

백작약 에탄올 추출물의 파골세포 분화 및 생성 억제 작용

박보라¹ · 박근하¹ · 구동륜^{1,5} · 고원민^{2,3} · 김윤철^{2,3} · 이승훈^{1,4,5*}

1 : 원광대학교 치과대학 구강미생물학 및 면역학교실, 2 : 원광대학교 약품 연구소, 3 : 원광대학교 천연물신약표준화소재은행, 4 : 원광 생체재료 · 매식연구소, 5 : 원광대학교 대사기능제어연구센터

Inhibitory Effect of *Paeoniae Radix Alba* Ethanol Extract on Osteoclast Differentiation and Formation

Bora Park¹, Geun Ha Park¹, Dong Ryun Gu^{1,5}, Wonmin Ko^{2,3}, Youn-Chul Kim^{2,3}, Seoung Hoon Lee^{1,4,5*}

1 : Department of Oral Microbiology and Immunology, College of Dentistry, 2 : Institute of Pharmaceutical Research and Development, 3 : Standardized Material Bank for New Botanical Drugs, College of Pharmacy, Wonkwang University, 4 : Wonkwang Institute of Biomaterial-Implant, 5 : Center for Metabolic Function Regulation(CMFR), Wonkwang University

Bone destruction is a pathological symptom of some chronic inflammatory diseases, such as rheumatoid arthritis and periodontitis. Inflammation-induced bone loss of these diseases results from increased number and activity of osteoclasts. *Paeoniae Radix Alba* has been used in Korean traditional medicine to treat disease including inflammation, gynecopathy and various pain. However, these effects have not been tested on osteoclasts, the bone resorbing cells that regulate bone metabolism. Here, we investigated the effects of *Paeoniae Radix Alba* ethanol extract (PRAE) on receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL)-mediated osteoclast differentiation and formation. Osteoclast differentiation and formation were measured by tartrate resistant acidic phosphatase (TRAP) staining and TRAP solution assay. The treatment of PRAE on bone marrow derived macrophages (BMMs), which is known as osteoclast precursor cells, inhibited osteoclast differentiation and formation in a dose-dependent manner. In addition, the expression of osteoclast differentiation marker genes was suppressed by PRAE treatment. This inhibitory effect of PRAE resulted from significant repression of c-Fos expression, and subsequent reduction of NFATc1 expression which was previously reported as a master transcription factor for osteoclastogenesis *in vitro* and *in vivo*. These results demonstrate that PRAE negatively regulates osteoclast differentiation and formation and suggest that PRAE can be used as a potent preventive or therapeutic candidate for various bone diseases, such as postmenopausal osteoporosis, periodontitis and rheumatoid arthritis.

keywords : *Paeoniae Radix Alba*, osteoclast, differentiation, c-Fos, NFATc1

서 론

뼈대사(bone metabolism)와 뼈재형성(bone remodeling)은 뼈 기질(bone matrix)을 만드는 조골세포(osteoblasts)와 뼈를 흡수하는 파골세포(osteoclasts) 사이의 조화로운 균형을 통해 이루어진다¹⁾. 다핵 성체 파골세포(multinucleated mature osteoclasts)는 조혈모세포(hematopoietic stem cells)로부터 증식(proliferation), 분화(differentiation), 융합(fusion) 그리고 활성화(activation)를 포함하는 일련의 과정을 통하여 생성된다. 조골세포에서 생산되는 macrophage colony-stimulating factor (M-CSF)와 receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL)은 조혈모

세포로부터 분화된 monocyte/macrophage 전구세포들을 파골세포로 분화 생성시키는 역할을 하는 중요한 사이토카인이다^{1,2)}. 조골세포에서 생성된 RANKL이 파골세포 전구세포의 표면에 있는 receptor activator of nuclear factor kappa-B (RANK)이라는 수용체에 결합을 하게 되면, 파골세포 분화, 활성 및 생성에 중요한 역할을 하는 세포내 신호전달 체계인 c-Jun N-terminal kinase (JNK), extracellular signal-regulated kinase (ERK), p38 등의 mitogen-activated protein kinases (MAPKs), NF- κ B 과 Akt의 활성화가 일어난다³⁾. RANKL은 파골세포 분화 및 생성의 양성조절자(positive modulator)로 작용하는 NF- κ B, c-Fos, nuclear factor of activated T cells (NFAT) c1 등의 다양한 전사인자의

* Corresponding author

Seoung Hoon Lee, Department of Oral Microbiology and Immunology, College of Dentistry, Wonkwang University, 344-2, Sinyong-dong, Iksan-si, Jeollabuk-do, Korea

E-mail : leesh2@wku.ac.kr · Tel : +82-63-850-6981

Received : 2014/12/08 · Revised : 2015/01/28 · Accepted : 2015/01/30

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

pISSN 1738-7698 eISSN 2288-2529 <http://dx.doi.org/10.15188/kjopp.2015.02.29.1.51>

Available online at http://society.kisti.re.kr/sv/SV_svjsjc03L.do?method=list&poid=ksomp&kojic=DRSRDH&sVnc=v28n5&menuid=1&subid=13

발현을 조절한다^{4,5}). 파골세포 생성과정 동안 RANKL이 RANK에 결합하게 되면 c-Fos의 발현이 증가하게 된다. 발현 증가된 c-Fos가 NFATc1의 promoter region에 결합하면 NFATc1의 발현을 유도시킨다⁶). 그 후 NFATc1은 자신의 promoter에 결합하여 auto-amplification에 의해 자신의 발현을 증가시킴으로써 RANKL에 의해 유도된 파골세포 생성과정 동안 NFATc1의 급격한 발현을 유도한다⁷). 파골세포 전구세포에 constitutive active form의 NFATc1을 발현시켰을 때 RANKL이 없어도 파골세포의 생성이 유도되었고, NFATc1이 결손된 배아세포에 RANKL을 처리했을 때 파골세포로 분화되지 않았다는 이전의 결과들은 NFATc1이 파골세포의 분화 및 생성 과정을 조절하는 역할을 하는 가장 중요한 전사인자임을 보여주고 있다^{6,8}). NFATc1은 파골세포의 분화와 기능에 중요한 역할을 하는 tartrate resistant acidic phosphatase (TRAP), Cathepsin K (CtsK), osteoclast-associated receptor (OSCAR) 같은 표적 유전자들의 발현을 유도한다^{6,9,10}). 최근, 파골세포 융합단계를 조절한다고 알려진 vacuolar H⁺-ATPase V0 domain의 d2 isoform (ATP6v0d2)과 dendritic cell-specific transmembrane protein (DC-STAMP) 유전자의 발현도 NFATc1에 의해 유도된다고 보고되었다¹¹). 따라서 NFATc1은 RANKL에 의해 유도되는 파골세포 분화, 융합, 활성 및 생성의 모든 단계에서 가장 중요한 조절자로 작용한다고 사료된다.

백작약(*Paeoniae Radix Alba*)은 미나리아재비과인 작약 뿌리를 말려서 사용하는 약재로 養血柔肝, 斂陰收汗, 緩中止痛하는 효능이 있다고 알려져 있다¹²). 백작약은 복통, 두통, 생리불순, 생리통, 팔다리의 경련과 통증 등 각종 통증에 효과가 있다고 보고되었다¹³). 백작약의 대표성분인 paeoniflorin이 분리되었고¹⁴), 그 후 Takagi 등에 의해 항염증 작용 및 스트레스성 궤양 예방효과가 보고되면서¹⁵) 이에 대한 다양한 연구가 진행되었다. 약리작용으로 중추신경계 억제, 평활근 이완 작용, 항혈소판응집, 항염증, 항스트레스 및 항경련 효과 등이 보고되었으며¹⁶), 항암효과¹⁶), 식중독 유발세균 증식 억제효과¹⁷), 면역증강효과^{13,18}), 방사선에 대한 방호효과¹⁹), 피부 미백 및 주름 예방효과²⁰) 그리고 산화적 스트레스에 대한 항산화 효과²¹) 등에 대한 보고가 있었다. 최근 三氣飲加味方 (Samkieumgamibang) 추출물에 의한 파골세포 분화가 억제된다는 보고가 있었고²³), 골관절염 생쥐 모델에서의 芍藥甘草附子湯 (Jakyakkamchobuja-tang, JKBT)의 항염증 효과에 의한 골관절염 발생 억제 효과가 보고되었다²⁴). 또한 류마티스 관절염 백서 모델에서 Sanshuibaihu decoction (SSBH)의 항염증 효과가 보고되었으나²⁵), 이러한 추출물들은 백작약 단독의 효과가 아닌 백작약을 포함한 수십 가지의 혼합 약재로 구성된 성분들의 효과이다. 이러한 백작약을 포함한 추출물의 파골세포 및 뼈 질환(bone diseases)등에 대한 작용 효과들이 보고되고 있지만, 뼈 대사(bone metabolism)의 중추적인 역할을 하고 있는 파골세포에서 백작약 단독의 효과와 작용기전을 직접적으로 연구한 보고는 없다.

따라서 본 연구에서 백작약 추출물(PRAE)을 파골세포에 처리하여 TRAP solution assay와 TRAP 염색에 의한 파골세포의 분화와 생성 측정, real-time PCR 분석에 의한 분화인자의 발현확인 그리고 western blot 분석을 통하여 세포내 신호전달 및 전사인자의 발

현을 조사하여 PRAE의 파골세포 분화 및 생성에 미치는 영향을 관찰하고 그 결과를 보고한다.

재료 및 방법

1. 시료의 추출 및 준비

본 실험에 사용한 백작약 (*Paeoniae Radix Alba*)은 2012년 5월 익산시 소재 대한한약국에서 구입하였으며, 형태학적 특징을 통하여 동정하였고, 표본품 (NNMBS-2012-066)은 원광대학교 천연물신약 표준화연구 소재은행에 보관하였다. 백작약 50 g을 70% 에탄올 수용액 50 mL로 70°C에서 2시간 동안 가열추출하고 여과한 후 여액을 감압 농축하여 백작약 추출물 7.5 g을 얻었다. 백작약 70% 에탄올 추출물 (NNMBS066, PRAE)은 원광대학교 천연물신약 표준화연구 소재은행에 보관하였다.

2. 파골세포 분화 및 배양

본 실험에서는 파골세포를 배양하기 위하여 (주)오리엔트 바이오(성남, 대한민국)로부터 구입한 6~8 주령의 C57BL/6 male mice의 대퇴골(femur)과 경골(tibia)로부터 골수세포(bone marrow cells)를 분리하였다. 이 골수세포를 10% fetal bovine serum (FBS, Hyclone, Rockford, IL, USA), 1% Penicillin (100U/mL)/Streptomycin (100 µg/mL)이 첨가된 Minimum Essential Media Alpha (MEM-α, Hyclone) 배지에서 3일 동안, 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 배양하면서 30 ng/mL 농도의 M-CSF를 처리하였다. 배양접시에 부착된 세포를 trypsin으로 분리하고 원심 분리 하여 모은 세포를 파골세포 전구세포(bone marrow-derived macrophages, BMMs)로 사용하였다. 파골세포를 생성하기 위하여 BMMs를 10% FBS, 1% Penicillin/Streptomycin이 첨가된 MEM-α 배지에 M-CSF (30 ng/mL)와 RANKL (100 ng/mL)을 처리한 후 4일 동안 배양하여 파골세포로의 분화를 유도하였다.

3. 세포독성 평가 및 PRAE 농도의 결정

세포독성은 Itsbio사(Korea)의 EZ-Cytox Enhanced Cell Viability Assay Kit를 사용하여 제조사의 지시에 따라 측정하였다. 우선, 배양 분리한 BMMs 세포를 1 × 10⁴ cells/well의 농도가 되도록 희석하고 M-CSF (30 ng/mL)와 RANKL (100 ng/mL)을 첨가하여 96 well culture plate (Greiner bio-one, Germany)에 분주한 후, 다양한 농도(1, 2, 5, 10, 20 and 40 µg/mL)의 PRAE를 처리하여 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 2일 동안 배양하였다. 배양 후 10 µL의 EZ-Cytox reagent를 각 well에 첨가해 준 후 37°C에서 4시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 ELISA reader (Tecan, Switzerland)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포독성 값은 PRAE를 처리하지 않은 대조군(0 µg/mL)에 대한 상대적인 % 값으로 표시하였다.

4. 파골세포 분화 및 생성에서의 PRAE 효과 측정

BMMs 세포를 1 × 10⁴ cells/well의 농도가 되도록 M-CSF (30 ng/mL)와 RANKL (100 ng/mL)이 첨가된 MEM-α 배지에 희석

하고 96 well culture plate에 분주한 후, 다양한 농도(1, 2, 5, 10, 20 and 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$)의 PRAE를 처리한 후 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 4일 동안 배양하면서 3일 마다 새로운 배지로 교환하였다. 배양 후 10% formalin 용액으로 세포를 고정시킨 다음 메탄올/아세톤 (1:1) 용액을 첨가하여 1 분 동안 세포를 처리한 후 상온에서 말렸다. Plate well 내 전체 TRAP (tartrate resistant acidic phosphatase) 활성을 측정하는 TRAP solution assay를 위하여 각 well에 150 μL 의 TRAP substrate solution (pNPP in TRAP buffer, pH 5.2)을 넣은 후 상온에서 30 분간 반응시켰다. 반응 후 100 μL 의 substrate solution을 새로운 96 well reaction plate로 옮기고 50 μL 의 1N NaOH를 각 well에 넣어 반응을 종결시켰다. ELISA reader를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. TRAP solution assay가 끝난 plate는 파골세포 확인을 위한 TRAP 염색을 실시하였다. PBS로 3회 세척한 후 TRAP staining solution (Naphthol AS phosphate and Fast Red Violet dye in TRAP buffer, pH 5.2)을 각 well에 첨가하고 상온에서 파골세포가 염색될 때 까지 반응시켰다. 반응 후 현미경으로 확인하며 핵이 3개 이상 가진 TRAP(+) multinuclear cells (MNCs)을 성체 파골세포로 간주하였다.

5. RNA 분리 및 실시간 정량 PCR (real-time PCR) 분석

파골세포 분화 정도를 측정하기 위하여 BMMs 세포를 M-CSF (30 ng/mL)와 RANKL (100 ng/mL)을 처리하고 PRAE (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$)를 첨가하여 4일 동안 배양시켰다. 배양기간 동안 매일 배양된 세포를 Trizol reagent (Invitrogen, USA)을 처리하여 total RNA를 추출하였다. 1 μg 의 total RNA를 Maxima reverse transcriptase (Thermo Scientific, USA)와 random primer를 이용하여 역전사 반응을 시켜 cDNA를 얻어내었다. 합성한 cDNA와 각각 10 pmole의 primer를 veriQuest SYBR Green qPCR Master mix (Affymetrix, USA)에 첨가하고 StepOne Plus™ Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems, USA)을 이용하여 실시간 정량 PCR 분석을 실시하였다. GAPDH로 정량화 시킨 파골세포 분화 인자들 (TRAP, CtsK, OSCAR, DC-STAMP, ATP6v0d2 and NFATc1)의 발현 수준을 대조군 (0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PRAE)과 비교하였다. 이 때 사용된 primer는 Table 1에 표시하였다.

6. Western blot analysis

BMMs을 3×10^5 cells/well의 농도가 되도록 M-CSF (30 ng/mL)이 첨가된 MEM- α 배지에 희석하고 6 well culture plate에 분주한 후, 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 24 시간 동안 배양시켰다. 이 세포에 RANKL (100 ng/mL)과 PRAE (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$)을 동시에 처리하여 RANKL에 의한 세포내 신호전달에서의 PRAE 효과를 측정하였다. 또는 BMMs을 M-CSF와 RANKL이 첨가된 배지로 희석하여 분주한 다음 PRAE를 처리하여 4일 동안 배양하였다. 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), protease-inhibitor cocktail (Roche, Germany)와 phosphatase inhibitor tablets (Thermo Scientific, USA)이 첨가된 lysis buffer (25 mM Tris-HCl, pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% sodium

deoxycholate, 0.1% SDS)를 이용하여 배양된 세포를 lysis 시키고 원심분리하여 모은 상층액을 전체 세포 단백질(total lysate)로 이용하였다. 단백질 농도는 Bradford method을 이용하여 측정하였다. 30 μg 의 total lysate를 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 사용하여 분리하였고, Hybond™-polyvinylidene fluoride membranes (PVDF, GE-Healthcare Life Science, USA)를 사용하여 이동하였다. 각각의 membrane은 5% skin milk를 사용하여 한 시간 동안 블로킹 하였고, 일차항체는 1:1000으로 희석하여 상온에서 2시간 동안 반응시켰다. 이차항체는 HRP-conjugated IgG (1:5000 dilution)를 사용하였다. 단백질 발현량은 image analyzer (FluorChem E, PreoteinSimple, USA)를 사용하여 확인하였다.

7. 통계분석

실험 결과는 각각의 세 번의 실험으로부터 얻은 mean \pm SD로 표시하였으며, 통계분석은 one-way ANOVA test (SPSS 12.0, SPSS GmbH, Germany)로 처리하고, P < 0.05인 것만 유의한 것으로 정하였다.

Table 1. Nucleotide sequences of the primers used for real-time PCR in this study

Gene		Primers
TRAP	forward	5'-CTGGAGTGCACGATGCCAGCGACA-3'
	reverse	5'-TCCGTGCTCGGCGATGGACCAGA-3'
CtsK	forward	5'-ACGGAGGCATTGACTCTGAAGATG-3'
	reverse	5'-GTTGTTCTTATCCGAGCCAAGAG-3'
Oscar	forward	5'-GGGGTAACGGATCAGCTCCCCAGA-3'
	reverse	5'-CCAAGGAGCCAGAACGTCGAAACT-3'
DC-STAMP	forward	5'-TGGAAGTTCACTTGAAGTACGTG-3'
	reverse	5'-CTCGGTTTCCGTCAGCCTCTCTC-3'
Atp6v0d2	forward	5'-TCAGATCTCTCAAGGCTGTGCTG-3'
	reverse	5'-GTGCCAAATGAGTTCAAGATGATG-3'
Nfatc1	forward	5'-CTCGAAGACAGCACTGGAGCAT-3'
	reverse	5'-CGGCTGCCTTCGTCATAG-3'

결 과

1. 백작약 에탄올 추출물(PRAE)의 세포독성

PRAE의 파골세포에 대한 세포독성의 유무를 확인하기 위하여 M-CSF와 RANKL을 처리한 BMMs 세포에 PRAE를 각각 1, 2, 5, 10, 20, 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리하고 2일 동안 배양한 후 세포독성을 측정하였다. 그 결과 PRAE를 처리한 모든 실험군의 cell viability를 PRAE를 처리하지 않은 대조군과 비교했을 때 유의적인 차이를 보이지 않았다. 따라서 실험에 사용할 농도에서는 세포독성이 없음을 확인 하였다(Fig. 1).

2. 파골세포 분화 및 생성에서의 PRAE 효과

BMMs 세포를 M-CSF와 RANKL을 처리하여 파골세포로의 분화를 유도시키고, 다양한 농도(1, 2, 5, 10, 20, 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$)의 PRAE를 처리하여 파골세포 분화 및 생성에서의 PRAE 효과를 측정하였다. 파골세포를 TRAP staining하고 현미경으로 관찰한 결과, 처리한 PRAE의 농도가 증가할수록 성체 파골세포인 TRAP(+) MNCs의

수가 감소됨을 관찰하였다(Fig. 2A and 2B). 1~2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 PRAE를 처리한 실험군에서는 성체 파골세포 생성에서 PRAE를 처리하지 않은 대조군과 유의성을 보이지 않았다. 그러나 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 PRAE를 처리한 실험군 부터 현저하게 성체 파골세포의 생성이 감소되었고, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PRAE를 처리한 실험군 부터 성체 파골세포가 생성되지 않음을 확인하였다. 또한, TRAP을 발현하는 mono-, di- 그리고 multinuclear cell의 total TRAP 활성을 측정할 수 있는 TRAP solution assay 결과, 파골세포 염색의 결과와 마찬가지로 20과 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 PRAE를 처리한 그룹에서 급격히 TRAP 활성이 감소함을 관찰하였다(Fig. 2C). 이러한 결과들은 PRAE가 파골세포의 분화 뿐 아니라 생성에서도 억제 효과를 보인다는 것을 보여준다.

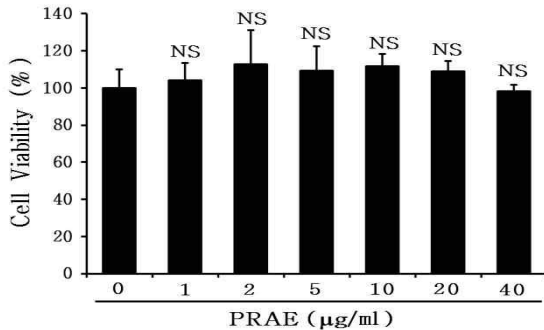


Fig. 1. Effects of PRAE on osteoclast viability. BMMs were cultured with indicated various concentrations of PRAE under M-CSF (30 ng/mL) and RANKL (100 ng/mL) treatment for 2 days. Data is the average of three independent experiments (\pm SD). NS : not significant.

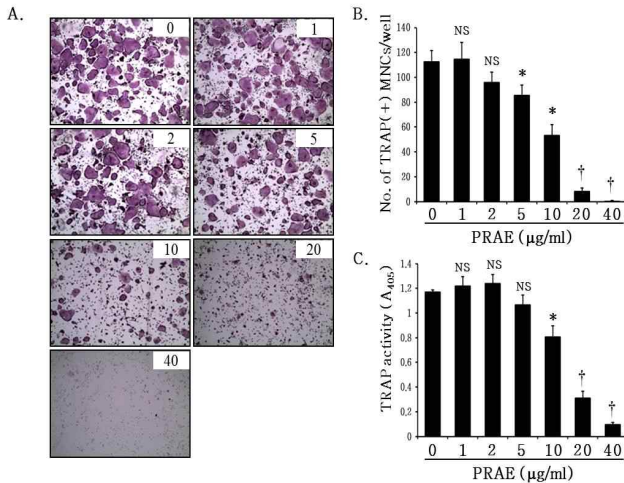


Fig. 2. Effects of PRAE on osteoclasts differentiation. BMMs were cultured with various concentration of PRAE under RANKL and M-CSF treatment for 4 days. A. Osteoclasts were stained for TRAP. B. TRAP(+) MNCs having more than 3 nuclei were counted as mature osteoclasts. C. Total TRAP activity from TRAP(+)-mono, di and multinuclear cells was measured as described in materials and methods. Data are expressed as the mean \pm SD and are representative of at least three independent experiments. * $P < 0.05$ and † $P < 0.01$ versus control (0 μg of PRAE). NS : not significant.

3. 파골세포 분화인자 발현에서의 PRAE 효과

Fig. 2에서 PRAE가 파골세포의 분화 및 생성을 억제함을 관찰

하였다. 이 결과를 좀 더 검증하기 위하여 실제로 파골세포 분화 및 생성동안 발현양이 증가하는 파골세포 분화인자들(TRAP, CtsK, OSCAR, DC-STAMP, ATP6v0d2, NFATc1)의 발현양을 real-time PCR 분석으로 측정하였다. 그 결과 측정된 모든 파골세포 분화인자들의 발현양이 PRAE를 처리하지 않은 control에 비해 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 PRAE를 처리한 그룹에서 배양기간에 걸쳐 발현양이 현저히 감소됨이 관찰되었다(Fig. 3). 특히 파골세포 분화와 생성의 모든 단계에서 가장 중요한 역할을 하는 전사인자인 NFATc1의 발현도 PRAE에 의해 감소되었다. 이 결과들은 PRAE가 파골세포 분화인자 및 전사인자의 발현을 감소시킴으로써 파골세포 분화 및 생성을 억제한다는 것을 보여준다.

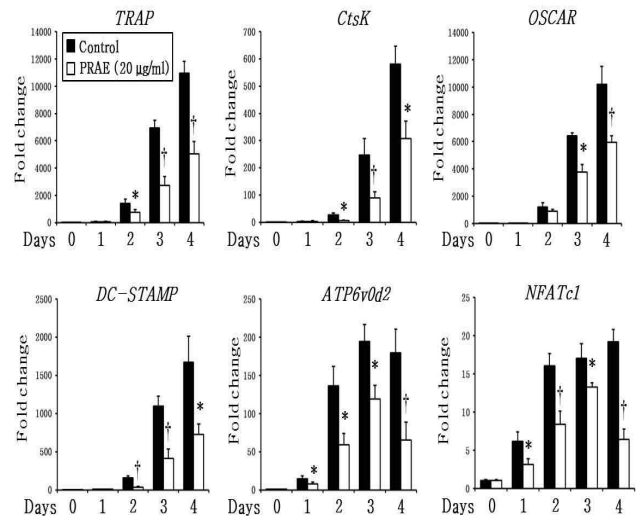


Fig. 3. Effects of PRAE in expression of osteoclast differentiation marker genes. BMMs were cultured with RANKL and M-CSF treatment in presence or absence of PRAE (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 4 days. The expression of osteoclast differentiation marker genes was measured by real-time PCR. The expression of mRNA levels was normalized with GAPDH and described as fold change mRNA level. Data are expressed as the mean \pm SD and are representative of at least three independent experiments. * $P < 0.05$ and † $P < 0.01$ versus control (0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of PRAE).

4. 파골세포 내 신호전달 및 전사인자 발현에서의 PRAE 효과

PRAE에 의한 파골세포의 분화 및 생성 억제의 기전을 규명하기 위하여 RANKL에 의해 유도되는 파골세포 내의 신호전달을 조사하였다. BMMs 세포를 M-CSF 처리하여 24시간 동안 배양한 후 RANKL을 5, 15, 30 분 처리하여 mitogen activated protein kinases (MAPKs, ERK, JNK and p38) 및 I κ B α 활성을 유도하였다. 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 을 동시에 처리하여 MAPKs 및 I κ B α 활성 변화를 조사하였다. 이 결과 PRAE를 처리했을 때 ERK, JNK 그리고 p38의 인산화 정도는 PRAE를 처리하지 않은 control과 차이가 없었다. 그러나 PRAE를 처리했을 때 I κ B α 의 인산화가 현저하게 억제되었다(Fig. 4A). 또한, 파골세포 분화와 생성에 가장 중요한 전사인자인 c-Fos와 NFATc1 발현에서의 PRAE의 효과를 측정하였다(Fig. 4B). RANKL을 처리할 때 c-Fos의 발현이 점점 증가하여 24 시간 후 가장 많이 발현되었다. 그러나 PRAE를 같이 처리했을 때 c-Fos의 발현이 전혀 증가되지 않고 억제되었다. 그리고 NFATc1의 발현은

control에서는 2일 후부터 발현이 급격하게 증가되어 4일 후에도 발현양이 유지되었다. 그러나 PRAE를 처리했을 때는 2일 후 조금 증가하였다가 점점 감소하는 경향을 보였다. 이상의 결과들은 PRAE가 RANKL에 의한 파골세포 분화과정에서 I κ B α 인산화와 c-Fos의 발현을 억제시킴으로써 NFATc1의 발현을 감소시킴을 보여준다. 이에 따라 NFATc1의 조절을 받는 많은 유전자들의 전사가 억제되어 파골세포의 분화와 생성이 감소되었다.

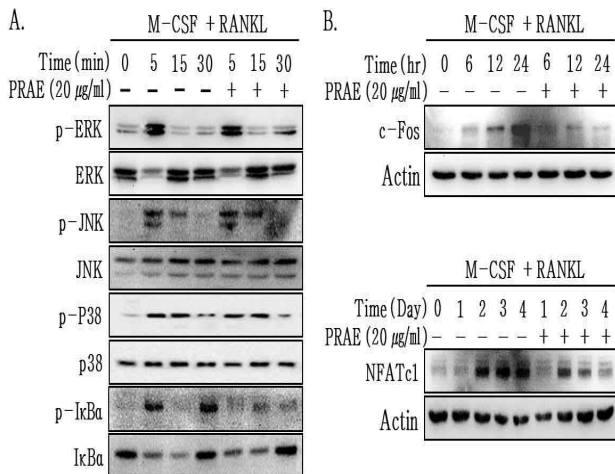


Fig. 4. Effects of PRAE in RANKL-induced intracellular signaling and expression of transcription factors in osteoclasts. A. BMMs under M-CSF treatment were cultured for 24 hr and then treated with PRAE (20 μ g/ml) and RANKL (100 ng/ml) for indicated time. The 30 μ g of lysates was subjected to SDS-PAGE and analyzed by immunoblotting. MAPKs (ERK, JNK and p38) and I κ B α activation was measured using by their specific antibodies. B. BMMs were treated with M-CSF and RANKL in presence or absence of PRE (20 μ g/ml) for indicated time. The 30 μ g of lysates was subjected to SDS-PAGE and analyzed by immunoblotting. The expression of c-Fos and NFATc1 was detected by anti-c-Fos and anti-NFATc1 antibody, respectively.

고찰

뼈를 이루는 주성분은 콜라겐을 비롯한 여러 단백질과 hydroxyapatite로 이루어진 미네랄 이다. 이러한 뼈기질을 분해하는 세포인 파골세포는 뼈대사의 중추 역할을 하며 골다공증 (osteoporosis), 류마티스 관절염 (rheumatoid arthritis), 골관절염 (osteoarthritis) 그리고 치주염 (periodontitis) 등의 질환에서 뼈 손상의 원인이다¹). 파골세포는 M-CSF에 의해 조혈모세포로부터 monocyte/macrophage lineage의 전구세포로 분화되고 RANKL에 의해 뼈를 흡수하는 활성을 가지는 다핵세포인 성체 파골세포로 분화된다. RANKL/RANK 결합에 의한 파골세포 분화는 두 가지 세포 내 신호전달 경로로 이루어진다^{1,22}). 첫 번째로, 세포내 NF κ B 및 MAPKs가 활성화 되고 전사인자인 c-Fos의 발현이 증가되며, 파골세포 분화 및 생성 전 과정에 필수적인 역할을 하는 전사인자인 NFATc1이 활성화되어 파골세포의 분화가 이루어지는 것이다. 두 번째 분화 신호로서 phospholipase C- γ (PLC γ)의 활성화로 세포내 Ca²⁺-Oscillation이 발생하고 Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type IV (CaMKIV)와 cAMP response

element-binding protein (CERB)의 활성화로 인해 c-Fos의 발현이 증가된다. 또한, Ca²⁺-Oscillation에 의해 NFATc1의 activator인 calcineurin이 활성화된다. 결국 두 가지 신호전달 모두 NFATc1의 활성화로 인해 파골세포의 분화 관련 유전자의 발현이 증가되어 분화가 이루어진다. 본 연구에서 RANKL에 의해 유도되는 파골세포 분화 및 생성에서 백작약 추출물(PRAE)이 억제효과를 보임을 확인하였다(Fig. 2). 20 μ g/ml의 PRAE를 처리한 결과 MAPKs (ERK, JNK, p38)의 활성은 변하지 않았지만, I κ B α 의 활성이 억제됨을 확인하였고, c-Fos의 발현양이 감소됨을 확인하였다. 이러한 신호 억제에 의해 최종 NFATc1의 단백질 발현양이 급격히 감소됨을 관찰하였다(Fig. 4). 또한 NFATc1의 mRNA 발현양도 PRAE에 의해 파골세포 분화과정동안 감소됨을 확인하였다(Fig. 3). 전사인자인 NFATc1의 조절을 받는 파골세포 분화 인자들(*TRAP*, *CtsK*, *OSCAR*, *DC-STAMP*, *ATP6v0d2*)의 발현이 파골세포 분화과정 동안 억제된 것은 PRAE에 의한 NFATc1의 발현양 감소로 기인한 것이라 사료된다(Fig. 3).

백작약 추출물만을 이용하여 파골세포에서의 그 효과와 작용기전을 연구한 보고는 아직 없다. 그러나 백작약 외 14가지 혼합 약재로 만든 三氣飲加味方(Samkieumgamibang) 추출물을 이용하여 파골세포의 분화를 측정할 결과 TRAP(+) MNCs의 수가 감소되고 파골세포 분화인자들(*CtsK*, *MMP-9*, *TRAP*, *c-Fos*, *NFATc1*)의 발현양이 감소됨이 보고되었지만, 억제작용의 분자기전에 대한 연구결과는 보고되지 않았다²³). 그리고 작약이 포함된 芍藥甘草附子湯 (Jakyakkamchobuja-tang, JKBT)을 이용한 골관절염 생쥐 모델 연구에서는 JKBT를 경구 투여한 그룹에서 염증반응을 유도하는 IL-1 β 를 비롯한 여러 물질들이 생성이 감소되어 골관절염 발생을 억제하는 효과를 보고하였다²⁴). 또한, Yang 등²⁵)이 콜라겐으로 유도한 관절염 백서에서 백작약이 포함된 17개 약재 혼합물인 Sanshuibaihu decoction (SSBH)이 항염증 효과를 보이고 이러한 효과는 NF κ B와 p38 MAPK의 활성화에 기인한다는 결과를 보고하였다. 본 연구에서는 PRAE에 의해 파골세포의 분화 억제가 I κ B α 활성 억제에 일부 기인함을 보였다(Fig. 4). 이러한 결과로 백작약의 효과는 세포내 NF κ B 활성을 억제한다고 유추할 수 있다. 그러나 본 연구에서 사용한 백작약 추출물은 에탄올로 추출한 것이다. 실제로 백작약을 탕약으로 사용할 때 추출되는 유효성분은 물에 의해 추출되는 것이다. 따라서 물 추출물과 에탄올 추출물의 유효성분 비교 및 뼈대사 (bone metabolism)에 미치는 차이에 대한 연구가 필요하다고 사료된다. 또한 in vitro 실험과 in vivo 실험 사이에 차이가 많이 발생할 수 있는데, PRAE를 사용한 본 실험도 생쥐를 이용하여 in vivo에서 파골세포 및 조골세포에 대한 효과 및 뼈 밀도에 얼마나 영향을 주는지에 대한 연구가 이루어져야 할 것이다. 그러나 이상의 결과들을 종합해 볼 때 PRAE가 골다공증, 류마티스 관절염, 골관절염 및 치주염 등 뼈 관련 질환들의 치료에 효과적인 후보물질이 될 수 있을 것이라 사료된다. 본 연구에서는 파골세포의 분화와 생성에서 PRAE의 억제효과를 in vitro에서 확인하고 그 억제 기전을 보고하였다. 다음으로 조골세포 분화에서의 PRAE 효과를 연구하고, 또한 동물모델을 이용한 in vivo 실험에서 그 효과를 증명하는 연구가 필요하다고 사료된다.

결 론

백작약 에탄올 추출물(*Paeoniae Radix Alba* ethanol extract, PRAE)의 파골세포 분화와 생성에서의 효과를 검증하기 위하여 골수세포로부터 유도된 파골세포 전구세포(BMMs)를 RANKL을 처리하여 파골세포로 분화시키는 과정에 PRAE를 처리하였다. 그 결과 PRAE는 측정된 40 µg/ml의 농도까지 세포독성을 나타내지 않았다. 따라서 이후 모든 실험을 20 µg/ml의 PRAE로 수행하였다. PRAE를 처리했을 때 성체 파골세포인 TRAP(+) MNCs의 수가 PRAE의 농도에 의존적으로 현저하게 감소되었다. 또한 파골세포 분화인자의 발현이 PRAE에 의해 감소됨을 real-time PCR 분석으로 확인하였다. 그리고 PRAE를 처리하였을 때 세포내 신호전달체계 중 IκBα의 활성화와 c-Fos의 발현이 감소하였고, 이로 인해 파골세포 분화와 생성에 가장 중추적인 역할을 하는 전사인자인 NFATc1의 발현이 현저히 감소되었다. 따라서 PRAE는 파골세포의 분화와 생성을 억제하는 효과를 보이며, 이상의 결과를 바탕으로 in vivo에서 효과를 확인한다면 골다공증, 류마티스 관절염 그리고 치주염 등 파골세포에 의한 뼈 흡수 현상을 보이는 뼈 질환 치료제의 후보 물질이 될 것으로 사료된다.

감사의 글

본 논문은 원광대학교 2012년 교내연구비로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

References

- Walsh, M.C., Kim, N., Kadon, Y., Rho, J., Lee, S.Y., Lorenzo, J., Choi, Y. Osteoimmunology: interplay between the immune system and bone metabolism. *Annu Rev Immunol* 24: 33-63, 2006.
- Suda, T., Takahashi, N., Udagawa, N., Jimi, E., Gillespie, M.T., Martin, T.J. Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev* 20(3):345-357, 1999.
- Lee, Z.H., Kim, H.H. Signal transduction by receptor activator of nuclear factor kappa B in osteoclasts. *Biochem Biophys Res Commun* 305(2):211-214, 2003.
- Boyle, W.J., Simonet, W.S., Lacey, D.L. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 423: 337-342, 2003.
- Teitelbaum, S.L., Ross, F.P. Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nat Rev Genet* 4(8):638-649, 2003.
- Takayanagi, H., Kim, S., Koga, T., Nishina, H., Isshiki, M., Yoshida, H., Saiura, A., Isobe, M., Yokochi, T., Inoue, J., Wagner, E.F., Mak, T.W., 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(6):889-901, 2002.
- Asagiri, M., Sato, K., Usami, T., Ochi, S., Nishina, H., Yoshida, H., Morita, I., Wagner, E.F., Mak, T.W., Serfling, E., Takayanagi, H. Autoamplification of NFATc1 expression determines its essential role in bone homeostasis. *J Exp Med* 202(9):1261-1269, 2005.
- Hirotsani, H., Tuohy, N.A., Woo, J.T., Stern, P.H., Clipstone, N.A. The calcineurin/nuclear factor of activated T cells signaling pathway regulates osteoclastogenesis in RAW264.7 cells. *J Biol Chem* 279(14):13984-13992, 2004.
- Kim, K., Kim, J.H., Lee, J., Jin, H.M., Lee, S.H., Fisher, D.E., Kook, H., Kim, K.K., Choi, Y., Kim, N. Nuclear factor of activated T cells c1 induces osteoclast-associated receptor gene expression during tumor necrosis factor-related activation-induced cytokine-mediated osteoclastogenesis. *J Biol Chem* 280(42):35209-25216, 2005.
- 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* 279(44):45969-45979, 2004.
- Kim, K., Lee, S.H., Kim, J.H., Choi, Y., Kim, N. NFATc1 induces osteoclast fusion via up-regulation of Atp6v0d2 and the dendritic cell-specific transmembrane protein (DC-STAMP). *Mol Endocrinol* 22(1):176-185, 2008.
- Kim, T.J., Shin, J.Y. Korean oriental medicine keeping with our herbal(3). 1st ed. Seoul:Liyou. pp 154-157, 2003.
- Kim, J. Enhancing Effect of *Paeonia japonica*, *Houttuynia cordata*, and *Aster scaber* Extracts on the Immunoreactivity in vivo in mice. Graduate School of Sookmyung Women's University. Ph.D Thesis, 2003.
- Aimi, N., Inaba, M., Watanabe, M., Shibata, S. Chemical studies on the oriental plant drugs. 23. Peoniflorin, a glucoside of Chinese paeony root. *Tetrahedron* 25(9):1825-1838, 1969.
- Takagi, K., Harada, M. Pharmacological studies on herb paeony root. II. Anti-inflammatory effect, inhibitory effect on gastric juice secretion, preventive effect on stress ulcer, antidiuretic effect of peoniflorin and combined effects with licorice component Fm 100. *Yakugaku Zasshi* 89(7):887-892, 1969.

16. Park, H.R., Jung, U., Jeong, I.Y., Yee, S.T., Jo, S.K. Inhibition of Tumor Growth through Macrophage Activation by Polysaccharide Fraction from *Peonia japonica* (PJ-P). *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 32(1):149-154, 2003.
17. Bae, J.H. Effect of Extracts from *Paeonia japonica* on the Growth of Food-borne Pathogens. *J East Asian Soc Dietary Life.* 21(2):272-276, 2011.
18. Lee, G.H., Kang, S.S., An, W.G., Lee, Y.S., Kwon, Y.K., Shin, S.W. Comparison of Immune Promotion Effects of Water-extracted *Angelicae gigantis*, *Rehmanniae Radix*, *Paeoniae japonica* and *Polygoni multiflori Radix*. *Korean J. Oriental Physiology & Pathology.* 20(6):1507-1515, 2006.
19. Oh, H., Park, H.R., Jeong, I.Y., Kim, S.H., Jo, S.K. Protective Effects of *Paeonia japonica* against Radiation-induced Damage. *J Korea Asso Radial Prot.* 27(3):181-188, 2002.
20. Lee, J.C., Park, S.Y., Choi, J.H., Kim, J.H. Effects of *Paeoniae radix alba*(PRA) on Skin whitening and Elasticity using Melanoma cells. *J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol.* 25(1):1-11, 2012.
21. Yoonm H,J,, Go, E.B., Choi, M.S., Kim, D.I., Sung, J.S. Antioxidant Effect of *Paeonia Japonica* Extracts on Mouse Embryonic Fibroblast Cells. *J Korean Obstet Gynecol.* 25(2):78-88, 2012.
22. Takayanagi, H. Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nat Rev Immunol.* 7(4):292-304, 2007.
23. Park, S.M., Yoo, D.Y. Effects of Samkieumgamibang Extract on Osteoclast Differentiation and Osteoblast Function. *J Korean Obstet Gynecol.* 25(2):23-42, 2012.
24. Lee, J.M., Hong, S.Y., Oh, M.S. Effects of Jakyakkamchobuja-tang on Papain-induced Osteoarthritis in Mice. *J Korean Oriental Med.* 34(1):116-135, 2013.
25. Yang, M., Xiao, C., Wu, Q., Niu, M., Yao, Q., Li, K., Chen, Y., Shi, C., Chen, D., Feng, G., Xia, C. Anti-inflammatory effect of Sanshuibaihu decoction may be associated with nuclear factor- κ B and p38 MAPK α in collagen-induced arthritis in rat. *J Ethnopharmacol.* 127(2):264-273, 2010.