

## 식물성 에스트로겐이 MC3T3-E1 골아세포의 성장과 Insulin-like Growth Factor-I(IGF-I) 생성에 미치는 영향

권지영<sup>1</sup> · 남택정<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>국립수산과학원 남해수산연구소

<sup>2</sup>부경대학교 식품생명공학부

### Effects of Phytoestrogen on Cell Growth and Insulin-like Growth Factor-I (IGF-I) Production in MC3T3-E1 Cells

Ji Young Kwon<sup>1</sup> and Taek Jeong Nam<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>South Sea Fisheries Research Institute, NFRDI, Yeosu 556-823, Korea

<sup>2</sup>Division of Food Sciences and Biotechnology, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

#### Abstract

Estrogen is known to play an important role in maintaining bone mass, since the concentration of serum estrogen decrease after menopause and the estrogen deficiency results in bone loss. Phytoestrogens are plant compounds with estrogen-like biological activity. In this study, to investigate the bioactivities of phytoestrogen, which act on bone metabolism, we examined the effect of selected food-borne phytoestrogens (genistein, daidzein and resveratrol) on osteoblast proliferation and IGF-I production using MC3T3-E1 cells, a mouse calvaria osteoblast-like cell line. Cells were cultured in a serum free medium for 48 hr in the presence of genistein ( $10^{-5}$  M), daidzein ( $10^{-5}$  M) and resveratrol ( $10^{-5}$  M). The effects of genistein, daidzein and resveratrol on the cell proliferation and growth were evaluated by total cell numbers, MTS assay and cell migration assay. Their effect was compared with the  $17\beta$ -estradiol. Genistein, daidzein and resveratrol exhibited stimulatory effects on the growth of MC3T3-E1 cells, and the most pronounced effect was shown with daidzein. In addition, these phytoestrogen increased alkaline phosphatase activity of MC3T3-E1 cells. These effects were similar to that of  $17\beta$ -estradiol effects. Moreover, treatment with genistein, daidzein and resveratrol increased production of insulin like growth factor-I (IGF-I) in conditioned media, indicating that the growth promoting effects of these phytoestrogen were related to the changes in production of IGF-I by MC3T3-E1 cells. These results show that genistein, daidzein and resveratrol have a stimulatory effect on osteoblast function, and that these findings in a cell model may prove relevant to protecting against the loss of bone mass and the development of osteoporosis in human subjects.

**Key words:** genistein, daidzein, resveratrol, IGF-I, MC3T3-E1

#### 서 론

골은 재형성 과정을 통해 건강한 상태로 유지되며(1,2), 골의 재형성은 골아세포에 의한 골 형성과 파골세포에 의한 골 흡수가 끊임없이 반복되는 골 대사 회전을 통해 조절되고 있다. 그리고 골 대사에는 다양한 내분비학, 영양학, 물리학 및 유전학적 인자들이 관여하고 있다(3,4). 따라서 에스트로겐 부족, 비타민 A와 D의 결핍, 부갑상선 호르몬 과잉 및 칼슘 섭취부족이나 장에서의 칼슘 흡수 능력 저하 등은 골 대사의 불균형을 초래할 수 있으며(5,6), 이로 인한 골아세포의 활성 저하와 파골세포의 활성 증진에 의한 골 대사의 불균형은 골 밀도가 감소되고 골질 빈도가 높아지는 것을 특징으로 하는 골다공증을 유발하기도 한다(7).

골다공증은 다양한 연령층에서 발병 가능하지만, 특히 여성 호르몬인 에스트로겐의 분비 감소에 의하여 급격한 생리적 변화를 수반하는 폐경기 여성들에게 높게 나타난다(8). 에스트로겐은 생체에서 성호르몬의 기능 이외에도 골대사의 주요한 조절인자로서 직접적으로 골세포의 DNA 합성을 촉진할 뿐만 아니라(9), collagen의 발현(10), 칼슘과 인 대사에 관여하는 alkaline phosphatase(ALP)의 활성(11,12) 및 성장인자인 Insulin-like Growth Factor I(IGF-I)의 생성과 유전자 발현을 증가시킴으로써 골 형성에 관여한다고 보고되어 있다(13).

폐경기 여성의 골다공증 치료에는 에스트로겐을 투여하는 호르몬 요법이 효과적인 치료법으로 이용되고 있지만, 불규칙한 자궁출혈, 자궁내막암 및 유방암과 같은 부작용을

\*Corresponding author. E-mail: namtj@pknu.ac.kr  
Phone: 82-51-620-6337, Fax: 82-51-620-6330

유발하기도 한다(14,15). 따라서 최근에는 에스트로겐의 대체물질로서 다른 부작용 없이 골 손실은 최소화하면서 골형성을 촉진할 수 있는 자연 식이성분에 대한 연구가 진행되었고, 이러한 관점에서 주목을 받고 있는 것이 다양한 식물성 에스트로겐이다(16-18).

식물성 에스트로겐 중 대표적인 것은 콩과식물(legumes)과 곡물(whole grains)에 널리 존재하는 이소플라본이며(19-21), 이들 중 genistein과 daidzein의 생리작용(22,23)과 골생성 증진에 관한 연구결과들이 보고되어 있다(24-26). Genistein과 daidzein 뿐만 아니라 포도과 오디를 포함한 많은 식물에서 발견되는 stilbene인 resveratrol 또한 식물성 에스트로겐의 범주에 포함되는 페놀성 화합물로서 에스트로겐과 유사한 활성을 나타내며(27), 골세포의 증식과 분화에 효과가 있는 것으로 보고되었다(28). 그러나 골 생성 증진을 유도하는 식물성 에스트로겐의 효과가 골에서 특이적인 작용을 하는 성장인자들과 관련된 것인지에 대한 연구는 미비한 실정이다.

이에 본 연구에서는 MC3T3-E1 골아세포의 증식에 대한 genistein, daidzein 및 resveratrol의 효과를 확인하고, 이들 식물성 에스트로겐의 효과가 성장인자인 IGF-1의 생성과 관련된 것인지를 검토하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 시약 및 재료

MC3T3-E1 세포배양에 사용된  $\alpha$ -MEM( $\alpha$ -Modified Eagle's Medium), FBS(Fetal bovine serum)는 Gibco BRL(Life Technologies, Gibco BRL, Gaithersburg, MD) 제품을 사용하였다. Sodium bicarbonate, BSA(bovine serum albumin), trypsin-EDTA, protease inhibitor, 17-estradiol, genistein, daidzein 및 resveratrol은 Sigma(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)와 USB(Amersham Pharmacia bioscience, England) 제품을 사용하였다. ECL-western immunoblot에 사용한 protein standard marker는 rainbow high molecular marker(Amersham Pharmacia bioscience, England)를 사용하였고 detection reagent는 Pierce(Pierce, Rockford, IL, USA)에서 구입하였다. 세포 배양용 용기와 기구는 Corning(Corning, NY, USA)과 Falcon(Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, USA) 제품을 사용하였고 세포의 RNA는 Intron(Intron Biotechnology, Inc., Korea) 제품인 Easy blue로 추출하였다. 전기영동용 agarose는 SeaKem LE agarose(BMA, Rockland, ME, USA)를 사용하였고 그 외 RNA와 DNA 실험용 시약은 molecular biology용으로 Sigma 제품과 특급시약을 사용하였다.

### MC3T3-E1 세포배양

MC3T3-E1 세포는 경희대학교 의과대학 내분비 연구실에서 분양받아 본 실험실에서 배양하면서 사용하였다. MC3T3-

E1 세포는 10% FBS(Fetal bovine serum)를 함유하는  $\alpha$ -MEM( $\alpha$ -Modified Eagle Medium; sodium bicarbonate, 100 U/mL penicillin, 100  $\mu$ g/mL streptomycin) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건 하에서 배양하고 배지는 3일마다 교환하였다. 17 $\beta$ -Estradiol과 식물성 에스트로겐인 genistein, daidzein 및 resveratrol의 세포 투여 농도를 결정하기 위해 다양한 농도별로 세포 증식에 미치는 효과를 확인한 결과, 17 $\beta$ -estradiol의 효과는 10<sup>-9</sup> M에서 가장 큰 것으로 나타났으며, genistein, daidzein, 및 resveratrol의 경우에는 10<sup>-5</sup> M에서 가장 큰 효과를 나타내었기 때문에 각각 10<sup>-9</sup> M과 10<sup>-5</sup> M 농도로 세포에 첨가하였다.

### 총 세포 수 측정

MC3T3-E1 세포는 6-well plate에 1×10<sup>5</sup> cells/well이 되도록 분주하여 confluent monolayer가 될 때까지 배양하고 FBS가 없는  $\alpha$ -MEM 배지로 교환하여 24시간 배양하였다. 24시간 경과 후, 새로운 배지에 17 $\beta$ -estradiol(10<sup>-8</sup> M), genistein(10<sup>-5</sup> M), daidzein(10<sup>-5</sup> M) 및 resveratrol(10<sup>-5</sup> M)을 첨가하여 48시간 더 배양하였다. 배양 후 세포 monolayer는 PBS-EDTA로 2회 세척하고 trypsin 처리하여 세포를 회수하였다. 회수한 세포는 Brightline hemacytometer(Hausser Scientific, USA)를 이용하여 전자현미경(OLYMPUS, Japan) 하에서 총 세포 수를 측정하였다.

### MTS assay에 의한 세포 증식 측정

살아있는 세포 수를 측정하여 세포 증식을 평가하기 위해 MTT assay를 변형한 MTS assay를 사용하여 실험하였다. MTS assay는 실험 조건별로 처리한 세포에 tetrazolium compound인 MTS를 투여하고 일정시간동안 배양하여 세포 내 미토콘드리아에 존재하는 succinate dehydrogenase에 의해 생성된 수용성 formazan의 양을 490 nm에서 비색정량하여 세포의 증식을 확인하는 방법이다.

세포를 96-well plate에 1×10<sup>4</sup> cells/well이 되도록 분주하고 10% FBS를 함유하는  $\alpha$ -MEM 배지로 배양하여 80% confluent 되었을 때 FBS가 없는  $\alpha$ -MEM 배지로 교환하여 24시간 더 배양하였다. 24시간 배양한 후, 새로운 배지에 17 $\beta$ -estradiol, genistein, daidzein 및 resveratrol을 첨가하여 44시간 배양하고 MTS/PMS solution(Celltiter 96 Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay Kit, Promega Co., Wisconsin, USA)을 첨가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 4시간동안 배양한 다음, ELISA plate reader를 사용하여 490 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

### Migration assay

MC3T3-E1 세포를 10% FBS를 함유하는  $\alpha$ -MEM 배지에서 배양하고 FBS가 없는  $\alpha$ -MEM 배지로 교환하여 24시간 배양한 다음, 세포의 일정한 영역을 면도칼로 긁어 빈 공간을 만든 후, 17 $\beta$ -estradiol, genistein, daidzein 및 resveratrol을 첨가하여 48시간동안 배양하였다. 48시간 경과 후, 배

지를 제거한 다음 세포를 PBS-EDTA로 2회 씻어내고 methanol로 고정하였다. 고정된 세포는 Harris hematoxylin으로 염색하여 절단면 아래로 내려온 세포의 핵을 전자현미경 하에서 계수하였다.

**Alkaline phosphatase(ALP) activity 활성 분석**

17β-Estradiol, genistein, daidzein 및 resveratrol을 첨가하여 48시간동안 배양한 세포 monolayer에 0.1% Triton X-100 buffer(pH 7.6)를 넣고 얼음 위에서 scrapping하여 cell lysate를 회수하였다. Cell lysate는 ice bath에서 60초간 sonication하고 원심분리하여 그 상청액을 다시 회수하였고 회수한 각 처리군 별 cell lysate의 ALP 활성은 ALP 측정용 kit(신양화학, Korea)를 사용하여 측정하였다.

**IGF-I 농도 측정**

MC3T3-E1 세포를 각 처리군 별로 48시간 배양하여 회수한 배양액과 cell lysate에서 IGF-I의 농도는 two-site immunoradiometric assay(IRMA) kit(DSL-5600 ACTIVE IGF-I Coated-Tube IRMA kit, USA)를 사용하여 측정하였다. 배양액과 cell lysate에 extraction solution을 가하여 실온에서 30분간 방치하고 원심분리하여 Insulin-like Growth Factor binding protein(IGFBP)을 제거하였다. IGFBP 제거 후, neutralizing solution으로 중화시켜 anti-IGF-I coated tubes에 넣고 <sup>125</sup>I으로 표지한 anti-IGF-I reagent를 첨가하여 실온에서 3시간동안 shaking incubation(180 rpm)하였다. 3시간 경과 후, anti-IGF-I coated tubes 내의 반응액을 제거하고 탈이온수로 3번 세척한 다음 gamma counter(Wallac 1470 wizard, Amersham Pharmacia Biotech, England)로 radio activity를 측정하였다.

**IGF-I의 mRNA 발현 분석**

IGF-I의 mRNA 발현 분석에는 digoxigenin(DIG)으로 표지하여 화학발광방법으로 mRNA를 확인하는 non-radioactive DIG northern blot 방법을 사용하였다. 각 처리조건별로 배양하여 추출한 MC3T3-E1 세포의 total RNA 20 μg을 1.2% 변성 formaldehyde agarose 젤에 전기영동하고 nylon 멤브레인(ICN Biomedicals, Inc., USA)으로 capillary transfer 하였다. 다음, baking한 membrane은 ExpressHyb hybridization solution(Clontech laboratories, Inc., USA)을 사용하여 pre-hybridization하고 DIG-dUTP로 표지한 IGF-I probe를 넣은 hybridization 용액으로 68°C에서 1시간동안 hybridization을 행하였다. Hybridization 과정을 거친 멤브레인은 실온에서 30분간 blocking(0.1 M Maleic acid, 0.15 M NaCl; pH 7.5; 1%(w/v) blocking reagent)하고 Anti-Digoxigenin-AP conjugate(1:10,000)로 30분간 반응시킨 후, 세척(0.1 M maleic acid, 0.15 M NaCl, 0.3%(v/v) Tween 20, pH 7.5)하고 chemiluminescence substrate CSPD solution(1:100, Roche Dignostics)으로 처리하여 X-ray 필름에 감광시켰다.

**통계처리**

실험의 분석결과는 각각의 처리별로 평균치와 표준편차(mean±SD)를 사용하여 표기하였으며, 유의성 검정에는 Student's *t*-test를 이용하였다.

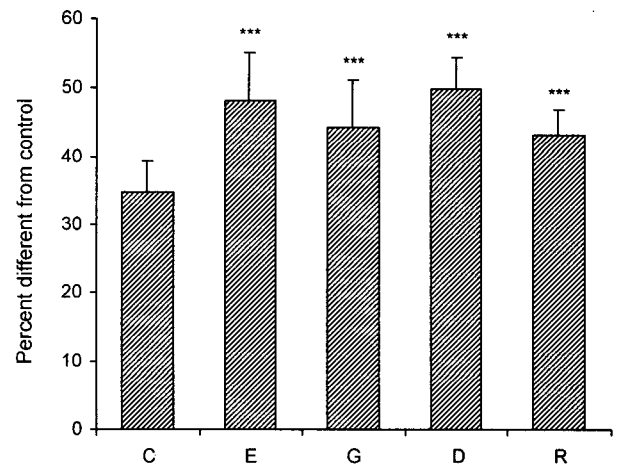
**결과 및 고찰**

**Genistein, daidzein 및 resveratrol이 세포의 증식과 성장에 미치는 효과**

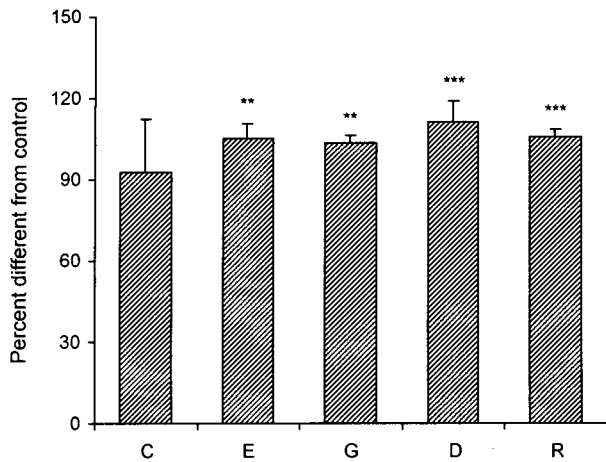
Genistein, daidzein 및 resveratrol이 MC3T3-E1 골아세포의 증식에 미치는 효과를 확인하기 위하여 총 세포 수와 MTS 분석을 통해 살아있는 세포수를 측정하였으며, 이들 식물성 에스트로겐의 효과를 17β-estradiol의 효과와 비교하여 살펴보았다.

Genistein, daidzein 및 resveratrol에 의해 총 세포 수는 각각 34.8%(*p*<0.001), 51.4%(*p*<0.001), 31.8%(*p*<0.001) 증가하였으며, 17β-estradiol에 의해 49.1%(*p*<0.001) 증가한 것으로 나타났다(Fig. 1). MTS assay로 살아있는 세포수를 확인한 결과(Fig. 2)에서는 daidzein과 resveratrol 처리군의 경우 대조군에 비해 각각 20.2%(*p*<0.001)와 14%(*p*<0.001)의 세포 수 증가를 나타내어 13.4%(*p*<0.001)의 증가를 보인 17β-estradiol보다 세포 증식에 미치는 효과가 크다는 것을 알 수 있었다. Genistein의 경우에는 11.7%(*p*<0.01)의 증식 향상을 나타내어 다른 실험군들에 비해 효과가 낮은 것으로 나타났다.

17β-Estradiol, genistein, daidzein 및 resveratrol이 MC3T3-E1 세포의 증식과 성장에 미치는 효과는 cell migration 분석을 통해서도 살펴보았다. Fig. 3은 17β-estradiol과 각각의 식물성 에스트로겐 처리에 의해 절단면 아래로 증식한 세포



**Fig. 1. Effects of 17β-estradiol, genistein, daidzein and resveratrol on total cell numbers of MC3T3-E1 cells.** Cells were cultured for 48 hr in vehicle (C, 0.1% ethanol), 17β-estradiol (E, 10<sup>-9</sup> M), genistein (G, 10<sup>-5</sup> M), daidzein (D, 10<sup>-5</sup> M) and resveratrol (R, 10<sup>-7</sup> M) after pre-incubation with SFM (serum free media) for 24 hr, and then cell number was counted by hemacytometer. Data shown are mean ± SD expressed. Samples significantly different from control by Student's *t*-test; \*\*\**p*<0.001.



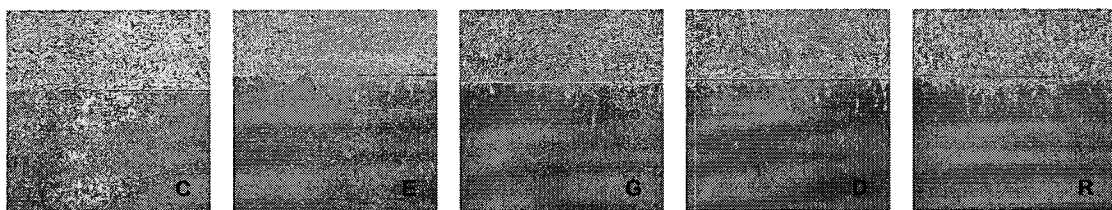
**Fig. 2. Effects of 17β-estradiol, genistein, daidzein and resveratrol on proliferation of MC3T3-E1 cells.**

Cells were cultured for 48 hr in vehicle (C, 0.1% ethanol), 17β-estradiol (E,  $10^{-9}$  M), genistein (G,  $10^{-5}$  M), daidzein (D,  $10^{-5}$  M) and resveratrol (R,  $10^{-5}$  M) after pre-incubation with SFM for 24 hr, and then cell proliferation was determined by MTS cell proliferation assay. Data shown are mean  $\pm$  SD expressed. Samples significantly different from control by Student's *t*-test; \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

사진을 나타낸 것이다. 17-Estradiol의 첨가에 의해서는 대조군에 비해 증식이 74.8% ( $p < 0.001$ ) 향상된 상태임을 확인할 수 있었으며, genistein과 daidzein에 의해서는 각각 16.5% ( $p < 0.01$ )와 43.2% ( $p < 0.01$ )의 증가를 보였다. Resveratrol의 투여에 의해서는 17β-estradiol의 효과에는 미치지 못하지만 58.8% ( $p < 0.001$ ) 증식이 향상된 것으로 나타났다(Fig. 4).

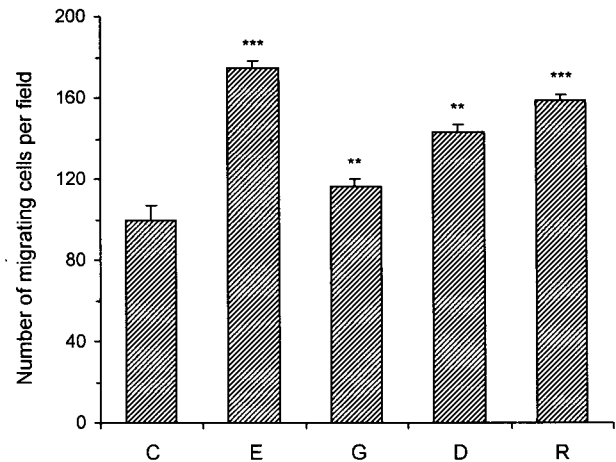
이상으로 식물성 에스트로젠인 genistein, daidzein 및 resveratrol이 세포의 증식과 성장에 미치는 효과를 살펴본 결과, 이들이 에스트로젠인 17β-estradiol과 마찬가지로 MC3T3-E1 골아세포의 증식과 성장을 유도한다는 것을 확인할 수 있었다. 그리고 난소 절제 쥐의 골 손실에서 daidzein은 genistein보다 효과적이라는 *in vivo* 결과(29)와 마찬가지로 MC3T3-E1 세포를 이용한 본 연구에서도 실험에 따른 차이는 있으나 daidzein과 resveratrol의 효과는 genistein보다 큰 것으로 나타났다.

Alkaline phosphatase(ALP) 활성에 미치는 영향  
골 형성 정도를 판단하는 생화학적 지표로 활용되고 있는



**Fig. 3. Photomicrographs illustrating migration of MC3T3-E1 cells.**

Cell monolayers were wounded as described in materials and methods. The cells were incubated with vehicle (C, 0.1% ethanol), 17β-estradiol (E,  $10^{-9}$  M), genistein (G,  $10^{-5}$  M), daidzein (D,  $10^{-5}$  M) and resveratrol (R,  $10^{-5}$  M) after wounding. After a 48 h incubation, cell monolayers were fixed, stained, and photographed.

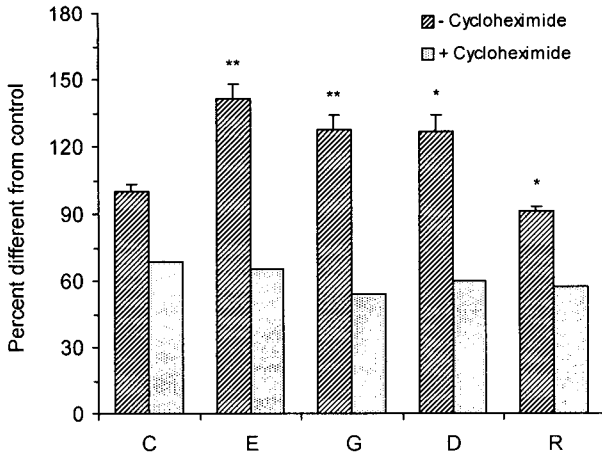


**Fig. 4. Effects of 17β-estradiol, genistein, daidzein and resveratrol on migration of MC3T3-E1 cells.**

Cells were cultured for 48 hr in vehicle (C, 0.1% ethanol), 17β-estradiol (E,  $10^{-9}$  M), genistein (G,  $10^{-5}$  M), daidzein (D,  $10^{-5}$  M) and resveratrol (R,  $10^{-5}$  M) after pre-incubation with SFM for 24 hr. After incubation, the number of cells migrating across the wound area was determined. Data shown are mean  $\pm$  SD expressed. Samples significantly different from control by Student's *t*-test; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .

alkaline phosphatase(ALP)는 칼슘과 인 대사에 관여하며(30, 31), 골아세포의 분화뿐만 아니라 증식과도 밀접한 관계를 가지는 효소(32,33)이다. MC3T3-E1 골아세포를 대상으로 살펴본 ALP의 활성은 Fig. 5에 나타내었다. 17β-Estradiol을 첨가한 경우, ALP 활성은 대조군에 비해 41.6% ( $p < 0.01$ ) 높은 것으로 나타났으며, genistein과 daidzein 처리에 의해서는 각각 27.1% ( $p < 0.01$ )와 26.4% ( $p < 0.05$ )의 활성 증가를 보였다. 이와 달리 resveratrol 첨가에 의해 ALP 활성은 8.5% ( $p < 0.05$ ) 감소한 것으로 나타나 resveratrol 처리군의 경우, 골아세포의 증식과 성장에 대한 효과는 genistein과 비슷하거나 높았지만 ALP 활성에는 별다른 영향을 미치지 못하는 것으로 나타났다. 그리고 17β-estradiol, genistein 및 daidzein 처리에 의해 높아졌던 ALP 활성은 단백질 합성 저해제인 cycloheximide 처리에 의해 완전히 저해되었는데(Fig. 5) 이러한 결과는 이들의 존재 시 골아세포에서 일어나는 대사 활성 효과가 부분적으로는 새로이 합성된 단백질 성분들에 의해 유도된다는 사실을 의미하는 것으로 볼 수 있을 것이다.

Genistein, daidzein 및 resveratrol이 MC3T3-E1 골아세



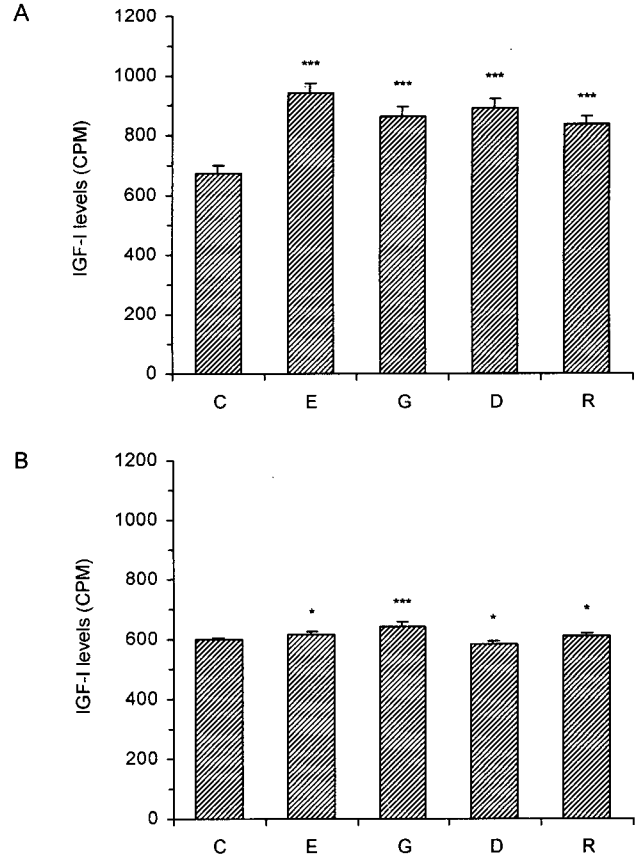
**Fig. 5. Effects of 17β-estradiol, genistein, daidzein and resveratrol on ALP activity in MC3T3-E1 cells.** Cells were cultured for 48 hr in medium containing vehicle (C, 0.1% ethanol), 17β-estradiol (E, 10<sup>-9</sup> M), genistein (G, 10<sup>-5</sup> M), daidzein (D, 10<sup>-5</sup> M) and resveratrol (R, 10<sup>-5</sup> M) in the presence or absence of cycloheximide (10<sup>-5</sup> M) after pre-incubation with SFM for 24 hr. Data shown are mean ± SD expressed as a percentage of vehicle-treated cells (C). Samples significantly different from control by Student's *t*-test; \**p*<0.05, \*\**p*<0.01.

포의 증식과 성장에 미치는 효과와 더불어 ALP 활성에 대한 효과를 통해 살펴본 결과들은 식물성 에스트로겐의 골 형성 촉진 효과를 증명하는 것으로서 에스트로겐 결핍에 의해 야기될 수 있는 골다공증의 예방과 치료적인 측면에 있어서 이들의 유용한 약리학적 기능을 뒷받침하는 하나의 근거가 될 수 있을 것이라고 사료된다.

**IGF-1 생성에 대한 효과**

MC3T3-E1 세포의 배양액에 17β-estradiol(10<sup>-9</sup> M), genistein(10<sup>-5</sup> M), daidzein(10<sup>-5</sup> M) 및 resveratrol(10<sup>-5</sup> M)을 첨가하여 48시간동안 배양한 후, 배양액과 cell lysate내에 존재하는 IGF-I의 농도를 immunoradiometric 분석방법으로 (IRMA) 측정된 결과는 각각 Fig. 6A와 B에 나타내었다. 배양액 중의 IGF-I 생성은 17β-estradiol 처리에 의해 40.1% (*p*<0.001) genistein, daidzein 및 resveratrol에 의해서는 각각 28.3%(*p*<0.001), 32.0%(*p*<0.001), 24.2%(*p*<0.001) 증가한 것으로 나타났(Fig. 6A). Cell lysate에서 IGF-I의 농도는 세포에서 생성된 후, 배양액으로 분비되고 남은 양으로서 배양액보다 전체적으로 낮은 경향을 보였으며(Fig. 6B), 17β-estradiol, genistein 및 resveratrol에 의해 각각 2.5% (*p*<0.05), 7.6%(*p*<0.001), 2.3%(*p*<0.05)의 증가를 나타내었고 daidzein 처리에 의해서는 2.8%(*p*<0.05) 감소한 것으로 나타났다.

지금까지의 연구에 의하면 에스트로겐은 직접적으로 골아세포의 증식과 골 형성 촉진작용을 나타낼 뿐만 아니라 IGF-I의 국소적 생산과 분비를 촉진하며 간접적으로 골 대사 촉진 효과를 유도해 낼 수 있다고 보고되어 있었지만 (34-36), 식물성 에스트로겐의 투여에 의해 IGF-I의 농도가



**Fig. 6. Effects of 17β-estradiol, genistein, daidzein and resveratrol on IGF-I production.** Cells were cultured for 48 hr in vehicle (C, 0.1% ethanol), 17β-estradiol (E, 10<sup>-9</sup> M), genistein (G, 10<sup>-5</sup> M), daidzein (D, 10<sup>-5</sup> M), resveratrol (R, 10<sup>-5</sup> M) after pre-incubation with SFM for 24 hr, and then IGF-I concentration determined by IRMA assay. IGF-I concentration in conditioned media (A) and cell lysates (B). Data shown are mean ± SD expressed. Samples significantly different from control by Student's *t*-test; \**p*<0.05, \*\*\**p*<0.001.

증가하였다는 보고는 없었다. 그러나 본 실험 결과, 17β-estradiol 뿐만 아니라 식물성 에스트로겐인 genistein, daidzein 및 resveratrol 또한 IGF-I의 생성을 증가시키는 것으로 나타났다. 이러한 결과로부터 앞서 살펴본 genistein, daidzein 및 resveratrol이 MC3T3-E1 골아세포의 증식, 그리고 골 형성과 관련된 대사 활성 증진에 미치는 효과에는 이들의 처리에 의해 국소적으로 생성이 증가된 세포 성장인자인 IGF-I의 작용이 관여하고 있다는 것을 확인할 수 있었다.

**IGF-I mRNA 발현**

IRMA로 IGF-I의 농도를 측정된 결과, 17β-estradiol과 genistein, daidzein 및 resveratrol은 MC3T3-E1 세포에서 IGF-I 생성을 증가시킨 것으로 나타났다(Fig. 6A). 이들의 처리에 의해 나타났던 IGF-I 생성 증가가 IGF-I mRNA 발현과 관련된 것인지를 northern hybridization 방법으로 분석하였다(Fig. 7).

Densitometer로 IGF-I mRNA 밴드를 정량한 결과(Fig.

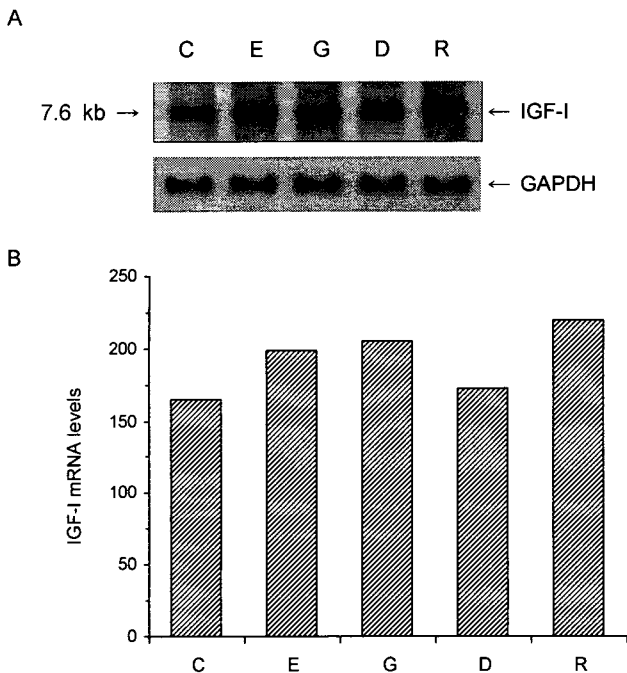


Fig. 7. Effects of 17 $\beta$ -estradiol, genistein, daidzein and resveratrol on IGF-I mRNA expression.

Cells were cultured for 48 hr in vehicle (C, 0.1% ethanol), 17 $\beta$ -estradiol (E,  $10^{-9}$  M), genistein (G,  $10^{-5}$  M), daidzein (D,  $10^{-5}$  M) and resveratrol (R,  $10^{-5}$  M) after pre-incubation with SFM for 24 hr. Total RNA extraction and northern hybridization using a DIG-labeled IGF-I cDNA. A, Representative northern blot analysis bands for IGF-I and GAPDH; B, Quantitative analysis of IGF-I mRNA expression levels.

7B), IGF-I mRNA의 발현은 17 $\beta$ -estradiol에 의해 20.6% 증가하였으며 genistein, daidzein 및 resveratrol의 처리에 의해서는 각각 24.2%, 4.8%, 32.7% 증가한 것으로 나타났다. IGF-I mRNA는 모든 처리 군에서 증가한 것으로 나타나 앞서 확인한 IGF-I의 증가는 IGF-I 생산 증가를 나타내는 지표(37,38)인 IGF-I mRNA 발현 수준을 반영하는 것임을 알 수 있었다. 그러나 IGF-I mRNA 발현 수준과 IGF-I 단백질 생성 수준이 완전히 일치하지는 않았다. 이러한 결과는 genistein, daidzein 및 resveratrol의 처리에 의한 IGF-I의 생성이 유전자 발현을 나타내는 전사 단계에서 조절될 뿐만 아니라 전사 후 번역 단계인 단백질 합성수준에서도 조절될 것이라는 가능성을 제시하는 것으로서 이에 대해서는 앞으로 더 많은 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

## 요 약

식물성 에스트로젠은 에스트로젠의 대체물질로서 골 형성을 촉진하며, 다른 부작용 없이 폐경기 이후 여성의 골다공증 예방에 효과적인 물질로 주목받고 있다. 본 연구에서는 식물성 에스트로젠의 골 형성과 관련된 생리학적 기능을 확인하고자 식물성 에스트로젠인 genistein, daidzein 및 resveratrol을 각각  $10^{-5}$  M 농도로 세포배양액에 첨가하여

MC3T3-E1 골아세포의 증식과 성장에 미치는 효과를 검토하였다. 그 결과 이들은 에스트로젠인 17 $\beta$ -estradiol과 마찬가지로 MC3T3-E1 골아세포의 증식과 성장을 향상시켰으며, daidzein과 resveratrol의 효과는 genistein의 효과보다 큰 것으로 나타났다. 골 형성 정도를 판단하는 생화학적 지표로 활용되고 골아세포의 증식과도 밀접한 관계를 가지는 alkaline phosphatase(ALP) 활성 또한 genistein, daidzein 및 resveratrol에 의해 증가하였다. 에스트로젠은 세포성장인자인 IGF-I의 국소적 생산과 분비를 촉진하며 간접적으로 골 대사 촉진 효과를 유도해낼 수 있다고 보고되어 있었지만 식물성 에스트로젠의 투여에 의해 IGF-I의 농도가 증가하였다는 보고는 없었다. 그러나 본 실험 결과, 식물성 에스트로젠인 genistein, daidzein 및 resveratrol은 IGF-I의 단백질과 mRNA 수준을 증가시키는 것으로 나타났다. 이상의 연구결과들은 식물성 에스트로젠의 골 형성 촉진 효과를 증명하는 것으로서 이들의 유용한 약리학적 기능을 뒷받침하는 하나의 근거로 활용될 수 있으리라 사료된다.

## 문 헌

- Shils ME, Young VR. 1988. *Modern nutrition in health and disease*. 7th ed. Lea and Febiger Publisher, Philadelphia. p 763.
- Christenson RH. 1997. Biochemical markers of bone metabolism: an overview. *Clin Biochem* 30: 573-593.
- Eriksen EF, Hodgson SF, Eastell R, Cedel SL, O'Fallon WM, Riggs BL. 1990. Cancellous bone remodeling in type I (postmenopausal) osteoporosis: quantitative assessment of rates of formation, resorption and bone loss at tissue and cellular levels. *J Bone Miner Res* 5: 311-319.
- Prestwood KM, Pilbeam CC, Raisz LG. 1995. Treatment of osteoporosis. *Annu Rev Med* 46: 249-256.
- Anderson JJ, Garner SC. 1998. Phytoestrogen and bone. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 12: 543-557.
- Lindsay R. 1993. Pathogenesis of postmenopausal osteoporosis. *Baillieres Clin Rheumatol* 7: 499-513.
- Gallagher JC, Bishop CW, Knutson JC, Mazess RB, DeLuca HF. 1994. Effects of increasing doses of 1 alpha-hydroxyvitamin D2 on calcium homeostasis in postmenopausal osteopenic women. *J Bone Miner Res* 9: 607-614.
- Ettinger B, Genant HK, Cann CE. 1985. Long-term estrogen replacement therapy prevents bone loss and fracture. *Ann Intern Med* 102: 319-324.
- Edward MW, Bain SD, Bailey MC, Lantry MM, Howard GA. 1992. 17 $\beta$ -estradiol stimulation of endosteal bone formation in the ovariectomized mouse: an animal model for evaluation of bone targeted estrogens. *Bone* 13: 29-34.
- Ernst M, Heath JK, Rodan GA. 1989. Estradiol effects on proliferation, messenger ribonucleic acid for collagen and insulin-like growth factor-I, and parathyroid hormone-stimulated adenylate cyclase activity in osteoblastic cells from calvariae and long bones. *Endocrinology* 125: 825-833.
- Tomkinson A, Reeve J, Shaw RW, Noble BS. 1997. The death of osteocytes via apoptosis accompanies estrogen withdrawal in human bone. *J Clin Endocrinol Metab* 82: 3128-3135.
- Vedi S, Purdie DW, Ballard P, Bord S, Cooper AC, Compston

- JE. 1999. Bone remodeling and structure in postmenopausal women treated with long-term, high-dose estrogen therapy. *Osteoporos Int* 10: 52-58.
13. McCarthy TL, Centrella M. 1993. Regulation of IGF activity in bone. *Adv Exp Med Bio* 343: 407-414.
  14. Genant HK, Baylink DJ, Gallagher JC. 1989. Estrogens in the prevention of osteoporosis in postmenopausal women. *Am J Obstet Gynecol* 161: 1842-1846.
  15. Murphy LJ, Ghahary A. 1990. Uterine insulin-like growth factor-1: regulation of expression and its role in estrogen-induced uterine proliferation. *Endocrine Rev* 11: 443-453.
  16. Anderson JJ, Garner SC. 1998. Phytoestrogen and bone. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 12: 543-557.
  17. Adlercreutz H, Mazur W. 1997. Phyto-oestrogens and Western diseases. *Ann Med* 29: 95-120.
  18. Setchell KDR. 1998. Phytoestrogens: the biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavones. *Am J Clin Nutr* 68: 1333-1346.
  19. Anderson JJ, Anthony MS, Cline JM, Washburn SA, Garner SC. 1999. Health potential of soy isoflavones for menopausal women. *Public Health Nut* 2: 489-504.
  20. Choi EM, Suh KS, Kim YS, Choue RW, Koo SJ. 2001. Soy bean ethanol extract increases the function of osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Phytochemistry* 56: 733-739.
  21. Setchell KDR, Cassidy A. 1999. Dietary isoflavones: biological effects and relevance to human health. *J Nutr* 129: 758-767.
  22. Arjmandi BH, Alekel L, Hollis BW, Amin D, Stacewicz-Sapuntzakis M, Guo P, Kukreja SC. 1996. Dietary soybean protein prevents bone loss in an ovariectomized rat model of osteoporosis. *J Nutr* 126: 161-167.
  23. Gao YH, Yamaguchi M. 1999. Anabolic effect of daidzein on cortical in tissue culture: Comparison with genistein effect. *Mol Cell Biochem* 194: 93-98.
  24. Potter SM, Baum JA, Teng H, Stillman RJ, Shay NF, Erdman JW Jr. 1998. Soy protein and isoflavones: Their effects on blood lipids and bone density in postmenopausal women. *Am J Clin Nutr* 68: 1375-1379.
  25. Panti P, Monier-Faugere MC, Geng Z, Schmidt J, Morris PE, Cohen D, Malluche HH. 1998. The phytoestrogen genistein reduces bone loss in short-term ovariectomized rats. *Osteoporos Int* 8: 274-281.
  26. Arjmandi BH, Alekel L, Hollis BW, Amin D, Stacewicz-Sapuntzakis M, Guo P, Kukreja SC. 1996. Dietary soybean protein prevents bone loss in an ovariectomized rat model of osteoporosis. *J Nutr* 126: 161-167.
  27. Gehm BD, McAndrews JM, Chien PY, Jameson JL. 1997. Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for the estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 14138-14143.
  28. Mizutani K, Ikeda K, Kawai Y, Yamori Y. 1998. Resveratrol stimulates the proliferation and differentiation of osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 253: 859-863.
  29. Picherit C, Coxam V, Bennetau-Pelissero C, Kati-Coulibaly S, Davicco MJ, Lebecque P, Barlet JP. 2000. Daidzein is more efficient than genistein in preventing ovariectomy-induced bone loss in rats. *J Nutr* 130: 1675-1681.
  30. Ljunghall S, Lindh E. 1989. Assessment of bone turnover with biochemical makers. *J Intern Med* 225: 219-220.
  31. Wlodarski KH, Reddi AH. 1986. Alkaline phosphatase as a marker of osteoinductive cells. *Calcif Tissue Int* 39: 382-385.
  32. Sugimoto E, Yamaguchi M. 2000a. Anabolic effect of genistein in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Int J Mol Med* 5: 515-520.
  33. Sugimoto E, Yamaguchi M. 2000b. Stimulatory effect of daidzein in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Biochem Pharmacol* 59: 471-475.
  34. Ernst M, Rodan GA. 1991. Estradiol regulation of insulin-like growth factor-I expression in osteoblastic cells: evidence for transcriptional control. *Mol Endocrinol* 8: 1081-1089.
  35. Nasu M, Sugimoto T, Kaji H, Chihara K. 2000. Estrogen modulates osteoblast proliferation and function regulated by parathyroid hormone in osteoblastic SaOS-2 cell: role of insulin like growth factor (IGF)-I and IGF-binding protein-5. *J Endocrinol* 167: 305-313.
  36. Huynh H. 1998. Suppression of uterine insulin-like growth factor binding protein 5 by estrogen is mediated in part by insulin-like growth factor 1. *Int J Oncol* 12: 427-432.
  37. Shinar DM, Endo N, Halperin D, Rodan GA, Weinreb M. 1993. Differential expression of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-II messenger ribonucleic acid in rowin rat bone. *Endocrinology* 132: 1158-1167.
  38. Lazowski D, Fraher L, Hodsman A, Steer B, Modrowski D, Han V. 1994. Regional variation of insulin like growth factor-I gene expression in mature rat bone and cartilage. *Bone* 15: 563-576.

(2005년 3월 15일 접수; 2005년 6월 1일 채택)