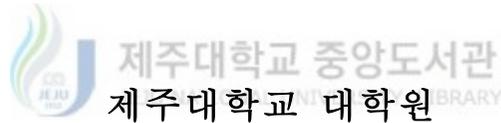


석사학위논문

제주 자생식물 좁은잎천선과(*Ficus erecta*)의 골다공증 인자 억제효과



의 학 과

윤 원 중

2005년 12월

제주 자생식물 좁은잎천선과(*Ficus erecta*)의
골다공증 인자 억제효과

지도교수 : 유 은 숙

윤 원 중

이 논문을 의학 석사학위 논문으로 제출함

2005년 12월

윤원중의 의학 석사학위 논문을 인준함



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

심사위원장

강 희 경



위 원

조 부 려



위 원

유 은 숙



제주대학교 대학원

2005년 12월

Inhibitory Effect of *Ficus erecta*, Jeju
native plant, on the osteoporotic factors
in vitro and *in vivo*

Weon-Jong Yoon

(Supervised by Professor Eun-Sook Yoo)

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF



DEPARTMENT OF MEDICINE
GRADUATE SCHOOL
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

2005. 12

ABSTRACT

Ficus erecta is a native plant growing at Jeju Island in Korea, and has been treated for several diseases such as nephritis, arthritis and contusion as a oriental folk medicine. Bone is maintained by a balance between cells (osteoclast) which resorb bone and cells (osteoblast) which form bone. Osteoporosis is metabolic bone disease associated with unequilibration of bone remodeling decreased bone formation or accelerated bone resorption. Lots of hormone and local factors can act on osteoblast to inhibit or promote osteoclastogenesis. Osteoclastogenesis is inhibited by IL-4, IL-12 and INF- γ and is stimulated by TNF- α , PGE2, IL-1 and IL-6. Osteoclast is multinucleated cells that formed by fusion of the mononuclear phagocyte cells derived from hematopoietic stem cells. TRAP, secreted from mature osteoclast, is a biomarker of osteoclast. In this study, we investigated the anti-osteoporotic activities of *F. erecta* *in vitro* and *in vivo*. *In vitro*, MG-63 cells were stimulated with IL-1 β (10 ng/ml) to induce osteoporotic factors (IL-6 and COX-2) and RAW 264.7 cells were stimulated with sRANKL (100 ng/ml) to induce differentiation into osteoclast. Hexane and EtOAc fractions of *F. erecta* decreased the mRNA expression of IL-6 and the mRNA expression and protein level of COX-2 in a dose-dependent manner. Among the sequential solvent fractions, hexane and EtOAc fractions decreased the differentiation into osteoclast of RAW 264.7 cell. *In vivo*, osteoporosis was induced by ovariectomy in SD rats, and *F. erecta* crude (80% MeOH) extract was administered to ovariectomized rats every day for 4 weeks. Femur/body weight rate and femur length were increased in *F. erecta* extract administrated rats. Theses results suggest that *F. erecta* may have significant effects on osteoporotic factors and anti-osteoporotic potential.

Key word : *Ficus erecta*, osteoporosis, IL-1, IL-6, COX-2, sRANKL, TRAP.

목 차

A B S T R A C T	i
목 차	ii
LIST OF SCHEME	iv
LIST OF TABLES	v
LIST OF FIGURES	vi
I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	7
1. 시료의 추출		
2. 세포 배양 및 시약		
3. Interleukine-6의 생성 및 정량		
4. RNA 분리		
5. RT-PCR		
6. Western blot analysis		
7. 파골세포형성에 미치는 영향		
8. 실험동물 및 실험군		
9. 난소적출, 시료투여 및 평가		
III. 결 과	14
1. MG-63 세포에서 interleukin-6의 생성 억제 효과		
2. Interleukin-6의 mRNA 발현 억제 효과		
3. Cyclooxygenase-2의 mRNA 발현과 protein 생성 억제 효과		
4. RAW 264.7 세포에서 파골세포형성 (osteoclastogenesis) 억제 효과		
5. 골다공증이 유발된 백서의 대퇴골무게 및 길이에 미치는 영향		

IV. 고찰	45
V. 참고 문헌	49
VI. 적 요	58



LIST OF SCHEME

Scheme 1. Systematic purification using solvent partitioning from <i>Ficus erecta</i>	8
--	---



LIST OF TABLES

Table 1. Sequences of primers and fragment sizes of the investigated genes in RT-PCR analysis11
Table 2. Changes of dry-femur/body weight ratio42
Table 3. Changes of femur length44



LIST OF FIGURES

Figure 1. Inhibitory effects of MeOH extract and solvent fractions of <i>F. erecta</i> on the IL-6 production in MG-63 cells	15
Figure 2. Inhibitory effect of hexane fraction of <i>F. erecta</i> on the IL-6 production in MG-63 cells	16
Figure 3. Inhibitory effect of CHCl ₃ fraction of <i>F. erecta</i> on the IL-6 production in MG-63 cells	17
Figure 4. Inhibitory effect of EtOAc fraction of <i>F. erecta</i> on the IL-6 production in MG-63 cells	18
Figure 5. Inhibitory effects of MeOH extract and solvent fractions of <i>F. erecta</i> on the IL-6 mRNA expression in MG-63 cells	20
Figure 6. Inhibitory effect of hexane fraction of <i>F. erecta</i> on the IL-6 mRNA expression in MG-63 cells	21
Figure 7. Inhibitory effect of CHCl ₃ fraction of <i>F. erecta</i> on the IL-6 mRNA expression in MG-63 cells	22
Figure 8. Inhibitory effect of EtOAc fraction of <i>F. erecta</i> on the IL-6 mRNA expression in MG-63 cells	23
Figure 9. Inhibitory effects of MeOH extract and solvent fractions of <i>F. erecta</i> on the COX-2 mRNA expression in MG-63 cells	25
Figure 10. Inhibitory effect of hexane fraction of <i>F. erecta</i> on the COX-2 mRNA expression in MG-63 cells	26
Figure 11. Inhibitory effect of CHCl ₃ fraction of <i>F. erecta</i> on the COX-2 mRNA expression in MG-63 cells	27
Figure 12. Inhibitory effect of EtOAc fraction of <i>F. erecta</i> on the COX-2 mRNA expression in MG-63 cells	28
Figure 13. Inhibitory effects of MeOH extract and solvent fractions of <i>F. erecta</i> on the COX-2 protein level in MG-63 cells	29
Figure 14. Inhibitory effect of hexane fraction of <i>F. erecta</i> on the COX-2 protein level in MG-63 cells	30

Figure 15. Inhibitory effect of CHCl ₃ fraction of <i>F. erecta</i> on the COX-2 protein level in MG-63 cells	31
Figure 16. Inhibitory effect of EtOAc fraction of <i>F. erecta</i> on the COX-2 protein level in MG-63 cells	32
Figure 17. Identification of inhibitory effects MeOH extract and solvent fractions of <i>F. erecta</i> on osteoclastogenesis through TRAP staining in RAW 264.7 cells	34
Figure 18. Inhibitory effects of MeOH extract and solvent fractions of <i>F. erecta</i> on osteoclastogenesis in RAW 264.7 cells	32
Figure 19. Inhibitory effect of hexane fraction of <i>F. erecta</i> on osteoclastogenesis in RAW 264.7 cells	36
Figure 20. Inhibitory effect of CHCl ₃ fraction of <i>F. erecta</i> on osteoclastogenesis in RAW 264.7 cells	37
Figure 21. Inhibitory effect of EtOAc fraction of <i>F. erecta</i> on osteoclastogenesis in RAW 264.7 cells	38
Figure 22. Inhibitory effects of MeOH extract and solvent fractions of <i>F. erecta</i> on TRAP amount in RAW 264.7 cells	39
Figure 23. Changes of dry-femur/body weight ratio by <i>F. erecta</i> extract	41
Figure 24. Changes of femur length by <i>F. erecta</i> extract	43

I. 서 론

우리가 일반적으로 알고 있는 것과는 달리, 인간은 성장기뿐만 아니라 살아가면서 골의 합성과 분해가 지속적으로 계속 된다 (Mundy *et al.*, 1993). 골의 분해 현상은 성장기 때에도 계속되는데 그럼에도 지속적으로 성장을 하는 것은 골의 분해보다 합성이 더욱 활발히 일어나기 때문이다. 그러나 여러 가지 환경적 영향, 신체의 정신적 또는 육체적인 변화에 의한 호르몬의 불균형이나, 골을 만드는 것보다 분해하는 것이 더욱 활발한 노년기의 경우 작은 충격으로도 골의 쉽게 부러지는 현상이 일어나게 된다. 흔히들 갱년기 이후의 여성에게 빈번하게 일어나는 골다공증 (osteoporosis)은 신체 내에서의 호르몬의 불균형으로 인해 골을 만드는 일이 어려워지고, 골을 분해하는 것이 더욱 활발하여, 골 사이에 공간이 생김으로써 발생하는 병이다. 이 외에도 골석화증 (osteopetrosis)으로 골의 분해가 잘 일어나지 않을 경우 골 내의 공간이 석회화 되면서, 골의 발달이 일어나지 않거나, 팔, 다리가 짧으며 모든 면역세포의 근간인 골수의 형성이 일어나지 않는 병이 생기기도 한다. 이러한 골석화증 또한 골이 너무 딱딱하여 골다공증에 걸린 골처럼 쉽게 부러지기도 한다. 하지만, 국내에서는 골석화증 보다는 골다공증이 더욱 빈번하게 일어나고, 전 세계적으로도 골다공증이 갱년기 이후의 문제로 대두되고 있는 추세이다 (Teitelbaum *et al.*, 1996).

골은 석회화된 견고한 표면과 골수로 불리는 내부의 세포 성분이 결합된 특수 조직이다. 생리적으로 상이한 이 두 구조의 결합은 일생을 두고 지속되는 골재형성 (bone remodeling)과정에 기인한 것인데, 이는 골에 가해지는 호르몬이나 물리적 자극에 의해 골수에 있는 파골세포 (osteoclast)들이 골의 표면으로 모여 골을 파들어 가면서 파괴하는 골 흡수 (bone resorption)와 흡수가 일어난 자리에 모여든 조골세포 (osteoblast)에 의한 골기질의 합성 (bone formation)으로 설명된다 (Park, 2000). 이 두 세포는 하는 일이 서로 상반된 만큼 그들의 기원도 다르다. 파골세포는 골에만 존재하는 다핵의 거대 세포이며, 골을 흡수하는 능력을 가지고 있다. 그들은 CFU-GM (colony-forming unit granulocyte macrophage)에서 유래되지만, 단핵세포/대식세포 (monocyte/macrophage) 계열과는 다르게

분화하는 조혈세포 (hematopoietic cell)이다. 이와는 다르게 조골세포는 중간엽 (mesenchyma)을 이루는 근간세포 (stem cell)에서 기원 한다 (Takahashi *et al.*, 1999). 골 표면에 위치하고 있는 조골세포는 세포막에 당 단백질 효소인 ALP (alkaline phosphatase)를 가지고 있으며 I형 콜라겐 (collagen), 오스테오칼신 (osteocalcin), 오스테오포틴 (osteopontin), 본 시알로프로테인 (bone sialoprotein)과 같은 골 기질 물질을 분비하고 석회화시키는 역할을 하는데 (Collier *et al.*, 1998) 이는 부갑상선 호르몬 (parathyroid hormone), 칼시토닌 (calcitonin), 활성비타민 D, 성호르몬 (estrogen), 인슐린 (insulin) 등의 전신적 호르몬과 골 조직에서 분비되는 IGF-I (insulin like growth factor-I), TGF- β (transforming growth factor- β), IL-1 (interleukin-1), IL-6 (interleukin-6) 등의 국소 인자들에 의해 조절 된다 (Jang *et al.*, 2001). 최근 조골세포, 골수의 기질세포 (stromal cell), 활성화된 T세포 (activated T cell)와 파골세포들의 분화에 있어서 조골세포, 골수 기질세포 또는 활성화된 T세포가 필요함이 밝혀졌다 (Toshida *et al.*, 1999). 이 들에서 발견되는 ODF (osteoclast differentiation factor)/OPGL (osteoprotegerin ligand)/TRANCE (TNF-related activation-induced cytokine)/RANKL (receptor activator of NF- κ B ligand)는 TNF (tumor necrosis factor) 리간드 계열에 속하는 type II의 막전이 단백질 (transmembrane protein)로 파골전구세포 (osteoclast precursor)의 RANK (receptor activator of NF- κ B)에 결합하여 파골세포의 형성을 유도한다. 이러한 과정에서 RANKL은 성장인자로서가 아니라 분화인자로서 작용한다.

조골세포 계열의 세포 (osteoblast-lineage cells)에 의한 RANKL 분비는 PTH, 1,25(OH) $_2$ D, PGs, 그리고 많은 cytokine 등에 의해서 촉진된다. 파골세포는 단핵 세포/대식세포계열의 단핵 원본 (mononuclear progenitor)의 융합에 의해 형성되는 과정을 파골세포형성 (osteoclastogenesis)이라고 한다. 조골세포/골수기질세포 (osteoblast/stromal cell)에서 만들어지는 OPG은 RANKL와 RANK의 결합을 방해하여, 파골세포의 형성을 억제 한다 (Lacey *et al.*, 1997). 파골세포는 우선 그 세포 막에 있는 접착분자인 인테그린 (integrin)이 골 매트릭스에 존재하는 오스테오포틴 (osteopontin) 등 세포접착 부위 (RGD 배열)를 인식해 골 표면에 접착한다. 인테그린으로 둘러싸인 골 표면에 주름진 막을 형성 한다 (Teitelbaum *et al.*,

1996). 파골세포의 세포질은 높은 주석산 저항성산 포스파타아제 (tartrate-resistant acid phosphatase) 활성과 양자 (H^+) 생산에 관여하는 탈산 탈수 효소 활성을 갖는다. 탈산 탈수 효소의 활성에 의해 만들어진 양자 (H^+)가 양자펌프 (proton pump)에 의해 세포 밖으로 배출된다. 미세 환경 (micro environment)안은 pH 4 정도의 산성 조건이 지속적으로 유지되며 골의 미네랄 용해가 시작된다. 더욱이 카텡신 (cathepsin) K 등 리소좀효소가 분비되면 유기 성 골 매트릭스가 분해된다. 산성 조건에서는 카텡신 K는 콜라겐으로도 분해된다 (Horton *et al.*, 1995). 파골세포의 기능은 많은 호르몬이나 사이토카인에 의해 조절되고 있다. 그러나 골 흡수 인자로 알려져 있는 비타민D3, PTH, IL-1, IL-6, TNF- α , PGE2등에 대한 수용체는 모두 파골세포에는 존재하지 않는다. 이러한 인자는 우선 조골세포에 작용한 후, 파골세포 활성화 인자로 불리는 액성 인자가 조골세포에 의해 생산되고 이 인자를 매개로 파골세포의 활성화가 일어나는 것으로 추정 된다 (Schinke *et al.*, 2000). 한편 갑상선에서 분비된 칼시토닌 (calcitonin)에 대한 수용체가 다수 존재하며 이 호르몬이 결합되면 주름막이 작용이 정지되고 골 흡수 능력은 급격히 저하된다. 한편, 골의 흡수는 파골세포에 의한 골 흡수 이외에도 조골세포에 의해서도 실행되는데, 조골세포는 골의 내부에 위치하고 있기 때문에 흡수는 완만하게 일어난다. 조골세포의 일부는 골기질 속에 퍼져 골세포 (osteocyte)가 되며 다른 것은 골의 표면에 남아 선 세포 (lining cell)가된다 (Feige *et al.*, 2000). 정상인에게는 골세포에 의한 골 흡수와 골 형성이 균형을 이루고 있으나 유전적, 생리적, 환경적 요인에 의해 초래된 전신호르몬과 국소인자들의 변화가 파골세포의 작용을 상대적으로 증가시키며, 골의 화학적 변화 없이 골 흡수가 증가되어 골 밀도는 낮아지게 되고 골다공증으로 이어지게 된다. 파골세포형성 (osteoclastogenesis) 자극제 (stimulators)로는 calcitriol, PTH, TNF- α , PGE2, IL-1, IL-6등이 있으며, 억제제 (inhibitors)로는 IL-4, IL-12, IL-13, IL-18, INF- γ 등이 있다.

골다공증의 본태를 규명하여 골 질량의 감소를 억제시키기 위한 임상적 및 실험적 연구들이 다수 보고되고 있다. 골다공증의 실험적 연구방법으로써 난소 적출법 (Canalis, 1986; Stasbeko *et al.*, 1987), 부동법 (Johnson *et al.*, 1989), 저 칼슘 식이 투여법 (Thomson *et al.*, 1986; Hughes *et al.*, 1995)등이 흔히 이용되고 있

다. 백서의 난소적출에 의한 골다공증 유발은 난소적출 4 주 후에 발생된다고 하였다 (Wronski *et al.*, 1991). 폐경기후 골다공증의 모델로는 난소를 적출시킨 백서가 흔히 사용되고 있는데 백서는 일생에 걸쳐 매우 늦게까지 골 소실이 없기 때문에 노화와 연관되어서 발생하는 골 상실은 없고 골소실과 침착 면에서 사람과 같은 기전으로 조절되며 기계적인 영향, 호르몬, 약물 그리고 다른 인자들에 유사하게 반응 한다 (Tabuchi *et al.*, 1986; Wronski *et al.*, 1993). 백서의 난소를 적출하면 골 형성보다 골 흡수가 왕성한 골 교체 (bone turnover)의 증가와 해면골이 현저히 감소하는 폐경기 후 골다공증 현상이 발생하게 된다. 골다공증은 여러 원인에 의해 발생하는데 일반적으로 골다공증을 일으킬 수 있는 병력이 있는 경우 이차성 (속발성) 골다공증이라 하고, 이러한 원인 없이 폐경 후 발생하는 경우 일차성 (원발성) 골다공증이라 한다 (KIM, 1998). 폐경기 여성에게서 특히 골다공증의 발생 빈도가 높은 것은 폐경기 이후 여성 호르몬인 에스트로겐의 분비가 감소하여 골 손실이 급격히 증가하기 때문으로 설명할 수 있다 (Kim, 2000).

골다공증의 현행 치료제인 에스트로겐, 칼시토닌, 비스포스포네이트 (bisphosphonate) 등의 골 흡수 억제제가 일반적으로 상용되고 있고, 골 형성을 촉진하는 약물로는 불소와 부갑상선 호르몬이 있으며, 이외에 비타민D 대사물질, 칼슘이 사용되고 있으나 아직 만족할만한 성과는 없는 실정이다 (Rogers, 1967). 폐경기 여성의 골다공증 치료에는 기본적으로 에스트로겐을 사용하고 있는데, 골량이 유지되거나 골 소실률이 감소되는 정도이다. 그러나 골다공증 발생 위험이 높은 사람에게 예방의 목적으로 사용한 경우에는 현저한 골 량 증가 및 유지에 좋은 효과를 나타낸다고 보고되어 골다공증 발병 이후의 치료보다 폐경기 이전에 에스트로겐 등의 골 흡수 억제제를 이용한 예방이 중요함이 제안되고 있다 (KIM, 1998). 그러나 장기적인 에스트로겐의 사용은 오심, 두통, 체중증가, 유방통, 불규칙한 자궁출혈 등의 부작용을 비롯한 자궁 내막암 및 유방암 발생을 초래함이 보고되고 있어 사용을 기피하는 실정이며 안전하게 장기간 사용할 수 있는 새로운 치료 수단의 개발이 절실히 요구되고 있다.

최근에는 에스트로겐 투여에 의한 위험성을 보완하기 위해 한약재 및 식품 등 천연물의 활성물질을 이용한 대체 요법에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다 (John *et al.*, 1998). 폐경기 골다공증 예방을 위한 대표적인 대체 요법으로 식물성

에스트로젠 (phytoestrogen)의 식이 첨가 또는 이를 다량으로 함유하고 있는 식품의 섭취가 시도되고 있다 (Kenneth *et al.*, 1999). 식물성 에스트로젠은 알파과, 완두콩, �트밀, 팥, 쌀 및 대두 등 곡물에 다량 함유되어 있다. 식물성 에스트로젠으로는 이소플라본 (isoflavone)에 대한 연구가 활발히 진행 중이다. 이 중 다이드제인 (daidzein)과 제니스테인 (genistein)은 에스트로젠과 유사구조를 갖는 천연물로서 세포내에서 에스트로젠보다 ER- α (estrogen receptor- α)에 대한 친화력은 낮지만 ER- β (estrogen receptor- β)에 결합하여 (Enmark *et al.*, 1996) 에스트로젠 효과 뿐 아니라 항 에스트로젠 효과를 동시에 나타내기에 에스트로젠 보충 요법에 의한 여러 가지 부작용을 유발하지 않는 장점이 있어 골다공증 예방을 위한 에스트로젠 대체물질로 각광을 받고 있다. 천연물에 대한 관심이 고조되고 있는 가운데 이러한 천연 활성물질이 폐경기 골다공증 예방과 치료에 대한 효과가 기대된다.

제주도는 계절에 따라 대륙성과 해양성의 기후가 뚜렷하게 구분되어 나타나며 사면이 바다로 둘러싸여 있어 해발 1950 m의 한라산을 중심으로 지형조건과 특수한 기후조건에 의하여 난대식물에서부터 온대식물, 고산지대의 한대림식물이 다양하게 분포되어 식물의 보고를 이루고 있다 (Yang; Kim *et al.*, 2002). 그 분포도도 뚜렷이 구분되어 있어 생태 및 식물학적으로 중요한 연구 대상지가 되고 있다.

좁은잎천선과 (*Ficus erecta*)는 무화과과에 속하는 식물로서 가는잎천선과라고도 하며 우리나라에서도 제주도와 남해안 지방 특히 제주도에 주로 자생하는 식물이다. 바닷가 산기슭에서 자라며 높이 2~4 m이고, 나무껍질은 잿빛이 섞인 흰색이며 어두운 갈색 피목이 있고 털이 없다. 잎은 어긋나고 천선과 보다 좁은 바소꼴이며 길이 10~20 cm이다. 끝부분이 뾰족하고 가장자리는 밋밋하거나 거친 톱니가 난다. 결핵은 5~6 쌍이고 잎자루는 길이 1~4 cm이다 (이창복, 1979). 좁은잎천선과는 민간에서는 오래전부터 보충, 익기, 건비, 화습, 강근장골, 소종, 활혈, 해독의 효능이 있으며, 류마티스성 관절염, 중기허약, 기혈쇠미, 사디산연, 근골불리, 타박상, 경폐, 산후유즙결핍을 치료 등에 이용되어져왔다 (Ahn, 1998). 그러나 그러한 성분의 생리 활성에 대한 보고는 거의 없는 실정이다.

이에 본 연구에서는, IL-1 β (interleukin-1 β)로 자극한 조골세포 계열 (human osteoblast cell line)인 MG-63 세포에 좁은잎천선과 추출물 및 분획물을 처리하

여 골다공증성 인자인 IL-6와 PGE₂를 합성시키는 COX-2의 생성 억제저해정도를 확인하였다. 또한, sRANKL (soluble receptor activator of NF- κ B ligand)를 사용하여 대식세포 계열 (murine macrophage cell line)인 RAW 264.7 세포에 좁은잎천선과 추출물 및 분획물을 처리하여 파골세포 (osteoclast)로 분화시킨 후 TRAP staining을 이용하여 파골세포형성의 억제저해정도를 확인하였으며, 파골세포의 생화학적 마커인 TRAP 생성 억제저해정도를 TRAP assay를 이용하여 확인하였다. 또한 골다공증 유발을 위해 난소적출을 한 S.D. 백서에게 좁은잎천선과 추출물을 투여 한 후 대퇴골을 분리하여 대퇴골 무게/백서의 무게 비율과 대퇴골 길이를 측정하여 변화 정도를 확인하였다.



II. 재료 및 방법

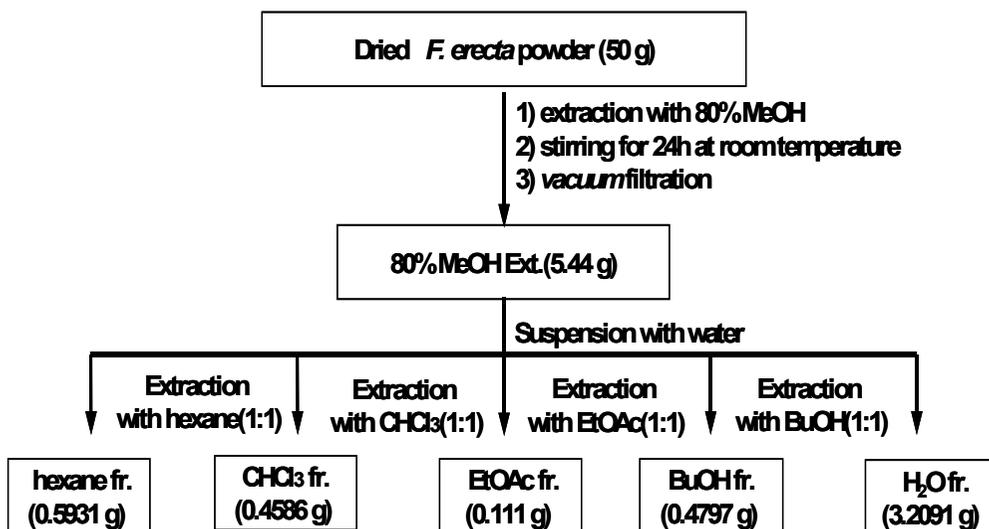
1. 시료의 추출

제주도에 자생하고 있는 좁은잎천선과의 잎을 채집하여 음건한 다음 마쇄기로 갈아 미세말로 만들었다. 미세말 시료 (50 g)를 80 % methanol (MeOH)로 2 회 교반 추출 후 여과하여 감압 농축하였다. 여기서 얻은 MeOH 추출물 (5.44 g)을 계통적 추출 방법 (우원석, 1995)에 의하여 hexane 분획물 (0.5931 g), chloroform (CHCl₃) 분획물 (0.4586 g), ethylacetate (EtOAc) 분획물 (0.111 g), butanol (BuOH) 분획물 (0.4797 g), H₂O 분획물 (3.2091 g)을 얻었으며 여기서 얻은 각각의 분획물 시료를 실험에 이용하였다 (Scheme 1).

2. 세포 배양 및 시약



조골세포 계열 (human osteoblast cell line)인 MG-63 세포와 대식세포 계열 (murine macrophage cell line)인 RAW 264.7 세포는 Korean Cell Line Bank (KCLB)로부터 분양 받아 penicillin-streptomycin 100 units/ml과 10 % fetal bovine serum (FBS)이 함유된 DMEM 배지를 사용하여 37 °C, 5 % CO₂ 항온기에서 배양하였으며, MG-63 세포는 4 일에 한번씩 RAW 264.7 세포는 3 일에 한번씩 계대배양을 시행하였다. Interleukin-1 β (Biosource, CA USA), sRANKL (Biovision, CA 94043 USA)를 각각 구입하여 사용하였다.



Scheme 1. Systematic purification using solvent partitioning from *Ficus erecta*

3. Interleukin-6 생성 및 정량

조골세포 계열인 MG-63 세포 (4.0×10^5 cells/ml)를 DMEM 배지를 이용하여 24 well plate 에 접종하고, 5 % CO₂ 항온기에서 18 시간 전 배양하였다. 이후 배지를 제거하고 10 배 농도 (1 mg/ml)로 조제된 시험물질 50 μ l와 IL-1 β (10 ng/ml) 450 μ l를 함유한 새로운 배지를 동시에 처리하여 전 배양과 동일 조건에서 배양하였다. 24 시간 후 배양 배지를 원심분리 (12,000 rpm, 3 분)하여 얻어진 상층액의 IL-6 함량을 측정하였다 (Tolonen *et al.*, 2002). 모든 시료는 정량 전까지 -20 °C 이하에 보관하였다. IL-6 정량은 human enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Farmingden system, Inc, USA)를 이용하여 정량하였으며 standard 에 대한 표준곡선의 r^2 값은 0.99 이상이었다.

4. RNA 분리

MG-63 세포 (4.0×10^5 cells/ml)를 18 시간 전 배양하고 10 배 농도로 조제된 시험 약물과 IL-1 β (10 ng/ml)를 동시 처리하여 24 시간 배양한 후 TRI-reagent (MRC)를 이용하여 total RNA를 분리하였다. 세포에 TRI-reagent를 첨가하여 균질화한 후, 클로로포름을 첨가하여 원심 분리 (15000 rpm, 15 분)시켰다. 상층액에 동량의 이소프로판올을 첨가하여 원심 분리 (12000 rpm, 8 분)시켜 RNA를 침전시키고 75 %의 DEPC (diethyl pyrocarbonate) 처리된 에탄올을 첨가하여 원심 분리 (10000 rpm, 5 분)시킨 후, 건조시켜 DEPC가 처리된 증류수에 녹였다. 260 nm에서 흡광도를 측정하여 RNA를 정량하였고, 260 nm에서의 흡광도와 280 nm에서의 흡광도 비율이 1.7~1.9 범위 내의 값을 갖는 RNA를 실험에 사용하였다. 모든 실험은 RNase-free한 조건하에서 이루어졌다.

5. RT-PCR

1 μ g의 total RNA를 oligo(dT)₁₈ primer, dNTP (0.5 μ M), 1 unit RNase inhibitor 그리고 M-MuLV reverse transcriptase (2 U)로 70 °C 5 분, 25 °C 5 분,

37 °C 60 분, 그리고 70 °C에서 10 분 heating 시킴으로서 반응을 중지시켰다. Polymerase chain reaction (PCR)은 합성된 cDNA로부터 IL-6, COX-2, β -Actin을 증폭시키기 위하여 2 μ l cDNA, 4 μ M의 5' 과 3' primer, 10x buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 0.1 % Triton X-100), 250 μ M dNTP, 25 mM MgCl₂, 1 unit Taq polymerase (Promega, USA)를 섞고 distilled water로 전체를 25 μ l로 맞추는 다음 Perkin-Elmer Thermal Cycler를 이용하여 실시하였다. 이때 PCR 조건은 94 °C/20 초, 55~62 °C/30 초, 72 °C/40 초, 30 cycle이며, PCR에 의하여 생성된 산물은 1.2 % agarose gel에서 전기영동을 실시하고 ethidium bromide로 염색하여 특정 band를 확인하였다 (Table 1).

6. Western blot analysis

MG-63 세포 (4.0×10^5 cells/ml)를 DMEM 배지에서 5 % CO₂ 배양기에서 18 시간 전 배양 하였다. 이후 배지를 제거하고 10 배 농도 (1 mg/ml)로 조제된 시험물질과 IL-1 β (10 ng/ml)를 함유한 새로운 배지를 동시에 처리하여 전 배양과 동일 조건에서 배양하였다. 세포를 PBS (phosphate buffered saline)로 2~3 회 세척 후 200 μ l의 lysis buffer를 첨가, 30 분에서 1 시간 동안 lysis 시킨 후 원심 분리 (15,000 rpm, 15 분)하여 세포막 성분 등을 제거하였다. 단백질 농도는 BSA (bovine serum albumin)를 표준화하여 Bio-Rad Protein Assay Kit를 사용하여 정량하였다. 20~30 μ g의 lysate를 10 % mini gel SDS-PAGE (Poly Acrylamide Gel Electrophoresis)로 변성 분리하여, 이를 PVDF membrane (BIO-RAD)에 200 mA로 2 시간 동안 transfer하였다. 그리고 membrane의 blocking은 5 % skin milk가 함유된 TTBS (TBS + 0.1 % Tween 20) 용액에서 overnight 시켰다. COX-2의 생성을 검토하기 위한 항체로는 anti-goat COX-2 (1 : 1000, Santa-Cruz)를 TTBS 용액에서 희석하여 상온에서 2 시간 반응시킨 후 TTBS로 3 회 세정하였다. 2 차 항체로는 HRP (Horse Radish Peroxidase)가 결합된 anti-goat IgG (Amersham Co.)를 1 : 5000으로 희석하여 상온에서 40 분 동안 반응시킨 후, TTBS로 4 회 세척하여 ECL 기질 (Amersham Co.)과 1 분 동안 반응 후 X-ray 필름에 감광하였다.

Table 1. The sequences of primers and fragment sizes of the investigated genes in RT-PCR analysis

Gene		Primer sequences	Fragment size(bp)
IL-6	F	5'-AATTCGGTACATCCTCGACG-3'	421
	R	5'-GCGCAGAATGAGATGAGTTG-3'	
COX-2	F	5'-TTCAAATGAGATTGTGGGAAAATTGCT-3'	305
	R	5'-AGATCATCTCTGGCCTGAGTATCTT-3'	
β-Actin	F	5'-ATGGGTCAGAAGGATTCCTATG-3'	588
	R	5'-CAGCTCGTAGCTCTTCTCCA-3'	

7. 파골세포형성에 미치는 영향

1) TRAP staining

RAW 264.7 세포를 96 well plate에 1.0×10^4 cells/well이 되도록 넣은 후, sRANKL (100 ng/ml)와 좁은잎천선과 추출물 및 분획물을 넣어준 상태에서 37 °C, 5 % CO₂ incubator에서 7 일간 배양하였으며 3 일에 한 번 신선한 배양액으로 교환해 주었다. 7 일 후 배지를 모두 제거하고 PBS로 한 번 세척해주고, 고정액을 50 μ l/well씩 넣은 후 5 분 동안 세포를 고정시켰다. 증류수로 3 번 세척해주고 기질물질을 각각 50 μ l/well씩 넣어준 후, 빛을 차단한 상태에서 37°C에서 1 시간 동안 방치하였다. 증류수로 2 번 세척하고 건조한 후, 현미경으로 염색된 성숙한 파골세포의 수를 확인하였다.

2) TRAP assay

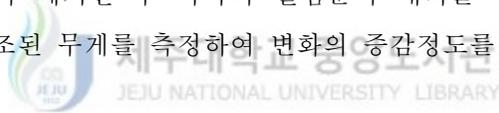
RAW 264.7 세포를 96 well plate에 1.0×10^4 cells/well이 되도록 넣은 후, sRANKL (100 ng/ml)와 좁은잎천선과 추출물 및 분획물을 넣어준 상태에서 37 °C, 5 % CO₂ incubator에서 4 일간 배양하였다. 일정양의 배지를 취한 후 원심 분리하고, 이로부터 상층액을 취한 후 TRAP assay kit (Kamiya Biomedical Company, Thousand Oak, CA USA)를 사용하여 파골세포의 생화학적 마커인 TRAP의 양을 ELISA (540 nm)를 이용하여 측정하였다.

8. 실험동물 및 실험군

생후 24 주령인 체중 250~300 g 정도의 백서 (Sprague-Dawley) 암컷을 사용하였고, 실험군은 모의수술을 실행한 대조군 (sham)과 양측 난소절제술을 시행한 실험군 (OVX)으로 나누었으며, 수술 4 주 후부터 vehicle을 처리한 정상대조군 (sham), vehicle을 처리한 무처리 OVX군, 17 β -estradiol 20 μ g/kg을 처리한 OVX군, 좁은잎천선과 추출물을 처리한 OVX군으로 나누었으며, 군당 7 마리씩 실험에 이용하였다.

9. 난소적출, 시료투여 및 평가

생후 24 주령인 체중 250~300 g 정도의 백서를 ketamine (유한양행, 한국) 50 mg/kg과 rompun (바이엘코리아, 한국) 10 mg/kg을 혼합하여 근육 주사하여 전신 마취한 후, 등 쪽 하방부의 털을 제거하고 중앙에 시상 면으로 3~4 cm 정도 절개 하였다. 복벽을 박리, 절개하고, 지방층에 둘러싸인 양측의 난소를 찾아 적출하여 통법에 따라 봉합한 후 실험에 이용하였다. 수술 4 주후부터 4 주 동안 sham vehicle처리군, OVX vehicle 처리군, OVX 좁은잎천선과 추출물을 vehicle에 각각 100, 200 mg/kg 의 용량으로 녹여 투여한 처리군, 17 β -estradiol를 이틀에 한번 씩 20 μ g/kg을 4 주 동안 격일로 근육 내에 주사한 처리군 으로 분리하였다. 수술 시행 후 8 주후 각 군별로 희생 시킨 후 좌우측 대퇴부를 분리하여 실험에 이용하였다. 희생 전 각각의 실험군의 무게를 측정하고 적출된 양쪽 대퇴골의 근육과 골막을 완전히 제거한 후 각각의 실험군의 대퇴골 무게와 길이를 측정한 후, 24 시간 후 건조된 무게를 측정하여 변화의 증감정도를 비교하였다.



III. 결 과

1. MG-63 세포에서 interleukin-6의 생성 억제 효과

좁은잎천선과 잎의 용매 분획의 IL-6의 생성 억제정도를 조사하였다. IL-1 β 가 조골세포 (osteoblast)에서 IL-6 생성을 증가시키는 것으로 알려져 있으므로 IL-1 β (10 ng/ml)를 처리하여 조골세포 계열인 MG-63 세포로부터 IL-6의 생성을 유도하였다. 좁은잎천선과 시료의 단독 처리 시에는 IL-6의 생성에는 영향을 주지 않았다 (data not shown). 하지만, IL-1 β 와 함께 각각 다른 농도의 80% MeOH 추출물을 처리한 결과 IL-6 생성에서 IL-1 β 단독처리에 비해 농도 의존적인 억제 효과를 보였다. 이러한 결과는 IL-6 억제가 세포 독성에 의하지 않은 것임을 보여준다. 좁은잎천선과 용매 분획물을 100 μ g/ml 농도로 처리하였을 때 hexane, CHCl₃, EtOAc 분획물이 IL-6 생성을 강하게 억제 하였다. 하지만 CHCl₃ 분획물 100 μ g/ml 농도에서 활성은 있었으나 세포증식을 억제하는 것으로 보아 세포독성에 의한 것으로 여겨진다. Hexane, EtOAc 분획물은 처리 농도에서 세포증식을 억제하지 않은 것으로 보아 IL-1 β 에 의해 발현되는 IL-6 억제에 중요하게 작용함을 알 수 있었다. 세포 생존률은 MTT 방법을 이용하여 측정하였다 (Figure 1~4).

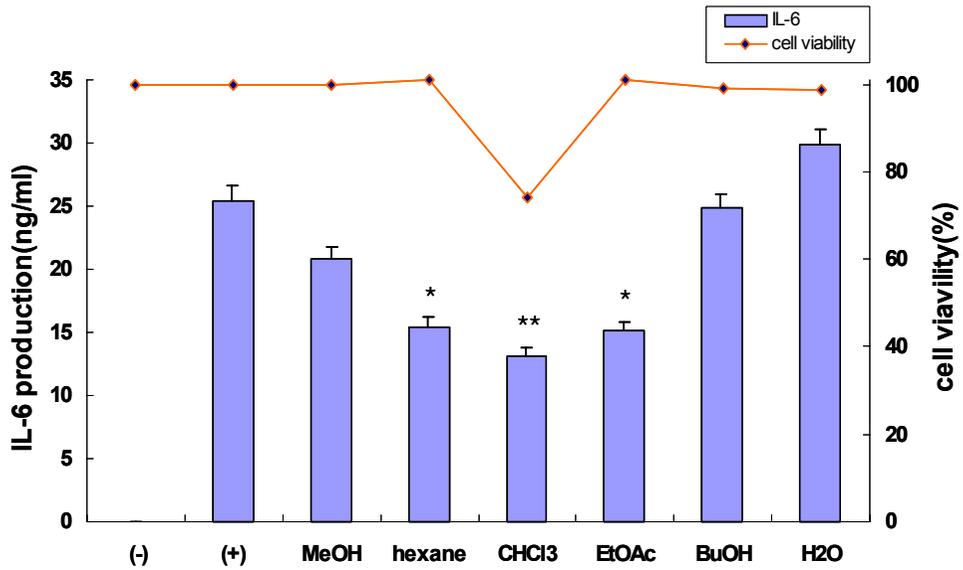


Figure 1. Inhibitory effects of MeOH extract and solvent fractions of *F. erecta* on the IL-6 production in MG-63 cells. The productions of IL-6 were assayed by ELISA (450 nm) method from the culture supernatant of MG-63 cells (4.0×10^5 cells/ml) stimulated with IL-1 β (10 ng/ml) in the presence of MeOH extract and solvent fractions of *F. erecta* (100 μ g/ml). Cell viability was determined by MTT method. Values are the mean \pm SEM of triplicate experiments. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$

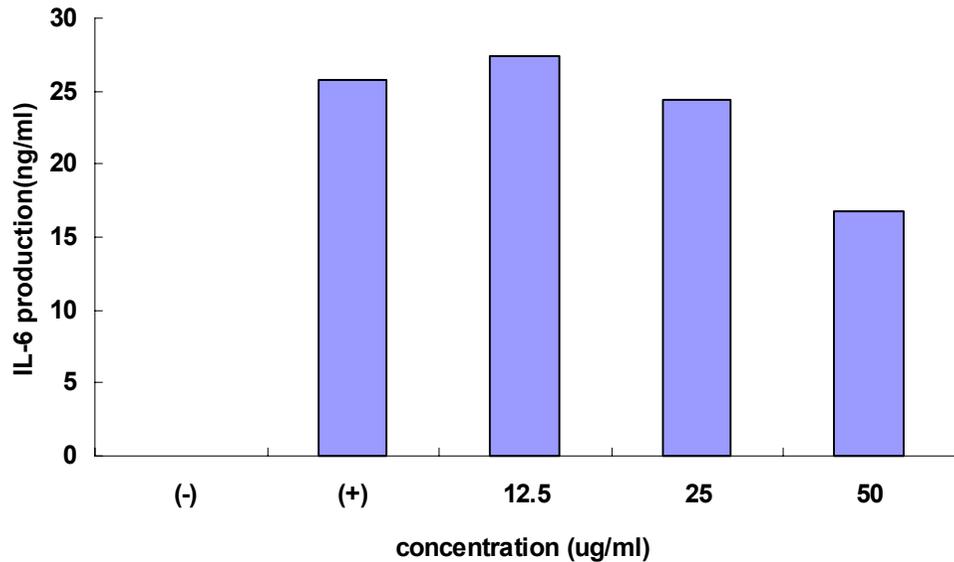


Figure 2. Inhibitory effect of hexane fraction of *F. erecta* on the IL-6 production in MG-63 cells. The productions of IL-6 were assayed by ELISA (450 nm) method from the culture supernatant of MG-63 cells (4.0×10^5 cells/ml) stimulated with IL-1 β (10 ng/ml) in the presence of *F. erecta* fraction (hexane-12.5, 25, 50 μ g/ml).

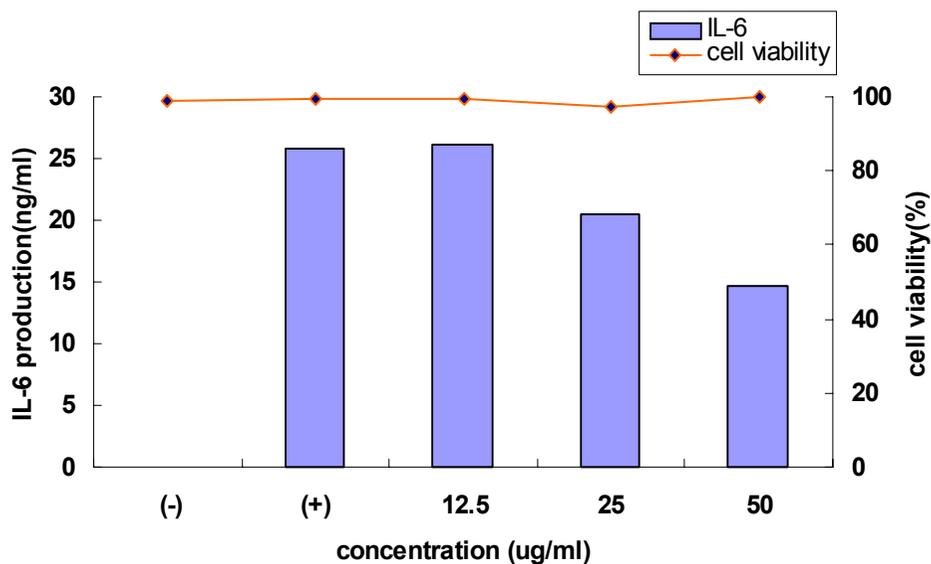


Figure 3. Inhibitory effect of CHCl_3 fraction of *F. erecta* on the IL-6 production in MG-63 cells. The productions of IL-6 were assayed by ELISA (450 nm) method from the culture supernatant of MG-63 cells (4.0×10^5 cells/ml) stimulated with IL-1 β (10 ng/ml) in the presence of *F. erecta* fraction (CHCl_3 -12.5, 25, 50 $\mu\text{g/ml}$). Cell viability was determined using MTT method.

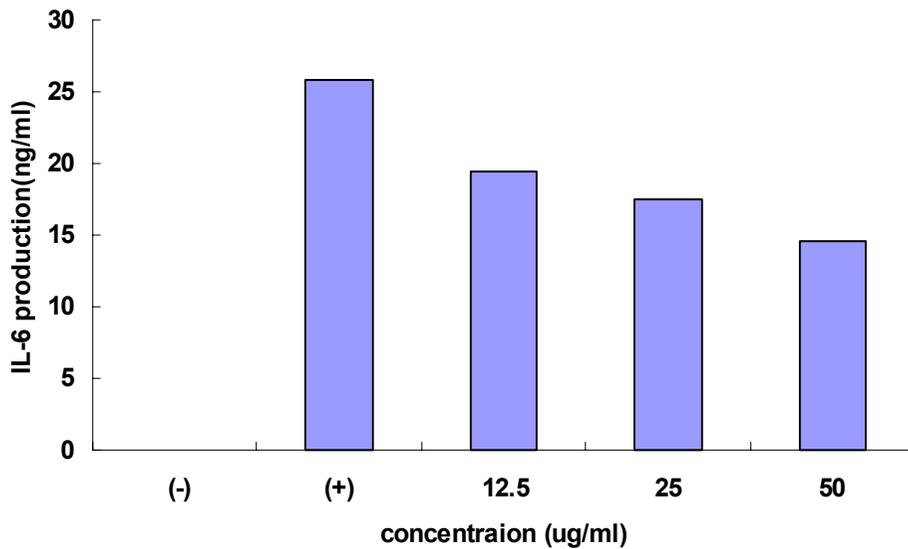


Figure 4. Inhibitory effect of EtOAc fraction of *F. erecta* on the IL-6 production in MG-63 cells. The productions of IL-6 were assayed by ELISA (450 nm) method from the culture supernatant of MG-63 cells (4.0×10^5 cells/ml) stimulated with IL-1 β (10 ng/ml) in the presence of *F. erecta* fraction (EtOAc-12.5, 25, 50 μ g/ml).

2. Interleukin-6의 mRNA 발현 억제 효과

IL-6 생성억제가 mRNA 발현을 억제한 결과인지를 조사하기 위하여 IL-1 β 와 좁은잎천선과 시료를 함께 처리하여 IL-1 β 에 의한 IL-6 mRNA 발현에 대한 억제효과를 조사하였다. 좁은잎천선과의 hexane, EtOAc 분획물에서 강한 억제 효과가 나타났으며 IL-1 β 에 의해 발현되는 IL-6 억제에 중요한 작용을 함을 알 수 있었다. β -Actin을 같이 나타내줌으로써 동일한 양의 RNA를 가지고 실험에 이용한 것을 보여주었다 (Figure 5~8).



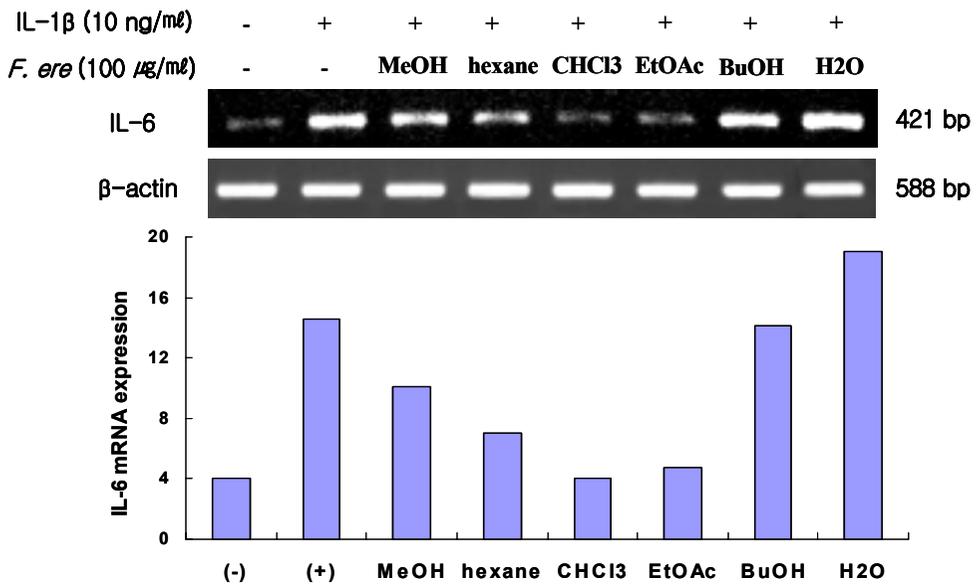


Figure 5. Inhibitory effects of MeOH extract and solvent fractions of *F. erecta* on the IL-6 mRNA expression in MG-63 cells. MG-63 cells (4.0×10^5 cells/ml) were pre-incubated for 18 hr, and the IL-6 mRNA expression were determined from 24 hr culture of cells stimulated with IL-1 β (10 ng/ml) in the presence of MeOH extract and solvent fractions of *F. erecta* (100 μ g/ml).

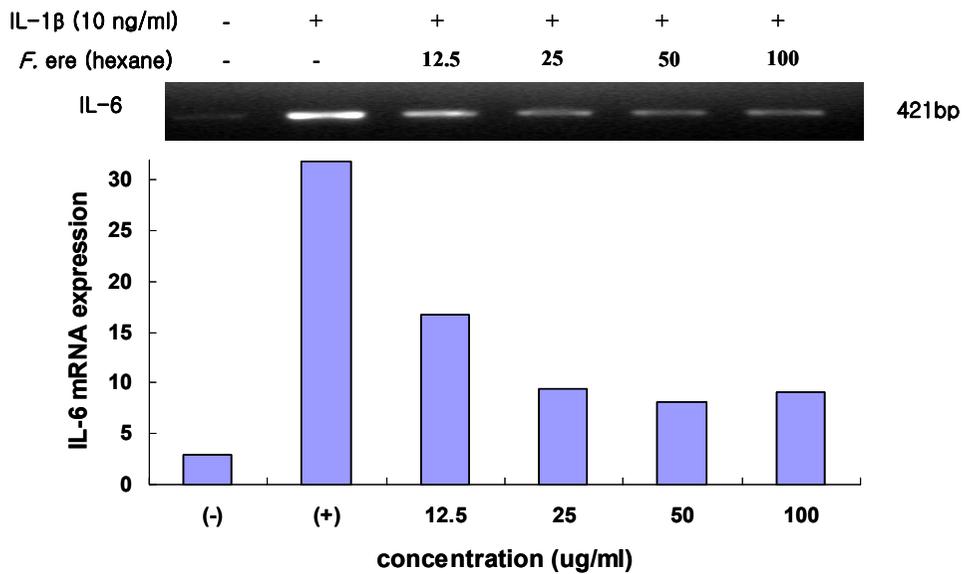


Figure 6. Inhibitory effect of hexane fraction of *F. erecta* on the IL-6 mRNA expression in MG-63 cells. MG-63 cells (4.0×10^5 cells/ml) were pre-incubated for 18 hr, and the IL-6 mRNA expression were determined from 24 hr culture of cells stimulated with IL-1 β (10 ng/ml) in the presence of *F. erecta* fraction (hexane-12.5, 25, 50, 100 μ g/ml).

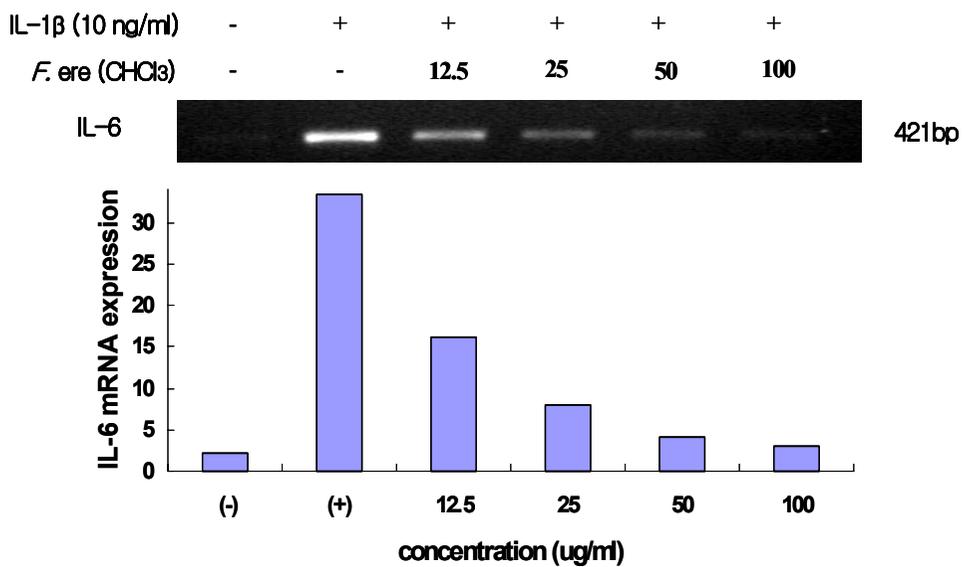


Figure 7. Inhibitory effect of CHCl₃ fraction of *F. erecta* on the IL-6 mRNA expression in MG-63 cells. MG-63 cells (4.0×10^5 cells/ml) were pre-incubated for 18 hr, and the IL-6 mRNA expression were determined from 24 hr culture of cells stimulated with IL-1 β (10 ng/ml) in the presence of *F. erecta* fraction (CHCl₃-12.5, 25, 50, 100 μ g/ml).

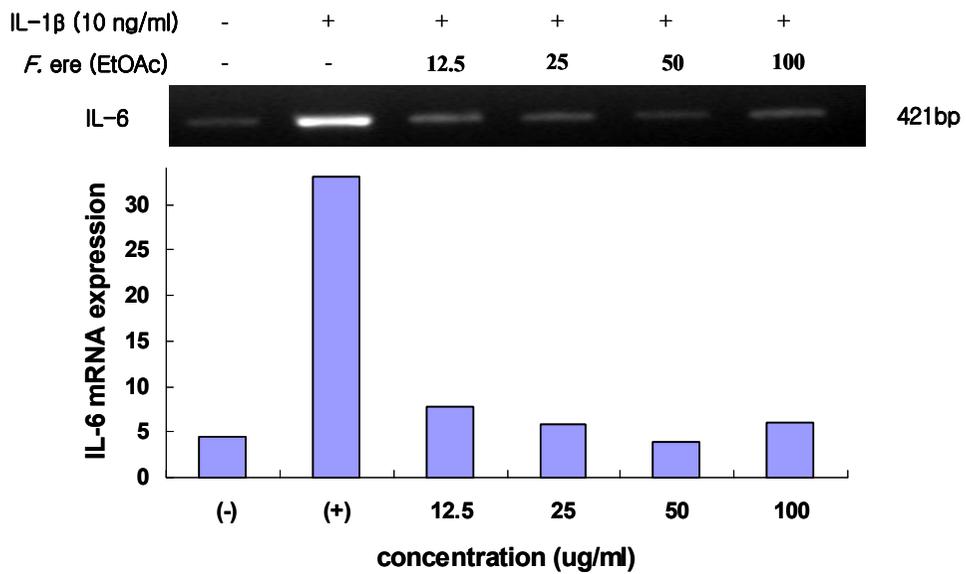


Figure 8. Inhibitory effect of EtOAc fraction of *F. erecta* on the IL-6 mRNA expression in MG-63 cells. MG-63 cells (4.0×10^5 cells/ml) were pre-incubated for 18 hr, and the IL-6 mRNA expression were determined from 24 hr culture of cells stimulated with IL-1 β (10 ng/ml) in the presence of *F. erecta* fraction (EtOAc-12.5, 25, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$).

3. Cyclooxygenase-2의 mRNA 발현과 protein 생성 억제 효과

좁은잎천선과의 COX-2 mRNA 발현에 대한 효과를 조사하였다. MG-63 세포에 IL-1 β (10 ng/ml)를 처리하여 COX-2의 발현을 유도한 다음, 좁은잎천선과에 의한 COX-2의 mRNA 발현에 대한 억제정도를 RT-PCR를 이용하여 알아보았다. 좁은잎천선과의 hexane, EtOAc 분획물을 처리하였을 때 IL-1 β 단독 처리에 비해 COX-2 mRNA 발현이 강하게 억제 되었다 (**Figure 9~12**). 그리고 IL-1 β (10 ng/ml)를 사용하여 COX-2의 protein 생성에 대한 억제정도를 western blotting을 통해 알아보았다. 좁은잎천선과의 hexane, EtOAc 분획물을 처리하였을 때 IL-1 β 단독 처리에 비해 COX-2 protein 생성이 강하게 억제 되었다 (**Figure 13~16**). β -Actin을 같이 나타내줌으로써 동일한 양의 RNA와 protein을 가지고 실험에 이용한 것을 보여주었다.



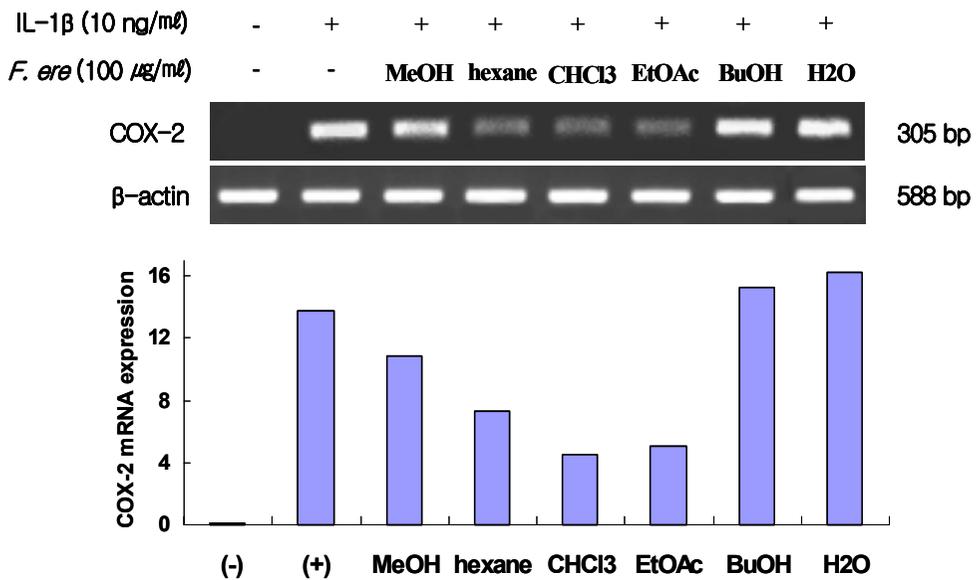


Figure 9. Inhibitory effects of MeOH extract and solvent fractions of *F. erecta* on the COX-2 mRNA expression in MG-63 cells. MG-63 cells (4.0×10^5 cells/ml) were pre-incubated for 18 hr, and the COX-2 mRNA expression were determined from 24 hr culture of cells stimulated with IL-1 β (10 ng/ml) in the presence of MeOH extract and solvent fractions of *F. erecta* (100 μ g/ml).

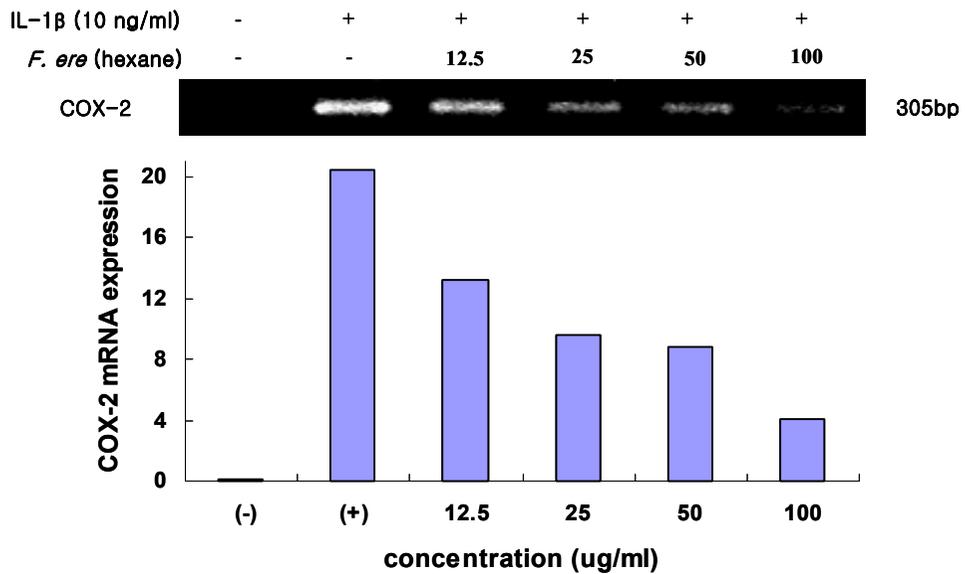


Figure 10. Inhibitory effect of hexane fraction of *F. erecta* on the COX-2 mRNA expression in MG-63 cells. MG-63 cells (4.0×10^5 cells/ml) were pre-incubated for 18 hr, and the COX-2 mRNA expression were determined from 24 hr culture of cells stimulated with IL-1 β (10 ng/ml) in the presence of *F. erecta* fraction (hexane-12.5, 25, 50, 100 μ g/ml).

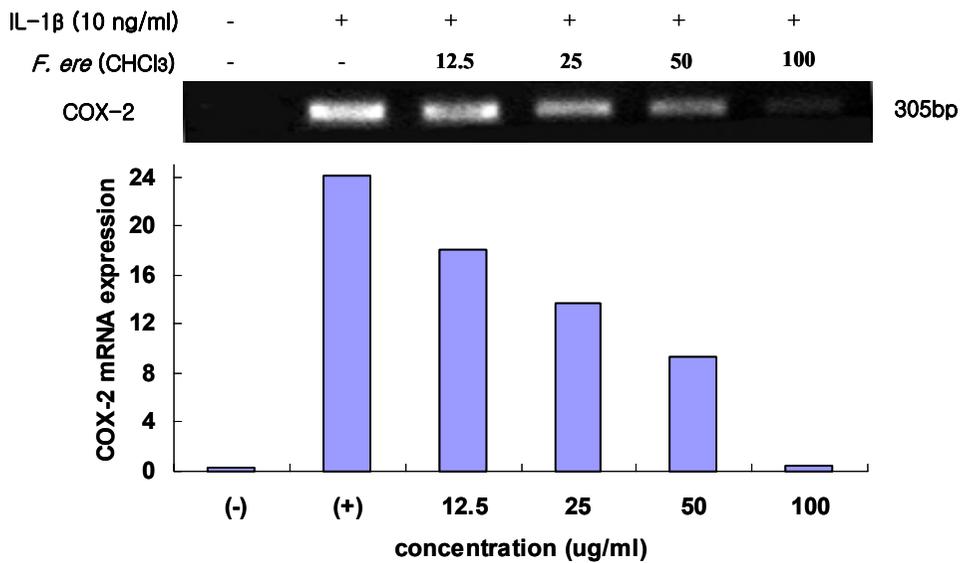


Figure 11. Inhibitory effect of CHCl₃ fraction of *F. erecta* on the COX-2 mRNA expression in MG-63 cells. MG-63 cells (4.0×10^5 cells/ml) were pre-incubated for 18 hr, and the COX-2 mRNA expression were determined from 24 hr culture of cells stimulated with IL-1 β (10 ng/ml) in the presence of *F. erecta* fraction (CHCl₃-12.5, 25, 50, 100 μ g/ml).

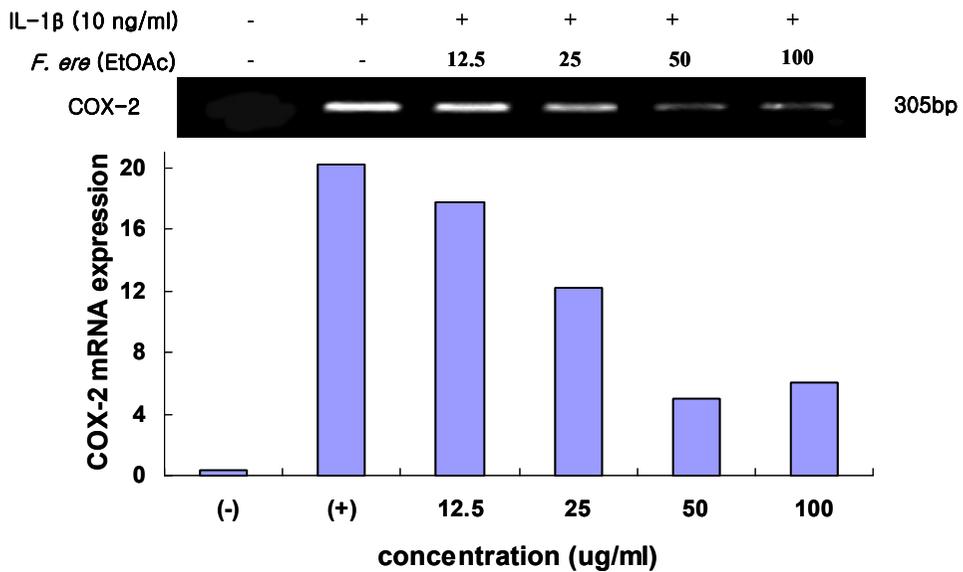


Figure 12. Inhibitory effect of EtOAc fraction of *F. erecta* on the COX-2 mRNA expression in MG-63 cells. MG-63 cells (4.0×10^5 cells/ml) were pre-incubated for 18 hr, and the COX-2 mRNA expression were determined from 24 hr culture of cells stimulated with IL-1 β (10 ng/ml) in the presence of *F. erecta* fraction (EtOAc-12.5, 25, 50, 100 μ g/ml).

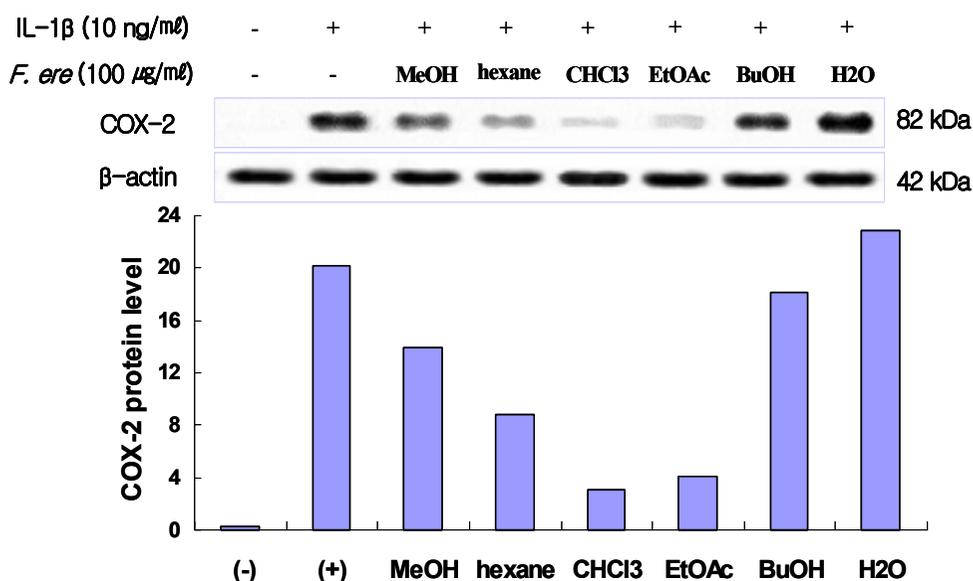


Figure 13. Inhibitory effects of MeOH extract and solvent fractions of *F. erecta* on the COX-2 protein level in MG-63 cells. MG-63 cells (4.0×10^5 cells/ml) were pre-incubated for 18 hr, and the cells were stimulated with IL-1 β (10 ng/ml) in the presence of MeOH extract and solvent fractions of *F. erecta* (100 μ g/ml) for 24 hr. COX-2 protein level was determined by immunoblotting method.

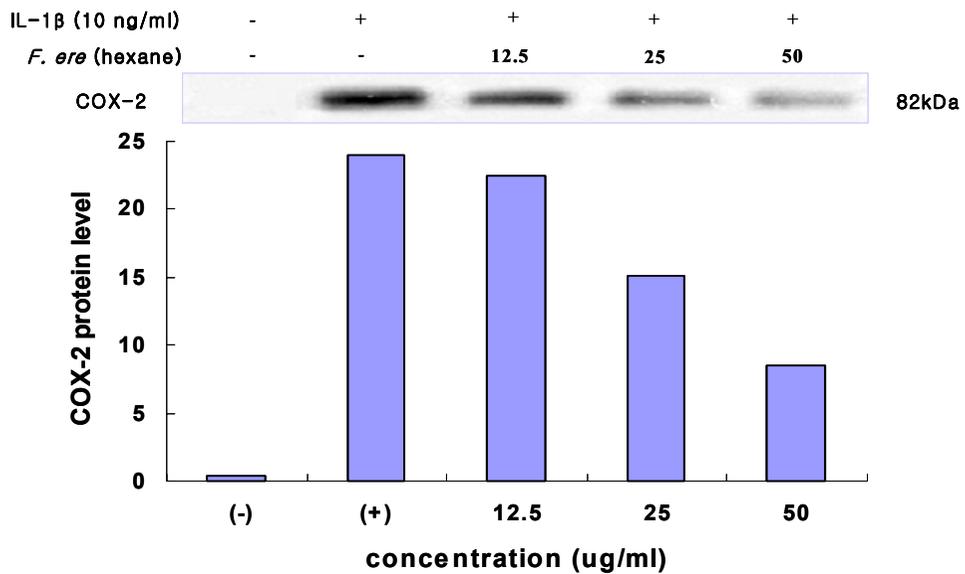


Figure 14. Inhibitory effect of hexane fraction of *F. erecta* on the COX-2 protein level in MG-63 cells. MG-63 cells (4.0×10^5 cells/ml) were pre-incubated for 18 hr, and the cells were stimulated with IL-1 β (10 ng/ml) in the presence of *F. erecta* fraction (hexane-12.5, 25, 50 $\mu\text{g/ml}$) for 24 hr. COX-2 protein level was determined by immunoblotting method.

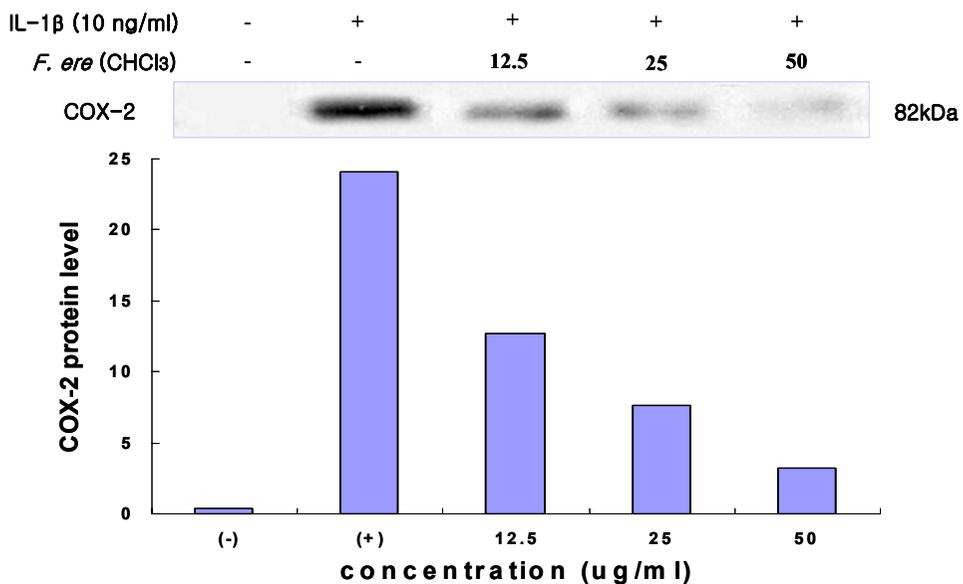


Figure 15. Inhibitory effect of CHCl₃ fraction of *F. erecta* on the COX-2 protein level in MG-63 cells. MG-63 cells (4.0×10^5 cells/ml) were pre-incubated for 18 hr, and the cells were stimulated with IL-1 β (10 ng/ml) in the presence of *F. erecta* fraction (CHCl₃-12.5, 25, 50 μ g/ml) for 24 hr. COX-2 protein level was determined by immunoblotting method.

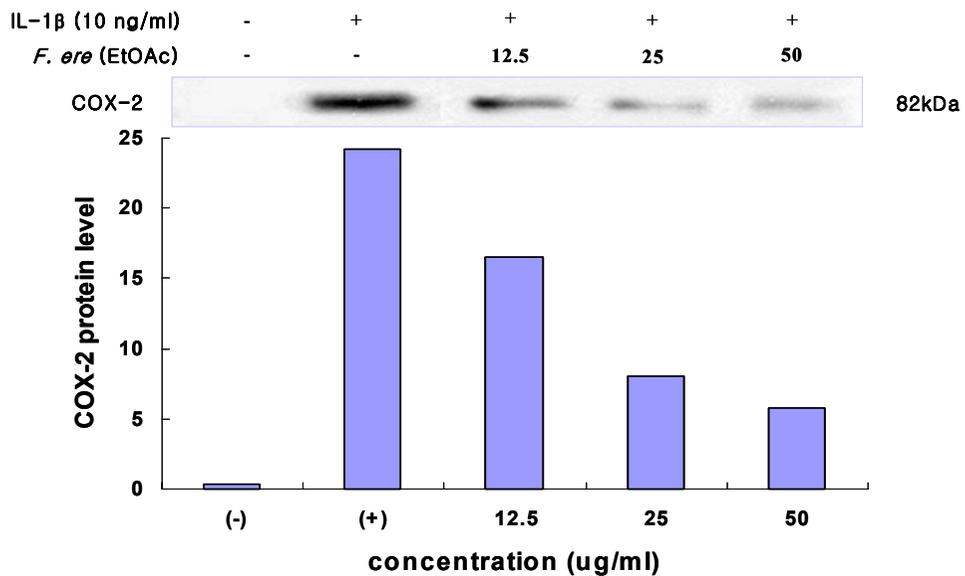


Figure 16. Inhibitory effect of EtOAc fraction of *F. erecta* on the COX-2 protein level in MG-63 cells. MG-63 cells (4.0×10^5 cells/ ml) were pre-incubated for 18 hr, and the cells were stimulated with IL-1 β (10 ng/ ml) in the presence of *F. erecta* fraction (EtOAc-12.5, 25, 50 $\mu\text{g/ml}$) for 24 hr. COX-2 protein level was determined by immunoblotting method.

4. RAW 264.7 세포에서 파골세포형성(osteoclastogenesis) 억제 효과

RAW 264.7 세포에 sRANKL (100 ng/ml)를 사용하여 파골세포형성을 유도한 후 좁은잎천선과 분획물에 의한 파골세포형성 억제저해정도를 TRAP staining을 통해 알아보았다. 파골세포를 포함한 단핵세포 (mononuclear cell)들은 TRAP (tartrate-resistant acid phosphatase)를 가지고 있다. 효소적 가수분해 (enzymatic hydrolysis)에 의해 Naphthol AS-BI와 GBC solution이 결합하여, 불용성의 maroon dye를 형성하며 이로 인해 세포가 붉은색으로 염색된다. 여기서는 핵을 염색할 수 있는 hematoxylin을 사용하지 않았으며 다핵화된 세포 형태의 파골세포를 확인할 수 있었다. sRANKL에 의한 파골세포형성이 현저히 증가하였으며, 좁은잎천선과 추출물과 분획물들을 처리한 결과 좁은잎천선과의 hexane, EtOAc 분획물이 sRANKL 단독 처리에 비해 파골세포형성을 강하게 억제하였다 (Figure 17~21). 그리고 TRAP assay kit를 사용하여 파골세포의 생화학적 마커인 TRAP에 대한 억제저해정도를 알아보았다. 좁은잎천선과 추출물과 분획물들을 처리한 결과 TRAP assay에서도 좁은잎천선과의 hexane, EtOAc 분획물이 sRANKL 단독 처리에 비해 TRAP 생성을 강하게 억제 하였다 (Figure 22). 그러나 좁은잎천선과의 CHCl₃ 분획물 100 µg/ml 농도에서 세포증식을 억제하는 것으로 보아 세포독성이 있는 것을 확인 할 수 있었다.

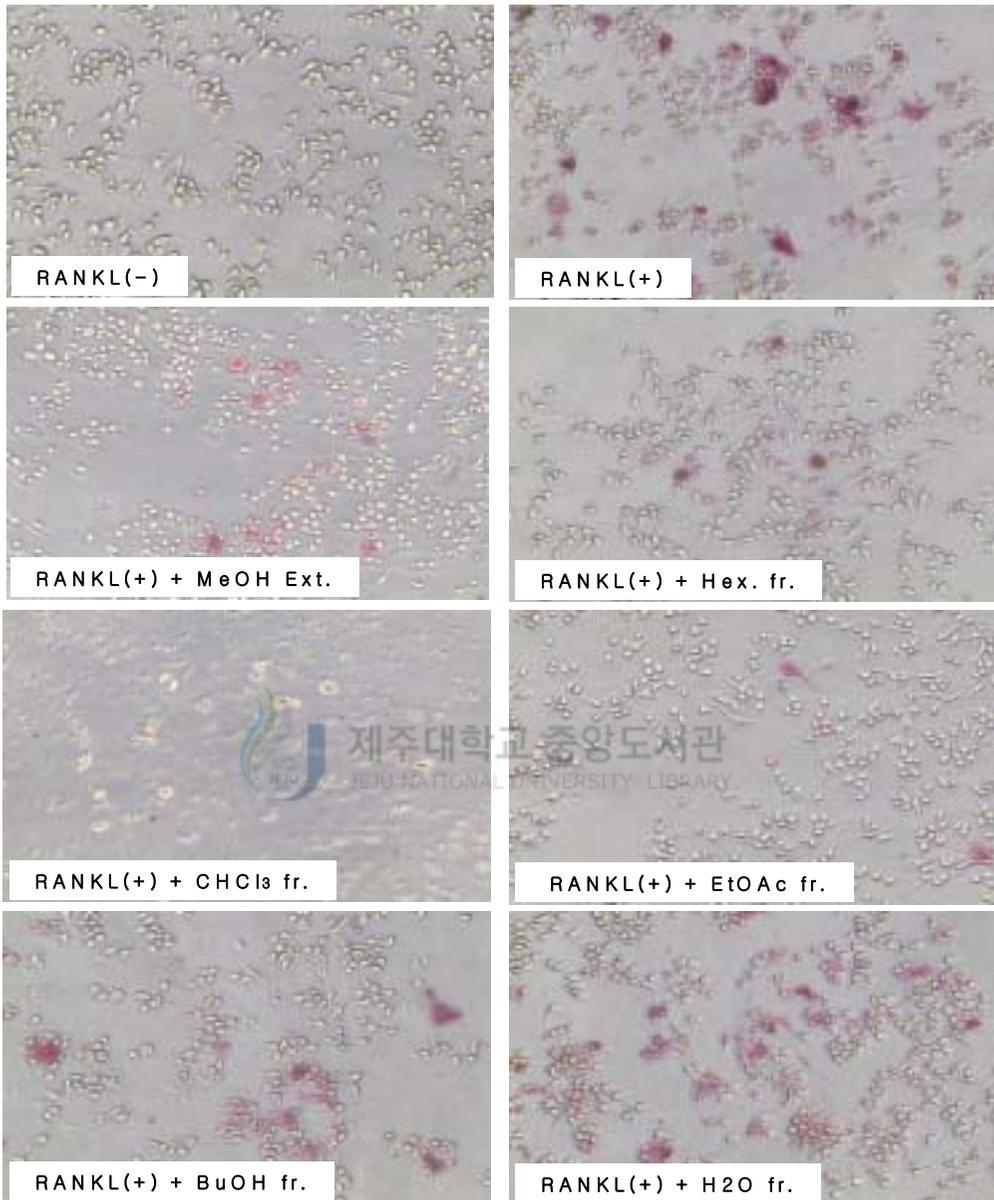


Figure 19. Identification of inhibitory effects of MeOH extract and solvent fractions of *F. erecta* on osteoclastogenesis through TRAP staining in RAW 264.7 cells. Microphotograph of inhibitory effects of MeOH extract and solvent fractions of *F. erecta* (100 $\mu\text{g}/\text{m}\ell$) on osteoclastogenesis through TRAP staining in sRANKL (100 $\text{ng}/\text{m}\ell$) stimulated RAW 264.7 cells. ($\times 200$)

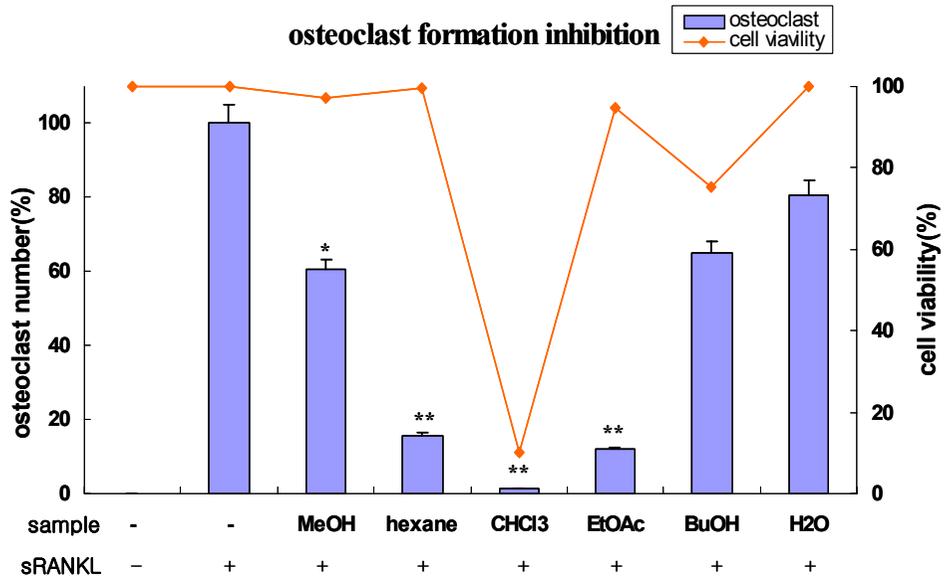


Figure 18. Inhibitory effects of MeOH extract and solvent fractions of *F. erecta* on osteoclastogenesis in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells (1.0×10^4 cells/ml) were pre-incubated for 18 hr, and the cells were stimulated with sRANKL (100 ng/ml) in the presence of MeOH extract and solvent fractions of *F. erecta* (100 μ g/ml) for 7 days. Mature osteoclast was determined by TRAP staining. Cell viability was determined by MTT method. Values are the mean \pm SEM of triplicate experiments. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$

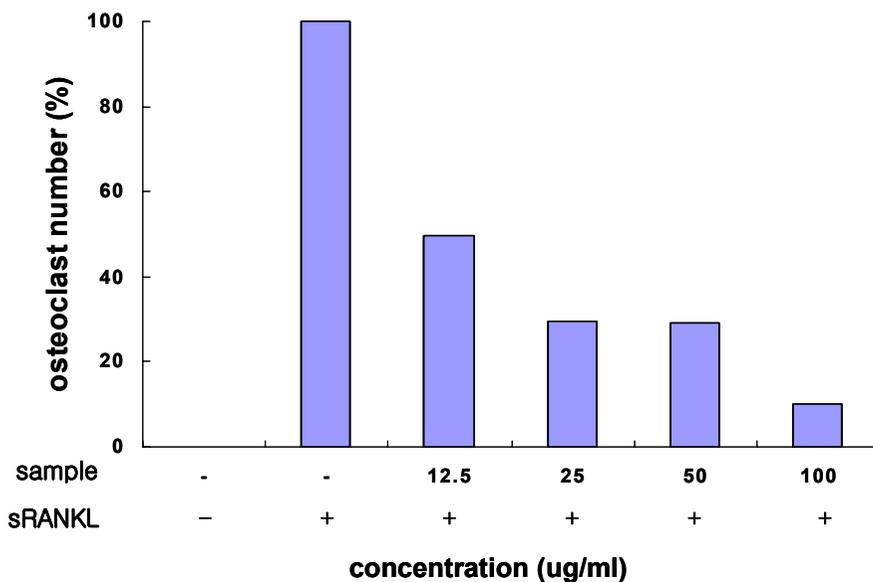


Figure 19. Inhibitory effect of hexane fraction of *F. erecta* on osteoclastogenesis in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells (1.0×10^4 cells/ml) were pre-incubated for 18 hr, and the cells were stimulated with sRANKL (100 ng/ml) in the presence of *F. erecta* fraction (hexane-12.5, 25, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$) for 7 days. Mature osteoclast was determined by TRAP staining.

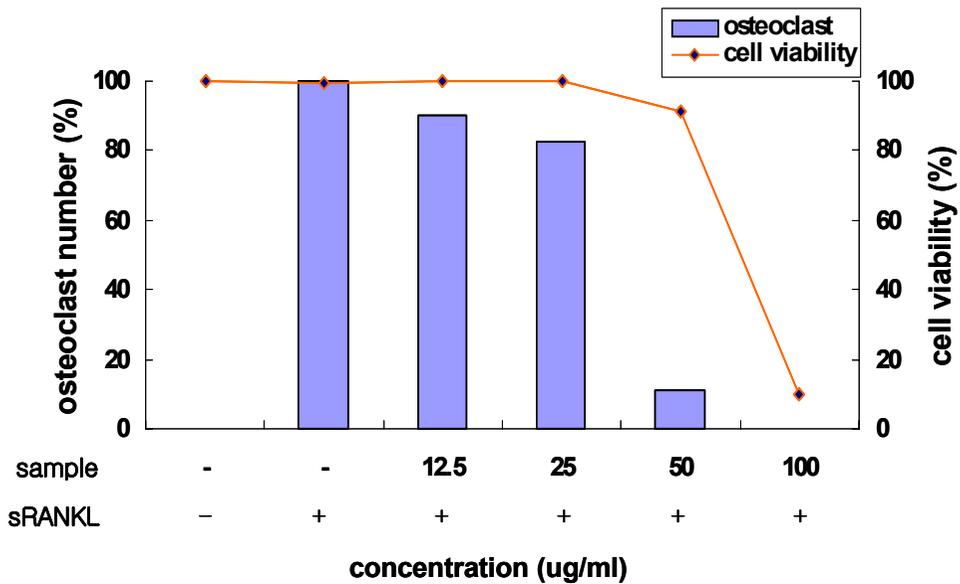


Figure 20. Inhibitory effect of CHCl₃ fraction of *F. erecta* on osteoclastogenesis in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells (1.0×10^4 cells/ml) were pre-incubated for 18 hr, and the cells were stimulated with sRANKL (100 ng/ml) in the presence of *F. erecta* fraction (CHCl₃-12.5, 25, 50, 100 μ g/ml) for 7 days. Mature osteoclast was determined by TRAP staining. Cell viability was determined by MTT method.

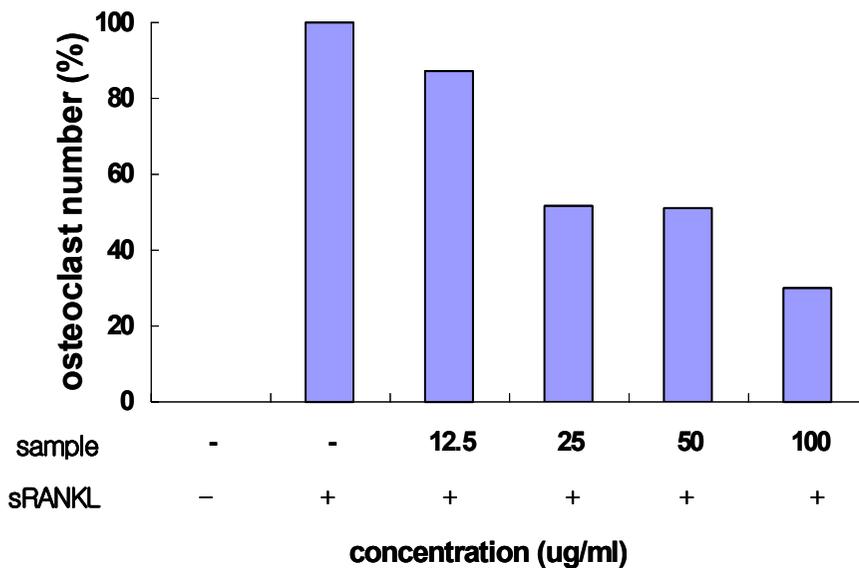


Figure 21. Inhibitory effect of EtOAc fraction of *F. erecta* on osteoclastogenesis in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells (1.0×10^4 cells/ml) were pre-incubated for 18 hr, and the cells were stimulated with sRANKL (100 ng/ml) in the presence of *F. erecta* fraction (EtOAc-12.5, 25, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$) for 7 days. Mature osteoclast was determined by TRAP staining.

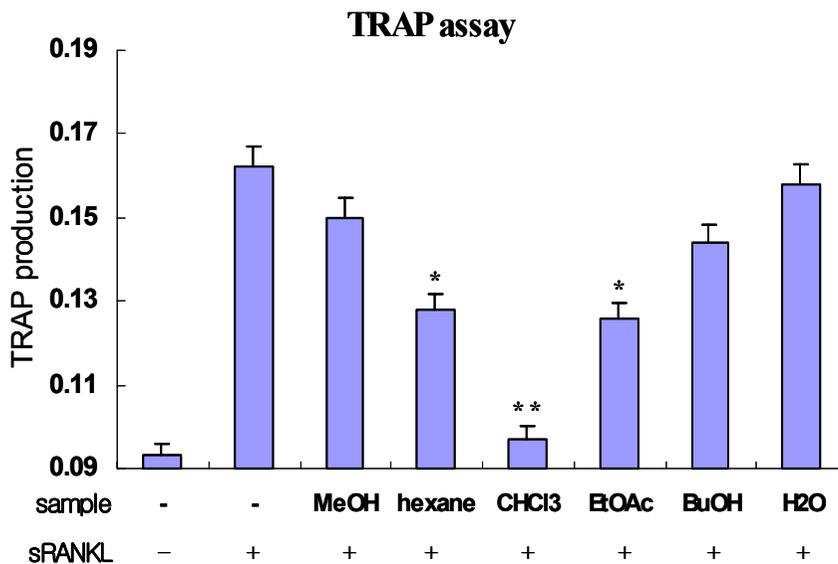


Figure 22. Inhibitory effects of MeOH extract and solvent fractions of *F. erecta* on TRAP amount in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells (1.0×10^4 cells/ml) were pre-incubated for 18 hr, and the cells were stimulated with sRANKL (100 ng/ml) in the presence of MeOH extract and solvent fractions of *F. erecta* (100 μ g/ml) for 4 days. TRAP amount was determined by ELISA (540 nm) method by TRAP assay kit. Values are the mean \pm SEM of triplicate experiments. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$

5. 골다공증이 유발된 백서의 대퇴골무게 및 길이에 미치는 영향

골다공증을 유발시킨 백서의 대퇴부 무게 및 길이의 변화를 확인하기 위하여 난소제거 4 주 후부터 4 주 동안 정상 대조군으로 vehicle을 처리한 난소적출을 하지 않고 가수술한 sham군, 난소적출한 무처리군인 OVX군, 골 흡수를 억제시키는 물질인 17 β -estradiol 처리한 OVX군, 그리고 좁은잎천선과 추출물을 각각 100, 200 mg/kg의 용량으로 처리한 OVX군으로 분리하였다. 정상 대조군인 sham군에 비해 무처리군인 OVX군의 대퇴부의 무게와 길이의 변화가 나타났다. 골 흡수를 억제시키는 물질인 17 β -estradiol를 처리한 OVX군이 무처리군인 OVX군에 비해 대퇴골 무게/백서의 무게의 비율과 대퇴골 길이가 증가한 것을 확인 할 수 있었으며 좁은잎천선과 추출물을 처리한 OVX군의 대퇴골 무게/백서의 무게의 비율이 무처리군인 OVX군에 비하여 증가한 것을 확인 할 수 있었으며, 100 mg/kg의 용량보다는 200 mg/kg의 용량에서 더 높은 결과를 얻었다 (**Figure 23, Table 2**). 또한, 좁은잎천선과 추출물을 처리한 OVX군의 대퇴골 길이가 무처리군인 OVX군에 비하여 증가한 결과를 얻었으며, 100 mg/kg의 용량보다는 200 mg/kg의 용량에서 더 높은 결과를 얻었다 (**Figure 24, Table 3**).

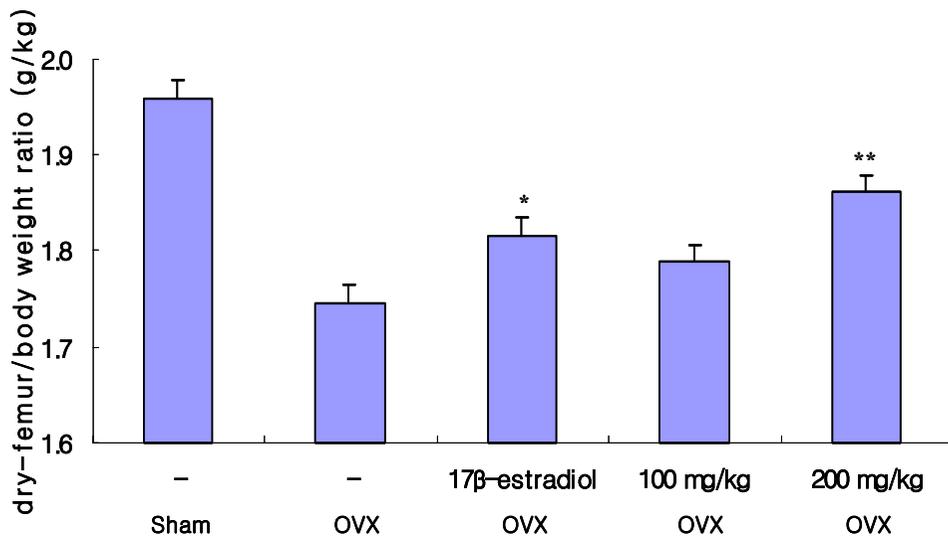


Figure 23. Changes of dry-femur/body weight ratio by *F. erecta* extract. *F. erecta* extract (100, 200 mg/kg) was administered to ovariectomized rats every day for 4 weeks. All rats were sacrificed 8 weeks after OVX. Femur was obtained from all rats and then was dried for 24 hr. Dry-femur/body weight ratio was analyzed. *, $P<0.05$; **, $P<0.01$ (n=7)

Table 2. Changes of dry-femur/body weight ratio

실험군	Dry-femur/ body weight(g/kg)
Sham	1.95±0.13
OVX	1.74±0.12
OVX + 17β-estradiol	1.81±0.15 *
OVX + <i>F. erecta</i> MeOH Ext. (100 mg/kg)	1.79±0.19
OVX + <i>F. erecta</i> MeOH Ext. (200 mg/kg)	1.86 ±0.13 **

F. erecta extract (100, 200 mg/kg) was administered to ovariectomized rats every day for 4 weeks. All rats were sacrificed 8 weeks after OVX. Femur was obtained from all rats and then was dried for 24 hr. Dry-femur/body weight ratio was analyzed. *, $P<0.05$; **, $P<0.01$ (n=7)

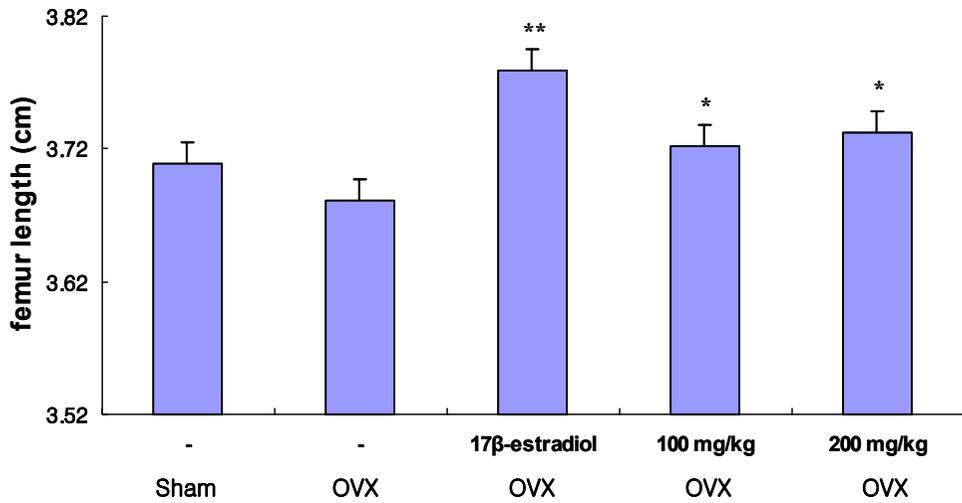


Figure 24. Changes of femur length by *F. erecta* extract. *F. erecta* extract (100, 200 mg/kg) was administered to ovariectomized rats every day for 4 weeks. All rats were sacrificed 8 weeks after OVX. Femur was obtained from all rats and then was dried for 24 hr. Femur length was analyzed. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ (n=7)

Table 3. Changes of femur length

실험군	Femur length (cm)
Sham	3.708±0.071
OVX	3.681±0.074
OVX + 17β-estradiol	3.778±0.092 **
OVX + <i>F. erecta</i> MeOHExt. (100 mg/kg)	3.721±0.052 *
OVX + <i>F. erecta</i> MeOHExt. (200 mg/kg)	3.732 ±0.034 *

F. erecta extract (100, 200 mg/kg) was administered to ovariectomized rats every day for 4 weeks. All rats were sacrificed 8 weeks after OVX. Femur was obtained from all rats and then was dried for 24 hr. Femur length was analyzed. *, $P<0.05$; **, $P<0.01$ (n=7)

IV. 고 찰

골다공증이란 단순히 골 량이 정상보다 적은 현상을 의미하는 골감소증 (osteopenia)이 아닌 골 흡수가 골 형성보다 상대적으로 많이 발생하는 골재형성 (bone remodeling) 현상의 이상으로 골절의 위험이 높은 골 대사질환이다.

난소 절제 및 폐경은 에스트로겐의 생성과 분비를 감소시켜 에스트로겐의 결핍을 초래하게 된다. 이 호르몬의 저하 시 골조직의 손실을 일으키는 기전은 정확히 밝혀지지 않았지만 에스트로겐 결핍 시 싸이토카인과 부갑상선호르몬 (PTH)이 서로 상승작용을 일으켜 interleukin-1 (IL-1), interleukin-6 (IL-6) 및 tumor necrosis factor (TNF)의 증가가 일어나고 증가된 이들 싸이토카인 (IL-1, IL-6, TNF)과 macrophage colony stimulation factor (M-CSF)에 의한 파골세포의 전구세포가 증가되어 골재형성의 불균형을 일으켜 골 흡수가 일어나는 것으로 보고되고 있다 (Gowen *et al.*, 1985; Pflisberger *et al.*, 1989). 이러한 사이토카인 중에서 IL-1은 파골세포형성 (osteoclastogenesis)을 자극하고 동시에 골 흡수에 관여하는 다른 사이토카인의 분비를 자극 하는 것으로 알려져 있다.

골다공증의 치료는 골 질량을 증가시켜 골절의 감소 또는 방지하는데 그 목적이 있다. 이때 증가된 골 량의 정도뿐 아니라 어느 부위에 어떠한 질 (quality)의 골이 증가되는가하는 것도 중요하다. 에스트로겐이 골소실의 감소 및 방지하는 기전에 대해서 정확히 밝혀져 있지는 않지만 여성 호르몬은 폐경 후 여성에서 조골세포 및 골수기질 조골세포들을 조절해서 증가된 IL-6 생성을 억제하여 파골세포의 활동을 감소시키며 (Grasol *et al.*, 1992), 또한 파골세포의 예정사 (apoptosis)를 증가시켜 골 량의 감소를 나타낸다 (Hughes *et al.*, 1996; Kameda *et al.*, 1997).

IL-6는 파골세포성 골 흡수를 조절하는 다 기능적 사이토카인이며 폐경기 골다공증 (Jilka *et al.*, 1992), 파켓병 (Paget's disease) (Roodman *et al.*, 1992), 그리고 류마티스 관절염 (Ohashima *et al.*, 1998)을 포함한 많은 골질환의 병인에 영향을 끼친다. IL-6는 조골세포에 의한 RANKL분비도 증가시킨다고 보고되었다 (Nakashima *et al.*, 2000). 또한, IL-6는 조골세포에서 COX-2 발현과 PGE2 생산

을 증가시키는데 이는 IL-6가 조골세포에서 OPG (osteoprotegerin) 분비억제에 영향을 미치는 PGE₂를 매개하기 때문이다 (Tai *et al.*, 1997). IL-6는 골 흡수 인자이다. 골에서 IL-6는 부갑상선 호르몬 (parathyroid hormone)에 의해서 조절되는 조골세포성 세포에 의해 생성 된다 (Feyen *et al.*, 1989; Lowik *et al.*, 1989). 조골세포에서 생성된 IL-6는 주변의 골 흡수에 중요한 역할을 하는 파골세포의 형성/분화를 유발 시킨다 (Lowik *et al.*, 1989; Ishimi *et al.*, 1993). 또한 조골세포에서 IL-6 생성은 에스트로겐 매개체를 통하여 에스트로겐에 의해 조절되어진다고 보고되어져 왔다 (Jilka *et al.*, 1992; Horowitz, 1993).

COX-2는 PGE₂ (prostaglandin E₂)합성을 유발하는 효소로서 파골세포형성에서 관여 한다 (Joldersma *et al.*, 2000). PGE₂는 골다공증과 파켓병 (Paget's disease)과 같은 질환에서 파골세포의 수와 활성을 증가시키는데 중요한 역할을 한다고 보고되어져 왔다 (Manolagas, 1995). COX-2와 PGE₂는 골 조직 remodeling에서 중요한 역할을 하며 (Ono *et al.*, 2002), 파골세포 활성화와 조골세포의 골 형성을 매개하는 싸이토카인에 관여한다. 또한, COX-2-catalyzed pathway로부터 유리된 PGE₂가 조골세포증식과 파골세포분화를 증가시킨다. COX-2와 PGE₂는 조골세포에서 OPG 분비를 억제하고 RANKL 생성을 증가시키며 파골세포에서 RANK 발현을 자극시켜 파골세포형성을 증가 시킨다 (Liu *et al.*, 2005). COX-2의 경로는, 또한, 지방암 세포의 골 대사에서 파골세포형성과 골 파괴에 영향을 끼친다 (Ono *et al.*, 2002).

RANK/RANKL/OPG 체계에서 COX-2와 PGE₂의 어느 정도의 영향이 이전에 보고되어졌다 (Okada *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2002). 조골세포와 파골세포의 동시 배양에서 파골세포에 대한 PGE₂ 영향은 조골세포에서 RANKL 분비를 증가시키고 OPG 분비를 감소시킨다. 조골세포에 의한 RANKL과 OPG 분비에 대한 PGE₂의 생물학적 영향은 PGE₂에 의해 파골세포에서 RANK 발현의 up-regulation되기 때문에 동시배양에 있어서 더욱 증가되었다.

최종적으로, COX-2/PGE₂ 체계도, 조골세포 (Gruber *et al.*, 2000; Kozawa *et al.*, 1998)와 파골세포에 의해 IL-6 분비의 up-regulation을 통하여 파골세포분화를 자극하여 골 흡수를 증가 시킨다 (Ohashima *et al.*, 1998).

Human osteoblast cell line인 MG-63 세포에 IL-1 β 를 가지고 자극을 주고 좁은

잎천선과 추출물을 처리하여 골다공증발생에 중요한 역할을 하는 골다공증성 인자인 IL-6와 COX-2의 생산에 대한 영향을 알아보았다. 좁은잎천선과의 hexane, EtOAc 분획물이 IL-6 생성과 mRNA 발현을 농도 의존적으로 억제하였다. 또한 좁은잎천선과의 hexane, EtOAc 분획물이 COX-2 mRNA 발현과 단백질 생성을 농도 의존적으로 억제하였다.

파골세포는 CFU-GM으로부터 분화한다. 이때는 파골세포의 마커인 CTR, TRAP, ruffled border가 모두 음성인 상태이다. 이후, pOC (perfusion osteoclast) 상태에서는 CTR, TRAP만이 양성을 보인다. 이후 세포간의 융합에 의해 다핵화된 파골세포로 분화되며, 역시 CTR, TRAP만이 양성을 보인다. 지속적인 자극에 의해 활성화된 파골세포로 분화되며 ruffled border를 형성한다. Ruffled border는 골 흡수 활성을 가지는데 필수적인 구조물로서 이를 통해 파골세포는 골에 흡착함과 동시에 외부와 차단된 공간을 형성하여 골의 흡수를 진행할 수 있다

이러한 분화의 단계를 거치는 파골세포는 먼저 조각이 용이한 세포를 이용하여 얻을 수 있다. Murine macrophage cell line인 RAW264.7 세포에 파골세포로 분화시키기 위해서 sRANKL를 가지고 자극을 주고 좁은잎천선과 추출물을 처리하여 파골세포형성 (osteoclastogenesis)이 억제되는 것을 TRAP staining과 TRAP assay를 통해 확인하였다. 파골세포형성은 TRAP staining을 통해 좁은잎천선과의 hexane, EtOAc 분획물에서 농도 의존적으로 억제하는 것을 확인하였으며, TRAP 생성은 TRAP assay를 통해 hexane, EtOAc 분획물에서 농도 의존적으로 억제하는 것을 확인하였다.

백서는 성장기, 성장 후 및 골다공증이 유발되는 골 형성과 골 흡수의 생물학적 기전이 사람과 같은 반응을 나타내어 인체의 골감소증 연구에 백서의 골격구조는 좋은 모델이 된다. 백서의 난소절제 후 형태계측학적 분석을 통해 경골 중간부 (tibial metaphysis) 골 소주 양을 관찰한 결과 28 일째 60 % 이상이 감소되었으며 (Frost 1990; Tunur *et al.*, 1987), 35 일째 약 60 % 가까이 골 손실이 있었다고 보고하였다 (Wronski *et al.*, 1991). 그리고 백서의 난소절제 후 대퇴골부위의 골 조직 변화를 60 일까지 관찰한 결과 대조군에 비해 골 조직이 상당히 감소되었으나 통계학적 유의성은 없었다고 보고하였으며 (Ikeda *et al.*, 1996), 1 년째는 약 70 %이상 골량의 감소가 일어났다고 보고하였다 (Thompson *et al.*, 1996).

생후 24 주령인 체중 250~300 g 정도의 백서를 난소 적출하여 실험모델로 삼았다. 백서의 난소적출 후 3~4 주 경과 후부터 정상군에 비해 현저하게 해면골량이 감소되어 골다공증현상이 나타난다고 알려져 있는데 이를 근거로 하여 본 실험은 난소적출 후 3 주간을 경과시켜 폐경기 상태를 유발시키고 좁은잎천선과 추출물의 효과를 알아보았다. 골다공증 실험이나 치료분야에서 보편적으로 사용되는 17 β -estradiol을 사용하여 이들에 한번씩 20 μ g/kg를 근육 내 투여하여 좁은잎천선과의 효과와 비교하였다. 그 결과, 대퇴부 건조무게/백서무게 비율은 가수술한 정상대조군인 sham군, 난소적출한 무처리군인 OVX군, 17 β -estradiol를 처리한 OVX군, 좁은잎천선과 100 mg/kg 과 200 mg/kg 처리한 OVX군에서 각각 1.95 (g/kg) \pm 0.13, 1.74 (g/kg) \pm 0.12, 1.81 (g/kg) \pm 0.15*, 1.79 (g/kg) \pm 0.19, 1.86 (g/kg) \pm 0.13** 으로 나타났으며, 대퇴부길이는 3.708 (cm) \pm 0.071, 3.681 (cm) \pm 0.074, 3.778 (cm) \pm 0.092**, 3.721 (cm) \pm 0.052*, 3.732 (cm) \pm 0.034* 으로 통계학적으로 의미 있는 변화를 보였으며, 난소적출한 무 처리군에 비해 좁은잎천선과를 처리한군이 정상대조군에 가까운 수치로 증가한 결과를 얻었다.

본 실험 결과를 요약하면, 좁은잎 천선과 추출물의 hexane과 EtOAc 분획물들이 *in vitro* 실험에서 골다공증성 인자인 IL-6와 COX-2의 발현과 생성 억제 효과를 나타냈으며, 파골세포로의 분화를 억제시켰다. 하지만 *in vitro* 실험에서 CHCl₃ 분획물의 100 μ g/ml의 농도에서 활성은 있었으나 세포증식을 억제하는 것으로 보아 세포독성에 의한 것으로 여겨진다. 또한 난소적출을 통해 골다공증을 유발시킨 백서에 좁은잎천선과 추출물을 처리한 백서의 체중에 대비한 대퇴골 무게 비율과 대퇴골 길이가 증가하였다. 이러한 결과는 좁은잎천선과의 유효성분 추출을 통한 골다공증 실험에서 물질의 연구, 예방 또는 치료할 수 있는 억제 성분의 분리 및 그 작용기전 연구에 중요한 기초 자료가 될 것이라 사료 된다.

V. 참고 문헌

- Ahn, D. K. 1998 Illustrated book of korean medicinal herbs.
- Anderson, J. J. and S. C. Garner. 1998. Phytoestrogens and bone. *Bailliere 's Clinical Endocrinology and Metabolism.*, 12(4):543~557.
- Canalis, E. 1986. Interleukin-1 has independent effects on deoxyribonucleic acid and collagen synthesis in culture of rat calvariae. *Endocrinology.*, 118(1):74~81.
- Collier, F. M., W. H. Huang, W. R. Holloway, J. M. Hodge, M. T. Gillespie, L. L. Daniels, M. H. Zheng and G. C. Nicholson. 1998. Osteoclasts from human giant cell tumor of bone lack estrogen receptors. *Endocrinology.*, 139:1258~1267.
- Cruess, R. L. and K. C. Hong. 1979. The effect of long term estrogen administration on bone metabolism in the female rats. *Endocrinology.*, 104(40):1188~1193.
- Ducy, P., T. Schinke and G. Karsenty. 2000. The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science.*, 289(5484):1501~1504.
- Ernst, M., J. K. Heath and G. A. Lodan. 1989. Estradiol effects on proliferation, messenger ribonucleic acid for collagen and insulin-like growth factor-I and parathyroid hormone-stimulated adenylate cyclase activity in osteoblastic cells from calvariae and long bones. *Endocrinology.*, 125:822~833.
- Feyen, J. H., M. P. Elford, F. E. Padova and U. Trechsel. 1989. Interleukin-6 is produced by bone and modulated by parathyroid hormone. *J Bone Miner Res.*, 4:633~638.
- Frost, H. M. 1990. Skeletal structural adaptations to mechanical usage(SATMU): 3. The hyaline cartilage modeling problem. *Anat Rec.*, 226(4):423~432.

- Girasole, G., R. L. Jilka, G. Passeri, S. Boswell, G. Boder, D. C. Williams and S. C. Manolagas. 1992. 17β -estradiol inhibitor interleukin-6 production by bone marrow-derived stromal cells and osteoblasts in vitro: A potential mechanism for the antiosteoporotic effect of estrogens. *J Clin Invest.*, 89(3):883~891.
- Gowen, M., D. D. Wood and E. J. Ihrle. 1983. An interleukin-1 like factor stimulates bone resorption in vivo. *Nature.*, 306~378.
- Gowen, M., D. D. Wood and R. R. G. Russell. 1985. Stimulation of the proliferation of human bone cells in vivo by humane monocyte products with interleukin-1 activity. *J Clin Invest.*, 75(4):1223~1129.
- Greenfield, E. M., S. M. Shaw, S. A. Gornik and M. A. Banks. 1995. Adenyl cyclase and interleukin-6 are downstream effectors of parathyroid hormone resulting in stimulation of bone resorption. *J Clin Invest.*, 96:1238~1244.
- Gruber, R., G. Nothegger, G. M. Ho, M. Willheim and M. Peterlik. 2000. Differential stimulation by prostaglandin E2 and calcemic hormones of interleukin-6 in stromal/osteoblastic cells. *Biochem Biophys Res. Commun.*, 270:1080~1085.
- Horowitz, M. C. 1993. Cytokines and estrogen in bone: anti-osteoporotic effects. *science.*, 26:626~627.
- Hughes, D. E. and B. F. Boyce. 1997. Apoptosis in bone physiology and disease. *J Clin Pathol.*, 50(3):132~137.
- Hughes, D. E., A. Dai, J. C. Tiffie, G. R. Mundy and B. F. Boyce. 1996. Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF- β . *Nature Med.*, 2(10):1132~1136.
- Hughes, D. E., K. R. Wright, H. L. Uy, A. Sasaki, T. Yoneda, G. D. Roodman, G. R. Mundy and B. F. Boyce. 1995. Bisphosphonates promote apoptosis in murine osteoclasts in vitro and in vivo. *J Bone Miner Res.*, 10(10):1478~1487.

- Ikeda, T., A. Yamaguchi, S. Yokose, Y. Nagai, H. Yamato, T. Nakamura, H. Tsurukami, T. Tanizawa and S. Yoshiki. 1996. Changes in biological activity of bone cells in ovariectomized rats revealed by in situ hybridization. *J Bone Miner Res.*, 11(6):780~788.
- Ishimi, Y., C. Miyaura, C. H. Jin, T. Akatsu, E. Abe, Y. Nakamura, A. Yamaguchi, S. Yoshiki, T. Matsuda, T. Hirano, T. Kishimoto and T. Suda. 1990. IL-6 is produced by osteoblasts and induces bone resorption. *J Immunol.*, 145:3297~3303.
- Jilka, R. L., G. Hangoc, G. Girasole, G. Passeri, D. C. Williams, J. S. Abrams, B. F. Boyce, H. Broxmeyer and S. C. Manolagas. 1992. Increased osteoclast development after estrogen loss: mediation by interleukin-6. *Science.*, 257:88~91.
- Johnson, R. A., B. F. Boyce, G. R. Mundy and G. D. Roodman. 1989. Tumors producing human tumor necrosis factor induce hypercalcemia and osteoclastic bone resorption in nude mice. *Endocrinology.*, 124(3):1424~1427.
- Joldersma, M., E. H. Burger, C. M. Serneins and J. Klein-Nulend. 2000. Mechanical stress induces COX-2 mRNA expression in bone cells from elderly women. *J biomech.*, 33(1):53~61.
- Kameda, T., H. Mano, T. Yuasa, Y. Mori, M. Miyazawa, Y. Nakamaru, E. Hiroi, K. Hiura, A. Kameda, N. N. Yang, T. Hakeda and M. Kumegawa. 1997. Estrogen inhibits bone resorption by directly inducing apoptosis of the bone-resorbing osteoclasts. *Exp Med.*, 186(4):489~495.
- Kang, S. A., K. H. Jang, Y. H. Cho, K. H. Hong, S. H. Kong and R. W. Choue. 2001. High performance liquid chromatographic analysis of isoflavone in soybean and blackbean. *J Arahe.*, 8:44~48.
- Kanis, J. A., L. J. 3rd. Melton, C. Christiansen, C. C. Johnston and N. Khaltayev. 1994. The diagnosis of osteoporosis. *Bone Miner Res.*, 9(8):1137~1141.

- Kim, K. S. 1998. Osteoporosis; The Women ' s News, *seoul.*, 10~11.
- Kim, K. S. 1998. Osteoporosis; The Women ' s News, *seoul.*, 31~62.
- Kim, K. S., B. K. Min, S. P. Lee, H. Y. Kim and S. R. Sim. 2000. Evaluation of biochemical markers of bone turnover in postmenopause osteoporotic women to Alendronate treatment. *J Korean Soc Menopause.*, 6(1):36~42.
- Kim, M. R., C. H. Yang and B. I. Seo. 1998. Effect of safflower seeds on bone mineral density in ovariectomy-induced postmenopausal osteoporotic rats. *Kor. J Herbology.*, 13(2):37~43.
- Kim, W. H., K. H. Kim and M. C. Hong. Principle of Oriental medicine. *Seoul sungbosa.*, 107~111.
- Kong, Y. Y. and J. M. Penninger. 2000. Molecular control of bone remodeling and osteoporosis. *Experimental Gerontology.*, 35(8):947~956.
- Kong, Y. Y., U. Feige, I. Sarosi, B. Bolon, A. Tafuri, S. Morony, C. Capparelli, J. Li, R. Elliott, S. McCabe, T. Wong, G. Campagnuolo, E. Moran, E. R. Bogoch, G. Van, L. T. Nguyen, P. S. Ohashi, D. L. Lacey, E. Fish, W. J. Boyle and J. M. Penninger. 1999. Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature.*, 402(6759):304~309.
- Kong, Y., Y. Yoshida, H. Santos, A. J. Van, G. Itie, A. Khoo, W. Wakeham, A. Dunstan, C. R. Lacey, D. L. Mak, T. W. Boyle and W. J. Penninger. 1999. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature.*, 397:315~323.
- Kozawa, O., A. Suzuki, H. Tokuda, T. Kaida and T. Uematsu. 1998. Interleukin-6 synthesis induced by prostaglandin E2: cross-talk regulation by protein kinase C. *Bone.*, 22:355~360.
- Kuehl, W. M. and P. L. Bergsagel. 2002. Multiple myeloma : evolving genetic events and host interactions. *Nat Rev Cancer.*, 1:175~187.
- Kuiper, G. G., E. Enmark, M. Peltö-Huikko, S. Nilson and J. A. Gustafsson. 1996. Cloning of novel estrogen receptor expressed in rat prostat and ovary. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA.*, 93:5925~5930.

- Kwon, B. S., S. Wang, N. Udagawa, V. Haridas, Z. H. Lee, K. K. Kim, K. O. Oh, J. Greene, Y. Li, J. Su, R. Gentz, B. B. Aggarwal and J. Ni. 1998. TR1, a new member of the tumor necrosis factor receptor superfamily, induces fibroblast proliferation and inhibits osteoclastogenesis and bone resorption. *Faseb Journal.*, 12(10):845~854.
- Lakkakorpi, P. T. and H. K. Vaananen. 1991. Kinetics of the osteoclast cytoskeleton during the resorption cycle in vitro. *Journal of Bone and Mineral Research.*, 6(8):817~826.
- Lakkakorpi, P. T., J. Tuukkanen, T. Hentunen, K. Jarvelin and H. K. Vaananen. 1989. Organization of osteoclast microfilaments during the attachment to bone surface in vitro. *Journal of Bone and Mineral Research.*, 4(6):817~825.
- Lee, H. K. 1998. Effect of blackbean and sam-ryung-bak-chul-san on ovariectomy-induced postmenopausal osteoporotic rats. *The Graduated School of Kyung Hee University.*
- Li, X., C. C. Pilbeam, L. Pan, R. M. Breyer and L. G. Raisz. 2002. Effects of prostaglandinE2 on gene expression in primary osteoblastic cell from prostaglandin receptor knockout mice. *Bone.*, 30(4):567~573.
- Lim S. G. 1994. Bone turnover marker의 임상적 의의와 응용. *대한골대사학회지.*, 1~1
- Liu, X. H., A. Kirschenbaum, S. Yao and A. C. Levine. 2005. Cross-Talk between the interleukin-6 and prostaglandinE2 signaling systems results in enhancement of osteoclastogenesis through effects on the osteoprotegerin/receptor activator of nuclear factor- κ B(RANK) ligand/RANK system. *Endocrinology.*, 146:1991~1998.
- Lowik, C. W., G. van der Pluijm, H. Bloys, K. Hoekman, O. L. Bijvoet, L. A. Aardan and S. E. Papapoulos. 1989. Parathyroid hormone(PTH) and PTH-like protein(PLP) stimulate interleukin-6 production by osteogenic cells; a possible role of interleukin-6 in osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res. Commun.*, 162(3):1546~1552.

- Manolagas, S. C. 1995. Role of cytokines in bone resorption. *Bone.*, 17:63~67.
- Mundy, G. R. 1993. Factors which stimulate bone growth in vivo. *Growth Regul.*, 3(2):124~128.
- Nakashima, T., Y. Kobayashi, S. Yamasaki, A. Kawakami, K. Eguchi, H. Sasaki and H. Akai. 2000. Protein expression and functional difference of membranebound and soluble receptor activator of NF- κ B ligand: modulation of the expression by osteotropic factors and cytokines. *Biochem Biophys Res. Commun.*, 275:768~775.
- Ohshima, S., Y. Saeki, T. Mima, M. Sasai, K. Nishioka, S. Nomura, M. Kopf, Y. Katada, T. Tanaka, M. Suemura and T. Kishimoto. 1998. Interleukin-6 plays a key role in the development of antigen-induced arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 95:8222~8226.
- Okada, Y., J. A. Lorenzo, A. M. Freman, M. Tomita, S. G. Morham, L. G. Raisz, and C. C. Pilbeam. 2000. Prostaglandin G/H synthase-2 is required for maximal formation of osteoclast-like cells in culture. *J Clin Invest.*, 105:823~832.
- Ono, K., T. Akatsu, T. Murakami, R. Kitamura, M. Yamamoto, M. Rokutanda, N. Nagata and N. Kugai. 2002. Involvement of cyclooxygenase-2 in osteoclast formation and bone destruction in bone metastasi of mammary carcinoma cell lines. *J. Bone Miner Res.*, 17:774~781.
- Park, J. S. 2000. Physiological effect of isoflavone (II): Osteoporosis and postmenopausal symptom. *Natl Nutr.*, 215:25~31.
- Pfeilschifter, J., C. Chenu, A. Bird, G. R. Mundy and G. D. Roodman. 1989. Interleukin-1 and tumor necrosis factor stimulate the formation of human osteoclastlike cells in vitro. *J Bone Miner Res.*, 4(1) 113~118.
- Rogers, J. 1967. Estrogens in the menopause and postmenopause. *N Engl J Med.*, 280:364~367.
- Roodman, G. D., N. Kurihara, Y. Ohsaki, A. Kukita, D. Hosking, A. Demulder, J. F. Smith and F. R. Single. 1992. Interleukin-6, a potential autocrine/paracrine factor in Paget's disease of the bone. *J Clin Invest.*, 89:46~52.

- Sandhu, J. S., R. M. Gorczynski, J. Waddell, H. Nguyen, J. Squires, J. II Wadde, E. L. Boynton and N. Hozumi. 1999. Effect of interleukin-6 secreted by engineered human stromal cells on osteoclasts in human bone. *Bone.*, 24:217~227.
- Schiller, C., R. Gruber, G. M. Ho, K. Redlich, H. J. Gober, F. Katzgraber, M. Willheim, O. Hoffmann, P. Pietschmann and M. Peterlik. 1998. Interaction of triiodothyronine with 1,25-dihydroxyvitamin D3 on interleukin-6-dependent osteoclast-like cell formation in mouse bone marrow cell culture. *Bone.*, 22(4):341~346.
- Schiller, C., R. Gruber, K. Redlich, G. M. Ho, M. Katzgraber, H. Willheim, P. Pietschmann and M. Peterlik. 1997. 17 β -Estradiol antagonizes effects of 1, 25-dihydrox-vitamin D3 on interleukin-6 production and osteoclast-like cell formation in mouse bone marrow primary cultures. *Endocrinology* 138(11):4567~4571.
- Setchell, K D. and A. Cassidy. 1999. Dietary Isoflavone: Biological Effect and Relevance to Human Health. *J. Nutr.*, 129(3):758~767.
- Simonent, W. S., D. L. Lacey, C. R. Dunstan, M. Kelley, M. S. Chan, R. Luthy, H. Q. Nguyen, S. Wooden, L. Bennett, T. Boone, G. Shimaoto, M. DeRose, R. Elliott, A. Colombero, H. L. Tan, G. Trail, J. Sullivan, E. Davy, N. Bucay, L. Renshaw-Gegg, T. M. Hughes, D. Hill, W. Pattison, P. Campbell, S. Sander, G. Van, J. Tarpley, P. Derby, R. Lee and W. J. Boyle. 1997. Osteoprotegerin : a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell.*, 89(2):309~319.
- Sims, N. A., B. J. Jenkins, J. M. Quinn, A. Nakamura, M. Glatt, M. T. Gillespie, M. Ernst and T. J. Martin. 2004. Glycoprotein 130 regulates bone turnover and bone size by distinct downstream signaling pathways. *J Clin Invest.*, 113(3):379~389.
- Stashenko, P., F. E. Dewhirst, M. L. Rooney, L. A. Desjardins and J. D. Heeley. 1987. Interleukin-1 beta is a potent inhibitor of bone formation in vitro. *Bone Miner Res.*, 2(6):559~565.

- Suda, T., N. Takahashi and T. J. Martin. 1992. Modulation of osteoclast differentiation. *Endocrine Reviews*. 13(1):66~80.
- Tabuchi, C., D. J. Simmons and A. Fausto. 1986. Bone deficit in ovariectomized rats. *J Clin Invest.*, 78:637~692.
- Tai, H., C. Miyaura, C. C. Pilbeam, T. Tamura, Y. Ohsugi, Y. Koishihara, N. Kubodera, H. Kawaguchi, L. G. Raisz and T. Suda. 1997. Transcriptional induction of cyclooxygenase-2 in osteoblasts is involved in interleukin-6-induced osteoclast formation. *Endocrinology.*, 138:2372~2379.
- Takahashi, N., N. Udagawa and T. Suda. 1999. A New Member of tumor necrosis factor Ligand family. ODF/ OPG/ TRANCE/ RANKL, regulates osteoclast differentiation and function. *Biochemical and Biophysical Reserch Communications.*, 256:449~445.
- Takano, Y. T. and G. Rodan. 1990. Direct effects or 17 β -estradiol on trabecular bone in ovariectomized rats. *Proc Natl Acad Sci USA*.
- Tamura, T., N. Udagawa, N. Takahashi, C. Miyaura, S. Tanaka, Y. Yamada, Y. Koishihara, Y. Oshugi, K. Kumaki, T. Taga, T. Kishimoto and T. Suda. 1993. Soluble interleukin-6 receptor triggers osteoclast formation by interleukin-6. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 90:11924~11928.
- Teitelbaum, S. I. 1996. The osteoclast and osteoporosis. *Mt Sinai J Med.*, 63(5-6):399~402.
- Teitelbaum, S. L. 2000. Osteoclasts, integrins, and osteoporosis. *Journal of Bone and Mineral Metabolism.*, 18(6):344~349.
- Thompson, D. D., J. G. Sedor, H. Quartuccio, H. Solomon, C. Fioravanti, J. Davidson, H. Klein, R. Jackson, J. Clair and D. Frankenfield. 1996. The bisphosphonate, Alendronate, prevents bone loss in ovariectomized baboon. *J Bone Miner Res.*, 7(8):951~960.
- Thomsom, B. M., J. Saklatvala and T. J. Chambers. 1986. Osteoblasts mediate interleukin-1 stimulation of bone resorption by rat osteoclasts. *J Exp Med.*, 164(1):104~112.

- Tolonen, A., T. Joutsamo, S. Mattila, T. Kamarainen and J. Jalonen. 2002. Identification of isomeric dicaffeoylquinic acids from *Eleutherococcus senticosus* using HPLC-ESI/TOF/MS and ¹H-NMR methods. *Phytochem Anal.*, 13:316~328.
- Turner, R. T., J. J. Vandersteenhoven and N. H. Bell. 1987. The effects of ovariectomy and 17 β -estradiol on cortical bone histomorphometry in growing rats. *J Bone Miner Res.*, 2(2):115~122.
- Vaananen, H. K. and M. Horton. 1995. The osteoclast clear zone is a specialized cell-extracellular matrix adhesion structure. *Journal of Cell Science.*, 108(Pt8):2729~2732.
- Wong, B. R., J. Rho, J. Arron, E. Robinson, J. Orlinick, M. Chao, S. Kalachikov, E. Cayani, F. S. 3rd Bartlett, W. N. Frankl, S. Y. Lee and Y Choi. 1997. TRANCE is a novel ligand of the tumor necrosis factor receptor family that activates c-Jun N-terminal kinase in T cells. *Journal of Biochemical chemistry.*, 272(40):25190~25194.
- Woo W. S. 1995. 천연물 연구법. 민음사., 9~15
- Wronski, T. J., C. F. Yen, H. Qi and L. M. Dann. 1993. Parathyroid hormone is more effective than estrogen or bisphosphonates for restoration of lost bone mass in ovariectomized rats. *Endocrinology.*, 132(2):823~831.
- Wronski, T. J., L. M. Dann, H. Qi and C. F. Yen. 1993. Skeletal effects of withdrawal of estrogen and diphosphonate treatment in ovariectomized rats. *Calcif Tissue int.*, 53(3):210~216.

VI. 적 요

본 연구에서는 천연물로부터 효능이 뛰어난 골다공증치료를 위한 활성물질을 찾기 위하여 제주도에 자생하고 있는 좁은잎천선과를 채집하여 계통적인 방법에 의하여 추출하고 그 추출물에 대하여 골다공증 생체지표 인자에 대한 억제효과를 조사하였다. 좁은잎천선과는 한국에서도 남해지방 특히 제주도에서 주로 자생하는 식물로 알려져 있으며, 민간에서는 오래전부터 보중, 익기, 건비, 화습, 강근장골, 소종, 활혈, 해독의 효능이 있으며, 신장염, 류머티스성 관절염, 중기허약, 기혈쇠미, 사지산언, 근골불리, 타박상, 경계, 산후유즙결핍 등을 치료하는데 이용되어져 왔다. 그러나 그러한 성분의 생리 활성에 대한보고는 거의 없는 실정이다.

골은 골 흡수에 관여하는 세포인 파골세포와 골 형성에 관여하는 세포인 조골세포의 균형에 의해 유지된다. 골 형성 주기에 불균형이 생겨서 치환되는 골보다 파괴되는 골이 더 많을 때 골다공증이 유발된다. 많은 호르몬과 극소인자들이 조골세포의 활동을 증진시키거나 파골세포형성을 억제할 수 있다. 파골세포형성은 IL-4, IL-12 그리고 INF- γ 에 의해 억제되며, TNF- α , PGE₂, IL-1 그리고 IL-6에 의해 자극된다. 파골세포는 조혈줄기세포로부터 발생하는 단핵식세포들의 융합에 의한 다핵화된 세포이다. TRAP은 성숙한 파골세포로부터 분비되며, 파골세포의 생화학적 마커이다.

이 연구에서 조골세포 계열인 MG-63 세포에 IL-1 β 로 자극을 주고 좁은잎천선과 추출물을 처리하여 IL-6 와 COX-2의 생성에 대한 영향을 조사하였다. 좁은잎천선과의 hexane, EtOAc 분획물이 IL-6의 단백질 생성과 mRNA 발현을 농도 의존적으로 억제하였다. 또한 좁은잎천선과의 hexane, EtOAc 분획물이 COX-2의 mRNA 발현과 단백질 생성을 농도 의존적으로 억제하였다. 대식세포 계열인 RAW 264.7 세포를 파골세포로 분화시키기 위해서 sRANKL로 자극을 주고 좁은잎천선과 추출물을 처리하여 파골세포로 분화되는 것을 억제하는지 확인하기 위해 TRAP staining과 TRAP assay를 실행하였다. 파골세포형성은 TRAP staining을 통해 좁은잎천선과의 hexane, EtOAc 분획물에서 농도 의존적으로 억제되는 것을

확인하였으며, TRAP assay를 통해 hexane, EtOAc 분획물에서 TRAP 생성량이 감소하는 것을 확인하였다. 또한 난소적출을 통해 골다공증을 유발시킨 백서에서 좁은잎천선과의 영향을 실험하였다. 24 주령 된 백서를 난소적출을 한 후 4주 후부터 4 주 동안 좁은잎천선과 추출물을 처리하지 않은 것과 매일 각각 100, 200 mg/kg을 처리 한 군으로 분리하여 사육하였다. 그 결과, 이 실험에서 좁은잎천선과 추출물을 처리한 백서의 대퇴골 건조 무게/백서의 체중 비율과 대퇴골 길이가 무처리군에 비해 증가하였다.

결과적으로, 좁은잎천선과의 조추출물 및 이로부터 분획화된 hexane, EtOAc 분획물은 골다공증성 인자 억제 활성을 나타내었고, 이러한 결과들은 천연식물로부터 골다공증의 예방 및 치료를 위한 활성성분의 분리와 작용기전 연구에 중요한 기초 자료가 될 것으로 사료된다.

Key word: 좁은잎천선과, 골다공증, IL-1 β , IL-6, COX-2, RANKL, TRAP.



감사의 글

2년의 대학원 생활동안 참 많은 걸 배웠습니다. 조금 더 발전하기 위한 과정이었다는 생각을 하며, 아직도 배워야 할 것들이 많다는 걸 새삼 느낍니다.

본 논문이 완성되기까지 참 많은 분들의 도움과 격려가 있었습니다. 이 지면을 빌어 감사의 말씀을 드립니다. 우선, 바쁘신 와중에도 많은 관심 가져주시고 격려해주신 유은숙 교수님께 감사드립니다. 앞으로도 많은 조언 부탁드립니다 항상 건강하십시오. 또한 논문의 부족한 부분들을 지적해 주시고 점검해 주신 강희경 교수님, 조수현 교수님께도 감사의 말씀을 올립니다. 그리고 대학원 과정동안 늘 관심과 조언으로 학문의 길로 이끌어 주신 이영기 교수님, 이봉희 교수님, 박덕배 교수님, 강현욱 교수님, 정영배 교수님, 조문제 교수님, 고영상 교수님, 현진원 교수님, 김문두 교수님, 김수영 교수님, 은수용 교수님께도 감사드립니다.

실험의 과정에서 관심과 조언으로 많은 도움을 주셨던 정용환 선생님, 박수영 선생님, 이욱재 선생님, 영미누나, 희경이누나, 상철이형, 재우형, 은아에게 감사드립니다. 특히, 저 때문에 고생 많았던 약리학 교실 혜자, 정일이, 경진이, 재희에게 감사의 마음을 전합니다. 생명자원과학과 자원식물 연구실 지훈이형, 선순이, 생명과학과 분자생물학 실험실 정형복 선생님, 김지영, 식품공학과 성근이형, 의학과 이정희, 윤지현, 오근희, 김은희 선생님, 최수길, 강경아, 구정은, 김진영 대학원생들을 비롯한 여러 선생님들께도 감사의 마음을 전합니다. 내가 힘들 때 마다 나를 지켜봐준 나의 벗 우석이, 창범이, 혁이, 창준이와 착한 나의 동생들인 한철이, 만수, 경후, 성룡, 명선이에게도 이 자리를 통해 감사의 마음을 전합니다.

끝으로 부족한 아들을 믿고 옆에서 지켜봐주신 부모님과 누나인 지현, 동생들인 지형, 정훈이에게도 말로 다 표현할 수 없는 고마움과 사랑의 마음을 전하며, 이 논문을 바칩니다. 감사합니다.