대한한방부인과학회지
J Korean Obstet Gynecol
VOL.26 NO.3 : 033-043 (2013)

# 乾地黃 추출물이 Rat fetus 두개골로부터 분리한 조골세포에 미치는 영향

대전대학교 한의과대학 부인과교실
임규정, 최경희, 정은혜, 유동열

## ABSTRACT

### The Effect of Dried Roots of *Rehmannia glutinosa* Extract on Osteoblast in Rat Fetus Calvarial Cells

Kyu-Jung Im, Kyung-Hee Choi, Eun-Hye Jung, Dong-Youl Yoo
Dept. of Korean Gynecology, College of Korean Medicine,
Dae-Jeon University

**Objectives:** Osteoporosis is characterized by bone loss and morbidity with osteoporotic fracture. In this study, the author aimed to evaluate the effect of dried roots of *Rehmannia glutinosa* extract (RGE) on osteoblast proliferation in murine calvarial cells.

**Methods:** The osteoblast separated from murine calvariae was cultivated for 6 days and evaluated the cell function. After the addition of RGE on the culture medium, we determined the effect of RGE on the cell viability, cell proliferation, protein synthesis, alkaline phosphatase activity, collagen synthesis and calcified nodule formation of the cultivated osteoblast.

**Results:** The results were summarized as follows.
1. RGE did not change the survival rate of rat calvarial osteoblast.
2. RGE increased the proliferation of rat calvarial osteoblast.
3. RGE increased ALP activity of rat calvarial osteoblast.,
4. RGE slightly affected protein synthesis of rat calvarial osteoblast.
5. RGE increased collagen synthesis of rat calvarial osteoblast.
6. RGE slightly affected calcified nodule formation of rat calvarial osteoblast.

**Conclusions:** From these results, it is concluded that RG might improve the osteoporosis resulted from augmentation of osteoblast proliferation.

**Key Words:** *Rehmannia glutinosa*, Osteoblast, Osteoporosis, Osteoblastogenesis, Rat fetus calvarial cell

Corresponding author(Dong-Youl Yoo) : 75, Daedeok-daero 176beon-gil, Seo-gu, DaeJeon, Dunsan oriental hospital of DaeJeon University
Tel : 042-470-9139 E-mail : ydy1010@dju.kr

# Ⅰ. 서 론

골다공증은 골 강도의 감소로 인한 골절 위험이 증가되는 상태를 말한다. 골조직의 감소는 뼈의 미세구조악화와 관련되어 있는데 WHO에서는 같은 성별에서 건강한 젊은 성인 평균의 표준편차 -2.5(T<-2.5)이하를 골다공증으로 정의내리고 있다. 또한 폐경여성에서는 T<-1.0 상태의 집단을 골다공증 위험을 갖고 있는 낮은 골밀도군으로 정의하고 있다[1].

골다공증은 주로 노인층에서 빈발하는 생체노화현상의 하나로 폐경기 여성 및 부신피질 호르몬을 장기 투여하는 환자에게서 많이 발생하고 있으며, 골량의 감소와 골 조직 미세구조의 이상으로 심한 충격 없이도 쉽게 골절상을 입는다. 게다가 매년 많은 수의 노인이 낙상하고 그들 중 일부는 심각한 신체손상을 입는 것으로 알려져 있는데, 그 대부분은 골절상해로 인한 것이다. 이는 장기간의 활동 제한에 따르는 경제적 손실로 사회적, 의학적으로 큰 문제를 야기하고 있다. 현재 한국에서 골다공증 환자는 200만 명 이상이며, 노인층 사망 원인의 약 15%를 차지하는 골절의 원인이 된다고 추정되고 있다[1,2].

일반적으로 뼈에서는 칼슘의 흡수와 침착과정이 균형을 이루고 있으나, 골다공증 환자의 뼈에서는 골 침착의 감소와 골 흡수의 증가로 인한 골대사의 불균형이 나타난다. 이러한 골량 감소는 30대 초반부터 시작된다. 따라서, 골다공증을 치료 또는 예방하기 위해서는 조골세포의 기능을 활성화시키거나, 파골세포 기능을 억제할 필요가 있다[3-6].

한의학에서 골은 ≪素門·五臟生成論≫[7]에 "腎의 合은 骨이다."고 하였고, ≪素門·宣明五氣論≫[7]에는 "五臟은 각기 그 주관하는 바가 있는데, 腎은 骨을 주관한다."고 하였으며 ≪素門·六節藏象論≫[7]은 "腎은 그 충만함이 骨에 있다."고 하여 腎과 骨과의 밀접한 관계를 말해왔다. 또 ≪素門·逆調論≫[8]에선 "腎者水也, 而生于骨, 腎不生卽髓不能滿" 이라고 하여, 腎水가 骨을 만드는데 그렇지 못하면 骨髓가 채워질 수 없다고 하였다. 결국 腎이 骨髓를 충족하면 骨格이 强壯하지만, 腎이 虛損하여 骨髓의 化源이 부족하면 骨格이 충분히 영양을 받을 수 없다. 따라서, 腎이 虛弱해지면 骨과 骨髓도 약해지며 골다공증이 유발되는 것으로 볼 수 있다[9].

地黃(*Rehmannia Glutinosa*)은 현삼과(Scrophulariaceae)에 속하는 다년생 숙근초로 性凉無毒하고 甘苦하며, 心·肝·腎으로 귀경하여 養陰生津, 淸熱凉血의 효능이 있는 대표적인 補陰약재이다. 地黃의 근엽과 잔뿌리를 제거하고 흙을 깨끗이 씻어 말린 것을 乾地黃이라고 하는데, 滋陰凉血의 효능이 있어 陰虛發熱, 消渴, 吐血, 鼻出血, 血崩, 月經不順, 陰虛便秘 등의 치료에 사용되고 있다[10-12]. 최근에는 地黃 추출물이 항 당뇨작용과 강심작용, 항균작용, 간 보호 작용 등이 있음이 보고되었다[13].

골다공증에 대한 기존 연구로는 冬蟲夏草, 鹿茸, 杜仲, 五味子, 白朮, 木香, 覆盆子 추출물이 골다공증 형성과정의 한 축인 파골세포 분화를 억제 할 수 있다고 보고한 바 있다[14-19]. 하지만 乾地黃이 파골세포나 조골세포에 미치는 영향에 대한 연구는 아직 접하지 못하였다.

이에 저자는 滋陰凉血의 효능이 있는 乾地黃이 골다공증에 효과적인지를 究明하고자, 乾地黃 에탄올 추출물이 조골세포의 생존율, 분열능, ALP 활성, 골 기질 단백질 합성, collagen 합성 및 calcified nodule 생성에 미치는 영향을 평가한 결과 유의한 성적을 얻었기에 보고하는 바이다.

## Ⅱ. 실 험

### 1. 재 료

1) 동 물

실험동물은 임신한 암컷 Sprague-Dawley (SD)系 rat를 대한 바이오링크에서 공급받아 실험실에서 적응시킨 후 사용하였다. 실험기간동안 고형사료와 물을 충분히 공급하여 자유롭게 섭취하도록 하였다.

2) 약 재

실험에 사용한 乾地黃(*Rehmannia Glutinosa*)은 대전대학교 둔산 한방병원에서 구입하여 엄선한 후 사용하였다.

### 2. 방 법

1) 검액 제조

乾地黃(*Rehmannia Glutinosa*) 100 g에 EtOH 500 ml를 가하고 6시간 이상 가열하여 환류 추출하였다. 그리고 여과지로 여과한 다음, 여액을 evaporator (EYERA, Japan)를 이용하여 감압 농축한 다음 동결 건조 시켜서 실험 대상에 적용할 때까지 냉동보관 하였다. 냉동 보관된 추출 분말을 배지에 녹인 후 pore size 0.45 μm의 여과지에 통과시켜 乾地黃 에탄올 추출물(*Rehmannia Glutinosa* extract, RGE)을 만들어 실험에 사용하였다.

2) Fetal calvarial cell 배양

임신 21일 된 쥐의 자궁을 절개하여 fetus를 꺼낸 후, 후두부를 절개하고 calvariae를 적출하였다. Calvariae에 붙어있는 결체조직을 제거하고, HBSS로 세척했다. Calvariae를 1.5 ml의 collagenase, trypsin, 0.5 mM EDTA 용액에 넣어 37℃에서 반응시켰다. 상등액을 취하여 500 rpm에서 원심분리하여 침전된 calvarial cell을 얻었다. PBS에 재현탁하여 1,500 rpm에서 원심분리하여 세척한 후, 이를 DMEM 배지에 넣어 현탁한 후 37℃, 5% $CO_2$에서 배양하였다. 상등액을 제거하고 남은 calvariae에 다시 1.5 ml의 효소를 넣고, 상기 반응을 수 회 반복하였다. 세포의 배지는 3일에 한 번씩 교환하였다. 배양한 세포는 2주 후 trypsin 처리하여 세포수를 측정한 후 실험에 사용하였다.

3) 검액 처리

실험은 3개 군, 즉 (1) 정상 대조군(Normal control, Control), (2) 정상 대조군에 1 μg/ml의 乾地黃 추출물을 투여한 군(RG1), (3) 정상 대조군에 10 μg/ml의 乾地黃 추출물을 투여한 군(RG10)으로 나누어 시행하였다.

4) 조골세포의 생존율 측정

RGE를 첨가하여 3일간 배양한 후 조골세포에 대한 MTT assay를 시행하였다. Cell suspension을 hemocytometer를 사용하여 counting한 다음, 96 well plate의 각 well에 cell 부유액 180 μl를 넣고, RGE를 PBS에 녹인 후 농도별로 20 μl씩 각 well에 첨가 한 후 incubation하였다. 3일 후 RGE를 제거하고, 각 well에

MTT solution을 100 μl씩 첨가하고 4시간 동안 incubation시킨 후 MTT 희석액을 조심스럽게 제거하였다. 각 well에 100 μl의 DMSO를 첨가하여 15-20분간 plate shaker로 흔들어 준 후, ELISA reader를 사용하여 wave length 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

5) 조골세포의 분열능 측정

Subculture를 통하여 조골세포가 $1\sim3\times10^5$ cells/well이 되도록 24 well plate에 seeding하였으며, 6일간 배양한 세포의 수를 세기 위하여 세포의 배지를 제거하고, HBSS로 세포를 세척하였다. 이후 collagenase, trypsin, 0.5 mM EDTA를 가하여 세포를 culture plate로부터 분리하였다. 세포를 isoton-2 solution을 이용하여 20배 희석한 후 세포계수기(Sysmax F-820)로 세포의 수를 측정하였다.

6) Alkaline phosphatase(ALP) 활성 측정

ALP 활성은 ALP-K Kit를 이용하여 측정하였다. 6일간 세포를 배양한 plate를 냉각한 PBS로 세척한 후 세포를 scraper로 긁어내어 leupeptin이 함유된 냉각된 PBS에 현탁하였다. 이 현탁액을 냉각상태에서 ultrasonicator로 sonication하고 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 원심분리한 후 상등액만을 0.56 M 2-amino-2-methyl-propanol, 1 mM $MgCl_2$, 10 mM p-nitrophenylphosphate를 함유한 반응액과 37℃에서 10분간 반응시켰다. 0.2 N NaOH 1 ml를 가하여 반응을 중단시킨 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

7) 골 기질 단백질 합성량 측정

10일간 세포를 배양한 plate를 PBS로 세척한 후 cell scraper를 이용해 세포를 긁어내어 5 mM dithiothreitol(DTT)이 함유된 PBS에 현탁하였다. 이 현탁액을 냉각상태에서 ultrasonicator로 sonication하였다. 현탁액을 취하여 뷰렛트 시약과 37℃에서 10분간 반응시킨 후 550 nm에서 흡광도를 측정하였다.

8) Collagen 합성량 측정

10일간 세포를 배양한 plate를 PBS로 세척한 후 cell scraper로 세포를 긁어내었다. 이를 5 mM dithiothreitol이 함유된 50 mM tris buffer에 현탁시킨 후에 ultrasonicator로 sonication 시켰다. 이후, 100,000 xg에서 30분간 원심분리하여 상등액을 제거한 후 pellet에 6 N HCl을 가하여 24시간동안 100℃에서 가수분해하였다. 이를 6 N NaOH로 중화시킨 후, 물을 이용하여 적정한 농도로 희석하였다. Hydroxy-proline은 amino acid analyzer를 이용하여 정량하였다.

9) Calcified nodule 생성 측정

세포를 21일간 배양한 후 냉각한 PBS로 washing하였다. Neutral buffered formalin (100 ml formalin, 16 g $Na_2HPO_4$, 4 g $NaH_2PO_4.H_2O$ in 1 ℓ)를 가하고, 15분간 고정시킨 후, PBS로 washing하였다.

Von Kossa's reagent(2.5 % silver nitrate in $H_2O$)를 가하여 상온에서 30분간 반응시켰다. 다시 washing 한 후 toluidine blue solution(0.1 % w/v in 30 % v/v ethanol)을 가하여 수초 간 반응시키고 PBS로 세척한 다음, 공기 중에서 건조한 후 형성된 nodule의 부피를 측정하였다.

### 3. 통계 분석

각 군과의 유의성 검증을 위하여 Student's t-test를 실시하여 통계처리하였고, $p<0.01$ 및 $p<0.05$인 경우 유의성이 있는 것으로 인정하였다.

# Ⅲ. 결 과

## 1. 조골세포의 생존율에 미치는 영향

RG의 세포독성을 평가하기 위하여 미분화된 세포에 RG를 첨가한 후, 3일간 배양한 후 MTT assay를 시행하였다. 실험결과 540 nm에서 측정한 O.D 값이 정상 대조군은 0.46이었다. 1 μg/ml의 RG를 처리한 경우에는 0.47이었고, 10 μg/ml의 RG를 처리한 경우에는 0.48로서 두 실험군 모두 조골세포의 생존율에 영향을 주지 않았다(Fig. 1).

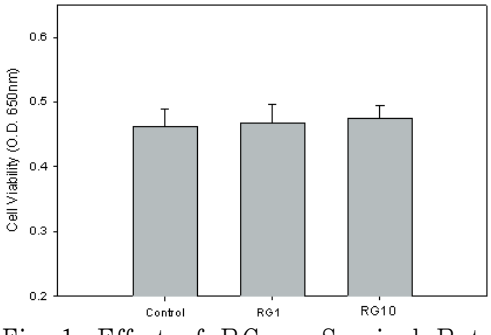


Fig. 1. Effect of RG on Survival Rate of Calvarial Cell.
Each bar represents Mean±SD of 6 cultured wells.
Control : vehicle(0.01 % DMSO)
RG1 : 1 μg/ml of RG
RG10 : 10 μg/ml of RG

## 2. 조골세포 분열능에 미치는 영향

Rat fetus의 두개골로부터 분리한 조골세포를 RG 처리 후 6일간 배양한 결과, 정상 대조군의 조골세포는 $3.42\times10^5$ cells/well 이었고, 1 μg/ml의 RG를 처리한 경우에는 $3.63\times10^5$ cells/well이었다. 10 μg/ml의 RG를 처리한 경우에는 $3.95\times10^5$ cells/well로서 정상 대조군에 비해 유의성 있게($p<0.05$) 증가하였다(Fig. 2).

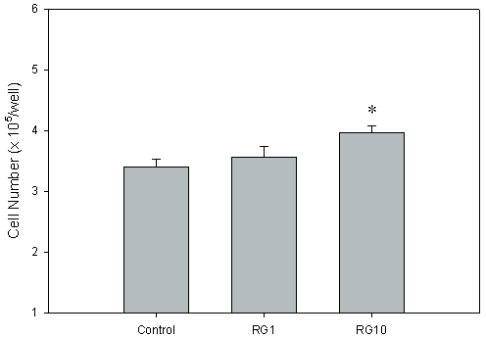


Fig. 2. Effect of RG on Cell Proliferation of Rat Calvarial Cell.
Each bar represents Mean±SD of 6 cultured wells.
Control : vehicle(0.01 % DMSO)
RG1 : 1 μg/ml of RG
RG10 : 10 μg/ml of RG
* : $p<0.05$ vs Control by Student's t-test

## 3. ALP의 활성에 미치는 영향

Rat fetus의 두개골로부터 분리한 조골세포를 RG 처리 후 6일간 배양한 결과, ALP 활성은 정상 대조군에서 21.9 unit/ml 이었고, 1 μg/ml의 RG를 처리한 경우에는 22.7 unit/ml이었다. 10 μg/ml의 RG를 처리한 경우에는 24.8 unit/ml로서 정상 대조군에 비해 ALP 활성이 유의성 있게($p<0.01$) 증가하였다(Fig. 3).

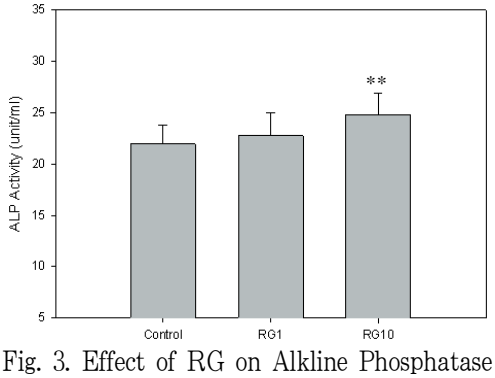


Fig. 3. Effect of RG on Alkline Phosphatase (ALP) Activity of Rat Calvarial Cell.
Each bar represents Mean±SD of 6 cultured wells.
Control : vehicle(0.01% DMSO)
RG1 : 1 μg/ml of RG
RG10 : 10 μg/ml of RG
** : $p<0.01$ vs Control by Student's t-test

### 4. 골 기질 단백질 합성에 미치는 영향

Rat fetus의 두개골로부터 분리한 조골세포를 RG처리 후 10일간 배양한 결과, 정상 대조군이 생성하는 단백질량은 3.35 μg/ml 이었고, 1 μg/ml의 RG를 처리한 경우에는 3.42 μg/ml이었다. 또 10 μg/ml의 RG를 처리한 경우에는 3.62 μg/ml로 증가하였지만 통계적으로 유의성은 없었다(Fig. 4).

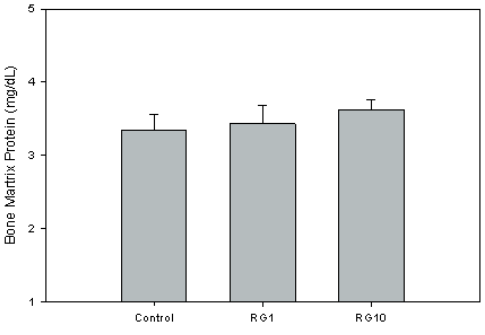


Fig. 4. Effect of RG on Protein Synthesis of Rat Calvarial Cell.
Each bar represents Mean±SD of 6 cultured wells.
Control : vehicle(0.01 % DMSO)
RG1 : 1 μg/ml of RG
RG10 : 10 μg/ml of RG

### 5. Collagen 합성에 미치는 영향

Rat fetus의 두개골로부터 분리한 조골세포를 RG처리 후 10일간 배양한 결과, 정상 대조군의 collagen량은 3.37 μg/well 이었고, 1 μg/ml의 RG를 처리한 경우에는 3.62 μg/well로 유의성 있게($p<0.05$) 증가하였다. 10 μg/ml의 RG를 처리한 경우에는 collagen량이 3.47 μg/well로 증가하였지만 유의성은 없었다(Fig. 5).

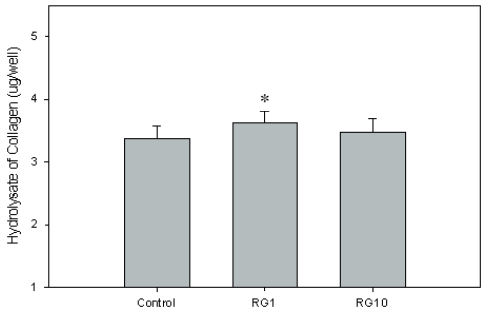


Fig. 5. Effect of RG on Collagen Synthesis of Rat Calvarial Cell.
Each bar represents Mean±SD of 6 cultured wells.
Control : vehicle(0.01% DMSO)
RG1 : 1 μg/ml of RG
RG10 : 10 μg/ml of RG
* : $p<0.05$ vs Control by Student's t-test

### 6. Calcified nodule 생성에 미치는 영향

Rat fetus의 두개골로부터 분리한 조골세포를 RG처리 후 21일간 배양하여 칼슘침착 결절 형성을 측정한 결과, 정상 대조군은 2.71 $mm^3$, 1 μg/ml의 RG를 처리한 경우에는 2.86 $mm^3$, 그리고 10 μg/ml의 RG를 처리한 경우에는 2.58 $mm^3$을 나타내었다. 1 μg/ml의 RG를 처리한 경우 결절 형성이 증가하는 경향을 보였으나 유의성은 없었다(Fig. 6).

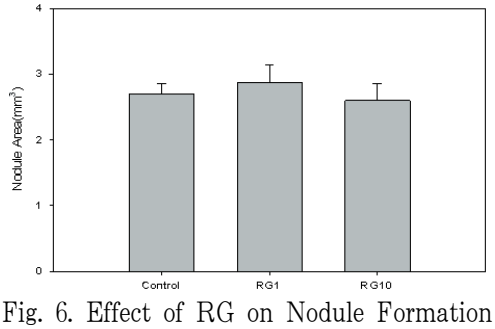


Fig. 6. Effect of RG on Nodule Formation in Rat Calvarial Cell.
Control : Vehicle
RG1 : 1 μg/ml RG
RG10 : 10 μg/ml RG
DMSO (0.01%) was administered to Control group.

# Ⅳ. 고 찰

골은 골 형성 세포인 조골세포(osteoblast)와 골 흡수 세포인 파골세포(osteoclast) 및 골세포(osteocyte)에 의해 끊임없이 형성되고 흡수되는 동적인 조직이다. 골다공증은 파골 세포의 기능 및 작용 시간 증가, 또는 조골세포의 기능 및 작용 시간 감소와 같이 골 형성과 골 흡수의 균형이 깨지면서 골 형성이 골 흡수보다 상대적으로 저하되어 나타난다. 증상으로는 척추의 압박과 미소골절로 인한 흉·요추부의 동통, 체중을 지탱하는 척추의 함몰로 인한 심한 등통증과 신장의 감소 및 요추의 전굴증, 대퇴경부나 손목 등 다른 뼈의 골절 등이다[3,20]. 그러나 임상에서 골절되기 전에 그 증세를 확연하게 확인할 수는 없고, 초기에 단순피로, 척추부위의 나른함을 호소하는 정도로 시작되어 점차 증상정도가 심해진다. 골다공증의 원인은 정확히 밝혀져 있지는 않지만 노화, 유전적 요인, estrogen의 결핍, 운동 부족, 가족력, 약물의 장기간 복용, 만성 질환 등이 복합적으로 관여하고 있는 것으로 알려져 있다[21]. 최근 수명연장의 기술 발달로 노년층의 인구가 많아지면서 여성의 폐경이후의 삶도 연장하게 되었다. 폐경이후 삶의 연장은 여성들을 폐경기 골다공증의 위험성을 더욱 높이게 되었고 그에 따른 염려가 높아져서, 사회 전반적으로 골다공증의 예방 및 치료에 대한 관심이 높아지고 있다[22,23].

이에 대한 기존 서양 의학적 치료로는 크게 골 흡수 억제제와 골 형성 자극제로 나눌 수 있다. 골밀도가 낮은 사람에게는 sodium fluoride, parathyroid hormone (PTH), growth hormone(GH), IGF-1 등의 골 형성 자극제로 골 형성을 자극하여 골량을 증가시킨다[24,25]. 골 흡수율이 빠른 사람에게는 estrogen, calcitonin, bisphosphonates, 비타민 D 등으로 골 흡수를 억제하여 골 교체율을 감소시킨다[24,26]. 이러한 골 흡수 억제제는 biphosphonate 계열의 약물인데 파골세포로의 분화를 억제하며 이미 성숙한 파골세포의 기능을 억제하는 것으로 알려져 있다[27]. 그러나 이러한 약물은 골다공증치료에서 가장 많이 사용됨에도 불구하고 식도염이나 하악골의 무혈성 괴사와 같은 부작용등이 있어 사용 시 제한이 있다[28]. 그러므로 골다공증 치료에 효과 있는 천연물 발견이 의미가 있을 것으로 사료된다.

地黃(*Rehmannia Glutinsa*)은 현삼과(Scrophulariaceae)에 속하는 다년생 숙근초로 뿌리를 약용으로 사용한다. 地黃의 근엽과 잔뿌리를 제거하고 흙을 깨끗이 씻은 것을 生地黃 또는 鮮地黃, 陽乾한 것을 乾地黃, 地黃을 황주 또는 백주에 넣고 주침하여 증숙한 후 건조한 것을 熟地黃이라고 분류하고 각각 약리작용을 달리하여 사용하고 있다. 地黃의 성미는 性凉 無毒하고 甘苦하다고 알려져 있다. 주성분은 b-sitosterol, mannitol 등이며 그 밖에 stigmasterol, campesterol 등이 알려져 있다. 生地黃은 淸熱, 凉血, 生津의 효능이 있으며, 乾地黃은 滋陰養血의 효능이 있어 陰虛發熱, 消渴, 吐血, 鼻出血, 血崩, 月經不順, 陰虛便秘 치료에 사용되고 있다[10-13].

한의학에서는 '골다공증'이라는 표현은 직접 사용되지는 않았으나, ≪素問·痿論≫[8]에 "腎氣熱則 腰脊不擧 骨枯而髓減 發爲

骨痿. 腎生骨髓 在體爲骨 腎氣熱而精液竭 則髓減骨枯而發爲骨痿也", "腎者水藏也 今水不勝火 則骨枯而髓虛 故足不任身發爲骨痿"라 하였는데, 이는 腎氣가 熱하면 腎水가 不足하고, 骨이 乾枯하며 骨髓가 骨腔내에 충만되지 못하고 마르게 되어 骨萎縮과 枯竭이 나타날 수 있는데 이를 '骨痿'라고 표현한 것으로, 현대의 골다공증과 유사한 것으로 인식되어 진다[29].

그리고 ≪素問·長刺節論≫[8]에서는 "病在骨 骨中不可擧 骨髓酸痛 寒氣至 名曰骨痺"라 하여 寒氣때문에 骨中不可擧 骨髓酸痛한 것을 '骨痺'라 하였는데, 이 또한 현대의 골다공증과 유사한 것으로 볼 수 있다[29].

골다공증의 원인을 韓醫學에서 年老體衰, 臟腑失調, 風邪侵襲 등으로 보고 있는데[30-34], 여성에게 있어서는 폐경후기 증상의 하나로 陰陽의 불균형 때문에 49세를 전후하여 腎氣가 衰하고 天癸가 竭하며 衝任二脈이 虧虛하면, 精血이 不足해지고 腎陰陽의 氣가 모두 衰하여 臟腑의 機能喪失이 초래되어 갱년기 장애가 발생한다고 하였다[35-37].

한의학 문헌에서 여성의 폐경기 골다공증과 연관되어지는 부분은 天癸過期, 過期不止, 老年行經, 四十六七經證, 四九五旬經證, 五旬以後經證, 經斷前後症候, 絶經前後諸證, 更年期 및 更年期 症候群 등이며, 그 症狀은 腰腹疼痛, 腰痛, 偏身作痛, 腰膝痠軟, 肢冷, 腰痠腿軟, 尾骨痛, 疼痛, 肩痛, 腰痛, 神經痛, 腰膝痠疼 및 腰膝痠冷 등으로 표현되어 있다[35-37].

골다공증의 한의학적 치료는 기본적으로 腎陰不足, 腎陽不足, 氣血兩虛, 風邪偏勝로 변증하여 滋陰補腎, 補腎將陽, 補益氣血, 祛風通絡하는 치법을 활용하고 있다[34]. 최근에는 골다공증의 한의학적 치료에 대한 관심이 높아 이[38], 신[39], 이[40], 황[41], 윤[42], 김[43], 육[44], 이[45]등에 의해 荊芥, 黃芩, 天門冬, 鹿角, 杜仲, 何首烏, 紅花子, 熟地黃 등이 조골세포와 파골세포의 생성과 활성 등에 미치는 연구가 진행되었다. 하지만 대표적인 補肝腎약물이면서 熟地黃 보다 가격이 저렴한 乾地黃은 골다공증의 치료제로서의 가능성에 대해 연구된 바가 없어, 저자는 골다공증 예방 및 치료 방법을 개발하기 위하여, 乾地黃(*Rehmannia Glutinosa*) 추출물을 사용하여 조골세포의 분화와 기능 활성화에 관여하는 인자들에 대한 효과를 연구하였다. 이를 위하여 rat의 두개골로부터 분리 배양한 조골세포에 乾地黃 에탄올 추출물을 투여한 후 조골세포의 분열능과 골 형성을 나타내는 생화학적 지표에 미치는 영향을 측정하였다. 연구지표로는 조골세포에 대한 생존율에 미치는 영향, 분열능에 미치는 영향, 골 석회침착(calcification)에 관여하는 골세포 표면의 ALP(alkaline phosphatase) 활성에 미치는 영향, 골세포의 단백질 합성에 미치는 영향, collagen 합성에 미치는 영향 및 calcified nodule 생성에 미치는 영향을 선정하여 평가하였다.

배양된 조골세포에 RGE를 처리한 후 MTT assay 검사를 한 결과 세포 생존율에는 커다란 변화가 없었으며 세포독성을 보이지 않았다(Fig. 1).

또 배양된 조골세포에 RGE를 처리한 후 6일간 배양한 결과, RG 10 μg/ml 투여군에서는 정상 대조군에 비해 유의적인 증가($p<0.05$)를 나타내 조골세포의 수를 증가시킴을 알 수 있었다(Fig. 2).

조골세포의 칼슘 침착에 관여하는 지표성분인 ALP의 활성을 측정한 결과, RG를 10 μg/ml 처리한 경우 정상 대조군에 비해 ALP 활성도를 유의성 있게 ($p<0.01$) 증가시켰다(Fig. 3).

또한, rat fetus의 두개골로부터 분리한 조골세포를 10일 간 배양한 결과, 1 μg/ml의 RG 및 10 μg/ml의 RG를 처리한 경우 모두 정상 대조군에 비해 세포가 생성하는 골 기질 단백질량이 증가하였지만 통계적으로 유의성은 없었다(Fig. 4).

조골세포에 의해 생성되는 골 기질 물질인 교원질(collagen) 생합성에 미치는 RGE의 영향을 측정한 결과, RG를 1 μg/ml 농도로 처리한 경우에는 정상 대조군에 비해 유의한($p<0.05$) 증가를 나타내었다. 따라서, 골기질의 특이 단백질인 collagen의 생합성을 증가시켜 골 형성 증가와 골다공증 예방을 할 수 있을 것으로 판단되었다(Fig. 5).

그리고 조골세포의 칼슘침착 결절 생성에 미치는 RGE의 영향을 측정한 결과, 정상세포에 RG 1 μg/ml 농도로 처리한 경우에는 결절 형성이 증가하는 경향을 보였으나 유의적인 변화는 없었다.

이상으로 보아, 乾地黃 에탄올 추출물(RGE)은 조골세포의 분열능 개선, 칼슘침착에 관여하는 ALP의 활성 증가, 골기질 물질인 collagen 합성을 증가시키면서도 조골세포에 대한 세포독성이 없어서 갱년기나 노년기 골다공증 치료 및 예방에 효과적으로 이용할 수 있을 것으로 판단된다.

# V. 결 론

Rat fetus의 두개골로부터 조골세포를 분리, 배양하여 乾地黃 추출물(RGE)을 첨가한 다음, 조골세포의 생존율, 조골세포 분열능, ALP활성, 골 기질 단백질 합성, collagen 합성 및 calcified nodule 생성을 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. RGE는 두개골 조골세포의 세포 생존율에 변화를 주지 않았다.
2. RGE는 두개골 조골세포의 분열능을 유의성 있게($p<0.05$) 증가시켰다.
3. RGE는 두개골 조골세포의 ALP 활성을 유의성 있게($p<0.01$) 증가시켰다.
4. RGE는 두개골 조골세포의 단백질량을 증가시켰지만 유의성은 없었다.
5. RGE는 두개골 조골세포의 collagen량을 유의성 있게($p<0.05$)증가시켰다.
6. RGE는 calcified nodule 생성에는 영향을 주지 않았다.

따라서 乾地黃은 부작용이 없으며 상용할 수 있는 골 형성 촉진약물로 사료되는 바, 골다공증의 치료 및 예방에 활용될 수 있을 것으로 보인다.

□ 투 고 일 : 2013년 7월 19일
□ 심 사 일 : 2013년 8월 7일
□ 게재확정일 : 2013년 8월 19일

# 참고문헌

1. 대한내과학회 해리슨 내과학 편집위원회. HARRISON'S 내과학. 17판. 서

울:도서출판 MIP. 2010:48, 2883-96.
2. 이명수, 김정중, 오재민. 파골세포 분화에 목향 물 추출물의 효과. 동의생리병리학회지. 2011;25(3):516-20.
3. 대한 병리학회. 병리학. 서울:고문사. 1991:1183-5.
4. Pietschmann P., et al. Osteoporosis: an age-related and gender-specific disease. Gerontology. 2008;55(1):3-12.
5. E Canalis. Mechanisms of glucocorticoid action in bone: implications to glucocorticoid -induced osteoporosis. J Clion Endocri Met. 1996;81:3441-7.
6. Pacifici R. Estrogen deficiency, T cells and bone loss. Cell Immunol. 2008; 252(1-2):68-80.
7. 윤창렬, 이남구, 김선호. 황제내경소문 왕빙주 上. 대전:주민출판사. 2003:191-215, 216-37, 459-75.
8. 윤창렬, 이남구, 김선호. 황제내경소문 왕빙주 中. 대전:주민출판사. 2003:47-52, 188-97, 307-15.
9. 정우열, 안규석. 한방임상병리학. 서울: 영림사. 1998:507, 513.
10. 정보섭, 신민교. 향약대사전. 서울:영림사. 2003:906-9.
11. 한방약리학 교재편찬위원회. 한방약리학. 서울:신일상사. 2010:709-12.
12. 강병수. 방제의 체계적 구성을 위한 임상배합본초학. 서울:영림사. 1996:158, 263-4.
13. 정혜진. 地黃류 생약의 항당뇨에 관한 비교연구: 地黃류엑스가 Streptozotocin 유발 고혈당 흰쥐에 미치는 영향. 서울:중앙대대학원. 1990:22-31.
14. 최경희 등. 동충하초가 파골세포의 분화와 유전자 발현에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2012;25(3):16-26.
15. 곽한복 등. 녹용 물 추출물의 파골세포 분화 억제효과. 동의생리병리학회지. 2008;22(4):891-5.
16. 정연태 등. 두충의 물 추출물이 파골세포의 분화에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 2009;23(3):613-8.
17. 리연 등. 오미자 물 추출물이 파골세포 분화에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 2010;24(5):848-53.
18. 박성태 등. 백출의 파골세포 분화에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 2011; 25(1):109-14.
19. 오재민 등. 파골세포 분화에 미치는 복분자 물 추출물의 효과. 동의생리병리학회지. 2011;25(4):669-73.
20. 두호경. 동의 신계학. 서울:동양의학연구원. 1992:578-84, 1240-53.
21. Aloia JF, et al. Risk factors for postmenopausal osteoporosis. AmJ Med. 1985;78:95-100.
22. Karasik D. Osteoporosis : an evolutionary perspective. Human Genetics. 2008; 124(4):349-56.
23. 김남현 등. 홍삼의 골다공증에 대한 임상적 효능 연구. 고려인삼학회지. 1998; 22(2):114-21.
24. 서울대학교의과대학 내과학교실 편저. 임상내과학. 서울:고려의학. 2004: 1793-1801.
25. 이형우. 골다공증(골다공증의 치료: 골형성 촉진제 및 대증요법). 대구:경북대학교병원. 1995:56-64.
26. 하승우. 골다공증(골다공증의 치료: 골흡수 억제제). 대구:경북대학교병원. 1995:51-5.
27. Nishikawa M, et al. Biphosphonates

act on osteoblastic cells and inhibit osteoclast formation in mouse marrow cultures. Bone. 1996;18:9-14.
28. Khosla S, et al. 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.
29. 이응세, 김혜경. 골다공증의 동의학적 임상문헌에 관한 고찰. 한방재활의학회지. 1997;7(1):437-56.
30. 藏位壓, 王和鳴編. 中國骨病學. 北京:人民衛生出版社. 1990:249-58.
31. 陳可培. 中國傳統康復醫學. 北京:人民衛生出版社. 1988:555-8..
32. 蔡新吉. 腎虛證與 骨廣物含量的 關係. 山東:山東中醫學院學報. 1998;16(2):52.
33. 呂犹政. 常見丙 最新療法. 北京:中國中醫學 出版社. 1994:371-3, 1994.
34. 한방재활의학과학회. 한방재활의학. 서울:군자출판사. 2003:110, 168.
35. 羅元愷. 中醫婦科學. 河北省:人民衛生出版社. 1998:17-22, 161-3.
36. 陳自明. 婦人良方大全. 1卷. 臺北:文光圖書有限公司. 1987:38.
37. 葉天士. 섭천사여과. 서울:대성문화사. 1989:212, 213.
38. 이주엽, 황귀서. 형개가 조골세포에 미치는 영향. 대한예방한의학회지. 2009;13(3):127-38.
39. 신정민 등. 황금 추출물이 조골세포와 파골세포의 활성에 미치는 영향. 한국식품과학회지. 2008;40(6):674-9.
40. 이승연, 김시나, 김종근. 천문동 추출물에 의한 조골세포 분화 및 파골세포 생성 억제 효과. 한국식품영양과학회지. 2008;37(1):16-9.
41. 황정수 등. 녹각이 난소적출로 유발된 흰쥐의 골다공증 치료에 미치는 영향. 대한본초학회지. 2010;25(2):1-10.
42. 윤석주 등. 두충 추출물 투여와 트레드밀 운동이 골다공증 유발 백서의 골대사에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 2008;22(4):884-90.
43. 김민정 등. 하수오와 백수오가 난소적출로 유발된 흰쥐의 골다공증 예방에 미치는 영향. 대한본초학회지. 2004;19(1):23-34.
44. 육태한 등. 녹각과 홍화자가 난소적출에 의한 실험적 흰쥐 골다공증 모델에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 2006;20(5):1226-32.
45. 이진아 등. 숙지황이 난소적출로 유발된 흰쥐의 골다공증에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2004;17(4):112-24.