

단삼이 수지상 세포의 유전자 발현에 미치는 영향

강문여 · 김종한 · 최정화 · 박수연
동신대학교 한의과대학 안이비인후피부과학교실

Effects of *Salviae miltiorrhizae Radix* Extract on Gene Expression of Dendritic cells.

Wen-Lih Chiang · Jong-Han Kim · Jeong-Hwa Choi · Su-Yeon Park

Objectives and Methods : *Salviae miltiorrhizae Radix* (SMR) promotes blood circulation to remove blood stasis, cools the blood to relieve carbuncle, clears away heat from the heart and tranquilizes the mind. This study was designed to investigate the effects of SMR on immuno-potentiative action in terms of changes in the genetic profile of dendritic cells (DC) using by microarray analysis.

Results and Conclusion : In this experiment, treatments with more than 250 $\mu\text{g/ml}$ upto 1000 $\mu\text{g/ml}$ of SMR elevated the proliferation rates of DC. Microscopic observations confirmed the tendency on proliferation rates. Expression levels of genes related with cellular methabolic process, cell communication, and macromolecule metabolic process were elevated by treatment with SMR in comparison of functional distribution in a Biological Process. In molecular functions, expression levels of genes related with receptor activation, nucleotide binding and nucleic acid binding were elevated. In cellular components, expression levels of genes related to cellular membrane-bound organelles were elevated. In addition, expression levels of genes related to Wnt signalling pathways and the glycerophospholipid metabolism were elevated through analysis using pathway analysis between up-and down-regulated genes in cells treated with SMR. Finally, genes related to JAK2, GRB2, CDC42, SMAD4, B2M, FOS and ESR1 located the center of Protein interaction network of genes through treatment with SMR.

Key words : *Salviae miltiorrhizae Radix*, Dendritic cells.

1. 서 론

교신저자 : 김민정, 동신대학교부속목동한방병원
안이비인후피부과학교실
(Tel:02-2640-2700, E-mail: mj0820@freechal.com)
• 접수 2008/11/07 • 수정 2008/12/04 • 채택 2008/12/05

단삼(*Salviae Miltiorrhizae Radix*)은 唇形科에 속한 다년생 본초인 丹蔘(*Salvia miltiorrhiza Bunge*)의 뿌리와 根莖을 건조한 것으로 活血祛瘀,

涼血消癰의 效能이 있어 癥瘕積聚, 癰瘡腫毒 등의 증상을 치료한다¹⁾. 약리작용으로는 심혈관계에 작용하여 관상동맥의 혈류량을 증가시키고, 미세순환을 개선시키며, 혈액 계통에서는 혈장의 점도를 감하시키고 적혈구의 비중을 조절하며, 항혈전작용을 한다. 또한, 간세포의 변성, 괴사 및 염증 반응을 감소시키며 간섬유조직의 증식을 억제하여 補肝作用을 하며 신장에도 작용하여 신장세포 손상을 방지한다²⁾.

戴³⁾는 丹蔘 등의 活血化癥 하는 효능이 있는 藥이 通經氣, 活血脈하여 氣血의 流注를 流暢하게 發揮하게 함으로써 免疫機能의 活性化를 促進시키며 이는 祛瘀生新이라는 理論에 立脚하고 있다고 하여 단삼과 면역기능이 관계있음을 설명하였다.

단삼에 대한 실험적 연구로는 免疫細胞 및 腫瘍細胞에 미치는 效果에 관한 연구⁴⁾가 있으며 단삼의 면역 기능⁵⁾ 및 면역조절 작용에 관한 연구⁶⁾도 이루어져 면역기능이 있음을 밝혔으나, 이 논문은 선행연구와 다르게 단삼이 면역 기능에 관계하는 수지상 세포의 유전자 발현에 미치는 영향에 관한 항목으로 면역기능을 밝히고자 하였다.

이에 본 저자는 면역기능 활성화에 영향을 미치는 수지상세포에 단삼을 투여하고 나타나는 유전자의 발현 변화를 Microarray 법을 통해 분석하여 유의한 결과가 도출되어 이에 보고하는 바이다

II. 재료 및 방법

1. 재료

1) 세포주

생쥐 유래 수지상 세포주 (Dendritic cell)인 DC-1 세포주는 서울대학교 의과대학으로부터 냉동 상태로 분주 받아 실험에 사용하였다. 분주 받은 세포주는 해동되어 배양액 속에 분주 된 후, 2주

이상 계대 배양하여 실험실에 충분히 적응 시킨 후 증식률(Doubling Time)이 서울대학교에서 제공한 자료와 거의 일치하게 되었을 때, 충분히 적응하였다고 생각하고 실험에 사용하였다.

2) 약재

본 실험에서 사용된 단삼(SMR, *Salviae miltiorrhizae Radix*)은 꿀풀과에 속한 다년생 초본인 丹蔘의 뿌리를 건조 절편한 것으로 동신대학교 광주 한방병원을 통하여 구입하여 동신대학교 한의과대학 본 초학교실에서 사용하였다.

3) 시약 및 기기

Fetal bovine serum (Gibco LOT. NO. 1006842, FBS) 및, mRNA 분리를 위한 Trizol reagent (invitrogen, Cat# 15596-026)은 진성SMR (광주, 한국)을 통하여 구입하였고, RPMI 1640 (Sigma, R4130), penicillin -streptomycin(100 units/ml, 100 μ g/ μ l), Trypsin-EDTA (Sigma) 및 기타 시약은 Sigma(St. Louis, MO, USA)제품을 구입 사용하였다. 측정을 위해 Micro-plate reader (Bio-rad, CA), 광학 현미경(Olympus, Japan)등이 사용되었다.

2. 방법

1) 세포주

수지상 세포주인 DC-1의 생육 배지로는 RPMI 1640 배지를 사용하였고, 배지에는 10% FBS와 penicillin-streptomycin(100 units/ml, 100 μ g/ μ l)을 첨가하였다. 세포주의 계대 배양은 2일 간격으로 시행하였고, 부착세포의 탈착을 위해서 Trypsin-EDTA를 사용하였다. DC-1 세포주는 5% CO₂가 공여되는 배양기 속에서 37℃를 유지하며 배양되었다.

2) 약물의 준비

세척되고 세절된 상태로 구입된 단삼 100 g을 증류수 1,500 ml에 전기약탕기 (대웅, 한국)을 이용하여 3시간 동안 전탕한 후, 거즈로 걸러 전탕액을 얻었다. 얻어진 전탕액을 5,000 Xg에서 10분간 원심분리하여 찌꺼기는 버리고 상청액을 얻은 다음 가온감압건조법으로 70℃를 유지하면서 건조분말을 얻었다. 이렇게 하여 얻어진 추출물은 35 g으로 수율은 35% 였다. 추출물을 실험에 사용하기 위하여 PBS에 녹인 후, 2000 rpm에서 15분간 원심분리하여 찌꺼기를 제거하고, 상청액을 얻었다. 얻어진 상청액은 왓만 지로 거른 다음 최종적으로 0.22 μm 크기의 필터(Syringe filter, Whatman)로 걸러 멸균을 대신 하였다. 이렇게 하여 얻어진 검액은 소량씩 나누어 -20℃에 보관하였다가 사용 직전 해동하여 사용하였다.

3) 세포 증식을 측정

도진도사에서 개발한 독특한 highly water-soluble tetrazolium salt인 WST-8,2-(2-methoxy-4-nitro phenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfo-phenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt를 사용하여 살아있는 세포를 정량하는 방법⁷⁾을 사용하였다. 먼저 96-well plate (Nunc, Netherlands)에 측정하고자 하는 대상 세포주를 웰당 5×10^3 의 분량으로 분주 하고, 37℃, 5% CO₂가 공여되는 환경에서 24시간을 배양하여 부착 및 안정화를 시행하였다. 24시간의 배양이 끝난 후, 상기한 방법으로 제조된 SMR을 최종 농도 1000 $\mu\text{g/ml}$, 500 $\mu\text{g/ml}$, 250 $\mu\text{g/ml}$, 125 $\mu\text{g/ml}$, 62.5 $\mu\text{g/ml}$ 이 되게 배양액에 희석하여 부착 및 안정화된 세포주에 공급하고, 24시간 동안 배양 하였다. 24시간 동안의 배양이 끝난 후, 각 well당 10 μl 의 CCK-8 (CCK-8 sol., Dojindo, Japan) 용액을 첨가하고 37℃, 5% CO₂가 공여되는 환경에서 3시간 동안 방치하였다. 3시간 후, Micro-plate reader를 이용하여 450

nm파장에서 흡광도를 측정하였다. 정상 대조군으로는 약물을 첨가하지 않은 well을 사용하였고, 결과는 정상 대조군에 대한 백분율로 환산하여 나타내었다.

4) 세포 배양 형태의 현미경적 관찰

SMR이 수지상 세포의 증식에 미치는 영향을 현미경상 관찰하기 위하여 6-well plate(TPP, Switzerland)에 2×10^5 개의 세포를 분주하고 37℃, 5% CO₂가 공여되는 환경에서 24시간을 배양하여 부착 및 안정화를 시행하였다. 24시간의 배양이 끝난 후, 세포 증식을 및 세포 독성 측정에서와 같은 방법으로 SMR을 투여하고 24시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 후, 광학 현미경으로 세포의 형태 및 밀도를 관찰하였다.

5) RNA 분리를 위한 약물 처리 및 실험군 분류

1×10^6 개의 수지상 세포를 100 \emptyset dish (SPL, 한국)에 분주한 후, 37℃, 5% CO₂가 공여되는 환경에서 24시간을 배양하여 부착 및 안정화를 시행하였다. 24시간의 배양이 끝난 후, 실험군은 SMR을 250 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 투여하고 다시 24시간 동안 배양하였다. 정상 대조군으로는 실험군과 동일한 조건에서 배양된 후, 동일한 용량의 인산 완충액을 투여하였다.

6) RNA 분리

Microarray 분석을 위한 RNA 분리는 Florell 등⁸⁾의 방법을 변형하여 시행되었다. 상기한 방법으로 약물을 투여하고 24시간이 지난 후, 생육 배지를 완전히 제거한 다음, 인산 완충액을 이용하여 3번 수세 하였다. 수세 과정이 끝난 후, 각각의 dish에 2 ml의 Trizol reagent를 넣고 pipet을 이용하여 세포를 분리 수거 한 다음 바로 동결시킨 후 액체질소에 보관하였다가 RNA 분리에 사용하였다. 동결세포로부터 전RNA를 분리하였는데, 이

것은 Qiagen에서 제시한 방법에 따라 이루어졌다.

7) RNA 추출 정도 관리

Total RNA를 아가로스겔 상에서 전기영동한 후 28S/18S RNA의 비율을 측정하여 정도 관리하여 분석 적합 판정을 확인한 후 실험을 진행하였다. Microarray 실험에 있어서 결과에 영향을 주는 여러 가지 factor들 중 가장 중요한 것이 RNA이며⁹⁾, 이 RNA 상태를 확인하기 위해 Agilent사의 Bioanalyzer2100을 사용하여 rRNA ratio (28S/18S ribosomal RNA)를 확인함으로써 판정하였다.

8) DNA 칩을 이용한 실험

45K oligo-chip¹⁰⁾을 이용하여 실험을 수행하였다. 탐침 준비와 혼성화 반응은 3DNA array detection system을 이용하여 수행하였다 (Genisphere, PA). 형광 표지된 cDNA 제작시 20 μ g total RNA를 사용하였다. 어레이를 씻어낸 후 ScanArray scanner (Perkin-Elmer, Boston, MA)로 스캔하였다. 정상 RNA를 레퍼런스로 사용하여 DNA 칩상의 대다수 cDNA spots (85% 이상)이 검출됨을 확인하였다.

9) 데이터분석

이미지파일에서 IMAGEGENE 4.0 (Bio-discovery, Marina del Rey, CA)를 사용하여 1차 데이터를 얻은 후 LOcally WEighted Scatterplot Smoothing method (Lowess method)¹¹⁾를 사용하여 표준화하였다. 모든 칩상의 spot에서, 각 채널의 형광 강도가 배경의 형광 강도보다 1.4배 더 큰 경우에 한해 제대로 측정된 것으로 판단하여 선별하였고, 시료에서 제대로 측정되지 않은 것은 제외시켰다. 발현 비율은 CLUSTER를 이용하여 순차적 클러스터링한 후 TREEVIEW (M.B. Eisen, <http://rabam.lbl.gov>)¹²⁾를 이용하여 시각화하였다. 유전자 기능 분석은 FatiGo algorithms (<http://babelomics>,

bioinfo.cipf.es)를 이용하여 수행하였다. 클래스간 비교분석을 통해 얻어진 결과는 False Discovery Rate (FDR) 값이 0.05 이하일 때 의미있는 것으로 판단하였다. 단백질 결합은 BOND 데이터베이스 (<http://bond.unleashedinformatics.com>)에서 얻어진 인간단백질 데이터베이스로 cytoscape program (버전 2.4)을 이용하여 분석하였다.

3. 통계 처리

세포 증식을 실험 결과에 대한 통계적 분석은 통계 패키지인 Sigma plot (Sigma plot for Windows, ver. 9.0, U.S.A.)를 이용하였다. 실험 성적은 평균 \pm 표준편차(mean \pm SD)로 나타내었으며, 실험군 간 평균의 차이를 검정할 때에는 student's t-test로 검정하여 p-값이 0.05 미만일 때 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였다.

III. 성 적

1. 수지상 세포의 증식율에 미치는 영향

SMR의 투여는 농도에 비례하여 수지상 세포의 증식율을 증가시키는 경향을 보였으며, 투여 농도 250 μ g/ml 이상에서 수지상 세포의 증식율을 유의하게 증가시켰다. 대조군의 증식율을 100%로 하였을 때, 250, 500, 1000 μ g/ml 투여에 의한 증식율은 각각 129.2 \pm 8.0, 196.7 \pm 11.3, 195.0 \pm 10.3% 였다 (Fig. 1).

2. 수지상 세포의 증식 형태 및 밀도에 관한 영향

SMR의 세포 증식율에 미치는 영향을 육안적으로 재확인하기 위하여 수지상 세포에 SMR을 처리한 다음 현미경을 이용하여 증식 형태 및 밀도를 관찰한 결과 투여 농도와 비례하여 세포증식에 의한 밀도가 증가하는 경향이 나타났다 (Fig. 2).

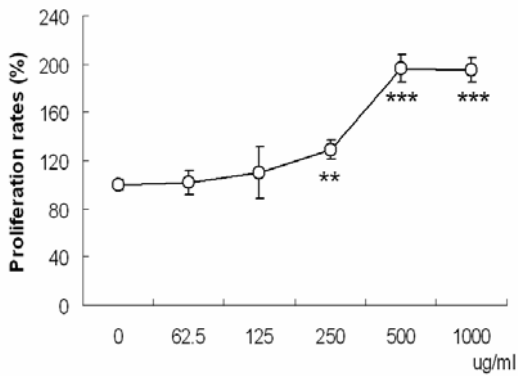


Fig. 1. Effects of SMR on proliferation rates of dendritic cells in vitro

DC-1 Cells were attached 96-well plate, and added SMR as indicated concentrations respectively. After 24 hr incubation, proliferation rates were measured using altered MTT methods. Values are expressed as percentage of control. Result are presented as mean±SD. **P < 0.01, and ***P < 0.001 vs. non-treated Control(n=6).

3. DNA 칩 이미지

SMR을 투여한 수지상 세포의 DNA 칩 이미지는 Fig. 3에 표시하였다. Agilent Whole Human Genome 44K 올리고칩을 사용하여 세포의 전체 유전체 변이를 분석하였다. Cy3와 cy5로 구성된 two colors system을 사용하였기 때문에, 적색과 녹색 스팟으로 표현되어졌다. 대부분의 유전자는 의미있는 변화를 보이지 않았기 때문에 대부분의 스팟이 노란색으로 나타났다 (Fig. 3).

4. DNA 칩 표준화

원천 이미지에서 얻어진 1차 데이터 (Fig. 4A)를 lowess 기법을 사용해 표준화하였다 (Fig. 4B). 표준화 과정을 통해, 이전의 왜곡된 비 형태가 0을 기점으로 하는 일직선 형태의 log 비로 변화되었다.

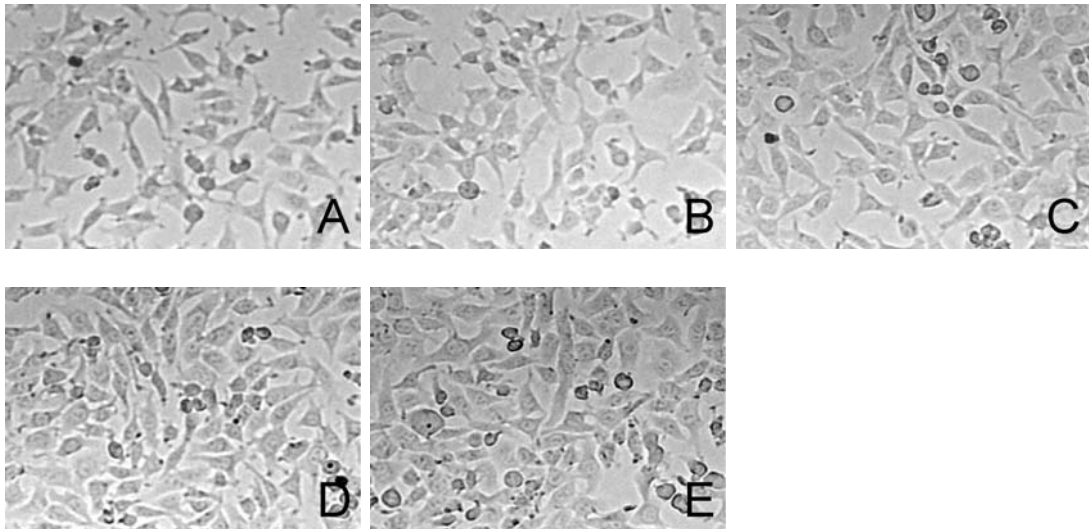


Fig. 2. Effects of SMR on morphology and proliferation density of dendritic cells in vitro

DC-1 Cells were attached 6-well plate, and added 0, 125, 250, 500 and 1000 ug/ml of SMR respectively. After 24 hr incubation, morphology and proliferation density were observed using microscope. (A) non-treated control group, (B) 125 ug/ml treated group, (C) 250 ug/ml treated group, (D) 500 ug/ml treated group, (E) 1000 ug/ml treated group.

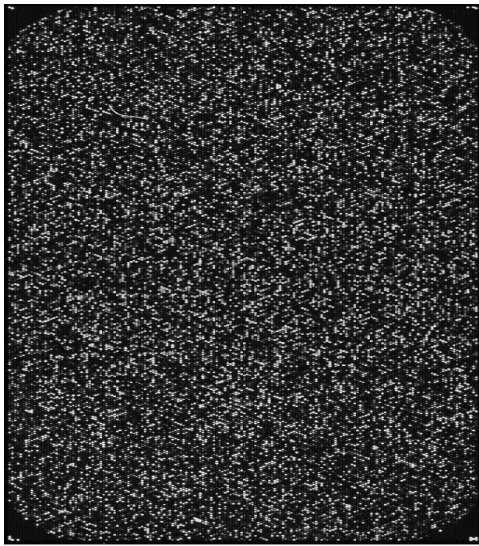


Fig. 3. Raw image of microarray

A total sequence set of ~45,000 oligo-nucleotides were printed onto glass microscope slides. The probe preparation and hybridization were performed using 3DNA array detection system with 20 μ g of total RNA from cells. Untreated cells was used as reference RNA.

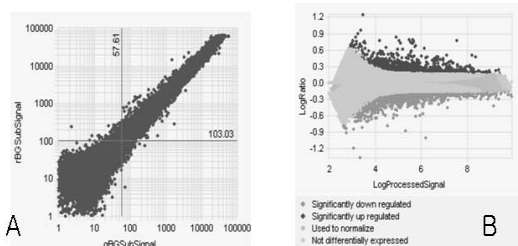


Fig. 4. Signal distribution of microarray

(A) Vertical axis represents log cy5 intensity and horizontal axis represents log cy3 intensity. Normalization of microarray (B) Primary data from raw image were normalized using lowess method. Vertical axis represents log ratio and horizontal axis represents log intensity of all spots after normalization.

5. 생물학적 과정, 분자기능 및 세포 구성요소 항목에서의 기능 분포 비교

본 연구의 결과에 나타내지는 않았지만 발현이

감소되었거나 증가된 유전자들의 기능을 분류하였을 때, 비슷한 기능별 분포를 보여주고 있다는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 이들 유전자 사이의 차이를 좀 더 세분화해서 관찰할 필요가 있었으며 그 결과가 Fig. 5, 6, 7에 나와 있다. 생물학적 과정의 경우 세포 대사 조절, 세포 신호 전달, 거대 분자 대사과정 등의 세포내 기능과 관련된 항목들에서 증가유전자와 감소유전자간에 유의한 ($P < 0.05$) 차이를 보였다 (Fig. 5). 분자기능분포의 경우에는 수용체 활성화, 뉴클레오티드 결합 및 핵산 접합 등의 항목에서 유의한 변화가 나타났다 ($P < 0.05$) (Fig. 6). 세포성분에서는 세포막 경계 소기관 등의 항목에서 차이를 나타내었다 (Fig. 7).



Fig. 5. Comparison of functional distribution in Biological Process

Genes were analyzed in Biological Process category in ontology. The horizontal bar represents the percentage of specific functional category in Biological Process. The list was arrayed in decreasing percentage of functional category. Red and Green color represent percentage of up-regulated and down-regulated genes in each functional category. $P < 0.05$ was considered significant.



Fig. 6. Comparison of functional distribution in Molecular Function

Genes were analyzed in Molecular Function category in ontology. The horizontal bar represents the percentage of specific functional category in Molecular Function. The list was arrayed in decreasing percentage of functional category. Red and Green color represent percentage of up-regulated and down-regulated genes in each functional category. $P < 0.05$ was considered significant.

6. 단삼 처리에 의해 증가 및 감소된 수지상 세포 유전자의 경로 분석

수지상 세포에 단삼 추출물을 처리하여 증가 및 감소된 유전자와 이들의 경로를 분석하여 보았다. 그 결과 3개의 주요 경로가 확인 되었는데, Wnt signaling pathway 및 Glycerophospholipid metabolism에 관여하는 유전자는 발현이 증가하였으며, Neuroactive ligand-receptor interaction 에 관여하는 유전자들은 발현이 감소되었다 (Fig. 8).

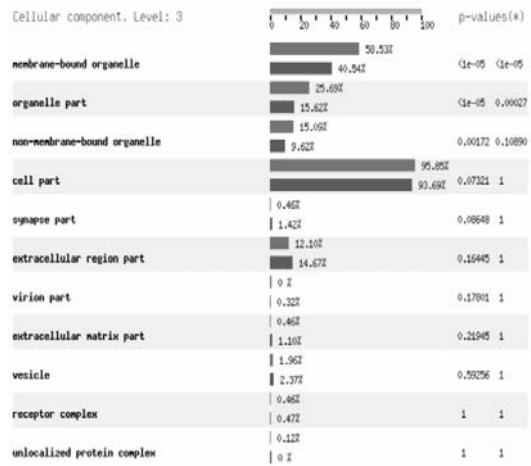


Fig. 7. Comparison of functional distribution in Cellular Component

Genes were analyzed in Cellular Component category in ontology. The horizontal bar represents the percentage of specific functional category in Cellular Component. The list was arrayed in decreasing percentage of functional category. Red and Green color represent percentage of up-regulated and down-regulated genes in each functional category. $P < 0.05$ was considered significant.

7. 인체 시스템에서 단백질 네트워크와 단삼 추출물 처리에 의해 변화된 유전자들의 상호작용 네트워크

단삼 추출물 처리에 의해 유전자들의 발현 변화가 있다는 것을 확인하였다. 더 나아가 이들 유전자들 간의 상호작용에 대해 알기 위하여 단백질 상호작용을 이용한 네트워크 분석을 수행하였다. Fig. 9와 10은 칩에 존재하는 유전자에 해당하는 단백질의 상호작용을 보여주는 그림이다. Fig. 9에서는 노란색으로 표시된 도형이 단삼 처리에 의해 수지상 세포에서 발현이 증가한 단백질을 나타내며, Fig. 10에서는 노란색으로 표시된 도형이 발현 감소된 단백질을 나타낸다.

확인된 단백질 네트워크의 개개의 그림을 살펴

보면 (A, B, C 및 D) 각각의 단백질들을 직접 확인할 수 있었다. JAK2, GRB2, CDC42, SMAD4 등의 단백질은 발현이 증가되었고, GRB2, B2M, 램, ESR1 등의 단백질은 발현이 감소되었다. 즉, JAK2, GRB2, CDC42, SMAD4, B2M, FOS 및 ESR1 등의 단백질이 다른 여러 단백질과 상호작용한다는 것을 확인할 수 있었으며, 따라서 이들 단백질이 약물의 세포내 작용에 매우 중요한 역할을 수행할 것으로 예측된다.

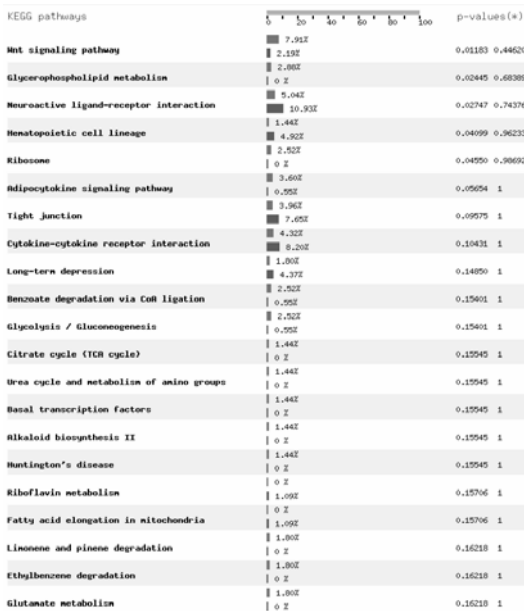


Fig. 8A. Pathway analysis

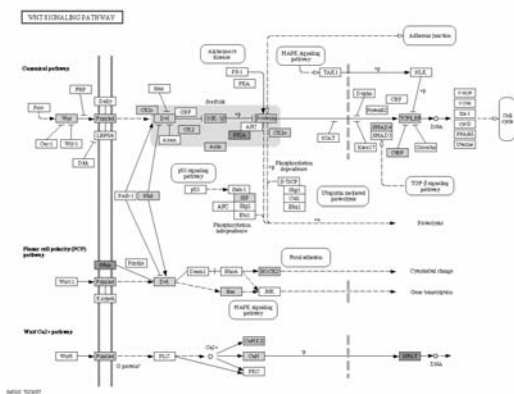


Fig. 8B. Wnt pathway

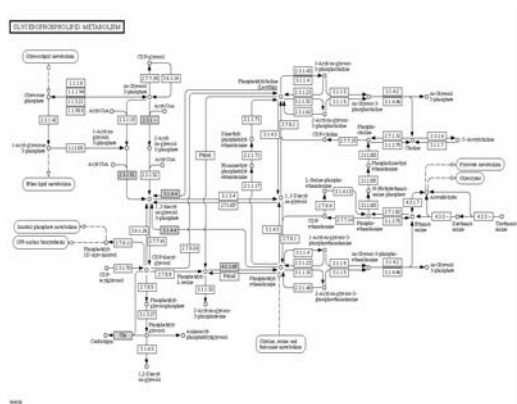


Fig. 8C. Glycerophospholipid metabolism

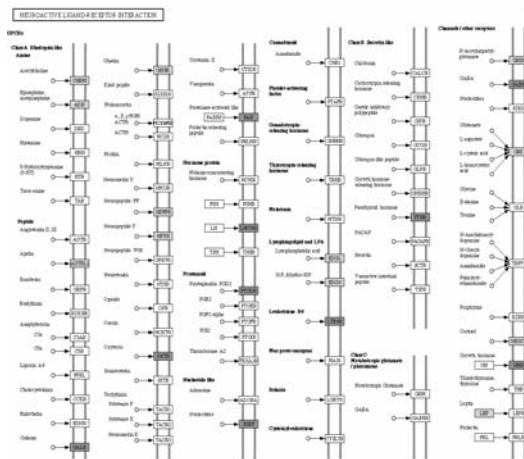


Fig. 8D. Neuroactive ligand-receptor interaction

Fig. 8. Pathway analysis between up- and down-regulated genes in cells treated with *Salvia Miltiorrhizae Radix* extract (Fig. 8A)

Involvement of these genes on different pathway was analyzed. The horizontal bar represents the percentage of genes on each pathway. The list was arrayed in decreasing percentage of pathway involvement. Top 3 pathways were showed in detail in which the up or down-regulated genes were colored in red or green, respectively. The represented pathways were obtained from KEGG.

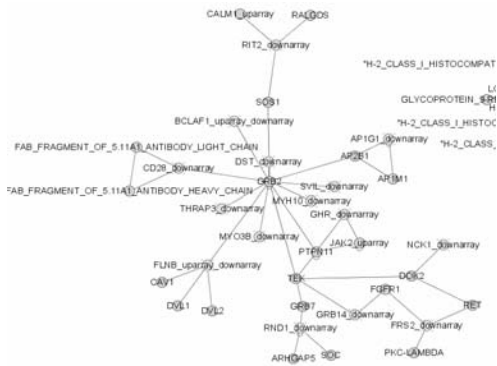


Fig. 10A

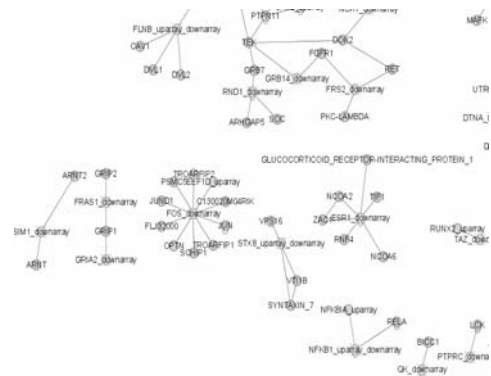


Fig. 10C

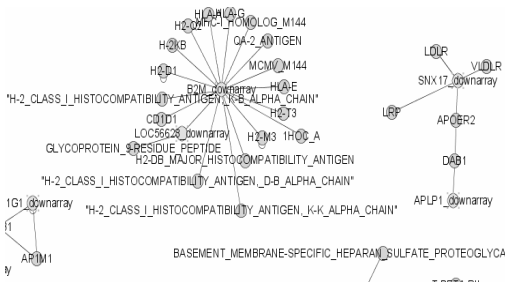


Fig. 10B

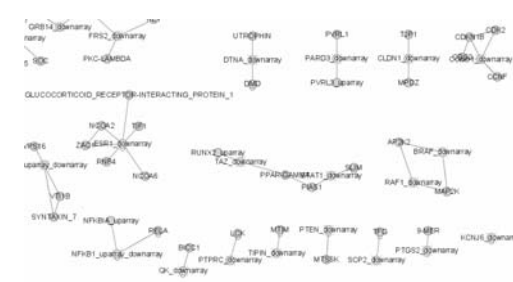


Fig. 10D

Fig. 10. Protein interaction network of genes down-regulated by treatment with *Salvia Miltiorrhizae Radix* extract

Yellow circles marked were shown in detailed view. Each circle have name of the protein. GRB2 (A), B2M (B), FOS (C), and ESR1 (D) were placed on core positions with intensive interactions with other proteins.

排膿止痛，生肌長肉，破宿血，補新血。”이라고 하였다.

성분으로 tanshinone I, II, dihydrotanshinone, cryptotanshinone, methyltanshinonate, methylene hanshiquinone 및 β -sitosterol 등이 있으며¹⁾, 약리작용으로는 심혈관계에 작용하여 혈관확장으로 관상동맥의 혈류량을 증가시키고, 미세순환을 개선시키며, 혈액 계통에서는 혈장의 점도를 강하시키고 적혈구의 비중을 조절하며, 항혈전작용을 하며 또한 간세포의 변성, 괴사 및 염증 반응을 감소시키며 간섬유조직의 증식을 억제하여 補肝作用을 하며 신장에도 작용하여 신장세포 손상을 방지하는 것으로 보고되었다²⁾.

단삼에 대한 실험적 연구로는 林¹⁵⁾과 朴¹⁶⁾등의 丹蔘藥鍼이 急性腎不全에 미치는 영향에 관한 연구, 免疫細胞 및 腫瘍細胞에 미치는 效果에 관한 연구⁴⁾, 抗癌活性和 apoptosis에 미치는 影響에 관한 연구¹⁷⁾ 등이 있으며 최근에는 단삼의 면역 기능⁵⁾ 및 면역조절 작용에 관한 연구⁶⁾도 이루어지고 있다.

韓醫學에서 免疫의 概念은 疾病의 發生 및 進展을 人體의 正氣와 病因인 邪氣의 抗爭 및 消長進退의 過程으로 본 正邪論에서 그 關聯性을 찾아볼 수 있으며, 疾病發生과 進行에 대한 病理理論을 보면 正氣와 邪氣의 力量對備에 의하여 疾病이 發生, 轉歸, 治療 된다는 正邪論의 認識과 가장 가깝다 (18-19).

여기에서 正은 正氣 즉 生命活動의 原動力이며 生體의 調節 防禦 및 適應能力을 말하고 各種 臟腑 組織機管의 機能活動에서부터 外部 環境에 대한 適應力과 病因에 對한 抗病力을 뜻하고 邪氣란 病邪를 말하며 人體의 正常的인 生命活動을 沮害하고 人體와 外部環境 사이의 相對的 平衡狀態를 破壞하는 各種 有害因子로 六淫外邪나 體內的 病理的 產物인 瘀血, 痰飲 등을 指稱하였다¹⁸⁻²⁰.

《素問》²¹⁾上古天真論에서는 “眞氣從之 精神內守 病安從內”라 하였고 刺法論²¹⁾에서는 “正氣存內 邪不可于”라 하였으며 評熱病論²¹⁾에서는 “邪氣所湊 其氣必虛”라 하였고 《靈樞》²¹⁾百病始生篇에서는 “風雨寒熱, 不得虛. 邪不能獨傷人”이라 하여 人體의 正氣가 旺盛하면 비록 邪氣가 있어도 致病하기 어렵고 疾病을 豫防함을 說明하였다.

疾病의 發生시 正氣가 아직 크게 損傷받지 않았을 경우에는 邪氣를 먼저 治療함으로써 邪氣가 더욱 發展되지 못하게 되어 身體에 對한 傷害作用도 消失 또는 中止되고 臟腑 經絡 등의 病理的 損傷과 精, 血, 氣, 津液 등의 物質的 損傷이 恢復되어 이들 精, 血, 氣, 津液이 邪氣에 影響을 받아 痰飲, 瘀血이 되는 二次病理進行도 防止되며 이로 因하여 陰陽이 새로이 相對的 平衡을 이루게 되어 疾病은 治癒되는 것이다. 이는 瀉劑의 投與를 통한 祛瀉法지만 이 또한 正氣恢復에 影響을 준다는 面에서 扶正과 祛邪는 相互密接하다고 생각된다²²⁾. 예로는 戴³⁾는 丹蔘, 紅花, 川芎 등의 活血化瘀하는 藥이 通經氣, 活血脈하여 氣血의 流注를 流暢하게 發揮하게 함으로써 免疫機能의 活性化를 促進시키며 이는 祛瘀生新이라는 理論에 立脚하고 있다고 하였다.

이에 저자는 活血祛瘀劑로 外科疾患에 應用되는 丹蔘이 면역기능 활성화에 미치는 影響을 수지상세포의 유전자 발현 측면에서 살펴보기 위하여 본 실험을 기획하였다.

인체의 면역계는 크게 자연면역(innate immunity)

와 획득면역(acquired immunity)으로 구분 할 수 있다²³⁾. 자연면역은 병원체나 조직의 손상을 인식하여 획득면역에 관여하는 세포에 신호를 보내는 능력을 지니고 있는데, 대식세포 (Macrophage), 자연살해세포 (Natural killer cell)가 대표적이며, 이외에도 다양한 cytokine이 관여한다고 알려져 있다²⁴⁻²⁵⁾.

이러한 강력한 면역 시스템이 순조롭게 작동하기 위해서는 항원을 제시해주는 항원제시세포 (Antigen presenting cell)의 활성화가 필수적이다. 이러한 역할을 하는 면역 세포로 B 세포와 대식세포 등이 알려져 있었으나, 최근 90년대에 들어 전문적인 항원제시세포가 수지상세포 (DC, Dendritic cell)임이 알려졌다²⁶⁻²⁷⁾. 수지상세포는 수지(dendrite)를 가지고 있는 형태 때문에 붙여진 이름으로 생체 내 가장 강력한 항원전달세포로 알려져 있다²⁸⁾. 골수의 전구세포로부터 기원하는 수지상세포는 뇌를 제외한 거의 모든 조직에 산재해 있으며, 말초 단핵구(PBMC)에는 1%미만으로 존재한다²⁹⁾. 수지상세포는 다른 세포에 비하여 항원전달분자(CD1a, MHC-I, MHC-II), 부속/동시자극분자(CD40, CD58, CD80, CD86 등), 세포 내 부착분자(CD50, CD54) 그리고 항원 흡수에 필요한 다양한 수용체 (CD11b, CD32, CD64, macrophage mannose receptor, DEC-205)를 많이 발현한다³⁰⁻³²⁾. 따라서 이와 같은 많은 표면 항원분자와 수용체들 때문에 수지상세포는 다양한 감염원과 항원 그리고 주위환경의 변화에 민감하게 반응한다. 수지상세포는 항원을 T 세포에게 공여하여 T 세포를 활성화시킴으로써 면역 반응의 시작에 매우 중요한 역할을 한다. 이들이 가지는 T 세포 활성화 능력은 대식세포의 50배에 달하며, 면역 기능의 활성화 측면에서 수지상세포의 역할에 버금가는 기능의 다른 면역계 세포를 찾기는 힘들다³³⁻³⁴⁾. 수지상세포는 세포 표면에 다양한 활성화 인자들을 표출 할 수 있다. 휴지기의 수지상 세포에는 T 세

포를 활성화 시킬 수 있는 CD80, CD86, MHC Class II 등으로 대표되는 표지인자들의 발현이 매우 낮지만, 일단 균주에서 유리되는 Lipopolysaccharide (LPS) 등의 활성화 물질에 의하여 활성화 되면 상기한 표면 항원 (surface marker) 들을 표출하여 효율적인 항원 제시기능을 수행하게 된다³⁵⁻³⁶⁾.

일반적인 세포의 특성은 특정 단백질 하나에 의하여 결정된다기보다는 유사거나 계통적 기능을 가진 다양한 단백질군의 특성에 의하여 결정되는 경향을 보인다³⁷⁾. 이러한 이유에서 최근 수천에서 수만개에 이르는 유전자의 발현을 동시에 관찰 할 수 있는 DNA 칩 기술의 개발은 이러한 종합적 관찰을 가능하게 하였다³⁸⁾.

Array에는 filter array, oligonucleotide array와 cDNA microarray의 3가지 종류가 있다. 본 연구에서 사용한 방법인 cDNA microarray는 분자생물학적 기법으로 볼 때 Northern blot의 역실험이라고 할 수 있으며, Inverted northern blot 또는 Reverse northern이라 불리운다³⁸⁻³⁹⁾.

현재 약물 기전을 밝히기 위해서는, 대용량 분석을 통해 얻어진 모든 종류의 데이터를 시스템 생물학을 이용하여 분석하는 접근법이 일반적으로 사용되고 있으며⁴⁰⁾, 가까운 미래에 신약 개발이나 약물기전 연구에 있어 많은 부분이 생물정보학이나 시스템적 접근 방식을 통해 이루어질 것이다⁴¹⁾.

본 연구에서는 수지상 세포에 대한 SMR 투여의 효과를 분자수준에서 파악하기 위하여 DNA 칩을 이용하여 유전자들의 발현정도를 측정하였다.

일반적으로 수지상 세포의 증식율을 증가시키는 것은 면역 기능의 활성화에 관여할 가능성이 높다⁴²⁾. 본 논문의 결과를 살펴보면, 250 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 SMR 투여군에서 유의할 만한 세포 증식율의 증가를 보였다 (Fig. 1). 이러한 증식율의 증가 양상과 현미경적 관찰 결과 상의 밀도는 유사한 경향을 보였다 (Fig. 2). 이러한 결과는 SMR이 수지상세포의 증식율 증가를 통하여 면역 반응의 활성화에

기여할 가능성이 있는 것으로 해석된다. 또한, 상기한 결과를 바탕으로 추후 계속될 DNA를 이용한 유전자 발현 정도 측정에 250 $\mu\text{g/ml}$ 농도를 사용하기로 결정 하였다.

Microarray 분석법을 이용한 유전자 발현 조사에서 250 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 SMR 처리는 대다수의 유전자에 특별한 영향을 미치지 않았으며, 발현이 변화한 유전자 수는 소수였다 (data not shown).

발현이 변화한 유전자를 바탕으로 생물학적 과정, 분자기능 및 세포 구성요소 관련 유전자의 발현 정도를 각각 비교 하여본 결과 생물학적 과정에서는 세포 대사 조절, 세포 신호 전달 등의 세포의 성장 및 분화와 직접적으로 관련이 있는 유전자들이 유의한 차이를 보였다. 이러한 결과는 앞서 제시한 증식율의 증가와 동일한 맥락에서 해석된다. 분자기능 분포의 경우에도 수용체 활성화, 뉴클레오티드 결합 및 핵산 접합등에 관련된 유전자들의 발현이 증가하였는데, 수용체 활성화는 외부의 신호를 세포내로 전달하는 과정에 관여하고 뉴클레오티드 결합 및 핵산 접합 등은 세포 분화와 관련 있으므로 이 역시 Fig. 1과 Fig. 2에서 제시한 결과와 동일한 맥락에서 해석된다.

SMR 처리에 의하여 증가하거나 감소한 수지상 세포 유전자들을 세포 대사 관련 경로별로 재분석한 결과 Wnt signalling pathway, Glycerophospholipid metabolism과 관련된 유전자군의 발현이 증가하였다 (Fig. 8).

Wnt는 인간의 oncoprotein으로서 처음 발견되었으며 나중에는 발생과정에 중요한 단백질이라는 것이 알려졌다⁴³⁾. Wnt가 결합하는 리셉터는 Frizzled 계열의 리셉터이다⁴⁴⁾. 이것은 GPCR (G-protein coupled receptor)인데 실제로 G-protein 신호와 PI3K 신호도 유발할 수 있다⁴⁵⁾. Wnt 경로에 관여하는 주요한 단백질로 b-catenin이라는 다기능 단백질이 있다. 이 단백질은 일반적으로 평상시에는 Cadherin과 결합하여 세포와 세포의 부

착에 관여한다. 그런데, Wnt가 Frizzled를 통해 신호를 유발시키면 어떤 단계를 거쳐서 Dishevelled라는 단백질이 활성화 되고, 여기에 ck1이라는 kinase가 Dishevelled와 결합한다⁴⁶⁾. 이러한 일련의 과정을 통하여 b-catenin이 phosphorylation되는 것을 막고, 이러한 안정된 상태의 b-catenin은 핵 내로 들어가서 wnt target gene들을 발현시킨다⁴⁶⁾. Wnt target gene으로 알려진 것으로 c-myc이 대표적이다⁴⁷⁾. c-myc은 세포 증식 및 분화에 필수적인 단백질이다. 본 연구의 결과에서 Wnt 관련 유전자들의 발현이 전반적으로 증가한 것은 결국 SMR의 투여가 세포 증식과 분화를 일으키는데 중요한 c-myc과 같은 유전자를 발현시키고 그 결과 세포 증식을 일으킨 것으로 해석할 수 있다.

인지질(phospholipid)은 glycerophospholipid 와 sphingophospholipid로 분류되며, 세포막, 핵 기타 세포질의 구성 성분 이다, 또한, 단백질 합성에도 관여한다⁴⁸⁾. 본 연구의 결과에서 Glycerophospholipid metabolism과 관련된 유전자의 발현 증가도 상기한 결과들과 마찬가지로 세포 증식에 직접적으로 관여함으로써 같은 맥락으로 이해된다.

마지막으로, SMR 처리에 의해 변화되는 유전자 중에서 향후 새로운 약물의 신규 타겟이 될 수 있는 유전자를 선별하기 위하여 단백질 상호작용을 이용한 네트워크 분석을 수행한 결과, 원발성 골수 섬유증(primary myelofibrosis)과 관련 있는 JAK2⁴⁹⁾, 세포의 증식 및 분화에 관련된 신호 전달 체계와 관련된 GRB2 (Growth factor receptor-bound protein 2)⁵⁰⁾, 세포 분화등의 세포 주기의 조절과 관련된 CDC42⁵¹⁾, 대장암과 관련이 있는 SMAD4⁵²⁾, 다발성 골수종(Multiple Myeloma)과 관련이 있는 B2M⁵³⁾, 전사인자로서 세포 분열에 관여하는 FOS⁵⁴⁾ 및 여성 호르몬인 에스트로젠의 수용체와 관련 깊은 ESR1 (Estrogen receptor 1)⁵⁵⁾ 등의 단백질이 다른 여러 단백질과 상호작용한다는 것을

확인할 수 있으며, 따라서 이들 단백질이 약물의 세포내 작용에 매우 중요한 역할을 수행할 것으로 예측된다. 상기한 유전자들은 대부분 oncogene에 속하여 암증과의 관련성을 가지고 있는 것처럼 보이나, oncogene은 대부분 세포의 증식 분화에 관여하는 필수적인 유전자 군에 속하고, 암종의 발현은 이러한 oncogene의 과발현(overexpression)에 의한 것이므로 이를 구분할 필요가 있는 것으로 생각된다.

이상의 결과로부터 본 저자는 단삼 추출물의 투여는 수지상세포의 증식을 증가시키므로써 면역 기능 활성화에 관여할 가능성이 있으며, 수지상세포의 증식을 증가에는 Wnt signalling pathway, Glycerophospholipid metabolism 등이 관여할 가능성이 높다고 생각하며, 관련 단백질의 정량 등을 통한 추가 연구를 통하여 상기한 가설을 입증할 필요가 있다고 생각한다. 또한 이러한 결과는 추후 단삼의 면역 기능 연구에 중요한 자료가 될 것으로 생각한다.

V. 결 론

단삼이 수지상 세포의 증식을 및 유전자 발현 양상에 미치는 영향을 관찰하기 위하여, DC-1 세포주에 단삼을 처리하고 증식을 관찰한 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 투여농도 250 $\mu\text{g/ml}$ 이상에서 유의하게 수지상 세포의 증식을 증가시켰다.
2. 현미경상 관찰에서 투여농도와 비례하여 형태 및 밀도의 증가가 관찰되었다.
3. 생물학적 과정의 경우 세포 대사 조절, 세포 신호 전달, 거대분자 대사과정 등의 세포내 기능과 관련된 항목들에서 유전자 발현의 유의한 차이를 보였다.

4. 분자 기능분포 측면에서 수용체 활성화, 뉴클레오티드 결합 및 핵산 접합 등의 항목에서 유전자 발현의 유의한 차이를 보였다.
5. 세포 성분에서는 세포막 경계 소기관 등의 항목에서 유전자 발현의 유의한 차이를 보였다.
6. 세포 내 신호 전달 체계별로 분류해 본 결과 Wnt signalling pathway 및 Glycerophospholipid metabolism에 관여하는 유전자군의 발현은 증가하였고, Neuroactive ligand-receptor interaction에 관여하는 유전자군의 발현은 감소하였다.
7. 단백질 상호작용을 이용한 네트워크 분석결과 JAK2, GRB2, CDC42, SMAD4, B2M, FOS 및 ESR1 등의 단백질이 상호작용 네트워크의 중심부에 위치하고 있었다.

참고 문헌

1. 全國韓醫科大學 本草學教室 共著. 本草學. 서울;영림사. 2004;461.
2. 宗先禎 外. 丹蔘製劑臨床應用概況. 山東中醫學院學報, 1992;422-5.
3. 戴新民. 中醫免疫學. 臺北;啓業書局. 1985;1-51.
4. 진천식, 강성도, 정현우. 免疫細胞 및 腫瘍細胞에 미치는 丹蔘의 效果. 대한동의병리학회지. 1998;12(2):125-31.
5. 서영찬, 배현수, 홍무창, 신민규. 단삼이 루프스 Model NZB/wF1 Mouse의 면역기능에 미치는 영향. 대한동의생리학회:학술대회논문집. 2006;30-31.
6. 은재순. 단삼 물 추출액의 면역조절 작용. 동의생리병리학회지. 2001;15(6):876-80.
7. Roslev P, King GM. Application of a Tetrazolium Salt with a Water-Soluble Formazan as an Indicator of Viability in Respiring Bacteria. Appl Environ Microbiol. 1993;59(9):2891-6.
8. Florell SR, Coffin CM, Holden JA, Zimmermann JW, Gerwels JW, Summers BK, Jones DA, Leachman SA. Preservation of RNA for functional genomic studies: a multidisciplinary tumor bank protocol. Mod Pathol. 2001;14(2):116-28.
9. Weis S, Llenos IC, Dulay JR, Elashoff M, Martínez-Murillo F, Miller CL. Quality control for microarray analysis of human brain samples: The impact of postmortem factors, RNA characteristics, and histopathology. J Neurosci Methods. 2007;165(2):198-209.
10. Kwon KH, Kim SJ, Kim HJ, Jung HH. Analysis of gene expression profiles in cholesteatoma using oligonucleotide microarray. Acta Otolaryngol. 2006;126(7):691-7.
11. Zahurak M, Parmigiani G, Yu W, Scharpf RB, Berman D, Schaeffer E, Shabbeer S, Cope L. Pre-processing Agilent microarray data. BMC Bioinformatics. 2007;8:142.
12. Pavlíček A, Hrdá S, Flegr J. Free-Tree-freeware program for construction of phylogenetic trees on the basis of distance data and bootstrap/jackknife analysis of the tree robustness. Application in the RAPD analysis of genus Frenkelia. Folia Biol (Praha). 1999;45(3):97-9.
13. 神農本草經. 北京;科學技術文獻出版社. 1996: 92-3.
14. 許浚. 東醫寶鑑. 서울;法人文化社. 1999:690.
15. 임춘우, 서정철, 윤현민, 장경진, 송춘호, 안창범. 丹蔘藥鍼이 急性腎不全 家兔의 신세뇨관에 미치는 영향. 대한침구학회지. 2001;18(2): 111-22.

16. 朴世貞, 張慶全, 宋春活, 安昌範. 丹蔘藥鍼이 Rhabdomyolysis에 의한 急性腎不全에 미치는 영향. 대한침구학회지. 1999;16(2):233-48.
17. 崔善美, 崔昇勳, 安圭錫. 단산의 항암활성과 apoptosis에 미치는 영향. 대한동의병리학회지. 2000;14(2):22-47.
18. 安圭錫 外著. 東醫病理學. 서울;高文社. 1990: 23-7,78-80,118-222.
19. 方藥中 外著. 實用中醫內科學. 上海;上海科學技術出版社. 1988:12-6.
20. 金完熙, 崔達永 編著. 臟腑辨證論治. 서울;成輔社. 1985:53.
21. 洪元植 編. 精校黃帝內經. 서울,東洋醫學研究院 出版社. 37, 55, 57, 69, 78, 82, 87, 118, 119, 122, 169, 213, 249, 256, 292, 304, 305, 318, 319, 326, 347, 348, 1981.
22. 金英희, 이병렬. 구기자분획약침이 마우스의 면역기능에 미치는 영향. 대한침구학회지. 1996;13(2):67-86.
23. Fearon DT, Locksley RM. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. Science. 1996;5:272 (5258):50-3.
24. Brightbill HD, Libraty DH, Krutzik SR, Yang RB, Belisle JT, Bleharski JR, Maitland M, Norgard MV, Plevy SE, Smale ST, Brennan PJ, Bloom BR, Godowski PJ, Modlin RL. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. Science. 1999;30:285 (5428):732-6.
25. Aliprantis AO, Yang RB, Mark MR, Suggett S, Devaux B, Radolf JD, Klimpel GR, Godowski P, Zychlinsky A. Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2. Science. 1999;30:285(5428):736-9.
26. 김도순, 박정은, 서권일, 고성룡, 이종원, 도재호, 이성태. 고려홍삼의 수지상세포 활성화 효과. 고려인삼학회지. 2006;30(3):117-27.
27. Thomas R, Lipsky PE. Dendritic cells: origin and differentiation. Stem Cells. 1996; 14(2):196-206.
28. Banchereu J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. Nature. 1998;392:245-52.
29. Fearley PB, Whyte LF, Carnoutsos SA, Cook AH, Hart DN. Monitoring human blood dendritic cell numbers in normal individuals and in stem cell transplantation. Blood. 1999;93:728-36.
30. Stockwin LH, McGonagle D, Martin IG, Blair GE. Dendritic cells; immunological sentinels with a central role in health and disease. Immunol Cell Biol. 2000;78:91-102.
31. Jiang W, Swiggord WJ, Heuflerc, Peng M, Mirza A, Steinman RM, et al. The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. Nature. 1995;375: 151-55.
32. Sallusto F, Cella M, Danieli C, Lanzavecchia A. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macro molecules in the major histocompatibility complex class II compartment; down regulation by cytokines and bacterial products. J Exp med. 1995; 182:389-400.
33. Hart DN. Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. Blood. 1997;90(9):

- 3245-87.
34. Bell D, Young JW, Banchereau J. Dendritic cells. *Adv Immunol*. 1999;72:255-324.
 35. Kronin V, Winkel K, Süß G, Kelso A, Heath W, Kirberg J, von Boehmer H, Shortman K. A subclass of dendritic cells regulates the response of naive CD8 T cells by limiting their IL-2 production. *J Immunol*. 1996;157(9):3819-27.
 36. Süß G, Shortman K. A subclass of dendritic cells kills CD4 T cells via Fas/Fas-ligand-induced apoptosis. *J Exp Med*. 1996;183(4):1789-96.
 37. Brown PO, Botstein D. Exploring the new world of the genome with DNA microarrays. *Nat Genet*. 1999;21(1 Suppl):33-7.
 38. 김진혁, 이용성. CDNA microarray. *천식 및 알레르기학회지* 2001;21(3):467-76.
 39. Jeffrey SS, Fero MJ, Børresen-Dale AL, Botstein D. Expression array technology in the diagnosis and treatment of breast cancer. *Mol Interv*. 2002;2(2):101-9.
 40. Hong Y, Ho KS, Eu KW, Cheah PY. A susceptibility gene set for early onset colorectal cancer that integrates diverse signaling pathways: implication for tumorigenesis. *Clin Cancer Res*. 2007;13(4):1107-14.
 41. Galbraith DW. The daunting process of MIAME. *Nature*. 2006 Nov 2;444(7115):31.
 42. Pimpinelli N, Santucci M, Romagnoli P, Giannotti B. Dendritic cells in T- and B-cell proliferation in the skin. *Dermatol Clin*. 1994;12(2):255-70.
 43. Nusse R, Theunissen H, Wagenaar E, Rijsewijk F, Gennissen A, Otte A, Schuurig E, van Ooyen A. The Wnt-1 (int-1) oncogene promoter and its mechanism of activation by insertion of proviral DNA of the mouse mammary tumor virus. *Mol Cell Biol*. 1990;10(8):4170-9.
 44. Bafico A, Gazit A, Pramila T, Finch PW, Yaniv A, Aaronson SA. Interaction of frizzled related protein (FRP) with Wnt ligands and the frizzled receptor suggests alternative mechanisms for FRP inhibition of Wnt signaling. *J Biol Chem*. 1999;274(23):16180-7.
 45. Kawasaki A, Torii K, Yamashita Y, Nishizawa K, Kanekura K, Katada M, Ito M, Nishimoto I, Terashita K, Aiso S, Matsuoka M. Wnt5a promotes adhesion of human dermal fibroblasts by triggering a phosphatidylinositol-3 kinase/Akt signal. *Cell Signal*. 2007;19(12):2498-24506.
 46. Semba S, Kusumi R, Moriya T, Sasano H. Nuclear Accumulation of B-Catenin in Human Endocrine Tumors: Association with Ki-67 (MIB-1) Proliferative Activity. *Endocr Pathol*. 2003;1(3):243-50.
 47. You Z, Saims D, Chen S, Zhang Z, Guttridge DC, Guan KL, MacDougald OA, Brown AM, Evan G, Kitajewski J, Wang CY. Wnt signaling promotes oncogenic transformation by inhibiting c-Myc-induced apoptosis. *J Cell Biol*. 2002;157(3):429-40.
 48. Holmsen H, Hindenes JO, Fukami M. Glycerophospholipid metabolism: back to the future. *Thromb Res*. 1992;67(3):313-23.
 49. Kennedy JA, Barabé F, Patterson BJ,

- Bayani J, Squire JA, Barber DL, Dick JE. Expression of TEL-JAK2 in primary human hematopoietic cells drives erythropoietin-independent erythropoiesis and induces myelofibrosis in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103(45):16930-5.
50. Berry DM, Nash P, Liu SK, Pawson T, McGlade CJ. "A high-affinity Arg-X-X-Lys SH3 binding motif confers specificity for the interaction between Gads and SLP-76 in T cell signaling". *Curr. Biol*. 2002;12(15):1336-41.
51. Johnson DI. Cdc42: An essential Rho-type GTPase controlling eukaryotic cell polarity. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1999;3(1):54-105.
52. Schutte M. DPC4/SMAD4 gene alterations in human cancer, and their functional implications. *Ann Oncol*. 1999;10 Suppl 4:56-9.
53. Bataille R, Grenier J, Sany J. Unexpected normal serum beta microglobulin (B2M) levels in multiple myeloma. *Anticancer Res*. 1987;7:513-15.
54. Karin Milde-Langosch. The Fos family of transcription factors and their role in tumorigenesis. *European Journal of Cancer* 2005;41(16):2449-61.
55. Bonnelye E, Aubin JE. Estrogen receptor-related receptor alpha: a mediator of estrogen response in bone. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90(5):3115-21.