

흰 무궁화 꽃 추출물의 항산화 활성과 골 흡수의 억제 효과

이희정* · 이상원* · 박춘근* · 안영섭* · 김진성*† · 방만석** · 오충훈***† · 김철태***

*농촌진흥청 국립원예특작과학원 인삼특작부, **단국대학교 종합임상시험원, 바이오안전성 & 유효성 센터, ***건양대학교 의과대학 응급구조학과

Effects of White *Hibiscus syriacus* L. Flower Extracts on Antioxidant Activity and Bone Resorption Inhibition

Hee Jung Lee*, Sang Won Lee*, Chun Geun Park*, Young Sup Ahn*, Jin Seong Kim*†, Man Seok Bang**, Chung Hun Oh**† and Chul Tae Kim***

*Department of Herbal Crop Research, NIHHS, RDA, Eumseong 369-873, Korea.

**Clinical Trial Institute, Biosafety & Validation Center, Dankook University, Cheonan 330-714, Korea.

***Department of Emergency Medical Service, College Medical Science, Konyang University, Daejeon 302-832, Korea.

ABSTRACT : In this study, we tried to offer the possibility of White *Hibiscus syriacus* L. (WHS) flower extracts as a preventive and improving agent of osteoporosis that bone mass reduction is induced by an decrease of osteoblast involved in bone formation and increase of bone resorption by osteoclast activity. As a results, it was found to have antioxidant activity and contain a flavonoid contents (47.74 mg/g) of the WHS flower. There was cytotoxicity at more than 250 µg/ml concentration of WHS flower extract of RANKL-induced osteoclast in RAW264.7. There were no significant inhibited TRAP activity in the WHS leaf and stem. However, it was confirmed that it is significantly inhibited the differentiation activity of osteoclasts in 50 and 100 µg/ml concentration of cells of stability levels of only WHS flower extracts ($p < 0.01$). The WHS flower prominently inhibited RANKL-induced osteoclast differentiation activity by decreased calcitonin receptor and TRAP mRNA ($p < 0.01$). These results indicate that of osteoclasts differentiation activity is inhibited by protection of oxidative stress due to the antioxidant activity of the WHS flower. Therefore, suggesting the WHS flower may be a presents the possibility as a preventive and therapeutic agents for osteoporosis.

Key Words : white *Hibiscus syriacus* L., Flavonoid, Antioxidant Activity, Osteoporosis, Osteoclast, Osteoblast

서 언

골다공증 (osteoporosis)은 고령화 사회에서 대두되고 있는 전신 골격계 질환으로서 골의 화학적 조성 변화 없이 골질량과 골밀도가 낮아져 골절 위험이 높아지는 질환이다 (Bartl and Frisch, 2004; Lee and Lee, 2004). 조혈모세포로부터 분화하는 파골세포 (osteoclast)에 의해 오래된 골은 파괴 또는 흡수 (resorption)가 이루어지며 이는 칼슘이 혈류로 방출되어 신체기능 유지에 이용된다. 한편, 중간엽줄기 세포에서 생성된 조골세포 (osteoblast)는 새로운 골을 형성하여 골 재형성을 이루게 된다 (Lim *et al.*, 2009). 결국, 조골 속도와 파골 속도

의 일정한 균형을 통하여 골 조직 항상성이 유지되는데 이때 파골 속도가 빨라지게 되면 골 약화로 인해 골절이 쉽게 일어나게 되는 것이다.

조골세포 또는 활성화된 면역세포에서 생성된 RANKL (receptor activator of nuclear factor-κB ligand)은 파골세포 및 전구세포에 위치한 수용체 (RANK)와 결합하여 파골세포의 형성과 활성을 촉진시킨다. 다양한 골 흡수의 자극 원인 (에스트로겐 결핍, 부갑상선 호르몬 항진증 등)이 발생하게 되면 최종적으로 RANKL과 이에 대한 생체 내 길항제인 Osteoprotegerin (OPG)의 균형이 깨짐으로서 파골세포의 활성이 증가되는 것이다 (McClung, 2007). 이렇게 활성화된 파골

†Corresponding author: (Phone) +82-43-871-5684, +82-41-550-1819 (E-mail) chiseijs@korea.kr, choh@dankook.ac.kr

Received 2015 April 6 / 1st Revised 2015 April 20 / 2nd Revised 2015 May 28 / 3rd Revised 2015 May 30 / Accepted 2015 May 30

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

세포는 꿀 표면에 부착하여 꿀 단백 용해제 중 하나인 카텝신 K (cathepsin K)가 파골세포 특이적으로 생성되고, 칼시토닌 수용체 (calcitonin receptor, Cal-R)와 TRAP (tartrate resistant acid phosphate)이 존재하며 실제적으로 꿀 흡수 작용에 관여하는 것으로 알려졌다 (Boyle *et al.*, 2003). 따라서 이들 꿀 단백 용해제의 억제를 통하여 꿀 흡수 억제 효과를 이끌어낼 수 있을 것으로 사료된다. 꿀 흡수 억제제로는 칼슘, 비타민 D, 칼시토닌, 여성호르몬, 티볼론, 선택적 에스트로겐 수용체 조절제, 비스포스포네이트 등이 이용되어 왔다 (Park, 2012). 그러나 이들 치료법들은 비전형적 골절, 체중증가, 위장장애, 자궁내막암과 유방암 발병 및 하악골 괴사 등 일부 부작용이 보고되고 있다 (Kannel and Drake, 2009).

최근에는 골다공증과 산화스트레스와 연관성에 대한 연구가 진행되어 산화스트레스 증가와 골밀도 간에는 유의한 음의 상관관계가 있는 것으로 보고된 바 있다 (Basu *et al.*, 2001). 산화 스트레스가 파골세포에 직접적으로 작용하여 분화와 활성을 증가시킴으로서 꿀 흡수가 촉진된다고 하였다 (Silverton *et al.*, 1995; Yang *et al.*, 1998). 또한, 골다공증 여성의 경우 혈중 항산화제 농도 감소가 감소되었고, 항산화 비타민 섭취에 의해서 골밀도를 증가시켰다고 보고되었다 (Maggio *et al.*, 2003; Morton *et al.*, 2001). 산화적 스트레스 방어 물질인 항산화 물질은 세포내 산화적 손상을 억제시키거나 지연시키는 물질로서 (Jung *et al.*, 1999) 동·식물계에 분포되어 있으며 페놀성 화합물과 플라보노이드, 아스코르빈산, 토코페롤 등과 같은 물질은 체내 산소의 환원 대사산물인 활성 산소종 (reactive oxygen species, ROS)의 작용을 억제하는 것으로 알려졌다 (Block and Langseth, 1994). 이러한 항산화 성분을 가진 유효 약용식물의 안전한 천연물 소재를 이용하여 파골세포 활성의 억제에 의한 꿀 흡수를 최소화 시켜 골밀도 증가를 통한 골다공증 예방 또는 치료 물질 발굴이 절실하게 요구 된다.

무궁화 (*Hibiscus syriacus* L.)는 아욱과 (Malvaceae)에 속하는 낙엽활엽 관목으로 성질은 가볍고 약간 향기가 있으며 꽃이 크고 흰 것이 좋다 (Lee, 2006). 흰 무궁화 꽃에서 플라보노이드의 플라본 성분이 다량 함유되어 있고, 전체 플라본의 50%가 사포나린 (saponarin)으로 이루어져 약용으로 이용되어져왔다 (Yoo *et al.*, 1996). 또한, Lee 등 (2013)은 무궁화 추출물이 염증을 유발시킨 대식세포에서 염증 매개 인자를 현저하게 억제하여 항염 효능을 가진다고 보고하였다.

따라서 본 연구는 흰 무궁화 (white *Hibiscus syriacus* L. flower, WHS) 추출물의 항산화 활성과 *in vitro* 상 파골세포의 분화에 미치는 영향을 평가하여 꿀 질환 조절에 응용하기 위한 기초 연구 자료와 골다공증 예방 및 치료제로서의 가능성을 제시하고자 수행하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

1) 추출물 제조

실험에 사용된 무궁화는 충청남도 금산군 군북면 일대에 식재된 흰 무궁화 꽃, 잎 그리고 줄기 등을 2014년 8월에 채취하였으며 모든 약재는 실험 전에 초음파 세척기 (Branson, MO, USA)를 이용하여 불순물을 제거하고 실험에 사용하였다. 80% 에탄올 추출물을 이용하여 한국 약용 및 식용식물들의 활성화 식물 탐색방법 (Chung *et al.*, 1998)을 변형하여 선별된 흰 무궁화 부위별 시료를 동결건조기 (Martin Christ, Osterode, Germany)에서 건조한 후 분쇄하여 70% EtOH을 시료의 3배 부피로 첨가하여 85°C에서 3시간씩 3번 환류추출한 후 실온에서 냉각한 뒤 Filter paper (No. 4)를 이용하여 여과하고, 회전 감압농축기 (Rotavapor RII, Buchi, Switzerland)로 45°C에서 감압농축한 후 추출물을 동결 건조하여 분말 형태로 초저온 냉동고에 보관하였다. 이를 실험 직전 DPBS (Dulbecco's phosphate buffered saline, Daegu, Korea)에 용해하여 사용하였다.

2) 시약

총 폴리페놀과 총 플라보노이드 함량 측정을 위한 Folin-Ciocalteu's phenol, diethylene glycol, catechin 및 naringin과 DPPH (2,2-Diphenyl-1-picryl hydrazyl), 7 mM 2,2-azino-bis(3-ethylbenthiazoline-6-sulfonic acid), potassium persulfate 및 ascorbic acid 등의 모든 시약은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)사를 구입하여 항산화 활성을 평가하였다. 세포는 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Bremen, Germany)과 alpha-modified minimum essential medium (α -MEM), fetal bovine serum (FBS) 및 penicillin-streptomycin 등은 Gibco BRL (Gaithersburg, MD, USA)사의 제품으로 배양하였다. 파골세포 분화제 RANKL은



Fig. 1. White *Hibiscus syriacus* L. flower and its 70% EtOH extracts. (A); The flower has a large whole white within centrae and five petals. (B); It was showed that WHS extracts has formed by 70% ethanol extraction method. WHS; White *Hibiscus syriacus* L. flower.

PeproTech EC (London, England)사의 제품을 사용하였다. 세포 생존을 평가를 위한 MTT 용액 [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide]과 dimethyl sulfoxide (DMSO), 그리고 TRAP 활성 분석을 위한 TRAP 염색 kit 및 TRAP 용액 (sodium tartrate, *p*-nitrophenyl phosphate) 등 모든 시약은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) 사를 구입하여 실험에 이용하였다. 과일세포의 꿀 흡수 단계 유전자 분석을 위하여 TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), Emerald Taq (Takara, Tokyo, Japan) 등을 구입하여 RT-PCR 을 시행하였다.

3) 세포배양

과일세포 분화 유도를 위한 마우스 대식 세포주 RAW264.7 세포를 American Type Culture Collection (ATCC; Rockville, MD, USA)로부터 구입하여 10% FBS와 1% penicillin-streptomycin (100 U/ml, 100 µg/ml)이 포함된 DMEM 배지로 5% CO₂, 37°C incubator에서 배양 3일 간격으로 계대 배양하였다.

2. 실험방법

1) 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량 측정

(1) 총 폴리페놀 함량

총폴리페놀의 함량 측정은 Folin-Denis 방법 (1959)을 변형시켜 실시하였다. 시료 0.1 ml 에 증류수를 가하여 1 ml로 만든 후 0.1 ml의 Folin-ciocalteu's phenol reagent를 혼합하여 실온에서 3분 동안 방치시켰다. Na₂CO₃ 포화용액 0.2 ml 를 혼합하고 증류수를 첨가하여 2 ml로 만든 뒤 실온에서 1시간 동안 반응시키고 3,000 × g에 10분간 원심 분리하였다. 상등액을 취해 725 nm에서의 흡광도를 측정하였으며, 총 폴리페놀이 다량 함유되어 있다고 알려진 Catechin을 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 총 폴리페놀 함량을 구하였다.

(2) 총 플라보노이드 함량

총 플라보노이드의 함량 측정은 Davis 방법 (1947)을 변형하여 측정하였다. 에탄올 추출 검액 0.1 ml에 90% diethylene glycol 1 ml 과 1 N NaOH 0.2 ml 을 혼합하여, 37°C 수조에 넣어서 1시간 동안 반응시켰다. 흡광도의 변화는 420 nm에서 측정하였으며 Naringin을 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 총 플라보노이드 함량을 구하였다.

(3) DPPH radical 소거능

DPPH radical 항산화 활성은 100 M의 DPPH (2,2-Diphenyl-1-picryl hydrazyl) 메탄올 용액을 제조하여 시료를 농도별로 제조한 후 (0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1 mg/ml), 40 µl 에

DPPH solution 160 µl을 첨가한 후 23°C 암실에서 30분간 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구 L-ascorbic acid와 비교실험 하여 아래의 식으로 계산하였다. DPPH radical을 50% 감소시키는 농도를 IC₅₀값으로 표현하였다.

Inhibition% =

$$\frac{\text{Control}_{\text{Abs}} - (\text{Sample}_{\text{Abs}} - \text{Sample blank}_{\text{Abs}})}{\text{Control}_{\text{Abs}}} \times 100$$

Sample_{Abs}: 추출물을 넣었을 때의 흡광도 값

Sample blank_{Abs}: 추출물대신 동량의 증류수를 첨가했을 때의 흡광도 값

(4) ABTS radical 소거능

ABTS radical을 이용한 항산화력 측정은 ABTS cation decolourisation assay 방법을 시행하였다. 7 mM 2,2-azino-bis (3-ethylbenthiazoline-6-sulfonic acid)와 2.45 mM potassium persulfate를 최종 농도로 혼합하여 실온인 암실에서 12시간 이상 방치하여 ABTS를 형성시킨 후 734 nm에서 흡광도 값이 0.70.8 nm가 되도록 희석하였다. 희석된 용액 180 µl에 시료 20 µl을 가하여 60분 방치한 후 흡광도를 측정하였다. 대조구는 ascorbic acid와 비교실험 하였으며 아래의 식으로 계산하였다.

Inhibition% =

$$\frac{\text{Control}_{\text{Abs}} - (\text{Sample}_{\text{Abs}} - \text{Sample blank}_{\text{Abs}})}{\text{Control}_{\text{Abs}}} \times 100$$

Sample_{Abs}: 추출물을 넣었을 때의 흡광도 값

Sample blank_{Abs}: 추출물대신 동량의 증류수를 첨가 했을 때의 흡광도 값

2) 세포 생존을 및 과일세포 분화

(1) 세포 생존을

흰 무궁화 꽃, 잎 그리고 줄기 등의 과일세포에 대한 세포 생존율은 MTT assay에 의하여 평가하였다. RAW264.7 세포를 96-well plate에 1 × 10⁴ cells/well 농도로 분주하여 10% FBS와 1% penicillin-streptomycin이 포함된 DMEM에 24시간 동안 안정화 시켰다. 과일세포 분화 유도를 위하여 10% FBS와 1% penicillin-streptomycin이 첨가된 α-MEM에 RANKL (50 ng/ml)을 첨가한 뒤 시료의 1) 부위별 처리군; 10, 25, 50 µg/ml 과 2) 흰 무궁화 꽃 단독 처리군; 50, 100, 250, 500, 1,000 µg/ml 으로 구분하였고, 각각의 추출물을 처리하지 않은 군을 대조군으로 설정하였다. 배양 3일 후 MTT 용액 (2 mg) 50 µl 를 첨가하여 5% CO₂, 37°C incubator에서 2시간

동안 반응시켰다. 이후 배지를 제거하고 DMSO를 150 μ l 씩 첨가하여 실온에서 20분간 반응시켜 생성된 불용성의 formazan 결정을 용해하였다. Microplate reader (BIO-RAD 450, California, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 확인하였다. 세포 생존율 (cell viability)은 다음의 공식으로 계산하였다.

$$\text{Cell viability (\%)} = \text{AT} / \text{AC} \times 100$$

AC: absorbance of control
AT: absorbance of tested extract solution

(2) TRAP 염색

RAW264.7 세포로부터 RANKL에 의하여 분화된 성숙 파골 세포의 형태를 관찰하기 위하여 TRAP (tartrate resistant acid phosphate) 염색을 시행하였다. 분화제와 시료처리하여 배양 3 일된 세포는 PBS로 수세한 뒤 10% formalin으로 5분간 고정하고, DW로 다시 수세하였다. 시그마 TRAP 염색 kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 사용 설명에 따라 신선한 TRAP 용액으로 30분간 처리하였다. 염색된 둥근 모양 형태의 파골세포 (round-shaped osteoclast, ROC)는 광학현미경 (CKX41, Olympus, Tokyo, Japan)으로 관찰하고, 디지털 영상카메라 (DIXI 3000, Olympus, Tokyo, Japan)로 이미지를 영상화하였다.

(3) TRAP 활성화도

파골세포 특이 지표 TRAP 효소의 활성 측정은 Tintut 등 (2002)의 방법을 이용하여 TRAP solution assay으로 평가하였다. 분화제와 시료처리 후 배양 3일된 세포는 PBS로 수세 후 세포 용혈 완충액 (lysis buffer; 90 mM citrate, pH 4.8, 0.1% Triton X-100 containing 80 mM sodium tartrate)을 80 μ l 씩 분주하여 10분간 처리하였다. substrate solution (20 mM *p*-nitrophenyl phosphate)을 80 μ l 씩 첨가하여 5% CO₂, 37°C incubator에서 20분간 반응시킨 뒤 0.5 N NaOH 40 μ l 로 반응을 중지시켰다. microplate reader (BIO-RAD 450, California, USA)를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 확인하였다.

(4) 역전사 중합효소 연쇄반응 (RT-PCR)

파골세포의 꿀 흡수 단계에 관여하는 Cal-R (calcitonin receptor)와 TRAP 유전자의 발현을 관찰하기 위하여 세포 내 총 RNA는 TRIzol로 설명서에 따라 추출하였고, 동등한 양의 RNA는 iScript cDNA synthesis kit을 이용하여 cDNA를 합성하였다. 중합효소 연쇄반응은 Emerald Taq을 이용하여 초기 변성 과정을 95°C에서 10분간 처리한 후 95°C 1분, 51~58°C 30초, 72°C에서 1분으로 총 25~32 주기를 시행하였다. 최종 증폭 과정을 72°C에서 10분간 반응시킨 뒤 2% agarose gel에

Table 1. The sequences of each PCR primers.

Gene	Primer sequence (5'-3')	Annealing Temp (°C)	Product size (bp)
Cal-R	F-ACCGACGAGCAACGCCTACGC	58	490
	R-GCCTTCACAGCCTTACAGGTAC		
TRAP	F-AAATCACTCTTTAAGACCAG	51	317
	R-TTATTGAATAGCAGTGACAG		
GAPDH	F-AACTTTGGCATTGTGGAAG	53	223
	R-ACACATTGGGGTAGGAACA		

서 전기영동한 후 Et-Br로 염색하여 UV상 관찰하였고, densitometric analysis를 이용하여 수치화하였다. cDNA 1 mg 은 Table 1에 나타낸 바와 같이 각각의 primer를 이용하여 PCR을 수행하였다.

3. 통계분석

본 연구에 대한 실험결과는 통계분석 SAS 8.2를 이용하여 ANOVA (Analysis of variation) 검정을 실시한 후 Duncan's Multiple Range Test (DMRT)의 다중범위검정과 two-tailed Student's t-test로 $p < 0.05$ 수준에서 유의성을 검증하였다. 모든 실험군은 3개 이상, 3번 이상 반복하여 동일한 실험결과로 사용하였으며 정량적 결과는 대조군에 대한 백분율로 평균 \pm 표준편차로 나타냈다.

결과 및 고찰

1. 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량과 항산화 활성

폴리페놀성 물질은 에스트로겐 유사 활성이 있으며 활성자유 라디칼에 수소원자를 제공하여 안정된 비활성 라디칼을 형성하여 항산화 효과를 나타낸다 (Choi, 2006). 또한, 폴리페놀에 속하는 플라보노이드 (flavonoids)는 폐쇄계 화합물의 총칭으로서 활성산소종을 효과적으로 제거하여 뛰어난 항산화능이 있어 항바이러스, 항염증 및 항암 효과가 있는 것으로 알려져 있다 (Hetog *et al.*, 1993; Taso, 2010; Sohn *et al.*, 2008). 이러한 약용식물을 포함한 천연소재의 항산화 활성을 평가하기 위해서 자유 라디칼을 소거하는 DPPH assay (Jeong *et al.*, 2009)와 극성과 비극성 물질 모두와 반응하여 양이온 라디칼을 소거하는 ABTS assay (Li *et al.*, 2007) 방법이 이용되고 있다.

본 연구 결과 흰 무궁화의 총 폴리페놀 함량은 잎 (3.19%), 줄기 (2.20%), 꽃 (2.18%)순으로 나타났으며 총 플라보노이드 함량은 잎 (1.88%), 꽃 (1.40%), 줄기 (0.36%) 순으로 나타났다 (Table 2). 또한, 흰 무궁화의 DPPH radical 소거능과 ABTS radical 소거 활성능에서 IC₅₀ value이 각각 잎에서 1084.48 μ g/ml 과 587.35 μ g/ml 으로서 가장 높은 항산화 활성

Table 2. The contents of functional components of white *Hibiscus syriacus* L.

Sample	Total polyphenol (%)	Total flavonoids (%)
Flower	2.18 ± 0.01	1.40 ± 0.02*
Leaf	3.19 ± 0.00	1.88 ± 0.02
Stem	2.20 ± 0.01	0.36 ± 0.01

*Values are expressed Means ± SD (n = 4).

Table 3. Antioxidant activities of white *Hibiscus syriacus* L.

Sample	IC ₅₀ (μg/ml)	
	DPPH scavenging activities	ABTS scavenging activities
Ascorbic acid	31.15 ± 0.01	38.82 ± 0.01*
Flower	2039.77 ± 0.01	1196.92 ± 0.01
Leaf	1084.48 ± 0.02	587.35 ± 0.02
Stem	1841.67 ± 0.02	803.38 ± 0.02

*Values are expressed Means ± SD (n = 4).

을 보였다 (Table 3). 일반적으로 총 폴리페놀의 함량이 높을수록 DPPH 라디칼 소거능도 높아지고 (Choi *et al.*, 2005), 총 플라보노이드 성분과 ABTS 간 높은 상관관계가 있다고 하였다 (Ku *et al.*, 2009). 본 연구 결과 역시 흰 무궁화 부위에 따른 항산화 활성이 총 폴리페놀 함량과 총 플라보노이드 함량이 높을수록 우수한 것으로 나타났다. 그러나 본 연구에서 상대적으로 낮은 항산화 활성을 갖는 흰 무궁화 꽃의 총 플라보노이드 성분 함량은 47.74 mg/g으로 약용식품 중 높은 총 플라보노이드 함량을 가진 죽엽 (55.56 mg/g)과 차전자 (48.06 mg/g)와 (Kim *et al.*, 2012) 큰 차이를 보이지 않았다.

Yoo 등 (1996)은 무궁화 품종을 크로마토그래피로 조사한 결과 항산화 성분으로 알려진 플라보노이드를 13종 함유하고 있어 항산화 활성이 높을 것으로 예상하였고, 백색계통의 품종들이 다른 계통에 비해 함량이 더욱 높은 것으로 나타났다. 특히, 백색화는 약용으로 이용되어 왔으며 사포나린 (saponarin) 성분의 효능일 가능성이 있다고 하였다. 따라서, 흰 무궁화 꽃의 기능성 성분 분석과 다양한 질환 분야에서의 기능성 평가가 이루어져야 할 것이다.

2. 흰 무궁화 부위별 추출물의 파골세포 생존율과 분화 억제

마우스 대식 세포주 RAW264.7 세포를 이용하여 RANKL에 의해 유도된 파골세포에 대한 흰 무궁화 부위별 추출물의 10, 25, 50 μg/ml 농도에 따른 세포 생존율을 측정하였다. 흰 무궁화 꽃 처리군은 대조군과 유사한 생존율을 보였지만 흰 무궁화 잎과 줄기의 모든 농도에서 통계적으로 유의하게 증가되었다 (p < 0.05). 또한, TRAP 효소는 ATP와 nitrophenyl phosphate가 존재할 때 높은 활성을 가지며 골 흡수 작용 시 분비가 증가되기 때문에 그 활성도 측정하여 파골세포 분화

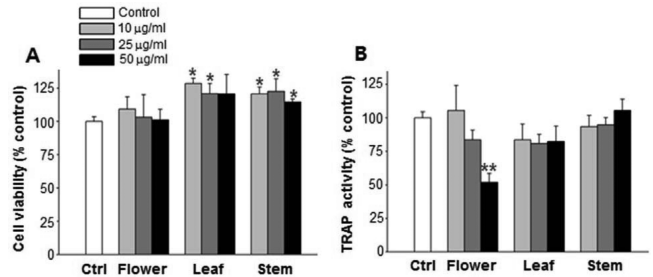


Fig. 2. Cytotoxicity and TRAP activity of osteoclast derived from RAW264.7 cell in the each regions extract of WHS. RAW264.7 cells were induced osteoclast by RANKL (50 ng/ml). (A); Cell viability was not affected at all concentrations of WHS flower. But, increase of cell viability revealed in the it's leaf and stem. (B); Above all, TRAP activity remarkably inhibited only WHS flower extract. Each column represents mean ± SD. *p < 0.05, **p < 0.01 vs Control. Ctrl; Control (only RANKL treatment), WHS; White *Hibiscus syriacus* L.

정도를 확인하는데 이용 된다 (Mok and Shin, 1996). Fig. 2에서와 같이 흰 무궁화 꽃 처리군의 50 μg/ml (51.99%) 에서만 대조군에 비하여 현저하게 감소된 TRAP 활성을 보였다 (p < 0.01). 반면 잎과 줄기의 모든 농도에서는 대조군과 유의한 차이가 나타나지 않아 파골세포 분화 억제에는 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

3. 흰 무궁화 꽃의 파골세포 생존율과 분화 억제

단핵구/대식세포에서 발현하는 RANK에 RANKL가 결합하여 분화된 TRAP 양성 세포는 RANKL, interleukin-1, tumor necrosis factor-α (TNF-α)와 같은 염증인자에 의해 자극되면 세포끼리 융합되어 다핵형 TRAP 양성 세포로 분화 된다 (Boyle *et al.*, 2003). 흰 무궁화 꽃 추출물을 고농도 처리하였을 경우 250 μg/ml 이상의 농도에서 세포 생존율이 유의하게 감소되어 세포 독성이 나타났다 (Fig. 3B). 세포 독성이 나타나지 않는 세포 안정 수준의 농도에서 파골세포의 TRAP 활성도는 대조군에 비교하여 50 μg/ml (47.28%)과 100 μg/ml (39.74%)에서 현저하게 낮은 활성도를 보였다 (Fig. 3C).

흰 무궁화 꽃 추출물에 의한 세포치사 활성 없이 낮은 TRAP 활성을 보이는 50과 100 μg/ml 농도로 처리하여 3일간 배양한 후 TRAP 염색을 시행한 결과, 대조군에서 세포가 융합되면서 다핵의 성숙 파골세포가 형성되어 골 표면에 부착하여 골 흡수 작용을 하는 TRAP 양성 다핵형 파골세포 (Karst *et al.*, 2004) 즉, 둥근 모양 형태 파골세포 (ROC)가 뚜렷하게 관찰되었다. 흰 무궁화 꽃 추출물의 모든 농도에서 대조군과 비교하여 농도 의존적으로 현저하게 감소된 불규칙 모양 형태 파골세포 (irregular shaped osteoclast, IOC)와 ROC와 융합되지 않은 단핵의 파골전구세포와가 관찰되었다. 이상의 본 연구 결과는 RANKL에 의해 유도되는 파골세포 분화 과

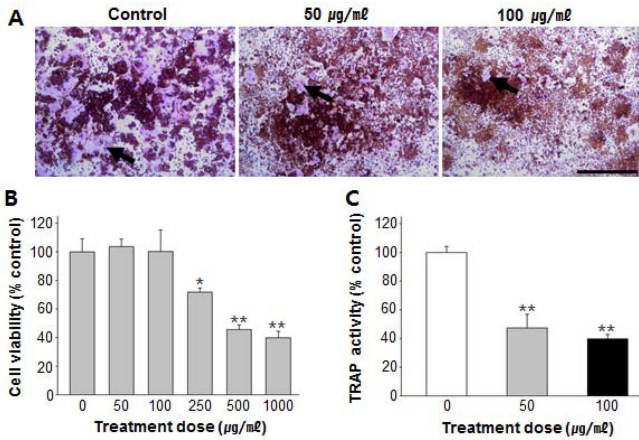


Fig. 3. Cytotoxicity and TRAP activity of high concentration treated WHS flower extract on osteoclast derived from RAW264.7 cell. (A); TRAP positive multinucleated cells shows that TRAP staining was performed after 3 days of culture. (B); The cytotoxicity is revealed a concentration of more than 250 µg/ml. (C); Osteoclast differentiation activity was reduced in a concentration-dependent manner, evaluated including ROC and irregular shaped osteoclast (IOC) by TRAP solution assay. Scale bar = 500 µm. Each column represents mean ± SD. **p* < 0.05, ***p* < 0.01 vs Control. Control; only RANKL treatment, Arrow; ROC formation, WHS; White *Hibiscus syriacus* L.

정 중에 흰 무궁화 꽃 추출물이 농도 의존적으로 파골세포 분화 억제에 직접적으로 관여하고 있음을 보여주고 있다 (Fig. 3A).

4. 흰 무궁화 꽃의 파골세포 분화 유도인자 억제

여러 신호전달 물질과 전사인자의 증가를 유도해 파골세포로의 분화를 촉진시키는 RANKL은 파골세포의 분화 초기 단계에 c-Fos의 유도하여 NFATc1의 발현에 중요한 역할을 한다고 알려졌다 (Takayanagi, 2007; Matsuoka *et al.*, 2004). NFATc1은 파골세포의 특이 유전자인 cathepsin K, TRAP, 칼시토닌 수용체 (calcitonin receptor, Cal-R), osteoclast-associated receptor (OSCAR) 및 β-integrin 등의 발현을 촉진시킴으로서 파골세포 분화 및 기능을 활성화 시킨다 (Takayanagi *et al.*, 2005). 더욱이 Cal-R와 TRAP은 실제적으로 골 흡수 작용에 관여하여 골 기질을 흡수한다고 알려졌다 (Boyle *et al.*, 2003). 흰 무궁화 꽃 추출물에 의한 성숙 파골세포의 골 기질 흡수단계에서 Cal-R와 TRAP의 mRNA 발현양 변화를 분석한 결과, 흰 무궁화 꽃 처리군의 Cal-R 발현양은 100 µg/ml 농도에서 대조군에 비해 46.69%로 현저하게 감소되었고, TRAP 발현양 역시 대조군에 비해 71.98%로 현저하게 감소하였다 (Fig. 4). 본 연구에서 RANKL에 의해 유도된 파골세포의 특이 지표인 TRAP 효소 활성의 억제와 마찬가지로 흰 무궁화 꽃 추출물에 의해서 Cal-R와 TRAP의 mRNA 발현 역시 유의하게 억제되고 있음을 확인하였다.

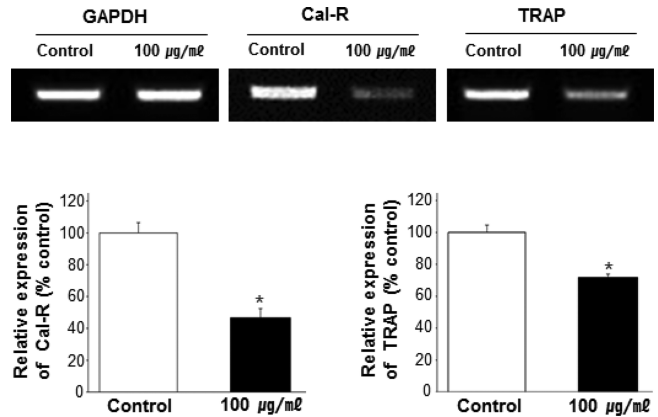


Fig. 4. WHS flower extract inhibits RANKL-induced gene expression in the resorption stage of osteoclast differentiation. RAW264.7 cells were treated with RANKL in the concentration of 100 µg/ml. RT-PCR was performed to detect the expression of the indicated genes, and performed with 25 cycles. Each column represents mean ± SD. **p* < 0.05 vs Control. Control; only RANKL treatment, Cal-R; calcitonin receptor, TRAP; tartrate resistant acid phosphate, WHS; White *Hibiscus syriacus* L.

이러한 결과는 최종적으로 골 기질 흡수를 억제시킬 것으로 사료된다.

산화 스트레스는 인터류킨-1 (interleukin-1)이나 tumor necrosis factor-α (TNF-α) 등에 의한 파골세포의 활성화에 관여하고 (Garrett *et al.*, 1990) 파골 계열세포의 NFκB를 활성화시켜 파골세포로의 분화를 촉진한다는 보고가 있다 (Iotsova *et al.*, 1997). 또한, Jeon 등 (2011)은 적송잎의 폴리페놀 물질이 파골세포의 분화억제 효과를 나타냄으로서 골 흡수 억제에 적송잎 추출물의 항산화 물질이 관여한다고 보고하였다. 플라보노이드, 안토시아닌, 타닌, 카테킨, 이소플라본, 리그난 및 레스베라트롤 등이 포함 되어 있는 폴리페놀은 함량이 높을수록 강력한 항산화 활성을 갖는다 (Urquiaga and Leighton, 2000; Li and Jeong, 2015; Song and Lee, 2015). 따라서 본 연구의 흰 무궁화 꽃 추출물의 폴리페놀 내 플라보노이드 특정 성분의 항산화 활성에 의한 산화스트레스를 방어하여 파골세포의 활성을 억제시킴으로서 골 흡수 억제효과가 있을 것으로 생각된다.

본 연구는 골 형성에 관여하는 조골세포 감소 혹은 파골세포에 의한 골 흡수 증가로 인하여 골질량 감소가 유발되는 골 다공증 예방 및 개선제로서 흰 무궁화 꽃 추출물의 가능성을 제시하고자 시행하였다. 연구 결과 흰 무궁화의 잎에서 가장 높은 총 폴리페놀과 총 플라보노이드 성분을 함유하여 항산화 활성 역시 높게 나타났다. 마우스 대식세포 RAW264.7 세포로부터 RANKL에 유도되는 파골세포는 흰 무궁화 꽃 추출물의 250 µg/ml 이상 농도에서 세포독성을 보였다. 또한 흰 무궁화 잎과 줄기의 세포 안정성 수준의 처리 농도에서 TRAP

활성 억제에 영향을 미치지 않았지만, 흰 무궁화 꽃 추출물의 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서는 파골세포의 분화 활성을 현저하게 억제시키고 있음을 확인하였다.

이상의 결과는 흰 무궁화 꽃의 플라보노이드 내 특정 성분이 항산화 활성에 의한 산화 스트레스를 방어하여 파골세포 활성을 억제시키고 있음을 시사한다. 따라서 흰 무궁화 꽃 추출물이 골다공증 예방 및 치료제로서 가능성을 제시하며, 추후 흰 무궁화 꽃의 성분 분석과 파골세포 분화 작용 기전에 대한 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 국립원예특작과학원 기관고유사업 ‘성장호르몬 분비 촉진 약용식물의 골다공증 개선 소재 탐색 및 발굴(과제번호: PJ009559)’의 지원을 받아 수행된 결과로 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Bartl R and Frisch B.** (2004). Informed decisions: Osteoporosis. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, Germany. p.253.
- Basu S, Michaelsson K, Olofsson H, Johansson S and Melhus H.** (2001). Association between oxidative stress and bone mineral density. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 288:275-279.
- Block G and Langseth L.** (1994). Antioxidant vitamins and disease prevention. *Food Technology*. 48:80-85.
- Boyle WJ, Simonet WS and Lacey DL.** (2003). Osteoclast differentiation and activation. *Nature*. 423:337-342.
- Choi KH.** (2006). The effects of mulberry fruits on the biological activity in ovariectomized rats. Master Thesis. Silla University. p.1-49.
- Choi SY, Lim SH, Kim JS, Ha TY, Kim SR, Kang KS and Hwang IK.** (2005). Evaluation of the estrogenic and antioxidant activity of some edible and medicinal plants. *Korean Journal of Food Science Technology*. 37:549-556.
- Chung IM, Kim KH and Ahn JK.** (1998). Screening of Korea medicinal and food plants with antioxidant activity. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 6:311-322.
- Davis WB.** (1947). Determination of flavanones in citrus fruits. *Analytical Chemistry*. 19:476-478.
- Garrett IR, Boyce BF, Oreffo RO, Bonewald L, Poser J and Mundy GR.** (1990). Oxygen-derived free radicals stimulate osteoclastic bone resorption in rodent bone *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Clinical Investigation*. 85:632-639.
- Hetog MGL, Hollman PCH and Van de Putte B.** (1993). Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea infusions, wines and fruit juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 41:1242-1246.
- Iotsova V, Caamano J, Loy J, Yang Y, Lewin A and Bravo R.** (1997). Osteopetrosis in mice lacking NF-B1 and NF-B2. *Nature Medicine*. 3:1285-1289.
- Jeong HS, Han JG, Ha JH, Kim Y, Oh SH, Kim SS, Jeong MH, Choi GP, Park UY and Lee HY.** (2009). Antioxidant activities and skin-whitening effects of nano-encapsuled water extract from *Rubus coreanus* Miquel. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 17:83-89.
- Jeon MH, Park MR, Park YS, Hwang HJ, Kim SG, Lee SH and Kim MH.** (2011). Effect of pine(*Pinus densiflora*) needle extracts on antioxidant activity and proliferation of osteoclastic RAW 264.7 cells. *Journal of the Korean Society Food Science Nutrition*. 40:525-530.
- Jung S, Kim HW and Yoon S.** (1999). Analysis of antioxidant nutrients in green yellow vegetable juice. *Food Science and Biotechnology*. 31:880-886.
- Kannel KA and Drake MT.** (2009). Adverse effects of bisphosphonates for osteoporosis management. *Mayo Clinic Proceedings*. 84:632-638.
- Karst M, Gorny G, Galvin RJ and Oursler MJ.** (2004). Roles of stromal cell RANKL, OPG, and M-CSF expression in biphasic TGF- regulation of osteoclast differentiation. *Journal of Cellular Physiology*. 200:99-106.
- Kim EJ, Choi JY, Yu MR, Kim MY, Lee SH and Lee BH.** (2012). Total polyphenols, total flavonoid contents, and antioxidant activity of Korean natural and medicinal plants. *Korea Journal of Food Science and Technology*. 44:337-342.
- Ku KM, Kim SK and Kang YH.** (2009). Antioxidant activity and functional components of corn silk(*Zea mays* L.). *Korean Journal of Plant Resources*. 22:323-329.
- Lee CB.** (2006). Wonsaekdaeha nsikmuldogam. Hyangmunsa. Seoul, Korea. p.736.
- Lee DM, Han HS and Lee YJ.** (2013). Effect of *Hibiscus flos* on inflammatory cytokines production in lipopolysaccharide-stimulated Raw 264.7 macrophages. *The Korea Journal of Herbology*. 28:61-68.
- Lee JW and Lee IS.** (2004). Effects of *Rubus coreanus* Miquel extracts on the activity and differentiation of MC3T3-E1 osteoblastic cell. *Journal of Life Science*. 14:967-974.
- Li H, Choi YM, Lee JS, Park JS, Yeon KS and Han CD.** (2007). Drying and antioxidant characteristics of the shiitake(*Lentinus edodes*) mushroom in a conveyor-type far-infrared dryer. *Journal of the Korean Society Food Science Nutrition*. 36:250-254.
- Li H and Jeong JM.** (2015). Antioxidant activities of various berries ethanolic extract. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 23:49-56.
- Lim YW, Sun DH and Kim YS.** (2009). Osteoporosis: Pathogenesis and fracture prevention. *Journal of the Korean Hip Society*. 21:6-16.
- Maggio D, Barabani M, Pierandrei M, Polidori C, Catani M, Mecocci P, Senin U, Pacifici R and Cherubini A.** (2003). Marked decrease in plasma antioxidants in aged osteoporotic women: Results of a cross-sectional study. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 88:1523-1527.
- Matsuo K, Galson DL, Zhao C, Peng L, Laplace C, Wang KZ, Bachler MA, Amano H and Aburatani H, Ishikawa H and Wagner EF.** (2004). Nuclear factor of activated T-cells(NFAT) rescues osteoclastogenesis in precursors lacking c-Fos. *Journal of Biological Chemistry*. 279:26475-26480.

- McClung M.** (2007). Role of RANKL inhibition in osteoporosis. *Arthritis Research & Therapy*. 9:1-6.
- Mok SK and Shin HS.** (1996). The effects of prostagladine and dibutyryl cAMP on osteoblastic cell activity and osteoclast generation. *Journal of WonKwang Dental Research International*. 6:43-62.
- Morton D, Barrett-Conner EL and Schneider DL.** (2001). Vitamin C supplement use and bone mineral density in postmenopausal women. *Journal of Bone Mineral Research*. 16:135-140.
- Park YS.** (2012). Diagnosis and treatment of osteoporosis. *Journal of the Korean Medical Association*. 55:1083-1094.
- Silverton SF, Mesaros S, Markham GD and Malinski T.** (1995). Osteoclast radical interactions: NADPH causes pulsatile release of NO and stimulates superoxide production. *Endocrinology*. 136:5244-5247.
- Sohn HY, Ryu HY, Jang YJ, Jang HS, Park YM and Kim SY.** (2008). Evaluation of antimicrobial, antithrombin, and antioxidant activity of aerial part of *Saxifraga stolonifera*. *Korean Journal of Microbiology Biotechnology*. 36:195-200.
- Song JH and Lee SR.** (2015). Anti-oxidant and inhibitory activity on NO production of extract and it's fractions from *Rosa davurica* Pall. leaves. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 23:20-26.
- Takayanagi H, Sato K, Takaoka A and Taniguchi T.** (2005). Interplay between interferon and other cytokine systems in bone metabolism. *Immunological Reviews*. 208:181-193.
- Takayanagi H.** (2007). Osteoimmunology: Shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nature Review Immunology*. 4:292-304.
- Taso R.** (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*. 2:1231-1246.
- Tintut Y, Parhami F and Tsingotjidou A.** (2002). 8-Isoprostaglandin E2 enhances receptor-activated NFkappa B ligand(RANKL)-dependent osteoclastic potential of marrow hematopoietic precursors via the cAMP pathway. *Journal of Biological Chemistry*. 277:14221-14226.
- Urquiaga I and Leighton F.** (2000). Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress. *Biological Research*. 33:55-64.
- Yang S, Ries WL and Key LL.** (1998). Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase in the formation of superoxide in osteoclasts. *Calcified Tissue International*. 63:346-350.
- Yoo KO, Lim HT and Kim JH.** (1996). Studies on the flavonoids of the *Hibiscus syriacus* L. complex. *Korean Journal of Plant Resources*. 9:224-229.