

Inhibitory Effects of *Locusta migratoria* Ethanol Extracts on RANKL-induced Osteoclast Differentiation

Minhee Baek[†], Minchul Seo[†], Joon Ha Lee, Hwa Jeong Lee, In-Woo Kim, Sun Young Kim, Mi-Ae Kim, Sunghyun Kim and Jae-Sam Hwang*

Department of Agricultural Biology, National Institute of Agricultural Sciences, Rural Development Administration, Wanju-gun, Jeonbuk 55365, Korea

Received September 11, 2019 / Revised October 10, 2019 / Accepted October 11, 2019

Recently, there has been an increase in the elderly population of the world. Consequently, bone metabolic diseases such as osteoporosis are emerging as a social problem. Osteoclasts play a role in bone resorption, and osteoporosis is induced when bone resorption occurs excessively. Because currently used bone resorption inhibitors may cause side effects when used for a long period of time, it is necessary to develop a new material that effectively inhibits osteoclast differentiation. This study aimed to confirm the inhibitory effect of ethanol extract of *Locusta migratoria* on RANKL-induced osteoclast differentiation and its mechanism. The toxicity and proliferation effects of LME on RAW264.7 osteoclasts were measured by an MTS assay. There was no cytotoxicity or proliferation when the osteoclasts were treated with up to 2,000 $\mu\text{g/ml}$ of LME. In order to confirm the effect of LME on the differentiation of osteoclasts, osteoclasts were treated with RANKL alone or with LME for 3 days. As a result of a TRAP (tartrate-resistant acid phosphatase) assay, the increasing osteoclast differentiation by RANKL decreased in a concentration-dependent manner with the treatment of LME. In addition, LME suppressed the expression of differentiation-related marker genes (*TRAP*, *RANK*, *NFATc1*, and *CK*) and proteins (*NFATc1* and *c-Src*) that had been increased by RANKL. Also, LME influenced the $\text{NF-}\kappa\text{B}$, ERK and JNK signaling pathways, resulting in the inhibition of osteoclast differentiation. These results suggest that LME may be used as a novel functional material for the prevention and treatment of osteoporosis by playing a role in inhibiting bone absorption.

Key words : Bone resorption, *Locusta migratoria*, osteoclastogenesis, osteoporosis, RANKL

서 론

우리 몸의 형태를 유지하는 뼈는 골 조직의 형성과 재흡수를 끊임없이 반복함으로써 골 항상성을 유지해나가며, 재형성 과정을 통해 건강한 골격 유지, 칼슘, 인과 같은 다양한 무기질 저장, 각종 면역세포의 발달 및 성숙에 필요한 골수 구조 형성 등의 체내 중요한 역할을 담당하게 된다[9, 34]. 이 과정에서 과도한 뼈 흡수로 인해 불균형이 발생하게 되면 골다공증, 용해성 골 전이 및 류마티스 관절염과 같은 골격질환과 함께 뼈 손실이 발생한다[35]. 골다공증은 골 재흡수를 담당하는 파골세포의 기능이 우세하여 발생하는 대표적인 골격계 질환으로 특히 폐경기를 겪는 여성에게서 에스트로겐 결핍으로 인해 많이 발행하고 있다. 골다공증의 치료 및 예방을 위하여 조골

세포의 기능 활성화에 따른 골 형성 촉진 또는 파골세포 활성화 억제를 통한 골 흡수 저해와 같은 방법들이 시도되고 있다[29].

파골세포는 조혈모세포로부터 유래된 전구세포인 단핵 및 대식 세포에서 분화되어 발생하는 다핵 세포로서 조골세포와 함께 뼈의 형성 및 흡수를 담당하므로 골격계 형성에 필수적인 세포이다[17]. 조골세포가 활성화되어 골 형성이 일어나면 receptor activator of nuclear factor kappa-b ligand (RANKL)와 macrophage colony stimulating factor (M-CSF)가 분비되며 파골세포 전구체의 융합 및 파골세포의 분화에 영향을 미치게 된다[32]. 조골세포의 표면으로부터 분비되는 RANKL과 파골세포의 표면에 존재하는 RANK (Receptor activator of nuclear factor kappa-b)의 결합은 파골세포 분화에서 가장 먼저 발생하는 자극이다. RANKL과 RANK의 결합은 세포질내의 TNF receptor-associated factor (TRAF6)를 활성화 시키며, 활성화된 TRAF6는 nuclear factor κB (NF- κB) 및 mitogen-activated protein kinases (MAPKs)를 통하여 RANKL의 신호 전달을 촉진시킨다[4, 30]. MAPK pathway의 활성화는 파골세포에서 c-Fos 발현을 증가시키며 그에 따라 파골세포 분화의 주요 전사인자인 NFATc1의 발현 또한 증가하게 된다. 증가된 NFATc1는 TRAP, Cathepsin K, DC-STAMP와 같은 전사 유전자의 발현에 영향을 미치게 된다. 따라서 NF- κB 와 MAPK

[†] Authors contributed equally.

*Corresponding author

Tel : +82-63-238-2974, Fax : +82-63-238-3833

E-mail : hwangjs@korea.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

signaling의 조절을 통해 osteoclastogenesis를 억제할 수 있으며 골 흡수를 감소시킴으로써 골다공증 치료 효능이 나타나게 된다[10, 18, 27].

최근 들어 세계적으로 꾸준히 증가하고 있는 인구와 지구온난화, 환경오염 등으로 인해 미래의 식량자원 부족에 대한 우려가 계속되고 있으며, 그에 따라 미래의 지속가능한 식량자원으로서 곤충에 대한 관심이 높아지고 있다[15, 26]. 국내에는 현재 총 7종의 곤충이 식용곤충으로 등록되어있으며, 식품으로의 활용 이외에도 곤충 유래의 다양한 생리활성 물질 탐색을 통해 기능성 소재 개발 연구도 활발히 진행되고 있다[8].

풀무치(*Locusta migratoria*)는 메뚜기목(Orthoptera) 메뚜기과(Acrididae)의 곤충으로 과거에는 해충으로서 방제해야 할 곤충으로 여겨져 왔으나 최근에는 아프리카와 아라비아 지역에서 식용으로 이용해오던 것이 알려지게 되면서 소비자와 식품회사로부터 각광을 받고 있다[19]. 풀무치는 성충 기간이 4-8개월로 짧아 빠른 세대교체가 가능하며 세대를 거침에 따라 개체 수가 10-16배 정도로 증가하므로 빠르고 효율적인 사육 조건을 가지고 있다[33]. 뿐만 아니라 풀무치는 풍부한 단백질, 식이섬유, 필수지방산 등을 함유하고 있어 영양적으로도 우수한 것으로 알려져 있다. 평균적으로 50-65% 정도의 단백질을 함유하고 있으며 필수 아미노산의 비율이 높아 기존의 육류로부터 섭취하던 단백질을 충분히 대체할 수 있을 것으로 사료된다[20, 22, 24]. 현재 풀무치를 이용한 식·약용 소재로 이용하기 위한 연구는 풀무치 추출물을 이용한 세포유전학적 영향 분석[31], 풀무치로부터 추출한 지방과 단백질의 조성 및 특성 분석[6] 등이 진행되었으며, 본 연구진에 의해 풀무치 추출물의 조골세포 분화 촉진 효과가 확인되었다[2]. 따라서 본 연구에서는 풀무치 추출물이 파골세포 분화에 미치는 영향을 확인하였으며, 이를 통해 풀무치 추출물의 골다공증 개선 효능을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

풀무치 추출물 제조

본 연구에 사용한 풀무치(*Locusta migratoria*)는 국립농업과학원 곤충산업과에서 실내 계대 사육하여 사용하였다. 실험 곤충은 30°C, 65% R. H., 9L/15D, 1,800 Lux의 조건에서 밀을 먹이로 하여 사육하였다. 곤충 추출물은 풀무치를 세척 및 동결건조 한 후 분말화하여 Baek 등[1] 방법에 따라 추출하였다. 풀무치 동결건조 분말을 70% 에탄올 용액에 혼합하여 초음파 처리(250 J, 10 s, twice)한 후 30분간 실온에서 방치하였다. 혼합액의 상등액을 걸러 centrifugal evaporator (EYELA, Tokyo, Japan)를 이용하여 완전히 건조한 후 사용 전까지 -20°C에서 냉동 보관하였다.

세포주

마우스 대식세포주인 RAW264.7 세포는 ATCC (VA, USA)

에서 구입하였으며 10% FBS (fetal bovine serum) (Hyclone, UT, USA)와 1× penicillin-streptomycin (Hyclone)이 첨가된 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Hyclone)을 사용하여 배양하였고 세포는 37°C, 5% CO₂의 배양조건을 유지하였다. 세포가 충분히 성장하는 2-3일 간격으로 계대 배양하며 실험을 진행하였다.

세포 생존율 측정

풀무치 추출물이 RAW264.7의 세포 생존율에 미치는 영향은 Chao 등[5]의 방법에 따라 확인하였다. RAW264.7에 대한 풀무치 추출물의 세포독성 및 세포증식을 확인하기 위하여 RAW264.7을 96-well plate (SPL life sciences, Korea)에 4.0×10⁴ cells/well로 분주하여 약 80%의 confluency에 도달할 때까지 10% FBS (Hyclone)가 들어있는 배지에서 약 24시간 동안 배양하였다. 그 후 풀무치 추출물을 100, 500, 1,000 및 2,000 µg/ml의 농도로 처리하여 24시간 동안 배양한 후 MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) reagent (Sigma, MO, USA)를 사용하여 세포 생존율을 측정하였다.

TRAP (Tartrate-resistant acid phosphatase) 활성 측정 및 염색

풀무치 추출물이 RAW264.7의 파골세포 분화에 미치는 영향을 확인하기 위해 TRAP staining kit (Kamiya Biomedical Co, WA, USA)를 사용하여 kit의 instruction에 따라 실험을 진행하였다. RAW264.7 세포를 96-well plate (SPL life sciences)에 5.0×10³ cells/well로 분주하여 24시간 배양한 다음, 100 ng/ml RANKL과 함께 풀무치 추출물을 농도별(50, 100, 500 및 1,000 µg/ml)로 처리하여 3일간 배양하였다. TRAP 활성의 변화를 확인하기 위하여 분화가 끝난 배양액에 TRAP solution을 혼합하여 3시간 동안 37°C에서 배양한 후, 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 분화가 끝난 파골세포는 PBS (Caisson laboratories)로 세척하였고 10% formalin을 사용하여 세포를 고정한 후 TRAP solution을 분주하여 37°C에서 30분 이상 배양하였다. 염색된 세포를 현미경으로 관찰하여 3개 이상의 핵을 가진 다핵세포 유무 및 세포 수를 확인하였다.

RT-PCR

RAW264.7 세포를 1×10⁵ cells/well의 농도로 6-well plate (SPL life sciences)에 분주하여 24시간 배양하였다. 그 후 100 ng/ml RANKL과 함께 풀무치 추출물을 농도별(50, 100, 500 및 1,000 µg/ml)로 처리하여 3일간 배양하였다. TRIzol reagent (Ambion Life Technology, MA, USA)를 이용하여 RNA를 분리하였으며 RNA의 정량은 50배 희석한 후 UV/vis 분광광도계(Beckman coulter, CA, USA)를 이용하여 260 nm에서 흡광도를 측정하였다. 정량한 RNA는 cDNA reverse transcription kit (Thermo Fisher Scientific, MA, USA)를 이용하여

cDNA를 합성하였고, qPCR Green Mix (ENZO, NY, USA)를 사용하여 Real-time PCR 반응을 수행하였다. 측정하고자 하는 목적 유전자의 발현은 Gapdh의 발현 양을 이용하여 정량화하였다.

Western blot

RAW264.7 세포를 1×10^5 cells/well의 농도로 6-well plate (SPL life sciences)에 분주하여 24시간 배양하였다. 그 후 100 ng/ml RANKL과 함께 풀무치 추출물을 농도별(50, 100, 500 및 1,000 $\mu\text{g/ml}$)로 처리하여 20분(MAPK 및 I κ B) 또는 3일(NFATc1 및 c-Src)간 배양하였다. 배양이 끝나는 날, 세포를 PBS (Caisson laboratories)로 세척한 뒤 protease와 phosphatase inhibitor cocktail가 함유된 RIPA buffer를 사용하여 세포를 lysis 하고 원심분리하여 상등액을 회수하였다. BCA를 이용하여 단백질을 정량한 후, SDS-PAGE gel에서 전기영동을 통해 분자량에 따라 단백질을 분리하고, PVDF membrane으로 transfer하였다. 단백질이 흡착된 Membrane을 5% skim milk 용액으로 blocking 한 후 각각의 1차 항체를 4°C에서 overnight으로 반응시켰으며, 그 후 각 항체에 대한 2차 항체를 반응시킨 후 ECL kit를 이용하여 각 band를 관찰하였다. Western blot에 사용한 시약은 Thermo fisher (MA, USA)로부터 구입하여 사용하였으며, 1차 항체는 Cell signaling (MA, USA) 및 Santa cruz biotechnology (TX, USA), 2차 항체는 Promega (WI, USA)에서 구입하여 사용하였다.

통계처리

모든 실험 결과는 3회 반복하여 평균과 표준편차(mean \pm SD)로 나타냈다. 실험군 간의 유의성은 Student's *t*-test를 통해 검정하였고, $p < 0.05$ 일 때 군 간의 차이가 유의적인 것으로 판단하였다.

결과 및 고찰

풀무치 에탄올 추출물의 파골세포 증식 및 독성 평가

RAW264.7 세포는 파골세포 전구체로 주로 사용되고 있으며 RANKL의 자극에 의해 파골세포로 분화된다[35]. 풀무치 추출물(LME)이 RAW264.7 세포의 증식 및 독성에 미치는 영향을 확인하기 위하여 추출물을 24시간 처리한 후 MTS assay를 통해 세포 생존율을 확인하였다. 그 결과, LME는 2,000 $\mu\text{g/ml}$ 농도까지 세포 독성을 유발하지 않았으며 LME에 의한 세포 증식 또한 나타나지 않았다(Fig. 1). 따라서 이후의 실험은 LME의 독성이 없는 것으로 확인된 2,000 $\mu\text{g/ml}$ 이하의 농도에서 수행하였다.

풀무치 에탄올 추출물이 Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) 활성에 미치는 영향

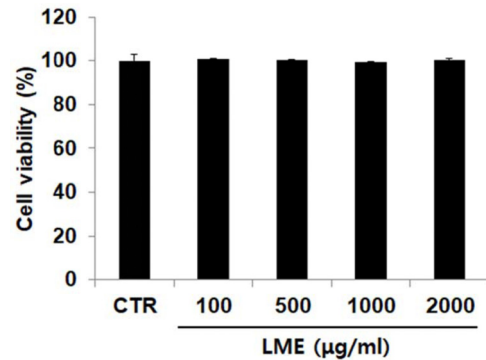


Fig. 1. Effect of *Locusta migratoria* extract on the osteoclastic cell cytotoxicity. Raw264.7 cells were seeded into 96-well plate (4.0×10^4 cells/well), and then treated with LME (100-2,000 $\mu\text{g/ml}$) for 24 hr. Cell cytotoxicity was determined using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS) assay. Values are the mean \pm SD of triplicate. CTR, control; LME, *Locusta migratoria* ethanol extract.

TRAP은 파골세포의 리소좀에 다량 분포하며 TRAP 활성은 골 조직에서 다핵세포를 인식하는 세포화학적 마커로 알려져 있다[3]. 따라서 파골세포의 분화 정도를 나타내는 표지인자로서 파골세포에서의 TRAP 활성을 측정하여 풀무치 에탄올 추출물이 파골세포 분화에 미치는 영향을 확인하였다. 파골세포의 TRAP 활성은 RANKL 단독 처리군과 무처리군인 CTR군에 대한 비율로 나타냈으며 그 결과는 Fig. 2와 같다. 파골세포의 분화를 유도하는 RANKL을 단독으로 처리한 군에서 TRAP 활성이 CTR군에 비해 약 3배 정도 증가하였으나 풀무치 에탄올 추출물을 함께 처리한 군에서는 추출물 농도에 의존적으로 TRAP 활성이 유의적으로 감소함을 확인할 수 있었다(Fig. 2A). 이러한 결과는 세포의 TRAP 염색을 통해서도 확인할 수 있었다. RANKL만 처리한 군에서는 RAW264.7 세포가 다핵세포로 분화되었고 붉은색을 나타내며 염색된 반면 풀무치 에탄올 추출물을 농도별로 처리하는 경우에는 다핵세포의 개수 및 면적이 감소하면서 붉은색으로 염색된 정도도 연하게 나타나는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2B). 따라서 풀무치 에탄올 추출물은 RANKL에 의해 증가된 TRAP 활성을 감소시키며, 이를 통해 파골세포의 분화를 억제하는 효과가 있음을 확인하였다.

풀무치 에탄올 추출물의 파골세포 분화 관련 유전자 발현에 미치는 영향

Raw264.7세포에 RANKL을 처리할 경우 RANK/TRAF6를 통하여 파골세포 분화 신호전달이 시작되고, 그 결과 분화와 관련된 주요 유전자인 TRAP, RANK, NFATc1 및 CK (CathepsinK) 발현이 유도된다[13]. TRAP은 파골전구세포에서 파골세포로 분화되면서 발현이 증가되는 표지인자로서 TRAP 양성 세포들이 다핵세포로 분화되어 골 흡수 작용을 유도한다

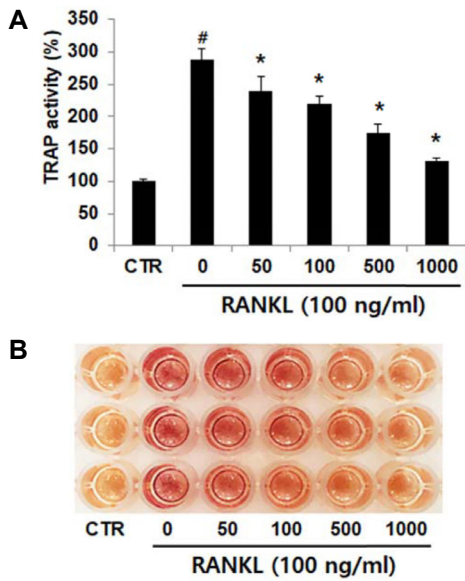


Fig. 2. Effect of *Locusta migratoria* extract on the TRAP activity and staining of osteoclastic cells. Raw264.7 cells were seeded into 96-well plate (5.0×10^3 cells/well), and then treated with LME (50-1,000 $\mu\text{g/ml}$) and RANKL (100 ng/ml) for 3 days. (A) TRAP activity was measured by spectro-photometric method. (B) Cells were stained with TRAP solution after fixation. Values are the mean \pm SD of triplicate. [#] $p < 0.05$, compared with the control. ^{*} $p < 0.05$, compared with the RANKL only. CTR, control; RANKL, 100 ng/ml RANKL; LME, *Locusta migratoria* ethanol extract.

[23]. RANK는 세포 표면에 존재하며 RANKL에 의해 발현이 증가하고, RANK와 RANKL의 결합을 통해 파골세포로의 분화가 촉진되는 것으로 보고되어 있다[12]. NFATc1는 RANKL에 의해 활성화된 TRAF6에 의해 유도되는 NF- κ B 및 JNK pathway의 과정을 거쳐 발현되는 유전자로 파골세포 분화에 필수적인 요소이다[28]. CK는 파골세포에서 분비되는 cysteine protease로, 골 흡수 과정에서 콜라겐과 기질 단백질을 감소시키는 역할을 한다. 반면에 CK가 감소되면 조골세포에 의한 골 형성이 촉진된다[7, 11]. 따라서 본 연구에서는 풀무치 에탄올 추출물과 RANKL을 처리한 후 RAW264.7 세포로부터 RNA를 분리하여 파골세포 분화 관련된 유전자의 발현 변화를 확인하였다(Fig. 3).

그 결과 RANKL을 단독 처리하여 파골세포 분화관련 유전자의 발현이 증가하는 것으로 확인 하였으며, 풀무치 추출물 처리에 의해 각 유전자의 발현이 농도 의존적으로 억제되는 것을 확인 하였다. 따라서 풀무치 추출물은 파골세포 분화와 관련된 TRAP, RANK, NFATc1 및 CK 유전자 발현에 영향을 미치며 그에 따라 파골세포 분화 억제 효능을 가지는 것으로 판단된다.

풀무치 에탄올 추출물의 파골세포 분화 관련 단백질 발현에 미치는 영향

풀무치 에탄올 추출물과 RANKL을 처리한 후, RAW264.7 세포로부터 단백질을 추출하여 파골세포 분화와 관련된 단백질

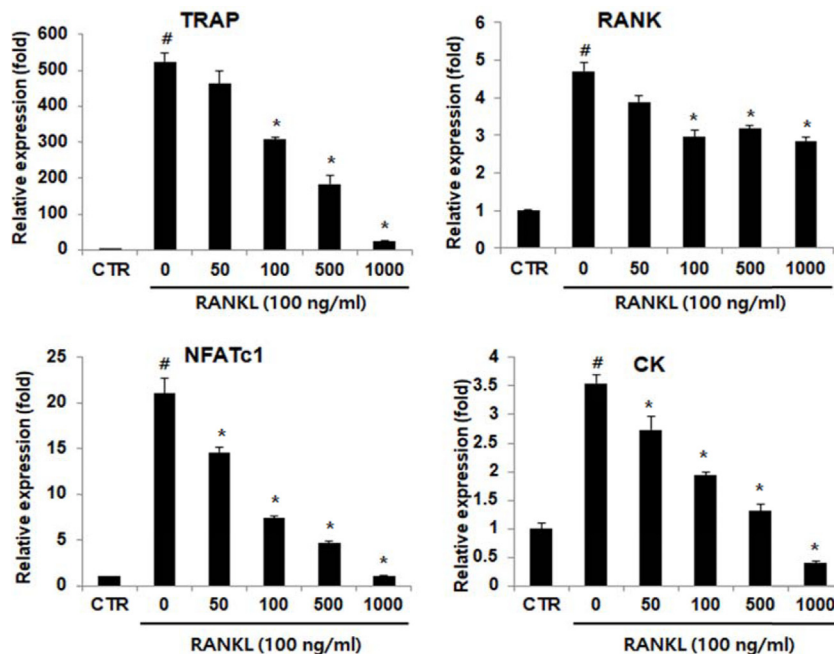


Fig. 3. Effect of *Locusta migratoria* extract on osteoclastogenesis related gene expression. Raw264.7 cells were seeded into 6-well plate (1.0×10^5 cells/well), and then treated with LME (50-1,000 $\mu\text{g/ml}$) and RANKL (100 ng/ml). RNA was isolated at 3 days after the sample treatment. The levels of mRNA expression were determined by quantitative real-time RT-PCR. The data were normalized to Gapdh. Results are shown as the mean \pm SD. [#] $p < 0.05$, compared with the control. ^{*} $p < 0.05$, compared with the RANKL only. CTR, control; RANKL, 100 ng/ml RANKL; LME, *Locusta migratoria* ethanol extract.

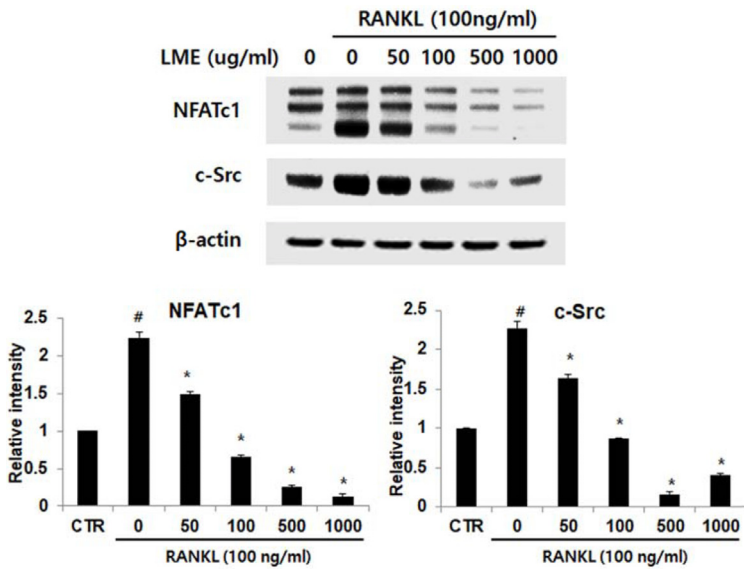


Fig. 4. Effect of *Locusta migratoria* extract on osteoclastogenesis related protein expression. Raw264.7 cells were seeded into 6-well plate (1.0×10^5 cells/well), and then treated with LME (50-1,000 $\mu\text{g/ml}$) and RANKL (100 ng/ml). Protein was isolated at 3 days after the sample treatment. The expression levels of NFATc1 and c-Src protein were determined by Western blot. The data were normalized to β -actin. Results of densitometric analysis of western blot are graph of down. Results are shown as the mean \pm SD. # $p < 0.05$, compared with the control. * $p < 0.05$, compared with the RANKL only. CTR, control; RANKL, 100 ng/ml RANKL; LME, *Locusta migratoria* ethanol extract.

발현의 변화를 확인하였다(Fig. 4). NFATc1 단백질은 RANKL 처리에 의해 발현량이 2배 이상 증가하였고 풀무치 에탄올 추출물에 의해 발현량이 현저하게 감소하였다. 이는 앞서 확인한 NFATc1 유전자 발현과 유사한 경향을 나타내었다. c-Src는 파골세포에 존재하는 단백질로 mature osteoclast에서 골 흡수 활성을 조절하는 역할을 하며, NFATc1에 의해 조절되는 여러 유전자 중 하나이다[14, 36]. RANKL만 처리한 군에서 c-Src 단백질 발현량이 증가하였으나 풀무치 에탄올 추출물을 함께 처리한 경우 단백질 발현량이 현저히 감소함을 확인할 수 있었다. 따라서 풀무치 에탄올 추출물의 파골세포 분화 억제효능은 분화관련 단백질인 NFATc1 및 c-Src 단백질 발현의 조절을 통해 이루어진 것으로 판단된다.

풀무치 에탄올 추출물의 파골세포 분화 억제 기작 확인

풀무치 에탄올 추출물이 파골세포 분화에 영향을 미치는 신호전달 기작을 확인하기 위해 Raw264.7 세포에 풀무치 에탄올 추출물을 1시간 전처리한 후 RANKL을 20분간 처리하고 단백질을 추출하여 파골세포 분화 신호전달에 관련된 단백질들의 변화를 관찰하였다(Fig. 5). 파골전구세포로 사용된 Raw 264.7세포에 RANKL을 처리하면 RANK를 통하여 TRAF6를 활성화시키며, 활성화된 TRAF6는 MAPKs (p38, ERK 및 JNK)와 NF- κ B의 신호전달경로를 활성화함으로써 NFATc1, TRAP 및 CK 등과 같은 파골세포 분화 관련 인자의 발현을 증가시키는 것으로 보고되어 있다[16, 25]. 따라서 본 연구에서는 풀무치 추출물이 파골세포 분화 신호전달 기작인 MAPKs 및 NF- κ B 신호전달경로에 미치는 영향을 Western blot을 통하여 확인하였다. 그 결과 MAP kinase인 ERK, JNK 및 p38의 인산화가 RANKL 처리에 의해 증가한 것을 확인하였으나 풀무치 에탄올 추출물을 함께 처리한 경우 ERK 및 JNK의 인산화가 억제됨을 확인할 수 있었다. 그러나 풀무치 추출물은 p38의 인산

화에는 영향을 미치지 않는 것으로 확인되었다. 이러한 결과는 라즈베라트롤의 유사체인 Pterostilbene을 이용한 연구 결과[21]와 유사하게 풀무치 추출물은 RANKL에 의해 유도된

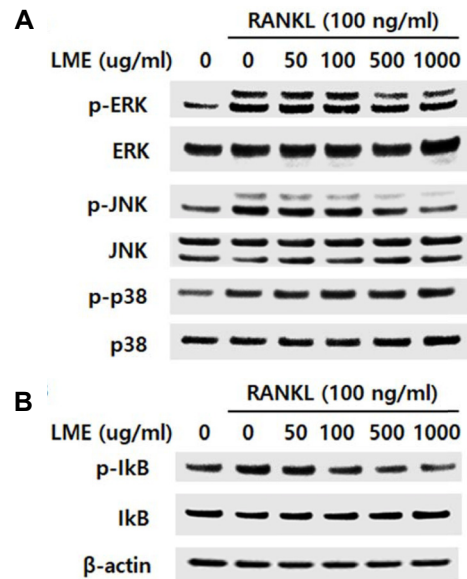


Fig. 5. Mechanism of inhibitory effects of *Locusta migratoria* extract on osteoclastogenesis. Raw264.7 cells were seeded into 6-well plate (1.0×10^5 cells/well), and then treated with LME (50-1,000 $\mu\text{g/ml}$) and RANKL (100 ng/ml). Protein was isolated at 20 min after the sample and RANKL treatment. (A) Inhibitory effects of RANKL-induced phosphorylation of MAPK signaling. (B) Inhibitory effects of RANKL-induced NF- κ B activity. The expression levels of proteins were determined by western blot. The data were normalized to β -actin. CTR, control; RANKL, 100 ng/ml RANKL; LME, *Locusta migratoria* ethanol extract.

MAPK 중 JNK와 ERK의 인산화 억제를 통해 파골세포 분화를 조절하는 것으로 사료된다. 다음으로 파골세포 분화에 영향을 미치는 NF- κ B의 활성화를 확인하기 위하여 I κ B의 인산화 및 proteasome에 의한 분해 정도를 관찰하였다. 그 결과 RANKL 처리에 의한 I κ B의 인산화가 풀무치 추출물의 농도에 의존적으로 감소함을 확인 하였으며, RANKL 처리에 의해 감소한 I κ B 단백질의 양 또한 회복됨을 확인 할 수 있었다. 이러한 결과는 풀무치 에탄올 추출물이 파골세포 분화의 주요 매커니즘인 MAPKs (ERK 및 JNK)와 NF- κ B 신호전달경로의 인산화 및 활성화 억제를 통해 파골세포 분화를 조절하는 것으로 판단된다. 본 연구의 결과에 따라 풀무치 에탄올 추출물은 골 흡수 과정 억제를 통해 골다공증 예방 및 치료에 도움을 줄 수 있는 새로운 의약품 소재개발에 이용 가능할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 어젠다 사업(과제 번호: PJ01311002)의 지원에 의해 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

References

- Baek, M., Seo, M., Kim, M. A., Yun, E. Y. and Hwang, J. S. 2017. The antioxidant activities and hair-growth promotion effects of *Tenebrio molitor* larvae extracts (TMEs). *J. Life Sci.* **27**, 1269-1275.
- Baek, M., Seo, M., Lee, J. H., Kim, I. W., Kim, M. A. and Hwang, J. S. 2018. Osteoblast activity of *Locusta migratoria* ethanol extracts on the MG-63 osteoblastic cell. *J. Life Sci.* **28**, 1448-1454.
- Ballanti, P., Minisola, S., Pacitti, M. T., Scarnecchia, L., Rosso, R., Mazzuoli, G. F. and Bonucci, E. 1997. Tartrate-resistant acid phosphate activity as osteoclastic marker: sensitivity of cytochemical assessment and serum assay in comparison with standardized osteoclast histomorphometry. *Osteoporosis Int.* **7**, 39-43.
- Boyle, W. J., Simonet, W. S. and Lacey, D. L. 2003. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* **423**, 337-342.
- Chao, D., Bahl, P., Houlbrook, S., Hoy, L., Harris, A. and Austyn, J. M. 1999. Human cultured dendritic cells show differential sensitivity to chemotherapy agents as assessed by the MTS assay. *Br. J. Cancer* **81**, 1280-1284.
- Clarkson, C., Miroso, M. and Birch, J. 2018. Potential of extracted *Locust migratoria* protein fractions as value-added ingredients. *Insects* **9**, 20.
- Fuller, K., Lawrence, K. M., Ross, J. L., Grabowska, U. B., Shiroo, M., Samuelsson, B. and Chambers, T. J. 2008. Cathepsin K inhibitors prevent matrix-derived growth factor degradation by human osteoclasts. *Bone* **42**, 200-211.
- Han, S. M., Lee, S. H., Yun, C. Y., Kang, S. W., Lee, K. G., Kim, I. S., Yun, E. Y., Lee, P. J., Kim, S. Y. and Hwang, J. S. 2006. Inhibition of nitric oxide production by ladybug extracts (*Harmonia axyridis*) in LPS-activated BV-2 cells. *Kor. J. Appl. Entomol.* **45**, 31-36.
- Hitoshi, H., Eiko, S., Kazuhiro, K., Kan, S., Ken-ichiro, M., Hideki, K., Noriaki, Y. and Koji, N. 2002. U0126 and PD98059, specific inhibitors of MEK, accelerate differentiation of RAW264.7 cells into osteoclast-like cells. *J. Biol. Chem.* **277**, 47366-47372.
- Ikeda, F., Nishimura, R., Matsubara, T., Tanaka, S., Inoue, J. I. and Reddy, S. V. 2004. Critical roles of c-Jun signaling in regulation of NFAT family and RANKL-regulated osteoclast differentiation. *J. Clin. Investig.* **114**, 475-484.
- Kang, M. R., Jo, S. A., Yoon, Y. D., Park, K. H., Oh, S. J., Yun, J., Lee, C. W., Nam, K. H., Kim, Y., Han, S. B., Yu, J., Rho, J. and Kang, J. S. 2014. Agelastin D suppresses RANKL-induced osteoclastogenesis via down-regulation of c-Fos, NFATc1 and NF- κ B. *Mar. Drugs* **12**, 5643-5656.
- Keigo, A., Yoshitaka, Y., Yoshiaki, D., Takashi, K., Tomokazu, H., Kanchu, T., Hisashi, S., Kuniaki, S. and Yoshimasa, K. 2012. Effect of bisphosphonates on osteoclastogenesis in RAW264.7 cells. *Int. J. Mol. Med.* **29**, 1007-1015.
- Kim, D. G., Kim, M. H., Kang, M. J. and Shin, J. H. 2015. Effect of spinach extract on RANKL-mediated osteoclast differentiation. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **44**, 532-539.
- Kim, J. H., Kim, M., Jung, H. S. and Sohn, Y. 2019. *Leonurus sibiricus* L. ethanol extract promotes osteoblast differentiation and inhibits osteoclast formation. *Int. J. Mol. Med.* **44**, 913-926.
- Kim, S. Y., Son, Y. J., Kim, S. H., Kim, A. N., Lee, G. Y. and Hwang, I. K. 2015. Studies on oxidative stability of *Tenebrio molitor* larvae during cold storage. *Kor. J. Food Cook. Sci.* **31**, 62-71.
- Lee, C. H., Kwak, S. C., Kim, J. Y., Oh, H. M., Rho, M. C., Yoon, K. H., Yoo, W. H., Lee, M. S. and Oh, J. 2014. Genipin inhibits RANKL-induced osteoclast differentiation through proteasome-mediated degradation of c-Fos protein and suppression of NF- κ B activation. *J. Pharmacol. Sci.* **124**, 344-353.
- Lee, S. M., Kim, M. G., Lee, S. Y. and Kang, T. H. 2010. Effects of *Artemisia princeps* extract on bone metabolism. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **39**, 363-368.
- Lee, Z. H. and Kim, H. H. 2003. Signal transduction by receptor activator of nuclear factor kappa B in osteoclasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **305**, 211-214.
- Mariod, A. A., Saseed Mirghani, M. E. and Hussein, I. 2017. Unconventional oilseeds and oil sources, pp. 293-297, Cambridge, MA, USA.
- Mohamed, E. H. A. 2015. Determination of Nutritive value of edible migratory locust *Locusta migratoria*, Linnaeus, 1758 (Orthoptera: Acrididae). *Int. J. Adv. Pharm. Biol. Chem.* **4**, 144-148.
- Nikhil, K., Sharan, S. and Roy, P. 2015. A pterostilbene derivative suppresses osteoclastogenesis by regulating RANKL-mediated NF κ B and MAPK signaling in RAW264.7 cells. *Pharmacol. Rep.* **67**, 1264-1272.
- Oonincx, D. G. A. B. and Van Der Poel, A. F. B. 2011. Effects of diet on the chemical composition of migratory locusts (*Locusta migratoria*). *Zoo Biol.* **30**, 9-16.

23. Park, J. S. and Lim, H. H. Effects of *Pyrola japonica* extracts on osteoclast differentiation and bone resorption. *J. Kor. Med. Rehabil.* **29**, 135-147.
24. Paul, A., Frederich, M., Megido, R. C., Alabi, T., Malik, P., Uyttenbroeck, R., Francis, F., Bleccker, C., Haubruge, E. and Lognay, G. 2017. Insect fatty acids: A comparison of lipids from three Orthopterans and *Tenebrio molitor* L. larvae. *J. Asia-Pac. Entomol.* **20**, 337-340.
25. Rahman, M. M., Bhattacharya, A. and Fernandes, G. 2006. Conjugated linoleic acid inhibits osteoclast differentiation of RAW264.7 cells by modulating RANKL signaling. *J. Lipid Res.* **47**, 1739-1748.
26. Seo, J. H., Park, J. Y., Jeon, M. J., Cho, Y. I. and Jeon, M. S. 2018. Perception and selection attributes of edible insects intake in adults in Daejeon and Chungnam area. *Culi. Sci. Hos. Res.* **24**, 170-182.
27. Takayanagi, H. 2007. The role of NFAT in osteoclast formation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1116**, 227-237.
28. Takayanagi, H., Kim, S., Koga, T., Nishina, H., Isshiki, M. and Yoshida, H. 2002. Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts. *Dev. Cell* **3**, 889-901.
29. Thompson, W. R., Rubin, C. T. and Ribin, J. 2012. Mechanical regulation of signaling pathways in bone. *Gene* **503**, 179-193.
30. Thummuri, D., Jeengar, M. K., Shrivastava, S., Nemani, H., Ramavat, R. N., Chaudhari, P. and Naidu, V. G. M. 2015. Thymoquinone prevents RANKL-induced osteoclastogenesis activation and osteolysis in an *in vivo* model of inflammation by suppressing NF- κ B and MAPK signaling. *Pharmacol. Res.* **99**, 63-73.
31. Turkez, H., Incekara, U., Guner, A., Aydin, E., Dirican, E. and Togar, B. 2012. The cytogenetic effects of the aqueous extracts of migratory locust (*Locusta migratoria* L.) *in vitro*. *Toxicol. Ind. Health* **30**, 233-237.
32. Väänänen, H. K. and Laitala-Leinonen, T. 2008. Osteoclast lineage and function. *Arch. Biochem. Biophys.* **473**, 132-138.
33. Van Huis, A., Van Itterbeek, J., Klunder, H., Mertens, E., Halloran, A., Muir, A. and Vantomme, P. 2013. Edible insects: Future prospects for food and feed security. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.
34. Walsh, M. C., Kim, N., Kadono, Y., Rho, J., Lee, S. Y., Lorenzo, J. and Choi, Y. 2006. Osteoimmunology: interplay between the immune system and bone metabolism. *Annu. Rev. Immunol.* **24**, 33-63.
35. Zeng, X. Z., He, L. G., Wang, S., Wang, K., Zhang, Y. Y., Tao, L., Li, X. J. and Liu, S. W. 2016. Aconine inhibits RANKL-induced osteoclast differentiation in RAW264.7 cells by suppressing NF- κ B and NFATc1 activation and DC-STAMP expression. *Acta Pharmacol. Sin.* **37**, 255-263.
36. Zungxia, Z., Jianzhong, S., Wei, C. and Yi-Pang, L. 2007. Osteoclast differentiation and gene regulation. *Front. Biosci.* **12**, 2519-2529.

초록 : RANKL 유도된 파골세포 분화에 대한 풀무치 에탄올 추출물의 분화 억제 효과

백민희[†] · 서민철[†] · 이준하 · 이화정 · 김인우 · 김선영 · 김미애 · 황재삼*
(농촌진흥청 국립농업과학원 농업생물부)

최근 노령인구의 증가로 고령화 사회로 접어들면서 골다공증과 같은 골 대사 질환이 사회적 문제로 대두되고 있다. 파골세포는 골 흡수 역할을 하는 세포이며 골 흡수가 강하게 일어나는 경우 골다공증이 유발된다. 그러나 현재 사용 중인 골 흡수 억제제는 장기간 사용 시 부작용이 발생할 수 있어, 파골세포 분화 억제에 효과가 있는 새로운 소재 개발이 필요한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 풀무치 에탄올 추출물을 대상으로 RANKL에 의해 유도된 파골세포 분화에 대한 억제 효능 확인 및 그 기작을 구명하고자 하였다. RAW264.7 파골세포에서 풀무치 추출물의 독성 및 증식 효과를 확인하기 위하여 MTS assay를 진행하였고 2,000 μ g/ml 농도까지 세포 독성은 확인되지 않았다. 풀무치 추출물이 파골세포의 분화에 미치는 영향을 확인하기 위해 3일 동안 RAW264.7 세포에 파골세포 분화 촉진제인 RANKL을 단독 처리 및 풀무치 추출물과 함께 처리한 후 TRAP 활성을 비교하였다. 그 결과 RANKL에 의해 증가한 파골세포 분화가 풀무치 추출물 처리에 의해 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인하였다. 파골세포 분화와 관련된 유전자(TRAP, RANK, NFATc1 및 CK)의 발현량 변화를 확인한 결과, RANKL 처리 시에 증가한 유전자 발현량이 풀무치 추출물 처리에 의해 현저하게 감소하는 것을 확인하였고, NFATc1, c-Src 와 같은 분화 관련 단백질 발현량 또한 풀무치 추출물 처리에 의해 감소하였다. 풀무치 에탄올 추출물은 NF- κ B, ERK 및 JNK 신호전달에 영향을 미쳐 그 결과로 파골세포 분화 억제 효과가 나타나는 것으로 판단된다. 이러한 결과로 보아 풀무치 에탄올 추출물은 골 흡수를 억제하는 역할을 함으로써 골다공증 예방 및 치료를 위한 새로운 기능성 소재로 사용 가능성이 있음을 확인하였다.