Original Article

소청룡탕이 파골세포 분화억제와 골흡수에 미치는 영향

안민윤, 임형호

가천대학교 한의과대학

Effect of *Sochungryong-tang* Extract on Osteoclast Differentiation and Bone-pit Formation

Min-Youn Ahn, Hyung-Ho Lim.

College of Korean Medicine, Gachon University

Objectives: This study was performed to evaluate effects of *Sochungryong-tang* Extract(SRE) on osteoclast differentiation and bone resorption in order to find out the possibility for clinical use in preventing and treating osteoporosis.

Methods: To evaluate the effect of SRE on osteoclast differentiation, we induced RAW 264. 7 cells to be differentiated to osteoclasts by RANKL (receptor activator of nuclear factor- κ B ligand). We measured effect on TRAP (Tartrate-resistant acid phosphatase), NFATc, cathepsin K, MMP-9, inflammation related factors, histogenesis factors and bone resorption.

Results: SRE decreased osteoclast differentiation, and also decreased expression of bone resorbing factors such as MMP-9, cathepsin K, TRAP, NFATc1, MITF, c-Fos, osteoclast stimulatory transmembrane protein, calcitonin receptor in RANKL-induced osteoclast. SRE also decreased Cyclooxygenase-2, inducible nitric oxide synthase, TNF- α , which are thought to be related with the inflammatory bone destruction.

Conclusion: SRE inhibits osteoclast differentiation and bone resorption. The results indicate that the BHT extract can potentially be applied for preventing and treating osteoporosis.

Key Words : Sochungryong-tang, Osteoclast, Bone resorption, osteoporosis

서론

세계보건기구(WHO)는 골다공증(osteoporosis)을 ‘골량의 감소와 미세구조의 이상을 특징으로 하는 전신적인 골격계 질환으로, 결과적으로 뼈가 약해져서 부러지기 쉬운 상태가 되는 질환’으로 정의하고 있다. 노화가 진행되면 골량뿐만 아니라 골의 질도 현저히 감소되는데, 그 기전은 아직 정확히 밝혀져 있지 않으나 산화스트레스의 증가 및 활성형 비타민 D 합성 및 작용 민감도 저하로 인한 소장에서 칼슘

섭취 저하, 이차성 부갑상선호르몬의 증가 등이 영향을 미칠 것으로 여겨진다¹⁾. 한국의 골다공증 유병률은 2012년 국민건강영양조사 결과에 따르면 50세 이상의 여성은 34.9%, 남성은 7.8%로 매우 높은 유병률을 보이고 있다²⁾.

현재 사용되는 치료방법으로는 비스포스포네이트(bisphosphonate), 여성 호르몬(estrogen), 선택적 여성호르몬 수용체조절제(SERM, selective estrogen receptor modulator), 칼시토닌(calcitonin), 부갑상선 호르몬 등 골대사 변화를 유도하는 방법들이 사용되

• Received : 7 August 2017

• Revised : 19 September 2017

• Accepted : 20 September 2017

• Correspondence to : 임형호(Hyung-Ho Lim)

경기도 성남시 수정구 성남대로 1342 가천대학교

Tel : +8-31-750-8599, E-mail : omdlimhh@gachon.ac.kr

어 왔으나 하악골 괴사, 비정형 대퇴 골절, 암 발생 위험 증가, 뇌졸중과 정맥색전증의 위험 등의 부작용이 알려져 있다³⁾. 이에 따라 부작용이 적은 천연 약물, 침구 등 한의학적 접근을 통한 골다공증의 연구가 매우 필요한 시점이다.

최근의 골다공증에 관한 연구에 따르면 補肝腎 强筋骨 하는 두충⁴⁾, 자하거⁵⁾, 우슬⁶⁾, 녹각⁷⁾, 구기자⁸⁾, 하수오⁹⁾ 등과 活血祛瘀 하는 강황¹⁰⁾ 등의 단미제에 관한 연구가 진행되었다. 복합제에 관한 연구로는 補肝腎 强筋骨 효능의 가미장신탕¹¹⁾, 구척보골탕¹²⁾ 등과 補益氣血 효능의 쌍화탕¹³⁾, 祛風寒濕 효능의 삼기음¹⁴⁾, 疎肝解鬱 효능의 가미소요산¹⁵⁾ 등에 대한 연구가 진행되었다¹⁶⁾. 또한 여정자(女貞子)와 곡기생(槲寄生)¹⁷⁾, 어성초(魚腥草)¹⁸⁾, 유근피(楡根皮) 등의 천연약물들과 생맥산(生脈散)¹⁹⁾ 등이 파골세포의 분화와 활성을 억제하는 것으로 나타나 치료에 효과가 있을 것으로 기대된다.

소청룡탕은 한국, 일본 및 중국에서 사용 되며, 주로 호흡기계 질환인 천식, 기관지염, 알러지성 비염 등에 자주 사용되어져 왔다²⁰⁾.

최근 연구에 따르면 천식병력이 있거나 천식의 특징인 기도과민성이 있는 경우 골감소증과 골다공증의 발생률이 높은 것으로 조사되어 천식과 골다공증 사이 밀접한 연관성이 있다고 밝혀졌다²¹⁾. 또한 염증이 골다공증의 원인으로 작용 하므로²²⁾ 이에 저자는 천식 등의 알레르기성 염증 질환에 사용되는 소청룡탕이 골다공증의 치료에 효과가 있는지 알아보기 위해 파골세포 분화 억제에 대한 실험 연구를 시행하였다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 한약재 추출 및 검액 제조

소청룡탕을 믹서기를 이용하여 분말로 만들어 플라스크에 넣은 후, 한약재 무게의 약 40 배의 증류수를 가하여 6시간 이상 가열하고 환류 추출하였다. 여과지로 여과한 후, 여액을 Evaporator (EYELA,

Japan)를 사용하여 감압 농축하고 농축액을 동결 건조한 후 실험 시까지 냉동보관 하였다. 실험 시에는 소청룡탕 추출물(이하 SRE라 함)을 DMSO(dimethyl sulfoxide)를 사용하여 배지에 녹인 후, pore size 0.45 μ m인 여과지를 이용하여 여과하여 사용하였다. 소청룡탕은 가천대학교부속길한방병원에서 공급받아 사용하였으며, 처방 구성은 다음과 같다(Table 1).

Table 1. Composition of *Sochungryong-tang*

Herbal name	Pharmacognostic Name	Dose amount(g)
麻黄	Ephedrae Herba	6
桂枝	Cinnamomi Ramulus	6
白芍藥	Paeoniae Radix	6
半夏	Pinelliae Tuber	6
乾薑	Zingiberis Rhizoma	4
五味子	Schizandra Fructus	2
細辛	Asari Herba	2
甘草	Glycyrrhizae Radix et Rhizoma	2

2) 세포

실험에 사용된 파골세포 전구세포로는 mouse myeloid 세포주인 RAW 264.7 세포를 RANKL (receptor activator of nuclear factor- κ B ligand)로 처리하여 유도된 세포 모델을 사용하였다. 한국세포주은행에서 RAW 264.7 세포를 구입하여 사용하였다.

2. 방법

1) RAW 264.7 Cell 배양

DMEM(Dulbecco's modified eagle medium)/10% FBS(fetal bovine serum)/PC-SRE 배지를 사용하여 CO₂ 세포배양기에서 RAW 264.7 세포를 배양하였으며, 5 $\times$ 10³ cells/well인 96 well plate를 사용하여 배양하였다. 24시간 동안 배양한 후 배양액을 버리고 50 ng/ml RANKL, 1 ng/ml TGF β (transforming growth factor beta), 10% FBS가 첨가된 α -MEM(α -minimum essential medium)으로 교환하여 세포를 배양했다. 배양액에 여러 농도의 SRE를 첨가하였

다. 6일 동안 2일에 한 번씩 동일한 배지로 교환하면서 배양하였다.

2) 약물처리

실험군은 (1) RANKL로 처리하지 않은 군 (Normal), (2) RANKL로 처리한 군 (3) RANKL과 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 SRE를 처리한 군, (4) RANKL과 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 SRE를 처리한 군, (5) RANKL과 120 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 SRE를 처리한 군으로 하였다.

3) 파골세포 생성 측정

RAW 264.7 cell을 RANKL로 처리하여 파골세포로 유도한 다음, 성숙한 파골세포의 발현 marker로 알려진 TRAP (Tartrate-resistant acid phosphatase)을 염색하여 TRAP-positive 세포를 확인하였다. PBS (Phosphate buffered saline)로 분화시킨 세포를 2회 세척한 후 3.7% formaldehyde-citrate-acetone 용액을 사용하여 10분 동안 고정시키고 증류수로 2회 세척하였다. NaNO_3 용액과 2% TRAP fast garnet GBC base 용액을 1:1로 혼합하여 만든 용액과 5% naphtha AS-BI phosphoric acid, 4% acetic acid, 2% tartaric acid의 용액을 고정시켜 놓은 세포에 처리한 다음 상온에서 30분 이상 방치하였다. 광학현미경으로 관찰하였을 때 핵이 3개 이상으로 나타나는 TRAP-positive한 다핵세포(TRAP+) MNCs(multinucleated cells))를 계수하여 파골세포의 생성지표로 하였다.

4) 파골세포 유전자발현 측정

(1) Total RNA 분리

배양세포의 배지를 제거한 후 4 $^{\circ}\text{C}$ 의 PBS로 3회 세척하여 RNA(ribo nuclear acid)를 분리하였다. 세포를 모은 후 $750 \times \text{g}$ 에서 10분 동안 원심 분리를 하고 ice cold PBS로 2회 세척하였다. lysis buffer를 침전된 세포에 가하여 용해시킨 후 $12,000 \times \text{g}$ 에서 10분 동안 원심 분리 한 후 상층을 취하였다. 1 M sucrose를 함유하는 Tris buffer 위에 loading한 후 36,000 rpm에서 160분 동안 원심분리 하였다. Polysome pellet을 SDS buffer에 녹인 다음 37 $^{\circ}\text{C}$ 에

서 30분 동안 배양 시켰다. Sodium acetate buffer를 가한 후 phenol/CsCl₃ 용액을 이용하여 추출하였다. 0.2 M이 되도록 NaCl을 가한 후 EtOH를 가하고 -20 $^{\circ}\text{C}$ 에서 12시간 동안 보관하였다. 75% EtOH로 침전물을 2회 세척한 후 건조하였다. 유전자 발현에 필요한 RNA양은 시험군과 대조군의 mRNA양이 같게 조정된 후 전기영동으로 확인하였다.

(2) cDNA 제조

시험군 및 대조군에서 각각 분리한 10 μl (10 μg RNA 함유)의 total RNA액에 oligo dT 1 μl (2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)을 넣고 조심스럽게 혼합한 후, 90 $^{\circ}\text{C}$ 에서 5분 동안 배양하였다. 실온에서 약 10분간 방치하여 Primer가 annealing 하도록 한 후 4 $^{\circ}\text{C}$ 로 유지하면서 다음과 같은 시약을 가하였다. 5 x cySREipt buffer 4 μl , 0.1 M DTT(dithiothreitol) 2 μl , dUTP Cydye-labelled nucleotide 0.1 μl , dUTP(deoxyuridine triphosphate) nucleotide mix 1 μl , CySREipt reverse tranSREiptase 1 μl , H₂O 0.9 μl 을 첨가하여 20 μl 로 한 후, 아주 조심스럽게 tipping 혼합하였다. 이후, 42 $^{\circ}\text{C}$ 에서 90분간 배양한 다음, 얼음 상에 방치하였다. 2.5 M NaOH를 2 μl 씩 가하고 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 15분 동안 배양하였으며, 10 μl 의 2M HEPES buffer (free acid)를 가하여 중화시켰다. Amersham Bioscience에서 각각의 시약을 구입하였다.

(3) Real time RT-PCR

Optical tube (MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode and Optical Adhesive Films, Applied Biosystems, Cat.No. 4314320) 각각에 3배의 SybrGreen Mix 2.5 μl (Sigma-Aldrich, Cat. No. S9430), (2)에서 합성한 cDNA 1 μl , 10 pmol/ μl primer pair mix 1 μl , 각각 2.5 mM의 dNTP(nucleoside triphosphate) 2 μl , 10x Tag polymerase buffer 2.5 μl , Tag Polymerase 0.3 μl 와 14.7 μl H₂O를 넣고, 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min 1 cycle, 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 sec, 45 $^{\circ}\text{C}$ 30 sec, 72 $^{\circ}\text{C}$ 60 sec 40 cycles, 95 $^{\circ}\text{C}$ 20 min 1 cycle로 증폭시켰다. Primer는 RT-PCR(Reverse

Table 2. Primers

Target gene	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
TRAP	ACACAGTGATGCTGTGTGGCAACTC	CCAGAGGCTTCCACATATATGATGG
Cathepsin K	AGGCGGCTATATGACCACTG	CCGAGCCAAGAGAGCATATC
MMP-9	CGTCGTGATCCCCACTTACT	AGAGTACTGCTTGCCCAGGA
NFATc1	GGGTCAGTGTGACCGAAGAT	GGAAGTCAGAAGTGGGTGGA
iNOS	CCTTGTTACGCTACGCCTTC	AAGGCCAAACACAGCATACC
MITF	GGAACAGCAACGAGCTAAGG	TGATGATCCGATTACACAGA
b-actin	TCACCCACACTCTGCCCAT	TCCTTAATGTCACGCACCATTT

transcription polymerase chain reaction)에 사용한 것을 사용하였다. PCR을 마친 후 tube를 꺼내고, 반응액 5 μ l를 사용하여 3% agarose gel에서 PCR specificity를 측정하고, ABI PRISRE® 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Cat. No. 4349157)을 사용하여 real time PCR 결과를 분석하였다. PCR에 사용한 primer는 아래 Table 2에 표시하였다.

5) Bone resorption assay

파골세포의 분화와 활성의 결과 나타나는 뼈의 흡수능을 평가하기 위하여, plate에 calcium-collagen으로 코팅하여 제조된 인공 뼈를 사용하여 측정하였다. Calcium phosphate와 collagen을 코팅한 plate를 phenol-red-free MEM 배지를 사용하여 세척한 다음, 미분화된 파골세포 전구세포를 1×10^3 cells/well로 분주하고 24시간 배양한 다음, RANKL을 100 ng/ml로 처리하였다. 1시간 배양 후 SRE를 농도별로 처리한 다음 10일간 배양하였다. 배지는 2일에 한번 교체해 주었다. 배양을 마친 후 5% sodium hypochlorite를 처리해 세포를 제거하고 DDW(deuterium depleted water)로 세척한 다음 $\times 400$ 역상 현미경으로 뼈의 흡수를 관찰하고 사진을 촬영하였다.

3. 통계처리

각 결과는 mean $\pm$ SEM(standard error of the mean)으로 표시하였다. 결과에 대한 유의성 검증은 student's t-test를 이용하였으며, 유의성은 $p < 0.05$

이하로 규정하였다.

결 과

1. SRE가 Cell Viability에 미치는 영향

SRE는 배양용 배지에 7일간 처리하여 배양한 결과, 150 μ g/ml 이하에서 세포독성을 나타내지 않았다(Fig.1).

Fig. 1. Effect of SRE on cell viability.

A : RANKL(100 ng/ml) only
 B : RANKL(100 ng/ml) + 18.7 μ g/ml of SRE
 C : RANKL(100 ng/ml) + 37.5 μ g/ml of SRE
 D : RANKL(100 ng/ml) + 75 μ g/ml of SRE
 E : RANKL(100 ng/ml) + 150 μ g/ml of SRE
 F : RANKL(100 ng/ml) + 300 μ g/ml of SRE
 Each bar represents Mean $\pm$ SD of 5 tests,
 ** : $p < 0.01$ vs RANKL only

2. SRE가 파골세포 분화 및 기능에 미치는 영향

1) SRE가 파골세포 형성에 미치는 영향

Fig. 2. Effects of SRE on the formation of TRAP(+) MNCs in RANKL stimulated osteoclast.

0 : RANKL(100 ng/ml) only
 30 : RANKL(100 ng/ml) + 30 µg/ml of SRE
 60 : RANKL(100 ng/ml) + 60 µg/ml of SRE
 120 : RANKL(100 ng/ml) + 120 µg/ml of SRE
 Each bar represents Mean±SD of 5 tests.
 **: $p < 0.01$ vs RANKL only

RANKL로 처리하여 유도된 파골세포 형성 시 나타나는 TRAP(+) MNCs 형성을 평가하여 SRE가 파골세포 형성에 미치는 영향을 평가하였다. SRE는 15 µg/ml 농도에서는 거의 효과를 나타내지 않았으나, 30 µg/ml 에서는 약 23%, 60 µg/ml 에서는 약 41%, 120 µg/ml 농도에서는 약 68% 억제효과를 나타내었다(Fig. 2).

2) SRE가 TRAP 발현에 미치는 영향

TRAP의 mRNA 생성량을 측정하고 비교하여 SRE가 파골세포 형성 시 나타나는 TRAP 발현에

미치는 영향을 평가하였다. RANKL 처리 시 TRAP의 발현은 현저히 증가되었다. SRE 처리 시 30 µg/ml 농도에서는 약 22%, 60 µg/ml 농도에서는 약 79%, 120 µg/ml 농도에서는 약 97%의 억제효과를 나타내었다(Fig. 3(A)).

3) SRE가 MMP-9 발현에 미치는 영향

MMP-9의 mRNA 생성량을 측정하고 비교하여 SRE가 파골세포 형성 시 나타나는 MMP-9(matrix metalloproteinase 9)의 발현에 미치는 영향을 평가하였다. RANKL 처리 시 MMP-9의 발현은 현저히 증가되었다. SRE처리 시 30 µg/ml 농도에서는 약 72%, 60 µg/ml 농도에서는 약 87%, 120 µg/ml 농도에서는 약 99%의 억제효과를 나타내었다(Fig. 3(B)).

4) SRE가 cathepsin K 발현에 미치는 영향

SRE가 파골세포 형성 시 나타나는 cathepsin K의 발현에 미치는 영향을 평가하기 위하여 cathepsin K의 mRNA 생성량을 측정하여 비교하였다. RANKL 처리 시 cathepsin K의 발현은 현저히 증가되었다. SRE 처리 시 30 µg/ml 농도에서는 약 31%, 60 µg/ml 농도에서는 약 76%, 120 µg/ml 농도에서는 약 99%의 억제효과를 나타내었다(Fig. 3(C)).

3. SRE가 파골세포 분화 관련 인자에 미치는 영향

1) SRE가 NFATc1 발현에 미치는 영향

SRE가 파골세포 형성 시 나타나는 NFATc1의 발현에 미치는 영향을 평가하기 위하여 NFATc1의 mRNA 생성량을 측정하여 비교하였다. RANKL 처리 시 NFATc1의 발현은 현저히 증가되었다. SRE 처리 시 30 µg/ml 농도에서는 약 28%, 60 µg/ml 농도에서는 약 26%, 120 µg/ml 농도에서는 약 70%의 억제효과를 나타내었다(Fig. 4(A)).

2) SRE가 c-Fos 발현에 미치는 영향

Fig. 3. Effects of SRE on (A)TRAP, (B) MMP-9 and (C)cathepsin K gene expression in RANKL-stimulated osteoclast.

NC : Vehicle

0 : RANKL(100 ng/ml) only

30 : RANKL(100 ng/ml) + 30 μg/ml of SRE

60 : RANKL(100 ng/ml) + 60 μg/ml of SRE

120 : RANKL(100 ng/ml) + 120 μg/ml of SRE

Each bar represents Mean±SD of 5 tests.

* : p<0.05 vs NC

: p<0.05 vs RANKL only

SRE가 파골세포 형성시 나타나는 c-Fos의 발현에 미치는 영향을 평가하기 위하여 c-Fos의 mRNA 생성량을 측정하여 비교하였다. RANKL 처리시 c-Fos의 발현은 현저히 증가되었다. SRE 처리 시 30 μg/ml 농도에서는 약 16%, 60 μg/ml 농도에서는 약 27%, 120 μg/ml 농도에서는 약 47%의 억제효과를 나타내었다(Fig. 4(B)).

3) SRE가 MITF 발현에 미치는 영향

MITF의 mRNA 생성량을 측정하고 비교하여 SRE가 파골세포 형성 시 나타나는 MITF의 발현에 미치는 영향을 평가하였다. RANKL 처리 시 MITF의 발현이 현저히 증가되었다. SRE 처리 시 30 μg

/ml 농도에서는 약 12%, 60 μg/ml 농도에서는 약 36%, 120 μg/ml 농도에서는 약 68%의 억제효과를 나타내었다(Fig. 4(C)).

4. SRE가 iNOS, COX-2, TNF-α, IL-6 발현에 미치는 영향

SRE가 파골세포 형성을 촉진하는 것으로 알려진 염증관련 인자의 발현에 미치는 영향을 평가하기 위하여 iNOS, COX-2, TNF-α의 mRNA 생성량을 측정하여 비교하였다. RANKL로 유도한 파골세포에 SRE 처리한 경우, iNOS, COX-2, IL-6, TNF-α의 발현을 현저히 억제하는 효과를 나타냈다(Fig. 5).

Fig. 4. Effects of SRE on (A)NFATc1, (B)c-Fos and (C)MITF gene expression in RANKL-stimulated osteoclast.

NC : Vehicle

0 : RANKL(100 ng/ml) only

30 : RANKL(100 ng/ml) + 30 μg/ml of SRE

60 : RANKL(100 ng/ml) + 60 μg/ml of SRE

120 : RANKL(100 ng/ml) + 120 μg/ml of SRE

Each bar represents Mean±SD of 5 tests.

* : $p < 0.05$ vs NC

: $p < 0.05$ vs RANKL only

5. SRE가 파골세포 융합 관련인자에 미치는 영향

1) SRE가 OC-STAMP, CTR 발현에 미치는 영향

SRE가 파골세포 분화 및 발생을 조절하는 것으로 알려진 인자의 발현에 미치는 영향을 평가하기 위하여 OC-STAMP(osteoclast stimulatory transmembrane protein), CTR(calcitonin receptor)의 mRNA 생성량을 측정하여 비교하였다. RANKL 처리 시 OC-STAMP, CTR의 발현은 현저히 증가되었다. SRE 처리 시 RANKL 처리로 인해 증가된 OC-STAMP, CTR의 발현을 현저히 억제하였다.(Fig. 6).

2) SRE가 bone pit 형성에 미치는 영향

분화된 파골세포는 골흡수를 유발한다. 뼈조직에서의 골흡수에 대한 평가를 위하여 bone pit 형성에 미치는 영향을 측정하였다. RANKL 처리하여 파골세포 형성 후 나타나는 골흡수로 인해 형성되는 pit 면적이 크게 나타났으며, SRE 처리 시 60 μg/ml 농도에서는 골흡수가 저해되어 작은 pit가 관찰되었다. SRE를 120 μg/ml 농도로 처리한 경우에는 pit 형성이 거의 나타나지 않았다(Fig. 7).

고 찰

골다공증은 낮은 골밀도와 골조직의 미세구조의

Fig. 5. Effects of SRE on iNOS, COX-2, TNF- α , IL-6 gene expression in RANKL-stimulated osteoclast.

0 : RANKL(100 ng/ml) only

30 : RANKL(100 ng/ml) + 30 μ g/ml of SRE

60 : RANKL(100 ng/ml) + 60 μ g/ml of SRE

120 : RANKL(100 ng/ml) + 120 μ g/ml of SRE

Each bar represents Mean $\pm$ SD of 5 tests.

** : $p < 0.01$ vs RANKL only

악화를 특징으로 하며, 골강도의 저하 및 골절률의 증가를 가져올 수 있는 전신적인 골질환이다²³). 골다공증의 원인으로는 에스트로겐 결핍, 비타민 D 결핍, 부갑상선항진 등이 있고 이에 따라 파골세포의 골흡수가 항진된다. RANKL이 활성화되고 파골세포의 세포자멸사가 억제되어 파골세포의 형성과 활성화가 증가한다²⁴).

현재 골다공증에 사용되는 치료 방법의 여러 부작용으로 인해 사용에 많은 제한이 따르고 있다⁴). 그래서 최근에는 비교적 부작용이 적은 한약재를 이용한 골다공증 등의 골질환을 치료하는 약물을 개발하기 위한 시도가 이루어지고 있다.

최근의 골다공증에 관한 연구로는 補肝腎 强筋骨 하는 두충⁴), 자하거⁵), 우술⁶), 녹각⁷), 구기자⁸), 하수오⁹) 등과 活血祛瘀 하는 강황¹⁰) 등의 단미제에 관한

연구가 진행되었고 복합제에 관한 연구로는 補肝腎 强筋骨 효능의 가미장신탕¹¹), 구척보골탕¹²) 등과 補益氣血 효능의 쌍화탕¹³), 祛風寒濕 효능의 삼기음¹⁴), 疎肝解鬱 효능의 가미소요산¹⁵) 등에 대한 연구가 진행되었다¹⁶). 또한 여정자(女貞子)와 곡기생(槲寄生)¹⁷), 어성초(魚腥草)¹⁸), 유근피(楡根皮) 등의 천연약물들과 생맥산(生脈散)¹⁹) 등이 파골세포의 분화와 활성을 억제하는 것으로 나타나 치료에 효과가 있을 것으로 기대된다.

소청룡탕은 한국, 일본 및 중국에서 사용 되며, 주로 호흡기계 질환인 천식, 기관지염, 알러지성 비염 등에 자주 사용되어져 왔다²⁰).

소청룡탕은 肺의 宣發肅降 작용을 원활하게 하여 外寒邪를 풀어내고, 咳嗽氣逆을 내리며, 痰涎의 壅盛을 치료하여 貯痰之器으로서 폐가 가지는 기능을

Fig. 6. Effects of SRE on (A)OC-STAMP and (B)CTR gene expression in RANKL-stimulated osteoclast.

NC : Vehicle
 0 : RANKL(100 ng/ml) only
 30 : RANKL(100 ng/ml) + 30 μg/ml of SRE
 60 : RANKL(100 ng/ml) + 60 μg/ml of SRE
 120 : RANKL(100 ng/ml) + 120 μg/ml of SRE
 Each bar represents Mean±SD of 5 tests.
 ** : $p < 0.01$ vs NC
 ## : $p < 0.01$ vs RANKL only

정상적으로 작동하게 한다. 즉, 肺氣의 散布작용 증강과 痰飲을 치료하는 작용이 동시에 이루어져서 解表散寒하고 化飲平喘하는 효능이 발휘되도록 하는 것으로, 기침과 객담이 동시에 발생하는 질병에 특히 효능이 있는 것으로 볼 수 있다. 기침과 객담이 동시에 발생하는 질병의 대표적인 것으로 천식을 들 수 있는데, 소청룡탕이 천식 치료에 높은 빈도로 사용되고 있다. 이는 호흡곤란과 기침, 객담 등으로 대표되는 천식의 증상과 폐의 宣發肅降을 강화하고 痰飲을 풀어주는 소청룡탕의 효능에 의한 것으로 판단된다²⁵⁾.

소청룡탕은 8종의 한약재로 구성되어 있는 한약

Fig. 7. Effect of SRE on bone pit formation by RANKL-induced Osteoclast.

NC : Vehicle
 0 : RANKL(100 ng/ml) only
 60 : RANKL(100 ng/ml) + 60 μg/ml of SRE
 120 : RANKL(100 ng/ml) + 120 μg/ml of SRE

처방으로, 최근 연구에서는 동물 모델을 사용하여 항염증 작용을 하고 Th2 관련 사이토카인의 분비를 억제한다. 소청룡탕을 구성하는 마황, 작약, 세신 추출물은 항염증의 효과가 있다고 보고되었고, 오미자와 건강은 항산화의 효과, 반하는 항천식의 효과, 감초는 항알러지의 효과 등의 다양한 생리활성을 가지는 것으로 밝혀졌다. 또한, 구성약재들의 주요성분인 Albiflorin과 paeoniflorin은 골수이상에 대한 치료 효과, liquiritin의 신경보호작용, coumarin의 항염증 효과, cinnamicacid와 schizandrin의 항산화 작용, cinnamaldehyde의 PGE2 생성 억제 효과, glycyrrhizin의 면역조절작용을 가진다는 보고를 통하여 소청룡탕은 염증과 관련된 질환에서 치료효과가 기대된다고 볼 수 있다²⁶⁾.

파골세포의 작용에는 여러 염증인자들이 작용하고 있어 골다공증에도 또한 염증인자들이 작용하므로 여러 염증인자와 더불어 파골세포에 영향을 미치는 요소들에 대한 실험을 통하여 파골세포에 미치는 소청룡탕의 작용에 알아보려고 하였다. 또한 최근 한 연구진에 의하여 천식과 골다공증이 밀접한 관련성이 있다는 결과가 발표되었다. 천식의 특징인 기도과민성이 있는 사람의 경우 기도과민성이 없는 사람에 비해 요추와 대퇴골의 골밀도가 낮게 나타났고, 천식병력이 있거나 기도과민성이 있는 사람의 경우 골감소증과 골다공증의 발생률이 높은 것으로 조사되었다⁹⁾. 물론 두 질환의 선후관계에 대해서는 후속 연구가 필요하지만 일반적인 발생 시기를 감안

해 볼 때 천식이 있는 경우 골밀도가 감소했을 가능성이 높으며 이는 천식을 포함한 알레르기 질환이 골대사에 영향을 줄 가능성이 존재한다. 이에 천식 등의 알레르기성 염증 질환에 사용되는 소청룡탕이 골다공증의 치료에 효과가 있는지 알아보기 위하여 파골세포 분화 억제에 대한 실험 연구를 시행하였다.

파골세포의 형성 과정은 시작, 분화, 다핵화, 다핵화된 파골세포의 성숙화 등 매우 복잡한데, 많은 사이토카인, 호르몬, 유전인자 등의 조절을 받아 이루어진다²⁷⁾. 이 중 RANKL은 분화에 가장 중요한 사이토카인의 하나로 TNF 계열의 사이토카인이며 조골세포의 막에 붙어 파골전구세포에 붙어있는 수용체인 RANK와 결합하여 세포내 신호전달 과정인 MAPK(mitogen-activated protein kinase)의 신호전달 경로가 활성화되며 파골세포 분화에 필수적인 NF- κ B, c-Fos, NFATc1, MITF와 같은 transcription factor가 발현되어 파골세포로의 분화를 개시한다²⁸⁾.

TRAP은 성숙한 파골세포에서 발현되어 골의 흡수에 관여하고 있으므로 TRAP 양성세포는 파골세포로 분화 여부를 판단하게 하는 기준이 될 수 있다²⁹⁾. RANKL로 유도한 파골세포 형성 시 나타나는 TRAP(+) MNCs 형성을 평가하여 SRE가 파골세포 형성에 미치는 영향을 살펴본 결과 SRE에 의해 60 μ g/ml 이상의 농도에서 유의하게 억제되었다(Fig. 2). TRAP mRNA 생성량을 측정하여 TRAP 발현에 미치는 영향을 살펴본 결과 SRE가 RANKL 유도 파골세포에서 TRAP의 발현을 30 μ g/ml 농도에서부터 유의하게 억제하였으며 120 μ g/ml 농도에서는 약 97%의 억제효과를 보였다(Fig. 3(A)).

Cathepsin K는 M-CSF(macrophage colony stimulating factor)나 RANKL 등을 처리하면 발현되는 단백질로 알려져 있고, 파골세포에 의해 유리되는 시스테인 단백질분해제로서 골흡수 시 파골세포의 주름진 가장자리를 통해 분비되어 제1형 콜라겐의 분해를 촉매한다⁴⁾. Cathepsin K는 MMP-9, TRAP 등과 함께 골의 흡수에 직접적으로 관여하고 있다³⁰⁾. MMP-9는 파골세포의 골흡수 과정 중 나타나는 효소이다³¹⁾. SRE는 MMP-9의 발현을 30 μ g/ml 농

도에서 약 72%의 현저한 억제효과를 보였다(Fig. 3(B)). Cathepsin K의 발현은 30 μ g/ml 농도에서부터 유의한 억제효과를 보였으며 120 μ g/ml 농도에서는 약 99%의 억제효과를 나타냈다(Fig. 3(C)).

RANKL은 수용체인 RANK(receptor activator of nuclear factor kappa-B)와 결합하여 다양한 신호전달 단백질을 활성화 하고 파골세포 분화에 필수적인 전사인자 발현을 촉진하는데, 특히 MAPK 중에서 p38은 전사인자인 MITF를 활성화 하여 파골세포의 표지 유전자인 TRAP의 발현에 관여하고 c-Fos, NFATc1 등과 함께 파골세포 표지 유전자 발현을 촉진한다고 알려져 있다³²⁾. SRE는 RANKL 유도 파골세포에서 c-Fos의 발현을 억제하였다. SRE 30 μ g/ml 농도에서부터 유의한 억제효과를 보였으며, 60 μ g/ml 농도에서는 30 μ g/ml과 큰 차이를 보이지 않았으나 120 μ g/ml 농도에서는 약 70%의 억제효과를 나타냈다(Fig. 4(A)). SRE는 NFATc1의 발현 또한 억제하였다. 30 μ g/ml 이상의 농도에서 유의한 억제효과를 보였다(Fig. 4(B)).

MITF는 TRAF(TNF receptor-associated factor), p38의 활성화 등 일련의 신호전달 과정을 거쳐 활성화되는 인자로 파골세포의 분화를 촉진하며 파골세포 분화 시 증가하는 인자이다³³⁾. SRE 처리 시 MITF의 mRNA 생성량 측정 결과 MITF 발현이 억제되었다. 30 μ g/ml 이상의 농도에서 유의한 억제효과를 보였으며 120 μ g/ml 농도에서는 약 68%의 억제효과가 나타났다(Fig. 4(C)).

NO(nitric oxide)는 L-arginine이 NOS(nitric oxide synthase)에 의해 산화되어 생성된다. cNOS(constitutive NOS)는 일반적으로 항상 발현되어 있고, iNOS(inducible NOS)는 사이토카인 등의 특정 자극이 있어야만 전사되어 발현된다. iNOS에 의해 생성된 NO는 생리적 기능뿐 아니라 병리적 기능도 갖고 있다. iNOS에서 생성된 NO는 주로 면역반응 조절 및 세포독성에 관여한다³⁴⁾. RANKL, TNF- α 등의 각종 염증 신호에 의해 활성화되는 iNOS에 의해 NO가 생성되고³⁵⁾, 이러한 과정으로 생성된 NO는 염증반응을 매개하는 역할을 하게 되며, 대식세포는 활성

화되어 IL-6, TNF- α 와 같은 pro-inflammatory cytokine을 생산한다^{36,37)}.

파골세포의 활성 조절에서 PGE₂의 합성의 시작은 막 인지질로부터 phospholipase A2의 효소작용에 의해 arachidonic acid가 만들어지는 것으로 시작된다. 효소작용에 의해 Arachidonic acid는 prostaglandin G₂가 되고 다시 prostaglandin H₂가 되는데 이것은 불안정한 대사산물이다. Cyclooxygenase (COX)에 의해 두 과정이 촉진된다. COX는 여러 종류의 isoenzyme이 존재하며 이들 중 COX-2는 염증 등의 자극에 의해 발현된다. 그렇기 때문에 COX-2에 의해 생성되는 prostaglandin이 염증반응과 세포증식에 관여한다고 알려져 있다³⁸⁾. 실험결과 SRE는 COX-2, iNOS, TNF- α , IL-6 발현을 현저하게 억제하는 효과를 나타냈다(Fig. 5). 이를 통해 SRE가 파골세포 형성을 촉진하는 것으로 알려진 염증관련 인자의 발현을 억제하는 항염증 효과를 확인하였다.

OC-STAMP는 파골세포 분화를 촉진하는 막관통 단백질이다³⁹⁾. CTR은 calcitonin의 활동성을 조절하며 파골세포 분화 과정의 발현 마커로 사용되는 파골세포 특이적 유전자이다⁴⁰⁾. 실험결과 SRE는 OC-STAMP의 발현을 억제하는 것으로 나타났다. 30 μ g/ml 이상의 농도에서부터 유의한 억제효과를 보였다(Fig. 6(A)). CTR 발현 억제 효과 실험 결과 역시 30 μ g/ml 이상의 농도에서 유의하게 억제되었다(Fig. 6(B)).

분화된 파골세포로 인해 유발된 골흡수로 인해 형성되는 흡수 흔적인 bone pit의 면적을 살펴본 결과 SRE에 의해 bone pit의 형성이 줄어드는 것으로 나타나 SRE가 파골세포 작용으로 인한 골흡수에 의한 골조직 상처 생성을 억제하는 것을 확인하였다(Fig. 7).

이와 같이 실험을 통해 알아본 결과, 소청룡탕 추출물은 RANKL로 유도된 파골세포의 분화를 억제하였으며, 파골세포를 분화시키고 기능을 활성화시키는 과정에 관련된 유전자의 발현을 조절하여 골흡수를 억제하는 것을 볼 수 있었다. 따라서 소청룡탕이 골다공증 치료에 사용될 수 있는 가능성을 발견

하였다. 이에 대한 보다 많은 연구가 추후 이루어질 것으로 기대된다.

본 연구의 한계점은 세포실험만이 진행되었다는 점으로 본 실험을 통해 발견한 가능성을 바탕으로 추가적인 동물실험과 임상실험이 진행되어야 할 것으로 사료된다.

결론

청룡탕 추출물(SRE)이 파골세포의 분화와 활성을 억제하고 골의 재흡수를 억제하는지 알아보기 위하여 RANKL로 유도된 파골세포의 분화와 관련된 인자들의 유전자 발현에 미치는 영향과 골 pit 형성에 미치는 영향을 평가하여 얻은 결과는 다음과 같다.

1. SRE는 RANKL 유도 파골세포의 형성을 억제하였고, 파골세포 활성 관련 인자인 MMP-9, cathepsin K, TRAP 발현을 억제하였다.
2. SRE는 RANKL 유도 파골세포에서 파골세포 분화 관련 인자인 NFATc1, MTF, c-Fos의 발현을 억제하였다.
3. SRE는 RANKL 유도 파골세포에서 염증관련 인자인 COX-2, iNOS, TNF- α 발현을 억제하였다.
4. SRE는 RANKL 유도 파골세포에서 융합과 관련된 인자인 OC-STAMP, CTR 발현을 억제하였다.
5. SRE는 파골세포에 의한 골 pit 형성을 억제하여 골흡수를 억제하였다.

이상의 연구결과, 소청룡탕 추출물은 RANKL 유도 파골세포 분화를 억제하였으며, 파골세포 분화 및 기능활성화에 관련된 유전자의 발현을 조절하여 골흡수를 억제하는 것으로 나타나 골다공증 치료에 사용될 수 있는 가능성을 확인할 수 있었다. 추후 동물실험 등 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2016년도 가천대학교 교내지원에 의한 결과임.

참고문헌

1. Guideline Development Committee, Korean Society of Bone Metabolism. Osteoporosis Diagnosis and Treatment. Seoul:Mincom. 2015:1-10.
2. Ministry of Health and Welfare. Health Behavior and Chronic Disease Statistics. 2012.
3. Kim SW. Management of osteoporosis: Who to treat, what to use, and for how long? Korean J Med. 2013;85(4):364-73.
4. Yoon SJ, Kim KY, Kim GY, Nam KW, Sim KC, Kim EJ, et al. Effects of Eucommia Ulmoides Oliver and Treadmill Exercise on the Osteoporosis of Rats Caused by Glucocorticoid Induction. Korean J Oriental Physiology & Pathology. 2008;22(4):884-90.
5. Jeong YH, Kim RY, Lee TK, Kim DI. Hominis Placenta suppress Calcium release, cyclooxygenase expression and PGE2 synthesis. The Journal of Oriental Obstetrics & Gynecology. 2005;18(1):55-63.
6. Kim EJ, Kim GY, Kim YE, Jang MK, Kim YI, Kim HW, et al. Effect of Biochemical Makers of Bone Metabolism by Administration of Achyranthes Radix Concentration in Ovariectomized Rats. Korean J Oriental Physiology & Pathology. 2007;21(4):967-72.
7. Hwang JS, Seo BI, Park JH, Roh SS, Kim MR, Kim SM, et al. Effect of Cervi Cornu On treatment of Osteoporosis in Ovariectomized Rats. Kor J Herbology. 2010;25(2):1-10.
8. Koo YM, Kim SH, Kim EY, Lee HS, Choi H, Sohn YJ, et al. Effects of Lycii Fructus on the Ovariectomized Osteoporosis of Rats. J Korean Oriental Med. 2008;29(3):144-54.
9. Seo GT, Seo BI, Park JH, Lee ES, Choi DJ, Choi HS, et al. Effect of Polygoni Multiflori Radix and Polygoni Multiflori Radix Preparat On Prevention of Osteoporosis In Ovariectomized Rats. Kor J Herbology. 2005;20(2):137-48.
10. Kwak HB, Choi MK. Inhibitory Mechanism of Curcumin in Osteoclast Differentiation. Korean J Oriental Physiology & Pathology. 2008;22(4):796-801.
11. Han DH, An JJ, Jo HK, Yoo HR, Kim YS, Seol IC. Experimental Studys of GMJST on Bone Growth Factors;Proliferation of Osteoblast and Supression of Osteoclast. Korean J Oriental Physiology & Pathology. 2008;22(4):802-9.
12. Han DH, Kang HJ, An JJ, Jo HK, Yoo HR, Seol IC, Kim YS. Effect of Gucheokbogol-tang in Proliferation and Calcification of Osteoblast. Korean J Oriental Physiology & Pathology. 2008;22(1):142-7.
13. Shim KS, Lee JH, Lee JH, Ma JY. Effect of Ssangwha-tang Fermented by Lactobacillus fermentum on Osteoclast Differentiation and Osteoporosis of Ovariectomized Rats. KOREAN JOURNAL OF ORIENTAL MEDICINE. 2010;16(1):149-55.
14. Park SM, Yoo DY. Effects of Samkieumgamibang Extract on Osteoclast Differentiation and Osteoblast Function. The Journal of Oriental Obstetrics & Gynecology. 2012;25(2):23-42.
15. Park CS, Sohn YJ. A Study on the Effects of Gamisoyosan on Ovariectomized Osteoporosis in Rats. The Journal of Oriental Obstetrics & Gynecology. 2008;21(1):1-15.
16. Seo MS, Kim HC, Choo WJ, Jeong SY, Kim SJ, Choi JU, et al. The Review on the Study of Osteoporosis in Korean Medicine Journals.

- The Journal of Korea CHUNA Manual Medicine for Spine & Nerves. 2013;8(2):67-78.
17. Lee SY, Seo BI, Park JH, Noh SS, Kim DJ. Effect of Ligustri Lucidi Fructus Extract and Vici Herba Extract on Treatment of Osteoporosis in Ovariectomized Rat. KOREAN JOURNAL OF ORIENTAL MEDICINE. 2011;17(1):153-65.
18. Song KC, Hwang GS. Effects of Houytnnia cordata on bone marrow stromal cell and osteoporetic rat. Kor JOriental Preventive Medical Society. 2009;13(2):103-13.
19. Ju IH, Lee EK, Hwang GS, Chong MS. Effects of Saengmaek-san(SM) on osteoclastogenesis and gene expression. Kor J Oriental Preventive Medical Society. 2015;19(2):135-44.
20. Amagaya S, Iizuka A, Makino B, Kubo M, Komatsu Y, Cheng FC, et al. General pharmacological properties of Sho-seiryu-to (TJ-19) extracts. Phytomedicine. 2001;8(5):338-47.
21. Jung JW, Kang HR, Kim JY, Lee SH, Kim SS, Cho SH. Are asthmatic patients prone to bone loss? Ann Allergy Asthma Immunol. 2014;112(5):426-31.
22. Lee EJ, Choi BK, Hwang ES, Chang EJ. Interleukin-32 Gamma as a new face in inflammatory bone diseases. J Rheum Dis. 2017;24(1):14-20.
23. Cosman F, de Beur SJ, LeBoff MS, et al. Clinician's guide to prevention and treatment of osteoporosis. Osteoporos Int. 2014;25:2359-81.
24. The Korean Acadmemy of Clinical Geriatrics. Principles of Geriatric Medicine. Seoul: HanKukmb. 2011:399.
25. Kim JH, Shin HK. Analysis of Biological Experiment on Socheongryong-tang(Xiaoqinglong-tang). J Korean Oriental Med. 2012;33(3):54-73.
26. Woo YJ, Lee MY, Lim HS, Shin IS, Kim YJ, Jin SE, et al. Experimental Studies on the inflammation-related diseases pharmacological effect of water and 70% ethanol extracts from Socheongnyong-tang. Fomula science. 2012;20(2):13-28.
27. Yavropoulou MP, Yovos JG. Osteoclastogenesis Current knowledge and future perspectives. J Musculoskelet Neuronal Interact. 2008;8(3):204-16.
28. Kim HK, Kim JS, Yoon SH, Ryu BH. Radioprotective Effect of Saengmaek-san on Mice Jejunal Crypt Cell Survival and Apoptosis. Kor J Orient Int Med. 2006;27(2):316-26.
29. Kim JY, Hwang GS. The effects of Cuscuta japonica Chois on gene expression in RANKL-induced RAW 264.7 cell. Kor J Oriental Preventive Medical Society. 2010;14(2):77-89.
30. Pang M, Martinez AF, Fernandez I, Balkan W, Troen BR. AP-1 stimulates the cathepsin K promoter in RAW 264.7 cells. Gene. 2007;403(1-2):151-8.
31. Yoo M, Youn Y, Lee N, Choi S. Cellular proteins related to osteoclastogenesis in RAW 264.7 cells. Cancer Prevention Research. 2007;12:310-8.
32. Kim SJ, Lee JJ, Kim JH, Jo SH, Park MC, Jo EH. Inhibitory Effects of Ssangbohwan on Osteoclast Differentiation and Bone Resorption. The Acupuncture. 2015;32(3):69-81.
33. Choi KH, Yoo JE, Hwang GS, Yoo DY. Effects of Cordyceps militaris(CM) on osteoclastogenesis and gene expression. The journal of oriental obstetrics & gynecology. 2012;25(3):16-26.

34. Yim CY. Nitric oxide and cancer. Korean journal of internal medicine. 2010;78:430-6.
35. Han M, Wen JK, Zheng B, Zhang DQ. Acetylbritannilatone suppresses NO and PGE2 synthesis in RA W 264. 7 macrophages through the inhibition of iNOS and COX-2 gene expression. Life Science. 2004;75:675-84.
36. Seo WG, Pae HO, Oh GS, Kim NY, Kwon TO, Shin MK, et al. The aqueous extract of *Rhodiola sachalinensis* root enhances gene in RAW264.7 macrophage. J Ethnopharmacol. 2001;76:119-23.
37. Horwood HJ, Page TH, McDaid JP, Palmer CD, Campbell J, Mahon T, et al. Bruton's tyrosine kinase is required for TLR2 and TLR4-induced TNF, but not IL-6 production. L Immunol. 2006;176(6):3635-41.
38. Turini ME, DuBois RN. Cyclooxygenase-2: a therapeutic target. Annu Rev Med. 2002;53: 35-57.
39. Yang M, Birnbaum MJ, MacKay CA, Mason -Savas A, Thompson B, Odgren PR. Osteoclast stimulatory transmembrane protein (OC-STAMP), a novel protein induced by RANKL that promotes osteoclast differentiation. J Cell Physiol. 2008; 215(2):497-505.
40. Kim MH, Chun YN, Yim MJ. Effect of pentoxifylline, a phosphodiesterase, on osteoclast formation. Yakhak Hoeji. 2004;48(3):197-201.