

鹿茸, 紅花子 단일 및 혼합 물 抽出物の 破骨細胞 分化 抑制와 骨吸收 抑制 效果

안지영*, 김주호*, 기지예*, 곽한복¹, 오재민¹, 김윤경*

*원광대학교 약학대학 한약학과 · 원광한약연구소, ¹원광대학교 의과대학 해부학교실 · 의과학 연구소

ABSTRACT

Inhibitory Effects of Water Extract of *Cervi parvum cornu*, *Carthami tinctorii fructus* and Their Combination on Osteoclast Differentiation and Bone Resorption

Ji-Young Ann*, Ju-Ho Kim*, Ji-Ye Ki*, Han-Bok Kwak¹, Jae-Min Oh¹, Yun-Kyung Kim*

*Dept. of Oriental Pharmacy, College of Pharmacy, Wonkwang Oriental Medicines Research Institute

¹Dept. of Anatomy, School of Medicine, and Wonkwang Medical Science Institute, Wonkwang University

Cervi parvum cornu (Deer Antler) and *Carthami tinctorii fructus* (Also known as Carthami seed) are widely used for treating osteoporosis and rheumatoid arthritis. In this study, We found out that the water extract of *Cervi parvum cornu*(WECPC), *Carthami tinctorii fructus*(WECTF) and their combination have effects of suppressing the RANKL-induced osteoclast differentiation. We assayed mRNA expression levels of NFATc1, c-Fos, TRAP and GAPDHS from bone marrow macrophages(BMMs) by means of RT-PCR. Similarly, the protein expression levels of NFATc1, c-Fos, MAPKs and β -actin in cell lysates were analyzed by means of Western

-
- 교신저자 : 김윤경
 - 전라북도 익산시 신용동 원광대학교 약학대학 한약학과
 - Tel : 063-850-6803 E-mail : hestia@wonkwang.ac.kr
 - 접수 : 2010/ 11/ 22 수정 : 2010/ 11/ 29 채택 : 2010/ 12/ 08

blotting. then we determined the anti-osteoporotic effects of WECPC, WECTF and their combination using Lipopolysaccharide (LPS)-induced bone-loss mouse. WECPC, WECTF and their combination showed remarkable inhibition on RANKL-treated osteoclast differentiation without cytotoxicity. WECPC suppressed degradation of I- κ B. WECPC, WECTF and their combination down-regulated the induction of c-Fos and NFATc1 by RANKL. Lastly, *in vivo* data showed that WECPC, WECTF and their combination rescued the bone erosion by LPS treatment. Thus, these results demonstrate that WECPC, WECTF and their combination can be efficacious remedies for bone-loss diseases such as osteoporosis and rheumatoid arthritis.

Key word : Cervi parvum cornu, Carthami tinctorii fructus, osteoclast differentiation, NFATc1, osteoporosis, RANKL

1. 緒 論

사회경제 수준의 향상과 과학의 발달은 평균 수명의 증가를 가져왔고 이에 따라 骨多孔症(Osteoporosis)이나 關節炎과 같은 骨疾患이 점차 주요한 의료 보건 문제로 부각되고 있다. 骨多孔症은 骨代謝의 불균형으로 인해 骨吸收가 骨形成보다 많아져서 骨無機質의 비율은 일정하게 유지되면서도 이것의 총량인 骨量(骨密度)이 감소하는 것이다^{1,2)}. 骨多孔症은 그 자체보다 이로 인해 발생하는 骨折이 더 큰 문제가 되며 骨折이 일어나기 전까지는 아무런 통증이나 이상 증세를 나타내지 않는 질환이다. 骨多孔症은 모든 연령에서 발생할 수 있고 특히 閉經후 여성에서 흔히 발생하는 1차성 骨多孔症에서 제 1형에 속하는 骨多孔症은 慢性痛症, 骨折, 憂鬱症을 동반한다. 특히 骨多孔症으로 인한 이차적 大腿骨 骨折의 경우 환자의 20%가 사망에 이르는 중대 질환으로 그 예방과 치료가 매우 중요하다³⁾.

오래 전부터 이러한 骨多孔症을 치료하기 위한

의약품이 사용되고 있지만 이에 따른 부작용이 많이 보고⁴⁻⁸⁾되고 있다. 최근 부작용을 줄이고 치료의 효과를 높이기 위해 천연물질을 이용한 연구가 계속되고 있는데 骨多孔症에 유효한 한약재의 연구와 개발은 좋은 대안이 될 것으로 생각된다. 韓醫學에는 骨多孔症과 同一한 病名은 없으나 전통 문헌에서 그것과 유사한 기록은 찾을 수 있다. 骨多孔症에 관한 韓醫學의 해석에는 언제나 腎의 개념이 동반된다. 黃帝內經⁹⁾에 “腎主骨”, “腎氣乃傷...高骨乃壞”라고 하여 骨을 담당하는 인체 기관이 腎이라는 의미로 骨과 腎이 밀접한 관계가 있음을 언급한 것이다. 韓醫學에서 腎臟은 五臟六腑에서 藏精, 主骨, 生骨髓를 담당하고 骨의 生長發育을 주관하는 器官으로 인식되고 있다¹⁰⁾. 前書에서 “腎氣熱則 腰脊不舉骨枯而髓減 發爲骨痿 腎生骨髓 在體爲骨, 腎氣熱而 精液竭 則髓減骨枯而發爲骨痿也”라 하여 骨多孔症의 原因, 發病, 症狀 등을 고려할 때 骨痿, 骨痺, 骨枯 등이 오늘날의 骨多孔症과 그 범위가 매우 유사하다고 할 수 있다. 따라서 腎虛를 치료하는 補益藥, 強筋骨藥 계

동의 韓藥에 대해 骨多孔症에 대한 효과를 찾는 연구가 많이 진행되고 있다.¹¹⁾

鹿茸은 腎虛를 치료하는 대표적인 補陽藥이다. 鹿茸(Cervi parvum cornu)은 鹿科(Cervidae)에 속하는 梅花鹿(Cervus nippon Temminck), 馬鹿(Cervus elaphus Linne) 또는 大鹿(Cervus canadensis Erxleben)의 숫사슴의 털이 밀생되고 아직 骨質化되지 않았거나 약간 骨質化된 어린 뿔을 자른 다음 말린 것이다¹²⁾. 鹿茸은 性味が 甘鹹溫無毒하고 肝腎經으로 歸經하며 壯元陽, 補氣血, 益精髓, 強筋骨의 효과가 있으며 虛勞羸瘦, 精神倦乏, 眩暈, 耳聾, 目暗, 腰膝酸軟, 陽痿, 滑精, 子宮虛冷, 崩漏帶下 등을 치료¹³⁾한다. 최근 骨多孔症을 韓醫學的 病理 현상인 腎虛로 辨證하는 것을 근거로 補陽藥이나 補腎藥으로 사용되어온 鹿茸에 대한 骨多孔症의 치료와 破骨細胞 分化에 미치는 영향을 연구한 논문이 몇 편 보고되었으며 그 가능성에 관심이 증대되고 있다. 鹿茸의 주요 성분은 colloids, glycolipid의 ganglioside, protein, phosphate, calcium, magnesium, estrone 등¹³⁻¹⁹⁾으로 밝혀졌고 이들의 약효, 약리작용에 관한 연구가 일부 보고²⁰⁻²⁷⁾되었다.

紅花子(Carthami tinctorii fructus)는 紅花의 종자이다. 紅花(Carthamus tinctorius L. Carthami flos)는 菊科(Compositae)에 속한 일년생 본초인 잇꽃(Carthamus tinctorius L.)의 花를 건조한 것이다. 紅花는 7~8월에 꽃잎이 黃色에서 紅色으로 변할 때 筒狀花를 따서 曬乾하거나 또는 陰乾한다. 紅花는 性味が 辛溫無毒하고 心肝經으로 歸經하며 活血通經, 散瘀止痛의 효과를 가지고 있으며 經閉, 痛經, 惡露不行, 癥瘕痞塊, 跌撲損傷, 瘡瘍腫毒을 치료한다¹³⁾. 紅花子は 우리나라에서 骨折 疾患의 民間藥으로 破骨, 骨折, 碎骨을 복구시키는 藥²⁸⁾으로 알려져 왔고 최근 그 사용이 더 늘어가는 추세이다. 紅花子の 性味는 辛微苦溫하고 活血行瘀, 消腫散結, 解毒, 解毒하는 효과를 지니고 있어 현재 임상에서는 經痛, 經閉, 產後瘀阻腹痛, 癥瘕, 損傷瘀腫, 瘡癰癤腫, 瘡毒不出, 痘出不快, 婦

女血氣瘀滯腹痛 등의 증상에 사용되고 있다²⁹⁻³⁰⁾. 최근 紅花子를 이용한 骨多孔症 치료제로의 효능 실험 연구가 많이 보고³¹⁻⁴²⁾되었다. 紅花子の 주요 성분은 linolic acid, oleic acid, palmitic acid 등의 油脂와 protein 등이다¹⁴⁾. 紅花(Carthamus tinctorius L.)는 꽃과 종자를 모두 약으로 쓰지만 전통적 방제에는 대부분 紅花를 이용하였고 紅花子는 주로 우리나라 민간에서 활용되었다.

이제까지 보고된 鹿茸이나 紅花子를 이용한 骨多孔症 치료와 예방에 관한 연구는 대부분 卵巢摘出로 骨多孔症을 유발한 마우스나 랫드를 이용한 것으로 in vivo에서 血清成分, 尿成分, 骨密度 등의 生化學的 指標 檢査를 통한 骨多孔症에 대한 효능을 실험한 것이 대부분이었다. 천연물 혹은 천연물에서 유래한 성분을 이용하여 세포 단위에서 RANKL(receptor activator of NFκB ligand)로 誘導된 破骨細胞의 分化를 단계별로 抑制하는 효과를 시험한 연구도 보고⁴³⁻⁴⁶⁾되었으나 아직 鹿茸, 紅花子の 물 抽出物이 세포 수준에서 破骨細胞의 分化를 억제하는 정도와 염증성 骨損失에 미치는 작용, 작용기전과 두 약물의 混合 물 抽出物의 相乘效果에 관해 보고한 논문은 아직 없었다. 따라서 이 연구는 鹿茸과 紅花子の 효과에 관한 과학적 근거를 밝히고 각각의 약물의 투여와 併用 投與가 어떤 효과를 가지는지 그 가능성을 확인하고자 실험을 진행하였다.

II. 實驗材料 및 方法

1. 材料 및 試藥

이 연구에 사용한 鹿茸(옴니허브, 뉴질랜드)과 紅花子(한국식물추출물은행, 한국생명공학연구원)를 각각 100 g에 정제수 1,000 mL를 넣고 Glas-Col (Terre Haute, IN, USA)社에서 구입한 Heating mantle를 이용하여 2시간 동안 40℃에서 減壓加熱하여 抽出하였다. 減壓濃縮機(Rotavapor R-124, Buchi,

Switzerland)로 농축한 후 凍結乾燥機(FDU-2100, EYELA, Japan)로 건조하여 최종적으로 파우더 형태로 각각의 약물을 얻었다. 鹿茸의 收得率은 3.0%, 紅花子の 收得率은 8.6%를 보였다. 멸균된 1× PBS에 녹인 후 0.20 μm 필터에 여과한 후 -20°C 저장고에서 보관하였다. Human RANKL과 Human M-CSF는 Peptrotech(London, UK)社의 것을, c-Fos와 NFATc1의 항체는 Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz, CA, USA)社의 것을 사용하였다. Phospho-ERK, ERK, phospho-p38, p38, phospho-JNK, JNK, I- κ B에 대한 항체는 Cell signaling Technology(Beverly, MA, USA)社의 제품을, XTT assay kit는 Roche(Indianapolis, IN, USA)社의 제품을, actin 항체와 TRAP solution, LPS(Lipopolysaccharide)는 Sigma Aldrich(St. Louis, MO, USA)社에서 구입하여 사용하였다. PVDF(polyvinylidene difluoride membrane) millipore(billerica, CA, USA)社의 제품을, ECL (enhanced chemiluminescence) 용액은 iTnRON(성남, 한국)社의 제품을 사용하였다.

2. 破骨細胞 培養 및 分化 抑制效果

5週齡의 수컷 ICR 마우스를 頸椎奪骨法으로 희생시킨 후 1× antibiotic을 첨가한 α -MEM(α -minimum essential medium)을 1cc 주사기에 충전하여 脛骨 및 大腿骨에서 骨髓를 채취하였다. 채취한 骨髓細胞에서 적혈구를 제거한 후 10% FBS(Fetal bovine serum)와 M-CSF(30 ng/mL)를 첨가한 α -MEM(α -minimum essential medium) 배지에서 3일간 배양하였다. 림프구를 포함하고 있는 浮游細胞는 제거하고 부착된 세포를 破骨前驅細胞

로써의 大食細胞(bone marrow macrophages, BMMs)로 사용하였다. 大食細胞를 3.5×10^4 /well의 밀도로 48-well plate에 分株하고 M-CSF(30 ng/mL)와 RANKL(50 ng/mL)을 첨가한 배지에 鹿茸 물 抽出物과 紅花子 물 抽出物을 각각 농도별로 처리하여 배양하였다. 3일후 배양액을 교환하고 4일째에 TRAP(tartrate-resistant acid phosphatase) 용액으로 염색하여 적자색의 TRAP 양성세포를 破骨細胞로 인정하였다. 염색된 破骨細胞에서 핵이 3개 이상인 세포의 개수를 통계에 이용하였다.

3. 鹿茸, 紅花子 물 抽出物의 毒性檢査

大食細胞를 1×10^4 /well의 밀도로 96-well plate에 分株하고 M-CSF(30 ng/mL)를 처리한 후 鹿茸 물 抽出物, 紅花子 물 抽出物을 농도별로 처리하여 3일간 배양하였다. 3일 후 각각의 well에 XTT 용액을 처리하고 4시간 동안 incubation한 다음 ELISA Reader로 450nm 흡광도에서 측정하였다.

4. RT-PCR 分析

세포내 전량의 RNA를 TRIzol 용액(Invitrogen, USA)을 이용하여 제조사의 매뉴얼에 따라 분리하였다. 분리한 RNA 중에서 1 μg 을 oligo dT primer, dNTP buffer, dithiothreitol, RNase inhibitor, Superscript II reverse transcriptase(Invitrogen)를 사용하여 cDNA로 합성하였다. 각 遺傳因자의 DNA 증폭을 위한 PCR(polymerase chain reaction) primer는 Table 1과 같다. PCR을 마친 후 增幅된 각 DNA를 1% agarose gel에 電氣泳動을 걸어 분리하고 ethylene bromide(Et-Br)로 염색한 후 U.V.에서 band를 확인하였다.

Table 1. Sequence of primer used in PCR amplification

Name	Sequence
c-Fos	forward 5'-CTGGTGCAGCCCCTCTGGTC-3'
	reverse 5'-CTTTCAGCAGATTGGCAATCTC-3'
NFATc1	forward 5'- CAACGCCCTGACCACCGATAG-3'
	reverse 5'-GGCTGCCTTCCGTCTCATAGT-3'
TRAP	forward 5'-ACTTCCCCAGCCCTTACTAC-3'
	reverse 5'-TCAGCACATAGCCCACACCG-3'
ID2	forward 5'-CGGGATCCACCATGAAAGCCTTCAGTCGGTG-3'
	reverse 5'-ATAAGAATGCGGCCGCTTAGCCACAGATACTTTGCT-3'
GAPDH	forward 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'
	reverse 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'

5. Western blot 分析

세포를 lysis buffer(50 mM tris-Cl, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100, 1 mM sodium fluoride, 1 mM sodium vanadate, 1% deoxycholate, and protease inhibitors) 로 용해하였다. 전체 세포 용해물을 遠心分離(14,000 rpm, 20 min) 하여 上層液을 얻었다. 표준 단백질량과 비교하여 단백을 定量化하였다. 그 후 30 µg의 단백을 10% SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)에서 電氣泳動으로 분리하고 PVDF 막으로 옮겼다. 5% skim milk를 처리하여 非特異 단백질이 부착되는 것을 방지한 후 단백 각 사이즈 별로 1차 항체를 처리하였다. 이어 horseradish peroxidase가 붙어있는 2차 항체를 처리하고 ECL(enhanced chemiluminescence) 용액으로 蛋白 發顯 정도를 측정하였다. PVDF 막으로 옮긴 이후의 각 과정 중간 단계마다 TBS-T 용액으로 세척하여 불순물을 제거하였다.

6. LPS 誘導 염증성 골손실 모델 實驗

생체 내의 骨損失에 미치는 鹿茸, 紅花子와 混合 물 抽出物の 效果를 연구하기 위해, 5週齡의 수컷 ICR 마우스 각 5마리씩을 각 군별로 배정하였다. 鹿茸 물 抽出物, 紅花子 물 抽出物, 混合 물

抽出物(마우스 g당 0.4mg 또는 0.2mg), 또는 PBS를 군별로 나누어 10일간 經口投與 하였다. 骨損失 誘發을 위해 實驗群에 LPS(마우스 g당 5µg)를 鹿茸 물 抽出物, 紅花子 물 抽出物 투여일로부터 3일과 6일에 2회에 걸쳐 腹腔注射하였고 對照群에는 PBS를 腹腔注射하여 實驗誤差를 제거하였다. 10일째 되는 날 마우스를 희생시키고 대퇴골을 취하여 4% paraformaldehyde로 고정하였다. Nano-CT인 NFR-Polaris-S160(Nano Focus Ray, 한국)을 이용하여 대퇴골 내부의 3차원적 영상을 얻었다.

7. 統計 分析

모든 실험은 3회 이상 반복 수행하였다. 그 가운데서 대표적인 결과를 사용하였다. 정량적인 결과는 평균 ± 표준편차로 나타내었다. 결과의 통계적인 유의성은 Student's unpaired *t-test*를 이용하여 분석하였고, *p*<0.05 인 경우를 통계적으로 유의한 것으로 인정하였다.

III. 結 果

1. 鹿茸, 紅花子 單一 抽出物の 效果

1) 鹿茸, 紅花子의 破骨細胞 分化 抑制效果
이 연구를 수행하기 전 骨多孔症에 效果가 있

다고 알려진 數種의 韓藥材를 시험적으로 스크린하여 우수한 효과를 보인 鹿茸과 紅花子를 선택하였다. 大食細胞에 M-CSF와 RANKL을 처리하고 4일간 배양하면 對照群 세포와 같이 핵이 3개 이상인 TRAP 양성 다핵형 破骨細胞로 分化되는데, 여기에 鹿茸 물 抽出物(Water extract of *Cervi parvum cornu*, WECPC)과 紅花子 물 抽出物(Water extract of *Carthami tinctorii fructus*, WECTF)을 투여하여 破骨前驅細胞에서 破骨細胞로의 分化를 억제하는 것을 확인하였다(Fig. 1A, 2A). 鹿茸과 紅花子 모두 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도부터 유의성이 있는 分化 抑制 效果를 관찰하였고, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 90% 이상 抑制되는 濃度依存的 抑制 效果를 확인하였다(Fig. 1B, 2B). 이 결과는 鹿茸 물 抽出物과 紅花子 물 抽出物이 RANKL에 의해 誘導되는 破骨細胞의 分化 과정을 직접적으로 抑制하고 있다는 것을 의미한다.

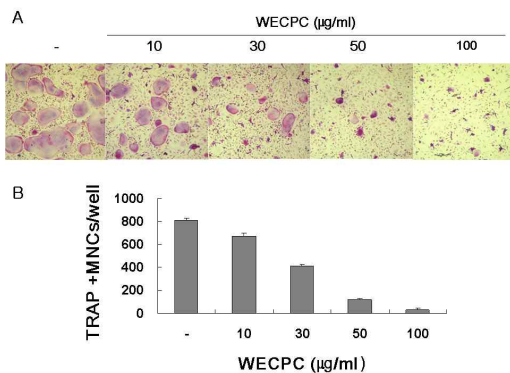


Fig. 1. Inhibitory effects of water extract of *Cervi parvum cornu*(WECPC) on osteoclastogenesis from BMMs induced by soluble RANKL.

A : BMMs were cultured with the indicated dose of water extract of *Cervi parvum cornu*(WECPC) in the presence of M-CSF(30 ng/mL) and RANKL(100 ng/mL) for 4 days. The cells were fixed and TRAP stained with WECPC inhibited osteoclast differentiation dose dependently.

B : TRAP-positive multinucleated cells were counted (TRAP-positive cells included three or more nuclei were counted as multinucleated osteoclasts). * $p < 0.05$, significantly different from the control.

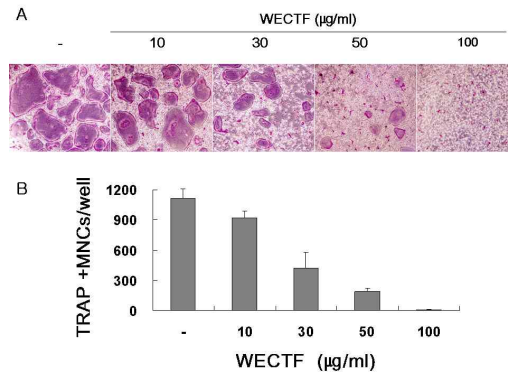


Fig. 2. Inhibitory effects of water extract of *Carthami tinctorii fructus*(WECTF) on osteoclastogenesis from BMMs induced by soluble RANKL.

A : BMMs were cultured with the indicated dose of water extract of *Carthami tinctorii fructus*(WECTF) in the presence of M-CSF(30 ng/mL) and RANKL(100 ng/mL) for 4 days. The cells were fixed and TRAP stained with WECTF inhibited osteoclast differentiation dose dependently.

B : TRAP-positive multinucleated cells were counted (TRAP-positive cells included three or more nuclei were counted as multinucleated osteoclasts). * $p < 0.05$, significantly different from the control.

2) 鹿茸, 紅花子の 細胞毒性 檢査

鹿茸, 紅花子 물 抽出物은 破骨前驅細胞에서 破骨細胞로의 分化에 有意性있는 抑制 效果를 나타냈다. 그러나 鹿茸, 紅花子 물 抽出物에 의한 破骨細胞 分化 抑制가 破骨前驅細胞에 대한 독성 때문인지 확인하기 위하여 XTT 檢사를 실시하여 M-CSF 단독 처리한 對照群과 鹿茸 물 抽出物과 紅花子 물 抽出物을 농도별로 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서부터 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 까지 농도를 높이면서 처리한 결과 鹿茸과 紅花子 모두 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 까지 大食細胞에 대한 毒性을 나타내지 않았다(Fig. 3). 따라서 이 결과를 통해 破骨細胞 分化 抑制효과는 破骨前驅細胞에 대한 鹿茸이나 紅花子 물 抽出物의 細胞毒性으로 인한 것이 아니라고 할 수 있다.

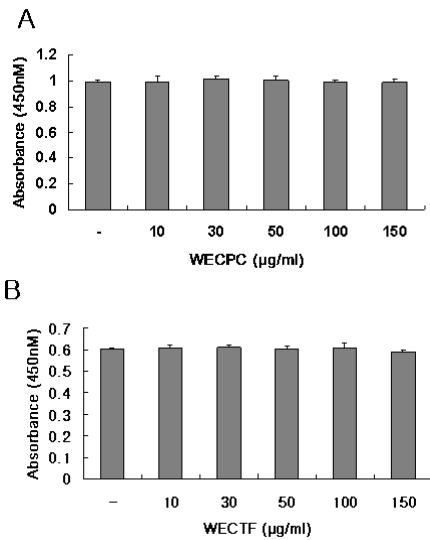


Fig. 3. Water extract of *Cervi parvum cornu* (WECPC) and *Carthami tinctorii fructus* (WECTF) showed no cell cytotoxicity.

BMMs were incubated for 3 d with the indicated concentrations of WECPC(A) or WECTF(B). XTT reagents were added to each well, and the cells were incubated for 6 h. The optical density at 450 nm was measured using an ELISA reader.

3) 鹿茸, 紅花子の RANKL에 의한 破骨細胞 誘導因子 抑制效果

RANKL 신호에 發顯되는 특정 유전자들은 破骨細胞의 分化를 조절하는 기능을 한다. 鹿茸 물 抽出物과 紅花子 물 抽出物이 破骨細胞의 分化와 밀접한 관련이 있는 誘導 因子에 어떤 效果를 나타내는지 확인하기 위하여 RANKL로 誘導되는 NFATc1, c-Fos, TRAP, ID2(Inhibitor of DNA binding 2)의 mRNA 發顯 정도를 RT-PCR 방법으로 검증하였다. 大食細胞에 M-CSF(20 ng/mL)와 RANKL(100 ng/mL)을 처리한 다음 각 군별로 鹿茸 물 抽出物, 紅花子 물 抽出物을 처리하거나 처리하지 않고 培養하여 배양된 세포를 시간별로 모았다. RANKL은 NFATc1, c-Fos, OSCAR mRNA의 發顯을 촉진하였지만 鹿茸 물 抽出物과 紅花子 물 抽出物에 의해 유의하게 抑制되었고,

TRAP의 發顯에는 유의한 차이가 없었다(Fig. 4, Fig. 5).

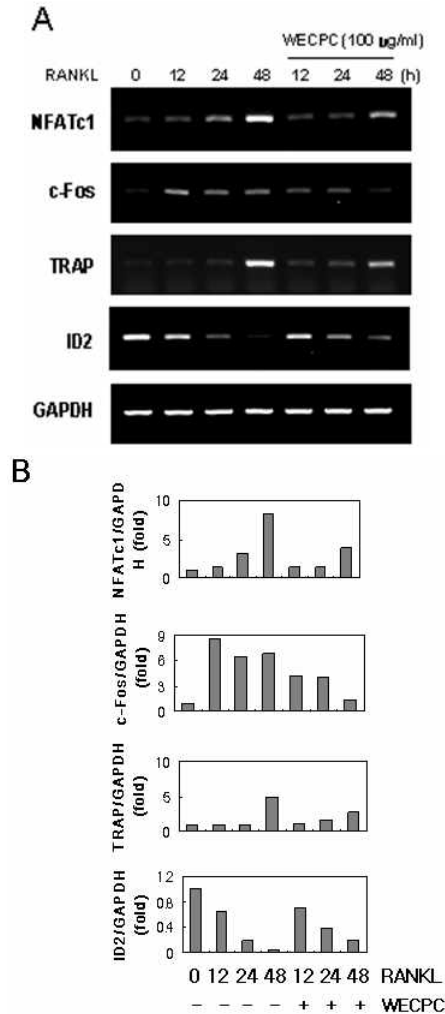


Fig. 4. Inhibitory effects of WECPC on RANKL-induced gene expression.

BMMs were cultured with M-CSF(20 ng/mL) and RANKL(100 ng/mL) in the presence or absence of WECPC(100 µg/mL) for the indicated time.

A : The mRNA expression levels of the genes were determined by RT-PCR.

B : Gene expression levels of each genes were measured by densitometric analysis.

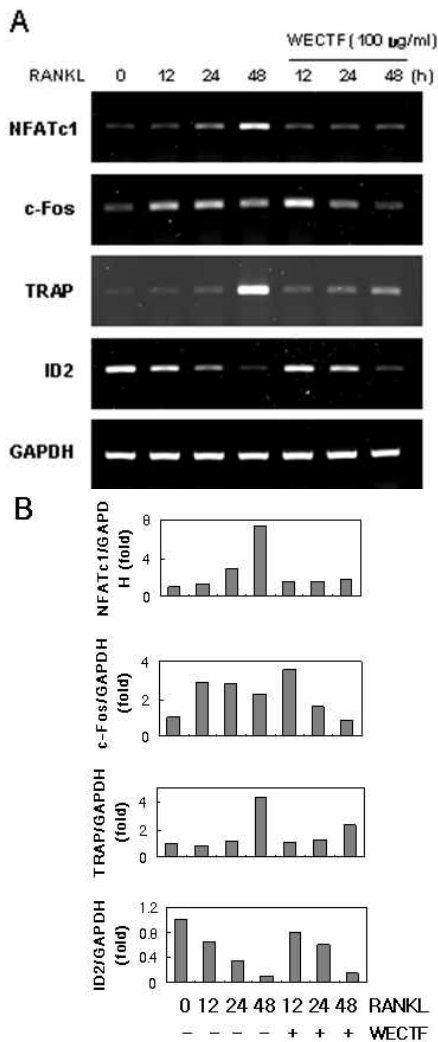


Fig. 5. Inhibitory effects of WECTF on RANKL-induced gene expression.

BMMs were cultured with M-CSF(20 ng/mL) and RANKL(100 ng/mL) in the presence or absence of WECTF(100 µg/mL) for the indicated time.

A : The mRNA expression levels of the genes were determined by RT-PCR.

B : Gene expression levels of each genes were measured by densitometric analysis.

4) RANKL에 의해誘導되는 NFATc1, c-Fos에 대한 鹿茸, 紅花子の 發顯 抑制 效果

NFATc1과 c-Fos는 破骨細胞의 分化에 가장 중

요하고 필수적인 요소이다. RANKL로 誘導되는 轉寫 因子인 NFATc1, c-Fos의 蛋白 發顯이 鹿茸 物 抽出物과 紅花子 物 抽出物에 의해 抑制되는 것을 Western blot 방법으로 확인하였다. M-CSF와 RANKL을 처리한 對照群의 NFATc1과 c-Fos의 단백질이 時間依存的으로 發顯되는 것에 비해 鹿茸, 紅花子를 각각 처리한 實驗群에서는 단백질 發顯이 현저히 감소되는 것을 확인하였다(Fig. 6).

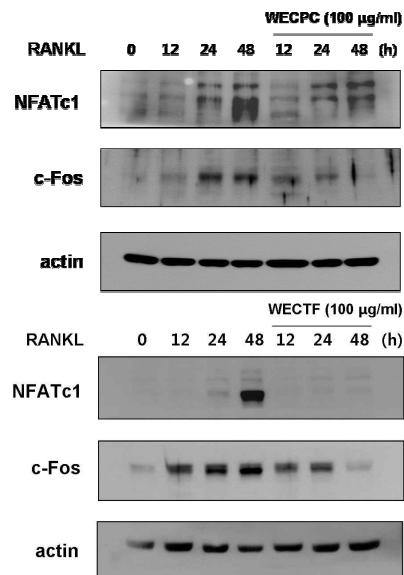


Fig. 6. WECTF and WECTF inhibited protein expression levels of NFATc1 and c-Fos induced by RANKL.

BMMs were pretreated in the presence or absence of WECTF or WECTF(100 µg/mL) for 1 h. and then stimulated with RANKL(100 ng/mL) for the time. Cell lysates were prepared and analyzed by Western blotting with NFATc1, c-Fos, and actin antibodies.

6) RANKL에 의해 誘導되는 MAPKs와 IκB에 미치는 鹿茸, 紅花子の 影響

鹿茸 物 抽出物이 RANKL로 유도되는 여러 가지 MAPKs(Mitogen-activated protein kinases)에 미치는 영향을 western blot 방법으로 검증하였다. 그 결과 鹿茸 物 抽出物은 p38, JNK, AKT의 磷

酸化를 억제하였으나 I-κB에는 영향을 주지 않았다(Fig. 7A). 紅花子 물 抽出物도 같은 방법으로 RANKL로 誘導되는 MAPKs인 p38, ERK, JNK와 I-κB에 미치는 영향을 검증하였다. 그 결과, 紅花子 물 抽出物은 MAPKs인 p38, ERK, JNK의 활성화에는 영향을 주지 않았고, I-κB에만 선택적으로 작용하였다(Fig. 7B).

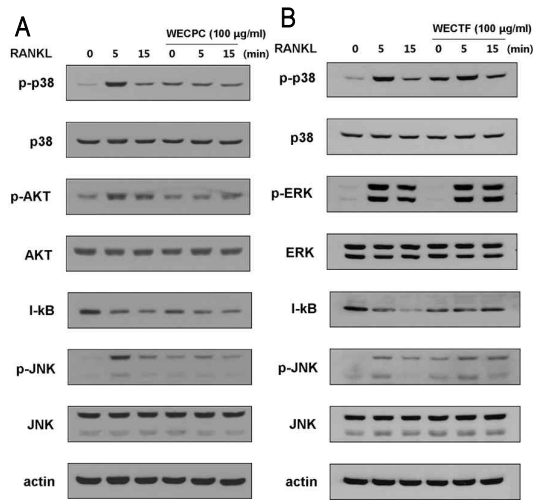


Fig. 7. WECPC decreased the activation of p38, JNK, AKT by RANKL and WECTF decreased the degradation of I-κB by RANKL.

BMMs were serum-starved for 3 h, pretreated with or without WECPC(100 µg/mL) or WECTF(100 µg/mL) for 1h. and treated with RANKL(100 ng/mL) for the time. Cell lysates were subjected to Western blotting with antibody to specific for phosphorylated p38, ERK, JNK and I-κB.

2. 鹿茸, 紅花子 단일 및 혼합 물 抽出物の 效果

1) 鹿茸, 紅花子 단일 및 혼합 물 抽出物の RANKL 誘導 轉寫因子 抑制 效果

RANKL에 의해 誘導되는 NFATc1과 c-Fos의 蛋白 發顯에 紅花子 30 µg/mL, 鹿茸 30 µg/mL, 紅花子 15 µg/mL + 鹿茸 15 µg/mL, 紅花子 30 µg/mL + 鹿茸 30 µg/mL 를 처리했을 때의 效果

를 western blot 방법으로 검증하였다. 그 결과 對照群은 時間依存的으로 c-Fos와 NFATc1 蛋白 發顯이 증가하였지만 鹿茸, 紅花子 抽出物과 混合 물 抽出物을 같이 처리한 實驗群의 NFATc1과 c-Fos 蛋白 發顯은 對照群에 비하여 감소되었다. 특히 鹿茸과 紅花子를 단독으로 30 µg/mL를 투여한 것보다 鹿茸과 紅花子를 각 15 µg/mL 씩 併用 投與한 군에서 더 큰 억제 效果를 나타냈고 鹿茸과 紅花子를 각 30 µg/mL씩 併用 投與한 群은 15 µg/mL 씩 併用 投與한 군과 비교할 때 濃度依存的으로 有意性있는 抑制 效果를 나타냈다(Fig. 8).

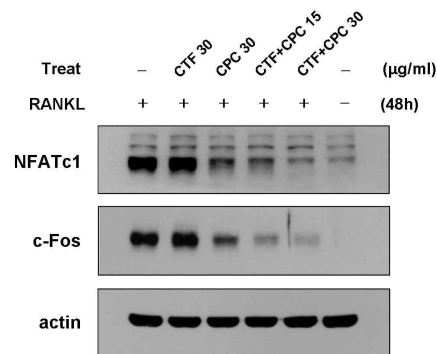


Fig. 8. Water extract of *Carthami tinctorii fructus* (WECTF), water extract of *Cervi parvum cornu*(WECPC) and their combination decreased the activation of NFATc1 and c-Fos by RANKL.

BMMs were serum-starved for 3 h, pretreated with or without CTF(30 µg/mL), CPC(30 µg/mL), CTF+CPC (15 µg/mL each), CTF+CPC(30 µg/mL each) for 1 h and treated with RANKL(100 ng/mL) for the time. Cell lysates were subjected to Western blotting with antibody to specific for phosphorylated NFATc1 and c-Fos.

2) 鹿茸, 紅花子 단일 및 혼합 물 抽出物の LPS-誘導 炎症성 골손실 모델에 대한 效果

鹿茸, 紅花子와 混合 물 抽出物이 생체 내 骨組織에 미치는 영향을 검증하고자 炎症성 骨損失 동물모델을 사용하여 마우스는 각 군별로 5마리씩을 배정하고 각각의 마우스에 LPS를 腹腔注射하여

骨損失을 유발시켰다. 鹿茸, 紅花子の 單一 물 抽出物과 混合 물 抽出物을 각 군별로 나누어 經口 投與하여 LPS에 의한 骨損失에 미치는 效果를 확인한 결과 LPS만 단독 처리한 對照群의 경우 小柱骨(trabecular bone)의 骨損失을 뚜렷하게 확인할 수 있었다. 반면에 鹿茸, 紅花子 물 抽出物과 混合 물 抽出物을 투여한 實驗群에서는 LPS에 의한 骨損失이 抑制되었음을 확인하였다. 鹿茸과 紅花子를 단독으로 200 mg/kg을 투여한 것보다 鹿茸과 紅花子를 각 100 mg/kg 씩을 混合하여 併用 投與한 군에서 骨損失을 억제하는 것이 단독으로 200 mg/kg을 투여한 것보다 效果가 있었고, 鹿茸과 紅花子를 각각 200mg/kg 씩 併用投與한 군은 100 mg/kg 씩을 併用投與한 군과 比較할 때 濃度 依存的으로 有意성 있는 抑制效果를 나타냈다(Fig. 9). 이 결과로 鹿茸, 紅花子の 單一 물 抽出物과 混合 물 抽出物은 生體 內 條件에서도 炎症성 骨損失을 抑制한다는 사실을 확인할 수 있었다. 특히 鹿茸, 紅花子の 混合 물 抽出物을 투여한 경우 같은 농도의 단일 투여군보다 월등한 效果를 나타내었다.

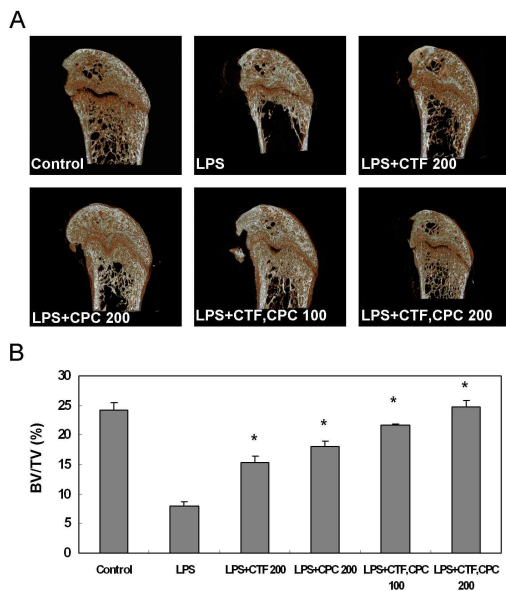


Fig. 9. WECPC, WECTF and their combination

rescued bone-loss by LPS-induction in mice.

Mice were oral-treated with CTF(200 mg/kg/day), CPC(200 mg/kg/day), CTF+CPC(100 mg/kg/day each), CTF+CPC(200 mg/kg/day each) or PBS for 10 days. LPS(5 μ g/g of body weight) or PBS was administered intraperitoneally on days 4 and 7, and the femurs were collected on days 10 after the first treatment of CPC, CTF and their combination.

A : Radiographs were taken with a nano CT.

B : CT data were measured by Bone volume/Tissue volume.

* $P < 0.05$, significantly different from the control.

IV. 考 察

骨에서는 骨質에서 만들어지는 破骨細胞(osteoclast)와 造骨細胞(osteoblast)가 骨再形成(bone remodeling)을 함으로써 오래된 골은 파괴되고 새로운 골이 그 자리를 대체하는 일이 끊임없이 반복된다. 이 과정에서 破骨細胞의 骨吸收 양과 造骨細胞의 骨形成 양이 완벽하게 일치하지 않고 미세한 骨損失이 일어나고 이러한 骨損失이 누적되어 단위 용적 내에 骨密度가 감소하면서 骨多孔症이 발생한다⁴⁷⁾. 骨多孔症이 일어나는 작용기전은 아직 확실치 않으나 閉經 후 骨多孔症의 경우는 난소에서 에스트로겐의 분비가 감소할 때 破骨細胞에 의한 骨吸收의 증가가 그 원인일 것으로 추측하고 있다⁴⁸⁾.

骨多孔症의 치료에 사용되는 치료제는 骨吸收 抑制劑와 骨의 形成을 자극하는 骨形成 促進劑의 두 가지 종류의 약물이 사용되고 있다. 骨吸收 抑制劑는 내과적 치료제로 破骨細胞에 작용하여 骨吸收를 억제하며 estrogen, bisphosphonate, SERM (selective estrogen receptor modulator), calcitonin, tibolone 등이 있다^{1,3)}. 이들 제제에서 bisphosphonate는 복용 중에 惡心, 腹痛, 속쓰림 등의 다양한 부작용들이 동반되고, 저칼슘혈증이나 食道疾患, 腎疾患이 있는 사람은 주의하여 투약해야 하고 이 약을 복용하는 중에는 避妊을 해야 하는 등의 단점이 있다. SERM의 경우는 血栓塞栓症의 과거력이 있

는 여성에게는 사용할 수 없고 warfarin, diazepam, diazoxide, lidocaine 등의 약물에는拮抗劑로 작용하기 때문에 투여에 신중을 기해야 한다^{3,6,7}. Tibolone은 1960년대에 骨多孔症 치료 목적으로 개발되기 시작한 합성 스테로이드로 호르몬 치료의 대체제로 사용되어 왔으며 선택적 조직 에스트로겐 작용 조절제(selective tissue estrogenic activity regulator: STEAR)로 분류된다³. 이 제제를 사용한 여성 환자 중에서 子宮 內膜炎이 발생하였다는 보고⁸가 있으므로 膾出血이 있으면 子宮內膜 生檢을 하면서 사용에 주의해야 한다.

현재까지 사용되는 骨多孔症 치료는 骨密度를 높이기 위해 骨吸收를 억제하는 방법이 대부분이었는데 최근에는 골 구조에 대한 동화 작용의 효과가 있는 치료제로 骨形成 促進劑들이 소개되고 있다. 이들은 骨形成을 자극하는 제제로 造骨細胞에 작용하여 骨形成을 촉진한다. 대표적으로 Sodium fluoride, 부갑상선호르몬(PTH) 등이 있다. Sodium fluoride는 骨多孔症 환자에게 사용된 최초의 동화 작용 제제로 직접적으로 造骨細胞의 증식을 자극하고 骨成長을 촉진하는 작용을 한다. 그러나 sodium fluoride는 骨多孔症 치료제로 아직 미국 FDA에서 승인되지 않았고 골밀도를 증가시키나 골절 발생률에 대한 효과는 아직 논란이 있는 등의 문제점이 있어 표준 치료제가 아니다. 부갑상선호르몬(PTH)은 칼슘 항상성 유지에 아주 중요한 호르몬이다. 부갑상선호르몬(PTH)은 2002년 12월 미국 FDA의 승인을 받았으나 惡心, 頭痛, 眩氣症, 下肢痙攣 등으로 인해 투약을 중단하는 경우가 약 6% 정도 있으며 고칼슘혈증이나 부갑상선 기능항진증 과거력이 있는 환자에게도 투여해서는 안된다³.

이러한 단점 혹은 부작용을 보완할 수 있는 새로운 치료제가 계속 연구되고 있으며 그 대안으로 천연물이 부각되고 있다. 식물성 에스트로겐(phytoestrogen)에 대한 연구도 그 일환이며 이것은 식물의 non-steroidal compounds로서 구조적, 기능적으로 에스

트로젠과 유사하고 에스트로겐 수용체에 대하여 에스트로겐과 경쟁적으로 결합하여 SERM과 같은 효과를 나타내는 물질이다¹. 식물에 있는 대부분의 식물성 에스트로겐은 inactive compound의 상태로 들어 있으며 섭취 후 장내의 복잡한 효소에 의하여 에스트로겐과 유사한 작용을 하는 물질로 변환한다. 콩, 석류, 升麻, 甘草 등의 성분인 isoflavone, genistein, daidzein 등이 많이 연구되고 있다^{5,49,50}. 그러나 식물성 에스트로겐의 연구는 일관성이 없고 결과도 다양하게 나타나는 한계가 있다. 그 이유는 천연물 유래의 성분에 subtype이 매우 많으며 체내에서의 biotransformation, tissue specification, indivisual metabolism의 차이와 농도에 따라 작용 기전이 달라지는 등의 문제가 있다¹. 앞으로 더 많은 연구가 필요한 분야이다.

다양한 한약을 이용하여 骨多孔症에 대한 효과를 연구한 논문들¹¹도 많이 있다. 대부분 마우스나 랫드를 이용하여 난소적출로 骨多孔症을 유발한 모델을 사용하여 실험을 진행하였다. 난소를 적출한 동물 모델에서는 모두 骨多孔症이 발생하는 것으로 보아 여성호르몬의 결핍과 骨多孔症이 밀접한 관계가 있는 것으로 思料되며 여성 생식기의 기능이 쇠퇴하는 폐경기 여성 骨多孔症과 유사한 모델로 볼 수 있을 것이다^{51,52}.

鹿茸에 관한 최근 연구에는 골다공증에 대한 효과, 성분에 대한 연구^{15,18,19}, 랫드의 비만과 지방 대사 및 혈액 성분에 미치는 영향^{20,21,24}, 노화억제 효과^{23,25}, in vitro 생리활성 효과²¹, 골 성장에 미치는 영향^{22,26}, 혈압, 혈당에 미치는 영향²⁷, 파골 세포에 대한 효과⁴³에 관한 것이 있고, 紅花子에 대한 연구로는 骨多孔症과 같은 骨疾患에 대한 효과를 연구한 것^{31,32,38-42}, 毒物質에 의한 損傷 臟器에 대한 보호 작용을 연구한 것^{33,34}, 기타 消炎, 鎮痛 작용에 관한 연구³⁵가 있었다. 이들 鹿茸과 紅花子에 관한 기존 논문 중에서 특히 骨多孔症과 관련하여 진행된 연구는 주로 卵巢摘出 동물모델을 이용한 생체실험으로 骨多孔症의 生化學的 指

標의 변화 결과만을 도출하였고 구체적인 骨多孔症에 대해 약효를 발휘하는 작용기전을 밝히지 못한 한계가 있었다.

현재까지 造骨細胞와 破骨細胞의 生成, 分化와 기능에 관여하는 調節 因子들과 이들의 신호 전달 경로에 대해 상당한 부분이 규명되었지만 아직도 骨吸收와 骨形成의 양을 결정하는 모든 因子가 밝혀지지 않았다. 破骨細胞는 골을 흡수하는 유일한 세포로 造血母細胞에서 유래되어 前驅細胞인 大食細胞가 破骨細胞 分化에 중요한 역할을 하는 사이토카인인 M-CSF와 RANKL에 의해 TRAP 양성 다핵성 세포로 分化된다. RANKL이 수용체인 破骨細胞 막의 RANK와 결합하면 破骨細胞의 형성에 중요한 세포내 여러 가지 신호 전달 물질을 활성화시키는데⁵³⁾ 특히 중요한 調節 因子의 하나인 TRAF-6(TNF α receptor-associated factor-6)는 MAPKs, NFATc1, NF κ B의 활성화를 통해 破骨細胞의 分化를 촉진한다^{51,54-56)}. 鹿茸과 紅花子 물 抽出物은 破骨細胞로 分化하기 이전 단계인 破骨前驅細胞 단계에서 濃度依存的으로 分化를 억제하며 破骨細胞 分化에 직접적인 영향을 미치고 있다는 것을 실험을 통해 확인할 수 있었다. NFATc1과 c-Fos는 TRAP, DC-STAMP, OSCAR 등 破骨細胞의 分化에 중요한 蛋白 發顯을 조절한다⁵³⁻⁵⁵⁾. 鹿茸과 紅花子 물 抽出物로 처리하였을 때 RANKL 신호 전달 과정에서 M-CSF와 RANKL로 처리한 대식세포의 破骨細胞 誘導 因子인 NFATc1과 c-Fos의 蛋白 發顯이 현저히 감소되는 것을 알 수 있었다. 특히 鹿茸 물 抽出物은 RANKL로 유도되는 다양한 MAPKs인 p38, JNK, AKT의 磷酸化를 억제하였고, 紅花子 물 抽出物은 NFATc1 상위단계의 調節因子인 NF- κ B의 활성을 억제하는 구체적인 경로도 확인할 수 있었다. TRAF-6에 의해 유도되는 NF- κ B와 MAPKs의 활성이 紅花子和 鹿茸의 藥理作用에 의해 차단되고 또 紅花子, 鹿茸 각각의 抽出物이 차단하는 破骨細胞에 分化에 대한 신호 전달 경로가 독립적이므로 두 약물을

併用投與했을 때 그 약효가 相乘하게 되는 것으로 생각된다. 이 실험을 통해 鹿茸, 紅花子 抽出物이 RANKL 신호 전달 과정의 한 단계를 차단함으로써 破骨細胞 형성을 抑制한다는 것을 확인하였다.

鹿茸과 紅花子の in vivo 실험에서는 LPS로 염증을 유발한 마우스를 사용하여 骨損失에 대한 효과를 실험하여 유의할만한 결과를 얻었다. LPS에 의해 破骨細胞의 分化를 촉진하는 정확한 작용기전은 밝혀지지 않았지만 LPS의 破骨細胞 분화 촉진은 LPS가 破骨前驅細胞에서 MMP-9을, 造骨細胞에서 SDF-1 α 의 發顯을 증가시켜 破骨前驅細胞의 이동을 촉진시키기 때문으로 추측⁵⁷⁾하고 있다. LPS로 誘導된 骨 破壞 모델에서의 紅花子 약침액이 LPS로 유발한 관절염에 대한 骨多孔症의 효능 연구가 보고^{36,37)}되었으나, 鹿茸, 紅花子和 두 약물의 混合 물 抽出物의 효과를 연구한 보고는 없었다.

이번 연구에서 LPS로 骨損失을 유발한 마우스에 鹿茸, 紅花子 그리고 이들의 混合 물 抽出物을 투여한 결과 鹿茸과 紅花子 각각의 단일 抽出物을 200 mg을 투여한 경우에도 骨損失을 일정 정도 복원하였으나 각각의 용량을 100mg씩으로 한 混合 抽出物을 투여했을 경우 骨損失의 복원이 단일 抽出物을 200 mg을 투여한 경우보다 유의성있게 증가하였고 鹿茸과 紅花子の 용량을 200 mg씩으로 併用投與한 경우 骨損失을 거의 완벽하게 차단하였다. 앞으로 더 많은 연구가 뒤따라야 하겠지만 이 실험의 결과는 LPS를 투여하여 骨多孔症을 유발하는 경우 骨多孔症과 관련하여 증가하는 염증성 사이토카인이나 PGE₂ 같은 염증 물질을 鹿茸과 紅花子の 併用投與가 抑制할 가능성이 있음을 시사하는 것이다. 그동안 鹿茸과 紅花子是 임상에서 많이 사용되었고 한약으로서의 그 효과는 명백히 알려져 있으나 骨多孔症을 예방하고 치료하는 작용기전에 대해서는 아직도 밝혀지지 않은 부분이 있었다. 이번 연구를 통해 전형적인 RANKL \rightarrow TRAF-6 \rightarrow c-Fos \rightarrow NFATc1 경로를 통한 破

骨細胞의 分化 과정에서 鹿茸과 紅花子が 細胞毒性 없이 分化를 직접적으로 抑制하며, 생체의 骨損失 모델에서 鹿茸과 紅花子が 骨損失을 抑制하는 결과를 얻었다. 이를 통해 骨多孔症을 포함한 파골세포와 관련된 骨疾患에 새로운 치료제 연구와 개발로 이어질 수 있을 것으로 思料된다.

V. 結 論

鹿茸과 紅花子 물 抽出물을 이용하여 破骨細胞 分化 抑制 실험과 骨吸收 抑制 效果에 대해 LPS로 염증성 骨損失을 유도한 마우스 동물실험을 수행한 결과는 다음과 같다.

1. 鹿茸과 紅花子是 세포독성없이 破骨前驅細胞에서 破骨細胞로의 分化를 濃度依存的으로 抑制하였다.
2. RANKL 신호에 發顯되면서 破骨細胞의 分化를 조절하는 기능을 하는 특정 유전자에 대한 效果를 확인한 결과, NFATc1, c-Fos의 유전자 發顯은 鹿茸과 紅花子 모두에서 유의하게 抑制되었다. RANKL로 誘導되는 NFATc1, c-Fos의 蛋白 發顯은 鹿茸, 紅花子 물 抽出물을 투여한 實驗群에서 대조군에 비하여 감소되었고 특히 併用投與한 實驗群은 濃度依存的으로 유의성있는 抑制 效果를 나타냈다.
3. 鹿茸 물 抽出물은 RANKL로 유도되는 MAPKs인 p38, JNK, AKT의 磷酸化를 억제하였고 I-κB의 활성에는 영향을 주지 않았다. 紅花子 물 抽出물은 NF-κB의 활성을 조절하는 I-κB의 활성만을 선택적으로 抑制하였다. 紅花子, 鹿茸 각각의 抽出물이 차단하는 破骨細胞에 分化에 대한 신호 전달 경로가 독립적이므로 두 약물의 併用投與는 단일투여에 비해 破骨細胞 分化 억제에 더 큰 效果를 나타내는 것으로 보인다.
4. 鹿茸, 紅花子와 두 약물의 混合 물 抽出물을 투

여하여 생체내 骨 組織에 미치는 影響을 확인한 결과 LPS에 의해 骨損失을 유발한 마우스에서 鹿茸 물 抽出物, 紅花子 물 抽出物과 두 약물의 混合 물 抽出物을 併用投與한 實驗群에서는 骨損失이 抑制되었다. 특히 鹿茸과 紅花子の 併用投與는 단일 약물의 투여에 비해 骨損失에 대한 탁월한 회복을 보여주었다.

이러한 결과로 볼 때, 鹿茸과 紅花子 배합 약물은 파골세포와 관련된 骨損失 질환에 效果적인 치료제로 개발될 수 있다고 思料된다.

감사의 말씀

이 논문은 2008년도 원광대학교 교비연구비에 의하여 수행되었으므로 이에 감사드립니다.

參考文獻

1. 대한골대사학회. 骨多孔症. 서울:한미의학. 2006 ;51:343-8.
2. 이기행. 骨多孔症의 진단. 대한고관절학회지. 2007 ;19(3):260-5.
3. 윤상호, 김정구. 폐경후 骨多孔症의 최신 치료. 대한산부회지. 2005;48(4):844-56.
4. Colditz GA, Hankinson SE, Hunter DJ, Willett WC, Manson JE, Stampfer MJ, Hennekens C, Rosner B, Speizer FE. The use of estrogens and progestins and the risk of breast cancer in postmenopausal women. *New Eng J Med.* 1995 ;332:1589-93.
5. 이병익, 고승권, 황성욱, 박지현, 김종화. 폐경기증상 치료에서 升麻抽出物과 호르몬 보충요법의 비교연구. 대한산부회지. 2002;45(8):1330-5.
6. Bhavnani BR, Strickler RC. Menopausal hormone therapy. *J. Obstet Gynaecol Can.* 2005;27(2)

- :137-62.
7. Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine. Estrogen and progesterone therapy in postmenopausal women. *Fertil Steril.* 2008;90(5 Suppl):S88-102.
 8. Yazigi R. etc. Carcinoma of the endometrium in patients treated with tibolone. *Gynecol Oncol.* 2004;93:568-70.
 9. 양유걸. 黃帝內經素問譯解. 서울:성보사. 1980;6, 52, 89, 90, 140, 210, 269, 337-40.
 10. 金完熙, 崔達永. 臟腑辨證論治. 서울:성보사. 1996:286-93.
 11. 안지영, 기지예, 김주호, 박혜정, 김현주, 이정호, 김윤경. 국내학술지에 발표된 한약추출물의 골다공증에 대한 효능실험 결과 고찰. 대한한의학회지. 2008;16(2):75-97.
 12. 식품의약품안전청. 대한약전의한약규격집. 서울:동원문화사. 2002:103.
 13. 전국한의과대학본초학교수. 본초학. 서울:영림사. 1998;424-425,545-546.
 14. 김창민 외. 中藥大辭典. 서울:정담. 1998:794-9.
 15. Hong ND, Won DH, Kim NJ, Chang SY, Youn WG, Kim HS. Studies on the analysis of constituents of deer horn(I). *Korean J. Pharmacogn.* 1991;22:171-82.
 16. Han NY and Jhon GJ. Purification and analysis gangliosides from deer antler. *Korean Biochem. J.* 1994;27:459-65.
 17. Sunwoo HH, Nakano T., Hudson RJ. and Sim JS. Isolation characterization and localization of glycosaminoglycans in growing antlers of wapiti (*Cervus elaphus*). *J. Agric Food Chem.* 1995;43:2846-9.
 18. 김혜영, 류미라. 국내산 鹿茸(*Cervi parvum Cornu*)의 부위별 무기질 조성. *한국식품과학회지.* 2000;32(1):31-6.
 19. 이부용, 이옥환, 최현선. 국내산 鹿茸의 부위별 식품학적 성분 분석. *한국식품과학회지.* 2003;35(1):52-6.
 20. 최향순, 김혜인, 조성구. 수용성 鹿茸 抽出물이 랫드의 지방대사 및 혈액성분에 미치는 영향. *한국동물자원과학회지.* 2008;50(3):417-28.
 21. 이경애, 정혜영. In vitro에 의한 鹿茸 抽出물의 생리활성 효과. *한국식품영양학회지.* 2007;20(2):114-9.
 22. 장수정, 전호남, 윤승섭, 이임식, 이연숙. 鹿茸 抽出물이 성장기 흰쥐의 혈중 IGF-1 농도, 골격성장 및 비장세포 증식능에 미치는 영향. *한국영양학회지.* 2006;39(3):225-35.
 23. 김정숙 김연태. 노화 촉진 생쥐에서 鹿茸의 조혈 작용에 관한 연구. *생약학회지.* 1996;27(4):371-7.
 24. 전찬일, 이진용, 김덕곤. 鹿茸이 흰쥐의 비만 억제에 미치는 영향. *대한한약회지.* 2005;26(1):148-60.
 25. 이수영, 안택원. 鹿茸대보탕의 노화억제 효과에 대한 실험적 연구. *한의학논문집.* 2007;16(2):327-48.
 26. 김기태 김명규 임강현. 鹿茸과 녹각의 성장기 흰쥐 장골 길이 성장에 대한 효과. *대한본초학회지.* 2006;21(1):63-9.
 27. 김혜영, 전은재, 박유경, 강명희. 당뇨환자에 있어서 鹿茸추출물의 섭취가 혈압, 혈당 및 임파구 DNA 손상에 미치는 영향. *한국영양학회지.* 2004;37(9):794-800.
 28. 김일훈. 神藥. 서울;광제원. 1994:83-4.
 29. 張貴君, 常用中藥鑑定大全. 中國:黑龍江科學技術出版社. 1993:383-4.
 30. 徐富一 外. 韓藥臨床要訣. 慶山大學校出版社. 2000:165.
 31. Alam MR, Kim SM, Lee JI, Chon SK, Choi SJ, Choi IH, Kim NS. Effects of Safflower Seed Oil in Osteoporosis Induced-Ovariectomized Rats. *The American Journal of Chinese Medicine.*

- 2006;34(4):601-12.
32. Alam MR, Kim SM, Lee JI, Chon SK, Choi SJ, Choi IH, Kim NS. Effects of Safflower Seeds on the Serum Levels of Insulin-like Growth Factors, Insulin-like Growth Factor Binding Protein-3 and BASP in Osteoporosis Induced-ovariectomized Rats. *J Wet Clin.* 2003;20(3):263-73.
 33. 정기화, 정춘식, 정정숙. 紅花子 분획물이 사염화탄소 유발 간손상 흰쥐에서 지질과산화와 oxygen free radical 제거 효소 활성도에 미치는 영향. *한국식품위생안전성학회지*, 1999;14(2):179-85.
 34. 정기화, 정춘식, 정정숙. 사염화탄소로 유발된 간손상에서의 효소 활성도의 변화로 본 紅花子 분획물의 간손상 보호 작용. *한국식품위생안전성학회지*. 1999;14(2):172-8.
 35. 서부일, 이은숙, 박지하, 김상찬, 변부형, 최호영. 한국산 紅花子와 중국산 紅花子가 진통, 소염 및 관절염에 미치는 효과. *대한본초학회지*. 2001;16(1):1-10.
 36. 임대정, 조재용, 정웅채, 박인식, 김갑성, 김경호. 紅花子약침의 항염증능이 백서의 LPS로 유발된 류마티스성 관절염에 미치는 영향. *대한침구학회지*. 2008;25(3):95-106.
 37. 박원, 김경호, 이창환, 이동건, 이현진, 황지혜, 김갑성. 紅花子약침의 윤행관절막내에서의 MIF 활성 억제를 통한 LPS 유발 관절염의 치료 효과. *대한침구학회지*. 2007;24(4):157-66.
 38. 강동휘, 김철호. Effects of Honghwain-Jahage extracts on cytokines-induced production of nitric oxide synthases and nitric oxide in mouse calvarial osteoblasts. *대한부인과학회지*. 2003;16(3):1-16.
 39. 주병주. 홍화씨가 난소적출 흰쥐의 골대사에 관련된 Hormone과 Cytokine에 미치는 영향. *대한부인과학회지*. 2002;15(2):41-55.
 40. 송해룡, 라도경, 김종수, 정태성, 김용환, 강호조, 강정부, 연성찬, 김은희, 이후장, 신기욱, 박미림, 김곤섭. 홍화씨가 신생골 형성에 미치는 영향. *한국임상수의학회지*. 2002;19(1):66-72.
 41. 배기환, 이용무, 신승윤, 정종평, 구영. 후박 및 홍화종자 추출 혼합물이 치주인대세포 및 골아세포의 활성도 및 백서의 두개골 재생에 미치는 영향. *대한치주과학회지*. 1998;28(4):545-59.
 42. 윤동환, 이승철, 김명은, 김은철, 유형근, 김윤철, 신형식. 홍화씨 추출물이 조골모유사세포 활성 및 골재생에 미치는 영향. *대한치주과학회지*. 1998;28(4):769-86.
 43. 광한복, 김주호, 김동주, 권영미, 오재민, 김윤경. Effect of Water Extract of Deer Antler in Osteoclast Differentiation. *Korean J. Oriental Physiology & Pathology*. 2008;22(4):891-5.
 44. Kwak HB, Yang D, Ha H, Lee JH, Kim HN, Woo ER, Lee S, Kim HH, Lee ZH. Tanshinone II A inhibits osteoclast differentiation through down-regulation of c-Fos and NFATc1. *Experimental and Molecular Medicine*. 2006;38(3):256-64.
 45. Han KY, Yang D, Chang EJ, Lee Y, Huang H, Sung SH, Lee ZH, Kim YC, Kim HH. Inhibition of osteoclast differentiation and bone resorption by sauchinone. *Biochemical Pharmacology*. 2007;74:911-23.
 46. Tsai HY, Lin HY, Fong YC, Wu JB, Chen YF, Tsuzuki M, Tang CH. Paeonol inhibits RANKL-induced osteoclastogenesis by inhibiting ERK, p38 and NF- κ B pathway. *European Journal of Pharmacology*. 2008;588:124-33.
 47. Raisz LG. Local and systemic factors in the pathogenesis of osteoporosis. *New Engl. J. Med.*, 1988;18(13):818-28.
 48. Garnero P, Delmas PL. New developments in biochemical markers for osteoporosis. *Calcif*

- Tissue Int. 1996;54(Supp1):S2-5.
49. 송방호, 배수영, Hoang Ngoc AiTran. 석류 (*Punica granatum*)의 Phytoestrogen 및 항암 활성 성분. 한국미생물생명공학회지. 2007;35(2):81-97.
 50. 박형무. 최신임상강좌: 폐경여성에서의 식물성 에스트로겐의 효용성. 대한산부학회지. 2007; 50(3):389-415.
 51. Lloyd M. Treatment of postmenopausal osteoporosis. The New England Journal of Medicine. 1998; 338:736-46.
 52. Ron GA., Martin TJ. Therapeutic approaches to bone diseases. Science. 2000;289:1508-14.
 53. Boyle WJ., Simonet WS., Lacey DL., Osteoclast differentiation and activation. Nature. 2003; 423:337-42.
 54. Darnay BG, Ni J, Moore PA, Aggarwal BB. Activation of NF-KappaB by RANK requires tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF)6 and NF-KappaB inducing kinase. Identification of a novel TRAF6 interaction motif. J Biol Chem. 1999;274:7724-31.
 55. Takayanagi H, Kim S, Koga T, Nishina H, Isshiki M, Yoshida H, Saiura A, Isobe M, Yokochi T, Inoue J, Wagner EF, Mak TW, Kodama T, Taniguchi T. Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts. Developmental Cell. 2002;3:889-901.
 56. Takayanagi, H. Osteoimmunology: shared mechanism and crosstalk between the immune and bone systems. Nature Reviews Immunology. 2007;7:292-304.
 57. 이희영, 이대실, 차정현, 유윤경. The effect of Lipopolysaccharide on the migration of osteoclast precursors. 대한치주과학회지. 2007;37(1):23-34.