



녹용의 약리학적 성분

PHARMACEUTICAL COMPOSITION OF VELVET ANTLER



전길자/이화여자대학교 화학과 교수

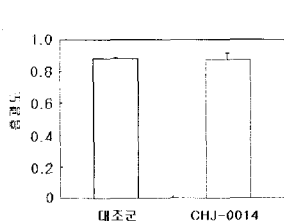
<마지막 회 >

3.1.2 SCOH의 세포독성

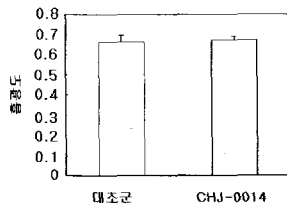
화합물 SCOH의 세포독성은 MTT (3-[4,5-디메틸티아졸-2-2,5-디페닐테트라졸륨 브로마이드) 분석으로 확인하였다.

A. 마우스에서 분리한 조골세포(그림

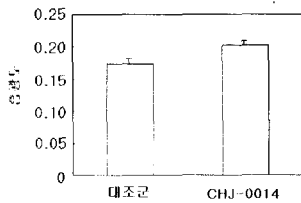
1)와 마우스 골수세포(그림 2), 복강 대식세포(그림 3) 및 인간배신장세포주인 293T(그림 4)에 대한 세포독성 결과를 SCOH(6 μ M)으로 각각 24시간 처리하였을 4가지 세포에 모두 세포독성을 나타내지 않았다.



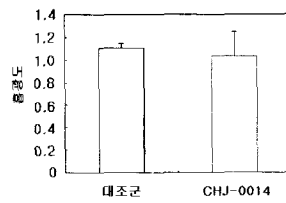
<그림 1>



<그림 2>

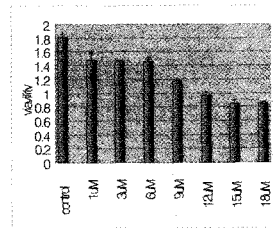


<그림 3>

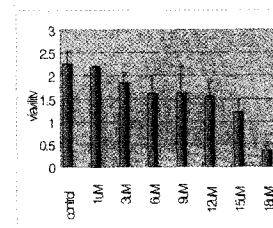


<그림 4>

B. RAW264.7 세포에 대한 세포독성



24시간



72시간



것을 관찰할 수 있었다.
위와 같은 실험으로 SCOH가 MAPK인 JNK와 P38의 phosphorylation에 미치는 영향을 관찰하였는데 24시간, 48시

간, 72시간에서 모두 JNK와 P38의 phosphorylation에는 영향을 주지 않았다.(data 제시하지 않음)

C. SCOH가 RANKL에 의한 NF- κ B의 활성화에 미치는 영향



RANKL + SCOH RANKL SCOH control

마우스 경골에서 분리한 골수세포(2×10^5)를 48 well plate에서 배양하였다. 이때 cell을 SCOH($6 \mu\text{M}$)로 30분간 처리해준 다음 RANKL(100ng/ml)로 15분 처리해준다. 핵전 사인자 NF- κ B활성은 EMSA(electrophoresis mobility shift assay)를 수행하여 조사하였다. 결과, SCOH는 파골세포 분화 유도인자인 RANKL가 NF- κ B을 활성화하는 것을 억제함을 알 수 있었다.

3.2 녹용에서 파골세포 분화를 억제하는 물질의 분리

녹용(*Cervus elaphus*)은 계통 용매 추출법에 의해 hexane, chloroform 및 70% ethanol 세 단계의 추출이 실시하였고,

그 중 파골세포 억제 효과가 뚜렷한 chloroform 추출물을 silica gel column chromatography를 통하여 분리하였다. 용출용매는 각각의 band들이 최대한 잘 분리되도록 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 의 비를 적절히 조절하여 사용하였다. column chromatography를 통해 정제한 물질을 TLC를 이용하여 분류, 확인하였다. 각 단계에서 얻은 녹용추출물의 파골세포 분화 억제능은 골수세포와 조골세포의 상호배양 시스템을 이용하여 TRAP 염색을 통하여 확인하였다. 실험결과 녹용추출물은 뚜렷한 파골세포 분화 억제작용을 나타내었고 silica column chromatography를 통한 정제과정에서



MTT분석결과, SCOH는 1~18 μ M으로 각각 24시간, 72시간 처리하였을 때 RAW264.7 세포에 세포독성을 나타내지 않았다.

3.1.3 SCOH의 파골세포분화 억제 작용의 메카니즘

파골세포는 단핵구/대식세포 계열의 단핵 세포 전구 세포 (mononuclear progenitor)의 융합으로 생긴 다핵세포로서 뼈 흡수에 관여한다.

RANKL은 osteoclastogenesis의 가장

중요한 요소이다. RANKL가 그의 수용체인 RANK와 결합하면 세포질중에 있던 TRAF2, TRAF, c-Src과 같은 adaptor 단백질들이 RANK와 결합되며 downstream인 NF- κ B 및 MAPK들이 activation되면서 osteoclastogenesis가 일어난다. SCOH의 작용 메카니즘을 연구하기 위하여 RAW264.7 세포를 이용하여 SCOH가 NF- κ B, TRAF6와 JNK, ERK, P38 등 MAPK들에 미치는 영향을 관찰하였다.

A. SCOH가 TRAF6의 발현에 미치는 영향

SCOH(24hr)	-				+			
RANKL(min)	0	10	20	30	0	10	20	30
Western blotting	[Western blotting results for TRAF6 at 24hr]							
Western blotting	[Western blotting results for TRAF6 at 48hr]							
Western blotting	[Western blotting results for TRAF6 at 72hr]							

RAW264.7 cell을 SCOH(6 μ M)로 24시간, 48시간, 72시간 미리 처리해 준 다음 RANKL(50ng/ml)로 각각 0, 10, 20, 30분 처리해준다. 다음 cell을 lysis시키고 TRAF6의 발현은 westem blotting으로 확인하였다. 결과 SCOH 24시간 48시간 72시간에서 모두 TRAF6의 발현에는 영향을 주지 않는 것을 알 수 있었다.

RAW264.7 cell을 SCOH(6 μ M)로 24시

B. SCOH가 ERK phosphorylation에 미치는 영향

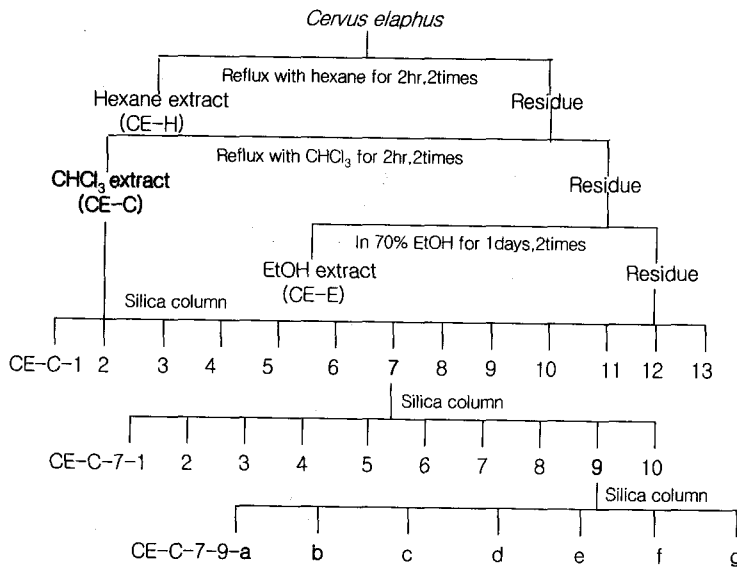
SCOH(24hr)	-				+			
RANKL(min)	0	10	20	30	0	10	20	30
Western blotting	[Western blotting results for p-ERK and ERK at 24hr]							
Western blotting	[Western blotting results for p-ERK and ERK at 48hr]							
Western blotting	[Western blotting results for p-ERK and ERK at 72hr]							

간, 48시간, 72시간 미리 처리해 준 다음 RANKL(50ng/ml)로 각각 0, 10, 20, 30분 처리해준다. 다음 cell을 lysis시키고 ERK 및 p-ERK의 발현은 westem blotting으로 확인하였다. 결과 SOCH는 24시간, 48시간 미리 처리하였을때에는 ERK의 phosphorylation에 영향을 주지 않았지만 72시간 처리하였을 때 ERK의 phosphorylation을 뚜렷하게 억제하는



더욱 좋은 억제작용을 보여 녹용에는 파골세포 분화를 억제하는 물질이 함유되어 있음을 확인할 수 있었다. 이 물질을 분리하기 위하여 더 정제를 하고 있다. **한국양륙**

3.2.1 녹용추출분리도



Isolation of CE-C-7-9-a and b from CHCl₃ extract of *Cervus elaphus*

3.2.2 각 단계에서 얻은 녹용추출물의 파골세포 분화 억제능

