

## 경옥고와 경옥고가연자육의 조골세포 증식과 골흡수 억제효과

김주호, 이정호<sup>1</sup>, 오재민<sup>2</sup>, 김윤경

원광대학교 약학대학 한약학과·원광한약연구소, <sup>1</sup>송호대학 자연건강관리학과  
<sup>2</sup>원광대학교 의과대학 해부학교실·의과학 연구소

### ABSTRACT

## Inhibitory Effects on Bone Resorption and osteoblast proliferation of Kyungok-go

Ju-Ho Kim, Jung-Ho Lee<sup>1</sup>, Jae-Min Oh<sup>2</sup>, Yun-Kyung Kim

Dept. of Oriental Pharmacy, College of Pharmacy,

Won-Kwang Oriental Medicines Research Institute, Won-Kwang University

<sup>1</sup>Dept. of Natural Health Management, Song-Ho College

<sup>2</sup>Dept. of Anatomy, School of Medicine, and Won-Kwang Medical Science Institute, Won-Kwang University

Objectives : Kyungok-go(KOG), the first herbal formulation of donguibogam, has been used for treating of many symptoms of yin deficiency. In this study, we examined the effect of KOG on bone resorption.

Methods : We determined the effects of water extract of KOG in RANKL(Receptor Activator for Nuclear Factor  $\kappa$  B Ligand)-induced osteoclast differentiation culture system and osteoblast proliferation. In addition, we determined the effects of water extract of ABR on LPS-induced bone-loss with mice.

- 
- 교신저자 : 김윤경
  - 전라북도 익산시 신용동 원광대학교 약학대학 한약학과
  - Tel : 063-850-6803 E-mail : hestia@wonkwang.ac.kr
  - 접수 : 2011/ 11/ 18 수정 : 2011/ 12/ 07 채택 : 2011/ 12/ 21

Results : Water extract of KOG showed proliferation effect on osteoblast without cytotoxicity and no effect on RANKL-treated osteoclast differentiation. KOG rescued bone erosion by LPS induction in vivo study.

Conclusions : These results demonstrated that KOG can be a useful remedy for treating of bone-loss disease such as osteoporosis.

*Key word* : Kyungok-go, osteoblast proliferation, osteoclast differentiation, osteoporosis, RANKL

## 1. 서 론

우리나라는 최근 본격적인 고령화 사회로 진입하여 2010년 65세 이상 고령인구의 비중이 총 인구의 11.3%로 55년 전보다 24.4% 급증하였다<sup>1)</sup>. 미국에서는 50세 이상의 인구중 4400만명이 골다공증을 앓고 있거나 낮은 골밀도(Bone Mineral Density)를 보이는 것으로 나타났다<sup>2)</sup>. 이중 골다공증으로 진단받은 환자는 천만명이며 환자 5명중의 4명은 여성이다. 골다공증은 주로 폐경기 이후 estrogen 부족으로 발생하기 때문에 여성의 질병으로만 생각할 수 있으나 나이와 성별에 관계없이 발생할 수 있는 질병으로<sup>3)</sup> 미국 내에서는 심각한 사회문제로 매년 2백만 건 이상의 골다공증성 골절이 발생하고 이와 관련한 사회비용이 총 17조에 달한다(2005년)<sup>4)</sup>. 우리나라도 고령화 사회 진입에 따라 골다공증의 위험이 증가하고 있으므로 이를 예방·치료할 적절한 치료제의 개발이 필요하다.

골의 항상성은 새로운 골 기질을 형성하는 조골세포와 오래된 골 기질을 흡수하는 파골세포의 적절한 균형에 의해 유지된다. 골은 인체하중의 지탱, 기관보호, 조혈작용의 역할을 수행하는데, 성인에서 매년 전체 골 함량 중 약 10%가 재형성되

는 매우 역동적인 조직이다<sup>5)</sup>. 골다공증은 대사성 질환으로 파골세포에 의한 골의 흡수가 조골세포에 의한 골의 형성보다 과도하여 골의 항상성이 깨질 때 발생한다<sup>6)</sup>. 골다공증 발현에 중추적인 역할을 하는 파골세포는 조혈모세포에서 기원한 다핵형세포로서 골조직에 부착되어 산, FPP(farnesyl pyrophosphate) 등 여러 종류의 분해효소를 분비하여 골 기질을 재흡수 한다<sup>7)</sup>.

현재 골다공증 치료에는 두 가지 종류의 약물로, bisphosphonate, calcitonin, estrogen 요법제 등의 골흡수 억제제와<sup>8-10)</sup> Teriparatide(제조합 부갑상선 호르몬) 제제 등의 골형성 촉진제가 있다<sup>11)</sup>. 이 중 bisphosphonate 제제는 식도 및 위장관에 궤양을 유발하는 부작용이 많고, 생체 이용률이 매우 낮다. 비교적 부작용이 적으며 전체추출물을 사용하여 다중의 효과를 나타낼 수 있는 장점으로 최근 천연물질을 이용한 질병의 치료가 보편화되면서 골다공증의 치료에 이를 응용한 연구 또한 활발하다. 기존에 녹용, 노각나무(*Stewartia Koreana*), 삼백초(*sauchinone*), 작약(*paconol*)등이 RANKL로 유도된 파골세포의 분화를 억제하고 LPS로 유도된 생체 내 골 손실을 억제한다는 보고가 있다<sup>12-15)</sup>.

한의학에서는 골다공증의 발병원인을 五臟 중의 하나인 腎臟과 밀접한 관련이 있는 것으로 생

각하는데, 腎은 “先天의 本”으로 精을 저장하며<sup>16)</sup> 骨과 상합하여 髓를 생성하고 生長·발육·생식을 주관한다고 본다. 따라서 腎을 補할 수 있는 약물들은 腎을 충실하고 튼튼하게 하여 골다공증을 예방하고 치료할 수 있다. 경옥고는 동의보감에는 그 효능을 ‘鎮精 調眞 養性 返老 還童하는 膏藥.....’ 이라 기록하고 있다<sup>17)</sup>. 이는 노화방지, 체력 및 지구력 증진 등 원기 회복의 효능을 가진 것으로 해석할 수 있다. 연자육은 수련과(Nymphaeaceae)에 속한 다년생 수생식물인 연꽃(Nelumbo nucifera GAERTN.)의 성숙한 종자를 건조한 것으로 性味が 甘澁하고 平無毒하며, 心, 脾, 腎經에 歸經한다. 補脾止瀉하고 益腎固精시키며 養心安腎시키는 효능이 있어 임상에서 心悸失眠과 遺精帶下, 脾氣虛로 인한 久瀉를 치료한다<sup>18)</sup>.

연자육은 혈액 내 lipids 양을 줄이고 혈전을 억제하는 것에 대한 보고<sup>19)</sup>, 프로테옴분석 및 동물실험을 통해 우울증의 개선에 유효하다는 보고<sup>20)</sup>, 심근경색후 회복에 대한 효과<sup>21)</sup>에 대한 보고, nitric oxide의 억제 효과에 대한 보고<sup>22)</sup>가 있다.

이상과 같은 경옥고와 연자육의 효능과 약리에 대한 기존의 기록과 연구결과를 바탕으로, 노년기

의 골다공증이나 골절 등에 대비하여 경옥고와 연옥고의 LPS로 유도되는 생쥐의 염증성 골 손실모델에서 방지효과를 검증하고자 Nano-CT로 대퇴골의 3차원적 영상을 얻어 경옥고가 미치는 생체내 효과를 규명하고자 하였다.

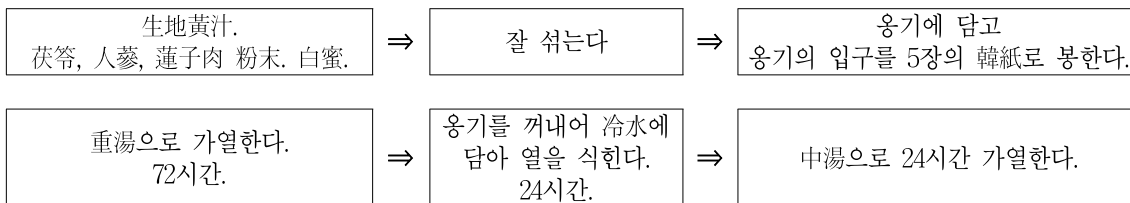
## II. 실험재료 및 방법

### 1. 경옥고와 연옥고 제조

생지황을 쪼개 즙을 취하고 人蔘, 茯苓, 蓮子肉을 갈아 곱게 粉末을 냈으며 白蜜은 걸러내어 異物質이 없도록 하였다. 生地黃汁, 3종류의 粉末, 白蜜을 옹기 단지에 넣고 잘 혼합한 후 옹기의 입구를 韓紙로 봉하고 물이 끓어 옹기로 들어가지 않도록 주의하면서 옹기를 물 重湯으로 72시간을 가열하였다.

64시간 重湯하여 끓인 후에는 옹기를 다시 꺼내 冷水에 24시간을 담가두어 열을 식히고 그후 다시 물 重湯으로 24시간을 끓였다.

이 과정이 끝나면 옹기를 개봉하고 작은 옹기 단지에 덜어내어 포장하였다.



#### 1) 원방 瓊玉膏의 배합 비율

東醫寶鑑의 瓊玉膏 제조법<sup>17)</sup>에서의 재료의 비율은 取汁 전의 生地黃, 白蜜, 人蔘 粉末, 茯苓 粉末의 비율은 각 9.6kg, 6kg, 960g, 1920g 그램이다.

동의보감에서는 ‘生地黃 16근(9.6kg)을 取汁하여.....’라고 되어 있는데, 生地黃의 상태와 取汁 과정에서 오차가 발생할 수 있으므로 이번 연구에서는 쪼아서 즙을 낸, 生地黃汁을 기준으로 재료의

비율을 기술하였다.

#### 2) 연옥고 배합의 비율.

生地黃汁, 白蜜, 茯苓 粉末, 人蔘 粉末, 蓮子肉 粉末의 비율을 7:7:2:2:1의 경우, 원방 瓊玉膏의 형태와 비슷한 적당한 膏의 형태를 이루었으며, 蓮子肉 특유의 澁味가 적절하게 우러나와 제품의 특성을 살릴 수 있는 비율로 판단되어 제조하여 실험에 사용하였다.

## 2. 시 료

경옥고와 연옥고 10 g을 3차 D.W 100 ml와 함께 삼각플라스크에 넣고 Branson Ultrasonic(Danbury, USA)사에서 구입한 초음파추출기(8510E-DTH)를 이용하여 21°C의 온도에서 12시간씩 2회에 걸쳐 추출하였다.

연자육은 Glas-Col(Terre Haute, IN, USA)사에서 구입한 Heating mantle을 이용하여 냉각기를 달고 2시간 동안 40°C에서 가열하여 물로 추출하고 Büchi Labortechnik AG(Flawil, Switzerland)사에서 구입한 감압농축기(Rotavapor R-124)로 농축한 후 EYELA(Japan)사에서 구입한 동결건조기(FDU-2100)로 건조하여 최종적으로 파우더 형태를 얻었다. Human RANKL과 Human M-CSF는 Peprotech(London, UK)사의 제품을 사용하였다. XTT assay kit는 Roche(Indianapolis, IN, USA)사에서 구입하였다. TRAP 용액은 Sigma Aldrich사에서 구입하였다.

## 2. 파골세포 분화에 대한 효과 검증

골수는 5주령 ICR 생쥐의 대퇴골과 경골에서 분리하였다. 분리된 골수세포는 10% Fetal bovine serum(FBS), M-CSF(30 ng/ml)를 첨가한  $\alpha$ -minimum essential medium( $\alpha$ -MEM)배지에서 3일간 배양 후 부유 세포는 제거하고 부착된 세포를 대식세포(bone marrow macrophages, BMMs)로 사용하였다. 대식세포는 M-CSF(30 ng/ml)와 RANKL(50 ng/ml)을 첨가한 배지에 녹용 물 추출물을 농도별로 처리하여 4일간 배양하였다. 4일간 배양한 세포는 TRAP 용액을 이용하여 염색하고 TRAP 양성 세포를 파골세포로 간주하였다.

## 3. 조골세포 증식에 대한 효과 검증

뼈의 구성성분인 osteoblast와 유사한 성질을 나타내는 C2C12 cell - mouse myoblast origin(muscle) cell line을 분양받아 사용하였다. 조골세포 증식에

미치는 효과를 검색하기 위하여 96-well plate에 추출물을 50, 100, 200ug/ml 농도로 DMSO에 용해하여 첨가하였으며 각 농도에 따라 6-8개의 well에 처리하였다. 이들을 incubator에서 3일간 배양한 후 XTT 용액 50  $\mu$ l 첨가하고 4시간 배양한 후 ELISA reader를 이용하여 450 nm 흡광도에서 확인하였다.

## 4. 연자육의 독성검사

생쥐의 골수에서 유래된 대식세포는  $1 \times 10^4$ /well의 밀도로 96-well plate에 첨가하고 M-CSF(30 ng/ml)를 처리한 후, 추출물을 농도별로 처리하여 3일간 배양하였다. 3일 배양 후, 각각의 well에 XTT 용액 50  $\mu$ l 첨가하고 4시간 배양한 후 ELISA reader를 이용하여 450 nm 흡광도에서 확인하였다.

## 5. LPS유도 골 손실 모델 *in vivo* 실험

생체내의 골손실에 미치는 추출물의 효과를 연구하기 위해, 5주령의 수컷 ICR 마우스 각 5마리씩을 각 군별로 배정하였다. 연자육 물 전탕액, 연옥고 물용액, 경옥고 물용액(마우스 200mg/kg)또는 PBS를 군별로 나누어 10일간 경구투여하였다.

골소실 유발을 위해 실험군에 LPS(마우스 g당 4.5  $\mu$ g)를 투여일로부터 3일과 6일에 2회에 걸쳐 복강 주사하였고 대조군에는 PBS를 복강주사하여 실험 오차를 제거하였다. 10일째 되는 날 마우스를 희생시키고 대퇴골을 취하여 4% paraformaldehyde로 고정하였다. Nano-CT인 NFR-Polaris-S160(Nano Focus Ray, 한국)을 이용하여 대퇴골 내부의 3차원적 영상을 얻었다.

## 6. 통계분석

본 연구 결과는 3번 이상 반복 실험한 결과중 대표적인 결과를 보여주고 있으며 정량적인 결과는 평균  $\pm$  표준편차로 표시하였다. 대조군과 실험군과의 통계적인 유의성은 Student's t-test를 이용

하여 분석하였고, p값이 0.05 이하인 경우 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

### III. 결 과

#### 1. 파골세포 분화 억제효과

대식세포에 M-CSF와 RANKL을 처리한 후 천연물을 처리하여 파골세포 분화의 억제정도를 확인하였다. 대식세포에 M-CSF와 RANKL을 처리한 후 4일간 배양하면 대조군 세포와 같이 TRAP

양성 다핵형 파골세포로 분화되는데, 경옥고(KOG)나 연옥고(YOG), 연자육(NS; Nelumbinis Semen)은 파골세포로의 분화를 농도 의존적으로 억제하지 못한다는 것을 TRAP 염색을 통해 확인하였다(Fig. 1A). 염색된 파골세포 중 핵이 3개 이상인 세포의 숫자를 세어본 결과 50 µg/ml의 농도부터 200 µg/ml의 농도에서는 거의 아무런 변화를 관찰할 수 없었다(Fig. 1B). 이 결과는 RANKL에 의해 유도되는 파골세포 분화과정 중에는 연자육 및 경옥고, 연옥고가 억제효과를 발휘하지 못한다는 것을 의미한다.

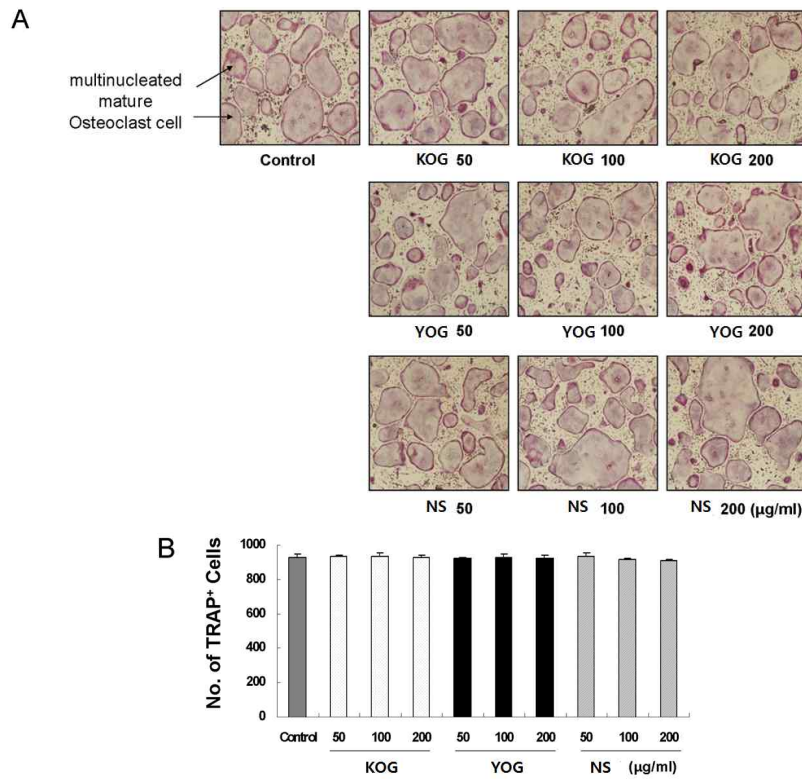


Fig. 1. Effect of Kyungok-go(KOG), Yeonok-go(YOG) and NS on osteoclastogenesis from BMMs induced by soluble RANKL.

A. BMMs were cultured with the indicated doses in the presence of M-CSF(30 ng/ml) and RANKL(100 ng/ml) for 4 days. Cells were fixed and TRAP stained.

B. TRAP-positive multinucleated cells were counted (TRAP+ cells containing three or more nuclei were counted as multinucleated Osteoclasts).(\* P < 0.05, significantly different from the control)

## 2. 조골세포 증식 촉진 효과

C2C12 cell에 3가지 농도로 경옥고와 연옥고, 연자육 추출물을 처리하여 3일간 배양하여 조골세포의 수를 센 결과 농도의존적으로 조골세포 증식 효과가 나타났다.(Fig. 2A). 염색된 조골세포의 수를 통계처리한 결과 연자육은 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도부터 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 모든 농도에서 유의성 있는 조골

세포 증식효과를 관찰할 수 있었으며 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 45%가량의 증식효과를 보였다. 연옥고와 경옥고는 비슷한 효과를 보였으나 경옥고가 100, 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 증식효과가 있었던 반면 연옥고가 약간 증식효과는 더 좋았으며 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 조골세포 증식효과를 관찰할 수 있었다(Fig. 2B).

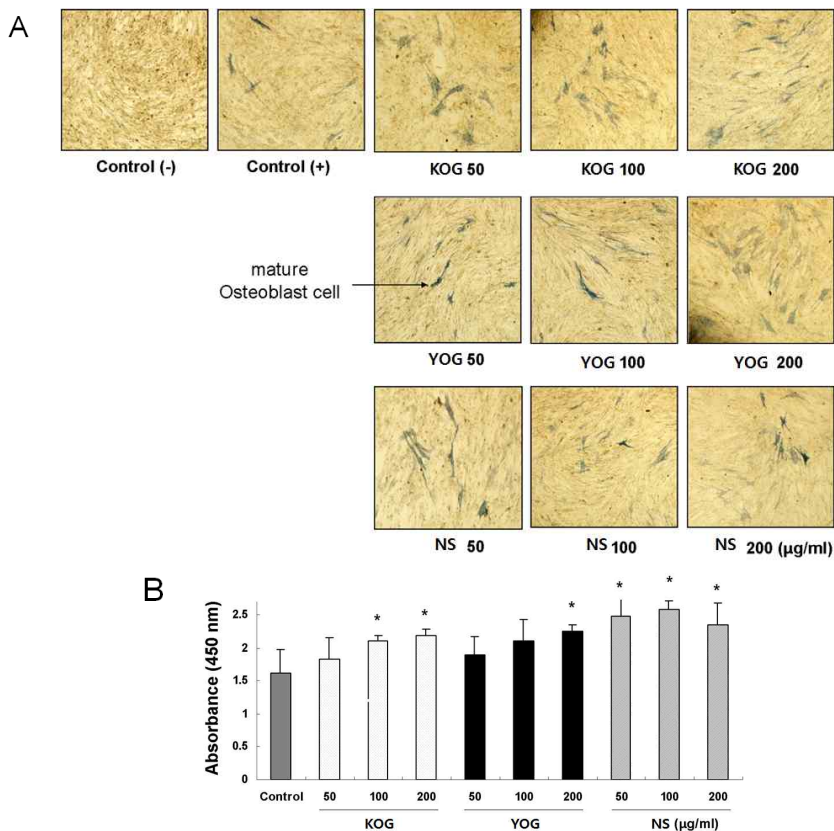


Fig. 2. Effect of Kyungok-go, Yeonok-go and NS on osteoblast proliferation.

A. C2C12 cells were cultured with the indicated doses for 3 days.

B. The XTT assay was evaluated and absorbance was read at 450 nm using ELISA reader. (\*  $P < 0.05$ , significantly different from the control)

## 3. 연자육 물 추출물의 세포독성효과

경옥고에 연자육을 가하면서 연자육이 세포에

대한 독성효과를 가지고 있는지 확인하기 위하여 대식세포에 M-CSF 처리 후 연자육을 농도별로 처

리하여 3 일간 배양하였다. XTT검사를 실시하여 M-CSF 단독 처리한 대조군과 연자육을 농도별로 처리한 실험군 사이에 차이적인 유의성이 없다는 것을 검증하였다(Fig. 3).

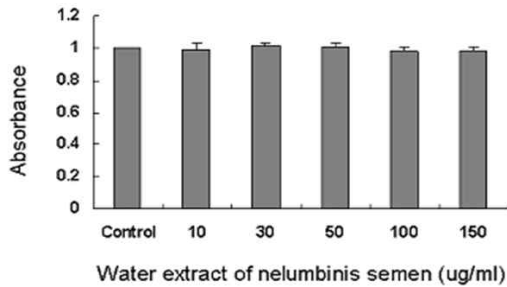


Fig. 3. WNS showed no effect on cell cytotoxicity.

BMMs were cultured with the indicated dose of NS in the presence of M-CSF(30 ng/ml) for 3 days. The XTT assay was evaluated and absorbance was read at 450 nm using ELISA reader. This result means NS has no cell cytotoxicity effect.

#### 4. LPS 유도 골 손실 모델 *In vivo* 실험

연자육과 연옥고, 경옥고 抽出物이 생체 내 骨組織에 미치는 영향을 검증하고자 骨損失 동물모델을 사용하여 실험을 수행하였다. 마우스는 각 군별로 5마리씩을 배정하였고 각각의 마우스에 전술한 방법대로 LPS를 腹腔注射하여 骨損失을 유발시켰다. 각 군별로 나누어 經口投與하여 LPS에 의한 骨損失에 미치는 效果를 확인하였다. LPS만 단독 처리한 對照群의 경우 小柱骨(trabecular bone)의 骨損失을 뚜렷하게 확인할 수 있었다. 반면에 연자육, 연옥고, 경옥고 물 抽出物을 투여한 實驗群에서는 LPS에 의한 骨損失이 抑制되었음을 확인하였다(Fig 4A).

연자육을 단독으로 200 mg/kg을 투여한 것보다 연옥고나 경옥고를 각 200 mg/kg 씩 投與한 군에서 유의성 있는 抑制效果를 나타냈다(Fig 4B).

이 결과로 연자육과 연옥고, 경옥고 抽出物은 生體外 條件 뿐만 아니라 生體內 條件에서도 骨損失을 抑制한다는 사실을 확인할 수 있었다. 특히

연자육 단독 抽出物이 아닌 연옥고, 경옥고 물 抽出物을 투여한 경우 월등한 效果를 나타내었다.

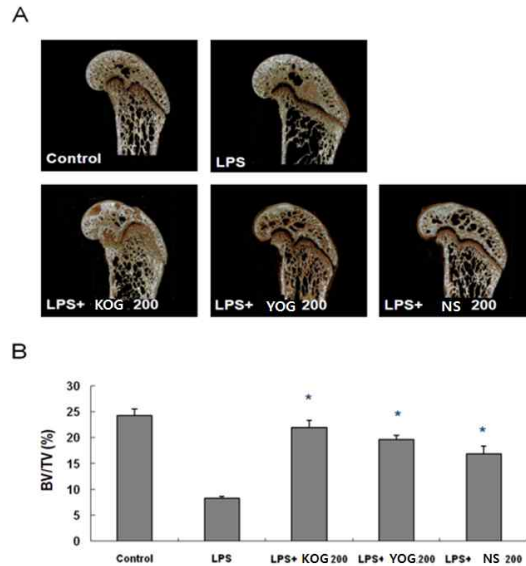


Fig. 4. NS, YOG and KOG rescued bone-loss by LPS-induction in mice

Mice were oral-treated with NS, Yeonokgo and Kyungokgo (200 mg/kg/day) or PBS for 10 days. LPS(4.5 µg/g of body weight) or PBS was administered intraperitoneally were serum-starved for 3 h, pretreated with or without on days 4 and 7, and the femurs were collected on days 10 after the first treat. A : Radiographs were taken with a nano CT. B : CT data were measured by Bone volume/Tissue volume. \**P* < 0.05, significantly different from the control.

#### IV. 고 찰

骨은 骨質에서 만들어지는 破骨細胞(osteoclast)와 造骨細胞(osteoblast)가 骨再形成(bone remodeling)을 함으로써 오래된 골은 파괴되고 새로운 골이 그 자리를 대체하는 일이 끊임없이 반복된다. 이 과정에서 破骨細胞의 骨吸收 양과 造骨細胞의 骨形成 양이 완벽하게 일치하지 않고 미세한 骨損失이 일어나고 이러한 骨損失이 누적되어 단위 용적

내에 骨密度가 감소하면서 骨多孔症이 발생한다<sup>23)</sup>. 骨多孔症이 일어나는 원인은 閉經 후 骨多孔症의 경우는 난소에서 에스트로겐의 분비가 감소할 때 破骨細胞에 의한 骨吸收의 증가로 생각되고 있다<sup>24)</sup>.

骨多孔症의 치료에 사용되는 치료제는 골격의 현 수준이 유지되도록 하는 骨吸收 抑制劑와 骨의 形成을 자극하는 骨形成 促進劑의 두 가지 종류의 약물이다. 우선 骨吸收 抑制劑는 내과적 치료제로 破骨細胞에 작용하여 骨吸收를 억제하는 제제로 estrogen, bisphosphonate, SERM, calcitonin, tibolone 등이 있다<sup>25,6)</sup>. 이들 제제에서 bisphosphonate는 복용 중에 惡心, 腹痛, 속쓰림 등의 다양한 부작용들이 동반되고, 저칼슘혈증이나 食道疾患, 腎疾患이 있는 사람은 주의하여 투약해야 하고 이 약을 복용하는 중에는 避妊을 해야 하는 등의 단점이 있다. SERM의 경우는 血栓塞栓症의 과거력이 있는 여성에게는 사용할 수 없고 warfarin, diazepam, diazoxide, lidocaine 등의 약물에는 拮抗劑로 작용하기 때문에 투여에 신중을 기해야 한다<sup>26-28)</sup>. Tibolone은 1960년대에 骨多孔症 치료 목적으로 개발되기 시작한 합성 스테로이드로 호르몬 치료의 대체제로 사용되어 왔다. 선택적 조직 에스트로겐 작용 조절제(selective tissue estrogenic activity regulator : STEAR)로 분류된다<sup>26)</sup>. 이 제제를 사용한 여성 환자 중에서 子宮 內膜炎이 발생하였다는 보고<sup>29)</sup>가 있으므로 膕出血이 있으면 사용에 주의해야 한다.

최근에는 골 구조에 대한 동화 작용의 효과가 있는 치료제로 骨形成 促進劑들이 소개되고 있다. 이들은 骨形成을 자극하는 제제로 造骨細胞에 작용하여 骨形成을 촉진한다. 대표적으로 Sodium fluoride, 부갑상선호르몬(PTH) 등이 있다. Sodium fluoride는 骨多孔症 환자에게 사용된 최초의 동화작용 제제로 직접적으로 造骨細胞의 증식을 자극하고 骨成長을 촉진하는 작용을 하나 骨多孔症 치료제로 아직 미국 FDA에서 승인되지 않았고 골밀도를 증가시키나 골절 발생률에 대한 효과는 아직 논란이 있는 등의 문제점이 있어 표준 치료제가 아니

다. 부갑상선호르몬(PTH)은 칼슘 항상성 유지에 아주 중요한 호르몬이다. 부갑상선호르몬(PTH)은 2002년 12월 미국 FDA의 승인을 받았으나 惡心, 頭痛, 眩氣症, 下肢痙攣 등으로 인해 투약을 중단하는 경우가 약 6% 정도 있으며 고칼슘혈증이나 부갑상선 기능항진증 과거력이 있는 환자에게도 투여해서는 안된다<sup>26)</sup>.

이러한 단점 혹은 부작용을 보완할 수 있는 새로운 치료제가 계속 연구되고 있으며 그 대안으로 천연물이 부각되고 있다. 韓藥에서 새로운 骨多孔症 치료제의 대안을 찾는 것도 기존 骨疾患 치료제를 보완할 좋은 방법이 될 수 있다. 식물성 에스트로겐(phytoestrogen)에 대한 연구도 그 일환이며 이것은 식물의 non-steroidal compounds로서 구조적, 기능적으로 에스트로겐과 유사하고 에스트로겐 수용체에 대하여 에스트로겐과 경쟁적으로 결합하여 SERM과 같은 효과를 나타내는 물질이다<sup>25)</sup>. 식물에 있는 대부분의 식물성 에스트로겐은 inactive compound의 상태로 들어 있으며 섭취 후 장내의 복잡한 효소에 의하여 에스트로겐과 유사한 작용을 하는 물질로 변환한다. 대표적인 식물성 에스트로겐으로는 콩, 석류, 升麻, 甘草 등의 성분인 isoflavone류로 genistein, daidzein 등이 많이 연구되고 있다. 다양한 한약재와 처방을 이용하여 骨多孔症에 대한 효과를 연구한 논문도 많으며 경옥고의 구성약재인 인삼과 생지황의 포제품인 숙지황에 대한 보고도 있다<sup>30-35)</sup>. 그러나 식물성 에스트로겐의 연구는 일관성이 없고 결과도 다양하게 나타나는 한계가 있다. 그 이유는 천연물 유래의 성분은 subtype이 매우 많고, 체내에서 biotransformation을 일으키고, tissue specification이 있고, individual metabolism의 차이가 있고 농도에 따라 작용기전이 달라지는 등의 문제가 있다<sup>25)</sup>. 앞으로 더 많은 연구가 필요한 분야이다.

한약을 이용한 실험의 경우 대부분 마우스나 랫드를 이용하여 난소적출로 骨多孔症을 유발한 모델을 사용하여 실험을 진행하였다. 여성호르몬의 결핍



과 骨多孔症이 밀접한 관계가 있으므로 난소를 적출한 동물 모델에서는 모두 骨多孔症이 발생하며 이는 여성 생식기의 기능이 쇠퇴하는 폐경기 여성 骨多孔症과 유사한 모델<sup>36,37)</sup>로 한의학에서의 노화로 인한 腎水不足과 연관된다고 볼 수 있을 것이다. 본 연구에서는 마우스에서 LPS를 주사하여 염증을 일으켜 급성으로 골손실을 유발한 모델을 사용하였다.

그 결과 연자육의 경우 파골세포보다는 조골세포에 작용하여 조골세포 증식촉진 효과가 있었으며 동물실험에서도 골 소실 억제효과가 있었으나 연자육과 경옥고를 배합한 연옥고의 경우 조골세포 증식효과와 함께 동물실험에서 더 높은 골 소실 억제 효과가 있었다. 이는 다종의 한약재를 배합하여 전신적인 multi-function을 추구하는 한약의 특징과 관련 있다고 볼 수 있다. 경옥고는 동의보감 정문(精門)에 수록된 처방으로 腎精회복으로 노화방지, 체력 및 지구력 증진 등의 효능을 가진 것으로 해석가능하므로 일종의 補陰에 해당하는 조골세포 증식작용을 통해 좋은 골 소실 억제 작용을 보였다고 생각된다. 연자육을 첨가한 경옥고인 연옥고는 인삼, 생지황, 봉밀, 복령으로 이루어진 경옥고의 효능외에 補脾止瀉하고 益腎固精시키며 養心安神시키는 연자육의 효능을 겸하여 한의약 임상에서 心悸失眠과 遺精帶下를 치료하는데에도 사용될 수 있을 것이다. 현대인들에게 많은 불면증이나 스트레스로 인한 화병 등 정신신경계 질환이 있는 사람들에게는 경옥고보다 연옥고가 더 좋은 효과를 보일 수 있다고 생각되나 본 연구에서는 연자육을 첨가함으로 경옥고보다 나은 골손실 억제 효과를 관찰할 수는 없었다. 경옥고에서 나타난 골손실 억제효과를 폐경후 골다공증 모델 등 다른 골손실 모델을 이용하여 후속연구를 진행하고 있다.

## V. 결 론

본 연구는 조골세포의 증식과 전구세포인 대식

세포의 RANKL에 의한 파골세포의 분화에 연자육, 연옥고, 경옥고 추출물의 효과를 검증하였다.

연자육, 경옥고, 연옥고 물 추출물은 세포에 대한 독성 없이 농도 의존적으로 조골세포의 증식을 유도하였으며 파골세포의 분화 억제와는 관련이 없었다.

또한 생쥐를 이용한 동물실험에서 LPS로 인한 염증에 의한 골 소실을 억제하였다. LPS에 의해 骨損失을 유발한 마우스에서 LPS만 단독처리한 對照群은 小柱骨(trabecular bone)의 骨損失 발생이 뚜렷하게 나타났으나 연자육, 연옥고, 경옥고 추출물을 投與한 實驗群에서는 骨損失이 抑制되었다. 특히 연자육 단독 추출물보다 연옥고, 경옥고 물 抽出物을 투여한 경우 월등한 효과를 나타내었다.

따라서 이 결과로 연옥고, 경옥고 추출물은 관절염이나 골다공증 등의 골질환에 조골세포 증식을 통해 골량 증가를 위한 치료제로 사용될 수 있음을 알 수 있었다.

## 감사의 글

이 연구는 2009년도 원광대학교 교비에 의하여 수행되었으므로 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

1. 통계청. 2010 인구주택총조사(<http://www.census.go.kr/>)
2. National Osteoporosis Foundation. America's Bone Health: The State of Osteoporosis and Low Bone Mass in Our Nation. Washington, DC:National Osteoporosis Foundation. 2002.
3. Reginster JY, Burlet N. Osteoporosis: a still increasing prevalence. Bone. 2006;38:S4-S9.
4. Burge R, Dawson-Hughes B, Solomon DH, Wong

- JB, King A, Tosteson A. Incidence and economic burden of osteoporosis-related fractures in the United States, 2005-2025. *J Bone Miner Res.* 2007;22:465-75.
5. Alliston T, Derynck R. Interfering with bone remodelling. *Nature.* 2002;416:686-7.
  6. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature.* 2003;423:337-42.
  7. Yagi M, Miyamoto T, Toyama Y, Suda T. Role of DC-STAMP in cellular fusion of osteoclasts and macrophage giant cells. *J. Bone Miner. Metab.* 2006;24:355-8.
  8. Chesnut CH III, Skag A, Christiansen C, Recker R, Stakkestad JA, Hoiseth A. Effects of oral ibandronate administered daily or intermittently on fracture risk in postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res.* 2004;19:1241-9.
  9. Ringe JD, Dorst A, Faber H, Ibach K, Sorenson F. Intermittent intravenous ibandronate injections reduce vertebral fracture risk in corticosteroid-induced osteoporosis: results from a long-term comparative study. *Osteoporos Int.* 2003;14:801-7.
  10. Ettinger B, Black DM, Mitlak BH, Knickerbocker RK, Nickelsen T, Genant HK. Reduction of vertebral fracture risk in postmenopausal women with osteoporosis treated with raloxifene: results from a 3-year randomized clinical trial. Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation(MORE) Investigators *JAMA.* 1999;282:637-45.
  11. Neer RM, Arnaud CD, Zanchetta JR, Prince R, Gaich GA, Reginster JY. Effect of parathyroid hormone(1-34) on fractures and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. *N Engl J Med.* 2001;344:1434-41.
  12. Kwak HB, Kim JH, Kim DJ, Kwon YM, Oh JM, Kim YK. Effect of Water Extract of Deer Antler in Osteoclast Differentiation. *Korean J. Oriental Physiology & Pathology.* 2008;22(4):891-5.
  13. Park CK, Kim HJ, Kwak HB, Lee TH, Bang MH, Kim CM, Lee Y, Chung DK, Baek NI, Kim J, Lee ZH, Kim HH. Inhibitory effects of *Stewartia koreana* on osteoclast differentiation and bone resorption. *International Immunopharmacology.* 2007;7:1507-16.
  14. Han KY, Yang D, Chang EJ, Lee Y, Hao Huang, Sung SH, Lee ZH, Kim YC, Kim HH. Inhibition of osteoclast differentiation and bone resorption by sauchinone. *Biochemical Pharmacology.* 2007;74:911-23.
  15. Tsai HY, Lin HY, Fong YC, Wu JB, Chen YF, Tsuzuki, Tang CH. Paeonol inhibits RANKL-induced osteoclastogenesis by inhibiting ERK, p38 and NF- $\kappa$ B pathway. *European Journal of Pharmacology.* 2008;588:124-33.
  16. 李仲梓. 醫宗必讀. 의성당. 1992.
  17. 許浚 저, 동의학연구소 역. 東醫寶鑑, 여강출판사. 1994:1권 27.
  18. 辛民敎, 임상본초학. 영림사. 1997:505.
  19. la Cour B, Molgaard P, and Ti Z. Traditional Chinese Medicine in treatment of hyperlipidaemia. *J Ethnopharmacol.* 1995;46(2):125-9.
  20. 이진우, 홍무창, 신민규, 배현수. 연자육의 항우울 효과 및 프로티옴 분석을 통한 기전 연구. *동의생리병리학회지.* 2006;20(4):830-43.
  21. 김수오. 허혈성 심근경색 모델에 대한 연자육의 효과 연구. *경희대학교 대학원.* 2005.
  22. 김태현. 연자육이 LPS로 유도된 BV2 Microglia cell에서의 nitric oxide 생성에 미치는 영향. *경희대학교 대학원.* 2007.
  23. Raisz LG. Local and systemic factors in the pathogenesis of osteoporosis. *New Engl. J. Med.* 1988;18(13):818-28.

24. Garnero P, Delmas PL, et al. New developments in biochemical markers for osteoporosis. *Calcif Tissue Int.* 1996;54(Supp1):S2-5.
25. 대한골대사학회. 骨多孔症. 서울:한미의학. 2006: 51, 343-8.
26. 윤상호, 김정구. 폐경후 骨多孔症의 최신 치료. *대한산부학회지.* 2005;48(4):844-56.
27. Bhavnani BR, Strickler RC. Menopausal hormone therapy. *J. Obstet Gynaecol Can.* 2005;27(2): 137-62.
28. Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine. Estrogen and progesteron therapy in postmenopausal women. *Fertil Steril.* 2008;90(5 Suppl):S88-102.
29. Yazigi R. etc. Carcinoma of the endometrium in patients treated with tibolone. *Gynecol Oncol.* 2004;93:568-70.
30. 조수인. 熟地黄이 卵巢摘出로 閉經이 誘發된 흰쥐에 미치는 영향. *대한본초학회지.* 2005;20(4):61-7.
31. 정국영 외. 蔘鬚가 卵巢摘出로 誘發된 흰쥐의 骨多孔症에 미치는 영향. *대한본초학회지.* 2003; 18(4):13-23.
32. 정국영 외. 人蔘이 卵巢摘出로 誘發된 흰쥐의 骨多孔症 예방에 미치는 영향. *대한본초학회지.* 2004;19(1):1-11.
33. 안지영 외. 국내 학술지에 발표된 한약추출물의 골다공증에 대한 효능실험결과 고찰. *대한한의학방제학회지.* 2008;16(2):47-69.
34. 이효정 외. 천연물 추출물의 파골세포 분화억제 효과 검색. *한국식품과학회지.* 2005;37(6): 997-1004.
35. 박형무. 최신임상강좌: 폐경여성에서의 식물성 에스트로겐의 효용성. *대한산부학회지.* 2007;50(3): 389-415.
36. Ron, G.A., Martin, T.J. Therapeutic approaches to bone diseases. *science.* 2000;289:1508-14.
37. Lloyd, M. Treatment of postmenopausal osteoporosis. *The New England Journal of Medicine.* 1998; 338:736-46.