

원 저

六味地黃湯加味方이 骨形成 關聯 遺傳子인 TG2와 BMP4의 轉寫活性에 미치는 影響

신용욱, 박용일¹⁾, 김홍렬¹⁾, 이응세

상지대학교 한의학과 한방재활의학교실, 경희대학교 한의학연구소¹⁾

Effect of *Yukmigiwhang-tang kamibang* on the Expression of Osteo-related Genes, TG2 and BMP4

Yong-Wook Shin, Yong-Il Park¹⁾, Hong-Yeoul Kim¹⁾, Eung-Se Lee

Dept. of Oriental Medicine, Graduate School of Sangji University, Dept. of Molecular Biology,
Institute of Oriental Medicine, Kyung Hee University¹⁾

Objectives : This study was performed to examine the effect of *Yukmigiwhang-tang kamibang*, a mixture of oriental herbal extracts, on the transcription of bone formation genes, BMP4 (bone morphogenetic protein 4) and TG2 (transglutaminase-2).

Methods : Bone-related cells, MG-63 (human male osteosarcoma), HOS-TE85 (human female osteosarcoma), and KG-1 (bone marrow) were cultured with portions of *Yukmigiwhang-tang kamibang* and the transcription activities of bone-related genes, BMP4 (bone morphogenetic protein 4) and TG2 (transglutaminase-2), were determined by Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR).

Results : Transcription of BMP4 gene in HOS-TE85 cell increased up to 40% at 0.3% (v/v) of *Yukmigiwhang-tang kamibang* extract and that of TG2 gene in MG-63 cells also increased up to 40% at 0.3-0.4% of the same extract. Although it was less significant when compared to those in other cells, the transcription of BMP4 gene in KG-1 cells also increased up to 10 to 25%.

Conclusions : These results clearly demonstrated that *Yukmigiwhang-tang kamibang* have an effect on transcription activity of bone-related genes, TG2 and BMP4, suggesting that it may play an important role in bone formation. (*J Korean Oriental Med* 2002;23(2):190-197)

Key Words: *Yukmigiwhang-tang kamibang*, bone-related genes, bone formation.

서 론

대사성 골질환의 대표적인 예인 골다공증은 정상적으로 무기질화된 골기질의 단위부피당 질량이 감소된 상태를 말하며, 전세계적으로 가장 흔한 골격계 질환이며, 수질과 골단위 공간의 확장과 피질 두께의 감소로 인해 뼈의 구조적인 취약성을 특징으로 한다¹⁾. 노년층 골다공증에 의한 골절은 주로 대퇴골, 척추,

· 접수 : 2002년 3월 8일 · 채택 : 2002년 5월 7일
· 교신저자 : 이응세, 강원도 원주시 우산동 산 41, 상지대학교
한외과대학 부속한방병원 재활의학과
(Tel. 033-741-9260, E-mail: puriceo@purimed.com)

손목관절에서 나타나며, 만성적인 후유증이나, 통증 및 죽음을 유발하기도 하며, 심각한 경제적인 손실을 초래할 수 있는 것이다.

한의학에서는 腎의 精氣가 모이는 곳을 骨이라 하여, 骨의 生長, 發育, 強勁, 衰弱 등은 腎精盛衰와 밀접한 관계를 형성한다. 만약 腎精充足하면 髓生化有源하여 骨格이 滋養할 바를 얻어 強健有力해지나, 腎精不足하면 骨髓生化乏源하여 骨格失養하여 骨疾患이 발생된다고 하였으며 주요 원인을 腎陰虛나 腎陽虛로 파악하여 滋陰強骨하거나 溫補腎陽하는 약물로 치료하게 된다^{2,5)}. 서양의학에서는 골질환이 유전적 인자, 칼슘섭취부족, 에스트로겐 상실, 비타민D 결핍, 내분비 이상, 골수의 국소변화, 장관의 칼슘 흡수기능 저하 등에 의한다고 알려져 왔다⁶⁾. 치료에 있어서 진단은 되어도 치료가 거의 불가능한 질환으로 여겨져 왔으나, 근래에 들어서는 미국 식품의약국에서 공인된 칼슘, 에스트로겐, 칼시토닌, 활성비타민D 제제와 불소제 등이 사용되고 있으며, 이외에도 비스포스포네이트, SERM (selective estrogen receptor modulator) 과 같은 골흡수 억제제와 부갑상선호르몬, 인슐린 성장인자 I (IGF- I), 성장호르몬 (GH) 등과 같은 골형성 촉진제에 대한 많은 연구가 이루어지고 있다⁶⁾. 한편, 최근에 TGF-β 계열에 속하는 성장인자인 골형성 단백질 (bone morphogenetic protein, BMP)중 BMP4⁷⁾ 와 FSF (fibrin stabilizing factor)로도 부르는 응고인자로 응고인자 가운데 유일한 SH효소에 속하는 TG (transglutaminase)의 유전자 발현⁸⁾이 골형성이나 치유에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되었다.

최근 한의학계에서는 골다공증에 대한 실험적 연구가 꾸준히 진행되어왔다. 六味地黃湯과 골다공증에 관한 연구로는, 金 등⁹⁾이 六味地黃湯과 附益地黃丸 등의 補肝腎 強筋骨하는 한약재 및 처방이 난소적출로 골다공증을 유발한 白鼠에 미치는 영향에 대하여 보고하였다. 이외에도 朴 등¹⁰⁾은 左歸飲과 右歸飲이 난소를 적출한 白鼠의 성호르몬과 지질 및 골대사에 미치는 영향에 대하여 연구하였으며, 金¹¹⁾은 腎虛로 발생하는 골다공증을 치료하기 위해 大營煎을 사용하였고, 閔¹²⁾은 靑娥丸加味가 난소를 적출한

白鼠의 골다공증에 미치는 영향에 대하여 연구하였으며, 趙 등¹³⁾은 大補元煎이 골다공증에 미치는 영향에 대해 연구하였다. 그러나, 대부분의 연구들이 白鼠의 난소를 적출하여 골다공증을 유발시킨 후에 한약재나 한약 처방의 효과를 실험한 것들이다. 최근에 李¹⁴⁾는 RT-PCR 방법을 사용하여 接骨木, 麻子仁, 熟地黃 등의 개별 약재가 골형성 유전자 발현에 미치는 영향에 대하여 보고하였다. 종래의 실험 연구와 달리 인체세포를 대상으로 실험하였다는 데에 큰 의미가 있다고 할 수 있겠다. 李¹⁴⁾의 연구 이외에는, 六味地黃湯 등의 한약 처방 추출물이 골형성에 관련된 유전물질에 미치는 영향에 관한 연구는 아직 접하지 못하였다.

본 연구에서는 滋陰補腎하는 六味地黃湯에 黃芩, 龍骨, 紅花子 등 골형성에 관련이 있는 것으로 알려진 약재와 砂仁, 白朮, 蜂蜜 등을 첨가한 천연물 약재 혼합물인 六味地黃湯 加味方이 골형성에 미치는 영향을 분자생물학적 차원에서 알아보기 위하여 골형성 관련 세포주인 MG-63 (human male osteosarcoma), HOS-TE85 (human female osteosarcoma), KG-1 (bone marrow)에 육미지황탕가미방을 농도별로 가하여 배양한 후, RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction)¹⁵⁾방법을 통하여 육미지황탕가미방이 골형성 관련유전자인 TG2 (transglutaminase-2)와 BMP4 (bone morphogenetic protein 4)의 전사활성에 미치는 영향을 조사한 결과 그 有意成이 인정되어 보고하는 바이다.

실험재료 및 방법

1. 材料

1) 사용세포

본 실험에는 골형성 관련 세포주인 MG-63 (human, male, osteosarcoma, Cat. #21427), HOS-TE85 (human, female, osteosarcoma, Cat. #21543), KG-1 (bone marrow)을 한국세포주은행으로부터 분양 받아 액체질소에 보관하면서 사용하였다.

韓藥名	生藥名	用量 (g)	韓藥名	生藥名	用量 (g)
熟地黃	<i>Rehmanniae Radix Preparata</i>	60	白茯苓	<i>Poria</i>	15
山藥	<i>Dioscoreae Rhizoma</i>	30	白朮	<i>Atractylodis Rhizoma Alba</i>	10
山茱萸	<i>Corni Fructus</i>	30	黃芩	<i>Scutellariae Radix</i>	10
牡丹皮	<i>Moutan Cortex Radicis</i>	15	砂仁	<i>Amomi Xanthioides Fructus</i>	10
澤瀉	<i>Alismatis Rhizoma</i>	15	龍骨	<i>Draconis Os</i>	10
紅花子	<i>Carthami Flos</i>	10	蜂蜜	<i>Mel</i>	5
Total amount					220

2) 사용약재 및 조성

六味地黃湯 加味方 處方 內容 (出典 : 方藥合編)은 위의 표에 나타난 바와 같고, 이들 약재를 살균 증류수 2.5 L에 녹여 2시간 동안 열수추출 한 후 거즈 (Cheese cloth)로 여과한 여액을 농축, 동결건조한 후 증류수에 100 mg/ml 농도로 녹여 stock solution을 만들고, 실험 시에, 10,000 x g에서 20분간 원심분리하고 그 상층액을 syringe filter로 여과 (0.4 μm)하여 얻어진 여액을 실험에 사용하였다.

3) 사용 Primers

Table 2에 나타난 바와 같이, GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), TG2 (Transglutaminase-2), BMP4 (Bone morphogenetic protein 4) 등의 유전자 서열의 일부를 PCR (Polymerase Chain Reaction)을 위한 primer로 사용하였다.

2. 方法

1) 세포배양

MG-63과 KG-1 세포는 MEM (Minimum Essential Medium)에 sodium bicarbonate (2.2 g/L)을 첨가한 배양배지를 사용하고, HOS-TE85 세포는 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)에 sodium bicarbonate (3.7 g/L)와 HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazine- N'-2-Ethane Sulfonic Acid) buffer (2.5 g/L)를 첨가한 배양 배지를 사용하여, T-75 culture flask 또는 100 mm culture dish에서 각각 배양하였다. 각각의 배지에는 2 mM L-glutamine, 0.1 mM non-essential amino acids, 1.0 mM sodium pyruvate, 10%

fetal bovine serum (FBS), 1% penicillin-streptomycin (10,000 U/ml)를 첨가하여 사용하였다. 배지는 7-10 ml 씩 주 2회 교체해 주었고 주 1-2회 계대 배양 하였으며, 5% CO₂의 humidified 조건이 유지되는 37℃ Incubator에서 배양하였다. FBS는 사용하기 전 56℃에서 30분간 heat-inactivation시켜 사용하였다. 세포 배양에 사용한 모든 reagent는 Gibco BRL CO., (USA) 제품 및 일급 시약을 사용하였다.

2) Cell seeding 및 RNA의 추출

배양된 MG-63, HOS-TE85, KG-1 cell을 20 μl 씩 취한 다음 0.4% trypan blue로 염색한 뒤에 hemocytometer로 cell counting을 하였다. 이때 실험용 세포를 배양하기 위해서는 EMEM (without calcium medium, Bio Whittaker, Walkersville, Maryland)에 1 M HEPES buffer (60 ml/L), 10% FBS, 1% penicillin-streptomycin을 첨가한 배양 배지를 사용하여 3일 동안 매일 배양 배지를 교체해 주었다. 사용약재를 농도별로 처리하여 72시간동안 배양한 MG-63, HOS-TE85와 KG-1 cell들은 Trizol solution (Gibco BRL CO., USA)을 사용하여 total RNA를 분리하였다. 1 ml의 Trizol solution을 처리하여 cell을 lysis 시킨 후 scraper로 세포를 긁어내어 세포를 수확하였다. KG-1 cell은 부유형 세포로 원심분리하여 세포를 수확하였다.

세포파쇄물을 1.5-ml microtube에 모은 후 18-21G syringe로 homogenize한 후 4℃에서 12,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 상층액을 수거한 후, 이 상층액과 200 μl의 phenol:chloroform:isoamylalcohol (25:24:1,

v/v/v)을 혼합한 다음 5-15분 정도 상온에 두었다가 맑은 상층액만을 수거하여 4℃에서 12,000 rpm으로 15분 동안 원심분리한 후 RNA 층만 떠서 새로운 microtube에 옮기고 동일 volume의 100% isopropanol alcohol을 혼합한 뒤 5-15분 정도 상온에 두었다가 4℃에서 12,000 rpm에서 15분 동안 원심분리하였다. 상층액을 제거하고 RNA pellet에 1.5 ml의 75% ethanol로 세척하고 4℃에서 12,000 rpm으로 5분 동안 원심분리하였다. 5-10분간 상온에서 완전히 건조시킨 후, 100 μl의 DEPC(Diethylpyrocarbonate)-treated water에 RNA를 녹인 다음 분광광도계 (UV spectrophotometer, Hewlett Packard, USA)로 정량하였다. 실험결과는 3회 실시한 평균값으로 나타내었다.

3) Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

RT-PCR은 Sambrook과 Russell의 방법에 따라 수행하였다³⁰⁾. cDNA 합성 (RT 반응)을 위하여 42℃에서 30 min, 75℃에서 30 min 동안 반응시켰으며 PCR을 위한 positive control로써는 house keeping gene인 Human glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) gene을 사용하였다. GAPDH는 95℃에서 3분간 1 cycle, 95℃에서 30초, 63℃에서 30초, 72℃에서 30초 30 cycle, 72℃에서 7분 1 cycle 동안 반응을 수행하였고, TG2와 BMP4는 95℃에서 3분 1 cycle, 95℃에서 30초, 55℃에서 30초, 72℃에서 30초 30 cycle, 72℃에서 7분 1 cycle 동안 반응을 수행하였다. cDNA의 합성을 위한 혼합액 및 PCR을 위한 혼합액

의 조성과 PCR에 사용된 primer의 sequence는 Table 1 및 Table 2에 나타내었다.

4) 전기영동

10 μl의 RT-PCR product를 1.5% agarose gel에 전기영동하여 분석하였다. 전기영동은 100 V에서 40분 동안 수행하였으며 1X TAE (Tris- Acetate-EDTA) buffer를 사용하였다. 전기영동한 agarose gel을 ethidium bromide 용액으로 20분간 염색을 한 후 다시 3차 증류수에 15-20분간 탈색하였다. 탈색된 gel은 UV transilluminator (Paramount, CA, USA)로 관찰한 후 GEL-DOC (Photodoc system, Bio-Rad, USA)을 사용하여 다시 확인하고 사진으로 제작하였다.

실험 성적

六味地黃湯加味方 추출물이 골형성 관련 유전자들의 전사활성에 미치는 영향을 조사하기 위하여, 골형성 관련 세포들인 HOS-TE85 (female human osteosarcoma), MG63 (male human osteosarcoma), KG-1 (bone marrow) cell을 2×10^5 cells/dish로 seeding한 후에 72시간동안 배양하고 사용 약재를 농도별로 처리하여 함께 배양한 후 RNA를 분리하고 골형성 관련 유전자들인 TG2, BMP4의 primer (Table 1 & 2)를 이용하여 각 각의 PCR 생성물을 얻었고, 이를 전기영동으로 분석한 결과는 다음과 같았다.

Table 1. Composition of RT-PCR Mixture

cDNA 합성(RT) 혼합액 (μl)		PCR 혼합액 (μl)	
5X RT buffer	6.0	10X buffer(Takara)	2.5
10mM dNTP	0.5	10mM dNTP	0.5
Random primer	1.0	sense primer(10p)	1.0
100mM DTT	1.0	anti-sense primer(10p)	1.0
MMLV	1.0	Taq polymerase(5U)	0.3
RNasin	0.1	RT mixture	1.0
RNA template	1.0	DEPC water	18.7
DEPC water	19.4		
Total 반응액	30.0	Total 반응액	25.0

Table 2. PCR Primer Sequences and Expected Product Sizes

Transcript name	RT-PCR primer set (5' -3')		Expected product size (bp)
	Upper primer(UP)	Lower primer(LP)	
GAPDH*	UP : TTGACCTCAACTACATGG	LP : TCATACCAGGAAATGAGC	992
BMP4	UP : ATGAGAGCCCTCACACTCCTC	LP : CTAGACCGGGCCGTAGAAGCG	303
TG2	UP : CTCGTGGAGCCAGTTATCAACAGCTAC	LP : TCTCGAAGTTCACCACCAGCTTGTG	310

*Symbols : GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), TG2 (transglutaminase-2), BMP4 (bone morphogenetic protein 4)

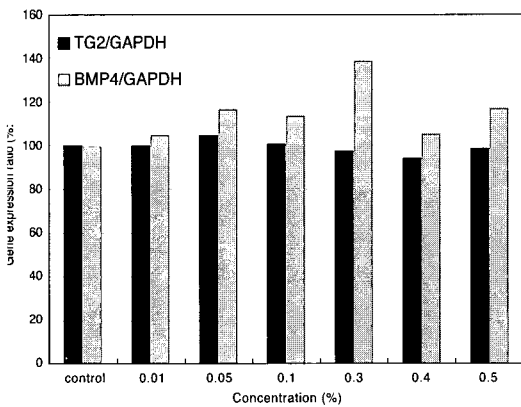


Fig. 1 Effect of *Yukmigihwang-tang kamibang* on the transcription of osteo-related genes, TG2 (transglutaminase-2) and BMP4 (bone morphogenetic protein 4), in HOS-TE85 (human female osteosarcoma) cells. Cells were grown with varying concentrations (v/v) of *Yukmigihwang-tang kamibang* for 72 h and the total RNA recovered was used for RT-PCR. Primer sequences used for RT-PCR are as described in Table 2. Gene expression ratios were determined by comparing the amount of PCR product of each osteo-related gene (TG2 or BMP4) to that of house-keeping gene (GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase). Triplicate cultures were maintained for each concentration of *Yukmigihwang-tang kamibang* and the data shown represent the mean of triplicates. Details on the experimental procedures are described in Materials and Methods.

1. 육미지황탕가미방이 HOS-TE85 cell의 골형성 관련 유전자들의 전사활성에 미치는 영향
농도별 육미지황탕가미방 추출물이 HOS-TE85 cell의 TG2와 BMP4 gene의 전사활성에 미치는 영향

을 RT-PCR로 조사한 결과, Fig. 1에서 보는 바와 같이 골형성에 관여하는 TG2 (transglutaminase-2) gene의 전사활성에 대한 영향은 미미하였으나, BMP4 (bone morphogenetic protein 4) gene의 경우에는 추출물 농도가 0.3%에서 40%에 가까운 전사활성의 증가를 보였다. 또한 BMP4 gene의 경우, 전체적으로 모든 농도에서 10%이상의 전사활성의 증가를 보였다.

2. 육미지황탕가미방이 MG63 cell의 골형성 관련 gene들의 전사활성에 미치는 영향

Fig. 2에서 보는 바와 같이 농도별 육미지황탕가미방 추출물이 MG63 cell의 골형성에 관여하는 TG2

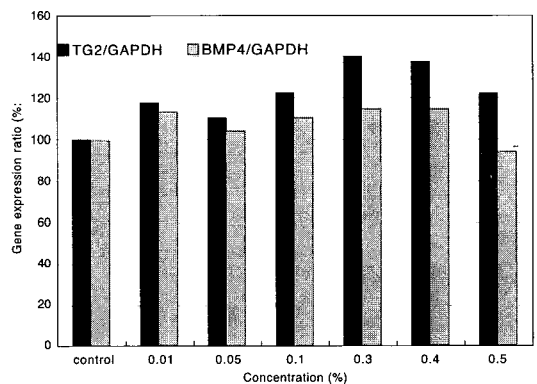


Fig. 2 Effect of *Yukmigihwang-tang kamibang* on the transcription of osteo-related genes, TG2 (transglutaminase-2) and BMP4 (bone morphogenetic protein 4), in MG-63 (human male osteosarcoma) cells. Details on the experimental procedures are described in Materials and Methods and in the legend of Fig. 1.

(transglutaminase-2) gene에 첨가한 추출물의 농도가 0.3%, 0.4%일 때 약 40%의 전사활성의 증가를 보였으며, 모든 농도에서 최소 10%에서 최고 40%의 증가를 보였다. BMP4 (bone morphogenetic protein 4) gene의 경우에는, TG2의 경우만큼의 영향을 끼치지 않는 않지만, 추출물 농도 0.01%, 0.3%, 0.4%에서 20%에 가까운 전사활성의 증가를 보였다.

3. 육미지황탕가미방이 KG-1 cell의 골형성 관련 gene 들의 전사활성에 미치는 영향

농도별 육미지황탕가미방 추출물이 KG-1 cell의 TG2와 BMP4 gene의 전사활성에 미치는 영향을 RT-PCR로 조사한 결과, Fig. 3에서 보는 바와 같이 HOS-TE85 cell의 경우와 마찬가지로 골형성에 관여하는 TG2 gene의 전사활성에는 거의 영향을 미치지 못하였으며, 도표상으로는 더 떨어진 것으로 나타났다. 그러나, BMP4 gene의 경우에는 전체적으로 최소 10%에서 30%에 가까운 전사활성의 증가를 보였다.

고찰

한의학에서는 腎臟과 骨과의 관계에 대하여 <素問

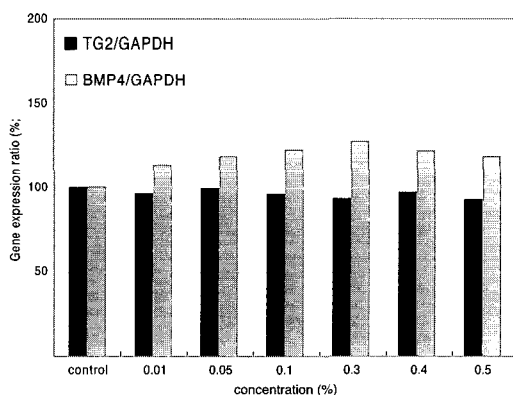


Fig. 3 Effect of Yukmigihwang-tang kamibang on the transcription of osteorelated genes, TG2 (transglutaminase-2) and BMP4 (bone morphogenetic protein 4), in KG-1 (bone marrow) cells. Details on the experimental procedures are described in Materials and Methods and in the legend of Fig. 1.

陰陽應象大論¹⁶⁾에서는 “腎生骨髓”라 하였고, <素問 平人氣象論>¹⁶⁾에서는 “臟眞下于腎, 腎臟骨髓之氣也”라 하였으며, <素問 脈要精微論>¹⁶⁾에서는 “骨爲幹”, “骨者, 水之府”라 하여 五臟중에 骨이 腎과 밀접한 관계가 있음을 나타내었다. 그러므로 骨은 腎의 精氣가 모이는 곳이며, 骨의 성장, 발육, 강약, 퇴화 등은 腎機能의 盛衰와 밀접한 관계가 있어 骨의 생리와 병리는 직접 腎의 主宰를 받는다고 하였고⁹⁾, 골질환 중 骨形成不全症, 佝僂病, 骨軟化症, 골다공증과 같은 대사성 골질환을 “骨痿”의 범주로 보아 원인을 주로 腎精不足, 腎氣虧損, 脾腎陽虛, 腎陰不足, 腎陽不足 등으로 보았다¹⁷⁾.

六味地黃湯은 滋陰補腎하는 효능을 가지며, 腎陰不足으로 인한 腰膝痠軟, 頭暈目眩, 耳鳴耳聾, 盜汗, 遺精, 消渴, 骨蒸潮熱, 手足心熱, 牙齒動搖, 小便淋瀝, 舌紅少苔하고 脈이 沈細數한 症狀에 사용되며, 眞陰이 虧損하여 虛火上炎으로 발생하는 病症을 치료하는 方劑로서, 이¹⁸⁾ 등은 난소적출로 유도된 골다공증 쥐에게 60일간 四物湯과 육미지황탕을 투여한 후 혈청 무기질 함량, ALP와 ACP 활성도, Osteocalcin 함량 및 脛骨과 腰椎骨의 조직학적 변화를 관찰한 후 四物湯보다는 육미지황탕이 더 유의성이 있음을 보고하였다.

본 가미방에 첨가된 黃芩의 藥性은 苦, 寒하고, 肺, 膽, 大腸經으로 들어가 清熱燥濕, 瀉火解毒, 清熱涼血, 安胎의 효능이 있으며, 항균, 항바이러스 작용, 소염, 항알러지 작용, 항산화작용, 혈중지질강화, 세포면역 촉진 등의 약리작용 뿐 만 아니라¹⁹⁾, 1997년 박²⁰⁾ 등은 黃芩이 치조골 재형성에 관련이 있음을 보고하였다. 龍骨은 性味が 苦澁, 微寒하고 歸經은 肝經, 心經, 腎經으로 작용하며, 효능은 收斂固澁, 固精, 澁精固氣, 主養精, 健脾益腎, 益腎精氣, 澁精收斂하여 骨髓를 滋養하는 기능을 보조¹⁹⁾하며, 1997년 제²¹⁾ 등은 龍骨이 골형성에 유의성이 있음을 보고하였다. 紅花는 性味が 辛, 溫하고 心, 肝經으로 들어가 活血祛瘀의 효능이 우수하여 각종 瘀血阻滯로 인한 病症에 적용되며, 紅花子 또한 瘀血腹痛, 中풍 및 骨折疾患에도 자주 사용^{19,22)}되어 왔으며, 전²³⁾ 등은 골밀도 증가에 紅花子

가 상당한 유의성이 있음을 발표하였다. 白朮은 性味が 溫 無毒, 苦甘하며, 歸經은 脾, 胃經으로 들어가며 補脾益胃, 燥濕和中²³⁾하고, 砂仁도 性味が 溫 無毒, 辛하며, 歸經은 脾, 胃, 腎經으로 들어가 化濕開胃, 溫脾止瀉, 理氣安胎¹⁹⁾하며, 蜂蜜또한 性味が 平無毒, 甘하며 歸經은 肺, 脾, 大腸經으로 들어가고 補中, 潤燥, 止痛, 解毒하는 효능을 가지는 약물로 위의 약물의 사용으로 인한 性味를 조화²³⁾시킬 목적으로 사용하였다.

한편, Fujiwara⁷⁾ 등에 의하면 TGF- β 계열에 속하는 성장인자인 골형성 단백질 (bone morphogenetic protein, BMP)중 BMP4는 쥐의 발생학적 분석에서 PGCs (primordial germ cells)과 allantois의 형성에 필요하며, extraembryonic ectoderm에서 기인한 trophoblast와 extraembryonic mesoderm에서 기인한 epiblast 둘 모두에서 발현되며, tissues에서 기인한 epiblast에서 발현된 BMP4는 embryo와 placenta 사이의 vascular connection과 germ line의 발달을 조정함으로써 재생산을 담당한다. 그리고 fibroblast를 osteoblast로 전환되도록 유도하여 골형성이나 치유에 중요한 역할을 하는 것으로 보고하였다.

TG (transglutaminase)는 FSF (fibrin stabilizing factor)로도 부르는 응고인자로 응고인자 가운데 유일한 SH효소에 속하며, 효소활성이 있는 A subunit과 carrier단백으로 B subunit이 비공유 결합에 의해 A2B2 4배체형을 취하여 혈장에 존재한다. XIII인자는 thrombin에 의한 A subunit에서 활성 peptide의 유리 and Ca²⁺ ion에 의한 입체구조의 변화를 거쳐 활성화되며, 혈액응고, 신경치유^{24,25)}, Crohn's disease²⁶⁾, 창상치유촉진, 골의 분화와 무기질화²⁷⁾ 등의 작용이 있다고 보고하였으며, Rosenthal⁸⁾ 등도 transglutaminase (TG)가 성장판 연골의 무기질 침착에 관여하며, Type II TG는 TGF- β 의 활성화에도 관여한다고 하였으며, 방사선 측정검사를 통해 3-5년된 늙은 돼지와 2-6주된 어린 돼지의 슬관절에서 TG의 활성을 검사하여 TG 활성화와 CPPD (calcium pyrophosphate dihydrate)의 결정침착을 일으키는 병적인 무기질 침착과의 사이에는 밀접한 관계가 있음을 제시하였다.

본 연구에서는 六味地黃湯加味方이 骨形成 관련

유전자인 BMP4와 TG2의 전사활성에 미치는 영향을 조사한 결과, 골형성 관련 유전자들인 TG2와 BMP4 gene의 전사활성이 MG-63 cells, HOS-TE85 cells, KG-1 (bone marrow) 전반적으로 이들 유전자 모두에서 유의성이 있었으며, 특히, BMP4의 전사활성에 有意性이 더 있는 것으로 나타났다. 이러한 결과들은 육미지황탕가미방이 골형성에 有意成이 있음을 보여 주었다. 이상의 결과로 보아 六味地黃湯加味方이 최근 급증하고 있는 여러 가지 골에 관련된 질병에 대한 안정한 치료제 및 예방제로 개발 될 수 있음을 의미하며, 이를 위한 지속적인 研究가 必要하다고 思料된다.

결론

六味地黃湯加味方이 골형성에 관련 유전자들인 TG2와 BMP4의 전사활성에 미치는 영향을 연구하기 위하여 MG-63 (human male osteosarcoma)과 HOS-TE85 (human female osteosarcoma) 세포주와 KG-1(bone marrow)을 사용하여 RT-PCR방법으로 실험하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 육미지황탕가미방이 HOS-TE85 cell에 미치는 영향으로 골형성 관련 gene 들 중에서 특히 0.3% 농도에서는 BMP 4 gene이 40%의 활성증가를 보였다.
2. 육미지황탕가미방이 MG-63 cell에 미치는 영향으로 골형성 관련 gene 들 중에서 특히 0.3%, 0.4% 농도에서 TG2 gene이 40%의 활성증가를 보였다.
3. 육미지황탕가미방이 KG-1 cell에 미치는 영향으로 골형성 관련 gene 들 중에서 BMP4에서 거의 모든 농도에서 10에서 25%의 활성 증가를 보였다.

이상의 결과를 종합해 보면, 六味地黃湯加味方이 골형성에 유의성이 있는 것으로 보여지며, 골 관련 질환에 있어서 六味地黃湯加味方의 투여가 더욱 효과적인 치료법이 되기 위해서는 지속적인 연구가 있어야 할 것으로 思料된다.

참고문헌

1. Netter FH. The CIVA Collection of medical illustrations, Vol. 8, Musculoskeletal system, Part 1. CIVA Geigy CO. 1987:216.
2. 홍원식. 황제내경소문해석. 서울:고문사. 1977:21-177.
3. 홍은암, 마원대. 황제내경소문. 대북. 1979:5-308.
4. 이응세, 김혜경. 골다공증의 동의학적 임상문헌에 관한 고찰. 한방재활의학회지. 1997;7(1): 437-38.
5. 김정연, 송용선. 골다공증에 대한 동서의학적 고찰. 한방재활의학회지. 1996;6(1): 293-94.
6. 장중호. 골다공증. 서울:도서출판 삶과 꿈. 1995:28-55.
7. Fujiwara T, Dunn NR, Hogan BL. Bone morphogenetic protein 4 in the extraembryonic mesoderm is required for allantois development and the localization and survival of primordial germ cells in the mouse. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2001;98(24): 13739-44.
8. Rosenthal AK, Derfus BA, Henry LA. Transglutaminase activity in aging articular chondrocyte and articular cartilage vesicles. Arthritis Rheum. 1997;40(5): 966-70.
9. 金始榮, 李仁仙. 六味地黃元과 附益地黃丸이 卵巢 摘出 白鼠의 성호르몬 지질대사에 미치는 영향. 大韓 韓方婦人科學會誌. 1998; 11(1): 175-91.
10. 朴鍾鐵. 左歸飲과 右歸飲이 卵巢摘出白鼠의 성호르몬과 脂質 및 骨代謝에 미치는 影響. 韓方婦人科學會誌. 1995;8(1):1-27.
11. 金根佑. 大營煎이 卵巢摘出로 유발된 白鼠의 골다공증에 미치는 영향. 慶山大學校 大學院. 1998.
12. 閔庚憲. 靑娥丸加味가 卵巢摘出 白鼠의 骨多孔症에 미치는 影向. 圓光大學校 大學院. 2000.
13. 趙漢栢, 朴炳烈. 大補元煎이 卵巢 摘出로 骨多孔症이 유발된 白鼠에 미치는 영향. 大韓韓方婦人科學會誌. 1999;12(1):343-63.
14. 李鎮赫. 骨多孔症에 應用되는 數種의 藥物에 의한 Bone Morpho- genesis Protein-2 發顯에 관한 연구. 大田大學校 大學院. 2000.
15. Sambrook J, Russell DW. Molecular cloning, a laboratory manual (3rd ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press. NY. 2001:8.46-8.53.
16. 왕기, 이병문, 구덕문. 황제내경소문금석. 서울:성보사. 1983:85-93.
17. 전국한의과대학 재활의학과학교실. 동의재활의학과 학. 서울:서원당. 1995:175-85.
18. 이상근, 김완희. 사물당과 육미지황탕이 난소적출로 유도된 백서의 골다공증에 미치는 영향. 동의생리학회지. 1997;12(1): 1-18.
19. 김호철. 한약약리학. 서울:집문당. 2001:129-376.
20. 박준봉, 허 익, 권영혁, 배기환, 정종평. 황금의 에타놀 추출물이 백서 치주골 형성에 미치는 영향. 대한치주과학회지. 1997;27(3): 443-57.
21. 제정진, 정석희, 김성수, 이종수, 신현대. 용골, 모려, 구판, 귀갑, 아교가골다공증에 미치는 영향에 관한 문헌적 고찰. 한방재활의학회지. 1997;7(1): 254-62.
22. 전국한의과대학 본초학교수 공편저. 본초학. 서울:영림사. 1991:4-544.
23. 전선민, 김준한, 이희자, 이인규, 문광덕, 최명숙. 한국산 홍화씨 분말 보충식이의 급여가 골절된 흰쥐의 골대사 지표에 미치는 영향. 한국영양학회지. 1998;31(6): 1049-56.
24. Monosonego A, Mizrahi T, Eitan S, Moalem G, Bardos H, Adany R, Schwartz M. Factor XIIIa as a nerve-associated transglutaminase. FASEB J. 1998;12(12): 1163-71.
25. Lesort M, Tucholski J, Miller ML, Johnson GV. Tissue transglutaminase : a possible role in neurodegenerative diseases. Prog. Neurobiol. 2000;61(5): 439-63.
26. Chamouard P, Grunebaum L, Wiesel ML, Sibilia J, Coumaros G, Wittersheim C, Baumann R, Cazenave JP. Significance of diminished factor XIII in Crohn's disease. Am. J. Gastroenterol. 1998;93(4): 610-14.
27. Heath DJ, Downes S, Verderio E, Griffin M. Characterization of tissue transglutaminase in human osteoblast-like cells. J. Bone Miner. Res. 2001;16(8): 1477-85.