

虎杖根의 파골세포 분화 억제 효과와 기전 연구

경희대학교 한의과대학 부인과교실
장희재, 황덕상, 이진무, 이창훈, 이경섭, 장준복

ABSTRACT

Osteoclast Differentiation of *Polygoni Cuspidati* Radix Extracts Effects and Mechanism of Inhibition Studies

Hee-Jae Jang, Deok-Sang Hwang, Jin-Moo Lee
Chang-Hoon Lee, Kyung-Sub Lee, Jun-Bok Jang

Dept. of Gynecology, College of Korean Medicine, Kyung-Hee University

Objectives: This study was conducted to evaluate the inhibitory effect of *polygoni cuspidati* radix (PCR) extract on osteoclast differentiation.

Methods: MTT-assay was performed to estimate cytotoxicity of PCR extract in BMMs stimulated with RANKL. Tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) staining, TRAP activity and RT-PCR were performed to know the inhibitory effect on osteoclast differentiation. actin ring formation were analysed to observe the effect of PCR extract.

Results: PCR decreased the number of TRAP positive cells and TRAP activities in BMMs stimulated with RANKL and M-CSF. PCR restrained the formation of actin ring. PCR down regulated the induction of NFATc1, c-Fos, TRAP and OSCAR by RANKL. PCR inhibited NF- κ B activity by inducing degradation of I κ B α .

Conclusions: We suggest that PCR Extracts can be an effective therapeutic agent on osteoclast differentiation caused by diseases such as osteoporosis.

Key Words: *Polygoni Cuspidati* Radix Extracts (PCR Extracts), Osteoclast Differentiation, Tartrate Resistant Acid Phosphatase (TRAP) Activity, NF- κ B, C-FOS, NFATc1

I. 서론

현대에는 평균 수명이 연장됨에 따라 노인 질환의 관리가 중요 문제로 대두되고 있다¹⁾. 우리나라 65세 이상 노인의 주요 만성질환 중 골다공증은 18.9%를 차지하는데 남성은 3.5%인데 비해 여성은 28.6%에 해당한다²⁾. 폐경기 이후 에스트로겐의 감소로 여성에서 호발하는 골다공증은 골밀도가 감소하여 통증 및 골절이 초래된다³⁾.

골다공증의 치료에는 에스트로겐 요법이 시행되어 왔지만 여성의 유방, 자궁내막의 암성 변화율 증가 등 위험성이 확인되고 있어 호르몬 요법 시 최저 용량 및 최저 기간이 권장되는 실정으로³⁾ 비교적 안전하고 부작용이 적은 한약재를 이용한 치료가 주목받고 있다⁴⁾.

한의학에서 골다공증은 骨痿, 骨枯, 骨痺 및 骨痛 등의 범주에 속하고 腎의 盛衰와 骨의 代謝가 밀접한 관계가 있다고 보아⁵⁾ 補腎, 將筋骨, 生血하는 약재를 이용한 연구가 많이 보고⁶⁻⁸⁾되고 있지만 關節痺痛과 跌撲損傷 등 관절 손상과 관련된 通經, 清熱, 化濕, 活血하는 紅花子, 黃芩, 木瓜, 乳香 등⁹⁻¹²⁾ 다양한 약제에 대한 효능 연구가 진행되고 있다.

虎杖根의 性味는 苦, 無毒 하고 微寒하며 肝, 膽 및 肺에 歸經하고 祛風利濕, 散瘀定痛 효능이 있다¹³⁾. 각종 실험연구를 통해 만성염증¹⁴⁾, 류머티스 관절염¹⁵⁾ 및 골소실 억제¹⁶⁾ 등에 대한 연구가 시도되었으나 파골세포와 관련된 보고는 아직까지 없었다.

이에 저자는 虎杖根 추출물이 파골세포 분화 억제에 미치는 영향을 알아보기 위해 tartrate resistant acid phosphatase

(TRAP) 활성과 정량적 평가, actin ring 형성, 파골세포 활성 유전자 및 신호 통로 발현 등을 연구하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 실험

1. 재 료

1) 虎杖根 추출물

虎杖根은 마디풀과(Polygonaceae)에 속하는 多年生 草本인 虎杖根 *Polygonum cuspidatum* S. et Z.의 根(Polygoni Cuspidati Radix, PCR)이다. 虎杖根은 한국식물추출물은행의 제품을 구매하여 DMSO에 녹인 후 0.22 μm 필터(Milopore Carrigtwohill, Ireland)에 여과하여 4℃에 보관하였으며 용액제조 후 15일 이내에 사용하였다.

2) 시 약

Human receptor activator of NF-κB ligand(RANKL)과 human macrophage-colony stimulating factor(M-CSF)는 Peprotech사(London, UK)에서 구입하였다. TRAP staining solution은 Sigma Aldrich사(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며, β-actin 항체는 Santa Cruz Biotechnology사(Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였다. Phospho-IκBa에 대한 항체는 Cell Signaling Technology사(Beverly, MA, USA)의 제품을 사용하였다. A-minimum essential medium(α-MEM), 10% fetal bovine serum(FBS), antibiotic, Dulbecco's phosphate-buffered saline(DPBS)은 Gibco사(Rockville, MD, USA)에서 구입하였으며 1% Triton X-100는 Sigma Chemical사(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 또한 2',7'-dichlorofluorescein diacetate(DCFH), rhodamin-conjugated phalloidin은 Molecular Probes(Eugene,

OR, USA)에서 제품을 구입하였다.

3) 파골세포의 배양과 분화

6주령의 수컷 ICR 생쥐를 희생시킨 후 antibiotic을 첨가한 α -MEM을 1 cc 주사기에 충전하여 경골 및 대퇴골에서 골수를 채취하였다. 채취한 골수세포에서 적혈구를 제거한 후 FBS과 M-CSF 30 ng/ml를 첨가한 α -MEM배지에서 5% CO₂, 95% 습도 및 37°C를 유지하면서 3일간 배양하였다. 배양 후 부착된 세포를 파골전구세포로서의 대식세포(bone marrow-derived macrophages, BMMs)로 사용하였다.

2. 방 법

1) 세포 독성 측정

BMMs를 96-well plate에 1×10^4 cells/well로 분주하고 M-CSF 30 ng/ml를 처리한 후 虎杖根 추출물 1, 10, 30 및 50 μ g/ml를 첨가하여 24시간 및 48시간 배양하였다. 그 후 각각의 well에 cell counting kit (CCK-8, Dojindo, Japan)을 처리하고 2시간 동안 배양한 후 ELISA microplate reader (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포독성 효과는 시료를 첨가하지 않는 대조군에 대한 백분율(%)로 표시하였다.

2) TRAP positive cell 측정

BMMs를 48-well plate에 2×10^4 cells/well로 분주하고 RANKL 100 ng/ml와 M-CSF 30 ng/ml로 처리한 배지에 虎杖根 추출물 1, 10 및 30 μ g/ml를 첨가하고 배양하였다. 3일 후 배양액을 교환하고 추가로 2일 더 배양하였다. 부착세포를 DPBS로 2회 세척한 후 3.7% formaldehyde에 10분간 고정하고 PBS로 세척 후 0.1% Triton X-100으로 용해시킨 후 TRAP 용액으로 염색하여 보라색의 TRAP positive cell

을 파골세포로 인정하였다. 염색된 파골세포 중 핵이 3개 이상인 세포의 개수를 현미경에서 직접 관찰하였다.

3) TRAP activity

BMMs를 48-well plate에 2×10^4 cells/well로 분주하고 RANKL 100 ng/ml와 M-CSF 30 ng/ml로 처리한 배지에 虎杖根 추출물 1, 10 및 30 μ g/ml를 첨가하고 배양하였다. 4일째에 배양액을 제거하고 DPBS용액으로 3회 세척 후, lysis buffer[40 mM HEPES(pH 7.0), 0.1% NP-40, 20% glycerol, 5 μ g/ml leupeptin, 10 μ g/ml aprotinin, 48 μ g/ml PMSF]을 200 μ l 넣고 얼음에서 20분간 incubation 한 후 세포막을 용해시켰다. 4°C 13000rpm에서 10분간 원심 분리 한 후 상층액 50 μ l를 취하여 pNPP (p-nitro-phenyl phosphate) substrate을 sodium acetate용액(pH 5.2, 0.5M)으로 녹인 후 sodium tartrate solution(0.5M sodium tartrate buffer, pH 5.2)와 10:1로 혼합하여 60분 동안 배양하여, 1N 수산화나트륨 용액을 50 μ l씩 넣어 효소 반응을 정지시켜 TRAP assay kit(Taksra, Japan)을 처리하고 ELISA microplate reader(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. TRAP activity는 시료를 첨가하지 않는 대조군의 흡광도에 대한 백분율(%)로 표시하였다.

4) Actin ring 염색

BMMs를 48-well plate에 2×10^4 cells/well로 분주하고 RANKL 100 ng/ml와 M-CSF 30 ng/ml를 처리하고 동시에 虎杖根 추출물 1, 10 및 30 μ g/ml를 첨가하여 파골 세포 분화를 5일간 유도시켰다. 그 후 세포를 3.7% formaldehyde에 10분간 고정하고 PBS로 세척 후 rhodamin-conjugated

phalloidin을 처리하여 30분간 배양하였다. Actin ring 형성은 형광현미경 Olympus IX71-F32PH(Olympus, Tokyo, Japan)을 사용하여 관찰하였다.

5) Real time-PCR 분석

BMMs를 48well plate에 2×10^4 cells/well로 그룹별로 3개씩 분주하고 RANKL 100 ng/ml와 M-CSF 30 ng/ml를 5일 동안 함께 배양 후 각각 3개의 well을 함께 수집하여 RNA RNeasy kit(Qiagen, Valencia, CA, USA)를 이용하여 cell에서 총 RNA를 분리하였다. 추출한 RNA의 1 μ g을 oligo-dT(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 cDNA로 합성하였다. 합성된 cDNA를 iQ SYBR Green supermix(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)로 중합효소연쇄반응을 수행하였다. 중합효소연쇄반응에 사용된 primer는 파골세포 분화의 지표로 사용된 TRAP, OSCAR, NFATc1, c-FOS이고 control 유전자인 GAPDH와 비교하여 그 상대적 양을 비교하였다. Primer의 염기서열은 TRAP [(sense) 5'- CTG GAG TGC ACG ATG CCA GCG ACA -3', (antisense) 5'- TCC GTG CTC GGC GAT GGA CCA GA -3', OSCAR [(sense) 5'- CTG CTG GTA ACG GAT CAG CTC CCC AGA -3', (antisense) 5'- CCA AGG AGC CAG AAC CTT CGA AAC T -3', NFATc1 [(sense) 5'- CTC GAA AGA CAG CAC TGG AGC AT -3', (antisense) 5'- CGG CTG CCT TCC GTC TCA TAG -3'], c-FOS [(sense) 5'- CTG GTG CAG CCC ACT CTG GTC -3', (antisense) 5'- CTT TCA GCA GAT TGG CAA TCT C -3'], GAPDH [(sense) 5'-CAT GGC CTT CCG TGT TCC TAC CC -3', (antisense) 5'-CCT

CAG TGT AGC CCA AGA TGC CCT -3']이다. 각각의 annealing 온도는 TRAP 66°C, OSCAR 60.4°C, NFATc1 58.3°C, c-FOS 57°C이며 모두 시간은 30초로 시행하였으며, extension 온도는 모두 72°C에 30초로 이 사이클을 45회 반복시켰다. 결과로 나온 각각의 cycle threshold(CT) 값을 GAPDH의 CT값과 비교하여 상대 비교 방법으로 계산하여 그래프를 그렸으며 RT-PCR에 사용된 기계는 iCycler mini opticon system(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 사용하였다.

6) Western blot 분석

BMMs를 6well plate에 1×10^6 cells/well로 분주하고 1일간 배양하였다. 그 후 RANKL를 처리하고 30분 동안 시간별로 파골세포 배양액을 걸어내고 DPBS로 세척 후 세포를 획득하였다. 그 후 lysis buffer를 첨가하여 30분간 유지하고 13,000 rpm으로 4°C에서 원심분리를 하여 상층액을 사용하였다. 단백질을 정량하고, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis를 수행한 후, semi-dry transfer(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 membrane에 단백질을 이동하였다. 5% skim milk(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 처리하여 비특이 단백질이 붙는 것을 방지한 후 단백질 각 사이즈 별로 항체를 처리하였다. 항체들을 차례로 반응시키고 ECL kit(Amersham Biosciences, NJ, USA)를 사용하여 chemiluminescence로 확인하였다. 실험에 사용한 항체는 p-IkBa, β -actin에 대한 항체를 사용하였다.

7) 통계처리

실험결과에 대한 통계처리는 SPSS(version 13.0)을 이용하였다. 실험군과 대조군의 비교는 student's T-test를 분석하였고,

$p < 0.05$ 이하인 경우를 통계적으로 유의한 차이가 있다고 판정하였다.

III. 결 과

1. 세포 독성 평가

BMMs에 M-CSF 30 ng/ml를 처리한 후 虎杖根 추출물 1, 10, 30 및 50 $\mu\text{g/ml}$

를 첨가하여 배양한 후 세포 독성을 관찰한 결과 24시간 배양 시 세포 독성은 나타나지 않았지만 48시간 배양 시 모든 군에서 경미하게 나타났다. 하지만 虎杖根 50 $\mu\text{g/ml}$ 첨가한 군의 살아남은 세포가 虎杖根 1, 10 및 30 $\mu\text{g/ml}$ 를 첨가한 군에 비해 감소하여 虎杖根 50 $\mu\text{g/ml}$ 를 첨가한 군을 배제하였다(Fig. 1).

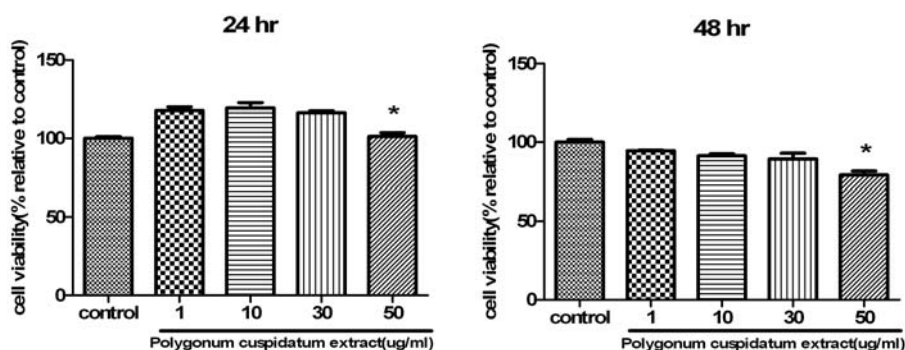


Fig. 1. Cytotoxicity of PCR Extract in RANKL, M-CSF Stimulated BMMs(bone marrow-derived macrophages) for 24 and 48 Hours Incubation.

* : $p < 0.05$, comparing to control group, 1 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 30 $\mu\text{g/ml}$ PCR extracts group

2. 파골세포 분화 억제 효과

1) TRAP 염색

TRAP 염색 후 TRAP positive cell를 현미경으로 관찰한 결과 虎杖根 추출물 1 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$ 및 30 $\mu\text{g/ml}$ 에서 대조군에 비해 농도 의존적으로 억제되었다(Fig. 2A).

2) TRAP positive cell 수

TRAP 염색 후 TRAP positive cell 수를 측정된 결과 대조군은 135.3 \pm 14.18개 이었고 1 $\mu\text{g/ml}$ 에서 95.33 \pm 2.30개($p < 0.05$),

10 $\mu\text{g/ml}$ 에서 56.33 \pm 5.50개($p < 0.01$) 및 30 $\mu\text{g/ml}$ 에서 5.66 \pm 1.52개($p < 0.01$)로 나타나 농도 의존적으로 억제되었다(Fig. 2B).

3) TRAP activity

TRAP activity를 측정된 결과 대조군은 100 \pm 5.53%이었고 虎杖根 추출물 1 $\mu\text{g/ml}$ 에서 64.71 \pm 5.12($p < 0.05$), 10 $\mu\text{g/ml}$ 에서 34.01 \pm 4.07%($p < 0.01$) 및 30 $\mu\text{g/ml}$ 에서 11.34 \pm 0.58%($p < 0.01$)로 나타나 농도 의존적으로 억제되었다(Fig. 2C).

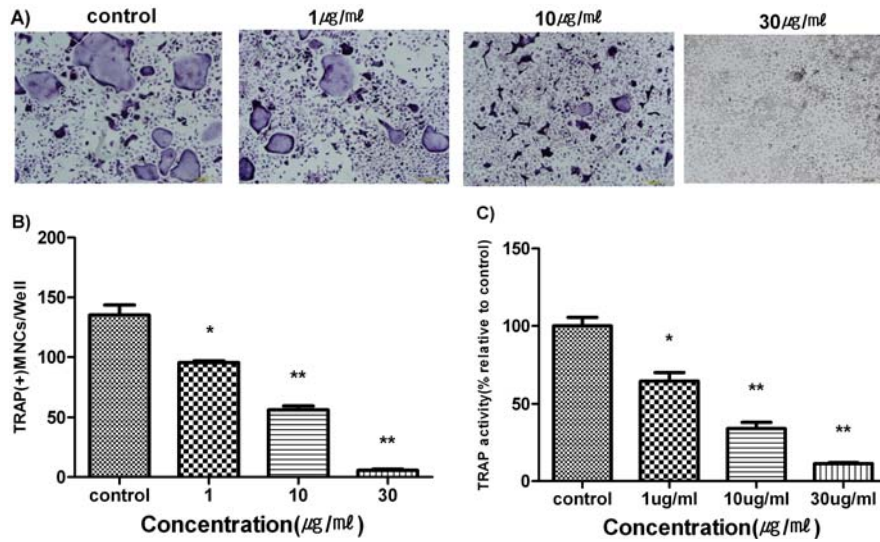


Fig. 2. Effect of PCR Extract on RANKL-induced Osteoclast Differentiation.

A) Cells were fixed and TRAP stained.

B) TRAP positive cells were counted as osteoclasts.

C) TRAP activity are expressed as the percentage relative to control group.

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, comparing to control group

3. Actin Ring 형성

Actin ring 형성은 虎杖根 추출물 1 µg/ml, 10 µg/ml 및 30 µg/ml에서 대조군에 비해 농도 의존적으로 억제되었다(Fig. 3).

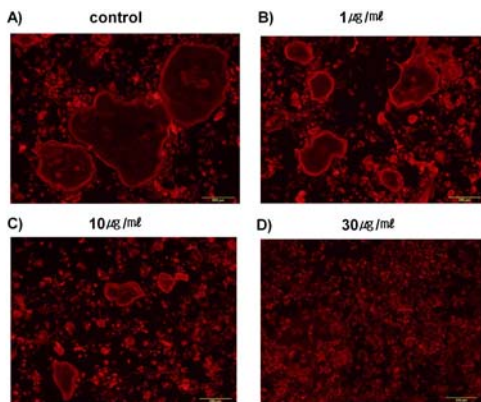


Fig. 3. Inhibition Effect of PCR Extract on Actin Ring Formation in BMMs

Stimulated with RANKL.

4. 파골세포 활성 유전자와 신호통로 억제 효과

1) NFATc1, c-FOS, TRAP, OSCAR
파골세포 분화 시 지표로 사용되는 NFATc1, c-FOS, TRAP, OSCAR의 RT-PCR 결과 虎杖根 추출물 1 µg/ml, 10 µg/ml 및 30 µg/ml에서 대조군에 비해 농도 의존적으로 억제되었다(Fig. 4A).

2) NF-κB signal

파골세포 분화의 대표적인 신호통로인 NF-κB에 대해서 Western blot으로 확인한 결과, 인산화된 IκBa 신호 강도는 虎杖根 추출물 30 µg/ml 첨가군에서 약하게 나타났다(Fig. 4B).

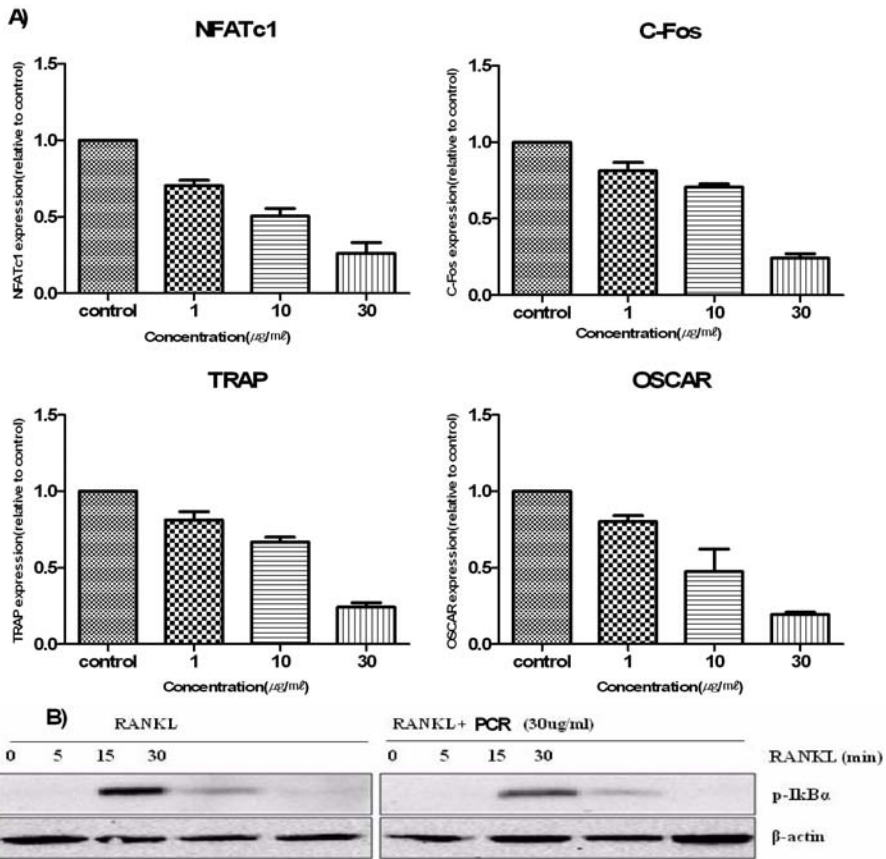


Fig. 4. Effect of PS Extract on the Expression of NFATc1, c-Fos, TRAP, OSCAR and NF-κB Signal.

A : Gene expression levels of each genes are measured by Real-time PCR.

B : Cell lysates were analyzed by Western blotting with antibody to specific for phosphorylated IκBα.

IV. 고찰

골은 동적인 조직으로서 조골세포와 파골세포의 연속적인 생성과 파괴를 통해 골의 항상성을 유지시키는데^{17,18)} 이러한 항상성이 파괴 되면 많은 골 관련 질환이 유발된다. 파골세포에 의한 골 재흡수의 결핍은 골경화가 야기되지만, 과도한 골 재흡수는 골다공증, 관절염, 치주질환의 주요 원인이 된다^{18,19)}. 이중 대표적인 질병은 골다공증을 꼽을 수 있으며 이것은 에스트로겐이 부족한 폐경기

여성에서 쉽게 관찰된다²⁰⁾.

최근 골다공증 약제로 estrogen, selective estrogen receptor modulators, bisphosphonates, calcitonin 등이 사용되지만, 이들은 자궁 내막염, 유방암, 혈전색전증, 고칼슘혈증과 같은 부작용이 수반된다²¹⁻²⁴⁾. Statin과 steroid계열의 약제는 골형성을 촉진하지만 생각지 못하는 부작용과 양질의 골 형성을 유도하지 못하는 한계가 있다^{25,26)}. 따라서 조기에 발견하고 골 흡수를 억제하여 골 손실이 더 이상 증가하지 않도록 하는데 골다공증 치료의 목표가

있다³⁾.

한의학에서는 骨痿, 骨枯 및 骨痺 등이 골다공증의 범주에 속하며 주된 병인은 腎虛와 大熱 등으로 보았다⁵⁾. 일반적으로 補腎, 將筋滑, 生血하는 약재인 牛膝, 鹿茸, 天門冬을 이용한 골다공증과 관련된 실험이 진행되어 왔다⁶⁻⁸⁾. 최근에는 關節痺痛과 跌撲損傷 등 관절 손상과 관련된 通經, 清熱, 化濕, 活血하는 紅花子, 黃芩, 木瓜, 乳香 등⁹⁻¹²⁾ 각종 약제에 대한 효능 연구가 진행되었다.

虎杖根은 祛風利濕, 散瘀定痛의 효능이 있어 골과 관련된 질환에서 다른 약제와 配伍되어 많이 쓰는 약물이다¹³⁾. 최근에는 虎杖根의 효능과 관련하여 만성 염증과 관련된 MMP-9의 억제 반응¹⁴⁾, 류마티스 관절염의 억제 반응¹⁵⁾, 항균 및 항부착 작용²⁸⁾ 등이 연구되어 왔으며 골다공증을 유발한 쥐에 대한 골소실 억제에 우수한 효능이 검증되었으나¹⁶⁾ 파골세포에 대한 연구는 보고 된 바 없다.

이에 저자는 虎杖根 추출물이 파골세포 분화 억제에 미치는 영향을 알아보기 위해 농도별 세포독성 여부를 확인한 후 TRAP 활성과 정량적 평가, actin ring 형성 및 파골세포 활성 유전자와 신호통로 발현 등의 실험연구를 시행하였다.

BMMs에 虎杖根 추출물 1, 10, 30 및 50 µg/ml를 첨가하여 배양한 후 세포독성을 관찰한 결과 24시간 배양 시 모든 군에서 세포 독성은 나타나지 않았지만 48시간 배양 시 모든 군에서 경미하게 나타났다. 하지만 24시간 및 48시간 배양한 군에서 虎杖根 50 µg/ml 첨가한 군의 살아 남은 세포 수가 虎杖根 1, 10 및 30 µg/ml 첨가한 군에 비하여 감소하여 虎杖根 50 µg/ml를 첨가한 군을 배제하였다.

TRAP은 ATP, nitrophenyl phosphate 존재 하에 활성을 나타내는 파골세포에만 유일하게 존재하는 골분해 효소로²⁹⁾ 파골 세포 분화 정도를 측정할 수 있는 지표 효소이다. TRAP은 성숙한 파골세포에서 발현되는 것으로 TRAP positive cell은 파골세포 분화 여부를 판단하는 기준으로 이용될 수 있다³⁰⁾.

虎杖根 추출물의 파골세포 분화 억제 효과를 확인하기 위해 TRAP positive cell을 염색하여 관찰한 결과, 모든 虎杖根 추출물을 처리한 군에서 대조군에 비해 농도 의존적으로 TRAP positive cell 수 및 activity가 감소하였다.

파골세포는 뼈를 흡수하는 동안 cytoskeletal organization을 수행한다. 뼈에 부착함과 동시에 급격한 골 흡수를 위해서 파골세포 표면의 actin ring 구조는 필수적이다³¹⁾. 파골세포의 세포골격화 과정에서 뼈에 부착함과 동시에 세포의 공간과 뼈를 흡수하는 공간을 구분하기 위해, 파골세포의 actin이 하나의 큰 ring으로 조직화된다. 파골세포에 있어 actin ring의 형성은 세포가 뼈를 흡수할 수 있는 능력에 대한 중요한 표지가 되며 골다공증 치료에 actin ring의 형성을 방해하여 골 흡수를 저하시키는 약물³²⁾이 유용할 수 있다.

파골세포 분화 시 虎杖根 추출물을 농도별로 처리하여 actin ring 형성을 관찰한 결과 actin ring 형성이 대조군에 비해 농도 의존적으로 억제되는 것을 알 수 있었다.

RANKL과 RANK의 결합은 파골세포의 분화에 필수적인 유전자를 발현한다. 특히 파골세포 분화에 중요한 전사 인자인 c-Fos와 NFATc1은 TRAP, OSCAR 같은 파골세포의 분화에 필수적 단백질

들의 발현을 조절한다³³⁾.

虎杖根 추출물을 처리한 실험군에서는 c-FOS, NFATc1의 발현을 농도 의존적으로 억제하였고 따라서 TRAP과 OSCAR의 발현도 농도의 의존적으로 억제하였다. 따라서 파골세포의 분화에 있어서 필수적 유전자를 억제함으로써 파골세포의 분화 단백질의 방해를 하여 파골세포 분화를 억제함을 관찰하였다.

RANKL에 의한 파골세포 분화 개시는 다양한 신호전달 체계를 경유하여 조절된다. RANKL은 수용체인 RANK와 결합하여 파골세포의 형성에 중요한 세포내 신호 전달 물질인 I κ B α 의 인산화를 통해 활성화시켜 파골세포 분화에 필수적인 전사인자인 NF- κ B를 유도한다³⁴⁾. NF- κ B는 I κ B α 에 의해 억제 되는데 I κ B α 의 인산화는 NF- κ B가 핵 내로 이동하여 전사인자로서의 역할을 수행하도록 유도한다³⁴⁾.

BMMs에 虎杖根 추출물을 처리하여 주요 신호 전달 경로인 I κ B α 발현을 Western blot으로 확인한 결과, 虎杖根 추출물을 처리한 군에서 인산화된 I κ B α 의 신호 강도가 대조군에 비해 감소한 것을 확인하였다. I κ B α 신호가 감소한 것을 통해 虎杖根이 NF- κ B 활성을 억제하는 것으로 사료된다.

이상의 연구결과를 종합해 보면 虎杖根 추출물은 RANKL로 유도된 파골세포의 분화에 특이적인 단백질 TRAP 및 골 흡수를 위한 파골 세포의 actin ring 형성을 농도 의존적으로 억제하였다. 이는 NF- κ B 신호 활성화의 억제와 c-FOS, NFATc1 유전자 발현의 억제가 이루어짐으로 TRAP, OSCAR 발현이 감소됨을 이 실험을 통하여 확인할 수 있었다.

이는 虎杖根 추출물이 골다공증과 같은 파골세포의 분화로 야기되는 질환에 효과적인 치료제가 될 수 있음을 시사한다. 향후 다른 약제와 配伍될 때 파골 세포 억제에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

V. 결 론

虎杖根 추출물의 파골세포 분화 억제 효과와 기전을 알아보기 위해 TRAP 활성과 정량적 평가, actin ring 형성, 파골 세포 활성 유전자와 신호 통로 발현 등을 연구한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. TRAP positive cell과 TRAP activity는 虎杖根 추출물 1 μ g/ml, 10 μ g/ml 및 30 μ g/ml에서 대조군에 비해 농도 의존적으로 감소하였다.
2. Actin ring 형성은 虎杖根 추출물 1 μ g/ml, 10 μ g/ml 및 30 μ g/ml에서 대조군에 비해 농도 의존적으로 억제되었다.
3. NFATc1, c-FOS, TRAP 및 OSCAR 등의 파골세포 활성유전자는 虎杖根 추출물 1 μ g/ml, 10 μ g/ml 및 30 μ g/ml에서 대조군에 비해 농도 의존적으로 억제되었다.
4. NF- κ B의 주 신호인 인산화된 I κ B α 의 신호 강도는 虎杖根 추출물 50 μ g/ml 첨가군에서 약하게 나타났다.

투 고 일 : 2014년 1월 13일

심 사 일 : 2014년 2월 4일

게재확정일 : 2014년 2월 10일

참고문헌

1. Kim TH, Lee HH, Chung SH. A difference of bone fracture rate and frequency to have determined in diagnosis dstandards. *Osteoporosis*. 2010;8:266-70.
2. 정경희 등. 2004년도 전국 노인생활실태 및 복지욕구조사. 한국보건사회연구원. 2005;통계청 e-나라지표. Available from : http://www.index.go.kr/egams/stts/jsp/potal/stts/PO_STTS_IdxMaisp?idx_cd=1410.
3. 오한진. 갱년기 골다공증의 치료. 가정의학회지. 2000;21(1):20-7.
4. Hidaka S. Natural products with potential for osteoporosis examined *in vivo* and *in vitro*. *J Trad Med*. 2009;26:1-10.
5. 최창민 등. 우귀음이 난소적출 백서의 골다공증에 미치는 영향. 대한부인과학회지. 2006;19(4):77-92.
6. 곽한복 등. 녹용 물 추출물의 파골세포 분화 억제효과. 동의생리병리학회지. 2008;22(4):891-95.
7. 이승연, 김시나, 김종근. 천문동 추출물에 의한 조골세포 분화 촉진 및 파골세포 생성 억제효과. 한국식품영양과학회지. 2008;37(1):16-9.
8. 김주호 등. 우슬의 파골세포 분화 억제와 골흡수 억제효과. 대한본초학회지. 2010;25(1):65-74.
9. 김미려, 양재하, 서부일. 홍화자가 난소절제로 유발된 폐경 후 골다공증 흰쥐의 골밀도에 미치는 영향. 대한본초학회지. 1998;13(2):32-9.
10. 신정민 등. 황금추출물이 조골세포와 파골세포에 미치는 영향. 대한식품과학회지. 2008;40(6):674-79.
11. 권강 등. 목과의 Adjuvant 관절염에 대한 실험적 연구. 대한약침학회. 2003;6(2):29-43.
12. 한상현, 유형근, 신형식. 유황 추출물이 MC3T3-E1세포 활성 및 분화에 미치는 영향. 대한치주과학회지. 2001;31(2):287-99.
13. 한의과대학 본초학 편찬위원회. 본초학. 서울:영림사. 2006:452-53.
14. 이태진 등. 목과, 호장근 및 유황 추출물이 Raw 264.7 cell에서 LPS로 유도된 MMP-9의 활성에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 2006;20(1):37-42.
15. 정준희 등. The effect of pharmacopuncture with polygonu cuspidatum Sieb et Zucc. Solution on colla-gen-induced arthritis in Wistar Rat. *경락경혈학회지*. 2011;28(1):79-89.
16. Liu ZP, et al. Effects oftrans-resveratrol from polygonumcuspidatum on bone loss using the ovari-ectomized rat model. *Jounal of Medical Food*. 2005;8(1):14-9.
17. Wagner EF, Karsenty G. Genetic control of skeletal development. *Curr Opin Genet Dev*. 2001;11:527-32.
18. Boyle WJ, Simonet Ws, Lacey DL. Osteoclasto differntiation and activation. *Nature*. 2003;423:337-42.
19. Karsenty G, Wagner EF. Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development. *Dev. Cell*. 2002;4:398-406.
20. Jimi E, et al. Selective inhibition of nf-kb blocks osteo clastogenesis and prevents inflammatory bone destruction

- in vivo. *Nat Med.* 2004;10:617-24.
21. Lloyd M. Treatment of postmenopausal osteoporosis. *The New England J Med.* 1998;338:736-46.
 22. Rodan GA, Martin TJ. Therapeutic approaches to bone diseases. *Science.* 2000;298:1508-14.
 23. Body JJ. Calcitonin for the long-term prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis. *Bone.* 2002;30:75S-9S.
 24. Watt NB. Bisphosphonate treatment of osteoporosis. *Clin Geriatr Med.* 2003;19:395-414.
 25. Reginster JY. Treatment of bone in elderly subjects: calcium, vitamin D, fluor, bisphosphonates, calcitonin. *Horm Res.* 1995;43:83-8.
 26. Garrett IR, Mundy GR. The role of statins as potential targets for bone formation. *Arthritis Res.* 2002;4:237-40.
 27. 김희진 등. 폐경기골다공증에 관한 문헌적 고찰. *대한한방부인과학회지.* 1998; 11(1):131-48.
 28. 김신규 등. 호장근의 항세균효과 및 항부착효과. *대한구강보건학회지.* 2005; 29(1):80-91.
 29. Väänänen HK, Horton M. The osteoclast clear zone is a specialized cell extracellular matrix adhesion structure. *J Cell Sci.* 1995;108:2729-32.
 30. Minkin C. Bone acid phosphatase: tartrate-resistant acid phosphatase as a marker of osteoclast function. *Calcif Tissue Int.* 1982;34(3):285-90.
 31. Takuma M, et al. Critical role of cortactin in actin ring formation and osteoclastic bone resorption. *J Bone Miner Metab.* 2006;24:368-72.
 32. Murakami H, et al. Tiludronate inhibits protein tyrosine phosphatase activity in osteoclasts. *Bone.* 1997;20(5):399-404.
 33. Takayanagi H. Osteoimmunology: shared mechanism and crosstalk between the immune and bone systems. *Nat Rev Immunol.* 2007;7:292-304.
 34. Teitelbaum SL, Ross FP. Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nat Rev Genet.* 2003; 4(8):638-49.