

羌活續斷湯加味方이 파골세포 분화 및 조골세포 활성화에 미치는 영향

대전대학교 한의과대학 부인과학 교실
정은혜, 유동열

ABSTRACT

Effects of *Kanghwalsokdan-tang Gamibang* Water Extract on Osteoclast Differentiation and Osteoblast Proliferation

Eun-Hye Jung, Dong-Youl Yoo
Dept. of Oriental Gynecology, College of Korean Medicine,
Daejeon University Graduate School

Objectives: This study was conducted to evaluate the effect of *Kanghwalsokdan-tang Gamibang* water extract (KSG) on osteoporosis.

Methods: RANKL-stimulated RAW 264.7 was used to evaluate inhibitory effect of KSG osteoclast differentiation and gene expression. We counted TRAP (+) multinucleated cells and measured TRAP activity and mRNA expressions of osteoclastogenesis-related genes (NFATc1, MIF, JNK1, cathepsin K, MMP-9) to figure out the effect of KSG on osteoclast. Osteoblastogenesis was also determined in rat calvarial cell. Alkaline phosphatase (ALP) activity, bone matrix protein and collagen synthesis were measured by using murine calvarial cell.

Results: KSG inhibited the differentiation of osteoclast precursor cell and expression of genes related osteoclastogenesis like NFATc1, MIF, c-fos, JNK1, Cathepsin K, MMP-9 and TRAP. KSG increased cell division and function of osteoblast separated from the skull of a rat and ALP synthesis, biosynthesis of bone matrix protein and collagen.

Conclusions: Reviewing these results, KSG has efficacy on osteoclast inhibition and osteoblast activation. After further study, KSG will be able to apply for osteoporosis treatment and prevention.

Key Words: *Kanghwalsokdan-tang Gamibang*, osteoporosis, osteoclastogenesis, osteoblastogenesis, rat calvarial cell, osteoclast, osteoblast

I. 서 론

골밀도는 뼈를 생성하는 조골세포와 골흡수를 담당하는 파골세포의 기능이 균형을 이루어 유지되고 있다¹⁾. 골다공증은 이러한 균형이 깨져 골 생성이 감소되거나 골흡수가 증가하여 골량이 감소되고 골의 미세구조가 악화되어 골절의 위험이 높아지는 상태로 대표적인 노인성 질환으로 분류되며 인구의 고령화로 인해 그 치료와 예방에 중요성이 더해지고 있다²⁾. 특히 골다공증 유병률은 여성에게 평균 50세인 폐경기 이후 4~8년간 급격히 증가하는데, 이는 에스트로겐 결핍상태로 인하여 파골세포의 분화 및 활성도가 증가되기 때문이다^{2,3)}. 그러므로 폐경기와 노년기의 골다공증의 치료와 예방에서 조골세포의 기능을 활성화 시키는 것과 파골세포의 기능을 억제 시키는 것이 중요하다고 볼 수 있다.

한의학에서 골다공증은 골의 위약한 상태를 나타내는 骨痿, 骨痺, 骨枯 등의 범주로 볼 수 있다^{4,5)}. 또한 한의학에서는 뼈는 주로腎과 연계된 것으로 보아 《素問·五藏生成論》⁶⁾에서는 “腎之合, 骨也”라고 하였으며 《素問·平人氣象論》⁶⁾에서 “臟眞下於腎, 腎藏骨髓之氣也”라고 하여 腎精이 부족하면 骨髓의 化源이 부족하여 골격을 충분히 영양하지 못해 골이 痿弱無力하게 된다고 보았다. 이와 같이 골이 위약해지는 상태인 골다공증의 주요 원인을 腎虛로 보고 있으며 변증 유형 역시 腎陰不足, 腎陽不足, 氣血兩虛, 風邪偏勝으로 분류하여 風邪偏勝을 제외하고 腎虛, 氣血虛가 주요 병인으로 여겨진다^{4,7)}.

羌活續斷湯은 《東醫寶鑑 外形編》⁸⁾에 기재된 처방으로 “治脚氣肝腎虛弱筋攣骨痛”이라 하여 肝腎의 허약으로 인한 腰膝의 痺痛을 補肝腎, 強筋骨해서 치료하는 처방으로 滋補肝腎의 효능이 腎虛가 주요병인인 골다공증에 유효할 것으로 사료된다.

羌活續斷湯의 약효에 대한 보고는 melanin 생성 억제 효과, 항비만 및 항고지혈증 효과 등이 있는 것으로 보고되었다^{9,10)}. 근골격계 관련 연구로는 근위축을 예방하고 근섬유를 재생, 증식하는 효과가 보고되었으며¹¹⁾, 난소적출 rat의 골조직 검사에서 소주골 밀도를 증가시키는 것으로 보고되었다¹²⁾.

이에 저자는 한의학적으로 補肝腎, 強筋骨하는 효과가 있고 상기 연구보고에 따라 골다공증에 유효할 것으로 사료되는 羌活續斷湯에 조골세포의 기능을 향상시키며 清熱解毒, 排膿의 효능이 있어 항염, 항산화 작용이 있는 것으로 알려진 魚腥草¹³⁻⁶⁾를 가미하여 골다공증에 대한 구체적 작용 기전을 밝히기 위해 본 연구를 시행하였다.

羌活續斷湯加味方の 골흡수 억제에 대한 효과를 알아보기 위하여 羌活續斷湯加味方 추출물을 RANKL 유도 RAW 264.7 cell에 첨가하여 TRAP 생성능을 측정하고, 관련 유전자인 NFATc1, MITF, c-FOS, JNK1, cathepsin K, MMP-9, TRAP의 발현을 측정하였다. 또한, 골 형성에 미치는 영향을 알아내기 위해 rat의 두개골 세포에서 골세포를 배양하여 조골세포의 분열능, ALP 활성, bone matrix protein 및 collagen 생성에 미치는 영향을 평가하였으며 유의한 결과를 얻었다.

II. 실험

1. 재 료

1) 약 물

羌活續斷湯加味方の 구성 약물은 《東醫寶鑑 外形編》⁸⁾의 羌活續斷湯을 기본방으로 하여 魚腥草를 가미하였다. 약재는 대전대학교 둔산한방병원에서 구입한 것을 엄선하여 사용하였다(Table 1).

Table 1. Prescription of Kanghwalsokdan-tang Gamibang

Herbs	Pharmacology name	Dose (g)
羌 活	<i>Notopterygii Rhizoma</i>	2
防 風	<i>Ledebourielae Radix</i>	2
白 芷	<i>Angelicae Dahuricae Radix</i>	2
細 辛	<i>Asari Radix</i>	2
杜 冲	<i>Eucommiae Cortex</i>	2
牛 膝	<i>Achyranthis Bidentatae Radix</i>	2
秦 芫	<i>Gentianae Macrophyllae Radix</i>	2
續 斷	<i>Phlomis Radix</i>	2
熟地黃	<i>Rehmanniae Radix Preparat</i>	2
當 歸	<i>Angelicae gigantis Radix</i>	2
人 蔘	<i>Ginseng Radix</i>	2
白芍藥	<i>Paeoniae Radix Alba</i>	2
赤茯苓	<i>Poria (Hoelen)</i>	2
肉 桂	<i>Cinnamomi Cortex</i>	2
川 芎	<i>Cnidii Rhizoma</i>	2
白 芷	<i>Angelicae Dahuricae Radix</i>	2
生 薑	<i>Zingiberis Rhizoma Crudus</i>	6
魚腥草	<i>Houttuyniae Herba</i>	10
Total		48

2) 세 포

실험에 사용된 파골세포 전구세포는 mouse myeloid 세포주인 RAW 264.7 세포(한국세포주은행, 한국)에 RANKL를 처리하여 유도된 세포 모델을 사용하였다.

3) 동 물

동물은 체중이 약 250 g 출산예정 2일 전인 임신한 Sprague-Dawley(SD) rat (대한바이오링크, 한국)을 실험실에서 출산 때까지 사육하였다. 실험에 사용한 조골세포는 생후 1일 된 rat의 두개골에서 세포를 분리하여 사용하였다.

2. 방 법

1) 한약재 추출 및 검액 제조

羌活續斷湯加味方 48 g을 분말로 만들어 증류수 1 l를 가하여 약 6시간 정도 가열한 후, 환류 추출하였다. 羌活續斷湯加味方 추출액을 여과지를 이용하여 여과하였고, evaporator(EYELA, Japan)를 이용하여 감압 농축한 후 냉동 건조하여 냉동보관 하였다. 실험 시에는 DMSO를 이용하여 배지에 羌活續斷湯加味方 추출물(이하 KSG)을 녹이고 pore size 0.45 μm의 여과지로 여과한 후 사용하였다.

2) 파골세포 형성 측정

(1) RAW 264.7 cell 배양

실험에 사용한 RAW 264.7 cell은 CO₂ 세포 배양기에서 DMEM(Dulbecco's modified eagle medium), 10% FBS(fetal bovine serum), PC-SM(penicillin-streptomycin) 배지를 통해 배양하였으며, 세포수는 96 well plate를 이용해 5×10³ cells/well로 배양하였다. 24시간 배양 후 배양액을 버리고 10% FBS, 50 ng/ml RANKL과 1 ng/ml TGFβ가 가미된 α-MEM으로 교환해 세포를 배양하였다. 배양액에 여러 농도의 KSG를 첨가해 주고 2일에 한번씩 동일한 배지로 교환하면서 6일간 배양하였다.

(2) 파골세포 형성 측정

RAW 264.7 cell에 RANKL을 가하여

파골세포로 유도한 후, 성숙 파골세포의 발현 marker인 TRAP을 염색하여 TRAP(+) 세포를 확인하였다. 분화시킨 세포를 PBS (phosphate buffer saline)로 2회 세척 후 3.7% 농도의 formaldehyde-citrate-acetone 용액으로 10분간 고정시킨 후 다시 증류수로 2회 세척하였다. NaNO₃ 용액과 2% TRAP fast garnet GBC base solution을 동일한 비율로 섞어 만든 용액과 2% tartaric acid, 4% acetic acid, 5% naphtha AS-BI phosphoric acid를 포함한 용액을 고정시킨 세포에 가하고 상온에서 약 30분 정도 방치하였다. 광학현미경으로 관찰해서 핵이 3개 이상인 TRAP(+) 다핵 세포의 수를 세어 파골세포의 생성지표로 하였다.

3) 파골세포 유전자 발현 측정

(1) 총 RNA 분리

Rat으로 부터 얻은 조직을 PBS를 넣고 균질화하고 1 ml TRIzol reagent(Invitrogen, USA)를 처리해 총 RNA를 분리하였다. 분리한 RNA 용액에 200 μ l의 chloroform: isoamylalcohol(24:1)을 첨가해 섞은 후, 14,000 rpm에서 원심 분리해 상층액 500 μ l를 분리하였다. 여기에 0.5 ml isopropyl alcohol을 첨가해 영하 20°C에서 RNA를 침전시키고 1,400 rpm으로 20분 동안 원심 분리하였다. 이후 상등액을 버리고 70% 에탄올로 세척한 다음 자연 건조시켰다. RNase free water에 RNA를 녹이고 RNase-free DNase를 첨가한 후 -70°C에서 저장하였다.

(2) cDNA 제조

대조군과 실험군에서 각각 분리된 total RNA 액 1 μ l에 oligo dT(농도 100 pmol)

1 μ l과 RNase free water 3 μ l을 넣고 혼합하고, 65°C에서 10분간 incubation하였다. Primer가 annealing 하도록 4°C에서 약 5분간 방치한 후, Reverse transcriptase buffer, dNTP(각 2.5 mM), DTT(100 nM), RNase inhibitor, Reverse transcriptase (M-MLV 200 U/ μ l)을 첨가하고 조심스럽게 혼합하였다. 이후, 42°C에서 90분간 incubation 하고 95°C에서 5분간 처리한 후에 사용하였다.

(3) Reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR)

Oligo(dT) primer(Promega, Cat.No. C1101), reaction buffer(50 mM Tris-HCl, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM DTT, pH 8.3)(Promega, Cat.No. M1705), 1 mM dNTP(Promega, Cat.No. U1515)과 200 unit M-MLV-RT(Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase)(Promega, Cat. No. M1705)를 분리한 RNA에 처리해 역전사를 수행하여 cDNA를 합성하였다. PCR은 총 용량 25 μ l에 10 \times PCR buffer, 0.2 mM dNTPs, 2 pmole의 sense와 antisense primer를 넣은 혼합액에 cDNA, 1.25 unit의 Taq polymerase(Promega, Cat.No. M8295)을 넣고 PCR을 시행했다. PCR 조건은 94°C 4분, 30 cycles의 [94°C(20초), 54°C(20초), 72°C(30초)], 72°C 10분이었다(Perkin Elmer, USA). 증폭된 PCR 산물을 2% agarose gel에 전기영동 하였고, 전기영동 후 나온 band는 Gel-Pro analyzer 3.1(Media Cybernetics, USA)을 사용하여 구했다. RT PCR에 사용한 primer는 아래와 같다(Table 2).

Table 2. Primers

Target gene	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
NFATc1	GGGTCAGTGTGACCGAAGAT	GGAAGTCAGAAGTGGGTGGA
MITF	GGAACAGCAACGAGCTAAGG	TGATGATCCGATTCACCAGA
c-Fos	CCAGTCAAGAGCATCAGCAA	AAGTAGTGCAGCCCGGAGTA
JNK1	GCCATTCTGGTAGAGGAAGTTTCTC	CGCCAGTCCAAAATCAAGAATC
Cathepsin K	AGGCGGCTATATGACCACTG	CCGAGCCAAGAGAGCATATC
MMP-9	CGTCGTGATCCCCACTTACT	AGAGTACTGCTTGCCCAGGA
TRAP	ACACAGTGATGCTGTGTGGCAACTC	CCAGAGGCTTCCACATATATGATGG

(4) Real time RT-PCR

각각의 optical tube(MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode and Optical Adhesive Films, Applied Biosystems, Cat. No. 4314320)에 3배의 SybrGreen Mix 2.5 μ l(Sigma-Aldrich, Cat. No. S9430), 앞서 합성한 cDNA 1 μ l, 10 pmol/ μ l primer pair mix 1 μ l, 각각 2.5 mM의 dNTP 2 μ l, Tag polymerase 0.3 μ l, 10 \times Tag polymerase buffer 2.5 μ l와 14.7 μ l H₂O를 넣은 후, 95 $^{\circ}$ C 5 min 1 cycle, 95 $^{\circ}$ C 30 sec, 45 $^{\circ}$ C 30 sec, 72 $^{\circ}$ C 60 sec 40 cycles, 95 $^{\circ}$ C 20 min 1 cycle로 증폭시켰다. Primer는 RT-PCR에 이용한 것을 사용하였다. PCR을 마친 다음 tube를 꺼내고 반응액의 5 μ l를 사용하여 3% agarose gel에서 PCR 특이성을 측정하였으며, ABI PRISM® 7000 Sequence Detection System(Applied Biosystems, Cat. No. 4349157)를 사용해 real time PCR 결과를 분석하였다.

4) 조골세포의 기능 측정

(1) Calvarial cell의 분리 및 배양

생후 하루된 rat의 후두부를 절개하여 calvariae를 적출하였다. Calvariae에 붙어있는 결체조직 등을 제거하고, HBSS (Hanks' balanced salt solution)를 이용해 세척했다. 적출한 calvariae를 2 ml의 collagenase, trypsin, 0.5 mM EDTA

(ethylenediaminetetraacetic acid) 용액에 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 반응시킨 후, 상등액을 취해 1,500 rpm에서 원심 분리해서 침전된 calvarial cell을 얻었다. PBS에 재현탁하고 1,500 rpm으로 원심 분리하여 washing 한 다음 이를 DMEM 배지(10% FBS, 100 IU/Penicillin, 100 μ g/ml streptomycin, 50 μ g/ml L-ascorbic acid, 10 nM dexamethasone, 10 mM β -glycerophosphate, 300 ng/ml Fungizone)에 넣어 현탁 후 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 상등액을 제거하고 남은 calvariae에 다시 효소 2 ml를 넣고, 위 반응을 수회 반복하였다. 세포 배지는 3일에 한번 씩 교환하였으며, 배양한 세포는 2주 뒤 trypsin 처리하고 세포 수를 측정한 후 실험에 사용하였다.

(2) 조골세포의 분열능 측정

Subculture를 통해 두개골세포가 1.0~3.0 \times 10⁵ cells/well이 되게 24well plate에 seeding 하였다. plate에 세포가 부착하는 것을 확인하고 24시간 후 KSG를 첨가하여 8일간 배양하였으며 배지는 2일마다 교환했다. 8일째에 collagenase, trypsin, 0.5 mM EDTA를 가해 세포를 culture plate에서 분리하였으며, isoton-II solution을 이용해 20배 희석한 다음 세포계수기(Sysmax F-820)를 이용하여 세포의 수를 측정하

였다.

(3) Alkaline phosphatase 활성 측정

ALP 활성은 ALP-K Kit를 이용해 측정하였다. Cell을 배양한 plate를 냉각된 PBS로 세척하고 cell을 scraper로 긁어내 5 mM dithiothreitol(DTT)가 함유된 PBS에 현탁하였다. 냉각상태에서 이 현탁액을 ultrasonicator로 sonication하였다. 이 현탁액을 취해 기질액과 37°C에서 15분간 반응시킨 후발색액을 넣어주었다. 10분 후 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(4) Bone matrix protein 합성 측정

PBS로 Cell을 배양한 plate를 세척한 후 cell scraper를 이용해 세포를 긁어내 5 mM dithiothreitol(DTT)가 함유된 PBS에 현탁하였다. 냉각상태에서 이 현탁액을 ultrasonicator로 sonication하였고, 현탁액을 취해 뷰렛트 시약과 37°C에서 10분간 반응시킨 후 550 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(5) Collagen 합성 측정

PBS로 cell을 배양한 plate를 세척한 후 cell scraper를 이용하여 세포를 긁어내었다. 5,000 rpm으로 15분간 원심 분리하고 PBS로 현탁하고, 0.3% collagenase를 넣은 후 37°C에서 2시간 동안 배양하였다. 또한 11.14 N HCl을 첨가하여 100°C에서 24시간 동안 가수분해한 후 11.14 N HCl을 넣었다. Isopropanol을 넣고 oxidant solution을 첨가한 다음 상온에서 4분 동안 두었다. 이후 Ehrlich's reagent solution을 첨가한 후 60°C에서 25분간 heating한 다음 2-3분간 cooling하였으며, 17시간 후에 550 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3. 통계 처리

모든 실험 결과는 SPSS for windows

(Release 14.0K, SPSS inc, USA)를 이용해 분석하였고, 분석결과는 평균±표준편차로 나타내었다. 실험 결과에 대한 유의성 검증은 student's t-test를 이용하였으며 P-value가 $p < 0.05$ 이하인 경우 통계적 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

III. 결 과

1. 파골세포 분화 및 유전자 발현에 미치는 영향

1) 파골세포 형성에 미치는 영향

파골세포로 분화한 TRAP-positive 다핵세포 수를 측정한 결과 10 $\mu\text{g/ml}$ 농도군은 대조군에 비해 약 18% 감소하였고, 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도군은 대조군에 비해 약 42% 유의하게 ($p < 0.05$) 감소하였다. 또한, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도군과 200 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도군에서도 대조군에 비해 TRAP-positive 다핵세포 수가 약 66%, 76% 유의하게 ($p < 0.01$) 감소하였다(Fig. 1).

2) 세포 생존율에 미치는 영향

세포 생존율을 MTT assay로 평가한 결과, KSG는 실험에 사용한 모든 농도군에서 정상군과 비교하였을 때 세포 생존율에 영향을 주지 않았다(Fig. 2).

3) NFATc1 발현에 미치는 영향

KSG가 NFATc1의 발현에 미치는 영향을 측정한 결과, KSG는 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도군은 대조군에 비해 NFATc1 발현을 유의하게 ($p < 0.05$) 억제하였으며, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도군은 대조군에 비해 RANKL 처리 파골세포 분화과정에서 증가한 NFATc1 발현을 유의성 있게 ($p < 0.01$) 억제하였다(Fig. 3).

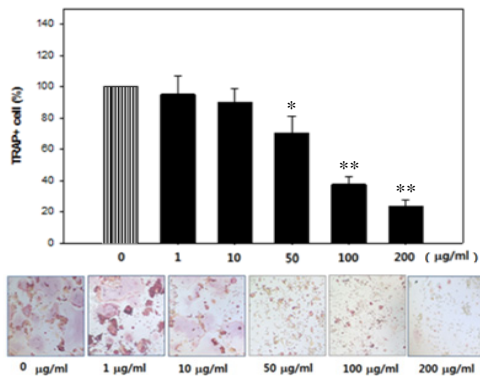


Fig. 1. Effects of KSG on the formation of TRAP (+) MNCs in RANKL stimulated osteoclast.

0 µg/ml (Control) : RANKL (50 ng/ml)
 1 µg/ml : RANKL (50 ng/ml)+1 µg/ml of KSG
 10 µg/ml : RANKL (50 ng/ml)+10 µg/ml of KSG
 50 µg/ml : RANKL (50 ng/ml)+50 µg/ml of KSG
 100 µg/ml : RANKL (50 ng/ml)+100 µg/ml of KSG
 200 µg/ml : RANKL (50 ng/ml)+200 µg/ml of KSG

Each bar represents Mean±SD of 5 tests.

* : p<0.05 vs Control

** : p<0.01 vs Control

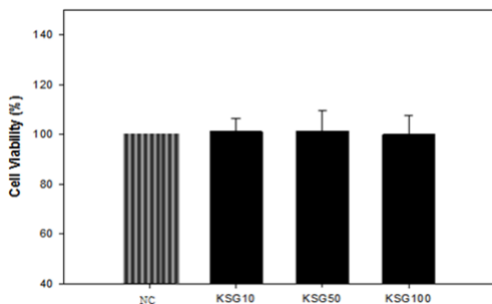


Fig. 2. Effects of KSG on cell viability of raw 264.7 cells.

Normal control : vehicle

KSG10 : 10 µg/ml of KSG

KSG50 : 50 µg/ml of KSG

KSG100: 100 µg/ml of KSG

Each bar represents Mean±SD of 5 tests.

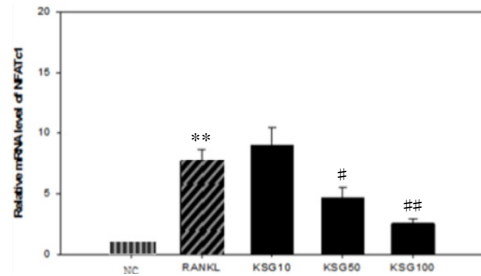


Fig. 3. Effects of KSG on the expression of NFATc1 in RANKL stimulated osteoclast.

Normal control : vehicle

Control : 50 ng/ml of RANKL

KSG10 : RANKL (50 ng/ml)+10 µg/ml of KSG

KSG50 : RANKL (50 ng/ml)+50 µg/ml of KSG

KSG100 : RANKL (50 ng/ml)+100 µg/ml of KSG

Each bar represents Mean±SD of 5 tests.

** : p<0.01 vs NC

: p<0.05 vs RANKL

: p<0.01 vs RANKL

4) MITF 발현에 미치는 영향

KSG가 MITF의 발현에 미치는 영향을 측정 한 결과, RANKL 처리시 MITF 발현이 증가되었으며, KSG 100 µg/ml 농도군은 대조군에 비해 MITF 발현을 유의하게 (p<0.05) 억제하였다(Fig. 4).

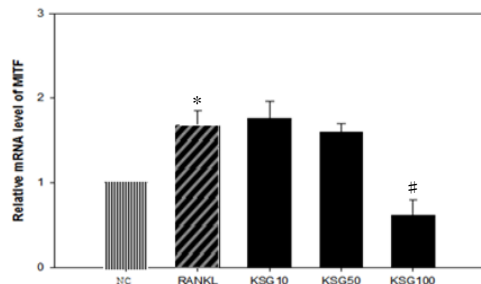


Fig. 4. Effects of KSG on the expression of MITF in RANKL stimulated osteoclast.

Normal control : vehicle

Control : 50 ng/ml of RANKL

KSG10 : RANKL (50 ng/ml)+10 µg/ml of KSG

KSG50 : RANKL (50 ng/ml)+50 µg/ml of KSG

KSG100 : RANKL (50 ng/ml)+100 µg/ml of KSG

Each bar represents Mean±SD of 5 tests.

* : p<0.05 vs NC

: p<0.05 vs RANKL

5) c-Fos 발현에 미치는 영향

KSG가 c-Fos의 발현에 미치는 영향을 측정 한 결과, RANKL 처리시 c-Fos 발현이 정상 대조군에 비해 유의하게 ($p < 0.01$) 증가하였으며, KSG 처리시 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도군에서 대조군에 비해 c-Fos 발현이 유의하게 ($p < 0.05$) 억제되었으며, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도군은 대조군에 비해 c-Fos 발현이 유의하게 ($p < 0.01$) 억제되었다(Fig. 5).

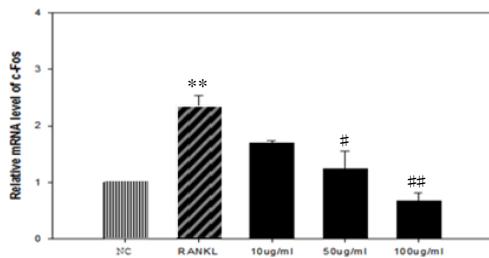


Fig. 5. Effects of KSG on the expression of c-Fos in RANKL stimulated osteoclast.

Normal control : vehicle
 Control : 50 ng/ml of RANKL
 KSG10 : RANKL (50 ng/ml)+10 $\mu\text{g/ml}$ of KSG
 KSG50 : RANKL (50 ng/ml)+50 $\mu\text{g/ml}$ of KSG
 KSG100: RANKL (50 ng/ml)+100 $\mu\text{g/ml}$ of KSG

Each bar represents Mean \pm SD of 5 tests.

** : $p < 0.01$ vs NC

: $p < 0.05$ vs RANKL

: $p < 0.01$ vs RANKL

6) JNK1 발현에 미치는 영향

실험 결과 RANKL 처리 시 JNK1 발현이 유의성 있게 ($p < 0.05$) 증가하였다. KSG 10 $\mu\text{g/ml}$ 농도군과 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도군에서는 JNK1 발현이 유의하게 ($p < 0.05$) 억제되었으며, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도군에서도 대조군에 비해 JNK1 발현이 유의하게 ($p < 0.01$) 억제되었다(Fig. 6).

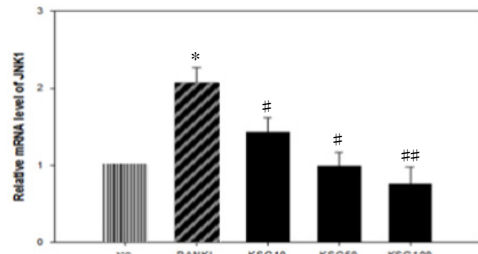


Fig. 6. Effects of KSG on the expression of JNK1 in RANKL osteoclast.

Normal control : vehicle

Control : 50 ng/ml of RANKL

KSG10 : RANKL (50 ng/ml)+10 $\mu\text{g/ml}$ of KSG

KSG50 : RANKL (50 ng/ml)+50 $\mu\text{g/ml}$ of KSG

KSG100: RANKL (50 ng/ml)+100 $\mu\text{g/ml}$ of KSG

Each bar represents Mean \pm SD of 5 tests.

* : $p < 0.05$ vs NC

: $p < 0.05$ vs RANKL

: $p < 0.01$ vs RANKL

7) Cathepsin K 발현에 미치는 영향

KSG가 cathepsin K의 발현에 미치는 영향을 측정 한 결과, KSG는 10 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도군 모두 대조군에 비해 cathepsin K 유전자 발현을 유의하게 ($p < 0.01$) 억제하였다(Fig. 7).

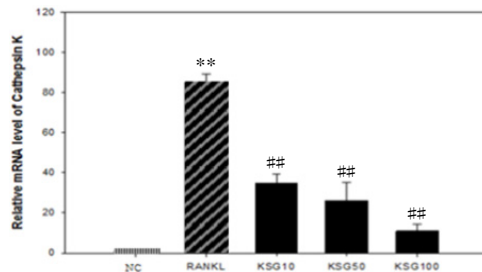


Fig. 7. Effects of KSG on the expression of Cathepsin K in RANKL stimulated osteoclast.

Normal control : vehicle

Control : 50 ng/ml of RANKL

KSG10 : RANKL (50 ng/ml)+10 $\mu\text{g/ml}$ of KSG

KSG50 : RANKL (50 ng/ml)+50 $\mu\text{g/ml}$ of KSG

KSG100 : RANKL (50 ng/ml)+100 $\mu\text{g/ml}$ of KSG

Each bar represents Mean \pm SD of 5 tests.

** : $p < 0.01$ vs NC

: $p < 0.01$ vs RANKL

8) MMP-9 발현에 미치는 영향

KSG를 처리한 파골세포로부터 MMP-9 활성을 측정된 결과, KSG는 10 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml 농도군 모두 대조군에 비해 RANKL 처리 파골세포에서 증가한 MMP-9 발현을 유의하게(p<0.01) 억제하였다(Fig. 8).

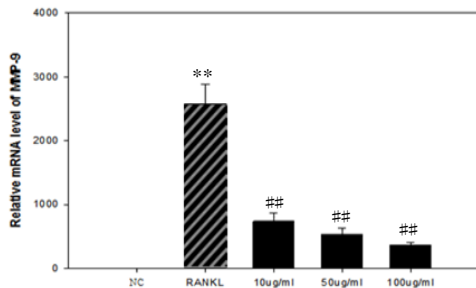


Fig. 8. Effects of KSG on the expression of MMP-9 in RANKL stimulated osteoclast. Normal control : vehicle
Control : 50 ng/ml of RANKL
KSG10 : RANKL (50 ng/ml)+10 µg/ml of KSG
KSG50 : RANKL (50 ng/ml)+50 µg/ml of KSG
KSG100 : RANKL (50 ng/ml)+100 µg/ml of KSG
Each bar represents Mean±SD of 5 tests.
** : p<0.01 vs NC
: p<0.01 vs RANKL

9) TRAP 발현에 미치는 영향

실험 결과, KSG는 10 µg/ml 농도군에서는 대조군에 비해 TRAP유전자 발현을 억제하였으나 유의성이 없었고, KSG 50 µg/ml, 100 µg/ml 농도군 모두 대조군에 비해 RANKL 처리로 증가된 TRAP 유전자 발현을 유의하게(p<0.01) 억제하였다(Fig. 9).

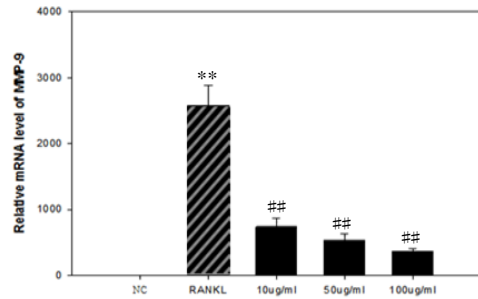


Fig. 9. Effects of KSG on the expression of TRAP in RANKL stimulated osteoclast. Normal control : vehicle
Control : 50 ng/ml of RANKL
KSG10 : RANKL (50 ng/ml)+10 µg/ml of KSG
KSG50 : RANKL (50 ng/ml)+50 µg/ml of KSG
KSG100 : RANKL (50 ng/ml)+100 µg/ml of KSG
Each bar represents Mean±SD of 5 tests.
** : p<0.01 vs NC
: p<0.01 vs RANKL

2. 조골세포 기능에 미치는 영향

Rat 태자의 두개골에서 분리한 조골세포를 8일간 배양하여, 조골세포 분열능을 측정된 결과 정상 대조군(NC)은 4.5×10^5 cells/well이었고, 1 µg/ml의 KSG를 처리한 경우에는 5.1×10^5 cells/well로 정상대조군에 비해 조골세포 분열능이 증가하였으나 유의성이 없었고, 10 µg/ml의 KSG를 처리한 경우에는 6.2×10^5 cells/well로서 정상 대조군에 비해 조골세포 분열능이 유의성 있게(p<0.05) 증가하였다.

ALP 활성을 측정된 결과, 정상 대조군의 ALP 활성은 9.7 unit/ml이었으며, 1 µg/ml의 KSG를 처리한 경우에는 14.5 unit/ml로 정상 대조군에 비해 ALP 활성이 증가하였으나 유의성이 없었고, 10 µg/ml의 KSG를 처리한 경우에는 14.8 unit/ml로서 정상 대조군에 비해 ALP 활성이 유의하게(p<0.05) 증가하였다.

BMP를 측정된 결과 정상 대조군의 BMP는 3.23 g/dl이었고, 1 µg/ml의 KSG

를 처리한 경우에는 3.4 g/dl이었으며, 10 µg/ml의 KSG를 처리한 경우에는 3.7 g/dl로서 정상 대조군에 비해 BMP 합성량이 유의하게 ($p < 0.05$) 증가하였다.

Collagen 합성량을 측정한 결과, 정상 대조군의 collagen 생합성량은 136 µg/well

이었고, 1 µg/ml의 KSG를 처리한 경우에는 147 µg/well이었으며, 10 µg/ml의 KSG를 처리한 경우에는 165 µg/well로서 정상 대조군에 비해 collagen 합성이 유의성 있게 ($p < 0.05$) 증가하였다.

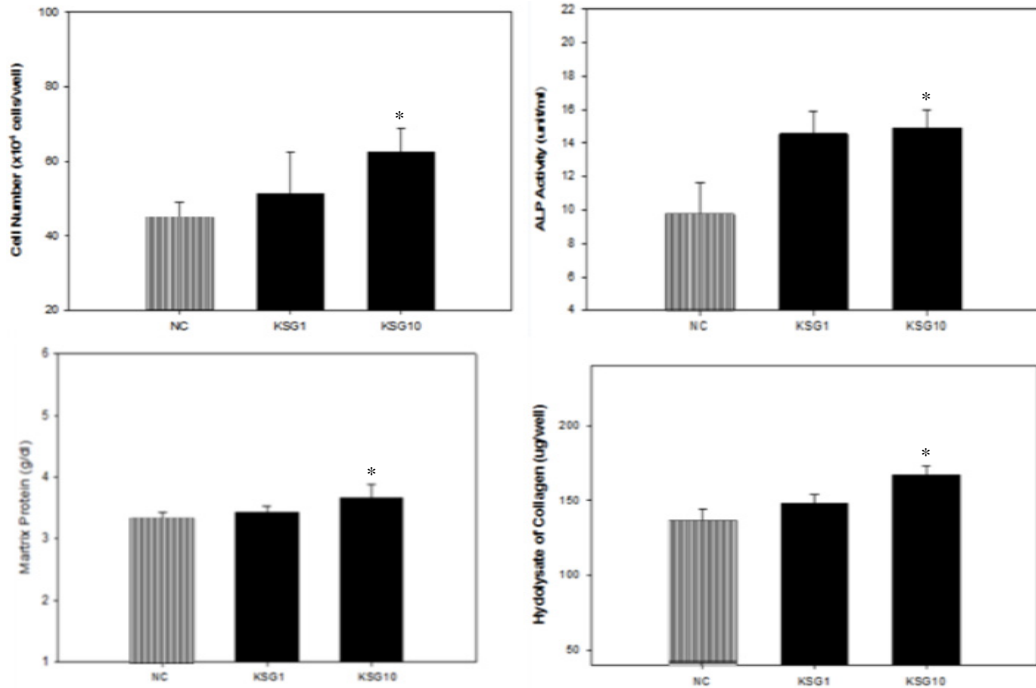


Fig. 10. Effect of KSG on cell proliferation, alkaline phosphatase activity, bone matrix protein and collagen synthesis in rat calvarial cell.

NC (normal control) : Vehicle

KSG1 : 1 µg/ml KSG

KSG10 : 10 µg/ml KSG

Each bar represents Mean±SD of 6 cultured well.

* : $p < 0.05$ vs NC

IV. 고 찰

골다공증(Osteoporosis)은 만성질환으로 세계보건기구(WHO)에서 '낮은 골밀도와 골 조직의 미세구조 약화로 인해 그 결과로 뼈가 잘 부러지는 상태가 증

가되는 전신적인 골격계 질환'으로 정의한다¹⁷⁾. '2012 국민건강영양조사'에 의하면 50세 이상 여성 34.9%, 남성 9.8%가 골다공증에 이환되어 있는 것으로 조사되었다¹⁸⁾.

골다공증은 발병원인에 따라 크게 원발성 골다공증과 속발성 골다공증으로 나

눌 수 있다¹⁹⁾. 원발성 골다공증은 전체 골다공증의 90% 정도를 차지하고, 폐경 후 골다공증과 노인성 골다공증으로 분류한다. 폐경 후 골다공증은 폐경기 이후에 감소된 에스트로겐으로 인하여 에스트로겐의 파골세포의 분화를 억제하고 자연사를 촉진하여 골흡수를 억제하며, 조골세포의 분화를 촉진하고 자연사를 억제하는 효과가 감소되어 나타난다. 노인성 골다공증은 70세 이상의 남녀 모두에서 볼 수 있으며, 연령 증가와 함께 조골세포에 의한 골 생성 능력이 저하되어 발생한다²⁰⁾. 따라서 원발성 골다공증의 치료에 있어서 조골세포의 기능을 활성화시키고 수명을 연장하거나 파골세포의 기능을 억제하고 수명을 단축시키는 것이 중요한 것으로 사료된다.

한의학에서 뼈는 《素問·五臟生成論》⁶⁾에서 “腎之合, 骨也”이라 하였고 《素問·宣明五氣論》⁶⁾에 따르면 “骨屬腎”이라고 하였으며, 《素問·逆調論》⁶⁾에서 “腎不生, 則髓不能滿, 故寒甚至骨也. 病名曰骨痺”라 하여 腎은 精을 藏하고 精은 髓를 생하며 髓는 骨을 자양한다고 하여 腎精이 부족하면 골수의 화생이 부족하여 골격을 충분히 자양하지 못해 골의 쇠약이 오는 것으로 골은 腎氣의 성쇠에 따라 결정된다고 하였다^{21,22)}. 또한 《素問·上古天真論》⁶⁾에서 남성은 “六八...天癸竭...腎氣衰, 形體皆極, 八八, 則齒髮去”이며, 여성은 “七七, 任脈虛, 太衝脈衰小, 天癸竭, 地道不通, 故形壞而無子也.”라고 하여 남성과 여성의 노화에 대하여 말하였다. 이는 腎의 소산물인 腎氣가 쇠약해지고 腎과 밀접한 天癸²³⁾가 노화와 함께 소진되며 생기는 것으로, 形體皆極, 齒髮去와 形壞는 노화와 함께 외형과 골격에

있어서의 쇠약해짐을 표현한 것이다. 이는 현대의학적으로 연령의 증가와 함께 발생하는 골격의 감소인 노인성 골다공증과 폐경후 에스트로겐 감소로 인한 폐경후 골다공증과 유사한 것으로 사료된다^{24,25)}.

羌活續斷湯은 宋代 陳自明의 《世醫得效方》²⁶⁾에 처음 소개되었으며, 補肝腎, 強筋骨의 효능이 있는 獨活寄生湯의 처방에서 桑寄生을 續斷으로, 獨活을 羌活로 代用하여 만든 變方으로, 羌活, 防風, 白芷, 細辛, 杜沖, 牛膝, 秦朮, 續斷, 熟地黃, 當歸, 人蔘, 白芍藥, 赤茯苓, 肉桂, 川芎 각 2 g, 生薑 3쪽으로 구성되어 肝腎虛弱으로 발생한 筋攣骨痛과 脚氣를 補肝腎, 強筋骨의 처방으로 치료하는 처방이다. 《東醫寶鑑 外形編》⁸⁾에는 羌活續斷湯을 “腰背痛 皆是腎氣虛弱 臥冷濕當風得之 不是速治 喜流入脚膝或爲偏枯冷痺 緩弱疼重若有腰痛攣 脚重痺 急宜服之”나 “治脚氣 肝腎虛弱 筋攣骨痛”이라 하여 肝腎虛弱이나 風寒濕 邪氣의 侵襲으로 인한 筋攣骨痛과 脚氣를 치료할 수 있다고 설명하고 있다. 각 구성 약물의 효능과 역할을 살펴보면 祛風散寒하는 羌活과 細辛은 少陰經으로 들어가 血脈을 통하게 하며, 祛風勝濕하는 防風, 散風發汗 하는 白芷, 祛風濕, 舒筋絡의 효능이 있는 秦朮는 經絡을 소통시키며 升陽하며, 強筋骨, 補肝腎하는 杜沖, 牛膝, 續斷은 健骨強筋하여 固下시키고, 川芎, 當歸, 白芍藥은 活血하며 熟地黃과 함께 補血補陰하며, 人蔘, 肉桂, 茯苓은 益氣補陽하며, 茯苓은 開胃健脾, 調中滲濕하며 生薑은 溫中散寒한다. 이로 보아 羌活續斷湯은 肝腎이 모두 虛하여 風濕이 머물러 腰膝作痛, 冷痺無力하고 骨痿하

여 屈伸이 불리한 증에 활용되어 腎虛로 인한 골다공증에 효과가 있을 것으로 생각되어 이번 연구에 사용하였다²⁷⁾. 羌活續斷湯은 補肝腎, 強筋骨의 효능으로 고원병, 류마티스성 관절염, 다발성 신경염 등에 활용되며²⁶⁾, 그와 관련된 실험결과들이 발표되었다. 김 등²⁸⁾은 羌活續斷湯이 진통, 해열작용으로 류마티스성 관절염에 유의성이 있다고 하였으며, 소 등¹¹⁾은 근축을 예방하고 근섬유의 재생과 증식에 관여한다고 발표하였다. 골다공증과 관련된 연구에서 장 등¹²⁾은 羌活續斷湯이 조골세포 활성화 및 골다공증에 유효하다고 하였으며, 이 등²⁹⁾은 조골세포의 증식능을 증가시키며 조골세포의 기능 활성화에 관련된 유전자 발현을 증가시켰음을 보고하였다.

본 연구에서는 이상의 연구 보고들로 골다공증과 관련하여 유효할 것으로 추측되는 羌活續斷湯에 조골세포의 기능을 향상시키며 항염 효능이 있는 것으로 알려져 있는 魚腥草¹³⁻⁶⁾를 가미하여 파골세포 분화와 조골세포 활성화에 미치는 효과를 평가하였다.

羌活續斷湯加味方 추출물(이하 KSG)이 파골세포 분화에 미치는 영향을 평가하기 위해서 RAW 264.7 cell에 RANKL과 TGF β 처리하여 형성된 파골세포에 KSG를 투여하였다. RANKL은 조골세포, 골수기질세포 및 섬유아세포에서 분비되는 물질로 파골전구세포가 파골세포로 분화되는 것을 촉진하여 파골세포를 활성화 시킨다^{30,31)}. 파골세포로 분화한 TRAP-positive 다핵세포수를 대조군과 비교하였을 때 KSG 농도에 비례하여 유의성 있게 감소하였다. 따라서 KSG가 파골세포의 TRAP-positive 세포 형성을

억제하여, 파골세포로 분화하는 것을 억제하는 것으로 판단되었다.

또한 약물의 독성으로 인한 세포상해 여부를 평가하기 위해 미분화된 세포에 KSG를 첨가한 후 3일간 배양한 후 세포 생존율을 평가한 결과 세포 생존율에 영향을 주지 않았다. 따라서 羌活續斷湯加味方 추출물은 세포를 손상시키지 않으면서 파골세포의 분화를 억제하는 것으로 사료된다. 위 결과를 토대로 파골세포 분화에 관여하는 인자들의 유전자 발현을 측정하여 羌活續斷湯加味方 추출물의 구체적인 작용기전을 밝히고자 하였다.

NFATc1는 파골세포의 분화를 촉진하는 신호전달 단백질이다^{32,33)}. KSG가 신호전달 과정의 일부인 NFATc1 발현에 미치는 영향을 측정한 결과, KSG는 RANKL 처리한 파골세포의 분화과정에서 증가하는 NFATc1 발현을 유의하게 억제하였다. 10 μ g/ml 농도군에선 NFATc1의 발현이 증가하였지만, 50 μ g/ml 농도군과 100 μ g/ml 농도군에서 용량에 비례하여 유의하게 발현을 억제하는 것으로 보아 최적의 효과를 나타내는 유효 농도를 찾아내는 것이 필요할 것으로 보인다.

MITF(microphthalmia-associated transcription factor)는 멜라닌 생성세포나 파골세포 등 체내 정상유지에 필수적인 다양한 세포의 분화에 중요한 역할을 하고^{34,35)}, RANKL 자극시 MITF가 인산화되고 파골세포 분화가 촉진하는 것으로 알려져 있다. 실험 결과, RANKL 처리되어 유의하게 증가한 MITF 발현이 KSG 100 μ g/ml 농도군에서 유의하게 ($p < 0.05$) 억제되었다. KSG는 MITF 발현을 억제하여 파골세포 분화를 효과적으로 억제할 것으로 사료된다.

c-Fos는 경련, 저산소-허혈, 감각 자극 등의 외부자극에 의해 생성되며 특정 사이트에서 DNA를 결합하며 암종류에서 과발현 되는 것으로 알려져 있다^{36,37)}. 본 실험에서 RANKL 처리 시에 유의하게 증가된 c-Fos 발현이 KSG 모든 농도군에서 억제된 것으로 나타났다. 실험 결과, KSG 농도가 높아질수록 발현이 억제 되는 것을 관찰 할 수 있어 저농도보다 고농도에서 c-Fos 발현을 효과적으로 억제할 것으로 사료된다.

JNK1은 염증성 사이토카인 등에 의해 활성화되는 MAPK 계열의 단백질 키나제로 JNK1 증가시 골손실이 증가하는 것으로 알려져 있다³⁸⁾. 본 실험에선 RANKL 처리 시 JNK1 발현이 유의하게 증가하였으며, JNK1의 발현은 KSG의 농도에 비례해서 유의하게 감소하였다. 따라서 KSG는 JNK1 발현을 억제시켜 골손실량을 줄일 것으로 판단된다.

Cathepsin K는 RANKL 처리시 발현되는 단백질 분해효소로 MMP-9, TRAP 등과 같은 파골세포의 분화 및 활성화를 통해 골 리모델링과 흡수에 관여하므로 파골세포 활성 지표로 사용할 수 있다^{39,40)}. 본 연구에서는 KSG가 파골세포 활성화에 관여하는 유전자들에 미치는 영향을 평가하기 위해 cathepsin K의 발현에 미치는 영향을 평가하였다. 실험 결과, KSG가 cathepsin K의 유전자 발현을 유의하게 억제하였다. 특히 10 µg/ml의 적은 농도에서도 대조군에 비해 약 64% 발현을 억제하였으며, 100 µg/ml 농도에서는 대조군에 비해 약 88% 발현을 억제하였다. 따라서 KSG는 cathepsin K의 발현을 억제하여 파골세포의 분화 및 활성화를 억제시킬 수 있는 것으로 사료된다.

MMP-9은 파골세포에서 분비되는 단백질 파괴물질로 뼈의 기질물질인 collagen을 파괴하여 골흡수를 유발한다⁴¹⁾. 본 실험에서 KSG는 RANKL로 자극받은 파골세포로부터 유의하게 발현된 MMP-9을 유의하게 억제하였다. 따라서 KSG 추출물이 분화된 파골세포에서 MMP-9 분비를 억제시켜 골흡수를 억제할 것으로 판단된다.

TRAP은 골수에서 유래한 전구세포들이 파골세포로 분화할 때 발현되는 효소로 파골세포 표식유전자를 발현 한다. 이들 TRAP positive 세포들은 세포융합 과정을 거쳐 다핵 파골세포로 분화하며 골흡수에 기여한다^{42,43)}. 실험 결과, TRAP positive 유전자 발현은 KSG 농도에 비례하여 감소하였으며, 특히 KSG 50 µg/ml, 100 µg/ml 농도군에서 유의하게(p<0.01) 억제되었다.

이상의 결과를 바탕으로 판단하였을 때 羌活續斷湯加味方 추출물은 약물의 독성 없이 분화된 파골세포에서 RANKL 처리로 증가된 TRAP 발현을 유의하게 억제하며, NFATc1와 MTF억제제를 통해 파골세포의 분화를 억제할 것으로 보인다. 골손실에 관여하는 JNK1과 cathepsin K, MMP-9의 발현역시 유의하게 억제하여 파골세포의 활성을 억제하는 것으로 보여 골다공증 치료에 유효할 것으로 사료된다.

KSG가 조골세포 기능에 미치는 영향을 평가하기 위해서 rat 태자의 두개골에서 분리한 골세포에 KSG를 투여한 후 8일간 배양하고 관찰하였다. 그 결과 KSG는 용량에 비례하여 정상 대조군에 비해 조골세포의 수를 증가시켰다.

ALP(Alkaline phosphatase)는 조골세

포에서 분비되는 골형성 표지자로 가장 보편적으로 사용 된다⁴⁴⁾. 실험 결과, 정상 대조군에 비하여 KSG를 투여하였을 때, 두개골세포에서 ALP 활성을 유의하게 증가시켜 골재형성 활동에 도움을 줄 것으로 사료된다.

조골세포에서 합성 분비하는 BMP(bone matrix protein)은 osteocalcin, osteopontin, ALP, bone sialoprotein, EGFR, collagen 등을 합성하며 이는 조골세포의 활성화와 뼈형성시 mineral formation의 중요 기전으로 알려져 있다^{45,46)}. 실험 결과 KSG 10 µg/ml 농도군에서 두개골 세포에서 protein 및 collagen 합성을 유의하게 증가시켰다.

이상의 실험 결과를 종합 하였을 때, 羌活續斷湯加味方 추출물은 파골세포의 분화는 억제하고 조골세포의 기능을 활성화시켜 골손실을 억제하고, 골 형성을 촉진할 것으로 판단되었다.

골다공증은 가장 흔한 뼈질환으로 그 치료는 파골세포의 활성화를 막는데 초점을 둔다⁴⁷⁾. 羌活續斷湯加味方 추출물은 파골세포의 분화와 파골세포를 활성화시키는 유전자 발현을 유의하게 억제 하였으며, 동시에 조골세포의 분열능의 지표가 되는 alkaline phosphatase, bone matrix protein과 collagen 합성을 세포독성 없이 증가 시켰다.

이상의 연구결과로 보아 羌活續斷湯加味方 추출물은 골다공증 치료 및 예방에 효과가 있을 것으로 사료되며, 이를 바탕으로 향후 임상시험을 통해 안전하고 효과적인 골다공증 치료와 예방에 기여할 것으로 사료된다.

V. 결 론

본 연구에서는, 羌活續斷湯加味方 추출물(KSG)이 골다공증 억제 및 치료 효과를 가지는지를 알아보기 위하여 파골세포와 조골세포의 발현과 활성화에 미치는 영향을 실험해 다음의 결과를 얻었다.

1. KSG는 세포독성 없이 RANKL에 의해 분화 유도된 파골세포의 형성지표인 TRAP(+) 다핵세포 형성을 유의하게 억제하였다.
2. KSG는 분화된 파골세포에서 NFATc1, MITF, c-Fos, JNK1의 발현을 억제하였다
3. KSG는 분화된 파골세포에서 Cathepsin K, MMP-9, TRAP의 발현을 억제하였다.
4. KSG는 rat의 두개골 조골세포의 분열능을 증가시켰다.
5. KSG는 rat의 두개골 조골세포의 ALP 활성을 증가시켰다.
6. KSG는 rat의 두개골 조골세포의 bone matrix protein과 collagen 합성을 증가시켰다.

이상의 연구결과, KSG는 RANKL로 유도된 파골세포의 분화를 억제하고, 분화 및 활성화에 관련된 유전자 발현을 억제하였다. 또한, 조골세포의 분열과 골기질 단백질 및 콜라겐 합성을 증가시켜, 골다공증 치료와 예방에 효과적일 것으로 판단하였다.

- Received : Apr 25, 2016
- Revised : Apr 29, 2016
- Accepted : May 06, 2016

참고문헌

1. St-Arnaud R. The direct role of vitamin D on bone homeostasis. Arch Biochem Biophys. 2008;473(2):225-30.
2. The Korean association of Internal medicine. Harrison's Principles of Internal Medicine 17th edition. Seoul :MIP. 2015:2845-7, 2883-96.
3. Kang HY, et al. Incidence and mortality of hip fracture among the elderly population in South Korea: a population-based study using the national health insurance claims data. BMC Public Health. 2010;10:230.
4. The Korean academy of oriental rehabilitation medicine. The Oriental rehabilitation medicine. Seoul:Koonja publisher. 2005:155-9.
5. Kang SK, Park YB, Ahn HS. The bibliographical studies on the acupuncture treatment of the osteoporosis. The acupuncture. 1995;15(2):171-89.
6. Jeon JM annotation. 黃帝內經 素問. Seoul:Hakmin. 2015:20, 70, 106, 188.
7. Kim MB, Kim SS, Chung SH. A Literature Review of Herbal Medicines on Osteoporosis Studies - Reviewing Articles Published after Year 2000. Journal of oriental rehabilitation medicine. 2010;20(1):91-107.
8. 許浚 東醫寶鑑. Seoul:Yeogang. 2005:1095.
9. Yang SK. Effect of Kanghwalsokdintang (KS) on melanin synthesis and gene expression in B16F10. Gachon university Graduate school. 2008.
10. Sun SH, Ko SG, Jeong YS. Effects of KanghwalSokdintang(KS) on LDL Oxidation in Macrophage Cell. Korean J Orient Int Med. 2003;23(2):203-12.
11. Soh KS, et al. The Effect of KangwhalSokdintang, (Jianghuoxuduan-tang) Administration on Muscle Regeneration in Atrophied Rat Muscle Induced by Hindlimb Suspension. Journal of oriental rehabilitation medicine. 2009;19(4):19-35.
12. Jang DS, Kim KH. The Effects of Kamipalmijiwhangtang and Kamigangwhalsokdintang on Osteoporosis in Ovariectomized Rats. Kor J Oriental Preventive Medical society. 1999;3(1):1-33.
13. Song KC, Hwang GS. Effects of Houytnia cordata on Bone Marrow Stromal Cell and Osteoporetic Rat. Kor J Oriental Preventive Medical society. 2009;13(2):103-13.
14. Lee JY, Lee YJ, Park WS. Anti-inflammatory Effects of Fermented Houttuyniae Herba Water Extract on LPS-induced Mouse Macrophage. Kor J Herbology. 2010;25(3):27-34.
15. Lee HJ, Kim KJ. The Effects of Houttuyniae Herba on the Mast Cell-mediated Inflammatory Responses. Journal of Korean Oriental medical Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology. 2009;22(2):60-73.
16. An DK. Illustrated book of Korean

- medicinal health. Seoul:Kyohaksa. 2016:110.
17. Organization WH. Prevention and management of osteoporosis. World Health Organ Tech Rep Ser. 2003; 921(1):1-164.
 18. Centers for Disease control and prevention. Health Behavior and Chronic Disease Statistics 2012. National research Institute of Health. 2013:35-6.
 19. Futoshi Shintani. Steps to internal medicine part 9. Seoul:Jungdam. 2008 :151-2.
 20. The Korean Society of Bone Metabolism. Osteoporosis 4th edition. Seoul:Koonja publisher. 2013:113-4.
 21. Kim HJ, Lee TK. Literature review of postmenopausal osteoporosis. Journal of Oriental Gynecology. 1998;11(1) :131-48.
 22. Lee ES, Kim HK. A study about the East-West Medicinal Clinical report of osteoporosis. Journal of oriental rehabilitation medicine. 1997; 7(1):437-56.
 23. Korean oriental society of obstetrics and gynecology. Oriental Obstetrics and Gynecology fol.2. Seoul:Euseongdang. 2012:173, 200.
 24. Academy of Internal medicine of Seoul university. Textbook of Internal Medicine. Seoul:Korea. 2004:1793-801.
 25. Jung SP. Diagnosis and treatment of geriatric osteoporosis. Korean journal of family medicine. 1998;19(11):1117-24.
 26. 東醫科學院. 東醫處方大全(2). Seoul: 麗江出版社. 1993:767-8.
 27. Oriental medicine textbooks compiled by the national joint council. Herbology. Seoul:Younglim Inc. 2010:159, 161, 163, 168, 308, 345, 375, 378, 447, 466, 573, 603, 605, 630, 633, 635.
 28. Kim GC, Lee MJ. The Effects of Kanghwalsokdan-tang(Qianghuoxuduan-tang) in Adjuvant-Induced Arthritic Animals. Journal of oriental rehabilitation medicine. 2004;14(1):1-18.
 29. Lee TJ. Effects of Kangwhal-Sokdintang Extract on Osteoblast Function. Kor J Oriental Preventive Medical society. 2004;8(2):13-30.
 30. Hanada R, et al. RANKL/RANK-beyond bones. J Mol Med(Berl). 2011;89(7):647-56.
 31. Wada T, et al. RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease. Trends Mol Med. 2006;12(1):17-25.
 32. Horsley V, Pavlath GK. NFAT : ubiquitous regulator of cell differentiation and adaptation. J Cell Biol. 2002; 156(5):771-4.
 33. Rao A, Luo C, Hogan PG. Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. Annu Rev Immunol. 1997;15:707-47.
 34. Hershey CL, Fisher DE. MITF and TFE3: members of a b-HLH-ZIP transcription factor family essential for osteoclast development and function. Bone. 2004;34(4):689-96.
 35. Moore KJ. Insight into the microphthalmia gene. Trends Genet. 1995;11(11):442-8.
 36. Rivera VM, Greenberg ME. Growth

- factor-induced gene expression : The ups and downs of c-Fos regulation. *New Biol.* 1990;2:751-8.
37. Chiu R, et al. The c-Fos protein interacts with c-Jun/AP-1 to stimulate transcription of AP-1 responsive genes. *Cell.* 1998;54(4):541-52.
38. Oltmanns U, et al. Role of c-jun N-terminal kinase in the induced release of GM-CSF, RANTES and IL-8 from human airway smooth muscle cells. *Br. J. Pharmacol.* 2003; 139(6):1228-34.
39. Manhui Pang, et al. Troen : AP-1 stimulates the cathepsin K promoter in RAW 264.7 cells. *Gene.* 2007; 403(1-2):151-8.
40. Inaoka T, et al. Molecular cloning of human cDNA for cathepsin K : novel cysteine proteinase predominantly expressed in bone. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995;206(1):89-96.
41. Nagase H, Woessner JF. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem.* 1999;274(31):21491-4.
42. Minkin C. Bone acid phosphatase : tartrate-resistant acid phosphatase as a marker of osteoclast function. *Calcif Tissue Int.* 1982;34(3):285-90.
43. Angel NZ, et al. Transgenic mice overexpressing tartrate-resistant acid phosphatase exhibit an increased rate of bone turnover. *J Bone Miner Res.* 2000;15(1):103-10.
44. Sabokbar A, et al. A rapid, quantitative assay for measuring alkaline phosphatase activity in osteoblastic cells in vitro. *Bone Miner.* 1994;27(1):57-67.
45. Marian F. Young. Bone matrix proteins: their function, regulation, and relationship to osteoporosis. *Osteoporosis Int.* 2003; 14(3):35-42.
46. Ivan W, et al. Effects of osteogenic protein-1 (OP-1, BMP-7) on bone matrix protein expression by fetal rat calvarial cells are differentiation stage specific. *Journal of Cellular Physiology.* 1996;169(1):115-25.
47. Jung HY. Osteoporosis Diagnosis and Treatment 2007. *Endocrinology and Metabolism.* 2008;23(2):76-108.