

夏枯草에서 추출한 Ursolic acid의 파골세포 분화 억제 효과

경희대학교 한방부인과 한방부인과학교실
허자경, 황덕상, 이진무, 이창훈, 장준복, 이경섭

ABSTRACT

Inhibitory Effects of Ursolic Acid from *Prunella Vulgaris* on Osteoclast Differentiation

Ja-Kyung Heo, Deok-Sang Hwang, Jin-Moo Lee
Chang-Hoon Lee, Jun-Bock Jang, Kyung-Sub Lee

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

Purpose: This study was conducted to evaluate the inhibitory effect of ursolic acid from *Prunella vulgaris* on osteoclast differentiation.

Methods: MTT-assay was performed to estimate cytotoxicity of ursolic acid from *Prunella vulgaris* 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 ursolic acid from *Prunella vulgaris*.

Results: Ursolic acid from *Prunella vulgaris* has no cytotoxicity at the concentration of 1 µg/ml or lower. Ursolic acid decreased the number of TRAP positive cells and the expression of NFATc1 gene, c-Fos gene, TRAP and OSCAR in BMMs stimulated with RANKL. Ursolic acid restrained the formation of actin ring. Ursolic acid inhibited NF-κB activity by inducing degradation of p-IκBa.

Conclusions: Ursolic acid from *Prunella vulgaris* has the inhibitory effect of osteoclast differentiation and bone resorption. Further studies are needed to treat osteoporosis by usolic acid from *Prunella vulgaris*.

Key Words: Ursolic Acid, *Prunella Vulgaris*, Osteoclast, NFATc1, C-Fos, OSCAR, TRAP

I. 서 론

세계보건기구(WHO)는 골다공증을 골량의 감소와 미세구조의 이상을 특징으로 하는 전신적인 골격계 질환으로, 결과적으로 뼈가 약해져서 부러지기 쉬운 상태가 되는 질환으로 정의하고 있다¹⁾. 이는 파골세포와 조골세포간 상호작용의 불균형으로 발생하는데, 폐경 이후 여성호르몬의 결핍으로 발생하는 골다공증은 조골세포에 의한 골형성보다 파골세포의 골 흡수의 증가가 주요한 원인으로 알려져 있다²⁾.

현재 골다공증 치료 방법으로 뼈 손실이 더 이상 증가하지 않고 진행속도를 지연시키는 방법을 많이 사용하고 있는데, 알렌드로네이트와 같은 비스포스포네이드(bisphosphonate) 계열의 약제들을 사용하고 있지만 사용의 번거로움과 낮은 약효 및 부작용으로 인해 사용에 많은 제한이 따르고 있다³⁾. 그리고 뼈 손실의 진행속도를 지연시켜 골량 유지에 효과적인 것으로 알려진 에스트로겐 호르몬 대체요법은 10년 이상의 장기 치료 시 유방암, 고혈압 발생 빈도의 증가 등의 부작용이 있다³⁾. 그래서 최근에는 비교적 부작용이 적은 한약재를 이용한 파골세포 분화 억제 연구가 활발하게 이루어지고 있다⁴⁻⁸⁾.

夏枯草는 脣形科(꿀풀과, Labiatae)에 속한 多年生 本草인 꿀풀 *Prunella vulgaris* var. *lilacina* NAKAI의 果穗를 건조한 것으로 性味는 寒 無毒하고, 味는 苦寒하다. 歸經은 肝, 膽經이며, 淸肝, 散結하는 효능으로 瘰癧, 癭瘤, 乳癰, 目赤腫痛, 頭痛, 筋骨疼痛 등을 치료한다⁹⁾. 실험적 연구로는 유방암 예방효과¹⁰⁾, 감상선향진증

개선효과¹¹⁾, 항염증효과¹²⁾, 면역증강효과¹³⁾, 간보호효과¹⁴⁾ 및 항알러지 효과¹⁵⁾ 등이 있다.

夏枯草의 주 효능이 肝血을 補하여 肝虛를 치료하는데 있고¹⁶⁾, 肝血이 충분하면 腎精으로 化함으로써 腎精이 充만해진다. 골다공증은 骨痿 등의 병증과 유사하고¹⁷⁾ 뼈는 腎과 밀접한 관련이 있으므로¹⁸⁾ 夏枯草의 補肝腎하는 효능이 골다공증에 양호한 효과를 나타낼 것으로 생각된다. 또한 夏枯草의 全草는 triterpenoid saponins을 함유하는데, 그 sapogenin에는 ursolic acid이 포함되어 있다. Triterpenoid saponins 유도체인 ursolic acid는 이성질체로 생물학적 활성 때문에 치료제로서 관심이 집중되고 있는데, 조골세포의 분화를 촉진시키고, 골 형성을 유도하였다는 실험결과가 있다¹⁹⁾. 그러나, 폐경후 골다공증은 파골세포의 골 흡수 증가가 골다공증의 병인으로 중요한데, 아직까지 夏枯草 성분 ursolic acid의 파골세포 분화억제 효과를 알아본 연구가 없었다.

이에 저자는 夏枯草 성분 ursolic acid의 파골세포 분화 억제 효과를 알아보기 위해, TRAP 활성과 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. 실 험

1. 재 료

1) 검 액

夏枯草(*Prunella vulgaris*) 주성분의 하

나인 ursolic acid를 SIGMA Chemical (H5142, St. Louis, USA)에서 구매하여 DMSO에 녹인 후 0.22 μm 필터(Milipore Carrigtwohill, Ireland)에 여과하여 -20°C 에 보관하였으며 실험 시 용액제조 후 15일 이내에 사용하였다.

2) 시 약

Murine receptor activator of NF- κB ligand (RANKL)와 murine macrophage-colony stimulating factor(M-CSF)는 Peprotech 사(London, UK)에서 구입하였다. TRAP staining solution은 Sigma Aldrich사(St. Louis, USA)에서 구입하였으며, TRAP activity 실험에 사용된 TRACP assay kit는 TaKaRa(Tokyo, Japan)에서 구입하였다. β -actin 항체는 Santa Cruz Biotechnology 사(Santa Cruz, USA)에서 구입하였다. Phospho-I $\kappa\text{B}\alpha$ 에 대한 항체는 Cell Signaling Technology사(Beverly, USA)의 제품을 사용하였다. α -Minimum essential medium (α -MEM), 10% fetal bovine serum(FBS), 1% antibiotic, Dulbecco's phosphate-buffered saline(DPBS)은 Gibco사(Rockville, USA)에서 구입하였으며 0.1% Triton X-100는 Sigma Chemical사(St. Louis, USA)에서 구입하였다. CCK-8(cell counting kit)은 Dojindo(Kumamoto, Japan)를 사용하였다. Rhodamin-conjugated phalloidin은 Molecular Probes(Eugene, USA)에서 제품을 구입하여 사용하였다.

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 10%의 FBS과 1%의 antibiotic과 30 ng/ml의 M-CSF를 첨가한 α -MEM 배지에서 5%

CO_2 , 95% 습도 및 37°C 를 유지하면서 3일간 배양하였다. 배양 후 cell culture plate 바닥에 부착된 세포를 파골전구세포로서의 대식세포(bone marrow macrophages, BMMs)로 사용하였다.

2. 방 법

1) 세포 독성 측정

BMMs를 96-well plate에 1×10^4 cells/well로 분주하고 M-CSF 30 ng/ml를 처리한 후 ursolic acid를 각각 0.1, 1, 10, 50, 100 및 500 μM 을 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, USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포독성 효과는 시료를 첨가하지 않는 대조군에 대한 백분율(%)로 표시하였다. Ursolic acid 10 μM 에서 독성이 나타났기에 0 μM 를 대조군으로 하고 실험군의 농도를 0.1, 0.5, 1 μM 로 결정하였다.

2) TRAP 활성세포 염색과 세포 수 측정

BMMs를 48-well plate에 2×10^4 cells/well로 분주하고 RANKL 100 ng/ml와 M-CSF 30 ng/ml로 처리한 배지에 ursolic acid 0.1, 0.5 및 1 μM 를 각각 첨가하고 4일 동안 배양하였다. 4일 후 세포를 3.7% formaldehyde에 20분간 고정하고 DPBS로 3회 세척 후 0.1% Triton X-100으로 10분간 세포막을 용해시키고 다시 DPBS로 3회 세척한다. TRAP 용액으로 염색하여 보라색의 TRAP positive cell인 파골세포를 확인 하였고, 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 100 ng/ml와 M-CSF 30 ng/ml로 처리한 배지에 각각 ursolic acid 0.1, 0.5, 1 μ M를 첨가하고 배양하였다. 4일 후 배양액을 제거하고 DPBS 용액으로 3회 세척 후, 1.5 ml의 e-Tube에 cell을 수확하여 담은 후 protease inhibitor가 첨가된 lysis buffer [40 mM HEPES(pH 7.0), 0.1% NP-40, 20% glycerol, 5 μ g/ml leupeptin, 10 μ g/ml aprotinin, 48 μ g/ml PMSF]를 60 μ l씩 넣고 세포막을 용해시켰다. 4°C 13000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상층액 50 μ l를 취하여 TRACP assay kit protocol 대로 만들어낸 혼합액 50 μ l와 함께 60분 동안 배양한 후, 1 N 수산화나트륨 용액을 50 μ l씩 넣어 효소 반응을 정지시키고 ELISA microplate reader를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였으며 남은 10 μ l의 상층액으로 Bradford assay를 이용하여 cell을 정량하였다. TRAP activity 실험 결과는 시료를 첨가하지 않은 대조군의 흡광도에 대한 백분율(%)로 표시하였다.

4) Real-time PCR 분석

BMMs를 48-well plate에 2×10^4 cells/well로 ursolic acid 0.1, 0.5 및 1 μ M를 첨가한 그룹별로 3개씩 분주하고 RANKL 100 ng/ml와 M-CSF 30 ng/ml를 4일 동안 함께 배양 후 각각 3개의 well을 함께 수집하여 RNA RNeasy kit(Qiagen, Valencia, USA)를 이용하여 cell에서 총 RNA를 분리하였다. 추출한 RNA의 1 μ g을 oligo-dT (Invitrogen, Carlsbad, USA)를 사용하여 cDNA로 합성하였다. 합성된 cDNA를 iQ SYBR Green supermix(Bio-Rad, Hercules, 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°C, 시간은 30초, extension 온도는 72°C에 30초로 사이클을 45회 반복시켰다. 각각의 cycle threshold(CT)값을 GAPDH의 CT값과 비교하여 상대 비교 방법으로 계산하여 그래프로 나타내었다. Real-time PCR에 사용된 기계는 iCycler mini opticon system(Bio-Rad, Hercules, USA)을 사용하였다. 시료를 첨가하지 않은 대조군의 값을 1로 정하고 시료를 첨가한 것들 그에 대한 비율로 그래프로 나타내었다.

5) Western blot 분석

BMMs를 2개의 6-well plate에 1×10^6 cells/well로 분주한 후 대조군은 100 ng/ml의 RANKL만 들어있는 배지에 키우고 실

험군은 100 ng/ml의 RANKL과 10 μ M의 ursolic acid가 함유된 배지를 넣어서 배양했는데 이때 대조군과 실험군 모두 각각 5분, 15분, 30분이 되었을 때마다 각각의 well의 cell을 DPBS로 세척 후 수확하였다. Protease inhibitor와 phosphatase inhibitor가 함유된 lysis buffer [40 mM HEPES(pH 7.0), 0.1% NP-40, 20% glycerol, 5 μ g/ml leupeptin, 10 μ g/ml aprotinin, 48 μ g/ml PMSF]를 첨가하여 30분간 유지하여 lysis시킨 후 13,000 rpm으로 4°C에서 원심분리를 하여 상층액을 사용하였다. 단백질을 정량하여 각각의 sample이 40 μ g으로 통일한 후, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis를 수행하였다. semi-dry transfer(Bio-Rad, Hercules, USA)를 이용하여 membrane에 단백질을 이동하였다. 5% skim milk(Bio-Rad, Hercules, USA)를 처리하여 비특이 단백질이 붙는 것을 방지한 후 단백질 각 사이즈별로 항체를 처리하였다. 항체들을 차례로 반응시키고 ECL kit(Amersham Biosciences, USA)를 사용하여 chemiluminescence로 확인하였다. 실험에 사용한 항체는 p-I κ B α , β -actin에 대한 항체를 사용하였다.

6) Actin ring 염색

BMMs를 48-well plate에 2×10^4 cells/well로 분주하고 RANKL 100 ng/ml와 M-CSF 30 ng/ml로 처리한 배지에 ursolic acid 0.1, 0.5 및 1 μ M를 첨가하고 4일 동안 배양하였다. 4일 후 세포를 3.7% formaldehyde에 20분간 고정하고 DPBS로 3회 세척 후 0.1% Triton X-100으로 10분간 용해시키고 다시 DPBS로 3회 세척한 후, 200:1로 희석한 rhodamin-conjugated phalloidin을 처리하여 30분간 배양하였다. Actin ring 형성은 형광현미경 Olympus IX 71-F3

2PH(Olympus, Japan)를 사용하여 관찰하였다.

7) 통계분석

실험결과에 대한 통계처리는 SPSS version 13.0을 이용하였다. 대조군과 각 농도별 ursolic acid의 비교는 one-way ANOVA를 사용하였고 $p < 0.05$ 일 때 통계적으로 유의한 차이가 있다고 판정하였다.

III. 결 과

1. 세포 독성 평가

BMMs에 M-CSF 30 ng/ml를 처리한 후 ursolic acid 0.1, 1, 10, 50, 100 및 500 μ M을 첨가하여 24시간 및 48시간 배양한 후 cell viability를 측정된 결과, 1 μ M에서 세포 독성이 없는 것으로 평가되었다(Fig. 1).

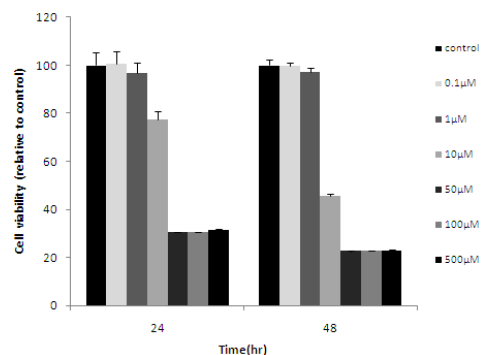


Fig. 1. Cytotoxicity of Ursolic Acid from *Prunella Vulgaris* on BMMs

2. 파골세포 분화 억제 효과

1) TRAP 염색

TRAP 염색 후 TRAP positive cell을 현미경으로 관찰한 결과 ursolic acid 0.1, 0.5 및 1 μ M에서 대조군에 비해 농도 의존적으로 억제되었다(Fig. 2A).

2) TRAP positive cell 수

TRAP 염색 후 TRAP positive cell 수를 측정된 결과, 대조군 124.33 ± 7.50 개에 비해, ursolic acid $0.1 \mu\text{M}$ 군에서는 110.67 ± 2.51 개 ($p < 0.05$), $0.5 \mu\text{M}$ 군에서는 94.67 ± 6.81 개 ($p < 0.01$) 및 $1 \mu\text{M}$ 군에서는 21.33 ± 3.51 개 ($p < 0.01$)로 유의하게 억제되었다(Fig. 2B).

3) TRAP activity

TRAP activity를 측정된 결과 대조군 $100.00 \pm 2.50\%$ 에 비해 ursolic acid $0.1 \mu\text{M}$ 군에서 $80.23 \pm 4.53\%$ ($p < 0.01$), $0.5 \mu\text{M}$ 군에서 $63.45 \pm 4.70\%$ ($p < 0.01$) 및 $1 \mu\text{M}$ 군에서 $16.27 \pm 2.66\%$ ($p < 0.01$)로 유의하게 억제되었다(Fig. 2C).

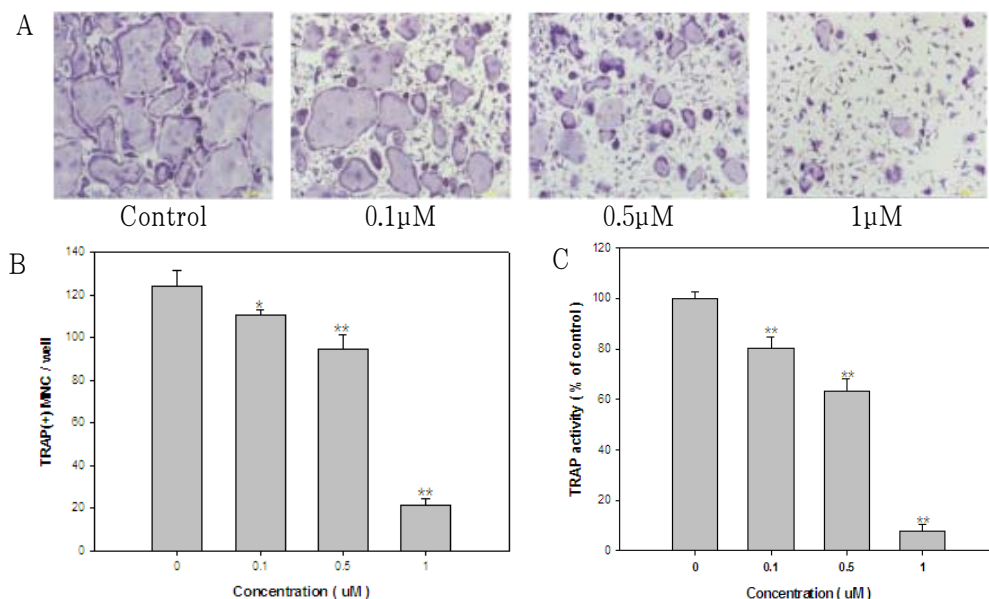


Fig. 2. Effect of Ursolic Acid from *Prunella Vulgaris* on Osteoclast Differentiation Induced by RANKL.

- A : Cells were fixed and TRAP stained
 - B : TRAP-positive cells were counted as osteoclasts
 - C : TRAP activity were measured using absorbance
- (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compare to control)

3. 파골세포 분화 유전자 발현 및 신호통로 억제 효과

1) NFATc1, c-Fos, TRAP 및 OSCAR
 파골세포 분화시 지표로 사용되는 NFATc1, c-Fos, TRAP 및 OSCAR의 Real-time PCR 결과 대조군에 비해 ursolic acid 0.1 , 0.5 및 $1 \mu\text{M}$ 에서 모두 억제되었고, $1 \mu\text{M}$ 에

서 가장 많이 억제되었다(Fig. 3A).

2) p-IkBa

파골세포 분화의 대표적인 신호통로인 NF- κ B에 대해서 알아보기 위하여 p-IkBa를 western blot으로 확인한 결과, 대조군에 비해 ursolic acid $1 \mu\text{M}$ 에서 인산화된 IkBa 신호 강도가 약하게 나타났다(Fig. 3B).

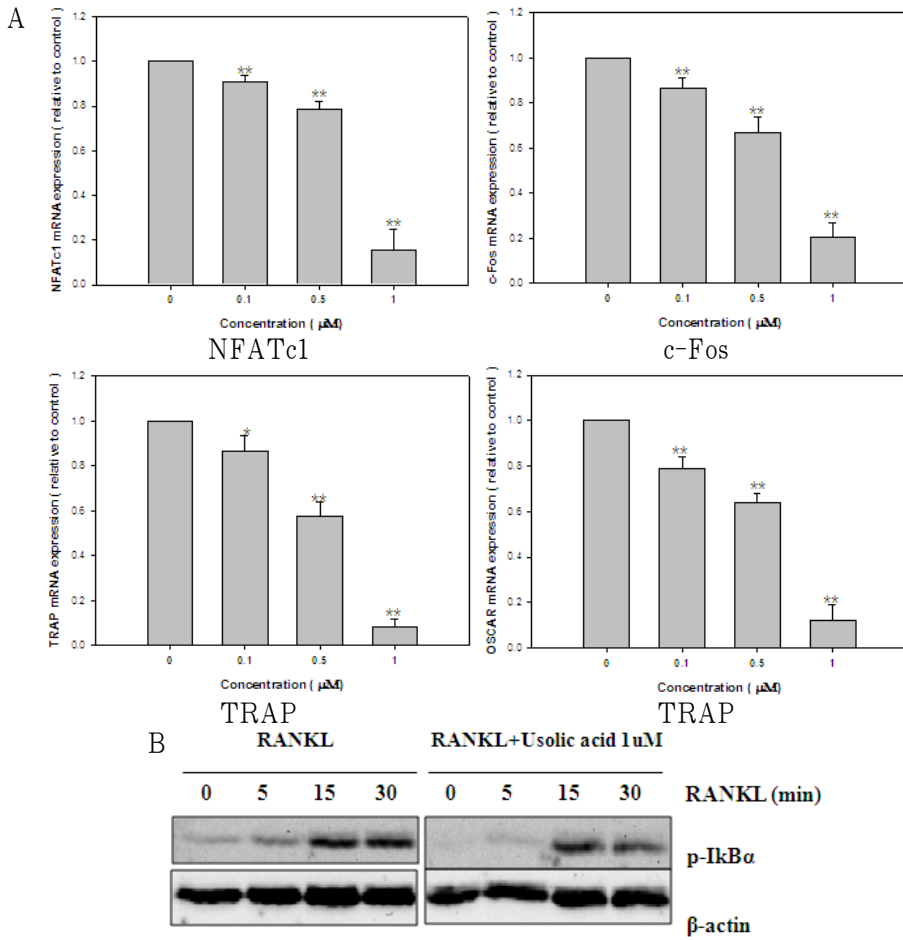


Fig. 3. Effect of Ursolic Acid from *Prunella Vulgaris* on the Expression of NFATc1, C-Fos, TRAP, OSCAR and NF-κB Signal
 A : Gene expression levels of each genes are measured by Real-time PCR
 B : Cell lysates were analyzed by Western blotting with antibody to specific for phosphorylated IκBα (* : p<0.05, ** : p<0.01, compare to control group)

4. Actin ring 형성 억제 효과

Actin ring 형성은 대조군에 비해 夏枯草 성분 ursolic acid 0.1, 0.5 및 1 μM에서

모두 억제되었으며 1 μM에서 가장 많이 억제되었다(Fig. 4).

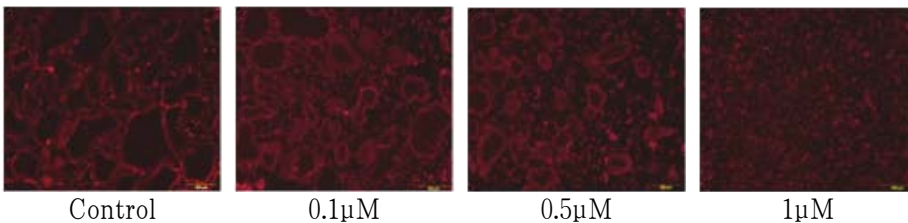


Fig. 4. Inhibitory Effect of Ursolic Acid from *Prunella Vulgaris* on Actin Ring Formation in BMMs Stimulated with RANKL.

IV. 고찰

골다공증은 골량의 감소와 미세구조의 이상을 특징으로 하는 전신적인 골격계 질환으로, 결과적으로 뼈가 약해져서 부러지기 쉬운 상태가 되는 질환으로 정의한다¹⁾. 골의 항상성은 새로운 골기질을 형성하는 조골세포와 오래된 골기질을 흡수하는 파골세포의 적절한 균형에 의해 유지되는데, 식이, 호르몬과 물리적인 스트레스 등의 요인들에 의해 상호작용의 불균형이 초래되어 골다공증이 발생하게 된다²⁰⁾. 특히, 여성들의 폐경기로 인해 발생하는 골다공증은 조골세포에 의한 골형성 보다는 골을 흡수하는 파골세포 활성화 증가가 주된 원인으로 알려져 있다²¹⁾.

파골세포는 단핵-탐식세포(monocyte-macrophage) 계통의 조혈전구세포(hematopoietic precursor)에서 분화되며, 골내막에 위치하며 골조직에 존재하는 유일한 다핵세포이다. 또한 파골세포는 tartrate-resistant acid phosphatase(TRAP)와 풍부한 calcitonine (CT) 수용체를 가지는 특징이 있으며 실제적으로 뼈의 흡수작용을 할 때는 산 생성이 활발하고 actin ring을 형성하여 골기질을 흡수한다²²⁾.

완전한 기능을 하는 파골세포가 되기 위하여 일련의 분화과정을 거쳐야 하는데 파골전구세포는 분화에 중요한 두 가지 사이토카인 M-CSF(macrophage colony-stimulating factor)와 RANKL(receptor activator of nuclear factor- κ B ligand)의 조절에 의해 성숙한 파골세포로 분화된다²³⁾. 특히 파골세포의 생존, 분화, 다핵화, 활성화에 총체적인 역할을 하는 RANKL은 TNF 계열의 사이토카인으로 수용체인 RANK와

결합하여 TRAF6(TNF receptor associated factor 6)를 활성화하고 이는 NF- κ B(nuclear factor- κ B), NFATc1(nuclear factor of activated T cells c1)등과 같은 전사인자를 활성화하여 파골세포 분화과정이 진행된다. 따라서 RANKL 신호 과정의 단계별 차단을 통한 과도한 파골세포 형성의 억제는 골다공증에 대한 치료적 접근을 가능하게 한다²⁰⁾.

《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 이라하여 뼈는 腎과 밀접한 관련이 있다²⁴⁾. 골다공증은 한의학적으로 骨痿, 骨枯, 骨痺 등의 범주에 속하는데¹⁷⁾, 그 주된 병인은 腎虛라고 보았으며²⁵⁾ 나타나는 증상에 근거하여 腎虛, 腎陰虛, 腎陽虛, 肝腎不足, 脾腎陽虛 등으로 변증분류할 수 있다²⁶⁾. 최근에는 골다공증과 관련하여 鹿茸⁴⁾, 天門冬⁵⁾, 牛膝^{6,8)} 등의 補腎, 強筋骨하는 약재를 이용한 실험연구가 많으며, 活血하는 紅花子⁷⁾, 舒肝行氣하는 天楝子²⁷⁾ 등 다양한 약재를 이용한 연구들도 있다.

夏枯草는 脣形科(꿀풀과, Labiatae)에 속한 多年生 本草인 꿀풀 *Prunella vulgaris* var. *lilacina* NAKAI의 果穗를 건조한 것으로 性味는 寒 無毒하고, 味는 苦寒하며, 歸經은 肝, 膽經이다⁹⁾. 夏枯草의 補肝腎하는 효능이 있어 골다공증에 양호한 효과를 기대할 수 있으며, 특히 夏枯草의 畚草는 triterpenoid saponins을 함유하는데, 그 saponin에는 ursolic acid가 포함되어 있다⁹⁾. Triterpenoid saponins 유도체인 ursolic acid는 이성질체로 생물학적 활성 때문에 치료제로서 관심이 집중되고 있는데, 항세균²⁸⁾, 항암²⁹⁾, 항염증³⁰⁾, 간보호 효과³¹⁾, 항우울³²⁾, 항불안³³⁾, 비만 및 지방간 억제³⁴⁾ 등이 연구된 바 있다. 또한 ursolic

acid가 조골세포의 분화를 촉진시키고, 골형성을 유도하였다는 실험결과가 있어¹⁹⁾, 골다공증에 도움이 될 것으로 생각된다. 그러나 골다공증에 직접적인 영향을 미치는 파골세포의 억제에 관한 연구는 아직 없었다.

이에 저자는 夏枯草 성분 ursolic acid의 파골세포 분화 억제 효과를 알아보기 위해, TRAP 활성과 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 분석을 이용하여 조사하였다.

夏枯草 성분 ursolic acid의 세포독성 여부를 확인하기 위해 cell viability를 살펴본 결과, ursolic acid 10 μ M에서 24, 48 시간 배양시 유의한 세포 독성이 나타났다. 따라서 본 실험에서 사용할 ursolic acid의 농도는 0.1, 0.5, 1 μ M로 택하여 실험을 진행하였다.

파골세포가 골 흡수 작용을 할 때, TRAP 효소의 분비가 증가하는데, TRAP은 성숙한 파골세포에만 유일하게 존재하는 세포 화학적 표지자로서 이를 통해 파골세포의 분화정도를 측정할 수 있다³⁵⁾. 파골세포 분화시 분화 marker인 TRAP을 염색하여 분화 정도를 확인한 결과, 0.1, 0.5, 1 μ M의 ursolic acid에서 분화가 억제되는 것을 확인하였다. 또한 TRAP 활성을 정량적으로 측정한 TRAP positive cell 수와 흡광도를 이용한 TRAP activity도 모든 실험농도에서 감소하였다. 이는 夏枯草 성분 ursolic acid가 파골세포 분화 억제효과가 있음을 의미한다.

골세포 표면의 actin ring 구조는 필수적이며 이를 통해 골기질을 흡수한다. 파

골세포가 분화하면 그 크기가 거대해지고 표면이 actin ring을 형성하여 골흡수 과정에 관여하게 된다³⁶⁾. 따라서 파골세포에 있어 actin ring 형성은 세포가 뼈를 흡수할 수 있는 능력에 대한 중요한 표지가 된다³⁷⁾. 이번 실험에서 BMMs에 RANKL과 M-CSF를 투입한 후, 夏枯草 성분 ursolic acid를 처리한 결과 파골세포의 actin ring이 농도 의존적으로 둥글고 매끄러운 전형적인 형태가 유지되지 않았다. 이는 ursolic acid가 골 흡수 과정에 관여하여 파골세포 분화를 억제함을 의미한다.

RANKL은 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 촉진한다³⁸⁾. NFATc1은 세포질에 존재하지만 calcium/camodulin 신호전달 체계에 의존적으로 calcineurin이라 불리는 phosphatase에 의해서 활성화되어 핵으로 이동한다³⁹⁾. 핵으로 이동한 NFATc1은 파골세포에 특이적인 유전자인 TRAP, OSCAR 등의 유전자 발현을 촉진한다⁴⁰⁾.

이번 실험에서 BMMs에 ursolic acid 0.1 μ M, 0.5 μ M, 1 μ M를 첨가하여 RANKL과 M-CSF로 4일 동안 함께 배양 후 NFATc1, c-Fos, TRAP 및 OSCAR를 Real-Time PCR로 분석한 결과, 파골세포 분화시 발현되는 유전자 중 전사인자인 NFATc1 및 c-Fos와 분화 marker인 TRAP, OSCAR의 발현이 모든 농도에서 억제되었다.

RANKL에 의한 파골세포 분화 개시는 다양한 신호전달 체계를 경유한다. 특히 전사인자인 NF- κ B는 분화에 중추적인 역할을 하는 NFATc1과 c-Fos를 조절하는 중요한 신호전달 물질로 알려져 있다²⁰⁾.

RANKL과 수용체인 RANK의 결합은 RANK에 부착되어 있는 TRAF6을 활성화하며, 이에 I- κ B kinases a and b 등의 활성화는 세포질 내에서 NF- κ B와 복합체를 형성하고 있는 I- κ B의 분해를 유도하여, 이에 따라 NF- κ B가 핵 내로 이동하여 전사인자로서의 역할을 수행하게 한다. 따라서, 세포내 신호전달 물질인 I κ Ba 등의 인산화로 인한 전사인자의 유도는 파골세포 분화에 필수적이다⁴¹⁾.

BMMs에 RANKL 100 ng/ml와 夏枯草 성분 ursolic acid 1 μ M를 처리한 후, Western blot 분석을 이용하여 I κ Ba의 인산화를 측정 한 결과, RANKL만 처리한 대조군은 시간 의존적으로 p-I κ Ba 단백질 발현이 증가되었지만 ursolic acid를 같이 처리한 실험군의 p-I κ Ba 단백질 발현은 대조군에 비하여 감소되었다. 이를 통해 夏枯草 성분 ursolic acid가 파골세포 분화시 요구되는 I κ Ba signal을 억제함으로써, 파골세포 분화를 억제함을 확인하였다.

따라서, 이번 실험에서 夏枯草 성분 ursolic acid가 TRAP 활성 세포 수와 TRAP activity를 감소시키고 actin ring 형성을 억제하였는데, 이는 ursolic acid가 파골세포 분화 억제 효과가 있음을 의미한다. 이는 전사인자인 c-Fos와 NFATc1 및 NF- κ B의 발현을 억제하여 분화 marker인 TRAP, OSCAR의 발현 억제를 통하여 이루어진 것으로 생각된다. 이것을 통하여 볼 때, 夏枯草 성분 ursolic acid가 폐경기 골다공증 치료제로 개발될 수 있는 가능성을 보여주었고, 추후 이와 관련된 임상 연구가 이루어져야 할 것이다.

V. 결 론

夏枯草에서 추출한 ursolic acid의 파골세포 분화 억제효과를 알아보기 위해, TRAP 활성과 actin ring 형성 억제효과, NFATc1, c-Fos, TRAP 및 OSCAR의 Real-Time PCR 분석 및 p-I κ Ba의 western blot 분석을 이용하여 조사한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 夏枯草 성분인 ursolic acid는 1 μ M 이하의 농도에서 세포독성이 나타나지 않았다.
2. TRAP positive cell 수 및 TRAP activity는 夏枯草 성분인 ursolic acid 모든 농도에서 억제되었다.
3. Actin ring 형성은 夏枯草 성분인 ursolic acid 모든 농도에서 억제되었다.
4. NFATc1, c-Fos, TRAP 및 OSCAR의 유전자 발현은 夏枯草 성분인 ursolic acid 모든 농도에서 억제되었다.
5. I κ Ba의 인산화된 신호강도는 夏枯草 성분인 ursolic acid 1 μ M에서 억제되었다.

- 투 고 일 : 2014년 4월 28일
- 심 사 일 : 2014년 4월 28일
- 게재확정일 : 2014년 5월 10일

참고문헌

1. 정호연. 골다공증 진단 및 치료 지침 2007. 대한내분비학회지. 2008;23(2):76-108.
2. Del FA, Teti A, Rucci N. Osteoclast receptors and signaling. Arch Biochem Biophys. 2008;473:147-60.

3. Yasui T, et al. Hormone replacement therapy in postmenopausal women. *J Med Invest.* 2003;50:136-45.
4. 곽한복 등. 녹용 물 추출물의 파골세포 분화 억제효과. *동의생리병리학회지.* 2008;22(4):891-5.
5. 이승연, 김시나, 김종근. 천문동 추출물에 의한 조골세포 분화 촉진 및 파골세포 생성 억제효과. *한국식품영양과학회지.* 2008;37(1):16-9.
6. 김주호 등. 우슬의 파골세포 분화 억제와 골 흡수 억제효과. *대한본초학회지.* 2010;25(1):65-74.
7. 양나래 등. 우고닌-하이드로젤 지지체의 파골세포 분화 억제 효과. *대한한방부인과학회지.* 2001;24(4):1-9.
8. 최진영 등. 하이드로젤에 탑재한 우슬 추출물의 효과적인 파골세포 분화 억제 작용. 2012;25(1):1-10.
9. 전국한의과대학 본초학교수 공저. *本草學.* 서울:영림사. 2000:169-70.
10. 남경수, 김한규, 손윤희. 하고초 에탄올추출물이 지방암 예방효소계에 미치는 영향. *生藥學會誌.* 2003;34(2):161-5.
11. 변부형, 임사비나. 뎅싸리 夏枯草藥鍼이 甲狀腺機能亢進症에 미치는 影響. *大韓鍼灸學會誌.* 1997;14(1):503-11.
12. 고인자, 유승조, 이은방. 韓國產 夏枯草類의 藥物學的 研究(I): 消炎作用에 대하여. *生藥學會誌.* 1986;17(3):232-41.
13. 서부일, 김선희. 夏枯草의 免疫調節作用 및 알레르기 低減化에 關한 研究. *大韓本草學會誌.* 1997;12(1):7-18.
14. Mrudula G, et al. Evaluation of hepatoprotective activity of *Prunella vulgaris* by carbontetrachloride induced hepatotoxicity. *Pharmacologyonline.* 2010;2:1045-53.
15. Shin TY, Kim YK, Kim HM. Inhibition of immediate-type allergic reactions by *Prunella vulgaris* in a murine model. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2001;23(3):423-35.
16. 허준. *대역 동의보감.* 서울:법인문화사. 1999:1960.
17. 김종환. 골다공증에 관한 문헌적 고찰-주로 최근의 한의학적 임상 및 실험 논문을 중심으로. *대한침구학회지.* 1998;15(2):437-54.
18. 김동균, 류지윤, 이연정. 腎主骨에 관한 동서의학적 고찰. *대한한방내과학회지.* 1991;12(2):26-9.
19. Lee SU, et al. Anabolic activity of ursolic acid in bone: Stimulating osteoblast differentiation in vitro and inducing new bone formation in vivo. *Pharmacological Research.* 2008;58:290-6.
20. William JB, Scott S, David LL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature.* 2003;423:337-42.
21. Togari A, et al. Alteration of in vitro bone metabolism and tooth formation by zinc. *Gene Pharmacol.* 1993;24:1133-40.
22. Mok SK, Shin HS. The effects of prostaglandine and dibutyryl cAMP on osteoblastic cell activity and osteoclast generation. *J. Wonkwang Dental Res Int.* 1996;6:43-62.
23. Lacey DL, et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell.* 1998;93:165-76.
24. 이경우. *編注譯解 黃帝內經素問.* 서울:여강출판사. 1994:31, 191, 333, 540(1권),

- 193(2권).
25. 김희진, 이태균. 폐경기 골다공증에 관한 문헌적 고찰. 대한한방부인과학회지. 1998;11(1):131-48.
 26. 한의부인과학 교재편찬위원회. 한의부인과학(상). 서울:정담출판사. 2001:241.
 27. 윤영진 등. 천련자의 파골세포 분화 억제기전 연구. 대한한방부인과학회지. 2012;25(2):1-11.
 28. 박재윤, 김화숙. Oleonic acid 및 Ursolic Acid의 *Streptococcus downei*에 대한 항균작용. 한국치위생과학회지. 2011;11(1):37-40.
 29. Liu W, et al. Ursolic acid inhibits cigarette smoke extract-induced human bronchial epithelial cell injury and prevents development of lung cancer. *Molecules*. 2012;17(8):9104-15.
 30. Baricevic D, et al. Topical anti-inflammatory activity of *Salvia officinalis* L. leaves: the relevance of ursolic acid. *J Ethnopharmacol*. 2001;75(2-3):125-32.
 31. Jin YR, et al. Ursolic acid enhances mouse liver regeneration after partial hepatectomy. *Pharm Biol*. 2012;50(4):523-8.
 32. Machado DG, et al. Antidepressant-like effect of ursolic acid isolated from *Rosmarinus officinalis* L. in mice: Evidence for the involvement of the dopaminergic system. *Pharmacol Biochem Behav*. 2012;103(2):204-11.
 33. Kazmi I, et al. Pharmacological evaluation of anxiolytic activity of ursolic acid stearyl glucoside isolated from *Lantana camara*. *CNS Neurosci Ther*. 2012;18(8):707-8.
 34. Kunkel SD, et al. Ursolic acid increases skeletal muscle and brown fat and decreases diet-induced obesity, glucose intolerance and fatty liver disease. *PLoS One*. 2012;7(6):e39332.
 35. Vaananen HK, Horton M. The osteoclast clear zone is a specialized cell extracellular matrix adhesion structure. *J Cell Sci*. 1995;108:2729-32.
 36. Teitelbaum SL. Osteoclasts: what do they do and how do they do it? *Am J Pathol*. 2007;170(2):427-35.
 37. 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.
 38. 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.
 39. Takayanagi H. Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nat Rev Immunol*. 2007;7:292-304.
 40. Kim Y, et al. Contribution of NFATc1 to the transcriptional OSCAR but not TREM-2 during osteoclastogenesis. *J Biol Chem*. 2005;280:32905-13.
 41. Teitelbaum SL, Ross FP. Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nat Rev Genet*. 2003;4(8):638-49.