

# Phytoecdysteroid가 조골세포와 파골세포의 성장과 활성화에 미치는 영향

단국대학교 치과대학 구강생화학교실

고 선 일

Ecdysteroid는 곤충의 탈피호르몬으로 알려져 있으며, phytoecdysteroid는 식물의 ecdysteroid로 포유동물에 여러 유용한 효과를 가진다고 알려져 있다. 본 연구는 식물의 phytoecdysteroids가 골대사에서 미치는 영향을 알아보기 위하여 세포수준에서 관찰하였다. 즉 조골세포에 미치는 영향을 알아보기 위하여 세포증식율, 염기성인산분해효소 활성, gelatinase 활성의 변화를 관찰하였고, 파골세포에 미치는 영향을 알아보기 위하여 tartrate-저항성 인산분해효소 양성인 다핵세포의 형성을 측정함으로써 관찰하였다. Phytoecdysteroid 처리에 의해 조골세포의 ALP 활성과, gelatinase의 활성이 증가되었다. 또한 phytoecdysteroid는 macrophage-colony stimulating factor (M-CSF)와 receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand (RANKL)에 의해 유도된 파골세포의 생성을 감소시켰다. 이상의 결과 phytoecdysteroid는 조골세포와 파골세포의 활성 및 생성을 변화 시킴으로써 골수의 미세환경에서 세포내 조절작용에 관여하리라 여겨진다.

주제어 : 조골세포, 파골세포, Phytoecdysteroid

## I. 서 론

골조직은 성장이 끝난 후에도 평생 동안 골재형성 (bone remodeling)이 일어나는 특수한 형태의 결합조직으로, 정상 성인에서는 파골세포에 의한 골흡수 양과 조골세포에 의한 골형성 양 사이에는 항상 균형이 유지되고 있다. 골조직은 미분화 간엽세포, 연골세포, 조골세포, 파골세포, 내피세포와 골수세포 등 여러 종류의 세포로 구성되며, 이들 모든 세포들은 전신적인 호르몬 뿐 아니라, 그들 스스로 분비하는 국소적 인자에 의해 조절 되는 것으로 알려져 있다. 그러나 이러한 조절인자에 의한 골조직의 대사과정이 평형을 잃

은 경우 여러 골조직 질환이 발생할 수 있으며, 상대적으로 과도한 골흡수가 유발된 경우 골다공증과 류마티스 관절염 등이 일어날 수 있다. 골다공증은 폐경기 이후 여성에서 특히 빈발하며 에스트로젠의 분비 감소에 의하여 현저하게 골량이 감소되는 질환으로, 고령인구에서 건강의 중요한 문제점으로 여겨지며, 골량의 점진적인 감소는 골절의 위험 뿐 아니라 사망률을 증가시키게 된다.<sup>1)</sup> 류마티스 관절염은 가동 관절에 대칭적으로 발생하는 만성 염증성 질환이며, 자가 면역 질환 중의 하나로, 염증 세포의 침윤과 활막의 현저한 이상 증식 (hyperplasia)으로, 뼈와 관절이 파괴되는 만성 염증성 질환이며 류마티스 인자와 같은 자가 항체 생성 등을 특징으로 하는 전신적인 자가 면역 질환이다. 이러한 과도한 파골세포의 활성화에 의한 골질환의 치료 목적으로 파골세포의 활성을 억제하기 위한 여러 물질들이 연구되고 있다.

최근 활성화 산소종 (reactive oxygen species, ROS) 들이 파골세포의 생성의 신호전달에 관여하여 파골세포의 생성을 촉진하는 연구 결과가 있으며,<sup>2,3)</sup> 여러 생약의 성분 중 하나인 phytoecdysteroid가 항산화 작용 (anti-oxidation)과 활성 자유기 (free

교신저자 : 고선일

충청남도 천안시 안서동 산 29

단국대학교 치과대학 구강생화학교실

전화: 041-550-1934

Fax: 041-552-7648

E-mail : syko@dku.edu

원고접수일 : 2007-02-21

심사완료일 : 2007-04-10

\* 이 연구는 2005학년도 단국대학교 대학연구비의 지원으로 연구되었음

radical) 제거효과를 가지고 있다는 보고<sup>4,5)</sup>가 있다.

Phytoecdysteroid는 *Rhaphoticum carthamoides*,<sup>6)</sup> *Rhaponticum uniflorum*,<sup>7)</sup> *Achyranthes bidentata* Bl.<sup>8)</sup> 및 *Serratula strangulata*<sup>5)</sup> 등을 포함하는 여러 식물에서 분리됨이 보고 되었으며, 항산화 효과 이외에 면역증강 작용,<sup>9)</sup> 지질대사와 관련하여 콜레스테롤을 낮추는 작용<sup>10)</sup> 및 간 보호 작용<sup>4,11)</sup> 등이 있음이 알려져 있다.

본 연구는 phytoecdysteroid의 주 성분인 20-hydroxyecdysone를 이용하여 조골세포에 미치는 영향을 알아보기 위하여 조골세포의 세포 증식율, 염기성인산분해효소 활성 및 gelatinase 활성을 관찰하였고, 파골세포에 미치는 영향을 알아보기 위하여 tartrate-저항성 인산분해효소 양성인 다핵세포의 형성을 측정함으로써 phytoecdysteroid가 골조직 세포에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

## II. 연구대상 및 연구방법

### 1. 연구재료

Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM),  $\alpha$ -minimum essential medium ( $\alpha$ -MEM), fetal bovine serum (FBS), trypsin-EDTA 및 배양에 필요한 다른 시약들은 Gibco laboratories로부터 구입하였다 (Gibco, Invitrogen Co. Grand Island, USA). 세포배양용기들은 Corning (Corning, NY, USA)사로부터 구입하였다. BCA 단백질 정량 시약은 Pierce (Rockford, IL, USA)로부터 구입하였다. 20-hydroxyecdysone은 Sigma chemical company로부터 구입하였다. 재조합 사람 M-CSF, 재조합 사람 RANKL과 재조합 사람 TGF- $\beta$ 는 PeproTech EC Ltd (USA)으로부터 구입하였다. 나머지 다른 시약은 Sigma chemical company (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. 실험에 사용된 동물은 6내지 8주된 웅성 ICR 마우스를 사용하였으며 다물 사이언스 (Korea)로부터 구입하였다.

### 2. 조골세포의 배양

조골세포의 실험모델로는 HOS 세포주를 사용하였다. 통상적인 방법에 따라 조골세포를 10% FBS, 100 U/ml penicillin G와 100  $\mu$ g/ml streptomycin sulfate 가 첨가된 DMEM을 이용하여 75 cm<sup>2</sup> 배양플라스크에

배양하였다. 배양액을 일주일에 2번씩 교환해 주면서 세포가 단층을 이루면 trypsin-EDTA로 처리하여 세포를 수집한 후 1 : 10으로 계대배양을 시행하였다. 세포배양 시 37°C의 온도와 95% 습도를 유지하였으며 5% CO<sub>2</sub>와 95% 공기를 공급하였으며, 세포를 24-well plate에 분주하여 실험에 이용하였다.

### 3. 세포 증식도 측정

HOS 세포를 24-well plate에 well 당  $2 \times 10^4$  개의 세포가 들어가도록 분주하여 3일간 배양하였다. 배양액을 제거하고 여러 농도의 phytoecdysteroid가 첨가된 배양액으로 교환하여 준 후 2일간 배양하였다. 배양이 끝난 후에 trypsin-EDTA 용액을 이용하여 부착된 세포를 모아 인산 완충 생리식염수 (D-PBS, pH 7, Gibco, USA)로 희석시킨 후 광학현미경 (Nikon, Japan)하에서 hemocytometer를 이용하여 계수하였다.

### 4. 염기성 인산분해효소 활성측정

HOS 세포를 24-well 배양접시에 well 당  $2 \times 10^4$  개의 세포가 들어가도록 분주하여 배양하면서 여러 농도의 phytoecdysteroid를 배양액 내에 첨가하여 준 후 2일간 배양하였다. 배양이 끝난 후 0.1% Triton X-100/saline으로 처리하여 세포추출액을 만들어 염기성 인산분해효소의 활성을 측정하였다. 효소활성의 측정은 일정량의 세포추출액을 기질인 100 mM의 p-nitrophenyl phosphate (pNPP, Sigma)가 포함된 glycine-NaOH 완충액 (pH 10.4)에서 30분간 반응시킨 후 기질인 pNPP에서 분해된 p-nitrophenol의 양을 405 nm의 파장에서 microplate absorbance reader (SLT 400)를 이용하여 비색정량 하였다. 단백질 양은 BCA protein assay reagent를 이용하여 측정하였으며, 효소활성을 nmole substrate/h/mg protein으로 측정하였으며 대조군에 대한 백분율로 나타냈다.

### 5. Type IV collagenase/Gelatinase 활성측정

HOS 세포를 24-well plate에 배양하면서 여러 농도의 phytoecdysteroid가 첨가된 serum-free 배양액으로 교환하여 48시간동안 처리하였다. 배양이 끝난 후 각각의 배양액을 모아 원심분리 하여 부유세포를 제거하고 필터형의 concentrator (Centricon TM,

Amicon)을 이용하여 배양액을 약 5배 농축하였다. 농축된 배양액은 동량의 2X sample buffer로 혼합한 후 non-reducing 상태로 1 mg/ml의 gelatin이 첨가된 10% SDS-PAGE gel (zymogram gel, Novex, USA)에 mini-gel electrophoresis system (Xcell Mini-Cell, Novex, USA)을 이용하여 25 mA/gel의 조건으로 전기영동을 시행하였다. 전기영동이 끝난 후 renaturing buffer (0.25% triton X-100)으로 30분간 2회 세척하여 gel 내의 SDS를 제거한 후 developing buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.3, 0.2 M NaCl, 6.7 mM CaCl<sub>2</sub>, 및 0.02% Brij 35)로 1회 세척하고 37°C에서 16시간 정도 incubation 하였다. 그 후 gel을 0.5% Coomassie brilliant blue R250으로 45분간 염색한 후 탈색하여 gelatinase 밴드를 관찰하였다.

#### 6. M-CSF dependent bone marrow macrophage (MDBM) 세포 배양

마우스 골수세포를 분리하기 위해 마우스를 경부 염전으로 희생시킨 후 대퇴골과 경골을 무균적으로 적출하고 연조직을 제거하였으며, 장골의 양끝을 절단한 후 26G 주사침을 이용하여 한쪽 끝의 골수강에 0.01% collagenase, 0.05% trypsin 및 0.5 mM EDTA가 포함된 효소 용액 1 ml를 주사하여 골수를 모은 후 30분간 37°C에서 교반하여 골수세포를 모아 원심 분리한 후, 5초간 증류수로 처리하여 적혈구를 제거한 후 40 µm nylon mesh (Cell strainer, Falcon, USA)로 여과하여 단일 세포가 되도록 분산시켰다. 10% FBS와 5 ng/ml M-CSF가 포함된 α-MEM으로 100 mm 배양접시에 6×10<sup>6</sup>개 세포가 되도록 분주하여 24시간 전 배양한 후 미부착세포들을 모았다. 파골세포의 전구세포가 되는 미부착세포를 10% FBS, 10 ng/ml M-CSF and 1 ng/ml TGF-β가 포함된 α-MEM으로 96-well plate에 well당 5×10<sup>4</sup>개의 세포가 되도록 분주하여 배양하였다. 7-8일간 배양하는 동안 10 ng/ml M-CSF, 1 ng/ml TGF-β 및 50 ng/ml RANKL과 여러 농도의 phytoecdysteroid가 포함된 배양액으로 배양하였으며, 3일과 6일째 신선한 배양액으로 교환하였다. 배양이 끝난 후 파골세포의 생성을 검사하기 위하여 세포를 고정하여 TRAP 염색을 시행하였다.

#### 7. 파골세포의 생성측정

MDBM 세포의 배양이 끝난 후 인산완충 생리식염수로 세포를 세척하고 citrate-acetone-formaldehyde 용액으로 고정한 후 tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) 염색을 시행하여 파골세포의 생성 정도를 평가하였다. TRAP 염색은 Sigma 사의 TRAP 염색용 kit를 구입하여 제조사의 지시에 따라 시행하였으며, 기질로 naphthol AS-BI phosphate를 이용하였고, 염색제로는 fast Garnet GBC 용액을 사용하였다. 염색이 끝난 후 광학현미경을 이용하여 핵이 3개 이상인 TRAP-양성 다핵세포를 계수하여 파골세포의 생성지표로 삼았다.

#### 8. 통계처리방법

본 실험의 통계처리는 Student's *t* test 방법을 사용하였으며, 값은 평균과 표준 오차로 나타냈다.

### III. 연구결과

Phytoecdysteroid가 조골세포에 미치는 영향을 관찰하기 위하여, HOS 세포를 이용하여 조골세포의 세포 증식, 염기성 인산분해효소 활성 및 gelatinase 활성을 측정하였다. 또한 파골세포에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 마우스 골수세포를 분리하여 M-CSF와 RANKL을 처리하여 파골세포의 분화를 유도하였고, TRAP에 양성인 다핵세포의 형성을 관찰하여 파골세포의 생성에 미치는 영향을 알아보았다.

#### 1. Phytoecdysteroid가 조골세포의 성장 및 활성화에 미치는 영향

Phytoecdysteroid가 조골세포의 세포 증식률에 미치는 영향을 관찰한 결과, 실험에 사용한 모든 농도에서 조골세포의 세포 증식에는 영향을 미치지 못하였다 (Fig. 1).

Phytoecdysteroid가 조골세포의 활성화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 조골세포의 표지 효소로 알려진 염기성 인산분해효소의 활성을 검사한 결과, 대조군에 비해 증가하는 경향을 보였으나, 0.032 µM의 농도에서만 유의성 있는 증가를 나타냈다 (Fig. 1).

Phytoecdysteroid가 조골세포의 유기기질 분해에 미치는 효과를 알아보기 위하여, gelatinase의 활성을

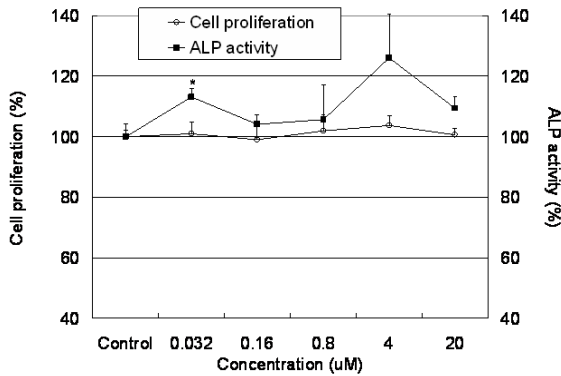


Fig. 1. Effects of phytoecdysteroid on the cell proliferation (○) and ALP activity(■) of osteoblastic cells. Osteoblasts were cultured in the presence or absence of 20-hydroxyecdysone for 48 hours. After culture, cells were collected and counted in a hemocytometer under the light microscope. The data represent a mean ± S.E. of 4 experiments and are expressed as a ratio to the control. Enzyme activity was measured by spectrophotometric method using p-nitrophenyl phosphate as a substrate. The enzyme activity was calculated as nmole substrate cleaved/min/mg protein for HOS cells respectively. Values are Mean ± S.E. (n=5). \*p<0.05.

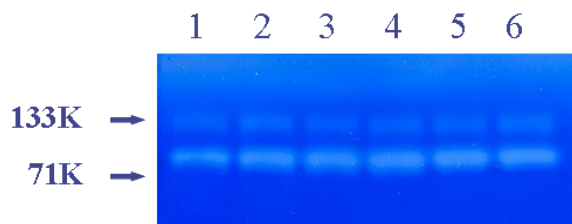


Fig. 2. Effect of phytoecdysteroid on the gelatinase activity. Concentrated conditioned media after culture with various concentrations of 20-hydroxyecdysone was resolved in 10% zymogram gel containing 1 mg/ml gelatin. Numerals are molecular weight standard. Lane 1: control, lane 2-6: 20-hydroxyecdysone 0.032, 0.016, 0.8, 4, and 20 µM.

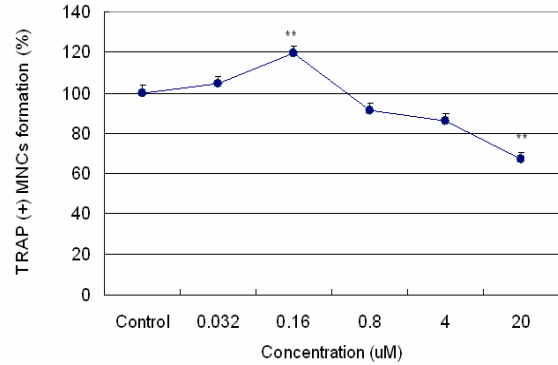


Fig. 3. Effect of phytoecdysteroid on the osteoclast generation culture of MDBM cells. MDBM cells were plated at a density  $5 \times 10^4$  cells/well in a 96-well plate, cultured for 8 days in the presence of 10 ng/ml M-CSF, 30 ng/ml RANKL and various concentrations of 20-hydroxyecdysone. After culture, the TRAP (+) multinucleated cells containing three or more nuclei were counted as osteoclasts. Values are Mean ± S.E. (n=5). \*\*p<0.01.

측정하였다. 72 KDa의 gelatin을 분해한 띠가 관찰되었으며, 0.032, 0.016, 0.8, 4 및 20 µM의 phytoecdysteroid 처리에 의해 gelatinase의 활성이 현저히 증가되었다 (Fig. 2).

## 2. Phytoecdysteroid가 파골세포의 성장 및 활성화에 미치는 영향

Phytoecdysteroid가 파골세포의 생성에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 파골세포 전구세포를 배양하여 M-CSF와 RANKL을 처리하여 TRAP 양성 다핵세포인 파골세포의 분화를 유도하였으며, phytoecdysteroid는 TRAP 양성 다핵세포의 형성을 유의하게 감소시켰다 (Fig. 3).

## IV. 총괄 및 고찰

Ecdysteroid는 곤충의 탈피호르몬으로 알려져 있으며, 기본 steroid 구조를 가지며, 포유동물에 대한 생리적 효과는 잘 알려져 있지 않으나, 식물에서 분리되는 phytoecdysteroid는 포유동물에 대하여 anabolic effect와 adaptogenic effect를 가지고 있다고 알려져

있다.<sup>12)</sup> Phytoecdysteroid는 최근에 superoxide dismutase, catalase 및 glutathione peroxidase를 포함하는 항산화에 관여하는 효소의 활성을 증진시킴으로써 세포의 보호 작용을 가진다고 보고 되었다.<sup>13)</sup> 또한 phytoecdysteroid는 미국 등에서 이미 건강증진 목적으로 phytoecdysteroid의 주 성분인 20-hydroxyecdysone이 포함된 다양한 제품이 출시되어 있으며,<sup>14)</sup> phytoecdysteroid가 피부재생, 면역증강, 간 보호, 혈중 포도당 농도 조절 및 항염증 등과 같은 다양한 약리작용을 나타냄이 보고 되었다.<sup>14)</sup>

본 연구에서는 사람의 골육종에서 분리한 세포주인 HOS 세포주를 조골세포의 실험모델로 이용하였으며, 이 세포주는 염기성 인산 분해효소의 활성, 부갑상선 호르몬 처리에 의한 cyclic adenosine monophosphate 생성, 골조직 단백질의 형성 등 조골세포의 특징을 갖고 있어 조골세포의 실험모델로 널리 이용되는 세포주이다. 조골세포주를 배양하면서 20-hydroxyecdysone를 배양액에 첨가한 경우 조골세포의 증식에는 영향을 미치지 못하였다. 염기성 인산분해효소는 조골세포의 표지효소로 이용되며 골조직 형성의 여러 단계에 관여할 것으로 추측되며,<sup>15,16)</sup> 본 연구에서는 phytoecdysteroid가 조골세포의 활성화에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 조골세포 활성화의 지표로 염기성 인산분해효소의 활성을 측정하여, 실험에 사용한 모든 농도에서 조골세포의 염기성 인산분해효소 활성을 증가시켰다. 따라서 본 연구 결과에 의하면 phytoecdysteroid가 조골세포에 작용하여 세포 증식에 대한 영향 없이 활성화에 영향을 미치는 것으로 사료된다.

골조직은 교원질 및 비교원성 단백질 등과 같은 유기기질에 무기질이 침착되어 있는 구조를 갖고 있으며, 골조직의 분해과정도 무기질의 용해와 유기질의 분해과정에 의해 일어난다.<sup>17)</sup> Matrix metalloproteinase (MMP)는 종양의 침윤과 전이에 중요한 역할을 하는 효소로 알려져 있으며, 특히 gelatinase A와 B (MMP-2와 MMP-9)가 중요한 역할을 나타낸다.<sup>18,19)</sup> MMPs는 zinc 의존형 효소의 하나로 넓은 의미에서 발생기,<sup>20)</sup> 혈관염 및 혈관 손상 후<sup>21)</sup>와 같은 과정 동안 세포 외 기질 단백질을 분해하는 효소이다. Phytoecdysteroid가 조골세포의 유기기질 분해에 미치는 효과를 알아보기 위하여, gelatinase의 활성을 측정하였다. 본 실험에서 20-hydroxyecdysone는 실험한 모든 농도에서 HOS 세포의 gelatinase의 활성을 현저히 증가시켰다. 따라서 phytoecdysteroid는 조

골세포의 gelatinase 효소의 활성을 증가시킴으로써 골조직 대사에 영향을 미치리라 생각된다.

본 연구는 phytoecdysteroid가 파골세포에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 파골세포 전구세포로부터 파골세포의 생성 및 활성화에 미치는 영향을 관찰하였다. 뼈조직에서 유일하게 뼈의 파괴를 담당하는 파골세포는 단핵구/대식세포 계통의 세포이며, 여러 조직에 존재하는 단핵구 대식 전구세포로부터 시험관내에서 파골세포의 생성이 가능하다.<sup>22)</sup> 파골세포가 조혈기관 기원인 것을 이용하여 다수의 파골세포 전구세포를 얻기 위하여 골수세포 배양이 널리 이용되고 있으며<sup>23)</sup> 이러한 골수세포 배양시 관찰되는 다핵세포는 TRAP 양성 반응을 나타내고 CT 수용체<sup>24)</sup>를 가지며 석회화된 상아질을 흡수할 때 주름변연을 형성하는<sup>25)</sup> 등의 파골세포의 특징을 나타내고 있으며, TPAP은 골조직내 다른 세포와 구별할 수 있는 파골세포의 세포화학적 표지효소로 이용된다.<sup>26)</sup> 본 연구에서는 파골세포 전구세포를 배양하여, M-CSF와 RANKL을 처리하여 TRAP 양성 다핵세포인 파골세포의 분화를 유도하였으며, 20-hydroxyecdysone를 처리한 결과 TRAP 양성 다핵세포의 형성이 유의하게 감소되었다. 위의 결과로 phytoecdysteroid가 파골세포의 생성을 억제시킴을 알 수 있었다.

이상의 결과 phytoecdysteroid는 조골세포의 세포 증식에는 영향을 미치지 않았으나, 염기성 인산분해효소 활성과 gelatinase의 활성을 증가시키며 파골세포 생성을 감소시키는 결과를 나타내었으므로, phytoecdysteroid가 골수의 미세환경에서 세포의 조절작용을 하는 물질로 여겨지며, 정확한 작용기전의 규명이 필요하리라 사료된다.

## 참 고 문 헌

1. Wasnich R. What is an osteoporotic fracture? In Rosen CJ (Ed). Osteoporosis: Diagnostic and Therapeutic Principles, Totowa, 1996, Humana Press, pp. 79-88.
2. Ha H, Kwak HB, Lee SW *et al.* Reactive oxygen species mediate RANK signaling in osteoclasts. *Exp Cell Res* 2004;301:119-127.
3. Reddy SV. Regulatory mechanisms operative in osteoclasts. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2004;14: 255-270.
4. Kholodova Y. Phytoecdysteroids: biological effects, application in agriculture and complementary medicine (as presented at the 14-th Ecdysone

- Workshop, July, 2000, Rapperswil, Switzerland). Ukr Biokhim Zh 2004;73:21-29.
5. Cai YJ, Dai JQ, Fang JG *et al.* Antioxidative and free radical scavenging effects of ecdysteroids from *Serratula strangulata*. Can J Physiol Pharmacol 2002; 80:1187-1194.
  6. Syrov VN, Kurmukov AG. Anabolic activity of phytoecdysone-ecdysterone isolated from *Rhaponticum carthamoides*(Willd). IJin Farmakol Toksikol 1976;39:690-693.
  7. Li XQ, Wang JH, Wang SX *et al.* A new phytoecdysone from the roots of *Rhaponticum uniflorum*. J Asian Nat Prod Res 2002;2:225-229.
  8. Yao QY, Hu DF. Determination of ecdysones in polyploid and monoploid *Achyranthes bidentata* Bl. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi 1989;14:210-254.
  9. Chiang HC, Wang JJ, Wu RT. Immunomodulating effects of the hydrolysis products of formosanin C and beta-ecdysone from *Paris formosana* Hayata. Anticancer Res 1992;12:1475-1478.
  10. Catalan RE, Martinez AM, Aragones MD. Alterations in rat lipid metabolism following ecdysterone treatment. Comp Biochem Physiol B 1985;81:771-775.
  11. Syrov VN, Khushbaktova ZA, Komarin AS *et al.* Experimental and clinical evaluation of the efficacy of ecdysten in the treatment of hepatitis. Eksp Klin Farmakol 2001;64:56-58.
  12. Bathori M, Kalman A, Toth G *et al.* Ecdysteroids of *Silene italica* ssp. *nemoralis*, novel approaches of ecdysteroid therapy. Acta Pharm Hung 2004;74: 131-141.
  13. Yang SF, Wu ZJ, Yang ZQ *et al.* Protective effect of ecdysterone on PC12 cells cytotoxicity induced by beta-amyloid25-35. Chin J Integr Med 2005;11: 293-296.
  14. Bathori M. Phytoecdysteroids effects on mammals, isolation and analysis. Mini Rev Med Chem 2002;2: 285-293.
  15. Siffert RS. The role of alkaline phosphatase in osteogenesis. J Exp Med 1951;93:415-422.
  16. Fauran-Clavel MJ, Oustrin J. Alkaline phosphatase and bone calcium parameters. Bone 1986;7:95-99.
  17. Nijweide PJ, Burger EH, Feyen JHM. Cells of bone : Proliferation, differentiation, and hormonal regulation. Physiol Rev 1986;66:855-886.
  18. Matrisian LM. The matrix-degrading metalloproteinases. Bioessays 1992;14:455-463.
  19. Kleiner DE, Stetler-Stevenson WG. Matrix metalloproteinases and metastasis. Cancer Chemother Pharmacol 1999;43:S42-S51.
  20. Galis ZS, Muszynski M, Sukhova GK *et al.* Cytokine-stimulated human vascular smooth muscle cells synthesize a complement of enzyme required for extracellular matrix digestion. Circ Res 1994;75: 181-189.
  21. Johnson JL, van Eys GJ, Angelini GD *et al.* Injury induces dedifferentiation of smooth muscle cells and increased matrix-degrading metalloproteinase activity in human saphenous vein. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2001;21:1146-1151.
  22. Suda T, Takahashi N, Udagawa N *et al.* Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families Endocr Rev 1999;20:345-357.
  23. Takahashi N, Yamana H, Yoshiki S *et al.* Osteoclast-like cell formation and its regulation by osteotropic hormones in mouse bone marrow cultures. Endocrinol 1988;122:1373-1382.
  24. Takahashi N, Akastu T, Sasaki T *et al.* Induction of calcitonin receptors by 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in osteoclast-like multinucleated cells formed from mouse bone marrow cells. Endocrinol 1988;123:1504-1510.
  25. Sasaki T, Takahashi N, Higashi S *et al.* Multinucleated cells formed on calcified dentin from mouse bone marrow cells treated with 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> have ruffled borders and resorb dentin. Anat Rec 1989;224:379-391.
  26. Minkin C. Bone acid phosphatase: Tartrate-resistant acid phosphatase as a marker of osteoclast function. Calcif Tissue Int 1982;34:285-290.

-ABSTRACT-

Effects of Phytoecdysteroid on the Proliferation and Activity of Bone Cells

Seon-Yle Ko

*Department of Oral Biochemistry, School of Dentistry, Dankook University*

Ecdysteroids are known as insect molting hormone. At the same time, ecdysteroids and plant ecdysteroids (phytoecdysteroids) reveal beneficial effects on mammal. The present study was undertaken to determine the possible cellular mechanism of action of phytoecdysteroids in bone metabolism. The effects on the osteoblasts were determined by measuring cell proliferation, alkaline phosphatase (ALP) activity, and gelatinase activity. The effects on the osteoclasts were investigated by measuring tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP)(+) multinucleated cells (MNCs) formation after culturing osteoclast precursors. Phytoecdysteroid treatment showed a increase in ALP activity of osteoblasts. Phytoecdysteroid increased the activity of gelatinase. In addition, phytoecdysteroid decreased the osteoclast generation induced by macrophage-colony stimulating factor (M-CSF) and receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand (RANKL) in (M-CSF)-dependent bone marrow macrophage (MDBM) cell cultures. Taken these results, phytoecdysteroid may be a regulatory protein within the bone marrow microenvironment.

Key words : Osteoblast, Osteoclast, Phytoecdysteroid

---