

하수오 물 추출물이 골형성 및 파골세포에 미치는 영향

도윤정* · 구세광** · 김홍태*** · 오태호 · 조영무* · 김상우* · 유일선* · 이근우¹

경북대학교 수의과대학, *농촌진흥청 국립축산과학원, **대구한의대학교 한의과대학, ***부산광역시 보건환경연구원

Effects of Polygoni Multiflori Radix (PMR) on Osteogenesis and Osteoclasts in vitro

Yoon-Jung Do*, Sae-Kwang Ku**, Hong-Tae Kim***, Tae-Ho Oh, Young-Moo Cho*, Sang-Woo Kim*, Il-Sun Ryu* and Keun-Woo Lee¹

College of Veterinary Medicine, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

*National Institute of Animal Science, Namwon 590-832, Korea

**College of Oriental Medicine, Daegu Haany University, Kyungsan 617-763, Korea

***Busan Metropolitan City Institute of Health & Environment, Busan 616-810, Korea

(게재승인: 2011년 8월 27일)

Abstract : Polygoni Multiflori Radix (PMR) a dried root tuber of *Polygonum multiflorum* Thunberg with bioactivities in bone metabolism is one of the most famous tonic traditional medicines in China, Japan and Korea. To observe the anti-osteoporotic effect of PMR, we observed the effects on proliferation and alkaline phosphatase (ALP) activity of primary osteoblasts, bone nodule formation, pit formation of osteoclasts and osteoclastogenesis in vitro. As the result of that, although PMR extracts have no meaningful changes on the proliferation of primary osteoblasts, significant ($p < 0.01$) increases of ALP activity of osteoblasts were dose-dependently observed in all PMR extracts treated groups tested compared to that of vehicle control. It means that it enhanced the differentiation (ALP activity) and bone nodule formation of osteoblast. In addition, PMR extracts dose-dependently inhibits the pit formation and the number of multinucleated osteoclast-like cells (OCLs), osteoclastogenesis in vitro. Therefore these results show the possibility of PMR extracts as another anti-osteoporotic agents.

Key words : Polygoni Multiflori Radix (PMR), anti-osteoporotic effect, alkaline phosphatase (ALP), osteoblast, osteoclast-like cells (OCLs).

서 론

하수오(*Polygonum multiflorum* THUNBURG, 何首烏)는 다년생 만년 초본으로, 보간신(輔肝腎), 익정혈(益精血), 윤장통변(潤腸通便), 해장독(解毒)의 효능이 있는 것으로 알려져 있다(9,19). 하수오의 에탄올 추출물은 동맥경화에 대한 예방 효과를 가진 것으로 알려져 있고(11,44), 질병의 예방뿐만 아니라 항노화 효과(11,47), 세포 생존 시간 연장 및 면역 조절 기능, 신진 대사 기능이 있으며(11,17), 난소 적출로 골다공증이 유발된 흰쥐에서 하수오 추출물이 골다공증을 예방하는 효과를 나타냈다는 보고가 있었다(26,40).

일반적으로 골다공증이란 낮은 골 량과 골의 미세구조 이상으로 골절에 대한 감수성이 증가하는 전신성골질환으로서, 대사성 골 질환 중 가장 흔한 질환이며(4), 정상 골 수복과정

의 억제, 골 형성과 재흡수간의 불균형에 의하여 유발 되는 것이다(39).

조골세포는 중간엽 세포에 의해 형성되며 골의 기질을 축적시키고 골 량을 증가시키는 역할을 하며(14), 골을 형성하는 조골세포가 되는 개체발생 단계는 복잡한 과정으로써 3단계 즉: 1) 골 조상세포의 증식, 2) 세포외 기질의 형성과 성숙(maturation), 3) 무기질 침착(Matrix mineralization)의 과정으로 나누어진다(14,15). 또한 ALP (Alkaline Phosphatase)는 조골세포가 골형성을 하는 동안 생성되어 그 중의 일부가 혈중에 분비되는 효소이며, 임상에서 가장 흔히 이용되는 골 형성 표지자이다(3). 이 ALP는 폐경기 골다공증 환자에서는 현저히 증가되어 있고, 골흡수억제제 사용시 감소하는 것으로 알려져 있다(6). 따라서 조골세포의 증식과 활성이 골 형성의 주된 근원으로 간주되며 조골세포에 대한 하수오 물 추출물의 효과는 세포 증식과 활성을 근거로 시행되었다(21).

조혈세포에서 생성되는 파골세포는 골의 재생성 과정에서 불균형을 초래하고 골의 재흡수에 중요한 역할을 한다. 파골

¹Corresponding author.
E-mail : kwolee@knu.ac.kr

세포의 골 재흡수는 파골세포 전구체의 분화, 다핵 파골세포로의 융합, 그리고 골 흡수를 위한 성숙 파골세포의 활성화와 같은 여러 단계로 이루어지며(22), 성숙다핵 파골세포는 골의 재흡수 기간동안 경계부위의 찌그러짐, 산성화 및 적절한 actin 세포골격 구성 등을 유지시킨다(43). 따라서 항 골다공증 효과는 pit 형성 분석에서와 같이 파골세포 생성과 그들의 활성 억제의 측면에서 실시되고 있다(21,42).

골 질환의 치료 또는 예방에 대하여 새로운 물질을 개발하고자 하는 수많은 연구가 진행되고 있으며(37) 현재도 항 골 흡수 물질은 광범위하게 이용되고 있지만 여전히 안전하고 효과적인 흡수 억제제에 대한 관심 및 요구가 증가되고 있다. 하지만 골 형성을 촉진할 수 있는 동화물질은 항 흡수 물질에 비하여 인식이 비교적 낮기 때문에(20) 조골세포 분화와 골 형성에 관하여서는 지속적인 연구가 필요하며 또한 이러한 관점에서 골 질환에 대한 치료효과를 나타내는 천연 물질에 대한 관심이 증가되고 있는 실정이다.

본 실험에서는 하수오 물 추출물(Polygoni Multiflori Radix; PMR)의 항 골다공증에 대한 치료 효과를 관찰하기 위하여, 초대배양 조골세포의 증식과 ALP (Alkaline phosphatase) 활성, 골 결절형성, in vitro에서의 파골형성과 파골의 pit 형성에 대하여 관찰하였다.

재료 및 방법

하수오 물추출물의 준비

시판되는 건조 하수오의 뿌리 (yield: 15.03%)를 분쇄하여 세 번 환류 시켜 열수 4L로 추출하였으며 수용성 현탁액에 농축된 추출물을 동결 건조하여 총 300.6 g의 동결 건조 하수오 물 추출물을 얻었다. High performance liquid chromatography analysis (HPLC)분석을 위하여 하수오 물 추출물을 30분간 초음파 파쇄하여 50% methanol 50 ml에 용해하였다. 이 용액을 0.45 μm 여과지(Advantec, CA, USA)로 여과하였다. 이 후 용매인 $\text{CH}_3\text{CN} + 0.1\%$ trifluoroacetic acid와 TSK-GEL ODS-80TS column (4.6 ϕ × 250 mm)을 사용하여 LC-10A (Japan)로 측정하였다. Mobile phase (methanol : water; 80 : 20)는 1.0 ml/min 으로 하였으며 254 nm에서 흡광도를 측정 하였다. Standard stilbene, emodin 및 physcion은 methanol에 용해시켜 1, 0.5, 0.25, 0.125, 및 0.0625 mg/l로 희석한 후, 3회 HPLC를 이용하여 측정 하였다. Calibration plot은 peak area를 측정하여 얻었으며, UV absorption spectra와 retention time (40 min)으로 동정하였다. 본 실험에 사용한 하수오 물 추출물중 화학 성분은 1.5% stilbeneglycoside와 1.6% anthraquinones (emodin, physcion)이 함유되어 있었다.

시약

세포배양을 위하여 minimal essential medium alpha modification (α -MEM), fetal bovine serum (FBS), penicillin, streptomycin, trypsin-EDTA를 Gibco-BRL (Grand Island, NY, USA)를 사용하여 사용하였으며, 조골세포 검사를 위하여 ascorbic acid,

β -glycerophosphate, ALP enzyme 분석과 Alizalin Red-S (AR-S) 염색을 위한 모든 시약을 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. 이외 파골세포 검사를 위해서 1,25 (OH) $_2$ D $_3$, dexamethasone, TRAP staining kit를 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)에서 구입하였다.

조골세포의 배양

신생 ICR 마우스의 두개관에서 0.2% collagenase를 이용하여 조골세포를 분리하였으며 이 후 세포는 10% FBS를 함유한 α -MEM을 이용하여 조직배양접시에서 $1 \times 10^5/\text{ml}$ 의 농도로 단층배양 하였다. 24시간 후, 세포는 ascorbic acid (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)와 β -glycerophosphate (10 mM)를 함유한 분화 배지로 옮겨 배양하면서 배지를 3일 간격으로 교환하였으며, 실험 시 세포를 PBS로 두 번 세척한 후 수거하여 사용하였다.

조골세포의 증식과 ALP 활성 시험

신생 마우스의 두개관에서 초대 배양한 조골세포를 하수오 물 추출물 각 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} g/ml 농도액으로 처리하여 3일간 배양하였다. 세포증식 여부는 각 실험 종료 시 세포수를 계산하여 결정하였으며 hemacytometer를 이용하여 세포수를 계산하였다. ALP 활성과 총 단백질 함량의 측정을 위하여 1 mM MgCl_2 가 첨가된 PBS로 제조한 0.05% triton X-100으로 세포를 분리하여 1,000 \times g, 5분간 원심분리 하였다. 이 상층액을 분리하고 p-nitrophenyl phosphate (PNP)를 기질로 사용하여 405 nm의 파장에서 발색 반응을 수행하여 효소의 활성도를 결정하였으며, 단백질 함량은 Protein assay kit (Bio-Rad, USA)를 이용하여 측정하였다. ALP는 nmol PNP/ μg protein/min로 표시하였다.

골 형성 시험

골 형성 시험은 골 기질에 침착된 무기질 양을 AR-S 염색하여 결정하였다. 즉 조골세포를 하수오 물 추출물 처리군과 무처리군으로 나누어 상기의 배양조건에서 14일간 배양한 후 10% 포르말린 용액으로 고정하였다. 양의 측정을 위해 AR-S로 염색된 결절을 10% cetylpyridinium chloride 용액에서 30분간 반응하여 염색을 제거 하였다. 이 후 용출된 AR-S의 양을 562 nm에서 흡광도를 측정하였다.

파골세포 (OCLs)의 준비 및 파골세포 형성시험

10% FBS가 함유된 α -MEM과 1,25(OH) $_2$ D $_3$ (10^{-8} M) 및 dexamethasone(10^{-7} M)의 존재 하에 골수세포 (2.5×10^5 cells/cm 2)와 두개관 유래의 조골세포(4×10^4 cells/cm 2)를 콜라겐 겔 평판상에 동시 배양하여 파골세포를 발생시켰다. 골수 세포는 생후 6주령 ddY 마우스의 대퇴골에서 분리하였고 조골세포는 신생 ICR 마우스의 두개관에서 분리하였으며 배지는 이틀간격으로 교환하였으며 동시 배양 6 일에서 8일째에 다핵 파골세포(multinucleated OCLs)를 0.2% collagenase를 처리하여 평판으로부터 분리한 후(Crude OCLs) 파골세포를 이용한 연구를 위하여 다시 배양하였으며 TRAP 염색을 통한

TRAP-양성 다핵 파골세포(TRAP(+) MNCs)의 수를 파골세포 형성의 지표로 사용하였다. 파골세포 분화에 있어서 하수오 물 추출물의 효과를 관찰하기 위하여 하수오 물 추출물을 처리한 군과 처리하지 않은 군을 96-well plate에서 동시 배양하였다. 6일째 세포를 10% formaldehyde에 고정하여 TRAP에 염색하였으며 6개 내지 7개 이상의 핵을 가진 TRAP(+) MNCs를 현미경(Leica, Germany)으로 관찰하였다.

파골세포의 골 흡수 시험(Pit formation)

파골세포를 10% FBS를 함유한 α -MEM에 부유시킨 후 96-well culture plate의 dentin slice (4 mm diameter)위에 분주하였다. 2시간의 배양 후 dentin slice를 하수오 물 추출물과 vehicle을 함유한 48-well plate로 옮기고 24시간 더 배양하였다. 이 후 1M NH_4OH 를 처리하여 세포를 제거하고 slice상에 형성된 흡수된 pits는 Mayer's hematoxylin으로 염색하였다. 흡수된 pits는 image analyzer로 계산하였으며 대조군과 비교하였다.

결 과

조골세포 증식에 대한 효과

조골세포의 수를 측정된 결과, 매체 대조군은 10.20 ± 1.30 , 하수오 물 추출물 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} g/ml 투여군의 경우 각각 10.00 ± 1.00 , 10.60 ± 1.52 , 11.20 ± 1.48 Number of osteoblasts/well ($\times 10^4$)로서 하수오 물 추출물을 처리한 군에서 매체 대조군에 비해 각각 -1.96, 3.92, 9.80%의 변화를 나타내었으며, 매체 대조군과 비교 하였을 때, 모든 하수오 물 추출물 처리 군에서 조골세포의 수적 증가는 유의한 변화를 나타내지 않았다(Fig 1).

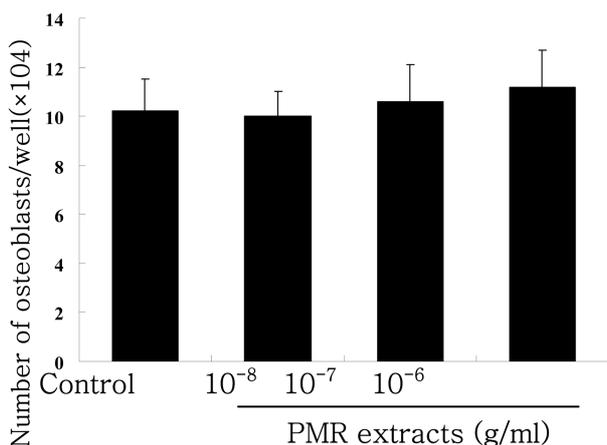


Fig 1. OSTEOBLAST PROLIFERATION. PMR extracts do not influence the proliferation of primary osteoblast cells. Primary osteoblast cells were cultured in growth medium containing the vehicle (water) and different concentrations of PMR extracts for 3 days. All data are represented as the mean \pm SD of five independent experiments.

조골세포의 ALP activity에 대한 효과

조골세포의 ALP 활성은 매체 대조군의 16.53 ± 1.15 nmol PNP/ μ g protein/min 과 하수오 물 추출물 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} g/ml 처리군에서 각각 20.40 ± 0.80 , 21.76 ± 1.01 및 22.32 ± 2.00 nmol PNP/ μ g protein/min 으로 나타났으며, 매체 대조군에 비하여 모든 하수오 물 추출물 처리군에서 ALP 활성은 용량의존적으로 유의한증가($p < 0.01$)를 나타내었다(Fig 2).

조골세포의 ALP 활성은 하수오 물 추출물 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} g/ml 처리군에서 매체 대조군과 비교했을 때 각각 3.37, 31.60, 34.98%를 나타내었다.

골 형성에 대한 효과

조골세포를 하수오 물 추출물 처리군과 무처리군으로 나누어 14일간 배양하여 고정한 후 AR-S 염색을 실시하였다. 염색된 무기질의 양을 측정하기 위해 10% cetylpyridinium chloride를 이용하여 AR-S 염색을 용출시키고 흡광도를 측정 한 결과, 매체 대조군은 254.40 ± 11.18 μ M/well, 하수오 물 추출물 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} g/ml 처리군은 각각 300.80 ± 59.40 , 347.18 ± 36.18 및 369.20 ± 28.10 μ M/well로 조골세포의 골 결절 형성은 10^{-8} g/ml 처리군을 제외하고는 매체 대조군과 비교했을 때 모든 하수오 물 추출물 처리군에서 용량 의존적으로 유의성 있는 증가($p < 0.01$)가 나타났다(Fig 3).

조골세포에 의한 골 결절 형성은 하수오 물 추출물 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} g/ml 처리군에서 매체 대조군과 비교했을 때 각각 18.24, 36.64, 45.13%로 관찰되었다.

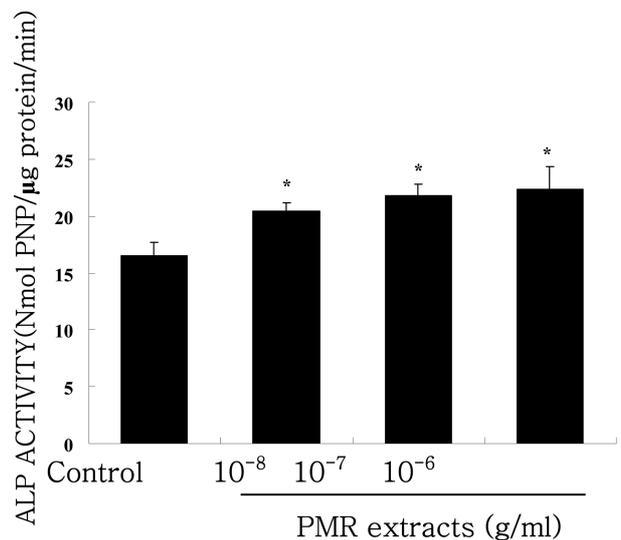


Fig 2. ALP ACTIVITY. Dose-response effect of PMR extracts on ALP activity. PMR extracts increased the ALP activity of primary osteoblast cells. The primary osteoblast cells were treated for 3 days with graded doses of PMR extracts in differentiation medium. ALP was expressed as nmol PNP/ μ g protein/min. All data are represented as the mean \pm SD of five independent experiments. * $p < 0.01$ compared to that of control by MW test.

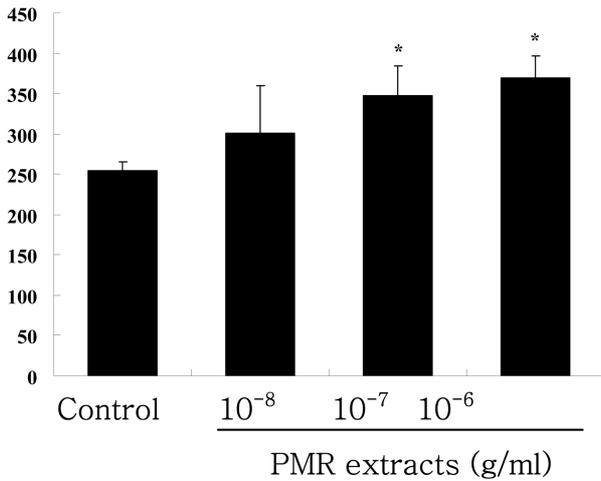


Fig 3. BONE NODULE ASSAY. PMR extracts stimulated the formation of mineralized bone nodules. Primary osteoblast cells were plated in 12-well plates at a density of 1×10^5 cells/well, cultured until confluence, and then treated with PMR extracts for 14 days in differentiation medium. The bound AR-S was eluted from the matrix with 10% cetylpyridinium chloride solution and quantified by measuring the absorbance at 562 nm. All data were represented as the mean \pm SD of five independent experiments. * $p < 0.01$ compared to that of control by MW test.

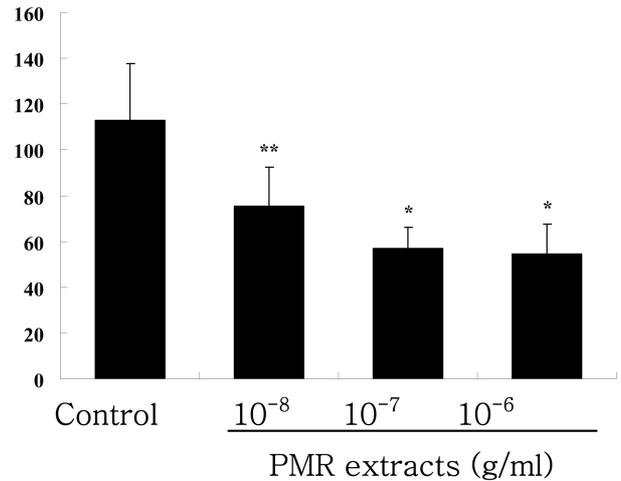


Fig 5. PIT FORMATION ASSAY. PMR extracts inhibit osteoclastic bone resorption. OCLs obtained from co-cultured cells were plated on dentine slices and cultured in the presence of the indicated concentration of PMR extracts for 24 h. After removing the cells by 1M NH_4OH treatment, resorption pits on dentine slices were visualized by staining with hematoxylin. Number of resorption pit was measured under microscope. All data are represented as the mean \pm SD of five independent experiments. * $p < 0.01$ and ** $p < 0.05$ compared to that of control by MW test.

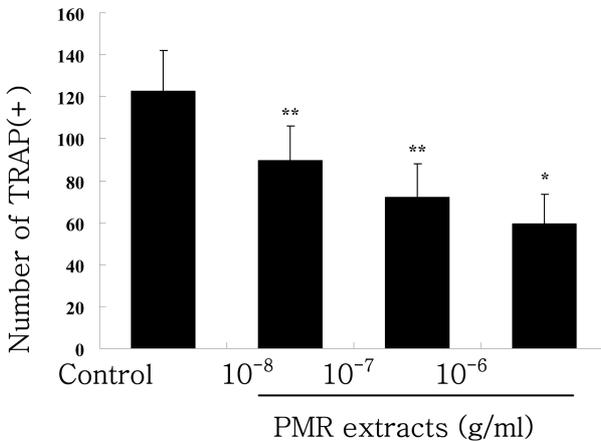


Fig 4. OSTEOCLASTOGENESIS ASSAY. PMR extracts inhibited osteoclastogenesis. Mouse bone marrow cells and primary osteoblasts were cocultured in the presence of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ and dexamethasone with PMR extracts for 6 days. Cells were fixed and stained for TRAP. The number of TRAP(+) MNCs containing six or more nuclei were counted. All data are represented as the mean \pm SD of five independent experiments. * $p < 0.01$ and ** $p < 0.05$ compared to that of control by MW test.

파골세포 형성에 대한 효과

현미경으로 6에서 7개 이상의 핵을 가진 다핵의 파골세포를 관찰하였으며, 그 결과 파골세포의 수는 매체 대조군에서 122.60 ± 19.64 TRAP(+) MNCs/well, 하수오 물 추출물 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} g/ml 처리군에서 각각 89.40 ± 16.46 , 72.00 ± 15.94 및 9.20 ± 14.29 TRAP(+) MNCs/well으로서, 매체 대조군과

비교했을 때 모든 하수오 물 추출물 처리군에서 용량 의존적으로 유의한 감소($p < 0.01$ or $p < 0.05$)를 나타내었다(Fig 4). 파골세포의 수는 하수오 물 추출물 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} g/ml 처리군에서 매체 대조군에 비하여 각각 -27.08, -41.27, 51.71%를 나타내었다.

파골세포의 골 흡수에 대한 효과(Pit formation)

파골세포가 골 흡수에 미치는 영향을 관찰하기 위해 slice 상에 형성된 pits를 Mayer's hematoxylin으로 염색하여 그 수를 측정된 결과, 매체 대조군은 112.60 ± 24.85 Pit/slice, 하수오 물 추출물 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} g/ml 처리군은 각각 75.20 ± 17.36 , 56.80 ± 9.23 및 54.60 ± 13.01 pit/slice로 나타났으며, 따라서 파골세포에 의한 dentin slice의 pit 형성은 매체 대조군과 비교해서 모든 하수오 물 추출물 처리군에서 용량 의존적으로 유의한 감소($p < 0.01$)를 나타내었다(Fig 5).

파골세포에 의한 dentin slice의 pit 형성은 하수오 물 추출물 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} g/ml 처리군에서 매체 대조군과 비교했을 때 각각 -33.21, -49.56, -51.51%로 관찰되었다.

고 찰

골다공증이란 조직학적으로 골조성에는 변화가 없이 뼈가 감소되고, 골절에 대한 감수성이 증가되는 전신성 골결핍환으로 대사성 골질환 중 가장 흔한 질환이다(40).

골다공증의 정확한 원인은 아직 불명확 하지만 원발성 골다공증의 제1형(폐경후 골다공증)은 폐경으로 인한 estrogen결

핍이 주요 원인이며, 제2형(노인성 골다공증)은 노령이, 속발성 골다공증에는 주로 갑상선 기능항진증, 당뇨병 등의 내분비질환, 알코올, 위장관질환, 골수질환, 교원성 질환, 기타 만성질환이나, steroid 등의 약물이 주요 원인으로 알려져 있다.

현대 의학의 발달로 수명이 연장되고 폐경기 이후의 여성 인구가 급격히 증가됨에 따라 이러한 골다공증의 발생 빈도 또한 증가하고 있는 추세이다(8).

하수오는 마디골과에 속하는 한약재로써 고혈압, 관상동맥경화, 고콜레스테롤혈증 등의 증상을 치료한다고 알려져있으며, 이외에도 최근에는 골다공증에대한 효과가 보고 된 후 지속적인 연구가 진행되고 있다(26, 40).

골다공증에 대한 약물요법으로는 칼슘제와 비타민 D, 골소실의 예방 및 골량을 증가시킬수 있는 estrogen, calcitonin 및 파골세포의 기능을 저하시켜 골흡수를 억제하는 bisphosphate, 골형성을 자극하는 fluoride 등이 보고되어 있다. 그러나 estrogen 등 호르몬 요법은 폐경기 후 골재형성을 감소시켜, 골다공증으로 인한 골절을 예방시켜주는 효과가 있으나, 대부분의 약물 치료가 치료 목표를 달성하기는 쉽지 않으며, 특히 호르몬 요법의 경우 장기간 사용시 관상동맥질환, 뇌일혈, 혈전색전증, 담낭염 등의 위험을 증가시킬수 있다는 보고도 있다(26).

따라서 보다 안전하고 부작용이 적은 천연물질을 이용한 항 골다공증 치료약에 대한 수요가 증가함에 따라 골 질환에 효과가 있는 것으로 알려진 하수오의 덩이뿌리를 이용한 하수오 물 추출물의 골다공증에 대한 효과를 알아보기 위하여 본 실험을 실시하였다.

ALP는 임상에서 흔히 이용되는 골형성 표지자로서 골다공증 환자에서는 현저히 증가되며, 골흡수억제제 사용시에는 감소하는 것으로 알려져 있다(26), 김 등(26)과 서 등(40)은 난소적출로 유발된 쥐의 골다공증 모델에 하수오 추출물을 투여한 결과, 3주 및 6주 투여군에서 비투여군에 비해 혈중 ALP농도가 감소되었으며, 특히 3주 투여군에서 유의한 결과가 인정되었다고 보고한 바 있다.

본 실험에서는 *in vitro* 상에서조골세포의 증식과 ALP 활성 시험을 위해 신생 마우스의 두개관에서 초대 배양한 조골세포를 하수오 물 추출물 각 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} g/ml 농도액으로 처리하고 3일간 배양하여 수를 측정 한 결과,매체 대조군은 10.20 ± 1.30 , 하수오 물 추출물 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} g/ml 투여군의 경우 각각 10.00 ± 1.00 , 10.60 ± 1.52 , 11.20 ± 1.48 Number of osteoblasts/well ($\times 10^4$)로써 하수오 물 추출물을 처리한 군에서 매체 대조군에 비해 각각 -1.96, 3.92, 9.80%의 변화를 나타내었다. 매체 대조군과 비교 하여, 모든 하수오 물 추출물 처리 군에서 조골세포의 수적 증가가 유의한 변화를 나타내지는않았으나, 조골세포의 ALP 활성은 하수오 물 추출물 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} g/ml 처리군에서 매체 대조군에 비하여 각각 3.37, 31.60, 34.98%를 나타내어 모든 하수오 물 추출물 처리군에서 ALP 활성은 용량 의존적으로 유의한 증가($p < 0.01$)를 나타내었다.

하수오 물추출물의 골 형성에 대한 효과를 관찰하기 위해

조골세포를 하수오 물 추출물 처리군과 무처리군으로 나누어 14일간 배양하여 고정 한 후 AR-S 염색을 실시하고 흡광도를 측정 한 결과, 매체 대조군은 $254.40 \pm 11.18 \mu\text{M/well}$, 하수오 물 추출물 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} g/ml 처리군은 각각 300.80 ± 59.40 , 347.18 ± 36.18 및 $369.20 \pm 28.10 \mu\text{M/well}$ 로 조골세포의 골 결절 형성은 10^{-8} g/ml 처리군을 제외하고는 매체 대조군과 비교하여 모든 하수오 물 추출물 처리군에서 각각 18.24, 36.64, 45.13%로 용량 의존적인유의한 증가($p < 0.01$)를 나타내었다.

이상과 같이 하수오 물 추출물 처리가 비록 조골세포 증식에 영향을 미치지는 않았지만 하수오 물 추출물의 지속적인 투여에 의하여 ALP 활성과 골 형성 활성이 상당히 촉진되는 것으로 확인된 바, 하수오 물 추출물이 초대배양 조골세포의 증식을 자극하고 이것이 분화과정을 촉진함으로써 골 형성 활성에 영향을 미친다는 것을 알 수 있었다. 골 형성을 활성화하고 골 밀도를 증가시키기 위한 조골세포 분화과정의 마지막 단계가 무기질 침착이라는 것을 감안한다면 하수오 물 추출물은 조골세포의 골 형성 활성을 증가시키는 positive agent로 간주된다.일반적으로 BMP-2와 Cbfa-1이 조골세포형성과 골 형성에 필수적인 ALP, Col I, OCN 과 같은 조골세포 특이 유전자의 발현을 자극함으로써 골 형성 조절에 있어 중추적인 역할을 한다고 알려져 있다(16,27,28,41,48). 따라서 하수오 물 추출물의 조골세포 형성 및 활성에 미치는 정확한 기전을 확인하기위하여서는 조골세포 특이 유전자의 발현과 BMP-2, Cbfa-1 같은 molecular target에 대한 지속적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

하수오 물추출물의 파골세포 형성에 대한 효과를 관찰하기 위하여현미경상 6~7개 이상의 핵을 가진 다핵 파골세포를 관찰한 결과 파골세포의 수는 매체 대조군에서 122.60 ± 19.64 TRAP(+) MNCs/well, 하수오 물 추출물 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} g/ml 처리군에서 각각 89.40 ± 16.46 , 72.00 ± 15.94 및 9.20 ± 14.29 TRAP(+) MNCs/well으로서, 매체 대조군에 비하여 모든 하수오 물 추출물 처리군에서 각각 -27.08, -41.27, 51.71% 로써 용량 의존적인 유의한 감소($p < 0.01$, $p < 0.05$)를 나타내었다.

또한 하수오 물추출물의 투여가 파골세포의 골 흡수에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 slice 상에 형성된 pits를 Mayer's hematoxylin으로 염색하여 그 수를 측정 한 결과, 매체 대조군은 112.60 ± 24.85 Pit/slice, 하수오 물 추출물 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} g/ml 처리군은 각각 75.20 ± 17.36 , 56.80 ± 9.23 및 54.60 ± 13.01 pit/slice로 나타남에 따라 하수오 물 추출물 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} g/ml 처리군에서 매체 대조군에 비하여 각각 -33.21, -49.56, -51.51%로 모든 하수오 물 추출물 처리군에서 용량 의존적으로 유의한 감소($p < 0.01$)를 나타내었다.

파골세포에 대한 연구에서 하수오 물 추출물이 파골세포의 주요 기능인 골의 재흡수를 상당히 억제시키는 것으로 관찰되었으며, 이는 파골세포의 형성과 관계가 있는것으로 알려져 있다(41). 따라서 파골세포 배양에 있어서 하수오 물 추출물이 TRAP(+) 파골세포의 수를 억제하는데 좋은 효과가

있는 것으로 나타남에 따라 하수오 물 추출물이 파골세포 분화과정에 영향을 미친다는 것을 알 수 있었다. Noble(35)은 성숙 파골세포의 생존 기간이 골 재흡수 활성화와 bone homeostasis에 영향을 미치는 결정적 요인이며 이것이 주로 세포 죽음에 의해 매개된다고 보고하였으며. Lee 등(32)과 Gingery 등(18)은 Akt, ERK, NF- κ B 를 포함한 몇 가지 signaling pathway가 파골세포의 생존과 활성화에 관여한다는 것을 증명한 바있다. 따라서, 파골세포에 대한 하수오 물 추출물의 정확한 기전을 규명하기 위하여서는상기한 파골세포의 apoptosis에 관련된 signal pathway와 함께 성숙 파골세포의 생존기간에 관한 추가 연구가 필요할 것으로 사료된다.

결 론

골다공증 치료제로써 하수오 물 추출물의 가능성을 평가하기 위하여, 조골세포 증식, ALP 활성화, 골 결절 형성 및 파골세포 pit 형성 및 파골세포 형성시험에 대한 in vitro 시험을 실시한 결과 하수오 물 추출물이 조골세포의 증식에는 직접적인 효과가 없었지만 조골세포의 분화와 활성화에 의해 방출되는 효소인 ALP 활성을 증가시키고 골 결절의 형성을 촉진시키는 것으로 나타났으며, 파골세포에 관한 실험에서는 pit 형성 시험에서 골 흡수에 의한 pit의 형성을 억제하며 파골세포의 생성을 억제하는데 효과가 있는 것으로 확인되었다. 따라서 골다공증의 치료목표는 유발인자의 제거와 동시에 골 흡수를 억제하고 골 형성을 촉진하여 감소된 골량을 회복시키는 것으로써, 하수오 물 추출물은 새로운 골다공증의 예방 및 치료제로써 가능성이 있다고 생각되며 구체적인 골다공증에 대한 분자생물학적 작용기전은 더 연구되어야 하겠다.

참 고 문 헌

1. 강소신의학원. 신편중약대사전. 의성당 1992: 862-865.
2. 강세윤 외. 오늘의 진단 및 치료(Current Medical Diagnosis & Treatment). 도서출판 한우리. 1999: 1218, 1295-1296.
3. 김덕윤. 골형성의 생화학적 표지자. 대한 골대사 학회지. 1994; 1: 233-239.
4. 대한정형외과학회. 정형외과학. 최신의학사. 1992: 13-14, 81-82.
5. 도설한방의학대사전.중국약학대전3, 인민위생출판사 1991: 124-127
6. 박근용. 골다공증의 진단 및 치료에서 생화학적 표지자의 응용. 경북대학교병원/내분비-대사내과; 골다공증논문집. 1995: 29.
7. 이동선, 변상요, 두충[Eucommia ulmoides Oliver.] 조성물이 골다공증에 미치는 효과. 한국 생물공학회지. 2001; 16: 614-619
8. 이해남, 박용문, 장미경, 변용진. 한국 여성의 요골 골 밀도치에 의한 골다공증의 빈도 및 폐경에 따른 변화. 대한산부회지. 2002; 45: 1186-1190.
9. 조수현. 폐경과 골다공증. 대한의학협회지. 1992; 35: 587-598.
10. 지형준. 대한약전 및 대한약전의 한약규격주해. 한국메디칼인덱스사. 1998: 266-267
11. 한방약재 교재 편찬위원회. 한방약리학. 신일상사. 2006
12. Alexander JM, Bab I, Fish S, Muller R, Uchiyama T, Gronowicz G, Nahounou M, Zhao Q, White DW, Chorev M, Gazit D, Rosenblatt M. Human parathyroid hormone 1-34 reverses bone loss in ovariectomized mice. J Bone Miner Metab. 2001; 16: 1665-1673.
13. Andersson N, Lindberg MK, Ohlsson C, Andersson K, Ryberg B. Repeated in vivo determinations of bone mineral density during parathyroid hormone treatment in ovariectomized mice. J Endocr. 2001; 170: 529-537.
14. Aubin JE. Regulation of osteoblast formation and function. Rev Endocr Metab Disord. 2001; 2: 81-94
15. Benayahu D. The hematopoietic microenvironment: The osteogenic compartment of bone marrow: Cell biology and clinical application. Hematology. 2000; 4: 427-435.
16. Chen D, Zhao M, Mundy GR. Bone morphogenetic proteins. Growth Fac 2004; 22: 233-241.
17. Chen K, Li C. Recent advances in studies on traditional Chinese anti-aging material medication. J Tradit Chin Med. 1993; 13: 223-226.
18. Gingery A, Bradley E, Shaw A, Oursler MJ. Phosphatidylinositol 3-kinase coordinately activates the MEK/ERK and AKT/NF κ B pathways to maintain osteoclast survival. J Cell Biochem. 2003; 89: 165-169
19. Gittens SA, Wohl GR, Zernicke RF, Matyas JR, Morley P, Uludag H. Systemic bone formation with weekly PTH administration in ovariectomized rats. J PharmPharm Sci. 2004; 7: 27-37.
20. Gowen M, Emery JG, Kumar S. Emerging therapies for osteoporosis. Emer Drugs. 2000; 5: 1-43.
21. Hwang YH, Lee JW, Hahm ER, Jung KC, Lee JH, Park CH, Rhee HS, Ryu JM, Kim HK, Yang CH. Momordin I, an inhibitor of AP-1, suppressed osteoclastogenesis through inhibition of NF-kappaB and AP-1 and also reduced osteoclast activity and survival. Biochem Biophys Res Commun. 2005; 337: 815-823.
22. Jimi E, Akiyama S, Tsurukai T, Okahashi N, Kobayashi K, Udagawa N, Nishihara T, Takakashi N, and Suda T. osteoclast differentiation factor acts as a multifunctional regulator in murine osteoclast differentiation and function, J Immuno. 1999; 163: 434-442.
23. Joseph, M. L., Vincent, J. V.. Current concepts review osteoporosis. J Bone Joint Sur. 1983: 223-224.
24. Ke HZ, Foley GL, Simmons HA, Shen V, Thompson DD. Long-term treatment of lasofoxifene preserves bone mass and bone strength and dose not adversely affect the uterus in ovariectomized rats. Endocrinology, 2004; 145: 1996-2005.
25. Kim HJ, Lee WH, Yoon CH, Jeong JC, Nam KS, Kim HM, Choo YK, Lee MC, Kim CH. Bombycis corpus extract prevents amyloid-beta-induced cytotoxicity and protects superoxide dismutase activity in cultured rat astrocytes. Pharm Res. 2001; 43: 11-16.
26. Kim MJ, Seo BI, Shin SS, Park JH. Effect of Polygoni Multiflori Radix and Cynanchi Wilfordii Radix On Prevention of Osteoporosis In Ovariectomized Rats. KorJ Herbology. 2004; 19: 23-34
27. Komori T. Requisite roles of Runx2 and Cbfa in skeletal development. J Bone Miner Metab. 2003; 21: 193-197.
28. Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, Shimizu Y, Bronson RT, Gao YH, Inada M, Sato M,

- Okamoto R, Kitamura Y, Yoshiki S, Kishimoto T. Targeted disruption of Cbfa-1 results in a complete lack of bone formation owing to matureational arrest of osteoblasts. *Cell*. 1997; 89: 755-764.
29. Ladizesky MG, Cutrera RA, Boggio V, Somoza J, Centrella JM, Mautalen C, Cardinali DP. Effect of melatonin on bone metabolism in ovariectomized rats. *Life Sci*. 2001; 70: 557-565.
30. Lauritzen DB, Balena R, Shea M, Seedor JG, Markatos A, Le HM, Toolan BC, Myers ER, Rodan GA, Hayes WC. Effects of combined prostaglandin and alendronate treatment on the histomorphometry and biomechanical properties of bone in ovariectomized rats. *J Bone Miner Res*. 1993; 8: 871-879.
31. Lee JH, Yang KJ, Shin HD, Park BR, Son CW, Jang HJ, Park DC, Lee HS, Ku SK. Single subcutaneous dose toxicity of Polycan®, a β -Glucan originated from *Aureobasidium* in mice. *Lab Ani Res*. 2005; 21: 299-305.
32. Lee SE, Chung WJ, Kwak HB, Chung CH, Kwack KB, Lee ZH, Kim HH. Tumor necrosis factor-alpha supports the survival of osteoclasts through the activation of Akt and ERK. *J Biol Chem*. 2001; 276: 49343-49349.
33. Li M, Du XP, Ye H. Protective effect of polygonum multiflorum thubn on the cerebral cholinergic neurofibers in rats Hunan Yi Ke Da Xue Xue Bao. 2003; 28: 361-364.
34. Li R, Gilliland FD, Baumgartner K, Samet J. Hormone replacement therapy and breast carcinoma risk in Hispanic and non-Hispanic women. *Cancer*. 2002; 95: 960-968.
35. Noble B. Bone microdamage and cell apoptosis. *Europ Cells Mater*. 2003; 6: 45-56.
36. Pytlík M. Effects of tibolone on the development of osteopenia induced by ovariectomy in rats. *Poli J Pharmacol*. 2002; 54: 35-43.
37. Rodan GA, Martin TJ. Therapeutic approaches to bone diseases. *Science*. 2000; 289: 1508-1514
38. Ryu G, Ju JH, Park YJ, Ryu SY, Choi BW, Lee BH. The radical scavenging effects of stilbene glucosides from *Polygonum multiflorum*. *Arc of PharmRes*. 2002; 25: 636-639.
39. Sakai A, Nishida S, Okimoto N, Okazaki Y, Hirano T, Norimura T, Suda T, Nakamura T. Bone marrow cell development and trabecular bone dynamics after ovariectomy in ddy mice. *Bone*. 1998; 23: 443-451.
40. Seo GT, Seo BI, Park JH, Lee ES, Choi DJ, Choi HS, Kim HK, Seo YB, Kim IR, Park JH. Effect of *Polygoni Multiflori Radix* and *Polygoni Multiflori Radix Preparat* on prevention of osteoporosis in ovariectomized rats. *Kor J Herbology* 2005; 20: 137-148
41. Stein GS, Lian JB, Owen TA. Relationship of cell growth to the regulation of tissue-specific gene expression during osteoblast differentiation. *FASEB J*. 1990; 4: 3111-3123.
42. Suda T, Nakamura I, Jimi E, Takahashi N. Regulation of osteoclast function. *J Bone Miner Res*. 1997; 12: 869-879.
43. Suda T, Udagawa N, and Takahashi N. osteoclast generation. In: Raisz LG, Rodan GA and Bilezikian JP. (eds) *Principles of Bone Biology*. Academic Press, San Diego, CA, 1996; 87.
44. Wang W, Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi. Effect of alcoholic extract of prepared radix *Polygoni multiflori* on preventing atherosclerosis in Japanese quail, 1984; 4: 748-750.
45. Weinreb M, Patael H, Preisler O, Ben-Shemen S. Short-term healing kinetics of cortical and cancellous bone osteopenia induced by unloading during the reloading period in young rats. *Virchows Arch*. 1997; 431: 449-452.
46. Wronski TJ, Schenck PA, Cintron M, Walsh CC. Effect of body weight on osteopenia in ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int*. 1987; 40: 155-159.
47. Xiao PG, Xing ST, Wang LW. Immunological aspects of Chinese medicinal plants as antiageing drugs. *J Ethnopharmacol*. 1993; 38: 167-175.
48. Yamaguchi A, Komori T, Suda T. Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehogs, and Cbfa-1. *Endocrine Rev*. 2000; 21: 393-411.