

Inhibitory Effects of *Tenebrio molitor* Larvae Ethanol Extract on RANKL-Induced Osteoclast Differentiation

Minchul Seo^{†*}, Minhee Baek[†], Hwa Jeong Lee, Yong Pyo Shin, Joon Ha Lee, In-Woo Kim, Mi-Ae Kim and Jae-Sam Hwang

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

Received September 4, 2020 / Revised November 5, 2020 / Accepted November 6, 2020

The balance between bone-resorbing osteoclasts and bone-forming osteoblasts is key to bone health. An imbalance between osteoclasts and osteoblasts leads to various bone-related disorders, such as osteoporosis, osteomalacia, and osteopetrosis. However, the bone-resorption inhibitor drugs that are currently used may cause side effects. Natural substances have recently received much attention as therapeutic drugs for the treatment of bone health. This study was designed to determine the effect of *Tenebrio molitor* larvae ethanol extract (TME) on receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL)-induced osteoclast differentiation. To measure the effect of TME on osteoclast differentiation, RAW264.7 cells were treated with RANKL with or without TME for 5 days. The tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) activity was significantly inhibited by treatment of TME without cytotoxicity up to 2 mg/ml. In addition, TME effectively suppressed expression of osteoclast differentiation-related marker genes and proteins such as TRAP, NFATc1, and c-Src. TME also significantly inhibited the p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway without affecting ERK and JNK signaling in RANKL-induced RAW264.7 cells. Consequently, we conclude that TME suppresses osteoclast differentiation by inhibiting RANKL-induced osteoclastogenic genes expression through the p38 MAPK signaling pathways. These results suggest that TME and its bioactive components are potential therapeutics for bone-related diseases such as osteoporosis.

Key words : NFATc1, osteoclast, osteoporosis, RANKL, *Tenebrio molitor*

서 론

골다공증은 골 형성보다 골 흡수가 증가되어 발생하는 대사성 골 질환으로 특별한 증상이 없이 뼈의 강도를 약화시켜 골절의 위험성을 증가시킨다. 특히 나이가 들면서 진행되는 양상을 보이므로 고령 인구가 증가할수록 예방과 치료에 대한 사회적인 관심이 증가하고 있다. 뼈는 동적인 조직으로 뼈를 지속적으로 흡수하는 파골세포와 새로운 뼈를 형성하는 조골세포의 균형으로 양질의 뼈가 지속적으로 유지되기 때문에 이들의 균형이 매우 중요하다[20].

그러나 골 파괴의 중요한 역할을 담당하는 파골세포의 기능이 비정상적으로 항진된 경우 골 파괴가 증가되어 골다공증이 야기되며 이러한 현상은 류마티스 관절염 같은 염증성 질환의 골 소실과 밀접한 연관이 있다[7]. 파골세포는 조혈모세포에서

유래되는 전구세포인 단핵 및 대식세포에서 분화되어 발생하는 다핵세포로서 조골세포와 함께 골격계 형성에 필수적인 세포이다[26]. 파골세포의 분화는 조골세포가 활성화되어 발현되는 Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL) 과 파골전구세포의 표면에 존재하는 Receptor activator of nuclear factor- κ B (RANK)의 결합에 의해 시작되며, 이러한 결합은 세포질내의 TNF receptor-associated factor (TRAF6)를 통해 파골세포 분화에 중요한 전사 인자인 Nuclear factor κ B (NF- κ B), c-Fos, Nuclear factor of activated T-cells c1 (NFATc1) 등의 발현을 증가시켜 파골세포의 성숙을 야기한다[21, 25]. 현재 임상적으로 파골세포의 기능을 조절하여 골 흡수를 줄이는 치료에 대표적인 약물은 Bisphosphonate 계열의 약물이다[20]. Bisphosphonate 계열 약물의 주된 작용은 파골세포가 작용하는 지점에서 파골세포의 기능을 기계적으로 저해하며 파골세포의 세포사멸을 유도하는 것이며, 일부 파골세포의 분화를 억제하는 기능을 가지고 있는 것으로 보고되어 있다. 그러나 Bisphosphonate 계열 약물은 식도염이나 하악골의 무혈성 괴사로 인한 부작용 등이 있어 사용에 제한이 있다[1, 11]. 따라서 기존의 치료제들은 임상적 적용에 주의가 필요하여 보다 안전하고 효과적인 골다공증 치료제 개발 후보군으로서 천연물에 대한 관심이 증가하고 있으며 두충, 오미자, 백출, 목향, 복분자, 녹용 추출물들이 파골세포 분화를 억제하

[†] Authors contributed equally.

*Corresponding author

Tel : +82-63-238-2991, Fax : +82-63-238-3833

E-mail : nansmc@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.

여 골다공증의 치료 후보 천연물이 될 수 있다는 연구 결과가 보고되었다[5, 15].

갈색거저리(*Tenebrio molitor*)는 딱정벌레목(Coleoptera) 거저리과(Tenebrionidae)의 곤충으로 갈색거저리의 유충은 대표적인 식용곤충이다. 최근 갈색거저리 유충의 분말을 이용하여 패티, 파스타 및 전식 등 식품에 적용하는 연구[13, 14, 18]가 선행되었으며 갈색거저리 추출물의 항산화, 항균 및 항염 효과[2, 27] 등이 보고된 바 있으나 뼈에 대한 효능이나 골다공증 치료제로서의 가능성에 대해서는 보고된 바가 없다. 따라서 본 연구에서는 갈색거저리 유충 추출물의 파골세포 분화와 파골세포 기능 활성화에 관여하는 인자들에 대한 효과를 평가하고자 RANKL로 자극한 RAW264.7 세포가 파골세포로 분화하는 과정에 미치는 영향과 관련 유전자의 발현을 측정함으로써 갈색거저리 추출물의 골다공증 개선 효능을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

갈색거저리 유충 에탄올 추출물(TME) 제조

본 연구에 사용한 갈색거저리(*Tenebrio molitor*) 유충은 전라남도 담양 소재 갈색거저리 사육농가에서 구입하여 사용하였다. 수분함량이 3.5%인 건조 갈색거저리 유충을 분쇄기로 분쇄한 후 분말로 사용하였으며, 제조한 분말은 -70°C에서 냉동보관하여 실험에 사용하였다. 시료의 추출은 갈색거저리 유충 분말 1 g에 10 ml의 70% ethanol을 혼합하여 초음파 분쇄기(250 J, 10 s, twice)로 추출하고 추출된 물질을 필터로 거른 뒤 감압농축기(Tokyo Rikakikai, Japan)로 농축한 후 20% DMSO에 녹여 사용하였다.

세포주

마우스 대식세포주인 RAW264.7 세포는 ATCC (Manassas, 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

갈색거저리 유충 에탄올 추출물이 RAW264.7의 세포 생존율에 미치는 영향은 Chao 등[4]의 방법에 따라 확인하였다. RAW264.7에 대한 갈색거저리 유충 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 갈색거저리 유

충 에탄올 추출물을 0.1, 0.5, 1 및 2 mg/ml의 농도로 처리하여 1, 3, 5일 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

갈색거저리 유충 에탄올 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 24-well plate에 2.0×10⁴ cells/well로 분주하여 24시간 배양 후, 100 ng/ml RANKL과 함께 갈색거저리 유충 에탄올 추출물을 농도별(0.1, 0.5, 1 및 2 mg/ml)로 처리하여 5일간 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, UT, USA)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.

Real-time PCR

RAW264.7 세포를 1×10⁵ cells/well의 농도로 6-well plate에 분주하여 24시간 배양하였다. 그 후 100 ng/ml RANKL과 함께 갈색거저리 유충 에탄올 추출물을 농도별(0.1, 0.5, 1 및 2 mg/ml)로 처리하여 5일간 배양하였다. TRIzol reagent (Invitrogen, CA, 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 Life Sciences, NY, USA)를 사용하여 Real-time PCR 반응을 수행하였다. 측정하고자 하는 목적 유전자의 발현은 Gapdh의 발현량을 이용하여 정량화 하였다.

Western blot

RAW264.7 세포를 1×10⁵ cells/well의 농도로 6-well plate (SPL life sciences, Korea)에 분주하여 24시간 배양하였다. 그 후 100 ng/ml RANKL과 함께 갈색거저리 유충 에탄올 추출물을 농도별(0.1, 0.5, 1 및 2 mg/ml)로 처리하여 20분(MAPKs) 또는 5일(NFATc1, TRAP 및 c-Src)간 배양하였다. 배양이 끝난 후, 세포를 PBS (Caisson laboratories)로 세척한 뒤 protease와 phosphatase inhibitor cocktail이 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 transfer 하였다. 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 ± SD)로 나타냈다. 실험군 간의 유의성은 Student's t-test를 통해 검증하였고, p<0.05일 때 군 간의 차이가 유의적인 것으로 판단하였다.

결과 및 고찰

갈색거저리 유충 에탄올 추출물이 TRAP 활성화에 미치는 영향

Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP)는 성숙한 파골 세포에서 발현되는 것으로 리소좀에 다량 분포하며 TRAP 양성 세포는 파골세포로의 분화 여부를 판단하는 기준으로 세포 화학적 마커로 알려져 있다[3]. 따라서 본 연구에서는 TRAP 활성 측정 및 염색을 통하여 갈색거저리 유충 에탄올 추출물 (TME)이 파골세포 분화에 미치는 영향을 확인하였다. TRAP 활성 및 파골세포 분화와 관련된 실험들은 파골 전구세포 모델로 이용되고 있는 RAW264.7 세포를 이용하였다[28]. 파골 세포의 TRAP 활성은 무처리군인 CTR 군에 대한 RANKL (100 ng/ml) 단독 처리군 또는 갈색거저리 유충 에탄올 추출물을 농도별(0.1, 0.5, 1 및 2 mg/ml)로 함께 처리한 실험군의 비율로 나타내었다(Fig. 1). 파골세포의 분화를 유도하는 RANKL을 단독으로 처리한 군에서 TRAP 활성이 무처리 군에 비해 약 1.8배 정도 증가하였으나 갈색거저리 유충 에탄올 추출물을 함께 처리한 군에서는 추출물 농도에 의존적으로 TRAP 활성이 현저히 감소함을 확인할 수 있었다(Fig. 1A). 또한 RANKL만 처리한 군에서는 RAW264.7 세포가 다핵세포로 분화되었으며, 많은 세포들이 붉은색으로 염색된 반면 갈색거저리 유충 에탄올 추출물을 농도별로 처리한 경우에는 다핵세포의 개수 및 면적이 감소하면서 붉은색으로 염색된 정도도 연하게 나타나는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1B). 이러한 결과는 갈색거저리 유충 에탄올 추출물이 RANKL에 의해 증가되는 TRAP 활성을 감소시키고, 이를 통한 파골세포의 분화 억제효과가 있음을 확인할 수 있었다.

갈색거저리 유충 에탄올 추출물의 파골세포 증식 및 독성 평가

갈색거저리 유충 에탄올 추출물(TME)이 RAW264.7 세포의 증식 및 독성에 미치는 영향을 확인하기 위하여 TME를 단독 및 RANKL과 함께 농도별로 24시간 처리한 후 MTS assay를 통해 세포의 증식 및 독성을 확인하였다. 그 결과, 파골세포 분화조건인 RANKL 처리 조건에서는 RANKL 처리에 의해 세포의 증식이 감소되었으나 TME 처리에 의해 농도의존적으로 세포의 증식이 촉진되는 것을 확인할 수 있었으며, TME를 단독으로 5일 동안 처리한 경우도 3 mg/ml 농도까지 세포독성은 나타나지 않았으며 배양초기에 5~15% 세포 증식효과를 확인할 수 있었다(Fig. 1D). 따라서 이후의 실험들은 TME에 의한 세포독성이 없으며 세포 보호 효능을 나타내는 것으로 확인된 2 mg/ml 이하의 농도에서 수행하였다.

갈색거저리 유충 추출물이 파골세포 분화 관련 유전자 발현에 미치는 영향

파골 전구세포인 RAW264.7 세포에 RANKL을 처리할 경우 Tumor necrosis factor receptor (TNFR) superfamily의 일종으

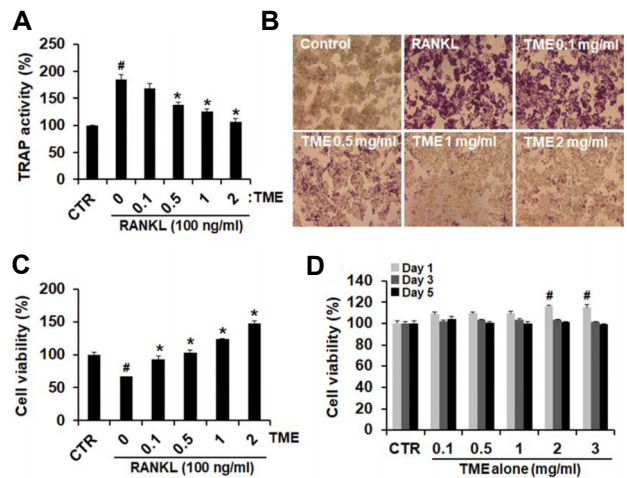


Fig. 1. Anti-osteoclastogenic effect of *Tenebrio molitor* larvae extract (TME) on the RAW 264.7 macrophages. RAW264.7 macrophages were seeded into 24-well plate (2.0×10^4 cells/well), and then treated with TME (0.1-2 mg/ml) and RANKL (100 ng/ml) for 5 days. TRAP activity was measured by spectro-photometric method (A). Cells were stained with TRAP solution after fixation (B). Cytotoxicity of TME was determined using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS) assay. Cells were seeded at a density of 4×10^4 cells/well in a 96 well-plate and treated with TME for 1~5 days with (C) or without (D) RANKL. Results are presented as mean ± standard deviation (SD) of triplicate. #p-value of <0.05 indicates significant difference from control (CTR). *p-value of <0.05 indicates significant difference from RANKL treated control without TME.

로 파골 전구세포에서 발현되는 RANK를 통하여 파골세포 분화 신호전달이 시작되고, 그 결과 분화와 관련된 주요 유전자인 c-Fos, NFATc1, TRAP 및 CtsK (CathepsinK) 등의 유전자 발현이 유도된다[12, 16]. c-Fos는 파골세포 분화 초기 단계에 중요한 전사 인자로 NFATc1 발현을 촉진하는 것으로 알려져 있으며, NFATc1는 RANKL/RANK 복합체에 의해 활성화된 TRAF6를 통해 NF- κ B 및 MAPKs pathway를 거쳐 발현되는 유전자로 파골세포 분화에 필수적인 요소이다[23, 24]. CtsK는 파골세포에서 합성되고 분비되는 cysteine protease로, 골 흡수 과정에서 콜라겐과 기질 단백질을 감소시키는 역할을 하며 CtsK의 발현이 억제된 경우에는 조골세포에 의한 골 형성이 촉진된다[9, 10]. 따라서 본 연구에서는 RANKL에 의해 유도되는 파골세포 분화의 중요 인자인 NFATc1, TRAP, 그리고 CtsK 유전자 발현에 갈색거저리 에탄올 추출물이 미치는 영향을 검토하였다(Fig. 2).

그 결과 RANKL을 단독으로 처리한 RAW264.7 세포에서 파골세포 분화 관련 유전자의 발현이 현저히 증가하는 것이 확인되었으며, 갈색거저리 유층 에탄올 추출물의 처리에 의해 유전자의 발현이 추출물 처리농도에 의존적으로 억제되는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 갈색거저리 유층 에탄올 추출물이 파골세포 분화와 관련된 TRAP, NFATc1 및 CtsK 유전자 발현에 영향을 미치며 그에 따라 파골세포 분화 억제 효능을 나타낸 것으로 판단된다.

갈색거저리 유층 추출물이 파골세포 분화 관련 단백질 발현에 미치는 영향

파골세포 분화 및 활성화에 RANKL과 RANK의 결합은 필수적인 단계이며, 이를 통해 c-Fos 및 NFATc1의 발현이 증가하게 되는 경로가 파골세포 분화의 주요 기전으로 보고되어 있다[23, 24]. 이들 중 NFATc1은 파골세포 분화의 조절인자로

서 TRAF6, NF- κ B, AP-1에 의존적으로 발현되고 세포질에 존재하며, calcineurin이라 불리는 phosphatase에 의해서 활성화되어 핵으로 이동하여 파골세포에 특이적인 유전자인 TRAP 및 CtsK 등의 발현을 촉진시킨다[23]. c-Src 단백질은 세포의 성장과 분화, 생존 등에 중요한 역할을 하는 비수용체형 protein-tyrosine kinases (PTK)의 하나로서 파골세포가 기능하는데 필요한 골격화를 도와 뼈가 잘 흡수되도록 함으로써 골다공증을 유도하는 것으로 보고되어 있다[8, 17, 22].

따라서 본 연구에서는 갈색거저리 유층 에탄올 추출물을 1시간 전처리한 RAW264.7 세포에 RANKL을 5일간 처리하여 파골세포 분화를 유도한 후 단백질을 분리하여 파골세포 분화와 관련된 단백질의 발현 변화를 관찰하였다(Fig. 3). 그 결과 NFATc1 단백질은 RANKL 단독처리군에서 무처리군에 비해 발현량이 4배 이상 증가하였으며 이와 유사하게 TRAP 및 c-Src의 발현량 또한 RANKL에 의해 현저히 증가됨을 확인할 수 있었다. 그러나 RANKL에 의한 파골세포 분화 관련 단백질 발현의 증가는 갈색거저리 유층 에탄올 추출물 처리에 의해 농도의존적으로 무처리군 수준까지 발현이 억제됨을 확인하였으며, 이는 앞서 확인한 유전자 발현 결과와 일치됨을 확인하였다. 이러한 결과는 갈색거저리 유층 에탄올 추출물의 파골세포 분화 억제 효능은 분화 관련 단백질인 NFATc1, TRAP 및 c-Src 단백질 발현의 조절을 통해 이루어진 것으로 판단된다.

갈색거저리 유층 에탄올 추출물의 파골세포 분화 억제 기작 확인

RANKL은 파골세포의 표면에 발현되는 RANK와 결합한 후 TNF receptor associated factor (TRAF) 6와 같은 TRAF family 단백질 등의 집합을 유도하고, NF- κ B, Akt 와 MAPK 경로를 활성화시키는 작용을 하는 것으로 알려져 있다[6]. 특히 MAPK 신호 전달 경로는 p38, JNK, ERK 등을 포함하는데

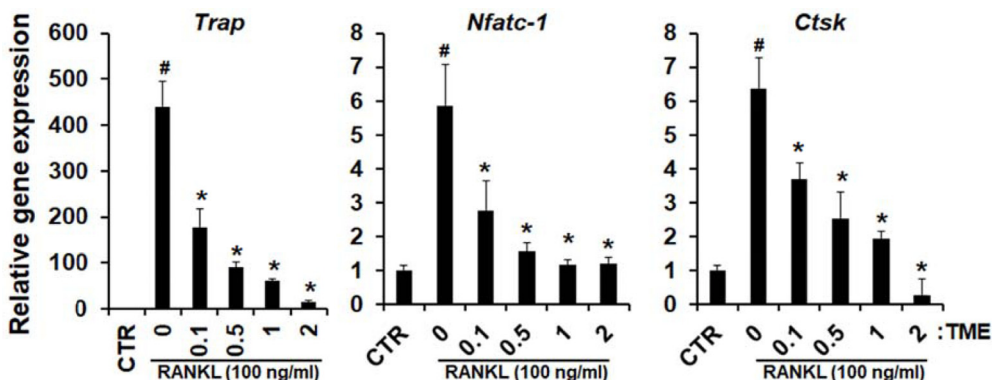


Fig. 2. Effect of *Tenebrio molitor* larvae extract on osteoclastogenesis related gene expression. RAW264.7 cells were seeded into 6-well plate (1.0×10^5 cells/well), and then treated with TME (0.1-2 mg/ml) and RANKL (100 ng/ml). RNA was isolated at 5 days after the sample treatment. The levels of mRNA expression were determined by quantitative real-time RT-PCR. The data were normalized to Gapdh. Results are shown as the mean \pm SD. [#]p-value of <0.05 indicates significant difference from control. ^{*}p-value of <0.05 indicates significant difference from RANKL only. Trap: Tartrate resistant acid phosphate; Nfatc-1: Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 1; Ctsk: Cathepsin K.

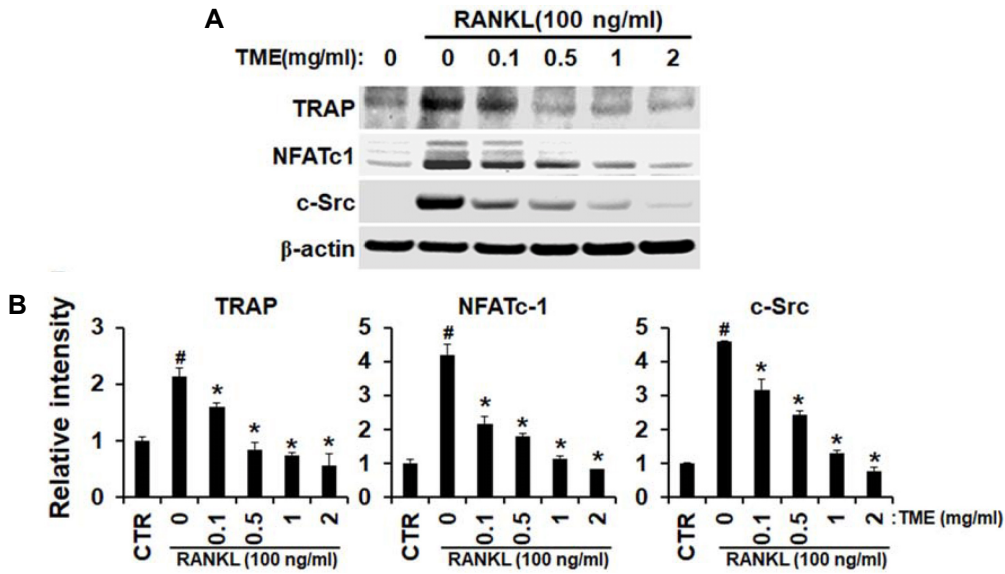


Fig. 3. Effect of *Tenebrio molitor* larvae extract on osteoclastogenesis related protein expression. RAW264.7 macrophages were seeded into 6-well plate (1.0×10^5 cells/well), and then treated with TME (0.1-2 mg/ml) and RANKL (100 ng/ml). Protein was extracted at 5 days after the sample treatment, and TRAP, NFATc-1 and c-Src protein were determined by Western blot (A). Results of densitometric analysis of western blot are also shown (B). The data were normalized to β -actin. Experiment was performed three times using independently prepared cell lysates; representative blots are shown. #p-value of <0.05 indicates significant difference from control. *p-value of <0.05 indicates significant difference from RANKL only.

p38 활성화가 파골세포 분화에 있어서 중요한 중간단계로 알려져 있으며 이외에 JNK도 파골세포의 분화와 생존에 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀져 있다[19].

따라서 본 연구에서는 갈색거저리 에탄올 추출물의 파골세포 분화 억제 신호전달 기작을 확인하기 위해 RAW264.7 세포에 TME를 1시간 전처리하고 RANKL을 20분간 처리한 후 세포로부터 단백질을 분리하여 파골세포 분화 신호전달에 관련된 MAPKs 단백질의 인산화를 관찰하였다(Fig. 4). 그 결과 MAP kinase인 ERK, JNK 및 p38의 인산화가 RANKL 처리에 의해 증가한 것을 확인하였으나 TME를 함께 처리한 경우 특

이적으로 p38의 인산화가 현저히 억제됨을 확인할 수 있었다. 그러나 ERK 및 JNK의 인산화에는 영향을 미치지 않는 것으로 확인되었다. 이러한 결과는 갈색거저리 에탄올 추출물이 파골세포 분화의 주요 매커니즘인 MAPKs 중 p38의 인산화 및 활성화 억제를 통해 파골세포 분화를 조절하는 것으로 판단된다. 따라서 본 연구에서 사용된 갈색거저리 에탄올 추출물은 골 재흡수를 담당하는 파골세포의 분화 억제 기작을 활용한 천연물 기반 골다공증 예방 및 치료에 도움을 줄 수 있는 의약품 소재개발에 이용 가능할 것으로 사료된다.

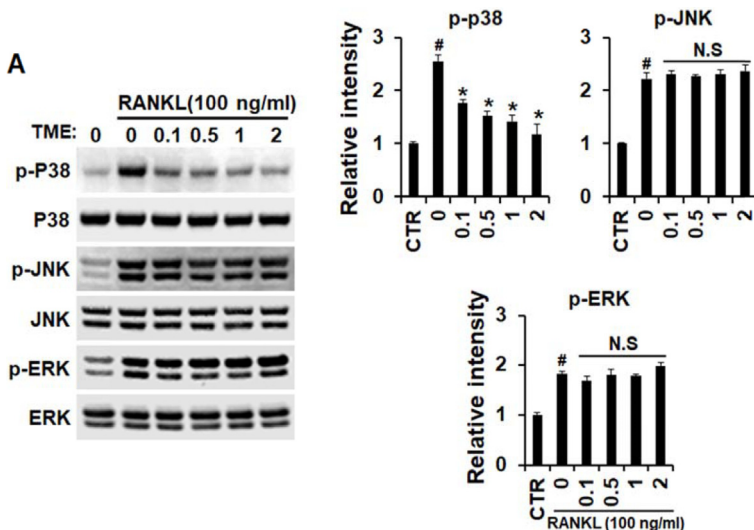


Fig. 4. Signaling mechanism of *Tenebrio molitor* larvae extract on osteoclastogenesis. RAW264.7 macrophages were seeded into 6-well plate (1.0×10^5 cells/well), and then treated with TME (0.1-2 mg/ml) and RANKL (100 ng/ml). Protein was extracted at 20 min after the RANKL treatment, and phosphorylation of p38, JNK, ERK, and AKT was detected using Western blot (A). Results of densitometric analysis of Western blot are also shown (B). Experiment was performed three times using independently prepared cell lysates; representative blots are shown. #p-value of <0.05 indicates significant difference from control (CTR). *p-value of <0.05 indicates significant difference from RANKL alone. N.S: Not significant.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 어젠다 사업(과제 번호: PJ01419801)의 지원에 의해 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

References

- Abrahamsen, B. 2010. Bisphosphonate adverse effects, lessons from large databases. *Curr. Opin. Rheumatol.* **22**, 404-409.
- Baek, M., Seo, M., Lee, J. H., Kim, I. W., Kim, M. A. and Hwang, J. S. 2018. Osteoblastogenic activity on *Locusta migratoria* ethanol extracts on pre-osteoblastic MG-63 cells. *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.
- 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.
- Choi K. H., Yoo J. E., Hwang, G. S. and Yoo, D. Y. 2012. Effect of *Cordyceps militaris* (CM) on osteoclastogenesis and gene expression. *J. Orient. Obstet. Gynecol.* **25**, 16-26.
- Darnay, B. G., Haridas, V., Ni, J., Moore, P. A. and Aggarwal, B. B. 1998. Characterization of the intracellular domain of receptor activator of NF-kappaB (RANK). Interaction with tumor necrosis factor receptor-associated factors and activation of NF-kappaB and c-Jun N-terminal kinase. *J. Biol. Chem.* **273**, 20551-20555.
- Delmas, P. D. 2005. The use of bisphosphonates in the treatment of osteoporosis. *Curr. Opin. Rheumatol.* **17**, 462-466.
- Fu, J., Tao, Y. D., Chen, J., Zhang, Y. and He, J. 2016. Role of RANKL in the regulation of NFATc1 and cSrc mRNA expression in osteoclastlike cells. *Mol. Med. Rep.* **13**, 5163-5168.
- 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.
- 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-κB. *Drugs* **12**, 5643-5656.
- Khosla, S., Burr, D., Cauley, J., Dempster, D. W., Ebeling, P. R., Felsenberg, D., Gagel, R. F., Gilsanz, V., Guise, T., Koka, S., McCauley, L. K., McGowan, J., McKee, M. D., Mohla, S., Pendry, D. G., Raisz, L. G., Ruggiero, S. L., Shafer, D. M., Shum, L., Silverman, S. L., Van Poznak, C. H., Watts, N., Woo, S. B. and Shane, E. 2007. Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: report of a task force of the American Society for Bone and Mineral Research. *J. Bone Miner. Res.* **22**, 1479-1491.
- 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, H. M., Kim, J. N., Kim, J. S., Jeong, M. Y., Yun, E. Y., Hwang, J. S. and Kim, A. J. 2015. Quality characteristics of patty prepared with mealworm powder. *Kor. J. Food Nutr.* **28**, 813-820.
- Kim, S. H., Kim, K. B., Noh, J. S., Yun, E. Y. and Choi, S. K. 2014. Quality characteristics of Pasta with addition of mealworm (*Tenebrio molitor*). *FoodServ. Ind. J.* **10**, 55-64.
- Kwak, H. B., Kim, J. H., Kim, D. J., Kwon, Y. M., Oh, J. M. and Kim, Y. K. 2008. Effect of water extract of deer antler in osteoclast differentiation. *Kor. J. Orient. Physiol. Pathol.* **22**, 891-895.
- Lowe, C., Yoneda, T., Boyce, B. F., Chen, H., Mundy, G. R. and Soriano, P. 1993. Osteopetrosis in Src-deficient mice is due to an autonomous defect of osteoclasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**, 4485-4489.
- Park, J. H., Jeong, E., Lin, J., Ko, R., Kim, J. H., Yi, S., Choi, Y., Kang, I. C., Lee, D. and Lee, S. Y. 2019. RACK1 interaction with c-Src is essential for osteoclast function. *Exp. Mol. Med.* **51**, 86.
- Park, K. H. and Kim, G. Y. 2018. Quality and characteristic of manufacturing Sunsik with edible insect (mealworm). *Culi. Sci. Hos. Res.* **24**, 13-23.
- Partington, G. A., Fuller, K., Chambers, T. J. and Pondel, M. 2004. Mitf-PU.1 interactions with the tartrate-resistant acid phosphatase gene promoter during osteoclast differentiation. *Bone* **34**, 237-245.
- Rodan, G. A. and Martin, T. J. 2000. Therapeutic approaches to bone diseases. *Science* **289**, 1508-1514.
- Roodman, G. D. 2006. Regulation of osteoclast differentiation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1068**, 100-109.
- Sheng, M. H. and Lau, K. H. 2009. Role of protein-tyrosine phosphatases in regulation of osteoclastic activity. *Cell Mol. Life Sci.* **66**, 1946-1961.
- Takayanagi, H. 2007. Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 292-304.
- Takayanagi, H., Kim, S., Koga, T., Nishina, H., Isshiki, M., Yoshida, H., Saiura, A., Isobe, M., Yokochi, T., Inoue, J., Wagner, E. F., Mak, T. W., Kodama, T. and Taniguchi, T. 2002. Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts. *Dev. Cell* **3**, 889-901.
- Teitelbaum, S. L. and Ross, F. P. 2003. Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nat. Rev. Genet.* **4**, 638-649.

26. Väänänen, H. K. and Laitala-Leinonen, T. 2008. Osteoclast lineage and function. *Arch. Biochem. Biophys.* **473**, 132-138.
27. Yu, J. M., Jang, J. Y., Kim, H. J., Cho, Y. H., Kim, D. I., Kwon, O. J., Cho, Y. J. and An, B. J. 2016. Antioxidant capacity and Raw 264.7 macrophage anti-inflammatory effect of the *Tenebrio molitor*. *Kor. J. Food Preserv.* **24**, 890-898.
28. 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.

초록 : 갈색거저리 유충 에탄올 추출물이 RANKL에 의해 유도되는 파골세포 분화에 미치는 영향

서민철^{*†} · 백민희[†] · 이화정 · 신용표 · 이준하 · 김인우 · 김미애 · 황재삼
(농촌진흥청 국립농업과학원 농업생물부)

파골세포에 의한 뼈의 재흡수와 조골세포에 의한 뼈 형성의 균형은 뼈 건강에 매우 중요한 요소이다. 따라서 이들의 불균형은 골다공증, 골연화증 및 골석화증과 같은 다양한 골 질환을 유발할 수 있다. 특히 파골세포의 기능이 비정상적으로 항진된 경우 골 파괴가 증가되어 골다공증이 야기되며 이런 현상은 류마티스 관절염 같은 염증성 질환의 골 소실과 밀접한 연관이 있다. 그러나 현재 사용중인 골 흡수 억제제는 장기간 사용시 부작용이 보고되고 있어 천연물 소재를 기반으로한 새로운 골 흡수 억제제 개발이 요구되고 있다. 따라서 본 연구에서는 갈색거저리 유충 에탄올 추출물이 RANKL에 의해 유도되는 파골세포 분화에 미치는 영향을 확인하고 그 작용 기작을 구명하고자 하였다. 갈색거저리 유충 에탄올 추출물이 파골세포 분화에 미치는 영향을 조사하기 위하여 RAW264.7 세포에 RANKL을 단독 처리 및 추출물과 함께 5일간 처리한 후 TRAP 활성을 비교하였다. 그 결과 RANKL에 의해 증가한 파골세포 분화는 갈색거저리 유충 추출물 2 mg/ml 농도까지 세포독성 없이 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 또한 갈색거저리 추출물이 TRAP, NFATc1 및 CtsK와 같은 파골세포 분화 마커 유전자 및 단백질 발현량에 미치는 변화를 확인한 결과, RANKL 처리에 의해 현저히 증가한 이들 유전자가 갈색거저리 추출물에 의해 현저하게 감소하는 것을 확인하였다. 또한 갈색거저리 추출물의 파골세포 분화 억제 작용기작을 확인한 결과 mitogen activated protein kinases (MAPKs)중 p38의 신호 전달 억제 기작을 통하여 파골세포 분화가 억제됨을 확인 할 수 있었다. 이러한 결과로 보아 갈색거저리 유충 에탄올 추출물 및 그 생리활성 물질들은 골다공증과 같은 골 질환 치료 및 예방을 위한 잠재적 기능성 소재로 사용될 수 있음을 확인하였다.