

대추 물 추출물이 RANKL에 의해 유도되는 파골세포 분화에 미치는 영향

윤강휴¹ · 백종민¹ · 김주영² · 곽성철¹ · 천윤희¹ · 전병훈³ · 이창훈^{2,4} · 최민규^{1,5} · 오재민^{1,2} · 이명수^{2,4} · 김정중^{1*}

1: 원광대학교 의과대학 해부학교실 & 골격계질환연구소, 2: 의과대학 영상의학기반 폐 및 골 질환 연구센터,
3: 한의과대학 병리학교실 & 한국전통의학연구소, 4: 의과대학 류마티스내과학교실,
5: 의과대학 환경과학연구소

Inhibitory Effect on RANKL-Induced Osteoclast Differentiation by Water Extract of *Zizyphus Jujuba Mill*

Yoon Kang Hugh¹, Jong Min Baek¹, Ju Young Kim², Seong Cheoul Kwak¹, Yoon Hee Cheon¹,
Byung Hoon Jeon³, Chang Hoon Lee^{2,4}, Min Kyu Choi^{1,5}, Jaemin Oh^{1,2}, Myeung Su Lee^{2,4}, Jeong Joong Kim^{1*}

1: Department of Anatomy, Institute for Skeletal Disease,
2: Imaging Science-based Lung and Bone Diseases Research Center,
3: Department of Pathology, College of Korean Medicine & Research Center of Traditional Korean Medicine,
4: Department of Internal Medicine, Division of Rheumatology and Institute of Wonkwang Medical Science College of Medicine,
5: Institute for Environmental Science, Wonkwang University

Bone homeostasis is maintained by balance between bone resorbing-osteoclasts and bone forming-osteoblasts. Excessive osteoclastic bone resorption plays a critical role in bone destruction in pathological bone diseases such as osteoporosis, rheumatoid arthritis, and periodontal disease. Many compounds derived from natural products have pharmacological applications and have therapeutic value for treating or preventing several bone diseases characterized by excessive bone resorption. To discover new compounds that can act as anti-resorptive agents, we screened for natural compounds that regulate osteoclast differentiation, and found that water extract of *Zizyphus Jujuba Mill* (WEZJ) has inhibitory effects on osteoclast differentiation. In this study, WEZJ clearly inhibits the osteoclast differentiation in the presence of receptor activator of nuclear factor kB (RANKL), macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) without cytotoxicity by blocking activation of nuclear factor of activated T cells (NFAT)c1, and c-Fos. In signaling pathway, the phosphorylation of Akt, p38, c-Jun N-terminal kinases (JNK), extracellular signal-regulated kinases (ERK) and the expression of osteoclast-associated receptor (OSCAR), tartrate-resistant acid phosphates (TRAP), Integrin av, Integrin b3, Cathepsin K are suppressed, too. These result suggest that WEZJ may have therapeutic value for treating or preventing several bone diseases characterized by excessive bone destruction.

Key words : *Zizyphus Jujuba Mill*, Osteoclast, Differentiation, Bone resorption, Osteoporosis Therapy

서 론

골다공증은 낮은 골밀도로 인해 골강도가 약해지는 증상을 가지며 가벼운 충격에도 골절위험성이 큰 질환이다¹⁾. 이러한 골

다공증은 골을 형성하는 조골세포에 비해 골을 흡수하는 파골세포가 증가함으로써 골대사의 균형이 조절되지 못해 발생하며 그 원인으로는 폐경기 여성의 에스트로겐 결핍, 노화 등을 들 수 있다²⁻⁵⁾.

파골세포는 골수 내에서 혈액세포를 만들어내는 기능을 가지는 조혈모세포에서 유래되며, 단핵구/대식세포의 세포이동과 융합의 과정을 거치면서 성숙한 다핵형 파골세포로써 분화된다. 파골세포의 분화는 조골세포에서 분비되는 분화인자인 RANKL

* 교신저자 : 김정중, 전북 익산시 익산대로 460 원광대학교 의과대학
· E-mail : jjkim@wku.ac.kr, · Tel : 063-850-6760
· 접수 : 2013/12/06 · 수정 : 2013/12/29 · 채택 : 2014/01/20

과 그 수용체인 RANK의 결합을 시작으로, tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6)가 군집되고, 하위 경로인 MAP kinase의 p38, JNK, ERK와 NF- κ B, Akt의 인산화 과정 경로를 통하여 NFATc1의 전사활동이 일어나게 됨으로써 OSCAR, TRAP, Cathepsin K 등의 유전자가 발현되는 일련의 과정을 통해 일어나게 된다.

따라서 파골세포의 분화를 억제시키는 것은 골다공증을 치료하기 위해서 선택할 수 있는 방법 중 하나라고 할 수 있다. 임상에서는 골다공증을 치료하기 위해 파골세포의 기능을 억제시킴으로써 골 흡수를 줄이는 bisphosphonate 제제라는 약물을 사용한다⁶⁾. 이 bisphosphonate 약물에 의한 치료는 현대에서 자리를 확실하게 잡은 골다공증 치료법이라 여겨지며 대부분의 환자에게 최우선의 약물 치료로서 사용된다⁷⁾. 그러나 이 bisphosphonate 치료법은 몇몇 환자들에게 미비한 부작용을 일으키고, 소수의 환자들에게는 심각한 부작용을 일으킨다. 단기 부작용에는 급성기 반응, 근골격의 심한 고통, 저칼슘혈증 등이 있으며 장기 부작용에는 턱 부분의 골 괴사증, 심방 세동, 심한 골 교체 억제 등이 있어 때때로 치명적일 수 있다^{8,9)}. 따라서 부작용을 최소화하기 위해 천연자원으로부터 새로운 작용 및 약물 구조를 가지면서 독성과 부작용이 적은 골다공증의 예방 또는 치료에 효과적인 신물질을 찾고자하는 시도가 계속해서 이루어지고 있는 실정이다¹⁰⁻¹²⁾.

대추(*Zizyphus Jujuba Mill*)는 갈매나무과(Rhamnaceae)에 속하는 낙엽교목인 대추나무의 열매이다. 비타민 C, 비타민 A, 비타민 B군, 카로틴, 칼슘, 철, 인 등의 영양분이 많이 함유되어 있으며 또한 진정, 강장, 소염살균, 항 알러지 작용 등의 효과가 있다고 알려져 있다^{10,11)}. 하지만 지금까지 파골세포 분화와 관련된 보고는 전무하며, 골다공증과의 관계에 대해서도 거의 밝혀지지 않았다. 따라서, 본 연구에서는 대추 물 추출물이 파골세포의 분화에 어떠한 영향을 미치는지와 그 작용기전을 밝혀내어 대추가 가지는 골다공증 치료제로서의 가능성을 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 시료 및 실험재료

본 연구에 사용한 대추 추출물은 전통적인 생약추출방법인 약탕기를 사용하여 추출한 후 여과하여 동결 건조한 것으로 한국생명공학연구원 한국식물추출물은행에서 구입하였다. 대추는 멸균한 3차 증류수에 희석하여 사용하였다. TRAP 용액과 β -actin 항체는 Sigma Aldrich (St.Louis, MO, USA) 제품을 사용하였고, XTT (2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulphophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide) assay kit는 Roche (Indianapolis, IN, USA)에서 구입하였다. 세포배양 및 파골세포 분화를 위해 필요한 Human receptor activator nuclear factor kappaB ligand (RANKL)과 macrophage colony-stimulating factor (M-CSF)는 peprotech (London, UK)사의 제품을 사용하였으며, α -minimum essential medium (MEM), fetal bovine serum (FBS) 및 penicillin-streptomycin 등은 Gibco-BRL (Grand Island,

NT, USA)에서 구입하였다. Western blotting을 위한 1차 항체는 Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA)사의 p-p38, p38, p-JNK, JNK, p-ERK, ERK, p-I κ B, I κ B, p-Akt와 Akt 항체를 사용하였고 NFATc과 c-Fos에 대한 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)사에서 구입하였다. 2차 항체 anti-mouse와 anti-rabbit은 Amersham Pharmacia Biotechnology Inc. (Tokyo, Japan)에서 구입하였다. F-actin을 염색하는 데에 필요한 phalloidin과 DAPI는 Life technology (Seoul, Korea)에서 구입하였다.

2. 파골세포의 분화

골수세포를 분리하기 위하여 생후 5주령 ICR mouse를 경추 탈골법으로 희생시킨 후, 대퇴골과 경골을 무균적으로 적출하고 연조직을 제거하였다. 장골의 양끝을 절단한 후 양쪽 끝의 골수강에 1 ml의 주사기를 이용하여 뼈의 속질을 수세함으로써 골수세포를 얻었다. 분리된 골수세포는 10% FBS와 1% penicillin/streptomycin이 포함된 α -MEM 배지에서 1일간 배양한 후 미부착세포를 모았다. 파골세포의 전구세포가 되는 미부착세포를 10% FBS, 1% penicillin/streptomycin과 M-CSF (30 ng/ml)이 포함된 α -MEM 배지에서 3일간 배양하였다. 3일 후, 부착된 대식세포를 사용하여 실험하였다. 대식세포는 M-CSF (30 ng/ml)와 RANKL (100 ng/ml)을 처리하여 배양하면서 대추 물 추출물을 50, 100, 200 μ g/ml의 농도별로 처리하였다. 3일 후, 같은 조건으로 media change를 하였고 다음 날, 배양한 세포를 TRAP 용액으로 염색하고 붉은색으로 염색된 세포를 세워서 분화 정도를 확인하였다.

3. 세포 독성검사

대식세포는 1×10^4 /well의 밀도로 96-well plate에 첨가하고 M-CSF (30 ng/ml)와 대추 물 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. Filamentous-actin (f-actin) assay

골수대식세포를 48-well plate에 동일한 농도의 RANKL (100 ng/ml)과 M-CSF (30 ng/ml)처리 후 대추 물 추출물을 50, 100, 200 μ g/ml의 농도별로 처리하였다. 3일 후, 같은 조건으로 media change를 하였다. 다음날 배양한 세포를 3.7% 포르말린으로 20분간 처리한 후 0.1% Triton X-100으로 15분, 2.5% BSA으로 30분 각각 처리한다. 그 후 phalloidin (BSA 2.5%, 1:500)으로 30분간 암실에서 처리를 하며 30분이 끝나기 3분 전에 DAPI를 처리해준다. 모든 과정 사이에 PBS로 washing을 해주며, 모든 과정이 완료된 후 암실에서 현미경으로 촬영한다.

5. Western blot analysis

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 PVDF 멤브레인 (Amersham Biosciences)으로 옮기고 PVDF막은 5% non-fat dry milk를 처리하여 비특이 단백질이 붙는 것을 방지하였다. 그리고 1차 항체 및 2차 항체를 처리했다. TBS-T 완충 용액으로 PVDF막을 세척하고 enhanced chemiluminescence를 이용해 빛을 차단하여 단백질 발현을 관찰하였다.

6. 역전사중합효소 연쇄반응 (RT-PCR) 분석

세포 내 총 RNA는 QIAzol lysis reagent (QIAGEN, Valencia, CA, USA)로 설명서에 따라 추출하였다. 동등한 양의 RNA는 TOPscript cDNA synthesis kit (Enzynomics, Daejeon, Korea)를 사용하여 cDNA를 합성하였다. cDNA 1 µg은 다음과 같은 각각의 primer를 이용하여 PCR을 수행하였다.

c-Fos forward, 5'-CTGGTGCAGCCCACTCTGGTC-3';
 c-Fos reverse, 5'-CTTTCAGCAGATTGGCAATCTC-3';
 NFATc1 forward, 5'-CAACGCCCTGACCCGATAG-3';
 NFATc1 reverse, 5'-GGCTGCCTCCGTCTCATAGT-3';
 TRAP forward, 5'-ACTTCCCCAGCCCTTACTAC-3';
 TRAP reverse, 5'-TCAGCACATAGCCACACCG-3';
 OSCAR forward, 5'-CTGCTGGTAACGGATCAGCTCCCCAGA-3';
 OSCAR reverse, 5'-CCAAGGAGCCGAACCTTGGAAACT-3';
 Cathepsin K forward, 5'-CACTGCTCTCTCAGGGCTT-3';
 Cathepsin K reverse, 5'-ACGGAGGCATTGACTCTGAA-3';
 Integrin av forward, 5'-TTGTGCGCCTTACGAGAA-3';
 Integrin av reverse, 5'-GCAGATGGCATGCCACAGG-3';
 Integrin b3 forward, 5'-TCTCTGCGTCCGCTACAAA-3';
 Integrin b3 reverse, 5'-CCCTGGGACACTCAGGCTC-3';
 GAPDH forward, 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3';
 GAPDH reverse, 5'-TCCACCACCTGTTGCTGTA-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.

7. 통계분석

각각의 실험군은 3개 이상 수행하였고 평균값과 표준편차를 계산하였다. 모든 실험은 3회 이상 반복하여 동일한 실험결과를 얻은 경우 실험결과로 사용하였으며, 정량적인 결과의 통계는 Student's t-test를 이용하여 분석하였고 p 값이 0.05 이하인 경우 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

결 과

1. 대추 물 추출물이 TRAP 양성 파골세포 분화에 미치는 영향

TRAP은 파골세포의 특이한 표지자로 알려져 그 활성도를 통해 골 흡수의 활성을 측정할 수 있다. 따라서 대추 물 추출물이 파골세포 분화에 미치는 영향을 알아보기 위해 M-CSF와 RANKL을 각 군에 동일한 농도로, 대추 물 추출물을 농도별로

처리한 후 4일 동안 배양하였다. 그 결과 대추 물 추출물이 첨가되지 않은 대조군에서는 TRAP 양성 파골세포가 많이 생성되었으나, 대추 물 추출물이 첨가된 실험군에서는 농도 증가에 따라 TRAP 양성 파골세포 형성이 줄어드는 것을 확인할 수 있었으며 (Fig. 1A), 직접 세어본 결과 TRAP 양성 파골세포의 수가 대추 물 추출물 농도에 따라 줄어드는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1B). 이러한 결과가 대추 물 추출물의 세포 독성에 의한 것인지 여부를 확인하기 위하여 XTT실험을 실행하였고 대추 물 추출물이 첨가되지 않은 대조군과 농도 별로 첨가된 실험군의 흡광도에서 의미 있는 차이가 관찰되지 않았으므로(Fig. 1C) 대추 물 추출물이 세포 독성 없이 파골세포의 분화를 억제한다는 것을 알 수 있었다.

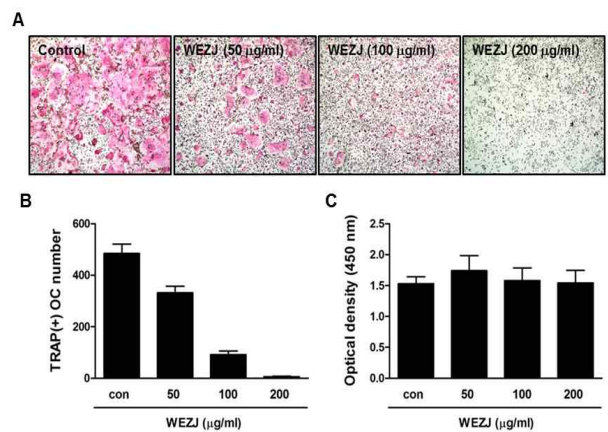


Fig. 1. Inhibition effect on osteoclast differentiation by water extract of *Zizyphus Jujuba Mill* (WEZJ). (A) BMMs were cultured for 4 days with M-CSF and RANKL in the presence and absence of WEZJ. Cells were fixed in 3.7% formalin, permeabilized with 0.1% Triton X-100, and stained with TRAP solution. TRAP-positive cells were photographed under a light microscope (100× magnification). (B) TRAP-positive cells were counted as osteoclasts. $p < 0.05$ vs control. (C) BMMs were seeded into a 96-well plate and cultured for 3 days in the presence of M-CSF and with the indicated concentrations of WEZJ. After 3 days, the absorbance was measured at 450 nm using an ELISA reader.

2. 대추 물 추출물이 f-actin ring 형성에 미치는 영향

대추 물 추출물이 농도 별로 다르게 첨가된 실험군과 첨가되지 않은 대조군을 각각 4일간 배양한 후 phalloidin과 DAPI를 이용하여 염색시켜 비교하였다. 대조군의 경우 f-actin ring이 가장 선명하며 세포들이 활발하게 뭉쳐 있지만 대추 물 추출물 처리된 실험군은 농도의 증가에 따라 f-actin ring이 적어지며 발선 명도가 약해짐을 확인할 수 있었다(Fig. 2). f-actin ring의 형성은 파골세포의 뼈 흡수를 위한 전제 조건으로 f-actin ring의 형성이 억제되었다는 것은 뼈 흡수가 가능한 단계로의 분화가 억제된 것이라고 유추할 수 있다.

3. RANKL에 의한 초기 신호전달 체계에 미치는 대추 물 추출물의 영향

대추 물 추출물의 파골세포 분화를 억제하는 작용기전을 규명하기 위해 필요한 정보인 RANKL에 의한 초기 신호전달 체계의 활성화에 대추 물 추출물이 미치는 영향을 보여주는 결과이다.

실험군의 골수대식세포를 대추 물 추출물로 전 처리한 후 RANKL을 실험군, 대조군에 첨가하여 각각 0, 5, 15, 30분 동안을 반응시킨 뒤 Akt, p38, ERK, JNK, 그리고 IκB의 활성을 시간대 별로 확인하였다. 대조군과 비교하였을 때 Akt, p38, ERK, 그리고 JNK의 인산화가 줄어든 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 3). 이 결과를 통해 대추 물 추출물이 파골세포 분화를 억제하는 작용 기전이 Akt, p38, ERK, 그리고 JNK의 인산화 억제와 관련이 있음을 알 수 있었다.

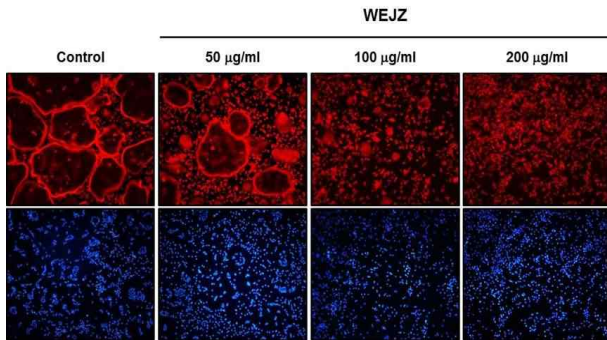


Fig. 2. Effect of water extract of *Zizyphus Jujuba Mill* (WEZJ) on f-actin ring formation. BMMs were cultured for 4 days with M-CSF and RANKL in the presence and absence of WEZJ. Cells were fixed in 3.7% formalin, permeabilized with 0.1% Triton X-100, stained with phalloidin and DAPI in darkness.

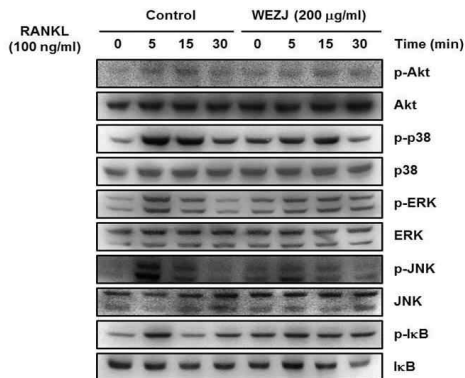


Fig. 3. Effect of water extract of *Zizyphus Jujuba Mill* (WEZJ) on phosphorylation of RANK signaling pathway. BMMs were starved for 3 h, pretreated with WEZJ for 1 h and then stimulated with RANKL for the indicated times. The cell were lysed in lysis buffer then resolved by SDS-PAGE and western blotting with primary antibody against p-p38, p38, p-Akt, Akt, p-IκB, IκB, p-JNK, JNK, p-ERK and ERK and secondary antibody (anti-rabbit, anti-mouse).

4. 대추 물 추출물이 RANKL에 의한 파골세포 분화와 관련된 유전자 발현에 미치는 영향

RANKL이 RANK와 결합함으로써 파골세포의 분화와 관련된 유전자의 발현을 돕는다. 파골세포의 분화와 관련된 대표적인 유전자 c-Fos, NFATc1, OSCAR, TRAP, Integrin αv, Integrin β3, 그리고 Cathepsin K의 mRNA 발현양이 대추 물 추출물 처리 여부에 따라 변화하는지 확인해 보았다. c-Fos는 대조군과 실험군에서 별다른 차이를 보이지 않았으나 파골세포 형성, 세포의 신호전달과 관련된 NFATc1, OSCAR, TRAP에서 mRNA 발현양이 의미 있게 감소하였다. F-actin ring 형성에 관여하는 유전자로

알려진 Integrin αv, Integrin β3의 mRNA 발현양이 의미 있게 감소하였고, 파골세포의 골흡수능에 영향을 미치는 Cathepsin K의 mRNA 발현양도 의미 있게 감소하는 것을 볼 수 있었다 (Fig. 4).

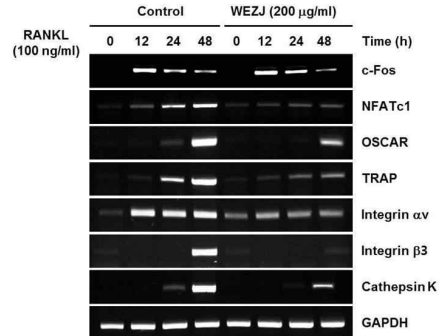


Fig. 4. Effect of water extract of *Zizyphus Jujuba Mill* (WEZJ) on gene expression. BMMs were pretreated with or without WEZJ for 1 hour and then treated with RANKL for the indicated time points. Total RNA from the cells was obtained and the level of expression of the mRNA of the indicated genes was analyzed by RT-PCR.

5. 대추 물 추출물의 RANKL에 의한 파골세포 분화에서 c-Fos와 NFATc1의 단백질 발현량에 미치는 영향

대추 물 추출물이 파골세포 분화를 억제하는 과정 속에 c-Fos와 NFATc1의 단백질 발현량에 어떤 영향을 미치는 지에 대해 알아보기 위해 실험군의 골수대식세포를 대추 물 추출물로 전처리한 후 RANKL을 실험군, 대조군에 첨가하여 각각 0, 12, 24, 48시간 동안을 반응시킨 뒤 단백질 발현량을 시간대 별로 확인하였다. 대조군과 비교하였을 때 c-Fos와 NFATc1의 발현양이 모두 의미 있게 감소하였음을 확인하였다(Fig. 5).

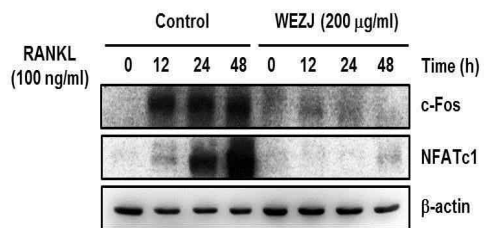


Fig. 5. Effect of water extract of *Zizyphus Jujuba Mill* (WEZJ) on proteins that are associated with osteoclast differentiation; c-Fos and NFATc1. BMMs were pretreated with or without WEZJ for 1 h and then treated with RANKL for the indicated time. The cells were lysed in lysis buffer then resolved by SDS-PAGE and western blotting with antibodies against c-Fos and NFATc1 and β-actin.

고 찰

뼈의 항상성을 유지하기 위해서는 골흡수 기능을 주관하는 파골세포와 골형성 기능을 주관하는 조골세포 간의 균형이 필수적이다¹²⁾. 그러나, 상호간의 균형이 한쪽으로 치우치게 되면 골다공증, 류마티스 관절염을 비롯한 골질환들이 유발되고 이러한 질환은 파골세포의 분화 및 골흡수능이 상대적으로 우세할 경우 잦은 발병률을 보인다. 그러므로 여러 골질환들의 치료적, 예방

적 차원에서 파골세포의 분화 및 골흡수능을 억제하는 물질을 찾기 위한 연구가 다양하게 이루어지고 있다¹³⁾. 오늘날 임상에서 골다공증을 치료하기 위해 사용하는 약물 중 가장 대표적이라 할 수 있는 것으로 bisphosphonate 계열의 약물을 들 수 있다⁹⁾. 그러나 최근 들어 여러 부작용이 발생하고⁷⁻⁹⁾ 그로 인해 임상적 사용이 제한되고 있으며 그 결과, 부작용을 최소화 하는 골다공증 치료제로써 천연물질의 역할이 대두되고 있다. 또한 그 작용기전에 대한 연구를 통해 특정 추출물의 치료제로써의 가치여부를 밝혀내는 것이 치료제 개발에 큰 도움이 될 것이라 사료된다.

본 연구에서 사용된 대추는 파골세포의 분화와 관련된 연구가 전무하며, 골다공증과의 관계에 대해서도 실험적 근거를 바탕으로 한 명확한 내용이 확립되지 않은 상황이다¹⁴⁾. 따라서 본 실험에서는 대추가 파골세포의 분화를 억제시키는지에 대한 여부와 그에 따른 작용기전을 밝힘으로써 향후 골다공증과 같은 여러 골질환을 치료하기 위한 천연물로서의 가능성을 알아보고자 하였다. 우선적으로 대추 물 추출물이 파골세포의 분화를 실제적으로 억제시키는지 확인하기 위하여 TRAP 염색을 통해 스크리닝을 하였다. 그 결과 다핵형 파골세포에서 TRAP의 발현이 50, 100, 200 µg/ml의 농도에서 의미 있게 감소하였고, 이로써 대추 물 추출물이 세포독성이 없이 파골세포의 분화를 농도 의존적으로 억제한다는 결과를 확인하였다. 또한 골흡수능을 가진 성숙한 파골세포로의 성장에 있어서 필수 조건인 f-actin ring의 형성¹⁵⁾에 미치는 영향을 실험한 결과 역시 유의성 있는 저해효과를 도출하였다. 하지만, 대추에 함유되어 있는 성분 중 이와 같은 효과를 가지는 특정 유효성분을 규명하기 위한 연구가 필요할 것이며, 이를 통해 좀 더 효율적인 치료제 개발을 위한 연구가 필요할 것이다.

조혈모세포를 기원으로 다핵형의 파골세포로 분화가 이루어지는 과정에 있어서 필수적인 사이토카인으로 M-CSF와 RANKL을 들 수 있다¹⁶⁾. 파골세포의 전구체의 세포표면에 부착되어 있는 RANK에 조골세포에서 분비되는 사이토카인인 RANKL이 결합을 하게 되면 파골세포 형성과 생존에 영향을 미치는 여러 신호전달 경로들이 활성화되며¹⁷⁾, 대표적인 예로 NF-κB, Akt와 p38, JNK, ERK 등의 핵심 인자들이 포함되어 있는 MAP kinases 경로를 들 수 있다¹⁶⁻¹⁹⁾. 이러한 주요 경로들에 포함된 특정 단백질들의 인산화의 발현정도와 파골세포와 관련된 특정 유전자들의 mRNA 수준에서의 발현 정도를 대추 물 추출물의 첨가 여부에 따라 대조군과 실험군으로 나누어 비교하여 대추 물 추출물이 어떤 유전자에 영향을 미치는지 밝혀보고자 하였다. 우선 RANKL에 의한 파골세포 분화과정에서 대표적인 유전자로 알려진 NFATc1과 c-Fos^{20,21)}의 단백질 수준에서의 발현이 확연하게 감소한 결과를 확인할 수 있었다. 또한 신호전달경로에 있어서 RANKL에 의한 c-Fos와 NFATc1의 발현을 중재하는 초기 신호전달에 중요하다고 알려진 특정단백질들의 인산화 정도의 차이를 확인해 보았다. 또한 단백질 수준뿐만이 아닌 mRNA 수준에서의 특정 유전자들의 발현변화를 알아보았다. 초기 신호전달 경로에서 IκB의 인산화에는 영향을 주지 않았으나 Akt, p38, ERK, 그리고 JNK의 인산화가 현저히 억제되는 결과를 도출하였다. 특

이하계도 mRNA 수준에서 c-Fos의 발현량에는 대추 물 추출물이 영향을 미치지 않았으나 단백질 수준에서의 발현량은 유의성 있게 억제하였다. 이를 통해 대추는 전사단계가 아닌 번역단계에서 c-Fos의 발현을 억제하였고 그에 따른 NFATc1의 발현 또한 저해하였을 것이라 유추하였다. 이외에도 NFATc1, OSCAR, TRAP의 mRNA 발현량이 감소하였으며, Integrin αv, Integrin β3²²⁻²⁴⁾의 발현량이 감소한 결과를 통해 성숙한 파골세포로의 형성과 그 과정에 있어서 세포의 신호전달, 세포간의 융합과 이동에도 영향을 미칠 것이라는 사실을 확인 할 수 있었다²⁵⁻²⁸⁾. 그리고 f-actin ring 형성에 관여한다고 알려진 Cathepsin K의 발현량이 의미 있게 감소함을 보아 대추 물 추출물이 Cathepsin K의 발현을 조절하여 f-actin ring의 형성²⁵⁾을 억제함을 확인할 수 있었다.

결과적으로 대추 물 추출물이 세포독성이 없는 농도에서 파골세포 분화와 F-actin ring 형성을 억제시키며, 그 기전이 초기 신호전달 단백질 Akt, p38, ERK, 그리고 JNK의 인산화와 c-Fos와 NFATc1의 발현, 그리고 mRNA상의 NFATc1, OSCAR, TRAP, Integrin αv, Integrin β3, 그리고 Cathepsin K의 발현을 억제한다는 사실을 규명하였다.

결 론

천연물인 대추는 독성이 없으며 골다공증 완화에 효과가 있다고 알려져 있었으나 그와 관련된 논문이나 기전은 찾아볼 수 없었다. 이에 사실여부와 기전을 밝혀내기 위해 연구를 진행하였고 그 결과 대추 물 추출물은 파골세포의 분화과정을 현저히 억제하며 그 과정에서 중요한 단백질들의 발현과 인산화, 그리고 mRNA의 발현이 줄어드는 것을 확인하였다. 본 연구를 통하여 대추의 골다공증 치료제로서의 가능성을 입증한 바이다.

감사의 글

이 논문은 2011년도 원광대학교 교비 지원에 의해 수행되었습니다.

참고문헌

1. Kanis, J.A. Diagnosis of osteoporosis and assessment of fracture risk. *Lancet* 359: 1929-1936, 2002.
2. Bilezikian, J.P. Estrogens and postmenopausal osteoporosis : was albright right after all?. *J Bone Miner Res* 13: 774-776, 1998.
3. Chen, F., Quyang, Y., Ye, T., Ni, B., Chen, A. Estrogen inhibits RANKL-induced osteoclastic differentiation by increasing the expression of TRPV5 channel. *J Cell Biochem* [Epub ahead of print] 2013.
4. Oursler, M.J. Direct and indirect effects of estrogen on osteoclasts. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 3: 363-366, 2003.

5. Ginaldi, L., Di Benedetto, M.C., De Martins, M. Osteoporosis, inflammation and ageing. *Immun Ageing* 2: 14, 2005.
6. Cheng, M.H., Chen, J.F., Fuh, J.L., Lee, W.L., Wang, P.H. Osteoporosis treatment in postmenopausal women with pre-existing fracture. *Taiwan J Obstet Gynecol* 51: 153-166, 2012.
7. Khosla, S., Bilezikian, J.P., Dempster, D.W., Lewiecki, E.M., Miller, P.D., Neer, R.M., Recker, R.R., Shane, E., Shoback, D., Potts, J.T. Benefits and risks of bisphosphonate therapy for osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* 97: 2272-2282, 2012.
8. Kannel, K.A., Drake, M.T. Adverse effects of bisphosphonates: implications for osteoporosis management. *Mayo Clin Proc* 84: 632-638, 2009.
9. Khosla, S., Burr, D., Cauley, J., Dempster, D.W., Ebeling, P.R., Felsenberg, D., Gagel, R.F., Gilsanz, V., Guise, T., Koka, S., McCauley, L.K., McGowan, J., McKee, M.D., Mohla, S., Pendrys, D.G., Raisz, L.G., Ruggiero, S.L., Shafer, D.M., Shum, L., Silverman, S.L., Van Poznak, C.H., Watts, N., Woo, S.B., Shane, E. Bisphosphonates-associated osteonecrosis of the jaw: report of a task force of the american society for bone and mineral research. *J Bone Miner Res* 22: 1479-1491, 2007.
10. Al-Reza, S.M., Yoon, J.i., Kim, H.J., Kim, J.S., Kang, S.C. Anti-inflammatory activity of seed essential oil from *Zizyphus jujuba*. *Food Chem Toxicol* 48: 639-643, 2010.
11. Gao, Q.H., Wu, C.S., Wang, M. The jujube (*Zizyphus jujuba* Mill.) fruit: a review of current knowledge of fruit composition and health benefits. *J Agric Food Chem* 61: 3351-3363, 2013.
12. Phan, T.C., Xu, J., Zheng, M.H. Interaction between osteoblast and osteoclast; impact in bone disease. *Histol Histopathol* 19: 1325-1344, 2004.
13. Akesson, K. New approaches to pharmacological treatment of osteoporosis. *Bull World Health Organ* 81: 657-664, 2003.
14. Ballanti, P., Minisola, S., Pacitti, M.T., Scarnecchia, L., Rosso, R., Mazzuoli, G.F., Bonucci, E. Tartrate-resistant acid phosphate activity as osteoclastic marker: sensitivity of cytochemical assessment and serum assay in comparison with standardized osteoclast histomorphometry. *Osteoporos Int* 7: 39-43, 1997.
15. Chellaiah, M.A. Regulation of actin ring formation by rho GTPases in osteoclasts. *J Biol Chem* 280: 32930-32943, 2005.
16. Roodman, G.D. Regulation of osteoclast differentiation. *Ann N Y Acad Sci* 1068: 100-109, 2006
17. Boyle, W.J., Simonet, W.S., Lacey, D.L. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 423: 337-342, 2003.
18. Li, X., Udagawa, N., Itoh, K., Suda, K., Murase, Y., Nishihara, T., Suda, T., Takawashi, N. p38 MAPK-mediated signals are required for inducing osteoclast differentiation but not for osteoclast function. *Endocrinology* 143: 3105-3113, 2002.
19. Wada, T., Nakashima, T., Hiroshi, N., Penninger, J.M. RANKL - RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease. *Trends Mol Med* 12: 17-25, 2006.
20. Takayanagi, H. The role of NFAT in osteoclast formation. *Ann N Y Acad Sci* 1116: 227-237, 2007.
21. Boyce, B.F., Yamashita, T., Yao, Z., Zhang, Q., Li, F., Xing, L. Roles for NF- κ B and c-Fos in osteoclasts. *J Bone Miner Metab* 23: 11-15, 2005.
22. Nakamura, I., Pilkington, M.F., Lakkakorpi, P.T., Lipfert, L., Sims, S.M., Dixon, S.J., Rodan, G.A., and Duong, L.T. Role of avb3 integrin in osteoclast migration and formation of the sealing zone. *J Cell Sci* 112: 3985-3993, 1999.
23. Rodan, S.B., Rodan, G.A. Integrin function in osteoclasts. *J Endocrinol* 154: S47-S56, 1997.
24. Moissoglu, k., Schwartz, M.A. Integrin Signalling in directed cell migration. *Biol Cell* 98: 547-555, 2006.
25. Wilson, S.R., Peters, C., Saftig, P., Brömme, D. Cathepsin K activity-dependent regulation of osteoclast actin ring formation and bone resorption. *J Biol Chem* 284: 2584-2592, 2009.
26. Baek, J.M., Kim, J.Y., Lee, M.S., Jeung, W.J., Moon, S.Y., Jeon, B.H., Oh, J.M., Choi, M.K. Inhibition effect of *Taxilli Ramulus* extract on osteoclast differentiation and bone resorption. *J Korean Oriental Med* 27: 431-436, 2013.
27. Kwak, J.C., Moon, S.Y., Kwack, H.B., Jeon, B.H., Oh, J.M., Choi, M.K., Kim, J.J., Jang, S.J. Effect of *Drynariae Rhizoma* in RANKL-induced osteoclast differentiation. *J Korean Oriental Med* 26: 506-510, 2012.
28. Cheon, Y.H., Kwack, S.C., Oh, J.M., Choi, M.K., Kim, J.J., Kwack, H.B., Lee, M.S., Jeon, B.H., Moon, S.Y. Effect of *Hoelen* in RANKL-induced osteoclast differentiation. *J Korean Oriental Med* 26: 320-324, 2012.