

어성초 추출물 부탄올 분획이 Bone Marrow Stromal Cell 분열능 및 골다공증 랫드에 미치는 영향

송규춘 · 황귀서*

경원대학교 한의학과 예방의학교실

Effects of *Houytnia cordata* on Bone Marrow Stromal Cell and Osteoporetic Rat

Kyoo-Chun Song & Gwi-Seo Hwang

Kyungwon University College of Oriental Medicine, Seongnam-shi, Gyunggi-do 461-701, Korea

Abstract

This study was performed to evaluate the effect of HCB 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 HCB, extract of *Houytnia cordata*, per orally, and continued for 10 weeks. And osteoporosis related parameters were determined to investigate the effect of HCB.

Osteoporotic rats showed lower serum estrogen level, higher body weight than normal rats, and showed atrophy of uterine horns.

Key words : *Houytnia cordata*, Osteoporosis Rat, Bone Marrow Stromal Cell, HCB.

· 접수 : 2009년 7월 20일 · 수정접수 : 2009년 8월 25일 · 채택 : 2009년 8월 26일

* 교신저자 : 황귀서, 경원대학교 한의학과 예방의학교실

Tel : 031-750-5423, Fax : 031-721-7029, E-mail : seoul@kyungwon.ac.kr

I. 서론

뼈는 조골세포 작용에 의해 지속적으로 형성되고, 파골세포의 작용으로 파괴되는 과정을 거치면서 평형상태를 유지하고 있다. 골다공증은 노화, 당뇨, 스트레스, 약물의 남용, 난소기능 감소 등의 원인에 의해 조골세포보다 파골세포 기능이 우세해지면 유발되는 것으로 알려져 있다. 특히, 여성 폐경기 이후에는 estrogen 결핍으로 파골세포 기능항진과 이에 수반하여 골형성 세포의 기능이 항진되어 있지만, 상대적으로 골 흡수가 증가되어 골조직 손실이 많이 발생하고 있다.¹⁾ 또한, Estrogen 감소는 calcitonin 기능 억제에 따른 파골세포 기능 활성화와 부갑상선 호르몬(parathyroid hormone, PTH)의 감소를 주된 작용으로 골 흡수 증가, 1,25(OH) Vit.D의 감소로 인해 장으로부터의 칼슘 흡수 감소, 노중 칼슘 배설의 증가 등이 보고되고 있으며, IL-6 등의 증가로 인한 파골세포의 활성화 증가도 보고되었다.²⁾ 골다공증의 공통적인 특징은 조골세포와 파골세포 기능의 불균형으로 인한 골흡수 증가, 골량의 감소, 골밀도의 감소, 골절의 위험도 증가로 나타난다. 이는 골원이 차지하는 공간과 피질두께가 감소하는 것과 관련이 있으며, 조직학적으로 해면골(cancellous bone)과 소주골(trabeculae)의 수와 크기 감소가 관찰되고 있다.³⁾

조골세포는 BMSC(bone marrow stromal cell)나 Mesenchymal Stem Cell의 분화로 인해 형성되며, 조골세포 전구체로부터 전조골세포, 조골세포와 골내막 세포로 분화되는 과정에 속하는 세포이다.⁴⁾ 활성화된 조골세포는 Collagen, osteocalcin, bone sialoprotein등을 합성하여 calcium과 함께 뼈의 석회화에 관여하여 골형

성을 촉진하며, 특이적으로 세포막에 ALP(alkaline phosphatase)를 가지고 있다.⁵⁾ 조골세포의 분화과정은 BMP(bone morphogenetic protein)에 의해 촉진되며 세포내 cAMP 증가로 인한 PKA 활성화가 일어난다.⁶⁾ 이러한 자극은 조골세포로부터 M-CSF(macrophage-colony stimulating factor)와 지지 세포의 ODF(osteoclast differentiation factor)나 OPG(osteoprotegerin) OPGL, RANKL (receptor activator for nuclear factor κ B ligand)를 생성함으로써 파골세포의 활성화를 촉진하기도 한다.^{7,8)}

그동안 골다공증을 치료하기 위하여 칼슘보충제, Vitamin D 대사산물, calcitonin, bisphosphates 류가 주로 이용되었으며, 성장인자를 사용하는 방법에 의한 것도 많이 연구되었다. 또한, 골다공증에는 여성호르몬 및 thyroid hormone, ipriflavone등과 같이 골 흡수를 차단하려는 약물들이 사용되고 있다.^{9,10,11)} 그러나, 골흡수를 억제하는 작용을 가지는 약물은 이미 발생한 골다공증의 손실된 골량을 완전히 회복시키기 어려운 점이 있다.¹¹⁾ 따라서, 천연물로부터 골 형성을 촉진할 수 있는 유효성분이 개발된다면 의미 있는 일이 될 것이다.

본 연구에서는 여성초 부탄올 추출 분획(HCB)이 골다공증의 치료 및 예방에 효과적인지를 알기 위해 수행되었다. 대퇴골에서 분리한 BMSC를 배양하여 조골세포 분화능 및 세포활성에 미치는 영향을 측정하였다. 또한, 에스트로겐 결핍성 골다공증에 미치는 영향을 검토하고자, 난소제거 랫드의 골밀도와 골의 무기질함량에 미치는 영향을 검색하였으며, 골의 흡수 및 형성 등에 미치는 영향을 측정하기 위하여 osteocalcin, ALP, hydroxyprolin등 골 흡수 및 골 형성 지표로 사용되는 대사물질과 효소에 미치는 영향을 평가하였다.

II. 실험재료 및 방법

1. 재료

1) 동물

골세포 분열능을 측정하기 위해서는 4주령의 S.D. 랫드를 구입하여 약 3일간 실험실에 적응시킨 후 사용하였다. 골다공증 유발용 실험동물은 200g 내외의 S.D. 랫드를 바이오링크(주)에서 구입하여 사용하였다. 실험기간동안 고품 사료와 물을 충분히 공급하여 자유롭게 섭취하도록 하였으며, 2주간 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

2) 약재의 추출

여성초(HC) 500g을 MeOH 2,000ml를 가하고 4시간 이상 환류 추출하였다. 여과지를 이용하여 여과한 다음, 여액을 Evaporator(EYERA, Japan)을 이용하여 감압 농축한 다음 농축액을 다시 증류수에 현탁하였다. 이 현탁액을 Ethylacetate로 분획을 실시하고, 나머지 추출물 현탁액을 다시 Butanol로 분획을 실시하여 얻은 용액을 동결 건조하여 투여약물(이하 HCB)로 하였다.

2. 방법

1) 골 형성세포에 미치는 영향

(1) 골세포 분리

실험에 이용한 골세포는 Osteoblast cell인 S.D. 랫드의 대퇴부에서 Bone Marrow Stromal Cell을 분리 배양하여 사용 하였다.¹²⁾ 4주령이 된 S.D. rat을 경추 탈골시켜 sacrifice한 후,

femora를 적출하였다. 적출한 femora에 붙어 있는 결체조직을 잘 제거하고, 70% alcohol로 소독하였다. Femora의 양끝부분을 자르고 18G middle에 5ml의 DMEM 배지(10% FBS, 100 IU/Penicillin, 100µg/ml streptomycin)를 채워 가하여 줌으로써 골수를 취했다. 세포가 포함된 액을 취하여 1,500rpm에서 원심분리 하였으며 침전된 BMSC를 얻었다. PBS에 재현탁과 washing을 반복한 후, 이를 DMEM 배지(10% FBS, 100IU/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin, 50µg/ml L-ascorbic acid, 10mM β-glycerophosphate, 300ng/ml Fungizone)에 넣어 현탁한 후 37°C, 5% CO₂에서 배양하였다. 세포의 배지는 2-3일에 한 번씩 교환하였다. 배양한 세포는 2주후 trypsin 처리하여 세포수를 측정하고 계대 배양한 후 실험에 사용하였다.

(2) 세포 증식능 측정

약물의 처리로 인한 세포수 증가 여부를 측정하기 위하여 BMSC를 분리 배양한 골세포를 1×10^5 cell/well로 seeding하였으며, 실험약물을 1µg/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

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 0.56 M 2-amino-2-methyl-propanol, 1mM MgCl₂, 10mM p-nitrophenyl phosphate를 함유한 반응액 1ml와 37°C에서 10분간 반응시켰다. NaOH 1ml를 가하여 반응을 중단시킨 후 405nm에서 흡광도를 측정하였다.

2) 골다공증 랫드 유발 및 약물 투여

(1) 난소적출수술

랫드에 ketamine(유한양행)을 1ml/kg 용량으로 근육 주사하여 전신마취를 시킨 다음 복부 털을 제거하였다. 70% EtOH로 수술부위를 소독한 다음 1cm 정도로 피부, 복근, 복막을 절개하고 난소를 노출시킨 후 적출수술을 시행하고 다시 봉합하였다.¹³⁾

(2) 모의수술

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

(3) 실험군 설정 및 약물 투여

실험은 실험동물을 4개군으로 나누어 시행하였다. 즉, (1)복막 절개 후 난소를 적출하지 않은 모의수술 정상군(NC), (2)난소적출 후 약물을 투여하지 않은 실험대조군(OC), (3)난소적출 후 추출 분획물을 500mg/kg 씩 경구 투여한 군(HCB)으로 나누었다. 실험에 사용한 동물은 모의 수술군 및 대조군은 10마리, 대용량 및 소용량 투여군은 8마리씩으로 하였다. 투여약물은 동결 건조한 추출을 200mg/ml이 되도록 생리식염수에 녹인 후, 1일 1회씩 70일간 투여하였다.

3) 골다공증 랫드에 미치는 영향 평가

(1) 골분리 및 회분 정량

랫드를 경추 탈골하여 치사시킨 후, 대퇴골을 분리한 다음 전자저울을 이용하여 무게를 재고, 부피를 측정하였다. Dry Oven(Daeil, Korea)을 이용하여 80°C 에서 6시간동안 건조하고, 900°C Furnace에서 24시간 회화하고 남은 무기물질을 정량하였다.

(2) 골의 무기질 분석

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

(3) 골생성지표의 검색

실험에 필요한 혈청을 얻기 위하여 심장 천자하여 채혈하였으며, 30분 방치 후 3,000rpm에서 15분간 원심 분리하여 혈청을 취하였다. 혈중의 Osteocalcin 농도는 ELISA kit(Osteometer A/S, DK)를 이용하여 정량하였으며, alkaline phosphatase 활성은 혈청내 측정 kit(Sigma Co.)를 이용하여 측정하였다.

(4) 골흡수지표 검색

약물투여 마지막 날에 랫드의 소변을 채취하였다. 소변을 11,000rpm으로 원심 분리하여 상층액을 취하여 creatinine 함량을 측정하였다. 골흡수지표인 hydroxyproline은 Aminoacid analyzer를 이용하여 측정하였다.

3. 통계학적 분석

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

III. 실험결과

1. BMSC 활성에 미치는 영향

1) BMSC 증식능에 미치는 영향

랫드의 대퇴골에서 분리한 골세포를 10일간 1차 배양한 다음, 계대 배양을 2일간 시행한 다음, 세포에 검체를 투여하여 8일, 10일간 배양하여 세포 증식능에 미치는 영향을 측정 하였다. 측정 결과, 8일간 배양한 경우, BMSC 숫자는 10 μ g/ml의 농도를 가진 HCB10에서 NC(Normal Control)에 비해 약 8% 증가하였고, 10 μ g/ml 인 HCB20 에서는 NC에 비해 약 25% 증가하였다. 10일간 배양한 경우, BMSC 숫자는 10 μ g/ml의 농도를 가진 HCB10에서 NC(Normal Control)에 비해 약간 감소하였으나, 10 μ g/ml 인 HCB20 에서는 NC에 비해 약 100% 증가하였다.

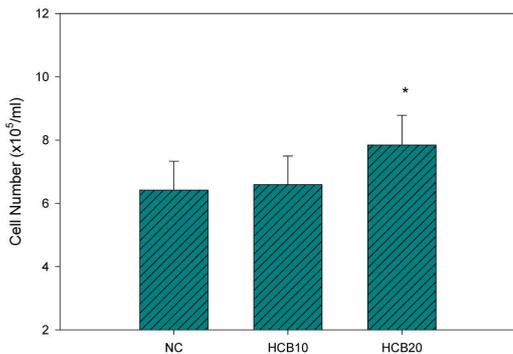


Fig. 1. Effect of HCB on Cell proliferation of Bone Marrow Stromal Cell

Cell Number was determined at 8th days.

NC: vehicle

HCB10: 1 μ g/ml of HCB extract

HCB20: 10 μ g/ml of HCB extract

*: p<0.05 vs NC

2) Bone Alkaline Phosphatase(B-ALP)

활성에 미치는 영향

조골세포의 분열 및 증식은 osteoblastogenic factor가 수용체에 결합된 후 세포내 신호전달 체계를 거쳐 단백질을 발현시킨다. HCB가 골

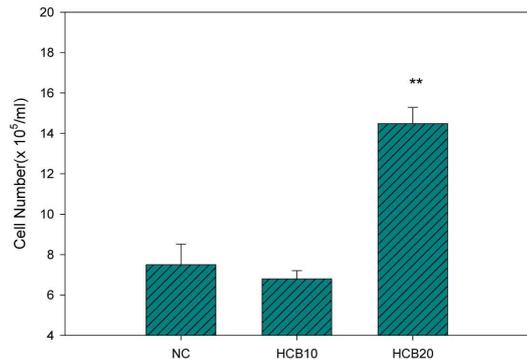


Fig. 2. Effect of HCB on Cell proliferation of Bone Marrow Stromal Cell

Cell Number was determined at 10th days.

NC: vehicle

HCB10: 1 μ g/ml of HCB extract

HCB20: 10 μ g/ml of HCB extract

** : p<0.01 vs NC

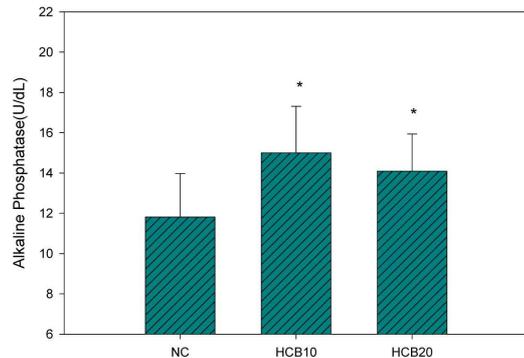


Fig. 3. Effect of HCB on Alkaline Phosphatase Activity of Bone Marrow Stromal Cell

Alkaline Phosphatase Activity was determined at 10th days.

NC: vehicle

HCB10: 1 μ g/ml of HCB extract

HCB20: 10 μ g/ml of HCB extract

*: p<0.05 vs NC

세포의 활성화에 미치는 영향을 평가하기 위하여 골세포 분열에 관여하는 단백질인 alkaline phosphatase의 활성을 측정하였다. 호소활성은 계대배양과 약물 처리 후 10일째에 측정하였다. 실험 결과, ALP 활성은 10 μ g/ml의 농도를 가진 HCB10 에서 NC(Normal Control)에 비해 약 25% 증가하였고, 20 μ g/ml 인 HCB20 에서는 NC에 비해 약 17% 증가하였다.

2. Estrogen 결핍성 골다공증에 미치는 영향

1) 골밀도 변화에 미치는 영향

골밀도는 랫드의 tibia를 이용하여 측정하였다. 난소적출로 유발된 골다공증 랫드의 골밀도는 약 1.28mg/ μ l로서 모의수술을 시행한 정상군의 1.41mg/ μ l에 비해 유의적인 감소를 보였다. 한약재 추출액을 투여한 경우, 난소제거 수술군에 비하여 골밀도의 감소가 억제되었다. 한약재 추출액을 500mg/kg을 투여한 군에서

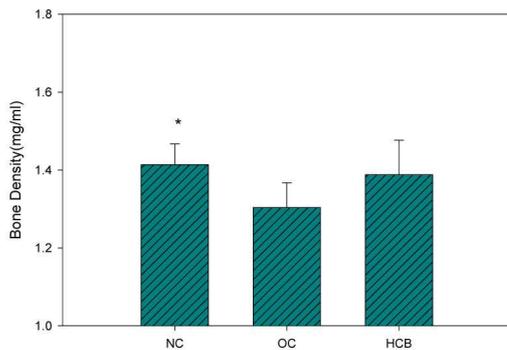


Fig. 4. Effect of HCB on Bone Density of Rat Tibia. Bone density was calculated from dried bone weight divided by bone volume(mg/ml). Each bar represents results of 8 rats.

NC: Sham operated Rat p
 OC: Ovariectomized Rat
 HCB: OC +HCB(500mg/kg, P.O.)
 *: p<0.05 vs OC

는 약 1.34로서 증가하는 경향을 나타내었다.

2) 골 원소 함량 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 1.16mg/ μ l 이었으며, 500mg/kg 어성초 투여군의 골회분량은 1.20mg/ μ l으로 난소제거 수술 시행군에 비하여 유의한 증가를 나타내었다.

3) Alkaline phosphatase(ALP) 활성에 미치는 영향

Alkaline Phosphatase는 골아 세포에서 분비되는 glycoprotein으로서 임상에서 가장 흔히

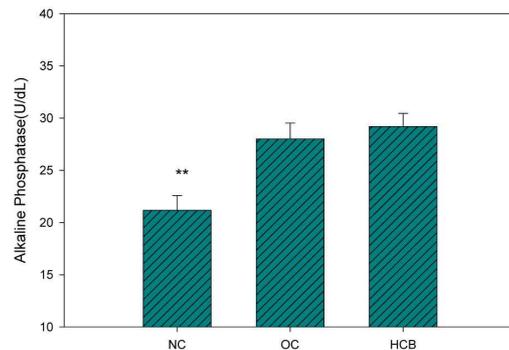


Fig. 5. Effect of HCB on Alkaline Phosphatase Activity in Estrogen-deficient Rat

ALP activity was determined in serum of Estrogen-deficient Rat. Each bar represents results of 8 rats.

NC: Sham operated Rat
 OC: Ovariectomized Rat
 HCB: OC +HCB(500mg/kg, P.O.)
 **: p<0.01 vs OC

이용되는 골형성 지표이다. 폐경기 여성의 경우 골흡수가 증가함에 따라 골형성을 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(22.5IU/ml)에 비해 골다공증군(28.7IU/ml)에서 ALP 활성이 증가하였다. 여성초 부탄올 추출 분획(HCB) 투여군(500mg/kg)에서는 골다공증군에 비하여 커다란 변화가 없었다.

4) 혈중 골 생성지표(osteocalcin)에 미치는 영향

Osteocalcin은 Gla-protein이라고도 불리는 골격계의 가장 풍부한 비교원질 단백질로서 조골세포에서 형성된 후 상당부분이 골기질속에 침착되며 새로이 생성되는 것의 일부는 혈

액내로 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(4.48 μ mol/ml)에 비해 골다공증군(4.76 μ mol/ml)에서 유의적으로 증가하고 있다. 여성초 부탄올 추출 분획을 투여한 경우, 4.93 μ mol/ml로 유의적인 증가를 나타내었다. 이러한 결과는 조골세포의 기능을 활성화시켜 골 형성이 증가하여 나타난 결과로 추정된다.

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

Hydroxyproline은 주로 교원질 내에 존재하며 전체 아미노산의 13%를 차지하고 있다. 교

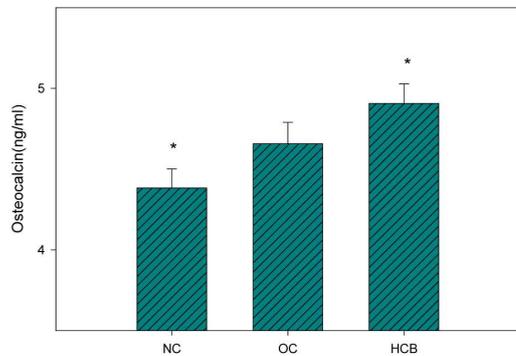


Fig. 6. Effect of HCB on Osteocalcin in Estrogen-deficient Rat

Osteocalcin level was determined in serum of Estrogen-deficient Rat. Each bar represents results of 8 rats.

NC: Sham operated Rat

OC: Ovariectomized Rat

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

*: p<0.05 vs OC

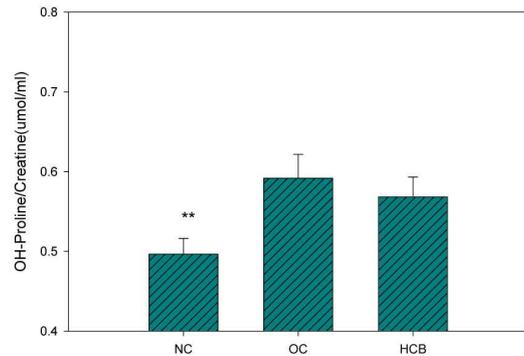


Fig. 7. Effect of HCB on Urine Hydroxy-proline in Estrogen-deficient Rat.

OH-P level was determined in urine of Estrogen-deficient Rat. Urine was collected before sacrifice. Each bar represents results of 8 rats.

NC: Sham operated Rat

OC: Ovariectomized Rat

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

** : p<0.01 vs OC

원질이 분해되면, 아미노산인 hydroxyproline, hydroxylysine 등과 collagen crosslinks 산물인 DPyD, pyrilinks, PyD 등 다양한 교원질 분해성분이 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 않기 때문에 혈액 중에 순환하다가 신장에서 여과된 후 재흡수 되고 나머지는 소변으로 배설된다. 따라서, 신장 기능과 밀접한 관련이 있어 hydroxyproline을 creatinine치로 나눈 값을 이용한다. 실험 결과, 정상군의 뇨에서의 OH-Pro /creatinine(10^{-3}) 비는 0.49이었으며, 난소제거 수술을 하여 골다공증을 유발한 군의 뇨중에서의 비율은 0.61로 유의적인 증가가 있었다. 어성초 부탄을 추출 분획 투여군(500mg/kg)은 0.58로 골다공증군에 비해 유의적으로 증가하였다. 이상의 결과에 의하면, 어성초 투여군은 난소제거로 에스트로겐이 결핍되어 생기는 골밀도 감소를 개선시키며, 이는 난소 제거 시 발생하는 골흡수의 증가를 차단하는 것에서 기인하는 것으로 보인다.

IV. 고찰

조골세포는 골의 형성과 재형성 및 복원에 관여하는 대표적인 세포로 뼈의 외기질 부분에 존재한다. 조골세포는 조골세포의 전구체인 BMSC (bone marrow stromal cell)나 Mesenchymal Stem Cell로부터 BMP(bone morphogenic protein)의 자극에 의해 골원성 세포가 된 후, 전 골아세포를 거쳐 형성된다.⁴⁶⁾ 조골세포의 증식은 각종 growth factor인 bFGF(basic fibroblast factor), PG(prostaglandin), TGF- β (transforming growth factor- β), PDGF(platelet derived growth factor), IGF(insulin-like

growth factor)등에 의해 촉진된다.^{14,15)} 골의 형성은 이러한 조골세포 전구체의 분화와 증식, 세포외 기질물질의 생성과 칼슘과 결합하는 석회화 과정을 통하여 형성되는데, 이 과정에서 collagen(type I), ALP(alkaline phosphatase), OPG(osteoprotegrin), osteopontin, osteonectin osteocalcin 등의여러가지 단백질 발현이 수반된다.¹⁶⁾ 골의 평형상태 유지에 조골세포와 함께 중요한 인자인 파골세포는 hematopoietic stem cells에서 유래하며, 골수 간질세포와 골모세포로부터 유리된 M-CSF (macrophage-colony stimulating factor)와 조골세포의 ODF (osteoclast differentiation factor)나 RANKL (receptor activator for nuclear factor κ B ligand)에 의해 분화가 촉진된다.^{17,18)} 그러나, 조골세포로부터 분비된 OPG는 RANKL과 결합하여 파골전구세포로부터 파골세포가 형성되는 것을 억제하기도 한다.

본 연구에서는 조골세포 형성과 증식에 미치는 어성초 추출분획의 효과를 평가하기 위하여 랫드의 대퇴골로부터 얻은 BMSC를 배양한 후 약효를 검색하였다. 실험 결과, 어성초 부탄을 분획은 BMSC의 분열능을 증가시켰다(Fig. 1, Fig. 2). 또한, 조골세포 형성 시 발현되는 ALP 활성을 증가시켜 BMSC로부터 조골세포 형성과 분열능을 증가시킴을 확인하였다(Fig. 3). 이를 바탕으로 어성초 추출물이 골다공증에 실질적으로 효과적인지를 알기 위하여 난소를 적출하여 골다공증이 유발된 랫드에 투약하여 효능을 평가하였다.

난소를 적출한 랫드는 estrogen 결핍으로 인한 다양한 갱년기 질환에 대한 연구를 수행하는데 이용될 수 있다. 여성갱년기 이후에 나타나는 estrogen 감소는 calcitonin 기능 억제에 따른 파골세포의 기능을 활성화시키며, 그 결과 골 기질이 분해되어 칼슘의 재흡수가 증가되어 있다.¹⁹⁾ 또한, PTH(parathyroid hormone)의 감소로 인한 골 흡수 증가, 1,25(OH) Vit.D의

감소로 인한 장으로 부터의 칼슘 흡수 감소와 노중 칼슘 배설의 증가 등이 보고되고 있으며, IL-6 등의 증가로 인한 파골세포의 활성화등도 보고되고 있다. 따라서, 골다공증에는 여성 호르몬 및 thyroid hormone, calcitonin과 ipriflavone등을 투여하여 골 흡수를 차단하려는 약물들이 사용되고 있다.^{9),10),11)} 그러나, 기존의 약물들은 각각의 한계점을 가지고 있다.

본 연구에서는 골다공증치료 및 예방에 이용할 수 있는 한약재를 개발하기 위하여, 난소를 적출하여 유발된 골다공증 랫드에 여성초 부탄올 추출 분획(HCB)을 투여한 후, 골밀도와 골의 무기질 함량에 변화를 관찰하였다. 실험결과, 여성초 부탄올 추출 분획을 투여한 경우, 골다공증 랫드에서 관찰되는 골밀도와 골회분 함량의 감소가 억제되었다(Fig. 4). 이러한 작용이 골의 재흡수를 억제하여 나타나는지를 알아보기 위하여 노중에 유리되는 OH-P (hydroxyproline) 량을 측정하였다. 난소를 적출하여 유발된 골다공증 랫드에서는 hydroxyproline의 유리가 증가되어 있으며, HCB를 투여한 경우 약간 억제하는 경향을 나타내었다(Fig. 7).

또한, HCB가 골형성에 미치는 영향을 측정하기 위하여 골형성 세포의 대사산물인 osteocalcin, ALP를 지표로 하여 정량하였다. 그 결과, 혈중 osteocalcin 은 골다공증 랫드에서 정상랫드에 비하여 증가되어 있었다. 이는 estrogen 부족으로 파골세포 기능이 활성화 되면, 조골세포의 기능도 활성화되어 나타나는 결과로 보인다. 여성초 부탄올 추출 분획을 투여한 군에서의 osteocalcin 량은 골다공증 랫드에 비해서는 유의적으로 감소하였다(Fig. 6). 이는 파골세포의 기능을 억제하여 나타난 결과로 보이지만, 정확한 것을 알기 위하여서는 좀 더 연구가 진행되어야 할 것 같다. 또한, 혈중 ALP에 미치는 영향을 측정하였다. 골다공증군은 정상군에 비해 ALP량이 증가하였다. 그러나, 여성초 부탄올 추출 분획을 투여한 경우, ALP

활성은 감소하였으며, 이는 osteocalcin과 같은 결과이다(Fig. 5).

이상의 연구결과, 여성초는 골다공증 랫드에서 발생하는 골밀도 감소를 차단할 수 있었으며, 골다공증의 치료 및 예방에 유용하게 쓰일 수 있는 가능성을 제시하였다. 또한 이러한 작용은 여성초가 조골세포의 분화를 촉진하여 나타난 것으로 사료되었다.

V. 결 론

골다공증에 효과적인 약물을 개발하기 위한 연구의 일환으로 여성초의 부탄올추출분획물이 랫드의 대퇴골에서 분리한 BMSC의 증식 및 난소 절제술을 시행하여 유발한 estrogen 결핍성 골다공증에 미치는 영향을 검토하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 여성초추출물은 랫드의 대퇴골에서 분리한 골세포 증식을 증가 시켰다.
2. 여성초추출물은 랫드의 대퇴골에서 분리한 골세포 기능 활성화 결과 나타나는 ALP 활성을 증가시켰다.
3. 여성초는 골다공증 랫드에서 감소한 골밀도를 증가시켰다.
4. 여성초는 골다공증 랫드에서 감소한 골회분량을 증가시켰다.
5. 여성초는 골다공증 랫드에서의 증가한 혈중 osteocalcin을 증가시켰으며, ALP 활성을 증가 시키는 경향을 나타냈다.
6. 여성초는 골다공증 랫드에서 증가한 노중 OH-proline 유리를 억제하는 경향을 나타내었다.

여성초 추출물의 부탄올 분획은 난소를 적출하여 유발시킨 골다공증 랫드에서 조골세포의 기능을 항진시켜 골밀도를 증가시킬 수 있

을 것으로 판단되었다.

감사의 글

이 논문은 경원대학교 연구비 지원으로 수행되었다.

참고문헌

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* 1996; 19; 69-72.
2. Johansson A.G., Lindah E., Blum W.F., Kollerup G. Effect of growth hormone and insulin-like growth factor I in men with idiopathic osteoporosis. *J. Clin. Endocri. Met.*, 1996; 81; 44-48.
3. Canalis E. Mechanisms of glucocorticoid Action in Bone: Implications to glucocorticoid-induced Osteoporosis., *J. Clin. Endocri. Met.* 1996; 81; 3441-3447.
4. Gopalakrishnan V, Vignesh R C, Arunakaran J, Aruldas M M, Srinivasan J, Effects of glucose and its modulation by insulin and estradiol on BMSC differentiation into osteoblastic lineages *Biochem. Cell Biol.* 2006; 84; 93-101.
5. Gundberg CM. Biochemical markers of bone formation. *Clin Lab Med.* 2000; 20; 489-501.
6. Ghayor C, Ehrbar M, San Miguel B, Grätz KW, Weber FE. cAMP enhances BMP2-signaling through PKA and MKP1-dependent mechanisms. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009; 381; 247-252.
7. Kim T, Kim K, Lee SH, So HS, Lee J, Kim N, Choi Y. Identification of LRRc17 as a negative regulator of receptor activator of NF-kappaB ligand(RANKL)-induced osteoclast differentiation. *J Biol Chem.* 2009; 284; 15305-16.
8. Takami M, Mochizuki A, Yamada A, Tachi K, Zhao B, Miyamoto Y, Anada T, Honda Y, Inoue T, Nakamura M, Suzuki O, Kamijo R. Osteoclast differentiation induced by synthetic octacalcium phosphate through RANKL expression in osteoblasts. *Tissue Eng Part A.* 2009 Jul 13.
9. Miyake M, Arai N, Ushio S, Iwaki K, Ikeda M, Kurimoto M. Promoting effect of kaempferol on the differentiation and mineralization of murine pre-osteoblastic cell line MC3T3-E1. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2003; 67; 1199-1205.
10. Mansell JP, Farrar D, Jones S, Nowghani M. Cytoskeletal reorganisation, 1alpha,25-dihydroxy vitamin D3 and human MG63 osteoblast maturation. *Mol Cell Endocrinol.* 2009; 305; 38-46.
11. 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.* 1991; 6; 987-996.
12. Gopalakrishnan V, Vignesh RC, Arunakaran J, Aruldas MM, Srinivasan N., Effects of glucose and its modulation by insulin and estradiol on BMSC differentiation into osteoblastic lineages. *Biochem Cell Biol.* 2006; 84; 93-101.
13. Lee JW, Jhee O, Yuan H, Kim T, Kim

- D, Lee M, Om A, Lee B, Park SK, Kang J. Effect of Korean oriental medicine extract on bone mass as compared with alendronate in ovariectomized rats. *J Med Food*. 2005; 8(3); 369-76.
14. Tanaka H, Liang CT, Effect of platelet-derived growth factor on DNA synthesis and gene expression in bone marrow stromal cells derived from adult and old rats. *J Cell Physiol*. 1995; 164; 367-75.
15. Nemoto E, Shimonishi M, Nitta Y, Shimauchi H. The involvement of platelet-derived growth factor receptors and insulin-like growth factor-I receptors signaling during mineralized nodule formation by human periodontal ligament cells. *J Periodontal Res*. 2004; 39; 388-97.
16. Kacena MA, Gundberg CM, Horowitz MC. A reciprocal regulatory interaction between megakaryocytes, bone cells, and hematopoietic stem cells. *Bone*. 2006; 39; 978-84.
17. Deyama Y, Kikui T, Ohnishi G, Feng YG, Takeyama S, Hatta M, Yoshimura Y, Suzuki K. Histamine stimulates production of osteoclast differentiation factor/receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand by osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002; 25; 240-6.
18. Chikazu D, Katagiri M, Ogasawara T, Ogata N, Shimoaka T, Takato T, Nakamura K, Kawaguchi H. Regulation of osteoclast differentiation by fibroblast growth factor 2: stimulation of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand/osteoclast differentiation factor expression in osteoblasts and inhibition of macrophage colony-stimulating factor function in osteoclast precursors. *J Bone Miner Res*. 2001; 16; 2074-81.
19. Sayegh RA, Stubblefield PG. Bone metabolism and the perimenopause overview, risk factors, screening, and osteoporosis preventive measures. *Obstet Gynecol Clin North Am*. 2002; 29; 495-510.