

菟絲子が RANKL 유도 破骨細胞에 미치는 영향

김준연·황귀서*

경원대학교 한의과대학 예방의학교실

The Effects of Cuscuta japonica Chois on Gene Expression in RANKL-induced RAW 264.7 Cell

Joon-Yeon Kim & Gwi-Seo Hwang*

Department of preventive medicine, College of Oriental Medicine, Kyungwon University

ABSTRACT

Objectives: This study was performed to evaluate the effect of CJ(Cuscuta japonica Chois) on osteoclast differentiation and gene expression.

Methods: The osteoclastogenesis and gene expression were determined in RANKL(receptor activator of nuclear factor kappa B ligand)-stimulated RAW 264.7. The results were summarized as follows.

Results: CJ decreased the number of TRAP positive cell in RANKL-stimulated RAW264.7 cell. CJ decreased the expression of RANK(receptor activator of nuclear factor kappa B), TNF α , and IL-6 in RANKL-stimulated RAW264.7 cell. CJ decreased the expression of iNOS and COX-2 in RANKL-stimulated RAW264.7 cell. CJ decreased the expression of Cathepsin K in RANKL-stimulated RAW264.7 cell.

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

Key words : Cuscuta japonica Chois(CJ), RANKL, RANK.

· 접수: 2010년 3월 29일 · 수정접수: 2010년 5월 19일 · 채택: 2010년 5월 22일

* 교신저자: 황귀서. 경기도 성남시 수정구 복정동 산 65번지, 경원대학교 한의과대학 예방의학교실.

전화: 031-750-5423, 팩스: 031-721-7029, 전자우편: kgyjiy@naver.com

TNF α 등의 발현을 측정하였다.

I. 서론

과골세포는 대식세포 계열의 전구세포에서 다양한 분화유발인자들에 의해 분화된다.¹⁻²⁾ 특히, 조골세포로부터 분비되는 RANKL(receptor activator of nuclear factor kappa B ligand)은 과골전구세포 및 과골세포 표면에 존재하는 RANK(receptor activator of nuclear factor kappa B)와 결합하여 과골전구세포가 과골세포로의 분화와 활성화를 유발한다.³⁾ 분화된 과골세포는 NF- κ B, c-Fos, c-jun, AP-1, NFATc1의 활성화와 MAPK, ERK, JNK, p38 활성화 과정, Src, Akt 활성화 등을 통하여 TRAP(tartrate resistant acid phosphatase), cathepsin K, calcitonin receptor 등 과골세포 특이 단백질 발현을 촉진한다.⁴⁻⁶⁾

菟絲子(*Cuscuta japonica* Chois.)는 새삼의 성숙한 種子로써, 성미가 辛甘平無毒하며, 脾, 肝, 腎經으로 歸經하여 明目, 止瀉 작용을 나타내며, 補肝腎, 益精髓의 효능이 있어 韓方에서는 腰膝酸痛, 遺精, 消渴, 頭眩, 尿有餘瀝 등의 치료에 사용되었다.⁷⁾ 최근 연구결과, 토사자의 주성분으로 Flavonoids 류인 quercetin 및 그 유도체와 kaempferol 등이 보고되었으며,⁸⁾ 지방대사 억제를 통한 간 보호 효과,⁹⁾ 항암효과,¹⁰⁾ T-cell 통합 대사에 관련된 면역증강효과,¹¹⁾ ACE(angiotensin -converting enzyme)의 억제에 의한 항고혈압 효과¹²⁾ 등이 보고되었다.

본 연구는 토사자 추출물이 골 흡수 억제를 통하여 골다공증에 효과적인 과골세포의 분화와 관련, 유전자 활성화에 관여하는 인자들에 대한 효과를 평가하고자 하였다. 이를 위하여 RANKL로 자극한 RAW 264.7 cell에서의 TRAP(+) 생성능을 측정하였으며, 관련 유전자인 TRAP, OPG, RANK, Cathepsin K, COX-2, iNOS,

II. 실험재료 및 방법

1. 실험재료

1) 한약재 추출 및 검액 제조

토사자 100g을 분말로 만들어 플라스크에 넣은 후, MeOH 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 토사자 추출물(이하 CJ라 함)을 DMSO를 이용하여 배지에 녹인 후, pore size 0.45 μ m의 여과지를 통과시킨 후 사용하였다.

2) 세포

실험에 사용된 과골세포 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 세포배양기에서 배양하였으며, 세포수는 5 \times 10³ cells/well 로 96 well plate를 이용하여 배양하였다. 24시간 배양 후 배양액을 버린 후, 10 % FBS, 50 ng/ml RANKL, 1 ng/ml TGF β 가 첨가된 α -

MEM으로 교환하여 세포를 배양했다. 배양액에 여러 농도의 CJ를 첨가해 주었다. 2일에 한번씩 동일한 배지로 교환해 주면서 6일간 배양하였다.

2) 약물처리

실험군은 (1) RANKL 유도 대조군(C), (2) 50 μ g/ml의 토사자 추출물을 투여한 군(CJ50), (3) 100 μ g/ml의 토사자 추출물을 투여한 군(CJ100), (4) 200 μ g/ml의 토사자 추출물을 투여한 군(CJ200)으로 하였다.

3) 파골세포 생성 측정

RANKL로 RAW 264.7 cell를 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 $^{\circ}$ C PBS로 3회 washing 하였다. 세포를 모은 다음, 750 \times g에서 10분간 원심 분리한 다음, ice cold PBS로 2회 씻었다. 침전

된 세포에 lysis buffer를 가하여 용해시킨 다음, 12,000 \times g에서 10분간 원심 분리하여 상층을 취하였다. 다시 1M sucrose가 함유된 Tris buffer 위에 loading한 다음, 36,000rpm에서 160분간 원심분리 하였다. Polysome pellet을 취하여 SDS buffer에 녹인 후, 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 incubation 시켰다. Sod. Acetate buffer를 가한 다음, phenol/CsCl₃ 용액으로 추출하였다. NaCl을 0.2M이 되도록 가한 다음, EtOH를 가한 후 -20 $^{\circ}$ 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 RNA 액 10 μ l(10 μ g RNA 함유)에 oligo dT 1 μ l (2 μ g/ μ l)을 넣은 후 조심스럽게 혼합한 다음, 90 $^{\circ}$ C에서 5분간 incubation하였다. primer가 annealing 하도록 실온에서 약 10분간 방치한 후 4 $^{\circ}$ C로 유지하며 다음 시약을 가하였다. 5 \times 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 l을 첨가하여 20 μ l로 한 후, 아주 조심스럽게 손으로 tipping 혼합하였다. 이 후, 42 $^{\circ}$ C에서 90분간 incubation한 후, 얼음상에 방치하였다. 여기에 2.5M NaOH을 2 μ l 씩 가한 후 37 $^{\circ}$ C에서 15분간 incubation하였으며, 2M 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 (50mM Tris-HCl, 75mM KCl, 3mM MgCl₂,

10mM DTT, pH 8.3), 1mM dNTP(Biotoools, Spain)과 200unit M-MLV-RT(Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase, Promega)를 분리한 RNA에 처리하여 역전사를 수행함으로써 cDNA를 합성하였다. PCR은 total volume 15 μ l에 10X PCR buffer, 0.2mM dNTPs, 2pmole의 sense 및 antisense primer를 넣은 혼합액에 cDNA와 1.25unit의 Taq polymerase (Biotoools, Spain)을 넣어 PCR을 시행하였다.

RANK의 sense primer는 GCA AAC CTT GGA CCA ACT GCA C이었으며, antisense는 AAT CCA CCG TGC TTT CAG TCC C을 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 GGC 이었다. PCR 조건은 94 $^{\circ}$ C 4분, 30 cycles의 [94 $^{\circ}$ C (30초), 59 $^{\circ}$ C (30초), 72 $^{\circ}$ C (45초)], 72 $^{\circ}$ C 10분이었다(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 5ug, 50ng/ μ l의 random hexamer 3 μ l, 10mM dNTP 1 μ l를 넣고 DEPC H₂O를 가하여 10 μ l의 RNA/primer mixture를 만들었다. 실험용 samPMe을 65C에서 5분간 incubation 시킨 후 1분 이상 얼음에 방치하였다. Reaction mixture으로 10배의 RT buffer 2 μ l, 25mM MgCl₂ 4 μ l, 0.1M DTT 2 μ l, RNAaseOUT 1 μ l을 섞어 준비하였다.

RANK의 sense primer는 GCA AAC CTT GGA CCA ACT GCA C이었으며, antisense는 AAT CCA CCG TGC TTT CAG TCC C을 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 GGC 이었다. Reaction mixture를 RNA/primer mixture에 가하여 섞고 실온에 2분간 방치한 후, SuperScript II RT 1 μ l (50units)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 $^{\circ}$ C

에서 20분간 incubation 시킨 다음, 사용 시까지 -20°C에 보관하였다. 각각의 optical tube에 2배의 SYBR Green Mix 12.5 μ l, cDNA 0.2 μ l, 5pmol/ μ l primer pair mix 1 μ l, 11.3 μ l H₂O를 넣고, 50°C 2분 1cycle, 95°C 10min 1cycle, 95°C 15sec, 60°C 30sec, 72°C 30sec 40cycles, 72°C 10min 1cycle로 증폭시켰다. PCR을 마친 후 tube를 꺼낸 다음, 반응액 5 μ l를 사용하여 3% agarose gel에서 PCR specificity를 측정했다. SDS 7000 software를 사용하여 real time PCR 결과를 분석하였다.

3. 통계학적 분석

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

III. 결 과

1. 파골세포 생성에 미치는 영향

RAW 264.7 cell에 RANKL과 TGF β 를 첨가한 배지로 배양한 경우 다수의 TRAP-positive 다핵세포가 형성되는 것이 관찰되었다. 이 세포를 파골세포로 하여 CJ 추출물이 파골세포 생성에 미치는 영향을 평가하였다. 측정 결과, TRAP-positive 다핵세포 숫자는 50 μ g/ml의 농도를 가진 group은 Control에 비해 약 62% 감소하였고, 100 μ g/ml인 group은 Control에 비해 약 74% 감소하였다. 또한, 200 μ g/ml인 group도 Control에 비해 약 88% 감소하였다.

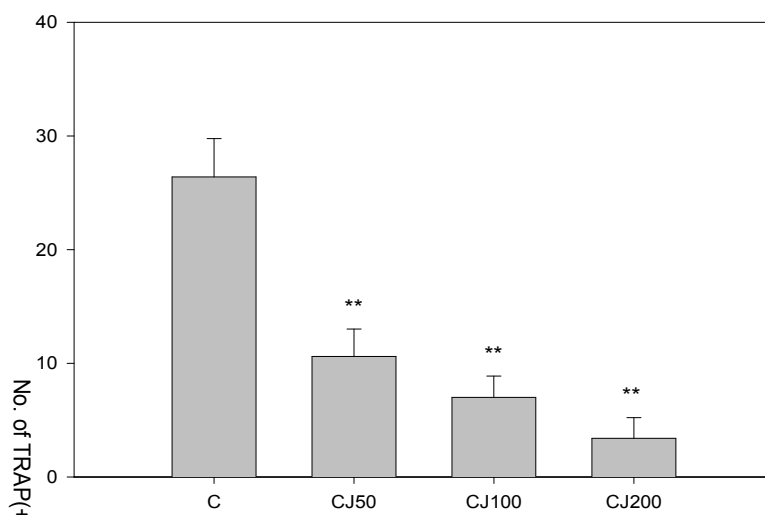


Fig. 1 Effects of CJ on the Formation of TRAP(+) MNCs in RANKL stimulated RAW 264.7 cells.

CON : RANKL(50ng/ml)

CJ50 : RANKL(50ng/ml) + 50ug/ml of CJ

CJ100 : RANKL(50ng/ml) + 100ug/ml of CJ

CJ200 : RANKL(50ng/ml) + 200ug/ml of CJ

** : p<0.01 vs C

2. RANK 발현에 미치는 영향

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. 본 연구에서는 CJ가 파골세포 기능에 관여하는 유전자들에 미치는 영향을 평가하는 일환으로 RANK의 발현에 미치는 영향을 RT-PCR 및 real time PCR system을 이용하여 평가하였다. Fig. 2와 같이 CJ는 200ug/ml, 100ug/ml, 50ug/ml 농도에서 CJ를 처리하지 않은 대조군에 비해 발현을 억제하였다.

3. TNF α 발현에 미치는 영향

TNF α 는 조골세포의 collagen 합성과 ALP 및 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 활성도가 증가될 수 있다. 본 연구에서는 CJ가 유전자 발현을 조절하는 인자에 미치는 영향을 평가하는 일환으로 TNF α 의 발현에 미치는 영향을 평가하였다. 실험 결과, Fig. 3과 같이 CJ는 200ug/ml, 100ug/ml 농도에서 TNF α 유전자 발현을 억제하였다.

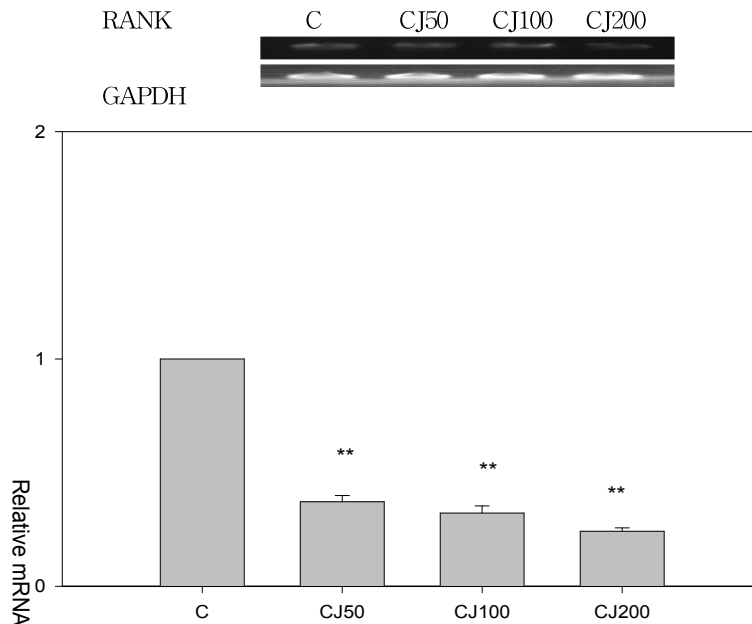


Fig. 2 Effects of CJ on the expression of RANK in RANKL stimulated RAW 264.7 cells.

C : RANKL(50ng/ml)

CJ50 : RANKL(50ng/ml) + 50ug/ml of CJ

CJ100 : RANKL(50ng/ml) + 100ug/ml of CJ

CJ200 : RANKL(50ng/ml) + 200ug/ml of CJ

** : p<0.01 vs C

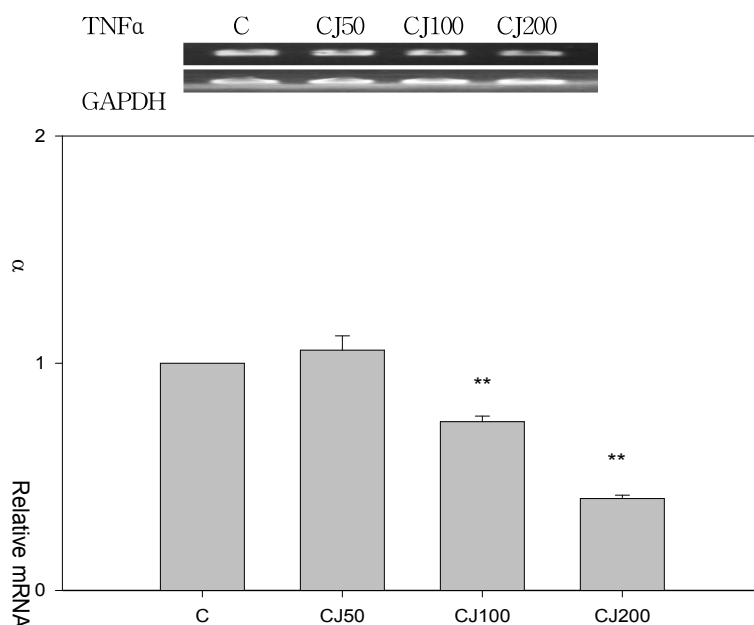


Fig. 3 Effects of CJ on the expression of TNF α in RANKL stimulated RAW 264.7 cells.

C : RANKL(50ng/ml)

CJ50 : RANKL(50ng/ml) + 50ug/ml of CJ

CJ100 : RANKL(50ng/ml) + 100ug/ml of CJ

CJ200 : RANKL(50ng/ml) + 200ug/ml of CJ

** : p<0.01 vs C

4. IL-6 발현에 미치는 영향

IL-6는 파골세포가 분화되거나 활성화 및 염증반응을 촉진한다고 알려져 있으며 adenylyate cyclase의 활성을 증가시켜 cAMP 농도가 증가한다. PKA는 cAMP 의존적 protein kinase로 파골세포 기능 활성화와 인산화와 활성 증가를 유발한다. 본 연구에서는 CJ가 세포성을 조절하는 인자에 미치는 영향을 평가하는 일환으로 IL-6의 발현에 미치는 영향을 평가하였다. 실험결과, CJ는 200ug/ml, 100ug/ml, 50ug/ml 농도에서는 억제 효과를 나타내었다(Fig. 4).

5. COX-2 발현에 미치는 영향

Interleukin-1 β 등의 자극으로 유발되는 COX-2 활성은 파골세포(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 Adenylyate Cyclase를 활성화시켜 cAMP -dependent PKA의 활성을 증가시키며, cAMP에 의존적인 RANKL과 OPG -osteoprotogerin의 작용을 거쳐 collagen을 분해하는 MMP의 유전 발현을 촉진하여 골의 재흡수에 관여한다. 실험결과, CJ는 파골세포에서 COX-2 유전자 발현을 억

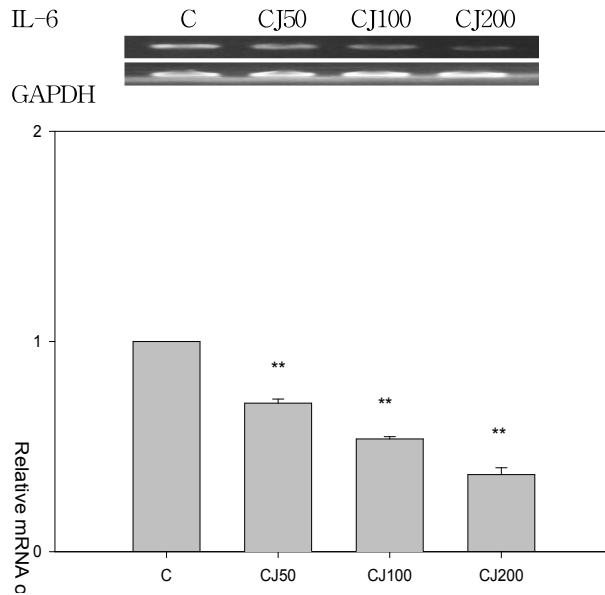


Fig. 4 Effects of CJ on the expression of IL-6 in RANKL stimulated RAW 264.7 cells.

C : RANKL(50ng/ml)

CJ50 : RANKL(50ng/ml) + 50ug/ml of CJ

CJ100 : RANKL(50ng/ml) + 100ug/ml of CJ

CJ200 : RANKL(50ng/ml) + 200ug/ml of CJ

** : p<0.01 vs C

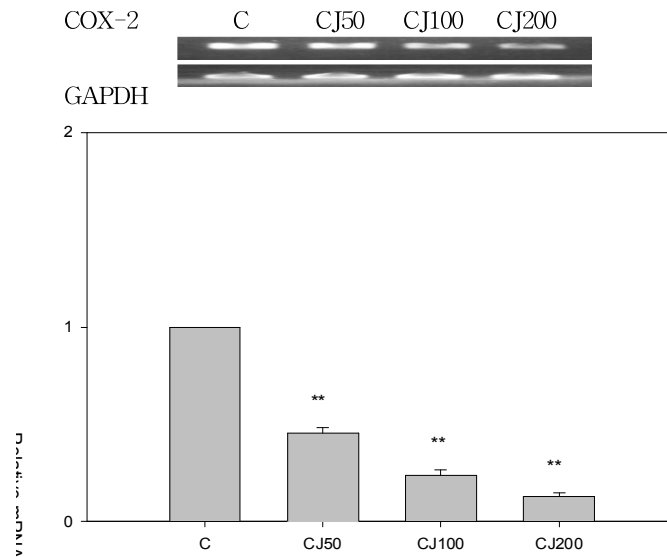


Fig. 5 Effects of CJ on the expression of COX-2 in RANKL stimulated RAW 264.7 cells.

C : RANKL(50ng/ml)

CJ50 : RANKL(50ng/ml) + 50ug/ml of CJ

CJ100 : RANKL(50ng/ml) + 100ug/ml of CJ

CJ200 : RANKL(50ng/ml) + 200ug/ml of CJ

** : p<0.01 vs C

제하였다(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 파골세포형성과 골흡수를 억제한다. 본 연구에서는 CJ가 유전자 발현을 조절하는 인자에 미치는 영향을 평가하는 일환으로 iNOS의 발현에 미치는 영향을 평가하였다. 실험 결과, Fig. 6와 같이 CJ는 200ug/ml, 100ug/ml, 50ug/ml 농도에서 iNOS 유전자 발현을 억제시켰다.

7. Cathepsin K 발현에 미치는 영향

Cathepsin K는 RANKL이나 M-CSF(macro-

phage 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 K나 MMP-9, TRAP의 mRNA를 지표로 사용하여 측정할 수 있다. 실험 결과, Fig. 7과 같이 CJ는 200ug/ml, 100ug/ml, 50ug/ml 농도에서 Cathepsin K 발현을 억제하였다.

IV. 고찰

대식세포는 미생물 침입 및 암 발생 등에 일차적인 방어작용을 하는 세포로 골수의 줄기 세포로부터 생성된다. 대식세포는 인체의 다양한 조직에 존재하는데, 뇌의 소교세포(microglial cell), 간의 Kupffer 세포, 폐의 alveolar macro-

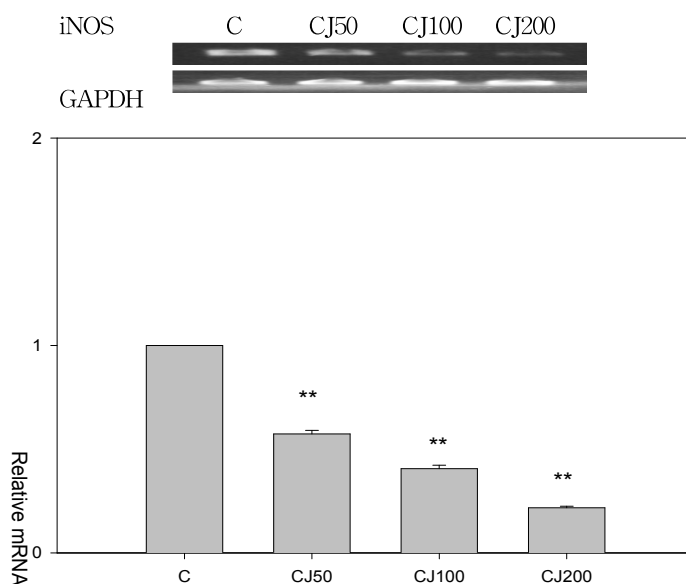


Fig. 6 Effects of CJ on the expression of iNOS in RANKL stimulated RAW 264.7 cells.

C : RANKL(50ng/ml)

CJ50 : RANKL(50ng/ml) + 50ug/ml of CJ

CJ100 : RANKL(50ng/ml) + 100ug/ml of CJ

CJ200 : RANKL(50ng/ml) + 200ug/ml of CJ

** : p<0.01 vs C

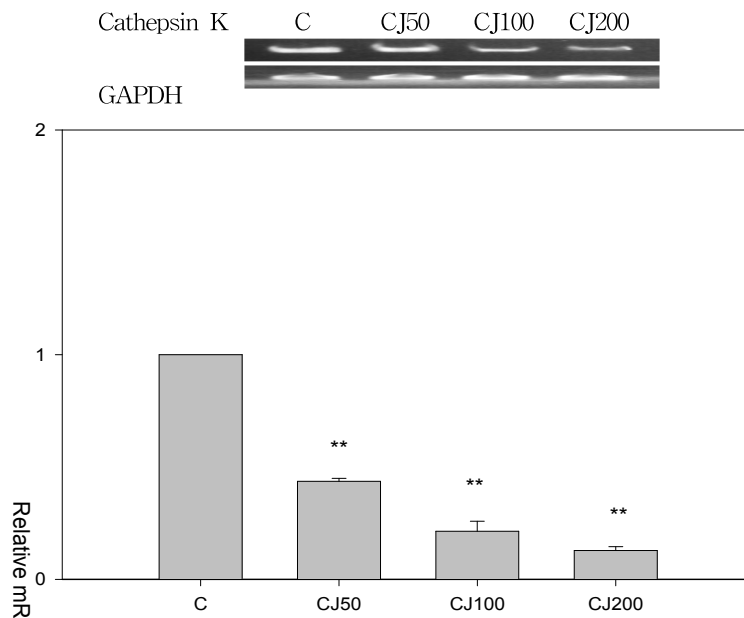


Fig. 7 Effects of CJ on the expression of Cathepsin K in RANKL stimulated RAW 264.7 cells.

C : RANKL (50 ng/ml)

CJ50 : RANKL (50 ng/ml) + 50ug/ml of CJ

CJ100 : RANKL (50 ng/ml) + 100ug/ml of CJ

CJ200 : RANKL (50 ng/ml) + 200ug/ml of CJ

** : p<0.01 vs C

phage 등과 같이 다른 기능을 가진 형태로 존재한다. 뼈에 존재하는 Osteoclast는 대식세포와 같은 계열의 세포로 골수의 줄기세포로부터 GM-CFU(granulocyte-macrophage colony forming unit), CFU-M(colony forming unit - myelocyte)을 거치며 RANKL의 자극을 받아 분화된다. 이와 같은 특징으로 RANKL로 자극된 RAW 264.7 세포는 많은 연구에서 osteoclastogenesis를 측정하는 모델 세포로 이용되고 있다.¹⁴⁾

본 연구에서는 우선적으로 골 흡수를 억제하여 골다공증에 효과적인 약제를 찾아내기 위하여, 토사자 추출물(CJ)이 RANKL 유도 RAW 264.7의 TRAP 양성 세포 생성을 억제하는지를 검색하였다. 이와함께 토사자가 파골세포의 단백질 합성에 미치는 구체적인 작용기전 밝히기 위하여, 유전자 발현에 대한 검색을 실시하였다. TRAP은 성숙한 파골세포에서 발현하는 것으로 TRAP 양성세포는 파골세포로 분화 여부

를 판단하는 기준으로 이용될 수 있다.¹⁵⁾ 실험 결과, 토사자 추출물(CJ)은 파골세포의 TRAP 양성 세포 형성을 억제시켰다(Fig. 1). 이를 바탕으로 파골세포 기능에 관련되는 단백질을 합성하는 유전자 발현을 측정하여 구체적인 기전을 밝히고자 하였다. 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.¹⁶⁻¹⁷⁾ 실험결과, 토사자 추출물은 RANK 발현을 억제하였다(Fig 2). RANK에 RANKL이 결합하면 TRAF(tumor necrosis factor associated factor)이 활성화되고 NF-κB, AP-1, NFATc1와 같은 transcription factor이 활성화된다. 이와 함께 ERK, TNF(tumor necrosis factor associated factor)등으로 구성된 MAPK 경로가 활성화와 JNK, p38, Src,

Akt 등이 활성화되어 파골세포의 분화 및 기능이 활성화 된다.¹⁸⁾ 따라서, 토사자는 이상의 파골세포 분화 및 기능 활성화에 관련된 인자를 억제할 수 있을 것으로 평가되었다. 관련된 실험결과에서 토사자 추출물(CJ)은 TNF α 유전자 발현 억제를 보였다.(Fig. 3) TNF α 는 조골세포의 collagen 합성과 ALP 및 osteocalcin의 발현을 억제한다고 알려져 있다. 또한, IL-6와 M-CSF를 활성화시켜 파골세포의 분화를 증진시키고 골 흡수를 유발한다.¹⁹⁾ 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. 그러나, 토사자는 TNF α 의 발현을 억제하여 파골세포 발현을 억제하는 것으로 판단되었다. 이와 함께 강력한 골흡수 인자인 IL-6는 파골세포가 분화되거나 활성화 및 염증반응을 촉진한다고 알려져 있는데, 토사자는 IL-6의 유전자 발현을 억제하였다. 이는 인산화 과정을 통해 세포기능을 활성화시키는 PKA의 활성 증가와 관련이 있다.²⁰⁾ 실험에서 IL-6의 발현을 억제하는(Fig. 4) 토사자 추출물은 cAMP 생성에 관여하는 adenylylate cyclase의 활성이나 cAMP 의존적인 PKA의 활성을 조절할 수 있을 것으로 판단되었다. 이와는 별도로 파골세포의 활성 조절에는 COX-2 과정을 거쳐 생성되는 PGE $_2$ 가 관여하는데,²¹⁾ 토사자는 COX-2 유전자 발현을 억제하였다(Fig. 5). RANKL로 자극된 파골세포(OC)는 PLA $_2$ 의 활성이 증가하여 세포막의 인지질로부터 AA를 유리하며, AA는 대사과정을 거쳐 생성되는 다양한 prostaglandin류를 통하여 조골세포와 파골세포의 기능을 조절할 수 있다. 특히, 파골세포에서 골흡수를 촉진하는 Prostaglandin 류인 PGE $_2$ 를 생합성하여 골다공증을 심화시키는 것으로 보고되었다.¹⁵⁻¹⁶⁾ PGE $_2$ 는 OC의 분화에 중요한 역할을 하는 PKC의 활성과 MAPK의 활성 증가시키고, G-protein에 연계된 Adeny-

late Cyclase를 활성화시켜 cAMP-dependent PKA의 활성을 증가시킨다. 이와 함께 cAMP에 의존적인 collagen을 분해하는 MMP의 유전 발현을 촉진하여 골의 재흡수에 관여한다.²²⁻²³⁾ 따라서, 토사자는 RANK 발현 억제, COX-2 억제등을 통해 collagen을 분해하는 MMP의 생성을 차단할 수 있을 것으로 추정된다. 이와 함께 토사자는 Prostaglandin 류와 비슷한 염증유발물질인 NO 생성을 억제하였다(Fig. 6). NO는 NOS(nitric oxide synthetase)에 의해 생성되는 물질로, calcium dependent한 endothelial NOS 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 골흡수를 촉진한다.²⁴⁻²⁵⁾ 이들의 작용을 통해 나타나는 Cathepsin K는 RANKL이나 M-CSF (macrophage colony stimulating factor)등을 처리하는 경우 발현되는 단백질로 알려져 있으며, MMP-9, TRAP 등과 함께 골의 흡수에 직접적으로 관여하고 있다.²⁶⁾ 토사자는 파골세포의 활성화로 인한 재흡수과정은 세포에서 발현되는 Cathepsin K 발현을 억제하였다(Fig. 7). 이상의 결과, 토사자는 파골세포의 분화 및 기능을 증가억제 할 수 있을 것으로 평가되었으며, 이는 파골세포(OC)의 분화와 기능을 활성화시키는 유전자의 발현을 억제하여 나타나는 것으로 판단되었다.

V. 결론

토사자 추출물(CJ)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 결

과를 얻었다.

(1) CJ는 RANKL 유도 RAW 264.7의 TRAP-positive 세포의 형성을 억제하였다.

(2) CJ는 RANKL 유도 RAW 264.7 세포에서 RANK, TNF α , IL-6의 발현을 억제하였다.

(3) CJ는 RANKL 유도 RAW 264.7 세포에서 iNOS 및 COX-2의 발현을 억제하였다.

(4) CJ는 RANKL 유도 RAW 264.7 세포에서 Cathepsin K의 발현을 억제하였다.

이상의 연구결과, 토사자 추출물(CJ)은 RANKL 유도 RAW 264.7 세포에서 과골세포로의 분화를 억제하였으며, 과골세포 분화 및 기능 활성화에 관련된 유전자 발현을 억제하였다.

VI. 참고문헌

1. Kumamoto H, Ooya K. Expression of parathyroid hormone-related protein(PTHrP), osteoclast differentiation factor(ODF)/receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand (RANKL) and osteoclastogenesis inhibitory factor(OCIF)/osteoprotegerin(OPG) in ameloblastomas. *J Oral Pathol Med.* 2004; 33(1) : 46-52.
2. Reddy SV. Regulatory mechanisms operative in osteoclasts. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2004; 14(4) : 255-70.
3. Boyce BF, Yamashita T, Yao Z, Zhang Q, Li F, Xing L. Roles for NF-kappaB and c-Fos in osteoclasts. *J Bone Miner Metab.* 2005; 23 Suppl : 11-5.
4. Murakami A, Song M, Ohigashi H. Phenethyl isothiocyanate suppresses receptor activator of NF-kappaB ligand (RANKL)-induced osteoclastogenesis by blocking activation of ERK1/2 and p38 MAPK in RAW264.7 macrophages. *Biofactors.* 2007; 30(1) : 1-11.
5. 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.
6. 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.
7. 全國韓醫科大學 教授. 本草學, 永林出版社, 서울, 1994, pp568-9.
8. Ye M, Li Y, Yan Y, Liu H, Ji X Determination of flavonoids in Semen Cuscutae by RP-HPLC. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2002; 28(3-4) : 621-8.
9. Yen FL, Wu TH, Li CC, Lin TJ. Hepatoprotective and antioxidant effects of Cuscuta chinensis against acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats. *J Ethnopharmacol.* 2007; 111(1) : 123-8.
10. 이재복, 이병렬, 兔絲子藥針의 抗癌作用 및 免疫效果에 對한 實驗的 研究. *大韓鍼灸學會誌* 2001; 18 : 94-104.
11. Koo BS, Choi EG, Park JB, Cho CH, Chung KH, Kim CH. Neuroprotective effect of Chuk-Me-Sun-Dan on NMDA- and AMPA-evoked nitric oxide synthase activity in mouse brain. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2005; 27(3) : 499-514.
12. Oh H, Kang DG, Lee S, Lee HS. Angiotensin converting enzyme inhibitors from Cuscuta japonica Choisy. *J Ethnopharmacol.* 2002; 83(1-2) : 105-8.
13. 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. Epub 2005 Apr 28.
14. 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.
 15. 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
 16. Khosla S. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology.* 2001;142(12):5050-5.
 17. 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.
 18. Yao Z, Li P, Zhang Q, Schwarz EM, Keng P, Arbin 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-Fos expression. *J Biol Chem.* 2006;281(17):11846-55.
 19. 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.
 20. 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.
 21. 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.
 22. 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.
 23. 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.
 24. 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.
 25. Kim MS, Day CJ, Selinger CI, Magno CL, Stephens SR, Morrison NA. MCP-1-induced human osteoclast-like cells are tartrate-resistant acid phosphatase, NFATc1, and calcitonin receptor-positive but require receptor activator of NF- κ B ligand for bone resorption. *J Biol Chem.* 2006;281(2):1274-85.