

羌活續斷湯이 骨細胞 機能에 미치는 影響

이택준¹⁾ · 홍지우¹⁾ · 최현주²⁾ · 길인호¹⁾ · 정선충¹⁾ · 황귀서³⁾ · 이기남²⁾

¹⁾원광대학교 대학원 한의학과, ²⁾원광대학교 한의학전문대학원 제3의학과,
³⁾경원대학교 한의학과

Effects of Kangwhal-Sokdantang Extract on Osteoblast Function

Taek-Jun Lee,¹⁾ Ji-Woo Hong,¹⁾ Hyun-Ju Choi,²⁾ In-Ho Gil,¹⁾
Sun-Chung Jeong,¹⁾ Gui-Seo Hwang³⁾ & Ki-Nam Lee²⁾

¹⁾Dept. of Oriental Medicine, Graduate School, Wonkwang University

²⁾Dept. of Third Medicine, Professional Graduate School of Oriental Medicine, Wonkwang University

³⁾Dept. of Oriental Medicine, Kyungwon University

Abstract

This study was performed to evaluate the effect of Kangwhal-Sokdan tang(KS) on osteoblast function and gene expression. The osteoblast separated from the murine calvariae and MG-63 cell were cultivated to evaluate the cell function and gene expression.

The results were summarized as follows.

- 1) KS increased cell proliferation of murine calvarial cell.
- 2) KS increased protein synthesis, collagen synthesis and ALP activity of murine calvarial cell.
- 3) KS increased the survival rate of murine calvarial cell.
- 4) KS increased the expression of calcitonin receptor and PTH receptor.
- 5) KS increased the expression of PKA and PKC.
- 6) KS decreased the expression of PLA₂, COX, PGE₂ synthase, but increased prostacyclin synthase.
- 7) KS increased the expression of collagen(type IV) gene.

* Corresponding author : Teak-Jun Lee, Dept. of Third Medicine, Professional Graduate School of Oriental Medicine, Wonkwang University Tel : 82-63-850-6836. E-Mail : kinaml@wonkwang.ac.kr

It is concluded that KS might improve the osteoporosis resulted from augmentation of osteoblast proliferation and gene expression.

Key words : Kangwhal-Sokdintang Extract, Osteoblast Function

I. 서론

골다공증은 골의 구성성분의 양적 감소를 주된 병변으로하는 대사성 골질환으로 그 기전은 골형성과 골흡수의 균형이 파괴되어 나타난다.^(1,2) 골다공증은 여러가지 원인에 의해 유발되는데, 노화, 당뇨, 스트레스, 약물의 남용, 난소기능의 감소 등이 알려져 있다. 골다공증의 공통적인 현상은 골상의 밀도가 감소된 상태에 있으며, 이는 골원이 차지하는 공간과 피질두께가 감소하는 것과 관련이 있다.⁽³⁻⁵⁾ 조직학적으로는 피질두께의 감소와 해면골(cancellous bone)의 소주(trabeculae)의 수나 크기의 감소가 관찰된다.

韓醫學에서 骨은 腎과 밀접한 관계가 있다고 보는데 <素問.平人氣象論>에서 “藏眞下于腎, 腎藏骨髓之氣也”이라 하여 五臟의 眞氣가 腎으로 내려가 腎은 이 骨髓의 氣를 저장한다⁽⁶⁾고 하였고, <素問.逆調論>에서 “腎者水也, 而生于骨, 腎不生即髓不能滿”이라 하여 腎은 五行중에 水에 속하며 骨을 生하는데 腎이 骨을 生하지 못하면 骨髓는 充만할 수 없다고 하여 腎이 骨대사를 주관한다⁽⁷⁾고 하였다. 따라서 腎이 虛弱해지면 骨과 骨髓도 약해지며 골다공증이 유발되는 것으로 볼 수 있다.

강활속단탕은 동의보감 외형편에 수재된 처방으로 “腰背痛者 皆是腎氣虛弱 臥冷濕當風得之不時速治 喜流入脚膝或爲偏枯冷痺 緩弱疼重若有腰痛攣 脚重痺 急宜服之”이라 하여 腎氣虛弱

으로 인한 腰背痛과 風寒濕 邪氣의 侵襲으로 인한 腰膝의 痺痛에 적용할 수 있다⁽⁸⁾고 하였다. 따라서 강활속단탕의 腎氣를 補하는 治法이 골다공증 치료의 韓醫學的 접근방법과 부합된다고 판단되어, 강활속단탕의 골다공증 치료 가능성을 측정하기 위한 연구를 수행하였다.

이 연구에서는 강활속단탕의 골다공증에 미치는 영향을 검색하고자 골 형성을 촉진할 수 있는 조골세포 분열능 및 조골세포에 의한 단백질의 생합성능, ALP 활성, collagen 생합성에 미치는 영향을 측정하였다. 또한 강활속단탕에 의한 골세포 생존률과 조골세포에 의해 생성되는 칼슘화된 nodule에 미치는 영향에 대하여 측정하여 유의적인 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

1) 동물

실험동물은 암컷 S.D. 랫드를 대한 바이오링크에서 구입하여 실험실에 적응시킨 후 사용하였다. 실험기간동안 고품사료와 물을 충분히 공급하여 자유롭게 섭취하도록 하였다.

2) 약제

약제는 시중에서 구입하여 정선한 것을 세절하여 실험에 사용하였다. 羌活續斷湯(KS)의 처방내용(동의보감에 수재)은 다음과 같다.

韓藥材	生藥名	用量
羌活	Rhizoma Notopterigii	2g×3
防風	Radix Saposhnikoviae	2g×3
白芷	Radix Angelicae Dahuricae	2g×3
細辛	Herba Asari	2g×3
杜仲	Cortex Eucommiae	2g×3
牛膝	Radix Achyranthis Bidentatae	2g×3
莖朮	Radix Gentianae Macrophyllae	2g×3
續斷	Radix Dipsaci	2g×3
熟地黃	Radix Rehmanniae Preparata	2g×3
當歸	Radix Angelicae Sinens	2g×3
人蔘	Radix Ginseng	2g×3
白芍藥	Radix Paeoniae Alba	2g×3
赤茯苓	Poria	2g×3
桂心	Ramulus Cinnamomi	2g×3
川芎	Radix Chuanxiong	2g×3
生薑	Rhizoma Zingiberis	10g
		100g

(4)에 10ug/ml의 KS를 첨가한 군(KS10-d)으로 나누어 시행하였다.

2. 방법

1) 검액제조

KS 약재 100g을 3차증류수 1,000ml를 가하고 6시간 이상 가열하여 환류추출하였다. 여과지를 이용하여 여과한 다음, 여액을 Evaporator (EYERA, Japan)을 이용하여 감압 농축한 다음 농축액을 동결건조하여 실험시까지 냉동보관하였다. 수득한 검액은 12.1g(12.1%) 이었다. 실험시에는 검액(KS 추출분말)을 배지에 녹인 후 pore size 0,45um 의 여과지를 통과시킨 후 사용하였다.

2) 약물첨가

실험은 6개군, 즉 (1) 정상군(NC), (2) 정상군에 1 ug/ml의 KS를 첨가한 군(KS1), (3) 정상군에 10 ug/ml의 KS를 첨가한 군(KS10), (4) 정상군에 prednisolone을 처리한 군(OC), (5) (4)에 1 ug/ml의 KS를 첨가한 군(KS1-d), (6)

3) Fetal calvarial cell culture(FCS)

임신 21일 된 쥐의 자궁을 절개하여 fetus를 꺼낸 후, 후두부를 절개하고 calvarie를 적출하였다. calvarie에 붙어있는 결체조직을 제거하고, HBSS로 세척했다. calvarie를 1.5ml의 collagenase, trypsin, 0.5mM EDTA 용액에 넣어 37℃에서 반응시켰다. 상등액을 취하여 500 rpm에서 원심분리하여 침전된 calvarial cell을 얻었다. PBS에 재현탁하여 1500 rpm에서 원심분리하여 세척한 후, 이를 DMEM 배지에 넣어 현탁한 후 37℃, 5% CO₂에서 배양하였다. 상등액을 제거하고 남은 calvarie에 다시 1.5ml의 효소를 넣고, 위 반응을 수회 반복하였다. 세포의 배지는 3일에 한 번씩 교환하였다. 배양한 세포는 2주후 Trypsin처리하여 세포수를 측정한 후 실험에 사용하였다.

4) 골세포의 분열능 측정

FCS의 경우 $1-3 \times 10^5$ /well로 seeding 하였으며, 배양한 세포의 수를 세기 위하여 세포의 배지를 제거하고, HBSS로 세포를 세척하였다. 이후 collagenase, trypsin, 0.5 mM EDTA를 가하여 세포를 culture plate로부터 분리하였다. 세포를 Isoton- 2 solution을 이용하여 20배 희석한 후 세포계수기(sysmax F-820)로 세포의 수를 측정하였다.

5) Alkaline phosphatase 활성 측정

Cell을 배양한 plate를 냉각한 PBS로 세척한 후 cell을 scraper로 긁어 내어 Leupeptin이 함유된 냉각한 PBS에 현탁하였다. 이 현탁액을 냉각상태에서 ultrasonicator로 sonication한 후 3000 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 원심분리후 상등액을 취하여 0.56 M 2-amino-2-methyl-propanol, 1mM MgCl₂, 10 mM p-nitrophenylphosphate를 함유한 반응액과 37°C에서 10분간 반응시켰다. 0.2 N NaOH 1 ml를 가하여 반응을 중단시킨 후 405nm에서 흡광도를 측정하였다.

6) Collagen 합성량 측정

Cell을 배양한 plate를 PBS로 세척한 후 cell scraper를 이용해 세포를 긁어내었다. 이를 5mM dithiothreitol이 함유된 50mM Tris buffer에 현탁시킨 후 ultrasonicator로 sonication 시켰다. 이후, 100,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 상등액을 제거한 후 pellet에 6 N HCl을 가하여 24 시간동안 100°C에서 가수분해하였다. 이를 조심스럽게 6 N NaOH로 중화시킨 후, 물을 이용하여 적정한 농도로 희석하였다. Hydroxy-proline은 amino acid analyzer를 이용하여 정량하였다.

7) Calcified Nodule 의 측정

세포를 21일간 배양한 후 냉각한 PBS로 세척하였다. Neutral buffered formalin (100ml Formalin, 16g Na₂HPO₄, 4g NaH₂PO₄·H₂O in 1L)를 가하고, 15분간 고정시킨 후, PBS로 세척하였다. Von Kossa's reagent(2.5% silver nitrate in H₂O)를 가하여 상온에서 30분간 반응시켰다. 다시 세척한 후 toluidine blue solution (0.1%w/v in 30% v/v ethanol)을 가하여 수초간 반응시킨 후 PBS로 세척하고, 이를 공기중에서 건조하였다. 형성된 nodule 의 면적을 image analyser를 사용하여 측정하였다.

8) 조골세포의 유전자발현에 미치는 영향

(1) MG-63 Cell의 배양

인간의 골에서 얻은 Cell-line인 MG-63을 급속히 해동시킨 후, 10% FBS가 포함된 DMEM 배지(SM-PC, fungizone 포함)에 배양하였다. 7일간 배양 후 세포를 수거한 다음, 세포 수 6×10^6 cell/ml 이 되도록 현탁 시켜 4시간 배양하였다. KS 추출물을 배지에 녹인 후 0.45um pore size를 가진 membrane filter에 통과시킨 시험용 sample을 배양된 세포에 50ug/ml의 농도가 되도록 첨가하여 15시간 배양하였다. 여기에 대조군에는 샘플 Cy3를, 시험군에는 Cy5를 50ug/ml이 되도록 처리한 다음 10시간을 추가 배양하였다.

(2) tRNA(total RNA) 분리

RNA를 분리하기 위하여 배양세포의 배지를 제거한 다음, 4°C PBS로 3회 washing 하였다. 세포를 모은 다음, 750 rpm에서 10분간 원심분리한 다음, ice cold PBS로 2회 씻었다. 침전된 세포에 lysis buffer를 가하여 용해시킨 다음, 12,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 상층액을 취하였다. 다시 1M sucrose가 함유된

Tris buffer 위에 loading한 다음, 36,000 rpm에서 160분간 원심분리 하였다. Polysome pellet을 취하여 SDS buffer에 녹인 후, 37°C에서 30분간 incubation 시켰다. Sod. Acetate buffer를 가한 다음, phenol/CsKl₃ 용액으로 추출하였다. NaCl을 0.2M이 되도록 가한 다음, EtOH를 가한 후 -20°C에서 12시간 보관하였다. 침전물을 75% EtOH로 2회 washing한 다음 건조시켰다. 유전자 발현에 필요한 RNA양을 대조군과 시험군에서 mRNA양이 같도록 조정한 다음, 전기영동으로 확인하여 사용하였다.

(3) cDNA 製造

대조군 및 시험군에서 각각 분리한 total RNA 액(13ug RNA 함유)에 oligo dT 1ul을 넣은 후 조심스럽게 혼합한 다음, 70°C에서 5분간 incubation하였다. primer가 annealing 하도록 실온에서 약 10분간 방치한 다음, cyscript buffer, 0.1M DTT, dUTP nucleotide, dUTP Cydye-labelled nucleotide, Cyscript reverse transcriptase을 첨가한 후, 아주 조심스럽게 혼합하였다. 이 후, 42°C에서 90분간 incubation한 후, 얼음상에 방치하였다. 여기에 2.5M NaOH을 가한 후 37°C에서 15분간 incubation하였으며, 2M HEPES buffer를 추가하여 중화시켰다.

(4) cDNA의 정제

製造된 cDNA 액을 GFX column상에 loading한 다음, capture buffer와 washing soln을 사용하여 elution시켰다. Cy3-, Cy5- labelled cDNA 양을 각각 60ul 만큼 elution하였다.

(5) 유전자 발현의 확인 및 정량

각각의 Cy3-, Cy5- labelled cDNA를 speed vacuum container에 3시간 동안 건조한 다음, nuclease free water에 녹였다. 95°C에서 가열한 다음, 곧바로 얼음상에 30초 이상 방치하였다.

여기에 hybridization buffer와 100% formamide를 가한 후 조심스럽게 섞었다. 혼합된 액을 microarray slide와 cover slip 사이에 loading하였다. cDNA가 loading된 microarray slide를 hybridization chamber에 넣고 42°C에서 18시간 동안 incubation하였다. microarray slide를 SDS가 함유된 55°C로 가온된 SSC(saline, SDS, citrate)buffer에 넣어 55°C에서 10분간 2회 washing하였다. 다시 희석한 SSC buffer로 상온에서 10분간 washing한 다음, 1,000rpm에서 2분간 원심 분리하였다. 테스케이터에 1시간 방치하여 건조한 다음, scanner에 넣고 발현된 mRNA양을 측정하였다.

3. 통계처리

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

III. 결 과

1. 골세포에 미치는 영향

1) 조골세포 분열능에 미치는 영향

랫드 태자의 두개골로부터 분리한 골세포를 10일간 배양한 결과, 정상 세포는 5×10^5 /well 이었으며, 1ug/ml의 KS를 처리한 경우에는 2.1×10^5 /well 로서 유의적인 감소를 나타내었다. 10ug/ml의 KS를 처리한 경우에는 7.6×10^5 /well 로서 정상에 비해 增加하였다. 프레드니솔론을 함께 처리한 두개골 세포는 2.8×10^5 /well 로서, 정상군에 비해 현저히 저하됨이 관찰되어 조골세포의 기능을 억제하는 것으로 나타났다. 프레드니솔론에 의해 감소한 두개골 세포의 분열능은 1ug/ml의 KS를 처리한 경우에는 7.6×10^5 /well 로서 유의적인 增加를 나타내었다. 10ug/ml의 KS를 처리한 경우에도 7.6×10^5 /well 로서

역시 프레드니솔론에 의해 減少한 분열능을 유의하게 增加시켰다($p < 0.01$).

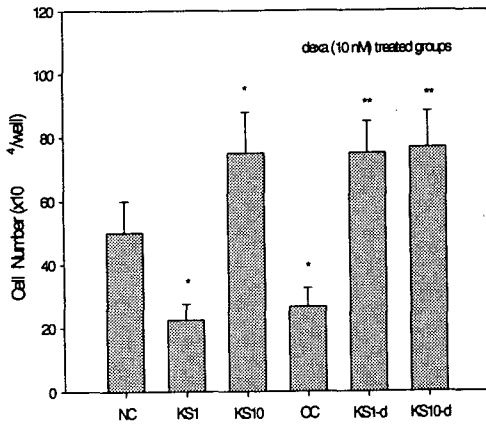


Fig. 1. Effect of KS on cell proliferation of murine calvarial cell. Cells were counted in 10 days after KS treatment. Each bars represents the mean \pm S.D. of 6 wells.

NC : vehicle

KS 1 : 1 ug/ml of KS

KS10 : 10 ug/ml of KS

OC : vehicle + prednisolone

KS1-d : 1ug/ml of KS + prednisolone

KS10-d : 10ug/ml of KS + prednisolone

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$

2) 단백질 합성에 미치는 영향

랫드 태자의 두개골로부터 분리한 골세포를 10일간 배양한 결과, 정상 세포가 생성하는 단백질량은 3.5g/dl이었으며, 1ug/ml의 KS를 처리한 경우에는 3.48g/dl로서 변화를 주지 못했다. 10ug/ml의 KS를 처리한 경우에는 3.6g/dl로서 정상에 비해 약간 增加하는 경향을 나타내었다. 프레드니솔론을 함께 처리한 두개골 세포에서의 단백질 총량은 2.95g/dl로서, 정상군에 비해 현저히 저하됨이 관찰되어 조골세포에서 생성하는 단백질의 기능을 억제하는 것으로 나타났다. 프레드니솔론에 의해 감소한 두개

골 세포의 기능억제는 1ug/ml의 KS를 처리한 경우에서의 단백질 생합성량이 3.30g/dl로서 프레드니솔론 처리군에 비해 유의적인 增加를 나타내었다. 또한, 10ug/ml의 KS를 처리한 경우에는 3.72g/dl로서 역시 프레드니솔론에 의해 減少한 단백질 생합성량을 유의하게 增加시켰다($p < 0.01$).

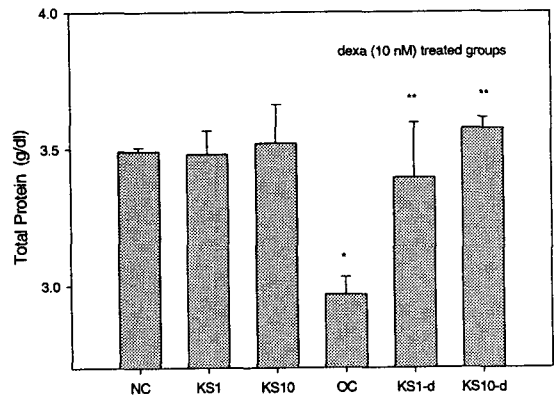


Fig. 2. Effects of KS on protein synthesis of murine calvarial cell. Total protein were determined in 10 days after KS treatment. Each bars represents the mean \pm S.D. of 6 wells.

NC : vehicle

KS 1 : 1 ug/ml of KS

KS10 : 10 ug/ml of KS

OC : vehicle + prednisolone

KS1-d : 1ug/ml of KS + prednisolone

KS10-d : 10ug/ml of KS + prednisolone

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$

3) ALP의 활성화에 미치는 영향

랫드 태자의 두개골로부터 분리한 골세포를 10일 간 배양한 결과, 정상 세포에서의 ALP 활성은 13 unit/ml이었으며, 1ug/ml의 KS를 처리한 경우에는 16.5unit/ml로서 유의적인 增加를 나타내었다. 10ug/ml의 KS를 처리한 경우에도 17.5unit/ml로서 정상에 비해 增加하였다.

프레드니솔론을 함께 처리한 두개골 세포에서의 ALP 활성은 8.8unit/ml로서, 정상군에 비해 현저히 저하됨이 관찰되어 조골세포의 기능을 억제시키는 것으로 나타났다. 프레드니솔론에 의해 감소한 두개골 세포의 ALP 활성은 1ug/ml의 KS를 처리한 경우에는 17.4unit/ml, 10ug/ml의 KS를 처리한 경우에는 15.1unit/ml로서 프레드니솔론에 의해 減少한 ALP 활성을 유의하게 증가시켰다(p<0.01).

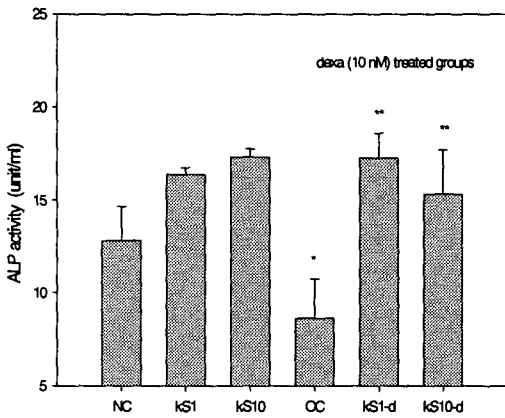


Fig. 3. Effect of KS on alkaline phosphatase activity of murine calvarial cell. Alkaline phosphatase activity was determined in 8 days after KS treatment. Each bars represents the mean \pm S.D. of 6 wells.

NC : vehicle
 KS 1 : 1 ug/ml of KS
 KS10 : 10 ug/ml of KS
 OC : vehicle + prednisolone
 KS1-d : 1ug/ml of KS + prednisolone
 KS10-d : 10ug/ml of KS + prednisolone
 * : p < 0.05, ** : p < 0.01

4) Collagen 생합성에 미치는 영향

랫드 태자의 두개골로부터 분리한 골세포를 10일간 배양한 결과, 정상 세포에서의 collagen 생합성량은 140ug/well 이었으며, 1ug/ml의 KS

를 처리한 경우에는 133ug/well 로서 약간 감소하는 경향을 나타내었다. 10ug/ml의 KS를 처리한 경우에도 142ug/well로서 거의 변화를 나타내지 못했다. 프레드니솔론을 함께 처리한 두개골 세포에서의 collagen 합성량은 110ug/well로서, 정상군에 비해 현저히 저하됨이 관찰되어 조골세포의 기능을 억제시키는 것으로 나타났다. 프레드니솔론에 의해 감소한 두개골 세포의 collagen 합성량은 1ug/ml의 KS를 처리한 경우에는 122ug/well, 10ug/ml의 KS를 처리한 경우에는 155ug/well 로서 프레드니솔론에 의해 減少한 collagen 합성량을 유의하게 증가시켰다 (p<0.01).

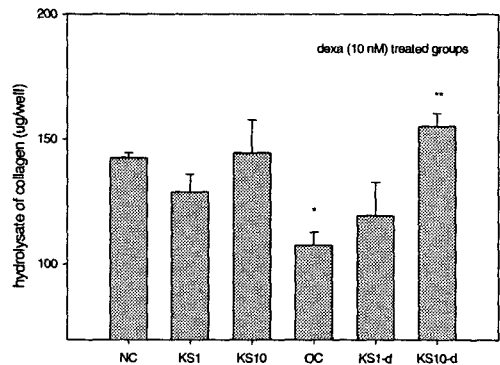


Fig. 4. Effects of KS on collagen synthesis of murine calvarial cell. Collagen synthesis was determined in 10 days after KS treatment. Each bars represents the mean \pm S.D. of 6 wells.

NC : vehicle
 KS 1 : 1 ug/ml of KS
 KS10 : 10 ug/ml of KS
 OC : vehicle + prednisolone
 KS1-d : 1ug/ml of KS + prednisolone
 KS10-d : 10ug/ml of KS + prednisolone
 * : p < 0.05, ** : p < 0.01

5) Cell Apoptosis에 미치는 영향

랫드 태자의 두개골로부터 분리한 골세포를 10일간 배양한 결과, 정상 세포에서의 생존률은 0.50 이었으며, 1ug/ml의 KS를 처리한 경우에는 0.52으로서 유의적인 증가를 나타내었다. 10ug/ml의 KS를 처리한 경우에는 0.62로서 정상에 비해 증가하였다. 프레드니솔론을 함께 처리한 두개골 세포에서의 생존률은 0.39로서, 정상군에 비해 현저히 저하됨이 관찰되어 조골세포의 기능을 억제시키는 것으로 나타났다. 프레드니솔론에 의해 감소한 두개골 세포의 생존률은 1ug/ml의 KS를 처리한 경우에는 0.58, 10ug/ml의 KS를 처리한 경우에는 0.59로서 프레드니솔론에 의해 減少한 생존률을 유의하게 증가시켰다(p<0.01).

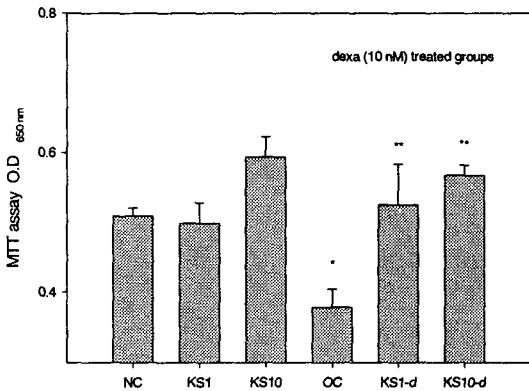


Fig. 5. The Apoptosis of murine calvarial cell in the presence of KS. Cell viability was measured by MTT assay. Each bars represents the mean ± S.D. of 6 wells.

NC : vehicle
 KS 1 : 1 ug/ml of KS
 KS10 : 10 ug/ml of KS
 OC : vehicle + prednisolone
 KS1-d : 1ug/ml of KS + prednisolone
 KS10-d : 10ug/ml of KS + prednisolone
 * : p < 0.05, ** : p < 0.01

6) 칼슘 침착 능력에 미치는 영향

랫드 태자의 두개골로부터 분리한 골세포를 10일간 배양한 결과 정상군에서 2.97mm²/well의 칼슘화된 nodule area를 형성하였고, 1ug/ml의 KS를 처리한 경우에는 2.95mm²/well, 10ug/ml의 KS를 처리한 경우에는 3.31mm²/well의 칼슘화된 nodule area를 형성하여 칼슘 침착에 의한 nodule 생성을 증가시키는 경향을 나타내었다.

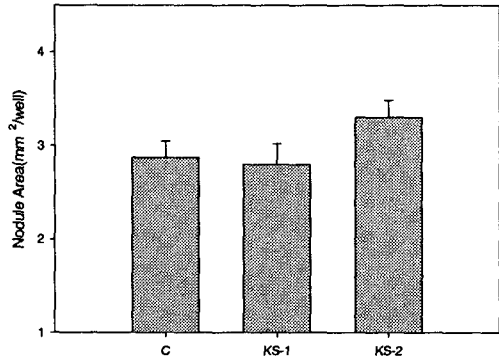


Fig. 6. The Nodule formation of murine calvarial cell in the presence of KS. Each bars represents the mean ± S.D. of 6 wells.

C : vehicle
 KS 1 : 1 ug/ml of KS
 KS10 : 10 ug/ml of KS

2. 골세포의 유전자 발현에 미치는 영향

1) Vitamin D3 수용체의 발현에 미치는 영향
 골세포에서 Vitamin D₃ 수용체의 유전자 발현은 유전자에 함유된 fluorescence 량을 측정하여 결정하였다. 실험결과, 대조군의 유전자량은 1.240±0.050이었으며, KS를 첨가하여 배양한 군에서 얻은 유전자의 양은 1.317±0.033로 KS는 Vitamin D₃ 수용체 유전자 발현에 유의적인 영향을 주지 못했다.

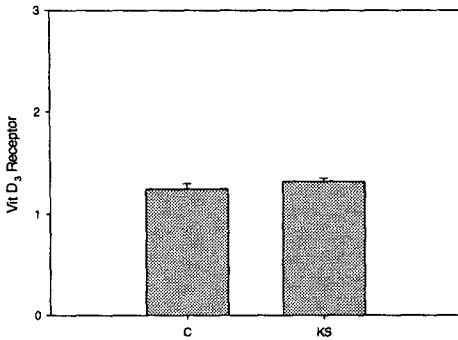


Fig. 7. Effect of KS on Expression of Vitamin D3 Receptor Gene in MG-63 Cell-line. Gene expression was represented as a fluorescence of Cy incorporated into mRNA.
C : Vehicle
KS : 50ug/ml of KS Extract

2) PTH receptor 유전자 발현에 미치는 영향
골세포에서 PTH receptor 유전자 발현은 유전자에 함유된 fluorescence 량을 측정하여 결정하였다. 실험결과, 대조군의 유전자 양은 0.905 ± 0.020 이었으며, KS를 첨가하여 배양한 군에서 얻은 유전자의 양은 1.191 ± 0.054 로, KS는 PTH Receptor 유전자 발현을 유의하게 증가시켰다($p < 0.01$).

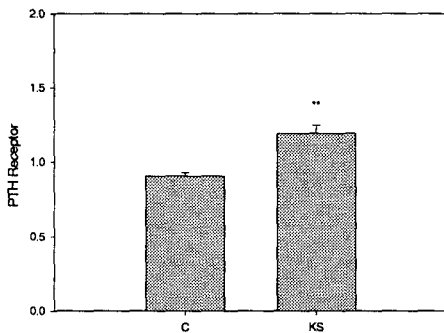


Fig. 8. Effect of KS on Expression of Parathyroid Hormone(PTH) Receptor Gene in MG-63 Cell-line. Gene expression was represented as a fluorescence of Cy incorporated into mRNA.
C : Vehicle
KS : 50ug/ml of KS Extract
** : $p < 0.01$ vs C

3) Calcitonin 수용체 유전자 발현에 미치는 영향

골세포에서 calcitonin receptor 유전자 발현은 유전자에 함유된 fluorescence 량을 측정하여 결정하였다. 실험결과, 대조군의 유전자 양은 0.108 ± 0.006 이었으며, KS를 첨가하여 배양한 군에서 얻은 유전자의 양은 0.118 ± 0.005 로, KS를 calcitonin Receptor 유전자 발현을 유의하게 억제하였다($p < 0.01$).

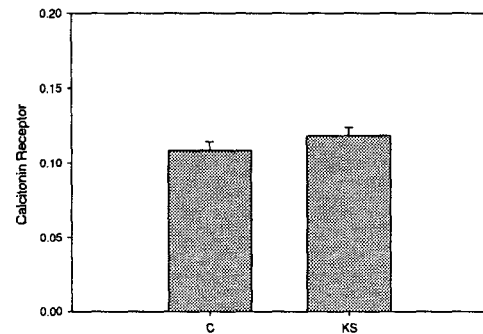


Fig. 9. Effect of KS on Expression of Calcitonin receptor Gene in MG-63 Cell-line. Gene expression was represented as a fluorescence of Cy incorporated into mRNA.
C : Vehicle
KS : 50ug/ml of KS Extract
** : $p < 0.01$ vs C

4) PKA(Protein Kinase A) 유전자 발현에 미치는 영향

골세포에서 PKA 유전자 발현은 유전자에 함유된 fluorescence 량을 측정하여 결정하였다. 실험결과, 대조군(C)의 유전자 양은 3.022 ± 0.131 이었으며, KS를 첨가하여 배양한 군에서 얻은 유전자의 양은 3.185 ± 0.175 으로, KS를 PKA 유전자 발현을 유의적으로 증가시켰다($p < 0.01$).

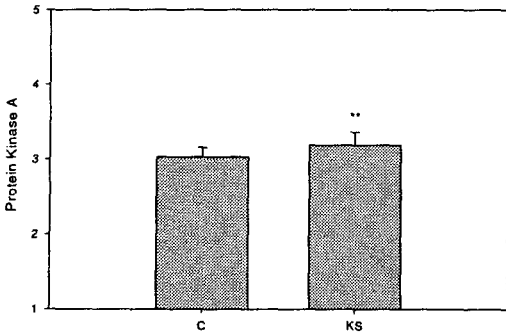


Fig. 10. Effect of KS on Expression of Protein Kinase A Gene in MG-63 Cell-line. Gene expression was represented as a fluorescence of Cy incorporated into mRNA.
 C : Vehicle
 KS : 50ug/ml of KS Extract
 **: p<0.01 vs C

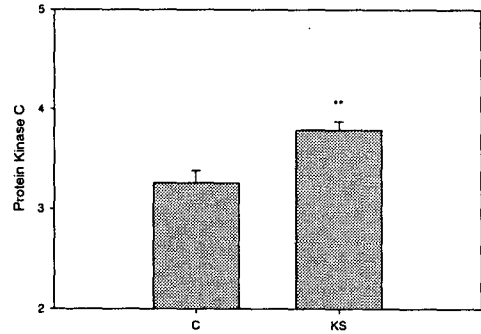


Fig. 11. Effect of KS on Expression of Protein Kinase A Gene in MG-63 Cell-line. Gene expression was represented as a fluorescence of Cy incorporated into mRNA.
 C : Vehicle
 KS : 50ug/ml of KS Extract
 **: p<0.01 vs C

5) PKC(Protein Kinase C) 유전자 발현에 미치는 영향

골세포에서 PKC 유전자 발현은 유전자에 함유된 fluorescence 량을 측정하여 결정하였다. 실험결과, 대조군(C)의 유전자 양은 3.259 ± 0.123 이었으며, KS를 첨가하여 배양한 군에서 얻은 유전자의 양은 3.791 ± 0.082 으로, KS를 PKC 유전자 발현을 유의하게 증가시켰다($p < 0.01$).

6) PLA2 (phospholipase A₂) 유전자 발현에 미치는 영향

골세포에서 PLA₂ 유전자 발현은 유전자에 함유된 fluorescence 량을 측정하여 결정하였다. 실험결과, 대조군의 유전자 양(C)은 1.979 ± 0.072 이었으며, KS를 첨가하여 배양한 군에서 얻은 유전자의 양은 1.758 ± 0.062 로, KS를 PLA₂ 유전자 발현을 유의하게 억제하였다($p < 0.05$).

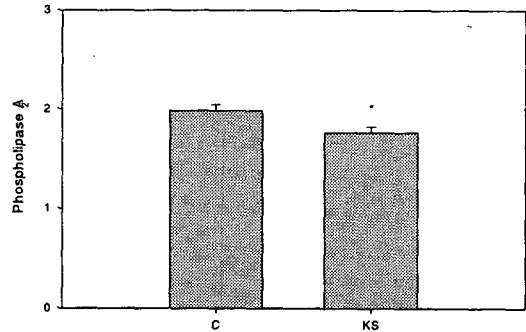


Fig. 12. Effect of KS on Expression of Phospholipase A2 (PLA₂) Gene in MG-63 Cell-line. Gene expression was represented as a fluorescence of Cy incorporated into mRNA.
 C : Vehicle
 KS : 50ug/ml of KS Extract
 *: p<0.05 vs C

7) COX (cyclooxygenase) 유전자 발현에 미치는 영향

골세포에서 COX 유전자 발현은 유전자에 함유된 fluorescence량을 측정하여 결정하였다. 실험결과, 대조군의 유전자 양(C)은 0.145 ± 0.010 이었으며, KS를 첨가하여 배양한 군에서 얻은 유전자의 양은 0.095 ± 0.004 로, KS를 COX 유전자 발현을 유의하게 억제하였다($p < 0.05$).

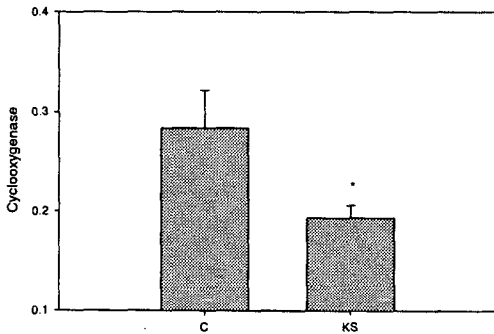


Fig. 13. Effect of KS on Expression of Cyclooxygenase(COX) Gene in MG-63 Cell-line. Gene expression was represented as a fluorescence of Cy incorporated into mRNA. C : Vehicle
KS : 50ug/ml of KS Extract
* : $p < 0.05$ vs C

8) PGE₂ (Prostaglandin E₂) synthase 유전자 발현에 미치는 영향

골세포에서 PGE₂ 유전자 발현은 유전자에 함유된 fluorescence량을 측정하여 결정하였다. 실험결과, 대조군의 유전자 양(C)은 0.167 ± 0.012 이었으며, KS를 첨가하여 배양한 군에서 얻은 유전자의 양은 0.133 ± 0.006 로, KS를 PGE₂ 유전자 발현을 유의하게 억제하였다($p < 0.05$).

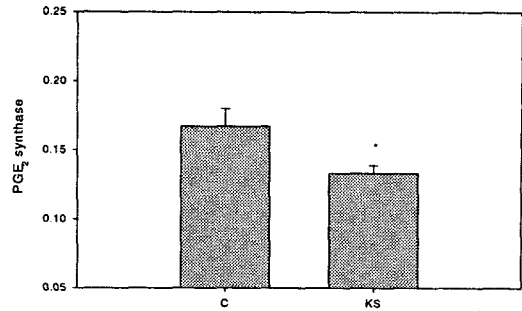


Fig. 14. Effect of KS on Expression of Prostaglandin E₂(PGE₂) Synthase Gene in MG-63 Cell-line. Gene expression was represented as a fluorescence of Cy incorporated into mRNA. C : Vehicle
KS : 50ug/ml of KS Extract
* : $p < 0.05$ vs C

9) Prostacyclin synthase 유전자 발현에 미치는 영향

골세포에서 Prostacyclin synthase 유전자 발현은 유전자에 함유된 fluorescence량을 측정하여 결정하였다. 실험결과, 대조군(C)의 유전자 양은 4.228 ± 0.088 이었으며, KS를 첨가하여 배양한 군에서 얻은 유전자의 양은 4.680 ± 0.176 로, KS를 prostacyclin synthase 유전자 발현을 유의하게 증가시켰다($p < 0.05$).

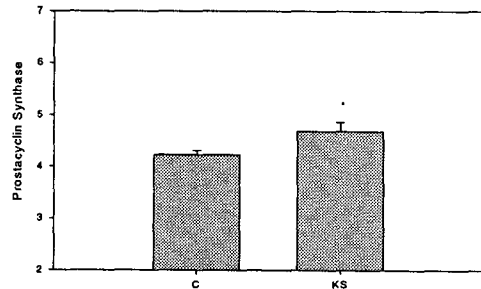


Fig. 15. Effect of KS on Expression of Prostacyclin Synthase Gene in MG-63 Cell-line. Gene expression was represented as a fluorescence of Cy incorporated into mRNA. C : Vehicle
KS : 50ug/ml of KS Extract
* : $p < 0.05$ vs C

10) Collagen 유전자 발현에 미치는 영향
 골세포에서 Collagen(type IV) 유전자 발현은 유전자에 함유된 fluorescence 란을 측정하여 결정하였다. 실험결과, 대조군(C)의 유전자 양은 0.841 ± 0.102 였으며 첨가하여 배양한 군에서 얻은 유전자의 양은 1.277 ± 0.097 로, KS를 prostacyclin synthase 유전자 발현을 현저히 증가시켰다($p < 0.01$).

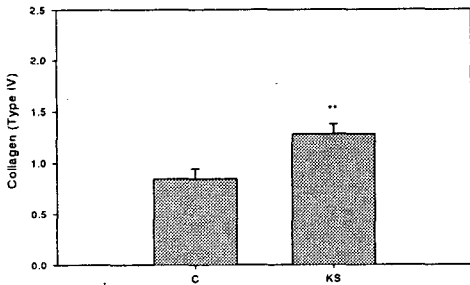


Fig. 16. Effect of KS on Expression of Collagen(type IV) Gene in MG-63 Cell-line. Gene expression was represented as a fluorescence of Cy incorporated into mRNA.
 C : Vehicle
 KS : 50ug/ml of KS Extract
 **: $p < 0.01$ vs C

IV. 고찰

골다공증은 골의 구성성분의 양적 감소를 주된 병변으로 하는 대사성 골질환으로 골의 형성에 관여하는 조골세포의 기능과, 골 흡수 작용을 하는 파골세포의 기능의 균형이 파괴되어 나타나며 주로 노화, 당뇨, 스트레스, 약물남용, 난소기능 감소 등이 원인이 되어 유발된다.⁽³⁻⁵⁾

一般的으로 뼈에서는 칼슘의 흡수와 침착과정이 균형을 이루고 있으나, 골다공증에서는 골대사의 불균형으로 인한 골형성능의 減少 또는 골파괴의 增加가 나타나고 있다. 그중, type I 골다공증은 여성 폐경기 이후 estrogen결핍으로 인해 나타나는데, estrogen 결핍으로 인한 파골

세포의 기능항진과 이에 수반된 골형성 세포의 기능이 항진되어 있으며, 세포기능 조절 이상으로 인해 골흡수가 상대적으로 증가하여 골조직이 소실되어 발생한다.^(30,31) Type II 골다공증은 노화에 따라 조골 세포의 기능이 저하되어 나타나며, 노령인구에서 성별에 구별 없이 발생하고 있다.^(3,4) 그 밖에 중요한 원인으로서는 부신피질호르몬의 과다 투여로 유발된 골다공증이 있다.

여기에는 골기질을 생성하고 칼슘을 침착시켜 골을 형성하는 조골세포와 골 기질을 분해하여 칼슘의 재흡수를 촉진하는 파골세포가 상호작용하여 조절한다. 골조직의 대사에 관여하는 조골세포나 파골세포는 다양한 인자들에 의해 조절되며, 이들 세포에는 골기질의 형성과 분해에 영향을 주는 growth factor들에 대한 수용체가 있다. 골세포와 관련이 있는 growth factor에는 TGF-beta(transforming growth factor beta), IGF-I(insulin like growth factor I), IGF-II, BMP(bone morphogenic protein), PDGF(platelet derived growth factor), IL-1(interleukin 1), IL-6, CSF(colony stimulating factor)등이 있다. 또한, PTH, calcitonin, thyroid hormone, estrogen등의 호르몬등도 관련되어 있다.⁽⁹⁻¹³⁾

여성 폐경기 이후에 나타나는 골다공증은 estrogen 감소로 인해 calcitonin 기능억제에 따른 파골세포의 기능활성화 결과 골기질이 분해되어 칼슘의 재흡수가 증가되어 있다. 또한, 부갑상선 호르몬(parathyroid hormone, PTH)의 감소로 인한 골 흡수 증가, 1,25(OH) Vit.D의 감소로 인한 장으로 부터의 칼슘 흡수 감소와 뇨중 칼슘 배설의 증가 등이 보고되고 있으며, IL-6 등의 증가로 인한 파골세포의 활성화등도 보고되고 있다.⁽¹⁴⁻¹⁶⁾

한편, 골다공증 유발의 화학적인 원인으로 작용하는 부신피질 호르몬은 주로 조골세포의 기능을 억제하고 조골세포의 숫자를 감소시켜 골형성능을 減少시키며, 동시에 파골세포의 기능

은 약간 증가시키는 것으로 알려져 있다^(17,18). 이는 부갑상선호르몬(PTH)의 생성을 증가시키고 조골세포의 PTH 수용체의 합성 증가를 통해 PTH 호르몬에 대한 감수성을 증가시킨 결과로 보인다. 또한, 조골세포에 의해 생성되어 골의 기질물질로 작용하는 type I collagen 합성 유전자를 억제하고, collagenase 유전자를 발현시킴으로써 골 기질물질을 파괴한다.⁽²⁷⁻²⁹⁾ PTH는 세포성장과 관련이 있는 growth factor 들인 IGF1, IGFBP-5의 발현을 억제하고, TGF-β 수용체에 대한 신호전달을 억제함으로써 조골세포에서의 collagen의 생합성을 억제하고, 조골세포의 분열과 증식을 억제한다^(19,20)고 보고되었다. 랫드에서 분리한 두개골 세포에 부신피질호르몬을 처리한 경우, 골세포의 증식과 분열이 억제되는 것이 관찰되었으며, 골 기질 물질인 collagen 생합성이 억제되었다. 이러한 작용은 세포 내 신호전달과정에 관여하는 protein kinase A의 활성을 억제하여 나타난 것으로 보고되었다.

韓醫學에서 骨은 腎과 밀접한 관계가 있다고 보는데 <素問.平人氣象論>에서 “藏眞下于腎, 腎藏骨之氣也”이라 하여 五臟의 眞氣가 腎으로 내려가 腎은 이 骨髓의 氣를 저장한다⁽⁶⁾고 하였고, <素問.逆調論>에서 “腎者水也, 而生于骨, 腎不生即髓不能滿”이라 하여 腎은 五行중에 水에 속하며 骨을 生하는데 腎이 骨을 生하지 못하면 骨髓는 充만할 수 없다고 하여 腎이 骨대사를 주관한다고 하였다. 또한 腎은 藏精, 生髓 및 養骨작용이 있으므로 骨髓가 虛하면 骨도 역시 虛해지며 骨髓는 골격을 滋養하므로 골격의 성장과 기능은 腎氣의 盛衰에 따라 결정된다⁽⁷⁾고 하였다. 그러므로 腎虛하면 腎精이 부족해져 骨과 髓가 失養되어 骨病이 발생하므로 腎과 骨의 밀접한 관계를 알 수 있다.

강활속단탕은 肝腎虛弱하여 筋攣骨痛과 脚氣를 치료하는 대표적 처방이다. 腎은 水臟이므로 虛하면 寒濕의 邪氣가 여기에 침입하므로 腰膝

이 邪實이 되어 疼痛하고, 冷痺는 陰邪가 勝한 것이다. 肝은 筋을 主하고, 腎은 骨을 主하니 “靈樞”에 말하기를 屈하기는 잘 하여도 伸하지 못한 것은 병이 筋에 있고, 伸은 잘하여도 屈하지 못한 것은 병이 骨에 있다⁽⁸⁾고 하였다.

본 연구에서는 골다공증 예방 및 치료 수단을 개발하기 위하여, 조골세포의 기능을 활성화시켜 골 형성을 증가시키는 藥物을 찾고자 하였다. 이를 위하여, 랫드의 두개골로부터 분리 배양한 골세포 및 프레드니솔론을 처리한 골세포에 각각 강활속단탕을 투여하여 조골세포의 분열능과 생화학적 인자에 미치는 영향을 측정하였으며, MG-63 Cell에 강활속단탕을 첨가하여 배양한 다음 유전자 발현에 미치는 영향을 측정하고자 하였다.

우선, 랫드의 두개골로부터 조골세포를 배양하여 강활속단탕(KS)이 이들 세포의 증식능에 미치는 영향과, 골세포의 형성에 미치는 영향을 탐색해 보았다. 연구결과, culture의 초반에는 ALP의 활성이 측정되지 않았고, 이후 ALP의 활성이 지속적으로 증가하였다. ALP의 활성이 지속적으로 증가하면서 nodule의 생성이 함께 진행되었다. 연구 결과 KS는 골세포의 분열을 촉진하였으며(Fig. 1), 분화가 활발히 일어나는 시점에서 ALP의 활성이 증가하는 것을 촉진시키고 골세포의 주된 작용인 collagen의 합성과 calcium 침착에 의한 nodule의 생성을 증가시켰다. 또한, 프레드니솔론이 포함된 배지와 프레드니솔론이 포함되지 않은 배지에서 배양한 calvarial cell에 대한 약물의 효과를 관찰하였다. 배지에서 프레드니솔론을 뺐을 경우 세포의 수는 프레드니솔론을 가한 경우보다 매우 빨리 증가하였으나 nodule의 형성은 일어나지 않았다.

랫드 태자의 두개골로부터 분리한 골세포를 10일간 배양한 결과, 정상세포에 1ug/ml의 KS와 10ug/ml의 KS를 처리한 경우 모두 정상에 비해 증가하는 결과를 보였다. 프레드니솔론을

함께 처리한 두개골 세포에서도 정상군에 비해 현저히 증가되는 것이 관찰되어 조골세포의 기능을 향상시키는 것으로 나타났다.(Fig.1) 그리고 두 개골 세포를 10일간 배양하여 조골세포가 생성하는 기질물질인 단백질합성에 미치는 영향을 측정한 결과, 정상세포에 KS를 1ug/ml 농도 및 10ug/ml 농도로 처리한 경우 정상에 비해 증가가 있었다. 프레드니솔론을 함께 처리한 두 개골 세포에서의 단백질 총량은 정상군에 비해 현저히 감소하였으며, 조골세포에서 생성되는 단백질의 기능을 억제하는 것으로 생각되었다. 또한, 프레드니솔론에 의해 감소한 두개골 세포의 기능억제는 KS를 1ug/ml 농도로 처리한 경우에서의 단백질 생합성량이 프레드니솔론 처리군에 비해 유의적인 증가를 하였으며, 또한 KS를 10ug/ml 농도로 처리한 경우에는 KS를 1ug/ml 농도로 처리한 경우보다 단백질 생합성량을 증가시켰다.(Fig.2)

조골세포의 기능을 측정하는 지표성분인 ALP의 활성을 측정한 결과, 정상세포에 KS를 1ug/ml 농도로 처리한 경우와 KS를 10ug/ml 농도로 처리한 경우 모두 정상에 비해 증가하였으며, 프레드니솔론을 처리한 두 개골 세포에서의 ALP활성이 정상군에 비해 현저히 저하되어 조골세포의 기능이 억제된 것으로 나타났고, 여기에 KS를 1ug/ml 농도로 처리한 경우와 KS를 10ug/ml 농도로 처리한 경우 모두 현저한 증가를 보였다.(Fig.3)

조골세포에 의해 생성되는 골기질물질인 collagen 생합성에 미치는 KS의 영향을 측정한 결과, 정상세포에 KS를 1ug/ml 농도로 처리한 경우와 KS를 10ug/ml 농도로 처리한 경우 정상에 비해 증가하는 경향을 나타내었다. 프레드니솔론을 함께 처리한 두개골 세포에서의 collagen 생합성량은 정상군에 비해 현저히 저하되어 조골세포의 기능이 억제된 것으로 나타났고, 여기에 KS를 1ug/ml 농도로 처리한 경우와 KS를 10ug/ml 농도로 처리한 경우 모두 프레

드니솔론에 의해 감소한 collagen 생합성량을 증가시켰다.(Fig.4)

KS 처리한 경우에 나타나는 cell survival rate에 미치는 영향을 측정한 결과, 정상세포에 KS를 1ug/ml 농도로 처리한 경우와 KS를 10ug/ml 농도로 처리한 경우 모두 약간의 생존률이 증가하였으며, 프레드니솔론을 함께 처리한 경우 생존률이 현저히 감소하였고, 여기에 KS를 1ug/ml 농도로 처리한 경우와 KS를 10ug/ml 농도로 처리한 경우 모두 프레드니솔론에 의해 감소한 생존률을 증가시켰다.(Fig.5)

조골세포가 실제로 칼슘을 침착시키는 능력을 측정한 결과, 정상군에 KS를 1ug/ml 농도로 처리한 경우와 KS를 10ug/ml 농도로 처리한 경우 모두 골세포의 nodule 생성능을 약간 증가시켰다.(Fig.6)

이상의 연구결과를 바탕으로 강활속단당이 골세포의 유전자 발현에 미치는 영향을 평가하기 위하여 MG-63를 배양하여 실험하였다. 造骨細胞의 PLA2는 Vitamin D₃, PTH, Calcitonin 등의 刺戟에 의해 활성이 증가하여 細胞膜의 인지질로부터 AA를 遊離하며, AA는 代謝과정を 거쳐 생성되는 다양한 prostaglandin류를 통하여 조골세포와 파골세포의 機能을 調節함으로써 골대사에 參與한다.^(21,22) 研究結果, 강활속단당은 칼슘 依存的인 PLA2의 유전자 발현을 억제하여, 骨기질 물질의 파괴를 통한 골손실에 抑制效果가 있을 것으로 생각되었다(Fig12).

PLA2 작용으로 遊離된 AA는 COX-1과 COX-2를 통하여 prostaglandin endoperoxide를 생성한다. AA로부터 생성된 Pendoperoxide 류는 脂質의 peroxidation을 유발하고 caspase pathway를 통해 각종 細胞의 apoptosis를 誘發한다. 本 實驗에서 강활속단당이 조골세포의 COX 유전자 발현에 미치는 영향을 측정한 결과, 抑制作用을 나타내었다(Fig.13).

PGE₂의 생성 및 조골세포(OB) 및 파골세포

(OC)의 분화 및 기능 활성화에 미치는 영향을 나타내고 있다. PGE₂는 OC의 분화에 중요한 역할을 하는 PKC의 활성화와 MAPK의 활성화 증가시키고, G-protein에 연계된 Adenylate Cyclase를 활성화시켜 cAMP-dependent PKA의 활성을 증가시키며, OC에서 cAMP에 의존적인 collagen을 분해하는 MMP의 유전 발현을 촉진하여 골의 재흡수에 관여한다.⁽²³⁾ 실험결과, 강활속단탕은 PGE₂ synthase 유전자 발현을 억제하여(Fig.14) OC의 기능을 억제할 것으로 생각되었다.

이와는 별도로 prostacyclin은 cAMP에 의존적인 PKA의 작용을 통하여 OB의 MAPK를 활성화시키며, OB내의 cAMP의 증가는 bone ALP 및 osteocalcin의 합성증가를 유도하며 OB의 분화와 증식에 관여하고 있다. 또한, prostacyclin은 OB의 기능활성화 결과, 골기질의 형성을 유도하는 BMP (bone morphogenetic protein) 발현의 증가와, collagen 합성을 증가시킨다^(24,25) 실험결과, 강활속단탕은 PKA와 PKC, collagen 유전자 발현을 증가시켰으며(Fig.10, Fig.11, Fig.16), 또한 1차 배양된 랫드의 두개골 세포로부터 collagen생합성(Fig. 4)과 ALP 유전자 발현과 단백질 합성을 증가시켰으며(Fig.3), 또한, bone mineralization도 증가시켰다(Fig.5).

그러나, prostacyclin은 OB의 분화와 기능활성화를 자극하고 OC의 분화와 OC로부터 MMP 유전자 발현을 억제하여 골의 재흡수를 차단할 수 있다⁽²⁶⁾고 보고되었다. 實驗結果, 강활속단탕은 prostacyclin synthase의 發現을 增加시켜 PGE₂의 生成을 增加시킬 것으로 생각되었다(Fig. 15). 따라서, 강활속단탕은 cAMP을 증가시키며 PKA의 活性를 통해 造骨細胞의 기능을 활성화 시키며 破骨細胞의 기능을 抑制하며, 骨의 재흡수로 인한 골다공증의 치료 및 예방에 사용될 수 있을 것으로 생각되었다.

이상의 결과, 강활속단탕은 프레드니솔론으로 減少한 조골세포의 분열능 및 기능을 增加시킬

수 있는 것으로 평가되었으며, 이는 파골세포(OC)의 분화와 기능을 활성화시키는 유전자의 발현을 억제하고, 조골세포(OB)의 분화와 기능을 활성화시키는 유전자의 발현을 증가시켜, 조골세포에서의 세포증식과 단백질의 생합성, ALP의 활성, Collagen의 생합성의 增加를 통하여 나타나는 것으로 사료되었다.

V. 結論

골다공증 예방 및 치료 수단을 개발하기 위하여, 조골세포의 기능을 활성화시켜 골 형성을 증가시키는 藥物을 찾고자 하였다. 랫드의 두개골로부터 분리 배양한 골세포 및 프레드니솔론을 처리한 골세포에 각각 강활속단탕을 첨가하여 조골세포의 분열능과 생화학적 인자에 미치는 영향을 측정하였으며, MG-63 Cell에 강활속단탕을 첨가하여 배양한 다음 유전자 발현에 미치는 영향을 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

- (1) 조골세포의 분열능은 프레드니솔론에 의해 減少하였으며, 강활속단탕은 이를 증가시켰다.
- (2) 조골세포의 단백질 생합성량과 ALP 활성 및 collagen 생합성량은 프레드니솔론에 의해 감소하였으며, 강활속단탕은 이를 증가시켰다.
- (3) 조골세포의 apoptosis는 프레드니솔론에 의해 증가하였으며, 강활속단탕은 조골세포의 생존율은 증가시켰다.
- (4) 강활속단탕은 vitamin D₃ receptor의 발현에는 영향을 주지 못했으나, calcitonin receptor 및 PTH receptor의 발현은 증가시켰다.
- (5) 강활속단탕은 PKA 및 PKC의 발현을 증

가시켰다.

- (6) 강활속단탕은 PLA₂, COX, PGE₂synthase의 발현을 억제하였으나, Prostacyclin7 synthase의 발현은 증가시켰다.
- (7) 강활속단탕은 Collagen의 발현을 증가시켰다.

이상의 연구결과, 강활속단탕은 조골세포의 기능 활성화에 관련된 유전자 발현을 증가시키고, 파골세포의 활성 증가에 관련된 유전자 발현을 억제하였다. 또한, 조골세포의 증식능을 증가시키고, 골기질 물질의 생합성을 증가시켰다. 따라서, 강활속단탕은 골다공증의 치료 또는 예방에 응용될 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

- 1) 김기수 : 대한내분비학회 10주년 심포지움 논문집, pp35-48, 1996
- 2) 全國 韓醫科大學 再活醫學科 教授室編 : 東醫再活醫學科學 書苑堂, pp.26-37, p.48, pp.181-184, 1995
- 3) E. Canalis. Mechanisms of Glucocorticoid action in Bone : Implications to glucocorticoid-induced osteoporosis, J. Clin. Endocri. Met, 81,pp.3441-3447, 1996.
- 4) Johansson A.G., Lindah E., Blum W.F., Kollerup G., Effect of growth hormone and insulin-like growth factor I in men with idiopathic osteoporosis. J. Clin. Endocri. Met., 81, pp.44-48, 1996.
- 5) Thomas Pufe, Katharina E. Scholz-Ahrens, Andreas T. M. Franke, Wolf Petersen, Rolf Mentlein, Deike Varoga, Bernhard Tillmann, Jurgen Schrezenmeir and Claus C. Gluer The role of vascular endothelial growth factor in glucocorticoid-induced bone loss : evaluation in a minipig model. Bone 33(6), pp. 869-876 2003
- 6) 王奇 外 : 黃帝內經素問今釋, 서울, 成輔社, p.27, 60, 94, 212, 1983.
- 7) 孫思邈 : 備急千金要方, 서울, 大星文化社, p607 ,1991
- 8) 許浚 : 東醫寶鑑. 서울, 南山堂, p.303, 1990
- 9) Delany AM et al. Cortisol increases interstitial Collagenase expression in osteoblasts by post-transcriptional mechanisms. J Biol chem, 270, pp.26607- 26612, 1995
- 10) Canalis E. et al, Insulin like growth factors inhibit interstitial collagenase synthesis in bone cell cultures. Endocrinology, 136, pp.1348-1354 1995
- 11) Oursler MJ et al. Glucocorticoid-induced activation of latent transformation growth factor-beta by normal human osteoblast-like cell. Endocrinology 133, pp.2187-2196, 1993
- 12) Kiefer MC, et al. Characterization of recombinant human insulin-like growth factor binding protein 4,5 and 6 produced in yeast. J Biol chem. 267, pp.12692-12699, 1992.
- 13) Ernesto Canalis. Effect of Glucocorticoids on Type 1 collagen synthesis, Alkaline phosphatase Activity, and Deoxyribonucleic Acid Content in Cultured Rat Calvariae. Endocrinology 112, pp.931-935, 1983
- 14) Akatsu T, Takahashi N, Udagawa N, Sato K, Nagata N, Moseley JM, Martin TJ, Suda T, Parathyroid Hormone (PTH)-related protein is a potent stimulator of osteoclast-like multinucleated cell forma-

- tion to the same extent as PTH in mouse marrow cultures. *Endocrinology* 125, pp.20-27.(1989)
- 15) John T. Swarthout, Richard C. D'Alonzob, Nagarajan Selvamurugan and Nicola C. Partridge. Parathyroid hormone-dependent signaling pathways regulating genes in bone cells. *Gene* 282(1-2), pp.1-17 2002
 - 16) Seiki Wada et al. Regulation by Calcitonin and Glucocorticoids of Calcitonin Receptor Gene Expression in Mouse osteoclast. *Endocrinology* 138, pp.521-529, 1997
 - 17) A. Tsingotjidoua, J. M. Nervinaa, L. Pharna, O. Bezouglaiaa and S. Tetradis. Parathyroid hormone induces RGS-2 expression by a cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-mediated pathway in primary neonatal murine osteoblasts *Bone* Volume 30(5), pp.677-684 2002
 - 18) H. A. Feister, J. E. Onyia, R. R. Miles, X. Yang, R. Galvin, J. M. Hock, and J. P. Bidwell. The expression of the nuclear matrix proteins NuMA, topoisomerase II-, and - in bone and osseous cell culture : regulation by parathyroid hormone. *Bone* 26(3), pp.227-234 2000
 - 19) Bellows CG et al. Mineralised bone nodules formed in vitro from ezymatically released rat calvarial cell populations. *Calcif Tiss Int.* 36, pp.143-154. 1986
 - 20) Vedi S., Croucher P.I., Garrahan N.J., Compston J.E., Effect of hormone replacement therapy on cancellous bone microstructure in postmenopausal woman. *Bone* 19, pp.69-72, 1996.
 - 21) Tomoyasu Ohshiba, Chisato Miyaura, and Akira Ito Role of prostaglandin E produced by osteoblasts in osteolysis due to bone metastasis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 300(4), pp.957-964 2003
 - 22) M. Tomita, X. Li, Y. Okada, F. N. Woodie1, R. N. Young, C. C. Pilbeam and L. G. Raisz. Effects of selective prostaglandin EP4 receptor antagonist on osteoclast formation and bone resorption in vitro. *Bone* 30(1), pp.159-163 2002
 - 23) P. Kloen, M. Di Paolaa, O. Borensa, J. Richmond, G. Perino, D. L. Helfet and M. J. Goumans. BMP signaling components are expressed in human fracture callus. *Bone* 33(3), pp.362-371 2003
 - 24) J. M. Nervinaa, 1, S. Tetradis, 1, Y. -F. Huang, D. Harrisona, C. Molinab and B. E. Kream Expression of inducible cAMP early repressor is coupled to the cAMP-protein kinase A signaling pathway in osteoblasts. *Bone* 32(5), pp.483-490 2003
 - 25) Annegret Eichner, Josef Brock, Carl-Henrik Heldin and Serhiy Souchelnyskiy Bone Morphogenetic Protein-7(OP1) and Transforming Growth Factor-1 Modulate 1,25(OH)₂-Vitamin D₃-Induced Differentiation of Human Osteoblasts. *Experimental Cell Research.* 275(1), pp.132-142 2002
 - 26) Peter G. Bradford A. Jodi M. Maglicha, Alfred S. Ponticellib and Keith L. Kirkwood. The effect of bone morphogenetic protein-7 on the expression of type I inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in G-292 osteosarcoma cells and primary osteoblast cultures. *Archives of Oral Biology* 45(2), pp.159-16 2000
 - 27) E. Canalis. Mechanisms of Glucocorticoid

- action in Bone : Implications to glucocorticoid-induced osteoporosis, *J.Clin. Endocri. Met*, 81, pp.3441-3447, 1996
- 28) P. Urea et al. Regulation of PTH /PTH related peptide receptor Messenger ribonucleic acid by glucocorticoids and PTH in ROS 17/28 and OK cell. *Endocrinology*, 134, pp.451-456, 1994
- 29) Su-Li Cheng et al. Differentiation of human Bone Marrow osteogenic stromal cells in vitro : Induction of the osteoblast phenotype by Dexamethasone. *Endocrinology* 134, pp.277-286, 1994
- 30) H. Seto, K. Aoki, S. Kasugai and K. Ohya. Trabecular bone turnover, bone marrow cell development, and gene expression of bone matrix proteins after low calcium feeding in rats. *Bone* 25(6), pp.687-695 1999
- 31) Vedi S., Croucher P.I., Garrahan N.J., Compston J.E. Effet of hormone replacement therapy on canxellous bone microstructure in postmenopausal woman. *Bone* 19, pp.69-72, 1996