

석사학위논문

말뚝 추출물이 뼈질환 인자에
미치는 영향

제주대학교 대학원

의학과

박선순

2009년 2월

말뚝 추출물이 뼈질환 인자에 미치는 영향

지도교수: 유 은 숙

박 선 순

이 논문을 의학 석사학위 논문으로 제출함

2009년 2월

박선순의 의학 석사학위 논문을 인준함

심사위원장

강 희 경

印

위 원

현 진 원

印

위 원

주 홍 구

印

제주대학교 대학원

2009년 2월

Effects of Horse Bone Extracts on the Bone
Disease Factors

Sun Soon Park

(Supervised by Professor Eun-Sook Yoo)

A thesis submitted in partial fulfillment of the requirement for degree of
Master of Science in Medicine

2009. 2.

This thesis has been examined and approved.

Heekyung Kang

Jin Won Nyeon

Hong-Gu Joo

December 29, 2008

DEPARTMENT OF MEDICINE

GRADUATE SCHOOL

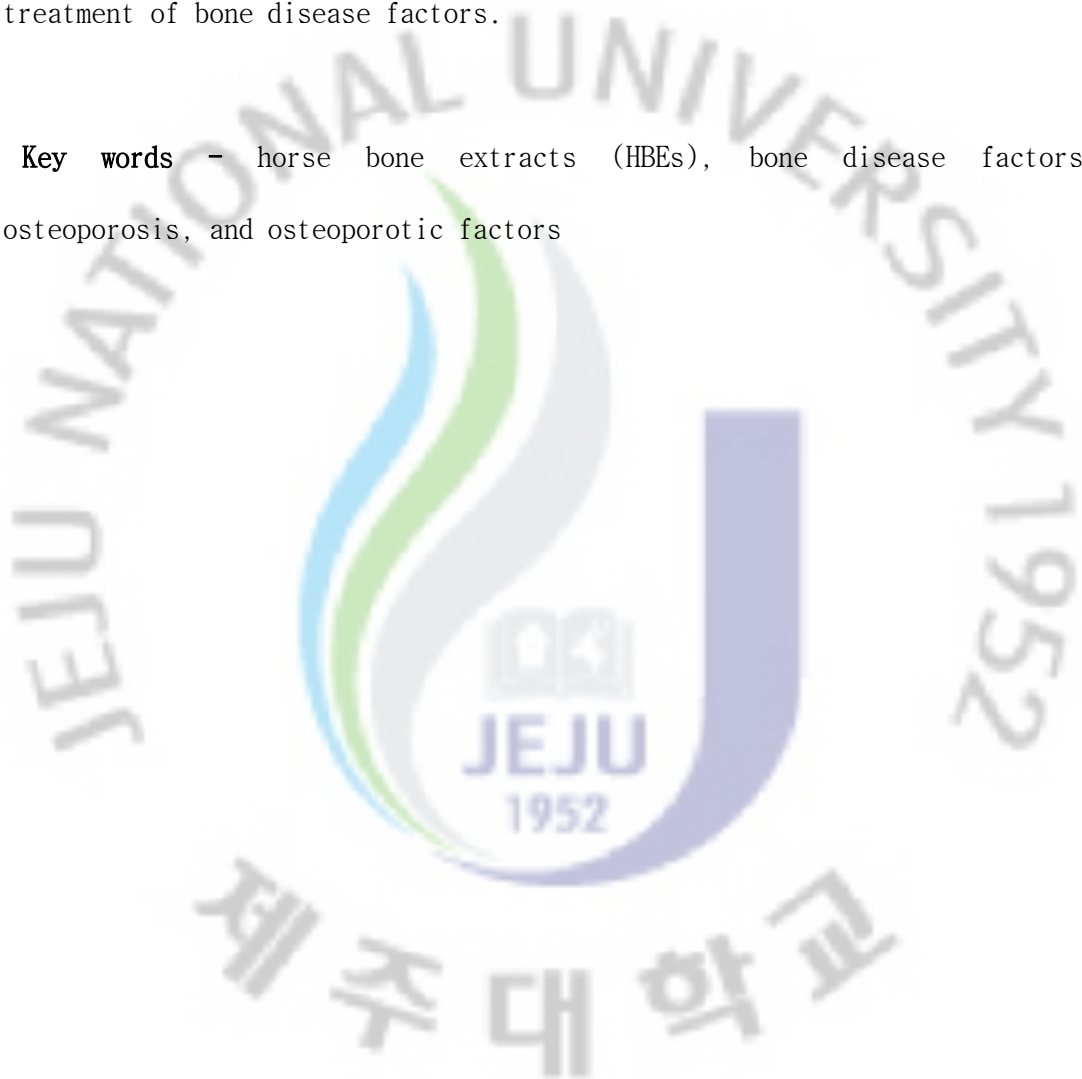
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

ABSTRACT

Bone is an active organ, constantly being remodeled through a lifelong balance between bone formation by osteoblasts and bone resorption by osteoclasts. This balance is maintained by various signals, including hormones, growth factors, and cytokines. Osteoporosis is a metabolic bone disease associated with an imbalance of bone remodeling. Osteoporosis is characterized by decreased bone mass and increased bone fractures. In this study, we investigated the *in vitro* and *in vivo* effects of horse bone extracts (HBEs). Horse bone was extracted with 80% alcohol (HBE-A1) at 100°C or water (HBE-W1) at 120°C, and 80% alcohol (HBE-A2) and water (HBE-W2) at room temperature. *In vitro*, MG-63 cells were stimulated with IL-1 β (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) to induce bone disease factor (IL-6) and RAW 264.7 cells were stimulated with sRANKL (100 ng/ml) to induce differentiation into TRAP-positive osteoclasts. An *in vivo* bone disease model of postmenopausal osteoporosis was used, in which osteoporosis was induced by ovariectomy of female S.D. rats (female rats were divided into 5 groups), and HBEs were administered to ovariectomized rats every day for 8 weeks. After 8 weeks, the rats were sacrificed and the following osteoporotic factors were measured: body weight, serum alkaline phosphatase (ALP), serum estradiol (E2), uterine/body weight ratio, and bone mineral density (BMD). The results showed that HBEs decreased the bone disease factors *in vitro* in a dose-dependent manner, and the TRAP-positive multinuclear osteoclasts were

decreased. The administration of HBE-W1 *in vivo* decreased the changes in body weight in ovariectomized rats. HBE-A1 and HBE-W1 decreased the ALP. In addition, HBE-W1 increased the uterine/body weight ratio, femur/body weight ratio, and BMD. Therefore, HBEs may be used for the prevention or treatment of bone disease factors.

Key words - horse bone extracts (HBEs), bone disease factors, osteoporosis, and osteoporotic factors



목차

ABSTRACT	i
목차	iii
LIST OF TABLES	v
LIST OF FIGURES	vi
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	7
1. 시료의 추출	7
2. 세포실험	9
1) 세포배양		
2) 세포독성평가; MTT assay		
3) Interleukin-6의 생성 및 정량		
4) RNA분리		
5) cDNA합성 및 Polymerase Chain Reaction (PCR)		
6) 뼈괴괴세포형성 (osteoclastogenesis)		
7) Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) staining		
3. 동물실험	13
1) 실험동물 및 실험군		
2) 난소적출 및 시료투여		
3) 혈청분리 및 자궁적출		
4) 넙다리뼈분리 및 뼈무기질함량 (bone mineral content; BMC), 뼈밀도(bone mineral density; BMD) 측정		

4. 통계처리	15
III. 결과	16
1. 세포실험에서 말뚝 추출물이 뼈질환 인자에 미치는 영향	16
1) MG-63 세포와 RAW 264.7 세포에서 말뚝 추출물의 독성평가	
2) MG-63 세포에서 interleukin-6의 mRNA발현에 미치는 효과	
3) MG-63 세포에서 interleukin-6의 생성에 미치는 효과	
4) RAW 264.7 세포에서 뼈과괴세포형성 미치는 효과	
2. 뼈질환 동물 모델에서 말뚝 추출물의 효과	34
1) 난소적출로 유도된 골다공증 백서의 체중변화	
2) 넓다리뼈의 무게변화	
3) 넓다리뼈의 뼈무기질함량 (bone mineral content; BMC) 및 뼈밀도 (bone mineral density; BMD) 변화	
4) 자궁의 무게변화	
5) 혈청 estradiol (E2)의 변화	
6) 혈청 alkaline phosphatase (ALP)의 변화	
IV. 고찰	45
V. 참고문헌	50
VI. 적요	56

LIST OF TABLES

Table 1 - 말뼈와 소뼈의 무기물 함량 비교 (이종언: 말고기와 말뼈의 영양 특성. 난지농업연구지, 2006)	6
Table 2 - Experimental design for the extraction conditions of horse bone	8
Table 3 - Primers used for PCR	12



LIST OF FIGURES

Figure 1 - Effects of HBEs on cell viability in IL-1 β stimulated MG-63 cells.	19
Figure 2 - Effects of HBEs on cell viability in RAW 264.7 cells.	20
Figure 3 - Effects of HBEs on the IL-6 production in IL-1 β stimulated MG-63 cells.	21
Figure 4 - Effects of HBE-W1 on the IL-6 production in IL-1 β stimulated MG-63 cells.	22
Figure 5 - Effects of HBE-W2 on the IL-6 production in IL-1 β stimulated MG-63 cells.	23
Figure 6 - Effects of HBE-A1 on the IL-6 production in IL-1 β stimulated MG-63 cells.	24
Figure 7 - Effects of HBE-A2 on the IL-6 production in IL-1 β stimulated MG-63 cells.	25
Figure 8 - Effects of HBE-W1 and HBE-W2 on the IL-6 mRNA expression in IL-1 β stimulated MG-63 cells.	26
Figure 9 - Effects of HBE-A1 and HBE-A2 on the IL-6 mRNA expression in IL-1 β stimulated MG-63 cells.	27
Figure 10 - Effects of HBEs on osteoclastogenesis in sRANKL stimulated RAW 264.7 cells.	28

Figure 11 - Effects of HBEs on osteoclastogenesis in sRANKL stimulated RAW 264.7 cells.	29
Figure 12 - Effect of HBE-W1 on osteoclastogenesis in sRANKL stimulated RAW 264.7 cells.	30
Figure 13 - Effect of HBE-W2 on osteoclastogenesis in sRANKL stimulated RAW 264.7 cells.	31
Figure 14 - Effect of HBE-A1 on osteoclastogenesis in sRANKL stimulated RAW 264.7 cells.	32
Figure 15 - Effect of HBE-A2 on osteoclastogenesis in sRANKL stimulated RAW 264.7 cells.	33
Figure 16 - Changes of body weight during administration of Horse Bone Extracts in ovariectomized rats.	38
Figure 17 - Changes of femur/body weight ratio by administration of Horse Bone Extracts in ovariectomized rats.	39
Figure 18 - Changes of femur bone mineral content (BMC) by administration of Horse Bone Extracts in ovariectomized rats.	40
Figure 19 - Changes of femur bone mineral density (BMD) by administration of Horse Bone Extracts in ovariectomized rats.	41
Figure 20 - Changes of uterine/body weight ratio by administration of Horse Bone Extracts in ovariectomized rats.	42
Figure 21 - Changes of serum estradiol (E2) by administration of Horse Bone Extracts in ovariectomized rats.	43
Figure 22 - Changes of alkaline phosphatase (ALP) by administration of Horse Bone Extracts in ovariectomized rats.	44

I. 서론

뼈 (골; bone)는 세포기능에 중요한 무기질의 저장과 물리적 지지·운동 유발·내부 장기의 보호와 같은 다양한 기능을 하고, 생체 내에서 가장 단단한 조직 중 하나이며, 뼈에 가해지는 힘에 반응하여 형태가 끊임없이 변화한다 (배용철 외, 2005; 전국 의과대학 교수편, 2002; 한국임상병리교수협의회 세포분과위원회, 2004). 이러한 뼈의 변화는 일생 동안 뼈의 형성과 흡수가 지속되는 뼈재형성을 통해 이루어진다. 뼈재형성은 뼈를 형성하는 뼈모세포 (조골세포; osteoblast)와 뼈를 흡수하는 뼈파괴세포 (파골세포; osteoclast)의 상호작용으로 이루어지며, 호르몬과 골격에 가해지는 기계적인 힘 등에 의해서 조절되는데, 혈류의 칼슘 이온 농도가 저하되면 부갑상선호르몬 (parathyroid hormone; PTH)이 분비되어 칼슘 이온이 방출되도록 하고, 칼시토닌과 음성 되먹이 기전 (negative feedback)에 의해 칼슘 이온의 방출을 억제한다. 또한 물리적인 스트레스, 중력과 미세 전기자극 등에 의해서도 일어나게 된다 (최명애 외, 1999).

이러한 뼈재형성을 이루는 세포 중 뼈모세포는 중간엽 (mesenchyma)을 이루는 근간세포 (stem cell)에서 유래되고 뼈 표면에 위치하여 뼈기질을 분비하고 석회화시키는 역할을 하는데 당 단백 효소인 alkaline phosphatase (ALP), I형 collagen, osteocalcin, osteopontin, bone sialoprotein 등을 분비하는 것으로 알려져 있다. 또한 뼈파괴세포는 골수내의 단핵구/ 대식세포 (monocyte/macrophage) 계통의 세포에서 유래되고 혈액 내로 순환되며 뼈 내막 층에서 다핵세포를 형성하여 뼈를 흡수한다. 뼈파괴세포는 세포표면에 주석산 저항성산 포스파타아제 (tartrate-resistant acid phosphatase; TRAP) 활성과 탄산탈수소 효소 활성을 갖는다. 탄산탈수소효소의 활성은 이산화탄소와 물로부터 탄산

(H₂CO₃)의 형성을 촉진시키며, 이렇게 형성된 탄산은 수소이온 (H⁺)과 중탄산이온 (HCO₃⁻)으로 분리되어 산성환경을 만든다. 바탕질의 무기염은 산성환경에 의해 용해되며, 방출된 무기염은 뼈파괴세포의 세포질 내로 들어가고 난 후 이접한 모세혈관으로 수송하는 과정에서 뼈흡수가 이루어진다 (William J. *et al.*, 2003) .

골수내의 단핵구/대식세포는 분화가 일어나는 동안 cytokine의 영향을 받는 것으로 알려져 있으나 뼈흡수 인자로 알려진 비타민D, PTH, interleukin-1 (IL-1), interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor (TNF- α), prostaglandin E₂ (PGE₂) 등에 대한 수용체는 뼈파괴세포에 존재하지 않는다. 이러한 인자는 우선 뼈모세포에 작용한 후, 뼈파괴세포 활성화 인자로 불리는 액성 인자가 뼈모세포에 의해 생산되고 이 인자를 매개로 뼈파괴세포의 활성화가 일어나는 것으로 알려져 있다. PTH, calcitonin, 비타민D, estrogen, insulin 등 전신적 호르몬과 뼈 조직에서 분비되는 insulin like growth factor-I (IGF-I), transforming growth factor- β (TGF- β), IL-1, IL-6 등의 국소 인자 등에 의해 뼈의 석회화를 조절하고, PGE₂ 자극에 의해 생성되는 TNF- α , IL-6, IL-1 β 는 뼈흡수에 영향을 미친다. 그 중 IL-6은 단핵세포로부터 생성되는 IL-1 β 에 의해 자극되어 뼈파괴세포의 분화를 촉진하는 것으로 알려져 있다. (Isabel Fernandez-Tresguerres Hernandez-Gil *et al.*, 2006; Koichi Matsuo *et al.*, 2008; LORENZ C. HOFBAUER *et al.*, 2000).

뼈파괴세포형성 (osteoclastogenesis)은 receptor activator of NF- κ B (RANK)/ RANK ligand (RANKL)/osteoprotegerin (OPG) signaling system에 의해 조절되는데, RANK는 뼈파괴세포에 존재하는 수용체로 RANKL과 결합하여 뼈파괴세포형성을 유도한다. 또한 자극된 뼈모세포나 기질세포에서 RANKL과 OPG가 분비되는데 RANKL [osteoclast differentiation factor (ODF), osteoprotegerin ligand (OPGL), TNF-related activation-induced cytokine (TRANCE)]은 TNF 리

간드 계열에 속하는 type II의 막전이단백질 (transmembrane protein)로서, 뼈과
괴진구세포 (osteoclast precursor)의 receptor activator of NF- κ B (RANK)에
결합하게 된다. OPG는 RANKL에 결합하여 RANK와 RANKL의 결합을 저해함으로써
뼈과괴세포의 형성을 억제하는 것으로 알려져 있다 (William J. *et al.*, 2003).

이러한 뼈형성과 뼈흡수간의 불균형이 이루어지면 대사성 뼈질환이 발생하는
데, 대사성 뼈질환의 대표적인 예로는 골다공증, 골연화증, 낭성 섬유성 골염,
파제트병, 섬유성 이형성증, 비대성 골관절증 등이 있으며, 골다공증의 경우 별
개의 질환이라기보다는 뼈의 밀도가 감소되어 있는 상태를 일컫는 말로써 그 원
인이 다양하다. 특히 여성의 경우, 폐경기 후 에스트로겐의 결핍으로 뼈소실이
증가하여 생기는 것으로 알려져 있다 (Ohta H *et al.*, 1992; Li M *et al.*,
1997). 실험적으로는 난소적출로 폐경을 유도한 백서의 골다공증 모델이 초기
폐경기 여성의 뼈소실과 비슷하여 골다공증 연구에 많이 이용되고 있다 (Kalu,
D. N., 1991; T. J. WRONSKI *et al.*, 1993). 난소적출에 의한 에스트로겐의 분
비가 억제되면 혈중 estradiol (E2)의 수치가 낮아지며, 자궁내막 및 자궁근 등
의 위축현상으로 자궁의 무게가 감소된다. (Bagi CM *et al.*, 1997; Li M *et al.*,
1997; Malluche HH *et al.*, 1987; Mueller K *et al.*, 1980). 또한 폐경기 여성
의 경우 뼈교체율이 증가하여 혈액 내 ALP가 증가하는 양상을 나타내어 폐경기
전후 여성에서 골다공증 관련 인자로 사용되고 있으며 (Durbridge TC *et al.*,
1990), 난소적출에 의한 뼈밀도 (bone mineral density; BMD)의 감소는 골다공
증을 진단하는데 유용하게 이용되고 있다. (Faugere Mc *et al.*, 1986).

뼈질환에서 가장 흔한 증상은 동통, 운동성 감소, 기형 등이 있으며, 환자의
이학적 검사는 운동성, 걸음걸이, 신경학적 검사 및 기형이나 종괴의 발견을 포
함한다. 또한 칼슘, 인, ALP에 대한 혈청 검사로 뼈의 대사능력을 측정하며, 중
양의 경우에는 조직생검 (biopsy)이 이용되고 있다 (이대일 외, 1997). 이와 관
련하여 뼈질환 치료제는 주요 호르몬과 이차성 호르몬, 비호르몬성 제제가 사용

되고 있다. 주요 호르몬으로는 PTH와 비타민 D가 칼슘과 인산염의 항상성을 조절하고, 이차성 호르몬으로는 칼시토닌, 프롤락틴, 성장호르몬, 인슐린, 갑상선 호르몬, 당질코르티코이드, 성호르몬 등이 있다. 그 밖에 비호르몬성 치료제로 나트륨과 불소, 칼슘과 인산염, 비스포스포네이트, 플리카미신, 이노제 등도 사용되고 있다 (전국 의과대학 교수편, 2003). 최근에는 한약재 및 식품 등 천연물의 활성물질을 이용한 대체 요법과 식이 섭취에 의한 무기질의 조절 등에 대한 연구가 이루어지고 있는데, 특히 골다공증 예방을 위한 대체 요법으로 식물성 에스트로젠 (phytoestrogen)의 식이 첨가 또는 이를 다량으로 함유하고 있는 식품의 섭취가 시도되고 있다 (Anderson JJB *et al.*, 1998; Setchell KDR *et al.*, 1999).

과거 우리나라에서 말은 승용 (乘用), 태용 (馱用), 만용 (輓用), 희생용, 식용 (食用)으로 사용되어왔으며, 최고의 재산가치로 계산되었다 (Kim Jeong-Sook, 2003). 말고기는 일부 유럽국가와 일본 등지에서 중요한 식품자원으로 이용되고 있으며, 허준의 동의보감에 의하면 "백마의 육 (肉)은 성질이 차고 맛은 맵고 쓰며 독이 약간 있으니 근골 (筋骨)을 기르고 요 (腰)와 척 (脊)을 강하게 하여 장건 (壯健)해진다."고 나와 있다 (Pil Nam Seong *et al.*, 2008; 허준, 1995). 말고기와 말뼈의 영양 특성 (Table 1.)에 대한 분석 자료를 참고하면, 말뼈의 무기질 함량은 소뼈에 비해 칼슘, 구리 등에서 함량이 높았고, 인과 마그네슘 함량이 낮게 나타났다 (이종언, 2006). 이는 말뼈가 무기질의 공급원으로 이용될 수 있음을 시사한다. 그러나 말과 관련한 연구는 주로 유럽에서 진행되었으며, 말고기의 영양적 및 식육적 가치에 대한 것으로 말뼈에 대한 연구는 미미한 실정이다 (Pil Nam Seong *et al.*, 2008; Young-Boong Kim *et al.*, 2005).

이에 본 연구에서는, 말뼈 추출물 (horse bone extract; HBE)을 120°C에서 증류수로 추출한 고온 물 추출물 (HBE-W1), 100°C에서 80% ethanol (EtOH)로 추출한 고온 주정 추출물 (HBE-A1), 실온에서 증류수로 추출한 실온 물 추출물

(HBE-W2), 실온에서 80% EtOH로 추출한 실온 주정 추출물 (HBE-A2)로 나누어 *in vitro*와 *in vivo*에서 뼈질환 인자에 미치는 영향을 확인하였다. *In vitro*에서는 뼈모세포 계열 (human osteoblast cell line)인 MG-63 세포에 IL-1 β 로 자극을 주어 뼈질환 관련 인자인 IL-6을 유도한 후 각 추출물의 IL-6의 생성억제 정도를 mRNA 발현과 ELISA로 확인하였다. 또한 대식세포 계열 (murine macrophage cell line)인 RAW 264.7 세포에서 sRANKL (soluble RANKL)을 사용하여 뼈파괴세포를 형성시킨 후 각 추출물의 뼈파괴세포형성의 억제 정도를 TRAP staining으로 확인하였다. *In vivo*에서는 난소절제술에 의해 유도된 백서의 골다공증 모델에 말뚝 고온 추출물을 투여하여 체중변화와 혈청 생화학적 인자, 자궁무게, 넓다리뼈의 변화 등 골다공증 인자들에 대한 영향을 확인하였다.

Table 1 - 말뚝과 소뚝의 무기물 함량 비교 (이종언: 말고기와 말뚝의 영양 특성. 난지농업연구지, 2006)

구분	말뚝 (족) mg/100 g	소뚝 (족) mg/100 g
P	5,874 ± 75	6,619 ± 129
K	82 ± 2.6	57 ± 2.8
Ca	10,193 ± 634	6,839 ± 562
Mg	132 ± 2.3	179 ± 3.9
Na	549 ± 8.8	462 ± 9.2
Fe	12 ± 1.2	13 ± 1.4
Mn	0.12 ± 0.01	0.12 ± 0.01
Zn	4.7 ± 0.1	4.6 ± 0.1
Cu	0.79 ± 0.03	0.29 ± 0.04

II. 재료 및 방법

1. 시료의 추출

본 연구에 사용된 말뚝은 제주바이오세상에서 제공 받아 사용하였다. 말뚝을 수세하여 5 cm로 자른 후 무게의 10배의 끓는 물에 30분간 넣었다 건져 육과 피를 제거한 후 200 g/l 의 비율로 24 시간 동안 추출하였다. 추출조건은 120°C에서 distilled water (D.W.)로 추출한 고온 물 추출물 (HBE-W1)과 실온 물 추출물 (HBE-W2), 100°C에서 80% EtOH로 추출한 고온 주정 추출물 (HBE-A1)과 실온 주정 추출물 (HBE-A2)로 나누었다. 추출한 시료는 ADVANTEC 5B filter paper (ADVANTEC, Toyo, Japan)로 여과한 후 얻어진 여액을 감압 농축하였다. 세포용 추출물은 추가로 동결건조를 하여 남은 용매를 휘발 시키고 100% EtOH에 녹여 사용하였으며, 고온 추출물은 증류수를 가하여 동일한 용량으로 정용하여 사용하였다.

Table 2 - Experimental design for the extraction conditions of horse bone

Extraction condition			
Sample name	Temp. (°C)	Solvent	Time (hr)
HBE-W1 ^①	120	distilled water	24
HBE-W2 ^②	RT	distilled water	24
HBE-A1 ^③	100	80% EtOH	24
HBE-A2 ^④	RT	80% EtOH	24

Sample names

- ① HBE-W1; horse bone extract-water (120°C)
- ② HBE-W2; horse bone extract-water (room temperature)
- ③ HBE-A1; horse bone extract-80% EtOH (100°C)
- ④ HBE-A2; horse bone extract-80% EtOH (room temperature)

2. 세포실험

1) 세포배양

백모세포 계열 (human osteoblast cell line)인 MG-63 세포와 대식세포 계열 (murine macrophage cell line)인 RAW 264.7 세포는 Korean Cell Line Bank (KCLB)에서 분양 받아 실험에 사용하였다. MG-63 세포와 RAW 264.7 세포는 penicillin-streptomycin 100 units/ml (GIBCO, NY, USA)와 10% fetal bovine serum (FBS; GIBCO, NY, USA)이 함유된 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; GIBCO, NY, USA) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 항온기에서 배양하였으며, 3-4 일에 한번 계대배양 하였다.

2) 세포독성평가; MTT assay

MG-63 세포 (1.0×10^5 cells/ml)는 24 well plate에 접종하여 18 시간 전배양 후 배지를 제거하고 시료와 IL-1 β (BIOSOURCE, Europe S.A., 10 ng/ml)가 포함된 배지를 처리하여 24 시간 배양하였다. RAW 264.7 세포 (0.5×10^3 cells/ml)는 96 well plate에 접종하여 24 시간 전배양 한 후 시료를 처리하여 7 일간 배양하였다. 배양이 끝나면 배양액에 MTT용액 (AMRESCO, Ohio, USA)을 0.4 mg/ml의 농도로 첨가하여 4시간 동안 반응시킨 후 상층액을 제거하고, dimethylsulfoxide (DMSO; AMRESCO, Ohio, USA) 300 μ l을 가한 뒤 칩전물을 용해시켰다. 540 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 각 실험군에 대한 평균 흡광도 값을 구하여 대조군의 흡광도 값과 비교한 값으로 시료에 대한 세포독성을 나타내었다.

3) Interleukin-6의 생성 및 정량

MG-63 세포 (1.0×10^5 cells/ml)를 24 well plate 에 접종하여 18 시간 전 배양 후 배지를 제거하고 시료와 IL-1 β (10 ng/ml)가 포함된 배지를 처리하여 배양하였다. 30 시간 후 배양배지를 원심분리 (12,000 rpm, 3 min)하여 얻어진 상층액의 IL-6은 human IL-6 ELISA Kit II (BD Biosciences, NJ, USA)을 이용하여 정량하였으며, standard에 대한 표준곡선의 r^2 값은 0.99 이상이었다.

4) RNA분리

MG-63 세포 (1.0×10^5 cells/ml)를 60 Φ dish에 접종하여 18 시간 전배양 후 배지를 제거하고 시료와 IL-1 β (10 ng/ml)가 포함된 배지를 처리하여 24 시간 배양하였다. 세포에 TRI-reagent (MRC, OH, USA)를 첨가하여 균질화한 후 클로로포름 (chloroform; CHCl₃)을 첨가하여 원심분리 (4 $^{\circ}$ C, 15,000 rpm, 15 min)하여 상층액을 얻었다. 상층액에 동량의 이소프로판올 (isopropanol)을 첨가하여 원심분리 (12,000 rpm, 8 min)하고, 침전된 ribonucleic acid (RNA)를 세척하기 위해 diethyl pyrocarbonate (DEPC)가 포함된 75% EtOH을 첨가하여 원심분리 (10,000 rpm, 5 min) 한 후 건조시켜 DEPC가 포함된 D.W.에 녹였다. 260 nm에서 흡광도를 측정하여 RNA를 정량하였고, 260 nm에서의 흡광도와 280 nm에서의 흡광도 비율이 1.7-1.9 범위 내의 값을 갖는 RNA를 실험에 사용하였다. 모든 실험은 RNase-free한 조건에서 이루어졌다.

5) cDNA합성 및 polymerase chain reaction (PCR)

Complementary deoxyribonucleic acid (cDNA)를 합성하기 위해 1 μ g의 total

RNA를 oligo (dT)₁₈ primer, 0.5 μM deoxyribonucleotide tri-phosphate (dNTP), 1 unit RNase inhibitor, 2 U^M-MuLV reverse transcriptase로 70°C에서 5 분, 26°C에서 5 분, 37°C에서 60 분, 70°C에서 15 분 heating 시켜 반응을 중지시켰다. 합성된 cDNA로부터 IL-6, β-actin을 증폭시키기 위하여 polymerase chain reaction (PCR)을 수행하였다. 1 μl cDNA와 reaction buffer [5' and 3' primer, 10 × PCR buffer (100 mM Tris-HCl pH 8.3, 500 mM KCl, 20 mM MgCl₂, Enhancer solution), 10 mM dNTPs (2.5 mM each), i-TaqTM DNA Polymerase (5 U/μl)] (iNtRON Biotechnology, Gyeonggi-do, Korea)를 25 μl로 맞춘 다음 C1000TM Thermal Cycler(BIO-RAD, CA, USA)를 이용하여 PCR 을 실시하였다 (Table 1). PCR에 의하여 생성된 산물은 1.2% agarose (Promega, WI. USA) gel에서 전기영동을 실시하고 ethidium bromide (EtBr; SIGMA, MO, USA, 0.5 μg/ml)로 염색하여 특정 band를 확인하였다.

Table 2 - Primers used for PCR.

Gene	Primer sequences	Condition (cycle number)	Fragment Size (bp)
IL-6	F; 5'-AATTCGGTACATCCTCGACG-3'	94°C, 20 sec	421
	R; 5'-GCGCAGAATGAGATGAGTTG-3'	56°C, 30 sec 72°C, 30 sec (30 cycles)	
β-actin	F; 5'-ATGGGTCAGAAGGATTCCTATG-3'	94°C, 20 sec	588
	R; 5'-CAGCTCGTAGCTCTTCTCCA-3'	56°C, 30 sec 72°C, 30 sec (30 cycles)	



6) 뼈파괴세포형성 (osteoclastogenesis)

RAW 264.7 세포 (0.5×10^3 cells/ml)를 sRANKL (R&D Systems, MN, USA, 100 ng/ml)이 포함된 배지를 이용하여 96 well plate에 접종하여 24 시간 배양 후 시료를 처리하고 7 일간 배양하였으며, 4 일째에 신선한 배양액으로 교환해주었다.

7) Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) staining

뼈파괴세포형성을 확인하기 위해 TRAP assay kit (Kamiya Biomedical Company, CA, USA)를 사용하여 뼈파괴세포를 염색하였다. 배양이 끝난 세포를 phosphate buffered saline (PBS; SIGMA, MO, USA)로 한 번 세척하여 10% formalin을 50 μ l/well씩 넣어 5 분간 고정시켰다. D.W.로 3 번 세척해주고 기질 물질 [50 mM tartrate-containing buffer (pH 5.0), chromogenic substrate 3 mg/vial]을 각각 50 μ l/well씩 넣어준 후 빛을 차단한 상태에서 37°C에서 1 시간 30분 반응시켰다. 반응이 끝난 세포를 D.W.로 2 번 세척한 후 현미경으로 염색된 세포의 수를 확인하였다.

3. 동물실험

1) 실험동물 및 실험군

생후 1 개월의 Sprague-Dawley (S.D.)계 암컷을 (주) 오리엔트바이오에서 구입하여 5 개월까지 사육한 뒤 실험에 사용하였다. 실험군은 수술 직후부터 모의수

술을 실행한 정상대조군 (sham), 난소적출을 실행한 유발대조군 (OVX), 난소적출을 실행하고 치료약물인 17β -estradiol을 투여한 약물대조군 (OVX-E2), 난소적출을 실행하고 고온 물 추출물을 투여한 실험군 (OVX-W1), 난소적출을 실행하고 고온 주정 추출물을 투여한 실험군 (OVX-A1)으로 나누었으며, 군당 7 마리씩 실험에 사용하였다.

2) 난소적출 및 시료투여

체중 250 g 내외의 생후 5 개월 된 백서를 ketamine (yuhan, Korea) 50 mg/kg과 rompun (Bayer Korea Ltd, Korea) 10 mg/kg을 혼합하여 근육 주사하여 전신 마취한 후 등 쪽의 털을 제거하고 중앙에서 양쪽 아랫부분을 3-4 cm정도 피부 및 근육까지 절개한 뒤 지방층에 둘러싸인 양측의 난소를 찾아 적출하고 난관을 결찰한 후 봉합하였다. Sham수술은 난소적출과 동일한 방법으로 난소를 노출한 후 난소를 적출하지 않고 원상복귀 시킨 후 봉합하였다. 수술 직후부터 8 주 동안 OVX-W1군과 OVX-A1군은 시료를 4 ml/kg으로 음용수에 희석하여 매일 경구투여 (per os; P.O)하였고, OVX-E2군은 17β -estradiol을 20 μ g/kg으로 3 회/주 근육주사 (intramuscular injected; I.M.)하였다. 매주 1회 체중변화를 측정하였다.

3) 혈청분리 및 자궁적출

백서를 희생하기 전에 절식시키고 CO₂를 이용하여 안락사 시켰다. 혈액은 복대정맥을 통해 채취하였으며 즉시 원심분리 (3000 rpm, 15min)하여 혈청을 분리하고, 혈청 E2와 혈청 ALP는 이원의료재단에 의뢰하여 분석하였다. 혈액 채취 후 즉시 자궁을 분리하여 무게를 측정하였다.

4) 넙다리뼈 분리 및 뼈무기질함량 (bone mineral content; BMC), 뼈밀도 (bone mineral density; BMD) 측정

양쪽 넙다리뼈를 분리하기 위하여 근육과 골막 등을 전부 제거하였으며, 넙다리뼈를 24 시간 건조시켜 건조된 무게를 측정하였다. 넙다리뼈의 뼈밀도와 뼈무기질함량은 건조된 넙다리뼈를 이중에너지 X선 흡수법 (DEXA; Norland Medical Systems, Fort Atkinson, WI, USA)을 사용하여 측정하였다.

4. 통계처리

실험결과는 각 실험군별로 평균과 표준편차 (standard deviation; S.D.)를 구하고 유의성 검증을 위하여 Student's T-test 분석과 one-way ANOVA를 이용하여 검정하였다. 유의수준은 $p < 0.05$ 로 설정하였다.

III. 결과

1. 세포실험에서 말뚝 추출물이 뼈질환 인자에 미치는 영향

1) MG-63세포와 RAW 264.7 세포에서 말뚝 추출물의 독성평가

MTT assay는 살아있는 세포의 mitochondria의 탈수소 효소작용에 의하여 수용성의 노란색 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT)가 환원되어 형성되는 자주색을 띠는 불용성 formazan의 흡광도를 측정하는 방법으로 말뚝 추출물이 MG-63 세포와 RAW 264.7 세포에 독성을 나타내는지를 확인하기 위해 사용하였다 (Carmichael *et al.*, 1987).

MG-63 세포에 말뚝 추출물을 100, 200, 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 처리하였으며, 시료를 처리하지 않은 대조군과 흡광도 값을 비교하여 대조군의 세포생존율을 100%로 나타냈다. HBE-W1, HBE-W2, HBE-A2를 처리하여 각 농도에서 90% 이상의 세포생존율을 나타냈으며, HBE-A1은 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 세포생존율이 87%로 나타났다 (Figure 1).

RAW 264.7 세포에 말뚝 추출물을 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 처리하여 대조군과 비교하여 본 결과 HBE-W1, HBE-W2, HBE-A1을 처리하여 각 농도에서 90% 이상의 세포생존율을 나타냈으며, HBE-A2는 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 75%로 나타났다 (Figure 2).

이후 MG-63 세포는 100, 200, 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서, RAW 264.7 세포는 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도 이하에서 실험을 진행하였다.

2) MG-63 세포에서 interleukin-6의 생성에 미치는 효과

말뚝 추출물이 IL-6의 생성에 미치는 영향을 알아보기 위하여, MG-63 세포에 IL-1 β (10 ng/ml)를 처리하여 IL-6의 생성을 유도하고, 각각의 말뚝 추출물에 의한 IL-6의 생성 억제를 ELISA를 이용하여 정량하였다.

각각의 말뚝 추출물을 200 μ g/ml의 농도로 처리하였을 때, 모든 시료에서 30% 이상의 IL-6의 생성 억제효과를 확인할 수 있었으며 그 중 주정 추출물인 HBE-A1과 HBE-A2를 처리 하였을 때 각각 50%와 75% 정도의 억제효과를 확인할 수 있었다 (Figure 3). 이들을 농도별로 처리하여 HBE-A1과 HBE-A2가 농도의존적으로 억제하는 결과를 확인할 수 있었다 (Figure 4-7).

3) MG-63 세포에서 interleukin-6의 mRNA발현에 미치는 효과

MG-63 세포에 IL-1 β (10 ng/ml)를 처리하여 IL-6의 생성을 유도하고 말뚝 추출물이 IL-1 β 에 의한 IL-6 mRNA 발현에 미치는 영향을 알아보기 위하여 RT-PCR을 수행하였다.

IL-6 mRNA의 발현을 확인한 결과 IL-1 β 의 처리로 IL-6의 mRNA의 발현이 현저히 증가하였으며, 말뚝 추출물을 농도별 (100, 200, 400 μ g/ml)로 처리한 결과 모든 추출물에서 농도 의존적으로 억제하는 결과를 확인할 수 있었으며 HBE-A1과 HBE-A2의 경우 낮은 농도 (100 μ g/ml)에서도 IL-1 β 에 의해 유도된 IL-6 발현을 강하게 억제하는 결과를 확인할 수 있었다 (Figure 8-9).

4) RAW 264.7 세포에서 뼈파괴세포형성에 미치는 효과

sRANKL에 의해 유도된 단핵의 뼈파괴전구세포와 다핵의 뼈파괴세포는 세포표

면에 TRAP (tartrate-resistant acid phosphatase)을 가지고 있다. Acid phosphatase는 산성 조건에서 naphthol AS-B1 phosphoric acid를 가수분해하여 생성된 naphthol AS-B1이 azo dye (Fast garnet GBC)와 결합하여 불용성의 침전물을 형성하여 붉게 염색된다 (Goldberg *et al.*, 1962). 붉게 염색된 세포가 TRAP을 가지는 뼈과괴세포로 그 수를 확인하여 뼈과괴세포의 형성 정도를 조사하였다.

RAW 264.7 세포에 sRANKL (100 ng/ml)을 처리하여 뼈과괴세포형성을 유도하고, 각각의 말뚝 추출물을 처리하였다. 각각의 말뚝 추출물을 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 처리하였을 때, 뼈과괴세포형성을 30% 이상 억제하였으며, 그 중 고온 추출물인 HBE-W1과 HBE-A1에서 60% 이상의 억제효과를 나타냈다 (Figure 10-11).

각각의 말뚝 추출물을 농도별 (25, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)로 처리하여 확인한 결과 HBE-W1은 63, 71, 78% 정도의 억제효과를 나타내었고, HBE-W2는 46, 66, 73% 정도의 억제를 나타냈다. HBE-A1은 64, 79, 81% 정도, HBE-A2는 40, 48, 57% 정도로 뼈과괴세포형성을 억제하였다 (Figure 12-15).

위의 결과 sRANKL에 의해 유도된 뼈과괴세포형성에는 고온 추출물인 HBE-W1과 HBE-A1이 억제활성이 높다는 것을 확인할 수 있었다.

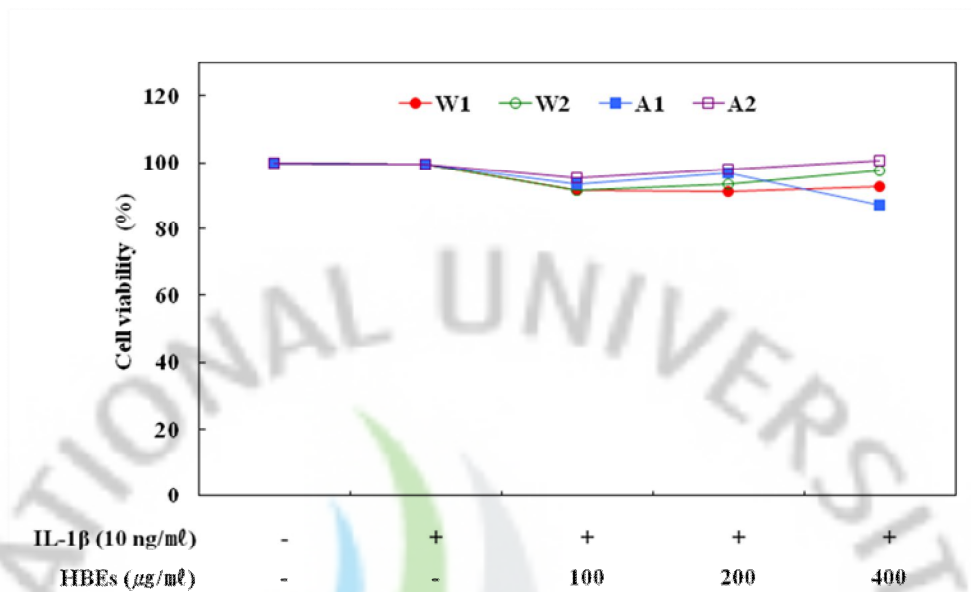


Figure 1 - Effects of HBEs on cell viability in IL-1 β stimulated MG-63 cells. MG-63 cells (1.0×10^5 cells/ml) were pre-incubated for 18 hr, and the 24 hr culture of cells were stimulated with IL-1 β (10 ng/ml) in the presence or absence of HBE-W1, W2, A1, and A2 (100, 200, and 400 μ g/ml). Cell viability was determined by MTT assay.

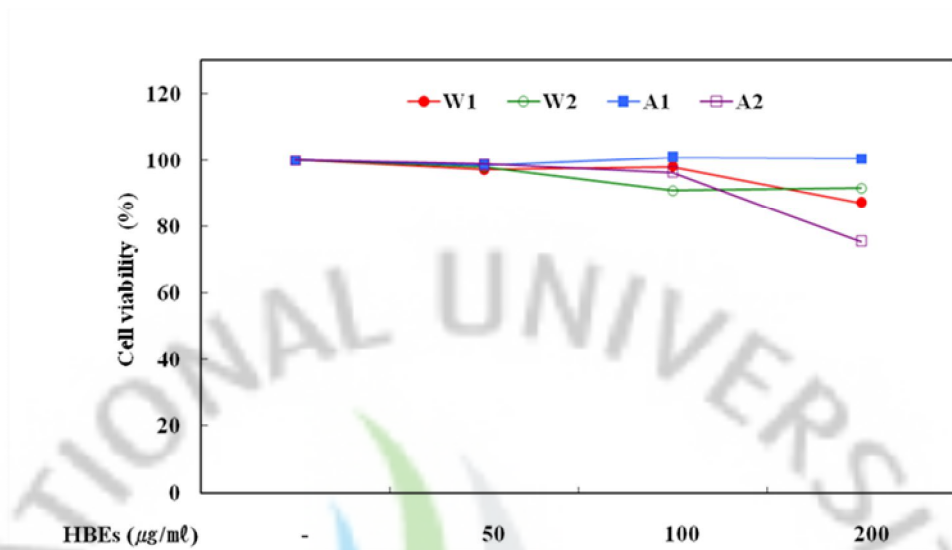


Figure 2 - Effects of HBEs on cell viability in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cell (0.5×10^3 cells/ml) were cultured for 7 days in the presence or absence of HBE-W1, W2, A1, and A2 (50, 100, and 200 $\mu\text{g/ml}$). Cell viability was determined by MTT assay.

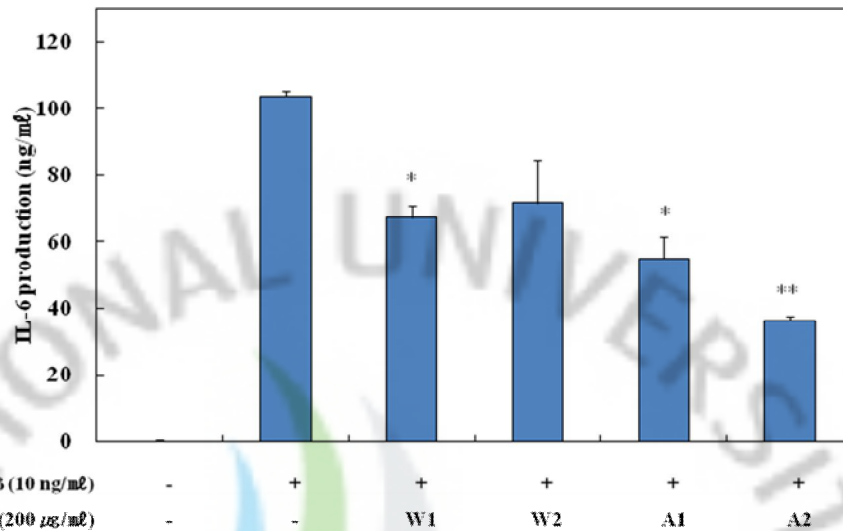


Figure 3 - Effects of HBEs on the IL-6 production in IL-1 β stimulated MG-63 cells. MG-63 cells (1.0×10^5 cells/ml) were pre-incubated for 18 hr, and the 30 hr culture of cells were stimulated with IL-1 β (10 ng/ml) in the presence or absence of HBE-W1, W2, A1, and A2 (200 μ g/ml). The productions of IL-6 were assayed by ELISA (450 nm) method from the culture medium. The data represent the mean \pm S.D. (n=4). *p<0.05 vs. IL-1 β , **p<0.01 vs. IL-1 β .

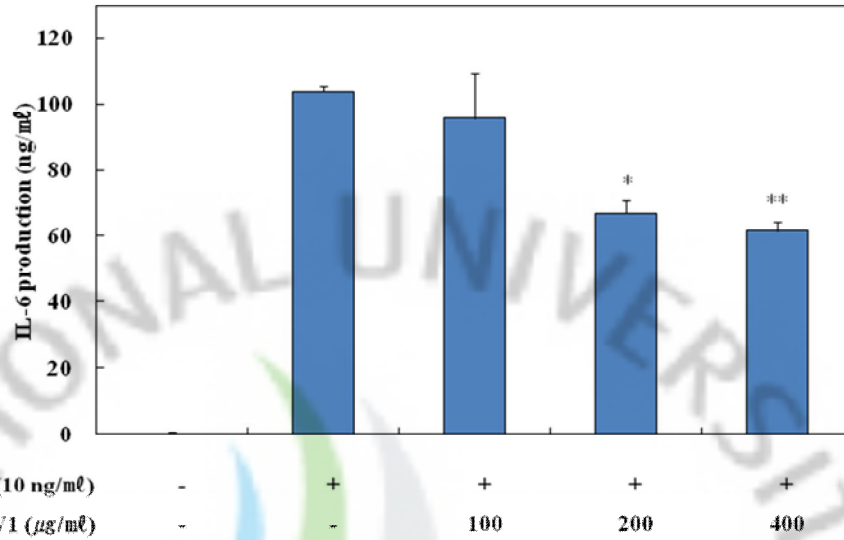


Figure 4 - Effects of HBE-W1 on the IL-6 production in IL-1 β stimulated MG-63 cells. MG-63 cells (1.0×10^5 cells/ml) were pre-incubated for 18 hr, and the 30 hr culture of cells were stimulated with IL-1 β (10 ng/ml) in the presence or absence of HBE-W1 (100, 200, and 400 μ g/ml). The productions of IL-6 were assayed by ELISA (450 nm) method from the culture medium. The data represent the mean \pm S.D. (n=4). *p<0.05 vs. IL-1 β , **p<0.01 vs. IL-1 β .

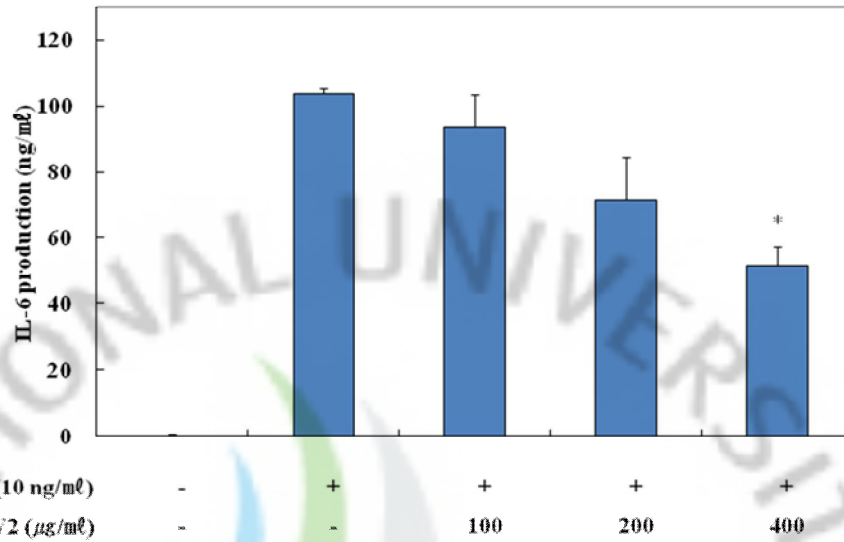


Figure 5 - Effects of HBE-W2 on the IL-6 production in IL-1 β stimulated MG-63 cells. MG-63 cells (1.0×10^5 cells/ml) were pre-incubated for 18 hr, and the 30 hr culture of cells were stimulated with IL-1 β (10 ng/ml) in the presence or absence of HBE-W2 (100, 200, and 400 μ g/ml). The productions of IL-6 were assayed by ELISA (450 nm) method from the culture medium. The data represent the mean \pm S.D. (n=4). *p<0.05 vs. IL-1 β .

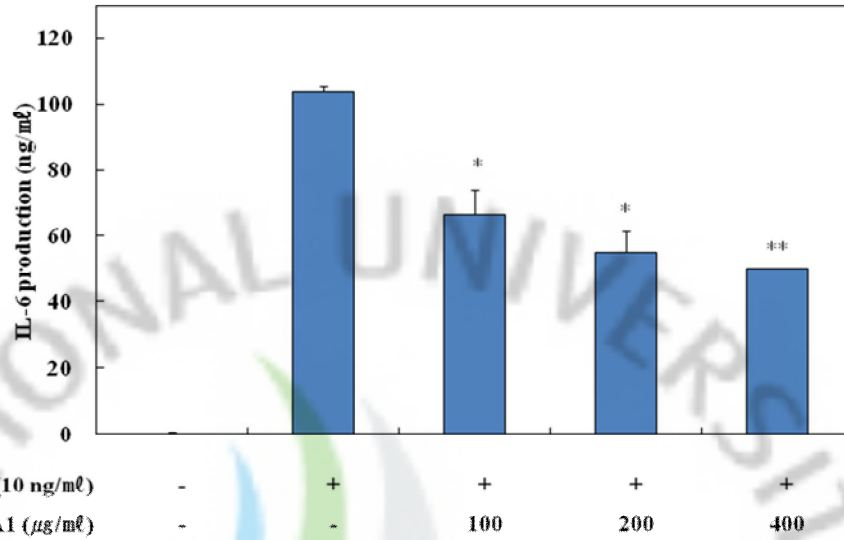


Figure 6 - Effects of HBE-A1 on the IL-6 production in IL-1 β stimulated MG-63 cells. MG-63 cells (1.0×10^5 cells/ml) were pre-incubated for 18 hr, and the 30 hr culture of cells were stimulated with IL-1 β (10 ng/ml) in the presence or absence of HBE-A1 (100, 200, and 400 μ g/ml). The productions of IL-6 were assayed by ELISA (450 nm) method from the culture medium. The data represent the mean \pm S.D. (n=4). *p<0.05 vs. IL-1 β , **p<0.01 vs. IL-1 β .

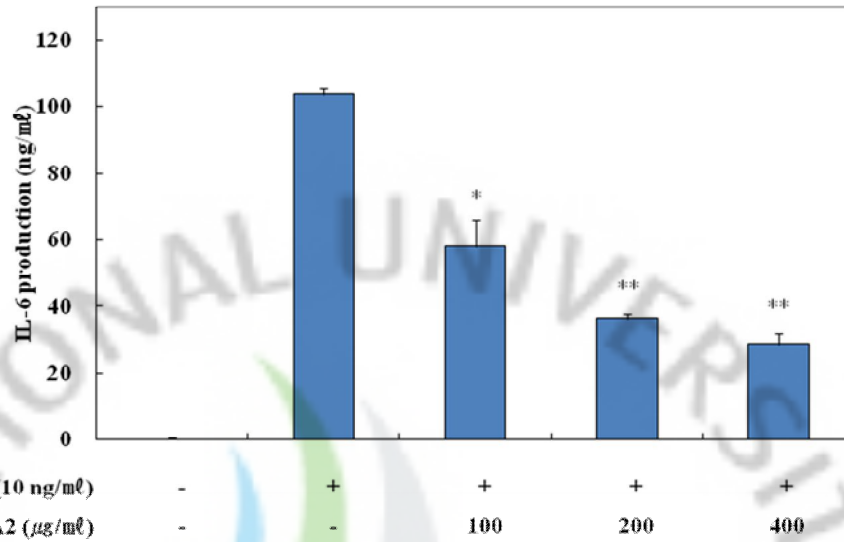


Figure 7 - Effects of HBE-A2 on the IL-6 production in IL-1 β stimulated MG-63 cells. MG-63 cells (1.0×10^5 cells/ml) were pre-incubated for 18 hr, and the 30 hr culture of cells were stimulated with IL-1 β (10 ng/ml) in the presence or absence of HBE-A2 (100, 200, and 400 μ g/ml). The productions of IL-6 were assayed by ELISA (450 nm) method from the culture medium. The data represent the mean \pm S.D. (n=4). *p<0.05 vs. IL-1 β , **p<0.01 vs. IL-1 β .

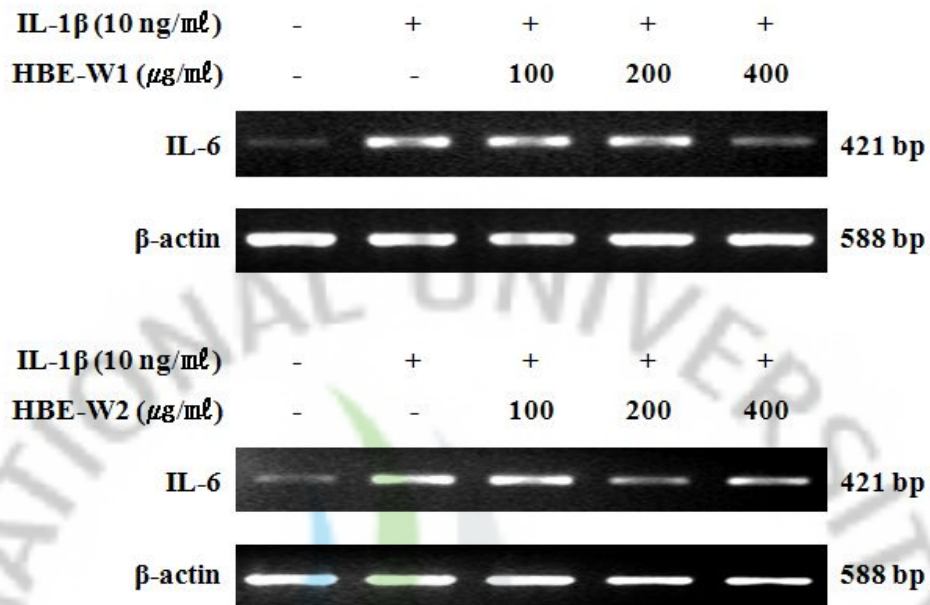


Figure 8 - Effects of HBE-W1 and HBE-W2 on the IL-6 mRNA expression in IL-1 β stimulated MG-63 cells. MG-63 cells (1.0×10^5 cells/ml) were pre-incubated for 18 hr, and the 24 hr culture of cells were stimulated with IL-1 β (10 ng/ml) in the presence or absence of HBE-W1 and HBE-W2 (100, 200, and 400 μ g/ml). mRNA expression was carried out in RNase-free environment determined by RT-PCR. PCR amplification was performed using primers for IL-6 gene. β -actin was used as an internal control.

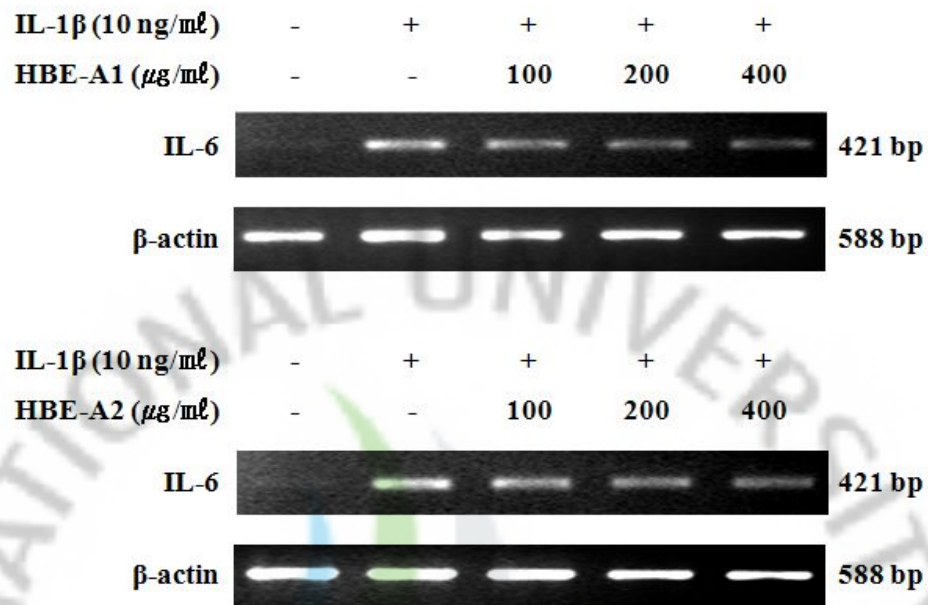
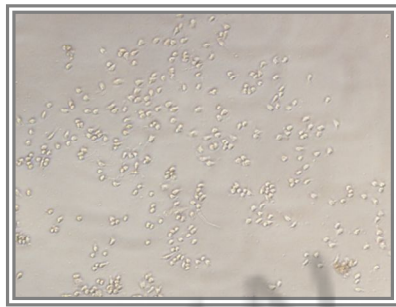
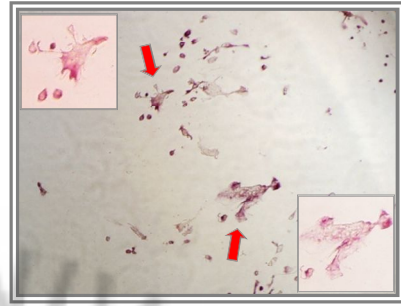


Figure 9 - Effects of HBE-A1 and HBE-A2 on the IL-6 mRNA expression in IL-1 β stimulated MG-63 cells. MG-63 cells (1.0×10^5 cells/ml) were pre-incubated for 18 hr, and the 24 hr culture of cells were stimulated with IL-1 β (10 ng/ml) in the presence or absence of HBE-A1 and HBE-A2 (100, 200, and 400 μ g/ml). mRNA expression was carried out in RNase-free environment determined by RT-PCR. PCR amplification was performed using primers for IL-6 gene. β -actin was used as an internal control.



sRANKL (-)



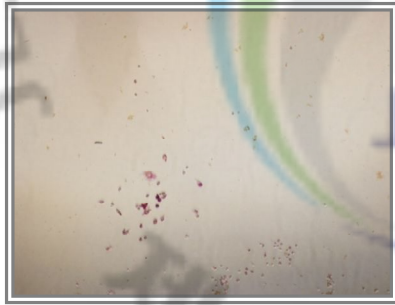
sRANKL (100 ng/ml)



sRANKL (100 ng/ml)+ HBE-W1



sRANKL (100 ng/ml)+ HBE-A1



sRANKL (100 ng/ml)+ HBE-W2



sRANKL (100 ng/ml)+ HBE-A2

Figure 10 - Effects of HBEs on osteoclastogenesis in sRANKL stimulated RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells (0.5×10^3 cells/ml) were stimulated with sRANKL (100 ng/ml) for 7 days in the presence or absence of HBE-W1, W2, A2, and A2 (25 μ g/ml). The growth medium was replaced 4 days. After 7 days, the cells were fixed and stained for TRAP. ($\times 200$)

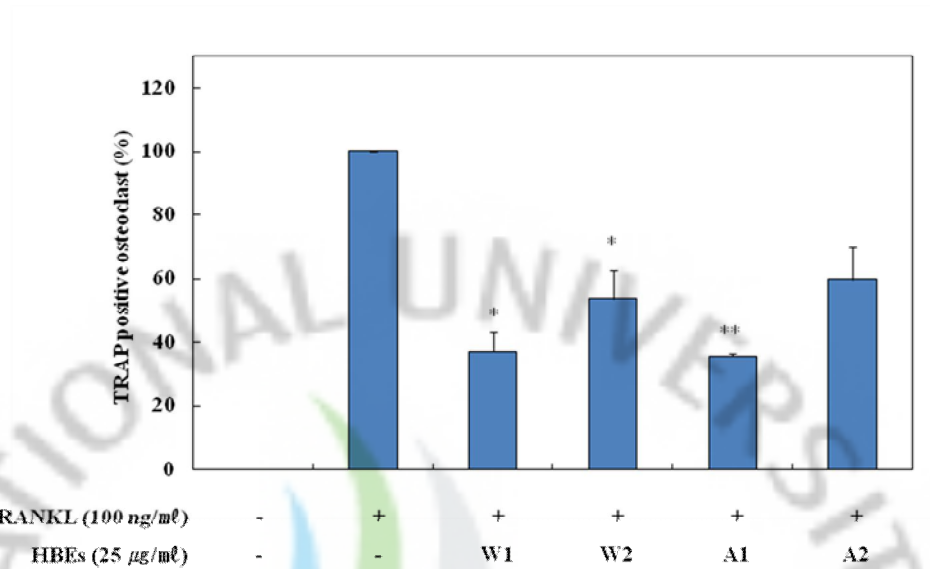


Figure 11 - Effects of HBEs on osteoclastogenesis in sRANKL stimulated RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells (0.5×10^3 cells/ml) were stimulated with sRANKL (100 ng/ml) for 7 days in the presence or absence of HBE-W1, W2, A1, and A2 (25 µg/ml). The growth medium was replaced 4 days. After 7 days, the cells were fixed and stained for TRAP. The data represent the mean \pm S.D. (n=3). *p<0.05 vs. sRANKL, **p<0.01 vs. sRANKL.

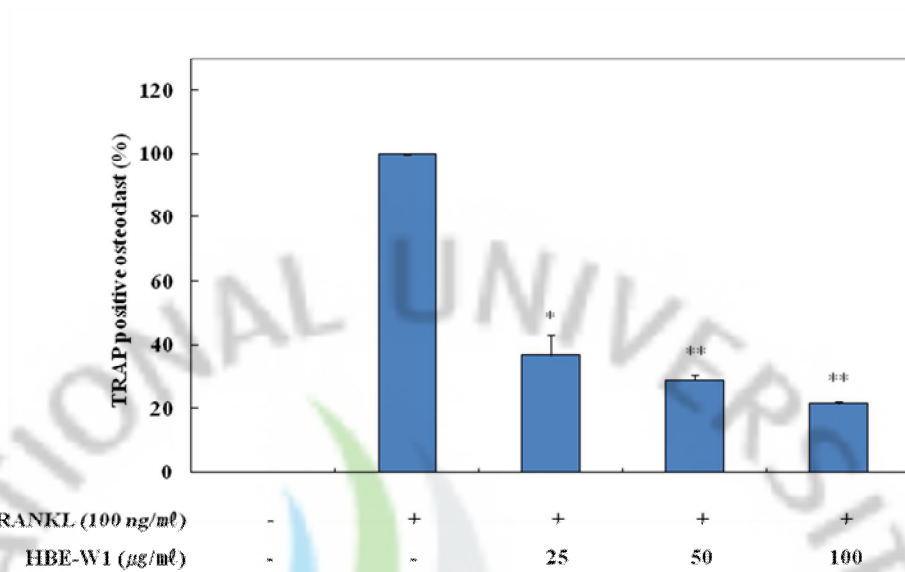


Figure 12 - Effect of HBE-W1 on osteoclastogenesis in sRANKL stimulated RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells (0.5×10^3 cells/ml) were stimulated with sRANKL (100 ng/ml) for 7 days in the presence or absence of HBE-W1 (25, 50, and 100 μ g/ml). The growth medium was replaced 4 days. After 7 days, the cells were fixed and stained for TRAP. The data represent the mean \pm S.D. (n=3). *p<0.05 vs. sRANKL, **p<0.01 vs. sRANKL.

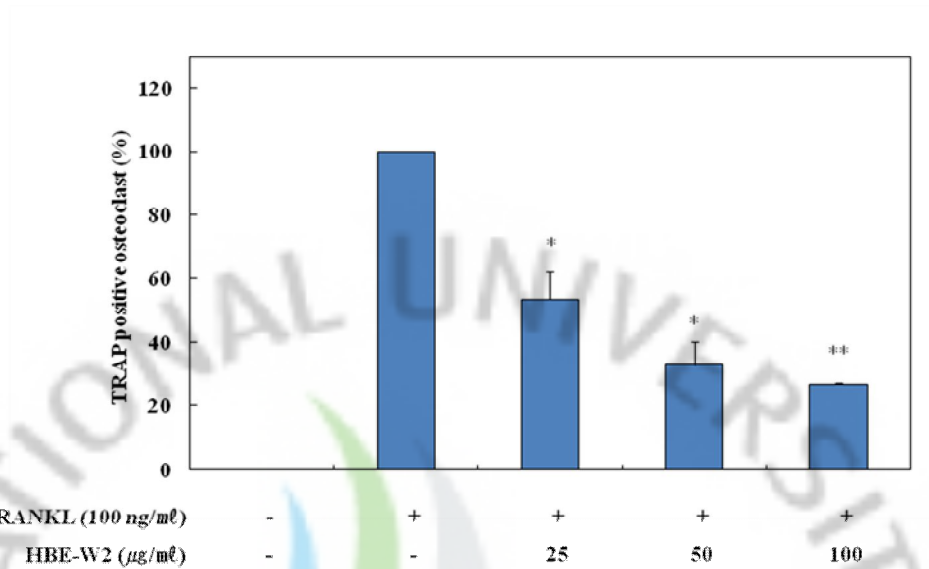


Figure 13 - Effect of HBE-W2 on osteoclastogenesis in sRANKL stimulated RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells (0.5×10^3 cells/ml) were stimulated with sRANKL (100 ng/ml) for 7 days in the presence or absence of HBE-W2 (25, 50, and 100 μ g/ml). The growth medium was replaced 4 days. After 7 days, the cells were fixed and stained for TRAP. The data represent the mean \pm S.D. (n=3). *p<0.05 vs. sRANKL, **p<0.01 vs. sRANKL.

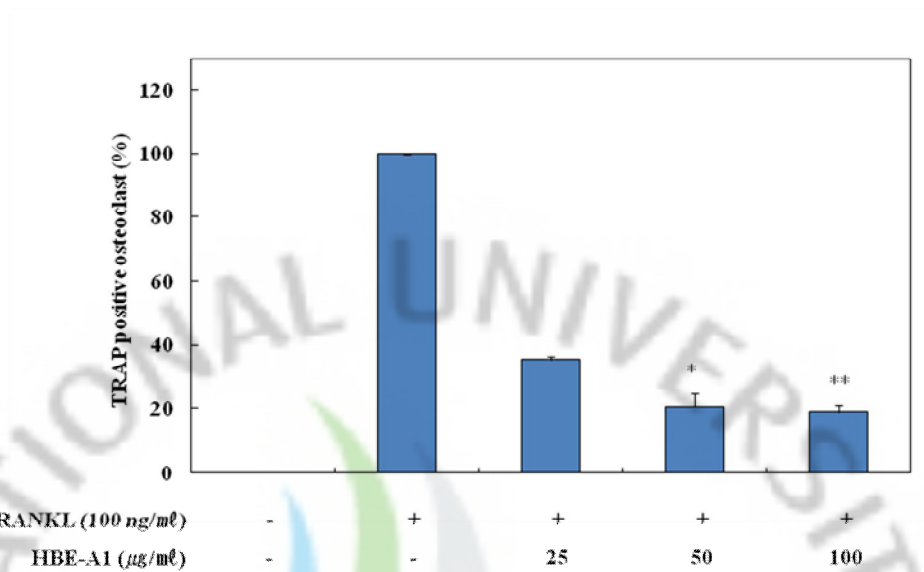


Figure 14 - Effect of HBE-A1 on osteoclastogenesis in sRANKL stimulated RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells (0.5×10^3 cells/ml) were stimulated with sRANKL (100 ng/ml) for 7 days in the presence or absence of HBE-A1 (25, 50, and 100 μ g/ml). The growth medium was replaced 4 days. After 7 days, the cells were fixed and stained for TRAP. The data represent the mean \pm S.D. (n=3). *p<0.05 vs. sRANKL, **p<0.01 vs. sRANKL.

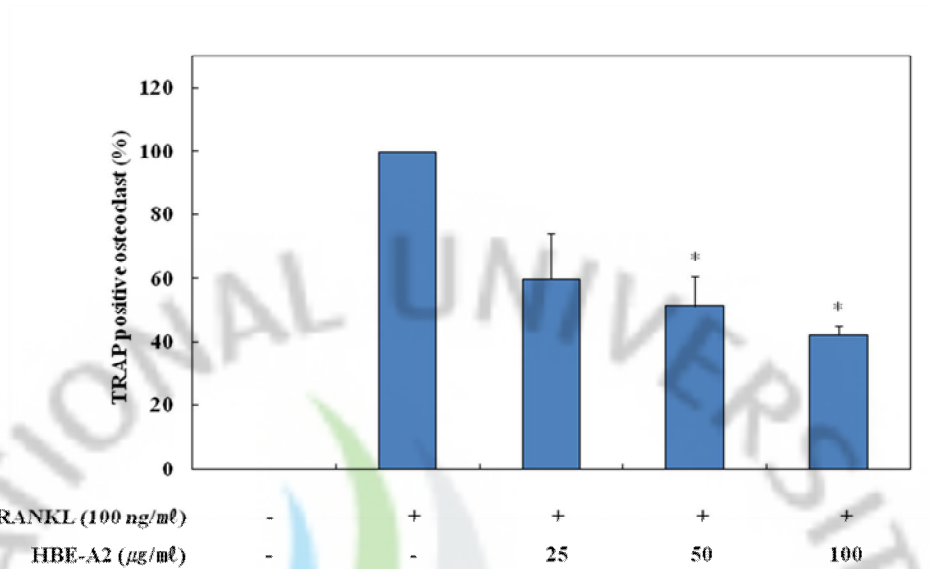


Figure 15 - Effect of HBE-A2 on osteoclastogenesis in sRANKL stimulated RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells (0.5×10^3 cells/ml) were stimulated with sRANKL (100 ng/ml) for 7 days in the presence or absence of HBE-A2 (25, 50, and 100 μ g/ml). The growth medium was replaced 4 days. After 7 days, the cells were fixed and stained for TRAP. The data represent the mean \pm S.D. (n=3). *p<0.05 vs. sRANKL.

2. 뼈질환 동물 모델에서 말뼈 추출물의 효과

대사성 뼈질환의 하나인 폐경기 골다공증 모델은 생후 5개월의 S.D. 백서의 암컷을 사용하였다. 실험군은 모의수술을 시행한 sham군과 양측 난소를 적출한 OVX군으로 나누었으며, 수술 직후부터 8주 동안 뼈흡수를 억제시키는 물질인 17 β -estradiol을 투여한 OVX-E2군, 고온 물 추출물을 투여한 OVX-W1군, 고온 주정 추출물을 투여한 OVX-A1군으로 분리하였다.

1) 난소적출로 유도된 골다공증 백서의 체중변화

백서의 폐경기 골다공증 모델은 난소적출에 의해 유도된 에스트로겐의 결핍으로 체중증가를 나타낸다 (Bagi CM *et al.*, 1997; Li M *et al.*, 1997; Mueller K *et al.*, 1980). 각 실험군의 실험 시작 전 평균체중은 실험군간에 차이가 없는 것으로 나타났다. 그러나 8주 후 각 실험군의 체중은 sham군이 308.0 ± 50 g, OVX군이 328.3 ± 40.9 g, OVX+E2군이 314.2 ± 25.7 g, OVX+W1군이 322.8 ± 28.7 g, OVX+A1군이 326.4 ± 32.8 g으로 나타나 실험 시작 전에 비해 각각 10.8%, 20.1%, 13.1%, 17.5%, 16.2% 증가하는 경향을 나타냈다 (Figure 16). 이러한 결과는 정상 대조군에 비해 난소를 적출한 군이 높은 체중증가를 나타낼 수 있었으며, 난소를 적출한 유발대조군 (OVX군)과 비교하여 말뼈추출물을 처리한 군의 체중증가율이 유의적으로 낮게 나타남을 확인할 수 있었다.

2) 넓다리뼈의 무게변화

골다공증을 유발시킨 백서의 넓다리뼈의 무게변화를 확인하기 위해 넓다리뼈

를 분리하고, 건조시켜 수분을 제거하였다. Sham군과 비교하였을 때 OVX군에서 넙다리뼈무게 비율이 감소함을 확인하였으며, OVX-E2군에서 그 비율이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 말뼈 추출물을 투여한 군에서는 OVX군 보다 높게 나타났으며, 그 중에서 OVX-W1군이 유의적으로 높았다. 본 실험의 결과, 난소적출에 의한 넙다리뼈의 무게가 감소하는 것을 확인하였으며, 말뼈 추출물이 넙다리뼈의 무게를 증가하는 것을 확인하였다 (Figure 17).

3) 넙다리뼈의 뼈무기질함량 (bone mineral content; BMC) 및 뼈밀도 (bone mineral density; BMD) 변화

골다공증 진단에 뼈밀도는 유용하게 이용되고, 측정 부위별로 차이를 나타내기도 하여 척추나 넙다리뼈에서는 뼈밀도가 낮게 나타난다 (Miller PD *et al.*, 1998; Shen. V. *et al.*, 1995). 실험적으로는 난소적출에 의한 뼈밀도 감소가 뼈소실이 이루어짐을 나타낸다. 난소적출로 골다공증이 유도된 백서에서 넙다리뼈의 뼈무기질함량과 뼈밀도를 측정한 결과는 다음과 같다. Sham군과 비교하였을 때 OVX군의 뼈무기질함량과 뼈밀도는 감소하였으며, 약물대조군인 OVX+E2군에서 난소적출에 의해 낮아진 뼈무기질함량과 뼈밀도를 유의적으로 증가시켰다. 또한, 말뼈 추출물을 투여한 군들에서 OVX군 보다 뼈무기질함량과 뼈밀도가 유의적으로 높게 나타났으며, 그 중 OVX+W1군의 뼈무기질함량과 뼈밀도가 정상 대조군과 높거나 비슷한 수준으로 회복되었다 (Figure 18-19). 본 실험의 결과, 난소적출에 의한 뼈무기질함량과 뼈밀도 감소를 확인하였으며, 말뼈 추출물이 뼈무기질함량과 뼈밀도를 증가시킴을 확인하였다.

4) 자궁의 무게변화

난소적출은 자궁에도 영향을 미치는데, 자궁전반의 위축을 나타내어 에스트로겐의 결핍에 의한 자궁무게의 감소를 보인다 (Lee HM *et al.*, 1992).

자궁을 적출하여 자궁무게 비율을 확인하여 본 결과는 다음과 같다. Sham군과 비교하였을 때 OVX군은 유의적으로 자궁무게 비율이 감소하였으며, OVX-E2군의 자궁무게 비율은 증가하였다. OVX-W1 군에서 자궁무게 비율은 유의적으로 증가하였으나, OVX-A1군에서는 OVX군 보다 낮았다 (Figure 20). 이러한 결과는 난소적출로 자궁무게는 위축되었으며, 말뚝 추출물중 물 추출물이 자궁무게의 위축을 개선시킨 것으로 생각된다.

5) 혈청 estradiol (E2)의 변화

실험동물의 난소적출은 에스트로겐 결핍을 유도한 것으로 혈청 E2를 감소시킨다 (Durbridge TC *et al.*, 1990; Eastell R *et al.*, 1988; Faugere Mc *et al.*, 1986; Malluche HH *et al.*, 1987;). Sham군과 비교하여 보았을 때 난소적출로 OVX군의 E2의 수치가 낮아짐을 확인하였으며, OVX-E2군에서 estradiol의 투여로 혈청 E2의 수치가 높아짐을 확인하였다. 말뚝 추출물을 투여한 OVX-A1군과 OVX-W1군에서는 난소적출에 의해 낮아진 혈청 E2 수치에 영향을 미치지 않는 것을 확인할 수 있었다 (Figure 21).

6) 혈청 alkaline phosphatase (ALP)의 변화

ALP의 수치는 뼈교체율과 관계되며, 폐경기 여성의 경우 뼈교체율의 증가하는 것을 ALP의 수치증가로 확인 할 수 있다 (Duda RH Jr *et al.*, 1988).

혈청 ALP의 수치를 확인하여 본 결과 OVX군에서 혈청 ALP의 수치가 유의적으로 증가함을 확인하였으며, OVX-E2군에서 혈청 ALP의 수치가 유의적으로 감소하

였다. 말뚝 추출물 투여군 역시 OVX군 보다 낮은 혈청 ALP의 수치를 나타내었다 (Figure 22). ALP의 수치가 낮아지는 것으로 보아 말뚝 추출물이 뼈교체율을 감소시키는 것으로 보인다.



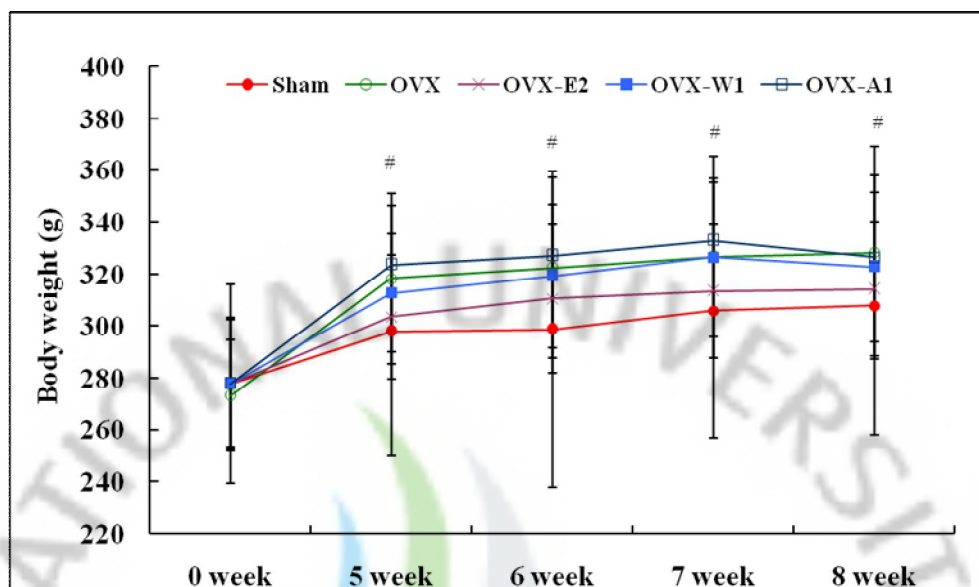


Figure 16 - Changes of body weight during administration of Horse Bone Extracts in ovariectomized rats. HBEs (4 ml/kg) were administrated (P.O) to ovariectomized rat every day for 8 weeks. 17β -estradiol (20 μ g/kg) was administered (I.M) to ovariectomized rats 3 days/week for 8 weeks. The data represent the mean \pm S.D. (n=7). #p<0.05 vs. 0 week.

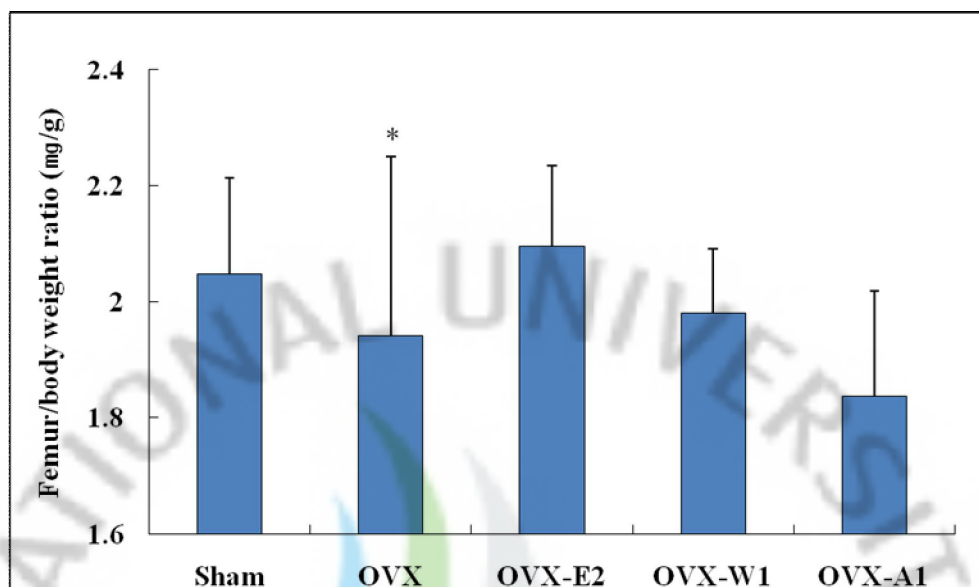


Figure 17 - Changes of femur/body weight ratio by administration of Horse Bone Extracts in ovariectomized rats. HBEs (4 ml/kg) were administrated (P.O) to ovariectomized rat every day for 8 weeks. 17β -estradiol (20 μ g/kg) was administered (I.M) to ovariectomized rats 3 days/week for 8 weeks. The data represent the mean \pm SD (n=6). *p<0.05 vs. Sham.

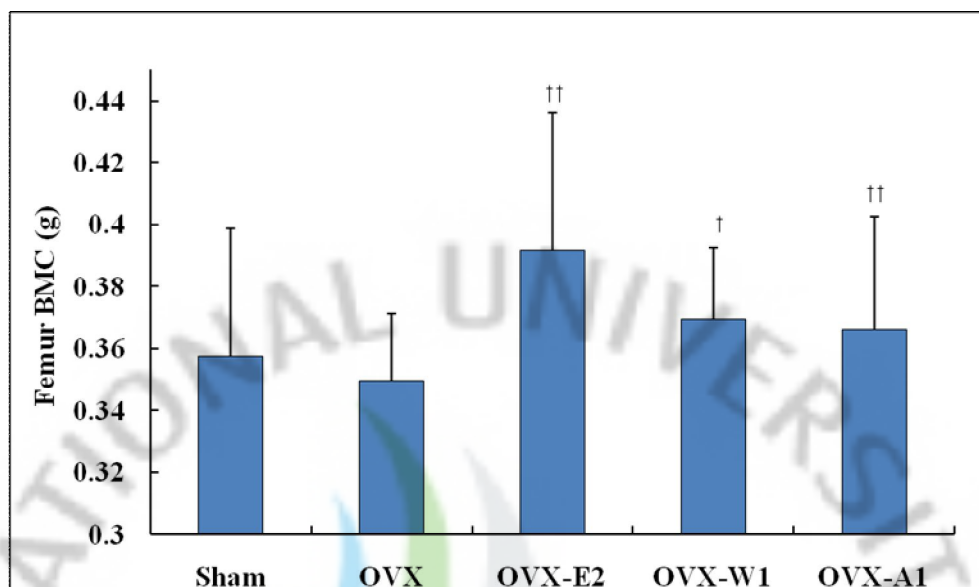


Figure 18 - Changes of femur bone mineral content (BMC) by administration of Horse Bone Extracts in ovariectomized rats. HBEs (4 ml/kg) were administered (P.O) to ovariectomized rat every day for 8 weeks. 17β -estradiol (20 μ g/kg) was administered (I.M) to ovariectomized rats 3 days/week for 8 weeks. The data represent the mean \pm SD (n=6). $^{\dagger}p < 0.05$ vs. OVX, $^{\dagger\dagger} p < 0.01$ vs. OVX.

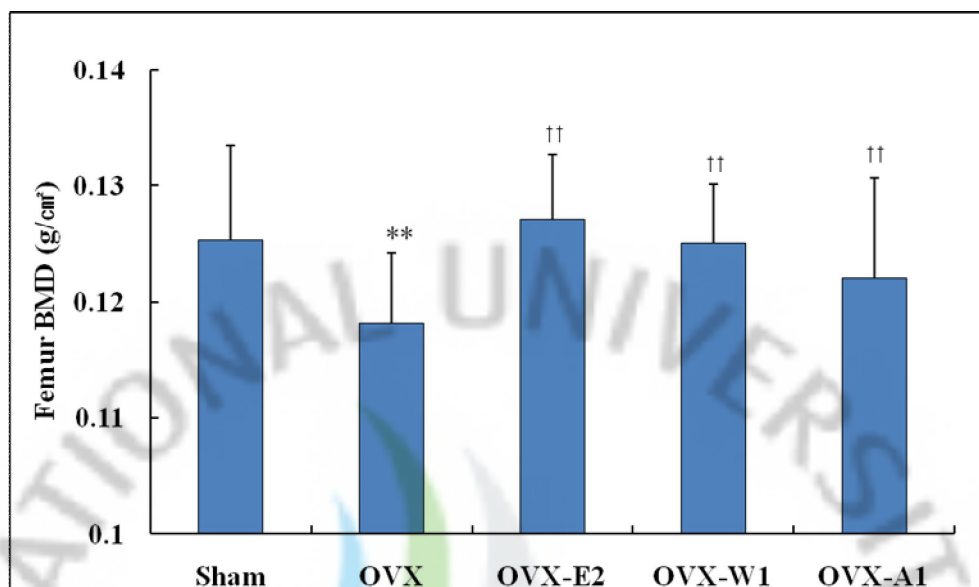


Figure 19 - Changes of femur bone mineral density (BMD) by administration of Horse Bone Extracts in ovariectomized rats. HBEs (4 ml/kg) were administrated (P.O) to ovariectomized rat every day for 8 weeks. 17 β -estradiol (20 μ g/kg) was administered (I.M) to ovariectomized rats 3 days/week for 8 weeks. The data represent the mean \pm SD (n=6). **p<0.01 vs. Sham, †† p<0.01 vs. OVX.

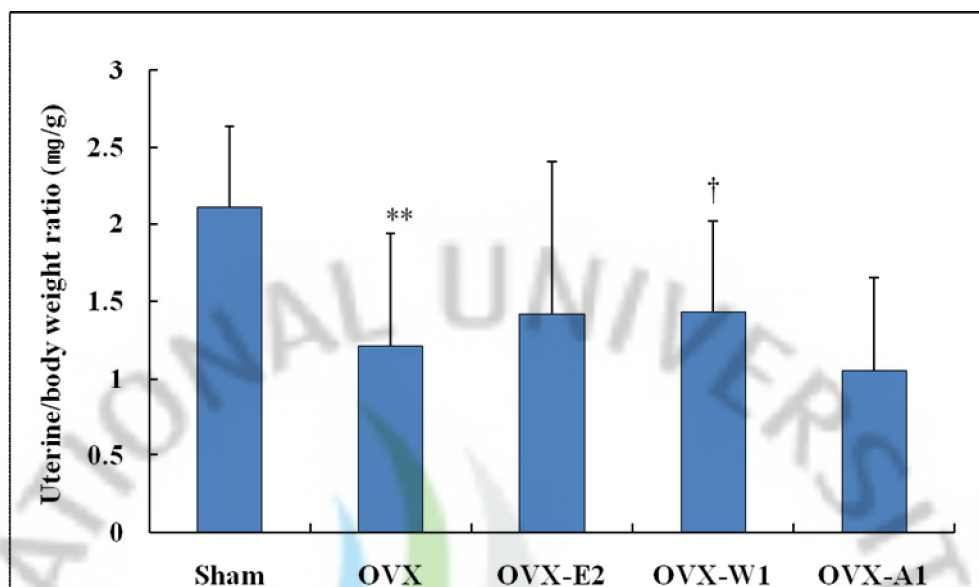


Figure 20 - Changes of uterine/body weight ratio by administration of Horse Bone Extracts in ovariectomized rats. HBEs (4 ml/kg) were administrated (P.O) to ovariectomized rat every day for 8 weeks. 17β -estradiol (20 μ g/kg) was administered (I.M) to ovariectomized rats 3 days/week for 8 weeks. The data represent the mean \pm SD (n=6). **p<0.01 vs. Sham, †p<0.05 vs. OVX.

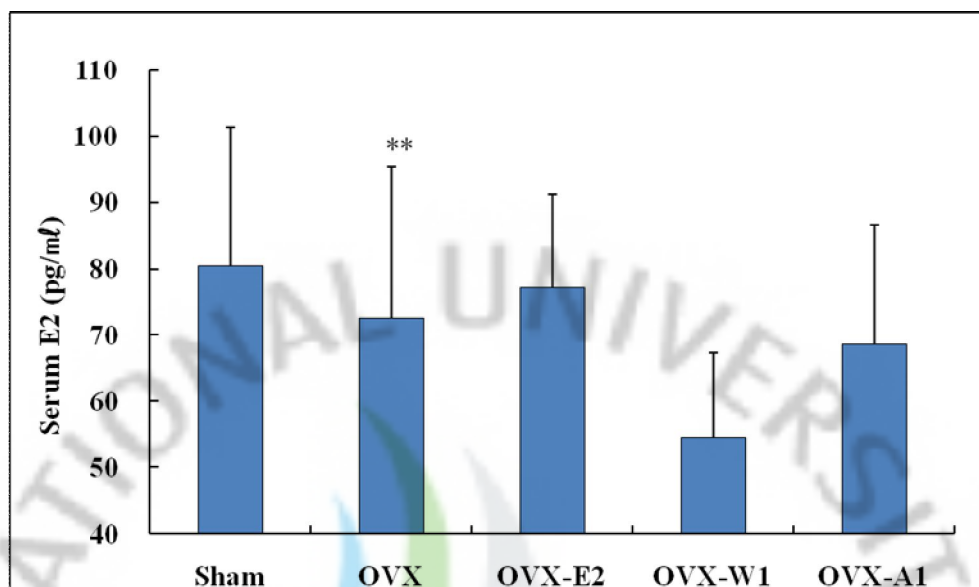


Figure 21 - Changes of serum estradiol (E2) by administration of Horse Bone Extracts in ovariectomized rats. HBEs (4 ml/kg) were administrated (P.O) to ovariectomized rat every day for 8 weeks. 17β -estradiol (20 μ g/kg) was administered (I.M) to ovariectomized rats 3 days/week for 8 weeks. The data represent the mean \pm SD (n=6). **p<0.01 vs. Sham.

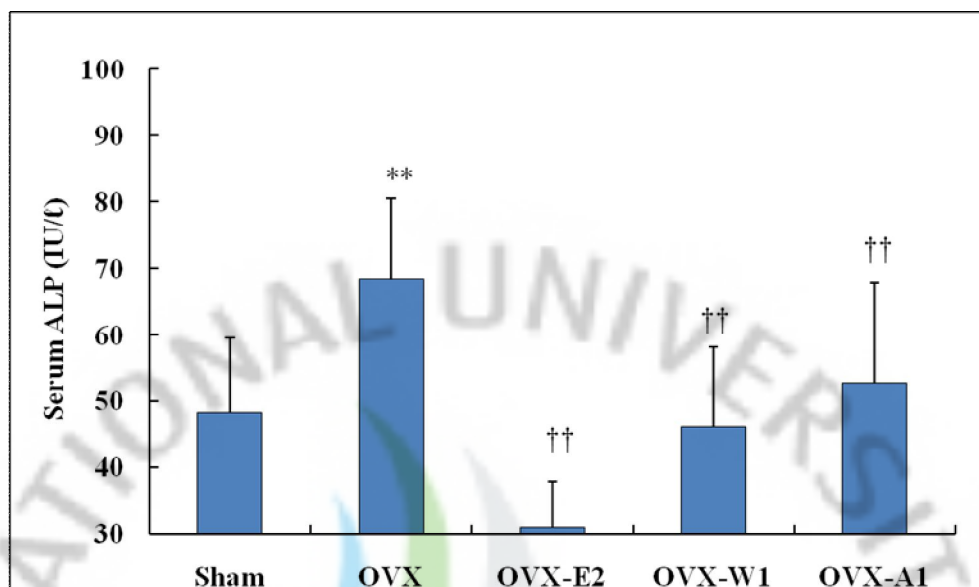


Figure 22 - Changes of serum alkaline phosphatase (ALP) by administration of HBEs in ovariectomized rats. HBEs (4 ml/kg) were administrated (P.O) to ovariectomized rat every day for 8 weeks. 17β -estradiol (20 μ g/kg) was administered (I.M) to ovariectomized rats 3 days/week for 8 weeks. The data represent the mean \pm SD (n=6). **p<0.01 vs. Sham, ††p<0.01 vs. OVX.

IV. 고찰

본 논문에서는 말뚝 추출물이 뼈질환에 미치는 영향을 알아보고자 뼈모세포 계열인 MG-63 세포에서 IL-1 β 의 자극에 의해 유도되는 IL-6의 단백질 생성 및 mRNA 발현 억제를 조사 하였으며, 뼈파괴전구세포 계열인 RAW 264.7 세포에서 sRANKL에 의해 유도되는 뼈파괴세포형성 억제활성을 조사하였다. 또한 이들이 골다공증에 미치는 영향을 알아보기 위하여 난소적출로 유도된 골다공증성 인자 (osteoporotic factors)의 변화를 조사하였다.

MG-63 세포에서 IL-1 β 는 IL-6를 유도하여 뼈파괴세포의 형성을 촉진한다. MG-63 세포에 IL-1 β (10 ng/ml)로 자극을 주어 IL-6의 생성을 유도하고 말뚝 추출물을 처리하여 ELISA 및 RT-PCR 방법을 통하여 IL-6의 억제 정도를 조사하였다. 각각의 말뚝 추출물을 200 μ g/ml의 농도로 처리하였을 때, 모든 시료에서 30% 이상의 IL-6의 생성 억제효과를 확인할 수 있었으며 그 중 주정 추출물이 HBE-A1과 HBE-A2를 처리 하였을 때 각각 50%와 75% 정도의 억제효과를 확인할 수 있었다 (Figure 3). 이들을 농도별로 처리하여 HBE-A1과 HBE-A2가 농도 의존적으로 억제하는 결과를 확인할 수 있었다 (Figure 4-7). mRNA의 발현을 확인한 결과 IL-1 β 의 처리로 IL-6의 mRNA의 발현이 현저히 증가하였으며, 말뚝 추출물을 농도별 (100, 200, 400 μ g/ml)로 처리한 결과 모든 추출물에서 농도 의존적으로 억제하는 결과를 확인할 수 있었으며 HBE-A1과 HBE-A2의 경우 낮은 농도 (100 μ g/ml)에서도 IL-1 β 에 의해 유도된 IL-6 발현을 강하게 억제하는 결과를 확인할 수 있었다 (Figure 8-9).

RAW 264.7 세포에 sRANKL (100 ng/ml)로 자극을 주어 뼈파괴세포로 유도하고, 각각의 말뚝 추출물을 25 μ g/ml로 처리하였을 때, 뼈파괴세포형성을 모든 추출

물에서 30% 이상 억제하였으며, 그 중 고온추출 조건의 HBE-W1과 HBE-A1에서 70% 정도의 억제효과를 나타냈다 (Figure 10-11, 12, 14).

대사성 뼈질환의 대부분을 차지하는 골다공증은 뼈흡수와 뼈형성의 불균형으로 뼈교체율이 증가하여 생기며 뼈의 밀도 감소와 골절의 위험을 가지고 있다 (Hobson EE *et al.*, 2001). 골다공증의 원인은 에스트로겐의 분비감소, 활동량의 부족, 칼슘의 섭취 부족 등이 있다 (Garnero P *et al.*, 1996; Gauley. J. A. *et al.*, 1986; Johansen JS *et al.*, 1988; Linda. S *et al.*, 1984). 특히 여성의 폐경기 후 골다공증은 에스트로겐의 결핍으로 뼈소실이 증가하여 생기는 것으로 알려져 있다 (Li M *et al.*, 1997; Ohta H *et al.*, 1992).

에스트로겐이 결핍되면 다양한 인자에 영향을 미치는 것으로 알려져 있는데, 실험동물에서는 체중이 증가하며, 난소적출에 의한 에스트로겐의 분비가 억제되면 혈중 E2의 수치도 낮아진다. 또한 자궁내막 및 자궁근 등의 위축현상으로 무게가 감소한다 (Bagi CM *et al.*, 1997; Li M *et al.*, 1997; Malluche HH *et al.*, 1987; Mueller K *et al.*, 1980). 본 실험에서도, 기존 연구결과와 마찬가지로 실험동물의 난소를 적출하여 골다공증 인자에 영향을 주었으며, 말뚝 추출물을 투여하여 변화를 관찰할 수 있었다. 체중변화는 OVX군과 비교하여 estradiol을 투여한 OVX-E2군에서 증가율이 낮았으며, OVX-A1군의 증가율은 마지막 관찰 주에서 낮게 나타나고, OVX-W1군은 전체 주에서 체중증가율이 유의적으로 낮게 나타났다 (Figure 16). 자궁무게/백서의 몸무게 비율은 OVX-W1군에서 비율은 약간 증가하였으나, OVX-A1군에서는 OVX군 보다 낮았다 (Figure 20). 그러나 말뚝 추출물의 투여가 난소적출로 유도된 E2의 감소에는 영향을 미치지 않았다. 골다공증을 진단하는데 뼈밀도는 유용하게 이용되고, 측정 부위별로 차이를 나타내기도 하여 척추나 넓다리뼈에서는 뼈밀도가 낮게 나타나기도 한다 (Miller PD *et al.*, 1998; Shen. V. *et al.*, 1995). 실험적으로는 난소적출에 의한 뼈밀도 감소가 뼈소실이 이루어짐을 나타내며, 말뚝 추출물을 투여한 군에서 OVX군 보다

높게 나타났다 (Figure 19). 또한 골다공증 인자 중 하나인 ALP는 조직 중에 다양하게 분포되며, 세포외에서 세포내로 기질을 운반하는데 관여한다. 그 중 뼈모세포에서는 ALP를 생성하여 세포막의 소포에 저장하는데 이 중에 일부가 혈액 내로 유리된다. 폐경기 여성의 경우 뼈교체율이 증가하여 혈액 내 ALP도 증가하는 양상을 나타내어 폐경기 전후 여성에서 골다공증 관련 인자로 사용되고 있다 (Durbridge TC *et al.*, 1990). 본 실험에서도 혈청 ALP의 수치를 확인하였으며, OVX군에서 혈청 ALP의 수치가 유의적으로 증가함을 확인하였다. 말뚝 추출물 투여군 역시 OVX군 보다 낮은 혈청 ALP의 수치를 나타내었다 (Figure 22). ALP의 수치가 낮아지는 것으로 보아 말뚝 추출물이 뼈교체율을 감소시키는 것으로 보인다.

뼈질환 치료에는 호르몬과 비호르몬성 제제가 사용되고 있으며, 대부분이 뼈흡수 억제제이다. 주요 호르몬으로는 PTH와 비타민 D가 칼슘과 인산염의 항상성을 조절하고, 이차성 호르몬으로는 칼시토닌, 프롤락틴, 성장호르몬, 인슐린, 갑상선호르몬, 당질코르티코이드, 성호르몬 등이 있다. 비호르몬성 치료제로 나트륨과 불소, 칼슘과 인산염, 비스포스포네이트, 플리카미신, 이노제 등도 사용되고 있다 (전국 의과대학 교수편, 2002). 비호르몬성 제재인 칼슘과 인은 뼈의 무기질로써 직접적인 항상성을 유지하는데 도움을 주기도 한다. (김옥녀, 2003; 한국임상병리교수협의회 세포분과위원회, 2004). 그러나 뼈흡수를 저해하는 호르몬 대체요법은 장기적 치료를 요하고 합병증의 위험을 안고 있다. 특히 에스트로젠은 골다공증, 혈관계 질병, 알츠하이머 등을 감소시키는 것으로 알려져 있으나, 오심, 두통, 체중증가, 유방통, 불규칙한 자궁출혈 등의 부작용과 자궁내막암 및 유방암 발생에 대한 위험성이 보고되고 있다 (Colditz GA, *et al.*, 1995; Grodstein F *et al.*, 1997; Harris RB *et al.*, 1990; Stolley PD *et al.*, 1975; Wickelren I. 1997). 이에 최근에는 식이섭취를 통한 무기질 조절 등에 대한 연구가 이루어지고 있다.

말은 주로 이동 수단의 목적으로 사육되어 왔으나 교통수단의 발전으로 그 이용가치가 줄어들고 관광용, 경주용, 식용으로 사육되고 있다 (Young-Boong kim *et al.*, 2005). 현재 유럽에서 말은 식육자원으로 소비가 되고 있으며, 일본 또한 말고기를 소비하고 있다. 말에 대한 연구는 주로 식육특성, 영양성분, 도체특성, 저장특성, 가공특성 등이 있으며, 주로 유럽국가에서 시행되었다 (P. N. Seong *et al.*, 2006). 최근 우리나라에서도 말에 대한 연구를 진행하고 있으며, 말고기에 대한 식육특성, 가공특성, 영양성분에 관한 연구 등이 있다 (Pil Nam Seong *et al.*, 2008; P. N. Seong *et al.*, 2006). 말은 민간에서 관절염, 골다공증, 골절 등 뼈 관련 질환에 사용되어 왔으며, 허준의 동의보감에도 근골을 기르고 허리를 강건하게 한다고 나와 있다. 이는 과거에도 뼈질환에 말뼈를 사용해 온 것으로 보이나 과학적인 연구는 미미한 실정이다. 현재 국내에서의 말뼈에 대한 연구는 무기물 함량 비교, 말뼈 성분 급여에 의한 생리기능에 미치는 영향 등이 있다 (고문석 외, 2006; 이종언, 2006). 말뼈의 무기물 함량 비교에서 칼슘과 구리의 함량이 소뼈보다 높은 것으로 나타났으며, 뼈대사에 영향을 미치는 칼슘과 인의 비율이 약 2:1로 나타났다. 식이 조절에 의한 무기물 섭취는 뼈대사에 영향을 미치는데 칼슘과 인의 섭취 비율이 2:1일 때 칼슘의 이용 및 뼈형성에 이상적인 것으로 나타난다 (Jeong Hae Kyoung *et al.*, 1997). 뼈대사에서 칼슘은 최대 뼈형성과 골격 손실 억제에 중요하며, 인의 섭취는 뼈밀도와 유의적인 양의 상관관계를 가진다 (Freudenhim JL *et al.*, 1986; Koo Jaeok Kwak *et al.*, 1991; Lee GJ *et al.*, 1981; Reid *et al.*, 1986; Tylavsky FA *et al.*, 1988). 그러나 인의 과도한 섭취로 뼈흡수를 증가시켜 뼈소실을 초래한다는 보고가 있다 (Calvo MS., 1994). 또한 미량 무기질인 구리는 뼈조직 형성에 관여하며 뼈모세포와 뼈파괴세포의 기능을 억제하여 뼈대사를 낮게 유도한다고 보고되고 있다 (Rucker RB *et al.*, 1969). 이는 말뼈가 식이섭취를 통한 무기질 조절에 주요한 영향을 줄 수 있는 것으로 말뼈가 뼈조직의 형성을 증가시키고

뼈대사를 감소시키는 역할을 할 수 있을 것이다.

본 실험의 결과를 요약하면, 말뚝 추출물을 다양한 추출 조건에 의하여 추출하고 이들이 뼈질환 인자에 미치는 영향을 알아본 결과, MG-63 세포에서는 주정 추출물이 뼈파괴세포의 형성을 촉진시키는 IL-6의 생성 억제효과가 좋았으며, RAW 264.7 세포의 뼈파괴세포형성에는 고온 추출물의 억제효과가 좋았다. 또한 대사성 뼈질환의 하나인 골다공증 모델에서 말뚝 추출물을 투여하였을 때 난소 적출에 의해 유도된 뼈밀도 감소를 다시 증가시켰으며, 뼈교체를 인자인 혈청 ALP를 감소시켰다. 따라서 말뚝 추출물은 뼈대사 과정 중 뼈흡수를 억제하여 효과를 나타내는 것으로 보이며, 다양한 추출물 중 고온 물 추출물이 뼈흡수의 억제효과가 가장 좋은 것을 알 수 있었다. 이러한 결과들은 말뚝로부터 뼈질환의 예방 및 치료를 위한 추출 조건의 확립과 이 추출물을 이용한 기능성 식품의 연구에 중요한 기초자료가 될 것으로 기대된다.

V. 참고문헌

- 고문석, 이영재: 말뚝 성분 급여가 쥐의 생리기능에 미치는 영향. 난지농업연구소 (2006).
- 김옥녀: 임상약리학 제6판, 수문사, 서울 pp. 307-314 (2003).
- 문형배, 박창수, 이광민, 이동근, 전호중: 일반 병리학, 사판, 고문사, 서울 pp. 425-434 (2001).
- 박경한 외 28 인 (역): 인체조직학, 정문각, 서울 pp. 252-266 (2003).
- 배용철 외 23 명 (역): 핵심조직학, 2판, 범문사, 서울 pp. 134-154 (2005).
- 이대일, 최종상: 개정증보 병리학개론, 3판, 신광출판사, 서울 pp. 270-288 (1997).
- 이종연: 말고기와 말뚝의 영양 특성. 난지농업연구지 15, 20-22 (2006).
- 전국 의과대학 교수편 (역): 임상약리학, 대한의학서적, 서울 pp. 771-789 (2002).
- 최명애, 변영순, 황애란, 홍해숙, 김희승, 최스미, 서화숙 (역): 인체 구조와 기능 (I), 계축문화사, 서울 pp. 108-122 (1999).
- 한국임상병리교수협의회 세포분과위원회: 조직학 (Histology), 고려의학, 서울, pp. 105-115 (2004).
- 허준: 동의보감, 도서출판삼성문화사, 서울 p. 489 (1995).
- Anderson JJB, Garner SC.: Phytoestrogens and bone. *Baillieres Best Pract Tes Clin Endocrinol Metab.* 12, 543-557 (1998).
- C. M. Bagi, P. Ammann, R. Rizzoli, S. C. Miller.: Effect of estrogen deficiency on cancellous and cortical bone structure and strength of

- the femoral neck in rats. *Calcif Tissue Int.* **61**, 336-344 (1997).
- Calvo MS.: The effects of high phosphorus intake on calcium homeostasis. *Adv Nutr Res.* **9**, 183-207 (1994).
- Carmichael, J., Degraff, W. G., Gazdar, A. F., Minna, J. D., and Mitchel, J. B.: Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemisensitivity testing. *Cancer Research.* **47**, 944-946 (1987).
- Colditz GA, Hankinson SE, Hunter DJ, Willett WC, Menson 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 Engl J Med.* **332**, 1589-1593 (1995).
- Duda RH Jr, O'Brien JF, Kantzmann JA, Peterson JM, Mann KG, Riggs BL.: Concurrent assays of circulating bone Gla-protein and bone alkaline phosphatase: effect of sex, age, and metabolic bone disease., *J Clin Endocrinol Metab.* **66**, 951-957 (1988).
- Durbridge TC, Morris HA, Parsons AM, Parkinson IH, Moore RJ, Porter S, Need AG, Nordin BE, Vernon-Roberts B.: Progressive cancellous bone loss in rats after adrenalectomy and oophorectomy. *Calcified Tissue International.* **47**, 383-387 (1990).
- Eastell R, Delmas PD, Hodgson SF, Eriksen EF, Mann KG, Riggs BL.: Bone formation rate in older normal women: Concurrent assessment with bone histomorphometry, calcium kinetics, and biochemical markers. *J. Clin Endocrinol Metab.* **67**, 741-748 (1988).
- Faugere MC, Okamoto S, DeLuca HF, Malluche HH.: Calcitriol corrects bone loss induced by oophorectomy in rats. *Am J Physiol.* E35-E38 (1986).

- Freudenheim JL, Johnson NE, Smith EL. Relationships between usual nutrient intake and bone-mineral content of women 35-65 years of age : longitudinal and cross-sectional analysis. *Am J Clin Nutr.* **44**, 863-876 (1986).
- Garnero P, Delmas PD.: New developments in biochemical markers for osteoporosis. *Calcif Tissue Int.* **1**, S2-S9 (1996).
- Gauley. J. A., Gutai. J. P., Sandler. R. B., Laporte. R. E., Kuller. L. H, Sashin. D. T.: Relationship of endogenous estrogen to bone density and bone area in normal postmenopausal women. *Am. J. Epidemiol.* **124**, 752 (1986).
- Goldberg, A. F., Barka, T.: Acid phosphatase activity in human blood cells. *NATURE.* **189**, 297 (1962).
- Grodstein F, Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC, Manson JE, Joffe M, Rosner B, Fuchs C, Hankinson SE, Hunter DJ, Hennekens CH, Speizer FE.: Postmenopausal hormone therapy and mortality. *New Engl J Med.* **336**, 1769-1775 (1997).
- Harris RB, Laws A, Reddy FM, King A, Haskell WL.: Are women using postmenopausal estrogens? A community survey. *Am J public Health.* **80**, 1266-1268 (1990).
- Hobson EE, Ralston Sh.: Role of genetic factors in the pathophysiology and management of osteoporosis. *Clin Endocrinol (Oxf).* **54**, 1-9 (2001).
- Isabel Fernández-Tresguerres Hernández-Gil, Miguel Angel Alobera Gracia, Mariano del Canto Pingarrón, Luis Blanco Jerez: Physiological bases of bone regeneration II. The remodeling process. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* **11**, E151-7 (2006).

- Jeong Hae Kyoung, Kim Joung Yeon, Lee Hyun Sook, Kim Jong Yeo: The Effect of Dietary Calcium and Phosphate Levels on Calcium and Bone Metabolism in Rats. *Korean J Nutrition*. **30**, 813-824 (1997).
- Johansen JS, Riss BJ, Delmas : Plasma BGP.: An indicator of spontaneous bone loss and effect of estrogen treatment in postmenopausal women. *Eur J Clin Invest*. **18**, 191-195 (1988).
- Kim Jeong-Sook: Research on The Raising of Horses and its Symbolic Status in the Ancient Shilla Society. *韓國史研究*. **123**, 21-53 (2003).
- Koichi Matsuo, Naoko Irie: Osteoclast-osteoblast communication. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **473**, 201-209 (2008).
- Koo Jaeok Kwak, Chungsil Choi, Haymie: Effects of Dietary Protein Levels and Sources on Calcium and Phosphorus Metabolism in Young Korean Women. *Korean J Nutrition*. **24**, 124-131 (1991).
- Lee GJ, Lawler GS and Johnson GH.: Effect of supplementation of the diets with calcium and calcium rich foods on bone density of elderly females with osteoporosis. *Am J Clin Nutr*. **34**, 819 (1981).
- Lee HM, Hahn SB, Park BM.: Effect of Calcitonin on Osteoporosis induced by Ovariectomy in Rats. *J Korean Orthop Assoc*. **27**, 577-588 (1992).
- Li M, Shen Y, Wronski TJ. Time course of femoral neck osteopenia in ovariectomized rats. *Bone*. **20**, 17-22 (1997).
- LORENZ C. HOFBAUER, SUDEEP KHOSLA, COLIN R. DUBSTAN, DAVID L. LACEY, WILLIAM J. BOYLE, and B. LAWRENCE RIGGS: The Roles of Osteoprotegerin and osteoprotegerin Ligand in the Paracrine Regulation of Bone Resorption. *JOURNAL OF BONE AND MINERAL RESEARCH*. **15**, 2-12 (2000)
- Malluche HH, Sherman D, Meyer W, Massry SG.: A new semiautomatic method

- for quantitative static and dynamic bone histology. *Calcified Tissue International*. **34**, 439-448 (1987).
- Miller PD, Bonnicksen SL, Johnston CC, Kleerekoper M, Lindsay RL, Sherwood LM, Siris ES.: The challenges of peripheral bone density testing: which patients need additional central density skeletal measurements? *J Clin Densitom*. **1**, 211-7 (1998).
- Mueller K, Hsiao S.: Estrus and ovariectomy-induced body weight changes : evidence for two estrogenic mechanisms. *J Comp Physiol Psychol*. **94**, 1126-1134 (1980).
- Ohta H, Masuzawa T, Ikeda T, Suda Y, Makita K, Nozawa S.: Which is more osteoporosis inducing, menopause or oophorectomy? *Bone Miner*. **19**, 273-285 (1992).
- P. N. Seong, C. E. Lee, B. Y. Park, K. H. Hah and M. S. Ko: Meat Quality and Sensory Characteristics in *Longissimus* Muscle of Jeju Horse as Influenced by Ageing. *J Anim. Sci. & Technol. (Kor.)* **48;2**, 287-292 (2006).
- P. N. Seong, C. E. Lee, J. H. Kim, B. Y. Park, K. H. Hah and M. S. Ko: Effect of Replacing Pork with Horse Meat on Quality Characteristics of Emulsion-type Sausage. *J Anim. Sci. & Technol. (Kor.)* **48;5**, 739-746 (2006).
- Pil Nam Seong, Chong Eon Lee¹, Jin Hyoung Kim, Soo Hyun Cho, Kyoung Hee Hah, Dong Gyun Lim, Dong Hoon Kim, Jong Moon Lee, and Moon Suck Ko: Effect of Horse Meat Content on the Quality and Sensory Characteristics of Press Ham. *Korean J. Food Sci. Ani. Resour*. **28**, 9-13 (2008).
- Reid and Ibbertson.: Calcium supplements in the prevention of steroid

- induced osteoporosis. *Am J Clin Nutr.* **44**, 287 (1986).
- Richelson LS, Wahner HW, Melton LJ 3rd, Riggs BL.: Relative contributions of aging and estrogen deficiency to postmenopausal bone loss. *N. Engl. J Med.* **311**, 1273-1275 (1984).
- Rucker RB, Parker HE, Rogler JC.: Effect of copper deficiency on chick bone collagen and selected bone enzymes. *J Nutr.* **98**, 57-63 (1969)
- Setchell KDR, Casidy A.: Dietary isoflavones: biological effects and relevance to human health. *J Nutr.* **129**, 758s-767s (1999).
- Shen. V., Birchman, R., Lindsay, R., and Dempster, D. W.: Short term changes in histomorphometric and biochemical turnover markers and bone mineral density in estrogen and/or dietary calcium deficient rats. *Bone.* **16**, 149-156 (1995).
- Stolley PD, Tonascia JA, Tockman MS, Sartwell PE, Rutledge AH, Jacobs MP.: Thrombosis with low-estrogen oral contraceptives. *Am J Epidemi.* **102**, 197-201 (1975).
- Tylavsky FA, Anderson JJB.: Dietary factors in bone health of elderly lactoovo-vegetarian and omnivorous women. *Am J Clin Nutr.* **48**, 842-849 (1988).
- Wickelren I.: A new wapon against Alzheimer's. *Science.* **276**, 676-677 (1997).
- William J. Boyle, W. Scott Simonet & David L. Lacey: Osteoclast differentiation and activation. *NATURE.* **423**, 337-342 (2003).
- Young-Boong Kim, Ki-Hong Jeon, Jung-Hae Rho and Suk-Nam Kang: Physicochemical Properties of Loin and Rump in the Native Horse Meat from Jeju. *KOREAN J. FOOD SCI. ANI. RESOUR.* **25**, 365-372 (2005).

VI. 적요

뼈는 활발히 대사되는 조직으로 뼈모세포에 의한 뼈형성과 뼈파괴세포에 의한 뼈흡수 간의 균형을 맞추어 끊임없이 뼈재형성을 이루는데, 이 균형은 여러 가지 신호전달과 성장인자, 사이토카인, 호르몬 등의 자극에 의해 유지된다. 대사성 뼈질환의 하나인 골다공증은 뼈흡수의 증가로 생기며, 이는 뼈의 밀도 감소와 골질을 증가로 야기된다. 이에 본 연구에서는, 말뼈 추출물을 120℃에서 증류수로 추출한 고온 물 추출물, 100℃에서 80% ethanol로 추출한 고온 주정 추출물, 실온에서 증류수로 추출한 실온 물 추출물, 실온에서 80% ethanol로 추출한 실온 주정 추출물로 나누어 *in vitro*와 *in vivo*에서 뼈질환 인자에 미치는 영향을 확인하였다. *in vitro*에서는 뼈모세포 계열인 MG-63 세포를 IL-1 β (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)로 자극하여 IL-6 생성을 유도하고, 대식세포 계열인 RAW 264.7 세포를 sRANKL (100 ng/mL)로 자극하여 뼈파괴세포형성을 유도하였다. MG-63 세포를 IL-1 β 로 자극하여 IL-6을 유도하고 말뼈 추출물을 처리하였을 때 말뼈 추출물이 농도 의존적으로 IL-6의 생성을 억제하였다. 또한, RAW 264.7 세포를 sRANKL로 자극하여 뼈파괴세포형성을 유도하고 말뼈 추출물을 처리하였을 때 말뼈 추출물이 농도 의존적으로 뼈파괴세포형성을 억제하였다. *In vivo*에서는 백서의 난소를 적출하여 뼈질환 모델 중 하나인 폐경기 골다공증을 유도하였으며, 난소 적출 후 각 5군으로 나누었다. 말뼈 추출물은 수술시행 당일부터 투여하였으며 8주 후에 백서를 희생하여 혈액을 채취하고, 자궁과 넓다리뼈를 분리하였다. 말뼈가 골다공증 인자에 미치는 영향을 알아본 결과, 말뼈 추출물을 투여한 군에서 에스트로겐 결핍에 의해 증가되었던 체중변화율이 감소됨을 확인할 수 있었다. 자궁무게 변화와 골밀도 측정에서는 물 추출물이 난소적출에 의해 감소된

백서의 자궁무게와 골밀도를 증가시켰다. 또한 난소적출에 의해 증가되었던 혈청 ALP 수치를 감소시켰다. 따라서 말뚝 추출물은 뼈대사 과정 중 뼈흡수를 억제하여 효과를 나타내는 것으로 보인다. 이러한 결과들은 말뚝로부터 뼈질환의 예방 및 치료를 위한 추출 조건의 확립과 이 추출물을 이용한 기능성 식품의 연구에 중요한 기초자료가 될 것으로 기대된다.

Key words - 말뚝 추출물, 뼈질환 인자, 골다공증, 골다공증 인자



감사의 글

내 생애 보석 같은 날이
그 아쉬움에 머물다간 시간
멀지 않은 그리운 시간에
나는 나를 그립니다

보석 같은 시간을 보낸 아쉬움이 너무 많은 대학원 2년 이었습니다. 그리 길지는 않은 시간이었지만 가장 많은 생각을 하게 하였으며, 나를 반성하게 하였던 이 시간을 앞으로 그리워할 것입니다. 이 시간을 함께 해주신 분들께 감사한 마음을 전하고자 이 글을 적습니다.

부족한 저에게 기회를 주신 유은숙 교수님. 아낌없이 주신 관심과 사랑이 많은 힘이 되었습니다. 감사합니다. 언제나 환한 웃음으로 마주 봐주신 강희경 교수님. 격려해주시고 다독여주셔서 감사합니다. 부족한 논문에 힘을 주신 현진원 교수님, 주홍구 교수님께 감사의 말씀을 전합니다. 다정한 말 건네주시며 웃어 주신 박덕배 교수님, 조문제 교수님, 고영상 교수님, 은수용 교수님께 감사드립니다. 또한 저에게 관심과 조언을 아끼지 않으신 많은 교수님들께도 감사의 마음을 전합니다. 덕분에 대학원 생활에 많은 도움이 되었습니다.

나의 대학원 생활에서 박사님을 외치며 쫓아다녔지만 짜증 한번 안낸 천사혜자언니, 말로는 어색하다고 했지만 친 오빠 같은 경진오빠, 논문 쓰는 내내 귀찮게 해도 웃으며 받아준 원종오빠, 동기사랑 나라사랑을 말하게 해준 은진언니, 같이 졸업하는 변운영 선생님. 덕분에 논문 마무리하게 됐습니다. 감사해요. 사랑해요. 약리학교실에서 함께 생활하며 같이 지낸 모르는게 없는 상철오빠, 멋진 재희언니, 친절한 정일오빠, 막내 혜진이, 동기 민쌤 (민경언니). 대학원 발표 때마다 이것저것 물어보면 자세히 가르쳐준 지현언니, 정은언니, 희경 선생님, 영미 선생님, 경아언니, 진영언니, 지은언니 도와주신거 너무 고마워요. 이번에 같이 졸업하는 보연언니, 은희 선생님께서도 너무 고생하셨고 감사해요.

대학원에 올 수 있게 격려해주신 송창길 교수님, 저에게 공부가 재미있다는 것을 가르쳐 주시고 지원을 아끼지 않은 지훈형님 (앞으로는 박사님이라고 부를게요) 너무 감사합니다. 공부한다는 핑계로 연락이 없어도 이해해주는 경아, 승희, 혜영, 지영. 니들이 있어 힘이 많이 됐어 고마워. 버릇없이 굴어도 귀엽게 봐주는 형민오빠, 종훈이 오빠. 고마워요.

언제나처럼 옆에서 든든하게 버티고 계셔주신 아버지, 어머니. 다 커서 공부한다고 고생시켜드려 죄송합니다. 또 감사합니다. 동생이지만 언니 같은 선정이, 덩치만 크지 천상 막내인 선영이. 그 동안 언니 때문에 고생 많았다.

저에게 힘을 주신 많은 분들께 마음으로 고마움을 전합니다. 감사합니다.