

MC3T3-E1 세포주에서 황기 · 계지 · 황백 처방(BHH10)의 골형성 촉진 효능 연구

이미림³ · 허정은² · 남동우¹ · 선종인¹ · 강중원¹ · 김성훈³ · 최도영¹ · 이재동^{*1}

¹경희대학교 한의과대학 침구의학교실

²경희대학교 골관절질환 한방연구센터

³경희대학교 한의과대학 암예방소재개발센터

Abstract

Effects of Astragalus Membranaceus, Innamomum Cassia, Phellodendron Amurensis(BHH10) on MC3T3-E1 Cells Proliferation, Differentiation and Bone Mineralized Formation

Mi Lim Lee³, Jeong Eun Huh², Dong Woo Nam¹, Jong In Seon¹, Jung Won Kang¹,
Sung Hoon Kim³, Do Young Choi¹ and Jae Dong Lee^{*1}

¹Department of Acupuncture & Moxibustion Medicine,
College of Korean Medicine, Kyung-Hee University

²Oriental Medicine Research Center for Bone & Joint Disease, Kyung-Hee University

³Dept. of Cancer Preventive Material Development, College of Korean Medicine,
Kyung Hee University

Objectives : BHH10 is traditional medicine herb used for enhancing body resistance against various diseases. The aim of this study was to identify BHH10 extract induces osteogenic activity in human osteoblast-like MC3T3-E1 cells.

* This work was supported by the National Research Foundation of Korea(NRF) grant funded by the Korea government [MEST]. (No. 2012-0005755)

Acceptance : 2012. 9. 10. Adjustment : 2012. 11. 27. Adoption : 2012. 11. 28.

Corresponding author : Jae Dong Lee, Department of Acupuncture & Moxibustion Medicine, College of Oriental Medicine, Kyung-Hee University, 1, Hoegi-dong, Dongdaemun-gu, Seoul, 130-702, Republic of Korea

Tel : +82-2-958-9208 E-mail : ljdacu@khmc.or.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Copyright © The Journal of Korean Acupuncture & Moxibustion Medicine Society

Methods : MC3T3-E1, pre-osteoblast cell line, were treated with BHH10 of various concentrations(0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). And then, the effect of BHH10 on osteoblast differentiation was examined by alkaline phosphatase(ALP) activity, von Kossa staining and RT-PCR for osteoblast differentiation markers such as osteocalcin(OCN), osteopontin(OPN).

Results : BHH10 had dose-dependent effect on the viability of osteoblastic cells, and dose-dependently increased alkaline phosphatase(ALP) activity. BHH10 markedly increased mRNA expression for OCN, OPN in MC3T3-E1 cells. Also, BHH10 significantly induced mineralization in the culture of MC3T3-E1 cells.

Conclusions : In conclusion, these results propose that BHH10 can play an important role in osteoblastic bone formation, osteogenesis, and may possibly lead to the development of bone-forming drugs.

Key Words : BHH10, ALP activity, OCN, OPN, mineralization

I. 서 론

골은 석회화된 견고한 표면과 골수로 불리는 내부의 세포 성분이 결합된 특수조직이다. 생리적으로 상이한 이 두 구조의 결합은 일생을 두고 지속되는 골의 재형성(bone remodeling) 과정에 기인한 것인데, 이는 골에 가해지는 호르몬이나 물리적 자극에 의해 골수에 있는 파골세포(osteoclast)들이 골의 표면으로 모여 골을 파들어가면서 파괴하는 골 흡수(bone resorption)가 일어난 자리에 모여든 조골세포(osteoblast)에 의한 골기질의 합성(bone formation)으로 설명된다¹⁾. 골 표면에 위치하는 조골세포는 세포막에 당단백 효소인 알칼리 포스파타제(alkaline phosphatase, ALP)를 가지고 있으며 오스테오칼신(osteocalcin, OCN), 오스테오폰틴(osteopontin, OPN), 뼈 시알로단백(bone sialoprotein, BSP)과 같은 골 기질 물질을 분비하고 석회화시키는 역할을 한다²⁾. 골은 조골세포와 파골세포 활성의 균형을 유지하므로 골 양이 일정하게 유지되며 이들의 활성으로 골의 재생이 지속적으로 일어난다. 그러나 조골세포보다 파골세포의 활성이 증가할 때 골량이 감소하여 골다공증을 유발하고, 폐경기 이후의 여성은 혈중 에스트로젠 농도 감소로 골다공증을 유발한다³⁻⁷⁾.

골다공증은 만성 난치성 질환으로서 전 세계적으로 심혈관계 질환 다음으로 유병률이 높으며 폐경기 이후 여성에서 두드러지게 발생된다. 특히 65세 이상

의 여성 2명 중 1명, 남성의 경우 5명 중 1명에서 골다공증이 발생하고, 그 원인이 골절에 의한 것으로 약 12~20 % 정도는 사망에 이르고 있다^{8,9)}.

기존 제품의 경우 약의 흡수율이 낮으며, 위장장애 및 심혈관계 질환발생 등과 같은 부작용이 있고, 현재까지의 골다공증 치료제에 관한 기술은 뼈가 녹아내리는 현상을 막아 진행을 억제 시키는 ‘뼈 재흡수 차단제’로 단순한 증상완화 수준의 약효만을 보일 뿐, 근원적 치료를 위한 ‘골 재형성 촉진’면에서는 어려움을 겪고 있다.

기존 골다공증 치료제가 뼈 성분이 빠져 나가는 것을 억제하는 골흡수 억제제였던 것에 비해, 최근에는 조골세포의 생성과 활동을 증가시킴으로써 새로운 뼈가 자라도록 돕는 골형성 촉진제로 진화했다^{10,11)}.

골다공증 시장에서 주도권을 잡기 위해서는 기존 치료제 기술의 단점을 보완하면서, 손상된 뼈까지도 재생이 가능한 치료제 개발이 절실히 필요하며, 안전성이 확보된 치료제 개발이 필요하다. 이에 기존 한의서 및 한방 임상에서의 안전성이 검증되고, 탁월한 효능이 있는 한방제제 개발이 필요하다.

최근 천연물을 이용하여 뼈 형성을 촉진하기 위한 골 형성 및 골다공증 치료제로 개발하려는 사례가 있다. 예로 숙지황과 오가피의 혼합 생약제 추출물로 뼈 형성 촉진치유로 특허가 출원된 바 있다. 다른 한편으로는 줄기세포를 이용하여 골유합 및 골재생 치료법이 시도되고 있다¹²⁾. 환자 자신의 골수에서 채취한 성체줄기세포를 골 형성세포로 분화시킨 뒤 대량증식

배양시킨 후 환자에게 주사하는 세포치료 연구가 진행되고 있다. 그러나 기존 골다공증 치료약제들은 골흡수만을 차단시키거나 골 형성을 촉진시키는 효능만이 있으며 장기간 투여 시 많은 부작용을 유발하고 있다^{13,14)}. 따라서 장기간 투여에도 지속적인 골밀도 증가 효과를 나타내고 부작용이 적은 안전한 치료제 개발이 요구되고 있다.

BHH10은 경희대학교 골관절질환 한방연구센터에서 골유합 치료 한약물 개발을 위한 한약물 검색 연구를 진행하여 황기(*Astragalus membranaceus* BGE.)·계지(*Cinnamomum cassia*)·황백(*Phellodendron amurense*) 추출물을 함유한 골다공증 및 골질환의 예방 및 치료용 조성물로 개발되었다.

황기의 효능으로는 보기승양(補氣升陽), 고표지한(固表止汗: 피부의 방어기능을 강화하여 땀을 멈추게 하는 치료법), 이수소종(利水消腫: 배뇨를 원활하게 하여 부은 것을 가라앉게 하는 치료법), 탁독배농(托毒排膿: 기혈을 보익하는 약물을 사용하여 정기를 보 조해서 병독을 밖으로 밀어 넣으므로써 내부의 농을 배출하는 치료법) 등이 있다. 따라서 황기는 만성 쇠약, 특히 비위기(脾胃氣) 허약에 효과가 있으며, 중추신경계의 흥분작용 효과도 있다. 최근 연구 보고에 따르면, 황기는 면역력을 높여주며 조혈기능을 높여줌으로써 방사선치료를 받고 있는 암환자의 치료 및 회복에 도움을 주는 처방에 사용한다고 보고되었으며¹⁵⁾, 난소 절제술을 실시한 동물모델(OVA rat model)에 황기 분획 추출물을 경구함으로써 골 대사 작용을 촉진시키는 결과 등이 보고된 바 있다¹⁰⁾. 그러나 현재 까지 황기의 골 파괴 억제, 골 형성 및 골 재생 촉진에 의한 치료 효과가 보고된 바는 없다.

계지(*Cinnamomum cassia*)는 장나무과의 상록고목 식물인 계수나무(또는 계피나무라고도 함)의 어린 가지로, 맵고 달며 성질은 따뜻하고 심과 폐와 방광에 작용한다. 위를 튼튼하게 하고, 중풍을 억제하며 진통, 강심작용이 있다. 피부혈관을 확장시키고 한선을 자극하여 땀을 내어 해열작용을 하며 바이러스의 억제 작용을 한다고 알려져 있다. 오한, 발열, 두통, 몸의 통증, 땀이 나지 않는 경우나 심계항진 등에도 사용한다. 계지의 약리실험 결과로 발한작용, 해열작용, 진통작용, 강심작용, 항알레르기작용, 항바이러스작용 및 억균작용 등이 밝혀졌다¹⁷⁻²⁰⁾.

황백은 약으로 쓰이며 혈당저하 작용을 한다. 또한 폐렴쌍구균, 인형결핵균, 포도상구균 등에 대하여 발육저지 작용을 함과 동시에 종양세포의 번식을 저지

시키고, 살균작용을 한다. 복용하는 경우에는 미각 반사의 항진에 의하여 위액의 분비를 촉진시키고, 식욕의 항진도 가져오게 한다. 또한 일반 알칼로이드가 지니는 전신작용을 하지 않기 때문에 다량으로 투여해도 부작용이 없으므로 정장제뿐만 아니라 건위제로도 사용할 수 있다. 또한 이 약제에 대하여 여러 세균의 내성(耐性)도 생기지 않으므로 유행성 눈병이 유행할 때 세안 소독약으로도 사용할 수 있다. 그 외에도 혈압강하, 중추신경계 억제, 항염증 등의 효과도 보고되어 있다. 동양의학에서는 황련해독탕·시호청간탕·형개연교탕 등에 사용되고 있으나, 현재까지 황백의 골형성 및 골재생 촉진에 의한 골다공증치료 효과가 교시되거나 개시된 바는 없다²¹⁻²⁴⁾.

BHH10의 개발 경위를 자세하게 살펴보면 민간요법, 중국·일본 및 국내의 한의학 고전 처방, 각종 임상 논문 및 보고서 등 관련 문헌을 통해 신허강화(腎虛降火) 할 수 있는 처방 및 한약제를 선정하였다. 1차적으로 처방 및 한약제 중 동물성·광물성, 강한 독성이 있는 처방 및 약제는 선별하여 배제하였고, 특허출원 조사에 따라 후보처방 및 한약제를 72종으로 압축하여 선정하였다. 이를 대상으로 골형성 활성을 탐색, 분석, 평가하여 골재형성에 우수한 효능이 있는 처방 10종을 선별하였다. *In vivo* 및 *in vitro* 연구를 통하여 골다공증 및 골유합에 가장 뛰어난 효과가 있는 자신환(滋腎丸)의 가감방인 BHH10처방을 개발하게 되었다^{15,25,26)}.

본 연구에서는 mouse pre-osteoblast cell인 MC3T3-E1에서의 골형성 관련 최적조건 확립 및 BHH10의 효능을 연구하였다.

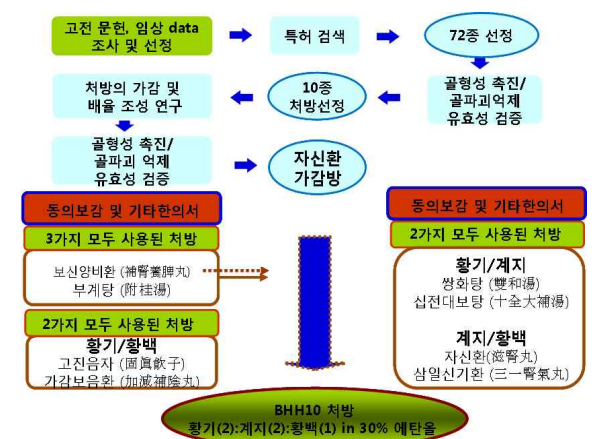


Fig. 1. BHH10 product development process mimetic diagram

II. 방 법

1. 계대배양

Mouse calvarial osteoblast MC3T3-E1(subclone 4) 세포주를 American Type Culture Collection(VA)로부터 구입하여 사용하였다. MC3T3-E1세포를 2~3일마다 계대배양하여 passage #4부터 #6까지 사용하였다. 세포는 α -minimal essential medium(WelGENE, Daegu, South Korea) 배지에서 10 % FBS(Lozga, Walkersville, MD, USA), 1 % Antibiotics(WelGENE, Daegu, Korea)가 첨가된 성장배지(growth Medium: GM)로 37 °C, 5 % CO₂ 배양기에서 배양하였다.

2. 조골세포주의 시간별 분화

성장배지로 세포를 6-well에(5×10^4 cells/well)분주하여 90 % 가량 자라면 분화유도배지[differentiation medium(DM): α -MEM(WelGENE, Daegu, Korea)에 10 mM β -glycerophosphate (Sigma, Louis, MO, USA)와 50 μ g/mL ascorbic acid(Sigma) 첨가]에 두 조건으로 나누어 7, 14, 18, 21일간 3일마다 배지를 교환하여 배양하였다.

1) Alkaline phosphatase staining

분화배지에서 7, 14, 18, 21일 동안 배양된 세포에 alkaline phosphatase 염색(Sigma, Louis, MO, USA)을 하였다. 배양된 세포의 배양액을 제거한 후 PBS로 두 번 세척하였다. Citrate-acetone-formaldehyde 고정액으로 실온에서 30초간 고정한 후 alkaline-dye mixture(Sigma, Louis, MO, USA)를 약 1 mL 첨가하여 차광하고, 실온에서 30분간 반응시켰다. 멸균수로 세정하고 hematoxyline 용액(Sigma, Louis, MO, USA)으로 2분간 counterstain하여 다시 멸균된 증류수로 세정하고 현미경(Axio vision 4.0 microscope, Carl Zeiss Inc, Weimar, Germany) 관찰 후 사진 촬영(100 \times)하였다.

2) Von Kossa 염색

분화배지에서 7, 14, 18, 21일 동안 배양된 세포에 von Kossa(von Kossa stain kit, IHC World, LLC, Woodstock, MD, USA)염색을 하였다. 배양된 세포의 배양액을 제거하고 PBS로 두 번 세척하였다. Citrate-

Acetone-Formaldehyde(von Kossa stain kit) 고정액으로 고정한 후 silver nitrate solution을 약 1 mL 첨가하여 1시간 동안 UV에 노출시켜 반응한 후 멸균증류수로 세척하였다. sodium thiosulfate solution(von Kossa stain kit)으로 2분간 실온에서 반응시킨 후 nuclear fast red solution(von Kossa stain kit)을 5분간 반응하여 멸균수로 세정하고 현미경 관찰 후 사진 촬영하였다(100 \times).

3) RT-PCR analysis

분화배지에서 7, 14, 18, 21일 동안 배양된 세포에서 RNA를 분리하였다. RNA검출 과정은 세 단계로 진행 하였다. Total RNA preparation \rightarrow reverse transcription \rightarrow PCR \rightarrow gel running \rightarrow EtBr staining \rightarrow UV에서 관찰 및 촬영하였다.

(1) RNA preparation(Trizol kit 사용)

배양된 세포를 PBS로 세척한 후 Trizol 1 mL를 넣었다. Chloroform을 200 μ l 넣고 혼합한 후 10분간 실온에서 반응 후 12,000 rpm에서 15분간 원심분리 후 상층액을 수확하였다. 상층액과 동량의 isopropanol을 첨가하고 혼합한 후 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 상층액을 버리고 차가운 75 % ethanol로 2회 세척하고, pellet을 확인한 후 공기 중에서 건조하였다. RNase-free water 30 μ l(e.g. DEPC)에 용해시키고 RNA를 정량한 후 70 °C에 보관하였다.

(2) RT-PCR

① Reverse transcription

Total RNA 1 μ g
Oligo dT(15mer) 1 μ l
10 \times reverse transcriptase buffer 3 μ l
10 mM dNTP 3 μ l
RNase inhibitor 0.75 μ l
Reverse transcriptase(250 unit/ μ l)
DEPC water to 30 μ l

95 °C 5분 : RNA denaturation
42 °C 60분 : Reverse transcriptase reaction
65 °C 5분 : Enzyme killing

② PCR

cDNA 2 μ l
5 \times PCR buffer 4 μ l

EX Taq DNA polymerase 0.1 μ l
 5'primer 1 μ l
 3'primer 1 μ l
 Water to 20 μ l

1단계 : 95 °C, 5분 1 cycle
2단계 : 30 cycle
95 °C, 30초 : denaturation
55~60 °C, 30초 : annealing
72 °C, 30초 : polymerization
3단계 : 72 °C, 5분, 1 cycle

골형성에 관여하는 유전자 염기서열은 OPN forward: 5'-TCA CCA TTC GGA TGA GTC TG-3' reverse: 5'-ACT TGT GGC TCT GAT GTT CC-3', OCN forward: 5'-CTC TGT CTC TCT GAC CTC ACA G-3' reverse: GGA GCT GCT GTG ACA TCC ATA C-3', GAPDH forward: 5'-ATC CCA TCA CCA TCT TCC AGG AG-3' reverse: 5'-CCT GCT TCA CCA CCT TCT TGA TG-3'이다.

(3) Gel running

1.8 % agarose gel(Carl ROTH)을 건조한 후 PCR 산물을 6× loading buffer 4 μ l와 혼합하여 90 V에서 40 분간 전기영동 하였다. EtBr로 염색 후 UV 촬영하였다.

(4) 정량

Image J(NIH program, USA)로 밴드의 intensity를 정량한 후에 GAPDH로 보완하여, 막대그래프로 표시하였다.

3. 조골세포주에 BHH10 억제처리

1) Cell proliferation

시료의 세포독성을 측정하기 위해 water-soluble type이 WST-8을 이용한 CCK-8(cell counting kit-8)로 측정하였다. 배양한 세포를 0.4 % trypan blue염색법으로 세포수를 측정한 후 1×10^4 cells/well의 농도로 96well-plate에 100 μ l씩 분주하고 성장배지로 24시간 배양하였다. 새로운 α -MEM 분화배지에 BHH10을 농도별(0, 0.1, 1, 10, 20, 50, 100 μ g/mL)로 각 well에 넣었다. 48시간 배양한 다음 CCK-8용액 10 μ l를 각 well에 첨가하고 3시간 동안 배양하였다. 450 nm (-650 nm)에서 흡광도를 측정하였으며, 세포독성은

시료의 흡광도를 대조군의 흡광도에 대한 백분율로 나타내었다.

2) Alkaline phosphatase staining

세포를 6-well에 (5×10^4 cells/well)분주하여 90 % 가량 자라면 BHH10을 농도별 (0, 0.1, 1, 10 μ g/mL)로 각 well에 처리하고, 7일 동안 배양한 후 alkaline phosphatase 염색(Sigma, Louis, MO, USA)을 하였다. 염색은 2. 2). (1)의 방법과 같이 시행하였다. 염색된 세포는 현미경(Axio vision 4.0 microscope, Carl Zeiss Inc, Weimar, Germany) 관찰 후 사진 촬영 (100×)하였다. ALP의 intensity는 isolution image분석 software를 이용하여 측정하였다(IMT echnology, Canada).

3) Von Kossa 염색 및 정량

세포를 6-well에(5×10^4 cells/well)분주하여 90 % 가량 자라면 BHH10을 농도별 (0, 0.1, 1, 10 μ g/mL)로 각 well에 처리하고, 14일 동안 배양한 후(von Kossa stain kit, IHC World, LLC, Woodstock, MD, USA)을 하였다. 염색은 2. 2). (2)의 방법과 같이 시행하였다.

4) RT- PCR

세포를 6-well에 (5×10^4 cells/well)분주하여 90 % 가량 자라면 BHH10을 농도별 (0, 0.1, 1, 10 μ g/mL)로 각 well에 처리하고, 7, 14, 18, 21일 동안 배양한 후 골형성 관련 유전자(OPN, OCN)를 확인 하였다. 2. 2). (3)과 동일한 방법으로 RT-PCR을 시행하고, 정량하였다.

4. 통계처리

실험결과는 GraphPad prism을 이용하여 paired t-test 통계처리 하였다.

III. 결 과

1. 조골세포주 분화에 따른 시간별 ALP 변화확인

MC3T3-E1세포는 mouse calvaria로부터 유래한 osteoblastic cell로 생체 내에서 일어나는 조골세포의

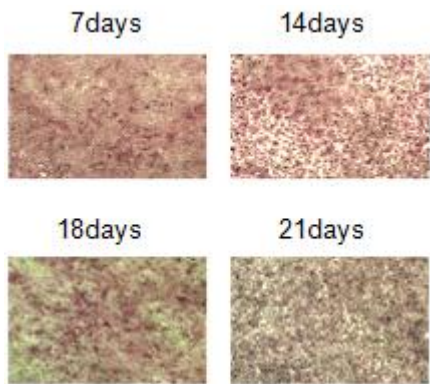


Fig. 2. Time dependent expression of alkaline phosphatase by ALP staining in MC3T3-E1 cells(100×)

증식, 분화, 석회화 등의 유사한 대사적 특징이 있으며, 특히 세포막에 당단백질인 ALP가 있어 골 형성과 관련된 연구에서 유용하게 사용된다.

본 실험에서는 MC3T3-E1 세포주에 7일, 14일, 18일, 21일 동안 분화배지에서 배양 후 조골세포의 분화를 ALP 염색을 통하여 발현 정도를 확인하였다.

ALP염색 결과, 7일째에 ALP 활성이 가장 많이 증가하였고, 14, 18, 21일째로 가면서 점차 감소하였다 (Fig. 2).

2. 조골세포주 분화에 따른 시간별 mineralization

뼈는 강도와 크기를 얻기 위하여 칼슘을 축적하는데, von Kossa 염색법은 이러한 칼슘성분과 반응하여 흑갈색으로 발색된다.

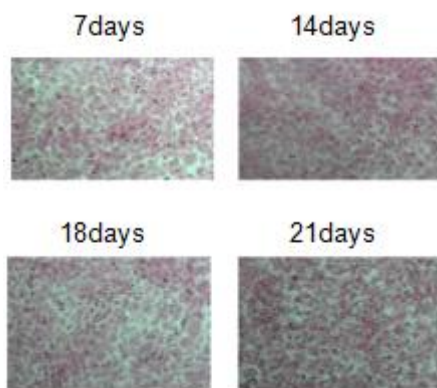


Fig. 3. Time dependent mineralization by von Kossa staining in MC3T3-E1 cells

Von kossa staining showing increase of osteogenic mineralization deposition(100×).

본 실험에서는 MC3T3-E1 세포주에 7일, 14일, 18일, 21일 동안 분화배지에서 배양 후 von Kossa염색을 실시하였다.

염색 결과 7일, 14일, 18일, 21일로 시간이 증가함에 따라 칼슘축적이 증가하였고, 14일째 칼슘의 축적이 가장 많이 발현되었다(Fig. 3).

3. 조골세포주 분화에 따른 시간별 골형성 유전자 발현

RNA 수준에서 골의 유기적 구성요소의 하나인 Osteocalcin(OCN), 세포외기질 단백질로 골 형성에 관여하는 산성 당단백 성분인 osteopontin(OPN)과 같은 특이적 osteogenic 유전자가 발현된다.

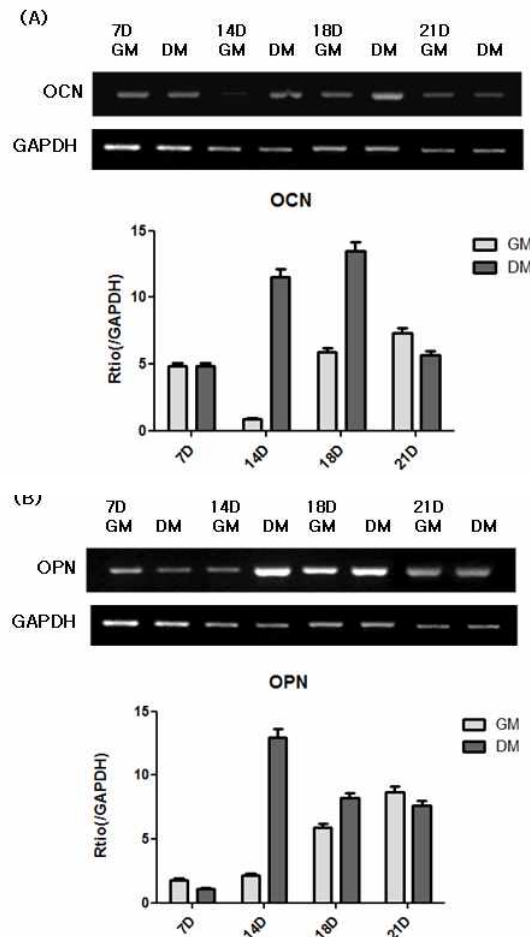


Fig. 4. Time dependent expression of osteogenic-specific markers including osteocalcin, osteopontin and collagen I by RT-PCR analysis in MC3T3-E1 cells (A) RT-PCR and (B) quantified by densitometric analysis of osteoblast-specific genes induced after osteogenic differentiation.

본 실험에서는 MC3T3-E1 세포주에 7일, 14일, 18일, 21일 동안 분화배지에서 배양 후 조골세포의 골형성 촉진 유전자인 OCN, OPN의 발현 변화량을 RT-PCR로 측정하였다.

실험 결과, OCN은 각 날짜별 대조군(GM)과 비교했을 때 14일째 약 12배 유의성 있게 증가하였고, 18일째에 약 2.3배 증가하였다(Fig. 4A). OPN도 각 날짜별 대조군(GM)과 비교했을 때 OPN과 마찬가지로, 14일째 약 6배 증가하여 날짜별 가장 높은 발현 양을 보였으며 18일째는 약 1.4배 증가 하였다. 시간 변화에 따른 조골세포의 골형성 유전자 OPN, OCN은 14일째 가장 높게 발현함을 확인하였다(Fig. 4B).

4. 조골세포주에서의 BHH10 세포생존율

BHH10의 MC3T3-E1세포 증식에 미치는 영향을 관찰 한 결과, 0.1, 1, 10, 20, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 모든 농도에서 95 % 이상의 높은 생존율을 보여 세포독성이 없음을 확인 하였다(Fig. 5).

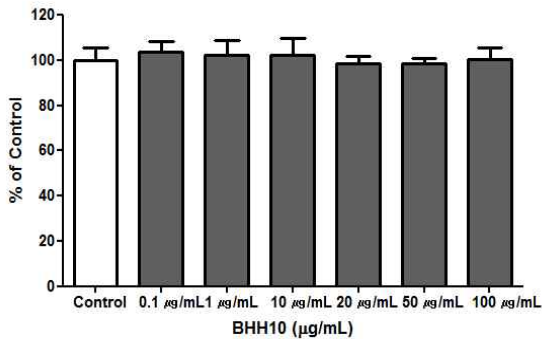


Fig. 5. Effect of BHH10 on the viability of MC3T3-E1 cells by the CCK-8 assay
Results were presented as means \pm SD.(n \geq 6)

5. BHH10 처리된 조골세포주의 ALP

BHH10은 조골세포에 대해 독성이 없으면서 우수한 활성을 보여 이를 농도별로 처리하였다.

조골세포의 세포막에 존재하는 ALP는 세포의 외막과 석회화 조직에서 높은 농도로 발견되어 석회화 과정 동안 무기인산의 운반, 세포분열이나 분화의 조절자 역할을 하며, 조골세포 활성의 표지인자로 널리 알려져 있다.

앞에서 시행된 조골세포주 분화에 따른 시간별 ALP의 변화 확인 결과 7일째 가장 높게 나타남을 확

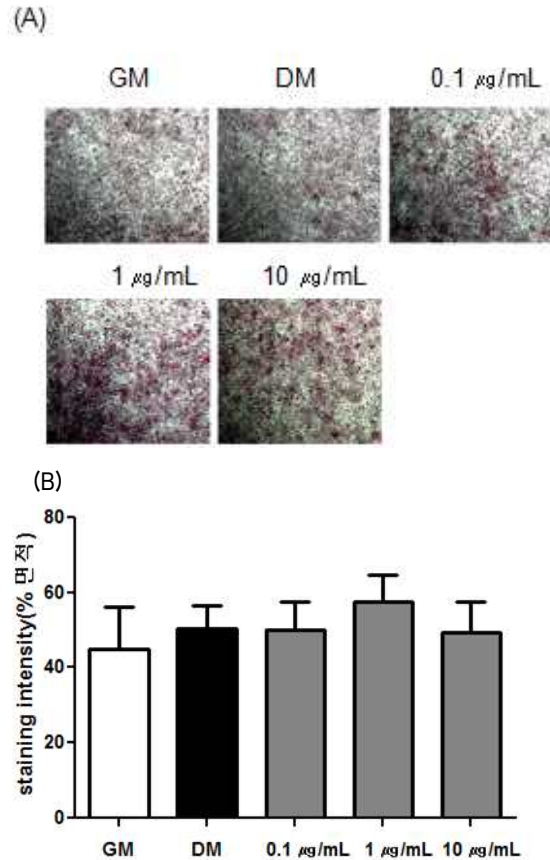


Fig. 6. Effect of BHH10 on the alkaline phosphatase of MC3T3-E1 cells at 7 days
(A) microscope (100x) (B) staining intensity. GM: Growth medium, DM: Differentiation medium

인하였다. 그 결과에 따라 BHH10이 조골세포의 활성화에 미치는 영향을 알아보기 위해 분화배지에서 7일 동안 BHH10을 농도별로 처리하였다. ALP의 효소활성을 현미경으로 관찰한 결과 BHH10을 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리했을 때 가장 많이 ALP가 염색되었으며(Fig. 6A), ALP효소의 활성을 isolation image로 분석한 결과 역시 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 저농도에서 분화배지만 처리한 군보다 증가함을 확인하였다(Fig. 6B).

6. BHH10 처리된 조골세포주의 mineralization

Osteogenic으로 분화를 유도한 후 이를 확인하기 위하여 세포를 silver nitrate 용액으로 처리하여 조직 내에 침착된 calcium염에서 calcium 대신 은이온을 치환시킨 후 흑갈색으로 침착된 calcium의 정도를 측정하게 된다.

조골세포주 분화에 따른 시간별 mineralization 실험을 통하여 14일째 칼슘의 축적이 가장 높음을 확인하였다. 이를 바탕으로 BHH10이 처리된 조골세포주의 mineralization을 조사하였다.

Von Kossa염색을 통하여 칼슘의 침착정도를 현미경으로 확인한 결과 0.1, 1, 10 $\mu\text{g/mL}$ 에서 모두 증가함을 확인하였다(Fig. 7A). Staining된 particle의 number를 counting한 결과 역시 0.1, 1, 10 $\mu\text{g/mL}$ 모든 농도에서 particle의 수가 증가함을 확인할 수 있었다(Fig. 7B).

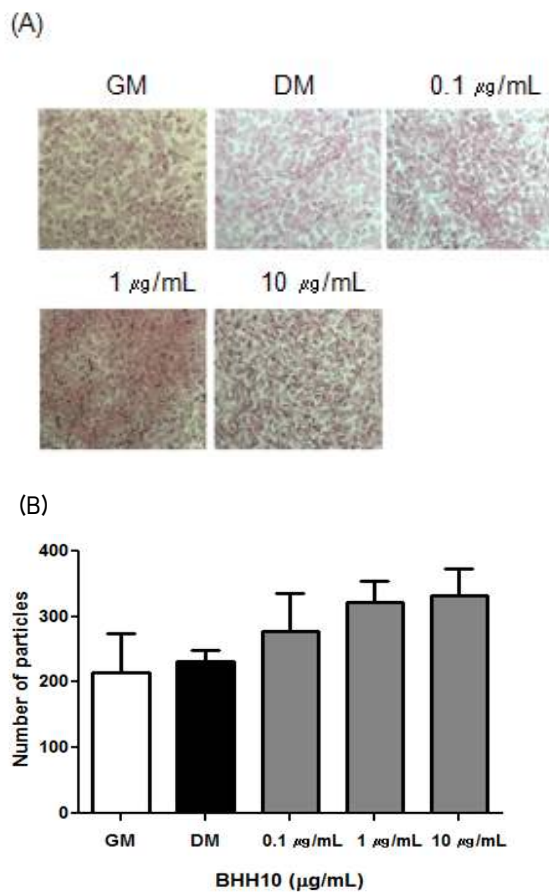


Fig. 7. Effect of BHH10 on the osteogenic mineralization of MC3T3-E1 cells by (A) von Kossa staining(100x) and (B) number of particle
GM : Growth medium, DM: Differentiation.

7. BHH10의 MC3T3-E1세포주 골형성 관련 유전자 확인

앞선 조골세포주 분화에 따른 시간별 골형성 유전자 발현을 확인한 결과, 골형성에 관여하는 유전자

OCN, OPN은 14일째 가장 높게 발현함을 확인하였다. 이러한 결과를 토대로 BHH10을 처리한 조골세포주에서 osteoblast분화 marker인 OCN, OPN을 조사하였다.

BHH10이 10 $\mu\text{g/mL}$ 처리된 MC3T3-E1 세포주에서의 유전자 발현 양을 RT-PCR로 측정하였다. OCN은 14일째 가장 높은 증가율을 보였다. 음성대조군(GM)에 비하여 양성대조군(DM)에서 1.6배 증가하였고, BHH10 처리 시 1.5배 더 증가하였다(Fig. 8A). OPN 역시 14일째 BHH10을 처리한 군이 분화배지만

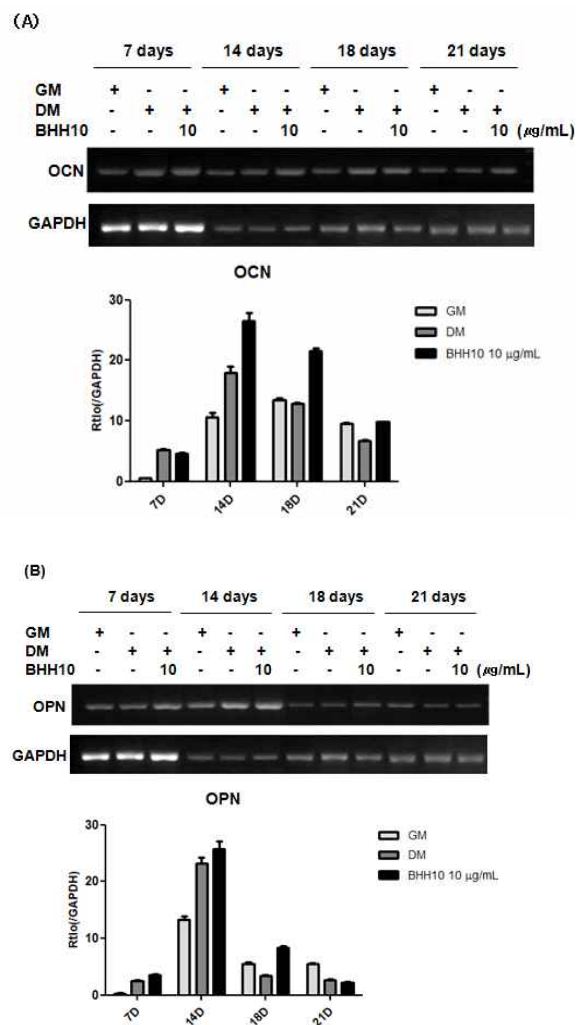


Fig. 8. Expression of BHH10 on the osteogenic-specific markers of MC3T3-E1 cells by RT-PCR and quantified by densitometric analysis

- (1) GM(control).
- (2) DM(positive control).
- (3) 10 $\mu\text{g/mL}$ BHH10.

Each value is expressed as relative level of target gene to GAPDH.

처리한 양성대조군 보다 높은 발현 양을 나타내었다 (Fig. 8B).

결과적으로 BHH10의 처리가 골형성 관련 유전자의 발현양을 증가시킨다는 것을 확인 할 수 있었다.

IV. 고찰

본 연구는 골다공증, 골형성 촉진 및 골유합 기반 기술을 응용한 선행연구를 바탕으로 자신환 가감방인 BHH10처방의 골형성 촉진의 효능을 연구하였다. Mouse pre-osteoblast cell인 MC3T3-E1에서의 골형성 관련 최적조건을 ALP활성과 mineralization, 골형성 유전자 발현을 확인함으로써 확립하였다. 또 pre-osteoblast MC3T3-E1 세포주의 골형성 분화 최적 조건을 확립한 후 BHH10처방이 골 형성에 미치는 영향을 검토하고자 BHH10을 농도별로 osteoblastic MC3T3-E1 세포주에 처리하여 그 효능을 확인하였다.

실험결과 ALP의 활성은 7일째 가장 높았으며, von Kossa염색결과 14일째가 가장 높았다. 골 형성 관련 유전자인 OCN과 OPN은 14일째 골형성 촉진이 가장 우수했다.

또 조골세포주의 세포성장에 BHH10이 미치는 영향을 관찰하였고, 0.1, 1, 10, 20, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 모든 농도에서 95 % 이상의 높은 생존율을 보여 세포 독성이 없음을 확인하였다. 이러한 결과를 바탕으로 BHH10을 조골세포주에 농도별로 처리하여 von Kossa staining을 통하여 조골세포의 발현을 확인하였다. BHH10은 7일째 ALP를 증가시켰고, 저농도인 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 높은 효과를 확인하였다. Von Kossa염색을 통하여 calcium의 침착을 확인한 결과 0.1~10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 까지 농도 의존적으로 증가시켰다. 또한 BHH10 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 을 처리한 조골세포주에서 osteoblast분화 marker인 OCN, OPN을 조사하였다. 그 결과 OCN과 OPN 모두 14일째 발현 양이 가장 높게 나타났다.

BHH10처방이 세포독성이 없고, ALP활성과 mineralization을 초기에 저농도에서 증가시키며, 골 형성 촉진 효능이 우수함을 확인하였다.

자신환(滋腎丸)은 《동의보감》, 《의학입문》, 《경약전서》, 《방약합편》 등 대부분의 주요 한의서에 기재되어 있는 처방으로 황기·계지·지모로 구성되어 있다. 주로 신허(腎虛)로 인해 발생하는 제반 증상-발열, 배뇨장애, 각슬무력(무릎과 다리에 힘이 없음)

등에 사용된다. 자신환의 가감방(BHH10)은 황기·계지·황백의 세 가지 본초로 구성되어 있다. 황기는 보기(補氣)하는 대표적인 본초 중 하나로 모든 허증과 관련하여 사용할 수 있으며, 정기보허탕(精氣補虛湯), 옥병풍산(玉屏風散) 등의 수많은 처방에서 주약으로 쓰이고 있다. 계지는 부위나 재배기간 차이에 따라서 계지·계피·육계·계심·관계 등 다양한 명칭으로 사용되고 있으나 그 효능은 대동소이하다고 하겠다. 주로 경락을 따뜻하게 하고 맥의 흐름을 원활하게 하는 효능이 있어, 몸 전체의 순환과 약 기운의 순환을 도우며 여러 통증 질환과 허증(虛症), 한증(寒症), 외감(外感) 등에 사용되고 있어 계지탕(桂枝湯), 팔미지황환(八味地黃丸) 등에서 찾아볼 수 있다. 황백은 열을 끄고 해독하는 효능이 있으며, 특히 인체의 하초(下焦: 인체의 장부를 상·중·하 세 부위로 나누었을 때 아래쪽에 속함, 주로 신장과 방광이 여기에 해당함)의 열을 조절하는 효능이 뛰어난 본초로서 지백지황환(지백지황환), 고정환(고정환) 등의 처방에 포함되어 있다.

이와 같이 황기·계지·황백은 각각이 갖는 특징적인 효능과 우수한 약효로 인해 개별적으로 다양한 한약 처방에서 사용되고 있으며, 두 개 혹은 세 개가 함께 배합되어 있는 처방도 많이 찾아볼 수 있다.

현재 기존의 골다공증 치료제들은 많은 부작용들이 보고되고 있다. 한 연구에 의하면 경구비스포스포네이트 사용자의 38 %가 이상 반응을 경험하였으며 이들의 대부분은 상부 위장관 증세를 호소하였다. 또한 19 %가 위장관 이상반응으로 투여를 중단하였다. 비스포스포네이트는 체내에 대사되지 않고 골격계 조직에 축적되므로 장기간 사용 시 골격계에 부정적인 영향을 미치게 될 것이라는 문제가 제기되어 왔다. etidronate의 장기간 사용 시 골통증, 골절, 골연화증(osteomalasia)에서 보이는 유골(osteoid)의 축적이 일어남이 알려져 있고 동물에서 고용량 사용 시 골절치유 장애가 보고되고 있다. 현재 세계적인 제약회사들이 여러 종류의 약물들에 대한 임상실험을 진행 하였거나 진행 중에 있지만 아직 탁월한 차세대 치료제 개발이 진행되지 못한 실정이다²⁷⁻³²⁾.

한약제를 이용한 한약제제 개발은 아직 미개척 분야로서 초기에 국제경쟁력 확보가 가능하고, 국내외적으로 한방 의약품 시장이 지속적으로 성장하고 있어, 한약제제 개발선진국으로 발전가능성이 높으므로, 효율적인 연구투자 및 집중화가 필요하다. 한약제를 이용한 신약개발 수준을 선진국과 비교해 보면, 우리

나라는 전통의약품에 대한 정보가 풍부하여 선진국과 비교 시 경쟁력을 갖추고 있다. 또 한약물 및 처방에 대한 임상자원이 풍부하고, 효과가 탁월한 품종이 다량 확보되어 있다. 또 학계, 연구소 및 산업계로의 체계적 연계가 시도되고 있고, 다국적 제약사들의 낮은 관심으로 상대적 경쟁 우위가 확보된 상태이다.

본 연구진은 앞으로 골다공증 동물모델에서의 BHH10 처방의 골 형성 촉진 및 골 파괴 억제 효과와 기전 보완 연구를 통해 부작용을 최소화하고, 복용하기 편리하며, 골재형성 효능이 확보된 새로운 골다공증 한약제제로 개발하여 현재 임상에서 사용 중인 골다공증치료제(estradiol 및 alendronate)의 단점이 보완된 한방치료제로 개발하고 한방이론의 과학화에 기여할 것으로 사료된다.

V. 참고문헌

1. Franceschi RT, Lyer BS. Relationship between collagen synthesis and expression of the osteoblast phenotype in MC3T3-E1 cells. *J Bone Miner Res.* 1992 ; 7(2) ; 235-46.
2. Maeda T, Matsunuma A, Kawane T, Horiuchi N. Simvastatin promotes osteoblast differentiation and mineralization in MC3T3-E1 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001 ; 280(3) : 874-7.
3. Grigoriadis AE, Wang ZQ, Cecchini MG et al. c-Fos: a key regulator of osteoclast-macrophage lineage determination and bone remodeling. *Science.* 1994 ; 266(5184) : 443-8.
4. Hwang KK, Huh NK, Lee JH. Studies on the signaling molecules in RANK, an osteoclast differentiation receptor. *Oral Biol Res.* 2000 ; 24(3) : 245-55.
5. Vaananen HK, Zhao H, Mulari M, Halleen JM. The cell biology of osteoclast function. *J Cell Sci.* 2000 ; 113(Pt3) : 377-81.
6. Suda TJ, Nakamura I, Jimi E, Takahashi N. Regulation of osteoclast function. *J Bone Miner Res.* 1997 ; 12(6) : 869-79.
7. Del Fattpre A, Teti A, Rucci N. Osteoclast receptors and signaling. *Arch Biochem Biophys.* 2008 ; 473(2) : 147-60.
8. Cho GJ, Park HT, Shin JH et al. The relationship between reproductive factors and metabolic syndrome in Korean postmenopausal women: Korea National Health and Nutrition survey. *Menopause.* 2009 ; 16(5) : 998-1003.
9. Parfitt AM. Bone remodeling. *Henry Ford Hosp Med J.* 1988 ; 36(3) : 143-4.
10. 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(4) : 206-13.
11. 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.* 2008 ; 84(1) : 167-77.
12. Zhu X, Zhu B. Effect of AMI on pro-liferative cycle phase of bone marrow in mice. *Zhong Tao Cai.* 2000 ; 23(10) : 625-27.
13. Giordano A, Galderisi U, Marino IP. From the laboratory bench to the patient's bedside: an update on clinical trials with mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol.* 2007 ; 211(1) : 27-35.
14. Niemeyer P, Kornacker M, Mehlhorn A et al. Comparison of immunological properties of bone marrow stromal cells and adipose tissue derived stem cells before and after osteogenic differentiation. *Tissue Eng.* 2007 ; 13(1) : 111-21.
15. Lee KH, Choi EM. Stimulatory effects of extract prepared from the bark of *Cinnamomum cassia blume* on the function of osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Phytother Res.* 2006 ; 20(11) : 952-60.
16. Akira M. Pharmacological studies on the anti-ulcerogenic activity of Chinese cinnamon. *Planta Med.* 1986 ; 6(6) : 440-43.
17. Chopra RN, Nayar SL, Chopra IC. Glossary of Indian Medicinal Plants. Council of Scientific and Industrial Research Press. 1956 ; ; 23(10) : 625-27..
18. Kurokawa M, Kumeda CA, Yamamura J, Kamiyama T, Shiraki K. Antipyretic activity of cinnamyl derivatives and related compounds in influenza virus-infected mice. *Eur J Pharmacol.* 1998 ; 348(1) : 45-1.

19. Park EK, Rhee HI, Jung HS et al. Antiinflammatory effects of a combined herbal preparation (RAH13) of *Phellodendron amurense* and *Coptis chinensis* in animal models of inflammation. *Phytother Res.* 2007 ; 21(8) : 746-50.
20. Uchiyama T, Kamikawa H, Ogita Z. Anti-ulcer effect of extract from *phellodendri* cortex. *Yakugaku Zasshi.* 1989 ; 109(9) : 672-76.
21. Park JI, Shim JK, Do JW et al. Immune-stimulating properties of polysaccharides from *Phellodendri* cortex(Hwangbek). *Glycoconj J.* 1999 ; 16(3) : 247-52.
22. Jia W, Gao WY, Tang L. Antidiabetic herbal drugs officially approved in China. *Phytother Res.* 2003 ; 17(10) : 1127-34.
23. Lee JD, Baek YH, Choi DY, Huh JE, Yang HR, Woo HS, Park DS. Screening and developmenet of Novel Herhal Medicine for Bone Healing Treatment. *Journal of Korean Acupuncture and Moxibustion.* 2007 ; 24(5) : 13-22.
24. Huh JE, Seo DM, Baek YH, Choi DY, Park DS, Lee JD. Biphasic positive effect of formononetin on metabolic activity of human normal and osteoarthritic subchondral osteoblasts. *Int Immunopharmacol.* 2010 ; 10(4) : 500-507.
25. Cheng XD, Hou CH, Zhang XJ et al. Effects of Huangqi(Hex) on inducing cell differentiation and cell death in K562 and HEL cells. *Acta Biochim Biophys Sin(Shanghai).* 2004 ; 36(3) : 211-7.
26. Kim C, Ha H, Lee JH, Kim JS, Song K, Park SW. Herbal extract prevents bone loss in ovariectomized rats. *Arch Pharm Res.* 2003 ; 26(11) : 917-24.
27. Huh JE, Kwon NH, Baek YH, Lee JD, Choi DY, Jingshi S, Kim KI, Park DS. Formononetin promotes early fracture healing through stimulating angiogenesis by up-regulating VEGFR-2/Flk-1 in a rat fracture model. *Int Immunopharmacol.* 2009 ; 9(12) : 1357-65.
28. Suda T, Takahashi N, Martin TJ. Modulation of osteoclast differentiation. *Endocr Rev.* 1992 ; 13(1) : 66-80.
29. Kim JA, Koh KJ. Effects of low dose irradiation on the calcific nodule formation in MC3T3-E1 osteoblastic cell line. *Korean Academy of Oral And Maxillofacial Radiology.* 2004 ; 34(1) : 137-44.
30. Torii Y, Hitomi K, Yamagishi Y, Tsukagoshi N. Demonstration of alkaline phosphatase participation in the mineralization of osteoblasts by antisense RNA approach. *Cell Biol Int.* 1996 ; 20(7) : 459-64.
31. Naoko Hatakeyama, Takashi Kojima, Kousuke Iba, Masaki Murata, Mia M. Thi, David C. Spray, Makoto Osanai, Hideki Chiba, Sumio Ishiai, Toshihiko Yamashita, and Norimasa Sawada. IGF-I regulates tight-junction protein claudin-1 during differentiation of osteoblast-like MC3T3-E1 cells via a MAP-kinase pathway. *Cell Tissue Res.* 2008 ; 334(2) : 243 - 54.
32. Park MJ, Joo BS, Lee JE, Kim HJ. Alendronate enhances osteoblastic differentiation with increased expression of Id-1 and Id-2 in pre-osteoblast cell line, MC3T3-E1. *Korean Journal of Obstetrics and Gynecology.* 2010 ; 53 (3) : 274-81.