

## 황금 추출물이 조골세포와 파골세포의 활성화에 미치는 영향

신정민 · 박찬경 · 신은주<sup>1</sup> · 조태형<sup>2</sup> · 황인경\*

서울대학교 식품영양학과 생활과학연구소, <sup>1</sup>(주)유니베라, <sup>2</sup>(주)남양에코벳기업본부

### Effects of *Scutellaria radix* Extract on Osteoblast Differentiation and Osteoclast Formation

Jeong Min Shin, Chan Kyung Park, Eun Ju Shin<sup>1</sup>, Tae Hyung Jo<sup>2</sup>, and In Kyeong Hwang\*

Department of Food and Nutrition, Research Institute of Human Ecology, Seoul National University

<sup>1</sup>Univera, <sup>2</sup>ECONET Corporate Center

**Abstract** *Scutellaria radix* (SR) has been utilized as a traditional medicine for a variety of diseases including Rheumatoid arthritis and its major flavonoids - baicalein, baicalin, and wogonin - have been reported to exert beneficial health effects, including anti-bacterial, anti-viral, anti-inflammatory, and free-radical scavenging. However, the mechanisms underlying this effect remain poorly understood. The principal objective of this study was to determine the effect of SR on osteoblast and osteoclast cells. SR extract was prepared using 70% ethanol solvent. Osteoblastic MC3T3-E1 cells and osteoclast precursor Raw 264.7 macrophage cells were utilized. SR extract increased MC3T3-E1 cell proliferation and stimulated alkaline phosphatase activity dose-dependently, 152.0% of the control at concentration 1 µg/mL. Additionally, SR extract (1 µg/mL) stimulated Bone nodule formation activity in MC3T3-E1 cells, approximately 223.3% of the control, 20 days after the exposure. In addition, SR extract significantly reduced the number of tartrate-resistant acid phosphatase-positive (TRAP+) multinucleated cells from Raw 264.7 cells. In conclusion, SR extract stimulates the proliferation and bioactivities of bone-forming osteoblasts, and inhibits the activities of bone-resorbing osteoclasts to a certain degree.

**Key words:** *Scutellaria radix*, osteoblast, osteoclast, alkaline phosphatase, tartrate-resistant acid phosphatase

## 서 론

골조직은 골량(bone mass) 및 골격의 항상성(skeletal homeostasis)을 유지하기 위해 흡수와 형성이 끊임없이 일어나는 동적인 조직이다. 이러한 뼈의 재형성(bone remodeling)에는 두 종류의 특수한 기능을 하는 세포가 관여한다. 파골세포는 뼈를 흡수하는 반면, 조골세포는 뼈기질을 합성하고 채우는 역할을 한다. 따라서 골량은 이러한 세포의 상대적인 기능에 의존하게 된다. 정상 성인에서는 골흡수량과 골형성량 사이에는 항상 균형이 유지되고 있다. 뼈의 재형성(bone remodeling)은 일정한 주기를 통해 일어나며 국소적으로 좁은 부위에서 일어남으로써 골격계의 구조가 유지되는데 이러한 골격계의 구조와 기능은 전신적인 호르몬과 국소적 인자 사이의 복잡한 상호작용에 의해 조절된다(1-2). 조골세포와 파골세포 활성간의 불균형은 전체적인 뼈의 감소(osteoporosis)나 증가(osteosclerosis)로 인한 골격의 이상으로 나타난다.

골대사 질환 중 고령사회에서 큰 문제로 대두되고 있는 골다공증은 골의 화학적 조성에는 큰 변화 없이 단위 용적내의 골량

이 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(3-4). 현재 estrogen이나 천연에 존재하면서 약한 estrogen활성을 나타내는 식물유래의 phytoestrogen이 폐경 후 골다공증 예방에 매우 유용하다는 연구가 활발히 진행되고 있다(5). 그 예로서, 콩에 다량 함유된 isoflavone류 중 genistein과 diadzein 등은 estrogen 유사활성 물질로, 콩이 폐경성 골다공증을 예방할 수 있는 것으로 보고되고 있다(6). 그러나 이 방법 또한 폐경성골다공증 이외의 원인에는 제한적으로 사용되므로 칼슘보충제, vitamin D 대사산물과 thiazide diuretics 요법, calcitonin 요법, bisphosphonates 및 불소요법 등이 비 폐경성 골다공증 치료에 이용되고 있으며(7), 성장인자를 치료와 예방법으로 사용하는 것에 대한 연구도 진행되고 있다(8).

또한 현대에서는 젊은 연령층 뿐 아니라 남자들도 골다공증 증세를 많이 보이는 것으로 보고되고 있고(9), 이와 같은 골대사 불균형은 일차적으로 조골세포의 기능저하에 의한 것인지, 혹은 골흡수의 증가 즉, 파골세포의 활성화도 강화에 의한 것인지 대하여는 여러 가지 이론과 주장이 제기되고 있으며 골다공증의 요인으로는 연령의 증가, 영양 결핍, 운동부족, 칼슘 섭취의 부족, 유전적 요소, 약물복용, 호르몬의 영향 등을 꼽는다(10). 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

\*Corresponding author: In Kyeong Hwang, Department of Food and Nutrition, Research Institute of Human Ecology, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

Tel: 82-2-880-5708

Fax: 82-2-882-5708

E-mail: ikhwang@snu.ac.kr

Received April 29, 2008; revised September 3, 2008;

accepted September 19, 2008

증가에 관한 연구가 최근 주목받고 있으며 최근 동양의학에서 사용되던 몇몇 생약제에 대한 효능 및 효과를 근거로 골조직 재생 능력에 미치는 영향 등에 대한 과학적인 접근이 시도되고 있고 (11,12), 특히 산화 억제 및 유리기(free radical) 소거능과 골다공증 예방에 대한 논문도 보고되고 있다(13-15).

황금(*Scutellaria radix*)은 꿀풀과(Labiatae)에 속하는 다년생 초본으로서 황금(속썩은 풀, *Scutellaria baicalensis* Georgi)의 주피를 벗긴 뿌리를 말한다. 뿌리에는 35% 이상의 페놀화합물을 포함하며 노란색을 띠기 때문에 황금(黃芩: golden root)이라 한다. 황금은 baicalin, baicalein, wogonin이 많이 함유되어 있으며, 그 중 baicalin이 가장 많이 함유되어 있다. 오래전부터 우리나라, 중국, 일본 등에서 황금을 항산화 효과와 함께 소염성 해열, 진통, 지사, 염증성 결막염, 두통, 위염, 장염 등에 사용되어 왔으며 최근에는 고혈압, 동맥경화, 피부질환, 불면, 감기, 상습유산에도 사용되고 있다(16). 최근 연구에 의하면 황금(黃芩)에 함유된 페놀 화합물인 baicalin, baicalein, wogonin 그리고 oroxylin A가 염증발현에 관여하는 COX-2(cyclooxygenase-2) 및 NO(nitric oxide)형성에 관여하는 iNOS(inducible nitric oxide synthase)를 억제하는 것으로 나타났으며(17), 염증 유발인자인 TNF를 억제함이 확인되었다(18). 또한 황금은 2,000-4,000 ng/g의 멜라토닌을 함유하고 있고 멜라토닌은 항산화, 항노화 효과 뿐 아니라 골아세포의 분화 및 골 성장을 촉진하는 것으로 보고되었다(19).

따라서 본 연구는 황금 추출물이 골조직의 대표적인 세포인 조골세포와 파골세포에 미치는 영향을 세포수준에서 관찰하고자 하였다. 조골세포에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 MC3T3-E1 세포를 이용하였고, 미분화된 파골세포 전구세포로부터 파골세포의 생성 및 활성에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 Raw 264.7 세포를 이용하였다.

## 재료 및 방법

### 황금 추출물의 제조

본 실험에 사용한 황금은 러시아에서 채배하여 세절 후 자연 건조 시킨 러시아산 황금((주)유니베라에서 제공)을 사용하였다. 황금 추출물은 황금 100g에 70% 에탄올 1L를 첨가 후 60°C 항온 수조에서 3시간 동안 진탕하는 과정을 3회 반복하였으며 여과, 감압, 농축 후 동결건조하여 분말의 시료를 얻었고, -80°C 냉동고에 보관하면서 실험에 사용하였다.

### 조골세포 배양

본 연구에 사용한 MC3T3-E1 세포는 mouse calvaria 유래의 조골세포로서 ATCC(American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)로부터 구입하였고, 세포배양에 필요한  $\alpha$ -MEM( $\alpha$ -minimum essential medium)배지, FBS(fetal bovine serum), penicillin-streptomycin 등은 GIBCO(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 사로부터 구입하였다. MC3T3-E1 세포는 10% fetal bovine serum 과 1% 항생제(penicillin-streptomycin)가 포함된  $\alpha$ -MEM 배지에서 배양하였다. 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건을 유지하는 incubator(Sanyo Electric Biochemical Co., Sanyo, Ora-gun, Japan)에서 배양하였으며, 세포가 충분한 증식이 일어나는 2-3일 간격으로 계대 배양하면서 실험에 사용하였다.

### 세포생존률 측정

조골세포의 성장정도는 Green 등의 방법(20)에 따라 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide(MTT, Sigma

Chemical Co. St. Louis, MO, USA) 시약을 사용하여 MTT tetrazolium이 자주색의 불용성 formazan으로 환원되는 정도를 570 nm에서 측정함으로써 살아있는 세포의 생존율을 구하는 MTT assay로 측정하였다. 즉, MC3T3-E1 세포를 1×10<sup>4</sup> cells/well 농도로 96 well plate에 100  $\mu$ L씩 분주한 후 24시간동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양 후, 배지를 제거하고 FBS가 첨가되지 않은 배지에 황금 추출물을 농도(0.01, 0.1, 1, 10, 100, 1000  $\mu$ g/mL)를 배분시켜 만든 새로운 배양액을 분주하였다. 48시간 배양한 후 배지를 제거하고 0.05 mg/mL농도의 MTT시약(10  $\mu$ L/well)을 분주한 다음, 4시간 더 배양 후 배양액을 제거하고 침전물을 DMSO(dimethyl sulfoxide)에 용해시켜 microplate reader(Bio-rad, Benchmark, Hercules, CA, USA)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군은 시료를 첨가하지 않은 배지만 넣고 배양시켰고, 대조군의 흡광도를 기준으로 세포생존율을 산출하였다.

### 염기성 인산 분해 효소 활성 측정

염기성 인산분해 효소(alkaline phosphatase activity: ALP) 활성 검사는 *p*-nitrophenyl phosphate의 가수분해 반응에 ALP가 촉매로 작용하는 것을 이용하여, 가수분해 산물인 *p*-nitrophenol의 양을 측정함으로써 ALP의 농도를 산출하는 방법이다. MC3T3-E1 세포를 6 well plate에 각 1×10<sup>5</sup> cells/well 농도로 분주한 후, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 배양 후, 배지를 제거하고 10% FBS, 1% 항생제(penicillin-streptomycin)가 첨가된 배지에 황금 추출물 농도를 배분시켜 만든 새로운 배양액을 분주하였다. 6일간 배양 후 배양액을 제거하고 0.1% Triton X-100을 첨가해 세포를 분리하였다. 세포의 현탁액을 4°C에서 10분간 shaking incubator에서 180 rpm의 속도로 흔들어진 후, 10분간 2,500×g에서 원심분리하여 상층액만 취하였다. ALP kit(EnzoLyte™ pNPP Alkaline Phosphatase Assay Kit, Sigma Chemical Co.)을 이용하여 *p*-nitrophenyl phosphate로부터 가수분해된 *p*-nitrophenol (*p*-NP)의 생성량을 측정하여 활성도를 도출하였고, 단백질량으로 나누어 단위단백질 함량 당 효소 활성도를 산출하였다. 즉, 상층액 1 mL 중 50  $\mu$ L를 96 well plate에 넣은 후 미리 만들어 둔 pNPP reaction mixture(pNPP stock solution을 2X assay buffer로 100배 희석한 것, pNPP stock solution: pNPP vial에 증류수 250  $\mu$ L 넣어서 녹인 용액)를 모든 well에 50  $\mu$ L씩 넣어서 30분간 상온에서 반응시키고 다음 마지막에 stop solution을 모든 well에 50  $\mu$ L씩 넣어 반응을 종결시켰고, microplate reader(Bio-rad)를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 단백질 양은 bovine serum albumin protein assay reagent를 이용하여 측정하였으며 효소 활성은 대조군에 대한 백분율로 나타내었다.

### Alizarin-red 염색법에 의한 골석회화 형성도 측정

MC3T3-E1 세포를 6 well plate에 1×10<sup>5</sup> cells/well 농도로 분주한 후, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 배양 후, 배지를 제거하고 석회화 유도를 위해 50  $\mu$ g ascorbic acid, 10 mM  $\beta$ -glycerol phosphate가 첨가된 배지에 앞의 실험에서 결정된 황금 추출물의 최적작용 농도(1  $\mu$ g/mL)를 맞춘 배양액을 분주하고 5일부터 20일까지 incubator에서 배양하였다. 배양 후, 배지를 제거하고 PBS로 세척한 뒤 70% EtOH로 4°C에서 1시간 고정시켰다. alizarin red solution은 alizarin red(Sigma Chemical Co.)를 증류수에 녹여 40 mM로 농도를 맞추고 pH 4.2로 조정하였다. 세포를 고정시킨 후, AR solution(2 mL/well)으로 10분간 염색하고 증류수로 5번 세척한 뒤 염색되지 않은 부분은 PBS로 씻어주면서 제거하고 표면이 너무 마르지 않게 PBS로 조금 적셔주면서 현미

경으로 석회화 형성 정도를 관찰하였다. 석회화형성 확인 후 10% cetylpyridinium chloride를 첨가한 10mM sodium phosphate(pH 7.0) 용액을 well에 2mL씩 첨가하여 15분간 녹이고 염색된 정도를 microplate reader(Bio-rad)를 이용하여 570nm에서 흡광도를 측정하였고 대조군의 흡광도를 기준으로 골 석회화 형성능을 계산하였다.

#### 파골세포 전구 세포의 배양 및 세포 생존률 측정

Murine macrophage 유래인 Raw 264.7 cells은 서울대학교 한국 세포주 은행에서 분양받았다. 10% Fetal bovine serum과 1% 항생제(penicillin/streptomycin)가 첨가된 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM)을 배양액으로 5% CO<sub>2</sub> incubator를 이용하여 37°C에서 배양하면서 세포가 70-80% 정도 증식되었을 때, 2-3일 간격으로 계대 배양하면서 실험에 사용하였다. 세포 생존률은 MTT assay(20)로 측정하였다.

#### 파골세포의 생성 측정

Raw 264.7 세포를 5×10<sup>4</sup> cells/well 농도로 48 well plate에 분주하여 24시간 배양하였다. 배지를 제거하고 FBS가 첨가된  $\alpha$ -MEM배지에 분화인자(receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand 100 ng/mL, macrophage colony-stimulating factor 25 ng/mL)와 황금 추출물의 농도를 배분시켜 만든 새로운 배양액을 분주하여 5일간 배양하였다. 배양이 끝난 후 배양액을 제거하고 PBS로 세척 후 fixative solution(citrate solution 25 mL+acetone 65 mL+formaldehyde 8 mL)으로 30초간 고정 후 증류수로 세척 후 acid phosphatase leukocyte kit(Sigma Chemical Co.)를 이용하여 tartrate-resistant acid phosphatase(TRAP) 염색을 시행하였다. TRAP 염색은 기질로 naphthol AS-BI phosphate (Sigma Chemical Co.)를 사용하였고, 염색제로는 fast garnet GBC(Sigma Chemical Co.) 용액을 사용하였다. 염색이 끝난 후 광학현미경을 이용하여 핵이 3개 이상인 TRAP-양성 다핵세포를 계수하여 파골세포의 생성지표로 삼았다.

#### 통계처리

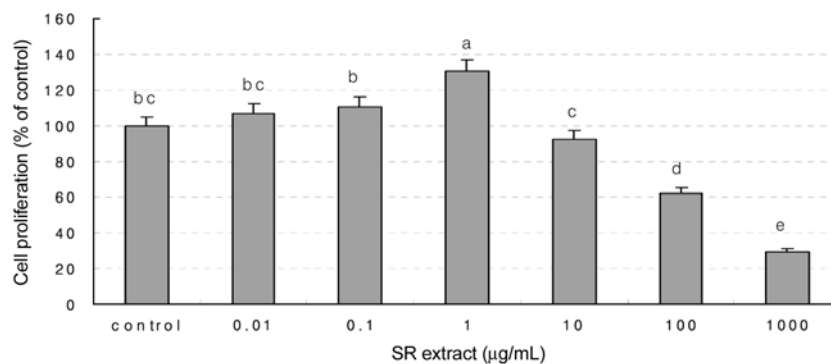
통계처리는 SAS/STAT TM User's guide 9.1판 프로그램을 이용하여 평균과 표준편차, 대조군에 대한 백분율과 표준편차 등을 표시하였다. 분산분석(ANOVA) 후 Duncan의 다중범위 유의성 검증을 실시하였다. 이때  $\alpha$ 값은  $p < 0.05$ 이었다.

## 결과 및 고찰

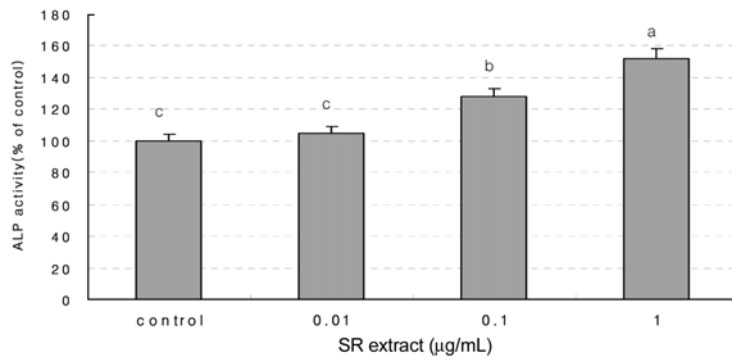
#### 황금 추출물 처리가 조골세포의 증식 및 활성에 미치는 영향

본 연구에 사용된 황금 추출물의 수율은 30.4%이었으며 추출물 중 baicalin, baicalein, wogonin, melatonin의 함량은 각각 162.16, 10.60, 7.19, 2.15 ppm이었다. 골기질의 성분을 주로 합성하는 조골세포는 미분화간엽세포로부터 유래하며(21), 활발한 대사 작용으로 석회화과정에 중요한 역할을 하고(22), 세포막에 당단백 효소인 염기성인산분해효소를 갖고 있다. 확립된 골조직유래 여러 가지 세포주 중 골세포의 세포활성과 관련된 연구에서 유용하게 이용되고 있는 mouse calvaria 유래의 MC3T3-E1 osteoblastic cell은 *in vivo* 뼈 형성 과정 중 세포의 증식, 분화, 석회화 등 골세포와 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 골내막 세포(bone lining cell) 또는 골세포(osteocyte)로 분화되는 과정에 속하는 세포이며(23,24) 특히 기질에 무기질을 형성(mineralization of matrix)하는 성질을 가지고 있다(25). 그러므로 본 연구에서는 황금 추출물의 조골세포 증식효과를 검색하고자 배양 시 안정성을 보이는 MC3T3-E1 세포주를 이용하였다. 황금 추출물이 조골세포의 증식에 미치는 영향을 알아보기 위해 MTT assay를 실시하였고, MC3T3-E1 세포의 생존률은 배양액만 처리한 대조군에 대한 백분율로 나타내었으며 그 결과는 Fig. 1과 같다. MC3T3-E1 세포는 처리한 황금 추출물의 농도에 의존적으로 세포의 증식이 촉진되는 경향을 나타내었으며 특히 1  $\mu$ g/mL 농도에서 130.4%의 증식 효과를 나타내었고 그 이상의 농도에서는 조골세포의 증식이 억제되었다. 따라서 조골세포에 대한 증식 억제를 보이지 않는 황금 추출물의 작용 농도는 0.01-1  $\mu$ g/mL 범위였고, 최적 작용 농도는 1  $\mu$ g/mL로 결정하였다. Cho 등(26)의 연구에 의하면 약용은 0.001-0.01 mg/mL 농도에서, 대두 추출물은 0.001-0.1 mg/mL 농도에서 조골세포주 MG-63의 증식을 유의적으로 증가시켰다. 본 연구에서도 황금 추출물에 함유된 페놀 화합물의 작용에 의한 조골세포 증식효과의 가능성이 있으므로 이는 추후 연구를 통하여 baicalein, baicalin, wogonin, melatonin 성분이 조골세포의 증식에 미치는 효과를 분석하여 검증해야 할 것으로 사료된다.

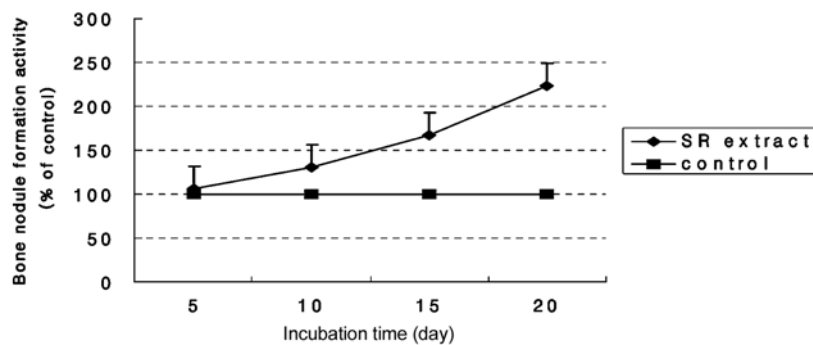
황금 추출물이 조골세포의 활성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 조골세포의 표지 효소로 알려진 ALP 활성을 측정하였다.



**Fig. 1. Effect of *Scutellaria radix* extract on the osteoblastic cells proliferation.** The MC3T3-E1 cells were plated at a density of 1×10<sup>4</sup> cells/well in 96 well plates and treated with extract for 48 hr. After removal of media, formazan granules were solubilized, and optical density was measured with the microplate reader. Cell viability was expressed with an absorbance ratio (Absorbance of treated cells/absorbance of control cells×100). Values with different letters were significantly different at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test. Each value is expressed as Mean±SD (n=3).



**Fig. 2. Effect of *Scutellaria radix* extract on the ALP activity of osteoblastic cells.** The MC3T3-E1 cells were plated at a density of  $1 \times 10^5$  cells/well in 6 well plates and treated with extract for 6 days. Enzyme activity was measured by spectro-photometric method using *p*-nitrophenyl phosphate as a substrate. Values with different letters were significantly different at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test. Each value is expressed as Mean $\pm$ SD (n=3).



**Fig. 3. Effect of *Scutellaria radix* extract on the Bone nodule formation activity of osteoblastic cells.** The MC3T3-E1 cells were plated at a density of  $1 \times 10^5$  cells/well in 6 well plates, cultured for 20 days in the presence of ascorbic acid,  $\beta$ -glycerophosphate and SR extract (1  $\mu$ g/mL). Each value is expressed as Mean $\pm$ SD (n=3).

조골세포는 골 표면에 근접해 있으며 세포막에 당단백 효소인 alkaline phosphatase(ALP)를 가지고 있다. 이 효소는 기질 특이성과 염기성 pH에서 최적의 활성을 나타내며 세포외막과 석회화 조직에서 높은 농도로 발견되어 석회화 과정 동안 무기인산의 운반, 세포분열이나 분화의 조절자로서 역할을 하므로 Stein 등(27)은 조골세포 활성화표지인자로 ALP 활성도를 측정하도록 추천하였고, 여러 논문에서도 ALP 활성을 검색하였다(14,15,24,27,28). 그러므로 본 연구에서는 황금 추출물의 조골 세포 활성 및 분화 효과를 검사하는 방법으로 조골세포의 ALP 활성을 측정하였다. 황금 추출물을 처리한 MC3T3-E1 세포의 ALP 활성은 배양액만 처리한 대조군에 대한 비율로 나타냈으며 그 결과는 Fig. 2와 같다.

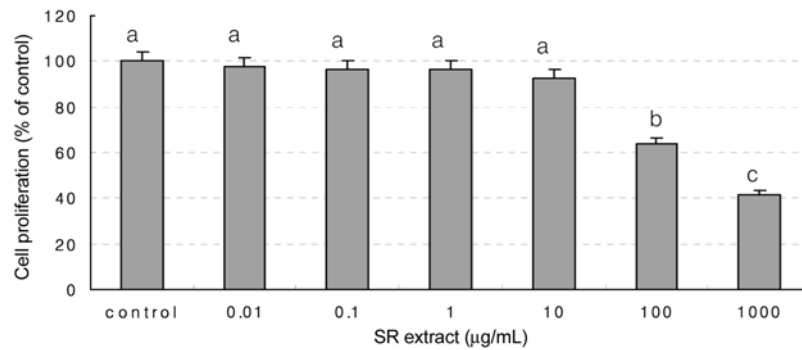
황금 추출물이 세포에 독성을 나타내지 않는 범위(0.01-1  $\mu$ g/mL)에서 ALP activity를 측정한 결과, 황금 추출물은 농도 의존적이고 유의적으로 ALP activity가 증가하였으며 1  $\mu$ g/mL 농도에서 152.0%의 ALP 활성 증가효과를 나타내었다. ALP는 조골 세포의 분화에 발현되는 표식인자(biomarker)이므로 이 결과에 의해 황금 추출물이 조골세포의 분화를 촉진하는 가능성이 있음을 유추할 수 있다. 이런 분화 촉진 효과가 황금에 함유된 유효성분 중 단일 성분에 의한 영향인지, 복합적 상승 작용에 의한 것인지의 향후의 연구로 규명하여야 할 것이다.

골석회화 형성능은 조골세포의 분화에 중요한 표식인자이다. alizarin은 무기질화된 세포의 기질에 염색되므로 석회화된 양과 염색 정도가 상호 비례한다. 따라서 시간에 따른 석회화 형성도를 확인하기 위해 염색된 석회화물을 10% cetylpyridinium chloride로 녹여 흡광도 값을 측정하여 상대활성을 나타낸다. 황금 추출물의 최적 작용농도(1  $\mu$ g/mL)에서 alizarin red 염색법으로 골석

회화 형성능을 측정한 결과, Fig. 3에서와 같이 추출물 처리 후 5일째는 대조군에 비해 106.6%, 10일째는 130.8%, 15일째는 167.0%, 20일째는 223.3%로 조골세포의 석회화 증가 효과를 관찰할 수 있었다. 따라서 본 연구에서는 황금 추출물이 MC3T3-E1 조골세포의 분화를 촉진하고, 석회화 형성능이 있음을 확인하였다.

### 파골세포의 생성 및 활성화에 미치는 영향

뼈조직에서 유일하게 뼈의 파괴를 담당하는 파골세포는 단핵구/대식세포 계통의 세포이며, 여러 조직에 존재하는 단핵구 대식 전구세포로부터 시험관내에서 파골세포의 생성이 가능하다(29). 파골세포는 특징적으로 TRAP와 풍부한 칼시토닌 수용체를 가지며 실제적으로 뼈의 흡수작용을 할 때는 산 생성이 활발하고, actin ring을 형성하여 골기질을 흡수한다(30). 파골세포의 생성을 위해서는 receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand(RANKL)와 macrophage colony stimulating factor(M-CSF)와 같은 두 종류의 cytokine이 필수적인데, 이러한 cytokine이 파골세포의 분화를 유도한다. 따라서 본 연구에서는 미분화된 파골세포 전구세포로부터 파골세포의 생성 및 활성화에 미치는 영향을 관찰하기 위하여, murine macrophage 유래인 Raw 264.7 세포를 이용하여 M-CSF와 RANKL을 처리하여 파골세포의 분화를 유도하였고, TRAP에 양성인 다핵세포의 형성을 관찰하여 황금추출물이 파골세포의 형성에 미치는 영향을 알아보았다. 황금 추출물이 파골세포 전구 세포인 Raw 264.7 세포의 증식에 미치는 영향을 알아보기 위해 MTT assay(20)를 실시하였다. 세포 생존율은 배양액만 처리한 대조군에 대한 백분율로 나타내었으며 그 결과는 Fig. 4와 같다. 황

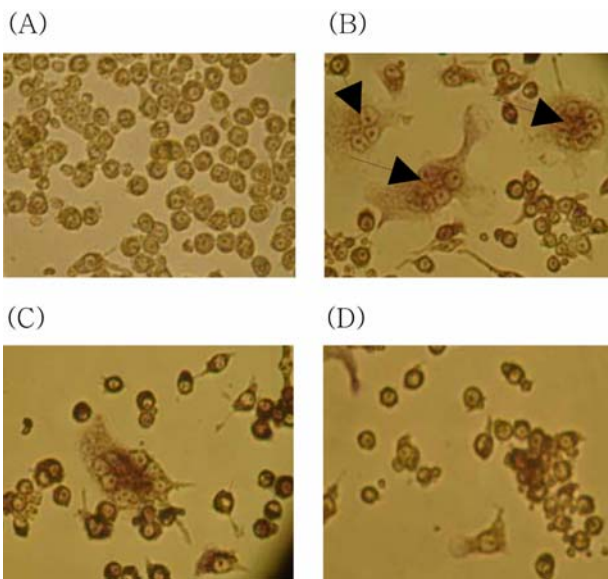


**Fig. 4. Effect of *Scutellaria radix* extract on the osteoclastic cells viability.** The Raw 264.7 cells were plated at a density of  $1 \times 10^3$  cells/well in 96 well plates and treated with extract for 48 hr. After removal of media, formazan granules were solubilized, and optical density was measured with the microplate reader. Cell viability was expressed with an absorbance ratio (Absorbance of treated cells/absorbance of control cells  $\times 100$ ). Values with different letters were significantly different at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test. Each value is expressed as Mean  $\pm$  SD (n=3).

**Table 1. Effect of *Scutellaria radix* extract on the osteoclast generation**

TRAP-positive multinucleated cells Number	SR extract (µg/mL)				
	Control	0.01	0.1	1	10
	134.0 $\pm$ 17.6 <sup>a</sup>	69.6 $\pm$ 2.1 <sup>b</sup>	36.6 $\pm$ 2.7 <sup>c</sup>	33.0 $\pm$ 4.9 <sup>c</sup>	7.0 $\pm$ 1.0 <sup>d</sup>
% of control	100 $\pm$ 13.1 <sup>a</sup>	51.9 $\pm$ 1.6 <sup>b</sup>	27.3 $\pm$ 2.0 <sup>c</sup>	24.6 $\pm$ 3.7 <sup>c</sup>	5.2 $\pm$ 0.7 <sup>d</sup>

The Raw 264.7 cells were plated at a density of  $5 \times 10^4$  cells/well in 48 well plates, cultured for 5 days in the presence of 100 ng/mL RANKL and 25 ng/mL M-CSF and various extract concentrations. After culturing, the TRAP(+) multinucleated cells containing three or more nuclei were counted as osteoclasts. Values with different letters were significantly different at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test. Each value is expressed as Mean  $\pm$  SD (n=3).



**Fig. 5. The morphology of cell at the end of cell cultures after TRAP staining by addition of *Scutellaria radix* extract.** (A) RAW 264.7 cells+no treated (standard) (B) RANKL+M-CSF (control) (C) RANKL+M-CSF+0.01 µg/mL SR extract (D) RANKL+M-CSF+10 µg/mL SR extract (Arrows indicate TRAP-positive cells)

금 추출물은 0.01-10 µg/mL 농도에서는 세포독성이 나타나지 않았고 100 µg/mL 농도에서는 63.9%의 세포 생존율을 나타냈다.

황금 추출물이 세포에 독성을 나타내지 않는 범위(0.01-10 µg/mL)에서 TRAP 염색한 결과, 황금 추출물은 0.01 µg/mL 농도에서 대조군에 비해 파골세포 분화를 50%이상 감소시켰으며(Table 1, Fig. 5), 농도 의존적이었다. 즉, 대조군에서는 TRAP 양성 세

포가 한 well당 평균 134개가 관찰되었는데 비해 황금 추출물 0.01 µg/mL 농도에서는 TRAP 양성 세포가 평균 69.6개, 0.1 µg/mL 농도에서는 평균 36.6개, 1 µg/mL 농도에서는 평균 33.0개, 10 µg/mL 농도에서는 평균 7.0개가 관찰되었다(Table 1, Fig. 5)

이처럼 파골 세포의 분화 억제 효과가 우수하게 나타난 황금은 주요성분으로서 baicalein, baicalin, wogonin 등의 폴리페놀 계통의 활성 성분을 함유하고 있으며 이들에 대한 항염증과 항산화 작용에 대한 여러 보고들이 있다. 폴리 페놀류들이 파골 세포의 분화에 미치는 영향에 대한 연구들을 보면 콩의 genistein, daidzein 같은 이소플라본의 파골 세포 분화 억제 효과(31)와 quercetin, kaempferol, tannin 등의 파골세포 apoptosis 유도 효과(32) 등이 있다. 이러한 연구로 미루어 보아 황금에 존재하는 폴리페놀 물질이 파골세포의 분화억제 효과를 보이는 것으로 유추할 수 있다. 이에 황금 추출물 중 폴리페놀계통의 화합물 각각에 대한 파골 세포 분화 억제에 관한 더 많은 연구가 이루어져야 할 것이다.

이상의 실험결과를 통해서 황금 추출물이 조골세포의 증식 및 분화를 촉진시키며, 파골세포 분화를 억제하는 효과가 있음을 알 수 있었다. 따라서 황금 추출물은 골흡수 관련 질환 및 골질환 예방에 효과가 있을 것으로 사료된다.

## 요 약

황금 추출물이 조골세포와 파골세포에 미치는 영향을 세포수준에서 관찰하고자 하였다. 조골세포에 미치는 영향을 관찰하기 위하여, mouse calvaria 유래의 MC3T3-E1 osteoblastic cells를 이용하여 세포 생존율, 염기성 인산분해효소 활성, 골석회화 형성능을 측정하였다. 또한 미분화된 파골세포 전구세포로부터 파골세포의 생성 및 활성에 미치는 영향을 관찰하기 위하여, murine macrophage 유래인 Raw 264.7 cells를 이용하여 M-CSF와

RANKL을 처리하여 파골세포의 분화를 유도하였고, TRAP에 양성인 다핵세포의 형성을 관찰하여 황금추출물이 파골세포의 형성에 미치는 영향을 알아보았다. 황금 추출물이 MC3T3-E1 세포의 증식에 미치는 영향을 MTT assay로 측정된 결과, MC3T3-E1 세포는 처리한 황금 추출물의 농도에 의존적으로 세포의 증식이 촉진되는 경향을 나타내었으며 특히 1 µg/mL 농도에서 130.4%의 증식 효과를 나타내었다. 또한 황금 추출물이 세포에 독성을 나타내지 않는 범위(0.01-1 µg/mL)에서 MC3T3-E1 세포의 ALP activity를 측정된 결과, 농도에 의존적으로 ALP activity가 증가하였으며 1 µg/mL 농도에서 152.0%의 ALP 활성 증가효과를 나타내었다. 황금 추출물의 최적 작용 농도 1 µg/mL에서 골석회화 형성능을 측정된 결과, 배양 시간에 따라 계속 증가하여 배양 20 일째는 대조군에 비해 223.3%의 석회화 형성능을 나타내었다.

황금 추출물의 파골세포 분화억제 효과를 알아보기 위해 황금 추출물이 세포에 독성을 나타내지 않는 범위(0.01-10 µg/mL)에서 TRAP staining한 결과, 황금 추출물은 0.01 µg/mL 농도에서 대조군에 비해 파골세포 분화를 50% 이상 감소시켰으며 농도 의존적으로 TRAP 양성 세포가 감소함을 관찰하였다.

이상의 결과로 미루어 볼 때, 황금 추출물이 골다공증을 포함한 골질환 예방에 효과가 있을 것으로 사료된다.

## 문 헌

- Canalis E, McCarthy T, Centrella M. Growth factors and the regulation of bone remodeling. *J. Clin. Invest.* 81:277-281 (1988)
- Raisz LG. Hormonal regulation of bone growth and remodeling. In *Cell and Molecular Biology of Vertebrate Hard Tissue* CIBA Foundation Symposium 136, pp. 226-238, Wiley, NY, USA (1988)
- Lee YS. Effect of isoflavones on proliferation and oxidative stress of MC3T3-E1 osteoblast-like cells. *Korea soybean Digest.* 18: 35-42 (2001)
- Jilka RL. Cytokines, bone remodeling and estrogen deficiency. *Bone* 23: 75-81 (1998)
- Aldercreutz H, Mazur W. Phyto-estrogens in relation to cancer and other human health risks. *Proc. Nutr. Soc.* 55: 399-417 (1996)
- Keum JC, Kang KH, Kim SB. Effects of estrogen on the tumor necrosis factor- $\alpha$  induced apoptosis and cytokine gene expression MC3T3-E1 osteoblast. *Korean J. Obstet. Gynecol.* 44: 324-336 (2001)
- Orcel P, Krane SM. Secondary osteoporosis and glucocorticoid include osteoporosis. *Ann. Med. Interne.* 151: 497-502 (2000)
- Karen MP, Carol CP, Lawrence GR. Treatment of osteoporosis. *Annu. Rev. Med.* 6: 249-256 (1995)
- Stein GS, Lian JB, van Wijnen AJ, Montecchino M. Transcriptional control of osteoblast growth and differentiation. *Physiol. Rev.* 76: 593-629 (1996)
- Ryan PJ, Evans P, Gibson T, Fogelman I. Osteoporosis and chronic back pain: A study with single-photon emission computed tomography bone scintigraphy. *J. Bone Miner. Res.* 7: 1455-1460 (1992)
- Cho SH, Kim KG, Kim SR, Lee JA, Moon H, Hwang YY. The effects of 17- $\beta$  estradiol, medroxyprogesterone acetate and parathyroid hormone on the differentiation of osteoblast cell. *Korean J. Obstet. Gynecol.* 39: 1497-1506 (1996)
- Boonen A, Broos P, Dequeker J. The prevention of treatment of age-related osteoporosis in the elderly by systemic recombinant growth factor therapy (rhIGF-I or rhRGF- $\beta$ ): a perspective. *J. Internal Med.* 242: 285-290 (1997)
- Lee YS. Effect of isoflavones on proliferation and oxidative stress of MC3T3-E1 osteoblastic like cells. *Korea Soybean Digest.* 18: 35-42 (2001)
- Choi EM, Suh KS, Kim YS, Choue RW, Koo SJ. Soybean ethanol extract increases the function of osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Phytochemistry* 56: 733-739 (2001)
- Choi EM, Koo SJ. Effects of soybean ethanol extract on the prostaglandin E2 and interleukin-6 production in osteoblastic cells. *Food Res. Int.* 2002, 35: 893-896 (2002)
- Herbal medicine. Young-lim Sa. Seoul, pp. 218-220 (2004)
- Chena YC, Shenb SC, Chena LG, Tony JF, Yang LL. Wogonin, baicalin, and baicalein inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 gene expressions induced by nitric oxide synthase inhibitors and lipopolysaccharide. *Biochem. Pharmacol.* 61: 1417-1427 (2001)
- Krakauer T, Li B, Young H. The flavonoid baicalin inhibits superantigen-induced inflammatory cytokines and chemokines. *FEBS. Lett.* 500:52-55 (2001)
- Jerome AR, Kim BG. Melatonin Promotes Osteoblast Differentiation and Bone Formation. *J. Biol. Chem.* 274: 22041-22047 (1999)
- Green LM, Reade JL, Ware CF. Rapid colometric assay for cell viability: Application to the quantitation of cytotoxic and growth inhibitory lymphokines. *J. Immunol. Methods* 70: 257 (1984)
- Owen ME. Lineage of osteogenic cells and their relationship to the stromal system. in *Bone and Mineral Research*, edited by Peck, W.A., pp. 1-25, Elsevier Science Publisher, Amsterdam (1985)
- Martin JH, Matthews JL. Mitochondrial granules in chondrocytes, osteoblasts and osteocytes. An ultrastructural and microincineration study. *Clin. Orthop. Relat. R.* 68: 237-278 (1970)
- Ernst M, Heath JK, Lodan GA. 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 (1989)
- Sudo H, Kodama H, Amagai Y, Yamamoto S, Kasai S. In vitro differentiation and calcification in new clonal osteogenic cell line derived from newborn mouse calvaria. *J. Cell Biol.* 96: 191-198 (1983)
- Kim KY, Lee CS, Lee SH, Lee JD, Kim GS. Primary culture of osteoblast. *J. Korean Orthop. Assoc.* 26: 1860-1863 (1991)
- Cho YH, Park SJ, Shin HJ, Jang KH, Kang SA, Cho RW. Comparative estrogenic effects of Yak-Kong and Soy Bean on the proliferation of human osteoblastic cell line, MG-63. *Korean J. Nutr. Soc.* 34: 905-911 (2001)
- Stein GS, Lian JB, Owen TA. Relationship of cell growth to the regulation for tissue-specific gene expression during osteoblast differentiation. *FASEB. J.* 4: 3111-3123 (1990)
- Park SK, Shin HS. Effects of extract of natural products on alkaline phosphatase activity of MC3T3-E1 cells. *Wonkwang Dental Medicine* 10: 89-100 (2001)
- Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT, Martin TJ. Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr. Rev.* 20: 345-57 (1999)
- Mundy GR, Roodman GD. Osteoclast ontogeny and function. Vol. 5, pp. 209-279. In: *Bone and Mineral Research*, Peck WA (ed). Elsevier, Amsterdam, Netherland (1987)
- Claudia MR, Michele L, Gilles C, Alain P, Giulia C. Down-Regulation of osteoclast differentiation by Daidzein via Caspase 3. *J. Bone Miner. Res.* 17: 630-638 (2002)
- Alice W, Said K, Romuald M, Florence L, Christophe P, Petit JP, Patrice F, Michel B. Potent inhibitory effect of naturally occurring flavonoids ruercetin and kaempferol on in vitro osteoclastic bone resorption. *Biochem. Pharmacol.* 65: 35-42 (2003)