

미역취(*Solidago virga-aurea* var. *gigantea* Miq.)뿌리 추출물이 MC3T3-E1 조골세포의 활성화와 분화에 미치는 영향

박정현¹ · 이지원² · 김현정¹ · 이인선^{1,2*}

¹계명대학교 전통미생물자원개발 및 산업화연구센터

²계명대학교 식품가공학과

Effects of *Solidago virga-aurea* var. *gigantea* Miq. Root Extracts on the Activity and Differentiation of MC3T3-E1 Osteoblastic Cell

Jung-Hyun Park¹, Ji-Won Lee², Hyun-Jeong Kim¹ and In-Seon Lee^{1,2*}

¹The Center for Traditional Microorganism Resources, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea

²Dept. of Food Science & Technology, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea

Abstract

The purpose of this study was to examine the ability of alkaline phosphatase (ALP) synthesis of MC3T3-E1 cells when above edible sources, *Solidago virga-aurea* var. *gigantea* Miq. root (SVR) extracts, were supplemented. MC3T3-E1 cells were cultured with α -MEM (vehicle control), dexamethasone and genestein (positive control), and SVR extracts for 27 days. The effects of SVR MeOH extracts and its fractions on cell proliferation were measured by MTT assay. At 10, 100 μ g/mL of SVR methanol extract treated, that were elevated of cell proliferation to 140 and 120% via vehicle control, respectively. And then ALP synthesis was measured by spectrophotometer for enzyme activity and by naphthol AS-BI staining for morphometry at 3, 9, 18, and 27th day. As the results, every extracts and fractions were promoted ALP activity by time course at 1, 10, 100 μ g/mL, except n-hexane and chloroform fractions. Remarkably, the MeOH extracts were increased ALP activity more than 4.4 times compared with vehicle control, 2.2 times via positive control at 27th day ($p < 0.05$). The SVR MeOH extracts treated cells, especially at a concentration of 10 μ g/mL, showed remarkably higher than vehicle-treated control cells of mineralization which were checked by Alizarin red staining. These results indicate that SVR methanol extract have an induction ability of proliferation and differentiation on osteoblast.

Key words: *Solidago virga-aurea* var. *gigantea* Miq. root, osteoblast, bone formation, proliferation, alkaline phosphatase, mineralization

서 론

인체의 골(骨)은 형성(bone modeling)과 재형성(bone remodeling) 과정을 통하여 그 항상성을 유지하게 된다. 골의 형성은 태생기부터 시작하여 골격이 성숙되어 성장이 끝나는 청장년까지 지속되며 조골세포(osteoblast)의 활동으로 인한 골형성이 파골세포(osteoclast)의 활동으로 인한 골흡수보다 훨씬 많을 때 이루어진다(1). 골의 재형성은 이미 성장이 끝난 후 오래된 골을 제거하고 다시 새로운 골로 대체되는 과정으로, 골 개조 단위(bone remodeling unit)에서 이러한 조골세포 활성화와 파골세포 활성의 균형을 통하여 그 항상성이 유지된다. 그러나 조골세포 활성도의 약화로 골형성이 감소되거나 파골세포의 활성도가 강화되어 골의 흡수가 증가되는 경우, 또는 두 가지 요소가 동시에 작용되는 경우에 골대사 질환이 생긴다.

골대사 질환 중 고령화사회에서 큰 문제로 대두되고 있는 골다공증은 골의 화학적 조성에는 큰 변화 없이 단위 용적내의 골량이 감소하여 경미한 충격에도 쉽게 골절을 일으킬 수 있는 질환으로 노인 특히 폐경 후 여성들에게서 가장 그 발생빈도가 높게 나타나서 골다공증의 주요원인으로 estrogen의 분비부족이 지적되어 왔다(2,3). 현재 골다공증의 예방과 치료에 가장 많이 이용되고 있는 방법은 estrogen이나 천연에 존재하면서 약한 estrogen 활성을 나타내는 식물유래의 phytoestrogen이 폐경 후 골다공증 예방에 매우 유용하게 처방되고 있다(4). 그 예로서, 콩에 다량 함유된 isoflavone류 중 genistein과 diadzein 등은 estrogen 유사활성 물질로, 콩이 폐경성 골다공증을 예방할 수 있는 것으로 보고되고 있다(5). 그러나 이 방법 또한 폐경성골다공증 이외의 원인에는 제한적으로 사용되므로 칼슘보충제, vitamin D 대사산물과 thiazide diuretics 요법, calcitonin 요법, bisphos-

*Corresponding author. E-mail: insoon@kmu.ac.kr
Phone: 82-53-580-6440, Fax: 82-53-580-6447

phonates 및 불소요법 등이 비폐경성 골다공증 치료에 이용되고 있으며(6), 성장인자를 치료와 예방법으로 사용하는 것에 대한 연구도 진행되고 있다(7).

그러나 현대에서는 젊은 연령층 뿐 아니라 남자들도 골다공 증세를 많이 보이는 것으로 보고되고 있으므로(8), 이와 같은 골대사 불균형은 일차적으로 조골세포의 기능저하에 의한 것인지, 혹은 골흡수의 증가 즉, 파골세포의 활성화에 의한 것인지 대하여는 여러 가지 이론과 주장이 제기되고 있으며 골다공증 요인으로는 연령의 증가, 영양결핍, 운동부족, 칼슘 섭취의 부족, 유전적 요소, 약물복용, 호르몬의 영향 등을 꼽을 수 있다(9). 여러 가지 요인이 있음에도 불구하고 현재 골다공증 예방 및 치료에 사용되고 있는 약제는 대부분 골흡수를 억제하는 작용을 하기 때문에 이미 진행된 골소실을 완전히 회복할 수 없어, 궁극적인 목표인 골다공증의 발생을 완전히 예방할 수 없는 현실이다. 이에 골다공증의 예방과 치료를 위해 골형성 증가에 관한 연구가 많이 이루어지고 있으며 최근 동양의학에서 사용되던 몇몇 생약제재에 대한 효능 및 효과를 근거로 골조직 재생능력에 미치는 영향 등에 대한 과학적인 접근이 시도되고 있고(10,11), 산화억제 및 free radical 소거능과 골다공증 예방에 대한 논문도 보고되고 있다(12-14)

골아세포의 배양법은 골의 대사 즉 골형성 및 흡수, 골세포의 생성 및 분화 등의 연구와 각종 호르몬이나 성장인자, cytokines 등이 골대사에 미치는 효과 그리고 식품유래 천연물질의 골대사 조절물질을 검색하는데 비교적 간편하면서 유용한 방법으로 소개되고 있다(15,16). 골조직유래 확립된 여러 가지 세포주 중 태생기의 마우스를 이용한 MMBI, MC3T3-E1 골아세포주와 태생기의 rat을 이용한 RCB, RCJ 세포주가 널리 이용된다. 이중 골세포의 세포활성과 관련된 연구에서 유용하게 이용되고 있는 mouse calvaria 유래의 MC3T3-E1 osteoblastic cell은 *in vivo* 뼈형성 과정 중 세포의 증식, 분화, 석회화 등 골아세포와 유사한 대사적 특징을 가지고 있으며 적절한 자극 하에 골수의 stromal cell이나 결합조직의 mesenchymal stem cell이 분화되어 생긴 것으로, 조골세포 전구체(osteoprogenitor)로부터 전조골세포(pre-osteoblast)와 조골세포, 그리고 골내막세포(bone lining cell) 또는 골세포(osteocyte)로 분화되는 과정에 속하는 세포로(17,18) 특히 기질에 무기질을 형성(mineralization of matrix)하는 성질도 가지고 있다(19). 그러므로 본 실험에서는 식용자원추출물의 골아세포 대사활성증진 물질을 검색하고자 배양시 안정성을 보이는 MC3T3-E1 세포주를 이용하여 실험을 실시하였다.

조골세포는 골 표면에 근접해 있으며 세포질내에 과립형 질내 세망이 발달해 있고, 핵 주위로 골지체가 위치하며, 골지체 바깥 세포질에 사립체가 존재하며, 세포막에 당단백 효소인 alkaline phosphatase(ALP)를 가지고 있다(13). 이 효소는 기질 특이성과 염기성 pH에서 최적의 활성을 나타내며

세포의막과 석회화 조직의 기질세포에서 높은 농도로 발견되어 석회화 과정 동안 무기인산의 운반, 세포분열이나 분화의 조절자로서 역할을 하므로 Stein 등(20)은 골아세포 활성화 표지인자로 염기성 분해효소 활성도를 측정하도록 추천하였고, 골아세포 유도는 여러 논문에서도 ALP활성을 검색하였으므로(13,14,18,20,21), 본 연구에서는 천연 식용자원 중 조골활성 및 분화인자를 가지는 물질을 검색하는 방법으로 골아세포의 ALP활성 검색방법을 96 well culture 조건에서 확립하여 *in vitro* screening system을 활용하였다.

한편, 미역취 (*Solidago virga-aurea* var. *gigantea* Miq.)는 일지황화, 광과일지황화, 두메미역취, 돼지나물이라 불리기도 하는 국화과로 원산지는 한국과 일본이며, 전국 각지의 산야에 흔히 자생한다(22,23). 미역취는 숙근성 다년초로 줄기는 직립하며 전체에 잔털이 있으며 30~80 cm정도로 자라고 붉은 자색을 띤다. 어린 새순은 무침으로 식용하고, 이뇨, 해열, 진통, 건위, 신장염, 방광염, 감기, 두통, 황달, 폐렴, 항암 등의 한약제로도 사용되고 있는 것으로, 이에 대한 성분분석(24) 및 항산화 활성에 대한 연구(25)들은 진행되고 있으나, 아직 조골세포에 대한 효과 및 골형성에 대한 영향을 살펴본 연구에 대해서는 아직 진행되고 있지 않고 있다. 그러므로 본 연구는 우리나라 자생 천연식용자원 중 건강기능 활성이 있는 물질을 탐색하기 위한 연구의 일환으로 수십 종의 천연식용자원 추출물 중 활성이 높았던 미역취뿌리 추출물의 조골세포의 증식과 분화에 미치는 영향을 보고하고자 한다.

재료 및 방법

시료조제

본 실험에 사용된 미역취뿌리는 울릉도에서 채취한 것으로 불순물을 제거하고 세척한 다음 동결건조한 후 분말화하였다. 분말화 된 시료는 10배량(w/v)의 80% methanol로 3회 추출하였으며, 추출액은 여과지(Whatman No.3, England)로 2회 여과하고 여과액은 rotary vacuum evaporator(Buchi R-205, Flawil, Switzerland)로 농축한 후 동결건조하여 methanol 추출물을 제조하였다.

또한 동결 건조한 미역취뿌리 추출물을 Fig. 1에서와 같이 20배(w/v)의 증류수에 녹인 후 n-hexane(hexane), chloroform(CHCl₃), ethylacetate(EtOAc) 및 butanol(BuOH)을 순차적으로 3회 반복 추출하여 각 용매별로 계통 분획하였고, 남은 수용성 층은 감압농축하여 water 분획으로 제조하였다. 이들 시료는 -20°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

미역취뿌리 추출물을 이용한 조골세포 활성검색

세포배양: Mouse calvaria osteoblast cell인 MC3T3-E1 cell은 계명대학교 의과대학 생화학교실에서 분양받아 사용하였다. Choi 등(13)의 방법을 참고하여 α -MEM(Gibco BRL, Grand island, NY, USA)배지에 10% FBS(Gibco

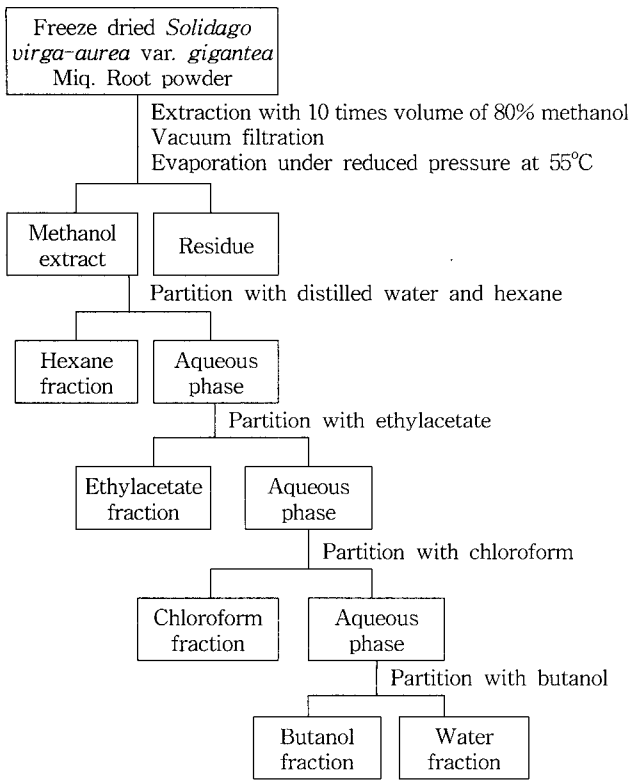


Fig. 1. Procedure for the methanol extraction and the fractionation of *Solidago virga-aurea* var. *gigantea* Miq. root powder by various solvents.

BRL, Grand island, NY, USA)와 1% antibiotics(Gibco BRL, Grand island, NY, USA)를 첨가하여 37°C의 5% CO₂ 배양기에서 2~3일마다 계대 배양하면서 실험에 사용하였으며, 분화유도를 위해 10% FBS α -MEM배지에 5 mM β -glycerol phosphate(Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, USA)와 50 mg/mL의 vitamin C(Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, USA)를 첨가하여 분화유도배지로 사용하였으며, 3일마다 배지를 교환하면서 증식, 분화 및 무기질화에 미치는 영향을 확인하기 위하여 27일간 배양하며 실험을 진행하였다(26,27).

조골세포 증식유도 측정 : 시료의 농도별 처리에 따른 조골세포의 성장 정도는 Green 등(28)의 방법에 따라 3-(3,4-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide 시약의 환원 정도를 측정하는 MTT assay로 측정하였다. 먼저 배양한 cell을 0.4% trypan blue를 사용하여 계수한 후 1×10⁵ cell/well로 조정하여 분주한 다음 각 시료를 최종농도 1, 10, 100 및 1,000 μ g/mL 되게 20 μ L씩 첨가한 후 37°C의 5% CO₂ 배양기에서 48시간 배양하였다. 양성대조군으로는 genistein(10⁻⁶ M, 10⁻⁷ M)과 dexamethasone(10⁻⁶ M, 10⁻⁷ M)를 사용하였으며(12), 시약 대조군은 시료 대신 배지를 20 μ L 첨가하여 동일하게 배양하였다.

배양 후 3-(3,4-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT; Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, USA)시약을 5 mg/mL농도로 10 μ L를 각 well에 첨가하여

4시간 더 배양한 후 배지를 제거하고 PBS로 2회 세척한 후 DMSO를 100 μ L씩 첨가하여 생성된 불용성의 formazan 결정을 용해시켜 ELISA reader(Spectra MAX 340 pc, Molecular Device, USA)로 550 nm에서 흡광도를 측정하였고 세포의 증식률은 시료의 흡광도를 대조군의 흡광도에 대한 백분율로 나타내었다(29).

$$\text{Cell proliferation (\%)} = \frac{\text{대조군의 흡광도} - \text{시료 처리군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \times 100$$

조골세포 배양시간에 따른 alkaline phosphatase 효소 활성 측정 : 포화배양된 MC3T3-E1 세포를 1×10⁵ cell/well로 조정하여 96 well plate에 분주하고 24시간 후 분화유도배지로 교환하여 24시간 배양 후 시료처리를 하였다. 매 3일마다 배지 교환시 미역취뿌리 추출물 및 분획물과 양성대조군을 넣어 27일 동안 분화시키면서 3, 9, 18, 27일째 ALP 효소 활성을 측정하였다. PBS로 3회 세척한 다음 0.1% Triton X-100을 20 μ L씩 첨가하여 37°C에서 30분간 lysis하였다. Lysis된 cell의 상등액 5 μ L는 단백질 정량에 사용하였고, 나머지 상등액에 20 μ L의 0.1 N glycine과 10 μ L의 100 mM p-nitrophenylphosphate(p-NPP)를 첨가한 후 다시 37°C에서 30분간 반응시켰다. 반응 후 200 μ L의 0.1 N NaOH로 반응을 중지하고 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. ALP activity는 p-NPP로부터 생성된 p-nitrophenol(p-NP)를 측정하여 p-NP에 대한 표준그래프를 작성한 후 활성도를 도출하였고, 단백질량으로 나누어 단위단백질함량 당 효소활성도를 산출하였다(30,31).

ALP 염색법에 의한 조골세포 활성검색 : ALP 효소의 염색 정도를 측정하기 위해 24 well에 1×10⁵ cells/mL로 처리하고 추출물을 적정농도로 희석처리한 후 시간경과에 따른 효소 활성을 측정하였다. 염색은 alkaline phosphatase(AP) kit (Sigma Chemical Co., USA)를 사용하여 측정하였고, 그 방법은 다음과 같다. 먼저, 배지를 제거하고 고정액(citrate-acetone-formaldehyde)을 첨가하여 약 30초간 실온에 보관하였다가 45초간 증류수로 행구었다. 준비된 diazonium solution(sodium nitrite : FRV-alkaline : naphthol AS-BI alkaline solution = 1:1:1)을 첨가하여 약 15분간 실온에서 방치한 뒤 2분간 증류수로 세척하고 hematoxylin solution으로 2분간 다시 염색한 뒤 흐르는 물로 염색액을 제거한 다음 현미경으로 관찰하였다(32-34).

Alizarin-red 염색법에 의한 석회화 형성도 검사 : ALP 염색법과 동일하게 24 well에 조골세포를 1×10⁵ cells/mL로 처리한 뒤, 배지를 제거하고, PBS로 세척한 뒤, 70% EtOH로 4°C에서 1시간동안 고정시켰다. Alizarin red(AR) solution은 10 mL의 증류수에 40 mM이 되게 농도를 맞춘 뒤 pH를 4.2로 조정하였다. 준비한 AR solution으로 10분간 염색하고, 증류수로 2번 세척한 뒤 염색되지 않은 부분은 PBS로 씻어주면서 제거해주고 표면이 너무 마르지 않게 PBS로 조

금 적셔주면서 현미경으로 nodule형성 정도를 관찰하였다. Nodule 형성 확인 후 10 mM sodium phosphate(pH 7.0)에 10% cetylpyridinium chloride를 첨가하여 15분간 녹이고 염색된 정도는 562 nm에서 흡광도로 측정하였다(35-37).

통계처리

실험결과의 통계분석은 SAS program을 이용한 분산분석법을 실시하여 Duncan's multiple range test에 의해 시료간의 유의적 차이를 검정하였다.

결과 및 고찰

미역취뿌리 추출물의 순차적 계통분획에 따른 수율

동결 건조한 미역취뿌리를 methanol로 추출한 다음, 극성이 다른 용매인 hexane, chloroform, ethylacetate, butanol로 분획하였으며 그 수율은 Table 1과 같이, aqueous 69.0%, butanol 7.29%, ethylacetate 2.67%의 순으로 극성이 높을수록 수율이 높았다.

Lee(38)의 미역취줄기의 순차분획 결과에 의하면, aqueous 47.4%, butanol 22.29%, ethylacetate 4.08%, chloroform 5.08%, hexane 16.47%로 극성이 높을수록 수율이 높아지나 비극성을 띄는 hexane의 수율이 크게 나타나 줄기와 뿌리성분의 차이가 있음을 확인하였다.

미역취뿌리 추출물의 조골세포에 대한 증식유도 검색

미역취뿌리 추출물의 시료농도에 따른 추출물의 조골세포 증식유도에 미치는 영향을 MTT assay로 분석한 결과는 Fig. 2와 같다. MC3T3-E1 cell에 미역취뿌리 메탄올추출물의 경우 10 µg/mL 처리하였을 때 시료를 첨가하지 않은 대조군에 비하여 140%이상의 증식률을 보였고, 100 µg/mL에서는 120%이상, 1 µg/mL에서도 100% 이상의 증식률을 보였으며 최고 농도인 1,000 µg/mL에서는 저해율을 보였다. 그리고 분획물의 경우 에틸아세이트분획물 1 µg/mL의 농도에서만 120% 이상의 가장 높은 증식유도를 나타내었고 고농도인 1,000 µg/mL 농도에서는 분획물 모두 조골세포에 대한 저해율을 보였으나, 10 µg/mL 농도에서는 분획물의 저해율을 보이지 않았다. 따라서 조골세포주에 대한 저해율을 거의 보이지 않은 미역취뿌리 추출물과 분획물의 최저

Table 1. Yields of hexane, chloroform, ethyl acetate, butanol and aqueous fraction from methanol extracts of dried *Solidago virga-aurea* var. *gigantea* Miq. root powder

Sample	(%) ¹⁾
Hexane fraction	1.58
Chloroform fraction	1.21
Ethyl acetate fraction	2.67
Butanol fraction	7.29
Aqueous fraction	69.0
Total	81.80

¹⁾Percentage of each fractions to methanol extract content (100 g).

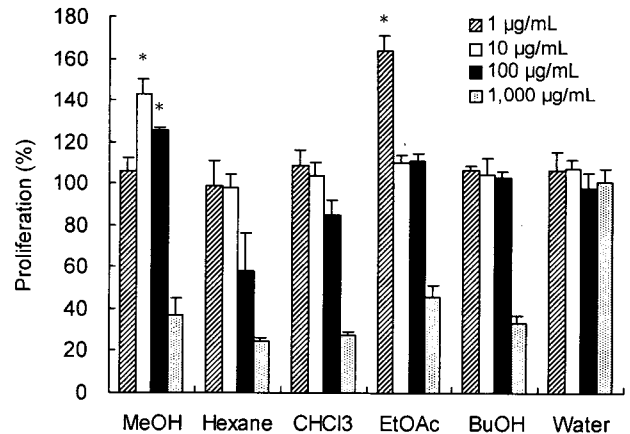


Fig. 2. Effect of SVR MeOH extract and its fractions on the proliferation of MC3T3-E1 cells by the MTT assay. Data were expressed as a percentage of vehicle control. *p<0.05 compared with vehicle control.

작용 농도를 10 µg/mL로 결정하였다. Choi 등(13)은 대두에탄올추출물을 50~100 µg/mL의 농도로 조골세포주에 처리한 결과, 대조군에 비해 최고 117%의 증가를 나타내었다고 보고하였는데 미역취뿌리 메탄올추출물은 140% 이상의 조골세포의 증식을 보였으므로 대두에탄올추출물 결과보다 훨씬 좋은 조골세포 증식유도를 나타냄을 확인할 수 있었다.

활성골조직은 교원질, 당단백과 같은 세포의 기질과 조골세포, 파골세포 등 여러 종류의 세포들로 구성되어있는 매우 복잡하고 활동적인 조직으로서 지속적으로 골개조가 일어나며, 골개조는 파골세포에 의한 골흡수와 조골세포의 골형성에 의하여 균형을 이루는 과정으로 순차적으로 진행된다. 이 중 골기질의 성분을 주고 합성하는 조골세포는 미분화 간엽세포에서 유래된 전조골세포가 골표면에 도달하여 성숙한 조골세포로 분화되고, 10~20%가 골세포로 석회화조직에 묻힌다고 알려져 왔다(39). 골대사 과정 중 조골세포에 의한 골형성은 여러 가지 생화학적 표지자를 이용하게 되었다. 즉 골형성의 생화학적 표지자로서는 osteocalcin(Bone gal-protein), procollagen I carboxyl terminal extension peptide 등이 사용되고 염기성 인산분해효소 활성도도 많이 사용된다. 이때 조골세포의 증식유도가 되었을 때 생화학적 지표 단백질의 유전자 수준 및 단백질 수준의 변화가 거의 양의 상관관계 있게 증가하고 있음을 여러 논문결과(5,8,17,20)에서 보여주고 있다. 본 실험에서는 미역취뿌리 추출물 처리에 의한 3일후 세포증식의 증가함을 확인하였으므로, 다른 생화학적 표지인자 확인 혹은 *in vivo* 실험에 적용 후 골대사 활성 변화도 측정 후 상관성을 확인하는 것이 필요하다고 본다.

미역취뿌리 추출물의 조골세포에 대한 분화유도 검색

Alkaline phosphatase(ALP) 효소활성 측정 : Ascorbic acid 및 β-glycerol phosphate와 같은 분화인자가 공급된 배지에서 MC3T3-E1 세포는 계획된 단계에 따라 조골세포형질의 발현 및 석회화 세포외기질 형성을 보이며 ALP의 활

성도도 증가한다. 즉, 초기 4~10일간은 증식기, 10~16일은 골기질 형성 및 성숙기, 16~30일은 석회화기를 거친다고 보고되고 있으므로 미역취뿌리 추출물 및 분획물이 조골세포의 활성 및 분화유도에 미치는 영향을 조사하기 위하여 MC3T3-E1 세포를 1×10^5 cells/well이 되도록 분주한 후 분화배지에 미역취뿌리 추출물 및 분획물을 독성이 보이지 않는 농도인 1~100 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 처리하고 3~27일까지 배양하면서 ALP 효소 활성을 조사하였다. 그 결과 Fig. 3에서와 같이 조골세포는 메탄올 추출물 처리 후 시간 경과에 따라 전반적인 활성도는 증가하였고, 배양 후 18일 이후부터 ALP 활성이 급격히 유도되는 것을 확인하였으며, 미역취뿌리 메탄올 추출물 10 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 경우 27일째에 시약대조군에 비해 약 4.4배의 ALP 활성이 유도되었으며, 양성대조군인 dexamethasone에 비해 2배 이상 유의적인 ALP 활성이 유도되었다($p < 0.05$). 분획물중 에틸아세테이트 분획에서 배양 18일째 약 2배 이상의 활성을 보였으나 그 외 나머지 분획물에서는 ALP 유도활성의 변화가 통계적으로 유의한 차이가 없었다. 이는 활성을 가지는 물질이 에틸아세테이트 층에서의 활성 단일물질의 검색 등 연관연구가 필요하다고 사료된다.

주로 세포막에 결합되어 존재하는 염기성 인산 분해효소는 기질 특이성과 염기성 pH에서 최적의 활성을 나타내는 효소이고, 세포외막과 석회화조직의 기질세포에서 높은 농도로 발견되며 석회화 과정동안 무기인산의 국소적 농도증가, 광화결절 성장억제제의 국소적 파괴, 무기인산의 운반, 세포분열이나 분화의 조절자로서의 역할을 한다(40). 그러나 칼슘과 인 대사에 관하여 관여하는 효소로써 염기성 인산 분해효소의 정확한 기능은 알려져 있지 않다. 그러나 많은 보고들에 의하면 Robinson(41)은 유기인산기질에서 무기인산을 분리해 낼 수 있는 효소라고 보고하였고, Stein 등(8)은 골

세포의 표지인자로 염기성 인산분해효소 활성도는 골세포분화의 표지인자라고 보고하였다. Fukayama와 Tashjian(42)은 ALP가 몇몇 조골양세포주들에서 칼슘섭취에 관여하는 것으로 보고하였으며, 부갑상선 호르몬의 신호전달의 조절에도 관여한다고 하였다.

본 연구의 양성대조군에 첨가한 dexamethasone은 합성 steoid성 호르몬 제제로 사용되는 약물로서 조골세포를 분화시켜 골 형성을 증가시킨다고 하며(43), 쥐의 두개골과 골수에서 채취한 조골성 dexamethasone으로 처리한 경우 골 특이 단백질인 osteopontin과 ALP효소, osteocalcin 등의 합성이 증가한다고 하였다(44). 한편, dexamethasone이 부족한 배지에서는 조골세포 뿐만 아니라 조골유사세포도 결절이나 그와 유사한 치밀한 물질을 형성시키지 못한다고 하는(45) 보고들이 있다. 그러나 본 연구에서는 이러한 여러 결과로 분화능이 입증된 dexamethasone을 처리한 양성대조군의 경우보다 미역취뿌리 메탄올추출물을 처리하였을 때 ALP 활성도가 높게 나타났다. 그러므로 보다 깊은 연구를 통하여 약물을 개발할 수 있는 신물질 후보로의 활용을 타진해 볼 수 있을 것이다. 아울러 조골세포 활성을 증진시킨다는 보고가 많이 되고 있는 isoflavone인 genestin 역시 phyto-estrogen의 일종으로 dexamethasone에 비하여 2배 정도 증가시켰지만, 미역취뿌리 메탄올 추출물은 genestein보다도 2배 이상 활성을 증가시키는 결과를 보였다.

조골세포배양 시 첨가한 vitamin C와 β -glycerol phosphate는 ALP와 세포외기질의 석회화에 영향을 미친다고 알려져 있다. Vitamin C는 MC3T3-E1 세포에서 Type I collagen 발현을 자극하지는 않지만 세포외기질에서 collagen 침착에는 반드시 필요하며, 성숙세포에서 ALP의 활성을 유도하고 그리고 β -glycerol phosphate는 vitamin C에 대해 상승효과를 보이며, 분화된 조골세포에서 collagen 축적이거나 ALP 활성도를 더욱 증가시킨다고 보고되고 있다(46). Quarles 등(47)은 MC3T3-E1 세포의 분화시 vitamin C와 β -glycerol phosphate의 영향에 대하여 연구한 바, vitamin C가 없을 때에는 MC3T3-E1 세포의 성장이 거의 정지되었고, 충분히 분화하지 못하여 세포외기질 형성이나 석회화는 이루어지지 못했다고 하였다. 한편 미역취에 대한 몇몇 연구중 미역취의 성분분석을 한 연구결과 caffeic acid, rutin, astragaln, chlorogenic acid, quercetin, tannin, saponin, flavonoid 등의 성분이 함유되어 있으며(24), 미역취의 휘발성 성분의 경우 항균성과 항산화성이 α -tocopherol, BHA보다 더 높다(25)고 알려져 있으므로 이 성분들이 조골세포의 분화에 영향을 미치는 것으로 보인다.

이 실험에서 미역취뿌리 추출물 농도 및 분화시간에 따른 ALP 활성도를 측정된 시간에 따라 증가하였는데, 이는 다른 성장인자나 다른 골기질 단백질에 영향을 미친 결과인지에 대하여는 이 실험에서는 알 수 없었다. 이 결과는 Quarles 등(47)의 연구결과에서와 같이 적용세포의 종류, 세포 접종수에 의한 세포의 밀도, 세포배양기간과 실험에 사용된 배양액

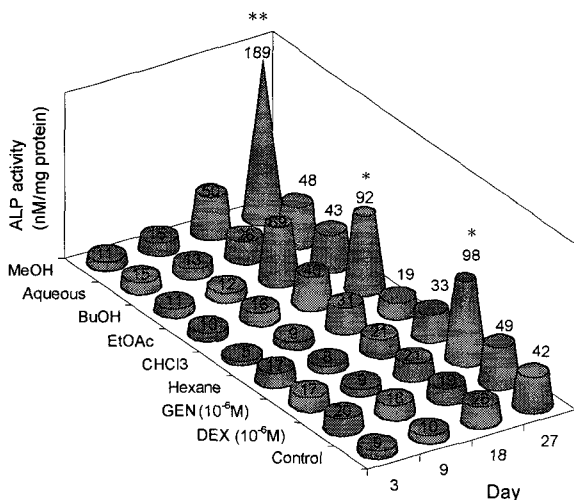


Fig. 3. Effect of SVR MeOH extract and its fractions on the alkaline phosphatase activities of the MC3T3-E1 osteoblastic cells during the differentiation.

Cells were cultured in 96 well plates with 50 $\mu\text{g/mL}$ of vitamin C and 10 mM of β -glycerol phosphate.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared with vehicle control.

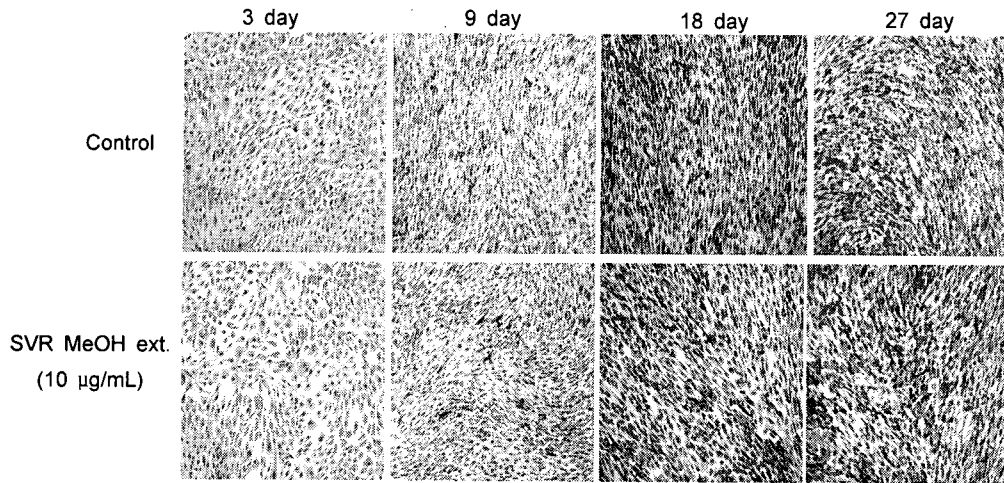


Fig. 4. Histochemical identification of the effect of SVR MeOH extract on the mineralization of extracellular matrix by MC3T3-E1 cells.

Phase contrast micrographs ($\times 10$) were taken by ALP staining after 3, 9, 18, 27 day, respectively. Cells were cultured with α -MEM containing 10% FBS, 50 $\mu\text{g/mL}$ ascorbic acid, and 10 mM β -glycerol phosphate.

의 농도 등 여러 요인들이 차이가 있으나, 염기성 인산분해 효소 활성도가 시간이 경과함에 따라 증가한다는 결과와 비슷하게 나타났다. ALP는 조골세포의 분화에 발현되는 분화 표식인자이므로 이러한 결과는 조골세포의 ALP의 발현을 증가시켜 조골세포의 분화에 영향을 줄 가능성을 제시한다.

Naphthol AS-BI staining에 의한 조골세포 ALP 활성 검색: 조골세포내 ALP 효소의 유도를 확인하고자 AZO 색소법(Burstone법)으로 검토하였다. 즉, Naphthol AS-BI phosphate 기질은 조직내 존재하는 ALP효소에 의해 가수분해되어 orthophosphate와 naphthol이 유도체로 유리되고, 유리된 naphthol은 반응액에 함유되어 있는 diazonium 염과 즉시 결합하여 AZO dye를 형성하므로 적색의 효소 활성 부위를 나타내게 된다.

미역취뿌리 메탄올 추출물을 10 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 첨가하여 역시 3~27일간 배양한 다음 세포내 ALP 효소의 염색 정도를 확인하였다. 결과 Fig. 4와 같이 시료를 처리하지 않은 대조군은 붉은 색의 효소가 많이 형성되지 않은 반면, 메탄올추출물을 처리한 군에서는 9일째부터 효소의 붉은 반점이 많이 생겼으며 27일째까지도 전체적으로 붉게 변하는 것을 확인할 수 있다. 따라서 메탄올 추출물이 조골세포내 ALP 효소활성을 유도하는 것을 염색을 통해 확인할 수 있었다.

Alizarin-red 염색법에 의한 석회화 형성도 확인: 또한 bone nodule 형성능은 조골세포의 분화에 중요한 표식인자이다(36,37). 따라서 시간에 따른 nodule 형성능을 측정하기 위해 Fig. 5와 같이, alizarin red로 염색하여 염색된 석회화물을 10% cetylpyridinium chloride로 녹여 O.D.값을 측정하여 상대활성을 나타내었다. 역시 메탄올 추출물 10 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 시간이 경과할수록 조골세포가 분화됨에 따라 염색된 정도의 흡광도값이 18일째에 대조군에 비해 약 1.6배까지 유의적으로 증가됨을 확인할 수 있었다.

ALP의 발현은 조골세포 분화과정 중 중요한 역할을 하며

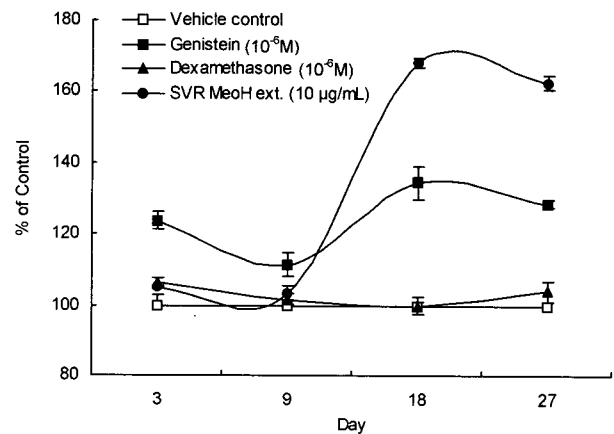


Fig. 5. Effect of SVR MeOH extract on the nodule formation of the MC3T3-E1 osteoblastic cells during differentiation.

그 활성 정도는 종종 조골세포의 분화단계를 상대적으로 평가하는 수단으로 사용되어왔다. 조골세포에 의한 석회화과정에서 이 효소의 정확한 기능은 분명하지는 않지만, organic phosphate를 가수분해하고 국소적으로 PO_4 농도를 증가시킴으로써 석회화의 촉발제 역할을 하는 것으로 보고되었다(46). ALP가 조골세포가 유도하는 석회화에 관여됨을 제시하는 많은 보고들이 있다. Torii 등(48)은 antisense RNA를 이용하여 ALP가 조골세포의 석회화에 관여하는 것을 입증하였다. Weiss 등(49)은 liver/bone/kidney type ALP 유전자의 선천적 결핍으로 인한 저인산효소증에서 골조직 석회화 부전을 보고하였다.

본 실험에서 사용된 MC3T3-E1 세포주는 골조직에 존재하는 조골세포와 유사하다. MC3T3-E1 세포주는 골기질의 축적, 석회화, 성장요소들에 대한 효과, 형태와 대사의 변화 등을 연구하는데 이용되고 있다. Ascorbic acid가 공급된 배지에서 MC3T3-E1 세포는 계획된 단계에 따라 조골세포

형질의 발현 및 석회화 세포외기질 형성을 보인다. 연속적인 발달단계에서 초기 4~10일간은 증식기, 10~16일은 골기질 형성 및 성숙기, 16~30일은 석회화기로, 증식기에서는 histone H3와 H4와 같은 세포주기 관련 유전자와 ribosomal protein S6 등이 발현되며, 골기질 형성 및 성숙기에서는 Col I, fibronectin, transforming growth factor(TGF)- β 1, osteonectin 등이 나타나고, ALP의 활성도도 증가한다. 석회화 기에는 결절의 수가 증가하며 osteocalcin 등이 높게 나타난다고 하였다. 본 실험에서도 최적 농도(10 μ g/mL)의 미역취 뿌리 메탄올 추출물을 MC3T3-E1 세포에 처리한 결과 18일 후에 다수의 석회화결절이 관찰되었다. 이는 Zheng 등(50)이 발표한 신생골 쥐 두개골에 혈소판 유래성장인자(platelet-derived growth factor) 처리시 21일 후에 석회화결절이 형성되었다는 연구 결과와 유사하였고, Choi 등(32)이 발표한 시간경과에 따른 석회화 결절의 수와 크기가 증가했다는 보고와도 유사하였다. 그러므로 미역취뿌리 메탄올 추출물에 대하여 다른 여러 가지 생화학적 인자를 확인하지는 못하여도 이러한 결과들과 비교하였을 때 미역취뿌리 추출물의 조골세포의 증식을 촉진시키는 작용을 하는 것은 염기성인 산분해효소가 다른 성장인자나 골기질 단백질에 영향을 주어 성장인자에 직접적으로 영향을 주는 것으로 생각된다. 그러나 이는 골개조와 연관되어 메탄올 추출물의 어떤 요소가 성장인자와 병용하여 골아세포의 분화와 증식에 영향을 미치는 지에 대한 효과를 확인하기 위하여 단백질 및 유전자 수준의 *in vitro* 실험과 *in vivo* 실험을 하여 지속적인 연구를 수행해야 할 것으로 사료된다.

요 약

골조직은 골아세포, 파골세포, 골세포 등으로 구성되며, 골개조시 여러 인자가 세포증식, 분화, 활성화 및 골대사 조절에 관여한다. 이때 조골세포의 활성화는 골형성에 중요하므로, 본 연구에서는 MC3T3-E1 조골세포주를 이용하여 식용자원인 미역취뿌리의 조골세포의 증식과 분화활성에 미치는 영향을 조사하였다. 미역취뿌리 메탄올 추출물 및 분획물이 조골세포의 성장에 미치는 영향을 MTT 검색법으로 조사한 결과, 미역취뿌리 메탄올 추출물 10, 100 μ g/mL 처리시 대조군과 비교하여 각각 140, 120% 증가하여 조골세포의 높은 성장률을 보였다. 미역취 뿌리 추출물 및 순차 분획물 시료가 ALP 효소 활성화에 미치는 영향을 3일 간격으로 배지 교환 및 시료처리를 하면서 27일 동안 배양시간에 따른 변화를 측정하여 조사하였다. 그 결과, 농도 1, 10, 100 μ g/mL 처리시 n-hexane과 chloroform 분획을 제외한 나머지 분획물들이 시간이 지남에 따라 약간의 ALP 활성을 증가시켰고, 메탄올 추출물은 27일째에 대조군에 비해 약 4.4배 이상, 양성대조군에 비해 약 2배 이상 ALP 활성을 증가시켰다. 미역취뿌리 메탄올추출물은 다시 ALP 효소 염색법과 alizarin red 염색으로 조골세포의 ALP활성유도, 분화와 석회화 형

성능을 재확인하였다. 따라서 미역취뿌리 추출물중 골세포의 활성을 촉진시키는 물질은 극성에 따른 분획물보다 methanol 추출물에서 활성이 높게 나타나는 결과로 미뤄볼 때, 단일성분에 의한 것보다 복합적 성분들의 상승 작용에 의하여 조골세포의 증식과 분화를 증진시킬 수 있다고 할 수 있다. 아울러 종래의 골질환에 좋다고 알려진 식품과 양성대조군에 비해 빠르게 유도하고 있어 앞으로 미역취뿌리에 대한 분자생물학 수준 등의 구체적인 연구들과 기작연구가 지속적으로 이루어져야 할 것이다.

감사의 글

본 연구는 산업자원부 지정 계명대학교 전통 미생물자원 개발 및 산업화 연구센터, 한국과학재단 목적기초연구(R03-2002-000-00019-01(2002)지원 및 한국산업기술재단 지역산업인력양성사업(10018139)으로 수행되었음에 감사드립니다.

문 헌

1. Parfitt AM. 1994. Osteonal and hemi-osteonal remodeling: The spatial and temporal framework for signal traffic in adult human bone. *J Cell Biochem* 55: 273-286.
2. Lee YS. 2001. Effect of isoflavones on proliferation and oxidative stress of MC3T3-E1 osteoblast-like cells. *Korea Soybean Digest* 18: 35-42.
3. Jilka RL. 1998. Cytokines, bone remodeling and estrogen deficiency: a 1998 update. *Bone* 23: 75-81.
4. Aldercreutz H, Mazur W. 1996. Phyto-estrogens in relation to cancer and other human health risks. *Proc Nutr Soc* 55: 399-417.
5. Keum JC, Kang KH, Kim SB. 2001. Effects of estrogen on the tumor necrosis factor- α induced apoptosis and cytokine gene expression in MC3T3-E1 osteoblast. *Korean J Obstet Gynecol* 44: 324-336.
6. Orcel P, Krane SM. 2000. Secondary osteoporosis and glucocorticoid induced osteoporosis. *Ann Med Interne* 151: 497-502.
7. Karen MP, Carol CP, Lawrence GR. 1995. Treatment of osteoporosis. *Annu Rev Med* 6: 249-256.
8. Stein GS, Lian JB, van Wijnen AJ, Montecino M. 1996. Transcriptional control of osteoblast growth and differentiation. *Physiol Rev* 76: 593-629.
9. RyanPJ, Evans P, Gibson T, Fogelman I. 1992. Osteoporosis and chronic back pain: A study with single-photon emission computed tomography bone scintigraphy. *J Bone Miner Res* 7: 1455-1460.
10. Cho SH, Kim KG, Kim SR, Lee JA, Moon H, Hwang YY. 1996. The effects of 17- β estradiol, medroxyprogesterone acetate and parathyroid hormone on the differentiation of osteoblast cell. *Korean J Obstet Gynecol* 39: 1497-1506.
11. Boonen A, Broos P, Dequeker J. 1997. The prevention of treatment of age-related osteoporosis in the elderly by systemic recombinant growth factor therapy (rhIGF-I or rhRGF- β): a perspective. *J Internal Medicine* 242: 285-290.
12. Lee YS. 2001. Effect of isoflavones on proliferation and oxidative stress of MC3T3-E1 osteoblastic like cells. *Korea Soybean Digest* 18: 35-42.
13. Choi EM, Suh KS, Kim YS, Choue RW, Koo SJ. 2001. Soybean ethanol extract increases the function of osteo-

- blastic MC3T3-E1 cells. *Phytochemistry* 56: 733-739.
14. Choi EM, Koo SJ. 2002. Effects of soybean ethanol extract on the prostaglandin E2 and interleukin-6 production in osteoblastic cells. *Food Research International* 35: 893-896.
 15. Letton RW. 1990. Regulation of 25-hydroxyvitamin D3 metabolism in cultures of osteoblastic cells. *J Bone and Mineral Research* 5: 815-820.
 16. Pfeilschifter J, Wolf O. 1990. Chemotactic response of osteoblastic cells to transforming growth factor B. *J Bone and Mineral Research* 5: 815-823.
 17. Ernst M, Heath JK, Lodan GA. 1989. Estradiol effects on proliferation messenger ribonucleic acid collagen and insulin-like growth factor-I and parathyroid hormone-stimulated adenylate cyclase activity in osteoblastic cells from calvariae and long bones. *Endocrinology* 125: 822-833.
 18. Sudo H, Kodama H, Amagai Y, Yamamoto S, Kasai S. 1983. *In vitro* differentiation and calcification in new clonal osteogenic cell line derived from newborn mouse calvaria. *J Cell Biol* 96: 191-198.
 19. Kim KY, Lee CS, Lee SH, Lee JD, Kim GS. 1991. Primary culture of osteoblast. *J Korean Orthop Assoc* 26: 1860-1863.
 20. Stein GS, Lian JB, Owen TA. 1990. Relationship of cell growth to the regulation for tissue-specific gene expression during osteoblast differentiation. *FASEB J* 4: 3111-3123.
 21. Park SK, Shin HS. 2001. Effects of extract of natural products on alkaline phosphatase activity of MC3T3-E1 cells. *Wonkwang Dental Medicine* 10: 89-100.
 22. Kim TJ. 1997. *Flower growing in the wild flower of Korean*. Kunkil media. Seoul, Korea. p 38.
 23. <http://blog.naver.com/linkmoon.do?Redirect=Log&logNo=100003212756>.
 24. Toshio M, Yoshinori I, Akira U. 1991. Studies on the constituents of *Solidago virga-aurea* L. I. structural elucidation of saponins in the herb. *Chem Pharm Bull* 39: 2037-2042.
 25. Kim HS. 1996. Studies on the antimicrobial and antioxidant activity of *Solidago virga-aurea* L. I. and *Solidago virgaurea* Linne var. *asiatica* Nakai. *MS Thesis*. Pusan National University, Korea. p 24-25.
 26. Mori Y, Hiraki Y, Shukunami C, Kakudo S, Shiokawa M, Kagoshima M. 1997. Stimulation of osteoblast proliferation by the cartilage-derived growth promoting factors chondromodulin-I and -II. *FEBS Letters* 406: 310-314.
 27. Kinto N, Iwamoto M, Enomoto-Iwamoto M, Noji S, Ohuchi H, Yoshioka H. 1997. Fibroblasts expressing sonic hedgehog induce osteoblast differentiation and ectopic bone formation. *FEBS Letters* 404: 319-323.
 28. Green LM, Reade JL, Ware CF. 1984. Rapid colorimetric assay for cell viability: Application to the quantitation of cytotoxic and growth inhibitory lymphokines. *J Immunol Meth* 70: 257-268.
 29. Carmichael J, Degraff WG, Gadzar AF. 1987. Evaluation of a tetrazolium based semiautomated colorimetric assay: Assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res* 47: 936-942.
 30. Choi HH, Kim JK, Lim SB, Chung CH. 1999. Effects of platelet-derived growth factor on the activity of osteoblastic cells. *J Korean Academy Periodontology* 29: 785-804.
 31. Kim JW, Lee HJ, Kang JH, Ohk SH, Choi BK, Choi SH. 2000. The effect of cyclosporin A on osteoblast *in vitro*. *J Korean Academy Periodontology* 30: 747-757.
 32. Choi JY, Lee BH, Song KB, Park RW, Kim IS, Sohn KY, Jo JS, Ryoo HM. 1996. Expression patterns of bone-related proteins during osteoblastic differentiation in MC3T3-E1 cells. *J Cellular Biochemistry* 61: 609-618.
 33. Yoo MC, Han CS, Jang SG, Han IK. 1989. The effects of the several hormones on the MC3T3 osteoblast cells - *in vitro* study-. *J Korean Orthop Assoc* 24: 879-888.
 34. Cho SH. 1995. The electron microscopic observation of the effects of estrogen on the osteoblast-like cell (Ros-17/2.8-5) differentiation. *J Korean Soc Menopause* 1: 28-34.
 35. Kim KW. 2001. Condition on conversion of aglycones form using β -glucosidase and isoflavones extraction from soybean. *MS Thesis*. Pukyong National University, Korea. p 36.
 36. Maeda T, Matsunuma A, Kawane T, Horiuchi N. 2001. Simvastatin promotes osteoblast differentiation and mineralization in MC3T3-E1 cells. *Biochem Biophys Res Comm* 280: 874-877.
 37. Schiller PC, D'ippolito G, Balkan W, Roos BA, Howard GA. 2001. Gap-junctional communication is required for the maturation process of osteoblastic cells in culture. *Bone* 28: 362-369.
 38. Lee MS. 2002. Studies on the physiological activity compounds of Miyegochwi (*Solidago virga-aurea* L. var. *asiatica* Nakai). *MS Thesis*. Pusan National University, Korea. p 24-25.
 39. Choi SY. 2002. Effects of irradiation on the mRNA expression of the type I collagen and alkaline phosphatase in MC3T3-E1 osteoblastic cell line. *PhD Dissertation*. Chonbuk University, Korea.
 40. Cho JJ, Kim JK, Lim SB, Chung CH. 1999. Effects of platelet-derived growth factor on the activity of osteoblastic cells. *J Korean Academy Periodontology* 29: 785-804.
 41. Robinson R. 1923. The possible significance of hexose phosphoric esters in ossification. *Biochem J* 17: 263-293.
 42. Fukayama S, Tashjian AH Jr. 1990. Stimulation by parathyroid hormone of $^{45}\text{Ca}^{2-}$ uptake in osteoblast-like cells: possible involvement of alkaline phosphatase. *Endocrinology* 126: 1941-1949.
 43. Bellows CG, Aubin JE, Heersche JN, Antosz ME. 1986. Mineralized bone nodules formed *in vitro* from enzymatically released rat calvaria cell populations. *Calcif Tissue Int* 38: 143-154.
 44. Owen TA, Aronow M, Shalhoub V, Barone LM, Wilming L, Tassinari MS. 1990. Progressive development of the rat osteoblast *in vitro*: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. *J Cell Physiol* 143: 420-430.
 45. Yamashita Y, Sato M, Noguchi T. 1987. Alkaline phosphatase in the periodontal ligament of the rabbit and macaque monkey. *Arch Oral Biol* 32: 677-678.
 46. Herrision G, Shapiro IM, Golub EE. 1995. The phosphatidylinositol-glycolipid anchor on alkaline phosphatase facilitates mineralization initiation *in vitro*. *J Bone Miner Res* 10: 568-573.
 47. Quarles LD, Yohay DA, Lever LW, Caton R, Wenstrup RJ. 1992. Distinct proliferative and differentiated stages of murine MC3T3-E1 cells in culture: an *in vitro* model of osteoblast development. *J Bone Miner Res* 7: 683-692.
 48. Torii Y, Hitomi K, Yamagishi Y, Ysukagoshi N. 1996. Demonstration of alkaline phosphatase participation in the mineralization of osteoblasts by antisense RNA approach. *Cell Biol Int* 20: 459-464.
 49. Weiss MJ, Ray K, Fallon MD, Whyte MP, Fedde KN, Lafferty MA. 1989. Analysis of liver/bone/kidney phosphatase mRNA, DNA and enzymatic activity in cultured skin fibroblasts from 14 unrelated patients with severe hypophosphatasia. *Am J Hum Genet* 44: 686-694.
 50. Zheng MH. 1992. What's new in the role of cytokines on the osteoblast proliferation and differentiation. *Path Res Pract* 188: 1104-1121.