

荊芥가 造骨細胞에 미치는 影響

이주엽 · 황귀서*

경원대학교 한의학과 예방의학교실

The Effect of *Schizonepeta tenuifolia* on Osteoblast

Joo-Yup Lee & Gwi-Seo Hwang*

Department of preventive medicine,
College of Oriental Medicine, Kyungwon University

Abstract

Objectives : The author aimed to evaluate the effect of BuOH fraction(ST) from *Schizonepeta tenuifolia* on osteoblast proliferation in murine calvarial cells.

Methods : The osteoblast separated from murine calvariae was cultivated for 10 days and evaluated the cell function. After the addition of ST on the culture medium, we determined the effect of ST on the cell proliferation, protein synthesis, alkaline phosphatase activity, collagen synthesis, and apoptosis of the osteoblast.

Results :

1. ST increased the proliferation of osteoblast, and restored the decreased cell number in glucocorticoid (GC)-treated osteoblast.
2. ST increased protein synthesis of osteoblast, and restored the decreased protein synthesis in GC-treated osteoblast.
3. ST increased ALP activity of osteoblast, and restored the decreased enzyme activity in GC-treated osteoblast.
4. ST increased collagen synthesis of osteoblast, and restored the decreased collagen synthesis in GC-treated osteoblast.
5. ST did not change the survival rate of osteoblast, but increased the survival rate in GC-treated osteoblast.

· 접수 : 2009년 11월 30일 · 수정접수 : 2009년 12월 11일 · 채택 : 2009년 12월 13일

* 교신저자 : 황귀서, 경원대학교 한의과대학 예방의학교실

전화 : 031-750-5423, 팩스 : 031-721-7029, 전자우편 : seoul@kyungwon.ac.kr

Conclusions : It is concluded that ST might reduce the osteoporosis resulted from augmentation of osteoblast proliferation.

Key words : *Schizonepeta tenuifolia* (ST), Osteoblast, Osteoporosis, Glucocorticoid(GC)

I. 서론

골량은 골을 형성하는 조골세포(osteoblast)와 골을 흡수하는 파골세포(osteoclast)의 균형으로 항상성을 유지한다. 그러나, 골 형성이 골 흡수보다 상대적으로 저하되면 골다공증이 유발된다. 골다공증의 원인으로는 폐경으로 인한 에스트로겐 감소, 신체노화, 부갑상선 호르몬 증가, 비타민 D 섭취 부족, 스테로이드성 약물 등 다양한 원인등이 알려져 있는데, 이들은 파골세포의 기능 활성화나 조골세포 기능 억제를 통해서 골다공증을 유발한다.¹⁻²⁾

골을 형성하는 조골세포는 골수의 mesenchymal stem cell에서 유래하며, TGF(transforming growth factor), IGF-I(insulin-like growth factor), BMPs(bone morphogenetic proteins), VEGF(vascular endothelial growth factor) 등에 의해 분화가 촉진된다.³⁻⁴⁾ 조골세포의 분화가 촉진되고 기능이 활성화되면 골을 구성하는 단백질인 collagen(type I)이 합성되며, β -glycerol phosphate를 가수분해하여 골에 칼슘이 침착되는 석회화를 촉진하는 ALP(alkaline phosphatase)의 활성도 증가한다.⁵⁻⁶⁾

한의학에서 골은 <素門·五臟生成論>에 “腎의 습은 뼈이다.”고 하였고, <素門·宣明五氣論>에는 “五臟은 각기 그 주관하는 바가 있는데, 腎은 뼈를 주관한다.”고 하였으며 <素門·六節臧象論>은 “腎은 그 충만함이 뼈에 있다.”고 하여 腎과 뼈과의 밀접한 관계를 말해왔다. 또 <素門·逆調論>에선 “腎者水也, 而生于骨,

腎不生即髓不能滿”이라고 하여, 腎水가 뼈를 만드는데 그렇지 못하면 骨髓가 채워질 수 없다고 하였다. 결국 腎이 骨髓를 충족하면 骨格이 强壯하지만, 腎이 虛損하여 骨髓의 化源이 부족하면 骨格이 충분히 영양을 받을 수 없다. 따라서, 腎이 虛弱해지면 骨과 骨髓도 약해지며 골다공증이 유발되는 것으로 볼 수 있다. 이와는 별도로, 骨의 병은 대개 風濕, 瘀血, 痰飲, 熱邪, 先天不足, 痰攻 등으로 병발되어 진행된다고 한다.⁷⁾

형개(*Schizonepeta tenuifolia*)의 성미는 性溫 無毒하고 辛味하다소 알려져 있다. 주성분은 정유성분으로 d-menthone, dl-menthone과 소량의 d-limonene이 있으며, 그 밖에 heperidine, ursolic acid, luteolin, daucesterol 등이 보고되었다. 한의학에서는 發表, 散風, 透疹, 理血의 효능이 있어, 감기발열, 두통, 癰腫, 인후 부종 및 동통, 중풍으로 인한 開口不能, 吐血, 鼻出血, 血便, 子宮出血, 産後血暈, 瘡疥, 癩癧 등을 치료하는데 사용되었다.⁸⁾ 최근, 형개 추출물의 항히스타민 작용과 항소양증 작용이 보고되었으며,⁹⁻¹⁰⁾ 주성분인 필수지방에 의한 항충작용 및 항진균 작용도 보고되었다.¹¹⁾

본 논문에서는 한약을 이용하여 골다공증에 효과적인 약물을 개발하고자 형개 추출물 분획을 이용한 조골세포 기능향상을 평가하고자 하였으며, 이를 위해 형개의 부탄올 추출물 분획이 조골세포의 증식, 조골세포에서 단백질 생합성, alkaline phosphatase 활성 및 collagen 생합성에 미치는 영향, 골세포 생존율에 미치는 영향을 평가하였다.

(6) (4)군에 10 μ g/ml의 ST를 첨가한 군(ST10-d)으로 나누어 시행하였다.

II. 실험재료 및 방법

1. 실험재료

1) 실험동물

실험동물은 임신한 암컷 S.D. 랫드를 대한 바이오링크에서 구입하여 실험실에 2~3일 적응시킨 후 사용하였다. 실험기간동안 고품사료와 물을 충분히 공급하여 자유롭게 섭취하도록 하였다.

2) 약재

약재는 경원대학교 한방병원에서 구입한 형개 (*Schizonepeta tenuifolia*)를 사용하였다.

2. 방법

1) 검액제조

형개(ST) 100g에 MeOH 1,000ml를 가하고 6시간 이상 가열하여 환류추출하였다. 여과지를 이용하여 여과한 다음, 여액을 Evaporator (EYERA, Japan)로 감압 농축한 다음 건조시켰다. 여기에 증류수를 넣어 현탁시켰다. 이 후 클로르포름과 butanol로 차례로 분획을 실시하였으며, 이중 butanol층을 동결 건조하여 실험 대상에 적용할 때까지 냉동보관하였다. 실험시 검액(BuOH 추출분획 분말)을 배지에 녹인 후 pore size 0.45 μ m의 여과지에 통과시킨 후 사용하였다.

2) 약물처리

실험은 6개군, 즉 (1) 정상군(NC), (2) 정상군에 1 μ g/ml의 ST를 첨가한 군(ST1), (3) 정상군에 10 μ g/ml의 ST를 첨가한 군(ST10), (4) 정상군에 10uM prednisolone을 처리한 군(OC), (5) (4)군에 1 μ g/ml의 ST를 첨가한 군(ST1-d),

3) 태자 두개골세포(FCS) 배양

임신 21일 된 쥐의 자궁을 절개하여 fetus를 꺼낸후, 후두부를 절개하고 calvarie를 적출하였다. calvarie에 붙어있는 결체조직을 제거하고, HBSS로 세척했다. calvarie를 1.5ml의 collagenase, trypsin, 0.5mM EDTA 용액에 넣어 37°C에서 반응시켰다. 상등액을 취하여 500rpm에서 원심분리하여 침전된 calvarial cell을 얻었다. PBS에 재현탁하여 1500rpm에서 원심분리하여 세척한 후, 이를 DMEM 배지에 넣어 현탁한 후 37°C, 5% CO₂에서 배양하였다. 상등액을 제거하고 남은 calvarie에 다시 1.5ml의 효소를 넣고, 상기 반응을 수회 반복하였다. 세포의 배지는 3일에 한 번씩 교환하였다. 배양한 세포는 2주 후 trypsin 처리하여 세포수를 측정된 후 실험에 사용하였다.

4) 골세포의 분열능 측정

FCS를 1.0-3.0 \times 10⁵/well로 seeding 하였으며, 배양한 세포수를 세기 위하여 배지를 제거하고, HBSS로 세포를 세척하였다. 이후 collagenase, trypsin, 0.5mM EDTA를 가하여 세포를 culture plate로부터 분리하였다. 세포를 Isoton-2 solution을 이용하여 20배 희석한 후 세포계수기(Sysmax F-820)로 세포의 수를 측정하였다.

5) ALP(alkaline phosphatase) 활성 측정

Cell을 배양한 plate를 냉각한 PBS로 세척한 후 cell을 scraper로 긁어 내어 leupeptin이 함유된 냉각된 PBS에 현탁하였다. 이 현탁액을 냉각상태에서 ultrasonicator로 sonication한 후 3000rpm에서 10분간 원심분리하였다. 원심분리후 상등액을 취하여 0.56M 2-amino-2-methy 1-propanol, 1mM MgCl₂, 10mM p-nitrophenylphosphate를 함유한 반응액과 37°C에서 10분간 반응시켰다.

0.2N NaOH 1ml를 가하여 반응을 중단시킨 후 405nm에서 흡광도를 측정하였다.

6) Collagen 합성량 측정

세포를 배양한 plate를 PBS로 세척한 후 cell scraper를 이용해 세포를 긁어내었다. 이를 5mM dithiothreitol이 함유된 50mM Tris buffer에 현탁시킨 후 ultrasonicator로 sonication 시켰다. 이후, 100,000 × g에서 30분간 원심분리하여 상등액을 제거한 후 pellet에 6N HCl을 가하여 24시간 동안 100°C에서 가수분해하였다. 이를 조심스럽게 6N NaOH로 중화시킨 후, 물을 이용하여 적절한 농도로 희석하였다. Hydroxyproline(OH-P)은 amino acid analyzer를 이용하여 정량하였다.

3. 통계 분석

각 군과의 유의성 검증을 위하여 Student's t-test를 실시하고, p값이 0.01 및 0.05보다 작은 경우 유의성이 있는 것으로 인정하였다.

III. 결 과

1. 조골세포 분열능에 미치는 영향

랫드 태자의 두개골로부터 분리한 골세포를 10일간 배양한 결과, 정상세포군은 23.67×10^5 /well이었으며, 1 μ g/ml의 ST를 처리한 경우에는 34.83×10^5 /well로서 증가를 나타내었다. 10 μ g/ml의 ST를 처리한 경우에는 33.83×10^5 /well로서 정상에 비해 증가하였다. OC군의 두개골 세포가 11.17×10^5 /well로서, 정상군에 비해 현저히 저하하는 것으로 나타났다. OC군의 감소한 두개골 세포의 분열능은 1 μ g/ml의 ST를 처리한 경우에는 23×10^5 /well로서 증가를 나

타내었다. 10 μ g/ml의 ST를 처리한 경우에도 30.17×10^5 /well로서 역시 감소되었던 분열능이 유의하게 증가되었다.

2. 단백질 합성에 미치는 영향

랫드 태자의 두개골로부터 분리한 골세포를 10일간 배양한 결과, 정상세포군이 생성하는 단백질량은 3.40 μ g/ml이었으며, 1 μ g/ml의 ST를 처리한 경우에는 3.28 μ g/ml로서 약간 감소했다. 10 μ g/ml의 ST를 처리한 경우에는 3.87 μ g/ml로서 정상에 비해 유의한 증가를 나타내었다. OC군의 두개골 세포에서 단백질 총량은 2.65 μ g/ml로서, 정상군에 비해 현저히 저하되었다. OC군의 감소한 두개골 세포의 기능 억제 1 μ g/ml의 ST를 처리한 경우에서의 단백질 생합성량이 3.32 μ g/ml로서 증가를 나타내었다. 또한, 10 μ g/ml의 ST를 처리한 경우에는 3.73 μ g/ml로서 역시 OC군의 감소된 단백질 생합성량을 유의하게 증가시켰다.

3. Alkaline phosphatase(ALP)의 활성에 미치는 영향

랫드 태자의 두개골로부터 분리한 골세포를 10일간 배양한 결과, 정상세포군에서의 ALP 활성은 12.33unit/ml이었으며, 1 μ g/ml의 ST를 처리한 경우에는 16.83unit/ml로서 유의적인 증가를 나타내었다. 10 μ g/ml의 ST를 처리한 경우에도 17.5unit/ml로서 정상에 비해 증가하였다. OC군의 두개골 세포에서 ALP 활성은 6.12unit/ml로서, 정상군에 비해 현저히 저하되었다. OC군에서 저하된 ALP 활성은 1 μ g/ml의 ST를 처리한 경우에는 13.17unit/ml, 10 μ g/ml의 ST를 처리한 경우에는 17.5unit/ml로서 감소한 ALP 활성을 유의하게 증가시켰다(p<0.01).

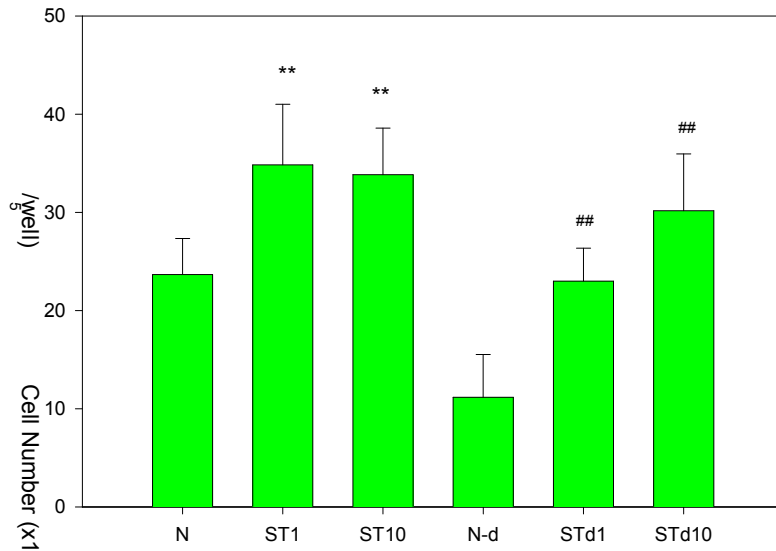


Fig. 1 Effect of ST on proliferation of murine calvarial cell. Cells were counted in 10th day after ST treatment. Each bars represents the mean±S.D. of 6wells.

N: vehicle
 ST 1: 1µg/ml of ST
 ST10: 10µg/ml of ST
 Nd: vehicle + prednisolone
 STd1: vehicle + prednisolone +1µg/ml of ST
 STd10: vehicle + prednisolone +10µg/ml of ST

* : p < 0.05 vs N, ** : p < 0.01 vs N
 # : p < 0.05 vs Nd ## : p < 0.01 vs Nd

4. Collagen 생합성에 미치는 영향

랫드 태자의 두개골로부터 분리한 골세포를 10일간 배양한 결과, 정상세포군의 collagen 생합성량은 2.0µg/well이었으며, 1µg/ml의 ST를 처리한 경우에는 2.15µg/well로서 약간 증가하는 경향을 나타내었다. 10µg/ml의 ST를 처리한 경우에는 2.5µg/well로서 유의한 변화를 나타냈다. OC군의 두개골 세포에서 collagen 합성량은 1.02µg/well로서, 정상군에 비해 현저히 저하되었다. OC군의 감소한 두개골 세포의 collagen 합성

량은 1µg/ml의 ST를 처리한 경우에는 1.43µg/well, 10µg/ml의 ST를 처리한 경우에는 2.02µg/well로서 collagen 합성량을 증가시켰다(p<0.01).

5. Cell Apoptosis에 미치는 영향

랫드 태자의 두개골로부터 분리한 골세포를 10일간 배양한 결과, 정상세포군의 생존율은 0.535이었으며, 1µg/ml의 ST를 처리한 경우에는 0.51로서 약간의 감소를 나타내었다. 10µg/ml의 ST를 처리한 경우에는 0.54로서 정상에 비

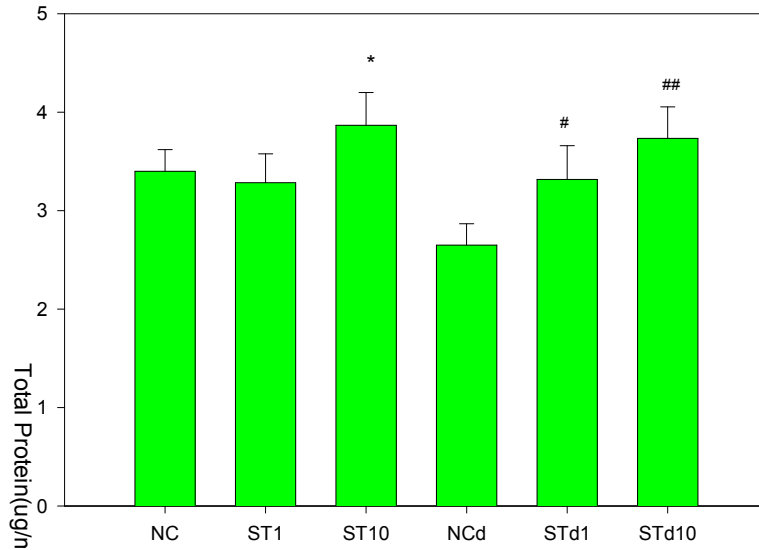


Fig. 2 Effect of ST on protein synthesis of murine calvarial cell. Total protein were measured in 10th day after ST treatment. Each bars represent the mean±S.D. of 6wells.

NC: vehicle
 ST 1: 1µg/ml of ST
 ST10: 10µg/ml of ST
 NCd: vehicle + prednisolone
 STd1: vehicle + prednisolone +1µg/ml of ST
 STd10: vehicle + prednisolone +10µg/ml of ST

*: p < 0.05 vs NC **: p < 0.01 vs NC
 #: p < 0.05 vs NCd ##: p < 0.01 vs NCd

해 약간 증가하였다. OC군의 두개골 세포에서의 생존율은 0.41로서, 정상군에 비해 현저히 저하됨이 관찰되어 조골세포의 기능을 억제된 것으로 나타났다. OC군의 감소한 두개골 세포 생존율은 1µg/ml의 ST를 처리한 경우에는 0.49, 10µg/ml의 ST를 처리한 경우에는 0.52로서 생존율을 유의하게 증가시켰다(p<0.01).

IV. 고 찰

골은 골형성세포인 조골세포(osteoblast)와 골

흡수세포인 파골세포(osteoclast) 및 골세포(osteocyte)에 의해 끊임없이 형성되고 흡수되는 동적인 조직(dynamic tissue)이다. 골다공증은 파골세포의 기능 및 작용시간 증가 또는 조골세포의 기능 및 작용시간 감소와 같이 골형성이 골흡수보다 상대적으로 저하되어 나타난다.⁴⁾

골다공증은 발병원인에 따라 에스트로겐 결핍으로 인한 I형 골다공증, 노인성인 II형 골다공증, 약물 및 기타 질병으로 인한 속발성 골다공증으로 나눌 수 있다. 여성 폐경기 이후에 나타나는 I형 골다공증에서는 에스트로겐 결핍으로 파골세포에 대한 부갑상선 호르몬(PTH)의

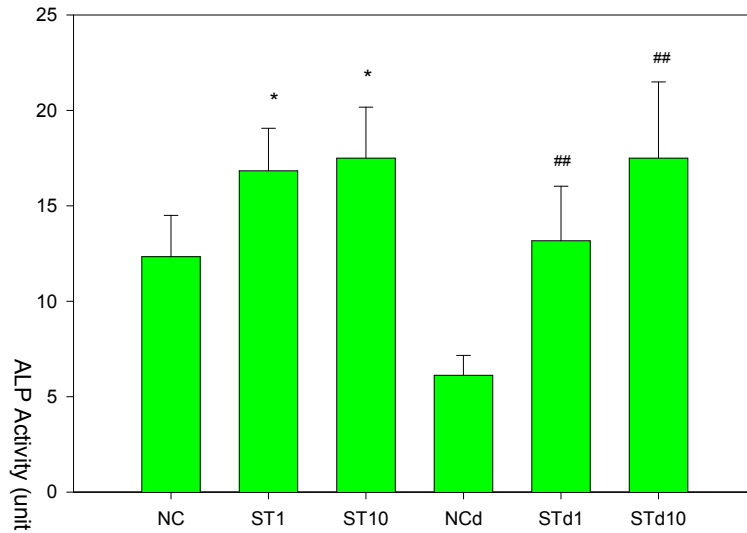


Fig. 3 Effect of ST on alkaline phosphatase activity of murine calvarial cell. Alkaline phosphatase activity was determined in 8th day after ST treatment. Each bars represent the mean±S.D. of 6wells.

NC: vehicle
 ST 1: 1µg/ml of ST
 ST10: 10µg/ml of ST
 NCd: vehicle + prednisolone
 STd1: vehicle + prednisolone +1µg/ml of ST
 STd10: vehicle + prednisolone +10 µg/ml of ST

*: p < 0.05 vs NC **: p < 0.01 vs NC
 #: p < 0.05 vs NCd **: p < 0.01 vs NCd

작용이 증가되어 골 기질물질의 파괴와 칼슘 흡수가 증가된다. 이로 인해 높아진 혈중 칼슘은 feedback 억제를 통해 PTH 유리가 억제하고, 동시에 Vit D 활성형인 1,25(OH)₂D₃ 감소와 장내 칼슘 흡수 감소를 가져온다. 한편, 노인성 골다공증인 II 형 골다공증의 원인으로는 신장에서의 1α-수산화효소 활성 감소와 Vit D의 활성화 감소 및 그에 따른 장내 칼슘 흡수의 저하, PTH 증가가 그 원인으로 알려져 있다.^{1), 7), 11)}

골다공증의 주요한 원인중 하나인 속발성인 경우, 주로 부신피질호르몬 투여로 나타나는

데,⁸⁾ 자가면역질환, 호흡기계 질환, 소화기계 질환, 장기이식, 종양 환자 등 부신피질호르몬이 쓰이는 질병에서 골다공증이 지속적으로 증가된 보고가 있다.^{13), 14), 15), 16), 17)} 부신피질호르몬은 조골세포(osteoblast)에 작용하여 세포 증식을 억제시키고 조골세포 분화를 감소시킨다. 또한, 부신피질호르몬은 골세포 증식능을 증가시키는 growth factor인 IGF-I(insulin like growth factor I), IGF-II(insulin like growth factor II), PDGF(platelet derived growth factor), IGFBP-5 등을 억제시키는 것으로 보고

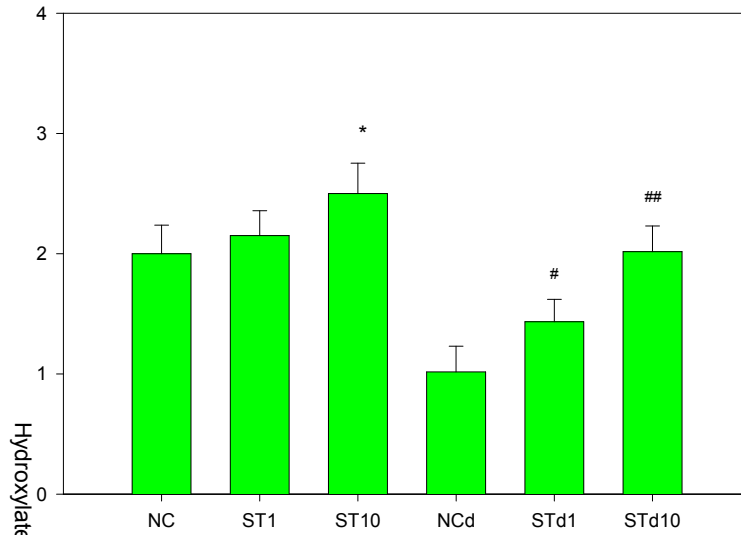


Fig. 4 Effect of ST on collagen synthesis of murine calvarial cell. Collagen synthesis was determined in 10th day after ST treatment. Each bars represent the mean±S.D. of 6wells.

NC: vehicle
 ST 1: 1µg/ml of ST
 ST10: 10µg/ml of ST
 NCd: vehicle + prednisolone
 STd1: vehicle + prednisolone +1µg/ml of ST
 STd10: vehicle + prednisolone +10µg/ml of ST

*: p < 0.05 vs NC **: p < 0.01 vs NC
 #: p < 0.05 vs NCd ##: p < 0.01 vs NCd

되었다.^{9), 10)} 이 결과, 비교원질 단백질로 칼슘과 결합하는 오스테오칼신(osteocalcin) 생합성과 교원질인 콜라겐 합성 억제와 골형성이 저하된다. 이와는 별도로, 부신피질호르몬은 파골세포(osteoclast)에 작용하여 세포분화를 촉진하고, 교원질 분해효소(collagenase)를 활성화시켜 골재흡수(bone resorption)를 증가시킨다. 또한, 부신피질호르몬은 Vit D 작용을 억제하고 PTH 분비를 촉진하여, 장관내 칼슘 흡수 억제, 신세뇨관 칼슘 재흡수 억제, 뼈에 칼슘 침착을 억제하여 골다공증을 유발할 수 있다.^{11), 16)}

본 연구에서는 골다공증 예방 및 치료방법

을 개발하기 위하여, 부신피질호르몬에 의해 감소되는 조골세포의 기능을 활성화시켜 골형성을 증가시키는 약물을 찾고자 하였다. 이를 위하여 랫드의 두개골로부터 분리 배양한 골세포 및 GC(glucocorticoid)을 처리한 골세포에 각각 형개 추출물 부탄을 분획을 투여한 후 조골세포의 분열능과 골형성을 나타내는 생화학적 지표에 미치는 영향을 측정하였다. 우선, 랫드의 두개골로부터 조골세포를 배양하여 형개 추출물 분획(ST)이 세포에 미치는 영향을 평가하고자 하였다. 연구지표로는 조골세포 분열능에 미치는 영향, 골세포의 단백질 합성능에

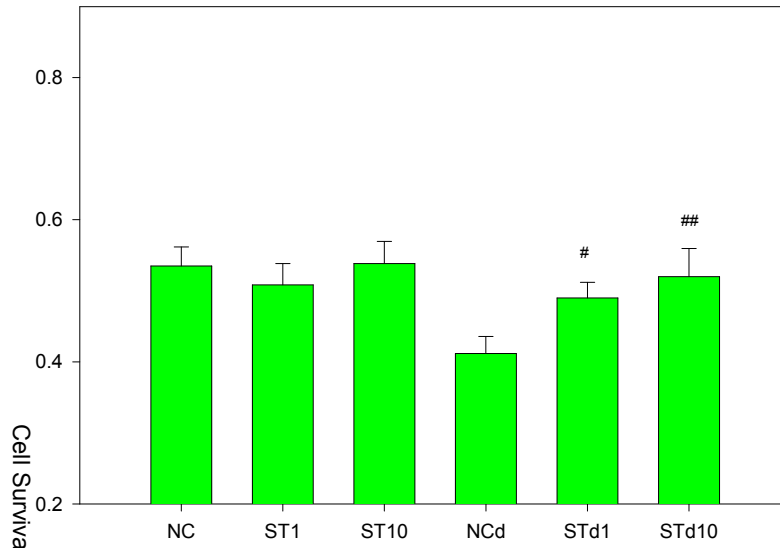


Fig. 5 The viability of murine calvarial cell in the presence of ST. Cell viability was measured by MTT assay. Each bars represent the mean \pm S.D. of 6 wells.

NC: vehicle
 ST 1: 1 μ g/ml of ST
 ST10: 10 μ g/ml of ST
 NCd: vehicle + prednisolone
 STd1: vehicle + prednisolone +1 μ g/ml of ST
 STd10: vehicle + prednisolone +10 μ g/ml of ST

*: p < 0.05 vs NC **: p < 0.01 vs NC
 #: p < 0.05 vs NCd ##: p < 0.01 vs NCd

미치는 영향, 골 석회침착(calcification)에 관여하는 골세포 표면의 ALP(alkaline phosphatase) 활성에 미치는 영향, 골세포의 교원질 생합성에 미치는 영향, 그리고 골세포의 자가사멸(apoptosis)에 미치는 영향을 선정하여 평가하였다.

배양된 골세포에 ST를 처리한 후 10일간 배양한 결과, 정상적인 골세포와 GC(glucocorticoid)로 처리해 골세포 증식능이 현저히 감소한 실험군에서 모두 대조군에 비해서 유의적인 증가를 나타내었다. ST는 대조군에 비해 유의적인 증가를 나타냈으며, GC에 의해 감소한 두개골 세포에서도 감소된 조골세포의 기능을 향상시키는

것으로 나타났다(Fig. 1). 이는 장기간 GC와 조골세포를 배양했을 경우 세포의 생존능이 감소한다는 보고와 일치한다. ST는 GC에 의한 조골세포 생존능 감소를 억제하는 것으로 판단된다.

또한, 랫드 태자의 두개골로부터 분리한 골세포를 10일 간 배양한 결과, ST를 처리한 경우에는 정상 대조군 세포가 생성하는 단백질 량에 비해 약간 감소되었으며, 10 μ g/ml의 ST를 처리한 경우에는 정상 대조군 세포가 생성하는 단백질량에 비해 증가를 나타내었다. GC를 처리한 세포에서 단백질 생합성량은 정상군에 비해 현저히 저하되어, 조골세포에서 생성하는

단백질의 합성 기능이 GC에 의해 억제됨을 알 수 있었다. 이는 세포의 생존능 결과와 비슷한 결과를 나타냈으며, ST는 GC에 의해 감소된 단백질 합성을 증가시켜 GC에 의한 세포기능 억제체를 차단할 수 있을 것으로 판단되었다(Fig. 2).

ALP는 세포 외에서 β -glycerol phosphate를 가수분해하고 PO_4^- 농도를 증가시켜 골세포의 칼슘 침착에 관여하는 효소로서 조골세포 기능을 측정하는 지표성분이다. ALP의 활성을 측정한 결과, 정상세포에 ST를 1 μ g/ml 농도로 처리한 경우와 ST를 10 μ g/ml 농도로 처리한 경우 모두 정상대조군에 비해 증가하였다. 이는 세포의 분열과 함께 조골세포의 활성을 증가시키는 것을 시사한다. GC를 처리한 두개골 세포에서의 ALP 활성은 정상군에 비해 현저히 저하되어 GC이 조골세포의 기능을 억제하는 것으로 나타났다. 여기에 ST를 처리한 경우 GC만을 처리했던 대조군보다 현저한 증가를 보여 GC에 의해 억제된 조골세포 기능을 회복시키는 것으로 나타났다(Fig. 3).

조골세포에 의해 생성되는 골기질 물질인 교원질(collagen) 생합성에 미치는 영향을 측정한 결과 ST를 처리한 경우 정상에 비해 유의한 증가를 나타내었다. GC와 함께 처리한 ST의 영향을 측정한 결과, 정상세포에 GC를 함께 처리한 두개골 세포에서의 collage 생합성량은 정상군에 비해 현저히 저하되어 조골세포의 기능이 억제된 것으로 나타났고, 여기에 ST를 처리한 경우 모두 GC에 의해 감소한 collagen 생합성량을 증가시켰다(Fig. 4).

또한, Cell survival rate에 미치는 ST의 영향을 측정한 결과, 정상세포에 ST를 1 μ g/ml 농도로 처리한 경우 약간의 감소를 나타냈으며, ST를 10 μ g/ml 농도로 처리한 경우에는 생존율이 약간 증가하였다. GC을 함께 처리한 경우 정상 세포군보다 생존율이 현저히 감소하였는데, 이는 GC 자체의 조골세포 기능억제와 관련이 있다. 여기에 ST를 처리하였을 때 모두 GC

에 의해 감소한 생존율을 증가시켰다(Fig. 5).

이상의 결과, 형개는 정상세포에 작용했을 때, 조골세포 분열능을 증가시켰고, 단백질 합성도 고용량의 투여에서 유의한 증가를 보였으며 ALP의 활성화와 콜라겐 생합성을 증가시키는 것으로 나타났다. 다만, 세포 생존율에는 커다란 변화를 미치지 못했다. 형개를 1 μ g/ml 농도로 첨가한 경우보다 10 μ g/ml 농도로 첨가한 경우 조골세포 분열능을 제외하고 약물의 효과가 증가되었다. 또한, 형개 추출물의 부탄올 분획은 GC(glucocorticoid)로 처리된 골세포에서 감소한 조골세포의 세포증식과 분열능을 호전시킬 수 있는 것으로 평가되었다. 이와 함께 조골세포의 단백질 생합성, ALP의 활성 발현, collagen의 생합성, 세포 생존율에도 긍정적인 효과를 나타내었다.

결론적으로, 형개 추출물의 부탄올 분획(ST)은 조골세포의 증식능 개선, 골 기질물질 생성 증가, 칼슘 침착 등을 증가시켜 골다공증에 효과적일 것으로 판단되었다. 또한, glucocorticoid (GC)로 인해 발생하는 골다공증의 치료 및 예방에 응용할 수 있을 것으로 판단되었다.

V. 결 론

랫드의 두개골로부터 분리 배양한 조골세포 및 glucocorticoid(GC)를 처리한 조골세포에 각각 형개 추출물 부탄올 분획(ST)을 첨가한 다음 조골세포의 증식능과 골 형성을 나타내는 생화학적 지표를 측정하여 다음의 결과를 얻었다.

1. ST는 정상 조골세포의 분열능을 증가시켰으며, GC에 의한 세포 분열 감소를 억제하였다.
2. ST는 정상 조골세포의 단백질 생합성량을 증가시켰으며, GC에 의한 조골세포의 단백질 생합성량 감소를 억제하였다.

3. ST는 정상 조골세포의 ALP 활성을 증가시켰으며, GC에 의한 ALP 활성감소를 억제하였다.

4. ST는 정상 조골세포의 collagen 생합성량을 증가시켰으며, GC에 의한 조골세포의 collagen 생합성량 감소를 억제하였다.

5. ST는 정상 조골세포의 Apoptosis에는 별 영향을 주지 않았으나, GC에 의한 조골세포의 Apoptosis를 감소시켰다.

이상의 연구결과, ST는 조골세포의 증식을 증가시키고, 골기질 물질의 생합성을 증가시켜 골형성을 증가시키는 것으로 나타났다. 따라서, ST는 골다공증의 치료 또는 예방에 응용될 수 있을 것으로 판단되었다.

감사의 글

이 논문은 경원대학교 연구비 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- 1) 대한병리학회. 병리학 PATHOLOGY, 고문사, p1001-1008, 2000.
- 2) Weinstein RS, Jilka RL, Parfitt AM, Manolagas. Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids. Potential mechanisms of their deleterious effects on bone, *J. Clin. Invest* 101 : 274-282, 1998.
- 3) Wildemann B, Burkhardt N, Luebbstedt M, Vordemvenne T, Schmidmaier G. Proliferating and differentiating effects of three different growth factors on pluripotent mesenchymal cells and osteoblast

- like cells. *J Orthop Surg Res.* 20 ; 27, 2007
- 4) Koch H, Jadlowiec JA, Campbell PG. Insulin-like growth factor-I induces early osteoblast gene expression in human mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.* 14 : 621-31, 2005.
- 5) Kim HK, Cho SG, Kim JH, Doan TK, Hu QS, Ulhaq R, Song EK, Yoon TR. Mevinolin enhances osteogenic genes(ALP, type I collagen and osteocalcin), CD44, CD47 and CD51 expression during osteogenic differentiation. *Life Sci.* 27 ; 84 (9-10) : 290-5, 2009.
- 6) Sowa H, Kaji H, Yamaguchi T, Sugimoto T, Chihara K. Activations of ERK1/2 and JNK by transforming growth factor beta negatively regulate Smad3-induced alkaline phosphatase activity and mineralization in mouse osteoblastic cells. *J. Biol Chem.* 277(39) : 36024-31, 2002.
- 7) 牛耕, 李慶雨 번역 : 譯解編注 黃帝內經素問, 여강출판사, 1권 p317, 318, 333, 334, 2권 p193, 194, 441, 442, 443, 2000.
- 8) 許浚 : 原文 對譯 東醫寶鑑 : 여강출판사, p2945, 2946, 2001.
- 9) Sona V. Biswas, Rehana iqbal with Daniel Horton-Szar as series editor, Mosby's Crash Course : Musculoskeletal System, 한우리, p53-54, 2000.
- 10) Canalis E., Mechanisms of glucocorticoid Action in Bone : Implications to glucocorticoid-induced Osteoporosis. *J. Clin. Endocrin. Met.* 81, 3441-3447, 1996.
- 11) 新谷太, 차봉수역, Steps to Internal Medicine Pathophysiology로 이해하는 내과학내분비 질환 part9, 정담출판사, p93, p130-134, 2002.
- 12) Sambrook P, Birmingham J, Kempler S, et al. Corticosteroid effects on proximal

- femur bone loss, *J. Bone Miner Res* 5 : 1211-1216, 1990.
- 13) Manelli, F. and Giustina, A., Glucocorticoid-induced osteoporosis., *Trends Endocrinol. Metab.* 11, 79-85. 2000.
 - 14) Van Staa, T.P. et al., Use of oral corticosteroids and risk of fracture., *J. Bone Miner. Res.* 15, p993-1000. 2000.
 - 15) Canalis, E. and Giustina, A., Glucocorticoid-induced osteoporosis: summary of a workshop., *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86, p5681-5685, 2001.
 - 16) Canalis, E. et al. Perspectives on glucocorticoid-induced osteoporosis., *Bone* 34, 593-598, 2004.
 - 17) Shaker, J.L. and Lukert, B.P., Osteoporosis associated with excess glucocorticoids., *Endocrinol. Metal. Clin. North Am.* 34, 341-356, 2005.
 - 18) Harrison's principles of Internal medicine. 16th edition
 - 19) Zhang YH, Zhou L, Shi RB, Guo YJ, Dong Y, Studies on chemical constituents in spikes of *Schizonepeta tenuifolia*., *Zhong-guo Zhong Yao Za Zhi*, 31 : 1247-1249, 2006.
 - 20) Shin TY, Jeong HJ, Jun SM, Chae HJ, Kim HR, Baek SH, Kim HM, Effect of *Schizonepeta tenuifolia* extract on mast cell-mediated immediate-type hypersensitivity in rats., *Immunopharmacol Immunotoxicol.*, 21 : 705-715, 1999.
 - 21) Tohda C, Kakihara Y, Komatsu K, Kurashi Y., Inhibitory effects of methanol extracts of herbal medicines on substance P-induced itch-scratch response., *Biol Pharm Bull.*, 23 : 599-601, 2000.
 - 22) Park IK, Kim LS, Choi IH, Lee YS, Shin SC, Fumigant activity of plant essential oils and components from *Schizonepeta tenuifolia* against *Lycoriella ingenua*(Diptera: Sciardae)., *J. Econ Entomol.*, 99: 1717-1721, 2006.