구척보골탕 추출물이 뼈모세포의 증식 및 석회화에 미치는 영향

한덕희 · 강희정[1] · 안정조 · 조현경 · 유호룡 · 설인찬 · 김윤식*

대전대학교 부속한방병원 심계내과학교실, 1 : 단국대학교 첨단과학부 미생물학교실

Effect of *Gucheokbogol-tang* in Proliferation and Calcification of Osteoblast

Deok Hee Han, Hee Jeong Kang[1], Joung Jo An, Hyun Kyung Jo, Ho Rhyong Yoo, In Chan Seol, Yoon Sik Kim*

Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Daejeon University,
1 : Department of Microbiology, High Technology, Dankook University

This study was purpose to investigate that *Gucheokbogol-tang(GBT)*, mainly used in osteoporosis, has possible regulatory effect on bone regeneration by operating in proliferation and calcification of osteoblast. So that, their cytotoxicity and proliferation was investigated with MTT by ELISA, and morphological change was observed by optical microscope and electron microscope. And activation of alkaline phosphates(ALP) which is secreted in early stage of bone formation was measured, and accumulation of Ca^{2+} in the process of calcification was investigated by alizaline red S assay(ARS). The results were as follows: The MG-63 cell, originated from human cell was activated in 10^{-5} treated group, and the level of ALP was also increased in the treated group, highest on the third day. And from the outcome of ARS assay of calcification process in the *Gucheokbogol-tang(GBT)* treated group for 21days. These results suggested that *Gucheokbogol-tang(GBT)* is effective in proliferation and calcification of osteoblast.

Key words : osteoporosis, osteoblast, calcification, Ca^{2+}, MG-63, ALP, *Gucheokbogol-tang(GBT)*

서 론

뼈는 생체에서 에나멜질에 버금가는 단단한 조직으로 그 주성분은 I 형 콜라겐을 주체로 하는 유기질과 무기성분으로서 인산칼슘을 주체로 하는 하이드록시아파타이트의 결정으로 구성되어있다. 뼈 조직은 뼈의 형성에 관여하는 뼈모세포(osteoblast), 뼈세포(osteocyte)와 뼈흡수에 관여하는 파골세포(osteoclast)의 활발한 골형성과 골흡수가 반복해서 일어나 항상 대사되고 있으며 그 균형은 정밀하게 조절되고 있다. 골을 만드는 뼈모세포는 사이토카인이나 호르몬 등의 자극을 분화한 성숙 뼈모세포는 I 형 콜라겐, 오스테오폰틴이나 오스테오칼신 등의 골기질 단백질을 분비하고 석회화를 행한다. 또한 파골세포는 뼈를 흡수하기 위해서 특수화한 마크로파지 라고 할 수 있으며 M-CSF, RANKL(receptor activator of NF-kB ligand) OPG (osteoprotegerin)가 파골세포 형성과 기능에 중요하고 뼈의 리모델링에 필수적이다[1]. 그래서 정상 상태에서는 골량은 거의 일정하게 유지되고 있지만 뼈 형성과 흡수의 균형이 파괴되면 골다공증과 같은 질환이 발생 한다[2].

골다공증은 뼈의 형성보다 흡수가 늘어나 뼈 속이 비게 되는데 그 원인은 분명하지 않지만 성호르몬의 결핍, 비타민 D와 칼슘부족 등이 있으며 위험인자로는 고령자, 폐경후의 여성, 운동 부족, 저체중, 흡연, 칼슘 식이, 난소절제 등을 들 수 있다[3].

최근에 파괴된 골의 재생을 목적으로 조골세포 분화를 유도하는 성장인자에 대한 관심이 높아져 BMP(bone morphogenetic protein)에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 또한 한의학에서는 오래전부터 골 형성을 유도하는 녹용 및 홍화씨를 포함한 여러 약재들을 골다공증 치료에 이용해 왔다. 사슴의 뿔인 녹용은 계속 성장하여 이와 뼈를 튼튼하게 하여 골의 성장 및 석회화를 조절하는 성분이 함유되어 있다하여 골 단백질 기질의 발현 및 호르몬 변화에 관한 연구가 이루어져 있으며[4], 홍화씨에는 뼈의 주된 성분인 칼슘과 골세포를 서로 연결시켜주는 구리성분도 함유되어 있어 골절치료에 효과가 있다고 하였다[5].

본 연구에서는 최삼섭 교수님의 처방집에 있는 복방 한약제

* 교신저자 : 김윤식, 대전 중구 대흥동 22-5, 대전대부속한방병원 순환신경내과
· E-mail : yoonsik@dju.ac.kr, · Tel : 042-229-6806
· 접수 : 2007/11/12 · 채택 : 2007/12/30

인 구척보골탕이 실제로 뼈를 형성하는 조골세포의 증식과 광물화 과정에 작용하여 뼈 재생에 영향을 주는지 알아보기 위하여 시행하였다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약물

본 실험에 사용한 구척보골탕의 내용과 용량은 다음과 같다 (Table 1).

Table 1. The Compositions of Gucheokbogol-tang(GBT)

韓藥名	學名	用量(g)
甘草	*Glycyrrhiza uralensis radix*	2.0
薏苡仁	*Coix lacryma-jobi Linne*	12.0
龍眼肉	*Euphoria longan steud*	12.0
杜沖	*Eucommia uloides Oliver*	8.0
白茯苓	*Poria cocos*	8.0
黃芪	*Astragalus membranaceus*	8.0
骨碎補	*Drynaria fortunei J. Smith*	8.0
鬱金	*Curcuma langa L*	8.0
山藥	*Dioscorea japonica D. batatas*	8.0
芡仁	*Euryale ferox Salisb*	8.0
破古紙	*Psoralea corylifolia L.*	8.0
狗脊	*Cibotium barometz J. Smith*	8.0
麥門冬	*Liriope platyphylla tuber*	6.0
白朮	*Atracctylodes japonica kitag*	6.0
香附子	*Cyperus rotundus L.*	6.0
陳皮	*Citrus unshiu pericarpium*	4.0
天麻	*Gastrodia elata rhizoma*	4.0
砂仁	*Amomum villosum fructus*	4.0
當歸	*Angelicae gigantis radix*	4.0
白芍藥	*Paeonia japonica*	4.0
白何首烏	*Pleuropterus multiflorus Turcz*	4.0
Total Amount		140.0

2) 구척보골탕 추출물의 준비

총 21종의 한약재로 이루어진 구척보골탕 140 g를 초음파 세척기로 세척한 후 200 ml의 증류수를 넣어 121℃에서 2시간 동안 가열한 후 추출한 침전물을 3차례 여과(3 M filter paper)하고, 다시 121℃에서 15분 동안 멸균하여 원심 분리한 후 상층액을 DMEM 배지로 희석하여 -70℃ deep freezer에서 4시간 동안 방치하고, 24시간 동안 freeze dryer로 동결 건조하여 분말을 얻었다. 이를 통해 얻어진 각 분말의 중량을 측정하여 최종농도가 각각 $1:10^3$, $1:10^4$, $1:10^5$가 되도록 생리식염수에 희석하여 -50℃ 냉동고에 분주하여 냉동 보관하였다.

2. 실험방법

1) 세포 배양

인간 뼈모세포 유래인 MG-63세포를 10% FBS와 항생제가 포함된 DMEM 배지에서 단일 세포층이 형성될 때까지 2~3일 간격으로 배양액을 교환하면서 37℃, 5% CO_2 배양기에서 증식하였다.

2) 구척보골탕 약제가 MG-63 세포의 증식에 미치는 영향

(1) 세포활성도 측정

MG-63 세포를 0.025% Trypsin-EDTA(pH 7.2)로 떼어내어 trypan blue로 염색한 후 hemocytometer로 세포수를 세어 96 well plate의 각 well 당 2×10^3 cell이 들어가도록 분주하여 세포들이 부착할 수 있도록 1일간 37℃, 5% CO_2 배양기에서 배양하였다. 부착하지 않은 세포를 제거하기 위해서 배지를 제거하고 0.1 M PBS 완충용액으로 세척한 후 새 DMEM 배지로 갈아주고 구척보골탕 추출물을 $1:10^3$, $1:10^4$, $1:10^5$로 희석하여 각 well에 첨가하였으며, 배양 배지만 들어 있는 배지를 대조군으로 하여 3일 동안 배양하였다. 배양된 세포배양액에 20 ㎕의 MTT 용액(5 mg/㎖ in PBS)을 첨가하여 4시간 동안 배양한 후 배지를 제거하고 200 ㎕의 DMSO를 첨가하여 formazan 결정을 용해시키고 ELISA analyser를 plate를 넣고 595 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(2) 형태학적 관찰

(가) 위상차 광학 현미경을 통한 관찰

구척보골탕 약제를 넣어 세포활성을 보인 세포와 약제를 넣지 않고 자란 MG-63 세포의 형태를 살펴보기 위해 6 well plate의 각 well에 10^4 cell이 들어가도록 분주하여 1일 동안 배양한 후 세포활성도를 알아본 조건과 동일하게 구척보골탕 약제 추출물을 첨가한 후 3일 동안 배양하였다. 배양 후 세포 배양액을 버리고 PBS 완충용액으로 세척 한 후 위상차 광학 현미경으로 관찰하였다.

(나) 주사 전자 현미경(Scanning electron microscope:SEM)을 통한 관찰

세포의 내부구조를 자세히 알아보기 위해 전자 현미경으로 관찰하였다. 세포 활성도를 보인 구척보골탕 약제와 함께 배양된 MG-63 세포의 형태변화를 주사 전자 현미경으로 관찰하기 위해 먼저 24 well 배양용기에 cover slip를 깔고 MG-63 세포를 2×10^3 cell이 들어가도록 분주하여 1일 동안 배양 한 후 구척보골탕 약제를 $1:10^5$ 으로 희석하여 넣고 3일 동안 배양하였다. 배양 후 세포 배양액을 버리고 PBS 완충용액으로 세척한 후 2% glutaraldehyde로 1시간 고정한 후 1% OsO_4로 30분간 후 고정을 실시하고 0.1 M PBS (pH 7.4)로 깨끗이 수세하였다. 50%~100% ethanol로 탈수시킨 후 인공 건조제인 HMDS (hexamethyldislazene)로 건조시킨 후 금 스퍼터링으로 코팅 한 후 주사 전자 현미경으로 관찰하였다.

(다) 투과 전자 현미경(Transmission electron microscope : TEM)을 통한 관찰

세포의 내부 구조를 자세히 살펴보기 위해 6 well 배양 용기에 MG-63 세포를 1×10^4 cell이 들어가도록 분주하여 1일 동안 배양한 후 배양액을 버리고 세포 활성을 보인 약제와 함께 3일 동안 배양하였다. 배양 후 세포를 관찰하기 위해 TEM 고정액인 2.5% glutaraldehyde-1.5% paraformaldehyde 고정액에 1시간 고정 한 후 1% OsO_4 에서 후 고정을 실시하였다. 0.1 M PBS (pH 7.4)로 깨끗이 수세한 후 50%~100% ethanol로 탈수시킨 후 cell을 긁어내어 새 tube에 옮긴 후 100% ethanol과 propylene oxide를 1:1로 혼합된 용액에 20분간 두었다가 다시 propylene oxide만 들어 있는 용액에 20분 동안 처리하였다. 다시 resin과 propylene oxide가 1:1로 혼합된 용액에 2시간 두었다가 resin만 들어 있는 용액에 하룻밤 두었다. 세포들을 beem capsule로 옮긴 후 새 resin을 채워 60℃에서 2~3일 동안 중합시킨 후 전자현미경용 절편을 만들었다. LKB-V ultratome으로 1 ㎛ 두께의 절

편을 만들어 toluidine blue로 염색하여 광학현미경으로 세포부위를 확인한 후 60~70 nm 두께로 초박 절편을 만들었다. 각각의 절편을 만든 후 투과 전자 현미경으로 관찰하였다.

(3) 뼈모세포에의 Alkaline phosphatase(ALP) 측정

24-well 배양용기에 MG-63 세포를 2×10^3 cell/ml 이 되도록 분주한 후 10% FBS 가 첨가된 DMEM 배지에서 37℃, 5% CO_2 배양기에서 배양하였다. 1일 후 배지를 제거하고 구척보골탕 약제 추출물을 $1:10^3$, $1:10^4$, $1:10^5$이 되도록 배지와 함께 희석하여 첨가한 후 3일, 7일, 14일 동안 배양하였다. 배양 후 배지를 제거하고 0.025% trypsin-EDTA로 세포를 분리하여 3000rpm에서 4분간 원심 분리하였다. 상층액을 제거하고 PBS buffer (pH7.2)로 수세한 후 0.5% Triton X-100(in PBS) 250 ㎕를 첨가하여 lysis 시키고 freeze-and thaw를 3번 반복하여 세포막을 파괴한 후 50 ㎕의 세포 추출액에 기질 p-NPP (2 mg/ml)를 50 ㎕ 첨가하여 37℃에서 30분간 반응시켰다. 반응 후 2 M NaOH 100 ㎕로 반응 정지시킨 후 ELISA reader로 405 nm에서 흡광도를 측정하였으며 효소 활성은 p-nitrophenol를 기준으로 정량하였다. 총 단백질 양은 BSA(Bovine Serum Albumin)을 표준 단백질로 BCA protein assay kit를 사용하여 측정하였다.

(4) 뼈모세포의 석회화 결절에 미치는 영향(Mineralization assay)

석회화 결절 중 calcium은 calcium만 특이적 염색하는 Alizalin Red S에 의해 정량적으로 알 수 있으며 calcium 결절을 전자현미경으로 관찰하였다. 먼저 monolayer된 세포를 24-well 배양용기에 2×10^3 cell/ml 이 되도록 분주한 후 10% FBS, 1% antibiotic, 50 ㎍/ml ascorbic acid, β-glycerophosphate가 첨가된 DMEM 배지에 구척보골탕 약제를 $1:10^3$, $1:10^4$, $1:10^5$이 되도록 배지와 함께 희석하여 첨가한 후 3일마다 배지를 교환하면서 21일 동안 배양하였다. 배양 후 각 well의 배지를 제거하고 PBS buffer로 세척하여 5% formaldehyde로 실온에서 15분 고정한 후 40 mM AR-S(alizarin red-S) pH 4.2로 10분간 염색한 후 세척하였다. AR-S에 결합된 calcium이 녹아 나오도록 500 mM CPC(cetylpyridinium chloride) 용액에 1시간 담가둔 후 상층액을 595 nm에서 측정하였다. AR-S 농도는 AR-S standard curve를 사용하여 측정하였으며 총단백질 양은 BSA(Bovine Serum Albumin)을 표준 단백질로 BCA protein assay kit를 사용하여 측정하였다.

결 과

1. 구척보골탕이 뼈 모세포의 활성도에 미치는 영향

구척보골탕 약제를 첨가한 배양배지에 MG-63 세포를 3일 동안 배양한 후 MTT법을 이용하여 세포활성도를 측정하였다. Fig. 1에서 보는 것처럼 $1:10^5$로 희석한 구척보골탕 추출물을 첨가한 배지에서는 정상 배양배지에서 자란 MG-63 세포보다 세포 성장이 높게 나온 반면 $1:10^3$으로 희석한 약제에서는 대조군인 정상 세포에 비해 세포 성장이 현저하게 떨어져 보인다. 따라서 약제의 농도가 너무 높으면 세포 성장에 나쁜 영향을 미치는 것으로 관찰되었다(Fig. 1). 또한 약제를 넣지 않은 정상세포와 세포활성을 보인 $1:10^5$로 희석한 구척보골탕 약제를 넣은 세포의 형태학적 변화를 광학현미경과 전자현미경을 이용하여 형태의 변화를 살펴보았다.

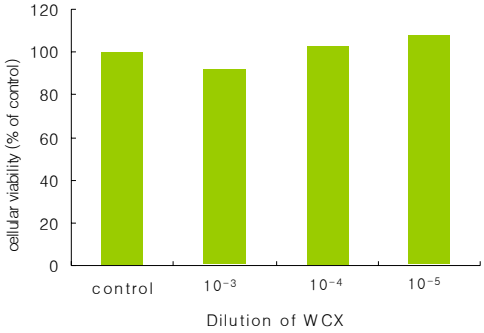

Fig. 1. Effects of GBT on the proliferation of MG-63 cells was determined by MTT assay.

2. 구척보골탕이 뼈모세포의 형태 변화에 미치는 영향

1) 광학현미경으로 살펴본 MG-63 세포의 형태학적 변화

구척보골탕 약제와 함께 배양된 뼈 모세포가 세포증식 후 형태에 어떤 영향을 미치는지를 광학 현미경으로 관찰하였다. Fig. 2a에서 보는 것처럼 약제를 첨가하지 않은 배양배지에서 자란 MG-63세포와 $1:10^5$로 희석한 구척보골탕 약제를 첨가한 배지에서 자란 세포(Fig. 2b)와 형태학적으로 별 차이가 없이 정상적인 모양을 띠며 수적으로도 차이가 없이 잘 자라 세포독성이 없는 것으로 보였다(Fig. 2).

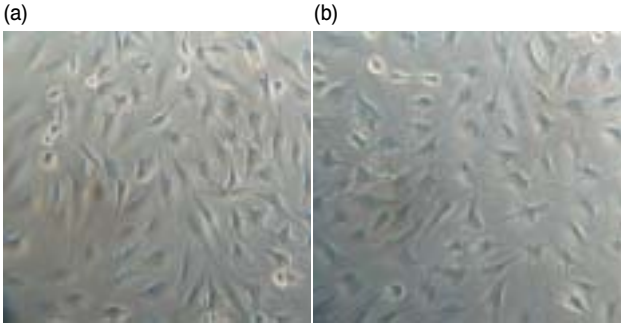

Fig. 2. LM images of normal MG-63 osteoblast cells(a) and incubated for 3 days in presence of GBT(b).

2) 전자현미경(SEM)으로 살펴본 MG-63 세포의 형태학적 변화

구척보골탕 약제를 넣고 함께 배양한 MG-63 세포와 약제를 넣지 않고 배양한 정상세포의 겉모습을 살펴보기 위해 세포 활성도를 측정한 조건과 동일하게 하여 주사전자현미경으로 관찰하여 보니 약제를 넣지 않은 정상세포(Fig. 3a)와 세포 활성도를 보인 $1:10^5$로 희석한 약제를 넣은 세포에서는 광학 현미경에서와 마찬가지로 정상적인 모습을 보였다(Fig. 3).

3) 뼈모세포에서의 Alkaline phosphatase(ALP) 측정

구척보골탕 약제를 넣고 3일, 7일, 14일 동안 배양한 후 ALP 활성을 살펴보았는데 Fig. 4에서 보이는 것처럼 3일에서 ALP 활성이 가장 높았으며 7일과 14일 때는 점차 효소 활성이 떨어지는

것을 알 수 있었다. 이는 ALP 효소가 뼈 모세포 분화초기에 영향을 미치는 효소 중의 하나이기 때문에 약제 처리 한 후 3일 배양한 후 측정 했을 때가 가장 높게 나타났다(Fig. 4).

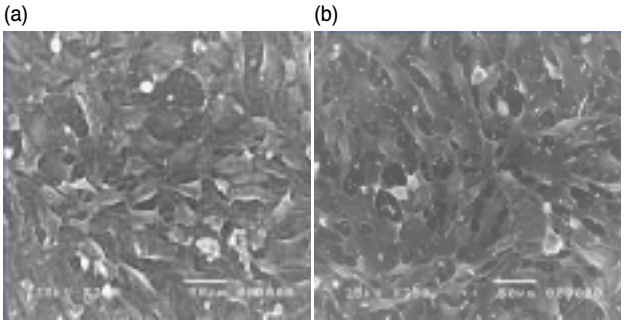

Fig. 3. SEM images of normal MG-63 osteoblast cells(a) and MG-63 osteoblast cells after 3 days of culture in presence of GBT(b).

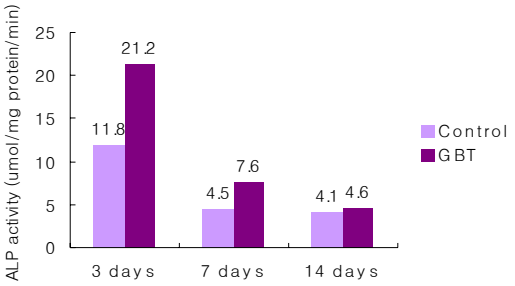

Fig. 4. ALP activities of osteoblast after treatment of GBT were compared with the control at 3, 7 and 14 days. ALP activity of osteoblast was markedly increased when MG-63 cells were cultured with GBT for 3 days.

4) 구척보골탕이 뼈모세포의 석회화 결절에 미치는 영향

21일 동안 mineralization을 calcium만 특이적으로 염색하는 alizarin red S에 의해 측정해 보니 구척보골탕 약제 추출물을 넣고 배양한 배지에서 약제를 넣지 않은 대조군에 비해 높게 나타났다(Fig. 5). 또한 구척보골탕 약제 추출물이 뼈 모세포의 세포 내 소기관과 석회화에 어떤 영향을 미치는지 알아보기 위해 투과 전자현미경을 이용하여 관찰하였다. TEM 사진에서 핵과 세포질 내의 세포 소기관들의 손상은 보이지 않고 석회화 결절로 보이는 물질들이 발견되었다(Fig. 6).

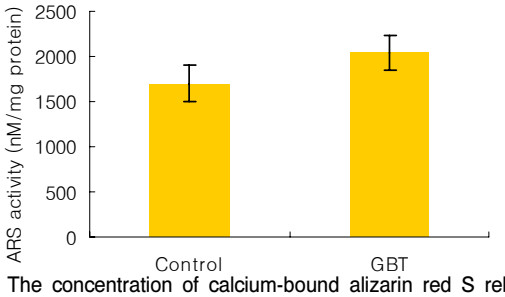

Fig. 5. The concentration of calcium-bound alizarin red S released from osteoblast cultured with GBT at 21days. It represents that GBT induced the deposition of calcium inside the osteoblast.

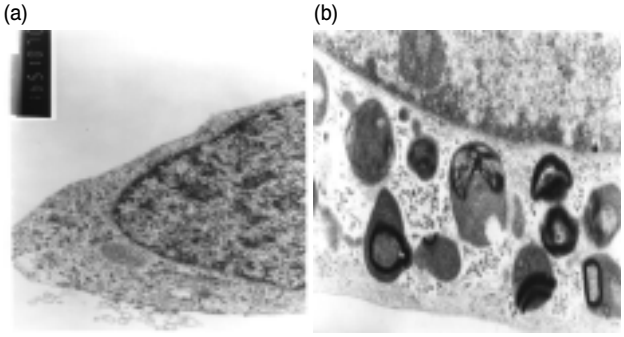

Fig. 6. TEM images of MG-63 osteoblast cells in presence of GBT at 4 days(a) and cells at 21days(b).

고 찰

골은 성체가 될 때까지 계속 성장하고 그 후에는 유지되며 나이가 들어감에 따라 골 량은 서서히 감소한다. 골 형성과 골 흡수의 균형은 매우 정밀하게 조절되고 있으며 여러 가지 사이토카인 작용하고 있지만 골 형성만을 촉진하는 사이토카인은 발견되지 않고 있지만 골 흡수를 담당하는 파골세포의 증식, 분화, 활성화에 M-CSF와 TNF 패밀리인 RANKL이 필수적이다. 즉 뼈 모세포에서 생산하는 M-CSF의 자극을 받아 조혈간세포에서 pro-파골세포로 분화한다. 골 흡수 인자에 의해 뼈 모세포 상에 RANKL이 발현 유도되고 pro-파골세포는 리셉터분자 RANK를 통하여 pre-파골세포로 분화되고 최종적으로 골을 흡수하는 성숙 파골세포로 분화한다. 또한 TNF 리셉터 패밀리인 OPG가 RANKL에 결합하면 파골세포 분화를 억제함으로써 골 대사를 제어하고 있는 중요한 분자라는 것을 알 수 있었다[6].

골세포의 분화는 골 기질 단백질 발현과 밀접한 관련이 있다. 골 기질 단백질 중 collagen, ALP(alkaline phosphatase) 및 osteopontin은 분화 초기에 발현되고 BSP(bone sialoprotein) 및 OC(osteocalcin)는 성숙한 조골세포에서만 발현이 된다[7]. 그 중 ALP는 유기인산 에스테르를 가수분해하여 석회화가 이루어지는 부위에서 국소적으로 인산이온의 농도를 증가시키는 효소로 세포외 기질에 calcium phosphate를 침착시킴으로써 석회화를 유도하는 기능을 갖는다[8].

따라서 뼈의 성장과 흡수는 뼈 모세포와 파골세포 조절에 의해 균형을 이루는데, 어린아이나 성장기 청소년은 뼈 모세포의 활성이 왕성하여 뼈의 성장이 이루어지고, 노인이나 폐경기 여성에서는 파골세포의 활성이 증가되어 뼈의 흡수에 의한 골다공증이 유발된다. 골다공증은 나이가 들어감에 따라 골량 감소가 병적으로 진행되는 1차성 골다공증과 다른 질환이나 약물에 의한 2차성 골다공증으로 대별되는데 1차성 골다공증은 폐경 후 골다공증과 노인성 골다공증으로 분류된다. 폐경 후 골다공증은 주로 에스트로겐 부족에 의해 뼈 모세포 활성보다 파골세포 활성이 비정상적으로 증가해 골 량이나 골 밀도가 감소한다. 노인성 골다공증은 노화에 의한 뼈의 손실로 70세 이후 남성과 여성 모두에서 발병된다. 한편 2차성 골다공증에서는 스테로이드 치료 부작용으로 일어나는 골다공증이 임상적으로 가장 문제가 된다.

기존의 연구에 있어 녹용 추출물에서 골 형성유도 인자인

BMP가 발현 된다고 하였고[9], 유윤정 등(2000)의 실험에서는 녹용추출물이 석회화결절 형성을 촉진하며 ALP, BSP 및 OC의 발현을 증가시키는 것으로 나타났다[10]. 또한 홍화씨는 골절과 골다공증 등의 골 질환에 탁월한 효과가 있다고 하였고[11], 홍화씨가 치주인대와 골세포의 활성도가 증가하였다는 보고[12]와 홍화씨 성분 분리 추출물이 치주인대세포와 조골모 유사세포의 골 석회화에 과정에 관여한다는 보고도 있었다[13]. 또한 Rehmannia glutinosa Libosch가 세포 활성도와 ALP 활성을 높인다는 보고[14]와 areca nut 추출물이 ALP와 RANKL의 발현을 조절한다는 보고도 있었다[15].

본 연구에 사용된 구척보골탕은 최삼섭 교수님이 임상에서 골절 및 골다공증 환자에게 많이 사용한 처방으로서 강근골시키는 금모구척, 골쇄보, 두충, 파고지 등을 군으로 삼고, 보혈을 위주로 하는 백작약, 당귀, 용안육 등을 좌로 삼았으며, 보음자음을 위주로 하는 산약, 하수오, 감인, 맥문동 등을 사로 삼아 자음익신하고 강근골하는 효능을 주로 하여 골의 모태가 되는 신수를 보하는 데 주안점을 둔 뼈의 생성과 관련된 대표적인 처방이다.

본 연구에서 세포활성도는 살아있는 세포의 미토콘드리아의 dehydrogenase에 의해 MTT formazan 형성 정도를 측정하였는데 약물을 처리하지 않은 대조군과 비교하여 $1:10^5$로 희석한 약물을 처리한 배지에서는 정상 배지에서 자란 MG-63 세포보다 세포활성도가 높게 나왔으나 $1:10^3$로 희석한 약물이 첨가된 배양배지에서 자란 세포는 대조군에 비해 낮은 세포활성도를 보였다. 또한 인간의 뼈 모세포 MG-63 세포를 구척보골탕 약제로 희석하여 함께 배양한 후 하여 광학 현미경과 전자현미경으로 관찰한 결과 $1:10^3$로 희석한 배양액에서는 핵이나 세포질부분이 부푼 모양으로 심하게 손상된 반면, 세포 활성도가 높게 나온 $1:10^5$로 희석한 약제와 함께 배양한 배양액에서는 정상적인 세포 형태를 띠고 있는 것을 알 수 있었다. 따라서 $1:10^5$가 가장 적절한 농도로 생각된다.

Alkaline phosphatase(ALP)는 뼈모세포 분화 초기에 발현하며 뼈의 석회화가 이루어지는 부위에서 국소적으로 인산이온의 농도를 증가시켜 세포외 기질에 calcium phosphate를 침착시킴으로써 석회화를 유도하는 효소로 알려져 있는데 본 연구에서는 배양초기인 3일에 ALP 수치가 제일 높게 나오다가 배양시간이 길어짐에 따라 수치가 줄어드는 것을 관찰할 수 있었다. 이는 ALP가 제거된 쥐 실험에서 정상적인 뼈 모세포가 분화되었어도 석회화가 이루어지지 않은 것으로 미루어[16] ALP가 뼈 모세포의 분화 초기 발현하여 초기 석회화 과정에 관여하며 석회화가 진행되면서 줄어드는 것으로 생각된다.

또한 석회화 과정을 살펴보기 위해서 배양 3일 후에 ascorbic acid와 β-glycerophosphate를 기본배지에 첨가하여 3일마다 배양액을 갈아주어야 하며, 14일 내지 21일 후에는 석회화 결절들을 형성 한다[17]. 석회화 결절은 phosphate만 특이적으로 염색하는 Von Kossa 염색법[18]과 calcium만 염색하는 Alizarin Red S(ARS) 염색법 두 가지로 관찰할 수 있는데 석회화가 이루어진 곳에서는 동시에 관찰된다. 본 실험에서는 기존의 calcium detection[19] 보다 더 민감한 ARS 염색법으로 염색 후 정량하여 더 정확하다고 볼 수 있는데[20], 구척보골탕 약제를 희석하여 처리한 배지에서는 자란 세포가 정상 배지에서 자란 MG-63 세포보다 석회화 결절 형성에 더 효과가 있는 것으로 나타났다.

결 론

본 연구를 통하여 $1:10^5$ 농도의 구척보골탕이 핵이나 세포질의 손상 없이 세포활성도를 유의하게 증가시키는 것을 알 수 있었으며, ALP 효소의 농도 또한 증가시킴으로써 뼈모세포의 증식 및 석회화를 유도하는 것을 알 수 있었다. 또한 ARS 염색 결과에서도 구척보골탕이 세포독성 없이 석회화 결절 형성에 의미있는 효과를 미치는 것으로 나타났다. 이와 같은 결과를 통해 구척보골탕이 골 형성능을 증가시키며 골다공증 치료제로도 효과가 높을 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Lacey, D.L., Timms, E., Tan, H.L., et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. Cell, 93: 165-176, 1998.
2. Kartsogiannis, V., Ng, K.W. Cell lines and primary cell cultures in the study of bone cell biology. J. Mol. Endocrinol. 228: 79-102, 2004.
3. Tuck, S.P., Francis, R.M. Osteoporosis. J. Postgrad Med 78: 526, 2002.
4. Barling, P.M., Gupta, D.K., Lim, C.E. Involvement of phosphodiesterase I in mineralization: histochemical studies using antler from red deer(Cervus elaphus) as a model. Calcif. tissue Int. 65: 384-389, 1999.
5. 이인우, 최진규. 홍화씨 건강법. 태일 출판사, pp 45-70, 1998.
6. Simonet, W.S., Lacey, D.L., Dunstan, C.R. et al. Osteoprotegerin : a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. Cell, 89: 309-319, 1997.
7. Yao, K.L., Todescan, R., Sodek, J. Temporal changes in matrix protein synthesis and mRNA expression during mineralized tissue formation by adult rat bone marrow cells in culture. J. Bone Miner. Res pp 231-240, 1994.
8. Beertsen, W., Theo, V.D.B. Calcification of dental collagen by cultured rabbit periosteum : The role of alkaline phosphatase. Matrix 9: 159-171, 1989.
9. Feng, J.Q., Chen, D., Esparza, J., Harris, M.A., Mundy, G.R., Harris, S.E. Deer antler tissue contains two types of bone morphogenetic protein 4 m RNA transcripts. Biochim. Biophys Acta 1263: 163-168, 1995.
10. 유윤정, 이현정, 임소형, 강정화, 이은희, 옥승호, 최봉규, 전길자. 녹용 추출물에 의한 MC3T3 세포의 분화촉진. 대한치주과학회지 30: 885-892, 2000.
11. 본초학. 동의학연구소, pp 319-320, 1993.

12. 두진수, 강정구, 유형근, 신형식. 생약제제가 세포활성도에 미치는 효과. 대한치주과학회지 27: 459-468, 1997.
13. 강정구, 유형근, 신형식. 홍화씨 추출물이 치주인대세포와 조골유사세포의 골 광물화 작용에 미치는 효과. 대한치주과학학회지 28: 475-489, 1998.
14. Oh, K.O., Kim, S.W., Kim, J.Y., Ko, S.Y., Kim, H.M., Baek, J.H., Ryoo, H.M., Kim, J.K. Effect of Rehmannia glutinosa Libosch extracts on bone metabolism. Clinica Chimica Acta 334: 185-195, 2003.
15. Ling, L.J., Ho, F.C., Chen, Y.T., Holborow, D.W., Liu, T.Y., Hung, S.L. Areca nut extracts modulated expression of alkaline phosphatase and receptor activator of nuclear factor kB ligand in osteoblasts. J. Clin Periodontol 32: 353-359, 2005.
16. Wennberg, C., Hessle, L., Lundberg, P., Mauro, S., Narisawa, S., Lerner, U.H. et al. Functional characterization of osteoblasts and osteoclasts from alkaline phosphatase knockout mice. J. Bone Miner. Res 15: 1879-1888, 2000.
17. Roth, J.A., Kim, B.G., Lin, W.L., Cho, M.I. Melatonin promotes osteoblast differentiation and bone formation. J. Biol. Chem. 274: 22041-22047, 1999.
18. Anselme, K., Broux, O., Noel, B., et al. In vitro control of human bone marrow stromal cells for tissue engineering, Tissue Eng. 8: 941-953, 2002.
19. Stanford, C.M., Jacobson, P.A., Eanes, E.D., Lembke, L.A., Midura, R.J. Rapidly forming apatitic mineral in an osteoblastic cell line (UMR 106-01 BSP). J. Biol. Chem. 270: 9420-9428, 1995.
20. Gregory, C.A., Gunn, W.G., Peister, A., Prockop, D.J. An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture : comparison with cetylpyridinium chloride extraction. Anal. Biochem. 329: 77-84, 2004.