

쌍보환 추출물의 파골세포 분화 억제와 골 흡수 억제효과*

김성중¹, 이정주¹, 김준현¹, 조소현², 박민철^{2,3}, 조은희^{1,3,*}

¹원광대학교 한의과대학 침구의학교실

²원광대학교 한의과대학 안이비인후피부학교실

³원광대학교 한국전통의학연구소



[Abstract]

Inhibitory Effects of *Ssangbohwan* on Osteoclast Differentiation and Bone Resorption*

Seong Joung Kim¹, Jeong Ju Lee¹, June Hyun Kim¹, So Hyun Jo²,
 Min Cheol Park^{2,3} and Eun Heui Jo^{1,3,*}

¹Department of Acupuncture & Moxibustion Medicine, College of Oriental Medicine, Wonkwang University

²Department of Oriental Medical Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology, College of Oriental Medicine, Wonkwang University

³Research Center of Traditional Korean Medicine, Wonkwang University

Purpose : The first purpose of this study is to find out whether the water extract of *Rehmanniae Radix Preparat*(RRP), *Cuscutae Semen*(CS) and their combination(*Ssangbohwan*, SBH) have the effect of suppressing Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand(RANKL)-induced osteoclast differentiation. The second purpose of this study is to find out whether the water extract of RRP, CS and SBH have the effect of inhibiting osteoporosis in an osteoporosis model induced by lipopolysaccharide(LPS).

Methods : After promoting differentiation of osteoclasts by treating the RANKL, we observed the effect by the administration of RRP, CS and SBH. In addition, by means of Reverse transcription polymerase chain reaction(RT-PCR), we assayed mRNA expression levels of NFATc1, c-Fos, TRAP and GAPDH(Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, spermatogeni) from bone marrow macrophages(BMMs). Similarly, the protein expression levels of NFATc1 (Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic1), C-Fos, MAPKs(Mitogen-activated protein kinases) and β -actin in cell lysates were analyzed by means of Western Blotting. Finally, we determined the anti-osteoporotic effects of RRP, CS and SBH, through the use of Lipopolysaccharide-induced bone-loss mouse.

Results : RRP, CS and SBH showed remarkable inhibitive effect on RANKL-treated osteoclast differentiation without cytotoxicity. SBH inhibited the phosphorylation of p38, Jun N-terminal kinases(JNK), and I- κ B and down-regulated the induction of c-Fos and NFATc1 by RANKL. RRP, CS suppressed degradation of I- κ B, but it did not affect c-Fos and NFATc1 by RANKL. Lastly, *in vivo* data showed that RRP and SBH prevented bone erosion by LPS treatment.

Conclusions : These results demonstrate SBH can be effective remedy for bone-loss diseases such as osteoporosis.

Key words :

Rehmanniae Radix Preparat(RRP);
Cuscutae Semen(CS);
Ssangbohwan(SBH);
 Osteoclast
 differentiation;
 Osteoporosis

Received : 2015. 08. 06.

Revised : 2015. 09. 07.

Accepted : 2015. 09. 09.

On-line : 2015. 09. 20.

* This study was supported by academic research grant of Wonkwang University in 2013

* Corresponding author : Department of Acupuncture & Moxibustion Medicine, College of Oriental Medicine, Wonkwang University, 460, Iksandae-ro, Iksan-si, Jeollabuk-do, 54538, Republic of Korea
 Tel : +82-63-270-1022 E-mail : freezo@wonkwang.ac.kr

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

The Acupuncture is the Journal of Korean Acupuncture & Moxibustion Medicine Society. (<http://www.TheAcupuncture.org>)
 Copyright © 2014 KAMMS, Korean Acupuncture & Moxibustion Medicine Society. All rights reserved.

I. 서 론

노인 연령에서 주로 발생하는 뼈 질환인 골다공증은 70세 이상 성인 전체의 41.8%의 유병률로 흔한 질환이다¹⁾. 보통은 경미한 낙상으로 손목이나 고관절의 골절이 생기고 나서야 골다공증을 알게 된다. 하지만 고관절 골절은 때로는 치명적일 수 있다²⁾. 더불어 우리 사회가 골다공증에 부담해야 하는 비용이 점차 증가하고 있는 상황이다³⁾.

골다공증의 발병 원인은 흡연과 같은 잘못된 식습관, 노화, 만성적인 염증 등 다양한 원인에 의해 발생되지만, 여성은 폐경기 이후 에스트로겐의 결핍으로 골 밀도가 감소되어 골다공증이 발생하는 것이 가장 흔하다²⁾. 이와 같은 뼈 질환인 골다공증은 뼈의 밀도를 조절하는 두 가지 세포인 뼈를 흡수하는 파골세포와 뼈를 형성하는 조골세포의 불균형에 의해 이루어진다. 일반적으로 골다공증은 파골세포의 과도한 형성과 활성에 의해 발생하게 된다⁴⁾. 따라서 파골세포의 억제제는 골다공증과 같은 뼈 질환의 치료에 중요한 단서가 될 수 있다.

이 연구에서 저자는 오래전부터 사용되어 온 한약제를 이용한 파골세포 억제 물질을 찾고자 하였다. 토사자는 파골세포를 억제한다고 알려져 있었고⁵⁾, 숙지황과 가시오가피 복합 추출물이 난소를 절제한 흰쥐의 골 밀도에 긍정적인 효과를 나타낸다는 보고가 있다⁶⁾. 또한 숙지황과 토사자의 혼합물인 쌍보환이 골다공증에 미치는 영향을 규명하고자 하는 연구도 선행되었다⁷⁾. 하지만 이것은 난소적출로 골다공증을 유발한 마우스를 이용한 것으로 생화학적 지표 검사를 통한 변화 결과만을 도출한 것으로, 골다공증에 구체적인 약효를 발휘하는 작용기전을 밝히지 못한 한계가 있다⁷⁻⁹⁾.

이에 저자는 본 연구를 통하여, 파골세포를 억제하는 정도와 작용을 밝힘으로써 숙지황과 토사자 및 쌍보환의 물 추출물 효과에 대하여 세포 수준에서 조사해보고자 하였다. 그리고 그 결과를 통하여 병용 투여와 각각의 약물의 투여가 어떤 차이를 가지는지 알아보려고 하였다. 또한 lipopolysaccharide(LPS)로 골다공증을 유발시킨 마우스에 대한 실험을 통하여 생체 내 염증성 골소실에 미치는 작용을 알아보려고 실험을 하였다. 이에 다양한 연구를 진행하였고, 유의한 결과를 얻었기에 이를 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

연구에 사용된 시약은 human receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand(RANKL)와 M-CSF는 Peprotech(London, UK)사에서 구입하였다. 그리고 XTT assay kit는 Roche (Indianapolis, IN, USA)사에서 구입하였다. Phospho-c-Jun N-terminal kinases(p-JNK), JNK, phospho- Extracellular signal-regulated kinases (p-ERK), extracellular signal-regulated kinases(ERK, p-p38, p38, I- κ B 항체는 Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA)사의 제품을 사용하였다. c-Fos, nuclear factor of activated T-cells(NFATc1), cytoplasmic 1, β -actin 항체는 Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz, CA, USA)사에서 구입하였다.

2. 방법

1) 약물의 추출 및 제조

본 실험에 사용한 숙지황과 토사자는 (주) 옴니허브를 통해 구입하였고, 중국에서 수입된 것이다.

숙지황과 토사자를 고루 잘라 30분간 냉침시키고 heating mantle에서 2시간 끓인 후에 농축하여 동결 건조한 시료를 사용하였으며 수율은 Table 1과 같다. 약재는 각 100g에 정제수 1l를 넣고 glas-col(Terre Haute, IN, USA) heating mantle로 2시간 동안 가열하여 추출하였다. 얻은 추출액을 여과한 후 여액을 감압농축기(Rotavapor R-124, Buchi, Switzerland)로 감압농축한 후 동결건조기로 건조하여 최종적으로 파우더 형태로 각각의 실험약물을 얻었다 (Table 1). 쌍보환 추출물은 숙지황 추출물과 토사자 추출물의 비율을 1 : 1로 섞어 실험하였다.

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

Korean name	Pharmaceutical name	Abbreviation	Yield
Sukjihwang	<i>Rehmanniae Radix Preparat</i>	RRP	49.6 %
Tosaja	<i>Cuscutae Semen</i>	CS	11.9 %
Ssangbohwan	<i>Ssangbohwan</i>	SBH	15.1%

2) 파골세포 배양 및 분화 억제

골수세포는 수컷 5주령 imprinting control region (ICR) mice를 경추 탈골로 희생시킨 후 넓적다리골과 정강골을 분리한 후 1cc 주사기를 이용하여 1X antibiotic을 첨가한 α -MEM으로 골의 속질을 수세하여 얻었다. 얻어진 골수세포에서 적혈구를 제거한 후 10 % fetal bovine serum(FBS), antibiotics, M-CSF (30 ng/ml)가 포함된 α -MEM배지에서 3일간 배양하고 림프구를 포함한 부유세포는 제거하고 부착된 세포를 파골전구세포로서의 대식세포(bone marrow macrophages, BMMs)로 사용하여 실험하였다. 대식세포를 3.5×10^4 /well의 밀도로 48-well plate에 분주하고 macrophage colony-stimulating factor(M-CSF)(30 ng/ml)와 receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand(RANKL)(100 ng/ml)을 첨가한 배지에 숙지항 추출물, 토사자 추출물, 쌍보환 추출물을 농도별로 처리하여 배양하였다. 3일 후 배양액을 교환한 다음 4일째 배양한 세포에 tartrate-resistant acid phosphate(TRAP) 용액으로 염색하여 적자색의 TRAP 양성세포를 파골세포로 인정하였다. 염색된 파골세포 중, 핵이 3개 이상인 세포의 개수를 통계에 이용하였다.

3) 독성검사

대식세포를 1×10^4 cells/well의 밀도로 96-well plate에 분주하고 macrophage colony-stimulating factor (M-CSF)(30 ng/ml)를 처리한 후 추출물을 농도별로 처리하여 3일간 배양하였다. 3일 후 각각의 well에 50 μ l의 XTT(2,3-Bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide)용액을 첨가하고 4시간 배양 후 ELISA reader(Molecular Devices, CA, USA)로 450 nm에서 흡광도를 확인하였다.

4) Western blot analysis

배양된 세포는 잔류물질을 제거하기 위하여 $1 \times$ phosphate-buffered saline(PBS)를 사용하여 2~3번 세척한 후 lysis buffer(50 mM Tris-Cl, 150 mM NaCl, 5 mM ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA), 1 % Triton X-100, 1 mM sodium fluoride, 1 mM sodium vanadate, 1 % deoxycholate and protease inhibitors)로 용해하고 원심분리(14,000 rpm, 20 min)하여 순수한 단백질을 얻었다. 단백질은 DCTM Protein assay kit Protein assay kit(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 사용하여 표준 단백질량과 비교하여 정량화 한 후 동량의 단백질은 10 % Sodium dodecyl sulfate(SDS)-polyacrylamide

gel에서 분리하였다. 분리된 단백질은 transfer buffer를 이용하여 polyvinylidene fluoride(PVDF)-membrane에 분리된 단백질을 전사시켰다. 비특이반응을 제거하기 위해서 5 % 비지방 skim milk가 함유된 T-TBS로 실온에서 1시간 동안 충분히 흔들면서 방치하였다. 반응이 끝난 후 blocking buffer에 1 : 1,000으로 희석된 1차 항체를 넣고 4°C에서 반응시켰다. 반응 후 T-TBS로 7분 간격으로 3번 세척하고 blocking buffer에 1 : 5,000으로 희석한 2차 항체를 넣고 상온에서 1시간 동안 반응을 시켰다. TBS-T로 10분 간격으로 3번 세척한 후 ECL kit로 발색시켜 단백질의 발현 정도를 확인하였다.

5) 역전사 중합반응(RT-PCR) 분석

세포 내 RNA는 1 ml의 Isol-RNA lysis reagent (5 PRIME)을 이용하여 제조사의 설명에 따라 분리하였다. 분리한 RNA는 0.5 pg ~ 1 μ g으로 정량하여 ReverTra Ace[®] qPCR RT kit(Toyobo)로 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA는 다음과 같은 primer를 이용하여 PCR하였다 (Table 1). PCR에서 annealing time은 30초 정도 하였다. PCR을 마친 후 증폭된 각 DNA를 1 % agarose gel에 전기영동 하였고 Et-Br로 염색하여 ultraviolet(UV)상에서 확인하였다(Table 2).

Table 2. Primers for PCR Amplification

Primer	Sequence
c-Fos	Forward 5'- CTGGTGCAGCCCACTCTGGTC-3'
	Reverse 5'- CTTTCAGCAGATTGGCAATCTC-3'
NFATc1	Forward 5'- CAACGCCCTGACCACCGATAG-3'
	Reverse 5'- GGCTGCCTTCGCTCATAGT-3'
TRAP	Forward 5'-ACTTCCCCAGCCCTTACTAC-3'
	Reverse 5'-TCAGCACATAGCCACACCG-3'
GAPDH	Forward 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'
	Reverse 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'

6) 동물실험

생체 내의 골 손실에 미치는 추출물의 효과를 규명하기 위해 5주령의 수컷 ICR 생쥐 5마리를 한 군으로 하여 각 군별로 숙지항 추출물, 토사자 추출물, 쌍보환 추출물(생쥐 g당 0.4 mg or 0.2 mg) 또는 PBS를 10일간 경구투여 하였다. 골 손실의 유도를 위해 실험군에 LPS(생쥐 g당 5 μ g)를 투여시작일(1일)로부터 4일과 7일 2회에 걸쳐 복강주사 하였고 대조군에는 PBS를 주사하여 실험오차를 제거하였

다. 10일째 되는 날 생쥐를 희생시키고 대퇴골을 얻어 4% paraformaldehyde로 고정하였다. Skyscan BE/skyscan 1172로 대퇴골 내부의 3차원적 영상을 얻었다.

7) 통계분석

각각의 실험군은 4개체 이상 수행하였고 평균값과 표준편차를 계산하였다. 모든 실험은 3회 이상 반복하여 동일한 실험결과를 얻은 것을 실험결과로 사용하였으며, 정량적인 결과의 통계는 SPSS 12.0 프로그램으로 비모수 검정을 수행하였다. 두 군 간의 비교분석은 Mann-Whitney 검정을, 세 군 간의 비교분석은 Kruskal-Wallis 검정을 이용하여 분석하였고, 군 간 차이가 인정될 때 사후검정 결과 p 값이 0.05 이하를 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

III. 결 과

1. 파골세포 분화 억제 효과

1) 쌍보환 추출물이 RANKL에 의해 유도되는 파골세포 분화에 미치는 영향

파골세포는 뼈를 흡수 하는 세포로 파골세포의 분화가 파골세포 유발에 중요하게 작용한다. 쌍보환 추출물이 파골세포의 분화에 미치는 영향을 알아보기 위해 BMM에 M-CSF와 RANKL을 처리한 후 쌍보환 추출물 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리하여 배양한 후 TRAP 양성 뼈 파골세포의 형성 및 다핵의 성숙된 뼈 파골세포로서의 분화를 확인하였다. 그 결과 M-CSF와 RANKL만 처리한 대조군에 비하여 쌍보환 추출물을 처리한 실험군에서 TRAP 양성 파골세포의 형성 및 다핵의 성숙된 파골세포로서의 분화가 억제됨을 확인하였으며(Fig. 1A), TRAP 염색 후, 염색된 파골세포 중, 핵이 3개 이상이 융합되어 있는 세포의 개수를 측정하여 정량적 분석한 결과 쌍보환 추출물을 처리한 실험군에서 유의성 있게 억제됨을 확인하였다(Fig. 1B).

2) 쌍보환 추출물 구성 약재인 숙지황 추출물, 토사자 추출물이 RANKL에 의해 유도되는 파골세포 분화에 미치는 영향

쌍보환 추출물을 구성하는 약재인 숙지황 추출물과 토사자 추출물을 단독으로 처리하여 파골세포 분화에 미치는 영향을 확인하였다. BMM에 M-CSF와 RANKL을 처리한 후에 쌍보환 추출물 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도를 기준으로 숙지황

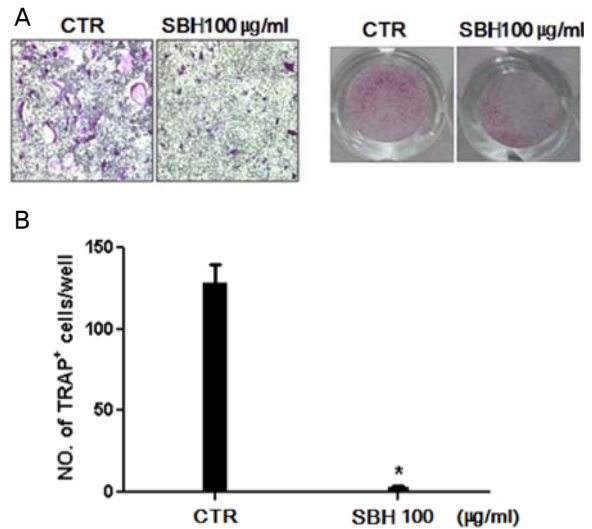


Fig. 1. *Ssangbohwan*(SBH) inhibits osteoclast differentiation

Bone marrow macrophages(BMMs) were cultured for 4 d with M-CSF(30 ng/ml) and RANKL(100 ng/ml) in the presence or absence of *Ssangbohwan*.

A : after 4 d, cells were fixed in 3.7 % formalin, permeabilized in 0.1 % triton x-100, and stained for TRAP.

B : TRAP-positive cells were counted as osteoclasts.

Asterisks(*) indicate statistical differences from the control(* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$).

N=4

추출물과 토사자 추출물의 배합비율 1 : 1의 비율을 고려하여 숙지황 추출물과 토사자 추출물의 농도는 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리하여 확인하였으며, 그 결과 M-CSF와 RANKL만 처리한 대조군에 비하여 숙지황 추출물, 토사자 추출물을 처리한 실험군에서 TRAP 양성 파골세포의 형성 및 다핵의 성숙된 파골세포로서의 분화가 억제되었지만 약간의 파골세포들이 보였으며(Fig. 2A), 숙지황 추출물보다는 토사자 추출물이 파골세포 분화 억제 효과가 더 있었다. TRAP 염색 후, 염색된 파골세포 중, 핵이 3개 이상이 융합되어 있는 세포의 개수를 측정하여 정량적 분석한 결과 숙지황 추출물, 토사자 추출물을 처리한 실험군에서 유의성 있게 억제됨을 확인하였다. Kruskal-Wallis 검정을 통해 유의성 있음을 확인하였으며, 사후검정에 대한 결과는 Fig. 2B에 표시하였다.

2. 쌍보환, 숙지황, 토사자 물 추출물의 세포독성

숙지황 추출물, 토사자 추출물, 쌍보환 추출물의 파골세포 분화 억제 효과가 세포독성과의 관련성을 배제하기 위

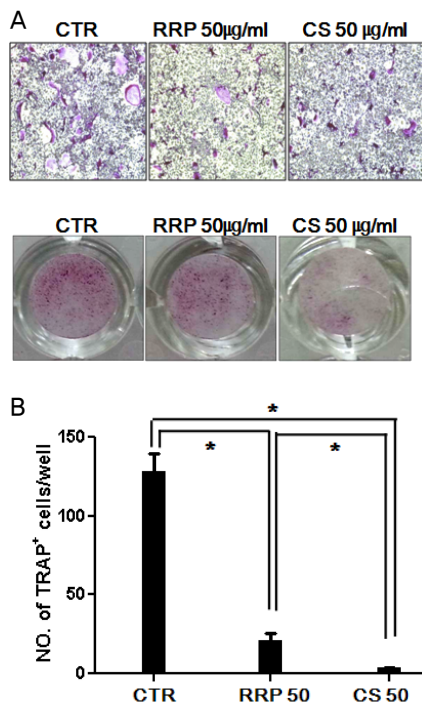


Fig. 2. *Rehmanniae Radix Preparat*(RRP) and *Cuscutae Semen*(CS) inhibits osteoclast differentiation
Bone marrow macrophages(BMMs) were cultured for 4 d with M-CSF(30 ng/ml) and RANKL(100 ng/ml) in the presence or absence of *Rehmanniae Radix Preparat* and *Cuscutae Semen*.
A : After 4 d, cells were fixed in 3.7 % formalin, permeabilized in 0.1 % Triton x-100, and stained for TRAP.
B : TRAP-positive cells were counted as osteoclasts. Asterisks(*) indicate statistical differences from the control(* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$).
N=4

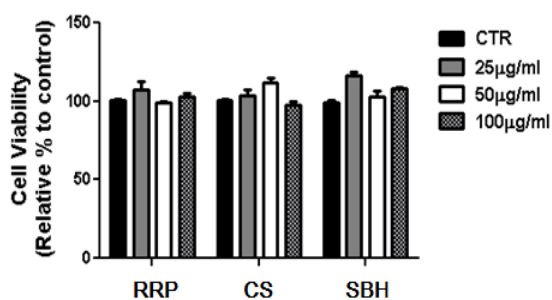


Fig. 3. The effect of *Rehmanniae Radix Preparat* (RRP), *Cuscutae Semen*(CS) and *Ssangbohwan* (SBH) on cell viability
BMMs were cultured for 3 d with M-CSF(30 ng/ml) in the presence or absence of *Rehmanniae Radix Preparat*, *Cuscutae Semen* and *Ssangbohwan*.
After 3 d, each well were added with XTT solution and incubated for 4-6 h.
The plate was measured at 450 nm using a microplate reader.

해 각 약물을 농도별로 처리한 BMMs에서 XTT assay로 탐색한 결과 숙지황 추출물, 토사자 추출물, 쌍보환 추출물 25, 50, 100 µg/ml의 농도에서 세포독성이 나타나지 않음을 확인하였다(Fig. 3).

3. RANKL에 의한 파골세포 유도인자 발현 억제효과

1) 쌍보환 추출물이 RANKL에 의한 유전자 발현에 미치는 효과

RANK는 RANKL과의 결합 이후 세포내의 신호 전달 체계를 거쳐 전사인자인 c-Fos나 NFATc1의 발현을 촉진시키며 이들로 인해 파골세포의 지표라 할 수 있는 TRAP의 발현을 유도하였다. 쌍보환 추출물이 RANKL에 의해 발현되는 유전자인 c-Fos, NFATc1, TRAP의 발현을 확인하기 위하여 RT-PCR을 수행하였으며, 그 결과 RANKL에 의한 c-Fos, NFATc1, TRAP의 mRNA 발현이 1~2일에 증가하였으며, 쌍보환 추출물을 처리한 실험군에서는 TRAP을 제외한 c-Fos, NFATc1의 mRNA 발현이 유의성 있게 억제되었다(Fig. 4). Mann-Whitney 검정을 통해 유의성 있음을 확인하였다.

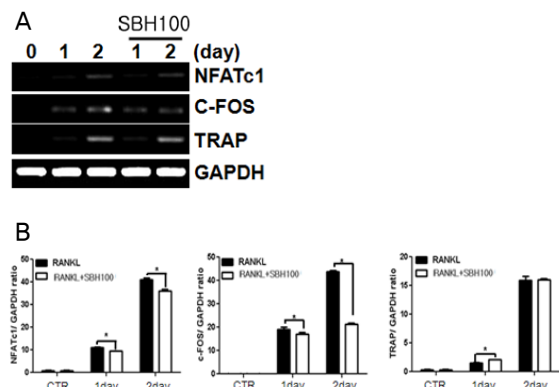


Fig. 4. *Ssangbohwan*(SBH) suppresses RANKL-induced c-Fos, NFATc1 and TRAP expression
BMMs were pretreated with or without *Ssangbohwan*(100 µg/ml) for 1 h and then stimulated with RANKL(100 ng/ml) for the indicated times.
A : each mRNA were analyzed by RT-PCR.
B : quantitative analysis by image J program.
Significance(*) indicates significance for the difference between control and extraction treatment group(* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$).
Error bars indicate SDs; N=4.

2) 쌍보환 추출물 구성 약재인 숙지황 추출물, 토사자 추출물이 RANKL에 의한 유전자 발현에 미치는 효과

RANKL에 의해 유도되는 유전자 발현을 확인하고자 역전사중합반응 분석을 통해 c-Fos, NFATc1, TRAP의 발현을 확인하였다. 그 결과 RANKL에 의한 c-Fos, NFATc1, TRAP의 mRNA 발현이 1~2일에 증가하였으나 숙지황 추출물을 처리한 군에서는 c-Fos, NFATc1의 mRNA 발현이 억제되지 않았으며, TRAP의 mRNA에서는 미미하게 억제되었다. 그러나 토사자 추출물을 처리한 군에서는 2일째 c-Fos, NFATc1의 mRNA 발현이 억제되었다. Kruskal-Wallis 검정을 통해 유의성 있음을 확인하였으며, 사후검정에 대한 결과는 Fig. 5에 표시하였다.

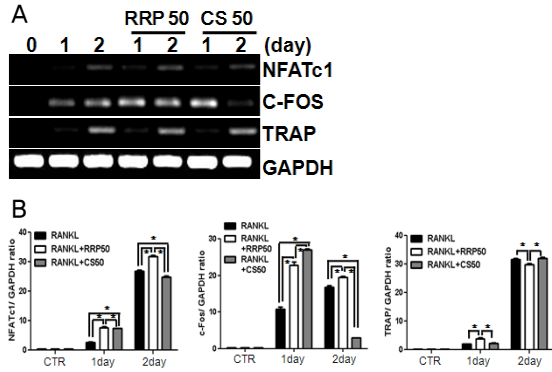


Fig. 5. *Rehmanniae Radix Preparat*(RRP) and *Cuscutae Semen*(CS) suppresses RANKL-induced c-Fos, NFATc1 and TRAP expression
 BMMs were pretreated with or without *Rehmanniae Radix Preparat* and *Cuscutae Semen*(50 µg/ml) for 1 h and then stimulated with RANKL(100 ng/ml) for the indicated times.
 A : each mRNA were analyzed by RT-PCR.
 B : quantitative analysis by image J program.
 Significance(*) indicates significance between control and extraction treatment group(* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$).
 Error bars indicate SDs; N=4.

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

1) 쌍보환 추출물이 RANKL로 유도되는 c-Fos와 NFATc1 발현에 미치는 효과

파골세포 전구세포에서 골 흡수하는 파골세포로의 분화는 RANK와 RANKL이 결합되어 c-Fos와 NFATc1의 발현을 유도하며 이는 뼈 파골세포의 분화에 중요한 역할을 한

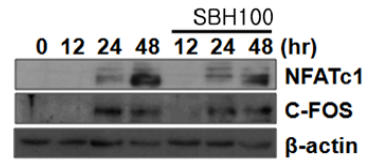


Fig. 6. *Ssangbohwan*(SBH) suppresses RANKL-induced c-Fos and NFATc1 expression
 BMMs were pretreated with or without *Ssangbohwan*(100 µg/ml) for 1 hour and then stimulated with RANKL(100 ng/ml) for the indicated times.
 The cell lysates were analyzed by western blotting with antibodies for c-Fos, NFATc1, and β-actin.

다. 쌍보환 추출물이 파골세포 분화 억제효과에 있어 c-Fos와 NFATc1의 단백질 발현에 미치는 영향을 확인하고자 western blotting을 수행하였다. RANKL을 처리한 후 12, 24, 48시간에서 NFATc1과 c-Fos의 발현이 증가하였다. 그러나 쌍보환 추출물을 처리한 실험군에서는 NFATc1과 c-Fos의 발현이 억제되었다(Fig. 6).

2) 숙지황 추출물, 토사자 추출물이 RANKL에 의해 유도되는 c-Fos와 NFATc1 발현에 미치는 효과

쌍보환 추출물은 구성 약재인 숙지황 추출물과 토사자 추출물이 c-Fos와 NFATc1 발현에 미치는 영향을 확인하였다. 그 결과, RANKL을 처리한 후 12, 24, 48시간에서 NFATc1과 c-Fos의 발현이 증가하였지만, 숙지황 추출물과 토사자 추출물을 처리한 실험군에서는 NFATc1과 c-Fos의 발현이 억제되지 않았다(Fig. 7). 숙지황 추출물과 토사자 추출물 단독 처리보다는 숙지황 추출물과 토사자 추출물을 배합한 쌍보환 추출물을 처리할 때 RANKL에 의해 유도되는 c-Fos와 NFATc1 발현에 억제효과가 나타남으로써 숙지황 추출물, 토사자 추출물 단독처리보다 쌍보환 추출물이 상승효과를 보임을 확인하였다.

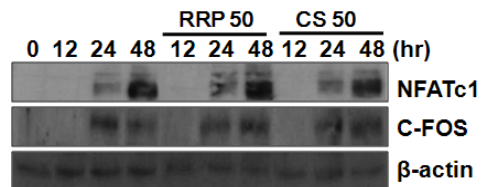


Fig. 7. *Rehmanniae Radix Preparat*(RRP) and *Cuscutae Semen*(CS) suppresses RANKL-induced c-Fos and NFATc1 expression
 BMMs were pretreated with or without *Rehmanniae Radix Preparat* and *Cuscutae Semen*(50 µg/ml) for 1 hour and then stimulated with RANKL(100 ng/ml) for the indicated times.
 The cell lysates were analyzed by Western blotting with antibodies for c-Fos, NFATc1, and β-actin.

5. 파골세포 분화의 신호전달 경로에 미치는 효과

1) 쌍보환 추출물이 RANKL로 유도되는 뼈 파골세포 분화의 신호전달 경로에 미치는 효과

쌍보환 추출물이 뼈 파골세포 분화 억제 작용기전을 규명하기 위하여 RANKL에 의해 유도되는 주요 신호전달 체계에 쌍보환 추출물이 미치는 영향을 western blotting을 수행하여 확인하였다. BMM에 쌍보환 추출물을 전 처리하고 RANKL을 0, 5, 15, 30분 간격으로 처리한 결과 MAPKs의 인산화가 증가되었지만, 쌍보환 추출물을 처리한 실험군에서는 P38, JNK, I- κ B의 인산화가 억제되었다(Fig. 8).

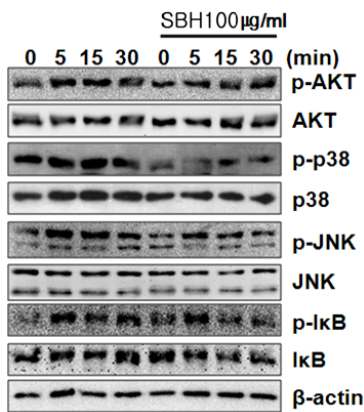


Fig. 8. *Ssangbohwan*(SBH) inhibits RANKL signaling pathways

BMMs were pretreated with or without *Ssangbohwan*(100 μ g/ml) and further stimulated with RANKL(100 ng/ml) for the indicated time. The cells were lysed and proteins were resolved by 10 % SDS-PAGE and subjected to western blot analysis.

2) 숙지황 추출물, 토사자 추출물이 RANKL로 유도되는 뼈 파골세포 분화의 신호전달 경로에 미치는 효과

쌍보환 추출물을 구성는 숙지황 추출물과 토사자 추출물이 파골세포 분화 억제 기전에 있어 RANKL에 의해 유도되는 주요 신호전달 체계에 미치는 효과를 확인하고자 western blotting을 수행하였다. BMM에 숙지황 추출물과, 토사자 추출물을 전 처리하고 RANKL을 0, 5, 15, 30분 간격으로 처리한 다음 시간대별로 MAPKs의 인산화가 증가됨을 확인하였고 숙지황 추출물을 처리한 실험군에서는 RANKL로

인해 유도되는 I- κ B의 인산화만 억제되었으며, 토사자 추출물을 처리한 실험군에서는 RANKL에 의해 유도되는 I- κ B 감소를 억제하였다(Fig. 9).

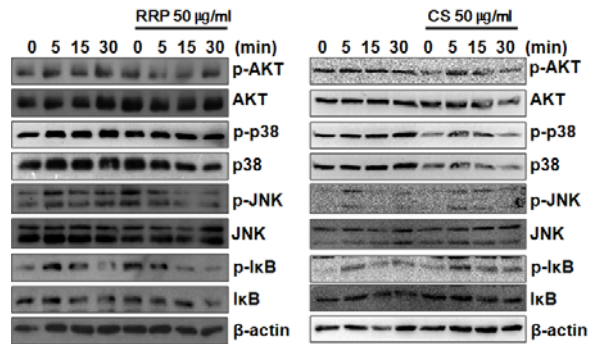


Fig. 9. *Rehmanniae Radix Preparat*(RRP) and *Cuscutae Semen*(CS) inhibits RANKL signaling pathways

BMMs were pretreated with or without *Rehmanniae Radix Preparat* and *Cuscutae Semen*(50 μ g/ml) and further stimulated with RANKL(100 ng/ml) for the indicated time. The cells were lysed and proteins were resolved by 10 % SDS-PAGE and subjected to western blot analysis.

6. LPS-유도 골 손실에 미치는 효과

생체 내에서 쌍보환의 물 추출물과 이를 구성하고 있는 약재인 숙지황과 토사자의 추출물이 미치는 영향을 검증하고자 염증성 골 손실 동물 모델을 이용하여 확인하였다. 생쥐에 1회 / 3일 복강주사를 통하여 LPS(5 μ g/g)를 투여하였으며 각 추출물은 농도별로 1회/1일 경구 투여하였다. LPS로 유도되는 골 손실에 대한 영향은 Skyscan BE/skyscan 1172로 대퇴골 내부의 3차원적 영상을 얻었으며 이 결과를 바탕으로 분석하였다(Table 3).

대조군에 비해 LPS 처리군에서는 평균 18 % 정도의 골 손실을 보였으며 LPS와 단일 약물을 동시 처리한 군에서는 토사자에서 골 손실이 심화되었다. 하지만 숙지황과 LPS 동시 처리군에서는 골 손실이 다소 회복되었다. 또한 쌍보환 추출물은 200 mg/kg/day와 400 mg/kg/day의 농도로 처리했을 때 유의성 있는 결과는 얻지 못하였지만, 400 mg/kg/day보다는 200 mg/kg/day의 농도에서 bone volume/ tissue volume(BV/TV)이 LPS군에 비해 숙지황 처리군과 같은 수준으로 골 손실이 회복되었으며, 또한 trabecular thickness, trabecular separation, trabecular number도 회복되었음을 확인할 수 있었다(Fig. 10).

Table 3. Skyscan Analysis of LPS-induced Bone Loss in Mice

	CTR	RRP200	CS200	LPS +				
				-	RRP200	CS200	SBH200	SBH400
BV/TV(%)	32.3±3.1	29.5±3.4	28.0±1.6	26.5±0.6	29.4±0.6	21.6±1.9	29.7±2.4	26.1±1.0
Trabecular thickness(μm)	16.0±1.1	13.9±0.6	13.8±0.2	14.7±0.5	15.8±0.1	13.0±0.4	16.3±2.1	14.6±1.4
Trabecular separation(μm)	33.5±2.7	33.4±3.9	35.6±2.3	41.0±2.0	37.9±0.8	50.3±0.8	38.4±0.6	41.4±2.2
Trabecular number(1/μm)	0.021±0.0	0.021±0.0	0.020±0.0	0.018±0.0	0.019±0.0	0.016±0.0	0.018±0.0	0.018±0.0

CTR : control group. RRP : *Rehmanniae Radix Preparat.* CS : *Cuscutae Semen.* SBH : *Ssangbohwan.* LPS : lipopolysaccharide.

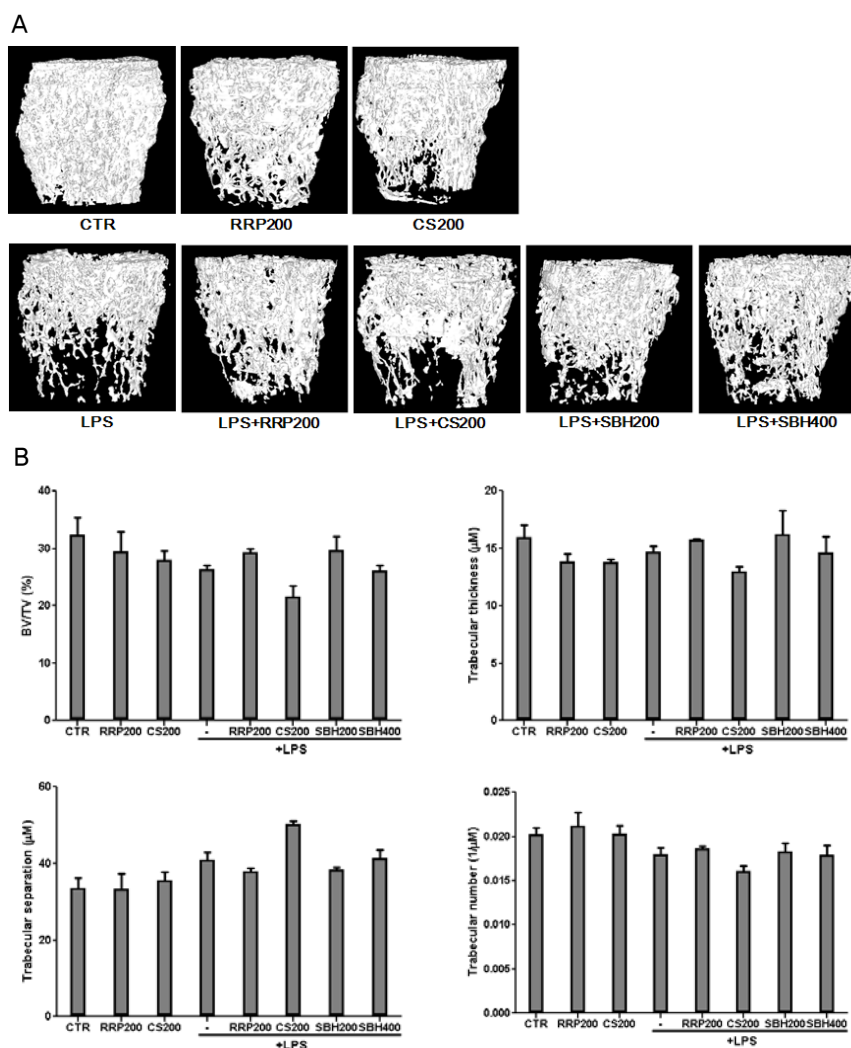


Fig. 10. Skyscan analysis of LPS-induced bone loss in mice

A : Mice were oral-treated *Rehmanniae Radix Preparat*(RRP), *Cuscutae Semen*(CS) and *Ssangbohwan*(SBH) extracts(200 or 400 mg/kg/day) or 1×PBS for every 10 days. LPS(5 μg/g of body weight) or 1×PBS was administered intraperitoneally on day 4 and 7, and the femurs were collected on day 10 after the first of PPR, CS and SBH extracts. Radiographs were taken with a Skyscan.

B : Bone volume/ tissue volume(BV/TV), trabecular thickness, trabecular separation and trabecular number was analyzed using the histomorphometric results. Asterisks indicate statistical difference from the Lipopolysaccharide(LPS) group. * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$.

IV. 고 찰

노인 연령에서 흔하게 발생하는 뼈 질환인 골다공증은 뼈의 파괴와 재생과정에서 이상이 발생하여 생긴 질환으로 뼈가 약해져 부러지기 쉬운 질환이다²⁾. 나이가 들어감에 따라 뼈는 점점 얇아지고 가벼워져, 70세에 이르면 40세에 비하여 3분의 1 정도로 가벼워진다. 골다공증으로 알려진 골밀도의 손실은 뼈의 자연적인 파괴가 재생보다 빨리 일어나서 발생한다⁴⁾. 결과적으로 모든 노인들은 골다공증이 있지만 그 심한 정도는 사람에 따라 다양하다. 보통은 마르고, 운동을 거의 하지 않으며, 친척이 골다공증을 가지고 있는 사람들은 다른 사람들보다 골다공증을 앓을 가능성이 높다. 많은 사례에서 경미한 낙상으로 손목이나 고관절의 골절이 생기고 나서야 골다공증이 있다는 것을 알게 된다. 노년기 골절의 주요한 원인이 골다공증이며, 특히 고관절 골절이 많이 일어난다. 노인에서 고관절 골절이 생기면 거동을 불가능하게 하며, 때로 치명적일 수 있다²⁾.

골다공증의 일반적인 진단원칙은 폐경 후 여자, 혹은 50세 이상 남자에서 요추 혹은 대퇴경부, 골반골 골밀도 검사를 하는 것이며, 검사에서 T-score -2.5 이하일 때를 골다공증으로 진단한다. 65세 이상 성인 전체의 골다공증 유병률은 34.0%, 남성의 유병률은 9.1%, 여성의 유병률은 51.4%이다. 70세 이상 성인 전체의 골다공증 유병률은 41.8%, 남성의 유병률은 12.3%, 여성의 유병률은 59.8%이다¹⁾. 더불어, 2010년 발표된 국내 경기도 안성 지역 코호트 연구 결과에서는 척추 골절의 50세 이상 성인의 유병률은 여성 16.5%, 남성 12.1%로 나타났다¹⁰⁾. 골다공증은 연령이 증가할수록 그리고 여성이 남성보다 유병률이 높음을 알 수 있고, 골다공증에 의한 골절도 노년기에 매우 흔함을 알려 준다.

건강보험심사평가원이 2007년부터 2011년까지 5년간의 자료를 이용하여 ‘골다공증(M80-M82)’에 대해 분석한 결과를 보면 진료인원은 2007년 53만 5천 명에서 2011년 77만 3천 명으로 5년간 약 44.3%가 증가하였고, 연평균 증가율은 9.7%로 나타났다¹⁾. 이를 보면 우리 사회가 골다공증에 대해 부담해야 하는 비용이 점차 증가함을 알 수 있다.

골다공증은 중년의 건강을 위협하는 흔한 질환일 뿐 아니라 노년의 삶의 질과 수명까지 결정할 수 있는 심각한 질환으로 인식되며, 그렇기 때문에 이미 많은 골 질환 치료제가 사용되고 있다. 골 질환 치료제로는 주요 호르몬과 이차성 호르몬, 비호르몬성 제제로 나뉜다. 주요 호르몬으로는 parathyroid hormone(PTH)를 말할 수 있으며, 이것은 비타민 D와 함께 칼슘과 인산염의 항상성을 조절한다. 이차

성 호르몬으로는 칼시토닌, 프롤락틴, 성장호르몬, 인슐린, 갑상선호르몬, 당질코르티코이드, 성호르몬 등이 있다. 그 밖에 비호르몬성 치료제로 나트륨과 불소, 칼슘과 인산염, 비스포스포네이트, 플리카미신, 이노제 등이 사용되고 있다¹¹⁾. 이렇게 다양한 종류의 약이 사용되고 있으나, 현재는 그에 따른 부작용도 대두되었다¹²⁾. 그렇기 때문에 최근에는 이러한 부작용이 덜하며 골다공증에는 유효한 작용을 하는 한약재에 대한 연구가 점차 증가하고 있다¹³⁻¹⁵⁾.

한의학에서 골다공증과 일치하는 병명은 없다. 그렇기에 골다공증과 가장 유사한 표현을 찾아보면, 《黃帝內經》에서 骨痺와 骨痿를 찾을 수 있다. 그 외에도 虛勞나 虛痺, 骨寒, 骨熱, 骨虧, 骨枯, 骨痛 등의 질환을 골다공증의 범주에 포함시킬 수 있을 것이다¹⁶⁾. 그리고 한의학에서 腎臟은 오장육부에서 臟精, 主骨, 生骨髓를 담당하고 骨의 성장발육을 주관하는 기관으로 인식되고 있다¹⁷⁾. 그렇기 때문에 골다공증에 관한 한의학적 해석에는 언제나 腎의 개념이 동반된다. 실제로 腎虛에 도움을 주는 補益藥, 補陽藥 계통의 약재들이 골다공증에 대해 유효한 효과를 나타내는 것으로 조사되었다¹⁸⁾.

雙補丸은宋代 陳의 《壽親養老新書》에 처음 수록되었으며, 補血의 熟地黃 半斤과 補精의 菟絲子 半斤으로 구성되어 “治下部虛冷平補, 不燥不熱”한다 하였고, 특히 골다공증에 사용되는 補腎劑의 구성약물로 임상에서 활용되고 있다¹⁹⁾.

熟地黃(*Rehmanniae Radix Preparata*)은 玄蔘科(Scrophulariaceae)에 속하는 多年生草本 地黃(*Rehmannia glutinosa Liboschitz*)을 포제 가공한 것으로, 熟地라고도 하며 性味 및 歸經은 甘, 微溫, 無毒하고 肝·腎 二經에 작용한다고 하였다^{20,21)}. 《景岳全書》중 補益藥에 대표적인 補血藥으로 滋陰補血, 益精填髓의 효능이 있어 腎陰虛와 血虛로 인한 腰膝酸軟, 骨蒸潮熱, 盜汗遺精, 內熱消渴, 血虛萎黃, 心悸, 怔忡, 眩暈, 耳鳴 등의 치료에 응용되고 있다²²⁻²⁶⁾.

菟絲子(*Cuscutae Semen*)는 旋花科(Convolvulaceae)에 속하는 1年生 寄生性 초본인 갯실새삼(*Cuscuta chinensis Lam*)의 성숙한 씨앗(ripe seed)이다²¹⁾. 性味 및 歸經은 辛, 甘, 平 無毒하고 肝·腎 二經에 작용한다고 하였다²⁷⁾. 기능으로는 전통적으로 肝과 腎臟機能을 補하고 눈을 밝게 하며 설사를 멈추고 태아를 편안하게 하는 약물로 사용되어 왔다^{21,27)}. 또한 최근에는 부인과질환, 만성 기관지염과 암생의 억제효과를 보인다고 보고되었다²⁸⁻³⁰⁾.

현재까지 숙지황 추출물과 토사자 추출물 및 쌍보환 추출물이 골다공증에 미치는 영향에 대하여 진행된 실험은 란소적출로 골다공증을 유발한 마우스를 이용하여 연구되었다. 이것은 *in vivo*에서 혈청성분, 요 성분, 골밀도 등의 생화학적 지표 검사를 통한 골다공증에 대한 효능을 시험

한 것이었다^{7-8,10}). 그래서 숙지황과 토사자 및 쌍보환의 물 추출물에 대하여 염증성 골 손실에 미치는 작용을 마우스를 통하여 확인하고, 세포 수준에서 파골세포의 분화를 억제하는 정도와 작용기전에 관해 좀 더 알아보려고 실험을 진행하였다. 또한 그 결과를 통하여 병용 투여와 각각의 약물의 투여가 어떤 의미가 있는지 알아보려고 하였다.

TRAP assay로 파골세포 형성을 확인한 결과, 숙지황 추출물과 토사자 추출물이 파골세포의 분화를 억제함을 확인하였다. 그리고 단일 추출물보다 쌍보환 추출물이 세포 독성이 없는 파골세포 분화 억제에 효과가 더 좋다는 점을 확인할 수 있었다(Fig. 1~3).

c-Fos와 NFATc1의 유전자를 결핍시킨 세포는 파골세포로 분화되지 않는다는 다수의 연구 결과 보고가 있다³¹). 따라서 쌍보환 추출물의 파골세포 분화 억제 효과 확인 후, c-Fos와 NFATc1 발현의 관련성을 조사하였다. 그 결과 쌍보환 추출물은 c-Fos와 NFATc1의 mRNA와 단백질 발현을 억제함을 알 수 있었다(Fig. 4, 6). 그러나 토사자 추출물과 숙지황 추출물은 파골세포의 분화를 억제하였지만, 숙지황 추출물은 c-Fos와 NFATc1 발현을 억제하지 못하였고, 토사자 추출물은 2일째 c-Fos의 mRNA 발현만을 억제하였다(Fig. 5, 7). 이들의 결과로 추론해보면, 비록 숙지황 추출물과 토사자 추출물이 c-Fos와 NFATc1 발현을 억제하지 못하지만 두 가지 추출물의 처방전인 쌍보환 추출물이 c-Fos와 NFATc1 발현을 억제하는 것은 두 가지 추출물 성분의 상호작용으로 나타난다고 사료된다.

RANKL은 tumor necrosis factor(TNF) 계열의 사이토카인으로, 수용체인 receptor activator of nuclear factor kappa-B(RANK)와 결합하여 다양한 신호전달 단백질을 활성화 하고 파골세포 분화에 필수적인 전사인자 발현을 촉진한다³²). 특히 MAPK 중에서 p38은 전사인자인 MITF를 활성화 하여 파골세포의 표지 유전자인 TRAP의 발현에 관여하고 c-Fos, NFATc1 등과 함께 파골세포 표지 유전자 발현을 촉진한다고 알려져 있다³³). 또한 JNK는 전사인자 c-Jun의 활성을 촉진하여 c-Fos와 함께 전사인자인 AP-1 형성을 유도한다고 보고되었다³⁴). 또한 NF- κ B는 c-Fos 발현에 중추적인 역할을 한다고 잘 알려져 있다³¹). NF- κ B는 세포질 내에서 I- κ B와 결합을 하여 핵 내로 이동하는 것을 저해받는다. 만약 RANKL에 의해 I- κ B 단백질이 분해되면, NF- κ B는 핵 내로 이동하게 된다. I- κ B의 지속적인 발현은 NF- κ B의 작용 억제를 의미하며 결과적으로 파골세포로의 분화자체가 억제된다³⁵).

따라서 저지는 쌍보환, 숙지황, 토사자 물 추출물의 파골세포 분화 억제 작용기전을 규명하기 위해 MAPK의 활성을 확인함으로써 쌍보환, 숙지황, 토사자 물 추출물의 영

향을 검증하였다. 그 결과 쌍보환 추출물은 p38, JNK, NF- κ B의 활성을 억제함을 알 수 있었다(Fig. 8). 그러나 토사자 추출물, 숙지황 추출물은 오직 NF- κ B의 활성을 미미하게 억제하였다(Fig. 9). 이들의 결과로 쌍보환 추출물이 p38, JNK, NF- κ B의 활성을 억제하여 전사인자 c-Fos와 NFATc1의 발현을 억제한다고 할 수 있을 것이다. 또한 숙지황 추출물과 토사자 추출물이 c-Fos와 NFATc1 발현을 억제하지 못하는 것은 전사인자 발현에 중요한 신호전달 단백질 활성에 큰 영향이 없기 때문으로 사료된다. 결과적으로 단일 추출물은 파골세포 분화 억제 효과가 미미하지만 배합처방인 쌍보환 추출물은 상승작용으로 파골세포 분화 억제효과를 나타내는데 그 상승효과는 본 연구에서 명확히 규명하지는 못했지만, 숙지황과 토사자를 같이 추출한 물질이 각각 추출한 물질과 성분의 차이가 있어 파골세포 분화 억제 상승효과를 낸다고 생각되는 바이다.

세포 실험에서 확인된 파골세포 분화 억제 효과를 생체 내에서 확인하기 위해 LPS를 주입하여 염증성 골 손실을 유도한 동물 모델에서 검증하였다. LPS를 주입하여 유도되는 염증성 사이토카인이나 prostaglandin 같은 염증 물질의 증가로 골 흡수를 야기하며³⁶), LPS에 의해 TNF- α 가 유도되고 이로 인해 c-src의 발현이 증가하기 때문이라는 보고가 있다³⁷). 숙지황 추출물은 흰쥐의 난소 적출로 estrogen 결핍성 골다공증을 유발시킨 마우스 모델에서 체중에 대한 대퇴골의 무게 비율의 증가, 혈청 중 osteocalcin 함량 증가, 혈청 중 alkaline phosphatase(ALP) 함량 감소 등의 효과가 있음이 밝혀져 있으며³⁸), 토사자는 대퇴골의 무게와 경골의 회분함량이 증가하고 혈청 내 albumin, ALT, triglyceride 및 estradiol의 혈중 농도 증가와 AST, ALP, total-cholesterol 및 T4는 감소 등의 결과로 폐경기 후 골다공증에 토사자가 골형성을 촉진하고 골흡수를 예방하는 효과가 있음이 확인된 바 있다³⁹).

본 연구에서 LPS-유도 골 손실 모델을 이용하여 각 추출물의 골 손실 영향을 확인한 결과 토사자는 단독으로 사용하여 효과가 없었으나 숙지황과 쌍보환 추출물에서 bone volume/ tissue volume(BV/TV), trabecular thickness, trabecular separation, trabecular number가 LPS군보다 회복되었으며, 쌍보환에서 400 mg/kg/day의 농도보다 200 mg/kg/day의 농도에서 효과적임을 확인하였다.

저지는 숙지황 추출물과 토사자 추출물 그리고 두 가지 추출물의 처방전인 쌍보환 추출물을 이용하여 파골세포 분화 억제 효과를 확인하였는데, 쌍보환 추출물이 신호 전달 단백질 p38, JNK와 전사인자 NF- κ B의 활성을 억제하고, c-Fos와 NFATc1 발현을 저해하여 파골세포 분화를 억제한다고 할 수 있다. 또한 *in vivo* 모델에서도 쌍보환

200 mg/kg/day 농도는 골 손실 억제 효과가 있었다. 이로써 숙지황과 토사자의 배합 약물인 쌍보환은 골다공증 치료제 개발에 유용하게 사용될 수 있을 것이라 생각되는 바이다.

V. 결 론

본 연구는 파골세포의 분화에 숙지황 추출물과 토사자 추출물 그리고 두 가지 추출물의 처방전인 쌍보환 추출물이 어떠한 효과를 미치는지 규명하고자 수행하였으며, 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. RANKL에 의해 유도되는 파골세포 분화에 쌍보환 추출물은 유의성 있게 억제함을 확인하였다.
2. RANKL에 의해 유도되는 파골세포 분화에 쌍보환 추출물 구성 약재인 숙지황 추출물, 토사자 추출물이 유의성 있게 억제함을 보여주었다.
3. 숙지황 추출물, 토사자 추출물, 쌍보환 추출물 25, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 세포독성을 나타내지 않음을 확인하였다.
4. RANKL로 유도되는 c-Fos와 NFATc1 발현에 쌍보환 추출물을 처리한 후, western blotting와 RT-PCR을 수행했을 때, NFATc1와 c-Fos의 발현이 억제됨을 보여주었다.
5. RANKL로 유도되는 c-Fos와 NFATc1 발현에 숙지황 추출물과 토사자 추출물을 처리한 뒤, western blotting와 RT-PCR을 통해 확인한 결과 western blotting에서 NFATc1과 c-Fos의 발현이 억제되지 않았다. RT-PCR의 경우 숙지황 추출물을 처리한 군에서는 c-Fos, NFATc1의 mRNA 발현이 억제되지 않았으며, TRAP의 mRNA에서는 미미하게 억제되었으며, 토사자 추출물을 처리한 군에서는 2일째 c-Fos, NFATc1의 mRNA 발현이 억제되었다.
6. RANKL로 유도되는 파골세포 분화에 쌍보환 추출물을 처리한 후, 신호전달 경로를 확인하기 위해 western blotting을 수행하면 P38, JNK의 인산화를 억제하였고, RANKL에 의한 I- κ B의 가수분해를 유의하게 억제함으로써 NF- κ B의 활성이 저해됨을 알 수 있었다.
7. RANKL로 유도되는 파골세포 분화에 숙지황 추출물 또는 토사자 추출물을 처리한 후, 신호전달 경로를 확인하기 위해 western blotting을 수행하면 오직

NF- κ B의 활성만 미미하게 억제됨을 알 수 있었다.

8. LPS-유도 골 손실 모델을 이용하여 각 추출물의 골 손실 영향을 확인한 결과 숙지황과 토사자의 단독 추출물에서 골 손실의 경향이 보였으며 LPS와 숙지황 추출물을 동시에 처리한 군에서는 골 손실이 회복되었다. 또한, 쌍보환은 200 mg/kg/day의 농도에서 bone volume/ tissue volume(BV/TV)이 LPS군에 비해 골 손실이 회복되었으며 또한 trabecular thickness, trabecular separation, trabecular number도 회복되었음을 알 수 있었다.

이상의 실험 결과를 종합해 볼 때, 쌍보환 추출물이 신호 전달 단백질 p38, JNK와 전사인자 NF- κ B의 활성을 억제하고, c-Fos와 NFATc1 발현을 저해하여 파골세포 분화를 억제한다고 할 수 있다. 숙지황과 토사자의 단일 추출물은 파골세포 분화 억제 효과가 미미하지만 처방전인 쌍보환 추출물 조합은 파골세포 분화 억제 상승효과가 있다고 사료된다. LPS-유도 골 손실 모델에서 쌍보환과 숙지황은 골 흡수가 억제되었다. 이로써 숙지황과 토사자의 배합 약물인 쌍보환은 골다공증 치료제 개발에 유용하게 사용될 수 있을 것이라 생각되는 바이다.

VI. References

1. Ministry of Health & Welfare, 2008 national health statistics [Internet]. Sejong City [cited 2010 March 18]. table2-62. Available from : http://www.mw.go.kr/front_new/jb/sjb030301vw.jsp?PAR_MENU_ID=03&MENU_ID=0321&CONT_SEQ=264493
2. Goldmann DR. American college of physicians Complete bone medical guide. New York : DK Publishing, Inc. 2003 : 368.
3. Statistical Information Center, Health insurance review & assessment service [Internet]. Seoul [cited 2013 January 31] Available from : http://www.hira.or.kr/dummy.do?pgmid=HIRAA020041000000&cmsurl=/cms/notice/02/1316013_24959.html
4. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. Nature, 2003 ; 423(6937) : 337-42.
5. Kim JY. Effects of *Cuscuta japonica* Choisi on gene expression in RANKL-induced RAW 264.7 cell.

- Spkom, 2010 ; 14(2) : 77-89.
6. Kim JK, Kim SW, Lee BE, Hwang HH, Kwon JS, Ko SY. The effect of herbal formulation(OPB) rehmannia gutinosa lbosch and eleutherococcus senticosus max extracts on bone density and bone biochemical marker in ovariectomized rats. J Oral Med Pain, 2007 ; 32(1) : 35-43.
 7. Park JW, Choi SS, Kim CW, Park BR. Effects of *Ssangbohwan* on the ovariectomized rat model of postmenopausal osteoporosis. The Journal of Traditional Korean Medicine, 2000 ; 10(1) : 241-54.
 8. Cho SI. Effects of the *Rehmanniae Radix Preparat* on ovariectomized rats. Kor J Herbology, 2005 ; 20(4) : 61-7.
 9. Kim JH, Kim HS, Jun JY et al. Effects of *Cuscutae Semen* extract on prevention of osteoporosis in ovariectomized rats. J Korean Obstet Gynecol, 2012 ; 25(4) : 1-11.
 10. Shin CS, Choi HJ, Kim MJ et al. Prevalence and risk factors of osteoporosis in Korea : a community-based cohort study with lumbar spine and bone mineral density. Bone, 2010 ; 47 : 378-87.
 11. Katzung BG. Basic & clinical pharmacology. Seoul : Daehan Medical Books, 2002 : 771-89.
 12. Chung YS. The medical treatment of osteoporosis. Korean J Med, 2010 ; 79(3) : 250-3.
 13. Ann JY, Kim JH, Ki JY, Kwak HB, Oh JM, Kim YK. Inhibitory effects of water extract of cervi parvum cornu, carthami tinctorii fructus and combination on osteoclast differentiation and bone resorption. HFS, 2010 ; 19(2) : 167-82.
 14. Lee JW, Seo BI, Park JH, Roh SS, Kim YH, Kim MR. Effect of mantidis oötheca and mori fructus on treatment of osteoporosis in ovariectomized rats. Kor J Herbology, 2009 ; 24(1): 59-71.
 15. Hwang JS, Seo BI, Park JH et al. Effect of cervi cornu on treatment of osteoporosis in ovariectomized rats. Kor J Herbology, 2010 ; 25(2) : 1-10.
 16. Kim JH. Review of recent research on the osteoporosis - is mainly dependent on the oriental medicine clinical and experimental study. The Acupuncture, 1998 ; 15(2) : 437-54.
 17. Kim WH, Choi DY. *Jangboobyeonjeungnonchi*. Seoul : Sungbosa, 1988 : 286, 293.
 18. Ann JY, Ki JY, Kim JH et al. A review of anti-osteoporosis effects of herbal extracts in Korean journals. Herbal Formula Science, 2008 ; 16(2) : 47-69.
 19. Jin J. Suchinyangnosinseo.(Heumjeongsagojeonseo-jaboo) Seoul : Daesungmoonhwasa, 1995 : 386.
 20. Xu HG. Commonly used Chinese medicine knowledge. Shanghai : Shanghai Science and Technology Press, 1983 : 174-5.
 21. Sin MG. Clinical herbal medicine. Seoul : Younglimsa 2006 : 226-7, 248-51.
 22. Sun SM. *Qian Jin Yi Fang*. Taipei : Free Press, 1982 : 19.
 23. Lee CH. *Uihak-ïpmun*. Seoul : Hansungsa, 1984 : 194-5.
 24. Beijing University of Chinese Medicine Teaching with WH Group with Prescription Medicine. Four subway vernacular solutions include medicinal song. Beijing : People's Health Publishing House, 1978 : 4-5.
 25. Zhongshan Medical College. Clinical application of traditional Chinese medicine. Guangdong : Guangdong People's Publishing House, 1975 : 82-4, 374-6.
 26. Lee GU, Woo HW, Park YS. Modern clinical psychiatry. Seoul : Hana-Uihaksa, 1988 : 495-501.
 27. Kim DH. Pharmacology of traditional oriental medicine. Seoul : Shinil Books, 2005 : 690-1.
 28. Jinfeng Z. Experimental and clinical studies on the effect of *Shou Tai Wan* and additives on threatened abortion. Journal of Integrated Traditional and Western Medicine, 1987 ; 7 : 407.
 29. Linmao Y. Integrating Chinese and western medicine to treat infantile uterus. Herbal Journal of Traditional Chinese Medicine, 1992 ; 14(4) : 40.
 30. Xiumei D. Researches on semen cuscutae botanicals, Research and Development of Chinese Medicine in Chang Bai Shan, 1992 ; 1(2) : 53.
 31. Matsuo K, Galson DL, Zhao C et al. Nuclear factor of activated T-cells(NFAT) rescues osteoclastogenesis in precursors lacking c-Fos. J Biol Chem, 2004 ; 279(25) : 26475-80.
 32. Dougall WC, Glaccum M, Charrier K et al. RANK

- is essential for osteoclast and lymph node development. *Genes Dev.* 1999 ; 13(18) : 2412-24.
33. Takayanagi H. Mechanistic insight into osteoclast differentiation in osteoimmunology. *J Mol Med.* 2005 ; 83(3) : 170-9.
34. Takayanagi H, Kim S, Taniguchi T. Signaling crosstalk between RANKL and interferons in osteoclast differentiation. *Arthritis Res.* 2002 ; 4(3) : 227-32.
35. Shimizu H, Nakagami H, Tsukamoto I et al. NFkappaB decoy oligodeoxynucleotides ameliorates osteoporosis through inhibition of activation and differentiation of osteoclasts. *Gene Ther.* 2006 ; 13(12) : 933-41.
36. Qureshi ST, Larivi re L, Leveque G et al. Endotoxin-tolerant mice have mutations in toll-like receptor 4(Tlr4). *J Exp Med.* 1999 ; 189(4) : 615-25.
37. Abu-Amer Y, Ross FP, Edwards J, Teitelbaum SL. Lipopolysaccharide-stimulated osteoclastogenesis is mediated by tumor necrosis factor via its P55 receptor. *J Clin Invest.* 1997 ; 100(6) : 1557-65.
38. Lee JA, Ban HR, Yang SJ, Cho SH, Jin CS. Effects of the *Rehmanniae Radix Preparat* on osteoporotic tats induced by ovariectomy. *J Korean Obstet Gynecol.* 2004 ; 17(4) : 112-24.
39. Kim JH, Kim HS, Jun JY et al. Effects of *Cuscutae Semen* extract on prevention of osteoporosis in ovariectomized rats. *J Korean Obstet Gynecol.* 2012 ; 25(4) : 1-11.