

Estrogen 缺乏性 骨多孔症에 미치는 山藥 抽出物の 影響

黃貴緒 · 李大榮

暎圓大學校 韓醫科大學

Effects of *Dioscorea batatas* on Estrogen-deficient Osteoporosis

Gwi Seo Hwang & Dae Young Lee

College of Oriental Medicine, Kyungwon University

Abstract

Osteoporosis is characterized by bone loss and morbidity with osteoporotic fracture. This study was performed to evaluate the effect of on the bone mass and its related factors in estrogen-deficient animal model. The model rats of osteoporosis showed a significant decrease in bone density, bone ash density, calcium content of femur bone. At the 14th day after ovariectomy-surgery, rats were administered with DBE, extract of *Dioscorea batatas*, per orally, and continued for 10 weeks. And osteoporosis related parameters were determined to investigate the effect of DBE. Osteoporotic rats showed lower serum estrogen level, higher body weight than normal rats, and showed atrophy of uterine horns. DBE showed inhibitory effect on bone loss in osteoporotic condition, and reduced the increase of ALP activity and osteocalcin level in serum, and reduced the increase of OH-proline level in urine. But, DBE had no effect on cell proliferation and ALP activity in rat calvarial cell culture.

Key words : *Dioscorea batatas*, estrogen-deficient, osteoporosis

서론

골다공증은 골의 구성성분의 양적 감소를 주

된 병변으로 하는 대사성 골질환으로 그 기전은 골형성과 골흡수의 균형이 파괴되어 나타난다. 골다공증은 여러 가지 원인에 의해 유발되는데, 노화, 당뇨, 스트레스, 약물의 남용, 난소기능의 감소 등이 알려져 있다. 그중, type I

* Corresponding author : Dept. of Preventive Oriental Medicine, Kyungwon University.

Tel : 82-31-750-5421. E-mail : seoul@mail.kyungwon.ac.kr

골다공증은 여성 폐경기 이후 estrogen 결핍으로 인해 나타나는데, estrogen 결핍으로 인한 파골세포의 기능항진과 이에 수반된 골형성 세포의 기능이 항진되어 있으며, 세포기능 조절 이상으로 인해 골흡수가 상대적으로 증가하여 골조직이 소실되어 발생한다.¹⁾ Type II 골다공증은 노화에 따라 조골 세포의 기능이 저하되어 나타나며, 노령인구에서 성별에 구별 없이 발생하고 있다.³⁾ 그 밖에 원인불명의 골다공증이 있다. 여러가지 골다공증에서 공통적인 현상은 골상의 밀도가 감소된 상태에 있으며, 이는 골원이 차지하는 공간과 피질두께가 감소하는 것과 관련이 있다. 조직학적으로는 피질두께의 감소와 해면골(cancellous bone)의 소주(trabeculae)의 수나 크기의 감소가 관찰된다.²⁾

골대사는 골의 형성과 분해과정으로 이루어져 있으며, 여기에는 골기질을 생성하고 칼슘을 침착시켜 골을 형성하는 조골세포와 골기질을 분해하여 칼슘의 재흡수를 촉진하는 파골세포가 상호작용하여 조절한다. 골조직의 대사에 관여하는 조골세포나 파골세포는 다양한 인자들에 의해 조절되며, 이들 세포에는 골기질의 형성과 분해에 영향을 주는 growth factor들에 대한 수용체가 있다. 골세포와 관련이 있는 growth factor에는 TGF-beta(transforming growth factor beta), IGF-I(insulin like growth factor I), IGF-II, BMP(bone morphogenic protein), PDGF(platelet derived growth factor), IL-1(interleukin 1), IL-6, CSF(colony stimulating factor) 등이 있다. 또한, PTH, calcitonin, thyroid hormone, estrogen 등의 호르몬 등도 관련되어 있다.^{4, 26-32)}

여성 폐경기 이후에 나타나는 골다공증은 estrogen 감소로 인해 calcitonin 기능억제에 따른 파골세포의 기능활성화 결과 골기질이 분해되어 칼슘의 재흡수가 증가되어 있다. 또한, 부갑상선 호르몬(parathyroid hormone, PTH)의 감소로 인한 골 흡수 증가, 1,25(OH) Vit. D의

감소로 인한 장으로부터의 칼슘 흡수 감소와 노중 칼슘 배설의 증가 등이 보고되고 있으며, IL-6 등의 증가로 인한 파골세포의 활성화 등도 보고되고 있다. 따라서, 골다공증에는 여성 호르몬 및 thyroid hormone, calcitonin과 ipriflavone 등을 투여하여 골흡수를 차단하려는 약물들이 사용되고 있다.³³⁻³⁶⁾ 그러나, 기존의 약물들은 각각의 한계점을 가지고 있어 한약재로부터의 유효한 성분이 개발된다면 의미있는 일이 될 수 있을 것이다.

韓醫學적 觀點에서 骨은 奇恒之府로,¹²⁾ 《素問·五臟生成篇》의 “腎主合骨也 腎藏精而主水 故所合在骨”,¹³⁻¹⁶⁾ 《素問平人氣象論》의 “藏眞下於腎 腎藏骨髓之氣也” “腎藏精髓而注於骨 故所主在骨”¹²⁾의 表現대로 腎과 밀접한 關聯이 있는 것으로 判斷되었다. 또한, 또한, 韓醫學的 症狀인 ‘骨痿’ ‘附骨疽’ ‘流注’ ‘流痰’ 등은 현대의학의 骨多孔症은과 관련이 있는 것으로 認識되어진다.

최근의 연구에 의하면, 산약추출물은 항진균 작용,⁷⁾ 종양세포에 대한 억제작용,⁸⁾ 당뇨병에서의 혈당강화작용,⁹⁻¹⁰⁾ 지질과산화물 생성 억제작용¹¹⁾ 등의 효능을 가지고 있는 것으로 보고되고 있으며, 주성분인 dioscin의 항종양 효과도 보고되었다. 한의학적으로는 산약(Dioscorea batatas)이 健脾補肺, 固腎益精의 효능이 있어⁵⁻⁶⁾ 골위의 주원인을 肝腎虧虛에 重點을 두고 滋陰 清熱 補益肝腎의 治法을 주로 쓰는 한의학적 접근방법과 부합되어 골다공증에 효과적일 것으로 판단되었다.

본 연구에서는 난소를 적출하여 유발된 에스트로젠 결핍성 골다공증 랫드에 산약 추출물(DBE)을 투여하여 골다공증에 대한 영향을 검색하고자 시도하였다. 그 일환으로 골밀도와 골의 무기질함량에 미치는 영향을 검색하였으며, 골의 흡수 및 형성 등에 미치는 영향을 측정하기 위하여 osteocalcin, ALP, hydroxyprolin 등 골흡수 및 골형성지표로 사용되는 대사물질과

효소에 대한 정량을 시도하였다. 또한, 골세포를 배양하여 골증식능 및 세포활성에 미치는 영향을 측정하였다.

실험방법

1. 동물

실험동물은 200g 내외의 S.D. 랫드를 대한 실험동물센터에서 구입하여 사용하였다. 실험기간 동안 고품사료와 물을 충분히 공급하여 자유롭게 섭취하도록 하였으며, 2주간 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

2. 약재의 추출

산약 500g을 MeOH 2,000ml를 가하고 4시간 이상 환류 추출하였다. 여과지를 이용하여 여과한 다음, 여액을 Evaporator(EYERA, Japan)을 이용하여 감압 농축한 다음 농축액을 동결 건조하여 투여약물(이하 DBE)로 하였다.

3. 실험적 골다공증 유발

(1) 난소적출수술

랫드에 ketamine(유한양행)을 1ml/kg 용량으로 근육주사하여 전신마취를 시킨다음 복부털을 제거하였다. 70% EtOH로 수술부위를 소독한 다음 1cm 정도로 피부, 복근, 복막을 절개하고 난소를 노출시킨 후 적출수술을 시행하고 다시 봉합하였다.

(2) 모의수술

랫드의 복막 절개까지만 난소절제수술과 같은 방법으로 시행하고, 난소적출은 하지 않은 채로 다시 봉합하는 모의수술(Sham Operation)을 시행하였다.

4. 실험군 설정 및 약물 투여

실험은 실험동물을 4개군으로 나누어 시행하였다. 즉, (1) 복막 절개 후 난소를 적출하지 않은 모의수술 정상군(NC), (2) 난소 적출 후 약물을 투여하지 않은 실험대조군(OC), (3) 난소 적출 후 추출약물을 1,000mg/kg씩 경구 투여한 대용량 투여군(DBH), (4) 난소적출 후 500mg/kg씩 경구 투여한 소용량 투여군(DBL)으로 나누었다. 실험에 사용한 동물은 모의수술군 및 대조군은 10마리, 대용량 및 소용량 투여군은 8마리씩으로 하였다. 투여약물은 동결건조한 추출을 200mg/ml이 되도록 생리식염수에 녹인 후, 1일 1회씩 10주간 투여하였다.

5. 골다공증에 미치는 영향 평가

1) 체중측정

1주에서 7주까지 매주 1회 전자저울로 랫드의 체중을 측정하였다.

2) 골분리 및 회분 정량

랫드를 경추탈골하여 치사시킨 후, 대퇴골을 분리한 다음 전자저울을 이용하여 무게를 재고, 부피를 측정하였다. 그리고 Dry Oven(Daeil, Korea)을 이용하여 80℃에서 6시간 동안 건조하고, 900℃ Furnace에서 24시간 회화하고 남은 무기물질을 정량하였다.

3) 골의 무기질 분석

회화 후 남은 무기질을 6N HCl에 녹인 후, 100배 희석한 다음 ICP를 이용하여 Ca, Mg, P 함량을 정량하였다.

4) 골생성지표의 검색

실험에 필요한 혈청을 얻기 위하여 심장천자하여 채혈하였으며, 30분 방치 후 3,000rpm에서

15분간 원심분리하여 혈청을 취하였다. 혈중의 Osteocalcin 농도는 ELISA kit(Osteometer A/S, DK)를 이용하여 정량하였으며, alkaline phosphatase 활성은 혈청 내 측정 kit(Sigma Co.)를 이용하여 측정하였다.

5) 골흡수지표 검색

약물투여 마지막날에 랫드의 소변을 채취하였다. 소변을 11,000rpm으로 원심분리하여 상층액을 취하여 creatinine 함량을 측정하였다. 골흡수지표인 hydroxyproline은 Aminoacid analyzer를 이용하여 측정하였다.

6. 골 형성세포에 미치는 영향

(1) 골세포 분리

실험에 이용한 골세포는 Osteoblast cell인 S.D 랫드의 태자 두개골 세포 Fetal calvarial cell(FCS)를 분리배양하는 C.G. Bellows(1986) 등의 방법을 변형하여 사용하였으며, 요약하면 다음과 같다. 임신 21일된 S.D 랫드의 자궁을 절개하여 fetus를 꺼낸 후 치사시킨 다음, 후두부를 절개하고 calvarie를 적출했다. calvarie에 붙어 있는 결합조직 등을 깨끗이 제거하고, HBSS로 세척했다. calvarie 조각들을 collagenase 용액(0.05% trypsin, 0.5mM EDTA 포함)에 넣어 37°C에서 10분간 반응시켰다. 골조직을 제거한 상등액을 취하여 1,500rpm에서 원심분리하였으며 침전된 calvarial cell을 얻었다. PBS에 재현탁과 washing을 반복한 후, 이를 DMEM 배지(10% FBS, 100 IU/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 50 µg/ml L-ascorbic acid, 10mM β-glycerophosphate, 300ng/ml Fungizone)에 넣어 현탁한 후 37°C, 5% CO₂에서 배양하였다. 세포의 배지는 3일에 한 번씩 교환하였다. 배양한 세포는 2주 후 trypsin 처리하여 세포수를 측정하고 계대 배양한 후 실험에 사용하

였다.

(2) 세포수의 측정

약물의 처리로 인한 세포수 증가 여부를 측정하기 위하여 Kohei(1994) 등의 방법을 변형하여 사용하였다. FCS의 경우 (1)에서 분리 배양한 골세포를 1×10⁵cell/well로 seeding하였으며, 실험약물을 1 µg/ml이 되도록 처리하고 8일간 배양하였다. 스테로이드 호르몬에 의한 영향을 측정하기 위해서는 dexamethasone을 10ng/ml 첨가하여 배양하였다. 배양한 세포의 수를 세기 위하여 세포의 배지를 제거하고, HBSS로 세포를 세척하였다. 이후, 0.1% collagenase, 0.5% trypsin, 0.5mM EDTA를 가하여 세포를 배양 용기로부터 분리하였다. 세포를 Isoton-II solution을 이용하여 20배 희석한 후 세포계수기(Sysmax F-820)로 세포의 수를 측정하였다.

(3) Alkaline phosphatase(ALP) 활성 측정

Lowry 등(1954)의 방법을 변형하여 사용하였다. Cell을 배양한 plate를 냉각한 PBS로 세척한 후 cell을 scraper로 긁어 내어 leupeptin이 함유된 냉각한 PBS에 현탁하였다. 이 현탁액을 냉각상태에서 ultrasonicator로 sonication한 후 3,000rpm에서 10분간 원심분리하였다. 원심분리 후 상등액을 취하여 0.56M 2-amino-2-methylpropanol, 1mM MgCl₂, 10mM p-nitrophenylphosphate를 함유한 반응액 1ml와 37°C에서 10분간 반응시켰다. NaOH 1ml를 가하여 반응을 중단시킨 후 405nm에서 흡광도를 측정하였다.

7. 통계학적 분석

각 결과에 대한 유의성 검증은 Student's t-test를 이용하였다.

결 과

1. 체중변화에 미치는 영향

정상군(모의수술군)에 비해 난소제거 수술을 한 쥐에서 더 큰 체중의 증가가 있었다. 고용량(1,000mg/kg)의 DBE 투여군은 체중의 증가가 난소제거 수술군보다 크게 나타났고, 저용량(500mg/kg) 투여군은 난소제거 수술군과 유사한 경향을 보였다(Table I).

2. 대퇴골의 골밀도 변화에 미치는 영향

골밀도는 랫드의 대퇴골을 이용하여 측정하였다. 난소적출로 유발된 골다공증 랫드의 골밀도는 약 1.18mg/μl로서 모의수술을 시행한 정상군의 1.33mg/μl에 비해 유의적인 감소를 보였다. 한약재 추출액을 투여한 경우, 난소제거 수술군에 비하여 골밀도의 감소가 억제되었다.

한약재 추출액을 1,000mg/kg 용량으로 투여한 군의 골밀도는 약 1.23mg/μl이었으며, 500mg/kg을 투여한 군에서는 약 1.22로서 모두 증가하는 경향을 나타내었다. 따라서, estrogen 결핍으로 유발되는 골다공증 치료 또는 예방에 효과적인 것으로 추측되었다(Fig. 1).

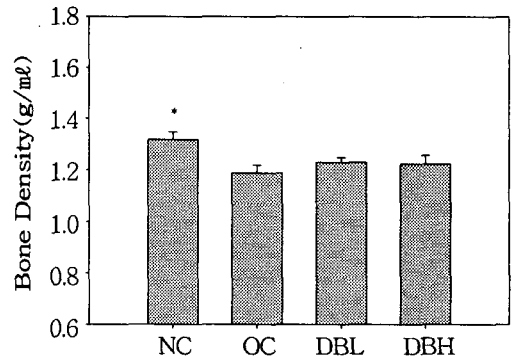


Figure 1. Effect of DBE on Femur Density in Ovariectomized Rats.

NC : Normal Group

OC : Ovariectomized Control Group

DBL : OC+DBE(500mg/kg, P.O.)

DBH : OC+DBE(1,000mg/kg, P.O.)

*p < 0.05 vs OC

Table I. Change of Body Weight during Experiments(g)

Weeks	NC	OC	DBL	DBH
0	206.3±3.95	207.8± 6.81	205.8±8.08	209.8± 7.30
1	212.5±4.54*	233.8± 6.66	234.2±8.11	235.5± 6.71
2	221.5±4.12*	242.4± 7.73	240.7±8.65	243.2± 8.31
3	219.9±4.77*	238.8± 9.19	245.8±9.36	250.2± 8.70
4	224.4±4.62*	258.3± 8.64	261.4±8.58	264.3± 7.97*
5	238.3±5.17*	279.5± 8.69	290.2±8.19	295.3±12.02*
6	245.8±5.33*	283.8±11.01	294.2±7.66	306.3±14.54*
7	251.6±6.54*	295.0±11.73	297.1±9.14	314.8±15.25*
8	256.9±6.37*	303.1±11.42	305.7±8.63	320.8±11.60*

NC : Normal Group

OC : Ovariectomized Control Group

DBL : OC+DBE(500mg/kg, P.O.)

DBH : OC+DBE(1,000mg/kg, P.O.)

*p < 0.05 vs OC

3. 대퇴골 회분함량 변화에 미치는 영향

골조직은 collagen을 비롯한 단백질 기질과 칼슘, 마그네슘 등을 비롯한 무기질 성분으로 구성되어 있다. 골밀도의 변화는 골기질을 구성하는 기질단백질이 파골세포의 작용으로 파괴되어 유리되면 기질과 결합된 무기질 성분이 혈중에 유리되어 골밀도가 낮아지게 된다. 본 실험에서도 모의 수술을 시행한 정상군의 회분량은 약 $1.01\text{mg}/\mu\text{l}$ 이었으며, 난소제거 수술을 시행한 골다공증 군의 골회분량은 약 $0.80\text{mg}/\mu\text{l}$ 로서 유의적인 감소를 나타내었다. 한약재 추출액을 투여한 투여군에서는 골 회분량이 유의적으로 증가하는 결과를 나타내었다. 산약 추출물(DBE)을 $1,000\text{mg}/\text{kg}$ 용량으로 투여한 군의 회분량은 약 $0.91\text{mg}/\mu\text{l}$ 이었으며, $500\text{mg}/\text{kg}$ 용량으로 투여한 군의 회분량은 $0.89\text{mg}/\mu\text{l}$ 으로, 골다공증에 의해 감소하는 골의 무기질 함량이 산약 추출물(DBE)의 투여로 억제되었다(Fig. 2).

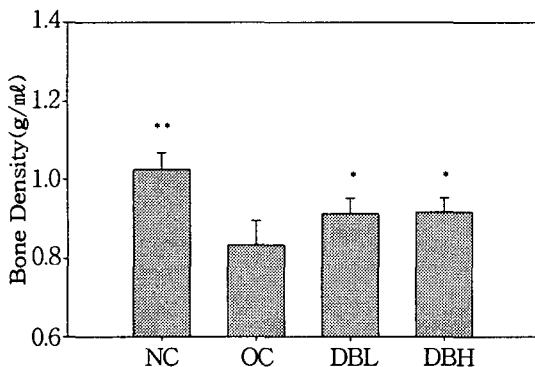


Figure 2. Effect of DBE on Femur Ash Density in Ovariectomized Rats.

NC : Normal Group

OC : Ovariectomized Control Group

DBL : OC+DBE(500mg/kg, P.O.)

DBH : OC+DBE(1,000mg/kg, P.O.)

**p < 0.01 vs OC

*p < 0.05 vs OC

4. 대퇴골의 혈중 무기질 성분의 변화에 미치는 영향

정상군의 칼슘 함량은 $384.6\text{mg}/\text{g}$, 골다공증 군의 칼슘 함량은 $354.5\text{mg}/\text{g}$ 으로 난소절제에 의해 감소되었다. 산약 추출물을 고용량($1,000\text{mg}/\text{kg}$)으로 투여한 군에서의 칼슘량은 $358.8\text{mg}/\text{g}$ 으로 골다공증으로 인한 칼슘함량 손실을 억제하는 경향을 나타내었다. 저용량($500\text{mg}/\text{kg}$)을 투여한 군의 칼슘함량은 $352.1\text{mg}/\text{g}$ 으로 골다공증으로 인한 칼슘함량 손실을 억제하지 못하였다.

대퇴골의 무기질인 마그네슘의 함량은 난소제거 골다공증 랫드에서 정상군에 비해 감소하였다. 산약 추출물을 투여한 경우 저용량($500\text{mg}/\text{kg}$)에서는 감소하는 경향을 나타내었으며, 고용량($1,000\text{mg}/\text{kg}$) 투여군에서는 유의적인 변화를 나타내지 못하였다.

무기인의 함량은 난소제거 골다공증 랫드에서 정상군에 비해 감소하였다. 산약 추출물을 투여한 경우 저용량($500\text{mg}/\text{kg}$)에서는 약간 증가하는 경향을 나타내었으며, 고용량($1,000\text{mg}/\text{kg}$) 투여군에서는 증가시켰으나, 모두 유의적인 차이를 나타내 못하였다(Table II).

Table II. Contents of inorganic element in femur (mg/g ash weight)

	Ca	Mg	Pi
NC	$384.6 \pm 13.6^{**}$	$5.58 \pm 0.24^*$	167.6 ± 8.3
OC	354.5 ± 7.4	4.95 ± 0.12	160.4 ± 3.7
DBL	352.1 ± 14.8	4.96 ± 0.31	157.3 ± 7.5
DBH	358.8 ± 10.8	$5.20 \pm 0.17^*$	162.4 ± 4.8

NC : Normal Group

OC : Ovariectomized Control Group

DBL : OC+DBE(500mg/kg, P.O.)

DBH : OC+DBE(1,000mg/kg, P.O.)

**p < 0.01 vs OC

*p < 0.05 vs OC

5. Alkaline phosphatase(ALP) 활성에 미치는 영향

Alkaline Phosphatase는 골아세포에서 분비되는 glycoprotein으로서 임상에서 가장 흔히 이용되는 골형성 지표이다. 폐경기 여성의 경우 골흡수가 증가함에 따라 골 형성을 촉진하는 조골세포가 활성화되어 alkaline phosphatase 활성이 증가한다. 이 효소는 뼈 이외에 간, 신장, 태반 등에서도 분비되며, 연령이 증가함에 따라 증가하는 경향이 있다. 따라서, 간질환이나 간대사에 영향을 미치는 약제에 의해서도 증가될 수 있다. 본 실험에서 정상군(38.5 IU/ml)에 비해 골다공증군(50.7 IU/ml)에서 ALP활성이 증가하였다. 산약 추출물(DBE)의 고용량 투여군(1,000mg/kg)에서는 35.8 IU/ml이었으며, 저용량 투여군(500mg/kg)에서는 38.0 IU/ml에서 모두 골다공증군에 비하여 ALP 활성이 감소하였다(Fig. 3).

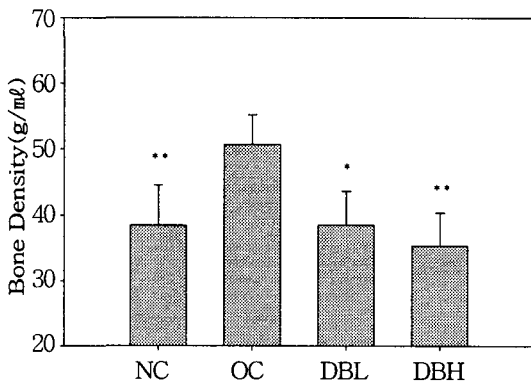


Figure 3. Effect of DBE on Serum Alkaline Phosphatase Activity from Ovariectomized Rats.

NC : Normal Group

OC : Ovariectomized Control Group

DBL : OC+DBE(500mg/kg, P.O.)

DBH : OC+DBE(1,000mg/kg, P.O.)

** p < 0.01 vs OC

* p < 0.05 vs OC

6. 혈중 골생성지표(osteocalcin)에 미치는 영향

Osteocalcin은 Gla-protein이라고도 불리는 골격계의 가장 풍부한 비교원질 단백질로서 조골세포에서 형성된 후 상당부분이 골기질 속에 침착되며 새로이 생성되는 것의 일부는 혈액 내로 유리된다. Osteocalcin은 뼈에 매우 특이적인 단백질로서 골대사 평가에 있어 예민도와 특이도가 높아 골형성의 지표로 이용되고 있다. 조골세포의 기능은 파골세포의 기능과 밀접한 연관성을 가지고 있다. 골다공증 환자의 경우 파골세포의 기능이 활성화되어 골흡수가 증가하면, 조골세포의 기능도 증가한다. 본 실험 결과, 조골세포의 골형성지표인 osteocalcin은 정상군(2.48μmol/ml)에 비해 골다공증군(2.89μmol/ml)에서 유의적으로 증가하고 있다. 산약 추출물을 투여한 경우, 저용량 투여군(500mg/kg)에서는 2.33μmol/ml으로 유의적인 감소를 나타내었으며, 고용량 투여군(1,000mg/kg)에서는 2.19μmol/ml로서 모두 골다공증군에 비해 감소하였다. 이러한 결과는 골의 형성과 재흡수과정을 억제하여 조골세포의 기능에 저하하여 나타난 결과로 추정된다(Fig. 4).

7. 뇨중 골흡수지표(hydroxy-proline : OH-P)의 유리에 미치는 영향

Hydroxyproline은 주로 교원질 내에 존재하며 전체 아미노산의 13%를 차지하고 있다. 교원질이 분해되면, 아미노산인 hydroxyproline, hydroxylysine 등과 collagen crosslinks 산물인 DPyD, pyrilinks, PyD 등 다양한 교원질 분해 성분이 유리되어 나온다. 체내 교원질의 약 절반은 뼈에 존재하고 뼈의 대사가 다른 조직보다 훨씬 빠르기 때문에, 유리된 collagen 분해 산물들은 대부분 골흡수 결과 생성된 물질이다. 이러한 물질들은 교원질 합성에 다시 사용되지

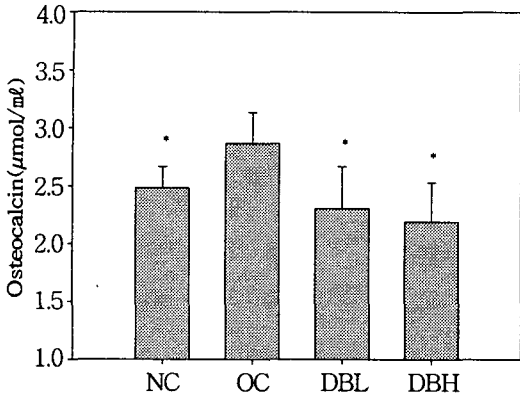


Figure 4. Effect of DBE on Osteocalcin level in Ovariectomized Rats.

NC : Normal Group
 OC : Ovariectomized Control Group
 DBL : OC+DBE(500mg/kg, P.O.)
 DBH : OC+DBE(1,000mg/kg, P.O.)
 *p < 0.05 vs OC

않기 때문에 혈액 중에 순환하다가 신장에서 여과된 후 재흡수되고 나머지는 소변으로 배설된다. 따라서, 신장기능과 밀접한 관련이 있어 hydroxyproline을 creatinine치로 나눈값을 이용한다. 실험 결과, 정상군의 뇨에서의 OH-Pro/creatinine(10^{-3}) 비는 1.26이었으며, 난소제거 수술을 하여 골다공증을 유발한 군의 뇨중에서의 비율은 2.30으로 유의적인 증가가 있었다. 산약 추출물의 저용량군(500mg/kg)은 1.01로 골다공증군에 비해 유의적으로 감소하였으며, 고용량(1,000mg/kg) 투여군의 뇨중 농도는 1.48로 유의적인 감소를 보였다. 이상의 결과에 의하면, 한약재 투여군은 난소제거로 에스트로젠이 결핍되어 생기는 골밀도 감소를 개선시키며, 이는 난소제거시 발생하는 골흡수의 증가를 차단하는 것에서 기인하는 것으로 보인다(Fig 5).

8. 골세포 증식능에 미치는 영향

산약추출물(DBE)의 골세포에 미치는 영향을 직접 측정하기 위하여, 랫드의 두개골에서 분리

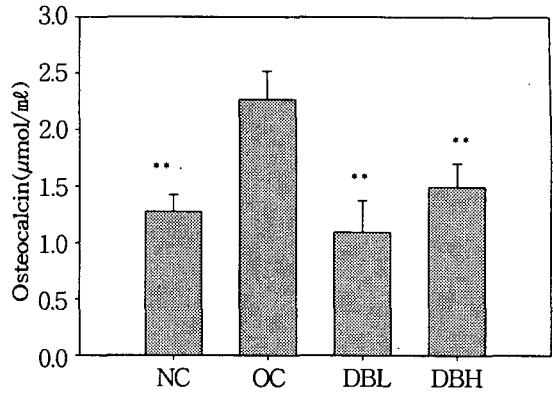


Figure 5. Effect of DBE on Hydroxy-Proline/Creatinine in Urine from Ovariectomized Rats.

NC : Normal Group
 OC : Ovariectomized Control Group
 DBL : OC+DBE(500mg/kg, P.O.)
 DBH : OC+DBE(1,000mg/kg, P.O.)
 *p < 0.05 vs OC

한 골세포에 산약 추출물을 $1\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 투여하고 배양하였다. 실험 결과, 세포배양 4일째의 대조군은 약 $36 \times 10^3 \text{ cells/ml}$ 이었으며, DBE 추출물 첨가군은 $38 \times 10^3 \text{ cells/ml}$ 이었다. 세포배양 9일째의 실험결과, 대조군의 경우는 $172 \times 10^3 \text{ cells/ml}$, DBE 첨가군의 경우 $169 \times 10^3 \text{ cells/ml}$ 로서 골세포 분열에는 영향을 주지 못한 것으로 나타났다(Table III).

Table III. Effect of DBE on rat calvarial cell proliferation

	No. of cell ($\times 10^4 \text{ cell/ml}$)	
	4th day	9th day
Control(vehicle)	3.6 ± 0.21	17.2 ± 0.45
DBE($1\mu\text{g/ml}$)	3.8 ± 0.17	16.9 ± 0.41

9. 골세포의 alkaline phosphatase(ALP) 형성에 미치는 영향

골세포의 활성화 결과 나타나는 ALP 활성화에 미치는 영향을 측정하기 위하여, 랫드의 두개골

에서 분리한 골세포에 산약 추출물을 2 μ g/ml의 농도로 투여하고 배양하였다. 실험 결과, 세포 배양 4일째의 대조군은 약 1.414 I.U./ml이었으며, DBE 추출물 첨가군은 1.396 I.U./ml이었다. 세포배양 9일째의 실험결과, 대조군의 경우는 1.894 I.U./ml, DBE 첨가군의 경우 1.868 I.U./ml로서 골세포 활성화에는 직접적인 영향을 주지 못한 것으로 나타났다(Table IV).

Table IV. Effect of DBE on ALP activity from rat calvarial cell culture

	ALP(I.U./ml)	
	4th day	9th day
Control(vehicle)	1.41 \pm 0.49	1.89 \pm 0.12
DBE(1 μ g/ml)	1.40 \pm 0.43	1.87 \pm 0.26

고찰

韓醫學적 原理에 의하면 骨은 奇恒之府로 五臟 중에서 腎과 밀접한 관계가 있다. 《素問·五臟生成篇》의 “腎主合骨也 腎藏精而主水 故所合在骨”,¹³⁻¹⁶⁾ 《素問·平人氣象論》¹³⁾의 “藏眞下於腎 腎藏骨髓之氣也” “腎藏精髓而注於骨 故所主在骨” 등은 腎과 骨 및 骨髓와의 관계를 표현하는 내용이다. 즉, 腎은 藏精 生髓 및 養骨作用이 있으므로 髓가 虛하면 骨도 역시 虛해지며, 髓는 骨格을 滋養하므로 骨格의 生長과 機能은 腎氣의 盛衰에 따라 決定된다.¹⁶⁾ 그러므로 骨痛은 腎虛가 腎精의 不足을 유발하여 骨髓가 失養된 결과로 판단되었다. 現代醫學에서의 骨多孔症은 ‘骨痿’ ‘附骨疽’ ‘流注’ ‘流痰’ 등의 표현과 부합되는데, ‘骨痿’는 急·慢性 骨多孔症에, ‘附骨疽’는 化膿性 骨多孔症, ‘流注’ ‘流痰’은 結核性 骨多孔症과 유사한 경우로 판단된다.¹⁷⁻²⁰⁾ 骨痿의 原因은 《素問·痿論》의 內熱傷津, 腎熱과,²¹⁾ 《傷寒論臨床實驗錄》의 汗吐下後 陰陽氣血俱虛,²⁴⁾ 《素問·六元正紀大論》의 “陽明司天

之政” 등의 寒氣로 인한 火의 鬱滯, 肝의 俱虛, 胃氣의 虛와 濕熱乘期肝腎, 五臟之熱에 狹濕熱, 濕痰, 血虛, 氣虛, 肝腎下虛, 元氣敗傷 등일 것으로 추측되었으며,^{23, 25)} 症狀은 骨枯 髓減 腰脊不能伸舉 下肢痿弱 不能久立 腿脛大肉漸脫으로 인한 骨痛, 腰痛, 脊背痛 등이다.²⁶⁾ 따라서, 骨痿의 治療는 肝腎虧虛에 重點을 두어 滋陰清熱 補益肝腎의 治法이 쓰였다.²⁶⁾ 따라서 健脾補肺, 固腎益精의 효능이 있는 山藥이 골다공증에 효과적일 것으로 판단되었다.

여성 폐경기 이후에 나타나는 골다공증은 estrogen 감소로 인해 calcitonin 기능억제에 따른 파골세포의 기능활성화 결과 골기질이 분해되어 칼슘의 재흡수가 증가되어 있다. 또한, 부갑상선 호르몬(parathyroid hormone, PTH)의 감소로 인한 골 흡수 증가, 1,25(OH) Vit. D의 감소로 인한 장으로부터의 칼슘 흡수 감소와 뇨중 칼슘 배설의 증가 등이 보고되고 있으며, IL-6 등의 증가로 인한 파골세포의 활성화 등도 보고되고 있다. 따라서, 골다공증에는 여성호르몬 및 thyroid hormone, calcitonin과 ipriflavone 등을 투여하여 골흡수를 차단하려는 약물들이 사용되고 있다. 그러나 기존의 약물들은 각각의 한계점을 가지고 있다.

본 연구에서는 난소를 적출하여 유발된 골다공증 랫드에 산약 추출물(DBE)을 투여하여 골다공증치료 및 예방에 이용할 수 있는 한약재를 개발하려고 시도하였다. 그 일환으로, 골밀도와 골의 무기질함량에 미치는 영향을 검색하였다. 산약 추출물을 투여한 경우, 골다공증 랫드에서 관찰되는 골밀도와 골회분 함량의 감소를 억제하였다(Fig. 1).

이러한 작용이 골의 재흡수를 억제하여 나타나는지를 알아보기 위하여 뇨중에 유리되는 hydroxyproline량을 측정하였다. 한약재를 투여한 경우, 골다공증 랫드에서 증가된 hydroxyproline의 유리를 감소시켜 골의 재흡수를 억제할 것으로 사료되었다(Fig. 5).

골다공증 환자의 경우, 혈중 칼슘량이 감소되어 있다. 한약재를 투여한 경우, 골다공증 랫드의 혈중에서 감소된 칼슘량을 증가시키는 경향을 보였으며 인산염의 농도에서도 비슷한 경향을 보였다. 또한, 한약재가 골형성에 미치는 영향을 측정하기 위하여 골형성세포의 대사산물인 osteocalcin, ALP를 지표로 하여 정량한 결과, 혈중 osteocalcin은 골다공증 랫드에서 정상 랫드에 비하여 증가되어 있었다. 이는 estrogen 부족으로 파골세포 기능이 활성화 되면, 조골세포의 기능도 활성화되어 나타나는 결과로 보인다. 산약 추출물을 투여한 군에서의 osteocalcin량은 골다공증 랫드에 비해서는 유의적으로 감소하였다(Fig. 4).

이는 파골세포의 기능을 억제하여 나타난 결과로 보이지만, 정확한 것을 알기 위하여서는 좀더 연구가 진행되어야 할 것 같다. 또한, 혈중 ALP에 미치는 영향을 측정하였다. 골다공증군은 정상군에 비해 ALP량이 증가하였다(Fig. 3).

그러나 산약 추출물을 투여한 경우, ALP 활성은 감소하였으며, 이는 osteocalcin과 같은 결과이다. ALP는 조골세포뿐 아니라 간조직 등에서도 유리될 수 있고, 상해를 받는 경우 증가할 수 있으므로, 골세포의 기능에 의한 것인지를 평가하기 위하여 조골세포의 분열능 및 ALP 활성에 미치는 영향에 대하여 검색하였다. 두개골 세포는 조골세포의 활성화의 모델로 사용되는 세포 시스템이다. 실험 결과, 산약 추출물은 조골세포의 증식능 및 기능활성화에 의한 ALP 활성 변화에는 영향을 주지 못하였다.

이상의 연구결과, 산약은 골다공증 랫드에서 발생하는 골밀도 감소를 차단할 수 있었으며, 이러한 결과는 산약이 골다공증의 치료 및 예방에 유용하게 쓰일 수 있는 가능성을 시사한다. 또한 이러한 작용은 산약이 조골세포 기능에는 영향을 주지 못하고, 파골세포를 억제하여 골흡수 저해를 통해 골대사에 영향을 주어 나

타난 것으로 추측할 수 있었다. 자세한 것은 좀더 연구가 진행되어야 알 수 있을 것으로 사료된다.

결론

난소 절제술을 시행하여 유발한 estrogen 결핍성 골다공증에 산약추출물을 투여하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

- 1) 산약추출물은 골다공증 랫드에서 감소한 골밀도를 증가시켰다.
- 2) 산약추출물은 골다공증 랫드에서 감소한 골회분량을 증가시켰다.
- 3) 산약추출물은 골다공증 랫드에서 감소한 골 미량원소량을 증가시켰다.
- 4) 산약추출물은 골다공증 랫드에서의 증가한 혈중 osteocalcin 및 ALP 활성을 감소시켰다.
- 5) 산약추출물은 골다공증 랫드에서 증가한 뇨중 OH-proline 유리를 감소시켰다.
- 6) 산약추출물은 골세포의 증식능 및 조골세포 기능활성화 결과 나타나는 ALP 활성에 영향을 주지 못하였다.

이상의 결과, 산약추출물은 난소를 적출하여 유발시킨 골다공증 랫드에서 조골세포의 기능을 항진시키지 못하고 파골세포의 기능을 억제하여 골다공증에서 촉진된 골대사를 억제함으로써 골밀도를 증가시킬 수 있을 것으로 사료된다.

參考文獻

1. Vedi S., Croucher P.I., Garrahan N.J., Compston J.E., Effect of hormone replacement therapy on cancellous bone microstructure

- in postmenopausal woman. *Bone* 19, 69-72, 1996
2. Canalis E., Mechanisms of glucocorticoid Action in Bone: Implications to glucocorticoid-induced Osteoporosis., *J. Clin. Endocri. Met.* 81, 3441-3447, 1996
 3. Johansson A.G., Lindah E., Blum W.F., Kollerup G. et al., Effect of growth hormone and insulin-like growth factor I in men with idiopathic osteoporosis. *J. Clin. Endocri. Met.*, 81, 44-48, 1996
 4. Pacifici R., Estrogen, cytokines, and pathogenesis of postmenopausal osteoporosis., *J. Bone. Miner. Res.*, 11, 1043-1051, 1996
 5. 中藥大辭典, 2권 p992, 1985, 小學館
 6. 生藥學, 韓大錫, p159, 1992, 東明社
 7. Aderiya B.I. et al. *Folia Microbial. Praha.*, 41, 407-12, 1997
 8. Hu K. et al., *Planta Med.* 62, 573-5, 1996
 9. Hikino H. et al., *Planta Med.* 52, 168-171, 1986
 10. Arghiniknam M., et al., *Life Sci.*, 59, PL147-57, 1996
 11. Undie A.S. et al., *J. Ethnopharmacol.*, 15, 133-44, 1986
 12. 林準圭 外：東醫物理療法科學, 서울, 高文社, p.325, 1993.
 13. 王奇外：黃帝內經素問今釋, 서울, 成輔社, p.60, 94, 212, 1983.
 14. 許浚：東醫寶鑑, 서울, 南山堂, pp.278-296, 1994.
 15. 金定濟：診療要鑑 上, 서울, 東洋醫學 研究院, pp.416-417, 1983.
 16. 全國 漢醫科大學 再活醫學科 教授室篇：東醫再活醫學科學, 書苑堂, pp.26-37, p.48, pp.181-184, 1995
 17. 이명식 外：韓方專門醫叢書, 서울, 해동의학사, pp.53-64, 1996.
 18. 許芝銀 外：外科病實用方, 江蘇科學技術出版社, 江蘇省, pp.54-58, p.70, 1993.
 19. 陳貴廷 外：實用中西醫結合診斷治療學, 서울, 一中社, pp.1611-1619.1992.
 20. 新太陽社 編輯局 百科事典部：原色最新大百科事典, 新太陽社, p.111, 128, 1981.
 21. 河北醫學院校釋：靈樞經校釋, 人民衛生出版社, p.182, 355, 1986.
 22. 那錫波：傷寒論臨床實驗錄. 天津, 天津科學技術出版社, p.160, 1988.
 23. 李東垣：東垣十書醫書, 서울, 大星文化社, p.409, 1989.
 24. 王肯堂：六科證治準繩, 醫部全錄, 北京, 人民衛生出版社, 5卷 p.2617, 1989.
 25. 張介賓：景岳全書, 上海 上海科學技術社出版, p.891, 1984.
 26. 顧伯華：實用中醫內科學, 一中社, pp.569-573, 1988.
 27. Delmas P.D.: Biochemical markers of bone turnover for the clinical investigation of osteoporosis. *Osteoporosis Int. supp* 1, S81-86, 1993
 28. Delmas P.D., Gineytes E., Bertholin A., Garnero P., Marchand F., Immunoassay of pyridinoline crosslinks excretion in normal adults and in paget's disease. *J. Bone Mineral Res.* 8, 643-648, 1993
 29. Lowik C.W., Pluijm G., Bloys H., Hoekman K., Bijvoet O.L., Aarden L.A., Papapoulos S.E., Parathyroid hormone (PTH) and PTH-like protein(PLP) stimulate interleukin-6 production by osteogenic cells: A possible role of interleukin-6 in osteoclastogenesis. *Biochem Biophys. Res. Commun.*, 162, 1546-1552, 1989
 30. Kanehisa J., Heersche J.N.: Osteoclastic bone resorption: in Vitro analysis of the rate of resorption and migration of

- individual osteoclasts. *Bone* 9, 73-79, 1988
31. Hattersley G., Chambers T.J. : Calcitonin receptors as markers for osteoclastic differentiation : Correlation between generation of bone resorptive cells that express calcitonin receptors in mouse bone marrow cultures. *Endocrinology*, 125, 1606-1612, 1989
32. Lukert B.P., Higgins J.C., Stoskopf M.M., Serum osteocalcin is increased in patients with hyperthyroidism and decreased in patients receiving glucocorticoids. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 62, 1056-1058, 1986
33. Recker R.R., Salville P.D., Heaney R.P. : Effect of estrogens and calcium carbonate on bone loss in postmenopausal woman. *Ann. Intern. Med.* 87, 649-655, 1977
34. Sziklai I., Ribari P. : The effect of flavone treatment on human osteocytic ossicle organ culture. *Arch. Otorhinolaryngol* 242, 67-70, 1985
35. Benvenuti S., Tanini A., Frediani U., Bianchi S., Masi L., Casano R., Buffalino L., Serio M., Bradi M.L. : Effects of ipriflavone and its metabolites on a clonal osteoblastic cell line. *J. Bone Miner. Res.* 6, 987-996, 1991
36. Yamazaki I., Shino A., Shimizu Y., Tsukuda R., Shiakawa Y., Kinoshita M. : Effect of ipriflavone on glucocorticoid-induced osteoporosis in rats. *Life Sci.*, 38, 951-958, 1986