

## 사철쑥(*Artemisia capillaris* T.) 추출물의 항산화 활성 및 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 산화적 스트레스를 유도한 조골세포의 활성과 분화에 미치는 영향

서지은<sup>1</sup> · 황은선<sup>2</sup> · 김건희<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>덕성여자대학교 식품영양학과

<sup>2</sup>한경대학교 영양조리학과

### Antioxidative and Differentiation Effects of *Artemisia capillaris* T. Extract on Hydrogen Peroxide-induced Oxidative Damage of MC3T3-E1 Osteoblast Cells

Jeeun Seo<sup>1</sup>, Eun-Sun Hwang<sup>2</sup>, and Gun-Hee Kim<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Food and Nutrition, Duksung Women's University, Seoul 132-714, Korea

<sup>2</sup>Dept. of Nutrition and Culinary Science, Hankyong National University, Gyeonggi-do 456-749, Korea

#### Abstract

In this study, the antioxidative activity of *Artemisia capillaris* T. extract on the proliferation and differentiation of MC3T3-E1 cells under H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress was investigated in order to determine its protective effect against oxidative stress as well as its availability as an antioxidant material related to treatment of bone diseases. As a result, the total polyphenol content of *A. capillaris* extract was 90.10 mg/g, whereas the flavonoid content was 4.45 mg/g. *A. capillaris* extract increased proliferation of MC3T3-E1 cells under H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress, and also increased the proliferation of differentiated osteoblast cells under oxidative stress. In addition, two differentiation markers, alkaline phosphatase activity and mineralization level, in *A. capillaris* extract tended to increase. These results indicate that *A. capillaris* extract suppresses the damage to osteoblasts caused by oxidative stress, which demonstrates its availability as an antioxidant material for preventing bone diseases.

**Key words:** osteoblast, MC3T3-E1 cell, *Artemisia capillaris* T., reactive oxygen species, antioxidant, differentiation

#### 서 론

현대사회는 의학 및 과학의 발달에 따라 평균수명이 연장되고 이로 인해 노인성 질환자의 수가 급격하게 증가하고 있다. 특히, 골다공증을 비롯한 퇴행성관절염과 골 질환 환자의 수가 증가하고 있는 추세이다. 골 질환 환자들의 병적 원인은 다양하며 치료하는데 많은 비용과 노력이 요구된다. 이에 대한 사람들의 부담이 날로 증가함에 따라 치료 보조제 및 1차 예방을 할 수 있는 건강 기능성식품 개발이 요구되고 있다.

활성산소(reactive oxygen species; ROS)는 산소의 환원 대사물로서 미토콘드리아나 peroxisome 등의 정상세포 내 대사과정이나 세포질 내 효소들의 작용으로 내부로부터 형성되거나 다양한 외부 요소에 의해 형성되는데, DNA와 단백질 및 지방의 심한 손상을 일으켜 세포의 손상을 가져온다. 세포들은 ROS의 생성 및 축적에 대처하기 위한 항산화 시스템을 가지고 있으나, ROS의 발생이 세포내 항산화능력을 초과하는 경우 산화스트레스에 노출된다. 산화스트레스

는 뇌질환, 심장질환, 동맥경화, 당뇨병, 폐섬유증, 암, 관절염 및 치매 등의 여러 질환과 노화의 중요 병인으로 알려져 있다(1,2).

최근 들어 특히 활성산소로 인한 산화스트레스와 골다공증의 연관성에 대한 관심이 고조되고 있다. Basua 등(3)의 임상연구에 따르면 55세 이상의 남성과 여성들의 산화적 스트레스가 증가함에 따라 골밀도가 감소한다는 연구 결과가 발표되었고, 항산화제인 vitamin C를 섭취한 폐경기 여성의 골밀도가 증가되었다는 연구가 보고되고 있다(4). 또한 활성산소는 조골세포의 대사를 저해하고 파골세포의 활성도를 증가시켰으며(5,6), 과산화수소로 인한 세포내 산화스트레스의 증가는 전구조골세포주인 MC3T3-E1 세포와 골수기 질세포주인 M2-10B4세포의 조골세포로의 분화를 저해하는 것으로 나타났다(7,8).

사철쑥은 우리나라 냇가나 강가의 모래땅에서 자생하는 국화과에 속하는 다년생 초본이다. 겨울철에도 죽지 않고 이듬해 줄기에서 다시 싹이 나온다 하여 사철쑥 또는 애당쑥이라 불리며, 생약명으로는 인진, 인진호 또는 추호라 불린

\*Corresponding author. E-mail: ghkim@duksung.ac.kr  
Phone: 82-2-901-8496, Fax: 82-2-901-8661

다(9), 사철쭉은 다양한 flavonoids 물질을 가지고 있으며 (10), 항산화 활성(11) 및 소염진통 효과(12), 염증반응 조절 및 superoxide 생성 억제(13), 항암 효과(14) 등이 보고되었다. 본 연구에서는 사철쭉의 항산화 효과 및 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 유도한 산화적 스트레스 상황에서 조골세포의 전구세포인 MC3T3-E1 세포의 증식 및 분화에 미치는 영향을 분석하여 산화적 스트레스에 대한 사철쭉 추출물의 보호효과 및 골 질량 예방 관련 식품소재로서의 이용 가능성을 알아보고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

건조된 사철쭉 시료무게의 10배량(w/v)의 70% methanol 을 첨가하여 100°C에서 6시간 동안 환류추출 하였다. 추출액은 여과지(ADVANTEC, 2호)로 여과하여 감압농축기(EYELA, Tokyo Rikakikai Co., Ltd, Japan)로 농축 후 동결 건조(Bondiro freeze, Ilshin Lab Co., Ltd., Kyunggi-do, Korea)하였고, 이를 DMSO에 100 mg/mL로 녹여 여과하여 실험에 사용하였다.

### 폴리페놀 함량

총 폴리페놀 함량은 페놀성 물질이 phosphomolybdic acid 와 반응하여 청색으로 발색되는 원리를 이용한 Folin-Denis 방법(15)에 따라 분석하였다. 1 mg/mL로 제조한 추출물 0.5 mL에 Folin 시액 0.5 mL을 혼합한 뒤 3분간 실온에서 반응시킨 후 2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1.5 mL을 첨가한 뒤 2시간 동안 암소에서 반응시킨 뒤 760 nm에서 microplate reader(Spectra MAX M2, Molecular Device, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도는 gallic acid(6.25~100 µg/mL)를 이용하여 표준곡선을 작성하여 총 폴리페놀 함량(mg/g)을 계산하였다.

### 플라보노이드 함량

1 mg/mL로 제조한 추출물 1 mL에 2% aluminium chloride methanolic solution 1 mL을 혼합한 뒤 15분간 실온에서 반응시킨 후 430 nm에서 microplate reader를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 총 플라보노이드 함량(mg/g)은 quercetin (6.25~100 µg/mL)을 이용하여 표준곡선을 작성하여 계산하였다.

### DPPH radical 소거활성 측정

전자공여능은 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH)을 이용한 방법으로 측정하였다. 농도별로 제조한 추출물 100 µL에 0.2 mM DPPH 100 µL를 혼합하여 30분간 실온에 방치하고 515 nm에서 microplate reader를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 소거능을 비교하기 위한 양성대조군은 ascorbic acid를 사용하였다. 시료를 첨가하지 않은 대조군 대비 자유 라디칼 소거활성은 백분율로 나타내고 50% inhibition concentration(IC<sub>50</sub>)을 구하였다.

### ABTS radical 소거활성 측정

ABTS[2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt] radical 소거활성은 ABTS radical cation decolorization assay를 이용하여 측정하였다. 7.4 mM의 ABTS와 2.6 mM potassium persulfate를 혼합하여 실온, 암소에서 24시간 동안 방치하여 radical을 형성시킨 다음 ABTS 용액을 732 nm에서 흡광도가 0.70±0.03이 되도록 phosphate-buffered saline(pH 7.4)으로 희석하여 사용하였다. 농도별 추출물 50 µL에 ABTS 용액 950 µL를 첨가하여 암소에서 10분간 반응시킨 후 732 nm에서 microplate reader를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 소거능을 비교하기 위한 양성대조군은 ascorbic acid를 사용하였다.

### 조골세포의 배양

본 연구에 사용한 MC3T3-E1 세포는 mouse calvaria 아래의 조골세포로서 ATCC CRL-2593(American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)을 구입하였다. MC3T3-E1 세포는 10% FBS와 1% 항생제(100 U/mL penicillin-100 µg/mL streptomycin)를 함유한 α-MEM 배지에 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건인 incubator에서 배양하였으며 세포밀도가 90%로 포화되었을 때 계대배양 하면서 실험에 사용하였다. 분화 유도를 위해 10 mM β-glycerol phosphate와 50 µg/mL ascorbic acid를 첨가하여 분화 유도 배지로 사용하였으며, 2~3일 간격으로 배지를 교환해 주었다.

### 조골세포의 생존률 및 분화 시 생존률 측정

조골세포의 성장 정도와 분화 시 성장속도는 Green 등(16)의 방법에 따라 MTT시약을 사용하여 MTT tetrazolium이 자주색 불용성 formazan으로 환원되는 정도를 570 nm에서 측정함으로써 살아있는 세포의 생존율을 구하는 MTT assay로 측정하였다(2). 48-well plate에 1×10<sup>4</sup>/well로 세포를 분주하여 1일간 배양하였고, 분화 시 생존율은 10 mM β-glycerol phosphate와 50 µg/mL ascorbic acid를 함유한 α-MEM배지로 교환하여 2일마다 배지를 갈아주며 10일 동안 분화를 유도하였다. 0.3% BSA와 1% 항생제(100 U/mL penicillin-100 µg/mL streptomycin)를 함유한 α-MEM 배지에 사철쭉 추출물을 0, 25, 50, 100, 200 µg/mL의 농도로 첨가하여 처리하였다. 1시간 뒤 0.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리한 후 48시간 배양하였다. 배양 후 5 mg/mL 농도의 MTT 시약을 각 well에 20 µg/mL씩 첨가한 뒤 incubator에서 2시간 반응시켰다. 배지를 제거하고 DMSO를 200 µL를 첨가하여 불용성의 formazan 결정을 용해시켜 570 nm에서 microplate reader를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

### Alkaline phosphatase(ALP) 활성 측정

MC3T3-E1 세포를 24-well plate에 1×10<sup>4</sup>/well로 분주한 후 세포가 90% 포화되게 자라던 10 mM β-glycerol phosphate와 50 µg/mL ascorbic acid를 함유한 α-MEM배

지로 교환하여 2일마다 배지를 갈아주며 분화를 유도하였다. 분화 유도 10일 후 0, 25, 50, 100, 200 µg/mL의 농도로 사철쭉 추출물을 첨가하고 1시간 뒤 1.25 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리하고 48시간 배양하였다. 배양한 세포는 DPBS로 세척한 후 0.2% Triton X-100을 첨가해 30분간 세포를 용해시킨 뒤 25,000 rpm에서 10분간 원심분리 하여 상등액을 취하고 SensoLyte ALP kit(Asan Pharm, Seoul, Korea)를 사용하여 ALP 활성을 측정하였다. 단백질량은 상등액 중 5 µL를 96-well plate에 넣은 후 Bradford법으로 단백질을 정량하였다.

#### 골의 석회화 측정

48-well plate에 MC3T3-E1 세포를  $1 \times 10^4$  cell/well 농도로 분주한 후 세포가 90% 포화되면 10 mM β-glycerol phosphate와 50 µg/mL ascorbic acid를 함유한 배지로 교환하여 2일마다 배지를 갈아주며 분화를 유도하고, 15일 후 0, 25, 50, 100, 200 µg/mL의 농도로 사철쭉 추출물을 첨가 후 1시간 뒤 1.25 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리한 뒤 48시간 배양하였다. 48시간 후 배지를 제거하고 DPBS로 세척한 뒤, 70% EtOH로 실온에서 1시간 동안 고정시켰다. 세포를 고정시킨 후 40 mM alizarin red(AR) solution으로 10분간 염색하고 3차 증류수로 세척한 뒤 15분간 10% cetylpyridinium chloride를 첨가하여 염색된 정도를 561 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군에 대한 백분율로 석회화 정도를 나타내었다.

#### 통계처리

실험 결과는 SPSS 18.0(Statistical Package for the Social Sciences, Spss Inc., Chicago, IL, USA) 프로그램을 이용하여 ANOVA(analysis of variance) test를 하였으며 시료간의 유의성을 Duncan's multiple range test을 이용하여 p<0.01과 p<0.05 유의수준에서 분석하였다.

## 결과 및 고찰

#### 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량 및 항산화 활성

사철쭉 추출물의 총 페놀 함량은  $90.19 \pm 2.03$  mg/g으로 나타났고 총 플라보노이드 함량은  $11.10 \pm 0.38$  mg/g으로 나타났다(Table 1). 이러한 결과는 Lim 등(17)이 약용식물 82종에 대해 총 페놀의 함량을 측정하였을 때 본 실험의 사철

Table 1. Total polyphenol and flavonoid contents of *Artemisia capollaris* T. extract

| Sample                         | Total phenolic contents (mg GAE/g residue) | Total flavonoid contents (mg QE/g residue) |
|--------------------------------|--|--|
| <i>Artemisia capollaris</i> T. | $90.19 \pm 2.03^{1)}$                      | $11.10 \pm 0.38^{2)}$                      |

GAE=gallic acid equivalent, QE=quercetin equivalent.

<sup>1)</sup>Values are means±SD (n=3). As a standard, gallic acid was used.

<sup>2)</sup>Values are means±SD (n=3). As a standard, quercetin was used.

Table 2. DPPH free radical scavenging and ABTS radical cation scavenging activity (IC<sub>50</sub>, µg/mL) of *Artemisia capollaris* T. extract

| Sample                         | DPPH radical scavenging activity | ABTS radical cation scavenging activity |
|--------------------------------|----------------------------------|---|
| Ascorbic acid                  | $13.70 \pm 1.12$                 | $16.80 \pm 0.74$                        |
| <i>Artemisia capollaris</i> T. | $105.80 \pm 4.27$                | $251.48 \pm 14.00$                      |

쭉의 총 페놀 함량과 비슷한 81.49 mg/g의 함량을 나타냈고 이는 약용식물 중 페놀 함량이 높은 수준에 속했다. Heo 등(18)에 따르면 약용식물의 경우 총 페놀 함량이 30 mg/g 이상이면 뛰어난 항산화 활성을 나타낸다 하였고, 이를 토대로 보았을 때 사철쭉은 뛰어난 항산화 활성을 보일 것이라 사료된다.

사철쭉의 메탄올 추출물의 DPPH radical 소거 활성과 ABTS cation radical 소거 활성을 측정한 결과는 Table 2와 같다. DPPH 실험에서 사철쭉이 radical을 50% 소거 활성에 필요한 농도는  $105.80 \pm 4.27$  µg/mL였고 ABTS radical 소거 활성에 필요한 농도는  $251.48 \pm 14.00$  µg/mL이었다.

#### 산화적 스트레스 시 조골세포의 활성에 미치는 영향

사철쭉 추출물이 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 유도한 산화적 스트레스 상태에서 MC3T3-E1 조골세포의 증식률에 미치는 영향을 MTT assay로 측정한 결과는 Fig. 1과 같다. MC3T3-E1 조골세포는 0.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리함으로써 처리하지 않은 군보다 유의적으로 26% 정도로 증식률이 감소하였고 사철쭉 추출물에 의해 25, 50, 100, 200 µg/mL 농도에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리한 대조군에 비해 유의적으로 증식률이 증가하는 경향을 나타내었다. 사철쭉 200 µg/mL 농도일 때 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리하지 않은 세포군 대비 239% 수준으로 증식률이 증가하여 사철쭉 추출물이 산화적 스트레스 상황에 대해 보호효과를 가진다고 볼 수 있다. Yun(2)의 연구에서 0.3 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 유도한 산화

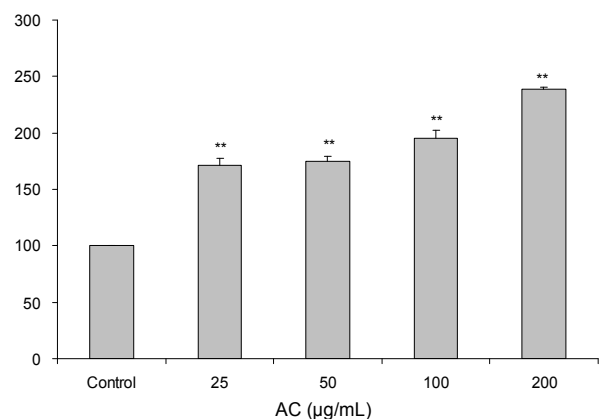


Fig. 1. Effect of *Artemisia capollaris* T. (AC) on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-reduced cell growth in MC3T3-E1 cells. MC3T3-E1 cells were cultured with vehicle or AC in the presence of 0.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 48 hr. Values are mean±SD (n=3). All data are reported as the percentage change in comparison to the vehicle-treated control group. \*\*p<0.01, significantly different from the control group.

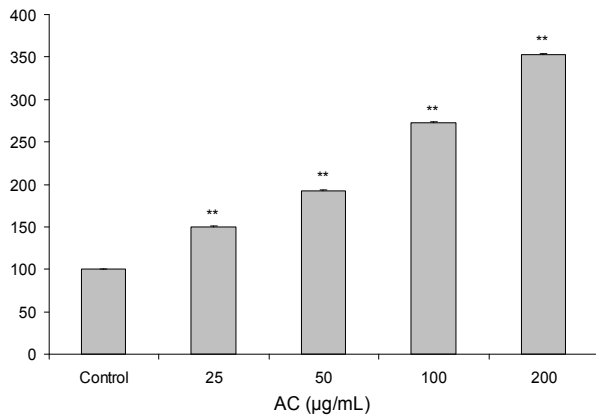


Fig. 2. Effect of *Artemisia capollaris* T. (AC) on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-reduced cell growth in differentiation of MC3T3-E1 cells. MC3T3-E1 cells were cultured with vehicle or AC in the presence of 1.25 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 48 hr. Values are mean±SD (n=3). All data are reported as the percentage change in comparison to the vehicle-treated control group. \*\*p<0.01, significantly different from the control group.

적 스트레스 상황의 MC3T3-E1 세포의 증식률을 100 µg/mL 농도의 감국 추출물이 106%로 증가시켰다고 보고하고 있고 감국추출물과 비교하여 사철쭉 추출물이 더 높은 증식률의 증가를 나타내어 산화적 스트레스에 대한 증식률에 대한 보호효과가 감국추출물에 비해 크다고 볼 수 있다.

산화적 스트레스 시 조골세포의 분화에 미치는 영향

사철쭉 추출물이 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 유도한 산화적 스트레스 상태에서 분화된 MC3T3-E1 조골세포의 증식률에 미치는 영향을 MTT assay로 측정한 결과는 Fig. 2와 같다. 분화된 MC3T3-E1 조골세포는 1.25 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리함으로써 처리하지 않은 군보다 유의적으로 17% 정도 생존률이 감소하였고 감소된 생존률이 사철쭉 추출물에 의해 25, 50, 100, 200 µg/mL 농도에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리한 대조군에 비해 증식률이 유의적으로 증가하였다. 사철쭉은 200 µg/mL 농도일 때 가장 높은 증식률을 나타냈는데 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리하지 않은 세포군 대비 353% 수준으로 회복되어 사철쭉 산화적 스트레스상황의 분화된 조골세포에 대해 보호효과를 가진다고 볼 수 있다.

사철쭉 추출물이 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 유도한 산화적 스트레스 상황에서 MC3T3-E1 조골세포의 분화에 미치는 영향을 보기 위해 분화지표의 하나인 ALP 활성을 측정한 결과는 Fig. 3과 같다. 분화된 MC3T3-E1 조골세포의 ALP 활성은 1.25 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리함으로써 처리하지 않은 군보다 유의적으로 45% 정도 활성이 감소하였고 감소된 활성이 사철쭉 추출물에 의해 25, 50, 100, 200 µg/mL 농도에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리한 대조군에 비해 유의적으로 증가하였다. 사철쭉은 200 µg/mL 농도일 때 가장 높은 활성을 나타냈는데 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리하지 않은 세포군 대비 278% 활성이 증가하였다. 최근 Choi 등(19)은 10 µg/mL의 장출 뿌리 추출물이 산화적 스트레스 상황에서 MC3T3-E1 세포의 ALP 활성을 115% 활성을 증가시켰다고 보고하고 있고 Yun(2)은 0.3 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 유도한 산화

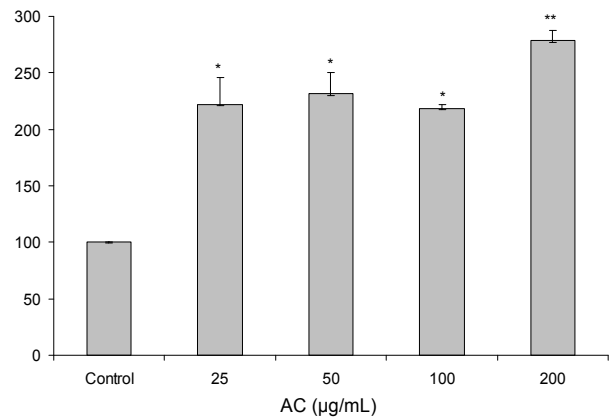


Fig. 3. Effect of *Artemisia capollaris* T. (AC) on the alkaline phosphatase activity of MC3T3-E1 cells in the presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. MC3T3-E1 cells were cultured with vehicle or AC in the presence of 1.25 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 48 hr. Values are mean±SD (n=3). All data are reported as the percentage change in comparison to the vehicle-treated control group. \*p<0.05 or \*\*p<0.01, significantly different from the control group.

적 스트레스 상황의 분화된 MC3T3-E1 세포의 ALP 활성을 200 µg/mL 농도의 감국 추출물이 153% 활성을 증가시켰다고 보고하고 있다. 보고된 창출 뿌리 추출물과 감국추출물과 비교하여 사철쭉이 높은 ALP 활성을 나타내어 산화적 스트레스에 대한 ALP 활성에 대한 보호효과가 더 크다고 볼 수 있다.

사철쭉 추출물이 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 유도한 산화적 스트레스 상태에서 MC3T3-E1 조골세포의 분화에 미치는 영향을 보기 위해 분화지표의 하나인 석회화를 측정한 결과는 Fig. 4와 같다. 분화된 MC3T3-E1 조골세포의 석회화는 1.25 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리함으로써 처리하지 않은 군보다 유의적으로 62% 정도 감소하였다. 사철쭉 200 µg/mL 농도일 때 가장 높은 석회화를 나타냈는데 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리하지 않은 세포군 대비 154%나 증가했다. 사철쭉은 분화 지표인 석회화를 유의적으로 비슷

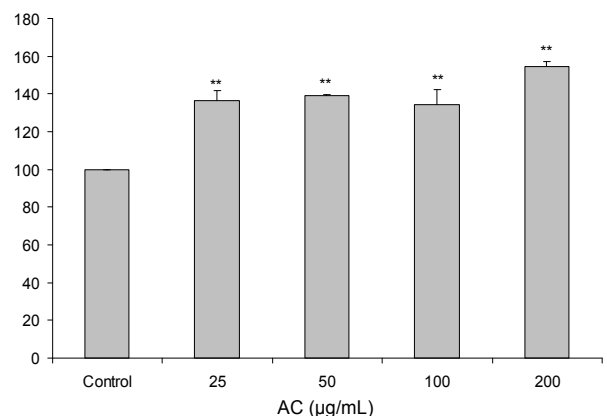


Fig. 4. Effect of *Artemisia capollaris* T. (AC) on the mineralization of MC3T3-E1 cells in the presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. MC3T3-E1 cells were cultured with vehicle or AC in the presence of 1.25 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 48 hr. Values are mean±SD (n=3). All data are reported as the percentage change in comparison to the vehicle-treated control group. \*\*p<0.01, significantly different from the control group.

한 수준으로 증가시켰으며 산화적 스트레스에 대해 보호효과를 가진다고 볼 수 있다.

최근 Choi 등(19)은 10 µg/mL의 창출 뿌리 추출물이 산화적 스트레스 상황의 분화된 MC3T3-E1 세포의 석회화를 과산화수소를 첨가하지 않은 대조군 대비 98% 정도로 회복시켰다고 보고하고 있고 Yun(2)은 0.3 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 유도한 산화적 스트레스 상황의 분화된 MC3T3-E1 세포의 석회화를 200 µg/mL 농도의 감국 추출물이 106%로 증가시켰다고 보고하고 있다. 보고된 창출 뿌리 추출물과 감국추출물과 비교하여 사철쭉 추출물이 더 높은 석회화를 나타내어 산화적 스트레스 상황에서 석회화에 대한 보호효과가 더 크다고 볼 수 있다.

## 요 약

본 연구에서는 사철쭉 추출물의 항산화 효과 및 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 유도한 산화적 스트레스 상황에서 조골세포의 증식 및 분화에 미치는 영향을 분석하여 산화적 스트레스에 대한 사철쭉 추출물의 조골세포 보호효과 및 골 질환 관련 항산화소재로서의 이용가능성에 대해 확인하였다. 항산화 능력을 알아보기 위해 총 페놀 함량, 총 플라보노이드 함량, DPPH radical 소거능, ABTS radical 소거능을 측정하였다. 그 결과 총 페놀 함량 및 총 플라보노이드 함량은 각각 90.19±2.03 mg/g 과 11.10±0.38 mg/g으로 나타났고 DPPH와 ABTS radical 50% 소거 활성의 농도는 105.80±4.27와 251.48±14.00 µg/mL였다. 이를 바탕으로 사철쭉은 항산화 기능을 하는 페놀 및 플라보노이드를 가지고 있으며 항산화 활성이 있으므로 조골세포에서 산화적 스트레스에 대해 보호효과를 가질 것이라 기대되었다. 산화적 스트레스 상황에서 사철쭉 추출물이 조골세포의 증식에 미치는 영향은 MTT assay를 통해 분화에 미치는 영향은 분화 지표인 ALP 활성, 석회화를 측정하여 알아보았다. 그 결과 사철쭉 추출물은 산화적 스트레스로 인해 감소된 세포의 증식률을 유의적으로 증가시켰고 산화적 스트레스 상황의 분화된 세포의 증식률도 유의적으로 증가시켰다. 분화의 지표인 ALP 활성은 모든 농도에서 활성이 유의적으로 증가하였고 석회화 또한 유의적으로 증가하였다. 증식률 및 두 개의 분화지표인 ALP 활성, 석회화 모두 사철쭉 추출물 200 µL 농도일 때 가장 높은 활성을 보였다. 사철쭉 추출물이 항산화 활성이 있고 산화적 스트레스 상황의 조골세포의 증식과 분화를 증가시키는 결과로 미루어 볼 때 사철쭉 추출물의 항산화 활성이 산화적 스트레스 상황의 조골세포를 보호하는 역할을 한다고 볼 수 있다. 이상의 연구결과 사철쭉 추출물은 항산화 작용을 통해 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 유도된 산화적 스트레스 상황에서 조골세포의 증식 및 분화를 촉진하고 손상 및 활성 감소를 억제하여 산화적 스트레스에 대해 보호하는 효과가 있는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과로 보아 산화적 스트레스에 대한 조골세포의 보호효과 및 골 질환 관련 항산화소재로서 사철쭉이 이용가능성이 있다고 사료된다.

## 문 헌

1. Stadtman ER, Berlett BS. 1998. Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. *Drug Meta Rev* 30: 325-243.
2. Yun JH. 2010. Effects of *Chrysanthemum indicum* L. extract in the activity and differentiation of osteoblastic MC3T3-E1 cells. *MS Thesis*. Duksung Women's University, Seoul, Korea.
3. Basua S, Michaëlsson K, Olofsson H, Johansson S, Melhus H. 2001. Association between oxidative stress and bone mineral density. *Biochem Biophys Res Comm* 288: 275-279.
4. Morton DJ, Barrett-Connor EL, Schneider DL. 2001. Vitamin C supplement use and bone mineral density in postmenopausal woman. *J Bone Miner Res* 16: 135-140.
5. Garrett IR, Boyce BF, Oreffo ROC, Bonewald L, Poser J, Mundy GR. 1990. Oxygen-derived free radicals stimulate osteoclastic bone resorption in rodent bone in vitro and in vivo. *J Clin Invest* 85: 632-639.
6. Fraser JHE, Helfrich MH, Wallace HM, Ralston S. 1996. Hydrogen peroxide, but not superoxide, stimulates bone resorption in mouse calvariae. *Bone* 19: 223-226.
7. Mody L, Parhami F, Sarafian TA, Demer LL. 2001. Oxidative stress modulates osteoblastic differentiation of vascular and bone cells. *Free Radic Biol Med* 31: 509-519.
8. Oh ES, Baek KH, Lee WY, Oh KW, Kim HS, Han JH, Lee KW, Son HY, Kang SK, Kang MI. 2006. The effect of oxidative stress on the proliferation and differentiation of human bone marrow stromal cell-derived osteoblasts. *J Kor Soc Endocrinol* 21: 222-232.
9. Kim TJ. 1996. *Korea resources plants IV*. Seoul National University Press, Seoul, Korea.
10. Wang XJ, Sun H, Liu ZS. 1994. Quantitative analysis of 6,7-dimethylscutelin and capillarisine in *Artemisia capollaries* Thunb. and prescriptions containing the crude drug. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 19: 667-670.
11. Lee SD, Park HH, Kim DW, Bang BH. 2000. Bioactive constituents and utilities of *Aremisia* sp. as medicinal herb and foodstuff. *Kor J Food Nutr* 13: 490-505.
12. Kim SN, Kim HS, Nam GS, Hwang SW, Hwang SY. 2005. The anti-inflammatory and analgesic activities of *Artemisia capillaris* Thunberg. *Kor J Phamacogn* 36: 338-343.
13. Ak JS. 1999. Effect of *Artemisia caillaris* on the iNOS expression and superoxide formation in the RAW264.7 cells. *J Trad Kor Med* 9: 200-211.
14. Jung MJ, Yin Y, Heo SI, Wang MH. 2008. Antioxidant and anticancer of extract from *Artemisia capollaries*. *Kor J Phamacogn* 39: 194-198.
15. Kang MJ, Shin SR, Kim KS. 2002. Antioxidative and free radical scavenging activity of water extract from dandelion (*Taraxacum officinale*). *Kor J Food Preserv* 9: 253-259.
16. Green LM, Reade JL, Ware CF. 1984. Rapid colorimetric assay for cell viability: Application to the quantitation of cytotoxic and growth inhibitory lymphokines. *J Immunol Meth* 70: 257-268.
17. Lim JD, Yu YY, Kim MJ, Yun SJ, Lee SJ, Kim NY, Chung IM. 2004. Comparison of SOD activity and phenolic compound contents in various Korean medicinal plants. *Kor J Med Crop Sci* 12: 191-202.
18. Heo SI, Jung HJ, Kim MK, Wang MH. 2007. Antioxidative activities and tyrosinase inhibitory effects of Korean medicinal plants. *J Appl Biol Chem* 50: 115-119.
19. Choi EM, Kim GH, Lee YS. 2009. *Atractylodes japonica* root extract protects osteoblastic MC3T3-E1 cells against hydrogen peroxide-induced inhibition of osteoblastic differentiation. *Phytother Res* 23: 1537-1542.

(2011년 8월 29일 접수; 2011년 10월 25일 채택)