

단치소요산가미방이 Dexamethasone 처리한 랫드의 두개골 세포에 미치는 영향

박종형 · 황귀서*

경원대학교 한의과대학

Effects of DSG on Osteoblastic Cell from Rat Calvariae in the Presence of Dexamethasone

Jong Hyeong Park & Gwi Seo Hwang*

College of Oriental Medicine, Kyungwon University

Abstract

It is well known that glucocorticoid may induce osteoporosis as its side effect in long-term therapy. The inhibition of osteoblast by glucocorticoid is also recognized as its action mechanism of decreased bone formation. In this study, the effect of DSG, Danchisoyosangamibang, on the differentiation and function of osteoblastic cells was investigated. The osteoblastic cells were isolated from rat calvariae using collagenase treatment. The cell counting, enzyme activity assay, MTT assay, collagen content assay were done to determine the cell proliferation, intracellular alkaline phosphatase (ALP) activity, bone matrix production, and cell apoptosis. DSG enhanced the cell proliferation after the culture for 10 days. ALP activity and total protein synthesis, and intracellular collagen synthesis were increased time dependently when the cells were treated with DSG in the presence of dexamethasone. And, DSG restored calvarial cell function decreased by dexamethasone.

Key words : Osteoporosis, DSG, Osteoblast, ALP, Collagen

* Corresponding author : Gwi Seo Hwang, College of Oriental Medicine, Kyungwon University
Tel : 82-31-750-5421 E-mail : seoul@kyungwon.ac.kr

I. 서론

골 대사에 관여하는 세포로는 조골세포, 파골세포, 골세포 등이 있다. 조골세포는 fibroblast-like cell 알려져 있으며 골 내의 기질물질인 콜라겐을 합성하여 골 형성을 촉진하고 있다.¹⁾ 이와는 대조적으로 macrophage-like cell인 파골세포는 collagenase를 비롯한 다양한 단백질을 분비하여 골의 재흡수를 촉진한다.²⁾ 조골세포와 파골세포는 세포 조절물질을 분비하여 상호 세포 기능을 조절한다. 그러나, 골 대사에 관여하는 PTH, Vitamin D₃, Calcitonin 등의 작용에 영향을 미치는 여러 요인들에 의해 골 형성능의 감소 또는 골 파괴의 증가가 나타나면 골다공증이 유발될 수 있다.^{3,4)}

골다공증에는 에스트로겐 결핍으로 인한 I형 골다공증, 노인성인 II형 골다공증, 약물 및 기타 질병으로 인한 속발성 골다공증 등이 있다. 부신피질호르몬은 항염 및 면역억제에 효과가 우수하여 천식이나 자가면역질환 등 면역체계와 관련된 질환의 치료에 광범위하게 사용되고 있다. 이는 속발성 골다공증의 유발원인으로 작용하여,⁵⁾ 자가면역질환, 호흡기계 질환, 소화기계 질환, 장기이식, 중앙 환자 등 부신피질호르몬이 쓰이는 질병에서 골다공증이 많이 보고되었다.⁶⁾ 부신피질호르몬의 작용은 조골세포(osteoblast)의 세포 증식과 세포 분화를 직접적으로 감소시키며, 골세포 증식능을 증가시키는 성장인자인 IGF-I(insulin like growth factor I), IGF-II(insulin like growth factor II), PDGF(platelet derived growth factor), IGFBP-5 등을 억제시킨다.^{7,8)} 이와 함께 교원질인 콜라겐의 생합성이 억제되고 오스테오칼신(osteocalcin) 같은 비교원성 단백질의 생합성도 억제되어 단백질 칼슘화를 통한 골 형성이 저하된다. 이와는 별도로, 부신피질호르몬은

파골세포(osteoclast)에 작용하여 세포분화를 촉진하고, 교원질 분해효소(collagenase)를 활성화시켜 골 재흡수(bone resorption)를 증가시킨다. 또한, 부신피질호르몬은 Vit D 작용을 억제하고 PTH 분비를 촉진하여, 장관내 칼슘 흡수 억제, 신 세뇨관 칼슘 재흡수 억제, 뼈에 칼슘 침착을 억제하여 골다공증을 유발한다.^{9,10)}

한의학적 관점에서 뼈는腎과 밀접한 관계가 있다고 알려져 있다. <素問·平人氣象論>의 “藏眞下于腎, 腎藏骨髓之氣也”,¹¹⁾ <素問·逆調論>의 “腎者水也, 而生于骨, 腎不生即髓不能滿”은腎이 뼈대사를 주관하는 것을 나타내고 있다.¹¹⁾ 그 동안 단치소요산은 여성 폐경기장애 증후군을 치료하기 위한 처방으로 주로 사용되었다.¹²⁾ 최근 연구 결과, 단치소요산은 대식세포의 LDL 산화작용 억제 등을 통한 혈액순환 개선,¹³⁾ 신경전달물질의 조절을 통한 스트레스 억제¹⁴⁾ 등이 효능이 있는 것으로 보고되었다. 골다공증과 관련한 논문으로는 난소 기능이 저하된 랫드에서 골다공증 예방 효과,¹⁵⁾ 랫드의 조골세포 기능 활성화에 미치는 효과를 보고한¹⁶⁾ 것이 있었다. 그러나, 단치소요산이 여성 폐경기증후군 치료에 많이 처방되는 것을 고려하면, 주증상인 골다공증에 좀더 효과적인 처방으로 개선하는 것이 필요하다고 판단되었다. 본 연구는 조골세포 기능을 억제하여 골다공증을 유발하는 것으로 알려진 부신피질호르몬을 이용한 실험을 통하여 골다공증의 예방 및 치료에 이용할 수 있는 수단을 개발하기 위해 시도되었다. 이를 위하여 단치소요산의 조골세포 활성화 작용을 강화하기 위해 여성초를 가미한 가미방 연구를 시도하였다. 연구는 랫드의 두개골에서 분리한 골세포를 배양하여 사용했으며, 배양된 골세포에 부신피질호르몬제와 단치소요산가미방(DSG) 추출물을 처리하여 골 형성 촉진 효과를 측정하였다. 또한, 조골세포 분열능 및 조골세포에 의한 단백질의 생합성능, ALP 활성, collagen 생합성,

골세포 생존률에 미치는 영향을 측정하였다.

2) 약물처리

II. 실험재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

실험에 사용된 약물은 경원대학교 한방병원에서 사용하는 단치소요산(DS)에 어성초를 가미한 처방(이하 DSG라 함)을 사용하였다.

<단치소요산가미방> 당귀 6g, 시호 백작약 백출 백복령 각 5g, 목단피 치자 감초 각 3g, 박하 생강 각 2g, 어성초 10g

2) 실험동물

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

2. 실험방법

1) 검액제조

DS와 DSG 약물 2첩 분량을 각각 3차증류수 1,000ml를 가하고 6시간 이상 가열하여 환류 추출하였다. 여과지를 이용하여 여과한 다음, 여액을 Evaporator(EYERA, Japan)을 이용하여 감압 농축한 다음 농축액을 동결 건조하여 실험시까지 냉동보관 하였다. 실험시에는 DS 및 DSG 추출분말을 배지에 녹인 후 pore size 0.45um 의 여과지를 통과시킨 후 사용하였다.

실험은 6개군, 즉 (1) 정상군(NC), (2) (1)에 1ug/ml의 DSG를 투여한 군(DSG1), (3) (2)에 10ug/ml의 DSG를 투여한 군(DSG10), (4) 정상군에 dexamethasone을 처리한 군(OC), (5) (2)에 1ug/ml의 DSG를 투여한 군(DSG1d), (6) (2)에 10ug/ml의 DSG를 투여한 군(DSG10d)으로 나누어 실험하였다. 단, DS 와의 비교를 위하여 세포 증식능에 미치는 영향에 대한 평가에서는 (1)과 (2)에 1ug/ml의 단치소요산 추출물 투여한 군(DS1), 10ug/ml의 단치소요산 추출물 투여한 군(DS10)을 따로 실험하여 DSG 군과 비교하였다.

3) Fetal calvarial cell culture(FCS)

임신 21일 된 쥐의 자궁을 절개하여 fetus를 꺼낸후, 후두부를 절개하고 calvarie를 적출하였다. calvarie에 붙어있는 결체조직을 제거하고, HBSS로 세척했다. calvarie를 1.5ml의 collagenase, trypsin, 0.5mM EDTA 용액에 넣어 37°C에서 반응시켰다. 상등액을 취하여 500rpm에서 원심분리하여 침전된 calvarial cell을 얻었다. PBS에 재현탁하여 1500rpm에서 원심분리하여 세척한 후, 이를 DMEM 배지에 넣어 현탁한 후 37°C, 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 측정 한 후 실험에 사용하였다.

4) 골세포의 분열능 측정

배양된 세포를 이용하여 날짜별로 분열능을 측정하였다. FCS의 경우 $1-3 \times 10^5$ /well로 seeding 하였으며, 배양한 세포의 수를 세기 위하여 세

포의 배지를 제거하고, HBSS로 세포를 세척하였다. 이후 collagenase, trypsin, 0.5mM 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 3000rpm에서 10분간 원심분리하였다. 원심분리후 상등액을 취하여 0.56 M 2-amino-2-methyl-propanol, 1mM MgCl₂, 10mM p-nitrophenylphosphate를 함유한 반응액과 37°C에서 10분간 반응시켰다. 0.2 N NaOH 1ml를 가하여 반응을 중단시킨 후 405nm에서 흡광도를 측정하였다.

6) Bone Matrix Protein 생합성 측정

Cell을 배양한 plate를 PBS로 세척한 후 cell scraper를 이용해 세포를 긁어내어 5mM dithiothreitol(DTT)이 함유된 PBS에 현탁하였다. 이 현탁액을 냉각상태에서 ultrasonicator로 sonication 하였다. 현탁액을 취하여 뷰렛 시약(BC 114 영동뷰렛 시약 Biuret Reagent)과 37°C에서 10분간 반응시킨 후 550nm에서 흡광도를 측정하였다.

7) Collagen 생합성 측정

Cell을 배양한 plate를 PBS로 세척한 후 세포를 긁어내었다. 이를 5mM dithiothreitol이 함유된 50mM Tris buffer에 현탁시킨 후 ultrasonicator로 sonication 시켰다. 이후, 100,000x g

에서 30분간 원심분리하여 상등액을 제거한 후 pellet에 HCl을 가하여 24 시간동안 100°C에서 가수분해하였다. Isopropanol을 넣은 다음 oxident solution을 첨가한 후 상온에서 4분 동안 두었다. 이후 Ehrlich's reagent solution을 첨가한 다음 60°C에서 25분간 heating한 후 2~3분간 cooling 했다. 17시간 후에 550nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준품으로는 Hydroxyproline을 사용하였다.

8) MTT assay

Cell을 배양한 plate를 PBS로 세척한 후 cell scraper를 이용해 세포를 긁어내어 5mM dithiothreitol(DTT)이 함유된 PBS에 현탁하였다. 이 현탁액을 냉각상태에서 ultrasonicator로 sonication하였다. 현탁액을 취하여 MTT(5mg/ml in PBS)와 37°C에서 1시간동안 반응시킨 후 100% DMSO를 넣어주었다. 5분 후 650nm에서 흡광도를 측정하였다.

3. 통계처리

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

III 결과

1. 조골세포 분열능에 미치는 영향

랫드 태자의 두개골로부터 분리한 조골세포를 8일 간 배양한 결과, 정상 세포는 5.7x10⁵cells/well이었으며, 텍사메타손을 함께 처리한 두개골 세포는 3.0x10⁵cells/well 로서, 정상군에 비해 현저히 저하됨이 관찰되어 조골세포의 기능을 억제하는 것으로 나타났다. 텍사메타손에 의해 감소한 두개골 세포의 분열능은 1ug/ml

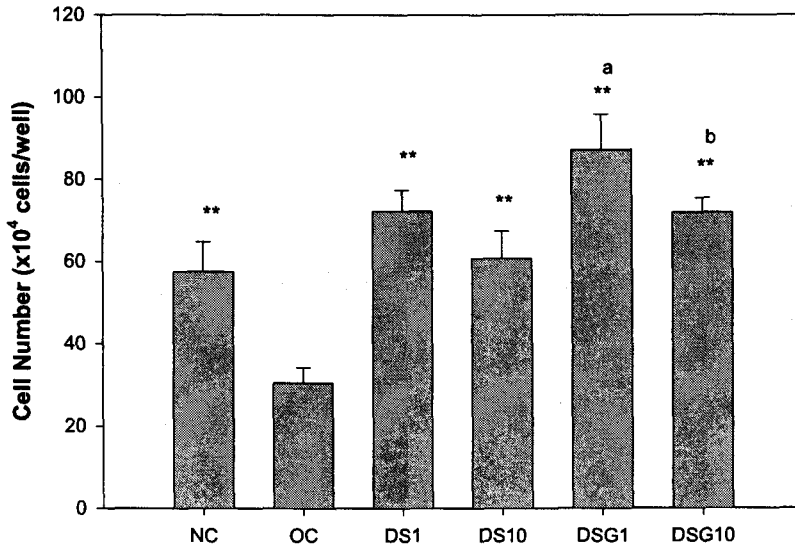


Fig. 1 Effect of DSG on cell proliferation of murine calvarial cell

Cells were counted in 8 days after DSG treatment.
Each bars represents the mean \pm S.D. of 6 wells.

NC : vehicle

OC : vehicle + dexamethasone

DS1 : 1ug/ml of DS + dexamethasone

DS10 : 10ug/ml of DS + dexamethasone

DSG1 : 1ug/ml of DSG + dexamethasone

DSG10 : 10ug/ml of DSG + dexamethasone

** : p < 0.01 vs OC, a : p < 0.05 vs DS1, b : p < 0.05 vs DS10

의 DS를 처리한 경우에는 7.2×10^5 cells/well 로서 유의적인 증가를 나타내었다. 10ug/ml의 DS를 처리한 경우에도 6.0×10^5 cells/well 로서 역시 텍사메타손에 의해 감소한 분열능을 현저히 증가시켰다. 또한, 1ug/ml의 DSG를 처리한 경우에는 8.7×10^5 cells/well 대조군에 비해 유의적인 증가를 나타내었으며, 10ug/ml의 DSG를 처리한 경우에도 7.2×10^5 cells/well 로서 역시 텍사메타손에 의해 감소한 분열능을 현저히 증가시켰다. DSG는 같은 농도의 DS에 비해서도 유의적인 증가를 보였다(Fig. 1).

이러한 DSG의 효과가 정상적인 두개골세포

의 기능 활성화를 증가시키는지 알아보기 위하여 정상세포에 처리한 결과, DSG는 역시 DS에 비해 현저한 활성증가를 나타내었다(Fig. 2).

2. 단백질 합성에 미치는 영향

랫드 태자의 두개골로부터 분리한 조골세포를 10일 간 배양한 결과, 정상 세포가 생성하는 단백질량은 3.39g/d이었으며, 텍사메타손을 함께 처리한 두 개골 세포에서의 단백질 총량은 2.89g/d로서, 정상군에 비해 현저히 저하됨이 관찰되어 조골세포에서 생성하는 단백질의

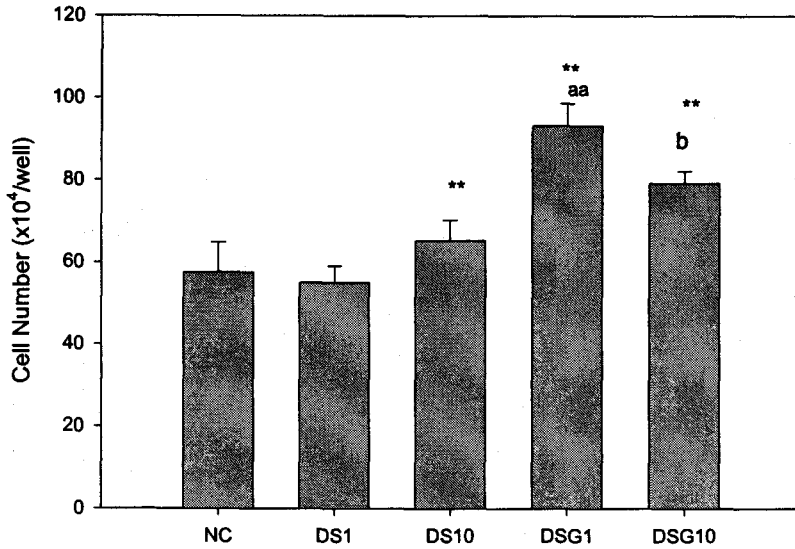


Fig. 2 Effect of DSG on cell proliferation of murine calvarial cell
Cells were counted in 8 days after DS and DSG treatment.
Each bars represents the mean \pm S.D. of 6 wells.

NC : vehicle

DS1 : 1ug/ml of DS

DS10 : 10ug/ml of DS

DSG1 : 1ug/ml of DSG

DSG10 : 10ug/ml of DSG

** : $p < 0.01$ vs NC, aa : $p < 0.01$ vs DS1, b : $p < 0.05$ vs DS10

기능을 억제할 것으로 판단되었다. 정상세포에서 1ug/ml의 DSG를 처리한 경우에서의 단백질 생합성량이 3.51g/dl이었으며, 10ug/ml의 DSG를 처리한 경우에는 3.45g/dl로 변화가 없었다. 또한, 1ug/ml의 DSG를 처리한 경우에서의 단백질 생합성량이 3.30g/dl로서 텍사메타손 처리군에 비해 유의적인 증가를 나타내었다. 또한, 10ug/ml의 DS를 처리한 경우에는 3.45g/dl로서 역시 텍사메타손에 의해 감소한 단백질 생합성량을 현저히 증가시켰다. (Fig. 3).

3. ALP의 활성화에 미치는 영향

랫드 태자의 두개골로부터 분리한 조골세포를 10일 간 배양한 결과, 정상 세포에서의 ALP 활성은 12.8unit/ml이었으며, 텍사메타손을 함께 처리한 두 개골 세포에서의 ALP 활성은 8.6unit/ml로서, 정상군에 비해 현저히 저하됨이 관찰되어 조골세포의 기능을 억제된 것으로 나타났다. 텍사메타손에 의해 감소한 두개골 세포의 ALP 활성은 1ug/ml의 DSG를 처리한 경우에는 16.4unit/ml, 10ug/ml의 DS를 처리한 경우에는 16.3unit/ml로서 텍사메타손에 의해 감소한 ALP 활성을 현저히 증가시켰다.

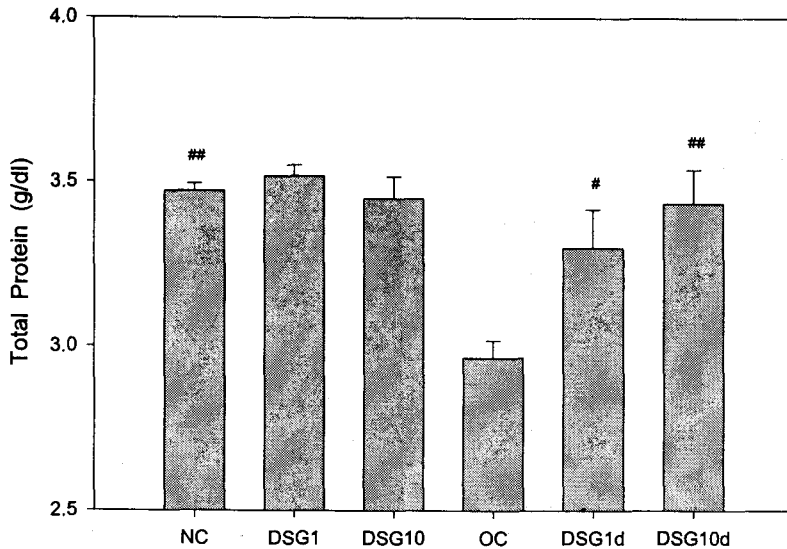


Fig. 3 Effects of DSG on protein synthesis of murine calvarial cell
Total protein were determined in 10 days after DSG treatment.
Each bars represents the mean \pm S.D. of 6 wells.

NC : vehicle
 DSG1 : 1ug/ml of DSG
 DSG10 : 10ug/ml of DSG
 OC : vehicle + dexamethasone
 DSG1d : 1ug/ml of DSG + dexamethasone
 DSG10d : 10ug/ml of DSG + dexamethasone
 #: p<0.05 vs OC, ##: p<0.01 vs OC

또한, 정상 세포에 1ug/ml의 DSG를 처리한 경우에는 15.7unit/ml, 10ug/ml의 DSG를 처리한 경우에는 14.2unit/ml로서 정상 대조군에 비해서 ALP 활성을 현저히 증가시켰다(Fig. 4).

4. Collagen 생합성에 미치는 영향

랫드 태자의 두개골로부터 분리한 조골세포를 10일 간 배양한 결과, 정상 세포에서의 collagen 생합성량은 142.8ug/well이었으며, 텍사메타손을 함께 처리한 두 개골 세포에서의 collagen 합성량은 107.3ug/well로서, 정상군에

비해 현저히 저하됨이 관찰되어 조골세포의 기능을 억제된 것으로 나타났다. 텍사메타손에 의해 감소한 두개골 세포의 collagen 합성량은 1ug/ml의 DSG를 처리한 경우에는 143.4ug/well, 10ug/ml의 DSG를 처리한 경우에는 151.6ug/well로서 대조군에 비해 collagen 합성량을 현저히 증가시켰다. 또한, 정상 세포에 1ug/ml의 DSG를 처리한 경우에는 146.6ug/well, 10ug/ml의 DSG를 처리한 경우에는 162.6ug/well로서 대조군에 비해 collagen 합성량을 현저히 증가시켰다(Fig. 5).

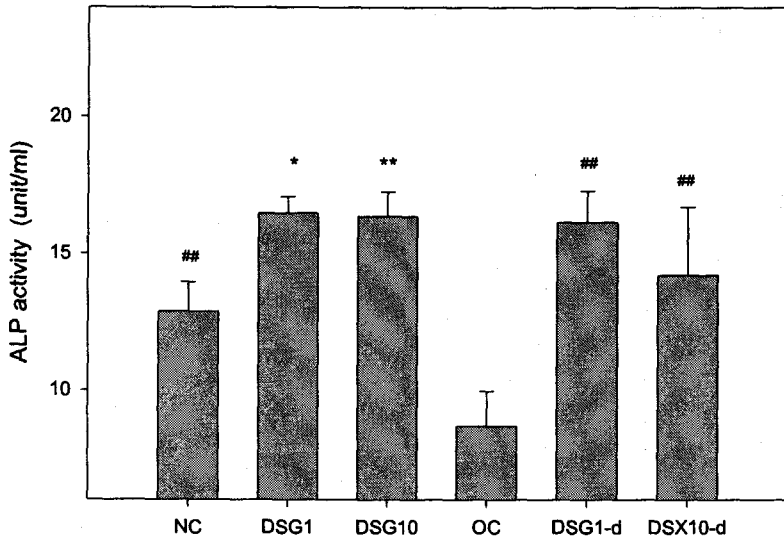


Fig. 4 Effect of DSG on alkaline phosphatase activity of murine calvarial cell. Alkaline phosphatase activity was determined in 10 days after DSG treatment. Each bars represents the mean \pm S.D. of 6 wells

DSG1: 1ug/ml of DSG

DSG10: 10ug/ml of DSG

OC: vehicle + dexamethasone

DSG1d: 1ug/ml of DSG + dexamethasone

DSG10d: 10ug/ml of DSG + dexamethasone

** : p<0.01 vs NC, * : p<0.05 vs NC, ## : p<0.01 vs OC

5. Cell Viability에 미치는 영향

랫드 태자의 두개골로부터 분리한 조골세포를 10일 간 배양한 결과, 정상 세포에서의 생존률로 나타나는 MTT 수치는 0.51이었으며, 덱사메타손을 함께 처리한 두 개골 세포에서의 생존률은 0.39로서, 정상군에 비해 현저히 저하됨이 관찰되어 조골세포의 생존률이 현저히 감소하는 것으로 나타났다. 덱사메타손에 의해 감소한 두개골 세포의 생존률은 1ug/ml의 DSG를 처리한 경우에는 0.51, 10ug/ml의 DS를 처리한 경우에는 0.56이었다. 정상 세포에 1ug/ml의 DGS를 처리한 경우에는 0.52,

10ug/ml의 DSG를 처리한 경우에는 0.57로 대조군과 차이가 없었다(Fig. 6).

IV. 고찰

부신피질호르몬은 항염 및 면역억제에 효과가 우수하여 천식이나 자가면역질환등 면역체계와 관련된 질환의 치료에 광범위하게 사용되고 있다. 또한, 소화기계질환, 종양환자 및 면역억제가 필요한 장기이식 환자의 경우에서도 부신피질호르몬 투여로 인한 골다공증과 골절 발생이 증가가 나타나고 있다.⁵⁶⁾ 일반적

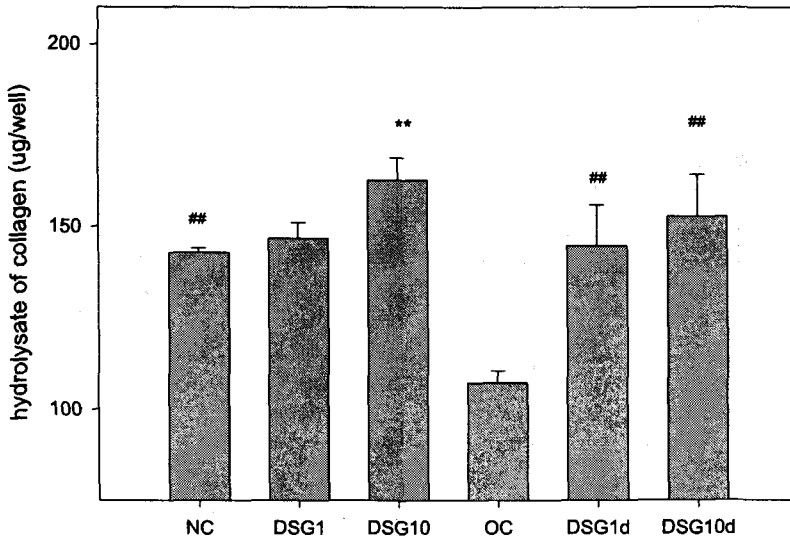


Fig. 5 Effects of DSG on collagen synthesis of murine calvarial cell
Collagen synthesis was determined in 10 days after DSG treatment.
Each bars represents the mean \pm S.D. of 6 wells.

NC : vehicle
 DSG1 : 1ug/ml of DSG
 DSG10 : 10ug/ml of DSG
 OC : vehicle + dexamethasone
 DSG1d : 1ug/ml of DSG + dexamethasone
 DSG10d : 10ug/ml of DSG + dexamethasone
 **: $p < 0.01$ vs NC, #: $p < 0.01$ vs OC

으로 부신피질호르몬은 고용량에서 간장 및 신장에 치명적인 독성이 유발 될 수 있다. 그러나, 골다공증은 부신피질호르몬을 이용한 치료의 상용량 범위 내에서도 발생할 수 있어서 위험성이 크다. 부신피질호르몬은 조골세포의 apoptosis를 증가시키며 전구세포의 조골세포화를 억제하고, 파골세포의 활성을 증가시켜 골다공증을 유발한다고 알려져 있다.¹⁷⁾

본 연구에서는 골다공증 예방 및 치료 수단을 개발하기 위하여, 조골세포의 기능을 활성화시켜 골 형성을 증가시키는 효과적인 약물을 찾고자 하였다. 이를 위하여, 랫드의 두개골로부터 분리 배양한 골세포 및 텍사메타손을

처리한 골세포에 각각 단치소요산가미방을 투여하여 조골세포의 분열능과 생화학적 인자에 미치는 영향을 측정하였다. 우선, 랫드의 두개골로부터 조골세포를 분리 배양하였다. 1주일간 배양 후 계대 배양하고 dexamethasone을 처리하여 배양하였다. Dexamethasone을 처리하는 경우 조골세포의 대사에는 영향을 주지 않지만 osteocyte와 osteoblast 세포의 괴사, collagen의 생합성 감소, preosteoblast가 osteoblast로의 분화과정을 감소시켜 골 형성을 차단하는 것으로 알려져 있다.¹⁸⁾ 본 연구에서도 랫드의 두개골 세포의 1차 배양시 dexamethasone을 처리한 경우 조골세포의 분열능이 현저히 감소

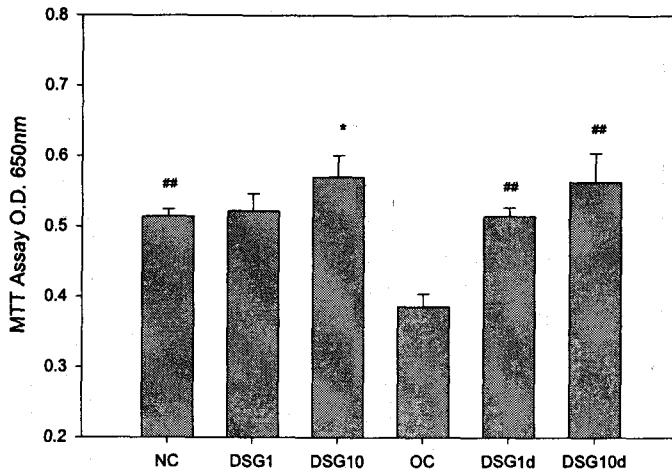


Fig. 6 The Apoptosis of murine calvarial cell in the presence of DSG
Cell viability was measured by MTT assay.
Each bars represents the mean \pm S.D. of 6 wells.

NC: vehicle
 DSG1: 1 μ g/ml of DSG
 DSG10: 10 μ g/ml of DSG
 OC: vehicle + dexamethasone
 DSG1d: 1 μ g/ml of DSG + dexamethasone
 DSG10d: 10 μ g/ml of DSG + dexamethasone
 *: p<0.05 vs NC, #: p<0.01 vs OC

하는 것이 관찰되었다. 배양된 조골세포에 DS와 DSG를 처리한 경우 dexamethasone에 의해 감소한 조골세포 분열능이 현저히 증가되었다. 단치소요산 가미방(DSG)을 처리한 경우에는 단치소요산(DS) 처리군에 비해 조골세포 분열능을 더 효과적으로 증가시켰다(Fig. 1, Fig. 2). 단백질 합성능의 경우 dexamethasone을 처리한 대조군에서 현저한 감소가 있었다. 이는 조골세포의 분열능이 현저히 낮아진 것과 상관성이 있는 것으로 보인다. DS를 처리한 경우와 DSG를 처리한 경우에 모두 dexamethasone에 의해 감소된 단백질 합성능이 증가되었다. 그러나, 정상 세포에 DSG를 처리한 경우에는 유의적인 차이가 없었다(Fig. 3). 랫드의 두개골 세포를 primary culture 한 경우 다양한 종류의

골세포들이 함께 존재하게 된다. 이 중 Pre-osteoblast부터는 ALP의 활성이 나타나고 분화를 지속함에 따라 그 활성이 커진다.¹⁹⁾ 그러나 osteoblast로 완전히 분화한 골세포는 STRO-1의 발현과 ALP의 활성이 나타나지 않는다. 본 연구에서도 두개골 세포 배양시 약 3일 동안에는 ALP의 활성이 거의 측정되지 않았다. 5일 이후부터 ALP의 활성이 증가하고 15일 경부터는 ALP의 활성이 지속적으로 증가하면서 calcium nodule 생성되기 시작하였다. 그러나, dexamethasone을 처리한 경우에는 ALP 활성이 현저히 감소하였다. 이는 dexamethasone이 osteoblast의 분화를 억제한다는 보고와 일치하였다.¹⁷⁾¹⁸⁾ 실험결과, DSG를 처리한 경우 dexamethasone에 의해 감소한 ALP 활성이

현저히 증가되었다.(Fig. 4), 이는 DSG가 조골 세포의 분화를 촉진하여 세포 숫자를 증가시킨 결과와 일치하였다(Fig. 1, Fig. 2). 또한, 실험 목적인 DS의 활성을 강화시키기 위한 DSG 처방은 1ug/ml 및 10ug/ml에서 같은 농도의 DS에 비해 효과적이었다. 조골세포에서 생성하는 collagen은 대부분 골 기질 물질로 작용한다. 조골세포는 collagen을 합성하여 calcium을 포함한 무기물질과 반응하여 골 형성을 촉진한다. 이와는 반대로 파골세포는 collagen을 포함한 골 기질물질인 단백질을 분해 효소를 분비하여 뼈가 녹아나오게 한다. 실험결과, 조골세포에 의해 생성되는 골기질 물질인 collagen 생합성은 dexamethasone을 함께 처리한 두개골 세포에서의 정상군에 비해 현저히 저하되어 조골세포의 기능이 억제된 것으로 나타났다. DSG를 각각 1ug/ml, 10ug/ml 농도로 처리한 결과 dexamethasone에 의해 감소한 조골세포로부터 collagen 생합성을 현저히 증가시켰다. 또한, 정상 세포에 DSG를 1ug/ml 농도로 처리한 경우와 DSG를 10ug/ml 농도로 처리한 경우 활성이 증가하였다(Fig. 4). DSG 처리한 경우에 나타나는 cell survival rate에 미치는 영향을 측정된 결과, dexamethasone을 함께 처리한 경우 현저한 생존률 감소가 나타났으며, DSG를 1ug/ml, 10ug/ml 농도로 처리한 경우 모두 dexamethasone에 의해 감소한 생존률이 증가되었다. 그러나, 정상 세포에 DSG를 처리한 경우 유의적인 차이는 없었다.

연구결과, DSG는 dexamethasone으로 감소한 조골세포의 분열능 및 기능을 증가시킬 수 있는 것으로 평가되었으며, 이는 골세포의 증식과 단백질의 생합성, ALP의 활성, Collagen의 생합성의 증가를 통하여 나타나는 것으로 사료되었다. 이와 함께 DSG는 DS에 비해 골세포 기능 활성화에 더 효과적인 것으로 나타났다. 이들은 부신피질 호르몬에 의해 유발되는 골다공증 예방 치료에 응용될 수 있다고

판단되었다.

V. 結 論

이 연구에서는 골다공증 예방 및 치료 수단을 개발하기 위하여, 조골세포의 기능을 활성화시켜 골 형성을 증가시키는 약물을 찾고자 하였다. 랫드의 두개골로부터 분리 배양한 골세포 및 텍사메타손을 처리한 골세포에 단치소요산가미방(DSG)을 투여하여 조골세포의 분열능과 생화학적 인자에 미치는 영향을 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

- (1) 조골세포의 분열능은 부신피질 호르몬제에 의해 감소하였으며 DSG는 이를 증가시켰으며, 이러한 효과는 단치소요산에 비해 현저히 증가되었다.
- (2) 조골세포의 단백질 생합성량과 ALP 활성 및 collagen 생합성량은 부신피질 호르몬제에 의해 감소하였으며 DSG는 이를 증가시켰다.
- (3) 조골세포의 apoptosis는 부신피질 호르몬제에 의해 증가하였으며 DSG는 조골세포의 생존율은 증가시켰다.

이상의 연구결과, DSG는 조골세포의 증식능을 증가시키고, 골기질 물질의 생합성을 증가시켰다. 따라서, DSG는 골다공증의 치료 또는 예방에 응용될 수 있을 것으로 판단되었다.

VI. 참고문헌

1. E. J. Mackie, Osteoblasts : novel roles in orchestration of skeletal architecture, *Int J Biochem Cell Biol.* 35(9) : 1301-5, 2003
2. Xing L, Boyce BF, Regulation of apoptosis in osteoclasts and osteoblastic cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;18 : 328

- (3) : 709-20
3. Crandall C. Parathyroid hormone for treatment of osteoporosis. Arch Intern Med. 162 : 2297 - 2309, 2002.
 5. Manelli, F. and Giustina, A., Glucocorticoid-induced osteoporosis. Trends Endocrinol. Metab. 11, 79~85. 2000.
 6. Van Staa, T.P. et al., Use of oral corticosteroids and risk of fracture., J. Bone Miner. Res. 15, 993~1000. 2000.
 7. Dijke P, Fu J, Schaap P, Roelen BA. The Signal transduction of bone morphogenetic proteins in osteoblast differentiation. J Bone Joint Surg Am. 85-A Suppl 3, 34-8, 2003.
 8. Olney RC. Regulation of bone mass by growth hormone. Med Pediatr Oncol. 41, 128-34, 2003
 9. Kim S, Yamazaki M, Zella LA, Shevde NK, Pike JW Activation of receptor activator of NF-kappaB ligand gene expression by 1,25-dihydroxyvitamin D3 is mediated through multiple long-range enhancers. Mol Cell Biol. 26(17) : 6469-86, 2006
 10. Hurley M, Yao W, Lane NE. Changes in serum fibroblast growth factor 2 in patients with glucocorticoid-induced osteoporosis treated with human parathyroid hormone(1-34). Osteoporos Int. 16(12) : 2080-4, 2005
 11. 牛耕, 이경우 번역 : 譯解編注 黃帝內經素問, 여강출판사, 1권 317-318, 333-334, 2권 193-194, 441-443, 2000.
 12. 신경숙, 단치소요산이 갱년기 장애에 미치는 효능에 관한 임상보고. 대한한방부인과학회지 16, 77-82, 2003.
 13. 황귀서, 송지연, 가미소요산이 지단백산화에 따른 RAW 264.7 활성화에 미치는 영향. 대한예방의학회지 5, 134-143, 2001
 14. 황귀서, 이기선, 박종형, 단치소요산이 구속 스트레스를 가한 흰쥐의 뇌내 catecholamine 함량변화에 미치는 영향. 한국환경독성학회지 13, 143~149, 1998
 15. 소재영, 이인선, 가미소요산과 가미소요산 가모려가 난소적출로 유발된 흰쥐의 골다공증에 미치는 영향. 한방재활의학회지 11, 147-160, 2001
 16. 김영선, 가미소요산이 골세포 기능에 미치는 영향, 경원대학교 대학원, 2005
 17. Weinstein RS, Jilka RL, Parfitt AM, Manolagas : Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids. Potential mechanisms of their deleterious effects on bone, J. Clin. Invest. 274-282, 1998.
 18. Weinstein RS, Chen JR, Powers CC, Stewart SA, Landes RD, Bellido T, Jilka RL, Parfitt AM, Manolagas SC. Promotion of osteoclast survival and antagonism of bisphosphonate-induced osteoclast apoptosis by glucocorticoids. J. Clin Invest. 109(8) : 1041-8, 2002
 19. Roth JA, Kim BG, Lin WL, Cho MI. Melatonin promotes osteoblast differentiation and bone formation. J Biol Chem. 274(31) : 22041-7, 1999