

원저

골유합 촉진 치료제 개발을 위한 수종의 한약재 활성 검색

이재동* · 백용현* · 최도영* · 허정은** · 양하루** · 우현수* · 박동석*

**경희대학교 한의과대학 침구학교실

**경희대학교 골관절질환 한방연구센터

Abstract

Screening and Development of Novel Herbal Medicine for Bone Healing Treatment

Lee Jae-dong*, Baek Yong-hyeon*, Choi Do-young*, Huh Jeong-eun**, Yang Ha-ru**,
Woo Hyun-su* and Park Dong-suk*

*Department of Acupuncture & Moxibustion, College of Oriental Medicine,
Kyung-Hee University

**Oriental Medicine Research Center for Bone & Joint Disease, Kyung-Hee University

Objectives : The differentiation of osteoblasts is controlled by various growth factors and matrix protein expressed in bone. The aim of this study was to investigate the effects of many herbs medicine(KHBJs) for bone healing that induces osteogenic activity in human osteoblast-like SaOS-2 cells.

Methods : The osteogenic effects of KHBJs were evaluated by using cell proliferation(WST-8) assay, alkaline phosphatase(ALP) activity assay, colorimetric analysis of vascular endothelial growth factor(VEGF) expression in human osteoblast like SaOS-2 cell. Also, osteogenic activity of KHBJ fractions(KHBJB and KHBJR) by activity guided fractionation were evaluated.

Results : About 7 KHBJs had effect on the proliferation of osteoblast like SaOS-2 cells, and dose-dependently increased alkaline phosphatase(ALP) activity. KHBJs markedly increased expression for VEGF. Fractionated KHBJs(KHBJB or KHBJR) not enhanced more than KHBJs on osteogenic activity in SaOS-2 cells.

Conclusions : This study found that 7 KHBJs had effect on proliferation, ALP activity, and VEGF expression in osteoblast like SaOS-2 cells. These results propose that KHBJs can play an important role in osteoblastic bone formation, and may possibly lead to the development of bone-forming drugs.

Key words : Bone healing, Proliferation, Alkaline phosphatase, VEGF

· 접수 : 2007년 8월 10일 · 수정 : 2007년 9월 18일 · 채택 : 2007년 9월 18일
· 교신저자 : 박동석, 서울시 강동구 상일동 149번지 경희대학교 부속동서신의학병원
Tel. 02-440-7702 E-mail : dspark49@yahoo.co.kr

I. 緒 論

인체의 골은 형성과 재형성 과정을 통하여 그 항상성을 유지하게 된다. 오래된 뼈는 제거되고(골 흡수), 새로운 뼈가 생기는(골 형성) 과정을 지속하게 된다¹⁾. 뼈는 고정되어 있는 것이 아니라 오래된 것은 사라지고, 새롭게 채워지면서 뼈의 정상적인 형태를 유지하는 것이다. 골 형성과 골 재생은 뼈의 발달, 성숙, 유지 및 회복에 필수적이다. 골의 형성은 태생기부터 시작하여 골격이 성숙되어 성장이 끝나는 청장년기까지 지속 된다^{1,2)}. 이 시기는 osteoblast(조골세포)의 활동으로 인한 골 형성이 파골세포의 활동으로 인한 골 흡수보다 훨씬 많게 되는 시기이다. 골의 재형성은 이미 성장이 끝난 후 오래된 골을 제거하고 다시 새로운 골로 대체되는 과정을 말하며, 조골세포와 파골세포의 짝을 이룬 활성의 균형을 통하여 그 항상성이 유지된다. 이러한 기전은 골 개조단위라는 국소부위에서 일어나는데, 신체 전반적으로 영향을 미치는 systemic factors들도 중요한 역할을 한다³⁻⁷⁾. 조골세포의 분화는 이 과정에 포함되고 골 대사 호르몬 뿐만 아니라 뼈에서 생성된 다양한 성장 인자와 cytokines에 의해 조절된다⁸⁻¹⁰⁾.

Mesenchymal stem cell precursors로 부터 일어나는 조골세포는 뼈 구조 발생 단백질(BMPs)¹¹⁾, 변형시키는 성장 인자(TGF)¹²⁾, 인슐린 성장 인자-IGF-I¹³⁾, 혈관 내피 성장 인자(VEGF)¹⁴⁾, glucocorticoids¹⁵⁾ 포함하는 많은 요소에 의해 분화한다. 이들은 osteoblastic 분화에 중요하게 작용하며 조골세포에서 특정 유전자의 발현을 조절한다. 게다가 몇몇 다른 단백질들은 mineralization된 골격 성분의 침전과 유지에 관여한다. 일단 matrix synthesis는 조골세포 분화과정에서 시작되며, osteoblastic markers인 alkaline phosphatase(ALP), osteopontin(OPN), and osteocalcin(OCN) 등 유전자에서 유발된다. 마지막으로 Osteoblasts는 type I collagen(Col I)으로 구성하는 extracellular matrix에 포함되고 matrix mineralization은 mineral 침착과 collagen fibrils에서 일어난다¹⁶⁻²⁰⁾.

골절과 관련된 골유합의 한방치료와 관련하여 흰 쥐의 대퇴골에 인위적으로 골결손을 유발시킨 후, 녹용 약침액의 자극이 골형성에 미치는 영향을 알아보고자 X-ray 소견, 조직학적 관찰 및 비교원성 골 특이 유전자인 osteocalcin의 발현을 in situ hybridization법으로 관찰, 조직학적 측면에서 유의성 있는 효

과를 보였으며 X-ray 소견 및 osteocalcin mRNA의 발현에서는 대조군에 비하여 강하게 나타났으나 유의성 있는 차이를 발견하지 못했다고 보고되었다²¹⁾.

또한 한약재 중 인삼을 골절 후에 다량으로 투여할 때 골절이 융합되는 초기단계에서 매우 효과적인 영향을 보이며 다량으로 투여할 때 골절 융합의 재성형기에서 평균효과치가 상승 되었다는 보고가 있다²²⁾.

골유합과 관련된 한약물의 연구는 아직은 초보단계 수준이어서 보다 많은 한약재를 이용한 연구와 연구실험 및 임상시험의 방법론에 대한 개발이 필요하다. 본 연구팀에서는 골유합 치료 한약물의 개발 필요성을 인식하여 골유합에 효과적일 수 있는 다종의 한약재를 이용하여 골유합 또는 골형성에 활성이 있는 한약물 개발하려는 연구를 진행하였다.

본 연구에서는 조골세포주 Saos-2에서의 세포증식능, alkaline phosphatase 활성, 혈관 내피 성장 인자(VEGF)의 활성을 증가시키는 것을 목표로 수종의 한약재의 활성을 검색 하였고, 실험 결과 개발가능성이 있는 한약물을 도출하였기에 결과를 발표한다.

II. 材料 및 方法

1. 재료

1) 약재

본 실험에 사용한 단미재는 27종이며, 약재들은 경희대학교 한의과대학 부속한방병원에서 구입하였고, 감정한 다음 정선하여 사용하였다.

2) 시약 및 기기

실험에 사용한 조골세포주인 Saos-2 세포는 ATCC (HTB-85)에서 구입하였으며, McCoy's 5A 배지, 우태아혈청(Fetal bovine serum, FBS)는 CAMBREX사(Walkersville, MD USA)에서 구입하였다. 항생제 및 trypsin등의 세포배양성분은 GIBCO BRL사(Grand Island, NY, USA)에서 구입하였으며, 배양용기는 Falcon사(Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)에서 구입하여 사용하였다.

배양액의 혈관 내피 성장 인자(VEGF) 정량을 위해 Human VEGF ELISA kit, recombinant human VEGF는 R&D system사에서 구입하였다. 흡광도 측정을 위한 ELISA reader는 Molecular Device사에서 구

입하였다.

2. 방법

1) 약재선정

본 실험에서 사용한 약재는 민간요법, 중국, 일본 및 국내외 한의학 고전 처방, 각종 임상 논문 및 보고서 등 관련 문헌 등을 통해 기존의 상용 처방과 단미재를 탐색·분석·평가하여 약 200여종의 유효한 단미재를 일차로 선정 후, 가장 가능성 있다고 판별되는 약재를 최종적으로 26종 선정하여 사용하였다.

2) 추출 및 분획

경희대학교 한의과대학 부속 한방병원에 의뢰하여 구입하여 감정한 다음 정선하여 사용하였다. 각각의 한약재를 1cm 이하로 분쇄한 후, 시료 200g을 3ℓ 플라스크에 넣은 후 50%에탄올 1,500ml을 가하여 3시간 동안 환류 추출하고 여과하였다. 잔사는 다시 50% 에탄올로 추출하고 이 조작을 2회 반복하여 모은 여액을 감압농축기로 감압농축한 후, 이를 동결 건조하여 약재 에탄올 추출물을 얻어 본 실험에 필요로 하는 농도로 희석하여 사용하였다. 분획은 알코올 추출액을 유기용매인 butanol과 residue층인 물층으로 분획하여 동결건조하였다.

3) 사람의 조골세포주 Saos-2에서

세포증식 활성 검색

상세히 설명하면, 멸균상태에서 15% FBS와 페니실린-스트렙토마이신 100unit/ml이 함유된 MaCoy'5A 배지에 배양한다. 0.25% Trypsin-EDTA로 세포를 분리해서 재배양한다. 96well 플레이트에 15% FBS와 페니실린-스트렙토마이신 100unit/ml이 함유된 MaCoy'5A 배지로 1×10^4 cells/well씩 분주하여 5% CO₂, 37°C 배양기에서 50~60% 정도 배양한 후, 1% FBS와 페니실린-스트렙토마이신 100unit/ml이 함유된 MaCoy'5A 배지로 수종의 약재를 농도별(0.1~1000ug/ml)로 처리하여 3일간 더 배양하였다. 여기에 WST-8 시약을 10μl씩 넣어 2시간 동안 5% CO₂, 37°C 배양기에서 배양한 후 ELISA reader 450 nm- 650 nm 파장에서 측정하였다. 또, 6-웰 플레이트에 15% FBS와 페니실린-스트렙토마이신 100unit/ml이 함유된 MaCoy'5A 배지로 1×10^7 cells/well씩 분주하여 5% CO₂, 37°C 배양기에서 50~60% 정도 배양한 후, 1% FBS와 페니실린-스트렙토마이신 100unit/ml이 함유

된 MaCoy'5A 배지로 수종의 약재를 농도별 (1, 10μg/ml)로 처리하여 7일간 더 배양하여 상등액을 수집하여 이를 -20°C에 보관하였다.

4) 조골세포주인 Saos-2에서 alkaline phosphatase 활성 검색

96well 플레이트에 15% FBS와 페니실린-스트렙토마이신 100unit/ml이 함유된 MaCoy'5A 배지로 1×10^4 cells/well씩 분주하여 5% CO₂, 37°C 배양기에서 50~60% 정도 배양한 후, 1% FBS와 페니실린-스트렙토마이신 100unit/ml이 함유된 MaCoy'5A 배지로 수종의 약재를 농도별(0.1~1000μg/ml)로 처리하여 3일간 더 배양하였다. 10% Triton X-100으로 세포를 용해시킨 후 세포를 수집하여 초음파 분쇄기로 세포 내의 Alkaline phosphatase가 p-nitrophenylphosphate를 p-nitrophenol과 phosphate로 분해하여 발색하는 정도를 405 nm에서 흡광도를 측정한다.

5) 혈관내피 성장인자(VEGF)의 발현량 측정

6 well 플레이트에 배양하여 유효 단미재 7종 및 분획 약재를 농도별로 처리하여 7일간 배양하여 수집한 상등액을 혈관 내피 성장 인자 (VEGF) 항체가 표지된 플레이트에 분주하여 반응시킨 후 세척하여 peroxidase-labelled goat anti-mouse Ig-G를 반응시키고 다시 세척한다. TMB substrate를 이용하여 발색시켜 반응을 종료시킨 후 ELISA reader를 이용하여 450-570nm에서 측정한다.

6) 통계

모든 결과는 평균값±표준편차로 나타내었으며 Student's t test로 검정하였다. 유의수준 p<0.05% 이한 것을 유의하게 판단하였다.

III. 結 果

1. 조골세포주인 Saos-2에서 세포 증식능 활성 검색

골유합에 유효할 것으로 기대하여 선정된 단미재 27종(KHBJ 034~049, 058~070, 077)을 대상으로 조골세포주인 Saos-2에 수종의 약재를 농도별(0.1~1000

Table 1. Effects of KHBJs on viability in human osteoblast-like SaOS-2 cells

Name	Proliferation(% of control)	
	1 $\mu\text{g}/\text{ml}$	10 $\mu\text{g}/\text{ml}$
KHBJ 034	167.029 \pm 0.024	150.362 \pm 0.160
KHBJ 035	95.723 \pm 0.029	87.666 \pm 0.040
KHBJ 036	120.557 \pm 0.016	105.157 \pm 0.017
KHBJ 037	107.143 \pm 0.008	117.700 \pm 0.018
KHBJ 038	97.524 \pm 0.030	98.762 \pm 0.032
KHBJ 039	104.476 \pm 0.026	123.048 \pm 0.046
KHBJ 040	119.056 \pm 0.024	141.379 \pm 0.046
KHBJ 041	139.746 \pm 0.049	162.160 \pm 0.084
KHBJ 042	116.412 \pm 0.022	122.430 \pm 0.021
KHBJ 043	200.504 \pm 0.039	168.222 \pm 0.043
KHBJ 044	148.802 \pm 0.022	238.462 \pm 0.037
KHBJ 045	109.524 \pm 0.069	176.464 \pm 0.122
KHBJ 046	127.658 \pm 0.093	124.001 \pm 0.086
KHBJ 047	104.951 \pm 0.086	121.160 \pm 0.043
KHBJ 048	70.434 \pm 0.038	79.336 \pm 0.042
KHBJ 049	117.779 \pm 0.026	122.593 \pm 0.026
KHBJ 058	119.458 \pm 0.113	116.710 \pm 0.098
KHBJ 059	99.528 \pm 0.035	111.646 \pm 0.043
KHBJ 061	107.898 \pm 0.042	120.382 \pm 0.046
KHBJ 062	124.109 \pm 0.100	149.862 \pm 0.078
KHBJ 063	133.521 \pm 0.057	133.942 \pm 0.070
KHBJ 064	89.635 \pm 0.037	87.977 \pm 0.053
KHBJ 067	95.997 \pm 0.008	89.254 \pm 0.029
KHBJ 068	25.515 \pm 0.007	24.703 \pm 0.005
KHBJ 069	112.750 \pm 0.089	106.199 \pm 0.058
KHBJ 070	109.143 \pm 0.070	106.756 \pm 0.021
KHBJ 077	149.807 \pm 0.080	169.740 \pm 0.138
VEGF	112.761 \pm 0.036	

Cell proliferation was determined by a colorimetric WST-8 assay. Data are expressed as percentage of control.

$\mu\text{g}/\text{ml}$)로 처리한 후 72시간 배양하여 WST-8을 처리하여 ELISA reader로 측정된 결과, 대조군으로 혈관 내피 성장 인자(VEGF)를 50ng/ml 처리한 대조군 112.761 \pm 0.036% 보다 활성이 증가된 한약재 중 고농도 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상에서 세포 독성이 있는 약재를 제외한 후, 한약재 10종(KHBJ 034, 040, 041, 044, 046, 049, 058, 062, 063, 077)을 1차 선정하였다(Table. 1).

2. 조골세포주인 Saos-2에서 ALP활성 검색

조골세포주 Saos-2를 이용하여 수종의 단미재를 농도별로 처리한 후 72시간 배양한 후 세포를 수집하여 alkaline phosphatase 활성을 검색한 결과, 단미재 추출물이 대체적으로 저농도인 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 대조군에 비하여 활성이 증가하였으나 고농도에서는 증가하지 않는 것을 확인하였다. 대조군에 비하여 활성이 60%

Table 2. ALP activity was measured by using an ALP kit from whole cell extracts

Name	Alkaline phosphatase(% of control)	
	1 $\mu\text{g}/\text{ml}$	10 $\mu\text{g}/\text{ml}$
KHBJ 034	114.651 \pm 0.022	111.7 \pm 0.050
KHBJ 035	121.645 \pm 0.031	93.026 \pm 0.040
KHBJ 036	146.853 \pm 0.002	166.977 \pm 0.012
KHBJ 037	123.089 \pm 0.033	130.555 \pm 0.033
KHBJ 038	154.754 \pm 0.027	150.055 \pm 0.009
KHBJ 039	130.484 \pm 0.011	137.567 \pm 0.028
KHBJ 040	103.464 \pm 0.061	171.232 \pm 0.012
KHBJ 041	83.586 \pm 0.011	85.457 \pm 0.002
KHBJ 042	83.643 \pm 0.012	72.384 \pm 0.008
KHBJ 043	97.988 \pm 0.009	49.170 \pm 0.005
KHBJ 044	166.816 \pm 0.021	399.999 \pm 0.009
KHBJ 045	93.818 \pm 0.025	152.439 \pm 0.006
KHBJ 046	139.941 \pm 0.019	149.334 \pm 0.017
KHBJ 047	105.746 \pm 0.002	50.992 \pm 0.022
KHBJ 048	83.743 \pm 0.072	173.337 \pm 0.002
KHBJ 049	231.579 \pm 0.042	155.073 \pm 0.018
KHBJ 058	95.829 \pm 0.031	113.099 \pm 0.082
KHBJ 059	115.000 \pm 0.008	109.167 \pm 0.009
KHBJ 061	87.821 \pm 0.050	90.385 \pm 0.052
KHBJ 062	79.459 \pm 0.007	85.405 \pm 0.033
KHBJ 063	79.126 \pm 0.009	81.068 \pm 0.061
KHBJ 064	111.868 \pm 0.014	114.964 \pm 0.017
KHBJ 067	82.967 \pm 0.018	86.870 \pm 0.051
KHBJ 068	36.119 \pm 0.007	29.074 \pm 0.025
KHBJ 069	106.711 \pm 0.061	98.881 \pm 0.042
KHBJ 070	104.283 \pm 0.016	112.313 \pm 0.029
KHBJ 077	59.659 \pm 0.044	47.703 \pm 0.009
VEGF	75.691 \pm 0.027	

Data are expressed as percentage of control.

이상 증가하고 세포 독성이 없는 단미재 7종(KHBJ 034, 040, 044, 046, 049, 058)을 1차 선정하였다(Table 2).

골유합에 유효할 것으로 기대하여 선정된 단미재 27종에 대하여 실험을 진행한 결과 세포 성장을 유도하고 골유합의 가장 대표적인 표지인자인 ALP 활성을 증가시킨 단미재 7종(KHBJ 034, KHBJ 040, KHBJ 044, KHBJ 046, KHBJ 049, KHBJ 058, KHBJ 063)을 최종 선정하였다.

3. 조골세포주인 Saos-2에서 유효단미재 분획층의 세포 증식능 활성 검색

선정된 유효 한약제 7종을 buthanol(B)층과 residual (R)로 분획하여 조골세포주인 Saos-2에 유효 단미재 7종(T)과 그의 분획 14종을 농도별로 처리한 후 72 시간 배양하여 WST-8을 처리하여 ELISA reader로 측정된 결과 KHBJ 063B와 063R은 유의적으로 증가되었지만 나머지 한약제 추출물에서는 total층에 비해

Table 3. Effects of KHBJs and KHBJs-fraction on proliferation of human osteoblast-like SoOS-2 cells

Name	Proliferation(% of Control)					
	Total층		BuOH층		Residue층	
	0.01 $\mu\text{g/ml}$	10 $\mu\text{g/ml}$	0.01 $\mu\text{g/ml}$	10 $\mu\text{g/ml}$	0.01 $\mu\text{g/ml}$	10 $\mu\text{g/ml}$
KHBJ 034	113.94 \pm 0.149	112.96 \pm 0.220	107.64 \pm 0.131	109.27 \pm 0.152	117.36 \pm 0.151	115.40 \pm 0.192
KHBJ 040	127.78 \pm 0.144	129.56 \pm 0.140	96.89 \pm 0.208	110.57 \pm 0.104	115.41 \pm 0.111	112.24 \pm 0.149
KHBJ 044	111.62 \pm 0.136	99.61 \pm 0.144	115.61 \pm 0.115	110.05 \pm 0.094	107.38 \pm 0.108	108.77 \pm 0.093
KHBJ 046	127.24 \pm 0.068	124.00 \pm 0.086	109.61 \pm 0.071	119.92 \pm 0.076	118.69 \pm 0.088	109.83 \pm 0.062
KHBJ 049	114.23 \pm 0.071	121.19 \pm 0.077	101.86 \pm 0.071	121.07 \pm 0.106	103.02 \pm 0.102	104.69 \pm 0.088
KHBJ 058	115.27 \pm 0.110	126.71 \pm 0.091	116.43 \pm 0.067	121.99 \pm 0.085	113.57 \pm 0.089	106.66 \pm 0.071
KHBJ 063	112.70 \pm 0.117	112.62 \pm 0.136	128.59 \pm 0.061*	121.61 \pm 0.078*	121.81 \pm 0.103*	120.48 \pm 0.121*
VEGF	129.96 \pm 0.130					

Cell proliferation was determined by a colorimetric WST-8 assay. Data are expressed as percentage of control.

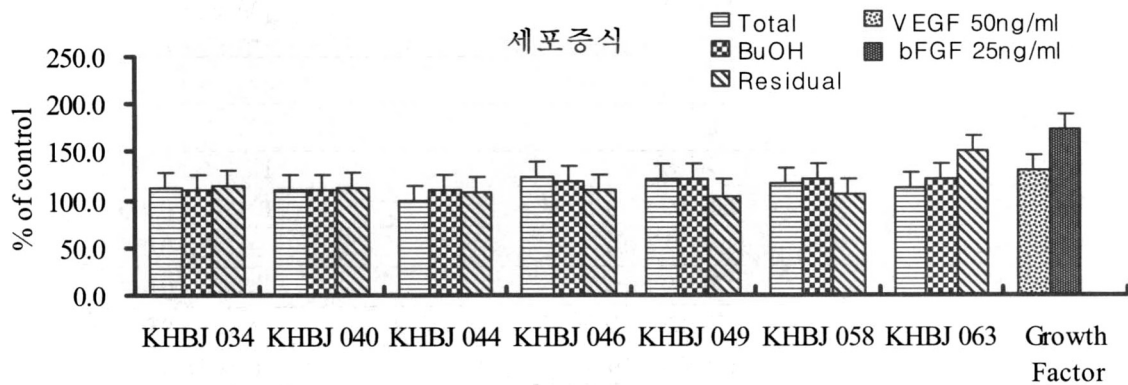


Fig. 1. Effects of KHBJs and KHBJs-fraction on proliferation of human osteoblast-like SoOS-2 cells

KHBJs and KHBJs-fraction at various concentrations were added to SaOS-2 cells for 3 days. Cell proliferation was determined by a colorimetric WST-8 assay. Data are expressed as percentage of control.

BuOH층에서 활성이 유효하게 증가하지 않음을 확인하였다(Table 3, Fig. 1). 또 alkaline phosphatase 활성도 분획층 2종(KHBJ 044R, 049R)에서 활성이 유의하게 증가되었고, 나머지 한약재는 total층에 비해 분획층에서 활성이 유효하게 증가하지 않았다(Table 4, Fig. 2).

4. 혈관 내피 성장 인자(VEGF)의 발현량 측정

조골세포주 Saos-2에서 대조군에 비하여 약재 처리한 군에서 VEGF 발현량이 증가되는 것을 확인하였고, 그 후 선정된 단미재 7종을 유기용매로 분획 후 각 분획층을 저농도에서 고농도로 농도별로 처리하여 7일간 더 배양하여 수집하여 VEGF 발현량은 측정된 결과 total층에 비하여 분획층에서 활성이 증가하지 않음을 확인하였다(Fig. 3).

Table 4. Effects of KHBJs and KHBJs-fraction on ALP activity SaOS-2 cells

Name	ALP activity(% of Control)					
	Total층		BuOH층		Residue층	
	0.01 $\mu\text{g/ml}$	10 $\mu\text{g/ml}$	0.01 $\mu\text{g/ml}$	10 $\mu\text{g/ml}$	0.01 $\mu\text{g/ml}$	10 $\mu\text{g/ml}$
KHBJ 034	217.352	169.877	142.173	145.079	105.326	183.113
KHBJ 040	111.470	166.978	170.782	151.121	87.051	146.848
KHBJ 044	133.924	121.660	105.783	127.335	184.420***	230.076***
KHBJ 046	114.285	149.334	114.186	122.263	142.807	123.185
KHBJ 049	140.828	91.190	109.101	77.032	81.342	164.237**
KHBJ 058	95.561	113.099	108.801	103.800	92.593	88.773
KHBJ 063	71.085	78.423	128.950	133.547	118.565	109.711
VEGF	75.691					

ALP activity was measured by using an ALP kit from whole cell extracts. Data are expressed as percentage of control.

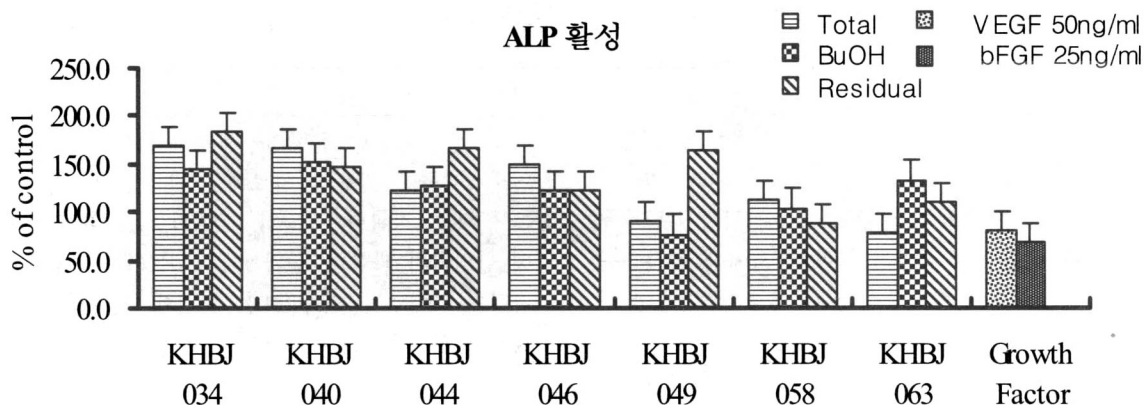


Fig. 2. Effects of KHBJs and KHBJs-fraction on ALP activity SaOS-2 cells

ALP activity was measured by using an ALP kit from whole cell extracts. KHBJs and KHBJs-fraction at various concentrations were added to SaOS-2 cells for 3 days. Data are expressed as percentage of control.

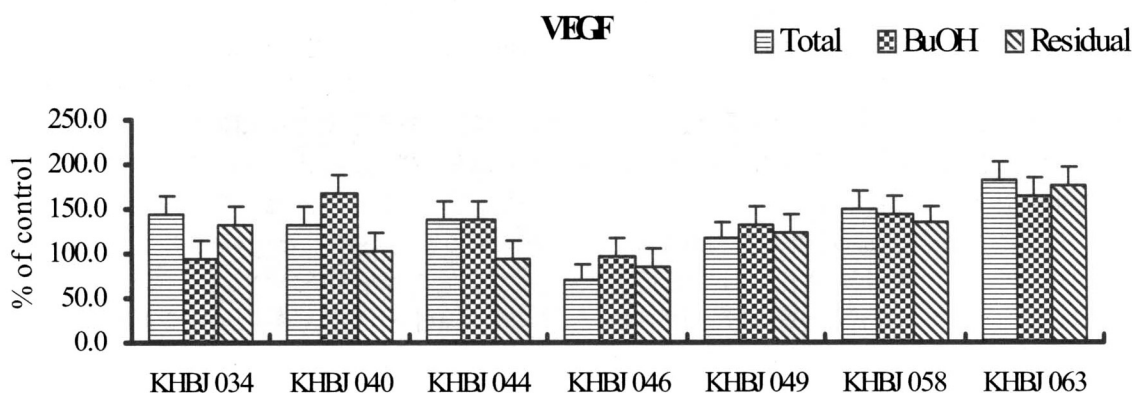


Fig. 3. Effects of KHBJs and KHBJs-fraction on VEGF expression of SaOS-2 cells

KHBJs and KHBJs-fraction at various concentrations were added to SaOS-2 cells for 3 days. Data are expressed as percentage of control.

IV. 考 察

경희대학교 골관절질환 한방연구센터에서 골유합 치료 한약물 개발을 위하여 연구를 진행한 결과, 개발 가능성을 확인하였기에 한약물 단독 또는 분획물에 대한 연구과정 및 결과를 기술하였다. 이 결과를 바탕으로 한약처방을 구성하고, 조성물의 비율 및 새로운 한약제의 첨가를 조절하여 만들어진 혼합 조성물의 효능에 대한 세포실험, 적응증 동물실험 및 독성실험 연구단계에 있다.

현재까지 골형성 및 골유합 치료제들은 개발된 바 없으며, 기존 골다공증 치료제가 뼈 성분이 빠져나가는 것을 억제하는 골흡수 억제제였던 것에 비해, 최근에는 조골세포의 생성과 활동을 증가시킴으로써 새로운 뼈가 자라도록 돕는 골형성 촉진제로 진화했다^{23, 25)}. 최근 천연물을 이용한 뼈형성 촉진으로 골형성 및 골다공증 치료제로 개발하려는 사례가 있다. 예로 숙지황과 오가피의 혼합 생약재 추출물로 오스코텍(주)에서 뼈 형성 촉진치유로 특허가 출원된 바 있다. 다른 한편으로는 줄기세포를 이용하여 골유합 및 골재생 치료법이 시도되고 있다²⁶⁾. 환자 자신의 골수에서 채취한 성체줄기세포를 골(骨)형성세포로 분화시킨 뒤 대량증식 배양시킨 후 환자에게 주사하는 세포치료 연구가 진행되고 있으나 발암성 발생 부작용이 지적되고 있다^{27, 28)}.

따라서 한의학에서 임상효능이 입증된 천연자원을 이용하여 부작용은 최소화되고, 혈관신생관련 유전자 조절을 통하여 궁극적으로는 탁월한 골유합을 유도하며, 유효 활성 성분 및 기전 규명으로 신뢰성 있는 약효 및 안전한 한방신약 개발이 필요하다.

본 연구를 진행하기 위하여 민간요법, 중국, 일본 및 국내 외 한의학 고전 처방, 각종 임상 논문 및 보고서 등 관련 문헌 등을 통해 기존의 상용 처방과 단미재를 탐색·분석·평가하여 약 200여종의 유효한 단미재를 1차로 선정한 후 골유합 중심으로 최종 27종을 선별하여 연구를 진행하였다.

연구결과, 조골세포주인 SaOS-2에서 세포증식능 검색에서 20~40% 이상 활성을 보인 단미재는 10종, alkaline phosphatase 10~30% 활성을 보인 단미재는 6종이었고, 이중 세포독성을 가지지 않고 세포 증식능을 갖으며 alkaline phosphatase 활성을 동시에 보인 단미재 7종(KHBJ 034, 040, 044, 046, 049, 058,

063)을 선정하였다(Table 1, 2). 일반적으로 한약물의 활성 증가를 위해 분획, 재분획 및 유효단일물질 분리 등이 시도되고 있으나 본 실험에 사용한 단미재의 경우 세포 증식능에서는 KHBJ 063B와063R만 활성을 보였고 alkaline phosphatase 검색에서는 KHBJ 044R, 049R만이 유의적인 활성 증가를 보였다. 이를 제외한 나머지 한약재에서는 total층의 활성이 butanol 분획층과 비슷한 활성을 보여 골유합 촉진 치료제 개발을 위한 처방은 한방개념이 도입된 복합처방 및 분획으로 활성을 증진시킬 수 있는 다양한 처방을 조합하여 연구할 수 있을 것으로 사료된다.

또한 혈관 내피 성장 인자의 발현량을 측정된 실험결과, 세포증식능과 alkaline phosphatase 활성이 우수하였던 단미재 7종이 혈관 내피 성장 인자(vascular endothelial growth factor) 발현을 유의적으로 증가시키는 것을 알 수 있었다. 그 중에서도 단미재 3종(KHBJ 040, 058, 063)은 분획에 의해서도 효능이 유의적으로 증가되었다(Fig. 3). 이로써 최종 선정된 한약재 7종을 복합처방 구성 시 균약으로 사용될 수 있음을 제시하였다.

본 골관절질환 한방연구센터에서의 기초 및 임상 연구결과들은 골유합 치료제 개발 뿐 아니라 한약제제에 대한 객관화, 정량화, 표준화, 현대화 작업을 통해 한의학의 과학화, 한약제제의 실용화·제품화로 부가가치 창출 및 인류 보건 향상에 기여할 수 있을 것으로 사료된다.

V. 結 論

조골세포주 Saos-2에서의 세포 증식능의 활성, alkaline phosphatase 활성의 증가, 혈관 내피 성장 인자인 VEGF의 발현량 증가를 통해 골유합 촉진 효과를 확인한 수종의 한약재(KHBJ 034, 040, 044, 046, 049, 058, 063) 및 활성 분획(KHBJ 040, 058, 063)을 도출하였다. 이 결과는 효능이 검증된 골유합 촉진 치료제 개발을 위한 복합처방구성의 기초자료를 제시하는데 그 의미가 있다.

본 연구에 의해서 도출된 한약재에 대하여 약동력학, 안전성 연구 등을 수행하고 표준화 연구를 통하여 골유합 및 골형성 촉진 치료제 한방신약 물질을 도출하고자 한다.

VI. 參考文獻

1. Baron R, Vigner, A and Horowitz M. Lymphocyte, Macrophages and the regulation of bone remodeling. *Bone and Mineral Research*. New York : Peck WJ Elsevier. 1984 : 175-243.
2. Lian JB, Stein GS, Canalis E, Robey PG, Boskey AL. Bone Formation, Osteoblast lineage cells, growth factor, matrix proteins, and the mineralization process. 4th Ed. Favus MJ. *Primer on the metabolic bone disease and disorders of mineral metabolism*. Philadelphia, U.S.A : Lippincott Williams and Wilkins. 1999 : 14-27.
3. McCarthy TL, Centrella M, Canalis E. Regulatory effects of insulin-like growth factors I and on bone collagen synthesis in rat calvarial cultures. *Endocrinology*. 1989 ; 124 : 301-309.
4. Midy V, Plouet J. Vasculotropin/vascular endothelial growth factor induces differentiation in cultured osteoblasts. *Biochemical Biophysics Research Communication*. 1994 ; 199 : 380-386.
5. Hughes FJ, Collyer J, Stanfield M, Goodman SA. The effects of bone morphogenic protein-2, -4, and 6 on differentiation of rat osteoblast cells in vitro. *Endocrinology*. 1995 ; 136 : 2671-2677.
6. Goad DL, Rubin J, Wang H, Tashjian AH, Jr, Patterson C. Enhanced expression of vascular endothelial growth factor in human SaOS-2 osteoblast-like cells and murine osteoblasts induced by insulin-like growth factor I. *Endocrinology*. 1996 ; 137 : 2262-2268.
7. Gerber HP, Vu TH, Ryan AM, Kowalski J, Werb Z, Ferrara N. VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nature Medicine*. 1999 ; 5 : 623-628.
8. Spelsberg TC, Subramaniam M, Riggs BL, Khosla S. The actions and interactions of sex steroids and growth factors/cytokines on the skeleton. *Molecular Endocrinology*. 1999 ; 13 : 819-828.
9. Franceschi RT, and Iyer BS. Relationship between collagen synthesis and expression of the osteoblast phenotype in MC3T3-E1 cells. *Journal of Bone Mineral Research*. 1992 ; 7 : 235-246.
10. Lian JB, Stein GS, Boskey AL. Bone formation : Maturation and functional osteoblast lineage cells. In Favus, M.J., editor. *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*. 5th edition. Washington DC : The American Society for Bone and Mineral Research. 2003 : 13-28.
11. Gautschi OP, Frey SP, Zellweger R. Bone morphogenetic proteins in clinical applications. *ANZ J Surg*. 2007 ; 77 : 626-631.
12. Shen ZJ, Kim SK, Jun do Y, Park W, Kim YH, Malter JS, Moon BJ. Antisense targeting of TGF- β 1 augments BMP-induced up-regulation of osteopontin, type I collagen and Cbfa1 in human Saos-2 cells. *Exp Cell Res*. 2007 ; 313 : 1415-1425.
13. Reijnders CM, Bravenboer N, Holzmann PJ, Bhoelan F, Blankenstein MA, Lips P. In vivo mechanical loading modulates insulin-like growth factor binding protein-2 gene expression in rat osteocytes. *Calcif Tissue Int*. 2007 ; 80 : 137-143.
14. Deckers MM, Karperien M, van der Bent C, Yamashita T, Papapoulos SE, Lowik CW. Expression of vascular endothelial growth factors and their receptors during osteoblast differentiation. *Endocrinology*. 2000 ; 141 : 1667-1674.
15. Maeda T, Matsunuma A, Kawane T, Horiuchi N. Simvastatin promotes osteoblast differentiation and mineralization in MC3T3E1 cells. *Biochemical Biophysics Research Communication*. 2001 ; 280 : 874-877.
16. Maeda T, Kawane T, Horiuchi N. Statins augment vascular endothelial growth factor expression in osteoblastic cells via inhibition

- of protein prenylation. *Endocrinology*. 2003 ; 144 : 681-692.
17. Furumatsu T, Shen ZN, Kawai A, Nishida K, Manabe H, Ohashi T, Inoue H, Ninomiya Y. Vascular endothelial growth factor principally acts as the main angiogenic factor in the early stage of human osteoblastogenesis. Tokyo : *Journal of Biochemistry*. 2003 ; 133 : 633-639.
 18. Maes C, Carmeliet P, Moermans K, Stockmans I, Smets N, Collen D, Bouillon R, Carmeliet G. Impaired angiogenesis and endochondral bone formation in mice lacking the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF164 and VEGF188. *Mechanism of Development*. 2003 ; 111 : 61-73.
 19. Hunter GK, Hauschka PV, Poole AR, Rosenberg LC, Goldberg HA. Nucleation and inhibition of hydroxyapatite formation by mineralized tissue proteins. *Biochemical Journal*. 1996 ; 317 : 59-64.
 20. Wu L, Wu Y, Lin Y, Jing W, Nie X, Qiao J, Liu L, Tang W, Tian W. Osteogenic differentiation of adipose derived stem cells promoted by overexpression of osterix. *Mol Cell Biochem*. 2007 ; 301 : 83-92.
 21. 한상원, 최제용, 이운호. 鹿茸藥鍼이 骨形成에 미치는 影響. *대한침구학회지*. 2001 ; 18 : 135-146.
 22. 이한구, 정문상, 윤강섭. 한국 인삼이 골절치유에 미치는 영향. *대한정형외과학회지*. 1984 ; 19 : 483-491.
 23. Wu D, Malda J, Crawford R, Xiao Y. Effects of hyperbaric oxygen on proliferation and differentiation of osteoblasts from human alveolar bone. *Connect Tissue Res*. 2007 ; 48 : 206-213.
 24. Wan DC, Pomerantz JH, Brunet LJ, Kim JB, Chou YF, Wu BM, Harland R, Blau HM, Longaker MT. Noggin suppression enhances in vitro osteogenesis and accelerates in vivo bone formation. *J Biol Chem*. 2007 ; 2 : Epub ahead of print.
 25. Dong GC, Chen HM, Yao CH. A novel bone substitute composite composed of tricalcium phosphate, gelatin and drynaria fortunei herbal extract. *J Biomed Mater Res A*. 2007 ; 2 : Epub ahead of print.
 26. Zhu X, Zhu B. Effect of AMI on proliferative cycle phase of bone marrow in mice. *Zhong Yao Cai*. 2000 ; 23 : 625-627.
 27. Giordano A, Galderisi U, Marino IR. From the laboratory bench to the patient's bedside : an update on clinical trials with mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol*. 2007 ; 211 : 27-35.
 28. Niemeyer P, Kornacker M, Mehlhorn A, Seckinger A, Vohrer J, Schmal H, Kasten P, Eckstein V, Sudkamp NP, Krause U. Comparison of immunological properties of bone marrow stromal cells and adipose tissue-derived stem cells before and after osteogenic differentiation. *Tissue Eng*. 2007 ; 13 : 111-121.