

머위(*Petasites japonicus*)와 여주(*Momordica charantia* L.) 추출물의 MC3T3-E1 조골세포 증식 및 분화에 미치는 효과

지속희¹ · 안도환² · 전미라^{1*}

¹동아대학교 식품영양학과

²고신대학교 의과대학 생리학교실

Effects of *Petasites japonicus* and *Momordica charantia* L. Extracts on MC3T3-E1 Osteoblastic Cells

Suk-Hee Ji¹, Do-Hwan Ahn², and Mira Jun^{1*}

¹Dept. of Food Science and Nutrition, Dong-A University, Busan 604-714, Korea

²Dept. of Physiology, Kosin Medical College, Busan 602-030, Korea

Abstract

In this study, the effects of *Petasites japonicus* and *Momordica charantia* L. extracts on MC3T3-E1 osteoblastic cells were investigated. Since the activity of osteoblastic cell is one of the important factors for bone formation, the cellular proliferation of osteoblast was evaluated by MTT and alkaline phosphatase (ALP) activity. Compared to control, the cell proliferation was elevated to 114% and 112% by the treatment of *Petasites japonicus* and *Momordica charantia* L. extracts, respectively at the concentration of 10 µg/mL. The cell differentiation was also measured by alkaline phosphatase (ALP) activity at 3, 7, 14, and 27 days treatments with one of the extracts, respectively. As results, the ALP activity was significantly increased at 3 days, compared to control ($p < 0.05$). To evaluate the effect of *Petasites japonicus* and *Momordica charantia* L. extracts on bone nodule formation, MC3T3-E1 cells were cultured in α -MEM for 3, 14, and 21 days and then stained by alizarin red. To determine the expression patterns of bone-related proteins during the MC3T3-E1 osteoblast-like cell differentiation, osteoblast cells were cultured in α -MEM for 24 hr. RNA was extracted and RT-PCR analysis was performed to examine the expression of OPG, RANKL and osteocalcin. *Petasites japonicus* extract exhibited the significant increment of osteocalcin compared with the positive control, which suggests that *Petasites japonicus* may have beneficial effects on bone health through the proliferation of osteoblast cells.

Key words: *Petasites japonicus*, MC3T3-E1, OPG, RANKL, alkaline phosphatase (ALP)

서 론

급격한 경제 발달과 더불어 고령화 사회로의 진입, 복잡한 현대 사회에서 생성되는 스트레스 및 환경오염에 의한 생체 내 신호전달계의 파괴 등으로 인해 최근 골 대사 질환 중 골다공증에 대한 관심이 증가하고 있다. 골다공증은 노령화에 의한 골격대사 이상 또는 골격 무기질 대사의 불균형으로 인해 골밀도가 현저하게 감소된 상태로써 골조직의 대사과정이 평형을 잃은 경우 어떠한 연령층에서도 발생할 수 있다(1).

골 조직은 성장이 끝난 이후에도 골 재형성(bone remodeling)이 지속적으로 일어나며 이 과정을 통해 파골세포(osteoclast)에 의한 골 흡수와 조골세포(osteoblast)에 의한 골 형성 간의 항상성이 유지된다. 정상적인 조건에서의 골 조직은 골 형성과 골 흡수가 균형을 이루고 있지만 병리적인 상황에서는 골 형성에 비해 흡수가 많이 일어나는 불균형상

태가 진행되어 조직 내 화학적 조성에는 큰 변화가 없으나 단위 용적내의 골질량이 감소하여 골질의 위험뿐 아니라 이로 인한 사망률을 증가시킨다(2). 이러한 골대사의 불균형에 대한 원인으로 일차적인 골아세포의 기능 저하 및 파골세포의 활성화 증가뿐만 아니라 autocrine 또는 paracrine 인자들에 의한 복합적 반응, 골 흡수 시 유리되는 growth factor, 세포외기질(extracellular matrix) 등이 제시되고 있다(3,4). 또한 골 표면에 존재하는 세포역시 호르몬, 단백질 분해효소, prostaglandin, cytokines 등을 분비하므로 골 흡수과정은 이러한 관련인자들에 의한 복잡한 과정에 의하여 조절되고 있음을 알 수 있다(4).

남성과 여성 모두 노화과정에 따른 파골세포 작용의 증가로 골다공증의 유병률이 증가하며, 특히 여성의 경우 폐경 후 에스트로겐 분비 저하에 의한 골밀도 감소로 인해 남성보다 현저히 높은 발병률을 보이고 있다. 에스트로겐의 분비가

*Corresponding author. E-mail: mjun@dau.ac.kr
Phone: 82-51-200-7323, Fax: 82-51-200-7535

감소될 경우, 골수세포 내에서 IL-1, IL-6, tumor necrosis factor(TNF) 등의 생성이 증가하고 이는 파골세포의 발달을 촉진하고 부갑상선 호르몬에 대한 민감도를 증진시켜 골 흡수 속도가 증가하게 된다(5). 또한 TGF- β 의 활성화 억제로 인해 조골세포로부터 골 기질의 합성이 감소된다고 알려져 있다(6). 에스트로겐 분비 감소에 따른 골밀도 감소의 다른 기전으로 산화적 스트레스와 관련하여 에스트로겐이 활성 산소에 의한 세포손상을 감소시키는 항산화 역할을 하는 것으로 알려져 있어 골 형성 및 흡수 기전에 있어 유리 라디칼이 연관되어 있을 가능성을 제시한다(7).

임상적 골다공증의 치료는 골 흡수를 억제하거나 골 형성을 촉진하여 손실된 골량을 회복시키는 것으로 나누어지는데 전자의 경우는 estrogen요법, calcitonin요법, 칼슘보충제, 비타민 D 유도체 요법 등이고, 후자의 경우는 sodium fluoride, parathyroid hormone(PTH) 요법 등이 존재한다. 현재 골다공증의 예방 및 치료에 가장 많이 이용되는 방법은 estrogen요법과 calcitonin요법으로 보고되며 특히 폐경기 여성의 골다공증 치료에는 에스트로겐을 투여하는 호르몬 요법이 효과적인 치료법으로 인식되고 있으나, 여러 가지 부작용과 투여시기를 조절하기 어렵고 유방암, 자궁암, 간질환 등의 특정 환자들은 사용하지 못해 적용에 있어 어려움이 따른다(8). 이러한 이유로 최근에는 에스트로겐 투여에 따른 부작용을 최소화하기 위해 골 손실은 최소화하면서 골 형성을 촉진할 수 있는 천연물의 활성 성분을 이용한 다양한 연구가 진행되고 있다(9-11). 뿐만 아니라 활성 산소종(reactive oxygen species, ROS)이 파골세포 생성의 신호전달에 관여하여 파골세포의 생성을 촉진한다는 연구 결과를 고려해 볼 때(12,13) 항산화 활성을 지닌 천연물 성분이 골 형성과 흡수 기전에 긍정적인 효과를 제시할 것으로 사료된다.

머위(*Petasites japonicus*)는 특유의 쓴맛과 향미를 지니는 국화과 다년생 식물로 중국, 일본 및 우리나라에서 자생하고 있다. 잎은 짬파 생채로 이용하고 줄기는 나물로 사용하거나 말려서 탕의 원료로 이용한다(14). 보고된 약리학적 연구로 해독작용, 콜레스테롤 저해효과, 항알레르기 기능 및 항산화능 등이 있다(14-17). 여주(*Momordica charantia* L.)는 일년생 박과식물로, 우리나라에서는 주로 관상용으로 사용하였으나 중국, 인도 및 동남아시아 등지에서는 주요한 기능성 채소로 식용되어지고 있다(18). 머위와 마찬가지로 쓴맛을 지니며 혈당강하, 항암, 항산화 및 항균효과 등이 보고되고 있다(18,19).

Receptor Activator of NF- κ B Ligand(RANKL)은 세포막에 존재하는 tumor necrosis factor(TNF) 중의 하나로 파골세포 전구체에 위치하는 RANK와 결합하고 RANKL-RANK 복합체를 형성하여 파골세포의 형성을 촉진한다(20). 반면, 골수간질세포, 골모세포 등 여러 형태의 세포에 의해 생산되는 OPG(osteoprotegerin, OCIF)는 RANKL과 결합함으로써 RANKL-RANK간의 복합체 형성을 억제하

여 파골세포의 분화를 저해한다(20,21). 즉, RANKL은 NF- κ B 연관 신호전달 체계에 의해 파골세포 전구체의 활성을 촉진하고, OPG는 이러한 활성을 억제하므로 RANKL/RANK/OPG의 발현 및 비율은 파골세포 형성 및 골 흡수를 조절하는 결정적인 요소로 제시된 바 있다(12,20,21).

따라서 본 연구에서는 screening단계에서 우수한 항산화 효과를 나타내었던 머위와 여주 추출물을 대상으로 조골세포에 대한 분화 및 골 형성에 미치는 영향을 살펴보기 위해 MC3T3-E1의 세포 증식률, 염기성 인산분해효소(alkaline phosphatase, ALP)의 활성 및 석회화 정도를 측정하고, 조골세포에서의 골 형성도를 설명하는 기전으로 조골세포에서 분비되어 파골세포 형성에 관여하는 RANKL 및 OPG mRNA의 발현 정도를 분석하고자 하였다.

재료 및 방법

시료 제조

본 실험에 사용된 머위와 여주는 2006년 5월에 경상남도 밀양 얼음골 농가에서 구매하여 수세하고 음건하여 분말화하였다. 각각의 분말 시료 2 kg을 95% 에탄올(10 L)에 5일간 실온에서 냉침한 후 추출하였다. 추출액은 여과하고 동일한 방법으로 총 3회 반복 추출한 후 감압 농축하였다.

세포 배양

본 실험에 사용된 세포는 mouse calvaria osteoblast cell(MC3T3-E1)로 고신대학교 의과대학 생리학교실에서 분양받았다. 10% fetal bovine serum(FBS, Gibco BRL, Grand island, NY, USA)과 1% antibiotic과 antimycotic(Gibco, Grand Island, NY, USA)을 포함한 α -MEM(Gibco) 배지를 사용하여 37°C의 5% CO₂ 배양기에 배양하였다. 3일간격으로 신선한 배지로 교환하여 배양하였다.

MC3T3-E1 조골세포의 생존력 및 증식률

조골세포의 증식률 측정은 Suda 등의 방법(22)에 따라 MTT colorimetric assay를 사용하여 측정하였다. 96-well plate에 2×10^3 cells/well의 농도로 조골세포를 분주하고 24시간 후에 각 추출물을 농도별(0, 1, 10, 100 및 1,000 μ g/mL)로 투여하여 24시간 배양하였다. 대조군은 시료 대신 배지를 첨가하여 동일하게 배양하였다. 배양 후 3-(3,4-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT, Sigma, St. Louis, MO, USA) 시약을 5 mg/mL 농도로 첨가하여 4시간 더 배양하였다. 시간 경과 후 배지를 제거하고 PBS로 2회 세척하고 DMSO를 100 μ L 첨가하여 생성된 불용성의 formazan 결정을 용해시켜 ELISA reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 추출물에 대한 세포 증식 효과는 8번 반복 실험의 평균값을 취한 후 대조군에 대한 백분율로 표시하였다.

ALP 활성 측정

MC3T3-E1 조골세포를 6-well plate에 3×10^3 cells/well 농도로 분주하고 24시간 후 머위 및 여주 추출물을 각각 첨가한 후 3, 7, 14 및 21일로 세포를 배양하였다. 배양이 끝난 plate는 배양액을 제거한 후 PBS로 2회 세척한 다음 trypsin 처리하고 원심분리(4°C, 8,000 rpm, 10 min)하여 세포를 획득하였다. 수확한 세포는 0.5% Triton X-100 25 μ L와 PBS 50 μ L 처리하여 37°C에서 1시간 동안 방치하였다. 4°C로 8000 rpm에서 10분간 원심분리 하여 상등액을 분리하였으며, 상등액 45 μ L에 1 M trizma base buffer(pH 10) 70 μ L, 5 mM MgCl₂ 15 μ L, 5 mM PNPP 15 μ L 넣은 후 37°C에서 1시간 반응시킨 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였다(23). 두 실험 모두 동량의 Triton X-100 용액을 반응시킨 것으로 blank를 측정하였고, 단백질량은 표준시료로서 bovine serum albumin(BSA)을 이용한 Bradford법을 사용하여 표준곡선을 작성한 후 정량하였다. 각 실험에서 얻어진 ALP 활성은 총 단백질량으로 보정하여 표시하였다.

Alizarin red 염색법을 이용한 석회화 형성도 분석

골의 형성 정도는 세포의 기질의 석회화를 나타내는 alizarin red 염색을 시행하였다. ALP 염색과 동일한 조건으로 MC3T3-E1 조골세포를 12-well plate에 2×10^3 cells/well 농도로 분주하여 24시간 동안 배양하였다. 배양된 plate에 여주 추출물 10 μ g/mL와 머위 추출물 10 μ g/mL를 각각 투여한 후 다시 3, 14 및 21일간 세포를 배양하였다. 배양이 끝난 plate는 배지를 제거하고, PBS로 세척한 후 fixative solution(citrate solution 25 mL, acetone 65 mL, 37% formaldehyde 8 mL)을 이용하여 고정하고 멸균수로 세척한 후 40 mM alizarin red(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) solution를 pH 4.2로 조정하여 실온에서 30분간 방치하였다. 염색된 plate를 다시 멸균수로 5분간 3번 세척하여 현미경으로 관찰하였다.

Primer 제작과 RT-PCR법에 의한 RNA gene 발현조사

Primer 제작 시 genomic DNA의 오염을 줄이기 위한 이중적 장치로 forward와 reverse primer가 인접한 두 개의 exon에 위치하도록 설계하였으며 primer3 input(Whitehead Institute) 프로그램을 통해 primer를 제작하였다(Table 1).

MC3T3-E1 조골세포를 6-cm dish에 1×10^6 cells/well 분주하고 24시간 배양한 세포에 시료처리 후 8일간 배양하여 배지를 제거하고 PBS로 세척한 후 trypsin을 사용하여 수확하였다. Trizol method로 RNA 분리 후 total RNA 2 μ g, SuperscriptTM First-Strand Synthesis System for RT-PCR(In vitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA)을 사용하여 cDNA를 합성하였다. Table 1의 primer를 사용해 PCR 방법으로 증폭시켰으며, 반응 산물은 2% agarose gel에서 전기영동 후 ethidium bromide로 염색하여 UV lamp에서 확인하였다. Real time RT-PCR은 SmartCycler(Cepheid Co., Sunnyvale, CA, USA)를 사용하여 시행하였다. 20 μ L 반응액 내 합성한 cDNA 1 μ L, 1 \times SYBR Green, 1 \times additive reagent, 3 nM MgCl₂, 0.2 μ M primer, 200 μ M dNTP mix, 0.25 U Platinum Taq DNA polymerase 등을 포함시켰다. PCR 조건은 95°C 15 min(Taq activation), 95°C-5 sec, 65°C-10 sec, 72°C-15 sec(denaturation-annealing-extension-fluorescence measurement)로 구성된 4-step cycle을 설정하여 총 45주기를 시행하였다.

통계처리

본 실험결과는 최소한 3회 이상의 실험을 거쳐 평균±표준편차로 표시하였다. 자료 분석은 SPSS(14.0.1 for Windows) program을 이용하여 통계분석을 시행하였다. 유의적 차이를 확인하기 위해 two-way ANOVA를 시행하였고, 군별 차이는 Duncan의 다중검증법을 이용하여 시료 간 유의적 차이를 검증하였다.

결 과

머위 및 여주 추출물이 조골세포 증식에 미치는 효과

머위 및 여주 추출물이 조골세포의 증식률에 미치는 영향을 MTT assay로 분석한 결과는 다음과 같다(Fig. 1). 머위 추출물을 처리한 세포의 경우 1~10 μ g/mL 농도에서 100% 이상의 증식률을 보였으며, 특히 10 μ g/mL에서 114%의 높은 증식률을 보였다. 반면 고농도(100~1,000 μ g/mL) 시료 처리 시 대조군에 비해 세포 증식률이 유의적으로 감소하는 시료의 세포독성 효과를 나타내 보였으며(p<0.05), 특히 1,000 μ g/mL 농도에서 20% 이하의 증식률을 나타내었다.

Table 1. Oligonucleotide primer for RT-PCR

Gene	Fragment size (bp)	Oligonucleotides
β -Actin	216	Forward: 5'-GACGGCCAGGTCATCACTAT-3' Reverse: 5'-CTTCTGCATCCTGTCAGCA-3'
ALP	393	Forward: 5'-CTTGCTGGTGAAGGAGGCAGG-3' Reverse: 5'-CACGTCTTCTCCACCGTGGGTC-3'
Osteocalcin	237	Forward: 5'-GCGCTCTGTCTCTCTGACCT-3' Reverse: 5'-TTTGTAGGCGGTCTTCAAGC-3'
RANKL	291	Forward: 5'-ATTTGCACACCTCACCATCA-3' Reverse: 5'-GTGCTCCCTCCTTTTCATCAG-3'
OPG	240	Forward: 5'-TGTGTATTGCAGCCCAGTGT-3' Reverse: 5'-CAGGGTGCTTTCGATGAAGT-3'

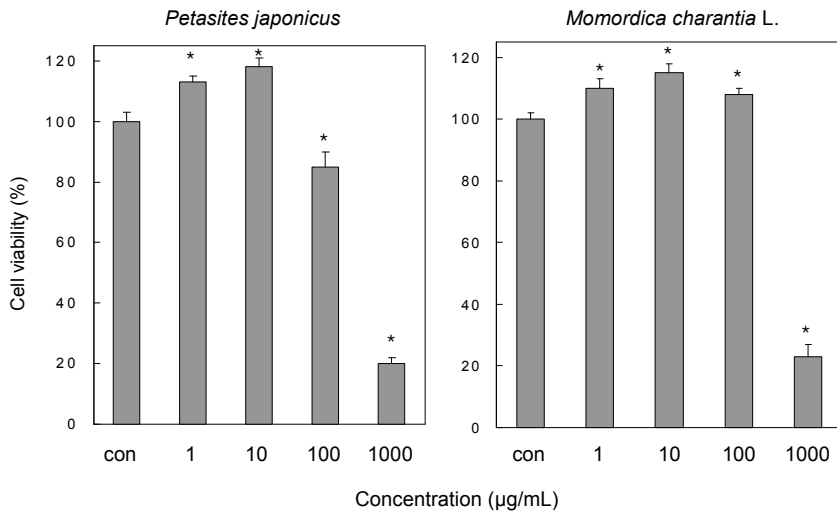


Fig. 1. Cell proliferation effects of *Petasites japonicus* and *Momordica charantia* extracts on MC3T3-E1 cell line by MTT assay. MC3T3-E1 cells were cultured with vehicles or various concentrations of each extract on these cells for 24 hrs. Data are mean \pm SD of 4 wells ($p < 0.05$).

여주 추출물 역시 머위 추출물과 비슷한 효과를 나타내었다. 각 농도별 세포 증식률은 대조군과 비교하여 1 $\mu\text{g/mL}$ 에서는 108%, 10 $\mu\text{g/mL}$ 에서는 112%, 100 $\mu\text{g/mL}$ 에서 108%의 증식률을 나타내었고 그 이상의 농도에서는 세포 독성 효과를 보였다. 따라서 조골세포의 증식을 저해하지 않는 머위 및 여주 추출물의 최적 작용 농도를 10 $\mu\text{g/mL}$ 로 결정하여 다음 실험을 진행하였다.

ALP 활성도 분석

머위 및 여주 추출물을 각각 처리한 MC3T3-E1 조골세포를 3일, 7일, 14일 및 21일 동안 배양한 후 ALP 활성을 조사한 결과는 Fig. 2에 제시하였다. 대조군의 ALP 활성은 배양 3일 기준으로 시간이 경과함에 따라 점차 증가하여 배양 14일째의 효소 활성은 최고에 도달하였고 그 이후 감소하였다. 머위 추출물 처리 시 배양 3일째 대조군과 비교하여 ALP 활성이 높게 나타났으며 배양 7일째에 ALP 활성이 최고에 도달하고 그 이후에 감소하는 대조군과 비슷한 경향을 보였다. 반면, 여주 추출물 처리군의 ALP 활성은 배양 3일째 대조군에 비해 높게 나타났지만 3일 이후 효소 활성이 계속적으로 감소함을 알 수 있었다.

Alizarin red 염색법에 의한 석회화 형성도 분석

MC3T3-E1 조골세포를 3일, 14일 및 21일 배양한 후 bone nodule 형성 수준을 관찰한 결과, 배양 시간이 경과함에 따라 증가되는 것을 확인할 수 있었다. Alizarin red 염색 결과 대조군의 경우, 3일간의 배양으로는 bone nodule의 형성을 확인할 수 없었으나, 배양 14일 경과 후부터 적은 양이지만 bone nodule 형성된 것을 확인할 수 있었고, 이후 bone nodule 형성이 증가됨을 확인할 수 있었다(Fig. 3). 이러한 경향은 머위 및 여주 추출물에서도 뚜렷이 나타났으며, 대조군과 마찬가지로 배양시간이 경과함에 따라 염색정도가 진해짐을 알 수 있었다. 특히, 머위 추출물 처리 시 대조군에 비해 염색정도가 뚜렷하게 증가하였고, 여주 추출물을 처리

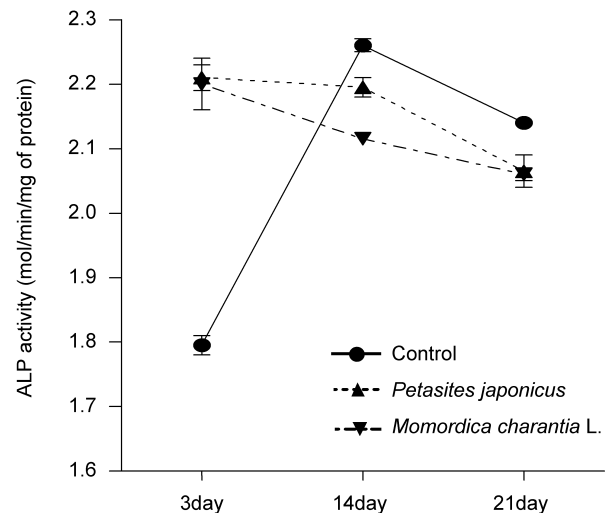


Fig. 2. Effect of *Petasites japonicus* and *Momordica charantia* extracts on the alkaline phosphatase (ALP) activities of MC3T3-E1 cell during differentiation.

한 세포의 경우 14일 및 21일째 bone nodule 형성이 대조군보다 적게 형성되었다.

RT-PCR을 이용한 ALP, osteocalcin, OPG 및 RANKL 유전자 발현 분석

8일간의 치료처리 후 세포를 수확하여 분리한 RNA를 이용하여 cDNA를 합성하여 RT-PCR을 시행하였다. MC3T3-E1 조골세포의 분화인자로 알려진 ALP 및 osteocalcin mRNA의 발현정도를 PCR로 확인하였다(Fig. 4A). 대조군에 비해 머위 추출물 처리 시 ALP 발현도가 높아짐을 확인할 수 있었고, 여주 추출물을 처리한 경우에는 거의 변화가 없었다. Osteocalcin mRNA의 경우, 머위 및 여주 추출물을 처리 시 발현이 나타났지만 대조군과의 차이는 보이지 않았다.

MC3T3-E1세포의 OPG와 RANKL mRNA에 대한 RT-PCR 결과, OPG mRNA는 머위 추출물 10 $\mu\text{g/mL}$ 농도로

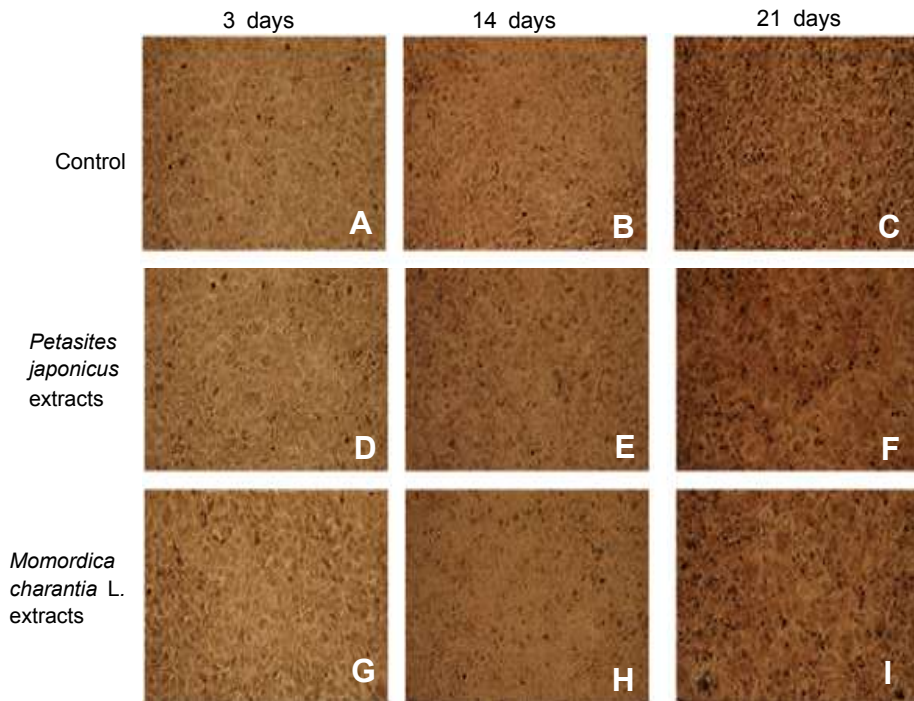


Fig. 3 Alizarin red staining results of MC3T3-E1 cells treated with *Petasites japonicus* and *Momordica charantia* L. extracts, respectively ($\times 100$). A, B, C: control group. D, E, F: experimental group treated with *Petasites japonicus* extract. G, H, I: experimental group treated with *Momordica charantia* L. extract. Cells were cultured in osteogenic media after 3, 14, and 21 days, respectively.

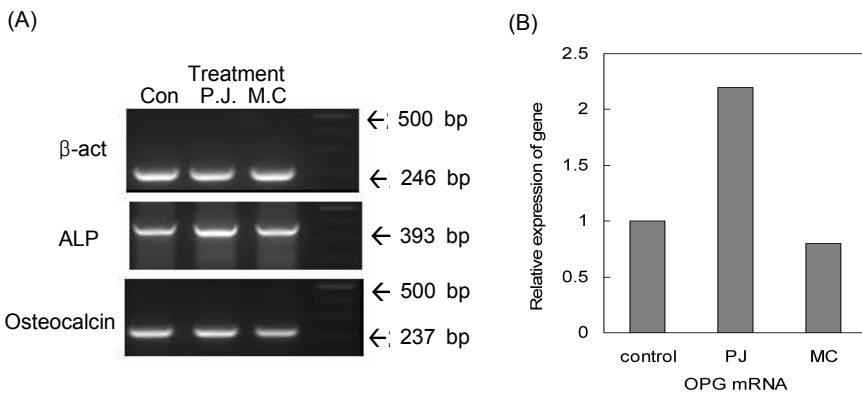


Fig. 4. Expression of alkaline phosphatase (ALP), osteocalcin and OPG genes. (A) RT-PCR analysis of the mRNA expression for ALP and osteocalcin in MC3T3-E1 cells. (B) Real-time RT-PCR analysis of the mRNA expression for OPG in MC3T3-E1 cells. MC3T3-E1 cell were treated with *Petasites japonicus* and *Momordica charantia* extracts for 8 days. The results were normalized with β -act mRNA. The expression of RANKL mRNA was not significant.

처리한 군의 경우, 발현 정도가 대조군에 비해 2.1배 증가한 반면 여주 추출물 처리군은 0.85로 감소하였다(Fig. 4B). RANKL mRNA의 발현 정도는 대조군, 머위 및 여주 추출물 처리군 간의 차이가 관찰되지 않았다.

고찰

현재 골다공증의 예방 및 치료에 사용되고 있는 치료제는 대부분 골 흡수 억제 기전과 관련되므로 손상된 골 조직을 완전히 회복시킬 수 없고, 호르몬 요법인 에스트로겐 요법은 폐경기 여성의 골다공증 치료에 효과적이지만 여러 가지 부작용과 특정 환자에 대한 제한성으로 인해 적용에 있어 불편함이 있다(24). 이에 최소의 골 손실과 최대의 골 형성을 촉진할 뿐만 아니라 에스트로겐 투여에 의한 위험성을 최소화하기 위해 상대적으로 부작용이 적은 천연물의 활성 성분에 대한 연구가 다각도로 진행되고 있다.

노화뿐만 아니라 대부분의 퇴행성 질환의 발병과정에서 활성산소가 생성되고 이로 인한 산화적 스트레스가 질병의 직접 또는 간접적인 위험인자로 보고되고 있으며, 노화에 따른 골다공증의 경우 역시 세포의 산화적 손상과 연관되어 있다. 활성산소의 수준이 증가할 경우, 조골세포의 활성화에 관여하는 fibronectin이 손상을 입게 되어 조골세포의 증식, 분화 및 석회화 과정이 저해되므로 전체적인 골 형성에 부정적인 영향을 초래한다(25). 뿐만 아니라, 활성산소는 NF- κ B 연관 신호전달체계를 통하여 파골세포를 활성화시킴으로써 골 흡수를 촉진한다는 결과가 보고된 바 있다(26). 이러한 연구보고는 스크리닝 단계에서 우수한 항산화 활성을 가진 머위와 여주 추출물이 전체적인 골 대사에 긍정적인 영향을 미칠 가능성을 제시해 준다.

골의 생성과정은 기질의 증식, 성숙 및 석회화의 세 단계로 이루어진다(27). 첫 번째 단계인 기질의 증식은 MTT assay로 분석하였다. 머위 및 여주 추출물 처리 시 1~10 μ g/

mL 수준에서 100% 이상의 조골세포 증식을 보였으며, 특히 머위 추출물의 경우 10 µg/mL 수준에서 114%의 높은 증식을 나타내었다. 반면 두 추출물 모두 100 µg/mL 이상의 농도에서는 시료의 독성효과로 인한 세포 증식 저해를 나타내었다. 따라서 조골세포의 증식을 저해하지 않는 추출물의 최적 작용 농도를 10 µg/mL로 결정하였다.

기질의 성숙단계는 ALP, osteopontin, osteonectin 등의 골 분화 표지자로 확인할 수 있으며, 본 연구에서는 조골세포의 표지 효소로 보고된 ALP의 활성을 분석하여 머위 및 여주 추출물의 조골세포의 활성화에 대한 효과를 분석하였다. ALP는 세포막에 위치하는 효소로서 거의 대부분의 조직에 존재하고 특히 조골세포 분화과정에 관여하며, 이 효소의 상대적인 활성도에 따라 조골세포의 분화단계를 확인할 수 있다(28). 즉, 골 조직에 존재하는 ALP의 경우 골 성장이 활발히 진행될 때 이 효소의 활성 역시 증가한다. 머위 추출물 투여군의 ALP 활성은 배양 개시 3일째 대조군과 비교하여 높은 활성을 보였으며, 배양 7일째 ALP 활성이 최고로 유도되는 것을 확인하였고 이후 점차 감소하는 경향을 나타내었다. 반면, 여주 추출물 투여군은 3일째 대조군에 비해 높은 ALP 활성을 보였으나 이후 효소의 활성이 계속적으로 감소하였다. ALP 활성이 시간 경과에 따라 감소하는 것은 osteocalcin이 발현되거나 bone nodule이 형성되기 때문이며 이들이 형성되기 전 ALP 활성은 최고조에 달하게 된다(29). 배양 3일째의 머위 및 여주 추출물 투여군의 경우, 대조군에 비해 높은 ALP 활성을 나타내었으며, 이는 각각의 추출물이 조골세포의 증식과 기질의 성숙에 영향을 준다는 것을 의미한다. 배양 3일 이후 시간이 경과할수록 ALP 활성이 감소한 여주 추출물 투여군의 결과를 미루어 볼 때 여주 추출물은 조골세포의 증식률에는 영향을 주지만 골 형성에 영향을 주지 않는 것으로 판단된다.

골조직의 생성과정 중 마지막 단계는 원시 세포가 골화되는 석회화단계이다. Bone nodule은 조골세포의 분화에 중요한 표지인자로서 칼슘에 특이적으로 흡착력이 높은 alizarin을 이용하여 확인할 수 있다(30). 이 식물성 염료는 석회화된 세포의 세포외기질에 염색되므로 석회화 정도가 진행될수록 진하게 염색되는 것을 알 수 있다(31). MC3T3-E1 조골세포는 배양기간에 비례하여 bone nodule 형성이 증가하였다. 배양 14일째 머위 추출액을 투여한 처리군의 경우 대조군에 비해서 염색의 정도가 증가하였으며, 21일째에는 염색된 영역이 확대되었고, 시간이 지날수록 짙은 염색이 나타난 것으로 미루어 볼 때 머위 추출물이 MC3T3-E1 조골세포의 증식 유도 및 ALP 활성 증가뿐만 아니라 조골세포의 분화와 석회화에 관여하는 것을 확인할 수 있었다. 반면, 여주 추출물을 투여한 처리군은 14일과 21일째 bone nodule 형성이 대조군보다 적은 것을 확인하였으며, 여주 추출물은 조골세포의 세포외기질화에 긍정적인 효과를 나타내지 못한 것으로 확인하였다.

조골세포의 분화와 기질 석회화 형성능의 재확인을 위해 RNA를 분리하여 RT-PCR을 이용하여 골기질에 관련된 유전자의 발현 변화를 조사하였다. 조골세포 석회화의 유도에 관여하는 ALP mRNA는 대조군에 비해 머위 추출물 투여군에서 높게 발현되었고, 여주 추출물 투여군의 경우 변화가 없었다. 골 기질 내에 있는 비콜라겐성 단백질로서 골세포에 의해 주로 생산되는 osteocalcin mRNA의 경우 대조군, 머위 및 여주 추출물에서 유전자의 발현을 확인하였으나 유의적인 차이를 나타내지는 않았다. 골 형성 및 흡수기전으로 조골세포에서 분비되어 파골세포의 활성화에 영향을 미치는 OPG와 RANKL mRNA 발현의 변화는 real time-PCR를 사용하여 정량화 하였다. RANKL은 파골세포 전구체에 위치하는 RANK와 결합하여 RANKL-RANK 복합체를 형성함으로써 파골세포의 활성화 및 분화를 촉진한다(20). OPG는 이러한 RANKL에 부착하여 RANKL-RANK 결합체 형성을 저해함으로써 파골세포의 분화를 방해한다(32). OPG가 증가할 경우 파골전구세포에서 파골세포로의 분화가 방해되고 파골세포의 세포사가 증가하게 되어 골흡수가 억제되므로 조골세포에 의한 골형성이 우세하게 나타난다(33). Real time-PCR 결과, OPG mRNA는 머위 추출물을 10 µg/mL 농도로 처리한 경우 그 발현 정도가 대조군에 비해 2.1배 증가하였다. 반면, 여주 추출물 처리군의 발현 정도는 대조군에 비해 0.85배로 감소하였고 RANKL mRNA의 발현 정도는 대조군과 머위 및 여주 추출물 간 차이를 보이지 않았다. Kawamoto 등(34)은 면역조직화학적 방법을 통해 모든 분석된 조직에서 RANKL과 OPG는 함께 위치한다는 것을 밝혔고, 이러한 RANKL/OPG 발현도의 차이, 즉 OPG의 높은 발현율은 RANKL에 의해 증가된 골 흡수를 보상하기 위한 보호적인 메커니즘으로 보고한 바 있다. 따라서 파골세포의 분화에 RANKL의 발현차이는 나타나지 않았지만, 머위 추출물을 투여한 조골세포에서 RANKL의 활성을 역으로 조절하는 OPG의 발현도가 대조군에 비해 2.1배 증가한 결과는 머위 추출물이 골 형성을 증가시키는 주요 매개 물질로서의 가능성을 보여준다고 사료된다.

요 약

본 연구를 통하여 여주 추출물은 세포 증식을 제외하고는 조골세포에 긍정적인 영향을 미치지 못하였지만 머위 추출물은 세포의 증식, ALP 활성, bone nodule의 형성이 대조군과 비슷한 결과를 나타내거나 높은 경향을 나타냄으로써 조골세포의 골 형성 과정인 증식, 기질의 성숙, 기질의 석회화의 세 단계에서 유효성을 증명하였다. 또한 OPG mRNA의 2배 이상의 증가는 조골세포의 골 형성에 주요 매개 물질로서 가능성이 있음을 밝혔다. 따라서 머위 추출물은 골수의 미세 환경에서 세포의 조절작용을 하는 물질로 여겨지며, 골다공증을 포함한 각종 골 결손 질환의 예방과 치료약 개발

에 긍정적인 가능성을 제시할 것이라 사료된다.

감사의 글

본 연구는 2007년 동아대학교 신입교원 연구과제에 의해 지원되었음을 감사드립니다.

문헌

- Lee YS. 2001. Effect of isoflavones on proliferation and oxidative stress of MC3T3-E1 osteoblast-like cells. *Korea Soybean Digest* 18: 35-42.
- Wasnich R. 1996. What is an osteoporotic fracture. In *Osteoporosis: Diagnostic and Therapeutic Principles*. Rosen CJ, ed. Humana Press, NJ, USA. p 79-88.
- Teitelbaum SL, Ross FP. 2003. Genetic regulation of osteoclasts development and function. *Nat Rev Genet* 4: 638-649.
- Suda T, Takagashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT. 1999. Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev* 20: 345-357.
- Duda RJ, O'Brien JF, Katzmann JA. 1988. Concurrent assays of circulating bone-gla protein and alkaline phosphatase: effects of sex, age, and metabolic bone disease. *J Clin Endocr Meta* 66: 951-957.
- Pacifici R. 1996. Estrogen, cytokines and pathogenesis of postmenopausal osteoporosis. *J Bone Mine Res* 11: 1043-1051.
- Datta HK, Rathod H, McNeil CJ. 1996. Parathyroid hormone induces superoxide anion burst in the osteoclast by the hormone. *Endocrinology* 149: 269-275.
- Anderson JJ, Graner SC. 1998. Phytoestrogen and bone. *Bailliere Clin Endoc* 12: 543-557.
- Kim MR, Yang CH, Seo BI. 1998. Effects of safflower seeds on bone mineral density in ovariectomy-induced postmenopausal osteoporotic rats. *Korean J Herbo* 13: 37-43.
- Setchell KDR, Cassidy A. 1999. Dietary isoflavones: biological effects and relevance to human health. *J Nutr* 129: 758S-767S.
- Lee HK. 1998. Effect of black bean and samryungbackchulsan on ovariectomy-induced postmenopausal osteoporotic rats. *PhD Dissertation*. Kyung Hee University, Seoul, Korea.
- Ha H, Kwak HB, Lee SW, Jin HM, Kim HM, Kim HH, Lee ZH. 2004. Reactive oxygen species mediate RANK signaling in osteoclasts. *Exp Cell Res* 301: 119-127.
- Reddy SV. 2004. Regulatory mechanisms operative in osteoclasts. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 14: 255-270.
- Choi OB. 2002. Anti-allergic effects of *Petasites japonicus*. *Korean J Food Nutr* 15: 382-385.
- Park JY. 2007. The effect of *Petasites japonicus* extract on hepatotoxicity in rats. *Kor J Env Hlth* 33: 202-206.
- Jee YH, Lee CS. 1996. Pathological changes on rats and mice fed with *Petasites japonicus* Maxim. *Korean J Vet Res* 36: 417-428.
- Oh SH, Yang YH, Kwon OY, Kim MR. 2006. Effects of diet with added butterbur (*Petasites japonicus* Maxim) of the plasma lipid profiles and antioxidant index of mice. *J East Asian Soc Dietary Life* 16: 399-407.
- Park Y, Park YL, Cho DH, Lee HH. 2007. Antioxidant activity of *Momordica charantia* L. extracts. *Korean J Medicinal Crop Sci* 15: 56-61.
- Grover JK, Yadav SP. 2000. Pharmacological actions and potential uses of *Momordica charantia*: a review. *J Ethnopharmacol* 93: 123-132.
- Yasuda H, Shima N, Nakagawa N. 1998. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis is a ligand for osteoprotegerin-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci* 95: 3597-3602.
- Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, Lacey DL, Boyle WJ, Riggs BL. 2000. The roles of osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. *J Bone Miner Res* 15: 2-12.
- Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT, Martin TJ. 1999. Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocrine Rev* 20: 345-357.
- Cho SH. 1995. The electron microscopic observation of the effects of estrogen on the osteoblast-like cell differentiation. *Korean Soc Menopause* 1: 28-34.
- Lee J, Lee I. 2004. Effect of *Rubus coreanus* M. extract on the activity and differentiation of MC3T3-E1 osteoblastic cell. *J Life Sci* 14: 967-974.
- Suzuki H, Hayakawa M, Kobayashi K, Takiguchi H, Abiko Y. 1997. H₂O₂-derived free radicals treated fibronectin substratum reduced the bone nodule formation of rat calvarial osteoblast. *Mech Aging Dev* 98: 113-125.
- Hall TJ, Schaeublin M, Jeker H, Fuller K, Chambers TJ. 1995. The role of reactive oxygen intermediates in osteoclastic bone resorption. *Biochem Biophys Res Commun* 207: 280-287.
- Pittenger JJ, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284: 143-147.
- Lee C, Jang Y, Park J, Yoon S. 2007. Antioxidant and cell proliferation effects of *Acanthopanax senticosus* extract in human osteoblast-like MG-63 cell line. *Korean J Food Sci Technol* 39: 694-700.
- Jang H, Eom H, Roh S, Yun I. 2005. Effect of extracts from safflower seeds on osteoblastic differentiation and intracellular free calcium concentration in MC3T3-E1 cells. *Korean J Physiol Pharmacol* 9: 55-62.
- Matsunuma M, Kawane T, Horiuchi N. 2001. Simvastatin promotes osteoblast differentiation and mineralization in MC3T3-ET1 cell. *Biochem Biophys Res Comm* 208: 874-877.
- Schiller PC, D'ipplito G, Balkan W, Roos BA, Howard GA. 2001. Gap-junctional communication is required for the maturation process of osteoblastic cell in culture. *Bone* 28: 362-369.
- Oh SI, Kim GH, Kwak CS, Lee MS. 2001. Effect of melatonin on the antioxidative enzyme activities in type 1 osteoporosis. *Korea J Gerontol* 11: 29-35.
- Ha WH, Hwang DS. 2007. Identification of receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) in ameloblastoma. *Oral Maxillofac J Kor Surg* 33: 94-102.
- Kawamoto S, Ejiri S, Hoshi K. 2002. Immunolocalization of osteoclast differentiation factor in rat periodontium. *Arch Oral Biol* 47: 55-58.

(2009년 10월 20일 접수; 2009년 10월 23일 채택)