

三氣飲加味方이 Dexamethasone 처리 조골세포에 미치는 영향

대전대학교 한의과대학 부인과교실
이혜인, 장새별, 유정은, 유동열

ABSTRACT

Effect of *Samki-eum Gamibang* Water Extract on Dexamethasone-treated Osteoblast

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

Objectives: The purpose of this study is to evaluate the effect of water extract of *Samki-eum Gamibang* (SKG) on osteoblast proliferation in murine calvarial cells.

Methods: The osteoblast separated from calvariae of murine was cultivated and evaluated the function of cell. After the addition of SKG on the culture medium, we investigated the effect of SKG on the cell viability, cell proliferation, alkaline phosphatase (ALP) activity, bone matrix protein synthesis and collagen synthesis of the cultivated osteoblast.

Results: SKG increased the survival rate and proliferation of rat calvarial osteoblast. SKG increased ALP activity, bone matrix protein synthesis and collagen synthesis of rat calvarial osteoblast.

Conclusions: This study suggests that SKG has effect on glucocorticoid-induced osteoporosis (GIO) resulting from increase of osteoblast function.

Key Words: *Samki-eum Gamibang* (SKG), glucocorticoid-induced osteoporosis (GIO), osteoporosis, osteoblast

I. 서 론

골다공증은 골량이 감소하고 골질이 변화하여 뼈의 미세구조가 손상되고 약한 외력에도 골절 위험이 증가하는 상태로 정의 된다¹⁾. 건강보험심사평가원 보고서에 따르면 2004~2008년 건강보험심사청구 자료를 분석한 결과, 50세 이상의 인구 중 골다공증 골절 발생은 연평균 3.8%씩 늘어나는 것으로 밝혀졌다. 2009년 국민건강영양조사에 의하면 우리나라의 50세 이상 인구의 골다공증 유병률은 남자 8.1%, 여자 38.7%로 남자에 비해서 여자가 4배 이상 높았다²⁾. 골다공증은 골절 후에 통증, 행동장애, 보행장애, 일상생활 수행능력 장애²⁾ 등을 포함하는 장기간 후유증으로 삶의 질에도 많은 영향을 미치므로 고령화가 급속도로 진행되는 시점에서, 골다공증에 대한 적극적인 치료와 예방은 필수적이라 할 수 있다.

부신 피질에서 분비되는 스테로이드 호르몬인 글루코코르티코이드는 임상적으로 가장 광범위하게 사용되는 약물로 항염증작용과 면역억제의 기능으로 척수손상, 관절염, 자가 면역질환, 피부염, 천식 등 여러 질병의 치료약으로 흔히 사용되는데³⁾, 조골세포와 성선호르몬 등에 영향을 주어 골형성을 감소시키며, 파골세포와 부갑상선호르몬의 기능 증가를 통해 골흡수를 증가시켜 결과적으로 골량을 감소시킴으로 골다공증을 유발한다고 알려져 있다⁴⁾.

한의학 문헌에서는 골다공증에 관한 직접적인 언급은 없으나, 임상 증상으로 보면 骨痿, 骨痺, 骨傷, 骨枯, 骨極 등의 범주에 속한다고 할 수 있으며⁵⁾, 임상에

서는 腎陰虛, 腎陽虛, 氣血兩虛, 風邪偏勝 등으로 변증하여 치료하고 있다⁶⁾.

三氣飲은 明代 張介賓이 저술한 《景岳全書》⁷⁾에 처음으로 수록되었으며, 黃度淵의 《方藥合編》⁸⁾에도 기록되었다. 《景岳全書》⁷⁾, 《方藥合編》⁸⁾에서 三氣飲은 氣血이 손상된 상태에서 風寒濕이 침입하여 발생한 筋骨의 歷節痺痛과 痢疾 후 鶴膝風을 치료하며 營血不和로 外邪가 침입하여 발생한 陰寒痺痛證을 치료한다 하였다.

본 연구에서 사용한 三氣飲加味方은 《景岳全書》⁷⁾, 《方藥合編》⁸⁾의 三氣飲 처방 구성(숙지황, 두충, 우슬, 당귀, 구기자, 백복령, 백작약, 육계, 세신, 백지, 부자, 감초)에 祛風除濕, 通痺解表止痛의 효능이 있는 독활과 清熱解毒, 消癰排膿, 利尿通淋의 효능이 있는 어성초를 가미하였다.

최근의 연구 결과에서 三氣飲과 三氣飲加味方은 관절염⁹⁻¹²⁾과 골다공증¹³⁻⁶⁾, 진통 및 소염¹⁷⁾, 뇌손상 및 혈전¹⁸⁾ 등에 효과가 있음이 밝혀졌다. 특히 골다공증과 관련해서 三氣飲加味方이 조골세포를 활성화시키며 파골세포의 분화를 억제한다는 연구¹⁵⁾가 있었으나, 스테로이드 제제(글루코코르티코이드) 투여로 발생한 골다공증에 미치는 영향에 대한 연구는 아직 접하지 못하였다.

이에 저자는 rat fetus의 두개골에서 조골세포를 분리하여 배양한 후 합성 글루코코르티코이드인 dexamethasone으로 처리하여 조골세포 작용을 억제한 후 三氣飲加味方 물 추출물을 투여하여 조골세포 생존율과 분열능, alkaline phosphatase 활성, 골기질 단백질 합성 및 collagen 생합성에 미치는 영향을 평가하여 三氣飲加味方의 글루코코르티코이드 유래 골

다공증에 대한 치료효과를 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 실험

1. 재 료

1) 등 물

실험동물은 임신한 암컷 SD rat를 대한바이오링크에서 구매하여 실험실에 적응시킨 후 사용하였다. 실험기간동안 고형사료 및 물을 충분히 제공하여 자유롭게 섭취하도록 하였다.

2) 약 재

三氣飲加味方の 구성 약물은 《景岳全書》⁷⁾, 《方藥合編》⁸⁾의 三氣飲을 기본으로 하여 독활과 어성초를 가미하고 약재의 용량은 조정하였다. 약재는 대전대학교 둔산한방병원에서 구입한 것을 엄선하여 사용하였다(Table 1).

Table 1. Prescription of *Samki-eum Gamibang*

韓藥名	生藥名	用量 (g)
熟地黃	<i>Rehmanniae Radix Preparat</i>	12
杜 仲	<i>Eucommiae Cortex</i>	2
牛 膝	<i>Achyranthis Bidentatae Radix</i>	2
當 歸	<i>Angelicae Gigantis Radix</i>	2
枸杞子	<i>Lycii Fructus</i>	2
白茯苓	<i>Hoelen</i>	2
白芍藥	<i>Paeoniae Radix Alba</i>	2
肉 桂	<i>Cinnamomi Cortex</i>	2
細 辛	<i>Asari Radix</i>	2
白 芷	<i>Angelicae Dahuricae Radix</i>	2
附 子	<i>Aconti Lateralis Preparata Radix</i>	2
甘 草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	4
獨 活	<i>Angelicae pubescentis Radix</i>	2
魚腥草	<i>Houttuyniae Herba</i>	10
Total		48

2. 방 법

1) 검액 제조

三氣飲加味方 48 g에 증류수 1 ℓ를 가하고 6시간 이상 가열하여 환류 추출하였다. 여과지로 여과한 후, 여액을 evaporator (EYERA, Japan)을 사용하여 감압 농축한 다음 동결 건조하여 실험 대상에 사용할 때까지 냉동보관 하였다. 실험시에는 三氣飲加味方 추출물(이하 SKG라 함)을 배지에 녹인 다음 pore size 가 0.45 μm 인 여과지에 통과시킨 후 사용하였다.

2) 약물 처리

실험은 4개군, 즉 (1) 0.01% demethyl sulfoxide(DMSO)로 처리한 정상 대조군(Normal control, NC), (2) dexamethasone 단독 처리군, (3) dexamethasone을 처리한 후 1 μg/ml의 三氣飲加味方 추출물을 투여한 군(SKG1), (4) dexamethasone을 처리한 후 10 μg/ml의 三氣飲加味方 추출물을 투여한 군(SKG10)으로 나누어 시행하였다.

3) Fetal calvarial cell culture(FCS)

임신 21일째인 SD rat의 자궁을 절개하여 fetus를 꺼낸 후, fetus의 후두부를 절개하고 calvarie를 적출하였다. Calvarie에 붙어있는 결체조직을 박리하여 제거하고 Hanks' balanced salt solution(HBSS)로 세척하였다. Calvarie를 1.5 ml의 collagenase, trypsin, 0.5 mM ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA) 용액으로 37°C에서 반응시켰다. 상등액을 이용하여 500 rpm으로 원심분리하여 침전된 calvarial cell을 얻은 후 phosphate buffer saline(PBS)에 재현탁하여 1,500 rpm으로 원심분리하여 세척한 후, 이를 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM) 배지에 넣어 현탁한 후 37°C의 5% CO₂에서 배양하였다. 상

등액을 제거시키고 남은 calvarie에 다시 1.5 ml의 효소를 넣어 위와 같은 반응을 수회 반복하였다. 세포의 배지는 3일에 한 번씩 교체하였다. 배양된 세포는 2주가 지난 후 trypsin 처리하여 세포의 수를 측정 한 후 실험에 이용하였다.

4) 조골세포의 생존율 측정

SKG를 첨가하여 3일간 배양한 후 조골세포에 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) assay를 시행하였다. Cell suspension을 hemocytometer를 사용하여 counting을 하고 난 후, 96 well plate의 각 well에 세포 부유액 180 μ l를 넣고, SKG를 PBS에 녹인 후 농도 별로 각 well에 첨가한 후 incubation하였다. 3일 후 SKG를 제거하고, 각각의 well에 MTT solution을 100 μ l씩 첨가하고 4시간 동안 incubation한 후 MTT 희석액을 제거하였다. 각 well에 DMSO를 100 μ l씩 첨가하여 15~20분 동안 plate shaker로 흔들어 준 후, enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) reader를 이용하여 wave length 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

5) 조골세포의 분열능 측정

Subculture를 통하여 $1.0 \sim 3.0 \times 10^5$ cells/well이 되도록 24 well plate에 seeding 하였으며, 6일 동안 배양시킨 세포수를 세기 위해서 세포의 배지를 제거하고, 세포를 HBSS로 세척하였다. 이후 collagenase, trypsin, 0.5 mM EDTA 용액을 가하여 세포를 culture plate로부터 분리하였다. 세포를 isoton-II solution을 사용하여 20 배로 희석한 후 세포계수기(Sysmax F-820)로 세포수를 측정하였다.

6) Alkaline phosphatase(ALP) 활성 측정

ALP 활성은 ALP-K Kit를 사용하여

평가하였다. 6일 동안 세포를 배양한 plate를 냉각된 PBS로 세척하고 세포를 scraper로 긁어낸 후 leupeptin이 함유된 냉각된 PBS에 현탁하였다. 이 현탁액을 냉각상태로 ultrasonicator로 sonication한 후 3000 rpm에서 10분간 원심분리 하였다. 원심분리를 한 후 상등액을 취하여 0.56 M 2-amino-2-methyl-propanol, 1 mM $MgCl_2$, 10 mM p-nitrophenylphosphate를 함유한 반응액과 37°C에서 10분 동안 반응시켰다. 0.2 N NaOH 1 ml를 가하여 반응을 중지시킨 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

7) 골기질 단백질 합성 측정

10일간 세포를 배양한 plate를 PBS로 세척하고 scraper를 이용해 세포를 긁어낸 후 5 mM dithiothreitol(DTT)이 함유된 PBS에 현탁하였다. 이 현탁액을 냉각상태에서 ultrasonicator로 sonication하였다. 현탁액을 취하여 biuret 시약과 37°C에서 10분간 반응시킨 후 550 nm에서 흡광도를 측정하였다.

8) Collagen 생합성 측정

10일 동안 세포를 배양한 plate를 PBS로 세척하고 scraper를 이용하여 세포를 긁어내었다. 이를 5 mM dithiothreitol이 함유된 50 mM tris buffer에 현탁시킨 후 ultrasonicator로 sonication하였다. 이후, 100,000 xg에서 30분간 원심분리하여 상등액을 제거시킨 후 pellet에 6 N HCl를 넣고 100°C에서 24시간 동안 가수분해하였다. 이를 6 N NaOH로 중화시킨 후 물을 사용하여 적정 농도로 희석하였고, hydroxy-proline은 amino acid analyzer를 이용하여 측정하였다.

3. 통계 분석

Student's T-test를 실시하여 각 군과의 유의성을 검정하고, P값이 0.05 및 0.01보다 작은 경우 유의성이 있다고 판정하였다.

III. 결 과

1. 조골세포의 생존율에 미치는 영향

SKG의 세포 독성을 평가하기 위해서 조골세포에 MTT assay를 시행하였다. 그 결과, dexamethasone 단독 처리군은 정상 대조군에 비해 생존율이 74.6%로 유의성 있게(p<0.01) 저하되었으며, dexamethasone 처리 후 1 µg/ml의 SKG와 10 µg/ml의 SKG를 투여한 경우 각각 104.2%, 103.1%로 조골세포의 생존율이 dexamethasone 단독 처리군에 비하여 유의성 있게(p<0.01) 증가하였다(Fig. 1).

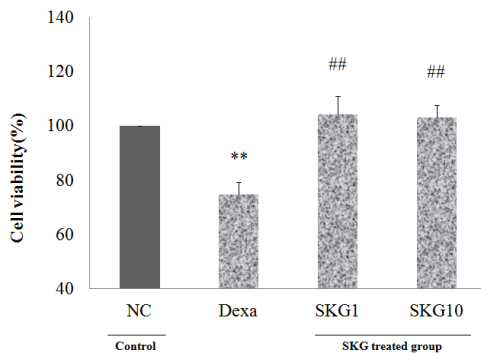


Fig. 1. Effects of SKG on viability of rat calvarial cell.

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

Dexa : dexamethasone

SKG1 : dexamethasone+1 µg/ml of SKG

SKG10 : dexamethasone+10 µg/ml of SKG

** : 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 두개골에서 분리한 조골세포를 6일 동안 배양한 결과, 정상 대조군은 54.2×10^4 cells/well이었으며, dexamethasone 단독 처리군은 28.1×10^4 cells/well로 정상 대조군에 비하여 유의성 있게(p<0.05) 감소하였다. Dexamethasone 처리 후 1 µg/ml의 SKG과 10 µg/ml의 SKG를 투여한 경우 각각 46.3×10^4 cells/well, 62.1×10^4 cells/well로 조골세포 분열능이 dexamethasone 단독 처리군에 비해 유의성 있게(p<0.05, p<0.01) 증가하였다(Fig. 2).

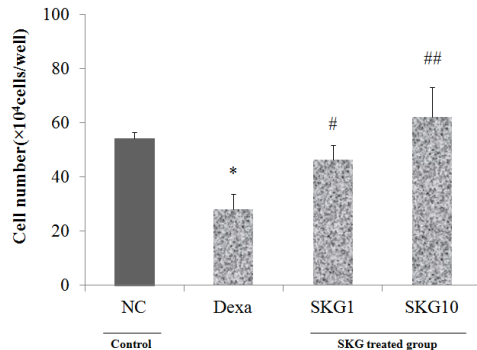


Fig. 2. Effects of SKG on cell proliferation of rat calvarial cell.

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

Dexa : dexamethasone

SKG1 : dexamethasone+1 µg/ml of SKG

SKG10 : dexamethasone+10 µg/ml of SKG

* : p<0.05 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

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/ml였으며, dexamethasone 단독 처리군은 9.8 unit/ml로 유의성 있

계 ($p < 0.05$) 감소하였다. Dexamethasone 처리 후 1 $\mu\text{g/ml}$ 의 SKG과 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 SKG를 투여한 경우 각각 15.6 unit/ml, 14.5 unit/ml로 alkaline phosphatase(ALP) 활성이 dexamethasone 단독 처리군에 비해 유의성 있게 ($p < 0.05$, $p < 0.01$) 증가하였다(Fig. 3).

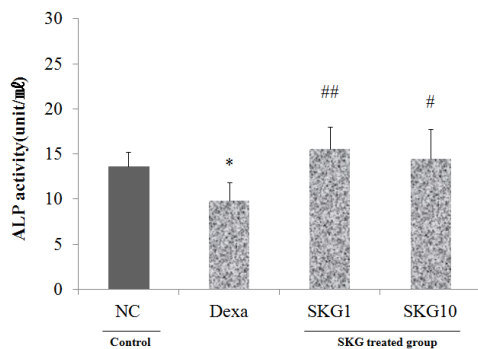


Fig. 3. Effects of SKG on alkaline phosphatase (ALP) activity of rat calvarial cell. Each bar represents Mean \pm SD of 6 cultured well.

NC : vehicle (0.01% DMSO)
 Dexa : dexamethasone
 SKG1 : dexamethasone+1 $\mu\text{g/ml}$ of SKG
 SKG10 : dexamethasone+10 $\mu\text{g/ml}$ of SKG
 * : $p < 0.05$ 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

4. 골기질 단백질 합성에 미치는 영향

Rat fetus의 두개골에서 분리한 조골세포를 10일 동안 배양한 결과, 정상 대조군에서 세포가 생성하는 골기질 단백질 합성량은 3.47 $\mu\text{g/dl}$ 이었고, dexamethasone 단독 처리군은 2.94 $\mu\text{g/dl}$ 로 유의성 있게 ($p < 0.01$) 감소하였다.

Dexamethasone을 처리 후, 1 $\mu\text{g/ml}$ 의 SKG를 투여한 경우에는 3.26 $\mu\text{g/dl}$ 이었고, 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 SKG를 투여한 경우에는 3.50 $\mu\text{g/dl}$ 를 나타내어 골기질 단백질 합성이 dexamethasone 단독 처리군에 비

해 유의성 있게 ($p < 0.05$, $p < 0.01$) 증가하였다(Fig. 4).

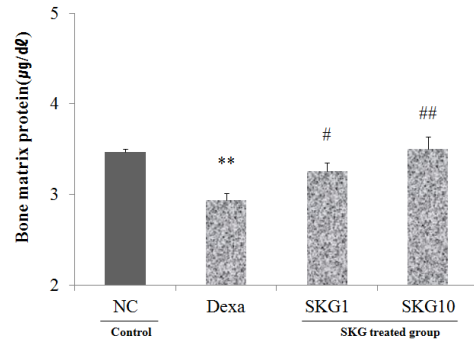


Fig. 4. Effects of SKG on bone matrix protein synthesis of rat calvarial cell. Each bar represents Mean \pm SD of 6 cultured well. NC : vehicle (0.01% DMSO)

Dexa : dexamethasone
 SKG1 : dexamethasone+1 $\mu\text{g/ml}$ of SKG
 SKG10 : dexamethasone+10 $\mu\text{g/ml}$ of SKG
 ** : $p < 0.01$ 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 조골세포 10일 동안 배양한 결과, 정상 대조군의 collagen 생합성량은 144.5 $\mu\text{g/well}$ 이었고, dexamethasone 단독 처리군은 110.6 $\mu\text{g/well}$ 로 유의성 있게 ($p < 0.01$) 감소하였다. Dexamethasone 처리 후 1 $\mu\text{g/ml}$ 의 SKG를 투여한 경우에 collagen 생합성량은 131.0 $\mu\text{g/well}$, 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 SKG를 투여한 경우에는 149.4 $\mu\text{g/well}$ 을 나타내어 collagen 생합성량이 dexamethasone 단독 처리군에 비해 유의성 있게 ($p < 0.05$, $p < 0.01$) 증가하였다(Fig. 5).

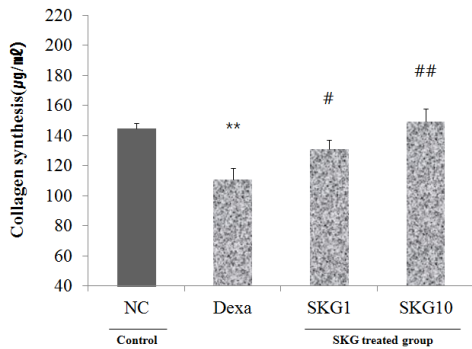


Fig. 5. Effects of SKG on collagen synthesis of rat calvarial cell.

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

Dexa : dexamethasone

SKG1 : dexamethasone+1 µg/ml of SKG

SKG10 : dexamethasone+10 µg/ml of SKG

** : 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

IV. 고 찰

골다공증은 골기질의 감소로 인해 골 질량이 전반적인 감소를 일으키는 질환 으로서, 대사성 골질환 중 가장 흔하며 골량이 감소할 뿐만 아니라 골조직 미세 구조의 파괴로 인하여 약한 외력에도 골절 이 생기는 전신질환이라 할 수 있다^{6,19)}. 특히 우리나라는 빠른 속도로 인구가 고령화 되면서 골다공증의 유병율과 골다 공증 골절로 인한 사망률, 다양한 합병 증이 증가하고 있어 사회적으로 중요한 문제가 되고 있다.

골다공증은 일차성과 이차성 골다공증 으로 분류된다. 일차성(원발성) 골다공 증은 폐경 후 에스트로겐 결핍으로 인한 제 1형 골다공증과 노인에서 칼슘과 비 타민 D 부족으로 인한 제 2형 골다공증 으로 분류하지만, 거의 비슷한 시기에 병합되어 진행되므로 정확히 나누기는

어렵다. 이차성(속발성) 골다공증은 발 병 연령에 관계없이 질병 또는 수술, 약 물 복용 등으로 인하여 골형성에 장애가 있거나 골소실이 증가되는 경우에 발병 한다. 이차성 골다공증 중에 가장 대표 적인 것은 글루코코르티코이드 인한 골 다공증으로, 골다공증 중에서 세 번째로 흔하다^{2,20)}.

부신피질에서 분비되는 스테로이드 호 르몬인 글루코코르티코이드는 항염증작 용과 면역억제의 기능으로 임상에서 광 범위하게 사용되는데, 골대사의 측면에 서는 골의 재형성에 직접적으로 영향을 주며, 장의 칼슘흡수와 신장의 칼슘배설 등에 간접적으로 영향을 준다²¹⁾. 글루코코 르티코이드 유래 골다공증 (glucocorticoid -induced osteoporosis, GIO)은 조직학적 연구에서 뼈 형성 감소가 나타나며, 골량 및 골밀도의 감소와 함께 골절 위험성이 증가한다. 글루코코르티코이드는 조골세 포 계열의 세포 증식을 억제함으로써 조 골세포의 수를 감소시킬 뿐 아니라²²⁾, 조골세포의 사멸을 촉진하고 조골세포화 (osteoblastogenesis)를 억제한다²³⁻⁵⁾. 또 한 조골세포화를 촉진하는 신호 경로를 저해함으로써 조골세포의 분화를 억제하 며²⁶⁾, 성숙한 파골세포의 기능에 필수적 인 cytoskeletal organization을 억제하여 골흡수 활성을 억제하고 골재형성 측면 에서 골형성을 더욱 감소시킨다³⁾.

통계적으로 살펴보면, 글루코코르티코 이드를 투여한 환자의 경우 1년 이내 골 밀도의 12%가 감소되고 그 이후로는 서 서히 진행되어 매년 골밀도가 2~5%씩 점차적으로 감소된다고 하였다²⁷⁾. 주로 대퇴골두가 가장 흔히 영향을 받으며 상완골두가 그 다음으로 영향을 받지만 장

골 어느 부위에서도 나타날 수 있다^{28,29)}. 또한 글루코코르티코이드를 사용하면 골밀도가 동일하더라도 사용하지 않은 군에 비하여 골절 발생률이 높고, 골밀도 T-값이 낮지 않은 경우에도 골절이 발생할 수 있다²⁾.

글루코코르티코이드 유래 골다공증의 치료법은 우선 글루코코르티코이드를 감량하는 것이다. 용량은 가능한 최소 용량을 최단기간동안 사용해야하며, 전신적 처리 방법을 국소요법 또는 흡입제 사용으로 바꾸거나 제형을 변화하는 것도 고려될 수 있다²⁾. 상황에 따라서 비타민 D제제와 칼슘제제, fluoride, bisphosphonates, thiazide, anabolic steroid 등이 다양하게 사용되고 있으나³⁰⁻⁴⁾ 최근에 시행된 관련 연구에 따르면 글루코코르티코이드 유발성 골다공증 치료율은 14~30%로 매우 낮으며 치료법과 예방법은 아직 뚜렷하게 확립되지 않은 실정이다³⁵⁻⁷⁾.

한의학에서 뼈는 《內經·素問》³⁸⁾의 〈宣明五氣論〉에 따르면 “腎主骨”이라 하였고, 〈六節臟象論〉에서 “腎者...其充在骨”이라 하였으며, 〈五臟生成論〉에서 “腎之合骨也”라 하였고, 〈逆調論〉에서는 “腎者水也, 而生于骨, 腎不生即髓不能滿”이라 하였다. 이로 미루어볼 때 뼈의 성장발육과 기능이 腎中精氣의 성쇠의 영향을 받는다고 볼 수 있다.

한의학 문헌에서는 골다공증에 관한 직접적인 표현은 없으나, 임상 증상으로 보면 骨痿, 骨痺, 骨傷, 骨枯, 骨極 등의 범주에 속한다고 할 수 있으며⁵⁾, 임상에서는 腎陰虛, 腎陽虛, 氣血兩虛, 風邪偏勝 등으로 변증하여 치료하고 있다⁶⁾. 특히 骨痿와 骨痺는 내경에서 언급되었는데 《內經·素問》³⁸⁾의 〈痿論〉에 “腎主身之

骨髓...腎氣熱則腰脊不舉, 骨枯而髓減, 發爲骨痿”, “有所遠行勞倦, 逢大熱而渴, 渴則陽氣內伐, 內伐則熱舍于腎, 腎者水臟也, 今水不勝火, 則骨枯而髓虛, 故足不任身, 發爲骨痿”라 하여 骨枯髓減 하는 증상을 ‘骨痿’라 하였으며, ‘骨痺’에 대해서는 〈痺論〉에 “腎痺者, 善脹, 尻以代踵, 脊以代頭”라 하였고, 〈長刺節論〉에서는 “病在骨, 骨重不可舉, 骨髓酸痛, 寒氣至, 名曰骨痺”라고 기술되어 있어 골다공증과 유사한 발병기전과 증상을 가지므로 지금의 골다공증과 관련지어 생각할 수 있으며, 오장육부 중 腎과 직접적인 관계가 있는 것으로 생각 된다³⁹⁾. 이러한 견해는 《內經·素問》³⁸⁾의 〈上古天真論〉에서 남자는 “七八...天癸竭...腎氣衰, 形體皆極, 八八, 則齒髮去”라 하였고, 여자는 “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 하여 연령이 증가함에 따라 腎氣가 점차 衰해지고 天癸가 竭하여 골다공증이 발생하는 것³⁹⁾과 연관되며, 현대 의학적으로는 노화와 폐경으로 인한 일차성 골다공증의 개념과 유사한 것으로 생각된다.

三氣飲은 明代 張介賓이 저술한 《景岳全書》⁷⁾에 처음으로 수록되었으며, 黃度淵의 《方藥合編》⁸⁾에도 기록되었다. 《景岳全書》⁷⁾, 《方藥合編》⁸⁾에서 三氣飲은 氣血이 손상된 상태에서 風寒濕이 침입하여 발생한 筋骨의 歷節痺痛과 痢疾 후 鶴膝風을 치료하며, 營血不和로 外邪가 침입하여 발생한 陰寒痺痛證을 치료한다 하였다. 이로 보아 三氣飲이 관절질환의 치료에 사용되었음을 알 수 있다. 三氣飲은 숙지황, 두충, 우슬, 당귀, 구기자, 백복령, 백작약, 육계, 세신, 백지, 부자, 감초로 구성되어 있으며, 《景

岳全書》⁷⁾의 三氣飲은 숙지황은 3錢이고 당귀, 구기자, 두충은 2錢 나머지 약물은 1錢으로 구성되어 있고, 《方藥合編》⁸⁾에서는 숙지황이 3錢이고 나머지 약물은 모두 1錢으로 구성되어 있다. 본 연구에서는 三氣飲을 기본으로 하여 독활과 어성초를 가미하고, 용량을 조정하여 숙지황과 어성초를 균약으로 하는 三氣飲加味方을 구성하였다.

三氣飲加味方の 처방 구성을 살펴보면, 숙지황은 滋陰補血, 益精하고 두충, 우슬, 구기자는 補肝腎, 強筋骨의 효능으로 腰膝酸軟을 치료한다. 당귀는 補血和血, 調經止痛하여 外科 및 傷科에도 사용되며, 백복령은 利水滲濕, 백작약은 養血柔肝, 緩急止痛한다. 백지는 祛風除濕의 효능이 있어 腰膝疼痛을 치료한다. 육계는 溫補腎陽하고 부자는 回陽補火 散寒除濕하며 세신은 祛風散寒하여 風寒濕痺를 치료한다. 감초는 和中, 緩急止痛의 효능이 있어서 四肢拘攣作痛을 치료한다⁴⁰⁾. 그리고 독활은 祛風除濕, 通痺解表止痛의 효능⁴⁰⁾으로 항혈소판 및 항산화 효과⁴¹⁾, 항염효과⁴²⁾ 등이 있으며, 어성초는 清熱解毒, 消癰排膿, 利尿通淋의 효능⁴⁰⁾으로 면역 증진⁴³⁾, 항산화 작용⁴⁴⁾, 항염효과⁴⁵⁾ 등이 있어 골다공증에 대한 효과를 증강시킬 수 있을 것으로 생각하였다.

최근의 연구 결과에서 三氣飲과 三氣飲加味方은 관절염⁹⁻¹²⁾과 골다공증¹³⁻⁶⁾, 진통 및 소염¹⁷⁾, 뇌손상 및 혈전¹⁸⁾ 등에 효과가 있음이 보고되었다. 특히 골다공증과 관련해서 三氣飲加味方이 조골세포를 활성화시키며 파골세포의 분화를 억제한다는 연구¹⁵⁾가 있었으나, 스테로이드 제제(글루코코르티코이드) 투여로 발생한 골다공증에 미치는 영향에 대한 연구는

아직 접하지 못하였다.

이에 저자는 三氣飲加味方이 글루코코르티코이드 투여로 유발된 골다공증에 효과가 있는지 알아보기 위해서 본 연구를 진행하였다.

Rat fetus의 두개골에서 조골세포를 분리하여 배양한 후 합성 글루코코르티코이드인 dexamethasone으로 처리하여 三氣飲加味方 물 추출물(SKG)이 세포에 미치는 영향을 평가하였다. 연구지표로 조골세포 생존율과 분열능에 미치는 영향, 골 석회침착에 관련된 골세포 표면의 ALP활성에 미치는 영향, 조골세포의 골기질 단백질 합성과 collagen 생합성에 미치는 영향을 선정하여 평가하였다.

SKG의 세포 독성을 평가하기 위해서 조골세포에 MTT assay를 시행하였다. 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 SKG와 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 SKG를 투여한 경우 각각 104.2%, 103.1%로서 조골세포의 생존율이 dexamethasone 단독 처리군에 비하여 유의성 있게($p < 0.01$) 증가하였다(Fig. 1).

Rat fetus의 두개골에서 분리한 조골세포를 6일 동안 배양한 결과, 정상 대조군은 54.2×10^4 cells/well이었으며, dexamethasone 단독 처리군은 28.1×10^4 cells/well로 정상 대조군에 비하여 유의성 있게($p < 0.05$) 감소하였다. Dexamethasone 처리 후 1 $\mu\text{g/ml}$ 의 SKG와 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 SKG를 투여한 경우 각각 46.3×10^4 cells/well, 62.1×10^4 cells/well로 조골세포 분열능이 dexamethasone 단독 처리군에 비해 유의성 있게($p < 0.05$, $p < 0.01$) 증가하였다(Fig. 2).

골형성이 활발할 때 그 활성이 증가하여

조골세포 분화의 표지인자로 사용되는⁴⁶⁾ ALP의 활성을 측정된 결과, 정상 대조군에서는 13.6 unit/ml였으며 dexamethasone 단독 처리군은 9.8 unit/ml로 유의성 있게 ($p<0.05$) 감소하였다. Dexamethasone 처리 후 1 $\mu\text{g/ml}$ 의 SKG와 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 SKG를 투여한 경우 각각 15.6 unit/ml, 14.5 unit/ml로 alkaline phosphatase(ALP) 활성이 dexamethasone 단독 처리군에 비해 유의성 있게 ($p<0.05$, $p<0.01$) 증가하였다 (Fig. 3).

Rat fetus의 두개골에서 분리한 조골세포를 10일 동안 배양하여 골기질 단백질 합성량을 측정된 결과, 정상 대조군에서 세포가 생성하는 골기질 단백질 합성량은 3.47 $\mu\text{g/dl}$ 이었고, dexamethasone 단독 처리군은 2.94 $\mu\text{g/dl}$ 로 유의성 있게 ($p<0.01$) 감소하였다. Dexamethasone을 처리 후, 1 $\mu\text{g/ml}$ 의 SKG를 투여한 경우에는 3.26 $\mu\text{g/dl}$ 이었고, 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 SKG를 투여한 경우에는 3.50 $\mu\text{g/dl}$ 를 나타내어 골기질 단백질 합성이 dexamethasone 단독 처리군에 비해 유의성 있게 ($p<0.05$, $p<0.01$) 증가하였다 (Fig. 4).

골기질 단백질은 뼈의 유연성과 탄성을 유지시키며 구조적인 지지 역할을 하는데 그 중 가장 기본이 되는 단백질은 collagen (type I collagen)으로 전체 골기질 중 90%를 구성하고 있다⁴⁷⁾. Rat fetus의 두개골에서 분리한 조골세포를 10일 동안 배양한 결과, 정상 대조군의 collagen 생합성량은 144.5 $\mu\text{g/well}$ 이었고, dexamethasone 단독 처리군은 110.6 $\mu\text{g/well}$ 로 유의성 있게 ($p<0.01$) 감소하였다. Dexamethasone 처리 후 1 $\mu\text{g/ml}$ 의 SKG를 투여한 경우에 collagen 생합성량은 131.0 $\mu\text{g/well}$, 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 SKG를 투여한 경우에는 149.4

$\mu\text{g/well}$ 을 나타내어 collagen 생합성량이 dexamethasone 단독 처리군에 비해 유의성 있게 ($p<0.05$, $p<0.01$) 증가하였다 (Fig. 5).

이상의 결과, 三氣飲加味方 추출물을 두개골에서 분리한 조골세포에 투여했을 때, dexamethasone 처리로 정상 대조군에 비하여 저하된 조골세포 생존율, 분열능, ALP의 활성, 골기질 단백질 합성, 콜라겐 생합성을 증가시키는 것으로 나타났다.

결론적으로, 三氣飲加味方의 물 추출물은(SKG)은 세포 독성이 없으며, 합성 글루코코르티코이드인 dexamethasone으로 저하된 조골세포의 기능을 향상시키므로 글루코코르티코이드 유래 골다공증의 치료와 예방에 효과적으로 활용할 수 있을 것으로 평가되었다. 이전의 연구들과 종합하여 보았을 때, 三氣飲加味方은 노화와 폐경으로 인한 일차성 골다공증 뿐만 아니라 약물로 인한 이차성 골다공증에도 효과가 있을 것으로 생각되므로 향후 이에 관한 더 많은 연구가 필요할 것으로 생각된다.

V. 결 론

SD rat fetus의 두개골로부터 분리하여 배양한 조골세포에 dexamethasone을 처리한 후 三氣飲加味方 물 추출물(SKG)을 첨가한 다음 조골세포의 생존율과 분열능, ALP 활성, 골기질 단백질 합성, collagen 생합성을 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. SKG는 dexamethasone 처리한 두개골 조골세포의 세포 생존율을 증가시켰다.

2. SKG는 dexamethasone 처리한 두개골 조골세포의 분열능을 증가시켰다.
3. SKG는 dexamethasone 처리한 두개골 조골세포의 ALP 활성을 증가시켰다.
4. SKG는 dexamethasone 처리한 두개골 조골세포의 골기질 단백질 합성량을 증가시켰다.
5. SKG는 dexamethasone 처리한 두개골 조골세포의 collagen 생합성량을 증가시켰다.

이상의 연구결과, SKG는 dexamethasone 처리로 인해 저하된 조골세포의 생존율과 분열능을 증가시키고, dexamethasone 처리로 인해 저하된 조골세포의 ALP 활성, 골기질 단백질 및 collagen 생합성량을 증가시키는 것을 확인하였다. 그러므로 SKG가 글루코코르티코이드 유래 골다공증의 치료와 예방에 효과적으로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

- Received : Apr 21, 2016
- Revised : Apr 29, 2016
- Accepted : May 11, 2016

참고문헌

1. Kanis JA. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis: synopsis of a WHO report. WHO Study Group. *Osteoporos Int.* 1994;4(6):368-81.
2. Korean Society for Bone and Mineral Research. *Textbook of Osteoporosis.* 4rd ed. Seoul:KoonJa publisher. 2013: 5, 217-29.
3. Kim SY, Kim HJ. Glucocorticoid-induced Osteoporosis; Update. *J Korean Orthop Assoc.* 2009;44(2):151-8.
4. Buckley LM, et al. Variation in physician's judgements about corticosteroid-induced osteoporosis by physician speciality. *Journal of Rheumatology.* 1998;25(11):2195-202.
5. Kang SK, Park YB, Ahn HS. The bibliographical studies on the acupuncture treatment of the osteoporosis. *The J of Korean Acupuncture & Moxibustion Society.* 1995;11(2):171-90.
6. Korean academy of oriental rehabilitation medicine. *Oriental rehabilitation medicine.* Seoul:KoonJa publisher. 2003;4:105-6.
7. Jang GB. *Kyungakjeonsuh Formulary.* Seoul:Bubin publisher. 2007:96.
8. Hwang DY. *Jeungmaek Bangyakapyeon.* Seoul:Namsandang publisher. 2009:136.
9. Lee KM, et al. Effects of *Samgi-eum (Sanqi-yin)* Treatment on the Monosodium Iodoacetate-induced Osteoarthritis in Rats. *Journal of Korean Medicine Rehabilitation.* 2008;18(2):17-31.
10. Choi ES. Effects of *Samki-eum (sanqi-yin)* on Freund's Complete Adjuvant-induced Arthritic Rats. *Journal of Korean Medicine Rehabilitation.* 2013; 23(3):1-14.
11. Kim SJ, Lee CW. The Experimental Study of *Samgium* and *Samgium* (except *Kyungpobuja*) on the Affecting of Free Radical Generating System by Adjuvant Arthritis-Induced Rats. *Journal of Korean Medicine Rehabilitation.* 1997;7(2):1-45.

12. Jeon GT. Experimental Studies on the Effects of *Binsosan* and *Sangieum* on Adjuvant Arthritis. Graduate School of Daejeon University. 1994.
13. Lee HC. The preventive and healing effects of *Gamikobonkeonyangtang* and *Gagamsamkiyum* on Osteoporosis in Ovariectomized Rats. Graduate School of Kyung Hee University. 2000.
14. Lee DY. Effects of *Samkieum*(SK) on Osteoblast Function. Graduate School of Kyungwon University. 2004.
15. Park SM, Yoo DY. Effects of *Samkieumgamibang* Extract on Osteoclast Differentiation and Osteoblast Function. *J Korean Obstet & Gynecol.* 2012;25(2):23-42.
16. Yu SJ, et al. A Comparative Study of BMD between Osteoporosis Patients Taking Fosamax and Taking Fosamax and *Samgieumgamibang*. *J Korean Obstet & Gynecol.* 2012;25(1):11-9.
17. Kim YG, Kim KH. Studies on the Analgesic, Anti-inflammatory effect of *Samgi-um* and *Samgi-um* with Buthus. Kyung Hee University. 1983; 6(1):257-63.
18. Lim SM, et al. The Study on the Effects of *Samgiyeum*(SGY) and *Tongbiyeum*(TBY) on Thrombosis and Brain Damage. *Korean J Orient int Med.* 2002;23(4):617-26.
19. Lim SG. Recent trends of Osteoporosis research. *Biochemistry and molecular biology news.* 2002;22(3):270-6.
20. Lim YW, Kim YS, Sun DH. Osteoporosis: Pathogenesis and Fracture Prevention. *Hip & pelvis.* 2009;21(1):6-16.
21. Min YG. The Effects of Glucocorticoids on Osteoblast. *Endocrinology and Metabolism.* 2002;17(1):20-2.
22. Smith E, Coetzee GA, Frenkel B. Glucocorticoids inhibit cell cycle progression in differentiating osteoblasts via glycogen synthase kinase-3beta. *J Biol Chem.* 2002;277:18191-7.
23. Canalis E. Mechanisms of glucocorticoid action in bone: implications to glucocorticoid-induced osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996;81(10):3441-7.
24. Pereira RC, Delany AM, Canalis E. Effects of cortisol and bone morphogenetic protein-2 on stromal cell differentiation: correlation with CCAAT-enhancer binding protein expression. *Bone.* 2002; 30(5):685-91.
25. Pereira RM, Delany AM, Canalis E. Cortisol inhibits the differentiation and apoptosis of osteoblasts in culture. *Bone.* 2001;28:484-90.
26. Ohnaka K, et al. Glucocorticoid suppresses the canonical Wnt signal in cultured human osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;329:177-81.
27. Weinstein RS. Glucocorticoid-induced osteoporosis. *Rev Endocr Metab Disord.* 2001;2:65-73.
28. Weinstein RS, Nicholas RW, Manolagas SC. Apoptosis of osteocytes in glucocorticoid-induced osteonecrosis of the hip, *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85(8):2907-12.
29. Mankin HJ. Nontraumatic necrosis

- of bone (osteonecrosis). *N Engl J Med*. 1992;326(22):1473-9.
30. Aloia JF, Vaswani A, Neunier PJ. Coherence treatment of postmenopausal osteoporosis with growth hormone and calcitonin. *Calcif Tissue Int*. 1987;40:253-9.
 31. Aloia JF, Vaswani A, Kapoor A. Treatment of osteoporosis with calcitonin with and without growth hormone. *Metabolism*. 1985;34:124-8.
 32. Eastell R, Reid DM, Compstone J. A UK consensus group on management of glucocorticoid-induced osteoporosis: an update. *J Intern Med*. 1998;244:271-92.
 33. Adachi JD, Bensen WG, Brown J. Intermittent etidronate therapy to prevent glucocorticoid-induced osteoporosis. *N Engl J Med*. 1997;337:382-7.
 34. Reginster JY, Henrotin Y, Gosset C. Promising new agents in osteoporosis. *Drugs RD*. 1999;1:195-201.
 35. Buckley LM, et al. Variation in physician's judgements about corticosteroid-induced osteoporosis by physician speciality. *J Rheumatol*. 1998;25:2195-202.
 36. Buckley LM, et al. Prevention of corticosteroid-induced osteoporosis : results of a patient survey. *Arthritis Rheum*. 1999;42:1736-9.
 37. Osiri M, et al. Practice pattern variation among internal medicine specialists in the prevention of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Journal of Clinical Rheumatology*. 2000;6:117-22.
 38. Bae BC. Geumseok Whangjenaegyong somun. Seoul:Sungbo publisher. 1994: 131, 134, 255, 320.
 39. Kim JH, Lee H. A Study of Herbal -acupuncture with *Cyperi Rhizoma* Infusion Solution on Osteoporotic Rats Induced by Ovariectomy. *The J of Korean Acupuncture & Moxibustion Society*. 2008;25(2):243-57.
 40. National Oriental Medicine School Coeditorship of Herbal Medicines Professors. *Herbal Medicine*. 2nd rev. ed. Seoul:Youngrimsa. 2008:161, 168, 345, 372, 377, 466, 583, 602, 629, 632, 634, 654.
 41. Yang SA, et al. Effects of *Aralia continentalis Kitagawa* on Antiplatelet and Antioxidative Activities. *Journal of Life Science*. 2008;18(3):357-62.
 42. Yang GY, Kim YI, Lee H, et al. A study on the effect of herbal-acupuncture with *angelicae pubescentis radix* solution at joksamni on collagen-induced arthritis. *The J of Korean Acupuncture & Moxibustion Society*. 2006;23(3):191-206.
 43. Kim JH, Kim YS, Lim EM. Immune Enhancing Effect of *Houttuyniae Herba* on Mouse Macrophage. *J Korean Obstet & Gynecol*. 2012;25(2):12-22.
 44. Jeong HR, et al. Antioxidant and Neuronal Cell Protective Effects of an Extract of *Houttuynia cordata Thunb* (a Culinary Herb). *Korean J Food Preserv*. 2010;17(5):720-6.
 45. 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.
46. Stein GS, Lian JB, Owen TA. Relationship of cell growth to the regulation of tissue-specific gene expression during osteoblast differentiation. *FASEB J*. 1999;4(13):3111-23.
47. Shin CS, Cho HY. Bone Remodeling and Mineralization. *Endocrinology and Metabolism*, 2005;20(6):543-55.