

## 한약재 추출물의 조골세포 분화 및 파골세포 형성에 미치는 영향

임남경<sup>1</sup> · 김현정<sup>2</sup> · 김미진<sup>1</sup> · 이은주<sup>1</sup> · 김혁일<sup>1</sup> · 이인선<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>계명대학교 식품가공학과, <sup>2</sup>계명대학교 전통미생물자원개발 및 산업화 연구센터

## Effects of Medicinal Herb Extracts on Osteoblast Differentiation and Osteoclast Formation

Nam-Kyung Im<sup>1</sup>, Hyun-Jeong Kim<sup>2</sup>, Mi-Jin Kim<sup>1</sup>, Eun-Ju Lee<sup>1</sup>, Hyuk-II Kim<sup>1</sup>, and In-Seon Lee<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Food and Technology, Keimyung University

<sup>2</sup>The Center for Traditional Microorganism Resources, Keimyung University

**Abstract** Bone is continuously remodeled by osteoblasts and osteoclasts. We investigated the effects of medicinal herbs, which act on bone metabolism. Fifteen kinds of medicinal herb extracts were screened for bone formation activity with osteoblastic cells, and MC3T3-E1 and bone resorption were screened with osteoclasts derived from mouse bone marrow macrophages. Among these samples, *Actinidia polygama*, *Eucommia ulmoides* Oliv., *Schizonepeta tenuifolia*, *Sorbus commixta*, and *Zingiber officinale* Rosc. extracts showed strong bone-forming activity accompanied with osteoblast proliferation and alkaline phosphatase activity. In addition, these extracts decreased tartrate-resistant acid phosphatase activity against osteoclast differentiation. The results indicate that these medicinal herb extracts can potentially prevent bone-related diseases such as osteoporosis by increasing osteoblast differentiation and reducing osteoclast activity.

**Key words:** osteoblast, osteoclast, ALP, TRAP

### 서론

최근 들어 의학의 발달과 생활수준의 향상으로 인하여 노령화가 급속하게 진행되어 골다공증에 대한 사회적, 의학적 관심이 크게 증가하고 있는 추세이다(1). 골다공증(osteoporosis)은 가장 흔한 대사성 질환으로 골 형성(bone formation)과 골 흡수(bone resorption) 불균형에 의하여 골의 화학적 조성에는 변화가 없으나 단위용적내의 골량(bony quantity)을 감소시켜 척추, 요골 및 대퇴부의 골절을 쉽게 일으키는 질환으로 알려져 있다. 2008년 질병관리본부의 국민건강 영양조사 결과 발표에 따르면 50세 이상의 골다공증 유병률은 전체인구의 19.3%, 남자가 4.9%, 여자가 32.6%로 나타났으며, 특히 여성이 남성보다 6배 높은 유병률을 보였다(2).

뼈(bone)는 우리 몸의 구조를 이루고 골격계(skeletal system)를 구성하는 역할을 한다(3,4). 뼈를 생성하는 역할을 하는 조골세포(osteoblast)와 뼈를 흡수하는 역할을 하는 파골세포(osteoclast)가 서로 균형을 이루면서 뼈의 생성과 재흡수가 이루어져, 뼈의 재형성(bone remodeling)이 일어난다(5). 골대사가 항상성(homeostasis)을 이루었을 때, 정상적인 골대사가 이루어진다. 하지만, 각종질

병이나 노화, 흡연, 스트레스와 폐경기 여성들의 급격한 에스트로겐 저하로 인하여 균형이 깨어지게 되면서 뼈의 생성보다 흡수가 증가하게되어, 결국 골 소실(bone loss)이 일어나게 된다(6). 특히 노화와 관련한 골 질환이나, 폐경으로 인한 골다공증은 골의 형성에 관여하는 골아세포 보다 파골세포의 기능이 향상되어, 골 흡수가 증가하여 골다공증이 발생한다(7).

이러한 골 질환 발생 시 손실된 뼈를 원상태로 재생하는 것은 사실상 어려우며, 일반적으로는 뼈의 소실이 더 이상 진행되지 않게 치료하는 방법을 많이 사용하고 있다(8). 임상에서는 골 흡수 억제제로 에스트로겐, 칼시토닌, 비스포스포네이트 제제가 많이 사용되고 있다(9). 하지만 비스포스포네이트의 경우 사용상의 번거로움과 다소 낮은 치료효과 및 부작용의 사례가 나타났고(10), 또한 에스트로겐 처방은 골량 유지에는 효과적이거나 60세 이상의 고령층에서는 골량 감소 억제효과가 폐경 초기에 비하여 낮으며, 최소 5년 이상의 장기 치료를 요하고 있으며, 불규칙한 자궁 출혈, 유방암, 자궁내막암 및 고혈압 발생 빈도 증가 등의 합병증에 대한 위험이 있는 것으로 보고되었다(11).

최근에는 식물 유래의 폴리페놀화합물 중 하나인 quercetin과 녹차의 카테킨 성분중 하나인 EGCG를 이용한 파골세포의 골 흡수억제 효과에 대한 연구(12), 대두 및 콩류를 이용한 조골세포 활성화 검색에 대한 연구(13) 등이 보고되기도 하였다. 이처럼 부작용이 적으면서 쉽게 생활 속에서 섭취 가능한 식품 소재나 약재 혹은 천연물로부터 골 질환 개선 소재를 검색하려는 연구는 중요하다고 하겠다. 따라서 본 실험에서는 천연 한약재로부터 골대사에서 조골세포의 증식은 높이면서, 파골세포의 분화는 억제하는 효과를 가진 소재를 검색하여, 이를 새로운 골 기능 개선제로 개발하기 위한 기초연구의 일환으로 검토해 보았다.

\*Corresponding author: In-Seon Lee, Department of Food Science and Technology, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea  
Tel: 82-53-580-5538

Fax: 82-53-580-5538

E-mail: inseon@kmu.ac.kr

Received February 20, 2010; revised April 15, 2010;

accepted April 20, 2010

Table 1. Lists of medicinal herb

No.	Scientific name	Extracts <sup>1)</sup>
1	<i>Actinidia polygama</i>	E
2	<i>Allium monanthum</i> Maxim.	E
3	<i>Aralia contidentialis</i>	M
4	<i>Asarum sieboldii</i>	M
5	<i>Dioscorea tokoro</i> Makino.	M
6	<i>Diospyros kaki</i> Thunb.	M
7	<i>Eucommia ulmoides</i> Oliv.	M
8	<i>Kalopanax pictus</i> Nakai.	M
9	<i>Nelumbo nucifera</i> Gaer.	M
10	<i>Perilla sikokiana</i> Britton.	M
11	<i>Salvia miltorrhiza</i> Bunge.	M
12	<i>Schizonepeta tenuifolia</i>	M
13	<i>Sorbus commixta</i>	M
14	<i>Teucrium veronicoides</i> Max.	M
15	<i>Zingiber officinale</i> Rosc.	E

<sup>1)</sup>E: Ethanol extracts, M: Methanol extracts.

## 재료 및 방법

### 시료조제

본 실험에 사용된 시료는 건조된 상태의 한약재를 대구 약령 시장에서 구입하였으며, 건조중량의 10배(w/v)의 70% ethanol이나 80% methanol을 넣어 3회 추출 후, Whatman filter papaer No. 3(Whatman, Maidstone, UK)을 이용하여 여과하였다. 추출물을 여과한 뒤 rotary evaporator(NVC-2000, EYELA, Tokyo, Japan)로 감압 농축한 후 동결건조하여 사용하였다. 이때 사용한 한약재의 종류는 Table 1과 같다.

### 세포배양

Mouse calvaria osteoblast cell인 MC3T3-E1(CRL-2593) cell은 ATCC(ATCC, Manassas, VA, USA)로부터 분양받아 사용하였다. Cho 등(14)의 방법을 참고하여  $\alpha$ -MEM 배지에 10% FBS와 1% antibiotics(Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)를 첨가하여 37°C의 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 2-3일 마다 계대배양하고, 분화유도를 위해 10 mM  $\beta$ -glycerol phosphate(Sigma Co., St. Louis, MO, USA)와 50  $\mu$ g/mL의 vitamin C(Sigma Co., St. Louis, MO, USA)를 첨가하여 분화유도배지로 사용하였으며, 3일마다 배지를 교환하였다(15,16).

### 세포 생존율 측정

시료의 세포독성을 측정하기 위해 Green 등(17)의 방법에 의한 MTT [3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide] assay로 측정하였다. 배양한 cell을 0.4% trypan blue 염색법으로 세포수를 측정한 후 1×10<sup>4</sup> cells/well의 농도로 96-well plate의 각 well에 200  $\mu$ L씩 분주하고 24시간 배양 후 배지를 제거한다. 여기에 새로운  $\alpha$ -MEM 배지 180  $\mu$ L를 첨가한 후 각각의 농도별 시료를 각 well에 20  $\mu$ L씩 넣는다. 시료 첨가 후 48시간 배양한 다음 MTT(5 mg/mL) 용액 10  $\mu$ L를 각 well에 가하고 4시간 동안 배양하였다. 배양 종료 후 상층액을 제거하고 각 well에 100  $\mu$ L의 DMSO를 첨가하여 생성된 formazan 결정을 용해시켜 550 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 세포독성은 시료의 흡광도를 대조군의 흡광도에 대한 백분율로 나타내었다.

### 조골세포의 ALP(alkaline phosphatase) 활성과 염색

배양된 MC3T3-E1 세포를 1×10<sup>4</sup> cells/well로 조정하여 96-well plate에 분주하고 24시간 배양한 후 분화유도배지로 교환하여 24시간 배양한 다음 시료처리를 하였다. 시료추출물을 각 농도별로 처리하여 세포를 배양한 후 3일 뒤 PBS로 세척한 다음 0.1% Triton X-100을 20  $\mu$ L씩 첨가하여 37°C에서 30분간 lysis하였다. Lysis된 cell의 상층액 5  $\mu$ L는 단백질 정량에 사용하였고, 나머지 상층액에 20  $\mu$ L의 0.1N glycine과 10  $\mu$ L의 100 mM  $\rho$ -nitrophenylphosphate( $\rho$ -NPP)를 첨가한 후 다시 37°C에서 30분간 반응시켰다. 반응 후 200  $\mu$ L의 0.1 N NaOH로 반응을 중지하고, 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. ALP 활성은  $\rho$ -NPP로부터 생성된  $\rho$ -nitrophenol( $\rho$ -NP)를 측정하여  $\rho$ -NP에 대한 표준그래프를 작성한 후 활성도를 대조군과의 상대비교를 통해 도출하였다(18,19).

ALP 효소의 염색 정도를 측정하기 위해 96 well에 1×10<sup>5</sup> cells/mL로 처리한 후 시간경과에 따른 효소활성 정도를 alkaline phosphatase kit(Sigma Co., St. Louis, MO, USA)를 사용하여 염색하여 측정하였다. 즉 배지를 제거하고 고정액(citrate-acetone-formaldehyde)을 첨가하여 약 30초간 실온에 보관하였다가, 45초간 증류수로 세척하였다. 준비된 diazonium solution(sodium nitrite: FRV-alkaline:naphthol AS-BI alkaline solution=1:1:1)을 첨가하여 약 15분간 실온에서 방치한 뒤 2분간 증류수로 세척하고, hematoxylin solution으로 2분간 다시 염색한 뒤 흐르는 물로 염색액을 제거한 다음 현미경으로 관찰하였다(20-22).

### 골수세포의 분리 및 파골세포 분화

4-5주령 된 ICR 마우스의 경골(tibia)을 적출하여, 양끝을 절단하고  $\alpha$ -MEM essential medium을 통과시켜 골수세포를 수집하고, 50 ng/mL M-CSF(macrophage-colony stimulation factor)를 처리하여 24시간 배양하였다. 미부착 세포를  $\alpha$ -MEM으로 세척한 후 96 well에 5×10<sup>4</sup> cells/well이 되도록 분주하고 50 ng/mL의 M-CSF가 첨가된  $\alpha$ -MEM 배지에 3일간 배양하였다. 그 후 50 ng/mL의 M-CSF와 100 ng/mL의 RANKL(Receptor Activator for Nuclear Factor  $\kappa$ B Ligand)을 함께 처리하고, 시료를 농도별로 처리하여 4일간 배양하였다.

### 파골세포의 TRAP(tartrate resistant acid phosphatase)활성과 염색

파골분화 정도를 Hotokezaka 등(23)의 방법에 따라 TRAP활성 측정과 TRAP염색으로 확인하였다. 96-well에 5×10<sup>4</sup> cells/well이 되게 cell을 접종하고 분화인자와 시료를 처리하여 4일간 배양하였다. 배지를 제거하여 PBS로 세척한 다음 10% formaldehyde로 고정된 cell에 기질용액(1.36 mg/mL 4-nitrophenyl phosphate disodium salt, 10 mM tartrate, 50 mM citrate buffer pH 4.6)을 100  $\mu$ L씩 분주하여 37°C에서 30분간 반응시켰다. 반응 후 효소 반응액을 새로운 plate에 옮기고 0.1 N NaOH로 반응을 중지시켜 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. TRAP 활성은 시료의 흡광도를 대조군의 흡광도에 대한 백분율로 표시하였다.

그리고 TRAP 염색은 먼저 50 mM tartrate acid를 포함하는 50 mM sodium acetate buffer 10 mL에 1 mg/mL naphthol AS-MX phosphate와 N,N-dimethylformamide 100  $\mu$ L를 첨가하여 염색액을 제조한 후 10% formaldehyde로 고정된 cell에 염색액을 45  $\mu$ L씩 분주하고 37°C에서 30분간 염색 후 현미경으로 관찰하였다.

### 통계 처리

실험결과는 통계 처리하여 평균치와 표준편차를 계산하였으며,

각 군간의 유의성 검정은 SAS program을 이용하여 5% 수준에서 Duncan's multiple range test를 이용하여 통계분석 하였다.

### 결과 및 고찰

#### 한약재 추출물의 조골세포 증식 및 ALP 활성화에 미치는 영향

MC3T3-E1 세포는 mouse calvaria 유래의 osteoblastic cell로 골의 형성과정에서 세포의 증식, 분화, 석회화 등 골아세포와 유사한 대사적 특징을 가지고 있으며, 조골세포 전구체로부터 전조골세포와 조골세포, 골내막세포 또는 골세포로 분화되는 과정에 속하는 세포이다(24-26). 따라서 골 형성과 관련된 연구에서 유용하게 사용되는 세포이다.

본 실험에 사용한 한약재들은 예로부터 골 질환에 약효가 있다고 알려진 한방자원 및 문헌 자료를 토대로 하여 15종의 한약재를 선정하였다(27). MC3T3-E1 세포에 이 15종의 한약재 추출물을 처리하여 세포증식에 미치는 영향을 관찰한 결과 Table 2와 같이, 10-50 µg/mL의 농도에서는 연근 추출물의 경우 76.8%의 세포 생존율을 보였고 다른 추출물들은 90% 이상의 높은 세포 생존율을 보였다. 그러나 100 µg/mL의 농도 처리시에는 달래, 음나무, 연근 3종의 추출물의 경우 약 30% 미만의 세포 사멸을 나타내었고, 다른 시료들에서는 세포 독성이 없음을 확인하였다.

조골세포는 세포막에 염기성 인산 분해 효소(ALP)를 가지고 있고, 이 효소는 세포의 외막과 석회화 조직에서 높은 농도로 발견되어 석회화 과정 동안 무기인산은 운반, 세포 분열이나 분화의 조절자 역할을 하며 조골세포 활성화의 표지인자로 널리 알려져 있다(28). 조골세포의 활성화에 미치는 영향을 알아보기 위해 조골세포 활성화의 지표효소로 널리 알려진 ALP를 측정하였다. 그 결과, 달래(*Allium monanthum* Maxim.), 연근(*Nelumbo nucifera* Gaer.), 차조기(*Perilla sikokiana* Britton.) 추출물을 제외한 다른 시료추출물에서 농도 의존적으로 ALP 활성이 증가되었으며, 특히 두충(*Eucommia ulmoides* Oliv.), 괘향(*Teucrium veronicoides* Max.) 추출물의 경우 처리 농도가 증가할수록 ALP 활성이 50% 이상의 유의적인 증가를 보였으며, 개다래(*Actinidia polygama*), 비해(*Dioscorea tokoro* Makino.), 형개(*Schizonepeta tenuifolia*) 추출물도 ALP 활성이 30% 이상 증가하였으며, 정공등(*Sorbus commixta*), 생강(*Zingiber officinale* Rosc.) 추출물에서도 10% 정도의 ALP 활성이 있음을 확인하였다(Table 2). 따라서 이들 추출물은 조골세포 증식 및 ALP 활성을 높이는 우수한 소재로 생각되었다.

조골세포내의 ALP효소 활성을 확인하기 위해 AZO 색소법으로 염색하였다. Naphthol AS-BI phosphate는 기질로 작용하여 조직 내의 ALP효소에 의해 가수분해 되어 orthophosphate와 naphthol로 유리되고, 유리된 naphthol은 반응액에 함유된 diazonium salt와 결합하여 AZO dye를 형성하여 효소활성이 나타난 부분이 붉게 염색되게 된다(20). 조골세포를 배양한 후 한약재 추출물중 ALP 활성이 높은 3종의 개다래, 두충, 형개 추출물을 처리하여 세포내의 ALP효소의 염색정도를 확인한 결과는 Fig. 1과 같다. 시료를 처리하지 않은 대조군과 비교하여 개다래, 두충, 형개 추출물을 처리한 경우 붉은색 반점이 확연히 증가한 것을 확인할 수 있었다. 해조류의 알칼리 이온수인 ENA-A를 처리하였을 때 조골세포의 활성이 증가함에 따라 ALP효소 활성이 증가하고 염색시에도 붉은 색 반점이 증가한다는 보고(29)와 유사하게, 3종의 시료를 처리하였을 때 ALP효소 활성 및 염색시 붉은 반점의 증가로 조골세포의 활성이 증가한 것으로 보여진다. 또한 천문동 추출물(30), 황금 추출물(31)의 경우에도 조골세포의 ALP 활성을 증가시켰다는 보고와 유사한 경향을 보였다. 따라서 개다래, 두

**Table 2. Effect of 15 extracts from medicinal herb on the proliferation and alkaline phosphatase (ALP) activities of MC3T3-E1 osteoblastic cells**

	Treatment		Proliferation (%)	ALP activity (%)
		Concentrations (µg/mL)		
Control		0	100.0±1.2 <sup>1)</sup>	100.0±0.2
	1	10	106±7.2	139.1±27.0
		50	98.8±4.7	135.0±30.2
2	100	94.4±7.5	136.2±12.1	
	10	99.9±2.8 <sup>2)</sup>	97.6±14.4 <sup>a</sup>	
	50	105.3±9.7 <sup>a</sup>	72.2±9.5 <sup>b</sup>	
3	100	75.7±17.1 <sup>b</sup>	99.3±14.3 <sup>a</sup>	
	10	100.5±5.8	107.1±10.8	
	50	94.2±8.3	104.1±26.0	
4	100	95.8±1.8	105.8±23.2	
	10	94.7±11.8	85.0±8.7	
	50	99.6±14.6	94.7±3.3	
5	100	82.7±7.8	95.3±9.7	
	10	101.6±9.7	136.7±21.0	
	50	93.7±2.5	121.5±20.6	
6	100	92.2±4.4	142.6±22.9	
	10	107.5±1.5	84.5±42.2	
	50	102.2±7.2	102.0±11.4	
7	100	105.1±7.3	118.8±35.4	
	10	102.4±8.9	119.0±12.9 <sup>b</sup>	
	50	100.0±11.2	156.3±8.5 <sup>a</sup>	
8	100	96.3±8.0	152.7±19.4 <sup>a</sup>	
	10	89.5±9.9	104.3±14.9	
	50	87.3±10.8	104.9±8.8	
9	100	69.4±3.1	86.3±6.7	
	10	80.6±2.9 <sup>a</sup>	88.7±8.7 <sup>ab</sup>	
	50	76.8±2.8 <sup>ab</sup>	93.4±11.6 <sup>a</sup>	
10	100	72.1±4.9 <sup>b</sup>	79.0±2.4 <sup>b</sup>	
	10	98.1±13.7	73.7±3.3	
	50	97.2±2.2	70.0±7.6	
11	100	95.4±13.9	64.6±4.3	
	10	103.8±2.1 <sup>a</sup>	92.7±9.3	
	50	90.5±1.6 <sup>b</sup>	89.7±25.5	
12	100	85.6±3.7 <sup>b</sup>	65.3±19.9	
	10	101.5±1.7 <sup>a</sup>	97.4±23.0	
	50	100.7±9.6 <sup>a</sup>	105.3±15.5	
13	100	85.3±5.6 <sup>b</sup>	123.6±10.2	
	10	92.9±3.8 <sup>b</sup>	115.3±14.7	
	50	111.3±7.8 <sup>a</sup>	117.5±4.4	
14	100	96.9±9.3 <sup>ab</sup>	110.3±22.3	
	10	96.7±3.6 <sup>a</sup>	123.3±8.4 <sup>b</sup>	
	50	90.2±8.3 <sup>ab</sup>	166.2±30.0 <sup>a</sup>	
15	100	86.0±6.6 <sup>b</sup>	154.6±12.4 <sup>a</sup>	
	10	98.6±7.3 <sup>a</sup>	109.6±11.7	
	50	86.4±7.1 <sup>ab</sup>	111.4±9.1	
	100	84.6±3.9 <sup>b</sup>	113.1±6.4	

<sup>1)</sup> Mean±SD (n=3).

<sup>2)</sup> Values with different superscripts are significantly different (p<0.05).

충, 형개 추출물은 MC3T3-E1 조골세포의 증식과 활성화에 효과가 있음을 확인하였다.

**Table 3. Effect of 15 extracts from medicinal herb on the mouse bone marrow osteoclastic cells proliferation and TRAP activity**

Treatment		Proliferation (%)	TRAP activity (%)
	Concentrations ( $\mu\text{g/mL}$ )		
Control	0	100 $\pm$ 0.1 <sup>1)</sup>	100 $\pm$ 1.2
	10	126.8 $\pm$ 2.8 <sup>b2)</sup>	60.4 $\pm$ 2.7 <sup>a</sup>
1	50	135.5 $\pm$ 2.2 <sup>a</sup>	42.2 $\pm$ 1.7 <sup>b</sup>
	100	114.3 $\pm$ 8.3 <sup>c</sup>	14.6 $\pm$ 1.8 <sup>c</sup>
	10	103.8 $\pm$ 16.0	85.5 $\pm$ 8.2 <sup>a</sup>
2	50	91.8 $\pm$ 16.7	83.6 $\pm$ 2.4 <sup>a</sup>
	100	86.6 $\pm$ 16.2	59.9 $\pm$ 1.9 <sup>b</sup>
	10	90.9 $\pm$ 1.5 <sup>a</sup>	60.9 $\pm$ 2.1 <sup>a</sup>
3	50	78.8 $\pm$ 6.6 <sup>b</sup>	47.2 $\pm$ 4.9 <sup>b</sup>
	100	42.8 $\pm$ 9.5 <sup>c</sup>	21.2 $\pm$ 2.9 <sup>c</sup>
	10	68.4 $\pm$ 8.4 <sup>a</sup>	43.7 $\pm$ 9.5 <sup>a</sup>
4	50	37.4 $\pm$ 5.1 <sup>b</sup>	13.9 $\pm$ 1.2 <sup>b</sup>
	100	22.4 $\pm$ 1.3 <sup>c</sup>	6.7 $\pm$ 0.7 <sup>c</sup>
	10	86.6 $\pm$ 11.4 <sup>a</sup>	57.4 $\pm$ 6.5 <sup>b</sup>
5	50	77.4 $\pm$ 15.9 <sup>ab</sup>	84.1 $\pm$ 10.0 <sup>a</sup>
	100	60.2 $\pm$ 13.8 <sup>b</sup>	69.2 $\pm$ 13.4 <sup>ab</sup>
	10	120.6 $\pm$ 7.7 <sup>a</sup>	95.2 $\pm$ 6.1 <sup>b</sup>
6	50	111.8 $\pm$ 1.0 <sup>b</sup>	107.3 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>
	100	87.0 $\pm$ 3.0 <sup>c</sup>	89.4 $\pm$ 0.8 <sup>b</sup>
	10	86.5 $\pm$ 7.9	53.7 $\pm$ 2.3 <sup>a</sup>
7	50	85.3 $\pm$ 9.3	18.0 $\pm$ 6.2 <sup>b</sup>
	100	87.8 $\pm$ 4.9	5.4 $\pm$ 0.3 <sup>c</sup>
	10	30.9 $\pm$ 2.5	25.1 $\pm$ 4.8 <sup>a</sup>
8	50	10.2 $\pm$ 0.6	3.0 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>
	100	9.4 $\pm$ 0.5	3.0 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>
	10	84.3 $\pm$ 16.7	92.4 $\pm$ 1.7 <sup>a</sup>
9	50	64.7 $\pm$ 16.2	64.6 $\pm$ 4.9 <sup>b</sup>
	100	58.8 $\pm$ 13.4	54.8 $\pm$ 9.7 <sup>b</sup>
	10	89.0 $\pm$ 7.4	65.0 $\pm$ 14.9 <sup>a</sup>
10	50	87.9 $\pm$ 11.9	49.8 $\pm$ 8.3 <sup>a</sup>
	100	78.5 $\pm$ 10.6	17.6 $\pm$ 7.6 <sup>b</sup>
	10	89.6 $\pm$ 5.0 <sup>a</sup>	89.4 $\pm$ 1.8 <sup>a</sup>
11	50	78.5 $\pm$ 5.2 <sup>b</sup>	72.9 $\pm$ 2.9 <sup>b</sup>
	100	53.7 $\pm$ 8.4 <sup>c</sup>	54.6 $\pm$ 2.6 <sup>c</sup>
	10	77.7 $\pm$ 5.7 <sup>a</sup>	22.4 $\pm$ 2.8 <sup>a</sup>
12	50	75.3 $\pm$ 4.1 <sup>a</sup>	7.6 $\pm$ 1.5 <sup>b</sup>
	100	54.1 $\pm$ 3.2 <sup>b</sup>	3.4 $\pm$ 0.2 <sup>c</sup>
	10	123.1 $\pm$ 5.9 <sup>a</sup>	76.3 $\pm$ 11.9 <sup>a</sup>
13	50	124.7 $\pm$ 0.9 <sup>a</sup>	40.9 $\pm$ 6.3 <sup>b</sup>
	100	105.0 $\pm$ 10.3 <sup>b</sup>	21.3 $\pm$ 5.1 <sup>c</sup>
	10	132.7 $\pm$ 12.1 <sup>a</sup>	60.7 $\pm$ 12.9 <sup>a</sup>
14	50	141.7 $\pm$ 16.3 <sup>a</sup>	37.3 $\pm$ 6.6 <sup>b</sup>
	100	97.1 $\pm$ 11.6 <sup>b</sup>	18.6 $\pm$ 4.4 <sup>c</sup>
	10	121.2 $\pm$ 3.6	103.3 $\pm$ 5.5 <sup>b</sup>
15	50	118.9 $\pm$ 4.1	117.1 $\pm$ 1.2 <sup>a</sup>
	100	110.4 $\pm$ 3.0	100.3 $\pm$ 2.7 <sup>b</sup>

<sup>1)</sup>Mean $\pm$ SD (n=3).<sup>2)</sup>Values with different superscripts are significantly different ( $p < 0.05$ ).**한약재 추출물의 파골세포 분화 및 활성에 미치는 영향**

파골세포는 조혈모세포(hematopoietic precursor)에서 유래하여

단핵 대식세포로부터 분화되며, 일반적으로 macrophage stimulating factor(M-CSF)와 tumor necrosis factor(TNF)-related activation-induced cytokine(TRANCE, RANKL or ODF) 두 가지 cytokine에 의하여 조절된다(32). 따라서 본 연구에서는 마우스의 골수세포를 분리하여 M-CSF와 RANKL을 이용하여 파골세포 분화를 유도하였다.

파골세포는 분화가 진행되면서 단핵의 전파골세포를 형성하지만 세포가 융합되면 다핵의 성숙 파골세포를 형성하게 되고 이는 골 표면에 부착하여, 골을 흡수하는 작용을 한다(33). 또한 파골세포는 TRAP과 칼시토닌 수용체를 가지며, 산생성이 활발한 특징을 가진다. 이에 TRAP은 파골세포의 표지인자로 널리 사용되고 있다(34,35).

마우스 골수세포를 이용하여 한약재 추출물의 세포 증식에 미치는 영향을 관찰한 결과(Table 3), 처리시료 농도가 증가할수록 파골세포의 생존율이 감소하는 경향을 보였으며, 세신 및 음나무 추출물을 처리한 경우 10  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서도 30.9-68.4% 정도의 낮은 생존율을 보였으나, 이들 시료를 제외한 13종의 추출물을 10  $\mu\text{g/mL}$ 의 처리시에는 80% 이상의 세포 생존율을 확인하였다. 그리고 50  $\mu\text{g/mL}$ 와 100  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서는 개다래, 달래, 감(*Diospyros kaki* Thunb.), 두충, 차조기, 정공등, 광향, 생강 추출물에서 80% 이상의 세포 생존율을 나타내었으나, 두릅피(*Aralia continentalis*), 세신(*Asarum sieboldii*), 비해, 음나무(*Kalopanax pictus* Nakai.), 연근, 단삼(*Salvia miltorrhiza* Bunge.), 형개 추출물에서는 세포 독성이 있음을 확인하였다.

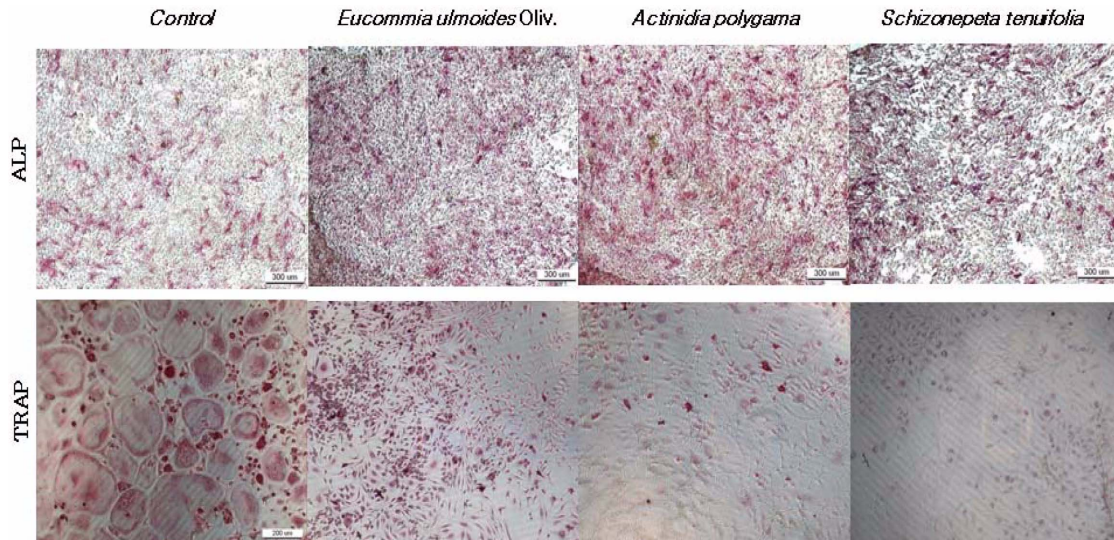
그리고 파골세포의 분화 형태를 측정하고, 세포막의 특이 효소인 TRAP 효소활성을 측정한 결과 10  $\mu\text{g/mL}$  농도의 개다래, 두릅피, 비해, 두충, 광향 추출물에서 세포독성 없이 TRAP활성을 40% 정도 억제하는 것으로 나타났고, 형개 추출물 10  $\mu\text{g/mL}$  농도 처리시에 70% 정도의 가장 큰 TRAP활성이 억제됨을 확인하였다. 또한 개다래, 두릅피, 차조기, 정공등, 광향 추출물을 50  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리시에 60% 정도의 TRAP활성이 억제되었고, 특히 50  $\mu\text{g/mL}$ 의 형개, 두충 추출물 처리시에 각각 7.6 $\pm$ 1.5%, 18.0 $\pm$ 6.2%의 TRAP활성을 보여 파골세포의 분화가 가장 크게 억제됨을 확인하였다. 또한 100  $\mu\text{g/mL}$ 의 개다래, 두충, 차조기, 정공등, 광향 추출물의 처리시에 세포독성 없이 파골세포의 TRAP활성이 억제됨을 확인하였다.

또한 이들 시료중 개다래, 두충, 형개 추출물의 파골 분화에 미치는 영향을 TRAP 염색으로 확인한 결과, 대조군에서는 다핵의 파골세포를 확인할 수 있었으나, 50  $\mu\text{g/mL}$ 의 개다래, 두충, 형개 추출물을 처리한 군에서는 단핵의 전파골세포만 발견되거나 파골세포가 확인되지 않았다(Fig. 1). 따라서 개다래, 두충, 형개 추출물은 파골세포의 분화 및 억제에 관한 효과가 있음을 확인하였다.

이와 같이 개다래, 두충, 형개, 광향, 정공등 추출물의 경우 조골세포의 증식과 파골세포의 억제에 관여하는 우수한 소재임을 확인하여 향후 골다공증의 치료제로서의 개발 가능성을 가진 소재로 생각된다.

**요 약**

천연물 유래의 생약에서 조골세포 증식을 높이면서, 파골세포의 분화 억제에 효과가 있는 시료를 검색하고자 15종의 한약재 추출물의 효과를 검토해 보았다. Mouse calvaria 유래의 osteoblastic cells를 이용하여 세포 생존률 및 ALP 활성을 측정하였으며, 또한 마우스 골수 세포를 이용하여 M-CSF와 RANKL을 처리하여 파골세포의 분화를 유도한 후, 세포 생존율과 TRAP효소활성



**Fig. 1. Effect of *Eucommia ulmoides*, *Actinidia polygama* and *Schizonepeta tenuifolia* var. extracts on osteoblast formation in MC3T3-E1 cells and osteoclast formation in mouse BMMΦ.** MC3T3-E1 cells were cultured with 3 kinds of extracts (10 μg/mL), 50 μg/mL vitamin C and 10 mM β-glycerol phosphate for 72 hr cultured in 96-well plates. After culturing for 3 days, cells were fixed and measured ALP activities. Mouse BMMΦ (bone marrow macrophage) cells were cultured with 3 kinds of extracts (50 μg/mL), RANKL (100 ng/mL) and M-CSF (50 ng/mL) in 96-well plates for 72 hr. After culturing for 3 days, cells were fixed and measured TRAP activities.

을 측정하였다. 그 결과, 두충, 광향, 개다래, 형개, 정공등 추출물은 조골세포 증식 및 ALP 활성을 증가시켰으며, 파골세포 활성을 나타내는 TRAP활성이 억제되는 것으로 확인되었다. 따라서 이 추출물들은 조골세포의 기능을 향상시키는 동시에 파골세포의 기능을 억제하여 골 흡수와 관련된 질환과 함께 골 질환 예방에 효과가 있을 것으로 생각되어진다.

### 감사의 글

이 논문은 2010년 교육과학기술부 지역거점연구단육성사업/노화극복·웰빙의 위한 융합의료기술개발사업단 및 지식경제부 계명대학교 전통미생물자원개발 및 산업화연구센터의 지원에 의한 것입니다.

### 문헌

- Parfitt AM. Bone remodeling: Relationship to the amount and structure of bone the pathogenesis and prevention of fractures. pp. 45-93. In: Osteoporosis, Etiology, Diagnosis and Management. Melton LJ (ed). Raven Press, New York, NY, USA (1988)
- Cho GJ, Park HT, Shin JH, Kim T, Hur JY, Kim YT, Lee KW, Kim SH. The relationship between reproductive factors and metabolic syndrome in Korean postmenopausal women. Korean Soc. Menopause 16: 998-1003 (2009)
- Suda T, Nakamura J, Jimi B, Takahashi N. Regulation of osteoclast function. J. Bone Miner. Res. 12: 869-879 (1997)
- Kalervo V, Haibo Z, Mika M, Jussi MH. The cell biology of osteoclast function. J. Cell Sci. 113: 377-381 (2000)
- Hwang KK, Huh NK, Lee JH. Studies on the signaling molecules in RANK, an osteoclast differentiation receptor. Oral Biol. Res. 24: 245-254 (2000)
- Grigoriades AE, Wang ZQ, Cecchini MG, Hofstetter W, Felix R, Fleisch HA, Wagner EF. c-Fos: A key regulator of osteoclast-macrophage lineage determination and bone remodeling. Science 266: 443-448 (1994)
- Del FA, Teti A, Rucci N. Osteoclast receptors and signaling. Arch. Biochem. Biophys. 473: 147-160 (2008)

- Oh HJ. Therapy of osteoporosis in climacteric. J. Korean Acad. Fam. Med. 21: 20-27 (2005)
- Pole HAP, Felsenberg D, Hanley DA, Stenpan J, Munoz-Torres M, Wolkins TJ, Qui-sheng G, Galich M, Vandormael K, Yates AJ. Multinational placebo-controlled, randomised trial of the effects of alendronate on bone density and fracture risk in postmenopausal women with low bone mass: Results of the FOSIT. Osteoporosis Int. 9: 461-468 (1999)
- Aldercreutz H, Mazur W. Phyto-estrogens in relation to cancer and other human health risks. Proc. Nutr. Soc. 55: 399-417 (1996)
- Boonen A, Broos P, Dequeker J. The prevention of treatment of age-related osteoporosis in the elderly by systemic recombinant growth factor therapy (rhIGF-I or rhRGF-β): A perspective. J. Int. Med. 242: 285-290 (1997)
- Wattel A, Kamel S, Mentaverri R, Lorget F, Prouilet C, Petit JP, Fardelonne P, Brazier M. Potent inhibitory effect of naturally occurring cell death. Biochem. Biophys. Res. Co. 292: 94-101 (2002)
- Lee YS. Effect of isoflavones on proliferation and oxidative stress of MC3T3-E1 osteoclast-like cells. Korean Soybean Digest. 18: 35-42 (2001)
- Cho SH. The electron microscopic observation of the effects of estrogen on the osteoblast-like cell(Ros-17/2.8-5) differentiation. J. Korean Soc. Menopause 1: 28-34 (1995)
- Kinto NM, Iwamoto M, Enomoto-Iwamoto S, Noji H, Ohuchi H, Yoshioka. Fibroblasts expressing sonic hedgehog induce osteoblast differentiation and ectopic bone formation. FEBS Lett. 404: 319-323 (1997)
- Mori Y, Hiraki Y, Shukunami C, Kakudo S, Shiokawa M, Kagoshima M. Stimulation of osteoblast proliferation by the cartilage-derived growth promoting factors chondromadulin-I and -II. FEBS Lett. 406: 310-314 (1999)
- Green LM, Reade JL, Ware CF. Rapid colometric assay for cell viability: Application to the quantitation of cytotoxic and growth inhibitory lymphokines. J. Immunol. Meth. 70: 257-261 (1984)
- Choi HH, Kim JK, Kim SB, Chung CH. Effects of Platelet-derived growth factor on the activity of osteoblastic cells. J. Periodontal Res. 29: 785-804 (1999)
- Kim JW, Lee HJ, Kang JH, Ohk SH, Choi BK, Yoo YJ, Cho KS, Choi SH. The effect of cyclosporin A on osteoblast *in vitro*. J. Periodontal Res. 30: 747-757 (2000)

20. Cho SH. The electron microscopic observation of the effects of estrogen on the osteoblast-like cell (Ros-17/2.8-5) differentiation. J. Korean Soc. Menopause 1: 28-34 (1995)
21. Choi JY, Lee BH, Song KB, Park RW, Kim IS, Sohn KY. Expression patterns of bone-related proteins during osteoblastic differentiation in MC3T3-E1 cells. J. Cell. Biochem. 61: 609-618 (1996)
22. Yoo MC, Han CS, Jang SG, Han IK. The effects of the several hormones on the MC3T3 osteoblast cells-*in vitro* study. J. Korean Orthop. Assoc. 24: 879-888 (1989)
23. Hotokezaka H, Sakai E, Kanaoka K, Saito K, Matsuo KI, Kitaura H, Yoshida N, Nakayama K. U0126 and PD98059, specific inhibitors of MEK, accelerate differentiation of RAW 264.7 cells into osteoclast-like cells. J. Biol. Chem. 277: 47366-47372 (2002)
24. Centrella M, McCarth TL, Canalis E. Transforming growth factor  $\beta$  is a bifunctional regulator of replication and collagen synthesis in osteoblast-enriched cell cultures from fetal rat bone. J. Biol. Chem. 262: 2869-2874 (1987)
25. Letton RW. Regulation of 25-hydroxyvitamin D3 metabolism in cultures of osteoblastic cells. J. Bone Miner. Res. 5: 815-820 (1990)
26. Pfeilschifter J, Wolf O. Chemotactic response of osteoblastic cells to Transforming growth factor B. J. Bone Miner. Res. 5: 815-823 (1990)
27. Vijayanarayana K, Rodrigues RS, Chandrashekhar KS, Subrahmanyam EVS. Evaluation of estrogenic activity of alcoholic extract of rhizomes of *Curculigo orchoides*. J. Ethnopharmacol. 114: 241-245 (2007)
28. Stein GS, Lian JB, Owen TA. Relationship of cell growth to the regulation for tissue-specific gene expression during osteoblast differentiation. FASEB J. 4: 3111-3123 (1990)
29. Lee JW, Jeon SK, Kim HJ, Lee IS. Effects of ENA (ENA actim-neral resource A) ion water on the activity and differentiation of MC3T3-E1 osteoblastic cell. J. Life Sci. 16: 925-931 (2006)
30. Lee SY, Kin SN, Kin JK. Effects of *Asparagus cochinchinensis*(Lour.) Merr. on the stimulation of osteoblast differentiation and inhibition of osteoclast generation. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 37: 16-19 (2008)
31. Shin JM, Park CK, Shin EJ, Jo TH, Hwang IK. Effects of *Scutellaria radix* extract on osteoblast differentiation and osteoclast formation. Korean J. Food Sci. Technol. 40: 674-679 (2008)
32. Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclast. Science 289: 1504-1508 (2000)
33. Mok SK, Shin IS. The effects of prostagladine and dibutyryl cAMP in osteoclastic cell activity and osteoclast generation. J. Wonkwang Dental Res. Int. 6: 43-62 (1996)
34. Karst M, Gorny G, Galvin RJ, Oursler MJ. Roles of stromal cell RANKL, OPG, and M-CSF expression in biphasic TGF- $\beta$  regulation of osteoclast differentiation. J. Cell Physiol. 200: 99-106 (2004)
35. Vananen HK, Horton M. The osteoclast clear zone is a specialized cell extracellular matrix adhesion structure. J. Cell Sci. 108: 2729-2732 (1995)