

난소 적출 마우스 모델에서 *Oryza sativa* L.의 뿌리 추출물에서 분리된 화합물의 골다공증 개선 효과에 관한 예비연구

김선희·최은용·양희진·배준상^{1*}

㈜성균바이오테크, 1: 원광대학교 한의과대학 병리학교실

Preliminary Study on the Osteoporosis Improvement Effect of Compounds Isolated from *Oryza sativa* L. root Extract in the Ovariectomized Mouse Model

Seon-Hee Kim, Eun-Yong Choi, Hee-Jin Yang, Jun Sang Bae^{1*}

Sungkyun Biotech Co., Ltd.,

1: Department of Pathology, College of Korean Medicine, Wonkwang University

Bisphosphonates, estrogen, and calcium supplements are commonly used medications for postmenopausal osteoporosis, but they are associated with various side effects such as vaginal bleeding, deep vein thrombembolism, and breast cancer. In this study, we aimed to investigate the potential of a compound isolated from the roots of *Oryza sativa* L. to improve osteoporosis using an ovariectomized mouse model. We isolated and identified oryzativol A, a lignan compound, through chemical analysis of an ethanol extract using a bioassay-guided fractionation protocol. We also examined the metabolism, clearance, and CYP enzyme activity of oryzativol A, and found that it showed plasma stability of over 80% at all analysis times, and indicating a low likelihood of inactivation or excretion by the CYP3A4 enzyme. Our results showed that the high-dose group of oryzativol A exhibited a significant increase in bone mineral density compared to the control group. Although the ALP concentration did not differ significantly compared to the control group, it showed a tendency to increase in the high-dose group of oryzativol A. Furthermore, the abnormal ratio of serum Ca/P, caused by osteoporosis, was improved to a level closer to that of the normal group as the dosage of oryzativol A increased. Taken together, these findings suggest that oryzativol A is stable in vivo and has potential as a therapeutic agent for osteoporosis, particularly when administered in high doses.

keywords : *Oryza sativa* L., Lignans, Oryzativol A, Osteoporosis, Bone mineral density, Ovariectomized mouse model

서 론

골 재형성은 파골 세포에 의한 골 재흡수와 조골 세포에 의한 골 형성 간의 균형이 필요하다^{1,2)}. 파골세포의 과도한 분화와 활성화는 이들 세포 간의 불균형으로 인해 폐경 후 골다공증, 치주염, 류마티스 관절염 등 골밀도가 낮고 골 파괴가 일어나는 골질현의 발병과 관련이 있다³⁾.

이 중, 폐경 후 골다공증은 폐경 후 여성의 삶의 질에 심각한 영향을 미치며, 골다공증 관련 골절은 노년층 여성의 장애 및 사망의 주요 원인이다. 폐경 후 여성의 거의 절반이 골다공증성 골절을 경험할 것으로 추정된다⁴⁾. 폐경 후 골다공증은 에스트로겐의 결핍이 중요한 원인으로 알려져 있으며, 에스트로겐의 결핍은 골 흡수를 증가시키고 혈중 칼슘의 농도가 증가함에 따라 파골세포의 활성화로 인해 발생한다⁵⁾. 최근 비스포스포네이트, 에스트로겐, 칼슘 보충제, 비타민 D 대사산물 등 다양한 약물이 골다공증 치료제로 사용되고 있으나 질 출혈, 심부정맥 혈전색전증, 유방암, 자궁암, 비정형 대퇴골 골절, 턱 괴사 등의 부작용이 나타난다⁶⁻⁹⁾. 현재 이러한 부작용을 보완하기 위한 대안적 치료 전략으로 기능성 식품 및 의약품 자원으로 각광받고 있는 천연물 발굴에 집중하고 있다.

아시아 쌀(*Oryza sativa* L., Gramineae)은 세계 인구의 절반 이상이 주식으로 사용하는 중요한 작물이다¹⁰⁾. 한국에서 나도근으로 알려진 *O. sativa*의 뿌리는 소화 개선, 해열, 냉한 및 당뇨병 치료 등 한국과 중국에서 여러 가지 의학적 용도를 사용되고 있다¹¹⁾. *O. sativa*의 추출물은 항바이러스, 항종양, 항균 및 항멜라닌생성 효과 등 다양한 약리학적 효과를 나타낸다¹²⁻¹⁵⁾. 이전 연구들에서 *O. sativa*의 파이토케미컬 분석 결과, diterpenoids¹²⁾, gibberellins^{12,14)}, phenolic¹⁵⁾, 및 phytosterols¹⁶⁾ 화합물을 포함한 많은 생리활성 화합물의 존재를 보고하였다. 그러나 *O. sativa* 추

출물 또는 추출물에서 분리된 새로운 화합물이 골다공증과 관련된 골대사에 대한 효과는 명확하게 알려져 있지 않다.

난소적출 동물은 폐경 후 여성의 생리학적, 병리학적 변화를 연구하기 위해 전 세계적으로 사용되는 동물모델이며 에스트로겐 변화, 혈청 내 골교체율(bone turnover rate)의 상승, 칼슘의 장내흡수 저하, 비만 및 골 미네랄 감소를 야기시킨다¹⁷⁾.

본 연구는 *O. sativa* 추출물에서 분리된 새로운 화합물의 혈장 안정성과 대사 안정성을 평가하여 화합물의 유효성을 확인하고, 이 화합물을 사용하여 난소적출로 유도된 골다공증 동물모델에서 골밀도 및 골대사와 관련된 생화학적 지표를 확인하여 골다공증 개선 효과를 나타낼 수 있는지를 알아보기 위한 예비 연구이다.

재료 및 방법

1. *O. sativa* 뿌리 추출 및 분리

*O. sativa*의 뿌리는 2019년 7월, 경동시장(서울, 한국)에서 구입하였다. *O. sativa* 뿌리의 추출 및 분리는 이전 연구에서 설명한 대로 수행하였다¹⁸⁾. 간략하게, *O. sativa* 뿌리(400 g)를 건조한 후 60°C에서 24시간 동안 95% 에탄올로 3회 추출한 다음 여과하였다(Whatman 여과지 No. 2). 여과된 추출물을 동결건조기로 증발시킨 후 42 g을 분말 형태로 얻었다. 건조된 분말을 증류수에 녹이고, LC/MS(액체 크로마토그래피-질량 분석) 분석을 위해 소량의 에탄올 추출물을 순차적으로 주입하였다. 이동상은 MeOH/H₂O(1:9-1:0, 유속: 0.3 mL/분)의 조건으로 구배 용매 시스템을 수행하였다. LC/MS 분석 기술은 자체 제작 UV 라이브러리를 사용하였고, 양이온 모드의 전자분사이온화(ESI)법을 이용하여 m/z 729 ([M+H]⁺)에서 분자 이온 피크를 갖는 lignans oryzativol A의 존재를 이전 연구에서와 마찬가지로 확인하였다¹⁸⁾.

Jun Sang Bae, Department of Pathology, College of Korean Medicine, Wonkwang University, 460, Iksan, Jeonbuk 54538, Korea

E-mail : jsbae78@wku.ac.kr ·Tel : +82-63-850-7359

Received : 2023/03/31 ·Revised : 2023/04/14 ·Accepted : 2023/04/21

© The Society of Pathology in Korean Medicine, The Physiological Society of Korean Medicine

pISSN 1738-7698 eISSN 2288-2529 http://dx.doi.org/10.15188/kjopp.2023.02.37.2.30

Available online at https://kmpath.jams.or.kr

분리한 oryzativol A는 사용 전까지 -80°C 에 보관하였다.

2. 세포배양 및 실험동물

마우스 간세포 분리 방법으로 EDTA와 콜라겐아제를 사용하였다. 간략하게 두 단계로 EDTA와 콜라겐아제를 처리하여 마우스 간을 부드럽게 다진 후 DMEM 배지를 넣어 혼합한 후 100 μm 필터를 통과시켰다. 세척 후 세포를 수집하였고 penicillin and streptomycin (100 U/ml) 및 10% fetal bovine serum(Gibco BRL, Gaithersburg, MD)이 포함된 DMEM 배지에서 배양하였다.

실험동물은 10주령, ICR 마우스(ORIENTBIO Inc., 성남, 한국) 암컷 45 마리를 구입하여 7일간 적응시켰다. 적응기간 동안 실험사료는 일반 고형사료(Teklad Certified Global 18% Protein Rodent Diets #2918C, Envigo TEKLAD Ltd., 미국)를 사용하였고 여과된 음수는 자유롭게 섭취할 수 있도록 매일 갈아주었다. 사육 환경은 제어된 온도($21 \pm 3^{\circ}\text{C}$), 습도($50 \pm 5\%$) 및 조명(150-300 lx)으로 12시간 명/암 주기로 조절하여 사육하였다. 적응 기간 후 체중을 측정하고 그룹 간 평균값이 유사하도록 군 분리를 실시하였다. 실험군은 다음과 같이 4개 군으로 분류하였다. 정상대조군(G1, n=5), 실험대조군(G2, n=10), oryzativol A 저용량군(G3, n=10), oryzativol A 고용량군(G4, n=10)(Table 1). 모든 동물 실험은 (주)케이피씨의 동물실험윤리위원회에 의해 승인 후 실험을 진행하였다(승인번호: P191016).

Table 1. Group composition and dose administered

Group	Ovariectomy	Test article	Dose (mg/kg)	Vol. (mL/kg)	Head (n)
G1	None	Vehicle	-	10	5
G2		Vehicle	-	10	10
G3	Operation	oryzativol A	5	10	10
G4		oryzativol A	50	10	10

3. 혈장 및 대사 안정성 검사

분리된 oryzativol A의 유효성 확인을 위해 혈장 및 대사 안정성 검사를 시행하였다. 혈장 안정성 검사는 메탄올(100%)에 용해된 oryzativol A 1 mg/ml를 혈청과 1대 1 비율로 섞은 후 CO_2 incubator내에서 반응시켰다. 1, 4, 8, 24시간 동안 반응한 시료를 14000 rpm, 15분간 원심 분리하였다. 상층액을 COSMOSPIN Centrifugation Filter, (Nacalai Tesque, Japan) 14000 rpm, 2분간 원심분리하고 상층액을 취하여 HPLC (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)로 분석(column: COSMOSIL 5C18-MS-II, 파장: 254nm, Solvent A: 5% MeOH with 0.04% TFA, Solvent B: 100% MeOH)을 실시하였다. 대사 안정성 검사는 마우스의 간조직에서 세포를 분리하여 lysis 용액(Tris-HCl (pH 7.5) 10 mM, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.5 mM)에서 lysate를 만들었다. 저온상태의 lysate에 oryzativol A(2.5 μM or 5 μM)를 처리하고 CYP3A4 Activity Assay Kit(ab211076, ABCAM, Cambridge, UK)의 protocol에 따라 반응시킨 후 5분 간격으로 40분간 형광측정기(SpectraMax M, Molecular Devices, San Jose, CA, USA)로 Ex/Em = 535/587 nm에서 CYP3A4의 활성을 측정하였다.

4. 골다공증 모델 제작 및 실험 설계

정상대조군(G1)을 제외한 실험군들(G2-G4)은 난소 절제술을 시행하였다. 난소 절제술은 11주령 ICR 마우스에 케타민과 자일라진 혼합물(90 mg/kg)을 복강 내 주사하여 전신마취를 시행하였다. 하복부의 피부, 근육, 복막의 절개를 시행하여 양쪽 난소를 절제하였다. 노출된 피부와 근육을 봉합하고 수술 부위를 포비돈 요오드로 소독하였다. 난소 절제 후 12주 후에 시험물질을 투여하였다. 시험물질 oryzativol A는 저용량군(G3, 5 mg/kg)과 고용량군(G4, 50 mg/kg)으로 설정하였고(Table 1), 매일 오전 경구용 존재를 사용하여 8주간 1일 1회로 경구 투여하였다.

5. 관찰 및 검사항목

1) 임상증상 관찰

모든 동물에 대하여 1일 1회 일반증상을 관찰하였고, 1일 1회 사망여부, 증상의 종류 및 정도 등을 확인하며 관찰은 투여 1일부

터 투여 종료 시까지 실시하였다.

2) 체중 측정

시험물질 투여 개시일(투여 전)에 체중을 측정하고 그 이후 1주일 간격으로 체중을 측정하여 각 군별의 변화를 비교하였다. 부검일의 체중은 체중 평가에서 제외하였다.

3) 골밀도(Bone mineral density; BMD) 측정

골밀도 측정은 시험물질 투여 후 4주와 8주에 실시하며 동물을 isoflurane으로 흡입 마취한 후 dual energy X-ray absorptiometry(DEXA) (InAlyzer, (주)메디코어스, 성남, 한국)를 이용하여 골밀도를 측정하였다. 골밀도 측정에 객관성을 부여하기 위해 개체별 동일 부위를 한정하여 측정하였고, 측정부위는 골다공증 유발 시 골 소실과 재생에 대한 관찰이 용이한 장골(long bone)의 가장 대표적인 대퇴골(Femur)을 설정하였다.

4) 혈청 생화학적 검사

실험기간 종료 후 동물을 isoflurane으로 흡입 마취한 후 복대정맥을 통해 전혈을 채취하였다. 복대정맥에서 채취한 혈액은 혈청 분리를 위하여 5 mL SST(serum separate tube) tube(Microtainer, BD, 미국)에 넣어 혈액을 완전히 굳힌 다음 4°C 에서 5,000 rpm 으로 15분간 원심분리한 후 혈청을 취하여 1.5 ml tube 에 담아 -70°C 이하의 deep freezer에 보관하였다. 냉동 보관된 혈청을 이용하여 혈청 생화학 분석기(Accute TBA-40FR, Toshiba Medical System Co., 일본)로 ALT(Alanine aminotransferase), AST(Aspartate Aminotransferase), ALP(Alkaline phosphatase), Ca(Calcium) 및 P(Phosphorus)를 측정하였다.

6. 통계학적 분석

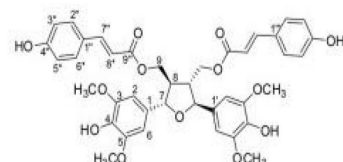
모든 실험 결과는 평균치 \pm 표준편차로 표시하고 SPSS (version 20, IBM SPSS Statistics, 미국)와 student's t-test(Excel, Microsoft, 미국)를 사용하여 검정하였다. G1군과 G2군은 난소적출의 영향을 알아보기 위해 t-test를 실시하였고, G2-G4군은 난소 적출을 동일하게 받은 동물 내에서 시험물질의 영향을 알아보기 위해 Levene's test로 분산의 동질성을 확인하고, 동질한 경우에는 one-way analysis of variance(ANOVA)와 LSD test를 사용하여 G2군과 실험군(G3, G4)의 차이를 분석하였다. $p < 0.05$ 의 경우에서 통계적 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

결 과

1. *O. sativa* 에탄올 추출물에서 얻은 활성 화합물의 LC/MS 분석 및 구조

이전 연구와 마찬가지로, LC/MS 분석을 통해 *O. sativa* 에탄올 추출물에서 얻은 화합물은 oryzativol A로 확인되었으며, 분자식은 $\text{C}_{40}\text{H}_{40}\text{O}_{13}$ 이었다¹⁸⁾. 그 구조는 고 분해능-전자분사이온화-질량분석(HR-ESI-MS), 적외선 스펙트럼(IR) 및 핵자기공명(NMR) 분석을 사용하여 결정하였다. 이 화합물은 2개의 trans-p-coumaroyl 구조와 icariol A2 구조를 포함하였다. Oryzativol A의 절대 배열은 circular dichroism(CD) 데이터를 사용하여 7R,7'R,8S,8'S로 결정되었고, 구조는 [(2R,3S,4S,5R)-tetrahydro-2,5-bis-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)-3,4-furandiyl]-bis-(methylene) ester (E)-p-hydroxycinnamic acid였다(Fig. 1A). 또한, NMR 데이터 분석 결과, 분자 내에 2,5-diaryl tetrahydrofuran lignan인 icariol A2 구조가 존재한다는 것을 시사했으며, 이는 2D NMR 데이터 분석 (Heteronuclear single quantum correlation (HSQC), 1H-1H correlation spectroscopy (COSY) 및 heteronuclear multiple bond correlation (HMBC))을 통해 확인하였다(Fig. 1B).

A



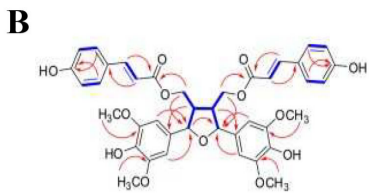


Fig. 1. (A) Chemical structures of oryzativols A. (B) 1H-1H COSY correlations (blue bond) and key HMBC correlations (H → C) of oryzativol A.

2. 혈장 안정성과 대사 안정성을 통한 oryzativol A의 유효성 확인

Oryzativol A는 이전 연구에서 골 형성의 생물학적 활성을 갖는 것으로 확인되었다¹⁸⁾. 따라서 oryzativol A의 생물학적 특성이 동물모델에서도 활성을 갖는지를 평가하였다. 먼저, 혈장에서 일어나는 가수분해에 의한 oryzativol A의 대사반응, clearance를 평가하여 oryzativol A의 혈장 안정성을 확인하였다. 0.5 mg/mL 농도로 oryzativol A의 시간별 혈장 안정성 분석 결과, oryzativol A의 0시간 피크 면적 값을 기준으로 1, 4, 8, 24시간의 퍼센트(%) 면적 값은 각각 85%, 89%, 90%, 99%로 모든 분석 시간에서 80% 이상의 혈장 안정성을 보이므로 혈장 내에서 oryzativol A가 매우 안정적임을 확인할 수 있었다(Fig. 2A). 또한 oryzativol A의 대사 안정성 평가를 위해 CYP 효소의 활성을 측정하였다. 5 μM oryzativol A의 농도로 실험을 진행하여 간의 CYP 계열 효소 중 가장 높은 비율을 차지하는 CYP3A4의 활성도를 측정하였다. 5 μM oryzativol A 처리 5분부터 40분까지 CYP3A4의 활성이 약 20% 정도 감소되고 유지됨을 확인할 수 있었다(Fig. 2B).

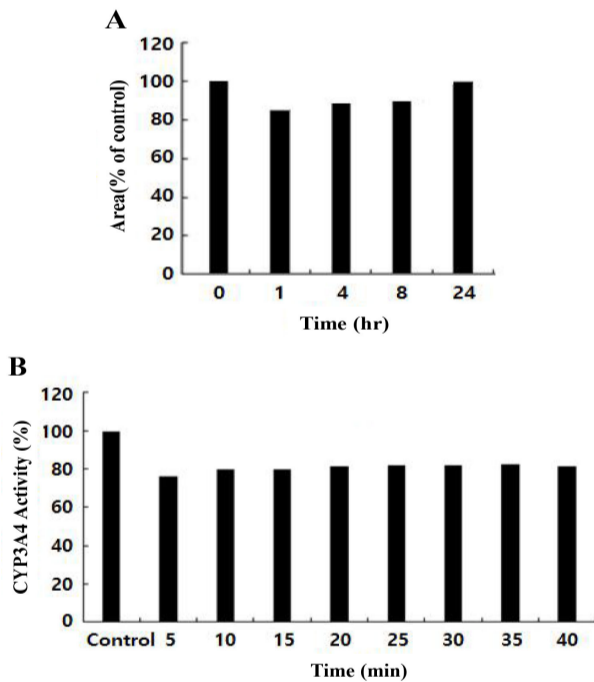


Fig. 2. Plasma and metabolic stability assessment of oryzativol A. (A) In the plasma stability test, oryzativol A was mixed with serum and reacted for 1, 4, 8, and 24 hours, after which the supernatant was analyzed by HPLC. (B) In the metabolic stability test, lysate was prepared from mouse liver tissue, and the activity of CYP3A4 was measured using a fluorescence spectrophotometer at 5 minute intervals for 40 minutes after treating the lysate with oryzativol A. There was no significant difference in the plasma stability and metabolism of oryzativol A-treated mouse and mouse liver primary cells compared to the control group.

3. 임상증상 및 체중 변화

시험 동물 입고 후 적응 기간 동안 이상증상이 관찰되는 동물은 없었다. 또한 8주간의 약물 투여기간 동안 이상 반응을 보이는 동물은 관찰되지 않았으며, 투여에 의한 이상 증상도 시험 종료 시까지 관찰되지 않았다(data not shown). ICR 마우스에 난소 절제술 시행 후 12주간 골다공증 유발 및 회복기를 가졌으며, oryzativol A 처리기간인 8주간 매주 1회 체중을 측정하였다. 그 결과 oryzativol A의 투여 직전 난소 절제를 받은 실험군(G2-G4)의 체중은 정상대조군(G1)과 비교하였을 때 유의하게 증가하였다. Oryzativol A 투여 1주일 후에는 실험군의 체중이 감소하기 시작하였다. 이는 약물 투여 행위로 인해 정상대조군에 비해 많은 체중 감소 경향을 보인 것으로 보인다. 투여 행위에 의해 감소한 체중은 3

주 정도부터 회복되었다. Oryzativol A 투여군(G3, G4)의 체중 증가율은 실험대조군(G2)에 비해 낮았고, 투여 8주차에는 oryzativol A 고용량군(G4, 50 mg/kg)보다 저용량군(G3, 5 mg/kg)의 체중 증가율이 실험대조군에 비해 유의하게 낮았다(Fig. 3A).

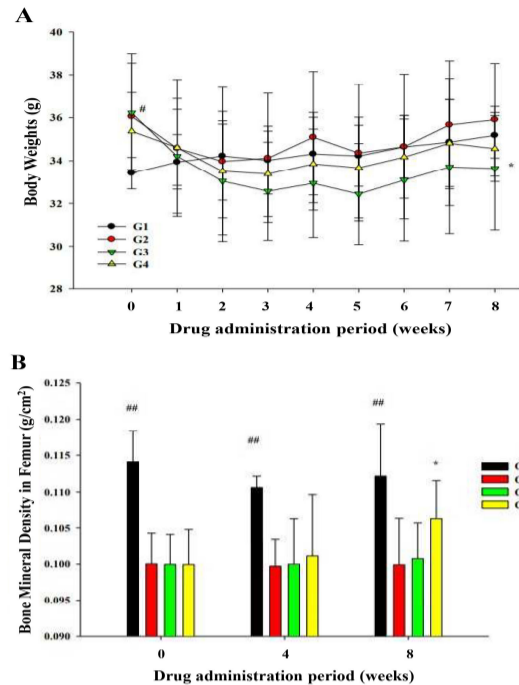


Fig. 3. Changes in body weight and bone mineral density of ovariectomized mouse treated with oryzativol A. The ICR mice were divided into four groups; normal control group(G1), experimental control group(G2), oryzativol A low-dose group(G3), oryzativol A high-dose group(G4). Except for the G1 group, the experimental group(G2-G4) underwent ovariectomy. After 12 weeks, oryzativol A was prepared and orally administered for 8 weeks. Body weight was measured every week after administration of oryzativol A, and bone mineral density was measured 4 weeks and 8 weeks after oryzativol A administration. (A) Body weight, (B) bone mineral density. Results are expressed as the mean ± SD. Bars labeled with different superscripts are significantly different (*p<0.05, vs. G2; #p<0.05, ##p<0.01, vs. G2).

4. 골밀도(Bone Mineral Density) 측정

골밀도 측정은 oryzativol A 경구 투여하기 직전, 투여 후 4주, 투여 후 8주차에 측정하였으며, 총 3회의 측정 시 마다 해당 실험일에 동물을 isoflurane으로 흡입 마취한 후 dual energy X-ray absorptiometry (InAlyzer, ㈜메디코어스)를 이용하여 골밀도를 측정하였다. 골밀도 측정 결과, 전 측정 기간 동안 실험대조군(G2)이 정상대조군(G1)에 비해 유의하게 낮았고 이는 난소 적출에 의한 골다공증의 유발이 이루어졌다고 판단할 수 있었다. Oryzativol A 투여 8주차에 고용량군(G4, 50 mg/kg)의 골밀도가 ($0.1063 \pm 0.0053 \text{ g/cm}^2$) 실험대조군(G2)($0.0999 \pm 0.0064 \text{ g/cm}^2$)에 비해 유의하게 증가하였다($p=0.017$). 골밀도의 측정 값은 Table 2와 Fig. 3B에서 보여주었다.

Table 2. Bone Mineral Density of ovariectomized mouse treated with oryzativol A for 8 weeks administration

Group		BMD (g/cm ²)		
		Pre-Dose	4 weeks	8 weeks
G1 Normal	None	Mean	0.1141 ^{##}	0.1106 ^{##}
		SD	0.0043	0.0016
G2 Control		Mean	0.1001	0.0997
		SD	0.0042	0.0037
G3 oryzativol A (5 mg/kg)	Ovariectomized	Mean	0.1000	0.1000
		SD	0.0041	0.0062
G4 oryzativol A (50 mg/kg)		Mean	0.1000	0.1011
		SD	0.0048	0.0085

1) Data are expressed as mean ± SD 2) Significant difference from G2 vehicle control group by One-way ANOVA followed by the LSD test: *p<0.05, **p<0.01. 3) Significant difference from G2 vehicle control group by student's t-test: #p<0.05, ##p<0.01

5. 혈청 생화학적 검사

Oryzativol A 투여가 골다공증 동물모델에서 혈액 내 미치는 영향을 확인하기 위해, 부검 시 채취한 혈액을 이용하여 AST, ALT, ALP, 칼슘(Ca)과 인(P) 수준을 생화학 분석기를 통해 측정하였다. 정상대조군(G1)에서 (A) AST($70.00 \pm 18.49 \text{ U/L}$), (B) ALT($32.60 \pm 9.48 \text{ U/L}$), (C) ALP($49.40 \pm 6.23 \text{ U/L}$), (D)

Ca(11.04 ± 1.06 mg/dL)과 (E) P(6.56 ± 0.91 U/L)의 수준을 각각 나타내었으며, 실험대조군(G2)과 비교 시 P 수치만 유의적으로 높게 관찰되었다. 또한, oryzativol A 고용량군(G4)과 실험대조군(G2)의 비교 분석에서도 P 수치만 유의한 차이를 보여주었다 ($p=0.026$)(Fig. 4).

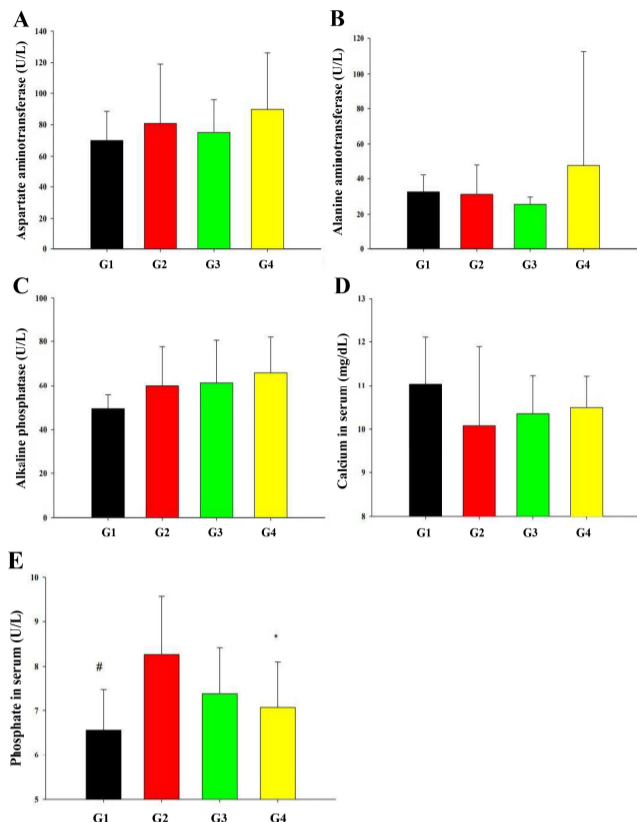


Fig. 4. Effects of oryzativol A on serum (A) AST, (B) ALT, (C) ALP, (D) Ca and (E) P levels in ovariectomized mouse. The ICR mice were divided into four groups; normal control group(G1), experimental control group(G2), oryzativol A low-dose group(G3), oryzativol A high-dose group(G4). Results are expressed as the mean \pm SD. Bars labeled with different superscripts are significantly different ($*p<0.05$, vs. G2; $\#p<0.05$, vs. G2).

고찰

골 대사는 항상 일정한 평형상태를 이루며, 조골세포, 파골세포의 상호작용에 의한 골 형성과 골 흡수의 균형으로 적절하게 유지된다¹⁹. 그러나 골 대사의 불균형으로 인한 골 흡수가 골 형성보다 많아 골밀도가 감소하게 되면 골다공증 등 다양한 골 질환이 발생할 수 있다³.

폐경 후 골다공증은 폐경 후 여성에서 골밀도 감소 및 골절 위험 증가를 특징으로 하는 대사 장애이며, 감소된 에스트로겐, 칼슘섭취 부족, 호르몬 불균형 및 유전적인 요인 등이 중요한 원인으로 보고되었다²⁰. 적절한 치료가 없을 시 골절 등이 발생하여 심각한 문제를 초래한다.

현재 비스포스포네이트, 에스트로겐 등 다양한 약물이 골다공증 치료제로 사용되고 있으나 질 출혈, 심부정맥 혈전색전증, 유방암, 비정형 대퇴골 골절, 턱 괴사 등의 부작용이 나타난다¹⁶⁻⁹. 따라서 부작용이 적은 천연물과 한약재 발굴에 초점을 맞추고 있으며, 대안적 치료 전략으로 개발하려는 노력을 하고 있다.

*O. sativa*의 뿌리는 한국에서 나도근으로 알려져 있으며, 위와 폐를 보호하고 구토와 해열을 개선하는 등 한국과 중국에서 다양한 의학적 용도를 사용되고 있다^{21,22}. *O. sativa*의 추출물은 phyosterols, polysaccharides, glycans, diterpenoids, gibberellins, 및 phenolic과 같은 파이토케미컬을 가지고 있으며 항종양, 항균, 항바이러스 및 항멜라닌 생성 효과 등 다양한 약리학적인 효과를 나타낸다고 보고되었다²². 그러나 *O. sativa* 뿌리 추출물 또는 추출물에서 분리된 새로운 화합물이 골다공증과 관련된 골대사에 대한 효과는 명확하게 알려져 있지 않다.

본 연구는 골다공증 마우스모델에서 나도근으로 알려진 *O. sativa*의 뿌리 추출물에서 분리된 새로운 화합물(oryzativol A)의 유효성을 평가하고, 골밀도 및 골대사와 관련된 생화학적 지표를 확인하여 골다공증 개선 효과를 알아보았다.

먼저, *O. sativa* 뿌리 추출물에서 분리된 oryzativol A의 생체 내 연구에 적용할 수 있는지를 알아보기 위해 혈장 안정성과 대사 안정성을 평가하여 화합물의 유효성을 확인하였다. 본 연구에서 0.5 mg/mL 농도의 oryzativol A를 0, 1, 4, 8, 24시간별 혈장 안정성을 분석한 결과 0 시간을 기준으로 모든 시간에서 80% 이상의 혈장 안정성을 보여주었다. 이러한 결과를 바탕으로 혈장에서 일어나는 가수분해에 대해 oryzativol A는 매우 안정적인 물질일 것이라고 판단된다. 또한, oryzativol A의 대사 안정성 평가를 위해 CYP 효소의 활성을 측정된 결과 5 μ M oryzativol A 처리 5분부터 40분까지 CYP3A4의 활성이 약 20% 정도 감소됨을 확인할 수 있었다. Oryzativol A에 의한 CYP3A4의 활성 감소는 oryzativol A가 CYP3A4의 저해제일 가능성을 암시하며, CYP3A4 효소에 의하여 oryzativol A가 불활성되거나 극성 물질로 변화되어 배설될 가능성이 있음을 알 수 있었다. 따라서 생체 내에서 oryzativol A가 효과적으로 잔류하여 약물 효과가 높아질 것으로 기대할 수 있으며 생체 내 대사 유효성이 높을 것이라 판단된다. 종합하였을 때, oryzativol A의 간 대사 정도 및 약물간의 상호작용을 예측할 수 있으며 이를 기반으로 동물 실험 여부의 유효성을 판단할 수 있었다.

본 연구에서 8주간의 약물 투여기간 동안 oryzativol A에 의한 이상 반응을 보이는 동물은 관찰되지 않았다.

난소 절제술은 에스트로겐 결핍과 관련된 골 손실과 폐경 후 골다공증의 임상증상을 유발하는 것으로 잘 알려져 있다¹⁷. 따라서 본 연구에서는 마우스의 골다공증을 유발하기 위해 난소 절제술을 시행하였다. 그 결과 oryzativol A의 투여 직전 난소 절제를 받은 실험군의 체중은 정상대조군과 비교하였을 때 유의하게 증가하였다. 이러한 현상은 에스트로겐 결핍으로 인해 지방세포의 분화를 촉진시켜 지방조직을 축적하여 난소 절제 후 체중이 증가한다는 이전 연구와 일치하였다^{23,24}. 또한, Oryzativol A 투여군의 체중 증가는 실험대조군에 비해 낮았다. 최근 oryzativol A가 지방세포 분화에 관여하는 유전자의 발현을 억제하여 지방세포 생성을 감소시키는 것으로 보고하였다¹⁸. 이러한 결과는 oryzativol A가 체중 감소에 유용한 역할을 할 수 있음을 시사한다. 투여 8주차에는 oryzativol A 고용량군(50 mg/kg)보다 저용량군(5 mg/kg)의 체중 증가율이 실험대조군 대비 유의하게 낮았다. 체중의 감소가 발생하는 부분은 10배의 용량 차이에도 낮은 용량에서 더 낮은 체중을 보임이 관찰되었다. 이것이 약물에 의한 영향인지는 추후 독성 시험과 추가 시험에서 재연되는지 확인할 필요가 있다고 판단되었다.

골다공증을 진단하는 가장 유용한 지표로 골밀도를 측정하는 것으로 알려져 있다. 골밀도 측정 결과, 전 측정 기간 동안 실험군의 골밀도가 정상대조군에 비해 유의하게 낮았다. 이는 난소 적출로 인한 에스트로겐의 감소가 파골세포의 분화를 억제하는 osteoprotegerin(OPG)을 감소로 인해 골밀도가 낮아지므로 골다공증을 유발시킨다는 기존 연구와 같은 결과를 보여주었다^{24,25}. 또한, 난소 절제 후 oryzativol A 투여 8주차에 고용량군(50 mg/kg)의 골밀도(0.1063 ± 0.0053 g/cm²)가 실험대조군(0.0999 ± 0.0064 g/cm²)에 비해 유의하게 증가하였다. 이전 연구에서 oryzativol A가 골세포의 분화를 촉진하는 Runx2 발현을 높이는 것으로 보고하였다¹⁸. 이러한 결과는 oryzativol A가 골밀도를 증가시켜 골다공증을 개선시킬 수 있음을 시사한다.

ALT, AST 및 ALP는 간세포 내에 존재하며 간세포가 파괴되면 혈중 농도가 증가하게 되므로 간 기능 검사 표지자로 사용된다. Oryzativol A가 간 독성에 영향을 미치는지를 확인하기 위해, 간 기능 관련 효소인 ALT, AST, ALP의 혈중 농도 변화를 측정하였다. 그 결과 정상대조군에서 ALT, AST, ALP의 농도 수준을 실험군과 비교하였을 때 유의미한 차이를 보여주지 않았으며 이는 oryzativol A 투여가 간 독성을 나타내지 않는다는 것을 시사한다. 따라서 oryzativol A는 생체 내 장기간 투여 시 안전성을 가지는 물질이라고 판단하였다.

추가적으로 골 기능 검사 표지자로 사용되는 ALP, 칼슘(Ca), 인(P)의 혈중 농도를 확인하여 oryzativol A 투여가 골형성과 칼슘 대사에 영향을 미치는지를 확인하였다. ALP는 간세포뿐만 아니라 골아세포에도 많이 존재하며, 뼈 무기질 침착을 증진시키고, 골재형성이 활발할 때 혈중 내에서 증가하는 특징을 보이는 골 기능 검사의 지표로 사용된다^{26,27}. 본 연구에서 정상대조군과 실험군 또는

실험대조군과 oryzativol A 투여군 사이에는 유의미한 차이를 보여 주지 않았다. 하지만 정상대조군에 비해 실험군에서 약간 증가하는 경향을 보였으며, 특히, oryzativol A 고용량군에서 가장 증가하는 경향을 보여 주어 oryzativol A가 골 형성에 약간의 효과가 있는 것으로 사료된다. 하지만 보다 명확한 결과를 확인하기 위해 추가 연구가 필요할 것으로 생각된다.

뼈 속에 칼슘이 빠져나가면 골밀도가 떨어지고 보상 차원으로 골아세포는 혈액 내 칼슘을 운반하여 뼈를 생성한다. 또한 우리 몸은 혈액 속에 칼슘 농도를 일정하게 유지하려고 하는데 혈액 내 칼슘 농도가 떨어지게 되면 부갑상선 호르몬이 파골세포를 자극하여 뼈를 파괴해서 뼈 속의 칼슘을 혈액으로 이동시켜 다시 혈액 속에 칼슘 농도를 맞춰준다²⁸⁾. 또한, 폐경 후 여성은 에스트로겐 결핍으로 인해 혈중 칼슘을 뼈로 흡수하지 못하고 혈중 칼슘농도를 증가시킨다고 알려져 있다²⁹⁾. 대표적인 뼈의 무기질 성분 중 하나인 인도 칼슘과 마찬가지로 골아세포 수를 증가시켜 골형성을 일으키며, 난소 절제술에 의해 골다공증으로 유도된 마우스 뼈에서 인의 농도가 감소하는 것으로 알려져 있다³⁰⁾. 하지만 본 연구에서 정상대조군과 실험군 간에 칼슘 농도는 유의미한 차이를 보이지 않았다. 다만 oryzativol A 투여군이 실험대조군에 비해 칼슘은 약간 증가하고 인은 감소하는 경향을 보여주었다. 정상대조군과 실험대조군에서 인의 농도 수준을 비교하였을 때 실험대조군에서 유의미하게 증가하는 것을 나타냈다. 또한, 실험대조군과 oryzativol A 고용량군을 비교하였을 때 oryzativol A 고용량군의 인의 농도가 유의미하게 감소하는 것을 확인하였다. oryzativol A 투여량 증가에 따라 골다공증 유발로 비정상화된 혈중 Ca/P의 비율을 정상대조군의 혈중 Ca/P 비율에 가깝게 개선시키는 것으로 보여주었다. 이는 oryzativol A 투여가 혈중 칼슘과 인의 비율 정상화를 통해 골형성을 촉진하고 골다공증을 개선할 수 있는 가능성을 보여주었다.

이상의 결과를 종합해보면, 난소 절제술을 시행한 동물 모델에서 oryzativol A를 경구 투여한 결과 혈장 및 대사 안정성을 보였고, 간 독성을 보이지 않았다. Oryzativol A 고용량군에서 실험대조군에 비해 골밀도가 유의하게 증가하는 것을 확인하였다. 또한, ALP 농도는 실험대조군 대비 oryzativol A 고용량군에서 증가하는 경향을 보여주었다. Oryzativol A 투여량 증가에 따라 골다공증 유발로 비정상화된 혈중 Ca/P의 비율을 정상대조군의 혈중 Ca/P 비율에 가깝게 개선시키는 것으로 보여주었다. 따라서 oryzativol A 고용량군 투여는 골다공증 개선에 효과적인 것으로 사료된다.

결 론

본 연구는 *O. sativa* 뿌리 추출물에서 분리된 oryzativol A의 골다공증 개선효과의 유효성을 알아보기 위한 예비연구이다. 본 연구를 통해 oryzativol A의 생체 내 대사 안정성을 확인하였으며, 골다공증 동물모델에서 골다공증 개선 효능과 8주 투여 안전성을 확인한 바, 신규화합물 oryzativol A가 골형성을 촉진하는 골다공증 예방 및 개선용 의약품으로 개발할 가능성이 충분하다고 판단할 수 있었다. 하지만 추후 더 낮은 농도에서 골다공증 개선효과를 확인하거나 추가적인 실험이 필요할 것으로 판단된다.

감사의 글

이 논문은 2022학년도 원광대학교의 교비지원에 의해 수행됨

References

- Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*. 2003;423(6937):337-42.
- Nordin BE, Aaron J, Speed R, Crilly RG. Bone formation and resorption as the determinants of trabecular bone volume in postmenopausal osteoporosis. *Lancet*. 1981;2(8241):277-9.
- Rodan GA, Martin TJ. Therapeutic approaches to bone diseases. *Science*. 2000;289(5484):1508-14.
- Qin X, Wei Q, An R, Yang Y, Cai M, Han X, Mao H, Gao X. Regulation of bone and fat balance by Fructus Ligustri Lucidi in ovariectomized mice. *Pharm Biol*. 2023;61(1):391-403.
- Heaney RP. A unified concept of osteoporosis. *Am J Med*. 1965;39(6):877-80.
- Hanley DA, McClung MR, Davison KS, Dian L, Harris ST, Miller PD, Lewiecki EM, Kendler DL; Writing Group for the Western Osteoporosis Alliance. Western Osteoporosis Alliance Clinical Practice Series: Evaluating the Balance of Benefits and Risks of Long-Term Osteoporosis Therapies. *Am J Med*. 2017;130(7):862.e1-862.e7.
- Barasch A, Cunha-Cruz J, Curro FA, Hujoel P, Sung AH, Vena D, Voinea-Griffin AE, Beadnell S, Craig RG, DeRouen T, Desaranayake A, Gilbert A, Gilbert GH, Goldberg K, Hauley R, Hashimoto M, Holmes J, Latzke B, Leroux B, Lindblad A, Richman J, Safford M, Ship J, Thompson VP, Williams OD; CONDOR Collaborative Group; Wanrong Y. Risk factors for osteonecrosis of the jaws: a case-control study from the CONDOR Dental PBRN. *Tex Dent J*. 2013;130(4):299-307.
- Grodstein F, Stampfer MJ, Goldhaber SZ, Manson JE, Colditz GA, Speizer FE, Willett WC, Hennekens CH. Prospective study of exogenous hormones and risk of pulmonary embolism in women. *Lancet*. 1996;348(9033):983-7.
- Narod SA. Hormone replacement therapy and the risk of breast cancer. *Nat Rev Clin Oncol*. 2011;8(11):669-76.
- Khush GS. What it will take to feed 5.0 billion rice consumers in 2030. *Plant Mol Biol*. 2005;59(1):1-6.
- Hikino H, Murakami M, Oshima Y, Konno C. Isolation and hypoglycemic activity of oryzarans A, B, C, and D: glycans of *Oryza sativa* roots. *Planta Med*. 1986;(6):490-2.
- Peters RJ. Uncovering the complex metabolic network underlying diterpenoid phytoalexin biosynthesis in rice and other cereal crop plants. *Phytochemistry*. 2006;67(21):2307-17.
- Kim SJ, Park HR, Park E, Lee SC. Cytotoxic and antitumor activity of momilactone B from rice hulls. *J Agric Food Chem*. 2007;55(5):1702-6.
- Prisic S, Xu M, Wilderman PR, Peters RJ. Rice contains two disparate ent-copalyl diphosphate synthases with distinct metabolic functions. *Plant Physiol*. 2004;136(4):4228-36.
- Jcho JG, Huh J, Jeong RH, Cha BJ, Shrestha S, Lee DG, Kang HC, Kim JY, Baek NI. Inhibition effect of phenyl compounds from the *Oryza sativa* roots on melanin production in murine B16-F10 melanoma cells. *Nat Prod Res*. 2015;29(11):1052-4.
- Park HY, Lee KW, Choi HD. Rice bran constituents: immunomodulatory and therapeutic activities. *Food Funct*. 2017;8(3):935-943.
- Kim EJ, Kim GY, Kim YE, Jang MK, Kim YI, Kim HW, Chung HW. Effect of Biochemical Makers of Bone Metabolism by Administration of *Achyranthes Radix* Concentration in Ovariectomized Rats. *Korean J. Oriental Physiology & Pathology*. 2007;21(4):967-72.
- Kang HR, Yun HS, Lee TK, Lee S, Kim SH, Moon E, Park KM, Kim KH. Chemical Characterization of Novel Natural Products from the Roots of Asian Rice (*Oryza sativa*) that Control Adipocyte and Osteoblast Differentiation. *J Agric Food Chem*. 2018;66(11):2677-2684.
- Chung HY. Osteoporosis Diagnosis and Treatment 2007. *Endocrinology and Metabolism*. 2008;23(2):76-108.
- Nilas L, Christiansen C, Rødbro P. Calcium

- supplementation and postmenopausal bone loss. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1984;289(6452):1103-6.
21. Kimura T, But PPH, Guo J-X, Sung CK. *International Collation of Traditional and Folk Medicine: Northeast Asia part 1*; World Scientific, 1996; pp 198-9.
 22. Lee TK, Lee D, Yu JS, Jo MS, Baek SC, Shin MS, Ko YJ, Kang KS, Kim KH. Biological Evaluation of a New Lignan from the Roots of Rice (*Oryza sativa*). *Chem Biodivers*. 2018;15(11):e1800333.
 23. Okazaki R, Inoue D, Shibata M, Saika M, Kido S, Ooka H, Tomiyama H, Sakamoto Y, Matsumoto T. Estrogen promotes early osteoblast differentiation and inhibits adipocyte differentiation in mouse bone marrow stromal cell lines that express estrogen receptor (ER) alpha or beta. *Endocrinology*. 2002;143(6):2349-56.
 24. Park H, Yoon L, Kim H-S. Effects of Fermented Soybean Paste Chungkukjang on the Immunoreactivity in Ovariectomized Mice. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2013;42(12):1930-39.
 25. Lee M-J, Jung H-K, Sim M-O, Jang J-H, Kim T-M, Lee H-J, Lee K-H, An B-K, Cho J-H, Jang M-C, Yong J-H, Kim J-C, Cho H-W. Calcium Bioavailability and Antiosteoporotic Effects of Cheonggukjang Containing High Poly-Gamma Glutamate Contents. *Soc Food Sci Nutr*. 2016;45(11):1544-51.
 26. Naylor K, Eastell R. Bone turnover markers: use in osteoporosis. *Nat Rev Rheumatol*. 2012;8(7):379-89.
 27. Yook T-H, Bae J-S, Kim Y-J, Kim D-K, Jung I-K, Lee C-H. Effects of Cervi Pontotrichum cornu and Carthami semen on the experimental osteoporosis induced by ovariectomy in rats. *Korean J. Oriental Physiology & Pathology*. 2006;20(5):1226-32.
 28. Kiebzak GM. Age-related bone changes. *Exp Gerontol*. 1991;26(2-3):171-87.
 29. Yeh JK, Aloia JF, Barilla ML. Effects of 17 beta-estradiol replacement and treadmill exercise on vertebral and femoral bones of the ovariectomized rat. *Bone Miner*. 1994;24(3):223-34.
 30. Broulik PD. Tamoxifen prevents bone loss in ovariectomized mice. *Endocr Regul*. 1991;25(4):217-9.