六味地黃湯의 인중합체 함량과 골형성 관련 遺傳子의 轉寫活性에 대한 연구

박병철 · 차윤엽* · 이응세

상지대학교부속 한방병원 한방재활의학교실

Study on the Polyphosphate content of the Yukmijihwang-tang and its Effect on transcription activity of Genes related to Bone Morphogenesis

Byung Chul Park, Yun Yeop Cha*, Eung Se Lee

Department of oriental Rehabilitation Medicine, College of Oriental Medicine, Sang-ji University

The aim of this study was to find out the effects of the Yukmijihwangtang on transcription activity of Genes related to Bone Morphogenesis. For this purpose, experiments were performed to compare the polyphosphate contents of Yukmijihwangtang and its component herbs, and to verify their Effects on transcription activity of Genes related to Bone Morphogenesis. We know that Yukmijihwangtang and its component herbs have adequate amount of polyphosphate contents and have effects on transcription activity of Genes such as BMP1A, BMP2B, OTN, MGP, COL. In the conclusion, Yukmijihwangtang and its component herbs are strongly believed to have effectiveness on bone morphogenesis.

Key words : Yukmijihwang-tang, Bone Morphogenesis, polyphosphate

서 론

2000년에 한국은 이미 고령화 사회로 접어들었으며, 서구의 선진 국가들은 이미 20~30년 전부터 이러한 노령화 사회의 문제점에 대비해 왔다. 노령인구의 증가는 자연히 노인 관련 질환의 유병율을 높였고 그들 중 하나인 골다공증 또한 주요한 문제점으로 대두되어 왔다. 대부분의 골관련 질환은 만성적인 질환이므로 오랜 투약기간 및 치료가 필요한 만큼 안전하게 장기간 사용할 수 있는 새로운 치료 수단의 개발이 절실히 요구되며, 유효성과 안정성 면에서 한약재를 통한 치료제의 검색 및 유효물질의 개발이 필요하다고 사료된다.

인중합체(polyphosphate)는 수십 또는 수백 개의 orthophosphate가 높은 에너지의 phosphoanhydride결합으로 연결된 선상 복합체로서[1], 인중합체의 골형성과 관련된 연구를 종합해 보면, 인중합체는 조골세포양 세포(osteoblast-like cells)에서 다량 발견되고 골조직의 무기질 과정의 조절과 관련이 있으며, 골과 칼슘대사에 관여하며, 골절시 골형성이 촉진되는 것으로 골유도 효과가 있으며, osteocalcin 발현량을 증가시킴으로 골화세포의 생성을 촉진시킬 수 있는데[2-10], 金[11]의 연구에 의하면 鹿茸, 鹿角, 大豆黃卷, 野菊花, 鼠目太, 발아한 鼠目太의 인중합체 함량을 분석한 결과 인중합체가 많은 鼠目太, 발아한 鼠目太, 野菊花, 大豆黃卷이 골형성 관련 유전자의 전사활성에도 활성증가를 보여 인중합체가 골형성에 유효하다는 연구 결과를 보고한 바 있다. 따라서 한약재내에서 인중합체의 정량을 분석하고 골형성과 관련된 다른 실험을 통하여 인중합체 함량과의 상관성을 비교하는 것이 매우 의미 있다고 생각된다.

골다공증은 한의학적으로 腎虛에 속하는 것으로 보아, 滋陰强骨하고 溫補腎陽하는 약물을 응용하여 치료한다. 따라서 腎陰虛를 치료할 수 있는 대표적인 처방인 六味地黃湯을 이용하여 六味地黃湯과 여섯 가지 구성 약물의 인중합체를 정량 분석하여 비교하고, 한의학 문헌과 기존의 연구를 통하여 골형성에 유효할 것으로 보이는 六味地黃湯이 골모세포인 HOS-TE85 세포주의 증식능과 골 형성 관련 유전자들의 전사활성을 통하여 골형성에 미치는 영향을 살펴보았다.

* 교신저자 : 차윤엽, 강원도 원주시 우산동 283 상지대학교 부속한방병원
· E-mail : omdcha@sangji.ac.kr, · Tel : 033-741-9260
· 접수 : 2004/07/23 · 수정 : 2004/08/25 · 채택 : 2004/09/22

재료 및 방법

1. 재료

1) 세포주

본 실험에는 HOS-TE85 (human, female, osteosarcoma, Cat. #21543) 세포주를 한국세포주은행에서 분양 받아서 사용했다.

2) 약재

(1) 牧丹皮, 熟地黃, 澤瀉 山藥, 山茱萸, 白茯苓

국내산 牧丹皮, 熟地黃, 澤瀉 山藥, 山茱萸, 白茯苓을 각 200 g씩 경동시장에서 구입하여 정선하였다. 각 한약재 무게 20배인 증류수 4L를 집어넣어 2시간 동안 추출한 후 여과하여 여액을 감압 농축 후 72시간동안 동결건조한 것을 시료로 사용하였으며 각각의 건조중량과 회수율은 Table 1과 같다.

Table 1. Weight of freeze-dried herbs and recovery rate

韓藥名	學 名	weight of freeze-dried herb(g)	recovery rate(%)
熟地黃	REHMANNIAE RADIX PREPARAT, 이하 RRP	103.24	51.62
山茱萸	CORNI FRUCTUS, 이하 CR)	83.29	41.645
山 藥	DIOSCOREAE RHIZOMA, 이하 DR	64.03	32.015
牧丹皮	MOUTAN CORTEX, 이하 MC)	52.60	26.3
澤 瀉	ALISMATIS RHIZOMA, 이하 AR	23.48	11.74
白茯苓	PORIA, 이하 PO	1.29	0.645

(2) 六味地黃湯(Yukmijihwangtang, 이하 YM)

위의 약재 6가지를 方藥合編에 근거하여 조제하였다. 조제된 약재의 총 중량을 200 g으로 하고 한약재 무게 20배인 증류수 4 L를 집어넣어 2시간동안 추출한 후 여과하여 여액을 감압 농축 후 72시간동안 동결건조한 것을 시료로 사용하였으며, 74.11 g의 건조 중량을 보이고, 37.055 %의 회수율을 보였다.

2. 방법

1) 세포 배양

100 mm 배양 접시 또는 T-75 배양 flask에 사람의 osteosarcoma 세포주인 HOS-TE85 세포주를 분주하고 배양 접시에 부착된 HOS-TE85 (human female)는 2 g/L sodium bicarbonate가 첨가된 RPMI 1640 배양배지를 사용하였다. 배양배지에는 페니실린 및 streptomycin이 함유된 1 % antibacterial antifungal solution (Gibco BRL, Co., USA)과 10 % FBS (Gibco BRL, Co., USA), HEPES 6 g/L 를 첨가하였다. 배양시 습도는 95 % 온도는 37 ℃를 유지하면서 5 % CO_2를 계속 공급하였다. 배지는 7~10 ㎖ 씩 주 2회 교체해 주었고 주 1~2회 계대 배양(subculture)을 하였다.

2) 세포 증식율 측정 Cell proliferation assay

배양한 HOS-TE85 세포를 96well plate 각 well에 1×10^4 cells/well/100㎕ 로 배양을 하고 24시간 후 약물을 각 농도 (0, 0.1, 1, 10, 100, 1000, 10000 ㎍/㎖)의 한약재 추출물들을 처리하여 48시간 동안 습도는 95 % 온도는 37 ℃를 유지하면서 5 % CO_2 incubator에서 배양하였다. 배양 종료 1시간 전에 빛을 차광하고 cell proliferation assay solution (CellTiter 96® AQueous Cell Proliferation Assay. Promega Co. USA)을 20 ㎕/well 을 처리한다. 발색된 각 well의 흡광도를 ELISA reader 흡광도 490 ㎚에서 측정하고 대조군의 흡광도와 비교하여 세포증식율을 백분율로 환산하였다. 외 한약재들은 경희의료원에서 구입하였다.

3) RNA 추출

Cell proliferation assay에서 세포증식율이 가장 좋은 농도의 山茱萸 100 ng/㎖, 澤瀉, 白茯苓, 六味는 1 ㎍/㎖, 牧丹皮, 熟地黃은 10 ㎍/㎖, 山藥은 100 ㎍/㎖의 약재를 처리 48시간 후 Trizol solution method을 이용하여 배양 세포주들로부터 전체 세포 RNA를 추출하였다. 먼저 원심분리를 통하여 수확한 세포들에 1 ㎖ 의 Trizol solution (Gibco BRL, Co., U.S.A.)을 처리하여 18~21 G syringe로 균질화시킨 다음 4 ℃에서 12,000 rpm 으로 원심분리하여 상층액을 수거한 후 5분 정도 상온에 두었다가 200 ㎕ phenol, chloroform, isoamylalcoho을 25:24:1의 비율로 섞은 다음 12,000 rpm 에서 10분간 원심 분리한다. 맑은 상층액을 수거한 후 동량의 isopropanol을 혼합한 뒤 -20 ℃에서 30분간 보관하여 RNA pellet을 침강시켰다. 침강된 RNA는 100 ㎕ 의 DEPC water에 녹인 후 spectrophotometer (Hewlett Packard, Co., U.S.A.)를 사용하여 정량하였다.

4) cDNA 합성과 RT-PCR

cDNA합성 (Reverse Transcription)을 위해 각 sample에서 추출한 RNA 5~10 ㎍에 Random primer 0.5 ㎍/㎕ 1 ㎕를 첨가한 후 70 ℃에서 5분간 heating 시킨 후 바로 얼음에 담근다. 그 이후에 MMLV 1X Reaction buffer, 0.4 mM dNTPs, 20 U RNase inhibitor, DEPC-DW을 전체 총 양이 30 ㎕가 되게 첨가한다. 상온에서 2분간 incubation 한 후 200 U M-MLV RTase를 첨가 한 후 42 ℃에서 50 min, 70 ℃에서 15 min 동안 반응시켰다. PCR을 위한 positive control로써는 house keeping gene인 Human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)를 사용하였다. GAPDH, BMP1A (bone morphogenic protein 1A), BMP2B (bone morphogenic protein 2B), MGP (Matrix Gla protein), OTN (Osteonectin), COL1 (Collagen type 1)는 95 ℃에서 10 min 1cycle, 95 ℃에서 45 sec, 60 ℃에서 45 sec, 72 ℃에서 60 sec 50 cycle, 72 ℃에서 10 min 1cycle 동안 반응을 수행하였다.

5) PCR products의 전기영동

10 ㎕ 의 PCR product를 1.5 % agarose gel에 loading하였다. 전기영동은 100 V 에서 40분 동안 수행하였으며 0.5 × TAE buffer를 사용하였다. 분리된 PCR product를 육안으로 확인하기 위하여 gel을 500 ㎖ 의 ethidium bromide (Et-Br) 용액으로 20분간 염색한 후 GEL DOC (BIO RAD Co., U.S.A.)을 이용하여 정량분석 관찰하였다.

6) 한약추출물의 인중합체(polyphosphate)의 함유량 측정

Test tube의 이물질을 제거하기 위해서 6 N HCl 에서 24시간동안 tube를 세척을 하였다. 그리고 증류수로 다시 세척을 한 후 dry 시켰다. Tube에 각 한약재의 sample을 100 ㎕ 넣고 60 ㎕ 의 10 % $Mg(NO_3)_2$ $6H_2O$를 첨가하였다. Tube를 알코올램프로 가열을 하였다. Tube의 색이 갈색에서 투명색으로 변하고

sample의 색깔은 불투명액체에서 흰색의 분말로 변할 때까지 가열을 한다. 인중합체와 인의 가수분해를 위해 0.6 ㎖ 의 0.5 N HCl을 넣어주고 15분동안 water bath에 boiling하고 바로 cooling을 한다. 1.4㎖ 의 molybdenum-ascorbate reagent (0.42 % ammonium molybdate in 1 N H_2SO_4 : 10 % ascorbic acid in dH_2O, 6 : 1, v/v)의 혼합액을 넣어주고 45 ℃에서 20분간 incubation을 한다. 그리고 흡광도 530/630의 spectrophotometer (Hewlett Packard, Co., U.S.A.)로 정량측정을 한다.

결 과

1. 한약추출물내 인중합체 정량

1) 한약추출물내 인중합체 OD530/630 값 측정

六味地黃湯 및 六味地黃湯에 들어가는 약재들의 10 ㎎/㎖을 인중합체 정량 방법을 이용하여 각 약재들의 인중합체 함유량을 흡광도(흡광기의 파장 설정을 530과 630으로 고정)를 이용하여 OD530/630 두 파장에서 인중합체를 정량하였다. 그 결과 모든 약재에서 비슷한 양을 나타났으나, 전체 건조중량에 따른 인중합체의 전체 총량을 측정한 결과, 熟地黃이 가장 많은 양을 나타났고, 山茱萸, 六味, 山藥, 牧丹皮, 澤瀉, 白茯苓 순서로 나타났다.

2. 세포의 세포증식능 측정

1) 六味地黃湯을 처리한 HOS-TE85 세포의 세포증식능 측정

六味地黃湯을 처리한 HOS-TE85세포의 세포증식능은 10 % FBS 상태와 2 % FBS 상태에서 별다른 큰 효과를 보이지 않으나, 2 % FBS상태에서 약재를 1 ㎍/㎖로 약재를 처리 하였을 경우 11 %의 세포 증식능을 보였다. 또한 항산화 효과를 볼 수 있는 과산화수소를 처리하여 세포 증식능을 본 결과 1 ㎎/㎖의 농도로 약재를 처리한 샘플에서 대조군에 비해서 약 62 % 정도 항산화 효과를 보이는 것으로 나타났다.

2) 熟地黃을 처리한 HOS-TE85 세포의 세포증식능 측정

熟地黃을 처리한 HOS-TE85세포의 세포 증식능은 약재를 처리하였을 때 세포 증식능이 증가하는 것을 볼 수 없었으며, 牧丹皮와 마찬가지로 1 ㎎/㎖에서부터 세포 독성이 나타나는 것을 볼 수 있었다. 또한 항산화 효과를 볼 수 있는 과산화수소를 처리하여 세포 증식능을 본 결과 10 ㎍/㎖에서 과산화수소가 있는 상태의 대조군에 비해서 12 %정도 증가하는 것을 볼 수 있었으며, 10 ㎎/㎖에서는 세포 독성이 나타났다.

3) 澤瀉를 처리한 HOS-TE85 세포의 세포증식능 측정

澤瀉를 처리한 HOS-TE85세포의 세포증식능은 10 % FBS 상태에서 10 ㎍/㎖로 약재를 처리하였을 경우 35 %의 세포 증식능을 보였고, 2 % FBS 상태에서는 1 ㎍/㎖로 약재를 처리하였을 경우 20 %의 세포 증식능을 보였다. 또한 항산화 효과를 볼 수 있는 과산화수소를 처리하여 세포 증식능을 본 결과 항산화 효과엔 큰 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

4) 山藥을 처리한 HOS-TE85 세포의 세포증식능 측정

山藥을 처리한 HOS-TE85세포의 세포 증식능은 10 % FBS 상태와 2 % FBS 상태에서 약재를 처리하였을 경우 두 경우다 별다른 증감 현상을 나타나지 않으나, 100 ㎍/㎖로 약재를 처리하였을 경우 약간의 세포 증식능을 보였다. 또한 항산화 효과를 볼 수 있는 과산화수소를 처리하여 세포 증식능을 본 결과 항산화 효과엔 큰 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

5) 山茱萸를 처리한 HOS-TE85 세포의 세포증식능 측정

山茱萸를 처리한 HOS-TE85세포의 세포증식능은 10 % FBS 상태와 2 % FBS 상태에서 약재를 처리하였을 경우 두 경우다 별다른 증감 현상을 나타나지 않으나, 1 ㎍/㎖로 약재를 처리하였을 경우 약간의 세포 증식능을 보였다. 또한 항산화 효과를 볼 수 있는 과산화수소를 처리하여 세포 증식능을 본 결과 항산화 효과엔 큰 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

6) 白茯苓을 처리한 HOS-TE85 세포의 세포증식능 측정

白茯苓을 처리한 HOS-TE85세포의 세포증식능은 10 % FBS 상태에서 1 ㎍/㎖로 약재를 처리하였을 경우 약 20 %의 세포 증식능을 보였고, 2 % FBS 상태에서는 1 ㎍/㎖로 약재를 처리하였을 경우 11 %의 세포 증식능을 보였다. 또한 항산화 효과를 볼 수 있는 과산화수소를 처리하여 세포 증식능을 본 결과 0.1 ㎍/㎖의 농도로 약재를 처리한 샘플에서 대조군에 비해서 약 50 % 정도 항산화 효과를 보이는 것으로 나타났다.

7) 牧丹皮를 처리한 HOS-TE85 세포의 세포증식능 측정

牧丹皮을 처리한 HOS-TE85세포의 세포증식능은 10 % FBS 상태에서 1 ㎍/㎖로 약재를 처리하였을 경우 22 %의 세포 증식능을 보였고, 2 % FBS 상태에서는 10 ㎍/㎖로 약재를 처리하였을 경우 10 % FBS에서 1㎍/㎖을 처리하였을 경우와 마찬가지로 22 %의 세포 증식능을 보였다. 또한 항산화 효과를 볼 수 있는 과산화수소를 처리하여 세포 증식능을 본 결과 10 ㎍/㎖에서 과산화수소가 있는 상태의 대조군에 비해 43 %정도 증가하는 것을 볼 수 있었으며, 1 ㎎/㎖에서는 세포 독성이 나타났다.

3. Reverse Transcription Polymerase chain reaction 및 PCR

1) HOS-TE85 세포 전사 활성

(1) 한약재 추출물이 HOS-TE85 세포의 골형성 관련 유전자들의 대조군인 GAPDH의 전사 활성

전체적으로 10 % FBS 상태에서 山茱萸 100 ng/㎖, 澤瀉, 白茯苓, 六味는 1 ㎍/㎖, 牧丹皮, 熟地黃은 10 ㎍/㎖, 山藥은 100 ㎍/㎖ 약재를 처리한 sample은 전반적으로 GAPDH가 증가하는 양상을 보였으며, 스트레스를 준 2 % FBS 상태에서도 대조군에 비해서 熟地黃, 山茱萸, 牧丹皮, 六味, 白茯苓은 증가하는 추세를 보였으나, 山藥과 澤瀉는 대조군과 비슷한 양상을 보였다. 위의 GAPDH 결과를 BMP1A, BMP2B, MGP, OTN, COL1의 대조군으로 사용하였다.

(2) 한약재 추출물이 HOS-TE85 세포의 골형성 관련 유전자인 BMP1A의 전사 활성에 미치는 영향

2 % FBS 처리 후 山茱萸 100 ng/㎖, 澤瀉, 白茯苓, 六味는 1 ㎍/㎖, 牧丹皮, 熟地黃은 10 ㎍/㎖, 山藥은 100 ㎍/㎖ 약물을 처리한 sample에서는 아무런 발현을 보이지 않았고, 10 % FBS 처리 후 약물을 처리한 sample에서는 대조군에 비해서 발현 양상이 현저히 줄어드는 것을 볼 수 있다. 특히, 澤瀉 같은 경우에

는 약 60 %가 감소하는 것을 볼 수 있다. 즉, 영향이 부족한 경우 BMP1A는 발현이 일어나지 않고 영향이 충분한 경우라도 六味地黃湯 및 그 구성 약재 특히 白茯苓, 澤瀉는 BMP1A의 발현을 억제하는 것으로 나타났다.

(3) 한약재 추출물이 HOS-TE85 세포의 골형성 관련 유전자인 BMP2B 의 전사 활성에 미치는 영향

山茱萸 100 ng/㎖, 澤瀉, 白茯苓, 六味는 1 ㎍/㎖, 牧丹皮, 熟地黃은 10 ㎍/㎖, 山藥은 100 ㎍/㎖ 약재를 처리한 sample중에서 10 % FBS 대조군에서는 발현이 안 되었고, 2 % FBS 대조군에서는 발현 양상이 나타는 것을 볼 수 있다. 즉, BMP2B는 스트레스를 받았을 경우 BMP1A와 반대로 gene expression이 유발된다. 이것은 六味地黃湯에 및 그 구성 약재들은 BMP2B를 조절할 수 있는 어떠한 regulator를 갖고 있다는 것을 의미하기도 한다. 2 % FBS 처리 후 약물을 처리한 것에서는 山茱萸와 白茯苓, 牧丹皮, 六味에서 약간의 발현을 볼 수 있고, 10 % FBS 처리 후 약물을 처리한 경우에는 대조군을 제외한 모든 약재에서 BMP2B가 발현되었으며, 특히, 山藥에서 다른 약재보다 약 30 %이상의 발현율을 보였다.

(4) 한약재 추출물이 HOS-TE85 세포의 골형성 관련 유전자인 OTN의 전사 활성에 미치는 영향

2 % FBS를 처리 후 山茱萸 100 ng/㎖, 澤瀉, 白茯苓, 六味는 1 ㎍/㎖, 牧丹皮, 熟地黃은 10 ㎍/㎖, 山藥은 100 ㎍/㎖ 약재를 투여한 sample에서는 牧丹皮의 gene expression 양이 다른 약제들에 비해서 현저히 줄어드는 것을 볼 수 있고 六味에서 대조군과 발현 양상이 비슷하게 나타나는 것을 볼 수 있다. 또한, 10 % FBS 처리 후 약재를 처리한 sample 에서는 牧丹皮에서 대조군과 발현 양상이 비슷하게 나타나는 것을 볼 수 있다.

(5) 한약재 추출물이 HOS-TE85 세포의 골형성 관련 유전자인 MGP의 전사 활성에 미치는 영향

2 % FBS 처리 후 山茱萸 100 ng/㎖, 澤瀉, 白茯苓, 六味는 1 ㎍/㎖, 牧丹皮, 熟地黃은 10 ㎍/㎖, 山藥은 100 ㎍/㎖ 약물을 처리한 sample에서는 아무런 발현을 보이지 않았고, 10 % FBS 처리 후 약물을 처리한 sample에서도 마찬가지로 유전자 발현이 되지 않는 것을 볼 수 있다. 그러나 특이하게 10 % FBS 처리 후 약물을 처리한 것 중에서 牧丹皮, 六味, 山藥에서 약간의 유전자 발현이 되는 것을 육안으로 확인할 수 있다.

(6) 한약재 추출물이 HOS-TE85 세포의 골형성 관련 유전자인 COL1의 전사 활성에 미치는 영향

10 % FBS 처리 후 山茱萸 100 ng/㎖, 澤瀉, 白茯苓, 六味는 1 ㎍/㎖, 牧丹皮, 熟地黃은 10 ㎍/㎖, 山藥은 100 ㎍/㎖ 약재를 넣은 sample들은 COL1의 발현이 대조군과 비교하였을 때 15 %~30 %가량 발현양이 줄어드는 것을 볼 수 있고, 2 % FBS 처리 후 약재를 넣은 sample 중 六味地黃湯과 山藥에서 각각 10 %, 20 % 발현양이 증가하는 것을 볼 수 있다.

고 찰

골조송증(骨粗鬆症)이라고도 부르는 골다공증은 45세 이상의 여성의 50 %, 75세 이상의 여성에서는 90%가 발생하며, 골밀도의 감소로 골절의 빈도가 증가하는 가장 흔한 대사성 골질환이다[13]. 미국 내의 백인 여성 중 13 %~18 %가 골다공증으로 추정되며, 30 %~50 %가 대퇴골의 골밀도가 감소한 골다공증으로 보고되고 있다[14]. 골절은 주로 척추, 고관절 부위, 손목 부위에 잘 생기는데 정상인이라면 아무 문제가 되지 않을 가벼운 충격에도 쉽게 뼈가 부러질 수 있으며, 나이가 많은 경우 골절이 되면 치료하고 회복하는데 심한 장애가 예상될 뿐만 아니라 때때로 심각한 합병증을 초래할 수 있다. 또한 심각한 경제적인 손실을 초래할 수 있으므로, 골다공증의 치료는 바로 이런 골절을 예방하는데 있다.

골은 골흡수를 통하여 칼슘을 체내에 공급하며, 주로 파골세포 (osteoclast)가 역할을 담당한다. 골흡수는 골형성이라는 두 번째 과정과 항상 couping 되는데, 이것은 골형성을 하는 조골세포 (osteoblast)에 의한다. 조골세포는 파골세포에 의해 형성된 터널에 들어가 교원질 가닥들을 풀어놓아 마침내 스스로 갇히어 골세포 (osteocyte)가 된다. 골세포는 혈류 속의 칼슘, 인 등 다른 무기물들과 서로 합체되어 결정체의 hydroxyapatite가 되어 골형성 과정을 마친다. 이런 remodeling 과정은 칼슘을 유리시킬 뿐 아니라, 노화된 골을 신생골로 교체함으로써 골격을 유지하는 역할을 한다. 그러나, 이러한 골형성이 골흡수를 완전히 따라갈 수 없기 때문에 결국은 골량이 감소하게 되어 골다공증으로 진행하게 되는데, 파골세포에 의한 골흡수는 신속히 일어나지만 조골세포에 의한 골형성은 천천히 진행되며 길게는 약 8개월 가량이 소요되는 것으로 알려져 있다. 즉, 골생성에 비하여 증가된 골흡수는 골다공증의 원인이 되며 이는 골질의 위험성을 증가시킨다. 이러한 과정은 연령의 증가와 특히 여성에서 폐경으로 인한 호르몬의 변화는 퇴행기 골다공증의 중요한 원인이다.

골다공증 치료제는 파골세포에 의한 골흡수를 억제하는 역할을 하므로 골흡수 억제제라고 불리우며, 대표적인 약제로는 estrogen, bisphosphonate, calcitonin 등이 있다[14]. Estrogen은 파골세포에 의한 골흡수를 감소시키고, 파골세포와 조골세포의 작용에 관여되는 cytokine 혹은 growth factor에 영향을 주며 칼슘의 대상에도 영향을 미치는 것으로 제시되고 있다. 이러한 기능을 갖고 있어 노인성, 폐경에 따른 골다공증 치료에 가장 중요한 방법으로 자리잡았으나, 자궁내막 증식증과 내막암의 발생을 막기 위해서 또 다른 호르몬인 프로게스테론의 투여가 필요하다. 또한, 에스트로겐과 프로게스테론의 동시 투여한 경우 유방암, 뇌졸중, 폐색전 등의 위험성이 위약군보다 높게 나타났다[15-17]. Bisphosphonate는 Etidironate가 인간의 질환에 가장 처음 사용한 이래 칼슘 크리스탈의 형성과 용해를 억제하기 때문에 파골세포의 기능을 억제하기 위한 파제트병과 악성종양에 의한 고칼슘혈증을 치료하는데 사용되었다. 1970년에 들어서 골다공증 치료에 처음 도입된 이래로 1980년대 중반 이후 치료가 확대되기 시작하여 etidronate, alendronate가 널리 사용되며 ibandronate, pamidronate에 대한 임상적 연구가 진행되고 있다. 현재 골다공증 치료제로 비스포스포네이트 계열 중 가장 많이 사용되고 있는 알랜드로네이트의 임상연구를 보면 10 mg 용량에서 척추 골

밀도가 첫해 6 % 증가, 3년 치료 후 총 10 %가 증가되었으며 대퇴골, 상완골, 총 골밀도 등의 결과 역시 긍정적으로 나타났다. 1 ㎎, 2.5 ㎎, 5 ㎎의 용량으로 치료하였을 때 2.5 ㎎ 이상을 투여하여야 척추골에서 효과가 있었고 5 ㎎ 이상을 투여하여야 모든 부위의 골밀도의 증가를 보였다. 골절에 대한 효과는 FIT(Fracture Intervention Tria) 연구에서 척추, 손목, 대퇴골 모두에서 50 % 감소시키는 것으로 보고 있으나, 부작용으로 골연화증, 오심, 구토, 설사 등의 위장관 장애 등을 일으킬 수 있으며, 다량을 빨리 투여할 경우 신장기능 저하가 나타나기도 한다[18]. 이와 같이 현재 주로 시판 중인 약제들은 거의 대부분들이 골 흡수를 억제하는 약제들이다. 그러나 골다공증의 궁극적인 치료를 위해서는 골 흡수 억제는 물론 골 형성을 자극하는 약재들이 시급히 요구되는 실정이다. 최근에 골 전환에 관여되는 국소 인자들, 특히 골 형성 과정에 관여되는 인자들을 골다공증 치료에 이용하는 연구들이 시도되고 있다. 약재로 사용될 가능성이 높은 인자들로는 BMP, IGF-1, IGF-1+IGF-BP3, TGF, FGF 및 PDGF 등을 들 수 있겠다[19].

골다공증은 만성질환으로 오랜 투약 기간 및 치료가 필요함에 따른 한약재 추출물에 의한 치료 및 예방이 더욱 유효성 및 안정성을 확보할 수 있으리라 보여지며, 한약재에 의한 골관절 질환 치료제의 검색 및 한약재내 유효물질의 개발이 매우 중요하리라 본다.

인중합체(polyphosphate)는 세균, 곰팡이, 원생동물, 식물, 포유동물 등의 거의 모든 생물체에서 발견되며[20], 인체에 무해하고 식품의 신선도를 유지시켜 식품첨가물로 많이 이용되고[21], 항균제로 분류되지는 않았지만 항균효과를 가진다고 보고되어 있으며[22,23], 인중합체의 기능은 ATP 대체물과 에너지원, Pi의 저장소, 금속 이온의 chelator, 알칼리에 대한 완충제, DNA 출입을 위한 통로, 스트레스와 생존을 위한 조절자, 발생(development)의 조절자, 세포의 외내막의 구성요소로 요약된다[24]. Schröder에 따르면, 인중합체는 proliferation phase, matrix maturation phase, mineralization phase, apoptosis phase에 관련된 다양한 물질들에 영향을 미친다고 나와 있다. 인중합체가 cell culture 상에서 어떤 물질들과 반응하여 분열, 성숙, 파괴에 영향을 미치는지 간단히 그려 놓은 것이다. 이로써 인중합체와 골형성과 관련된 연구를 종합해 보면, 인중합체가 조골세포양 세포(osteoblast-like cells)에서 다량 발견되고 골조직의 무기질 과정의 조절과 관련이 있으며, 골과 칼슘대사에 관여하며, 골절시 골형성이 촉진되는 것으로 골유도 효과가 있으며, osteocalcin 발현량을 증가시킴으로 골화세포의 생성을 촉진시킬 수 있다는 것이다. 그러나, 아직 인중합체가 어떠한 기전으로 이러한 일들을 일으키는지는 정확히 알려지지 않았으나, 인중합체가 골대사에 중요한 역할을 하고 있다는 것은 많은 사람들에 의해서 증명되어지고 있는 실정이다. 따라서, 한약재 내에서 인중합체의 정량을 분석하고 골형성과 관련된 다른 실험을 통하여 인중합체 함량과의 상관성을 비교하는 것이 매우 의미 있다고 생각된다.

본 실험에서 인중합체를 골형성과 관련된 하나의 factor로 보아 六味地黃湯과 그 구성 한약재를 사용하여 인중합체를 정량 분석을 하였다. 한약재에 함유된 인중합체를 spectrophotometer (OD530/630)로 측정하여 평균한 결과, 10 mg/㎖에 함유되어 있는 인중합체는 山藥, 澤瀉, 六味, 熟地黃, 山茱萸, 白茯苓, 牧丹皮가 평균 44~45 ng/㎖의 양을 보였으나 전체 건조중량에 비례하여 비교해 보면 熟地黃이 가장 많고 그 다음으로 山茱萸, 六味, 山藥, 牧丹皮, 澤瀉순으로 많이 있었고 白茯苓이 가장 적은 양을 갖고 있는 것으로 나타났다. 위 농도는 같은 100 ㎎/㎖의 野菊花, 鹿茸, 鹿角의 인중합체의 양을 정량한 것 보다 대략 4~5배 정도가 많은 양이다[11].

골다공증은 한의학적으로 腎虛에 속하는 것으로, 《素問·宣明五氣篇》에서 "五臟所主, ……, 腎主骨"이라 하였고, 《素問·六節臟象論》에 "腎者, 主蟄封藏之本, 精之處也, ……, 其充在骨"이라 하였고, 《素問·陰陽應象大論》에 "北方生寒, 寒生水, 水生鹹, 鹹生腎, 腎生骨髓"라고 하여[25] 腎은 精을 藏하고 精은 髓를 生하며 髓는 骨을 養한다고 하였다. "髓者, 骨之充也"라 하여[26] 腎精이 骨髓의 盛衰와 밀접하게 관련되어 있는 것을 설명하고 있다. 한의학에서는 골다공증을 '骨痿', '骨痺'의 범주에 포함[27]시켰으며 또한 '腎主骨'이라 하여 腎과 骨과는 밀접한 연관성을 가지고 있는 것으로 인식하고 있으며 腎이 骨을 主한다는 것은 腎이 水液을 조절하고 先天과 後天의 精을 이용하여 骨髓를 滋養함으로써 腎精이 骨髓를 생장시킨다는 의미를 내포하고 있는데 이는 骨의 생리, 병리 과정에서 腎의 기능이 아주 중요한 역할을 담당하고 있음을 알려준다[28].

六味地黃湯은《金匱要略》[29] 八味腎氣丸에서 肉桂, 附子를 祛하고 六味地黃丸의 분량을 1/20로 줄인 處方으로, 宋代 錢乙의 《小兒藥證直訣》卷下方[30]에 처음으로 기재되었다. 六味地黃湯은 熟地黃, 山藥, 山茱萸, 白茯苓, 牧丹皮, 澤瀉 6종의 약물로 구성되고 熟地黃을 君藥으로 쓰기 때문에 六味地黃湯이라고 稱한다. 本方의 효능은 滋補肝腎, 滋補腎陰하므로 先天元氣不足, 腎氣虛乏, 陰虛로 발생하는 諸證을 치료하며, 補眞陰, 除百病하며 通治大小證한다[31,32].

본 연구에서는 위에서 상기한 6가지 한약재와 六味地黃湯을 통하여, 골모세포의 증식과 RT-PCR법을 이용한 골 형성 관련 유전자들 (Bone Morphogenetic protein 1과 2, Osteonectin, Matrix Gal protein, Collagen type 1)의 전사활성을 통하여 골형성에 미치는 영향을 살펴보았다. HOS-TE85 세포주는 골모세포의 특징을 유지하고 있는 골종양 세포주이다[33]. 본 실험에서 HOS-TE85 세포의 세포증식능을 평가한 결과, 牧丹皮, 澤瀉, 白茯苓, 六味地黃湯에서 약 10 %~35 %의 세포증식율을 보였으며, 항산화 효과를 볼 수 있는 과산화수소를 처리하여 세포증식능을 본 결과, 牧丹皮, 白茯苓, 六味地黃湯에서 약 50 %정도의 세포증식율을 보인 것을 제외하고는 모든 약재에서 두드러진 증가나 감소는 없었다. 위 항산화 효과 실험은 골다공증으로 인한 탈골 및 디스크 등에 의한 염증반응을 치료할 수 있을지 알아보고자 진행 진행하였고, 六味地黃湯, 牧丹皮, 白茯苓에서 항산화 효과가 있는 것으로 나타남에 따라 IL-2, 4, 10 등의 전사율 및 다양한 실험을 통해서 六味地黃湯의 다른 기능을 알아보는 것도 좋을 것으로 추정된다. 결과적으로, 牧丹皮와 白茯苓 그리고 六味地黃湯이 골모세포 증식에 영향을 미치리라 사료된다.

FBS의 농도차에 의한 결과 차이가 적었는데 이는 2 % FBS 특여가 7가지 약재에 대하여 stress 요인으로 작용하지 못한 것으로 보여지며, 이 HOS-TE85 cell line의 증식능을 억제한 실험에서 0.3 %와 0 %에서 P>0.01로 유의성 있게 증식능이 억제된 바 향후 FBS가 더욱 적은 용량으로도 비교하여 진행된 실험이 필요하리라 생각된다.

골형성 단백질 (Bone morphogenetic protein, BMP)은 골기질 중에 포함되며 단독으로 뼈의 발생을 촉진하는 polypeptide로써 tumor necrosis factor (TNF) 같이 발견되었다. BMP의 존재에 대한 첫 번째 힌트는 방광에서 수술 중 발생한 큰 틉을 메우기 위해 사용한 근막에서 뼈가 형성되는 것을 관찰한 데서 기인한다. 이는 결합조직과 "osteoinductive" tissues (혹은 substances)과의 작용에서 기인한다. 이식된 탈회골과 방광상피를 서로 같이 두었을 때 결합조직에 이소성 골형성을 관찰할 수 있었다. 어떠한 조직이 "osteogenic protein"을 소유하는 것으로 생각되었고 이는 새로운 뼈의 형성을 유도할 수 있었다. 많은 종류의 BMP가 발견되었고 이는 homology 배열에 기초하고 있으며, 대부분의 GDF (growth differentiation factors)도 BMP군에 포함되었다. 현재까지 알려진 BMP는 약 20종이 있으며, 이소성 골이나 연골의 생성을 유도할 수 있을 뿐만 아니라 장기의 발육에도 관여를 하고 있다. 이는 세포의 증식, apoptosis, 분화 그리고 morphogenesis에도 관여한다[34]. 즉, 구조적으로 BMP-1은 730개의 아미노산으로 된 효소로 pro-collagens I, II, III를 절단하여 성숙한 콜라겐 섬유를 만드는 데 관여한다. 이 1형을 제외하고 BMPs는 TGFβ 계열에 속하는 성장인자로 밝혀졌다. 여러 가지 BMP 아형들 가운데 BMP-2와 BMP-4는 신생골 형성 능력이 뛰어나서 골절 치유 과정에서도 중요한 조절인자로 작용할 것으로 기대되고 있다. Procollagen을 collagen으로 만드는 BMP1A는 10 % FBS를 처리한 sample에서 대조군에 비해 전사량이 줄어드는 것을 볼 수 있었다. 이것은 collagen의 합성이 과발현되는 것을 조절하는 것으로 추정된다. 또한 골화세포 분열에 영향을 미치는 BMP2B는 10 % FBS를 처리한 sample에서는 전사량이 전혀 보이지 않는 대조군에 비해서 약재를 첨가하였을 때에는 모든 약제에서 전사되는 것을 볼 수 있다. 이것은 약재가 골 유도 능력이 좋다는 것을 의미한다. 그러나, 2 % FBS를 처리한 sample에서는 대조군에 비해서 약재를 처리한 sample들의 전사량이 줄어드는 것을 보아 약재들의 어떠한 peptide나 물질이 BMP2의 전사량을 조절하는 regulator로써 작용하는 것으로 추정된다. 위의 내용은 다양하게 진행된 실험이 필요하리라 생각된다.

뼈의 유기질 성분의 90 %는 collagen이고 나머지 10 %가 osteocalcin, osteonectin, α-HS glycoprotein, cyanoprotein, fetuin 등의 비 collagen성 단백질로 구성된다. 비 collagen성 단백질인 osteonectin(OTN)은 분자량이 32 kDa인 인산화 당단백질로서 주로 발육 중인 뼈의 무기성분에 존재하는 비아교단백질이다[35]. 석회화 조직에서의 OTN의 기능은 아직 정확히 밝혀지지 않았으나, 시험관에서 아교섬유 위에 수산화인회석 형성의 개시시에 많이 분포된다고 알려져 있으며, 아교세섬유와 칼슘에 부착된다고 알려졌다[36,37]. HOS-TE85 세포의 골형성 관련 유전자인 OTN은 牧丹皮를 제외하고 모든 약재들에서 대조군에 비해서 저하되는 것을 볼 수 있다. 즉, 이것은 골기질 성숙단계와 무기질화 단계를 억제하고 있는 것을 알 수 있다. MGP는 작은 matrix 단백질로서 골에서 isolation되었으며 Price와 Williamson에 의해서 characterized 되었다[38]. 이 단백질의 기능은 석회화를 억제하나, 아직 정확한 mechanism은 밝혀지지 않았다. 발달 중인 limbs에서 MGP가 과발현 되면 연골 성숙이 늦어지고 연골 내의 골화가 block 된다. 또한, MGP의 발현양이 BMP2 양보다 적으면 BMP2가 활성되고 비슷하면 억제, 발현양이 많으면 BMP2의 활성이 오랫동안 지속이 된다고 알려져 있다. MGP는 10 % FBS 처리 후 약재를 넣은 sample 山藥, 牧丹皮, 六味에서 발현되는 것을 볼 수 있다. 특히, 山藥에서 다른 약재들에 비해서 많은 양이 발현되는 것을 볼 수 있는데, BMP2에서 보면 다른 약제들에 비해서 山藥의 BMP2 전사량이 많은 것을 볼 수 있다. 석회화기능을 억제하여 BMP2의 발현을 증가시켜 골화세포의 발현을 증가시킨다고 볼 수 있다. COL1(collagen type 1)은 뼈의 유기질의 90 %를 차지하고 있는 단백질로서, 많은 질환이 이를 만드는 유전자의 결함과 연관되어 있다. osteonectin, osteopontin의 표현과 관련된 연구에서 이들은 단지 ossification에만 관여하는 것으로 알려져 있다. 동물의 세포외 매트릭스의 주성분으로 오랫동안 구조 유지라는 물리적 기능을 위한 불활성 단백질이라고 생각되어 있었지만, 현재는 세포접착활성을 나타내는 것으로 알려져 있다. 콜라겐 분자는 Ⅰ ~ ⅩⅢ형으로 많은 종류가 있다. 그중 Ⅰ형은 교원섬유를 이루는 콜라겐으로 섬유형성 콜라겐 또는 간질형 콜라겐이라고 불리운다. HOS-TE85 cell line에서 영양분이 부족한 상태인 2 % FBS 처리 후 약재를 넣은 sample 六味地黃湯과 山藥에서 각각 10 %, 20 % 발현양이 증가하는 것을 볼 수 있다. 이것은 六味地黃湯과 山藥이 연골형성에 있어서 유효하게 관여 할 수 있음을 시사한다.

이상에서 六味地黃湯 및 그 구성 약재들의 인중합체를 정량한 결과 비슷한 양을 나타내어 인중합체에 따른 골형성 관련 유전자들의 비교를 할 수 없었으나, 다른 약재들에 비해 많은 양의 인중합체를 함유하고 있으며, 이들이 골화세포 분열에 관여하는 BMP2와 collagen, procollagen을 collagen으로 만들어 주는 BMP1등의 전사량을 조절하는 것으로 보아 골다공증 치료제로 심도 있는 연구가 필요하다고 보여지며, 이들에 관한 protein level에서의 다양한 실험을 통해서 BMP1과 BMP2, MGP등의 상관관계를 알아보는 등의 좀 더 심도 있는 실험을 통해 골다공증 치료제로서의 검증이 필요하다고 본다.

결 론

六味地黃湯과 그 여섯 가지 구성 약물들의 인중합체 함량을 정량 분석하여 비교하고, 골모세포인 HOS-TE85 세포의 증식과 RT-PCR 법을 이용한 골 형성 관련 유전자들의 전사활성을 통하여 골형성에 미치는 영향을 분석한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

인중합체를 spectrophotometer (OD530/630)로 측정하여 평

균한 결과, 100mg/㎖에 함유되어 있는 인중합체는 山藥, 澤瀉, 六味, 熟地黃, 山茱萸, 白茯苓, 牧丹皮가 평균 44-45ng/㎖의 양을 보였으나 전체 건조중량에 비례하여 비교해 보면 熟地黃이 가장 많고 그 다음으로 山茱萸, 六味, 山藥, 牧丹皮, 澤瀉, 白茯苓의 순으로 나타났다. HOS-TE85세포의 세포증식능을 평가한 결과, 牧丹皮, 澤瀉, 白茯苓, 六味地黃湯에서 약 10~35%의 세포증식율을 보였으며, 六味地黃湯, 牧丹皮, 白茯苓에서 항산화 효과가 있는 것으로 나타났다. BMP1A는 10% FBS에서 약재를 처리한 경우는 대조군에 비해 전사량이 현저히 줄었고, 2% FBS에서 약재를 처리한 경우는 대조군에 비해 아무런 발현을 보이지 않았다. BMP2B는 10% FBS에서 약재를 처리한 경우는, 전사량이 전혀 보이지 않는 대조군에 비해, 모든 약재에서 전사되었고, 2% FBS에서 약재를 처리한 경우는 대조군에 비해 전사량이 줄었다. OTN은 10% FBS에서 약재를 처리한 경우는 대조군과 전사량이 비슷하게 나타났고, 2% FBS에서 약재를 처리한 경우는 牧丹皮에서만 다른 약재들에 비해 전사량이 현저히 줄었다. MGP는 10% FBS에서 山藥, 牧丹皮, 六味을 넣은 경우는 약간의 유전자 발현이 되었고, 2% FBS 처리 후 약재를 처리한 경우는 아무런 발현을 보이지 않았다. COL1은 10% FBS에서 약재를 넣은 경우는 대조군과 비교하였을 때 15~30%가량 발현양이 줄었고, 2% FBS에서 약재를 넣은 경우 六味地黃湯과 山藥에서 각각 10%, 20% 발현양이 증가하였다.

이상의 결과를 종합해 보면, 六味地黃湯과 그 구성 약재들의 인중합체를 정량한 결과 비슷한 양을 나타내어 인중합체에 따른 골형성 관련 유전자들의 비교를 할 수는 없었으나, 六味地黃湯과 그 구성 약재들은 다른 약재들에 비해 많은 양의 인중합체를 함유하고 있으며, 이들이 골화세포 분열에 관여하는 BMP2와 BMP1, OTN, MGP, COL1 등의 전사량을 조절하는 것으로 보아 골형성에 유효한 것으로 사료된다.

참고문헌

1. 김구순. polyphosphate가 골형성에 미치는 영향에 관한 연구. 경희대학교 대학원(博士). p.2, 7, 2001.
2. Fleisch H. Form polyphosphates to bisphosphate and their role in bone and calcium metabolisem. Prog Mol Subcell Biol. 23;197-216, 1999.
3. 이진용 外 2人. Inorganic polyphosphate promotes bone regeneration. 대한구강해부학회. 23;219-228, 1999.
4. (주)경원메디칼, 인산칼슘(Ca-phosphate)에 골재생(성장) 촉진물질인 인중합체를 첨가한 생체적합적인 골대체 및 재생소재의 개발. 보건복지부, 1999.
5. Leyhausen G, Lorenz B, Zhu H, Geurtsen W, Bohnensack R, Muller WE, Schröder HC. Inorganic polyphosphate in human osteoblast-like cells. J Bone Miner Res. 13(5);803-12, 1998.
6. Schröder HC, Kurz L, Muller WE, Lorenz B. Polyphosphate in bone. Biochemistry (Mosc). 65(3);296-303, 2000.
7. Khokher MA, Dandona P. Diphosphonates inhibit human osteoblast secretion and proliferation. Metabolism. 38(2);184-7, 1989.
8. Reinholz GG, Getz B, Pederson L, Sanders ES, Subramaniam M, Ingle JN, Spelsberg TC. Bisphosphonates directly regulate cell proliferation, differentiation, and gene expression in human osteoblasts. Cancer Res. 60(21): 6001-6007, 2000.
9. Renier ML, Kohn DH. Development and characterization of a biodegradable polyphosphate. J Biomed Mater Res. 34(1);95-104, 1997.
10. Sun JS, Tsuang YH, Liao CJ, Liu HC, Hang YS, Lin FH. The effects of calcium phosphate particles on the growth of osteoblasts. J Biomed Mater Res. ;37(3);324-334, 1997.
11. 金榮信. 數種 韓藥材의 인중합체 含量과 骨形成 關聯 遺傳子의 活性에 대한 硏究. 尙志大學校 大學院(博士). 2003.
12. 羅昌洙 외 3人. 頭面 脊椎 四肢病의 診斷과 治療. 서울. 대성문화사. p.142, 1995.
13. 오한진. 갱년기 골다공증의 치료. 가정의학회지. 21(1);20-21, 2000.
14. 강무일 골다공증의 최근 동향. 대한내분비학회 연수강좌. pp.123-135, 1998.
15. Felson DT, Zhang Y, Hannan MT, Kiel DP, Wilson DW, Anderson JJ. The effect of postmenopausal setrogen therapy on bone density in elderly woman. N Engl J Med. 329;1141-1146, 1993.
16. 정호연. 골다공증의 치료. 대한내분비학회 연수강좌. pp.25-36, 2000.
17. Schneider DL, Barrett-Corner EL, Morton DJ: Timing of postmenopausal optimal bone mineral density. JAMA. 277;543-547, 1998.
18. 한기옥. 골다공증증 치료의 다제 병합요법. 대한내분비학회 연수강좌. pp.47-53, 2000.
19. 임승길. 골다공증 치료제로서 bone Formation-stimulating Agent의 최신지견 대한내분비학회지. 14(2);219-226, 1999.
20. Komberg A. Inorganic polyphosphate : toward making a forgotten polymer unforgattoable. J Bacteriol. 177(3);191-196, 1995.
21. Knabel Sj, Walker HW and Hartman PA. Inhihition of Aspergillus flavus and selected grampositive bacteria by chelation of essential metal cations by polyphosphates. J Food Prot. 54(5);360-365, 1991.
22. 최인식 外. Porphyromonas gingivalis에 대한 polyphosphate의 항균효과. 대한미생물학회지. 34;285-301, 1999.
23. HY-kim eat. Scutellariae Radix as a novel antibacterial herb targetting ppk(polyphosphate kinase) of Salmonella typhimurium. Biochemistry society in UK 18th International congress of biochemistry and Molecular biology.
24. Kornberg A. Inorganic Polyphosphate: A molecular of

many Functions. Prog Mol Subcel Biol. 23;8-11, 1999.
25. 程士德 主編. 素問注釋匯粹(上冊). 北京, 人民衛生出版社. p.89, 152, 189, 1982.
26. 王氷 注. 黃帝內經素問. 서울. 大成出版社. pp. 21, 101, 212, 274, 340, 768, 1994.
27. 金貞娟 外 1人. 骨多孔症에 대한 東西醫學的 考察. 韓方再活醫學會誌 6(1):1996.
28. 金完熙 外 1人, 臟腑辨證論治. 서울. 成輔社. pp.281-88, 1985.
29. 張機. 金匱要略方論. 서울. 成輔社. pp.34-35, 1985.
30. 錢乙. 小兒藥證直訣(卷下方). 江蘇科學技術出版社. pp.47-8, 1981.
31. 尹吉永. 東醫臨床方劑學. 서울. 明寶出版社. pp.185-6, 319-21, 1985.
32. 汪訒庵. 醫方集解. 台北. 文光圖書有限公司. pp.1-4,227-31, 1972.
33. Clover J, Growen M. Are MG-63 and Hos-TE85 human osteocarcoma cell line representative models of the osteoblastic phenotype. Bone. 15(6);585-91, 1994.
34. Ian C. Scott, Yasutada Imamura, William N. Pappano, James M. Troedel, Anneliese D. Recklies, Peter J. Roughley, Danel S. Greenspan. Bone Morphogenetic Protein-1 processes probioglycan. The Journal of Biological Chemistry. 275(39);30504-30511, 2000.
35. Termine JD, Kleinman HK, Whitson SW, Conn KM, McGarvey ML, Martin GR. Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen. Cell. 26;99-105, 1981.
36. Romsberg RW, Werness PG, Riggs BL, Mann KG. Inhibition of hydroxyapatite crystal growth by bone-specific and other calcium binding proteins. Biochem. 25;1176-80, 1986.
37. Pacifici M, Oshimao, Fisher LW, Young MF, Shapiro IM, Leboy PS. Changes in osteonectin distribution and levels are associated with mineralization of the chiken tibial growth cartilage. Calcif Tissue Int. 47;51-61, 1990.
38. Price, P. A. and Williamson, M. K. Primary structure of bovine matrix Gla protein, a new vitamin K-dependent bone protein. J. Biol. Chem. 260(28);14971-14975, 1985.