International Journal of Oral Biology, Vol. 32, No. 1, March 31 2007, p. 23~34
Copyright (c) 2007, *The Korean Academy of Oral Biology*

International Journal of Oral Biology

OPB, a water extract from *Rehmannia glutinosa* Libosch and *Eleutherococcus senticosus Max*, inhibits osteoclast differentiation and function

Jung-Keun Kim[1], Se-Won Kim[1,4], Hae-Young Kim[2], Byung-Eui Lee[3], and Seon-Yle Ko*[1,5]

[1]*Department of Pharmacology and Mechanism, Research Institute, Oscotec Inc.*
[2]*Department of Pharmacokinetics, Research Institute, Oscotec Inc.*
[3]*Department of Herbal medicine, Research Institute, Oscotec Inc.*
[4]*Department of Dental Pharmacology, School of Dentistry, Dankook University*
[5]*Department of Oral Biochemistry, School of Dentistry, Dankook University*

(Received January 11, 2007 ; Accepted February 20, 2007)

We performed the present study to investigate whether *Rehmannia glutinosa* Libosch (RG) extracts (RGX) and *Eleutherococcus senticosus Max* (ES) extracts (ESX) play any roles in bone metabolism. We examined cellular activities of bone cells by measurement of osteoblastic cell viability, osteoprotegerin (OPG) secretion from osteoblasts, osteoclastogenesis, and osteoclastic activity. There is no cytotoxicity from osteoblasts after treatment with RGX and ESX. The secretion of OPG from the osteoblasts showed marked increases after treatment with RGX and ESX. In addition, RGX and ESX treatment decreased the number of tartrate-resistant acid phosphatase-positive multinucleated cells and the resorption areas. RGX and ESX, when mixed at optimal ratios, induced synergic effects, *in vitro*. OPB, which showed synergic effects, is the extract of natural ingredients RG and ES mixed at a raw material weight ratio of 4 : 1. It can be suspected that extracts of RG and ES mixtures contains active ingredients involved in bone tissue metabolism and may be effective in improving osteoporosis.

key words: *Rehmannia glutinosa* Libosch, *Eleutherococcus senticosus Max*, bone metabolism, Osteoporosis

*Corresponding author: Seon-Yle Ko, PhD, Oscotec Inc. 2-17, Omok-ri, Seonggeo-eup, Cheonan, Choongnam, 330-831, Korea. Dept. of Oral Biochemistry, School of Dentistry, Dankook University, San 29-1, Anseo-dong, Cheonan, Choongnam, 330-716, Korea. Tel.:+82-41-555-7666: Fax.:+82-41-555-7668; E-mail: esther@oscotec.com

서 론

골조직은 골량 (bone mass) 및 골격의 항상성 (skeletal homeostasis)을 유지하기 위해 흡수와 형성이 끊임없이 일어나는 동적인 조직이다. 이러한 뼈의 재형성 (bone remodeling)에는 두 종류의 특수한 기능을 하는 세포가 관여한다. 파골세포는 뼈를 흡수하는 반면, 조골세포는 뼈 기질을 합성하고, 채우는 역할을 한다. 따라서 골량은 이러한 세포의 상대적인 기능에 의존하게 된다. 골조직은 성장기에는 형성되는 양이 점차 증가하여 30대 초반에 골량이 최고치에 이르다가 그 이후에는 뼈의 형성과 소실이 비슷한 정도로 균형을 이루어 전반적인 골량이 일정하게 유지되나, 40대 이후에는 뼈의 소실이 점차 증가하여 골량이 감소하게 된다. 즉 정상 성인에서는 골흡수량과 골형성 양 사이에는 항상 균형이 유지되고 있다. 골개조는 일정한 주기를 통해 일어나며 국소적으로 좁은 부위에서 일어남으로써 골격계의 구조가 유지되는데 이러한 골격계의 구조와 기능은 전신적인 호르몬과 국소적인 자 사이의 복잡한 상호작용에 의해 조절된다. (Canalis, 1985; Nijweide 등, 1986; Raisz, 1988; Canalis 등, 1988). 조골세포와 파골세포 활성간의 불균형은 전체적인 뼈의 감소 (osteoporosis)나 증가 (osteosclerosis)로 인한 골격의 이상 (abnormalities)으로 나타난다.

골다공증은 폐경기 이후 여성에서 특히 빈발하며 이는 에스트로겐의 분비 감소에 의하여 현저하게 골량이 감소되는 질환이다. 골량의 감소는 개인차, 또는 다른 여러

가지 원인으로 인해 그 정도의 차이가 있지만, 병적으로 과다하게 골량이 감소하여 임정치 이하로 지하되면 작은 충격에도 쉽게 골절이 생기게 된다 (Wasnich, 1996). 골다공증은 그 증세 자체보다는 골의 약화에 따라 용이하게 초래되는 각종 골절, 특히 대퇴골 골절 또는 척추골절 등으로 장기간 활동을 제한하여 건강한 생활을 영위할 수 없고, 결과적으로 노인층 사망의 15%에 대한 원인이 되는 것으로 알려져 있다. 과도한 파골세포의 활성에 의해 유발된 골질환의 치료나 예방의 목적으로 내인성 조절인자들 이외에도 여러 물질들이 연구되고 있다. 이러한 목적으로 현재 사용되고 있는 약물들은 일정한 약리작용을 나타내고 있으나, 여러 가지 부작용과 복용상의 어려움을 갖고 있음이 알려져 있어 (Recker, 1993; Rodan, 1994; Reginster, 1995; Stock, 1996), 새로운 작용 및 약물구조를 가지면서 독성과 부작용이 적으며 골다공증의 예방 또는 치료에 효과적인 신물질의 개발이 절실히 요구되고 있다. 또한 이러한 신물질은 민간요법으로 예로부터 사용되어온 독성이 없는 천연물에서 발견될 가능성이 매우 높기 때문에 천연물로부터 신약을 창출하려는 시도가 활발히 진행되고 있다.

지황 (*Rehmannia glutinosa*)은 현삼과에 속한 약용식물의 뿌리를 쪄서 말린 것으로 한방에서 약재로 사용되고 있으며, 허리와 무릎이 시리고 아픈 증상이나 원경이상, 어지럼증 등을 치료하고 각종 만성병 중 몸이 허약하여 나타나는 내열(內熱), 인후건조(咽喉乾燥), 갈증 등의 증상에 쓰여져 왔다. 또한 지황은 약제의 가공방법에 따라 생지황, 건지황 및 숙지황으로 분류된다. 즉, 지황의 근엽과 잔뿌리를 제거하고 흙을 깨끗이 씻은 것을 생지황, 생지황을 말린 것을 건지황, 생지황을 황주 또는 백주에 넣고 구증구폭한 것을 숙지황이라 분류하며, 이때 다른 성분이 분리되어 각각 약리효과를 달리하여 사용하고 있다 (生藥學, 1998). 이전의 연구에서 지황의 주요 성분으로 β-sitosterol, stigmasterol과 campesterol등을 포함하는 phytosteol류, 당류, 아미노산, iridoid glycosides, inorganic elements, chryseoriol, luteoline, stachyose, verbascose, mannotriose, raffinose 등이 보고되어 있으며 (Chang, 1986; Tang 과 Eisenbrand, 1992; Zhao 등, 2006), 이 중 iridoid glycosides는 free radical을 제거할 수 있는 항산화 효과를 가지고 있다는 연구 결과가 있다 (Raju 등, 2004; Sridhar 등, 2004; Kim 등, 2005).

최근 연구결과 구기자와 숙지황 혼합 추출액이 간암세포의 증식억제와 세포사멸을 (apoptosis) 유도하였다고 보고되었으며 (Chao 등, 2006), 숙지황 추출물이 superoxide radical, hydroxyl radical 및 hydrogen peroxide을 포함하는 산소자유기에 대한 제거효과를 가지며, cisplatin으로 유도된 HEI-OC1 auditory cells의 세포손상을 억제함이 보고된 바 있다. (Yu 등, 2006). 또한 지황, 참마 (*Dioscorea japonica* THUNB), 산수유 (*Cornus officinalis* SIEB et. ZUCC), 청미래덩굴 (*Smilax glabra* ROXB), 모란 (*Paeonia suffruticosa* ANDR), 질경이택사 (*Alisma platago-aquatica* var. *orientale* SAMUELS)와 자하거 (*Hominis placenta*) 등의 7가지 생약제로 제조된 육미지황탕이 cyclooxygenase 발현 등을 조절함으로써 골흡수를 억제함이 보고되었다 (Jin 등, 2006).

가시오가피 (*Eleutherococcus senticosus*)는 두릅나무과 (Araliaceae)에 속하는 오가피나무 (Acanthopanas sessiliflorum Seeman) 및 그 동속 식물의 뿌리와 줄기 및 가지의 껍질을 건조한 것으로, 한방에서 약재로 사용되고 있다. 오가피는 맛이 맵고 쓰며 따뜻한 성질을 갖고 있고, 자양강장 (Awang, 1996), 강정, 진경 및 신진대사 활성작용이 있는 생약으로, 1960년대 러시아의 학자들이 자생식물인 가시오가피의 성분 및 약효 연구를 시행하여 오가피나무 및 동속 식물의 연구가 활발해졌다. 또한 연구 결과 위궤양의 억제 (Fujikawa 등, 1996), 항염작용 (Wang 등, 1992), 면역억제작용 (Wang 등, 1991; Shen 등, 1991; Shan 등, 1999) 등의 효과가 있다고 알려져 있다. 그 성분으로는 eleutherosides A-G로 동정된 화합물이 주를 이루며 (Awang, 1996), carotene, ligustrin, 7-methyl-6,8-dimethylcoumarineglycoside,galactoside, syringaresinol di-o-beta-D-glucoside 및 caryophyllenol 등 다종의 배당체와 chlorogenic acid, flavone, 정유, 다당 등을 성분으로 함유하며, eleutheroside B(syringin)와 eleutheroside E (syringaresinol di-O-β-D-glucoside; liriodendrin)가 오가피의 활성을 나타내는 성분으로 알려져 있다(Takasugi 등, 1985). 지혈압에도 효과가 있으며 사람을 흥분시키지 않기 때문에 인삼과는 달리 불면증 등의 부작용이 없다고 한다(Ben-Hur와 Fulder, 1981). 최근에는 가시오가피, Leuzea carthamoides, 홍경천 (Rhodiola rosea), 오미자 (Schizandra chinensis) 열매 등으로 제조한 혼합 추출액이 화학치료를 받는 난소암환자에서 지하된 면역계를 증대시켰다고 보고한 바 있다(Kormosh 등, 2006).

본 논문은 골흡수 억제 및 골형성 촉진 작용을 갖는 물질을 찾고자 자생식물을 검색하던 중 두 종류의 천연물 추출액의 효과를 검증하였으며, 두 종류의 천연물 추출액을 혼합하는 경우 *in vitro* 실험으로 상승효과를 나타내는지 확인하고, 적정 혼합 비율로 두 천연물을 혼합하여 추출한 후 그 효과를 재 확인하였다.

실험재료 및 방법

천연물의 추출 및 시료 조제

천연물 원자재 구입

본 연구에서는 숙지황과 가시오가피 두 종류의 천연물을 실험에 이용하였다. 실험에 사용한 숙지황은 경북 안동의 풍신제약에서 제조한 숙지황을 구입하여 지표물질인 5-

HMF (5-hydroxymethyl-2-furaldehyde) 의, 함량이 약전규격(100 mg/100 g)이상의 제품을 사용하였으며, 가시오가피는 중국 동북지역에서 자생하는 것을 동 제약회사를 통하여 절편된 것을 구입 후 사용하였다.

숙지황 추출물(RGX) 제조방법

숙지황 100 g을 2 *l*추출기에 넣고 정제수 10배수를 가하여 95~100°C에서 8시간 동안 가열 추출하였다. 상기 추출액을 suction filter를 사용하여 여과하여 진공감압 농축기로 40°C 이하에서 농축한 후 고형분 함량 69 mg/ml의 농도를 냉장보관하며 실험에 사용하였다(숙지황 추출물 5-HMF 함량 : 2.5 mg/g, 수율 45%).

가시오가피 추출물(ESX) 제조방법

가시오가피 100 g을 5 *l* 추출기에 넣고 정제수 10배수를 가하여 95~100°C 에서 8시간 동안 가열 추출하였다. 상기 추출액을 suction filter를 사용하여 여과하여 진공감압 농축기로 40°C 이하에서 용액이 약 200 ml까지 농축한 후 동결건조기를 사용하여 분말화하여 11.5 g을 얻었고(가시오가피 추출물 Eleutheroside E 함량 : 0.6 mg/g, 수율 11.5%) 냉장보관하며 이를 배양액으로 희석하여 실험에 사용하였다.

숙지황과 가시오가피 혼합추출물(OPB) 제조방법

숙지황과 가시오가피를 원재료 무게비 4 : 1(wt : wt) 비율로 200 g을 혼합하여 3 *l* 추출기에 넣고 정제수 10배수를 가하여 95~100°C에서 8시간 동안 가열 추출하였다. 상기 추출액을 suction filter를 사용하여 여과하여 진공감압 농축기로 40°C 이하에서 농축한 후 (수율 : 38.2%)을 얻어 냉장 보관하며 실험에 사용하였다.

품질관리방법(지표물질 선정 및 확인)

숙지황의 지표물질은 5–HMF이고, 가시오가피의 지표물질은 Eleutheroside E이다. 지표물질 선정사유로는 숙지황은 지황에 술을 가하여 증기로 찌어서 가공 처리한 약제로서 가공과정에서 숙지황에 5-HMF가 생성되어 이 생성된 물질의 함량으로 충분한 가공과정을 거친 지표물질이 되므로 대한약전에 숙지황의 지표물질로서 규정되어 있다. 또한 가시오가피는 Eleutheroside E가 가시오가피의 대표적인 약리성분으로서 가장 잘 알려져 있으므로 Eleutheroside E를 OPB의 원료인 가시오가피의 지표성분으로 선정하였다.

HPLC를 이용한 지표물질 확인방법으로 숙지황과 가시오가피의 HPLC 조건은 아래와 같다.

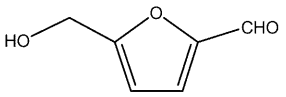
숙지황

Waters HPLC system
Column: Shim-pack VP-ODS
Mobil Phase: 5% Acetonitrile (in DDW)
Flow rate: 1.2 ml/min
Detected wave: 280 nm
Retention Time: 11 min
Standard calibration Curve: Y = 110669 X-277.61 (R^2 = 0.9999)

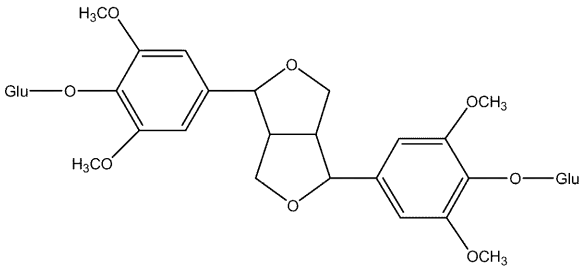
가시오가피

Waters HPLC system
Column: Discovery C-18 column
Mobil Phase: 15% Acetonitrile (in DDW)
Flow rate: 1 ml/min
Detected wave: 210 nm
Retention Time: 7 min
Standard calibration Curve: Y = 139342 X+2417.1 (R^2 = 1)
(범위 : 0.1 ug~12.5 ug/ml)

따라서 숙지황의 지표성분은 5-HMF이며, 가시오가피의 지표성분은 Eleutheroside E {(−)-Syringaresinol–4–4'–O–β–D–Diglucoside를 사용하였으며, 최종 추출물의 지표성분 함량은 각각 5–HMF 5.0 mg/g/dry weight와 Eleutheroside E 은 0.25 mg/g/dry weight 이었다. 구조는 다음과 같다.



5-HMF



Eleutheroside E

조골세포의 증식 및 활성에 미치는 영향

조골세포의 배양

천연물의 독성 및 조골세포의 증식에 미치는 영향을 평가하기 위하여 조골세포 배양을 시행하였다. 사용된 세포로는 사람 골육종에서 유래된 세포주인 MG 63 세포를 ATCC(American Type Culture Collection, Rockville, USA)에서 구입하여 사용하였으며, Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM, Gibco, USA)에 10% fetal bovine serum(FBS, Gibco, USA)을 첨가한 배지에 배양하여 사용하였다.

세포생존률의 측정

천연물의 독성을 간접적으로 평가하고, 조골세포의 증식에 미치는 천연물의 영향을 알아보기 위하여, MG63 세포를 이용하여 MTT 방법으로 세포생존율을 평가하였다. 조골세포를 96-well plate에 well당 $5x10^3$개가 되도록 분주하고 10% FBS 포함된 DMEM을 배양액으로 사용하여 48시간 배양한 후, 일정 농도 범위내로 연속적으로 희석하여 준비한 천연추출물을 첨가한 새 배양액으로 교환하였다. 시료 첨가 후 48시간 배양 된 세포에 MTT 용액을 0.5 mg/ml 첨가하였다. 염색된 정도를 550 nm에서 Elisa reader를 이용하여 측정하였다.

조골세포의 OPG 분비량 측정

조골세포로부터 OPG 분비에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 사람 골육종에서 유래된 세포주인 MG 63 세포를 10^4 cells/well 씩 96-well plate에 분주하고 10% FBS가 포함된 DMEM을 배양액을 사용하여 24시간 배양하였다. 그 후 0.5 % FBS 가 포함된 DMEM에 추출물을 여러 농도로 처리하여 24시간 배양하였다. 배양이 끝난 후 배양액의 일부를 OPG-ELISA kit (Oscotec Inc.)를 사용하여 OPG 분비량을 측정하였다. 즉 배양이 끝난 후 배양액의 일부를 DPBS로 10배 희석한 후 100 μl/well씩 OPG ELISA Plate에 넣고 상온에서 2시간 반응시키고, 0.05% Tween20/PBS로 3회 세척하였다. 1 μl/ml의 농도로 OPG selection Ab (R&D 사)를 1% BSA/PBS에 희석하여 100 μl/well씩 넣고 상온에서 2시간 반응시킨 후 0.05% Tween20/PBS로 3회 세척하였다. 그 후 streptavidin-HRP (R&D 사)를 1% BSA/PBS에 200배 희석하여 100 μl/well씩 넣고 상온에서 30분간 반응시킨 후 0.05% Tween 20/PBS로 4회 이상 세척하였다. TMS 기질용액 A와 B를 1 : 1로 혼합하여 100 μl/well씩 넣어 15분 동안 빛에 노출되지 않도록 37°C에서 반응시켰다. 1 M H_3PO_4를 50 μl/well 넣어 반응을 멈추고 ELISA-reader를 이용하여 450 nm 파장으로 흡광도를 측정하였다.

파골세포의 생성 및 활성에 미치는 영향

파골세포 전구세포의 분리 및 배양

마우스 골수세포를 분리하기 위해 마우스를 경부염전으로 희생시킨 후 대퇴골과 경골을 무균적으로 적출하고 연조직을 제거하였으며 장골의 양끝을 절단한 후 26 G 주사침을 이용하여 한쪽 끝의 골수강에 0.01% collagenase, 0.05% trypsin 및 0.5 mM EDTA가 포함된 효소 용액 1 ml를 천천히 주사하여 골수세포를 모은 후 30분간 37°C에서 교반하여 골수세포를 모아 5초간 증류수로 처리하여 적혈구를 제거한 후 40 μm nylon mesh (Cell strainer, Falcon, USA)로 여과하여 단일 세포가 되도록 분산시켰다. 10% FBS와 5 ng/ml M-CSF가 포함된 α-MEM으로 100 mm 배양접시에 6×10^6개 세포가 되도록 분주하여 24시간 전 배양한 후 미부착세포들을 모았다. 파골세포의 전구세포가 되는 미부착세포를 10% FBS, 10 ng/ml M-CSF and 1 ng/ml TGF-β가 포함된 α-MEM으로 96-well plate 및 96-well OAAS™ plate (Oscotec Inc., Korea)에서 well당 5×10^4개의 세포가 되도록 분주하여 배양하였다. 8-9일간 배양하는 동안 10 ng/ml M-CSF, 1 ng/ml TGF-β 및 50 ng/ml RANKL과 여러 농도의 추출액이 포함된 배양액으로 배양하였으며, 3일과 6일째 신선한 배양액으로 교환하였다. 배양이 끝난 후 파골세포의 생성을 검사하기 위하여 세포를 고정하여 tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) 염색을 시행하고, 파골세포의 활성을 검사하기 위하여 세포를 떼어낸 후 흡수된 부위를 관찰하였다.

파골세포의 생성측정

파골세포 전구세포의 배양이 끝난 후 인산완충 생리식염수로 세포를 세척한 다음 citrate-acetone-formaldehyde 용액으로 고정한 후 TRAP 염색을 시행하여 파골세포의 생성 정도를 평가하였다. TRAP 염색은 Sigma 사의 TRAP 염색용 kit를 구입하여 제조사의 지시에 따라 시행하였으며, 기질로 naphthol AS-BI phosphate를 이용하였고, 염색제로는 fast Garnet GBC 용액을 사용하였다. 염색이 끝난 후 광학현미경을 이용하여 핵이 3개 이상인 TRAP-양성 다핵세포를 계수하여 파골세포의 생성지표로 삼았다.

파골세포의 흡수와 관찰

파골세포의 활성을 검사하기 위하여, 배양이 끝난 후 배양액을 제거하였다. 세포배양 후 붙어있는 세포를 제거하기 위하여 OAAS™를 증류수로 세척한 후 5% sodium hypochlorite 용액을 넣어 5분간 방치하였으며 다시 증류수로 깨끗이 세척한 후 말린 다음 흡수된 부위를 현미경에 연결된 digital camera로 촬영한 후 Image pro plus (version 3.0. Media Cybernetics Inc. USA)를 이용하여 흡수와의 면적을 측정하였다.

통계처리방법

본 실험의 조골세포 및 파골세포에 미치는 영향에 대한 *in vitro* 실험의 통계처리는 Student's *t* test 방법을 사용하였으며, 값은 평균과 표준 오차로 나타내었다. 대조군에 비해 $p<0.05$및 $p<0.01$인 값을 유효성 있는 값으로 표기하였다.

결 과

숙지황 추출물 (RGX)과 가시오가피 추출물 (ESX)의 뼈관련 영향을 관찰하기 위하여 각각 단독 및 혼합하여 여러 농도로 조골세포의 세포생존률과 OPG 분비량을 측정하였고, 파골세포의 생성 및 활성을 관찰하였다. 또한 두 종류의 천연물을 혼합하는 경우 상승효과를 나타내는

지 확인하고, 상승효과를 나타내는 혼합비율로 두 천연물을 혼합하여 추출한 OPB가 각각의 혼합 비율에서 보이는 최대 활성을 가지는지 확인하였다.

RGX와 ESX 각각의 영향

조골세포의 세포생존률에 미치는 영향

사람 골육종세포에서 유래한 MG 63 세포를 사용하여 세포생존율에 미치는 영향을 관찰한 결과, RGX와 ESX 모두 세포독성을 나타내지 않았으며, RGX의 경우 2 mg/ml에서 ESX의 경우 0.5 및 1 mg/ml의 농도에서 세포생존률을 유의하게 증가시켰다 (Fig. 1).

조골세포의 OPG 분비에 미치는 영향

RGX와 ESX가 조골세포로부터 OPG 분비에 미치는 영향을 관찰한 결과, RGX와 ESX 모두 OPG 분비량을 농도의존적으로 증가시켰으며, RGX는 0.25 mg/ml 이상의 농도에서 유의성 있는 증가를 나타냈으며, ESX는 0.125 mg/ml 이상의 농도에서 유의성 있는 증가를 나타냈다(Fig. 2).

파골세포의 생성 및 활성에 미치는 영향

RGX와 ESX가 파골세포의 생성에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 파골세포 전구세포를 배양하여 M-CSF와 RANKL을 처리하여 TRAP 양성 다핵세포인 파골세포의 분화를 유도하였으며, RGX와 ESX는 각각 단독으로 TRAP 양성 다핵세포의 형성을 유의하게 감소시켰다(Fig. 3). 또한 파골세포의 활성에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 OAAS plate에서 배양한 후 세포를 제거하고 image 분석 프로그램을 이용하여 전체 흡수와 (resorption pit)를

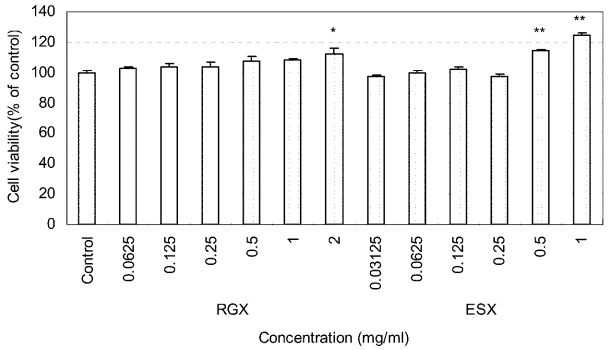


Fig. 1. Effects of RG and ES extracts on the osteoblastic cell viability. MG 63 cells were cultured in the presence or absence of RG or ES extracts for 24 hours. After removal of the media, formazan granules were solubilized, and optical density was measured with the microplate reader. Cell viability was expressed with an absorbance ratio (Absorbance of treated cells/absorbance of control cells x 100). Values are Mean ± S.E. (n = 5). * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

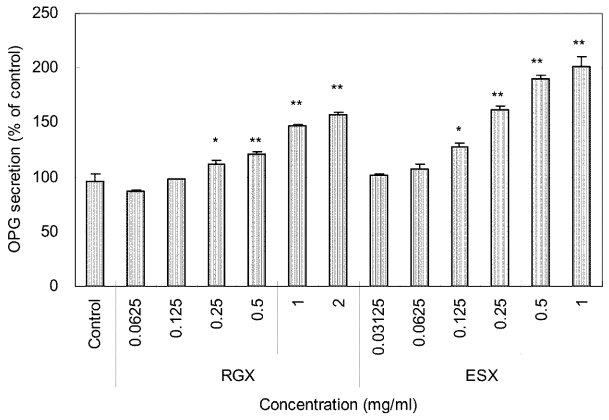


Fig. 2. Effects of RG and ES extracts on the OPG secretion from osteoblasts. MG 63 cells were cultured in the presence or absence of RG or ES extracts for 24 hours. OPG secretion into the culture medium was measured by the ELISA kit. OPG secretion was expressed with percent ratio (OPG secretion of treated/control cells x 100). Values are Mean ± S.E. (n = 5). * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

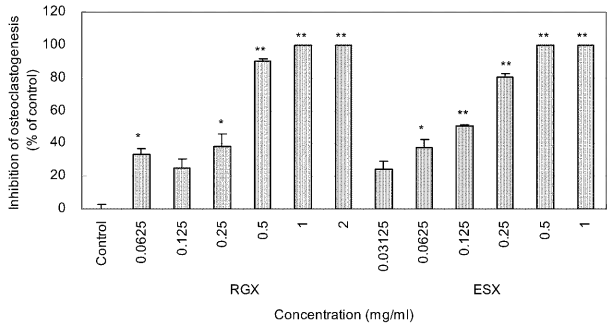


Fig. 3. Effects of RG and ES extracts on the osteoclastogenesis. The osteoclast precursor cells were plated at a density 6 x 10^4 cells/well in a 96-well plate, cultured for eight days in the presence of 10 ng/ml M-CSF, 50 ng/ml RANKL and various RG or ES extracts concentrations. After culturing, TRAP (+) multinucleated cells, containing three or more nuclei, were counted as osteoclasts. The data represent a mean ± S.E. of four experiments and are expressed as a ratio to the control. * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

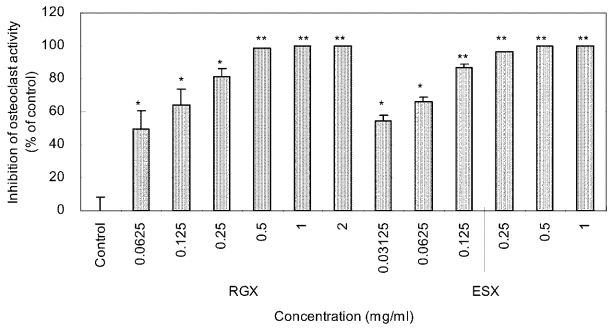


Fig. 4. Effects of RG and ES extracts on the osteoclastic activity. The osteoclast precursor cells were plated at a density 6 x 10^4 cells/well in a 96-well OAAS^{TM} plate, cultured for eight days in the presence of 10 ng/ml M-CSF, 50 ng/ml RANKL and various RG and ES extracts concentrations. After culturing, the total area of the resorption pit was measured. The data represent a mean ± S.E. of four experiments and are expressed as a ratio to the control. *$p<0.05$, ** $p<0.01$.

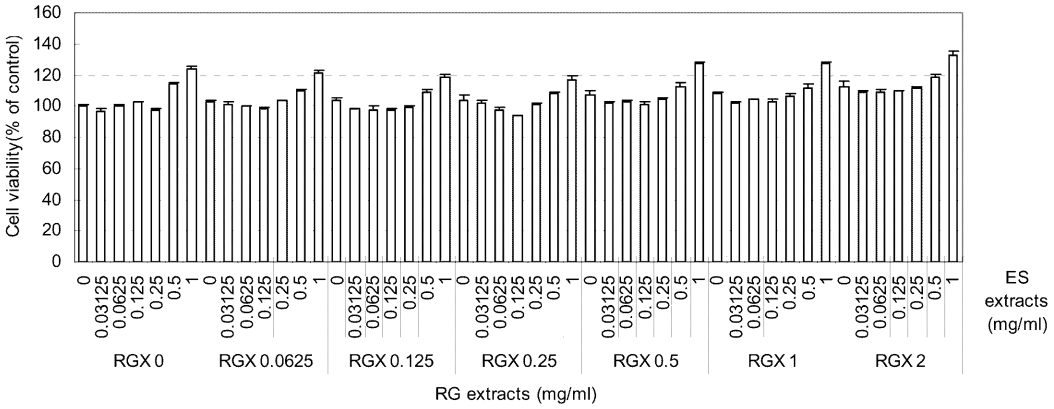


Fig. 5. Effect of RGX and ESX combination on the osteoblastic cell viability. MG 63 cells were cultured in the presence of RG and ES extracts for 24 hours. After removal of the media, formazan granules were solubilized, and optical density was measured with the microplate reader. Cell viability was expressed with an absorbance ratio (Absorbance of treated cells/absorbance of control cells x 100). Values are Mean ± S.E. (n = 5).

측정한 결과 넓은 범위의 흡수와가 관찰되었으며, RGX와 ESX 각각 단독으로 처리한 경우 흡수와의 면적이 유의하게 감소하였다(Fig. 4).

RGX와 ESX 혼합한 경우의 영향

조골세포의 세포생존률에 미치는 영향

RGX와 ESX를 여러 농도로 혼합하여 세포생존률을 측정한 결과 혼합한 경우에도 모두 세포독성을 나타내지 않았으며, 혼합으로 인하여 세포생존율을 증가시키지 않았다(Fig. 5).

조골세포의 OPG 분비에 미치는 영향

RGX와 ESX를 여러 농도로 혼합하여 조골세포로부터 OPG 분비에 상승효과를 미치는 영향을 관찰한 결과를 표와 그래프로 표시하였다. 표는 RGX와 ESX를 여러 농도로 혼합한 경우 각각의 OPG 분비 변화를 대조군에 대한 백분율로 표기한 것이며, 그래프는 RGX와 ESX를 각각 단독으로 처리한 경우의 값에서 100을 뺀 값을 막대 그래프로 표기한 후, 실제 혼합하여 나타난 값의 차이를 synergic value로 표시하였다. 즉 RGX 0.5 mg/ml과 ESX 0.03125 mg/ml를 처리하는 경우 RGX 0.5 mg/ml의 값은 156.4±3.3이고 ESX 0.03125 mg/ml의 값은 121.9±4.0이다. 이 경우 각각 단독으로 처리한 경우의 합은 178.3이다. 이 때 실제 혼합하여 나타난 값은 194.3이므로, 단독으로 처리한 경우에 비해 혼합하여 처리한 경우의 차이가 16이다. 따라서 RGX 0.5 mg/ml과 ESX 0.03125 mg/ml 또는 0.0625 mg/ml을 혼합한 경우, RGX 1 mg/ml과 ESX 0.03125 mg/ml 또는 0.0625 mg/ml을 혼합한 경우 등에서 조골세포로부터 OPG 분비에 대하여 각각 단독으로 처리한 경우에 비해 상승효과를 나타냈다 (Table 1 및 Fig. 6).

파골세포의 생성 및 활성에 미치는 영향

RGX와 ESX를 여러 농도로 혼합하여 파골세포의 생성 억제에 대한 상승 효과를 나타내는지 관찰한 결과를 표와 그래프로 표시하였다. 표는 RGX와 ESX를 여러 농도로 혼합한 경우 각각의 파골세포 생성 억제에 대한 변화를 대조군에 대한 백분율로 표기한 것이며, 그래프는 RGX와 ESX를 각각 단독으로 처리한 경우에 나타날 수 있는 억제율을 막대 그래프로 표기한 후, 실제 혼합하여 나타난 값의 차이를 synergic value로 표시하였다.

Table 1. Effects of RGX and ESX on the OPG secretion from osteoblasts.

	Conc. (mg/ml)	ESX						
		0	0.03125	0.0625	0.125	0.25	0.5	1
RGX	0	100.0 ± 2.7	121.9 ± 4.0	127.6 ± 5.4	143.8 ± 2.2	164.1 ± 0.4	181.1 ± 3.5	239.9 ± 2.5
	0.0625	128.0 ± 3.7	138.1 ± 4.4	139.2 ± 6.9	142.5 ± 3.1	172.2 ± 6.0	197.7 ± 5.2	215.6 ± 13.5
	0.125	128.2 ± 1.7	147.7 ± 0.8	153.0 ± 5.3	142.4 ± 1.9	163.6 ± 14.1	194.2 ± 2.6	233.2 ± 8.9
	0.25	145.4 ± 1.6	154.2 ± 1.6	158.7 ± 4.3	171.2 ± 7.5	178.1 ± 9.0	204.4 ± 1.5	234.8 ± 10.2
	0.5	156.4 ± 3.3	194.3 ± 5.2	192.6 ± 3.5	191.3 ± 6.8	216.8 ± 5.8	249.6 ± 8.2	289.1 ± 0.8
	1	174.2 ± 9.0	210.9 ± 3.3	209.8 ± 7.3	200.2 ± 1.9	212.6 ± 5.2	238.2 ± 4.9	288.5 ± 2.0
	2	196.6 ± 13.6	226.3 ± 7.7	199.0 ± 2.8	223.4 ± 14.4	213.6 ± 6.6	242.9 ± 5.4	267.9 ± 6.4

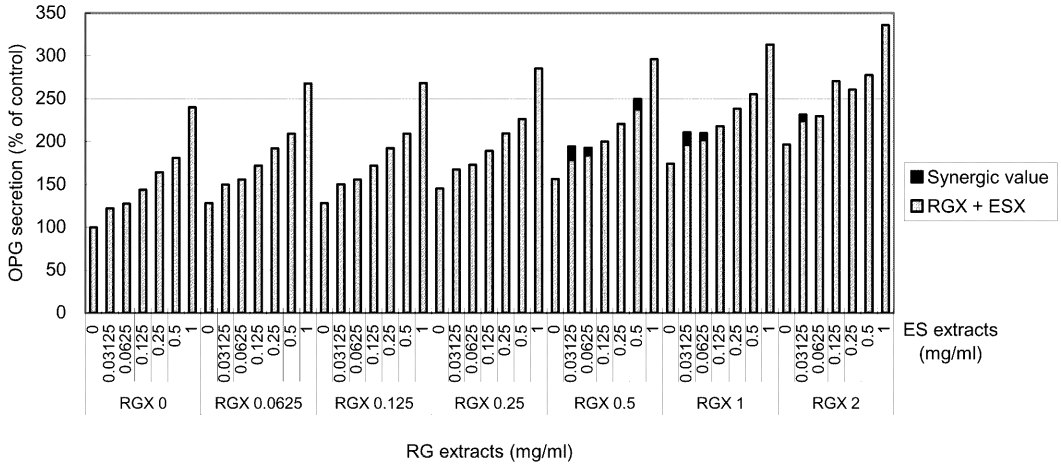


Fig. 6. Synergic effect of RGX and ESX on the OPG secretion from osteoblasts. MG 63 cells were cultured in the presence or absence of RG and ES extracts for 24 hours. OPG secretion into the culture medium was measured by the ELISA kit. OPG secretion was expressed with percent ratio (OPG secretion of treated/control cells x 100). Values are Mean ± S.E. (n = 5).

Table 2. Effect of RGX and ESX on the osteoclastogenesis from M-CSF dependent macrophage cells.

	Conc. (mg/ml)	ESX						
		0	0.015625	0.03125	0.0625	0.125	0.25	0.5
RGX	0	0.0 ± 6.2	25.8 ± 4.3	35.7 ± 2.0	30.1 ± 1.8	21.2 ± 4.3	65.1 ± 1.5	100.0 ± 0.0
	0.0625	25.8 ± 11.0	33.9 ± 3.7	31.7 ± 2.2	34.0 ± 6.5	61.7 ± 10.0	96.7 ± 0.5	100.0 ± 0.0
	0.125	21.1 ± 3.0	34.4 ± 5.6	42.6 ± 1.9	48.8 ± 1.2	72.7 ± 2.3	97.9 ± 0.4	100.0 ± 0.0
	0.25	30.5 ± 9.1	24.9 ± 7.2	44.0 ± 5.1	61.1 ± 4.5	88.6 ± 2.6	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0
	0.5	61.8 ± 6.5	70.7 ± 2.0	77.7 ± 4.3	87.8 ± 2.7	96.2 ± 1.7	99.6 ± 0.2	100.0 ± 0.0
	1	99.4 ± 0.3	99.3 ± 0.5	99.6 ± 0.2	99.6 ± 0.4	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0
	2	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0

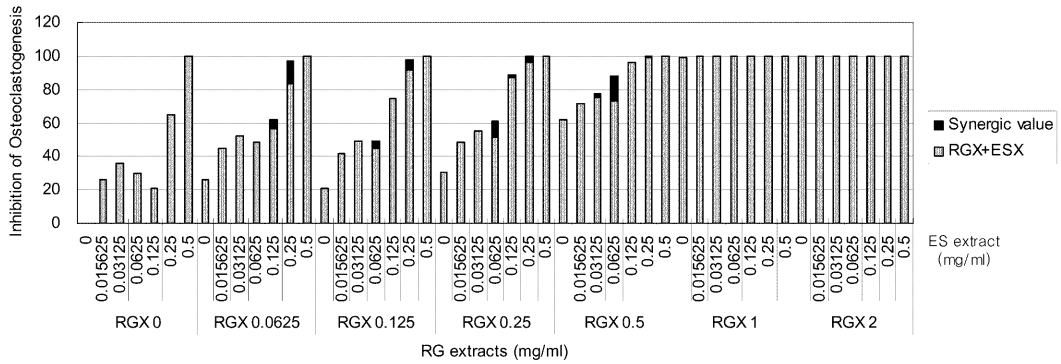


Fig. 7. Synergic effect of RGX and ESX on the osteoclastogenesis from M-CSF dependent macrophage cells. The osteoclast precursor cells were plated at a density 6 x 10^4 cells/well in a 96-well plate, cultured for eight days in the presence of 10 ng/ml M-CSF, 50 ng/ml RANKL and various RG or ES extracts concentrations. After culturing, TRAP (+) multinucleated cells, containing three or more nuclei, were counted as osteoclasts. The data represent a mean ± S.E. of four experiments and are expressed as a ratio to the control.

즉 RGX 0.5 mg/ml과 ESX 0.0625 mg/ml를 처리하는 경우 RGX 0.5 mg/ml의 값은 61.8±6.5이고 ESX 0.0625 mg/ml의 값은 30.1±1.8 이다. 이 경우 RGX를 기준으로 하여 RGX의 파골세포 증식 억제율이 61.8% 이고, 파골세포 증식억제율 전체 100%에서 RGX에 의한 파골세포 증식억제율 61.8%를 뺀 38.2%에 대한 ESX의 파골세포 증식억제효과 (100% 기준으로 30.1%)는 11.5%이다. 따라서 RGX 0.5 mg/ml과 ESX 0.0625 mg/ml 혼합 추출한 경우의 파골세포 증식억제율은 61.8%와 11.5%를 더한 73.3% 이상인 87.8%의 값을 나타내므로 상승효과를 나타낸다고 할 수 있다. 따라서 RGX 0.5 mg/ml과 ESX 0.0625 mg/ml 또는 ESX 0.03125 mg/ml

Table 3. Effect of RGX and ESX on the osteoclastic activity from M-CSF dependent macrophage cells.

	Conc. (mg/ml)	ESX						
		0	0.015625	0.03125	0.0625	0.125	0.25	0.5
RGX	0	0.0 ± 12.0	0.0 ± 1.5	36.1 ± 5.0	79.7 ± 2.2	93.1 ± 0.8	99.8 ± 0.0	100.0 ± 0.0
	0.0625	90.3 ± 0.0	92.6 ± 1.2	94.7 ± 0.1	96.8 ± 0.2	99.2 ± 0.2	99.9 ± 0.0	100.0 ± 0.0
	0.125	92.5 ± 0.1	95.7 ± 0.6	97.2 ± 0.1	97.0 ± 1.0	99.8 ± 0.0	99.9 ± 0.0	100.0 ± 0.0
	0.25	93.9 ± 0.8	97.1 ± 0.3	99.7 ± 0.0	99.6 ± 0.1	99.8 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0
	0.5	94.0 ± 1.0	95.6 ± 0.6	96.1 ± 1.0	98.8 ± 0.1	99.7 ± 0.0	99.9 ± 0.0	100.0 ± 0.0
	1	99.9 ± 0.0	99.9 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0
	2	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0

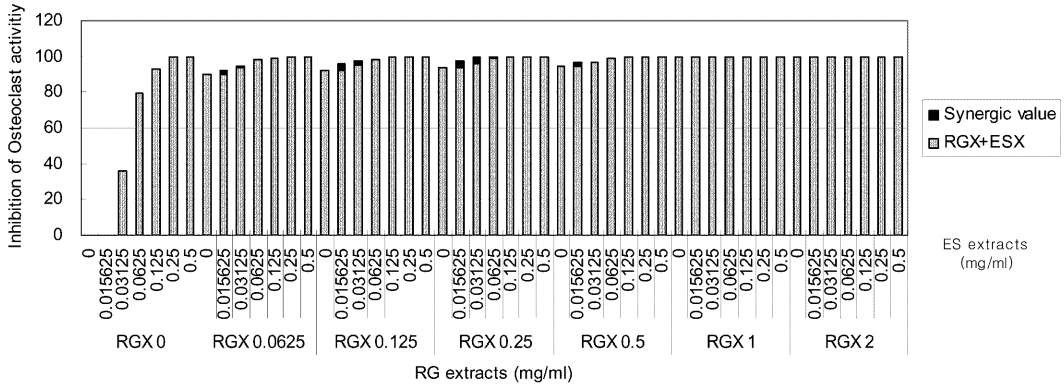


Fig. 8. Synergic effect of RGX and ESX on the osteoclastic activity from M-CSF dependent macrophage cells. The osteoclast precursor cells were plated at a density 6 x 10^4 cells/well in a 96-well OAASTM plate, cultured for eight days in the presence of 10 ng/ml M-CSF, 50 ng/ml RANKL and various RG and ES extracts concentrations. After culturing, the total area of the resorption pit was measured. The data represent a mean ± S.E. of four experiments and are expressed as a ratio to the control.

을 혼합한 경우를 포함하여 일정 농도에서 파골세포의 생성 억제효과에 대하여 각각 단독으로 처리한 경우에 비해 상승효과를 나타냈다 (Table 2 및 Fig. 7).

또한 RGX와 ESX를 여러 농도로 혼합하여 파골세포의 활성에 대한 상승 효과를 나타내는지 관찰한 결과를 표와 그래프로 표시하였다. 표는 RGX와 ESX를 여러 농도로 혼합한 경우 각각의 파골세포 활성 억제에 대한 변화를 대조군에 대한 백분율로 표기한 것이며, 그래프는 RGX와 ESX를 각각 단독으로 처리한 경우에 나타날 수 있는 억제율을 막대 그래프로 표기한 후, 실제 혼합하여 나타난 값의 차이를 synergic value로 표시하였다. RGX와 ESX를 여러 농도로 혼합하여 파골세포의 활성억제에 대한 상승효과를 나타내는지 관찰한 결과 파골세포 생성 억제와 마찬가지로 RGX 0.5 mg/ml 또는 RGX 0.25 mg/ml과 ESX 0.0156 mg/ml을 혼합한 경우를 포함하여 몇몇 농도에서 파골세포의 활성 억제효과에 대하여 각각 단독으로 처리한 경우에 비해 상승효과를 나타냈다(Table 3 및 Fig. 8).

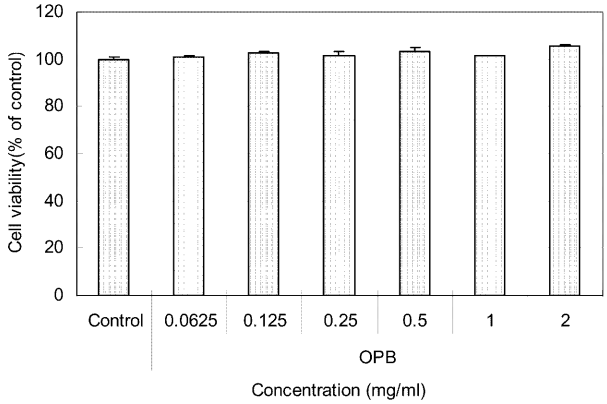


Fig. 9. Effect of OPB on the osteoblastic cell viability. MG 63 cells were cultured in the presence or absence of OPB for 24 hours. After removal of the media, formazan granules were solubilized, and optical density was measured with the microplate reader. Cell viability was expressed with an absorbance ratio (Absorbance of treated cells/absorbance of control cells x 100). Values are Mean ± S.E. (n = 5).

OPB의 영향

조골세포의 세포생존률에 미치는 영향

RGX와 ESX 원재료를 4 : 1의 비율로 혼합하여 제조한 OPB의 조골세포에 대한 세포생존율에 미치는 영향을 관찰한 결과 모든 농도에서 세포독성을 나타내지 않았다(Fig. 9).

조골세포의 OPG 분비에 미치는 영향

OPB가 조골세포로부터 OPG 분비에 미치는 영향을 관찰한 결과, OPB처리에 의하여 농도의존적으로 OPG 분

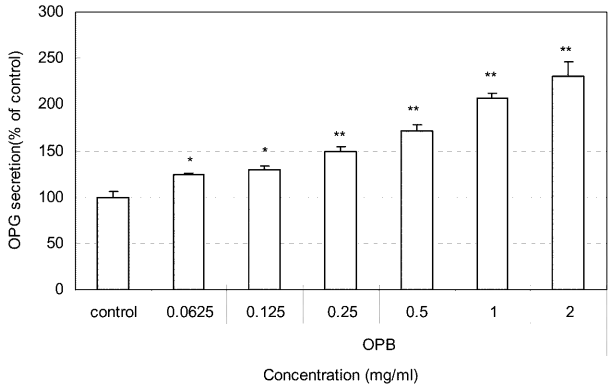


Fig. 10. Effects of OPB on the OPG secretion from osteoblasts. MG63 cells were cultured in the presence or absence of OPB for 24 hours. OPG secretion into the culture medium was measured by the ELISA kit. OPG secretion was expressed with percent ratio (OPG secretion of treated/control cells x 100). Values are Mean ± S.E. (n = 5). *p<0.05, **p<0.01.

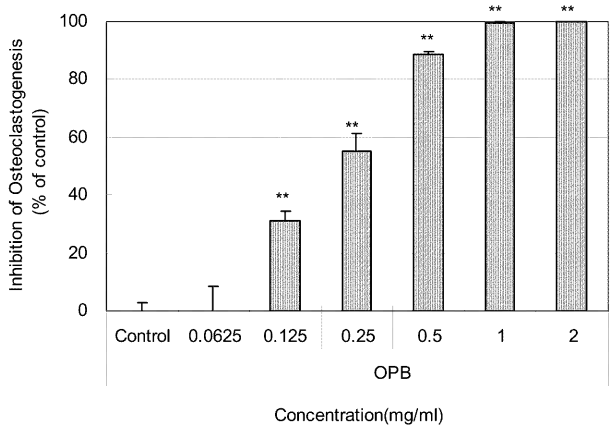


Fig. 11. Effects of OPB on the osteoclastogenesis. The osteoclast precursor cells were plated at a density 6 x 10^4 cells/well in a 96-well plate, cultured for eight days in the presence of 10 ng/ml M-CSF, 50 ng/ml RANKL and various OPB concentrations. After culturing, TRAP (+) multinucleated cells, containing three or more nuclei, were counted as osteoclasts. The data represent a mean ± S.E. of four experiments and are expressed as a ratio to the control. ** p<0.01.

비량을 증가시켰으며, OPB 2 mg/ml의 농도에서 약 230%의 증가를 나타냈으며, OPB의 효과는 OPB에 포함된 RGX와 ESX 각각의 혼합 비율에서 보이는 최대 활성에 근접한 효과를 나타냈다(Fig. 10).

파골세포의 생성 및 활성에 미치는 영향

OPB가 파골세포의 생성과 활성에 미치는 영향을 관찰한 결과 TRAP 양성 다핵세포의 형성 및 흡수와의 형성을 유의하게 감소시켰으며, 그 효과는 OPB에 포함된 RGX와 ESX 각각의 혼합 비율에서 보이는 최대 활성에 근접한 효과를 나타냈다(Fig. 11 및 12).

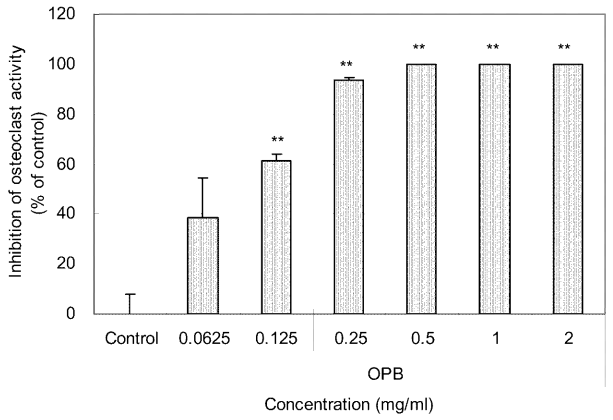


Fig. 12. Effects of OPB on the osteoclastic activity. The osteoclast precursor cells were plated at a density 6 x 10^4 cells/well in a 96-well OAAS™ plate, cultured for eight days in the presence of 10 ng/ml M-CSF, 50 ng/ml RANKL and various OPB concentrations. After culturing, the total area of the resorption pit was measured. The data represent a mean ± S.E. of four experiments and are expressed as a ratio to the control. ** p<0.01.

고 찰

병적인 뼈의 파괴는 각각의 원인에 관계없이 조골세포에 의한 뼈형성에 대한 파골세포에 의한 뼈파괴의 비율이 증가되어 나타난다. 따라서 뼈파괴가 증가된 상태인 골다공증환자에서나, 치주질환 및 성장장애를 가진 소아인 경우 약학적 치료의 궁극적인 목적은 정상적인 골량을 증가시키며, 뼈의 파절 및 부작용의 위험을 줄이는 것이다. 골다공증과 관련하여 주로 골의 무기질, 즉 칼슘과 인의 대사 이상 만을 중심으로 그 연구가 진행되어 왔다. 그러나, 최근 골형성에 있어서 무기질뿐만 아니라 골기질 단백질의 대사에 관한 연구의 중요성이 새로이 부각되고 있다. 골다공증 치료제로 널리 사용되는 칼슘 보강제제 및 에스트로젠이나 칼시토닌을 이용한 호르몬 요법에 있어서 치료효과의 통계적 유의성이 없음이 보고되고 있다 (Heaney 등, 1996). 특히 에스트로젠이나 칼시토닌을 이용한 호르몬 요법의 경우 간, 난소, 유방 등에 종양을 일으키는 부작용을 일으키기도 한다 (Nelson 등, 2002). 비스포스포네이트는 새로운 대체 치료제로 주목받고 있으나 위장장애 등의 문제를 가지고 있다 (Fleisch, 1996).

본 연구에서는 기존 골다공증 치료제에서 보이는 부작용이 나타날 가능성이 적은 두 종류의 자생식물의 추출물으로부터 세포수준에서 활성 및 상승효과를 확인하고, 적절한 비율로 혼합하여 세포수준의 실험을 통해 효과를 확인하고자 하였다.

골기질의 성분을 주로 합성하는 조골세포는 미분화간엽세포로부터 유래하며 (Owen, 1985), 세포질에서는 과립형질내세망이 발달해 있고, 골지체, 사립체가 존재하며, 활발한 대사작용으로 석회화과정에 중요한 역할을 하고

(Martin과 Matthews, 1970), 세포막에 당단백효소인 염기성인산분해효소를 갖고 있다. 본 연구에서는 두 가지 생약제재의 추출물이 조골세포의 세포생존율에 미치는 영향을 관찰하였다. 실험에는 조골세포의 특성을 가지고 있어 조골세포의 실험모델로 흔히 사용되는 MG 63 세포를 이용하였다. 실험 결과 RGX와 ESX 모두 세포독성을 나타내지 않았으며, RGX의 경우 2 mg/ml의 농도에서, ESX의 경우 0.5 및 1 mg/ml의 농도에서 세포생존율을 증가시켰다. 두 친연물 추출물을 혼합 처리한 경우에도 세포독성을 나타내지 않았으며, 단독으로 처리한 경우에 비해 상승효과를 나타내지는 않았다. 이는 두 친연물을 단독 혹은 혼합 처리하여도 조골세포에서 세포독성을 나타내지 않음을 시사한다.

뼈조직에서 유일하게 뼈의 파괴를 담당하는 파골세포는 단핵구/대식세포 계통의 세포이며, 여러 조직에 존재하는 단핵구 대식 전구세포로부터 시혈관내에서 파골세포의 생성이 가능하다 (Suda 등, 1990) 파골세포는 특징적으로 tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP)와 풍부한 칼시토닌 수용체를 가지며 산 생성이 활발하고, 석회화조직에 흡수와를 형성한다 (Baron 등, 1986; Mundy와 Roodman, 1987). 파골세포의 생성을 위해서는 receptor activator of NF-kB ligand (RANKL)와 macrophage-colony stimulating factor (M-CSF)와 같은 두 종류의 cytokine이 필수적이다 (Boyle 등 2003; Pixley와 Stanley, 2004). 이들 두 단백질은 골수간엽세포나 조골세포 계통의 세포로부터 생성되며 막에 부착되어 있거나 떨어진 형태 모두 존재하며, 단핵 전구세포로부터 파골세포의 생성에 관여한다. 또한 osteoprotegerin (OPG)은 RANKL과 강한 결합력을 가짐으로써, 파골세포 전구세포 혹은 파골세포 막에 존재하는 RANK와의 결합을 방해하는 생리적 억제제이다 (Kostenuik 와 Shalhoub, 2001).

본 연구에서는 두 종류의 친연물 추출액이 파골세포의 생성 및 활성을 조절하는 주요 단백질의 하나인 RANKL의 강력한 억제제인 OPG의 생성을 확인하기 위하여, 조골세포로부터 OPG의 분비량을 측정하였다. 그 결과 RGX와 ESX 모두 OPG 분비량을 농도의존적으로 증가시켰으며, 두 친연물 추출물을 혼합 처리한 경우에 낮낮 농도의 조합에서 단독으로 처리한 경우에 비해 상승효과를 나타냈다. 이는 친연물 추출액이 조골세포로부터 OPG 생성을 변화시켜 파골세포의 생성 또는 골대사에 관여함을 시사한다. 이 때의 농도는 RGX와 ESX 추출물의 고형분 비율이 약 32 : 1, 16 : 1 및 8 : 1에 해당하였으며, 이는 RGX의 수율이 약 45%이고 ESX의 수율이 약 11%임을 고려하여, RG와 ES의 원재료비가 각각 8 : 1, 4 : 1 또는 2 : 1에 해당하는 비율이다.

또한 본 연구에서는 두 종류의 친연물 추출액이 파골세포의 생성 및 활성의 억제효과에 대한 상승효과를 나타내는지 확인하기 위하여, 파골세포 전구세포로부터 파골세포의 생성 및 활성시험을 하였다. 파골세포가 조혈기관 기원인 것을 이용하여 다수의 파골세포 전구세포를 얻기 위하여 골수세포 배양이 널리 이용되고 있으며 (Takahashi 등, 1988a) 이러한 골수세포 배양시 관찰되는 다핵세포는 TRAP 양성 반응을 나타내고 칼시토닌 수용체 (Takahashi 등, 1988b)를 가지며 석회화된 상아질을 흡수할 때 주름변연을 형성하는 (Sasaki 등, 1989) 등 파골세포의 특징을 나타내고 있으며, 이 중 TPAP는 골조직내 다른 세포와 구별할 수 있는 파골세포의 세포화학적 표지효소로 이용된다 (Minkin, 1982). 따라서 본 연구에서는 파골세포의 생성을 관찰하기 위하여 파골세포 전구세포를 배양하여 TRAP에 양성이며 다핵인 세포를 파골세포로 간주하였다.

파골세포는 뼈를 흡수하는 세포로써 뼈의 흡수능력이 파골세포의 활성의 지표라 할 수 있다. 본 연구에서는 칼슘-포스페이트가 박막 코팅된 plate를 이용하여 파골세포의 골흡수능을 쉽게 측정할 수 있는 파골세포 활성도 측정키트를 이용하여 두 가지 친연물 추출물이 파골세포의 골흡수능에 미치는 영향을 관찰하였다. 파골세포의 생성을 위해 M-CSF와 RANKL를 첨가하여 배양하면서 RGX와 ESX를 처리하며 8일간 배양한 결과, 각각 단독으로 처리한 경우에도 파골세포의 생성 및 활성을 억제하였으며, 농도의존적으로 그 효과가 증가하였다. 이는 두 가지 친연물 추출물이 파골세포의 생성 및 활성을 억제하여 과도한 골흡수가 일어나는 질환에서 골파괴를 막을 수 있음을 보여주며, 두 가지 친연물 추출물 모두 파골세포의 생성 및 활성을 억제하는 성분이 있으며, 골대사의 이상으로 발생된 질환의 치료제로 사용될 가능성이 있다고 여겨진다. 또한 두 친연물 추출물을 혼합 처리한 경우에 낮낮 농도의 조합에서 단독으로 처리한 경우에 비해 상승효과를 나타냈다. 이 때의 농도는 RGX와 ESX 추출물의 고형분 비율이 약 16 : 1에서 8 : 1에 해당하였으며, 이는 친연물의 추출수율을 고려할 때 RG와 ES의 원재료비가 4 : 1 또는 2 : 1에 해당하는 비율이다.

In vitro 실험 결과 두 친연물 추출물이 원재료로 8 : 1, 4 : 1 및 2 : 1의 비율에서 상승효과를 나타냈으므로 이 중 RG와 ES 원재료 4 : 1의 비를 선택하여 혼합 추출액을 제조하였으며 (OPB), 이의 *in vitro* 효과를 관찰하였다. OPB를 처리하여 조골세포의 세포생존율, OPG 분비, 파골세포의 생성 및 활성에 미치는 영향을 관찰한 결과 2 mg/ml까지 세포독성을 나타내지 않았고, 농도의존적으로 OPG 분비를 증가시켰으며 그 효과는 각각의 추출물을 혼합한 경우 나타내는 값의 최대 활성에 근접하게 나타났다. 즉 OPB 2 mg/ml의 경우 230%의 OPG 분비 촉진효과를 나타냈으며, OPB 2 mg/ml에 포함된 각각의 양과 유사한 경우의 농도인 RGX 2 mg/ml과 ESX 0.125 mg/ml의 경우 223%의 OPG 분비 촉진효과를 나타냈다. 또한 OPB는 파골세포 생성 및 활성을 농도의존적으로

유의하게 억제하였으며, 그 효과는 각각의 추출물을 혼합한 경우 나타내는 값의 최대 활성에 근접하게 나타났다.

이상의 결과 두 천연물 추출액이 세포수준의 실험에서, 조골세포의 세포 생존율과 OPG 단백질의 분비를 증가시키며, 파골세포의 생성 및 활성을 직접적으로 억제하였으며, 혼합하는 경우 특정 농도에서 상승효과를 나타냈다. 또한 상승효과를 나타내는 두 천연물의 혼합추출물로 OPG 단백질 분비를 증가시키며, 파골세포의 생성 및 활성을 억제하였으며, 그 효과는 각각의 혼합 비율에서 보이는 최대 활성에 근접하게 나타났다. 따라서 두 천연물을 혼합 추출하는 경우 골조직 대사를 조절할 수 있는 유효한 물질을 함유하고 있으므로, 골다공증 개선 및 성장기 뼈 성장에 도움이 된다고 생각된다.

참고문헌

Awang, D.V.C.: Siberian ginseng toxicity may be a case of mistaken identity. Can. Med. Assoc. J. 155:1237, 1996.

Baron, R., Neff, L., Van, P.T., Nefussi, J.R. and Vignery, A.: Kinetic and cytochemical identification of osteoclast precursors and their differentiation into multinucleated osteoclasts. Am. J. Pathol. **122**:363-378, 1986.

Ben-Hur, E. and Fulder, S.: Effect of Panax ginseng saponins and Eleutherococcus senticosus on survival of cultured mammalian cells after ionizing radiation. Am. J. Chin. Med. **9**:48-56, 1981.

Boyle, W.J., Simonet, W.S. and Lacey. D.L.: Osteoclast differentiation and activation. Nature **423**:337-342, 2003.

Canalis, E., McCarthy, T. and Centrella, M.: Growth factors and the regulation of bone remodeling. J. Clin. Invest. **81**:277-281, 1988.

Canalis, E.: Effect of growth factors on bone cell replication and differentiation. Clin. Orthop. Rel. Res. **193**:246-263, 1985.

Chang, H.M. and But, P.P.H.: Pharmacology and applications of Chinese amteria medica. vol 1, edited by Yao, S.C., Wang, L.L. and Shem, C.S. p 461, 1986.

Chao, J.C., Chiang, S.W., Wang, C.C., Tsai, Y.H. and Wu, M.S.: Hot water-extracted Lycium barbarum and Rehmannia glutinosa inhibit proliferation and induce apoptosis of hepatocellular carcinoma cells. World J. Gastroenterol. **12**:4478-4484, 2006.

Fleisch, H.: Bisphosphonates: Mechanism of action and clinical use. in Principles of Bone biology. edited by Bilezikian, J.P., Raisz, L.G and Rodan, G.A. pp 1037-1052, Academic Press, 1996.

Fujikawa, T., Yamaguchi, A., Morita, I., Takeda, H. and Nishibe, S.: Protective effects of Acanthopanax senticosus Harms from Hokkaido and its components on gastric ulcer inrestrained cold water stressed rats. Biol. Pharm. Bull. **19**:1227-1230, 1996.

Heaney, R.P.: Calcium. in Principles of Bone biology. edited by Bilezikian, J.P., Raisz, L.G and Rodan, G.A. pp 1007-1017, Academic Press, 1996.

Jin, U.H., Kim, D.I., Lee, T.K., Lee, D.N., Kim, J.K., Lee, I.S. and Kim, C.H.: Herbal formulation, Yukmi-jihang-tang-Jahage, regulates bone resorption by inhibition of phosphorylation mediated by tyrosine kinase Src and cyclooxygenase expression. J. Ethnopharmacol. **106**:333-343, 2006.

Kim, S.S., Son, Y.O., Chun, J.C., Kim, S.E., Chung, G.H., Hwang, K.J. and Lee, J.C.: Antioxidant property of an active component purified from the leaves of paraquat-tolerant Rehmannia glutinosa. Redox. Rep. **10**:311-318, 2005.

Kormosh, N., Laktionov, K. and Antoshechkina, M.: Effect of a combination of extract from several plants on cell-mediated and humoral immunity of patients with advanced ovarian cancer. Phytother. Res. **20**:424-425, 2006.

Kostenuik, P.J. and Shalhoub, V: Osteoprotegerin: A physiological and pharmacological inhibitor of bone resorption. Curr. Pharm. Des. **7**:613-635, 2001.

Martin, J.H. and Matthews, J.L.: Mitochondrial granules in chondrocytes, osteoblasts and osteocytes. An ultrastructural and microincineration study. Clin. Orthop. **68**:273-278, 1970.

Minkin, C.: Bone acid phosphatase: Tartrate-resistant acid phosphatase as a marker of osteoclast function. Calcif. Tissue Int. **34**:285-290, 1982.

Mundy, G.R. and Roodman, G.D.: Osteoclast ontogeny and function, in Bone and Mineral Research, vol. 5, edited by Peck, W.A., pp 209-279, Elsevier, Amsterdam, 1987.

Nelson, H.D., Humphrey, L.L., Nygren, P., Teutsch, S.M. and Allan, J.D.: Postmenopausal hormone replacement therapy: scientific review. JAMA **288**:872-881, 2002.

Nijweide, P.J., Burger, E.H. and Feyen, J.H.M.: Cells of bone: Proliferation, differentiation, and hormonal regulation. Physiol. Rev. **66**:855-886, 1986.

Owen, M.E.: Lineage of osteogenic cells and their relationship to the stromal system. in Bone and Mineral Research, edited by Peck, W.A., pp 1-25, Elsevier Science Publisher, Amsterdam, 1985.

Pixley, F.J. and Stanley, E.R.: CSF-1 regulation of the wandering macrophage: Complexity in action. Trends Cell Biol. **14**:628-638, 2004.

Raisz, L.G: Hormonal regulation of bone growth and remodeling. in Cell and Molecular Biology of Vertebrate Hard Tissue CIBA Foundation Symposium 136, pp 226-238, Wiley, NY, 1988.

Raju, B.L., Lin, S.J., Hou, W.C., Lai, Z.Y., Liu P.C. and Hsu, F.L.: Antioxidant iridoid glucosides from Wendlandia formosana, Natural Product Res. **8**:357-364, 2004.

Recker, R.P.: Current therapy for osteoporosis. J. Clin. Endocrinol. Metab. **76**:14-16, 1993.

Reginster, J.Y.: Treatment of bone in elderly subjects: calcium, vitamin D, fluor, bisphosphonates, calcitonin. Horm. Res. **43**:83-88, 1995.

Rodan, G.A.: Emerging therapies in osteoporosis. Ann. Rep. Med. Chem. **29**:275-285, 1994.

Sasaki, T., Takahashi, N., Higashi, S. and Suda, T. Multinucleated cells formed on calcified dentin from mouse bone marrow cells treated with 1a,25-dihydroxyvitamin D_3

have ruffled borders and resorb dentin. Anat. Rec. **224**:379-391, 1989.

Scheven, B.A.A., Visser, J.W.M. and Nijweide, P.J.: In vitro osteoclast generation from different bone marrow fractions, including a highly enriched hematopoietic stem cell population. Nature **321**:79-81, 1986.

Shan, B.E., Yoshita, Y., Sugiura, T. and Yamashita, U.: Suppressive effect of Chinese medicinal herb, Acanthopanax gracilistylus, extract on human lympocytes in vitro. Clin. Exp. Immunol. **118**:41-48, 1999.

Shen, M.L., Zhai, S.K., Chen, H.L., Luo, Y.D., Tu, G.R. and Ou, D.W.: Immunopharmacological effects of polysaccharides from Acanthopanax senticosus on experimental animals. Int. J. Immunopharmacol. **13**:549-554, 1991.

Sridhar, C., Subbaraju, G.V., Venkateswarlu, Y. and Venugopal, R.T.: New acylated iridoid glucosides from Vitex altissima. J. Natural Products **67**:2012-2016, 2004.

Stock, J.L.: Drug therapy. in Osteoporosis: Diagnotic and Therapeutic Principles, edited by Rosen, C.J., pp 173-187, Humana Press, Totowa, NJ, 1996.

Suda, T., Takahashi, N., Udagawa, N., Jimi, E., Gillespie, M.T. and Martin, T.J.: Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. Endocr. Rev. **20**:345-57, 1999.

Takahashi, N., Akastu, T., Sasaki, T., Nicholson, G.C., Moseley, J.M., Martin, T.J. and Suda, T.: Induction of calcitonin receptors by 1a,25-dihydroxyvitamin D_3 in osteoclast-like multinucleated cells formed from mouse bone marrow cells. Endocrinol. **123**:1504-1510, 1988b.

Takahashi, N., Yamana, H., Yoshiki, S., Roodman, G.D., Mundy, G.R., Jones, S.J., Boyde, A. and Suda, T.: Osteoclast-like cell formation and its regulation by osteotropic hormones in mouse bone marrow cultures. Endocrinol. **122**:1373-1382, 1988a.

Takasugi, N., Moriguchi, T., Fuwa, T., Sanada, S., Ida, Y., Shofi, J. and Saito, H.: Effect of Eleutherococcus senticosus and its rectal temperature, body and grip tones, mortor coordination, and exploratory and spontaneous movements in acute stressed mice. Shoyakugaku Zasshi. **39**:232-237, 1985.

Tang, W. and Eisenbrand, G.: Chinese Drugs of Plant Origin: in Chemistry, Pharmacolgy, and Use in Traditional Modern Medicine, pp 849-854, Springer-Verlag, Berlin 1992.

Wang, J.Z., Mao, X.J., Ito, H. and Shimura, K.: Immunomodulatory activity of polysaccharide from Acanthopanax obovatus roots. Planta. Med. **57**:335-336, 1991.

Wang, J.Z., Tsumura, H., Shimura, K. and Ito, H.: Antitumor activity of polysaccharide form a Chinese medicinal herb, Acnthopanax giraldii Harms. Cancer Lett. **65**:79-84, 1992.

Wasnich, R.: What is an osteoporotic fracture? in Osteoporosis: Diagnotic and Therapeutic Principles, edited by Rosen, C.J., pp 79-88, Humana Press, Totowa, NJ, 1996.

Yu, H.H., Seo, S.J., Kim, Y.H., Lee, H.Y., Park, R.K., So, H.S., Jang, S.L. and You, Y.O.: Protective effect of Rehmannia glutinosa on the cisplatin-induced damage of HEI-OC1 auditory cells through scavenging free radicals. J. Ethnopharmacol. **107**:383-388, 2006.

Zhao, Y., Wen, X.S., Cui, J. and Wu, W.H.: Extraction and salting-out purification of alpha-galactosidase and beta-glucosidase from fresh roots of Rehmannia glutinosa. Zhong. Yao. Cai. **29**:137-139, 2006.

生藥學硏究會：現代生藥學 ,PP263-265, 아창사 , 서울 1998.