

파골세포의 분화와 뼈 흡수에 미치는 칩(*Pueraria lobata*)의 영향

백종민¹, 윤강휴¹, 안성준¹, 박선향¹, 천윤희¹, 김주영², 오재민¹

¹원광대학교 의과대학 해부학교실 & BK21 플러스 ICT기반 라이프 케어산업 융복합 인재양성사업단
& 골격계질환연구소, ²원광대학교 의과대학 영상기반 폐 및 골 질환 연구센터

(2014년 8월 28일 접수, 2014년 11월 12일 수정접수, 2014년 12월 21일 게재승인, Published Online 30 December 2014)

간추림 : 칩은 뼈소실 모델인 난소를 적출한 마우스와 랫드에서 뼈형성을 촉진한다고 밝혀진 바 있다. 그러나 뼈파괴세포의 분화와 뼈흡수능에 미치는 칩의 효과와 기전은 아직 밝혀지지 않았다. 그러므로 본 연구에서는 칩이 receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL)과 macrophage colony stimulating factor (M-CSF)로 유도한 뼈파괴세포의 분화에 미치는 효과와 그 기전을 연구하였다.

우선적으로 뼈파괴세포 분화에 억제효과를 확인하기 위하여 마우스에서 분리한 큰포식세포에 칩을 농도별로 처리하여 tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) staining을 시행하였다. 또한 칩이 작용하는 기전을 알아보기 위하여 western blot 분석과 RT-PCR을 시행하였고, 성숙한 뼈파괴세포의 뼈흡수능에 미치는 영향을 알아보기로 하여 hydroxyapatite 플레이트로 실험을 진행하였다.

그 결과, 칩은 뼈파괴세포 분화단계의 필수적인 초기 신호전달경로인 p38, Akt, c-Jun N-terminal kinase (JNK), I κ B의 인산화를 억제하였다. 또한 nuclear factor of activated T cells (NFAT)c1과 c-Fos의 비활성화를 유도함으로써 뼈파괴세포와 관련된 유전자인 osteoclast-associated receptor (OSCAR), TRAP, Integrin β 3, osteoclast stimulatory transmembrane protein (OC-STAMP), dendritic cell-specific transmembrane protein (DC-STAMP)의 발현을 저해하였다. 특히, hydroxyapatite로 코팅된 플레이트를 통해서 뼈흡수능을 억제하는 칩의 효과를 확인하였으며, 이와 깊은 연관성을 가지는 유전자인 Cathepsin K의 발현 또한 저해하였다.

이러한 결과를 통하여 뼈파괴세포 분화와 뼈흡수능을 저해하는 칩의 효과와 이와 관련된 분자적 기전에 대하여 규명하였다.

찾아보기 낱말 : 칩, 뼈파괴세포, RANKL, 뼈재형성, 골다공증

서 론

인체 내에서 지지대 역할을 수행하는 뼈는 뼈모세포에 의한 뼈형성과 뼈파괴세포에 의한 뼈흡수의 지속적인 작용에 의해 유지되며 상호 간의 균형을 통해 뼈의 항상성이 유지된다[1,2]. 그러나, 이러한 균형의 파괴는 치명적인 뼈질환들의 발병으로 이어지는데, 특히 뼈파괴세포의 지나친 뼈흡수로 인해 골다공증과 류마티스 관절염 등의 성인 뼈질환이 유발되며, 그 원인으로는 폐경

기 여성의 에스트로겐 결핍과 칼슘 결핍 등을 들 수 있다[3,4]. 그 중 대표적인 질환인 골다공증은 골절에 대한 위험성이 매우 높아지며 골절시 회복가능성이 낮아지는 치명적인 질병이다[5].

골다공증의 주된 요인으로 작용하는 뼈파괴세포는 조혈모세포에서 유래하며[6], 단핵구/큰포식세포가 macrophage colony stimulating factor (M-CSF)와 receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL)이라는 2가지 중요한 사이토카인에 의해 다핵성인 세포로 분화한 것이다[7]. RANKL와 RANK가 결합함으로써 세포질의 RANK 도메인에 TNF receptor-associated factor 6 (TRAF6)가 군집하게 된다. 이에 따라 TRAF6의 후속 유전자인 nuclear factor kappa B (NF- κ B), activator protein-1 (AP-1), NFATc1과 같은 전사인자가 활성화되며, p38, JNK 및 extracellular-signal regulated kinases (ERK)을 포함하

저자(들)는 '의학논문 출판윤리 가이드라인'을 준수합니다.
저자(들)는 이 연구와 관련하여 이해관계가 없음을 밝힙니다.
교신저자: 오재민(원광대학교 의과대학 해부학교실)
전자우편: jmoh@wku.ac.kr

는 mitogen-activated protein kinases (MAPKs)와 Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)/Akt 경로 등의 인산화 과정을 거치면서 단백질 수준에서 활성화가 이루어진다[8-10]. 단핵구/큰포식세포가 성숙한 뼈파괴세포로 분화하는 과정에서 c-Fos, NF- κ B, NFATc1 또한 중요한 역할을 수행한다. NF- κ B는 RANKL에 의해 자극되지 않은 상태에서는 I κ B와 함께 복합체를 형성하고 있지만, 세포내에서 NF- κ B가 RANKL에 의해 자극을 받게 되면 I κ B Kinase (IKK) 복합체가 I κ B를 인산화시키고 인산화된 I κ B는 프로테아좀에 의해 분해되어 NF- κ B signaling이 발현되게 된다. 그에 따라 NF- κ B는 I κ B와 분리되어 세포질에서 핵으로 이동하여 타겟 유전자의 전사를 촉진시킨다. 이후, 뼈파괴세포 분화의 대표조절인자인 NFATc1이 활성화되며 OSCAR, TRAP, Cathepsin K 등 뼈파괴세포의 특이적 유전자들의 발현이 유도된다[11-13].

이러한 일련의 분화과정을 억제하고, 뼈흡수 기능을 저하시킴으로써 골다공증을 치료하기 위한 연구가 활발히 이루어지고 있는 실정이다. Bisphosphonate 제제는 이러한 점을 이용하여 골다공증을 치료하는 가장 대표적인 약물이라 알려져 있다. Bisphosphonate 제제는 뼈파괴세포 기능을 방해함으로써 뼈흡수를 저하시키고 골다공증 환자에게서 골질의 유발을 저해한다는 효과가 있다고 입증된 약물로써 현재 임상에서 가장 일반적으로 사용되는 골다공증 치료제이다[14]. 그러나 Bisphosphonate 제제는 부작용이 많으며, 소수의 환자들에게는 심각한 부작용을 일으키고 있다. 즉, 급성기 반응, 근골격의 심한 고통, 저칼슘혈증 등의 단기부작용부터 턱뼈 부분의 뼈괴사증, 심방세동, 심한 뼈교체억제 등의 장기부작용까지 다양한 부작용을 일으켜 때때로 매우 치명적이다[15,16]. 이에 따라 부작용이 적으면서도 골다공증 치료 및 예방에 효과적인 신물질을 찾는 연구가 활발히 진행되고 있다.

쑥(*Pueraria lobata*)은 콩과의 덩굴식물로 갈증해소에 탁월하여 숙취에 좋고 항염증작용을 한다고 알려져 있다[17,18]. 또한 쑥은 뼈에 좋은 효과가 있다고 알려진 피토에스트로젠(Phytoestrogen)과 푸에라린(Puerarin), 다이제인(Daidzein)을 포함한 이소플라본(Isoflavone)을 풍부하게 함유하고 있다[17,19]. 뼈소실의 동물모델에서 쑥의 투여가 뼈밀도를 증가시킨다는 연구는 이미 밝혀진 바가 있지만[19] 쑥이 뼈파괴세포 분화와 기능에 어떠한 영향을 미치는지와 그 작용기전에 대해서는 알려진 바가 없다. 본 연구에서는 쑥이 뼈파괴세포의 분화와 그 기능에 있어서 미치는 영향과 그 작용기전을 밝혀내고자 하였다.

재료 및 방법

1. 시료 및 실험재료

쑥(*Pueraria lobata*) 추출물은 에탄올 95~95.5 v/v% 용매로 추출한 것으로 한국생명공학연구원 한국식물추출물은행에서 구입하였다. 쑥 추출물은 DMSO 용매를 사용하여 1, 5, 25 μ g/mL로 희석하여 실험에 사용하였다. TRAP 용액은 Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)를 사용하고, XTT (2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulphophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide) assay kit는 Roche (Indianapolis, IN, USA)에서 구입하였다. 세포배양 및 뼈파괴세포 분화를 위해 필요한 α -MEM, FBS 및 penicillin-streptomycin 등은 Gibco-BRL (Grand Island, NY, USA)에서 구입하였고, human RANKL과 human M-CSF는 Peprotech (London, UK)의 제품을 사용하였다. Western blot 분석을 위한 일차항체로 rabbit-anti-c-Fos, mouse-anti-NFATc1 (Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz, CA, USA), rabbit-anti-phospho-p38, rabbit-anti-p38, rabbit-anti-phospho-Akt, rabbit-anti-Akt, rabbit-anti-phospho-JNK, rabbit-anti-JNK, rabbit-anti-phospho-I κ B, rabbit-anti-I κ B (Cell Signaling Technology; Beverly, MA, USA) 및 mouse-anti- β -actin (internal control) (Sigma Aldrich)등을 사용하였고, 이차항체는 anti-rabbit과 anti-mouse를 사용하였으며 Amer-sham Pharmacia Biotechnology Inc. (Tokyo, Japan)을 구입하였다.

2. 큰포식세포 획득 및 뼈파괴세포 분화

골수세포를 분리하기 위하여 생후 5주령 ICR 마우스를 경추 탈골법으로 희생시킨 후, 넙다리뼈와 정강뼈를 무균적으로 적출하고 연조직을 제거한 후, 양끝을 절단하고 양쪽 끝의 골수공간에 1 mL의 주사기를 이용하여 뼈의 속질을 수세함으로써 골수세포를 얻었다. 분리된 골수세포를 10% FBS와 1% penicillin/streptomycin이 포함된 α -MEM 배지에서 1일간 배양한 후 미부착세포를 모았다. 뼈파괴세포의 전구세포가 되는 미부착세포를 10% FBS, 1% penicillin/streptomycin과 M-CSF (30 ng/mL)이 포함된 α -MEM 배지에서 3일간 배양하였다. 3일 후, 부착된 큰포식세포를 사용하여 실험하였다. 큰포식세포는 M-CSF (30 ng/mL)와 RANKL (100 ng/mL)을 처리하여 배양하면서 쑥 추출물을 1, 5, 25 μ g/mL의 농도별로 처리하였다. 3일 후, 같은 조건으로 배양액을 교체하였고 다음 날, 배양한 세포를 TRAP 용액으로 염색하고 붉은 색으로 염색된 세포를 세어 분화 정도를 확인하였다.

3. 세포 독성검사

큰포식세포는 1×10^4 /well의 밀도로 96-well 플레이트에 첨가하고 M-CSF (30 ng/mL)와 침 추출물을 농도별로 첨가하여 3일간 배양하였다. 3일 후, XTT 용액 50 μ L를 각각의 well에 첨가하고 4시간 배양 후 ELISA reader (Molecular Devices, CA, USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 확인하였다.

4. 역전사중합효소 연쇄반응 (RT-PCR) 분석

세포 내 총 RNA는 QIAzol lysis reagent (QIAGEN, Valencia, CA, USA)로 설명서에 따라 추출하였다. 동등한 양의 RNA는 Reverse Transcription System cDNA synthesis kit (Promega, Madison, WI, USA)를 사용하여 cDNA를 합성하였다. cDNA 1 μ g은 다음과 같은 각각의 primer를 이용하여 PCR을 수행하였다.

c-Fos forward,
5'-CTGGTGCAGCCCACTCTGGTC-3';
c-Fos reverse,
5'-CTTTCAGCAGATTGGCAATCTC-3';
NFATc1 forward,
5'-CAACGCCCTGACCACCGATAG-3';
NFATc1 reverse,
5'-GGCTGCCTTCCGTCTCATAGT-3';
TRAP forward,
5'-ACTTCCCCAGCCCTTACTAC-3';
TRAP reverse,
5'-TCAGCACATAGCCCACACCG-3';
OSCAR forward,
5'-CTGCTGGTAACGGATCAGCTCC CCAGA-3';
OSCAR reverse,
5'-CCAAGGAGCCAGAACCTTGGA AACT-3';
Cathepsin K forward,
5'-CACTGCTCTCTTCAGGGCTT-3';
Cathepsin K reverse,
5'-ACGGAGGCATTGACTCTGA A-3';
DC-STAMP forward,
5'-GCAAGGAACCCAAGGAGT CG-3';
DC-STAMP reverse,
5'-CAGTTGGCCCAGAAAGAGGG-3';
Integrin α v forward,
5'-TTGTTGCCGCCTTACGAGAA-3';
Integrin α v reverse,
5'-GCAGATGGCATAGCCACAGG-3';
Integrin β 3 forward,
5'-TCTCCTGCGTCCGCTACAAA-3';

Integrin β 3 reverse,

5'-CCCTTGGGACACTCAGGCTC-3';

GAPDH forward,

5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3';

GAPDH reverse,

5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3';

PCR 조건은 94°C에서 30초 동안 denaturation, 58°C에서 30초 동안 annealing, 그리고 72°C에서 30초 동안 extension 반응을 25~30 cycles로 하여 증폭시켰다. 합성된 cDNA는 1% agarose gel에서 분리하였고, EtBr로 염색하여 자외선에서 관찰하였다.

5. 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 원심분리 (14,000 rpm, 20 min)를 수행하여 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 PVDF막 (Millipore, Billerica, MA, USA)으로 옮기고 PVDF막은 5% nonfat dry milk를 처리하여 비특이단백질이 붙는 것을 방지하였다. 그리고 1차 항체 및 2차 항체를 처리했다. TBS-T 완충용액으로 PVDF막을 세척하고 enhanced chemiluminescence를 이용해 빛을 차단하여 단백질 발현을 관찰하였다.

6. 뼈흡수능 분석

성숙한 뼈파괴세포를 얻기 위하여 콜라겐으로 코팅한 90 mm 배양접시에 5주령 ICR 마우스의 넵다리뼈와 정강뼈에서 획득한 골수세포와 1일령 ICR 마우스의 머리덜개뼈에서 분리한 뼈모세포를 첨가하고 1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃ (VitD₃)와 프로스타글란딘 E₂ (PGE₂)를 처리하여 6일간 공생배양하였다. 배양한 후, 세포는 0.1% collagenase를 처리하여 떼어내고 hydroxyapatite로 코팅된 96-well 플레이트에 첨가하였다. 동시에 침 추출물을 주어진 농도로 처리하여 12시간 배양하였다. 12시간 배양 후, 세포는 증류수로 수세하고 광학현미경을 통해 관찰하였다. Hydroxyapatite가 흡수된 부분을 Image Pro-Plus program version, 4.0 (Media Cybernetics)으로 정량하였다.

7. 통계분석

각각의 실험군은 3개 이상 수행하였고 평균값과 표준

편차를 계산하였다. 모든 실험은 3회 이상 반복하여 동일한 실험결과를 얻은 경우 실험결과로 사용하였으며, 정상적인 결과의 통계는 분산분석 (analysis of variance, ANOVA)을 시행하여 값을 구하고 post-hoc으로 대조군과 각 구간의 유의성 차이를 검증하였다. 통계적 유의성은 $P < 0.05$ 수준에서 평가하였다.

결 과

1. 칩이 TRAP 양성 뼈파괴세포 분화에 미치는 영향

TRAP은 뼈파괴세포의 특이한 표지자로 알려져 그 활성도를 통해 뼈흡수의 활성을 측정할 수 있다. 따라서 칩이 뼈파괴세포 분화에 미치는 영향을 알아보기 위해 M-CSF와 RANKL을 각 군에 동일한 농도의 조건으로 칩 추출물을 농도별로 처리한 후 4일 동안 배양하였다. 그 결과 칩 추출물이 첨가되지 않은 대조군과 비교하였을 때, 칩 추출물이 첨가된 실험군에서는 농도 증가에 따라 TRAP양성 뼈파괴세포 형성이 줄어드는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1A, B). 이러한 결과가 칩 추출물의 세포 독성에 의한 것인지 여부를 확인하기 위하여 XTT 실험을 실행하였고 칩 추출물이 첨가되지 않은 대조군과 농도별로 첨가된 실험군의 흡광도에서 의미 있는 차이가 관찰되지 않았으므로 칩 추출물이 실험 농도에서

세포독성 없이 뼈파괴세포의 분화를 억제한다는 것을 알 수 있었다(Fig. 1C).

2. 칩이 RANKL에 의한 뼈파괴세포 분화에서 c-Fos와 NFATc1의 유전자 및 단백질 발현량에 미치는 영향

칩 추출물이 뼈파괴세포를 억제하는 과정에서 c-Fos와 NFATc1의 유전자, 단백질 발현량에 각각 어떤 영향을 미치는 지에 대해 알아보기 위해 실험군의 골수 큰포식세포를 칩 추출물로 전처리한 후 RANKL을 실험군과 대조군에 첨가하여 각각 0, 12, 24, 48시간 동안 반응시킨 뒤 mRNA 및 단백질 발현량을 시간별로 확인하였다. 대조군과 비교하였을 때 RANKL에 의하여 증가된 c-Fos와 NFATc1의 mRNA, 단백질 발현량이 모두 의미 있게 감소하였음을 확인하였다. 또한 정량화된 수치로 유의성을 한번 더 확인하였다(Fig. 2A, B).

3. RANKL에 의한 초기 신호전달 체계에 미치는 칩의 영향

칩 추출물의 뼈파괴세포 분화를 억제하는 작용기전을 규명하기 위해 필요한 정보인 RANKL에 의한 초기 신호전달 체계의 활성화에 칩 추출물이 미치는 영향을 보여주는 결과이다. 실험군의 골수 큰포식세포를 칩 추출물

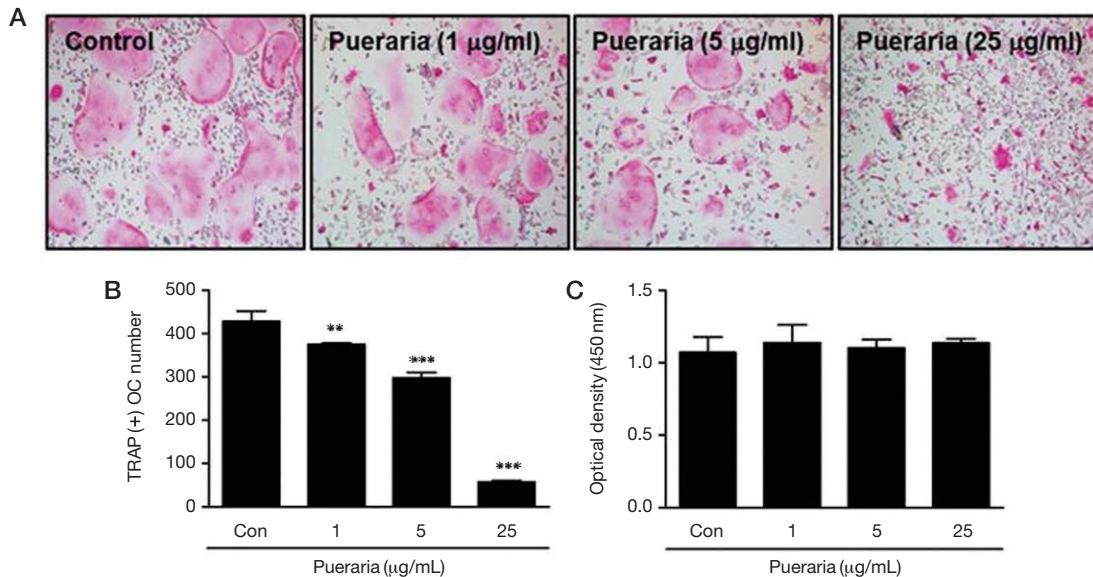


Fig. 1. Effect on osteoclast differentiation by ethanol extract of *Pueraria lobata*. (A) BMMs (bone marrow macrophages) were cultured for 4 days with M-CSF (30 ng/mL) and RANKL (100 ng/mL) in the presence of ethanol extract of *Pueraria lobata*. Cells were fixed in 3.7% formalin, permeabilized with 0.1% Triton X-100, and stained with TRAP solution. TRAP-positive cells were photographed under a light microscope (100× magnification). (B) TRAP-positive cells were counted as osteoclasts. $P < 0.05$ vs control (DMSO). (C) BMMs were seeded into a 96-well plate and cultured for 3 days in the presence of M-CSF (30 ng/mL) and with the indicated concentrations of ethanol extract of *Pueraria lobata*. After 3 days, the absorbance was measured at 450 nm using an ELISA reader.

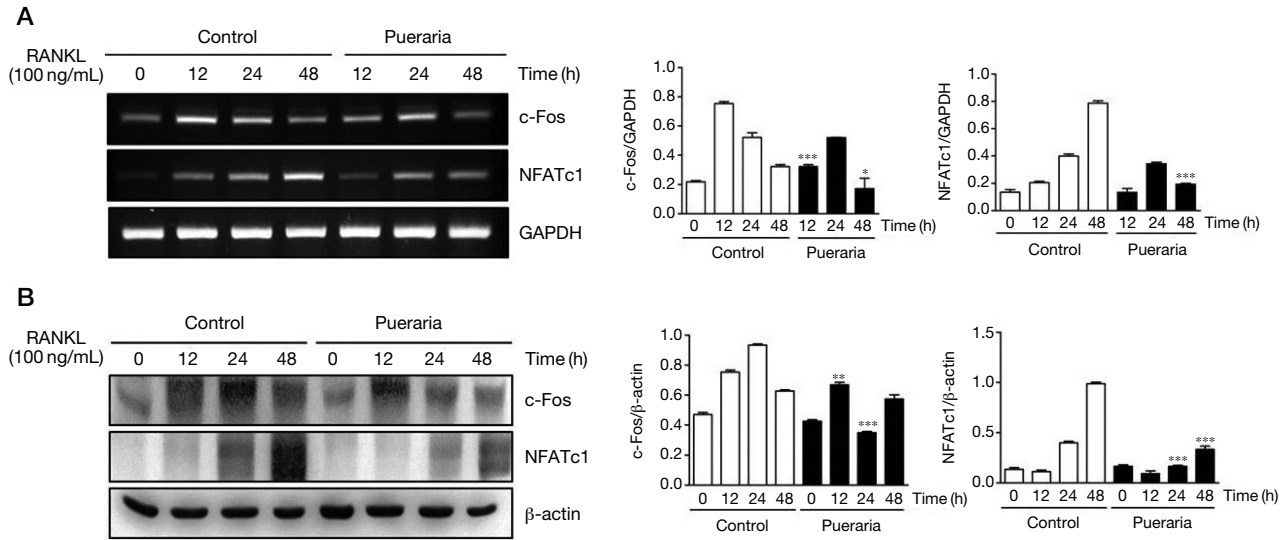


Fig. 2. Effect of ethanol extract of *Pueraria lobata* on gene expression, c-Fos and NFATc1 that are associated with osteoclast differentiation. (A) BMMs were pretreated with or without ethanol extract of *Pueraria lobata* (25 µg/mL) for 1 h and then treated with RANKL (100 ng/mL) for the indicated time points. Total RNA from the cells was obtained and the level of expression of the mRNA of the indicated genes was analyzed by RT-PCR. The quantification of western blotting is calculated by using Image J. The respective intensity is relative value of β-actin. (B) BMMs were pretreated with or without ethanol extract of *Pueraria lobata* (25 µg/mL) for 1 h and then treated with RANKL (100 ng/mL) for the indicated time. The cells were lysed in lysis buffer, then resolved by SDS-PAGE and western blotting with antibodies against c-Fos and NFATc1 and β-actin. The quantification of western blotting is calculated by using Image J. The respective intensity is relative value of β-actin.

로 전처리한 후 RANKL을 실험군과 대조군에 첨가하여 각각 0, 5, 15, 30분 동안 반응시킨 뒤 Akt, p38, JNK, IκB의 활성을 시간별로 확인하였다. 대조군과 비교하였을 때 RANKL에 의하여 유도된 Akt, p38, JNK, IκB의 인산화가 모두 감소한 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3A). 또한, 정량화된 수치로도 칩의 억제 효과를 확인할 수 있었다(Fig. 3B). 이를 통해 칩이 MAPKs 경로뿐만 아니고 Akt 경로와 NF-κB 경로에도 영향을 미친다는 사실을 확인하였다.

4. 칩이 RANKL에 의한 뼈파괴세포 분화와 관련된 유전자 발현에 미치는 영향

RANKL은 RANK와 결합함으로써 뼈파괴세포의 분화와 관련된 유전자의 발현을 돕는다. 뼈파괴세포의 분화와 관련된 대표적인 유전자 OSCAR, TRAP, Integrin αv, Integrin β3, Cathepsin K, OC-STAMP, DC-STAMP의 mRNA 발현량이 칩 추출물의 처리 여부에 따라 변화하는지 확인하였다. 그 결과 Integrin αv의 mRNA 발현량은 대조군과 실험군에서 별다른 차이를 보이지 않았으나 OSCAR, TRAP, Integrin β3, Cathepsin K, OC-STAMP, DC-STAMP의 mRNA 발현량이 의미 있게 감소하는 것을 확인할 수 있었으며, 정량화된 수치로도 칩의 억제 효과의 유의성을 확인하였다(Fig. 4A, B). 이러한 대표

유전자들의 발현 저하는 상위기전에 위치한 전사인자인 c-Fos와 NFATc1이 각자의 기능을 제대로 수행하지 못하는 점에서 비롯된 것으로 이러한 억제 효과는 칩에 의하여 발현시기를 지연시킨 것이 아닌 발현 자체를 억제한 것으로 48시간 이후에도 발현의 저하가 계속될 것이라 생각된다.

5. 뼈흡수능에 미치는 칩의 효과

칩 추출물이 뼈파괴세포 뼈흡수능에 미치는 효과를 확인하기 위하여 뼈모세포와의 공생배양을 통해 성숙한 뼈파괴세포와 칩 추출물을 hydroxyapatite로 코팅된 플레이트에 주입하였다. 대조군에서는 hydroxyapatite가 뼈파괴세포에 의해 흡수된 부분이 많이 관찰되었지만, 칩 추출물을 처리한 실험군에서는 흡수된 부분이 현저하게 감소된 양상이 관찰되었다. 또한 그래프를 통해 대조군과 실험군의 pit area를 측정된 결과 실험군에서 현저하게 감소되는 경향을 확인하였다(Fig. 5).

고 찰

골다공증은 뼈밀도가 낮아져 뼈의 질적인 변화와 뼈의 양 감소로 인해 뼈의 강도가 약해져 골절이 일어날

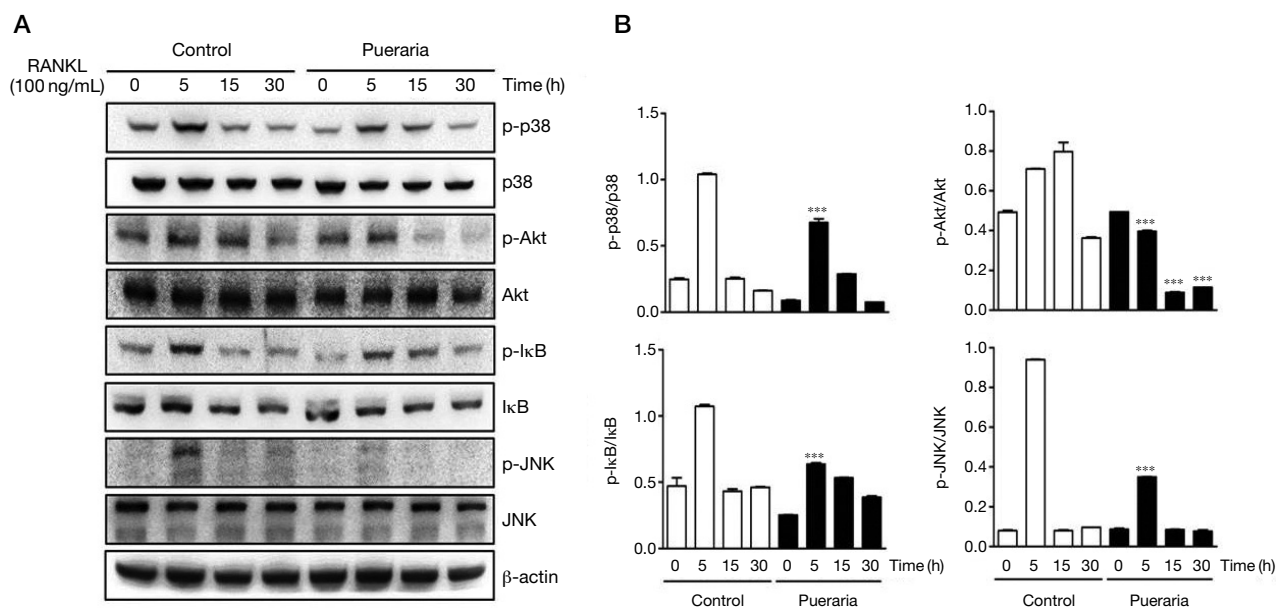


Fig. 3. Effect of ethanol extract of *Pueraria lobata* on phosphorylation of MAPK. (A) BMMs were starved for 3 h, pretreated with ethanol extract of *Pueraria lobata* (25 μ g/mL) for 1 h and then stimulated with RANKL (100 ng/mL) for the indicated times. Cell lysates were analyzed by Western blotting with primary antibody against p-p38, p38, p-Akt, Akt, p-IkB, IkB, p-JNK, JNK and β -actin and secondary antibody (anti-rabbit and anti-mouse). (B) The quantification of western blotting is calculated by using Image J. The respective intensity is relative value of respective total form.

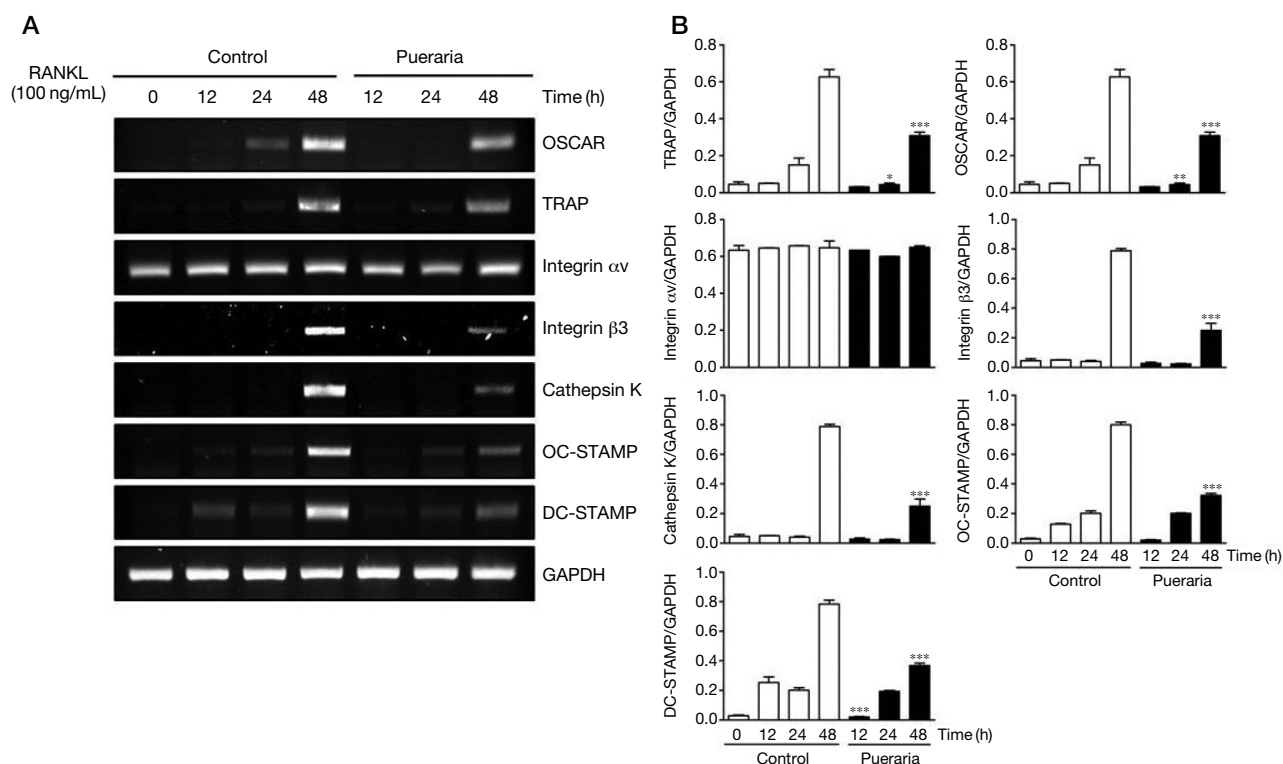


Fig. 4. Effect on RANKL-induced mRNA expression is inhibited by ethanol extract of *Pueraria lobata*. (A) BMMs were pretreated with or without ethanol extract of *Pueraria lobata* (25 μ g/mL) for 1 h and then treated with RANKL (100 ng/mL) for the indicated time points. Total RNA from the cells was obtained and the level of expression of the mRNA of the indicated genes was analyzed by RT-PCR. (B) The quantification of western blotting is calculated by using Image J. The respective intensity is relative value of β -actin.

가능성이 높은 상태로 환자들의 삶의 질을 감소시키며 또한 높은 연령대에서 발병률이 매우 높은 질병이다[20]. 이러한 골다공증을 비롯한 성인 뼈질환들은 뼈파괴세포의 뼈흡수가 뼈모세포의 뼈형성에 비해 지나치게 활성화된 경우에 발생하게 된다. 따라서 뼈파괴세포의 분화와 뼈흡수를 억제시키는 것이 골다공증의 주된 치료원리라 할 수 있다. 이러한 원리를 이용한 약물 중 현재 임상에서 사용되는 약물 가운데 가장 대표적인 것으로서 Bisphosphonate 제제를 들 수 있다. 그러나 최근 들어 Bisphosphonate 제제의 여러 부작용이 발생하여 임상적 사용이 제한되고 있고 그 결과 부작용이 적은 천연물질이 새로운 치료제의 후보물질로 떠오르고 있다[14-16].

칩은 이미 여러 연구에서 골다공증 완화에 긍정적인 효과가 있다고 입증되었다. 그러나 칩이 RANKL과 M-CSF 처리 하에서 뼈파괴세포의 분화와 뼈흡수 기능에 어떠한 영향을 미치는지는 아직 밝혀진 바가 없다. 그러므로 본 연구에서는 골다공증에 대한 칩의 긍정적인 효과가 뼈파괴세포의 분화와 뼈흡수에 미치는 연관성 및 그 작용기전을 알아보려고 하였다. 우선적으로, 칩의 뼈파괴세포 분화의 억제효과를 확인하기 위하여 RANKL과 M-CSF가 처리된 골수에서 유래한 큰포식세포를 칩 추출물을 처리한 실험군과 DMSO를 처리한 대조군으로 나누어 4일 동안 배양한 후 TRAP 염색을 통해 비교하였다. 그 결과 뼈파괴세포의 TRAP 발현과 TRAP 양성 다핵세포의 수가 칩 추출물 1, 5, 25 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 의미 있게 감소한 것을 확인하였다. 또한 뼈파괴세포의 TRAP 발현의 감소가 세포 독성에 의한 것인지 확인하기 위해 XTT assay를 수행한 결과 세포 독성은 발견되지 않았다. c-Fos와 NFATc1은 뼈파괴세포의 분화와 관련 있는 유전자들 중에서도 가장 핵심적인 유전자로 알려져 있는데[11,13], c-Fos와 NFATc1의 mRNA 및 단백질 수준에서의 발현량에 칩 추출물 처리 여부에 따른 효과를 밝히기 위하여 칩 추출물을 처리한 실험군과 DMSO를 처리한 대조군으로 나누어 각각 western blot 분석과 RT-PCR을 수행하였다. 그 결과 c-Fos와 NFATc1의 단백질과 mRNA 발현량이 농도의존적으로 유의성 있게 감소한 것을 확인할 수 있었다. c-Fos와 NFATc1의 활성화가 억제된 결과를 바탕으로, c-Fos와 NFATc1의 상위 기전인 p38, Akt, JNK와 NF- κ B 경로를 확인하기 위해 각각의 단백질 인산화 정도를 비교하였다[2]. 그 결과 칩은 p38과 NF- κ B 경로를 포함한 전반적인 초기의 신호전달경로를 저해하는 효과를 나타냈으나, 그 중 JNK와 Akt의 활성화를 눈에 띄게 억제하는 결과를 보였다. 즉 대조군에서 JNK는 RANKL을 처리한지 5분에서만 인산화가 강하게 유도되어 초기활성으로 하위기전에 위치한 NFATc1의 전사활동을 조절하는 반면, 실험

군에서는 RANKL을 처리한지 5분 후에 JNK의 인산화가 억제되는 것을 확인하였고, Akt는 대조군에서 RANKL을 처리한지 5분과 15분 후에 인산화가 강하게 유도되어 초·중기의 활성으로 NFATc1의 전사활동에 영향을 미치는 반면, 실험군에서는 RANKL을 처리한지 15분 후에 Akt의 인산화가 강하게 억제되는 현상을 확인하였다. 결국 JNK와 Akt가 각각 활성화되는 시간에 인산화를 억제시킴으로써 NFATc1의 발현을 저해할 것이라는 사실을 확인하였다(Fig. 3). JNK는 뼈파괴세포 분화뿐 아니라 뼈모세포의 세포자멸사(programmed cell death)와 관련되어 있으며[21] Akt signaling은 뼈파괴세포 표면의 수용기인 Integrin α_v , Integrin β_3 , RANK 등의 하위

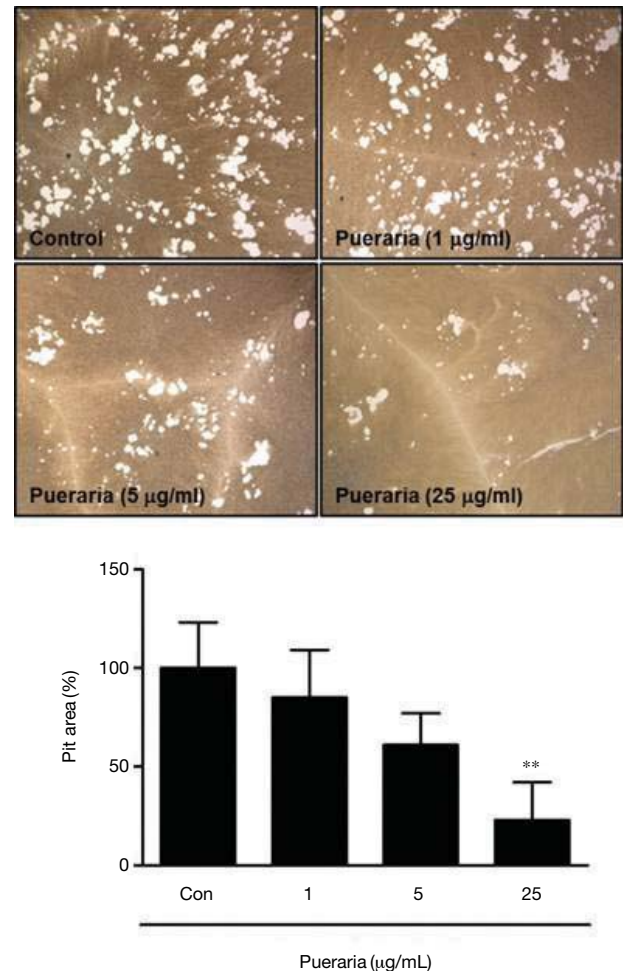


Fig. 5. Ethanol extract of *Pueraria lobata* inhibits osteoclastic bone resorption. Mature osteoclasts were seeded on hydroxyapatite-coated plates and treated for 24 h with the indicated concentrations of *Pueraria lobata*. Attached cells on the plates were removed and photographed under a light microscope (top) (100 \times magnification). Pit areas were quantified using the image (bottom). * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ versus the control (DMSO).

기전으로 알려져 있고 [22] 여러 연구를 통해 M-CSF와 RANKL 처리 하에서의 Akt 인산화는 NF- κ B와 NFATc1 발현에 영향을 주어 뼈파괴세포 분화에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다 [23]. 이를 통해 췌은 NFATc1의 발현을 억제하는 과정에 있어서 주로 JNK와 Akt 경로를 경유할 것이라는 사실을 유추하였다. 또한 NFATc1의 비활성화를 통한 뼈파괴세포 관련 유전자들의 발현변화를 확인하기 위하여 RT-PCR을 수행하였다. 우선적으로 NFATc1의 활성화로 인해 발현되는 특정 유전자로 알려진 OSCAR, TRAP [24], 그리고 뼈파괴세포 분화를 촉진하는 막관통 단백질인 OC-STAMP의 mRNA 발현량을 비교하였다 [25]. 또한 단핵구세포에서 다핵형세포로의 이동과 융합의 정도가 감소된 실험결과를 토대로 하여 뼈파괴세포에서의 세포간 결합에 중요한 역할을 수행하는 것으로 알려진 DC-STAMP, Integrin α v, Integrin β 3 [26,27]의 mRNA 발현량을 비교하고 뼈파괴세포의 뼈흡수 기능에 영향을 끼치는지 여부를 확인하기 위해 Cathepsin K의 mRNA 발현량 또한 비교하였다 [28]. 그 결과 췌 추출물이 OSCAR, TRAP, 그리고 OC-STAMP의 mRNA 발현을 감소시켜 뼈파괴세포 분화를 억제하는 것과 DC-STAMP와 Integrin β 3의 mRNA 발현을 감소 시킴으로써 세포 간의 결합을 억제하는 것을 알 수 있었다. 또한 뼈파괴세포가 뼈흡수기능을 수행하기 위해 필수적인 actin ring 형성에 관여하는 것으로도 알려진 Cathepsin K [28,29]의 발현량이 줄어든 것으로 보아 췌 추출물이 뼈파괴세포의 뼈흡수 기능을 억제시킬 것이라고 예상할 수 있었다 (Fig. 4). 췌 추출물이 뼈파괴세포의 뼈흡수 기능을 실질적으로 억제시키는지 확인하기 위해서 뼈 바탕질의 주요성분인 hydroxyapatite로 코팅된 플레이트를 이용해 췌 추출물 처리 여부에 따른 뼈흡수능을 비교하였다. 그 결과 췌 추출물을 처리한 실험군이 DMSO를 처리한 대조군에 비해 뼈흡수 정도가 유의성있게 감소한 것을 pit 형성의 차이를 통해서 확인할 수 있었다 (Fig. 5).

결론적으로, 본 연구에서는 췌이 p38, Akt, JNK와 NF- κ B 경로를 통해 뼈파괴세포의 분화를 억제시키며, 뼈파괴세포와 관련된 여러 유전자의 저해를 통해 실질적인 뼈파괴세포의 뼈흡수능을 저하시킨다는 사실을 확인하였다. 오랜 기간 한약재와 건강식품으로 사용된 췌은 골다공증을 비롯한 여러 뼈질환들의 치료를 위한 후보물질로서의 가능성을 제시하였다. 또한 뼈파괴세포의 분화를 억제하는 에스트로겐과 비슷한 역할을 수행하는 식물성 에스트로겐의 한 종류인 다이제인 성분은 췌의 주성분으로 뼈파괴세포 형성 및 기능 억제효과에 크게 기여할 것이라 생각되며, 향후 이에 대한 깊은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2012년 원광대학교 교비 지원에 의해 수행되었습니다.

참 고 문 헌

- Oursler MJ. Direct and indirect effects of estrogen on osteoclasts. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2003; 3:363-6.
- Tanaka Y, Nakayamada S, Okada Y. Osteoblasts and osteoclasts in bone remodeling and inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy.* 2005; 4:325-8.
- Nordin BE. Calcium and osteoporosis. *Nutrition.* 1997; 13: 664-86.
- Weitzmann MN, Pacifici R. Estrogen deficiency and bone loss: an inflammatory tale. *J Clin Invest.* 2006; 116:1186-94.
- Kanis JA, Johansson H, Oden A, McCloskey EV. Assessment of fracture risk. *Eur J Radiol.* 2009; 71:392-7.
- Hayase Y, Muguruma Y, Lee MY. Osteoclast development from hematopoietic stem cells: apparent divergence of the osteoclast lineage prior to macrophage commitment. *Exp Hematol.* 1997; 25:19-25.
- Yamashita T, Takahashi N, Udagawa N. New roles of osteoblasts involved in osteoclast differentiation. *World J Orthop.* 2012; 3:175-81.
- Han KY, Yang D, Chang EJ, Lee Y, Huang H, Sung SH, et al. Inhibition of osteoclast differentiation and bone resorption by sauchinone. *Biochem Pharmacol.* 2007; 74:911-23.
- Lamothe B, Webster WK, Gopinathan A, Besse A, Campos AD, Darnay BG. TRAF6 ubiquitin ligase is essential for RANKL signaling and osteoclast differentiation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007; 359:1044-9.
- Soysa NS, Alles N, Aoki K, Ohya K. Osteoclast formation and differentiation: an overview. *J Med Dent Sci.* 2012; 59: 65-74.
- Grigoriadis AE, Wang ZQ, Cecchini MG, Hofstetter W, Felix R, Fleisch HA, et al. c-Fos: a key regulator of osteoclast-macrophage lineage determination and bone remodeling. *Science.* 1994; 266:443-8.
- Oeckinghaus A, Ghosh S. The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2009; 1:a000034.
- Takayanagi H, Kim S, Koga T, Nishina H, Isshiki M, Yoshida H, et al. Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts. *Dev Cell.* 2002; 3: 889-901.
- 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.
15. Papapetrou PD. Bisphosphonate-associated adverse events. *Hormones (Athens).* 2009; 8:96-110.
16. Khosla S, Burr D, Cauley J, Dempster DW, Ebeling PR, Felsenberg D, et al. Bisphosphonates-associated osteonecrosis of the jaw: report of a task force of the american society for bone and mineral research. *J Bone Miner Res.* 2007; 22: 1479-91.
17. Lim DW, Lee C, Kim IH, Kim YT. Anti-inflammatory effects of total isoflavones from *Pueraria lobata* on cerebral ischemia in rats. *Molecules.* 2013; 18:10404-12.
18. McGregor NR. *Pueraria lobata* (Kudzu root) hangover remedies and acetaldehyde-associated neoplasm risk. *Alcohol.* 2007; 41:469-78.
19. Urasopon N, Hamada Y, Asaoka K, Cherdshewasart W, Malaivijitnond S. *Pueraria mirifica*, a phytoestrogen-rich herb, prevents bone loss in orchidectomized rats. *Maturitas.* 2007; 56:322-31.
20. Ginaldi L, Di Benedetto MC, De Martinis M. Osteoporosis, inflammation and ageing. *Immun Ageing.* 2005; 2:14.
21. Li X, Han Y, Guan Y, Zhang L, Bai C, Li Y. Aluminum induces osteoblast apoptosis through the oxidative stress-mediated JNK signaling pathway. *Biol Trace Elem Res.* 2012; 150:502-8.
22. Lane D, Matte I, Laplante C, Garde-Granger P, Rancourt C, Piché A. Osteoprotegerin (OPG) activates integrin, focal adhesion kinase (FAK), and Akt signaling in ovarian cancer cells to attenuate TRAIL-induced apoptosis. *J Ovarian Res.* 2013; 6:82.
23. Moon JB, Kim JH, Kim K, Youn BU, Ko A, Lee SY, et al. Akt induces osteoclast differentiation through regulating the GSK3 β /NFATc1 signaling cascade. *J Immunol.* 2012; 188:163-9.
24. Ballanti P, Minisola S, Pacitti MT, Scarnecchia L, Rosso R, Mazzuoli GF, et al. Tartrate-resistant acid phosphate activity as osteoclastic marker: sensitivity of cytochemical assessment and serum assay in comparison with standardized osteoclast histomorphometry. *Osteoporos Int.* 1997; 7:39-43.
25. Yang M, Birnbaum MJ, MacKay CA, Mason-Savas A, Thompson B, Odgren PR. Osteoclast stimulatory transmembrane protein (OC-STAMP), a novel protein induced by RANKL that promotes osteoclast differentiation. *J Cell Physiol.* 2008; 215:497-505.
26. Duong LT, Lakkakorpi P, Nakamura I, Rodan GA. Integrins and signaling in osteoclast function. *Matrix Biol.* 2000; 19: 97-105.
27. Yagi M, Miyamoto T, Sawatani Y, Iwamoto K, Hosogane N, Fujita N, et al. DC-STAMP is essential for cell-cell fusion in osteoclasts and foreign body giant cells. *J Exp Med.* 2005; 202:345-51.
28. Wilson SR, Peters C, Saftig P, Brömme D. Cathepsin K activity-dependent regulation of osteoclast actin ring formation and bone resorption. *J Biol Chem.* 2009; 284:2584-92.
29. Chellaiah MA. Regulation of actin ring formation by rho GTPases in osteoclasts. *J Biol Chem.* 2005; 280:32930-43.

The Effects of *Pueraria lobata* on Osteoclast Differentiation and Bone Resorption

Jong Min Baek¹, Kang Hugh Yoon¹, Sung-Jun Ahn¹, Sun-Hyang Park¹, Yoon-Hee Cheon¹, Ju-Young Kim², Jaemin Oh¹

¹Department of Anatomy, BK21plus Program & Department of Smart Life-Care Convergence, Wonkwang University, Graduate School, Institute for Skeletal Disease

²Imaging Science-Based Lung and Bone Diseases Research Center

Abstract : Previous researches have proved that *Pueraria lobata* up-regulates bone mineral contents and bone mineral density in bone-loss model, ovariectomized mice and orchidectomized rats. However, the precise effects and mechanisms of *Pueraria lobata* on osteoclast differentiation and bone resorbing activity of mature osteoclasts still remains unknown. Therefore, we investigated the effect and mechanism of *Pueraria lobata* on receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL) and macrophage colony stimulation factor (M-CSF)-induced osteoclast differentiation in bone marrow macro-phages (BMMs). First of all, we treated BMMs derived from mice with various concentrations of *Pueraria lobata* in order to perform screening by tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) staining. Also, we conducted western blotting and RT-PCR for the purpose of verifying the treatment mechanism of *Pueraria lobata* and lastly, we used hydroxyapatite-coated plate to evaluate the effects of *Pueraria lobata* on bone resorbing activity of mature osteoclasts. As a result, *Pueraria lobata* has inhibitory effect on phosphorylation of p38, Akt, c-Jun N-terminal kinase (JNK), and I κ B which are essential early signaling pathway of osteoclastogenesis. Also, the inactivation of nuclear factor of activated T cells (NFAT)c1, and c-Fos which is caused by *Pueraria lobata* is followed by the suppression effects of *Pueraria lobata* on osteoclast-related various genes, osteoclast-associated receptor (OSCAR), TRAP, Integrin β 3, osteoclast stimulatory transmembrane protein (OC-STAMP), and dendritic cell-specific transmembrane protein (DC-STAMP). Particularly, *Pueraria lobata* blocks the formation of pit area on hydroxyapatite-coated plate in a dose-dependent manner as well as the mRNA expression of Cathepsin K, which is associated with bone resorbing activity. These results demonstrate the molecular mechanism relating to anti-osteoclastogenesis effect of *Pueraria lobata* as well as the inhibitory effect of *Pueraria lobata* on mature osteoclast formation and bone resorbing activity.

Keywords : *Pueraria lobata*, Osteoclast, RANKL, Bone remodeling, Osteoporosis