

육미지황환 (六味地黃丸) 에탄올 추출물이 난소제거 흰쥐의 경골 소주골에 미치는 영향

김정숙^{1,*}, 하혜경¹, 이제현², 송계용³, 김혜진¹, 신선미¹

¹한국한의학연구원 한약제제연구부

²경희대학교 약학대학 한약학과

³중앙대학교 의과대학 병리학교실

Abstract

Effect of Ethanol Extract of Yukmijiwhang-Whan on Trabecular Bone Area in OVX Rats

Kim Chungsook^{1,*}, Ha Hyekyung¹, Lee Jehyun², Song Kyeyong³, Kim Hyejin¹, Shin Sunmi¹

¹Department of Herbal Pharmaceutical Development, Korea Institute of
Oriental Medicine, 129-11 Chungdam-dong, Kangnam-ku, Seoul, 135-100, Korea

²Department of Oriental Pharmaceutical Science, College of Pharmacy, KyungHee University, Seoul, Korea

³College of Medicine, Chung-Ang University, Seoul, Korea

Bone is continuously remodeled during adult life with the resorption of old bone by osteoclasts and its subsequent replacement by osteoblast. Bone homeostasis is maintained by a balance between activities of osteoblasts and osteoclasts, but an imbalance between resorption and formation results in bone diseases including osteoporosis. Osteoblasts line up on the bone surface, especially regions of new bone formation, lay down bone matrix (osteoid) in orderly lamellae and induce its mineralization. Thus, the increased activity of osteoblasts is helpful to treat and prevent osteoporosis. In this study, we examined whether 80% EtOH extract of yukmijiwhang-whan is capable of affecting osteoblast proliferation using human osteoblast-like cell line, MG-63 and Saos-2. In an *in vivo* experiment, extract of yukmijiwhang-whan was administered for 9 weeks to ovariectomized (OVX) rats. At necropsy, uterus weights were measured, and trabecular bone areas (TBAS) of tibia and the sixth lumbar vertebra were measured by bone histomorphology. The maximum cell proliferation of MG-63 caused by extract of yukmijiwhang-whan at 5×10^{-6} mg/ml was approximately 115% compared with control. In Saos-2, cell proliferation was approximately 145% of control at 5×10^{-4} mg/ml and maximum alkaline phosphatase (ALP) activity was approximately 143% of control at 5×10^{-5} mg/ml. In animal study, however, the tibia and lumbar TBAS of the yukmijiwhang-whan group did not increased than the OVX control group. In conclusion, the 80% EtOH extract of yukmijiwhang-whan increased proliferation of osteoblasts but did not prevent bone loss in OVX rats.

Keyword : osteoporosis, osteoblast, ovariectomized rat, trabecular bone area.

I. 서론

골(骨)은 70%의 무기질과 30%의 유기질로 구성되어 있는 조직으로, 무기질의 대부분은 hydroxyapatite로 이루어져 있으며, 유기질은 collagen type I matrix (95%) 및 골세포(2%)로 구성되어 있다¹⁾. 골세포 증골을 형성하는 조골세포(osteoblast)와 미네랄화된 골기질을 재흡수하는 파골세포(osteoclast)의 활성의 균형이 골의 항상성(homeostasis)을 조절하는데 큰 역할을 한다. 이러한 조골세포와 파골세포의 활성은 노화, steroid hormone의 결핍(특히 estrogen), 성장호르몬의 결핍 등 기타 호르몬의 이상, 칼슘이 부족한 식이 및 장에서의 칼슘이온의 흡수 감소, 음주, 흡연 등의 원인으로 균형이 깨지게 되고, 파골세포의 활성이 조골세포의 활성보다 증가될 경우 지속적인 골감소가 진행되어 골다공증이 발생하게 된다¹⁾²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾. 골다공증은 폐경기 이후의 여성에서 나타나는 type I 골다공증과 노인층의 남녀 모두에서 나타나는 노화에 의한 type II 골다공증으로 대별된다. Type I 골다공증은 estrogen의 결핍이 주요 원인이 되는 만큼 치료 및 예방법으로 호르몬 대체요법(estrogen replacement therapy)이 효과적이거나 장기간의 투여는 자궁 출혈, 유방암 등의 부작용이 있다. 현재 사용 중인 골다공증의 치료제로는 estrogen 외에도 칼슘제제, 불소제제, calcitonin, 1,25(OH)₂D₃, 성장호르몬, 부갑상선 호르몬(parathyroid hormone), bisphosphonate 제제, ipriflavone 등이 있으나 그 치료효과는 일부 골다공증 증상에 국한되고 역시 장기투여시에는 여러 부작용이 있어¹⁾²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾⁶⁾ 아직까지 골다공증의 확실한 치료제는 없는 실정이다. 이에 본 연구에서는 부작용이 적고 골다공증 치료효과가 우수한 치료제를 개발하고자 하는 연구의 일환으로 한의학적으로 널리 사용되어온 처방 중 육미지황환의 골다공증 치료 효과를 검색하였다.

六味地黃丸은 小兒藥證直訣⁷⁾에 地黃圓이라는 이름으로 최초로 기록된 처방으로 “治腎怯失音 凶關不合 神不足 目中白睛多 面色晄白等方: 선천적으로 약하여 말을 잘하지 못하고 천문의 융합이 늦으며 정신 발달이 더디고 눈의 흰자위가 많고 얼굴의 혈색 부족등에 사

용한다”고 하여 소아의 발육부전을 개선할 목적으로 사용하였으나, 이후 醫方集解⁸⁾에서 補養之劑의 첫 번째 처방으로 六味地黃丸을 수록하여 “治肝腎不足 眞陰虧損 精血枯竭 憔悴羸弱 腰痛足酸 自汗盜汗 水泛爲痰 發熱咳嗽 頭暈目眩 耳鳴耳聾 遺精便血 消渴淋瀝 失血失音 舌燥喉痛 虛火牙痛 足眼作痛 下部瘡瘍等證: 肝腎과 眞陰, 精血의 부족으로 초체하고 허약하며 요통과 다리가 시리며 자한증과 도한증, 水泛으로 痰이 되어 발열해수 어지러움증과 귀에서 소리가 나거나 안들리며, 유정과 변혈, 갈증이 심하고 소변에 이상이 있으며 혈액이 부족하고 말 소리를 잘내지 못하고 혀가 마르고 목이 아프며, 虛火로 인한 치통, 발바닥의 통증, 하체의 종기 등의 증상에 사용한다”라고 하여 소아의 발육부전 뿐만 아니라 성인에서의 肝腎虛弱으로 인한 精虛·陰虛에 사용한다고 하였다. 이는 六味地黃丸의 方意가 補陰·補精을 주요한 목적으로 하는데 기인한다. 六味地黃丸은 숙지황 8兩 山茱萸 山藥 각각 4兩 茯苓 牡丹皮 澤瀉 각각 3兩으로 구성되어 있으며⁷⁾⁸⁾, 그 구성 약물의 작용에 대하여 醫方集解에서는 熟地黃은 滋陰補腎하는 작용으로 精血을 생성하며, 山茱萸는 溫肝逐風하여 澁精秘氣하며, 牡丹皮는 君火와 相火를 치료하여 涼血退蒸하며, 山藥은 肺脾의 虛熱을 치료하여 補脾固腎하며, 茯苓은 脾의 濕熱을 치료하여 心腎을 소통시키며, 澤瀉는 膀胱의 水邪를 치료하여 聽耳明目하는 작용을 한다고 하였다. 그리고 汪昂은 이들 약물은 그 작용으로 볼 때 熟地黃과 牡丹皮, 山藥과 茯苓, 山茱萸와 澤瀉에서와 같이 補法의 약물과 瀉法의 약물을 서로 배합하여 조합함으로써 약효가 잘 조화되어 補의 작용을 나타낸다고 하였다⁸⁾.

II. 실험 방법

1. 한약 추출물의 제조

숙지황 (Rhizoma Rehmanniae Preparata, 중국産), 산

수유 (Fructus Corni), 산약 (Tuber Dioscorea), 목단피 (Cortex Paeoniae), 택사 (Rhizoma Alismatis), 백복령 (Hoelen)을 각각 분말화 하여 약물 무게의 10배 부피의 80% 에탄올로 3회 추출하여 감압농축 후 동결건조하여 제조하였다. 또한 숙지황+목단피 (8:3), 산수유+산약 (1:1), 산수유+택사 (4:3), 산약+복령 (4:3) 등의 두 가지 약재의 혼합물은 육미지황환의 배합비율로 하여 위와 같은 방법으로 제조하였다. 실험에 사용한 M3 (숙지황:산수유:산약 = 2:1:1), M4 (숙지황:산수유:산약:목단피 = 8:4:4:3) 및 육미지황환인 M6 (숙지황:산수유:산약:목단피:택사:복령 = 8:4:4:3:3:3)의 추출물은 각각을 분말화하여 위와 같은 방법으로 제조하였다.

2. 조골세포의 세포증식실험

가. 조골세포의 배양

조골세포와 유사한 성질을 나타내는 MG-63 및 Saos-2 세포주 (한국세포주은행, 서울대학교 의과대학 암연구소, 서울)를 사용하였다. MG-63 세포주는 FBS (fetal bovine serum), penicillin과 streptomycin (Gibco BRL, U.S.A.)을 함유하는 DMEM (Dulbecco's modified eagles medium, Gibco BRL, U.S.A.)을 사용하였고, Saos-2 세포는 RPMI 1640배지 (Gibco BRL, U.S.A.)를 사용하여 humidified condition의 5% CO₂, 37°C의 incubator에서 배양하였다.

나. MTT 실험

약물의 첨가에 따른 세포의 증식은 MTT 검색법⁹⁾으로 확인하였다. 우선 각 세포주를 96-well plate에 20000 cells/well로 세포를 분주하고, 한약추출물을 건조약재로 환산하여 5~5×10⁻⁷ mg/ml의 농도가 되도록 첨가하였다. 한약추출물의 용해는 최종농도는 1%가 되도록 DMSO (dimethylsulfoxide, Sigma Chemical Co., U.S.A.)를 사용하였다. 또한 한약추출물의 세포증식 효과에 대한 표준물질로 NaF, 1,25(OH)₂ D₃ 및 E2 (17β-estradiol)를 각각 사용하였다. 사용된 시료는 육미지황환의 각각의 약제들 및 여러 가지 배합한 혼합물들로 육미지황

환의 배합비율을 따라 사용하였다. 배양된 세포에 MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma Chemical Co., U.S.A.)를 가할 때, 생성된 formazan 결정을 DMSO에 용해시켜 ELISA reader (Ceres UV 900C, Bio-tech instrument, U.S.A.)로 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료를 첨가하지 않은 control well의 흡광도에 대한 시료를 첨가한 well의 흡광도의 비를 %로 계산하였다.

다. Alkaline phosphatase (ALP)의 활성검색

조골세포의 특성인 ALP 활성을 세포증식실험에서 검색하였다(10). MTT 검색법에서와 같은 세포수와 같은 약물 농도로 처리하고 3일간 배양 후 세포를 수집하였다. ALP 활성 측정은 이 효소가 무색의 p-nitrophenylphosphate를 노란색의 p-nitrophenol과 phosphate로 분해촉진시키는 것을 이용하여 405 nm에서 흡광도의 변화를 이용하여 측정하였다¹⁰⁾¹¹⁾.

3. 골다공증 유발 동물실험

골다공증을 유발하는 동물모델은 Sprague-Dawley계 흰쥐의 암컷으로 난소적출 모형¹²⁾을 선택하였다. 체중 200-300 gram 정도의 암컷 흰쥐(Sprague Dawley rat, 한국화학연구소, 대전)를 난소적출 (OVX)하거나 난소적출을 제외한 모든 수술조작을 시행하여 (Sham 군) 사용하였으며, 온도 22±3°C, 습도 50~60%, 12시간 명/암 주기의 조명 및 식수와 사료를 충분히 공급하여 사육하였다.

약물 투여는 난소적출 1주 후부터 9주 동안 실시하였으며, 대조군(OVX control)과 Sham 군은 해당량의 식수를 경구투여하였고, E2군 (OVX 및 17β-estradiol 투여)은 17β-estradiol (1μg/kg/day, Sigma Chemical Co., U.S.A.)을 복강주사하였다. 또한 M3 및 M6 추출물은 각각 전체 한약재의 5 g/kg/day의 용량으로 경구투여하였다. 각 군의 체혈은 난소적출전, 약물투여 전 및 실험종료 후에 각각 미정맥내에서 채혈하여 혈액분석 (총혈구수 검사) 및 혈장의 생화학적 검사를 하였다.

부검시 후대정맥에서 채혈하여 총혈구수 검사를 행하고, 혈장을 분리하여 -70°C 에서 아래의 실험들을 행할 때까지 냉동보관 하였다. 자궁, 경골등의 조직은 분리하여 무게를 측정하여 -70°C 에서 냉동보관 하였고, 경골은 4% formaline 용액에 보관하여 형태계측학적 실험에 사용하였다.

가. 총혈구수 측정 (complete blood cells (CBC) counts)

난소제거 또는 약물 투여로 인한 조혈기능 및 면역기능의 이상 유무를 검증하기 위해 백혈구 (white blood cells: WBC), 림프구 (lymphocytes), 단핵구 (monocytes), 과립구 (granulocytes), 적혈구 (erythrocytes; RBC), 헤모글로빈 (hemoglobin; Hb), 적혈구용적비 (hematocrit; Hct)를 Coulter counter (Coulter Co., Miami, FL, U.S.A.)를 이용하여 측정하였다.

나. 생화학 검사

생화학 분석기 (Airon 200, Crony Instruments, Rome, Italy)와 분석시약들 (Trace Am. Inc., Miami, FL, U.S.A.)을 사용하여 ALP¹¹⁾, 칼슘¹³⁾, 크레아티닌 (creatinine)¹⁴⁾, 무기성 인산염¹⁵⁾, 혈중 요소성 우레아 (BUN)¹⁶⁾, 총 콜레스테롤¹⁷⁾, HDL-콜레스테롤¹⁸⁾¹⁹⁾²⁰⁾ 및 LDL-콜레스테롤 농도를 각각 검사하였다. 특히 ALP, 칼슘, 무기성 인산염은 골다공증의 증상을 검색하기 위하여 측정했으며, 크레아티닌은 신장 기능의 변화를 확인할 목적으로 검색하였다.

다. 경골 및 요추골의 형태계측학적 연구

적출한 경골과 요추골을 4% 포르말린 용액에서 고정한 후, formic acid내에서 탈회를 시행한 후에 골 조직의 관찰부위를 양분한 후 70% 에탄올로부터 100% 에탄올과 아세톤에 이르는 단계별 탈수과정을 거쳐 자일렌으로 청명하고 파라핀 포매를 시행하였다. 파라핀 포매된 골 조직을 microtome으로 $5\mu\text{m}$ 두께로 절단하고 H & E 염색을 실시하여 광학현미경으로 관찰하였다. 성장판의 직하부에서 성장판의 기준면적 $0.2 \times 10^7\mu\text{m}^2$ 인 직사각형의 내부에 있는 소주골을 정량적인 영상분

석기 (Image Analysis System, Wild Leitz Co., Wetzlar, Germany)의 digitizer를 이용하여 소주골 면적을 구하였다²¹⁾.

4. 통계처리

Systat program (SYSTAT Inc, Evanston, Ill, U.S.A.)을 이용하여 각 한약의 투여군과 대조군과의 비교는 ANOVA 를 이용하여 $P<0.05$ 일 때 의미가 있는 것으로 정의하였으며, 각 군에 대해 투여전 (day 0) 군과 비교하여 Bonferroni multiple comparison analysis 법을 이용하여 $P<0.05$ 이하인 것²²⁾을 유의성있는 차이가 있는 것으로 정의하였다.

III. 실험결과

1. 조골세포의 세포증식실험

가. MTT 검색

MG-63 세포주에 대한 약재추출물의 세포증식에 대한 MTT 검색결과는 Fig. 1과 동일하게 대조군의 %로 나타냈다. NaF는 $10^{-10} \sim 10^{-6}$ mg/ml의 농도에서 약 20%의 세포증식효과를 나타냈고, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 는 $10^{-4} \sim 10^{-6}$ mg/ml에서 약 15%의 세포증식효과를 나타냈으나 반면에 E2는 세포증식효과를 나타내지 않았다. M3는 5×10^{-5} mg/ml에서 약 20%, M6는 5×10^{-6} mg/ml에서 약 15%의 세포증식효과가 있었다 (Fig. 1). 목단피는 5×10^{-1} mg/ml의 농도에서 약 25%, 산수유+산약 추출물은 5×10^{-5} mg/ml에서 약 15%, 숙지황+목단피 추출물은 $5 \times 10^{-5} \sim 5 \times 10^{-1}$ mg/ml에서 약 20%의 세포증식효과를 나타냈으나 다른 농도에서는 대조군과 유사하게 나타났으며, 숙지황, 산수유, 산약의 각 단일 약물 및 M4는 세포증식 효과가 없는 것으로 나타났다 (결과 표기 안함).

Saos-2 세포주에 대한 MTT 검색 결과, NaF는 10^{-6}

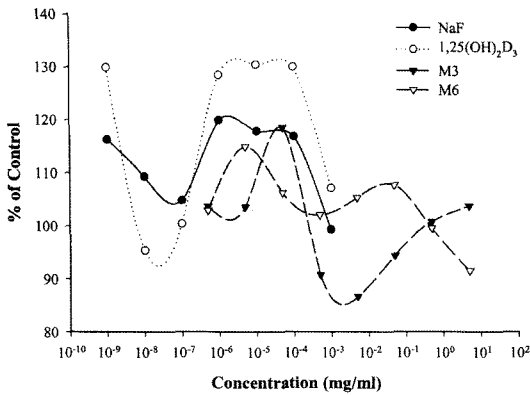


Fig. 1. Cell proliferation effect on MG-63, human osteoblast-like cell line (MTT assay)

mg/ml에서 약 10%의 세포증식효과를 나타냈고, 1,25(OH)₂D₃와 E2는 10⁻⁸ mg/ml에서 각각 37%와 39%의 세포증식효과가 있었다. M3는 세포증식 효과가 없었으나, M6는 5×10⁻⁴ mg/ml에서 46%의 세포증식효과를 나타냈다 (Fig. 2). 숙지황은 5×10⁻⁴⁻⁵ mg/ml의 농도에서 70~100%이상, 산수유는 5×10⁻¹ mg/ml에서 약 25%, 산약은 5×10⁻⁴mg/ml에서 약 28%, 목단피는 5×10⁻⁶과 5×10⁻¹ mg/ml에서 20% 이상의 세포증식효과가 있었으며, 약재의 혼합물중에서 산수유+산약 추출물은

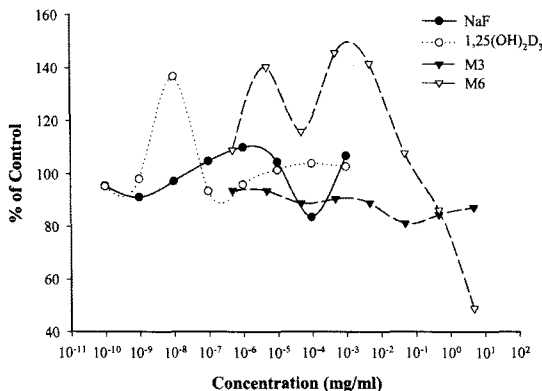


Fig. 2. Cell proliferation effect on Saos-2, human osteoblast-like cell line (MTT assay).

5×10⁻⁶ mg/ml에서 36%, 숙지황+목단피 추출물은 5×10⁻² mg/ml의 농도에서 각각 73%의 세포증식효과가 있었고, M4는 5×10⁻³ mg/ml농도에서 15%의 세포증식효과를 나타냈다 (결과 표기 안함).

나. ALP 활성 측정

MG-63 세포주는 Saos-2 세포주와 비교하여 ALP 활성이 낮았으므로 Saos-2 세포주에 대해서만 ALP 활성을 검색하였다. NaF는 10⁻⁸~10⁻⁵ mg/ml의 농도에서 80-90%, 1,25(OH)₂D₃는 10⁻⁸~10⁻⁷ mg/ml에서 90-100%의 ALP 활성증가를 나타냈으나, E2는 ALP의 활성을 증가시키지 않았다. M3는 5×10⁻¹ mg/ml의 농도에서 20%, M6는 5×10⁻⁵ mg/ml에서 43%의 ALP 활성을 증가시켰다 (Fig. 3).

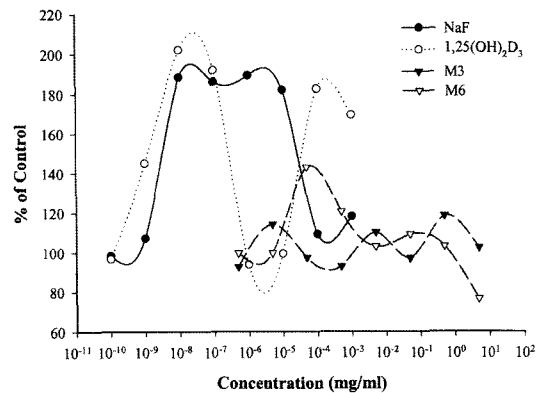


Fig. 3. Changes of alkaline phosphatase (ALP) activities of Saos-2 cells.

숙지황은 5×10⁻² mg/ml에서 약 100%의 ALP 활성증가를 나타내 Saos-2의 MTT 결과와 일치하였고, 산수유는 5×10⁻⁵ mg/ml에서 약 20%, 산약은 전체적으로 약 30%이상 특히 5×10⁻³ mg/ml에서 약 40%, 목단피는 5×10⁻² mg/ml에서 73%의 ALP 활성증가를 나타내 MTT 결과와 유사하게 나타났다. 숙지황+목단피 추출물은 5×10⁻² mg/ml에서 36%, 산약+복령 추출물은 5 mg/ml에서 40%의 ALP 활성을 나타냈으나, 산수유+산약 추출물은 5×10⁻² mg/ml에서 약 17%, M4는 5×

10⁻⁷ mg/ml에서 17%로 ALP의 활성에 큰 영향을 주지 않았으며, 산수유+텍사 추출물은 ALP 활성을 증가시키지 않는 것으로 나타났다 (결과 표기 안함).

2. 골다공증 유발 동물실험

가. 체중의 변화

각 군의 동물실험을 수행하는 기간 중에 나타난 각 동물들의 체중의 변화를 Fig. 4에 나타냈다. Sham군은 수술전과 비교하여 투여 3주부터 체중이 증가하였고 (P<0.01), 대조군, E2군 및 M6군은 투여 1주부터 체중이 증가하기 시작했으며 (P<0.01), M3군은 투여 2주부터 증가하였다 (P<0.01). 또한 난소를 적출하지 않은 Sham군에 비해 난소 적출한 대조군의 체중이 더 급격히 증가하였고, E2군은 Sham군과 대조군의 중간수준으로 체중 증가를 보였다. M3와 M6 투여군은 모두 대조군과 유사한 체중증가를 나타냈다 (Fig. 4).

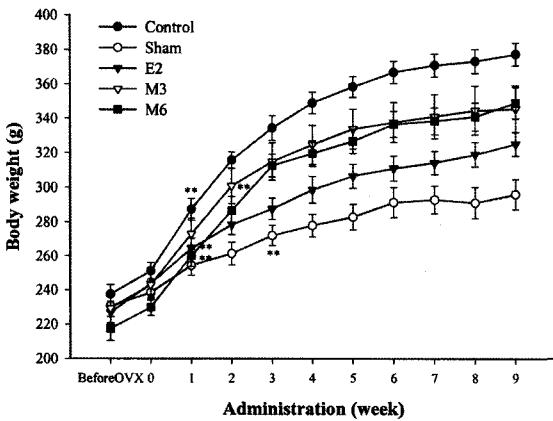


Fig. 4. Changes in body weight of ovariectomized (OVX) rats during 9 weeks administration of the extracts. Comparison to before OVX group by Bonferroni multiple comparison method, *; P<0.05, **; P<0.01.

나. 조직의 무게변화

9주간의 투여 후 각 실험동물의 장기를 적출하여 그 무게를 측정된 결과, 간, 신장, 경골 등의 조직의 무게는 각 투여군 간에 유의성있는 차이가 없었으나 (결과

표기 안함), 자궁의 무게는 대조군과 비교하여 Sham군과 E2군에서 증가하였으며 (P<0.01), M3와 M6 투여군은 모두 자궁의 크기가 증가하지 않았다 (Fig. 5).

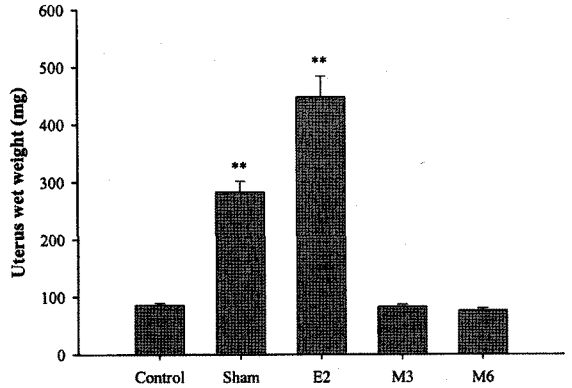


Fig. 5. Wet weight of uterus in ovariectomized rat during 9 weeks administration of the extracts. Comparison to control group by Bonferroni multiple comparison method, ** : p<0.01.

다. 전혈구수 측정

난소적출 전 및 투여 9주 후에 채혈한 혈액의 전혈구수를 측정된 결과, 주령의 증가나 약물의 투여에 의한 혈구수의 유의성 있는 변화는 없었다 (결과 표기 안함).

라. 생화학 검사

ALP는 모든 군에서 수술 전이나 투여 전보다 9주 투여 후에 감소하는 경향을 보였는데, E2군에서는 수술 전 및 투여 전과 비교하여 9주 투여 후에서 모두 유의성있는 감소를 보였으며 (각각 P<0.01), 대조군에서는 투여 전과와 비교하여 9주 투여 후에 감소하였고 (P<0.01), M6 투여군은 수술 전이나 투여 전보다 9주 투여 후에 유의성있는 감소를 보였다 (각각 P<0.05, P<0.01). 무기성 인산염은 모든 군에서 수술 전과 비교하여 투여 전과 9주 투여 후에 증가하였으며 (각각 P<0.01), 칼슘은 큰 차이가 없었다 (Table I).

Table 1. Results of biochemical clinical analysis in plasma of ovariectomized rat during 9 weeks administration of the extracts

	Age(week)	Adminstration				
	Age	Control	Sham	E2	M3	M6
ALP (U/L)	10	179.93±11.95	182.21±14.67	195.79±14.93	180.42±12.00	157.99±11.54
	11	193.69±14.46	174.67±20.97	229.95±15.10	180.17±17.81	181.42±18.34
	20	136.74±11.32 ^{§§}	111.20±23.47	130.74±9.64 ^{***§}	135.36±13.69	109.38±10.24 ^{§§}
Calcium (mg/dL)	10	11.13±0.33	10.80±0.40	10.96±0.27	10.42±0.35	10.66±0.23
	11	12.05±0.32	11.69±0.29	11.85±0.39	12.20±0.14 ^{**}	11.16±0.10
	20	11.03±0.21	11.27±0.20	11.01±0.28	10.66±0.16 ^{§§}	11.44±0.21 [*]
Inorganic phosphate (mg/dL)	10	8.26±0.31	7.62±0.27	7.69±0.41	8.05±0.32	7.64±0.31
	11	5.66±0.24 ^{**}	5.90±0.28 ^{**}	5.41±0.13 ^{**}	5.05±0.19 ^{**}	5.69±0.19 ^{**}
	20	5.15±0.35 ^{**}	5.51±0.30 ^{**}	5.03±0.31 ^{**}	5.10±0.48 ^{**}	5.46±0.25 ^{**}
Total cholesterol (mg/dL)	10	97.27±6.27	89.97±5.45	96.05±5.13	106.42±5.87	84.41±5.15
	11	109.44±2.91	85.52±5.38	109.26±4.08	110.38±5.01	109.24±6.13 [*]
	20	116.82±3.42 [*]	93.36±4.12	125.82±4.48 ^{***§}	98.26±3.45	102.92±7.18
HDL cholesterol (mg/dL)	10	40.72±2.22	40.65±2.50	39.93±2.08	42.21±2.68	37.88±1.93
	11	49.67±1.97 [*]	43.80±1.90	47.69±2.21 [*]	50.94±2.73	44.95±1.44 [*]
	20	39.80±2.05 ^{§§}	37.88±2.73	36.32±1.90 ^{§§}	29.68±1.67 ^{§§§}	44.00±1.81
LDL cholesterol (mg/dL)	10	57.10±5.01	49.32±3.97	56.11±4.94	58.56±4.22	46.53±4.75
	11	59.77±2.72	38.08±4.48	61.57±3.40	59.44±3.03	64.29±5.63
	20	77.02±3.20 ^{***§§}	55.47±3.94 [§]	89.50±3.67 ^{***§§}	68.58±4.06	61.21±7.17

Comparison to 10week by Boneferroni multiple comparison method, * : P<0.05, ** : P<0.01
 Comparison to 11week by Boneferroni multiple comparison method, § : P<0.05, §§ : P<0.01

마. 경골 및 요추골의 소주골 면적의 변화

골의 생성 및 소실 정도를 직접적으로 관찰하는 방법으로 M3 및 M6 추출물의 투여에 따른 소주골 면적을 측정된 결과, 경골의 경우 난소를 제거하지 않은 Sham 군은 난소 제거한 대조군 (50.18±3.08 (×10⁴) μm²) 의 약 140%를 나타냈다 (P<0.05). E2 투여군은 대조군의 약 127%로 소주골의 증가를 나타냈으나, M3 군 및 M6 군은 각각 대조군의 90.64% 및 87.96%로 난소 제거로 인한 경골의 소주골 감소를 억제하지 못한 것으로 나타났다. 요추골의 경우 Sham 군은 대조군 (77.27±3.76 (×10⁴) μm²) 의 126%를 나타냈으나 (P<0.01), E2군, M3 군 및 M6 군은 각각 대조군의 107%, 96% 및 98%로 소주골의 증가를 나타내지 않았다 (Fig. 6).

IV. 고 찰

골다공증의 치료제는 크게 두 가지로 나눌 수 있다. 하나는 폐경기 이후의 type I 골다공증 치료제로 흔히 사용되는 estrogen과 같이 파골세포의 활성을 억제시키는 것이고, 다른 하나는 노화로 인한 type II 골다공증에 주로 사용되고 골생성단위(bone modeling unit)의 활성을 증가시키는 것으로 특히 조골세포의 활성을 증가시키는데 목적을 둔 약물이다³⁾⁴⁾. 본 연구에서는 한약 추출물이 조골세포의 활성에 미치는 효과를 검색하고자 유사 조골세포주인 MG-63과 Saos-2 세포주를 선택하여 약물에 의한 세포증식실험을 행하였다. 약물 효과의 비교 물질로 사용한 NaF는 골생성 단위의 활성을 증가시키는 약물로 사용되며, E2는 파골세포의 활성 억제제로 사용된다³⁾⁴⁾. MTT 실험 중 MG-63세포주에서 단일 한약 추출물로는 목단피가 5×10⁻¹ mg/ml에서 약

25%의 조골세포 증식효과가 있었고 각 한약재의 조합이나 배합에서 숙지황+목단피의 추출물이 약 20%, M3는 5×10^5 mg/ml에서 약 20%, M6는 5×10^6 mg/ml에서 약 15%의 증식효과가 있었다 (Fig. 1). Saos-2의 MTT 검색 결과 숙지황은 $5 \times 10^{-4-5}$ mg/ml에서 80~100%, 산수유는 5×10^{-1} mg/ml에서 24%, 산약은 5×10^{-4} mg/ml에서 19%, 목단피는 5×10^{-1} mg/ml에서 20%의 세포증식효과가 있었다. 산수유+산약, 숙지황+목단피는 30-70%의 세포증식효과가 있었고 M3는 5×10^{-4} mg/ml에서 22%, M6는 5×10^{-4} mg/ml에서 45%의 높은 세포증식효과를 나타냈다 (Fig. 2). 또한 ALP의 활성이 숙지황은 5×10^{-2} mg/ml에서 약 100%로 가장 높았고, 산수유는 5×10^{-5} mg/ml에서 약 20%, 산약은 5×10^{-3} mg/ml에서 약 40%, 목단피는 5×10^{-2} mg/ml에서 73%, 숙지황+목단피는 5×10^{-2} mg/ml에서 36%, M6는 5×10^{-5} mg/ml에서 43%의 ALP 활성 증가를 나타내어 MTT 결과와 유사하게 나타났다 (Fig. 3).

위의 실험 결과를 바탕으로 유사조골세포의 세포증식효과가 있는 약물로 M3 및 M6의 추출물로 난소적출 흰쥐 모델을 사용하여 동물실험을 행하였다. M3 및 M6의 투여 용량으로 선택한 건조한약재 5g/kg/day의 용량은 OECD의 독성시험법에서 단일성분의 독성검사에 사용하는 용량이나 실제로 숙지황은 60g/kg을 경구 투여하여도 독성을 나타내지 않았으므로 이를 선택하였고²⁶⁾, 본 연구에서 사용한 양은 경구투여시 약물의 독성을 나타내지 않았다. 먼저 실험 동물의 체중변화를 보면 난소제거 후 체중의 증가가 Sham군에 비해 크게 나타났으며, 이러한 현상은 현재 치료제로 사용되고 있는 estradiol의 투여 (E2군)로 감소된 경향을 보였으나 한약 추출물을 투여한 군들에서는 대조군과 차이 없는 체중의 증가를 나타냈다. 즉 난소제거 후 호르몬의 변화로 체지방이 증가되었고 이러한 현상은 estradiol의 투여로 체지방의 축적을 감소시킬 수 있었으나 한약추출물들은 체지방의 축적에 영향을 미칠 만큼 호르몬의 변화가 크지 않았음을 짐작할 수 있다. 항에스트로젠 효과 (anti-estrogenic effect)의 척도가 될 수 있는 것 중의 하나로서 약물투여 후 자궁 무게의 변화를 관찰

하였다. 자궁의 무게는 Sham군에 비하여 E2군에서 감소하였으나 다른 약물투여군에 비해 증가되었다. 즉 한약추출물의 투여군들에서는 에스트로젠 효과가 나타나지 않았다. 또한 다른 장기들의 무게나 조직학적 연구 결과 약물투여에 따른 변화 및 독성도 나타나지 않았다.

동물실험에서 M3와 M6의 한약추출물 투여군을 비롯한 모든 군에서 수술전과 투여전 그리고 9주간 투여 후에 ALP의 활성이 감소하였다. ALP의 활성은 골대사의 정도를 반영하는 것이지만 실제적으로 혈장의 ALP 농도는 여러 장기들에 대해 모두 영향을 받기 때문에 골조직에서의 ALP 활성을 직접적으로 반영한다고 할 수는 없다. 골대사와 밀접한 관련이 있는 혈장내 칼슘과 무기인산은 동물실험에서 전체적으로 칼슘의 농도에는 변화가 없었으나 무기인산의 농도는 모든 군에서 주령이 증가함에 따라 감소하였다. Type I 골다공증에서는 LDL-cholesterol의 농도가 증가한다는 보고가 있고 또 E2의 투여로 인하여 HDL-cholesterol의 농도가 증가하고 LDL-cholesterol의 농도가 감소한다는 보고²⁹⁾가 있어 혈중 콜레스테롤의 농도를 측정하였다. 그 결과 total cholesterol의 농도는 대조군의 경우 난소제거 전에 비하여 9주간 투여후에 증가되었고 ($P < 0.05$), E2군에서는 난소제거 전과 투여전에 비하여 9주간 투여후에 증가되었으나 (각각 $P < 0.01$, $P < 0.05$), Sham 군과 M3와 M6의 투여군에서는 차이가 없는 것으로 나타났다. 즉 대조군과 E2군에서 total cholesterol의 유의성 있는 증가를 보였다. HDL-cholesterol의 농도는 M3 투여군에서 난소제거 전과 투여 전에 비하여 9주간 투여 후에 감소되었으나 (각각 $P < 0.05$, $P < 0.01$) 다른 군들에서는 변화가 없었다. LDL-cholesterol의 농도는 대조군과 E2군에서 난소제거 전 및 투여 전에 비하여 9주간 투여 후에 증가되었고 (각각 $P < 0.01$ 다른 군들에서는 큰 변화가 없었다. 이로써 난소적출 후에 total cholesterol 및 LDL-cholesterol의 증가현상이 나타났고, 이것은 체지방의 축적에 따른 체중의 증가와도 관련이 있는 것으로 보이며, 다른 보고들에서와는 달리 E2의 투여에 따른 HDL-cholesterol의 증가 및 LDL-cholesterol의 감소

는 나타나지 않았고 오히려 total cholesterol과 LDL-cholesterol의 증가를 보였다.

골량의 변화는 여러 가지 방법으로 측정할 수 있으나, 본 연구에서는 소주골 면적을 측정하였다. 골의 형태조직학적 측정 실험으로 경골과 요추골의 소주골의 면적 변화를 측정한 결과 Sham군에 비해 대조군의 경골 및 요추골의 소주골 면적이 모두 크게 감소되어 있었고 (P<0.01), 이것은 폐경기 이후 호르몬의 변화에 따른 골량의 감소를 반영한다고 하겠다. Sham 군과 E2 군을 제외한 대조군 및 한약 투여군에서의 소주골의 면적은 비슷하여 한약의 투여에 따른 골량의 증가는 나타나지 않았다.

이전의 다른 보고에서 육미지황탕 (전탕액)을 난소 제거 백서에 투여한 경우, 난소제거 대조군과 비교하여 경골 회분의 무게가 증가되었다는 보고가 있었으나²⁴⁾, 본 연구에서는 육미지황환의 처방을 산업적으로 개발하고자 약물의 추출시 80% 에탄올로 추출하여 실험에 사용하였고 육미지황환 에탄올 추출물의 투여로 인한 경골의 무게 차이는 없었다.

위의 결과들을 종합하여 볼 때 유사 조골세포의 세포증식효과와 같이 *in vitro*의 결과가 반드시 생체에서 골량의 증가효과와 일치하는 것은 아니며, 호르몬 대체 요법에 사용되는 에스트로겐의 투여는 폐경기 이후의 골다공증에서 소주골의 증가효과가 있는 반면 자궁의 무게를 증가시키는 부작용을 가지는 것으로 나타났으나, 본 연구에서 사용한 M3와 M6 추출물은 조골세포의 활성 증가효과가 우수하고, 에스트로겐의 역효과인 자궁 비대 현상은 없었다. 그러나 본 연구에서 가장 중요하다고 생각되는 골량의 증가를 나타내지는 못하였다.

따라서 육미지황환의 에탄올 추출물은 본 연구에서 실행한 type I 골다공증 유발 모델인 난소적출 흰쥐에 대해서는 골다공증 개선 효과가 없었으며, 이는 골다공증 치료제로는 적합하지 않다고 사료된다.

참고문헌

- 1) Gillespy III, T. and Gillespy, M. P. 「Osteoporosis」, 『Radiol. Clin. North America』 1991; Vol.29: 77-84.
- 2) Kalu, D. N. 「Evolution of the pathogenesis of postmenopausal bone loss」, 『Bone』1995; Vol.17: 135S-144S.
- 3) Wark, J. D. 「Osteoporotic fractures: background and prevention strategies」, 『Maturitas』1996; Vol.23: 193-207.
- 4) Scrip. 『Scrip's osteoporosis report. Osteoporosis: research, markets, trends and opportunities』Surrey, U. K.: PJB Publications Ltd., 1994.
- 5) Lian, J. B. et. al. 『Primer on the metabolic bone disease and disorder of mineral metabolism』 4th ed. Philadelphia, U. S. A.: Lippincott Williams & Wilkins, 1999.
- 6) Finkenstedt, G., Gasser, R. W., H fle, G., Wafah, C. and Fridrich, L. 「Effects of growth hormone replacement on bone metabolism and mineral density in adult onset of GH deficiency: results of a double-blind placebo-controlled study with open follow-up」, 『Eur. J. Endocrinol.』1997; Vol.136: 282-289.
- 7) 錢乙. 『小兒藥證直訣』 江蘇科技. 江蘇省(중국), 1983: pp.47-48
- 8) 汪詡庵. 『醫方集解』 文光圖書有限公司, 대만, 민국75. pp.1-4
- 9) Carmichael, J., DeGraff, W. G., Gazdar, A. F., Minna, J. D., and Mitchell, J. B. 「Evaluation of a terazolium-based semiautomated colorimetric assay assessment of chemosensitit testing」, 『Cancer Res.』1987; Vol.47: 936-942.
- 10) Sabokbar, A., Millett, P. J., Myer, B. and Rushton, N. 「A rapid, quantitative assay for measuring alkaline phosphatase activity in osteoblastic cells in vitro」, 『Bone Miner.』1994; Vol.27: 57-67.
- 11) Bessey, O. A., Lowry, O. H. and Brock, M. J. 「A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum」, 『J. Biol. Chem.』 1946; Vol.164: 321-332.

[색인어] 골다공증, 조골세포, 난소제거 흰쥐, 육미지황환

- 12) Nordin, B. E., Heyburn, P. J., Peacock, M. et al. 「Osteoporosis and osteomalacia」. 『Clin Endocrinol. Metab.』 1980; Vol.9: 177-205.
- 13) Moorehead, W. R. and Briggs, H. C. 「2-Amino-2-methyl-1-propanol as the alkalinizing agent in an improved continuous-flow cresolphthalein complexone procedure for calcium in serum」. 『Clin. Chem.』 1974; Vol.20: 1458-1460.
- 14) Knoll, M. H. and Elin, R. J. 「Mechanism of cefoxitin and cephalthrin interference with the Jaffe method for creatinine」. 『Clin. Chem.』 1983; Vol.29: 2044-2048.
- 15) Wang, J., Chen, C. C. and Osaki, S. 「Optimization of the phosphorus-UV reagent」. 『Clin. Chem.』 1983; Vol.29: 1255.
- 16) Tiffany, T. O., Jansen, J. M., Burtis, C. A., Overton, J. B. and Scott, C. D. 「Enzymatic kinetic rate and endpoint analysis of substrate by use of a GeMsaec fast analyzer」. 『Clin. Chem.』 1972; Vol.18: 829-840.
- 17) Allain, C. C., Poon, L. S., Chan, C. S. G., Richmond, W. and Fu, P. C. 「Enzymatic determination of total serum cholesterol」. 『Clin. Chem.』 1974; Vol.20: 470-475.
- 18) Demacher, P. N. M., Hijmans, A. G. M., et al. 「Measurement of high-density lipoprotein cholesterol in serum: comparison of six isolation methods combined with enzymatic cholesterol analysis」. 『Clin. Chem.』 1980; Vol.26: 1780-1786.
- 19) Allen, J. K., Hensley, W. J., et al. 「An enzymatic and centrifugal method for estimating high-density lipoprotein cholesterol」. 『Clin. Chem.』 1979; Vol.25: 325-327.
- 20) Warnick, G. K., Nguyen, W. J. and Albers, A. A. 「Comparison of improved precipitation methods for quantification of high-density lipoprotein cholesterol」. 『Clin. Chem.』 1985; Vol.31: 217.
- 21) Kim, C., Kim, J. S., Kim, Y. T. and Song, K. Y. 「Effects of herbal medicine on tibia bone changes in ovariectomized rats and SAM P6 mice」. 『Yakhak Hoeji』 1998; Vol.42: 220-228.
- 22) Rosner, B. 『Fundamentals of biostatistics』, Boston, MA, U.S.A.: PWS-Kent Co., 1990.
- 23) Bryant, H. U. and Dere, W. H. 「Selective estrogen receptor modulators: an alternative to hormone replacement therapy」. 『Proc. Soc. Exp. Bio. Med.』 1998; Vol.217: 45-52.
- 24) 이상근. 「사물탕과 육미지황탕이 난소적출로 유도된 백서의 골다공증에 미치는 영향」. 경산대 박사학위논문, 1996.
- 25) 왕유생. 『중약약리여응용』 인민위생출판사, 북경, 중국, 1983.