# 威靈仙이 RANKL 처리 RAW 264.7 Cell에 미치는 영향

대전대학교 한의과대학 부인과교실 송영훈, 유정은, 임현정, 유동열

# ABSTRACT

Effects of Clematidis Radix Extract on Osteoclastogenesis and Gene Expression in RANKL-induced RAW 264.7 Cell

Young-Hun Song, Jeong-Eun Yoo, Hyun-Jung Lim, Dong-Youl Yoo Dept. of Gynecology, College of Oriental Medicine, Dae-Jeon University

**Purpose:** This study was performed to evaluate the effect of Clematidis Radix extract(CB) on osteoclast differentiation and gene expression. The osteocastogenesis and gene expression were determined in RANKL-induced RAW 264.7 cell.

**Methods:** RANKL-induced RAW 264.7 cell with Clematidis Radix extract was stained by TRAP which is expressive marker of osteoclast. The gene expression of RANK, TNFα, IL-6, iNOS and Cathepsin, those are factors related to bone resorption, was estimated by using Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR).

**Results:** Clematidis Radix extract decreased the number of TRAP-positive multi nuclei cell, and decreased the gene expression of RANK, TNFa, IL-6, iNOS and Cathepsin K in RANKL-induced RAW 264.7 cell.

**Conclusion:** It is concluded that Clematidis Radix extract might decrease the bone resorption resulted from decrease of osteoclast differentiation and it's related gene expression.

Key Words: RANKL-induced RAW 264.7 Cell, Clematidis Radix, Osteoporosis

## I. 서 론

세계보건기구는 골다공증을 골량의 감소와 미세구조의 이상을 특징으로 하는 전신적인 골격계질환으로 결과적으로 뼈 가 약해져서 부러지기 쉬운 상태가 되는 질환으로 정의하고 있는데, 빠른 속도로 초고령화 사회에 진입하고 있는 국내현 실상 골다공증의 유병률은 매우 높아질 것이 분명하고, 골다공증 골절의 치료비 용도 가파르게 증가할 것이다<sup>1)</sup>.

골다공증의 유발 요인으로는 여성의 폐경, 갑상선 기능항진, 당뇨병, 스트레스, 흡연 및 운동 부족, 신체적 노화와 glucocorticoid 계열 약물의 복용 등이 알려져 있다<sup>2-4)</sup>.

골 대사는 골 형성을 담당하는 조골세 포와 골 흡수를 담당하는 파골세포의 작 용으로 이루어져 있으며, 이 들 세포의 기능이 균형을 이루어 항상성을 유지한 다. 만약 조골세포 활성이 저하되거나 파골세포 활성이 증가되면 골밀도가 감 소하여 골다공증이 유발될 수 있다<sup>2-4)</sup>.

뼈 조직내에 존재하는 파골세포는 대식세포 계열의 전구세포로부터 다양한 분화유발인자들에 의해 분화되어 활성화된다<sup>5,6)</sup>. 특히, 파골세포 분화 유발인자인 RANKL(receptor activator of nuclear factor kappa B ligand)은 조골세포로부터 분비되며, 파골전구세포 및 파골세포표면에 존재하는 RANK(receptor activator of nuclear factor kappa B)와 결합하여 파골전구세포가 파골세포로 분화하는 것을 촉진한다<sup>7)</sup>. 분화한 파골세포는 MAPK, ERK, JNK, p38 활성화 과정과 AP-1, NFATc1, c-Fos, c-jun, NF-ĸB의 활성

화, Src, Akt 활성화 등을 통하여 뼈조직을 파괴하는 단백질인 TRAP (tartarate resistant acid phosphatase) 및 cathepsin K 합성을 촉진하게 된다<sup>8-10)</sup>.

한의학 문헌에서 '골다공증'이라는 직접적인 언급은 찾아볼 수 없지만, <素問・痿論><sup>11)</sup>에 腎氣가 熱하여 腎水가 不足하면, 骨이 乾枯하며 骨髓가 骨腔내에充滿되지 못하고 마르게 되어 '骨痿'가된다고 하였고, <素問・長刺節論><sup>11)</sup>에서는 寒氣로 인해 骨髓酸痛한 것을 '骨痺'라 하였는데, 이는 현대의학의 골다공증과 類似한 것으로 認識되어진다<sup>12)</sup>.

골다공증은 韓醫學에서 年老體衰, 臟腑失調, 風邪侵襲 등을 그 原因으로 보고, 脾氣虛, 腎陰虛, 腎陽虛, 腎陰陽兩虛, 氣血兩虛, 風邪偏勝 등으로 변증하여 滋陰補腎, 補腎將陽, 補益氣血, 祛風通絡하는 치법을 활용한다. 특히 風은 百病之長인데 正氣가 不足하면 風邪가 承虛侵襲하여 관절에 遍歷하고 筋脈을 阻隔하면 骨髓가 失養하여 發病하게 된다<sup>13-17)</sup>. 골다공증에 對한 實驗的 研究로는, 정<sup>18)</sup>, 金<sup>19)</sup>, 차<sup>20)</sup>, 李<sup>21)</sup>, 曹<sup>22)</sup>의 生血補髓湯, 鹿茸 및 六味地黃湯加鹿茸, 左歸飲과 右歸飲, 四物湯과 六味地黃湯, 借力丸變方 등이 골다공증에 有效하다는 報告가 있다.

威靈仙(Clematidis Radix)은 미나리아 재비과에 속한 으아리의 根과 根莖을 건조한 것으로, 祛風除濕 通絡止痛의 효능이 있어 한방에서 風濕痺痛, 筋骨肢痛, 脚氣疼痛등을 치료하는 데에 활용되고 있다<sup>23)</sup>. 주성분으로는 saponin, clematoside A, anemonol 등이 보고되었으며, 최근연구결과, 면역증강 작용, 항염증 작용, 관절염 치료작용 등이 보고되었다<sup>24-27)</sup>.

본 연구는 祛風除濕 通絡止痛의 효능

과 관절염 치료작용이 있다고 보고된 威靈仙 추출물이 골다공증에도 효과적일 것으로 사료되어 파골세포의 분화와 기 능 활성화에 관여하는 인자들에 미치는 영향을 평가하고자 하였다. 이를 위하여 RANKL로 자극한 RAW 264.7 cell에서 의 TRAP(+) 세포 형성능을 측정하였 으며, 관련 단백질 유전자인 RANK, TNFa, IL-6, iNOS, Cathepsin K 등의 유전자 발현에 대하여 연구한 결과 유의 한 성적을 얻었기에 보고하는 바이다.

## Ⅱ. 실 험

### 1. 재 료

1) 한약재 추출 및 검액 제조

실험에 사용한 威靈仙(*Clematis manshurica* RUPR.)은 둔산한방병원에서 구입한 것을 정선하여 사용하였다.

威靈仙 100 g을 플라스크에 넣은 후, MeOH 500 ml를 가하고 6시간 이상 가열하여 환류 추출하였다. 여과지를 이용하여 여과한 다음, 여액을 evaporator (EYELA, Japan)을 이용하여 감압 농축한 다음 농축액을 동결 건조(8.2 g)하여실험 시까지 냉동보관 하였다. 실험 시에는 威靈仙 추출물(이하 CB라 함)을 dimethyl sulfoxide(DMSO, Sigma, USA))를 이용하여 배지에 녹인 후, pore size 0.45 μm의 여과지를 통과시킨 후 사용하였다.

## 2) 세 포

실험에 사용된 파골세포 전구세포는 mouse myeloid 세포주인 RAW 264.7 cell에 RANKL을 처리하여 유도된 세포모델을 사용하였다. 사용된 RAW 264.7

cell은 한국세포주은행에서 구입하였다.

## 2. 방 법

#### 1) RAW 264.7 cell 배양

RAW 264.7 cell은 DMEM (Dulbecco's modified eagle medium, Gibco/BRL, USA)/10% FBS/PC-SM 배지를 이용하여 CO<sub>2</sub> 세포 배양기에서 배양하였으며, 세포 수는 5×10³ cells/well 로 96 well plate를 이용하여 배양하였다. 24시간 배양 후 배양액을 버린 후, 10% FBS(fetal bovine serum, Gibco/BRL Co., USA), 50 ng/ml RANKL, 1 ng/ml TGFβ가 참가된 α-minimal essential medium(α-MEM)으로 교환하여 세포를 배양했다. 배양액에 50, 100, 200 μg/ml 농도로 CB를 첨가해 주었다. 2일에 한번 씩 동일한 배지로 교환해 주면서 6일간 배양하였다.

#### 2) 약물처리

RANKL 처리 대조군은 Control (C) 로, 실험군은 50  $\mu$ g/ml의 威靈仙 추출물을 투여한 군(CB50), 100  $\mu$ g/ml를 투여한 군(CB100), 200  $\mu$ g/ml를 투여한 군(CB200)으로 하였다.

## 3) TRAP 형성 측정

RANKL 처리로 RAW 264.7 cell을 파골세포로 만든 후, 성숙한 파골세포의 발현 marker로 알려진 TRAP을 염색하여 TRAP-positive 다핵세포를 확인하였다. 분화시킨 세포를 PBS로 세포를 2회세척하고, 3.7% formaldehyde-citrate-acetone 용액으로 10분 고정시키고 증류수로 2회세척하였다. 2% TRAP fast garnet GBC base 용액과 NaNO3 용액을 같은 비율로섞어 만든 용액과 5% naphtha AS-BI phosphoric acid, 4% acetic acid, 2% tartaric acid를 포함한 용액을 고정시킨

세포에 처리하고 상온에 30분 이상 방치하였다. 광학현미경으로 관찰하여 핵이 3개 이상인 TRAP-positive 다핵세포 {TRAP(+) MNCs}를 계수하여 파골세포의 생성지표로 하였다.

#### 4) 유전자 발현 측정

## (1) total RNA 분리

RNA를 분리하기 위하여 배양세포의 배지를 제거한 다음, 4℃ PBS로 3회 세 척하였다. 세포를 모은 다음, 750×g에서 10분간 원심 분리한 다음, ice cold PBS 로 2회 씻었다. 침전된 세포에 lysis buffer를 가하여 용해시킨 다음, 12,000×g 에서 10분간 원심 분리하여 상층을 취하 였다. 다시 1 M sucrose가 함유된 tris buffer 위에 loading한 다음, 36,000 rpm 에서 160분간 원심분리 하였다. Polysome pellet을 취하여 SDS buffer에 녹인 후, 37℃에서 30분간 incubation 시켰다. Sodium acetate buffer를 가한 다음, phenol/CH3Cl 용액으로 추출하였다. NaCl을 0.2 M이 되도록 가한 다음, EtOH를 가한 후 -20℃ 에서 12시간 보관하였다. 침전물을 75% EtOH로 2회 세척한 다음 건조시켰다. 유전자 발현에 필요한 RNA양을 대조군 과 시험군에서 mRNA양이 같도록 조정 한 다음, 전기영동으로 확인하여 사용하 였다.

### (2) cDNA 제조

대조군 및 실험군에서 각각 분리한 total RNA 액 10  $\mu$ l(10  $\mu$ g RNA 함유)에 oligo dT (Promega, USA) 1  $\mu$ l (2  $\mu$ g/ $\mu$ l)를 넣은 후 조심스럽게 혼합한 다음, 90  $^{\circ}$ C 에서 5분간 incubation하였다. Primer가 annealing 하도록 실온에서 약 10분간 방치한 후 4  $^{\circ}$ C 로 유지하며 다음 시약을 가하였다. 5배의 cyscript buffer 4  $\mu$ l,

0.1M DTT 2  $\mu$ l, dUTP nucleotide mix 1  $\mu$ l, dUTP cydye-labelled nucleotide 0.1  $\mu$ l, cyscript reverse transcriptase 1  $\mu$ l, H<sub>2</sub>O 0.9  $\mu$ l를 첨가하여 총 20  $\mu$ l로 한 후, 아주 조심스럽게 손으로 tipping 혼합하였다. 이 후, 42℃에서 90분간 incubation 한 후, 얼음 상에 방치하였다. 여기에 2.5 M NaOH을 2  $\mu$ l 씩 가한 후 37℃에서 15분간 incubation하였으며, 2 M Hepes buffer(free acid)를 10  $\mu$ l 가하여 중화시켰다. 각각의 시약은 Amersham Bioscience(USA) 에서 구입하였다.

## (3) Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Oligo (dT)12-18, reaction buffer(50 mM Tris-HCl, 75 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, pH 8.3), 1 mM dNTP (Biotools, Spain)과 200 unit M-MLV -RT(Molonev murine leukemia virus reverse transcriptase, Promega, USA)를 분리한 RNA에 처리하여 역전사를 수행 함으로써 cDNA를 합성하였다. PCR은 total volume 15 #에 10배의 PCR buffer, 0.2 mM dNTPs, 2 pmole의 sense 및 antisense primer를 넣은 혼합액에 cDNA 와 1.25 unit의 Tag polymerase (Biotools, Spain)을 넣어 PCR을 시행하였다. RANK 의 sense primer는 GCA AAC CTT GGA CCA ACT GCA C이었으며, antisense는 AAT CCA CCG TGC TTT CAG TCC C을 사용하였다. TNFa의 sense primer 는 ATG AGC ACA GAA AGC ATG ATC, antisense 

TAC AGG CTT GTC ACT CGA ATT를 사용하였으며, IL-6 의 sense primer는 GGA GAG ACT ATC AAG ATA GT, antisense는 ATG GTC AGT AGA CTT TTA CA를 사용하였

다. iNOS의 sense primer는 AAT GGC AAC ATC AGG TCG GCC ATC ACT, antisense는 GCT GTG TGT CAC AGA AGT CTC GAA CTC를 사용하였으며, Cathepsin K의 sense primer는 TTA ATT TGG GAG AAA AAC CT. CAT AAT를 사용하였다. Control로는 GAPDH를 사용하였으며 sense primer는 CAGC CTC GTC CCG TAG ACA AA 이었으며, antisense는 CAC GAC ATA CTC AGC ACC GGC 이었다. PCR 조 건은 94℃ 4분, 30 cycles의 [94℃ (30 초), 59℃ (30초), 72℃ (45초)], 72℃ 10 분이었다(Perkin Elmer, USA) 증폭된 PCR 산물을 2% agarose gel에 전기영동 한다. 전기영동 결과 나온 band를 density 분석 프로그램인 Gel-Pro analyzer 3.1 (Media Cybernetics. USA)을 이용하여 구했다.

## (4) Real time RT-PCR

우선 시험관에 정량한 RNA 5 μg, 50  $ng/\mu \ell$ 의 random hexamer 3  $\mu \ell$ , 10 mM dNTP 1 μℓ를 넣고 diethyl pyrocarbonate (DEPC, Sigma, USA) 처리된 증류수를 가하여 10 μℓ의 RNA/primer mixture를 만들었다. 실험용 sample을 65℃에서 5 분간 incubation 시킨 후 1분 이상 얼음 에 방치하였다. Reaction mixture으로 10 배의 RT buffer 2  $\mu \ell$ , 25 mM MgCl<sub>2</sub> 4  $\mu\ell$ , 0.1 M DTT 2  $\mu\ell$ , RNase 1  $\mu\ell$ 을 섞 어 준비하였다. Reaction mixture를 RNA /primer mixture에 가하여 섞고 실온에 2분간 방치한 후, SuperScript II RT 1 μl (50 units)를 가하고 25℃에 10분간 incubation 시켰다. 다시 42℃에서 50분 간 incubation 시킨 다음, 70℃에서 15분 간 가열하여 inactivate 시키고 ice 상에서 식혔다. RNase 1 #를 가하고 다시 37℃에서 20분간 incubation 시킨 다음, 사용 시까지 -20℃에 보관하였다. 각각의 optical tube에 2배의 SYBR Green Mix 12.5 #l, cDNA 0.2 #l, 5 pmol/#l primer pair mix 1 #l, 11.3 #l H2O를 넣고, 50℃ 2분 1 cycle, 95℃ 10 min 1 cycle, 95℃ 15 sec, 60℃ 30 sec, 72℃ 30 sec 40 cycles, 72℃ 10 min 1 cycle로 증폭시켰다. PCR을 마친 후 tube를 꺼낸 다음, 반응액 5 #l를 사용하여 3% agarose gel에서 PCR specificity를 측정했다. SDS 7000 software를 사용하여 real time PCR 결과를 분석하였다.

## 3. 통계 처리

각 결과에 대한 유의성 검증은 student's t-test를 이용하였다. p<0.05 인 경우 유의성이 있다고 판정하였다.

# Ⅲ. 실험성적

## 1. TRAP 양성 세포 형성에 미치는 영향

실험 결과, CB  $50\mu g/m \ell$  투여군은 대조군에 비해 TRAP-positive 다핵세포수를 약 9% 증가시켰고, CB  $100\mu g/m \ell$  투여군은 약 37% 감소시켰다. 또한, CB  $200\mu g/m \ell$  투여군도 대조군에 비해 약 66% 감소시켰다(p<0.01)(Fig. 1).

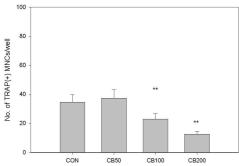


Fig. 1. Effects of CB on the Formation of TRAP(+) MNCs in RANKL-induced RAW 264.7 cells.

C: RANKL (50 ng/ml)

CB50: RANKL (50 ng/m $\ell$ ) + 50  $\mu$ g/m $\ell$  of CB CB100: RANKL (50 ng/m $\ell$ ) + 100  $\mu$ g/m $\ell$  of CB CB200: RANKL (50 ng/m $\ell$ ) + 200  $\mu$ g/m $\ell$  of CB \*\*: p<0.01 vs C

## 2. 유전자 발현 측정

## 1) RANK 발현에 미치는 영향

실험 결과, CB는 200  $\mu g/m \ell$ , 100  $\mu g/m \ell$ 농도에서 대조군에 비해 유전자 발현을 유의성 있게 (p<0.01) 억제하였다(Fig. 2).

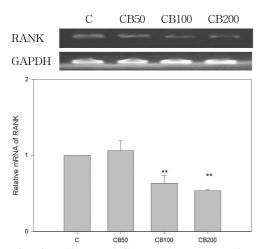


Fig. 2. Effects of CB on the expression of RANK in RANKL-induced RAW 264.7 cells.

C: RANKL (50 ng/ml)

CB50: RANKL (50 ng/m $\ell$ ) + 50  $\mu$ g/m $\ell$  of CB CB100: RANKL (50 ng/m $\ell$ ) + 100  $\mu$ g/m $\ell$  of CB CB200: RANKL (50 ng/m $\ell$ ) + 200  $\mu$ g/m $\ell$  of CB \*\*: p<0.01 vs C

## 2) TNFa 발현에 미치는 영향

실험 결과, CB는 200  $\mu$ g/m $\ell$ , 100  $\mu$ g/m $\ell$ , 50  $\mu$ g/m $\ell$  농도에서 대조군에 비해 유전 자 발현을 유의성 있게 (p<0.01) 억제하 였다(Fig. 3).

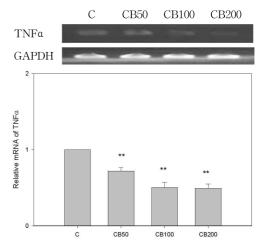


Fig. 3. Effects of CB on the expression of TNFa in RANKL-induced RAW 264.7 cells.

C: RANKL (50 ng/m $\ell$ ) CB50: RANKL (50 ng/m $\ell$ ) + 50  $\mu$ g/m $\ell$  of CB CB100: RANKL (50 ng/m $\ell$ ) + 100  $\mu$ g/m $\ell$  of CB CB200: RANKL (50 ng/m $\ell$ ) + 200  $\mu$ g/m $\ell$  of CB \*\*: p<0.01 vs C

3) IL-6 유전자 발현에 미치는 영향 실험결과, CB는 200 μg/ml, 100 μg/ml, 50 μg/ml 농도에서 대조군에 비해 유전 자 발현을 유의성 있게 (p<0.01) 억제하 였다(Fig. 4).

## 4) iNOS 발현에 미치는 영향

실험 결과, CB는 200  $\mu$ g/ml, 100  $\mu$ g/ml, 50  $\mu$ g/ml 농도에서 대조군에 비해 유전 자 발현을 유의성 있게 (p<0.01) 억제하 였다(Fig. 5).

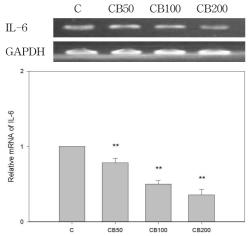


Fig. 4. Effects of CB on the expression of IL-6 in RANKL-induced RAW 264.7 cells.

C: RANKL (50  $ng/m\ell$ )

CB50: RANKL (50 ng/m $\ell$ ) + 50  $\mu$ g/m $\ell$  of CB CB100: RANKL (50 ng/m $\ell$ ) + 100  $\mu$ g/m $\ell$  of CB CB200: RANKL (50 ng/m $\ell$ ) + 200  $\mu$ g/m $\ell$  of CB \*\*: p<0.01 vs C

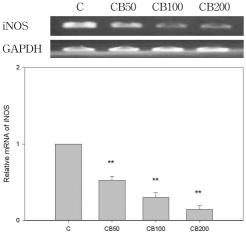


Fig. 5. Effects of CB on the expression of iNOS in RANKL-induced RAW 264.7 cells.

C: RANKL (50 ng/ml)

CB50: RANKL (50 ng/mℓ) + 50  $\mu$ g/mℓ of CB CB100: RANKL (50 ng/mℓ) + 100  $\mu$ g/mℓ of CB CB200: RANKL (50 ng/mℓ) + 200  $\mu$ g/mℓ of CB \*\*: p<0.01 vs C

5) Cathepsin K 발현에 미치는 영향

실험 결과, CB는 50  $\mu$ g/m $\ell$ , 200  $\mu$ g/m $\ell$ , 100  $\mu$ g/m $\ell$  농도에서 대조군에 비해 유전자 발현을 유의성 있게 (p<0.01) 억제하였다(Fig. 6).

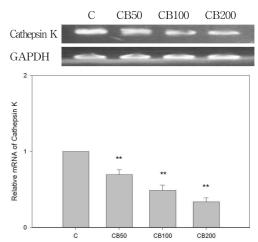


Fig. 6. Effects of CB on the expression of Cathepsin K in RANKL-induced RAW 264.7 cells.

C: RANKL (50 ng/ml)

CB50: RANKL (50 ng/m $\ell$ ) + 50  $\mu$ g/m $\ell$  of CB CB100: RANKL (50 ng/m $\ell$ ) + 100  $\mu$ g/m $\ell$  of CB CB200: RANKL (50 ng/m $\ell$ ) + 200  $\mu$ g/m $\ell$  of CB \*\*: p<0.01 vs C

# IV. 고 찰

고령화 사회로 접어들면서 갱년기 이후 여성의 삶의 질을 높이는 것이 부인과 질환의 예방과 치료에 큰 비중을 차지하게 되었다. 골다공증은 여러 가지원인이 있으나 특히 폐경 이후 여성의 estrogen 감소로 발생하는 경우가 가장 많으며 골다공증으로 인해 활동적인 삶이 제약을 받고 골강도가 약화되어 골절의 위험도가 높다<sup>1)</sup>.

골다공증은 여러 원인에 의해 유발되는데, 전신성 원인으로는 유전 및 체질 요인, 身體活性의 감소, 칼슘 조절 호르 모의 역할, 성장에 관여하는 호르몬의 감소 및 갑상선 호르몬 증가와 성호르몬 결핍이 있고, 국소적 원인으로는 PGE2, 파골세포 활성인자 및 골에서 유래하는 성장관여인자(IGF-I, TGFβ) 등이 관여한다. 위험군으로는 여성, 백인, 아시아인, 폐경, 조기폐경, 非外傷性 골절, 운동부족, 갑상선 기능 항진증, 장기간의 스테로이드 복용, 왜소증, 마른체격, 골다공증의 가족력, 적은 칼슘섭취, 알코올중독, 부갑상선 기능 항진증, 위절제 환자등이 알려져 있다<sup>28)</sup>.

골다공증을 분류해보면 크게 원발성 골다공증과 속발성 골다공증으로 나누는데,속발성 골다공증은 갑상선 및 부갑상선 기능 항진증,쿠싱 증후군,말단비대증,임신,당뇨병,성선기능 저하증으로 인한 내분비성 골다공증이 있고,영양불량으로 인한 영양성 골다공증이 있다.그리고 원발성 골다공증에는 Type I인 폐경 후 골다공증과 Type II인 노인성 골다공증이 있다<sup>29,30)</sup>.

골다공증의 증상은 척추의 압박과 미소골절로 인한 흉부 또는 요부의 동통, 체중을 지탱하는 척추의 함몰로 인한 격심한 背痛과 身長의 감소 및 요척추의 전굴증, 대퇴경부나 손목 또는 다른 뼈의 골절 등이다<sup>28,31)</sup>. 그러나 임상에서는 골절이 되기 전에는 그 증세가 확연히 드러나지 않고, 초기에는 단순한 피로를 호소한다거나 척추부위의 나른함을 호소하는 정도에서부터 시작해 肩胛痛, 腰背痛, 四肢痛 및 關節痛, 身長의 감소 등의 증상정도가 나타난다.

한의학에서는 <素問·痿論><sup>11)</sup>에 腎氣가 熱하여 腎水가 不足하면, 骨이 乾枯하며 骨髓가 骨腔내에 충만되지 못하고

마르게 되어 骨의 萎縮과 枯竭이 나타날수 있는 질환을 '骨痿'라고 표현 하였고 <素問·長刺節論><sup>11)</sup>에서는 寒氣로 인해骨髓酸痛한 것을 '骨痺'라 하였는데 이는현대적 의미의 골다공증과 유사한 것으로 볼 수 있다<sup>12)</sup>.

골다공증은 韓醫學에서 年老體衰, 臟腑失調, 風邪侵襲 등을 그 원인으로 보고 있는데<sup>13-17)</sup>, 특히 여성에게 있어서는 폐경후기 증상의 하나로써 음양의 부조를 그 원인으로 보고 있는 바, 여성이 49 세를 전후하여 腎氣가 衰하고 天癸가 竭하며 衝任二脈이 虧虛하면, 精血이 不足해지고 腎陰陽의 氣가 모두 衰하여 臟腑의 機能喪失이 초래되어 갱년기 장애가발생한다고 하였다<sup>32-34)</sup>.

한의학 문헌에서 여성의 폐경기 골다 공증과 연관되어지는 부분은 天癸過期, 過期不止,老年行經,四十六七經證,四九 五旬經證,五旬以後經證,經斷前後症候, 絶經前後諸證,更年期 및 更年期 症候群 등이며, 그症狀은 腰腹疼痛,腰痛,偏身 作痛,腰膝痠軟,肢冷,腰痠腿軟,尾骨痛, 疼痛,肩痛,腰痛,神經痛,腰膝痠疼 및 腰膝痠冷 등으로 표현되어 있다<sup>32-34)</sup>.

골다공증의 치료로, 藏 등<sup>13)</sup>은 脾氣虚 와 腎陰虛로, 陳<sup>14)</sup>과 蔡<sup>15)</sup>는 腎陰虛와 腎 陽虛로, 呂<sup>16)</sup>는 腎陰虛, 腎陽虛, 腎陰陽 兩虛로, 《韓方再活醫學科學》<sup>17)</sup>에서는 腎 陰不足, 腎陽不足, 氣血兩虛, 風邪偏勝로 변증하여 滋陰補腎, 補腎將陽, 補益氣血, 祛風通絡하는 치법을 활용하고 있다.

風은 百病之長인데 正氣가 不足하면 風邪가 腎虛한 틈을 타서 관절에 遍歷하고 筋脈을 阻隔하면 骨髓가 失養하여 발 병하게 된다. 이러한 경우 환부가 腫脹 하면서 紅斑이 나타날 수 있으며 유주성 동통을 호소하고 밤보다는 낮에 심하며 관절의 굴신이 곤란하고 菱軟無力하여 골다공증의 임상양상을 나타내며 祛風通 絡하는 치법을 사용한다<sup>17)</sup>.

서양의학적으로 골다공증 치료는 骨密度가 낮은 사람과 骨吸收率이 빠른 사람을 대상으로 하며, 현재 처방되고 있는 골다공증에 대한 약제로 estrogen, calcitonin 및 骨形成刺戟劑인 불소 등이 활용되고 있지만, 이미 발생한 골다공증을 치료하는데는 많은 限界點을 가지고 있다<sup>35-36)</sup>.

골다공증에 대한 실험적 연구로는, 정 18)의 生血補髓湯이 난소적출로 유발된 백서에서 파골세포의 활성을 억제하고 골밀도를 증가시킨다는 보고와, 金<sup>19)</sup>의 鹿茸 및 六味地黄湯加鹿茸이 좌골신경 절단으로 유발된 백서의 골다공증에서 골소실을 회복시킨다는 보고, 朴<sup>20)</sup>의 左 歸飮과 右歸飮이 난소적출로 야기된 백 서의 성호르몬 및 지질과 골대사에 효과 가 있다는 보고, 李<sup>21)</sup>의 四物湯과 六味 地黃湯이 난소적출로 인하여 실험적으로 유도된 골다공증에 대하여 유의한 효능 을 발휘한다는 보고와, 曹<sup>22)</sup>의 借力丸變 方이 난소적출로 인하여 실험적으로 유 도된 골다공증에서 골밀도 감소를 억제 한다는 보고가 있다.

威靈仙(Clematidis Radix)은 미나리아 재비과에 속한 으아리와 威靈仙 및 棉團 鐵線蓮의 根과 根莖으로 단면이 엷은 갈황색을 띄고 있으며, 祛風除濕 通絡止痛의 효능이 있어 한방에서 風濕痺痛, 筋骨肢痛, 脚氣疼痛등을 치료하는데에 활용되고 있다<sup>23)</sup>. 주성분은 saponin, clematoside A, anemonol 등<sup>23-25)</sup>이며, 최근 연구결과 면역증강작용, 항염증작용, 관절염치료작용 등이 보고되었다<sup>25-27)</sup>

골다공증은 주로 에스트로겐이 결핍된 폐경기 이후 여성에서 많이 발생하고 있다 <sup>2,3)</sup>. 이것은 estrogen 감소로 인해 calcitonin 활성 억제와 PTH (parathyroid hormone) 의 작용으로 파골세포의 기능이 활성화된 결과 골 기질물질이 분해되어 칼슘의 재흡수가 증가되어 나타난다<sup>37)</sup>. 따라서 파골세포의 기능을 억제하면 골다공증을 치료할 수 있다고 알려져 있다.

본 연구는 袪風除濕 通絡止痛의 효능과 관절염 치료작용이 있다고 보고된 威靈仙 추출물이 골다공증에도 효과적일 것으로 사료되어 파골세포의 분화와 기능 활성화에 관여하는 인자들에 미치는 영향을 평가하고자 하였다. 이를 위하여 RANKL 처리한 RAW 264.7 cell에서의 TRAP(+) 세포 형성능을 측정하였으며, 관련 단백질 유전자인 RANK, TNFa, IL-6, iNOS, Cathepsin K 등의 유전자발현에 대한 연구를 실시하였다.

파골세포는 대식세포 계열의 전구세포 에서 다양한 분화유발인자들에 의해 분 화된다5-6, 특히, 조골세포로부터 분비되 는 RANKL(receptor activator of nuclear factor kappa B ligand)은 파골전구세포 및 파골세포 표면에 존재하는 RANK (receptor activator of nuclear factor kappa B)와 결합하여 파골전구세포가 파 골세포로의 분화와 활성화를 유발한다70. 분화한 파골세포는 NF-κB(nuclear factor kappa B), c-Fos, c-jun(junamino), AP-1 (activated protein 1), NFATc1(nuclear factor of activated T cells 1)의 활성화와 MAPK(mitogen activated protein kinase), ERK(extracellular signal regulated kinase), JNK(jun N-terminal kinase), p38의 활 성화 과정, Src, Akt 활성화 등을 통하여

TRAP(tartarate resistant acid phosphatase) cathepsin K, calcitonin receptor 등 파골 세포 특이 단백질 발현을 촉진하다<sup>7-10)</sup>.

TRAP은 성숙한 파골세포에서 발현하는 것으로 TRAP 양성세포는 파골세포로의 분화 여부를 판단하는 기준으로 이용될 수 있다<sup>38)</sup>. 실험 결과, CB 50µg/ml투여군은 대조군에 비해 TRAP-positive 다핵세포수를 약 9% 증가시켰고, CB 100µg/ml투여군은 약 37% 감소시켰다. 또한, CB 200µg/ml투여군도 대조군에 비해 약 66% 감소시켰다(Fig. 1). 이러한 실험 결과를 바탕으로 CB가 파골세포 기능에 관여하는 유전자들에 미치는 영향을 평가하여, 그 기전을 밝히고자하였다.

RANK는 파골세포 표면에 존재하는 TNFα receptor family 단백질로 알려져 있다. 그리고 RANK는 RANKL의 수용체로서 RANK/RANKL 복합체는 파골세포 분화 및 활성화에 중요한 역할을 한다<sup>39,40)</sup>. RANKL이 RANK와 결합하면 TRAP의 활성화, transcription factor의 활성화(NF-kB, AP-1, NFATc1)와 MAPK의 pathway 활성화(ERK, JNK, p38), Src, Akt 등이 활성화되어 파골세포의기능이 활성화 된다<sup>41)</sup>. 실험 결과, CB는 200 μg/ml, 100 μg/ml 농도에서 대조군에비해 유전자 발현을 유의성 있게 억제하였다(Fig. 2).

TNFa는 조골세포의 collagen 합성과 ALP 및 osteocalcin의 발현을 억제한다. 또한, IL-6와 M-CSF(macrophage colony stimulating factor)를 활성화시켜 파골세포의 분화를 증진시키고 골 흡수를 유발하며, IL-1b와 함께 작용하여 TNFa 자신의 합성을 유도하고 IL-6의 합성을 유

도한다<sup>42)</sup>. 따라서 TNFa의 발현이 증가하면 파골세포의 분화 및 기능 활성화가증가될 수 있다. 실험 결과, CB는 200  $\mu$ g/ml, 100  $\mu$ g/ml, 50  $\mu$ g/ml 농도에서 대조군에 비해 유전자 발현을 유의성 있게억제하였다(Fig. 3).

IL-6는 파골세포의 분화나 활성화를 촉진하는 물질로 알려져 있으며, 염증반응을 촉진한다고도 알려져 있고, adenylate cyclase의 활성을 증가시켜 cAMP 농도를 증가시킨다. PKA(protein kinase A)는 cAMP 의존적 protein kinase로서 각종 효소의 활성을 조절하고, 세포 증식에 관여하는 것으로 알려져 있다. 따라서 PKA의 활성 증가는 파골세포 기능활성화와 인산화 증가를 유발한다<sup>43)</sup>. 실험결과, CB는 200 μg/ml, 100 μg/ml, 50 μg/ml 농도에서 대조군에 비해 유전자발현을 유의성 있게 억제하였다(Fig. 4).

NO는 NOS(nitric oxide synthetase)에 의해 생성되는 물질로, calcium dependent 한 endothelial 또는 neuronal NOS에 의해 생성되거나, RANKL, TNFα, IL-6등의 각종 염증 신호에 의해 활성화되는 inducible NOS에 의해 생성된다. 증가된 NO는 파골세포의 형성과 골의 재흡수를 억제 한다<sup>44,45)</sup>. 실험 결과, CB는 200 μg/ml, 100 μg/ml, 50 μg/ml 농도에서 대조군에 비해 유전자 발현을 유의성 있게 억제하였다(Fig. 5).

Cathepsin K는 RANKL이나 M-CSF 등을 처리하는 경우 발현되는 단백질로 MMP-9, TRAP 등과 같이 골의 흡수에 관여하고 있다<sup>46)</sup>. 따라서 파골세포의 활 성화로 인한 재흡수과정은 세포에서 발 현되는 Cathepsin K나 MMP-9, TRAP 의 mRNA를 지표로 사용하여 측정할 수 있다. 실험 결과, CB는 200 μg/ml, 100 μg/ml 농도에서 대조군에 비해 유전자 발현을 유의성 있게 억제하였다(Fig. 6). 이상의 연구결과, 威靈仙 추출물(CB)은 RANKL 처리 RAW 264.7 cell에서 파골세포로의 분화를 억제하였으며, 파골세포 분화 및 기능 활성화에 관련된 유전자 발현을 억제하였다. 이는 골다공증의 치료 및 예방에 활용하기 위해 威靈仙을 단방이나 복합방에 가미하여 활용할 수 있음을 의미한다.

## V. 결 론

威靈仙 추출물(CB)이 파골세포의 분화 및 기능 활성을 억제하여 골의 재흡수를 억제하는지를 평가하기 위하여, RANKL 처리 RAW 264.7 cell에서 TRAP-positive 다핵세포 형성에 미치는 영향을 측정하였으며, 골 흡수 관련인자들의 유전자발현에 미치는 영향을 측정한 결과, 威靈仙 추출물은 RANKL 처리 RAW 264.7 cell에서 TRAP-positive 다핵세포의 형성을 억제하였고, RANK, TNFa, IL-6, iNOS, Cathepsin K 등의 유전자발현을 억제하였다.

- □ 투 고 일 : 2010년 7월 29일
- □ 심 사 일 : 2010년 8월 3일
- □ 심사완료일 : 2010년 8월 10일

# 참고문헌

 대한내분비학회. 골다공증 진단 및 치료지침 2007. 대한내분비학회지. 2008; 23(2):76.

- Canalis E. Mechanisms of Glucocorticoid action in Bone. Implications to glucocorticoid-induced osteoporosis. J Clion Endocri Met. 1996;81:3441-7.
- 3. Pietschmann P et al. Osteoporosis, an age-related and gender-specific disease. Gerontology. 2008;55(1):3-12.
- 4. Pacifici R. Estrogen deficiency, T cells and bone loss. Cell Immunol. 2008; 252(1-2):68-80.
- Kumamoto H et al. Expression of parathyroid hormone-related protein (PTHrP), osteoclast differentiation factor (ODF)/receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand(RANKL) and osteoclastogenesis inhibitory factor(OCIF) /osteoprotegerin(OPG) in ameloblastomas.
   J. Oral Pathol. Med. 2004;33(1):46–52.
- 6. Reddy SV. Regulatory mechanisms operative in osteoclasts. Crit Rev. Eukaryot Gene Expr. 2004;14(4):255-70.
- 7. Boyce BF et al. Roles for NF-kappaB and c-Fos in osteoclasts. J Bone Miner Metab. 2005;23:11-5.
- 8. Murakami A et al. Phenethyl isothiocyanate suppreases receptor activator of NF-kappaB ligand (RANKL)-induced osteoclastogenesis by blocking activation of ERK1/2 and p38 MAPK in RAW264.7 macrophages. Biofactors. 2007;30(1):1-11.
- 9. Pang M et al. AP-1 stimulates the cathepsin K promoter in RAW 264.7 cells. Gene. 2007;403(1-2):151-8.
- 10. Lee ZH et al. Signal transduction by receptor activator of nuclear

- factor kappa B in osteoclasts. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2003;305(2):211-4.
- 11. 王氷 注. 黄帝内經素問. 서울:大成出版社. 1986:21, 101, 212, 274, 340, 768.
- 12. 이응세 등. 골다공증의 동의학적 임 상문헌에 관한 고찰. 한방재활의학회 지. 1997:7(1):437-56.
- 藏位壓. 王和鳴編:中國骨病學. 北京: 人民衛生出版社 1990:249-58.
- 14. 陳可培. 中國傳統康復醫學. 北京:人 民衛生出版社. 1998:555-8.
- 15. 蔡新吉. 腎虛證與 骨廣物含量的 關係. 山東:山東中醫學院學報. 1992:16(2):52.
- 呂犱政. 常見丙 最新療法. 北京:中國中醫學出版社. 1994:371-3.
- 17. 한방재활의학과학회. 한방재활의학. 군 자출판사. 2003:110, 168.
- 18. 정재숙. 生血補髓湯이 난소적출 흰쥐 대퇴골의 형태계측학적 변화 및 골 대사 관련 인자에 미치는 영향. 世明 大學校 大學院, 2005.
- 19. 金根模. 鹿茸 및 六味地黃湯加鹿茸이 白鼠의 運動抑制性 골다공증에 미치는 影響, 慶山大學校 大學院. 1994.
- 20. 朴鍾徹. 左歸飲과 右歸飲이 卵巢摘出白鼠의 性호르몬과 脂質및 骨代謝에 미치는 影響. 大韓 韓方婦人科學會誌. 1995;8(1):1-27.
- 21. 李相坤. 四物湯과 六味地黃湯이 卵巢 摘出로 誘導된 白鼠의 골다공증에 미치는 影響. 慶山大學校大學院, 1996.
- 22. 曹永任. 借力丸變方이 卵巢摘出로 誘導된 白鼠의 골다공증에 미치는 影響. 大田大學校 大學院, 1999.
- 23. 전국한의과대학본초학교수. 본초학. 서 울:영림사, 2000:307.

- 24. 안덕균. 한국본초도감. 서울:교학사. 1999:304.
- 25. 한방약리학교재편찬위원회. 한방약리 학. 서울:신일상사. 2005:201, 202.
- 26. 송승원. 威靈仙이 류마토이드 관절염 환자에서 분리한 활액세포의 면역반 응에 미치는 영향. 大田大學校 大學院. 2003.
- 27. 유석. 威靈仙이 관절염 유발 동물모 델의 소염, 진통 및 해열작용에 미치 는 영향. 東國大學校 大學院. 2004.
- 28. 대한 병리학회. 병리학. 서울:고문사 1991:1183-5.
- 29. 徐舞圭. 成人病 老人醫學 서울:고려 의학. 1993:483-6.
- 30. 민헌기. 임상 내분비학. 서울:고려의 학. 1990:220-2, 415-21, 489-98.
- 31. 杜鎬京. 東醫 腎系學. 서울:東洋醫學 研究院. 1992:578-84, 1240-53.
- 32. 羅元愷. 中醫婦科學. 河北省:人民衛 生出版社. 1988:17-22, 161-3.
- 33. 陳自明. 婦人良方大全 1卷. 文光圖書 有限公司. 1987:38.
- 34. 葉天士. 葉天士女科. 서울:大星文化 社. 1989:212, 213.
- 35. 최영길. 내분비학. 의학출판사. 1994: 483-90, 573-80.
- 36. 김영설. 골다공증의 약물치료. 제44회 대한내과학회 추계학회지. 1992:50-3.
- 37. Meiyanto E et al. Osteoclast differentiation factor modulates cell cycle machinery and causes a delay in s phase progression in RAW 264.7 cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2001:282(1):278–83.
- 38. John T et al. Parathyroid hormone
  -dependent signaling pathways regulating

- genes in bone cells, Gene. 2002; 282(1-2):1-17.
- 39. Cho ES et al.. Rolipram, a phosphodiesterase 4 inhibitor, stimulates osteoclast formation by inducing TRANCE expression in mouse calvarial cells. Arch. Pharm. Res. 2004;27(12):1258-62.
- 40. Khosla S. Minireview. the OPG/RANKL/RANK system. Endocrinology. 2001;142(12):5050-5.
- 41. Gallea S et al. Activation of mitogen –activated protein kinase cascades is involved in regulation of bone morphogenetic protein–2–induced osteoblast differentiation in pluripotent C2, C12 cells, Bone. 2001;28(5):491–8.
- 42. Yao Z et al. Tumor necrosis factor –alpha increases circulating osteoclast precursor numbers by promoting their proliferation and differentiation in the bone marrow through upregulation of c-Fos expression, J. Biol. Chem. 2006;281(17):11846–55.
- 43. Liu XH et al. Interactive effect of

- interleukin-6 and prostaglandin E2 on osteoclastogenesis via the OPG/RANKL/RANK system, Ann NY. Acad. Sci. 2006;1068:225-33.
- 44. Lin TH et al. PPAR gamma inhibits osteogenesis via the down-regulation of the expression of COX-2 and iNOS in rats, Bone. 2007;41(4):562-74.
- 45. Zheng H et al. Collin Osdoby P.. RANKL stimulates inducible nitric –oxide synthetase expression and nitric oxide production in developing osteoclasts. An autocrine negative feedback mechanism triggered by RANKL-induced interferon-beta via NF-kappa B that restrains osteoclastogenesis and bone resorption, J. Biol. Chem. 2006:281(23):15809–20.
- 46. Matsumoto M et al. Essential role of p38 mitogen-activated protein kinase in cathepsin K gene expression during osteoclastogenesis through association of NFATc1 and PU.1, J. Biol. Chem. 2004:279(44):45969-79.