

## 천속단(*Phlomis umbrosa Turcz*)의 파골세포 분화에 미치는 영향

백종민<sup>1,†</sup>, 박주하<sup>1,†</sup>, 송정훈<sup>2</sup>, 박성남<sup>3</sup>, 정우진<sup>1</sup>, 문서영<sup>4</sup>, 이창훈<sup>5</sup>, 최민규<sup>1,7</sup>, 김정중<sup>1</sup>, 오재민<sup>1</sup>, 장성조<sup>6</sup>

<sup>1</sup>원광대학교 의과대학 해부학교실 및 골격계질환연구소, <sup>2</sup>원광대학교 의과대학 성형외과학교실,

<sup>3</sup>원광대학교 의과대학 산부인과학교실, <sup>4</sup>원광대학교 의과대학 마취과학교실, <sup>5</sup>원광대학교 의과대학 류마티스내과학교실,

<sup>6</sup>원광대학교 의과대학 신경외과학교실, <sup>7</sup>원광대학교 환경과학연구소

(2013년 8월 30일 접수, 2013년 9월 17일 수정접수, 2013년 9월 17일 게재승인, Published Online 30 September 2013)

**간추림** : 골다공증, 류마티스 관절염을 비롯한 많은 골질환은 파골세포의 지나친 골 흡수 활동으로 인하여 발생한다. 최근 들어, 천연물에서 추출한 성분을 이용하여 새로운 치료물질을 개발하기 위한 연구가 활발하게 진행되고 있다. 그 중, 천속단이라고 알려진 천연물질은 뼈를 튼튼하게 해주는 효능이 있는 것으로 알려져 있으나, 천속단의 골질환과 관련된 정확한 효과나 치료기전에 대한 정보는 아직 알려진 바가 없다. 따라서 본 연구에서는 골수탐식세포에서 receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand (RANKL)로 유도한 파골세포의 분화와 골 흡수능에 천속단이 어떠한 영향을 미치는지 알아보았다. 또한, 파골세포의 분화와 관련된 작용기전을 규명하였다. 본 실험에서 천속단은 RANKL로 유도한 파골세포의 분화와 골 흡수능을 현저히 억제하였고, RANKL과 macrophage-colony stimulating factor (M-CSF)를 처리한 골수탐식세포에서 NF- $\kappa$ B의 발현을 저해하였다. 더 나아가, c-Fos를 비롯한 nuclear factor of activated T-cells (NFAT)c1, osteoclast-associated receptor (OSCAR), tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP)의 mRNA 발현이 천속단에 의해 억제됨을 확인하였으며, 세포융합과 관련 있는 유전자인 Integrin  $\alpha$ v,  $\beta$ 3와 actin ring에 관여하는 유전자인 dendritic cell-specific transmembrane preprotein (DC-STAMP) 그리고 골 흡수능과 연관된 Cathepsin K 또한 같은 결과를 나타내었다. 이러한 결과는 천속단의 골다공증을 비롯한 골질환 치료의 후보물질로써의 가능성을 제시하였다.

**찾아보기 낱말** : 천속단, 파골세포, 골다공증, 골 흡수, RANKL

### 서 론

우리 몸의 골 조직은 끊임없이 변하는 장기 중 하나로써, 약 10년마다 모든 골 조직이 새로운 골 조직으로 교체되는 개형과정을 거친다. 이러한 골대사는 골 흡수를 하는 파골세포와 골 형성을 하는 조골세포의 균형에 의하여 정상적으로 유지된다. 그러나 이러한 균형이 깨지게 되면 여러 가지 골질환이 발생하게 되는데 그 중, 대표적인 골 질환으로써 골다공증을 들 수 있다. 골다공증은 정상인에 비해 골절의 위험이 높아지는 질환으

로써, 가벼운 타박상이나 심할 경우, 재채기만으로도 골절이 일어나는 매우 위험한 질병이다[1,2].

이러한 골다공증의 병인에 가장 영향을 미치는 것으로써 파골세포를 들 수 있다. 조혈모세포에서 유래된 파골세포는 전구세포인 단핵구/탐식세포의 생존과 증식을 위해 필요한 macrophage-colony stimulating factor (M-CSF)와 파골세포의 분화에 필수적인 receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand (RANKL)이라는 사이토카인에 의해 다핵형세포로 분화된다[3,4]. 성숙한 파골세포로의 분화과정은 T-림프구에서 시발되어 조골세포에서 분비되는 RANKL과 파골세포의 RANK의 결합을 시작으로 tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF6)가 군집되고 전사인자요소인 nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B), NFATc1, c-Fos의 활성화와 mitogen-activated protein kinases (MAP kinase)의 인산화를 유도한다[5,6]. NF- $\kappa$ B는 IKK $\alpha$ , IKK $\beta$ , IKK $\gamma$ 로 이루어진 IKK complex의 인산

\*이 논문은 2011년도 원광대학교 교비연구비에 의해 수행되었습니다.

저자(들)는 '의학논문 출판윤리 가이드라인'을 준수합니다.

저자(들)는 이 연구와 관련하여 이해관계가 없음을 밝힙니다.

<sup>†</sup> 제1저자로 동등한 역할을 수행하였음.

교신저자: 장성조(원광대학교 의과대학 신경외과학교실)

전자우편: jang4025@wku.ac.kr

화와 유비퀴틴화를 통해 IκB를 감소시킴으로써 핵 내로의 이동이 이루어져 활성을 띄게 된다[7]. 또한 RANKL에 의하여 MAP kinase의 경로인 extracellular signal-regulated kinase (ERK), c-Jun N-terminal kinase (JNK)와 p38의 인산화의 과정을 거치고 이에 따라 또 다른 전사인자요소인 NFATc1과 c-Fos의 발현이 일어나게 되면서 골 흡수능을 가지는 성숙한 파골세포로 분화가 이루어진다[8]. 그러므로, 파골세포의 분화를 억제하고 성숙한 파골세포의 골 흡수 기능을 저해하는 것이 골다공증을 치료하는데 있어서 중요한 지표라 할 수 있다.

현재 임상에서 사용하고 있는 골다공증의 치료제로는 bisphosphonates, selective estrogen receptor modulators (SERM), calcitonin, strontium ranelate, teriparatide 등의 제제가 있다[9]. 그러나 이 중, bisphosphonate 제제로 치료를 받은 골다공증 환자들에게서 여러 가지의 부작용이 발견되면서 골다공증 치료에 대한 문제점이 제기되기 시작하였다. 즉, 파골세포의 괴사를 유도하여 골다공증을 치료하는 기전을 가진 bisphosphonate 제제가 턱뼈의 괴사가 일어나는 아래턱뼈괴사를 비롯하여 여러 위장관에도 궤양을 유발하는 부작용을 나타냈다[10]. 이로 인해, 질병의 치료를 비롯한 신약 등의 개발에 있어서 천연물질에 대한 연구가 활발히 이루어지면서 골다공증을 비롯한 여러 골 질환 또한 천연물을 이용하여 부작용은 적고 치료효과는 높은 치료제를 개발하기 위한 시도가 활발히 이루어지고 있는 추세이다.

천속단(*Phlomis umbrosa Turcz*)은 산토끼꽃과에 속하는 다년생 초본으로, 약간 납작하고 일부는 구부러진 형태를 띠며 표면은 황갈색 또는 회갈색으로 뚜렷하게 비틀려 구부러진 세로 주름을 가지며, 질은 연하고 피부의 가장자리는 엷은 갈색, 내부는 흑록색 또는 갈색, 목부는 황갈색을 띠는 성상을 가진다. 천속단은 강골(強骨)의 효능과 더불어 우리 몸의 오장육부중의 하나인 간과 신장을 보(補)해 주는 효능이 있다[11]. 뼈와 관련된 천속단의 효능은 이미 알려져 있지만, 구체적으로 골다공증에 직접적인 영향을 미치는 파골세포와 관련된 사실은 아직 밝혀진 바가 없다.

본 연구에서는 이러한 사실을 기반으로 천속단 추출물이 파골세포의 분화과정과 골 흡수능에 미치는 영향과 그 작용기전을 규명하기 위하여 실험을 진행하였고 향후 임상응용에서의 가능성 또한 알아보고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 시료 및 실험재료

천속단(*Phlomis umbrosa Turcz*) 추출물은 ethanol 95

~95.5 v/v% 용매로 추출한 것으로 한국생명공학연구원 한국식물추출물은행에서 구입하였다. 천속단 추출물은 DMSO 용매를 사용하여 25, 50, 100 µg/mL로 희석하여 실험에 사용하였다. TRAP 용액은 Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA) 제품을 사용하였고, XTT (2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide) assay kit는 Roche (Indianapolis, IN, USA)에서 구입하였다. 세포배양 및 파골세포 분화를 위해 필요한 α-MEM, FBS 및 penicillin-streptomycin 등은 Gibco-BRL (Grand Island, NY, USA)에서 구입하였고, human RANKL과 human M-CSF는 Peprotech (London, UK)의 제품을 사용하였다. 웨스턴 블롯을 위한 일차항체로 rabbit-anti-c-Fos, mouse-anti-NFATc1 (Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz, CA, USA), rabbit-anti-phospho-p38, rabbit-anti-p38, rabbit-anti-phospho-Akt, rabbit-anti-Akt, rabbit-anti-phospho-JNK, rabbit-anti-JNK, rabbit-anti-phospho-IκB, rabbit-anti-IκB (Cell Signaling Technology; Beverly, MA, USA) 및 mouse-anti-β-actin (internal control) (Sigma Aldrich) 등을 사용하였고, 이차항체는 anti-rabbit과 anti-mouse를 사용하였으며 Amer-sham Pharmacia Biotechnology Inc. (Tokyo, Japan)을 구입하였다.

### 2. 큰포식세포 획득 및 파골세포 분화

골수세포를 분리하기 위하여 생후 5주령 ICR 마우스를 경추 탈골법으로 희생시킨 후, 넵다리뼈와 정강뼈를 무균적으로 적출하고 연조직을 제거하였다[12]. 장골의 양끝을 절단한 후 양쪽 끝의 골수강에 1 mL의 주사기를 이용하여 뼈의 속질을 수세함으로써 골수세포를 얻었다. 분리된 골수세포를 10% FBS와 1% penicillin/streptomycin이 포함된 α-MEM 배지에서 1일간 배양한 후 미부착세포를 모았다. 파골세포의 전구세포가 되는 미부착세포를 10% FBS, 1% penicillin/streptomycin과 M-CSF (30 ng/mL)이 포함된 α-MEM 배지에서 3일간 배양하였다. 3일 후, 부착된 탐식세포를 사용하여 실험하였다. 큰포식세포는 M-CSF (30 ng/mL)와 RANKL (100 ng/mL)을 처리하여 배양하면서 천속단 추출물을 25, 50, 100 µg/mL의 농도별로 처리하였다. 3일 후, 같은 조건으로 매디아를 교체하였고 다음 날, 배양한 세포를 TRAP 용액으로 염색하고 붉은색으로 염색된 세포를 세어서 분화 정도를 확인하였다.

### 3. 세포 독성검사

탐식세포는  $1 \times 10^4$ /well의 밀도로 96-well 플레이트에 첨가하고 M-CSF (30 ng/mL)와 천속단 추출물을 농도별로 첨가하여 3일간 배양하였다. 3일 후, XTT 용액 50 µL

를 각각의 well에 첨가하고 4시간 배양 후 ELISA reader (Molecular Devices, CA, USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 확인하였다[13].

#### 4. 역전사중합효소 연쇄반응 (RT-PCR) 분석

세포 내 총 RNA는 QIAzol lysis reagent (QIAGEN, Valencia, CA, USA)로 설명서에 따라 추출하였다. 동등한 양의 RNA는 TOPscript cDNA synthesis kit (Enzynomics, Daejeon, Korea)를 사용하여 cDNA를 합성하였다. cDNA 1 µg은 다음과 같은 각각의 primer를 이용하여 PCR을 수행하였다.

c-Fos forward,

5'-CTGGTGCAGCCCACTCTGGTC-3';

c-Fos reverse,

5'-CTTTCAGCAGATTGGCAATCTC-3';

NFATc1 forward,

5'-CAACGCCCTGACCACCGATAG-3';

NFATc1 reverse,

5'-GGCTGCCTTCCGTCTCATAGT-3';

TRAP forward,

5'-ACTTCCCCAGCCCTTACTAC-3';

TRAP reverse,

5'-TCAGCACATAGCCCACACCG-3';

OSCAR forward,

5'-CTGCTGGTAACGGATCAGCTCCCCAGA-3';

OSCAR reverse,

5'-CCAAGGAGCCAGAACCTTGAAACT-3'

Cathepsin K forward,

5'-CACTGCTCTCTTCAGGGCTT-3'

Cathepsin K reverse,

5'-ACGGAGGCATTGACTCTGAA-3'

DC-STAMP forward,

5'-GCAAGGAACCCAAGGAGTCG-3'

DC-STAMP reverse,

5'-CAGTTGGCCCAGAAAGAGGG-3'

Integrin  $\alpha$ v forward,

5'-TTGTTGCCGCCTTACGAGAA-3'

Integrin  $\alpha$ v reverse,

5'-GCAGATGGCATAGCCACAGG-3'

Integrin  $\beta$ 3 forward,

5'-TCTCCTGCGTCCGCTACAAA-3'

Integrin  $\beta$ 3 reverse,

5'-CCCTTGGGACACTCAGGCTC-3'

GAPDH forward,

5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3';

GAPDH reverse,

5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'

PCR 조건은 94°C에서 30초 동안 denaturation, 58°C에서 30초 동안 annealing, 그리고 72°C에서 30초 동안 extension 반응을 25~30 cycles로 하여 증폭시켰다. 합성된 cDNA는 1% agarose gel에서 분리하였고, EtBr로 염색하여 자외선에서 관찰하였다.

#### 5. 웨스턴 블롯 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, 20 min)를 수행하여 순수한 단백질을 얻었다. 단백질은 DC Protein assay kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 사용하여 정량하고 동량의 단백질은 10% SDS-polyacrylamide gel에서 분리하였다. 분리된 단백질은 PVDF막 (Amersham Biosciences)으로 옮기고 PVDF막은 5% non-fat dry milk를 처리하여 비 특이단백질이 붙는 것을 방지하였다. 그리고 1차 항체 및 2차 항체를 처리했다. TBS-T 완충용액으로 PVDF막을 세척하고 enhanced chemiluminescence를 이용해 빛을 차단하여 단백질 발현을 관찰하였다.

#### 6. 골흡수능 분석

성숙한 파골세포를 얻기 위하여 콜라겐으로 코팅한 90 mm 배양접시에 5주령 ICR 마우스의 정강뼈와 넙다리뼈에서 획득한 골수세포와 1일령 ICR 마우스의 두개관에서 분리한 조골세포를 첨가하고 1 $\alpha$ , 25-dihydroxy-vitamin D3 (VitD3)와 프로스타글란딘 E2를 처리하여 6일간 공생배양하였다. 배양한 후, 세포는 0.1% collagenase를 처리하여 떼어내고 hydroxyapatite로 코팅된 96-well 플레이트에 첨가하였다. 동시에 천속단 추출물을 주어진 농도로 처리하여 12시간 배양하였다. 12시간 배양 후, 세포는 증류수로 수세하고 광학현미경을 통해 관찰하였다. Hydroxyapatite가 흡수된 부분을 Image Pro-Plus program version, 4.0 (Media Cybernetics)으로 정량하였다[14].

#### 7. 통계분석

각각의 실험군은 3개 이상 수행하였고 평균값과 표준편차를 계산하였다. 모든 실험은 3회 이상 반복하여 동일한 실험결과를 얻은 경우 실험결과로 사용하였으며, 정량적인 결과의 통계는 Student's t-test를 이용하여 분석하였고  $p$  값이 0.05 이하인 경우 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

## 결 과

### 1. RANKL에 의해 유도되는 파골세포 분화에 미치는 천속단 추출물의 영향

파골세포의 분화에 천속단 추출물이 미치는 영향을 알아보기 위하여 탐식세포에 파골세포 분화에 필수적인 M-CSF와 RANKL를 처리하고 천속단 추출물을 농도 별로 처리한 후 4일 동안 배양하였다. DMSO를 처리한 대조군에서는 TRAP 양성 다핵형 파골세포가 많이 생성되었으나, 천속단 추출물을 같이 처리한 실험군에서는 농도의 증가에 따른 TRAP 양성 파골세포의 형성이 억제되었다(Fig. 1A). TRAP 활성화와 연관되어 있는 TRAP 양성 세포 수 역시 천속단 추출물에 의해 농도 의존적으로 감소하는 경향을 보였다(Fig. 1B). 또한 천속단 추출물의 효과가 세포 독성과 연관되어 있는지를 확인하기 위하여 XTT 실험을 실행하였으나 본 연구에서는 천속단 추출물의 독성이 없는 것으로 확인되었다(Fig. 1C). 이를 통해, 천속단 추출물은 세포 독성이 없이 파골세포의 분화를 억제한다는 결론을 내릴 수 있었다.

### 2. 파골세포 분화의 신호전달 물질 활성화에 미치는 천속단 추출물의 효과

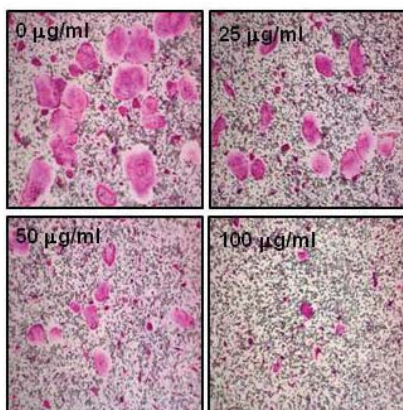
파골세포 분화를 억제하는 천속단 추출물의 작용기전을 규명하기 위하여 RANKL에 의한 MAP kinase의 활성화에 미치는 천속단 추출물의 효과를 검증하였다. 탐식세포를 천속단 추출물로 전처리 후 RANKL에 의한

MAP kinase의 활성을 주어진 시간별로 확인하였다. RANKL로 자극한 대조군과 비교했을 때, 천속단 추출물을 같이 처리한 군에서는 RANKL에 의하여 p38의 인산화가 5분과 15분에서 억제되는 결과를 확인하였고, IkB의 인산화는 RANKL을 주입한지 5분이 지났을 때 인산화가 억제되는 결과가 나타났고, JNK의 인산화는 15분에서 유의성 있게 감소하는 결과를 관찰할 수 있었다(Fig. 2). 이를 통해 천속단 추출물의 효과는 JNK, p-38, IkB의 신호전달경로를 이용하여 파골세포의 분화를 억제하는 것으로 판단하였다.

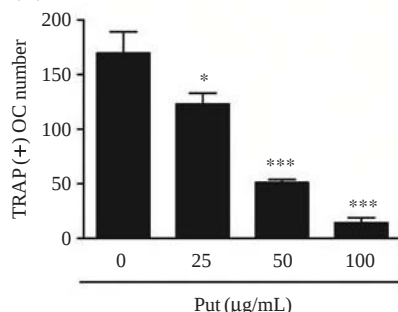
### 3. 천속단 추출물이 파골세포의 분화와 관련한 유전자 발현에 미치는 영향

RANKL과 RANK의 결합은 파골세포의 분화에 필수적인 유전자의 발현을 가능하게 한다. 파골세포의 분화에 중요한 유전자인 c-Fos와 NFATc1, TRAP, OSCAR와 세포융합과 관련된 Integrin  $\alpha$ v,  $\beta$ 3 그리고 actin ring과 연관된 DC-STAMP, Cathepsin K의 mRNA 발현을 살펴보았다. 또한 RANKL에 의한 c-Fos와 NFATc1 단백질 발현에 천속단 추출물이 미치는 영향을 실험하였다. RANKL은 c-Fos, NFATc1을 비롯한 유전자들의 발현을 촉진하였지만, 천속단 추출물을 처리한 실험군에서는 c-Fos와 NFATc1 및 파골세포의 분화와 관련된 유전자인 OSCAR, TRAP, Integrin  $\alpha$ v, Integrin  $\beta$ 3, DC-STAMP, Cathepsin K의 mRNA 수준에서의 발현을 억제하는 경향을 보였다(Fig. 3A). 또한 RANKL을 처리한 대조군은 c-Fos와 NFATc1의 단백질 발현을 촉진하

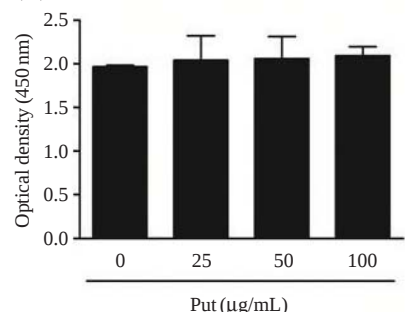
(A)



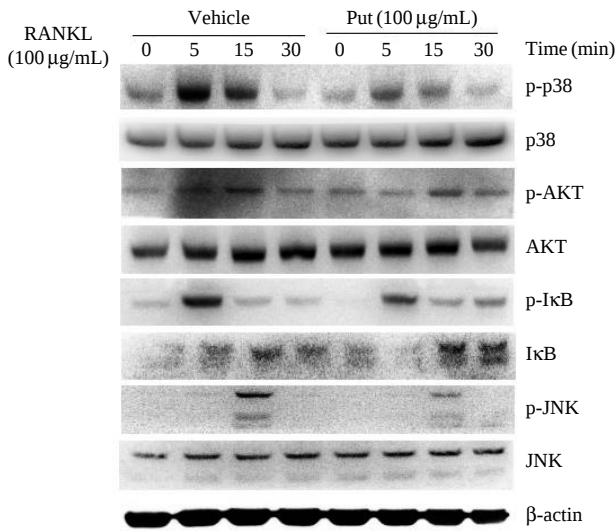
(B)



(C)



**Fig. 1.** Effect on osteoclast differentiation by ethanol extract of *Phlomis umbrosa Turcz* (PUT). (A) BMMs (bone marrow macrophages) were cultured for 4 days with M-CSF (30 ng/mL) and RANKL (100 ng/mL) in the presence of ethanol extract of PUT. Cells were fixed in 3.7% formalin, permeabilized with 0.1% Triton X-100, and stained with TRAP solution. TRAP-positive cells were photographed under a light microscope (100 $\times$  magnification). (B) TRAP-positive cells were counted as osteoclasts.  $p < 0.05$  vs control (DMSO). (C) BMMs were seeded into a 96-well plate and cultured for 3 days in the presence of M-CSF (30 ng/mL) and with the indicated concentrations of ethanol extract of PUT. After 3 days, the absorbance was measured at 450 nm using an ELISA reader.



**Fig. 2.** Effect of ethanol extract of *Phlomis umbrosa Turcz* (PUT) on gene expression, c-Fos and NFATc1 that are associated with osteoclast differentiation. (A) BMMs were pretreated with or without ethanol extract of PUT (100  $\mu$ g/mL) for 1 h and then treated with RANKL (100 ng/mL) for the indicated time points. Total RNA from the cells was obtained and the level of expression of the mRNA of the indicated genes was analyzed by RT-PCR. (B) BMMs were pretreated with or without ethanol extract of PUT (100  $\mu$ g/mL) for 1 h and then treated with RANKL (100 ng/mL) for the indicated time. The cells were lysed in lysis buffer, then resolved by SDS-PAGE and western blotting with antibodies against c-Fos and NFATc1 and  $\beta$ -actin.

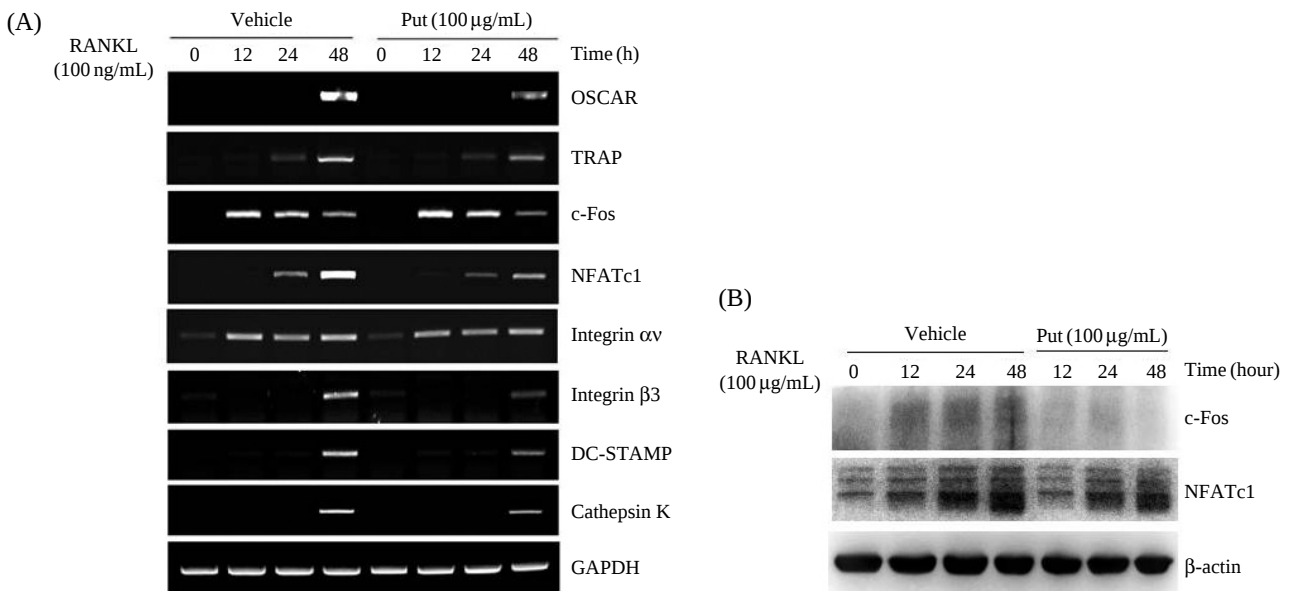
였지만, 천속단 추출물을 처리한 실험군에서는 c-Fos, NFATc1 단백질 발현이 강하게 억제되었다(Fig. 3B).

#### 4. 골 흡수능에 미치는 천속단 추출물의 효과

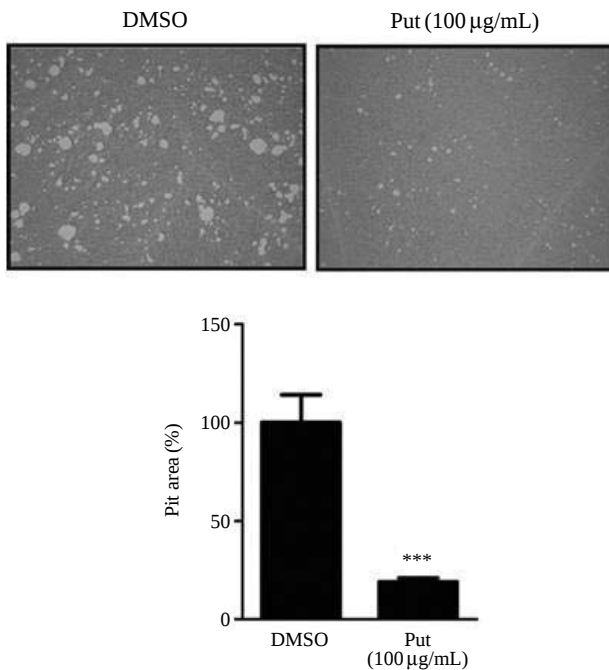
천속단 추출물이 파골세포 골 흡수능에 대한 효과를 좀더 *ex vivo*적인 측면에서 확인하기 위하여 조골세포와의 공생배양을 통해 성숙한 파골세포와 천속단 추출물을 hydroxyapatite로 코팅된 플레이트에 주입하였다. DMSO로 처리한 대조군에서는 hydroxyapatite가 파골세포에 의해 흡수된 부분을 많이 관찰하였지만, 천속단 추출물을 처리한 실험군에서는 흡수된 부분이 현저하게 감소된 양상을 관찰하였다(Fig. 4A). 또한 그래프를 통해 실험군과 대조군의 pit area를 측정한 결과 실험군에서 현저하게 감소되는 경향을 확인하였다(Fig. 4B). 천속단 추출물이 파골세포의 bone material의 흡수를 억제시키는 현상을 공생배양을 통한 골흡수능 분석에서 확인함으로써 인체 내에서도 천속단 추출물이 작용할 것이라고 예상할 수 있었다.

## 고 찰

골다공증은 현대사회에서 동서양을 막론하고 전세계적으로 주목받고 있는 질병중의 하나이며, 주로 척추 뼈



**Fig. 3.** Effect of ethanol extract of *Phlomis umbrosa Turcz* (PUT) on phosphorylation of MAPK. BMMs were starved for 3 h, pretreated with ethanol extract of PUT (100  $\mu$ g/mL) for 1 h and then stimulated with RANKL (100 ng/mL) for the indicated times. Cell lysates were analyzed by Western blotting with primary antibody against p-p38, p38, p-Akt, Akt, p-IκB, IκB, p-JNK, JNK and  $\beta$ -actin and secondary antibody (anti-rabbit, anti-mouse).



**Fig. 4.** Ethanol extract of *Phlomis umbrosa Turcz* (PUT) inhibits osteoclastic bone resorption. Mature osteoclasts were seeded on hydroxyapatite-coated plates and treated for 24 h with the indicated concentrations of PUT. Attached cells on the plates were removed and photographed under a light microscope (top) (100× magnification). Pit areas were quantified using the image (bottom). \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$  versus the control (DMSO).

와 골반 뼈가 쉽게 골절되는 증상을 수반한다. 이로 인해, 약 10년 전부터 골다공증을 치료하기 위한 연구가 활발하게 이루어지기 시작하였다[15]. 그러나, 현재 임상에서 사용하고 있는 골다공증 치료제의 한계점이 드러나기 시작하면서 새로운 치료제를 개발하기 위한 필요성이 제기되었고 특히 생체이용률이 높고 부작용이 적은 천연물이나 생약물질을 이용하여 치료제를 개발하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다[16]. 골다공증과 관련하여 오미자, 복분자, 목향, 우슬 등의 천연물질이 파골세포의 분화를 억제하고 골다공증을 예방할 것이라는 연구가 발표되었고[17-20], 이러한 사실을 기반으로 여러 종류의 천연물질을 스크리닝한 결과, 그 가운데 천속단이 효과가 있을 것이라는 추측을 하게 되었다. 따라서 본 연구는 파골세포 분화의 억제효과를 입증함과 동시에 그 작용기전을 밝히고 더 나아가 임상에서 골다공증 치료제로써의 유용성을 알아보려고 하였다.

천속단은 25 µg/mL의 저농도에서부터 고농도인 100 µg/mL까지 세포독성이 없이 RANKL로 유도한 파골세포의 분화를 억제하였고 농도 의존적으로 파골세포의 분화가 저해되는 양상을 나타내었다(Fig. 1). 이러한 억제

효과는 NFATc1과 c-Fos이 단백질 발현을 억제한다라는 사실에서 기인한 것을 알 수 있었다(Fig. 3). NFATc1은 TRAF6와 NF-κB의 subunit인 p50/p52가 상실된 세포에서 손상을 받는다는 기존의 연구결과에 따라 파골세포 분화의 초기단계에서 NF-κB의 타겟 유전자로 작용을 하고 파골세포 분화의 지표로써의 의미를 가지는 요소이다. 또한, RANKL과 RANK의 결합에 의해 활성화되는 또 다른 전사인자요소로써 AP-1복합체의 구성 성분인 c-Fos 역시 기존의 연구를 통해 파골세포의 분화과정에서 중요한 역할을 한다는 사실이 밝혀졌다[4]. 이러한 NFATc1과 c-Fos의 발현이 천속단에 의해 억제되었다는 사실은 파골세포의 분화과정에 있어서 천속단이 작용한다는 사실을 의미한다고 볼 수 있다.

MAP kinase의 신호전달체계에 있어서 천속단이 미치는 영향을 확인한 결과, p38, IκB, JNK의 인산화를 저해함으로써 파골세포의 분화를 억제한다는 것을 알 수 있었다(Fig. 2). MAP kinase 중 p38은 signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1)을 직접적으로 인산화시키고 이는 파골세포와 관련된 여러 타겟 유전자들의 발현을 조절한다. 또한 stress activated protein kinases (SAPKs)라 불리는 JNK는 MKK7의 하위단계의 경로로써 MKK7은 *in vitro*상에서 파골세포 분화과정에 연관되어 있다는 연구결과가 기존에 보고된 바 있으며[21], JNK는 c-Jun과 c-Fos 등을 포함한 AP-1의 조절자로서 역할을 한다고 알려져 있다[22]. 이러한 의미를 가지는 p38과 JNK의 인산화가 천속단에 의해 억제되고 NF-κB의 활성화에 깊은 연관이 있는 IκB의 인산화[7] 또한 억제되었다는 결과를 통해 천속단이 파골세포가 분화 억제기전에 미치는 연관성을 다시금 확인하였다.

단핵구에서 골 흡수능을 가지는 파골세포로써 성숙해지는 초기 단계에서 발현되는 유전자인 TRAP[23]과 폐경기 여성들에게서 발현에 이상이 있을 경우, 골다공증의 위험성을 증가시킨다고 알려진 OSCAR[24]의 mRNA 발현이 천속단에 의해 억제됨을 확인하였다. 더 나아가, 세포와 기질간의 상호작용에 있어서 heterodimeric adhesion receptor로써 작용하는 Integrin 중 파골세포에서 높은 수치의 발현을 보이며 vitronectin, osteopontin, bone sialoprotein 등을 포함한 세포외의 기질과 결합한다고 알려진 Integrin αv, Integrin β3의 발현은 천속단에 의해 억제되었다[25]. 이와 더불어 파골세포의 전구체에서 RANKL의 자극으로 인해 유도되고 TRAP의 지표로써 작용한다고 알려진 DC-STAMP[26] 그리고 *in vivo*, *in vitro* 상에서 파골세포의 골흡수능과 관련되었다고 알려진 Cathepsin K[27]의 발현 역시 천속단에 의해 감소되었음을 확인할 수 있었다(Fig. 2). DC-STAMP와

Cathepsin K의 발현이 억제된 결과를 통해 성숙한 파골세포의 골격을 이루는 actin ring의 형성 또한 천속단에 의해 억제될 것이라는 추측을 할 수 있었다. 본 연구에서는 성숙한 파골세포로의 형성이 억제되면 골 흡수능 또한 억제될 것이라는 추측을 하였고 이를 확인하기 위하여 골기질의 주요성분인 hydroxyapatite로 코팅된 플레이트를 이용한 골 흡수능 분석을 실시한 결과, 천속단이 파골세포의 골 흡수를 유의성 있게 억제함을 확인하였다(Fig. 4).

본 연구에서는 천속단이 MAP kinase의 경로 중 p38, JNK와 NF- $\kappa$ B의 신호전달을 억제하여 아래경로 전사인자들의 활성화를 저해하고 파골세포의 형성과 주 기능에 관련된 여러 유전자들의 발현을 감소시킴으로써 파골세포의 분화와 골 흡수 기능을 억제하였다는 사실을 확인하였다. 이러한 연구결과를 통해, 기존에 알려져 있던 천속단의 골 조직에 대한 효과에 대하여 과학적 뒷받침을 제공하였으며, 향후 골다공증의 치료 및 예방에 있어서 천속단이 의미 있게 쓰일 수 있을 것이라는 근거를 제시하였다. 더 나아가, 천속단에 포함된 지표성분을 비롯한 여러 유효성분을 좀 더 깊게 연구할 필요가 있을 것으로 사료된다.

## 참 고 문 헌

1. Park YS. Diagnosis and treatment of osteoporosis. J Korean Med Assoc. 2012; 55:1083-94.
2. Henriksen K, Bollerslev J, Everts V, Karsdal MA. Osteoclast activity and subtypes as a function of physiology and pathology-implications for future treatment of osteoporosis. Endocr Rev. 2011; 23:31-63.
3. David Roodman G. Regulation of osteoclast differentiation. Ann NY Acad Sci. 2006; 1068:100-9.
4. Masataka A, Hiroshi T. The molecular understanding of osteoclast differentiation. Bone. 2007; 40:251-64.
5. Lianping X, Edward MS, Brendan FB. Osteoclast precursors, RANKL/RANK, and immunology. Immunol Rev. 2005; 208:19-29.
6. Andrea DF, Anna T, Nadia R. Osteoclast receptors and signaling. Arch Biochem Biophys. 2008; 473:147-60.
7. Soysa NS, Alles N. NF- $\kappa$ B functions in osteoclasts. Biochem Biophys Res Commun. 2009; 378: 1-5.
8. Huang H, Chang EJ, Ryu JY, Lee ZH, Lee YK, Kim HH. Induction of c-Fos and NFATc1 during RANKL-stimulated osteoclast differentiation is mediated by the p38 signaling pathway. Biochem Biophys Res Commun. 2006; 351:99-105.
9. Cheng MH, Chen JF, Fuh JL, Lee WL, Wang PH. Osteoporosis treatment in postmenopausal women with pre-existing fracture. Taiwan J Obstet Gynecol. 2012; 51:153-66.
10. Sundeeep K, David B, Jane C, David WD, Peter RE, Dieter F, et al. Bisphosphonates-associated osteonecrosis of the jaw:report of a task force of the american society for bone and mineral research. J Bone Miner Res. 2007; 22:1479-91.
11. Seo BI, Lee JH, Choi HY, Kwon DY, Boo YM. Hernal Medicine, Seoul, Younglimsa.
12. Lee MS, Kim HS, Yeon JT, Choi SW, Chun CH, Kwak HB, et al. GM-CSF regulates fusion of mononuclear osteoclasts into bone-resorbing osteoclasts by activating the Ras/ERK pathway. J Immunol. 2009; 183:3390-9.
13. Kuhn DM, Balkis M, Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. Uses and Limitations of the XTT Assay in Studies of Candida Growth and Metabolism. J Clin Microbiol. 2003; 41:506-8.
14. Bradley EW, Oursler MJ. Osteoclast culture and resorption assays. Methods Mol Biol. 2008; 455:19-35.
15. Delman PD. Treatment of postmenopausal osteoporosis. Lancet. 2002; 359:2018-26.
16. Kang MJ, Cho JY, Shim BH, Kim DK, Lee JH. Bioavailability enhancing activities of natural compounds from medicinal plants. J Med Plant Res. 2009; 13:1204-11.
17. Lee MS, Kim JJ, Oh JM, Choi MK, Song MJ, Ahn YH, et al. Effect of water extract of *Saussurea radix* in RANKL-induced osteoclast differentiation. Korean J Oriental Physiol Pathol. 2011; 25:516-20.
18. Oh JM, Lee MS, Kim JJ, Lee JH, Chae SU, Kim HY, et al. Effect of water extract of *Rubi fructus* in RANKL-induced osteoclast differentiation. Korean J Oriental Physiol Pathol. 2011; 25:669-73.
19. Lee Y, Lee HS, Jang SJ, Song JH. Effect of water extract of *Schisandra Chinensis* on osteoclast differentiation. Korean J Oriental Physiol Pathol. 2010; 24:848-53.
20. Kim JH, Ki JY, Ahn JY, Park HJ, Kim HJ, Kwak HB, et al. Inhibitory effects of *Achyranthis bidentatae radix* on osteoclast differentiation and bone resorption. Kor J Herbology. 2010; 25:65-74.
21. Yamamoto A, Miyazaki T, Kadono Y, Takayanagi H, Miura T, Nishina H, et al. Possible involvement of IkB kinase 2 and MKK7 in osteoclastogenesis induced by receptor activator of nuclear factor kappa B ligand. J Bone Miner Res. 2002; 17:612-21.
22. Wada T, Nakashima T, Hiroshi N, Penninger JM. RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease. Trends Mol Med. 2006; 12:17-25.
23. Kim KS, Lee SH, Kim JH, Choi YW, Kim NS. NFATc1 induces osteoclast fusion via up-regulation of Atp6v0d2 and the dendritic cell-specific transmembrane protein (DC-

- STAMP). *Mol Endocrinol*. 2008; 22:176-85.
24. Kim GS, Koh JM, Chang JS, Park BL, Kim LH, Park EK, et al. Association of the OSCAR promoter polymorphism with BMD in postmenopausal women. *J Bone Miner Res*. 2005; 20:1342-8.
25. Nakamura I, Duong le T, Rodan SB, Rodan GA. Involvement of alpha(v)beta3 integrins in osteoclast function. *J Bone Miner Metab*. 2007; 25:337-44.
26. Kukita T, Wada N, Kukita A, Kakimoto T, Sandra F, Toh K, et al. RANKL-induced DC-STAMP is essential for osteoclastogenesis. *J Exp Med*. 2004; 200:941-6.
27. Tanaka H, Tanabe N, Kawato T, Nakai K, Kariya T, Matsumoto S, et al. Nicotine affects bone resorption and suppresses the expressions of Cathepsin K, MMP-9 and vacuolar-type(+)-ATPase d2 and organization in osteoclasts. *PLoS One*. 2013; 8:e59402.

# The Effects of *Phlomis umbrosa Turcz* on Osteoclast Differentiation

Jong Min Baek<sup>1,†</sup>, Ju Ha Park<sup>1,†</sup>, Jeong Hoon Song<sup>2</sup>, Seong-Nam Park<sup>3</sup>, Woo Jin Jeong<sup>1</sup>,  
Seo Young Moon<sup>4</sup>, Chang Hoon Lee<sup>5</sup>, Min-Kyu Choi<sup>1,7</sup>, Jeong Joong Kim<sup>1</sup>, Jaemin Oh<sup>1</sup>,  
Sung Jo Jang<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Department of Anatomy and Institute for Skeletal Disease, School of Medicine, Wonkwang University

<sup>2</sup>Plastic & Reconstructive Surgery, School of Medicine, Wonkwang University

<sup>3</sup>Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine, Wonkwang University

<sup>4</sup>Division of Anesthesiology and Pain Medicine, Sanbon Medical Center, School of Medicine, Wonkwang University

<sup>5</sup>Department of Internal Medicine, Division of Rheumatology and Institute of Wonkwang Medical Science, School of Medicine, Wonkwang University

<sup>6</sup>Department of Neurosurgery, Gunsan Medical Center, Wonkwang University

<sup>7</sup>Institute for Environmental Science, School of Medicine, Wonkwang University

**Abstract** : Many bone-related diseases such as osteoporosis, rheumatoid arthritis are occurred by excessive bone resorbing activity of osteoclasts. Recently, many studies have been proceeded to find out the new therapeutic materials from natural products of plants. *Phlomis umbrosa Turcz*, one of the natural products of plants has been known to improve bone health. However, the precise effects and treatment mechanisms of *Phlomis umbrosa Turcz* about bone diseases has been unknown. So, we examined the effects of *Phlomis umbrosa Turcz* on expression of receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand (RANKL)-induced osteoclast differentiation in bone marrow-derived macrophages (BMMs) and bone resorption. Also, we investigated the treatment mechanisms of *Phlomis umbrosa Turcz* relating to osteoclast differentiation. Here, we showed that *Phlomis umbrosa Turcz* significantly suppressed RANKL-induced osteoclast differentiation and bone resorption. Furthermore, *Phlomis umbrosa Turcz* suppressed the activation of NF- $\kappa$ B in bone marrow macrophage treated RANKL and M-CSF. The mRNA expression of c-Fos, nuclear factor of activated T-cells (NFAT)c1, osteoclast-associated receptor (OSCAR), tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) in BMMs was inhibited by *Phlomis umbrosa Turcz*. Integrin  $\alpha$ v,  $\beta$ 3 relating to cell adhesion and dendritic cell-specific transmembrane protein (DC-STAMP) relating to the structure of filamentous actin (F-actin) ring and cathepsin K relating to bone resorbing activity are disrupted too. These results suggest that *Phlomis umbrosa Turcz* will be a good materials to treat bone diseases like osteoporosis.

**Keywords** : *Phlomis umbrosa Turcz*, Osteoclast, Osteoporosis, Bone resorption, RANKL

<sup>†</sup> These authors contributed equally to this work.

Correspondence to : Sung Jo Jang (Department of Neurosurgery, Gunsan Medical Center, Wonkwang University)

E-mail : jang4025@wku.ac.kr