

이차원적 전기영동을 이용한 홍화씨의 신생골 형성 기작에 관한 연구

라도경 · 정태성 · 김종수 · 송해룡* · 김용환 · 강정부 · 강호조 · 연성찬 · 신기욱 · 박미림 · 김은희 · 김곤섭^{1**}

경상대학교 수의과대학(동물의학연구소)

*경상대학교 의과대학

**경상대학교 생명과학연구소

Possible Process of Safflower Seed on New Bone Formation by 2-Dimensional Electrophoresis

Do-kyung Ra, Tae-sung Jung, Jong-su Kim, Hae-ryong Song*, Yong-hwan Kim, Joung-bu Kang, Ho-jo Kang, Seong-chan Yeon, Gi-wook Shin, Mi-rim Park Eun-hee Kim and Gon-sup Kim^{1**}

College of Veterinary Medicine (Medicine and Institute of Animal Science) and *College of Medicine,

**Research Institute of Life Science, GyeongSang National University, Chinju 660-701, Korea

Abstract : Korean safflower (*Carthami Flos*) seed has been known to have healing effects on both bone fracture and osteoporosis. On the base of such a notice, this experiment was carried out to explore the effects of safflower seed on bone formation and bone repair. In addition, the healing mechanism was evaluated by analysing serum after feeding the seed to experimental animals. The effect of Korean safflower seed were evaluated with 40 rats, 3-month old. Forty Sprague-Dawley rats composed of 20 male and 20 female were underwent unilateral tibial defect and then fastened with unilateral fixators. The operated rats were divided into two groups depending on the composition of diet, such as positive control group fed normal diet (C-OP group) and safflower seed group fed 30% of safflower seed diet and 70% of normal diet (S-OP group). Postoperative radiographys were taken once in 2 weeks to evaluate callus formation for operated groups. In addition, a possible protein spots involved in bone recovery were examined using 2-Dimensional Gel Electrophoresis (2-DE). The comparison of the radiography between C-OP and S-OP group were showed that the safflower seed diet appeared to stimulate the formation of callus in the rat. On the images of 2-DE, it was able to identify possible five protein spots, having pI from 4 to 5 and molecular weight range from 24 to 26 kDa, involved in bone formation and repair, since no differing protein spots were found the two between groups except the five spots. No differences were observed between two groups before operation, but clear and bigger protein spots were observed from the S-OP group compared with C-OP group on 6 and 9 weeks post operation. These protein spots were, however, showed similar sizes and densities between two groups in 12 weeks later. The transformation of protein spots was suggested that these protein spots were involved in bone formation and recovery, in addition safflower seed might induce the formation of factors and activate these factors. In conclusion, this study suggest that safflower seed influence a variety of factors in the course of bone formation or the periods of remedy.

Key words : safflower seed, fracture, Dimensional Gel Electrophoresis, images, osteoporosis

서 론

국내산 약초 중 홍화 (safflower)는 잇꽃이라 하는 국화과 (Compositae)에 속하는 일년생 초목으로 원산지는 아프가니스탄의 산악지대 또는 에티오피아이며, 중국, 티벳 등지에서 재배되기도 하며 학명은 *Carthamus tinctorius*이다¹. 홍화는 한국, 일본, 중국 등지에서는 약용을 주목적으로 재배하여 왔으며, 20세기부터는 미국, 인도 등지에서는 식용유 생산용으로 재배되고 있는 자원작물이기도 하다. 홍화의 약용 부위는 꽃이며, 약용성분은 Carthamin (C₁₂H₂₂O₁₁) 인데^{2,3}, 한방의

처방 예로는 홍화탕, 활혈통경탕 등이 있으며⁴, 꽃은 혈소판 응고를 억제하고 출혈시간을 지연시키는 작용이 있을 뿐만 아니라^{5,6} 혈장 콜레스테롤과 중성지방의 저하 기능도 있어 여성들의 통경약이나 어혈을 푸는 약재로 한방에서 널리 사용해 왔다. 홍화 씨에는 지방이 다량 함유되어 있는데, 특히 linoleic acid의 함량이 높아 혈중 콜레스테롤 저하작용을 나타낸다고 보고되었다^{7,8}. 또한 홍화 기름을 이용하여 등불을 켜었을 때 나오는 그을음으로 필묵을 만들기도 하는데 이를 홍화묵이라 하여 최상의 필묵으로 여긴다⁹. 홍화가 지닌 또 하나의 기능은 그 작용 기전은 밝혀진 바 없으나 최근 이 홍화의 씨가 골절 및 골다공증 등의 뼈 질환에 뛰어난 효과가 있음이 민간인들 사이에 알려져 현재 국내에서 민간요법으로 사용되고 있다. 특히 금이 가거나 다친 뼈를 빠르고 튼튼하게 회복시켜 준다는 홍화 씨의 효력에 대하여 과학적 근거 및 치료 효과가 확립되어 있지 않고 있다.

¹Corresponding author.

E-mail : gonskim@nongae.gsnu.ac.kr

본 논문은 농림부 농림기술개발 연구사업에 의해 일부 지원되었습니다. (ARPC- 100052-2)

골은 세포와 이들 세포간에 존재하는 다량의 골 기질로 이루어져 있다. 골 기질은 대부분 교원섬유로 구성된 유기질 성분과 주로 칼슘으로 구성된 무기질 성분으로 이루어진다.

골 발생, 골 성장 및 형성된 골의 유지는 몇 가지 호르몬과 비타민에 의하여 현저한 영향을 받으며, 그 중에 중요한 몇 가지를 살펴보면 다음과 같다. 부갑상선 호르몬(parathyroid hormone)은 골 모세포로 하여금 파골 세포 활성 인자를 분비하도록 하여 파골 세포의 골 흡수 활동을 촉진시키며, 그에 따라 혈중 칼슘 농도가 상승한다. 칼시토닌(calcitonin)은 부갑상선 호르몬과 반대의 효과를 나타내는 호르몬으로서 갑상선의 부소포 세포(parafollicular cell)에서 분비된다. 이 호르몬은 파골 세포에 직접 작용하여 골 흡수 활동을 억제함으로써 혈중 칼슘 농도를 낮추며, 또한 골 모세포를 자극하여 골 기질 내에 칼슘염을 침착시켜 골 형성률을 높인다. 성선 호르몬(gonadal hormone)인 estrogen과 androgen은 골 발생을 조절하며 골 성숙에 관여한다. 비타민 중에는 비타민 A, C 및 D가 특히 골 형성에 큰 영향을 미친다¹¹⁻¹³. 이처럼 골 대사에 많은 요인들이 작용하게 되므로 작용 기전에 대하여 밝혀내기가 어려운 문제점이 있고 연구기간도 길어진다는 단점이 있다.

최근 단백질들의 발현을 종합적이고 정성적으로 측정하는 프로테오믹스(proteomics) 기법이 많이 이용되고 있는데^{14,15}, 이 프로테오믹스 기술의 핵심 중 하나는 전통적인 단백질 생화학 기술로서 이미 오래전에 사용되기 시작했던 이차원 전기영동(2-Dimensional Gel Electrophoresis; 2-DE)기술이다.

즉, 단백질을 등전점(pI)으로 나타내어지는 net charge에 따라 분석을 한 후(1D), 이어서 분자량에 따라 분리하는(2D) 방법이다. 이 방법으로 생물학적인 동요(질병, 약물 투여, shock등)에 의하여 변하는 단백질의 발현 양상의 변화를 정확하게 관찰할 수 있으며, 분리된 특정 spot에 대한 분리 양상을 지도로 구성할 수 있고, 이를 Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time Of Flight Mass Spectroscopy(MALDI-TOF-MS) 등의 단백질 질량 분석기로 분석하여 아미노산 서열을 결정하고, 이 단백질의 정체를 확인할 수 있다¹⁶⁻²⁰.

이번 연구에서는 식물성 에스트로겐 성분을 함유하고 있는 홍화 씨의 신생골 형성에 대한 효능을 밝혀내고 체내에 흡수되었을 때 어떠한 기전으로 효과를 나타내는지를 최신 2-DE기법을 사용하여 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

본 실험에서 사용한 홍화 씨 사료는 경남 산청의 산청홍화원에서 생산된 홍화 씨를 사용하였으며 볶아서 잘게 간 분말을 일반 rat사료에 30% 농도로 섞어 제조하였다.

실험 동물

본 실험을 위하여 3개월령의 Sprague-Dawley rat 40두(male 20, female 20)에게 골 결손술을 시술하여 다음과

같이 두 그룹으로 나누었다. 대조군(control-operation group; C-OP group)은 일반적인 rat 사료를 급여하였으며 처리군(Safflower seed-treatment group; S-OP group)은 홍화 씨가 30% 섞인 사료를 급여하여 두 그룹간의 신생골 형성을 비교하였다.

수술 방법

40두의 rat를 수술 하루 전부터 절식시켰다. Ketamin (40-80 mg/kg)과 Xylazine (5-10 mg/kg)을 혼합, 복강 내 주사하여 전신마취를 실시한 후, 골 결손을 만들 크기를 정하기 위하여 수술 전 방사선 사진 촬영을 하여 경골의 전체 길이를 측정하였다. 오른쪽 경골 부위의 털을 깨끗이 제거하고 내측에서 경골을 따라 피부와 근육을 절개하여 경골이 완전히 노출되도록 한 다음 경골을 싸고 있는 골막을 절개하여 양쪽에서 최대한 골막을 보호하고 외부고정기구의 구멍에 맞게 근위쪽과 원위쪽에 각각 2개씩의 pin hole을 뚫었다. 근위쪽에는 1.1 mm의 K-wire를, 원위쪽에는 0.9 mm의 K-wire를 삽입하고 rat의 경골에 맞게 제작된 외부고정기구를 장착하여 고정시켰다. 골 결손을 만들 경골간의 골편 부위의 골막을 다치지 않게 보정한 후 전체 경골 길이의 15%가 되게 air saw로 잘라내었다. 골막과 근육을 단단히 봉합한 후 피부를 봉합하고 dressing하였으며 3일간 gentamycin을 주사하였다. 수술 후 2주 간격으로 방사선 촬영을 통하여 신생골의 형성을 관찰하였다.

2차원적 전기 영동법에 의한 분석

혈청 내 총 단백질을 이용하여 정량하였다²⁰. 혈청을 8M urea, CHAPS (4% w/v), 40 mM Tris, 65 mM DTT, Bromophenol Blue (trace), Immobilized pH gradients (IPG) buffer (0.5% v/v)의 조성으로 구성된 sample buffer에 희석시켜 준비하였다. First dimension 즉 Isoelectric focusing (IEF)은 Pharmacia사의 IEF system인 IPGphor를 사용하여 실시하였고, pH range 3-10, 7cm의 IPG dry strip을 이용하였다.

IPGphor 내의 온도를 20°C로 control하여 12시간 동안 재수화(Rehydration)를 실시한 후 다음과 같은 세 단계로 focusing을 실시하였다(1D). 첫번째 단계로 500 V에서 30분간, 두번째 단계로 1000 V에서 30분간, 마지막으로 4500 V에서는 10시간동안(45,000 volt hour) 통전시켰다. Focusing이 끝난 직후 2% SDS, 50 mM Tris-HCl pH 8.8, 6 M urea, 30% glycerol, 1% DTT의 조성으로 만들어진 용액에 15분 동안 1차 equilibration시켰고, 2% SDS, 50 mM Tris-HCl pH 8.8, 6 M urea, 30% glycerol, 4% iodoacetamide의 조성으로 된 용액에 15분간 2차 equilibration시켰다. Electrophoresis buffer로 gel strip에 남아있는 equilibration 용액을 씻어낸 후 second dimension으로 SDS-PAGE (10% w/v slab gel, 1 mm thick)를 수행하였다(2D).

2차 전기 영동이 끝난 gel에서 단백질을 검출하기 위하여 silver nitrate stain방법을 이용하여 spot들을 확인하였다. 분

리되어진 spot들의 비교를 위해 Pharmacia사의 image scanner로 scan하고 Phoretix 2D Advanced program을 이용하여 각 spot들을 matching 시켜 비교 분석하였다.

결 과

홍화 씨가 가골이 생성되는 양과 골 유합 시기에 미치는 영향

수술 후 방사선 사진을 촬영하여 가골이 생성되는 양과 유합 시기를 비교한 결과 처리군이 대조군보다 1.5주가 빠른 것으로 나타났으며 골 경화시기도 빠른 경향을 보였다. 처리군은 수술 후 8주째 20두 중 12두(60%)가 이미 골 유합이 되었으나 대조군은 20두 중 3두(15%)가 골 유합 소견을 보였다 (Fig 1).

홍화 씨가 단백질 발현에 미치는 영향

홍화 씨가 단백질 발현에 미치는 영향을 조사하기 위하여 이차원적 전기 영동법을 실시하였다.

수술하기 전 두 그룹간에는 뚜렷한 차이를 보이지 않았으나 (Fig 2) 수술 후 6주째의 2-DE 결과 정상적으로 보이던 spot들이 수술 후 대조군에서는 크기 및 농도가 약하게 나타났으나 처리군에서는 오히려 spot의 크기가 커지고 농도 또한 진해진 것을 발견할 수 있었다 (Fig 3). 이는 술 후 9주째의 2-DE결과에서도 마찬가지로 나타났다 (Fig 4). 그러나 술 후 12주째 처리군의 spot 변화는 수술전보다 진해지거나 커진 것을 발견할 수 없었다. 다만 대조군은 여전히 수술전보다 spot이 작고 약하게 보였다 (Fig 5).

Gel 상에서 확연하게 그 차이가 screening되어진 spot 에 대한 분자량과 등전점을 Table 1에 나타내었다.

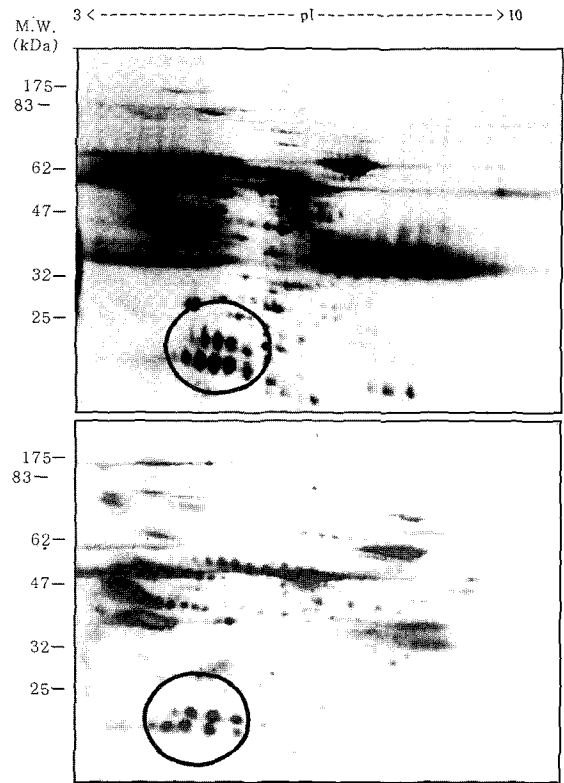


Fig 2. Comparison of 2-DE images for sera between rat fed normal diet (A) and rat fed safflower seed (B). No differences were observed between two images, especially the spots in the circle. Sera lysed in sample buffer were loaded onto IPG strips to perform isoelectric focusing (IEF) as the first dimensional gel electrophoresis (1D). The isoelectric focused IPG strips were separated by SDS-PAGE (2D), and then stained using silver nitrate to analysis with Phoretix program.

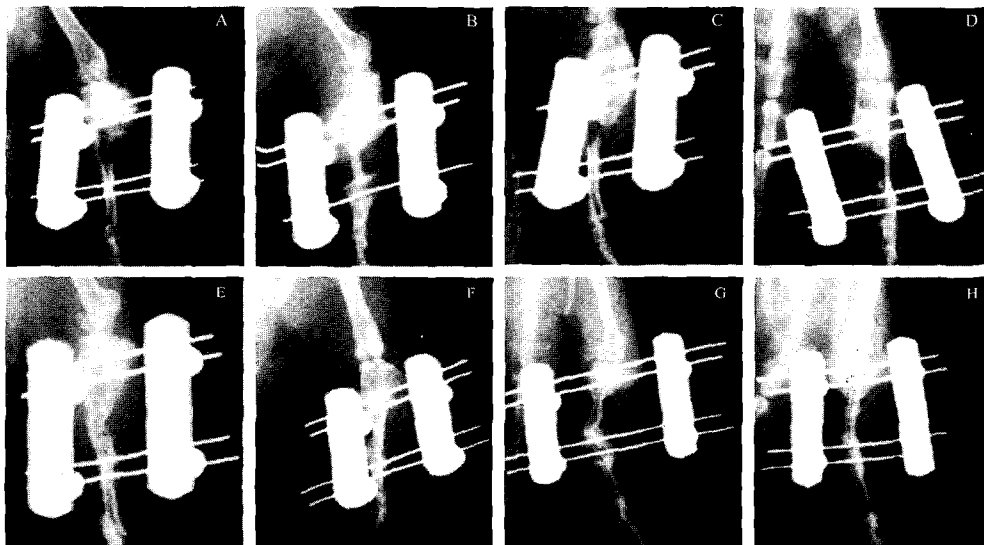


Fig 1. Radiographs at 8 weeks post operation. Rats were received bone defect (15% in size) surgery and they were divided into 2 groups, and then maintained either C-OP group by feeding normal diet for 15weeks or S-OP group by providing safflower seed diet (30% of safflower seed was mixed with normal diet) for 15weeks. A-D: Bone union was not completed in the radiographs of C-OP group. E-H: Callus was filled bone defect in the radiographs of S-OP group.

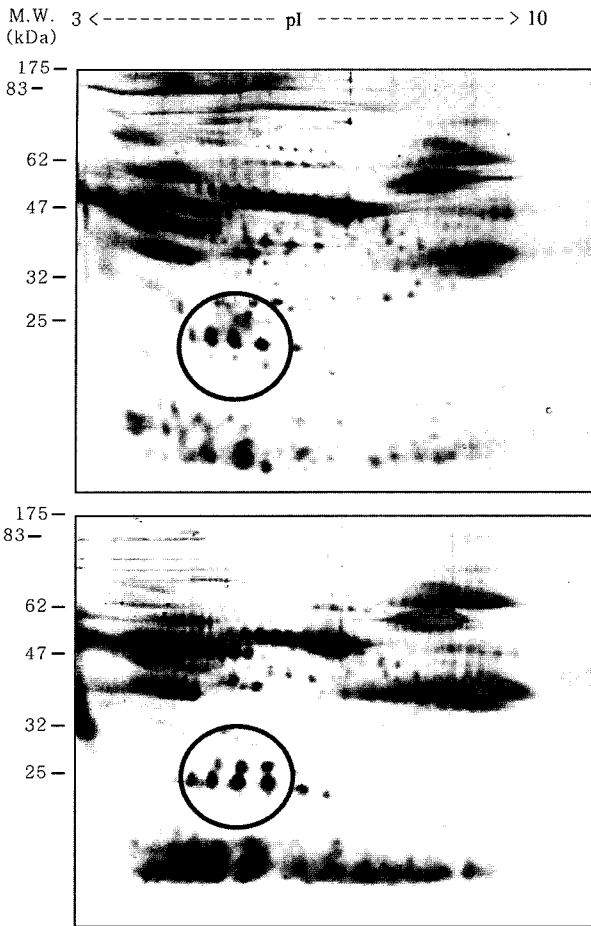


Fig 3. Comparison of 2-DE images for sera between rat fed normal diet (A) and rat fed safflower seed (B) at 6 weeks post operation. The 5 lower spots of B in the circle were become darker and bigger than that of both A of Fig 3 and B of Fig 2.

Table 1. Molecular weights and pI of spots transformed according to treatment

Spot No.	pI	Molecular Weight (kDa)
Spot 1	4.13±0.10	25.13±4.47
Spot 2	4.36±0.09	24.99±4.36
Spot 3	4.64±0.09	24.89±4.32
Spot 4	5.00±0.09	24.63±4.14
Spot 5	5.42±0.09	24.40±3.99

The intensity and size of spots, which had molecular weight 24-26 kDa and pI 4-5, were increased in groups treated with safflower seed after bone defect operation.

고찰

홍화 씨는 예로부터 우리나라에서 재배되어 오던 것으로 최근 골절 및 골다공증 등의 뼈 질환 및 골의 발달과 유지

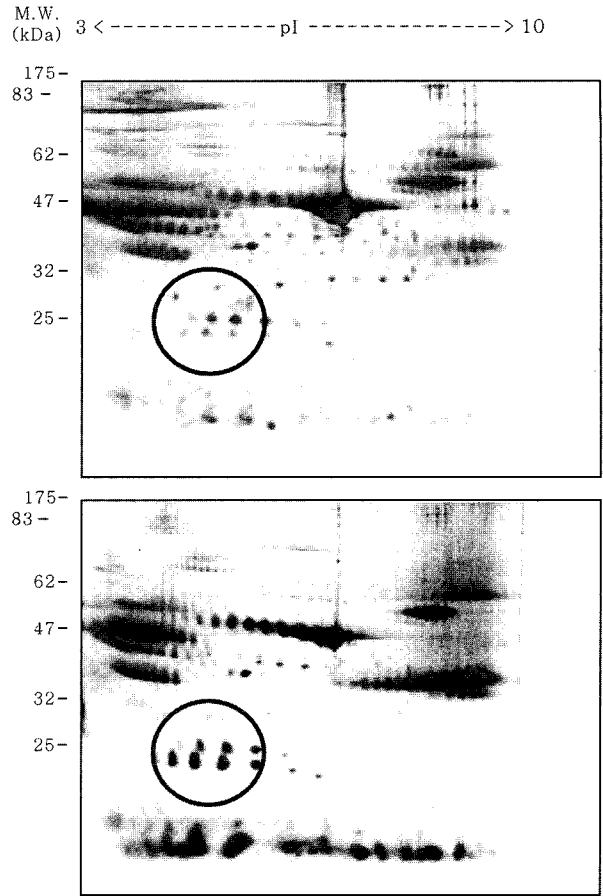


Fig 4. Comparison of 2-DE images for sera between rat fed normal diet (A) and rat fed safflower seed (B) at 9 weeks post operation. The images appeared highly similar to Fig 3.

에 뛰어난 효과가 있음이 알려져 국내에서 민간요법으로 사용되고 있으나 그 과학적 근거 및 치료 효과가 확립되어 있지 않고 있다. 본 연구에서는 인위적으로 경골에 골 결손을 유도한 쥐에게 홍화 씨가 30% 섞인 사료를 급여하였을 때 홍화 씨가 체내에 흡수된 후 골 형성에 끼치는 영향을 파악하고 이차원 전기영동 법을 통하여 그 작용 과정을 알아보고자 하였다.

신생골을 형성하여 골 결손을 치유하는 효과에 있어서는, 홍화 씨 식이군이 일반 식이군에 비하여 신생골 형성이 촉진되어 치유기간이 1.5주 정도 단축되었고, 홍화 씨가 체내에서 어떠한 경로를 통하여 신생골 형성에 대한 촉진 작용을 가지는지에 대해 알아보기 위하여 단백질체분석학 (proteomics) 방법을 이용하였는데 프로테오믹스는 구체적인 유전체 구조와 유전자의 세포 내 행동간 갭 (gap)을 메우는 역할을 하는 단백질 생성물 및 그들 간의 네트워크를 연구하는 분야이다. 생명공학 분야에서 이 기술의 발전은 대량발굴탐색 (high-throughput screening)이 가능한 2차 전기영동 (two dimensional electrophoresis: 2DE) 분석과 MALDI-TOF 에 의한 자동화된 단백질 구조 분석 기술 및

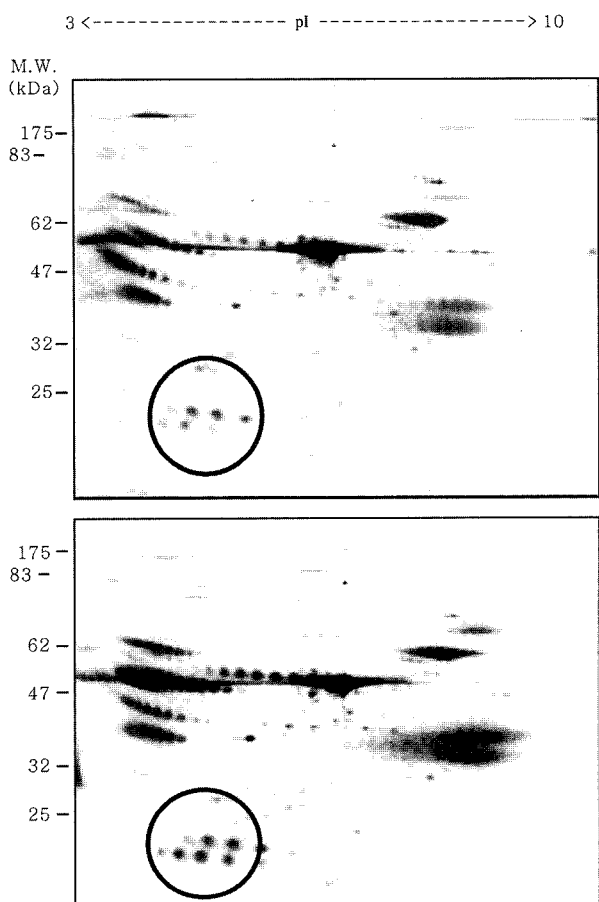


Fig 5. Comparison of 2-DE images for sera between rat fed normal diet (A) and rat fed safflower seed (B) at 12 weeks post operation. In the A, the spots in the circle were similar to the images of Fig 3 and Fig 4, on the other hand, the spots of B were returned to the shapes of pre-operation.

이들을 지원하는 프로테오믹스 정보학 (proteome informatics)의 발전과 긴밀하게 연계되어 있다. 따라서, 프로테오믹스는 세포의 생리적 상태변화에 따른 분자적인 현상과 세부적인 기전을 규명할 뿐만 아니라 어떻게 단백질의 표현형 (phenotype)이 질병과 약물 처리에 따라 변화하는지를 분석할 수 있고, 이로 인해 약물표적의 식별과 검증할 수 있게 한다²¹. 이 방법은 기능적 측면에서 세포 내 단백질의 생리상태별 (예, 암과 정상조직) 발현차이와 세포 내 상태별 특정단백질의 정량적 차이 및 변형상태, 그리고 상호관계 등을 규정하는데 필요하다. 활용성 측면에서 요약하면, 각종 질환 marker와 치료표적 단백질의 발굴을 동식물 성장조절단백질의 규명, 생식기전 및 약물독성과 신약개발을 들 수 있다²²⁻²⁵. 이번 연구에서 홍화 씨의 섭취에 의한 혈청 내 단백질의 발현과 변화를 알아보기 위해 실시한 이차원 전기영동의 결과 홍화 씨 식이그룹에서는 일반 식이그룹보다 정상상태의 spot들이 크고 강하게 나타나는 것을 알 수 있었으며, 변화를 보인 단백질 spot은 분자량 약 24-26 kDa, 등전점 4-5.5 사이

에 자리하고 있었다.

위의 결과에서 나타난 바와 같이 골 결손을 유발한 쥐에게 홍화 씨 분말을 30% 수준으로 정상식이에 보충하였을 때 골 유합 및 치유가 일반 식이군에 비해 빠르게 일어났다. 또한 수술 후 6주와 9주째에 정상상태에서 나타나는 spot들이 홍화 씨 식이그룹에서 더 진하게 나타나는 것으로 미루어 홍화 씨의 섭취가 골 재생 및 치유에 관여하는 인자들의 양을 증가시키고 활성화할 수 있는 조건을 만들어주는 역할을 하는 것이라 여겨진다

결론적으로 골 결손시 홍화 씨의 섭취는 골형성에 관여하는 체내의 여러 인자들이 활성화되는 조건을 만들어 그들의 능력을 증가시켜 새로운 골의 형성을 돕는 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. 이창복. 대한식물도감. 백양당. 1980: 779
2. 山口一孝: 식물성분분석법(상). 남강당. 1963: 260-265.
3. Beech, D.F. Safflower, Fiend Crop. Astr. 22. 1969: 107-119.
4. 안덕균과 육창수. 현대본초학. 고문사. 1975: 358-359.
5. Kee Chang Huang: The Pharmacology of Chinese Herbs CRC, press. 1993: 249-250.
6. 허 준: 東醫寶鑑5. 제 3권. 12. 풀부. 여강출판사. 1986: 2763-2764.
7. Khan, A.R. Studies in Indian Oil seed. No.3 Carthamus tinctorious L. The types of Safflower. Memoris. Dept. Agri. India. Bot. Ser. 1929: 18
8. Nast, H. G. et al. Effects of fertilization and papulation rate-spacing on Safflower yield and other characteristics. Agron. J. 1978: 70
9. Kim, H.J. et al. Bone protective effects of phytoestrogens extracted from safflower seeds in ovariectomized rats and osteoblast cells. 기초의학회 학술대회, 2000
10. Kennedy, W.K. and Unrau, J. A rapid method for deterning the oil concent of Safflower and sunflower seeds. Agron. J. 1949; 41: 93-95
11. Banks W.J. Applied veterinary histology 2nd ed. Williams and Wilkins Publisher. 1986
12. Price, C.P. and Thomson P.W. The role of Biochemical tests in the screening and monitoring of osteoporosis. Ann. Clin. Biochem. 1995; 30: 244-260.
13. 강호석 등. 조직학 제 2판. 고문사. 1994
14. Bairoch, A. Proteome Databases. p. 93-148. In M. R. Wilkins, K. L. Williams, R. D. Appel, and D. F. Hochstrasser (eds.), Proteome Research: New Frontiers in Functional Genomics. Springer, Berlin. 1997
15. Lackstock, W. P. and Weir, M. P. Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. Trends Biotechnol 1999; 17: 121-127.
16. Herbert, B. Advances in protein solubilisation for two-dimensional electrophoresis. Electrophoresis 1999; 20: 660-663.
17. Link, A.J. et al. 2D Proteome Analysis Protocol in Methods in Mol. Biol., Humana Press, Totowa, New Jersey 1999:12
18. Mann, M. Quantitative proteomics [news]. Nat.Biotechnol. 1999; 17: 954-955.
19. Marzocchi, B. et al. Two-dimensional gel electrophoresis and immunoblotting of human serum albumin modified by

- reaction with penicillins. *Electrophoresis* 1995; 16: 851-853
20. Mollenkopf, H. J. et al. A dynamic two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis database: the mycobacterial proteome via Internet. *Electrophoresis* 1999; 20: 2172-2180.
 21. Blackstock, W. P. and M. P. Weir. Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. *Trends Biotechnol.* 1999; 17: 121-127.
 22. Brewis, I. A. Proteomics in reproductive research: the potential importance of proteomics to research in reproduction. *Hum.Reprod.* 1999; 14: 2927-2929.
 23. Edvardsson, U. M. et al. A proteome analysis of livers from obese (ob/ob) mice treated with the peroxisome proliferator WY14,643. *Electrophoresis* 1999; 20: 935-942.
 24. Jungblut, P. R. Proteomics in human disease: cancer, heart and infectious diseases. *Electrophoresis* 1999; 20: 2100-2110.
 25. Myers, T. G. et al. A comparative study of mouse liver proteins arylated by reactive metabolites of acetaminophen and its nonhepatotoxic regioisomer, 3'-hydroxyacetanilide. *Chem.Res.Toxicol.* 1999; 8: 403-413.