

혈부축어탕이 파골세포 분화 및 골흡수에 미치는 영향

대전대학교 한의과대학 부인과교실
장새별, 유동열, 유정은

ABSTRACT

Effects of *Hyeolbuchugeo-tang* on Osteoclast Differentiation and Bone Resorption

Sae-Byul Jang, Dong-Youl Yoo, Jeong-Eun Yoo
Dept. of Oriental Gynecology, College of Korean Medicine,
Dae-Jeon University Graduate School

Objectives: This study was conducted to evaluate the effects of *Hyeolbuchugeo-tang* (HBC) on Osteoporosis.

Methods: We induced RAW 264.7 cells to differentiate to Osteoclasts by RANKL and treated RANKL-induced RAW 264.7 cells with HBC (0, 150, 350, 700 µg/ml). To measure osteoclast differentiation and activation, we counted TRAP (+) MNCs and measured mRNA expressions of its related genes (TRAP, MMP-9, cathepsin K, NFATc1, c-Fos, MITF, iNOS, COX-2, TNF-α) by RT-PCR. To assess bone resorption, the Bone pit formation were examined under a microscope.

Results: HBC decreased TRAP (+) MNCs and inhibited mRNA expressions of TRAP, MMP-9, cathepsin K, NFATc1, c-Fos, MITF in osteoclast. And HBC inhibited Bone pit formation.

Conclusions: HBC inhibited osteoclast differentiation and activation and bone resorption. Taken together, these results indicate that HBC might have potentials for prevention and treatment of Osteoporosis.

Key Words: *Hyeolbuchugeo-tang*, Osteoporosis, Osteoclasts, Osteoclastogenesis, Bone Resorption, Bone Pit

I. 서 론

세계보건기구는 골다공증을 “골 량의 감소와 미세구조의 이상을 특징으로 하는 전신적인 골격계 질환으로 결과적으로 뼈가 약해서 부러지기 쉬운 상태가 되는 질환”이라고 정의하였다¹⁾. 골 조직은 지속적인 재형성이 일어나는 조직으로 조골세포에 의한 골생성과 파골세포에 의한 골흡수가 서로 균형을 유지하고 있는데 과도한 파골세포의 분화 및 활성화로 골흡수 쪽으로 평형이 기울어지면 골다공증과 같은 골대사 질환을 유발한다²⁾.

골다공증에 의해 발생하는 골절로 인한 이환 및 사망은 환자의 삶의 질을 저하시킬 뿐 아니라 상당한 경제적 손실을 초래한다³⁾. 국민건강영양조사에서 2008년 7월부터 2011년 5월까지 조사한 골밀도 자료⁴⁾에 의하면 우리나라 50세 이상 성인의 22.4%가 골다공증, 47.9%는 골감소증을 보였고 29.7%만이 정상 골밀도를 가진 것으로 나타나 골다공증 및 골감소증이 주요한 건강문제로 대두되고 있다.

한의학에서는 골의 위약한 상태를 나타내는 ‘骨痿’나 ‘骨痺’의 범주에서 골다공증과 유사한 개념을 찾아볼 수 있는데, 《素問·痿論》에서 “腎主身之骨髓 腎氣熱則腰脊不舉 骨枯而髓減 發爲骨痿”, 《素問·長刺節論》에서 “病在骨 骨重不可舉 骨髓酸痛 寒氣至 名曰骨痺”라 하여 골 량이 감소하여 발생하는 골다공증의 발병원인 및 그에 따른 임상증상을 설명하고 있다⁵⁾.

골다공증의 치료는 보편적으로 적절한 칼슘, 비타민D를 공급하면서 약물치료를 병행하는데¹⁾ 강력한 골흡수 억제제인 bisphosphonate가 1차 선택 약제로서 처방되고 있으나

구역, 구토, 통증, 속쓰림 등의 상부위장관 장애, 결막염과 같은 안과적 합병증, 턱뼈 괴사, 식도암 등의 부작용이 보고되었다⁶⁾. 골다공증은 만성질환으로 장기적인 치료 및 관리가 필요한 것에 반하여 bisphosphonate는 장기간 사용에는 주의가 필요하므로 치료효과를 나타내면서도 부작용을 최소화한 새로운 대체 약물의 개발이 필요할 것으로 사료된다.

골 재형성의 과정에서 국소부위의 뼈손상과 같은 시작 신호가 생기면 골재형성이 활성화되어 파골세포의 골흡수가 선행되고, 파골세포가 제거된 후 조골세포가 나타나 분화되어 분화된 조골세포가 세포외 기질과 광화를 통해 새롭게 골형성을 하는데⁶⁾, 이러한 골흡수와 골형성의 과정이 한의학의 祛瘀生新的 개념과 유사하다는 점에 착안하여 대표적 어혈약 중 하나인 혈부축어탕의 골다공증에 대한 효과를 연구하였다.

혈부축어탕은 王淸任의 《醫林改錯》⁷⁾에 처음 기재된 처방으로 현재 임상에서 瘀血로 인한 제반 증상에 다양하게 활용되고 있다⁸⁾. 현재까지 혈부축어탕이 자궁근종⁹⁾, 자궁내막증¹⁰⁾, 다낭성난소증후군¹¹⁾, 동맥경화¹²⁾, 전뇌허혈¹³⁾, 신경보호 및 재생효과¹⁴⁾, 암전이억제¹⁵⁾에 효과가 있음이 실험을 통해 확인되었으며 심부정맥혈전증^{16,17)}, 어혈로 인한 경계정층¹⁸⁾에 대한 치험례가 보고된 바 있으나 골다공증에 대한 효능은 아직 밝혀진 바가 없다.

이에 저자는 혈부축어탕이 파골세포 분화 및 골흡수에 미치는 영향을 알아보기 위하여 RANKL 유도 파골세포 분화 및 관련 인자인 TRAP, MMP-9, cathepsin K, NFATc1, c-FOS, MITF, iNOS, COX-2, TNF- α 등의 유전자 발현을 측정하고, Bone

pit 형성 정도를 현미경으로 관찰하여 유의미한 결과를 얻었기에 이를 보고하고자 한다.

II. 실험

1. 재 료

1) 한약재 추출 및 검액 제조

혈부축어탕 100 g을 분말로 만들어 플라스크에 넣고 증류수 500 ml를 가한 후 6시간 이상 가열하여 환류 추출하였다. 여과지를 이용하여 여과한 뒤 여과액을 Evaporator(EYELA, Japan)로 감압 농축한 후에 농축액을 동결 건조하여 약 10%의 수득률로 분말 시료 50 g을 얻었다. 시료는 실험 시까지 냉동보관 하였다. 실험 시에는 DMSO(Sigma, St. Louis, MO, USA)를 이용하여 혈부축어탕 추출물(이하 HBC라 함)을 배지에 녹이고, pore size 0.45 µm의 여과지로 여과하여 사용하였다. 본 실험에 사용된 약재는 대전대학교 둔산한방병원에서 구입, 정선하여 사용하였으며 처방 구성은 다음과 같다(Table 1).

Table 1. The Composition of *Hyeolbuchugeo-tang*

Herbal name	Pharmacognostic name	Dose amount (g)
當 歸	<i>Angelicae Gigantis Radix</i>	12
生地黄	<i>Rehmanniae Radix</i>	12
桃 仁	<i>Persicae Semen</i>	16
紅 花	<i>Carthami Flos</i>	12
枳 殼	<i>Aurantii Fructus Immaturus</i>	8
赤芍藥	<i>Paeoniae Radix</i>	8
柴 胡	<i>Bupleuri Radix</i>	4
甘 草	<i>Glycyrrhizae Radix et Rhizoma</i>	4
桔 梗	<i>Platycodonis Radix</i>	6
川 芎	<i>Cnidii Thizoma</i>	6
牛 膝	<i>Achyranthis Radix</i>	12
Total		100

2) 세 포

본 실험에 사용된 파골세포 전구세포는 mouse myeloid 세포주인 RAW 264.7 cell에 RANKL를 처리하여 유도된 세포 모델을 사용하였다. 사용된 RAW 264.7 cell은 한국세포주은행(Korean Cell Line Bank, Seoul, Korea)에서 구입하였다.

2. 방 법

1) 시약 및 배지

DMEM(Dulbecco's modified eagle medium), 10% fetal bovine serum(FBS), penicillin, streptomycin, α-Minimum essentialmedium (α-MEM) 및 모든 세포배양 시약은 Life Technology사(Rockville, MD, USA)에서 구입하였으며 기타 시약은 세포배양용 및 분석용 특급시약을 사용하였다. dimethylsulfoxide (DMSO), TRAP fast garnet GBC base 용액, 5% naphthol AS-BI phosphoric acid, Actin 항체, TRAP은 Sigma-Aldrich사 (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. c-Fos와 NFATc1에 대한 항체는 Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였고, oligo dT, 5×CyScript buffer, DTT(Dithiothreitol), dUTP nucleotide, dUTP CyDye-labelled nucleotide, CyScript reverse transcriptase, HEPES buffer(free acid)는 Amersham Bioscience에서 구입하였다.

2) RAW 264.7 cell 배양

RAW 264.7 cell은 DMEM(Dulbecco's modified eagle medium)/10% FBS(fetal bovine serum)/PC(penicillin-streptomycin)-HBC 배지를 이용하여 CO₂ 세포 배양기에서 배양하였고, 세포 수를 5×10³ cells/well로 하여 96 well plate를 이용하여 배양하였다. 24시간 동안 배양 후 배양액을

버린 뒤 10% FBS, 50 ng/ml RANKL, 1 ng/ml TGF β 가 첨가된 α -MEM으로 교환하여 세포를 배양하였다. 배양액에 여러 농도의 HBC를 첨가해 주었다. 2일에 한 번씩 동일한 배지로 교환하여 6일간 배양하였다.

3) 약물처리

실험군은 (1) RANKL 미처리군(Normal control, NC), (2) RANKL 처리군(Control, C), (3) RANKL 처리 후 150 μ g/ml의 HBC를 투여한 군, (4) RANKL 처리 후 350 μ g/ml의 HBC를 투여한 군, (5) RANKL 처리 후 700 μ g/ml의 HBC를 투여한 군으로 하였다.

4) 파골세포 생성 측정

RAW 264.7 cell을 RANKL로 처리하여 파골세포로 유도한 후, 성숙 파골세포의 발현 marker로 알려져 있는 TRAP을 염색하여 TRAP-positive 세포를 확인하였다. 분화시킨 세포를 PBS로 2회 세척한 후, 3.7% formaldehyde-citrate-acetone 용액으로 10분간 고정시킨 뒤 증류수로 2회 세척하였다. 고정시킨 세포에 2% TRAP fast garnet GBC base 용액과 NaNO₃ 용액을 1:1로 섞어 만든 용액과 5% naphthol AS-BI phosphoric acid와 4% acetic acid와 2% tartaric acid를 포함한 용액을 처리하였다. 상온에서 30분 이상 방치한 후 광학현미경으로 관찰하여 핵이 3개 이상인 TRAP-positive한 다핵세포(TRAP(+) MNCs)의 수를 세어 파골세포의 생성지표로 삼았다.

5) 파골세포 유전자발현 측정

(1) Total RNA 분리

RNA를 분리하기 위하여 배양세포의 배지를 제거한 다음, 4°C PBS로 3회 세척하였다. 세포를 모은 후, 750 \times g에서 10

분간 원심 분리하고 ice cold PBS로 2회 세척하였다. 침전된 세포에 lysis buffer를 가하여 용해시킨 후 12,000 \times g에서 10분간 원심 분리 후 상층을 취하였다. 이것을 다시 1 M sucrose를 함유한 tris buffer 위에 loading하고 36,000 rpm에서 160분간 원심분리 하였다. Polysome pellet을 취하여 SDS buffer에 용해시킨 뒤 37°C에서 30분간 incubation 하였다. Sodium acetate buffer를 가하고 phenol/CHCl₃ 용액을 이용하여 추출하였다. NaCl을 0.2 M이 되도록 가하고, EtOH를 가하여 -20°C에서 12시간 동안 보관하였다. 침전물을 75% Ethanol로 2회 세척한 다음 건조시켰다. 유전자 발현에 필요한 RNA양을 대조군과 시험군의 mRNA양이 같도록 조정하고 전기영동으로 확인하여 사용하였다.

(2) cDNA 제조

대조군과 시험군에서 각각 분리한 total RNA액 10 μ l(10 μ g RNA 함유)에 oligo dT 1 μ l(2 μ g/ μ l)을 넣어 조심스럽게 혼합한 후, 90°C에서 5분간 incubation하였다. Primer annealing을 위해 실온에서 약 10분간 방치한 후, 4°C로 유지하면서 다음 시약을 가하였다. 5 \times CyScript buffer 4 μ l, 0.1 M DTT(Dithiothreitol) 2 μ l, dUTP nucleotide mix 1 μ l, dUTP CyDye-labelled nucleotide 0.1 μ l, CyScript reverse transcriptase 1 μ l, H₂O 0.9 μ l을 첨가하여 20 μ l로 만든 후, 아주 조심스럽게 tipping 혼합하였다. 이후 42°C에서 90분간 incubation한 뒤 얼음상에 방치하였다. 여기에 2.5 M NaOH을 2 μ l씩 가하여 37°C에서 15분간 incubation하고, 2 M HEPES buffer(free acid) 10 μ l를 가하여 중화시켰다.

(3) Real time RT-PCR

각각의 optical tube(MicroAmp® Optical

96-Well Reaction Plate with Barcode & Optical Adhesive Films, Applied Biosystems, Cat. No. 4314320)에 3배의 SybrGreen Mix 2.5 μ l(Sigma-Aldrich, Cat. No. S9430), (2)에서 합성한 cDNA 1 μ l, 10 pmol/ μ l primer pair mix 1 μ l, 각각 2.5 mM의 dNTP 2 μ l, 10 \times Tag polymerase buffer 2.5 μ l, Tag Polymerase 0.3 μ l 와 14.7 μ l H₂O를 넣고, 95 $^{\circ}$ C 5 min 1 cycle, 95 $^{\circ}$ C 30 sec, 45 $^{\circ}$ C 30 sec, 72 $^{\circ}$ C 60 sec 40 cycles,

95 $^{\circ}$ C 20 min 1 cycle로 증폭시켰다. PCR을 마친 후 tube를 꺼낸 후, 반응액 5 μ l를 사용하여 3% agarose gel에서 PCR specificity를 측정하고, ABI PRIBHC@ 7000 Sequence Detection System(Applied Biosystems, Cat. No. 4349157)를 사용하여 real time PCR 결과를 분석하였다. PCR에 사용한 primer는 다음과 같다 (Table 2).

Table 2. Primer Sequence Used for PCR

Target gene	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
TRAP	ACACAGTGATGCTGTGTGGCAACTC	CCAGAGGCTTCCACATATATGATGG
MMP-9	CGTCGTGATCCCCACTTACT	AGAGTACTGCTTGCCCAGGA
cathepsin K	AGGCGGCTATATGACCACTG	CCGAGCCAAGAGAGCATATC
NFATc1	GGGTCAGTGTGACCGAAGAT	GGAAGTCAGAAGTGGGTGGA
c-Fos	CCAGTCAAGAGCATCAGCAA	AAGTAGTGCAGCCCGGAGTA
MITF	GGAACAGCAACGAGCTAAGG	TGATGATCCGATTCACCAGA
iNOS	CCTTGTTTCAGCTACGCCTTC	AAGGCCAAACACAGCATAACC
COX-2	AGAAGGAAATGGCTGCAGAA	GCTCGGCTTCCAGTATTGAG
TNF- α	ACGGCATGGATCTCAAAGAC	CGGACTCCGCAAAGTCTAAG
β -actin	TCACCCACACTCTGCCCAT	TCCTTAATGTACGCACCATTT

6) Bone resorption assay

파골세포의 분화와 활성의 결과 나타나는 뼈의 흡수능을 평가하기 위하여, plate에 calcium-collagen으로 코팅하여 제조된 인공 뼈를 사용하여 측정하였다. calcium phosphate와 collagen을 코팅한 plate를 phenol-red-free MEM 배지를 사용하여

세척한 다음, 미분화된 파골세포 전구세포를 1×10^3 cells/well로 분주하고 24시간 배양한 다음, RANKL을 100 ng/ml로 처리하였다. 1시간 배양 후 HBC 추출물을 농도별로 처리한 다음 10일간 배양하였다. 배지는 2일에 한번 교체해 주었다. 배양을 마친 후 5% sodium hypochlorite

를 처리해 세포를 제거하고 DDW로 세척한 다음 ×400 역상 현미경으로 뼈의 흡수를 관찰하고 사진을 촬영하였다.

3. 통계처리

각 결과는 SPSS v12.0을 이용하여 평균 ±SEM으로 표시하였다. 결과에 대한 유의성 검증은 student's t-test를 이용하여, p<0.05 일 때 유의성이 있다고 판정하였다.

III. 결 과

1. HBC가 cell viability 에 미치는 영향

RAW 264.7 cell에 RANKL을 처리하여 유도한 파골세포에서 HBC는 대조군과 비교하였을 때 800 µg/ml 이하의 모든 실험 농도에서 세포독성을 나타내지 않았다(Fig. 1).

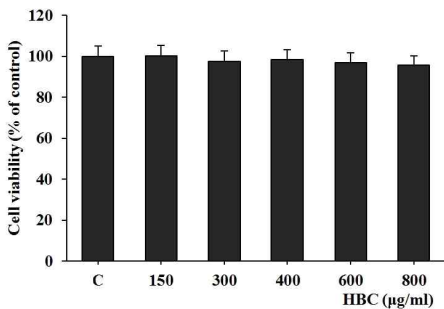


Fig. 1. Effect of HBC on cell viability. C : RANKL (100 ng/ml) only
 150 : RANKL (100 ng/ml)+150 µg/ml of HBC
 300 : RANKL (100 ng/ml)+300 µg/ml of HBC
 400 : RANKL (100 ng/ml)+400 µg/ml of HBC
 600 : RANKL (100 ng/ml)+600 µg/ml of HBC
 800 : RANKL (100 ng/ml)+800 µg/ml of HBC
 Each bar represents Mean±SD of 5 tests.

2. HBC가 TRAP(+) MNCs 형성에 미치는 영향

RAW 264.7 cell에서 RANKL로 유도한

파골세포 형성 시 나타나는 TRAP(+) MNCs 형성을 평가한 결과, HBC 처리 시 150 µg/ml 농도에서는 TRAP(+) MNCs 형성에 효과를 나타내지 않았으나, 350 µg/ml 처리군에서는 TRAP(+) MNCs 형성이 약 19% 감소하여 유의성 있는(p<0.05) 억제효과를 나타내었으며, 700 µg/ml 처리군에서는 TRAP(+) MNCs 형성이 약 46% 감소하여 유의성 있는(p<0.01) 억제효과를 나타내었다(Fig. 2).

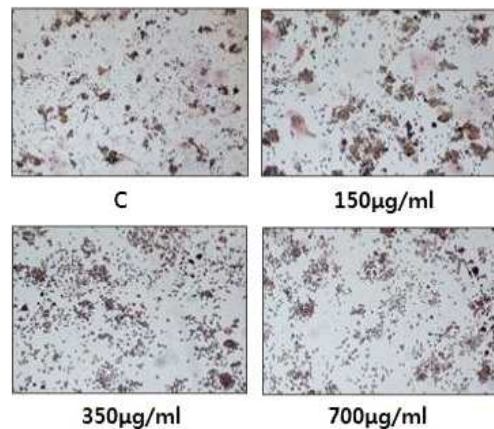
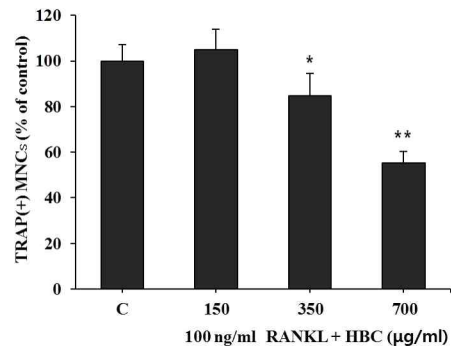


Fig. 2. Effect of HBC on the formation of TRAP (+) MNCs in RANKL-stimulated osteoclast.

C : RANKL (100 ng/ml) only
 150 : RANKL (100 ng/ml)+150 µg/ml of HBC
 350 : RANKL (100 ng/ml)+350 µg/ml of HBC
 700 : RANKL (100 ng/ml)+700 µg/ml of HBC
 Each bar represents Mean±SD of 5 tests.
 * : p<0.05 vs C
 ** : p<0.01 vs C

3. HBC가 TRAP 발현에 미치는 영향

RAW 264.7 cell에 RANKL 처리 시 TRAP의 발현이 현저히 증가되었다. HBC 처리 시 RANKL 단독 처리한 대조군과 비교하여 150 µg/ml 농도에서는 TRAP 발현이 오히려 증가하였으나 유의성이 없었고, 350 µg/ml 농도에서는 TRAP 발현을 약 27% 억제하였으며 유의성이(p<0.01) 있었고, 700 µg/ml 농도에서는 약 58% 억제하였으며 유의성이(p<0.001) 있었다 (Fig. 3).

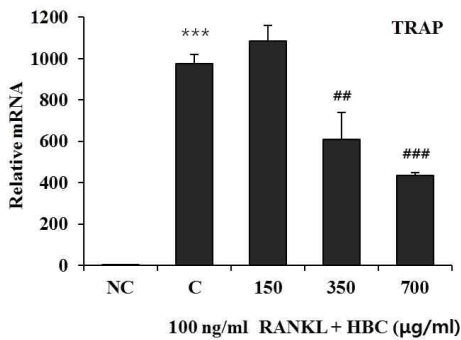


Fig. 3. Effect of HBC on TRAP gene expression in RANKL-stimulated osteoclast. NC : Vehicle
 C : RANKL (100 ng/ml) only
 150 : RANKL (100 ng/ml)+150 µg/ml of HBC
 350 : RANKL (100 ng/ml)+350 µg/ml of HBC
 700 : RANKL (100 ng/ml)+700 µg/ml of HBC
 Each bar represents Mean±SD of 5 tests.
 *** : p<0.001 vs NC
 ** : p<0.01 vs C
 *** : p<0.001 vs C

4. HBC가 MMP-9 발현에 미치는 영향

RAW 264.7 cell에 RANKL로 유도한 파골세포에 RANKL 처리 시 MMP-9의 발현이 현저히 증가되었다. HBC 처리 시 RANKL 단독 처리군과 비교하여 MMP-9의 발현은 150 µg/ml 농도에서는 유의성 있게(p<0.01) 약 58% 억제되었으며, 350 µg/ml 농도에서 약 76%, 700 µg/ml 농도

에서는 약 85% 억제되어 유의성이(p<0.001) 있었다(Fig. 4).

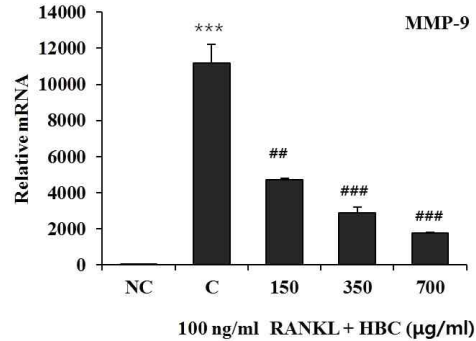


Fig. 4 Effect of HBC on MMP-9 gene expression in RANKL-stimulated osteoclast. NC : Vehicle
 C : RANKL (100 ng/ml) only
 150 : RANKL (100 ng/ml)+150 µg/ml of HBC
 350 : RANKL (100 ng/ml)+350 µg/ml of HBC
 700 : RANKL (100 ng/ml)+700 µg/ml of HBC
 Each bar represents Mean±SD of 5 tests.
 *** : p<0.001 vs NC
 ** : p<0.01 vs C
 *** : p<0.001 vs C

5. HBC가 cathepsin K 발현에 미치는 영향

RAW 264.7 cell에 RANKL로 유도한 파골세포에 RANKL 처리 시 cathepsin K의 발현이 현저히 증가되었다. HBC 처리 시 RANKL 단독 처리군과 비교하여 cathepsin K의 발현이 150 µg/ml 처리군에서는 유의성 있게(p<0.01) 약 48% 억제되었고, 350 µg/ml 처리군에서는 유의성 있게(p<0.01) 약 61% 억제되었으며, 700 µg/ml 처리군에서는 약 93%의 억제 효과가 유의성 있게(p<0.001) 나타났다 (Fig. 5).

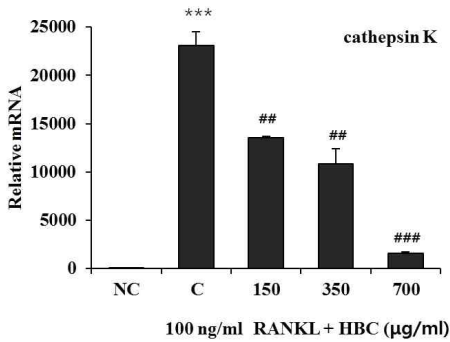


Fig. 5. Effect of HBC on cathepsin K gene expression in RANKL-stimulated osteoclast.

NC : Vehicle

C : RANKL (100 ng/ml) only

150 : RANKL (100 ng/ml)+150 μg/ml of HBC

350 : RANKL (100 ng/ml)+350 μg/ml of HBC

700 : RANKL (100 ng/ml)+700 μg/ml of HBC

Each bar represents Mean±SD of 5 tests.

*** : p<0.001 vs NC

: p<0.01 vs C

: p<0.001 vs C

6. HBC이 NFATc1 발현에 미치는 영향

RAW 264.7 cell에 RANKL로 유도한 파골세포에 RANKL 처리 시 NFATc1의 발현이 현저히 증가되었다. HBC 처리 시 RANKL 단독 처리군과 비교하여 150 μg/ml 농도군에서는 NFATc1 발현이 약간 감소하였으나 유의성이 없었고, 350 μg/ml 농도군에서는 약 53% 감소하여 유의성이 (p<0.01) 있었고, 700 μg/ml 농도군에서는 약 82% 감소하여 유의성 있는(p<0.001) 억제효과를 나타냈다(Fig. 6).

7. HBC 가 c-Fos 발현에 미치는 영향

RAW 264.7 cell에 RANKL로 유도한 파골세포에 RANKL 처리 시 c-Fos의 발현이 현저히 증가되었다. HBC 처리 시 RANKL 단독 처리군과 비교하여 c-Fos 발현이 150 μg/ml 농도군에서는 약간 감소하였으나 유의성이 없었고, 350 μg/ml 농도

에서는 약 77%, 700 μg/ml 농도에서는 약 79% 감소하여 유의성 있는(p<0.001) 억제효과를 나타냈다(Fig. 7).

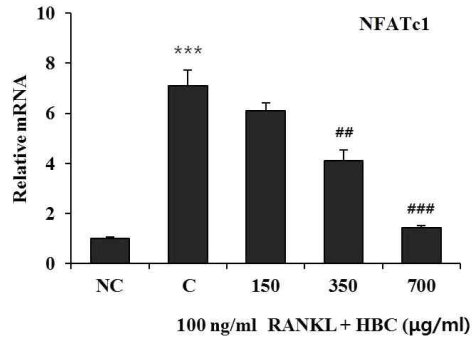


Fig. 6. Effect of HBC on NFATc1 gene expression in RANKL-stimulated osteoclast.

NC : Vehicle

C : RANKL (100 ng/ml) only

150 : RANKL (100 ng/ml)+150 μg/ml of HBC

350 : RANKL (100 ng/ml)+350 μg/ml of HBC

700 : RANKL (100 ng/ml)+700 μg/ml of HBC

Each bar represents Mean±SD of 5 tests.

*** : p<0.001 vs NC

: p<0.01 vs C

: p<0.001 vs C

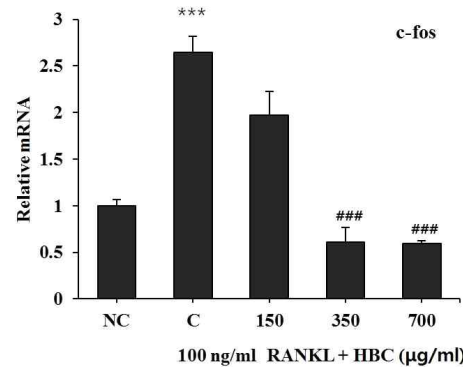


Fig. 7. Effect of HBC on c-Fos gene expression in RANKL-stimulated osteoclast.

NC : Vehicle

C : RANKL (100 ng/ml) only

150 : RANKL (100 ng/ml)+150 μg/ml of HBC

350 : RANKL (100 ng/ml)+350 μg/ml of HBC

700 : RANKL (100 ng/ml)+700 μg/ml of HBC

Each bar represents Mean±SD of 5 tests.

*** : p<0.001 vs NC

: p<0.001 vs C

8. HBC이 MITF 발현에 미치는 영향

RAW 264.7 cell에 RANKL로 유도한 파골세포에 RANKL 처리 시 MITF의 발현이 현저히 증가되었다. HBC 처리 시 RANKL 단독 처리군과 비교하여 MITF의 발현이 150 µg/ml에서는 약 34% 감소하여 유의성이($p < 0.05$) 있었고, 350 µg/ml에서는 약 45% 감소하였으나 유의성은 없었으며, 700 µg/ml 농도에서는 약 68% 감소하여 유의성 있는($p < 0.001$) 억제효과를 나타내었다(Fig. 8).

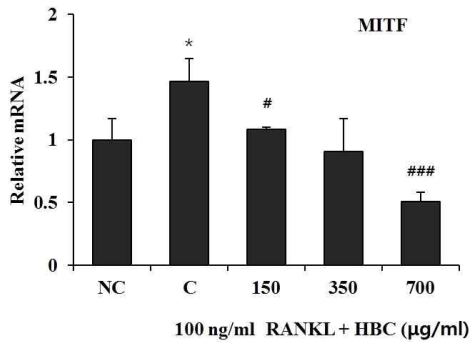


Fig. 8. Effect of HBC on MITF gene expression in RANKL-stimulated osteoclast.

NC : Vehicle

C : RANKL (100 ng/ml) only

150 : RANKL (100 ng/ml)+150 µg/ml of HBC

350 : RANKL (100 ng/ml)+350 µg/ml of HBC

700 : RANKL (100 ng/ml)+700 µg/ml of HBC

Each bar represents Mean±SD of 5 tests.

* : $p < 0.05$ vs NC

: $p < 0.05$ vs C

: $p < 0.001$ vs C

9. HBC가 iNOS, COX-2, TNF-α 발현에 미치는 영향

RAW 264.7 cell에 RANKL로 유도한 파골세포에 RANKL 처리 시 염증 인자인 iNOS, COX-2, TNF-α의 발현은 현저히 증가되었다. 그러나 HBC 처리 시 모든 실험 농도에서 iNOS, COX-2, TNF-α의 발현을 억제하지 못했다(Fig. 9, 10, 11).

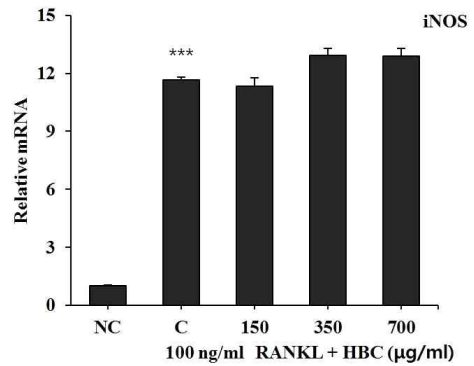


Fig. 9. Effect of HBC on iNOS gene expression in RANKL-stimulated osteoclast.

NC : Vehicle

C : RANKL (100 ng/ml) only

150 : RANKL (100 ng/ml)+150 µg/ml of HBC

350 : RANKL (100 ng/ml)+350 µg/ml of HBC

700 : RANKL (100 ng/ml)+700 µg/ml of HBC

Each bar represents Mean±SD of 5 tests.

*** : $p < 0.001$ vs NC

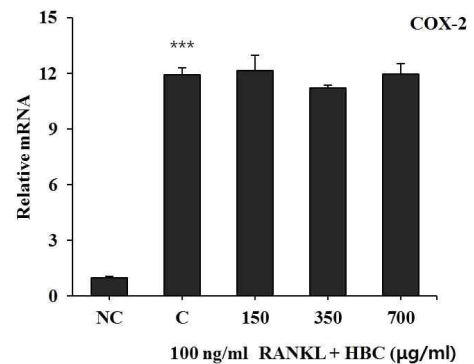


Fig. 10. Effect of HBC on COX-2 gene expression in RANKL-stimulated osteoclast.

NC : Vehicle

C : RANKL (100 ng/ml) only

150 : RANKL (100 ng/ml)+150 µg/ml of HBC

350 : RANKL (100 ng/ml)+350 µg/ml of HBC

700 : RANKL (100 ng/ml)+700 µg/ml of HBC

Each bar represents Mean±SD of 5 tests.

*** : $p < 0.001$ vs NC

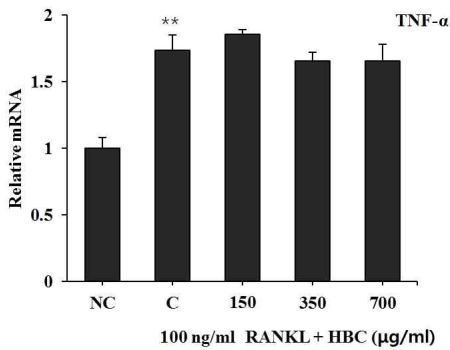


Fig. 11. Effect of HBC on TNF- α gene expression in RANKL-stimulated osteoclast. NC : Vehicle
C : RANKL (100 ng/ml) only
150 : RANKL (100 ng/ml)+150 μ g/ml of HBC

350 : RANKL (100 ng/ml)+350 μ g/ml of HBC
700 : RANKL (100 ng/ml)+700 μ g/ml of HBC
Each bar represents Mean \pm SD of 5 tests.
** : p<0.01 vs NC

10. HBC 가 Bone pit 형성에 미치는 영향

RANKL 유도 파골세포의 뼈의 흡수를 $\times 400$ 역상 현미경으로 관찰한 결과, HBC는 대조군과 비교하였을 때, 350 μ g/ml에서 RANKL로 자극된 파골세포의 Bone pit 형성이 억제되었으며, 700 μ g/ml에서는 현저하게 억제되었다(Fig. 12).

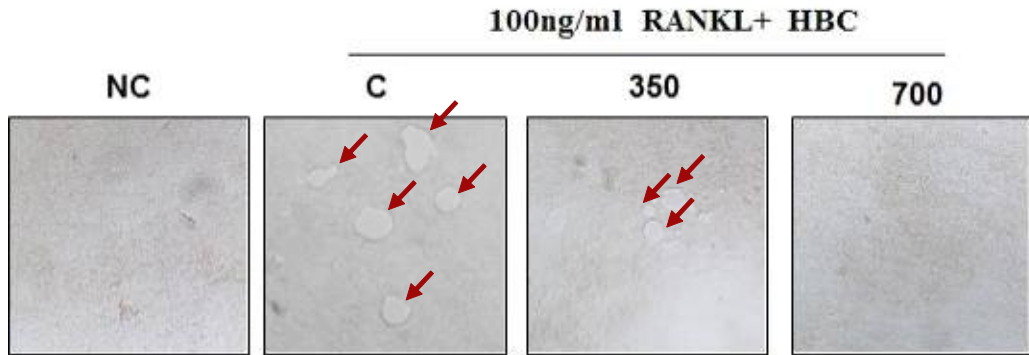


Fig. 12. Effect of HBC on bone pit formation by RANKL-stimulated Osteoclast (under inverted-microscope ($\times 400$)). NC : Vehicle
C : RANKL (100 ng/ml) only
350 : RANKL (100 ng/ml)+350 μ g/ml of HBC
700 : RANKL (100 ng/ml)+700 μ g/ml of HBC

V. 고 찰

골다공증은 뼈의 양적 감소가 일어나 골격의 다공성이 증가하는 질환으로 골소실 속도는 폐경기 상태에서 가속화되어 여성이 골다공증에 쉽게 이환되며 기질적인 질환과 상관없이 점진적인 골량 감소는 골절위험성을 증가시키기 때문에 임상적으로 중요한 의미가 있다. 성인에

서 골모세포에 의한 골형성과 파골세포에 의한 골흡수는 동적평형상태를 유지하지만 골형성과 골흡수, 골모세포와 간질세포에 의한 파골세포 활성화 조절 기능 사이의 불균형이 초래되어 파골세포에 의한 골흡수가 향상되는 쪽으로 평형이 기울어지면 골다공증이 발생하게 된다^{2,6)}.

국민건강영양조사⁴⁾에 따르면 우리나라 50세 이상 여성의 37.3%는 골다공증, 48.9%

는 골감소증으로 정상적인 골밀도를 가진 여성은 13.8%에 불과하였고, 50세 이상 남성에서 골다공증 유병률은 7.5%로 여자의 1/5 수준이었으나 골감소증은 46.8%로 여성과 유사하게 보고되어 골다공증 및 골감소증이 주요한 건강문제로 대두되고 있다.

골다공증 자체는 특별한 증상을 나타내지 않으나 골절이 발생하면 통증, 신장감소 등의 골격계 변형 및 운동능력 감소 등의 문제를 야기하고 척추뒤굽음증(kyphoscoliosis)의 경우 호흡기능에도 영향을 미칠 수 있다. 대퇴경부, 골반, 척추골절의 합병증으로 폐색전과 폐렴 등이 흔하게 발생하고 이로 인해 사망을 초래하기도 한다²⁾. 또한 골다공증에 의해 발생하는 골절로 인한 높은 이환 및 사망은 환자의 삶의 질을 저하시킬 뿐 아니라 상당한 경제적 손실을 초래하는데, 실제로 골절과 관련된 직접적인 비용은 대표적 만성질환인 뇌졸중, 유방암, 당뇨 등에 비해 오히려 더 높으며 동반되는 간접비용을 함께 고려하면 전체적인 손실은 이보다 훨씬 더 클 것으로 추정된다³⁾.

한의학 문헌을 살펴보면 《素問·五臟生成論》에 “腎之合骨”, 《素問·宣明五氣篇》에 “腎主骨”, 《素問·陰陽應象大論》에 “在體爲骨 在藏爲腎 …腎生骨髓”, 《素問·解精微論》에 “髓者骨之充也”, 《素問·六節臟象論》에 “腎者…其充在骨”이라 하여 뼈는腎이 주관하며 腎精이 충족하면 骨髓가 生長, 堅實해지고 髓는 骨을 자양하는데 骨髓가 充足하면 骨격을 强壯케 하지만 腎精이 虛少하여 骨髓의 化源이 부족해지면 骨격을 充分하게 滋養하지 못하여 骨에 병이 생길 수 있다고 인식하였다¹⁹⁾. 따라서 임상적으로 골다공증은

腎虛證에 속하는 것으로 보고 주로 補腎의 처방으로 치료하는 것이 일반적이며⁵⁾ 현재까지 골다공증에 효과가 있다고 보고된 처방으로는 六味地黃湯²⁰⁾, 當歸地黃飲²¹⁾, 青蛾地黃湯²²⁾, 增益歸茸湯²³⁾, 歸腎丸²⁴⁾, 羌活續斷湯²⁵⁾, 生血補髓湯, 滋陰八味煎, 加減獨活奇生湯, 加味左歸飲, 右歸飲, 丹梔逍遙散, 身痛逐瘀湯, 歸脾湯, 加味長身湯, 狗脊補骨湯, 雙和湯, 三氣飲加味方, 加味逍遙散 등이 있으며 補肝腎强筋骨의 효능을 가진 처방이 많다²⁶⁾.

골 재형성이 일어나기 위해서는 파골세포의 골흡수가 선행된 후에 조골세포가 새롭게 골형성을 하는데⁶⁾, 이 과정이 한의학의 祛瘀生新的 개념과 유사하다는 점에 착안하여 祛瘀生新하는 효능이 있는 혈부축어탕이 골다공증에 미치는 효과를 확인하고자 하였다.

혈부축어탕은 王淸任의 《醫林改錯》⁷⁾에 처음 기재된 처방으로 胸中의 瘀血로 인한 흉통, 두통, 심계정충 등을 치료할 목적으로 창방되어 현재 임상에서는 어혈로 인한 제반 증상에 다양하게 활용되고 있다. 처방 구성을 살펴보면 도인, 홍화, 당귀, 생지황, 천궁, 적작약, 우슬, 길경, 시호, 지각, 감초로 구성되어 있는데 活血化瘀하면서 補血의 효능이 있는 도홍사물탕에서 숙지황을 생지황으로 바꾸고, 行氣약인 사역산과 우슬, 길경을 가한 것으로 보여진다⁸⁾. 각 구성 약물별 효능을 살펴보면 당귀는 補血하면서 活血化瘀하고 생지황은 淸熱涼血하는 효능으로 당귀와 함께 養血潤燥하므로 祛瘀시키도 陰血을 손상시키지 않게 하고 천궁, 적작약, 도인, 홍화는 活血祛瘀하고, 우슬은 어혈을 祛하고 血脈을 통하게 하여 引血下行하면서 肝腎을 補養하여 强

筋骨하고, 시호는 疏肝解鬱, 길경과 지각은 開胸行氣하여 氣가 行하면 血이 行하게 되며 감초는 諸藥을 조화시킨다^{8,27)}. 종합하면 혈부축어탕은 血分の 瘀滯를 行하게 하는 약물이 주를 이루지만 氣分の 鬱結도 解하여 주며, 活血하면서도 耗血하지 않고 능히 祛瘀生新하는 효능이 있다⁸⁾.

이에 저자는 혈부축어탕이 파골세포 분화 및 골흡수에 미치는 영향을 알아보기 위하여 RANKL 유도 파골세포 분화를 측정하고, 관련 인자인 TRAP, MMP-9, cathepsin K, NFATc1, c-FOS, MITF, iNOS, COX-2, TNF- α 등의 유전자 발현을 측정하고, Bone pit 형성 정도를 현미경으로 관찰하였다.

먼저 약물의 독성으로 인한 세포손상 여부를 평가하기 위해 배양용 배지에서 미분화된 세포에 HBC를 농도별로 7일간 처리하여 배양한 결과, 800 mg/ml 이하 농도에서 세포생존율에 영향을 주지 않는 것으로 나타났다(Fig. 1).

전구파골세포는 증식-분화-융합-활성화 과정을 거쳐 골흡수 기능을 하는 활성 파골세포가 된다. 여러 사이토카인과 성장 인자들이 파골세포의 분화를 조절하고 있으며 RANKL-OPG 신호가 파골세포 분화에 중심적인 역할을 담당한다. 초기 파골전구세포 표면의 RANK에 RANKL이 결합하면 NF- κ B 전사경로를 활성화하여 파골세포의 증식과 분화가 촉진되고 골수에서 증식된 파골세포 전구체가 골 표면으로 이동하여 융합과정을 거쳐 활성 파골세포가 된다. 활성 파골세포는 골 표면에 부착한 뒤 주름경계 밑의 소강에 H⁺, MMP-9, cathepsin K를 분비하고, 분비된 수소이온으로 인해 소강에 산성화가 일어나면 기질분해효소가 활성화

화되고 골의 탈무기질화가 일어난다. 이후 여러 가수분해 효소에 의해 남아있는 유기질의 분해가 일어나는데 이 과정에 콜라겐 분해 효소인 MMP-9와 제 1형 콜라겐의 분해에 관여하는 시스테인 단백질 분해 효소인 cathepsin K가 관여한다. 분해된 골 기질은 파골세포 내로 이입되고 주름경계의 반대편으로 유리되므로 지속적인 골흡수가 일어나게 된다^{2,6)}.

파골세포의 분화과정 중 TRAP이 발현되는데 TRAP은 골 기질내의 osteopontin과 bone sialoprotein 단백질의 탈인산화 과정에 관여하며 파골세포의 활성화와 분화를 나타내는 표지자로도 사용된다⁶⁾. HBC가 파골세포 형성에 미치는 영향을 평가하기 위하여, RANKL로 유도한 파골세포 형성 시 나타나는 TRAP(+) MNCs 형성을 평가하였다. HBC는 150 μ g/ml 농도에서는 효과를 나타내지 않았으나, 350 μ g/ml 처리군에서는 TRAP(+) MNCs 형성이 약 19% 감소하여 유의성 있는($p < 0.05$) 억제효과를 나타내었으며, 700 μ g/ml 처리군에서는 TRAP(+) MNCs 형성이 약 46% 감소하여 유의성 있는($p < 0.01$) 억제효과를 나타내었다(Fig. 2). 따라서 HBC는 미분화세포를 손상시키지 않으면서 파골세포의 분화를 억제하는데 효과가 있다고 생각된다.

HBC가 파골세포 형성 시 나타나는 TRAP의 발현에 미치는 영향을 평가하기 위하여 TRAP의 mRNA 생성량을 측정하여 비교한 결과 RAW 264.7 cell에 RANKL 처리 시 TRAP의 발현은 현저히 증가되었다. RANKL 처리 후 HBC를 농도별로 처리하여 RANKL 단독 처리군과 비교했을 때 HBC 150 μ g/ml 농도군에서는 TRAP 발현이 오히려 증가

하였으나 유의성이 없었고, HBC 350 $\mu\text{g/ml}$ 농도군에서는 TRAP 발현을 약 27% 억제하였으며 유의성이($p<0.01$) 있었고, HBC 700 $\mu\text{g/ml}$ 농도군에서는 약 58% 억제하였으며 유의성이($p<0.001$) 있었다(Fig. 3).

HBC가 MMP-9의 발현에 미치는 영향을 평가하기 위하여 MMP-9의 mRNA 생성량을 측정하여 비교한 결과 RAW 264.7 cell에 RANKL 처리 시 MMP-9의 발현은 현저히 증가되었다. RANKL 처리 후 HBC를 농도별로 처리하여 RANKL 단독 처리군과 비교한 결과 HBC 처리 시 MMP발현이 150 $\mu\text{g/ml}$ 농도군에서는 유의하게($p<0.01$) 약 58% 억제되었으며, 350 $\mu\text{g/ml}$ 농도군에서는 유의하게($p<0.001$) 약 76% 억제되었고, 700 $\mu\text{g/ml}$ 농도군에서는 유의하게($p<0.001$) 약 85% 억제되었다(Fig. 4).

HBC가 cathepsin K의 발현에 미치는 영향을 평가하기 위하여 cathepsin K의 mRNA 생성량을 측정하여 비교한 결과 RAW 264.7 cell에 RANKL 처리 시 cathepsin K의 발현은 현저히 증가되었다. RANKL 처리 후 HBC를 농도별로 처리하여 RANKL 단독 처리군과 비교한 결과 HBC 처리 시 cathepsin K 발현이 150 $\mu\text{g/ml}$ 처리군에서는 유의하게($p<0.01$) 약 48% 억제되었고, 350 $\mu\text{g/ml}$ 처리군에서는 유의하게($p<0.01$) 약 61% 억제되었으며, 700 $\mu\text{g/ml}$ 처리군에서는 약 93%의 억제효과가 유의성 있게($p<0.001$) 나타났다(Fig. 5). 이는 HBC가 활성화된 파골 세포가 분비하는 MMP-9와 cathepsin K의 발현을 억제하는 효과를 나타낸 것으로 HBC는 파골세포의 활성을 억제하는 효능이 있다고 사료된다.

파골세포의 분화는 분화와 관련된 MITF,

AP-1, NFATc1 등의 전사인자들의 순차적 발현에 의해 결정된다⁶⁾. 본 연구에서는 파골세포에 분화과정에 관여하는 인자들의 유전자 발현을 측정하여 HBC의 작용기전을 확인하고자 하였다.

NFATc1은 파골세포 분화에 중요한 RANK 신호의 하위인자이며 Fos/Jun 단백질의 표적 유전자로 최종분화단계 동안 NFATc1이 TRAP 또는 칼시토닌 수용체 같은 파골세포 특이적 유전자를 c-Fos와 함께 상승적으로 활성화 시킨다⁶⁾.

HBC가 NFATc1의 발현에 미치는 영향을 평가하기 위하여 NFATc1의 mRNA 생성량을 측정하여 비교한 결과 RAW 264.7 cell에 RANKL 처리 시 NFATc1의 발현은 현저히 증가되었다. RANKL 처리 후 HBC를 농도별로 처리하여 RANKL 단독 처리군과 비교한 결과 HBC 처리 시 150 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 효과가 없었으나, 350 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 약 53% 감소하여 유의한($p<0.01$) 억제효과를, 700 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서는 약 82% 감소하여 유의한($p<0.001$) 억제효과를 나타냈다(Fig. 6).

c-Fos는 c-Jun과 이합체를 이루어 골대사에 중요한 역할을 하는 전사인자인 AP-1 단백질이 되는데 c-Fos 결핍 시 파골세포 형성이 결손되어 골화속증을 포함한 다면발현성의 결여를 초래하고 골수 대식세포 수가 증가하는 현상을 보인다⁶⁾.

HBC가 c-Fos의 발현에 미치는 영향을 평가하기 위하여 c-Fos의 mRNA 생성량을 측정하여 비교한 결과, RAW 264.7 cell에 RANKL 처리 시 c-Fos의 발현은 현저히 증가되었다. RANKL 처리 후 HBC를 농도별로 처리하여 RANKL 단독 처리군과 비교한 결과 HBC 처리 시

150 µg/ml 농도에서는 유의적인 감소 효과가 없었으나, 350 µg/ml 농도에서는 약 77%, 700 µg/ml 농도에서는 약 79% 감소하여 유의한($p < 0.001$) 억제효과를 나타냈다(Fig. 7).

파골세포에서 M-CSF과 RANKL에 의해 유발되는 신호전달과정은 MITF 활성화를 유도하고 MITF는 다른 전사인자(PU.1, NFATc1)와 함께 결합하여 파골세포 특이적 유전자인 TRAP, cathepsin K, OSCAR 유전자 발현을 상승적으로 증가시킨다⁶⁾.

HBC이 MITF의 발현에 미치는 영향을 평가하기 위하여 MITF의 mRNA 생성량을 측정하여 비교한 결과, RAW 264.7 cell에 RANKL 처리 시 MITF의 발현은 현저히 증가되었다. RANKL 처리 후 HBC를 농도별로 처리하여 RANKL 단독 처리군과 비교한 결과 HBC 처리 시 MITF의 발현이 150 µg/ml에서는 유의하게($p < 0.05$) 약 34% 감소하였고, 700 µg/ml 농도에서는 유의하게($p < 0.001$) 약 68% 감소하여 억제효과를 나타내었다(Fig. 8). 따라서 HBC는 파골세포 분화 과정에 필수적인 전사인자인 NFATc1, c-Fos, MITF의 발현을 억제하여 파골세포 분화를 억제한다고 사료된다.

파골세포는 완전히 분화된 후에 survival factor의 존재가 없으면 사멸하게 되는데 TNF- α 는 iNOS 발현을 증가시켜 NO의 생성을 유도하고 이때 생성된 NO는 TNF의 파골세포의 survival factor로서의 기능을 촉진하여 파골세포의 생존에 기여할 뿐 아니라 파골세포 분화를 촉진하여 염증성 골소실에 관여한다²⁸⁾. COX-2는 PGE2의 활성을 증가시키는데 PGE2는 파골세포의 분화를 촉진하고 파골세포

분화 억제인자인 OPG 발현은 억제하는 기능이 있다. 그러므로 COX-2 발현을 억제하면 파골세포의 분화를 억제할 수 있다²⁹⁾.

HBC이 파골세포 형성을 촉진하는 것으로 알려진 염증관련 인자의 발현에 미치는 영향을 평가하기 위하여 iNOS, COX-2, TNF- α 의 mRNA 생성량을 측정하여 비교하였다. RANKL 처리 시 염증 인자인 iNOS, COX-2, TNF- α 의 발현은 현저히 증가되었다. 그러나 HBC 처리 시 iNOS, COX-2, TNF- α 의 발현을 억제하는 효과는 없는 것으로 나타났다(Fig. 9, 10, 11).

파골세포의 골조직에서의 bone resorption에 대한 평가를 위하여 Bone pit 형성에 미치는 영향을 알아보기 위해 $\times 400$ 역상 현미경으로 뼈의 흡수를 관찰한 결과, 대조군과 비교하였을 때, HBC 350 µg/ml 농도군에서 RANKL로 자극된 파골세포의 Bone pit 형성이 억제되었으며, HBC 700 µg/ml 농도군에서는 현저하게 억제되었다(Fig. 12). 따라서 HBC는 골 흡수를 억제한다고 생각된다.

이상의 결과를 종합하여 보면 혈부축어탕 추출물은 MITF, c-Fos, NFATc1와 같은 파골세포 분화와 관련된 전사인자들의 발현을 억제하여 파골세포 분화를 억제하고 파골세포의 골흡수 과정에 필요한 TRAP, MMP-9, cathepsin K 등의 발현을 억제하여 골손실을 예방할 수 있을 것이라고 생각된다. 따라서 HBC는 향후 골다공증의 예방 및 치료를 위한 새로운 처방으로 고려해 볼 수 있을 것으로 사료된다.

수술 후 또는 이미 골다공증으로 인한 골절이 있어 장시간 외상 생활을 하는 환자는 활동에 제약을 받게 되어 강제적

침상 안정을 취해야 하는 경우가 많은데 신체 활동의 제약으로 氣血의 운행이 宣通하지 못하게 되고 瘀血이 정체된다. 이러한 경우 골밀도가 급격히 감소할 뿐 아니라 관절구축, 욱창, 심부정맥 혈전증, 폐색전증, 폐렴 등의 합병증에 이환될 수 있다¹⁾. 또한 골절의 초기에는 근맥이 손상되고 瘀血阻滯되고 腫脹疼痛하므로 活血化瘀 消腫止痛의 처방³⁰⁾을 활용하는 것이 일반적이다. 현재까지 골다공증에 효과가 있다고 발표된 처방은 많지만 혈부축어탕은 活血化瘀 효능이 특징적이므로 골절의 초기 치료, 장시간 외상 환자의 골다공증 예방 또는 어혈병증을 동반한 환자의 골다공증의 예방 및 치료에 활용한다면 더욱 효과적일 것으로 생각된다.

V. 결 론

혈부축어탕 추출물(HBC)이 파골세포 분화 및 활성을 억제하여 골 재흡수를 억제하는지 평가하기 위하여, RANKL 유도 파골세포 분화와 관련 인자들의 유전자 발현 및 Bone pit 형성에 미치는 영향을 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. HBC은 RANKL 유도 파골세포의 형성을 억제하였다.
2. HBC은 RANKL 유도 파골세포에서 TRAP의 발현을 억제하였다.
3. HBC은 RANKL 유도 파골세포에서 MMP-9, cathepsin K의 발현을 억제하였다.
4. HBC은 RANKL 유도 파골세포에서

NFATc1, MITF, c-Fos의 발현을 억제하였다.

5. HBC은 RANKL 유도 파골세포에서 염증관련 인자인 COX-2, iNOS, TNF- α 발현에는 영향을 주지 못했다.
6. HBC은 파골세포에 의한 Bone pit 형성을 억제하여 골 흡수를 억제하였다.

이상의 연구결과, 혈부축어탕 추출물은 RANKL 유도 파골세포 분화를 억제하고, 파골세포의 분화 및 기능 활성화에 관련된 유전자의 발현을 조절하여 골 흡수를 억제하는 것으로 나타나 골다공증의 예방 및 치료에 효과가 있을 것으로 사료된다.

Received : Oct 24, 2017

Revised : Oct 29, 2017

Accepted : Nov 17, 2017

References

1. Korean Society for bone and mineral research. Physician's guide for diagnosis & treatment of osteoporosis. Seoul:Ivy. 2015:1-4.
2. Vinay K, et al. Robbins Basic Pathology. 8e. USA:Elsevier Inc. 2007:804-6.
3. Kim JG, Choi H. Gynecologic Endocrinology. Seoul:Koonja publisher. 2012:515-20.
4. Kim YA. Osteoporosis or low bone mass in adults aged 50 years old and above in Republic of Korea, 2008-2011. Public health weekly report, KCDC. 2012;7(42):939-42.
5. Lee ES, Kim HK. Literature review

- of osteoporosis in oriental medicine. J of Oriental Rehabilitation Medicine. 1997;7(1):437-56.
6. Korean Society for bone and mineral research. Osteoporosis. Seoul:Koonja publisher. 2013:55-91.
 7. Wáng QR. Yī lín gǎi cuò. Seoul: Bubin publisher. 2016:66-71.
 8. Nationwide professors of Herbal formula study co-edit. The herbal formula study. Seoul: Yunglim publisher. 2008:410-3.
 9. Moon NY, Kim DC, Baek SH. Effect of *Hyulbuchukeotang* on the Inhibition of Proliferation of Uterine Leiomyoma cells and Cell apoptosis. J Korean Obstet Gynecol. 2016;19(2):186-98.
 10. Oh GS, Hong YW, Lee TK. The effect of *Heulbuchuketang* on endometriosis. J Korean Oriental Med. 1997;18(2):273-82.
 11. Bae SJ, Kim HJ, Lee DN. Effects of *Hyeolbuchukeo-tang* on the Estradiol Valerate-induced Polycystic Ovaries and the Conception of Rats. J Korean Obstet Gynecol. 2012;25(2):43-65.
 12. Lee BJ, et al. Effects of Concurrent Administration of *Hyeolbuchukeo-tang* and Aspirin on Atherosclerosis in the ApoE^(-/-) Mouse. J Korean Oriental Med. 2011;32(1):164-74.
 13. Cho EH, Kwon JN, Kim YG. Neuroprotective Effects of *Hyulbuchookau-tang* on Global Cerebral Ischemia of the Rats. J Korean Oriental Med. 2007;28(2):44-53.
 14. Jung YG, et al. Study on the regenerative and inhibitory effect of CT105-induced neuroblastoma cell lines by *Hyeolbuchukeo-tang* water extract. J of Oriental Neuropsychiatry. 2004;15(1):65-76.
 15. Lee JH, et al. Anti-metastatic Effects of *Xuefezhuyutang*. J of Kor Oriental Oncology. 1999;5(1):61-75.
 16. Lee MH, et al. Case Study of a Deep-vein Thrombosis Patient Treated with Combinatorial *Hyulbuchuko-tang*. J Int Korean Med. 2016;37(2):315-21.
 17. Kang JS, et al. The Effect of *Hyulbuchuko-tang* on a Case with Deep Vein Thrombosis (DVT) and Intracranial Hemorrhage (ICH). J Int Korean Med. 2009;30(2):438-49.
 18. Kim YY, et al. A case study of patient with Jung choong, Gyeong gye that improved by *Hyeolbuchukyeo-tang*. J of Oriental Neuropsychiatry. 2009;20(3):249-59.
 19. Nationwide professors of Physiology co-edit. Oriental Physiology. Seoul: Jipmoondang. 2008:299-300.
 20. Kanf HJ, Kim DI, Lee TK. A study on bone resorption & osteoporosis by *Yukmi-jihwang-tang-Jahage* extracts. J Korean Obstet Gynecol. 2003;16(1):1-17.
 21. Lee JJ. Effects of *Dangguijihwangyum* on the ovariectomized rat model of postmenopausal osteoporosis. J Korean Obstet Gynecol. 2004;17(1):111-28.
 22. Kim MS. Effect of *Chungajihwangtang* on Osteoporosis in Ovariectomized Rats. Kor J Herbology. 2003;18(2):49-58.
 23. Song YS, Lim HH. Effect of *Jeungikwiryon*

- tang* (*Tsengikueijung-tang*) on Bone Density and Bone Biochemical Markers in Osteoporotic Rats. *J Korean Oriental Med.* 2003;24(3):11-22.
24. Kim TH, et al. Effects of Guisinhwan on the Ovariectomized Rat Model of Postmenopausal Osteoporosis. *Korean J Oriental Physiology & Pathology.* 2004;18(5):1476-84.
25. Lee TJ, et al. Effects of Kangwhal-Sokdintang Extract on Osteoblast Function. *Kor J oriental Preventive Medical Society.* 2004;8(2):13-30.
26. Seo MS, et al. The Review on the Study of Osteoporosis in Korean Medicine Journals. *Journal of Korea CHUNA Manual Medicine for Spine & Nerves.* 2013;8(2):67-78.
27. Oriental medicine textbooks compiled by the national joint council. *Herbology.* Seoul:Younglim Inc. 2010:462-3, 629-31, 447, 231, 236-8, 466-7, 496-7, 186-7, 393-4, 583-5.
28. Lee SK, et al. Involvement of iNOS-dependent NO production in the stimulation of osteoclast survival by TNF-alpha. *Exp Cell Res.* 2004;298(2):359-68.
29. Coon D, et al. The role of cyclooxygenase-2 (COX-2) in inflammatory bone resorption. *J Endod.* 2007;33(4):432-6.
30. The Korean academy of oriental rehabilitation medicine. *The Oriental rehabilitation medicine.* Seoul:Koonja publisher. 2011:200-4.