

민들레 추출물의 항산화 활성 및 H₂O₂로 산화적 스트레스를 유도한 조골세포의 활성과 분화에 미치는 영향

서지은 · 김건희[†]

덕성여자대학교 식물자원연구소

Antioxidant Activity and Differentiation Effect of *Taraxacum mongolicum* Extracts against Hydrogen Peroxide-induced Oxidative Damage of MC3T3-E1 Osteoblast Cells

Jieun Seo and Gun-Hee Kim[†]

Plant Resources Research Institute, Duksung Women's University

Abstract

The correlation between osteoporosis and reactive oxygen species (ROS)-induced oxidative stress was investigated. Thus, interest in food and plants with antioxidant effects that can reduce damage caused by ROS during bone metabolism is heightening. In this study, the antioxidant effect of *Taraxacum mongolicum* on proliferation and differentiation of MC3T3-E1 cells under H₂O₂-induced oxidative stress was studied to investigate its protective effect against oxidative stress and its availability as an antioxidant material related to bone diseases. As a result, total polyphenol and total flavonoid contents of *T. mongolicum* were 33.65 mg/g and 4.45 mg/g, respectively. The *T. mongolicum* extract increased proliferation of both MC3T3-E1 cells and differentiated osteoblasts under H₂O₂-induced oxidative stress conditions. In addition, two differentiation markers, alkaline phosphatase activity and mineralization level in the *T. mongolicum* extract, tended to increase. These results indicate that *T. mongolicum* extract suppressed the damage to osteoblasts under oxidative stress and that it is potential antioxidant materials for preventing bone diseases.

Key words : MC3T3-E1, ROS, antioxidant, differentiation

1. 서론

현대사회는 과학과 의학 제반기술의 발달에 따른 평균수명의 증가로 노인인구가 늘어나고 있다. 이와 같은 사회의 변화에 따라 노화로 인한 골다공증을 비롯한 퇴행성관절염과 같은 골 질환 환자의 수가 증가하고 있고 이에 따른 건강 기능성 식품개발이 요구 되고 있다.

이런 노인성 골질환의 원인 중 활성산소가 있다. 활성산소

(Reactive Oxygen Species, ROS)는 산소의 환원 대사물질로서 스트레스, 과식, 음주, 흡연, 방사선, 초음파 및 환경오염, 세포 내 대사과정의 불균형 등의 요인으로 인해 대사의 균형이 깨지게 되면 과잉으로 생성된다(David L등 1993, Alessio HM 1993, Jenkins R 1993). 과잉으로 생성된 활성산소는 DNA와 단백질 및 지방의 심한 손상을 일으켜 세포의 손상을 가져온다. 세포들은 ROS의 생성 및 축적에 대항하기 위한 항산화 시스템을 가지고 있으나, ROS의 발생이 세포내 항산화능력을 초과하는 경우 산화스트레스에 노출된다. 산화스트레스는 뇌 질환, 심장질환, 동맥경화, 당뇨병, 폐섬유증, 암, 관절염 및 치매 등의 여러 질환과, 노화의 중요 병인으로 알려져 있다(Stadtman ER과 Berlett BS 1998, Yun JH 2010). 항산화 물질은 활성산소에 의한 손상을 줄여주는데 합성항산화제는 과량 사용 시 발암성 및 독성을 나타낼 수 있다고 보고되고 있어 최근에는 식품이나 천연물에서 유래한 항산화제에 대한 연구

[†]Corresponding author : Gun-Hee Kim, Dept. of Food and Nutrition, Duksung Women's University, 419, Ssangmun-dong, Dobong-gu, Seoul 132-714, Korea.
Tel: +82-2-901-8496
Fax: +82-2-901-8474
E-mail: ghkim@duksung.ac.kr

가 진행되고 있다(Im DY 등 2011, Branen AL 1975, Farag RS 등 1989). 보고되고 있는 천연유래 항산화물질은 비타민 E, A, C, 베타카로틴 등이 있고 페놀성 물질이나 플라보노이드 또한 항산화 효과가 있다고 보고되고 있다(Jang JB 등 2010).

MC3T3-E1 cell은 mouse calvaria 유래의 조골세포이며 섬유아세포의 형태를 보이다가 장기간 배양 시 높은 alkaline phosphatase 활성을 보이고 조골세포와 골세포로 분화가 가능하며 골기질의 석회화를 일으키는 세포이다(Kurihara N 등 1986, 박상기와 신형식 2001). 골형성 과정 중 세포의 증식, 분화, 석회화 등 골아세포와 유사한 대사적 특징을 가지고 있으며 조골세포 전구체로부터 전조골세포와 조골세포, 그리고 골내막세포 또는 골세포로 분화되는 과정에 속하는 세포이다. 이러한 특징으로 골기질의 축적, 석회화, 성장요소에 대한 효과, 형태와 대사변화 등을 연구하는데 이용되고 있다(Park JH 등 2005).

최근 들어 이러한 활성산소로 인한 산화스트레스와 골다공증의 연관성에 대한 관심이 고조되고 있다. 55세 이상의 남성과 여성을 대상으로 산화적 스트레스가 증가함에 따라 골밀도를 감소시킨다는 연구가 보고되고 있고(Samar B 등 2001) 항산화제인 vitamin C를 섭취한 폐경기 여성의 골밀도가 증가되었다는 연구가 보고되고 있다(Morton DJ 등 2001). 또한 ROS는 조골세포의 대사를 저해하고 파골세포의 활성도를 증가시켰으며(Garrett IR 등 1990, Fraser JHE 등 1996), 과산화수소로 인한 세포내 산화스트레스의 증가는 전조골세포주인 MC3T3-E1세포와 골수기질세포주인 M2-10B4세포의 조골세포로의 분화를 저해함이 보고되고 있다(Mody L 등 2001, 오은숙 등 2006). H₂O₂ 처리 후 조골세포의 수와 분화가 감소되었고, 산화적 스트레스로 인한 조골세포 대사의 저해는 항산화제로 인해 차단되었음을 보고하기도 하였다(Nicholson NC 등 1998, 오은숙 등 2006).

본 실험에 사용된 민들레는 국화과에 속하는 여러해살이풀로서 별이 잘 드는 들이나 길가에서 전국적으로 자라난다. 잎은 뿌리에서만 나며, 잎몸은 길이 20-30 cm, 폭 2.3-5 cm, 로제트모양으로 땅위에 퍼지고 꽃은 4-5월에 핀다. 민들레의 주요 구성성분으로는 hydroxycinnamic acid, chicoric acid, monocaffeoyltartaric acid, chlorogenic acid, coumarines, cichorine, aesculin 등이 있다. 한방에서 포공영이라고 하고 해열, 소염, 이뇨, 항암작용, 해독과 이뇨에 효과가 있으며, 간과 담낭질환에 효과가 있다고 알려져 있다. 민들레 추출물에 관한 연구로는 항염 활성, 항종양 활성, 항암 활성, 항면역활성, 항알러지 및 항위염 등에 대하여 많이 보고되어지고 있고 특히 자유라디칼 소거활성 및 항산화 활성이 높다고 보고되고 있다(Kang MJ 등 2002, Koh YJ 등 2008).

이에 본 연구에서는 민들레의 항산화 효과를 확인하고 더 나아가 조골세포의 전구세포인 MC3T3-E1 세포를 가지고 민들레 추출물이 H₂O₂로 유도한 산화적 스트레스 상황에서의 증식 및 분화에 미치는 영향을 분석하여 산화적 스트레스에 대한 보호효과 및 골 질환 관련 항산화소재로서의 이용가능성에 대해 연구하고자 하였다.

연구 내용 및 방법

1. 추출물 제조

건조된 민들레 시료무게의 10배량(w/v)의 70% methanol을 첨가하여 100℃에서 6시간동안 환류추출 하였다. 추출액은 여과지(Advantec, 2호)로 여과하여 감압농축기(EYELA, Tokyo Rikakikai Co., Ltd, Japan)로 농축 후 동결건조(Bondiro freeze-dryer, Ilshin Lab Co., Ltd, Korea)하였고 이를 DMSO에 100 mg/mL로 녹여 여과하여 실험에 사용하였다.

2. 폴리페놀 함량

총 폴리페놀 함량은 페놀성 물질이 phosphomolybdic acid와 반응하여 청색으로 발색되는 원리를 이용한 Folin-Denis 방법에 따라 분석하였다(Kang MJ 등 2002). 1 mg/mL로 제조한 추출물 0.5 mL에 Folin 시액 0.5 mL을 혼합한 뒤 3분간 실온에서 반응시킨다. 그 뒤 2% Na₂CO₃ 1.5 mL을 첨가한 뒤 2시간 동안 암소에서 반응시킨 뒤 760 nm에서 흡광도를 측정한다. 측정된 흡광도는 gallic acid(6.25-100 µg/mL)를 이용하여 표준곡선을 작성하여 총 폴리페놀 함량을 계산하였다.

3. 플라보노이드 함량

1 mg/mL로 제조한 추출물 1 mL에 2% aluminium chloride methanolic solution 1 mL을 혼합한 뒤 15분간 실온에서 반응시킨 후 430 nm에서 흡광도를 측정한다. 총 플라보노이드 함량은 quercetin(6.25-100 µg/mL)을 이용하여 표준곡선을 작성하여 구하였다.

4. 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 흡광도를 측정한다. 소거능을 비교하기 위한 양성대조군은 ascorbic acid를 사용하였다. 시료를 첨가하지 않은 대조군 대비 자유라디칼 소거활성은 백분율로 나타내고 50% inhibition concentration (IC₅₀)을 구하였다.

$$\text{Electron donating activity (EDA, \%)} = (B - A / B) \times 100$$

A : 시료 첨가군의 흡광도 B : 대조군의 흡광도

5. ABTS radical 소거활성

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 ABTS용액을

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 흡광도를 측정하였다. 소거능을 비교하기 위한 양성대조군은 ascorbic acid를 사용하였다.

$$\text{Electron donating activity (EDA, \%)} = (B - A / B) \times 100$$

A : 시료 첨가군의 흡광도 B : 대조군의 흡광도

6. 조골세포의 배양

본 연구에 사용한 MC3T3-E1 세포는 mouse calvaria 유래의 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 a-MEM 배지에 37°C, 5% CO₂ 조건인 incubator에서 배양하였으며 세포밀도가 90%로 포화되었을 때 계대배양 하면서 실험에 사용하였다. 분화유도를 위해 10 mM β-glycerol phosphate와 50 µg/mL ascorbic acid를 첨가하여 분화유도배지로 사용하였으며, 2-3일 간격으로 배지를 교환해 주었다.

7. 조골세포의 생존률 측정

조골세포의 성장정도는 Green LM 등(1984)의 방법에 따라 MTT시약을 사용하여 MTT tetrazolium이 자주색 불용성 formazan으로 환원되는 정도를 570 nm에서 측정함으로써 살아있는 세포의 생존율을 구하는 MTT assay로 측정하였다(Yun JH 2010). 48 well plate에 1x10⁴/well로 세포를 분주하여 1일간 배양한 후, 0.3% BSA와 1% 항생제(100 U/mL penicillin-100 µg/mL streptomycin)를 함유한 a-MEM 배지에 시료를 0, 25, 50, 100, 200 µg/mL의 농도로 첨가하여 처리하였다. 1시간 뒤 0.5 mM H₂O₂를 처리 한 후 48시간 배양하였다. 배양 후 5 mg/mL농도의 MTT시약을 각 well에 20 µg/mL 씩 첨가한 뒤 2시간 반응시켰다. 배지를 제거하고 DMSO를 200 µL씩 첨가하여 불용성의 formazan 결정을 용해시켜 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

8. 분화 시 조골세포의 생존률 측정

MC3T3-E1 세포를 48well plate에 1x10⁴/well 로 분주한 후 세포가 90% 포화되게 자라면 10 mM β-glycerol phosphate와 50 µg/mL ascorbic acid를 함유한 a-MEM 배지로 교환하여 2 일마다 배지를 갈아주며 분화를 유도하였다. 분화 유도 10일 후 0, 25, 50, 100, 200 µg/mL의 농도로 시료를 첨가하였다. 1시간 뒤 1.25 mM H₂O₂를 처리 한 후 48시간 배양하였다. 배양 후 5 mg/mL농도의 MTT시약을 각 well에 20 µg/mL 씩 첨가한 뒤 2시간 더 배양하였다. 배지를 제거하고 DMSO를 200 µL씩 첨가하여 불용성의 formazan 결정을 용해시켜 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

9. Alkaline phosphatase(ALP) 활성 측정

MC3T3-E1 세포를 24well plate에 1x10⁴/well로 분주한 후 세포가 90% 포화되게 자라면 10 mM β-glycerol phosphate와 50 µg/mL ascorbic acid를 함유한 a-MEM배지로 교환하여 2일마다 배지를 갈아주며 분화를 유도하였다. 분화 유도 10일 후 0, 25, 50, 100, 200 µg/mL의 농도로 시료를 첨가하고 1시간 뒤 1.25 mM H₂O₂를 처리하고 48시간 배양하였다. 배양한 세포는 DPBS로 세척한 후 0.2% Triton X-100을 첨가해 30분간 세포를 용해시킨 뒤 25,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 취하고 Sensolyte ALP kit (Anaspec)를 사용하여 ALP 활성을 측정하였다. 단백질량은 상등액 중 5 µL를 96 well plate에 넣은 후 Bradford법으로 단백질을 정량하였다.

10. Mineralization 측정

48 well plate에 MC3T3-E1 세포를 1x10⁴ 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 시료 첨가 후 1시간 뒤 1.25 mM H₂O₂를 처리한 뒤 48시간 배양하였다. 48시간 후 배지를 제거하고 DPBS로 세척한 뒤, 70% EtOH로 실온에서 1 시간 동안 고정시켰다. 세포를 고정시킨 후 40 mM alizarine 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.

11. 통계 처리

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 test를 이용하여 0.01과 0.05 유의 수준에서 분석 하였다.

II. 결과 및 고찰

1. 총 폴리페놀, 총플라보노이드 함량 및 항산화 활성

폴리페놀 화합물이나 플라보노이드류는 여러 식품에 널리 분포되어 있으며 phenolic hydroxyl기를 가지므로 단백질 및 거대분자들과 쉽게 결합하여 산화 환원 반응 시 기질로 작용하여 항암 및 항산화 활성과 같은 다양한 생리활성을 나타내며 천연 항산화제로써 작용할 수 있다는 연구들이 보고되었다(Jung MJ 등 2008). 플라보노이드는 페놀 화합물의 일종으로 flavonols, isoflavonones, catechins, anthocyanine, flavines

및 이들의 유도체 등으로 분류되고 항산화 활성을 가진다고 알려져 있다(Bors W 등 1987, Prasad KN 등 2009, Kwon OC 등 2006).

민들레의 총 페놀 함량과 총 플라보노이드 함량은 Table 1 과 같다. 민들레의 총 페놀 함량은 33.65 ± 3.40 mg/g 으로 나타났고 총 플라보노이드 함량은 4.45 ± 0.12 mg/g 으로 나타났다. 페놀성 화합물들이 활성산소종인 superoxide anion radical을 소거한다는 보고가 있고(Joung YM 등 2007, Chung HJ와 Jeon IS 2011) Heo SI 등(2007)에 따르면 약용식물의 경우 총 페놀 함량이 30 mg/g 이상이면 뛰어난 항산화 활성을 나타낸다 하였다. 이를 토대로 보았을 때 민들레는 뛰어난 항산화 활성을 보일 것이라 사료된다.

전자공여능은 페놀성 물질인 phenolic acid와 flavonoid에 대한 항산화 작용의 지표이다. 식물체의 폴리페놀 함량과 전자 공여 작용사이에는 밀접한 관계가 있어 폴리페놀 함량이 높을수록 전자공여능도 높다(Im DY 2011). 이런 전자공여능을 측정하는데 여러 가지 방법이 사용되는데 DPPH radical 소거활성과 ABTS cation radical 소거활성 등이 있다.

DPPH는 짙은 자색을 띠는 비교적 안정한 유리기로서 분자 내에 안정한 라디칼을 가진다. 이는 항산화 물질인 cysteine, glutathione 과 같은 함 유허아미노산과 ascorbic acid, BHA 등에 의해 수소 혹은 전자를 받음으로써 라디칼이 소거되고 탈색되므로 항산화 물질을 검색하는데 많이 이용되고 있다. ABTS cation 소거능 측정법은 AAPH(2,2'-azobis(2-amidinopropane dihydrochloride)나 potassium persulfate와 같은 산화유도체에 의해 ABTS⁺ radical cation이 형성되어 청록색을 나타내고 항산화물질에 의해 radical이 소거되면서 탈색되는 원리로 항산화 활성을 측정하는 방법으로 지용성 및 수용성 물질의 총 항산화력을 측정하는데 많이 이용되고 있다(Choi Y 등 2003, Lee SH 등 2009).

민들레의 메탄올 추출물의 DPPH radical 소거활성과 ABTS cation radical 소거활성을 측정한 결과는 Table 2와 같다. DPPH 실험에서 민들레가 radical을 50% 소거활성에 필요한 농도는 203.50 ± 5.52 μ g/mL였고 ABTS radical 소거활성에 필요한 농도는 646.04 ± 34.52 μ g/mL이었다.

Heo SI와 Wang MH(2008)의 연구에서 민들레 지상부 메탄올 추출물의 DPPH radical을 50% 소거활성에 필요한 농도가 138.47 ± 3.78 μ g/mL이라고 보고하였다. Kang MJ 등(2002)은 민들레 잎의 물 추출물 1 mg/mL에서 50% 이상의 DPPH radical 소거활성을 나타내었고 그 외에도 hydroxyl radical, superoxide anion radical, hydrogen peroxide에 대한 소거활성 또한 높아 항산화제로의 개발가능성이 높을 것이라 판단된다 하였다. Ryu MJ 등(2010)은 민들레 에탄올 추출물의 DPPH radical을 50% 소거활성에 필요한 농도가 800 μ g/mL 이라고 보고하였다. 이상의 연구와 비교해 볼 때 민들레의 메탄올 추출물 또한 비슷한 농도나 더 낮은 농도에서 DPPH radical에 대해 50% 소거활성을 가지므로 항산화제로의 개발 가능성이 높다고 볼 수 있다.

Table 1 Total polyphenol and flavonoids contents of *Taraxacum mongolicum* extract

Sample	Total phenolic contents (mg/g)	Total flavonoid contents (mg/g)
<i>Taraxacum mongolicum</i>	33.65 ± 3.40	4.45 ± 0.12

Table 2 DPPH free radical scavenging and ABTS radical cation scavenging activity of *Taraxacum mongolicum* extract

Sample	DPPH radical scavenging activity IC ₅₀ (μ g/mL)	ABTS radical cation scavenging activity RC ₅₀ (μ g/mL)
Ascorbic acid	13.70 ± 1.12	16.80 ± 0.74
<i>Taraxacum mongolicum</i>	203.50 ± 5.52	646.04 ± 34.52

2. 산화적 스트레스 시 조골세포의 활성에 미치는 영향

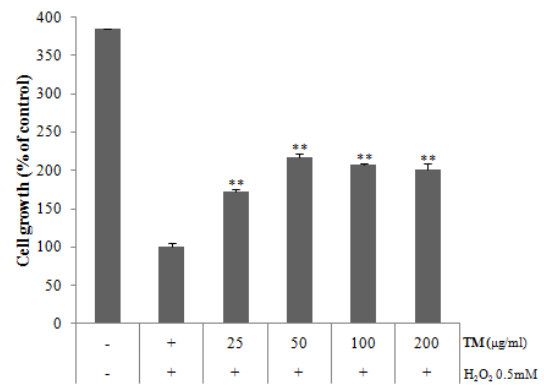


Fig. 1 Effect of *Taraxacum mongolicum* (TM) on H₂O₂-reduced cell growth in MC3T3-E1 cells. MC3T3-E1 cells were cultured with vehicle or AG in the presence of 0.5 mM H₂O₂ for 48 h.

Values are means \pm S.D (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.

민들레 추출물이 H₂O₂로 유도한 산화적 스트레스 상태에서 MC3T3-E1 조골세포의 증식률에 미치는 영향을 MTT assay로 측정한 결과는 Fig. 1과 같다. MC3T3-E1 조골세포는 0.5 mM H₂O₂를 처리함으로써 처리하지 않은 군보다 유의적으로 26% 정도로 증식률이 감소하였고 민들레 추출물에 의해 25, 50, 100, 200 μ g/mL 농도에서 H₂O₂를 처리한 대조군에 비해 200% 정도 까지 유의적으로 증식률이 증가하는 경향을 나타내었다. 이러한 결과는 민들레 추출물이 조골세포의 증식에

있어 산화적 스트레스 상황에 대해 보호효과를 가진다고 볼 수 있다. Yun JH(2010)의 연구에서 0.3 mM H₂O₂로 유도한 산화적 스트레스 상황의 MC3T3-E1 세포의 증식률을 100 μg/mL 농도의 감국 추출물이 106%로 증가시켰다고 보고하고 있고 감국추출물과 비교하여 민들레 추출물이 더 높은 증식률의 증가를 나타내어 산화적 스트레스에 대한 증식률에 대한 보호효과가 감국추출물에 비해 크다고 볼 수 있다.

3. 산화적 스트레스시 조골세포의 분화에 미치는 영향

1) 조골세포 증식률

민들레 추출물이 H₂O₂로 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 H₂O₂를 처리함으로써 처리하지 않은 군보다 유의적으로 17%정도로 생존률이 감소하였고 감소된 생존률이 민들레 추출물에 의해 100, 200 μg/mL 농도에서 H₂O₂를 처리한 대조군에 비해 증식률이 유의적으로 증가하였다. 민들레 추출물은 200 μg/mL 농도일 때 가장 높은 증식률을 나타냈는데 H₂O₂ 만 처리한 세포군 대비 203% 수준으로 회복되어 민들레 추출물이 산화적 스트레스상황의 분화된 조골세포에 대해 보호효과를 가진다고 볼 수 있다.

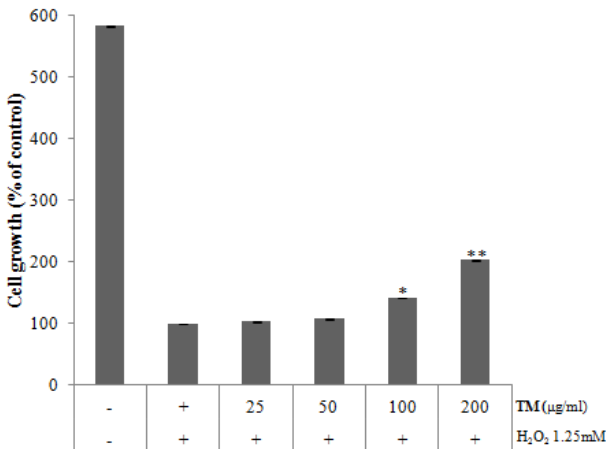


Fig. 2 Effect of *Taraxacum mongolicum* (TM) on H₂O₂-reduced cell growth in differentiation of MC3T3-E1 cells. MC3T3-E1 cells were cultured with vehicle or TM in the presence of 1,25 mM H₂O₂ for 48 h.

Values are means ± S,D (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.

2) Alkaline phosphatase(ALP) 활성

산화적 스트레스는 골 소실과 관련된 주요한 요인 중 하나

이다. 산화적 스트레스가 증가하면 조골세포가 apoptosis를 일으켜서 조골세포의 수가 감소하고 분화를 억제시킨다. 또한 H₂O₂는 조골세포의 석회화 과정에 관여하며, 세포막에 존재하는 조골세포 활성의 표식 효소인 ALP 활성을 감소시킨다고 보고되고 있다(Lee DH 등 2006, Liu AL 등 2004, Hwang HJ 등 2011).

민들레 추출물이 H₂O₂로 유도한 산화적 스트레스 상황에서 MC3T3-E1 조골세포의 분화에 미치는 영향을 보기 위해 분화 지표의 하나인 ALP 활성을 측정한 결과는 Fig. 3과 같다. 분화된 MC3T3-E1 조골세포의 ALP 활성은 1.25 mM H₂O₂를 처리함으로써 처리하지 않은 군보다 유의적으로 45%정도 활성이 감소하였고 감소된 활성이 민들레 추출물에 의해 100, 200 μg/mL 농도에서 H₂O₂를 처리한 대조군에 비해 유의적으로 증가하였다. 민들레 100 μg/mL 농도일 때 가장 높은 활성을 나타냈는데 H₂O₂만 처리한 세포군 대비 179% 활성이 증가하였다. 최근 Choi EM 등(2009)은 10 μg/mL의 창출 뿌리 추출물이 산화적 스트레스 상황에서 MC3T3-E1 세포의 ALP 활성을 115% 활성을 증가시켰다고 보고하고 있고 Yun JH(2010)은 0.3 mM H₂O₂로 유도한 산화적 스트레스 상황의 분화된 MC3T3-E1 세포의 ALP활성을 200 μg/mL 농도의 감국 추출물이 153% 활성을 증가시켰다고 보고하고 있다. 보고된 창출 뿌리 추출물과 감국추출물과 비교하여 민들레 추출물이 높은 ALP 활성을 나타내어 산화적스트레스에 대한 ALP 활성에 대한 보호효과가 더 크다고 볼 수 있다.

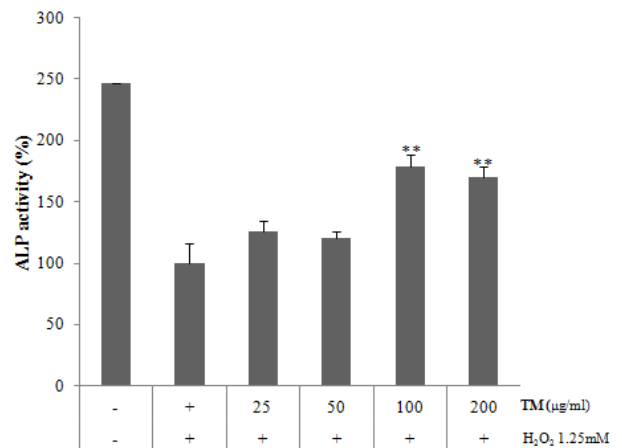


Fig. 3 Effect of *Taraxacum mongolicum* (TM) on the alkaline phosphatase activity of MC3T3-E1 cells in the presence of H₂O₂. MC3T3-E1 cells were cultured with vehicle or AC in the presence of 1,25 mM H₂O₂ for 48 h.

Values are means ± S,D (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.

3) Mineralization

전조골세포가 골세포로 분화되는 과정에서 기질에 무기질을 형성하므로 골석회화 형성능은 조골세포 분화의 중요한 표식인자이다(Park JH 등 2005, Kim KY 등 1991, Jeon MH와 Kim M 2011). H₂O₂는 조골세포에서 석회화된 골기질(mineralized bone matrix)의 활성을 감소시킨다고 보고되고 있다(Lee DH 등 2006, Liu AL 등 2004).

민들레 추출물이 H₂O₂로 유도한 산화적 스트레스 상태에서 MC3T3-E1 조골세포의 분화에 미치는 영향을 보기 위해 분화 지표의 하나인 mineralization을 측정된 결과는 Fig. 4와 같다. 분화된 MC3T3-E1 조골세포의 mineralization은 1.25 mM H₂O₂를 처리함으로써 처리하지 않은 군보다 유의적으로 62%정도 감소하였고 감소된 mineralization이 민들레 추출물에 의해 25, 50, 100, 200 µg/mL 농도에서 H₂O₂를 처리한 대조군에 비해 mineralization이 유의적으로 증가하였다. 민들레 200 µg/mL 농도일 때 가장 높은 mineralization을 나타냈는데 H₂O₂만 처리한 세포군 대비 146% mineralization이 증가했다. 민들레 추출물은 분화 지표인 mineralization을 유의적으로 비슷한 수준으로 증가시켰으며 산화적 스트레스에 대해 보호효과를 가진다고 볼 수 있다. 최근 Choi EM 등(2009)은 10 µg/mL의 추출 뿌리 추출물이 산화적 스트레스 상황의 분화된 MC3T3-E1 세포의 mineralization을 과산화수소를 첨가하지 않은 대조군 대비 98% 정도로 회복 시켰다고 보고하고 있고 Yun JH(2010)은 0.3 mM H₂O₂로 유도한 산화적스트레스 상황의 분화된 MC3T3-E1 세포의 mineralization을 200 µg/mL 농도의 감국 추출물이 106%로 증가시켰다고 보고하고 있다. 보고된 추출 뿌리 추출물과 감국추출물과 비교하여 민들레추출물이 더 높은 mineralization을 나타내어 산화적 스트레스 상황에서 mineralization에 대한 보호효과가 더 크다고 볼 수 있다.

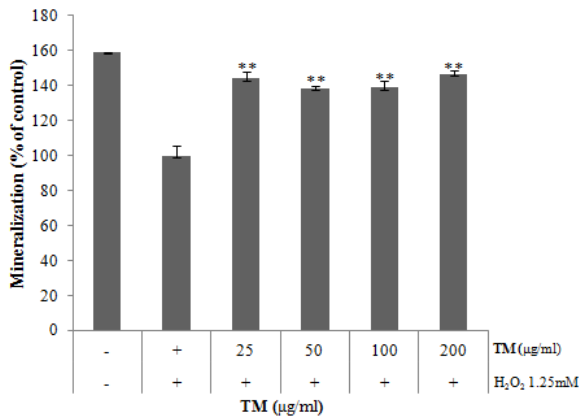


Fig. 4 Effect of Taraxacum mongolicum (TM) on the mineralization of MC3T3-E1 cells in the presence of H₂O₂. MC3T3-E1 cells were cultured with vehicle or AC in the presence of 1,25 mM H₂O₂ for 48 h.

Values are means ± S.D (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.

IV. 요약 및 결론

본 연구에서는 민들레 추출물의 항산화 효과 및 H₂O₂로 유도한 산화적 스트레스 상황에서 조골세포의 증식 및 분화에 미치는 영향을 분석 하고자 하였으며 항산화 능력을 알아보기 위해 총 페놀함량, 총 플라보노이드 함량, DPPH radical 소거능, ABTS radical 소거능을 측정하였다. 그 결과 총페놀 함량 및 총 플라보노이드 함량은 33.65±3.40 mg/g과 4.45±0.12 mg/g로 나타났고 DPPH와 ABTS radical 50% 소거 활성의 농도는 203.50±5.52 µg/mL와 646.04±34.52 µg/mL였다. 이를 바탕으로 민들레 추출물은 항산화 기능을 하는 페놀 및 플라보노이드를 가지고 있으며 항산화 활성을 가지고 있었다. 산화적 스트레스 상황에서 민들레 추출물이 조골세포의 증식에 미치는 영향은 MTT assay를 통해 분화에 미치는 영향은 분화 지표인 ALP 활성, mineralization을 측정하여 알아보았다. 그 결과 민들레 추출물 100, 200 µg/mL 농도에서 산화적 스트레스로 인해 감소된 세포의 증식률을 유의적으로 증가 시켰고 산화적 스트레스 상황의 분화된 세포의 증식률도 유의적으로 증가시켰다. 또한 분화의 지표인 ALP 활성이 유의적으로 증가하였고 mineralization도 유의적으로 증가하였다. 민들레 추출물이 항산화 활성이 있고 산화적 스트레스 상황의 조골세포의 증식과 분화를 증가시키는 결과로 미루어 볼 때 추출물의 항산화 활성이 산화적 스트레스 상황의 조골세포를 보호하는 역할을 한다고 볼 수 있다.

이상의 연구결과로 보아 민들레 추출물은 항산화 작용을 통해 H₂O₂로 유도된 산화적 스트레스 상황에서 손상된 조골세포의 증식 및 분화를 촉진하고 손상을 억제하여 산화적 스트레스에 대해 보호하는 효과가 있는 것을 확인 할 수 있었다. 이러한 결과를 토대로 산화적스트레스에 대한 조골세포의 보호효과 및 골 질환 관련 항산화소재로서 민들레가 이용 가능성이 있다고 사료된다.

V. 감사의 글

이 논문은 2011년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 대학중점연구소 지원사업으로 수행된 연구임 (2011-0031386)

참고문헌

박상기, 신형식. 2001. 수종의 생약추출물이 MC3T3-E1 세포의 염기성 인산분해 효소 활성에 미치는 영향. 원광치의학 10(3):89-107
 오은숙, 배기현, 이원영, 오기원, 김혜수, 한제호, 이광우, 손호영, 강성구, 강무일. 2006. 산화스트레스가 사람 골수기질세포 유래 조골세포의 증식과 분화에 미치는 영향. 대한내분비학회지

- 21:222-232
- Alessio HM, 1993. Exercise-induced oxidative stress. *Med Sci Sports Exerc* 25(2):218-224
- Bors W, Saran M, 1987. Radical scavenging by flavonoid antioxidants. *Free Radical Res Comm* 2:289-294
- Branen AL, 1975. Toxicological and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 52:59-65
- Choi EM, Kim GH, Lee YS. 2009. Atractylodes japonica root extract protects osteoblastic MC3T3-E1 cells against hydrogen peroxide-induced Inhibition of Osteoblastic Differentiation. *Phytotherapy Res* 10:1537-1542
- Choi Y, Kim M, Shin JJ, Park JM, Lee J. 2003. The antioxidant activities of the some commercial teas. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 32(5):723-727
- Chung HJ, Jeon IS. 2011. Antioxidative activities of methanol extracts from different parts of *Chrysanthemum zawadskii*. *Korean J Food Preserv* 18(5):739-745
- David LN, Michael M, Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. 1993. Principles of Biochemistry. Worth Publishers, Inc, United States.
- Farag RS, Badei AZMA, Baroty GSA. 1989. Influence of thyme and clove essential oils in cotton seed oil oxidation. *J Am Oil Chem Soc* 66:800-806
- Fraser JHE, Helfrich MH, Wallace HM, Ralston S. 1996. Hydrogen peroxide, but not superoxide, stimulates bone resorption in mouse calvariae. *Bone* 19:223-226
- Garrett IR, Boyce BF, Oreffo ROC, Bonewald L, Poser J, Mundy GR. 1990. Oxygen-derived free radicals stimulate osteocalcitic bone resorption in rodent bone in vitro and in vivo. *J Clin Invest* 85:632-639
- 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 Methods* 70:257- 265
- Heo SI, Wang MH. 2008. Antioxidant activity and cytotoxicity effect of extracts from *Taraxacum mongolicum* H. *Kor J Pharmacogn* 39(3):255-259
- Heo SI, Jung HJ, Kim MK, Wang MH. 2007. Antioxidative activities and tyrosidase inhibitory effects of Korean medicinal plants. *J Appl Biol Chem* 50: 115-119
- Hwang HJ, Jung BM, Kim M. 2011. ROS scavenging effect and cell viability hufusa extract on osteoblastic MC3T3-E1 cells. *J Life Sci* 21(12):1752-1760
- Im DY, Kim SH, Hor JR. 2011. A comparative study on antioxidative activity of extracts from *Taraxacum coreanum* and *Taraxacum officinale*. *Korean Soc Cosmetology* 17(3):544-549
- Jang JB, Park OR, Yun TE. 2010. Free radicals, physical performance, aging and antioxidants. *The Korea Journal of ideal body&beauty* 2(1):19-27
- Jenkins RR. 1993. Influence of exercise clearance of oxidant stress products and loosely bound iron. *Med Sci Sports Exer* 25:213-217
- Jeon MH, Kim M. 2011. Effect of *Hijikia fusiforme* fractions on proliferation and differentiation in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Journal of life science* 21(2):300-308.
- Joung YM, Park SJ, Lee KY, Lee JY, Suh JK, Hwang SY, Park KE, Kang MH. 2007. Antioxidant and antimicrobial activities of *Lilium* species extracts prepared from different aerial parts. *Korean J Food Sci Technol* 39:452-457
- Jung MJ, Yin Y, Heo SI, Wang MH. 2008. Antioxidant and anticancer of extract from *Artemisia capollaries*. *Kor J Phamacogn* 39(3):194-198
- Kang MJ, Shin SR, Kim KS. 2002. Antioxidative and free radical scavenging activity of water extract from Dandelion (*Taraxacum officinale*). *Korean J Food Preserv* 9(2):253-259
- Kim KY, Lee CS, Lee SH, Lee JD, Kim GS. 1991. Primary culture of osteoblast. *J Korean Orthop Assoc.* 26:1860-1863
- Koh YJ, Cha DS, Choi HD, Park YK, Choi IW. 2008. Hot water extraction optimization of dandelion leaves to increase antioxidant activity. *Korean J Food Sci Technol* 40:3 283-289
- Kurihara N, Ishizuka, Kiyoki M, Haketa Y, Ikeeda K, Kumegawa M. 1986. Effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Endocrinology* 118:940-947
- Kwon OC, Woo KS, Kim TM, Kim DJ, Hong JT, Jeong HS. 2006. Physicochemical characteristics of garlic on the high temperature and pressure treatment. *Korean J Food Sci Technol* 38:331-336
- Lee DH, Lim BS, Lee YK, Yang HC. 2006. Effect of hydrogen peroxide (H₂O₂) on alkaline phosphatase activity and matrix mineralization of odontoblast and osteoblast cell lines. *Cell Biol Toxicol* 22:39-46
- Lee SH, Hwang IG, Nho JW, Chang YD, Lee CH, Woo KS, Jeong HS. 2009. Quality characteristics and antioxidant activity of *Chrysanthemum indicum* L, *Chrysanthemum boreale* M, and *Chrysanthemum zawadskii* K, powdered teas. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38(7):824-831
- Liu AL, Zhang ZM, Zhu BF, Liao ZH, Liu Z. 2004. Metallothionein protects bone marrow stromal cells against hydrogen

- peroxide-induced inhibition of osteoblastic differentiation, *Cell Biol Int* 28:905-911
- 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
- Morton DJ, Barrett-Connor EL, Schneider DL. 2001. Vitamin C supplement use and bone mineral density in postmenopausal woman, *J Bone Miner Res* 16:135-40
- Nicholson NC, Ramp WK, Kneisl JS, Kaysinger KK. 1998. Hydrogen peroxide inhibits giant cell tumor and osteoblast metabolism in vitro, *Clin Orthop* 347:250-260
- 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(7):929-936
- Prasad KN, Yang B, Dong X, Jiang G, Zhang H, Xie H, Jiang Y. 2009. Flavonoid contents and antioxidant activities from *Cinnamomum* species, *Innovative Food Sci Emerging Technol* 10:627-632
- Ryu MJ, Lee SY, Park Y, Yang YK. 2010. Activities and antifungal effect against *Malassezia furfur* in the extracts from 6 spp. medicinal plants, *J Kor Soc Cosm* 16(1):120-128
- Samar B, Karl M, HelenabO, Sara J, Håkan M. 2001. Association between oxidative stress and bone mineral density, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 288:275-279
- Stadtman ER, Berlett BS. 1998. Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease, *Drug Metabolism Reviews* 30:325-243
- Yun JH. 2010. Effects of *Chrysanthemum indicum* L. extract in the activity and differentiation of osteoblastic MC3T3-E1 cells, Master's thesis, Duksung Women's University, Seoul, Korea