

## 녹용이 造骨細胞 성장에 미치는 유전자 발현 profile 분석에 대한 연구

이종우\*, 김덕곤\*

\*慶熙大學校 韓醫科大學 小兒科教室

### ANALYSES OF THE EXPRESSION PROFILES OF GENES RESPONSIBLE FOR THE GROWTH OF OSTEOBLAST UPON VELVET ANTLERS TREATMENT

Jong-Woo Lee, Doeg-kon Kim

Dept. of Oriental Pediatrics, College of Oriental Medicine, Kyung Hee University,  
Seoul, Korea

Recently, increased attention has been paid to the growth of the height of children and adolescents. To accelerate growth, velvet antlers are typically used in Oriental medicine. The present study investigated the effects of velvet antlers on bone growth using the cell line of Human Osteosarcoma (Hos), derived from the bone-generating cells essential to bone growth.

In order to give certain stress to this Hos, the medium contained 1% FBS was used for culturing for Hos cell instead of 10% in control. In this condition, of which the proliferation had been significantly decreased, the ethanol extract of upper part of velvet antlers was added. As a result, the cells proliferation rate was significantly increased. Using Oligonucleotide DNA microarray, comparison and analyses were done to see what kind of specific genes would be differentially expressed. The result showed that as opposed to the control group, the stressed group indicated a decrease in the expressions of 6 kinds of genes such as, Id1, retinoid X receptor(RXR $\beta$ ) and 14-3-3 epsilon, etc. The velvet antler treated group, as opposed to the control group, showed a decrease in the expressions of 8 kinds of genes such as Id1, etc. and an increase in the expressions of 24 kinds of genes. The number of genes that showed differences in the velvet antler treated group compared with the stressed group was 7: the expression of 1 kind of gene was decreased, and the expressions of 6 kinds of genes were increased.

Considering the mechanism by which velvet antlers affected the growth of osteoblast through reviewing the functions of these genes, the following results were attained.

The constraint in the proliferation of Hos cells resulting from the medium contained 1% FBS seems to be caused by three important factors: 1) the decrease of the expression of 14-3-3 epsilon involved in the signal transduction and metabolism of growth, 2) the decrease of the expression of Id1 gene involved in the metabolism of bone formation, and 3) the decrease of expression of RXRB gene involved in the metabolism of retinoic acid. It is suggested that the improvement of the cell proliferating effects by velvet antler treatment in stressed condition is mediated by increment of 6 genes particularly 14-3-3 epsilon, RXRB, and IGF2, which are the crucial factors for the cell growth and differentiation, metabolism of retinoic acid and osteoblast proliferation, respectively.

## I. 緒 論

최근 생활수준의 향상으로 소아의 평균 신장이 과거보다 증가했으며<sup>1)</sup> 상대적으로 신장이 작은 소아나 그의 부모들은 키성장을 위해 여러 가지 시도를 하고 있는 실정이다. 古人은 소아의 生理를 純陽이론으로 설명하였는데 이는 生氣旺盛하고 發育迅速하며 陽常有餘 陰常不足하여 영양물질, 열량, 체액요구량이 어른에 비해 상대적으로 높다는 것을 의미한다<sup>2)</sup>. 한의학에서 소아의 生長 發育은 先天之本인 腎과 後天之本인 脾의 機能과 관련이 있으며<sup>3)</sup> 그중 骨格의 生長과 機能은 腎氣의 盛衰에 영향을 받는 것으로 보인다<sup>4)</sup>.

녹용은 소아의 성장 발육을 위해 다용하는 약재중 하나이다. 녹용은 척추동물 哺乳綱 偶蹄目 鹿科에 속한 梅花鹿 혹은 馬鹿등 각종 雄鹿의 未骨化 幼角을 말하며<sup>5)</sup> 녹용의 효능에 대해서 神農本草經<sup>6)</sup>에 「治漏下惡血, 寒熱驚癇, 益氣強志, 生齒不老」라고 기록되었으며 「壯元陽, 補元氣, 益精髓, 強筋骨」 등의 효능이 있어 先天 및 後天的인 精氣의 損傷에 널리 사용되어왔다<sup>7,8)</sup>

녹용에 대해서는 그동안 성분에 대한 분석과 효능에 대한 연구가 이루어져 왔으며 최근 소아성장에 대한 관심이 증가하면서 녹용이 성장에 어떠한 영향을 미치는가 하는 연구가 이루어지고 있다. 그중 Grizimek<sup>9)</sup>과 성 등<sup>10)</sup>은 사슴뿔의 성장과 성호르몬과는 깊은 관계를 가지고 있어서 뇌하수체 전엽과 갑상선 호르몬은 뿔의 형성에 관여하여 성장을 돕는다는 사실을 보고 하였으며 배<sup>11-13)</sup>와 허<sup>14)</sup>등은 동물의 성장 촉진에 녹용이 유의한 영향을 미친다고 하였다. 김<sup>15)</sup>은 녹용 약침 투여군이 성장 호르몬 투여군에 비하여 총신장 증가량이 유의성있게 증가하였고 체중도 유의성있게 증가하였음을 보고하였다. 또한 김<sup>16)</sup>은 녹용의 추출액이 조골세포의 증식을 촉진시키고 세포 생존율을 증가시키며 ALP 활성을 증가시킨다고 보고하였다. 그러나 녹용 성분이 조골세포의 증식을 유발하는 기전에 대한 연구는 없었다.

이에 저자는 유전자 발현을 확인하여 두 조직간의 유전자 발현양상 비교, 유전자의 염기서열 분석, 유전자 변이 검색등 다양한 분야에서 사용되는 microarray 기

법<sup>17)</sup>을 이용하여 녹용이 조골세포의 성장에 어떤 영향을 미치며, 어떠한 특이 유전자를 발현시키는지 확인하기 위한 실험을 실시하여 유의한 결과를 얻었으므로 보고하는 바이다.

## II. 實驗材料 및 方法

### 1. 藥材의 調製

녹용은 부위별로 성장점 하 2cm 이하 부위 (upper part : up)와 제2분지 이하 제3분지 이상 부위 (middle part : mp)를 사용하였다. up의 alcohol 추출은 34.95g을 분쇄기로 분쇄하여 70% ethyl alcohol (덕산화학, 서울) 1ℓ가 담긴 플라스크에 넣고 실온에서 초음파 진탕기로 10분간 추출하여 상층액을 포집하였다.

이를 80% ethyl alcohol, 90% ethyl alcohol, 100% ethyl alcohol을 이용하여 같은 방법으로 추출한 후 상층액을 모았다. 상층액을 농축하기 위하여 감압농축기 (EYELA Co. Japan)로 농축한 후 동결 건조기 (EYELA Co. Japan)로 동결 건조하여 up 추출물 1.83g을 얻었으며, up 물 추출은 34.85g을 물 1ℓ를 넣고 진탕한 후 거즈로 거른 후 그 상층액을 농축한 후 건조하여 4.66g을 얻었다. mp 역시 같은 방법으로 76.72g을 alcohol 추출하여 1.56g, 75.35g을 물 추출하여 9.18g을 회수하였다. 각 약재의 수율은 up alcohol 추출물 5.23%, 물 추출물 13.4%,

mp alcohol 추출물 2%, 물 추출물 12.1%이다. 이 추출물을 각각 10mg/ml stock으로 조제하여 실험에 사용하였다.

### 2. Hos cell의 증식능 측정

#### 1) Hos cell

Hos cell (TE-85 human, female, osteosarcoma; bone)은 한국세포주은행에서 분양 받았다(KCLB # 21543).

#### 2) Hos cell의 배양

Hos cell은 10% Fetal bovine serum (Sigma, USA) 및 1% penicillin-streptomycin (Invitrogen Life Technologies, USA), 2g/ℓ NaHCO<sub>3</sub> (JRH Biosciences, USA), 10mM Hepes (JRH Biosciences, USA)가 함유된 RPMI 1640 배지 (Invitrogen Life Technologies, USA)를 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator (Nuair, USA)에서 배양하였다.

#### 3) FBS (Fetal bovine serum) 농도에 따른 Hos cell의 증식능 측정

Hos cell의 증식능 억제를 유발하는 FBS 농도를 확인하기 위하여 FBS 농도 별로 세포 증식능을 측정하였다.<sup>18)</sup> 2×10<sup>4</sup> cells/ml의 Hos cell을 96well plate에 분주하여 24시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하고, Phosphate Buffered Saline (PBS) (Invitrogen Life Technologies, USA)로 1회 세척한 후, 최종 배지 농도가 0, 0.3, 3, 5, 10%가 되도록 FBS를 배지에 희석하여 100μℓ씩 넣고 24시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다. CellTiter 96<sup>®</sup> AQueous

One Solution Cell Proliferation Assay Kit (Promega, UK)를 사용하여 각각의 well에 100 $\mu$ l 당 20 $\mu$ l의 MTS 용액을 넣고 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 1시간 동안 반응 후 Microplate reader (Molecular Device, USA)를 이용하여 490nm에서 측정하였다. 결과는 표준 FBS 농도인 10%에서의 흡광도를 기준으로 하여 cell viability (%)로 표시하였다.

#### 4) 녹용의 농도에 따른 Hos cell의 증식능 측정

2 $\times$ 10<sup>4</sup> cells/ml의 Hos cell을 96well plate에 분주하고 24시간 동안 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하고 PBS로 1번 세척한 다음, 두 군으로 나누어 한 군은 FBS 10% 와 각각의 녹용 추출물 0, 0.1, 0.5, 1, 2, 5 $\mu$ g/ml을 cell에 처리하고 다른 군은 FBS 1%와 각각의 녹용 추출물 0, 0.1, 0.5, 1, 2, 5  $\mu$ g/ml를 분주하고 48시간 동안 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양한 후 CellTiter 96<sup>®</sup> Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay Kit (Promega, UK)를 사용하여 각각의 well에 100 $\mu$ l 당 20 $\mu$ l의 MTS 용액을 넣고 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 1시간 동안 반응 후 Microplate reader를 이용하여 490nm에서 측정하였다. 결과는 10% FBS 농도에 녹용을 투여하지 않은 sample에서의 흡광도를 기준으로 하여 cell viability (%)로 표시하였다.

### 3. Oligonucleotide Chip Microarray

#### 1) Hos cell harvest

5 $\times$ 10<sup>6</sup> cells/ml을 flask에 분주하여 24시

간 동안 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하고 PBS로 1회 세척한 다음, 대조군 (Control group)에는 10% FBS를 처리하고 억제군 (Stressed Group)에는 1% FBS를 처리하였으며 실험군 (Velvet antler treated Group)에는 1% FBS와 녹용 upper part alcohol 추출물 0.5  $\mu$ g/ml을 처리한 후 48시간 동안 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다.

48시간 이후 각 군별로 Hos cell을 300G에서 10분간 원심분리하여 cell을 모았다.

#### 2) Total RNA 분리

각 군별로 모아진 Hos cell은 RNaeasy mini kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany)을 사용하여 제조사의 protocol에 따라 Total RNA를 분리하였다. 分離된 total RNA는 spectrophotometer (DU500, Beckman, Inc., USA)로 定量한 후 DEPC 처리 증류수를 이용하여 농도가 2 $\mu$ g/ $\mu$ l가 되도록 하였다.

#### 3) cDNA 합성

18 $\mu$ g의 total RNA가 ds cDNA 합성에 사용되었다. cDNA 합성은 Superscript Choice System for cDNA Synthesis (Invitrogen Life Technologies, USA)를 사용하여 제조사의 protocol대로 시행하였다. 다만 ss cDNA 합성에 사용된 primer는 100 $\mu$ M T7-(dT)<sub>24</sub> primer (Genotech, Korea)를 1 $\mu$ l 사용하였고, ss cDNA 합성을 위한 배양 온도는 제조사 protocol의 37 $^{\circ}$ C에서 42 $^{\circ}$ C로 바꾸어 사용하였다.

합성된 ds cDNA는 최종적으로 12 $\mu$ l의 증류수에 녹였다.

4) Biotin-labeled cRNA 합성

12 $\mu$ l의 ds cDNA 중 3.3 $\mu$ l가 biotin-labeled cRNA 합성에 사용되었다. Biotin-labeled cRNA 합성은 ENZO BioArray Highyield RNA reanscript Labeling Kit (Affymetrix, USA)를 사용하여 제조사의 protocol에 따라 시행하였다. 합성된 biotin-labeled cRNA은 RNaeasy mini kit을 사용하여 제조사의 protocol대로 cleanup한 후 spectrophotometer로 定量하여 1 $\mu$ g/ $\mu$ l의 농도가 되도록 하였다.

5) Fragmentation of cRNA

합성된 20 $\mu$ g cRNA는 2 $\mu$ l의 5X Fragmentation buffer (200mM Tris acetate pH 8.1, 500mM KOAc, 150mM MgOAc)를 첨가한 후 DEPC 처리 증류수로 40 $\mu$ l가 되게 하였다. 40 $\mu$ l의 반응액은 94 $^{\circ}$ C에서 35분간 배양하여 30-200 base의 조각으로 만들었다.

6) Oligonucleotide Chip Hybridization

cRNA fragment 15 $\mu$ g을 12,000 이상의 human 유전자와 EST clusters가 탑재되어 있는 GeneChip $^{\circledR}$  Human Genome U95A array (Affymetrix, USA)에 적용하여 hybridization하였다.

cRNA fragment 15 $\mu$ g을 1,300 이상의 Rat 중추신경계 유전자가 탑재되어 있는 GeneChip $^{\circledR}$  Rat Neurobiology U34 Array (Affymetrix, USA)에 적용하여 hybridization 하였다. 일련의 과정은 제조사의 추천대로 standrad format protocol를 따랐다.

150 $\mu$ l 2 $\times$  hybridization buffer (200mM

MES, 2M [Na $^{+}$ ], 40mM EDTA, 0.02% Tween 20), 5 $\mu$ l 3nM control oligonucleotide B2 (Affymetrix, USA), 15 $\mu$ l 20 $\times$ eukaryotic hybridization controls (bioB, bioC, bioD, cre 30pM each) (Affymetrix, USA), 3 $\mu$ l 10mg/ml herring sperm DNA (Promega, UK), 3 $\mu$ l 50mg/ml acetylated BSA (Invitrogen Life Technologies, USA), 30 $\mu$ l 0.5 $\mu$ g/ $\mu$ l fragmented cRNA 혼합액에 DEPC 처리 증류수를 첨가하여 300 $\mu$ l의 반응액을 만들었다.

반응액은 99 $^{\circ}$ C 5분, 45 $^{\circ}$ C 5분간 반응 후 15,000G에서 5분간 원심분리하여 불용성물질을 제거하였다. Array chip은 septa를 통하여 200 $\mu$ l의 1 $\times$  hybridization buffer를 채운 후 rotisserie hybridization oven (Affymetrix, USA)에서 60rpm, 45 $^{\circ}$ C, 10분간 incubation하였다.

Array chip에서 hybridization buffer를 제거한 후 200 $\mu$ l의 반응액을 채우고 Rotisserie hybridization oven에서 60rpm, 45 $^{\circ}$ C, 16시간 동안 반응시켰다.

7) Oligonucleotide Chip의 staining과 scanning

반응이 종료된 array chip은 GeneChip Fluidics Station (Affymetrix, USA)의 EukGE\_WS1 protocol에 따라 진행하였으며 secondary antibody amplication도 수행하였다. washing 및 staining한 후 GeneChip System confocal scanner (Hewlett-Packard, USA)를 이용하여 3 $\mu$ m resolution으로 두번 scan하였다.

8) Sample의 Quality 평가

각 군의 total RNA와 cDNA 및 fragment cRNA는 1 $\mu$ g을 1% agarose gel에 전기영동하여 size를 평가하였다.

$\beta$ -actin 및 GAPDH의 3'oligo와 5'oligo의 average Differential expression ratio는 제조사의 권장대로 3 미만인가를 확인하였다.

#### 4. Data 분석

MTS assay 결과 data는 mean $\pm$ SEM (standard error mean)로 표시하였고 결과의 유의성 평가는 SPSS 8.0 for windows (SPSS, Inc.)를 이용하여 Student T-test를 實施하였다.

Array chip의 scan data는 GeneChip 3.1 software (Affymetrix, USA)를 이용하여 분석하였다.

Hybridization의 완전성은 control oligonucleotide B2, bioB, bioC, bioD, cre의 signal을 비교함으로써 평가하였다.

사용된 array chip에는 모든 probe oligonucleotide에 대하여 mismatch probe가 인접해서 탑재되어 있어 positive match에 대하여 상대적으로 mismatch가 큰 경우는 data에서 제거하였다.

각 유전자의 발현량은 signal intensity의 평균값으로 normalization하여 average differential expression (AD)를 구한 후 GAPDH,  $\beta$ -actin 등 housekeep gene로 구성된 internal control과 spike control들의 AD value에 대한 상대치를 이용하여 비교함으로써 발현량의 차이가 있는 유전자를 구분하였다.

발현량의 비교는 대조군을 기준으로 억

제군에서의 발현량을 비교하거나, 대조군을 기준으로 실험군에서의 발현량을 비교하거나 억제군을 기준으로 실험군에서의 발현량을 비교하는 등 3가지의 비교를 실시하였다.

하나의 유전자당 여러개의 oligonucleotide가 적용되어 있으므로 각 oligonucleotide의 hybridization intensity의 평균값으로 비교를 하였으며 발현량의 차이를 확인하는 기준은 기본적으로 제조사의 추천대로  $\pm 2$  이상으로 하였다.

Oligonucleotide microarray의 각 군의 signal value 간의 선형회귀분석에는 GraphicPad Prizm 3.02 (GraphicPad software, Inc.)를 이용하였다.

### III. 實驗結果

#### 1. FBS 농도에 따른 Hos cell의 증식능 측정

Hos cell의 증식을 억제하는 FBS의 농도를 확인하여 보고자 FBS를 농도별로 투여하고 Hos cell의 증식능을 측정한 결과는 Fig. 1과 같다.

일반적으로 Hos cell을 배양하기 위하여 사용하는 10% FBS가 함유된 배지를 기준으로 하였을 때 각 낮은 농도의 FBS가 함유된 배지에서의 Hos cell 증식능은 유의성있게 떨어지는 것으로 나타났다. 특히 0.3%와 0%에서는  $P > 0.01$ 로 유의성있게 떨어지는 것으로 나타남으로써 저농도의 FBS가 Hos cell의 증식능을 낮추는

스트레스 인자로서 작용하는 것을 알 수 있었다.

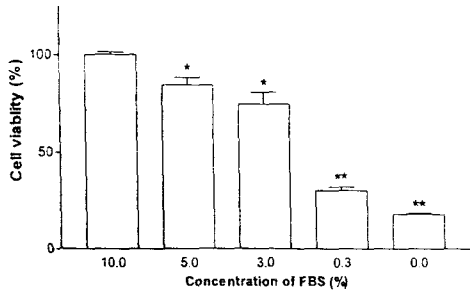


Fig. 1 Viability of Hos cell in medium containing various concentration of FBS after 24hr. incubation. Cell viability was quantified by MTS assay. Error bars indicate S.E.M. Comparisons were made by using Student's T test. \* p<0.05, \*\* p<0.01

2. 녹용 추출물이 Hos cell 증식능 억제 회복에 미치는 영향

녹용 up와 mp의 에탄올 추출물과 물 추출물이 FBS 농도를 낮춤으로써 유발된 Hos cell 증식능 억제를 회복시키는 지 확인하여 본 결과는 Fig. 2, 3, 4, 5와 같다.

녹용 up의 에탄올 추출물과 물 추출물을 투여한 군에서는 0.1µg/ml, 0.5µg/ml 농도에서 유의성있게 증가하였다(p<0.05).

녹용 mp의 에탄올 추출물과 물 추출물을 투여한 군에서는 다소 증가하는 경향을 보였으나 통계적 유의성은 없었다.

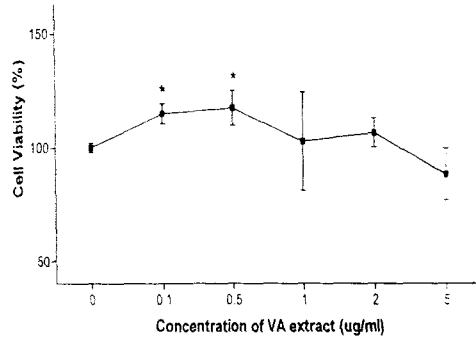


Fig. 2 Viability of Hos cell in medium containing various concentration of ethanol extract of upper part of VA (velvet antler) after 24hr. incubation. Cell viability was quantified by MTS assay. Error bars indicate S.E.M. Comparisons were made by using Student's T test. \* p<0.05

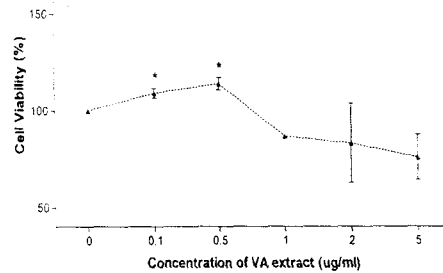


Fig. 3 Viability of Hos cell in medium containing various concentration of water extract of upper part of VA after 24hr. incubation. Cell viability was quantified by MTS assay. Error bars indicate S.E.M. Comparisons were made by using Student's T test. \* p<0.05

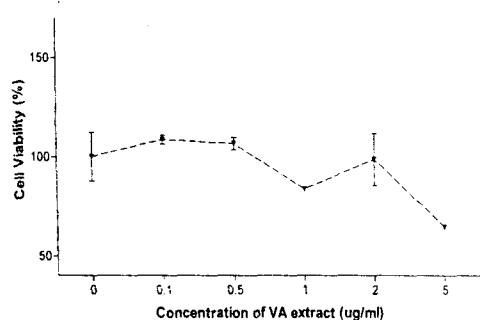


Fig. 4 Viability of Hos cell in medium containing various concentration of ethanol extract of middle part of VA after 24hr. incubation.

Cell viability was quantified by MTS assay. Error bars indicate S.E.M. Comparisons were made by using Student's T test.

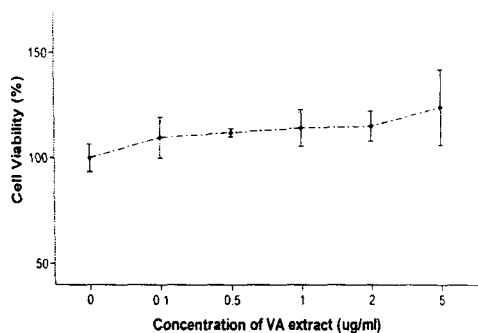


Fig. 5 Viability of Hos cell in medium containing various concentration of water extract of middle part of VA after 24hr. incubation.

Cell viability was quantified by MTS assay. Error bars indicate S.E.M. Comparisons were made by using Student's T test.

녹용의 추출방법에 따른 Hos cell 증식

능 회복 효과를 비교하기 위하여 가장 큰 증가를 보였던 0.5 $\mu$ g/ml 농도 투여군에서의 Hos cell 증식능을 비교하여 보면 Fig. 6과 같다.

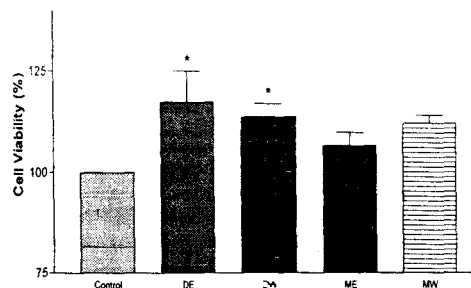


Fig. 6 Cell viability of Hos cell in medium containing 1% FBS with 0.5 $\mu$ g/ml of each VA extracts after 24hr. incubation.

DE: supplemented with ethanol extract of upper part of VA; DW: with water extract of upper part of VA; ME: with ethanol extract of middle part of VA; MW: with water extract of middle part of VA

Control was cultured in medium without VA extract. Cell viability was quantified by MTS assay.

Cell viability was quantified by MTS assay. Error bars indicate S.E.M. Comparisons were made by using Student's T test.

\* p<0.05

### 3. Microarray sample quality 평가

대조군과 억제군 및 실험군의 cell에서 total RNA를 분리하고 RNA의 size 분포 및 quality를 평가하여 위하여 1% agarose gel에서 전기영동한 결과는 Fig. 7와 같다. 세 군 모두 광범한 10,000 base 이상 큰 사이즈의 RNA를 확인할 수 있



고 18s rRNA와 28s rRNA band의 윤곽이 뚜렷하고 28s rRNA의 band가 18s rRNA의 band보다 굵은 것으로 total RNA는 degradation 되지 않은 것을 확인할 수 있었다.

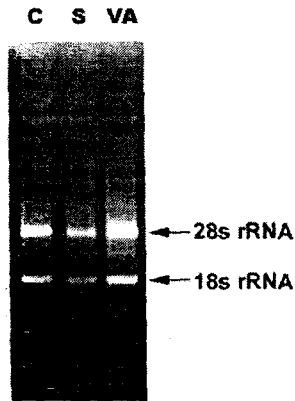


Fig. 7 The integrity and size distribution of each total RNA sample was checked by 1% agarose gel electrophoresis and ethidium bromide staining. Each lane was total RNA of Hos cell (C; control cultured with 10% FBS; S: stressed by decreased 1% FBS; MCR: treated with 0.5 $\mu$ g/ml VA alcohol extract and 1% FBS). The rRNAs appear as sharp bands on the stained gel. 28S rRNA bands are present at approximately twice the amounts of 18S rRNA.

Oligonucleotide chip에 적용될 target cRNA의 준비가 적절하게 이루어 졌는지를 확인하여 보고자 1% agarose gel에서 전기영동하고 ethidium bromide로 염색하여 본 결과는 Fig. 8과 같다.

합성된 cDNA와 cRNA의 size 분포가 4,000bp까지 광범위하게 분포하였으며 fragmented cRNA 역시 200base 이하로 완전히 조각이 난 것을 확인할 수 있었다.



Fig. 8 Evaluation of target preparation by 1% agarose gel electrophoresis.

M: MBI Permentas 1Kb DNA ladder)

Each lane of group shows 1st: ds cDNA; 2nd: purified cRNA; 3rd: fragmented cRNA.

Oligonucleotide chip에 적용된 cRNA가 full-length인가를 확인하기 위하여 internal control인  $\beta$ -actin 및 GAPDH의 3' oligo와 5' oligo의 average Differential expression ratio를 평가한 결과는 Table I 과 같다.

Cut-off range는 제조사의 권장대로 3 미만으로 하였으나 대조군, 억제군, 실험군 모두에서 3'/5' ratio는 2미만으로 조건을 만족시켰다.

Table 1. The average differential expression of internal controls

	Probe Set	AD* (5')	AD (M')	AD (3')	AD (all)	Ratio of AD (3'/5')
Con	GAPDH	184620.8	219537.3	195616.7	199924.9	1.06
	$\beta$ -actin	292347.3	293605.9	185742.3	257231.8	0.64
Str	GAPDH	178416.8	199789.5	231358	203188.1	1.30
	$\beta$ -actin	265498.6	262523.8	176037.9	234686.8	0.66
VA	GAPDH	147067.5	169822.3	196260.8	171050.2	1.33
	$\beta$ -actin	219611.8	224294.8	168654.1	204186.9	0.77

\*AD : average differential expression, which was normalized with average signal value.

To evaluate which synthesized cRNA was full-length, ratio of 3' oligonucleotide and 5' oligonucleotide AD of internal controls was checked. The cut-off range is less than 3 according to manufacturer's recommendation.

Ratio of all sample was less than 2 so that be available to be used.

#### 4. Oligonucleotide chip microarray

1) Scan image와 hybridization efficiency  
대조군, 억제군, 실험군의 sample을 Array chip에 hybridization 시킨 후 scan 하여 pseudocolor로 표현한 이미지는 Fig. 9와 같다.

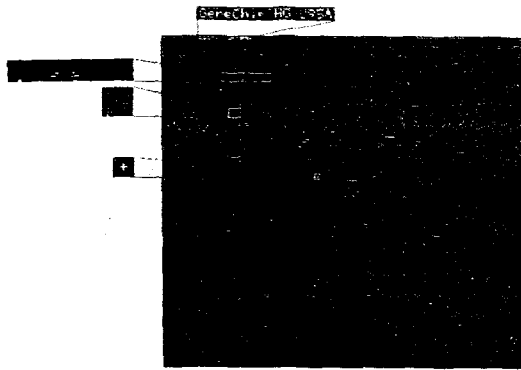
외곽의 하얀 점으로 이루어진 사각형 경계선과 중앙의 흰색 십자가 문양과 위쪽의 "GeneChip HG U98A" 글씨는 control oligonucleotide B2가 hybridization되어서 만들어낸 positive control로 hybridization의 완전성을 확인하기 위한 것이다. 세 개의 이미지 모두에서 선명한 표식을 확인할 수 있다.

좌상부에 있는 그물모양의 검은 색 선들은 negative control로서 세 개의 이미

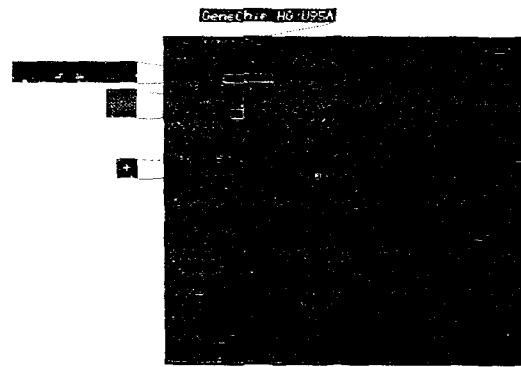
지 모두에서 선명한 선을 확인할 수 있다.

좌상부에 있는 사각형의 희미한 부위는 hybridization 효율성을 확인하기 위해 들 어간 Spike control이 hybridization된 것이다. 세 개의 이미지 모두에서 선명한 사각형이 확인되었다.

A. Control Group



B. Stressed Group



C. VA Group

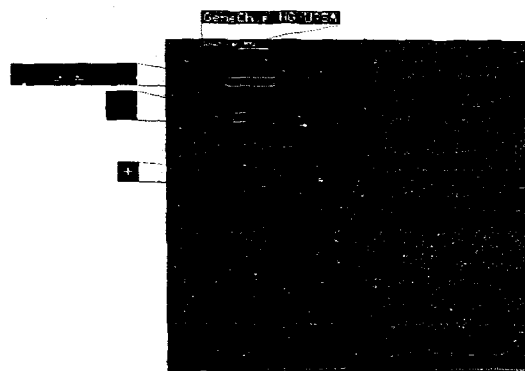


Fig. 9. Pseudocolor Scan image of each oligonucleotide chip.

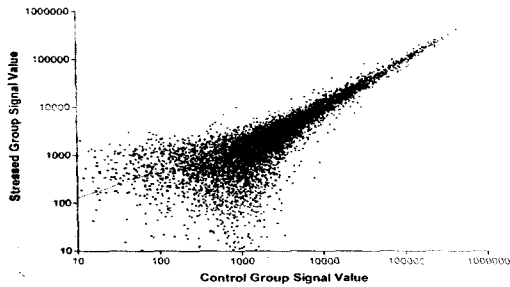
The border line, cross mark on center, and characters on upper region are control oligonucleotide B2 dimer used for positive control. Net-shape black line is negative control. Blur square image shows hybridization of spike control added to check the efficiency of hybridization. All array chip was passed in positive and negative control test.

2) 각 군별 Hybridization Intensity의 비교

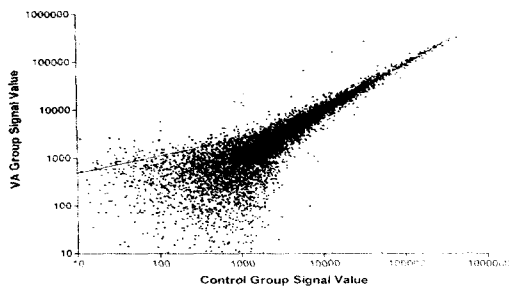
10% FBS를 함유한 배지에서 배양한 對照群과 1% FBS를 함유한 배지에서 배양한 억제군 및 1% FBS 및 0.5 $\mu$ g/ml의 녹용 에탄올추출물을 함유한 배지에서 배양한 실험군의 microarray scan 결과를 log-log scale의 scatter plot으로 표시하면 Fig. 10과 같다.

각군의 signal value는 biotin-labeling 된 cRNA가 oligonucleotide chip에 hybridization된 정도를 의미하며 각각 internal control을 利用하여 normalization 하였다.

(A)



(B)



(C)

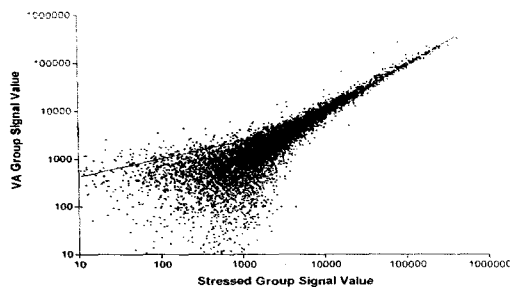


Fig. 10 Scatter plot of signal value means hybridization intensity in log-log scale (A) Comparison between Control and Stressed group; (B) between Control and VA group; (C) between Stressed and VA group.

All signal value means AD, which was normalized with average signal value.

### 3) 발현량의 차이를 보인 유전자

각 유전자의 발현량을 signal intensity의 평균값으로 normalization하여 average differential expression (AD)를 구한 후 GAPDH,  $\beta$ -actin 등 housekeeping gene로 구성된 internal control과 spike control들의 AD value에 대한 상대치를 이용하여 비교하였다.

유전자의 oligonucleotide들의 hybridization intensity가 큰 편차를 가진 경우는 분석 프로그램의 algorithm이 제공하는 유의수준의 기준에 따라 |2| 이하의 경우에도 유의성을 지니는 것이 있거나 |2| 이상의 경우에도 유의성이 인정되지 않는 것이 있었다.

억제군에서 대조군에 비하여 발현량의 차이를 보인 유전자는 22종으로 Table II과 같다. 이 중 9종의 유전자는 발현이 감소하였고, 13종의 유전자는 발현이 증가하였다.

실험군에서 대조군에 비하여 발현량의 차이를 보인 유전자는 32종으로 Table II와 같다. 이 중 8종의 유전자는 발현이 감소하였고, 24종의 유전자는 발현이 증가하였다.

실험군에서 억제군에 비하여 발현량의 차이를 보인 유전자는 7종으로 Table IV와 같다. 이 중 1종의 유전자는 발현이 감소하였고, 6종의 유전자는 발현이 증가하였다.

Table II. The genes which significantly differentially expressed in Control and Stressed Group

Gene Name	Fold*	ID <sup>#</sup>
14-3-3 epsilon	-2.6	U54778
Brain-type clathrin light-chain b (LCb)	-3.2	M20469
Inhibitor of Differentiation type 1 (Id1)	-3.1	X77956
Unknown gene	-2.4	AA059408
Estrogen-responsive B box protein (EBBP)	-2.7	AF096870
Selenoprotein W (selW)	-3.2	U67171
Creatine transporter (CreaT)	-2.4	U36341
Retinoid X receptor beta (RXRB)	-2.7	AL031228
Galectin-9 isoform	-2.5	AB006782
Insulin-like Growth Factor 2 (IGF2)	3.7	HG3543
Unknown gene	2.9	AA142942
KIAA0367	3.6	AB002365
Lamin B receptor homolog TM7SF2 (TM7SF2)	2.9	AF023676
UDP-N-acetylglucosamine-2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase (GNE)	2.0	AJ238764
Reducing agents and tunicamycin-responsive protein (RTP)	3.4	D87953
Leukemia virus receptor 2 (GLVR2)	2.2	L20852
Alpha-1 type XI collagen (COL11A1)	2.7	J04177
NMB	3.1	X76534
Lysosomal acid lipase (LAL)	3.0	X76488
Slow twitch skeletal muscle/cardiac muscle troponin C gene	3.0	M37984
51d2	2.9	W28765
Dual-specificity protein phosphatase (DSPs)	2.8	U15932

\* Fold means ratio of hybridization intensity. The genes with negative value are abundant in Control group, while positive value are abundant in Stressed group.

# ID indicates the accession number of GenBank (NCBI).

대조군, 억제군, 실험군 간에 발현량의 유의한 차이를 보인 유전자들의 발현량 변화를 도식화하면 Fig. 11과 같다. 모든 그래프에서 유전자의 발현량은 대조군에서의 발현량을 100으로 보았을 때의 억제군과 실험군에서의 발현량을 표시하였다.

대조군에 비하여 억제군에서 증가하는 경향을 보이고 실험군에서 더욱 증가하는 경향을 보인 유전자는 AA142942, ASS, alpha-tubulin, GlcT-1, CHES1, Bcl-6, COL11A1, Gas6, IGF2, hARF6, vascular smooth muscle alpha-actin, hSIAH2, KIAA0903 protein, KIAA1003 protein, laminin B1 chain, LAL, osteonidogen, polyA site DNA, RTP, NMB, KIAA0367 등 21종, 억제군에서는 증가하다가 실험군에서는 별다른 변화를 보이지 않은 유전자는 GLVR2, GNE 등 2종, 억제군에서 증가하다가 실험군에서 감소하는 경향을 보인 유전자는 Slow twitch skeletal muscle/cardiac muscle troponin C, DSPs, TM7SF2, 51d2 등 4종, 억제군에서 감소하다가 실험군에서 더욱 감소하는 경향을 보인 유전자는 KIAA0474 protein, EBBP, CreaT, DKFZp547E2110 등 4종, 억제군에서 감소하다가 실험군에서 별다른 변화를 보이지 않은 유전자는 Galectin-9 isoform 1종, 억제군에서는 감소하였다가 실험군에서 증가하는 경향을 보인 유전자는 PFKP, RXRB, selW, TCF5, LCb, Id1, AA059408, 14-3-3 epsilon 등 8종이었다.

Table III. The genes which significantly differentially expressed in Control and VA Group

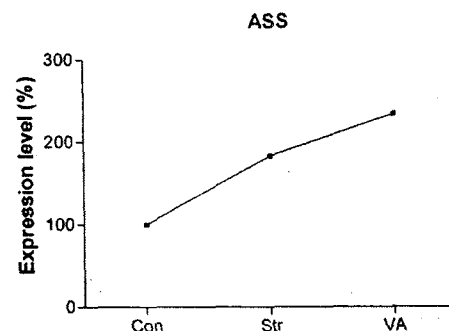
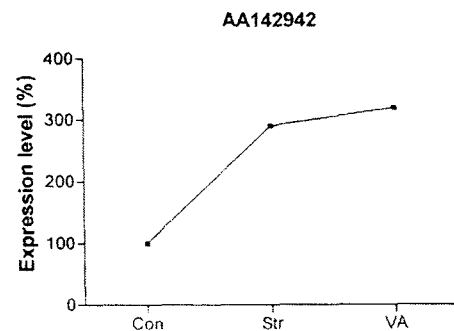
Gene Name	Fold*	ID
Brain-type clathrin light-chain b (LCb)	-2.3	M20469
Inhibitor of differentiation type 1 (Id1)	-2.6	X77956
Estrogen-responsive B box protein (EBBP)	-4.3	AF096870
Selenoprotein W (selW)	-2.0	U67171
Creatine transporter (CreaT)	-3.5	U36341
Galectin-9 isoform	-2.5	AB006782
KIAA0474 protein	-2.5	AB007943
DKFZp547E2110	-3.0	AL050261
Insulin-like Growth Factor 2 (IGF2)	5.5	HG3543
Unknown gene	3.2	AA142942
Lamin B receptor homolog TM7SF2 (TM7SF2)	2.4	AF023676
Laminin B1 chain	2.2	M61916
Reducing agents and tunicamycin-responsive protein (RTP)	5.1	D87953
Leukemia virus receptor 2 (GLVR2)	2.2	L20852
Alpha-1 type XI collagen (COL11A1)	3.0	J04177
NMB	4.3	X76534
Lysosomal acid lipase (LAL)	3.3	X76488
Slow twitch skeletal muscle /cardiac muscle troponin C	6.7	M37984
Growth-arrest-specific protein (Gas6)	2.6	L13720
Vascular smooth muscle alpha-actin	2.1	X13839
hSIAH2	2.3	U76248
PolyA site DNA	2.4	Z24724
KIAA0367 protein	3.9	AB002365
KIAA1003 protein	1.8	AB023220
ADP-ribosylation factor (hARF6)	2.0	M57763
Zinc-finger protein (bcl-6)	3.6	U00115
Ceramide glucosyltransferase (GlcT-1)	2.4	D50840
KIAA0903 protein	2.3	AB020710
Argininosuccinate synthetase (ASS)	2.3	X01630
Alpha-tubulin	2.5	X01703
Checkpoint suppressor 1 (CHES1)	2.0	U68723
Osteonidogen	3.2	D86425

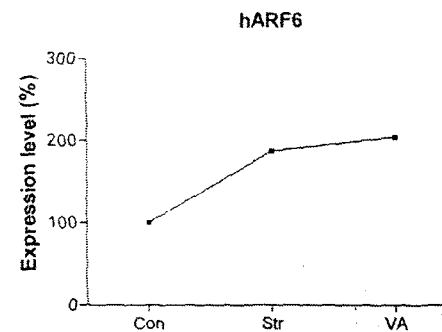
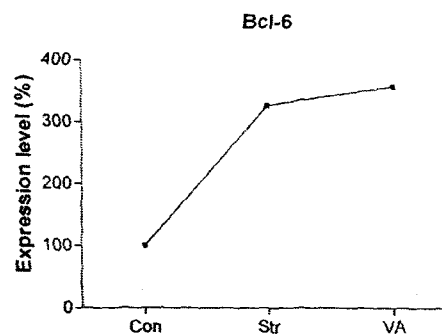
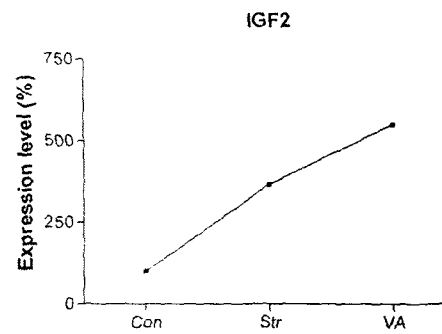
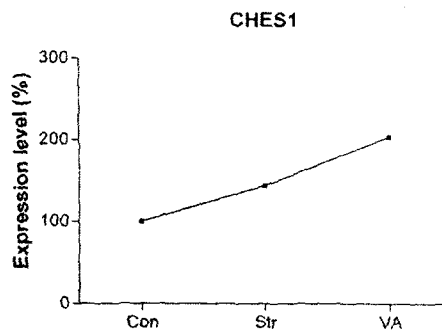
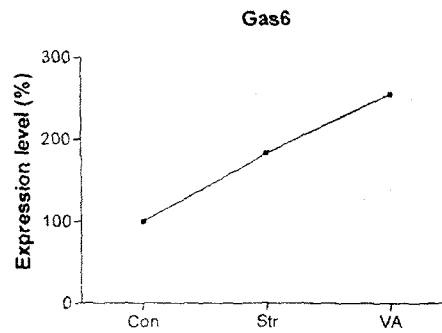
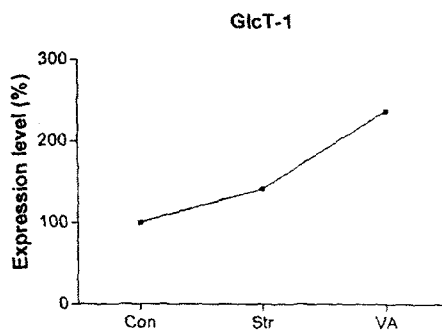
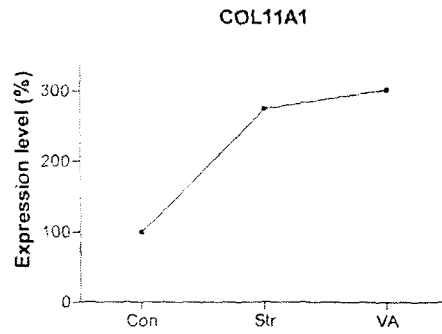
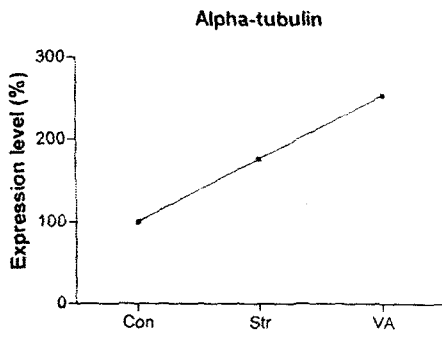
\* The genes with negative value are abundant in Control group, while positive value are abundant in VA group.

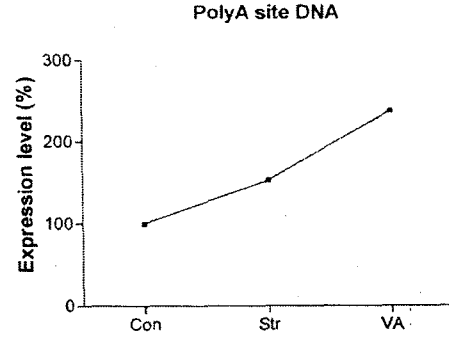
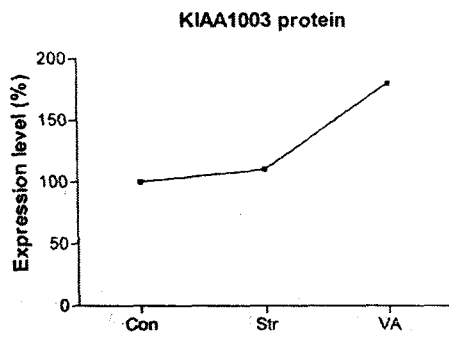
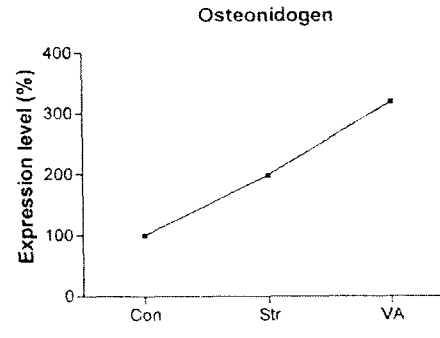
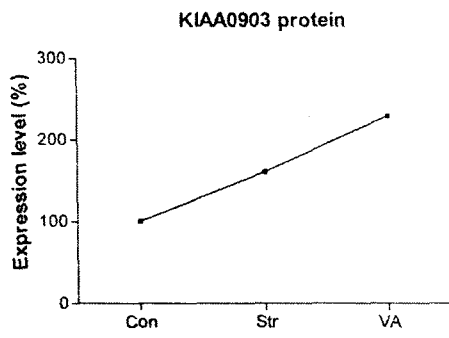
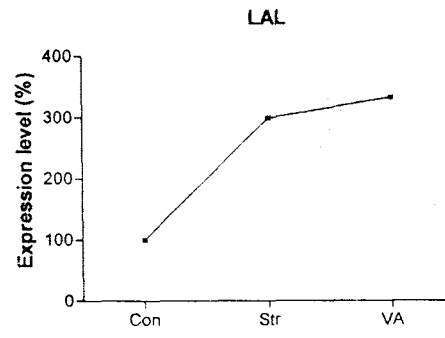
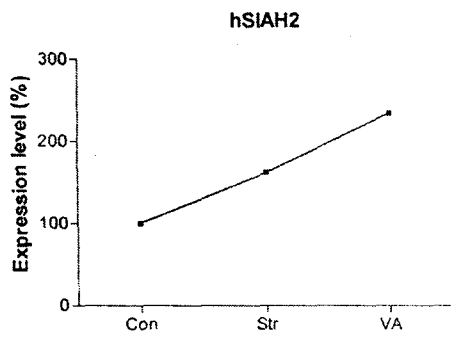
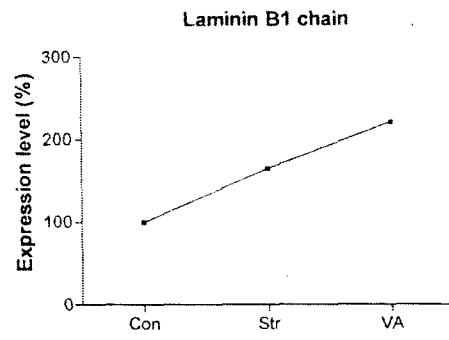
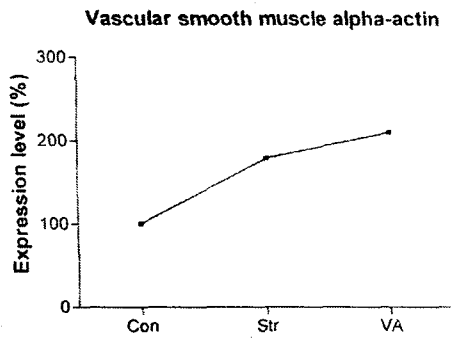
Table IV. The genes which significantly differentially expressed in Stressed and VA Group

Gene Name	Fold*	ID
51d2	-2.3	W28765
KIAA1003 protein	2.7	AB023220
14-3-3 epsilon	2.5	U54778
Heat shock factor 1 (TCF5)	2.5	M64673
Unknown gene	1.7	AA059408
Retinoid X receptor beta (RXRB)	2.1	AL031228
Platelet-type phosphofructokinase (PFKP)	2.4	D25328

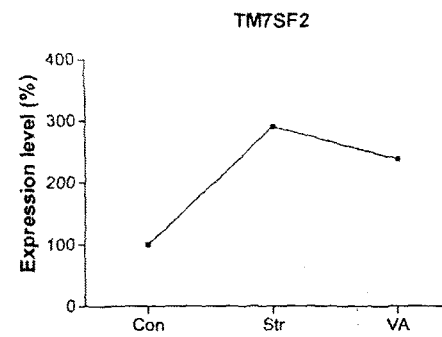
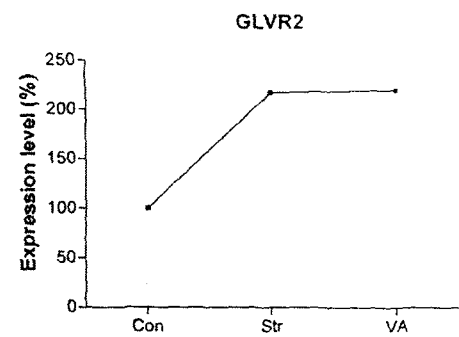
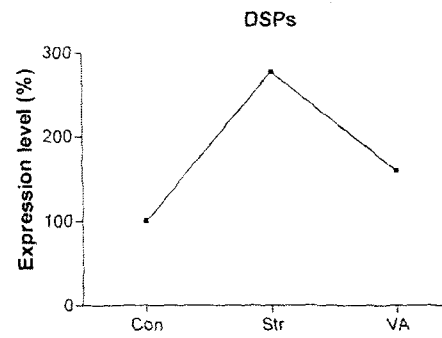
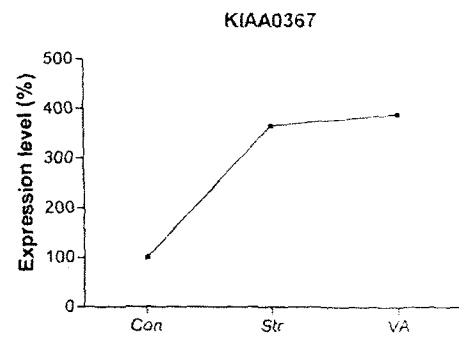
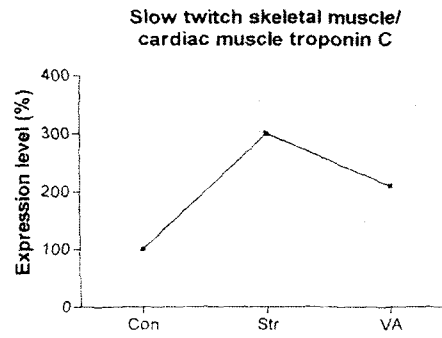
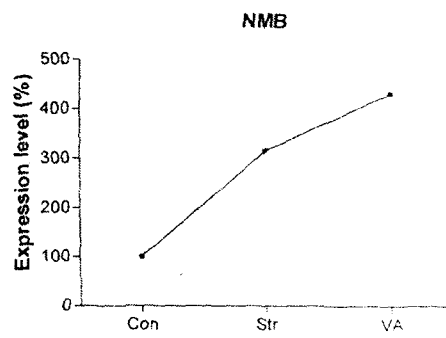
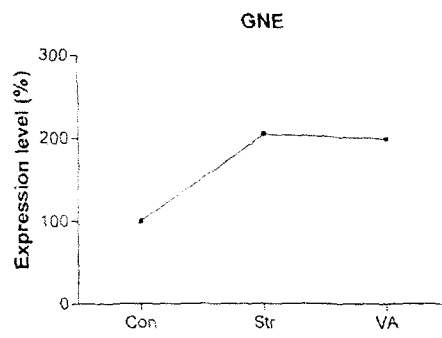
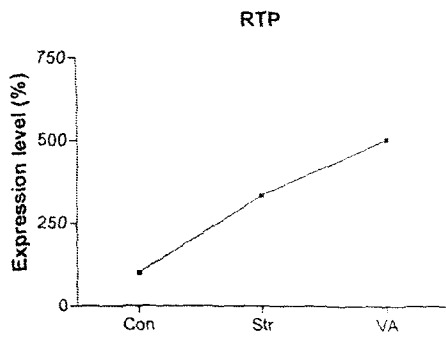
\* The genes with negative value are abundant in Stressed group, while positive value are abundant in VA group.

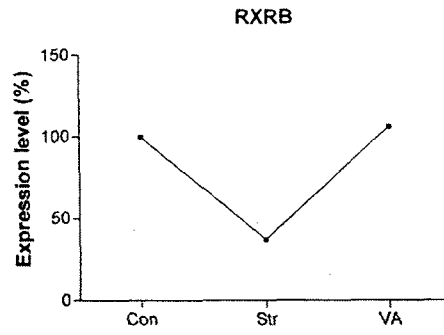
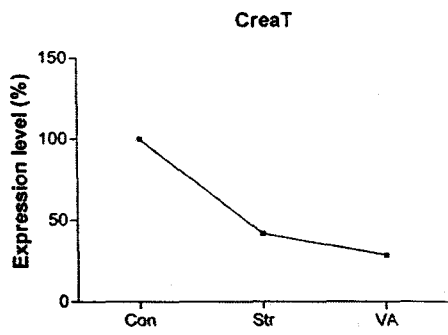
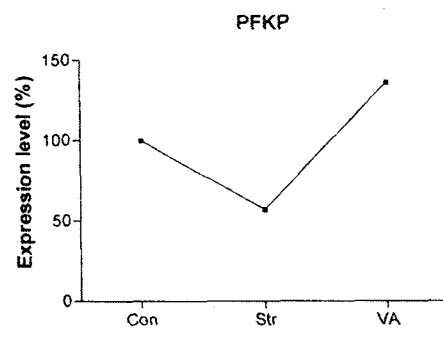
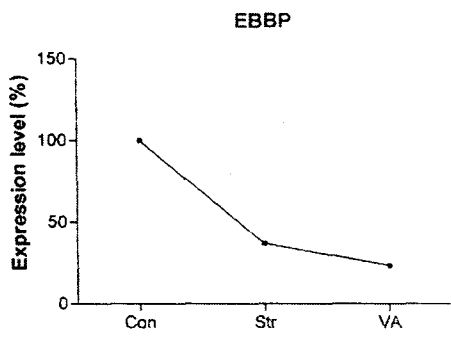
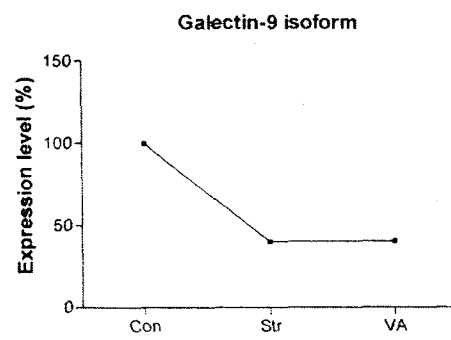
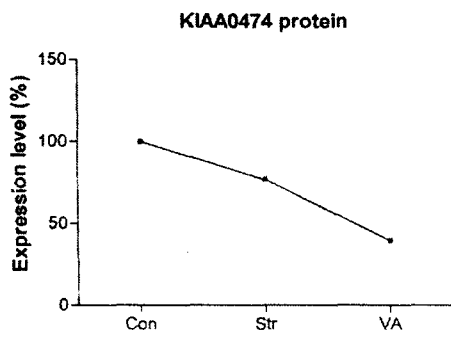
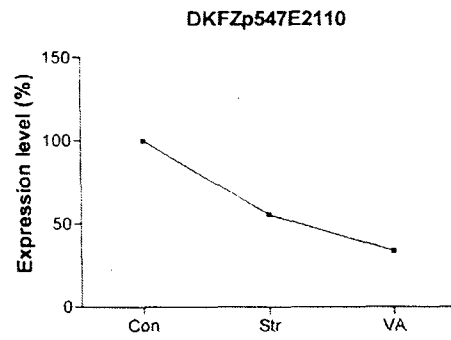
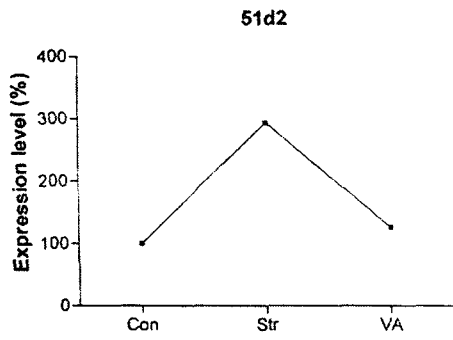












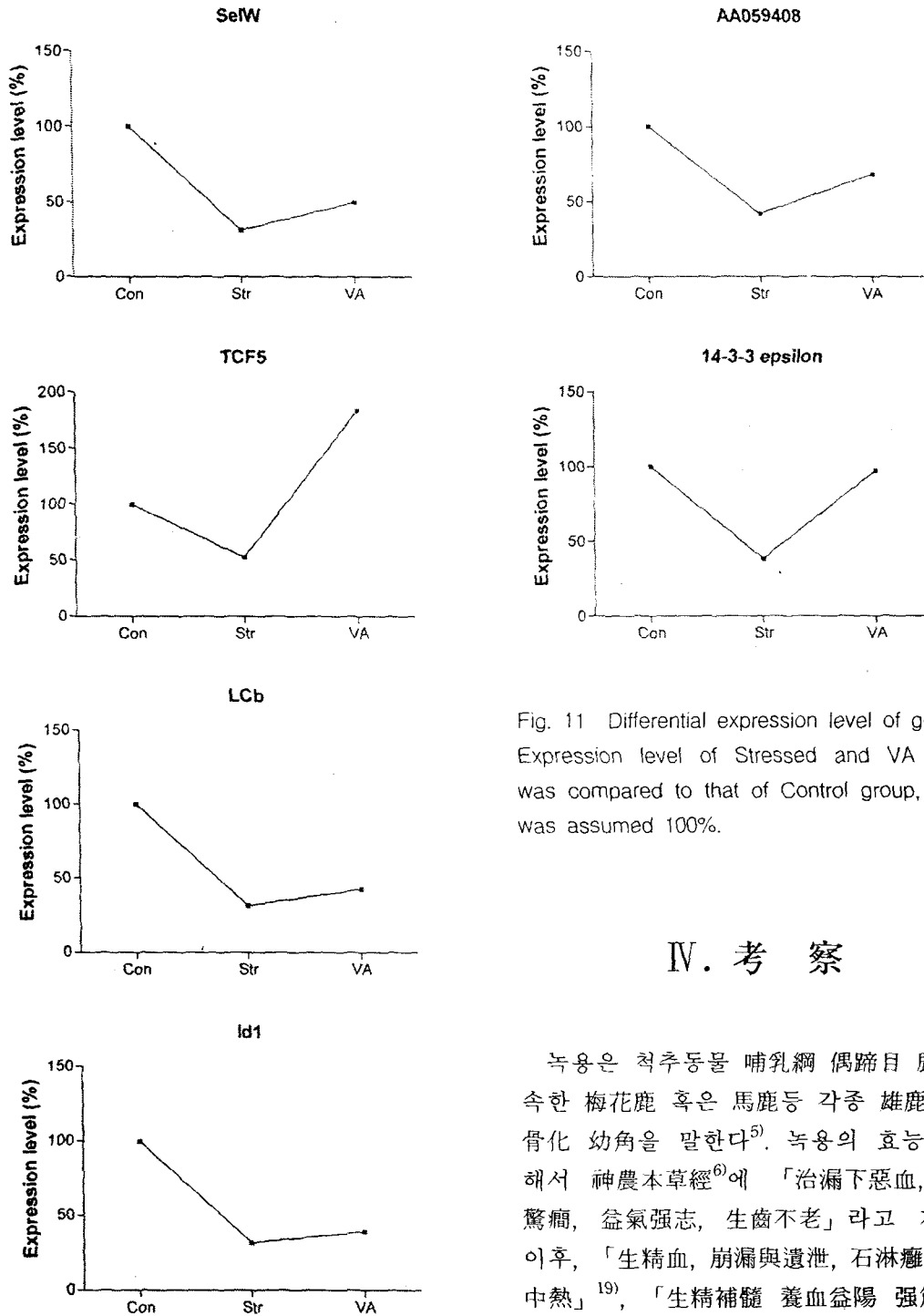


Fig. 11 Differential expression level of genes  
Expression level of Stressed and VA group was compared to that of Control group, which was assumed 100%.

#### IV. 考 察

녹용은 척추동물 哺乳綱 偶蹄目 鹿科에 속한 梅花鹿 혹은 馬鹿 등 각종 雄鹿의 未骨化 幼角을 말한다<sup>5)</sup>. 녹용의 효능에 대해서 神農本草經<sup>6)</sup>에 「治漏下惡血, 寒熱驚癇, 益氣強志, 生齒不老」라고 기록된 이후, 「生精血, 崩漏與遺泄, 石淋癰腫, 骨中熱」<sup>19)</sup>, 「生精補髓 養血益陽 強筋健骨 治一切虛損 耳聾目暗」<sup>20)</sup> 등이 기록되어 있으며 「壯元陽, 補元氣, 益精髓, 強筋

骨」 등의 효능이 있어 「虛勞羸瘦, 畏寒無力, 血虛眩暈, 腰膝痿軟, 四肢痠疼, 腰脊痛, 耳鳴, 目暗」 등 先天 및, 後天的인 精氣의 損傷에 널리 사용되어왔다<sup>7,8)</sup>.

녹용은 주로 우리나라를 비롯한 중국에서 한의학적 이론에 입각하여 주로 사용되어왔으며 최근에는 다양한 약리작용에 대한 성분 분석과 효능 실험이 이루어져왔다. 성분에 관한 실험연구를 통해 아미노산<sup>21, 24)</sup>, 지질성분<sup>25, 26)</sup>, 당성분<sup>27)</sup>, 미량원소<sup>28)</sup>, 기타성분이 검출되었다. 효능에 관한 실험을 통해 녹용이 간장계<sup>29, 30)</sup>, 심혈관계<sup>31, 32)</sup>, 면역계<sup>33, 34)</sup> 질환과 당대사<sup>35)</sup>, 조혈작용<sup>36)</sup>, 내분비작용에<sup>37)</sup> 효능이 있다고 보고되었고, 스트레스<sup>38)</sup>, 노화<sup>39)</sup>에도 유의한 효능이 있음이 보고되었다.

녹용은 「生精補髓 養血益陽 強筋健骨」, 「壯元陽, 補元氣, 益精髓, 強筋骨」<sup>20)</sup> 등의 문헌기록에 의거하여 소아의 성장발육을 촉진시키는 목적으로도 사용되어 왔으며 이에 녹용이 성장에 어떠한 영향을 미치는가 하는 실험연구도 이루어지고 있다.

한의학에서는 生理적으로 成長이 旺盛한 시기인 幼兒期를 少陽의 氣로 설명하는데 少陽은 '陽有餘 陰不足' 현상을 뜻하는 것으로 陰은 精, 血, 津, 液 등 신체를 형성하는 물질적 기초이고 陽은 생리기능을 의미한다. 陽이 有餘하다는 것은 발육기능이 촉진됨을 의미하고 陰不足이란 후천적으로 滋潤培養力이 아직 未洽함을 의미한다. 한의학에서 소아의 生長 發育은 先天之本인 腎과 後天之本인 脾의 機能, 또한 一身의 氣를 主宰하는 肺의 機能과 관련이 있으며 그중 骨格의 生長과 機能은 腎氣의 盛衰에 영향을 받는 것으로 보

인다<sup>2,3)</sup>.

이는 腎은 精을 간직하고 精은 髓를 생하고 髓는 骨을 滋養시킨다는 한의학적 이론에 근거한다<sup>4)</sup>. 이러한 腎의 기능은 서양의학의 내분비계의 기능과 유사하며 특히 뇌하수체와 성선의 작용과 밀접한 관련이 있는 것으로 생각된다<sup>40)</sup>.

성장은 외부적으로는 적절한 영양공급과 내부적으로는 호르몬의 복합작용에 이루어지고 있으며<sup>41)</sup> 신체와 골격의 성장에 현저한 영향을 미치는 호르몬으로는 성장호르몬, 갑상선호르몬, 부신 피질호르몬, 성호르몬, 인슐린과 여러종류의 펩티드양 성장인자들이 있다<sup>42)</sup>.

그중 성장호르몬은 신체성장 특히 골격계 성장에 관여하며 출생후 일반적으로 2세 이후의 신장 성장에 가장 중요한 호르몬으로 강력한 동화작용을 가진 호르몬이며 신체의 모든 조직에서 동화작용을 나타내며 특히 뼈와 연골조직에서 그 효과가 강하다<sup>43)</sup>. 갑상선호르몬은 조직에서 성장호르몬이 최대효과를 나타내기 위해서 반드시 필요하며 골단부 연골 성장판에도 작용하여 성장을 촉진한다<sup>41, 42)</sup>.

녹용이 성장에 미치는 효능에 관하여 Grizimek<sup>9)</sup>과 성 등<sup>10)</sup>은 사슴뿔의 성장과 성호르몬과는 깊은 관계를 가지고 있어서 뇌하수체 전엽과 갑상선 호르몬은 뿔의 형성에 관여하여 성장을 돕는다는 사실을 보고하였으며 배<sup>11-13)</sup>와 허 등<sup>14)</sup>은 동물의 성장 촉진에 녹용이 유의한 영향을 미친다고 하였다. 또한 김<sup>15)</sup>은 녹용 약침 투여군이 성장 호르몬 투여군에 비하여 총신장 증가량이 유의성있게 증가하였고 체중도 유의성있게 증가하였음을 보고하였다.

골성장은 복합적인 과정으로 여러 전신

적 호르몬과 국소적으로 작용하는 성장인자에 의해 영향을 받게 된다. 골형성에서 전신적 호르몬의 효과<sup>44,45)</sup>와 국소적 성장인자간의 연관성에 대한 연구<sup>46,47)</sup>가 지속되고 있다.

조골세포는 골생성에 필수적인 세포로서 골대사 질환의 연구에 이들 세포의 성장, 분화 및 대사에 관한 연구는 필수적이며 조골세포의 성장에는 많은 인자가 관여함으로 골대사를 이해하는데 중요하리라 생각된다.

골세포의 세포질내에는 많은 세포내세망이 몰려 있으며, 세포내세망 막에는 많은 수의 리보솜이 존재한다. 그러므로 세포내세망의 수는 세포의 단백질 합성 및 분비능력과 밀접한 관계가 있으며, 따라서 활발히 골을 형성하는 세포에 많이 존재한다. 핵과 세포막내세망 사이에는 골지체가 있는데 여기서 많은 양의 제 1형 콜라겐을 생성한다. 또한 조골세포 표면에 존재하는 bone-specific alkaline phosphatase는 조골세포의 분화를 나타내는 지표이며 BAP와 골형성간에 상관관계가 관찰되기도 하였다. 그러므로 조골세포의 특성은 alkaline phosphatase (ALP)의 발현, osteocalcin 및 osteopontin과 같은 골 특이 단백질의 발현, 세포의 기질의 무기질화, 부갑상선 호르몬에 대한 cAMP 반응, 제1형 콜라겐의 발현등으로 확인할 수 있다<sup>48)</sup>. 그중 ALP는 골형성 활동의 중요한 지표가 되는 것으로 국소의 뼈 무기질 침착을 향진시키며, 소아기와 골형성이 활발하게 진행 될 때 혈중 내에서 의미있게 증가한다<sup>49)</sup>. Osteocalcin은 조골세포의 활동을 나타내는데 가장 민감하고 특이한 성분이다<sup>50)</sup>.

녹용이 골형성에 미치는 영향에 대해 김<sup>16)</sup>은 녹용의 추출액이 조골세포의 증식을 촉진시키고 세포 생존율을 증가시키며 ALP 활성을 증가시킨다고 보고하였다.

최근 분자생물학의 발전으로 조골세포의 분화정도를 가늠케 하는 여러 유전자들의 감지가 in situ hybridization에 의한 골기질 단백질 유전자 발현연구로 조골세포의 분화과정상의 특성을 이해하는데 많은 도움이 되고 있으며, 주로 사용되는 골기질 유전자로 osteocalcin(OSC), osteonectin(OSN), osteopontin(OPN), matrix gla protein, bone sialoprotein 등을 들 수 있다<sup>51)</sup>. 김<sup>52)</sup>은 성장기의 배양 Hos 세포주에서 40S ribosomal protein S19, glutathione S-transferase pi, thymosin beta-10 유전자 순으로 많이 발현되었다고 보고하였으며 Estrogen에 의해서 조골세포 유전자 발현이 변화된다는 사실을 보고하였다.

한<sup>53)</sup>은 녹용 약침을 투여한 Hos 세포주에서 유전자 발현이 2배이상 증가한 것은 3개로 이 중 1개는 thioredoxin 유전자이고 나머지 2개는 염기 서열이 보고되어 있지 않은 새로운 유전자였음을 보고하였다.

Hos cell은 인간 여성의 골육종 세포주로서, 여성의 osteoporosis에 관한 연구에 주로 이용되어 왔다. 이러한 연구는 대부분 조골세포의 증식능력을 확인하는 방법으로 이루어 졌는데 이러한 연구방법은 뼈의 성장에 관한 연구에서도 이용된 바 있다.

본 연구에서는 Hos cell의 배양에 있어서 일정한 스트레스 인자를 줌으로써 세포증식을 억제하고 녹용의 추출물이 이를

회복하는가를 확인하였다. 이때 부여된 스트레스는 Vermes 등<sup>18)</sup>이 사용한 바 있는 FBS의 양을 줄이는 방법을 이용하였다.

낮추어진 FBS 농도가 Hos cell의 증식능을 억제하여 스트레스 인자로서 작용하는가를 확인하기 위하여 FBS의 농도를 기준인 10% 이하 여러 가지 농도에서 Hos cell 증식능을 확인하였다. 그 결과 5%, 3%의 농도에서는  $P>0.05$ 로, 0.3%와 0%에서는  $P>0.01$ 로 유의성있게 Hos cell 증식능 억제가 확인되었다. 이러한 결과는 FBS의 농도를 낮추는 것이 Hos cell의 증식능을 억제하는 스트레스 인자임을 의미한다.

녹용 upper part (up)와 middle part (mp)의 에타놀 추출물과 물 추출물 각각 4가지의 시료가 FBS 농도를 낮춤으로써 유발된 Hos cell 증식능 억제를 회복시키는 정도를 확인하기 위하여 1% FBS로 Hos cell 증식능을 다소 억제한 후 각각의 시료를 농도별로 투여하고 Hos cell 증식능을 측정하였다. 그 결과 녹용 up의 에타놀 추출물과 물 추출물을 투여한 군에서는  $0.1\mu\text{g/ml}$ ,  $0.5\mu\text{g/ml}$  농도에서 Hos cell의 증식능이 유의성있게 증가하다가 ( $p<0.05$ ),  $1\mu\text{g/ml}$  이상의 농도에서는 감소하였다. 이와 같은 결과에서 녹용 up의 에타놀 추출물과 물 추출물 모두 골 성장을 촉진하는 효과를 지니는 것으로 유추하여 볼 수 있다.

한편 녹용 mp의 에타놀 추출물과 물 추출물을 투여한 군에서는 다소 증가하는 경향을 보였으나 통계적 유의성은 없었다.

Hos cell을 10% FBS를 투여하여 자극

없이 배양한 대조군 (Control group), 1%로 FBS 농도를 줄임으로써 성장 억제가 확인된 억제군 (Stressed group), 1% FBS로 성장을 억제하고 녹용 up alcohol 추출물을  $0.5\mu\text{g/ml}$  투여하여 성장회복이 확인된 실험군 (VA group)의 cell을 도왔다. Total RNA를 추출하고 cDNA를 합성한 후 다시 biotin으로 labeling하면서 cRNA를 합성하여 oligonucleotide chip microarray에 hybridization하였다. 실험 결과 억제군에서 대조군에 비하여 3종의 유전자가 발현이 감소하였고 실험군에서는 대조군에 비하여 5종의 유전자가 발현이 감소하고 9종의 유전자가 발현이 증가하였으며, 실험군에서 억제군에 비하여 발현량의 차이를 보인 유전자는 20종으로 8종의 유전자가 발현이 감소하고, 12종의 유전자가 발현이 증가하였다.

각각의 Oligonucleotide chip microarray를 scan하여 얻은 signal value 즉 hybridization intensity를 scatter plot으로 표현하고 선형회귀 분석을 시행한 결과 대조군과 억제군, 대조군과 실험군, 억제군과 대조군의  $R^2$  score는 모두  $0.95\pm 0.05$  이내를 만족시킴으로써 data의 유용성은 충분한 것으로 사료된다.

억제군에서 대조군에 비하여 발현량의 변화를 보인 유전자들을 살펴보면,

14-3-3 epsilon, Brain-type clathrin light-chain b (LCb), Inhibitor of DNA-binding type I (Id1), Estrogen-responsive B box protein (EBBP), Selenoprotein W (selW), Creatine transporter (CreaT), Retinoid X receptor beta (RXRB), Galectin-9 isoform 등 8종의 유전자와 기능이 확인

되지 않은 유전자 1종, 총 9종의 유전자가 발현이 감소하였고, Insulin-like Growth Factor 2 (IGF2), Lamin B receptor homolog TM7SF2 (TM7SF2), UDP-N-acetylglucosamine-2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase (GNE), RTP, Leukemia virus receptor 2 (GLVR2), Alpha-1 type XI collagen (COL11A1), NMB, Lysosomal acid lipase (LAL), Slow twitch skeletal muscle/cardiac muscle troponin C, 51d2, Dual-specificity protein phosphatase (DSPs) 등 11종과 기능이 확인되지 않은 유전자 2종, 총 13종의 유전자가 발현이 증가하였다.

14-3-3 epsilon 유전자는 억제군에서 대조군에 비하여 2.6배 감소하고 실험군에서 억제군에 비하여 2.5배 증가함으로써 녹용 추출물의 투여가 이 감소된 FBS로 인하여 발현이 감소한 유전자 발현을 원상태로 회복시킨 것이다. 따라서 녹용 추출물의 투여로 인한 Hos cell 증식률 증가의 기전을 설명하는데 있어서 중요한 부분을 차지할 것으로 보인다. 14-3-3 epsilon은 14-3-3 protein의 주요 isoform 5개 중의 하나이며 isoform간의 기능차이는 명확히 밝혀지지 않았다. 14-3-3 protein은 여러 종류의 생명체에서 발견되는 등 진화론적으로 잘 보존되어 있는 cytoplasmic protein이며 tyrosine과 tryptophan hydroxylases을 활성화시키고 protein kinase C를 억제하고 cell cycle control에 개입하며<sup>54,55)</sup> RAS/MAP<sup>56)</sup>, Raf<sup>57,58)</sup>, bcr-abl<sup>59)</sup>, polyoma virus middle T antigen<sup>60)</sup>, PI 3-kinase<sup>61)</sup> 등 signaling protein과 관련되어 signal transduction에

중요한 역할을 담당할 뿐 아니라 Insulin-like growth factor I 및 transforming growth factor (TGF) beta receptor I과의 상호작용을 통해 세포의 분열, 전환 및 증식에도 영향을 미친다<sup>62-64)</sup>.

Clathrin coated vesicle의 주요 성분이며 endocytosis와 membrane recycling에 개입하는 LCB<sup>65,66)</sup>은 대조군에 비해 억제군에서 3.2배, 실험군에서 2.3배 감소하였다.

Id1은 helix-loop-helix transcription factor의 negative regulator인 Id protein의 isoform 중 하나이다.<sup>67)</sup> Id1은 myoblast의 분화를 억제하고 골 형성을 유도하는 bone morphogenetic proteins (BMPs)에 의하여 발현이 유도되는 것으로 알려져 있다<sup>68,69)</sup>. 이러한 Id1 유전자의 발현이 억제군에서 대조군에 비하여 3.1배 감소한 것은 FBS 농도 저하에 의한 Hos cell 증식 억제 기전의 중요한 부분을 차지할 것이다. 다만 녹용 추출물 투여한 실험군에서 억제군에 비하여 1.2배로 증가하는 경향을 보이기는 하였으나 대조군에 비하여 2.6배 감소한 상태인 것은 녹용 추출물이 억제된 Hos cell 증식을 회복시키는데 BMP 및 Id1이 개입하지 않고 다른 기전에 의한 것으로 추측하여 볼 수 있겠다.

대조군에 비해 억제군에서 2.7배 감소하고 실험군에서 4.3배 감소한 EBBP는 B box zinc finger protein의 subfamily member로서 아직 이렇다할 기능이 밝혀지지 않았다<sup>70)</sup>.

SelW 은 peptide chain에 selenium 원자를 가지고 있는 저분자량 단백질로서

selenium이 충분히 공급되면 어느 조직에서나 존재하며 selenium 대사에 관여하거나 glutathione과 결합하여 그 활성에 영향을 미친다는 것 외의 기능은 아직 알려진 바 없다<sup>71,72</sup>. SelW 유전자의 발현량이 대조군에 비해 억제군에서 3.2배, 실험군에서 2.0배 감소한 것은 FBS 농도 저하에 따른 selenium 공급 장애로 인한 것이며 녹용 추출물투여에 따라 다소 회복된 것으로 보인다.

세포의 creatine uptake에 관여하는 CreaT는 주로 골격근과 신경계에 분포하며<sup>73</sup> 조골세포나 세포 증식 및 성장과의 관련성과 발현조절인자에 대해 밝혀진 바가 없어, 어떤 이유로 대조군에 비해 억제군에서 2.4배, 실험군에서 3.5배 감소하였는가는 유추하기 어렵다.

Retinoic acid (RA)가 골 형성과 대사를 조절한다는 사실은 익히 알려진 바 있다<sup>74</sup>. RXRB는 이 RA에 반응하는 nuclear hormone receptor이다<sup>75</sup>. 억제군에서 대조군에 비해 2.7배 감소한 RXRB 유전자 발현이 녹용 추출물 투여에 따라 실험군에서 억제군에 비해 2.1배 증가하여 원상태를 회복한 것은 녹용 추출물 투여에 의한 RA 대사의 향상 혹은 FBS 농도 저하에 따른 RA 결핍을 회복시킨 것으로 볼 수 있겠다.

활성화된 T 세포에서 생성되는 eosinophil chemoattractant로 알려져 있는 Galectin-9는<sup>76</sup> 대조군에 비해 억제군에서 2.5배, 실험군에서 2.5배 감소한 것으로 나타났다.

Osteoblast를 포함한 세포의 성장과 증식에 결정적인 영향을 미치는 IGF2 유전자가 억제군에서 대조군에 비하여 3.7배

증가한 것은 특이적인 결과이다. 이는 Hos cell 생존률 측정실험의 결과와 상반되는 것으로서 다만 살아남은 세포의 항상성 유지를 위한 자기 방어 정도로 추측하여 볼 수 있겠다. 한편 실험군에서는 대조군에 비하여 5.5배 증가함으로써 억제군에 비해 1.5배 증가한 결과를 보였는데 이는 녹용 추출물의 투여가 Hos cell의 자기 방어 기전을 증강시킨 결과로 보아야 할 것이다.

대조군에 비해 억제군에서 2.9배, 실험군에서 2.4배 증가한 것으로 나타난 TM7SF2 유전자는 sterol reductase-1 (SR-1) polypeptide를 encoding하는데 이 SR-1은 lanosterol을 cholesterol로 환원하는데 중요한 역할을 하는 sterol C-14 reductase, 그리고 핵막 안에 존재하는 필수 protein인 lamin B receptor의 C-terminal domain 등과 아주 흡사한 sequence를 지니서 비슷한 기능을 하는 것으로 추정되고 있을 뿐 구체적인 기능을 밝혀진 바 없다<sup>77,78</sup>.

GNE는 두가지 기능을 지닌 enzyme으로서 N-acetylneuraminic acid 합성의 초기단계를 수행하는데<sup>79</sup> 이 N-acetylneuraminic acid는 가장 흔히 발견되는 sialic acid로서<sup>80</sup> glycoprotein과 ganglioside의 중요한 구성물질이 되어 세포막에 존재하는 많은 receptor의 외부자극에 대한 target이 됨으로써 biological recognition system에서 중요한 역할을 담당한다<sup>79,81</sup>. GNE 유전자는 대조군에 비하여 억제군에서 2.0배, 실험군에서 2.0배 증가한 것으로 나타났다.

혈액 중 homocysteine 농도 증가 기전을 연구하는 과정에서 발견된 novel



gene, RTP는<sup>82)</sup> 대조군에 비해 억제군에서 3.4배, 실험군에서 5.1배 증가하였다.

Virus infection에 관여하는 것 외에 특별한 기능이 밝혀지지 않은 GLVR2 유전자는 대조군에 비해 억제군에서 2.2배, 실험군에서 2.2배 증가하였다. 그러나 본 실험은 virus infection과 관련이 없는 조건에서 이루어 졌으므로 GLVR2가 다른 기능을 가지는 것을 고려해 볼 수 있겠다.

세포의 모양 형성, 증식, 분화, 이동 등에 중요한 역할을 하는 interstitial extracellular matix (ECM)의 중요한 성분이 되는 COL11A1은<sup>83)</sup> 연골세포 성장판의 분화와 위치 조성에 결정적 인자가 되는 것으로 보고된 바 있다<sup>84,85)</sup>. 이런 COL11A1이 대조군에 비하여 억제군에서 2.7배, 실험군에 비하여 3.0배 증가한 것으로 나타났다. 이는 IGF-2와 마찬가지로 억제군에서 항상성유지를 위한 방어 작용으로서 발현이 증가한 것이며 실험군에서는 다소나마 억제군보다 증가한 것으로 나타났다.

느린 속도로 전이되는 melanoma cell에서 최초로 발견된 NMB 유전자는<sup>86)</sup> 특별한 기능이나 역할이 아직 밝혀진바 없고 대조군에 비하여 억제군에서 3.1배, 실험군에서 4.3배 발현이 증가하였다.

LAL은 low density lipoprotein (LDL) receptor-mediated endocytosis에 의하여 lysosome으로 이동된 cholesterol esters와 triglycerides를 가수분해하여 세포질내의 lipoprotein level을 조절하고 과다축적으로 인한 cell death를 막음으로써 항상성을 유지시키는 역할을 한다<sup>87,88)</sup>. 이 LAL 유전자는 대조군에 비해 억제군에서 3.0배, 실험군에서 3.3배 증가하였다.

Calmodulin과 구조가 거의 흡사할 뿐 아니라  $Ca^{2+}$ 와 친화력도 있는 troponin C은 tropomyosin에 부착되어 있으며  $Ca^{2+}$ 과 결합하여 근육 수축이 시작되게 한다<sup>89)</sup>. Slow twitch skeletal muscle/cardiac muscle troponin C는 이러한 troponin C의 두가지 isoform 중 하나로서<sup>90)</sup> 조골세포와의 관련성에 대하여서는 아직 밝혀진 바 없고 대조군에 비해 억제군에서는 3.0배 실험군에서는 2.1배 증가한 것으로 나타났다.

아직 기능 및 역할에 관한 아무런 보고가 없는 51d2 유전자는 대조군에 비해 억제군에서 2.9배 증가하고 억제군에 비해 실험군에서 2.3배 감소하여 원상태로 회복된 경향을 보였다.

DSPs는 세포외 자극에 대한 mitogenic signal transduction과 cell cycle을 조절하는 기능을 하는 것으로 알려져 있다<sup>91)</sup>. 이 DSPs 유전자는 대조군에 비하여 억제군에서 2.8배, 실험군에서 1.6배 증가한 것으로 나타났으며 실험군에서의 증가는 유의성이 없었다.

실험군에서 대조군에 비하여 발현량의 변화를 보인 유전자들을 살펴보면,

LCb, Id1, EBBP, selW, CreaT, Galectin-9 isoform 등 6종의 유전자와 기능이 확인되지 않은 유전자 2종, 총 8종의 유전자가 발현이 감소하였고, IGF2, TM7SF2, Laminin B1 chain, RTP, GLVR2, COL11A1, NMB, LAL, Slow twitch skeletal muscle/cardiac muscle troponin C, Growth-arrest-specific protein (Gas6), Vascular smooth muscle alpha-actin, hSIAH2, PolyA site DNA, ADP-ribosylation factor (hARF6),

Zinc-finger protein (bcl-6), Ceramide glucosyltransferase (GlcT-1), Argininosuccinate synthetase (ASS), Alpha-tubulin (b alpha 1), Checkpoint suppressor 1, Osteonidogen 등 20종과 기능이 확인되지 않은 유전자 4종, 총 24종의 유전자가 발현이 증가하였다.

실험군에서 대조군에 비하여 발현이 감소한 유전자 LCb, Id1, EBBP, selW, CreaT, Galectin-9 isoform 등은 억제군에서도 대조군에 비하여 발현이 감소한 유전자들로 위에서 언급한 바 있다.

실험군에서 대조군에 비하여 발현이 증가한 유전자 중 IGF2, TM7SF2, RTP, GLVR2, COL11A1, NMB, LAL, Slow twitch skeletal muscle/cardiac muscle troponin C 등은 억제군에서도 대조군에 비하여 발현이 증가한 유전자들로 위에서 언급한 바 있다.

Laminin은 기저막에 특이적으로 존재하는 3개의 chain으로 구성된 glycoprotein으로 특히 상피세포에서 세포의 흡착, 이동, 성장과 분화를 촉진하는 등 다양한 기능을 수행하는 것으로 알려져 있으나<sup>92)</sup> 다른 종류의 세포에서의 기능은 증명되지 않았다. 그 chain 중 하나인 laminin B1 chain은 대조군에 비해 억제군에서 1.7배, 실험군에서 2.2배 증가하였으나 억제군에서는 유의성이 인정되지 않았다.

Gas protein은 일반적으로 휴지기에 생성되는 것으로 알려져 있으며 종류에 따라 다양한 기능을 지닌다<sup>93)</sup>. 그중 Gas6는 tyroxine kinases rescptor의 ligand로서 성장자극이 없는 상태에서 세포의 apoptosis를 막는 것으로 보고된 바 있다

<sup>94,95)</sup> 이러한 Gas6 유전자가 IGF2의 발현이 증가하여 성장 자극이 있었음에도 불구하고 실험군에서 대조군에 비하여 2.6배 증가한 것은 다소 모순이며 Gas6 유전자가 성장자극이 있을 때도 세포의 apoptosis를 억제할 수 있는지 확인이 되어야 할 것이다.

Vascular smooth muscle alpha-actin 유전자는 실험군에서 대조군에 비하여 2.1배 증가한 것으로 나타났으나 조골세포인 Hos cell에 어떤 영향을 미칠 것인지는 추측하기 어렵다.

Proto-oncogene인 Vav가 매개하는 signal pathway를 억제하는 Vav binding protein인 hSIAH2 유전자는<sup>96)</sup> 실험군에서 대조군에 비하여 2.3배 증가한 것으로 나타났으나 역시 Hos cell에 어떤 영향을 미칠지는 추측하기 어렵다.

그 기능이 밝혀진 바 없는 PolyA site DNA 유전자는 실험군에서 대조군에 비하여 2.4배 증가한 것으로 나타났다.

hARF6는 Ras-related GTPase의 ARF family 중 하나이다. hARF6는 membrane trafficking을 조절하고<sup>97,98)</sup> 세포표면에서 cytoskeletal rearrangement를 매개함으로써 세포의 모양 형성과 이동에 중요한 역할을 담당한다<sup>99)</sup>. 이는 세포의 분화와 증식에 있어서 중요한 작용으로 녹용 추출물 투여로 Hos cell의 증식 촉진 과정에서 hARF6 유전자가 대조군에 비하여 2.0배 증가한 것은 의미가 있다. 뿐만 아니라 hARF는 세포 모양 형성과정에서 actin-rich ruffles를 형성하게 되는데<sup>100)</sup> 이는 Vascular smooth muscle alpha-actin 유전자 발현이 증가한 것과 어느 정도 상관이 있을 것으로 생각된다.

다.

Proto-oncogene bcl-6는 주로 B-cell과 lymphoma에서 많이 발현되며 많은 유전자 특히 임파구의 활성화, 분화, 증식, 이동에 관여하는 유전자들의 전사를 억제하는 것으로 보고된 바 있다<sup>101)</sup>. bcl-6 유전자는 실험군에서 대조군에 비하여 3.6배 증가하였다.

Glycosphingolipid는 cell membrane에서 cell to cell interaction, signaling, trafficking 등 다양한 기능을 수행하는 것으로 알려졌다<sup>102)</sup>. GlcT-1는 이러한 Glycosphingolipid의 합성 초기에 glucose를 UDP-Glc로부터 ceramide로 이동시키는 glycosylation 단계를 촉진한다<sup>103)</sup>. GlcT-1 유전자는 실험군에서 대조군에 비하여 2배 증가한 것으로 나타났다.

Citrulline, aspartate, ATP를 argininosuccinate로 가역적 전화시키는 작용을 하며 Urea cycle과 관련되어 중요한 역할을 하는 ASS 유전자는<sup>104)</sup> 실험군에서 대조군에 비하여 2.3배 증가하였다.

Cytoskeleton protein인 Alpha-tubulin은 실험군에서 대조군에 비하여 2.5배 증가함으로써 Hos cell 증식을 반영하고 있다.

DNA 손상으로 활성화된 checkpoint mutation를 억제하는 기능만 알려져 있는 CHES1는<sup>105)</sup> 실험군에서 2.0배 증가하였다.

Osteonidogen 유전자는 bone metrix에서 새롭게 발견된 유전자로서 아직 기능이나 특성은 밝혀진바 없고 실험군에서 3.2배 증가하였다.

실험군에서 억제군에 비하여 발현량의 변화를 보인 유전자들을 살펴보면,

51d2 유전자 1종만 발현이 감소하였고, 14-3-3 epsilon, Heat shock factor 1 (TCF5), RXRB, Platelet-type phosphofructokinase (PFKP) 등 3종과 기능이 확인되지 않은 유전자 2종, 총 5종의 유전자가 발현이 증가하였다.

유일하게 억제군에 비하여 감소한 51d2 유전자는 억제군에서 대조군에 비하여 증가한 유전자로 위에서 언급하였다.

14-3-3 epsilon, RXRB 유전자는 억제군에서 대조군에 비하여 감소하였던 것을 실험군에서 회복시키는 경향을 보인 유전자로 위에서 언급하였다.

IL-6와 관련된 Transcription factor 정도로만 기능이 알려진 TCF5 유전자는<sup>106)</sup> 실험군에서 억제군에 비하여 2.5배 증가하였다.

해당작용에 있어서 핵심 enzyme이 되는 PFK의 세가지 isoform 중의 하나인 platelet-type PFK는 fibroblast-type이라고도 한다<sup>107)</sup>. PFPK 유전자는 실험군에서 억제군에 비하여 2.4배 증가한 것으로 나타났다.

발현량의 차이를 보인 유전자의 현재까지 밝혀진 기능을 근거로 하여 볼 때 FBS 농도 감소를 통한 Hos cell의 증식능 억제는 14-3-3 epsilon 생성 감소에 따른 signal transduction 장애와 IGF-1 및 TGF 대사 장애, Id1 생성 감소에 따른 골형성을 유도하는 BMP 대사의 장애, retinoic acid 대사에 관련된 RXRB와 같은 세가지 유전자가 중요한 기전으로 작용한다고 할 수 있다.

한편 저농도 FBS에서 증식능이 억제된 Hos cell에서 녹용 추출물 투여에 따른 증식능 증가의 기전은 Id1 생성 회복이

미미한 것으로 보아 BMP의 개입에 의한 것으로 보기는 어렵고 14-3-3 epsilon 생성 회복을 통한 signal transduction 장애와 IGF-1 및 TGF 대사 장애 개선, 세포의 항상성 증강에 따른 IGF-2 생성 증가로 세포 증식능 향상, retinoic acid 대사의 개선 등 세가지를 들 수 있다.

## V. 結 論

녹용이 조골세포의 성장에 미치는 영향과 어떤 특이 유전자를 발현시키는가를 실험한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 낮추어진 FBS 농도가 Hos cell의 증식능을 억제하여 스트레스 인자로서 작용하는가를 확인하기 위하여 FBS의 농도를 기준인 10% 이하 여러 가지 농도에서 Hos cell 증식능을 확인한 결과 5%, 3%의 농도에서는  $P>0.05$ 로, 0.3%와 0%에서는  $P>0.01$ 로 유의성있게 Hos cell 증식능이 억제되는 것이 확인되었다.

2. 1% FBS 조건 배양으로 억제된 Hos cell 증식능은 녹용 upper part의 에타놀 추출물과 물 추출물 모두  $0.1\mu\text{g}/\text{ml}$ ,  $0.5\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서 유의성있게 회복되었으며, ( $p<0.05$ ) 녹용 middle part의 에타놀 추출물과 물 추출물을 투여한 군에서는 다소 증가하는 경향을 보였으나 통계적 유의성은 없었다.

3. Oligonucleotide chip microarray 결과 억제군에서 대조군에 비하여 발현량의 차이를 보인 유전자는 22종이었으며 이중 감소하여 발현된 유전자는 Id1, retinoid X receptor, 14-3-3 epsilon 외 6종, 증가하여 발현된 유전자는 13종이었다.

4. Oligonucleotide chip microarray 결과 실험군에서 대조군에 비하여 발현량의 차이를 보인 유전자는 32종이었으며 이중 감소하여 발현된 유전자는 Id1 등 8종, 증가하여 발현된 유전자는 IFG2 등 24종이었다.

5. Oligonucleotide chip microarray 결과 실험군에서 억제군에 비하여 발현량의 차이를 보인 유전자는 7종이었으며 이중 감소하여 발현된 유전자는 1종, 증가하여 발현된 유전자는 14-3-3 epsilon 등 6종이었다.

이상의 결과로 다음과 같은 결론을 얻었다.

FBS 농도 감소에 의한 Hos cell의 증식능 억제는 signal transduction과 growth factor의 대사에 관여하는 14-3-3 epsilon, 골형성을 유도하는 BMP 대사에 관여하는 Id1 등의 유전자 감소와 retinoic acid 대사에 관련된 RXRB같은 3가지 유전자가 중요한 기전으로 작용할 것으로 사료된다. 저농도 FBS에서 증식능이 억제된 Hos cell에서 녹용 추출물 투여에 따른 증식능 증가의 기전은 14-3-3 epsilon, IGF-2 생성 증가에 의한 세포 증식능 향상과 retinoic 대사의 개선 등에 의한 것으로 사료된다.

## 參考文獻

1. 안주영 외, 서울지역 학생의 발육 표준치에 대한 통계적 관찰, 서울, 소아과, 39권, 12호, pp.1669-1679, 1996.
2. 金德坤 外, 東醫小兒科學, 서울, 鼎談, p.29, 2002.
3. 王伯岳 外, 中醫兒科學, 北京, 人民衛生出版社, pp.34-35, 176-184, 570-588, 1983.
4. 金完熙, 金廣中, 臟象學의 理論과 臨床, 一中社, 서울, p.54, 1996.
5. 戴新民, 現代本草中國藥物學, 啓業書局, 臺灣, p.1253, 1974.
6. 繆希雍撰, 神農本草經, 臺灣商務印書館, 臺灣, p.17:3,4, 18:7, 1973.
7. 江蘇新醫學院, 中藥大事典, 上海, 上海科學技術出版社, pp.26-29, 380-383, 2232-2235, 2626-2628, 1978.
8. 李時珍, 本草綱目, 서울, 고문사, pp.404-407, p.596, p.1205, p.1558, 1975.
9. Grizimk, Bernhard, Grizimek's animal life encyclopedia, Mammals, Van Nostrand Reinhold, N.Y., V, pp.154-156, 1975.
10. 성유석, 김송원, 김찬규, 사슴농장, 범각문화사, 서울, pp.13-14, 1978.
11. 배대식, 동물의 발육에 미치는 녹용의 효과에 관한 연구 (I), 韓蓄誌, 17:571, 1975.
12. 배대식, 동물의 발육에 미치는 녹용의 효과에 관한 연구 (II), 韓蓄誌, 10:209, 1976.
13. 배대식, 동물의 발육에 미치는 녹용의 효과에 관한 연구 (III), 韓蓄誌, 15:103, 1977.
14. 허령, 최숙형, 이매빈, 정규찬, 고돈이, 녹용에 관한 연구 (II)-녹용이 실험적 백서의 성장에 미치는 영향에 대해서, 약학회지, 5:10, 1959.
15. 김영태, 녹용 및 녹용약침이 동물의 성장과 성장발달에 미치는 영향, 경산대학교대학원, 2001.
16. 김부년, 녹용의 추출액이 조골세포의 활성화와 파골세포의 생성에 미치는 영향, 단국대학교 대학원, 2000.
17. Gerhold D, Rushmore T, Caskey T, DNA chips, promising toys have become powerful tolls. TIBS, 24:165-173, 1999.
18. Vermes C, Chandrasekaran R, Jacobs JJ, Galante JO, Roebuck KO, Glant TT, The effects of particulate wear debris, cytokine, and growth factors on the functions of MG-63 osteoblasts. J. BONE & JOINT SURGERY · JBJS.ORG 83-A(2), 2001.
19. 李梃, 醫學入門, 臺聯國風出版社, 臺灣, P.226, 1973.
20. 高本釗, 中藥大辭典, 新文豐出版社, 臺灣, p.1931, 2663, 1982.
21. Yang, X., Tong, Y., Cao, X., Zhang, D., Sun, S., Guo, T, Analysis of constituents in the amniotic fluid of Cervus nippon Temminck Zhongcaoyao 16(5), 238, 1985.
22. Zhang, Z. Q., Zhang, Y., Wang, B. X., Zhou, H. O., Wang, Y., Zhang, H., Purification and partial characterization of anti-inflammatory peptide from

- pilose of *Cervus nippon* Temminck, 藥學學報 27, 321-324, 1992.
23. 王靜竹, 陳定一, 薛崗, 鹿茸與鹿角中氣酸含量測定, 中藥材 13, 13-14, 1990.
  24. 홍남두, 원도희, 김남재, 장승엽, 윤황금, 김혜수, 산지별 녹각류의 성분분석 연구(II), Ganglioside 및 유리 아미노산의 분리, 생약학회지, 24(1), 38-46, 1993.
  25. 김영은, 임동구, 신승언, 녹용의 약효 성분에 관한 연구 (V), 녹용 및 판토크린의 당지질과 인지질의 조성에 관하여, 한국생화학회지, 10(3), 153-164, 1977.
  26. 段傳風, 王金和, 梅花鹿茸 脂和脂肪酸造成研究, 特産研究 3, 48-50, 1990.
  27. Zhao Q, Kiyohara H, Nagai T, Yamada H, Structure of the complement-activating proteoglycan from the pilose antler of *Cervus nippon* Temminck. Carbohy, Res 230, 361-372, 1992.
  28. 范玉林, 鹿茸中的微量元素, 中藥通報 5, 44-46, 1986.
  29. 이학인, 녹각이 백서 간장조직에 미치는 영향에 관한 조직화학적연구, 경희한의대 논문집 3, 35-50, 1980.
  30. 박종현, 고흥균, 김창환, 녹각 수침이 CCL4 중독 흰쥐 손상간에 미치는 영향, 경희한의대논문집 10, 627-642, 1987.
  31. 김병석, Effect of antler or blood pressure in the rabbit. 한양대학교대학원, 1983.
  32. Tsujibo, H., Miyake, Y., Maruyama, K., Inamori, Y, Hypotensive compounds isolated from an alcohol extract of unossified horn of *Cervus elaphus* L. var. *Xanthopygus* Milne-Edwarg(Rokujo). Isolation of lysophosphatidylcholine as a hypotensive principle and strcuture-activity study of related compounds, Chem, Pharm, Bull 35, 654-659, 1987.
  33. 최평낙, 김광호, 녹각이 methotrexate로 유발된 면역저하에 미치는 영향, 경희한의대 논문집 10, 589-604.
  34. 고병희, 송일병, 녹각, 숙지황, 인삼, 오가피가 면역반응 및, NK 세포 활성도에 미치는 영향, 대한 한의학회지 7, 157-173, 1990.
  35. 노중석, A study of *Cervis elaphus*, Ginseng Radix, *Commelina Communis* Aqua-acupuncture, Effects in alloxan-induced diabetic mice, 경희대학교대학원, 1988.
  36. 김길환, 박시원, 녹용추출액의 조혈작용에 관한 연구, 한국생화학회지, 15, 151-157, 1982.
  37. 김경빈, 녹각류가 백서의 내분비기능에 미치는 영향, 경희대학교대학원, 1985.
  38. 王本祥, 劉愛晶, 程秀娟, 王慶貴, 魏廣仁, 崔景朝, 鹿茸多糖抗潰瘍作用, 藥學學報, 20, 321-325, 1985.
  39. 徐惠波, 李延忠, 陳曉光, 孫曉波, 王本祥, 鹿茸 脂抗衰老的初步研究, 中藥藥理與臨床 8, 29-31, 1992.
  40. 金完熙, 臟腑辨證論治, 서울, 成輔社, pp201-45, 281-304, 1985.
  41. 홍창의, 소아과학, 서울, 대한교과서주

- 식회사, pp. 4-5, 1993.
42. 최영길 외, 내분비학, 서울, 의학출판사, pp. 601-626, 1994.
  43. 양세원, 문형로, Long- acting Gonadotropin Releasing Hormone Analog가 성장속도 및 최종예측 성인 신장에 미치는 영향, 서울, 소아과, 37 권, 3호, pp. 309-316, 1994.
  44. Canalis E, The hormonal and local regulation of bone formation, *Endocr Rev.* 4:62, 1983.
  45. Canalis E, Effects of growth factors on bone cell replication and differentiation, *Clin Orthop Related Res*, 193:246, 1985.
  46. Canalis E, the regulation of bone formation by local growth factors. *Bone and Mineral Research*, 6:27, 1989.
  47. Centrella M, Canalis E, Local regulators of skeletal growth, a perspective. *Endocr Rev*, 6:544, 1985.
  48. 김기수, 골다공증, 여성신문사, pp20-28, 1998.
  49. 이귀녕, 이종순, 임상병리과일, 서울, 의학문화사, pp.278-282, 300-303, 1993.
  50. 대한골대사학회, 골다공증, 서울, 최신 의학사, pp.27-32, 50-51, 1991.
  51. Bronckers A.L., Gay s., Dimuzio M.T. and Butler W.T., Immunolocalization of gamma-carboxy-glutamic acid containing proteins in developing rat bones, *Coll. Relat. Res*, 5:273-281, 1985.
  52. 김종인, cDNA Array를 이용한 골모세포의 유전자 발현 연구, 부산대학교 대학원, 2000.
  53. 한상원, 녹용약침이 골형성에 미치는 영향 및 DNA chip을 이용한 녹용 약침액의 유전자 발현 분석, 경희대학교 대학원, 2001.
  54. Aitken A, Collinge DB, van Heusden BP, Isobe T, Roseboom PH, Rosenfeld G, Soll J, 14-3-3 proteins, a highly conserved, widespread family of eukaryotic proteins, *Trends in biochemical sciences*, 17(12):498-501, 1992.
  55. Aitken A, 14-3-3 proteins on the MAP, *Trends in biochemical sciences*, 20(3):95-7, 1995.
  56. Su TT, Parry DH, Donahoe B, Chien CT, O'Farrell PH, Purdy A, Cell cycle roles for two 14-3-3 proteins during Drosophila development, *Journal of Cell Science*, 114(Pt 19):3445-54, 2001.
  57. Fantl WJ, Muslin AJ, Kikuchi A, Martin JA, MacNicol AM, Gross RW, Williams LT, Activation of Raf-1 by 14-3-3 proteins, *Nature*, 13:371(6498): 612-4, 1994.
  58. Freed E, Symons M, Macdonald SG, McCormick F, Ruggieri R, Binding of 14-3-3 proteins to the protein kinase Raf and effects on its activation, *Science*, 265(5179):1713-6, 1994.
  59. Reuther GW, Fu H, Cripe LD, Collier RJ, Pendergast AM, Association of the protein kinases c-Bcr and Bcr-Abl with proteins of the 14-3-3 family, *Science*,

- 266(5182):129-33, 1994.
60. Pallas DC, Fu H, Haehnel LC, Weller W, Collier RJ, Roberts TM, Association of polyomavirus middle tumor antigen with 14-3-3 proteins, *Science*, 265(5171):535-7, 1994.
61. Bonnefoy-Berard N, Liu YC, von Willebrand M, Sung A, Elly C, Mustelin T, Yoshida H, Ishizaka K, Altman A, Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase activity by association with 14-3-3 proteins in T cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(22):10142-6, 1995.
62. McGonigle S, Beall MJ, Pearce EJ, Eukaryotic initiation factor 2 alpha subunit associates with TGF beta receptors and 14-3-3 epsilon and acts as a modulator of the TGF beta response, *Biochemistry*, 41(2):579-87, 2002.
63. Craparo A, Freund R, Gustafson TA, 14-3-3 (epsilon) interacts with the insulin-like growth factor I receptor and insulin receptor substrate I in a phosphoserine-dependent manner, *The Journal of Biological Chemistry*, 272(17):11663-9, 1997.
64. Luk SC, Ngai SM, Tsui SK, Fung KP, Lee CY, Waye MM, In vivo and in vitro association of 14-3-3 epsilon isoform with calmodulin: implication for signal transduction and cell proliferation, *Journal of cellular biochemistry*, 73(1):31-5, 1999.
65. Stamm S, Casper D, Hanson V, Helfman DM, Regulation of the neuron-specific exon of clathrin light chain B, *Brain research. Molecular brain research*, 64(1):108-18, 1999.
66. Stamm S, Casper D, Dinsmore J, Kaufmann CA, Brosius J, Helfman DM, Clathrin light chain B : gene structure and neuron-specific splicing, *Nucleic acids research*, 20(19):5097-103, 1992.
67. Sun XH, Constitutive expression of the Id1 gene impairs mouse B cell development, *Cell*, 79(5):893-900, 1994.
68. Korchynskiy O, ten Dijke P, Identification and functional characterization of distinct critically important bone morphogenetic protein-specific response elements in the Id1 promoter, *The Journal of Biological Chemistry*, 277(7):4883-91, 2002.
69. Lopez-Rovira T, Chalaux E, Massague J, Rosa JL, Ventura F, Direct binding of Smad1 and Smad4 to two distinct motifs mediates bone morphogenetic protein-specific transcriptional activation of Id1 gene, *The Journal of Biological Chemistry*, 277(5):3176-85, 2002.
70. Liu HL, Golder-Novoselsky E, Seto MH, Webster L, McClary J, Zajchowski DA, The novel estrogen-responsive B-box protein



- (EBBP) gene is tamoxifen-regulated in cells expressing an estrogen receptor DNA-binding domain mutant, *Molecular endocrinology*, 12(11):1733-48, 1998.
71. Sun Y, Butler JA, Whanger PD, Glutathione peroxidase activity and selenoprotein W levels in different brain regions of selenium-depleted rats, *The Journal of nutritional biochemistry*, 12(2):88-94, 2001.
72. Sun Y, Ha PC, Butler JA, Ou BR, Yeh JY, Whanger PD, Effect of dietary selenium on selenoprotein W and glutathione peroxidase in 28 tissues of rat. *The Journal of nutritional biochemistry*, 9(1):23-27, 1998
73. Snow RJ, Murphy RM. Creatine and the creatine transporter: a review, *Molecular and cellular biochemistry*, 224(1-2):169-81, 2001.
74. Saneshige S, Mano H, Tezuka K, Kakudo S, Mori Y, Honda Y, Itabashi A, Yamada T, Miyata K, Hakeda Y, et al, Retinoic acid directly stimulates osteoclastic bone resorption and gene expression of cathepsin K/OC-2, *The Biochemical journal*, 309(Pt 3):721-4, 1995.
75. Fleischhauer K, McBride OW, DiSanto JP, Ozato K, Yang SY, Cloning and chromosome mapping of human retinoid X receptor beta: selective amino acid sequence conservation of a nuclear hormone receptor in mammals, *Hum Genet*, 90(5):505-10, 1993.
76. Sato M, Nishi N, Shoji H, Seki M, Hashidate T, Hirabayashi J, Kasai Ki K, Hata Y, Suzuki S, Hirashima M, Nakamura T, Functional analysis of the carbohydrate recognition domains and a linker peptide of galectin-9 as to eosinophil chemoattractant activity. *Glycobiology*, 12(3):191-7, 2002.
77. Roberti R, Bennati AM, Galli G, Caruso D, Maras B, Aisa C, Beccari T, Della Fazia MA, Servillo G. Cloning and expression of sterol Delta 14-reductase from bovine liver, *Eur J Biochem*, 269(1):283-90, 2002.
78. Holmer L, Pezhman A, Worman HJ. The human lamin B receptor/sterol reductase multigene family. *Genomics*, 54(3):469-76, 1998.
79. Hinderlich S, Berger M, Keppler OT, Pawlita M, Reutter W. Biosynthesis of N-acetylneuraminic acid in cells lacking UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase N-acetylmannosamine kinase, *Biol Chem*, 382(2):291-7, 2001.
80. Effertz K, Hinderlich S, Reutter W. Selective loss of either the epimerase or kinase activity of UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase N-acetylmannosamine kinase due to site-directed mutagenesis based on sequence alignments, *J Biol Chem*, 274(40):28771-8, 1999.
81. Lucka L, Krause M, Danker K.

- Reutter W, Horstkorte R, Primary structure and expression analysis of human UDP-N-acetyl-glucosamine-2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase, the bifunctional enzyme in neuraminic acid biosynthesis, FEBS Lett, 454(3):341-4, 1999.
82. Kokame K, Kato H, Miyata T, Homocysteine-responsive genes in vascular endothelial cells identified by differential display analysis. GRP78/BiP and novel genes, J Biol Chem, 271(47):29659-65, 1996.
83. Fischer H, Stenling R, Rubio C, Lindblom A, Colorectal carcinogenesis is associated with stromal expression of COL11A1 and COL5A2, Carcinogenesis, 22(6):875-8, 2001.
84. Yoshioka H, Iyama K, Inoguchi K, Khaleduzzaman M, Ninomiya Y, Ramirez F, Developmental pattern of expression of the mouse alpha 1 (XI) collagen gene (Coll1a1), Dev Dyn, 204(1):41-7, 1995.
85. Li Y, Lacerda DA, Warman ML, Beier DR, Yoshioka H, Ninomiya Y, Oxford JT, Morris NP, Andrikopoulos K, Ramirez F, et al, A fibrillar collagen gene, Coll1a1, is essential for skeletal morphogenesis, Cell, 80(3):423-30, 1995.
86. Weterman MA, Ajubi N, van Dinter IM, Degen WG, van Muijen GN, Ruitter DJ, Bloemers HP, Nmb, a novel gene, is expressed in low-metastatic human melanoma cell lines and xenografts, Int J Cancer, 60(1):73-81, 1995.
87. Goldstein JL, Dana SE, Faust JR, Beaudet AL, Brown MS, Role of lysosomal acid lipase in the metabolism of plasma low density lipoprotein. Observations in cultured fibroblasts from a patient with cholesteryl ester storage disease, J Biol Chem, 250(21):8487-95, 1975.
88. Lusa S, Somerharju P, Degradation of low density lipoprotein cholesterol esters by lysosomal lipase in vitro. Effect of core physical state and basis of species selectivity, Biochim Biophys Acta, 1389(2):112-22, 1998.
89. Guyton AC, Textbook of medical physiology, W.B. Sanders co., p71. 8th edition
90. Schreier T, Kedes L, Gahlmann R. Cloning, structural analysis, and expression of the human slow twitch skeletal muscle/cardiac troponin C gene, J Biol Chem, 265(34):21247-53. 1990.
91. Nakamura K, Shima H, Watanabe M, Haneji T, Kikuchi K, Molecular cloning and characterization of a novel dual-specificity protein phosphatase possibly involved in spermatogenesis, Biochem J, 344 Pt 3:819-25, 1999.
92. Sasaki M, Kato S, Kohno K, Martin GR, Yamada Y, Sequence of the cDNA encoding the laminin B1 chain reveals a multidomain protein

- containing cysteine-rich repeats, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84(4):935-9, 1987.
93. Philipson L, Cell cycle exit: Growth arrest, apoptosis, and tumor suppression revisited. *Mol. Med*, 4(4):205-213, 1998.
94. Bellosta P, Zhang Q, Goff SP, Basilico C, Signaling through the ARK tyrosine kinase receptor protects from apoptosis in the absence of growth stimulation. *Oncogene*, 15(20):2387-2397, 1997.
95. Goruppi S, Ruaro E, Varnum B, Schneider C, Gas6-mediated survival in NIH3T3 cells activates stress signalling cascade and is independent of Ras. *Oncogene*, 18(29):4224-4236, 1999.
96. Germani A, Romero F, Houliard M, Camonis J, Gisselbrecht S, Fischer S, Varin-Blank N, hSiah2 is a new Vav binding protein which inhibits Vav-mediated signaling pathways. *Mol Cell Biol*, 19(5):3798-807, 1999.
97. D'Souza-Schorey C, van Donselaar E, Hsu VW, Yang C, Stahl PD, Peters PJ, ARF6 targets recycling vesicles to the plasma membrane: insights from an ultrastructural investigation. *J Cell Biol*, 140(3):603-616, 1998.
98. D'Souza-Schorey C, Li G, Colombo MI, Stahl PD, A regulatory role for ARF6 in receptor-mediated endocytosis. *Science*, 267(5201):1175-1178, 1995.
99. Boshans RL, Szanto S, van Aelst L, D'Souza-Schorey C, ADP-ribosylation factor 6 regulates actin cytoskeleton remodeling in coordination with Rac1 and RhoA. *Mol Cell Biol*, 20(10):3685-3694, 2000.
100. Palacios F, Price L, Schweitzer J, Collard JG, D'Souza-Schorey C. An essential role for ARF6-regulated membrane traffic in adherens junction turnover and epithelial cell migration. *Embo J*, 20(17):4973-4986, 2001.
101. Dent AL, Vaswanala FH, Toney LM, Regulation of gene expression by the proto-oncogene BCL-6. *Crit Rev Oncol Hematol*. 41(1):1-9, 2002.
102. Ichikawa S, Sakiyama H, Suzuki G, Hidari KI, Hirabayashi Y, Expression cloning of a cDNA for human ceramide glucosyltransferase that catalyzes the first glycosylation step of glycosphingolipid synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(22):12654, 1996.
103. Basu S, Kaufman B, Roseman S, Enzymatic synthesis of ceramide-glucose and ceramide-lactose by glycosyltransferases from embryonic chicken brain. *J Biol Chem*, 243(21):5802-5804, 1968.
104. Lemke CT, Howell PL, Substrate induced conformational changes in argininosuccinate synthetase. *J Biol Chem*, 277(15):13074-81, 2002.
105. Pati D, Keller C, Groudine M, Plon

- SE, Reconstitution of a MEC1-independent checkpoint in yeast by expression of a novel human fork head cDNA, *Mol Cell Biol*, 17(6): 3037-46, 1997.
106. Szpirer J, Szpirer C, Riviere M, Houart C, Baumann M, Fey GH, Poli V, Cortese R, Islam MQ, Levan G, The Interleukin-6-dependent DNA-binding protein gene (transcription factor 5: TCF5) maps to human chromosome 20 and rat chromosome 3, the IL6 receptor locus (IL6R) to human chromosome 1 and rat chromosome 2, and the rat IL6 gene to rat chromosome 4, *Genomics*, 10(3):539-46, 1991.
107. Vora S, Miranda AF, Hernandez E, Francke U, Regional assignment of the human gene for platelet-type phosphofructokinase (PFKP) to chromosome 10p: novel use of polyspecific rodent antisera to localize human enzyme genes, *Hum Genet*, 63(4):374-9, 1983.