

골쇄보가 RANKL에 의해 유도되는 파골세포의 분화에 미치는 영향

곽성철 · 문서영² · 곽한복 · 전병훈⁴ · 오재민 · 최민규¹ · 김정중 · 장성조^{3*}

원광대학교 의과대학 해부학교실 & 골격계 질환 연구소 및 의과학연구소,

1: 원광대학교 의과대학 해부학교실 & 골격계 질환 연구소 및 환경과학연구소,

2: 산본병원 마취통증의학과, 3: 군산의료원 신경외과, 4: 원광대학교 한의과대학 병리학교실 & 한국전통의학연구소

Effect of *Drynariae Rhizoma* in RANKL-induced Osteoclast Differentiation

Seong Cheoul Kwak, Seo Young Moon², Han Bok Kwack, Byung Hun Jeon⁴, Oh Jae Min, Min Kyu Choi¹,
Jeong Joong Kim, Sung Jo Jang^{3*}

Department of Anatomy, School of Medicine, Wonkwang University & Institute for Skeletal Disease and Wonkwang Medical Science Institute

1: Department of Anatomy, School of Medicine, Wonkwang University & Institute for Skeletal Disease and Institute for Environmental Science, 2: Division of Anesthesiology and Pain Medicine, Sanbon Medical Center,

3: Department of Neurosurgery, Gunsan Medical Center,

4: Department of Pathology, College of Korean Medicine & Research Center of Traditional Korean Medicine, Wonkwang University

Bone homeostasis is regulated by the balance between bone-resorbing osteoclasts and bone-forming osteoblasts. Osteoporosis, rheumatoid arthritis and periodontal disease are related with up-regulated osteoclast formation and its activity. Gol-Swae-Bo(*Drynariae Rhizoma*) is widely used on skeletal disease. In this study, we sought to examine the effect of *Drynariae Rhizoma* in RANKL-induced osteoclast differentiation. The extract of *Drynariae Rhizoma* inhibited RANKL-induced osteoclast differentiation in a dose dependent manner without cytotoxicity. receptor activator of nuclear factor-kB ligand(RANKL) mediated IκB degradation in bone marrow macrophages(BMMs). However, the extract of *Drynariae Rhizoma* inhibited RANKL induced IκB degradation in BMMs. And mRNA expression of OSCAR, TRAP, c-Fos and NFATc1 was suppressed by the extract of *Drynariae Rhizoma*. Moreover, the extract of *Drynariae Rhizoma* inhibited the protein expression of NFATc1 and c-Fos induced by RANKL. After all the analysis, these results suggest that *Drynariae Rhizoma* may be good candidate of medicine in the treatment of bone-related disease.

Key words : *Drynariae Rhizoma*, Osteoclast, RANKL, Osteoporosis

서 론

뼈(Bone)는 인체 내에서 고정적인 구조처럼 보이지만 실제로는 조골세포(Osteoblast)와 파골세포(Osteoclast)가 함께 작용하여 균형을 유지해 나가는 역동적인 하나의 기관이다. 이 중 파골세포는 골흡수(bone resorption)를 담당하는 세포¹⁾로 인체가 건강한 상태(Healthy)에 있을 때는 문제가 없지만, 조골세포와 파골세포의 균형이 깨진 경우, 특히 폐경기 이후 일어나는 여성

* 교신저자 : 장성조, 전북 익산시 신용동 344-2 원광대학교 의과대학

· E-mail : jang4025@wku.ac.kr, · Tel : 063-850-6757

· 접수 : 2012/07/24 · 수정 : 2012/08/06 · 채택 : 2012/08/10

의 에스트로겐 결핍(Estrogen deficiency)²⁾과 염증반응(Inflammation)의 염증인자에 의하여 유도되는 파골세포의 분화의 증가는 골다공증(Osteoporosis), 류마티스(Rheumatism), 치주질환(Periodontal Disease)등의 질병에 큰 영향을 미친다.

파골세포의 분화에는 RANKL과 Macrophage colony-stimulating factor(M-CSF)가 필수적이며, 또한 이 두 가지 사이토카인은 파골세포의 생존 및 기능을 유지하는 데에도 중요한 역할을 한다³⁾. 그 중에서 RANKL은 파골세포로 분화하는 전구 세포인 대식세포의 여러 수용체 중 하나인 receptor activator of nuclear factor-kB(RANK) 수용체에 결합하여 다양한 신호 전달 물질을 활성화 시킨다⁴⁾. 이러한 신호 전달물질들은

TNF-receptor-associated factor 6 (TRAF6)를 통해 NF- κ B 활성화를 거치고 c-Fos, NFATc1 등의 새로운 유전자 발현을 유도한다^{5,6}). 또한 이러한 기전을 통해 증대된 NFATc1은 tartrate-resistant acid phosphates (TRAP), osteoclast-associated receptor (OSCAR) 등의 발현을 촉진한다⁷).

골쇄보(*Drynariae Rhizoma*)는 고관초과에 속하는 다년생 초본인 넉줄고사리의 근경이다. 『神農本草經』의 "破血止血, 補傷折."나 『本草求真』의 "功專入腎補骨,"의 문헌자료에서 볼 수 있듯 골쇄보는 부러진 뼈를 치료하거나 뼈를 튼튼하게 하는 약용식물로서 골격계 질환에 이용되어 왔다. 현대의 연구 결과를 보면 골쇄보는 근골격계 강화, 골재흡수방지, 고지혈증 예방 등에 효과가 있고 항염증 작용이 있는 것으로 알려져 있다⁸). 특히 골쇄보는 염증인자인 IL-1 α 와 IL-1 β 의 조절에 의한 골재흡수를 억제하는 효과가 있는 것으로 보고되었다⁹). 이러한 연구들은 골쇄보가 골 질환에 효과가 있는 것으로 사료되지만 아직 RANKL로 유도된 파골세포로의 분화 과정에 어떠한 기전으로 영향을 끼치는지 검증되지 않았다.

본 연구에서는 골쇄보 추출물이 RANKL로 유도된 파골세포의 분화과정에 있어서의 유전자 발현, 단백질 발현 그리고 신호 전달 단백질들의 활성에 미치는 영향을 알아보고자 한다.

재료 및 방법

1. 재료

본 실험에 사용된 골쇄보 추출물은 분쇄된 골쇄보를 3차 증류수로 끓여 추출한 용액을 감압 농축 한 뒤 동결 건조하는 방식으로 만든 분말을 한국한의약연구원(KIOM, 대전)에서 구입하여 실험에 이용하였다. 파골세포 분화를 위해 사용한 Human RANKL과 M-CSF는 peprotech(London, UK)사의 제품을 사용하였다. c-Fos와 NFATc1에 대한 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)사에서 구입하였다. phospho (p)-p38, p-JNK, p-ERK, I- κ B, p-AKT 항체는 Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA)사의 제품으로 사용하였다. Actin 항체와 TRAP 용액은 Sigma Aldrich사에서 구입하였다.

2. 파골세포 분화

5주령 ICR 마우스의 대퇴골과 경골을 분리하고 1cc 주사기로 골강을 수세하여 골수세포를 채취하였다. 얻어진 골수세포는 10% FBS, 30 ng/ml M-CSF가 포함된 α -minimum essential medium (α -MEM)배지에서 3일간 배양하였다. 3일 후, 부유세포를 제거하고 부착된 세포를 대식세포(bone marrow macrophage, BMM)로 사용하였다. 대식세포는 M-CSF(30 ng/mL)와 RANKL(100 ng/mL)을 첨가하고, 골쇄보를 농도별로 처리하여 4일간 배양하였다. 4일 후, 배양한 세포를 TRAP용액으로 염색하고 붉은 색으로 염색된 세포를 파골세포로 간주하였다.

3. XTT 분석

대식세포를 1×10^4 /well의 밀도로 96-well plate에 첨가하고

골쇄보 추출물과 M-CSF (30 ng/ml)를 농도별로 첨가하여 3일간 배양하였다. 3일 후, XTT 용액 50 μ l을 각각의 well에 첨가하고 4시간 배양 후 ELISA reader (Molecular Devices, CA, USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 확인하였다.

4. RT-PCR 분석

배양된 세포에서 TRIzol (Invitrogen) 용액으로 제조사의 방법에 따라 RNA를 분리하였다. 분리된 RNA 2 μ g은 dNTP, oligo dT primer, buffer, dithiothreitol, Superscript II reverse transcriptase 와 RNase inhibitor를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA를 다음과 같은 primer를 이용하여 PCR 증폭을 시행하였다.

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'-TCAGCATATAGCCACACCG-3';

OSCAR sense, 5'-CTGCTGGTAACGGATCAGCTCCCCAGA-3';

OSCAR antisense,

5'-CCAAGGAGCCAGAACCCTTCGAAACT-3';

Cathepsin K sense, 5'-CACTGCTCTCTCAGGGCTT3';

Cathepsin K antisense, 5'- ACGGAGGCATTGACTCTGAA-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, 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 PVDF 막은 5% non-fat dry milk를 처리하여 비 특이 단백질이 붙는 것을 방지하기 하였다. 그리고 1차 항체 및 2차 항체를 처리했다. TBS-T 완충용액으로 PVDF막을 세척하여 enhanced chemiluminescence를 이용해 단백질 발현을 관찰했다.

결 과

1. 파골세포의 분화에 골쇄보 추출물의 효과

파골세포의 분화에 골쇄보 추출물의 효과를 검증하기 위하여 마우스로부터 얻어진 대식세포(BMM)에 M-CSF(30 ng/mL)와 RANKL(100 ng/mL)을 처리하고, 골쇄보를 농도별로 처리하

였다. 4일간 배양 후 파골세포의 분화 양상을 확인하기 위해 TRAP 용액으로 염색한 결과 대조군의 대식세포에서는 TRAP양성 파골세포로 분화 되었지만 골쇄보 추출물을 처리한 실험군의 대식세포에서는 농도 의존적으로 파골세포로의 분화가 억제되었다(Fig. 1A, B). 실험에 이용된 골쇄보 추출물의 농도에서의 독성을 확인하기 위하여 XTT assay kit를 사용하여 세포 독성실험을 하였다. 자료를 해석한 결과, 본 실험에 사용된 농도에서의 약물의 농도에 따른 독성은 유의할만한 차이가 없었다(Fig. 1C).

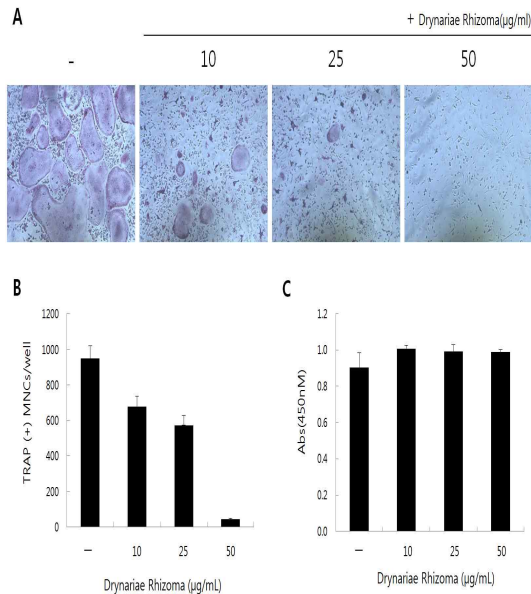


Fig. 1. *Drynariae Rhizoma* inhibits RANKL-induced Osteoclast Differentiation. (A) BMMs were cultured for 4 days with M-CSF(30 ng/ml) and RANKL(100 ng/ml) in the presence of *Drynariae Rhizoma*. Cells were fixed in 3.7% formalin, permeabilized with 0.1% Triton X-100, and stained with TRAP solution. (B) TRAP-positive cells were counted. (C) BMMs were cultured for 3 days with M-CSF (30 ng/ml) and RANKL(100 ng/ml) in the presence of *Drynariae Rhizoma*. After 3 days, 50 µl of XTT reagents were added to each well, and the cells were incubated for 4 hour. The absorbance was measured at 450 nm using a microplate reader.

2. RANKL에 유도된 유전자 발현에 골쇄보 추출물의 효과

RANKL에 영향을 받는 유전자들의 발현의 정도에 의해 파골세포의 분화가 조절된다¹⁰⁾. 그 중에서 c-Fos와 NFATc1의 발현이 파골세포의 분화에 중요하다고 알려져 있다. c-Fos는 파골세포 분화의 초기단계에서의 중요한 전사인자로 NFATc1의 발현을 촉진한다. 따라서 c-Fos와 NFATc1의 발현과 파골세포의 지표 유전자인 TRAP과 OSCAR의 발현에 골쇄보 추출물의 효과를 확인해보았다. 대조군의 대식세포에 RANKL을 처리 했을 때 c-Fos와 NFATc1의 mRNA의 발현이 증가되었지만, 골쇄보 추출물을 처리한 실험군의 대식세포에서는 c-Fos와 NFATc1의 발현이 감소되었다. OSCAR와 TRAP의 발현 또한 감소되었다(Fig. 2).

3. c-Fos와 NFATc1 단백 발현에 미치는 골쇄보 추출물의 영향

파골세포 분화에 c-Fos와 NFATc1의 단백질 발현이 필수적이므로 그 것에 미치는 골쇄보 추출물의 효과를 알아보기 위해 RANKL, M-CSF를 이용하여 파골세포 분화를 유도하여 골쇄보

추출물을 처리하거나 처리하지 않은 실험군과 대조군에서의 c-Fos와 NFATc1의 단백질 발현을 측정하였다. RANKL에 의해 유도되는 c-Fos는 NFATc1의 발현을 유도하는데 대조군의 경우 이 단백질이 높게 발현되었으나 골쇄보 추출물을 처리한 실험군에서는 c-Fos와 NATc1 단백질 발현 모두 억제되었다(Fig. 3).

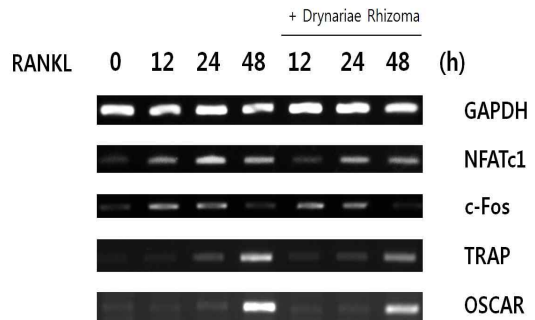


Fig. 2. *Drynariae Rhizoma* inhibits RANKL-induced NFATc1 expression. BMMs were pretreated with *Drynariae Rhizoma* for 1 hour and then stimulated with RANKL (100 ng/ml) for the indicated times. Total RNA of c-Fos, NFATc1, TRAP and OSCAR were obtained at the indicated time points. The mRNA expression levels of the indicated genes were analyzed by RT-PCR.

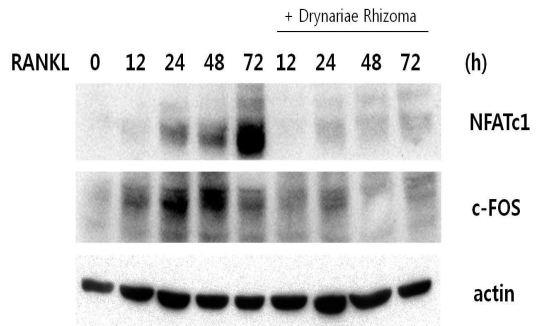


Fig. 3. *Drynariae Rhizoma* suppresses RANKL-induced NFATc1 expression. BMMs were pretreated with or without *Drynariae Rhizoma* (100 µg/ml) for 1 hour and then stimulated with RANKL (100 ng/ml) for the indicated times. The cell lysates were analyzed by Western blotting with antibodies for c-Fos, NFATc1, and actin.

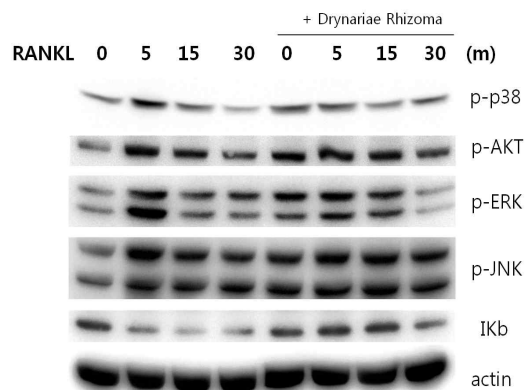


Fig. 4. Effect of *Drynariae Rhizoma* on signal transduction induced by RANKL. BMMs were pretreated with or without *Drynariae Rhizoma* (100 µg/ml) for 1 hour and then stimulated with RANKL (100 ng/ml) for the indicated times. The cell lysates were analyzed by Western blotting with the indicated antibodies.

4. RANKL의 신호전달 단백질의 활성화에 골쇄보 추출물의 영향

RANKL에 의해 유도되는 파골세포의 분화에 MAPKs의 활성화는 중요한 역할을 한다. IκB는 NFκB의 활성을 저해하여 파골세포의 분화에 영향을 미친다고 알려져 있다¹¹⁾. 따라서 골쇄보 추출물이 파골세포의 분화기전에 미친 효과를 알아보기 위해, 대식세포를 골쇄보 추출물로 전처리하고 RANKL을 시간대 별로 처리한 후 MAPKs의 인산화를 측정하여 관찰하였다. RANKL에 의해 자극된 대조군의 대식세포에서 p38, JNK, ERK의 증가가 관찰되었지만 골쇄보 추출군에서는 대조군과 유의할만한 차이가 없었다. 대조군의 대식세포에서는 IκB의 분해가 증가되었으나 이와 대조적으로 골쇄보 추출군에서는 IκB의 분해가 저해되었다 (Fig. 4).

고찰

골다공증은 통증이나 불편감 등 특별한 임상 증상이 없어 그 임상적 심각성에 비해 많은 경우 쉽게 간과되고 있는 질병이다. 골다공증은 골질의 위험을 증가시키는데, 특히 고관절 골절을 경험한 65세 이상의 고령의 환자의 경우 1년 이내 사망률이 25%나 된다는 보고도 있어 골다공증으로 야기되는 골질의 심각성을 미루어 짐작해볼 수 있다¹²⁾. 이 질환은 조골세포의 골 형성보다 골 흡수가 증가되어 조골세포와 파골세포의 역할의 균형이 깨어져서 나타나는데 특히 파골세포와 관련이 깊으며 파골세포의 형성과 활성화의 증가가 큰 영향을 미친다.

현재 임상에서 가장 많이 쓰이는 골다공증의 치료제 중 하나는 bisphosphonate 계열의 약물이다. 이 약물은 파골세포의 골 흡수를 억제하고 파골세포의 사멸을 유도하는 기전을 가지고 있다. 하지만 식도염이나 하악골 괴사와 같은 부작용과 장기 복용 시 골절 빈도가 늘어난다는 보고가 있다¹³⁾. 이러한 영향으로 현재 부작용이 적은 새로운 골다공증 치료제의 필요성이 요구되고 있으며, 이에 따라 특히 천연물 기반의 새로운 파골세포 억제제 발굴에 노력이 지속되고 있다. 파골세포 억제제 개발을 위해 본 연구에서 연구한 골쇄보(Drynariae Rhizoma)는 고관절에 속하는 다년생 초본인 넝쿨고사리의 근경이다. 그 동안의 연구에서 골쇄보는 골절에서 칼슘의 흡수를 촉진시키고 진통, 진정작용과 고지혈증을 예방하고 치료하는데 효과가 있다고 알려져 있었다. 하지만 아직 RANKL로 유도된 파골세포로의 분화 과정에 대한 효과는 잘 알려지지 않았다.

RANKL에 의해 활성화 되는 NF-κB는 파골세포의 분화에 중요한 전사인자로 알려져 있다¹⁴⁾. IKKs에 의해 NFκB는 억제제로 작용하는 IκB의 인산화가 유도되고 유비퀴틴-프로테오좀 경로를 통한 단백질분해 기전으로 IκB가 분해되어 NFκB가 핵으로 이동할 수 있게 된다¹⁵⁾. 따라서 IκB의 감소는 RANKL로 유도된 파골세포의 분화 과정에 있어 중요한 요소이다. 본 연구에서 RANKL은 대조군의 대식세포에서 IκB의 분해를 촉진하였지만 골쇄보 추출물을 처리한 대식세포에서는 IκB의 감소가 억제되었다 (Fig. 4). 이러한 결과는 골쇄보 추출물의 파골세포 억제 작용기전은 RANKL에 의한 NFκB 신호전달체계라는 것을 보여준

다. 따라서 골쇄보에 의한 NFκB 활성화 억제는 RANKL로 유도된 파골세포분화에서 c-Fos와 NFATc1의 발현을 감소시키고 이에 따라 TRAP 양성 파골세포의 분화를 억제한다고 판단된다.

결론

본 연구에서 골쇄보 추출물이 RANKL로 유도된 파골세포 분화과정을 농도 의존적으로 억제하였으며 XTT에 의한 독성 검사에서 실험농도인 50μg/mL에서 독성이 없음을 확인하였다. 또한 파골세포 분화과정의 중요 인자인 c-Fos와 NFATc1의 발현을 억제하였고 그 기전이 IκB의 발현 지속의 증가로 인함을 보여주었다. 이와 같은 연구결과는 천연물 기반의 골다공증 치료제 개발에 도움이 될 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2010년도 원광대학교 교비 지원에 의해 수행되었습니다.

참고문헌

1. Nijweidi Peter, J., JEAN, H., M. FEYEN. "Cells of Bone: Proliferation, Differentiation, and Hormonal Regulation". *Physiological Reviews*. 66(4):855-886, 1986.
2. Rodan, G.A., Martin, T.J. Therapeutic approaches to bone diseases. *Science*. 289: 1508-1514, 2000.
3. Teitelbaum, S.L., Ross, F.P. Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nat. Rev. Genet.* 4: 638-649, 2003.
4. Boyle, W.J., Simonet W.S., Lacey D.L., Osteoclast differentiation and activation. *Nature*. 423: 337-342, 2003.
5. Takayanagi, H. Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nat. Rev. Immunol.* 7: 292-304, 2007.
6. Lee, Z.H., Kim, H.H. Signal transduction by receptor activator of nuclear factor kappa B in osteoclasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 305: 211-214, 2003.
7. 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*. 23: 889-901, 2000.
8. J.C. Jeong, B.T. Lee, and C.H. Yoon, Effects of Drynariae Rhizoma on the proliferation of human bone cells and the immunomodulatory activity, *Pharmacological Research*. 51(2):125-136, 2005.
9. Hong, S.N., Jeong, J.C. Effects of complex extracts having Drynariae Rhizoma on suppression of collagenolysis and

- bone resorption in mouse calvarial osteoblasts. *D.J.I.O.M.* 9: 179-191, 2000.
10. Takayanagi, H. Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nat. Rev. Immunol.* 7: 292-304, 2007.
 11. M.L. Scott, T. Fujita, H.C. Liou. The p65 subunit of NF-kappa B regulates I kappa B by two distinct mechanisms. *Genes Dev.* 1993; 7: 1266-1276, 1993.
 12. Kanis, J.A., Oden, A., Johnell, O., De Laet, C., Jonsson, B., Oglesby, A.K. The components of excess mortality after hip fracture. *Bone.* 32: 468, 2003.
 13. Abrahamsen, B. Adverse effects of bisphosphonates. *CalcifTissue Int.* 86(60):421-435, 2010.
 14. Jimi, E., Aoki, K., Saito, H., D'Acquisto, F., May, M.J., Nakamura, I., Sudo, T., Kojima T., Okamoto, Fukushima, H., Okabe, K., Ohya, K., Ghosh, S. Selective inhibition of NF-kappa B blocks osteoclastogenesis and prevents inflammatory bone destruction in vivo. *Nat. Med.* 10: 617-624, 2004.
 15. Lin, L., DeMartino, G.N., Greene, W.C. Cotranslational biogenesis of NF-kappaB p50 by the 26S proteasome. *Cell.* 92: 819-828, 1998.