

## 부자와 육계 병용투여 시 파골세포 분화 억제에 미치는 영향

정기은<sup>1#</sup>, 김정영<sup>1#</sup>, 김지훈<sup>1,2</sup>, 한상용<sup>1,2</sup>, 김윤경<sup>1,3\*</sup>

1 : 원광대학교 약학대학 한약학과 방제학교실,  
2 : 원광대학교 한의학전문대학원 한약자원개발학과 BK 21 Plus Team, 3 : 원광한약연구소

### Effect of Co-administration of *Aconiti Lateralis Preparata Radix* and *Cinnamomi Cortex* on Osteoclast Differentiation

Gi-Eun Jung<sup>1#</sup>, Jung Young Kim<sup>1#</sup>, Ji-Hoon Kim<sup>1,2</sup>, Sang-Yong Han<sup>1,2</sup>, Yun-Kyung Kim<sup>1,3\*</sup>

1 : Department of Herbal Medicine, College of Pharmaceutics, Wonkwang University  
2 : Department of Herbal Resources, Professional Graduate School of Oriental Medicine, BK21 Plus Team, Wonkwang University  
3 : Wonkwang Oriental Medicines Research Institute, Wonkwang University

#### ABSTRACT

**Objectives** : *Aconiti Lateralis Preparata Radix* (*Aconitum Carmichaeli*, AC) and *Cinnamomi Cortex* (*Cinnamomi Cortex*, CC) have been treated to elderly for kidney yang enhancement in Korean traditional medicine. In this study, the effects of water extract of AC and CC on RANKL (Receptor Activator for Nuclear Factor  $\kappa$ B Ligand)-induced osteoclast differentiation were evaluated in culture system.

**Methods** : MTT assay was used to evaluate the potential cytotoxicity of AC and CC extracts in bone macrophage marrows (BMMs) stimulated with M-CSF. TRAP (tartrate-resistant acid phosphatase) staining and TRAP activity were performed to know the inhibitory effect on osteoclast differentiation. The protein expression levels of nuclear factors such as activated T cell(NFAT)c1, c-Fos, MAPKs and  $\beta$ -actin in cell lysates treated with AC and CC extracts were analysed by western blotting.

**Results** : AC, CC extracts and their co-administration inhibited significantly RANKL-induced osteoclast differentiation in BMMs in a dose dependent manner without toxicity. Each AC and CC extracts inhibited the phosphorylation of p38. Also, AC and CC extracts, respectively, inhibited the protein expression of c-Fos and NFATc1 more than Co-administration of AC and CC even if all treatments did. It was observed that RANKL-induced degradation of I- $\kappa$ B is significantly suppressed by all treatments.

**Conclusions** : Taken together, It was concluded that AC and CC have beneficial effect on osteoporosis by inhibition of osteoclast differentiation. Thus, *Atractylodis* AC and CC could be a treatment option for osteoporosis.

**Key words** : *Aconiti Lateralis Preparata Radix*, *Cinnamomi Cortex*, Bone marrow macrophage, RANKL

#### 서론

해마다 평균수명이 늘어감에 따라 고령인구의 비중이 증가하면서 골다공증과 같은 골 질환이 급격히 증가되어 골 관련

질환에 대한 관심이 늘고 있다. 골다공증의 진행은 나이에 비례하는데 50~60세 사이에서 주로 발병하며 특히 폐경기 여성에서 두드러지게 나타난다. 골다공증이 증가되는 70대의 대퇴골 골절은 사망위험이 높다고 보고되었다<sup>1)</sup>. 특히 현재 고령

\*교신저자 : 김윤경. 전북 익산시 익산대로 460 원광대학교 약학대학 방제학교실

· Tel : 063-850-6803 · Fax : 063-850-6803 · E-mail : hestia@wku.ac.kr

#제1저자 : 정기은. 전북 익산시 익산대로 460 원광대학교 약학대학 방제학교실

· Tel : 063-850-6803 · Fax : 063-850-6803 · E-mail : jge86@dreamwiz.com

김정영. 전북 익산시 익산대로 460 원광대학교 약학대학 방제학교실

· Tel : 063-850-6803 · Fax : 063-850-6803 · E-mail : happyboy15@daum.net

· 접수 : 2014년 2월 24일 · 수정 : 2014년 3월 12일 · 채택 : 2014년 3월 15일

인구들 중에는 천식이나 류머티즘 등과 같은 만성 질환으로 스테로이드계열 약물을 장기적으로 사용함에 따라 골다공증의 위험에 더욱 노출되어 있는 경우가 많다<sup>2)</sup>. 현재 임상에서 골다공증의 치료목적으로써 사용하고 있는 약물들은 두 가지 종류로 Bisphosphonate, Calcitonin, Estrogen 요법제 등의 골 흡수 억제제와 Teriparatide 제제 등의 골 형성 촉진제가 있다. Bisphosphonate 계열의 약물은 파골세포의 골 흡수 기능에 대해 기계적인 저해효과가 있으며 파골세포의 세포사멸을 유도한다<sup>3)</sup>. 그러나 치주염이 동반된 환자에서 하악골 괴사와 관련한 치명적인 부작용을 포함하여<sup>4)</sup> 여러 부작용이 이미 알려져 있다. 이러한 부작용이 발생함에 따라서 위험성이 적고 효과도 좋은 천연물신약이 각광을 받게 되었다. 기존에 삼백초, 산수유, 모과, 우슬 등이 RANKL로 유도한 파골세포의 분화를 억제하고 LPS로 유도된 생체의 골 손실을 억제한다고 보고된 바 있다<sup>5-8)</sup>.

인체의 골격을 구성하는 조직인 골은 흡수와 생성이 지속된다. 골의 생성을 담당하는 조골세포 (Osteoblast)와 골의 흡수를 담당하는 파골세포 (Osteoclast)의 균형이 인체의 골격 유지에 중요하다<sup>9)</sup>. 조혈모세포에서 유래되는 파골세포는 단핵구/대식세포의 융합으로 다형 핵 세포로 분화되는 과정을 거쳐 골을 흡수한다<sup>10)</sup>. 파골세포의 전구세포가 발현하는 tumor necrosis factor (TNF) 계열의 수용체인 receptor activator of NF- $\kappa$ B (RANK)와 조골세포에서 발현되는 RANK ligand (RANKL)와의 결합은 파골세포의 분화를 유도한다<sup>11,12)</sup>. RANK가 RANKL에 의해 활성화되는 초기의 신호 전달 경로에서 mitogen-activated protein kinase (MAPK) 계열인 extracellular signal-regulated kinase (ERK), c-Jun-N-terminal kinase (JNK), p38은 RANK의 신호전달에 중요한 역할을 하는 단백질이다<sup>13)</sup>. NF- $\kappa$ B, c-Fos, nuclear factor of activated T cells cytoplasm 1 (NFATc1) 등의 인자는 파골세포의 전구세포에서 파골세포로 분화하는 과정에서 발현되는 특이전자 인자들이다<sup>14)</sup>. 파골세포 분화 초기에서 발현되는 c-Fos는 MAPK 신호 전달 경로를 통해 파골세포 분화에 필수적인 전사인자 NFATc1의 발현을 촉진시키는 중요한 역할을 한다<sup>15)</sup>.

선행연구에서 부자와 육계는 모두 면역조절효과가 있고 2형 당뇨병억제에도 효과가 있으며<sup>16)</sup> 부자는 중추 진통효과, 체온상승효과, 혈액순환촉진효과가 있고<sup>17,18)</sup> 육계는 해열 및 소염진통효과, 혈압강화효과, 수면연장효과, 위산분비 억제효과가 있는 것으로 현재까지 밝혀져 있다<sup>19,20)</sup>.

신주골(腎主骨)의 오행배속에서 착안하여 신양을 보하는 부자와 육계가 신양이 허해지는 고령에서 발병 가능성이 높아지는 골다공증에 효과가 있을 것이라는 가능성을 확인하고자 본 연구에서는 부자와 육계의 물 추출물 각각과 병용투여시 RANKL로 유도된 파골세포의 분화억제 효과에 대해 연구하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 시료

부자는 중국산, 육계는 베트남산 YB 1등급으로 (주)오니허브에서 구입하였다. 약재를 고루 잘라 30분간 냉침시키고 Heating mantle에서 2시간 끓인 후에 농축하여 동결 건조한

시료를 사용하였으며 부자는 20.02 %, 육계 4.64 %의 수율로 건조파우더를 얻었다. 실험 사용하기 전까지  $-15^{\circ}\text{C}$  냉동고에 보관하였으며, 사용 전 3차 증류수로 용해 후 사용하였다. 부자와 육계 병용투여에 있어서는 부자와 육계 비율은 2:1로 수행되었다. Human RANKL과 M-CSF는 Peprotech (London, UK)사에서 구입하였고, XTT assay kit는 Roche (Indianapolis, IN, USA)사에서 구입하였다. P-JNK, JNK, P-p38, p38, I- $\kappa$ B 항체는 Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA)사의 제품을 사용하였다. c-Fos와 NFATc1 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)사에서 구입하였다.

### 2. 파골세포 분화

5주령 ICR 수컷 생쥐를 경추 탈골로 희생시킨 후 비골과 경골을 분리한 후 1 ml 주사기를 이용하여 골의 속질을 수세하여 골수세포를 얻었다. 분리된 골수세포는 10% FBS, 항생제, M-CSF (30 ng/ml)가 포함된  $\alpha$ -minimum essential medium ( $\alpha$ -MEM)배지 (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA)에서 3일간 배양하였다. 3일 후, plate에 부착된 세포를 포식세포 (bone marrow macrophage, BMM)로 사용하여 실험하였다. 포식세포는 M-CSF (30 ng/ml)와 RANKL(100 ng/ml)을 처리하고, 부자와 육계 물 추출물을 포식세포에 농도별로 처리하였다. 배양 4일 후, 배양한 세포를 TRAP 용액 (Sigma Aldrich, USA)으로 염색하고 붉은색으로 염색된 세포를 성숙된 파골세포로 간주하고 숫자를 세었다.

### 3. 독성검사

포식세포는  $1 \times 10^4$ /well의 밀도로 96-well plate에 첨가하고 M-CSF (30 ng/ml)와 부자와 육계 물 추출물을 농도별로 첨가하여 3일간 배양하였다. 3일 후, XTT 용액 50  $\mu$ l를 각각의 well에 첨가하고 4시간 배양 후 ELISA reader (Molecular Devices, CA, USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 확인하였다.

### 4. Western blot 분석

배양된 세포는 lysis buffer (50 mM tris-Cl, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100, 1 mM sodium fluoride, 1 mM sodium vanadate, 1% deoxycholate, protease inhibitors)를 이용하여 용해하고 원심분리 (13,200 rpm)를 수행하여 순수한 단백질을 얻었다. 단백질은 DC Protein assay kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 사용하여 정량하고 동량의 단백질은 10% SDS-polyacrylamide gel에서 분리하였다.

분리된 단백질은 PVDF 막 (Amersham Biosciences)으로 옮기고 PVDF 막은 5% non-fat dry milk를 처리하여 비특이 단백질이 붙는 것을 방지하였다. 그리고 1차 항체 및 2차 항체를 처리했다. TBS-T 로 PVDF를 세척하여 enhanced chemiluminescence를 이용해 단백질 발현을 관찰했다.

### 5. 통계분석

각각의 실험군은 3개 이상 수행하였고 평균값과 표준편차를 계산하였다. 모든 실험은 3회 이상 반복하여 동일한 실험 결과를 얻은 경우 실험결과로 사용하였으며, 정량적인 결과의 통계는 One-way ANOVA를 이용하여 분석하였고 p 값이 0.05 이하인 경우 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

## 결 과

### 1. 부자와 육계 물 추출물의 파골세포 분화 억제효과

파골세포는 골 흡수를 하는 세포이므로 파골세포의 분화가 골다공증에 중요하게 작용한다. 본 저자는 파골세포의 분화에 부자와 육계 물 추출물이 미치는 영향을 검증하였다. BMM에 M-CSF와 RANKL을 처리한 후에 부자와 육계 물 추출물을 농도별로 처리하여 배양한 결과 M-CSF와 RANKL만 처리한 대조군에 비하여 부자와 육계 물 추출물을 2:1의 비율로 함께 처리한 경우에 농도 의존적으로 유의성 있게 TRAP 양성 파골세포의 형성 및 다핵의 성숙된 파골세포로서의 분화가 억제되었음을 확인하였다(Fig. 1).

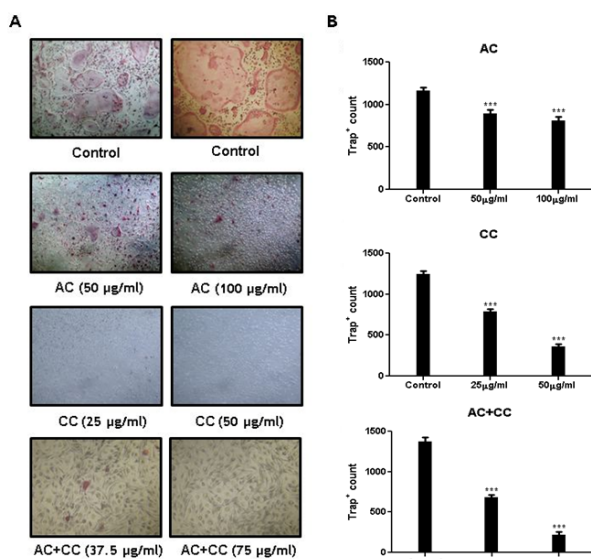


Fig. 1. Aconiti Lateralis Preparata Radix and *Cinnamomi Cortex* inhibits osteoclast differentiation. A) Bone marrow macrophages (BMMs) were cultured for 4 d with M-CSF (30 ng/ml) and RANKL (100 ng/ml) in the presence or absence of Aconiti Lateralis Preparata Radix and *Cinnamomi Cortex*. After 4 d, cells were fixed in 3.7% formalin, permeabilized in 0.1% Triton x-100, and stained for TRAP. B) After TRAP staining, TRAP-positive cells were counted as osteoclasts. \* indicates significance for the difference between normal and control group ( $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

### 2. 세포독성

부자와 육계의 파골세포 분화 억제 효과가 세포독성과의 관련성을 배제하기 위해 각 약물을 농도별로 처리한 BMMs에서 XTT assay로 탐색한 결과 부자는 100 µg/ml 이하, 육계는 50 µg/ml 이하의 농도에서 세포독성을 나타내지 않았음을 확인하였다(Fig. 2).

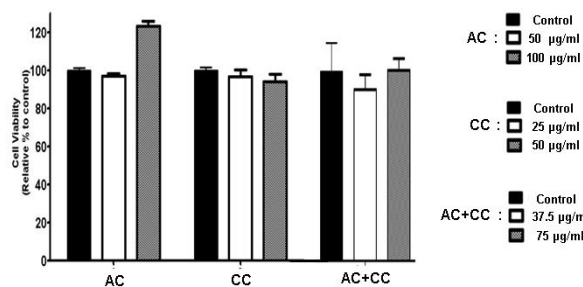


Fig. 2. The effect of Aconiti Lateralis Preparata Radix and *Cinnamomi Cortex* on cell viability. BMMs were cultured for 3 d with M-CSF (30 ng/ml) in the presence or absence of Aconiti Lateralis Preparata Radix and *Cinnamomi Cortex*. After 3 d, each well were added with XTT solution and incubated for 4-6 h. The plate was measured at 450 nm using a microplate reader.

### 3. RANKL로 유도되는 MAPKs에 대한 부자 물 추출물의 억제효과

본 저자는 부자 물 추출물이 파골세포 분화 억제에 대한 작용기전을 규명하기 위하여 RANKL에 의해 유도되는 주요 신호전달체계에 부자 물 추출물이 미치는 영향을 검증하였다. RANKL은 p38, JNK의 인산화를 유도하였으나 부자 물 추출물을 처리하였을 때 5~15분 이후부터 p38의 인산화가 억제되었다(Fig. 3A). 또한 RANKL로 c-Fos와 NFATc1의 인산화를 유도하였으나 부자 물 추출물을 처리하였을 때에는 c-Fos와 NFATc1의 인산화를 억제하였다(Fig. 3B).

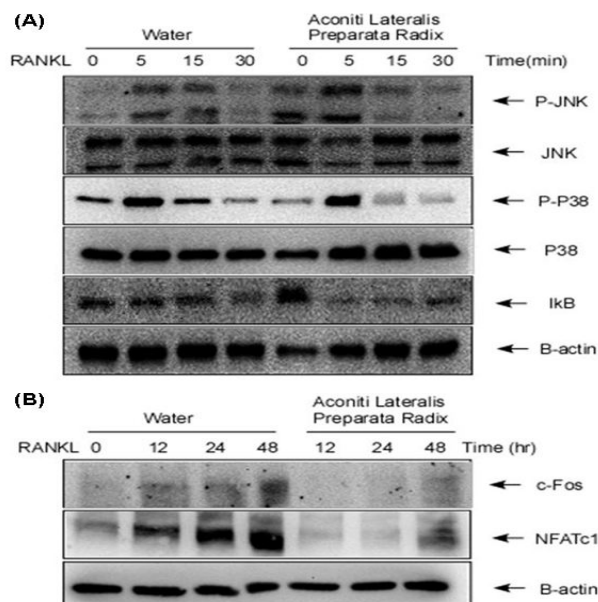


Fig. 3. Aconiti Lateralis Preparata Radix inhibits RANKL signaling pathways. BMMs were pretreated with or without Aconiti Lateralis Preparata Radix(100 µg/ml) and further stimulated with RANKL (100 ng/ml) for the indicated time. (A) Whole Cell lysates were subjected to western blotting with phospho-JNK, anti-JNK, phospho-P38, anti-P38 and IκB antibodies. (B) Whole Cell lysates were subjected to western blotting with c-Fos and NFATc1 antibodies.

#### 4. RANKL로 유도되는 MAPKs에 대한 육계 물 추출물의 억제효과

본 저자는 육계 물 추출물이 파골세포 분화 억제 작용기전을 규명하기 위하여 RANKL에 의해 유도되는 주요 신호전달 체계에 육계 물 추출물이 미치는 영향에 대하여 실험하였다.

RANKL은 p38, JNK의 인산화를 유도하였으나 육계 물 추출물은 p38의 인산화를 강하게 억제하였다(Fig. 4A). 또한 RANKL로 c-Fos와 NFATc1의 인산화를 유도하였으나 육계 물 추출물을 처리하였을 때에는 c-Fos와 NFATc1의 인산화를 억제하였다(Fig. 4B).

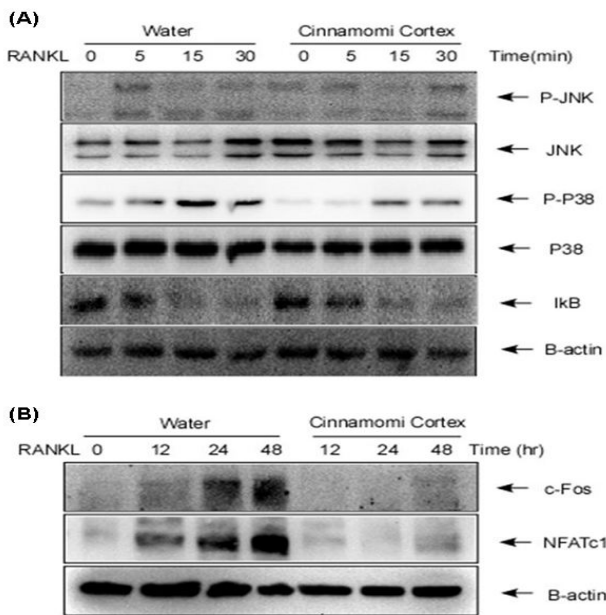


Fig. 4. *Cinnamomi Cortex* inhibits RANKL signaling pathways. BMMs were pretreated with or without *Cinnamomi Cortex* (50 µg/ml) and further stimulated with RANKL (100 ng/ml) for the indicated time. (A) Whole Cell lysates were subjected to western blotting with phospho-JNK, anti-JNK, phospho-P38, anti-P38 and IkB antibodies. (B) Whole Cell lysates were subjected to western blotting with c-Fos and NFATc1 antibodies.

#### 5. RANKL로 유도되는 MAPKs에 대한 부자 육계 물 추출물의 병용투여시 억제효과

본 저자는 부자와 육계 물 추출물을 병용투여 하였을 때 파골세포 분화 억제 작용기전을 규명하기 위하여 RANKL에 의해 유도되는 주요 신호전달 체계에 부자와 육계 물 추출물이 미치는 영향을 검증하였다.

RANKL은 p38, JNK의 인산화를 유도하였으나 부자와 육계 물 추출물을 각각 50 µg/ml, 25 µg/ml의 농도로 병용투여 하였을 때 5~15분 이후부터 p38의 인산화가 억제되었고 부자나 육계 한가지 씩 처리했을 때와 비교하면 병용투여 하였을 때는 IkB가 지속적으로 발현함을 확인하였다(Fig. 5A). 또한 RANKL은 c-Fos와 NFATc1의 발현을 유도하였으나 부자와 육계 물 추출물을 병용 투여하였을 때에는 c-Fos와 NFATc1의 발현을 억제하였다(Fig. 5B).

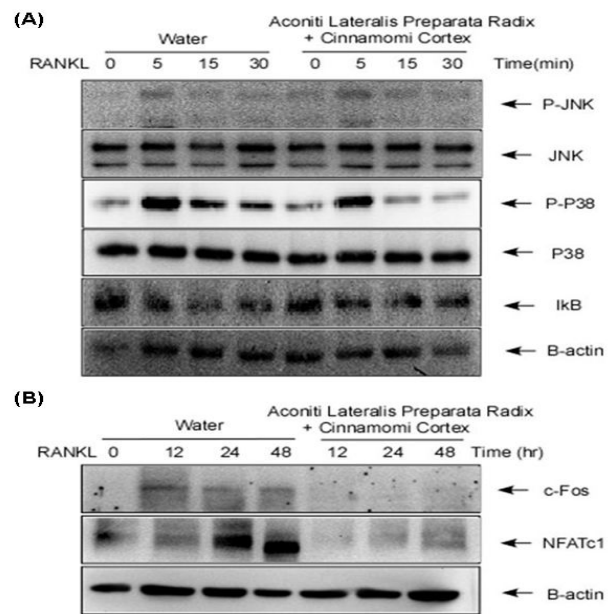


Fig. 5. *Aconitum Carmichaeli* and *Cinnamomi Cortex* inhibits RANKL signaling pathways. BMMs were pretreated with or without *Aconiti Lateralis Preparata Radix*(50 µg/ml) and *Cinnamomi Cortex* (25 µg/ml) and further stimulated with RANKL (100 ng/ml) for the indicated time. (A) Whole Cell lysates were subjected to western blotting with phospho-JNK, anti-JNK, phospho-P38, anti-P38 and IkB antibodies. (B) Whole Cell lysates were subjected to western blotting with c-Fos and NFATc1 antibodies.

### 고찰

골은 신체의 지지, 장기 보호, 칼슘 저장, 조혈작용 등 다양한 역할을 수행한다. 그러나 폐경기 여성의 다수는 에스트로겐의 결핍으로 심각한 골다공증이 유발된다. 비록 골다공증 자체로는 고통을 수반하지 않지만 이로 인한 고령에서의 대퇴골 골절은 정상적인 삶을 이어갈 수 없게 하는 치명적인 질환으로 사망률이 높다<sup>21,22)</sup>. 그러므로 노령에서 삶의 질과 연관된 인자 중 중요한 부분을 차지하는 것이 근 골격계의 안정성이며 골절은 환자의 운동범위를 제한시키며 삶의 질을 현저히 저하시키는 원인이 된다. 골절을 예방하기 위해서는 골다공증의 예방과 치료가 필수적인데 임상적으로 Bisphosphonate 계열의 약제가 가장 많이 사용되고 있다. 하지만 하악골 괴사나<sup>4)</sup> 노령에서 부정맥을 유발하는 부작용이 있고<sup>23)</sup> 장기간 사용 시 오히려 골절의 위험을 증가시킨다는 연구가 있어<sup>24)</sup> 사용에 제한을 받고 있는 현실이다. 그러므로 최근에 각광받는 천연물 중 부작용이 없는 새로운 골다공증 치료제의 개발이 시급히 필요하다.

지체(肢體)의 근맥이 이완되고 연약 무력해져 팔(肘), 손목(腕), 무릎(膝), 발꿈치 등에 운동 불능을 야기시키는 일련의 병증을 위증(痿證)이라 한다. 혈위(血痿), 육위(肉痿), 근위(筋痿), 맥위(脈痿), 골위(骨痿) 등 오위(五痿)는 폐열상진(肺熱傷津), 습열침음(濕熱浸淫), 간신휴허(肝腎虧虛), 기혈(氣血)부족으로 인해 발생한다. 이 중에 요배연약(腰背軟弱)으로 굴신거동(屈伸舉動)이 불리하고 하지(下肢)의 위약무력(萎弱無力) 등의 증상을 보이는 골위(骨痿)<sup>25)</sup>와 현대의 병명인 골다공증은 서로 부합하는 점이 많다.

부자와 육계는 수많은 본초들 중 온리약의 대표라 할 수 있는 약재이다. 두 약재 모두 전통적으로 신양(腎陽)을 온보(溫補)하는 작용이 뛰어나 팔미지황환(八味地黃丸)이나 우귀환(右歸丸) 등의 빈용되는 보익제 처방에서 두 약물을 배합하여 사용하는 경우를 확인할 수 있다<sup>26)</sup>. 자음청열(滋陰淸熱), 보신익기(補腎益氣)하는 골위의 처방 중에 보신익기<sup>25)</sup> 및 신주골(腎主骨)의 오행배속에서 착안하여 이렇게 전통적으로 신양을 보하는 목적으로 사용해왔던 두 약물의 고령의 골다공증에 대한 가능성을 확인하기 위해 각각 처리한 경우 그리고 각각 독성을 나타내지 않는 농도에서 병용한 경우를 비교하여 실험하였다. 부자와 육계 병용투여에 있어서 육계에서 파골세포에 대한 독성이 있어 부자와 육계 비율을 2:1로 실험을 수행하였다.

RANK와 RANKL이 결합되면 파골세포 분화과정에서 중요한 유전자인 c-Fos와 NFATc1의 발현이 증가되고 tartrate-resistant acid phosphate (TRAP), osteoclast-associated receptor (OSCAR)의 발현 또한 상승시킨다고 알려져 있다<sup>27,28)</sup>. 또한 TNF receptor associated factor (TRAF) 6와 같은 TRAF family의 집합을 유도하고 AKT와 p38, JNK 그리고 NF- $\kappa$ B 등을 포함한 mitogen-activated protein kinase (MAPK) 경로를 활성화시킨다는 것으로 알려져 있다<sup>29)</sup>. 그중에서도 p38 인산화는 파골세포 분화 초기에 매우 중요하게 작용하며 MITF의 활성을 촉진하여 TRAP의 발현을 유도한다고 보고되어있다<sup>30)</sup>. 또한 p38 MAPK 억제제인 SB203580은 RANKL에 의한 파골세포의 형성과 TRAP 발현을 억제한다고 보고되었다<sup>31)</sup>. 따라서 p38 MAPK의 활성화는 파골세포 형성에 중요한 신호전달 경로라 할 수 있다. 또한 JNK는 파골세포가 생존하고 분화하는 과정에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다<sup>32)</sup>. 그리고 NF- $\kappa$ B의 발현을 억제할 경우에는 파골세포로의 분화 자체가 억제된다는 것이 알려져 있다<sup>33)</sup>. 선행논문으로 부자와 육계가 포함되어 있는 처방인 우귀음이 난소적출 흰쥐의 폐경 후 골다공증 모델에서 ALP (alkaline phosphatase) 농도 감소, 피질골 부분의 피질 두께는 증가되고 파골세포 수와 골아세포 표면이 감소됨을 확인하여 노화나 폐경에 의한 골다공증의 예방효과를 확인<sup>34)</sup>한 것과 가미팔미지황탕 및 가미강활속단탕 처방의 경우 난소적출 흰쥐의 골다공증 모델에서 혈청 내 cathepsin L, K의 활성의 억제와 혈청과 골수 내 IL-6 함량이 억제됨을 확인한 결과가 있었다<sup>35)</sup>. 본 연구 결과는 부자와 육계 단독 투여과 부자와 육계 병용 투여시 파골세포분화에 중요한 신호 전달 경로인 p38과 JNK의 활성화 억제와 c-Fos와 NFATc1의 활성화 억제효과로 인해 류마티스 관절염, 골다공증과 같은 만성 염증성 골 질환 치료제의 가능성을 제시한 것으로 부자와 육계 단독투여 보다는 처방에서 부자와 육계를 병용 투여하는 것이 더 효과적인 골다공증 치료제가 될 수 있다는 것을 입증한 것이다.

## 결론

부자와 육계 물 추출물이 RANKL로 유도한 파골세포 분화 억제에 미치는 영향을 살펴보았다.

1. 부자와 육계 물 추출물을 각각 처리하였을 때보다 함께 병용투여 하였을 경우 RANKL로 유도한 파골세포 분화억제에 효과가 있음을 알 수 있다.
2. 부자 물 추출물 50, 100 $\mu$ g/ml, 육계 물 추출물 25, 50  $\mu$ g/ml 농도에서 세포독성이 나타나지 않았으며, 이들의 병용투여는 부자와 육계 2:1 비율로 수행하였으며 세포독성이 없음을 알 수 있다.
3. 부자는 RANKL로 유도되는 신호전달 경로들 중 c-Fos와 NFATc1, p38의 인산화를 억제하여 파골세포 분화를 억제하였다.
4. 육계는 RANKL로 유도되는 신호전달 경로들 중 c-Fos와 NFATc1, p38의 인산화를 억제하여 파골세포 분화를 억제하였다.
5. 부자와 육계 병용투여 시 RANKL로 유도되는 신호전달 경로들 중 c-Fos와 NFATc1, p38의 인산화를 억제하여 파골세포 분화를 억제하였다.

이상의 결과로 보아 부자와 육계는 단일 투여에 비하여 병용투여 시 파골세포 분화 억제 효과에 보다 유의함을 알 수 있었으며 앞으로 부자와 육계 주성분 사이의 상승효과를 검증하는 후속연구가 진행 되어야 할 것이다.

## 감사의 글

이 논문은 한국연구재단 일반연구자 지원 사업 NRF-2012R1A1A3013455의 지원을 받아 수행되었으며 이에 감사드립니다.

## References

1. Johnell O, Kanis JA, An estimate of the worldwide prevalence and disability associated with osteoporotic fractures, *Osteoporosis*, 2006 ; 17(12) : 1726-33.
2. Silverman SL, Lane NE, Glucocorticoid-induced osteoporosis, *Curr Osteoporos Rep*, 2009 ; 7(1) : 23-6.
3. Nishikawa M, Akatsu T, Katayama Y, Yasutomo Y, Kado S, Kugal N, Yamamoto M, Nagata N, Bisphosphonates act on osteoblastic cells and inhibit osteoclast formation in mouse marrow cultures, *Bone*, 1996 ; 18 : 9-14.
4. Abrahamsen B, Bisphosphonate adverse effects, lessons from large databases, *Curr Opin Rheumatol*, 2010 ; 22(4) : 404-9.
5. Kim JY, Jung JH, Lee MS, Lee CH, Kim YK, Jeon BH, Kwak HB, Kim JY, Choi MK, Kim JJ, Oh JM, Effect of Saururus Chinensis in RANKL-induced Osteoclast Differentiation, *Kor J Ori Med Physiol*

- Pathol. 2012 ; 26(6) : 869-73.
6. Kim JY, Kim YK, Choi MK, Oh JM, Kwak HB, Kim JJ. Effect of *Cornus Officinalis* on Receptor Activator of Nuclear Factor- $\kappa$ B Ligand (RANKL)-induced Osteoclast Differentiation. *J Bone Metab.* 2012 ; 19(2) : 121-7.
  7. Kim KM. Effects of papaya water extract on RANKL-induced osteoclast Differentiation. Faculty of Medical Science, Wonkwang University Graduate School, 2009.
  8. Kim JH, Ki JY, Ann JY, Park HJ, Kim HJ, Kwak HB, Oh JM, Kim YK. Inhibitory Effects of *Achyranthis Bidentatae Radix* on Osteoclast Differentiation and Bone Resorption. *Kor J Herbology.* 2010 ; 25(1) : 65-74.
  9. Goltzman D. Discoveries, drugs and skeletal disorders. *Nat Rev Drug Discov.* 2002 ; (10) : 784-96.
  10. Ikeda F, Nishimura R, Matsubara T, Hata K, Reddy SV, Yoneda T. Activation of NFAT signal in vivo leads to osteopenia associated with increased osteoclastogenesis and bone-resorbing activity. *J Immunol.* 2006 ; 177(4) : 2384-90.
  11. Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT, Martin TJ. Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev.* 1999 ; 20 : 345-57.
  12. Hofbauer LC, Dunstan CR, Lacey DL, Boyle WJ, Riggs BL. The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. *J Bone Miner Res.* 2000 ; 15 : 2-12.
  13. Lee ZH, Kim HH. Signal transduction by receptor activator of nuclear factor kappa B in osteoclasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003 ; 305 : 211-4.
  14. Takayanagi H. Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nat Rev Immunol.* 2007 ; 7 : 292-304.
  15. Matsuo K, Galson DL, Zhao C, et al. Nuclear factor of activated T-cells (NFAT) rescues osteoclastogenesis in precursors lacking c-Fos. *J Biol Chem.* 2004 ; 279 : 26475-80.
  16. Jung HS, Song BY, Lee CH, Yook TH. Effects of *Cinnamomi Cortex* and *Aconitum Carmichaeli*'s Pharmacopuncture and Oral Administration on Blood Sugar in Type II Diabetic Mice. *The Acupuncture.* 2010 ; 27(5) : 1-12.
  17. Ameri A. The effects of *Aconitum* alkaloids on the central nervous system. *Prog Neurobiol.* 1998 ; 56 : 211-35.
  18. Mitamura M, Horie S, Sakaguchi M, Someya A, Tsuchiya S, Van de Voorde J, Murayama T, Watanabe K. Meseconitine-induced relaxation in rat aorta: involvement of  $Ca^{2+}$  influx and nitric-oxide synthase in the endothelium. *Eur J Pharmacol.* 2003 ; 436 : 217-25.
  19. Zhu YP. *Chinese Materia Medica Chemistry, Pharmacology and Applications.* Amsterdam : Harwood Academic Publishers, 1998 : 353-6.
  20. Kurokawa M, Imakita M, Kumeda CA, Shiraki K. Cascade of fever production in mice infected with influenza virus. *J Med Virol.* 1996 ; 50 : 152-8.
  21. McBride TJ, Panrucker S, Clothier JC. Hip fractures: public perceptions. *Ann R Coll Surg Engl.* 2011 ; 93 : 67-70.
  22. Looker AC, Johnston CC Jr, Wahner HW, Dunn WL, Calvo MS, Harris TB, Heyse SP, Lindsay RL. Prevalence of low femoral bone density in older U.S. women from NHANES III. *J Bone Miner Res.* 1995; 10 : 796-802.
  23. Vestergaard P, Schwartz K, Pinholt EM, Rejnmark L, Mosekilde L. Risk of atrial fibrillation associated with use of bisphosphonates and other drugs against osteoporosis: a cohort study. *Calcif Tissue Int.* 2010 ; 86(5) :335-42.
  24. Watts NB, Diab DL. Long-term use of bisphosphonates in osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010; 95(4) : 1555-1565.
  25. The Younglimsa Editorial Office. *Oriental Medicine Unabridged Terminology Dictionary.* Seoul : Younglimsa, 2007 : 99,777.
  26. Seo BI, Lee JH, Choi HY, Kwon DY, Bu YM. *Herbal Medicine Herbalogy.* Seoul : Younglimsa, 2004 : 440-1.
  27. Ikeda F, Nishimura R, Matsubara T, Hata K, Reddy SV, Yoneda T. Activation of NFAT signal in vivo leads to osteopenia associated with increased osteoclastogenesis and bone-resorbing activity. *J Immunol.* 2006 ; 177(4) : 2384-90.
  28. Dougall WC, Glaccum M, Charrier K, Rohrbach K, Brasel K, De Smedt T, Daro E, Smith J, Tometsko ME, Maliszewski CR, Armstrong A, Shen V, Bain S, Cosman D, Anderson D, Morrissey PJ, Peschon JJ, Schuh J. RANK is essential for osteoclast and lymph node development. *Genes Dev.* 1999 ; 13(18) : 2412-24.
  29. Darnay BG, Haridas V, Ni J, Moore PA, Aggarwal BB. Characterization of the intracellular domain of receptor activator of NF- $\kappa$ B (RANK). Interaction with tumor necrosis factor receptor-associated factors and activation of NF- $\kappa$ B and c-Jun N-terminal kinase. *J Biol Chem.* 1998 ; 273 : 20551-5.
  30. Wong BR, Josien R, Lee SY, Vologodskaja M, Steinman RM, Choi Y. The TRAF family of signal

- transducers mediates NF- $\kappa$ B activation by the TRANCE receptor. *J Biol Chem*. 1998 ; 273(43) : 28355-9.
31. Takayanagi H, Kim S, Koga T, Nishina H, Isshiki M, Yoshida H, Saiura A, Isobe M, Yokochi T, Inoue J, Wagner EF, Mak TW, Kodama T, Taniguchi T. Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts. *Dev Cell*. 2002 ; 3: 889-901.
  32. Partington GA, Fuller K, Chambers TJ, Pondel M. Mitf-PU.1 interactions with the tartrate-resistant acid phosphatase gene promoter during osteoclast differentiation. *Bone*. 2004 ; 34(2) : 237-45.
  33. Shimizu H, Nakagami H, Tsukamoto I, Morita S, Kunugiza Y, Tomita T, Yoshikawa H, Kaneda Y, Ogihara T, Morishita R. NFkappaB decoy oligodeoxynucleotides ameliorates osteoporosis through inhibition of activation and differentiation of osteoclasts. *Gene Ther*. 2006 ; 13(12) : 933-41.
  34. Choe CM, Lee SJ, Park KH, Kim SB, Cho HB. Effects of Woogwiyeum on the Ovariectomized Rat Model of Postmenopausal Osteoporosis. *J Oriental Obstet Gynecol*. 2006 ; 19(4): 77-92.
  35. Jang DS, Kim KH. The Effects of Kamipalmijiwhangtang and Kamigangwhalsokdintang on Osteoporosis in Ovariectomized Rats. *Korean Soc Oriental Prev Med*. 1999 ; 3(1) : 1-33.