

Effect of *Hijikia fusiforme* Fractions on Proliferation and Differentiation in Osteoblastic MC3T3-E1 Cells

Min-Hee Jeon and Mihyang Kim*

Department Food and Nutrition, Silla University, Busan 617-738, Korea

Received January 12, 2011 / Accepted February 22, 2011

Osteoporosis is a disease involving a decrease in bone mineral density and increased risk of fractures. Osteoblast and osteoclast activities are important for bone formation. The MC3T3-E1 osteoblastic cell line is a well-accepted model of osteogenesis *in vitro*. *Hijikia fusiforme* is a kind of edible brown seaweed that grows mainly in the Northwest Pacific region, including the countries of Korea, Japan and China, and it has been widely used as a medicinal and health food in Korea. In this study, by using osteoblasts, the effects of *Hijikia fusiforme* fractions on proliferation, alkaline phosphatase (ALP) activity, collagen synthesis and mineralization of cells were investigated. *Hijikia fusiforme* were subjected to fractionation by using hexane, methanol, butanol and aqueous. Proliferation of the MC3T3-E1 osteoblastic cells that were treated with *Hijikia fusiforme* fractions increased by approximately 120%. Regarding effects of *Hijikia fusiforme* fractions on ALP activity, 1 $\mu\text{g/ml}$ butanol fraction showed the highest activity. The synthesis of collagen increased significantly in response to treatment with *Hijikia fusiforme* fractions, with the exception of the hexane fraction. Moreover, mineralization in the MC3T3-E1 cells that were treated with 100 $\mu\text{g/ml}$ butanol fraction increased by 281%. Also, when 100 $\mu\text{g/ml}$ aqueous fraction was added, mineralization increased by 240%. These results indicate that *Hijikia fusiforme* fractions have anabolic effect on bone through the promotion of osteoblastic differentiation, suggesting that it could be used for the treatment of common metabolic bone diseases.

Key words : *Hijikia fusiforme*, MC3T3-E1 cell, alkaline phosphatase, collagen synthesis, mineralization

서 론

골 조직은 collagen, 당단백과 같은 세포외기질(extracellular substance)과 조골세포(osteoblast), 파골세포(osteoclast), 골세포 등 여러 종류의 세포들로 구성되어 있다[21]. 특히 파골세포에 의한 골 흡수와 조골세포에 의한 새로운 골 기질 형성 및 무기질화 과정이 반복적으로 일어나는 대사기관으로[32], 조골세포의 활동으로 인한 골 형성이 파골세포의 활동으로 인한 골 흡수보다 많게 된다[27]. 골의 재형성은 성장이 끝난 후 오래된 골을 제거하고 다시 새로운 골로 대체하는 과정으로, 부갑상선 호르몬(PTH), 칼시토닌, 에스트로겐 등과 같은 호르몬과 insulin-like growth factor I (IGF-I) 등의 골조직에서 분비되는 다양한 성장인자, tumor necrosis factor- α (TNF- α) 등과 같은 cytokines를 통해 조골세포와 파골세포의 활성 균형을 조절하며 항상성을 유지시킨다[22].

우리나라는 이미 고령화 사회에 접어들었고, 65세 고령인구가 14%를 넘어서게 되는 고령사회를 눈앞에 두고 있다. 고령화 사회에서 가장 큰 문제로 대두되고 있는 골 대사 질환인 골다공증은 골의 화학적 조성에는 큰 변화 없이 단위 용적내의 골 양이 감소하여 경미한 충격에도 쉽게 골절을 일으킬

수 있는 질환으로 폐경 후 에스트로겐이 감소하면서 파골세포에 의한 골 흡수가 많아져 빠른 뼈 손실이 일어난다[18]. 특히 폐경 이후 10년 사이에 약 20%의 골무기질이 감소하는 등 골 대사 질환을 가진다[32]. 골다공증의 치료는 여성 호르몬 대체 요법, 선택적 에스트로겐 수용체 조절제(SERM), 비스포스포네이트, 부갑상선 호르몬, 칼시토닌 투여 등으로 알려져 있다[10]. 현재 골다공증의 예방과 치료에 가장 많이 이용되고 있는 방법은 에스트로겐이나 천연에 존재하면서 약한 에스트로겐 활성을 나타내는 식물 유래의 phytoestrogen이 폐경 후 골다공증 예방에 매우 유용하게 처방되고 있다[1].

조골세포는 골수의 간엽줄기세포(mesenchymal stem cell)에서 기원하며, 연골세포(contracts), myocytes, 지방세포(adipocytes)로 분화가 가능한 골기질 합성과 석회화에 관여하는 세포이다[13]. 세포막에는 당단백 효소인 alkaline phosphatase (ALP)가 존재하고 있으며, 이는 기질 특이성과 염기성 pH에서 최적의 활성을 나타내고 세포의 외막과 석회화 조직의 기질 소포에서 높은 농도로 발견되어 석회화 과정 동안 무기인산의 운반, 세포분열이나 분화의 조절자로서 역할을 하는 골세포 분화의 표지인자로 알려져 있다[8,23]. Collagen은 경섬유 단백질로써, 결합조직에 광범위하게 분포되어 있으며[19], 여러 cytokine의 분비를 통해 파골세포의 활성을 조절하는 기능을 담당하고 있다[22]. 또한 활성화된 조골세포는 골기질을 형성하는데 collagen, osteocalcin, osteopontin, bone

*Corresponding author

Tel : +82-51-999-5620, Fax : +82-51-999-5457

E-mail : mihkim@silla.ac.kr

sialoprotein과 같은 물질을 합성하여 석회화 과정에 중요한 역할을 한다[17].

최근 해조류는 육상식물과는 달리 물질대사의 경로가 특이하고 새로운 구조를 갖는 생리활성 물질을 생산할 수 있는 소재로 각광받고 있다. 해조류는 소화율이 낮아서 열량원으로서의 가치는 적지만 포만감과 통변을 조절하는 효과[25]뿐만 아니라 면역력 증강[26], 항암[5,16] 등의 효과가 보고되고 있다. 이에 많은 해조류가 전 세계 다양한 지역에서 전통 약재, 식재료, 건강 보조품으로 사용되고 있으며[35], 해조류 내에 함유되어 있는 생리기능성 물질 탐색의 필요성에 따라 해조류의 이용가치는 더욱 높아지고 있다[6]. 본 연구에 사용된 톳 (*Hijikia fusiforme*)은 갈조류 모자반과에 속하며 체장 20~100 cm까지 성장하는 다년생 해조류로, 평균수면에서 저조선 약 30 cm 위쪽의 조간대 하부에 서식한다. 톳은 다른 해조류에 비해 칼슘, 철, 요오드 같은 무기질, 비타민 등이 풍부하며, 항균효과[15] 및 동맥경화 예방[33]에 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 그러나 톳의 분획물에 대한 연구 및 조골세포와 관련된 구체적인 연구는 미비한 실정이다.

조골세포의 배양법은 골의 대사, 골세포의 생성 및 분화 등의 연구와 골 대사에 미치는 효과, 식품유래 천연물질의 골 대사 조절물질을 검색하는데 비교적 간편하면서 유용한 방법으로 알려져 있다[4,28]. 본 연구에 사용한 mouse calvaria 유래의 MC3T3-E1 세포는 *in vivo* 골 형성 과정에서 나타나는 세포의 증식, 분화, 석회화 등 골아세포와 유사한 대사적 특징을 가지고 있으므로, 골세포의 세포 활성화와 관련된 연구에서 유용하게 이용되어 왔다[11,14]. 따라서 본 연구에서는

MC3T3-E1 세포를 이용하여 톳 분획물이 조골세포의 증식에 미치는 영향, 조골세포의 활성화와 분화 인자인 ALP 활성화, 골 형성을 위한 필수 인자인 collagen 합성에 미치는 영향 및 조골세포의 표식인자인 골 석회화 형성능에 미치는 영향을 검토하였다.

재료 및 방법

세포배양

경희대학교 의과대학 내분비 연구실에서 분양 받은 mouse calvaria osteoblast cell 인 MC3T3-E1 세포는 α -MEM 배지 (Gibco BRL, Grand islane, N. Y., USA)에 10% FBS (Gibco)와 1% penicillin (Gibco)를 첨가하면서 37°C, 5%의 CO₂ incubator에서 2-3일 마다 배지를 교환하면서 실험에 사용하였다. 분화유도를 위해 5 mM β -glycerol phosphate (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO., USA)와 50 mg/ml의 vitamin C (Sigma)를 첨가하여 분화유도 배지로 사용하였으며, 3일마다 배지를 교환하였다.

분획물의 제조

본 실험에 사용한 톳은 2010년 남해일대에서 채취하여 물로 4-5회 세척하여 염분과 불순물을 제거하고 자연 건조 및 분쇄하여 사용하였다. 100 g의 건조된 톳에 80% ethanol 2 l를 가해 80°C 에서 4시간 추출하여 농축하고 건조하여 분말화하였다. 이를 Fig. 1과 같이 hexane 분획물(HFEH), methanol 분획물(HFEM), butanol 분획물(HFEB), aqueous 분획물(HFEA)로

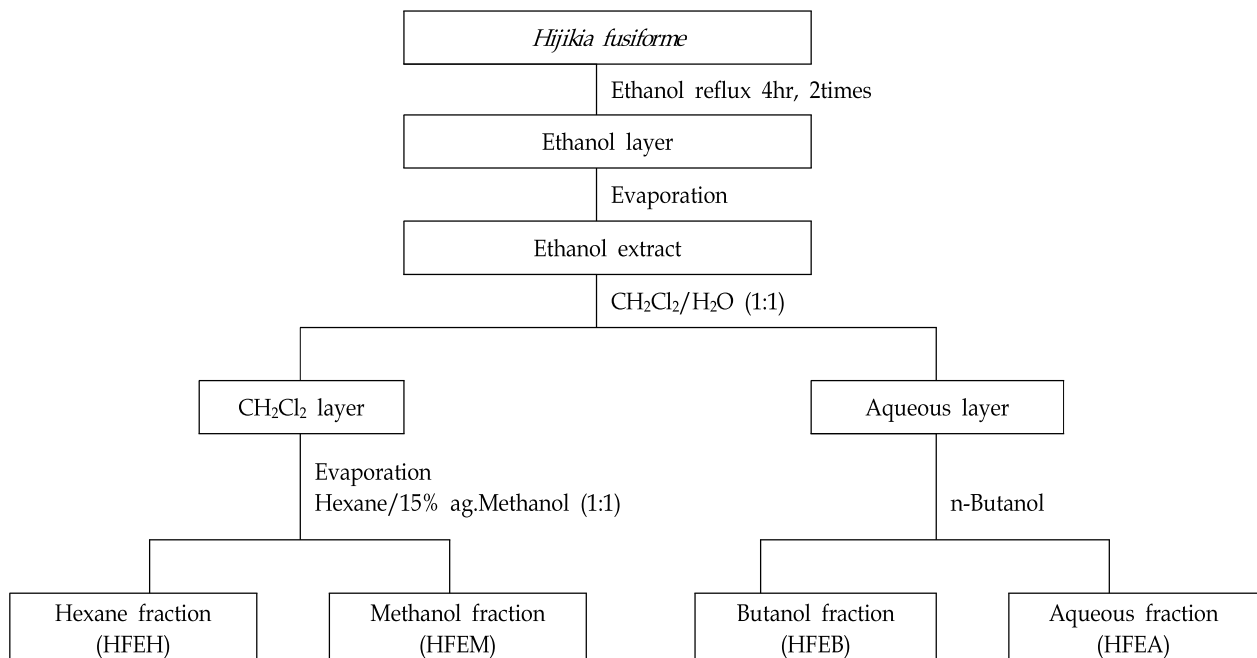


Fig. 1. Procedure of extract and fraction layers of *Hijikia fusiforme*

각각 분획하고 각 분획층을 감압 농축 후 동결 건조하였다. 동결 건조하여 얻은 톱 분획물 분말 각각 1, 10, 50, 100 µg/ml 를 ethanol로 용해한 후, 0.2 µm membrane filter로 여과하여 실험에 사용하였다.

세포증식 유도

시료의 농도별 처리에 따른 조골세포의 세포 증식은 Green 등의 방법에 따라 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT, sigma) 시약의 환원 정도를 측정하는 MTT assay 방법을 사용하여 측정하였다. 배양한 MC3T3-E1 세포를 0.4% trypan blue 염색법을 이용하여 세포 수를 1×10^5 cell/ml로 조정하여 96 well plate에 plating 한 후, 농도 별로 준비된 톱 분획물을 20 µl씩 첨가하여 37°C, 5%의 CO₂ incubator에서 48시간 배양하였다. 이때 대조군으로는 톱 분획물 대신 ethanol을 20 µl를 첨가하여 동일하게 배양하였다. 48시간 배양 후 MTT (5 mg/ml) 시약을 10 µl 씩 각각의 well에 첨가하고 37°C, 5%의 CO₂ incubator에서 4시간 더 배양하였다. 배양 후 배지를 제거하고 DMSO (dimethyl sulfoxide)를 100 µl씩 첨가하여 생성된 불용성의 formazan 결정을 용해시킨 뒤 ELISA reader로 550 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 세포 증식률은 톱 분획물의 흡광도를 대조군의 흡광도에 대한 백분율로 나타내었다.

Alkaline phosphatase (ALP) 활성

배양된 MC3T3-E1 세포를 1×10^5 cell/ml로 조정하여 96 well plate에 plating 한 후, 농도별로 준비된 톱 분획물을 20 µl씩 첨가한 후 37°C, 5%의 CO₂ incubator에서 48시간 배양하였다. 48시간 배양 후 PBS로 3회 세척하고 0.1% Triton X-100을 20 µl씩 넣은 다음 37°C, 5%의 CO₂ incubator에서 30분간 lysis하였다. Lysis된 cell의 상등액 5 µl는 단백질 정량에 사용하였고, 나머지 상등액에 20 µl의 0.1 N glycine과 100 µl의 100 mM p-nitrophenylphosphate (p-NPP)를 첨가한 후 37°C, 5%의 CO₂ incubator에서 30분간 반응시켰다. 반응 후 0.1 N NaOH로 반응을 정지하고 200 µl를 취해 405 nm에서 흡광도를 측정하여 ALP 효소에 의해 p-nitrophenol로 전환된 양을 산출하였다. 세포수의 차이가 ALP 활성도에 영향을 미칠 수 있으므로 총 단백질 양을 측정하여 나누어 줌으로써 단위 세포수에 대한 ALP 활성도를 계산하였다.

Collagen 측정 방법

배양한 MC3T3-E1 세포를 1×10^5 cell/ml로 조정하여 plate에 배양한 후 PBS로 2회 세척하고 세포층은 cell scraper를 이용하여 모은 후 이를 0.05 M Tris-HCl buffer로 한번 더 헹구고 후 ultrasonicator로 sonication 시켰다. 이후 5% TCA를 첨가한 후 원심 분리하여 상등액을 제거한 뒤 다시 침전물에 5% TCA를 첨가하는 과정을 2회 반복하였다. 상등액 제거 후

침전물에 6 N HCl을 가하여 20시간 동안 110°C에서 가수분해하고, 가수분해물을 여과 농축하여 pH를 중성으로 조절한 후 실험에 사용하였다. 시료 용액중의 hydroxyproline의 측정은 Woessner [42]법을 이용하였고 얻어진 hydroxyproline량으로부터 collagen량을 환산하였다. Collagen 중에 hydroxyproline이 약 10% 포함되어 있으므로, hydroxyproline $\times 100/11 =$ collagen으로 산출하였다.

골석회화 형성도 측정

배양한 MC3T3-E1 세포를 1×10^5 cell/ml로 조정하여 plate에 배양한 후 석회화 유도를 위해 분화유도 배지와 톱 분획물을 농도별로 첨가하여 7일간 배양하였다. 배양 후 70% ethanol로 4°C에서 1시간 세포를 고정시켰다. Alizarin-Red (AR) solution은 10 ml 증류수에 40 mM이 되도록 농도를 맞춘 후 pH 4.2로 조정하였다. 세포 고정 후 AR solution (2 ml/well)으로 10분간 염색한 후 증류수로 2-5회 세척하여 염색되지 않는 부분은 PBS로 세척하였다. 표면이 마르지 않도록 PBS로 적셔주면서 현미경으로 관찰하였고 nodule 형성 확인 후 10 mM sodium phosphate (10% cetylpyridinium chloride, pH 7.0)을 2 ml/well 첨가하여 ELISA reader로 550 nm에서 흡광도를 측정하였다.

통계처리

연구결과 얻어진 자료를 SPSS 통계 프로그램을 사용하여 하위그룹 각각의 기술 통계치(mean, SD)를 산출하였다. 사후 검증은 Tukey를 적용하였고 $\alpha < 0.05$ 수준에서 유의수준을 검증하였다.

결과 및 고찰

톱 분획물의 제조

톱 분말로부터 ethanol로 추출한 후 분획하여 분획물을 제조한 결과를 Table 1에 나타냈다. 톱 ethanol 추출물의 경우, 100 g으로부터 추출물 32.7 g을 획득하여 32.7%의 수율을 나타냈다. 톱 ethanol추출물 10 g으로부터 분획물을 제조한 결과, hexane 분획물은 0.47 g을 획득하여 4.7%의 수율로 가장 낮은

Table 1. Yields (%) of ethanol extracts and various solvent fractions of *Hijikia fusiforme*

Fraction	Yields (g)	Yields (%)
EtOH extraction	32.70	32.7
Hexane fraction	0.47	4.7
Methanol fraction	0.68	6.8
Butanol fraction	1.32	13.2
Aqueous fraction	4.74	47.4

수율을 나타내었다. Methanol 분획물은 0.68 g을 획득하여 6.8%의 수율을 나타내었고, butanol 분획물은 1.32 g을 획득하여 13.2%의 수율을 나타냈다. 또한 aqueous 분획물은 4.74 g을 획득하여 47.4%로 가장 높은 수율을 나타냈다. 따라서 분획물의 수율만 비교할 경우 hexane 분획물에서 가장 낮은 수율을 나타냈고, aqueous 분획물이 가장 높은 수율을 나타냈다. 이로 인해 톳의 성분이 지용성 성분보다는 수용성 성분을 더 많이 함유하고 있음을 확인하였다.

조골세포에 대한 증식유도 효과

MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) 분석은 탈수소 효소작용에 의해 노란색의 수용성 기질인 MTT tetrazolium을 청자색의 formazan으로 환원시키는 미토콘드리아의 능력을 이용하는 검사법으로 이 검사법은 세포의 증식과 성장을 알아보는 대표적인 실험방법 중 하나로 살아있는 세포 수에 비례해서 흡광도를 나타낸다.

톳 분획물의 농도(1, 10, 50, 100 µg/ml)에 따른 조골세포 성장에 미치는 영향을 MTT assay로 분석한 결과는 Fig. 2와 같다. MC3T3-E1 세포에 톳 분획물을 10~100 µg/ml 첨가하였을 때, 모든 분획물에서 대조군과 비교하여 유의적인 증식을

을 나타내었다. 특히, 10 µg/ml hexane 분획물, 50 µg/ml methanol 분획물 및 butanol 분획물, 100 µg/ml aqueous 분획물을 첨가하였을 때, 대조군과 비교하여 120% 정도의 증식을 나타내었다. 대두 에탄올 추출물을 실험한 최[6]의 결과에서는 50~100 µg/ml의 농도로 조골 세포주에 처리하여 대조군에 비해 최고 117%의 증가를 나타내었다. 본 실험결과 톳 분획물 첨가 시 120%의 증식유도 효과가 나타나 톳이 조골세포 증식을 효율적으로 유도하는 성분을 함유하고 있는 것으로 추측할 수 있다.

Alkaline phosphatase (ALP) 활성에 미치는 영향

염기성 인산분해 효소(Alkaline phosphatase, ALP)는 거의 모든 조직에 존재하며 특히 골조직에 존재하는 ALP는 골 성장이 활발히 일어날 때 그 활성이 증가한다[12]. 따라서 조골세포 활성을 나타내는 biomaker로서[9] MC3T3-E1 조골세포에서의 ALP 활성을 측정하여 톳 분획물이 조골세포의 골 성장 활성에 미치는 영향을 검토하였다.

톳 분획물이 ALP 활성에 미치는 영향을 조사한 결과는 Fig. 3에 나타내었다. 조골세포의 ALP 활성은 hexane 분획물 및 butanol 분획물을 첨가하였을 때, 대조군과 비교하여 유의적

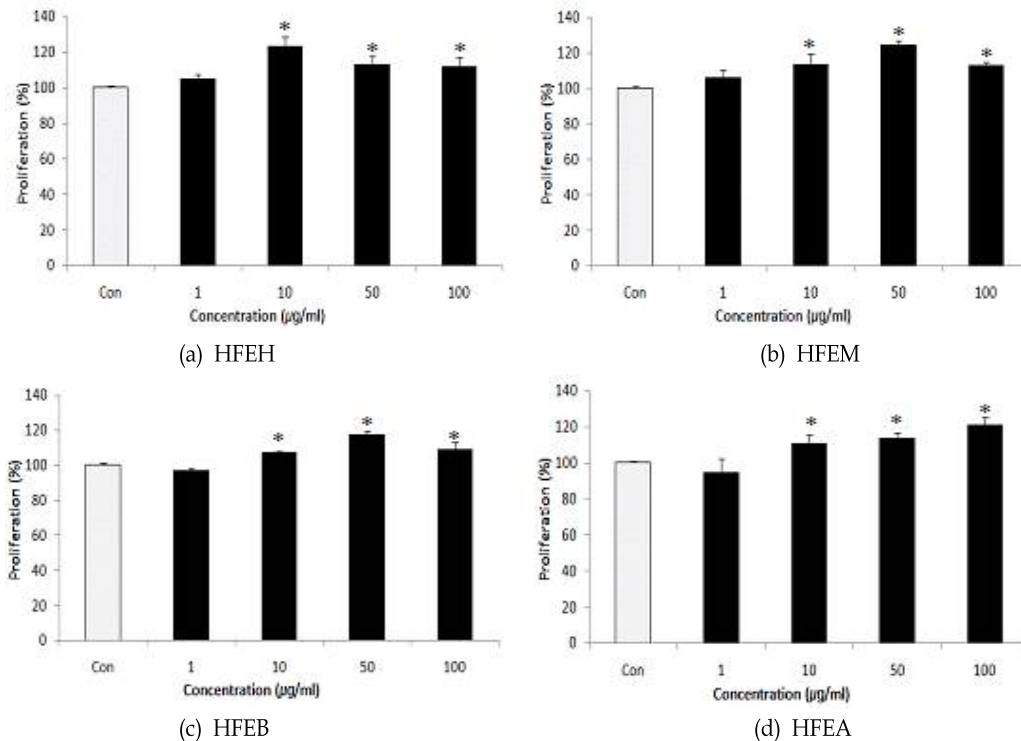


Fig. 2. Effect of various solvent fractions of *Hijikia fusiforme* on the proliferation of the MC3T3-E1 osteoblastic cells by the MTT assay. MC3T3-E1 cells were cultured with vehicles or various concentrations of *Hijikia fusiforme* fractions. Data were expressed as percentage of control.

Con; *Hijikia fusiforme* fractions 0 µg/ml

* $p < 0.05$ compared with control.

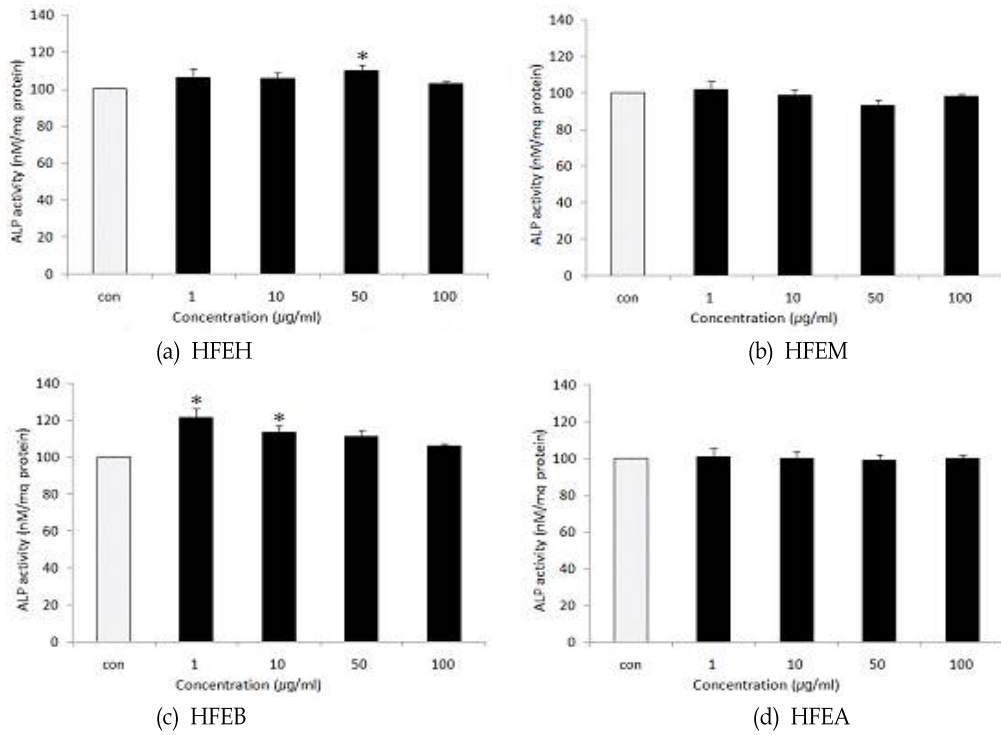


Fig. 3. Effects of various solvent fractions of *Hijikia fusiforme* on the alkaline phosphatase activities of the MC3T3-E1 osteoblastic cell during the differentiation. Data were expressed as percentage of control. Con; *Hijikia fusiforme* fractions 0 µg/ml * $p < 0.05$ compared with control.

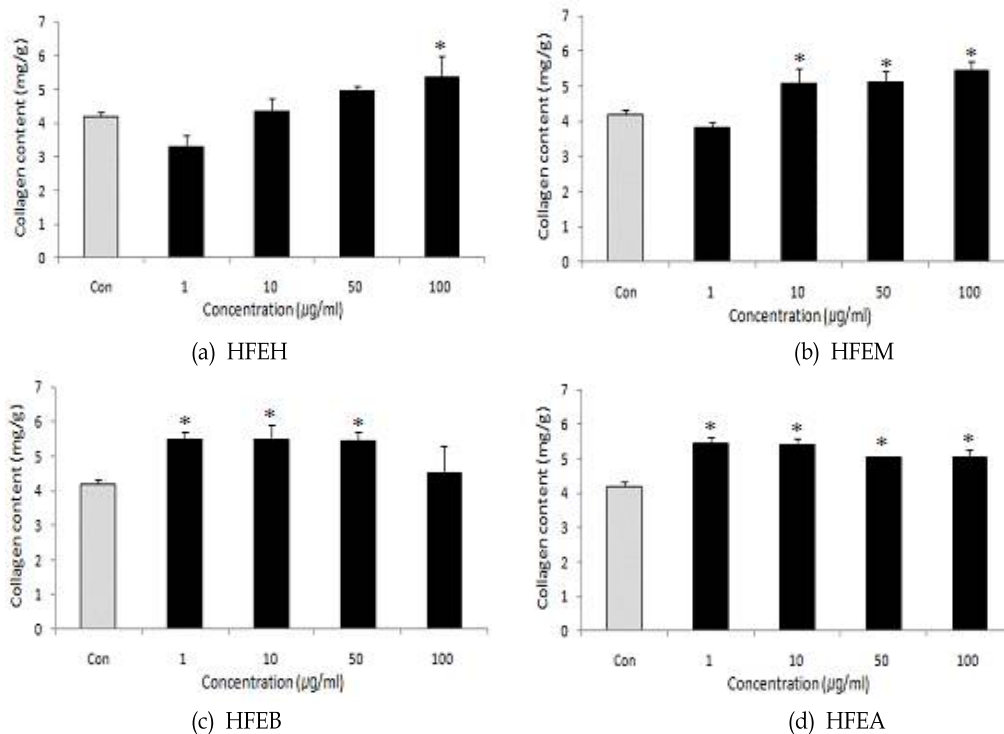


Fig. 4. Effects of various solvent fractions of *Hijikia fusiforme* on collagen content in bone of the MC3T3-E1 osteoblastic cells. Data were expressed as percentage of control. Con; *Hijikia fusiforme* fractions 0 µg/ml * $p < 0.05$ compared with control.

으로 증가하였다. 특히, butanol 분획물을 1 µg/ml 첨가하였을 때, 120% 이상의 효소 활성을 나타내었다.

주로 세포막에 결합되어 존재하는 염기성 인산 분해효소는 기질 특이성과 염기성 pH에서 최적의 활성을 나타내는 효소로써 골세포 분화의 표지인자로 알려져 있다[31]. 따라서 이상의 결과는 톳의 부탄올 분획물이 조골세포의 ALP의 발현을 증가시켜 조골세포의 분화에 영향을 줄 가능성을 제시하고 있다.

조골세포의 collagen 합성에 미치는 영향
 골 형성이 이루어지는 과정은 type I collagen의 합성과

세포 내의 과정 그리고 세포 외로 분비, 섬유질의 형성 및 collagen 기질의 성숙과 hydroxyapatite 형성 등의 단계를 밟는다 [34]. 조골세포에서 합성되는 type I collagen은 전체 골 단백질의 85~90%를 차지하며, 조골세포는 여러 가지 호르몬/국소인자에 의해 조절되고 있다[2-3,24]. 대표적으로 부갑상선 호르몬, 갑상선 호르몬, 1,25(OH)₂D₃, 성호르몬, insulin 등이 있고 국소인자로는 프로스타글란딘과 여러 종류의 cytokine 이 이에 해당된다[2]. 뼈는 주로 collagen과 칼슘으로 구성되어 있으며, 계속 성장하며 살아있는 조직이다. Collagen은 뼈에서 부드러운 골격을 형성하는 단백질이고 인산칼슘이라는 미세

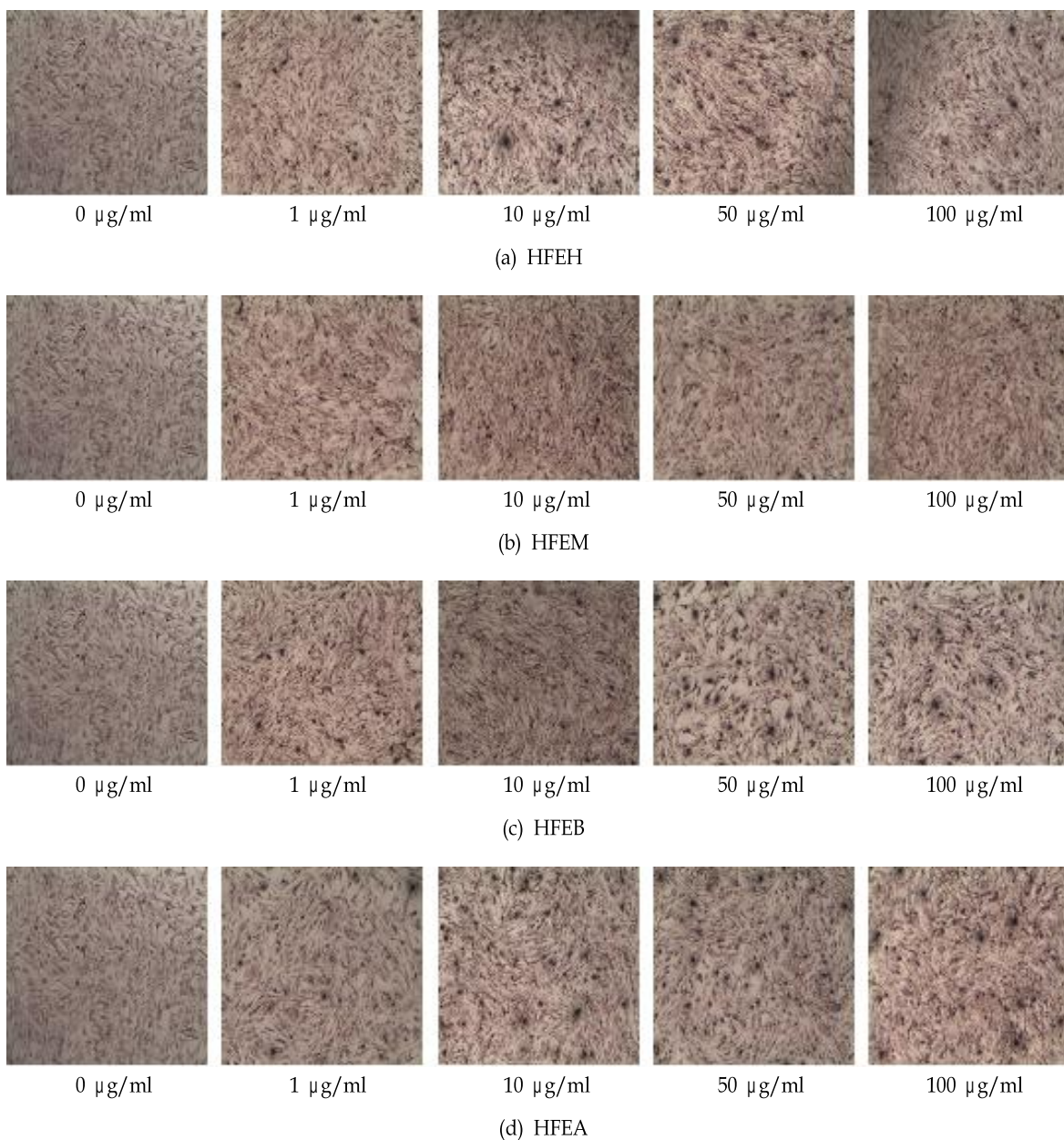


Fig. 5. Histochemical changes of various solvent fractions of *Hijikia fusiforme* on the mineralization of MC3T3-E1 osteoblastic cell. Phase contrast micrographs (×4) were taken by alizarin red staining.

랄이 뼈의 골격을 강하고 단단하게 만들어 준다. 또한 collagen은 골조직의 유기물의 대부분을 차지하며, collagen이 적절하게 생성되지 못하는 조건에서는 골조직의 석회화가 일어나지 않을 뿐만 아니라 ALP 활성 저하 및 osteocalcin의 생성 또한 매우 감소하는 것으로 알려져 있다[26].

Fig. 4는 톳 분획물이 조골세포의 collagen 합성능에 미치는 영향을 나타낸 것이다. 톳 분획물을 첨가하였을 때 모든 분획물에서 유의적인 collagen 합성능을 보였다. Hexane 분획물 및 methanol 분획물은 농도 의존적으로 collagen 합성능이 증가되는 경향을 나타내었다. 한편, butanol과 aqueous 분획물은 1 µg/ml의 낮은 농도에서도 높은 collagen 합성능을 나타내었고 첨가 농도가 증가함에 따라 오히려 감소하는 경향을 나타내었다. 따라서 톳의 모든 분획물에서 collagen 합성에 영향을 주는 것으로 나타났으나, 같은 농도에서는 butanol 및 aqueous 분획물이 collagen 합성에 가장 효율적인 영향을 미치는 것으로 나타났다.

조골세포의 골 석회화 형성에 미치는 영향

골 석회화 형성능은 조골세포의 분화에 중요한 표식인자이다. Alizarin은 식물성 염료로서 calcium에 특이적으로 흡착력

이 높다. 이것은 무기질화된 세포의 기질에 염색되므로 석회화된 양과 염색 정도가 상호 비례한다[20,30]. 조골세포에 톳 분획물을 첨가하여 골 석회화 형성을 확인한 결과는 Fig. 5와 같다. 시간에 따른 석회화 형성도를 확인하기 위해 염색된 석회화물을 10% cetypyrinium chlorid로 용해하여 흡광도 값을 측정하여 상대 활성을 나타낸 값을 Fig. 6에 나타내었다.

Fig. 5에서 methanol 분획물을 제외한 나머지 분획물에서 유의적인 석회화 형성능을 보였으며, 특히 butanol 분획물과 aqueous 분획물에서는 농도 의존적으로 석회화 형성능이 증가하였다. Butanol 분획물은 모든 농도에서 유의적인 형성능을 보였으며, 특히 100 µg/ml를 첨가하였을 때 281.25%의 가장 높은 석회화 형성능을 나타내었고, 또한 aqueous 분획물을 100 µg/ml 첨가하였을 때에도 240.46%의 높은 석회화 형성능을 나타내었다(Fig. 6).

이상의 실험결과에서 톳 분획물 중에서 butanol 분획물이 조골세포의 활성화에 가장 효율적인 영향을 미쳤음을 확인하였다. 특히 골 석회화 형성에 미치는 영향을 검토한 결과, butanol 분획물과 aqueous 분획물에서 가장 높은 골 석회화 형성능을 나타낸 것으로 미루어 볼 때, 지용성 성분보다는 수용성 성분이 골 석회화 형성을 촉진시킨 것으로 추측할 수 있다. 따라서 톳 분획물이 조골세포의 활성을 촉진하여

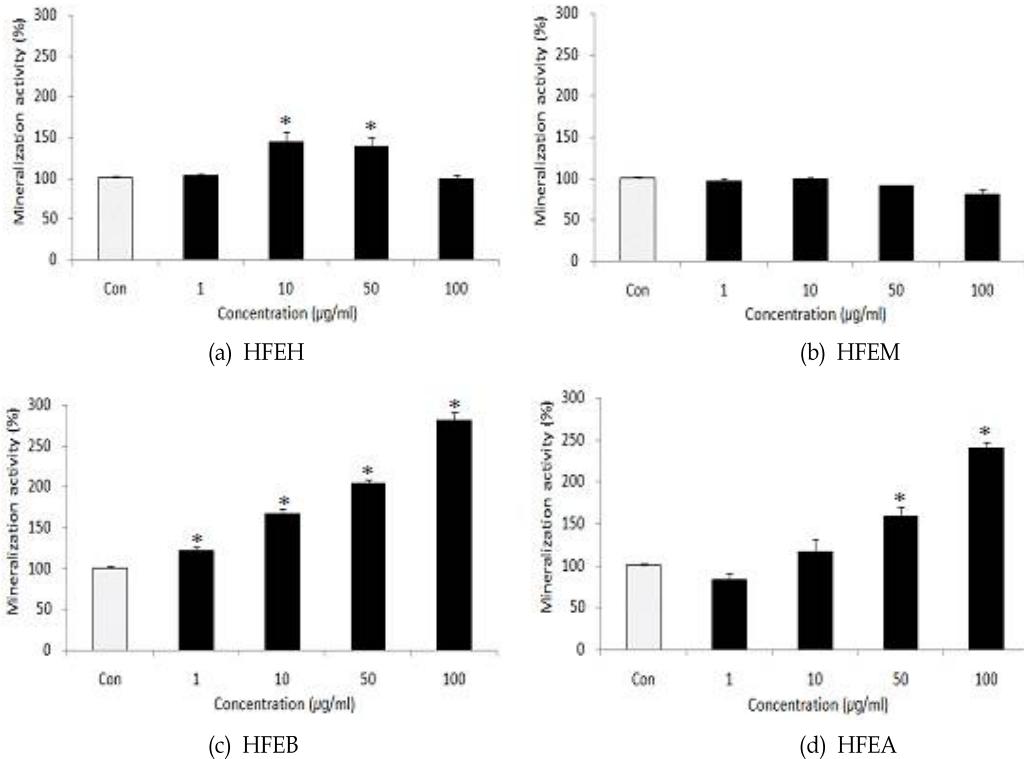


Fig. 6. Effects of various solvent fractions of *Hijikia fusiforme* on the mineralization of MC3T3-E1 osteoblastic cell. Data were expressed as percentage of control.

Con; *Hijikia fusiforme* fractions 0 µg/ml

* $p < 0.05$ compared with control.

콜 생성에 영향을 줄 수 있는 것이 확인되었으며, 그에 대한 구체적인 기작 연구와 *in vivo* 연구가 병행된다면 골다공증 예방과 관련된 기능성 식품의 천연소재로 개발이 가능하리라 사료된다.

References

- Aldercreutz, H. and W. Mazur. 1996. Phyto-estrogens in relation to cancer and other human health risks. *Proc. Nutr. Soc.* **55**, 399-417.
- Canalis, E. 1983. The hormonal and local regulation of bone formation. *Endocr. Rev.* **4**, 62-77.
- Canalis, E. 1985. Effect of growth factors on bone cell replication and differentiation. *Clin. Orthop. Related Res.* **193**, 246-263.
- Centrella, M., T. L. Mcartht, 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**, 2869-2874.
- Cho, K. J., Y. S. Lee, and B. H. Ryu. 1990. Antitumor effect and immunology activity of seaweeds toward sarcoma-180. *J. Korean Fish Soc.* **23**, 345-352.
- Choi, E. M., K. S. Suh, Y. S. Kim, R. W. Choue, and S. J. Koo. 2001. Soybean ethanol extract increase the function of osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Phytochemistry* **56**, 733-739.
- Choi, J. H., I. S. Kim, J. I. Kim, and T. H. Yoon. 1992. Studies on anti-aging action of brown algae (*undaria pinnatifida*). *Bull. Korean Fisheries Soc.* **25**, 181-188.
- Dragsted, L. O., M. Strube, and J. C. Larsen. 1993. Cancer-protective factor in fruits and vegetables. Biochemical and biological background. *Pharmacol. Toxicol.* **72**, 116-135.
- Jang, Y. J. 2008. Effects of *Acanthopanax senticosus* var. *Subinermis* (ASVS) leaf extract on promoting cell proliferation, differentiation, mineralization and osteogenesis-related gene expression in ROS 17/2.8 cells. Department of Food and Nutrition. Graduate School, Yonsei University. *M. S. thesis*, Korea.
- Jilka, R. L. 1998. Cytokines, bone remodeling and estrogen deficiency: a 1998 update. *Bone* **23**, 75-81.
- Kalu, D. 1991. The ovariectomized rat model on postmenopausal bone loss. *Bone and Mineral* **15**, 175-192.
- Kang, S. R. 2009. Effect of *ecklonia cava* extracts on lipids and bone turnover markers in menopausal women. Department of Food Nutrition. Graduate School, Silla University. *M. S. thesis*, Korea.
- Katagiri, T. and N. Takahashi. 2002. Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation. *Oral Diseases* **8**, 147-159.
- Kimble, R. B., J. L. Vannice, and D. C. Bloedow. 1994. Interleukin-I receptor antagonist decrease bone loss and resorption in ovariectomized rats. *J. Clin. Invest.* **93**, 1959-1967.
- Kim, S. H., S. B. Lim, Y. H. Ko, M. C. Oh, and C. S. Park. 1994. Extraction yields of *Hizikia fusiforme* by solvents and their antimicrobial effects. *Bull. Korean Fisheries Soc.* **27**, 462-468.
- Kim, Y. M., J. R. Do, D. S. Kim, and J. H. Park. 2006. Cytotoxicities of hydrolyzed crude laminaran from *Eisenia bicyclis* on the SNU-1, HeLa and SW cells. *J. Korean Food Sci. Technol.* **38**, 793-798.
- Lee, J. W. 2004. Effect of *Solidago Virga-aurea* var. *giagantea* Mig. Root extract on the activity of osteoblastic cells and bone metabolism. Department of Food Science and Technology, Graduate School of Keimyung University, Daegu, Korea. *M. S. thesis*, Korea.
- Lee, J. W. and I. S. Lee. 2004. Effects of *Rubus coreanus* miquel extracts on the activity and differentiation of MC3T3-E1 osteoblastic cell. *J. Life Sci.* **14**, 967-974.
- Manolagas, S. C. 2000. Basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. Birth and death of bone cells. *Endocr. Rev.* **21**, 115-137.
- 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**, 847-877.
- Mok, S. K. and H. S. Shin. 1996. The effects of prostaglandine and dibutyryl cAMP on osteoblastic cell activity and osteoclast generation. *J. Wonkwang Dental Res. Ins.* **6**, 43-62.
- Mone, Z. 2007. Skeletal remodeling in health and disease. *Nat. Med.* **13**, 791-801.
- Newmark, H. L. 1996. Plant phenolics as potential cancer prevention agents. *Adv. Exp. Med. Biol.* **401**, 25-34.
- Noriyoshi, K., I. Seichi, K. Mamoru, H. Yoshiyuki, I. Katsumi, and K. Masuoshi. 1986. Effect of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on osteoblastic MC3T3-E1 cell. *Endocrinology* **118**, 940-947.
- Oh, H. K. and H. S. Lim. 2007. Effects of the products of raw sea tangle on chronic idiopathic constipation. *J. Korea Soc. Food Sci. Nutr.* **36**, 720-726.
- Owen, T. A., M. Aronow, and V. Shahoub. 1990. Progressive development of the rat osteoblast phenotype *in vitro* relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. *J. Cell Physiol.* **143**, 420-430.
- 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.
- Park, J. C., J. M. Hur, H. J. Gwon, H. J. Kim, S. S. Chun, J. S. Choi, and J. W. Choi. 2000. Effects of phloroglycinol isolated from *Ecklonia stolonifera* on the acetaminophen - Metabolizing enzyme system in rat. *J. Korea Soc. Food Sci. Nutr.* **29**, 448-452.
- Pfeilschifter, J. and O. Wolf. 1990. Chemotactic response of osteoblastic cells to transforming growth factor B. *J. Bone Miner. Res.* **5**, 815-823.
- Schiller, P. C., G. Dippolito, 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.

31. Stein, G. S., J. B. Lian, A. J. Van Wijnen, and M. Montecino. 1996. Transcriptional control of osteoblast growth and differentiation. *Physiol. Rev.* **76**, 593-629.

32. Solt, D. B. 1991. The pathogenesis, oral manifestations, and implications for dentistry of metabolic bone disease. *Curr. Opin. Dent.* **1**, 783-791.

33. Watanabe, T., T. Hiroyama, T. Takahashi, T. Kokubo, and M. Ikeda. 1979. Toxicological evaluation of arsenic in edible seaweed, *Hizikia species*. *Toxicology* **41**, 1-22.

34. Yoon, H. G., J. T. Woo, J. W. Kim, Y. S. Kim, K. Y. Kim, Y. K. Choi, and K. S. Seo. 1993. Osteoblastic cell line MC3T3-E1 cell to the triiodothyronine. *Korean J. Medicine* **44**, 49-58.

35. Yoon, S. J. 2006. Measurement of HaCaT viability by seaweed *Undaria finnatifida* extracts. Department of Biotechnology, Graduate School of Pukyong National University, Busan, Korea. *M. S. thesis*, Korea.

초록 : 톳 분획물이 조골세포의 증식 및 분화에 미치는 영향

전민희 · 김미향*

(신라대학교 식품영양학과)

톳은 새로운 생리활성 물질을 생산할 수 있는 소재로 각광받고 있으며, mouse calvaria 유래의 MC3T3-E1 세포는 골세포의 세포 활성화와 관련된 연구에서 유용하게 이용되어 왔다. 따라서 본 연구에서는 MC3T3-E1 세포를 이용하여 톳 분획물이 세포 증식에 미치는 영향과 ALP 활성, 조골세포의 골 형성을 위한 필수 인자인 collagen 합성 및 조골세포의 표식인자인 골 석회화 형성능에 미치는 영향에 대해 검토하였다. 각 분획물의 수율은 aqueous 분획물이 47.4%로 가장 높은 수율을 나타내었으며 다음으로 butanol 분획물, methanol 분획물 순으로 나타났으며, hexane 분획물이 4.7%로 가장 낮은 수율을 나타내어 극성 성분의 함유량이 더 높은 것으로 확인되었다. 톳 분획물의 농도(1, 10, 50, 100 µg/ml)에 따른 조골세포 성장에 미치는 영향을 MTT assay로 분석한 결과, 모든 분획물에서 대조군과 비교하여 120% 정도의 증식률을 나타내었다. 이는 선행연구자에 의한 대두 에탄올 추출물 실험 결과인 최고 117%의 세포 증식률과 비슷한 조골세포 증식유도 결과임을 확인할 수 있었다. 톳 분획물이 ALP 활성에 미치는 영향을 조사한 결과, 톳 분획물 중 hexane 분획물과 butanol 분획물이 조골세포의 ALP 활성을 증가시켰으며, 특히 butanol 분획물은 120% 이상의 ALP 활성을 증가시켜 조골세포의 분화에 영향을 줄 가능성이 제시 되었다. 톳 분획물이 조골세포의 collagen 합성에 미치는 실험결과에서 모든 분획물에서 유의적인 collagen 합성능력을 나타내었다. 또한 조골세포의 골 석회화 형성에 미치는 영향은 methanol 분획물을 제외한 다른 분획물에서 유의적인 형성능을 보였으며, 특히 butanol 분획물을 100 µg/ml 첨가하였을 때는 281.25%, aqueous 분획물을 100 µg/ml 첨가하였을 때는 240.46%로 높은 골 석회화 형성능을 나타냈다. 따라서 톳 분획물이 조골세포의 증식, ALP 활성, collagen 합성 및 골 석회화 형성을 촉진하여 골 생성에 영향을 줄 수 있는 것이 확인되었으며, 구체적인 기작 연구와 *in vivo* 연구가 병행된다면 골다공증 예방과 관련된 기능성 식품의 천연소재로 개발이 가능하리라 사료된다.