

동충하초가 파골세포의 분화와 유전자 발현에 미치는 영향

¹대전대학교 한의과대학 부인과교실, ²가천대학교 한의과대학 예방의학교실
최경희¹, 유정은¹, 황귀서², 유동열¹

ABSTRACT

Effects of *Cordyceps militaris*(CM) on Osteoclastogenesis and Gene Expression

Kyung-Hee Choi¹, Jeong-Eun Yoo¹, Gwi-Seo Hwang², Dong-Youl Yoo¹

¹Dept. of Oriental Gynecology, College of Oriental Medicine, Dae-Jeon University

²Dept. of Preventive Medicine, College of Oriental Medicine, Ga-Chon University

Objectives: This study was performed to evaluate effects of *Cordyceps militaris*(CM) on osteoclast differentiation and its related gene expression.

Methods: We used mouse myeloid cells RAW 264.7 stimulated by receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand(RANKL) to induce osteoclast differentiation. There are four groups of which RAW 264.7 cells are not stimulated by RANKL (Normal), stimulated by RANKL without CM(Control), stimulated by RANKL with 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of CM(CM 0.1), stimulated by RANKL with 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of CM(CM 1). Osteoclastogenesis was measured by counting Tartrate-resistant acid phosphatase-positive multinucleated cells [TRAP(+) MNC]. RT-PCR was performed to evaluate the inhibitory effect of CM on gene expression(TRAP, AKT1, JNK1, NFATc1, c-Fos, MITF).

Results:

1. CM decreased the number of TRAP(+) osteoclast in RANKL-stimulated RAW 264.7 cell at the concentration of 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$.
2. CM decreased the expression of TRAP in osteoclast at the concentration of 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$.
3. CM decreased the expression of AKT1, JNK1 in osteoclast at the concentration of 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$.
4. CM didn't affect the expression of NFATc1, c-Fos, MITF in osteoclast.

Conclusions: *Cordyceps militaris* has inhibitory effects on osteoclast differentiation and its related gene expression. These results suggest that *Cordyceps militaris* has a potential as a treatment of osteoporosis.

Key Words: *Cordyceps militaris*, Osteoclast, Osteoporosis, Osteoclastogenesis

I. 서 론

골다공증은 골 형성보다 골 흡수가 증가되어 발생하는 대사성 골 질환으로¹⁾ 증상이 없이 뼈의 강도를 약화시켜 골절의 위험성을 증가시키므로 고령의 인구가 증가할수록 예방과 치료에 대한 사회적인 관심이 증가하고 있다²⁾.

뼈는 지속적으로 조골세포에 의해 생성되고 파골세포에 의해 파괴되는 과정을 겪게 되며 이 과정의 불균형은 골 질환을 야기하게 된다³⁾. 특히 골 파괴의 중요한 역할을 담당하는 파골세포의 분화는 조골세포에서 발현되는 파골세포 분화유도인자인 Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand(RANKL)와 파골전구세포에서 발현되는 그 수용체 Receptor activator of nuclear factor- κ B(RANK)의 결합에 의해 시작되며 이는 파골세포 분화에 중요한 전사 인자인 Nuclear factor κ B(NF- κ B), c-Fos, Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 1(NFATc1) 등의 발현을 증가시켜 파골세포의 성숙을 야기한다⁴⁾.

임상적으로 파골세포의 분화를 억제하고 파골세포의 기능을 억제하여 골 흡수를 줄이는 치료에 대표적인 약물이 Bisphosphonate 계열의 약물이다⁵⁾. Bisphosphonate 계열 약물의 주된 작용은 파골세포가 작용하는 지점에서 파골세포의 기능을 기계적으로 저해하며 파골세포의 세포사멸을 유도하는 것이다⁶⁾. 또한 파골세포의 분화를 억제하기도 한다⁷⁾. 그러나 Bisphosphonate 계열의 약물은 주로 골다공증을 가지는 고령의 환자에서 치과적인 문제를 야기하는 것으

로 알려져 최근 주의가 요구되고 있는데 하악골의 괴사가 가장 심각한 부작용이다⁸⁾. 따라서 임상적 사용에 주의가 필요하여 보다 안전하고 효과적인 골다공증 치료제의 개발이 필요한 상황으로 부작용이 없는 천연물을 통한 새로운 골다공증 치료제를 개발하기 위한 노력이 필요할 것으로 사료된다. 기존에 국내에서는 녹용⁹⁾, 두충¹⁰⁾, 오미자¹¹⁾, 백출¹²⁾, 목향¹³⁾, 복분자¹⁴⁾ 추출물이 골다공증을 야기하는 파골세포의 분화를 억제한다고 보고된 바 있다.

동충하초(*Cordyceps militaris*)는 곤충의 시체에 자실체를 내리는 소형 버섯류로 性味が 溫甘하고 肺腎 二經에 들어가 補虛損, 益精氣, 止咳化痰하는 효능이 있다. 또한 補腎陽하는 효능으로 腎氣不足으로 인한 陽痿遺精, 腰膝痠痛을 치료한다¹⁵⁾. 주성분은 Cordycepin으로 알려져 있으며 항암 작용, 면역 증강 작용 등에 대한 연구는 보고된 바 있으나¹⁶⁾ 뼈에 대한 효능이나 골다공증 치료제로서의 가능성에 대해서는 연구된 바가 없다.

이에 저자는 동충하초 추출물의 파골세포 분화와 파골세포 기능 활성화에 관여하는 인자들에 대한 효과를 평가하고자 RANKL로 자극한 RAW 264.7 cell이 파골세포로 분화하는 과정에 미치는 영향과 관련 유전자인 Tartrate-resistant acid phosphatase(TRAP), NFATc1, c-Fos, Microphthalmia-associated transcription factor(MITF), RAC-alpha serine/threonine-protein kinase(AKT1), c-Jun N-terminal kinase(JNK1)의 발현을 측정할 결과 유의한 성적을 얻었기에 이를 보고하는 바이다.

II. 실험

1. 재 료

1) 한약재 추출 및 검액 제조

대전대학교 둔산한방병원에서 구입하여 정선한 동충하초(*Cordyceps militaris*) 100 g을 분말로 만들어 플라스크에 넣은 후, Methanol 500 ml를 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 동충하초 추출물(이하 CM이라 함)을 DMSO를 이용하여 배지에 녹인 후, pore size 0.45 μm 의 여과지를 통과시킨 후 사용하였다.

2) 세 포

한국세포주은행에서 구입한 mouse myeloid 세포주인 RAW 264.7 cell에 RANKL을 처리하여 유도된 세포 모델을 사용하여 실험하였다.

2. 방 법

1) RAW 264.7 Cell 배양

RAW 264.7 cell은 DMEM(Dulbecco's modified eagle medium)/10% FBS(Fetal bovine serum)/PC-SM 배지를 이용하여 CO₂ 세포배양기에서 배양하였으며, 세포 수는 5×10^3 cells/well 로 96 well plate를 이용하여 배양하였다. 24시간 배양하여 배양액을 버린 후, 10% FBS, 50 ng/ml RANKL, 1 ng/ml TGF β 가 첨가된 α -MEM으로 교환하여 세포를 배양하였다. 배양액에 여러 농도의 CM을 첨가하였다. 2일에 한 번 씩 동일한 배지로 교환해 주

면서 6일간 배양하였다.

2) 약물처리

실험군은 RANKL 미처리군(Normal), RANKL 처리군(Control), RANKL 처리 후 CM 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 추출물을 투여한 군(CM 0.1)과 RANKL 처리 후 CM 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 추출물을 투여한 군(CM 1)으로 구분하였다.

3) 파골세포 생성 측정

RANKL로 RAW 264.7 cell을 파골세포로 유도한 후, 성숙한 파골세포의 발현 marker로 알려진 TRAP¹⁷⁾를 염색하여 TRAP-positive 세포를 확인하였다. 분화시킨 세포를 PBS(Phosphate buffered saline)로 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-positive 다핵세포 (TRAP(+) MNCs)를 계수하여 파골세포의 생성지표로 하였다.

4) 파골세포 유전자 발현 측정

(1) Total RNA 분리

RNA를 분리하기 위하여 배양세포의 배지를 제거한 다음, 4°C PBS로 3회 washing 하였다. 세포를 모은 다음, 750 \times g에서 10분간 원심 분리한 후 ice cold PBS로 2회 씻었다. 침전된 세포에 lysis buffer를 가하여 용해시킨 다음, 12,000 \times g에서 10분간 원심 분리하여 상층을 취하였다. 다시 1M sucrose가 함유된 tris buffer 위에 loading한 다음, 36,000rpm에

서 160분간 원심 분리하였다. Polysome pellet을 취하여 SDS buffer에 녹인 후, 37°C에서 30분 간 incubation 시켰다. Sod. Acetate buffer를 가한 다음, phenol/CsKl₃ 용액으로 추출하였다. NaCl을 0.2M이 되도록 가한 다음, EtOH를 가한 후 -20°C에서 12시간 보관하였다. 침전물을 75% Ethanol로 2회 washing한 다음 건조시켰다. 유전자 발현에 필요한 RNA양을 대조군과 시험군에서 mRNA 양이 같도록 조정된 다음, 전기영동으로 확인하여 사용하였다.

(2) cDNA 제조

대조군 및 시험군에서 각각 분리한 total RNA액 10 μ l (10 μ g RNA 함유)에 oligo dT 1 μ l (2 μ g/ μ l)를 넣은 후 조심스럽게 혼합한 다음, 90°C에서 5분간 incubation하였다. Primer가 annealing 하도록 실온에서 약 10분간 방치한 후 4°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 l를 첨가하여 20 μ l로 한 후, 아주 조심스럽게 손으로 tipping 혼합하였다. 이 후, 42°C에서 90분간 incubation한 후, 얼음상에 방치하였다. 여기에 2.5M NaOH을 2 μ l씩 가한 후 37°C에서 15분간 incubation하였으며, 2M HEPES buffer(free acid)를 10 μ l 가하여 중화시켰다. 각각의 시

약은 Amersham Bioscience에서 구입하였다.

(3) Real time PCR

각각의 optical tube (MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode and Optical Adhesive Films, Applied Biosystems, Cat.No. 4314320)에 3배의 SybrGreen Mix 2.5 μ l (Sigma -Aldrich, Cat.No. S9430), (2)에서 합성한 cDNA 1 μ l, 10 pmol/ μ l primer pair mix 1 μ l, 각각 2.5 mM의 dNTP 2 μ l, 10 \times Tag polymerase buffer 2.5 μ l, Tag Polymerase 0.3 μ l 와 14.7 μ l H₂O를 넣고, 95°C 5 min 1 cycle, 95°C 30 sec, 45°C 30 sec, 72°C 60 sec 40 cycles, 95°C 20 min 1 cycle로 증폭시켰다. Primer는 RT-PCR에 사용한 것을 이용하였다. PCR을 마친 후 tube를 꺼낸 다음, 반응액 5 μ l를 사용하여 3% agarose gel에서 PCR specificity를 측정하고, ABI PRISM® 7000 Sequence Detection System(Applied Biosystems, Cat.No. 4349157)를 사용하여 Real time PCR 결과를 분석하였다. PCR에 사용한 primer는 아래 Table 1에 표시하였다.

3. 통계처리

각 결과는 평균 \pm SEM으로 표시하였다. 결과에 대한 유의성 검증은 student's t-test를 이용하였으며, 유의성은 $p < 0.05$ 로 규정하였다.

Table 1. Primer

Target gene	Forward (5'-3')	Reverse (3'-5')
TRAP	ACACAGTGATGCTGTGTGGCAACTC	CCAGAGGCTTCCACATATATGATGG
Cathepsin K	AGGCGGCTATATGACCACTG	CCGAGCCAAGAGAGCATATC
MMP-9	CGTCGTGATCCCCACTTACT	AGAGTACTGCTTGCCCAGGA
JNK1	GCCATTCTGGTAGAGGAAGTTTCTC	CGCCAGTCCAAAATCAAGAATC
c-fos	CCAGTCAAGAGCATCAGCAA	AAGTAGTGCCAGCCCGGAGTA
NFATc1	GGGTCAGTGTGACCGAAGAT	GGAAGTCAGAAGTGGGTGGA
iNOS	CCTTGTTTCAGCTACGCCTTC	AAGGCCAAACACAGCATAACC
MITF	GGAACAGCAACGAGCTAAGG	TGATGATCCGATTCACCAGA
b-actin	TCACCCACACTCTGCCCAT	TCCTTAATGTACGCACCATTT
AKT1	CCTGGACTACTTGCCTCCGAG	GATCAGGCGCGTGATGGTGATC

III. 결 과

1. 파골세포 생성에 미치는 영향

실험 결과 RANKL을 처리하지 않은 정상군의 세포 분화는 거의 일어나지 않았으며, RANKL을 처리한 대조군은 TRAP(+) MNC의 생성이 정상군에 비해 유의성 있게 증가하여 파골세포로의 분화가 확인되었다. 동충하초 추출물(이하 CM)은 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 대조군에 비해 TRAP(+) MNC가 유의성($p < 0.05$) 있게 감소(약 35.4%)하였고, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서도 대조군에 비해 유의성($p < 0.01$) 있게 감소(약 42.1%) 하였다(Fig. 1).

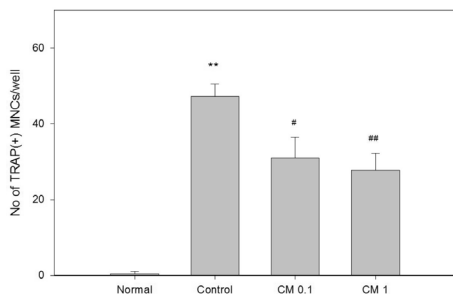


Fig. 1. Effects of CM on the Formation of TRAP(+) MNCs in RANKL Stimulated Osteoclast.

Normal : Vehicle

Control : RANKL(50 ng/ml)

CM 0.1 : RANKL(50 ng/ml) + 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of CM

CM 1 : RANKL(50 ng/ml) + 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of CM

Each bar represents Mean \pm SD of 5 tests.

** : $p < 0.01$ vs Normal

: $p < 0.05$ vs Control

: $p < 0.01$ vs Control

2. TRAP 유전자 발현에 미치는 영향

실험 결과, CM은 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 대조군에 비해 TRAP 유전자 발현을 유의성($p < 0.01$) 있게 억제하였다(Fig. 2).

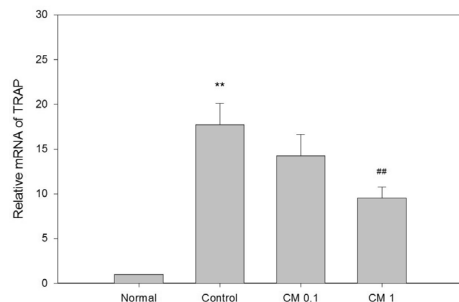


Fig. 2. Effects of CM on the Expression of TRAP in RANKL Stimulated Osteoclast.

Normal : Vehicle

Control : RANKL(50 ng/ml)

CM 0.1 : RANKL(50 ng/ml) + 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of CM

CM 1 : RANKL(50 ng/ml) + 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of CM

Each bar represents Mean \pm SD of 5 tests.

** : $p < 0.01$ vs Normal

: $p < 0.01$ vs Control

3. NFATc1 발현에 미치는 영향

실험 결과, CM을 처리한 경우 대조군에 비해 NFATc1 발현에 영향을 주지 못하였다(Fig. 3).

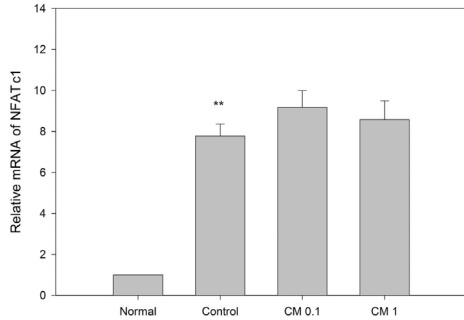


Fig. 3. Effects of CM on the Expression of NFATc1 in RANKL Stimulated Osteoclast.

Normal : Vehicle
 Control : RANKL(50 ng/ml)
 CM 0.1 : RANKL(50 ng/ml) + 0.1 μ g/ml of CM
 CM 1 : RANKL(50 ng/ml) + 1 μ g/ml of CM
 Each bar represents Mean \pm SD of 5 tests.
 ** : p<0.01 vs Normal

4. c-Fos 발현에 미치는 영향

실험 결과, CM은 1 μ g/ml의 농도에서 대조군에 비해 c-Fos의 발현을 감소시켰으나 유의성은 없었다(Fig. 4).

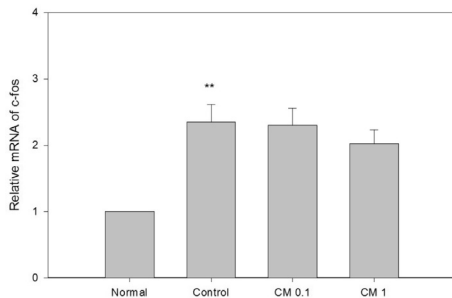


Fig. 4. Effects of CM on the Expression of c-Fos in RANKL Stimulated Osteoclast

Normal : Vehicle.
 Control : RANKL(50 ng/ml)
 CM 0.1 : RANKL(50 ng/ml) + 0.1 μ g/ml of CM

CM 1 : RANKL(50 ng/ml) + 1 μ g/ml of CM
 Each bar represents Mean \pm SD of 5 tests.
 ** : p<0.01 vs Normal

5. AKT1 발현에 미치는 영향

실험 결과, CM은 1 μ g/ml의 농도에서 대조군에 비해 AKT1 유전자 발현을 유의성(p<0.05) 있게 억제하였다(Fig. 5).

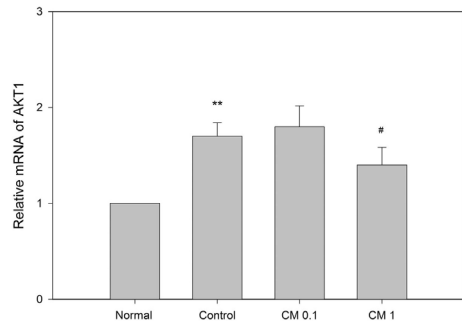


Fig. 5. Effects of CM on the Expression of AKT1 in RANKL stimulated Osteoclast.

Normal : Vehicle
 Control : RANKL(50 ng/ml)
 CM 0.1 : RANKL(50 ng/ml) + 0.1 μ g/ml of CM
 CM 1 : RANKL(50 ng/ml) + 1 μ g/ml of CM
 Each bar represents Mean \pm SD of 5 tests.
 ** : p<0.01 vs Normal
 # : p<0.05 vs Control

6. JNK1 발현에 미치는 영향

실험 결과, CM은 1 μ g/ml의 농도에서 대조군에 비해 JNK1의 발현을 유의성(p<0.05) 있게 억제하였다(Fig. 6).

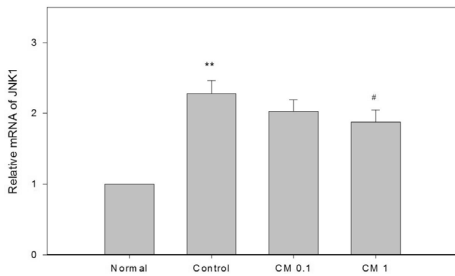


Fig. 6. Effects of CM on the Expression of JNK1 in RANKL Stimulated Osteoclast.
 Normal : Vehicle
 Control : RANKL(50 ng/ml)
 CM 0.1 : RANKL(50 ng/ml) + 0.1 μ g/ml of CM
 CM 1 : RANKL(50 ng/ml) + 1 μ g/ml of CM
 Each bar represents Mean \pm SD of 5 tests.
 ** : p<0.01 vs Normal
 # : p<0.05 vs Control

7. MITF 발현에 미치는 영향

실험 결과, CM을 처리한 경우 대조군에 비해 MITF 발현을 감소시켰으나 유의성은 없었다(Fig. 7).

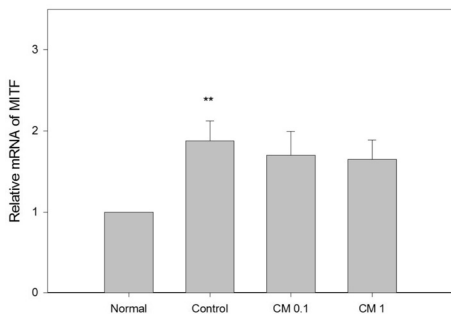


Fig. 7. Effects of CM on the Expression of MITF in RANKL Stimulated Osteoclast.
 Normal : Vehicle
 Control : RANKL(50 ng/ml)
 CM 0.1 : RANKL(50 ng/ml) + 0.1 μ g/ml of CM
 CM 1 : RANKL(50 ng/ml) + 1 μ g/ml of CM
 Each bar represents Mean \pm SD of 5 tests.
 ** : p<0.01 vs Normal

IV. 고찰

골다공증은 골 형성보다 골 흡수가 증가되어 발생하는 대사성 골 질환으로¹⁾ 그 주된 증상은 요부동통, 척추기형, 身長の 감소, 골절 등이며 원인으로는 내분비, 영양, 물리 및 유전학적 인자들이 관여하고 있다¹⁸⁻²⁰⁾. 특히 폐경기 이후 여성은 호르몬 결핍으로 인해 빠른 골 소실이 발생하여 30% 정도에서 적어도 한번 이상의 골다공증에 의한 골절을 경험한다고 보고된 바 있고, 그 빈도는 나이가 들수록 증가된다고 한다²¹⁾.

임상적으로 골다공증을 치료하는 약물인 Bisphosphonate 계열의 약물은 주로 파골세포로의 분화를 억제하고 이미 성숙한 파골세포의 기능을 억제하는 작용을 한다⁶⁾. 그러나 이 약물은 환자의 치료에 가장 많이 사용되는 약물임에도 불구하고 식도염이나 하악골의 무혈성 괴사로 인한 부작용 등이 있어 사용 시 제한이 있으며²²⁾, 이로 인해 골다공증 치료에 효과 있는 천연물의 발견이 필요할 것으로 사료된다.

동충하초(*Cordyceps militaris*)란 겨울 기간 동안 곤충의 체내에 서식하면서 양분을 흡수하여 숙주를 파괴시킨 후, 여름이 되면 곤충의 몸 밖으로 식물체가 자라나는 모습에서 그 명칭이 유래되었다. 즉, 동충하초균의 포자 또는 균사가 곤충 또는 균핵에 침입하여 기주 안에 내생균핵을 만든 다음, 밖으로 자실체를 형성하는 것이 바로 동충하초 버섯이다. 식물 분류 체계상 동충하초는 자낭균강(Ascomycota), 맥각균목(*Clavicipitales*), 맥각균과(*Clavicipitaceae*)에 속하며

Cordyceps, *Podonectria*, *Torrubiella* 등의 세 가지 종이 있는데, 그 중 대표적인 것이 *Cordyceps* 종이다²³⁾. 예로부터 약용으로 알려진 동충하초는 *Cordyceps sinensis*이며, 그 외에도 *C. militaris*, *C. sobolifera*, *C. ophioglossoides*, *C. martilis*, *C. hawkesii*, *C. beauveria*, *C. bassiana*, *C. cicade* 등이 알려져 있다²⁴⁾. 이 중 *Cordyceps militaris*는 *Cordyceps* 속균 특유의 생리활성물질인 *Cordycepin* 성분을 다량 함유하고, 항균, 항암, 면역기능 증강 등의 효능을 나타내는 것으로 알려져 있다¹⁶⁾.

동충하초는 性味가 溫甘하고 肺腎 二經에 들어가 補虛損, 益精氣, 止咳化痰하는 효능이 있으며 腎陽을 補하여 腎氣不足으로 인한 陽痿遺精, 腰膝痠痛을 치료한다¹⁵⁾고 하였다. 동충하초가 항균, 항암, 면역기능 증강에 효능을 나타내는 것으로 보고된 바 있으나²⁵⁾, 골다공증 치료에 대한 연구는 아직 접하지 못하였다.

이에 저자는 *Cordyceps militaris* 추출물을 사용하여 파골세포의 분화와 기능 활성화에 관여하는 인자들에 대한 효과를 연구하였다.

골다공증은 조골세포의 골 생성과 파골세포의 골 흡수 작용의 항상성이 깨져 파골세포에 의한 골 흡수가 많아져서 유발된다⁵⁾. 파골세포는 조혈모세포에서 유래되는 다핵형 세포이며 대식세포계의 세포로 파골세포의 분화는 병적인 골 소실의 주된 원인이 된다²⁶⁾.

파골세포의 분화는 여러 가지 자극인자를 통한 RANKL의 발현 및 작용이 매우 중요한데 RANKL은 Tumor necrosis factor(TNF) 계열의 사이토카인으로, 전

구세포에서 발현되는 RANK와 RANKL의 결합은 파골세포의 분화에 필수적인 인자이다²⁷⁾. RANK는 Tumor necrosis factor receptor(TNFR) superfamily의 일종으로 파골전구세포에서 발현되며 RANKL의 신호에 의해 활성화된다²⁸⁾. RANK와 RANKL의 결합으로 JNK, p38, Extracellular signal-regulated kinase(ERK) 등을 포함한 Mitogen-activated protein kinase(MAPK) 신호전달 경로가 활성화되며 파골세포 분화에 필수적인 NF- κ B, c-Fos, NFATc1, MITF, AKT1와 같은 전사인자가 유도된다²⁹⁾.

TRAP는 성숙한 파골세포에서 발현하는 것으로 TRAP 양성세포는 파골세포로의 분화 여부를 판단하는 기준으로 이용될 수 있다¹⁷⁾. 이를 이용하여 본 연구에서는 TRAP 양성인 다핵세포를 계수하여 동충하초 추출물이 0.1 μ g/ml와 1 μ g/ml의 농도에서 모두 파골세포의 생성을 억제시키는 것을 확인하였다(Fig. 1).

TRAP는 골의 흡수에 관여하고 있어 파골세포의 활성화로 인한 골 흡수 과정은 세포에서 발현되는 TRAP의 mRNA 유전자 발현을 지표로 삼아 측정하였다¹⁷⁾. 실험 결과 동충하초 추출물은 1 μ g/ml의 농도에서 TRAP 발현을 유의성($p < 0.01$) 있게 억제하여 동충하초 추출물이 파골세포 기능에 관여하는 유전자에 억제 효과가 있음을 확인하였다(Fig. 2).

파골세포의 분화를 유도하는 핵심 전사인자는 c-Fos와 NFATc1이다. c-Fos와 Calmodulin activated kinases (CaMKs) 신호전달 체계에 의해 NFATc1 발현이 증가하게 되며 이는 파골세포 분화의 주된 기전이다³⁰⁾. 실험 결과, 동충하초 추출물은 NFATc1 발현에는 영향을 주지

못하였다(Fig. 3). 또한 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 c-Fos의 발현을 감소시켰으나 유의성은 없었다(Fig. 4).

AKT1은 c-Src, PI3K 활성화를 통해 발현되는 인자로 동충하초 추출물 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리 시 AKT1 유전자 발현이 유의성($p < 0.05$) 있게 억제되었으며, 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리 시에는 유의한 효과를 나타내지 못하였다(Fig. 5).

MAPK 신호전달 경로는 p38, JNK, ERK 등을 포함하는데 p38 활성화가 파골세포 분화에 있어서 중요한 중간 단계임이 알려져 있으며 이 외에 JNK도 파골세포의 분화와 생존에 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀져 있다³¹⁾. 실험 결과, 동충하초 추출물 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리 시 JNK1의 발현이 유의성($p < 0.05$) 있게 억제되었으며 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리 시에는 유의한 효과를 나타내지 못하였다(Fig. 6).

TNF receptor associated factors(TRAF), TAK1, MKK6, p38의 활성화 등 일련의 신호전달 과정을 거쳐 활성화되는 인자인 MITF는 파골세포의 분화를 촉진하는 작용이 있다³²⁾. 실험 결과, 동충하초 추출물은 MITF 발현을 감소시켰으나 유의성은 없었다(Fig. 7).

이상의 실험 결과 동충하초 추출물이 파골세포 분화를 억제하는 효과가 있었으나, NFATc1, c-Fos, MITF와 같은 전사 인자들에는 영향을 주지 못하였으며 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 TRAP, AKT1 인자의 발현을 억제하였음을 확인할 수 있었고, JNK1 발현을 농도 의존적으로 억제하여 MAPK 신호전달 경로를 억제하는 효과가 있음을 알 수 있었다. 즉, 동충하초 추출물은 파골세포의 분화를 억제하는데 있어 세포 분화 기전 중 전사 인자

인 NFATc1, c-Fos는 억제하지 못하였으나 세포의 성장과 분화에 또 다른 중요한 역할을 하는 MAPK 신호전달 경로를 억제하였다. 따라서 동충하초는 파골세포의 분화와 분화를 촉진하는 신호전달 경로를 억제하는 기능이 있어 골다공증의 치료 약물로 사용할 수 있을 것으로 사료된다.

V. 결 론

동충하초 추출물(CM)이 파골세포의 분화 및 활성을 억제하여 골의 재흡수를 억제하는지를 평가하기 위하여 RANKL 유도 파골세포 분화에 미치는 영향을 측정하였으며, 관련 인자들의 유전자 발현에 미치는 영향을 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 동충하초 추출물은 TRAP(+) MNCs 생성을 억제하였다.
2. 동충하초 추출물은 파골세포에서 TRAP의 발현을 억제하였다.
3. 동충하초 추출물은 파골세포에서 AKT1, JNK1의 발현을 억제하였다.
4. 동충하초 추출물은 파골세포에서 NFATc1, c-Fos, MITF 발현에 영향을 주지 못하였다.

□ 투 고 일 : 2012년 07월 23일

□ 심 사 일 : 2012년 08월 08일

□ 게재확정일 : 2012년 08월 16일

참고문헌

1. 해리스 번역편찬위원회. Harrison's 내

- 과학. 서울:도서출판 정담. 1997:2312-3, 2342-3.
2. Cooper C, et al. Population-based study of survival after osteoporotic fractures. *Am J Epidemiol.* 1993; 137(9):1001-5.
 3. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature.* 2003;423(6937):337-42.
 4. Rao A, Luo C, Hogan PG. Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu Rev Immunol.* 1997;15:707-47.
 5. Rodan GA, Marfin TJ. Therapeutic approaches to bone disease. *Science.* 2000;289(5484):1508-14.
 6. Nishikawa M, et al. Bisphosphonates act on osteoblastic cells and inhibit osteoclast formation in mouse marrow cultures. *Bone.* 1996;18(1):9-14.
 7. Kwack HB, et al. Risedronate directly inhibits osteoclast differentiation and inflammatory bone loss. *Biol Pharm Bull.* 2009;32(7):1193-8.
 8. Abrahamsen B. Bisphosphonate adverse effects, lessons from large databases. *Curr Opin Rheumatol.* 2010;22(4):404-9.
 9. 곽한복 등. 녹용 물 추출물의 파골세포 분화 억제효과. *동의생리병리학회지.* 2008;22(4):891-5.
 10. 정연태 등. 두충의 물 추출물이 파골세포의 분화에 미치는 영향. *동의생리병리학회지.* 2009;23(3):613-8.
 11. 리연 등. 오미자 물 추출물이 파골세포 분화에 미치는 영향. *동의생리병리학회지.* 2010;24(5):848-53.
 12. 박성태 등. 백출의 파골세포 분화에 미치는 영향. *동의생리병리학회지.* 2011;25(1):109-14.
 13. 이명수 등. 파골세포 분화에 목향 물 추출물의 효과. *동의생리병리학회지.* 2011;25(3):516-20.
 14. 오재민 등. 파골세포 분화에 미치는 복분자 물 추출물의 효과. *동의생리병리학회지.* 2011;25(4):669-73.
 15. 전국한의과대학공동교재편찬위원회. *본초학.* 서울:영림사. 2005:615-6.
 16. Ying J, et al. *Icons of medical fungi from china.* Beijing, China:Science press. 1987:65-85.
 17. 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.
 18. 대한정형외과학회. *정형외과학.* 서울:대한정형외과학회. 1993:15-23, 133-5.
 19. 대한병리학회. *병리학.* 서울:고문사. 1998:1073-5.
 20. 조수현. *폐경과 골다공증.* 대한의학협회지. 1992;35(5):587-98.
 21. Christenson RH. Biochemical markers of bone metabolism:an overview. *Clin Biochem.* 1997;30(8):573-93.
 22. Khosla S, et al. Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: report of a task force of the American Society for Bone and mineral Research. *J Bone Miner Res.* 2007;22:1479-91.
 23. Kobayasi Y. Keys to the taxa of the genera *Cordyceps* and *Torrubiella.* *Trans Mycol Soc Japan.* 1982;23:

- 329-64.
24. Su CH, Wang HH. *Phytocordiceps*, a new genus of the *Clavicipitaceae*. *Mycotaxon*. 1986;26:337-44.
 25. 안덕균. *한국본초도감*. 서울:교학사. 2002:725.
 26. Roodman GD. Regulation of osteoclast differentiation. *Ann NY Acad Sci*. 2006;1068:100-9.
 27. Dougall WC, et al. RANK is essential for osteoclast and lymph node development. *Genes Dev*. 1999;13(18):2412-24.
 28. Lowe C, et al. Osteopetrosis in *Src*-deficient mice is due to an autonomous defect of osteoclasts. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993;90(10):4485-9.
 29. Takayanagi H. Osteoimmunology : shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nat Rev Immunol*. 2007;7(4):292-304.
 30. Takayanagi H, et al. Induction and activation of the transcription factor NFATc1(NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts. *Dev Cell*. 2002;3(6):889-901.
 31. Partington GA, et al. *Mitf*-*PU.1* interactions with the tartrate-resistant acid phosphatase gene promoter during osteoclast differentiation. *Bone*. 2004;34(2):237-45.
 32. Melton LJ 3rd, et al. Bone density and fracture risk in men. *J Bone Miner Res*. 1998;13(12):1915-23.