

## Baicalein이 골수유래대식세포의 파골세포 분화에 미치는 효과

윤지광<sup>1,†</sup>, 천윤희<sup>2,3,†</sup>, 김주영<sup>4</sup>, 광성철<sup>2</sup>, 윤강휴<sup>2</sup>, 백종민<sup>2,3</sup>, 이명수<sup>4</sup>, 오재민<sup>2,3,4</sup>, 박종태<sup>1</sup>

<sup>1</sup>원광대학교 의과대학병원 신경외과, <sup>4</sup>영상기반 폐 및 골 질환연구센터

<sup>2</sup>원광대학교 의과대학 해부학교실 및 골격계질환 연구소,

<sup>3</sup>BK21 플러스 ICT기반 라이프 케어산업 융복합 인재양성사업단,

(2014년 3월 28일 접수, 2014년 6월 4일 수정접수, 2014년 6월 23일 게재승인, Published Online 30 June 2014)

**간추림** : 현대사회가 급속한 노령화 시대에 접어들면서 뼈 건강에 대한 중요성이 증가됨으로써 최근, 천연물을 이용한 골질환의 치료제를 개발하기 위한 연구가 활발히 이루어지고 있다. Baicalein은 기존에 항암, 항염증, 항산화의 효과가 있고, MC3T3-E1 조골세포주의 분화를 촉진하며, RAW264.7세포주의 분화는 억제한다는 보고가 있다. 그러나 골수유래대식세포를 이용한 파골세포 분화의 억제기전에 대해서는 정확히 알려진 바가 없다. 그리하여 본 연구에서는 골수유래대식세포의 파골세포 분화에 있어 baicalein의 억제기전을 밝히고, 골수기질세포의 조골세포 분화에 미치는 영향을 탐색하기 위한 실험을 진행하였다.

파골세포 분화를 위해 골수유래대식세포를 사용하여 분화, mRNA 및 단백질 발현을 확인하였다. 조골세포 분화를 위해 골수기질세포를 사용하여 분화, ALP활성 및 미네랄 침착능을 확인하였다.

Baicalein은 골수유래대식세포에서 RANKL로 유도한 파골세포로의 분화를 세포독성 없이 농도 의존적으로 억제하였다. 억제기전으로는 Akt, JNK, PLC $\gamma$ 2의 인산화를 억제하였고, NF- $\kappa$ B의 활성화를 억제하여 파골세포 분화의 필수 유전자인 *c-Fos* 및 *NFATc1*의 발현 역시 억제하였다. 또한 *TRAP*, *OSCAR*, *cathepsin K*와 *DC-STAMP*의 mRNA 수준의 발현을 감소시켰다. 이와 더불어, baicalein이 골 형성의 기능을 갖는 조골세포의 분화를 촉진하는 효과를 골수기질세포에서 확인하였다.

Baicalein은 골수유래대식세포에서 파골세포 분화를 억제하고, 동시에 골수기질세포를 이용한 조골세포 분화를 높이는 양면적인 효과를 가지는 물질로, 향후 골 소실 질환 치료제 개발에 중요 후보물질이 될 것으로 사료된다.

**찾아보기 낱말** : Baicalein, 파골세포, 골다공증, RANKL, PLC $\gamma$ 2

### 서 론

최근 평균수명의 증가로 퇴행성 질환들이 급증하고 있다. 따라서 이 질환들에 대한 예방 및 치료의 중요성이 대두되고 있다. 골의 건강은 고령자의 신체적 활동과 밀접하게 연관되어 있어 신체적 건강을 유지하여 삶의 질을 유지하는 데 기여함은 물론, 신체적 활동이 억제되었을 때 이차적으로 발생할 수 있는 성인병의 억제와도 밀접한 관련이 있다[1].

골은 파골세포에 의한 파괴 및 흡수, 그리고 조골세포에 의해 생성이 지속적으로 발생하는 역동적인 조직이다. 따라서 뼈의 항상성 및 건강을 유지하기 위해서는 파골세포와 조골세포 간의 균형이 중요하며 이 균형의 붕괴는 뼈 질환을 야기하게 된다. 특히 노령화에 의한 이 균형의 붕괴는 조골세포의 뼈 형성 능력보다 파골세포의 뼈 파괴 능력이 과도하여 항상성이 깨어짐으로써 발생한다[2]. 따라서 노령화에 의한 골 질환 발생에서의 예방 및 치료 방법은 파골세포에 의한 뼈 흡수 억제가 중요하다[3].

파골세포는 조혈모세포에서 유래된 대식세포가 macrophage colony-stimulating factor (M-CSF)와 receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand (RANKL)에 의하여 여러 분화 단계를 거쳐 생성된다[4]. 파골세포의 전구세

저자(들)는 '의학논문 출판윤리 가이드라인'을 준수합니다.

저자(들)는 이 연구와 관련하여 이해관계가 없음을 밝힙니다.

<sup>†</sup>제1저자로 동등한 역할을 수행하였음.

교신저자 : 박종태 (원광대학교 의과대학병원 신경외과)

전자우편 : jtpark@wku.ac.kr

포 표면에 존재하는 receptor activator of NF- $\kappa$ B (RANK)에 RANKL이 결합하게 되면 TNF receptor associated factor 6 (TRAF6), c-Fos와 Nuclear factor of activated T cell c1 (NFATc1) 등이 활성화되어 파골세포 분화를 유도하게 된다[5]. 특히 TRAF6의 유도는 p38, extracellular-signal regulated kinases (ERK), c-Jun N-terminal kinases (JNK) 등과 같은 MAPKs (mitogen-activated protein kinases)와 NF- $\kappa$ B, c-Fos 및 NFATc1과 같은 파골세포의 분화에 중요한 인자들을 활성화시킨다[6]. 이 중 NFATc1은 파골세포의 분화에 필수적인 중요한 전사인자로 파골세포 지표인 tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP), osteoclast-associated receptor (OSCAR), cathepsin K와 dendritic cell-specific transmembrane protein (DC-STAMP) 등의 발현을 촉진하여 파골세포의 분화 및 기능을 활성화시킨다[7].

Baicalein은 황금의 유효성분 중 하나로 항암, 항염증과 항산화 효과가 있다고 알려져 있다[8-11]. 뼈의 항상성 조절에 있어 RAW264.7 및 MC3T3-E1세포주를 이용한 baicalein에 대한 효능 분석에 대해 밝혀진 바가 있으나[12,13], 최근 이러한 세포주와 기능의 차이를 가진다고 보고되고 있는 골수유래대식세포와 골수기질세포 등 조대세포에서의 baicalein효과는 보고된 바가 없다. 따라서 본 연구에서는 골수유래대식세포의 파골세포 분화와 골수기질세포의 조골세포 분화에 있어 baicalein이 미치는 영향을 규명하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 시료 및 실험재료

Baicalein은 Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. M-CSF와 human RANKL은 PeproTech (Rocky Hill, NJ, USA)사의 제품을 사용하였다. p38, JNK, ERK, Akt, PLC $\gamma$ 2, p-PLC $\gamma$ 2, p-p38, p-JNK, p-ERK, p-I- $\kappa$ B, p-Akt 항체는 Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA)사의 제품을 사용하였으며, c-Fos와 NFATc1에 대한 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)의 제품을 사용하였다.  $\beta$ -actin 항체와 TRAP kit는 Sigma Aldrich사의 제품을 사용하였다. XTT assay kit는 Roche (Indianapolis, IN, USA)에서 구입하였다. 세포배양에 필요한  $\alpha$ -MEM, FBS, antibiotics (Penicillin/Streptomycin)는 Gibco-BRL (Grand Island, NT, USA)에서 구입하였다.

### 2. 조골세포 분화

수컷 5주령 ICR 마우스의 골수기질세포 (bone marrow

stromal cells, BMSC)를 정제하여 실험에 이용하였다. 마우스의 골수세포를 6일간 부착시킨 뒤,  $\alpha$ -MEM 배지에 10% FBS와 1% antibiotics (Penicillin/Streptomycin)를 첨가하여 배양하였고, 분화를 위해 10 mM  $\beta$ -glycerol phosphate (Sigma Co., St. Louis, MO, USA)와 50  $\mu$ g/mL의 ascorbic acid (Sigma Aldrich St. Louis, MO, USA)를 첨가하여 사용하였으며, 3일마다 배지를 교환하였다.

### 3. 파골세포 분화

수컷 5주령 ICR마우스를 100% CO $_2$  가스를 이용하여 안락사시킨 뒤 대퇴골과 경골을 분리하였다. 분리된 경골과 대퇴골의 양끝을 절단한 뒤 1 mL 주사기로 골수강 내의 세포를 채취하고 red blood cell lysis buffer (RBCL)을 이용하여 적혈구를 용해시켜 제거하였다. 얻어진 골수세포를 10% FBS, M-CSF (30 ng/mL)가 포함된  $\alpha$ -MEM 배지에서 3일간 배양하였다. 배양 3일 후, 부착된 세포를 대식세포로 실험하였다. 파골세포로의 분화를 위해 대식세포에 M-CSF (30 ng/mL)와 RANKL (100 ng/mL)을 처리하고, baicalein을 농도 별로 처리하여 4일간 배양하였다. 4일 후, 배양한 세포를 TRAP 용액으로 염색하고 염색된 세포를 파골세포로 판단하였다.

### 4. 독성검사

96 well plate에 대식세포를  $1 \times 10^4$ /well의 밀도로 200  $\mu$ L씩 분주하고 baicalein과 M-CSF (30 ng/mL)를 농도 별로 첨가하여 3일간 배양하였다. 배양 3일 후, XTT 용액 50  $\mu$ L를 각각의 well에 첨가하고 4시간 배양하였고, 그 후 흡광도 측정기 (Molecular Devices, CA, USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 5. Real-Time PCR 분석

배양된 세포에서 TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 용액으로 제조사의 매뉴얼에 따라 RNA를 분리하였다. 분리된 RNA 2  $\mu$ g은 dNTP, oligo dT primer, buffer, dithiothreitol, Superscript II reverse transcriptase와 RNase inhibitor를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA를 아래의 primer를 이용하여 PCR 증폭을 시행하였다. PCR 조건은 95°C에서 10초 동안 그리고 60°C에서 20초 동안의 반응을 40 cycles를 반복하여 증폭시켰다.

### 6. Western blot 분석

배양된 세포는 lysis buffer (50 mM tris-Cl, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100, 1 mM sodium fluoride, 1 mM sodium vanadate, 1% deoxycholate, protease

inhibitors)를 이용하여 용해하고 원심분리하여 순수한 단백질을 얻었다. 단백질은 DC Protein assay kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 사용하여 정량하고 동량의 단백질은 10% SDS-polyacrylamide gel에서 분리하였다. 분리된 단백질은 PVDF 막(Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK)으로 옮기고 PVDF 막은 5% non-fat dry milk를 처리하여 비 특이 단백질이 붙는 것을 방지하였다. 그리고 1차 항체 및 2차 항체를 처리했다. TBS-T 완충용액으로 PVDF막을 세척하여 enhanced chemiluminescence를 이용해 단백질 발현을 관찰했다.

## 7. 통계분석

정량적인 결과는 평균값과 표준편차로 표시하였다. 통계적인 차이는 Student's t-test를 이용하여 분석하였고  $p$  값이 0.05 이하인 경우 통계적으로 유의한 것으로 간주하여 별표(\*)로 표시하였다.

## 결 과

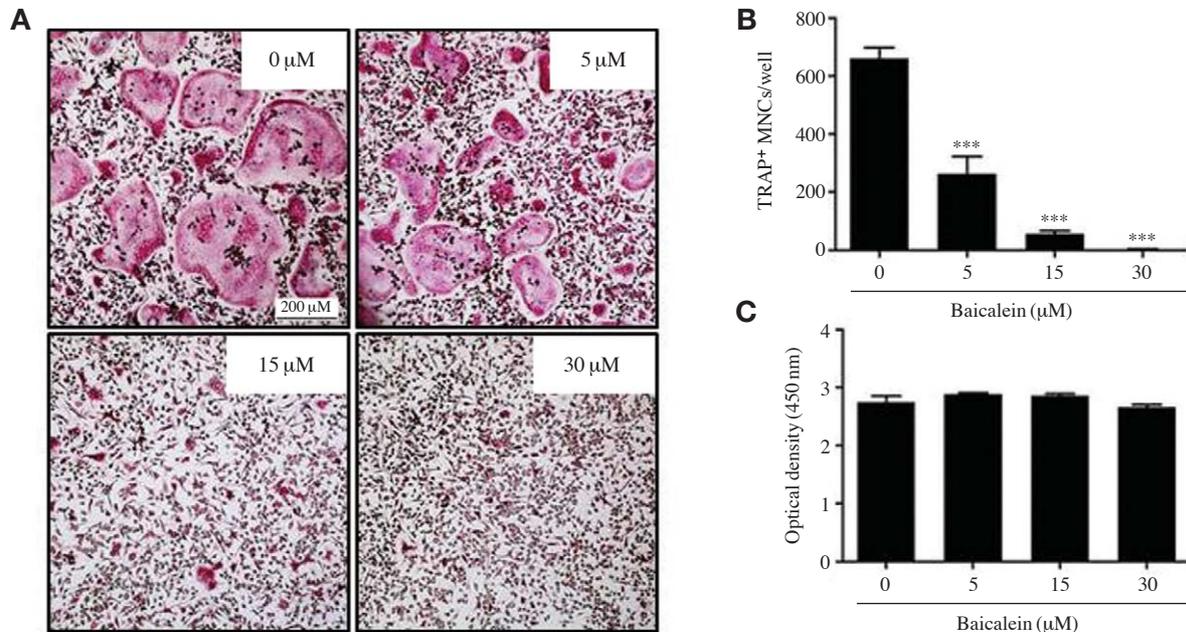
### 1. Baicalein의 RANKL에 의해 유도된 파골세포 분화 억제효과

Baicalein의 파골세포 분화에 대한 효과를 알아보기

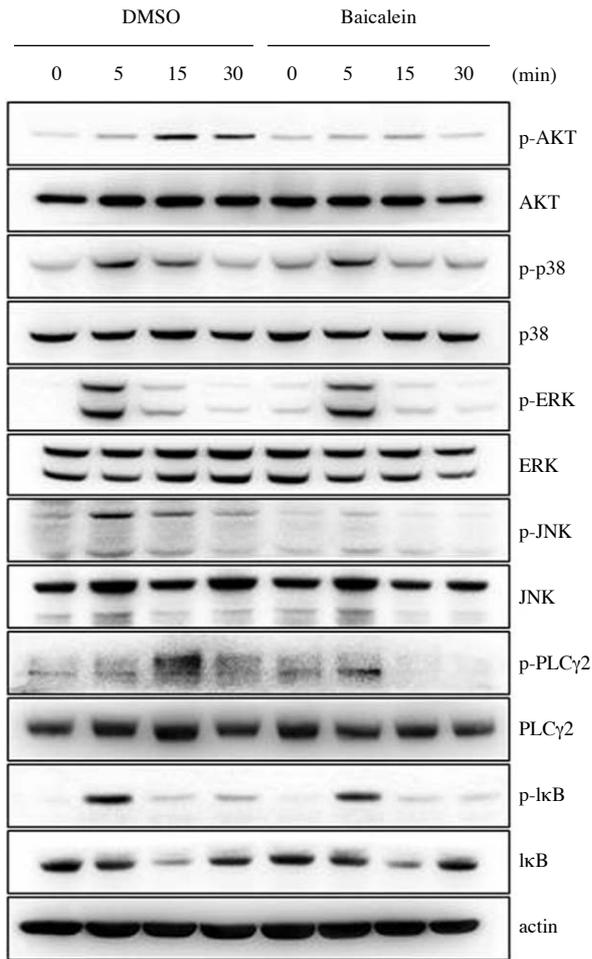
위하여 마우스로부터 분리한 대식세포에 baicalein을 농도별로 처리하고 RANKL로 파골세포로의 분화를 유도하였다. 그 결과, baicalein은 RANKL에 의해 유도된 파골세포의 분화를 농도 의존적으로 억제하였다(Fig. 1A, B). 또 baicalein의 파골세포 분화 억제 효과가 독성에 의한 것인지를 확인하기 위하여 시행한 XTT 실험에서 baicalein은 본 실험에 사용한 농도에서는 세포독성을 가지지 않음을 확인할 수 있었다(Fig. 1C).

### 2. Baicalein이 RANKL 신호전달 경로에 미치는 영향

MAPKs, Akt, NF- $\kappa$ B 신호전달은 파골세포의 분화과정 중에 RANKL에 의해 활성화되며 중요한 역할을 한다. 따라서 baicalein이 뼈 파골세포 분화 억제작용기전에 미치는 영향을 알아보기 위해 RANKL에 의한 신호전달과정에 baicalein의 영향을 조사하였다. 기존 RAW 264.7 세포주를 이용한 실험에서는 Akt, ERK의 인산화와 NF- $\kappa$ B의 활성화를 억제한다는 보고가 있었다. 이와는 대조적으로 골수세포 유래 대식세포를 이용한 실험에 있어 baicalein은 RANKL에 의한 p38, ERK의 활성화는 억제하지 못하였으나, Akt, JNK, NF- $\kappa$ B 및 PLC $\gamma$ 2의 활성을 억제하였다(Fig. 2). 이상의 결과로 baicalein은 Akt, JNK, NF- $\kappa$ B 및 PLC $\gamma$ 2 등의 다양한 경로에 작용함으로써 골수 대식세포가 파골세포로 분화하는 것을 억



**Fig. 1.** Baicalein suppresses RANKL-induced osteoclast differentiation. (A) Osteoclast precursors were cultured with M-CSF (30 ng/mL) and RANKL (100 ng/mL) for 4 days in the presence or absence of baicalein. Scale bar: 200  $\mu$ m (B) TRAP<sup>+</sup> cells containing five or more nuclei were counted as multinucleated osteoclasts. (C) BMMs were cultured for 3 days with M-CSF (30 ng/mL) in the presence of baicalein. After 3 days, 50  $\mu$ L of XTT reagents were added to each well, and the cells were incubated for 4 h. The absorbance was measured at 450 nm using a microplate reader. \*\*\*,  $p < 0.001$  vs untreated control.

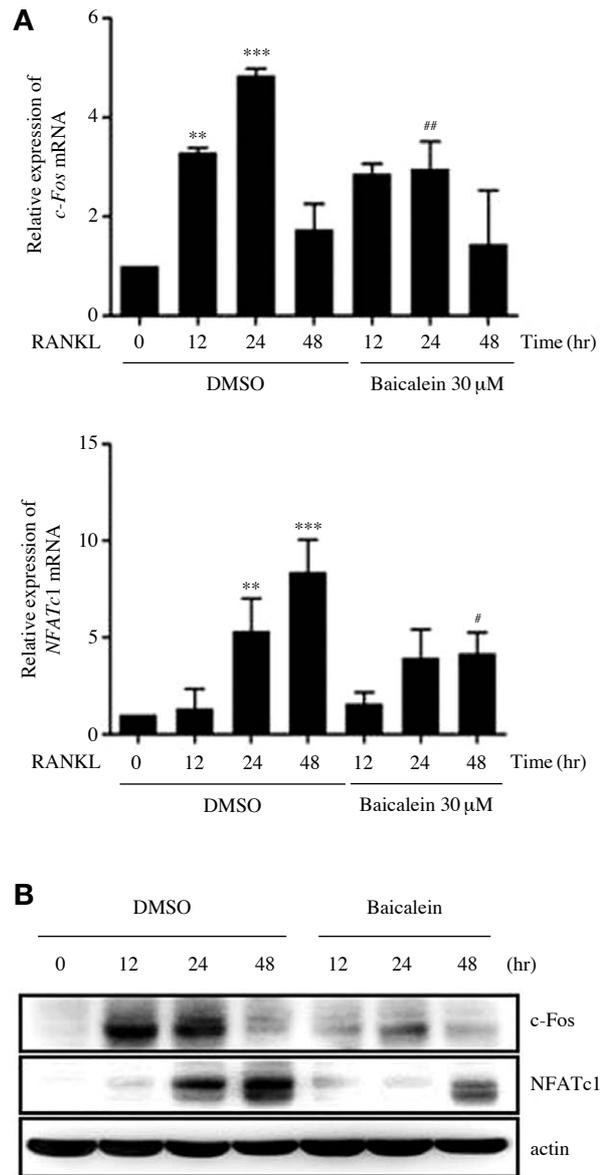


**Fig. 2.** Baicalein inhibits RANKL-mediated early signaling. BMMs were pretreated with baicalein for 1 h and then stimulated with RANKL for the indicated times. BMMs were pretreated with or without baicalein (30 μM) for 1 h and then stimulated with RANKL (100 ng/mL) for the indicated time. The cell lysates were analyzed by western blotting with antibodies.

제함을 알 수 있었다.

### 3. RANKL에 의해 유도된 c-Fos와 NFATc1의 발현에 baicalein이 미치는 영향

c-Fos는 뼈파괴세포 분화의 초기 단계에 작용하는 중요한 전사인자로 NFATc1의 발현을 촉진한다. 따라서 파골세포의 중요한 전사인자인 c-Fos와 NFATc1의 발현에 baicalein이 미치는 영향을 살펴보았다. RANKL에 의한 *c-Fos*의 mRNA 발현은 24시간대에 baicalein에 의한 유의성 있는 억제효과를 확인하였으며 *NFATc1* 또한 48시간 대에 대조군에 비해 억제되었음을 확인할 수 있었다(Fig. 3A). *c-Fos*와 *NFATc1*의 단백질 발현양상 또한 mRNA 결과와 마찬가지로 baicalein에 의해 억제

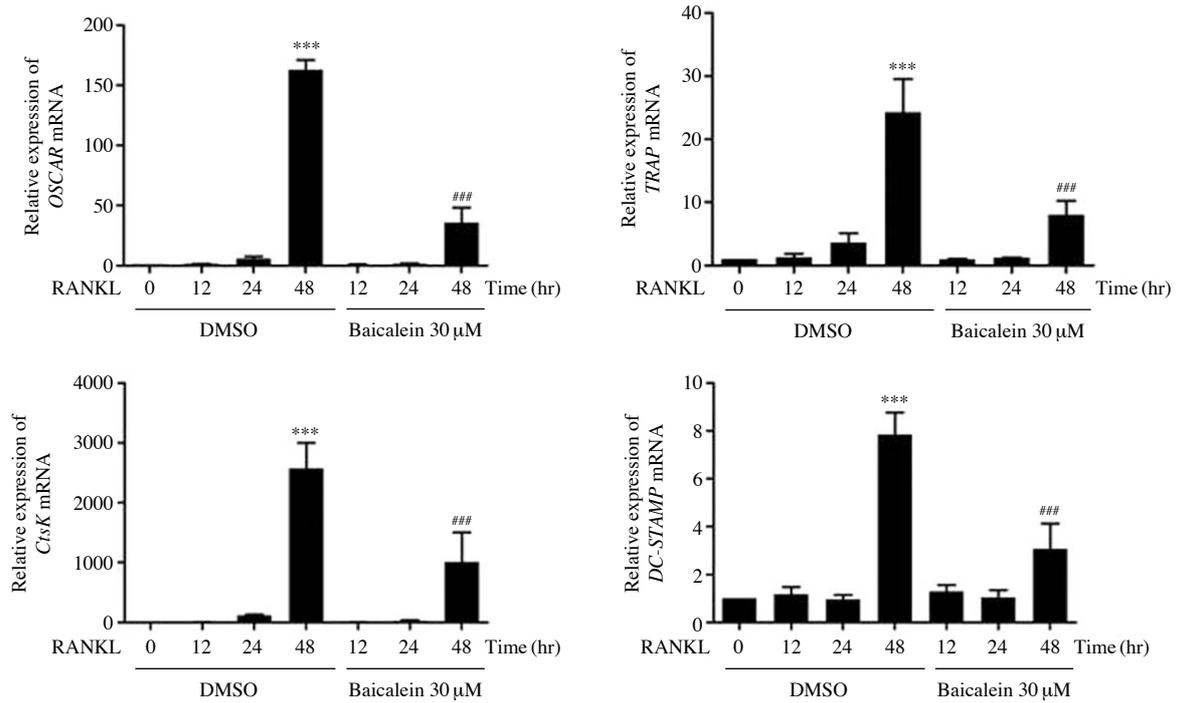


**Fig. 3.** Baicalein inhibits RANKL-induced c-fos and NFATc1 expression. BMMs were pretreated with baicalein for 1 h and then stimulated with RANKL (100 ng/mL) for the indicated times. Total RNA or protein of c-Fos, NFATc1 were obtained at the indicated time points, respectively. (A) The mRNA expression levels of the indicated genes was analyzed by Real-Time RT-PCR (B) The cell lysates were analyzed by western blotting with antibodies. \*\*,  $p < 0.01$  vs 0h; \*\*\*,  $p < 0.001$  vs 0h; #,  $p < 0.05$  vs treated with DMSO in time control; ##,  $p < 0.01$  vs treated with DMSO in time control.

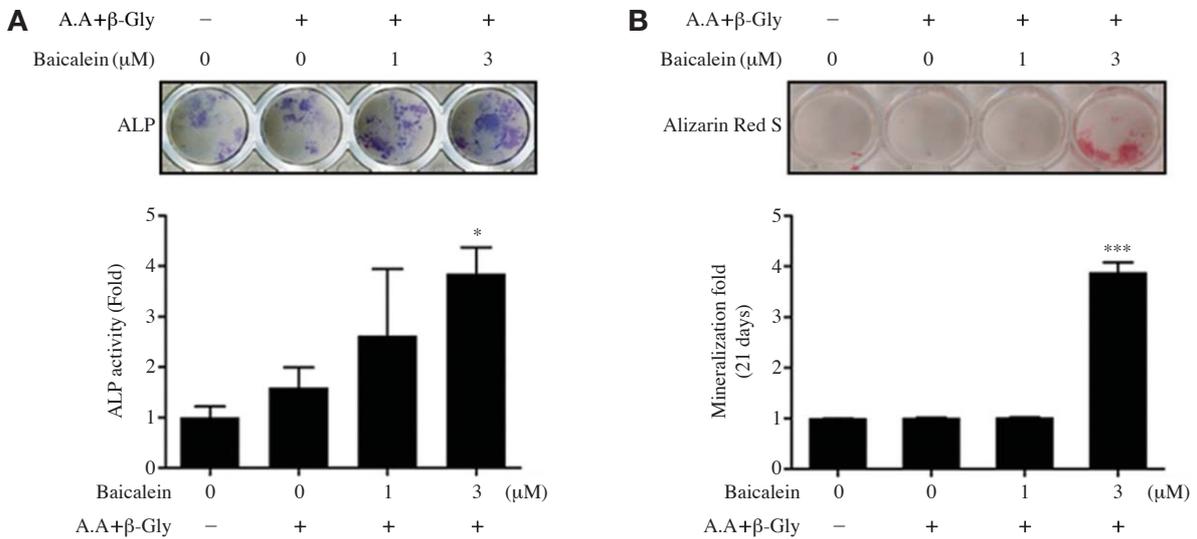
되었음을 확인하였다(Fig. 3B).

### 4. Baicalein의 파골세포 표지 유전자의 발현억제에 미치는 효과

파골세포 분화에 대한 baicalein의 효과를 확인하기



**Fig. 4.** Baicalein inhibits RANKL-induced osteoclastogenic marker gene expressions. (A) BMMs were pretreated with baicalein for 1 h and then stimulated with RANKL for the indicated times. Total RNA was obtained at the indicated time points. The mRNA expression levels of the indicated genes were analyzed by Real-Time PCR. \*\*\*,  $p < 0.001$  vs 0 h; ###,  $p < 0.001$  vs treated with DMSO in time control.



**Fig. 5.** Baicalein promotes BMSC derived osteoblast differentiation. (A, B) BMMs were plated at a density of  $1.5 \times 10^6$  cells/well in 48-well plates and cultured for 8 days and then were treated in the presence or absence of baicalein for 8 days (ALP stain), 21 days (ARS stain).

위하여 baicalein에 의한 성숙한 파골세포의 지표유전자들의 발현양상을 확인하였다. 파골세포의 지표유전자로 잘 알려진 *TRAP*, *OSCAR*, *CtsK*와 *DC-STAMP*의 mRNA

발현 양상을 살펴 본 결과, 모든 지표 유전자에서 파골세포 분화 후반 시간인 RANKL 자극 48시간대부터 유의성 있게 감소하였음을 확인하였다(Fig. 4).

**Table 1.** Primer sequence for real-time PCR analysis.

Gene	Primer sequence
<i>c-Fos</i>	sense5'-GGTGAAGACCGTGTGTCAGGAG-3'
<i>c-Fos</i>	antisense5'-TATTCCGTTCCCTTCGGATT-3'
<i>NFATc1</i>	sense5'-GAGTACACCTTCCAGCACCTT-3'
<i>NFATc1</i>	antisense5'-TATGATGTCGGGGAAAGAGA-3'
<i>TRAP</i>	sense5'-TCATGGGTGGTGCTGCT-3'
<i>TRAP</i>	antisense5'-GCCACAG-3';CCACAAATCT-3'
<i>OSCAR</i>	sense5'-GGAATGGTCTCATCTCCTT-3'
<i>OSCAR</i>	antisense5'-TCCAGGCAGTCTCTCAGTTT-3'
<i>Cathepsin K</i>	sense5'-CCAGTGGGAGCTATGGAAGA-3'
<i>Cathepsin K</i>	antisense5'-CTCCAGTTATGGGCAGAGA-3'
<i>DC-STAMP</i>	sense5'-TCCTCCATGAACAAACAGTCCA-3'
<i>DC-STAMP</i>	antisense5'-AGACGTGGTTTAGGAATGCAGC TC-3'
<i>GAPDH</i>	sense5'-TCAAGAAGGTGGTGAAGCAG-3'
<i>GAPDH</i>	antisense5'-AGTGGGAGTTGCTGTTGAAGT-3'

### 5. 조골세포 활성화와 미네랄화에 baicalein이 미치는 영향

Alkaline phosphatase (ALP)는 조골세포의 세포막에 존재하며 석회화 과정에서 무기인산의 운반에 관여하는 조골세포 활성화의 표지인자로 활용되고 있다. 수컷 5주령 ICR마우스로부터 정제한 골수기질세포를 이용하여 baicalein이 ALP 활성화에 미치는 영향을 관찰하였는데 ALP 활성화는 baicalein 농도 의존적으로 증가하였다(Fig. 5A). 또한 미네랄 침착을 확인하기 위해 시행한 Alizarin red S 염색 결과 baicalein 30 µM 처리군에서 유의성 있게 미네랄 침착이 증가되었다(Fig. 5B).

## 고찰

노년에 골질의 위험성을 증가시키는 골다공증은 특별한 임상 증상이 없어 쉽게 간과되어 심각한 상황을 야기시킬 수 있다. 특히 고관절 골절의 경우 65세 이상에서 사망률이 급증하여 [9] 골다공증으로 야기되는 심각성을 쉽게 알 수 있다. 노년에서 골다공증은 주로 조골세포에 의한 골 형성보다 파골세포에 의한 골 파괴가 증가되어 나타난다 [2]. 현재 골다공증의 치료제 중 임상에서 가장 많이 쓰이는 약물은 bisphosphonate 계열의 약물이다 [14]. 이 약물은 파골세포의 기능을 억제하지만 소화기관에 염증, 궤양, 그리고 하악골 괴사와 같은 부작용이 있다 [15]. 따라서 부작용이 적은 골다공증 치료제의 필요성이 대두되고 있어 비교적 부작용이 적은 천연물 기반의 새로운 파골세포 억제제 발굴에 대한 노력이 지속되고 있다. *Scutellaria Baicalensis*의 뿌리에서 추출되는 baicalein은 황금의 유효성분 중 하나로 항균, 항바이러스, 항염작용이 있다고 [16] 잘 알려져

있을 뿐만 아니라 뼈의 항상성 조절에 관한 연구들이 진행되어왔다. 그러나 골수유래대식세포를 이용한 파골세포의 억제효과와 관련된 기전에 대해서는 정확히 알려진 바가 없어 본 연구를 진행하게 되었다. 파골세포 억제제 개발을 위한 탐색으로 본 연구에서는 baicalein을 이용해 골 항상성 유지에 관련된 현상에 대해 고찰해 보고자 하였다.

세포배양은 생명현상 규명을 위하여 세포, 조직을 독립된 생명체로 인식하고 분자생물학 등 연구재료 및 방법으로 이용하고 있다. 생체 외 (in vitro) 실험에서 사용하는 세포는 정상세포, 불멸화세포로 나누어지는데, 정상세포(normal cell)는 개체로부터 떨어져 나온 정상 구조와 기능을 가진 수명이 한정된 세포로써 초대세포(일차세포)라 하고, 불멸화세포는 세포를 일정 조건하에 배양하면 정상세포의 형태로 무한증식할 수 있는 능력을 가지는 세포로써 세포주(cell line)라 한다 [17]. 생명현상을 규명하고 그 현상을 증명하기 위한 다양한 방법 중 생체 외 실험에 각 실험 조건에 맞게 위의 세포들이 빈번하게 사용되어지고 있다. 뼈세포의 생리나 치료제 개발을 위한 기전 연구에도 역시 여러 가지 형태의 세포들이 사용되고 있다. 초대세포는 원래의 세포의 기능을 유지할 수 있는 장점이 있는 반면, 그 세포를 다루는 데 있어 세포 수명이 짧다라는 한계점이 있고, 이를 개선하기 위한 방편으로 세포주를 사용하고 있다. 그러나 파골세포 분화에 있어서는 이에 적합한 세포주가 적다는 단점이 있고, 현재까지 파골세포 분화를 위해서 RAW 264.7세포가 사용되고 있지만, 이는 골수유래대식세포와 달리 파골세포 분화 시에 RANKL 외에 M-CSF를 필요로 하지 않고, 또한 조골세포 또는 기질세포와 공동배양을 할 수 없다라는 한계점 및 차이점을 가지고 있다. 이러한 차이를 뒷받침할 만한 구체적인 작용기전은 알려져 있지 않고, 이는 파골세포로 이어지는 신호 전달 경로에서의 차이가 존재함을 시사하는 바이다 [18,19]. 조골세포 분화에서도 역시 다양한 세포주를 사용하고 있지만, 최초로 분리된 세포주들 사이에서도 여러 개의 이형이 존재하고, 생체 내의 현상에 더 가깝다는 측면에서 보면 초대세포를 이용한 실험이 더 유의성이 높을 것으로 생각된다.

Baicalein을 이용한 조골세포와 파골세포 분화에 미치는 영향에 대한 기존 실험에서는 조골세포 분화를 위한 세포로서 MC3T3-E1 세포주를 사용하였고, 파골세포 분화를 위해 RAW 264.7세포주를 사용하여 각각의 효과 [12,13]를 확인한 바 있다. 하지만 위에서 살펴 본 세포주와 초대세포사이의 차이점을 기반으로 파골세포 및 조골세포의 분화에 있어 baicalein이 미치는 영향을 확인하였다.

조혈모세포에서 기원하는 파골세포는 서로 융합하여 골 흡수 기능을 수행하는 성숙한 파골세포로 분화된다. 성숙한 파골세포로의 분화를 위해서는 파골세포 표면의 RANK가 RANKL과 결합하는 과정이 필수적이다. RANKL이 RANK에 결합하게 되면 TRAF 계열 단백질 결합이 촉진되고 MAPKs인 JNK, p38, ERK와 같은 신호전달 물질의 활성화를 통하여 파골세포 분화에 필수적인 NF- $\kappa$ B, c-Fos, NFATc1의 발현을 유도한다. 특히 NFATc1은 파골세포 표지 유전자인 TRAP과 OSCAR의 발현을 촉진하여 파골세포의 분화를 유도한다 [4-7]. RANK/RANKL 결합에 의해 유도되는 파골세포 분화를 이끄는 신호전달체계에 있어 PLC $\gamma$ 2와 연관된 기전은 TRAF6 계열 신호전달을 통해 Grb2 binding adaptor protein (GAB2)와 PLC $\gamma$ 2 Src homology 모티프(SH motif)에 결합하여 I $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B, JNK 그리고 AP1의 하위신호전달 체계의 활성화를 유도하여 NFATc1의 발현을 증가시키는 1차 경로와 Dap12/FcR $\gamma$ 의 하위 단계에 존재하는 SFK에 의존적으로 PLC $\gamma$ 2의 인산화가 증가함으로써 NFATc1의 발현을 유도하는 2차 경로로 나뉜다 [20]. Kim 등 (Food and Chemical Toxicology, 2008)의 연구에 의하면 RAW264.7세포주에서 RANKL 자극에 의해 유도되는 파골세포 분화를 baicalein이 Akt, ERK의 인산화와 NF- $\kappa$ B의 활성을 억제하고, c-Src의 mRNA 전사수준을 낮춤으로써 억제하는 것으로 보였다. 그러나 본 실험에서는 초대세포인 BMM에서 RANKL 자극에 의해 유도되는 파골세포 분화를 baicalein이 Akt, JNK 그리고 I $\kappa$ B의 인산화를 억제함으로써 c-Fos와 NFATc1의 mRNA 및 단백질 발현을 억제하는 차이를 보였다. 이는 baicalein이 GAB2/PLC $\gamma$ 2의 결합을 저해함으로써 그 하위 단계 신호인 p-I $\kappa$ B, JNK 그리고 c-Fos의 활성을 줄임으로써 위의 첫 번째 기전을 억제할 가능성이 있고, 또 한편으로는 baicalein이 c-Src의 발현을 억제함으로써 PLC $\gamma$ 2의 인산화가 억제되고, PLC $\gamma$ 2의 촉매활성능이 저해됨에 따라 순차적으로 NFATc1의 발현이 줄어들어 위의 2차 경로를 억제하여 파골세포 분화를 조절하는 것으로 보인다 (Figs. 2, 3).

조골세포는 분화과정 동안 동화작용 산물로서 세포막에 염기성 ALP를 형성하고, 이는 세포 외막과 석회화 조직에서 높은 농도로 나타나고 조골세포 분화 활성 표지인자로 널리 알려져 있다. 기존에 밝혀진 바에 의하면 조골세포 분화에 사용하는 세포주는 RCT-1, RCT-3, KS-4, CRP4/7, UMR201, 2T3 및 MC3T3-E1 등 다양한 세포주들이 개발되어 있고, 분화 시기별, 형태별, 목적 유전자의 발현 양상 등에 따라 적절한 세포주를 선택하여 사용하고 있다. 보통의 세포주는 배양시 미네랄 침착이 되질 않는 한계점이 있는 것들이 대부분이나, 기존

에 밝혀진 baicalein이 조골세포 분화에 미치는 영향을 본 실험에서 사용한 세포주는 MC3T3-E1 세포주로서 2T3세포주와 함께 ALP 생성을 확인하거나 미네랄 침착을 보는 실험에 사용하는 것이 적절하다는 보편적인 견해가 있다 [18,19]. 이로써 baicalein이 조골세포 분화에 미치는 영향에 대한 실험은 MC3T3-E1세포주를 이용한 결과에 대한 확인의 차원에서 BMSC를 이용해 조골세포 분화양상을 살펴보고, MC3T3-E1 세포주를 사용한 기존 실험에서와 마찬가지로 농도 의존적으로 ALP를 형성하고, 그 활성이 증가하는 것으로 확인되었고, 미네랄 침착 정도를 보는 ARS 염색 결과 역시 유의하게 미네랄 침착 정도가 증가된 경향을 확인하였다. 결국 baicalein은 조골세포분화의 초기단계 활성 표지인자인 ALP를 농도 의존적으로 증가시켰으며, 이에 따른 결과물인 미네랄 침착을 촉진하였음을 ARS 염색법을 통해 확인하였다.

이상으로 baicalein이 조골세포의 활성을 증가시키고 동시에 PLC $\gamma$ 2의 활성 억제를 통해 파골세포의 분화를 억제함을 확인함으로써 골 소실 질환 치료에 이상적인 효과를 가진 치료 후보물질임을 확인하여 향후 baicalein을 이용한 골 소실 질환 치료제 개발에 도움이 될 수 있을 것으로 생각되고, 더불어 마우스 동물모델을 이용한 실험을 통하여 골 형성 및 흡수 기전에 baicalein이 미치는 효과를 확인하는 실험을 추후 진행해야 할 것으로 사료된다.

## 참 고 문 헌

1. Gass M, Dawson-Hughes B. Preventing osteoporosis-related fractures: an overview. Am J Med. 2006; 119:S3-11.
2. Raggatt LJ, Partridge NC. Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. J Biol Chem. 2010; 285:25103-8.
3. Tanaka Y, Nakayama S, Okada Y. Osteoblasts and osteoclasts in bone remodeling and inflammation. Curr Drug Targets Inflamm Allergy. 2005; 4:325-8.
4. Roodman GD. Regulation of Osteoclast Differentiation. Ann N Y Acad Sci. 2006; 1068:100-9.
5. Sakae T, Ichiro N, Jun-Ichiro I, Hiromi O, Kozo N. Signal transduction pathway regulating osteoclast differentiation and function. J Bone Miner Metab. 2003; 21:123-33.
6. Dickson KM, Bhakar AL, Barker PA. TRAF6-Dependent NF- $\kappa$ B Transcriptional Activity During Mouse Development. Dev Dyn. 2004; 231:122-7.
7. Qing Hong Z, Meng Tao L, Yi Z, Wei L, Ju Xiang S, Li L. The effect of rotative stress on CAII, FAS, FASL, OSCAR, and TRAP gene expression in osteoclasts. J Cell Biochem. 2013; 114:388-97.

8. Chao JI, Su WC, Liu HF. Baicalein induces cancer cell death and proliferation retardation by the inhibition of CDC2 kinase and survivin associated with opposite role of p38 mitogen-activated protein kinase and AKT. *Mol Cancer Ther.* 2007; 6:3039-48.
9. Lin CC, Shieh DE. The anti-inflammatory activity of *Scutellaria rivularis* extracts and its active components, baicalin, baicalein and wogonin. *Am J Chin Med.* 1996; 24:31-6.
10. Lapchak PA, Maher P, Schubert D, Zivin JA. Baicalein, an antioxidant 12/15-lipoxygenase inhibitor improves clinical rating scores following multiple infarct embolic strokes. *Neuroscience.* 2007; 150:585-91.
11. Kuntz S, Wenzel U, Daniel H. Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity, and apoptosis in human colon cancer cell lines. *Eur J Nutr.* 1999; 38:133-42.
12. Kim MH, Ryu SY, Bae MA, Choi JS, Min YK, Kim SH. Baicalein inhibits osteoclast differentiation and induces mature osteoclast apoptosis. *Food Chem Toxicol.* 2008; 46: 3375-82.
13. Kim JM, Lee SU, Kim YS, Min YK, Kim SH. Baicalein stimulates osteoblast differentiation via coordinating activation of MAP kinases and transcription factors. *J Cell Biochem.* 2007; 104:1906-17.
14. Kennel KA, Drake MT. Adverse effects of bisphosphonates: implications for osteoporosis management. *Mayo Clin Proc.* 2009; 84:632-7.
15. McClung M, Harris ST, Miller PD, Bauer DC, Davison KS, Dian L, et al. Bisphosphonate therapy for osteoporosis: benefits, risks, and drug holiday. *Am J Med.* 2013; 126:13-20.
16. Li FQ, Wang T, Pei Z, Liu B, Hong JS. Inhibition of microglial activation by the herbal flavonoid baicalein attenuates inflammation-mediated degeneration of dopaminergic neurons. *J Neural Transm.* 2005; 112:331-47.
17. Sultan KR, Haagsman HP. Species-specific primary cell cultures: a research tool in veterinary science. *Veterinary Sciences Tomorrow.* 2001; 1:1-7.
18. Kartsogiannis V, Ng KW. Cell lines and primary cell cultures in the study of bone cell biology. *Mol Cell Endocrinol.* 2004; 228:79-102.
19. Burton NM, Vierck J, Krabbenhoft L, Bryne K, Dodson MV. Methods for animal satellite cell culture under a variety of conditions. *Methods Cell Sci.* 2000; 22:51-61.
20. Mao D, Epple H, Uthgenannt B, Novack DV, Faccio R. PLCgamma2 regulates osteoclastogenesis via its interaction with ITAM proteins and GAB2. *J Clin Invest.* 2006; 116: 2869-79.

# The Effects of Baicalein on Osteoclast Differentiation from Bone Marrow Derived Macrophage

Ji Kwang Yun<sup>1, †</sup>, Yoon-Hee Cheon<sup>2,3, †</sup>, Ju-Young Kim<sup>4</sup>, Seong Cheoul Kwak<sup>2,3</sup>, Kang Hue Yoon<sup>2</sup>, Jong Min Baek<sup>2,3</sup>, Myeong Su Lee<sup>4</sup>, Jaemin Oh<sup>2,3,4</sup>, Jongtae Park<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Neurosurgery, Wonkwang University School of Medicine & Hospital

<sup>2</sup>Department of Anatomy & Institute for Skeletal Disease, Wonkwang University

<sup>3</sup>BK21plus Program & Department of Smart Life-Care Convergence, Wonkwang University, Graduate School

<sup>4</sup>Imaging Science-based Lung and Bone Disease Research Center, Wonkwang University

**Abstract** : As prediction of rapidly aging society, bone health is considered increasingly important and received more attention than ever. Bone health is regulated by balancing between bone resorptive osteoclasts and bone formative osteoblasts. Disruption of balance between bone-resorbing osteoclasts and bone-forming osteoblasts results in bone disease. Natural products have recently received much attention as an alternative tool for the development of novel therapeutic strategy. Baicalein is reported it has anti-cancer, anti-inflammatory and antioxidant effects. Baicalein also has been known that it has both promotive effect on MC3T3-E1 cell line and inhibitory effect on RAW 264.7 cell line. However, the inhibitory mechanism of baicalein using bone marrow derived macrophages (BMMs) on osteoclast differentiation remains not clear. In this study, the suppressive mechanism by baicalein on osteoblast differentiation was evaluated. Baicalein inhibited receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand (RANKL)-induced osteoclast differentiation in BMMs in a dose dependent manner without any toxicity. Baicalein suppressed phosphorylation of protein kinaseB (Akt), c-Jun N-terminal kinases (JNK) and phosphoinositide-specific phospholipaseC $\gamma$ 2 (PLC $\gamma$ 2). Furthermore, Baicalein suppressed the induction of RANKL-induced c-Fos and Nuclear factor of activated T cell c1 (NFATc1), essential genes on osteoclastogenesis. In BMMs, Baicalein inhibited the mRNA expression of tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP), osteoclast-associated receptor (OSCAR), *cathepsinK*, dendritic cell-specific transmembrane protein (DC-STAMP). Moreover, baicalein promoted differentiation of osteoblast on bone marrow stromal cells (BMSCs). Taken together, these results suggest that baicalein has a potential for treating bone lytic diseases, such as osteoporosis, periodontitis, and rheumatoid arthritis.

**Keywords** : Baicalein, Osteoclast, Osteoporosis, RANKL, PLC $\gamma$ 2

<sup>†</sup>These authors contributed equally to this work.

Correspondence to : Jongtae Park (Department of Neurosurgery, Wonkwang University School of Medicine & Hospital)

E-mail : jtpark@wku.ac.kr