

독활기생탕가미방이 Dexamethasone 처리 조골세포에 미치는 영향

대전대학교 한의과대학 부인과교실
백선은, 장새별, 유정은, 유동열

ABSTRACT

Effects of *Dokwhalgisaeng-tang Gamibang* (DGG) Water Extract on Dexamethasone-treated Osteoblast

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

Objectives: In this study, the author aimed to evaluate the effects of water extract of *Dokwhalgisaeng-tang Gamibang* (DGG) on osteoblast proliferation in murine calvarial cells.

Methods: The osteoblast separated from murine calvariae was cultivated and evaluated the cell function. After the addition of DGG on the culture medium, we determined the effect of DGG on the cell proliferation, protein synthesis, alkaline phosphatase activity, collagen synthesis, and cell viability of the cultivated osteoblast in the presence of dexamethasone.

Results: DGG increased the survival rate, proliferation, alkaline phosphatase (ALP) activity, protein synthesis and collagen synthesis of rat calvarial osteoblast in the presence of dexamethasone.

Conclusions: DGG might improve the osteoporosis resulted from augmentation of osteoblast proliferation.

Key Words: *Dokwhalgisaeng-tang Gamibang* (DGG), osteoporosis, osteoblast, osteoblastogenesis

I. 서 론

골다공증은 골량의 감소와 골의 미세 구조 이상을 특징으로 하는 골격계 질환으로 골강도가 감소되어 골절 위험이 증가되는 질환으로 정의하고 있다¹⁾. 흔히 골량(quantity)과 골질(quality)로 골강도를 표현할 수 있는데, 골량은 흔히 골밀도로 표현할 수 있고 골질은 구조, 골교체율, 무기질화, 미세 손상 축적 등으로 구성되어 현재는 골밀도를 측정하여 골다공증을 진단하고 있다²⁾. 뼈는 성장이 끝난 후에도 흡수와 형성이 계속되며, 이러한 재형성 과정은 파골세포에 의해 손상되거나 오래된 뼈는 흡수, 제거되고 조골세포에 의해 연속적으로 새로운 뼈가 생성되는데³⁾, 노화나 폐경으로 인한 골다공증은 조골세포의 골 형성 작용보다 파골세포에 의한 골 흡수가 증가하여 골의 항상성이 깨어져 발생하게 된다⁴⁾. 따라서 조골세포를 활성화시키거나 파골세포를 억제하는 것이 골다공증의 치료와 예방에 중요한 기전이라고 할 수 있다.

골다공증은 크게 일차성과 이차성 골다공증으로 분류되는데, 일차성 골다공증(원발성 골다공증)은 폐경으로 유발되는 제 1형 골다공증과 노화로 유발되는 제 2형 골다공증을 포함하며, 이차성 골다공증은 특정 질병, 혹은 수술, 약물 복용 등으로 최대 골량의 형성 장애가 발생하거나, 골 소실이 증가되는 경우를 말한다²⁾.

글루코코르티코이드는 강력한 면역 억제력을 갖고 있어 류마티스 관절염, 기관지 천식, 자가면역 질환, 장기이식 후 거부반응을 억제하기 위한 치료 등에 사용되어 왔으나, 장기간의 투여는 이차성 골다공증을 유발시키고 골절 위험을 높

이는 것으로 알려져 있다⁵⁻⁸⁾. 특히, 폐경기 여성 중 류마티스 관절염을 동반한 환자들의 경우 류마티스 관절염에 대한 치료로 흔히 글루코코르티코이드를 투여하게 되는데⁹⁾, 이로 인하여 골다공증의 위험이 현저히 증가하게 된다¹⁰⁾.

獨活寄生湯은 《備急千金要方》¹¹⁾에 처음 수록된 이래로 祛風濕, 止痺痛, 益肝腎, 補氣血하는 효능이 있어 痺證이 오래되어 肝腎이 虛하고 氣血의 부족으로 나타나는 腰膝冷痛, 脂節屈伸不利 등에 활용되고 있는데¹²⁾, 관련 연구로는 요통 및 슬비통에 대한 임상 증례 보고가 있으며¹³⁻⁴⁾, 그 외에도 멜라닌 생성억제에 미치는 영향¹⁵⁾, 통증과 신경 재생에 미치는 영향¹⁶⁾, 항 동맥경화에 미치는 영향¹⁷⁾, 배양척수감각신경세포에 미치는 영향¹⁸⁾ 등에 대한 연구가 있다. 또한 獨活寄生湯을 이용한 골다공증에 대한 연구로는 rat를 이용한 실험¹⁹⁻²²⁾을 통해 獨活寄生湯이 골다공증의 예방 및 치료에 활용될 수 있음이 보고되었다.

이에 저자는 祛風濕, 止痺痛, 補肝腎의 효능이 있으며 골다공증 예방과 치료에 유효하다고 보고된 獨活寄生湯에 항염, 항산화 및 골밀도 감소 억제 작용이 있는 魚腥草²³⁻⁵⁾를 가미하여 본 연구를 시행하였다. 송 등의 연구²⁵⁾에 따르면 魚腥草 추출물은 랫드의 대퇴골에서 분리한 골세포의 증식을 증가시키고, 난소를 제거하여 골다공증을 유발시킨 랫드에서 조골세포의 기능을 향진시켜 골밀도를 증가시킨다고 하였다. 이에 본 연구에서는 魚腥草 추출물을 가미한 獨活寄生湯 加味方이 글루코코르티코이드로 유발된 골다공증의 예방과 치료에도 유효할 것으로 판단하였다. 獨活寄生湯加味方 물 추출물이 글루코코르티코이드의 합성물

질인 dexamethasone을 처리한 조골세포에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 조골세포의 생존율과 분열능에 미치는 영향, alkaline phosphatase 활성에 미치는 영향, 골기질 단백질 합성에 미치는 영향, 조골세포의 collagen 생합성에 미치는 영향을 평가하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 실험

1. 재 료

1) 약 재

실험에 사용한 獨活寄生湯加味方은 《方藥合編》¹²⁾을 근거로 하여 獨活寄生湯에 魚腥草 10 g을 가미하여 구성하였다(Table 1).

본 실험에 사용한 약물은 대전대학교 둔산한방병원에서 구입한 것을 엄선하여 사용하였다.

Table 1. Prescription of *Dokhwalgisaeng-tang Gamibang*

韓藥名	生藥名	用量 (g)
獨活	<i>Angelicae pubescentis Radix</i>	3
白芍藥	<i>Paeoniae Radix Alba</i>	3
當歸	<i>Angelicae gigantis Radix</i>	3
桑寄生	<i>Taxilli Ramulus</i>	3
熟地黃	<i>Rehmanniae Radix Preparat</i>	2
川芎	<i>Cnidii Rhizoma</i>	2
人蔘	<i>Ginseng Radix</i>	2
白茯苓	<i>Hoelen</i>	2
牛膝	<i>Achyranthis Bidentatae Radix</i>	2
杜仲	<i>Eucommiae Cortex</i>	2
秦艽	<i>Gentianae Macrophyllae Radix</i>	2
細辛	<i>Asari Radix</i>	2
防風	<i>Ledebouriellae Radix</i>	2
肉桂	<i>Cinnamomi Cortex</i>	2
甘草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	1.5
生薑	<i>Zingiberis Rhizoma Crudus</i>	6
魚腥草	<i>Houttuyniae Herba</i>	10
Total		49.5

2) 동 물

실험동물은 임신한 암컷 Sprague-Dawley (SD) rat를 대한 바이오링크에서 구입하여 실험실에 적응시킨 후 사용하였다. 실험을 진행하는 기간 동안 고품사료와 물을 충분히 공급하여 자유롭게 섭취하도록 하였다.

2. 방 법

1) 검액 제조

獨活寄生湯加味方 49.5 g을 분말로 만들어 플라스크에 넣은 후, 증류수 500 ml를 가한 후 6시간 이상 가열하여 환류 추출하였다. 여과지로 여과한 후, 여액을 evaporator(EYERA, Japan)로 감압 농축하여 동결 건조시키고 실험 대상에 적용할 때까지 냉동하여 보관하였다. 실험 시 검액(추출 분말)을 배지에 녹이고, pore size 0.45 μm의 여과지로 여과시킨 후 獨活寄生湯加味方 추출물(이하 DGG라 함)을 만들어 사용하였다.

2) 약물 처리

실험은 4개군, 즉 (1) 0.01% DMSO로 처리한 정상 대조군(Normal control, NC), (2) dexamethasone 단독 처리군 (3) dexamethasone 처리 후 1 μg/ml의 獨活寄生湯加味方 추출물을 투여한 군(DGG1), (4) dexamethasone 처리 후 10 μg/ml의 獨活寄生湯加味方 추출물을 투여한 군(DGG10)으로 나누어 시행하였다.

3) Fetal calvarial cell culture(FCS)

임신 21일째인 rat의 자궁을 절개하여 fetus를 꺼낸 다음, 후두부를 절개하여 calvaria를 적출하였다. Calvaria에 붙어 있는 결체조직을 제거하고, HBSS를 사용하여 세척하였다. Calvaria를 1.5 ml의 collagenase, trypsin, 0.5 mM EDTA 용

액에 넣은 후 37°C에서 반응시키고, 상등액을 취하여 500 rpm에서 원심분리한 후 침전된 calvarial cell을 얻었다. PBS에 재현탁하여 1,500 rpm에서 원심분리한 후 세척하고, 이를 DMEM 배지에 넣어 현탁한 다음 37°C, 5% CO₂에서 배양하였다. 상등액을 제거하고 남은 calvaria에 1.5 ml의 효소를 다시 넣은 다음, 상기 반응을 수 회 반복하였다. Cell의 배지는 3일에 한 번씩 교환하였다. 배양한 cell은 2주 후 trypsin 처리하여 cell의 수를 측정 후 실험에 사용하였다.

4) 조골세포의 생존율 측정

DGG를 첨가하여 3일간 배양한 다음 조골세포에 대하여 MTT assay를 실시하였다. Cell suspension을 hemocytometer를 사용하여 counting한 후, 96 well plate의 각 well에 cell 부유액 180 µl를 넣고, DGG PBS에 녹여 농도별로 각 well에 첨가하여 incubation하였다. 3일 후 DGG를 제거하고, 각 well에 MTT solution을 100 µl씩 첨가하여 4시간 동안 incubation시키고 MTT 희석액을 제거하였다. 각 well에 100 µl의 DMSO를 첨가하여 15~20분간 plate shaker를 사용하여 흔들여 준 후, ELISA reader로 wave length 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

5) 조골세포의 분열능 측정

Subculture를 통하여 조골세포가 1.0~3.0 ×10⁵ cells/well이 되도록 24 well plate에 seeding 하였고, 6일 동안 배양한 cell의 수를 세기 위하여 cell의 배지를 제거하고, HBSS로 cell을 세척하였다. 이후 collagenase, trypsin, 0.5 mM EDTA를 추가하여 cell을 culture plate로부터 분리하여, isoton-2 solution을 이용하여 20배로 희석한 다음 세포계수기(Sysmax F-820)를 사용하여

cell의 수를 측정하였다.

6) Alkaline phosphatase(ALP) 활성 측정

ALP 활성은 ALP-K Kit를 사용하여 측정하였다. 6일 동안 cell을 배양한 plate를 냉각한 PBS로 세척하고, cell을 scraper로 긁어낸 후, leupeptin이 함유된 냉각된 PBS에 현탁하였다. 이 현탁액을 냉각상태로 ultrasonicator를 사용하여 sonication한 후 3000 rpm에서 10분 동안 원심분리하였다. 원심분리 후 취한 상등액과 0.56 M 2-amino-2-methyl-propanol, 1 mM MgCl₂, 10 mM p-nitrophenylphosphate를 함유한 반응액을 37°C에서 10분 동안 반응시켰다. 0.2 N NaOH 1 ml를 추가하여 반응을 중단시킨 다음, 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

7) 골기질 단백질 합성 측정

10일간 cell을 배양한 plate를 PBS로 세척하고 난 후 cell scraper를 사용하여 cell을 긁어낸 다음, 5 mM dithiothreitol (DTT)이 함유된 PBS에 현탁하였다. 이 현탁액을 냉각상태에서 ultrasonicator로 sonication하고, biuret 시약과 37°C에서 10분간 반응시키고 난 후 550 nm에서 흡광도를 측정하였다.

8) Collagen 생합성 측정

10일간 cell을 배양한 plate를 PBS로 세척한 다음, cell scraper를 사용하여 cell을 긁어내었다. 이를 5 mM dithiothreitol이 함유된 50 mM Tris buffer에 현탁시켜 ultrasonicator로 sonication시킨 다음, 100,000 xg에서 30분 동안 원심분리하여 상등액을 제거하고, pellet에 6 N HCl을 추가하여 24시간 동안 100°C에서 가수분해 시켰다. 이를 조심스럽게 6 N NaOH로 중화시켜, 물을 이용하여 적정 농도로 희석시켰다. Hydroxy-proline은 amino acid

analyzer로 정량하였다.

3. 통계 분석

각 군과의 유의성을 검증하기 위하여 Student's T-test를 실시하고, P값이 0.01 및 0.05보다 작은 경우 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

III. 결 과

1. 조골세포의 생존율에 미치는 영향

DGG의 세포독성을 평가하기 위해 조골세포에 MTT assay를 실시하였다. 그 결과, dexamethasone 단독 처리군은 정상 대조군에 비해 생존율이 74.6%로 유의성 있게($p<0.01$) 저하되었으며, dexamethasone 처리 후 1 $\mu\text{g/ml}$ 의 DGG와, 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 DGG를 투여한 경우 각각 101.1%, 98.2%로 조골세포의 생존율이 dexamethasone 단독 처리군에 비해 유의성 있게($p<0.01$) 증가하였다(Fig. 1).

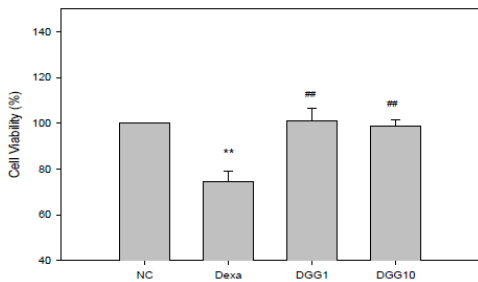


Fig. 1. Effects of DGG on viability of rat calvarial cell.

Each bar represents Mean \pm SD of 6 cultured well.
 NC : vehicle (0.01% DMSO)
 Dexa : dexamethasone
 DGG1 : dexamethasone+1 $\mu\text{g/ml}$ of DGG
 DGG10 : dexamethasone+10 $\mu\text{g/ml}$ of DGG
 ** : $p<0.01$ vs NC by Student's t-test
 ## : $p<0.01$ vs Dexa by Student's t-test

2. 조골세포의 분열능에 미치는 영향

Rat fetus의 두개골로부터 분리한 조골세포를 6일 동안 배양한 결과, 정상 대조군은 54.2×10^4 cells/well이었으며 dexamethasone 단독 처리군에서는 28.1×10^4 cells/well로 정상 대조군에 비하여 유의성 있게($p<0.05$) 감소하였다. Dexamethasone 처리 후 1 $\mu\text{g/ml}$ 의 DGG와, 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 DGG를 투여한 경우 각각 48.3×10^4 cells/well, 52.5×10^4 cells/well로 조골세포 분열능이 dexamethasone 단독 처리군에 비해 유의성 있게($p<0.05$) 증가하였다(Fig. 2).

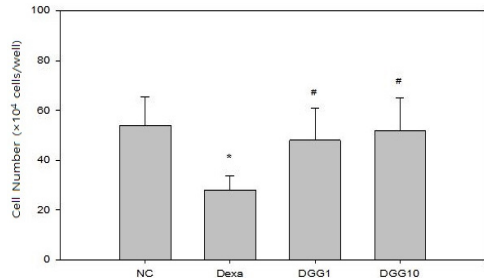


Fig. 2. Effects of DGG on cell proliferation of rat calvarial cell.

Each bar represents Mean \pm SD of 6 cultured well.
 NC : vehicle (0.01% DMSO)
 Dexa : dexamethasone
 DGG1 : dexamethasone+1 $\mu\text{g/ml}$ of DGG
 DGG10 : dexamethasone+10 $\mu\text{g/ml}$ of DGG
 * : $p<0.05$ vs NC by Student's t-test
 # : $p<0.05$ vs Dexa by Student's t-test

3. Alkaline phosphatase(ALP) 활성에 미치는 영향

Rat fetus의 두개골에서 분리한 조골세포를 6일 동안 배양한 결과, alkaline phosphatase(ALP) 활성은 정상 대조군에서는 13.6 unit/ml이었으며, dexamethasone 단독 처리군에서는 9.8 unit/ml로 활성이 유의성 있게($p<0.05$) 감소하였다. Dexamethasone 처리 후 1 $\mu\text{g/ml}$ 의 DGG를 투여한 경우 alkaline phosphatase(ALP) 활성이 dexamethasone

단독 처리군에 비하여 유의성 있게($p<0.05$) 증가하였으며, 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 DGG를 투여한 경우에는 alkaline phosphatase(ALP) 활성이 13.9 unit/ml로 dexamethasone 단독 처리군에 비해 증가하였으나 유의성은 없었다(Fig. 3).

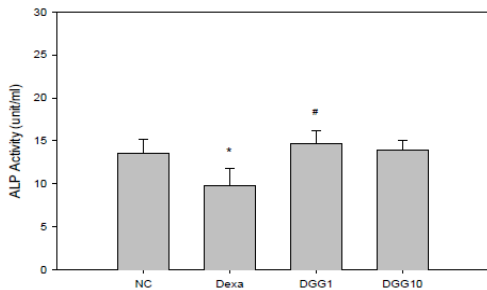


Fig. 3. Effects of DGG on alkaline phosphatase (ALP) activity of rat calvarial cell. Each bar represents Mean \pm SD of 6 cultured well. NC : vehicle (0.01% DMSO)
Dexa : dexamethasone
DGG1 : dexamethasone+1 $\mu\text{g/ml}$ of DGG
DGG10 : dexamethasone+10 $\mu\text{g/ml}$ of DGG
* : $p<0.05$ vs NC by Student's t-test
: $p<0.05$ vs Dexa by Student's t-test

4. 골기질 단백질 합성에 미치는 영향

Rat fetus의 두개골에서 분리한 조골 세포를 10일 동안 배양한 결과, 정상 대조군의 세포가 생성하는 단백질량은 3.47 $\mu\text{g/dl}$ 이었고, dexamethasone을 단독 처리한 경우는 2.94 $\mu\text{g/dl}$ 로 유의성 있게 ($p<0.01$) 감소하였다.

Dexamethasone을 처리한 후, 1 $\mu\text{g/ml}$ 의 DGG를 투여한 경우에는 3.31 $\mu\text{g/dl}$, 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 DGG를 투여한 경우에는 3.34 $\mu\text{g/dl}$ 로 골기질 단백질 합성이 dexamethasone 단독 처리군에 비해 유의성 있게($p<0.01$, $p<0.05$) 증가하였다(Fig. 4).

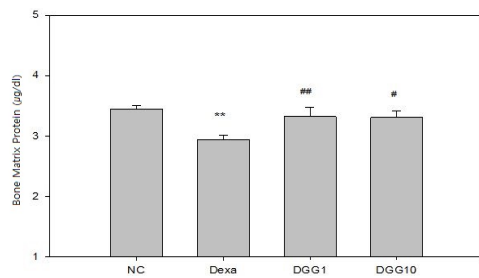


Fig. 4. Effects of DGG on bone matrix protein synthesis of rat calvarial cell. Each bar represents Mean \pm SD of 6 cultured well.

NC : vehicle (0.01% DMSO)
Dexa : dexamethasone
DGG1 : dexamethasone+1 $\mu\text{g/ml}$ of DGG
DGG10 : dexamethasone+10 $\mu\text{g/ml}$ of DGG
** : $p<0.01$ vs NC by Student's t-test
: $p<0.05$ vs Dexa by Student's t-test
: $p<0.01$ vs Dexa by Student's t-test

5. Collagen 생합성에 미치는 영향

Rat fetus의 두개골에서 분리한 조골 세포를 10일 동안 배양한 결과, 정상 대조군의 collagen 생합성량은 135.6 $\mu\text{g/well}$ 이었고, dexamethasone을 단독 처리한 경우에는 109.1 $\mu\text{g/well}$ 로 유의성 있게($p<0.01$) 감소하였다.

Dexamethasone을 처리한 후 1 $\mu\text{g/ml}$ 의 DGG를 투여한 경우에는 130.5 $\mu\text{g/well}$ 로 dexamethasone 단독 처리군에 비해 증가하였으나 유의성은 없었으며, 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 DGG를 투여한 경우에는 141.8 $\mu\text{g/well}$ 을 나타내어 collagen 생합성량이 dexamethasone 단독 처리군에 비해 유의성 있게($p<0.05$) 증가하였다(Fig. 5).

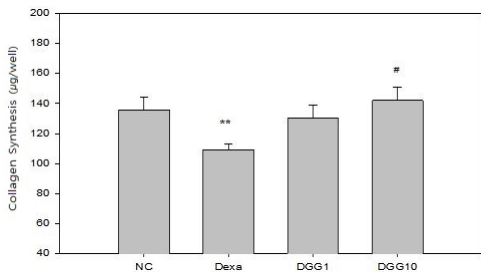


Fig. 5. Effects of DGG on collagen synthesis of rat calvarial cell.

Each bar represents Mean±SD of 6 cultured well. NC : vehicle (0.01% DMSO)

Dexa : dexamethasone

DGG1 : dexamethasone+1 µg/ml of DGG

DGG10 : dexamethasone+10 µg/ml of DGG

** : p<0.01 vs NC by Student's t-test

: p<0.05 vs Dexa by Student's t-test

IV. 고 찰

골다공증은 골기질의 감소로 골질량이 전반적으로 감소하는 질환으로 대사성 골 질환 중 흔한 질환으로, 무기질화 조직의 지속적인 감소로 피질골은 얇아지고 골수주의 수량과 크기 또한 감소하게 된다²⁶⁾. 골밀도는 T-score로 표현되며 T-score는 젊고 건강한 여성 골밀도 평균과 비교한 표준편차로부터 구하게 되는데, 골다공증은 젊은 성인에서 T-score≤-2.5로 골밀도가 감소되는 것으로 정의하며, 폐경 여성에서는 T-score<-1.0인 경우 골다공증의 위험이 증가되어 있는 낮은 골밀도군으로 간주하고 있다²⁷⁾.

2010년 국민건강영양조사에 따르면 50세 이상 성인의 21.8%, 50세 이상 여성의 34.9%, 50세 이상 남성의 7.8%가 골다공증으로 50세 이상 여성 3명 중 1명은 골다공증인 것으로 나타났다. 여성은 폐경 이후 급격한 골소실이 진행되며, 이는 여성 호르몬의 결핍으로 급격한 골 흡수가 유발되기 때문이다. 에스트로겐 결핍은 골

교체를 활성화시키고 골 흡수의 증가를 초래하여 골량 감소를 더욱 촉진시키는 역할을 하며, 이후 노화로 인하여 골 형성 기능이 감소되어 골 소실이 지속 된다^{3,29)}.

글루코코르티코이드는 강력한 면역 억제력을 갖고 있어 류마티스 관절염, 기관지 천식, 자가 면역 질환, 장기이식 후 거부반응을 억제하기 위한 치료 등과 같은 염증 질환, 자가 면역 질환, 알레르기 질환 등에 광범위하게 사용되어 왔으나, 글루코코르티코이드의 장기간 투여는 골다공증을 유발시키고 골절 위험을 높이는 것으로 알려져 있다⁵⁻⁸⁾. 글루코코르티코이드에 의해 유발된 골다공증은 이차성 골다공증의 가장 흔한 원인 중 하나이며, 최근 과학적인 모델에서는 글루코코르티코이드가 파골세포를 직접 자극할 뿐만 아니라, 파골세포의 활성화와 생존을 증가시키고, 조골세포를 직접 억제하는 동시에 조골세포 동원을 억제하며, 또한 골세포 증식을 촉진시키는 growth factor인 IGF-I (insulin like factor I), IGF-II (insulin like growth factor II), PDGF (platelet derived growth factor), IGFBP-5 등을 억제시켜 골다공증을 유발하는 것으로 설명하고 있다^{30,31)}.

글루코코르티코이드에 의해 유발된 골다공증의 일반적 치료 지침과 생활 개선으로는 가능한 최소 용량, 짧은 기간의 글루코코르티코이드 사용, 국소 글루코코르티코이드요법, 금연, 알코올 섭취 감소, 체중부하 운동, 적절한 칼슘 섭취, 비타민 D 섭취, 낙상 예방 등이 있으며, 약물 치료로는 성호르몬 요법, 칼시토닌, 비스포스포네이트, 부갑상선호르몬 요법 등이 있으나³⁰⁾, 이러한 약물 치료에 대한 부작용^{32,33)}으로 이를 보완할 수 있는 골

다공증 치료에 대한 연구가 필요한 실정이다.

노화와 성호르몬의 결핍이 진행되는 폐경기 여성에서 글루코코르티코이드의 투여는 골다공증을 유발시키는 주요한 원인이 되는데³⁴⁾, 최근 연구에 따르면 류마티스 관절염을 동반한 폐경기 환자들에서 골다공증 유병률이 56%로³⁵⁾, 이는 류마티스 관절염에 대한 글루코코르티코이드 치료로 인하여 골다공증 유병률이 증가된 것임을 알 수 있다¹⁰⁾. 또한 실제 글루코코르티코이드를 복용하는 대부분의 환자들이 골절 위험이 높은 70-79세의 폐경기 여성들로³⁶⁾, 글루코코르티코이드로 유발된 골다공증의 위험에 특히 노출되어 있다.

한의학 문헌에서는 골의 위약한 상태를 나타내는 ‘骨痿’, ‘骨痺’, ‘骨枯’, ‘骨極’이라는 병명이 골다공증과 가장 유사하다³⁷⁾. 한의학에서는 뼈와腎을 밀접한 관계로 인식하여, 《內經·素問》³⁸⁾의 〈宣明五氣論〉에서는 “骨屬腎”, 〈五臟生成論〉에서 “腎之合, 骨也”, 〈痿論〉에 “腎主身之骨髓”라 하였고, 〈逆調論〉에 따르면 “腎不生, 則髓不能滿, 故寒甚至骨也…病名曰骨痺”라 하여 골다공증의 원인을腎이骨髓를 자양하지 못하여 생기는腎虛로 설명하였다. 또한 증상에 따라腎虛, 腎陰虛, 腎陽虛, 肝腎虧虛, 脾腎陽虛, 氣滯血瘀, 氣血兩虛 등으로 변증하고 있고, 각각의 변증에 맞춰 補腎陰, 補腎陽, 補腎陰腎陽, 健脾益氣, 理氣活血, 氣血雙補의 治法을 활용하고 있다³⁹⁾.

또한 《內經·素問》³⁸⁾의 〈上古天真論〉에서 남성은 “六八…天癸竭, 腎氣衰, 形體皆極, 八八, 則齒髮去”라고 하였고, 여성은 “七七, 任脈虛, 太衝脈衰小, 天癸竭,

地道不通, 故形壞而無子也”라 하였는데, 이는腎氣가衰하고腎氣의 소산인天癸⁴⁰⁾가竭해짐에 따라 골격과 외형이 쇠약해지는 여성과 남성의 노화 과정을 표현한 것으로, 이는 폐경과 노화로 인한 골다공증의 기전과 유사한 것으로 사료된다.

獨活寄生湯은 《備急千金要方》¹¹⁾에 처음 수록되었고, 獨活, 當歸, 白芍藥, 桑寄生, 熟地黃, 川芎, 人蔘, 白茯苓, 牛膝, 杜仲, 秦艽, 細辛, 防風, 肉桂, 甘草로 구성되어 祛風濕, 止痺痛, 益肝腎, 補氣血하는 효능으로 痺證이 오래되어 肝腎이虛하고 氣血의 부족으로 나타나는 腰膝冷痛, 脂節屈伸不利 등에 활용되어 왔으며¹²⁾, 風寒濕의 三氣의 雜合으로 인한 痺痛을 치료하는 三痺湯의 變方으로⁴¹⁾, 三痺湯에서 桑寄生을 加하고 黃芪와 續斷을 去하여 구성된 처방으로 볼 수 있으며⁴²⁾, 氣血雙補하는 八物湯에서 白朮을 去하고, 祛風濕 止痛의 獨活, 防風, 秦艽, 細辛, 肝腎을 補하고 근골을 강화하는 桑寄生, 杜仲, 牛膝, 補陽散寒의 肉桂를 加한 처방으로도 볼 수 있다¹²⁾.

獨活寄生湯은 扶正하고 祛邪하는 두 작용이 있어 標本을 함께 치료하는데, 杜仲, 牛膝, 桑寄生 등은 肝腎을 補益하여 筋骨을 튼튼히 하고 風濕을 去하며, 當歸, 熟地黃, 芍藥 등은 養血和血하고, 人蔘, 茯苓, 甘草 등은 正氣를 補益하며, 또한 川芎, 肉桂心은 血脈을 溫通하게 하여 祛濕시키는 작용을 협조하므로 함께 扶正하고, 獨活, 秦艽, 防風 등은 風濕을 去하여 痺痛을 멈추게 하고 細辛을 加하여 陰經의 風寒을 發散하며 筋骨의 風濕을 祛風利濕하여 止痛시켜 함께 祛邪하여 肝腎과 氣血을 補益하고, 風濕을 祛하여 痺痛을 치료하게 된다⁴²⁾.

獨活寄生湯에 관한 연구로는 요통 및 슬비통에 대한 임상 증례 보고가 있으며^{13,14)}, 그 외에도 멜라닌 생성억제에 미치는 영향¹⁵⁾, 통증과 신경 재생에 미치는 영향¹⁶⁾, 항 동맥경화에 미치는 영향¹⁷⁾, 배양척수 감각신경세포에 미치는 영향¹⁸⁾ 등에 대한 연구가 있다. 또한 獨活寄生湯을 이용한 골다공증에 대한 연구로는 加減獨活寄生湯이 난소 적출 흰쥐의 대퇴골 형태계측학적 변화 및 골 대사 관련인자에 미치는 영향에 대한 연구¹⁹⁾, 獨活寄生湯이 난소 적출 흰쥐의 골다공증에 미치는 영향에 대한 연구²⁰⁾, 加味獨活寄生湯이 난소 적출 후 加味獨活寄生湯과 전침 시술을 병행한 흰쥐의 골다공증에 미치는 영향에 대한 연구²¹⁾, 獨活寄生湯加味方이 파골세포 및 조골세포에 미치는 영향에 대한 연구²²⁾ 등이 있으며, 이러한 연구를 통해 獨活寄生湯이 골다공증의 예방과 치료에 활용될 수 있음이 보고되었다.

본 연구에서는 글루코코르티코이드로 유발된 골다공증의 예방 및 치료를 위한 약물을 찾고자 하였다. 이에 저자는 祛風濕, 止痺痛, 補肝腎의 효능이 있는 獨活寄生湯에 清熱解毒, 消癰排膿의 효능이 있으며 항염, 항산화 및 골밀도 감소 억제 작용이 있는 魚腥草²³⁻⁵⁾를 가미하였다. 송등의 연구²⁵⁾에 따르면 魚腥草 추출물은 랫드의 대퇴골에서 분리한 골세포의 증식을 증가시키고, 난소를 제거하여 골다공증을 유발시킨 랫드에서 조골세포의 기능을 향진시켜 골밀도를 증가시킨다고 하였다. 이에 본 연구에서는 魚腥草 추출물을 가미한 獨活寄生湯加味方이 dexamethasone 처리한 조골세포의 기능에 미치는 영향을 평가하였다. 이를 위하여 rat의 두개골에서 분리 배양하여 dexamethasone 처

리한 골세포에 각각 獨活寄生湯加味方 물추출물(DGG)을 투여한 후 조골세포의 분열능과 골형성에 미치는 영향을 측정하였다.

연구지표로는 조골세포의 생존율과 분열능에 미치는 영향, alkaline phosphatase 활성에 미치는 영향, 골기질 단백질 합성에 미치는 영향, 조골세포의 collagen 생합성에 미치는 영향을 평가하였다.

Dexamethasone은 조골세포의 대사에는 영향을 미치지 않지만 골세포와 조골세포를 괴사시키고, collagen의 생합성 및 전조골세포가 조골세포로의 분화과정을 감소시켜 골의 형성을 억제하는 것으로 알려져 있다⁴³⁾. 조골세포의 생존율에 미치는 DGG의 영향을 측정한 결과, dexamethasone 단독 처리군은 정상 대조군에 비해 생존율이 74.6%로 유의성 있게($p < 0.01$) 저하되었으며, dexamethasone 처리 후 1 $\mu\text{g/ml}$ 의 DGG와, 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 DGG를 투여한 경우 각각 101.1%, 98.2%로 조골세포의 생존율이 dexamethasone 단독 처리군에 비하여 유의성 있게($p < 0.01$) 증가하였다(Fig. 1).

Rat fetus의 두개골에서 분리한 조골세포를 배양한 후, 6일간 배양한 결과, 정상 대조군은 54.2×10^4 cells/well이었으며 dexamethasone 단독 처리군에서는 28.1×10^4 cells/well로 정상 대조군에 비하여 유의성 있게($p < 0.05$) 감소하였다. Dexamethasone 처리 후 1 $\mu\text{g/ml}$ 의 DGG와, 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 DGG를 투여한 경우 각각 48.3×10^4 cells/well, 52.5×10^4 cells/well로 조골세포 분열능이 dexamethasone 단독 처리군에 비해 유의성 있게($p < 0.05$) 증가하였다(Fig. 2).

ALP는 조골세포의 칼슘 침착에 관여하는 지표 성분으로, 조골세포 분열 시

ALP의 활성이 현저히 증가하는 것으로 알려져 있는데⁴⁴⁾, Rat fetus의 두개골에서 분리한 조골세포를 6일 동안 배양한 결과, alkaline phosphatase(ALP) 활성은 정상 대조군에서는 13.6 unit/ml이었으며, dexamethasone 단독 처리군에서는 9.8 unit/ml로 활성이 유의성 있게 ($p<0.05$) 감소하였다. Dexamethasone 처리 후 1 $\mu\text{g/ml}$ 의 DGG를 투여한 경우 alkaline phosphatase(ALP) 활성이 dexamethasone 단독 처리군에 비해 유의성 있게 ($p<0.05$) 증가하였으며, 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 DGG를 투여한 경우에는 alkaline phosphatase(ALP) 활성이 13.9 unit/ml로 dexamethasone 단독 처리군에 비해 증가하였으나 유의성은 없었다(Fig. 3).

Bone morphogenetic protein은 조골세포에서 발현되는데 osteocalcin, ALP, bone sialoprotein, collagen 등의 합성을 증가시킨다고 알려져 있다^{45,46)}. Rat fetus의 두개골에서 분리한 조골세포를 10일 동안 배양한 결과, 정상 대조군의 세포가 생성하는 단백질량은 3.47 $\mu\text{g/dl}$ 이었고, dexamethasone을 단독 처리한 경우는 2.94 $\mu\text{g/dl}$ 로 유의성 있게 ($p<0.01$) 감소하였다.

Dexamethasone을 처리한 후, 1 $\mu\text{g/ml}$ 의 DGG를 투여한 경우에는 3.31 $\mu\text{g/dl}$, 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 DGG를 투여한 경우에는 3.34 $\mu\text{g/dl}$ 로 골기질 단백질 합성이 dexamethasone 단독 처리군에 비해 유의성 있게 ($p<0.01$, $p<0.05$) 증가하였다(Fig. 4).

뼈의 기질 단백질은 collagen이 대부분을 차지하며 뼈의 탄성과 유연성을 유지시키며 구조적으로 지지하는 역할을 한다⁴⁷⁾. Rat fetus의 두개골에서 분리한 조골세포를 10일 동안 배양한 결과, 정상 대조

군의 collagen 생합성량은 135.6 $\mu\text{g/well}$ 이었고, dexamethasone을 단독 처리한 경우에는 109.1 $\mu\text{g/well}$ 로 유의성 있게 ($p<0.01$) 감소하였다. Dexamethasone을 처리한 후 1 $\mu\text{g/ml}$ 의 DGG를 투여한 경우에는 130.5 $\mu\text{g/well}$ 로 dexamethasone 단독 처리군에 비해 증가하였으나 유의성은 없었으며, 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 DGG를 투여한 경우에는 141.8 $\mu\text{g/well}$ 을 나타내어 collagen 생합성량이 dexamethasone 단독 처리군에 비해 유의성 있게 ($p<0.05$) 증가하였다(Fig. 5).

이상의 결과, 獨活寄生湯加味方은 dexamethasone 처리한 조골세포에 작용했을 때, 조골세포의 생존율과 분열능을 증가시켰고, ALP의 활성과 단백질 합성에 유의한 증가를 보였으며, 콜라겐 생합성을 증가시키는 것으로 나타났다.

결론적으로, 獨活寄生湯加味方의 물추출물은(DGG)은 세포 독성이 없으며, dexamethasone 처리한 조골세포의 증식능 개선, 골 기질물질 합성 증가, 칼슘 침착에 관여하는 collagen 생합성을 증가시켜 글루코코르티코이드로 유발된 골다공증에 효과적일 것으로 사료된다. 특히 폐경기 여성의 경우 노화와 성호르몬 결핍으로 글루코코르티코이드로 유발된 골다공증에 노출되기 쉬워 폐경기 여성의 골다공증 치료에 獨活寄生湯加味方을 적용해볼 수 있을 것이라 생각된다. 또한 魚腥草를 포함하여 골다공증 치료에 유효성이 있는 약제들에 대한 보완연구가 필요하며, 향후 이를 바탕으로 임상적 연구가 이루어진다면 더 많은 임상적 가치와 활용도를 가질 것으로 사료된다.

V. 결 론

Rat의 두개골에서 분리 배양한 조골세포에 dexamethasone을 처리한 다음 獨活寄生湯加味方 물 추출물(DGG)을 첨가하여 조골세포의 생존율과 분열능, ALP 활성, 골기질 단백질 합성, collagen 생합성을 측정하여 다음의 결과를 얻었다.

1. DGG는 dexamethasone 처리한 두개골 조골세포의 세포 생존율을 증가시켰다.
2. DGG는 dexamethasone 처리한 두개골 조골세포의 분열능을 증가시켰다.
3. DGG는 dexamethasone 처리한 두개골 조골세포의 ALP 활성을 증가시켰다.
4. DGG는 dexamethasone 처리한 두개골 조골세포의 골기질 단백질 합성량을 증가시켰다.
5. DGG는 dexamethasone 처리한 두개골 조골세포의 collagen 생합성량을 증가시켰다.

Received : Apr 21, 2016

Revised : Apr 29, 2016

Accepted : May 07, 2016

참고문헌

1. Kanis JA, et al. The diagnosis of osteoporosis. *Journal of Bone and Mineral Research*. 1994;9(8):1137-41.
2. Jeong HY. Osteoporosis Diagnosis and Treatment 2007. *Endocrinology and metabolism*. 2008;23(2):76-108.
3. The Korean Orthopaedic Association. *Orthopaedics*. Seoul:Choishinuihaksa. 2013:251-65.
4. Fattore AD, Teti A, Rucci N. Osteoclast receptors and signaling. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2008; 473(2):147-60.
5. Chantler IW, et al. Oral corticosteroid prescribing in women over 50, use of fracture prevention therapy, and bone densitometry service. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2003;62(4):350-2.
6. Lafage-Proust MH, Boudignon B, Thomas T. Glucocorticoid-induced osteoporosis: pathophysiological data and recent treatments. *Joint Bone Spine*. 2002; 70(2):109-18.
7. Kim JB, et al. Oct4-induced pluripotency in adult neural stem cells. *CELL*. 2009; 136(3):411-20.
8. Chung HY, et al. Effect of Dexamethasone and Deflazacort on the Function and Gene Expression of the Primary Cultured Human Osteoblast-Like Cells. *Endocrinology and metabolism*. 1996; 11(4):479-91.
9. Ulrika I, et al. Combined treatment with dexamethasone and raloxifene totally abrogates osteoporosis and joint destruction in experimental postmenopausal arthritis. *Arthritis Research Therapy*. 2011;13(3):1478-6354.
10. Walsh S, et al. High concentrations of dexamethasone suppress the proliferation but not the differentiation or further maturation of human osteoblast precursors in vitro: relevance to glucocorticoid-induced osteoporosis. *Rheumatology*. 2001;40(1):74-83.

11. Son SM. Bigeupcheongeumyobang. Seoul : Daeseongmoonhwas. 1995:607.
12. Hwang D.Y. Bangyakhappyeon. Seoul : Yeonglimsa. 2002:168.
13. Park OJ, Yim JH. A Clinical Study of Lumbago patients on the Effect of Oriental Medicine treatment with Dokhwalgisaeng-tang(Duhuoqisheng-tang) Gamibang. The Journal of Korean Acupuncture & Moxibustion Society. 2011;28(6):177-84.
14. Choi CH, et al. Clinical Study of Dokhwalkisaengtanggagambang(DGG) and Gamisayuktanggagambang(GSG) for Improving Lumbago and Knee Joint Pain. Kor. J. Herbology. 2013; 28(2):75-82.
15. Oh WK, et al. Effects of Dokhwalkisaeng-tang on Melanin Synthesis Inhibition and Gene Expression in B16F10 Melanoma Cells. Korean J. Oriental Physiology & Pathology. 2009;23(1):63-75.
16. Lee SK, et al. The Effects of Dokhwalgisaeng-tang(Duhuoqisheng-tang) and Jungsongouhyul Pharmacopuncture on Pain Control and Nerve Regeneration in the Crush-induced Sciatic Nerve Injury of the Rat Model. the Journal of Oriental Rehabilitation Medicine. 2009;19(3):15-32.
17. Hwang GS, Song JY. Effects of Dokhwalkisaengtang on LDL Oxidation in Macrophage Cell. the Korean Journal of Oriental Preventive Medicine. 2000; 4(2):205-13.
18. Kwon YD, Shin BC. Effects of Dokhwalgisaeng-tang and Herbar Chelidonii on the Cultured Spinal Sensory Neurons Damaged by XO/HX. Korean J. Oriental Physiology & Pathology. 2001;15(6):998-1005.
19. Moon HJ, Lim EM. Effects of Gagamdokhwalgisang-Tang on the Morphometric Changes of Femur and the Factors Related with Bone Metabolism in Ovariectomized Rats. the Journal of Oriental Obstetrics & Gynecology. 2006;19(1):47-68.
20. Lee YS, et al. Effects of Dokhwalkisaengtang on the ovariectomized rat model of postmenopausal osteoporosis. the Journal of Oriental Obstetrics & Gynecology. 2000;13(2):104-19.
21. Choi WH, Cho MR, Chae WS. Effects of the Gamidokwalgisaeng-tang(GDS) Oral Administration and Electro-acupuncture at Chishil(BL52), Hyonjong (GB39) on Osteoporotic Rats Induced by Ovariectomy. The Journal of Korean Acupuncture & Moxibustion Society. 2006;23(3):1-19.
22. Je YM, Yoo DY. Effects of Dokhwalgisaengtang-gami Water Extract on Osteoclast Differentiation and Osteoblast Function in RANKL-induced RAW 264.7 Cell. the Journal of Oriental Obstetrics & Gynecology. 2013;26(2):1-16.
23. Hwang IS, et al. Anti-inflammatory Effect of Houttuyniae Herba Water Extract on LPS-induced RAW 264.7 Mouse Macrophages. Kor. J Herbology. 2014;29(4):83-9.
24. Lee HJ, Kim KJ. The Effects of

- Houttuyniae Herba on the Mast Cell-mediated Inflammatory Responses. *The Journal of Korean Oriental Medical Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology*. 2009;22(2):60-73.
25. Song KC, Hwang GS. Effect of Houytnia cordata on Bone Marrow Stromal Cell and Osteoporosis Rat. *the Korean Journal of Oriental Preventive Medicine*. 2009;13(2):103-13.
 26. The Society of Oriental Rehabilitation Medicine. *Oriental Rehabilitation Medicine*. Seoul:Koonja publisher. 2011:113-4, 165-9.
 27. The Korean Association of Internal Medicine. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. Seoul:MIP publication. 2010:2883-96.
 28. Ministry of Health & Welfare. *Korea Health Statistics 2010 : Korea National Health and Nutrition Examination Survey(KNHANES V-1)*. Seoul:Ministry of Health & Welfare. 2011:68, 519.
 29. Lee DY, et al. Risk Factors for Postmenopausal Osteoporosis in Korea. *the Journal of KAHP*. 2004;2(2):137-48.
 30. Chung YS. Glucocorticoid-induced Osteoporosis: From Pathogenesis to Treatment. *Journal of Korean Society of Osteoporosis*. 2009;7(3):145-51.
 31. Canalis E. Mechanisms of glucocorticoid action in bone. *Current osteoporosis reports*. 2005;3(3):98-102.
 32. Forsblad-D'Elia H, et al. Influence of hormone replacement therapy on disease progression and bone mineral density in rheumatoid arthritis. *The Journal of rheumatology*. 2003;30(7):1456-519.
 33. Jarvis CI, Morin AK, Lynch AM. Bisphosphonates for osteoporosis prevention and treatment. *Clinical Reviews in Bone and Mineral Metabolism*. 2005;3(1):3-18.
 34. Aswar U, et al. Effect of aqueous extract of Solanum xanthocarpum Schrad. & Wendl. on postmenopausal syndrome in ovariectomized rats. *Chinese Journal of Integrative Medicine*. 2014;12(5):439-46.
 35. Forsblad DH, et al. Radiographic joint destruction in postmenopausal rheumatoid arthritis is strongly associated with generalised osteoporosis. *Annals of the rheumatic diseases*. 2003;62(7):617-23.
 36. Chantler IW, et al. Oral corticosteroid prescribing in women over 50, use of fracture prevention therapy, and bone densitometry service. *Annals of the rheumatic diseases*. 2003;62(4):350-2.
 37. Kang SK. *The Bibliographical studies on the acupuncture treatment of the osteoporosis*. The Journal of Korean Acupuncture & Moxibustion Society. 1995;11(2):171-90.
 38. Jeong SD. Naegyeong. Beijing:Inminwisaeng publisher. 2006:198, 410, 630.
 39. Joo SJ, Park JH, Seo BI. Effects of Korean Corni Fructus On treatment of Osteoporosis In Ovariectomized Rats. *Kor. J. Herbology*. 2007;22(2):83-95.

40. The Society of Korean Medicine Obstetrics and Gynecology. Oriental Obstetrics & Gynecology. Seoul: Uiseongdang. 2012:173.
41. Shin JY. BangyakhappyeonHaeseol. Seoul:Seongbosa. 2008:78.
42. Kook YB, et al. Formula Science. Seoul:Yeonglimsa. 1999:522-4.
43. Weinstein RS, et al. Promotion of osteoclast survival and antagonism of bisphosphonate-induced osteoclast apoptosis by glucocorticoids. J. Clin Invest. 2002;109(8):1041-8.
44. Brendan FB, et al. Roles for NF- κ B and c-Fos in osteoclasts. Journal of Bone and Mineral Metabolism. 2005; 23(1):11-5.
45. René SA. The direct role of vitamin D on bone homeostasis. Archives of Biochemistry and Biophysics. 2008; 473(2):225-30.
46. Ivan W, et al. Effects of osteogenic protein 1 (OP 1, BMP 7) on bone matrix protein expression by fetal rat calvarial cells are differentiation stage specific. Journal of Cellular Physiology. 1996;169(1):115-25.
47. Shin CS, Cho HY. Bone Remodeling and Mineralization. Endocrinology and metabolism. 2005;20(6):543-55.