

## RANKL에 의해 유도되는 파골세포 분화에 대한 시금치 추출물의 영향

김동규 · 김미혜 · 강민정 · 신정혜

(재)남해마늘연구소

### Effect of Spinach Extract on RANKL-Mediated Osteoclast Differentiation

Dong-Gyu Kim, Mi-Hye Kim, Min Jung Kang, and Jung Hye Shin

Namhae Garlic Research Institute

**ABSTRACT** Inhibition of osteoclast differentiation is the most important target for prevention of inflammatory bone resorption and bone diseases. Here, we investigated the effect of spinach ethanol extract on osteoclast differentiation in RAW264.7 cells. Spinach was extracted with ethanol at a concentration ranging from 0 to 100% (0, 25, 50, 75, and 100% ethanol). Inhibitory effects of receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand (RANKL)-induced osteoclast differentiation were evaluated using tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) stain assay. The most effective ethanol concentration for osteoclast differentiation was 100%. Spinach extract (100% ethanol) suppressed RANKL-induced osteoclast differentiation and TRAP activity. Spinach extract (100% ethanol) also suppressed expression of osteoclast differentiation-related marker genes (NFATc1, c-FOS, cathepsin K, and TRAP) and down-regulated RANKL-induced NF- $\kappa$ B and ERK phosphorylation during osteoclast differentiation. Taken together, our results suggest that spinach extract is effective against reducing osteoclast differentiation through the NF- $\kappa$ B-mediated pathway.

**Key words:** spinach, osteoclast, tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP), RANKL, c-Fos

## 서 론

우리 몸을 지지하는 뼈는 골격 유지 기능과 칼슘, 인 등 다양한 무기질의 저장소 역할을 담당하는데, 단단한 표면적 이미지와는 달리 건강한 남녀의 경우 매년 전체 골량의 10%가 파괴되고 다시 만들어진다(1,2). 뼈는 재형성과정(bone remodeling)을 거쳐 건강한 뼈가 유지되고 각종 면역세포의 발달과 성숙에 중요한 골수 구조를 형성한다(3). 이 과정에서 뼈를 파괴하는 파골세포(osteoclast)와 뼈를 형성하는 조골세포(osteoblast)는 각각 조혈모세포 및 간엽줄기세포에서 발생하여 뼈 흡착 및 형성을 담당하므로 두 세포의 상호 밸런스는 건강한 골격계 형성에 필수적이다(4). 뼈 조직에서 유일하게 뼈의 파괴를 담당하는 파골세포는 단핵구/대식세포 계통의 세포이며, 파골세포의 분화는 골다공증과 같은 뼈 질환에 중요하게 작용한다(5). 여러 조직에 존재하는 대식 전구세포로부터 시험관 내에서 특정 cytokine인 receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand(RANKL, RANK ligand)와 macrophage colony stimulating factor(M-CSF) 등을 사용하여 분화시켜 파골세포의 생성이 가능하다(6,7). 파골세포는 특징적으로 tartrate-resistant acid phosphatase

(TRAP)와 풍부한 칼시토닌 수용체를 가지며 실제적으로 뼈를 흡수할 때는 산의 생성이 활발하고 actin ring을 형성하며 골기질을 흡수한다(8). RANKL은 주로 뼈 모세포에서 발현되며, 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D3(Vit D3), prostaglandin E2(PGE2), interleukin 1(IL-1), IL-6, TNF- $\alpha$  등에 의해 유도된다(9-12).

최근 관절질환 연구에 RANK와 RANKL이 파골세포 분화에 중요한 역할을 하는 것으로 알려졌고 RANKL signaling pathway가 빠르게 밝혀지고 있다(13). RANKL은 TNF family의 일원으로 다른 adapter molecule을 recruit 하여 파골세포 분화에서 NF- $\kappa$ B와 MAPKs(mitogen-activated kinase)가 활성화한다(14). RANK는 c-FOS의 induction을 통한 AP-1(activating protein-1)을 활성화하는데 NF- $\kappa$ B와 AP-1은 파골세포 분화의 결정적인 조절인자인 NFATc1(nuclear factor of activated T cell, cytoplasmic 1)의 초기발현을 조절한다(15,16). RANKL에 의해 활성화된 NF- $\kappa$ B는 이미 존재하고 있던 NFATc2와 함께 NFATc1 promoter에 결합하여 NFATc1의 초기발현을 주도하며, 이후 NFATc1은 다른 전사인자와 함께 cathepsin K, TRAP, OSCAR(osteoclast-associated receptor),  $\beta$ 3-integrin 등의 파골세포 특이적인 유전자의 발현을 조절한다(17-20).

시금치(spinach, *Spinacia oleracea* L.)는 페르시아가 원산인 명아주과의 일년생 작물로 우리나라에는 1500년대에 전래되어 연중 일반가정에서 상용하는 채소이다(21). 시금

Received 17 December 2014; Accepted 4 March 2015

Corresponding author: Jung-Hye Shin, Namhae Garlic Research Institute, Gyeongnam 668-812, Korea  
E-mail: whanbee@hanmail.net, Phone: +82-55-860-8947

치는 비타민 A의 전구체인 카로틴과 비타민 C 그리고 칼슘, 인, 철분 등의 무기질을 다량 함유하고 있으며, 클로로필을 많이 포함하는 녹색 엽채류로 식이섬유가 부드럽고 소화가 잘 되어 국민의 건강식품으로서 꾸준히 섭취되고 있다(22). 또한 생리학적으로 항산화, 항염증 등의 다양한 효과를 가지고 있다(23). 최근의 보고에 따르면 건강한 20대 남성을 대상으로 한 실험에서 급격한 운동 후 발생하는 산화적 스트레스 표지인자인 protein carbonyl(PC)과 uric acid의 발현이 시금치 섭취로 감소된다는 보고가 있었고, 또한 고지혈증을 유발시킨 실험동물에 시금치를 급여한 결과 고지방과 콜레스테롤에 의해 유발된 산화적 스트레스가 감소한다는 보고도 있었다(24,25).

시금치의 생리학적 효과에 대해서는 일정부분 연구가 이루어져 있지만 주로 부식으로 이용되어 왔기 때문에 다양한 분야에서의 연구는 부족한 실정이다. 시금치는 채소 중에서 비교적 칼슘의 함량이 높아 뼈 건강에 유용한 식품으로 인지되고 있는데 칼슘흡수를 방해하는 수산이 들어있어 섭취량의 5% 정도만이 체내로 흡수되어 이용률 저하가 우려되는 반면, 끓는 물에 데치는 작업을 통해 일정부분의 수산을 제거할 수 있기 때문에 조리된 시금치를 섭취할 경우 칼슘의 흡수를 우려할 정도는 아니라고 보고되어 있다(26). 또한 시금치에 많이 함유된 루테인을 포함하는 carotenoid 성분들은 강력한 항산화 효과를 통해 파골세포 분화를 억제한다는 연구 결과가 있었다(27,28). 시금치의 뼈 건강과 관련한 연구는 시금치 자체에 함유되어 있는 칼슘이나 철분과 같은 미네랄 성분과 더불어 다른 유효성분들도 영향을 미치므로 이와 관련한 기사를 밝히는 연구도 다양하게 추진되어야 한다. 본 연구에서는 이러한 연구의 일환으로 시금치 추출물이 파골세포의 분화 억제 효능을 가진다는 것을 몇 가지 실험 방법을 통해 검증하고, 이러한 연구 결과를 토대로 시금치가 뼈 건강에 미치는 영향을 확인하기 위한 기초자료를 얻고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 시료 및 추출물의 제조

시금치는 경남 남해군에서 노지 재배된 것을 취하여 흐르는 물로 세척한 후 자연 건조한 다음 뿌리부분을 제거하고 동결 건조하였다. 동결 건조된 시금치는 분쇄기(HMF-3450S, Hanil, Seoul, Korea)로 분쇄한 후 60 mesh 표준망체로 체질하여 추출물 제조용 시료로 사용하였다.

시금치 동결건조 분말에 물, 에탄올 및 이들을 비율별로 혼합(75:25, 50:50, 25:75)한 용매를 각각 20배(w/v)씩 첨가 후 상온에서 30분간 2회 진탕 추출하였다. 추출액을 여과지(Whatman No 2, Whatman International Ltd., Maidstone, UK)로 여과한 여액 각각을 회전식감압농축기(N-1110S-W, EYELA, Tokyo, Japan)로 농축하여 추출용매를 모두 제거하였다. 완전 건조된 추출물은 dimethylsulfoxide(DMSO, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)에 재용해시켜 -70°C에 보관하면서 실험에 사용하였다. 각 용매별 추출 수율은 추출 전 시금치 분말의 무게 대비 완전 건조된 추출물의 무게비로부터 산출하여 Table 1에 제시하였다.

**Table 1.** Extraction yield of *Spinacia oleracea* L. from different extraction solvent

Extraction solvent ratio (water : ethanol)	Yield (%)
100:0	12.42
75:25	25.34
50:50	27.83
25:75	28.29
0:100	31.98

oxide(DMSO, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)에 재용해시켜 -70°C에 보관하면서 실험에 사용하였다. 각 용매별 추출 수율은 추출 전 시금치 분말의 무게 대비 완전 건조된 추출물의 무게비로부터 산출하여 Table 1에 제시하였다.

### 세포 배양 및 세포독성 평가

실험에 사용된 마우스의 대식세포주인 RAW264.7 세포는 한국세포주은행(KCLB, Seoul, Korea)에서 분양받았으며, 세포 배양을 위해 10% fetal bovine serum(FBS)과 1% penicillin-streptomycin을 포함하는 Dulbecco's modified Eagle's media(DMEM; Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA)를 사용하여 CO<sub>2</sub> incubator(37°C, 5% CO<sub>2</sub>)에서 배양하였다. 시금치 추출물의 세포에 대한 독성 측정은 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) 환원방법을 이용하여 측정하였다. 세포를 96 well-plate에 well당 5×10<sup>4</sup>개가 되도록 분주하고 24시간 부착시킨 후, 완전 건조된 용매별 시금치 추출물을 dimethyl sulfoxide(DMSO; Sigma-Aldrich Co.)에 일정한 농도로 희석하여 0, 50, 100 µg/mL가 되도록 세포에 처리한 다음 30분 후 1 µg/mL lipopolysaccharide(LPS, Sigma-Aldrich Co.)를 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 이후 시료를 포함하는 배지를 제거한 후 serum-free 배지와 5 mg/mL MTT 용액을 첨가하여 37°C에서 2시간 더 배양하고 DMSO를 분주하여 sonication 하고 10분간 교반하여 용출시킨 뒤 570 nm에서 흡광도를 측정해 세포생존율을 구하였다. 세포생존율은 LPS 처리군에 대한 백분율로 나타내었다.

### 파골세포 분화유도

마우스 유래 대식세포주 RAW264.7(KCLB)을 파골전구 세포로 하여 10% FBS와 1% penicillin-streptomycin이 첨가된 DMEM(Gibco BRL)을 배양액으로 5% CO<sub>2</sub> incubator를 이용하여 37°C에서 계대 배양하면서 실험에 사용하였다. RAW264.7 세포를 culture용 well plate에 적정 수량을 분주한 후 4~6시간 배양하여 세포가 well에 부착되면 배지를 제거하고 10% FBS가 첨가된 α-MEM 배지에 분화인자인 RANKL 50 ng/mL와 남해 용매별 시금치 추출물을 0, 50, 100 µg/mL 농도가 되도록 혼합한 배양액을 분주하여 2일에 한 번씩 배지를 교환하면서 4일 또는 7일간 배양하였다.

### Reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR)

RANKL은 파골세포 분화단계의 주요 전사인자인 NFATc1의 분화를 유도하므로 시금치 100% 에탄올 추출물이 RANKL에 유도된 NFATc1과 c-FOS에 미치는 영향을 RT-PCR로 관찰하였다. 그리고 파골세포가 분화하여 기능할 때 발현되는 효소인 TRAP와 cathepsin K의 발현에 미치는 영향을 RT-PCR로 관찰하였다. 실험을 위해서 배양된 각각의 세포에서 ReliaPrep RNA Cell Miniprep System kit (Promega Corp., Madison, WI, USA)을 이용하여 total RNA를 분리하였다. 1-Thioglycerol을 포함하는 BL buffer를 plate에 첨가하여 회수한 cell lysate를 mini-column에 옮긴 뒤 14,000×g에서 30초간 원심 분리하여 column에 흡착시킨 다음 DNase와 MnCl<sub>2</sub> 혼합액을 column에 첨가하여 15분간 incubation 함으로써 DNA를 제거하였다. 이후 column wash solution과 RNA wash solution으로 column을 세척하고 최종적으로 nuclease free water를 첨가하여 원심 분리를 실시해 total RNA 샘플을 획득하였다. RNA의 정량을 위해서 QuantiFlour RNA system(Promega Corp.)을 이용하였고, 분리된 RNA로부터 1 µg을 취해 GoScript reverse transcription system을 이용하여 cDNA로 합성하였다. 합성된 cDNA는 Table 2에서 나타난 primer를 이용하여 PCR 하였다. 증폭된 cDNA는 1% agarose gel에서 분리하였고 gene stain detection solution을 이용하여 이미지 장비(E-Graph, ATTO, Tokyo, Japan)로 관찰하였다.

### Western blot 분석

RANKL에 의한 신호전달과정을 관찰하기 위해 RAW 264.7 세포를 6-well plate에 well당 5×10<sup>5</sup>개가 되도록 분주하고 10% FBS가 포함된 DMEM(Gibco BRL)을 배양액으로 6시간 배양한 다음, 10% FBS를 포함하는 α-MEM에 0, 50, 100 µg/mL 농도로 희석한 시금치 에탄올 추출물과 50 ng/mL의 RANKL을 24시간 처리하였다. 배양이 끝난 세포는 protease inhibitor와 phenylmethane-sulfonyl fluoride를 첨가한 radioimmunoprecipitation assay 완충액으로 용해하고 13,000 rpm, 4°C에서 20분간 원심 분리하여 얻은 상층액을 단백질 시료로 삼았다. Lysate 중의 단백

질은 BCA protein assay kit(Pierce, Rockford, IL, USA)을 이용하여 albumin 검량곡선에 대입하여 정량하였고 30 µg의 시료를 SDS-PAGE로 분리하여 PVDF막에 옮긴 후 특정 항체를 이용하여 반응시키고 이미지장비(Ez-Capture II, ATTO, Tokyo, Japan)를 통해 단백질 밴드를 관찰하였다.

### 통계처리

각각의 실험군은 3개 이상 수행하였고 결과 값은 SPSS 12.0 package(SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 프로그램을 사용하여 평균값과 표준편차를 계산하였다. 모든 실험은 3회 이상 반복하여 동일한 실험 결과를 얻은 경우 실험 결과로 사용하였다. 결과의 통계는 Student's t-test를 이용하여 분석하였고 P 값이 0.05 이하인 경우 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

## 결과 및 고찰

### 시금치 추출물의 세포독성 평가

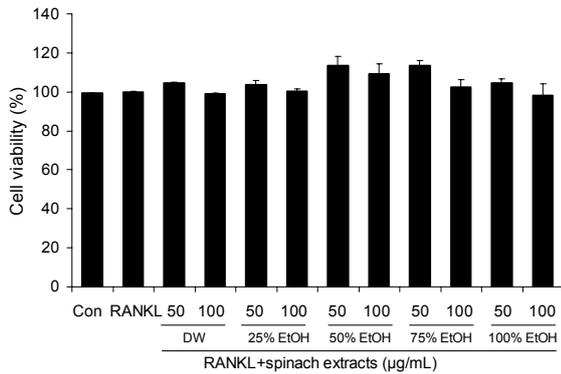
파골세포는 뼈 조직에서 유일하게 뼈의 파괴를 담당하는 단핵구 대식세포 계통의 세포로 RANKL과 같은 특정 cytokine에 의해 여러 조직에 존재하는 단핵구 대식 전구세포로부터 분화되어 생성이 가능하다(5). 본 실험에 앞서 시금치 추출물과 RANKL의 세포 내 처리가 세포 독성을 유발하는지 확인하기 위해 RAW264.7 세포에 50 ng/mL RANKL과 50 µg/mL 및 100 µg/mL의 시금치 추출물을 처리하여 7일간 배양한 후 MTT 방법으로 세포독성을 평가하였다. 실험 결과 시금치 물 추출물과 25~100% 에탄올 추출물을 처리한 세포 모두에서 세포 독성을 유발하지 않았다(Fig. 1).

### 파골세포 분화에 미치는 시금치 추출물의 영향

시금치 추출물이 파골세포 분화에 미치는 영향을 평가하기 위해서 TRAP 염색을 실시하였다. TRAP 염색을 하게 되면 RANKL 처리를 하지 않은 대조군은 RAW264.7 세포가 구 모양을 유지한 채 증식하며, TRAP 염색에서도 음성 반응을 보여 연한 갈색이나 황토색을 띤다. 이에 반해 RANKL을 처리한 세포에서는 진한 암갈색 내지 적갈색으로 염색된 TRAP(+) 다핵세포가 관찰된다(29).

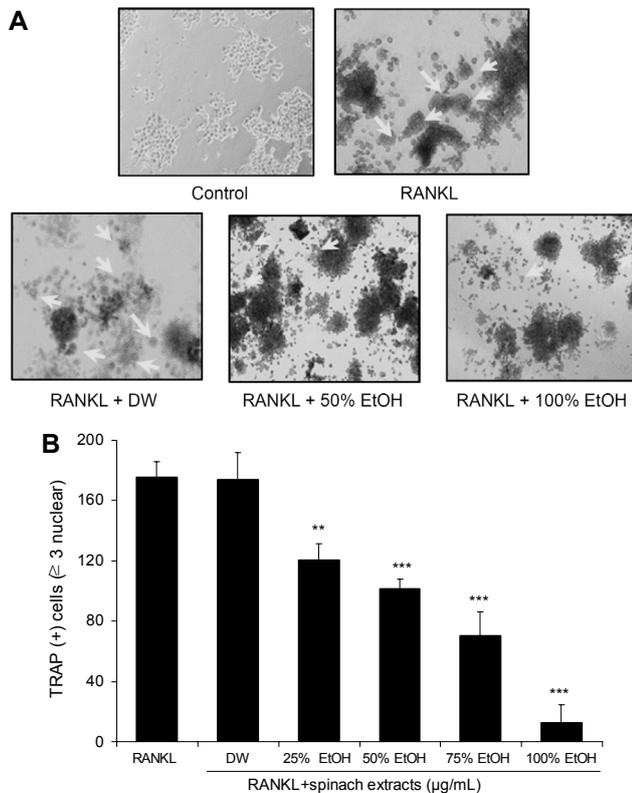
**Table 2.** The primer information of gene related to osteoclasts differentiation

Primer	Primer sequence
c-FOS sense	5'-CTG GTG CAG CCC ACT CTG GTC-3'
c-FOS antisense	5'-CTT TCA GCA GAT TGG CAA TCT C-3'
NFATc1 sense	5'-CAA CGC CCT GAC CAC CGA TAG-3'
NFATc1 antisense	5'-GGC TGC CTT CCG TCT CAT AGT-3'
TRAP sense	5'-ACT TCC CCA GCC CTT ACT AC-3'
TRAP antisense	5'-TCA GCA CAT AGC CCA CAC CG-3'
Cathepsin K sense	5'-CTG AAG ATG CTT TCC CAT ATG TGG G-3'
Cathepsin K antisense	5'-GCA GGC GTT GTT CTT ATT CCG AGC-3'
HPRT sense	5'-GTA ATG ATC AGT CAA CGG GGA C-3'
HPRT antisense	5'-CCA GCA AGC TTG CAA CCT TAA CCA-3'



**Fig. 1.** The effect of spinach extracts on cell viability of RAW 264.7 cells treated with RANKL (7 days). Each bar represents the mean±SD of three repeated experiments.

RANKL과 함께 시금치 추출물들을 처리한 후 2일에 한번씩 배지를 교환하며 7일째에 이미지 데이터를 얻어 파골세포의 분화를 확인하였다(Fig. 2A). Positive control로 사용된 RANKL 처리 세포군에서는 3개 이상의 핵을 가지는 TRAP(+) 다핵세포로 분화가 유도되었고, RANKL과 시금치 에탄올 추출물을 처리한 세포군에서는 추출용매의 에탄올 비율이 증가할수록 파골세포로의 분화가 억제되었다.



**Fig. 2.** Inhibition of RANKL-induced osteoclastogenesis by spinach extract. (A) The effect of 100 µg/mL spinach extracts on TRAP staining of RAW264.7 cells treated with RANKL (7 days). (B) Each bar represents the mean±SD of three repeated experiments. \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  compared to the RANKL treatment.

25%, 50% 및 75% 에탄올 추출물처리군에서 TRAP(+) 다핵세포 숫자는 각각 RANKL 단독 처리군 대비 31%, 42% 및 60%로 유의성 있게 억제되었으며, 100% 에탄올 추출물에서 대조군에 비해 파골세포 분화가 90% 이상 억제되었다. 반면 시금치 물 추출물은 RANKL 처리군과 유사한 수준의 파골세포 생성을 보여 분화 억제를 나타내지 않았다(Fig. 2B). 이러한 결과를 통해 시금치 에탄올 추출물이 파골세포의 분화를 억제하는 역할을 수행함을 확인하였으며, 100% 에탄올 추출물이 가장 높은 파골세포의 분화 저해 효과가 있는 것을 확인하였다.

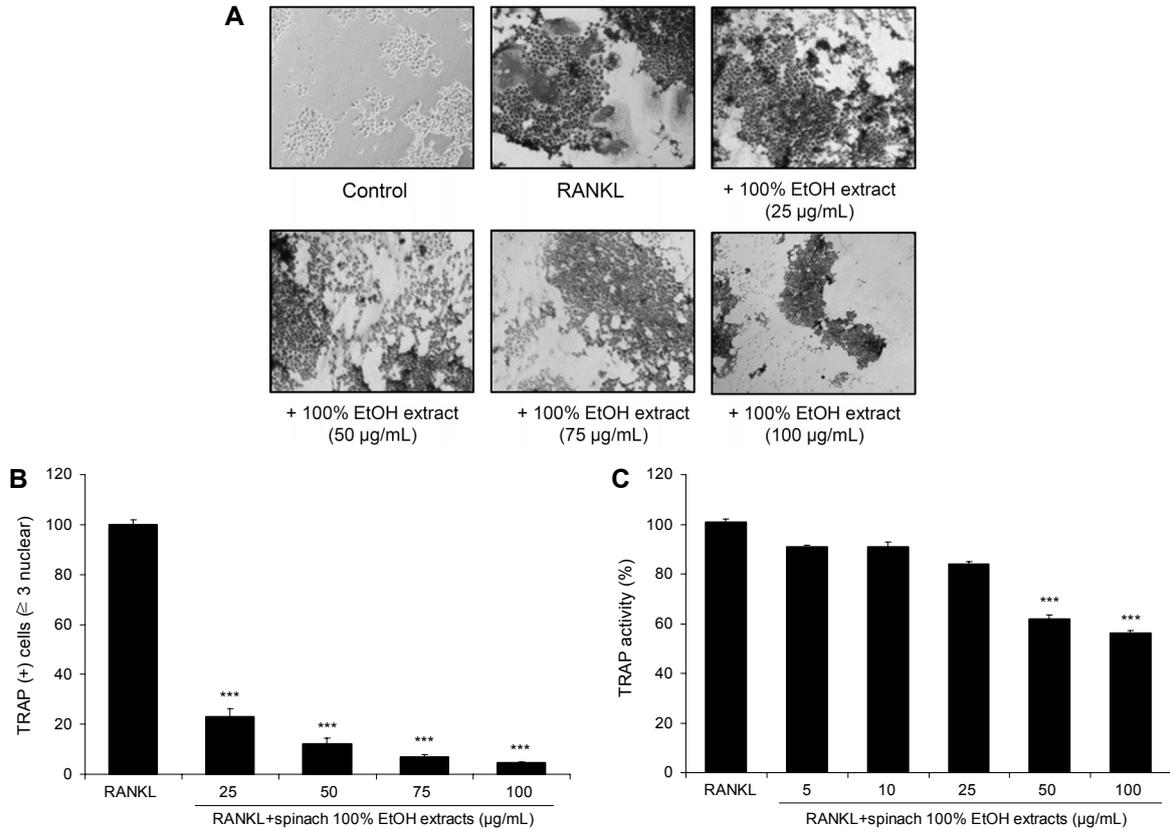
**시금치 에탄올 추출물의 파골세포 분화 저해 활성 검증**

100% 에탄올 추출물이 파골세포 분화 저해 활성이 있음을 확인하였기에 이후 실험은 시금치 100% 에탄올 추출물을 농도별로 처리하여 TRAP(+) 다핵세포 형성 및 효소 활성을 측정하였다. RANKL과 함께 시금치 100% 에탄올 추출물을 25, 50, 75 그리고 100 µg/mL로 각각 처리하여 7일간 배양한 결과는 Fig. 3A와 같다. 무처리 세포군에 비해 RANKL 처리군에서는 파골세포 분화지표인 TRAP(+) 반응의 파골세포들이 짙은 색으로 염색되었다. 광학 현미경을 통해 융합되어 다핵을 지닌 파골세포의 형성을 확인한 결과 25~100 µg/mL 농도의 시금치 100% 에탄올 추출물 처리 시 분화를 억제하여 TRAP(+) 반응 특유의 짙은 색을 띠는 세포의 수가 현저히 감소되었다. 또한 TRAP(+) 다핵세포 수를 계수한 결과 RANKL 처리에 의한 TRAP(+) 다핵세포 숫자 대비 25~100 µg/mL의 농도별 시금치 100% 에탄올 추출물은 파골세포 형성을 80% 이상 유의하게 감소시켰다(Fig. 3B).

파골세포는 특징적으로 주석산에 내성을 가진 TRAP 효소와 풍부한 칼시토닌 수용체를 가지며 뼈의 흡수작용에 관여할 때는 산의 생성이 활발하게 일어나 뼈에 흡착하여 골기질을 흡수하며, 이러한 TRAP 효소는 파골세포의 세포 화학적 표지효소(marker enzyme)로 파골세포가 골 흡수작용을 할 때 분비가 증가한다고 알려져 있다(8). 이를 이용하여 파골분화 정도를 측정된 결과 5, 10, 25 µg/mL 농도의 시금치 100% 에탄올 추출물 처리 시에는 효소 활성의 저해가 나타나지 않은 반면, 50과 100 µg/mL 농도에서는 각각 38%와 44%의 유의한 TRAP 효소 억제 활성을 나타내었다(Fig. 3C). 이러한 실험 결과를 통해 시금치 에탄올 추출물이 농도 의존적으로 TRAP(+) 다핵세포의 수뿐만 아니라 TRAP 효소 활성을 감소시켜 파골세포의 분화를 저해함을 검증하였다.

**시금치 에탄올 추출물의 파골세포 분화 억제 기작**

RANKL은 RANK와의 결합을 통해 파골세포의 분화에 필수적인 유전자 발현을 유도한다(18). 파골세포의 운명에 주요인자로 알려진 NFATc1, c-Fos 그리고 cathepsin K의 발현을 확인하기 위해 RT-PCR을 수행하였고, 각각의 발현



**Fig. 3.** Spinach extract inhibited RANKL-induced osteoclast differentiation of RAW264.7 cells. (A) TRAP staining of RANKL with spinach 100% EtOH extract treated cells. (B) Inhibition of RANKL-induced TRAP positive cells by spinach 100% EtOH extract. (C) Inhibition of RANKL-induced TRAP activity by spinach 100% EtOH extract. Each bar represents the mean±SD of three repeated experiments. \*\*\**P*<0.001 compared to the RANKL treatment.

량을 정량하기 위하여 housekeeping gene으로 hypoxanthine phosphoribosyltransferase(HPRT)의 발현을 확인하였다. HPRT gene은 다른 여타 housekeeping gene에 비해 경제적이고 정확하다고 알려져 있다(30).

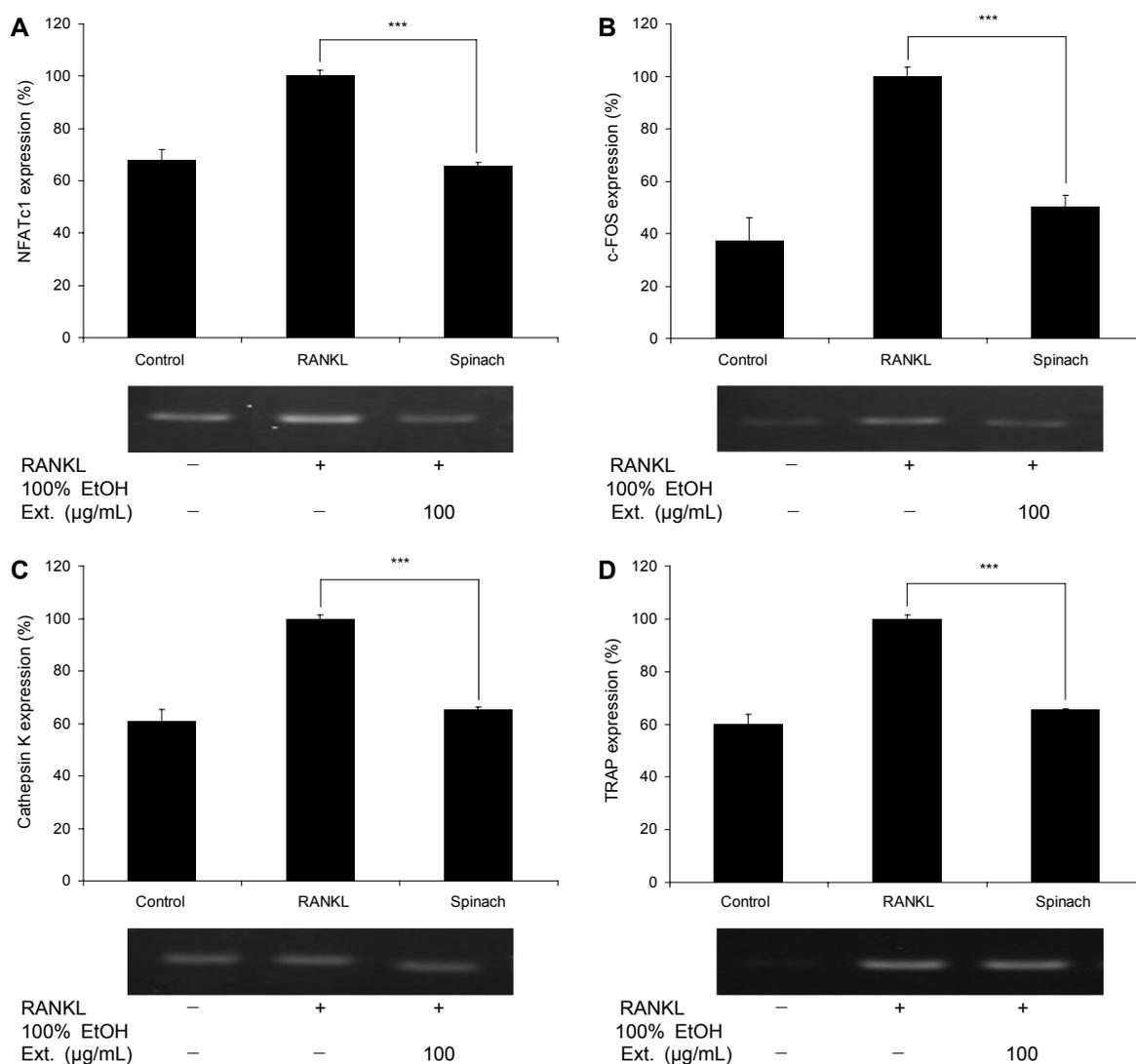
RAW264.7 세포에 RANKL을 처리했을 때 c-Fos, NFATc1, TRAP mRNA 발현이 증가되었지만 시금치 100% 에탄올 추출물을 처리한 세포군에서는 RANKL에 의해 증가된 NFATc1과 c-FOS 유전자 발현의 증가가 감소되었다 (Fig. 4). 또한 시금치 100% 에탄올 추출물은 RANKL에 의해 발현이 증가된 cathepsin K와 TRAP 유전자의 발현도 유의적으로 감소시켰다.

RANKL은 파골세포 분화단계의 전사인자인 NFATc1의 발현을 유도한다(18). 이 NFATc1은 다른 파골세포 분화에 중요한 단백질의 발현을 조절하는데 이때 MAPK 중 ERK의 활성이 파골세포 분화에 기여한다고 보고된 바 있고, 더욱이 ERK는 분화뿐만 아니라 파골세포의 생존에도 관여함이 알려져 있다(31-33). RANKL에 의해 유도되는 NFATc1과 c-FOS 단백질의 유도형 및 c-FOS의 활성형에 대한 시금치 100% 에탄올 추출물의 영향을 western blot법으로 확인하였다. 그 결과 유전자 수준에서의 분석 결과와 일치하는 경향으로 RANKL을 처리하지 않은 무처리 대조군에서도 en-

dogenous한 NFATc1 단백질의 발현이 확인되었다. 더욱이 RANKL 처리에 의해 NFATc1의 양이 일부 증가되는 양상을 나타내었으나 100 µg/mL 농도의 시금치 100% 에탄올 추출물에 의해 NFATc1의 발현 감소가 유도되었다(Fig. 5A). 또 다른 분화에 중요한 전사인자인 c-FOS의 발현 역시 RANKL에 의해 현저하게 증가하였고, 시금치 100% 에탄올 추출물은 RANKL에 의한 c-FOS의 발현 증가를 무처리 대조군의 c-FOS 유도형과 활성형 수준으로 현저하게 감소시켰다(Fig. 5B, D). 분화 신호를 전달하는 시그널 단백질 중 하나인 ERK의 불활성형에 대해서는 영향을 미치지 않았으나 활성형의 발현은 감소시키는 것을 확인하였다 (Fig. 5C, D). 시금치 100% 에탄올 추출물은 ERK의 발현에 대한 저해 효과가 낮은 수준이었으나, 파골세포 분화에 필수적인 전사인자 c-FOS의 유도형과 활성형의 발현을 저해함으로써 파골세포 분화의 신호전달과정을 억제하는 것으로 추정된다.

### 요 약

파골세포의 분화에 대한 시금치 추출물의 영향을 확인하고자 RANKL을 처리한 RAW264.7 세포에서 세포독성, TRAP



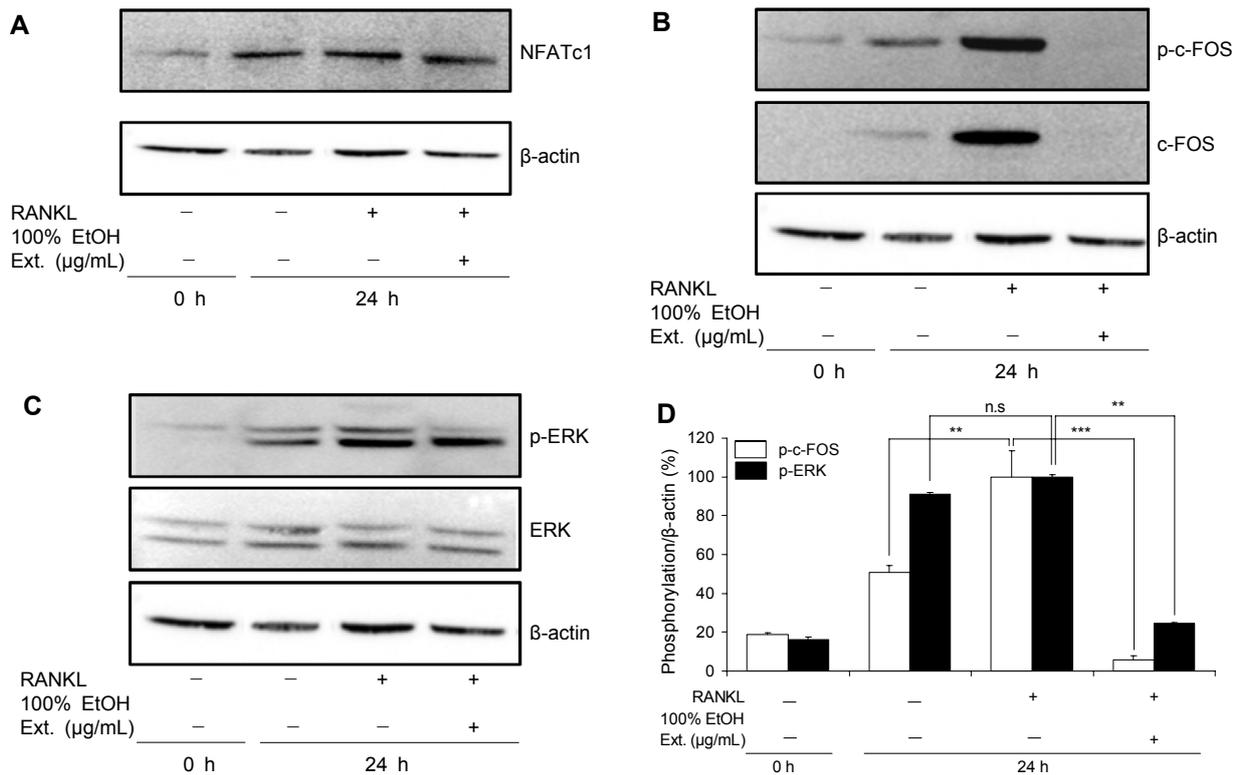
**Fig. 4.** Spinach extract down-regulated the expression of osteoclast-specific genes. RT-PCR analysis to measure the gene expression of NFATc1 (A), c-FOS (B), cathepsin K (C), and TRAP (D). Each bar represents the mean±SD of three repeated experiments. \*\*\* $P < 0.001$  compared to the RANKL treatment.

(+) 다핵세포의 형성, 파골세포 분화 관련 유전자의 발현, 그리고 단백질 발현을 확인하였다. 물과 25, 50, 75 및 100% 에탄올 시금치 추출물의 세포독성을 측정한 결과 모든 추출물들이 100 µg/mL 이하의 농도에서 RAW264.7 세포에 독성을 유발하지 않았다. TRAP 염색을 통해 TRAP(+) 다핵세포의 수와 효소 활성을 측정한 결과 물 추출물을 제외한 모든 추출물이 대조군에 비해 분화 억제 및 효소 활성 저해 효과가 있었다. 특히 100 µg/mL 농도의 100% 에탄올 추출물은 RANKL만 처리한 대조군과 비교해 80%의 유의한 TRAP(+) 다핵세포 숫자 감소와 44%의 TRAP 효소 활성 저해율을 보였다. 시금치 에탄올 추출물은 RANKL에 의한 파골세포 분화의 지표가 되는 관련유전자인 NFAT, c-FOS, cathepsin K 및 TRAP의 발현을 억제하였다. 또한 단백질 수준에서 시금치 에탄올 추출물은 RANKL에 의해 증가된 NFATc1의 발현을 현저히 감소시키는 것으로 확인되었고,

또한 c-FOS의 활성화 형태인 인산화된 c-FOS의 발현뿐만 아니라 인산화되지 않은 비활성의 c-FOS 발현도 감소시켰다. 반면 파골세포의 분화에 직간접적인 영향을 미친다고 알려진 MAPK 중 ERK의 활성화에는 거의 영향을 미치지 않는 것으로 보아 시금치 에탄올 추출물은 c-FOS의 활성화, 비활성형 전체를 감소시킴으로 파골세포 분화를 감소시키는 것으로 확인되었다.

## REFERENCES

1. Titorencu I, Pruna V, Jinga VV, Simionescu M. 2014. Osteoblast ontogeny and implications for bone pathology: an overview. *Cell Tissue Res* 355: 23-33.
2. Rodan GA, Martin TJ. 2000. Therapeutic approaches to bone diseases. *Science* 289: 1508-1514.
3. Walsh MC, Kim N, Kadono Y, Rho J, Lee SY, Lorenzo J, Choi Y. 2006. Osteoimmunology: interplay between the



**Fig. 5.** Spinach extract down-regulated the phosphorylation of c-FOS and ERK. (A) Inhibition of RANKL-induced NFATc1 expression by spinach 100% EtOH extract. The effect of spinach 100% EtOH extract on RANKL-induced c-FOS (B) and ERK (C) activation. (D) Each bar represents the mean±SD of three repeated experiments. \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  compared to the RANKL treatment. n.s: not significant.

immune system and bone metabolism. *Annu Rev Immunol* 24: 33-63.

- Wang C, Wang X, Xu XL, Yuan XL, Gou WL, Wang AY, Guo QY, Peng J, Lu SB. 2014. Bone microstructure and regional distribution of osteoblast and osteoclast activity in the osteonecrotic femoral head. *PLoS ONE* 9: e96361.
- Beederman M, Farina EM, Reid RR. 2014. Molecular basis of cranial suture biology and disease: Osteoblastic and osteoclastic perspectives. *Genes Dis* 1: 120-125.
- Tsubaki M, Komai M, Itoh T, Imano M, Sakamoto K, Shimaoka H, Takeda T, Ogawa N, Mashimo K, Fujiwara D, Mukai J, Sakaguchi K, Satou T, Nishida S. 2014. Nitrogen-containing bisphosphonates inhibit RANKL- and M-CSF-induced osteoclast formation through the inhibition of ERK1/2 and Akt activation. *J Biomed Sci* 21: 10.
- Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliott R, Colombero A, Elliott G, Scully S, Hsu H, Sullivan J, Hawkins N, Davy E, Capparelli C, Eli A, Qian YX, Kaufman S, Sarosi I, Shalhoub V, Senaldi G, Guo J, Delaney J, Boyle WJ. 1998. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 93: 165-176.
- Soysa NS, Alles N, Shimokawa H, Jimi E, Aoki K, Ohya K. 2009. Inhibition of the classical NF- $\kappa$ B pathway prevents osteoclast bone-resorbing activity. *J Bone Miner Metab* 27: 131-139.
- Takeda S, Yoshizawa T, Nagai Y, Yamato H, Fukumoto S, Sekine K, Kato S, Matsumoto T, Fujita T. 1999. Stimulation of osteoclast formation by 1,25-dihydroxyvitamin D requires its binding to vitamin D receptor (VDR) in osteoblastic

cells: studies using VDR knockout mice. *Endocrinology* 140: 1005-1008.

- Miyaura C, Inada M, Matsumoto C, Ohshiba T, Uozumi N, Shimizu T, Ito A. 2003. An essential role of cytosolic phospholipase A2 $\alpha$  in prostaglandin E2-mediated bone resorption associated with inflammation. *J Exp Med* 197: 1303-1310.
- Wei S, Kitaura H, Zhou P, Ross FP, Teitelbaum SL. 2005. IL-1 mediates TNF-induced osteoclastogenesis. *J Clin Invest* 115: 282-290.
- Feng X, McDonald JM. 2011. Disorders of bone remodeling. *Annu Rev Pathol* 6: 121-145.
- Kim HJ, Yoon HJ, Kim SY, Yoon YR. 2014. A medium-chain fatty acid, capric acid, inhibits RANKL-induced osteoclast differentiation via the suppression of NF- $\kappa$ B signaling and blocks cytoskeletal organization and survival in mature osteoclasts. *Mol Cells* 37: 598-604.
- Li DZ, Zhang QX, Dong XX, Li HD, Ma X. 2014. Treatment with hydrogen molecules prevents RANKL-induced osteoclast differentiation associated with inhibition of ROS formation and inactivation of MAPK, AKT and NF- $\kappa$ B pathways in murine RAW264.7 cells. *J Bone Miner Metab* 32: 494-504.
- Wagner EF, Eferl R. 2005. Fos/AP-1 proteins in bone and the immune system. *Immunol Rev* 208: 126-140.
- Teitelbaum SL, Ross FP. 2003. Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nat Rev Genet* 4: 638-649.
- Kim JH, Kim N. 2014. Regulation of NFATc1 in osteoclast differentiation. *J Bone Metab* 21: 233-241.
- Kavitha CV, Deep G, Gangar SC, Jain AK, Agarwal C, Agarwal R. 2014. Silibinin inhibits prostate cancer cells- and

- RANKL-induced osteoclastogenesis by targeting NFATc1, NF- $\kappa$ B, and AP-1 activation in RAW264.7 cells. *Mol Carcinog* 53: 169-180.
19. Battaglini R, Kim D, Fu J, Vaage B, Fu XY, Stashenko P. 2002. *c-myc* is required for osteoclast differentiation. *J Bone Miner Res* 17: 763-773.
  20. Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL, Dougall WC, Tometsko ME, Roux ER, Teepe MC, DuBose RF, Cosman D, Galibert L. 1997. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature* 390: 175-179.
  21. Lee MH, Han JS, Kozukue N, Minamide T. 2005. Physicochemical characteristics of commercial spinach produced in autumn. *J East Asian Soc Dietary Life* 15: 306-314.
  22. Kim NY, Yoon SK, Jang MS. 1993. Effect of blanching on the chemical properties of different kind of spinach. *Korean J Soc Food Sci* 9: 204-209.
  23. Lomnitski L, Bergman M, Nyska A, Ben-Shaul V, Grossman S. 2003. Composition, efficacy, and safety of spinach extracts. *Nutr Cancer* 46: 222-231.
  24. Bohlooli S, Barmaki S, Khoshkharesh F, Nakhostin-Roohi B. 2014. The effect of spinach supplementation on exercise-induced oxidative stress. *J Sports Med Phys Fitness* [Epub ahead of print].
  25. Ko SH, Park JH, Kim SY, Lee SW, Chun SS, Park E. 2014. Antioxidant effects of spinach (*Spinacia oleracea* L.) supplementation in hyperlipidemic rats. *Prev Nutr Food Sci* 19: 19-26.
  26. Seo JH, Kang HW, Han JS. 2012. Quality characteristics of *Jajang* noodles with added spinach. *J East Asian Soc Dietary Life* 22: 278-289.
  27. Moon HJ, Ko WK, Han SW, Kim DS, Hwang YS, Park HK, Kwon IK. 2012. Antioxidants, like coenzyme Q10, selenite, and curcumin, inhibited osteoclast differentiation by suppressing reactive oxygen species generation. *Biochem Biophys Res Commun* 418: 247-253.
  28. Lee JH, Kim HN, Yang D, Jung K, Kim HM, Kim HH, Ha H, Lee ZH. 2009. Trolox prevents osteoclastogenesis by suppressing RANKL expression and signaling. *J Biol Chem* 284: 13725-13734.
  29. Sriarj W, Aoki K, Ohya K, Takahashi M, Takagi Y, Shimokawa H. 2015. TGF- $\beta$  in dentin matrix extract induces osteoclastogenesis in vitro. *Odontology* 103: 9-18.
  30. de Kok JB, Roelofs RW, Giesendorf BA, Pennings JL, Waas ET, Feuth T, Swinkels DW, Span PN. 2005. Normalization of gene expression measurements in tumor tissues: comparison of 13 endogenous control genes. *Lab Invest* 85: 154-159.
  31. Liu YQ, Zhan LB, Liu T, Cheng MC, Liu XY, Xiao HB. 2014. Inhibitory effect of *Ecliptae herba* extract and its component wedelolactone on pre-osteoclastic proliferation and differentiation. *J Ethnopharmacol* 157: 206-211.
  32. Lee SE, Woo KM, Kim SY, Kim HM, Kwack K, Lee ZH, Kim HH. 2002. The phosphatidylinositol 3-kinase, p38, and extracellular signal-regulated kinase pathways are involved in osteoclast differentiation. *Bone* 30: 71-77.
  33. Chung YH, Choi B, Song DH, Song Y, Kang SW, Yoon SY, Kim SW, Lee HK, Chang EJ. 2014. Interleukin-1 $\beta$  promotes the LC3-mediated secretory function of osteoclast precursors by stimulating the Ca<sup>2+</sup>-dependent activation of ERK. *Int J Biochem Cell Biol* 54: 198-207.