

## RANKL에 의해 유도되는 뼈파괴세포 분화에 맥문동의 효과

박기인, 오재민<sup>1</sup>

전북대학교 자연과학대학 생물학과, <sup>1</sup>원광대학교 의과대학 해부학교실  
(2011년 11월 10일 접수, 2011년 12월 2일 수정접수, 2011년 12월 22일 게재승인)

**간추림** : 뼈파괴세포의 생성이나 활성 증가는 원하지 않는 뼈 흡수를 야기한다. 뼈파괴세포의 분화와 기능을 억제하는 천연물에 대한 연구가 뼈염성증성 뼈질환의 치료와 예방을 위해 진행 중이다.

맥문동은 동양의학에서 진해, 거담작용, 구갈 작용을 억제하는 작용 및 강장작용, 혈당 조절 작용, 이뇨작용, 변비를 조절하는 데 사용되어 왔다. 또한 최근에는 항염증 작용과 항혈전작용, 항유착작용이 있는 것으로 보고되고 있다.

본 연구의 목적은 맥문동이 뼈파괴세포 분화에 미치는 영향과 그 기전을 알아보기 위한 것이다. 맥문동 물 추출물은 RANKL에 의해 유도되는 큰포식세포의 뼈파괴세포로의 분화를 농도 의존적으로 억제하였다. 그러나 맥문동 추출물은 세포 독성은 나타내지 않았다. c-Fos, NFATc1, tartrate resistant-acid phosphatase (TRAP), cathepsin K의 mRNA의 발현이 맥문동 추출물에 의해 억제되었다. 또한 RANKL에 의해 유도되는 c-Fos, NFATc1의 단백질 발현도 저해되었다. 신호 경로 중에서 맥문동 추출물은 RANKL에 의해 유도되는 p38의 인산화를 저해하였다.

그러므로, 맥문동은 뼈파괴세포 분화에 필수 유전자인 c-Fos, NFATc1의 발현을 억제함으로써 뼈파괴세포 분화를 억제한다. 결론적으로 이러한 결과는 맥문동이 특이한 독성 없이 뼈염성증을 치료하는 유용한 후보물질이 될 수 있음을 암시하는 것이다

**찾아보기 낱말** : 맥문동, 뼈, RANKL, 뼈파괴세포

### 서 론

뼈염성증은 골량 감소로 인해서 작은 충격이나 넘어짐에도 쉽게 골절이 발생하는 근골격계통 질환이다. 이는 일반적으로 통증이 나타나지 않으며 소리 없이 진행되어 골절의 위험을 높이므로 고령화 사회에서 주의가 필요하다. 뼈염성증의 예방과 치료의 가장 중요한 목적은 골절을 방지하는 것인데 우리나라의 경우 매년 뼈염성증성 골절의 치료비용이 1조를 넘어 비용과 건강 측면에서 사회문제가 되고 있다. 뼈염성증은 이차적으로 쿠싱 증후군이나 갑상선 기능 항진증, 당뇨병 등의 만성 질환에 동반되는 경우 (Hamoudeh와 Yaqub, 2009), 류마티스 관절염이나 만성 호흡기 질환 등으로

스테로이드를 장기간 사용하는 경우에 (Maricic 2011) 흔하게 발생하므로 동반 질환의 치료와 함께 뼈염성증에 대한 치료적 접근이 중요하다. 일단 고령의 환자에서 골절, 특히 엉덩관절 골절이 발생하면 삶의 질이 현저히 떨어지고 엉덩관절 골절 발생 1년 이내의 사망률이 20%를 넘어 매우 위험한 결과를 초래한다 (Melton 등 2005). 이러한 뼈염성증의 치료를 위해 많은 연구들이 진행되고 있는데 기존 뼈염성증 약제의 부작용 등이 부각되면서 부작용이 적은 생약 성분을 이용한 치료제의 개발이 시도되고 있다. 맥문동은 자주색의 꽃이 피어 관상용으로도 사용되는 다년생 속근초로 뿌리의 팽대부가 약용으로 사용되는데 팽대부의 길이는 2.5~4cm 가량이며 너비는 약 1cm 가량이 된다. 맥문동에는 glucose, fructose, sucrose, ophiopogonone A and B,  $\beta$ -sitosterol, stigmasterol,  $\beta$ -sitosterol glycoside, oligosaccharides, polysaccharides, ruscogenin, ophiopogonin D 등이 함유되어 있어 진해 거담 작용, 영양 공급, 입마름, 이뇨 작용, 당 조절 작용 등이 있다고 알려져 있어 동양의

\*이 논문은 2009학년도 원광대학교의 교비지원에 의해 수행되었습니다  
저자(들)는 '의학논문 출판윤리 가이드라인'을 준수합니다.  
저자(들)는 이 연구와 관련하여 이해관계가 없음을 밝힙니다.  
교신저자 : 오재민 (원광대학교 의과대학 해부학교실)  
전자우편 : jmoh@wonkwang.ac.kr

학에서 응용되고 있다(Chung과 Shin 1998). 최근에는 맥문동이 항염 작용, 항 혈전 작용 등이 있다고 보고되었다(Kou 등 2005a, Kou 등 2006). 뼈는 흡수와 생성을 반복하는 역동적인 장기로서, 뼈 흡수를 담당하는 뼈파괴세포와 뼈 생성을 담당하는 뼈모세포의 균형이 중요하며 이들 세포의 불균형으로 뼈 질환이 발생할 수 있다(Boyle 등 2003). 특히 뼈 흡수기능을 수행하는 뼈파괴세포는 조혈모세포에서 유래되어 전구세포인 큰포식세포가 두 가지 중요한 사이토카인인 macrophage-colony stimulating factor(M-CSF)와 receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand(RANKL)에 의해서 tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) 양성 다핵형 세포로 분화된다. 성숙된 뼈파괴세포는 뼈 표면에 부착되어 주름진 표면을 통해 골을 흡수하게 된다. 뼈를 흡수하는 뼈파괴세포가 큰포식세포로부터 생성되지 않으면 뼈 흡수기능을 수행하지 못하므로 폐경이후 뼈영양증이나 염증으로 인한 뼈 소실을 막기 위해서는 뼈파괴세포의 분화를 억제하는 것이 좋은 치료 전략이 될 수 있다. 이전 연구에서 생약 성분을 이용한 뼈파괴세포 분화 억제 기능이 보고된 경우가 있는데 대표적으로 오미자(Lee 등 2010)와 천마(Choi 등 2010) 등이 있다. 맥문동은 많은 인체에 이로운 기능을 가지고 있음이 알려진 물질로서 뼈파괴세포 분화에 미치는 영향은 아직까지 연구가 이루어지지 않았다. 본 연구자는 RANKL에 의해 유도되는 뼈파괴세포의 분화에 맥문동이 미치는 영향을 알아보고 그 기전을 밝혀 뼈영양증 치료에 맥문동이 적용될 수 있는지를 알아보고자 연구를 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

본 연구에 사용한 맥문동(Liriopsis tuber)은 물로 추출하여 감압농축한 후 동결 건조하여 분말 형태로 얻었다. Human RANKL과 M-CSF는 peprotech(London, UK)사의 제품을 사용하였다. XTT assay kit는 Roche(Indianapolis, IN, USA)사에서 구입하였다. Phospho(p)-p38, p38, p-JNK, JNK, p-ERK, ERK, p-I- $\kappa$ B, I- $\kappa$ B, p-Akt, Akt 항체는 Cell Signaling Technology(Beverly, MA, USA)사의 제품을 사용하였다. Actin 항체와 TRAP 용액은 Sigma Aldrich사에서 구입하였다.

### 2. 뼈파괴세포의 분화

5주령의 5마리 이상 생쥐의 넙다리뼈와 정강뼈를 분

리하고 골수공간을 1 cc 주사기로 수세하여 골수세포를 얻었다. 분리된 골수세포는 10% FBS, 항생제, M-CSF(30 ng/mL)가 포함된  $\alpha$ -minimum essential medium( $\alpha$ -MEM) 배지에서 3일간 배양하였다. 3일 후, 부착된 세포를 골수 큰포식세포(bone marrow macrophage, BMM)로 사용하였다. 큰포식세포는 M-CSF(30 ng/mL)와 RANKL(100 ng/mL)을 첨가하여 배양하고 맥문동 물 추출물 농도별로 처리하였다. 4일 후, 배양한 세포는 TRAP 용액(Sigma Aldrich, USA)으로 염색하고 붉은색으로 염색된 세포는 뼈파괴세포로 간주하였다.

### 3. XTT 분석

큰포식세포는  $1 \times 10^4$ /well의 밀도로 96-well plate에 첨가하고 맥문동 물 추출물과 M-CSF(30 ng/mL)를 첨가하여 3일간 배양하였다. 3일 후, XTT 용액 50  $\mu$ L를 각각의 well에 첨가하고 4시간 배양 후 ELISA reader(Molecular Devices, CA, USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 확인하였다.

### 4. RT-PCR 분석

RNA는 배양된 각각의 세포에서 TRIzol(Invitrogen) 용액으로 제조사의 방법에 따라 분리하였다. 분리한 RNA 1  $\mu$ g은 oligo dT primer, dNTP, buffer, dithiothreitol, RNase inhibitor와 Superscript II reverse transcriptase를 이용하여 cDNA로 합성하였다. 합성된 cDNA는 다음과 같은 primer들을 이용하여 PCR 증폭을 하였다.

c-Fos sense, 5'-CTGGTGCAGCCCACTCTGGTC-3';

c-Fos antisense, 5'-CTTTCAGCAGATTGGCAATCTC-3';

NFATc1 sense, 5'-CAACGCCCTGACCACCGATAG-3';

NFATc1 antisense, 5'-GGCTGCCTCCGTCTCATAGT-3';

TRAP sense, 5'-ACTTCCCCAGCCCTTACTAC-3';

TRAP antisense, 5'-TCAGCACATAGCCCACACCG-3';

Cathepsin K sense, 5'-CACTGCTCTCTCAGGGCTT-3';

Cathepsin K antisense, 5'-ACGGAGGCATTGACTCTGAA-3';

GAPDH sense, 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3';

GAPDH antisense, 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'.

PCR 후, 증폭된 cDNA는 1% agarose gel에서 분리하였고 Et-Br로 염색하여 자외선상에서 관찰하였다.

### 5. Western blot 분석

배양된 세포는 lysis buffer(50 mM tris-Cl, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100, 1 mM sodium fluoride, 1 mM sodium vanadate, 1% deoxycholate, protease

inhibitors)를 이용하여 용해하고 원심분리 (14,000 rpm)를 수행하여 순수한 단백질을 얻었다. 단백질은 DC Protein assay kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 사용하여 정량하고 동량의 단백질은 10% SDS-polyacrilamide gel에서 분리하였다. 분리된 단백질은 PVDF 막 (Amersham Biosciences)으로 옮기고 여러 항체를 이용하여 단백질 발현 정도를 확인하였다.

### 6. 통계분석

정량적인 결과는 평균값과 표준편차로 표시하였다. 통계적인 차이는 Student's t-test를 이용하여 분석하였고  $p$  값이 0.05 이하인 경우(\*) 및  $p$  값이 0.01 이하인 경우(\*\*) 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

## 결 과

### 1. 뼈파괴세포의 분화에 미치는 맥문동 물 추출물의 효과

뼈 흡수에 주로 관여하는 뼈파괴세포의 분화는 뼈형성증의 치료에 매우 중요하다. 본 실험에서는 뼈파괴세포의 전구세포인 큰포식세포에서 뼈파괴세포로의 분화에 맥문동 물 추출물의 효과를 검증하기 위하여 M-CSF와 RANKL을 처리하여 뼈파괴세포 분화를 유도하고, 맥문동 물 추출물을 농도별로 같이 처리하여 4일간 배양하였다. 뼈파괴세포의 분화 유무를 확인하기 위해 TRAP 용액으로 염색한 결과 RANKL만 처리한 대조군에서는 양성 다핵형 뼈파괴세포가 형성되었지만 맥문동 물 추출물을 처리한 실험군에서는 농도 의존적으로 뼈파괴세포의 분화가 억제되었다(Fig. 1A, B). 두 군의 비교시 통계적으로 유의하게 맥문동 물 추출물에 의한 뼈파괴세포의 분화가 억제되어 있었다. 맥문동 물 추출물에 의한 뼈파괴세포의 분화가 세포 독성과 연관되어 있는지 확인하기 위하여 시행한 독성 실험에서 뼈파괴세포의 분화를 억제하는 효과를 보이는 농도에서 세포 독성이 나타나지 않았다(Fig. 1C).

### 2. RANKL에 의해 유도되는 뼈파괴세포의 유전자 발현에 미치는 맥문동 물 추출물의 효과

c-Fos는 뼈파괴세포 분화의 초기 단계에 중요한 전사인자로 NFATc1의 발현을 촉진한다(Takayanagi 등 2002). 따라서 RANKL에 의한 c-Fos, NFATc1의 발현과 뼈파괴세포의 지표인 TRAP과 OSCAR의 발현에 맥

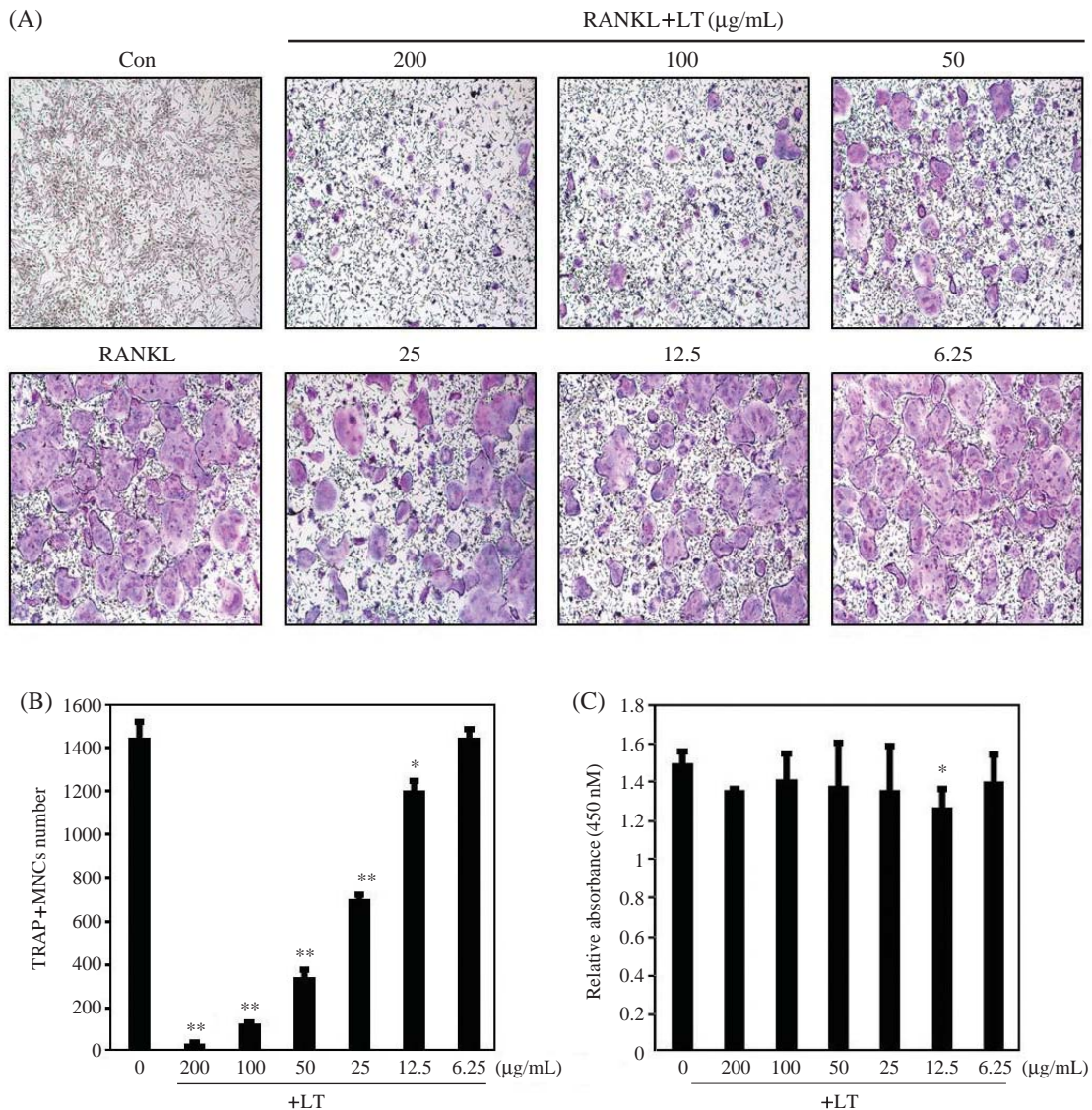
문동 물 추출물의 효과를 검증하였다. 큰포식세포에 RANKL을 처리했을 때 c-Fos, NFATc1의 발현이 증가하였고, 분화 시 후반기에 주로 발현되는 TRAP와 cathepsin K mRNA 발현이 증가되었지만, 맥문동 물 추출물을 같이 처리한 실험군에서는 c-Fos, NFATc1뿐만이 아니라 분화 시 후반기에 발현되는 TRAP와 cathepsin K mRNA 발현이 현저하게 억제되었다(Fig. 2).

### 3. RANKL에 의해 유도되는 단백질의 발현에 미치는 맥문동 물 추출물의 효과

전사인자 c-Fos와 NFATc1은 TRAP, DC-STAMP, OSCAR등 뼈파괴세포의 분화에 중요한 유전자 발현을 조절한다. 본 실험에서는 RANKL에 의하여 유도되는 이들 단백질의 발현에 맥문동이 미치는 영향을 western blotting을 통해 알아보았다. RANKL에 의해 유도되는 c-Fos는 전사인자 AP-1의 주요구성 단백질로써 NFATc1의 발현을 유도하는데, c-Fos 단백질의 발현은 RANKL을 투여하고 12시간에 가장 높게 발현됐으나 맥문동 물 추출물의 처리에 의해 c-Fos 단백질의 발현이 억제되었다(Fig. 3). 또한 NFATc1의 발현은 맥문동 물 추출물의 농도에 48시간에서 RANKL 투여 후 증가하였으나 맥문동 물 추출물의 처리에 의해 NFATc1 단백질의 발현이 억제되었다(Fig. 3). 이 결과를 통해 맥문동 물 추출물이 c-Fos와 NFATc1의 발현을 억제함으로써 TRAP 양성 뼈파괴세포의 분화를 억제한다고 할 수 있다.

### 4. RANKL의 신호전달 단백질의 활성화에 미치는 맥문동 물 추출물의 효과

MAPKs는 RANKL에 의해 활성화되는 단백질로 뼈파괴세포의 분화에 중요한 역할을 한다고 보고되었다(Teitelbaum과 Ross 2003). 특히, p38과 JNK의 활성화는 뼈파괴세포 분화에 중요한 신호전달 경로이다(Boyle 등 2003). 맥문동 물 추출물의 뼈파괴세포 분화 억제 작용기전 중 MAPKs의 활성화에 미치는 변화를 알아보기 위해 실험을 수행하였다. RANKL에 의해 분화 유도된 세포에서는 p38, JNK, ERK, I- $\kappa$ B의 인산화를 통한 활성화가 관찰되었지만, 맥문동 물 추출물을 처리한 실험군에서는 JNK, ERK, I- $\kappa$ B의 활성화에는 차이가 없었으나 p38의 인산화가 억제되었다(Fig. 4). 이들 결과로 맥문동 추출물이 p38의 신호전달 경로를 억제함으로써 큰포식세포에서 뼈파괴세포로의 분화를 억제함을 알 수 있었다.



**Fig. 1.** Liriopis tuber inhibits RANKL-induced osteoclast differentiation. (A) Bone marrow macrophages (BMMs) were cultured for 4 days with M-CSF (30 ng/mL) and RANKL (100 ng/mL) in the presence of Liriopis tuber with various concentration. Cells were fixed in 3.7% formalin, permeabilized with 0.1% Triton X-100, and stained with TRAP solution. Pictures were taken using a light microscope (Magnification: ×100) (B) TRAP-positive cells were counted as osteoclasts. Asterisks indicate a significant difference ( $p < 0.05$ ),  $** (p < 0.01)$  between control and Liriopis treated cells. (C) BMMs were cultured for 3 days with M-CSF (30 ng/mL) in the presence of Liriopis tuber. After 3 days, 50 μL of XTT reagents were added to each well and further incubated for 4 hours. The absorbance was measured at 450 nm using a microplate reader. Asterisks indicate a significant difference ( $p < 0.05$ ),  $** (p < 0.01)$  between control and Liriopis treated cells. Every experiments were conducted in triplicate.

## 고찰

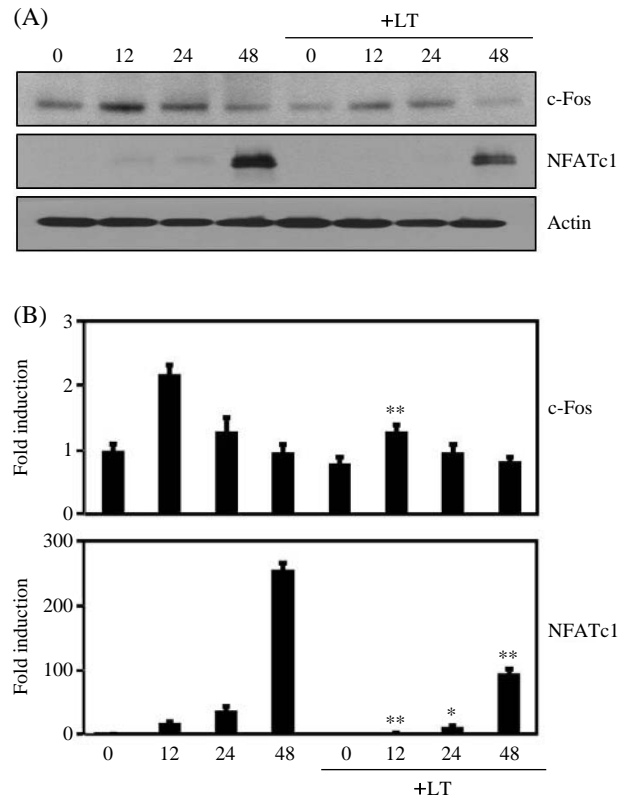
뼈형성증은 특이 증상 없이 골절의 위험을 증가시켜 고령에서 건강한 삶을 위협하는 심각한 상황을 야기할 수 있어 관심이 필요하다. 특히 움직임이 제한된 경우나 마른 체형의 사람 등은 뼈형성증의 위험이 높다. 뼈

형성증은 뼈를 형성하는 조골세포 기능부전이나 뼈를 흡수하는 뼈파괴세포의 기능이 증가하는 경우 발생하는데, 대부분의 뼈형성증 치료제는 장기간의 복용이 불가피하며 가장 많이 사용되고 있는 bisphosphonate 약물은 뼈파괴세포의 물리적인 작용을 억제하는데 장기 복용할 경우 뼈의 경도만 높아져 오히려 골절의 위험을 증가시킨다는 연구가 보고되고 있다(Nieves와 Cosman



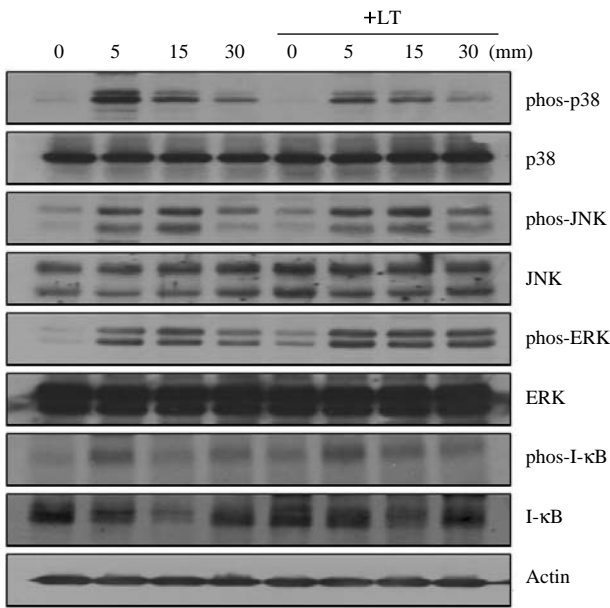
**Fig. 2.** RANKL-induced mRNA expression is inhibited by Liriopsis tuber. BMMs were pretreated with or without Liriopsis tuber (200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) for 1 hour and then stimulated with M-CSF (30  $\text{ng}/\text{mL}$ ) and RANKL (100  $\text{ng}/\text{mL}$ ) for the indicated time. Total RNA was isolated, and 1  $\mu\text{L}$  of cDNA was used as template for RT-PCR (top). The mRNA expression of the c-Fos, NFATc1, TRAP and cathepsin K genes was accessed by RT-PCR. Relative levels of c-Fos, NFATc1, TRAP and cathepsin K mRNA were quantified by densitometric analysis (bottom). Asterisks indicate a significant difference \* ( $p < 0.05$ ), \*\* ( $p < 0.001$ ) between control and Liriopsis treated cells. Every experiments were conducted in triplicate.

2010). 장기간의 안전하고 효과적인 뼈형성증 치료제의 개발이 중요한 시점에서 맥문동을 이용한 본 연구에서 뼈파괴세포 분화를 현저히 억제하는 결과를 보였다. 맥문동은 고전적으로 백일해, 자양강장, 거담, 이뇨 등에



**Fig. 3.** Inhibition of RANKL-induced c-Fos and NFATc1 expression by Liriopsis tuber. (A) BMMs were pretreated with or without Liriopsis tuber (200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) for 1 hour and then stimulated with RANKL (100  $\text{ng}/\text{mL}$ ) for the indicated time. The cell lysates were analyzed by Western blotting with antibodies to c-fos, NFATc1, and actin. (B) The protein expression of the c-fos, NFATc1 was accessed by Western blotting. Relative levels of c-fos, NFATc1 were quantified by densitometric analysis (bottom). Asterisks indicate a significant difference \* ( $p < 0.05$ ), \*\* ( $p < 0.001$ ) between control and Liriopsis treated cells. Every experiments were conducted in triplicate.

쓰여 왔고 최근 과학적인 실험을 통해 새로운 효능들이 보고되었는데 에탄올로 추출된 맥문동의 추출물이 항 혈전 작용이 있어 혈관 질환에 도움을 줄 수 있다는 연구가 보고되었고(Kou 등 2006) 상피세포 보호 작용을 가진다는 연구도 보고되었다(Kou 등 2005b). 맥문동에는 여러 가지 다당류를 포함한 성분이 포함되어 있는데 특히 이 성분들 중 ruscogenin and ophiopogonin D는 항염 작용을 가지고 있는 것으로 알려져 있다(Kou 등 2005a). 최근에 발표된 연구에서는 맥문동 성분이 AMPA (L- $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate) 수용체에 의해 유도되는 뇌세포 손상에 대하여 보호 역할을 한다고 보고되어 맥문동의 다른 영역의 효능을 기대할 수 있다(Kim과 Lee 2008). 본 연구에서 맥



**Fig. 4.** Liriopis tuber inhibits RANKL-induced phosphorylation of p38. BMMs were pretreated with or without Liriopis tuber (200 μg/mL) for 1 hour and then stimulated with RANKL (100 ng/mL) for the indicated time. The cell lysates were analyzed by Western blotting with the indicated antibodies. Every experiments were conducted in triplicate.

문동은 뼈파괴세포 분화에 핵심적인 유전자인 c-Fos와 NFATc1의 발현을 유의하게 억제하였다. 이는 RANKL로 유도되는 뼈파괴세포 분화의 핵심을 맥문동이 억제하는 것을 의미한다. NFATc1은 발현이 억제될 경우 뼈파괴세포 분화가 정상적으로 이루어지지 않아 NFATc1의 발현이 결핍된 배아 줄기 세포에서는 뼈파괴세포로의 분화가 되지 않았다(Takayanagi 등 2002). 임상에서 사용되는 면역 억제제중 cyclosporine은 NFATc1을 억제한다고 알려진 대표적인 약제인데 cyclosporine을 이용한 세포 실험도 뼈파괴세포 실험에서 이루어지고 있다. NFATc1의 상위에서 NFATc1의 발현을 억제하는 물질이 c-Fos인데(Takayanagi 등 2002), 맥문동이 c-Fos의 발현을 억제하며 이를 통해 NFATc1의 발현을 소견을 보였다(Fig. 3). 뼈파괴세포 분화에는 RANKL에 의한 세포 자극이 필수적인데 RANKL이 큰포식세포의 표면에 발현되는 RANK와 결합하고 이후에 세포질내 RANK에 TNF receptor-associated factor (TRAF) 계열의 단백질이 결합하고 하부 신호 체계, 즉 mitogen-activated protein kinases (MAPKs)인 JNK, p38, ERK와 같은 신호전달 단백질의 활성화를 일으킴으로 뼈파괴세포 분화에 필수적인 NF-κB, NFATc1, AP-1과 같은 전사인자가 유도된다(Galibert 등 1998). MAPKs 중에 p38과

c-Jun-N-terminal kinase (JNK)의 인산화를 통해 뼈파괴세포 분화를 촉진한다고 보고되었는데 (Tanaka 등 2006) 본 실험에서 맥문동은 p38의 인산화를 억제하였고 이를 통하여 c-Fos와 NFATc1의 발현을 조절할 가능성이 제시되었다. p38의 뼈파괴세포 분화에서의 중요성은 기존 연구를 살펴보면 알 수 있는데 p38의 지속적인 활성을 유도하면 세포내에서 NFATc1의 발현이 증가하고, 그 억제제인 SB203580로 뼈파괴세포에 처리하면 중요한 유전자인 c-Fos와 NFATc1의 발현을 억제한다고 보고되었다(Huang 등 2006). 또한 류마티스 관절염과 같이 염증으로 인한 골 소실에서 다른 MAPKs에 비해 p38 MAPK의 alpha-isoform이 관절염으로 인한 뼈 소실을 조절함을 보고하여 (Böhm 등 2009), 본 실험을 통해 p38 인산화 억제로 인해 뼈파괴세포 분화 억제 효과가 나타남을 확인하였다. 결과를 살펴보면 맥문동이 뼈파괴세포 분화 억제 뿐만 아니라 cathepsin K의 발현을 억제하였는데 cathepsin K는 성숙한 뼈파괴세포에서 특이적으로 생성되는 단백 파괴 효소로서 뼈 흡수를 일으킨다. 이 효소는 elastin, collagen, gelatin 등을 이화시켜 뼈와 연골의 소실을 가져오는데 최근 연구에서 cathepsin K를 억제하여 뼈 흡수를 억제하려는 약제들이 개발되었다(Roux 2010). 이들 중 odanacatib은 임상 2상을 진행한 결과 사람에서 주 1회 경구 요법을 통해 뼈형성증의 개선 효과를 보였다(McClung 등 2011). 본 실험에서 맥문동 추출물이 cathepsin K의 발현을 억제하는 것은 의미있는 결과라고 하겠다. 결론적으로 맥문동이 뼈파괴세포의 분화의 주요 기전인 c-Fos, NFATc1의 발현을 억제하여 뼈파괴세포 분화를 억제하는데 이는 p38경로를 저해함으로써 나타나는 결과임을 확인하였다. 종합적으로 생약 성분인 맥문동이 장기 치료가 불가피한 뼈형성증의 치료에 뼈파괴세포의 분화를 억제하는 기전을 통해 도움이 될 수 있을 것으로 기대된다.

### 참 고 문 헌

Böhm C, Hayer S, Kilian A, Zaiss MM, Finger S, Hess A, Engelke K, Kollias G, Krönke G, Zwerina J : The alpha-isoform of p38 MAPK specifically regulates arthritic bone loss. *J Immunol* 183: 5938-5947, 2009.  
 Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL : Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 423: 337-342, 2003.  
 Choi YH, Song JH, Jang SJ, Kim JK, Choi MK : Effects of *Gastrodia elata* blune water extract on RANKL-induced osteoclast differentiation. *Korean J Orient Physiol*

- Pathol 24: 807-813, 2010. (in Korean)
- Chung B, Shin M : Illustrated Dictionary of Folk Medicine. Younglim Company, pp 177-178, 1998.
- Galibert L, Tometsko ME, Anderson DM, Cosman D, Dougall WC : The involvement of multiple tumor necrosis factor receptor (TNFR)-associated factors in the signaling mechanisms of receptor activator of NF- $\kappa$ B, a member of the TNFR superfamily. *J Biol Chem* 273: 34120-34127, 1998.
- Hamoudeh E, Yaqub A : Evaluation of secondary causes of bone loss in a primary care setting. *Endocr Pract* 15: 410-414, 2009.
- Huang H, Chang EJ, Ryu J, Lee ZH, Lee Y, Kim HH : Induction of c-Fos and NFATc1 during RANKL-stimulated osteoclast differentiation is mediated by the p38 signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 351: 99-105, 2006.
- Kim SJ, Lee K : Extracts of *Liriopsis Tuber* protect AMPA induced brain damage and improve memory with the activation of insulin receptor and ERK I/II. *Phytother Res* 22: 1450-1457, 2008.
- Kou J, Sun Y, Lin Y, Cheng Z, Zheng W, Yu B, Xu Q : Anti-inflammatory activities of aqueous extract from *Radix Ophiopogon japonicus* and its two constituents. *Biol Pharm Bull* 28: 1234-1238, 2005a.
- Kou J, Yu B, Xu Q : Inhibitory effects of ethanol extract from *Radix ophiopogon japonicus* on venous thrombosis linked with endothelium-protective and anti-adhesive activities. *Vasc Pharmacol* 43: 157-163, 2005b.
- Kou J, Tian Y, Tang Y, Yan J, Yu B : Antithrombic activities of aqueous extract from *Radix Ophiopogon japonicus* and its two constituents. *Biol Pharm Bull* 29: 1267-1270, 2006.
- Lee Y, Lee HS, Jang SJ, Song JH : Effect of water extract of *Schisandra Chinensis* on osteoclast differentiation. *Korean J Orient Physiol Pathol* 24: 848-853, 2010. (in Korean)
- Maricic M : Update on glucocorticoid-induced osteoporosis. *Rheum Dis Clin North Am* 37: 415-431, 2011.
- McClung M, Boonen S, Törring O, Roux C, Rizzoli R, Bone H, Benhamou CL, Lems W, Minisola S, Halse J, Hoek H, Eastell R, Wang A, Siddhanti S, Cummings S : Effect of denosumab treatment on the risk of fractures in subgroups of women with postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res* 2011. (in press)
- Melton LJ 3rd, Kanis JA, Johnell O : Potential impact of osteoporosis treatment on hip fracture trends. *J Bone Miner Res* 20: 895-897, 2005.
- Nieves JW, Cosman F : Atypical subtrochanteric and femoral shaft fractures and possible association with bisphosphonates. *Curr Osteoporos Rep* 8: 34-39, 2010.
- Roux S : New treatment targets in osteoporosis. *Joint Bone Spine*. 77(3): 222-228, 2010.
- 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. *Dev Cell* 3: 889-901, 2002.
- Tanaka S, Miyazaki T, Fukuda A, Akiyama T, Kadono Y, Wakeyama H, Kono S, Hoshikawa S, Nakamura M, Ohshima Y, Hikita A, Nakamura I, Nakamura K : Molecular mechanism of the life and death of the osteoclast. *Ann N Y Acad Sci* 1068: 180-186, 2006.
- Teitelbaum SL, Ross FP : Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nat Rev Genet* 4: 638-649, 2003.

# Effects of Liriopsis Tuber Water Extract on RANKL-induced Osteoclast Differentiation

Kie-In Park, Jaemin Oh<sup>1</sup>

*Division of Biological Science, School of Natural Science, Chonbuk National University,*

<sup>1</sup>*Department of Anatomy, College of Medicine, Wonkwang University, Iksan, Korea*

---

**Abstract** : Increased formation and activation of osteoclast lead to unwanted bone resorption. Several natural products which have inhibitory effects on osteoclast differentiation and function are under investigation to prevent and treat the osteoporotic bone disease. Liriopsis tuber has been used in Oriental medicine for the suppression of cough, expectoration, thirst, and has been used for sthenia, diuresis, blood glucose regulation, treatment of xerostomia, and constipation. Also, recently it has been reported that Liriopsis tuber has anti-inflammatory, anti-thrombic, anti-adhesive activities. The purpose of this study was to evaluate the effects of Liriopsis tuber on osteoclast differentiation and was to evaluate of its mechanism. Water extract of Liriopsis tuber significantly inhibited receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand (RANKL)-induced osteoclast differentiation in bone marrow macrophages (BMMs) in a dose dependent manner. However, water extract of Liriopsis tuber did not affect cytotoxicity when compared with control. The mRNA expression of c-Fos, NFATc1, tartrate resistant-acid phosphatase (TRAP), and cathepsin K induced by RANKL was inhibited by water extract of Liriopsis tuber treatment. Also, water extract of Liriopsis tuber inhibited the protein expression of c-Fos and NFATc1 expression in BMMs treated with RANKL. Among the signal pathways, water extract of Liriopsis tuber suppressed the phosphorylation of p38 induced by RANKL. In summary, Liriopsis tuber exerted inhibitory effects on osteoclast differentiation via suppression of c-Fos and NFATc1 which are essential gene to osteoclastogenesis. Taken together, these results suggest that Liriopsis tuber may be a useful candidate in the treatment of osteoporosis without special toxicity.

---

**Keywords** : Liriopsis tuber, Bone, RANKL, Osteoclast