

환경호르몬에 의해 손상된 골모세포에 대한 人蔘의 영향

홍기연* · 박승택¹ · 전병훈² · 서은아³

원광대학교 의과대학, 1: 원광의과학연구소, 2: 원광대학교 한의과대학, 3: 원광대학교 의학지원연구센터

Effects of Ginseng Radix Against Osteoblasts Damaged by Endocrine Disrupting Chemicals

Gi Youn Hong*, Seung Taeck Park¹, Byung Hun Jeon², Eun A Seo³

Department of Obstetric and Gynecology, School of Medicine, 1:Institution for Medical Science, 2:College of Oriental Medicine, 3:Medicinal Resources Research Center, Wonkwang University, Iksan, Korea

In order to evaluate the effect of Ginseng Radix(GR) against endocrine disrupting chemicals(EDC), cultured mouse osteoblasts were preincubated with various concentrations of GR extract before the exposure of Bisphenol A for 12 hours. Cytotoxic effect of Bisphenol A was measured by the XTT assay. In addition, the protective effect of GR over Bisphenol A-induced cytotoxicity on osteoblasts was assessed by the DNA and protein synthesis in these cultures. The results were as follows : Osteoblastic cell viability was decreased in dose and time dependent manner after exposed to various concentrations of Bisphenol A. Midcytotoxicity value(MCV50) of Bisphenol A was determined at 6 μ M Bisphenol A after osteoblasts were grown for 12 hours in the media containing various concentrations of Bisphenol A. Amount of DNA synthesis was increased in dose-dependent manner after cultured osteoblasts were pretreated with GR for 2hrs before exposure to Bisphenol A for 12 hours. Amount of protein synthesis was increased in dose-dependent manner after cultured osteoblasts were pretreated with GR for 2 hours before exposure of Bisphenol A for 12 hours. From these results, it is suggested that Bisphenol A was highly toxic by the decrease of the cell viability, and GR is effective in the prevention of Bisphenol A-induced cytotoxicity by the increase of DNA and protein syntheses in cultured mouse osteoblasts.

Key words : Ginseng Radix(GR), Bisphenol A, Osteoblast.

서 론

최근에 산업이 전문화 되면서 현대인은 과중한 업무와 정신적인 스트레스로 인하여 뇌졸증을 비롯한 고혈압이나 당뇨와 같은 만성 난치성 질환에 노출될 빈도가 높아졌다^{1,2)}. 더욱이 환경의 오염이 날로 심화되면서 특히 노년층이나 폐경기에 접어든 여성들은 영양부족과 인체에 대한 면역기능이 급격히 떨어져 관절염을 비롯하여 골절이나 골다공증과 같은 질환에 자주 노출되고 있다^{2,14)}. 따라서 골질환에 대한 대중의 관심이 높아졌으며^{1,3)}, 현대과학이 풀어야 할 과제가 되었다^{4,12)}. 최근에는 전세계적으로 노년층이 많아져 골절회수가 빈번해졌으며 또한 여성들은 출산으로 인한 영양부족으로 골밀도가 현저히 감소하게 됨으로써 골다공증은 이제 사회적 문제로 등장하게 되었다^{3,5)}. 지금까지 알려진 골다공증의 병인을 보면 심한 스트레스를 비롯하여 영

양부족이나 생활습관 및 주위의 환경에 따라 발병률이 매우 다르다고 알려져 있으며^{6,13)}, 최근에는 활성산소나 환경 오염원 등도 병인으로 제시되고 있다^{7,9)}. 특히, 환경호르몬은 생식선자극호르몬에 영향을 주어 호르몬의 정상적인 기능의 저해나 분비자해를 유발하며^{10,17)}, 또한 정상 호르몬들이 이의 수용체와 결합하는 것을 방해하여 정상호르몬 대신 작용하여 정상호르몬의 작용에서 볼 수 없는 세포분열의 이상이나 골대사와 같은 생체의 물질대사에 변화를 유발하여 각종 부작용을 유도한다고 한다^{11,17)}. 골다공증의 현상은 골 형성 비율보다 골 흡수가 상대적으로 증가하면서 일어나기 때문에 이의 발병기전이나 치료를 위하여 국내외 많은 학자들은 꾸준히 연구를 진행하고 있다^{8,16)}. 한편, 최근 한약추출물이나 동식물에서 분리 정제한 천연 추출물들이 골다공증이나 관절염과 같은 질환에 매우 효과적인 약리활성물질을 가지고 있다는 보고가 되어지고 있다^{16,18)}. 특히 인삼은 saponin을 비롯하여 panaxynol이나 elemene과 같은 성분을 함유하고 있으며¹⁶⁾, 한방에서는 인삼을 현훈 두통을 비롯하여 건망, 빈뇨, 소갈등의 치료에 널리 처방 되고 있다¹⁸⁾. 그 밖에도 인

* 교신저자 : 홍기연, 전북 익산 신용동 344-2 원광대학교 의과대학

E-mail : hong57@wonkwang.ac.kr, Tel : 063-850-1228

· 접수: 2002/02/11 · 수정: 2002/03/08 · 채택 : 2002/04/02

삼은 중추신경계의 진정이나 내분비계통의 촉진 및 순환기계통의 작용을 나타내며¹⁷⁾, 특히 항 암효과나 면역증가와 같은 측면에서도 매우 유효한 약리활성을 나타낸다고 보고된 바 있다^{16,17)}. 최근에는 환경호르몬의 일종인 다이옥신의 독성감소에도 효과가 있다고 제시된 바 있다^{11,17)}. 근래에 세포배양기술이 널리 보급되면서 특정 세포의 동점이나 동일한 세포를 대량으로 순수 분리할 수 있게 되었으며^{11,15)}, 또한 세포주기가 짧아 단 시간내에 동일한 실험을 반복할 수 있어 재현성이 뛰어나다는 장점⁹⁾때문에 배양세포를 이용한 병변 모델은 현재 시험관내의 가장 적합한 실험도구로 자리잡아가고 있다²⁾. 더욱이 각종 질환의 기전연구나 치료적 접근의 연구에 필수적인 동물실험모델이 부족한 실정에서 배양세포의 실험모델은 매우 중요한 역할을 하고 있다^{2,9)}. 본 연구는 환경호르몬의 일종인 Bisphenol A에 대한 인삼추출물의 방어 작용을 조사하기 위하여 생쥐로부터 순수분리 배양한 골모세포를 재료로 Bisphenol A의 세포독성 작용을 조사하고 동시에 Bisphenol A의 독성작용에 대한 인삼추출물의 방어효과를 조사하였다.

재료 및 방법

1. 재료

본 실험에 사용한 동물은 원광대학교 동물사육실에서 순수분리 사육중인 건강 상태가 양호한 ICR 계통의 생쥐를 사용하였다.

2. 방법

1) 약재 추출

한약재와 증류수를 환저 플라스크에 넣고 냉각기를 부착하여 2시간 동안 전열기로 전탕한 후 3,000rpm에서 20분간 원심분리하고 진공 농축기로 감압 농축한 후 동결건조기에서 24시간 동안 동결 건조하여 분말 시료를 얻었다.

2) 시약 제조

본 실험에 사용한 Bisphenol A(Sigma)를 각각 2 μ M, 4 μ M, 6 μ M 및 8 μ M의 저장액을 만들어 냉암소에 저장한 다음 실험 당일 필요한 양을 직접 배양액에 첨가하여 사용하였다.

3) 세포 배양

Michikawa 등⁹⁾의 변형된 방법에 따라 생쥐의 골편으로부터 효소해리 분리법에 의하여 순수 분리하였다. 골모세포는 혈청이 포함된 배양액에 1×10^6 cells/well의 밀도로 산정하여 96-multiwell에 넣어 분주하였다. 분주된 세포는 CO₂정온기에서 5일 동안 배양하였으며 배양액은 3일마다 교환하여 주었다. 배양이 완료된 세포는 약재를 처리하거나 처리하지 않은 배양액에서 배양한 다음 약재가 포함되어 있지 않은 배양액을 대조군으로 하여 비교 조사하였다.

4) 환경호르몬의 처리

일정시간 동안 배양한 골모세포를 12시간 동안 2 ~ 8 μ M 농도의 Bisphenol A가 포함된 배양액에서 처리한 후 Bisphenol A가 세포 생존율에 미치는 영향을 조사하였다.

5) 약재의 처리

일정시간 배양한 골모세포를 2시간 동안 Ginseng Radix에

처리한 다음 6 μ M Bisphenol A가 포함된 배양액에서 12시간 동안 처리한 후 약재가 Bisphenol A에 미치는 영향을 조사하였다.

6) 세포 생존율 조사

2~8 μ M의 Bisphenol A를 배양 골모세포에 처리한 후 Bisphenol A가 골모세포에 미치는 독성효과와 이에 대한 Ginseng Radix의 효과를 XTT분석법에 의하여 조사하였다.

7) DNA 합성을 측정

시약이나 약재를 처리한 골모세포를 PBS로 3회 세척 후 3H thymidine이 10uCi/ml로 포함된 배양액으로 교환한 다음 1시간 동안 처리하였다. 처리 후 DNA 합성을 억제한 다음 Ca²⁺나 Mg²⁺가 없는 PBS로 세척하였다. 세척 후 Whatman GF/C glass filter paper로 수확한 다음 scintillation에서 측정하였다.

8) 단백질 합성 측정

단백질 정량은 일정시간 동안 배양한 세포를 PBS로 3회 세척 후 0.1M NaOH로 1시간 동안 처리한 다음 세포를 용해하여 540nm에서 분광광도계로 측정하였다. 표준단백질로는 일정농도의 bovine serum albumin(BSA, Sigma)을 사용하였다.

9) 통계 처리

본 실험의 결과에 대한 유의성은 ANOVA에 의하였으며, 각 군간에 대한 차이는 Student's t - test로 검정하였으며 p값이 0.05 이하인 것만 유의한 것으로 하였다.

결과

1. 환경호르몬의 독성효과

1) 농도에 따른 영향

Bisphenol A의 독성효과를 조사하기 위하여 Bisphenol A가 2~8 μ M까지 포함된 각각의 배양액에서 골모세포를 12시간 동안 배양 후 Bisphenol A가 골모세포에 미치는 세포 생존율을 대조군에 비교하여 본 결과 2 μ M Bisphenol A 처리에서는 82.6%로 나타났으며 4 μ M에서는 69.4%로 나타났다. 또한 6 μ M과 8 μ M에서는 각각 47.8%(p<0.05)와 23.6%(p<0.01)로 각각 나타났다(Fig. 1).

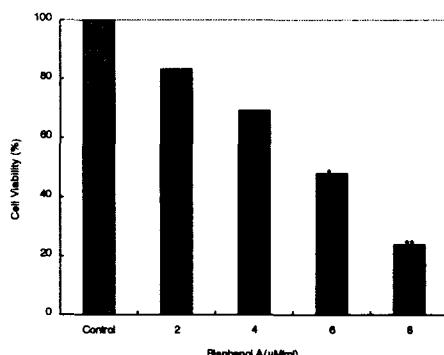


Fig. 1. Dose-response relationship of Bisphenol A in cultured osteoblasts of mouse. Cytotoxicity was measured by XTT assay. The results indicate the mean \pm SEM(n=6). *p<0.05; **p<0.01

2) 시간에 따른 영향

처리시간에 따른 Bisphenol A의 독성효과를 조사하기 위하여 6 μ M Bisphenol A의 농도에서 골모세포를 3 ~ 24시간 동안

배양 후 Bisphenol A가 골모세포에 미치는 세포생존율을 대조군과 비교 조사한 결과 3시간 처리군에서는 세포생존율이 88.6%로 나타났으며 6시간 처리에서는 72.6%, 그리고 12시간과 24시간 처리군에서는 각각 51.7%($p<0.05$)와 36.2%($p<0.01$)로 나타나 시간이 지남수록 Bisphenol A의 세포 독성효과가 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 2).

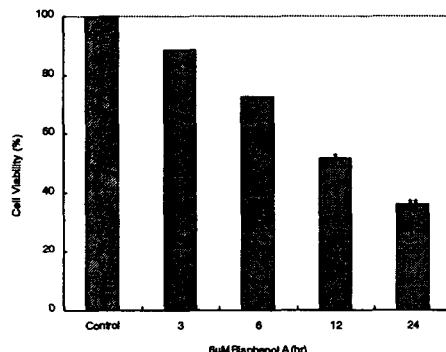


Fig. 2. Time-response relationship of Bisphenol A in cultured osteoblasts of mouse. Cytotoxicity was measured by XTT assay. The results indicate the mean \pm SEM($n=6$). * $p<0.05$; ** $p<0.01$

2. 환경호르몬에 대한 GR의 영향

1) 세포 생존율에 미치는 영향

Bisphenol A의 독성효과에 대한 GR의 방어효과를 규명하기 위하여 Bisphenol A가 처리되기 2시간 전 GR이 포함된 배양액에서 골모세포를 처리하고 세포생존율에 미치는 영향을 조사하였다. Bisphenol A에 노출시키기 2시간 전에 25 ~ 100 μ g/ml의 농도로 GR이 각각 포함된 배양액에서 골모세포를 처리한 후 여러 농도의 Bisphenol A에 6시간동안 노출시키고 이의 영향을 세포 생존율 측면에서 조사하였다. Bisphenol A만을 처리한 경우 세포의 생존율은 32.6%로 나타났고, 25 μ M GR처리군에서는 45.3%로 나타났으며 50mg/ml와 100 μ g/ml GR처리군에서는 세포 생존율이 각각 78.5%와 86.3%($P<0.05$)로 나타났다(Fig. 3).

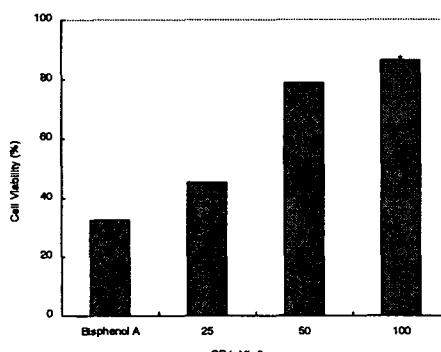


Fig. 3. Dose-response relationship of Ginseng Radix(GR) for its osteoprotective effect on Bisphenol A by DNA synthesis. The results indicate the mean \pm SEM($n=6$). * $p<0.05$

2) 단백질 합성에 미치는 영향

Bisphenol A의 독성효과에 대한 GR의 방어효과를 규명하기 위하여 골모세포를 Bisphenol A에 6시간 동안 노출시키기

2시간 전에 20 ~ 60 μ g/ml GR이 각각 포함된 배양액에서 골모세포를 처리한 후 이의 영향을 단백질 합성을 측면에서 조사하였다. Bisphenol A만을 처리한 경우 단백질 합성을 42.9%로 나타난 것에 비하여 20 μ M GR의 처리에서는 62.7%, 40 μ g/ml와 60 μ g/ml GR처리군에서는 세포의 단백질 합성을 각각 82.5%($p<0.05$)와 92.4%($P<0.01$)로 나타났다(Fig. 4).

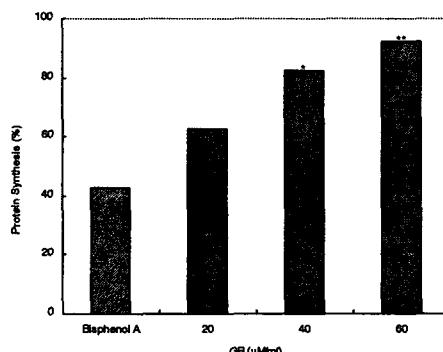


Fig. 4. Dose-response relationship of Ginseng Radix(GR) for its osteoprotective effect on Bisphenol A by protein synthesis. The results indicate the mean \pm SEM($n=6$). * $p<0.05$; ** $p<0.01$

고 칠

골모세포는 골의 형성에 관여함으로서 골다공증과 밀접한 관련이 있기 때문에 골절이나 골다공증의 병리적 현상이나 이에 대한 기전규명에 매우 중요한 위치를 차지하고 있다^{13,7}. 근래에 세포 배양기술이 널리 보급되면서 직접 배양된 골모세포를 이용하여 골절이나 골다공증과 같은 질환의 병인과 이의 치료적 접근을 위한 연구가 활발히 이루어지고 있다^{9,11}. 따라서 본 연구에서는 환경호르몬의 일종인 Bisphenol A가 배양 골모세포에 미치는 영향을 조사하기 위하여 2~8 μ M농도의 Bisphenol A가 각각 포함된 배양액에서 6시간 동안 배양한 다음 이에 대한 영향을 세포 생존율의 측면에서 조사한 결과, Bisphenol A는 골모세포에 처리한 농도에 비례하여 세포의 생존율을 유의하게 감소시켰는데, 이 같은 결과는 Bisphenol A가 배양생쥐의 골모세포에 대하여 독성효과를 가지고 있음을 말해주는 것이라 하겠다. Borenfreund 등²은 XTT50값이나 NR50값이 100 μ M 이하이면 고독성 물질이라 하였는데, 본 실험결과 Bisphenol A의 XTT50값은 6 μ M로 나타나 Bisphenol A가 고 독성을질임이 판명되었다. Bisphenol A의 세포독성은 Bisphenol A가 세포의 분화를 조절하는 이차 전달자와 결합하는 수용체의 결합부위를 봉쇄함으로써 세포의 성장이나 분화를 방해함으로써 나타났을 것으로 사료 된다^{3,14}. 한편, Bisphenol A의 독성에 대한 한약추출물의 영향을 세포의 DNA 합성측면에서 조사하기 위하여 배양중인 골모세포를 Bisphenol A에 처리하기 전에 여러 농도의 GR이 각각 포함된 배양액에서 먼저 처리한 다음 이의 영향을 조사한 결과, GR을 전처리한 경우 Bisphenol A만을 처리한 경우에 비하여 모두 세포의 DNA 합성을 증가시켰는데 이 결과는 GR가 Bisphenol A의 독성작용에 대한 방어효과를 가지고 있다는 것을 제시하고 있다. GR의 방어효과는 CR가 Bisphenol A의 세포

독성으로 인한 DNA의 손상을 직접 방어하였거나¹³⁾ GR이 Bisphenol A가 이차전달자의 수용체와 결합하는 것을 방해함으로써 나타났을 가능성이 있다¹⁴⁾. 이 두 가지 기전 중 후자의 기전을 추정할 수 있는 근거는 강력한 환경호르몬의 일종인 다이옥신이 마치 인체 내에서 방출된 호르몬처럼 작용하여 아릴하이드로카본 수용체와 결합함으로써 세포의 발생이나 분화를 억제한다는 사실이다^{3,14)}.

한편, Bisphenol A에 대한 GR추출물의 영향을 세포의 단백질 합성측면에서 조사하기 위하여 배양중인 골모세포를 Bisphenol A에 처리하기 전에 여러 농도의 GR추출물이 각각 포함된 배양액에서 미리 처리한 다음 이의 영향을 조사한 결과, GR추출물을 골 모세포에 전 처리한 경우 Bisphenol A만을 처리한 경우에 비하여 세포의 단백질합성이 처리한 농도에 비례하여 증가하였는데, 이 역시 GR추출물이 Bisphenol A의 독성방어에 효과적이었다는 것을 말해주고 있다.

본 실험에서와 같이 Bisphenol A가 단백질합성을 감소시킨 것은 Bisphenol A가 대부분의 환경호르몬처럼 단백질 수용체와 결합하여 단백질 수용체 간의 상호작용을 방어하였거나¹⁾, 단백질합성이 관여하는 효소에 대한 손상을 억제함으로써 나타난 결과로 생각된다¹⁴⁾. 그러나 이에 대한 더욱 자세한 기전을 밝히기 위해서는 분자적 수준에서의 연구는 물론 생리나 생화학적 같은 종합적인 측면에서의 연구가 더 이루어져야 할 것으로 생각된다.

결 론

Ginseng Radix(GR)가 Bisphenol A에 의하여 손상된 골모세포에 미치는 영향을 조사하기 위하여, 먼저 여러 농도의 Bisphenol A가 각각 포함된 배양액에서 골 모세포를 12시간 동안 배양한 후 Bisphenol A의 세포독성효과를 규명한 뒤, 6μM의 Bisphenol A를 12시간 동안 처리하기 전 여려 농도의 GR이 각각 포함된 배양액에서 2시간 동안 먼저 처리한 다음 GR이, Bisphenol A에 의한 DNA 합성 및 단백질합성 억제 작용에 어떤 영향을 미치는지를 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

Bisphenol A는 처리 시간과 농도에 비례하여 골모세포의 생존율을 유의하게 감소시켰다. 골모세포에 6μM Bisphenol A를 12시간 동안 처리하기 전 GR을 전처리한 결과 Bisphenol A만을 처리한 경우에 비하여 DNA 합성을 유의하게 증가시켰다. 골모세포에 6μM Bisphenol A를 12시간 동안 처리하기 전 GR을 전처리한 결과 Bisphenol A만을 처리한 경우에 비하여 단백질합성을 유의하게 증가 시켰다.

이상의 결과로부터, 환경호르몬의 일종인 Bisphenol A는 배양 골 모세포에 독성효과를 나타냈으며 GR과 같은 한약추출물이 Bisphenol A의 골 독성 작용을 방어하는데 효과적이라는 것을 알게 되었다.

감사의 글

이 논문은 2000년도 원광대학교의 교비지원에 의해서 연구됨.

참고문헌

- Berghard A, Gradin K, Poniatz I, Whitelaw M, Poellinger L : Cross-coupling of signal transduction pathways: the dioxin receptor mediates induction of cytochrome p450IA1 expression via a protein kinase C mechanism. *Mol. Biol.* 13:677-689, 1993.
- Borenfreund E, Babichi H, Mortin Alguacil N : Comparisons of two *in vitro* cytotoxicity assays-the neutral regand tetrazolium, MTT test. *Toxic* 2:1-6, 1988.
- Graf E, Mahoney JR, Bryant RG, Eaton JW: Iron-catalyzed hydroxyl radical formation Stringent requirement for free iron coordination site. *J Biol chem.* 259:3620-3624,1984.
- Guillette LJ : Endocrine disrupting environmental contaminants and developmental abnormalities in embryos. *Human ecological Risk Assess* 1:25-36, 1995.
- Jackson DR, Apfell L, Werrbach-Perez K, Perez-Polo JR : Role of nerve growth factor in oxidant-antioxiode resistance. *J Neurosci Res.* 25:360-368, 1990.
- Kharrazi M et al : Reproductive effect of dibromochloropropane. *Isreal J Mediacl Sci* 16:403-406, 1980.
- Kurebe M, Niizato T, Sanda M : Preventive effect of fosfomycin on the renal toxicity of cisplatin. *Jpn J Antibiot.* 38:62-68, 1985.
- Mattson MP, Zhang Y, Bose S : Growth factors prevent mitochondrial dysfunction, loss of calcium homeostasis and cell injury, but not ATP depletion in hippocampal neurons. *Exp Neurol.* 121:1-13, 1993.
- Michikawa M, Lim KT, McLarnon JG, Kim SU : Oxygen radical-induced neurotoxicity in spinal cord neuron cultures. *J Neurosci Res.* 37:62-70,1994.
- Nakata N, Kato H, Kogure K : Protective effects of basic fibroblast growth factor against hippocampal neuronal damage following cerebral ischemia in the gerbil. *Brain Res.* 605:354-356, 1993.
- Park ST, Kim SU : Study of neurotrophic factor for spinal motor neurons. *Kor J Anat* 28:381-389, 1995.
- Ravi R, Somani SM, Rybak LP : Mechanism of cisplatin ototoxicity : Antioxidant system. *Pharmacology & Toxicology*. 76:386-394, 1995.
- Rothstein JD, Tsai G, Kunel RW, Clawson S, Cornblath DR, Drachman DB, Pestronk A, Stauch BL, Coyle JT : Abnormal excitatory amino acid metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol.* 28:18-25, 1990.
- Sharpe R. M., Fisher J. S., Millar M. M. , Jobling S., Sumpter J. P. : Gestational and lactational exposure of rats to xenoestrogens results in reduced testicular size and sperm production. *Environmental Health Perspectives*. 103: 1136- 1143, 1995.

15. Walsh TJ, Clack AW, Parhad IM, Green WR : Neurotoxic effects of cisplatin therapy. Arch Neurol 39:719-720, 1982.
16. 김인환, 황우익 : 인삼의 polyacetylene 성분이 간암(HePG₂) 및 L929 세포증식에 미치는 영향 연구. 고려의대논문집. 30:35-51, 1993.
17. 김록호 : 내분비교란물질(환경호르몬)과 인류의 미래. 대한 의사협회지 41:1039-1047, 1998.
18. 정노팔, 전혜경, 김세창 : 생쥐의 대식세포 종양치료 활성과 항암효과에 미치는 인삼 saponin 분획물과 cyclophosphamide의 영향. 고려의대논문집. 24:459-467, 1991.