

川棟子の 파골세포 분화 억제기전 연구

경희대학교 한의과대학 한방부인과교실
윤영진, 이진무, 이창훈, 장준복, 이경섭

ABSTRACT

A Study on Inhibitory Mechanism of Melia Fructus Extract on Osteoclast Differentiation

Young-Jin Yun, Jin-Moo Lee, Chang-Hoon Lee
Jun-Bock Jang, Kyung-Sub Lee

Dept. of Oriental Gynecology, College of Oriental Medicine,
Kyung-Hee University

Objectives: This study was conducted to evaluate the inhibitory effect of Melia Fructus extract on osteoclast differentiation.

Methods: MTT-assay was performed to estimate cytotoxicity of Melia Fructus extract in BMMs stimulated with M-CSF. TRAP staining, TRAP activity and Real-time PCR were performed to know the inhibitory effect on osteoclast differentiation. Actin ring formation were analysed to observe the effect of Melia Fructus extract.

Results: Melia Fructus extract decreased the number of TRAP positive cells and the expression of NFATc1 gene, c-Fos gene, TRAP and OSCAR in BMMs stimulated with RANKL. Melia Fructus extract has no cytotoxicity at the concentration used in this study. Melia Fructus extract restrained the formation of actin ring. Melia Fructus inhibited NF- κ B activity by inducing degradation of p-IkBa.

Conclusions: Melia Fructus has the inhibitory effect of osteocalst differentiation and bone resorption. Further studies are needed to treat osteoporosis by herbal medicine containing Melia Fructus.

Key Words: Melia Fructus, osteoclast, NFATc1, c-Fos, OSCAR, TRAP

I. 緒 論

골다공증은 골량의 감소와 미세구조의 이상을 특징으로 하는 전신적인 골격계 질환으로, 결과적으로 뼈가 약해져서 부러지기 쉬운 상태가 되는 질환으로 정의하며¹⁾, 파골세포와 조골세포간의 상호작용에 불균형으로 발생한다²⁾. 이십대 중반 또는 삼십대 초반의 청장년 시기에 일생 중 최대골량이 형성되고 이 이후는 연령 증가에 따라 골 소실이 진행되므로, 골다공증의 중요한 두가지 위험인자는 청장년기에 낮게 형성된 골량과 노화 및 폐경으로 인한 빠른 골 소실이다¹⁾. 노화와 관련한 골질환과 폐경에 의해 여성호르몬의 결핍으로 발생하는 골다공증은 조골세포에 의한 골형성보다 파골세포의 골 흡수의 증가가 주요한 원인이다³⁾.

전 세계적으로 높은 유병율을 보이고 있으며 높은 의료비 지출로 인해 사회경제적인 문제로 대두되고 있고⁴⁾, 기존의 골다공증 치료제에 대한 합병증의 위험이 지적되고 있어⁵⁾, 현재에는 비교적 부작용이 적은 한약재를 이용한 파골세포 분화억제 연구가 활발하다⁶⁻¹¹⁾.

川棟子の 性은 寒 有小毒 하고, 味는 苦하다. 歸經은 肝, 胃, 小腸經이며, 효능은 舒肝行氣止痛, 治胸脇痛, 腕腹脹痛, 疝痛, 蟲積腹痛으로¹²⁾, 실험적 연구는 항산화 및 항염증 효과¹³⁾, 간기능에 미치는 영향¹⁴⁾, 전립선염¹⁵⁾, 유방암에 대한 효과¹⁶⁾ 등이 있으며, 파골세포 분화억제에 대한 스크리닝 테스트에서 川棟子の tartrate resistant acid phosphatase(TRAP) 활성 억제 효과를 보고 하였으나¹⁷⁾, 그 기전에 대한 연구는 없었다.

이에 저자는 川棟子の 파골세포 분화 억제기전을 알아보기 위해, TRAP 활성화와 actin ring 형성, nuclear factor of activated T cells c1(NFATc1), c-Fos, TRAP 및 osteoclast associated receptor (OSCAR)의 Real-time PCR 분석, p-IkBa의 western blot 분석하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 實 驗

1. 材 料

1) 川棟子 추출물

川棟子(Melia Fructus)는 楝科(Meliaceae)에 속하는 낙엽관목인 천련(川棟) *Melia toosendan* Sieb. et Zucc.의 성숙한 과실을 건조한 것이다. 川棟子은 한국식품추출물은행의 제품을 구매하여 DMSO에 녹인 후 0.22 μ m 필터(Milipore Carrigtwohill, Ireland)에 여과하여 4 $^{\circ}$ C에 보관하였으며 용액제조 후 15일 이내에 사용하였다.

2) 試 藥

Human receptor activator of NF- κ B ligand(RANKL)과 human macrophage-colony stimulating factor(M-CSF)는 Peprotech사(London, UK)에서 구입하였다. TRAP staining solution은 Sigma Aldrich사(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며, β -actin 항체는 Santa Cruz Biotechnology사(Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였다. phospho-IkBa에 대한 항체는 Cell Signaling Technology사(Beverly, MA, USA)의 제품을 사용하였다. Alpha-minimum essential medium(α -MEM), 10% fetal bovine serum(FBS), antibiotic, Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline

(DPBS)은 Gibco사(Rockville, MD, USA)에서 구입하였으며 Triton X-100는 Sigma Chemical사(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 또한 2',7'-dichlorofluorescein diacetate(DCFH), rhodamin- conjugated phalloidin은 Molecular Probes(Eugene, OR, USA)에서 제품을 구입하였다.

3) 파골세포의 배양 및 분화

6주령의 수컷 ICR 생쥐를 희생시킨 후 α -MEM을 1cc 주사기에 충전하여 경골 및 대퇴골에서 골수를 채취하였다. 채취한 골수세포에서 적혈구를 제거한 후 FBS과 M-CSF 30ng/ml를 첨가한 α -MEM 배지에서 5% CO₂, 95% 습도 및 37°C를 유지하면서 3일간 배양하였다. 배양 후 부착된 세포를 파골전구세포로서의 대식세포(bone marrow-derived macrophages, BMMs)로 사용하였다.

2. 方 法

1) 세포 독성 측정

BMMs를 96-well plate에 1×10^4 cells/well로 분주하고 M-CSF 30ng/ml를 처리한 후 川楝子 추출물 0.1, 0.5, 1 및 5 μ g/ml를 첨가하여 24시간 및 48시간 배양하였다. 그 후 각각의 well에 cell counting kit(CCK-8, Dojindo, Japan) 용액을 처리하고 2시간 동안 배양한 후 ELISA microplate reader(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 450nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포독성 효과는 시료를 첨가하지 않는 대조군에 대한 백분율(%)로 표시하였다.

2) TRAP positive cell 측정

BMMs를 48-well plate에 2×10^4 cells/well로 분주하고 RANKL 100ng/ml와 M-CSF 30ng/ml로 처리한 배지에 川楝子 추출물

0.1, 0.5 및 1 μ g/ml를 첨가하고 배양하였다. 3일 후 배양액을 교환하고 추가로 2일 더 배양하였다. 부착세포를 DPBS로 2회 세척한 후 3.7% formaldehyde에 10분간 고정하고 PBS로 세척 후 0.1% Triton X-100으로 용해시킨 후 TRAP 용액으로 염색하여 보라색의 TRAP positive cell을 파골세포로 인정하였다. 염색된 파골세포 중 핵이 3개 이상인 세포의 개수를 현미경에서 직접 관찰하였다.

3) TRAP activity 측정

BMMs를 48-well plate에 2×10^4 cells/well로 분주하고 RANKL 100ng/ml와 M-CSF 30ng/ml로 처리한 배지에 川楝子 추출물 0.1, 0.5 및 1 μ g/ml를 첨가하고 배양하였다. 4일째에 배양액을 제거하고 DPBS용액으로 3회 세척 후, lysis buffer [40 mM HEPES(pH 7.0), 0.1% NP-40, 20% glycerol, 5 μ g/ml leupeptin, 10 μ g/ml aprotinin 및 48 μ g/ml PMSF]을 200 μ l 넣고 얼음에서 20분간 incubation 한 후 세포막을 용해시켰다. 4°C 13,000rpm에서 10분간 원심분리 한 후 상층액 50 μ l를 취하여 pNPP(p-nitro-phenyl phosphate) substrate을 sodium acetate용액(pH 5.2, 0.5M)으로 녹인 후 sodium tartrate solution (0.5M sodium tartrate buffer, pH 5.2)와 10:1로 혼합하여 60분 동안 배양하여, 1N 수산화나트륨 용액을 50 μ l씩 넣어 효소 반응을 정지시켜 TRAP assay kit (Taksra, Japan)용액을 처리하고 ELISA microplate reader(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 405nm에서 흡광도를 측정하였다. TRAP activity는 시료를 첨가하지 않는 대조군의 흡광도에 대한 백분율(%)로 표시하였다.

4) Actin ring 염색

BMMs를 48-well plate에 2×10^4 cells/well로 분주하고 RANKL 100ng/ml와 M-CSF 30ng/ml를 처리하고 동시에 川棟子 추출물 0.1, 0.5 및 $1 \mu\text{g/ml}$ 를 첨가하여 파골세포 분화를 5일간 유도시켰다. 그 후 세포를 3.7% formaldehyde에 10분간 고정하고 PBS로 세척 후 rhodamin-conjugated phalloidin을 처리하여 30분간 배양하였다. Actin ring 형성은 형광현미경 Olympus IX71-F32PH(Olympus, Tokyo, Japan)을 사용하여 관찰하였다.

5) Real-time PCR 분석

BMMs를 48-well plate에 2×10^4 cells/well로 川棟子 추출물 0.1, 0.5 및 $1 \mu\text{g/ml}$ 를 첨가한 그룹별로 3개씩 분주하고 RANKL 100ng/ml와 M-CSF 30ng/ml를 5일 동안 함께 배양 후 각각 3개의 well을 함께 수집하여 RNA RNeasy kit(Qiagen, Valencia, CA, USA)를 이용하여 cell에서 총 RNA를 분리하였다. 추출한 RNA의 $1 \mu\text{g}$ 을 oligo-dT(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 cDNA로 합성하였다. 합성된 cDNA를 iQ SYBR Green supermix(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)로 중합효소연쇄반응을 수행하였다. 중합효소연쇄반응에 사용된 primer는 파골세포 분화의 지표로 사용된 TRAP, OSCAR, NFATc1 및 c-Fos이고 control 유전자인 GAPDH와 비교하여 그 상대적 양을 비교하였다. Primer의 염기서열은 TRAP [(sense) 5'-CTG GAG TGC ACG ATG CCA GCG ACA -3', (antisense) 5'-TCC GTG CTC GGC GAT GGA CCA GA -3'], OSCAR [(sense) 5'-CTG CTG GTA ACG GAT CAG CTC CCC AGA -3', (antisense) 5'-CCA AGG AGC CAG AAC CTT CGA AAC T

-3'], NFATc1 [(sense) 5'-CTC GAA AGA CAG CAC TGG AGC AT -3', (antisense) 5'-CGG CTG CCT TCC GTC TCA TAG -3'], c-Fos [(sense) 5'-CTG GTG CAG CCC ACT CTG GTC -3', (antisense) 5'-CTT TCA GCA GAT TGG CAA TCT C -3'], GAPDH [(sense) 5'-CAT GGC CTT CCG TGT TCC TAC CC -3', (antisense) 5'-CCT CAG TGT AGC CCA AGA TGC CCT -3']이다. 각각의 annealing 온도는 TRAP 66°C, OSCAR 60.4°C, NFATc1 58.3°C, c-Fos 57°C이며 모두 시간은 30초로 시행하였으며, extension 온도는 모두 72°C에 30초로 사이클을 45회 반복시켰다. 결과로 나온 각각의 CT(cycle threshold)값을 GAPDH의 CT값과 비교하여 상대비교 방법으로 계산하여 그래프로 나타내었다. Real-time PCR에 사용된 기계는 iCycler mini opticon system(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 사용하였다.

6) Western blot 분석

BMMs를 6-well plate에 1×10^6 cells/well로 분주하고 1일간 배양하였다. 그 후 RANKL를 처리하고 30분동안 시간별로 파골세포 배양액을 걸어내고 DPBS로 세척 후 세포를 획득하였다. 그 후 lysis buffer를 첨가하여 30분간 유지하고 13,000 rpm으로 4°C에서 원심분리를 하여 상층액을 사용하였다. 단백질을 정량하고, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis를 수행한 후, semi-dry transfer(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 membrane에 단백질을 이동하였다. 5% skim milk(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 처리하여 비특이 단백질이 붙는 것을 방지한 후 단백질 각 사이즈

별로 항체를 처리하였다. 항체들을 차례로 반응시키고 ECL kit(Amersham Biosciences, NJ, USA)를 사용하여 chemiluminescence로 확인하였다. 실험에 사용한 항체는 p-IkBa, β -actin에 대한 항체를 사용하였다.

7) 통계처리

실험결과에 대한 통계처리는 SPSS (version 13.0)을 이용하였다. 실험군과 대조군의 비교는 student's *t*-test를 분석하였고, $p < 0.05$ 이하인 경우를 통계적으로 유의한 차이가 있다고 판정하였다.

Ⅲ. 結 果

1. 세포 독성 평가

BMMs에 M-CSF 30ng/ml를 처리한 후 川棟子 추출물 0.1, 0.5, 1 및 5 μ g/ml를 첨가하여 24 및 48시간 배양한 후 cell viability를 측정된 결과, 0.1, 0.5 및 1 μ g/ml에서는 대조군에 비해 차이가 없었으나, 5 μ g/ml에서 각각 84.49 \pm 2.264%, 72.29 \pm 3.563%로 가장 낮았다(Fig. 1).

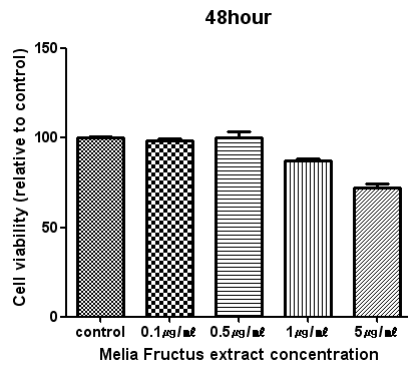
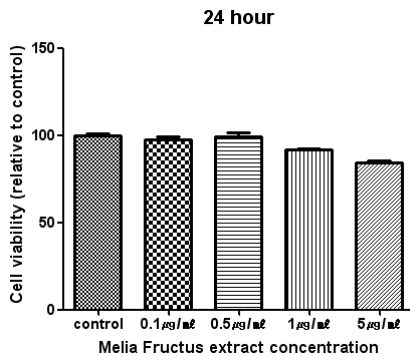


Fig. 1. Cytotoxicity of Melia Fructus Extract on BMMs

2. 파골세포 분화 억제 효과

1) TRAP 염색

TRAP 염색 후 TRAP positive cell를 현미경으로 관찰한 결과 대조군에 비해 川棟子 추출물 0.1, 0.5 및 1 μ g/ml에서 각각 억제되었다(Fig. 2A).

2) TRAP positive cell 수

TRAP 염색 후 TRAP positive cell 수를 측정된 결과 대조군 131.3 \pm 11.06개에 비해, 0.1 μ g/ml에서는 87.33 \pm 15.18개 ($p < 0.05$), 0.5 μ g/ml에서는 87.67 \pm 17.95개 ($p < 0.05$) 및 1 μ g/ml에서 9.667 \pm 3.215개 ($p < 0.001$)로 유의하게 억제되었다(Fig. 2B).

3) TRAP activity

TRAP activity를 측정된 결과 대조군 100.0 \pm 6.237%에 비해 0.1 μ g/ml에서 57.32 \pm 8.887% ($p < 0.01$), 0.5 μ g/ml에서 61.35 \pm 6.763% ($p < 0.01$) 및 1 μ g/ml에서 12.81 \pm 2.830% ($p < 0.001$)로 유의하게 억제되었다(Fig. 2C).

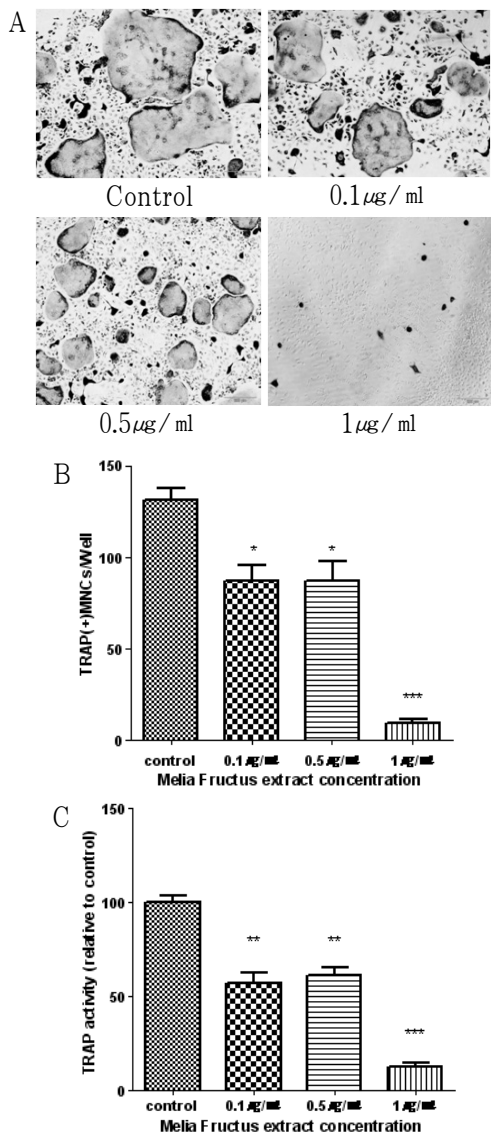


Fig. 2. Effect of Melia Fructus Extract on RANKL Induced Osteoclast Differentiation
 A : Cells were fixed and TRAP stained
 B : TRAP-positive cells were counted as osteoclasts
 C : TRAP activity were measured using absorbance
 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compare to control)

3. Actin ring 염색

Actin ring 형성은 대조군에 비해 川棟子 추출물 0.1, 0.5 및 1 µg/ml에서 모두

억제되었으며 1 µg/ml에서 가장 많이 억제 되었다(Fig. 3).

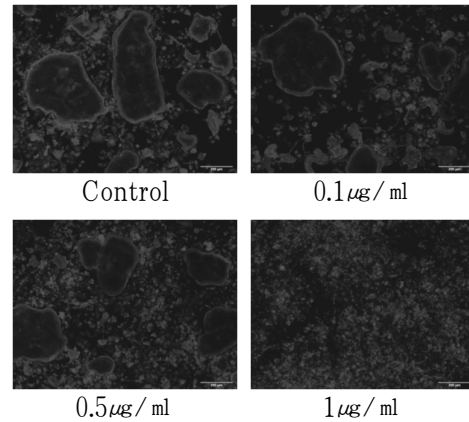


Fig. 3. Inhibitory effect of Melia Fructus extract on actin ring formation in BMMs stimulated with RANKL

4. 파골세포 활성화 유전자 발현 억제 효과

1) NFATc1, c-Fos, TRAP 및 OSCAR
 파골세포 분화 시 지표로 사용되는 NFATc1, c-Fos, TRAP 및 OSCAR의 Real-time PCR 결과 대조군에 비해 川棟子 추출물 0.1, 0.5 및 1 µg/ml에서 모두 억제되었고, 1 µg/ml에서 가장 많이 억제 되었다(Fig. 4A).

2) p-IkBa

파골세포 분화의 대표적인 신호통로인 NF-κB에 대해서 알아보기 위하여 p-IkBa를 Western blot으로 확인한 결과, 대조군에 비해 川棟子 추출물 1 µg/ml에서 인산화된 IkBa 신호 강도가 약하게 나타났다(Fig. 4B).

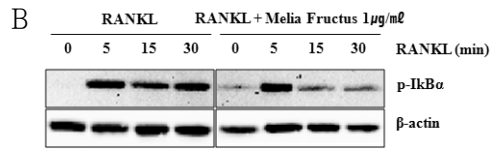
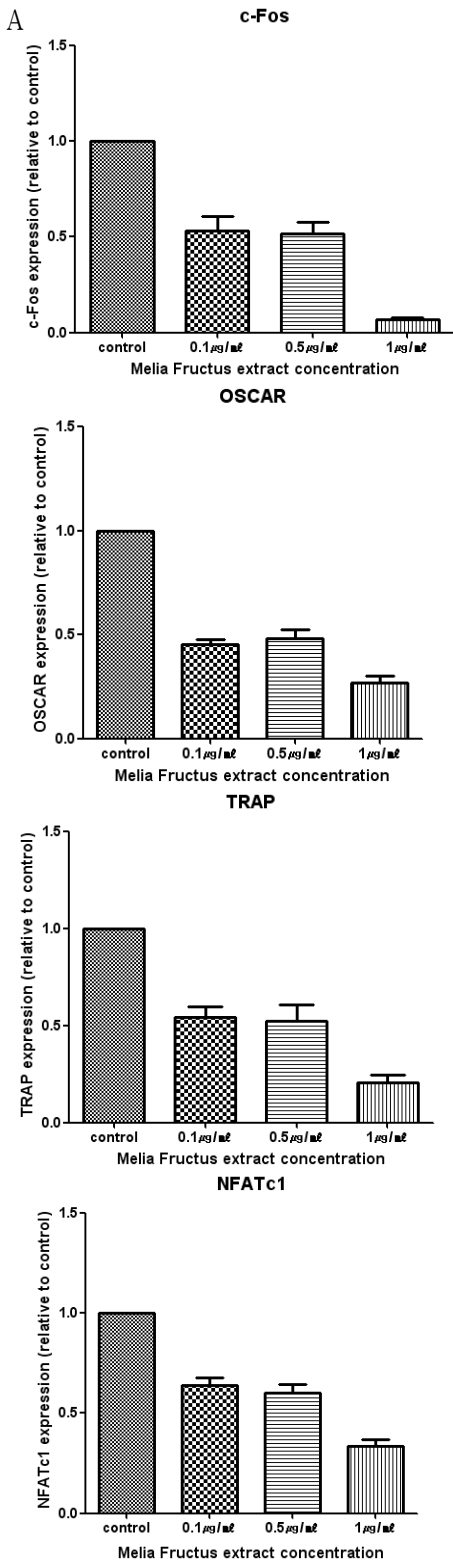


Fig. 4. Effect of Melia Fructus Extract on the Expression of NFATc1, c-Fos, TRAP, OSCAR and NF-κB Signal

A : Gene expression levels of each genes are measured by Real-time PCR.

B : Cell lysates were analyzed by Western blotting with antibody to specific for phosphorylated IκBα

IV. 考 察

50세 이상 여성 골다공증 환자의 과반수와 70세 이상 골다공증 환자의 대부분에서 활동적인 삶이 제약되며, 사망률도 평균 20%나 된다. 2007년에 50세 이상 남성과 여성의 골다공증의 비율은 각각 15.2%와 29.6%를 나타내었다¹⁾.

현재 미국 식약청에서 골다공증 치료 및 예방약재로 승인된 비스포스포네이트 제제는 생체 이용률이 낮으며, 에스트로겐은 최소 5년 이상의 장기치료의 경우 불규칙한 자궁출혈, 유방암, 자궁내막암 및 고혈압 발생빈도의 증가 등, 합병증의 위험이 지적되고 있다⁵⁾.

黃帝內經에서 腎主骨, 腎主骨髓, 腎藏精, 腎者...精之處也 其華在髮 其充在骨이라하여¹⁸⁾ 뼈는 腎과 밀접한 관련이 있다¹⁹⁾. 골다공증은 骨痿 등의 병증과 유사하여²⁰⁾, 鹿茸, 天門冬, 牛膝 등의 補腎, 強筋骨하는 약재를 이용한 연구가 많았으나⁷⁻⁹⁾, 최근에는 清熱燥濕하는 黃芩¹⁰⁾이나, 活血하는 紅花子¹¹⁾ 등 다양한 약재를 이용한 연구도 있다.

川楝子の 性은 寒 有小毒 하고, 味는 苦하다. 歸經은 肝, 胃, 小腸經이며, 효능

은 舒肝行氣止痛, 驅蟲, 治胸脇痛, 腕腹脹痛, 疝痛, 蟲積腹痛이다¹²⁾. 항산화 및 항염증 효과¹³⁾, 간기능에 미치는 영향¹⁴⁾, 전립선염¹⁵⁾, 유방암에 대한 효과¹⁶⁾와 같은 실험적 연구가 있다. 동의보감²¹⁾에 淸熱燥濕하는 苦寒한 氣味가 大熱로 인한 骨痿에 효과가 있을 것이란 언급이 있고, 생약의 파골세포 분화억제에 대한 스크리닝 테스트에서 川棟子の TRAP 활성 억제 효과 보고가 있다¹⁷⁾.

이에 저자는 川棟子の 파골세포 분화 억제효과를 알아보기 위해 TRAP 활성과 actin ring 형성 억제효과, NFATc1, c-Fos, TRAP 및 OSCAR의 RT-PCR 분석 및 p-IkBa의 western blot 분석을 이용하여 조사하였다.

川棟子の 파골세포 분화억제에 관한 연구에서 100 μ g/ml에서 세포독성이 보고된 바가 있었으나²²⁾, BMMs에 M-CSF를 처리한 후 川棟子 추출물 0.1, 0.5, 1 및 5 μ g/ml를 첨가하여 배양한 후 세포 독성을 관찰한 결과 세포 독성이 관찰되지 않았다.

파골세포가 골 흡수 작용을 할 때 TRAP 효소의 분비가 증가하는데, TRAP는 성숙한 파골세포에만 유일하게 존재하는 세포 화학적 표지자로서 이를 통해 파골세포의 분화정도를 측정할 수 있다²³⁾.

파골세포 분화 시 분화 marker인 TRAP을 염색하여 분화 정도를 확인한 결과 모든 농도의 川棟子 추출물에서 분화가 억제되는 것을 확인하였고 또한 TRAP 활성을 정량적으로 측정할 수 있는 TRAP positive cell 수와 흡광도를 이용한 TRAP activity도 감소하였다. 이는 川棟子 추출물이 파골세포분화 억제효과가 있음을 의미한다.

파골세포는 뼈 흡수 과정 동안 급격한 세포골격구성을 수행하는데, 이는 뼈에 부착함과 동시에 파골세포의 actin이 하나의 큰 ring으로 조직화되어, 일반적인 세포의 공간과 뼈를 흡수하는 공간이 구분된다²⁴⁾. 이러한 actin ring의 형성은 파골세포가 뼈를 흡수할 때 나타나는 고유의 것으로 골 흡수 능력에 대한 중요한 표지가 된다²⁵⁻²⁷⁾. 그러므로 골다공증의 치료에 있어서 actin ring 형성의 방해는 골 흡수 억제를 의미한다²⁸⁾.

BMMs에 RANKL과 M-CSF를 투입한 후 川棟子 추출물을 처리한 결과 모든 농도에서 actin ring이 억제되었다.

RANKL는 수용체인 RANK와 결합으로 중요한 세포내 여러 신호전달 물질 c-Fos, NFATc1 등 전사인자를 활성화시킨다. 전사인자 c-Fos는 RANKL에 의한 파골세포 분화초기에 발현되는 중요한 전사인자로 NFATc1의 발현을 촉진한다^{29,30)}. NFATc1은 세포질에 존재하지만 calcium/camodulin 신호전달 체계에 의존적으로 calcineurin 이라 불리는 phosphatase에 의해서 활성화되어 핵으로 이동한다³⁰⁾. 핵으로 이동한 NFATc1은 파골세포에 특이적인 유전자인 TRAP, OSCAR 등의 유전자 발현을 촉진한다³⁰⁻³²⁾.

BMMs를 RANKL과 M-CSF로 5일 동안 함께 배양 후 NFATc1, c-Fos, TRAP 및 OSCAR를 Real-time PCR로 분석한 결과 파골세포 분화 시 발현되는 유전자 중 전사인자인 NFATc1 및 c-Fos와 분화 marker인 TRAP, OSCAR의 발현이 억제되었다.

RANKL에 의한 파골세포 분화 개시는 다양한 신호전달 체계를 경유한다. RANKL과 수용체인 RANK와 결합은

RANK에 부착되어 있는 TRAF6를 활성화하며, 이에 I-kB kinases a and b 등의 활성화는 복합체인 NF-κB와 I-kB의 분해를 유도하여, NF-κB가 핵 내로 이동하여 전사인자로의 역할을 수행하게 된다. 세포내 신호전달 물질인 IκBa 등의 인산화로 인한 전사인자의 유도는 파골세포 분화에 필수적이다^{33,34}).

BMMs에 RANKL 100ng/ml과 川棟子 추출물 1μg/ml를 처리한 후 Western blot 분석을 이용하여 IκBa의 인산화를 측정된 결과 억제되었다.

이 연구결과를 종합해보면 川棟子 추출물이 RANKL로 유도된 파골세포의 분화기전 억제를 TRAP 활성 세포 수와 TRAP activity의 감소, actin ring의 형성억제로 확인하였다. 이와 관련한 기전은 전사인자인 c-Fos와 NFATc1 및 NF-κB의 발현을 억제하여 분화 marker인 TRAP, OSCAR의 발현 억제를 통하여 이루어진 것으로 사료된다. 앞으로, 川棟子 추출물에서 파골세포 분화 억제 성분의 분리 및 정제에 관한 지속적인 연구가 필요하다.

V. 結 論

川棟子の 파골세포 분화 억제효과를 알아보기 위해, TRAP 활성과 actin ring 형성 억제효과, NFATc1, c-Fos, TRAP 및 OSCAR의 Real-time PCR 분석, p-IκBa의 western blot 분석을 이용하여 조사한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 川棟子 추출물은 모든 농도에서 세포

독성이 나타나지 않았다.

2. TRAP positive cell 수 및 TRAP activity는 모든 농도의 川棟子 추출물에서 억제되었다.
3. Actin ring 형성은 모든 농도의 川棟子 추출물에서 억제되었다.
4. NFATc1, c-Fos, TRAP 및 OSCAR의 유전자 발현은 모든 농도의 川棟子 추출물에서 억제되었다.
5. IκBa의 인산화된 신호강도는 1μg/ml 농도의 川棟子 추출물에서 억제되었다.

□ 투 고 일 : 2012년 04월 27일

□ 심 사 일 : 2012년 05월 11일

□ 게재확정일 : 2012년 05월 15일

參 考 文 獻

1. 정호연. 골다공증 진단 및 치료 지침 2007. 대한내분비학회지. 2008;23(2):76-108.
2. Roodman GD. Mechanisms of bone metastasis. N Engl J Med. 2004;350:1655-64.
3. Del FA, Teti A, Rucci N. Osteoclast receptors and signaling. Arch Biochem Biophys. 2008;473:147-60.
4. Burge R et al. Incidence and economic burden of osteoporosis-related fractures in the United States. J Bone Miner Res. 2007;22:465-75.
5. Delmas PD. Treatment of postmenopausal osteoporosis. Lancet. 2002;359:2018-26.
6. Hidaka S. Natural products with potential for osteoporosis examined *in vivo* and

- in vitro*. J Trad Med. 2009;26:1-10.
7. 곽한복 등. 녹용 물 추출물의 파골세포 분화 억제효과. 동의생리병리학회지. 2008;22(4):891-5.
 8. 이승연, 김시나, 김종근. 천문동 추출물에 의한 조골세포 분화 촉진 및 파골세포 생성 억제효과. 한국식품영양과학회지. 2008;37(1):16-9.
 9. 김주호 등. 우슬의 파골세포 분화 억제와 골 흡수 억제효과. 대한본초학회지. 2010;25(1):65-74.
 10. 양나래. 우고닌-하이드로젤 지지체의 파골세포 분화 억제 효과. 서울:경희대학교 대학원. 2011.
 11. 김은경. 홍화자의 파골세포 분화 억제 효과. 서울:경희대학교 대학원. 2011.
 12. 전국한의과대학 본초학교수. 본초학. 서울:영림사. 1999:358.
 13. 이효승 등. 마우스 대식세포에서 천련자(川棟子)의 항산화 및 항염증 효과. 대한본초학회지. 2008;23(4):121-34.
 14. 김부생 등. 川棟子 성분이 간기능에 미치는 영향에 관한 연구 III. -Melianone 과 28-deacetyl sendanin의 약물 대사 효소계 및 담즙분비에 미치는 영향. 생약학회지. 1996;27(1):47-52.
 15. 이구현 등. 천련자가 만성 비세균성 전립선염 Rat 모델에서 혈액 및 세포조직의 변화에 미치는 영향. 대한본초학회지. 2007;22(4):145-53.
 16. 윤우경, 김동철. 천련자 메탄올 추출물이 Bcl-2 발현 억제를 통해 지방암세포의 자멸사에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2008;21(3):18-33.
 17. 이준원. 생약의 파골 세포 분화 저해활성 검색. 생약학회지. 2009;40(2):83-8.
 18. 양유걸. 황제내경역해. 서울:성보사. 1980:소문 6, 52, 90, 210, 269, 337, 338, 340, 399, 영추 89, 104.
 19. 김동균, 류지윤, 이연정. 腎主骨에 관한 東西醫學的 考察. 대한한방내과학회지. 1991;12(2):26-9.
 20. 김종환. 골다공증에 관한 문헌적 고찰-주로 최근의 한의학적 임상 및 실험논문을 중심으로. 대한침구학회지. 1998;15(2):437-54.
 21. 허준. 동의보감. 서울:법민문화사. 1999:765.
 22. 이효정 등. 천연물 추출물의 파골세포 분화억제 효과 검색. 한국식품과학회지. 2005;37(6):997-1004.
 23. Väänänen HK, Horton M. The osteoclast clear zone is a specialized cell extracellular matrix adhesion structure. J Cell Sci. 1995;108:2729-32.
 24. Teitelbaum SL. Osteoclasts: what do they do and how do they do it? Am J Pathol. 2007;170(2):427-35.
 25. Faccio R et al. Dynamic changes in the osteoclast cytoskeleton in response to growth factors and cell attachment are controlled by beta3 integrin. J Cell Biol. 2003;162(3):499-509.
 26. Nakamura I et al. IL-1 regulates cytoskeletal organization in osteoclasts via TNF receptor-associated factor 6/c-Src complex. J Immunol. 2002;168(10):5103-9.
 27. Burgess TL et al. The ligand for osteoprotegerin(OPGL) directly activates mature osteoclasts. J Cell Biol. 1999;145(3):527-38.
 28. Murakami H et al. Tiludronate inhibits protein tyrosine phosphatase activity

- in osteoclasts. *Bone*. 1997;20(5):399-404.
29. Takayanagi H et al. Induction and activation of the transcription factor NFATc1(NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts. *Dev Cell*. 2002;3:889-901.
30. Takayanagi H. Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nat Rev Immunol*. 2007;7:292-304.
31. Matsumoto M et al. Essential role of p38 mitogen- activated protein kinase in cathepsin K gene expression during osteoclastogenesis through association of NFATc1 and PU.1. *J Biol Chem*. 2004;279:45969-79.
32. Kim Y et al. Contribution of NFATc1 to the transcriptional control of immunoreceptor OSCAR but not TREM-2 during osteoclastogenesis. *J Biol Chem*. 2005;280:32905-13.
33. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*. 2003;423:337-42.
34. Teitelbaum SL, Ross FP. Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nat Rev Genet*. 2003; 4(8):638-49.