



Original Article / 원저

조골세포의 분화에 산겨릅나무 추출물이 미치는 영향

오태우¹, 심기석¹, 김광연¹, 조원경¹, 박광일^{1*}, 마진열^{1*}

¹한국한의학연구원 한의기술응용센터
²동국대학교 한의과대학

Effect of *Acer tegmentosum* Maxim. extract on differentiation of osteoblastic Primary calvarial osteoblasts cells

Tae Woo Oh¹, Ki-Shuk Shim¹, Kwang-Youn Kim¹, Won-Kyung Cho¹,
Kwang Il Park^{1*}, Jin Yeul Ma^{1*}

¹Korean Medicine (KM)-Application Center, Korea Institute of Oriental Medicine (KIOM), ²College of Oriental Medicine, Dongguk University

ABSTRACT

Objectives : The present study, to confirm the osteoblast differentiation effects of *Acer tegmentosum* Maxim. (AT) extract.

Methods : In this experiment, cell viability, Alizarin red S assay, and Alkaline phosphatase (ALP) activity with AT extract (50, 100 $\mu\text{g/ml}$). Also, we studied the expression of differentiation regulator with AT extract in primary calvarial osteoblasts cells (pOB).

Results : As a result of AT treatment, we determined that AT extract stimulates ALP activity and alizarin red activities in the pOB cells for mineralization for 18 days. Moreover, these factors increasing osteogenic markers such as Runt-related transcription factor2 (Runx2), osteocalcin (OC), osteopontin, osterix, smad1, smad5, activating transcription factor4 (ATF4) and collagen type I alpha 1.

Conclusions : These results indicate that AT extract have effect on bone through the promotion of osteoblastic differentiation, suggesting that it could be used for the treatment of bone diseases.

Key words : Osteoblast, Differentiation, *Acer tegmentosum* Maxim, primary calvarial osteoblasts cells, osteogenic marker.

I. 서론

정상적인 뼈의 재형성과정은 뼈 형성과 뼈 흡수의 항상성으로 유지되며, 이는 골 성분을 파괴하는(골 파괴) 파골세포와 골 성분을 만드는(골신생) 조골세포 사이의 균형에 달려 있다. 이러한 균형이 깨지게 되면 파골세포가 과다 증식해 골다공증을 유발하거나 류마티스성 관절염과 같은 골 흡수 질병을 유발하게 된다. 파골세포는 대식세포 및 조혈모세포의 전구세포로부터 유래되며, 여러 신호전달 경로에 의해 조절된다. 특히, 조골세포의 증식과 분화는 뼈의 석회화와 밀접한 관계가 있으며 조골세포에서 중요한 전사인자인 Runt-related transcription factor2 (RUNX2)에 변이가 생기거나 발현량이 감소하면 뼈의 석회화가 일어나지 않는다. RANKL (receptor activator of NF- κ B ligand)은 조골세포의 분화과정 동안에 발현되어 파골세포 분화를 조절하는 것으로 알려져 있고 OPG (Osteoprotegerin) 역시 조골세포에서 발현되어 RANKL의 역할을 억제함으로써 파골세포의 분화를 억제하는 인자로 알려져 있다. 또한, RANKL은 파골세포 분화의 핵심 유발인자로, 세포 표면의 수용체 RANK와 결합하여 파골세포 분화에 관여하는 다양한 세포(예를 들어, T cell)의 발현을 조절하여 파골세포 분화를 촉진시키는 것으로 알려져 있다¹⁾.

조골세포는 골아세포라고도 하며, 섬유모세포에서 분화되어 지방세포 또는 연골세포(chondroblasts)로 분화가 가능한 석회화 및 골 기질 합성에 관여하는 세포이다²⁾. 세포막에는 alkaline phosphatase (ALP)라고 불리는 당단백 효소가 존재하고 있으며, 이는 기질 특이성과 염기성 pH에서 최적의 활성을 나타낸다. 이는 골세포 분화의 표지인자로 알려져 있으며 석회화 조직의 기질 세포에서 높은 농도로 발현되며 석회화가 진행되는 동안 세포분열이나 분화의 조절자로서 역할을 한다고 알려져 있다^{3,4)}. 골조직이 신체의 다른 조직과 구별되는 생화학 특징은 무기질 침착이 많으며 조직내 콜라겐 함량이 높다는 것이다. 콜라겐이 신체의 다른 부위에도 널리 분포하지만 골형성 또

는 골 흡수표지자로 이용이 가능한 이유는 체내에 존재하는 콜라겐의 절반이 뼈에 존재하며 다른 조직의 콜라겐보다 대사율이 높기 때문이다⁵⁾. 또한, 골조직 내에 존재하는 콜라겐은 여러 cytokine의 분비를 통해 파골세포의 활성을 조절하는 기능을 담당하고 있다고 알려져 있다⁶⁾.

골다공증과 관련된 질환은 한의학에서 腎風, 骨痿, 骨痺, 骨蠶, 骨枯, 陰痺, 骨寒熱, 骨極, 骨痛 등의 범주에서 표현을 볼 수 있으며⁷⁾, 그 외에도 虛勞나 虛痺, 骨寒, 骨熱, 骨虧, 骨枯, 骨痛 등의 질환을 골다공증의 범주에 포함시킬 수 있을 것이다⁸⁾.

최근 골다공증 질환 증가와 더불어 치료약물 발굴에 대한 연구가 활발히 이루어지면서 골다공증 질환에서 한방임상처방 및 한약을 사용하여 다양한 면역조절작용에 대한 보고도 많이 이루어지고 있다. 산천목(植防風)은 무환자나무과(無患子나무科: *A. tegmentosum*) 단풍나무속(*Aceraceae*)에 속하는 산겨릅나무 *Acer tegmentosum*. Maxim 의 줄기로 산천목 및 벌나무라고도 불리며, 중국에서는 줄기를 청해적이라 하여 소종과 외상출혈에 치료목적으로, 한국에서는 잎과 목부를 간염, 간경화, 간암 등의 간질환 치료제 및 백혈병, 당뇨병, 신장염이나 부종의 치료에 사용하며 음주시 산겨릅나무의 목부 추출물을 복용하면 주독을 예방 하며 잎은 넓고 어린 줄기는 연한 녹색이며 줄기가 매우 연하여 잘 부러지며 껍질이 두껍고 재질은 희고 가벼우며, 독성이 어떠한 체질에도 부작용이 거의 없는 약재이며, 맛이 담백하여 청혈제와 이수제로 사용하고 있다^{9,10)}. 최근 산겨릅나무 줄기 추출물의 항당뇨, 알콜대사 효소 및 간보호 활성 효과¹¹⁾ 및 항산화, 항염증 효과¹²⁾, 지방간 개선효과¹³⁾가 보고되어 있으며, quercetin, catechin 등과 같은 페놀계 화합물을 포함하고 있다¹⁴⁾. 하지만 대부분의 연구는 간보호효과 및 항산화, 항염증 효과에 대한 것으로 그치며, 특히 산겨릅나무 추출물의 골다공증에 대한 연구는 전무한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 골다공증에 대한 효능을 알아보기 위해 산겨릅나무 물추출물을 제조하고 Primary

* Corresponding author : Kwang Il Park, Korean Medicine (KM)-Application Center, Korea Institute of Oriental Medicine (KIOM), 70 Cheomdan-ro, Dong-gu, Daegu, 41062, Republic of Korea.

Tel : +82-53-940-3877, E-mail: kipark@kiom.re.kr

* Corresponding author : Jin Yeul Ma, Korean Medicine (KM)-Application Center, Korea Institute of Oriental Medicine (KIOM), 70 Cheomdan-ro, Dong-gu, Daegu, 41062, Republic of Korea.

Tel : +82-53-940-3811, E-mail: ijma@kiom.re.kr

• Received : November 8, 2017 / Revised : November 16, 2017 / Accepted : November 16, 2017



calvarial osteoblasts cell을 이용하여 현대 약리적 방법으로 골다공증 질환에 대하여 그 효능을 확인하였으며 유의한 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

1) 약제

본 실험에서 사용된 산겨릅나무는 한국 강원도에서 생산된 산겨릅나무(*Acer tegmentosum* Maxim, AT)로서, 규격품으로 품질검사필한 절단생약을 제약회사로부터 구입하여 관능검사 후 제조한 물추출물을 사용하였다. 약제 표본은 한국한의약연구원에 보관하였다(표본번호 KIOM W134-1).

2. 방법

1) 추출물 제조

산겨릅나무 건조약재에 10배량의 정제수를 가하여 2시간 동안 열탕하고 전액을 mesh로 여과하였다. 추출액을 동결건조기(Bondiro, Ilshin Lab, Korea)로 동결건조하여 산겨릅나무 물추출물 건조분말을 얻었다. 추출물의 수득률은 건조약재 대비 4.62%였다.

2) 조골세포 배양

Primary calvarial osteoblasts (pOB) 세포를 얻기 위하여 생후 3일된 ICR mouse ((주)오리엔트바이오(경기도, 한국))를 전두골 및 두정골을 분리 하였다. 분리된 마우스 두개골의 피부와 결합조직을 제거하고 골막을 제거한 후 봉합부에서 떨어진 부위의 골편에서 얻었다. 채취한 골편을 잘게 자른 후 Aronow 등⁴⁾이 제시한 방법에 따라 다음과 같이 세포분리 및 배양을 시행하였다. 0.1% collagenase (Wako chemical, Osaka, Japan)와 0.1% dispase (GIBCO, Grand Island, NY, USA)를 free fetal bovine serum- α -Minimal Essential Medium (free FBS- α -MEM, GIBCO, Grand Island, NY, USA)용액 100ml에 첨가하여 만든 효소 용액으로 10분간 37°C의 shaking water bath에서 처리하여 상층액은 버리고 다시 효소 용액으로 60분간 재처리하여 얻어진 상층액을 20 μ m Nylon net filter (Millipore20, Milipore Corp., Bedford, MA, USA)로 여과한 후 1800 rpm으로 5분간 원심분리하여 얻어진 세포를 모두 모아서 사용하

였다. 이 세포의 증식을 위해 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco BRL, Grand Island, NY, USA), 100 U/ml penicillin 및 100 μ g/ml streptomycin을 섞은 Dulbecco's modified Eagles medium (DMEM, Gibco BRL)에서 배양하였다. 이차 계대 배양한 세포를 이용하여 실험을 진행하였으며, 조골세포 분화를 유도하기 위해 세포가 배양접시에 가득 차면 조골세포 분화배지로 교체하였다. 분화배지의 조성은 기존에 잘 알려진 10% FBS, 10 mM β -glycerophosphate, 50 μ g/ml ascorbic acid를 포함한 α -minimum essential medium (α -MEM, Cambrex, Walkersville, MD, USA), 20 mM N-acetyl-L-cysteine (SIGMA, Steinheim, Germany)을 추가하여 사용하였다.

3) C2C12세포에서의 생존율 측정

약물에 의한 세포독성을 알아보기 위하여 분화 된 C2C12 세포에 CCK-8 assay를 수행하였다. 먼저 96 well plate에 세포(1.5×10^4 cells/well) 분주하여 24시간 배양한 후 serum free media (SFM)에 여러 농도 (6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 μ g/ml)로 희석한 산겨릅나무 물추출물을 처리하였다. 배양 종료 후 CCK-8 시약을 10 μ l/well씩 넣은 후 37°C, 5% CO₂ incubator에서 암실상태를 유지하면서 반응시키고 Microplate Reader에서 450 nm의 흡광도를 측정하였다.

4) 알칼리성 인산분해효소 활성도 평가

배양된 pOB 세포를 1×10^5 cells/200 μ l로 분주하고, 산겨릅나무 물추출물을 농도별로 처리한 후 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 다음날 alendronate sodium이나 etidronate disodium을 첨가한 배지와 첨가하지 않은 배지로 각각 교환하며, 배지를 3일마다 교환하였다. 배양 7일 후에 효소 활성도 검사를 시행하였다. 배양접시로부터 배지를 제거한 후 PBS로 세척한 다음 0.1% Triton-X 100 (Sigma, USA)로 50 μ l를 첨가하고 20분간 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하여 세포를 용해시켰다. 40 μ l 표본에 알칼리성 인산분해효소 검사액(Sigma, USA)을 첨가하여 405 nm에서 1분, 2분 후의 p-NPP (4 mM p-nitrophenyl phosphate) 비색반응을 측정하였다.

5) 석회화 형성도 측정

배양한 pOB 세포를 각 well에 2×10^4 cells/500 μ l

으로 조정하여 plate에 배양한 후 석회와 유도를 위하여 분화유도 배지(50 µg/ml의 ascorbic acid, 10 mM의 β-glycerophosphate (Sigma, USA), 10⁻⁷ M의 dexamethasone (Sigma, USA))와 산겨릅나무 물추출물을 농도별로 첨가하여 배지를 3일마다 교환하면서 14일 또는 18일 배양하였다. 배지를 제거한 후 PBS로 세척한 다음 3% formalin PBS solution 500 µl를 첨가하여 10분 동안 실온에서 고정시켰다. PBS로 2회 세척하고 건조시킨 후 Ca²⁺에 대한 염색을 위하여 2% alizarin red 용액(pH 4.2, Sigma, USA)에 15분 간 실온에서 담근 후, 증류수로 3회 세척하여 현미경으로 관찰하였다. Nodule 형성 확인 후 10 mM sodium phosphate (10% cetylpyridinium chloride, pH 7.0)을 2 ml/well 첨가하여 ELISA reader로 550 nm에서 흡광도를 측정하였다.

6) Real time RT-PCR 분석

두개골 세포를 60 mm 배양접시에 4×10⁴ cells/cm²

밀도로 분주한 후, 세포가 가득 차면 조골세포 분화 배지로 교체하여 명시된 기간동안 배양하였다. Tri-solution (Bioscience Technology, Gyeongsan, Korea)을 이용하여 세포로부터 전체 RNA를 추출 및 분리하였다. 3 µg RNA를 TOP script TMRT Dry MIX (Enzymomics, Daejeon, Korea)를 이용하여 complementary DNA (cDNA)를 합성하였다. Emerald Amp GT PCR Master Mix (TaKaRa Bio Inc., Tokyo, Japan)와 primer가 포함된 혼합물 19 µl와 cDNA 1 µl를 polymerase chain reaction (PCR) 사이클을 30회 수행하였다. PCR 반응 조건은 95°C에서 10분 후 95°C에서 30초, 어닐링 온도에서 30초, 72°C에서 30초 후 72°C에서 5분을 수행하였다. qPCR은 AmpGene™ qPCR Green Mix HiROX (Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA)와 primer가 포함된 혼합물 19 µl와 cDNA 1 µl를 polymerase chain reaction (PCR) 사이클을 40회 수행하였다. 중합 효소 반응에 쓰인 primer의 정보는 Table 1에서 나타내었다.

Table 1. Specific primer sequences for PCR

Target	Primer Sequences	
Runx2	Forward	5'-AGATGGAAATTGTAAGTGTGCTA-3'
	Reverse	5'-TGTAATGCTGCTGAAATAGGTA-3'
Osterix	Forward	5'-CACGATGATGATGATGATGATGATGA-3'
	Reverse	5'-GCCAGGTTACTAACACCAATCTC-3'
Smad1	Forward	5'-TCCTTCTGTTTCGCAAATCAA-3'
	Reverse	GGAAATCAAAGCCTATGTCT-3'
Smad5	Forward	5'-ACAGAGTAGATGAAGAAGTG-3'
	Reverse	5'-CAGGGAAGTGACCAGAGA-3'
Osteopontin	Forward	5'-ATGTATGTAGAGAAAGAGAGGTAAT-3'
	Reverse	5'-ACAGGAAGAACAGAAGCAA-3'
Osteocalcin	Forward	5'-CACACAGCAGCTTGGC
	Reverse	5'-GTGAGGTCAGAGAGACAGAG-3'
ATF4	Forward	5'-CGAATGGATGACCTGGAAACC-3'
	Reverse	5'-GGGCTCCTTATTAGTCTCTTGGA-3'
Collagen type I	Forward	5'-CTGCCTGCTTCGTGTAATA-3'
	Reverse	5'-GGGAAATTGAGTTTGGGTTG-3'

7) 통계처리

모든 실험 결과는 GraphPad prism 5.0 통계 프로그램(GraphPad Software, La Jolla, CA, USA)을 이용하여 각 실험군의 평균과 표준편차(mean±SD)로 계산하였으며 각 그룹 간 비교를 위해 one-way ANOVA를 실시하여 p<0.05 수준에서 각 실험군 간의 유의성을 평가하였다.

III. 결과

1. 조골세포에 대한 세포독성 검사

CCK-8 (Cell Counting Kit-8) 분석은 세포내의 모든 dehydrogenase와 반응하므로 세포상태를 보다 정확하게 반영한다고 할 수 있으며, 수용성의 tetrazolium salt로서 살아있는 세포와 반응하여 오렌지색 수용성

의 formazan을 생성한다. 산겨릅나무 물추출물의 농도(6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$)에 따른 C2C12 세포의 성장에 미치는 영향을 CCK-8 assay로 분석한 결과는 Fig. 1와 같다. C2C12 세포에 추출물을 첨가하였을 때, 모든 농도에서 대조군과 비교하여 독성이 없는 것으로 나타났다.

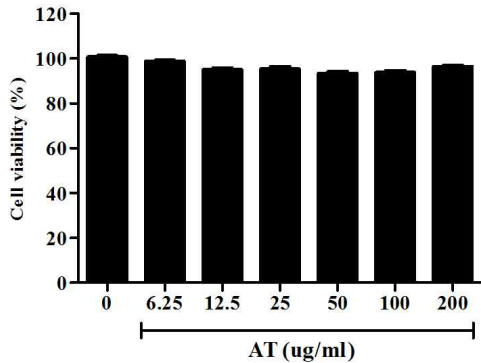


Fig. 1. Cytotoxic activity of AT extract in C2C12 cells. C2C12 cells were treated with various concentrations of AT extract (6.25–200 $\mu\text{g/ml}$). Cell viability was determined by CCK-8 assay.

2. Alkaline phosphatase (ALP) 활성에 미치는 영향

조골세포 분화의 표지인자인 염기성 인산분해 효소 (ALP)는 모든 조직에 분포하고 있으며, 특히 골 성장이 활발히 일어날 때 그 활성이 증가한다. 따라서 본 연구에서도 조골세포에서 산겨릅나무 물추출물에 대하여 ALP의 활성에 대한 효능을 확인한 결과(Fig. 2), 대조군과 비교하여 유의적으로 증가함을 확인하였다.

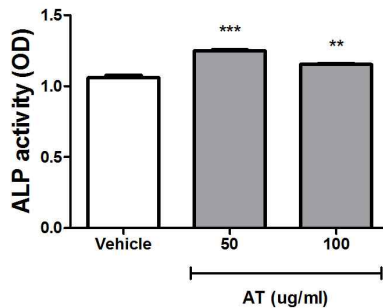


Fig. 2. Effects of AT on the alkaline phosphatase activities of the pOB cells. Data were expressed as percentage of control. Values are represented as mean \pm SD. ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ vs. Control.

3. 조골세포의 골 석회화 형성에 미치는 영향

앞서 확인한 결과를 바탕으로 조골세포의 ALP활성은 칼슘 침착을 도우며, 이는 조골세포의 분화에 중요한 표식인자로 골 석회화 형성능에 중요한 역할을 한다. 따라서 본 연구에서도 조골세포의 골 석회화 형성에 산겨릅나무 물추출물이 미치는 영향을 살펴본 바(Fig. 3), 14일 배양하였을 때 AT 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서 현저히 증가하는 것으로 나타났으나 유의성은 없었다(Fig. 3A). 하지만, 18일 배양을 하였을 때 AT 50 및 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서 농도 의존적으로 유의하게 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, Alizarin red S (ARS)염색을 통하여 현미경상에서도 석회화 결절인지 재확인을 하였으며, 그 결과 산겨릅나무 물추출물 처리군 모두에서 관찰되었으며, 특히 고농도 처리군에서 결절화된 정도가 강력하게 증가한 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3B, C).

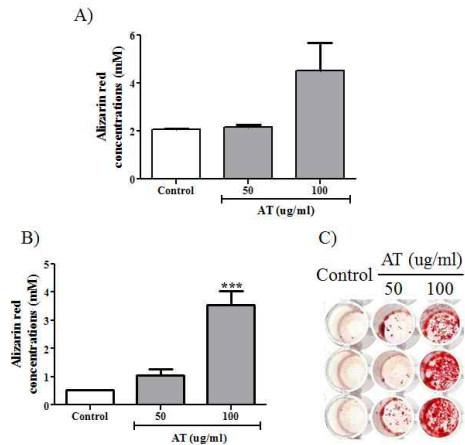


Fig. 3. Effects of AT on the Alizarin red activities of the pOB cells. Alizarin Red concentration of pOB cell for mineralization on AT extract for 14 days(A), 18 days(B, C) and Alizarin Red S Staining(C). Data were expressed as percentage of control. Values are represented as mean \pm SD. *** $p < 0.001$ vs. Control.

4. 조골세포 분화에 관련된 mRNA 발현에 미치는 영향

조골세포의 분화 마커와 관련된 유전자들의 발현을 확인하기 위하여 산겨릅나무 물추출물을 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 로 처리하고 18일 동안 배양 한 후 qPCR을 통하여 mRNA 발현을 확인하였다. 그 결과(Fig. 4), 조골세포 분화의 대표적인 마커인 Runx2, Osterix, Osteocalcin의 발현이 증가한 것을 확인할 수 있었으며, 또한 전사

인자 발현에 중요한 역할을 하는 Smad1, Smad5 및 ATF4의 발현도 증가함을 알 수 있었으며, 조골세포 분화의 표지인자인 osteopontin 및 Collagen type I alpha 1의 발현이 증가함을 확인 할 수 있었다.

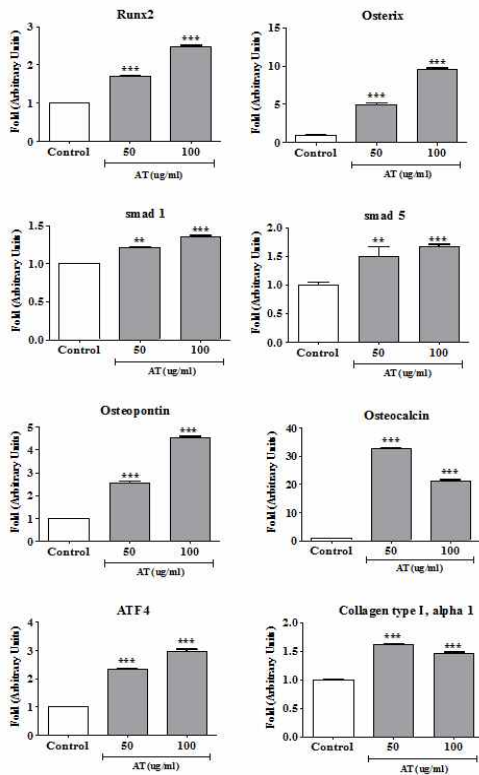


Fig. 4. Effect of AT on the change of Differentiation regulator expression in pOB cell. Values are represented as mean±SD. *p<0.05, **p<0.01 and ***p<0.001 vs. Control.

IV. 고찰

최근 우리나라는 고령화 사회에 진입하였으며, 65세 고령인구가 전체인구의 14%를 넘어서고 있다. 고령화 사회에서 가장 큰 문제로 대두되고 있는 골다공증은 대표적인 골 대사 질환으로 이는 뼈의 화학적 조성에는 큰 변화는 없지만, 골 단위 용적 내 골 양이 줄어들어 약한 충격에도 골절이 쉽게 일어날 수 있는 질환으로 특히, 여성의 폐경기 이후나 노인 남성의 경우 파골세포와 조골세포 간의 균형이 깨지면서 파골세포가 과다 증식해 뼈의 칼슘이 많이 소실되어 골 성분이 부족하여 빠른 뼈 손실이 일어난다¹⁵⁾. 골 조직은 골 조직을 이루는 조골전구세포(osteoprogenitor

cell), 골세포(osteocyte), 파골세포(osteoclast), 조골세포(osteoblast) 및 골표면세포(bone-lining cell)로 구분된다¹⁶⁾. 파골세포에 의한 골 흡수와 조골세포에 의한 새로운 골 기질 형성 및 무기질화 과정이 반복적으로 일어나는 대사기관으로¹⁷⁾, 뼈는 살아있는 조직이기 때문에 오래된 뼈는 일정하게 파괴되고 다시 새로운 뼈를 만들어내는 재형성 과정을 거치게 된다. 즉, 조골세포로 인하여 생성된 골 형성이 파골세포로 인한 골 흡수보다 많게 되는 것이다¹⁸⁾.

한의학에서는 골다공증을 주로 신허(腎虛)에 의해 초래되는 질환으로 정의하고 있으며 신허의 관점에 따라 세분화하여 분류하고 있다¹⁹⁾. 오행학설에 의하면腎은 精을 저장하고, 정은 髓를 만들며, 수는 骨을 영양한다. 바꾸어 말하면 건강한 신장은 건강한 골수와 높은 골밀도를 유지하며, 腎經이 體液, 氣, 귀(耳)를 조절한다. 따라서 腎精이 골수를 충분히 보충하지 않으면 뼈는 성글게 된다⁸⁾.

골다공증 치료는 골 흡수를 하는 파골세포의 활성을 억제함으로써 예방 및 치료를 하고 있다. 하지만 골다공증이 진행되어 생긴 골 소실을 완전히 회복할 수 없어, 결과적으로 완벽한 치료가 되지 않는다. 따라서 골다공증의 완벽한 치료를 위해서 파골세포의 활성을 억제하는 뿐만 아니라 조골세포의 활성을 촉진시켜 골 형성을 증가시키고 기존의 뼈만큼 회복시키는 것이 중요하다. 즉, 골다공증의 치료는 파골세포의 분화를 억제하여 과도한 골의 흡수를 막거나 조골세포의 분화를 촉진하여 부족한 골의 형성을 유도하는 방법으로 실행되고 있으며, 조골세포의 분화는 대표적인 마커 유전자들인 Runx2발현의 증가를 통해 촉진시키고, 이는 ALP, OC의 발현을 증가시킴으로써 세포막의 무기질 침착과 석회화 결절 형성능을 향상시킨다.

산겨릅나무(*Acer termentosum* Max)는 단풍과(Aceraceae)에 속하는 낙엽소교목 식물로서 산청목, 봉목, 청해척, 벌나무로도 불리고, 나무 주변으로 벌이 많이 모여드는 것을 보고 봉목이라고도 불리운다. 산겨릅나무는 독성이 없으며 어떠한 체질에도 부작용이 거의 없는 약재이며, 맛이 담백하여 청혈제와 이수제로 사용하고 있다^{9,10)}. 중국에서는 줄기를 청해척이라 하여 소종과 외상출혈에 치료목적으로 사용하고, 한국에서는 민간에서 잎과 목부를 간염, 간경화, 간암 등의 간질환 치료제 및 백혈병, 당뇨병, 신장염



이나 부종의 치료에 사용하며 또한 음주시 산겨릅나무의 목부 추출물을 복용하면 주독을 예방할 수 있다고 보고되고 있다¹¹⁾. 이에 대한 생리활성연구로는 간기능보호²⁰⁾, 항산화효과²¹⁾, 간염 바이러스를 포함하는 병원성 미생물 저해²²⁾, 이노작용²³⁾, 과골세포 분화억제²⁴⁾, 항염증¹²⁾ 및 유방암, 폐암, 간암 및 위암 세포 등에서 암세포 생육억제효과²⁵⁾를 보고한 바 있다. 또한, 산겨릅나무의 성분으로 알려진 salidroside는 amyloid-β에 대하여 신경세포의 산화적 스트레스에 대한 보호 효과²⁶⁾ 및 지질과산화 억제 효능²⁷⁾에 대한 연구가 보고되었다. 본 연구에서는 분화된 조골세포에 산겨릅나무 물추출물을 투여함으로써 ALP 및 골석회화 형성에 미치는 영향, 조골세포 분화에 관련된 유전자 활성을 조사함으로써 산겨릅나무의 골다공증 질환 치료제로서 효능을 관찰해보고자 하였다.

조골세포는 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cell)로부터 분화되며 이는 지방세포(adipocytes), 연골세포(chondroblasts)로 분화될 수 있다²⁸⁾. 중간엽 줄기세포 분화는 각각의 조건에 의해 분화되며 많은 사이토카인들이 관여를 하는데, 대표적인 것이 골형성 단백질(Bone morphogenetic protein, BMPs)이다. BMP는 동종 혹은 이종2량체로 BMP receptor에 결합하고, 이 결합에 의해 세포질의 serine/threonine kinase가 활성화되고, 이는 세포질에 존재하는 Smad1, Smad5, Smad8 을 인산화 시키게 된다. 이렇게 인산화된 Smad는 Smad4와 결합하여 핵으로 들어가 조골세포의 분화를 촉진하게 되는 것이다²⁷⁾. 결국 활성화된 Smad는 homeobox transcription factor인 Dlx5의 발현을 촉진하게 되며, 결국 조골세포 분화의 핵심 전사인자라 할 수 있는 Runx2²⁷⁾ 또는 Osterix²⁹⁾의 발현을 각각 촉진 하게 된다. 결과적으로 이는 조골세포 분화의 표지인자인 bone sialoprotein³⁰⁾, ALP³¹⁾ 및 osteocalcin³²⁾ 등의 발현을 증가 시키면서 석회화에 이르게 한다. 또한 세포막에는 당단백 효소인 ALP가 존재하고 있으며, 이는 기질 특이성과 염기성 pH에서 최적의 활성을 나타내고 세포의 외막과 석회화 조직의 기질 세포에서 높은 농도로 발견되어 석회화 과정 동안 무기인산의 운반, 세포분열이나 분화의 조절자로서 역할을 하는 골세포 분화의 표지인자로 알려져 있다⁴⁾.

이러한 보고들을 통해 본 연구에서는 조골세포의 분화에서는 어떠한 영향을 주는지 확인하고자 산겨릅

나무 물추출물을 처리하여 조골세포 분화를 확인할 수 있는 대표적인 방법인 ALP 활성과 ARS염색을 시행하였다. 그 결과, 산겨릅나무 물추출물을 처리한 그룹에서 ALP 활성 및 ARS 염색이 증가하는 것으로 나타났다.

조골세포의 분화는 다양한 스트레스 반응들이 동반되는데, 대표적으로 산화 스트레스와 ER-stress가 동반된다고 보고되어왔다. 각각의 스트레스 반응들은 그에 따른 단백질들을 조절하는 데, 최근 조골세포 분화에서는 ER-stress를 통한 ATF4 및 ATF6 단백질들의 발현이 유도된다고 알려졌다³³⁾. ER-stress를 통한 ATF4의 발현은 조골세포에서도 분화를 촉진시키는 전사인자로 많이 보고되었다³⁴⁾. 특히 부갑상선 호르몬에 의해 조골세포 분화 마커 유전자로 잘 알려진 Runx2와 상호작용을 통해 촉진한다고 보고되었다³⁵⁾.

본 연구에서도 조골세포 분화 마커 유전자들의 발현을 qPCR을 통하여 확인 하였고 그 결과 Runx2, Osterix의 발현이 증가한 것을 확인 할 수 있었다. 또한 전사인자 발현에 중요한 역할을 하는 Smad1 및 Smad5의 발현도 증가함을 알 수 있었으며, 조골세포 분화의 표지인자인 osteocalcin, osteopontin 및 Collagen type I alpha 1의 발현이 증가함을 확인 할 수 있었다.

이상의 실험결과에서 산겨릅나무 물추출물이 조골세포의 활성에 효능이 있다는 것을 확인하였다. 특히 골 석회화 형성에 미치는 영향을 검토한 결과, 100 μg/ml의 농도에서 유의있게 증가함을 알 수가 있었다. 조골세포를 활성화하여 골 생성을 촉진하는 것이 확인되었으며, 그에 대한 구체적인 기작 연구와 in vivo 연구가 병행된다면 골다공증 치료 및 예방에 새로운 치료제로 개발이 가능하리라 사료된다.

V. 결론

본 연구에서는 산겨릅나무 물추출물을 조골세포에 처리하였을 때 조골세포 분화와 관련하여, 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

1. 산겨릅나무 물추출물은 C2C12에서 200 μg/ml의 농도까지 독성을 보이지 않았다.
2. ALP의 활성을 측정한 결과 산겨릅나무 물추출물 50 및 100 μg/ml의 농도에서 유의하게 증가 하였다.
3. 산겨릅나무 물추출물의 석회화 형성도를 측정한

결과, Alizarin red의 농도는 14일 처리한 그룹에서는 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 증가를 하였지만, 18일 처리한 그룹에서는 (50, 100 $\mu\text{g/ml}$) 유의하게 증가하였다.

4. 산겨릅나무 물추출물의 조골세포 분화와 관련된 유전자들의 발현을 확인한 결과 전사인자(Osteocalcin, Runx2, osterix, smad1, smad5, osteopontin, ATF4, Collagen type I)가 유의적으로 증가하였다.

이상의 결과로부터 산겨릅나무 물추출물은 조골세포의 활성화를 촉진하여 골 생성에 영향을 줄 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 산림청(한국임업진흥원) 산림과학기술 연구개발사업의 연구비(2017039B10-1719-BA01, D17170) 지원과 한국한의학연구원 창의연구사업 (과제고유번호 K17830)의 지원 의해 한국한의학연구원에서 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

References

1. Takayanagi H., Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems., *Nat Rev Immunol.* 2007 ; 7(4): 292-304.
2. Katagiri, T. and N. Takahashi. Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation. *Oral Diseases.* 2002 ; 8 : 147-59.
3. Dragsted, L. O., M. Strube, and J. C. Larsen. Cancer-protective factor in fruits and vegetables. Biochemical and biological background. *Pharmacol. Toxicol.* 1993 ; 72: 116-35.
4. Newmark, H. L. Plant phenolics as potential cancer prevention agents. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1996 ; 401 : 25-34.
5. Manolagas, S. C. Basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Birth and death of bone cells. Endocr. Rev.* 2000 ; 21 : 115-37.
6. Mone, Z. Skeletal remodeling in health and disease. *Nat. Med.* 2007. ; 13 : 791-801.
7. Kang SK, Park YB, Ahn HS. The bibliographical studies in the acupuncture treatment of the osteoporosis. *J Korean Acupun & Moxibu Medicin Soc.* 1998 ; 15(2) : 437-54.
8. Cho, H.S. Research on menorrhagia in the questionnaire of oriental gynecology. Unpublished master's thesis. Dong-Eui University, 2002.
9. Lee GB. Korean Plant Illustrations. Hang Mun-sa. Seoul. 1993 ; 552.
10. So BG. Chinese main book illustrations. 3 vol. Yeogangchulpan-sa, Seoul. 1994 ; 193.
11. Cho EK, Jung KI and Young Ju Choi. Anti-Diabetic, Alcohol Metabolizing Enzyme, and Hepatoprotective Activity of *Acer tegmentosum Maxim.* Stem Extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2015 ; 44(12) : 1785-92
12. Lee CE, Jeong HH, Cho IA and Sun Yung Ly. In Vitro and In Vivo Anti-Oxidative and Anti-Inflammatory Activities of *Acer tegmentosum Maxim* Extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2017 ; 46(1) : 1-9.
13. Seo YH, Lee SH, Hwang HS and Choi SY. Effects of Non-Alcoholic Fatty Liver in Rats by *Acer tagmentosum Maxim.* Extract. *Korean J. Food & Nutr.* 2016 ; 29(3) : 307-12.
14. Park KM, Yang MC, Lee KH, Kim KR, Choi SU, Lee KR. Cytotoxic phenolic constituents of *Acer tegmentosum maxim.* *Arch Pharm Res.* 2006 ; 29 : 1086-90.
15. Lee, J. W. and I. S. Lee. Effects of *Rubus coreanus miquel* extracts on the activity and differentiation of MC3T3-E1 osteoblastic cell. *J. Life Sci.* 2004 ; 14 : 967-74.
16. Mok, S. K. and H. S. Shin. The effects of prostaglandine and dibutyryl cAMP on osteoblastic cell activity and osteoclast generation. *J. Wonkwang Dental Res. Ins.* 1996 ; 6 : 43-62.
17. Solt, D. B. The pathogenesis, oral manifestations, and implications for dentistry of metabolic bone disease. *Curr. Opin. Dent.* 1991 ; 1 :



- 783–91.
18. Parfitt, A. M. Osteonal and hemi-osteonal remodeling: The spatial and temporal framework for signal traffic in adult human bone. *J. Cell Biochem.* 1994 ; 55 : 273–86.
 19. Bureau of Statistics. The statistics of mortality factors, Meta Data Base. 2006 ; 9
 20. Tung NH , Yan D , Kim SK , Bae KH , Kim YH. Total peroxy radical scavenging capacity of the chemical components from the stems of *Acer tegmentosum* Maxim , *J Agric Food Chem*, 2008 ; 56 : 10510–4.
 21. Park KM, Yang MC, Lee KH, Kim KR, Choi SU, Lee KR. Cytotoxic phenolic constituents of *Acer tegmentosum* maxim. *Arch Pharm Res.* 2006 ; 29(12) : 1086–90.
 22. Yu T, Lee J, Lee YG, Byeon SE, Kim MH, Sohn EH, Lee YJ, Lee SG, Cho JY. In vitro and in vivo anti-inflammatory effects of ethanol extract from *Acer tegmentosum*. *J Ethnopharmacol.* 2010 ; 128(1) : 139–47.
 23. Kim EC, Kim SH, Piao SJ, Kim TJ, Bae K, Kim HS, Hong SS, Lee BI, Nam M. Antiangiogenic Activity of *Acer tegmentosum* Maxim Water Extract in Vitro and in Vivo. *J Korean Med Sci.* 2015 ; 30(7) : 979–87.
 24. Ha H, Shim KS, Kim T, An H, Lee CJ, Lee KJ, Ma JY. Water extract of *Acer tegmentosum* reduces bone destruction by inhibiting osteoclast differentiation and function. *Molecules.* 2014 ; 19(4): 3940–54.
 25. Shin, I.C., J.H. Sa, T.H. Shim and J.H. Lee. The physical and chemical properties and cytotoxic effects of *Acer tegmentosum* Maxim. extracts. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 2006 ; 49 : 322–7.
 26. Jang, S.I., H.O. Pae, B.M. Choi, G.H. Oh, S. Jeong, H.J. Lee, H.Y. Kim, K.H. Kang, Y.G. Yun, Y.C. Kim and H.T. Chung. Salidroside from *Rhodiola sachalinensis* protects neuronal PC 12 cells against cytotoxicity induced by amyloid- β . *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 2003 ; 25 : 295– 304.
 27. Zhang, Y. and Y. Liu. Study on effect of salidroside on lipid peroxidation in oxidative stress in rat hepatic stellate cells. *Zhong Yao Cai.* 2005 ; 28 : 794–6.
 28. Soltanoff CS, Yang S, Chen W, Li YP. Signaling networks that control the lineage commitment and differentiation of bone cells. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2009 ; 19 :1–46.
 29. Lee MH, Kwon TG, Park HS, Wozney JM, Kim HJ, Ryoo HM: BMP-2-induced Osterix expression is mediated by *Dlx5* but is independent of *Runx2*. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003 ; 309(3) : 689–94.
 30. Roca H, Phimpilai M, Gopalakrishnan R, Xiao G, Franceschi RT: Cooperative interactions between *RUNX2* and homeodomain protein-binding sites are critical for the osteoblast-specific expression of the bone sialoprotein gene. *J Biol Chem.* 2005 ; 280 : 30845–55.
 31. Kim YJ, Lee MH, Wozney JM, Cho JY, Ryoo HM: Bone morphogenetic protein-2-induced alkaline phosphatase expression is stimulated by *Dlx5* and repressed by *Msx2*. *J Biol Chem.* 2004 ; 279 : 50773–80.
 32. Xiao ZS, Hinson TK, Quarles LD: *Cbfa1* isoform overexpression upregulates osteocalcin gene expression in non-osteoblastic and pre-osteoblastic cells. *J Cell Biochem.* 1999 ; 74 : 596–605.
 33. Harding HP, Zhang Y, Zeng H, Novoa I, Lu PD, Calton M, Sadri N, Yun C, Popko B, Paules R, Stojdl DF, Bell JC, Hettmann T, Leiden JM, Ron D. An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol Cell.* 2003 ; 11 : 619–33.
 34. Yang X, Matsuda K, Bialek P, Jacquot S, Masuoka HC, Schinke T, Li L, Brancorsini S, Sassone-Corsi P, Townes TM, Hanauer A, Karsenty G. ATF4 is a substrate of RSK2 and an essential regulator of osteoblast biology; implication for Coffin-Lowry Syndrome. *Cell.* 2004 ; 117 : 387–98.

35. Jiang D, Franceschi RT, Boules H, Xiao G. Parathyroid hormone induction of the osteocalcin gene. Requirement for an osteoblast-specific element 1 sequence in the promoter and involvement of multiple-signaling pathways. J Biol Chem. 2004 ; 279 : 5329-37.