

## 生脈散의 파골세포 분화 억제와 관련 유전자 발현에 미치는 영향

주인학<sup>1)</sup> · 이은경<sup>2)</sup> · 황귀서<sup>3)</sup> · 정명수<sup>1)\*</sup>

<sup>1)</sup> 원광대학교 한의과대학, <sup>2)</sup> 경희대학교 한의과대학, <sup>3)</sup> 가천대학교 한의과대학

### Effects of *Saengmaek-san*(SM) on Osteoclastogenesis and Gene Expression

Inhak Ju<sup>1)</sup>, Eunyoung Lee<sup>2)</sup>, Gwiseo Hwang<sup>3)</sup> & Myongsoo Chong<sup>1)\*</sup>

<sup>1)</sup> College Korean Medicine, Wonkwang University, <sup>2)</sup> College of Korean Medicine, Kyung Hee University

<sup>3)</sup> College of Korean Medicine, Gachon University

#### Abstract

**Objective :** *Saengmaek-san* (SM) has been commonly used in Korea to treat various diseases that involve the respiratory and cardiovascular system. However, to date, the mechanism underlying the effects of osteoclasts differentiation of SM has not been clearly understood.

**Method :** To evaluate the effect of SM on osteoclast differentiation, we induced RAW 264,7 cells to be differentiated to osteoclasts by RANKL, and we performed RT-PCR to measure gene expression.

**Results :** SM decreased the number of TRAP(+) MNCs in RANKL-induced osteoclast. SM decreased the expression of MMP-9, cathepsin K1, TRAP, NFATc1, MTF, and COX-2 in the osteoclast. But SM increased the expression of iNOS, TNF- $\alpha$  and IL-6 in osteoclast.

**Conclusion :** It is concluded that SM might decrease the bone resorption resulted from decrease of osteoclast differentiation and it's related gene expression.

**Key words :** *Saengmaek-san* (SM), Osteoclastogenesis, Osteoclast

## 1. 서론

우리나라 만 50세 이상 성인의 골다공증(osteoporosis) 유병률에 대하여 2007년도와 2010년도에 보고된 국민건강영양조사 결과<sup>1)</sup>를 비교해 보면, 남성은 2.7%에서 7.8%, 여성은 18%에서 34.9%로 50세 이상 여성 3명 중 1명은 골다공증을 앓고 있으며 특히, 여성의 골다공증 유병률이 빠른 속도로 증가하고 있는 것으로 나

타났다. 골다공증의 임상적 정의는 전신적인 골격계 질환으로 낮은 골량과 골조직의 미세 구조적 노화로 뼈가 부서지기 쉬워지고 골절이 잘 되는 상태로 정의된다<sup>2)</sup>.

골다공증을 원인별로 분류해보면 원발성(primary) 골다공증과 속발성(secondary) 골다공증으로 분류할 수 있는데<sup>3)</sup>, 원발성 골다공증에는 여성에서 폐경 후에 에스트로겐의 결핍이 주된 원인으로 골 흡수가 증가하여 발생하는 폐경후 골다공증(postmenopausal osteoporosis, 제1형)과 70세 이후 성인 남녀에서 발생하는

• 접수 : 2015년 7월 28일 • 수정접수 : 2015년 8월 10일 • 채택 : 2015년 8월 10일

\*교신저자 : 정명수, 전북 익산시 익산대로 460(신동, 원광대학교) 한의과대학 예방의학교실

전화 : 063-850-6912, 팩스 : 063-852-5594, 전자우편 : neurokid@wku.ac.kr

노인성 골다공증(senile osteoporosis, 제2형)으로 나눌 수 있다<sup>4)</sup>. 폐경기 여성에게 흔히 발생하는 제 1형 골다공증은 만성통증, 골절, 우울증 등이 동반될 수 있고 같은 연령의 남성보다 2배 이상의 골절 위험성이 높으며 대퇴골 환자의 20%가 사망에 이르는 매우 위험한 질환이다<sup>3,5)</sup>. 속발성 골다공증은 연령에 상관없이 내분비질환, 위장관질환, 악성종양 등의 질병이나 부신피질호르몬, 항암화학요법, 갑상선호르몬, 항경련제, 항응고제, methotexate, cyclosporine 등의 약물과 알코올, 흡연 등에 의해서 발생하는 골다공증을 말한다<sup>6)</sup>.

골다공증의 치료 방법으로는 골 흡수를 억제시키고 골 형성을 촉진시켜 골 질량을 증가시키는 약물인 estrogen, calcitonin, calcium, vitamine D, sodium fluoride, biphosphonates 등이 사용되고 있으며<sup>7)</sup>, 골다공증 운동요법<sup>8)</sup>과 성장인자를 사용하는 치료법의 연구도 진행되고 있다<sup>9,10)</sup>. 그러나 골다공증치료제로 가장 많이 사용되는 biphosphonate 계열의 약물은 부작용<sup>11)</sup>의 문제로 사용시 제한이 있어 이것을 대체할 수 있는 천연물을 이용한 안전한 치료물질의 개발이 시급한 상황이다.

生脈散은 人蔘, 麥門冬, 五味子로 구성된 처방으로 元代 李의 《內外傷辯惑論》<sup>12)</sup>에 처음 수록된 이래 益氣生津하고 斂陰止汗하는 效能이 있어, 暑熱에 傷하여 元氣와 津液이 兩傷하여 나타나는 증상인 短氣, 體倦無力, 口渴을 치료하는데 사용되어 왔다<sup>13)</sup>. 현재까지 生脈散의 실험적 연구 보고로는 자외선에 의한 피부각질 세포의 상해에 미치는 영향<sup>14)</sup>, 혈압 및 국소뇌혈류량에 관한 연구<sup>15)</sup>, 신경세포종의 고사에 미치는 효과 및 기전연구<sup>16)</sup>, 대동맥 평활근 세포에서 NO 생성에 미치는 영향에 관한 연구<sup>17)</sup>, 방사선 보호효과에 관한 연구<sup>18)</sup>, 아토피 피부염에 대한 실험적 연구<sup>19)</sup> 등이 있었지만, 골다공증의 주요 원인인 파골세포(osteoclast) 분화에 대한 生脈散 抽出物の 영향과 파골세포의 분화를 촉진하는 여러 인자들에 대한 生脈散 抽出物の 효과에 관한 연구는 아직 보고된 바가 없다.

이에 본 저자는 生脈散 抽出物(SM)이 골 흡수 억제를 통하여 골다공증에 효과적인 것을 밝히기 위하여 파골세포 분화와 기능 활성화에 관여하는 인자들에 대한 효과를 평가하고자 하였다. 이를 위하여 RANKL 유도 파골세포 분화를 측정하였으며, 관련 인자인 TRAP, cathepsin K, NFATc1, MITF, iNOS, COX-2 등의 유전자 발현을 측정함으로써 유의성 있는 결과를 얻었

기에 보고하는 바이다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 한약재 추출 및 검액 제조

生脈散을 분말로 만들어 플라스크에 넣은 후, 증류수 500ml를 가하고 6시간 이상 가열하여 환류 추출하였다. 여과지를 이용하여 여과한 다음, 여액을 Evaporator (EYELA, Japan)을 이용하여 감압 농축한 다음 농축액을 동결 건조하여 실험 시까지 냉동보관 하였다. 실험 시에는 生脈散 抽出物(이하 SM라 함)을 DMSO를 이용하여 배지에 녹인 후, pore size 0.45µm의 여과지를 통과시킨 후 사용하였다. 生脈散은 麥門冬 8g, 人蔘 4g, 五味子 4g으로 구성되어 있으며, 경기도 고양시 소재 국산정품 한약판매 지정업소에서 구입하였다(Table 1).

Table 1. The composition of Saengmaek-san

Herbal Name	Pharmacognostic Name	Dose amount (g)
麥門冬	Radix Ophiopogonis	8
人蔘	Radix Ginseng	4
五味子	Fructus Schisandrae Chinensis	4

#### 2) 세포

실험에 사용된 파골세포 전구세포는 mouse myeloid 세포주인 RAW 264.7 세포에 RANKL를 처리하여 유도된 세포 모델을 사용하였다. 사용된 RAW 264.7은 한국세포주은행에서 구입하였다.

### 2. 방법

#### 1) RAW 264.7 Cell 배양

RAW 264.7 세포는 DMEM(Dulbecco's modified eagle medium)/10% FBS(fetal bovine serum)/PC-SM 배지를 이용하여 CO<sub>2</sub> 세포배양기에서 배양하였으며, 세포수는 5x10<sup>3</sup> cells/well 로 96 well plate를 이용하

여 배양하였다. 24시간 배양 후 배양액을 버린 후 10% FBS, 50 ng/ml RANKL, 1 ng/ml TGF $\beta$ 가 첨가된 a-MEM 으로 교환하여 세포를 배양했다. 배양액에 여러 농도의 CM을 첨가해 주었다. 2일에 한 번씩 동일한 배지로 교환해 주면서 6일간 배양하였다.

## 2) 약물처리

실험군은 (1) RANKL 미처리군(Normal), (2) RANKL 처리군(Control), (3) 50 $\mu$ g/ml의 SM을 투여한 군, (4) 75 $\mu$ g/ml의 SM을 투여한 군, (5) 100 $\mu$ g/ml의 SM을 투여한 군으로 하였다.

## 3) 파골세포 생성 측정

RANKL로 RAW 264,7 cell를 파골세포로 유도한 후, 성숙한 파골세포의 발현 marker로 알려진 TRAP를 염색하여 TRAP-positive 세포를 확인하였다. 분화시킨 세포를 PBS로 세포를 2회 세척하고, 3.7% formaldehyde-citrate-acetone 용액으로 10분 고정시키고 증류수로 2회 세척하였다. 2% TRAP fast garnet GBC base 용액과 NaNO $_3$  용액을 같은 비율로 섞어 만든 용액과 5% naphtha AS-BI phosphoric acid, 4% acetic acid, 2% tartaric acid를 포함한 용액을 고정시킨 세포에 처리하고 상온에 30분 이상 방치하였다.

광학현미경으로 관찰하여 핵이 3개 이상인 TRAP-positive한 다핵세포 (TRAP+) MNCs를 계수하여 파골세포의 생성지표로 하였다.

## 4) 파골세포 유전자발현 측정

### (1) total RNA 분리

RNA를 분리하기 위하여 배양세포의 배지를 제거한 다음, 4 $^{\circ}$ C PBS로 3회 washing 하였다. 세포를 모은 다음, 750  $\times$  g에서 10분간 원심 분리한 다음, ice cold PBS로 2회 씻었다. 침전된 세포에 lysis buffer를 가하여 용해시킨 다음, 12,000  $\times$  g에서 10분간 원심 분리하여 상층을 취하였다. 다시 1M sucrose가 함유된 Tris buffer 위에 loading한 다음, 36,000rpm에서 160분간 원심분리 하였다. Polysome pellet을 취하여 SDS buffer에 녹인 후, 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 incubation 시켰다. Sod. Acetate buffer를 가한 다음, phenol/

CsKl3 용액으로 추출하였다. NaCl을 0.2M이 되도록 가한 다음, EtOH를 가한 후 -20 $^{\circ}$ C에서 12시간 보관 하였다. 침전물을 75% EtOH로 2회 washing한 다음 건조시켰다. 유전자 발현에 필요한 RNA양을 대조군과 시험군에서 mRNA양이 같도록 조정한 다음, 전기영동으로 확인하여 사용하였다.

### (2) cDNA 제조

대조군 및 시험군에서 각각 분리한 total RNA액 10  $\mu$ l(10 $\mu$ g RNA 함유)에 oligo dT 1 $\mu$ l(2 $\mu$ g/ $\mu$ l)을 넣은 후 조심스럽게 혼합한 다음, 90 $^{\circ}$ C에서 5분간 incubation 하였다. primer가 annealing 하도록 실온에서 약 10분간 방치한 후 4 $^{\circ}$ C로 유지하며 다음 시약을 가하였다. 5 x cyscript buffer 4 $\mu$ l, 0.1M DTT 2 $\mu$ l, dUTP nucleotide mix 1 $\mu$ l, dUTP Cydye-labelled nucleotide 0.1 $\mu$ l, Cyscript reverse transcriptase 1 $\mu$ l, H $_2$ O 0.9 $\mu$ l을 첨가하여 20 $\mu$ l로 한 후, 아주 조심스럽게 손으로 tipping 혼합하였다. 이 후, 42 $^{\circ}$ C에서 90분간 incubation 한 후, 얼음 상에 방치하였다. 여기에 2.5M NaOH을 2 $\mu$ l씩 가한 후 37 $^{\circ}$ C에서 15분간 incubation하였으며, 2M HEPES buffer (free acid)를 10  $\mu$ l를 가하여 중화시켰다. 각각의 시약은 Amersham Bioscience에서 구입하였다.

### (3) Real time RT-PCR

각각의 optical tube (MicroAmp $^{\circ}$  Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode and Optical Adhesive Films, Applied Biosystems, Cat.No. 4314320)에 3배의 SybrGreen Mix 2.5 $\mu$ l (Sigma-Aldrich, Cat. No. S9430), (2)에서 합성한 cDNA 1 $\mu$ l, 10 pmol/ $\mu$ l primer pair mix 1 $\mu$ l, 각각 2.5 mM의 dNTP 2  $\mu$ l, 10xTag polymerase buffer 2.5 $\mu$ l, Tag Polymerase 0.3 $\mu$ l 와 14.7 $\mu$ l H $_2$ O를 넣고, 95 $^{\circ}$ C 5min 1 cycle, 95 $^{\circ}$ C 30sec, 45 $^{\circ}$ C 30sec, 72 $^{\circ}$ C 60sec 40 cycles, 95 $^{\circ}$ C 20min 1 cycle로 증폭시켰다. Primer는 RT-PCR에 사용한 것을 이용하였다. PCR을 마친 후 tube를 꺼낸 다음, 반응액 5 $\mu$ l를 사용하여 3% agarose gel에서 PCR specificity를 측정하고, ABI PRISM $^{\circ}$  7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Cat. No. 4349157)를 사용하여 real time PCR 결과를 분석하였다. PCR에 사용한 primer는 아래 table 2에 표시하였다.

Table 2. Primers

Target gene	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
TRAP	ACACAGTGATGCTGTGTGGCAACTC	CCAGAGGCTTCCACATATATGATGG
Cathepsin K	AGGCGGCTATATGACCACTG	CCGAGCCAAGAGAGCATATC
MMP-9	CGTCGTGATCCCCACTTACT	AGAGTACTGCTTGCCCAGGA
NFATc1	GGGTCAGTGTGACCGAAGAT	GGAAGTCAGAAGTGGGTGGA
iNOS	CCTTGTTTCAGCTACGCCTTC	AAGGCCAAACACAGCATACC
MITF	GGAACAGCAACGAGCTAAGG	TGATGATCCGATTACCAGA
b-actin	TCACCCACACTCTGCCCAT	TCCTTAATGTACGCACCATTT

### 3. 통계처리

각 결과는 평균 ± SEM으로 표시하였다. 결과에 대한 유의성 검증은 student's t-test를 이용하였으며, 유의성은 p < 0.05 이하로 규정하였다.

## III. 결 과

### 1. SM이 파골세포 형성에 미치는 영향

SM이 파골세포 형성에 미치는 영향을 평가하기 위하여, RANKL로 유도한 파골세포 형성 시 나타나는 TRAP(+) MNCs 형성을 평가하였다. SM은 25µg/ml

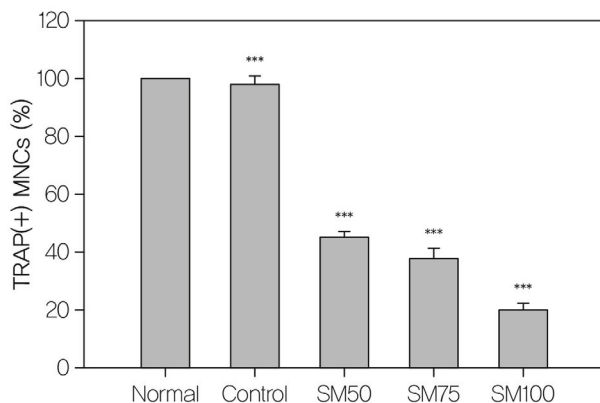


Fig. 1 Effects of SM on TRAP(+) multinucleated cells formation.

SM : *Saengmaek-san* (生脈散) Extract, Control : RANKL only, SM25 : RANKL + 25µg/ml of SM, SM50 : RANKL + 50µg/ml of SM, SM75 : RANKL + 75µg/ml of SM, SM100 : RANKL + 100µg/ml of SM. Data represent the mean ± SEM of three individual experiments, \*\*\* p < 0.001 vs Control.

농도에서는 거의 효과를 나타내지 않았으나, 50µg/ml에서는 약 54%, 75 µg/ml에서는 약 72%, 100µg/ml 농도에서는 약 79% 억제효과를 나타내었다(Fig. 1).

### 2. SM이 MMP-9 발현에 미치는 영향

SM이 파골세포 형성 시 나타나는 MMP-9의 발현에 미치는 영향을 평가하기 위하여 MMP-9의 mRNA 생성량을 측정하여 비교하였다. RANKL 처리 시 MMP-9의 발현은 현저히 증가되었다. SM처리 시 50µg/ml에서는 약 82%, 75µg/ml에서 91%, 100µg/ml 농도에서는 약 93% 억제효과를 나타내었다(Fig. 2).

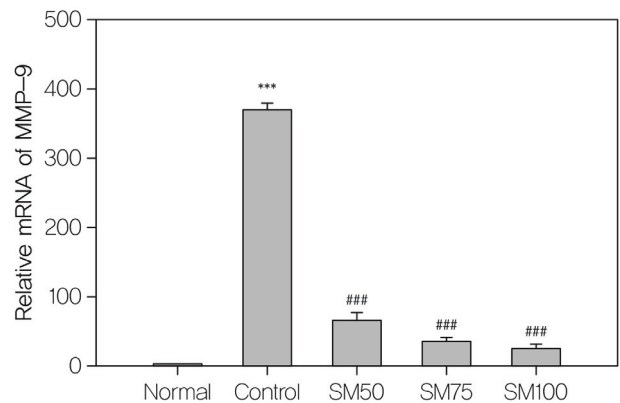


Fig. 2. Effects of SM on MMP-9 gene expression in osteoclast.

\*\*\* p < 0.001 vs Normal, ### p < 0.001 vs Control. For more detail, refer Fig. 1.

### 3. SM이 Cathepsin K 발현에 미치는 영향

SM이 파골세포 형성 시 나타나는 cathepsin K의 발현에 미치는 영향을 평가하기 위하여 cathepsin K

의 mRNA 생성량을 측정하여 비교하였다. RANKL 처리 시 cathepsin K의 발현은 현저히 증가되었다. SM 처리 시 50 $\mu$ g/ml에서는 약 67%, 75 $\mu$ g/ml에서는 약 86%, 100 $\mu$ g/ml 농도에서는 약 94% 억제효과를 나타내었다(Fig. 3).

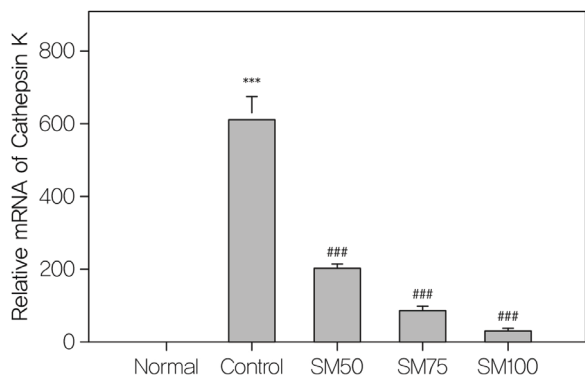


Fig. 3. Effects of SM on cathepsin K gene expression in osteoclast.

\*\*\* p<0.001 vs Normal, ### p<0.001 vs Control. For more detail, refer Fig. 1.

#### 4. SM이 Tartrate-resistance Acid Phosphatase(TRAP) 발현에 미치는 영향

SM이 파골세포 형성 시 나타나는 TRAP의 발현에 미치는 영향을 평가하기 위하여 TRAP의 mRNA 생성량을 측정하여 비교하였다. RANKL 처리 시 TRAP의 발현은 현저히 증가되었다. SM처리 시 50 $\mu$ g/ml에서는 약 69%, 75  $\mu$ g/ml에서는 약 85%, 100 $\mu$ g/ml 농도에서는 약 92%의 억제효과를 나타내었다(Fig. 4).

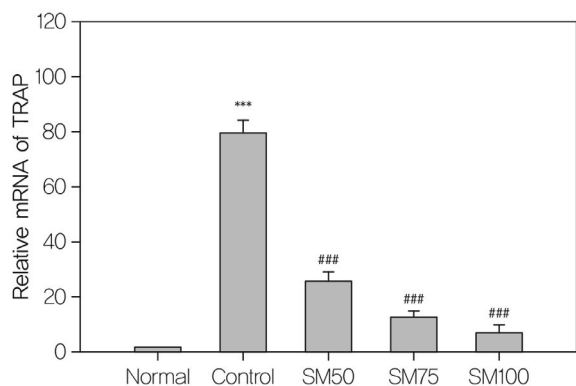


Fig. 4. Effects of SM on TRAP gene expression in osteoclast.

\*\*\* p<0.001 vs Normal, ### p<0.001 vs Control. For more detail, refer Fig. 1.

#### 5. SM이 NFATc1 발현에 미치는 영향

SM가 파골세포 형성시 나타나는 NFATc1의 발현에 미치는 영향을 평가하기 위하여 NFATc1의 mRNA 생성량을 측정하여 비교하였다. RANKL 처리시 NFATc1의 발현은 현저히 증가되었다. SM처리시 50 $\mu$ g/ml에서는 약 57%, 75  $\mu$ g/ml에서는 약 67%, 100 $\mu$ g/ml 농도에서는 약 79% 억제효과를 나타내었다(Fig. 5).

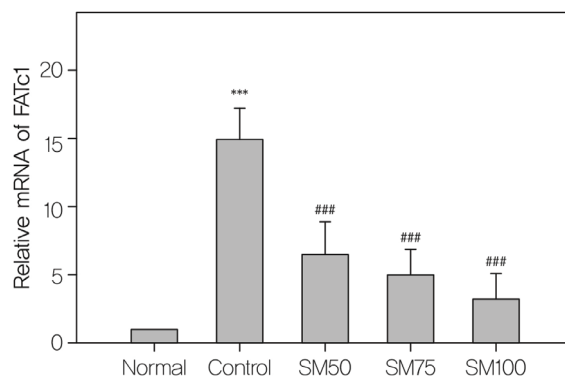


Fig. 5. Effects of SM on NFATc1 gene expression in osteoclast.

\*\*\* p<0.001 vs Normal, ### p<0.001 vs Control. For more detail, refer Fig. 1.

#### 6. SM이 MITF 발현에 미치는 영향

SM이 파골세포 형성 시 나타나는 MITF의 발현에 미치는 영향을 평가하기 위하여 MITF의 mRNA 생성량을 측정하여 비교하였다. RANKL 처리 시 MITF의 발현은 현저히 증가되었다. SM처리 시 50 $\mu$ g/ml에서는

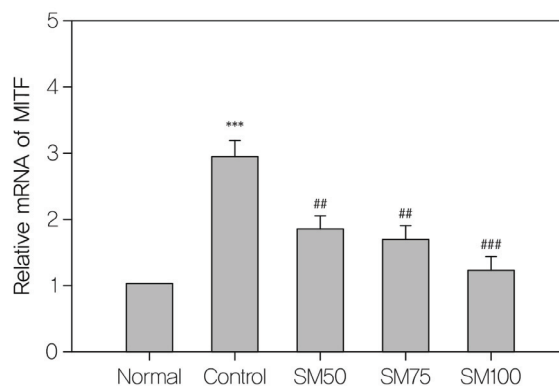


Fig. 6. Effects of SM on MITF gene expression in osteoclast.

\*\*\* p<0.001 vs Normal, ## p<0.01, ### p<0.001 vs Control. For more detail, refer Fig. 1.

약 40%, 75  $\mu\text{g/ml}$ 에서는 약 49%, 100 $\mu\text{g/ml}$  농도에 서는 약 60% 억제효과를 나타내었다(Fig. 6).

### 7. SM이 iNOS 발현에 미치는 영향

SM이 파골세포 형성 시 나타나는 iNOS의 발현에 미 치는 영향을 평가하기 위하여 iNOS의 mRNA 생성량 을 측정하여 비교하였다. RANKL 처리 시 iNOS의 발 현을 증가시킨 후, SM을 처리하였다. 실험결과, SM 50 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 약 61%, 75 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 약 44%, 100  $\mu\text{g/ml}$  농도에서는 약 54% 증가 효과를 나타내었다 (Fig. 7).

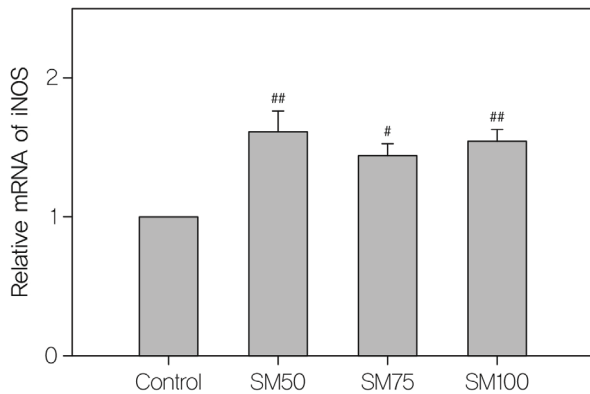


Fig. 7. Effects of SM on iNOS gene expression in osteoclast.

#  $p < 0.05$ , ##  $p < 0.01$  vs Control. For more detail, refer Fig. 1.

### 8. SM이 COX-2 발현에 미치는 영향

SM이 파골세포 형성 시 나타나는 COX-2의 발현에

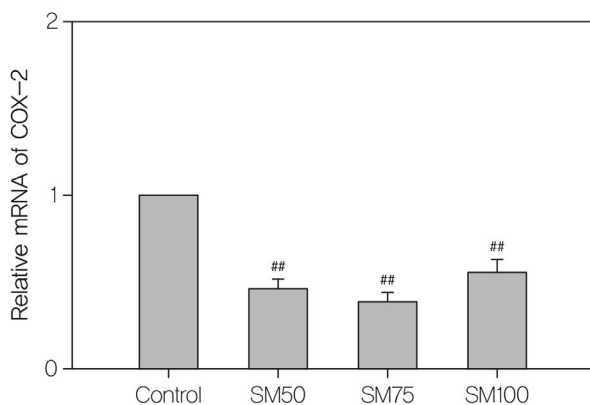


Fig. 8. Effects of SM on COX-2 gene expression in osteoclast.

##  $p < 0.01$  vs Control. For more detail, refer Fig. 1.

미치는 영향을 평가하기 위하여 COX-2의 mRNA 생 성량을 측정하여 비교하였다. RANKL 처리하여 COX-2 의 발현을 증가시킨 후, SM을 처리하였다. 실험결과, SM 50 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 약 53%, 75 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 약 61%, 100 $\mu\text{g/ml}$  농도에서는 약 44% 억제효과를 나타내었다 (Fig. 8).

### 9. SM이 TNF- $\alpha$ 발현에 미치는 영향

SM이 파골세포 형성 시 나타나는 TNF- $\alpha$ 의 발현에 미치는 영향을 평가하기 위하여 TNF- $\alpha$ 의 mRNA 생 성량을 측정하여 비교하였다. RANKL 처리하여 TNF- $\alpha$ 의 발현을 증가시킨 후, SM를 처리하였다. 실험결과, SM 50  $\mu\text{g/ml}$ 에서는 유의적인 변화가 없었으며, 75 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 약 31% 증가를 나타내었고, 100 $\mu\text{g/ml}$  농도 에서는 27% 증가 효과를 나타내었다(Fig. 9).

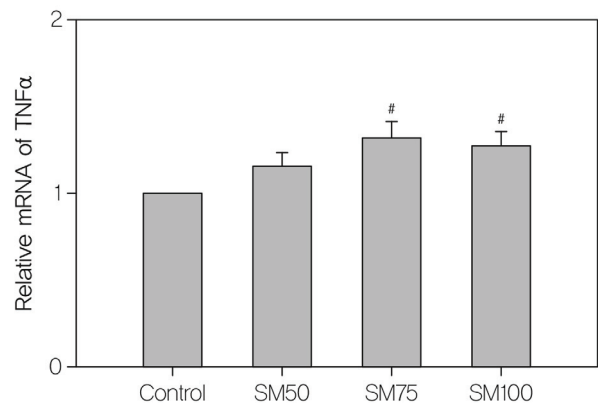


Fig. 9. Effects of SM on TNF- $\alpha$  gene expression in osteoclast.

#  $p < 0.05$  vs Control. For more detail, refer Figure 1.

### 10. SM이 IL-6 발현에 미치는 영향

SM이 파골세포 형성 시 나타나는 IL-6의 발현에 미치는 영향을 평가하기 위하여 IL-6의 mRNA 생성 량을 측정하여 비교하였다. RANKL 처리하여 IL-6의 발현을 증가시킨 후, SM을 처리하였다. 실험결과, SM 50 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 유의적인 변화가 없었으나, 75 $\mu\text{g/ml}$ 에 서는 약 35%, 100 $\mu\text{g/ml}$  농도에서는 약 31% 증가 효과 를 나타내었다(Fig. 10).

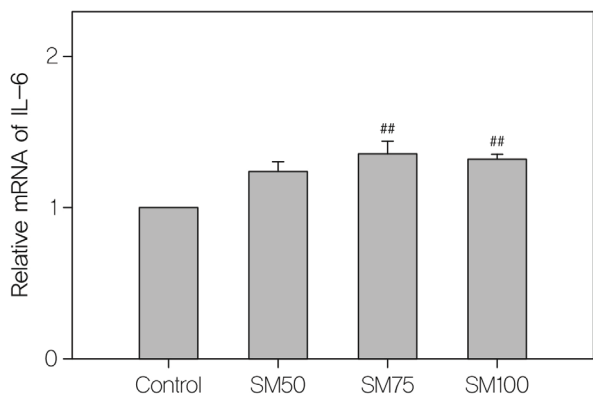


Fig. 10. Effects of SM on IL-6 gene expression in osteoclast.

## p<0,01 vs Control. For more detail, refer Figure 1.

#### IV. 고찰

골다공증은 대표적인 대사성 질환의 하나로 골질량이 감소하는 것은 물론 골조직 미세구조의 퇴화로 쉽게 골절이 생기는 전신질환이라 할 수 있다<sup>20</sup>. 골조직은 파골세포와 조골세포의 지배를 받고 있으며, 파골세포는 흡수의 기전을 통해 오래된 골을 제거하고 이 흡수강(resorption cavity)이 어느 정도의 수준에 도달하면 조골세포가 이 흡수강으로 들어와서 골을 새로이 형성한다. 이 과정에서 이들의 균형이 깨져 파골세포의 활성이 과도하거나 조골세포가 정상적으로 생성되는 흡수강을 채워주지 못할 때 골감소증이 발생하게 된다<sup>21,22</sup>.

우리나라의 만 50세 이상 성인의 골다공증 유병률에 대하여 2007년도와 2010년도에 보고된 국민건강영양조사 결과를 비교해 보면, 남성은 2.7%에서 7.8%, 여성은 18%에서 34.9%로 50세 이상 여성 3명 중 1명은 골다공증을 앓고 있으며 특히, 여성의 골다공증 유병률이 빠른 속도로 증가하고 있는 것으로 나타났다<sup>1</sup>.

골다공증의 치료제는 크게 나누어 골흡수 억제제와 골형성 촉진제, 골흡수억제 및 골형성 촉진 모두에 작용하는 동시작용제 등이 있으며, 골흡수 억제제로는 estrogen, calcitonin, bisphosphonate, ipriflavone, 비타민 D 등이 있고, 골형성 촉진제로는 부갑상선호르몬(parathyroid hormone), 성장호르몬 등이 있으며 동시작용제는 strontium 등이 있다<sup>23</sup>.

임상적으로 골다공증을 치료하는 약물인 Biphosphonate 계열의 약물은 주로 파골세포로의 분화를 억제하고 이미 성숙한 파골세포의 기능을 억제하는 작용을 한

다<sup>24</sup>. 그러나 이 약물은 환자의 치료에 가장 많이 사용되는 약물임에도 불구하고 식도염이나 하악골의 무혈성 괴사로 인한 부작용 등이 있어 사용시 제한이 있어<sup>11</sup>, 골다공증 치료에 효과있는 안전한 치료물질 개발이 시급한 실정이다.

韓醫學에서는 문헌상 골다공증이란 병명을 찾아 볼 수 없으나 원인과 임상양상을 유추해 볼 때, 골다공증은 骨萎, 骨痺, 虛勞의 범위에서 그 증상을 볼 수 있으며<sup>25</sup>, 치료에는 신음부족, 신양부족, 기혈양허, 풍사편승으로 변증하여 자음보신, 보신장양, 보익기혈, 거풍통락의 치법을 활용하고 있다<sup>26</sup>.

生脈散은 人蔘, 麥門冬, 五味子로 구성된 처방으로 元代 李의 《內外傷雜感論》<sup>12</sup>에 처음 수록된 이래 益氣生津하고 斂陰止汗하는 效能이 있어, 暑熱에 傷하여 元氣와 津液이 兩傷하여 나타나는 증상인 短氣, 體倦無力, 口渴, 汗出, 喘咳 등의 증상을 치료하는데 사용되어 왔다<sup>13</sup>. 현재까지 生脈散의 실험적 연구 보고로는 자외선에 의한 피부각질세포의 상해에 미치는 영향<sup>4</sup>, 혈압 및 국소뇌혈류량에 관한 연구<sup>15</sup>, 신경세포종의 고사에 미치는 효과 및 기전연구<sup>16</sup>, 대동맥 평활근 세포에서 NO 생성에 미치는 영향에 관한 연구<sup>17</sup>, 방사선 보호효과에 관한연구<sup>18</sup>, 아토피 피부염에 대한 실험적 연구<sup>19</sup> 등이 있었지만, 골다공증의 주요 원인인 파골세포 분화에 대한 生脈散의 영향이나 파골세포의 분화를 촉진하는 여러 인자들에 대한 生脈散의 효과에 관한 연구는 아직 보고된 바 없어 이에 대하여 평가하고자 하였다.

뼈는 지속적으로 조골세포에 의해 생성되고 파골세포에 의해 파괴되는 과정을 겪게 되며 이 과정의 불균형은 골 질환을 야기하게 된다<sup>27</sup>. 특히 골 파괴의 중요한 역할을 담당하는 파골세포의 분화는 파골세포의 분화는 여러 가지 자극인자를 통한 Receptor activator of nuclear factor-κB ligand(RANKL)의 발현 및 작용이 매우 중요한데 RANKL은 Tumor necrosis factor (TNF) 계열의 사이토카인으로 파골전구세포에서 발현되는 수용체 Receptor activator of nuclear factor-κB(RANK)와 결합하여 세포내의 신호전달 과정인 MAPK 신호전달 경로가 활성화되며 파골세포 분화에 필수적인 NF-κB, c-Fos, NFATc1와 같은 전사인자가 발현되어 파골세포의 성숙을 야기한다<sup>28</sup>.

TRAP(tartrate-resistant acid phosphatase)는 성숙한 파골세포에서 발현하는 것으로 TRAP 양성세포

는 세포융합 과정을 거쳐 다핵 파골세포로 분화하여 골 흡수기능을 하게 된다<sup>29)</sup>. Cathepsin K는 RANKL이나 M-CSF(macrophage colony stimulating factor) 등을 처리하는 경우 발현되는 단백질<sup>30)</sup>이며, MMP-9는 파골세포의 골 흡수 과정 중 나타나는 효소<sup>31)</sup>로서 이들은 TRAP와 같이 골의 흡수에 관여하고 있다. 따라서, 파골세포 활성화로 인한 골흡수 과정은 세포에서 발현되는 TRAP의 mRNA 유전자 발현과 함께 Cathepsin K, MMP-9이 유력한 지표로 사용될 수 있다.

본 연구 결과, 生脈散 抽出物(이하 SM)이 파골전구 세포로부터 RANKL로 유도된 TRAP를 발현하는 다핵 세포의 형성을 억제하여 파골세포 형성을 억제시키는 것으로 확인하였다(Fig. 1). 또한, 분화하는 파골세포가 기질물질을 분해하는데 관여하는 MMP-9 및 cathepsin K의 발현을 억제하였다(fig. 2, 3). 이와 함께 유전자 발현 연구에서도 SM이 TRAP 유전자 발현을 억제하는 것을 확인하였다(Fig. 4).

파골세포의 분화를 유도하는 핵심 전사인자는 c-Fos와 NFATc1로 알려져 있다. c-Fos 신호전달 체계에 의해 NFATc1 발현이 증가하게 되며 이는 파골세포 분화의 주된 기전이다<sup>32)</sup>. 본 실험에서는 SM이 NFATc1의 발현을 억제하는 결과를 나타내었다(Fig. 5).

MITF는 TRAF(TNF receptor-associated factor), p38의 활성화 등 일련의 신호전달 과정을 거쳐 활성화되는 인자로 파골세포의 분화를 촉진하는 작용이 있다. 또한, MITF는 파골세포 분화 시에도 증가하는 인자로 RANKL/RANK 복합체가 형성되는 것으로 시작하며, 이 과정에 TRAF 활성화, TAK1 활성화, MKK6 활성화, p38활성화 등 일련의 신호전달과정을 거친다<sup>33)</sup>. 실험결과, SM은 MITF 발현을 억제하여 파골세포의 분화를 억제하는 것으로 나타났다(Fig. 6).

NO는 NOS(nitric oxide synthase)에 의해 생성되는 물질로, calcium에 따른 endothelial 또는 neuronal NOS에 의해 생성되거나, RANKL, TNF- $\alpha$ , IL-6 등의 각종 염증 신호에 의해 활성화되는 inducible NOS(iNOS)에 의해 생성된다<sup>34)</sup>. 파골전구세포에서 파골세포로 분화하는 과정에서 iNOS는 분화조절에 관여하는데, SM은 iNOS 발현을 증가시켰다(Fig. 7).

COX-2의 발현으로 활성이 증가되는 PGE<sub>2</sub>는 그 자체가 골 항상성의 조절자로 cAMP-protein kinase A 활성화를 통해 파골세포의 분화를 촉진한다고 알려져 있으며, 파골세포 분화억제인자인 OPG 발현을 억제한다.

이는 염증반응의 일종으로 IL-6, TNF- $\alpha$  등에 의해 촉진되어 RANKL 처리된 파골세포에서 COX-2 발현과 PGE<sub>2</sub> 합성증가로 나타난다<sup>35)</sup>. 따라서 COX-2 발현을 억제하면 파골세포의 분화를 억제할 수 있다. TNF- $\alpha$ 는 조골세포의 collagen 및 ALP 합성을 억제하고 IL-6와 M-CSF를 증진시켜 파골세포로의 분화를 촉진하고 골의 흡수를 촉진하는 것으로 알려져 있으며<sup>36,37)</sup>, IL-6는 염증 매개 물질로 작용하는 cytokine으로 파골세포의 분화를 촉진하는 것으로 알려져 있어 염증성 골파괴를 유발할 수 있다<sup>38)</sup>. 실험결과, SM은 파골세포에서 COX-2 유전자 발현을 억제하였고(Fig. 8), TNF- $\alpha$ , IL-6의 발현 또한 억제하였다(Fig. 9, 10).

이상의 결과를 토대로 SM이 파골세포 분화를 억제하는 효과가 있음을 확인 할 수 있었다. 이는 NFATc1, MITF와 같은 전사 인자들의 발현을 억제하여 파골세포의 골 흡수 작용을 나타내는 TRAP, cathepsin K, MMP-9 등의 발현을 억제하는 것으로 판단된다. 따라서 生脈散은 파골세포의 분화와 분화를 촉진하는 신호전달 경로를 억제하는 기능이 있어 골다공증의 치료제로 사용할 수 있을 것으로 사료된다.

## V. 결론

生脈散 抽出物(SM)이 파골세포 분화 및 활성을 억제하여 골의 재흡수를 억제하는지를 평가하기 위하여, RANKL 유도 파골세포 분화와 관련 인자들의 유전자 발현에 미치는 영향을 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. SM은 RANKL 유도 파골세포의 형성을 억제하였다.
2. SM은 RANKL 유도 파골세포에서 MMP-9, cathepsin K의 발현을 억제하였다.
3. SM은 RANKL 유도 파골세포에서 TRAP의 발현을 억제하였다.
4. SM은 RANKL 유도 파골세포에서 NFATc1, MITF의 발현을 억제하였다.
5. SM은 RANKL 유도 파골세포에서 COX-2 발현을 억제하였다.
6. SM은 RANKL 유도 파골세포에서 iNOS, TNF- $\alpha$ , IL-6 발현을 증가시켰다.



이상의 연구결과, 生脈散 抽出物은 RANKL 유도 파골세포 분화를 억제하였으며, 파골세포 분화 및 기능 활성화에 관련된 유전자의 발현을 조절하는 것으로 나타나 대사성 질환인 골다공증 치료제로 이용할 수 있을 것으로 판단되었다.

### 감사의 글

본 연구는 2013년도 원광대학교 교내연구비 지원으로 이루어졌음.

### 참고문헌

1. 보건복지부 : 국민건강영양조사결과 보고서. 2007 and 2010.
2. Han IG : Diagnosis and therapy of osteoporosis. *Muscle and Joint Health*. 2002; 9(2): 216-29.
3. Kim JH, Jung SK, Shin BC, Kwon YD, Yeom SR, Song YS, Kil EY : Effects of Samul-tang (Siwu-tang) with Puerariae Radix on Ovariectomized Osteoporotic Rat Models. *JKMR*. 2007; 17(4): 89-105.
4. 대한정형외과학회 : 정형외과학. 서울. 최신의학사. 2005, pp.152-6
5. 윤상호, 김정우 : 폐경 후 골다공증의 최신치료. *大韓産婦人科學會誌*. 2005; 48(4): 844-56.
6. Lee G, Um YJ, Jung UW, Kim CS, Choi SH, Cho KS, Chai JK : A retrospective study of survival rate of dental implants placed in osteoporosis patients. *J Korean Acad Perio-dontol*. 2009; 39: 413-23.
7. 장수진, 이창현, 육태한 : 紅花子, 鹿茸, 紫河車 藥鍼이 骨多孔症에 미치는 影響. *大韓鍼灸學會誌*. 2001; 18(1): 61-75.
8. 주수경 : 골다공증 예방을 위한 운동 비디오프로그램 개발 연구. *여성건강*. 2003; 4(1): 59-78.
9. Karen MP, Carol CP, Lawrence GR : Treatment of osteoporosis. *Annu Rev Med*. 1995; 6: 249-56.
10. Boonen A, Broos P, Dequeker J, Bouillon R : The prevention or treatment of age-related osteoporosis in the elderly by systemic recombinant growth factor therapy(rhIGF-1 or rhTGF-β): a perspective. *J Internal medicine*. 1997; 242(4): 285-90.
11. Khosla S, Burr D, Cauley J, Dempster DW, Ebeling PR, Felsenberg D, Gagel RF, Gilsanz V, Guise T, Koka S, McCauley LK, McGowan J, McKee MD, Mohla S, Pendrys DG, Raisz LG, Ruggiero SL, Shafer DM, Shum L, Silverman SL, Van Poznak CH, Watts N, Woo SB, Shane E : Biophosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: report of a task force of the American Society for Bone and mineral Research. *J Bone Miner Res*. 2007; 22: 1479-91.
12. 李杲 : 東垣十種醫書. 서울. 오주출판사. 1986, p.19.
13. 鞠潤範, 金相贊, 朴宣東, 朴性奎, 徐富一, 徐榮培, 申舞植, 李尙仁, 李長泉, 李棣熙, 鄭宗佶, 朱榮丞, 崔湖榮 共編著 : 方劑學. 서울. 행림사. 2008, p.283.
14. 김은섭, 유동열 : 生脈散이 자외선에 의한 피부각질세포의 상해에 미치는 영향. *大韓漢方婦人科學會誌*. 2011; 24(2): 33-51.
15. 신대철, 김영균, 한종현, 문구, 김재섭 : 生脈散이 혈압 및 국소뇌혈류량에 미치는 영향. *大韓韓方內科學會誌*. 1997; 18(2): 167-76.
16. 김승모 : 신경세포종의 고사에 미치는 生脈散의 효과 및 기전연구. 원광대학교 대학원. 2001.
17. Heo Y, Na YH, Han SH, Jang HY, Im JM, Lee I, Jeon HJ, Lyu JY, Moon BS : Effects of Saengmaeg-san on the NO Production in Aortic Vascular Smooth Muscle Cells. *KJOMPP*. 2001; 15(5): 775-82.
18. Kim HK, Kim JS, Yoon SH, Ryu BH : Radioprotective Effect of Saengmaek-san on Mice Jejunal Crypt Cell Survival and Apoptosis. *Kor J Orient Int Med* 2006; 27(2): 316-26.
19. Moon H, Hwang CY, Hong SH, Hong CH, Kim NK, Jo GW, Lim KS : A comparative study on the effects of saengmaeksan and Saengmaeksan-gamibang on atopic dermatitis in NC/Nga mouse. *The Journal of Korean Oriental Medical Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology*. 2012; 25(1): 33-54.
20. Lane JM, Russell L, Khan SN : Osteoporosis.

- Clin Orthop Relat Res.* 2000; 372: 139-50.
21. Park SJ, Ahn YJ, Min HS, Oh KS, Park C, Cho NH, Kim KC : Osteoporosis Prevalence of Radius and Tibia and Related Factors Using Multiple Bone Sites Quantitative Ultrasound Measurement of the Korean Health and Genome Study Cohort Women. *Korean J Community Nutrition* 2005; 10(4): 536-45.
  22. Kim SW, Chung YK : Long Term Follow-up of Osteoporotic Vertebral Fractures According to the Morphologic Analysis of Fracture Pattern. *J Kor Soc Spine Surg.* 2000; 7(4): 611-7.
  23. 민병우, 이경재 : 고관절 부위의 골다공증: 약물치료. *大韓股關節學會誌.* 2007; 19(3): 266-70.
  24. Nishikawa M, Akatsu T, Katayama Y, Yasutomo Y, Kado S, Kugai N, Yamamoto M, Nagata N : Biphosphonates act on osteoblastic cells and inhibit osteoclast formation in mouse marrow cultures. *Bone.* 1996; 18: 9-14.
  25. 김정연, 송용선 : 骨多孔症에 대한 東西醫學의考察. *韓方再活醫學會誌.* 1996; 6: 293-315.
  26. The Society of Korean Medicine Rehabilitation : Korean Medicine Rehabilitation. Seoul, Koonja Publishing Inc., 2003, pp.110,168.
  27. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL : Osteoclast differentiation and activation. *Nature.* 2003; 423: 337-42.
  28. Takayanagi H : Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nature Reviews Immunology.* 2007; 7: 292-304.
  29. Nicola Z Angel, Nicole Walsh, Mark R. Forwood, Michael C. Ostrowski, A. Ian Cassady, David A. Hume : Transgenic mice overexpressing tartrate-resistant acid phosphatase exhibit an increased rate of bone turnover. *J Bone Miner Res.* 2000; 15(1): 103-10.
  30. Pang M, Martinez AF, Fernandez I, Balkan W, Troen BR : AP-1 stimulates the cathepsin K promoter in RAW 264.7 cells. *Gene.* 2007; 403(1-2): 151-8.
  31. Yoo M, Youn Y, Lee N, Choi S : Cellular proteins related to osteoclastogenesis in RAW 264.7 cells. *Cancer Prevention Research.* 2007; 12: 310-8.
  32. Dougall WC, Glaccum M, Charrier K, Rohrbach K, Brasel K, Smedt TD, Daro E, Smith J, Tometsko ME, Maliszewski CR, Armstrong A, Shen V, Bain S, Cosman D, Anderson D, Morrissey PJ, Peschon JJ, Schuh J : RANK is essential for osteoclast and lymphnode development. *Genes & Development.* 1999; 13: 2412-24.
  33. Melton LJ 3rd, Atkinson EJ, O'Connor MK, O'Fallon WM, Riggs BL : Bone density and fracture risk in men. *J Bone Miner Res.* 1998; 13: 1915.
  34. Han M, Wen JK, Zheng B, Zhang DQ : Acetylbritannilatonone suppresses NO and PGE2 synthesis in RAW 264.7 macrophages through the inhibition of iNOS and COX-2 gene expression. *Life Science.* 2004; 75: 675-84.
  35. Coon D, Gulati A, Cowan C, He J : The Role of Cyclooxygenase-2 (COX-2) in Inflammatory Bone Resorption. *Journal of Endodontics.* 2007; 33(4): 432-6.
  36. Nanes MS, Rubin J, Titus L, Hendy GN, Catherwood B : Tumor necrosis factor-alpha inhibits 1,25-dihydroxyvitamin D3-stimulated bone Gla protein synthesis in rat osteosarcoma cells (ROS 17/2,8) by a pretranslational mechanism. *Endocrinology.* 1991; 128(5): 2577-82.
  37. Jilka RL, Hangoc G, Girasole G, Passeri G, Williams DC, Abrams JS, Boyce B, Broxmeyer H, Manolagas SC : Increased osteoclast development after estrogen loss: mediation by interleukin-6. *Science.* 1992; 257(5066): 88-91.
  38. Kudoa O, Sabokbara A, Pococka A, Itonagab I, Fujikawab Y, Athanasoua NA : Interleukin-6 and interleukin-11 support human osteoclast formation by a RANKL-independent mechanism. *Bone.* 2003; 32(1): 1-7.