

## 용부탕의 파골세포 분화 억제와 골 흡수 억제효과\*

이정주<sup>1</sup>, 조소현<sup>2</sup>, 박민철<sup>2,3</sup>, 조은희<sup>1,3,\*</sup>

<sup>1</sup>원광대학교 한의과대학 침구의학교실

<sup>2</sup>원광대학교 한의과대학 안이비인후피부학교실

<sup>3</sup>원광대학교 한국전통의학연구소



### [Abstract]

#### Inhibitory Effects of *Yongbu-tang* on Osteoclast Differentiation and Bone Resorption\*\*

Jeong Ju Lee<sup>1</sup>, So Hyun Jo<sup>2</sup>, Min Cheol Park<sup>2,3</sup> and Eun Heui Jo<sup>1,3,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Acupuncture & Moxibustion Medicine, College of Oriental Medicine, Wonkwang University

<sup>2</sup>Department of Oriental Medical Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology, College of Oriental Medicine, Wonkwang University

<sup>3</sup>Research Center of Traditional Korean Medicine, Wonkwang University

**Objectives :** This study was performed to evaluate the effects of water extract of *Cervi Parvum Cornu*(CPC), *Aconiti Lateralis Radix Preparata*(ALR), and *Yongbu-tang*(YBT) on suppression of the receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand(RANKL)-induced osteoclast differentiation and bone resorption.

**Methods :** The effects of CPC, ALR, YBT extracts on osteoclast differentiation were determined by culture of bone marrow macrophage(BMM). The mRNA expression levels of the nuclear factor of activated T-cells cytoplasmic 1(NFATc1), c-Fos and tartrate-resistant acid phosphatase(TRAP) in BMMs were analyzed by reverse transcriptase polymerase chain reaction(RT-PCR). Similarly, the protein expression levels of NFATc1, c-Fos, mitogen-activated protein kinase(MAPK)s and  $\beta$ -actin in cell lysates were measured by western blotting. In addition, effects of CPC, ALR and YBT extracts were determined by means of Lipopolysaccharide(LPS)-induced bone-loss with mice.

**Results :** CPC, ALR and YBT extracts showed remarkable inhibition on RANKL-induced osteoclast differentiation without cytotoxicity. CPC and ALR extracts significantly reduced the protein expression level of NFATc1. YBT extract significantly reduced the mRNA expression levels of c-Fos, NFATc1 and the protein expression levels of c-Fos, NFATc1, AKT, p38, c-Jun N-terminal kinase(JNK). Further, YBT extract suppressed degradation of I- $\kappa$ B. And ALR extract significantly restored the bone erosion by LPS treatment in mice.

**Conclusions :** YBT extract showed more remarkable inhibition on osteoclast differentiation than CPC and ALR extracts *in vitro*. ALR extract showed remarkable inhibition on bone resorption *in vivo*. Thus, YBT extract can be a useful treatment for bone-loss diseases such as osteoporosis.

#### Key words :

*Cervi Parvum Cornu*;  
*Aconiti Lateralis Radix Preparata*;  
*Yongbu-tang*;  
 Osteoporosis, Osteoclast Differentiation;  
 Bone resorption

Received : 2015. 07. 16.

Revised : 2015. 08. 26.

Accepted : 2015. 08. 31.

On-line : 2015. 09. 20.

\*\* This study was supported by academic research grant of Wonkwang University in 2014

\* Corresponding author : Department of Acupuncture & Moxibustion Medicine, Wonkwang University Oriental Medical Hospital, Jeonju, 99, Garyeonsan-ro, Deokjin-gu, Jeonju-si, Jeollabuk-do, 54887, Republic of Korea

Tel : +82-63-270-1022 E-mail : freezo@wonkwang.ac.kr

© This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

*The Acupuncture* is the Journal of Korean Acupuncture & Moxibustion Medicine Society. (<http://www.TheAcupuncture.org>)

Copyright © 2014 KAMMS, Korean Acupuncture & Moxibustion Medicine Society. All rights reserved.

## I. 서 론

세계보건기구(World Health Organization, WHO)는 골다공증을 “골량의 감소와 미세구조의 이상을 특징으로 하는 전신적인 골격계 질환으로 뼈가 약해져서 쉽게 부러지게 되는 질환”이라고 정의하였다<sup>1)</sup>. 즉 파골세포에서 일어나는 골 흡수보다 조골세포에서 일어나는 골 형성이 저하되는 골대사의 불균형으로 인해 골 강도가 감소되는 질병이다. 일반적으로 골다공증은 노령인구에서 많이 발생되며, 특히 폐경 이후의 여성에서 에스트로겐 분비의 저하로 급격한 골 소실이 두드러지게 나타난다. 2012년 수행된 국민건강영양조사 결과에 따르면 50세 이상 인구 중 발병률은 여자 34.9%, 남자 7.8%였다<sup>2)</sup>. 골다공증은 여러 합병증이 발생할 수 있으며, 특히 골절로 인해 심각한 정신적·육체적 장애와 함께 개인 및 사회적·경제적 손실을 가져오게 된다. 가장 심각한 합병증인 고관절 골절이 발생하면 1년 내 사망률이 20~25%라고 보고되었다<sup>3)</sup>. 요즘은 우리 사회에서 급격한 고령화가 진행되면서 대표적인 노인성 질환인 골다공증에 대한 예방과 치료의 필요성이 매우 증대되고 있다.

녹용(鹿茸, *Cervi Parvum Cornu*)은 대표적인 補腎, 強筋骨, 補陽藥類<sup>4)</sup>, 여러 연구에서 골다공증, 류마티스 관절염, 성장촉진, 면역력 증강 등에 효과가 있는 것으로 보고되어 있다<sup>5-9)</sup>.

부자(附子, *Aconiti Lateralis Radix Preparata*)는 溫熱藥類에 속하며<sup>4)</sup>, 진통 및 소염작용, 관절염, 척수손상, 파골세포 분화, 비만 등에 관한 연구가 보고되어 있다<sup>10-14)</sup>.

녹용과 부자로 구성된 처방인 용부탕(茸附湯)은 《東醫寶鑑·虛勞門》의 陽虛用藥에 나온 처방으로 氣精血虛耗, 潮熱, 盜汗을 치료한다고 하였다<sup>15)</sup>. 용부탕은 임상에서 많이 활용되는 처방은 아니지만, 補陽, 補腎의 대표적인 약물이면서 위와 같은 효능과 연구가 보고된 녹용과 부자를 같이 사용하는 처방이므로 골다공증의 예방과 치료에 효과가 있을 것이라고 생각하였다.

현재까지 골다공증에 대한 연구로 鹿茸·附子·紫河車·續斷·杜仲·人蔘·紅花子·骨碎補·牛膝 등의 단일 한약재와 獨活寄生湯, 加味左歸飲, 歸腎丸, 三氣飲加味方 등의 한약 처방에 대한 연구가 보고 되어 있다<sup>5,6,13,16)</sup>. 실험 방법적인 면에서 난소 적출하여 골다공증을 유발한 mouse나 rat을 이용한 실험 연구가 많았으나<sup>5,13)</sup>, 파골세포 분화 억제와 골 흡수 억제에 대한 실험 연구가 점점 증가하고 있다<sup>6,13)</sup>. 그러나 아직 용부탕을 이용한 연구는 보고되지 않았다.

이에 저자는 골다공증에 유효할 것으로 추측되는 녹용과

부자 물 추출물을 단일 투여했을 때와 용부탕 물 추출물을 투여했을 때 어떠한 효과의 차이가 있는지 확인하고, 골다공증에 대한 각각의 구체적인 작용 기전을 밝히고자 하였다. 이를 위해 세포 단위에서 receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand(RANKL)로 유도된 파골세포의 분화를 단계별로 억제하는 효과를 시험하고, 또한 생체 내 염증성 골 소실에 미치는 작용을 보기 위해 lipopolysaccharide(LPS)로 골다공증을 유발시킨 마우스에 대한 실험을 진행하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 시약

Human RANKL과 macrophage colony stimulating factor(M-CSF)는 Peprrotech(London, UK)사에서 구입하였고, XTT(2,3-Bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide) assay kit는 Roche (Indianapolis, IN, USA)사에서 구입하였다. Phospho(p)-c-Jun N-terminal kinase(JNK), c-Jun N-terminal kinases(JNK), p-extracellular signal-regulated kinase (p-ERK), extracellular signal-regulated kinases(ERK), p-p38, p38, I- $\kappa$ B 항체는 Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA)사의 제품을 사용하였다. c-Fos, nuclear factor of activated T-cells cytoplasmic 1(NFATc1), actin 항체는 Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz, CA, USA)사에서 구입하였다.

### 2. 방법

#### 1) 약물의 추출 및 제조

본 실험에 사용한 녹용은 뉴질랜드 Hutt산, 부자는 중국 산으로 (주)옵니허브에서 구입하였다. 용부탕은 위의 한약재를 1:1의 비율을 섞어 물 추출하였다. 한약재의 추출물을 만들기 위해 한약재를 절편으로 잘게 자른 뒤 각 무게의 10배의 3차 증류수에 30분 동안 팽윤하였고, Glas-Col (Terre Haute, IN, USA) heating mantle로 2시간 동안 환류 추출하였으며, 추출액을 여과지(Advantec No.2 110 mm filterpaper)로 여과한 후 여과액을 감압농축기(Rotavapor

R-124, Buchi, Switzerland)로 60°C에서 감압 농축하였으며, 동결건조기(IIShin Freeze Dryer, Bondiro, Korea)로 건조하여 최종적으로 분말 형태로 각각의 실험약물을 얻었다(Table 1).

**Table 1. Extraction Yield of Medicinal Herbs Used in This Study**

Korean name	Pharmaceutical name	Abbreviation	Yield(%)
<i>Nokyong</i>	Cervi Parvum Cornu	CPC	15.4
<i>Buja</i>	Aconiti Lateralis Radix Preparata	ALR	20.0
<i>Yongbu-tang</i>	<i>Yongbu-tang</i>	YBT	11.6

### 2) 파골세포 배양 및 분화 억제

골수세포는 수컷 5주령 imprinting control region (ICR) mice를 경추 탈골법으로 희생시킨 후 대퇴골과 경골을 분리하고 1 ml 주사기틀로 1 X antibiotic을 첨가한  $\alpha$ -minimum essential medium( $\alpha$ -MEM, Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA)으로 뼈의 속질을 수세하여 얻었다. 분리된 골수세포에서 적혈구를 제거한 후 10 % fetal bovine serum(FBS), antibiotics, M-CSF(30 ng/ml)가 포함된  $\alpha$ -MEM 배지에서 3일간 배양하였다. 3일 후, 부착된 세포를 대식세포인 파골전구세포(bone marrow macrophages, BMMs)로 사용하여 실험하였다. 대식세포를  $3.5 \times 10^4$  /well의 밀도로 48-well plate에 분주하고 M-CSF(30 ng/ml)와 RANKL(100 ng/ml)을 첨가한 배지에 녹용, 부자, 용부탕 물 추출물을 농도별로 처리하여 배양하였다. 배양 4일 후, 배양한 세포를 tartrate-resistant acid phosphatase(TRAP)(Sigma Aldrich, USA) 용액으로 염색하여 적자색의 TRAP 양성세포를 파골세포로 인정하였다. 염색된 파골세포 중 핵이 3개 이상인 세포의 개수를 통계에 이용하였다.

### 3) 독성검사

대식세포를  $1 \times 10^4$  cells/well의 밀도로 96-well plate에 분주하고 M-CSF(30 ng/ml)를 처리한 후 추출물을 농도별로 처리하여 3일간 배양하였다. 3일 후, 각 well에 50  $\mu$ l의 XTT용액을 첨가하고 4시간 배양 후 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) reader(Molecular Devices, CA, USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 확인하였다.

### 4) Western blot analysis

배양된 세포는 잔류물질을 제거하기 위하여 1 X phosphate-buffered saline(PBS)를 사용하여 2~3번 세척한 후 lysis buffer(50 mM Tris-Cl, 150 mM NaCl, 5 mM ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA), 1 % triton X-100, 1 mM sodium fluoride, 1 mM sodium vanadate, 1 % deoxycholate and protease inhibitors)로 용해하고 원심분리(14,000 rpm, 20 min)하여 순수한 단백질을 얻었다. 단백질은 detergent compatible(DC) Protein assay kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 사용하여 표준 단백질량과 비교하여 정량화한 후 동량의 단백질은 10 % sodium dodecyl sulfate(SDS)-polyacrylamide gel에서 분리하였다. 분리된 단백질은 transfer buffer로 polyvinylidene fluoride(PVDF)-membrane에 분리된 단백질을 전사시켰다. 비 특이반응을 제거하기 위해서 5 % 비지방 skim milk가 함유된 TBS-T로 실온에서 1시간 동안 충분히 흔들면서 방치하였다. 반응이 끝난 후 blocking buffer에 1:1,000으로 희석된 1차 항체를 넣고 4°C에서 반응시켰다. 반응 후 TBS-T로 7분 간격으로 3번 세척하고 blocking buffer에 1:5,000으로 희석한 2차 항체를 넣고 상온에서 1시간 동안 반응을 시켰다. TBS-T로 10분 간격으로 3번 세척한 후 enhanced chemiluminescence(ECL) kit로 발색시켜 단백질 발현 정도를 확인하였다.

### 5) RT-PCR(reverse transcription polymerase chain reaction) 분석

배양된 세포에 1 ml의 Isol-RNA lysis reagent(5 PRIME) 용액을 넣어 제조사의 방법에 따라 RNA를 분리한 후 1  $\mu$ g의 RNA를 ReverTra Ace® qPCR RT Kit(Toyobo, Japan)로 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA는 다음과 같은 primer로 polymerase chain reaction(PCR)증폭하였다(Table 2). PCR 후, 증폭된 cDNA는 1 % agarose gel에서

**Table 2. Primers for PCR Amplification**

Primer	Sequence
c-Fos Forward	5'- CTGGTGCAGCCACTCTGGTC-3'
Reverse	5'- CTTTCAGCAGATTGGCAATCTC-3'
NFATc1 Forward	5'- CAACGCCCTGACCACCGATAG-3'
Reverse	5'- GGCTGCCTCCGTCTCATAGT-3'
TRAP Forward	5'-ACTTCCCAGCCCTTACTAC-3'
Reverse	5'-TCAGCACATAGCCACACCG-3'
GAPDH Forward	5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'
Reverse	5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'

전기영동으로 분리하였고 Et-Br로 염색하여 ultraviolet (UV)상에서 관찰하였다.

### 6) 동물실험

생체 내의 골 손실에 미치는 추출물의 효과를 규명하기 위해 5주령의 수컷 ICR mice 5마리를 한 군으로 하여 각 군별로 녹용, 부자, 용부탕 물 추출물(생쥐 g당 0.4 mg or 0.2 mg)과 대조군으로 PBS를 10일간 경구투여 하였다. 골 손실의 유도를 위해 실험군에 LPS(생쥐 g당 5 µg)를 투여 시작일(1일)로부터 4일과 7일 2회에 걸쳐 복강 주사하였고, 대조군에는 PBS를 주사하여 실험오차를 제거하였다. 10일째 되는 날 생쥐를 희생시키고 대퇴골을 얻어 4% paraformaldehyde로 고정하였다. Skyscan BE/skyscan 1172 (Bruker, USA)로 대퇴골 내부의 3차원적 영상을 얻었다.

### 7) 통계분석

각의 실험군은 3개 이상 수행하였고 평균값과 표준편차를 계산하였다. 모든 실험은 3회 이상 반복하여 동일한 실험결과를 얻었을 때 실험결과로 사용하였으며, 정량적인 결과의 통계는 Student's *t*-test로 분석하였고 *p*값이 0.05 이하일 때 통계적으로 유의한 것으로 보았다.

## III. 결 과

### 1. 파골세포 분화 억제 효과

#### 1) 파골세포 분화에 미치는 녹용, 부자 단일 물 추출물의 효과

파골세포는 골 흡수 작용을 하는 세포로서 파골세포 분화의 억제는 골 흡수를 억제할 수 있는 중요한 일이라 할 수 있다. 파골세포 분화에 용부탕에 포함된 각각의 한약재인 녹용과 부자 단일 물 추출물이 미치는 영향을 알아보고자 실험을 수행하였다. 이들의 농도는 배합비율인 1:1에 준하여 수행하였다. BMM에 M-CSF와 RANKL을 처리한 후에 각 시료를 농도별로 처리하여 4일간 배양하였다. 그 후 염색된 파골세포 중에서 핵이 3개 이상인 세포의 개수를 세었다. 배양 결과 추출물을 처리하지 않고 M-CSF와 RANKL만 처리한 대조군은 TRAP 양성 다핵성 파골세포로 분화되었지만 녹용 단일 물 추출물을 처리한 실험군에서는 TRAP 양성 다핵성 파골세포로 분화의

억제효과가 미미하였으며, 부자 단일 물 추출물을 처리한 실험군에서는 TRAP 양성 파골세포의 형성 및 다핵의 성숙된 파골세포로서의 분화가 유의성 있게 억제되었음을 확인하였다(Fig. 1).

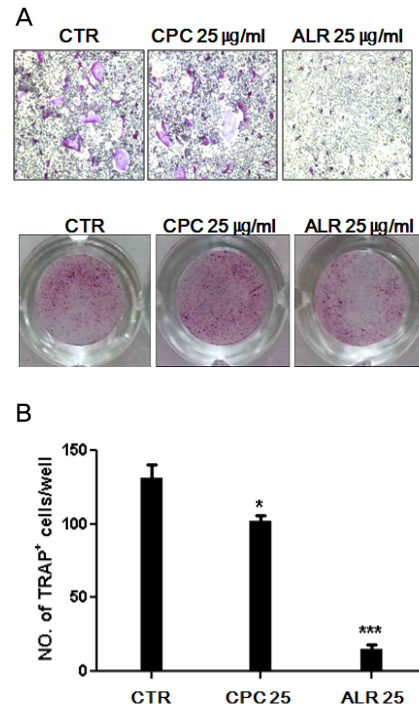


Fig. 1. Inhibitory effects of water extract of *Cervi parvum cornu*(CPC) and *Aconiti lateralis radix preparata*(ALR) on osteoclastogenesis from BMMs induced by soluble RANKL

CPC and ALR extracts inhibited 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 CPC and ALR extracts. After 4 d, cells were fixed in 3.7 % formalin, permeabilized in 0.1 % triton x-100, and stained for TRAP. CTR means control group. B : TRAP-positive multinucleated cells were counted (TRAP-positive cells included three or more nuclei were counted as multinucleated osteoclasts). Asterisks(\*) indicate statistical differences from the control(\* :  $p < 0.05$ , \*\* :  $p < 0.01$ , \*\*\* :  $p < 0.001$ ).

#### 2) 파골세포 분화에 미치는 용부탕 물 추출물의 효과

용부탕에 포함된 각각의 한약재인 녹용과 부자 단일 물 추출물의 파골세포 분화 억제를 확인한 바, 두 약재가 혼합되어있는 용부탕 물 추출물의 파골세포 분화 억제효과를 확인하였다. BMM에 M-CSF와 RANKL을 처리한 후에 각 시료를 농도별로 처리하여 4일 간 배양하였다. 그 후 염색된 파골세포 중에서 핵이 3개 이상인 세포의 개수를 세었

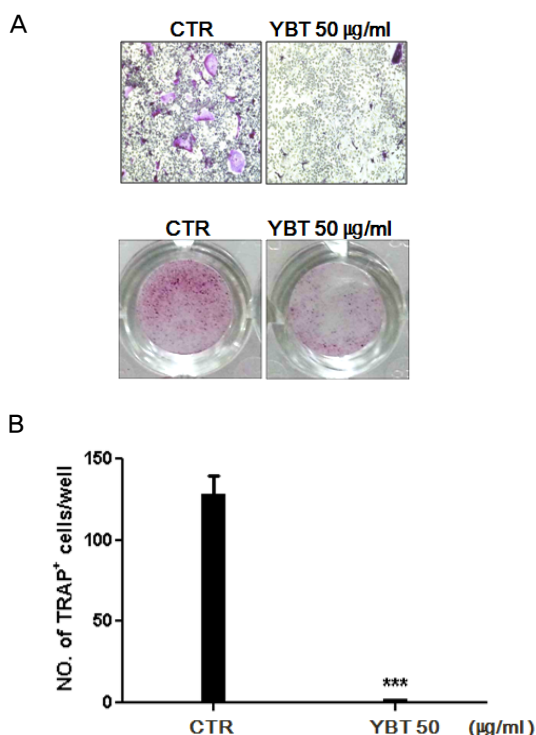


Fig. 2. Inhibitory effects of water extract of Yongbu-tang(YBT) on osteoclastogenesis from BMMs induced by soluble RANKL

YBT extract inhibited osteoclast differentiation. A : BMMs were cultured for 4 d with M-CSF(30 ng/ml) and RANKL(100 ng/ml) in the presence or absence of YBT extract. After 4 d, cells were fixed in 3.7 % formalin, permeabilized in 0.1 % triton x-100, and stained for TRAP. B : TRAP-positive multinucleated cells were counted (TRAP-positive cells included three or more nuclei were counted as multinucleated osteoclasts). Asterisks(\*) indicate statistical differences from the control(\* :  $p < 0.05$ , \*\* :  $p < 0.01$ , \* :  $p < 0.001$ ).

다. 배양 결과 추출물을 처리하지 않고 M-CSF와 RANKL 만 처리한 대조군은 TRAP 양성 다핵성 파골세포로 분화되었지만 용부탕 물 추출물을 처리한 실험군에서는 TRAP 양성 파골세포의 형성 및 다핵의 성숙된 파골세포로서의 분화가 억제되었음을 확인하였다(Fig. 2).

## 2. 녹용, 부자, 용부탕 물 추출물의 세포독성

녹용, 부자, 용부탕 물 추출물의 파골세포 분화 억제 효과와 세포독성의 관련성을 배제하기 위해 XTT assay를 수행하였다. 실험 결과 25, 50, 100 µg/ml의 농도로 녹용, 부자, 용부탕 물 추출물을 처리한 군 모두에서 세포독

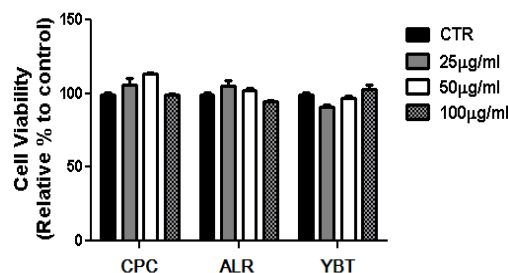


Fig. 3. The effects of CPC, ALR and YBT extracts on cell viability

BMMs were cultured for 3 d with M-CSF(30 ng/ml) in the presence or absence of CPC, ALR and YBT extracts. 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.

성은 나타나지 않음을 확인하였다(Fig. 3).

## 3. RANKL에 의한 파골세포 유도인자 발현 억제효과

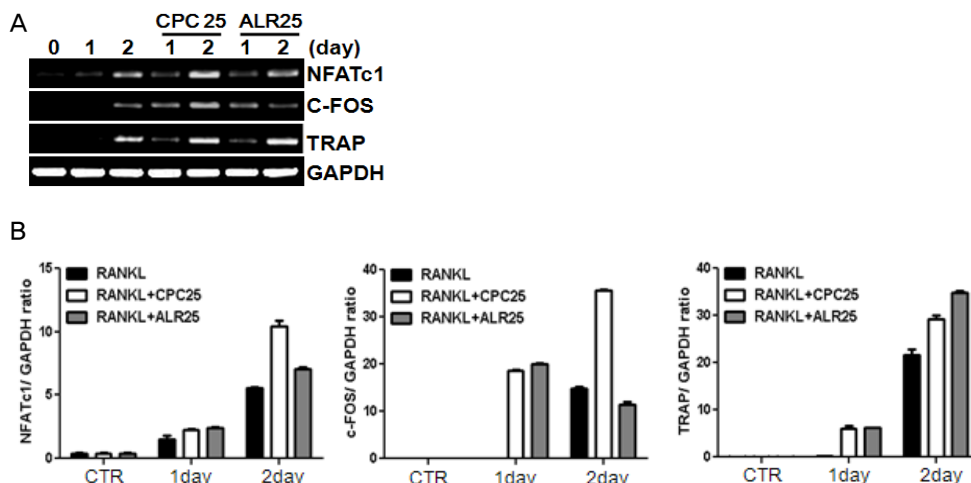
### 1) RANKL에 의한 유전자 발현에 대한 녹용, 부자 단일 물 추출물의 효과

RANKL은 receptor activator of nuclear factor kappa-B(RANK)와 결합한 후 신호전달 체계를 활성화시켜 전사인자인 c-Fos와 NFATc1의 발현을 촉진하고 파골세포의 지표인 TRAP의 유전자 발현을 유도한다. RANKL에 의해 유도되는 여러 가지 유전자 발현에 녹용, 부자 단일 물 추출물이 미치는 효과를 확인하기 위해 RT-PCR을 수행하였다.

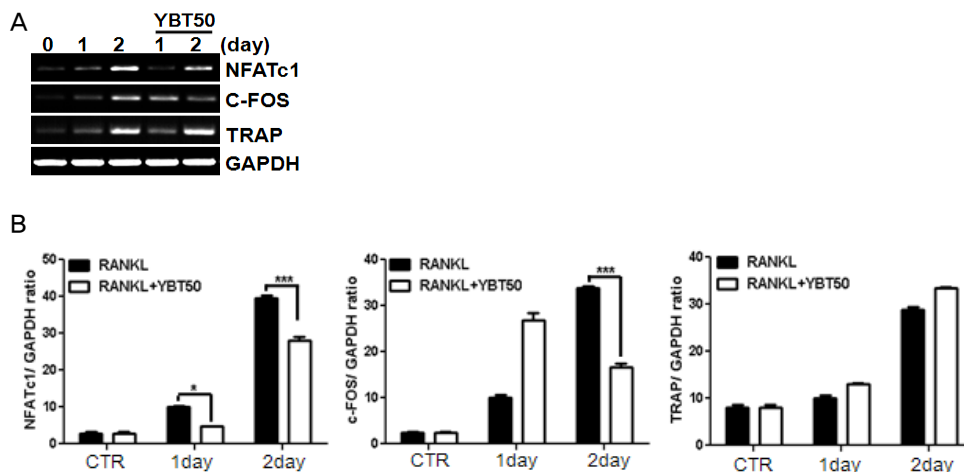
RANKL로 파골세포 분화를 자극하는 파골세포에서 c-Fos, NFATc1, TRAP mRNA가 1일과 2일에 증가하였고, 녹용, 부자 단일 물 추출물을 처리한 실험군에서는 c-Fos, NFATc1 mRNA 발현에 억제 효과가 없었음을 확인하였다(Fig. 4).

### 2) RANKL에 의한 유전자 발현에 대한 용부탕 물 추출물의 효과

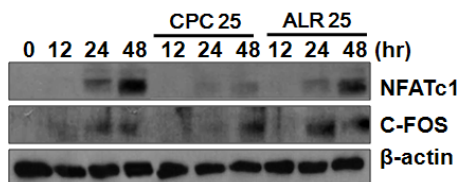
RANKL에 의해 유도되는 여러 가지 유전자 발현에 용부탕 물 추출물이 미치는 효과를 확인하기 위해 RT-PCR을 수행하였다. RANKL로 자극한 대식세포에서 c-Fos, NFATc1, TRAP mRNA 발현이 증가되었으며 용부탕 물 추출물을 처리한 실험군에서는 c-Fos, NFATc1 mRNA 발현이 2일째 억제 효과가 있음을 확인하였다(Fig. 5).



**Fig. 4. Inhibitory effects of CPC and ALR extracts on RANKL-induced gene expression**  
 CPC and ALR extracts didn't suppress RANKL-induced c-Fos, NFATc1 and TRAP expression.  
 A : BMMs were pretreated with or without CPC and ALR extracts(25  $\mu$ g/ml) for 1 h and then stimulated with RANKL(100 ng/ml) for the indicated times. Each mRNA expression levels of the genes were analyzed by RT-PCR.  
 B : Quantitative analysis by image J program.



**Fig. 5. Inhibitory effects of YBT extract on RANKL-induced gene expression**  
 YBT extract suppressed RANKL-induced c-Fos and NFATc1 expression.  
 A : BMMs were pretreated with or without YBT extract(50  $\mu$ g/ml) for 1 h and then stimulated with RANKL(100 ng/ml) for the indicated times. Each mRNA expression levels of the genes were analyzed by RT-PCR.  
 B : Quantitative analysis by image J program. Significance; \* indicates significance for the difference between control and extraction treatment group(\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\* :  $p < 0.001$ ). Error bars indicate SDs; N=3.



**Fig. 6. Inhibitory effects of CPC and ALR extracts on RANKL-induced protein expression**  
 CPC and ALR extracts suppressed protein expression levels of RANKL-induced NFATc1.  
 BMMs were pretreated with or without CPC and ALR extracts(25  $\mu$ g/ml) for 1 h and then stimulated with RANKL(100 ng/ml) for the indicated times.  
 The cell lysates were analyzed by Western blotting with antibodies for c-Fos, NFATc1, and  $\beta$ -actin.

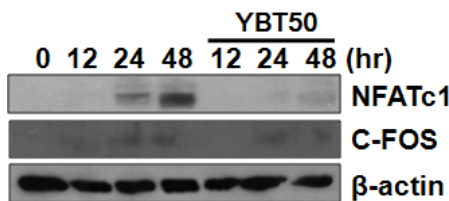
#### 4. RANKL에 의해 유도되는 c-Fos와 NFATc1 단백질 발현 억제 효과

##### 1) RANKL에 의해 유도되는 c-Fos와 NFATc1 단백질 발현에 미치는 녹용, 부자 단일 물 추출물의 효과

RANKL에 의해 발현되는 c-Fos는 NFATc1의 발현을 유도하며 이는 뼈 파괴세포의 분화에 중요한 역할을 한다. c-Fos와 NFATc1의 단백질 발현에 미치는 녹용, 부자 단일 물 추출물의 효과 검증을 위하여 western blotting을 시행하였다. RANKL을 처리한 후 12, 24, 48시간에서 c-Fos 단백질 발현이 증가하였으며, NFATc1 단백질 발현은 24, 48시간에 증가하였다. 녹용, 부자 단일 물 추출물을 처리한 실험군에서는 c-Fos의 단백질 발현에 억제효과가 없었지만, NFATc1의 단백질 발현에 억제효과가 있었음을 확인하였다(Fig. 6).

##### 2) RANKL에 의해 유도되는 c-Fos와 NFATc1 단백질 발현에 미치는 용부탕 물 추출물의 효과

c-Fos와 NFATc1의 단백질 발현에 미치는 용부탕 물 추출물의 효과 검증을 위하여 western blotting을 시행하였다. RANKL을 처리한 후 12, 24, 48 시간에서 c-Fos 단백질 발현이 증가하였으며, NFATc1 단백질 발현은 24, 48 시간에 증가하였다. 그러나 용부탕 물 추출물을 처리한 실험군에서는 c-Fos와 NFATc1의 단백질 발현이 억제됨을 확인하였다(Fig. 7).

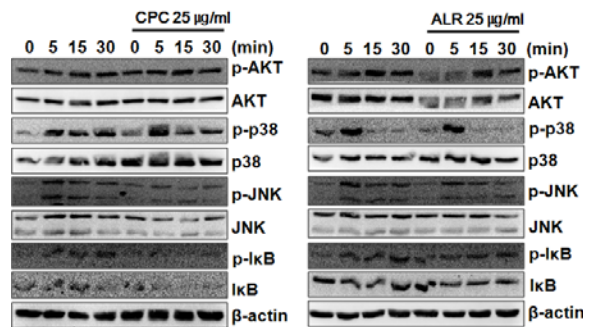


**Fig. 7. Inhibitory effects of YBT extract on RANKL-induced protein expression**  
YBT extract suppressed protein expression levels of RANKL-induced c-Fos, NFATc1. BMMs were pretreated with or without YBT extract(50 µg/ml) for 1 h and then stimulated with RANKL(100 ng/ml) for the indicated times. The cell lysates were analyzed by Western blotting with antibodies for c-Fos, NFATc1, and β-actin.

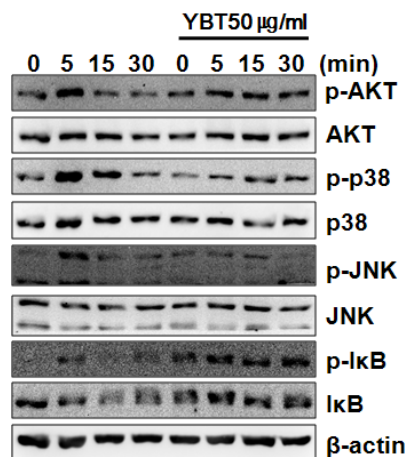
#### 5. 파골세포 분화의 신호전달 경로에 미치는 효과

##### 1) RANKL에 의해 유도되는 Mitogen-activated protein kinase(MAPK)s와 I-κB에 미치는 녹용, 부자 단일 물 추출물의 효과

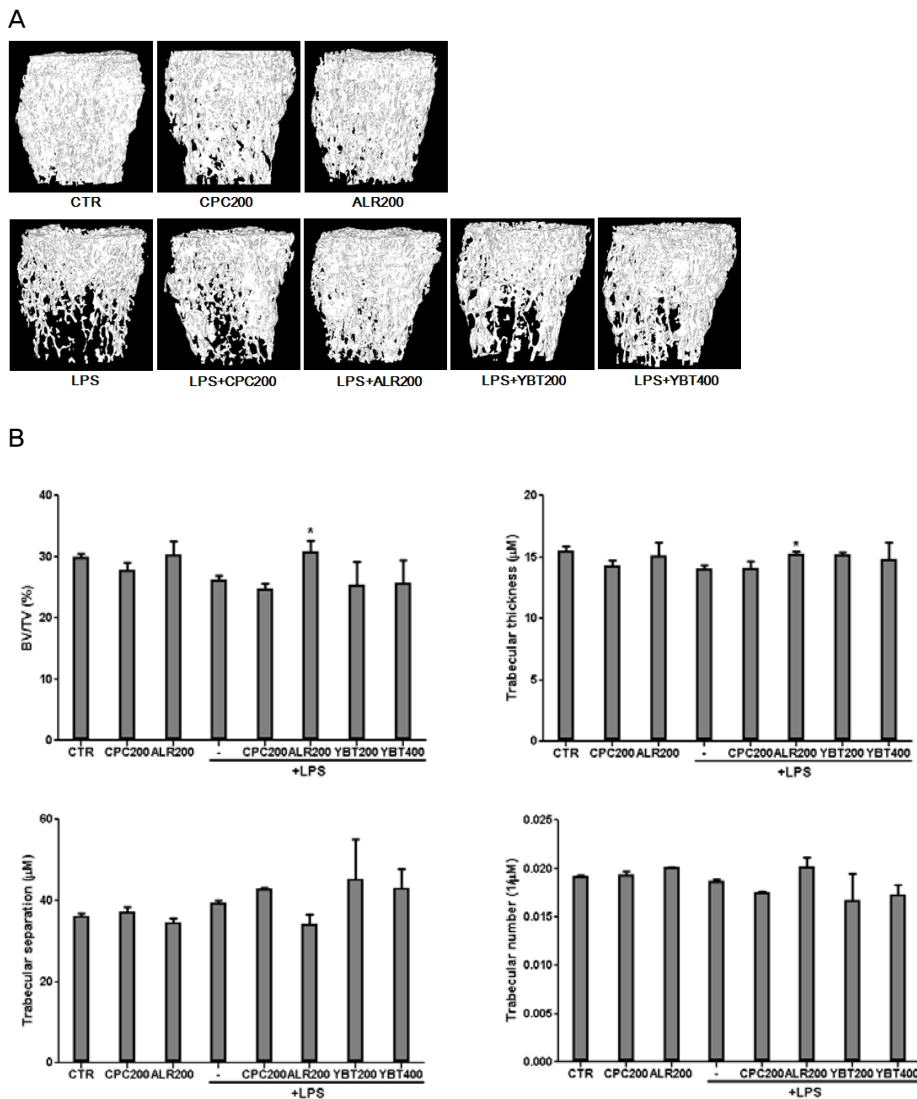
녹용, 부자 단일 물 추출물에 의한 파골세포 분화 억제 작용기전을 규명하기 위하여 RANKL에 의해 유도되는 주



**Fig. 8. Inhibitory effects of CPC and ALR extracts on RANKL signaling pathways**  
CPC and ALR extracts didn't inhibit RANKL signaling pathways. BMMs were pretreated with or without CPC and ALR extracts(25 µg/ml) and further stimulated with RANKL(100 ng/ml) for the indicated times. The cells were lysed and proteins were resolved by 10 % SDS-PAGE and subjected to Western blot analysis.



**Fig. 9. Inhibitory effects of YBT extract on RANKL signaling pathways**  
YBT extract inhibited RANKL signaling pathways by decreased the activation of AKT, p38, JNK and decreased the degradation of I-κB. BMMs were pretreated with or without YBT extract(50 µg/ml) and further stimulated with RANKL(100 ng/ml) for the indicated times. The cells were lysed and proteins were resolved by 10 % SDS-PAGE and subjected to Western blot analysis.



	CTR	CPC200	ALR200	LPS+				
				-	CPC200	ALR200	YBT200	YBT400
BV/TV(%)	30,0±0,5	27,8±1,2	30,4±2,1	26,3±0,6	24,8±0,7	30,9±1,7	25,4±3,8	25,8±3,7
Trabecular thickness(μm)	15,5±0,4	14,3±0,4	15,1±1,1	14,1±0,3	14,1±0,5	15,3±0,2	15,2±0,2	14,9±1,3
Trabecular separation(μm)	36,1±0,7	37,3±1,2	34,6±1,0	39,3±0,6	42,9±0,3	34,2±2,4	45,3±9,7	43,1±4,7
Trabecular number(1/μm)	0,019±0,0	0,019±0,0	0,020±0,0	0,019±0,0	0,018±0,0	0,020±0,0	0,017±0,0	0,017±0,0

**Fig. 10. Skyscan analysis of LPS-induced bone loss in mice**

ALR extract restored the bone erosion by LPS treatment in mice.

A : Mice were oral-treated CPC, ALR and YBT extracts(200 or 400 mg/kg/day) or 1 × PBS for every 10 days. LPS(5 μg/g of body weight) or 1 × PBS was administered intraperitoneally on day 4 and 7, and the femurs were collected on day 10 after the first of CPC, ALR and YBT extracts, Radiographs were taken with a Skyscan.

B : Bone volume/tissue volume(BV/TV), Trabecular thickness, Trabecular separation and Trabecular number was analyzed using the histomorphometric results. Asterisks(\*) indicate statistical difference from the LPS group.( \* :  $p < 0,05$ ).



요 신호전달체계에 녹용, 부자 단일 물 추출물이 미치는 영향에 대하여 실험하였다.

BMM에 녹용, 부자 단일 물 추출물을 전 처리하고 RANKL을 0, 5, 15, 30분 간격으로 처리한 다음 MAPKs의 인산화를 확인하였다. 그 결과 0, 5, 15, 30분에서 AKT, p38, JNK, I- $\kappa$ B의 인산화가 증가하였고, 동시간대에 녹용, 부자 단일 물 추출물을 처리한 실험군에서 인산화가 억제되지 않았다(Fig. 8).

## 2) RANKL에 의해 유도되는 MAPKs와

### I- $\kappa$ B에 미치는 용부탕 물 추출물의 효과

용부탕 물 추출물에 의한 파골세포 분화 억제 작용기전을 규명하기 위하여 RANKL에 의해 유도되는 주요 신호전달체계에 용부탕 물 추출물이 미치는 영향에 대하여 실험하였다. BMM에 용부탕 물 추출물을 전 처리하고 RANKL을 0, 5, 15, 30분 간격으로 처리한 다음 MAPKs의 인산화를 확인하였고 그 결과 5분에서 AKT, p38, JNK의 인산화가 증가하였으나, 동시간대에 용부탕 물 추출물을 처리한 실험군에서는 인산화가 억제되었다. 또한 RANKL에 의해 I- $\kappa$ B 단백질이 감소되었지만, 용부탕 물 추출물을 처리한 실험군에서는 I- $\kappa$ B 단백질 발현이 유지되었다. 이들의 결과로 용부탕 물 추출물이 RANKL의 신호전달 단백질 활성을 억제한다고 할 수 있다(Fig. 9).

## 6. LPS-유도 골 손실에 미치는 효과

생체 내에서 용부탕 물 추출물과 이를 구성하는 약재인 녹용과 부자 단일 물 추출물이 미치는 영향을 검증하고자 염증성 골 손실 동물 모델을 이용하였다. 생쥐에 1회/3일 복강주사를 통하여 LPS(5  $\mu$ g/g)를 투여하여 염증을 유발하였으며 각 추출물은 농도별로 1회/1일 경구 투여하였다. LPS로 유도되는 골 손실에 대한 영향은 Skyscan BE/skyscan 1172(Bruker, USA)을 이용하여 대퇴골 내부의 3차원적 영상을 얻었으며 이 결과를 바탕으로 분석하였다.

대조군에 비해 LPS 처리군에서는 평균 13.4 % 정도의 골 손실을 보였으며 녹용과 부자 단일 물 추출물을 단독 처리한 군에서는 골 손실의 영향은 확인되지 않았다. 녹용과 부자 단일 물 추출물과 LPS 동시 처리한 군에서는 부자 단일 추출물에서 bone volume / tissue volume(BV/TV)가 LPS 단독 처리군에 비해 골 손실이 유의성 있게 회복되었음을 확인하였다. 또한 trabecular thickness, trabecular separation, trabecular number도 회복되었음을 확인할 수 있었다. 녹용과 부자를 배합한 용부탕 물 추출물을 처리

한 군에서는 골 손실에 있어 회복효과는 확인할 수 없었다(Fig. 10).

## IV. 고 찰

인체의 뼈는 태아기에 형성되어 사망에 이르기까지 형성되고 흡수되는 과정이 반복되는데, 이때 파골세포(osteoclast)와 조골세포(osteoblast), 이 두 가지 세포의 균형에 의해 인체의 뼈가 성장하고 유지된다<sup>7)</sup>. 그러나 연령증가, 유전인자, 영양, 생활습관, 질병, 약제 등의 원인으로 골대사의 균형이 깨지면 골다공증이 발생하게 된다. 특히 폐경기 이후 여성에서 에스트로겐 분비의 저하, 운동 부족에 의한 mechanical stress의 저하 등으로 파골세포의 형성 및 활성이 급속히 증가되어 뼈의 밀도가 감소하는 골 소실이 많이 발생한다<sup>8)</sup>. 최근에 고령 인구의 증가로 여성뿐만 아니라 고령의 남성도 골다공증이 빈번히 발생하는데, 골다공증은 특별히 고통을 수반하지는 않지만, 골밀도의 감소로 인해 골절이 유발되는 것이 문제가 된다. 폐경기 이후 여성의 30 % 정도에서 골다공증에 의한 골절을 적어도 한 번 이상 경험한다고 보고된 바가 있으며<sup>9)</sup>, 골절 중 특히 대퇴골 골절 또는 척추 골절 등은 장기간 활동을 제한시키고 사망률도 평균 20 %(12~35 %)에 이르는 만큼, 골다공증의 치료는 매우 중요하다<sup>3)</sup>.

골다공증의 치료 목표는 주요한 위험인자를 제거하여, 골 흡수를 억제하고 골 형성을 촉진하여 감소된 골 양을 회복시킴으로써 골절을 방지하는 것이다. 일반적인 치료 지침으로 칼슘, 비타민 D의 섭취, 적절한 체중부하 운동, 금연, 과도한 음주 피함, 낙상방지가 있으며, 약물치료는 골다공증 골절의 위험인자가 없는 경우 골밀도 T-값  $-2.0$  이하, 1개 이상의 골절 위험인자가 있는 경우 골밀도 T-값  $-1.5$  이하, 척추 및 대퇴골 골절 병력, 비약물적 방법으로 효과가 없는 경우 시행한다<sup>3)</sup>.

골다공증에 사용되는 약물은 작용 기전에 따라 골 흡수 억제제, 골 생성 촉진제 등으로 분류된다. 칼슘, 비타민 D, 여성호르몬 요법으로 에스트로겐 단독요법(estrogen therapy, ET), 또는 에스트로겐-프로게스테론 복합요법(estrogenprogestogen therapy, EPT), tibolone이 있고 선택적 에스트로겐 수용체 조절제(selective estrogen receptor modulator, SERM), bisphosphonates, calcitonin, 부갑상선 호르몬(parathyroid hormone) 등이 있다. 부갑상선 호르몬은 현재 유일하게 승인을 받은 골 생성 촉진제이고 나머지 약물은 골 흡수 억제제에 속한다<sup>3)</sup>.

하지만 현재 가장 많이 사용되는 치료제인 비스포스포네이트 계열의 치료제는 치주염을 앓고 있는 골다공증 환자에게 장기 투여 시 턱뼈가 괴사되는 심각한 부작용이 나타난다는 보고가 있으며<sup>20)</sup>, 또한 장기간 사용 시 대퇴골의 비정형 골절과도 관련이 있다는 보고가 있다<sup>21)</sup>. 이외에도 장기간의 여성호르몬 치료는 심혈관 질환이나 유방암, 자궁암의 위험을 증가시킨다고 하며, 티볼론은 위장관 장애, 어지러움, 우울증 등을 유발할 수 있고, SERM은 정맥 혈전 색전증과 뇌졸중의 위험도를 증가시키며, 칼시토닌은 비염, 안면 홍조, 오심, 구토 등을 발생시킬 수 있는 등 골다공증 치료제에 대한 부작용이 많이 보고되고 있다<sup>3)</sup>. 따라서 급속한 노령화로 인해 골다공증 환자가 지속적으로 증가함에도 불구하고 위와 같은 치료제의 부작용으로 인한 문제점이 발생하고 있어, 더욱 새로운 골다공증 치료제 개발이 절실히 요구되고 있다.

그러므로 저자는 예로부터 부작용 없이 사용되어 온 한약재를 골다공증 치료제 개발을 위한 단서로 이용하기 위하여, 본 연구에서 골다공증의 원인이 되는 파골세포 분화를 억제하는 한약재를 찾고자 하였다.

한의학에서 골다공증이라는 직접적인 명칭이 사용되지는 않았으나 한의학 最古의 문헌인 《黃帝內經·素問·痿論》의 “腎氣熱則腰脊不舉, 骨枯而髓減, 發為骨痿, 《素問·長刺節論》의 “病在骨, 骨重不可舉, 骨髓酸痛, 寒氣至, 名曰骨痺”를 보면 骨痿와 骨痺가 골다공증과 비슷한 표현으로 쓰였다<sup>22)</sup>. 그리고 《黃帝內經·靈樞·經脈篇》의 “足少陰氣絕, 則骨枯, 少陰者, 冬脈也, 伏行而濡骨髓者也, 故骨不濡, 則肉不能著也, 骨肉不相親, 則肉軟却, 肉軟却, 故齒長而垢, 髮無澤, 髮無澤者, 骨先死”을 봤을 때 骨枯도 골다공증과 유사하다고 볼 수 있으며<sup>23)</sup>, 이외에도 虛勞나 虛痺, 骨寒, 骨熱, 骨虧, 骨痛, 骨極, 骨傷證, 骨病外證, 骨絕證, 腎虛腰痛 등을 골다공증의 범주에 포함시킬 수 있다<sup>24)</sup>.

또한 《素問·宣明五氣論》에 “腎主骨”, 《素問·陰陽應象大論》에 “腎生骨髓”, 《靈樞·經脈篇》에 “人始生, 先成精, 精成而腦髓生, 骨爲幹, 脈爲營, 筋爲剛, 肉爲牆, 皮膚堅而毛髮長, 穀入于胃, 脈道以通, 血氣乃行”이라 하여<sup>22, 23)</sup>, 骨의 生長과 發育, 強硬과 衰弱은 腎氣의 盛衰와 밀접한 관계가 있으며, 骨의 생리와 병리는 직접 腎의 주재를 받는다고 보았다. 현재는 골다공증을 腎虛, 腎陽虛, 腎陰虛, 腎陰陽兩虛, 陰陽兩虛, 寒濕侵襲, 脾虛, 腎精虧虛, 氣血兩虛, 肝鬱 등으로 나누어 대부분 腎虛에 속한다고 보아 補腎의 치료법이 주로 사용되고 있다<sup>25)</sup>.

현재 한의학계에 보고된 골다공증에 대한 연구들은 위의 내용을 근거로 하여 補腎, 強筋骨하는 약재와 처방을 주로 사용한 것이 많다. 예를 들면 녹용·자하거·속단·두

충·인삼·홍화자·골쇄보·우슬 등의 단일 한약재와 독활기생탕, 육미지황환, 가미좌귀음, 삼기음가미방 등의 한약처방 연구가 있다<sup>5, 6, 16)</sup>.

녹용(鹿茸, *Cervi Parvum Cornu*)은 대표적인 補陽, 補腎약물로 사슴과(鹿科; *Cervidae*)에 속한 척추동물인 매화록(梅花鹿, *Cervus nippon Temminck*) 또는 마록(馬鹿, *Cervus elaphus Linnaeus*) 및 同屬 近緣動物의 雄鹿 頭上의 未骨化된 帶毛茸의 幼角을 잘라 건조한 것이다. 녹용은 러시아·중국·캐나다·뉴질랜드 등지에서 서식하거나 대량 사육하며, 우리나라에서도 적은 양을 사육하는데 그 性味가 甘, 鹹, 溫, 無毒하고 肝·腎 二經으로 歸經한다<sup>4)</sup>. 《本草綱目》에 “生精補髓, 養血益陽, 強筋健骨, 治一切虛損, 耳聾, 目暗, 眩暈, 虛癩”<sup>26)</sup>라고 기재되어 있는 등 壯元陽, 補氣血, 補腎陽, 益精髓, 強筋健骨의 효능으로 腎虛陽萎, 遺精, 元氣不足, 畏寒乏力, 崩漏, 帶下, 四肢痿軟, 小兒發育不全 등의 병증을 치료하는 데 널리 사용되어 왔다<sup>4)</sup>. 녹용은 19종의 아미노산을 함유하고 있는데 그 중 glycine 양이 제일 많고 tryptophan, leucin, lysine 등이 많으며, 이외에도 lecithine, cephalin, neurophospholipid, hypoxanthine, estradiol, androgen, estrone, polyamin, polysaccharide, polypeptide, prostaglandin E(PGE) 등의 성분이 함유되어 있다<sup>27)</sup>.

녹용의 골다공증에 관한 연구를 살펴보면 난소를 절제한 흰쥐의 골다공증에 효과가 있으며<sup>5)</sup>, 파골세포의 분화 및 골 흡수를 억제한다고 보고하였다<sup>6)</sup>. 또 골다공증 외에도 류마티스 관절염, 성장촉진, 면역력 증강 등에 녹용이 효과가 있는 것으로 보고되어 있다<sup>7-9)</sup>.

부자(附子, *Aconiti Lateralis Radix Preparata*)는 미나리아재비과(毛茛科; *Ranunculaceae*)에 속한 다년생 초본인 재배종 바꽃(*Aconitum carmichaeli Debx*)의 子根을 가공한 것으로, 6월 하순부터 8월 상순에 母根과 鬚根을 제거하고 가공한다. 그 방법에 따라 鹽附子, 黑順片, 白附片으로 나누며, 중국의 四川·陝西 등지가 집산지이다. 性味는 辛, 熱, 有毒하고 腎·心·脾 三經에 작용하고 回陽救逆, 補火助陽, 溫中止痛, 逐風寒濕邪 등의 효능이 있어 大汗亡陽, 吐利厥逆, 各種 陽虛病, 寒濕痺, 陰疽 등의 병증을 치료한다. 辛熱燥烈하고 走而不守하며 純陽하는 성질이 있어 위로는 心陽을 도와 通脈하고, 가운데는 脾陽을 溫하게 하여 健運시키고, 아래로는 腎陽을 補하여 益火하며 밖으로는 衛陽을 固하여 祛寒하므로 溫裏, 扶陽, 祛寒의 要藥이 된다고 하였고, 腎陽不足으로 陽痿滑精하고 腰膝冷弱者에게 사용할 수 있다고 하였다<sup>4)</sup>. 부자는 alkaloid를 함유하며, aconitine, mesaconitine, hyaconitine이 주성분이다. Aconitine은 가수분해된 후 독성이 비교적 약한 benzoyl

aconine으로 변화하고, 지속적으로 가수분해 되면 aconine이 생성된다. 이밖에 DL-demetyl eckoclaurine(higenamine), coryneine choriol, salsolinol(SAL) 등의 활성 성분이 있다<sup>27)</sup>.

부자에 관한 연구를 살펴보면 부자와 육계를 병용 투여 시 파골세포 분화가 억제된다는 보고가 있고<sup>13)</sup>, 그 외에도 진통 및 소염작용, 관절염, 척수손상, 비만 등에 관한 연구가 보고되어 있다<sup>10-12,14)</sup>.

녹용과 부자로 구성된 처방인 용부탕(茸附湯)은 《東醫寶鑑·虛勞門》의 陽虛用藥에 나온 처방으로 氣精血虛耗, 潮熱, 盜汗을 치료한다고 하였다<sup>5)</sup>. 임상에서는 陽虛로 인한 畏寒, 手足冷, 身冷, 腹冷, 軟便, 腹痛, 惡寒, 戰慄, 淺眠 등에 사용하고 있다<sup>28)</sup>. 녹용과 부자는 골다공증에 효과가 있다는 보고가 있으며, 또한 補陽, 補腎의 대표적인 약물이므로 두 가지 약물로 혼합 구성 된 용부탕도 골다공증에 효과가 있을 것이라 추정하였다. 따라서 저자는 녹용, 부자 그리고 용부탕이 파골세포 분화에 미치는 영향을 확인하였다.

파골세포는 조혈모세포에서 유래되는 다핵형 세포이며 대식세포계의 세포로, 조골세포가 분비하는 파골세포 분화 유도인자인 RANKL에 의해 분화되어 활성화 된다. 활성화된 파골세포는 골 기질을 흡수하여 뼈의 골밀도를 감소시키고 병적인 골 소실의 주된 원인이 된다<sup>29)</sup>. RANKL은 tumor necrosis factor(TNF) 계열의 사이토카인으로, 파골세포에서 발현되는 수용체인 RANK와 결합한다. RANKL의 신호에 의해 활성화되는 RANK는 tumor necrosis factor receptor (TNFR) superfamily의 일종이다. RANK와 RANKL의 결합은 JNK, p38, ERK 등을 포함한 MAPK의 신호전달 경로를 활성화시키고, 파골세포 분화에 중요한 전사인자인 nuclear factor  $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B), c-Fos, NFATc1의 발현을 증가시켜 파골세포의 성숙을 야기한다<sup>29,30)</sup>.

M-CSF와 RANKL에 의해 분화된 성숙한 파골세포에서는 TRAP이 발현되므로, TRAP 양성세포는 파골세포로의 분화 여부를 판단하는 기준으로 이용할 수 있다. 실험 결과 녹용과 부자 단일 물 추출물은 각각 파골세포의 분화를 억제하는 효과를 보였고, 두 약물의 혼합 처방인 용부탕 물 추출물은 각각의 단일약물을 사용했을 때에 비해 상승효과를 나타냈다(Fig. 1, 2).

전사인자는 파골세포 형성에 필수적인 유전자 발현을 촉진한다. 특히, c-Fos는 RANKL 자극 후 이른 시간에 발현되는 전사인자로 c-Fos가 결핍된 세포를 이용한 파골세포 분화 연구를 통해 파골세포 분화에 c-Fos가 필수적임이 밝혀졌다<sup>31)</sup>. 이러한 c-Fos는 전사인자로서 c-Jun, JunD, Activating transcription factor(ATF) 등과 같은 전사인

자와 이형결합을 통해 전사인자 AP-1을 형성하여 NFATc1 전사인자 발현에 중요한 역할을 한다<sup>32)</sup>. NFATc1은 파골세포의 표지 유전자인 TRAP, osteoclast-associated receptor (OSCAR) 등의 발현을 촉진하는 전사인자로서, NFATc1을 과발현시킨 전구세포는 RANKL을 투여하지 않아도 파골세포로 분화된다<sup>30)</sup>. 따라서 저자는 녹용, 부자 그리고 용부탕 물 추출물에 의한 파골세포 분화 억제가 c-Fos, NFATc1의 유전자 및 단백질 발현과 관련이 있는지 확인해 보았다. 녹용과 부자 단일 물 추출물 모두 c-Fos와 NFATc1의 mRNA 발현에는 억제효과가 없었으나, NFATc1의 단백질 발현에는 억제효과를 보였다(Fig. 4, 6). 그리고 용부탕 물 추출물은 c-Fos, NFATc1의 mRNA 발현과 단백질 발현 모두를 억제함을 확인할 수 있었다(Fig. 5, 7).

RANKL는 다양한 신호전달 단백질을 활성화하여 파골세포 분화에 필수적인 유전자 발현에 필요한 전사인자 발현을 촉진한다<sup>29)</sup>. 저자는 용부탕 물 추출물이 c-Fos 발현을 억제하였기 때문에 c-Fos 발현에 중요한 신호전달 단백질 중 어느 신호 전달 경로를 저해하는지 확인하였다. p38은 특이 억제제인 SB203580을 투여한 전구세포가 파골세포로 분화가 저해된다는 연구 보고가 있고<sup>33)</sup>, p38이 결핍된 전구세포는 c-Fos 발현이 억제되어 파골세포로 분화되지 않는다는 연구결과가 있다<sup>34)</sup>. JNK는 AP-1의 구성 단백질인 c-Jun의 활성화에 중요한 역할을 한다는 보고가 있고, JNK 억제제 SP600125가 파골세포 분화를 억제 한다는 것은 잘 알려져 있다<sup>35)</sup>. 또한 I- $\kappa$ B는 NF- $\kappa$ B 억제 단백질로, NF- $\kappa$ B는 다양한 세포의 분화, 생존, 활성화에 관련되어 있다고 잘 알려져 있다<sup>36)</sup>. I- $\kappa$ B는 cytosol에서 NF- $\kappa$ B와 결합을 하지만, 다양한 사이토카인과 호르몬 등에 의해 인산화 되고 S26 proteasome에 의해 가수분해되면 NF- $\kappa$ B와의 결합이 떨어지게 된다. 그렇게 되면 NF- $\kappa$ B는 핵으로 이동하여 전사인자로서 기능을 한다<sup>37)</sup>. 본 연구에서 저자는 용부탕 물 추출물이 파골세포에 중요한 신호 전달 단백질인 AKT, p38, JNK의 인산화 억제를 확인하였고, RANKL에 의한 I- $\kappa$ B의 가수분해를 저해함을 확인하였다(Fig. 9). 그러나 녹용과 부자 단일 물 추출물은 RANKL의 신호 전달 단백질 활성화에 영향이 없었다(Fig. 8). 위의 결과로 용부탕 물 추출물이 RANKL에 의한 신호 전달 단백질인 AKT, p38, JNK의 활성을 저해하여 파골세포 분화에 중요한 전사인자 c-Fos, NFATc1의 발현을 억제하고, I- $\kappa$ B의 가수 분해를 저해하여 NF- $\kappa$ B의 활성 억제에 관여함으로써 파골세포 분화 억제를 알 수 있었다.

생체 내에서 추출물들의 효과를 확인하기 위해 LPS로 유도시킨 염증성 골 손실모델을 사용하였다. LPS는 염증 반응을 유도하는 그람음성균의 세포벽 구성성분으로 LPS의

자극은 단핵구와 대식세포에 다양한 염증 매개 물질을 분비 활성화하며, 염증성 인자들의 생산으로 pre-osteoclast fusion을 유도하고, osteoclast survival을 촉진시켜 osteoclastic bone resorption을 자극한다<sup>38)</sup>. LPS와 toll-like receptor 4(TLR4)의 결합은 NF- $\kappa$ B와 AP-1을 활성화하고, IL-1, IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$ 와 같은 염증성 사이토카인의 생성을 유도하게 된다<sup>39)</sup>. 이에 생쥐에서 LPS 유도 염증성 골 손실 모델을 이용하여 녹용, 부자, 용부탕 물 추출물의 효과를 확인하였다. 그 결과 녹용과 부자를 배합한 용부탕 물 추출물보다 부자 단일 물 추출군에서 BV/TV, trabecular thickness, trabecular separation, trabecular number 등 골관련 지표들이 정상수준으로 회복되어 유의한 효과를 보였다(Fig. 10). LPS로 유발한 염증모델에서 부자가 염증을 억제한다는 보고의 연구결과로 미루어 보아<sup>40)</sup>, 위의 결과는 부자의 항염증 관련 효능과 연결된 것이라고 생각된다. 또한 위의 결과에서는 녹용 및 용부탕 물 추출물이 유의한 효과를 보이지 않았지만, 이전 연구에서 녹용이 난소를 적출한 흰쥐 모델에서 골 소실을 억제하는 효과가 있다는 보고<sup>5)</sup>가 있고, LPS로 유도된 염증성 골 손실 마우스 모델에서도 골 손실 억제 효과가 있다고 보고<sup>6)</sup>되었으므로, 동물실험에서 녹용 및 용부탕 물 추출물의 효과에 대해서는 추가적인 연구가 필요하리라 사료된다.

이상의 연구 결과를 종합해 보면, 세포 내 실험에서 녹용과 부자 각각의 단일 추출물도 파골세포의 분화를 억제하였으나, 용부탕 물 추출물이 두 약물의 시너지 효과로 인하여 더 좋은 효과를 보였다. 용부탕 물 추출물은 파골세포 분화에 필수적인 전사인자 c-Fos, NFATc1의 발현을 억제하고, RANKL의 신호 전달 단백질 AKT, p38, JNK의 활성화와 I- $\kappa$ B의 가수 분해를 억제하는 기전을 통해 파골세포의 분화를 억제하였다. 그러나 염증성 골 손실 모델에서는 부자 단일 추출물이 더 좋은 골 손실 회복 효과를 보여 향후 관련 연구의 필요성이 제기된다. 결론적으로 골다공증의 예방과 치료제 개발 연구에 있어 용부탕이 응용 될 수 있다고 사료된다.

## V. 결 론

녹용, 부자 그리고 용부탕 물 추출물이 골다공증을 억제하는 효과가 있는지 알아보기 위해, 파골세포의 분화에 미치는 영향과 골 흡수에 대한 영향을 실험하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 녹용과 부자 그리고 용부탕 물 추출물은 RANKL에 의해 분화되는 파골세포의 형성지표인 TRAP 양성 다핵 세포 형성을 유의하게 억제하였다.
2. 녹용과 부자 단일 물 추출물 모두 RANKL 신호에 발현되면서 파골세포의 분화를 조절하는 기능을 하는 전사인자인 c-Fos와 NFATc1의 mRNA 발현을 억제하는 효과를 보이지 않았으나, 용부탕 물 추출물은 c-Fos, NFATc1의 mRNA 발현을 유의하게 억제하였다.
3. 녹용과 부자 단일 물 추출물 모두 NFATc1의 단백질 발현을 유의하게 억제하였고, 용부탕 물 추출물은 c-Fos, NFATc1의 단백질 발현을 유의하게 억제하였다.
4. 녹용과 부자 단일 물 추출물은 RANKL로 유도되는 MAPKs의 인산화 억제에 영향이 없었다. 그러나 용부탕 물 추출물은 AKT, p38, JNK의 인산화를 유의하게 억제하였고, RANKL에 의한 I- $\kappa$ B의 가수분해를 유의하게 억제하였다.
5. 세포독성검사에서 녹용, 부자, 용부탕 물 추출물은 세포독성을 나타내지 않았다.
6. LPS 유도 염증성 골 손실 마우스 모델에서 녹용과 부자를 배합한 용부탕보다 부자 단일 추출물에서 BV/TV, trabecular thickness, trabecular separation, trabecular number 등의 골 손실 지표가 유의하게 회복되었다.

이상의 결과를 종합해 보면, 세포 내 실험에서 녹용과 부자의 단일 물 추출물보다 용부탕 물 추출물이 파골세포의 분화 억제에 더욱 효과적이었으며, 염증성 골 손실 동물모델에서는 부자 단일 물 추출물만이 골 손실 회복효과가 있었다. 따라서 용부탕은 골다공증에 효과적인 예방 및 치료제로 응용될 수 있다고 사료된다.

## VI. References

1. Author Unknown, Consensus development conference: diagnosis, prophylaxis, and treatment of osteoporosis. *Am J Med*, 1993 ; 94(6) : 646-50.
2. Author Unknown, 2012 health behavior and chronic disease statistics. Chungbuk : Korea Centers for Disease Control and Prevention, Division of

- Health and Nutrition Survey. 2013 : 36.
3. Guideline Development Committee, Korean Society of Bone Metabolism. Osteoporosis diagnosis and treatment 2007. J Korean Endocr Soc. 2008 ; 23(2) : 76-108.
  4. Shin MK. Clinical traditional heralogy. Seoul : Yeong Lim's Publisher. 2002 : 204-6, 298-301.
  5. Shim SD, Ahn DK. Effects of the cerbi cornu on the aged ovariectomized rat model of postmenopausal osteoporosis. Kor J Herbology. 1999 ; 14(1) : 153-66.
  6. Ann JY, Kim JH, Ki JY, Kwak HB, Oh JM, Kim YK. Inhibitory effects of water extract of cervi parvum cornu, carthami tinctorii fructus and their combination on osteoclast differentiation and bone resorption. The Korean Journal Of Oriental Medical Prescription. 2010 ; 18(2) : 167-82.
  7. Ahn HJ, Kim KS. Inhibitory Effect of deer antler aqua-acupunture(DAA) on cathepsin S activity and rheumatoid arthritis in rats. The Acupuncture. 2003 ; 20(3) : 104-16.
  8. Lee JW, Kim DK. Analyses of the expression profiles of genes responsible for the growth of osteoblast upon velvet antlers treatment. J Korean oriental pediatrics. 2002 ; 16(1) : 39-74.
  9. Kim YW, Moon JY, Lim JK, Park WH, Park SD, Nam KS. Effects of CCP(*Cervi Cornu Parvum*) aqua-acupunture on glucocorticoid-induced immunosuppression in murine lymphocyte. The Acupuncture. 1997 ; 14(2) : 245-52.
  10. Jeong SH, Park DS. The analgesic and anti-inflammatory effect of AIPR aqua-acupunture on the arthritis induced by Freund's complete adjuvant in rats. The Acupuncture. 1997 ; 14(1) : 334-46.
  11. Kim YH, Yim YK, Lee H. The effects of herbal-acupunture with *Aconiti Iateralis Preparata* radix solution on collagen-induced arthritis. The Korean Journal of Meridian & Acupoint. 2006 ; 23(2) : 137-54.
  12. Lee GM, Kim KS, Lee KC. The effects of radix aconiti on the contraction of rat's spinal cord injury. The Acupuncture. 1999 ; 15(2) : 105-16.
  13. Jung GE, Kim JY, Kim JH, Han SY, Kim YK. Effect of co-administration of *Aconiti Lateralis Preparata* radix and *Cinnamomi* cortex on osteoclast differentiation. Kor J Herbology. 2014 ; 29(2) : 61-7.
  14. Lee GM, Kim KS, Jang JD, Kim KY. Study of Aconiti tuber on normal rats: change of body weight, transaminase. The Acupuncture. 1999 ; 16(1) : 269-82.
  15. Heo J. *Donguibogam*. Gyeongnam : Donguibogam Publisher. 2005 : 1259.
  16. Ann JY, Ki JY, Kim JH et al. A review of anti-osteoporosis effects of herbal extracts in Korean journals. The Korean Journal of Oriental Medical Prescription. 2008 ; 16(2) : 47-69.
  17. Berg C, Neumeyer K, Kirkpatrick P. Teriparatide. Nat Rev Drug Discov. 2003 ; 2(4) : 257-8
  18. Seeman E, Szmukler GI, Formica C, Tsalamandris C, Mestrovic R. Osteoporosis in anorexia nervosa: the influence of peak bone density, bone loss, oral contraceptive use, and exercise. J. Bone Miner Res. 1992 ; 7(12) : 1467-74.
  19. Christenson RH. Biochemical markers of bone metabolism: an overview. Clin Biochem. 1997 ; 30(8) : 573-93.
  20. Abrahamsen B. Bisphosphonate adverse effects, lessons from large databases. Curr Opin Rheumatol. 2010 ; 22(4) : 404-9.
  21. Shane E, Burr D, Ebeling PR et al. Atypical subtrochanteric and diaphyseal femoral fractures: report of a task force of the American Society for Bone and Mineral Research. J Bone Miner Res. 2010 ; 25 : 2267-94.
  22. Park CK. *Hwangjenaegyeong somunjuseok*. Gyeonggi : Jipmoondang. 2005 : 116, 478, 757.
  23. Hong WS. *Hwangjenaegyeong yeongchuhaeseok*. Seoul : Gomunsa. 1990 : 66, 76, 885.
  24. Lee CH, Lee IS. *Goldagongjeungui hanuihakjeok chiryo daehan munheonjeok gochal*. (The literatural study on the oriental therapy of osteoporosis). Donguihanuiyeon. 2000 ; 4(0) : 107-27.
  25. Kim JH. Reviews of recent research on the osteoporosis - is mainly dependent on the oriental medicine clinical and experimental study. The

- Acupuncture, 1998 ; 15(2) : 437-54.
26. Lee SJ. *Bonchogangmok*. Seoul : Gomunsa, 1987 : 17-20.
27. Han JH, Kim KY. *Hanbang yaklihak*(Oriental medicine pharmacology). Seoul : Euseongdang, 2004 : 271-8, 496-8.
28. Donguihakyonguso. *Saero boneun Bangyakhap-pyeon*. Gyeonggi : Dansaem, 2006 : 246-8.
29. Roodman GD. Regulation of osteoclast differentiation. *Ann NY Acad Sci*, 2006 ; 1068 : 100-9.
30. Takayanagi H. Mechanistic insight into osteoclast differentiation in osteoimmunology. *J Mol Med*, 2005 ; 83(3) : 170-9.
31. Fleischmann A, Hafezi F, Elliott C, Reme CE, Ruther U, Wagner EF. Fra-1 replaces c-Fos-dependent functions in mice. *Genes Dev*, 2000 ; 14(21) : 2695-700.
32. 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(25) : 26475-80.
33. Li X, Udagawa N, Itoh K et al. p38 MAPK-mediated signals are required for inducing osteoclast differentiation but not for osteoclast function. *Endocrinology*, 2002 ; 143(8) : 3105-13.
34. Böhm C, Hayer S, Kilian A et al. The alpha-isoform of p38 MAPK specifically regulates arthritic bone loss. *J Immunol*, 2009 ; 183(9) : 5938-47.
35. Mediero A, Perez-Aso M, Cronstein BN. Activation of adenosine A2A receptor reduces osteoclast formation via PKA- and ERK1/2-mediated suppression of NF- $\kappa$ B nuclear translocation. *Br J Pharmacol*, 2013 ; 169(6) : 1372-88.
36. Chae SW. Function and activation of NF- $\kappa$ B in immune system. *Korean J Otolaryngol*, 2005 ; 48 : 284-8.
37. Abu-Amer Y, Dowdy SF, Ross FP, Clohisy JC, Teitelbaum SL. TAT fusion proteins containing tyrosine 42-deleted IkappaBalpha arrest osteoclastogenesis. *J Biol Chem*, 2001 ; 276(32) : 30499-503.
38. Nakahara T, Uchi H, Urabe K, Chen Q, Furue M, Moroi Y. Role of c-Jun N-terminal kinase on lipopolysaccharide induced maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *Int Immunol*, 2004 ; 16(12) : 1701-9.
39. Aderem A, Ulevitch RJ. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature*, 2000 ; 406(6797) : 782-7.
40. Cho EH, Lee TH. Effects of *Coptidis rhizoma* and *Aconiti Lateralis Preparata* radix on the change of plasma corticosterone level and rectal temperature induced by LPS. *Kor J Herbology*, 2006 ; 21(2) : 77-85.