J Korean Soc Food Sci Nutr
40(10), 1384~1390(2011)

한국식품영양과학회지
http://dx.doi.org/10.3746/jkfn.2011.40.10.1384

감국(*Chrysanthemum indicum* L.) 추출물이 MC3T3-E1 조골세포의 증식 및 분화에 미치는 영향

윤지혜[1] · 황은선[2] · 김건희[1†]

[1]덕성여자대학교 식품영양학과
[2]한경대학교 영양조리과학과

Effects of *Chrysanthemum indicum* L. Extract on the Growth and Differentiation of Osteoblastic MC3T3-E1 Cells

Jeehye Yun[1], Eun-Sun Hwang[2], and Gun-Hee Kim[1†]

[1]Dept. of Food and Nutrition, Duksung Women's University, Seoul 132-714, Korea
[2]Dept. of Nutrition and Culinary Science, Hankyong National University, Gyeonggi 456-749, Korea

Abstract

***Chrysanthemum indicum* L. (Asteraceae) is a common traditional herbal medicine used for the treatment of inflammation, hypertension, and respiratory diseases due to its strong antagonistic function against inflammatory cytokines. In this study, the effects of *Chrysanthemum indicum* L. extract (CIE) on the function of osteoblastic MC3T3-E1 cells and the production of local factors in osteoblasts were investigated. CIE (100 μg/mL) significantly increased the growth of MC3T3-E1 cells and caused a significant elevation of alkaline phosphatase (ALP) activity, and the deposition of collagen and calcium in the cells ($p<0.05$). The effect of CIE in increasing cell growth, ALP activity, and collagen content was completely prevented by the presence of 1 μM tamoxifen, suggesting that CIE's effect might be partly involved in estrogen-related activities. These results indicate that the enhancement of osteoblast functionality by CIE may prevent osteoporosis and inflammatory bone diseases.**

Key words: *Chrysanthemum indicum* L., osteoblast, MC3T3-E1 cell, alkaline phosphatase, mineralization

서 론

골조직은 교원질, 수산화인회석 등의 무기질로 구성된 세포외기질과 조골세포, 파골세포, 골세포 등 여러 종류의 세포들로 구성되어 있는 매우 복잡하고 활동적인 조직이다(1). 조골세포와 파골세포의 작용을 매개로 일생동안 끊임없이 형성과 흡수를 반복하며 골재형성 과정을 진행해 나간다(2). 이러한 골재형성 과정은 parathyroid hormone(PTH), calcitonin, estrogen 등과 같은 호르몬과 insulin-like growth factor I(IGF-I) 등의 골조직에서 분비되는 다양한 성장인자, tumor necrosis factor-α(TNF-α) 등과 같은 cytokines을 통해 조골세포와 파골세포의 활성 균형을 조절하며 항상성을 유지시킨다(3). 그러나 유전적, 생리적, 환경적 인자의 변화와 더불어 조골세포의 활성도가 약화되어 골형성이 감소하거나 파골세포의 활성도 강화로 골흡수가 증가되는 경우, 또는 두 가지 요소가 동시에 작용되는 경우에 골대사질환이 발생하게 된다(4).

골대사질환의 치료방법으로는 현재 칼슘보충제, vitamin D 대사산물과 thiazide diuretic 요법, calcitonin 요법, bisphosphonates 요법, estrogen 요법 등이 이용되고 있다. 그러나 아직까지 감소된 골량을 완전히 회복시킬 수 있는 약물이 없어 치료보다 예방의 중요성이 강조되고 있다(5). 폐경성 골다공증(postmenopausal osteoporosis)의 치료를 위해 투여되는 estrogen은 생체 내에서 성호르몬의 기능 외에도 조골세포의 estrogen receptor α(ER α) 혹은 β(ER β)와 결합한 후(6) 핵으로 이동하여 골대사에 관여하는 국소인자 유전자의 전사활성을 조절할 뿐만 아니라(7), collagen의 발현(8), 칼슘과 인 대사에 관여하는 alkaline phosphatase (ALP)의 활성(9) 및 성장인자인 IGF-I의 생성과 유전자의 발현을 증가시킴으로써 골 형성에 관여하는 것으로 보고되고 있다(10). 또한 조골세포를 자극하여 골의 석회화를 촉진하고, 파골세포의 생성을 촉진하는 RANK ligand(RANKL)의 분비를 억제하여 새로운 파골세포의 생성을 억제하는 한편, 기 생성된 파골세포의 apoptosis를 촉진하는 것으로 보고된 바 있다(1). 그러나 장기간 사용 시 오심, 체중증가, 불규칙한 자궁출혈, 자궁내막암 및 유방암과 같은 부작용을

†Corresponding author. E-mail: ghkim@duksung.ac.kr
Phone: 82-2-901-8496, Fax: 82-2-901-8474

유발하는 것으로 보고되고 있다(11). 따라서 최근에는 기존 치료법의 부작용을 최소화하고 골손실을 최소화하면서 골 형성을 촉진할 수 있는 한약재 및 식품 등의 천연물유래 활성성분을 이용한 대체요법 연구가 활발히 진행되고 있다(12). 현재 콩과식물(legumes)과 곡물(whole grains)에 널리 존재하는 genistein, daidzein을 비롯하여 luteolin, apigenin, resveratrol 등의 estrogen 유사효과 등이 보고되고 있으며, 이를 다량 함유한 식품의 섭취를 통한 식물성 에스트로젠 대체요법이 시도되고 있다(13,14).

감국(*Chrysanthemum indicum* Linne)은 국화과에 속하는 다년생 초본으로, 우리나라 중부 이남의 산간지역에 널리 분포하는 야생국화이며 예로부터 궁중에서는 국화주로, 민가에서는 고혈압 환자들이 약술로 애용하여 왔다(15). 한의학에서는 해열, 소염, 혈압강하, 두통 완화 등을 목적으로 이용되고 있으며 최근 여러 연구들을 통해 항균, 항염증, 면역조절, 항산화, 항암활성 등이 보고되고 있다(16-18). 주요 성분으로는 flavonoid 화합물인 luteolin, apigenin, apigenin 7-O-β-D-glucoside, luteolin 7-O-β-D-glucoside과 sesquiterpene lactone 화합물인 cumambrin A, cumambrin B, arteglasin A 및 angeloyljadin 등이 알려져 있다(19). 이들 성분 중 luteolin은 항염증, 항암, 항산화 및 estrogen receptor를 매개로 한 조골세포의 기능 증진 활성이 보고된 바 있고(20,21), apigenin 역시 조골세포의 증식 및 기능증진 효과에 대한 보고가 있어(20), 감국의 phytoestrogen 효과를 기대해 볼 수 있을 것으로 생각된다.

본 연구에서는 조골세포와 유사한 대사적 특징을 가지고 있는 mouse calvaria 유래의 MC3T3-E1 세포를 이용하여 감국 에탄올 추출물이 조골세포의 증식 및 분화에 미치는 영향을 분석하여, 골다공증 예방을 위한 식물성 에스트로젠으로서의 이용가능성을 탐색하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

감국(*Chrysanthemun indicum* L.)은 경북 영주시 풍기읍에서 2008년 7월에 구매하여 음건(陰乾) 후 사용하였다. 추출용 에탄올을 비롯한 실험에 사용한 시약들은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)의 특급시약을 사용하였다.

감국추출물의 제조

음건된 감국에 시료무게의 10배량(w/v)의 70% ethanol을 첨가하여 100°C 항온수조에서 3시간 동안 환류추출 하였고, 이 과정을 3회 반복하였다. 추출액은 여과지(Whatman No. 1, Kent, England)로 여과하여 회전진공농축기(EYELA, Tokyo Rikakikai Co., Ltd., Tokyo, Japan)로 감압농축한 후 동결건조 하여 분말시료를 얻었고(yield: 25.3%, w/w), 이를 100% dimethylsulfoxide(DMSO)에 녹인 후 여과(Whatman PVDF 0.45 μm)하여 실험에 사용하였다.

조골세포의 배양

MC3T3-E1 조골세포(RCB1126, osteoblast-like cell line from C57BL/6 mouse calvaria)는 10% heat-inactivated fetal bovine serum(FBS), 1% 항생제(100 U/mL penicillin-100 μg/mL streptomycin)를 함유한 α-modified minimal essential medium(α-MEM, Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) 배지로 37°C, 5% CO_2 하에서 배양하며 세포밀도가 90% 정도 포화되면 0.02% EDTA-0.05% trypsin용액을 사용하여 계대배양 하면서 실험에 사용하였다. 분화유도를 위하여 10 mM β-glycerol phosphate와 50 μg/mL ascorbic acid를 첨가하여 분화유도 배지로 사용하였으며, 2~3일 간격으로 배지를 교환해주었다.

조골세포의 증식유도 측정

시료의 농도별 처리에 따른 조골세포의 증식 정도는 Green 등(22)의 방법에 따라 3-(3,4-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT) assay로 측정하였다. MC3T3-E1 조골세포를 48-well plate에 분주(2×10^4/well)하여 2일간 배양한 후, 시료의 최종 농도가 3, 10, 30, 100 및 200 μg/mL이 되도록 처리하여 48시간 동안 배양하였다. 배양 후 MTT 시약을 5 mg/mL 농도로 20 μL를 각 well에 첨가하여 2시간 더 배양한 후 배지를 제거하고 DMSO를 200 μL씩 첨가하여 생성된 불용성의 formazan 결정을 용해시켜 ELISA reader(Spectra MAX M2, Molecular Device, Sunnyvale, CA, USA)로 570 nm에서 흡광도(OD)를 측정하였다. 세포의 증식률은 시료의 흡광도를 대조군의 흡광도에 대한 백분율로 나타내었다.

조골세포의 분화

MC3T3-E1 조골세포를 2×10^4 cell/well 농도로 48-well plate에 분주한 후 세포가 90% 포화되게 자라면 10 mM β-glycerophosphate와 50 μg/mL ascorbic acid를 함유한 배지로 교환하여 2일마다 배지를 갈아주며 분화를 유도하였다.

Alkaline phosphatase(ALP) 활성 측정

조골세포 분화 6일 후 각 농도별 시료를 처리하여 48시간 배양하였다. 배양한 세포는 DPBS로 세척한 후 0.1% Triton X-100을 첨가해 30분간 세포를 lysis 시킨 후 13,000 rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 원심분리 후 상등액을 취하고 ALP kit(Asan Pharm, Seoul, Korea)를 사용하여 ALP 활성을 측정하였다. 단백질량은 상등액 50 μL 중 5 μL를 96 well plate에 넣은 후 Bio-Rad 단백질 정량 시약(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 정량하였다. *p*-nitrophenol에 대한 표준곡선그래프와 500 nm에서 측정한 각 시료 처리군별 *p*-nitrophenol의 흡광도로부터 산출한 활성도를 정량한 단백질량으로 나누어 단위단백질 함량당 효소활성도(unit/mg protein)를 산출하였다. 효소활성은 대조군에 대한 백분율로 나타내었다.

Collagen 함량 측정

조골세포의 collagen 합성능력은 Tullberg-Reinert와 Jundt (23)의 방법으로 측정하였다. 조골세포 분화 6일 후 각 농도별 시료를 처리하여 48시간 배양하였다. 배양한 세포는 DPBS로 세척한 후 주로 동물조직 고정에 사용되는 bouin's fluid (saturated picric acid : 35% formaldehyde : glacial acetic acid=15:5:1)로 1시간 고정시켰다. 고정 후 3차 증류수로 세척한 후 건조하여 sirius red 염색액(1 mg/mL saturated picric acid)으로 1시간 동안 흔들어주며 염색하고 0.01 N HCl로 세척 후 0.1 N NaOH 0.2 mL을 첨가하여 용해시켜 ELISA reader(Spectra MAX M2, Molecular Device)를 사용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. Collagen 함량(μg per 2×10^4 cell)은 대조군에 대한 백분율로 나타내었다.

골의 석회화 측정

조골세포 분화 10일 후 각 농도별 시료를 처리하여 48시간 배양하였다. 분석을 위해 배지를 제거하고 PBS로 세척한 뒤, 70% EtOH로 실온에서 1시간 동안 고정시켰다. 세포를 고정시킨 후 40 mM alizarine red(AR) solution으로 10분간 염색하고 3차 증류수로 세척한 뒤 10% cetylpyridinium chloride를 첨가하여 15분간 녹여 염색된 정도를 ELISA reader(Spectra MAX M2, Molecular Device)를 이용하여 561 nm에서 흡광도를 측정하였다. 석회화(mineralization) 정도는 대조군에 대한 백분율로 나타내었다.

통계처리

실험결과는 평균과 표준오차(mean±SEM, n=6)로 나타내었으며, 통계분석은 SAS program(V8, SAS Institute, Cary, NC, USA)을 이용한 one-way ANOVA($p<0.05$)을 실시하여 Duncan's multiple range test에 의해 시료간의 유의적 차이를 검정하였다.

결과 및 고찰

감국추출물이 조골세포의 증식에 미치는 영향

감국 에탄올 추출물이 조골세포의 증식에 미치는 영향을 알아보기 위하여 세포독성을 보이는 농도와 최적 작용농도를 MTT assay를 통해 알아보았다. 예비실험 결과를 통해 감국 에탄올 추출물의 적정 작용 농도 범위를 10~200 μg/mL로 결정하고, 10, 30, 100, 200 μg/mL 농도로 시료를 첨가하여 48시간 배양한 후 MTT assay로 세포 성장에 미치는 영향을 측정하였다(Fig. 1). MC3T3-E1 조골세포는 감국 에탄올 추출물(CIE) 처리 시 농도 의존적인 세포 증가 경향을 보였으며, 특히 100 μg/mL 농도에서 122%의 세포증식을 보여 유의적인 차이를 나타내었다(Fig. 1A). 그러나 골조직의 estrogen receptor(ER)에 antagonist(anti-estrogen reagent)로써 estrogen 반대효과 기전을 보이는 tamoxifen(24, 25) 1 μM을 122%의 세포성장을 보였던 100 μg/mL 농도의

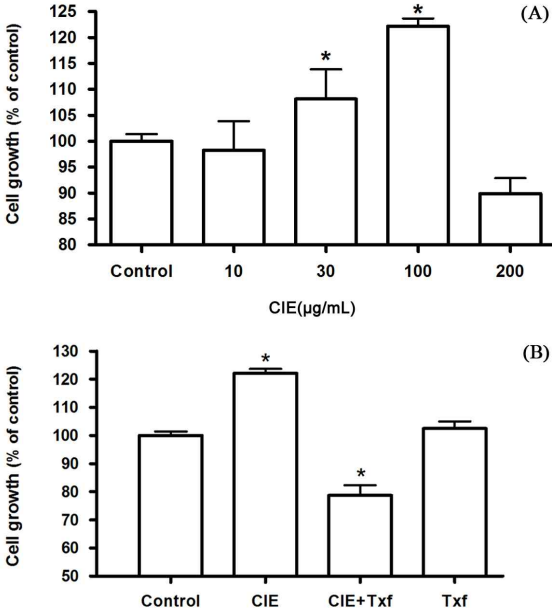

Fig. 1. Effect of CIE on the growth in MC3T3-E1 cells. MC3T3-E1 cells were cultured in the presence or absence of CIE (A), and in combination with 100 μg/mL CIE and 1 μM tamoxifen (Txf) (B) for 48 hr. Data shown are mean±SEM, expressed as a percentage of control (cells not treated with CIE) and the control value was 0.357±0.005 OD per 2×10^4 cells. Significant differences from control at $^*p<0.05$. CIE: *Chrysanthemum indicum* L. extract.

시료와 병행 처리 시 시료처리에 의한 세포성장 증가 효과가 억제되는 것이 관찰되었다(Fig. 1B).

이는 luteolin 1 μM 처리 시 estrogen receptor를 매개로 한 MC3T3-E1 조골세포의 기능 증진을 보고한 Choi(26)의 결과와 apigenin 0.01 μM 농도에서 약 124% 정도의 조골세포 증식효과를 보고한 Choi(27)의 연구결과와 유사하였다. Luteolin, apigenin 등이 주요성분인 감국 에탄올 추출물 역시 MC3T3-E1 조골세포 증식에 유효한 효과가 있는 것으로 판단되었다. 또한 estrogen antagonist인 tamoxifen 처리에 의해 성장 증가가 억제되는 것으로 보아 감국 추출물의 MC3T3-E1 조골세포에 대한 증식유도는 estrogen 유사효과에 의한 것으로 유추할 수 있었다. MC3TC-E1 조골세포의 증식 촉진 정도는 금앵자 추출물(100 μg/mL) 처리 시 대조군 대비 최대 140% 정도의 성장률을 나타내었다고 보고한 Lee(28)의 연구결과나 복분자 추출물 10 μg/mL 처리 시 140% 정도의 성장효과를 보고한 Lee와 Lee(29)의 결과보다는 낮았으나, 대두 에탄올 추출물 50~100 μg/mL 농도에서 최대 117%의 성장률을 확인한 Choi(30)의 결과에 비하여는 다소 높은 세포성장을 나타낸 것으로 보였다.

조골세포 분화에 대한 영향

Alkaline phosphatase(ALP) 활성에 대한 영향: 염기성 인산분해효소(ALP)의 활성측정은 *p*-nitrophenyl phosphate의 가수분해 반응에 ALP가 촉매로 작용하는 원리를 이용하여, 가수분해 산물인 *p*-nitrophenol의 양을 측정함으

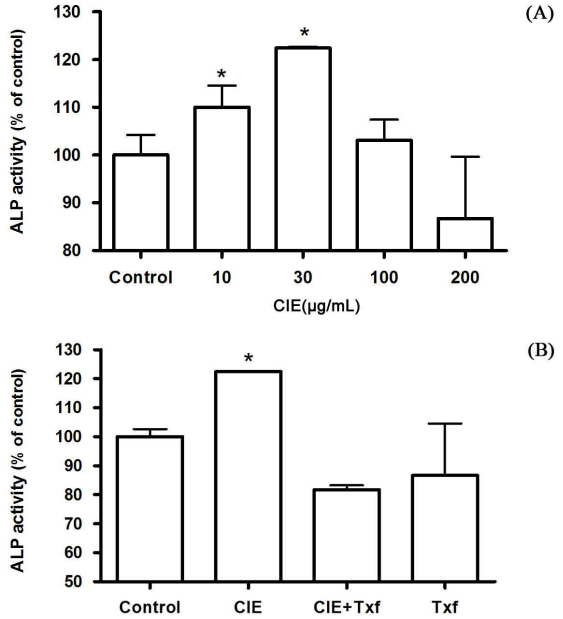

Fig. 2. Effect of CIE on the alkaline phosphatase activity of MC3T3-E1 cells. MC3T3-E1 cells were cultured in the presence or absence of CIE (A), and in combination with 30 μg/mL CIE and 1 μM tamoxifen (Txf) (B) for 48 hr. Data shown are mean ±SEM, expressed as a percentage of control (cells not treated with CIE) and the control value was 9.37±0.40 unit/ mg protein. Significant differences from control at $^{*}p<0.05$. CIE: *Chrysanthemum indicum* L. extract.

로써 ALP의 농도를 산출하는 방법이다.

감국 에탄올 추출물 처리에 의한 MC3T3-E1 조골세포의 ALP 활성은 Fig. 2A에서 보는 바와 같이 10~30 μg/mL 농도에서 농도 의존적인 증가 경향을 보였으며 30 μg/mL 농도에서 최대 122%의 ALP 활성을 나타내었다($p<0.05$). 그러나 이러한 활성 증가 효과는 시료와 estrogen antagonist인 tamoxifen 1 μM을 병행 처리 시 상쇄되었다(Fig. 2B).

조골세포는 골 표면에 근접해 있으며 세포막에 ALP를 가지고 있다. ALP는 칼슘과 인 대사에 관여하는 효소로서, 세포외막과 석회화 조직의 기질소포에서 높은 농도로 발견되며 염기성 pH 8~10에서 최적의 활성을 나타낸다(31). Organic phosphate를 가수분해하여 석회화가 이루어지는 부위에서 국소적으로 인산이온 농도를 증가시키고 세포외 기질에 인산칼슘을 침착시키는 석회화를 유도 하는 역할을 하므로(32), Stein 등(33)은 ALP 활성도는 골세포 분화의 표지인자로써 조골세포의 분화정도를 판단하기 위해 측정해야 한다고 하였다. 또한 Torii 등(34)은 antisense RNA를 이용하여 ALP가 조골세포의 석회화에 관여하는 것을 입증하였고, Weiss 등(35)은 liver, bone, kidney type ALP 유전자의 선천적 결핍으로 인한 저인산효소증에서 골조직 석회화부전을 보고하였다.

Fukayama와 Tashjian(36)은 ALP가 몇몇 조골세포주에서 calcuim uptake에 관여함을 보고하기도 하여 여러 후행 연구들에서 조골세포의 ALP 활성을 분화지표로 사용하였다(26,27). 본 연구에서도 감국 에탄올 추출물의 조골세포 활성 및 분화효과를 살펴보기 위한 지표로 ALP 활성을 측정하였다. 그 결과 10~30 μg/mL 농도범위에서 농도 의존적인 증가 경향과 30 μg/mL 농도에서 최고 122%의 ALP 활성을 확인하였으며($p<0.05$), tamoxifen 처리 시 시료에 의한 ALP 활성 증가효과가 상쇄되는 결과를 얻었다. 이는 luteolin 1 μM 농도에서 약 113% 정도의 ALP활성 증가와 tamoxifen 1 μM 처리 시 luteolin에 의한 활성 증가효과가 상쇄되었음을 보고한 Choi(26)의 연구와 apigenin 0.01 μM 농도에서 약 117% 정도의 ALP 활성 증가와 tamoxifen 처리를 통해 estrogen 유사작용임을 확인한 Choi(27)의 연구 결과 등을 볼 때, luteolin, apigenin이 주요성분으로 알려진 감국추출물 역시 이러한 유효성분들이 복합적으로 작용하여 조골세포의 ALP 활성 촉진 결과를 나타낸 것이며, 그 촉진 효과는 estrogen 유사작용에 의한 것으로 사료된다.

Collagen 합성에 대한 영향: 감국 에탄올 추출물이 조골세포의 분화를 증가시키는지 알아보기 위해 Sirius Red-based colorimetric assay를 사용하여 조골세포의 collagen 합성능을 측정하였다(Fig. 3). 감국 에탄올 추출물 처리 시 collagen 함량은 농도 의존적인 증가 경향을 보였으며, 200 μg/mL 농도에서 125%의 함량 증가를 나타내어 유의적인 차이를 보였다(Fig. 3A). 또한 tamoxifen 1 μM을 125%의 collagen 함량 증가를 나타내었던 200 μg/mL 농도의 시료와

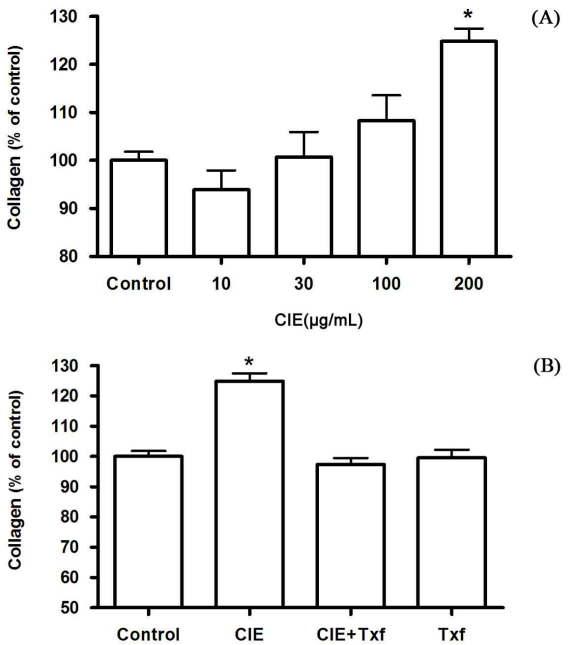

Fig. 3. Effect of CIE on the collagen synthesis of MC3T3-E1 cells. MC3T3-E1 cells were cultured in the presence or absence of CIE (A), and in combination with 200 μg/mL CIE and 1 μM tamoxifen (Txf) (B) for 48 hr. Data shown are mean ±SEM, expressed as a percentage of control (cells not treated with CIE) and the control value was 6.82±0.12 μg per 2×10^4 cells. Significant differences from control at $^{*}p<0.05$. CIE: *Chrysanthemum indicum* L. extract.

병행 처리 시에는 시료처리에 의한 collagen 함량 증가 효과가 상쇄 되는 것이 관찰되었다(Fig. 3B). 이는 조골세포의 초기 분화 지표인 ALP 활성 측정 결과에서와 마찬가지로 감국추출물이 조골세포의 collagen 합성능을 증가시키는 가능성이 있으며 이러한 증가 효과는 tamoxifen 처리에 의해 상쇄되는 것으로 보아 estrogen 유사효과에 의한 것으로 유추해볼 수 있었다.

Collagen은 인체 각 결합 조직에 분포하는 중요한 단백질로서, type I collagen은 피부, 골 및 인대에 풍부하게 존재하며 조골세포에 의해 주로 합성되고 전체 골단백의 85~90%를 차지한다(37). 조직 내의 collagen 손상은 연골조직의 노화와 골관절염, 골다공증의 원인이 되는 것으로 알려져 있으며(38), collagen 합성에 estrogen이 관여하는 것으로 보고되고 있다(39).

Clark와 Schutting(40)은 estrogen 투여는 골의 무기질 성분의 증가와 함께 collagen 조성에도 영향을 미쳐 골절 예방 효과를 지닌다고 하였고, Choi(41)는 동물실험결과 난소 절제로 인해 호르몬 분비가 중지된 흰쥐 군이 난소를 절제하지 않은 군에 비해 연골 collagen 함량이 낮았으며, 오디 추출물 200 mg/kg를 투여함으로써 함유된 flavonoid의 phytoestrogen 효과로 인해 collagen 수치가 유의적으로 회복되었다고 보고하였다. Choi(26)는 luteolin 1 μM에 의해 MC3T3-E1 조골세포의 collagen 합성이 대조군 대비 약 135%를 나타내어 유의적인 증가를 확인하였고, 이러한 증가효과는 tamoxifen 1 μM 존재 시 상쇄되어 estrogen receptor(ER)를 매개로 한 증가효과라고 보고하였다. Choi(27)는 ER β에 친화력이 높은 flavonoid인 apigenin이 MC3T3-E1 조골세포의 collagen 합성을 유의적으로 증가시켰으며 1 μM tamoxifen 처리 시 합성증가 효과가 상쇄되었다고 보고하였다. 이는 luteolin, apigenin이 주요 성분으로 알려진 감국의 추출물의 유효성분들이 복합적으로 작용하여 estrogen 유사효과를 매개로 collagen 함량 증가를 나타낸 것으로 사료된다.

골의 석회화에 대한 영향: Bone nodule 형성능은 조골세포의 분화에 중요한 표식인자이다. Alizarin은 식물성 염료로서 calcium에 특이적으로 흡착력이 높다. 이것은 무기질화된 세포의 세포외 기질에 염색되므로 무기질화 된 양과 염색된 정도가 상호 비례한다(42,43).

분화과정의 중요한 mineralization 지표는 Alizarin Red staining을 사용하여 calcium의 침착 정도를 측정하였다. 무기질화 형성능을 측정하기 위해 alizarin red로 염색하여 염색된 석회화물을 10% cetylpyridinium chloride로 녹여 OD 값을 측정하여 상대활성을 나타낸 결과, 감국 에탄올 추출물에 대해 농도 의존적으로 mineralization의 증가 경향을 보였으며, 분화 12일째 200 μg/mL 농도에서 111% mineralization을 보이며 대조군에 비해 유의적인 차이를 나타내었다($p<0.05$)(Fig. 4).

Park 등(44)은 미역취 메탄올 추출물 10 μg/mL 농도에서

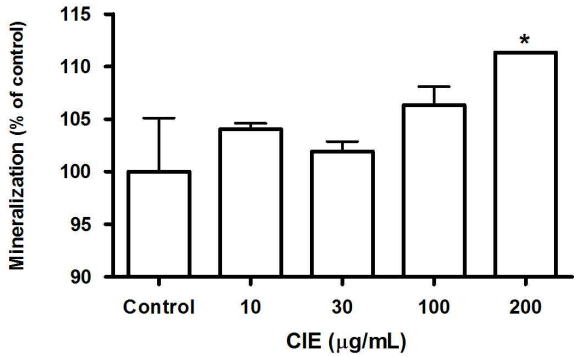

Fig. 4. Effect of CIE on the mineralization of MC3T3-E1 cells. MC3T3-E1 cells were cultured in the presence or absence of CIE for 48 hr. Calcium forms an alizarin red-calcium complex in a chelation process. Data shown are mean±SEM, expressed as a percentage of control (cells not treated with CIE) and the control value was 0.337±0.017 OD per 2×10^4 cells. Significant differences from control at $^*p<0.05$. CIE: *Chrysanthemum indicum* L. extract.

MC3T3-E1 조골세포 분화 9~18일 사이 mineralization이 급격히 증가하여 18일째에 최대에 이르러 대조군에 비해 약 1.6배(160%)에 달했으며, genistein 1 μM 농도에서도 최대 약 1.3배(130%) 증가됨을 확인하였다고 보고하였는데, 본 연구에서는 분화유도기간이 12일로 상대적으로 짧아 증가율이 다소 낮게 나타난 것으로 보이며 추후 분화기간을 연장하여 관찰해 볼 필요가 있을 것으로 사료된다.

요 약

본 연구에서는 감국 에탄올 추출물이 조골세포의 증식 및 분화에 미치는 영향을 분석하여 골다공증 관련 식물성 에스트로젠으로써의 이용 가능성을 확인하고자 하였다. 감국 에탄올 추출물은 30~100 μg/mL 농도 범위에서 조골세포의 증식을 유의적으로 증가시켰으며, 100 μg/mL 농도에서 대조군 대비 최대 122% 세포성장을 나타내었다. 이러한 세포증식 유도는 estrogen antagonist인 tamoxifen 처리 시 상쇄되어 estrogen 유사효과에 의한 것으로 사료되었다. MC3T3-E1 세포의 분화에 미치는 영향을 살펴보고자 대표적 분화지표인 ALP 효소활성, collagen 함량, mineralization 수준을 측정한 결과, 10, 30 μg/mL 농도에서 ALP 활성의 유의적 증가와 200 μg/mL 농도에서 collagen 함량과 mineralization의 유의적인 증가를 확인하였으며, ALP 활성, collagen 함량 모두 tamoxifen 처리에 의해 증가 효과가 상쇄되어 estrogen 유사작용에 의한 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2010년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 대학중점연구소 지원사업으로 수행된 연구(2010-0029692)임.

문 헌

1. Stuart IF. 2008. Bone deposition and resorption. In *Human Physiology*. 9th ed. McGraw-Hill Inc., New York, NY, USA. p 652-657.
2. Parfitt AM. 1994. Osteonal and hemi-osteonal remodeling: The spatial and temporal framework for signal traffic in adult human bone. *J Cell Biochem* 55: 273-286.
3. Mone Z. 2007. Skeletal remodeling in health and disease. *Nat Med* 13: 791-801.
4. Park JS. 2000. Physiological effect of isoflavone (II): osteoporosis and postmenopausal symptom. *Natl Nutr* 215: 25-31.
5. Rogers J. 1967. Estrogens in the menopause and postmenopause. *N Eng J Med* 280: 364-367.
6. Vidal O, Kindblom LG, Ohlsson C. 1999. Expression and localization of estrogen receptor-β in murine and human bone. *J Bone Miner Res* 14: 923-929.
7. Edward MW, Bain SD, Bailey MC, Lantry MM, Howard GA. 1992. 17β-estradiol stimulation of endosteal bone formation in the ovariectomized mouse: an animal model for evaluation of bone targeted estrogens. *Bone* 13: 29-34.
8. Ernst M, Heath JK, Rodan GA. 1989. Estradiol effects on proliferation, messenger ribonucleic acid for collagen and insulin-like growth factor-I, and parathyroid hormone-stimulated adenylate cyclase activity in osteoblastic cells from calvariae and long bones. *Endocrinology* 125: 825-833.
9. Tomkinson A, Reeve J, Shaw RW, Noble BS. 1997. The death of osteocytes via apoptosis accompanies estrogen withdrawal in human bone. *J Clin Endocrinol Metab* 82: 3128-3135.
10. McCarthy TL, Centrella M. 1993. Regulation of IGF activity in bone. *Adv Exp Med Biol* 343: 407-414.
11. Genant HK, Baylink DJ, Gallagher JC. 1989. Estrogens in the prevention of osteoporosis in postmenopausal women. *Am J Obstet Gynecol* 161: 1842-1846.
12. Anderson JJ, Anthony MS, Cline JM, Washburn SA, Garner SC. 1999. Health potential of soy isoflavones for menopausal women. *Public Health Nut* 2: 489-504.
13. Arjmandi BH, Alekel L, Hollis BW, Amin D, Stacewicz-Sapuntzakis M, Guo P, Kukreja SC. 1996. Dietary soybean protein prevents bone loss in an ovariectomized rat model of osteoporosis. *J Nutr* 126: 161-167.
14. Gehm BD, McAndrews JM, Chien PY, Jameson JL. 1997. Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for the estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 14138-14143.
15. Han SM. 2005. Studies on the functional components and cooking aptitude for medicinal tea of *Chrysanthemum indicum* L. *PhD Dissertation*. Sejong University, Seoul, Korea.
16. Shunying Z, Yang Y, Huaidong Y, Yue Y, Guolin Z. 2005. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Chrysanthemum indicum*. *J Ethnopharmacol* 96: 151-158.
17. Cheon MS, Yoon TS, Lee DY, Choi GY, Moon BC, Lee AY, Choo BK, Kim HK. 2009. *Chrysanthemum indicum* Linné extract inhibits the inflammatory response by suppressing NF-κB and MAPKs activation in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 macrophages. *J Ethnopharmacol* 122: 473-477.
18. Cheng W, Li J, You T, Hu C. 2005. Anti-inflammatory and immuno-modulatory activities of the extracts from the inflorescence of *Chrysanthemum indicum* Linné. *J Ethnopharmacol* 101: 334-337.
19. Ryu SY, Choi SU, Lee SH, Ahn JW, Zee OP. 1994. Antitumor activity of some phenolic components in plants. *Arch Pharm Res* 17: 42-44.
20. Heinrich PC, Behrmann I, Newen GM, Schaper F, Graeve L. 1998. Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J* 334: 297-314.
21. Husain SR, Cillard J, Cillard P. 1987. Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. *Phytochemistry* 26: 2489-2492.
22. Green LM, Reade JL, Ware CF. 1984. Rapid colorimetric assay for cell viability: Application to the quantitation of cytotoxic and growth inhibitory lympokines. *J Immunol Meth* 70: 257-268.
23. Tullberg-Reinert H, Jundt G. 1999. In situ measurement of collagen synthesis by human bone cells with a sirius red-based colorimetric microassay: effects of transforming growth factor beta2 and ascorbic acid 2-phosphate. *Histochem Cell Biol* 112: 271-276.
24. Damien E, Price JS, Lanyon LF, 1998. The estrogen receptor's involvement in osteoblasts adaptive response to mechanical strain. *J Bone Miner Res* 13: 1275-1282.
25. Ishibashi O, Yamagishi T, Hanada K, Kawashima H. 2001. Tamoxifen agonism and estrogen antagonism of c-fos gene promoter activity through non-consensus-responsive elements in MC3T3-E1 osteoblasts. *Biochem Biophy Res Comm* 289: 705-711.
26. Choi EM. 2007. Modulatory effects of luteolin on osteoblastic function and inflammatory mediators in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Cell Biology International* 31: 870-877.
27. Choi EM. 2007. Apigenin increases osteoblastic differentiation and inhibits tumor necrosis factor-α-induced production of interleukin-6 and nitric oxide in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Pharmazie* 62: 216-220.
28. Lee HJ. 2005. Effect of *Rosa laevigata* Michx. methanol extracts on the bone metabolism in ovariectomized rat. *MS Thesis*. Keimyung University, Daegu, Korea.
29. Lee JW, Lee IS. 2004. Effects of *Rubus coreanus* Miquel extracts on the activity and differentiation of MC3T3-E1 osteoblastic cell. *J Life Sci* 14: 967-974.
30. Choi EM. 2001. Effect of soybean ethanol extract on the function of osteoblastic MC3T3-E1 cells. *PhD Dissertation*. University of Kyunghee, Seoul, Korea.
31. Wlodarski KH, Reddish AH. 1986. Alkaline phosphatase as a marker of osteoinductive cells. *Calcif Tissue Int* 39: 382-385.
32. Harrison G, Shapiro IM, Golub EE. 1995. The phosphatidylinositol-glycolipid anchor on alkaline phosphatase facilitates mineralizaton initiation in vitro. *J Bone Miner Res* 10: 568-573.
33. Stein GS, Lian JB, Wijnen AJ, Montechino M. 1996. Transcriptional control of osteoblast growth and differentiation. *Physiol Rew* 76: 593-629.
34. Torii Y, Hitomi K, Yamagishi Y, Tsukagoshi N. 1996. Demonstration of alkaline phosphatase participation in the mineralization of osteoblasts by antisense RNA approach. *Cell Biol Int* 20: 459-464.
35. Weiss MJ, Ray K, Fallon MD, Whyte MP, Fedde KN, Lafferty MA. 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.
36. Fukayama S, Tashjian AH. 1999. Stimulation by parathyroid hormone of $^{45}Ca^{2+}$ uptake in osteoblast-like cells: possible involvement of alkaline phosphatase. *Endocrinology* 126: 1941-1949.

37. Lubec O, Labudova O. 1992. Alpha-methyl-proline restores normal levels of bone collagen type I synthesis in ovariectomized rats. *Life Sci* 57: 2245-2253.
38. Tiku ML, Allison GT. 2003. Malondialdehyde oxidation of cartilage collagen by chondrocytes. *Osteo Arthritis Res Soc Int* 11: 159-166.
39. Kim MH, Otsuka M, Arakawa N. 1994. Age-related changes in the pyridinoline content of guinea pigs cartilage and achilles tendon collage. *J Nutr Sci Vitaminol* 40: 95-103.
40. Clark AP, Schutting JA. 1992. Targeted estrogen/progesteron replacement therapy for osteoporosis: calculation of health care cost savings. *Osteoporosis Int* 2: 195-200.
41. Choi KH. 2006. The effects of mulberry fruits on the biological activity in ovariectomized rats. *MS Thesis*. University of Silla, Busan, Korea.
42. Maeda T, Matsunuma A, Kawane T, Horiuchi N. 2001. Simvastatin promotes osteoblast differentiation and mineralization in MC3T3-E1 cells. *Biochem Biophy Res Comm* 280: 874-877.
43. Schiller PC, D'ippolito G, Balkan W, Roos BA, Howard GA. 2001. Gap-junctional communication is required for the maturation process of osteoblastic cells in culture. *Bone* 28: 362-369.
44. Park JH, Lee JW, Kim HJ, Lee IS. 2005. Effects of *Solidago virga-aurea* var. *gigantea* Miq. root extracts on the activity and differentiation of MC3T3-E1 osteoblastic cell. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 34: 929-936.

(2011년 7월 26일 접수; 2011년 8월 28일 채택)