주조직의 재생에 중요한 역할을 하는 사람태아골모세포의 세포주기조절과 세포분열에 미치는 영향을 알아보기 위하여 실시되었다. 사람태아골모세포의 배양액에 100 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$, 100 ng/ml , 10 ng/ml 농도의 인삼-1, -2, -3 추출물을 첨가하여 세포증식을 측정하였으며, 이중 세포증식율이 높은 1 $\mu\text{g/ml}$, 100 ng/ml 농도의 인삼-1 추출물, 1 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 인삼-2 추출물, 10 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 인삼-3 추출물을 처리하여 사람태아골모세포의 세포주기 및 세포주기조절단백질 발현을 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 인삼-1 추출물을 배양액에 첨가한 실험 결과 12 시간째에는 100 ng/ml , 10 ng/ml 농도에서 유의한 세포증식률을 보였고, 24 시간째에도 역시 100 ng/ml , 10 ng/ml 농도에서 유의한 세포증식률을 보였다. 48 시간째에는 1 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 유의할 수준의 세포증식률을 보였다($p < 0.05$).
2. 인삼-2 추출물을 배양액에 첨가한 실험 결과 12 시간째에는 100 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 유의한 세포증식률을 보였고, 24 시간째에는 모든 농도에서 유의한 세포증식률을 보였으나, 48 시간째에는 유의할 수준의 세포증식률의 변화는 나타나지 않았다($p < 0.05$).
3. 인삼-3 추출물을 배양액에 첨가한 실험 결과 12 시간과, 24 시간째에는 모든 농도에서 유의한 세포증식률을 보였으나, 48 시간째에는 유의할 수준의 세포증식률의 변화는 나타나지 않았다($p < 0.05$).
4. 인삼-1 추출물을 사람태아골모세포에 24 시간 동안 처리한 후 세포주기를 분석한 결과 100 ng/ml 농도의 경우 대조군에 비하여 S 주기와 G1 주기는 증가하였으며 G2/M 주기는 감소하는 경향을 보였고, 1 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 경우 대조군에 비하여 S 주기와 G1 주기는 감소하였으며 G2/M 주기는 증가하는 경향을 보였다.
5. 인삼-2 추출물을 사람태아골모세포에 24 시간 동안 처리한 후 세포주기를 분석한 결과 1 μg

/ml 농도에서 대조군에 비하여 S 주기와 G1 주기는 증가하였으며 G2/M 주기는 감소하는 경향을 보였고, 10 μ g/ml 농도에서 대조군에 비하여 S 주기와 G1 주기는 증가하였으며 G2/M 주기는 감소하는 경향을 보였다.

6. 인삼-3 추출물을 사람태아골모세포에 24 시간 동안 처리한 후 세포주기를 분석한 결과 100 μ g/ml 농도에서 대조군에 비하여 S 주기와 G1 주기는 증가하였으며 G2/M 주기는 감소하는 경향을 나타냈으며, 10 μ g/ml 농도에서 대조군에 비하여 S 주기와 G1 주기는 증가하였으며 G2/M 주기는 감소하는 경향을 보였다.
7. 인삼-1, -2, -3 추출물을 사람태아골모세포에 24 시간 동안 처리한 후 세포주기조절 단백질의 발현 정도를 평가한 결과 Cyclin E, Cyclin D1, CDK 2, CDK 4, CDK 6 과 같은 세포주기조절 단백질의 발현이 모두 증가된 양상을 보였다.
8. 인삼-1, -2, -3 추출물을 사람태아골모세포에 24 시간 동안 처리한 후 세포주기조절 단백질의 발현 정도를 평가한 결과 pRb는 1 μ g/ml 농도의 인삼-1 추출물을 제외한 나머지 실험군에서, p21은 100 μ g/ml 농도의 인삼-3 추출물을 제외한 나머지 실험군에서 대조군에 비하여 감소된 발현양상을 보였다.
9. 인삼-1, -2, -3 추출물을 사람태아골모세포에 24 시간 동안 처리한 후 세포주기조절 단백질의 발현 정도를 평가한 결과 p53과 p16의 경우 100 ng/ml 농도의 인삼-1 추출물과 100 μ g/ml 농도의 인삼-3 추출물 투여시 대조군에 비하여 감소된 발현양상을 보였다.

이러한 실험 결과로 미루어 인삼이 사람태아골모세포에 대한 세포활성의 증가와 세포 주기진행을 촉진시키며, 그 기전은 세포주기진행에 있어서 positive regulator로 작용하는 Cyclin E, Cyclin D1, CDK 2, CDK 4, CDK 6 의 발현을 증가시키며 세포주기진행을 억제하는 negative regulator로서 p21과 pRb의 발현을 감소시킴으로서 이루어지는 것으로 보이므로 인삼이 사람태아골모세포의 활성화와 분화에 유효

한 영향을 미칠 수 있다고 사료된다. 또한 앞으로 치주조직재생제로서 인삼을 임상적으로 활용할 수 있는 방법에 관하여 다각도로 모색할 필요가 있다고 사료된다.

VI. 참고문헌

1. Caton, J.G., Quinones, C.R. : Etiology of periodontal diseases. *Curr Opin Dent* 1 : 17-28, 1991.
2. Schroeder, H.E., Munzel Pedrassoli, S., Page, R.C. : Correlated morphometric and biochemical analysis of gingival tissue in early chronic gingivitis in man. *Arch Oral Biol* 18 : 899-923, 1973.
3. Brunsvold M.A., Mellonig J.T. : Bone grafts and periodontal regeneration. *Periodontol* 2000 1 : 80-91, 1993.
4. Lowenguth R.A., Blieden T.M. : Periodontal regeneration; root surface demineralization. *Periodontol* 2000 1 : 54-68, 1993.
5. Karring T., Nyman S., Gottlow J., Laurell L. : Development of the biological concept of guided tissue regeneration-animal and human studies. *Periodontol* 2000 1 : 26-35, 1993.
6. Nyman, S., Gottlow, J., Karring, T., Lindhe, J. : The regenerative potential of the periodontal ligament. An experimental study in the monkey. *J Clin Periodontol* 9 : 257-265, 1982.
7. McCulloch, C.A.G. : Progenitor cell populations in the periodontal ligament of mice. *Anat Rec* 211 : 258-262, 1985.
8. Gottlow, J., Nyman, S., Karring, T., Lindhe, J. : New attachment formation as the result of controlled tissue regeneration. *J Clin Periodontol* 11 : 494-503, 1984.
9. Martin, T.J., Suda, T. : Bone cell physiology. *Endocrinol Met Clin North AM* 18 : 833-858, 1989.
10. Nijweide, P.J., Burger, E.H., Feyen, J.H.M. :

- Cells of Bone. Proliferation, Differntiation, and Hormonal Regulation. *Physiol Rev* 66 : 855-886, 1986.
11. Chang B., Lee Y., Ku Y., Bae K., Chung C. : Antimicrobial activity of magnolol and honokiol against periodontopathic microorganisms. *Planta Med* 64(4) : 367-369, 1998.
 12. 이용무, 구영, 배기환, 정종평 : 후박 및 대조추출물이 골조직 재생에 미치는 영향. *대한치주과학회지* 27 : 165-177, 1997.
 13. Kimura, Y., Okuda, H., Arichi, S. : Studies on *Scutellariae radix* ; VIII. Effects of various flavonoids on arachidonate metabolism in leucocyte. *planta Med* 51 : 132-136, 1985.
 14. 류인철, 이용무, 구영, 배기환, 정종평 : 홍화 추출물이 치주인대세포, 조골세포 활성도에 미치는 영향. *대한치주과학회지* 27 : 867-882, 1997.
 15. 강정구, 유형근, 신형식 : 홍화씨 추출물이 치주인대세포와 조골우사세포의 골광물화 작용에 미치는 영향. *대한치주과학회지* 28 : 475-489, 1988.
 16. 한국인삼 경작조합 연합회 : 한국인삼사, 상권 : 15-31, 1980.
 17. Popov, IM., Goldwag, W.J. : A review of the properties and clinical effects of ginseng. *Am J Chinese Med* 1 : 263-270, 1973.
 18. Hu SY. : A contribution to our knowledge of ginseng. *Am J Chinese Med* ; 5 : 1-23, 1977
 19. 허준 : 동의보감, 서울, 여강출판사, 98-99, 1994.
 20. 대한생약학교수협의회 : 본초학, 초판. 대한약사회, 728-835, 1994.
 21. Hiroshi Yamamoto., Mitsuo Katano., Hisashi Matsunaga. : Antitumor substance from panax ginseng roots. *Korean J. Ginseng Sci* 14(2) : 244-252, 1990.
 22. 김웅, 정노팔 : Effects of a ginseng saponin fraction on the tumoricidal activity of murine macrophage against k562 cells. *Korean J. Ginseng Sci* 13(1) : 24-29, 1989.
 23. 김인구, 김정근, 이재현 : 한국 홍삼사포닌이 배양중인 사람치주인대세포의 성장과 분화에 미치는 영향. *대한치주과학회지* 25 : 45-55, 1995.
 24. 木村雄四郎. : 和漢藥의 世界, 創元社, 53, 1974.
 25. 陸昌洙. : 現代方藥合編, 계축문화사, 458, 1976.
 26. 生藥學研究會 : 現代生藥學, 學窓社, 1994.
 27. 陸昌洙, 金成萬 : 漢藥의 藥理, 成分, 臨床應用, 癸丑文化社, 1982.
 28. 한덕룡, 김종원, 김태희 : 현대 생약학. 한국학습교재사 : 189-196, 1983.
 29. Garriques, S.S. : *Panax quinquefolia* Linne. *Ann Chem Pharm* 90 : 231, 1854.
 30. Brekhman, I.I., Derdymov, T.V. : New substances of plant origin which increase nonspecific resistance. *Ann Rev Pharmacol* 9 : 419-430, 1969.
 31. 김남현, 최종혁, 이환모 : 흰쥐의 난소제거 후 발생한 골다공증에 대한 홍삼 사포닌의 효능. *대한정형외과학회지* 30 : 808-816, 1995.
 32. Oura, H., Nakashima, S., Tuskada, K. : Effect of panax ginseng extract on serum protein synthesis. *Chem Pharm Bull*, 20 : 980, 1972.
 33. Luben, R.A., Wong, G.L., Cohn, D.V. : Biochemical characterization with parathromone and calcitonin of isolated bone cells : Provisional identification of osteoblasts and osteoclasts. *Endocrinology* 99 : 526-534, 1976.
 34. Takagi, K., Saito, H., Nabata, H. : Pharmacological studies of panax ginseng root. *Japan J Pharmacol*, 22 : 245-259, 1972.
 35. 이한구, 정문상, 윤강섭 : 한국인삼이 골절치유에 미치는 영향. *대한정형외과학회지*, 19 : 483-491, 1984.
 36. Hiai, S, Oura, H., Tsukada, K. : Stimulating effect of panax ginseng extract on RNA polymerase activity in rat liver nuclei. *Chem Pharm Bull* 19 : 1656-1663, 1971.
 37. 성진형, 류재덕, 김승수 : 홍삼사포닌이 골모세포에 미치는 영향. *대한정형외과학회지* 33 : 868-

- 876, 1998.
38. 전병훈, 강익현, 문병순 : 인삼이 산소유리기로 손상된 척수신경세포의 손상에 미치는 영향. Korean J. Oriental Medical Pathology 12(1) : 96-101, 1998.
39. 정진광, 김정근, 이재현 : 한국 홍삼사포닌이 배양중인 쥐 조골세포의 염기성 인산분 해효소 활성도에 미치는 영향. 대한치주과학회지 25 : 694-702, 1995.
40. 홍기연, 박승택, 전병훈, 서은아 : 환경호르몬에 의해 손상된 골모세포에 대한 인삼의 영향. Korean J Oriental Physiology & Pathology 16(2) : 338-342, 2002.
41. Giannino, D., Massimo, L., : Cell cycle and cancer ; critical events at the G1 restriction point. Critical Reviews in Oncogenesis 7 : 127-142, 1996.
42. Kang, G., Brian, D.D. : Activity and nature of p21WAF1 complexes during the cell cycle. Proc. Natl. Acad. Sci 95, 12254-12259, 1998.
43. 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.
44. Wang, J.Y., Knudsen, E.S., Welch, P.J. : The retinoblastoma tumor suppressor protein. Adv Cancer Res 64 : 25-85, 1994.
45. Sherr, C.J. : Mammalian G1 cyclins. Cell 73 : 1059-1065, 1993.
46. 이연태, 정원일 : 유전자 공학, 집문당, 429-433, 1983.
47. 최영길 : 임상 분자생물학 기법, 고려의학, 73-205, 1993.
48. Leonard, G., Davis, Mark C., Dibner, James F., Battey, Elsevier. : Molecular biology, 311-314, 1986.
49. Sherr, C.J., Roberts, J.M. : Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. Genes Dev 9 : 1149-1163, 1995.
50. 양대승, 유형근, 김윤철, 신형식 : 녹용이 사람태아골모세포의 세포주기조절에 미치는 영향. 대한치주과학회지 32 : 811-822, 2002.
51. Kim T.K. : in vitro Transcriptional activation of p21 promoter by p53. Biochem Biophys Res Commun 234 : 300-302, 1997.
52. 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.
53. Haapajarvi, T., Kivinen, L., Heiskanen, A., des Bordes C., Datto M.B., Wang, X.F., Laiho, M. : UV Radiation is a transcriptional inducer of p21 Cipl / Waf1 Cyclin-Kinase inhibitor in a p53-Independent manner. Exp Cell Res 248 : 272-279, 1999.
54. Kaye, P.V., Radehold, K., Isaacs, S., Dent, D.M. : Expression of p53 and p21 waf1/cipl in gastric carcinoma : lack of inter-relationship or correlation with prognosis. Eur J Surg Oncol 26 : 36-43, 2000.
55. 강성수, Rosemary B. Duda. : 인체 유방암 세포주에서 인삼에 의한 암억제 유전자 p21의 발현. 대한외과학회지 57 : 782-788, 1999.

Effects of Ginseng Radix on the Cell Cycle Regulation in Human Fetal Osteoblast

Dae-Gyeom Kim¹, Yong-Bae Lee¹, Sang-Kee Park¹, Hyung-Keun You¹,
Kyung-Tae You¹, Yun-Chul Kim², Hyung-Shik Shin¹

¹Department of Periodontology, School of Dentistry, Wonkwang University

²Department of Pharmacy, Pharmacy College, Wonkwang University

Ginseng Radix (GR) has been used widely from oriental medicine and the effects of it have been investigated by many researchers. The purpose of present study was to investigate the effects of GR on the cell cycle progression and its molecular mechanism in human fetal osteoblast. The results were as follows.

Increased cell proliferation was observed in cells exposed to 100 ng/ml, 10 ng/ml of GR-1 at 12 hours and 24 hours, 1 µg/ml of GR-1 at 48 hours, and 100 µg/ml, 10 µg/ml of GR-2 at 12 hours, all treatment groups of GR-2 at 24 hours ($p < 0.05$). S phase and G1 phase was increased in the group of treated with 100 ng/ml of GR-1, with 10 µg/ml and 1 µg/ml of GR-2, with 100 µg/ml and 10 µg/ml of GR-3 in the cell cycle analysis.

The cell cycle regulation protein levels of Cyclin D1, Cyclin E, CDK 2, CDK 4 and CDK 6 were increased in the group of treated with 1 µg/ml and 100 ng/ml of GR-1, with 10 µg/ml and 1 µg/ml of GR-2, with 100 µg/ml and 10 µg/ml of GR-3. On the other hand, p21 was decreased in the treatment group with 1 µg/ml and 100 ng/ml of GR-1, with 10 µg/ml and 1 µg/ml of GR-2, 10 µg/ml of GR-3, and p53 and p16 was decreased in the treatment group with 100 ng/ml of GR-1, 100 µg/ml GR-3 and pRb was decreased in the all treatment groups except 1 µg/ml of GR-1.

These results suggested that GR increases the cell proliferation and the cell cycle progression in human fetal osteoblast, which is linked to increased cell cycle regulation protein levels of Cyclin D1, Cyclin E, CDK 2, CDK 4, CDK 6 and decreased cell cycle regulation protein levels of p21, pRb.

Key words : Ginseng Radix, cell cycle, human fetal osteoblast, proliferation