

생약의 조골 세포 증식과 분화 검색

이준원*

배재대학교 과학기술바이오대학 생명유전공학과

Activity of Medicinal Plants on Proliferation and Differentiation of Osteoblasts

Junwon Lee*

Department of Life Science and Genetic Engineering, Paichai University, Daejeon, Korea, 302-735

Abstract – Osteoblasts play an important role in bone metabolism by bone formation. Natural medicines having a stimulatory activity on osteoblast proliferation and differentiation can improve bone diseases such as osteoporosis. The methanol extracts of 159 herbal medicines were screened for the stimulatory activity on osteoblast proliferation by MTT assay and differentiation in the presence of ascorbic acid and β -glycerophosphate. Among the tested extracts, *Alpiniae Semen*, *Amomi Semen*, *Ane-marrhenae Rhizoma*, *Bambusae Folium*, *Cannabis Semen*, *Dalbergiae odoriferae Lignum*, and *Luffae Fructus Retinervus* showed relatively strong stimulatory activity on osteoblast proliferation, whereas *Amomi Semen* showed strong stimulatory activity on osteoblast differentiation.

Key words – osteoblast, medicinal plants, osteoporosis, proliferation, differentiation, *Amomi Semen*

골은 골격으로서 체형을 만드는 물리적인 역할 뿐만 아니라 인체 칼슘의 99%, 인의 90%를 저장하고 있으며, 골수에서는 조절작용을 하는 중요한 기관이다. 일생 동안 일어나는 골조직의 활발한 대사는 파골세포 (osteoclast), 조골세포 (osteoblast)와 같은 뼈세포 (bone cell)의 골흡수와 골형성에 의해 골의 재형성과 항상성이 유지된다.^{1,2)}

조골세포는 골수에 존재하며 지방세포 (adipocyte), 연골세포 (chondrocyte), 근육세포 (myocyte) 등으로 분화할 수 있는 전구 세포인 중간엽 줄기세포 (mesenchymal stem cell)로부터 기원한다. 골의 재형성 과정은 활성 비타민, 호르몬, 그리고 국부적인 성장인자들을 포함하는 다양한 과정에 의해 이루어진다. 특히, 중간엽 줄기세포에서 조골세포로 분화는 bone morphogenetic protein (BMP)에 의하여 시작되며 *Cbfa1/Runx2* (Runt family transcription factor)라는 조골세포 특이 전사인자의 발현을 증가시킨다. *Runx2*는 현재까지 골의 형성과 재형성 과정 동안에 줄기세포가 조골세포로 성장하고 분화 하는 과정에 가장 필수적인 요소로 알려져 있다. *Runx2*는 조골세포의 분화에 필요한 osteopontin, bone sialoprotein, osteocalcin, alkaline phosphatase의 발현

을 조절한다.^{3,4)} 성숙한 조골세포는 결국 기질 안에 갇히게 되어 골세포 (osteocyte)로 분화하거나 세포자멸사 (apoptosis)에 의해 소멸된다.

세포자멸사 과정은 골의 발생과 재형성에 중요한 것으로 알려져 있다. 파골세포의 평균 수명은 2주, 조골세포의 평균 수명은 3개월로 알려져 있으며 이들 세포들 중 50% 이상이 세포자멸사에 의해 제거된다. 조골세포의 수명과 세포자멸사 정도는 골형성의 재형성에 중요한 인자가 된다. 노화가 진행될수록 중간엽 줄기세포의 결핍 및 기능 상실이 일어나고 체내에 산화스트레스가 증가하는 것으로 알려져 있다. H_2O_2 에 의해서 발생하는 산화스트레스는 caspase를 활성화시켜 조골세포의 사멸을 유도하는 것으로 여겨진다.⁵⁾ 또한, 노화와 관련 있는 부신피질호르몬 사용, 갑상선 증독증, 폐경 등에서 볼 수 있듯이 전신 호르몬이 골교체율에 영향을 주는 것으로 알려져 있다. 국소적으로는 파골세포의 분화에 중요한 요소인 tumor necrosis factor (TNF)-related activation-induced cytokine (TRANCE, RANKL)과 OPG (osteoprotegerin)의 발현 주체는 조골세포 이므로, 골대사 불균형은 일차적으로 조골세포의 기능저하 때문인지 파골세포의 분화와 뼈를 분해하는 활성이 증가한 것 때문인지에 대하여 많은 이론이 제기되고 있다. 세포 외로 분비된 OPG

*교신저자 (E-mail): junwon@pcu.ac.kr
(Tel): 82-42-520-5914

는 RANKL과 결합하고 기능을 억제함으로써 파골세포의 골흡수를 억제한다. OPG의 발현을 제거한 생쥐에게서는 골다공증과 동맥 내 석회화가 진행되고 파골세포의 생성이 증가되었다.⁴⁾ 조골세포 성장과 분화를 조절함으로써 파골세포의 분화를 조절할 수 있기 때문에 이러한 기본적인 골대사의 정보들은 골 질환 치료를 위한 신약후보 물질을 발굴하는 데에 중요한 단서를 제공해주고 있다.

현재 가장 흔히 골다공증 치료제로 사용되고 있는 비스포스포네이트 (bisphosphonate) 계열의 약제들은 실제로 골흡수를 억제하면 골흡수 과정은 빠르게 수주에 걸쳐 감소하지만 골형성 과정은 천천히 수개월에 걸쳐 감소하게 된다. 결국 골형성 과정도 억제되는 효과가 있으므로 여기에 부갑상선호르몬제 등과 같은 골형성 촉진제를 투여하면 골흡수 억제제와는 달리 2-3년 후에는 계속 골량이 증가하는 것으로 알려져 있다. 고령으로 갈수록 골소실은 조골세포의 숫자 및 기능 저하로 인한 골형성이 감소되어 발생하므로 골흡수를 억제하는 약제만으로는 치료가 불가능하다. 특히, 골다공증의 원인으로 폐경 후 골다공증, 비타민 D의 결핍으로 인한 이차성 골다공증과 더불어 가장 흔한 스테로이드로 인한 골다공증은 골형성의 감소가 원인이다. Glucocorticoid는 조골세포의 생성을 감소시키고 성숙된 조골세포의 세포사멸도 증가시킨다. 여러 가지 원인에 따라 다양하게 나타나는 골다공증은 그 원인에 따라 약제를 사용하여야 하지만 치료제의 부족이 현실이다. 따라서 골형성도 강력하게 촉진시키면서 골절을 예방할 수 있는 약제의 개발이 절실하다. 이러한 관점에서 최근에 연구자들은 glutaredoxin 5가 free radical을 제거하여 조골세포의 성장을 촉진하고 세포사멸사를 억제한다는 신호 전달 체계를 연구한 보고를 하였다.⁶⁾ 또한, 폐경기 골다공증의 치료법으로 시도되고 있는 에스트로겐은⁷⁾ 조골세포 내에서 ER (estrogen receptor) 수용체와 결합한 후 핵으로 이동하여 조골세포의 골대사에 관여하는 전사활성을 조절한다.⁸⁾ Isoflavone계 식물성 에스트로겐은 콩류에 많이 함유되어 있으며 이들 중 대두 추출물 성분인 genistein은 에스트로겐과 유사한 구조를 가지고 있어 에스트로겐 효과를 가지며 조골세포의 분화를 촉진하는 것으로 보고 되었다.⁹⁾

인체 내에서 전구 조골세포는 세포들의 증식이 멈춘 후에 골 특이적 alkaline phosphatase (ALP)를 표현하고 분화 조절 인자들인 osteocalcin, osteopontin, bone sialoprotein 등을 합성하게 된다. 이렇게 활성화된 조골세포는 ALP와 같은 효소의 합성을 통해 유기물인 뼈 기질 위에 칼슘과 인산의 염이 고도로 조직화된 hydroxyapatite 결정을 운반하고 축적시키게 해서 골 형성을 이루게 한다. 따라서, 조골세포의 염기성 인산 분해효소 활성도는 조골세포 분화의 표지인자라고 보고 되었고,¹⁰⁾ 이후에 많은 *in vitro* 실험에서 효율적으로 검정할 수 있는 방법으로 사용 되었다.⁸⁻¹⁵⁾ Mouse

calvaria로부터 유래한 MC3T3-E1 osteoblastic 세포는 생체 내에서 일어나는 조골세포의 증식, 분화, 석회화 등의 유사한 대사적인 특징을 가지고 있으며, 특히 세포막에 당단백질인 ALP를 가지고 있으므로 본 실험에서는 MC3T3-E1 osteoblastic cell을 이용하여 현재까지 미비한 천연물 유래의 생약에서 조골세포의 증식과 분화 촉진제를 개발해 보고자 일차로 methanol 추출물에 대한 조골세포의 증식과 분화 촉진 효과를 검정하였다.

재료 및 방법

시약과 조골세포의 배양 - 조골세포 배양에 필요한 α -Minimal essential medium (MEM), penicillin-streptomycin solution (5000 units/mL penicillin; 50000 μ g/mL streptomycin), fetal bovine serum (FBS)는 Gibco (Grand Island, NY, U.S.A)사에서 구입하였다. 조골세포 분화를 유도하기 위해 사용한 ascorbic acid와 β -glycerophosphate은 Sigma (St. Louis, MO, USA) 제품을 사용하였다.

MC3T3-E1 osteoblastic cell은 Lee 등의¹¹⁾ 방법을 참고하여 polystyrene 세포 배양 접시에 부착시키고 온도는 37°C를 유지하면서 5% CO₂를 계속 공급하며 습도는 95%을 유지시키고 2~3일마다 배양접시에서 70~80%의 세포수가 넘지 않도록 배양하였다.

세포증식 측정 - 생약 시료의 세포증식과 독성을 측정하기 위해 3 - (4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide (MTT) assay를 실시하였다. 조골세포는 96-well plate에 각 well당 5×10^3 cells/200 μ l 로 분주하고 24시간 배양 후 배지를 제거한다. 여기에 농도 별 생약 추출물이 혼합된 α -MEM 배지 200 μ l를 각 well에 첨가하여 48 시간 배양한다. MTT (5 mg/mL) 용액 10 μ l를 각 well에 첨가하고 5시간 동안 배양한다. 배양 후에 상등액을 제거하고 각 well에 100 μ l의 DMSO를 첨가하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포증식과 독성은 3회 반복 실험하여 대조군의 흡광도에 대한 시료의 흡광도를 백분율로 나타내었다.

ALP 활성 측정 - 조골세포는 96-well plate에 각 well당 1×10^4 cells/200 μ l 로 분주하고 24시간 배양 후 배지를 제거한다. 여기에 생약 추출물, ascorbic acid (25 μ g/mL), 그리고 β -glycerophosphate (10 mM)이 혼합된 α -MEM 배지 200 μ l를 첨가하고 7일 동안 배양한다. PBS로 세척하고 0.1% Trion X-100을 100 μ l 첨가하여 lysis하였다. 새로운 plate에 상등액 50 μ l와 100 mM p-nitrophenylphosphate (p-NPP, Sigma-Aldrich)를 첨가하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후 0.1 N NaOH 50 μ l로 반응을 중지시켜 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. ALP 활성은 3번의 반복 실험 후 대조군의 흡광도에 대한 시료의 흡광도를 백분율로 나타내었다.

생약 및 생약 시료의 조제 - 본 실험에 이용된 생약은 생명공학연구원 자생사업단에서 조제한 stock solution 시료를 구입하여 사용하였다. 건조한 시료 50 g을 methanol로 실온에서 7일간 추출한 후 40°C 이하에서 감압 농축하여 10 mg/mL 농도가 되도록 100% methanol에 녹여 stock solution으로 만들어진 시료를 일차 탐색에 사용하였다.

결과 및 고찰

본 실험에서는 159종의 식물 생약 methanol 추출물을 이용하여 MTT 방법으로 MC3T3-E1 세포의 증식과 세포독성을 측정하였고 강한 조골세포 증식 효과를 나타내는 추출물에 대하여 분화표지 효소인 ALP 활성을 조사하였다. 일차적으로 생약 시료를 최종농도 20 µg/mL에서 조골세포의 증식과 세포독성을 검색한 결과 *Alpiniae Semen* (익지인), *Amomi Semen* (사인), *Anemarrhenae Rhizoma* (지모), *Bambusae Folium* (죽엽), *Cannabis Semen* (마자인), *Dalbergiae odoriferae Lignum* (강진향), *Luffae Fructus Retinervus* (사과락)는 150% 이상의 조골세포 증식 촉진 활성을 나타내었다. *Aloe* (노회), *Ampelopsis Radix* (백렴), *Arecae Semen* (빈랑), *Artemisiae Argyi Folium* (애엽), *Artemisiae Iwayomogii Herba* (인진), *Astragali Radix* (황기), *Aurantii Fructus* (지각), *Caesalpiniae Lignum* (소목), *Ecliptae Herba* (한련초) *Lycii Fructus* (구기자)는 120% 이상의 조골세포 증식 촉진 활성을 나타내었다. (Table I) 일차 검색 결과 선정된 생약 시료 7종의 methanol 추출물을 희석하여 최종 농도 10 µg/mL, 5 µg/mL에서 조골세포의 증식을 측정하고 결과 7종의 모든 추출물에서 100% 이상의 조골세포 성장 활성을 나타내었다. (Table II) 이들 시료에 대하여 조골세포 분화표지 효소인 ALP 활성을 조사하기 위하여 ascorbic acid와 β-glycerophosphate가 혼합된 배지에 7종의 추출물을 각각 혼합하여 MC3T3-E1 세포에 7일 동안 처리 한 결과 최종농도 20 µg/mL에서 약 110%에서 130% 이상의 조골세포 분화를 증가시켰다. (Table III)

홍화씨 (safflower seeds)는 칼슘과 백금이 풍부하여 골다공증과 같은 골질환에 효능이 있다고 알려져 있으며, 홍화씨를 증류수로 100°C에서 2시간 가열하여 얻어진 증류액을 이용하여 분화활성을 측정할 결과 그 자체로 분화 활성과 조골세포 증식을 높였음이 보고 되었다.¹²⁾ 또한, 골쇄보 (*Drynariae Rhizoma*)¹³⁾, 당귀 (*Angelica sinensis*)¹⁴⁾, 토사자 (*Cuscuta chinensis*)¹⁵⁾의 증류액도 조골세포의 증식과 분화 활성을 증가시킨다고 보고 되었다. 그러나, 본 실험에서 methanol로 추출한 홍화씨, 홍화, 골쇄보, 당귀, 토사자의 추출물에서는 뛰어난 조골세포 증식 효과가 나타나지 않았다. 조골세포 증식과 분화 활성 검색을 통해 가장 뛰어난 활성을 보인 생약인 사인은 최근 연구에 따르면 에탄올과 물의

Table I. Survival rate of osteoblasts by the methanol extracts of natural plants

| Samples | | Survival rate (%) ^a | |
|---------|-------------------------------------|--------------------------------|----|
| 1 | <i>Acanthopanax Cortex</i> | 오가피 | 0 |
| 2 | <i>Achuranthis Radix</i> | 우슬 | 0 |
| 3 | <i>Aconiti Jaluencis Tuber</i> | 초오 | 0 |
| 4 | <i>Aconiti Tuber</i> | 천오 | -1 |
| 5 | <i>Acori Graminei Rhizoma</i> | 석창포 | 0 |
| 6 | <i>Actinidiae Caulis</i> | 미후(도)등 | 0 |
| 7 | <i>Actinidiae Fructus</i> | 미후도 | 0 |
| 8 | <i>Ailanthi Radicis Cortex</i> | 저근백피 | 0 |
| 9 | <i>Akebiae Caulis</i> | 목통 | 0 |
| 10 | <i>Alismatis Rhizoma</i> | 택사(토) | 0 |
| 11 | <i>Allii tuberosi Semen</i> | 구자 | 0 |
| 12 | <i>Aloe</i> | 노회 | +1 |
| 13 | <i>Alpiniae Officinari Rhizoma</i> | 고량강 | 0 |
| 14 | <i>Alpiniae Semen</i> | 익지인 | +2 |
| 15 | <i>Amomi Tsao-ko Fructus</i> | 초과 | 0 |
| 16 | <i>Amomi Cardamomi Fructus</i> | 백두구 | -1 |
| 17 | <i>Amomi Semen</i> | 사인 | +2 |
| 18 | <i>Ampelopsis Radix</i> | 백렴 | +1 |
| 19 | <i>Anemarrhenae Rhizoma</i> | 지모 | +2 |
| 20 | <i>Angelicae Dahuricae Radix</i> | 백지 | 0 |
| 21 | <i>Angelicae Gigantis Radix</i> | 당귀 | -1 |
| 22 | <i>Angelicae koreanae Radix</i> | 강활 | -1 |
| 23 | <i>Angelicae tenuissimae Radix</i> | 고본 | 0 |
| 24 | <i>Araliae Cordatae Radix</i> | 독활 | 0 |
| 25 | <i>Arctii Semen</i> | 우방자 | -1 |
| 26 | <i>Arecae Pericarpium</i> | 대복피 | 0 |
| 27 | <i>Arecae Semen</i> | 빈랑 | +1 |
| 28 | <i>Aristolchiae Fructus</i> | 마두령 | 0 |
| 29 | <i>Armeniacae Semen</i> | 행인(거피) | 0 |
| 30 | <i>Artemisiae Argyi Folium</i> | 애엽 | +1 |
| 31 | <i>Artemisiae Iwayomogii Herba</i> | 인진 | +1 |
| 32 | <i>Asiasari Radix</i> | 세신(근) | 0 |
| 33 | <i>Asparagi Tuber</i> | 천문동 | 0 |
| 34 | <i>Asteris Radix</i> | 자완 | 0 |
| 35 | <i>Astragali Radix</i> | 황기(토) | +1 |
| 36 | <i>Atractylodis Rhizoma</i> | 창출 | 0 |
| 37 | <i>Aurantii Fructus</i> | 지각 | +1 |
| 38 | <i>Aurantii Nobilis Pericarpium</i> | 진피 | 0 |
| 39 | <i>Bambusae Caulis in Taeniam</i> | 죽여 | 0 |
| 40 | <i>Bambusae Folium</i> | 죽엽 | +2 |
| 41 | <i>Belamcandae Rhizoma</i> | 사간 | 0 |

Table I. Continued

| Samples | | Survival rate (%) ^a |
|---------|-------------------------------|--------------------------------|
| 42 | Benincasae Semen | 동과자 0 |
| 43 | Biotae Orientalis Folium | 측백 0 |
| 44 | Bletillae Rhizoma | 백급 0 |
| 45 | Broussonetiae Fructus | 저실자 0 |
| 46 | Buddlejae Flos | 밀몽화 0 |
| 47 | Bupleuri Radix | 시호 -1 |
| 48 | Caesalpiniae Lignum | 소목 +1 |
| 49 | Cannabis Semen | 마자인 +2 |
| 50 | Carthami Flos | 홍화 0 |
| 51 | Carthami Semen | 홍화자 0 |
| 52 | Caryophylli Cortex | 정향수피 0 |
| 53 | Caryophylli Flos | 정향 0 |
| 54 | Cassiae Semen | 결명자 0 |
| 55 | Celosiae Semen | 청상자 0 |
| 56 | Chaenomelis Fructus | 모과(목과) 0 |
| 57 | Chaenomelis Langenariae Radix | 해당근 0 |
| 58 | Chelidonii Herba | 백굴채 0 |
| 59 | Chrysanthemi sibirici Herba | 구절초 0 |
| 60 | Chrysanthemi Flos | 감국 0 |
| 61 | Cibotii Rhizoma | 구척(금모구척, 초) 0 |
| 62 | Cimicifugae Rhizoma | 승마 0 |
| 63 | Cinnamomi Ramulus | 계지 0 |
| 64 | Cistanchis Herba | 육종용 0 |
| 65 | Citri tangerinae Semen | 귤핵 -1 |
| 66 | Cnidii Rhizoma | 천궁(토) 0 |
| 67 | Coicis Semen | 의이인 0 |
| 68 | Coptidis Rhizoma | 천황편 0 |
| 69 | Corni Fructus | 산수유 0 |
| 70 | Corydalis Tuber | 현호색 0 |
| 71 | Crassirhizomae Rhizoma | 관중 0 |
| 72 | Curculiginis Rhizoma | 선모 0 |
| 73 | Curcumae longae Rhizoma | 강황 -1 |
| 74 | Curcumae longae Radix | 울금 -2 |
| 75 | Cuscutae Semen | 토사자 0 |
| 76 | Cynanchi Radix | 백미 0 |
| 77 | Cynomorii Herba | 쇄양 0 |
| 78 | Cyperi Rhizoma | 향부자 0 |
| 79 | Dalbergiae odoriferae Lignum | 강진향 +2 |
| 80 | Dendrobii Herba | 석곡 0 |
| 81 | Desmodii Herba | 광금전초 0 |
| 82 | Dioscoreae Rhizoma | 산약 -1 |

Table I. Continued

| Samples | | Survival rate (%) ^a |
|---------|------------------------------|--------------------------------|
| 83 | Dipsaci Radix | 천속단 -2 |
| 84 | Drabae Semen | 정력자 0 |
| 85 | Drynariae Rhizoma | 골쇄보 0 |
| 86 | Echinopsis Radix | 누로 -1 |
| 87 | Ecliptae Herba | 한련초 +1 |
| 88 | Ephedrae Herba | 마황 0 |
| 89 | Ephedrae Radix | 마황근 0 |
| 90 | Equiseti Herba | 목적 0 |
| 91 | Eriobotryae Folium | 비파엽 0 |
| 92 | Erycibae Caulis | 정공등 0 |
| 93 | Eucommiae Folium | 두충엽 -1 |
| 94 | Eucommiae Ramulus | 두충지 0 |
| 95 | Euphorbiae kansui Radix | 감수 -1 |
| 96 | Evodiae Fructus | 오수유 0 |
| 97 | Fagopyri Semen | 교맥 0 |
| 98 | Farfarae Flos | 관동화 0 |
| 99 | Forsythiae Fructus | 연교 -1 |
| 100 | Fraxini Cortex | 목진피 0 |
| 101 | Gardeniae Fructus | 치자 0 |
| 102 | Gastrodiae Rhizoma | 천마 0 |
| 103 | Gentianae Macrophyllae Radix | 진범 0 (=진교) |
| 104 | Ginseng Radix | 인삼 0 |
| 105 | Gleditsiae Fructus | 조협 0 |
| 106 | Gleditsiae Semen | 조각인 0 |
| 107 | Gleditsiae Spina | 조각자 0 |
| 108 | Glycine Semen nigra | 흑두 0 |
| 109 | Glycyrrhizae Radix | 감초 -1 |
| 110 | Gossypii Semen | 면화자 -1 (=면실자) |
| 111 | Hedyotidis Diffusae Herba | 백화사설초 -1 |
| 112 | Hordei Fructus Germinatus | 맥아 0 |
| 113 | Hoveniae Lignum | 지구자나무 0 |
| 114 | Hydnocarpus Semen | 대풍자 0 |
| 115 | Illicii Veri Fructus | 팔각향 0 (대회향) |
| 116 | Imperatae Rhizoma | 모근 0 (백모근) |
| 117 | Inulae Flos | 선복화 0 |
| 118 | Inulae Radix | 토목향 0 |
| 119 | Isatidis Radix | 판랍근 0 |
| 120 | Kochiae Fructus | 지부자 0 |
| 121 | Ledebouriae Radix | 방풍 0 |

Table I. Continued

| Samples | | Survival rate (%) ^a |
|---------|--------------------------------|--------------------------------|
| 122 | Leonuri Herba | 익모초 0 |
| 123 | Licii Radicis Cortex | 지골피 0 |
| 124 | Ligustici Rhizoma | 천궁 0 |
| 125 | Ligustri Fructus | 여정실 0 |
| 126 | Lilii Bulbus | 백합 0 |
| 127 | Linderae Ramulus | 황매목 0 |
| 128 | Lini Semen | 아마자 (아마인) 0 |
| 129 | Lithospermi Radix | 자초 0 |
| 130 | Longanae Arillus | 용안육 (말린 것) 0 |
| 131 | Lonicerae Flos | 금은화 -1 |
| 132 | Lonicerae Folium | 인동 0 |
| 133 | Loranthi Ramulus | 상기생 0 |
| 134 | Luffae Fructus Retinervus | 사과락 +2 |
| 135 | Lycii Fructus | 구기자 +1 |
| 136 | Lycopi Herba | 택란 0 |
| 137 | Lygodii Spora | 해금사 0 |
| 138 | Lysimachiae Foenumgraeci Herba | 영릉향 0 |
| 139 | Magnoliae Cortex | 후박 0 |
| 140 | Magnoliae Flos | 신이(화) 0 |
| 141 | Malvae Semen | 동규자 0 |
| 142 | Massa Medicata Fermentata | 신곡 0 |
| 143 | Maydis Stigma | 옥축서예 (옥발) 0 |
| 144 | Melandrii Herba | 왕불유행 0 |
| 145 | Meliae Cortex | 고련피 0 |
| 146 | Meliae Fructus | 천련자 0 |
| 147 | Melonis Calyx | 과체 0 |
| 148 | Menthae Herba | 박하 0 |
| 149 | Mori Folium | 상엽 0 |
| 150 | Mori Fructus | 상심자 0 |
| 151 | Mori Cortex Radicis | 상백피 0 |
| 152 | Morindae Radix | 파극천 (거심) 0 |
| 153 | Moutan Cortex Radicis | 목단피 0 |
| 154 | Mucunae Caulis | 계혈등 0 |
| 155 | Mume Fructus | 오매 0 |
| 156 | Myristicae Semen | 육두구 -1 |
| 157 | Nardostachyos Rhizoma | 감송향 0 |
| 158 | Nelumbinis Semen | 연자육 0 |
| 159 | Nepetae Spica | 헝개 -1 |

^aFinal concentration: 20 µg/ml; +2> 150%, +1> 120%, 0=120-80%, -1<80%, -2<50%.

Table II. Survival rate of osteoblasts by each concentration of natural plants

| Samples | Concentration ^a | |
|------------------------------------|----------------------------|---|
| | 10 | 5 |
| Alpiniae Semen (익지인) | +2 | 0 |
| Amomi Semen (사인) | +3 | 0 |
| Anemarrhenae Rhizoma (지모) | +2 | 0 |
| Bambusae Folium (죽엽) | +1 | 0 |
| Cannabis Semen (마자인) | +1 | 0 |
| Dalbergiae odoriferae Lignum (강진향) | 0 | 0 |
| Luffae Fructus Retinervus (사과락) | +1 | 0 |

^aUnit: µg/ml, Survival rate : +3> 140%, +2> 130%, +1> 120%, 0> 100%.

Table III. Osteoblasts differentiation by each concentration of natural plants

| Samples | Concentration ^a | |
|------------------------------------|----------------------------|----|
| | 20 | 10 |
| Alpiniae Semen (익지인) | +1 | 0 |
| Amomi Semen (사인) | +3 | +1 |
| Anemarrhenae Rhizoma (지모) | +2 | 0 |
| Bambusae Folium (죽엽) | +2 | 0 |
| Cannabis Semen (마자인) | +2 | 0 |
| Dalbergiae odoriferae Lignum (강진향) | +1 | 0 |
| Luffae Fructus Retinervus (사과락) | +1 | 0 |

^aUnit: µg/ml. ALP activity : +3> 130%, +2> 120%, +1> 110%, 0> 100%.

추출물이 수지상 세포 (Dendritic cells)의 면역 활성을 높였으며 동물모델에서 종양세포의 성장을 저해하였다고 보고되었다.¹⁶⁾ 또한, 사인의 증류 추출물은 alloxan에 의해 야기된 췌장의 베타 세포의 산화스트레스, 세포질내의 Ca²⁺, 그리고 DNA 절단을 저해함으로써 베타세포의 파괴를 방어하는 작용을 한다고 보고되었다.¹⁷⁾ 지금까지 알려진 바와 같이 사인 추출물의 세포 보호와 증식 효과는 뛰어나다. 따라서, 사인 추출물의 조골세포 증식과 분화 효과를 생화학적으로 증명하고 동물모델을 통한 골다공증 치료효과를 검증하여 치료제로써 응용할 수 있는 가능성을 제시할 필요가 있다. 이후에 추출물로부터 순수 물질을 분리 정제하여 조골세포 증식에 미치는 영향과 표적 분자를 연구하게 될 것이다.

또한, 본 실험에서 사인 이외에 생약에 대한 조골세포 증식과 분화 촉진 물질의 검색은 아직까지 미비한 상태이므로 향후에 조골세포가 관여하는 골다공증 등의 치료 약물들의 개발을 위한 기초연구로 활용될 수 있을 것이다.

결 론

생약 159종의 추출물로부터 조골세포의 증식과 분화 표지 효소인 ALP 활성 효과를 조사하였다. 그 결과 *Alpiniae Semen* (익지인), *Amomi Semen* (사인), *Anemarrhenae Rhizoma* (지모), *Bambusae Folium* (죽엽), *Cannabis Semen* (마자인), *Dalbergiae odoriferae Lignum* (강진향), *Luffae Fructus Retinervus* (사과락)는 150% 이상의 조골세포 증식 촉진 활성을 나타내었다.

감사의 글

본 논문은 2008학년도 배재대학교 교내학술연구 신진교수 연구비 지원에 의해서 수행된 결과로 연구비 지원에 감사 드립니다.

인용문헌

- Roodman, G. D. (2004) Mechanisms of bone metastasis. *N Engl J Med* **350**: 1655-1664.
- Lorenzo, J., Horowitz, M., and Choi, Y. (2008) Osteoimmunology: interactions of the bone and immune system. *Endocr Rev* **29**: 403-440.
- Ducy, P., Zhang, R., Geoffroy, V., Ridall, A. L. and Karsenty, G. (1997) *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* **89**: 747-754.
- Komori, T. (2006) Regulation of osteoblast differentiation by transcription factors. *J Cell Biochem* **99**: 1233-1239.
- Kikuyama, A., Fukuda, K., Mori, S., Okada, M., Yamaguchi, H. and Hamanishi, C. (2002) Hydrogen peroxide induces apoptosis of osteocytes: involvement of calcium ion and caspase activity. *Calcif Tissue Int* **71**: 243-248.
- Linares, G. R., Xing, W., Govoni, K. E., Chen, S. T. and Mohan, S. (2009) Glutaredoxin 5 regulates osteoblast apoptosis by protecting against oxidative stress. *Bone* **44**: 795-804.
- Yasui, T., Uemura, H., Takikawa, M. and Irahara, M. (2003) Hormone replacement therapy in postmenopausal women. *J Med Invest* **50**: 136-145.
- Sasaki-Iwaoka, H., Maruyama, K., Endoh, H., Komori, T., Kato, S. and Kawashima, H. (1999) A trans-acting enhancer modulates estrogen-mediated transcription of reporter genes in osteoblasts. *J. Bone Miner Res* **14**: 248-255.
- Pan, W., Quarles, L. D., Song, L. H., Yu, Y. H., Jiao, C., Tang, H. B., Jiang, C. H., Deng, H. W., Li, Y. J., Zhou, H. H. and Xiao, Z. S. (2005) Genistein stimulates the osteoblastic differentiation via NO/cGMP in bone marrow culture. *J Cell Biochem* **94**: 307-316.
- Stein, G. S., Lian, J. B. and Owen, T. A. (1990) Relationship of cell growth to the regulation of tissue-specific gene expression during osteoblast differentiation. *FASEB J.* **4**: 3111-3123.
- Lee, J. W., Kim, J. H., Kim, K., Jin, H. M., Lee, K. B., Chung, D. J. and Kim, N. (2007) Ribavirin enhances osteoclast formation through osteoblasts via up-regulation of TRANCE/RANKL. *Mol Cell Biochem* **296**: 17-24.
- Kim, K. W., Suh, S. J., Lee, T. K., Ha, K. T., Kim, J. K., Kim, K. H., Kim, D. I., Jeon, J. H., Moon, T. C. and Kim, C. H. (2008) Effect of safflower seeds supplementation on stimulation of the proliferation, differentiation and mineralization of osteoblastic MC3T3-E1 cells. *J. Ethnopharmacol* **115**: 42-49.
- Jeong, J. C., Lee, J. W., Yoon, C. H., Lee, Y. C., Chung, K. H., Kim, M. G. and Kim, C. H. (2005) Stimulative effects of *Drynariae Rhizoma* extracts on the proliferation and differentiation of osteoblastic MC3T3-E1 cells. *J. Ethnopharmacol* **96**: 489-495.
- Yang, Q., Populo, S. M., Zhang, J., Yang, G. and Kodama, H. (2002) Effect of *Angelica sinensis* on the proliferation of human bone cells. *Clin Chim Acta* **324**: 89-97.
- Yang, H. M., Shin, H. K., Kang, Y. H. and Kim, J. K. (2009) *Cuscuta chinensis* extract promotes osteoblast differentiation and mineralization in human osteoblast-like MG-63 cells. *J. Med Food* **12**: 85-92.
- Fukui, H., Mitsui, S., Harima, N., Nose, M., Tsujimura, K., Mizukami, H. and Morita A. (2007) Novel functions of herbal medicines in dendritic cells: role of *Amomi Semen* in tumor immunity. *Microbiol Immunol* **51**: 1121-1133.
- Lee, J. H., Park, J. W., Kim, J. S., Park, B. H. and Rho, H. W. (2008) Protective effect of *Amomi semen* extract on alloxan-induced pancreatic beta-cell damage. *Phytother Res* **22**: 86-90.

(2009년 7월 31일 접수)