

천문동 추출물에 의한 조골세포 분화 촉진 및 파골세포 생성 억제효과

이승연 · 김시나 · 김종근[†]
(주)KMSI 부설 한국의과학연구소

Effects of *Asparagus cochinchinensis* (Lour.) Merr. on the Stimulation of Osteoblast Differentiation and Inhibition of Osteoclast Generation

Seung Youn Lee, Si Na Kim, and Jong Keun Kim[†]

Korea Medical Science Institute, Incheon 406-840, Korea

Abstract

Bone mass in adults decreases with age because of the imbalance between the rate of bone formation and resorption. We performed this study to investigate whether *Asparagus cochinchinensis* (Lour.) Merr. (ACAЕ) plays a role in osteoblasts differentiation and osteoclasts formation. Ethanol extract of ACAЕ showed increase in the differentiation and alkaline phosphatase activity of osteoblasts. Also, it decreased the number of tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP)-positive multinucleated cells (OCLs) and TRAP activity. Therefore, ACAЕ has the potential to prevent bone-related diseases such as osteoporosis by increasing the differentiation of osteoblasts and reducing both the number and activity of osteoclasts.

Key words: *Asparagus cochinchinensis* (Lour.) Merr., Saos-2 cell, osteoblast, osteoclast

서 론

뼈는 조골세포와 파골세포의 작용으로 뼈의 생성과 뼈의 재흡수가 지속적으로 유지되어 평형을 유지하지만(1,2) 폐경기 여성들의 급격한 에스트로겐 감소, 노화, 코르티코이드 제제의 투여, 흡연, 알코올 섭취 등 여러 가지 원인으로 조골세포와 파골세포 작용의 불균형이 생겨 뼈의 생성보다 뼈의 소실이 증가될 때 골다공증이 유발된다. 골다공증의 치료제로 NaF, calcitriol(1,25(OH)₂D₃), isoflavone, raloxifene, aminobisphosphonate, SERMs(selective estrogen receptor modulators) 등이 시판되고 있으나 부작용 등 여러 가지 문제점을 내포하고 있어(3-5) 부작용이 적고, 이들을 대체할 수 있는 천연 약제에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다(6-10).

천문동(*Asparagus cochinchinensis* (Lour.) Merr.)은 한국, 일본, 대만, 중국에 분포하는 백합과 식물로서, 예로부터 진해, 완화, 자양, 해열, 거담, 지갈, 이뇨, 강장의 효능이 있다고 하여 널리 사용되어 왔다. 덩이뿌리 부분이 주로 약용, 식용으로 널리 사용되며, 덩이뿌리에는 asparagine, β -sisterosterol, 5-methoxy-methylfurfural, 점액질, steroid saponin이 함유되어 있다(11). 천문동에 의한 약리효과는 다음과 같다. Koo 등(12)은 Hep G2 세포에서 TNF- α 로 유도된

세포공격에 대한 세포의 반응(apoptosis)이 천문동에 의하여 저해되었다고 보고하였으며, Kim 등(13)은 천문동에 의해 신경아교세포(astrocyte)에서 TNF- α 분비가 억제되었다고 보고하였다.

그러나 현재까지 천문동의 뼈 대사에 미치는 영향에 관해서는 보고된 바가 없기에, 본 연구에서는 천문동이 뼈 조직 내의 주세포인 조골세포와 파골세포에 어떠한 영향을 미치는지 알아보려고 하였다. 따라서 인간의 유사 조골세포인 Saos-2 세포를 이용하여 조골세포의 증식과 조골세포의 특성적인 염기성 인산분해 효소인 alkaline phosphatase 활성화에 미치는 영향을 관찰하였고, 또한 파골세포의 세포화학적 표지효소인 tartrate resistant acid phosphatase(TRAP) 양성반응을 보이는 파골세포수와 TRAP 활성도를 확인함으로써 천문동 추출물이 뼈의 대사에 미치는 영향에 관한 유의한 결과를 얻었기에 이를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

재료

본 연구에 사용된 천문동은 국내산으로써 경기도 부천시 에 소재한 대영제약에서 구입하였다. 천문동 100 g에 30% 에탄올 500 mL를 첨가하여 상온에서 2시간 동안 2회 추출한

[†]Corresponding author. E-mail: yakiki@kmsi.co.kr
Phone: 82-32-255-2500, Fax: 82-32-851-2508

후 농축, 동결 건조시켜 7.37 g의 분말을 얻었으며, 이를 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 녹여 100 mg/mL의 농도로 만든 후 실험에 사용하였다.

조골세포의 배양

본 연구에 사용된 Saos-2 cell은 인간의 유사 조골세포이며, 한국세포주은행에서 분양받아 RPMI 1640(Gibco, USA) 액체배지 500 mL에 10% FBS(Gibco), 100 U/mL penicillin(Gibco), 100 µg/mL streptomycin(Gibco)을 첨가하여 사용하였으며, 약 48시간 주기로 배양액을 교체하여 주었다. 세포배양은 37°C, 5%의 CO₂배양기(Nuaire, USA)에서 실시하였다.

조골세포의 증식 측정

천문동 에탄올 추출물이 조골세포의 증식에 미치는 영향을 알아보기 위하여 Mosmann(14)의 방법에 따라 MTT(3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) assay를 실시하였다. Saos-2 cell을 96 well plate에 well 당 1×10^4 개로 접종하고, 24시간 배양하여 세포를 부착시킨 후 천문동 추출물을 0.1, 1, 5, 20 µg/mL의 농도로 처리하고 24시간, 72시간 동안 배양하였다. MTT를 0.05 mg/mL 농도로 가하여 같은 조건에서 3시간 더 배양한 후 배지를 제거하고 불용성의 formazan 결정을 DMSO로 용해시킨 후 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

염기성 인산분해효소 활성도 측정

천문동 에탄올 추출물이 조골세포의 활성에 미치는 영향을 평가하기 위하여 Saos-2 cell에 천문동 추출물을 각각 0.1, 1, 5, 20 µg/mL의 농도로 처리하고 위와 동일한 조건에서 24, 72시간 배양한 후 배지를 제거하였다. 0.1% Triton X-100을 well 당 200 µL씩 첨가하고 30분 동안 배양한 후, 염기성 인산분해효소 활성 측정에 사용하였으며, 여기에 8 mM p-nitrophenyl phosphate(PNPP) 20 µL를 넣어 5분간 반응하였다. 이후 0.5 N NaOH 220 µL를 첨가하여 반응을 중단시킨 다음 405 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

골수세포의 분리 및 배양

4-5주령의 ICR 마우스(중앙실험동물)의 대퇴골과 경골을 무균적으로 해부하고 양 끝을 절단한 후 α -minimum essential medium(α -MEM, Gibco BRL, USA)을 통과시켜 골수세포를 수집하고, 10 ng/mL M-CSF(macrophage-colony stimulating factor, Peprotech EC)가 첨가된 α -MEM에 24시간 배양하였다. 미부착 세포를 α -MEM으로 세척한 후 1×10^6 cells/mL가 되도록 48 well 또는 96 well plate에 분주하고 30 ng/mL M-CSF가 첨가된 α -MEM에 배양하였다. 48시간 후 30 ng/mL M-CSF, 50 ng/mL RANKL(receptor activator of nuclear factor kB ligand, Peprotech EC)와 함께 천문동 추출물을 0.1, 1, 5, 20 µg/mL의 농도로 처리하였

으며, 배양액은 2일 간격으로 신선 배양액으로 교체하였다.

Tartrate-resistant acid phosphatase(TRAP) 염색

배양이 종결된 plate는 10% 중성 포르말린에 10분간 고정 후 시판되는 TRAP kit(tartrate-resistant acid phosphatase, Sigma, St. Louis, MO)를 사용하여 Fast Garnet GBC base 용액, sodium nitrite 용액, naphthol AS-BI phosphate 용액, acetate 용액, tartrate 용액 등을 혼합하여 37°C에서 30분간 반응시켰다. 증류수로 세척 후 hematoxylin 용액으로 대조 염색하여 건조시킨 후 현미경(CKX41, Olympus) 하에서 관찰하여 한 세포당 핵이 3개 이상인 다핵의 TRAP 양성세포를 파골세포로 간주하고 각 well당 형성된 다핵 파골세포의 숫자를 세었다. 결과는 각 군당 4개 well의 평균 \pm 표준편차로 표시하였다.

TRAP 활성도 측정

파골세포의 특이한 표지자로 알려진 TRAP 활성도를 측정하였다. 배양을 완료한 후 PBS로 세척하고, formaldehyde로 고정한 cell에 기질용액(1.35 mg/mL 4-nitrophenyl phosphate disodium salt, 10 mM tartarate, 50 mM citrate buffer)을 가하여 37°C에서 10분간 반응시켰다. 반응 후 0.1 N NaOH로 반응을 중지시켜 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

통계처리

본 연구에서 얻은 결과는 mean \pm SD로 표시하였고, 통계 처리는 Student's *t*-test를 이용하였으며, **p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001인 경우 대조군과 천문동 추출물 처리군 사이에 유의성이 있음을 인정하였다.

결 과

조골세포의 증식에 미치는 영향

Saos-2 세포를 사용하여 세포증식에 미치는 영향을 관찰한 결과, 천문동 에탄올 추출물은 24, 72시간 배양 후 최대농도인 20 µg/mL에서 대조군에 비하여 각각 21.22 \pm 1.86%, 29.35 \pm 1.49%까지 증가하였으며, 72시간 처리군에서는 모든 농도에서 유의성 있게 증가하는 것을 확인하였다(Fig. 1).

염기성 인산분해효소 활성도 측정

Saos-2 cell을 이용하여 천문동 에탄올 추출물이 염기성 인산분해효소 활성에 미치는 영향을 관찰한 결과, 천문동 추출물은 농도가 증가함에 따라 효소 활성을 유의적으로 증가시켰다. 24, 72시간 배양 후, 최대농도인 20 µg/mL에서 대조군에 비하여 각각 29.35 \pm 1.11%, 51.02 \pm 0.23%까지 증가하였으며, 24시간의 0.1 µg/mL군과 72시간의 1 µg/mL군을 제외한 모든 농도와 시간에서 염기성 인산분해효소의 활성이 유의성 있게 증가하는 것을 확인하였다(Fig. 2).

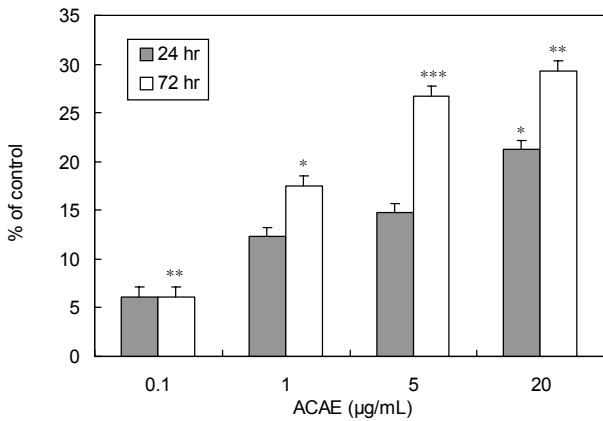


Fig. 1. The effect of ACAE on the proliferation of human osteoblast-like Saos-2 cells.

Data are expressed as the percentage of control. All values are mean ± SD (n=4). Bars within different letters are significantly different at *p<0.05, **p<0.01, and ***p<0.001 by Student's *t*-test.

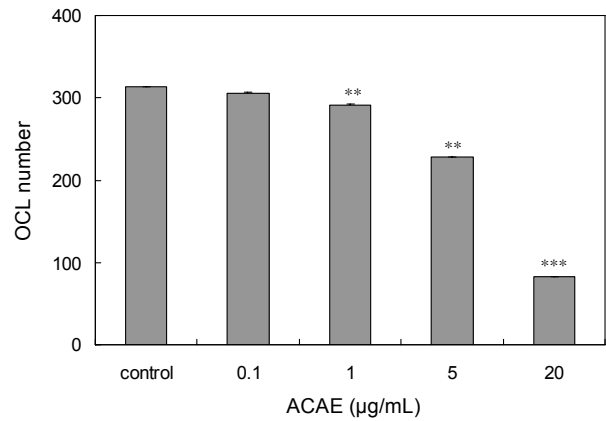


Fig. 3. The effect of ACAE on the formation of TRAP-positive osteoclast-like cells.

Data are expressed as the percentage of control. All values are mean ± SD (n=4). Bars within different letters are significantly different at **p<0.01 and ***p<0.001 by Student's *t*-test.

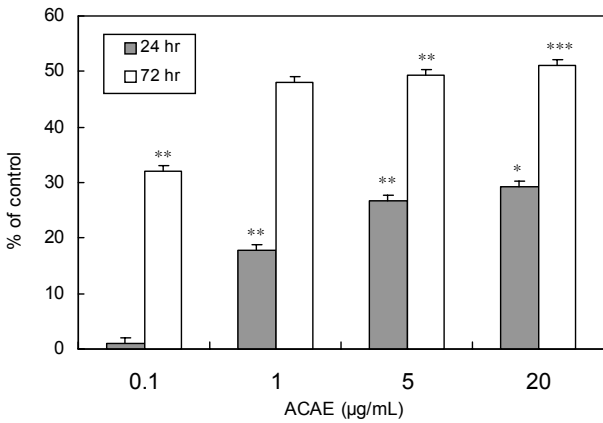


Fig. 2. The effect of ACAE on the alkaline phosphatase activity of human osteoblast-like Saos-2 cells.

Data are expressed as the percentage of control. All values are mean ± SD (n=4). Bars within different letters are significantly different at *p<0.05, **p<0.01, and ***p<0.001 by Student's *t*-test.

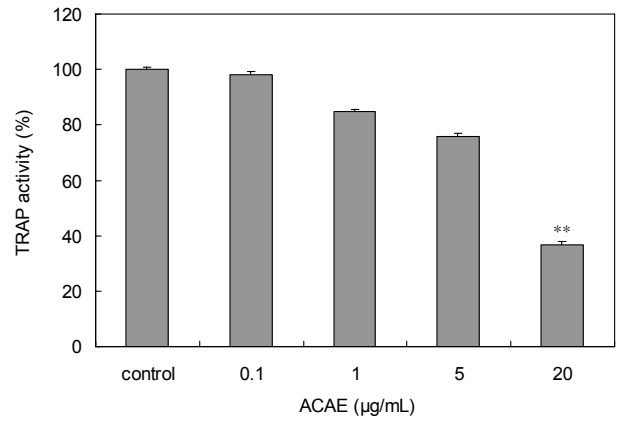


Fig. 4. The effect of ACAE on TRAP activity of osteoclast-like cells.

Data are expressed as the percentage of control. All values are mean ± SD (n=4). Bars within different letters are significantly different at **p<0.05 by Student's *t*-test.

파골세포의 증식에 미치는 영향

천문동 추출물이 파골세포의 생성에 미치는 영향을 관찰하기 위해 천문동 추출물을 0.1, 1, 5, 20 µg/mL로 처리한 후 TRAP 양성 다핵세포의 형성을 관찰하였다. 대조군의 파골세포수는 313개였으며, 천문동 추출물 0.1, 1, 5, 20 µg/mL 처리군에서는 각각 306개, 291개, 227개, 82개로, 대조군을 100%로 나타냈을 때 대조군에 비하여 천문동 추출물 처리군에서 각각 97.76%, 93.07%, 82.73%, 26.19%로 감소하는 것을 확인하였다(Fig. 3).

TRAP 활성에 미치는 영향

천문동 추출물이 파골세포의 TRAP 활성도에 미치는 영향을 관찰한 결과, 천문동 추출물 0.1, 1, 5, 20 µg/mL 처리군에서 TRAP 활성도가 대조군에 비하여 각각 98.11%, 87.64%, 75.94%, 36.76%로 감소하는 것을 확인하였다(Fig. 4).

고 찰

뼈의 조직은 교원질, 당단백질과 같은 세포의 기질과 조골세포, 파골세포, 골세포 등 여러 종류의 세포들로 구성되어 있는 매우 복잡하고 활동적인 조직으로서 계속적으로 뼈의 재형성이 일어나며, 뼈의 재형성은 파골세포에 의한 뼈의 흡수와 조골세포에 의한 뼈의 형성이 균형을 이루는 과정으로 순서적으로 진행된다(15,16).

뼈 기질의 성분을 주로 합성하는 조골세포는 미분화 간엽세포에서 유래된 전조골세포(preosteoblast)가 뼈의 표면에 도달하여 성숙한 조골세포로 분화되고, 10~20%가 골세포로 되어 석회화 조직에 묻힌다고 알려져 왔다(17). 활발한 대사작용으로 석회화 과정에 중요한 역할을 하는 조골세포는 세포막에 염기성 인산 분해효소를 갖고 있다. 본 연구에서는 인간의 유사 조골세포인 Saos-2 cell을 이용하여 천문

동 에탄올 추출물이 조골세포의 성장과 조골세포의 특성적인 염기성 인산분해 효소인 ALP 활성에 미치는 영향을 관찰하였다. 천문동 에탄올 추출물은 0.1~20 µg/mL의 농도에서 유의성 있게 조골세포의 증식 및 ALP 활성을 증가시켰다.

파골세포는 뼈의 내막에 위치하며, 뼈의 조직에 존재하는 유일한 다핵세포이고 흡수가 일어나는 뼈의 표면에 근접하여 주름의 형태를 보인다. 또한 tartrate-resistant acid phosphatase(TRAP)를 가지며 산 생성이 활발한 특성을 가진다(18). 파골세포는 골수내의 조혈 단핵세포로부터 유래하고, 이 단핵전구세포는 혈액내로 순환되며 뼈의 내막층에서 전구세포들이 증식되어 다핵세포를 형성하기 위해 융합되고 뼈를 흡수하는 것으로 알려져 있다(17). 최근 파골세포가 조혈기관 기원인 것을 이용하여 다수의 파골세포를 얻기 위하여 골수세포 배양이 널리 이용되고 있다. 이러한 골수세포 배양시 관찰되는 다핵세포는 TRAP 양성반응을 나타내는데, 이러한 특성은 다른 뼈의 조직세포와 구별할 수 있는 파골세포의 세포화학적 표지효소로 이용된다(19).

본 연구에서는 이러한 배양법을 이용하여 생쥐의 골수세포를 M-CSF와 RANKL이 함유된 배지에서 파골 전구세포로 배양하였고, TRAP 양성이고 3개 이상의 핵을 갖는 다핵세포를 파골세포로 간주하였다. 천문동 추출물이 파골세포의 생성에 미치는 영향을 관찰하기 위해 천문동 추출물을 0.1, 1, 5, 20 µg/mL로 처리한 후 TRAP 양성 다핵세포수와 TRAP 활성도에 미치는 영향을 관찰한 결과, 1 µg/mL 이상의 농도에서 다핵세포수 및 TRAP 활성도가 대조군에 비하여 감소하는 것을 확인하였다.

이상의 결과에서 천문동 에탄올 추출물은 조골세포의 활성을 증가시키고 파골세포의 활성을 억제함으로써 뼈의 대사에 영향을 미치는 것으로 사료되며, 이는 천문동이 골다공증 예방 효과가 있는 기능성 식품 후보로서의 가능성이 있음을 시사한다. 그러나 앞으로 조골세포 증식 및 파골세포 분화 억제와 관련된 유전자의 탐색, 작용기전 규명 및 활성성분의 분리 및 정제, 응용법 등의 심도 있는 연구가 더욱 필요할 것으로 사료된다.

요 약

천문동 에탄올 추출물은 조골세포의 증식을 농도 및 시간 의존적으로 유의성 있게 증가시켰으며 조골세포 분화유도 및 석회화에 관여하는 염기성 인산분해효소 활성을 효과적으로 촉진시켰다. 또한 TRAP 양성인 다핵 파골세포수 및 TRAP 활성도를 감소시켰다. 결과적으로 천문동 에탄올 추출물은 조골세포의 활성 증가 및 파골세포의 활성 억제 등 뼈의 대사에 영향을 미치므로 뼈의 대사와 관련된 치료제 및 골다공증 예방 건강 보조식품으로서 개발 가능성이 있으며, 이와 관련된 작용기전 및 활성성분의 분리, 정제에 대한 연구가 더욱 필요할 것으로 사료된다.

문 헌

1. Kalervo V, Haibo Z, Mika M, Jussi MH. 2000. The cell biology of osteoclast function. *J Cell Sci* 113: 377-381.
2. Suda T, Nakamura I, Jimi B, Takahashi N. 1997. Regulation of osteoclast function. *J Bone Mineral Res* 12: 869-879.
3. Im GI, Quershi SA, Kenny J, Rubash HE, Shanbhag AS. 2004. Osteoblast proliferation and maturation by bisphosphonates. *Biomaterials* 25: 4105-4115.
4. Cryer R, Bauer DC. 2002. Oral bisphosphonates and upper gastrointestinal tract problem: what is the evidence? *Mayo Clin Proc* 77: 1031-1043.
5. Recker RP. 1993. Current therapy for osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* 76: 14-16.
6. Kim SW, Kim HG, Lee BE, Hwand HH, Baek DH, Ko SY. 2006. Effects of mushroom, *Pleurotus eryngii*, extracts on bone metabolism. *Clin Nutr* 25: 166-170.
7. Muhlbauer RC, Lozano A, Reinli A. 2002. Onion and a mixture of vegetables, salads, and herbs affect bone resorption in the rat by a mechanism independent of their base excess. *J Bone Mineral Res* 17: 1230-1236.
8. Ochiuto F, Pasquale RD, Guglielmo G, Palumbo DR, Zangla G, Samperi S, Renzo A, Circosta C. 2007. Effects of phytoestrogenic isoflavones from red clover (*Trifolium pratense* L.) on experimental osteoporosis. *Phytother Res* 21: 130-134.
9. Lee JW, Lee IS. 2004. Effects of *Rubus coreanus* Miquel extracts on the activity and differentiation of MC3T3-E1 osteoblastic cell. *J Life Sci* 14: 967-974.
10. Park JH, Lee JW, Kim HJ, Lee IS. 2005. Effects of *Solidago virga-aurea* var. *gigantea* Miq. root extracts on the activity and differentiation of MC3T3-E1 osteoblastic cell. *J Kor Soc Food Sci Nutr* 34: 929-936.
11. 최옥자. 1991. 약초의 성분과 이용. 일월서각, 서울. p 672.
12. Koo HN, Jeong HJ, Choi JY, Choi SD, Choi TJ, Cheon YS, Kim KS, Kang BK, Park ST, Chang CH, Kim CH, Lee YM, Kim HM, An NH, Kim JJ. 2000. Inhibition of tumor necrosis factor- α -induced apoptosis by *Asparagus cochinchinensis* in Hep G2 cells. *J Ethnopharm* 73: 137-143.
13. Kim H, Lee E, Lim T, Jung J, Lyu Y. 1998. Inhibitory effect of *Asparagus cochinchinensis* on tumor necrosis factor- α secretion from astrocytes. *Inter J Immunopharm* 20: 153-162.
14. Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for the cellular growth and survival; application to proliferation and cytotoxic assay. *J Immun Methods* 65: 56-58.
15. Boyce BF, Xing L. 2006. Osteoclast, no longer osteoblast slaves. *Nature Med* 12: 1356-1358.
16. Suda T, Takahashi N, Martin TJ. 1992. Modulation of osteoclast differentiation. *Endo Reviews* 13: 66-80.
17. Laurence D, Maylis D, Philippe J, Dominique H. 2007. Embryonic stem cells: new tool to study osteoblast and osteoclast differentiation. *Stem Cells* 25: 544-552.
18. Karst M, Gorny G, Galvin RJ, Oursler MJ. 2004. Roles of stromal cell RANKL, OPG, and M-CSF expression in biphasic TGF- β regulation of osteoclast differentiation. *J Cell Physiol* 200: 99-106.
19. Vaananen HK, Horton M. 1995. The osteoclast clear zone is a specialized cell extracellular matrix adhesion structure. *J Cell Sci* 108: 2729-2732.

(2007년 7월 16일 접수; 2007년 11월 22일 채택)