獨活寄生湯加味方이 파골세포 분화 억제와 조골세포 활성화에 미치는 영향

대전대학교 한의과대학 부인과 교실
제윤모, 유동열

ABSTRACT

Effects of *Dokhwalgisaengtang-gami* Water Extract on Osteoclast Differentiation and Osteoblast Function in RANKL-induced RAW 264.7 Cell

Yun-Mo Je, Dong-Youl Yoo

Dept. of Oriental Gynecology, College of Oriental Medicine, Dae-Jeon University

Objectives: This study was performed to evaluate the effect of *Dokhwalgisaengtang-gami* water extract(DGG) on osteoporosis.

Methods: The osteoclastogenesis and gene expression were determined in RANKL-stimulated RAW 264.7 cell. And osteoblastogenesis was also determined in rat calvarial cell.

Results: The results were summarized as follows.

1. DGG decreased the number of TRAP positive cell in RANKL-stimulated RAW 264.7 cell.
2. DGG inhibited TRAP activity in RANKL-stimulated RAW 264.7 cell.
3. DGG decreased the expression of NAFTc1, MITF in RANKL-stimulated RAW 264.7 cell.
4. DGG increased the expression of iNOS, COX-2, IL-6 in RANKL-stimulated RAW 264.7 cell.
5. DGG decreased the expression of cathepsin K, MMP-9, TRAP in RANKL-stimulated RAW 264.7 cell.
6. DGG increased cell proliferation of rat calvarial cell.
7. DGG increased ALP activity in rat calvarial cell
8. DGG increased bone matrix protein, collagen synthesis and nodule formation in rat calvarial cell.

Conclusions: It is concluded that DGG might decrease the bone resorption resulted from decrease of osteoclast differentiation and it's related gene expression. And DGG might increase the bone formation resulted from increase of osteoblast function.

Key Words: *Dokhwalgisaengtang-gami*(DGG), Osteoporosis, Osteoclastogenesis, Osteoblastogenesis, Osteoclast, Osteoblast

I. 서 론

골다공증은 여성호르몬의 부족, 당뇨, 노화, 운동 부족 등의 경우 많이 발생하며, 골밀도가 감소되어 나타나는 것으로 알려져 있다^{1,2)}. 특히 폐경으로 인한 골다공증은 파골세포에 의한 골 흡수가 과도하여 골 항상성이 깨어질 때 발생한다³⁾. 파골세포는 조골세포가 분비하는 Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B Ligand(RANKL)에 의해 분화되어 활성화된다. 활성화된 파골세포는 골 기질을 흡수하여 뼈의 골밀도를 감소시킨다⁴⁾. 따라서 조골세포의 기능을 활성화시키거나 파골세포의 분화를 억제하는 것은 골다공증을 치료 또는 예방하는데 매우 중요한 수단이 될 것이다.

골다공증은 한의학적으로 ‘骨痿’, ‘骨痺’, ‘痺證’, ‘虛勞’ 등의 범위에 속한다고 할 수 있으며⁵⁾, ‘骨枯’, ‘骨極’이라는 병명 과도 유사하다⁶⁾. 《黃帝內經 素問》⁷⁾에 근거하여 腎虛로 보고 있으며 증상에 근거하여 腎虛, 腎陰虛, 腎陽虛, 肝腎虧虛, 脾腎陽虛, 氣滯血瘀 등으로 분류하고 변증에 따라 補腎陰, 補腎陽, 補肝腎, 健脾益氣, 理氣活血하는 처방이 활용되고 있다⁸⁾.

獨活寄生湯은 《備急千金要方》에 최초로 기록된 이래 補肝腎, 強筋骨, 祛風濕의 효능이 있어 肝腎虛弱, 筋攣骨痛, 脚膝偏枯, 冷痺 등에 활용되어 왔으며⁹⁻¹¹⁾, 《天眞處方解說》에서는 風·寒·濕邪가 침습하여 발병한 동통, 마비, 중창 등에 효과가 있다고 하였다¹²⁾.

실험적 연구로 진통작용 및 신경재생 효과¹³⁾, melanin 생성 억제 효과¹⁴⁾, 항 동

맥경화 효과¹⁵⁾ 등이 있음이 보고되었고, 난소적출 rat를 이용한 실험을 통해 노화 및 폐경기후 여성의 estrogen 결핍에 의한 골다공증의 예방 및 치료에 응용될 수 있음이 보고되었다¹⁶⁻¹⁸⁾.

이에 저자는 補肝腎, 強筋骨의 효능이 있으며, 상기와 같은 연구 보고들로 골다공증에 유효할 것으로 추측되는 獨活寄生湯에 항염, 항산화 작용이 있는 것으로 알려진 魚腥草¹⁹⁻²¹⁾를 가미하여 본 연구를 시행하였다.

연구방법으로는 파골세포 분화와 유전자 발현에 미치는 영향을 평가하기 위하여 RANKL 유도 RAW 264.7 세포에서의 Tartarate-Resistant Acid Phosphatase (TRAP) 활성도를 측정하고, 관련 유전자인 Nuclear Factor of Activated T-cells, cytoplasmic 1(NFATc1), Microphthalmia-associated Transcription Factor(MITF), inducible Nitric Oxide Synthases(iNOS), Cyclooxygenase-2(COX-2), Interleukin 6 (IL-6), Tumor Necrosis Factor-alpha(TNFα), cathepsin K, Matrix Metalloproteinase 9 (MMP-9), TRAP 등의 발현을 측정하였다. 또한 조골세포의 기능에 미치는 영향을 알아보기 위하여 rat의 두개골세포에서 조골세포의 분열능, ALP(alkaline phosphatase) 활성, 골 기질 단백질 합성, collagen 합성 및 nodule 생성에 미치는 영향을 평가하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 실 험

1. 재 료

1) 약 물

獨活寄生湯加味方은 《方藥合編》²²⁾을 근거로 하여 獨活寄生湯 2첩 분량에 魚腥草 10 g 을 가미하여 구성하였다(Table 1).

본 실험에 사용한 약물은 대전대학교 둔산한방병원에서 구입한 것을 정선하여 사용하였다.

Table 1. Prescription of *Dokhwalgisaengtang-gami*

Herbal name	Scientific name	Amount (g)
獨活	Angelicae pubescentis Radix	5.6
白芍藥	Paeoniae Radix Alba	5.6
當歸	Angelicae gigantis Radix	5.6
桑寄生	Taxilli Ramulus	5.6
熟地黃	Rehmanniae Radix Preparata	4
川芎	Cnidii Rhizoma	4
人蔘	Ginseng Radix	4
白茯苓	Poria Cocos	4
牛膝	Achyranthis Bidentatae Radix	4
杜仲	Eucommia ulmoides OLIVER	4
秦艽	Gentianae Macrophyllae Radix	4
細辛	Asari herba cum Radice	4
防風	Ledebouriellae Radix	4
肉桂	Cinnamomi Cortex	4
甘草	Glycyrrhizae Radix	2.4
生薑	Zingiberis Rhizoma Crudus	4
魚腥草	Houttuyniae Herba	10
Total		78.8

2) 약재 추출 및 검액 제조

獨活寄生湯加味方 78.8 g을 분말로 만들어 플라스크에 넣은 후, 증류수 1 ℓ를 가하고 6시간 이상 가열하여 환류 추출하였다. 여과지를 이용하여 여과한 다음,

여액을 evaporator를 이용하여 감압 농축한 다음, 냉동 건조하여 실험 시까지 냉동보관 하였다. 실험 시에는 獨活寄生湯加味方 추출물(*Dokhwalgisaengtang-gami* extract, DGG) 9.5 g(수득율 12%)을 DMSO를 이용하여 배지에 녹인 후, pore size 0.45 μm의 여과지를 통과시킨 후 사용하였다.

3) 동 물

동물은 체중 약 250 g 정도의 출산예정 2일전인 임신한 Sprague-Dawley(SD)系 rat를 대한바이오링크에서 공급받아 실험실에서 출산 때까지 사육하였다. 실험에 사용하는 조골세포를 얻기 위하여 생후 1일 된 rat의 두개골을 적출하고 세포를 분리하여 사용하였다.

4) 세 포

실험에 사용된 파골세포 전구세포는 RAW 264.7 세포에 RANKL을 처리하여 유도된 세포 모델을 사용하였다. 사용된 RAW 264.7 세포는 한국세포주은행에서 구입하였다.

2. 방 법

1) RAW 264.7 세포 배양 및 파골세포 형성 측정

(1) RAW 264.7 세포 배양

RAW 264.7 세포는 DMEM10% FBS/PC-SM 배지를 이용하여 CO₂ 세포 배양기에서 배양하였으며, 세포 수는 5×10³ cells/well로 96 well plate를 이용하여 배양하였다. 24시간 배양 후 배양액을 버린 후, 10% FBS, 50 ng/ml RANKL, 1 ng/ml TGFβ가 첨가된 α-MEM 으로 교환하여 세포를 배양했다. 배양액에 여러 농도의 DGG를 첨가해 주었다. 2일에 한번 씩 동일한 배지로 교환해 주면서 6

일간 배양하였다.

(2) 파골세포 형성 측정

RANKL로 RAW 264.7 세포를 파골세포로 유도한 후 TRAP를 염색하여 TRAP (+) 세포를 확인하였다. 분화시킨 세포를 PBS로 세포를 2회 세척하고, 3.7% formaldehyde-citrate-acetone 용액으로 10분 고정시키고 증류수로 2회 세척하였다. 2% TRAP fast garnet GBC base 용액과 NaNO_3 용액을 같은 비율로 섞어 만든 용액과 5% naphtha AS-BI phosphoric acid, 4% acetic acid, 2% tartaric acid를 포함한 용액을 고정시킨 세포에 처리하고 상온에 30분 이상 방치하였다. 광학현미경으로 관찰하여 핵이 3개 이상인 TRAP (+) 다핵세포를 계수하여 파골세포의 생성지표로 하였다.

2) 파골세포 유전자 발현 측정

(1) 총 RNA 분리

Rat에서 취한 조직을 PBS를 넣고 균질화한 다음, 1 ml TRIzol reagent를 처리하여 총 RNA를 분리하였다. 분리한 RNA 용액에 200 μl 의 chloroform : isoamylalcohol (24:1)을 넣고 강하게 섞은 후 14,000 rpm으로 원심 분리하여 상층액 500 μl 를 분리하였다. 0.5 ml isopropyl alcohol을 가하여 영하 20°C에서 하룻밤 RNA를 침전시킨 후 1,400 rpm으로 20분간 원심 분리하였다. 상등액을 버린 후 70% 에탄올로 세척하고 자연 건조시켰다. RNase free water에서 RNA를 녹인 후 RNase-free DNase를 첨가하고 -70

°C에서 저장하였다.

(2) cDNA 제조

대조군 및 실험군에서 각각 분리한 total RNA 액 1 μl 에 (1 μg RNA 함유)에 oligo dT(농도 100 pmol) 1 μl , RNase free water 3 μl 을 넣은 후 조심스럽게 혼합한 다음, 65°C에서 10분간 incubation하였다. Primer가 annealing 하도록 4°C에서 약 5분간 방치한 다음, Reverse transcriptase buffer, dNTP(각 2.5 mM), RNase inhibitor, DTT(100 nM), Reverse transcriptase (M-MLV 200 U/ μl)을 첨가한 후 조심스럽게 혼합하였다. 이후 42°C에서 90분간 incubation 한 후, 95°C에서 5분간 처리한 후 사용하였다.

(3) RT-PCR

oligo(dT) primer, reaction buffer(50 mM Tris-HCl, 75 mM KCl, 3 mM MgCl_2 , 10 mM DTT, pH 8.3), 1 mM dNTP과 200 unit M-MLV-RT를 분리한 RNA에 처리하여 역전사를 수행함으로써 cDNA를 합성하였다. PCR은 total volume 25 μl 에 10 $\times$ PCR buffer, 0.2 mM dNTPs, 2 pmole의 sense 및 antisense primer를 넣은 혼합액에 cDNA와 1.25 unit의 Taq polymerase를 넣어 PCR을 시행하였다. 증폭된 PCR 산물을 2% agarose gel에 전기 영동하였다. 전기영동 결과 나온 band를 density 분석 프로그램인 Gel-Pro analyzer 3.1을 이용하여 구했다. RT PCR에 사용한 primer는 아래와 같다(Table 2).

Table 2. Primers

Target gene	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
NFATc1	5'-GGGTCAGTGTGACCGAAGAT-3'	5'-GGAAGTCAGAAGTGGGTGGA-3'
MITF	5'-GGAACAGCAACGAGCTAAGG-3'	5'-TGATGATCCGATTCCACCAGA-3'
iNOS	5'-CCTTGTTTCAGCTACGCCTTC-3'	5'-AAGGCCAAACACAGCATACC-3'
COX-2	5'-AGAAGGAAATGGCTGCAGAA-3'	5'-GCTCGGCTTCCAGTATTGAG-3'
IL-6	5'-TCCAGTTGCCTTCTTGGGAC-3'	5'-GTGTAATTAAGCCTCCGACTTG-3'
TNF α	5'-ACGGCATGGATCTCAAAGAC-3'	5'-CGGACTCCGCAAAGTCTAAG-3'
Cathepsin K	5'-AGGCGGCTATATGACCACTG-3'	5'-CCGAGCCAAGAGAGCATATC-3'
MMP-9	5'-CGTCGTGATCCCCACTTACT-3'	5'-AGAGTACTGCTTGCCAGGA-3'
TRAP	5'-ACACAGTGATGCTGTGTGGCAA CTC-3'	5'-CCAGAGGCTTCCACATATATGAT GG-3'

(4) Real time RT-PCR

각각의 optical tube에 3배의 SybrGreen Mix 2.5 μ l, 위에서 합성한 cDNA 1 μ l, 10 pmol/ μ l primer pair mix 1 μ l, 각각 2.5 mM의 dNTP 2 μ l, 10 $\times$ Tag polymerase buffer 2.5 μ l, Tag Polymerase 0.3 μ l와 14.7 μ l H₂O를 넣고, 95 $^{\circ}$ C 5min 1cycle, 95 $^{\circ}$ C 30sec, 45 $^{\circ}$ C 30sec, 72 $^{\circ}$ C 60sec 40cycles, 95 $^{\circ}$ C 20min 1cycle로 증폭시켰다. Primer는 RT-PCR에 사용한 것을 이용하였다. PCR을 마친 후 tube를 꺼낸 다음, 반응액 5 μ l를 사용하여 3% agarose gel에서 PCR specificity를 측정하고, ABI PRISM $^{\circ}$ 7000 Sequence Detection System을 사용하여 real time PCR 결과를 분석하였다.

3) 조골세포 기능 측정

(1) Calvarial cell의 분리 및 배양

생후 1일된 쥐의 후두부를 절개하고 calvariae를 적출하여 HBSS로 세척했다. calvariae를 2 ml의 collagenase, trypsin, 0.5 mM EDTA 용액에 넣어 37 $^{\circ}$ C에서 반응시켰다. 상등액을 취하여 1500 rpm에서 원심 분리하여 침전된 calvariae cell을 얻었다. PBS에 재현탁하여 1500 rpm에서 원심 분리하여 washing한 후, 이를 DMEM 배지에 넣어 현탁한 후 37 $^{\circ}$ C 5%

CO₂ incubator에서 배양하였다. 상등액을 제거하고 남은 calvariae에 다시 2 ml의 효소를 넣고, 위 반응을 수회 반복하였다. 세포의 배지는 3일에 한 번씩 교환하였다. 배양한 세포는 2주 후 trypsin 처리하여 세포 수를 측정한 후 이후 실험에 이용하였다.

(2) 조골세포의 분열능 측정

Subculture를 통하여 두개골세포가 1~3 $\times 10^5$ cells/well이 되도록 24 well plate에 seeding하였다. 세포가 plate에 부착하는 것을 확인하고 24시간 후 DGG를 첨가하고 8일간 배양하였으며 배지는 2일마다 교환해 주었다. 8일째에 collagenase, trypsin, 0.5 mM EDTA를 가하여 세포를 culture plate로부터 분리하였으며, Isoton-II solution을 이용하여 20배 희석한 후 세포계수기(Sysmax F-820)로 세포의 수를 측정하였다.

(3) Alkaline phosphatase 활성 측정

ALP 활성은 ALP-K Kit를 이용하여 측정하였다. cell을 배양한 plate를 냉각한 PBS로 세척한 후 cell을 scraper로 긁어내어 5 mM DTT가 함유된 PBS에 현탁하였다. 이 현탁액을 냉각상태에서 ultrasonicator로 sonication하였다. 이 현탁액을 취하여

기질액과 37℃에서 15분간 반응시킨 후 발색액을 넣어주었다. 10분 후 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(4) Bone matrix protein 합성 측정

Cell을 배양한 plate를 PBS로 세척한 후 cell scraper를 이용해 세포를 긁어내어 5 mM DTT가 함유된 PBS에 현탁하였다. 이 현탁액을 냉각상태에서 ultrasonicator로 sonication 하였다. 현탁액을 취하여 뷰렛트 시약과 37℃에서 10분간 반응시킨 후 550 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(5) Bone collagen 합성 측정

Cell을 배양한 plate를 PBS로 세척한 후 cell scraper를 이용해 세포를 긁어내었다. 5,000 rpm에서 15분간 원심 분리한 후 PBS로 현탁했다. 0.3% collagenase를 넣은 후 37℃에서 2시간동안 배양하였다. 11.14 N HCl을 첨가한 후 100℃에서 24 시간동안 가수분해한 다음 11.14 N HCl을 넣었다. Isopropanol을 넣은 다음 oxidant solution을 첨가한 후 상온에서 4분 동안 두었다. 이후 Ehrlich's reagent solution을 첨가한 다음 60℃에서 25분간 heating 한 후 2-3분간 cooling 했다. 17시간 후에 550 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(6) Nodule 생성 측정

세포를 21일간 배양한 후 냉각한 PBS로 washing하였다. Neutral buffered formalin을 가하고, 15분간 고정시킨 후, PBS로 washing하였다. Von Kossa's reagent를 가하여 상온에서 30분간 반응시켰다. 다시 washing 한 후 toluidine blue solution을 가하여 수 초간 반응시키고 PBS로 세척한 다음, 공기 중에서 건조한 후 형성된 nodule의 면적을 측정하였다.

3. 통계 분석

검증은 Student's t-test를 이용하였다. $p < 0.05$ 인 경우 유의성이 있다고 판정하였다.

III. 결 과

1. 파골세포 분화 및 유전자 발현에 미치는 영향

1) RAW 264.7 세포 생존율

Dokhwalgisaengtang-gami(DGG)가 세포상해를 통해 분화를 억제하는지를 평가하기 위하여 미분화된 Raw 264.7 세포에 추출물을 첨가한 후, 3일간 배양하여 세포 생존율을 MTT 방법으로 평가하였다. 실험 결과 DGG는 50 $\mu\text{g/ml}$, 75 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 세포 생존율에 영향을 미치지 않았다(Fig. 1).

Fig. 1. Effects of DGG on Cell Viability of Raw 264.7 Cells.

NC : vehicle

50 $\mu\text{g/ml}$: RANKL (50 $\mu\text{g/ml}$) + 50 $\mu\text{g/ml}$ of DGG

75 $\mu\text{g/ml}$: RANKL (50 $\mu\text{g/ml}$) + 75 $\mu\text{g/ml}$ of DGG

100 $\mu\text{g/ml}$: RANKL (50 $\mu\text{g/ml}$) + 100 $\mu\text{g/ml}$ of DGG

Each bar represents Mean $\pm$ SD of 5 tests.

2) 파골세포 세포 형성

RAW 264.7 세포에 RANKL과 TGF β 를

첨가한 배지로 배양한 경우 다수의 TRAP (+) 다핵세포가 형성되는 것이 관찰되었다. 이 세포를 파골세포로 하여 DGG가 파골세포 생성에 미치는 영향을 평가한 결과 유의성 있게 감소하였다(Fig. 2).

Fig. 2. Effects of DGG on the TRAP(+) MNCs in RANKL Stimulated Osteoclast.
 0 µg/ml (Control) : RANKL (50 µg/ml)
 25 µg/ml(DGG25) : RANKL (50 µg/ml) + 25 µg/ml of DGG
 50 µg/ml(DGG50) : RANKL (50 µg/ml) + 50 µg/ml of DGG
 75 µg/ml(DGG75) : RANKL (50 µg/ml) + 75 µg/ml of DGG
 100 µg/ml(DGG100) : RANKL (50 µg/ml) + 100 µg/ml of DGG
 150 µg/ml(DGG150) : RANKL (50 µg/ml) + 150 µg/ml of DGG
 Each bar represents Mean±SD of 5 tests.
 ## : $p<0.01$ vs Control

3) TRAP 활성화

파골전구세포를 RANKL로 자극하여 분화시킨 파골세포는 골 흡수를 유발한

다. DGG를 처리한 파골세포로부터 1일 후 TRAP 활성을 측정한 결과 유의성 있게 억제하였으며($p<0.05$), 4일 후 TRAP 활성을 측정한 결과 유의성 있게 억제하였다($p<0.01$)(Table 3).

Table 3. Effects of DGG on the TRAP Expression in RANKL Stimulated Osteoclast

TRAP	1day	4day
Control	100	183.5±4.5**
DGG50	80.8±4.2*	153.9±3.1##
DGG75	41.5±1.1**	75.7±1.6##
DGG100	28.7±1.3**	38.4±1.2##

Control : RANKL (50 µg/ml)

DGG50 : RANKL (50 µg/ml) + 50 µg/ml of DGG

DGG75 : RANKL (50 µg/ml) + 75 µg/ml of DGG

DGG100 : RANKL (50 µg/ml) + 100 µg/ml of DGG

* : $p<0.05$ vs Control of 1st day

** : $p<0.01$ vs Control of 1st day

: $p<0.01$ vs Control of 4th day

4) NFATc1 발현

NFATc1는 파골세포의 분화를 촉진하는 신호전달 단백질로 파골세포의 분화를 조절하는 중요한 전사인자로 알려져 있다. 실험 결과 DGG는 RANKL 처리 파골세포 분화과정에서 증가하는 NFATc1의 발현을 유의성 있게 억제하였다($p<0.01$)(Fig. 3).

5) MITF 발현

MITF는 파골세포 분화시 증가하는 인자로 활성 증가시 파골세포의 분화가 촉진된다. 실험 결과 RANKL 처리 시 MITF 발현이 증가되었으며, DGG는 MITF 발현을 50 µg/ml, 75 µg/ml, 100 µg/ml 농도에서 모두 대조군에 비해 유의성 있게 억제하였다($p<0.01$)(Fig. 4).

Fig. 3. Effects of DGG on the Expression of NFATc1 in RANKL Stimulated Osteoclast. NC : vehicle

Control : RANKL (50 µg/ml)

DGG50 : RANKL (50 µg/ml) + 50 µg/ml of DGG

DGG75 : RANKL (50 µg/ml) + 75 µg/ml of DGG

DGG100 : RANKL (50 µg/ml) + 100 µg/ml of DGG

Each bar represents Mean±SD of 5 tests.

** : $p < 0.01$ vs NC

: $p < 0.01$ vs Control

Fig. 4. Effects of DGG on the Expression of MITF in RANKL Stimulated Osteoclast. NC : vehicle

Control : RANKL (50 µg/ml)

DGG50 : RANKL (50 µg/ml) + 50 µg/ml of DGG

DGG75 : RANKL (50 µg/ml) + 75 µg/ml of DGG

DGG100 : RANKL (50 µg/ml) + 100 µg/ml of DGG

Each bar represents Mean±SD of 5 tests.

** : $p < 0.01$ vs NC

: $p < 0.01$ vs Control

6) iNOS 발현

iNOS는 골 소실을 촉진한다고 알려져 있다.

실험 결과 RANKL 처리 파골세포는 전구세포에 비해 iNOS 발현이 증가되었으며, DGG 처리 시 iNOS 유전자 발현이 대조군에 비해 50 µg/ml 농도에서 유의성 있게 억제되었으며($p < 0.05$), 75 µg/ml, 100 µg/ml 농도에서도 모두 유의성 있게 억제되었다($p < 0.01$) (Fig. 5).

Fig. 5. Effects of DGG on the Expression of iNOS in RANKL Stimulated Osteoclast. NC : vehicle

Control : RANKL (50 µg/ml)

DGG50 : RANKL (50 µg/ml) + 50 µg/ml of DGG

DGG75 : RANKL (50 µg/ml) + 75 µg/ml of DGG

DGG100 : RANKL (50 µg/ml) + 100 µg/ml of DGG

Each bar represents Mean±SD of 5 tests.

** : $p < 0.01$ vs NC

: $p < 0.01$ vs Control

: $p < 0.05$ vs Control

7) COX-2 발현

RANKL은 Rac1을 통해서 COX-2 발현을 촉진하며, 이는 PGE₂ 발현 증가로 나타난다. COX-2 활성화 결과 생성된 PGE₂는 RANKL이 RANK에 결합하는 것을 방해하는 OPG(osteoprotegerin)가 조골세포로부터 유리하는 것을 억제한다. 따라서, PGE₂ 생성이 증가하면 파골

세포의 분화를 촉진할 수 있다. 실험 결과 RANKL에 의해 분화된 파골세포에서 COX-2 발현이 증가하였으며, DGG는 50 $\mu\text{g/ml}$ 와 75 $\mu\text{g/ml}$ 에서 대조군에 비해 유의성 있게 COX-2의 발현을 억제하였다($p<0.01$)(Fig. 6).

Fig. 6. Effects of DGG on the Expression of COX-2 in RANKL Stimulated Osteoclast. NC : vehicle

Control : RANKL (50 $\mu\text{g/ml}$)

DGG50 : RANKL (50 $\mu\text{g/ml}$) + 50 $\mu\text{g/ml}$ of DGG

DGG75 : RANKL (50 $\mu\text{g/ml}$) + 75 $\mu\text{g/ml}$ of DGG

DGG100 : RANKL (50 $\mu\text{g/ml}$) + 100 $\mu\text{g/ml}$ of DGG

Each bar represents Mean $\pm$ SD of 5 tests.

** : $p<0.01$ vs NC

: $p<0.01$ vs Control

8) IL-6 발현

IL-6의 발현 증가는 파골세포 분화를 촉진할 수 있다. 실험결과 DGG 처리 시 IL-6의 발현이 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서는 증가하였으며, 75 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서는 억제되었으나 유의성이 없었고, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서는 대조군에 비해 유의성 있게 억제하였다($p<0.05$)(Fig. 7).

Fig. 7. Effects of DGG on the Expression of IL-6 in RANKL Stimulated Osteoclast. NC : vehicle

Control : RANKL (50 $\mu\text{g/ml}$)

DGG50 : RANKL (50 $\mu\text{g/ml}$) + 50 $\mu\text{g/ml}$ of DGG

DGG75 : RANKL (50 $\mu\text{g/ml}$) + 75 $\mu\text{g/ml}$ of DGG

DGG100 : RANKL (50 $\mu\text{g/ml}$) + 100 $\mu\text{g/ml}$ of DGG

Each bar represents Mean $\pm$ SD of 5 tests.

** : $p<0.01$ vs NC

: $p<0.05$ vs Control

9) TNF α 발현

TNF α 는 파골세포 분화를 촉진하는 것으로 알려져 있다. 실험결과 RANKL 처리된 파골세포에서 TNF α 발현은 촉진되었으며, DGG는 50 $\mu\text{g/ml}$, 75 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 모두 TNF α 발현을 대조군에 비해 억제하지 못했다(Fig. 8)

10) Cathepsin K 발현

Cathepsin K는 RANKL이나 M-CSF 등을 처리하는 경우 발현되는 단백질로 MMP-9, TRAP 등과 같이 골의 흡수에 관여하고 있다. 실험결과 DGG는 cathepsin K 유전자 발현을 대조군에 비해 유의성 있게 억제하였다($p<0.01$)(Fig. 9).

Fig. 8. Effects of DGG on the Expression of TNF α in RANKL Stimulated Osteoclast.

NC : vehicle

Control : RANKL (50 μ g/ml)

DGG50 : RANKL (50 μ g/ml) + 50 μ g/ml of DGG

DGG75 : RANKL (50 μ g/ml) + 75 μ g/ml of DGG

DGG100 : RANKL (50 μ g/ml) + 100 μ g/ml of DGG

Each bar represents Mean $\pm$ SD of 5 tests.

** : $p < 0.01$ vs NC

: $p < 0.05$ vs Control

Fig. 9. Effects of DGG on the Expression of Cathepsin K.

NC : vehicle

Control : RANKL (50 μ g/ml)

DGG50 : RANKL (50 μ g/ml) + 50 μ g/ml of DGG

DGG75 : RANKL (50 μ g/ml) + 75 μ g/ml of DGG

DGG100 : RANKL (50 μ g/ml) + 100 μ g/ml of DGG

Each bar represents Mean $\pm$ SD of 5 tests.

** : $p < 0.01$ vs NC

: $p < 0.01$ vs Control

11) MMP-9 발현

파골세포에서 분비되는 MMP-9은 뼈의 기질물질인 collagen을 파괴하여 골흡수를 유발하는 단백질 파괴물질이다. 실험결과 DGG는 RANKL 처리 파골세포에서 증가한 MMP-9 발현을 대조군에 비해 유의성 있게 억제하였다($p < 0.01$) (Fig. 10).

Fig. 10. Effects of DGG on the Expression of MMP-9.

NC : vehicle

Control : RANKL (50 μ g/ml)

DGG50 : RANKL (50 μ g/ml) + 50 μ g/ml of DGG

DGG75 : RANKL (50 μ g/ml) + 75 μ g/ml of DGG

DGG100 : RANKL (50 μ g/ml) + 100 μ g/ml of DGG

Each bar represents Mean $\pm$ SD of 5 tests.

** : $p < 0.01$ vs NC

: $p < 0.01$ vs Control

12) TRAP 발현

TRAP(+) 세포들은 세포융합과정을 거쳐 다핵 파골세포로 분화하여 최종적으로 골 흡수 기능을 하게 된다. 실험결과, DGG는 분화한 파골세포에서 RANKL 처리로 증가된 TRAP 유전자 발현을 대조군에 비해 유의성 있게 억제하였다($p < 0.01$) (Fig. 11).

Fig. 11. Effects of DGG on the Expression of TRAP in Osteoclast.

NC : vehicle

Control : RANKL (50 µg/ml)

DGG50 : RANKL (50 µg/ml) + 50 µg/ml of DGG

DGG75 : RANKL (50 µg/ml) + 75 µg/ml of DGG

DGG100 : RANKL (50 µg/ml) + 100 µg/ml of DGG

Each bar represents Mean±SD of 5 tests.

** : $p < 0.01$ vs NC

: $p < 0.01$ vs Control

2. 조골세포 기능에 미치는 영향

1) 조골세포의 분열능

Rat 태자의 두개골로부터 분리한 조골세포를 8일간 배양한 결과 정상 대조군(NC)은 5.4×10^5 cells/well이었다. DGG 1 µg/ml를 처리한 경우에는 7.4×10^5 cells/well로 유의성 있게 ($p < 0.05$) 증가하였고, 5 µg/ml, 10 µg/ml의 DGG를 처리한 경우에도 각각 9.2×10^5 cells/well, 9.4×10^5 cells/well로 유의성 있게 증가하였다($p < 0.01$) (Fig. 12).

2) Alkaline phosphatase 활성

Rat 태자의 두개골로부터 분리한 조골세포를 8일간 배양한 결과 정상 대조군의 ALP 활성은 12.2 unit/ml 이었으며, DGG를 1 µg/ml 처리한 경우에는 17.3 unit/ml, 5 µg/ml 처리한 경우에는 14.9 unit/ml, 10 µg/ml 처리한 경우에는 16.5 unit/ml로서 세 경우 모두 정상 대

조군에 비해 각각 유의성 있게 증가하였다($p < 0.01$, $p < 0.05$, $p < 0.01$) (Fig. 13).

Fig. 12. Effect of DGG on Cell Proliferation in Rat Calvarial Cell.

NC(Normal Control) : Vehicle

DGG1 : 1 µg/ml DGG

DGG5 : 5 µg/ml DGG

DGG10 : 10 µg/ml DGG

DMSO(0.01%) was administered to NC(Normal Control) group.

Each bar represents Mean±SD of 6 cultured well.

** : $p < 0.01$ vs NC by Student's t-test

* : $p < 0.05$ vs NC

Fig. 13. Effect of DGG on Alkaline Phosphatase Activity in Rat Calvarial Cell.

NC(Normal Control) : Vehicle

DGG1 : 1 µg/ml DGG

DGG5 : 5 µg/ml DGG

DGG10 : 10 µg/ml DGG

DMSO(0.01%) was administered to NC(Normal Control) group.

Each bar represents Mean±SD of 6 cultured well.

** : $p < 0.01$ vs NC by Student's t-test

* : $p < 0.05$ vs NC

3) Bone Matrix Protein 합성

Rat 태자의 두개골로부터 분리한 조골세포를 8일간 배양한 결과, 정상 대조군이 생성하는 조골세포 기질 단백질량은 3.2 g/dl 이었고, DGG를 1 μ g/ml 처리한 경우 3.4 g/dl, 5 μ g/ml는 3.3 g/dl 이었다. 10 μ g/ml 처리한 경우에는 3.5 g/dl 로서 골 기질 단백질 합성량을 정상 대조군에 비해 유의성 있게 증가시켰다($p<0.05$)(Fig. 14).

Fig. 14. Effect of DGG on Bone Matrix Protein Synthesis in Rat Calvarial Cell.
NC(Normal Control) : Vehicle
DGG1 : 1 μ g/ml DGG
DGG5 : 5 μ g/ml DGG
DGG10 : 10 μ g/ml DGG
DMSO(0.01%) was administered to NC(Normal Control) group.
Each bar represents Mean $\pm$ SD of 6 cultured well.
* : $p<0.05$ vs NC by Student's t-test

4) Collagen 합성

Rat 태자의 두개골로부터 분리한 조골세포를 8일간 배양한 결과, 정상 대조군의 collagen 합성량은 140 μ g/well 이었고, DGG를 1 μ g/ml 처리한 경우에는 141 μ g/well, 5 μ g/ml의 경우에는 155 μ g/well 으로 통계적 유의성이 없었다. 10 μ g/ml의 경우에는 163 μ g/well로서 collagen 합성을 정상 대조군에 비해 유의성 있게 증가시켰다($p<0.01$)(Fig. 15).

Fig. 15. Effect of DGG on Collagen Synthesis in Rat Calvarial Cell.
NC(Normal Control) : Vehicle
DGG1 : 1 μ g/ml DGG
DGG5 : 5 μ g/ml DGG
DGG10 : 10 μ g/ml DGG
DMSO(0.01%) was administered to NC(Normal Control) group.
Each bar represents Mean $\pm$ SD of 6 cultured well.
** : $p<0.01$ vs NC by Student's t-test

5) Nodule 생성

DGG가 조골세포의 작용으로 나타나는 칼슘침착 결절 형성에 미치는 영향을 측정한 결과 DGG를 1 μ g/ml, 5 μ g/ml 처리한 경우에는 통계적 유의성이 없었고, 10 μ g/ml 처리한 경우에는 nodule 생성을 정상 대조군에 비해 유의성 있게 증가시켰다($p<0.05$)(Fig. 16).

Fig. 16. Effect of DGG on Nodule Formation in Rat Calvarial Cell.
NC(Normal Control) : Vehicle
DGG1 : 1 μ g/ml DGG
DGG5 : 5 μ g/ml DGG
DGG10 : 10 μ g/ml DGG
DMSO(0.01%) was administered to NC(Normal Control) group.
Each bar represents Mean $\pm$ SD of 6 cultured well.
* : $p<0.05$ vs NC

IV. 고 찰

만 50세 이상의 골다공증 유병률은 전체 인구의 21.8%에 이르는 질환으로 특히 여성의 유병률이 32.6%로 높다²³⁾. 이는 골 손실이 폐경 2~3년 전부터 시작되어 폐경 후 약 3~4년까지 주로 이루어진다는 보고와 폐경기 에스트로겐의 감소는 골다공증을 유발하고 골 흡수를 유도한다는 연구결과와도 일맥상통하는 부분이 있다^{24,25)}.

《黃帝內經 素問》에서 폐경기 여성의 특성을 표현하고 있는데⁷⁾, 이는 골다공증의 기전 중 폐경 후 여성호르몬의 결핍이 골다공증의 원인이 되는 것과 유사한 것으로 생각된다.

獨活寄生湯加味方 및 골다공증에 관한 실험적 연구로 문 등은 난소적출 흰쥐 대퇴골의 형태계측학적 변화 및 골대사 관련인자에 미치는 영향을 평가하였으며¹⁷⁾, 최 등은 난소를 적출한 흰쥐의 골다공증에 미치는 영향을 평가하였다¹⁸⁾.

본 연구에서는 이상과 같은 연구 보고들로 골다공증과 관련하여 유효할 것으로 추측되는 獨活寄生湯에 항염효능이 있는 것으로 알려진 魚腥草¹⁹⁻²¹⁾를 가미하여 파골세포 분화와 조골세포 활성화에 미치는 효과를 평가하였다.

NFATc1는 파골세포의 분화를 촉진하는 신호전달 단백질이다. 실험 결과 DGG는 RANKL 처리 파골세포 분화과정에서 증가하는 NFATc1의 발현을 유의성 있게 억제하였다.

MITF는 파골세포의 분화에 핵심적인 역할을 하는 인자로 알려져 있다. 실험 결과 DGG는 RANKL에 의해 발현이 증

가되는 MITF의 발현을 유의성 있게 억제하였다.

iNOS를 억제했을 경우 연골조직과 연골세포의 퇴행이 저해된다²⁶⁾. 실험 결과 DGG 처리시 iNOS 유전자 발현이 유의성 있게 억제되었다.

PGE₂ 생성이 증가하면 파골세포의 분화를 촉진할 수 있다. 실험 결과 DGG는 이의 발현을 유의성 있게 억제하였다.

Cathepsin K는 파골세포분화 및 활성화를 통하여 골의 흡수에 관여하고 있다²⁷⁾. 실험 결과 DGG는 cathepsin K의 유전자 발현을 유의성 있게 억제하였다.

RANKL로 자극받은 파골전구세포는 MMP-9의 작용으로 골 흡수를 유발한다. DGG를 처리한 파골세포로부터 MMP-9 활성을 측정한 결과 DGG는 RANKL 처리 파골세포에서 증가한 MMP-9 발현을 유의성 있게 억제하였다.

TRAP 양성 세포들은 분화하여 골 흡수 기능을 하게 된다. 실험 결과 DGG는 분화한 파골세포에서 RANKL 처리로 증가된 TRAP 유전자 발현을 유의성 있게 억제하였다.

조골세포의 활성화는 RANKL의 발현을 촉진하며, 이들의 증가는 bone ALP 및 osteocalcin의 합성을 증가시키며²⁸⁾, 골기질의 형성을 유도하는 BMP-2, BMP-4, BMP-7등을 발현 시킨다^{29,30)}. 실험 결과 DGG는 두개골세포에서 ALP 활성을 유의성 있게 증가시켰다.

조골세포에서 발현되는 BMP는 osteocalcin, ALP, bone sialoprotein, EGFR 등의 합성을 증가시키며 collagen(I) 합성을 증가시킨다^{31,32)}. 이는 조골세포의 활성화와 골에서의 matrix mineralization의 중요 기전으로 알려져 있다. 실험 결과 DGG

는 두개골세포에서 protein 및 collagen 합성을 유의성 있게 증가시켰다. 이를 통하여 DGG는 조골세포의 기능을 활성화시켜 골 형성을 촉진할 것으로 판단되었다.

이상의 연구결과, 獨活寄生湯加味方은 파골세포의 분화와 기능을 활성화시키는 유전자의 발현을 억제하여 파골세포의 분화 및 기능을 억제하였고, 동시에 조골세포의 분열능, ALP 활성, 골 기질 단백질, collagen 합성 및 nodule 생성을 증가시켰으므로, 골다공증 치료와 예방에 효과가 있을 것으로 평가되었다.

V. 결 론

獨活寄生湯加味方 추출물이 골다공증 억제 효과가 있는지를 알아보기 위해, 파골세포의 분화와 조골세포의 활성화에 미치는 영향을 평가하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 獨活寄生湯加味方은 RANKL에 의해 분화되는 파골세포의 형성지표인 TRAP (+) 다핵세포 형성을 유의성 있게 억제하였다.
2. 獨活寄生湯加味方은 분화된 파골세포에서 분비하는 TRAP 활성을 유의성 있게 억제하였다.
3. 獨活寄生湯加味方은 분화된 파골세포에서 NFATc1, MITF의 발현을 유의성 있게 억제하였다.
4. 獨活寄生湯加味方은 분화된 파골세포에서 iNOS, COX-2, IL-6의 유전자 발현을 유의성 있게 억제하였다.
5. 獨活寄生湯加味方은 분화된 파골세포

에서 cathepsin K, MMP-9, TRAP 유전자 발현을 유의성 있게 억제하였다.

6. 獨活寄生湯加味方은 rat의 두개골 조골세포의 분열능을 유의성 있게 증가시켰다.
7. 獨活寄生湯加味方은 rat의 두개골 조골세포의 ALP 활성을 유의성 있게 증가시켰다.
8. 獨活寄生湯加味方은 rat의 두개골 조골세포의 골 기질 단백질 합성, collagen 합성 및 nodule 생성을 유의성 있게 증가시켰다.

□ 투 고 일 : 2013년 4월 23일

□ 심 사 일 : 2013년 5월 2일

□ 게재확정일 : 2013년 5월 9일

참고문헌

1. Pietschmann P, et al. Osteoporosis: an age-related and gender-specific disease. Gerontology. 2009;55(1):3-12.
2. Pacifici R. Estrogen deficiency, T cells and bone loss. Cellular Immunology. 2008;252(1-2):68-80.
3. Del FA, Teti A, Rucci N. Osteoclast receptors and signaling. Arch Biochem Biophys. 2008;473(2):147-60.
4. Lacey DL, et al. Osteoprotegerin ligand modulates murine osteoclast survival in vitro and in vivo. Am J Pathol. 2000;157(2):435-48.
5. 한방재활의학과학회. 한방재활의학. 서울:군자출판사. 2005:155-9.
6. 강성길, 박영배, 안현석. 골다공증의 침구치료에 대한 문헌적 고찰. 대한침구

- 학회지. 1995;15(2):171-89.
7. 王水. 皇帝內經 素問. 서울:대성의학사. 1994;22, 339-40, 342.
8. 주석중, 박지하, 서부일. 한국산 산수유가 난소적출로 유발된 흰쥐의 골다공증 치료효과에 미치는 영향. 대한본초학회지. 2007;22(2):83-95.
9. 孫思邈. 備急千金要方. 서울:대성문화사. 1995:607.
10. 許浚. 東醫寶鑑. 서울:남산당. 2003:303.
11. 吳謙. 御纂 醫宗金鑑. 서울:법인문화사. 2006:933.
12. 성보사편집부. 天真處方解說. 서울:성보사. 2008:388-90.
13. 이상규 등. 獨活寄生湯 및 중성어혈약침이 좌골신경 압박손상 백서의 통증과 신경 재생에 미치는 영향. 한방재활의학과학회지. 2009;19(3):15-32.
14. 오원교 등. 獨活寄生湯이 멜라닌 생성 억제 및 유전자 발현에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 2009;23(1):63-75.
15. 황귀서, 송지연. 대식세포 oxLDL 생성에 미치는 獨活寄生湯의 영향. 대한예방의학학회지. 2000;4(2):205-13.
16. 이영석 등. 獨活寄生湯이 난소적출로 골다공증이 유발된 백서에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2000;13(2):104-19.
17. 문현주, 임은미. 加減獨活寄生湯이 난소적출 흰쥐 대퇴골의 형태계측학적 변화 및 골대사 관련인자에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2006;19(1):47-68.
18. 최원확, 조명래, 채우석. 加味獨活寄生湯의 경구투여와 志室·懸鍾 電鍼 병용 시술이 흰 쥐의 골다공증에 미치는 영향. 대한침구학회지. 2006;23(3):1-19.
19. 이지영, 이영중, 박완수. 발효 어성초(魚腥草) 물추출물의 마우스 대식세포 항염활성 연구. 대한본초학회. 2010;25(3):27-34.
20. 이희조, 김경준. 어성초(魚腥草)가 비만세포 매개 염증반응에 미치는 영향. 한방안이비인후피부과학회지. 2009;22(2):60-73.
21. 정병천 등. 어성초(魚腥草)가 자궁근종 세포의 성장억제와 세포 자멸사에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2007;20(3):1-12.
22. 신재용. 방약합편해설. 서울:성보사. 2008:78.
23. 보건복지부 질병관리본부 국민건강영양조사. Korean National Health and Nutrition Examination Survey (KNHANES), 2010 [cited 2011 Nov. 15]. Available from: URL:http://www.kdi.re.kr/infor/ep__view.jsp?num=117223.
24. Recker R, et al. Characterization of Perimenopausal Bone Loss: A Prospective Study. J Bone Miner Res. 2000;15(10):1965-73.
25. Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. Science. 2000;289(5484):1504-8.
26. Amin AR, Abramson SB. The role of nitric oxide in articular cartilage breakdown in osteoarthritis. Curr Opin Rheumatol. 1998;10(3):263-8.
27. Pang M, et al. AP-1 stimulates the cathepsin K promoter in RAW 264.7 cells. Gene. 2007;403(1-2):151-8.
28. Boyce BF, et al. Roles for NF-κB

- and c-Fos in osteoclasts. *J Bone Miner Metab.* 2005;23(1):11-5.
29. Shiotani A, et al. Regulation of osteoclast differentiation and function by receptor activator of NFkB ligand and osteoprotegerin. *Anat Rec.* 2002; 268(2):137-46.
30. Gallea S, et al. Activation of mitogen-activated protein kinase cascades is involved in regulation of bone morphogenetic protein-2-induced osteoblast differentiation in pluripotent C2C12 cells. *Bone.* 2001;28(5):491-8.
31. St-Arnaud R. The direct role of vitamin D on bone homeostasis. *Arch Biochem Biophys.* 2008;473(2):225-30.
32. Li IW, et al. Effects of osteogenic protein-1 (OP-1, BMP-7) on bone matrix protein expression by fetal rat calvarial cells are differentiation stage specific. *J Cell Physiol.* 1996; 169(1):115-25.