

## 三氣飲加味方이 파골세포의 분화 및 조골세포의 활성에 미치는 영향

대전대학교 한의과대학 한방부인과 교실  
박선민, 유동열

### ABSTRACT

#### Effects of Samkieumgamibang Extract on Osteoclast Differentiation and Osteoblast Function

Sun-Min Park, Dong-Youl Yoo  
Dept. of Oriental Gynecology, College of Oriental Medicine,  
Dae-Jeon University

**Objectives:** This study was performed to evaluate the effect of Samkieumgamibang (SKG) on osteoporosis.

**Methods:** The osteoclastogenesis and gene expression were determined in RANKL-stimulated RAW 264.7 cell. And, osteoblastogenesis was also determined in rat calvarial cell.

**Results:** SKG decreased the number of TRAP positive cell in osteoclast. It also decreased the expression of Cathepsin K, MMP-9, TRAP, c-fos, NAFTc1 and JNK1 in osteoclast. SKG increased the expression of iNOS in RANKL-stimulated in osteoclast. Otherwise, SKG inhibited TRAP activity in osteoclast. SKG increased cell proliferation, ALP activity, bone martix protein, collagen and nodule in osteoblast.

**Conclusions:** It is concluded that SKG might decrease the bone resorption resulted from decrease of osteoclast differentiation and it's related gene expression. And, SKG might increase the bone formation resulted from increase of osteoblast function.

**Key Words:** Samkieumgamibang(SKG), Osteoclast, Osteoblast, Osteoporosis, Bone resorption

## I. 서론

骨多孔症은 여성호르몬의 부족, 갑상선기능의 항진, 당뇨병, 신체적 노화, 운동 부족 등의 경우 많이 발생하며, 파골세포의 기능이 조골세포의 기능에 비해 우세하여 골밀도가 감소되어 나타나는 것으로 알려져 있다<sup>1,2)</sup>. 특히 남성보다는 여성에 있어서 골소실이 더 빨리 진행되는데, 남성은 급격한 감소 없이 서서히 지속적인 골소실이 나이에 비례해서 발생하는 것에 비해, 여성은 폐경기이후 첫 4~8년간 급격히 발생한다. 이는 폐경기에 조골세포의 증식과 분화를 촉진시키는 에스트로겐의 결핍이 원인이라고 할 수 있겠다<sup>3)</sup>. 따라서, 조골세포의 기능을 활성화시키거나 파골세포의 분화를 억제하는 것은 골다공증을 치료 또는 예방하는데 매우 중요한 수단이 될 것이다.

韓醫學 문헌에서는 골다공증이란 병명은 없지만 骨痺(骨寒), 骨痿(骨熱), 骨傷 등과 유사하며<sup>4,5)</sup>, 骨의 허약한 상태를 나타내는 '骨枯' '骨極'의 병명과 유사하다고 볼 수 있다<sup>6)</sup>. 특히 여성에 있어서는 《黃帝內經 素問·上古天真論》<sup>7)</sup>에 폐경기 여성의 생리적 특성을 표현하고 있는데, 그중 形壞는 외모 뿐 아니라 골격에 있어서도 쇠약해짐을 표현한 것으로 여겨지며, 이는 폐경후 여성호르몬인 estrogen의 결핍이 골의 약화, 골다공증의 원인이 되는 현대의학적 개념의 골다공증의 기전과 유사할 것으로 생각된다.

골다공증의 주된 원인은 《黃帝內經 素問·痿論》<sup>7)</sup>에 근거하여 腎虛로 보고 있으며, 나타나는 증상에 근거하여 腎虛,

腎陰虛, 腎陽虛, 肝腎虧虛, 脾腎陽虛, 氣滯血瘀, 氣血陽虛 등으로 辨證分類하고 있고, 치료에 있어서는 辨證유형에 따라 補肝腎, 補腎陽, 補腎陰腎陽, 健脾益氣, 理氣活血, 氣血雙補의 처방이 활용되고 있다<sup>3)</sup>.

三氣飲은 明代 張介賓<sup>8)</sup>의 《景岳全書》에 처음 기록되고, 黃度淵<sup>9)</sup>의 《方藥合編》에도 기록된 처방으로 氣血이 손상되었을 때 風寒濕의 침입으로 인해 筋骨에 歷節痺痛이 발생하거나 痢疾 후에 鶴膝風 등에 사용된다고 표현되어 있어, 기력저하와 함께 오는 관절염에 사용되는 처방이라고 알려져 있다.

본 연구에 활용한 三氣飲加味方은 熟地黃 杜沖 牛膝 枸杞子 當歸 白茯苓 白芍藥 肉桂 細辛 附子 甘草 生薑<sup>8,9)</sup>의 약물에 清熱解毒, 消癰排膿 하는 효능을 가진 魚腥草<sup>10)</sup>를 추가하여 면역력을 높이고 항염작용을 강화하였다. 三氣飲, 三氣飲加味方 및 三氣飲加味方 藥針 등에 관한 실험적 연구로 전<sup>11-14)</sup> 등은 관절염 치료에 효과가 있다고 하였으며, 강<sup>15-17)</sup> 등은 조골세포 활성화 및 골다공증에 유효하다고 하였다.

골다공증은 골의 형성에 관여하는 조골세포와 파골세포 사이의 균형이 파괴되어 나타나는 것으로 볼 때 三氣飲加味方이 補肝腎, 補腎陽, 強筋骨 등의 효능으로 골다공증의 치료에 유효할 것으로 판단되었다.

이에 조골세포 활성화 뿐 아니라 파골세포 분화에 미치는 효과를 평가하기 위하여 본 실험을 시행하였다. 파골세포 분화 및 기능 평가를 위해 RANKL 유도 RAW 264.7 cell의 TRAP(+) 세포 형성과 골 흡수관련 인자들의 유전자 발현을

측정하였으며, 조골세포의 활성을 평가하기 위해 rat의 두개골을 분리하여 조골세포의 분열능 및 ALP 활성, bone matrix protein 합성, bone collagen 합성, nodule 생성을 측정하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 실험

### 1. 재 료

#### 1) 약재 추출 및 검액 제조

三氣飲加味方 70 g을 분말로 만들어 플라스크에 넣은 후, MeOH 1ℓ를 가하고 6시간 이상 가열하여 환류 추출하였다. 여과지를 이용하여 여과한 다음, 여액을 evaporator(EYELA, Japan)을 이용하여 감압 농축한 다음, 냉동 건조하여 실험 시까지 냉동보관 하였다. 실험 시에는 三氣飲加味方 추출물 8 g(이하 SKG라 함)을 DMSO를 이용하여 배지에 녹인 후, pore size 0.45 μm의 여과지를 통과시킨 후 사용하였다. 실험에 사용한 약물은 《方藥合編》<sup>9)</sup>을 근거로 하여 ○○한방병원에서 구입한 것을 정선하여 사용하였다(Table 1).

#### 2) 동 물

동물은 체중 약 250 g정도의 출산예정 2일 전인 Sprague-Dawley(SD) rat를 대한바이오링크에서 공급받아 실험실에서 출산 때까지 사육하였다. 실험에 사용하는 조골세포를 얻기 위하여 생후 1일 된 rat의 두개골을 적출하고 세포를 분리하여 사용하였다.

#### 3) 세 포

실험에 사용된 파골세포 전구세포는 mouse myeloid 세포주인 RAW 264.7

cell에 RANKL를 처리하여 유도된 세포 모델을 사용하였다<sup>18)</sup>. 사용된 RAW 264.7 cell은 한국세포주은행에서 구입하였다.

Table 1. Prescription of SamKieumgamibang (SKG)

韓藥名	生藥名	用量 (g)
熟地黃	<i>Rehmanniae Radix Preparat</i>	12
杜仲	<i>Eucommiae Cortex</i>	4
牛膝	<i>Achyranthis Bidentatae Radix</i>	4
當歸	<i>Angelicae Gigantis Radix</i>	4
枸杞子	<i>Lycii Fructus</i>	4
白茯苓	<i>Hoelen</i>	4
白芍藥	<i>Paeoniae Radix Alba</i>	4
肉桂	<i>Cinnamomi Cortex</i>	4
細辛	<i>Asari Radix</i>	4
白芷	<i>Angelicae Dahuricae Radix</i>	4
附子	<i>Aconti Lateralis Preparata Radix</i>	4
甘草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	4
生薑	<i>Zingiberis Rhizoma Crudus</i>	4
魚腥草	<i>Houtuyniae Herba</i>	10
TOTAL		70

### 2. 방 법

#### 1) 파골세포에 미치는 영향 측정

##### (1) RAW 264.7 Cell 배양

정상군인 RAW 264.7 cell은 DMEM (Dulbecco's modified eagle medium)/10% FBS(fetal bovine serum)/PC-SM 배지를 이용하여 CO<sub>2</sub> 세포배양기에서 배양하였으며, 세포수는 5×10<sup>3</sup> cells/well 로 96 well plate를 이용하여 배양하였다. 대조군은 24시간 배양 후 배양액을 버린 후, 10% FBS, 50 ng/ml RANKL, 1 ng/ml TGFβ 가 첨가된 α-MEM 으로 교환하여 세포를 배양했다. 실험군은 배양액에 여러 농도의 SKG를 첨가해 주었다. 2일에 한 번씩 동일한 배지로 교환해 주면

서 6일간 배양하였다.

(2) 파골세포 형성에 미치는 영향 측정

RANKL로 RAW 264.7 cell을 파골세포로 유도한 후, 성숙한 파골세포의 발현 marker로 알려진 TRAP를 염색하여 TRAP(+) 세포를 확인하였다. 분화시킨 세포를 PBS로 세포를 2회 세척하고, 3.7% formaldehyde citrate acetone 용액으로 10분 고정시키고 증류수로 2회 세척하였다. 2% TRAP fast garnet GBC base 용액과 NaNO<sub>3</sub> 용액을 같은 비율로 섞어 만든 용액과 5% naphtha AS-BI phosphoric acid, 4% acetic acid, 2% tartaric acid를 포함한 용액을 고정시킨 세포에 처리하고 상온에 30분 이상 방치하였다. 광학현미경으로 관찰하여 핵이 3개 이상인 TRAP(+) 다핵세포를 계수하여 파골세포의 생성지표로 하였다.

2) 파골세포 유전자 발현에 미치는 영향 측정

(1) 총 RNA 분리

Rat에서 취한 조직을 PBS를 넣고 균질화한 다음, 1 ml TRIzol reagent(Invitrogen, USA)를 처리하여 총 RNA를 분리하였다. 분리한 RNA 용액에 200  $\mu$ l의 chloroform : isoamylalcohol(24 : 1)을 넣고 강하게 섞은 후 14,000 rpm으로 원심 분리하여 상층액 500  $\mu$ l를 분리하였다. 0.5 ml isopropyl alcohol을 여기에 가하여 영하 20°C에서 하룻밤 RNA를 침전시킨 후 1,400 rpm으로 20분간 원심 분리하였다. 상등액을 버린 후 70% 에탄올로 세척하고 자연 건조시켰다. RNase free water에서 RNA를 녹인 후 RNase-free DNase를 첨가하고 -70°C에서 저장하였다.

(2) cDNA 제조

대조군 및 실험군에서 각각 분리한

total RNA 액 1  $\mu$ l에(1  $\mu$ g RNA 함유)에 oligo dT(농도 100 pmol) 1  $\mu$ l, RNase free water 3  $\mu$ l을 넣은 후 조심스럽게 혼합한 다음, 65°C에서 10분간 incubation 하였다. Primer가 annealing 하도록 4°C에서 약 5분간 방치한 다음, Reverse transcriptase buffer, dNTP(각 2.5 mM), RNase inhibitor, DTT(100 nM), Reverse transcriptase(M-MLV 200 U/ $\mu$ l)을 첨가한 후, 아주 조심스럽게 혼합하였다. 이 후, 42°C에서 90분간 incubation 한 후, 95°C에서 5분간 처리한 후 사용하였다.

(3) RT-PCR

oligo(dT) primer(Promega, Cat.No. C1101), reaction buffer(50 mM Tris-HCl, 75 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, pH 8.3)(Promega, Cat.No. M1705), 1 mM dNTP(Promega, Cat.No. U1515)과 200 unit M-MLV-RT(Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase)(Promega, Cat.No. M1705)를 분리한 RNA에 처리하여 역전사를 수행함으로써 cDNA를 합성하였다. PCR은 total volume 25  $\mu$ l에 10X PCR buffer, 0.2 mM dNTPs, 2 pmole의 sense 및 antisense primer를 넣은 혼합액에 cDNA와 1.25 unit의 Taq polymerase(Promega, Cat.No. M8295)을 넣어 PCR을 시행하였다. PCR 조건은 94°C 4분, 30 cycles의 [94°C (20초), 54°C (20초), 72°C (30초)], 72°C 10분이었다(Perkin Elmer, USA). 증폭된 PCR 산물을 2% agarose gel에 전기영동하였다. 전기영동 결과 나온 band를 density 분석 프로그램인 Gel-Pro analyzer 3.1(Media Cybernetics, USA)을 이용하여 구했다. RT-PCR(Reverse Transcription

-Polymerase Chain Reaction) 에 사용한 primer는 아래 Table 2에 표시하였다.

Table 2. Primers

Target gene	Foward (5'-3')	Reverse (5'-3')
Cathepsin K	AGGCGGCTATATGACCACTG	CCGAGCCAAGAGAGCATATC
c-fos	CCAGTCAAGAGCATCAGCAA	AAGTAGTGCAGCCCGGAGTA
iNOS	CCTTGTTTCAGCTACGCCTTC	AAGGCCAAACACAGCATAACC
JNK1	GCCATTCTGGTAGAGGAAGTTTCTC	CGCCAGTCCAAAATCAAGAATC
MITF	GGAACAGCAACGAGCTAAGG	TGATGATCCGATTACCAGGA
MMP-9	CGTCGTGATCCCCACTTACT	AGAGTACTGCTTGCCCAGGA
NFATc1	GGGTCAGTGTGACCGAAGAT	GGAAGTCAGAAGTGGGTGGA
Trap	ACACAGTGATGCTGTGTGGCAACTC	CCAGAGGCTTCCACATATATGATGG

(4) Real time RT-PCR

각각의 optical tube(MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode and Optical Adhesive Films, Applied Biosystems, Cat.No. 4314320)에 3배의 SybrGreen Mix 2.5 µl (Sigma-Aldrich, Cat.No. S9430), 위에서 합성한 cDNA 1 µl, 10 pmol/µl primer pair mix 1 µl, 각각 2.5 mM의 dNTP 2 µl, 10xTag polymerase buffer 2.5 µl, Tag Polymerase 0.3µl 와 14.7 µl H<sub>2</sub>O를 넣고, 95°C 5분, 1 cycle의 95°C (30초), 45°C (30초), 72°C (60초) 40 cycles, 95°C 20분 1 cycle로 증폭시켰다. Primer는 RT-PCR에 사용한 것을 이용하였다. PCR을 마친 후 tube를 꺼낸 다음, 반응액 5 µl를 사용하여 3% agarose gel에서 PCR specificity를 측정하고, ABI PRISM® 7000 Sequence Detection System(Applied Biosystems, Cat.No. 4349157)를 사용하여 Real time PCR 결과를 분석하였다.

3) 조골세포 기능에 미치는 영향 측정

(1) Calvarial Cell의 분리 및 배양

생후 1일된 쥐의 후두부를 절개하고 calvaria를 적출하였다. calvaria에 붙어

있는 결체 조직 등을 깨끗이 제거하고, HBSS로 세척했다. calvaria를 2 ml의 collagenase, trypsin, 0.5 mM EDTA 용액에 넣어 37°C에서 반응시켰다. 상등액을 취하여 1,500 rpm에서 원심 분리하여 침전된 calvaria cell을 얻었다. PBS에 재현탁하여 1,500 rpm에서 원심 분리하여 washing 후, 이를 DMEM 배지(10% FBS, 100 IU/Penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 50 µg/ml L-ascorbic acid, 10 nM dexamethasone, 10 mM β-glycerophosphate, 300 ng/ml Fungizone)에 넣어 현탁한 후 37°C 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다. 상등액을 제거하고 남은 calvaria에 다시 2 ml의 효소를 넣고, 위 반응을 여러차례 반복하였다. 세포의 배지는 3일에 한 번씩 교환하였다. 배양한 세포는 2주 후 trypsin 처리하여 세포 수를 측정한 후 실험에 이용하였다.

(2) 조골세포의 분열능에 미치는 영향 측정

Subculture를 통하여 두개골세포가 1~3×10<sup>5</sup> cells/well이 되도록 24well plate에 seeding하였다. 세포가 plate에 부착하는 것을 확인하고 24시간 후 SKG를 첨

가하고 8일간 배양하였으며 배지는 2일마다 교환해 주었다. 8일째에 collagenase, trypsin, 0.5 mM EDTA를 가하여 세포를 culture plate로부터 분리하였으며, Isoton-II solution을 이용하여 20배 희석한 후 세포계수기(Sysmax F-820)로 세포의 수를 측정하였다.

### (3) Alkaline phosphatase(ALP) 활성 측정

ALP 활성은 ALP-K Kit를 이용하여 측정하였다. cell을 배양한 plate를 냉각한 PBS로 세척한 후 cell을 scraper로 긁어내어 5 mM dithiothreitol(DTT)이 함유된 PBS에 현탁하였다. 이 현탁액을 냉각상태에서 ultrasonicator로 sonication 하였다. 이 현탁액을 취하여 기질액과 37°C에서 15분간 반응시킨 후 발색액을 넣어주었다. 10분 후 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### (4) Bone Martrix Protein 생합성 측정

Cell을 배양한 plate를 PBS로 세척한 후 cell scraper를 이용해 세포를 긁어내어 5 mM dithiothreitol(DTT)이 함유된 PBS에 현탁하였다. 이 현탁액을 냉각상태에서 ultrasonicator로 sonication 하였다. 현탁액을 취하여 뷰렛트 시약과 37°C에서 10분간 반응시킨 후 550 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### (5) Bone Collagen 합성 측정

Cell을 배양한 plate를 PBS로 세척한 후 cell scraper를 이용해 세포를 긁어내었다. 5,000 rpm에서 15분간 원심 분리한 후 PBS로 현탁했다. 0.3% collagenase를 넣은 후 37°C에서 2시간동안 배양하였다. 11.14 N HCl을 첨가한 후 100°C에서 24시간동안 가수분해하였다. Isopropanol을 넣은 다음 oxidant solution을 첨가한

후 상온에서 4분 동안 두었다. 이후 Ehrlich's reagent solution을 첨가한 다음 60°C에서 25분간 heating한 후 2~3분간 cooling 했다. 17시간 후에 550 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### (6) Nodule 생성 측정

세포를 21일간 배양한 후 냉각한 PBS로 세척하였다. Neutral buffered formalin (formalin 100ml, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 16g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>O 4g in 1L) 를 가하고 15분간 고정 시킨 후 PBS 로 세척하였다. Von Kossa's reagenet를 가하여 상온에서 30분간 반응 시켰다. 다시 세척한 후 toluidine blue 액을 가하여 수 초간 반응시킨 후 PBS로 세척하고 공기 중에서 건조하였다. 형성된 nodule의 면적을 Image Analyzer를 이용하여 측정하였다.

## 3. 통계 분석

각 결과에 대한 유의성 검증은 student's t-test를 이용하였다. p<0.05 인 경우 유의성이 있다고 판정하였다.

## Ⅲ. 결 과

### 1. 파골세포 분화 및 유전자 발현에 미치는 영향

1) 파골세포 세포 형성에 미치는 영향  
실험 결과 RAW 264.7 cell에 RANKL과 TGFβ를 첨가한 배지로 배양한 대조군의 경우 다수의 TRAP(+) 다핵세포가 정상군에 비해 유의성 있게 형성되는 것이 관찰되었다. 10μg/ml의 농도를 가진 실험군에서는 파골세포로 분화된 TRAP(+) 다핵세포 숫자가 대조군에 비해 약 22% 감소하였으나 유의성이 없

었고, 50 $\mu$ g/ml 인 실험군은 대조군에 비해 유의성 있게 감소(약 56%)하였다. 또한, 100 $\mu$ g/ml 인 실험군도 대조군에 비해 유의성 있게 감소(약 78%)하였다 (Fig. 1).

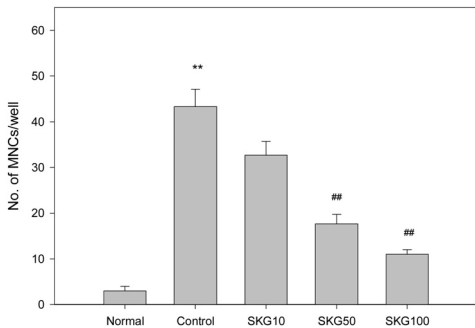


Fig. 1. Effects of SKG on the Formation of TRAP(+) MNCs in RANKL stimulated Osteoclast.

Normal : Vehicle  
 Control : RANKL(50 ng/ml)  
 SKG10 : RANKL(50 ng/ml) + SKG(10  $\mu$ g/ml)  
 SKG50 : RANKL(50 ng/ml) + SKG(50  $\mu$ g/ml)  
 SKG100 : RANKL(50 ng/ml) + SKG(100  $\mu$ g/ml)  
 Each bar represents Mean $\pm$ SD of 5 tests.  
 \*\* : p<0.01 vs Normal ## : p<0.01 vs Control

2) TRAP 활성화에 미치는 영향

파골세포로부터 TRAP 활성을 측정 한 결과, 대조군은 정상군에 비해 TRAP 활성이 유의성 있게 증가하였으며, SKG 10 $\mu$ g/ml의 농도를 가진 실험군에서는 대조군에 비해 TRAP 활성이 감소하였으나 유의성이 없었고, 50 $\mu$ g/ml와 100 $\mu$ g/ml의 농도를 가진 실험군은 모두 대조군에 비해 TRAP 활성이 유의성 있게 감소하였다(Fig. 2).

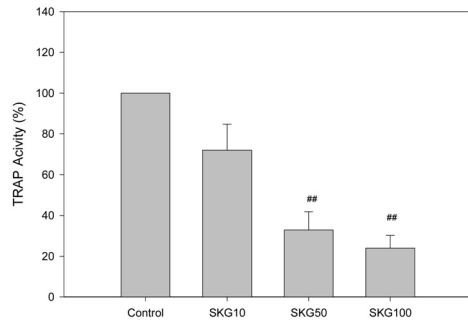


Fig. 2. Effects of SKG on the TRAP Activity in RANKL stimulated Osteoclast. Normal : Vehicle

Control : RANKL(50 ng/ml)  
 SKG10 : RANKL(50 ng/ml) + SKG(10  $\mu$ g/ml)  
 SKG50 : RANKL(50 ng/ml) + SKG(50  $\mu$ g/ml)  
 SKG100 : RANKL(50 ng/ml) + SKG(100  $\mu$ g/ml)  
 Each bar represents Mean $\pm$ SD of 5 tests.  
 ## : p<0.01 vs Control

3) Cathepsin K 발현에 미치는 영향

실험 결과, RANKL 처리 대조군은 정상군에 비해 Cathepsin K의 발현이 유의성 있게 증가하였고, SKG 10  $\mu$ g/ml, 50  $\mu$ g/ml, 100  $\mu$ g/ml의 농도를 가진 실험군은 모두 Cathepsin K 유전자 발현을 유의성 있게 억제하였다(Fig. 3).

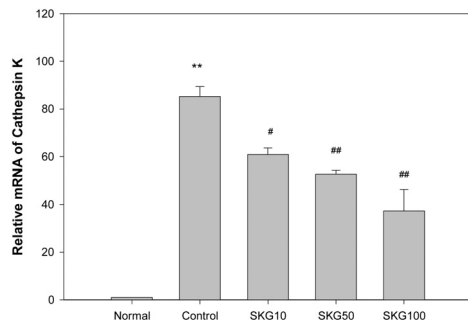


Fig. 3. Effects of SKG on the Expression of Cathepsin K in RANKL stimulated Osteoclast.

Normal : Vehicle  
 Control : RANKL(50 ng/ml)  
 SKG10 : RANKL(50 ng/ml) + SKG(10  $\mu$ g/ml)  
 SKG50 : RANKL(50 ng/ml) + SKG(50  $\mu$ g/ml)  
 SKG100 : RANKL(50 ng/ml) + SKG(100  $\mu$ g/ml)  
 Each bar represents Mean $\pm$ SD of 5 tests  
 \*\* : p<0.01 vs Normal # : p<0.05 vs Control  
 ## : p<0.01 vs Control

4) c-fos 발현에 미치는 영향

실험 결과, RANKL 처리 대조군은 정상군에 비해 신호전달 과정의 일부인 c-fos의 발현이 유의성 있게 증가하였고, SKG 10  $\mu\text{g/ml}$ , 50  $\mu\text{g/ml}$ , 100  $\mu\text{g/ml}$  농도를 가진 실험군은 모두 c-fos의 발현을 유의성 있게 억제하였다(Fig. 4).

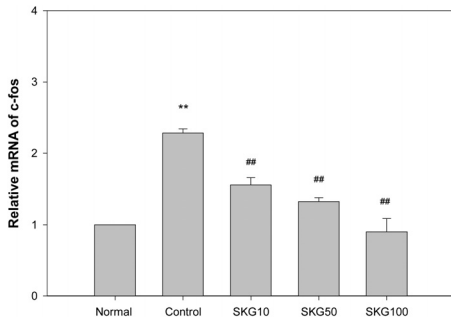


Fig. 4. Effects of SKG on the Expression of c-fos in RANKL stimulated Osteoclast. Normal : Vehicle  
Control : RANKL(50 ng/ml)  
SKG10 : RANKL(50 ng/ml) + SKG(10  $\mu\text{g/ml}$ )  
SKG50 : RANKL(50 ng/ml) + SKG(50  $\mu\text{g/ml}$ )  
SKG100 : RANKL(50 ng/ml) + SKG(100  $\mu\text{g/ml}$ )  
Each bar represents Mean $\pm$ SD of 5 tests.  
\*\* : p<0.01 vs Normal ## : p<0.01 vs Control

5) iNOS 발현에 미치는 영향

실험 결과, RANKL 처리 대조군은 분화되기 전의 전구세포인 정상군에 비해 iNOS 발현이 유의성 있게 억제되었으며, SKG 50  $\mu\text{g/ml}$ , 100  $\mu\text{g/ml}$  농도를 가진 실험군은 대조군에 비해 iNOS 유전자 발현을 유의성 있게 증가시켰다(Fig. 5).

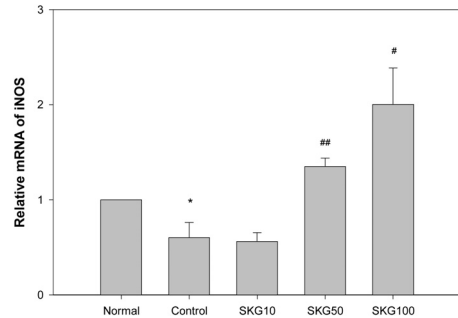


Fig. 5. Effects of SKG on the Expression of iNOS in RANKL stimulated Osteoclast. Normal : Vehicle  
Control : RANKL(50 ng/ml)  
SKG10 : RANKL(50 ng/ml) + SKG(10  $\mu\text{g/ml}$ )  
SKG50 : RANKL(50 ng/ml) + SKG(50  $\mu\text{g/ml}$ )  
SKG100 : RANKL(50 ng/ml) + SKG(100  $\mu\text{g/ml}$ )  
Each bar represents Mean $\pm$ SD of 5 tests.  
\* : p<0.05 vs Normal # : p<0.05 vs Control  
## : p<0.01 vs Control

6) JNK1 발현에 미치는 영향

실험 결과, RANKL 처리 대조군은 정상군에 비해 신호전달 과정의 일부인 JNK1의 발현이 유의성 있게 증가되었다. SKG 100  $\mu\text{g/ml}$  농도를 가진 실험군은 JNK1의 발현을 유의성 있게 억제하였다(Fig. 6).

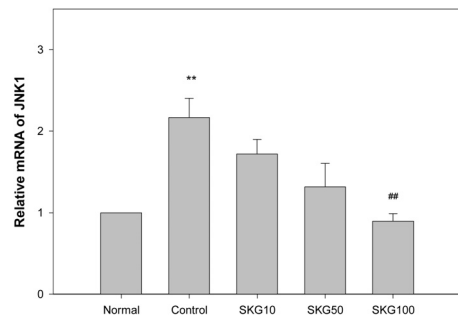


Fig. 6. Effects of SKG on the Expression of JNK1 in RANKL stimulated Osteoclast. Normal : Vehicle  
Control : RANKL(50 ng/ml)  
SKG10 : RANKL(50 ng/ml) + SKG(10  $\mu\text{g/ml}$ )  
SKG50 : RANKL(50 ng/ml) + SKG(50  $\mu\text{g/ml}$ )  
SKG100 : RANKL(50 ng/ml) + SKG(100  $\mu\text{g/ml}$ )  
Each bar represents Mean $\pm$ SD of 5 tests.  
\*\* : p<0.01 vs Normal ## : p<0.01 vs Control



7) MITF 발현에 미치는 영향

실험결과, RANKL 처리 대조군은 정상군에 비해 MITF 발현이 유의성 있게 증가되었고, SKG 100  $\mu\text{g/ml}$  농도를 가진 실험군은 MITF 발현을 유의성 있게 억제하였다(Fig. 7).

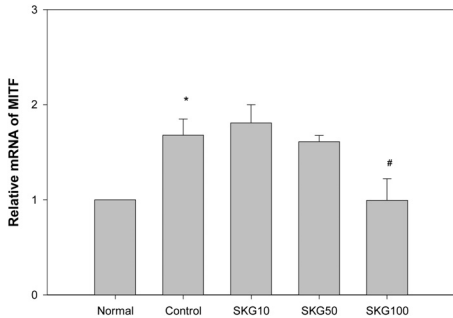


Fig. 7. Effects of SKG on the Expression of MITF in RANKL stimulated Osteoclast.  
 Normal : Vehicle  
 Control : RANKL(50 ng/ml)  
 SKG10 : RANKL(50 ng/ml) + SKG(10  $\mu\text{g/ml}$ )  
 SKG50 : RANKL(50 ng/ml) + SKG(50  $\mu\text{g/ml}$ )  
 SKG100 : RANKL(50 ng/ml) + SKG(100  $\mu\text{g/ml}$ )  
 Each bar represents Mean±SD of 5 tests.  
 \*\*:  $p < 0.05$  vs Normal # :  $p < 0.05$  vs Control

8) MMP-9 발현에 미치는 영향

실험결과, RANKL 처리 대조군은 정상군에 비해 MMP-9 발현이 유의성 있게 증가되었고, SKG 100  $\mu\text{g/ml}$  농도를 가진 실험군은 대조군에 비해 MMP-9 발현을 유의성 있게 억제하였다(Fig. 8).

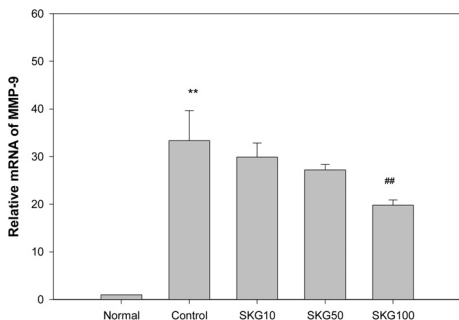


Fig. 8. Effects of SKG on the Expression

of MMP-9 in RANKL stimulated Osteoclast.  
 Normal : Vehicle

Control : RANKL(50 ng/ml)  
 SKG10 : RANKL(50 ng/ml) + SKG(10  $\mu\text{g/ml}$ )  
 SKG50 : RANKL(50 ng/ml) + SKG(50  $\mu\text{g/ml}$ )  
 SKG100 : RANKL(50 ng/ml) + SKG(100  $\mu\text{g/ml}$ )  
 Each bar represents Mean±SD of 5 tests.  
 \*\*:  $p < 0.01$  vs Normal ## :  $p < 0.01$  vs Control

9) NFATc1 발현에 미치는 영향

실험결과, RANKL 처리 대조군은 정상군에 비해 NFATc1의 발현이 유의성 있게 증가되었고, SKG 50  $\mu\text{g/ml}$ , 100  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도를 가진 실험군은 대조군에 비해 NFATc1의 발현을 유의성 있게 억제하였다(Fig. 9).

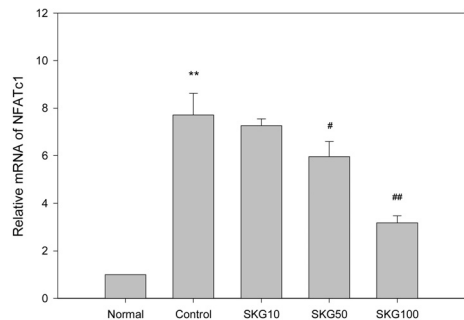


Fig. 9. Effects of SKG on the Expression of Cathepsin K in RANKL stimulated Osteoclast.  
 Normal : Vehicle  
 Control : RANKL(50 ng/ml)  
 SKG10 : RANKL(50 ng/ml) + SKG(10  $\mu\text{g/ml}$ )  
 SKG50 : RANKL(50 ng/ml) + SKG(50  $\mu\text{g/ml}$ )  
 SKG100 : RANKL(50 ng/ml) + SKG(100  $\mu\text{g/ml}$ )  
 Each bar represents Mean±SD of 5 tests.  
 \*\*:  $p < 0.01$  vs Normal # :  $p < 0.05$  vs Control  
 ## :  $p < 0.01$  vs Control

10) TRAP 발현에 미치는 영향

실험결과, RANKL 처리 대조군은 정상군에 비해 TRAP의 발현이 유의성 있게 증가하였고, SKG 100  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도를 가진 실험군은 TRAP 유전자 발현을 유의성 있게 억제하였다(Fig. 10).

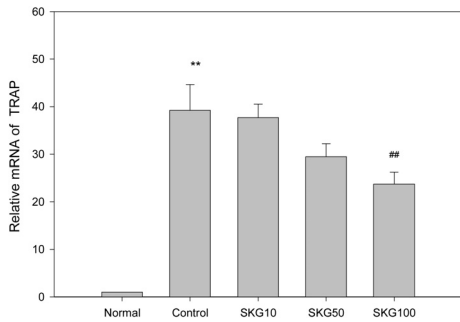


Fig. 10. Effects of SKG on the Expression of TRAP in Osteoclast.

Normal : Vehicle

Control : RANKL(50 ng/ml)

SKG10 : RANKL(50 ng/ml) + SKG(10  $\mu$ g/ml)

SKG50 : RANKL(50 ng/ml) + SKG(50  $\mu$ g/ml)

SKG100 : RANKL(50 ng/ml) + SKG(100  $\mu$ g/ml)

Each bar represents Mean $\pm$ SD of 5 tests.

\*\* : p<0.01 vs Normal ## : p<0.01 vs Control

## 2. 조골세포 기능에 미치는 영향

### 1) 조골세포의 분열능에 미치는 영향

생후 1일된 rat의 두개골로부터 분리한 골세포를 8일 간 배양한 결과, 정상 세포는  $5.4 \times 10^5$  cells/well 이었으며, 1  $\mu$ g/ml의 SKG를 처리한 경우에는  $6.2 \times 10^5$  cells/well 로서 정상 대조군에 비해 세포수가 증가하였으나 유의성이 없었고, 10  $\mu$ g/ml의 SKG를 처리한 경우에는  $8.4 \times 10^5$  cells/well 로서 정상 대조군에 비해 유의성 있게 증가하였다(Fig. 11).

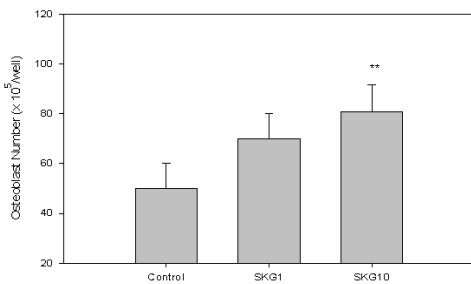


Fig. 11. Effect of SKG on cell proliferation in rat calvarial cell.

Control : Normal

SKG1 : 1  $\mu$ g/ml SKG

SKG10 : 10  $\mu$ g/ml SKG

DMSO(0.01%) was administered to NC (Normal Control) group.

Each bar represents Mean $\pm$ SD of 6 cultured well.

\*\* : p<0.01 vs Control

### 2) Alkaline phosphatase 활성화에 미치는 영향

실험 결과, 정상 세포에서의 ALP 활성은 12.2 unit/ml 이었으며, 1  $\mu$ g/ml의 SKG를 처리한 경우에는 16.6 unit/ml 로서 정상 대조군에 비해 유의적인 증가를 나타내었다. 10  $\mu$ g/ml의 SKG를 처리한 경우에도 17.1 unit/ml로서 정상 대조군에 비해 유의성 있게 증가하였다(Fig. 12).

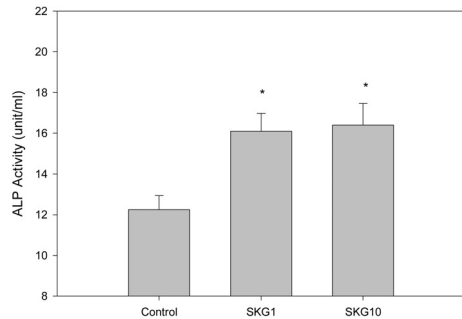


Fig. 12. Effect of SKG on Alkline phosphatase activity in rat calvarial cell.

Control : Normal

SKG1 : 1  $\mu$ g/ml SKG

SKG10 : 10  $\mu$ g/ml SKG

DMSO(0.01%) was administered to NC (Normal Control) group.

Each bar represents Mean $\pm$ SD of 6 cultured well.

\* : p<0.05 vs Control

### 3) Bone matrix protein 합성에 미치는 영향

실험 결과, 정상 세포가 생성하는 골세포 기질 단백질량은 2.9 g/dl 이었으며, 1  $\mu$ g/ml의 SKG를 처리한 경우에는 3.4 g/dl로 정상 대조군에 비해 골세포 기질 단백질량이 증가하였으나 유의성이

없었고, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 SKG를 처리한 경우에는 3.7 g/dl로서 정상 대조군에 비해 골세포 기질 단백질량이 유의성 있게 증가하였다(Fig. 13).

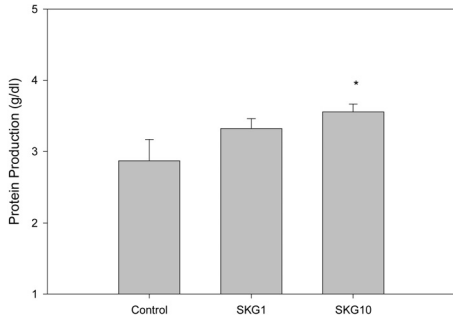


Fig. 13. Effect of SKG on Bone Matrix Protein Synthesis in rat calvarial cell.

Control : Normal  
 SKG1 : 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  SKG  
 SKG10 : 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  SKG  
 DMSO(0.01%) was administered to NC (Normal Control) group.  
 Each bar represents Mean $\pm$ SD of 6 cultured well.  
 \* : p<0.05 vs Control

4) Bone Collagen 합성에 미치는 영향  
 실험 결과, 정상 세포에서의 골 collagen 생합성량은 141  $\mu\text{g}/\text{well}$  이었으며, 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 SKG를 처리한 경우에는 140  $\mu\text{g}/\text{well}$ 로서 정상 대조군에 비해 골 collagen 생합성량의 변화가 없었다. 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 SKG를 처리한 경우에는 169  $\mu\text{g}/\text{well}$ 로서 정상 대조군에 비해 골 collagen 생합성량이 유의성 있게 증가하였다(Fig. 14).

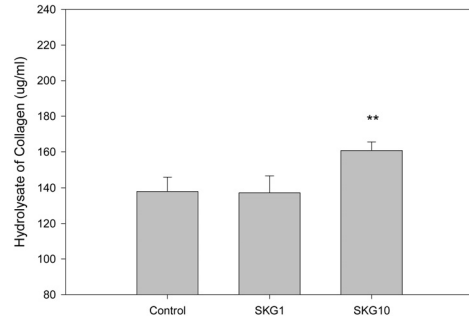


Fig. 14. Effect of SKG on collagen synthesis in rat calvarial cell.

Control : Normal  
 SKG1 : 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  SKG  
 SKG10 : 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  SKG  
 DMSO(0.01%) was administered to NC (Normal Control) group.  
 Each bar represents Mean $\pm$ SD of 6 cultured well.  
 \*\* : p<0.01 vs Control

#### 5) Nodule 생성에 미치는 영향

실험 결과 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 SKG를 처리한 경우에는 정상 대조군에 비해 nodule 생성량이 증가하였으나 유의성은 없었다. 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 SKG를 처리한 경우에는 정상 대조군에 비해 nodule 생성량이 유의성 있게 증가하였다(Fig. 15).

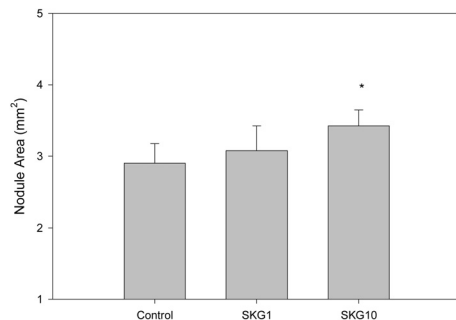


Fig. 15. Effect of SKG on Nodule Formation in rat calvarial cell.

Control : Normal  
 SKG1 : 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  SKG  
 SKG10 : 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  SKG  
 DMSO(0.01%) was administered to NC (Normal Control) group.  
 Each bar represents Mean $\pm$ SD of 6 cultured well.  
 \* : p<0.05 vs Control

## IV. 고찰

골다공증은 골강도의 약화로 인해 골절의 위험이 증가된 골격질환으로 정의하고 있다<sup>19)</sup>. 즉 대표적인 대사질환의 하나로 골량이 감소하는 것은 물론 골조직 미세구조의 파괴로 인하여 쉽게 골절이 생기는 전신질환이라 할 수 있겠다<sup>20)</sup>. 초기에는 외모에서나 방사선 검사에서나 어떤 변화가 나타나지 않으며, 환자는 척추부의 둔통과 잦은 피로감 등의 일반적인 증상만을 호소한다. 그 후 골다공증이 조기 진단이나 치료 없이 진행되면 점차 허리나 등이 구부러지며, 비로소 방사선 검사상 척추골의 변형이나 압박골절이 나타나게 된다. 흉추 요추 이외의 골에도 다공화가 진행되면 가볍게 넘어지기만 해도 쉽게 요골 원위부 골절이나 대퇴골 경부 및 전자부 골절을 일으키게 된다<sup>21,22)</sup>.

치료는 먼저 일차적인 요인이나 질환을 찾아 치료해야 한다. 질환이 분명하지 않을 경우에는 환자로 하여금 규칙적으로 운동을 하게 하여, 골을 강화시키는 것이 무엇보다 중요하다. 골다공증의 치료제는 크게 골흡수 억제제와 골형성 촉진제로 나뉘어지며 골흡수 억제제로는 estrogen, calcitonin, bisphosphonate, ipriflavone, 비타민 D 등이 있고, 골형성 촉진제로는 남성호르몬과 동화스테로이드, 불소, 부갑상선호르몬 등을 들 수 있다. 충분한 칼슘과 활성형 비타민 D의 공급이 필요하다<sup>21)</sup>. 특히 에스트로젠 대체요법은 골소실을 확실히 억제하지만 어느 정도는 소실된 골을 가역적으로 원상으로 증가시키기도 한다<sup>23)</sup>. 또한 에스트로젠

으로 인한 흔한 부작용으로는 위장계통의 오심 구토 등의 증상과, 증추신경계계통의 두통 현기증, 질분비물의 증가, 자궁근종의 성장, 유방압통 및 유즙분비, 기미 탈모 발진, 눈의 자극 등이 있다<sup>19)</sup>. 이러한 등의 이유로 에스트로젠 치료를 언제까지 투여해야 하는지에 대해서 논란이 많다<sup>23)</sup>.

한의학에서는 《東醫寶鑑 骨門》<sup>24)</sup>에 보면 신장이 뼈를 주관하며 소음맥으로 골수를 축여준다고 하였다. 또한 “骨爲髓府”라 하여 “골수가 뼈속에 차있으며 골수가 비면 뼈가 약해진다고 하였다. 《黃帝內經》<sup>24)</sup>에서는 신장에서 골수를 생성하는데 골수가 충분하지 못하면 찬기운이 뼈에까지 스며들게 되며 이를 ‘骨痺’라고 하였고, 골에서 열이 나면 골수와 이빨이 마르며 팔다리에 힘이 없고 들지 못하게 된다고 하였다. 또한 腎氣에 열이 있으면 뼈가 마르고 골수가 줄어들어 ‘骨痿’가 된다고 하였고, 오랫동안 서있으면 뼈가 상한다고 하였다<sup>25)</sup>. 《普濟方》에는 風邪가 腎臟을 침입하면 뼈가 상하여 ‘骨極’이 된다고 하였다<sup>26)</sup>. 이상으로 볼 때 韓醫學 문헌에서는 골다공증이란 병명은 없지만 骨痺(骨寒), 骨痿(骨熱), 骨傷 등과 유사하며<sup>4,5)</sup>, 뼈의 허약한 상태를 나타내는 ‘骨枯’ ‘骨極’의 병명과 유사하다고 볼 수 있다<sup>6)</sup>.

골다공증의 주된 원인을 《黃帝內經 素問·痿論》<sup>7)</sup>에 “腎主腎之骨髓” “腎主骨”에 근거하여 腎虛로 보고 있으며, 나타나는 증상에 근거하여 腎虛, 腎陰虛, 腎陽虛, 肝腎虧虛, 脾腎陽虛, 氣滯血瘀, 氣血陽虛 등으로 辨證分類하고 있고, 치료에 있어서는 辨證유형에 따라 補肝腎, 補腎陽, 補腎陰腎陽, 健脾益氣, 理氣活血,

氣血雙補의 처방이 활용되고 있다<sup>3)</sup>.

《素問·上古天真論》<sup>7)</sup>에서 여성은 49세 정도의 나이에 任脈, 太衝脈, 天癸가 虛해짐으로 형체가 쇠하여지고 월경이 끊어져 자녀를 낳을 수 없다하여 폐경기 여성들의 생리적 특성들을 표현하고 있다. 天癸는 性腺을 자극하는 내분비선의 기능과 밀접한 관련이 있음을 알 수 있다<sup>27)</sup>. 그 중 形壞는 외모 뿐 아니라 골격에 있어서도 쇠약해짐을 표현한 것으로 여겨지며, 이는 폐경후 여성호르몬인 estrogen의 결핍이 골의 약화, 골다공증의 원인이 되는 현대의학적 개념의 골다공증의 기전과 유사할 것으로 생각된다.

三氣飲은 明代 張介賓<sup>8)</sup>의 《景岳全書》에 처음 기록되었으며 黃度淵<sup>9)</sup>의 《方藥合編》에도 기록되어 있다. 氣血이 손상되었을 때 風寒濕의 침입으로 인해 筋骨에 歷節痺痛이 발생하거나 痢疾 후에 鶴膝風 등에 사용된다고 표현되어 있어, 기력저하와 함께 오는 관절염에 사용되는 처방으로 알려져 있다.

三氣飲은 熟地黃 杜沖 牛膝 枸杞子 當歸 白茯苓 白芍藥 肉桂 細辛 附子 甘草, 生薑<sup>8,9)</sup>의 약물로 구성되어 있으며, 다만 《景岳全書》<sup>8)</sup>에는 當歸, 枸杞子, 杜沖이 2錢씩으로 되어 있으나, 《方藥合編》<sup>9)</sup>에는 1錢으로 구성된 차이가 있다. 본 연구에서는 《方藥合編》<sup>9)</sup>에 수록된 三氣飲을 사용하였다. 약성을 살펴보면 熟地黃은 滋陰補血 益精, 杜沖 牛膝 枸杞子는 補肝腎 強筋骨, 當歸는 補血和血, 白茯苓은 利水滲濕, 白芍藥은 養血柔肝 緩中止痛, 肉桂는 補元陽 暖脾胃, 細辛은 祛風散寒 通竅止痛, 附子는 回陽補火 散寒除濕, 甘草는 和中緩急, 生薑은 解表散寒, 溫中化痰 하는 효능이 있다. 三氣飲

처방에 여러 가지 약물을 추가하여 실험해본 결과 清熱解毒, 消癰排膿 하는 효능을 가진 魚腥草<sup>10)</sup>를 추가한 경우에 면역력을 높이고 亢炎작용을 강화하여 더 유의성 있는 실험결과가 도출되었다. 三氣飲은 補肝腎, 補腎陽, 強筋骨 등의 작용으로 퇴행성 관절염, 류마티스 관절염 뿐만 아니라 최근에는 다양한 질환에 대한 연구 보고가 발표되고 있다. 三氣飲, 三氣飲加味方 및 三氣飲加味方 藥針 등에 관한 실험적 연구로 전<sup>11-14),28)</sup> 등은 진통 및 소염작용을 통해 관절염치료에 효과가 있다고 하였으며, 강<sup>15-17)</sup> 등은 조골세포 활성화 및 골다공증에 유효하다고 하였다. 김<sup>29)</sup>은 항고지혈에 효과가 있다고 하였고, 임<sup>30)</sup>은 뇌손상 및 혈전에 유효한 효과가, 이<sup>31)</sup>는 자외선유발 피부각질세포 손상과, 천<sup>32)</sup>은 melanin 생성 억제에 효과가 있는 것으로 보고되어 있어 중풍 및 피부질환, 각종 염증성 질환 등에 관한 연구가 있었다.

골다공증은 골의 형성에 관여하는 조골세포와 파골세포 사이의 균형이 파괴되어 나타나는 것으로 볼 때 三氣飲加味方이 補肝腎, 補腎陽, 強筋骨 등의 효능으로 골다공증과 관련하여 유효할 것으로 추측되어, 조골세포 활성화 뿐 아니라 파골세포 분화에 미치는 효과를 평가하기 위하여 본 실험을 시행하였다.

三氣飲加味方 추출물(SKG)이 파골세포에 미치는 영향을 평가하기 위해 RAW 264.7 cell 에 RANKL을 처리하여 TRAP(+) 세포를 측정하고, 세포 기능에 관련된 유전자 발현을 측정하였다. 파골세포 분화는 골 표면에 존재하는 단핵/대식세포 계통의 전구세포로부터 TNF-a(tumor necrosis factor-a), ODF(osteoclast differentiation

factor) NF- $\kappa$ B, RANKL(receptor activator of nuclear factor kappa B ligand) 등에 의해 촉진된다<sup>33,34</sup>. 특히, 실험에 사용된 RANKL은 조골세포 또는 골수기질세포 및 섬유아세포로부터 분비되는 물질로 파골세포 및 파골전구세포 표면에 존재하는 RANK(receptor activator of nuclear factor kappa B)와 결합하여 파골전구세포가 파골세포로 분화되는 것을 촉진하며, 거대세포로의 융합 및 파골세포의 활성화 등을 유발한다. 분화된 파골세포는 TRAF(tumor necrosis factor associated factor) 활성화, transcription factor의 활성화(NF- $\kappa$ B, AP-1, NFATc1)와 MAPK의 pathway 활성화(ERK, JNK, p38), Src, Akt 활성화 등을 통하여 TRAP(tartarate resistant acid phosphatase), cathepsin K, calcitonin receptor 등을 발현시킨다<sup>35,36</sup>. 이들이 파골세포의 수소이온 농도를 조절하여 골흡수를 촉진하는 것으로 알려져 있다. 이와는 별도로, cytokine들에 의해 자극된 파골세포의 PKC(Protein kinase C)와 PKA(Protein kinase A)의 활성화와 PLC에 의한 calcium 조절기전 및 PLA<sub>2</sub>에 의한 prostaglandin 생성 과정도 세포분화와 기능을 조절한다고 알려져 있다<sup>37,38</sup>.

본 연구에서는 우선적으로 골 흡수를 억제하여 골다공증에 효과적인 약재를 찾아내기 위하여, 三氣飲加味方 추출물(SKG)이 TRAP(+) 다핵세포 형성을 억제하는지 측정하였다. 세포는 osteoclastogenesis를 측정하는데 이용되는 RAW 264.7 cell에 RANKL을 가하여 분화시켜 사용하였다. 실험 결과, 대조군의 경우 다수의 TRAP(+) 다핵세포가 정상군에 비해 유의성 있게 형성되는 것이 관찰되었다.

SKG 50 $\mu$ g/ml인 실험군은 대조군에 비해 유의성 있게 감소(약 56%)하였다. 또한, 100 $\mu$ g/ml 인 실험군도 대조군에 비해 유의성 있게 감소(약 78%)하였다(Fig. 1).

파골전구세포를 RANKL로 자극하여 분화시킨 파골세포는 Cathepsin K, OPG, TRAP(tartarate-resistant acid phosphatase)과 같은 파골세포 단백질을 발현하여 골흡수를 유발한다. 파골세포로부터 TRAP 활성을 측정된 결과, 대조군은 정상군에 비해 TRAP 활성이 유의성 있게 증가하였으며, SKG 50 $\mu$ g/ml와 100 $\mu$ g/ml의 농도를 가진 실험군은 모두 대조군에 비해 TRAP 활성이 유의성 있게 감소하였다(Fig. 2).

이상의 결과를 바탕으로 파골세포 기능에 관여하는 인자들의 유전자 발현을 측정하여 SKG의 작용기전을 밝히고자 하였다.

Cathepsin K는 RANKL이나 M-CSF(macrophage colony stimulating factor) 등을 처리하는 경우 발현되는 단백질 분해효소로 MMP-9, TRAP 등과 같이 파골세포분화 및 활성화를 통하여 골의 흡수에 관여하고 있다<sup>36</sup>. 따라서, 파골세포의 활성화로 인한 재흡수과정은 세포에서 발현되는 Cathepsin K를 파골세포 활성 지표로 사용할 수 있다. 본 연구에서는 SKG가 파골세포 기능에 관여하는 유전자들에 미치는 영향을 평가하는 일환으로 Cathepsin K의 발현에 미치는 영향을 real time PCR system을 이용하여 평가하였다. 실험 결과, RANKL 처리 대조군은 정상군에 비해 Cathepsin K의 발현이 유의성 있게 증가하였고, SKG 10  $\mu$ g/ml, 50  $\mu$ g/ml, 100  $\mu$ g/ml의 농도를 가진 실험군은 모두 Cathepsin

K 유전자 발현을 유의성 있게 억제하였다(Fig. 3).

c-fos는 RANKL로 자극한 파골세포의 분화를 촉진하는 신호전달과정에 작용하는 인자로 RANKL/RANK 복합체로부터 신호를 전달받아 IFN $\beta$ 와 Fra-1 또는 Fra-2에 신호를 전달하는 역할을 하여 파골세포 분화를 조절한다. IFN $\beta$ 는 NF- $\kappa$ B와 함께 iNOS를 기능을 조절하는 역할을 한다<sup>40)</sup>. 본 연구에서는 신호전달 과정의 일부인 c-fos의 발현에 미치는 영향을 측정하였다. 실험 결과, RANKL 처리 대조군은 정상군에 비해 c-fos의 발현이 유의성 있게 증가하였고, SKG 10  $\mu$ g/ml, 50  $\mu$ g/ml, 100  $\mu$ g/ml 농도를 가진 실험군은 모두 c-fos의 발현을 유의성 있게 억제하였다 실험결과, SKG는 RANKL 처리로 증가하는 c-fos의 발현을 억제하였다(Fig. 4).

NO는 NOS(nitric oxide synthetase)에 의해 생성되는 물질로, calcium dependent 한 endothelial 또는 neuronal NOS에 의해 생성되거나, RANKL, TNF $\alpha$ , IL-6 등의 각종 염증 신호에 의해 활성화되는 inducible NOS에 의해 생성된다. 파골전구세포에서 파골세포로 분화하는 과정에서 iNO는 분화를 억제하는 것으로 보고되었다<sup>18)</sup>. 실험 결과, RANKL 처리 파골세포인 대조군은 분화되기 전의 전구세포인 정상군에 비해 iNOS 발현이 유의성 있게 억제되었으며, SKG 50  $\mu$ g/ml, 100  $\mu$ g/ml 농도를 가진 실험군은 대조군에 비해 iNOS 유전자 발현을 유의성 있게 증가시켰다(Fig. 5).

JNK-1은 MAPK의 일종으로 파골세포 분화에 조절인자이다. RANKL은 파골세포 표면에 존재하는 TNF receptor

family 단백질의 일종인 RANK(receptor activator of nuclear factor  $\kappa$  B)과 결합하여 골 흡수를 담당하는 파골세포로 분화시키며 동시에 활성화를 유발하여 골흡수에 관여한다. RANKL이 파골세포로 분화하는 신호전달과정은 RANKL/RANK 복합체가 형성되는 것으로 시작하며, 이 과정에 TRAF(tumor necrosis factor associated factor)가 활성화, transcription factor의 활성화(NF- $\kappa$ B, AP-1, NFATc1)와 MAPK의 pathway 활성화(ERK, JNK, p38), Src, Akt 등이 포함되어 있다<sup>35)</sup>. 본 연구에서는 신호전달 과정의 일부인 JNK1의 발현에 미치는 영향을 측정하였다. 실험 결과, RANKL 처리 대조군은 정상군에 비해 JNK1의 발현이 유의성 있게 증가되었다. SKG 100  $\mu$ g/ml 농도를 가진 실험군은 JNK1의 발현을 유의성 있게 억제하였다(Fig. 6).

MITF는 microphthalmia transcription factor로서 파골세포 표식유전자인 TRAP의 발현을 조절한다<sup>41)</sup>. 실험결과, RANKL 처리 대조군은 정상군에 비해 MITF 발현이 유의성 있게 증가되었고, SKG 100  $\mu$ g/ml 농도를 가진 실험군은 MITF 발현을 유의성 있게 억제하였다(Fig. 7).

파골세포에서 분비되는 MMP-9은 뼈의 기질물질인 collagen을 파괴하여 골흡수를 유발하는 단백질 파괴물질이다. RANKL로 자극받은 파골전구세포는 파골세포로 분화하여 나타나는 단백질인 OPG, TRAP(tartrate-resistant acid phosphatase) 등과 함께 MMP-9의 작용으로 여 골흡수를 유발한다<sup>33)</sup>. 실험결과, RANKL 처리 대조군은 정상군에 비해 MMP-9 발현이 유의성 있게 증가되었고, SKG 100  $\mu$ g/ml 농도를 가진 실험군

은 대조군에 비해 MMP-9 발현을 유의성 있게 억제하였다(Fig. 8).

NFATc1는 파골전골세포에서 파골세포로 분화를 촉진하는 신호전달 단백질로 RANKL이 파골세포로 분화하는 신호전달과정은 RANKL/RANK 복합체가 형성되는 것으로 시작하며, 이 과정에 TRAF(tumor necrosis factor associated factor)가 활성화, MAPK의 pathway 활성화(ERK, JNK, p38)를 거쳐 유전자 발현을 조절하는 전사인자인 transcription factor의 활성화에 NF- $\kappa$ B, AP-1, NFATc1, Src, Akt 등이 포함되어 있다<sup>38)</sup>. 본 연구에서는 SKG가 신호전달 과정의 일부인 NFATc1의 발현에 미치는 영향을 측정하였다. 실험결과, RANKL 처리 대조군은 정상군에 비해 NFATc1의 발현이 유의성 있게 증가되었고, SKG 50  $\mu$ g/ml, 100  $\mu$ g/ml의 농도를 가진 실험군은 대조군에 비해 NFATc1의 발현을 유의성 있게 억제하였다(Fig. 9).

골수로부터 유래하는 전구세포들이 파골전구세포로 분화하면 TRAP(tartrate-resistant acid phosphatase)과 같은 파골세포 표식유전자를 발현하게 된다. 이들 TRAP(+) 세포들은 세포융합과정을 거쳐 다핵 파골세포(multinucleated osteoclasts)로 분화하여 최종적으로 골흡수 기능을 하게 된다<sup>18)</sup>. 실험결과, RANKL 처리 대조군은 정상군에 비해 TRAP의 발현이 유의성 있게 증가하였고, SKG 100  $\mu$ g/ml의 농도를 가진 실험군은 TRAP 유전자 발현을 유의성 있게 억제하였다(Fig. 10).

이상의 결과와는 별도로 SKG가 조골세포 기능에 미치는 영향을 평가하기 위하여 두개골세포의 분열능을 확인하였

다. 생후 1일된 rat의 두개골로부터 분리한 골세포를 8일 간 배양한 결과, 정상 세포는  $5.4 \times 10^5$  cells/well 이었으며, 1  $\mu$ g/ml의 SKG를 처리한 경우에는  $6.2 \times 10^5$  cells/well 로서 세포 수가 증가하였으나 유의성이 없었고, 10  $\mu$ g/ml의 SKG를 처리한 경우에는  $8.4 \times 10^5$  cells/well 로서 정상에 비해 유의성 있게 증가하였다(Fig. 11).

조골세포의 활성화는 PKC, PKA, MAPK의 활성화와 CREB를 활성화시키며 이는 RANKL(receptor activator NF- $\kappa$ B ligand)의 발현을 촉진하며, c-fos promoter를 작동시킨다<sup>40)</sup>. 이들의 증가는 bone ALP 및 osteocalcin의 합성을 증가시키며<sup>40)</sup>, 골기질의 형성을 유도하는 BMP(bone morphogenetic protein)류인 BMP-2, BMP-4, BMP-7등을 발현시킨다<sup>42)</sup>. 실험결과, 정상 세포에서의 ALP 활성화는 12.2 unit/ml 이었으며, 1  $\mu$ g/ml의 SKG를 처리한 경우에는 16.6 unit/ml 로서 정상 대조군에 비해 유의적인 증가를 나타내었다. 10  $\mu$ g/ml의 SKG를 처리한 경우에도 17.1 unit/ml로서 정상 대조군에 비해 유의성 있게 증가하였다(Fig. 12).

Vitamin D<sub>3</sub>, TGF- $\beta$ 등의 자극에 의해 활성화된 OB에서 발현되는 BMP는 osteocalcin, ALP, bone sialoprotein, EGFR(epidermal growth factor receptor)등의 합성을 증가시키며, collagen(I) 합성을 증가시킨다<sup>43,44)</sup>. 이는 vitamin D<sub>3</sub>, TGF- $\beta$ 등의 작용으로 조골세포의 활성화와 골에서의 matrix mineralization의 중요 기전으로 알려져 있다. 실험 결과, 정상 세포가 생성하는 골세포 기질 단백질량은 2.9 g/dl 이었으며, 10  $\mu$ g/ml의 SKG를 처리한 경우에는 3.7 g/dl로서 정상 대조군에 비해 골세포 기질 단백질량이



유의성 있게 증가하였다(Fig. 13).

또한 정상 세포에서의 골 collagen 생합성량은 141  $\mu\text{g}/\text{well}$  이었으며, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 SKG를 처리한 경우에는 169  $\mu\text{g}/\text{well}$ 로서 정상 대조군에 비해 골 collagen 생합성량이 유의성 있게 증가하였다(Fig. 14). 그리고 조골세포의 작용으로 나타나는 칼슘침착 결절 형성에 대한 실험 결과, 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 SKG를 처리한 경우에는 정상 대조군에 비해 nodule 생성량이 증가하였으나 유의성은 없었다. 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 SKG를 처리한 경우에는 정상 대조군에 비해 nodule 생성량이 유의성 있게 증가하였다(Fig. 15).

이상의 결과, SKG는 조골세포의 기능을 활성화시켜 골 형성을 촉진하는 것으로 판단되었다.

결과를 종합하여 볼 때, 三氣飲加味方(SKG)은 파골세포(OC)의 분화와 기능을 활성화시키는 유전자의 발현을 억제하여 파골세포의 분화 및 기능을 억제하고, 동시에 조골세포(OB)의 분열능, ALP 활성, 골세포 기질 단백질, collagen 합성 및 nodule 생성을 증가시켜 골다공증 치료 및 예방효과가 있는 것으로 평가되었다. 다만, 본 연구는 rat의 조골세포를 이용한 논문으로 향후에 임상에서 사용하고자 한다면 인체 세포와의 차이점을 감안해야 할 것으로 사료된다.

## V. 결 론

본 연구에서는, 三氣飲加味方이 파골세포의 분화와 활성, 그리고 조골세포 분열능과 활성에 미치는 영향을 측정하였다. 파골세포 분화 및 기능 평가를 위해

RANKL 유도 RAW 264.7 cell의 TRAP(+) 세포 형성과 골 흡수관련 인자들의 유전자 발현을 측정하였으며, 생후 1일된 rat의 두개골을 분리하여 세포 분열능 및 ALP 활성, bone matrix protein 합성, collagen 합성, nodule 생성을 측정하여 조골세포 기능을 평가하였다.

1. SKG는 RANKL 유도 파골세포의 TRAP(+) 세포의 형성을 유의성( $p < 0.01$ )있게 억제하였다.
2. SKG는 RANKL 유도 파골세포에서 TRAP 활성을 유의성( $p < 0.01$ )있게 억제하였다.
3. SKG는 RANKL 유도 파골세포에서 Cathepsin K, MMP-9, TRAP 유전자 발현을 유의성( $p < 0.01$ )있게 억제하였다.
4. SKG는 RANKL 유도 파골세포에서 c-fos, NAFTc1, JNK1의 발현을 유의성( $p < 0.01$ )있게 억제하였다.
5. SKG는 RANKL 유도 파골세포에서 iNOS 유전자 발현을 유의성( $p < 0.01$ )있게 증가시켰다.
6. SKG는 조골세포의 분열능을 유의성( $p < 0.01$ )있게 증가시켰다.
7. SKG는 조골세포의 ALP 활성을 유의성( $p < 0.01$ )있게 증가시켰다.
8. SKG는 조골세포의 bone matrix protein 및 collagen 합성을 증유의성( $p < 0.01$ )있게 가시켰다.
9. SKG는 조골세포의 nodule 생성을 유의성( $p < 0.01$ )있게 증가시켰다.

이상의 연구결과, 三氣飲加味方 추출물(SKG)은 RANKL 유도 RAW 264.7 cell에서 파골세포 분화 및 기능 활성화

에 관련된 유전자 발현을 억제하였다. 또한 조골세포의 분열능과 ALP, bone matrix protein, collagen 합성 및 nodule 생성을 증가시켰다.

- 투 고 일 : 2012년 04월 25일
- 심 사 일 : 2012년 05월 11일
- 게재확정일 : 2012년 05월 15일

## 참고문헌

1. Pietschmann P et al.. Osteoporosis. an age-related and gender-specific disease. *Gerontology* 2008;55(1):3-12.
2. Pacifici R. Estrogen deficiency, T cells and bone loss. *Cell Immunol.* 2008;252(12):68-80.
3. 주석중, 박지하, 서부일. 한국산 산수유가 난소적출로 유발된 흰쥐의 골다공증 치료효과에 미치는 영향. *대한본초학회지.* 2007;22(2):83-95.
4. 한방재활의학회. 한방재활의학과학. 서울:군자출판사. 2003;4, 105-6.
5. 김갑성 등. 실용동서의학 임상총서. 서울:정담. 2001:553-62.
6. 강성실 등. 골다공증의 침구치료에 관한 문헌적 고찰. *대한침구학회지.* 1995;15(2):171-89.
7. 王冰 註. 皇帝內經 素問. 서울:대성출판사. 1986;22, 339-40, 342.
8. 張介賓. 景岳全書. 서울:도서출판 정담. 2004:1089.
9. 黃度淵. 方藥合編. 서울:南山堂. 1991:136.
10. 全國韓醫科大學 本草學教授 共編著. 本草學. 서울:永林社. 1991:135, 302, 331, 336, 427, 540, 556, 578, 580, 581, 596.
11. 전경택. 빈소산과 삼기음이 adjuvant 관절염에 미치는 실험적 연구. 대전대학교 대학원. 1994.
12. 신강우. 삼기음과 삼기음 거 부자가 adjuvant 관절염에 미치는 연구. 대전대학교 대학원. 1994.
13. 김순중. 삼기음과 삼기음 거 부자가 Adjuvant 관절염 유발시 활성산소에 미치는 영향. 대전대학교 대학원. 1996.
14. 이경무. 삼기음이 흰 쥐의 Monosodium lodoacetate 유발 골관절염에 미치는 영향. 세명대학교 대학원. 2008.
15. 강민환. 삼기음 가미방 약침이 난소적출 흰쥐의 골다공증에 미치는 영향. 대전대학교 대학원. 2008.
16. 이학철. 가미고본건양탕과 가감삼기음이 난소적출로 유발된 흰 쥐의 골다공증 치료 및 예방에 미치는 영향. 경희대학교 대학원. 2000.
17. 이대영. 삼기음이 조골세포 기능 및 유전자 발현에 미치는 영향. 경원대학교 대학원. 2004.
18. Meiyanto E et al. Osteoclast differentiation factor modulates cell cycle machinery and causes a delay in s phase progression in RAW264 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;282(1):278-83.
19. 대한폐경학회. 폐경기 여성의 관리. 서울:군자출판사. 2007;41, 127-8.
20. 임승길. 골다공증 연구의 최근 동향. *생화학분자 생물학 뉴스.* 2002;22(3):270-6.
21. 대한정형외과학회. 정형외과학 제 5판. 서울:최신의학사. 2002:152-6.

22. 주수경. 골다공증 예방을 위한 운동 비디오프로그램 개발 연구. 여성건강. 2003;4(1):71.
23. 대한산부인과학회. 부인과학. 서울:도서출판 칼빈서적. 1997:735.
24. 허준. 원본 동의보감. 서울:대성문화사. 1992:436-8.
25. 허준. 동의보감. 서울:여강출판사. 1994:986-8.
26. 張洪, 魏之玉, 王景存. 補腎疏肝健脾方治療老年原發性骨質疏鬆症38例. 山東中醫藥大學學報. 1997;21:375-6.
27. 송병기. 한방부인과학. 서울:행림출판. 1995:34.
28. 김영구. 삼기음이 진통 및 소염작용에 미치는 영향. 경희대학교 대학원. 1982.
29. 김훈. 가미삼기음(SGMX)의 항고지혈 효과에 대한 실험적 연구. 대전대학교 대학원. 2009.
30. 임승민. 삼기음과 통비음이 뇌손상 및 혈전에 미치는 영향. 대전대학교 대학원. 2002.
31. 이해경. 삼기음이 자외선유발 피부각질세포 손상에 미치는 효과. 원광대학교 의학전문대학원. 2011.
32. 천현자. 삼기음 가미방 추출물이 B16 Mouse Melanoma 세포의 멜라닌 생성에 미치는 영향. 약학회지. 2000;44(5):455-462.
33. Cho ES et al. Rolipram, a phosphodiesterase 4 inhibitor, stimulates osteoclast formation by inducing TRANCE expression in mouse calvarial cells. Arch Pharm Res. 2004;27(12):1258-62.
34. Khosla S. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. Endocrinology. 2001;142(12):5050-5.
35. Murakami A, Song M, Ohigashi H. Phenethyl isothiocyanate suppresses receptor activator of NF-kappaB ligand(RANKL)-induced osteoclastogenesis by blocking activation of ERK1/2 and p38 MAPK in RAW264.7 macrophages. Biofactors. 2007;30(1):1-11.
36. Pang M et al. AP-1 stimulates the cathepsin K promoter in RAW 264.7 cells. Gene. 2007;403(1-2):151-8.
37. Wei X et al. Fibroblasts express RANKL and support osteoclastogenesis in a COX-2-dependent manner after stimulation with titanium particles. J Bone Miner Res. 2005;20(7):1136-48.
38. Fukushima H et al. Parathyroid-hormone-related protein induces expression of receptor activator of NF-kappaB ligand in human periodontal ligament cells via a cAMP/protein kinase A-independent pathway. J Dent Res. 2005;84(4):329-34.
39. Lee ZH, Kim HH. Signal transduction by receptor activator of nuclear factor kappa B in osteoclasts. Biochem Biophys Res Commun. 2003;305(2):211-4.
40. Boyce BF et al. Roles for NF-kappaB and c-Fos in osteoclasts. J Bone Miner Metab. 2005;23:11-5.
41. Luchin A et al. The microphthalmia transcription factor regulates expression of the tartrate-resistant acid phosphatase gene during terminal differentiation of osteoclasts. J. Bone Miner. Res.

- 2000;15(3):451-60.
42. Gallea S et al. Activation of mitogen-activated protein kinase cascades is involved in regulation of bone morphogenetic protein-2-induced osteoblast differentiation in pluripotent C2C12 cells. *Bone*. 2001;28(5):491-8.
43. St-Arnaud R. The direct role of vitamin D on bone homeostasis *Arch Biochem Biophys*. 2008;473(2):225-30.
44. Li IW et al. Effects of osteogenic protein-1(OP-1, BMP-7) on bone matrix protein expression by fetal rat calvarial cells are differentiation stage specific. *J Cell Physiol*. 1996;169(1):115-25.