

# 천마가 RANKL에 의해 유도된 파골세포의 분화에 미치는 효과

최윤홍 · 송정훈<sup>1</sup> · 장성조<sup>2</sup> · 김진국<sup>3</sup> · 최민규\*

원광대학교 의과대학 해부학교실 및 환경과학연구소, 1: 성형외과학교실, 2: 신경외과학교실, 3: 한의과대학 병리학교실

## Effects of *Gastrodia elata* Blune Water Extract on RANKL-induced Osteoclast Differentiation

Yun Hong Choi, Jeong Hoon Song<sup>1</sup>, Sung Jo Jang<sup>2</sup>, Jin Kook Kim<sup>3</sup>, Min-Kyu Choi\*

Department of Anatomy & Institute for Environmental Science, 1: Department of Plastic & Reconstructive Surgery, 2: Department of Neurosurgery, School of Medicine, 3: Department of Pathology, College of Oriental Medicine, Wonkwang University

Impairment of balance between bone-resorbing osteoclasts and bone-forming osteoblasts result in bone disease. Especially, increased osteoclast formation and activity are responsible for bone diseases such as osteoporosis, rheumatoid arthritis, periodontal disease. Natural metabolites of plants have recently received much attention as an alternative tools for the development of novel therapeutic strategy. The aim of this study was to search the natural products to inhibit osteoclast differentiation and was to evaluate of its mechanism. Water extract of *Gastrodia elata* Blune significantly inhibited receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand (RANKL)-induced osteoclast differentiation in bone marrow macrophages (BMMs) in a dose dependent manner. However, water extract of *Gastrodia elata* Blune did not affect cytotoxicity when compared with control. The mRNA expression of c-Fos, NFATc1, and TRAP induced by RANKL was inhibited by water extract of *Gastrodia elata* Blune treatment. Also, water extract of *Gastrodia elata* Blune inhibited the protein expression of c-Fos and NFATc1 expression in BMMs treated with RANKL. Water extract of *Gastrodia elata* Blune suppressed the phosphorylation of p38 induced by RANKL. In general, RANKL considerably inhibited the expression level of Id2 and MafB known as negative regulators of osteoclastogenesis, but RANKL did not inhibit Id2 and MafB expression in BMMs when it was co-treated with *Gastrodia elata* Blune. Taken together, these results suggest that *Gastrodia elata* Blune may be a useful drug in the treatment of bone-related disease.

Key words : *Gastrodia elata* Blune, bone, RANKL, osteoclast

### 서 론

고령화 사회가 진행됨에 따라 골다공증이 사회적인 문제가 되고 있고 골다공증으로 인한 골절은 고령의 환자에게 삶의 질을 떨어뜨리고 많은 사회적인 지출의 요인이 된다. 특히 고령의 고관절 골절 환자에서 매년 24%가량의 사망률을 보이고 있어 골다공증의 예방 및 치료가 중요함을 시사해주고 있다<sup>1)</sup>. 기존에 임상에서 많이 사용되는 골다공증 치료제는 Bisphosphonate 계열의 약물로서 주로 골의 hydroxyapatite와 결합하여 파골세포의 작

용을 저해하고 파골세포의 세포 사멸을 유도할 뿐만 아니라<sup>2)</sup> 파골세포의 분화를 직접적으로 억제한다고 보고되고 있다<sup>3)</sup>. 흔하게 사용되는 약제이기는 하지만 bisphosphonate는 위장관의 불편감이나 치명적인 하악골의 괴사를 야기하는 것으로 알려져 있어 사용에 주의가 필요하다<sup>4)</sup>. 이러한 약물의 부작용 때문에 천연 물질의 골다공증 치료약제의 필요성이 대두 되었고, 최근 천연 물질에서 유래된 curcumin, stewartia koreana extract, tanshinone IIA, 녹용 추출물 등이 파골세포의 분화 및 기능을 억제한다고 보고되었다<sup>5-8)</sup>.

천마는 여러 나라에서 많이 연구 되고 있는 천연물 중에 하나이다. 천마의 뿌리는 수많은 phenolic compound가 포함되어 있어 1500년 이상 동양에서 주로 약재로 사용되고 있다<sup>9,10)</sup>. 천마

\* 교신저자 : 최민규, 익산시 신용동 344-2 원광대학교 의과대학

· E-mail :mkchoi@wku.ac.kr, · Tel : 063-850-6761

· 접수 : 2010/09/14 · 수정 : 2010/10/09 · 채택 : 2010/10/15

의 뿌리는 가을에 수확하여 건조하여 사용되어 지는데, 경련을 멈추게 하는 진경제, 진통제, 구풍제, 쓸개즙 배출 촉진제, 진정제, 강장제 등 여러 용도로 사용되고 있다<sup>11,12</sup>. 천마는 간질과 같은 경련이 동반되는 질환에 일반적으로 쓰이며 류마티스 관절염에도 유용하게 사용되고 있다<sup>9</sup>. 또한 천마의 줄기는 강장제와 최음제로도 사용된다<sup>13</sup>.

골(bone)은 골을 흡수하는 파골세포 (osteoclast)와 골을 형성하는 조골세포 (osteoblast)의 조화로 양질의 골이 유지되는데 이 두 가지 세포의 불균형이 골의 질환을 야기하는 것으로 알려져 있다<sup>14</sup>. 이러한 불균형을 야기하는 상황 중에서도 특히, 폐경기 이후 여성의 에스트로젠 결핍, 만성 염증에 의한 염증 인자의 증가, 류마티스 관절염, 치주염과 같은 골 질환 등이 파골세포의 형성 및 활성의 원인이 되는 것으로 알려져 있다<sup>15</sup>.

파골세포는 골을 흡수하는 유일한 세포로 조혈모세포에서 유래되어 전구세포인 대식세포가 두 가지 중요한 사이토카인인 macrophage colony-stimulating factor (M-CSF)와 receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand (RANKL)에 의해서 tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) 양성 다핵형 세포로 분화된다. RANKL은 Tumor necrosis factor (TNF) superfamily로서 수용체인 RANK와 결합하여 RANK의 세포질 내 부위로 TNF receptor-associated factor 6 (TRAF 6)의 이동을 촉진하여 extracellular signal-regulated kinase (ERK), c-Jun-N-terminal kinase (JNK), p38과 같은 3가지의 중요한 mitogen-activated protein kinases (MAPKs)들을 활성화 시킨다<sup>16</sup>. 이들 중 p38과 JNK는 파골세포의 분화에 중요한 역할을 하며, ERK는 파골세포 생존에 관여한다고 알려졌다<sup>17</sup>. 생존에 연구에서 p38의 지속적인 활성화는 세포내에서 NFATc1 발현이 증가하고 그 억제제인 SB203580이 c-fos와 NFATc1 발현을 억제하여 p38이 파골세포 분화에 매우 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다<sup>18</sup>. 또한 JNK의 활성화 억제를 통한 연구에서 NFATc1과 calcium/calmodulin-dependent protein kinase (CaMK)의 발현이 억제되어 파골세포의 분화가 저해되는 결과를 통해 JNK의 활성화가 중요함이 보고되었다<sup>19</sup>.

RANKL에 의해 활성화되는 전사인자 NF- $\kappa$ B, PU.1, Mitochondrial transcription factor (MITF), c-fos, nuclear factor of activation T cells (NFAT) c1은 TRAP, osteoclast-specific receptor (OSCAR), cathepsin K, dendritic-cell-specific transmembrane protein (DC-STAMP)등과 같은 파골세포 유도인자 발현을 촉진한다. 특히 c-fos는 분화 초기에 증가되는 전사인자로 NFATc1의 발현을 촉진하며 NFATc1은 c-fos의 이합체인 AP-1과 세포 내  $Ca^{2+}$ 의 증가로 인해 활성화 되는데 파골세포의 분화뿐만 아니라 DC-STAMP와 d2 isoform of vacuolar (H<sup>+</sup>) ATPase (v-ATPase) V(0) domain의 발현을 유도하여 파골세포의 융합을 촉진한다고 보고되었다<sup>20</sup>. 따라서 c-fos와 NFATc1 발현의 억제는 파골세포의 분화를 억제함으로써 골 질환의 치료에 중요한 단서를 제공할 수 있을 것이다.

천마가 여러 질병에 사용되고 있지만 파골세포의 증가에 의한 골 질환에 대한 효과는 검증되지 않았다. 따라서 본 연구에서

는 RANKL에 의한 파골세포의 분화에 천마 물 추출물의 효과를 검증하였고 억제 작용기전을 규명하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

본 연구에 사용한 천마 (*Gastrodia elata* Blune)는 물로 추출하여 감압농축한 후 동결 건조하여 파우더 형태로 얻었다. Human RANKL과 M-CSF는 peprotech (London, UK)사의 제품을 사용하였다. XTT assay kit는 Roche (Indianapolis, IN, USA)사에서 구입하였다. phospho (p)-p38, p38, p-JNK, JNK, p-ERK, ERK, p-I- $\kappa$ B, I- $\kappa$ B, p-Akt, Akt 항체는 Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA)사의 제품을 사용하였다. Actin 항체와 TRAP 용액은 Sigma Aldrich사에서 구입하였다.

### 2. 파골세포의 분화

5주령 생쥐의 넓적다리뼈와 정강뼈를 분리하고 골수강을 1cc 주사기로 수세하여 골수세포를 얻었다. 분리된 골수세포는 10% FBS, 항생제, M-CSF (30 ng/ml)가 포함된  $\alpha$ -minimum essential medium ( $\alpha$ -MEM)배지에서 3일간 배양하였다. 3일 후, 부착된 세포를 포식세포 (bone marrow macrophage, BMM)로 사용하였다. 포식세포는 M-CSF (30 ng/ml)와 RANKL (50 ng/ml)을 첨가하여 배양하고 천마 물 추출물을 농도별로 처리하였다. 4일 후, 배양한 세포는 TRAP 용액 (Sigma Aldrich, USA)으로 염색하고 붉은색으로 염색된 세포는 파골세포로 간주하였다. 생쥐는 특정 병원균 제어 동물실에서 생장 시키고 원광대학교 의과대학 동물 실험 윤리 위원회의 회칙에 따라 동물 실험을 수행하였다.

### 3. XTT 분석

포식세포는  $1 \times 10^4$ /well의 밀도로 96-well plate에 첨가하고 천마 물 추출물과 M-CSF (30 ng/ml)를 첨가하여 3일간 배양하였다. 3일 후, XTT 용액 50  $\mu$ l를 각각의 well에 첨가하고 4시간 배양 후 ELISA reader (Molecular Devices, CA, USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 확인하였다.

### 4. RT-PCR 분석

RNA는 배양된 각각의 세포에서 TRIzol (Invitrogen) 용액으로 제조사의 방법에 따라 분리하였다. 분리한 RNA 1  $\mu$ g은 oligo dT primer, dNTP, buffer, dithiothreitol, RNase inhibitor와 Superscript II reverse transcriptase를 이용하여 cDNA로 합성하였다. 합성된 cDNA는 다음과 같은 primer들을 이용하여 PCR 증폭을 하였다.

c-Fos sense, 5'- CTGGTGCAGCCCCTCTGGTC-3';

c-Fos antisense, 5'- CTTTCAGCAGATTGGCAATCTC-3';

NFATc1 sense, 5'- CAACGCCCTGACCACCGATAG-3';

NFATc1 antisense, 5'- GGCTGCCTTCCGTCTCATAGT-3';

TRAP sense, 5'-ACTTCCCCAGCCCTTACTAC-3';

TRAP antisense, 5'-TCAGCACATAGCCCACACCG-3';  
 OSCAR sense, 5'-CTGCTGGTAACGGATCAGCTCCCCAGA-3';  
 OSCAR antisense, 5'-CCAAGGAGCCAGAACCTTCGAAACT-3';  
 Id2 sense, 5'-AAGGAACTGGTGCCAGCAT-3';  
 Id2 antisense, 5'-CAAGACACCTGGGCAAGACG-3';  
 MafB sense, 5'-AGCAGGTGTGACTCACGATG-3';  
 MafB antisense, 5'-CCTTGTAGGCGTCTCTCTCG-3';  
 GAPDH sense, 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3';  
 GAPDH antisense, 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'.

PCR 후, 증폭된 cDNA는 1% agarose gel에서 분리하였고 Et-Br로 염색하여 U.V.상에서 관찰하였다.

### 5. Western blot 분석

배양된 세포는 lysis buffer (50 mM tris-Cl, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100, 1 mM sodium fluoride, 1 mM sodium vanadate, 1% deoxycholate, and protease inhibitors)를 이용하여 용해하고 원심분리 (14,000 rpm)를 수행하여 순수한 단백질을 얻었다. 단백질은 DC Protein assay kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 사용하여 정량하고 동량의 단백질은 10% SDS-polyacrilamide gel에서 분리하였다. 분리된 단백질은 PVDF 막 (Amersham Biosciences)으로 옮기고 여러 항체를 이용하여 단백질 발현 정도를 확인하였다.

### 6. 통계분석

정량적인 결과는 평균값과 표준편차로 표시하였다. 통계적인 차이는 Student's t-test를 이용하여 분석하였고 p 값이 0.05 이하인 경우, 통계적으로 유의한 것으로 간주하여 별표(\*)로 표시하였다.

## 결 과

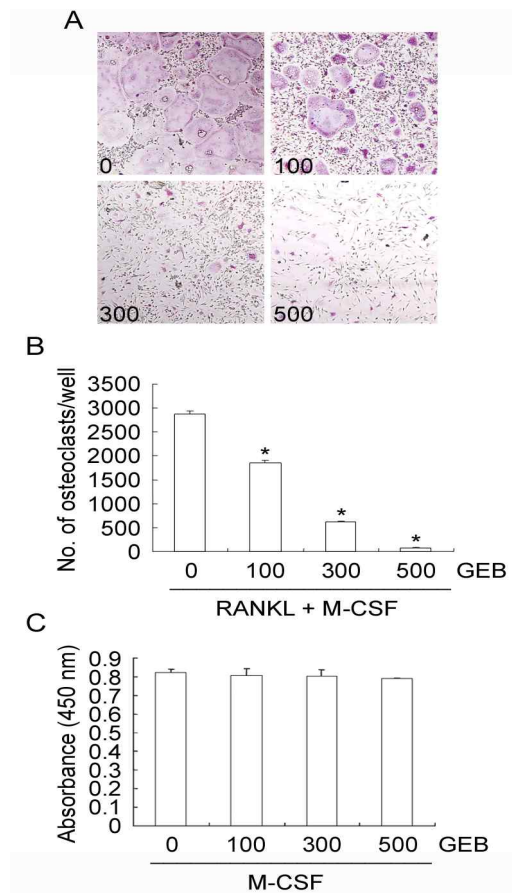
### 1. 천마 물 추출물이 파골세포의 분화에 미치는 영향

파골세포의 분화는 골다공증과 같은 골 질환에 중요하게 작용한다. 본 실험에서는 포식세포에서 파골세포로의 분화에 천마 물 추출물의 효과를 검증하기 위하여 M-CSF와 RANKL을 처리하고 천마 물 추출물을 농도 별로 처리하여 4일간 배양하였다. 파골세포의 유무를 확인하기 위해 TRAP 용액으로 염색한 결과 대조군 세포에서는 양성 다핵형 파골세포가 형성되었지만 천마 물 추출물을 처리한 실험군에서는 농도 의존적으로 파골세포의 분화가 억제되었다(Fig. 1A). TRAP 양성 파골세포의 수도 농도 의존적으로 감소되었다(Fig. 1B). 천마 물 추출물에 의한 파골세포의 분화가 세포 독성과 연관되어 있는지 확인하기 위하여 독성 실험을 수행하였으나 파골세포의 분화를 억제하는 효과를 보이는 농도에서는 세포 독성이 나타나지 않았다(Fig. 1C).

### 2. RANKL에 의해 유도되는 유전자의 발현에 미치는 천마 물 추출물의 효과

RANKL은 RANK와의 결합을 통해 파골세포의 분화에 필수

적인 유전자 발현을 유도한다. c-fos는 파골세포 분화의 초기 단계에 중요한 전사인자로 NFATc1의 발현을 촉진 한다<sup>21)</sup>. 따라서 RANKL에 의한 c-fos, NFATc1의 발현과 파골세포의 지표인 TRAP과 OSCAR의 발현에 천마 물 추출물의 효과를 검증하였다. 포식세포에 RANKL을 처리했을 때 c-fos, NFATc1, TRAP mRNA 발현이 증가되었지만 천마 물 추출물을 처리한 실험군에서는 이들 유전자의 발현이 강력하게 억제되었다(Fig. 2).



**Fig. 1. *Gastrodia elata* Blune inhibits RANKL-induced osteoclast differentiation.** (A) Bone marrow macrophages (BMMs) were cultured for 4 days with M-CSF (30 ng/ml) and RANKL (100 ng/ml) in the presence of *Gastrodia elata* Blune (500 µg/ml). Cells were fixed in 3.7% formalin, permeabilized with 0.1% Triton X-100, and stained with TRAP solution. Pictures were taken using a light microscope (Magnification: x100) (B) TRAP-positive cells were counted as osteoclasts. Asterisks indicate a significant difference (p<0.05) between GEB treated cells and control. (C) BMMs were cultured for 3 days with M-CSF (30 ng/ml) in the presence of *Gastrodia elata* Blune. After 3 days, 50 µl of XTT reagents were added to each well and further incubated for 4 hours. The absorbance was measured at 450 nm using a microplate reader.

### 3. RANKL에 의해 유도되는 단백질의 발현에 미치는 천마 물 추출물의 효과

전사인자 c-fos와 NFATc1 전사인자는 TRAP, DC-STAMP, OSCAR등 파골세포의 분화에 중요한 단백질 발현을 조절한다. 본 실험에서는 RANKL에 의하여 유도되는 이들 단백질의 발현 정도를 천마 추출물을 투여하여 검증하였다. RANKL에 의해 유도되는 c-fos는 전사인자 AP-1의 주요구성 단백질로서 NFATc1

의 발현을 유도하는데, 이 단백질의 발현은 RANKL을 투여하고 12시간에 가장 높게 발현됐으나 천마 물 추출물의 처리에 의해 c-Fos 단백질의 발현이 억제되었다(Fig. 3). 또한 c-fos와 NFATc1의 발현은 천마 물 추출물의 농도에 의존적으로 감소하였다(Fig. 3). 이 결과로 천마 물 추출물이 c-Fos와 NFATc1의 발현을 억제함으로써 TRAP 양성 파골세포의 분화를 억제한다고 할 수 있다.

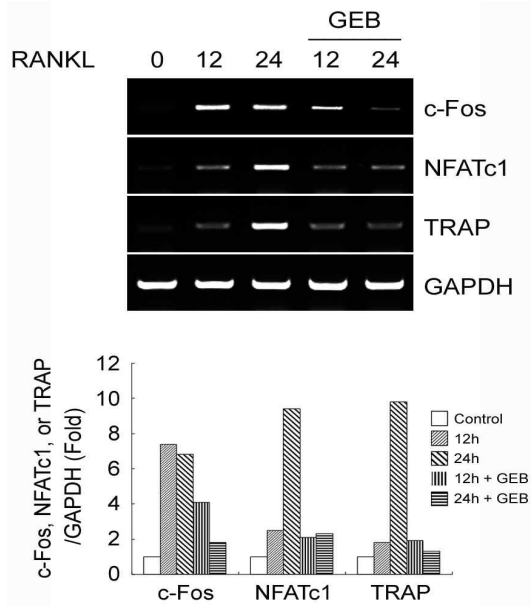


Fig. 2. RANKL-induced mRNA expression is inhibited by *Gastrodia elata* Blune. BMMs were pretreated with or without *Gastrodia elata* Blune (500  $\mu$ g/ml) for 1 hour and then stimulated with M-CSF (20 ng/ml) and RANKL (100 ng/ml) for the indicated time. Total RNA was isolated, and 1  $\mu$ l of cDNA was used as template for RT-PCR (top). The mRNA expression of the TRAP, c-Fos, and NFATc1 genes was accessed by RT-PCR. Relative levels of TRAP, c-Fos, and NFATc1 mRNA were quantified by densitometric analysis and were normalized to GAPDH (bottom).

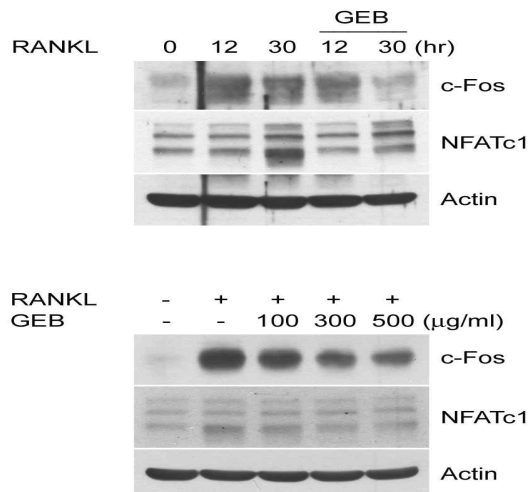


Fig. 3. Inhibition of RANKL-induced c-Fos and NFATc1 expression by *Gastrodia elata* Blune. (A) BMMs were pretreated with or without *Gastrodia elata* Blune (500  $\mu$ g/ml) for 1 hour and then stimulated with RANKL (100 ng/ml) for the indicated time. The cell lysates were analyzed by Western blotting with antibodies to c-Fos, NFATc1, and actin. (B) BMMs were pretreated with or without the indicated concentrations of *Gastrodia elata* Blune for 1 hour and then stimulated with RANKL (100 ng/ml) for 30 h.

4. RANKL의 신호전달 단백질의 활성화에 미치는 천마 물 추출물의 효과

MAPKs는 RANKL에 의해 활성화되는 단백질로 파골세포의 분화에 중요한 역할을 한다고 보고되었다<sup>15)</sup>. 특히, p38과 JNK의 활성화는 파골세포 분화에 중요한 신호 전달 경로이다<sup>14)</sup>. 따라서 천마 물 추출물의 파골세포 분화 억제 작용기전을 규명하기 위해 MAPKs의 활성화에 천마 물 추출물의 효과를 검증하였다. RANKL은 p38, JNK, ERK, I- $\kappa$ B의 인산화를 유도하였지만, 천마 물 추출물을 처리한 실험군에서는 p38의 인산화가 억제되었다(Fig. 4). 이들 결과로 천마 추출물이 p38의 신호전달 경로를 억제함으로써 포식세포에서 파골세포의 분화를 억제한다고 할 수 있다.

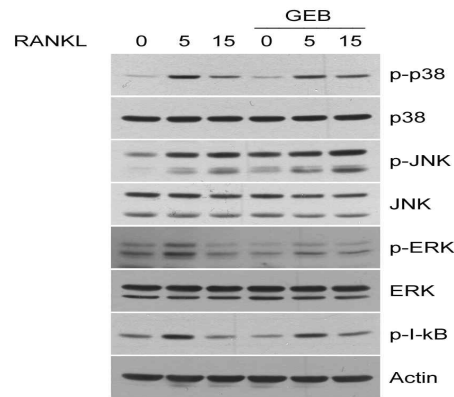


Fig. 4. *Gastrodia elata* Blune inhibits RANKL-induced phosphorylation of p38. BMMs were pretreated with or without *Gastrodia elata* Blune (500  $\mu$ g/ml) for 1 hour and then stimulated with RANKL (100 ng/ml) for the indicated time. The cell lysates were analyzed by Western blotting with the indicated antibodies.

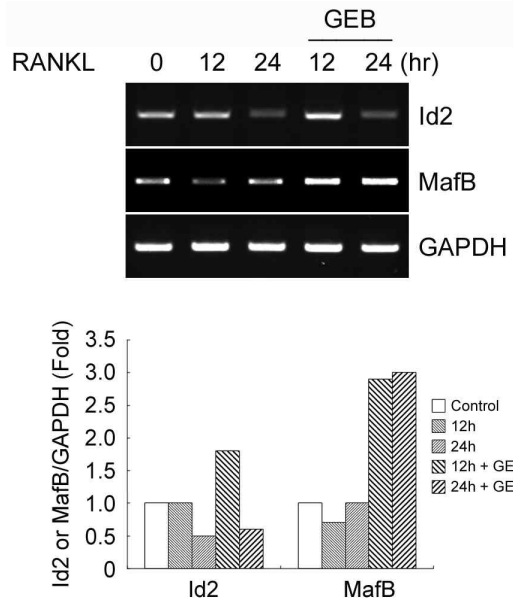


Fig. 5. *Gastrodia elata* Blune reverses the mRNA level of MafB and Id2 suppressed by RANKL. BMMs were pretreated with or without *Gastrodia elata* Blune (500  $\mu$ g/ml) for 1 hour and then stimulated with RANKL (100 ng/ml) for the indicated time. Total RNA was isolated, and 1  $\mu$ l of cDNA was used as template for RT-PCR (top). The mRNA expression of the indicated genes was analyzed by RT-PCR. Relative levels of Id2 and MafB mRNA were quantified by densitometric analysis and were normalized to GAPDH (bottom).

5. 파골세포 분화 억제 유전자의 발현에 천마 물 추출물의 효과

RANKL은 파골세포의 분화에 필수적인 유전자 발현을 유도한다. 그러나 최근 RANKL가 파골세포 분화를 저해하는 유전자로 알려진 Id2와 MafB의 발현을 억제하여 파골세포의 분화를 촉진한다고 보고하였다<sup>22,23</sup>). 따라서 RANKL에 의한 Id2와 MafB 발현에 억제에 관한 천마 물 추출물의 효과를 확인하였다. 포식세포에 RANKL을 처리했을 때 Id2와 MafB mRNA 발현이 억제되었지만, 천마 물 추출물을 처리한 실험군에서는 Id2와 MafB의 발현이 유지되었다(Fig. 5).

고찰

골 질환의 대부분은 파골세포의 증가로 인하여 유발되며<sup>24-26</sup>) 여러 가지 파골세포의 활성이 증가되는 상황에서 파골세포의 생성과 활성을 억제하는 것이 골 소실을 막는 중요한 기전으로 이해되고 있다. 기존 임상에서 많이 사용되고 있는 약제들은 부작용들이 있어 부작용을 줄이고 효과적인 약제들의 개발이 필요한 실정이다. 식물에서 유래된 천연물질은 화학적으로 합성된 약제보다 비교적 부작용이 없으며, 고대에서부터 현재에 이르기까지 여러 질환에서 민간요법으로 사용되고 있다. 최근에는 녹차의 성분인 Epigallocatechin-3-gallate 이 항염 작용과 함께 파골세포 분화를 억제하는 기능이 있다고 보고되었다<sup>27</sup>). 천마는 경련을 멈추게 하는 진경제, 진통제, 구풍제, 쓸개즙 배출 촉진제, 진정제, 강장제 등 여러 용도로 사용되고 있을 뿐만 아니라<sup>11,12</sup>), 간질과 같은 경련이 동반되는 질환에 일반적으로 쓰이며 류마티스 관절염에도 유용하게 사용되고 있다<sup>9</sup>). 하지만 파골세포와 골 질환에 관련한 효과는 보고되지 않았다. 본 저자는 천연 약제들을 스크리닝하여 천마 물 추출물이 파골세포의 분화를 억제하는 효과가 있음을 알게 되었고(Fig. 1), 천마 물 추출물이 농도 의존적으로 파골세포의 분화를 억제하여 골다공증을 비롯한 골 소실을 유도하는 질환에 효과적인 약제로서의 가능성을 확인하였다.

RANKL과 RANK는 파골세포 분화와 기능에 필수적인 인자이다<sup>28</sup>). RANKL은 파골세포의 분화를 유도하는 c-fos와 NFATc1의 발현을 유도한다. NFATc1이 결핍된 배아줄기 세포는 파골세포로 분화가 되지 않았다<sup>29,30</sup>). 또한 RANKL에 의한 NFATc1의 증가는 c-fos가 중요한 역할을 한다고 보고되었다<sup>29,31</sup>). 그러므로 파골세포에서의 c-fos와 NFATc1의 조절은 분화와 기능에 중요하다 할 수 있다. 본 연구에서 천마 물 추출물은 RANKL에 의해 유도된 파골세포의 중요 전사인자 c-fos와 NFATc1의 mRNA 발현을 억제하였다(Fig. 2). 또한 이들 단백질 발현은 천마 물 추출물의 농도에 의존적으로 억제되었다(Fig. 3). 이 결과를 통해 천마 물 추출물은 c-fos의 억제를 통한 NFATc1의 감소로 RANKL에 의한 파골세포의 분화를 억제한다고 할 수 있다.

파골세포의 전구세포인 포식세포에서 발현되는 RANK와 RANKL과의 결합으로 RANK의 세포질 부위로 TRAF 계열 단백질 결합이 촉진되고 MAPKs인 JNK, p38, ERK와 같은 신호전달 단백질의 활성화를 통하여 파골세포 분화에 필수적인 NF-κB, NFATc1, AP-1과 같은 전사인자가 유도 된다<sup>32</sup>). 이들 MAPKs들

의 활성화는 RANKL에 의한 c-fos, NFATc1의 발현을 증계하는데, 특히 p38과 JNK의 인산화는 파골세포의 분화를 촉진시키는 단백질로 알려져 있다<sup>17</sup>). 그러므로 이들 MAPKs의 억제는 RANKL에 의한 c-fos, NFATc1의 발현을 감소시킬 수 있다. 저자 등은 천마 물 추출물의 파골세포 억제 작용기전을 규명하기 위하여 RANKL의 신호 전달 경로에 천마 물 추출물이 미치는 영향을 연구하였다. RANKL은 MAPKs의 여러 경로의 인산화를 촉진하였으나 천마 물 추출물은 p38의 인산화를 억제하였다(Fig. 4). 결과적으로 천마 물 추출물에 의한 파골세포 분화 억제 작용기전은 p38의 발현이 저해됨과 연관이 있다고 말할 수 있겠다.

저자들은 천마의 물 추출물이 파골세포의 분화를 억제하는 것을 확인한 후 파골세포 분화를 저해하는 물질로 알려진 Id와 MafB와의 연관성을 연구하였다. Id는 4가지 종류로 이루어져 있는데 Id1, Id2, Id3가 파골세포의 전구세포에서 발현이 증가되어 있고 이러한 유전자의 발현은 RANKL에 의해 감소하는 것으로 알려져 있다<sup>22</sup>). 또한 Id 유전자의 과발현은 RANKL에 의한 파골세포 분화를 억제하고 OSCAR의 발현도 억제하는 것으로 보고되었다<sup>22</sup>). Id와 더불어 파골세포 분화를 억제하는 조절인자로 알려진 MafB는 다른 세포에서는 발현되지 않고 단핵세포와 포식세포에서 선택적으로 발현되며 전구세포에서는 거의 발현이 되지 않다가 성숙세포로 갈수록 발현이 증가한다고 알려져 있다<sup>33</sup>). MafB는 파골세포의 전구세포에서 발현이 현저히 증가되어 있으며 RANKL의 자극에 의해 P38이나 JNK경로를 통해 발현이 억제되고, MafB가 과도하게 발현되면 BMMs에서 RANKL에 의한 NFATc1과 OSCAR의 발현이 억제 되는 것으로 알려져 있다<sup>23</sup>). 대표적으로 RANKL에 의한 파골세포 분화에 저해하는 조절인자로 알려진 Id와 MafB의 발현이 천마 추출물에 의해 유지되었는데 이는 P38의 억제로 인한 현상으로 추측된다.

본 연구를 통해 천연물인 천마의 추출물이 RANKL에 의한 파골세포 분화 억제에 효능이 있음을 처음으로 규명하였다. 이러한 효능은 천마 물 추출물이 p38의 인산화 억제를 통해 전사인자인 c-fos와 NFATc1의 발현을 감소시키고, 파골세포 분화에 억제 작용을 하는 것으로 알려진 Id와 MafB의 발현은 유지함으로써 나타나는 것을 확인하였다. 결론적으로, 한의학에서 사용되는 천마 추출물은 파골세포의 분화를 억제함으로써 골 손실을 막을 수 있으며 이것은 골 질환 치료에 도움을 줄 수 있으리라 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2008학년도 원광대학교 교비지원에 의해서 수행되었습니다.

참고문헌

1. Melton, L.J. 3rd. Who has osteoporosis? A conflict between clinical and public health perspectives. *J. Bone Miner. Res.* 15: 2309-2314, 2000.
2. Halasy-Nagy, J.M., Rodan, G.A., Reszka, A. Inhibition of

- bone resorption by alendronate and risedronate does not require osteoclast apoptosis. *Bone* 29: 553-559, 2001.
3. Kwak, H.B., Kim, J.Y., Kim, K.J., Choi, M.K., Kim, J.J. Risedronate directly inhibits osteoclast differentiation and inflammatory bone loss. *Biol. Pharm. Bull.* 32: 1193-1198, 2009.
  4. 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. Bisphosphonate-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.
  5. Oh, S., Kyung, T.W., Choi, H.S. Curcumin inhibits osteoclastogenesis by decreasing receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand (RANKL) in bone marrow stromal cells. *Mol. Cells* 26: 486-489, 2008.
  6. Park, C.K., Kim, H.J., Kwak, H.B., Lee, T.H., Bang, M.H., Kim, C.M., Lee, Y., Chung, D.K., Baek, N.I., Kim, J., Lee, Z.H., Kim, H.H. Inhibitory effects of *Stewartia koreana* on osteoclast differentiation and bone resorption. *Int. Immunopharmacol.* 7: 1507-1516, 2007.
  7. Kwak, H.B., Yang, D., Ha, H., Lee, J.H., Kim, H.N., Woo, E.R., Lee, S., Kim, H.H., Lee, Z.H. Tanshinone IIA inhibits osteoclast differentiation through down-regulation of c-Fos and NFATc1. *Exp. Mol. Med.* 38: 256-264, 2006.
  8. Kwak, H.B., Kim, J.H., Kim, D.J., Kwon, Y.M., Oh, J., Kim, Y.K. Effect of water extract of deer antler in osteoclast differentiation. *Korean J. Oriental Physiology & pathology*, 22: 891-895, 2008.
  9. Huang, Z.L. Recent developments in pharmacological study and clinical application of *Gastrodia elata* in China. *Zhong. Xi. Yi. Jie. He. Za. Zhi.* 5: 251-254, 1985.
  10. Li, N., Wang, K.J., Chen, J.J., Zhou, J. Phenolic compounds from the rhizomes of *Gastrodia elata*. *J. Asian Nat. Prod. Res.* 9: 373-377, 2007.
  11. Yeung Him-Che. *Handbook of Chinese herbs and formulas.* Institute of Chinese Medicine, Los Angeles 1985.
  12. Bown, D. *Encyclopaedia of herbs and their uses.* Dorling Kindersley, London. 1995.
  13. Duke, J.A., Ayensu, E.S. *Medicinal plants of China.* 1985.
  14. Boyle, W.J., Simonet, W.S., Lacey, D.L. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*, 423: 337-342, 2003.
  15. Teitelbaum, S.L., Ross, F.P. Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nat. Rev. Genet.* 4: 638-649, 2003.
  16. Lee, S.E., Woo, K.M., Kim, S.Y., Kim, H.M., Kwack, K., Lee, Z.H., Kim, H.H. The phosphatidylinositol 3-kinase, p38, and extracellular signal-regulated kinase pathways are involved in osteoclast differentiation. *Bone* 1: 71-77, 2002.
  17. Tanaka, S., Miyazaki, T., Fukuda, A., Akiyama, T., Kadono, Y., Wakeyama, H., Kono, S., Hoshikawa, S., Nakamura, M., Ohshima, Y., Hikita, A., Nakamura, I., Nakamura, K. Molecular mechanism of the life and death of the osteoclast. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1068: 180-186, 2006.
  18. Huang, H., Chang, E.J., Ryu, J., Lee, Z.H., Lee, Y., Kim, H.H. Induction of c-Fos and NFATc1 during RANKL-stimulated osteoclast differentiation is mediated by the p38 signaling pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 351: 99-105, 2006.
  19. Chang, E.J., Ha, J., Huang, H., Kim, H.J., Woo, J.H., Lee, Y., Lee, Z.H., Kim, J.H., Kim, H.H. The JNK-dependent CaMK pathway restrains the reversion of committed cells during osteoclast differentiation. *J. Cell Sci.* 121: 2555-2564, 2008.
  20. 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: 176-185, 2008.
  21. Takayanagi, H., Kim, S., Koga, T., Nishina, H., Isshiki, M., Yoshida, H., et al: Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts. *Developmental Cell*, 3: 889-901, 2002.
  22. Lee, J., Kim, K., Kim, J.H., Jin, H.M., Choi, H.K., Lee, S.H., Kook, H., Kim, K.K., Yokota, Y., Lee, S.Y., Choi, Y., Kim, N. Id helix-loop-helix proteins negatively regulate TRANCE-mediated osteoclast differentiation. *Blood* 107: 2686-2693, 2006.
  23. Kim, K., Kim, J., Lee, J., Kim, K., Lee, S., Kim, N. MafB negatively regulates RANKL-mediated osteoclast differentiation. *Blood* 109: 3253-3259, 2007.
  24. Merkel, K.D., Erdmann, J.M., McHugh, K.P., Abu-Amer, Y., Ross, F.P., Teitelbaum, S.L. Tumor necrosis factor-alpha mediates orthopedic implant osteolysis. *Am. J. Pathol.* 154: 203-210, 1999.
  25. Liu, X.D., Zhu, Y.K., Umino, T., Spurzem, J.R., Romberger, D.J., Wang, H., Reed, E., Rennard, S.I. Cigarette smoke inhibits osteogenic differentiation and proliferation of human osteoprogenitor cells in monolayer and three-dimensional collagen gel culture. *J. Lab. Clin. Med.* 137: 208-219, 2001.
  26. Redlich, K., Hayer, S., Ricci, R., David, J.P., Tohidast-Akrad, M., Kollias, G., Steiner, G., Smolen, J.S., Wagner, E.F., Schett, G. Osteoclasts are essential for TNF-alpha-mediated

- joint destruction. *J. Clin. Invest.* 110: 1419-1427, 2002.
27. Lee, J.H., Jin, H., Shim, H.E., Kim, H.N., Ha, H., Lee, Z.H. Epigallocatechin-3-gallate inhibits osteoclastogenesis by down-regulating c-Fos expression and suppressing the nuclear factor-kappaB signal. *Mol. Pharmacol.* 77: 17-25, 2010.
28. Dougall, W.C., Glaccum, M., Charrier, K., Rohrbach, K., Brasel, K., De Smedt, T., Daro, E., Smith, J., Tometsko, M.E., Maliszewski, C.R., Armstrong, A., Shen, V., Bain, S., Cosman, D., Anderson, D., Morrissey, P.J., Peschon, J.J., Schuh, J. RANK is essential for osteoclast and lymph node development. *Genes Dev.* 13: 2412-2424, 1999.
29. Takayanagi, H. Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nat. Rev. Immunol.* 7: 292-304, 2007.
30. 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: 1261-1269, 2005.
31. Matsuo, K., Galson, D.L., Zhao, C., Peng, L., Laplace, C., Wang, K.Z., Bachler, M.A., Amano, H., Aburatani, H., Ishikawa, H., Wagner, E.F. Nuclear factor of activated T-cells (NFAT) rescues osteoclastogenesis in precursors lacking c-fos. *J. Biol. Chem.* 279: 26475-26480, 2004.
32. Galibert, L., Tometsko, M.E., Anderson, D.M., Cosman, D., Dougall, W.C. The involvement of multiple tumor necrosis factor receptor (TNFR)-associated factors in the signaling mechanisms of receptor activator of NF- $\kappa$ B, a member of the TNFR superfamily. *J. Biol. Chem.* 273: 34120-34127, 1998.
33. Sieweke, M., Tekotte, H., Frampton, J., Graf, T. MafB is an interaction partner and repressor of Ets-1 that inhibits erythroid differentiation. *Cell* 85: 49-60, 1996.