

우슬의 파골세포 분화 억제와 골 흡수 억제효과

김주호¹, 기지예¹, 안지영¹, 박혜정¹, 김현주¹, 곽한복², 오재민², 김윤경^{1,*}

1: 원광대학교 약학대학 한약학과 · 원광한약연구소
2: 원광대학교 의과대학 해부학교실 · 의과학연구소

Inhibitory Effects of *Achyranthis Bidentatae Radix* on Osteoclast Differentiation and Bone Resorption

Ju-Ho Kim¹, Ji-Ye Ki¹, Ji-Young Ann¹, Hye-Jung Park¹, Hyun-Ju Kim¹,
Han Bok Kwak², Jae Min Oh², Yun-Kyung Kim^{1,*}

1: Department of Oriental Pharmacy, College of Pharmacy and Wonkwang Oriental Medicines Research
Institute, Wonkwang University

2: Department of Anatomy, School of Medicine, and Wonkwang Medical Science Institute, Wonkwang
University

ABSTRACT

Objectives : *Achyranthis Bidentatae Radix* (ABR) has been used for treating of many symptoms especially osteoporosis and rheumatoid arthritis. In this study, we determined the effects of water extract of ABR in RANKL (Receptor Activator for Nuclear Factor κ B Ligand)-induced osteoclast differentiation culture system.

Methods : We assayed mRNA expression levels of NFATc1, c-Fos, TRAP, OSCAR, FcR γ , DAP12 and GAPDH in bone marrow macrophages (BMMs) treated with ABR. The protein expression levels of NFATc1, c-Fos, MAPKs and β -actin in cell lysates treated with ABR were analysed by Western blotting. In addition we determined the effects of water extract of ABR on LPS-induced bone-loss mouse.

Results : Water extract of ABR showed remarkable inhibition on RANKL-treated osteoclast differentiation without cytotoxicity. ABR down-regulated the induction of c-Fos and NFATc1 by RANKL. ABR suppressed phosphorylation of JNK, p38 and I- κ B. ABR rescued bone erosion by LPS induction *in vivo* study.

Conclusions : These results demonstrate that ABR may be a useful remedy for curing of bone-loss disease such as osteoporosis.

Key words : *Achyranthis Bidentatae Radix*, osteoclast differentiation, NFATc1, osteoporosis, RANKL

서론

미국 50세 이상의 여성 중 약 3천만 명, 남성 중 약 1천만 명이 골다공증을 앓고 있거나 낮은 골밀도(bone mineral density)를 보이는 것으로 나타났다¹⁾. 골다공증은 주로 폐경기 이후 estrogen 부족으로 발생하기 때문에

여성의 질병으로만 생각하기 쉽지만 나이와 성별에 관계 없이 발생할 수 있는 질병이다²⁾. 미국 내에서 2백만 건 이상의 골다공증성 골절이 발생하고 이와 관련한 사회비용이 총 17조 원에 달해(2005년도) 심각한 사회문제로 대두되었다³⁾. 우리나라 또한 고령화 사회의 진입으로 인하여 골다공증의 위협에 노출되어 있고 이에 따라 적절한

* 교신저자 : 김윤경, 전북 익산시 신룡동 344-2 원광대학교 약학대학 한약학과
· Tel : 063-850-6803 · E-mail : hestia@wku.ac.kr
· 접수 : 2010년 2월 20일 · 수정 : 2010년 3월 21일 · 채택 : 2010년 3월 22일

치료제의 개발이 중요한 사항으로 부각되었다.

골의 항상성은 새로운 골 기질을 형성하는 조골세포와 오래된 골 기질을 흡수하는 파골세포의 적절한 균형에 의해 유지되어 인체하중의 지탱, 기관보호, 조혈작용의 역할을 수행하는데, 성인에서 매년 전체 골 함량 중 약 10%가 재형성되는 매우 역동적인 조직이다⁴⁾. 골다공증은 대사성 질환으로 파골세포에 의한 골의 흡수가 조골세포에 의한 골의 형성보다 과도하여 골의 항상성이 깨질 때 발생한다⁵⁾. 골다공증 발현에 중추적인 역할을 하는 파골세포는 조혈모세포에서 기원한 다핵형 세포로서 골조직에 부착되어 산, FPP(farnesyl pyrophosphate) 등 여러 종류의 분해효소를 분비하여 골 기질을 재흡수한다. 완전한 기능을 하는 파골세포가 되기 위하여 일련의 분화과정을 거쳐야 하는데 파골전구세포는 분화에 중요한 두 가지 사이토카인 M-CSF (macrophage colony-stimulating factor) 와 RANKL (receptor activator of nuclear factor- κ B ligand)의 조절에 의해 성숙한 파골세포로 분화된다. 특히 파골세포의 생존, 분화, 다핵화, 활성화에 총체적인 역할을 하는 RANKL은 TNF계열의 사이토카인으로 수용체인 RANK와 결합하여 TRAF6 (TNF receptor associated factor 6)를 활성화 한다⁶⁾. TRAF6가 활성화되면 JNK (c-Jun N-terminal kinases), ERK (extracellular-signal regulated kinases), p38 MAP kinases 등과 같은 MAPKs (mitogen-activated protein kinases)는 물론 NF- κ B (nuclear factor- κ B), AP-1 (activator protein-1), NFATc1 (nuclear factor of activated T cells c1) 등과 같은 전사인자를 활성화하여 파골세포의 분화과정이 진행된다^{5,7)}. 따라서 RANKL 신호과정의 각 단계별 차단을 통한 과도한 파골세포 형성의 억제는 골다공증에 대한 치료적인 접근을 가능하게 할 것이다.

현재 골다공증 치료에는 크게 두 가지 종류의 약물이 사용되는데, bisphosphonate, calcitonin, estrogen 요법제 등의 골흡수 억제제와⁸⁻¹⁰⁾, teriparatide(재조합 부갑상선 호르몬 [1-34]) 제제 등의 골형성 촉진제가 있다¹¹⁾. 하지만 이 중 bisphosphonate 제제는 식도 및 위장관에 궤양을 유발하는 경우가 많고, 생체 이용률이 매우 낮다는 부작용이 있다. 비교적 부작용이 적은 장점으로 최근 천연물질을 이용한 신약개발과 질병의 치료가 보편화되면서 골다공증의 치료에 이를 응용한 연구 또한 활발하다. 기존에 녹용, 노각나무(*stewartia koreana*), 삼백초(*sauchinone*), 작약(*paconol*) 등이 RANKL로 유도된 파골세포의 분화를 억제하고 LPS로 유도된 생체 내 골 손실을 억제한다는 보고가 있다¹²⁻¹⁵⁾.

우슬(*Achyranthis Radix*)은 비름과(*Amaranthaceae*)에 속한 다년생 초본의 뿌리로 성분은 triterpenoid saponin 이 함유되어 있어 가수분해하면 oleanolic acid를 얻을 수 있고, ecdysterone, inokosterone 및 다량의 칼슘염이 함유되어 있다¹⁶⁾. 국내에서는 우슬로서 쇠무릎(*Achyranthes japonica* Nakai)을 사용하고, 중국에서는 懷牛膝(*Achyranthis Bidentatae* Radix, ABR)과 川牛膝(*Cyathula officinalis*

Kuan)을 사용한다. 한의학에서는 골다공증의 발병원인을 五臟 중의 하나인 腎臟과 밀접한 관련이 있는 것으로 생각하는데, 腎은 '先天의 本'으로 精을 저장하며 骨과 상합하여 髓를 생성하고 生長·발육·생식을 주관한다고 본다. 따라서 腎을 補할 수 있는 약물들은 骨을 충실하고 튼튼하게 하여 골다공증을 예방하고 치료할 수 있다. 특히 우슬 중에서도 懷牛膝은 '補肝腎·強筋骨'의 효능이 다른 우슬에 비해 비교적 강하고 '散瘀血·消癰腫' 등의 효능으로 임상에서 관절염에 이용되어 왔으며 과학적 방법으로 진통, 소염, 항암효과 및 골 형성 촉진효과가 보고되었다¹⁷⁻¹⁹⁾. 하지만 골다공증에 직접적인 영향을 미치는 파골세포의 억제에 관한 연구는 아직 미비하다. 따라서 이번 연구에서는 RANKL에 의한 파골세포 분화에 우슬 물 추출물의 직접적인 억제효과를 밝히고자 하였고, 파골세포 분화에 중요한 전사인자의 억제를 단계별로 연구하여 억제 작용기전을 규명하고자 하였다. 또한 기존에 생쥐의 난소적출을 통한 폐경 후 골다공증 모델에 우슬의 효과를 보고한 논문은 있지만 LPS로 유도되는 생쥐의 염증성 골 손실모델에 관한 연구가 아직 없으므로 이 모델을 사용하였고 Nano-CT로 대퇴골의 3차원적 영상을 얻어 관절염에 우슬이 미치는 생체 내 효과를 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 약재 및 시약

이번 연구에 사용한 우슬은 옴니허브사(대구, 한국)에서 구입하였고 Glas-Col (Terre Haute, IN, USA)사에서 구입한 Heating mantle을 이용하여 2시간 동안 가열하여 물로 추출하고 Büchi Labortechnik AG (Flawil, Switzerland)사에서 구입한 감압농축기(Rotavapor R-124)로 농축한 후 EYELA (Japan)사에서 구입한 동결건조기(FDU-2100)로 건조하여 최종적으로 파우더 형태를 얻었다. 10 g의 우슬에서 6 g의 파우더를 얻어 수율(yield)은 60% 이었으며 원약재의 용량으로 환산하여 농도를 결정하였다. 멸균된 1×PBS에 녹인 후 Sartorius (Göttingen, Germany)사에서 구입한 0.20 μ m 필터에 여과하여 곰팡이 등의 유해물질을 제거한 후 -20°C에 보관하였다. 한약재 추출물은 경시변화에 취약한 면이 있으므로 용액제조 후 한 달 이내에 용시에 녹여 사용하였다. Human RANKL과 Human M-CSF는 Peprotech (London, UK)사에서 구입하였다. c-Fos와 NFATc1의 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)사에서 구입하였다. Phospho-ERK, ERK, phospho-p38, p38, phospho-JNK, JNK, I- κ B에 대한 항체는 Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA)사의 제품을 사용하였다. XTT assay kit는 Roche (Indianapolis, IN, USA)사의 제품을 사용하였고, actin 항체와 TRAP solution, LPS는 Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)사에서 구입하였다.

2. 파골세포 배양 및 분화 억제

5주령의 수컷 ICR 생쥐를 경추탈골 법으로 희생시킨 후 1 × antibiotic을 첨가한 α-MEM을 1cc 주사기에 충전하여 경골 및 대퇴골에서 골수를 채취하였다. 채취한 골수세포에서 적혈구를 제거한 후 10% Fetal bovine serum (FBS)과 M-CSF (30 ng/ml)를 첨가한 α-minimum essential medium (α-MEM)배지에서 3일간 배양하였다. 림프구를 포함하고 있는 부유 세포는 제거하고 부착된 세포를 파골전구세포로서의 대식세포(bone marrow macrophages, BMMs)로 사용하였다. 대식세포를 3.5×10⁴/well의 밀도로 48-well plate에 분주하고 M-CSF (30 ng/ml)와 RANKL (100 ng/ml)을 첨가한 배지에 우슬 물 추출물을 농도별로 처리하여 배양하였다. 3일 후 배양액을 교환한 다음 4일째 TRAP 용액으로 염색하여 적자색의 TRAP (tartrate-resistant acid phosphatase) 양성세포를 파골세포로 인정하였다. 염색된 파골세포 중 핵이 3개 이상인 세포의 개수를 통계에 이용하였다.

3. 우슬 물 추출물의 독성검사

대식세포를 1×10⁴/well의 밀도로 96-well plate에 분주하고 M-CSF (30 ng/ml)를 처리한 후 우슬 물 추출물을 농도별로 처리하여 3일간 배양하였다. 3일 후 각각의 well에 XTT용액을 처리하고 4시간 동안 incubation한 후 ELISA Reader를 이용하여 450 nm 흡광도에서 측정하였다.

4. 역전사 중합반응(RT-PCR) 분석

세포내 전량의 RNA를 TRIzol 용액(invitrogen)을 이용하여 제조사의 설명서에 따라 분리하였다. 분리한 RNA 중 1 μg을 oligo dT primer, dNTP buffer, dithiothreitol, RNase inhibitor, Superscript II reverse transcriptase

(invitrogen)를 사용하여 cDNA로 합성하였다. 각 유전인자의 DNA 증폭을 위한 PCR (polymerase chain reaction) primer는 다음과 같다(Table 1). PCR을 마친 후 증폭된 각 DNA를 1% agarose gel에 전기영동을 걸어 분리하였고 EtBr으로 염색하여 U.V.상에서 band를 확인하였다.

5. Western blot 분석

세포를 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, and protease inhibitors)로 용해하였다. 전체 용해물을 원심분리(14,000 rpm, 20 min)하여 상층액을 얻었다. 표준 단백질량과 비교하여 단백을 정량화한 후 30 μg의 단백을 10% SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)에서 전기영동으로 분리하고 Millipore (Billerica, MA, USA)사에서 구입한 PVDF 막(polyvinylidene difluoride membrane)으로 옮겼다. 5% skim milk를 처리하여 비특이 단백질이 붙는 것을 방지한 후 단백질 각 사이즈 별로 1차 항체를 처리하였다. 이어 horseradish peroxidase가 붙어있는 2차 항체를 처리하고 iNtRON (성남, 한국)사에서 구입한 ECL (enhanced chemiluminescence)용액으로 단백질의 발현정도를 측정하였다. PVDF 막으로 옮긴 이후의 각 과정 중간에 TBS-T로 적당히 수세하여 불필요한 불순물을 제거하였다.

6. 동물실험

생체 내의 골 손실에 미치는 우슬 물 추출물의 효과를 규명하기 위해, 5주령의 수컷 ICR 생쥐 5마리를 한 군으로 하여 각 군별로 우슬(생쥐 g당 0.4 mg or 0.2 mg) 또는 PBS를 10일간 경구투여 하였다. 골 손실의 유도를 위해 실험군에 LPS (생쥐 g당 5 μg)를 우슬 투여시작일(1일)로부터 4일과 7일 2회에 걸쳐 복강주사하였고 대조군에는 PBS를 주사하여 실험오차를 제거하였다. 10일째 되는 날 생쥐를 희생시키고 대퇴골을 얻어 4% paraformaldehyde로 고정하였다. Nano-CT인 NFR Polaris-S160 (Nano Focus Ray, 한국)을 이용하여 대퇴골 내부의 3차원적 영상을 얻었다.

7. 통계분석

모든 실험은 3번 이상 반복 수행하여 그 중 대표적인 결과를 사용하였다. 정량적인 결과는 평균 ± 표준편차로 나타내었다. 결과 사이의 통계적인 유의성은 Student's paired t-test를 이용하여 분석하였고, p<0.05인 경우를 통계적으로 유의한 것으로 인정하였다.

Table 1. Sequences of Each Primers Used in PCR Amplification

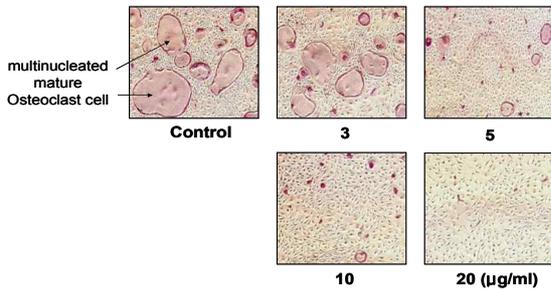
Primer	Sequence
c-Fos	forward 5'-CTGGTGCAGCCCACTCTGGTC-3'
	reverse 5'-CTTTCAGCAGATTGGCAATCTC-3'
NFATc1	forward 5'-CAACGCCCTGACCACCGATAG-3'
	reverse 5'-GGCTGCCTTCCGTCTCATAGT-3'
TRAP	forward 5'-ACTTCCCCAGCCCTTACTAC-3'
	reverse 5'-TCAGCACATAGCCACACCG-3'
OSCAR	forward 5'-CTGCTGGTAACGGATCAGTCCCCAGA-3'
	reverse 5'-CCAAGGAGCCAGAACCTTCGAAACT-3'
FcRγ	forward 5'-ATCTCAGCCGTGATCTTGTCTTTG-3'
	reverse 5'-TCTCATGCTTCAGAGTCTCATATG-3'
DAP12	forward 5'-TTCCTTCCTGTCTCCTCTGACTGTG-3'
	reverse 5'-TGCTCTGTGTGTTGAGGTCACATG-3'
GAPDH	forward 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'
	reverse 5'-TCCACCACCTGTGCTGTA-3'

결 과

1. 우슬 물 추출물의 파골세포 분화 억제효과

본 연구에서는 골다공증에 효과가 있다고 알려진 천연물 10가지를 스크린하였다. 대식세포에 M-CSF와 RANKL을 처리한 후 천연물을 처리하여 파골세포 분화의 억제 정도를 확인하였다. 그 중 효과가 좋은 우슬 물 추출물을 선별하여 연구를 시작하였다. 대식세포에 M-CSF와 RANKL을 처리한 후 4일간 배양하면 대조군 세포와 같이 TRAP 양성 다핵형 파골세포로 분화되는데, 우슬이 파골세포로의 분화를 농도 의존적으로 억제한다는 것을 TRAP 염색을 통해 확인하였다(Fig. 1A). 염색된 파골세포 중 핵이 3개 이상인 세포의 숫자를 세어 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도부터 유의성이 있는 분화 억제효과를 관찰하였고, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서는 거의 90%에 가까운 억제효과를 확인하였다(Fig. 1B). 이 결과는 RANKL에 의해 유도되는 파골세포 분화과정 중에 우슬이 직접적인 억제효과를 발휘한다는 것을 의미한다.

A



B

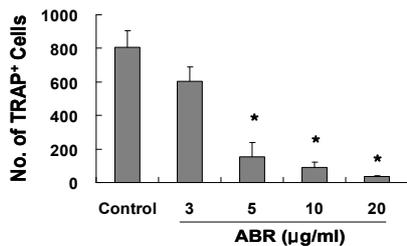


Fig. 1. Inhibitory effect of ABR on osteoclastogenesis from BMMs induced by soluble RANK.

A : BMMs were cultured with the indicated dose of ABR in the presence of M-CSF (30 ng/ml) and RANKL (100 ng/ml) for 4 days. Cells were fixed and TRAP stained. ABR inhibits osteoclast differentiation dose dependently.

B : TRAP-positive multinucleated cells were counted (TRAP+ cells containing three or more nuclei were counted as multinucleated osteoclasts). (* $p < 0.05$, significantly different from the control).

2. 우슬 물 추출물의 세포독성 효과

우슬 물 추출물은 파골세포의 분화에 의미 있는 억제 효과를 나타냈다. 하지만 만약 우슬이 세포에 대한 독성 효과를 가지고 있고, 배양기간 동안 대식세포의 세포사멸

을 유도한다면 파골세포의 형성이 감소될 것이다. 우슬에 의한 파골세포 분화의 억제가 파골전구세포에 대한 독성 효과인지 확인하기 위하여 대식세포에 M-CSF 처리 후 우슬을 농도별로 처리하여 3일간 배양하였다. XTT검사를 실시하여 M-CSF 단독 처리한 대조군과 우슬을 농도별로 처리한 실험군 사이에 차이적인 유의성이 없다는 것을 검증하였다(Fig. 2). 이 결과 파골세포 분화의 억제는 파골전구세포에 대한 우슬의 세포독성이 아닌 것으로 사료된다.

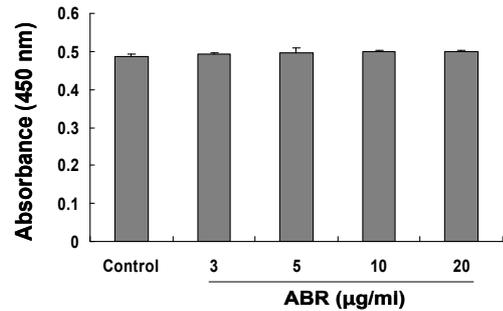


Fig. 2. ABR showed no effect on cell cytotoxicity

BMMs were cultured with the indicated dose of ABR in the presence of M-CSF (30 ng/ml) for 3 days. The XTT assay was evaluated and absorbance was read at 450 nm using ELISA reader. This result means ABR had no cytotoxic effect, indicating that the inhibition of osteoclastogenesis by ABR was not caused by cytotoxic effect on BMMs.

3. RANKL로 유도되는 MAPKs에 대한 우슬 물 추출물의 억제효과

RANKL/RANK 상호작용에 의한 파골세포 분화개시는 다양한 신호전달 체계를 경유하여 조절된다. 특히 p38, ERK, JNK 등의 MAP kinase와 전사인자인 NF- κ B는 분화에 중추적인 역할을 하는 NFATc1과 c-Fos를 조절하는 중요한 신호전달 물질로 알려져 있다. 앞서 밝힌 파골세포 분화의 억제가 어떠한 경로를 경유한 것인지 확인하기 위하여 대식세포에 우슬을 전처리하고 RANKL

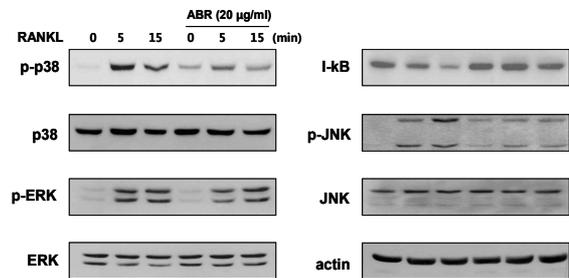


Fig. 3. ABR decreases the activation of p38, NF- κ B, and JNK by RANKL

BMMs were serum-starved for 3 h, pretreated with or without ABR (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 1 h and treated with RANKL (100 ng/ml) for the indicated time. Cell lysates were subjected to Western blotting with antibody to specific for phosphorylated p38, ERK, I- κ B, and JNK.

을 시간별로 처리하여 각 신호전달 물질의 발현정도를 관찰하였다. 우슬 물 추출물은 RANKL로 유도되는 p38, JNK, NF- κ B의 인산화를 억제하는 반면, ERK의 인산화는 억제하지 못하였다(Fig. 3). 이로써 우슬에 의한 파골세포 분화억제 경로가 p38, JNK, NF- κ B인 것을 증명하였다.

4. 우슬 물 추출물의 RANKL-유도 NFATc1, c-Fos 발현 억제효과

NFATc1과 c-Fos는 파골세포의 분화에 가장 핵심적인 요소이다. RANKL로 유도되는 NFATc1, c-Fos의 단백질 발현에 우슬 물 추출물의 효과를 검증하기 위하여 Western blotting 방법을 이용하였다. M-CSF와 RANKL을 처리한 대조군의 NFATc1과 c-Fos의 단백질이 시간의존적으로 발현되는 것에 비해 우슬을 함께 처리한 실험군에서는 단백질의 발현이 현저히 감소되었다(Fig. 4). 이 결과 우슬에 의한 파골세포 분화억제 작용기전이 c-Fos, NFATc1 발현과 관련되어 있음을 확인하였다.

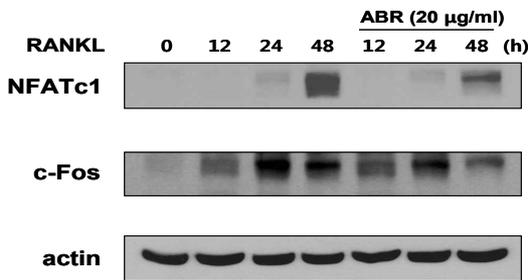


Fig. 4. ABR inhibits protein expression levels of NFATc1 and c-Fos induced by RANKL

BMMs were pre-treated in the presence or absence of ABR (20 μ g/ml) for 1 h. And then stimulated with RANKL (100 ng/ml) for the indicated time. Cell lysates were prepared and analyzed by Western blotting with NFATc1, c-Fos, and actin antibodies.

5. 우슬 물 추출물의 RANKL로 자극한 파골세포 유도인자 억제효과

RANKL 신호에 발현되는 특정 유전자들은 파골세포의 분화를 조절하는 기능을 한다. 특히 c-Fos는 파골세포 분화 초기 단계에 중요한 전사인자로 NFATc1의 발현을 조절하며 또한 NFATc1은 OSCAR (osteoclast-associated receptor)와 TRAP 유전자의 발현을 조절한다. 또한 FcR γ (Fc receptor common γ subunit)와 DAP12 (DNAX-activating protein 12)는 calcium signaling을 통하여 파골세포 분화를 조절한다. 그리하여 파골세포 분화와 밀접한 관련이 있는 유도인자에 우슬 물 추출물이 미치는 효과를 확인하기 위하여 RANKL로 유도되는 NFATc1, c-Fos, TRAP, OSCAR, FcR γ , DAP12의 mRNA 발현정도를 RT-PCR 방법으로 검증하였다. 대식세포에 M-CSF

(20 ng/ml)와 RANKL (100 ng/ml)을 처리한 후 각 군별로 우슬을 처리하거나 처리하지 않고 배양하여 배양세포를 시간별로 취합하였다. RANKL은 NFATc1, c-Fos, TRAP, OSCAR mRNA의 발현을 촉진하였지만 우슬에 의해 유의하게 억제되었다(Fig. 5A). 또한 RANKL에 의해 발현된 FcR γ 와 DAP12는 우슬에 의한 차이를 보이지 않았다. 발현된 유전자의 정도를 densitometric analysis를 이용하여 수치화하였다(Fig. 5B). 이는 앞서 밝힌 NFATc1, c-Fos 단백질 발현억제와 일치하는 결과 우슬은 파골세포 분화과정 중 NFATc1과 c-Fos를 확실히 억제하고 이를 통해 관련 유전인자를 억제한다는 것을 확인하였다.

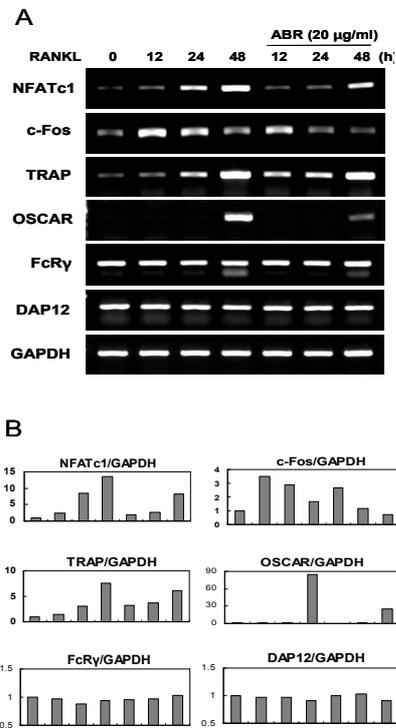


Fig. 5. Inhibitory effect of ABR on RANKL-induced gene expression

A : BMMs were cultured with M-CSF (20 ng/ml) and RANKL (100 ng/ml) in the presence or absence of ABR (20 μ g/ml) for the indicated time. The mRNA expression levels of the genes were determined by RT-PCR.

B : Gene expression levels of each genes are measured by densitometric analysis.

6. LPS-유도 골 손실에 미치는 우슬 물 추출물의 효과

앞선 실험에서 파골세포 분화의 세포 내 조건에 대한 우슬의 활성을 관찰하였다. 이번 실험에서는 생체 내에서 우슬 물 추출물이 미치는 영향을 검증하고자 염증성 골 손실 동물모델을 사용하였다. 생쥐 복강에 LPS를 주사하고 우슬을 경구 투여하여 LPS로 유도되는 골 손실에 대

한 우슬의 억제효과를 Nano-CT를 이용하여 확인하였다. LPS만 단독처리한 대조군에서 소주골(trabecular bone)의 골 손실을 확인할 수 있었고, 우슬을 함께 투여한 실험군에서는 LPS에 의한 골 손실이 억제되는 것을 관찰하였다(Fig. 6A). 또한 시각화된 CT상의 데이터를 수치화하기 위해 Bone volume/Tissue volume을 측정하여 우슬을 투여한 군과 LPS군과의 통계적인 차이를 확인하였다(Fig. 6B). 이 결과 우슬은 세포 내 조건뿐만 아니라 생체 내 조건에서도 염증을 동반한 골 손실을 억제하는 것으로 사료된다.

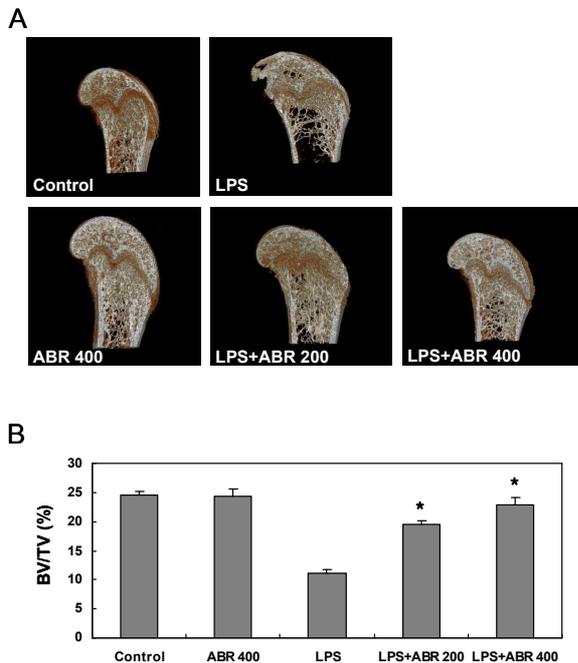


Fig. 6. ABR rescued bone-loss induced by LPS in mice

A : mice were oral-treated with ABR (200 or 400 mg/kg/day) or PBS for every 10 days. LPS (5 μ g/g of body weight) or 1 \times PBS was administered intraperitoneally on days 4 and 7, and the femurs were collected on day 10 after the first treat of ABR. Radiographs were taken with a Nano-CT.

B : bone volume/Tissue volume (BV/TV) was analyzed using the histomorphometric results. Asterisks indicate statistical difference from the LPS group. (* $p < 0.05$, significantly different from the control).

고찰

골은 몸의 형태를 유지하고 주요 장기를 외부의 충격으로부터 보호하며 칼슘과 인 등의 미네랄을 저장하여 혈액세포를 만들어내는 조절작용을 한다. 골밀도와 강도의 향상성은 골을 생성하는 조골세포와 골의 재흡수를 담당하는 파골세포 사이의 정교한 평형조절에 의해 유지된다. 골다공증은 estrogen 부족, 부갑상선 기능 항진증, corticosteroid 호르몬 및 각종 염증상황에 의해 야기되어 작은 충격에도 고관절, 척추, 손목 부위에 쉽게 골절이

생기는 질병이다²⁰. 파골세포는 조혈모세포에서 유래하여 골을 부식시키도록 특화된 세포인데 그 수와 활성이 과도하게 증가되면 골다공증이 발병한다. 따라서 이번 연구에서 골다공증에 핵심적인 역할을 하는 파골세포의 분화에 우슬 물 추출물의 효과를 검증하였다. 그 결과 우슬이 농도 의존적으로 파골세포의 분화를 현저하게 억제하는 것을 관찰하여 우슬이 파골세포 분화에 직접적인 영향을 미치는 것을 확인하였다(Fig. 1). 또한 세포독성검사를 통해 그 억제효과가 파골전구세포에 대한 약물의 독성작용에 의한 것이 아님을 확인하였다(Fig. 2).

파골세포는 시작, 분화, 다핵화, 다핵화된 파골세포의 성숙화 등 복잡한 과정에 의해 형성되는데, 여러 사이토카인과 호르몬, 유전자의 조절을 받는다²¹. 이 중 분화에 가장 중요한 두 사이토카인은 M-CSF와 RANKL이다. M-CSF에 의한 C-FMS의 활성화는 파골전구 대식세포의 증식과 생존에 필수적인데, M-CSF 유전자의 기능을 상실시킨 생쥐(*op/op* mice)에서 조직 대식세포의 수가 급감하고 파골세포의 감소로 인한 골화석증의 표현형을 보인다는 보고를 통해 확인할 수 있다²². RANKL은 TNF계열의 사이토카인으로 조골세포의 막에 붙어있으며 파골전구세포에 붙어있는 수용체인 RANK와 결합하여 파골세포로의 분화를 개시한다. 미끼 수용체인 OPG (osteoprotegerin) 역시 조골세포에서 생산되며 RANK와 결합을 통해 RANKL/RANK 결합을 방해한다. 최근의 연구에서 OPG가 출생 후 골격의 발달과 항상성에 주요하게 조절작용을 하는 것으로 밝혀졌다. OPG를 암호화하는 염색체 8q24.2 부위 TNFRSF11B 유전자의 삭제는 청소년기 파켓병(juvenile Paget's disease)과 관련 있는 것으로 밝혀졌다²³. RANKL/RANK 결합은 RANK와 결합되어 있는 부작분자인 TRAF6를 활성화 한다. 6가지의 TRAF 계열 단백질(TRAF1-TRAF6) 중 TRAF6가 파골세포의 분화에 가장 중추적인 역할을 하는데, TRAF6가 결여된 생쥐는 파골세포 형성의 방해로 인해 심각한 골화석증을 보인다는 연구결과를 통해 확인할 수 있다²⁴. TRAF6가 활성화 되면 IKK a와 b (I- κ B kinases a and b), MKK (MAP kinases), ERK, JNK, p38 MAPK 등 하위 신호경로의 자극으로 인해 분화가 진행된다. IKK의 활성화는 세포질 내에서 NF- κ B와 복합체를 형성하고 있는 I- κ B의 분해를 유도하고 이에 따라 NF- κ B가 핵 내로 이동하여 전사인자로서의 역할을 수행하도록 유도한다. 파골세포 분화에서 NF- κ B의 역할은 매우 중요한데, 구성단위인 p50과 p52를 모두 결여시킨 생쥐는 파골세포 분화가 억제되어 골경화증을 보인다²⁵. 또한 NF- κ B의 핵으로의 이동은 RANK로 유도된 PLC를 통한 Ca^{2+} 의 상승에 의해서도 촉진된다는 보고가 있다²⁶. 이에 이번 연구에서 RANKL 신호에 의해 I- κ B가 분해되어 NF- κ B가 핵 내로 이동한 뒤 시작되는 파골세포의 분화과정을 우슬이 효과적으로 억제한다는 것을 증명하였다. JNK 경로 또한 파골세포 분화과정에 중요한데, RANK의 과발현이 JNK와 NF- κ B의 활성화를 높인다는 보고를 통해 확

인할 수 있다²⁷⁾. 이번 연구를 통해 RANKL로 유도한 JNK의 발현을 우슬이 의미있게 억제하는 것을 증명하였다. 또다른 MAPK인 ERK와 p38 역시 파골세포 분화나 생존에 관련되어있다. ERK는 파골세포의 분화뿐만 아니라 생존에 기능적 역할을 하는 것으로 보고되었고^{28,29)}, p38은 파골세포 분화에 집중적인 영향을 미친다는 보고가 있다^{29,30)}. 또한 RAW264 세포가 유사파골세포로 분화하는데 p38 MAP kinase inhibitor인 SB203580를 처리하여 파골세포 형성에 p38의 중요성을 입증한 연구가 있다³¹⁾. 이번 연구를 통해 우슬이 RANKL에 의해 발현되는 p38의 발현을 억제하였지만 ERK의 발현은 억제하지 못하는 것을 증명하였다. 종합해보면 우슬에 의한 파골세포 분화의 주요 억제기전은 NF- κ B, JNK, p38 신호경로의 차단을 통한 것으로 사료된다(Fig. 3). 한 가지 흥미로운 점은 우슬을 처리한 0분에서 JNK와 p38이 활성화 된다는 것인데 이 같은 경우를 기존의 다른 연구에서 찾아볼 수 있고³²⁾, 그 원인은 열, U.V., 삼투압 등 세포에 대한 스트레스로 인한 것인데, 그 근거를 JNK, p38과 세포사멸 스트레스 반응과의 관련성에 관한 보고를 통해 찾아볼 수 있다³³⁾.

RANKL에 의해 MAPKs가 인산화 되면 PU1, MITF, AP-1, NFATc1 등을 활성화시키고 핵 안에서 복합체를 형성하게 하여 이 복합체에 의해 파골세포 분화에 중요한 유도인자를 촉진하게 된다. 특히 NFATc1은 파골세포 분화에 결정적인 조절인자로 알려져 있는데, NFATc1 (-/-) 배아줄기 세포는 파골세포로의 분화가 불가능하고 NFATc1의 무작위 발현은 RANKL이 없는 상황 하에서도 파골세포의 분화를 유도한다는 보고를 통해 확인할 수 있다³⁴⁾. AP-1은 전사인자로서 Fos (c-Fos, FosB, Fra-1, Fra-2)와 Jun (c-Jun, JunB, JunD) 그리고 ATF (ATFa, ATF2, ATF3, ATF4, B-ATF)로 구성되어 있다^{35,36)}. 이 중 c-Fos는 RANKL에 의하여 파골세포 분화 초기에 발현되며 NFATc1의 발현을 조절하는 매우 중요한 인자인데³³⁾, c-Fos의 기능을 상실시킨 생쥐모델에서는 파골세포 분화의 완벽한 차단을 통해 심각한 골경화증을 보인다는 보고가 있다³⁷⁾. 따라서 파골세포 분화에 필수적인 NFATc1과 c-Fos의 발현에 우슬이 미치는 영향을 연구하였다. 그 결과 NFATc1과 c-Fos 모두 RANKL의 영향 하에 시간 의존적으로 발현되지만 우슬을 처리하면 발현이 억제된다는 것을 단백질 수준과 mRNA 수준에서 일관되게 입증하였다(Fig. 4, 5). NFATc1의 핵으로의 이동은 RANKL로 유도되는 칼슘진동(Ca^{2+} oscillation)과 Ca^{2+} /calmodulin에 의존적인 calcineurin이라는 serine/threonine phosphatase와 관련이 있다³⁸⁾. 핵으로 이동한 NFATc1은 파골세포에 특이적인 유전자인 cathepsin K, TRAP, CTR (calcitonin receptor), OSCAR, β -integrin 등의 다양한 유전자 발현을 조절한다^{39,40)}. 이번 연구에서 RANKL에 의한 TRAP과 OSCAR의 발현이 우슬에 의해 억제되는 것을 관찰하였고, 이는 NFATc1의 억제를 통한 효과라 사료된다. 한편 FcR γ , DAPI2는 연관된 immunoglobulin-like 수용체

를 통한 calcium signaling의 활성화로 NFATc1의 발현을 유도하여 파골세포를 형성하는데 FcR γ 와 DAPI2의 기능을 모두 결여시킨 생쥐는 파골세포 분화억제를 통한 화석화된 골의 표현형을 보인다는 연구가 있다⁴¹⁾. 하지만 우슬이 FcR γ 와 DAPI2의 mRNA 발현에 의미있는 억제 작용을 하지 못하는 것으로 미루어 볼때 우슬의 분화억제효과는 calcium signaling과는 관련성이 없는 것으로 사료된다(Fig. 5).

생체 내 우슬의 효과를 규명하기 위해 LPS로 유도시킨 골 손실모델을 사용하였다. LPS는 그람음성균의 세포벽 구성성분으로 염증성 물질의 생산을 자극하여 파골전구세포의 용해를 유도하고, 성숙한 파골세포의 생존을 유지시키며 골 파괴를 진행시킨다⁴²⁾. LPS와 TLR4 (toll-like receptor 4)의 결합은 NF- κ B와 AP-1을 활성화 하고, IL-1, IL-6, IL-12, TNF- α 와 같은 염증성 사이토카인의 생성을 유도하는데⁴³⁾, 우슬은 LPS로 유도된 골 손실을 거의 완벽하게 억제하였다(Fig. 6). 이는 우슬이 LPS 유도로 증가되는 염증성 사이토카인이나 PGE₂ (prostaglandin E₂)와 같은 염증성 매개물질에 대한 억제가능성을 제시하는 것이고, 폐경 후 골다공증이나 퇴행성 골다공증뿐만 아니라 만성 염증이나 감염에 의한 염증성 골다공증 치료의 가능성을 보여주는 것이다.

우슬은 임상에서 각종 골 질환에 탁월한 효과를 보이며 널리 쓰이고 있는 천연물이다. 우리는 이번 연구를 통해 우슬 물 추출물이 골다공증을 유발하는 세포 내 상황에서 파골세포의 분화를 억제하는 기전을 밝히고, 생체 내 상황에서도 염증성 골 손실을 억제한다는 결과를 도출하였다. 이 결과를 통해 최근 가속화되고 있는 고령화 사회 속에서 우슬이 골다공증 예방 및 치료제 개발에 중요한 후보물질이 될 수 있을 것으로 기대한다.

결론

이번 연구를 통해 우슬 물 추출물의 효과로 RANKL로 유도되는 파골세포 분화과정이 억제됨을 규명하여 퇴행성 및 염증성 골다공증 치료제로서의 가능성을 제시하고자 하였다.

1. 우슬 물 추출물은 RANKL로 유도된 파골세포의 분화를 현저하게 억제하였으며 이는 세포독성에 의한 효과가 아니었다.
2. 우슬 물 추출물은 RANKL로 유도되는 MAPKs 중 p38, JNK, NF- κ B의 인산화를 억제하는 반면, ERK의 인산화는 억제하지 못하였다. 이를 통해 우슬에 의한 파골세포 분화억제 경로가 p38, JNK, NF- κ B임을 증명하였다.
3. 우슬 물 추출물은 RANKL로 유도되는 NFATc1, c-Fos의 단백질 발현을 억제하였고 NFATc1, c-Fos, TRAP, OSCAR의 mRNA 발현을 억제한 반면

FcR γ , DAP12 발현에는 영향을 주지 못했다.

4. 우슬 물 추출물은 생쥐에서 LPS로 유도된 염증성 골 손실을 억제하였다.

참고문헌

1. National Osteoporosis Foundation. America's Bone Health. The State of Osteoporosis and Low Bone Mass in Our Nation. Washington, DC : National Osteoporosis Foundation. 2002.
2. Reginster JY, Burlet N. Osteoporosis : a still increasing prevalence. *Bone*. 2006 ; 38 : S4-S9.
3. Burge R, Dawson-Hughes B, Solomon DH, Wong JB, King A, Tosteson A. Incidence and economic burden of osteoporosis-related fractures in the United States, 2005-2025. *J Bone Miner Res*. 2007 ; 22 : 465-75.
4. Alliston T, Derynck R. Interfering with bone remodelling. *Nature*. 2002 ; 416 : 686-7.
5. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*. 2003 ; 423 : 337-42.
6. Darnay BG, Ni J, Moore PA, Aggarwal BB. Activation of NF- κ B by RANK requires tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 6 and NF- κ B-inducing kinase. Identification of a novel TRAF6 interaction motif. *J Biol Chem*. 1999 ; 274 : 7724-31.
7. Lee ZH, Kim HH. Signal transduction by receptor activator of nuclear factor kappa B in osteoclasts. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003 ; 305 : 211-4.
8. Chesnut CH III, Skag A, Christiansen C, Recker R, Stakkestad JA, Hoiseth A. Effects of oral ibandronate administered daily or intermittently on fracture risk in postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res*. 2004 ; 19 : 1241-9.
9. Ringe JD, Dorst A, Faber H, Ibach K, Sorenson F. Intermittent intravenous ibandronate injections reduce vertebral fracture risk in corticosteroid-induced osteoporosis : results from a long-term comparative study. *Osteoporos Int*. 2003 ; 14 : 801-7.
10. Ettinger B, Black DM, Mitlak BH, Knickerbocker RK, Nickelsen T, Genant HK. Reduction of vertebral fracture risk in postmenopausal women with osteoporosis treated with raloxifene: results from a 3-year randomized clinical trial. Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation (MORE) Investigators. *JAMA*. 1999 ; 282 : 637-45.
11. Neer RM, Arnaud CD, Zanchetta JR, Prince R, Gaich GA, Reginster JY. Effect of parathyroid hormone (1-34) on fractures and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. *N Engl J Med*. 2001 ; 344 : 1434-41.
12. Kwak HB, Kim JH, Kim DJ, Kwon YM, Oh JM, Kim YK. Effect of Water Extract of Deer Antler in Osteoclast Differentiation. *Korean J Oriental Physiology & Pathology*. 2008 ; 22(4) : 891-5.
13. Park CK, Kim HJ, Kwak HB, Lee TH, Bang MH, Kim CM, Lee Y, Chung DK, Baek NI, Kim J, Lee ZH, Kim HH. Inhibitory effects of *Stewartia koreana* on osteoclast differentiation and bone resorption. *International Immunopharmacology*. 2007 ; 7 : 1507-16.
14. Han KY, Yang D, Chang EJ, Lee Y, Hao Huang, Sung SH, Lee ZH, Kim YC, Kim HH. Inhibition of osteoclast differentiation and bone resorption by sauchinone. *Biochemical Pharmacology*. 2007 ; 74 : 911-23.
15. Tsai HY, Lin HY, Fong YC, Wu JB, Chen YF, Tsuzuki, Tang CH. Paeonol inhibits RANKL-induced osteoclastogenesis by inhibiting ERK, p38 and NF- κ B pathway. *European Journal of Pharmacology*. 2008 ; 588 : 124-33.
16. Juan Li, Hui Qi, Lian-Wen Qi, Ling Yi, Ping Li. Simultaneous determination of main phytoecdysones and triterpenoids in *Radix Achyranthis Bidentatae* by high-performance liquid chromatography with diode array-evaporative light scattering detectors and mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. 2007 ; 596 : 264-72.
17. Lu T, Mao C, Zhang L, Xu W. The research on analgesic and anti-inflammatory action of different processed products of *Achyranthes bidentata*. *Zhong Yao Cai*. 1997 ; 20(10) : 507-9.
18. Chen XM, Tian GY. Structural elucidation and antitumor activity of a fructan from *Cyathula officinalis* Kuan. *Carbohydr Res*. 2003 ; 338(11) : 1235-41.
19. Gao XY, Wang DW, Li FM. Determination of ecdysterone in *Achyranthes Bidentata* Bl and its activity promoting proliferation of osteoblast-like cells. *Yao Xue Xue Bao*. 2000 ; 35(11) : 868-70.
20. Rodan GA, Raisz LG, Bilezikian JP. Principles of bone biology. *Pathophysiology of osteoporosis*. 2002 ; 1275-89.
21. Yavropoulou MP, Yovos JG. Osteoclastogenesis Current knowledge and future perspectives. *J*

- Musculoskelet Neuronal Interact. 2008 ; 8(3) : 204-16.
22. Dai XM. Targeted disruption of the mouse colony-stimulating factor 1 receptor gene results in osteopetrosis, mononuclear phagocyte deficiency, increased primitive progenitor cell frequencies, and reproductive defects. *Blood*. 2002 ; 99 : 111-28.
 23. Whyte MP, Obrecht SE, Finnegan PM, Jones JL, Podgornik MN, McAlister WH, Mumm S. Osteoprotegerin deficiency and juvenile Paget's disease. *N Engl J Med*. 2002 ; 347 : 175-84.
 24. Kobayashi T, Walsh PT, Walsh MC, Speirs KM, Chiffolleau E, King CG, Hancock WW, Caamano JH, Hunter CA, Scott P, Turka LA, Choi Y. TRAF6 is a critical factor for dendritic cell maturation and development. *Immunity*. 2003 ; 19 : 353-63.
 25. Iotsova V, Caamano J, Loy J, Yang Y, Lewin A, Bravo R. Osteopetrosis in mice lacking NF- κ B1 and NF- κ B2. *Nat Med*. 1997 ; 3 : 1285-9.
 26. Komarova SV, Pilkington MF, Weidema AF, Dixon SJ, Sims SM. RANK ligand-induced elevation of cytosolic Ca²⁺ accelerates nuclear translocation of NF- κ B in osteoclasts. *J Biol Chem*. 2003 ; 278 : 8286-93.
 27. Hsu H, Lacey DL, Dunstan CR, Solovyev I, Colombero A, Timms E, Tan HL, Elliott G, Kelley MJ, Sarosi I, Wang L, Xia XZ, Elliott R, Chiu L, Black T, Scully S, Capparelli C, Morony S, Shimamoto G, Bass MB, Boyle WJ. Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999 ; 96 : 3540-5.
 28. Lee SE, Chung WJ, Kwak HB, Chung CH, Kwack KB, Lee ZH. Tumor necrosis factor- α supports the survival of osteoclasts through the activation of Akt and ERK. *J Biol Chem*. 2001 ; 276 : 49343-9.
 29. Lee SE, Woo KM, Kim SY, Kim HM, Kwack K, Lee ZH. The phosphatidylinositol 3-kinase, p38, and extracellular signal-regulated kinase pathways are involved in osteoclast differentiation. *Bone*. 2002 ; 30 : 71-7.
 30. Li X, Udagawa N, Itoh K, Suda K, Murase Y, Nishihara T. p38 MAPK-mediated signals are required for inducing osteoclast differentiation but not for osteoclast function. *Endocrinology*. 2002 ; 143 : 3105-13.
 31. Matsumoto M, Sudo T, Saito T, Osada H, Tsujimoto M. Involvement of p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway in osteoclastogenesis mediated by receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL). *J Biol Chem*. 2000 ; 275 : 31155-61.
 32. Kwak HB, Lee SW, Li YJ, Kim YA, Han SY, Jhon GJ, Kim HH, Lee ZH. Inhibitory of osteoclast differentiation and bone resorption by a novel lysophosphatidylcholine derivative, SCOH. *Biochemical Pharmacology*. 2004 ; 67 : 1239-48.
 33. Basu S, Kolesnick R. Stress signals for apoptosis: ceramide and c-Jun kinase. *Oncogene*. 1998 ; 17 : 3277-85.
 34. Takayanagi H, Kim S, Koga T, Nishina H, Isshiki M, Yoshida H, Saiura A, Isobe M, Yokochi T, Inoue J, Wagner EF, Mak TW, Kodama T, Taniguchi T. Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts. *Dev Cell*. 2002 ; 3 : 889-901.
 35. Eferl R, Wagner EF. AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer*. 2003 ; 3 : 859-68.
 36. Wagner EF, Eferl R. Fos/AP-1 proteins in bone and the immune system. *Immunol Rev*. 2005 ; 208 : 126-40.
 37. Wang ZQ, Ovitt C, Grigoriadis AE, Mohle-Steinlein U, Ruther U, Wagner EF. Bone and haematopoietic defects in mice lacking c-fos. *Nature*. 1992 ; 360 : 741-5.
 38. Hiroshi Takayanagi. Amazing multifunctionality of calcineurin and NFAT signaling in bone homeostasis. *BoneKEy-Osteovision*. 2006 ; 3 : 28-31.
 39. Matsumoto M, Kogawa M, Wada S, Takayanagi H, Tsujimoto M, Katayama S, Hisatake K, Nogi Y. Essential role of p38 mitogen-activated protein kinase in cathepsin K gene expression during osteoclastogenesis through association of NFATc1 and PU.1. *J Biol Chem*. 2004 ; 279 : 45969-79.
 40. Kim Y, Sato K, Asagiri M, Morita I, Soma K, Takayanagi H. Contribution of NFATc1 to the transcriptional control of immunoreceptor OSCAR but not TREM-2 during osteoclastogenesis. *J Biol Chem*. 2005 ; 280 : 32905-13.
 41. Mocsai A, Humphrey MB, Van Ziffle JA, Hu Y, Burghardt A, Spusta SC. The immunomodulatory adapter proteins DAP12 and Fc receptor γ -chain (Fc γ R) regulate development of functional osteoclasts through the Syk tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004 ; 101 : 6158-63.

42. Suda K, Woo JT, Takami M, Sexton PM, Nagai K. Lipopolysaccharide supports survival and fusion of preosteoclasts independent of TNF- α , IL-1, and RANKL. *J Cell Physiol.* 2002 ; 190 : 101-8.
43. Aderem A, Ulevitch RJ. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature.* 2000 ; 406 : 782-7.