대한한방내과학회지 제38권 6호(2017년 12월)
J. Int. Korean Med. 2017;38(6):1035-1048
http://dx.doi.org/10.22246/jikm.2017.38.6.1035

치자 추출물이 RANKL 유도 파골세포 형성 및 골 흡수에 미치는 영향

최유경[1], 황귀서[2]
[1]가천대학교 한의과대학 내과학교실, [2]가천대학교 한의과대학 예방의학교실

Effects of Gardeniae Jasminoides on RANKL-induced Osteoclastogenesis and Bone Resorption

You-kyung Choi[1], Gwi-seo Hwang[2]
[1]Dept. of Korean Internal Medicine, Gachon University College of Korean Medicine
[2]Dept. of Preventive Medicine, Gachon University College of Korean Medicine

ABSTRACT

Objectives: This study was performed to investigate the effects of Gardenia jasminoides extract (GJ) on osteoclast differentiation and bone resorption in vitro.

Methods: To investigate the effect of GJ on osteoclast differentiation, the mouse leukemic myeloid cell line RAW 264.7 was stimulated by RANKL (receptor activator of nuclear factor kB ligand). Osteoclast differentiation was measured by counting TRAP (+) MNC in the presence of RANKL. To elucidate the mechanism of the inhibitory effect of GJ on osteoclast differentiation, gene expression of TRAP, Cathepsin K, MMP-9, NFATc1, c-Fos, MITF, DC-STAMP, CTR, OC-STAMP and Atp6v0d2 was measured using reverse transcription-PCR (RT-PCR). Bone resorption was measured using the bone pit formation assay.

Results: GJ decreased the number of TRAP (+) MNCs in the presence of RANKL. GJ inhibited the expression of cathepsin K, MMP-9, TRAP, MITF, NFATc1, c-Fos, iNON, OC-STAMP, Atp6v0d2, and DC-STAMP in the osteoclast, and inhibited bone pit formation in vitro.

Conclusions: The results suggest that GJ has inhibitory effects on bone resorption resulting from inhibition of osteoclast differentiation and gene expression.

Key words: Gardenia jasminodes, osteoclast differentiation, RANKL, NFATc1, bone resorption

Ⅰ. 서 론

인체에서 뼈가 약해지는 것은 노화에 수반되어 나타나는 현상으로 인간 수명이 길어짐에 따라 유병률도 증가하고 있다. 골절은 노인성 사망의 주요한 원인으로 알려져 있는데 뼈가 약해진 골다공증 환자에서 많이 발생한다. 뼈의 대사과정에는 골조직에서 칼슘을 녹여내는 기능이 있는 파골세포와 칼슘을 이용하여 골을 형성하는 기능을 가진 조골세포의 작용이 균형을 이루고 있다. 건강한 사람의 뼈에서는 두 세포가 균형적으로 작용하여 골 조직이 일정하게 유지되도록 작동하고 있다[1].

골다공증은 조골세포 기능이 약물들에 의해 저해되어 뼈의 생성이 억제되거나, 호르몬 분비의 변

· 투고일: 2017.12.06, 심사일: 2018.01.10, 게재확정일: 2018.01.11
· 교신저자: 황귀서 경기도 성남시 수정구 성남대로 1342
가천대학교 한의과대학
TEL: 031-750-5421
E-mail: seoul@gachon.ac.kr

화로 파골세포 기능이 증가하여 골 손실이 증가할 때 나타난다[2]. 따라서, 골다공증을 억제하여 뼈를 튼튼히 하기 위해서는 파골전구세포들이 파골세포로 분화하는 과정을 차단하거나 파골세포 작용을 억제하는 방법을 우선적으로 고려할 수 있으며, 조골세포 기능 활성화를 통한 골형성을 촉진하는 것도 유익한 방법이다.

파골세포는 파골세포전구세포의 표면에 존재하는 receptor activator of nuclear factor kB(RANK)에 조골세포에서 분비하는 receptor activator of nuclear factor kB ligand(RANKL)이 결합하여 분화된다. 이 과정에 면역관련 인자인 macrophage colony-stimulating factor(M-CSF) 등이 작용한다[3]. 파골세포로의 분화는 RANKL로 활성화된 수용체로부터 NF-kB 신호전달과정에 신호를 전달하여 시작되는데, 이러한 과정에 extracellular signal-regulated kinase(ERK), c-Jun N-terminal kinase(JNK)와 p38와 같은 mitogen-activated protein kinases(MAPKs)이 활성을 나타내면서 분화한다[4]. 이와 함께 nuclear factor of activated T cell cytoplasmic 1(NFATc1)이 활성화되어, 파골세포가 골흡수에 직접적으로 작용하는데 필요한 단백질인 tartarate-resistant acid phosphatase(TRAP), cathepsin K, matrix metalloproteinases-9(MMP-9) 등의 생합성을 촉진하게 된다[5].

치자는 치자나무(Gardenia jasminoides) 및 동속식물의 열매로서 凉血解毒, 淸熱利濕, 瀉火除煩의 효능이 있어서 한의학적으로 열병이나 불면, 황달, 소갈이나 결막염, 출혈이 수반된 다양한 증상을 완화하는데 사용되었다[6]. 또한, 음식의 색깔을 좋게 하여 식욕을 촉진하기 위한 식품 원료로 사용되고 있다.

주성분으로는 flavonoid 성분인 gardenin을 비롯하여 genipin, pectin, tannin, crocin, nonacosane, b-sitosterol 등이 보고되었고[7], 배당체로 gardenoside, geniposide, genipin-1-b-d-gentiobioside와 choline, ursolic acid 등이 보고되었다[8].

최근 연구보고에 의하면, 치자는 항염증작용[9]과 간보호작용[10], 멜라닌생성 억제작용[11], 혈전생성 억제작용[12], 위염 및 위궤양 억제 작용[13], 항당뇨작용[14], 기억력증진 작용[15] 등이 보고되었다. 특히, 치자 추출물이 NF-kB 를 억제하여 MMP-9의 작용을 억제한다는 보고가 있었다[16]. 이에 저자들은 치자 추출물이 파골세포 분화 또는 기능을 억제할 가능성이 있을 것으로 추정하였다. 따라서, 본 저자들은 뼈를 강화하여 노년기의 활력을 증진시키기 위하여 파골세포 기능을 억제하여 골을 강화시키는 한약재를 찾는 연구 목적으로 치자가 파골세포 형성 및 골 흡수에 미치는 영향을 평가하고자 하였다. 이를 위하여 RANKL로 자극한 RAW264.7 cell에서 TRAP(+) 형성능을 측정하였으며, 관련 유전자인 cathepsin K, TRAP, MMP-9, NFATc1, Dendritic Cell-Specific Transmembrane Protein(DC-STAMP), osteoclast stimulatory transmembrane protein (OC-STAMP), calcitonin receptor(CTR) 등의 유전자 발현을 측정하였으며, 인공 골조직에 파골세포를 첨가하여 나타나는 골 흡수에 미치는 영향을 측정하였다.

Ⅱ. 방 법

1. 재 료

1) 한약재 추출 및 검액 제조

나눔제약(한국)에서 구입하여 정선한 치자(Gardenia jasminodes)를 분말화하여 플라스크에 넣고, 약 30배의 증류수를 가하고 6시간 이상 가열하면서 환류 추출하였다. 여과지를 이용하여 여과한 다음, 여액을 evaporator(EYELA, Japan)를 이용하여 감압 농축한 다음 농축액을 동결 건조하여 실험에 사용할 때까지 냉동보관 하였다. 실험 시에는 치자 추출물(이하 GJ라 함)을 배지에 녹인 후, pore size 0.45 μm의 여과지로 여과하여 사용하였다.

2) 세 포

파골세포 전구세포로 한국세포주은행에서 구입한 mouse myeloid 세포주인 RAW264.7 cell을 사용

하였다. 파골세포로 분화는 receptor activator of nuclear factor kB ligand(RANKL)를 처리하여 유도하였다.

2. 방 법

1) RAW264.7 Cell 배양

DMEM(Dulbecco's modified eagle medium)/10% FBS(Fetal bovine serum)/PC-SM 배지에 RAW 264.7 cell을 96 well plate에 5×10^3 cells/well가 되도록 맞춘 후, CO_2 세포배양기에서 배양하였다. 24시간 동안 배양기에서 배양한 후 배양액을 제거하고, 다시 50 ng/mlRANKL, 10% FBS, 1 ng/ml TGFβ가 첨가된 α-MEM 배지로 교환하여 세포를 배양하였다. 배양액에는 약물처리를 위해 다양한 농도별로 GJ가 함유되도록 하였다. 동일한 배지인 α-MEM 용액으로 이틀 간격으로 교환해 주면서 총 6일간 배양하였다.

2) 약물처리

실험군은 RANKL이 함유되지 않은 배양군(Normal), RANKL이 함유된 배양군(Control), RANKL과 75 μg/ml의 GJ 추출물이 함유된 배양군(GJ 75), RANKL과 150 μg/ml의 GJ 추출물이 함유된 배양군(GJ 150), RANKL과 300 μg/ml의 GJ 추출물이 함유된 배양군(GJ 300)으로 나누어 실험하였다.

3) 파골세포 생성 측정

파골세포 분화는 RAW264.7 cell에 RANKL을 처리하여 유도시켰으며, 분화한 파골세포에서 발현되는 분화 marker로 tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP)를 염색하고 발색되는 TRAP-positive 세포(TRAP(+) MNC)를 확인하여 평가하였다. 분화시킨 세포는 PBS(Phosphate buffered saline)로 2번 세척하였으며, 이후 10분 동안 3.7% formaldehyde-citrate-acetone 용액으로 고정시키고 다시 증류수로 2번 세척하였다. 2% TRAP fast garnet GBC base 용액과 $NaNO_3$ 용액을 각각 동일한 양을 넣어 만든 혼합용액을 고정시킨 세포에 처리하였다. 다시 고정된 세포에 5% naphtha AS-BI phosphoric acid, 2% 주석산, 4% 초산이 포함된 용액을 처리하고 30분 동안 상온에 방치하였다. 파골세포 생성을 관찰하기 위하여 광학현미경을 이용하여 계수하였으며, 3개 이상의 핵이 염색된 다핵세포(TRAP(+) MNCs)를 파골세포로 판정하는 생성지표로 하였다.

4) 파골세포 유전자 발현 측정

(1) Total RNA 분리

RNA 분리는 실험군 별로 배양세포의 배지를 완전히 제거한 plate를 4 ℃ PBS로 3번 세척한 세포를 시용하였다. 각 plate에서 세포를 떼어내어 모은 다음, 750×g에서 10분간 원심 분리하여 침전된 세포를 냉각된 PBS로 2번 더 세척하였다. 상층액을 버리고 침전된 세포에 lysis buffer를 가하고 흔들어 용해시킨 다음, 12,000×g에서 10분간 다시 원심 분리하고 상층액을 얻었다. 얻어진 용액을 1 M sucrose가 함유되도록 제조한 tris buffer 윗부분에 조심스럽게 loading한 다음, 36,000 rpm으로 160분 동안 원심분리기로 분리하였다. 침전물을 SDS buffer에 녹인 후, 37 ℃ 배양기에 30분 간 incubation 하였다. 여기에 Sod. Acetate buffer를 가하고 phenol/$CsKl_3$ 용액을 사용하여 추출하였다. NaCl 농도가 최종적으로 0.2 M이 되도록 만든 다음, EtOH를 가한 후 -20 ℃ 냉장고에 12시간 방치하여 얻은 침전물을 75% EtOH로 2번 세척하고 건조시켰다. 유전자 발현에 필요한 RNA양을 각 실험군 별로 mRNA 양이 동일하게 맞춘 후, 전기영동으로 확인하고 사용하였다.

(2) cDNA 제조

각각의 실험군으로 부터 분리한 total RNA액 10 μl(10 μg RNA 함유)에 oligo dT 1 μl(2 μg/μl)를 가한 후 조심하여 혼합한 후, 90 ℃에서 5분간 가온하였다. Primer의 annealing을 위해 약 10분간 실온으로 방치한 후, 아래 시약을 가하는 동안 얼음 상에서 작업하였다. 5×cyscript buffer 4 μl, 0.1 M DTT 2 μl, dUTP nucleotide mix 1 μl, dUTP Cydye-labelled nucleotide 0.1 μl, Cyscript reverse transcriptase 1 μl, H_2O 0.9 μl를 첨가하여 총 20 μl로 한 후, tipping 하는 방법으로 조심하면서 혼합

하였다. 이 후, 42 ℃에서 90분간 가온한 다음, 얼음 상에 방치하였다. 여기에 2.5 M NaOH을 2 μl씩 가한 후 37 ℃로 15분 동안 유지시켰으며, 2M 농도의 HEPES buffer(free acid) 10 μl를 섞어 중화시켰다. 사용된 시약은 Amersham Bioscience에서 구매하였다.

(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 μl(Sigma-Aldrich, Cat.No. S9430), (2)에서 만든 cDNA 1 μl, 10 pmol/μl primer pair mix 1 μl, 각각 2.5 mM의 dNTP 2 μl, 10× Taq polymerase buffer 2.5 μl, Taq Polymerase 0.3 μl와 14.7 μl H_2O를 가했다. 이후 95 ℃에서 5분 1 cycle, 95 ℃에서 30초, 45 ℃에서 30초, 72 ℃에서 60초 40 cycles, 95 ℃에서 20분 1 cycle로 증폭시켰다. Primer는 RT-PCR에 사용한 것을 이용하였다. PCR을 수행한 후 증폭기에서 tube를 꺼내고, 반응액 5 μl를 사용하여 3% agarose gel 상에서 PCR specificity를 측정하였다. ABI PRISM® 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Cat. No. 4349157)를 사용하여 Real time PCR 결과를 분석하였다. PCR 반응에 사용한 primer는 Table 1에 표시하였다.

5) Bone resorption Assay

파골세포로 분화하여 작용한 결과 나타나는 골흡수에 미치는 영향을 평가하기 위하여, plate 상에 calcium-collagen을 코팅하여 제조한 인공 뼈 모델을 사용하여 측정하였다. collagen이 코팅된 plate를 phenol-red-free MEM 배지로 세척해 준 다음, 파골세포 전구세포가 1×10^3 cells/well이 되도록 분주하고 24시간 배양한 후, 100 ng/ml 농도의 RANKL로 처리하였다. 1시간 지난 후 GJ 추출물을 농도별로 가한 다음 10일 동안 배양하였다. 배지는 2일 간격으로 교체해 주었다. 배양을 마친 plate는 5% sodium hypochlorite를 이용하여 파골세포를 제거하고 증류수로 세척하였다. 건조한 다음 역상현미경으로 400배 확대하여 골 흡수로 인해 형성되는 pit를 관찰하였고 사진을 촬영하였다.

3. 통계처리

각 결과는 평균±SEM으로 표시하였다. 결과에 대한 유의성 검증은 Student's t-test를 이용하였고, 유의성은 $p<0.05$로 정하였다.

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	AAGTAGTGCAGCCCGGAGTA
NFATc1	GGGTCAGTGTGACCGAAGAT	GGAAGTCAGAAGTGGGTGGA
iNOS	CCTTGTTCAGCTACGCCTTC	AAGGCCAAACACAGCATACC
MITF	GGAACAGCAACGAGCTAAGG	TGATGATCCGATTCACCAGA
DC-STAMP	GCAAGGACCCCAAGGAGTCG	CAGTTGGCCCAGAAAGAGGG
OC-STAMP	TCACTGACCTGCGTTTCGACAA	GCGTAGGCCTGTAGCCACCAA
CTR	TCCAACAAGGTGCTTGGGAA	CTTGAACTGCGTCCACTGGC
ATP6v0d2	GACCCTGTGGCACTTTTTGT	GTGTTTGAGCTTGGGGAGAA
b-actin	TCACCCACACTCTGCCCAT	TCCTTAATGTCACGCACCATTT

Ⅲ. 결 과

1. 파골세포 생성에 미치는 영향

실험 결과, RANKL이 함유되지 않은 정상군에서는 파골세포로의 분화가 거의 나타나지 않았으며, RANKL 만을 처리한 대조군은 TRAP(+) MNC의 출현 빈도가 정상군에 비해 유의성 있게 증가하여 파골세포로 분화가 잘 유도된 것이 확인되었다. 치자 추출물(이하 GJ)은 75 μg/ml의 농도에서 대조군에 비해 TRAP(+) MNC가 유의성($p<0.001$) 있게 감소(약 43.9%)하였고, 150 μg/ml의 농도와 300 μg/ml의 농도에서도 대조군에 비해 각각 유의성($p<0.001$) 있게 감소(약 82.9%, 99.9%) 하였다(Fig. 1).

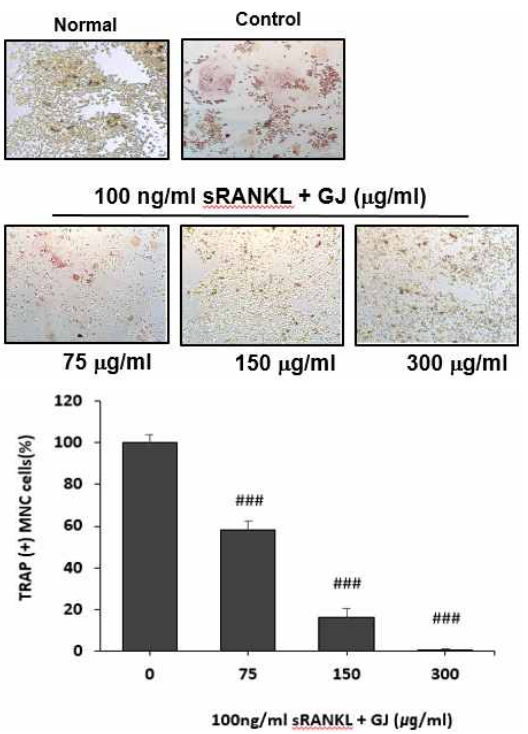

Fig. 1. Effects of GJ on the formation of TRAP (+) MNCs in RANKL stimulated osteoclast.

Normal : vehicle
0 (Control) : RANKL (100 ng/ml)
75 : RANKL (100 ng/ml)+75 μg/ml of GJ
150 : RANKL (100 ng/ml)+150 μg/ml of GJ
300 : RANKL (100 ng/ml)+300 μg/ml of GJ
Each bar represents Mean±SD of 5 tests.
: $p<0.001$ vs Control

2. Cell viability 에 미치는 영향

GJ를 전처리하여 7일간 배양한 결과 300 μg/ml의 농도이하에서는 세포독성이 나타나지 않았다(Fig. 2).

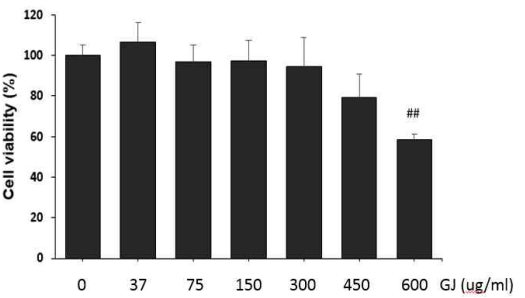

Fig. 2. Effects of GJ on cell viability.

0 : RANKL (100 ng/ml)
37: RANKL (100 ng/ml)+37 μg/ml of GJ
75 : RANKL (100 ng/ml)+75 μg/ml of GJ
150 : RANKL (100 ng/ml)+150 μg/ml of GJ
300 : RANKL (100 ng/ml)+300 μg/ml of GJ
450 : RANKL (100 ng/ml)+450 μg/ml of GJ
600 : RANKL (100 ng/ml)+600 μg/ml of GJ

3. TRAP 유전자 발현에 미치는 영향

실험 결과, RANKL이 함유되지 않은 정상군에서는 파골세포로의 분화시 나타나는 TRAP 발현이 거의 나타나지 않았으며, RANKL 만을 처리한 대조군은 TRAP 발현이 정상군에 비해 유의성 있게 증가하였다. 치자 추출물(이하 GJ) 처리시 75 μg/ml의 농도에서는 약 52%, 150 μg/ml의 농도에서는 약 85%, 300 μg/ml의 농도에서는 약 99.7% 억제 효과를 나타내었다(Fig. 3(A)).

4. MMP-9 발현에 미치는 영향

실험 결과, RANKL이 함유되지 않은 정상군에서는 파골세포로의 분화시 나타나는 MMP-9 발현이 거의 나타나지 않았으며, RANKL 만을 처리한 대조군은 MMP-9 발현이 정상군에 비해 현저히

증가하였다. 치자 추출물(이하 GJ) 처리시 75 μg/ml의 농도에서는 약 9%, 150 μg/ml의 농도에서는 약 32%, 300 μg/ml의 농도에서는 약 86% 억제 효과를 나타내었다(Fig. 3(B)).

5. Cathepsin K 발현에 미치는 영향

실험 결과, RANKL이 함유되지 않은 정상군에서는 파골세포로의 분화시 나타나는 Cathepsin K 발현이 거의 나타나지 않았으며, RANKL 만을 처리한 대조군은 Cathepsin K 발현이 정상군에 비해 현저히 증가하였다. 치자 추출물(이하 GJ) 처리시 75 μg/ml의 농도에서는 약 59%, 150 μg/ml의 농도에서는 약 83%, 300 μg/ml의 농도에서는 약 99.8% 억제 효과를 나타내었다(Fig. 3(C)).

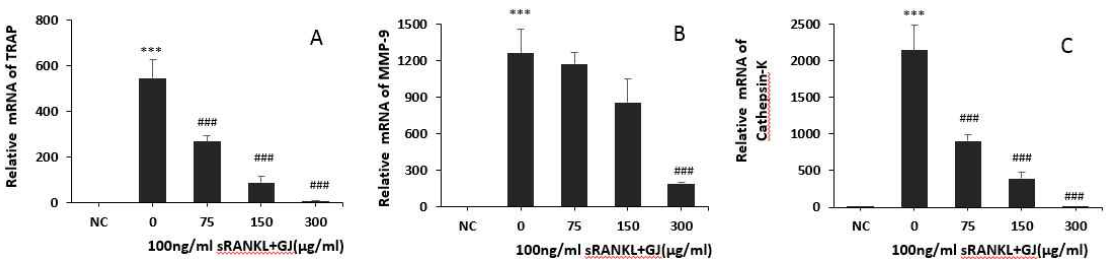

Fig. 3. Effects of GJ on the expressions of TRAP (A), MMP-9 (B), and Cathepsin K (C) in RANKL stimulated osteoclast.

Normal : vehicle
0 (Control) : RANKL (100 ng/ml)
75 : RANKL (100 ng/ml)+75 μg/ml of GJ
150 : RANKL (100 ng/ml)+150 μg/ml of GJ
300 : RANKL (100 ng/ml)+300 μg/ml of GJ
Each bar represents Mean±SD of 5 tests.
*** : $p<0.01$ vs NC
: $p<0.01$ vs Control

6. NFATc1 발현에 미치는 영향

실험 결과, RANKL이 함유되지 않은 정상군에서는 파골세포로의 분화시 나타나는 NFATc1 발현이 거의 나타나지 않았으며, RANKL 만을 처리한 대조군은 NFATc1 발현이 정상군에 비해 현저히 증가하였다. 치자 추출물(이하 GJ) 처리시 150 μg/ml의 농도에서는 약 45%, 300 μg/ml의 농도에서는 약 83% 억제 효과를 나타내었다(Fig. 4(A)).

7. c-Fos 발현에 미치는 영향

실험 결과, RANKL이 함유되지 않은 정상군에서는 파골세포로의 분화시 나타나는 c-Fos 발현이 거의 나타나지 않았으며, RANKL 만을 처리한 대조군은 c-Fos 발현이 정상군에 비해 현저히 증가하였다. 치자 추출물(이하 GJ) 처리시 150 μg/ml의 농도에서는 약 13%, 300 μg/ml의 농도에서는 약 54.8% 억제 효과를 나타내었다(Fig. 4(B)).

8. MITF 발현에 미치는 영향

실험 결과, RANKL이 함유되지 않은 정상군에서는 파골세포로의 분화시 나타나는 MITF 발현이 거의 나타나지 않았으며, RANKL 만을 처리한 대조군은 MITF 발현이 정상군에 비해 현저히 증가하였다. 치자 추출물(이하 GJ) 처리시 150 μg/ml의 농도에서는 약 29.4%, 300 μg/ml의 농도에서는 약 61.8% 억제 효과를 나타내었다(Fig. 4(C)).

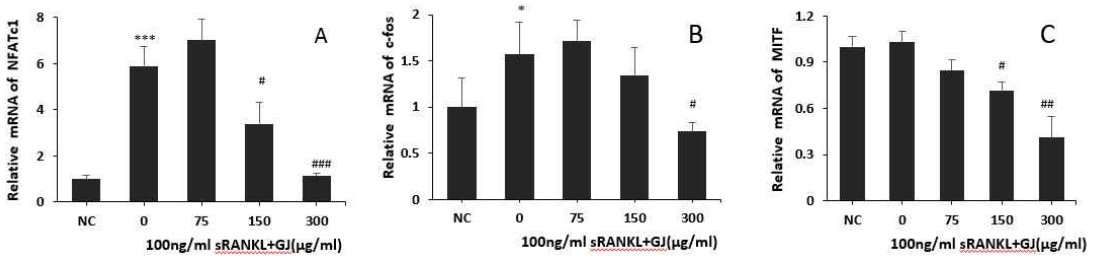

Fig. 4. Effects of GJ on the expressions of NFATc1 (A), c-Fos (B), and MITF (C) in RANKL stimulated osteoclast.

Normal : vehicle
0 (Control) : RANKL (100 ng/ml)
75 : RANKL (100 ng/ml)+75 μg/ml of GJ
150 : RANKL (100 ng/ml)+150 μg/ml of GJ
300 : RANKL (100 ng/ml)+300 μg/ml of GJ
Each bar represents Mean±SD of 5 tests.
*** : $p<0.001$ vs NC, * : $p<0.05$ vs NC
: $p<0.01$ vs Control, ** : $p<0.01$ vs Control, * : $P<0.05$ vs Control

9. OC-STAMP 발현에 미치는 영향

실험 결과, RANKL이 함유되지 않은 정상군에서는 파골세포로의 분화시 나타나는 OC-STAMP 발현이 거의 나타나지 않았으며, RANKL 만을 처리한 대조군은 OC-STAMP 발현이 정상군에 비해 현저히 증가하였다. 치자 추출물(이하 GJ) 처리시 75 μg/ml의 농도에서는 약 26.4%, 150 μg/ml의 농도에서는 약 65.9%, 300 μg/ml의 농도에서는 약 95.3% 억제 효과를 나타내었다(Fig. 5(A)).

10. DC-STAMP 발현에 미치는 영향

실험 결과, RANKL이 함유되지 않은 정상군에서는 파골세포로의 분화시 나타나는 DC-STAMP 발현이 거의 나타나지 않았으며, RANKL 만을 처리한 대조군은 DC-STAMP 발현이 정상군에 비해 현저히 증가하였다. 치자 추출물(이하 GJ) 처리시 75 μg/ml의 농도에서는 약 29.3%, 150 μg/ml의 농도에서는 약 39.1%, 300 μg/ml의 농도에서는 약 83.2% 억제 효과를 나타내었다(Fig. 5(B)).

11. CTR 발현에 미치는 영향

실험 결과, RANKL이 함유되지 않은 정상군에서는 파골세포로의 분화시 나타나는 CTR 발현이 거의 나타나지 않았으며, RANKL 만을 처리한 대조군은 CTR 발현이 정상군에 비해 현저히 증가하였다. 치자 추출물(이하 GJ) 처리시 75 μg/ml의 농도에서는 약 63.7%, 150 μg/ml의 농도에서는 약 87.8%, 300 μg/ml의 농도에서는 약 99.9% 억제 효과를 나타내었다(Fig. 5(C)).

12. ATP6v0d2 발현에 미치는 영향

실험 결과, RANKL이 함유되지 않은 정상군에서는 파골세포로의 분화시 나타나는 ATP6v0d2 발현이 거의 나타나지 않았으며, RANKL 만을 처리한 대조군은 ATP6v0d2 발현이 정상군에 비해 현저히 증가하였다. 치자 추출물(이하 GJ) 처리시 75 μg/ml의 농도에서는 약 74.1%, 150 μg/ml의 농도에서는 약 97.6%, 300 μg/ml의 농도에서는 약 99.9% 억제 효과를 나타내었다(Fig. 5(D)).

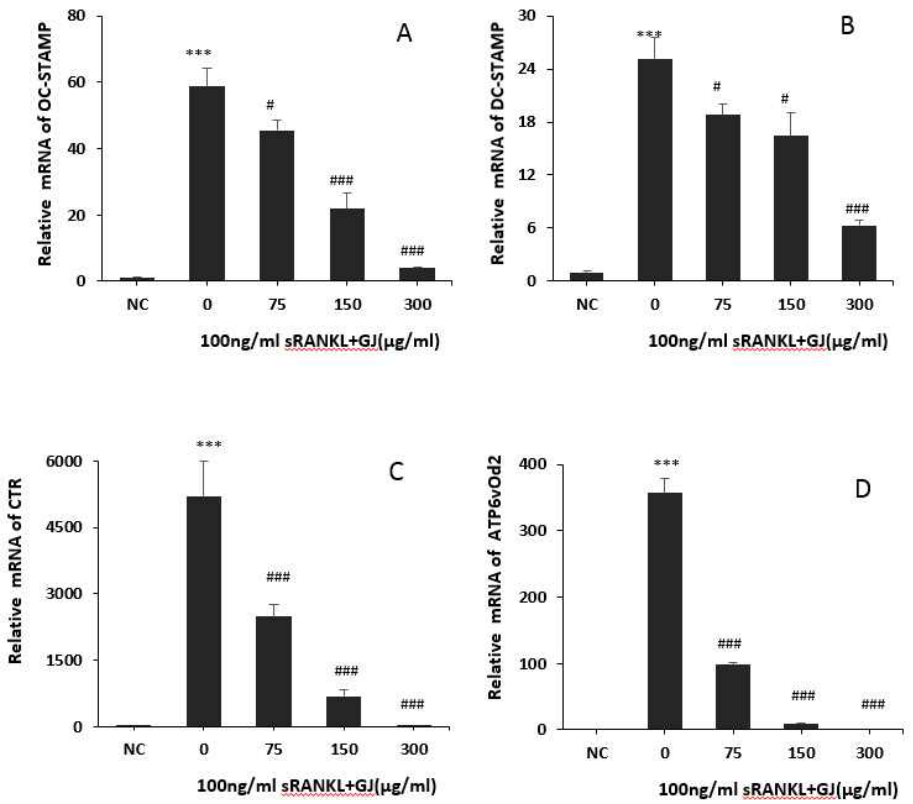

Fig. 5. Effects of GJ on the expressions of OC-STAMP, DC-SRTAMP, and CTR in RANKL stimulated osteoclast.

Normal : vehicle
0 (Control) : RANKL (100 ng/ml)
75 : RANKL (100 ng/ml)+75 μg/ml of GJ
150 : RANKL (100 ng/ml)+150 μg/ml of GJ
300 : RANKL (100 ng/ml)+300 μg/ml of GJ
Each bar represents Mean±SD of 5 tests.
*** : $p<0.001$ vs NC
: $p<0.01$ vs Control

13. 염증관련 인자 발현에 미치는 영향

실험 결과, 치자 추출물(이하 GJ) 처리시 iNOS 발현을 75 μg/ml의 농도에서는 약 14%, 150 μg/ml의 농도에서는 약 11.2%, 300 μg/ml의 농도에서는 약 42.3% 억제 효과를 나타내었다(Fig. 6(B)). 그러나, GJ는 COX-2, IL-6, TNFα 발현에는 영향을 주지 못했다(Fig. 6(A, C, D)).

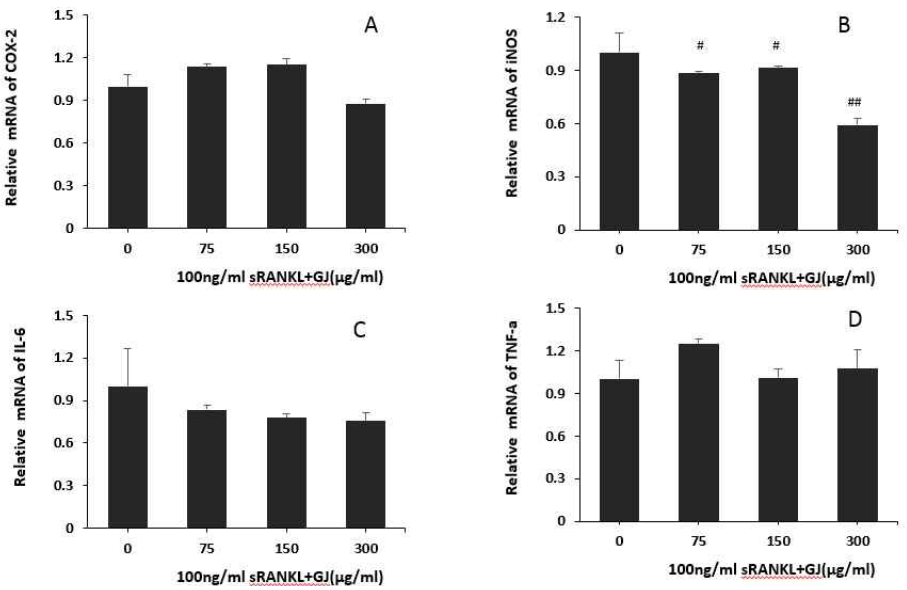

Fig. 6. Effects of GJ on the expressions of COX-2 (A), iNOS (B) and IL-6 (C), and TNFα (D) in RANKL stimulated osteoclast.

0 (Control) : RANKL (100 ng/ml)
75 : RANKL (100 ng/ml)+75 μg/ml of GJ
150 : RANKL (100 ng/ml)+150 μg/ml of GJ
300 : RANKL (100 ng/ml)+300 μg/ml of GJ
Each bar represents Mean±SD of 5 tests.
: $p<0.001$ vs Control, ## : $p<0.01$ vs Control, # : $p<0.05$ vs Control

14. 골흡수에 미치는 영향

실험 결과, GJ은 150 μg/ml, 300 μg/ml 농도에서 대조군에 비해 골흡수를 유의성($p<0.01$) 있게 억제하였다(Fig. 7).

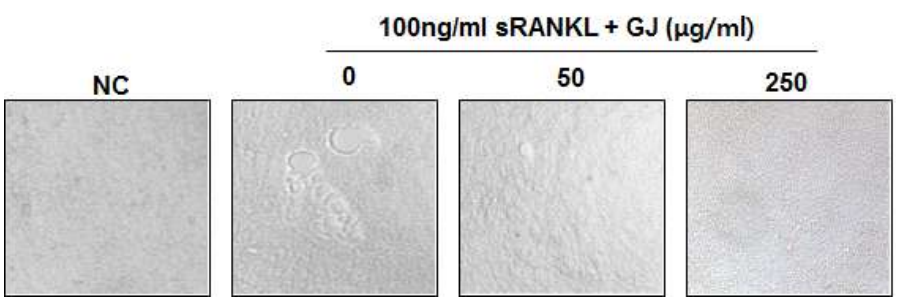

Fig. 7. Effect of GJ on bone pit formation.

NC : vehicle
0 (Control) : RANKL (100 ng/ml)
50 : RANKL (100 ng/ml)+75 μg/ml of GJ
250 : RANKL (100 ng/ml)+250 μg/ml of GJ

Ⅳ. 고 찰

골다공증은 노인층의 중요한 사망 원인인 골절의 실질적 원인으로 작용하고 있는데, 내분비 호르몬의 이상, 약물의 부작용, 영양소 결핍, 유전적 요인들에 의해 유발될 수 있다. 골다공증은 골 대사를 담당하는 골세포의 이상으로 골 기질물질의 손상이 빠르게 나타나는 현상으로, 골조직에서 칼슘과 결합한 결체조직을 파괴하여 칼슘의 유리를 촉진하는 파골세포가 칼슘을 이용하여 골을 형성하는 기능을 가진 조골세포 보다 활성이 우세하여 나타난다[2].

파골세포는 조혈모세포로부터 유래되는 단핵구/대식세포계의 다핵성세포로 파골세포전구세포가 분화하여 형성되면 골 조직을 파괴하는 역할을 한다[17]. 파골세포로의 분화는 RANKL과 같은 분화자극 인자의 작용으로 시작되는데, RANKL은 Tumor necrosis factor(TNF) 계열의 싸이토카인으로 주로 조골세포에서 macrophage-colony stimulating factor(M-CSF)와 마찬가지로 분비된다[3]. 조골세포 기능이 활발해지면 항상성을 유지를 이해 파골세포의 기능이 함께 활성화되는 것이다. 파골세포전구세포 표면에는 RANKL과 결합하는 RANK가 존재한다. RANK는 Tumor necrosis factor receptor(TNFR) superfamily에 속하는 수용체로 RANKL이 결합하면 JNK, Extracellular signal-regulated kinase(ERK), p38 등을 포함한 Mitogen-activated proteinkinase(MAPK) 신호경로가 활성화된다[4]. 이 과정을 통하여 파골세포로 분화되는데 필수적인 nuclear factor of activated T cells, cytoplasmic 1(NFATc1), NF-κB, c-Fos, MITF와 같은 전사인자가 발현된다[5]. 이들의 작용으로 TRAP, Cathepsin K, MMP-9 과 같은 골기질 물질을 파괴하는 단백질분해효소들이 발현되어 실질적인 작용을 하게 된다[18,19]. 한편, Extracellular signal-regulated kinase (ERK) 계열의 신호전달계통의 활성화는 파골세포의 아폽토시스를 억제하여 파골세포의 기능을 증가시키는데, macrophage-colony stimulating factor(M-CSF)은 파골세포의 분화를 촉진하는 RANKL과 상호작용을 하여 아폽토시스를 억제하고 세포능을 유지하게 한다[20].

본 연구에서는 치자가 파골세포의 분화를 억제하는 것을 관찰하고 분화관련 인자들의 발현에 미치는 영향을 평가한 것이다. TRAP은 분화하여 성숙한 파골세포에서 발현되는 단백질로 파골세포의 분화 여부와 기능의 활성 여부를 판단하는 기준 지표물질이 될 수 있다. 실험결과, 치자 추출물은 TRAP 양성인 다핵성 세포(TRAP(+) MNCs) 생성을 억제하여 파골세포의 분화과정을 통한 활성세포 형성을 억제하는 것으로 나타났다(Fig. 1).

TRAP은 골의 흡수에 관여하고 있어 파골세포의 활성화로 인한 골 흡수 과정은 세포에서 발현되는 TRAP의 mRNA 유전자 발현을 지표로 삼아 측정하였다. 실험 결과, RANKL은 파골세포에서 TRAP 발현을 증가시켰으며, GJ는 RANKL에 의해 발현이 증가된 TRAP 발현을 유의성($p<0.001$) 있게 억제하여 GJ가 파골세포의 골 흡수 역할을 하는 저해할 수 있음을 확인하였다(Fig. 3(A)). 이러한 GJ의 작용은 파골세포의 골흡수를 담당하는 또 다른 골 흡수 인자인 MMP-9, Cathepsin K 발현에도 같은 양상으로 나타났다(Fig. 3(B, C)). 이를 통해 GJ가 RANKL로 유도된 파골세포의 단백질 합성을 억제하여 골흡수를 억제할 것으로 판단되었는데, 이는 실제로 골흡수를 측정한 실험결과(Fig. 7)에서 관찰한 그림에서 확인할 수 있었다. 또한, 이러한 GJ의 효과는 TRAP, OSCAR, cathepsin K와 같이 파골세포 특이 유전자의 발현을 조절하는 NFATc1 발현을 GJ가 억제하기 때문에 나타난 결과로 판단되었다.

한편, 파골세포로 분화되는 과정에 작동되는 신호전달체계에 대한 영향과 Fig. 1 확인된 TRAP(+) MNC 형성과정의 연관성을 확인하기 위하여 파골세포 분화과정에 관여하는 전사인자들의 발현에 미치는 영향을 평가하고자 하였다. 이러한 파골세포의 분화를 유도하는 핵심 전사인자로는 NF-kB, c-Fos

와 NFATc1, MITF 등이 알려져 있다[21]. NFATc1는 RANKL이 수용체에 결합하여 활성화되는 TNF receptor associated factors(TRAF)를 통하여 c-Fos와 Calmodulin activated kinases(CaMKs) 계열의 신호전달과정을 거쳐 발현이 증가하며, 이는 파골세포 분화과정에 필요한 인자들의 발현에 중요한 역할을 하는 전사인자이다[5]. 실험 결과, GJ는 NFATc1 발현을 억제하여(Fig. 4(A)) 파골세포 분화과정에 필요한 인자들의 발현이 억제될 것으로 추측되었으며, 이는 Fig. 1에서 나타난 결과와 상관성이 있으며, 또한, GJ가 NFATc1에 의해 발현이 조절되는 TRAP과 cathepsin K 발현을 억제한 결과(Fig. 3(A, C))를 보였기 때문에 발현이 억제될 것으로 예측했던 바와 같이 억제되는 결과를 나타내었다. 이와는 별도로 TNF receptor associated factors (TRAF)를 통하여 전달되는 TAK1, MKK6, p38의 신호전달 결과 나타나는 microphthalmia-associated transcription factor(MITF)는 활성화되어 파골세포의 분화를 촉진하는 전사인자이다[22]. 실험 결과, GJ는 RANKL에 의해 증가된 MITF 발현을 감소시켰고, c-Fos 발현도 억제하여(Fig. 4(B, C)), 파골전구세포로부터 파골세포로의 분화를 억제할 것으로 판단되었다. 이러한 결과는 Fig. 1에서 보이는 바와 같이 분화가 억제되는 결과로 나타났다.

한편, NFATc1는 파골세포의 작용점으로의 이동, 골기질 물질에 대한 부착, 흡수부위의 산성화, 골기질의 파괴 등에 관여하는 파골세포 특이 단백질 유전자인 dendritic cell-specific transmembrane protein(DC-STAMP), osteoclast-stimulatory transmembrane protein(OC-STAMP), Atp6v0d2, calcitonin receptor (CTR)과 CtsK들의 발현을 조절하는 것으로 알려져 있다[23,24]. 이들은 RANKL 자극되어 활성화되는 MITF의 작용으로 분화된 전구세포가 세포융합을 통하여 완벽한 파골세포 형질세포로 변환하는데 중요한 역할을 한다. 이들은 파골세포의 분화과정과 파골세포의 활성화를 조절하는 NFATc1에 의해 조절되는 것으로 알려져 있다. 따라서, NFATc1 활성이 억제되면 DC-STAMP, OC-STAMP의 발현도 억제될 것으로 추측되었다. 실험결과, GJ는 예측한 대로 RANKL에 의해 발현이 증가된 DC-STAMP, OC-STAMP, Atp6v0d2, CTR의 발현을 억제하였다(Fig. 5(A, B, C, D)).

NO는 nitrite oxide synthase(NOS)에 의해 생성되는 물질로 eNO, nNO, iNO 등이 존재한다. 주로 대식세포에서 유래하는 iNO는 RANKL이나 같은 계열인 TNFα 같은 염증 유발 사이토카인에 의해 활성화된 iNOS 의해 생성된다. 생성된 iNO는 면역반응을 포함한 염증반응에 관여하는데, IL-6, TNF-a의 생합성을 증가시켜 파골세포 활성을 증가시킨다[25]. 이들은 세포막에 존재하는 수용체와 결합하여 활성화된 phospholipase A_2(PLA_2) 작용을 통해 유리되는 arachidonic acid(AA)를 이용한 prostaglandin(PG) 류의 생합성에 관여한다. Cyclooxygenase-2(COX-2)는 AA를 이용하여 PGG_2를 생합성하는 효소로서 이후 PGD_2, PGE_1, PGI_2, TXA_2 등의 다양한 prostaglandin 류를 합성하여 염증반응에 관여한다[26]. 최근, 파골전구세포에서 NO가 증가하는 경우 파골세포로의 분화가 촉진된다고 보고되었다[27]. 이러한 파골세포분화가 촉진되어 골흡수가 증가하는 데는 염증반응 인자들의 세포내 증가가 관찰되었다. 따라서, COX-2 또는 iNOS를 차단하는 것은 파골세포 분화를 억제할 수 있는 또다른 경로일 수 있다[28]. 실험 결과, GJ는 파골세포 분화과정에서 COX-2 발현을 억제하지는 못했지만, iNOS 발현은 억제하였다(Fig. 6(B)). 이러한 결과는 치자 추출물이 다른 염증세포를 억제한다는 보고와는 효과 면에서 약간의 차이를 보이고 있다[9]. 그러나, GJ는 iNOS 발현을 억제하여 세포내 NO 농도를 저하시켜 파골세포 분화 관련 인자들의 억제효능에 기여하는 것으로 추측되었다.

이러한 실험결과를 바탕으로, GJ가 골흡수에 미치는 영향을 평가하여 위해 인공뼈를 이용하여 파골세포에 의해 생성되는 bone-pit 생성을 관찰하였다. 실험결과, GJ는 bone-pit 형성을 억제하여 골

흡수를 억제하는 것으로 나타났다(Fig. 7).

결론적으로, 치자 추출물은 RANKL 유도된 파골세포의 분화, 세포 융합 및 이동, 골흡수 활성에 관여하는 다양한 유전자의 발현을 조절하여 파골세포 분화 및 활성을 억제하고 이를 통해 골흡수를 억제하는 것으로 나타났다.

V. 결 론

치자 추출물(GJ)이 파골세포의 분화과정과 세포활성을 억제하여 골의 재흡수를 억제할 수 있는지 평가하기 위해, RANKL 처리하여 유도되는 파골세포 분화와 관련 인자들의 유전자 발현에 미치는 영향, 골의 pit 생성에 미치는 영향을 측정하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. GJ는 RANKL 유도 TRAP(+) MNCs 생성을 억제하였다.
2. GJ는 RANKL 유도 파골세포에서 TRAP, MMP-9, cathepsin K의 발현을 억제하였다.
3. GJ는 RANKL 유도 파골세포에서 NFATc1, c-Fos, MITF의 발현을 억제하였다.
4. GJ는 RANKL 유도 파골세포에서 OC-STAMP, DC-STAMP, Atp6v0d2, CTR의 발현을 억제하였다.
5. GJ는 RANKL 유도 파골세포에서 염증관련 iNOS의 발현을 억제하였다.
6. GJ는 파골세포의 골흡수 활성을 억제하였다.

결론적으로, GJ는 RANKL로 유도되는 파골세포에서 분화를 조절하는 인자들의 발현을 조절하고, 파골세포의 골흡수 활성을 조절하는 유전자들의 발현 조절을 통하여 골흡수를 억제하는 것으로 나타났다. 따라서, 치자가 골다공증 치료 및 예방 목적에 사용이 가능할 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Kling JM, Clarke BL, Sandhu NP. Osteoporosis prevention, screening, and treatment: a review. *J Womens Health* 2014;23(7):563-72.
2. Sweet MG, Sweet JM, Jeremiah MP, Galazka SS. Diagnosis and treatment of osteoporosis. *Am Fam Physician* 2009;79(3):193-200.
3. Park JH, Lee NK, Lee SY. Current Understanding of RANK Signaling in Osteoclast Differentiation and Maturation. *Mol Cells* 2017;40(10):706-13.
4. Miyamoto T, Suda T. Differentiation and function of osteoclasts. *Keio J Med* 2003;52(1):1-7.
5. Kim JH, Kim N. Regulation of NFATc1 in Osteoclast Differentiation. *J Bone Metab* 2014;21(4):233-41.
6. Jeong BS, Shin MG. Do-hae Hyang-yak(Saeng-yak) Dae-sajeon. Seoul: Young-lim-sa; 1990, p. 925-6.
7. Yu Y, Feng XL, Gao H, Xie ZL, Dai Y, Huang XJ, et al. Chemical constituents from the fruits of Gardenia jasminoides Ellis. *Fitoterapia* 2012;83(3):563-7.
8. Oshima T, Sagara K, Yoshida T, Tong YY, Zhang GD, Chen YH. Determination of geniposide, gardenoside, geniposidic acid and genipin-1-beta-gentiobioside in Gardenia jasminoides by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 1988;455:410-4.
9. Sung YY, Lee AY, Kim HK. The Gardenia jasminoides extract and its constituent, geniposide, elicit anti-allergic effects on atopic dermatitis by inhibiting histamine in vitro and in vivo. *J Ethnopharmacol* 2014;156:33-40.
10. Chen YH, Lan T, Li J, Qiu CH, Wu T, Gou HJ, et al. Gardenia jasminoides attenuates hepatocellular injury and fibrosis in bile duct-ligated rats and human hepatic stellate cells.

World J Gastroenterol 2012;18(48):7158-65.
11. Akihisa T, Watanabe K, Yamamoto A, Zhang J, Matsumoto M, Fukatsu M. Melanogenesis inhibitory activity of monoterpene glycosides from Gardeniae Fructus. *Chem Biodivers* 2012;9(8):1490-9.
12. Zhang HY, Liu H, Yang M, Wei SF. Antithrombotic activities of aqueous extract from Gardenia jasminoides and its main constituent. *Pharm Biol* 2013;51(2):221-5.
13. Lee JH, Lee DU, Jeong CS. Gardenia jasminoides Ellis ethanol extract and its constituents reduce the risks of gastritis and reverse gastric lesions in rats. *Food Chem Toxicol* 2009;47(6):1127-31.
14. Wang L, Pi Z, Liu S, Liu Z, Song F. Targeted metabolome profiling by dual-probe microdialysis sampling and treatment using Gardenia jasminoides for rats with type 2 diabetes. *Sci Rep* 2017;7(1):1010-5.
15. Zhang H, Lai Q, Li Y, Liu Y, Yang M. Learning and memory improvement and neuroprotection of Gardenia jasminoides (Fructus gardenia) extract on ischemic brain injury rats. *J Ethnopharmacol* 2017;196:225-35.
16. Im M, Kim A, Ma JY. Ethanol extract of baked Gardeniae Fructus exhibits in vitro and in vivo anti-metastatic and anti-angiogenic activities in malignant cancer cells: Role of suppression of the NF-κB and HIF-1α pathways. *Int J Oncol* 2016;49(6):2377-86.
17. Atkins GJ, Findlay DM. Osteocyte regulation of bone mineral: a little give and take. *Osteoporos Int* 2012;23(8):2067-79.
18. Drake MT, Clarke BL, Oursler MJ, Khosla S. Cathepsin K Inhibitors for Osteoporosis: Biology, Potential Clinical Utility, and Lessons Learned. *Endocr Rev* 2017;38(4):325-50.
19. Kim J, Lee H, Kang KS, Chun KH, Hwang GS. Cordyceps militaris mushroom and cordycepin inhibit RANKL-induced osteoclast differentiation. *J Med Food* 2015;18(4):446-52.
20. Fong D, Bisson M, Laberge G, McManus S, Grenier G, Faucheux N, et al. Bone morphogenetic protein-9 activates Smad and ERK pathways and supports human osteoclast function and survival in vitro. *Cell Signal* 2013;25(4):717-28.
21. Kim J, Lee HK, Chang TS, Kang KS, Hwang GS. Inhibitory effect of brazilin on osteoclast differentiation and its mechanism of action. *Int Immunopharmacol* 2015;29(2):628-34.
22. Lu SY, Li M, Lin YL. MITF regulates osteoclastogenesis by modulating NFATc1 activity. *Exp Cell Res* 2014;328(1):32-43.
23. Park SH, Kim JY, Cheon YH, Baek JM, Ahn SJ, Yoon KH, et al. Protocatechuic Acid Attenuates Osteoclastogenesis by Downregulating JNK/c-Fos/NFATc1 Signaling and Prevents Inflammatory Bone Loss in Mice. *Phytother Res* 2016;30(4):604-12.
24. Zeng XZ, He LG, Wang S, Wang K, Zhang YY, Tao L, et al. Aconine inhibits RANKL-induced osteoclast differentiation in RAW264.7 cells by suppressing NF-κB and NFATc1 activation and DC-STAMP expression. *Acta Pharmacol Sin* 2016;37(2):255-63.
25. Song J, Jing Z, Hu W, Yu J, Cui X. α-Linolenic Acid Inhibits Receptor Activator of NF-κB Ligand Induced (RANKL-Induced) Osteoclastogenesis and Prevents Inflammatory Bone Loss via Downregulation of Nuclear Factor-KappaB-Inducible Nitric Oxide Synthases (NF-κB-iNOS) Signaling Pathways. *Med Sci Monit* 2017;23:5056-69.
26. Korbecki J, Baranowska-Bosiacka I, Gutowska

I, Chlubek D. Cyclooxygenase pathways. *Acta Biochim Pol* 2014;61(4):639-49.
27. Park JH, Lee NK, Lee SY. Current Understanding of RANK Signaling in Osteoclast Differentiation and Maturation. *Mol Cells* 2017;40(10):706-13.
28. Laveti D, Kumar M, Hemalatha R, Sistla R, Naidu VG, Talla V, et al. Anti-inflammatory treatments for chronic diseases: a review. *Inflamm Allergy Drug Targets* 2013;12(5):349-61.