

ENA-A(ENA actimineral resource A) 이온수가 MC3T3-E1 조골세포의 활성화와 분화에 미치는 영향

이지원 · 전상경 · 김현정¹ · 이인선^{1*}

계명대학교 식품가공학과, ¹계명대학교 전통 미생물자원 개발 및 산업화 연구센터

Received June 14, 2006 / Accepted August 17, 2006

Effects of ENA-A(ENA actimineral resource A) Ion Water on the Activity and Differentiation of MC3T3-E1 Osteoblastic cell. Ji-Won Lee, Sang-Kyung Jeon, Hyun-Jeong Kim¹ and In-Seon Lee^{1*}. *The Center for Traditional Microorganism Resources Center, Keimyung University 704-701, Korea, ¹Dept. of Food Science & Technology, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea* - Culture of osteoblast is extremely valuable in analyzing biological features that are specific to bone. ENA-A, ENA actimineral resource A, is a seaweed origin alkaline water. To investigate the bioactivity of ENA which act on bone metabolism, we studied the effects of a ENA on the activity of osteoblast MC3T3-E1 cells. ENA (1, 2, 4%) dose-dependently increased survival ($p < 0.05$) and alkaline phosphatase activity ($p < 0.05$) on MC3T3-E1 cell. And examined histochemistry and nodule formation according to the time course. To determine the expression patterns of bone-related proteins during the MC3T3-E1 osteoblast-like cell differentiation by using RT-PCR. This study suggest that ENA may promote the function of osteoblastic cells and play an important role in bone formation.

Key words - ENA, 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 많이 된다[28]. 골의 재형성은 이미 성장이 끝난 후 오래된 골을 제거하고 다시 새로운 골로 대체되는 과정으로, 골 개조 단위(bone remodeling unit)에서 이러한 골아세포 활성화와 파골세포 활성화의 균형을 통하여 그 항상성이 유지된다. 그러나 골아세포 활성화도의 약화로 골형성이 감소되거나 파골세포의 활성화도가 강화되어 골의 흡수가 증가되는 경우, 또는 두 가지 요소가 동시에 작용되는 경우에 골대사 질환이 생긴다.

대표적인 골대사 질환인 골다공증은 효과적인 치료 방법이 없기 때문에 예방이 가장 중요하며, 현재까지 알려진 최선의 치료는 성장기 동안의 최대 골질량(peak bone mass)을 극대화하고 골손실 위험 인자를 피하는 것이라고 한다[4]. 특히 골밀도는 무기질과도 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져 있는데 칼슘, 인 등의 다량 무기질과 골밀도에 대한 연구가 주로 보고되어 왔다[31,35,36,39]. 최근 철, 구리, 아연과 같은 미량 무기질이 골대사와 상관관계가 있다는 일부 연구가 보

고[3,14,17,22]되면서 이에 대한 관심이 증가하고 있다. 특히 철은 골격의 무기질화가 일어나는 콜라겐 합성에 필수적이라고 하며[15], Angus 등[2]은 폐경 전 여성을 대상으로 골밀도를 측정된 연구에서 대퇴경부의 골밀도와 철의 섭취량 간에 유의적인 양의 상관관계를 보였다고 하였다. 또한 구리와 아연의 식사섭취도 최대 골질량을 확보하고, 골밀도를 유지하는데 필요한 인자로 보고되었다[32]. 이와 같이 철, 구리, 아연과 같은 미량 무기질의 영양상태가 골밀도에 영향을 주 수 있음이 제시되고 있으나 폐경 전후의 여성을 대상으로 한 일부 보고[18,24,26,30]에 그치고 있어, 가임기 젊은 여성을 대상으로 골밀도와 철, 구리, 아연 영양상태와의 상관관계를 알아보는 연구가 필요하다.

이러한 연구에 있어서 사용되는 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[5,23,29]. 골세포의 세포활성과 관련된 연구에서 유용하게 이용되고 있는 mouse calvaria 유래의 MC3T3-E1 osteoblastic cell은 *in vivo* 골형성 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 세포이다. 조골세포는

*Corresponding author

Tel : +82-53-580-6440, Fax : +82-53-580-6447

E-mail : inseon@kmu.ac.kr

골 표면에 근접해 있으며 세포질내에 과립 형질내 세망이 발달해 있고, 핵 주위로 골지체가 위치하며, 골지체 바깥 세포질에 사립체가 존재하며, 세포막에 당단백 효소인 alkaline phosphatase(ALP)를 가지고 있다. 이 효소는 기질 특이성과 염기성 pH에서 최적의 활성을 나타내며 세포외막과 석회화 조직의 기질세포에서 높은 농도로 발견되어 석회화 과정 동안 무기인산의 운반, 세포분열이나 분화의 조절자로서 역할을 한다. Stein 등[34]은 골세포 표지인자로 염기성 분해효소 활성도를 측정하여야 하며, 골세포 분화의 표지인자라고 하였다.

한편 일부 연구에서 여러 무기질과 골밀도간의 상관성에 관한 약간의 보고도 있지만 이러한 선행 연구들은 식사를 통한 무기질의 섭취 상태와 골밀도 간의 상관성[15,26]에 관한 연구로 세포수준의 연구는 거의 없는 실정이다. 그러므로 조골세포를 이용한 세포의 활성과 골형성 관련 효소 활성의 상관성을 살펴보는 연구가 필요할 것으로 사료된다. 이에 본 연구에서는 조골세포를 이용한 *in vitro* screening system을 식품유래천연물질 중 조골활성 및 분화인자를 가지는 물질을 검색하는 방법으로 활용하였고 이를 통해 무기질성분을 함유한 ENA-A와 골다공증 예방을 위한 기초 자료로 활용하고자 한다.

재료 및 방법

ENA-A 시료 조제

본 실험에 사용한 ENA actin mineral resource A (ENA-A)는 알칼리 이온수로 식용의 오징어 (*Sepia esculenta*)와 두 종류의 해조류 (*Phymatolithon calcareum*, *Lithothamnion corallioides*)를 혼합하여 제조한 것으로 (주)진주바이오푸드에서 제공받아 사용하였다. ENA-A의 제조과정은 먼저 오징어의 뼈는 제거하고 해초와 함께 열을 가해 정련한 다음, 다시 1,000 ~ 1,100°C 가량의 열을 가해 한 시간동안 더 정련한다. 정련 후 이온수로 사용할 원료들은 상온에서 냉각하고 증류수에 녹여 water pump를 사용하여 압력 (>10 bar)을 가하여 무기질화한 다음, 24시간 동안 침전시킨 뒤 상등액을 여과시킴으로써 알칼리 이온수를 얻을 수 있다(pH 12.5).

ENA-A 이온수를 이용한 조골세포 활성검색 세포배양

Mouse calvaria osteoblast cell인 MC3T3-E1 cell은 ATCC (CRL-2593, USA)로부터 분양받아 사용하였다. 최 등[6]의 방법을 참고하여 α -MEM (Gibco BRL, Grand island, N.Y., USA)배지에 10% FBS (Gibco)와 1% antibiotics (Gibco)를 첨가하여 37°C의 5% CO₂ 배양기에서 2-3일 마다 계대배양을 하였으며, 분화유도를 위해 5 mM β -glycerol phosphate (Sigma Chem. Co., St. Louis, Mo., USA)와 50 mg/mL의

Vitamin C (Sigma)를 첨가하여 분화유도배지로 사용하였으며, 3일마다 배지를 교환하였다[21,27].

조골세포 증식유도 측정

시료의 농도별 처리에 따른 조골세포의 성장 정도는 Green 등[13]의 방법에 따라 3-(3,4-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT; Sigma) 시약의 환원 정도를 측정하는 MTT assay로 측정하였다. 먼저 배양한 cell을 0.4% trypan blue(Sigma)를 사용하여 계수한 후 1×10^5 cells/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. 이때 대조군은 시료 대신 배지를 20 μ L 첨가하여 동일하게 배양하였다.

배양 후 MTT 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 측정하였다. 세포의 증식률은 시료의 흡광도를 대조군의 흡광도에 대한 백분율로 나타내었다.

Alkaline phosphatase 효소활성 측정

포화 배양된 MC3T3-E1 세포를 1×10^4 cell/well로 조정하여 96well plate에 분주하고 24시간 후 분화유도배지로 교환하여 24시간 배양 후 시료처리를 하였다. ENA-A 이온수를 각 농도별 (1, 2, 4, 8%)로 넣어 세포를 배양한 후 3일 뒤 PBS로 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 0.1N 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 대조군과의 상대비교를 통해 도출하였다 [8,19].

ALP 염색법에 의한 조골세포 활성검색

ALP 효소의 염색 정도를 측정하기 위해 24 well에 1×10^5 cells/mL로 처리하고 이온수를 적정농도로 희석 처리한 후 시간경과에 따른 효소활성을 측정하였다. 염색은 alkaline phosphatase(AP) kit (Sigma)를 사용하여 측정하였다. 먼저, 배지를 제거하고 고정액(citrate-acetone-formaldehyde)을 첨가하여 약 30초간 실온에 보관하였다가 45초간 증류수로 세척하였다. 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 염색액

을 제거한 다음 현미경으로 관찰하였다[6,9,40].

Alizarin-Red 염색법에 의한 석회화 형성도 검사

ALP 염색법과 동일하게 24 well에 조골세포를 1×10⁵ cells/mL로 분주한 뒤, 배지를 제거하고, PBS로 세척한 뒤, 70% EtOH로 4℃에서 1시간동안 고정시켰다. Alizarine red(AR) solution은 10 mL의 증류수에 40 mM이 되게 농도를 맞추고 pH를 4.2로 조정하였다. 준비한 AR solution으로 10분간 염색하고, 증류수로 2번 세척한 뒤 염색되지 않은 부분은 PBS로 씻어주면서 제거해주고 표면이 너무 마르지 않게 PBS로 조금 적셔주면서 현미경으로 nodule 형성 정도를 관찰하였다[20,25,33].

RT-PCR법에 의한 조골세포 분화 관련 골기질 유전자 발현 조사

Total RNA는 조골세포를 100 φ dish에 1×10⁶ cells/mL로 9일간 배양한 뒤 TRI reagent (Molecular Research Center, Inc.)를 사용하여 제조사의 지침에 따라 분리하였다. 간단히 설명하면 배양된 세포에서 배지를 제거하고 phosphate buffered saline (PBS, pH7.4) 10 mL로 두 번 세척한 후 TRI reagent를 처리하였다. 이것을 1.5 mL tube에 1 mL씩 담고 1-bromo-3-chloropropane을 200 μL 첨가하여 30초간 vortex하여 원심분리 (3,000 rpm, 15분, 4℃)하여 상등액을 취해 새로운 tube에 옮겼다. 여기에 동량의 isopropanol을 첨가하여 -20℃에서 2시간 이상 방치하고 나서 원심분리(13,000 rpm, 15분, 4℃)한 후 상등액을 제거하였다. 침전물에 75% 에탄올을 첨가하여 제거한 후 diethyl pyrocarbonate (DEPC) 처리된 증류수를 첨가하여 65℃ 수조에서 10분간 반응시켜 침전물을 녹였다. 분리된 RNA는 spectrophotometer와 1% formaldehyde agarose gel 전기영동을 이용하여 정량하고 확인하였다. 분리된 total RNA 2 μg에 superscript II RT200 U, 0.5 μg Oligo dT, 0.5 mM dNTP를 첨가하여 42℃에서 90분간 반응시킨 후 70℃에서 10분간 반응을 종결시켜 cDNA를 제조하였다. cDNA는 Table 1의 primer들을 이용한 PCR 방법으로 증폭되었다. PCR의 반응에는 2.5 U Taq polymerase (Takara Ex), 2 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP를 첨가하여 각각의 primer에 맞는 조건으로 실시하였다.

통계처리

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

결과 및 고찰

ENA-A 이온수의 조골세포에 대한 증식유도 검사

ENA actimineral resource A (ENA-A)는 식용 오징어

(*Sepia esculenta*)와 두 종류의 해조류 (Phymatolithon calcareum, Lithothamnion corallioides)를 혼합하여 제조한 알칼리 이온수로, 그 무기질 조성과 pH는 Table 2와 같다. ENA-A는 pH가 12.5이고, Ca, Na, S, Fe, Mg, Zn, Cu, Co 등이 함유된 알칼리 이온수임을 알 수 있었다.

ENA-A 이온수의 시료농도에 따른 조골세포 성장에 미치는 영향을 MTT assay로 분석한 결과는 Fig. 1과 같다. MC3T3-E1 cell에 ENA-A 이온수를 2% 처리하였을 때 대조군과 비교하여 134% 이상의 증식률을 보였고, 1%와 4%에서는 각각 115, 132% 이상의 증식율을 보였다. 반면, 8% 첨가 시 98% 정도의 증식율을 나타낸 것으로 확인되었다. 최[7]는 대두에탄올추출물을 50~100 μg/mL의 농도로 조골세포주에 처리한 결과, 대조군에 비해 최고 117%의 증가를 나타내었다고 보고하였는데 ENA-A 이온수는 134% 이상의 조골세포의 증식을 보였으므로 대두에탄올추출물보다 훨씬 좋은 조골세포의 증식유도를 나타냄을 확인할 수 있었다.

ENA-A 이온수의 조골세포에 대한 분화유도 검사

Alkaline phosphatase(ALP) 효소활성 측정

조골세포를 1×10⁵ cells/well를 분주한 후 분화배지에 ENA-A 이온수를 0.1-100 μg/mL농도로 처리하고 9일까지

Table 1. Oligonucleotide primers for RT-PCR

Gene	Fragment size (bp)	Oligonucleotides
Alkaline phosphatase	474	F; 5'-CCAAGADGTACAACACCAACGC-3 R; 5'-AAATGCTGATGAGGTCCAGGC-3
Osteopontin	640	F; 5'-GATGAATCTGACGAATCTCAC-3 R; 5'-CTGCITTAATCCTCACTAACAC-3
Type II collagen	172	F; 5'-CACACTGGTAAGTGGGGCAAGACCG-3 R; 5'-CGATTGTGTGTGTTTCAGGGTTCGGG-3
GAPDH	514	F; 5'-TGAGAACGGGAAGCTTGTGCA-3 R; 5'-GGAAGCCATGCCAGTGA-3

Table 2. Composition of ENA actimineral resource A

Ingredient	Contents
Fe	0.239 mg/100g
Ca	92.871 mg/100g
Zn	0.094 mg/100g
Mg	0.142 mg/100g
Na	1.411 mg/100g
K	0.273 mg/100g
Cu	0.011 mg/100g
Mn	0.008 mg/100g
I	0.001345 mg/100g
S ²⁻	0.363 mg/100g
Co	0.004 mg/100g
pH	12.5

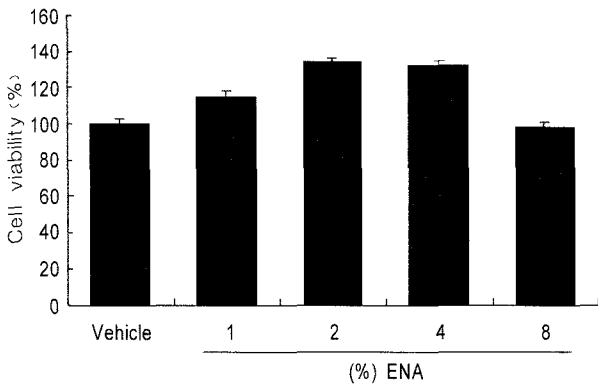


Fig. 1. Effect of ENA-A ion water on the proliferation of MC3T3-E1 cells by the MTT assay. MC3T3-E1 cells were cultured with vehicles and 1, 2, 4, 8% various concentrations of ENA-A ion water for 48 hr. Data were expressed as a percentage of control. $p < 0.05$ compared with control.

배양하면서 ALP 효소 활성을 조사하였다. 그 결과 Fig. 2에서와 같이 ENA-A 이온수 4% 농도의 경우 대조군에 비해 188%까지 ALP 활성이 유도되었으며, 그 외 2%와 8% 농도에서도 각각 150, 138% 이상의 분화 유도능을 나타내었다 ($p < 0.05$). 이는 Ca, Mg 등이 ALP 효소활성에 높은 영향을 미치는 보고[1]와 비교해 볼 때, ENA-A 이온수내에 칼슘이 함량이 높고 또한 ALP의 활성에 co-factor로 작용하는 Mg, Co 등의 함유되어 있어 ENA-A 이온수가 높은 ALP 분화 유도능에 영향을 미쳤다고 생각된다.

조골세포 배양 시 vitamin C와 β -glycerol phosphate의 첨가는 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 유도한다. 그리고 β -glycerol phosphate는 vitamin C에 대해 상승효과

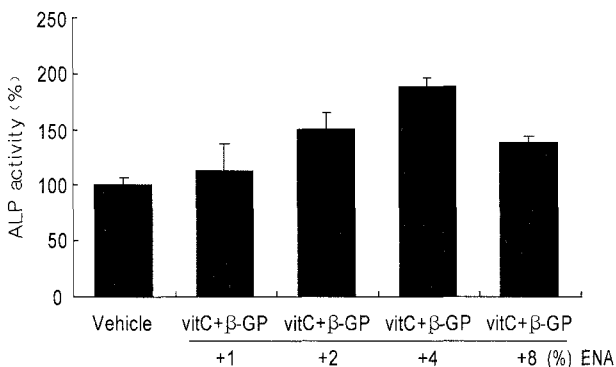


Fig. 2. Effect of ENA-A ion water on the alkaline phosphatase activities of the MC3T3-E1 osteoblastic cells during the differentiation. Cells were cultured in 96 well plates with 50 μ g/mL of vitamin C and 10 mM of β -glycerol phosphate.

를 보이며, 분화된 조골세포에서 collagen 축적이나 ALP 활성도를 더욱 증가시킨다고 보고되고 있다[10]. 또한 칼슘은 체내의 99% 정도가 hydroxyapatite의 형태로 골격 내 존재하며 골격과 연조직을 구성하는 구조적 기능을 갖고 있다. 이러한 칼슘의 섭취는 골질량을 증가시키며 골격을 유지하는데 필수적이다[10]. 따라서 조골세포에 vitamin C와 β -glycerol phosphate를 첨가한 분화배지에 ENA-A 이온수 첨가시 1%를 제외한 다른 처리군에서 ALP 분화 유도능을 나타내었고, 특히 4% 첨가군에서 가장 높은 ALP 활성이 유도됨을 알 수 있었다.

ALP 염색법에 의한 조골세포 활성검색

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

ENA-A 이온수를 1, 2, 4, 8% 의 농도로 첨가하여 9일간 배양한 다음 세포내 ALP 효소의 염색정도를 확인하였다. 그 결과 Fig. 3(A)와 같이 시료를 처리하지 않은 대조군은 붉은 색의 효소가 많이 형성되지 않은 반면, 이온수를 1, 2, 4% 처리한 군에서는 효소의 붉은 반점이 많이 생겼으며, 특히 농도별로 염색이 증가됨을 확인할 수 있었다. 그러나 8% 처리군에서는 다소 감소되는 경향을 보였다. 따라서 ENA-A 이온수는 조골세포내 ALP 효소활성을 유도함을 염색을 통해 확인하였다.

Alizarin-Red 염색법에 의한 석회화 형성도 확인

Bone nodule 형성능은 조골세포의 분화에 중요한 표식인자이다. Alizarin은 식물성 염료로서 calcium에 특이적으로 흡착력이 높다. 이것은 무기질화 된 세포의 세포외 기질에 염색되므로 무기질화 된 양과 염색된 정도가 상호비례 한다 [25,33]. 따라서 시간에 따른 무기질화 형성능을 alizarin red로 염색한 결과는, Fig. 3(B)와 같다. 역시 ENA-A 이온수 4% 농도에서 조골세포가 분화됨에 따라 염색된 정도가 대조군에 비해 증가됨을 확인할 수 있었다. 따라서 ENA-A 이온수는 MC3T3-E1 조골세포의 증식 유도, ALP 활성 증가 및 조골세포의 분화와 석회화 형성능이 있음을 확인하였다.

RT-PCR법에 의한 조골세포 분화 관련 골기질 유전자 발현의 변화

조골세포 분화에 관련된 골기질 유전자 발현의 변화 정도를 RT-PCR 후 전기영동하여 확인하였다. Fig. 4는 MC3T3-E1 세포의 9일간 배양에 따른 분화인자의 mRNA 발현양을 나타낸 것으로, alkaline phosphatase, type II collagen, osteopontin의 발현이 대조군에 비해 높게 발현되었다. Alkaline

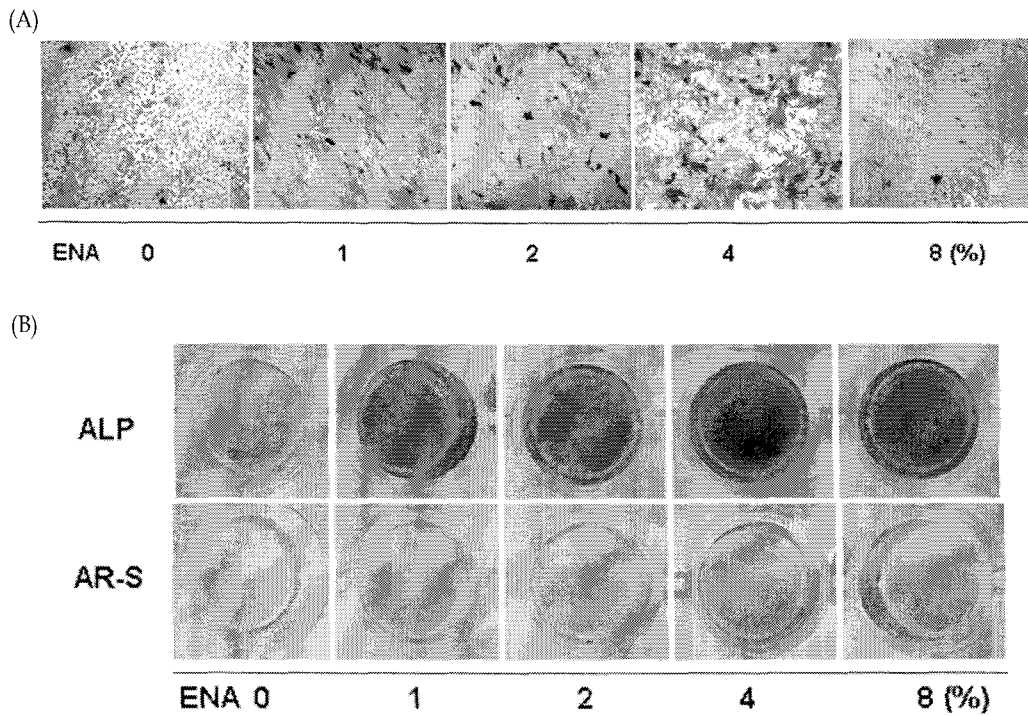


Fig. 3. Effect of ENA-A ion water on the alkaline phosphatase of extracellular matrix by MC3T3-E1 cells. Cells were cultured with α -MEM containing 10% FBS, 50 μ g/mL ascorbic acid, and 10 mM β -glycerol phosphate. (A)Phase contrast micrographs($\times 10$) were taken by ALP staining after 9 day, respectively. (B)Stained images by scanning. ALP;Alkaline phosphatase staining, AR-S;Alizarin Red staining (Degree of calcification through dye deposition)

phosphatase의 발현은 대조군에 비해 더 높게 나타났으며, 특히 ENA-A 이온수의 처리 농도가 높을수록 그 발현이 더 증가하였다. 또한 골기질 단백질인 type 2 collagen에서도 대조군에 비해 ENA-A 이온수의 처리 농도가 높을수록 그 발현이 더 증가하는 경향이였다.

ALP의 발현은 조골세포 분화과정 중 중요한 역할을 하며 그 활성정도는 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[16]. ALP가 조골세포가 유도하는 석회화에 관여됨을 제시하는 많은 보고들이 있다. Torii[37] 등은 antisense RNA를 이용하여 ALP가 조골세포의 석회화에 관여하는 것을 입증하였다. Weiss[38] 등은 liver/bone/kidney type ALP 유전자의 선천적 결핍으로 인한 저인산효소증에서 골조직 석회화부전을 보고하였다. Fukayama와 Tashjian[12]은 ALP가 몇몇 조골세포 주들에서 칼슘섭취에 관여하는 것으로 보고하였으며, 부갑상선호르몬의 신호전달의 조절에도 관여한다고 하였다.

이와같이 ENA-A 이온수는 MC3T3-E1 조골세포의 증식 유도, ALP 활성 증가 및 조골세포의 분화와 석회화 형성능이 있었으며, 조골세포 분화에 관련된 골기질 유전자인 Alkaline phosphatase, Type II collagen, osteopontin의 발현을 증가시킴을 알 수 있었다. 따라서 식용 오징어 (*Sepia esculenta*)와 두 종류의 해조류 (*Phymatolithon calcareum*, *Lithothamnion corallioides*)를 혼합하여 제조한 알칼리 이온수인 ENA actineral resource A (ENA-A)는 골 형성 개선에 우수한 소재임을 알 수 있었다.

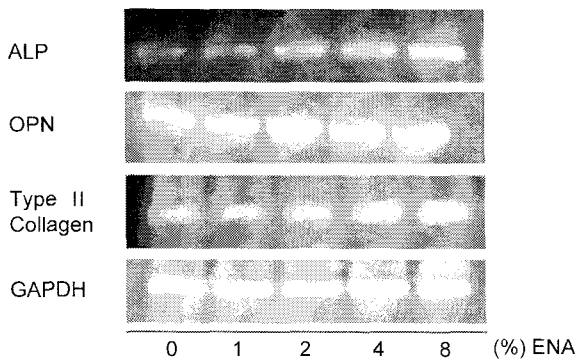


Fig. 4. The expression of Alkaline phosphatase (ALP), Osteopontin (OPN) and Type 2 collagen mRNA levels treat with ENA-A ion water during differentiation of MC3T3-E1 osteoblastic cells.

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 해조류로 조제한 알칼리의 ENA-A 이온수가 조골세포의 증식과 분화활성에 미치는 영향을 조사하였다. 먼저 ENA-A 이온수가 조골세포의 성장에 미치는 영향을 MTT 검색법으로 조사한 결과, ENA-A 이온수 2% 처리시 대조군과 비교하여 134% 증가하여 조골세포에 대해 높은 성장률을 보였다. 또한 ALP 효소 활성화에 미치는 영향을 9일간 배양하여 그 변화를 측정하였다. 결과, 농도 1, 2, 4, 8% 처리시 112, 150, 188%까지 ALP 활성을 증가시켰다. ENA-A 이온수는 다시 ALP 효소 염색법과 Alizarin Red 염색으로 조골세포의 ALP활성유도, 분화와 석회화 형성능을 재확인하였으며 골기질 유전자의 발현의 변화도 확인하였다. 이에 본 연구결과를 통해 각종 무기질 성분을 함유한 ENA 이온수가 조골세포의 분화시에 hydroxyapatite 형성에 영향을 줌으로써 골다공증 예방에 효과가 있을것으로 생각하여 이를 보고하는 바이다.

감사의 글

본 연구는 산업자원부 지역산업기술개발사업(공통기술개발사업 연구과제번호 : 10018139)에 의해 연구되었음에 감사드립니다.

참고 문헌

- Andrew, R. E., J. W. Kemp, W. S. Jee and D. M. Woodbury. 1984. Ion-transporting ATPase and matrix mineralization in cultured osteoblastlike cells. *In vitro* **20**, 837-846.
- Angus, R. M., P. N. Sambrook, N. A. Pocock and J.A. Eisman. 1988. Dietary intake and bone mineral density. *Bone Miner.* **4**, 265-277.
- Atik, O. S. 1983. Zinc and senile osteoporosis. *J. Am. Geriatr. Soc.* **31**, 790-791.
- Barr, S. J. and H. A. McKay 1988. Nutrition, Exercise, and bone status in youth. *Int. J. Sport Nutr.* **8**, 124-142.
- Centrella, M., T. L. McCartht and E. Canalis. 1987. Transforming growth Factor B is a bifunctional regulator of replication and collagen synthesis in osteoblast-enriched cell cultures from fetal rat bone. *J. Biol. Chem.* **262**, 286-2874.
- Cho, S. H. 1995. The electron microscopic observation of the effects of estrogen on the osteoblast-like cell (Ros-17/2.8-5) differentiation. *Korean Soc. Menopause* **1**, 28-34.
- Choi, E. M., K. S. Suh, Y. S. Kim, R. W. Choue and S. J. Koo. 2001. Soybean ethanol extract increases the function of osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Phytochemistry* **56**, 733-739.
- Choi, H. H., J. K. Kim, S. B. Kim and C. H. Chung. 1999. Effects of Platelet - derived Growth Factor on the Activity of Osteoblastic Cells. *J. Periodont. Res.* **29**, 785-804.
- Choi, J. Y., B .H. Lee, K. B. Song, R. W. Park, I. S. Kim and K. Y. Sohn. 1996. Expression patterns of bone-related proteins during osteoblastic differentiation in MC3T3-E1 cells. *J. Cellular Biochemistry* **61**, 609-618.
- Choi, S. Y. 2002. Effects of irradiation on the mRNA expression of the type I collagen and alkaline phosphatase in MC3T3-E1 osteoblasti cell line. PhD thesis., Chonbuk National University.
- Flynn, A. 2003. The role of dietary calcium in bone health. *Proc. Nutr. Soc.* **62**, 851-858.
- Fukayama, S and A. H. Tashjian. 1990. Stimulation by parathyroid hormone of ⁴⁵Ca²⁺ uptake in osteoblast-like cells: possible involvement of alkaline phosphatase. *Endocrinology* **126**, 1941-1949.
- Green, L. M., J. L Reade and C. F. Ware. 1984. Rapid colometric assay for cell viability : Application to the quantitation of cytotoxic and growth inhibitory lymphokines. *J. Immunol. Meth.* **70**, 257.
- Gur, A., L. Colpan, K. Nas, R. Cevik, J. Sarac, F. Erdogan and M. S. Duz. 2002. The role of trace minerals in the pathogenesis of postmenopausal osteoporosis and a new effect of calcitonin. *J. Bone Miner. Metab.* **20**, 39-43.
- Harris, M. M., L. B. Houtkooper, V. A. Stanford, C. Parkhill, J. L. Weber, H. Flint-Wagner, L. Weiss, S. B. Going and T. G. Lohman. 2003. Dietary iron is associated with bone mineral density in healthy postmenopausal women. *J. Nutr.* **133**, 3598-3602.
- Harrison, G., I. M. Shapiro and E. E. Golub. 1995. The phosphatidylinositol -glycolipid anchor on alkaline phosphatase facilitates mineralization initiation in vitro. *J. Bone Miner. Res.* **10**, 568-573.
- Herzberg, M., A. Lusky, J. Blonder and Y. Frenkel. 1996. The effect of estrogen replacement therapy on zinc in serum and urine. *Obstet Gynecol.* **87**, 1035-1040.
- Howard, G., M. Andon, P. Bracker Saltman and L. Strause. 1991. Low serum copper a risk factor additional to low dietary calcium in postmenopausal bone loss. *J. Trace Elements Experimental Med.* **5**, 23-31.
- Kim, J. W., H. J. Lee, J. H. Kang, S. H. Ohk, B. K. Choi, Y. J. Yoo, K. S. Cho and S. H. Choi. 2000. The Effect of Cyclosporin A on Osteoblast in vitro. *J. Periodont. Res.* **30**, 747-757.
- Kim, K. W. 2001. Optimum condition on conversion of aglycones form using β-glucosidase and isoflavones extraction from soybean. Master thesis. National University of Pykyung.
- Kinto, N., M. Iwamoto, M. Enomoto-Iwamoto, S. Noji, H. Ohuchi and H. Yoshioka. 1997. Fibroblasts expressing sonic hedgehog induce osteoblast differentiation and ectopic bone formation. *FEBS Letters* **404**, 319-323.
- Klevay, L. M. 1998. Lack of a recommended dietary allowance for copper may be hazardous to your health. *J. Am. Coll. Nutr.* **17**, 322-326.
- Letton, R. W. 1990. Regulation of 25-hydroxyvitamin D3

- metabolism in cultures of osteoblastic cells. *J. Bone Miner. Res.* **5**, 815-820.
24. Lowe, N. M., N. M. Lowe, W. D. Fraser and M. J. Jackson. 2002. Is there a potential therapeutic value of copper and zinc for osteoporosis? *Proc. Nutr. Soc.* **61**, 181-185.
 25. Maeda, T., A. Matsunuma, T. Kawane and N. Horiuchi. 2001. Simvastatin promotes osteoblast differentiation and mineralization in MC3T3-E1 cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **280**, 874-877.
 26. Michaelsson, K., L. Holmberg, H. Mallmin, A. Wolk, R. Bergstrom and S. Ljunghall. 1995. Diet, bone mass, and osteocalcin : a cross-sectional study. *Calcif Tissue Int.* **57**, 86-93.
 27. Mori, Y., Y. Hiraki, C. Shukunami, S. Kakudo, M. Shiokawa and M. Kagoshima. 1997. Stimulation of osteoblast proliferation by the cartilage-derived growth promoting factors chondromadulin- I and -II. *FEBS Letters* **406**, 310-314.
 28. Parfitt, A. M. 1994. Osteonal and hemi-osteonal remodeling: The spatial and temporal framework for signal traffic in adult human bone. *J. Cell. Biochem.* **55**, 273-286.
 29. Pfeilschifter, J and O. Wolf. 1990. Chemotactic response of osteoblastic cells to Transforming growth factor B. *J. Bone Miner. Res.* **5**, 815-823.
 30. Relea, P., M. Revilla, E. Ripoll, I. Arribas, L.F. Villa and H. Rico. 1995. Zinc, biochemical markers of nutrition, and type I osteoporosis. *Age Ageing* **24**, 303-307.
 31. Ruml, L. A., K. Sakhace, R. Peterson, B. Adams-Huet and C. Y. Pak. 1999. The effect of calcium citrate on bone density in the early and mid-postmenopausal period: a randomized placebo-controlled study. *Am. J. Ther.* **6**, 303-311.
 32. Saltman, P. D. and L. G. Strause. 1993. The role of trace minerals in osteoporosis. *J. Am. Coll. Nutr.* **12**, 384-389.
 33. Schiller, P. C., G. D'ippolito, W. Balkan, B.A. Roos and G.A. Howard. 2001. Gap-junctional communication is required for the maturation process of osteoblastic cells in culture. *Bone* **28**, 362-369.
 34. Stein, G. S., J. B. Lian and T. A. Owen. 1990. Relationship of cell growth to the regulation for tissue-specific gene expression during osteoblast differentiation. *FASEB J.* **4**, 3111-3123.
 35. Suzuki, Y., K. S. Davison and P. D. Chilibeck. 2003. Total calcium intake is associated with cortical bone mineral density in a cohort of postmenopausal women not taking estrogen. *J. Nutr. Health Aging* **7**, 296-299.
 36. Teegarden, D., R. M. Lyle, W. R. Proulx, C. C. Johnston and C.M. Weaver. 1999. Previous milk consumption is associated with greater bone density in young women. *Am. J. Clin. Nutr.* **69**, 1014-1017.
 37. Torii, Y., K. Hitomi, Y. Yamagishi and N. Tsukagoshi. 1996. Demonstration of alkaline phosphatase participation in the mineralization of osteoblasts by antisense RNA approach. *Cell Biol. Int.* **20**, 459-464.
 38. Weiss, M. J., K. Ray, M. D. Fallon, M. P. Whyte, K.N. Fedde and M.A. Lafferty. 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.
 39. Whiting, S. J., J. L. Boyle, A. Thompson, R.L. Mirward and R.A. Faulkner. 2002. Dietary protein, phosphorus and potassium are beneficial to bone mineral density in adult men consuming adequate dietary calcium. *J. Am. Coll. Nutr.* **21**, 402-409.
 40. Yoo, M. C., C. S. Han, S. G. Jang and I. K. Han. 1989. The effects of the several hormones on the MC3T3 osteoblast cells -in vitro study. *J. Korean Orthop. Assoc.* **24**, 879-888.