

白薇의 파골세포 분화 및 관련 유전자 발현 억제에 미치는 영향

김홍식[#], 이수민, 김민선, 김재현, 강예진, 권성준
남영우, 유승우, 최홍석, 허선진, 손영주, 정혁상^{*}

경희대학교 한의과대학 해부학교실

The Effect of *Ampelopsis japonica* (Thunb.) Makino on Osteoclastogenesis and Expression of Osteoclast-Related Gene

Hongsik Kim[#], Sumin Lee, Minsun Kim, Jae-Hyun Kim
Yejin Kang, Seoung Jun Kwon, Youngwoo Nam, Seungwoo Yoo
Hong-Seok Choi, SeonJin Huh, Youngjoo Sohn, Hyuk-Sang Jung^{*}

Department of Anatomy, College of Korean Medicine, Kyung Hee University, Seoul, 02447, Republic of Korea.

ABSTRACT

Objectives : Osteoporosis is a systemic skeletal disorder characterized by reduced bone mineral density and increased risk of fractures. Bisphosphonates and selective estrogen receptors, which are bone resorption inhibitors that are currently widely used as osteoporosis treatments, show serious side effects when administered for a long time. Research on bone resorption inhibitors that complement the problems of existing treatments is needed. The purpose of this study was to investigate the effect of inhibiting osteoclast differentiation and activity on the tuberous root of *Ampelopsis japonica* (Thunb.) Makino (AM).

Methods : After extracting AM using distilled water and ethanol, the inhibitory effects of the two solvents on osteoclast differentiation were compared using the RANKL-induced in vitro experimental model and the TRAP assay kit. The impact of AM on bone resorption was investigated through the pit formation assay, and its effect on F-actin formation was assessed through fluorescent staining. Additionally, protein and mRNA expression levels of osteoclast differentiation markers (NFATc1, c-Fos, TRAP and ATP6v0d2) and resorption markers (MMP-9, CTK, and CA2) were analyzed via western blot and RT-PCR.

Results : AM treatment significantly decreased the number of TRAP-positive cells and pit formation area. Furthermore, AM suppressed both the protein and mRNA expression of NFATc1 and c-Fos, key transcription factors involved in osteoclast differentiation and it downregulated the expression of osteoclast-associated genes such as TRAP, CTK, MMP-9, CA2, and ATP6v0d2.

Conclusions : These results suggest that AM can inhibit bone resorption and osteoclast differentiation, indicating its potential for use in the treatment and prevention of osteoporosis.

Key words : *Ampelopsis japonica* (Thunb.) Makino, Osteoporosis, Osteoclast, RANKL, NFATc1, c-Fos

*Corresponding author : Hyuk-Sang Jung, Department of Anatomy, College of Korean Medicine, Kyung Hee University, 26, Kyungheedaero, Dongdaemun-gu, Seoul, 02447, Republic of Korea.

· Tel : +82-2-961-9449

· Fax : +82-2-961-9449

· E-mail : jhs@khu.ac.kr

#First author : Hongsik Kim, Department of Anatomy, College of Korean Medicine, Kyung Hee University, 26, Kyungheedaero, Dongdaemun-gu, Seoul, 02447, Republic of Korea.

· Tel : +82-2-961-0327

· E-mail : srs783@naver.com

· Received : 27 July 2023

· Revised : 16 August 2023

· Accepted : 25 September 2023

I. 서론

골다공증은 골량의 감소와 뼈조직 미세구조의 변형에 의해서 골절의 위험도가 증가되는 전신성 골격계 질환이다. 전 세계 2억 명이 넘는 사람들이 골다공증을 앓고 있는 것으로 추정되며, 인구 고령화가 진행됨에 따라 골다공증 발병률은 계속 증가하는 추세이다¹⁾. 특히 폐경기 여성에게 더 많은 유병률을 보이며, 골다공증성 골절 사망 위험은 매우 높은 것으로 보고되었다²⁾. 이에 따라 골다공증 환자 70% 이상이 골다공증으로 인한 골절 치료 비용으로 손실되고 있으며, 매년 300만 건 이상 발생해 증가된 치료 비용은 사회경제적으로 많은 부담과 손실을 초래한다³⁾.

뼈의 재형성(remodeling)은 오래되거나 상처 입은 뼈조직이 파골세포에 의해 제거되고 새로운 뼈조직이 조골세포에 의해 형성되는 지속적인 과정이다⁴⁾. 파골세포는 단핵구/대식세포의 융합에서 유래된 다핵세포로, 오래되거나 손상된 뼈조직을 제거하는 뼈 재흡수 과정을 담당하며, 뼈 재형성에 관여하는 또 다른 유형의 세포인 조골세포는 중간엽줄기세포에서 유래하여 새로운 뼈조직을 합성하고 침착시키는 뼈 형성 과정을 담당한다. 파골세포와 조골세포의 기능은 서로 상호보완적으로 균형을 이루어야 하지만⁵⁾, 폐경으로 인한 에스트로겐의 결핍은 과도한 파골세포의 활성을 야기하여 이러한 균형을 무너뜨리고, 결과적으로 골다공증과 같은 뼈 질환을 유발하게 된다⁶⁾.

골다공증에 대표적으로 사용되는 치료제는 비스포스포네이트 제제로써 파골세포의 사멸 유도를 통해 골 흡수를 억제한다. 하지만, 장기적으로 비스포스포네이트 치료를 받게 되면 골 내에 축적만 되는 것이 아니라 골의 구조를 정상적으로 유지하는데 필수적인 과정인 골 재형성을 방해하여, 턱의 골 괴사증, 골절뿐만 아니라 심혈관계 질환과 같은 심각한 부작용이 발생된다고 지속적으로 보고되고 있다⁷⁾. 이에, 부작용이 적은 천연물 기반의 새로운 골다공증 치료제 연구개발이 지속적으로 진행되고 있다^{8,9)}.

Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL)은 tumor necrosis factor super-family로써 파골세포의 분화를 유도하는 cytokine이다. RANKL은 세포 표면의 수용체인 RANK와의 결합을 통해, 파골세포 핵심 전사인자인 c-Fos와 nuclear factor of activated T cells c1 (NFATc1)를 차례대로 유도한 뒤, 최종적으로 골 흡수 인자인 metalloproteinase-9 (MMP-9), Carbonic anhydrase 2 (CA2) 그리고 Cathepsin K (CTK)와 융합 관련한 인자인 ATPase H⁺ transporting V0 subunit d2 (ATP6v0d2) 등의 인자의 발현 유도하여 파골세포를 분화시킨다¹⁰⁾.

한의학에서 골위(骨痿)란 노화와 관련된 질환으로, 열이 심하여 陰液이 손상되거나 혹은 장기적인 피로, 腎精의 부족, 腎火의 지나친 항성 등에 의해 뼈가 마르고 髓液이 감소되어 나타난다. 이는 허리와 등이 쭉시고 연약하여 똑바로 서기가 어렵고, 다리가 약하고 힘이 없으며 얼굴이 검어지고 치아가 마르는 증상을 동반한다. 백령(白蘞)은 포도과(葡萄科: Vitaceae)에 속한 多年生 攀援藤本인 가회톱(白蘞) *Ampelopsis japonica* (Thunb.) Makino 의 塊根으로, 性은 微寒하고, 味는 苦하다. 心, 肝, 胃經에 작용하며 淸熱解毒(淸熱解毒), 소용산결(消癰散結)의 효능이 있어 응저발배(癰疽發背), 정창(疔瘡), 나력

(瘰癧) 등의 증상을 치료하는 것으로 알려져 있다¹¹⁾. 白蘞에 대한 기존 연구에서는 항암효과¹²⁾, 항염효과¹³⁾, 항산화 효과¹⁴⁾ 등이 보고되어 있으나 파골세포의 분화와 관련된 연구는 아직까지 많이 이루어지지 않았다. 이에 저자는 淸熱解毒(淸熱解毒), 소용산결(消癰散結)의 효능을 갖는 白蘞이 골다공증의 요인 중 염증매개 조절 보고를 통해 파골세포 분화 억제에 가능성이 높을 것으로 예측하여 연구하였다.

이에 본 연구에서는 白蘞의 에탄올 추출물과 열수 추출물의 골다공증 관련 기전에 미치는 영향을 연구하기 위해 RAW 264.7 cell을 이용하여 세포 독성을 평가하였고 파골세포 분화 관련 유전자인 TRAP 활성을 분석하였으며, NFATc1과 c-Fos 발현을 측정하였다. 또한 白蘞이 파골세포 관련 인자 ATP6v0d2, MMP-9, CA2 그리고 CTK의 유전자 발현을 유의미하게 억제하는 결과를 얻었기에 이를 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 시약

Peprotech (London, UK)에서 RANKL (cat: 315-11-100)을 구매하였다. Dulbecco modified eagle medium (DMEM)는 Welgene (Daejeon, Korea)에서, medium essential medium α (α -MEM) 그리고 penicillin and streptomycin (P/S)는 Gibco (Grand Island, NY, USA)에서 구매하였다. Atlas Biologicals (CO, USA)에서 Fetal bovine serum (FBS)을 구매하였다. Cell counting kit (CCK)-8은 Dojindo Molecular Technologies (Kumamoto, Japan)에서 구매하였다. TRAP staining kit는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구매하였다.

2. 세포 배양

한국세포주 은행(Korean cell line bank)에서 RAW 264.7 세포가 구매되었고 이를 5%의 CO₂ 그리고 37°C가 유지되는 세포 배양기에서 10% FBS와 1% P/S가 포함된 DMEM 배양액을 사용하여 배양되었다. 세포의 밀도가 plate 내 80% 이상 시 계대배양을 진행했다.

3. 白蘞 에탄올 추출물 및 열수 추출물의 제조

본 연구에 사용된 白蘞(*Ampelopsis Radix*, 이하 AM)은 음니허브 (Seoum, Korea)에서 구매되었다. 에탄올 및 열수 두 용매를 통해 白蘞이 추출되었다. 白蘞 에탄올 시료(ethanol extract of AM, 이하 Et-AM)의 추출은 300 g의 AM에 3 L 80% ethanol을 첨가하여 2주간 4°C에서 냉침 추출했다. 白蘞 열수 시료(Water extract of AM, 이하 W-AM)를 추출은 300 g의 AM에 3 L의 deionized water (DW)를 넣고 이후 2 시간 동안 100°C에서 끓였다. Filter paper no. 3 (Whatman, Maidstone, Kent, UK)을 사용하여 추출된 시료를 여과 후

동결건조하여 에탄올 추출물 21.1 g (수득률: 7%)과 열수 추출물 47.2 g (수득률: 15.7%)의 파우더를 얻었다. 시료를 사용하기 전에는 -80°C 의 초저온 냉동고에서 보관했다. 실험에 시료를 사용하기 위해, 에탄올 추출물은 dimethyl sulfoxide에 용해하고 물 추출물은 DW에 용해한 뒤, pore size $0.22\ \mu\text{m}$ 로 여과하여 사용했다.

4. 세포 생존율 분석

Et-AM과 W-AM의 세포 독성을 검증하기 위해 5×10^3 개의 RAW 264.7 세포를 96 well plate에 분주하였고 이를 24시간 안정화 이후, 용매별 AM 추출물이 포함된 DMEM 배지로 교환한 후 1일간 배양했다. 이후, 각 well에 $10\ \mu\text{l}$ 의 CCK-8을 처리한 후, 세포 배양기에서 1시간 동안 반응시켰다. 이후 enzyme-linked immunoassay (ELISA) 기기 (Versamax microplate reader, Molecular Devices, CA, USA), 를 이용해 $450\ \text{nm}$ 의 흡광도에서 세포 생존율을 측정하였고 이를 자극되지 않은 세포를 기준으로 백분율로 표기하였다. 90% 이하의 생존율일 때 시료가 독성을 나타낸다고 간주했다.

5. TRAP 염색 및 활성화 분석

Et-AM과 W-AM의 파골세포 분화 및 활성화에 대한 유효성을 검증하기 위해, 1.5×10^4 개의 RAW 264.7 세포를 24-well-plate에 분주하여 24시간 동안 안정화 했다. $100\ \text{ng/ml}$ 의 RANKL과 용매별 AM 추출물이 포함된 α -MEM 배지로 교환한 후 5일간 배양했다. 2일 마다 배양액은 동일한 배양액으로 교환했다. TRAP 염색 및 활성화 측정 실험 방법은 이전 연구 논문을 참고하여 진행하였다¹⁵⁾ 분화가 종료된 후, phosphate-buffered saline (PBS)으로 미분화 대식세포를 부드럽게 제거한 뒤, 세포를 4% 포르말린으로 고정하고 PBS로 3회 세척하였다. 제조사가 제공한 프로토콜에 따라 leukocyte acid phosphatase kit (Sigma; 387-A)를 사용하여 TRAP 염색을 수행했다. 위상차(inverted) 현미경 (CKX41, Olympus, Shinjuku, Japan)으로 염색된 세포를 촬영하고, Image J software (Ver. 1.46, National Institutes of Health)을 통해 파골세포의 수는 개수되었다. 각 well plate 별 100배의 배율에서 6시야를 촬영하였고, 붉은색의 다핵 세포 (핵 3개 이상)을 파골세포로 간주하였다.

이후 배양액 내 TRAP 활성도를 측정하기 위해, 동량의 TRAP 활성도 측정 용액($0.5\ \text{M}$ acetate $750\ \mu\text{l}$ + tartrate solution $150\ \mu\text{l}$ + $4.93\ \text{mg}$ p-nitrophenyl phosphate)을 분화가 종료된 배양액 $50\ \mu\text{l}$ 에 넣은 뒤, 37°C 의 온도에서 반응시켰다. 1시간 반응시킨 후 $0.5\ \text{NaOH}$ 용액으로 반응을 종료하였고 ELISA 기기를 이용해 $405\ \text{nm}$ 의 흡광도에서 TRAP 활성도를 측정했다.

6. F-actin ring 형성 분석

Et-AM의 파골세포 세포 골격구조인 F-actin ring 형성에 대한 유효성을 검증하기 위해, 1.5×10^4 개의 RAW 264.7 세포를 24-well-plate에 분주해서 24시간 안정화하였다. $100\ \text{ng/ml}$ 의 RANKL과 Et-AM 추출물이 포함된 α -MEM 배지로 교환한 후 5일간 배양하여 이 배양액을 동일한 배양액으로 2일 마다 교환했다. 분화 종료 후 세포 PBS로 3회 세척하고, mRNA를 TRIzol reagent (TAKARA, Kyoto, Japan)을 이용해 분리했다. 분리된 mRNA는 Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, United Kingdom)을 이용해 정량되었고, 이후 SuperScript[®]

ng/ml의 RANKL과 Et-AM 추출물이 포함된 α -MEM 배지로 교환한 후 5일간 배양하여 이 배양액을 동일한 배양액으로 2일 마다 교환했다. F-actin ring 형성 분석 방법은 이전 연구 논문을 참고하여 진행하였다¹⁵⁾. 분화 종료 후 세포 PBS로 3회 세척하고 세포를 4% paraformaldehyde으로 고정했다. 이후, 세포를 0.5% Triton X-100으로 투과시킨 뒤, 30분 동안 $100\ \text{nM}$ Acti-stain 488 phalloidin (PHDG1-A, Cytoskeleton, Inc, CO, USA)를 첨가하여 반응시키고, $100\ \text{nM}$ DAPI로 핵을 대조염색했다. 형광(fluorescence) 현미경 (Cellena, Logos Biosystem)을 사용해 염색된 세포가 관찰되었고, F-actin ring의 수는 Image J software을 통해 개수되었다.

7. Western blot 분석

Et-AM의 파골세포 세포 필수전사인자인 NFATc1 그리고 c-Fos의 단백질 발현에 대한 유효성을 검증하기 위해, 5×10^5 개의 RAW 264.7 세포를 $60\ \pi$ dish에 분주하여 24시간 안정화했다. $100\ \text{ng/ml}$ 의 RANKL과 Et-AM 추출물이 포함된 α -MEM 배지로 교환한 후 2일간 배양했다. 분화 종료 후 세포 PBS로 3회 세척하고, 전체 단백질(total protein)을 radioimmunoprecipitation lysis buffer ($25\ \text{mM}$ Tris · HCl pH 7.6, $150\ \text{mM}$ NaCl, 1% NP-40, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS)를 이용해 추출했다. 이후, bicinchoninic acid (BCA) protein assay kit (T9300A, TAKARA, Tokyo, Japan)을 통해 정량한 뒤, 단백질을 Sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 크기 별로 분리하고, nitrocellulose membrane에 흡착시켰다. 이후, 단백질이 흡착된 membrane의 비특이적 단백질의 결합을 5% skim milk in tris-buffered saline with 0.05% Tween 20 (TBST)를 이용해 방지하고, 1% BSA in TBST에 각각의 primary 항체를 희석하여 반응시킨 뒤 4°C 의 온도에서 반응시켰다. 24시간 이후 5% skim milk in TBST에 희석한 secondary 항체를 1시간 동안 반응시키고, enhanced chemiluminescence solution을 처리해 단백질의 발현을 시각화했다. Table 1에 각 항체의 희석 농도 및 정보가 기재되었다. Image J software를 통해 NFATc1, c-Fos 그리고 β -actin의 발현을 측정한 뒤, β -actin으로 표준화했다.

8. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) 분석

Et-AM의 파골세포 관련인자의 mRNA 발현에 대한 유효성을 검증하기 위해, 2×10^5 개의 RAW 264.7 세포를 6-well-plate에 분주하여 24시간 안정화했다. 이후, $100\ \text{ng/ml}$ 의 RANKL과 Et-AM 추출물이 포함된 α -MEM 배지로 교환한 후 4일간 배양했고 이 배양액은 동일한 배양액으로 2일 마다 교환했다. 분화 종료 후 세포 PBS로 3회 세척하고, mRNA를 TRIzol reagent (TAKARA, Kyoto, Japan)을 이용해 분리했다. 분리된 mRNA는 Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, United Kingdom)을 이용해 정량되었고, 이후 SuperScript[®]

III First-strand Synthesis System (Invitrogen, Carlsbad, CA)를 이용해 cDNA로 합성되었다. 다음과 같이 PCR 반응을 진행하여(1 분, 94℃; 1 분, 58℃; 1 분, 72℃) TRAP, MMP-9, CTK, CA2, ATP6v0d2의 mRNA 발현을 측정하였다. 실험에 사용된 primer는 Genotech (Deajoen, Korea)에서 구매되었고, sequence의 구조 및 PCR 실험조건에 정보는

Table 2에 기재되었다. 증폭 후 SYBR green 으로 염색된 2% agarose gel에서 반응물은 전기영동 되었고, NaBI gel document을 통해 시각화 되었다. 각 유전자의 발현은 Image J software를 통해 측정한 뒤, GAPDH로 표준화했다. 그리고 primer는 (Genotech, Deajoen, Korea)에서 구매하였다.

Table 1. Information of Antibody Used for Western Blot.

protein name	Primary Ab.				Secondary Ab.	
	Cat. No.	Company	dilution ratio	Host	Cat. No.	dilution ratio
NFATc1	556602	BD science	1:1000			1:10000
c-Fos	sc-447	Santaacruz	1:200	mouse	115-035-062	1:5000
β -actin	sc-8432	Santaacruz	1:500			1:1000

Table 2. Primer Sequence Used for RT-PCR

Gene name	Sequence	Gene No.	Cycle	Tm (°C)	Base pair
NFATc1	Forward: TGCTCCTCCTCCTGCTGCTC	NM_198429,2	30	58	480
	Reverse: CGTCTTCCACCTCCACGTCG				
c-Fos	Forward: ATGGGCTCTCCTGTCAACAC	NM_010234,3	35	58	480
	Reverse: GGCTGCCAAAATAAACTCCA				
TRAP	Forward: ACTTCCCAGCCCTTACTACCG	NM_007388,3	30	58	381
	Reverse: TCAGCACATAGCCCACACCG				
CTK	Forward: AGGCGGCTATATGACCACTG	NM_007802,4	26	58	403
	Reverse: CCGAGCCAAGAGAGCATATC				
MMP-9	Forward: CGACTTTTGTGGTCTTCCCC	NM_013599,4	30	58	258
	Reverse: TGAAGGTTTGAATCGACCC				
CA2	Forward: CTCTCAGGACAATGCAGTGCTGA	NM_001357334,1	32	58	411
	Reverse: ATCCAGGTCACACATTCAGCA				
ATP6v0d2	Forward: ATGGGGCCTTGCAAAAGAAATCTG	NM_175406,3	30	58	504
	Reverse: CGACAGCGTCAAACAAGGCTTGTA				
GAPDH	Forward: ACTTTGTCAAGCTCATTCC	NM_008084,3	30	58	267
	Reverse: TGCAGCGAACTTTATTGATG				

9. 통계 분석

모든 데이터는 평균 \pm 표준오차(mean \pm standard error of the mean)로 표시되었으며, 각 그룹 간 유의성은 one-way ANOVA를 통해 검증한 뒤, Tukey 테스트로 유의성을 사후 검증하였다 (Graph Pad Prism 9 Inc, San Diego, CA, USA). 유의수준 판단 기준은 $p < 0.05$ 로 설정했다.

III. 결 과

1. 용매별 AM 추출물의 독성 평가

Et-AM, W-AM의 세포 내 독성을 검증하여 처리 농도를 결정하기 위해 실험한 결과 실험에 사용된 Et-AM 농도 125, 250, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 는 RAW 264.7 세포에서 독성을 나타내지 않았다(Figure 1A). 또한, 125, 250, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 W-AM는 RAW 264.7 세포에서 독성을 나타내지 않았다(Figure 1B).

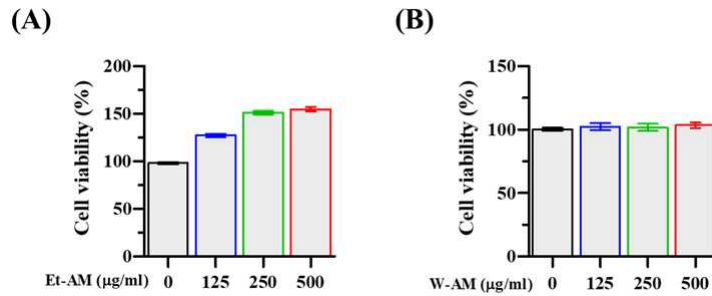


Figure 1. Affect of Et-AM and W-AM on the cytotoxicity of RAW 264.7 cells. (A) The effect of Et-AM and (B) W-AM on the cell viability of RAW 264.7 cells was measured with CCK-8 solution. Data were expressed as mean \pm standard error of mean (S.E.M), and all experiments were repeated three or more times.

2. Et-AM의 파골세포 분화 억제능 평가

에탄올 추출 AM의 파골세포 분화 억제에 대한 유효성을 판단하기 위해, Et-AM 125, 250, 500 $\mu\text{g/ml}$ 을 RANKL로 유도된 파골세포에 처리하였다. 분화 후 TRAP 용액을 통해 세포를 염색한 결과, RANKL 처리 세포는 붉은색의 다핵 세포가 관찰되었고, Et-AM 처리그룹은 이러한 붉은색의 다핵 세포의 수와 크기를 감소시켰다(Figure 2A). Et-AM 처리

그룹의 파골세포 수를 개수한 결과 RANKL 처리군 대비 125, 250, 500 $\mu\text{g/ml}$ 에서 각각 35%, 52% 그리고 81%의 억제율을 나타냈고 (유의성: $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.01$) (Figure 2B), 배지 내 TRAP 활성도 또한 125, 250, 500 $\mu\text{g/ml}$ 에서 각각 27%, 49%, 74% 억제하였다 (유의성: $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.01$) (Figure 2C).

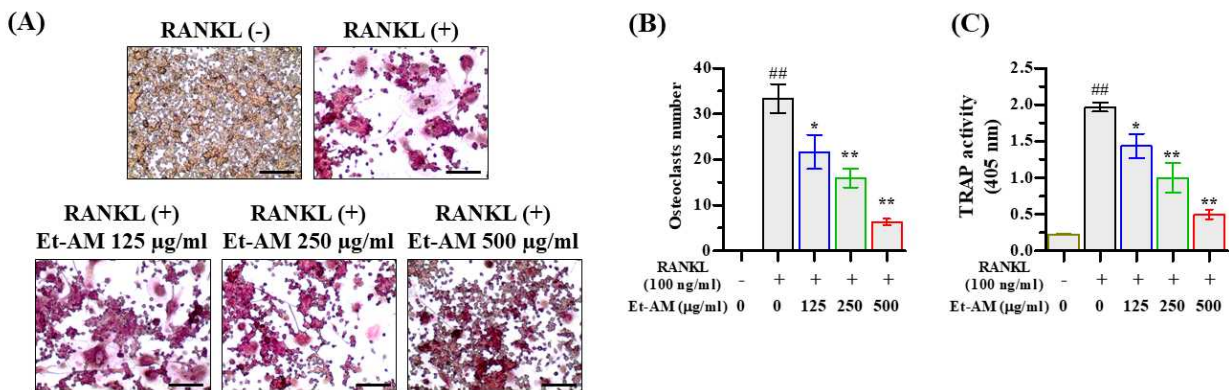


Figure 2. Effect of Et-AM on the inhibition of osteoclast differentiation. (A) Differentiated osteoclasts were stained using a TRAP assay kit and captured using a inverted microscope ($\times 100$, scale bar: 200 μm). (B) Changes in the number of TRAP-positive cells through Et-AM treatment were counted using ImageJ software. 6 fields of view were taken for each well plate, and red multinucleated cells (three or more nuclei) were regarded as osteoclasts. (C) The inhibitory effect of Et-AM on TRAP activity in medium was measured using an ELISA instrument. Data were expressed as mean \pm standard error of mean (S.E.M), and all experiments were repeated three or more times. ## $p < 0.01$ versus untreated cells and * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ versus RANKL-treated cells.

3. W-AM 추출물의 파골세포 분화 억제능 평가

W-AM의 파골세포 분화 억제에 대한 유효성을 판단하기 위해, RANKL로 유도된 파골세포에 W-AM 125, 250, 500 $\mu\text{g/ml}$ 을 처리하였다. 분화 후 TRAP 용액을 통해 세포를 염색한 결과, RANKL 처리 세포는 붉은색의 다핵 세포가 관찰되었고, W-AM 처리그룹은 이러한 붉은색의 다핵세포의 수와 크기를 감소시켰다(Figure 3A). W-AM 처리 그룹의 파골세포

수를 개수한 결과 RANKL 처리군 대비 500 $\mu\text{g/ml}$ 에서 82%의 억제율 (유의성: $p < 0.01$)을 나타냈으며 (Figure 3B), 배지 내 TRAP 활성도는 500 $\mu\text{g/ml}$ 의 W-AM에서 유발군 대비 39%의 억제율 (유의성: $p < 0.01$)을 나타냈다 (Figure 3C). AM의 용매별 파골세포 억제 효과를 비교 분석한 결과 에탄올 추출물이 열수 추출물에 비해 더 뛰어난 파골세포 억제 효과를 나타내 이후 실험은 에탄올 추출물로 진행하였다.

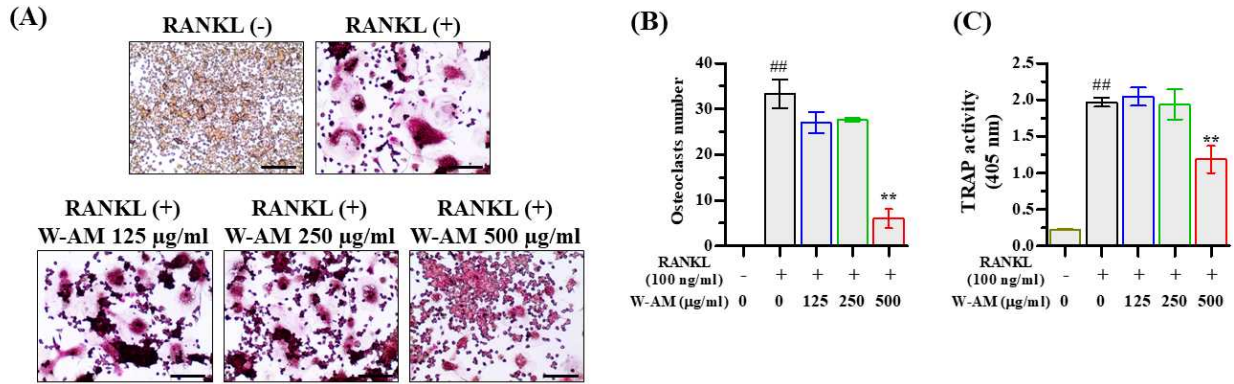


Figure 3. Effect of W-AM on the inhibition of osteoclast differentiation. (A) Differentiated osteoclasts were stained using a TRAP assay kit and captured using a inverted microscope ($\times 100$, scale bar: $200 \mu\text{m}$). (B) Changes in the number of TRAP-positive cells through W-AM treatment were counted using ImageJ software. 6 fields of view were taken for each well plate, and red multinucleated cells (three or more nuclei) were regarded as osteoclasts. (C) The inhibitory effect of W-AM on TRAP activity in medium was measured using an ELISA instrument. Data were expressed as mean \pm standard error of mean (S.E.M), and all experiments were repeated three or more times. ## $p < 0.01$ versus untreated cells and ** $p < 0.01$ versus RANKL-treated cells.

4. F-actin ring 형성에 Et-AM의 유효성 평가

Et-AM이 F-actin ring 형성 억제에 대한 유효성을 판단하기 위해, RANKL로 유도된 파골세포에 Et-AM 125, 250, 500 $\mu\text{g/ml}$ 를 처리하였다. 분화된 파골세포의 F-actin ring을 염색한 후 형광현미경을 통해 확인한 결과, RANKL 처리 세

포는 거대 골격구조가 관찰되었고, Et-AM 처리그룹은 이러한 구조의 크기와 수를 감소시켰다(Figure 4A). Et-AM 처리그룹의 F-actin ring의 수를 개수한 결과, 500 $\mu\text{g/ml}$ 의 Et-AM은 유발군 대비 84%의 억제율을 나타냈다 (유의성: $p < 0.05$) (Figure 4B).

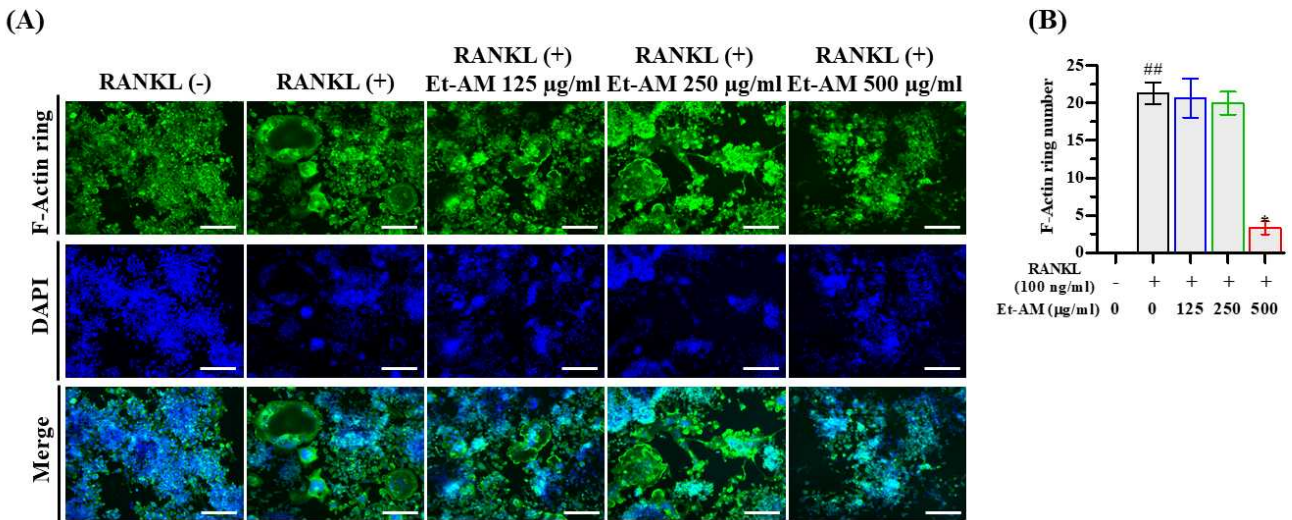


Figure 4. Effect of Et-AM on F-actin ring formation inhibition. (A) F-actin ring were stained using a Acti-stain kit and captured using a fluorescence microscope ($\times 100$, scale bar: $200 \mu\text{m}$). (B) Changes in the number of F-actin ring through Et-AM treatment were counted using ImageJ software. Data were expressed as mean \pm S.E.M, and all experiments were repeated three or more times. ## $p < 0.01$ versus untreated cells and * $p < 0.05$ versus RANKL-treated cells.

5. 파골세포 분화 필수 전사인자 발현에 Et-AM의 유효성 평가

Et-AM이 파골세포 분화 필수 전사인자인 NFATc1과 c-Fos의 발현 억제에 대한 유효성을 판단하기 위해, RANKL로 유도된 파골세포에 Et-AM 추출물 125, 250, 500 $\mu\text{g/ml}$ 를

처리 후 단백질을 추출했다. 이후 추출된 단백질 전사인자 발현을 western blot으로 확인한 결과, RANKL 처리그룹은 NFATc1과 c-Fos의 발현이 상향조절 되었고, Et-AM 처리 그룹은 이러한 발현이 농도 의존적으로 감소시켰다(Figure 5A). 각 지표의 발현을 β -actin으로 정량한 결과 Et-AM은 NFATc1의 발현을 250, 500 $\mu\text{g/ml}$ 에서 52%, 85% 억제하였다

(유의성: $p < 0.01$, $p < 0.01$) (Figure 5B). 또한, Et-AM은 c-Fos의 발현을 125, 250, 500 $\mu\text{g/ml}$ 에서 각각 37%, 56%, 74% 억제하였다 (유의성: $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.01$) (Figure 5C).

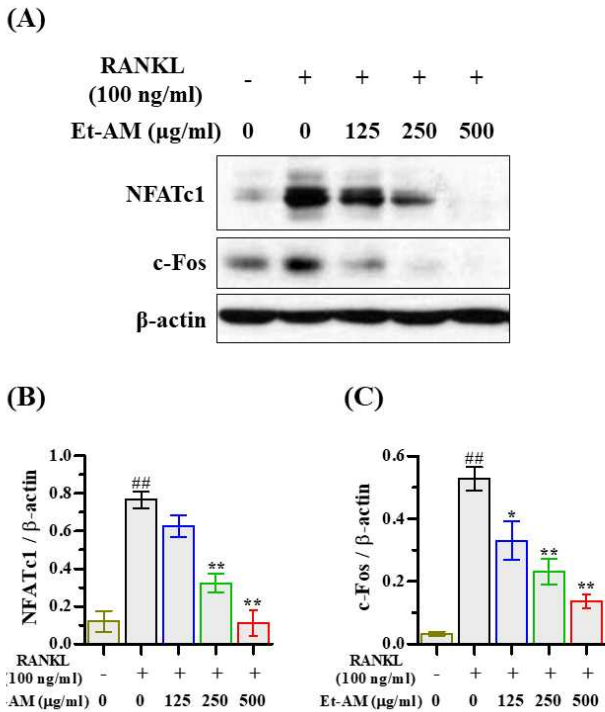


Figure 5. Effect of Et-AM on inhibition of NFATc1/c-Fos protein expression.

(A) Protein expression of NFATc1 and c-Fos was detected by western blot. (B) Expression of NFATc1 and (C) c-Fos was normalized to β -actin. Data were expressed as mean \pm S.E.M, and all experiments were repeated three times. ^{##} $p < 0.01$ versus untreated cells and ^{*} $p < 0.05$, ^{**} $p < 0.01$ versus RANKL-treated cells.

6. 파골세포 분화 관련 mRNA 발현에 Et-AM의 유효성 평가

Et-AM이 파골세포 분화 관련 유전자인 NFATc1, c-Fos, TRAP, 그리고 ATP6v0d2의 발현 억제에 대한 유효성을 판단하기 위해, RANKL로 유도된 파골세포에 각 Et-AM 125, 250, 500 $\mu\text{g/ml}$ 을 처리 후 mRNA를 추출했다. 이후 추출된 mRNA 내 단백질 전사인자 발현을 PCR로 확인한 결과, RANKL 처리그룹은 모든 인자에서 발현이 상향조절 되었고, Et-AM 처리그룹은 이러한 발현을 감소시켰다(Figure 6A). 각 지표의 발현을 GAPDH로 정량한 결과 Et-AM은 NFATc1의 발현을 250, 500 $\mu\text{g/ml}$ 에서 46%, 98% 억제하였고 (유의성: $p < 0.01$, $p < 0.01$) (Figure 6B), c-Fos의 발현을 250, 500 $\mu\text{g/ml}$ 에서 52%, 88% 억제하였다 (유의성: $p < 0.01$, $p < 0.01$) (Figure 6C). 또한, TRAP의 발현을 500 $\mu\text{g/ml}$ 에서 80%를 억제하였고 (유의성: $p < 0.01$) (Figure 6D), ATP6v0d2의 발현을 250, 500 $\mu\text{g/ml}$ 에서 51%, 81% 억제하였다 (유의성: $p < 0.01$, $p < 0.01$) (Figure 6E).

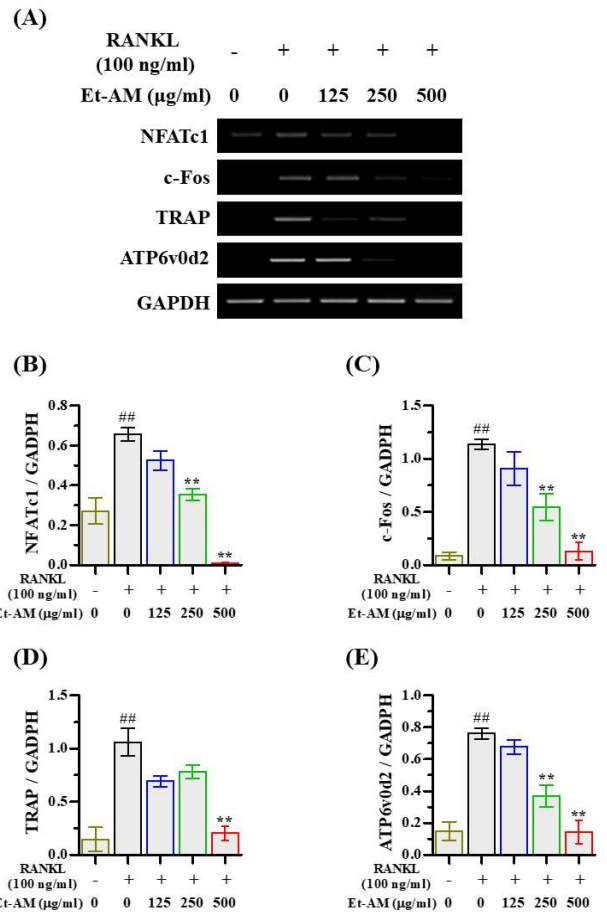


Figure 6. Effect of Et-AM on the inhibition of osteoclastogenesis-related gene expression.

(A) mRNA expression of osteoclastogenesis-related gene was detected by RT-PCR. (B) Expression of NFATc1, (C) c-Fos, (D) TRAP, and (E) ATP6v0d2 was normalized to GAPDH. Data were expressed as mean \pm S.E.M, and all experiments were repeated three times. ^{##} $p < 0.01$ versus untreated cells and ^{**} $p < 0.01$ versus RANKL-treated cells.

7. 골 흡수 관련 mRNA 발현에 Et-AM의 유효성 평가

Et-AM이 파골세포의 골 흡수 관련 유전자인 MMP-9, CTK, 그리고 CA2의 발현 억제에 대한 유효성을 판단하기 위해, RANKL로 유도된 파골세포에 각 Et-AM 125, 250, 500 $\mu\text{g/ml}$ 을 처리 후 mRNA를 추출했다. 이후 추출된 mRNA 내 단백질 전사인자 발현을 PCR로 확인한 결과, RANKL 처리 그룹은 모든 인자에서 발현이 상향조절 되었고, Et-AM 처리 그룹은 이러한 발현을 감소시켰다(Figure 7A). 각 지표의 발현을 GAPDH로 정량한 결과 Et-AM은 MMP-9의 발현을 500 $\mu\text{g/ml}$ 에서 64% 억제하였고 (유의성: $p < 0.05$) (Figure 7B), CTK의 발현을 500 $\mu\text{g/ml}$ 에서 59% 억제하였다 (유의성: $p < 0.01$) (Figure 7C). 그리고, CA2의 발현을 500 $\mu\text{g/ml}$ 에서 90% 감소시켰다 (유의성: $p < 0.05$) (Figure 7D).

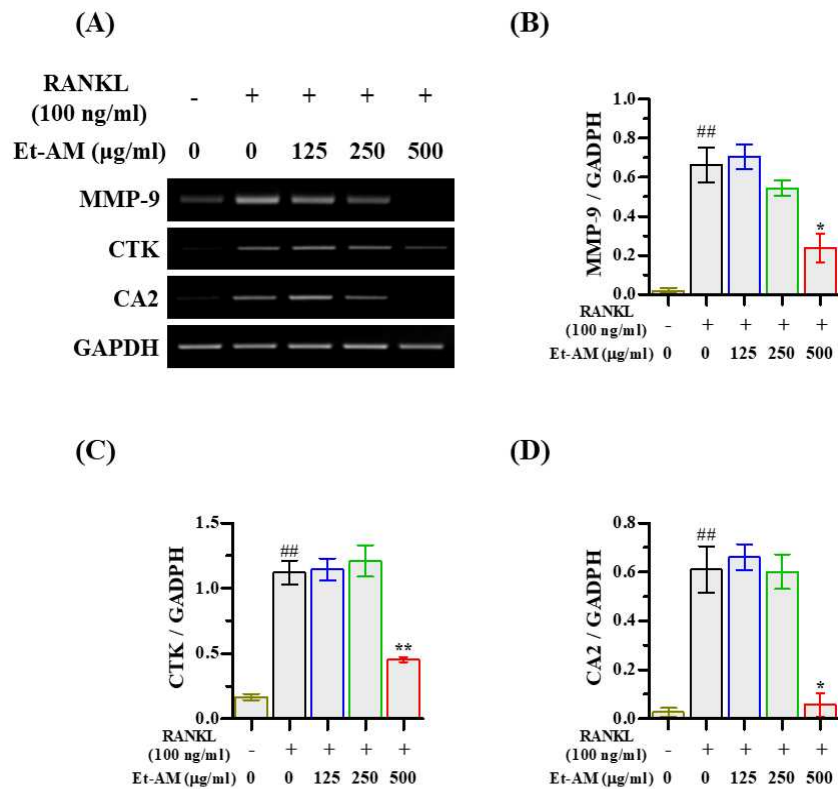


Figure 7. Effect of Et-AM on the inhibition of bone resorption-related gene expression. (A) mRNA expression of bone resorption-related was detected by RT-PCR. (B) Expression of MMP-9, (C) CTK, and (D) CA2 was normalized to GAPDH. Data were expressed as mean \pm S.E.M, and all experiments were repeated three times. ##p<0.01 versus untreated cells and *p<0.05, **p<0.01 versus RANKL-treated cells.

IV. 고찰

폐경기성 골다공증은 에스트로겐 결핍으로 인해 파골세포가 과도하게 활성화되어 골 손실을 유도해 발생한다. 현재 골다공증 치료제인 비스포스포네이트 제제는 골 괴사증, 골절 및 심혈관계 질환과 같은 심각한 부작용이 잇따르고 있다⁷⁾. 따라서 천연물 기반 골다공증 유효 물질의 연구가 지속적으로 이루어지고 있고^{8,9)}, 본 연구에서는 AM의 파골세포 분화 억제 효과를 규명하고자 하였다. Et-AM은 TRAP 활성화도와 F-actin ring의 형성을 감소시켰고, 파골세포 분화와 흡수에 관련된 필수 전사인자의 발현을 유의하게 억제하는 효과를 보였다.

TRAP은 파골세포의 대표적인 phenotype 마커로써, 임상 골다공증 환자의 혈청 내 분석을 통해 골다공증 검출 인자로도 사용되고 있으며, 세포 및 조직 내 TRAP 염색은 TRAP 효소를 기반으로 세포가 염색되어 시각화 된다¹⁶⁾. 본 연구에서는 RANKL 처리 파골세포 모델에서 에탄올 및 열수 추출물의 AM의 결과를 상호 비교하였다. 실험 결과, 두 용매 모두 파골세포 억제에 효과를 보였고, 특히 Et-AM은 W-AM 보다 125, 250 그리고 500 µg/ml의 실험 농도에서 각각 30%, 49% 그리고 58% 더 뛰어난 파골세포 활성화도 억제 효과를 나타내었다. 이러한 결과는 AM은 비정상적인 파골세포 분화로 유발된 골다공증을 치료할 수 있는 가능성을 보여 더 뛰어난 효과를 보인 Et-AM의 억제 상세 기전 검증을 진행하였다.

F-actin은 파골세포의 세포 골격구조로써, 파골세포와 뼈 표면 사이를 흡착시켜 조직화 되고 세포 외 공간과 골 흡수 공간이 구분하는 역할을 한다¹⁷⁾. 파골세포는 골 흡수 과정 중 세포골격 구성을 수행하며, 파골세포의 actin이 큰 ring으로 조직화 되고 세포 외 공간과 골 흡수 공간이 구분된다¹⁸⁾. 이에 파골세포의 F-actin ring의 형성을 이용해 파골세포의 골 흡수 능력을 평가할 수 있는 지표로 사용되고 있다. 본 연구에서 RANKL 처리된 파골세포는 거대 골격구조가 관찰되었고, Et-AM 처리그룹은 이러한 구조의 크기와 수를 감소시켰다. 이는 Et-AM이 파골세포의 분화를 억제함과 아울러 파골세포의 뼈 흡수 능력을 나타내는 F-actin ring의 형성을 감소시켰음을 의미한다.

NFATc1과 c-Fos는 파골세포 분화에 주요 역할을 하는 핵심 전사인자로서, 이 두 인자가 결핍된 쥐는 파골세포 분화에 장애가 발생하여, 골 석회증이 유발된다고 밝혀졌다^{19,20)}. RANKL-RANK의 결합은 c-Fos 그리고 NFATc1을 순차적으로 유도하며 TRAP, OSCAR, ATP6v0d2, MMP-9, CTK 그리고 CA2와 같은 파골세포 특이 인자의 발현을 조절한다. 본 연구에서 RANKL 처리 그룹은 NFATc1과 c-Fos의 발현을 유도하였고, Et-AM 처리 그룹은 이러한 발현을 농도 의존적으로 감소시켰다. 이는 Et-AM의 파골세포 분화 억제 효과가 NFATc1 그리고 c-Fos의 발현 억제에 매개된다는 것을 의미한다.

세포-세포 간의 융합은 다핵세포의 발달에 필수적이고 파골세포 성숙에 중요한 역할을 한다. ATP6v0d2는 파골세포 및 actin ring의 융합 시 두드러지게 발현되며, 결핍된 마우스는 파골세포 기능의 장애로 골 재흡수 능력이 급격하게 감소되어 골 화석증이 유발된다²¹⁾. 본 연구에서, RANKL은 파골세포 내 ATPv0d2의 발현을 유도하였고, Et-AM은 이러한 발현을 억제시켰다. 또한, TRAP 염색 결과와 동일하게 TRAP의 mRNA 발현도 Et-AM에서 농도의존적으로 억제되었다. 이를 통해 Et-AM은 세포-세포 간의 융합을 억제해 파골세포 및 F-actin ring의 형성에 유의미한 효과를 나타내는 것으로 보인다.

MMP-9는 골 흡수에 필수적으로 요구되는 인자로서, 뼈를 포함한 다양한 기관에서 세포의 기질 (Extracellular matrix)의 붕괴에 주요한 역할을 하며, 파골세포가 골의 표면으로 이동하게 하여 골의 재흡수에 역할을 한다^{22,23)}. CTK는 Cysteine 단백 분해 효소로 파골세포에서 많이 나타나고 골의 재흡수 효소로 작동한다²⁴⁾. CA2는 특징적으로 파골세포 분화 초기 단계에 발현되어 양성자 생성을 유도하고, 재흡수와 파골세포 분화에 필수적인 작용을 한다²⁵⁾. 본 연구에서 Et-AM은 MMP-9, CTK 그리고 CA2의 발현을 유의하게 감소시켰다. 이는 Et-AM이 MMP-9 및 CTK의 발현 억제를 통해 파골세포의 골 재흡수를 제어하며, CA2 발현을 제어해 통한 양성자 생성에 장애를 발생시켜 최종적으로 파골세포의 주 기능인 골 재흡수를 감소시킨다는 것을 의미한다.

본 연구는 이 연구는 AM의 파골세포 분화 관련 유전자나 단백질 등 지표에 대한 영향을 실험하였지만 한계점도 지니고 있다. 타 연구들에서 뼈 파괴세포 분화와 연관된다고 밝혀진 TRAP, F-actin ring, NFATc1, c-Fos, ATP6v0d2, MMP-9, CTK, 그리고 CA2와 같은 주요 지표들을 대상으로 실험을 진행하였으나 이는 파골세포 관련 지표들만을 대상으로 연구를 진행하였으므로 AM의 효능에 관련된 유효 성분에 대한 연구가 필요할 것으로 사료된다. 또한 향후 임상에서 치료제의 역할을 하기 위해선 동물실험은 물론 임상 연구까지 필요할 것이다.

본 연구는 한의학적으로 열해독(淸熱解毒), 소옹산결(消癰散結)의 효능을 지닌 AM의 파골세포 분화 및 골 흡수 관련 유전자 발현에 미치는 영향을 분석하였다. AM은 파골세포 분화 관련 유전자와 단백질의 발현을 감소시켜 파골세포 분화 및 골 흡수능을 억제하므로 골다공증의 진행을 막기 위한 한약재로 임상 적용의 실험 근거가 될 것으로 보이며 향후 임상에서 활용 가능하도록 더 많은 연구가 필요할 것이다.

V. 결 론

AM의 용매별 추출물이 파골세포 분화와 골 흡수 관련 단백질 및 유전자 발현에 미치는 영향을 알아보기 위해 RAW 264.7 세포에 RANKL을 처리하여 실험을 진행하였고, 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. Et-AM은 RANKL로 유도된 파골세포에서 파골세포

분화 억제에 유효성을 보여주는 TRAP 활성도를 억제하였고 파골세포 특이 골격구조인 F-actin ring의 형성을 억제하였다.

2. Et-AM은 RANKL로 유도된 파골세포의 분화 필수 전사인자인 NFATc1과 c-Fos의 발현을 유의하게 억제하였다.
3. Et-AM은 RANKL로 유도된 파골세포의 분화 관련 유전자인 NFATc1, c-Fos, TRAP, 그리고 ATP6v0d2의 발현을 유의하게 억제하였다.
4. Et-AM은 파골세포의 골 흡수 관련 유전자인 MMP-9, CTK, 그리고 CA2의 발현을 억제하였다.

이상을 종합하면, AM은 파골세포 분화 관련 인자들의 발현을 억제하여 파골세포 분화 및 골 흡수를 억제함을 확인하였다. 이 결과는 AM의 골다공증 치료에 대한 과학적 근거가 될 것으로 기대하며, 임상에서 골다공증의 치료에 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2021년도 정부 (보건복지부)의 재원으로 한국보건산업진흥원의 지원을 받아 수행된 연구임 (No. HF21C0092).

References

1. Reginster JY, Burlet N. Osteoporosis: A still increasing prevalence. *Bone*. 2006 ; 38(2) : 4-9. doi: 10.1016/j.bone.2005.11.024.
2. Johnell O, Kanis JA. An estimate of the worldwide prevalence and disability associated with osteoporotic fractures. *Osteoporos Int*. 2006 ; 17(12) : 1726-33. doi: 10.1007/s00198-006-0172-4. Epub 2006 Sep 16.
3. Kemmak AR, Rezapour A, Jahangiri R, Nikjoo S, Farabi H, Soleimanpour S. Economic burden of osteoporosis in the world: A systematic review. *Medical journal of the Islamic Republic of Iran*. 2020 ; 34 : 154. doi: 10.34171/mjiri.34.154.
4. Wawrzyniak A, Balawender K. Structural and Metabolic Changes in Bone. *Animals*. 2022 ; 12(15) : 1946. doi: 10.3390/ani12151946.
5. Chen X, Wang Z, Duan N, Zhu G, Schwarz EM, Xie C.

- Osteoblast–Osteoclast Interactions. *Connective tissue research*, 2018 ; 59(2) : 99–107. doi: 10.1080/03008207.2017.1290085.
6. Ji MX, Yu Q. Primary osteoporosis in postmenopausal women. *Chronic Dis Transl Med*. 2015 ; 1(1) : 9–13. doi: 10.1016/j.cdtm.2015.02.006.
 7. Kennel KA, Drake MT. Adverse Effects of Bisphosphonates: Implications for Osteoporosis Management. *Mayo Clinic Proceedings*. 2009 ; 84(7) : 632–638. doi: 10.1016/S0025–6196(11)60752–0.
 8. XUE N, JIA L, LI Q. Potential of natural medicines for treatment of osteoporosis: a narrative review. *J Tradit Chin Med*, 2023 ; 43(1) : 198–204. doi: 10.19852/j.cnki.jtcm.20221108.003.
 9. Jia M, Nie Y, Cao DP, Xue YY, Wang JS, Zhao L, Rahman K, Zhang QY, and Qin LP. Potential Antiosteoporotic Agents from Plants: A Comprehensive Review. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2012 ; :2012 : 364604. doi: 10.1155/2012/364604.
 10. Kim JH, Kim N. Regulation of NFATc1 in Osteoclast Differentiation. *J Bone Metab*. 2014 ; 21(4) : 233–41. doi: 10.11005/jbm.2014.21.4.233.
 11. Herbology Editorial Committee of Korean Medicine : Herbology. *Younglimsa* 2009 ; 607–8.
 12. Nam HS, Cho MK. The anti-cancer effects of *Ampelopsisradix* Extract (AE) on A549 cells — The role of Bcl-2 family protein on the AE-induced apoptosis—. *Journal of Society of Preventive Korean Medicine*. 2012 ; 16(1) : 71–80. UCI: G704–002177. 2012.16.1.001.
 13. Kim JH, Chun JH, Kim SY, Park YK. The Effects of *Ampelopsis Radix* on Allergic Inflammation in PMA-stimulated Human Mast Cells. *The Korea Journal of Herbology*. 2008 ; 23(4) : 91–101.
 14. Cho YH, Sim GS, Kim JH, Park SM, Lee BC, Pyo HB, Yun YP, Park HD. Effect of *Melothria heterophylla* Extract on Expression of Matrix Metalloproteinase-1 in Human Skin Fibroblasts. *Yakhak Hoeji*. 2004 ; 48(6) : 358–363. UCI: G704–000392.2004.48.6.008.
 15. Kim JH, Shin H, Kim M, Kim S, Song K, Jung HS and Sohn Y. *Solanum nigrum* Line inhibits osteoclast differentiation and suppresses bone mineral density reduction in the ovariectomy-induced osteoporosis model. *Molecular medicine reports*. 2021 ; 24(2) : 607. doi: 10.3892/mmr.2021.12246.
 16. Ballanti P, Minisola S, Pacitti MT, Scarnecchia L, Rosso R, Mazzuoli GF, Bonucci E. Tartrate-resistant acid phosphate activity as osteoclastic marker: sensitivity of cytochemical assessment and serum assay in comparison with standardized osteoclast histomorphometry. *Osteoporosis international*. 1997 ; 7(1) : 39–43. doi: 10.1007/BF01623458.
 17. Teitelbaum SL. Osteoclasts: what do they do and how do they do it?. *The American journal of pathology*. 2007 ; 170(2) : 427–435. doi: 10.2353/ajpath.2007.060834.
 18. Rumpler M, Würger T, Roschger P, Zwettler E, Sturmlechner I, Altmann P, Fratzl P, Rogers MJ, Klaushofer K. Osteoclasts on Bone and Dentin In Vitro: Mechanism of Trail Formation and Comparison of Resorption Behavior. *Calcified tissue international*. 2013 ; 93(6) : 526–539. doi: 10.1007/s00223–013–9786–7.
 19. Ikeda F, Matsubara T, Tsurukai T, Hata K, Nishimura R, Yoneda T. JNK/c-Jun signaling mediates an anti-apoptotic effect of RANKL in osteoclasts. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2008 ; 23(6) : 907–914. doi: 10.1359/jbmr.080211.
 20. Takayanagi H, Kim S, Koga T, Nishina H, Isshiki M, Yoshida H, Saiura A, Isobe M, Yokochi T, Inoue J, Wagner EF, Mak TW, Kodama T, Taniguchi T. Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts. *Developmental cell*. 2002 ; 3(6) : 889–901. doi: 10.1016/s1534–5807(02)00369–6.
 21. Lee SH, Rho J, Jeong D, Sul JY, Kim T, Kim N, Kang JS, Miyamoto T, Suda T, Lee SK, Pignolo RJ, Koczon-Jaremko B, Lorenzo J, Choi Y. v-ATPase V0 subunit d2-deficient mice exhibit impaired osteoclast fusion and increased bone formation. *Nature medicine*. 2006 ; 12(12) : 1403–1409. doi: 10.1038/nm1514.
 22. Cackowski FC, Anderson JL, Patrene KD, Choksi RJ, Shapiro SD, Windle JJ, Blair HC, Roodman GD. Osteoclasts are important for bone angiogenesis. *Blood*. 2010 ; 115(1) : 140–149. doi: 10.1182/blood–2009–08–237628.
 23. Ishibashi O, Niwa S, Kadoyama K, Inui T. MMP-9 antisense oligodeoxynucleotide exerts an inhibitory effect on osteoclastic bone resorption by suppressing cell migration. *Life sciences*. 2006 ; 79(17) : 1657–1660. doi: 10.1016/j.lfs.2006.05.024.
 24. Nishi Y, Atley L, Eyre DE, Edelson JG, Superti-Furga A, Yasuda T, Desnick RJ, Gelb BD. Determination of bone markers in pycnodysostosis: effects of cathepsin K deficiency on bone matrix degradation. *Journal of Bone and Mineral Research*. 1999 ; 14(11) : 1902–1908. doi: 10.1359/jbmr.1999.14.11.1902.
 25. Lehenkari P, Hentunen TA, Laitala-Leinonen T, Tuukkanen J, Väänänen HK. Carbonic anhydrase

II plays a major role in osteoclast differentiation and bone resorption by effecting the steady state intracellular pH and Ca^{2+} . Experimental cell research, 1998 ; 242(1) : 128-137. doi: 10.1006/excr.1998.4071.