

일엽추 추출물이 RANKL 유도 RAW264.7 Cell의 유전자 발현에 미치는 영향

이효근 · 황귀서*

경원대학교 한의과대학 예방의학교실

Effects of *Securinega suffruticosa*(SS) Extract on Osteoclastogenesis and Gene Expression in RANKL-induced RAW Cell

Hyo Keun Lee & Gwi Seo Hwang*

Department of Preventive Medicine, College of Oriental Medicine, Kyungwon University

ABSTRACT

Objectives: This study was performed to evaluate the effect of *Securinega suffruticosa* Rehder (SS) on osteoclast differentiation and gene expression.

Methods: The osteoclastogenesis and gene expression were determined in RANKL-stimulated RAW 264.7. The results were summarized as follows.

Results: SS decreased the number of TRAP positive cell in RANKL-stimulated RAW264.7 cell. SS decreased the expression of RANK, TNF α , and IL-6 in RANKL-stimulated RAW264.7 cell. SS decreased the expression of iNOS and COX-2 in RANKL-stimulated RAW264.7 cell. SS decreased the expression of Cathepsin K in RANKL-stimulated RAW264.7 cell.

Conclusions: It is concluded that SS might decrease the bone resorption resulted from decrease of osteoclast differentiation and it's related gene expression.

Key words : *Securinega suffruticosa* Rehder (SS), RANKL, TRAP, osteoclast, gene

· 접수: 2010년 12월 6일 · 수정접수: 2010년 12월 21일 · 채택: 2010년 12월 23일

* 교신저자: 황귀서. 경기도 성남시 수정구 복정동 산 65번지, 경원대학교 한의과대학 예방의학교실
전화: 031-750-5423, 팩스: 031-721-7029, 전자우편: kjjy@naver.com

I. 서론

골 대사는 골 형성을 담당하는 조골세포와 골 흡수를 담당하는 파골세포의 작용으로 이루어져 있으며, 이들 세포의 기능이 균형을 이루어 항상성을 유지한다. 그러나, 조골세포 활성이 저하되거나 파골세포 활성이 증가되면 골 밀도가 감소하여 골다공증이 유발될 수 있다. 골다공증의 유발 요인으로는 여성의 폐경, 갑상선 기능항진, 당뇨병, 스트레스, 흡연 및 운동 부족, 신체적 노화와 glucocorticoid 계열 약물의 복용 등이 알려져 있다.¹⁻³⁾

대식세포 계열의 파골세포 전구세포는 체내의 다양한 분화유발인자들에 의한 자극으로 파골세포로 분화된다.^{4,5)} 이러한 분화과정은 파골전구세포 표면에 존재하는 RANK(receptor activator of nuclear factor kappa B)가 RANKL(receptor activator of nuclear factor kappa B ligand)이라는 조골세포로부터 분비되는 세포 조절물질과의 결합에 의해 촉진된다. 파골세포 표면에도 존재하는 RANK는 RANKL 자극으로 활성화되어 파골세포가 골흡수를 유발하도록 한다.⁶⁾ 골흡수는 파골세포내의 유전자 전사 조절인자들인 NF- κ B, c-Fos, c-jun, AP-1, NFATc1의 활성화와 MAPK, ERK, JNK, p38 활성화 과정, Src, Akt 활성화등을 통하여 촉진되며,⁷⁻⁸⁾ 활성화된 파골세포는 TRAP(tartrate resistant acid phosphatase) cathepsin K, calcitonin receptor 등 파골세포 특이 단백질 발현을 발현한다.⁹⁾

일엽추(一葉蓀, *Securinega suffruticosa* Rehder)는 대극과에 속하는 관목인 광대싸리의 다른 이름이며, 엽하주(葉下珠), 화소조(花掃條), 서수라목(西水羅木), 구럭싸리라고도 부른다. 뿌리는 독성이 있어 주로 잎을 약용으로 사용한

다. 성미는 溫辛하며 活血舒筋, 建脾益腎, 强筋骨 등의 효능이 있어, 골다공증에 효과적인 것으로 판단하였다. 실제로 임상에서는 風濕腰痛, 四肢麻痺, 半身不遂, 陽萎, 顔面神經麻痺 등의 치료에 사용되고 있다.¹⁰⁾ 주성분은 securinine, dihydrosecurinine이며,¹¹⁾ 그 밖에 corilagin, helioscopinin B, geraniin, bergenin, norbergenin, 11-O-galloyl norbergenin, gallocatechin, rutin 등이 알려져 있다.¹²⁾ 주성분인 securinine은 CNS stimulant 작용과 GABA 저해 작용을 나타내며,^{13,14)} dihydrosecurinine은 acetylcholinesterase 활성을 저해하는 것으로 보고되었다.^{14, 15)}

본 연구에서는 골 흡수억제를 통해 골다공증에 효과적인 것을 밝히기 위하여 파골세포의 분화와 기능 활성화에 관여하는 인자들에 대한 효과를 평가하고자 하였다. 이를 위하여 RANKL로 자극한 RAW264.7 cell에서의 TRAP 생성능을 측정하였으며, 관련 유전자인 TRAP, OPG, RANK, Cathepsin K, COX-2, iNOS, TNF α 등의 발현을 측정하였다.

II. 실험 방법

1. 재료

1) 한약재 추출 및 검액 제조

광대싸리 100g을 분말로 만들어 플라스크에 넣은 후, EtOH 500ml를 가하고 6시간 이상 가열하여 환류 추출하였다. 여과지를 이용하여 여과한 다음, 여액을 Evaporator (EYELA, Japan)을 이용하여 감압 농축한 다음 농축액을 동결 건조하여 실험 시까지 냉동보관 하였다. 실험 시에는 한약재 추출물(이하 SS라 함)을 DMSO를 이용하여 배지에 녹인 후, pore size 0.45 μ m의 여과지를 통과시킨 후 사용하였다.

2) 세포

실험에 사용된 파골세포 전구세포는 mouse myeloid 세포주인 RAW 264.7 세포에 RANKL를 처리하여 유도된 세포 모델을 사용하였다. 사용된 RAW 264.7은 한국세포주은행에서 구입하였다.

2. 방법

1) RAW 264.7 Cell 배양

RAW 264.7 세포는 DMEM(Dulbecco's modified eagle medium)/10% FBS(fetal bovine serum)/PC-SM 배지를 이용하여 CO₂ 세포 배양기에서 배양하였으며, 세포수는 5×10³ cells/well로 96 well plate를 이용하여 배양하였다. 24시간 배양 후 배양액을 버린 후, 10% FBS, 50 ng/ml RANKL, 1 ng/ml TGFβ가 첨가된 α-MEM으로 교환하여 세포를 배양했다. 배양액에 여러 농도의 SS를 첨가해 주었다. 2일에 한 번씩 동일한 배지로 교환해 주면서 6일간 배양하였다.

2) 약물처리

실험군은 (1) RANKL 유도 대조군(C), (2) 50 μg/ml의 한약재 추출물을 투여한 군(SS50), (3) 100 μg/ml의 한약재 추출물을 투여한 군(SS100), (4) 200 μg/ml의 한약재 추출물을 투여한 군(SS2100)으로 하였다.

3) 파골세포 생성 측정

RANKL로 RAW 264.7 cell을 파골세포로 유도한 후, 성숙한 파골세포의 발현 marker로 알려진 TRAP를 염색하여 TRAP-positive 세포를 확인하였다. 분화시킨 세포를 PBS로 세포를 2회 세척하고, 3.7% formaldehyde-citrate-

acetone 용액으로 10분 고정시키고 증류수로 2회 세척하였다. 2% TRAP fast garnet GBC base 용액과 NaNO₃ 용액을 같은 비율로 섞어 만든 용액과 5% naphtha AS-BI phosphoric acid, 4% acetic acid, 2% tartaric acid를 포함한 용액을 고정시킨 세포에 처리하고 상온에 30분 이상 방치하였다. 광학현미경으로 관찰하여 핵이 3개 이상인 TRAP-positive한 다핵세포(TRAP(+) MNCs)를 계수하여 파골세포의 생성지표로 하였다.

4) 파골세포 유전자발현 측정

(1) total RNA 분리

RNA를 분리하기 위하여 배양세포의 배지를 제거한 다음, 4°C PBS로 3회 washing 하였다. 세포를 모은 다음, 750g에서 10분간 원심 분리한 다음, ice cold PBS로 2회 씻었다. 침전된 세포에 lysis buffer를 가하여 용해시킨 다음, 12,000g에서 10분간 원심 분리하여 상층을 취하였다. 다시 1M sucrose가 함유된 Tris buffer 위에 loading한 다음, 36,000 rpm에서 160분간 원심분리 하였다. Polysome pellet을 취하여 SDS buffer에 녹인 후, 37°C에서 30분간 incubation 시켰다. Sod. Acetate buffer를 가한 다음, phenol/CsKl₃ 용액으로 추출하였다. NaCl을 0.2M이 되도록 가한 다음, EtOH을 가한 후 -20°C에서 12시간 보관하였다. 침전물을 75% EtOH로 2회 washing한 다음 건조시켰다. 유전자 발현에 필요한 RNA양을 대조군과 시험군에서 mRNA양이 같도록 조정한 다음, 전기영동으로 확인하여 사용하였다.

(2) cDNA 제조

대조군 및 시험군에서 각각 분리한 total RNA액 10μl(10μg RNA 함유)에 oligo dT 1μl(2μg/ul)을 넣은 후 조심스럽게 혼합한 다음, 90°C에서 5분간 incubation하였다. primer가 annealing하도록 실온에서 약 10분간 방치한 후 4°C로 유지

하며 다음 시약을 가하였다. 5 x cyscript buffer 4 μ l, 0.1M DTT 2 μ l, dUTP nucleotide mix 1 μ l, dUTP Cydye-labelled nucleotide 0.1 μ l, Cyscript reverse transcriptase 1 μ l, H₂O 0.9 μ l 을 첨가하여 20 μ l로 한 후, 아주 조심스럽게 손으로 tipping 혼합하였다. 이 후, 42°C에서 90분간 incubation 한 후, 얼음 상에 방치하였다. 여기에 2.5 M NaOH을 2 μ l 씩 가한 후 37°C에서 15분간 incubation하였으며, 2 M HEPES buffer (free acid)를 10 μ l 가하여 중화시켰다. 각각의 시약은 Amersham Bioscience에서 구입하였다.

(3) Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

oligo (dT)12-18 (Promega, USA), reaction buffer(50 mM Tris-HCl, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM DTT, pH 8.3), 1 mM dNTP (Biotools, Spain)과 200 unit M-MLV-RT (Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase, Promega)를 분리한 RNA에 처리하여 역전사를 수행함으로써 cDNA를 합성하였다. PCR 은 total volume 15 μ l에 10X PCR buffer, 0.2 mM dNTPs, 2 pmole의 sense 및 antisense primer를 넣은 혼합액에 cDNA와 1.25 unit의 Taq polymerase (Biotools, Spain)을 넣어 PCR 을 시행하였다.

RANK의 sense primer는 GCA AAC CTT GGA CCA ACT GCA C이였으며, antisense 는 AAT CCA CCG TGC TTT CAG TCC C 을 사용하였다. TRAP의 sense primer는 AGC AGC CAA GGA GGA CTA CGT T, antisense는 TCG TTG ATG TCG CAC AGA GG을 사용하였으며, Cathepsin K의 sense primer는 TTA ATT TGG GAG AAA AAC CT, antisense는 AGC CGC CTC CAC AGC CAT AAT를 사용하였다. iNOS의 sense primer는 AAT GGC AAC ATC AGG TCG GCC ATC ACT, antisense는 GCT GTG TGT CAC

AGA AGT CTC GAA CTC를 사용하였으며, COX-2의 sense primer는 GGA GAG ACT ATC AAG ATA GT, antisense는 ATG GTC AGT AGA CTT TTA CA, TNF α 의 sense primer는 ATG AGC ACA GAA AGC ATG ATC, antisense는 TAC AGG CTT GTC ACT CGA ATT을 사용하였다.

Control로는 GAPDH를 사용하였으며 sense primer는 CAGC CTC GTC CCG TAG ACA AA이였으며, antisense는 CAC GAC ATA CTC AGC ACC GGC이였다. PCR 조건은 94°C 4분, 30 cycles의 [94°C(30초), 59°C(30초), 72°C (45초)], 72°C 10분이였다(Perkin Elmer, USA) 증폭된 PCR 산물을 2% agarose gel에 전기영동한다. 전기영동 결과 나온 band를 density 분석 프로그램인 Gel-Pro analyzer 3.1(Media Cybernetics, USA)을 이용하여 구했다.

(4) Real time RT-PCR

우선 시험관에 정량한 RNA 5 μ g, 50 ng/ μ l의 random hexamer 3 μ l, 10mM dNTP 1 μ l를 넣고 DEPC H₂O를 가하여 10 μ l의 RNA/primer mixture를 만들었다. 실험용 sample을 65°C에서 5분간 incubation 시킨 후 1분 이상 얼음에 방치하였다. Reaction mixture로 10배의 RT buffer 2 μ l, 25mM MgCl₂ 4 μ l, 0.1 M DTT 2 μ l, RNAase 1 μ l을 섞어 준비하였다.

RANK의 sense primer는 GCA AAC CTT GGA CCA ACT GCA C이였으며, antisense 는 AAT CCA CCG TGC TTT CAG TCC C 을 사용하였다. TRAP의 sense primer는 AGC AGC CAA GGA GGA CTA CGT T, antisense는 TCG TTG ATG TCG CAC AGA GG을 사용하였으며, Cathepsin K의 sense primer는 TTA ATT TGG GAG AAA AAC CT, antisense는 AGC CGC CTC CAC AGC CAT AAT를 사용하였다. iNOS의 sense primer는 AAT GGC AAC ATC AGG TCG

GCC ATC ACT, antisense는 GCT GTG TGT CAC AGA AGT CTC GAA CTC를 사용하였으며, COX-2의 sense primer는 GGA GAG ACT ATC AAG ATA GT, antisense는 ATG GTC AGT AGA CTT TTA CA, TNF α 의 sense primer는 ATG AGC ACA GAA AGC ATG ATC, antisense는 TAC AGG CTT GTC ACT CGA ATT을 사용하였다.

Control로는 GAPDH를 사용하였으며 sense primer는 CAGC CTC GTC CCG TAG ACA AA이었으며, antisense는 CAC GAC ATA CTC AGC ACC GGC이었다. Reaction mixture를 RNA/primer mixture에 가하여 섞고 실온에 2분간 방치한 후, SuperScript II RT 1 μ l (50 units)를 가하고 25 $^{\circ}$ C에 10분간 incubation 시켰다. 다시 42 $^{\circ}$ C에서 50분간 incubation 시킨 다음, 70 $^{\circ}$ C에서 15분간 가열하여 inactivate 시키고 ice 상에서 식혔다. RNase 1 μ l를 가하고 다시 37 $^{\circ}$ C에서 20분간 incubation 시킨 다음, 사용시까지 -20 $^{\circ}$ C에 보관하였다. 각각의 optical tube에 2배의 SYBR Green Mix 12.5 μ l, cDNA

0.2 μ l, 5 pmol/ μ l primer pair mix 1 μ l, 11.3 μ l H $_2$ O를 넣고, 50 $^{\circ}$ C 2분 1 cycle, 95 $^{\circ}$ C 10 min 1 cycle, 95 $^{\circ}$ C 15sec, 60 $^{\circ}$ C 30sec, 72 $^{\circ}$ C 30sec 40 cycles, 72 $^{\circ}$ C 10 min 1 cycle로 증폭시켰다. PCR을 마친 후 tube를 꺼낸 다음, 반응액 5ul를 사용하여 3% agarose gel에서 PCR specificity를 측정했다. SDS 7000 software를 사용하여 real time PCR 결과를 분석하였다.

3. 통계 분석

각 결과에 대한 유의성 검증은 student's t-test를 이용하였다. p<0.05인 경우 유의성이 있다고 판정하였다.

III. 실험결과

1. 파골세포 생성에 미치는 영향

RAW 264.7 cell에 RANKL과 TGF β 를 첨가

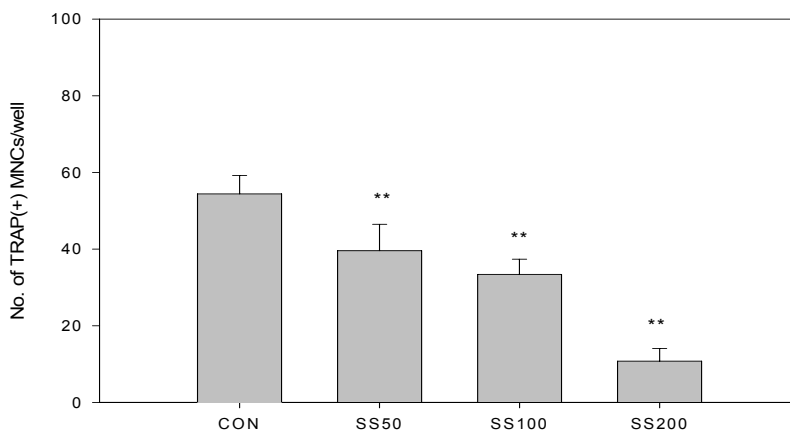


Fig. 1 Effects of SS on the Formation of TRAP(+) MNCs in RANKL stimulated RAW 264.7 cells.

CON: RANKL (50 ng/ml)
 SS50: RANKL (50 ng/ml) + 50 μ g/ml of SS
 SS100: RANKL (50 ng/ml) + 100 μ g/ml of SS
 SS200: RANKL (50 ng/ml) + 200 μ g/ml of SS
 **: p<0.01 vs C

한 배지로 배양한 경우 다수의 TRAP-positive 다핵세포가 형성되는 것이 관찰되었다. 이 세포를 파골세포로 하여 SS 추출물이 파골세포 생성에 미치는 영향을 평가하였다. 측정 결과, TRAP-positive 다핵세포 숫자는 50 μ g/ml의 농도를 가진 group은 Control에 비해 약 28% 감소하였고, 100 μ g/ml인 group은 Control에 비해 약 39% 감소하였다. 또한, 200 μ g/ml인 group도 Control에 비해 약 82% 감소하였다.

2. RANK 발현에 미치는 영향

RANK(receptor activator of nuclear factor kappa B)는 파골세포 표면에 존재하는 TNF re-

ceptor family 단백질로 알려져 있다. RANK는 RANKL의 수용체로서 RANK/RANKL 복합체는 파골세포 분화 및 활성화에 중요한 역할을 한다. 본 연구에서는 SS가 파골세포 기능에 관여하는 유전자들에 미치는 영향을 평가하는 일환으로 RANK의 발현에 미치는 영향을 RT-PCR 및 real time PCR system을 이용하여 평가하였다. Fig. 2와 같이 SS는 200 μ g/ml, 50 μ g/ml 농도에서 SS를 처리하지 않은 대조군에 비해 발현을 억제하였다.

3. TNF α 발현에 미치는 영향

TNF α 는 조골세포의 collagen 합성과 ALP 및

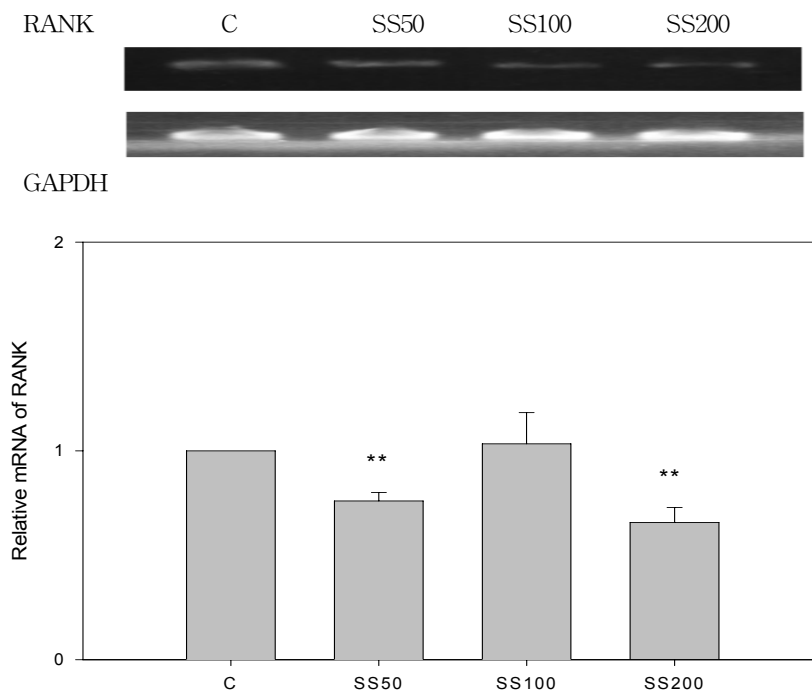


Fig. 2 Effects of SS on the expression of RANK in RANKL stimulated RAW 264.7 cells.

C: RANKL (50 ng/ml)
 SS50: RANKL (50 ng/ml) + 50 μ g/ml of SS
 SS100: RANKL (50 ng/ml) + 100 μ g/ml of SS
 SS200: RANKL (50 ng/ml) + 200 μ g/ml of SS
 **: p<0.01 vs C

이효근 · 황귀서 : 일엽추 추출물이 RANKL 유도 RAW264.7 Cell의 유전자 발현에 미치는 영향

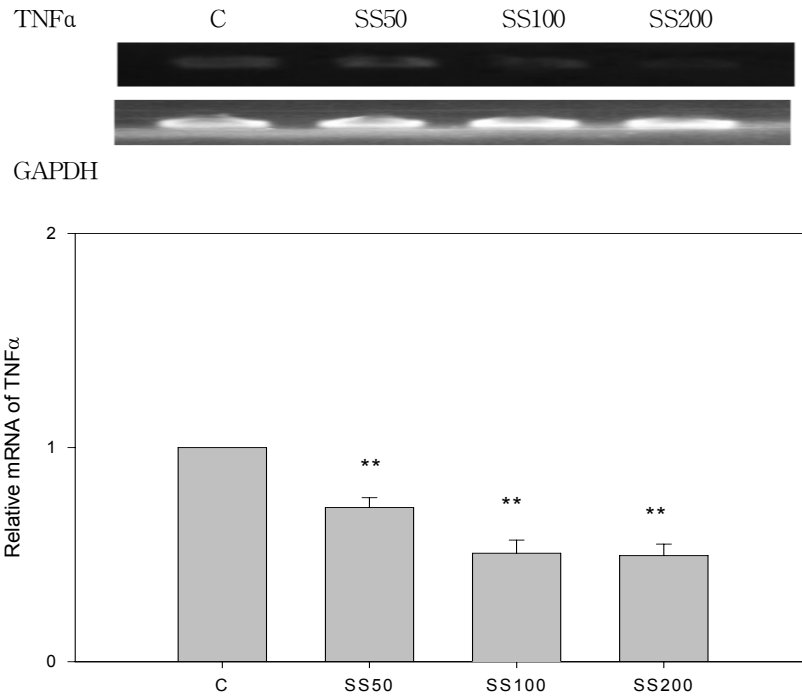


Fig. 3 Effects of SS on the expression of iNOS in RANKL stimulated RAW 264.7 cells.

C: RANKL (50 ng/ml)

SS50: RANKL (50 ng/ml) + 50 μ g/ml of SS

SS100: RANKL (50 ng/ml) + 100 μ g/ml of SS

SS200: RANKL (50 ng/ml) + 200 μ g/ml of SS

** : p<0.01 vs C

osteocalcin의 발현을 억제한다고 알려져 있다. 또한, IL-6와 M-CSF를 활성화시켜 파골세포의 분화를 증진시키고 골 흡수를 유발한다. TNF α 는 IL-1 β 와 함께 작용하여 TNF α 자신의 합성을 유도하고 IL-6의 합성을 유도한다. 따라서, TNF α 의 발현이 증가하면 파골세포의 분화 및 기능 활성화가 증가될 수 있다. 본 연구에서는 SS가 유전자 발현을 조절하는 인자에 미치는 영향을 평가하는 일환으로 TNF α 의 발현에 미치는 영향을 평가하였다. 실험 결과, Fig. 6과 같이 SS는 200 μ g/ml, 100 μ g/ml, 50 μ g/ml 농도에서 TNF α 유전자 발현을 억제하였다.

4. IL-6 발현에 미치는 영향

IL-6는 파골세포가 분화되거나 활성화를 촉진하는 물질로 알려져 있으며 염증반응을 촉진한다고 알려져 있으며 adenylate cyclase의 활성을 증가시켜 cAMP 농도가 증가한다. PKA는 cAMP 의존적 protein kinase로 파골세포 기능 활성화와 인산화와 활성 증가를 유발한다. 본 연구에서는 SS가 세포성을 조절하는 인자에 미치는 영향을 평가하는 일환으로 IL-6의 발현에 미치는 영향을 평가하였다. 실험결과, SS는 200 μ g/ml, 100 μ g/ml, 50 μ g/ml 농도에서는 억제 효과를 나타내었다(Fig. 4).

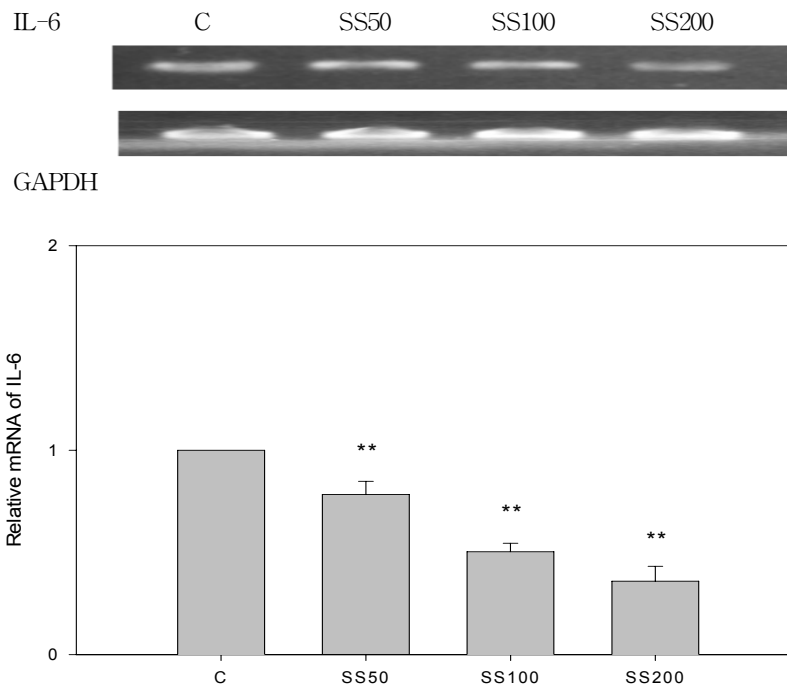


Fig. 4 Effects of SS on the expression of IL-6 in RANKL stimulated RAW 264.7 cells.

C : RANKL (50 ng/ml)
 SS50 : RANKL (50 ng/ml) + 50 μ g/ml of SS
 SS100 : RANKL (50 ng/ml) + 100 μ g/ml of SS
 SS200 : RANKL (50 ng/ml) + 200 μ g/ml of SS
 **: p<0.01 vs C

5. COX-2 발현에 미치는 영향

interleukin-1 β 등의 자극으로 유발되는 COX-2 활성은 과골세포(OC)에서 PGE₂ 등의 합성을 통하여 OC의 분화에 중요한 역할을 한다. 이는 OC 내의 PKC의 활성과 MAPK의 활성 증가를 통하여 RANKL(receptor activator NF- κ B ligand)의 발현을 촉진한다. 또한, G-protein에 연계된 Adenylate Cyclase를 활성화시켜 cAMP-dependent PKA의 활성을 증가시키며, cAMP에 의존적인 RANKL과 OPG-osteoprotogerin의 작용을 거쳐 collagen을 분해하는 MMP의 유전 발현을 촉진하여 골의 재흡수에 관여한다. 실험결과, SS는 과골세포에서 COX-2 유전자 발현을 억제

하였다(Fig. 5).

6. iNOS 발현에 미치는 영향

NO는 NOS(nitric oxide synthetase)에 의해 생성되는 물질로, RANKL, TNF α , IL-6 등의 각종 염증 신호에 의해 활성화되는 inducible NOS에 의해 생성된다. 이러한 증가된 NO는 과골세포형성과 골흡수를 억제한다. 본 연구에서는 SS가 유전자 발현을 조절하는 인자에 미치는 영향을 평가하는 일환으로 iNOS의 발현에 미치는 영향을 평가하였다. 실험 결과, Fig. 6과 같이 SS는 200 μ g/ml, 100 μ g/ml, 50 μ g/ml 농도에서 iNOS 유전자 발현을 억제시켰다.

이효근 · 황귀서 : 일엽추 추출물이 RANKL 유도 RAW264.7 Cell의 유전자 발현에 미치는 영향

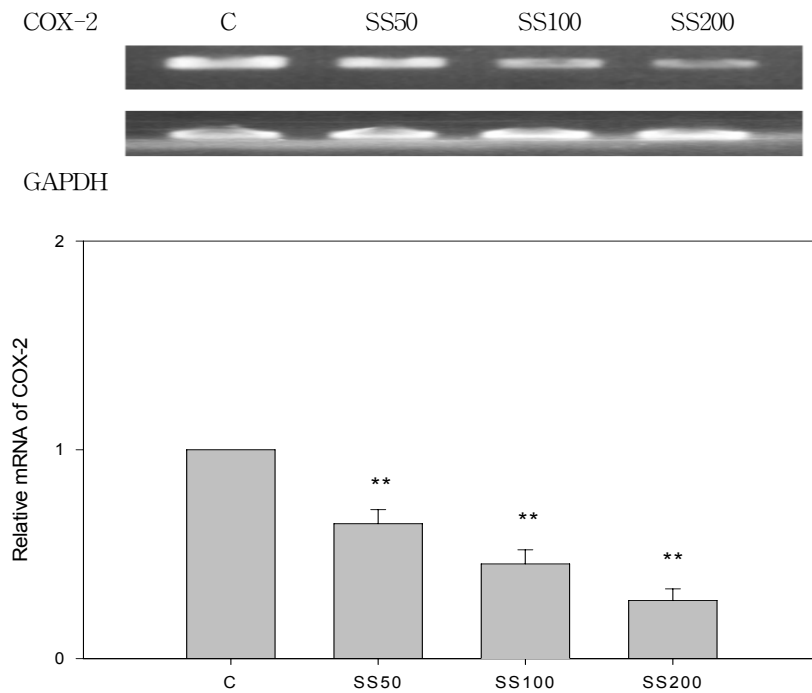


Fig. 5 Effects of SS on the expression of COX-2 in RANKL stimulated RAW 264.7 cells.

C: RANKL (50 ng/ml)
 SS50: RANKL (50 ng/ml) + 50 µg/ml of SS
 SS100: RANKL (50 ng/ml) + 100 µg/ml of SS
 SS200: RANKL (50 ng/ml) + 200 µg/ml of SS
 **: p<0.01 vs C

7. Cathepsin K 발현에 미치는 영향

Cathepsin K는 RANKL이나 M-CSF(macrophage colony stimulating factor)등을 처리하는 경우 발현되는 단백질로 MMP-9, TRAP 등과 같이 골의 흡수에 관여하고 있다. 따라서, 파골세포의 활성화로 인한 재흡수과정은 세포에서 발현되는 Cathepsin K 난 MMP-9, TRAP의 mRNA를 지표로 사용하여 측정할 수 있다. 실험 결과, Fig. 7과 같이 SS는 200 µg/ml, 100 µg/ml, 50 µg/ml 농도에서 Cathepsin K 발현을 억제하였다.

IV. 고찰

골다공증은 주로 에스트로겐이 결핍된 폐경기 이후 여성에서 많이 발생하고 있다.²⁻³⁾ 이는 estrogen 감소로 인해 calcitonin 활성 억제와 PTH(parathyroid hormone)의 작용으로 파골세포의 기능이 활성화된 결과 골 기질물질이 분해되어 칼슘의 재흡수가 증가되어 나타난다.¹⁶⁾ 따라서, 파골세포의 기능을 억제하면 골다공증을 치료할 수 있다고 알려져 있다.

본 연구에서는 골흡수를 억제하여 골다공증에 효과적인 약제를 찾아내기 위하여, 일엽추 추출물

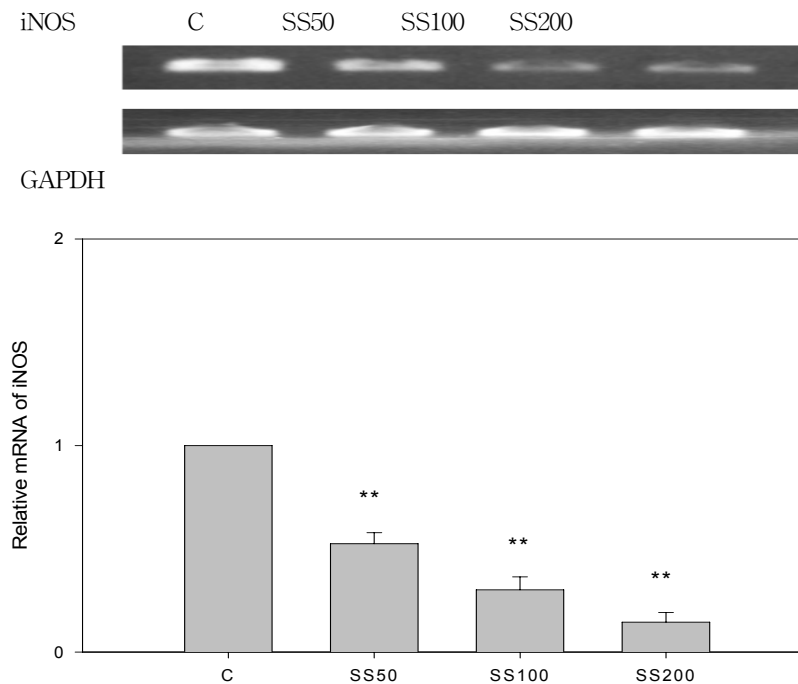


Fig. 6 Effects of SS on the expression of iNOS in RANKL stimulated RAW 264.7 cells.

C: RANKL (50 ng/ml)
 SS50: RANKL (50 ng/ml) + 50 µg/ml of SS
 SS100: RANKL (50 ng/ml) + 100 µg/ml of SS
 SS200: RANKL (50 ng/ml) + 200 µg/ml of SS
 **: p<0.01 vs C

(SS)이 RANKL 유도 RAW 264.7의 TRAP 양성 세포 생성을 억제하는지를 검색하였다. RANKL 유도 RAW 264.7세포는 많은 연구에서 osteoclastogenesis을 측정하는 모델 세포로 이용되고 있다(17). 또한, SS가 파골세포의 단백질 합성에 미치는 구체적인 작용기전 밝히기 위하여, 유전자 발현에 대한 검색을 실시하였다. TRAP은 성숙한 파골세포에서 발현하는 것으로 TRAP 양성세포는 파골세포로 분화 여부를 판단하는 기준으로 이용될 수 있다. 실험 결과, 일엽추 추출물(SS)은 파골세포의 TRAP 양성 세포 형성을 억제시켰다(Fig. 1). 이를 바탕으로 파골세포 기능에 관련되는 단백질을 합성하는 유전자 발현을 측정하여 구체적인 기전을 밝히고자 하였

다. RANK(receptor activator of nuclear factor kappa B)는 파골세포 표면에 존재하는 TNF receptor family 단백질로 알려져 있다. RANK는 RANKL의 수용체로서 RANK/RANKL 복합체는 파골세포 분화 및 활성화에 중요한 역할을 한다(18-19). RANKL이 RANK와 결합하면 TRAF(tumor necrosis factor associated factor)가 활성화, transcription factor의 활성화 (NF-κB, AP-1, NFATc1)와 MAPK의 pathway 활성화(ERK, JNK, p38), Src, Akt 이 활성화되어 파골세포의 기능이 활성화 된다(20). 실험결과, SS는 RANK 발현을 억제하였다(Fig 2).

TNFα는 조골세포의 collagen 합성과 ALP 및 osteocalcin의 발현을 억제한다고 알려져 있다. 또

이효근 · 황귀서 : 일엽추 추출물이 RANKL 유도 RAW264.7 Cell의 유전자 발현에 미치는 영향

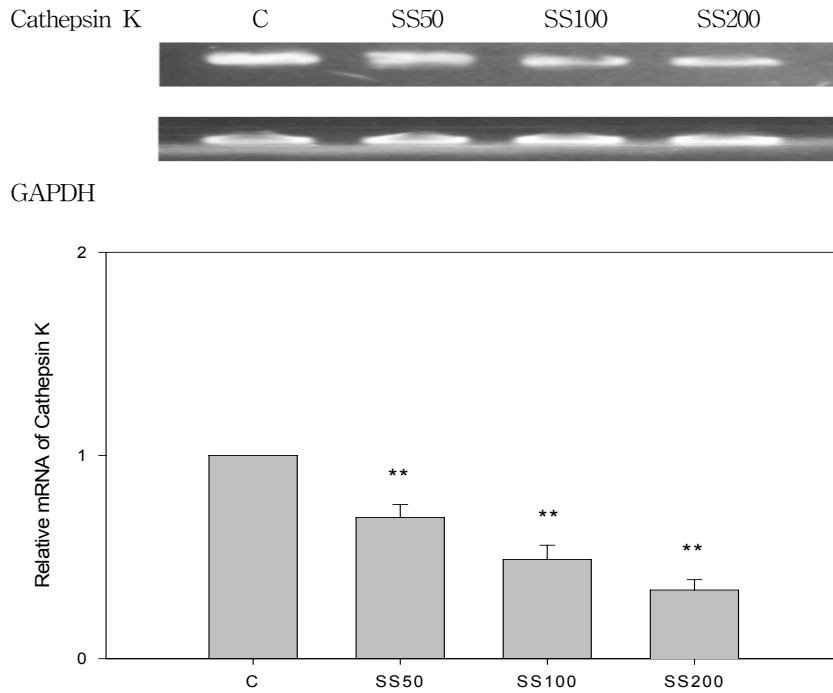


Fig. 7 Effects of SS on the expression of Cathepsin K in RANKL stimulated RAW 264.7 cells.

C: RANKL (50 ng/ml)
 SS50: RANKL (50 ng/ml) + 50 μ g/ml of SS
 SS100: RANKL (50 ng/ml) + 100 μ g/ml of SS
 SS200: RANKL (50 ng/ml) + 200 μ g/ml of SS
 **: p<0.01 vs C

한, IL-6와 M-CSF를 활성화시켜 파골세포의 분화를 증진시키고 골흡수를 유발한다.²¹⁾ TNF α 는 IL-1b와 함께 작용하여 TNF α 자신의 합성을 유도하고 IL-6의 합성을 유도한다. 따라서, TNF α 의 발현이 증가하면 파골세포의 분화 및 기능 활성화가 증가될 수 있다. 본 연구에서는 SS가 유전자 발현을 조절하는 인자에 미치는 영향을 평가하는 일환으로 TNF α 의 발현에 미치는 영향을 평가하였다. 실험 결과, Fig. 3과 같이 SS는 TNF α 유전자 발현을 억제하였다.

IL-6는 파골세포가 분화되거나 활성화를 촉진하는 물질로 알려 있으며 염증반응을 촉진한다고 알려져 있으며 adenylate cyclase의 활성을 증가시켜 cAMP 농도가 증가한다. PKA는

cAMP 의존적 protein kinase로서 각종 효소의 활성을 조절하고, 세포 증식에 관여하는 것으로 알려져 있다. PKA의 활성 증가는 파골세포 기능 활성화와 인산화와 활성 증가를 유발한다.²²⁾ 본 연구에서는 SS가 세포성을 조절하는 인자에 미치는 영향을 평가하는 일환으로 IL-6의 발현에 미치는 영향을 평가하였다. 실험결과, SS는 억제 효과를 나타내었다(Fig. 4).

RANKL로 자극된 파골세포(OC)는 PLA₂의 활성이 증가하여 세포막의 인지질로부터 AA를 유리하며, AA는 대사과정을 거쳐 생성되는 다양한 prostaglandin류를 통하여 조골세포와 파골세포의 기능을 조절함으로써 골대사에 관여한다. PLA₂는 파골세포에서 골흡수를 촉진하

는 Prostaglandin류를 생합성하여 골다공증을 심화시키는 것으로 보고되었다.¹⁷⁻¹⁸⁾ 이 중, PGE₂는 COX-2 효소계를 통하여 생성되며 파골세포 분화 및 기능 활성화에 중요한 역할을 한다.²³⁾ PGE₂는 OC의 분화에 중요한 역할을 하는 PKC의 활성화와 MAPK의 활성화 증가시키고, G-protein에 연계된 Adenylate Cyclase를 활성화시켜 cAMP-dependent PKA의 활성을 증가시킨다. 이와 함께 cAMP에 의존적인 collagen을 분해하는 MMP의 유전 발현을 촉진하여 골의 재흡수에 관여한다.²⁴⁻²⁵⁾ 실험결과, 한약제는 COX-2 유전자 발현을 억제하여 OC의 기능을 억제할 것으로 판단되었다(Fig. 5).

NO는 NOS(nitric oxide synthetase)에 의해 생성되는 물질로, calcium dependent한 endothelial 또는 neuronal NOS에 의해 생성되거나, RANKL, TNF α , IL-6 등의 각종 염증 신호에 의해 활성화되는 inducible NOS에 의해 생성된다. 이러한 증가된 NO는 파골세포 형성과 골 흡수를 억제한다.²⁶⁻²⁷⁾ 본 연구에서는 SS가 유전자 발현을 조절하는 인자에 미치는 영향을 평가하는 일환으로 iNOS의 발현에 미치는 영향을 평가하였다. 실험 결과, Fig. 6과 같이 SS는 iNOS 유전자 발현을 억제시켰다.

Cathepsin K는 RANKL이나 M-CSF(macrophage colony stimulating factor)등을 처리하는 경우 발현되는 단백질로 MMP-9, TRAP 등과 같이 골의 흡수에 관여하고 있다.²⁸⁾ 따라서, 파골세포의 활성화로 인한 재흡수과정은 세포에서 발현되는 Cathepsin K는 MMP-9, TRAP의 mRNA를 지표로 사용하여 측정할 수 있다. 본 연구에서는 SS가 파골세포 기능에 관여하는 유전자들에 미치는 영향을 평가하는 일환으로 Cathepsin K의 발현에 미치는 영향을 RT-PCR 및 real time PCR system을 이용하여 평가하였다. 실험 결과, Fig. 7과 같이 SS는 Cathepsin K 발

현을 억제하였다.

이상의 결과, 일엽추 추출물(SS)는 파골세포의 분화 및 기능을 증가억제 할 수 있는 것으로 평가되었으며, 이는 파골세포(OC)의 분화과 기능을 활성화시키는 유전자의 발현을 억제하여 나타나는 것으로 사료되었다.

V. 결론

이 연구에서는, 일엽추 추출물(SS)이 파골세포 분화 및 활성을 억제하여 골의 재흡수를 억제하는지를 평가하기 위하여, RANKL 유도 RAW 264.7 cell의 TRAP-positive 세포 형성에 미치는 영향을 측정하였으며, 골 흡수관련 인자들의 유전자 발현에 미치는 영향을 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

- (1) SS는 RANKL 유도 RAW 264.7의 TRAP-positive 세포의 형성을 억제하였다.
- (2) SS는 RANKL 유도 RAW 264.7 세포에서 RANK, TNF α , IL-6의 발현을 억제하였다.
- (3) SS는 RANKL 유도 RAW 264.7 세포에서 iNOS 및 COX-2의 발현을 억제하였다.
- (4) SS는 RANKL 유도 RAW 264.7 세포에서 Cathepsin K의 발현을 억제하였다.

이상의 연구결과, 일엽추 추출물(SS)은 RANKL 유도 RAW 264.7 세포에서 파골세포로의 분화를 억제하였으며, 파골세포 분화 및 기능 활성화에 관련된 유전자 발현을 억제하였다.

연구비지원

본 연구는 경원대학교 학술지원금에 의해 수행되었음.

참고문헌

1. E. Canalis. Mechanisms of Glucocorticoid action in Bone: Implications to glucocorticoid-induced osteoporosis, *J. Clin. Endocri. Met.* 1996; 81 : 3441-3447.
2. Pietschmann P, Rauner M, Sipos W, Kerschman-Schindl K. Osteoporosis: an age-related and gender-specific disease. *Gerontology.* 2008; 55(1) : 3-12.
3. Pacifici R. Estrogen deficiency, T cells and bone loss. *Cell Immunol.* 2008; 252 (1-2) : 68-80.
4. Kumamoto H, Ooya K. Expression of parathyroid hormone-related protein (PTHrP), osteoclast differentiation factor (ODF)/receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL) and osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF)/osteoprotegerin (OPG) in ameloblastomas. *J Oral Pathol Med.* 2004; 33(1): 46-52.
5. Reddy SV. Regulatory mechanisms operative in osteoclasts. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2004; 14(4) : 255-70.
6. Boyce BF, Yamashita T, Yao Z, Zhang Q, Li F, Xing L. Roles for NF- κ B and c-Fos in osteoclasts. *J Bone Miner Metab.* 2005; 23 Suppl : 11-5.
7. Murakami A, Song M, Ohigashi H. Phenethyl isothiocyanate suppresses receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL)-induced osteoclastogenesis by blocking activation of ERK1/2 and p38 MAPK in RAW-264.7 macrophages. *Biofactors.* 2007; 30(1) : 1-11.
8. Pang M, Martinez AF, Fernandez I, Balkan W, Troen BR. AP-1 stimulates the cathepsin K promoter in RAW 264.7 cells. *Gene.* 2007; 403(1-2) : 151-8.
9. Lee ZH, Kim HH. Signal transduction by receptor activator of nuclear factor kappa B in osteoclasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003; 305(2) : 211-4.
10. Lee SC, Lee KS, Roh JS, Park WY, Lee SH, Ahn BT, Chemical Study on the Phenolic Compounds from the Leaves of *Securinega suffruticosa*. *Kor J Pharmacog.* 1994; 25(2):105-112.
11. Ohsaki A, Kobayashi Y, Yoneda K, Kishida A, Ishiyama H. Securinega alkaloids from the wood of *Securinega suffruticosa* var. *amamiensis*. *J Nat Prod.* 2007; 70 (12) : 2003-5.
12. Lee SC, Ahn BT, Lee KS. Chemical study on the phenolic compounds from the leaves of *Securinega suffruticosa*. *Kor J Pharmacog.* 1994; 25 : 105.
13. Raj D, Luczkiewicz M. *Securinega suffruticosa*. *Fitoterapia.* 2008; 79(6) : 419-27.
14. Beutler JA, Karbon EW, and Brubaker AN. Securinine alkaloids: A new class of GABA receptor antagonist. *Brain Res.* 1985; 330 : 135-140.
15. Jang CH, Eun JS, Park HW, Seo SM, Yang JH, Leem KH, Oh SH, Kim DK. An Acetylcholinesterase Inhibitor from the Leaves of *Securinega suffruticosa*. *Kor J Pharmacog.* 2003; 34(1) : 14-17
16. Meiyanto E, Hoshijima M, Ogawa T, Ishida N, Takeya T. Osteoclast differentiation factor modulates cell cycle machinery and causes a delay in s phase progression in RAW264 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001; 282(1) : 278-83.

17. John T. Swarthout, Richard C. D'Alonzo, Nagarajan Selvamurugan and Nicola C. Partridge. Parathyroid hormone-dependent signaling pathways regulating genes in bone cells. *Gene* 2002; 282(1-2): 1-17.
18. Cho ES, Yu JH, Kim MS, Yim M. Rolipram, a phosphodiesterase 4 inhibitor, stimulates osteoclast formation by inducing TRANCE expression in mouse calvarial cells. *Arch Pharm Res.* 2004; 27(12): 1258-62.
19. Khosla S. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology.* 2001; 142(12): 5050-5.
20. Gallea S, Lallemand F, Atfi A, Rawadi G, Ramez V, Spinella-Jaegle S, Kawai S, Faucheu C, Huet L, Baron R, Roman-Roman S. Activation of mitogen-activated protein kinase cascades is involved in regulation of bone morphogenetic protein-2-induced osteoblast differentiation in pluripotent C2C12 cells. *Bone.* 2001; 28(5): 491-8.
21. Yao Z, Li P, Zhang Q, Schwarz EM, Keng P, Arbini A, Boyce BF, Xing L. Tumor necrosis factor- α increases circulating osteoclast precursor numbers by promoting their proliferation and differentiation in the bone marrow through up-regulation of c-Fms expression. *J Biol Chem.* 2006; 281(17): 11846-55.
22. Liu XH, Kirschenbaum A, Yao S, Levine AC. Interactive effect of interleukin-6 and prostaglandin E2 on osteoclastogenesis via the OPG/RANKL/RANK system. *Ann N Y Acad Sci.* 2006; 1068: 225-33.
23. Han SY, Lee NK, Kim KH, Jang IW, Yim M, Kim JH, Lee WJ, Lee SY. Transcriptional induction of cyclooxygenase-2 in osteoclast precursors is involved in RANKL-induced osteoclastogenesis. *Blood.* 2005; 106(4): 1240-5.
24. Wei X, Zhang X, Zuscik MJ, Drissi MH, Schwarz EM, O'Keefe RJ. Fibroblasts express RANKL and support osteoclastogenesis in a COX-2-dependent manner after stimulation with titanium particles. *J Bone Miner Res.* 2005; 20(7): 1136-48.
25. Fukushima H, Jimi E, Kajiyama H, Motokawa W, Okabe K. Parathyroid-hormone-related protein induces expression of receptor activator of NF- κ B ligand in human periodontal ligament cells via a cAMP/protein kinase A-independent pathway. *J Dent Res.* 2005; 84(4): 329-34.
26. Lin TH, Yang RS, Tang CH, Lin CP, Fu WM. PPAR γ inhibits osteogenesis via the down-regulation of the expression of COX-2 and iNOS in rats. *Bone.* 2007 Oct; 41(4): 562-74.
27. Zheng H, Yu X, Collin-Osdoby P, Osdoby P. RANKL stimulates inducible nitric-oxide synthase expression and nitric oxide production in developing osteoclasts. An autocrine negative feedback mechanism triggered by RANKL-induced interferon- β via NF- κ B that restrains osteoclastogenesis and bone resorption. *J Biol Chem.* 2006; 281(23): 15809-20.