

牛膝 추출물이 골아세포 증식과 분화에 미치는 효과

서은아 · 문형철^{1*}

원광대학교 생활과학대학 식품영양학과, 1: 원광대학교 한의과대학 침구학교실

Effects of *Radix Achyranthis Bidentatae* Extract on Proliferation and Differentiation in Human Osteoblast-like Cells

Eun A Seo, Hyung Cheal Moon^{1*}

Department of Food and Nutrition, School of Human Environmental Science,
1: Department of Acupuncture & Moxibustion, School of Oriental Medicine, Wonkwang University

In order to investigate the effects of *Radix Achyranthis Bidentatae* (RAB) on the growth and differentiation of human osteoblast-like cells, we supplemented the culture medium of MG-63 cells with various concentrations of RAB water extracts. RAB extracts significantly stimulated cell growth, as confirmed by the colorimetric MTT (3-dimethylthiazol-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay. RAB extracts also increased the alkaline phosphatase (ALP) activity, which is a osteoblast differentiation marker. These results suggest that RAB can stimulate osteoblastic activity and may represent new pharmacological tools for the treatment of osteoporosis.

Key words : *Radix Achyranthis Bidentatae*, human osteoblast-like cell, alkaline phosphatase, osteoporosis

서 론

牛膝은 苦·酸, 平 無毒하고 肝·腎에 二經 작용하고 活血祛瘀, 通利關節, 引血引火下行, 補肝腎, 強腰膝 등의 효능이 있어 月經不調, 通經, 經閉, 產後腹痛, 濕熱關節痠痛, 吐衄血, 口舌生瘡, 頭痛, 眩暈, 腰膝酸痛無力 등의 병증을 치료한다^{1,2)}. 牛膝 추출물에 대한 연구문헌은 항염증, 항산화, 간 보호, 항암작용 등 다양하게 보고되고 있다³⁾.

골다공증이란 골의 화학적 조성에는 변화가 없고, 단위 용적 내의 골량 감소를 초래하여 경미한 충격에도 쉽게 골절을 일으킬 수 있는 질환으로⁴⁾, 폐경후 estrogen의 부족으로 인하여 발생되는 폐경기성 골다공증, 노화에 의한 노인성 골다공증의 원발성 골다공증과 다른 질병 등에 의하여 이차적으로 발생하는 속발성 골다공증으로 분류할 수 있는데, 난소를 비롯한 여성생식기의 적은 estrogen 결핍을 초래하여 속발성 골다공증을 유발하며 폐경기성 골다공증과 유사한 양상을 보이는데 이를 시술받은 여성들의 골밀도는 자연폐경된 여성들보다 더 많이 낮아진다^{5,7)}.

골은 생체의 지지조직이며 칼슘이나 인 등 무기질의 저장고로

서 체액의 이온 조절에 중요한 역할을 담당하고 있다. 골조직은 언뜻 정적으로 보이지만 활발한 대사가 일어나고 있으며, 항상 골흡수와 골형성 즉 골교체(remodeling)가 일어나고 있다. 골형성에는 미분화 간엽계 세포에서 유래하는 골아세포(osteoblast)가 관여하며, 파골세포에 의하여 골흡수가 시작되고 연속해서 생겨나는 골아세포에 의한 골형성으로 골교체가 종료되며 정상적인 상태에서 골흡수와 골형성은 일정한 균형을 유지하면서 이루어진다⁸⁻¹⁵⁾

본 연구에서 牛膝의 골아세포 증식 및 분화에 대한 효과를 조사하기 위하여 human osteoblast-like cell인 MG-63세포에 牛膝 추출물을 처리한 후 MTT assay를 이용하여 세포 증식 효과를 조사하고 또한 골아세포 분화 지표 인자인 alkaline phosphatase 활성도를 조사하여 유의한 결과를 얻어 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

세포배양에 사용한 세포배양 용기는 Falcon사(Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)로부터 구입하였으며, MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), sodium p-nitrophenylphosphate, diethanolamine (DTT) 등은 Santa Cruz사(Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였고, 세포배양

* 교신저자 : 문형철, 광주시 남구 주월동 543-8, 원광대학교 광주한방병원

E-mail : freer9@wonkwang.ac.kr, Tel : 062-670-6446

접수 : 2004/09/30 · 수정 : 2004/10/29 · 채택 : 2004/11/30

액 RPMI, Fetal bovine serum(우태아혈청), 항생제 등은 GIBCO BRL사(Grand Island, NY, USA)로부터 구입하여 사용하였다.

2. 세포배양

인간 유래 골아세포주인 MG-63 세포는 American Type Culture Collection(ATCC; Rockville, MD, U.S.A)에서 구입하였고, 10% FBS가 첨가된 DMEM에서 95% 공기와 5% 이산화탄소(CO₂)가 소용되는 습기가 충분한 대기에서 37°C를 유지하였다. 세포는 지수 성장을 유지하기 위해서 2-3일 마다 분주하여 배양하였다. 세포수는 hemacytometer를 이용한 표준 절차에 의해서 측정하였다.

3. 牛膝 추출물 제조

본 연구에 사용된 牛膝은 원광대학교 익산 한방병원에서 구입하였으며 물 추출을 위하여 牛膝 200g에 3차 증류수 1.8L를 환적플라스크에 넣고 냉각기를 부착하여 3시간동안 전열기로 전탕한 후 3,000rpm에서 20분간 원심분리하고 회전 진공 농축기로 감압농축한 후 동결건조기에서 건조하여 36.5g의 분말 시료를 얻었다.

4. MTT 분석

MG-63 세포를 96 well 세포배양 용기에 1×10⁴ cells/ml씩 분주하여 24 시간 세포배양 용기에 부착시키고, 안정화된 MG-63 세포에 牛膝 추출물을 처리하여 MTT (0.5mg/ml)와 반응시켰다. 생존 세포가 MTT로부터 생성한 보라색 불용성 formazan은 DMSO로 용해하여 570nm 파장에서 ELISA reader(Molecular Device, E-max, USA)로 흡광도를 측정하였다. 측정된 formazan 생성 정도는 대조군 세포에 비교하여 백분율(%)로 표시하였다.

5. Alkaline phosphatase(ALP) 활성도 분석

MG-63 세포를 60cm dish에 5×10⁶ cells/ml씩 분주하여 24 시간 세포배양 용기에 부착시키고, 안정화된 MG-63 세포에 牛膝 추출물을 처리한 후 PBS 용액을 이용하여 세포를 수집하였다. 수집된 세포에 0.1% Triton X-100을 이용하여 cell lysate를 얻은 후 1 M diethanolamine, 0.5 mM MgCl₂, pH 9.8의 완충액에 기질인 5 mM sodium p-nitrophenylphosphate를 첨가함으로써 ALP에 의해 생성되는 sodium p-nitrophenyl의 양을 405nm 파장에서 ELISA reader(Molecular Device, E-max, USA)로 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도는 대조군 세포에 비교하여 백분율(%)로 표시하였다.

6. 단백질 정량

단백질 정량은 bovine serum albumin을 기준으로 이용한 Bradford의 방법¹⁶⁾에 의거하여 정량하였다.

7. 통계 분석

실험 결과는 mean±S.E.M으로 표시하였으며 유의성의 검정은 Microcal Origin(Version 6.0)을 이용하여 ANOVA one-way test에 의하였으며 p값이 0.05 이하인 것만 유의한 것으로 하였다.

결 과

1. 牛膝 추출물의 세포 증식에 대한 효과

골아세포인 MG-63세포에 여러 농도의 牛膝 추출물을 24, 48 시간 동안 처리한 후 세포 증식에 대한 효과를 MTT 분석법을 이용하여 조사 하였다. 그 결과 1.0, 2.0 mg/ml 牛膝 추출물을 24시간 동안 처리한 군에서 대조군(100%)에 비하여 116.8%(p<0.05), 123.6%(p<0.05)로 나타나 유의한 증가를 나타냈다. 또한 48시간 동안 0.5, 1.0, 2.0 mg/ml의 농도로 처리한 군에서는 각각 113.6%(p<0.05), 123.6%(p<0.05), 136.8%(p<0.05)로 대조군에 비하여 유의한 증가를 나타냈다(Fig. 1).

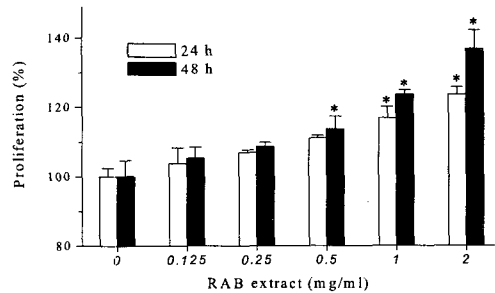


Fig. 1. Effects of *Radix Achyranthis Bidentatae* (RAB) extract on cell proliferation in MG-63 cells. Cells were treated with various concentrations of RAB extract for 24 or 48 hour. Cell proliferation rate was measured by MTT assay. The percentage of viable cells was calculated as a ratio of A570 of treated- to control cells (treated with 0.05% DMSO vehicle). Each value is the mean ± SEM of four independent experiments. *P<0.05 vs control

2. 牛膝 추출물의 ALP 활성도에 대한 효과

골아세포 분화 표지 인자 중의 하나인 ALP 활성도에 대한 牛膝 추출물의 효과를 관찰하기 위하여 MG-63 세포에 여러 농도의 牛膝 추출물을 48시간 동안 처리한 후 ALP 활성도를 측정하였다.

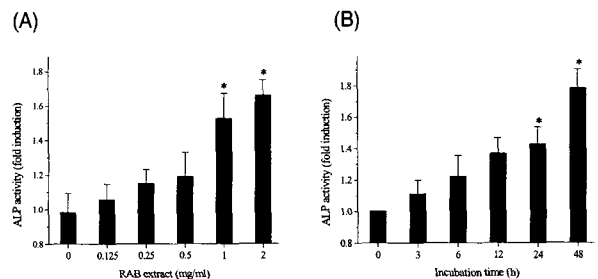


Fig. 2. Effects of *Radix Achyranthis Bidentatae* (RAB) extract on ALP activity in MG-63 cells. (A) Cells were treated with various concentrations of RAB extract for 48 hour. (B) Cells were treated with various time intervals with 2.0 mg/ml RAB extract. ALP activity rate was measured as Material and Methods. Each value is the mean ± SEM of four independent experiments. *P<0.05 vs control

그 결과 처리한 농도에 비례하여 ALP 활성도가 증가하였으며 특히 1.0, 2.0 mg/ml 牛膝 추출물을 처리한 군에서 ALP 활성도는 대조군에 비하여 각각 1.524배, 1.66배로 나타나 유의하게 증가하였다(Fig. 2A). 또한 2.0 mg/ml 牛膝 추출물을 3-48시간 동안 처리한 후 ALP 활성도를 조사한 결과 처리한 시간에 의존

적으로 ALP 활성도가 증가하였으며 특히 24, 48시간에서 ALP 활성도가 대조군에 비하여 각각 1.426배, 1.781배로 나타나 유의한 증가를 나타냈다(Fig. 2B).

고찰 및 결론

골다공증이란 골의 화학적 조성에는 변화가 없고, 단위 용적 내의 골량 감소를 초래하여 경미한 충격에도 쉽게 골절을 일으킬 수 있는 疾患으로⁴⁾, 한의학에서 “骨痿” 및 “骨痺”와 유사하여 증상을 辨證論治하면 腎陰虛, 腎陽虛, 肝腎虧虛, 脾胃氣虛, 氣滯血瘀, 氣血兩虛 등으로 나눌수 있다^{17,18)}. 또한 虛勞나 虛痺, 腎虧, 骨寒, 骨熱, 骨枯, 骨痛 등의 범위에 포함시키기도 한다¹⁹⁾. 牛膝은 活血祛瘀, 通利關節, 補肝腎, 強腰膝 등의 효능이 있어 濕熱關節痺痛, 腰膝酸痛無力 등의 병증을 치료한다고 알려져 있다¹²⁾.

본 논문은 牛膝 추출물의 強筋骨 효능을 실험적으로 규명하기 위하여 골아세포인 MG-63 세포에 牛膝 물 추출물을 처리한 후 골아세포의 증식과 분화에 미치는 효과를 조사하였다.

골은 골흡수와 골형성이 일정한 균형을 유지하면서 이루어지는데 골흡수에는 활혈간세포에서 유래하는 파골세포(osteoclast)가 관여하고 골형성에는 미분화 간엽계 세포에서 유래하는 골아세포(osteoblast)가 관여하며, 파골세포에 의하여 골흡수가 시작되고 연속해서 생겨나는 골아세포에 의한 골형성으로 골교체가 종료되며 정상적인 상태에서 골흡수와 골형성은 일정한 균형을 유지하면서 이루어진다¹⁵⁾. Fig. 1에서 나타났듯이 牛膝 추출물은 처리한 농도와 시간에 비례하여 골아세포 증식을 증가시켰다. 앞으로 파골세포에 대한 牛膝 추출물의 골흡수 억제 효과를 조사해야 할 것으로 사료된다.

최근 가장 많이 이용되는 골아세포 분화의 표식인자는 alkaline phosphatase (ALP) 활성도 측정이다. 인간에서 ALP는 non-specific, intestinal, palcental 조직에서 발견되고 있으며²⁰⁾, non-specific 조직에서 발견되는 ALP는 bone, kidney, liver에 각각 존재하는 3 가지의 isotype이 존재하는 것으로 알려져 있다²¹⁾. Bone의 ALP는 골아세포의 세포막과 연결되어 있으며 자라고 있는 bone의 기질 소체(matrix vesicles)에서 많이 보여지고 있다²²⁻²⁵⁾. 시험관내 연구에서 ALP 활성도는 bone의 구성성분인 collagen fiber의 형성률과 비례하는 것으로 알려져 있다²⁶⁾. 牛膝 추출물은 MG-63 세포의 ALP 활성도를 처리한 시간과 농도에 비례하여 유의하게 증가시켰다(Fig. 2). 이러한 결과로 牛膝 추출물이 골아세포의 분화를 촉진하여 골형성을 촉진하는 효과가 있음을 유추 할 수 있다. 그러나 직접적인 牛膝 추출물의 collagen fiber나 다른 골형성에 관련된 인자들에 대한 효과는 조사하지 못하였다.

앞으로 牛膝의 골아세포 증식과 분화에 대한 효과를 유전자 수준에서 조사하고 그 기전을 연구해야 할 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2004년도 원광대학교 교비 지원에 의해서 수행됨.

참고문헌

1. 신민교 : 임상 본초학. 영림사, pp.525-527, 1997.
2. Bensky D., Gamble A. : Chinese Herbal Medicine Materia Medica. Eastland Press. pp.408-410, 1993.
3. American Conference of Governmental Industrial Hygienists : Documentation of the Threshold Limit Values and Biological Exposure Indices, 6th ed. ACGIH, Cincinnati, OH. pp.BE147-55, 1991.
4. 韓醫婦人科學 教材編纂委員會 : 韓醫婦人科學 上, 서울, ?談, p.240, 2002.
5. 고석봉 외 5인 : 폐경기 증상과 양측 난소절제술이 골밀도에 미치는 영향, 대한 산부인과학회지, 37(10):2037-2047, 1994.
6. 문명상 외 4인 : 골다공증(골조송증), 서울, 최신의학사, p.1, pp.27-29, 32-37, 52-56, 1997.
7. 변영순, 신공범 : 골다공증이란 무엇인가, 서울, 정담출판사, pp.15-20, 43-45, 49-50, 70-73, 1997.
8. 김희진, 이태균 : 폐경기골다공증에 관한 문헌적 고찰, 대한 한방부인과학회지, 11(1):131-148, 1998.
9. 조한백, 박병렬 : 대보원전이 난소적출로 골다공증이 유발된 백서에 미치는 영향, 대한한방부인과학회지, 12(1):343-363, 1999.
10. 민현기 : 임상 내분비학, 서울, 고려의학, pp.220-224, 1990.
11. 민현기 외 : 내분비학, 서울, 고려의학, pp.699-700, 1269-1277, 1999.
12. 고은경 외 : 119여성클리닉-서울대 의대 출신 전문의 15명이 만든 책속의 종합병원, 서울, 도서출판 그린비, pp.283-293, 1990.
13. 李桂昇 : 身痛逐瘀湯이 Hydrogen Peroxide에 의해 損傷된 培養 脊髓 感覺 神經 細胞에 미치는 影響, 圓光大學校 韓醫學 專門大學院, 1999.
14. 대한골대사학회 : 골다공증, 서울, 최신의학사, pp.1-4, 1991.
15. 岡野一年 著, 서광 편집부 譯 : 골다공증, 광주, 서광, p.1,3, pp.6-12, p.15, 16, 336, 37, 46, 80, 81, pp.114-162, p.165, 2000.
16. Bradford M.M. : A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72, 248-254, 1976.
17. 金貞娟, 宋勇善 : 骨多孔症에 대한 東西醫學의 考察, 한방재활의학회지, 6(1):293-315, 1996.
18. 이응세, 김혜경 : 골다공증의 동의학적 임상문헌에 관한 고찰, 한방재활의학회지, 7(1):437-456, 1997.
19. 金鍾桓 : 骨多孔症에 관한 文獻的 考察(주로 最近 韓醫學의 臨床 및 實驗論文을 中心으로), 大韓鍼灸學會誌, 15(2):437-454, 1998.
20. Harris H. : The human alkaline phosphatase, what we know and what we don't know. Clin Chim Acta 186:133-136, 1989.
21. Cole D.E., Cohen M.M. : Mutations affecting bone-forming cells. In: HALL BK, ed. Bone, Volume 1. The osteocyte. Boca Raton: CRC Press, pp.442-452, 1992.
22. Robonson R. : The possible significance of hexose-phosphoric

- esters in ossification. *Biochem J* 93:415-422, 1923.
23. Siffert R.S. : The role of alkaline phosphatase in osteogenesis. *J Exp Med* 93:415-422, 1951.
24. McComb R.B, Bowers G.N. Jr, Posen S. : Alkaline phosphatase. New York: Plenum Press, 1979.
25. Risteli L., Risteli J. : Biochemical markers of bone metabolism. *Ann Med* 25:385-393, 1993.
26. Canalis E. : Effect of hormones and growth factors on alkaline phosphatase activity and collagen synthesis in cultured rat calvaria. *Metabolism* 32:14-20, 1983.