대한한방내과학회지 제36권 4호(2015년 12월)
J. Int. Korean Med. 2015:36(4)518-526

홍화, 홍화씨 추출물이 MC3T3E1 세포의 골분화 과정에 미치는 영향

유성률[1], 신선미[2]
[1]세명대학교 임상병리학과, [2]세명대학교 한의과대학 내과학교실

Effect of Safflower and Safflower Seed Extract on Osteogenic Differentiation of MC3T3E1 Cells

Sung-ryul Yu[1], Seon-mi Shin[2]
[1]Dept. of Clinical Laboratory Science, Se-Myung University
[2]Dept. of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Se-Myung University

ABSTRACT

Objectives: This study investigated the effect of purified safflower (Carthamus tinctorius Linne) and safflower seed (Carthamus tinctorius L. seed; CS) extract, using hot water and ethanol extract methods , on the osteogenic differentiation of MC3T3E1 cells.

Methods: The safflower and safflower seed were extracted with hot water and ethanol. The samples were concentrated by a rotary evaporator and then freeze-dried using a freeze-dryer. The MC3T3E1 cells were propagated and maintained in DMEM (Gibco) containing 10% FBS and a 1% antibiotic antimycotic solution. To induce osteogenic differentiation, the cells were treated for 14 days with DMEM with 10 mM β-glycerophosphate and 50 μM ascorbic acid. Extract doses were confirmed by the results of an MTT assay, and treatment of the extracts was performed in a differentiation medium every two days. The ALP staining and activity were tested after osteogenic differentiation for five days, and after 14 days, osteogenic differentiation was determined by alizarin red S staining. The mRNA expressions of osteogenic-related genes were quantified using quantitative real-time PCR.

Results: In the results of the MTT assay, all concentrations of safflower extracts had no toxicity in the MC3T3El cells. But in the groups of 100 ng/ml and 200 ng/ml concentrations of safflower seed extracts, the cell viability was significantly reduced by up to 40-50%. So we fixed the treatment concentration of the extract at 50 ng/ml. In the ALP and alizarin red S staining, all extract groups increased osteogenic differentiation compared with the control group. The water-safflower extract group showed the highest mRNA level of Alp, Runx2, and Dlx5 genes. The mRNA level of Ocn, an osteogenic gene related to late-stage differentiation, in the ethanol-safflower extract group increased the mineralization more significantly than in other groups.

Conclusions: These data suggest that the extract of safflower increases the osteoblastic differentiation activates of MC3T3E1 cells like the extract of safflower seed. The water-extract and ethanol-extract of safflower have effects on different stages of osteogenesis in MC3T3El. Not only safflower seed but also safflower will be useful therapeutic reagents for age-associated chronic diseases such as osteoporosis.

Key words: osteoblastic differentiation, safflower, safflower seed, osteoporosis

· 투고일: 2015.11.20, 심사일: 2015.12.28, 게재확정일: 2015.12.30
· 교신저자: 신선미　충북 제천시 세명로 65
세명대학교 부속 제천한방병원
TEL: 043-649-1814　FAX: 043-645-1382
E-mail: bunggujy21@hanmail.net
· 연구비지원기관 : 2015년 세명대학교 교내학술연구비 지원에 의해 수행된 연구

Ⅰ. 서 론

노령화 사회를 맞이하며 염려되는 질병 중 하나인 골다공증은 노화로 인한 골형성과 골감소의 불균형에 의해 초래된다[1,2]. 또한, 지방세포와 골아 세포의 불균형에 의해 골아 세포가 줄어든 곳에 지방세포가 채워짐으로써 질병을 더욱 악화시킬 수 있다[3]. 이렇듯, 노화과정에서 골아세포의 골분화 능력 유지는 매우 중요하며, 이를 위한 연구들도 활발하다. 즉, 골아세포의 골분화로 유도를 활성화 시킬 수 있는 추출물에 대한 연구는 골다공증과 같은 만성 질병치료를 위해 반드시 필요하다.

골아 세포로의 분화에서 핵심 전사 조절 유전자인 RUNX2(runt related transcription factor2), DLX5 (distal-less homeobox5), OSX(osterix), 그리고 MSX2 (msh homeobox2)에 대한 연구가 보고 된 바 있다. 골분화 과정에서 Runx2는 골분화 전기에는 골전구 세포에서 골아세포로의 발생을 촉진하며, 후기에는 자연적으로 감소됨으로써 골석회화를 촉진한다[4]. Osx는 Runx2의 하위 유전자로 골아 세포분화 동안 계속 발현하는 유일한 유전자이다. 또 다른 골 관련 전사인자인 Dlx5는 분화중기에서 분화말기까지 발현하며[5], Dlx5 결손 마우스의 경우, 두개골형성이 지연되며 골형성의 이상으로 인해 심각한 두개안면 이상증을 보인다. 이외에 골분화 말기에 발현하여, 골석회화를 유도하는 osteocalcin과 같은 유전자도 보고 되었다[6,7].

홍화는 항응혈 효과, 항염 효과 등이 확인된 바 있고, 한의학에서 어혈(blood stasis)을 치료하는 약제로 골재생 효과가 있는 것으로 알려져 골다공증이나 골질환의 치료로 사용되고 있다[8]. 홍화씨 역시, 홍화와 마찬가지로 항응혈, 항염 효과와 더불어 진통 및 해열 작용이 있어 피부 발진 및 여성의 자궁의 근종이나 낭종 등으로 인한 복통을 치료함은 물론, 내분비적인 문제로 인한 골다공증과 같은 골질환을 치료하는데 효과가 있는 것으로 보고되고 있다[9]. 난소절제술로 골다공증을 유도한 쥐에게 홍화씨 물 추출물을 투여한 경우, 혈청의 estradiol 함량이 유의하게 증가하고 골밀도도 증가시킨다고 보고되었다[10]. 또한, 백서의 두개골 결손 모델에 홍화씨 추출물의 투여는 조골세포의 기능을 활성화시켜 골치유를 촉진시켰으며, 염증 완화의 효과까지 보여줬다[11].

이러한 배경을 바탕으로 골아세포 분화기간 동안 홍화와 홍화씨 추출물이 미치는 영향에 대한 연구는 꾸준히 보고되고 있으나, 그 작용기전에 대한 연구는 미흡하다. 그리고, 골아세포에 영향을 미치는 생약성분의 추출방법을 규명하고, 이렇게 얻어진 천연추출물 이용에 의한 골분화 유도가 더 의미 있다고 할 수 있다. 따라서, 본 연구의 목적은 홍화와 홍화씨 추출물의 골분화에 영향을 주는 시기와 추출법에 따른 골분화 관련 유전자들의 발현 알아보기 위함이다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 홍화와 홍화씨 추출

홍화와 홍화씨는 세명대학교 부속 제천한방병원에서 구입했다. 홍화와 홍화씨 물 추출물은 95 ℃에서 150분간 물과 함께 끓인 뒤, Whatman 종이로 걸렀다. 그리고 에탄올 추출물은 99.5% 에탄올에 홍화와 홍화씨를 넣고 30 ℃에서 24시간 동안 반응시킨 후, Whatman 종이로 걸렀다. 걸러진 추출액은 55 ℃에서 농축시킨 뒤 동결 건조 시켰다.

2. MC3T3E1 세포의 배양 및 골분화 유도

MC3T3E1 세포는 ATCC(ATCC® CRL-2593™, subclone 4)에서 분양 받았다. MC3T3E1 세포는 기본 배양액(10% 우태 혈청, 1% antibiotic-antimycotic 용액이 첨가된 Dulbecco’s modified eagle’s medium-high

glucose(DMEM-HG))으로 2일에 한 번씩 갈아주며 배양하였다. 1차 배양된 MC3T3E1세포를 2×10^5 cells/well 로 6 well 배양 용기에 첨가하여 12시간 이상 안정화 시킨 후, 기본 배양액에 100 nM dexamethasone, 10 mM β-glycerophosphate, 그리고 50 ug/ml ascorbic acid 가 함유된 골분화 유도액을 첨가하여 14일간 분화 유도하였다. 이때, β-glycerophosphate와 ascorbic acid는 2일에 한 번씩 배양액을 교체 해 줄 때 마다 새로이 첨가해 주었다.

3. 세포 독성 측정

세포에 대한 추출물의 독성은 세포에 추출물을 다양한 농도로 처리 하여 48시간 동안 키우고, 세포의 생존력을 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) reduction assay 로 측정하였다. 세포는 96 well plate에 1×10^4 cells/well 농도로 분주 후 24시간 동안 키운 후, 홍화와 홍화씨 추출물을 각각 다양한 농도로 첨가하거나 추출물이 없는 세포에 0.5 mg/mL MTT를 넣고 37 ℃, 4시간 동안 반응시켰다. 흡광도는 microplate reader에서 540 nm 흡광도 값을 측정하였고, 대조군에 대한 백분율로 세포의 생존력을 나타내었다.

4. real-time PCR을 이용한 유전자 발현 분석

MC3T3E1 세포를(1×10^5/well(6well 기준)) DMEM-HG에서 하룻밤 안정화 시킨 뒤, 각 추출물 50 ng/ml 과 함께 4일간 골 분화 배지에서 골분화 유도하였다. 추출물을 포함한 골 분화배지는 이틀에 한 번씩 새로이 교체해 주었다. 골분화 유도된 MC3T3E1 세포로부터 RNeasy Mini Kit(QIAGENE, Hilden, Germany)를 사용하여 전체 RNA를 추출하였고, 역전사 중합효소 kit인 ominiscript RT Kit(QIAGENE)를 이용하여 37 ℃에서 90 분, 95 ℃에서 5분 조건으로 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA를 주형으로 사용하여 2x qPCRBIO SyGreen Mix Hi-Rox(PCR Biosystems, London, UK)를 이용한 real-time PCR을 수행하였고, 유전자 발현양은 house keeping 유전자인 GAPDH에 대비한 CT값을 계산하여 산출하였다. Real time PCR에 사용된 골분화 관련 유전자의 primer 염기서열은 다음과 같다. GAPDH (F-CTGCTGATGCCCCCATGTTC, R-ACCTTG GCCAGGGGTGCTAA), DLX5(F-GAGTAGGTGT CCCGCCTCAGAACCC, R-CCAACCAGCCAGAG AAAGAA), RUNX2(F-TACAAACCATACCCAGT CCCTGTTT, R-AGTGCTCTAACCACAGTCCAT GCA), OSX(F-TGCTTGAGGAGGAAGTTCAC, R-AGGTCACTGCCCACAGAGTA), ALP(F-ACGTG GCTAAGAATGTCATC, R-CTGGTAGGCGATG TCCTTA), OCN(F-CATGAGAGCCCTCACA, R-AG AGCGACACCCTAGAC).

5. ALP 활성 측정과 염색

MC3T3E1 세포를(5×10^4/well(12well 기준)) DMEM -HG에서 하룻밤 안정화 시킨 뒤, 각 추출물 50 ng/ml 과 함께 5일간 골 분화 배지에서 골분화 유도하였다. 5 일간 분화 유도된 세포는 citrate working solution:acetone(2:3, v/v) 으로 30초간 고정시킨 뒤, 두 차례 멸균수로 씻어주었다. ALP 염색은 fast violet B salt kit(Sigma Aldrich)로 30분간 반응시켰고, 다시 멸균수로 두 차례 씻어 주었다. ALP 활성은 colorimetric assay 법으로 실시하였고, 5일간 분화 유도한 세포를 차가운 PBS로 두 차례 씻어주고, 0.5 ml 50 mM Tris - HCl(pH 7.6)로 샘플링 하였다. 세포를 초음파 파쇄한 후, 12000 rpm으로 원심분리 하였다. 상층액을 따로 모아 p-nitrophenylphosphate 를 기질로 이용하여 405 nm에서 그 활성을 체크하였고, 이때 BCA assay kit를 이용하여 구한 전체 단백질의 농도를 기준으로 나누어 준 값을 비교하였다.

6. Alizarin Red S 염색과 탈색

MC3T3E1 세포를(5×10^4/well(12well 기준)) DMEM -HG 에서 하룻밤 안정화 시킨 뒤, 각 추출물 50 ng/ml 과 함께 14일간 골 분화 배지에서 골분화 유도하였다. 14일간 골분화 유도된 세포를 PBS로 두 차례 씻어주고, 70% 에탄올 용액으로 2분간 고정시켰다.

2% alizarin red S 용액으로 30분간 염색 한 뒤, 멸균수로 비특이적으로 염색된 부분을 수차례 씻어주었다. 탈색은 10%(w/v) cetylpyridinium chloride 용액으로 실온에서 30분간 반응 시켰고, 상층액은 microplate reader로 595 nm에서 흡광도 값을 측정하였다.

7. 통계 분석

모든 데이터는 3번 반복한 실험값을 이용하였으며, 평균치±표준 편차로 표시했다. 각 군 간의 유의성 평가는 ANOVA & post-hot 분석을 이용하였다.

III. 결 과

1. 추출물 수율

홍화의 물과 에탄올 추출물은 각각 92.0 mg/g, 25.8 mg/g, 홍화씨의 물과 에탄올 추출물은 각각 92.0 mg/g, 35.9 mg/g을 얻었으며, 물 추출법에 의한 추출 수율이 에탄올 추출법 보다 약 3.6~2.6배 더 높은 추출 수율을 보였다.

2. 홍화와 홍화씨 추출물의 세포독성

세포 독성은 추출물의 처리 농도를 0~200 ng/ml 범위로 시행하였고, 그 결과 홍화 추출물의 경우 물과 에탄올 추출물 모두 전혀 세포 독성이 없었다. 하지만, 홍화씨 추출물의 경우 물과 에탄올 추출물 모두 100 ng/ml과 200 ng/ml의 농도 처리시 세포의 약 40~50%가 사멸함을 확인하였다. 따라서, 이런 결과를 토대로 이후 모든 실험에 이용된 추출물의 농도는 50 ng/ml로 정하였다. 또한, 이러한 결과는 홍화 추출물이 홍화씨 추출물보다 세포에 더 안전함을 보여준다(Fig. 1A, 1B).

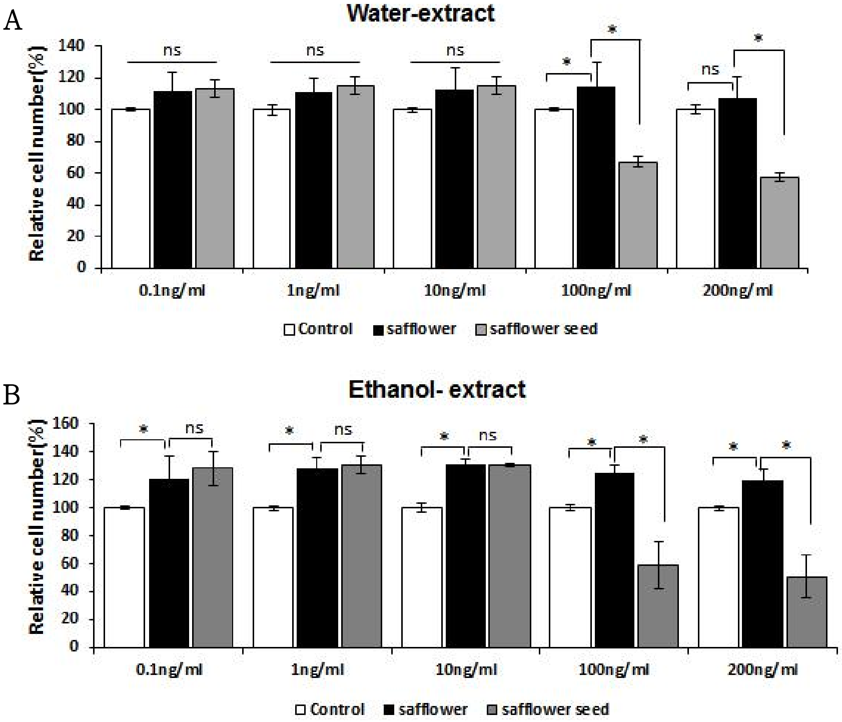

Fig. 1. Effect of extract on MC3T3E1 cells proliferation.

Cell viability percentage of MC3T3E1 cells was estimated by MTT and cell number by crystal violet assay in 48 well plates following 48 hour exposure to water-extract (A) and ethanol-extract (B) of *Safflower* and *Safflower* seed (each represented individually as bars from left to right respectively). Data is shown as mean±SEM of three separate experiments. Treatments significantly different from the untreated control at $p<0.01$ are presented as*.

3. 홍화와 홍화씨 추출물이 골분화 초기에 미치는 영향

추출물질과 추출방법에 따른 골분화 초기에 미치는 영향을 알아보기 위한 실험으로, 각각의 추출물을 대조군과 함께 5일간 골분화 유도 한 뒤, ALP 활성을 측정하였다. 그 결과, 홍화 추출물의 경우 물과 에탄올 추출물을 처리한 두 그룹의 ALP 염색 및 활성이 대조군과 홍화씨 처리군에 비하여 각각 유의하게 높았으며, 홍화씨 에탄올 추출물의 경우 대조군에 비해 ALP 염색 및 활성이 유의하게 높았으나, 홍화 처리군에 비해 미미하였다(Fig. 2A, 2B).

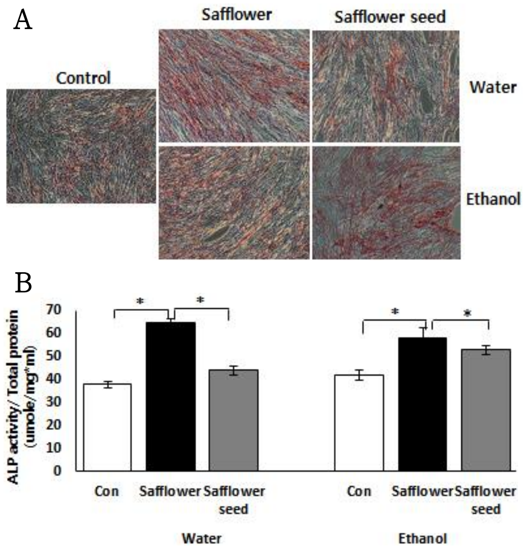

Fig. 2. Effect of extract on the early stage during osteogenic differentiation of MC3T3E1 cells.

ALP staining (A) and ALP activity (B) after 5 days induced to osteogenic differentiation MC3T3E1. All extracts were treated 50 ng/ml concentrations. Data is shown as mean±SEM of three separate experiments. Treatments significantly different from the untreated control at $p<0.05$ are presented as*.

4. 홍화와 홍화씨 추출물이 석회화에 미치는 영향

각각의 추출물이 골분화 후기에 미치는 영향을 알아보기 위해 추출물 처리와 함께 골분화 유도 14일 후, alizarin red S 염색을 시행하였다. 그 결과, 홍화와 홍화씨 추출물 모두 MC3T3E1 세포의 골석회화를 증가시켰으며, 특히, 홍화 에탄올 추출물이 골석회화를 가장 현저히 증가시켰고, 홍화씨 처리군의 경우, 대조군에 비해 석회화가 증가되었지만, 홍화 추출물에 비해 그 영향이 다소 적음을 확인하였다(Fig. 3A). 이를 탈색법을 통해 정량해 본 결과, 홍화 에탄올 추출물에 의한 골석회화가 대조군에 비해 약 2 배 이상 증가되었음을 확인 하였다(Fig. 3B).

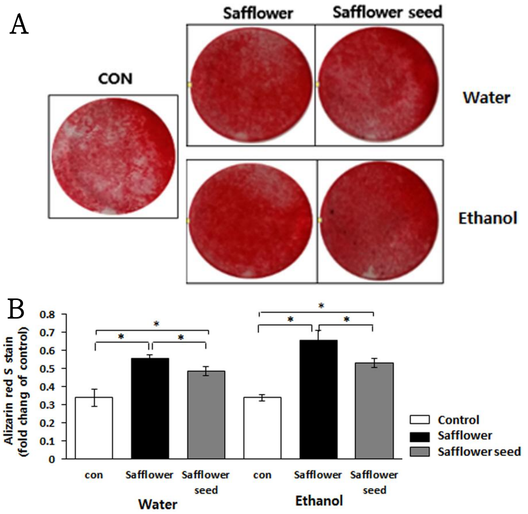

Fig. 3. Effect of extract on mineralization of MC3T3E1 cells.

Osteoblast differentiation of MC3T3E1 cells was

determined by Alizarin Red S staining. DW-extract (upper) and EtOH-extract (lower) of the staining on day 14 (A). Analysis of intensity from Alizarin Red S stains, which relative to quantity of mineralization process, were examined (B). Graph data are shown as mean±S.D. of three independent experiments. **P*<0.05.

5. 홍화와 홍화씨 추출물에 의한 골분화 관련 유전자들의 mRNA 발현

홍화와 홍화씨 추출물에 의해 증가된 골분화능을 토대로, 각각의 추출물에 의한 골분화 관련 유전자들의 mRNA 발현변화를 알아보기 위해, real time PCR을 실시하였다. 그 결과, 앞선 ALP 활성 결과와 일치하게, 홍화 물 추출물에 의한 ALP 발현이 가장 높게 나타났으며(Fig. 4A), 골분화 전사인자인 Dlx5와 Runx2의 발현 역시 홍화 물 추출물에 의해 가장 많이 증가되었다. 홍화 에탄올 추출물과 홍화씨 에탄올 추출물의 경우에도 대조군에 비해 Dlx5와 Runx2의 발현을 증가시켰으나, 홍화씨 물 추출물의 경우 대조군과 유사한 정도로만 Dlx5와 Runx2 발현을 보였다(Fig. 4B and 4C). 또 다른 골분화 전사인자인 Runx2의 하위 유전자로 알려진 Osterix의 발현은 모든 추출물 처리 군에서 대조군에 비해 증가하였다(Fig. 4D). 마지막으로, 골석회화에 관여하는 Ocn의 경우, 홍화씨 에탄올 추출물에 의해 가장 많이 증가하였지만, 홍화씨 물 추출물의 경우에는 그 영향이 미미하였으며, 홍화 추출물의 경우 물과 에탄올 추출물 모두에 의해 Ocn의 발현이 증가되었다(Fig. 4E).

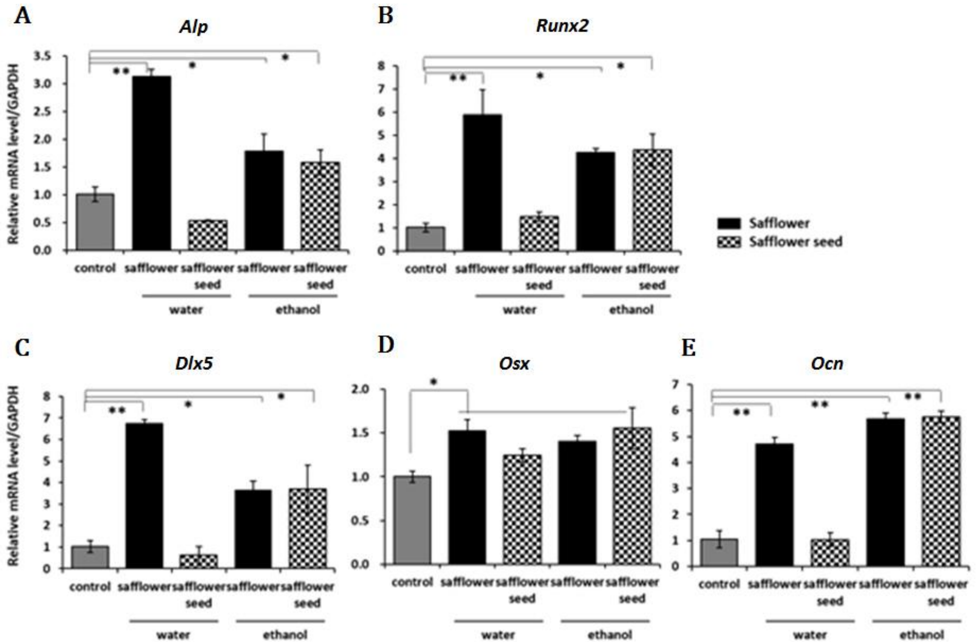

Fig. 4. mRNA expression levels of five osteogenic transcription factors.

(A–E) mRNA expression levels of five osteogenic transcription factors, *Alp* (A), *Runx2* (B), *Dlx5* (C), *Osx* (D), and *Ocn* (E), at different stages of osteogenesis in the extract treated (50 ng/ml) MC3T3E1 cells were investigated using reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (4 days after treatment, respectively). *Runx2* : runt-related transcription factor 2, *Dlx5* : distal-less homeobox 5, *Osx* : ostrix, *Alp* : alkaline phosphatase, Ocn : osteocalcin, Control : osteogenic induction medium without extract. Data are expressed as the mean±standard deviation of three independent experiments. **P*<0.05, ***P*<0.01.

Ⅳ. 고찰 및 결론

골 대사는 골을 형성하는 세포인 조골세포와 노화된 골을 흡수하는 파골세포의 상호작용에 의해 이루어지며, 이두 세포의 균형 잡힌 상호작용에 의해 골 항상성을 유지한다[1,12]. 그러나 노화로 인해 파골세포의 활성은 증가되는 반면, 조골세포 활성이 저하되면서 골밀도가 감소하게 되고[13], 감소된 골밀도(bone mineral density, BMD)와 골조직의 미세구조 변화로 인해 경미한 충격에도 쉽게 골절이 일어나게 되는 질병이 골다공증이다. 최근 들어 우리나라에서 골다공증은 국민건강상 중요한 질병으로 대두되고 있으며 국민 총 의료비 증가에도 상당 부분을 차지하기에 이르렀다. 골밀도는 유년기와 청소년기를 통해 최대 골질량(peak bone mass)에 이르게 되며, 이때의 최대 골질량은 폐경기 여성과 노년기의 골다공증 유발을 결정하는데 있어서 중요한 역할을 하게 된다[14,15]. 따라서 유년기와 청소년기의 최대 골질량 형성을 증가시켜주는 것이 골다공증과 골다공증 관련 골절을 예방하는데 최선책이라 할 수 있겠다[16,17]. 골 질환 발생 시 손실된 뼈를 원상태로 재생하는 것은 사실상 어려우며, 일반적으로는 골다공증이나 골질환에서 뼈의 소실이 더 이상 진행되지 않게 치료하는 방법을 많이 사용하고 있다[18]. 임상에서는 골 흡수 억제제로 에스트로겐, 칼시토닌, 비스포스포네이트 제제가 많이 사용되고 있다[19,20]. 하지만 비스포스포네이트의 경우 사용상의 번거로움과 다소 낮은 치료효과 및 부작용의 사례가 나타났고[21], 또한 에스트로겐 처방은 골량 유지에는 효과적이나 60세 이상의 고령층에서는 골량 감소 억제효과가 폐경 초기에 비하여 낮으며, 최소 5년 이상의 장기 치료를 요하고 있으며, 불규칙한 자궁 출혈, 유방암, 자궁내막암 및 고혈압 발생 빈도 증가 등의 합병증에 대한 위험이 있는 것으로 보고되었다[17,22]. 때문에 골다공증과 같은 골대사 질환의 예방과 치료에 관련된 약물들을 개발하려고 노력하고 있다. 따라서 현재 골다공증의 예방과 치료는 골형성 증가에 많은 연구가 집중되고 있으며, 최근 한의학에서 사용되던 몇몇 생약제재에 대한 효능 및 효과를 근거로 골조직 재생능력에 미치는 영향 등에 대한 과학적인 접근이 시도되고 있다[23,24].

골대사 질환은 한의학에서 骨痿, 骨痺, 虛勞의 범주에서 속하며, 補肝腎, 强筋骨하는 약재를 사용하고 있다[25]. 홍화씨(*Carthamus tinctorius L.* seed; CS)는 성미가 신(辛), 온(溫)하고, 활혈해독(活血解毒), 통행혈맥(通行血脈), 거어혈(祛瘀血), 지통(止痛), 윤조(潤燥), 소종(消腫), 해고독(解蠱毒)의 효능이 있어 천연두로 인한 발진 및 부인의 기체혈어복통을 치료하는 것으로 기록되어 있고, 최근에는 내분비적 원인의 골다공증과 같은 골질환을 치료하는데 효과가 있는 것으로 보고 되고 있다[9]. 또한, 홍화(紅花, Safflower: *Carthamus tinctorius Linne*)는 항응혈 효과, 항염 효과 등이 확인된 바 있고, 동양의학에서 울혈(blood stasis)을 위한 치료제로 전래되는 약제로 골 재생효과가 있는 것으로 알려져 실제 한의학에서 골다공증의 치료로 사용되고 있다[8]. 현재 약학계에서는 홍화씨가 골질환에 미치는 영향을 토대로 신약 개발이 진행 중이고, 식품영양학계에서 역시 건강기능식품으로서의 홍화씨에 대한 관심이 높은 실정이다. 하지만, 아직 한의학계에는 이에 대한 연구나 개발이 부족한 실정이고, 특히, 홍화를 이용한 여러 분야의 연구는 극히 미흡한 실정이다[26]. 따라서 홍화 추출물을 골분화 관련 특히, 한의학계 영역에서의 응용 및 신약개발에 적용시키는 연구는 지극히 중요하고 필요하다고 할 수 있다. 단순 식품으로서의 연구뿐 아니라, 보다 자세한 홍화의 세포내 신호전달 작용기전에 대한 연구가 진행되어야 할 것이다. 이에 홍화와 홍화씨의 물과 에탄올 추출물이 마우스 조골세포인 MC3T3E1 세포의 골분화에 미치는 영향을 알아보

기로 하였다. 홍화씨 추출물은 추출 방법에 무관하게 100 ng/ml 이상의 농도에서 세포독성을 나타낸 반면, 홍화추출물의 경우 200 ng/mL 농도까지 에서는 세포독성을 나타내지 않았다. 이 결과는 홍화가 홍화씨 보다 건강식품이나 약제로 사용되기 좋은 가능성을 제시한다. 또한, 조골세포의 골분화력을 살펴 본 실험결과, 홍화와 홍화씨 물 추출물과 에탄올 추출물 모두에서 대조군에 비해 높은 골 분화능을 확인 하였고, 홍화씨 보다 홍화 추출물이 추출법에 무관하게 높은 골분화력을 보였다. 특히, 홍화씨 에탄올 추출물의 경우, 골분화 초기에 관여하는 ALP의 발현에는 홍화의 영향에 미치지 못하였으나, 석회화 관련 유전자인 Ocn발현에는 가장 효능을 나타내었고, 반면 홍화 물 추출물 처리한 군에서, 골분화 관련 모든 유전자들의 발현이 가장 증가하였음을 관찰하였다. 이러한 결론들을 토대로 홍화 물 추출물은 골분화 초기부터 말기에 이르기까지 지속적인 영향을 주는 것으로 사료되고, 홍화씨 에탄올 추출물의 경우, 분화 초기보다는 후기에 영향을 미치는 것으로 사료된다.

이러한 결과를 검증하기 위해 각 추출물의 성분 비교분석을 통한 정확한 핵심 요소를 밝히는 연구가 진행될 필요가 있으며, 골다공증과 밀접한 골분화와 지방분화의 균형에서 홍화와 홍화씨 추출물이 미치는 영향에 대해 연구가 필요할 것으로 사료된다. 본 연구는 마우스 조골세포인 MC3T3E1 세포의 골 분화 과정 중 홍화와 홍화씨 추출물이 미치는 시기가 다름을 확인하였고, 홍화 추출물의 영향이 홍화씨에 비해 유의하게 우수함을 확인하였다. 이러한 결과는 한의학에서 골관련 질환 처방의 홍화와 홍화씨 추출물 적용에 있어서 기초적인 자료로 제공 될 수 있을 것이다.

감사의 글

본 연구는 2015년도 세명대학교 교내학술연구비 지원에 의해 수행된 연구이며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. 김광진, 전지천. 난소 절제 흰쥐의 골대사에 미치는 골쇄보의 영향. 대한한방내과학회지 2001;22(2):175-81.
2. 김수미, 최인혁, 김남수. 흰쥐의 난소제거로 유발한 골다공증에 대한 홍화씨의 IGFs, IGF binding protein-3 그리고 BALP에 대한 혈청내 효과. 한국임상수의학회지 2003;20(3):263-73.
3. Hwang JS, Lee KM, Jung HS, Lee JW, Choi YR. Differential Expression of STATs and Its Function in Osteogenesis of Mesenchymal Stem Cells. J. *of Korean Orthopaedic Research Society* 2013;16(1):1-9.
4. Kim YJ, Lee MH, Cho JY, Ryoo HM. Bone morphogenetic protein-2-induced alkaline phosphatase expression is stimulated by Dlx5 and repressed by Msx2. *The J of Biol Chem* 2004;279:50773-80.
5. Lee RH, Kim B, Choi I, Kim H, Choi HS, Suh K, et al. Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue. *Cell Physiol Biochem* 2004;14:311-24.
6. Jung HS, Lee YJ, Kim YH, Paik SI, Kim JW, Lee JW. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma/singal transducers and activators of transcription 5a pathway plays a key factor in adipogenesis of human bone marrow-derived stromal cells and 3T3-L1 preadipocytes. *Stem Cells Dev* 2012;21:465-75.
7. Ryoo HM, Hoffmann HM, Beumer T, Frenkel B, Towler DA, Stein GS, et al. Stage-specific expression of Dlx-5 during osteoblast differentiation involvement in regulation of osteocalcin gene expression. *Mol Endocrinol* 1997;11(11):1681-94.
8. Kutsuna H, Fujii S, Kitamura K, Komatsu K,

Nakano M. Identification and determination of platelet aggregation inhibitor from safflower (Carthamus tinctorius Linne). *Yakugaku Zasshi-Journal of the Pharmaceutical Society of Japan* 1988;108:1101-3.
9. Kim HJ, Bae YC, Park RW, Choi SW, Cho SH, Choi YS, et al. Bone-protecting effect of safflower seeds in ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int* 2002;71(1):88-94.
10. 김기영, 김상범, 임종우. 축산물 및 가공: 홍화씨 Yoghurt 급여가 난소절제 Rat의 골다공증에 미치는 영향. 한국동물자원과학회지 2004;46(1):69-76.
11. 김덕규, 홍성우, 유경태, 서재진, 김홍식, 유형근, 등. 홍화씨 추출물의 국소투여가 백서 두개골 결손부 재생에 미치는 영향. 대한치주과학회지 1999;29(2):297-310.
12. Tanaka Y, Nakayamada S, Okada Y. Osteoblasts and osteoclasts in bone remodeling and inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2005;4(3):325-8.
13. Hawker GA. The epidemiology of osteoporosis. *J Rheumatol suppl* 1996;45:2-5.
14. Ott SM. Attainment of peak bone mass. *J Clin Endoclinol Metab* 1990;71(5):1082A-C.
15. Hansen MA, Overgaard K, Riis BJ, Christiansen C. Role of peak bone mass and bone loss in postmenopausal osteoporosis: 12year study. *Br Med J* 1991;303:961-4.
16. Lee JW, Park JH, Lee HJ, Lee IS. The Effects of Solidago virga-aurea var. gigantea Miq. Root Extract on Bone Metabolism in Growth Period Rats. *Journal of Life Science* 2005;15(2):236-41.
17. Cho SH, Kim KG, Kim SR, Lee JA, Moon H, Hwang YY. The effects of 17-β etradiol, medroxyprogesterone acetate and parathyroid hormone on the differentiation of osteoblast cell. *Korean Soc Obst Gyn* 1996;39(8):1497-506.
18. Boonen S, Broos P, Dequeker J, Bouillon R. 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* 1997;242(4):285-90.
19. Oh HJ. Therapy of osteoporosis in climacteric. *J Korean Acad Fam Med* 2005;21:20-7.
20. 문준성, 원규장. 골다공증의 진단과 치료. 영남의대학술지 2008;25(1):19-30.
21. Aldercreutz H, Mazur W. Phyto-estrogens in relation to cancer and other human health risks. *Proc Nutr Soc* 1996;55:399-417.
22. Lee YS. Effect of isoflavones on proliferation and oxidatives stress of MC3T3-E1 osteoblastic like cells. *Korea Soybean Digest* 2001;18:35-42.
23. Pole HAP, Felsenberg D, Hanley DA, Stenpan J, Munoz-Torres M, Wolkins TJ, et al. Multinational placebo-controlled, randomised trial of the effects of alendronate on bone density and fracture risk in postmenopausal women with law bone mass: Results of the FOSIT. *Osteoporosis Int* 1999;9:461-8.
24. 김정연, 송용선. 골다공증에 대한 동서의학적 고찰. 한방재활의학회지. 1996;6:293-315.
25. Choi EM, Suh KS, Kim YS, Choue RW, Koo SJ. Soybean ethanol extract increases the funtion of osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Phytochemistry* 2001;56:733-9.
26. Choi CH, Kim HD, Im EB. Reviews of Research trends on Safflower seed(Carthamus tinctorius L.) *J Oriental Medical Classics* 2011;24(6):63-90.