

연산 오골계 물 추출물이 조골세포와 파골세포의 활성화에 미치는 영향

유한석¹, 정강현¹, 이권재², 김동희³, 안정희^{4*}

¹서울과학기술대학교 식품공학과

²대전대학교 신소재공학

³대전대학교 한의학과

⁴건국대학교 식품생명과학부

Received: August 20, 2015 / Revised: November 17, 2015 / Accepted: November 20, 2015

Effect of *Gallus gallus* var. *domesticus* (Yeonsan ogolgye) Extracts on Osteoblast Differentiation and Osteoclast Formation

Han-Seok Yoo¹, Kang-Hyun Chung¹, Kwon-Jai Lee², Dong-Hee Kim³, and Jeung Hee An^{4*}

¹Department of Food Science and Technology, Seoul National University of Science & Technology, Seoul 139-743, Republic of Korea

²Department of Advanced Materials Engineering, ³Department of Oriental Medicine, Daejeon University, Daejeon 300-716, Republic of Korea

⁴Division of Food Bioscience, Konkuk University, Chunju 380-701, Republic of Korea

The effects of water extracts of *Gallus gallus* var. *domesticus* (Yeonsan ogolgye, GD) on the activities of osteoblast differentiation and the restraint of osteoclast formation were investigated. The water extract of GD in the human osteoblast "MG-63" cell, was examined in relation to alkaline phosphatase (ALP) activity and alizarin red stains. In order to observe the effects of osteoclasts formation, we analyzed RAW 264.7 cell tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) activity and TRAP stains. The ALP activity of the water extract of hen and cock flesh (3 years) were 133.8% and 129.6%, respectively. The ALP activity of flesh extracts was also higher than that of the skin extracts. Concerning the effects of age, the 3 years old flesh extracts had a higher activity than that of the one year old extracts. However the activity of the 3 years old skin extracts was lower than that of the one year old extracts. For gender conditions, the ALP activity of the hen extract was higher than that of the cock. The degree bone mineralization in the three years old hen flesh exhibited the highest rate, at 124.3%, amongst all the groups. The TRAP activity of the flesh extracts of the three years old cock revealed the lowest rate, at 31.8%, compared to the control. Our results demonstrate that the water extract of GD increases bone mineralization and osteoblast differentiation activity in MG-63 cells and enhances the inhibitory activity of bone-resorption in RAW 264.7 cells. In conclusion, the water extracts of GD seem to be effective in the prevention and treatment of bone related disorders.

Keywords: *Gallus gallus* var. *domesticus*, alkaline phosphatase, tartrate-resistant acid phosphatase, osteoblast differentiation, osteoclast formation

서론

오골계는 지방함량이 적은 데 비해 단백질이 풍부한 식품으로 알려져, 임신부와 허약자를 위한 건강식으로 주로 이용되고 있다[5]. 그러나 건강식품으로 조명받는 오골계 관련 선

행 연구들은 주로 오골계의 이화학적 특성[7]과 저장 및 관능 특성[6] 등을 다루고 있는데 오골계의 효능에 관한 연구에서는 골수에서 적혈구의 생성을 촉진하여 빈혈과 출혈에 효과가 있고, 항산화, 항고혈압에 효과가 있다고 보고되었고[22], 항염증 및 진통, 간 보호에 효과가 있다고 보고되어 있다[35]. 그중 한국 재래 오골계인 연산 오골계는 1980년 4월 우리나라 천연기념물 265호로 지정되어 중국이 원산지인 백봉 오골계와는 전혀 다른 품종으로서 몸집이 더 크고 깃털은 검고 크기가 일반 닭과 거의 같으며 발가락 수는 4개이다[7]. 흰 털에 검은 뼈를 가진 오골계와는 달리 연산 오골계

*Corresponding author

Tel: +82-43-840-3584, Fax: +82-43-840-3585

E-mail: anjhee@kku.ac.kr

© 2015, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

는 뼈를 비롯하여 깃털, 피부, 눈자위, 눈동자, 심지어 발톱까지 모두 검다[7].

일반적으로 골 조직은 콜라겐, 당 단백질과 같은 세포 외 기질(extracellular substance) 외에 골세포, 골 형성에 관여하는 조골세포(osteoblast) 및 골 흡수에 관여하는 파골세포(osteoclast) 등 여러 종류의 세포들로 구성되어 있다[30]. 정상적인 경우 골의 형성은 파골세포에 의한 골 흡수와 조골세포에 의한 새로운 골 기질 형성 및 무기질화 과정이 반복적으로 일어나 조골세포의 활동으로 인한 골 형성이 파골세포의 활동으로 인한 골 흡수보다 많게 된다[27, 31]. 그러나 30-45세 이후에는 점차 골 흡수가 골 형성을 능가하게 되며 과도한 골 소실은 골다공증을 유발하기도 한다. 즉, 골다공증(osteoporosis)은 골 형성(bone formation)과 골 흡수(bone resorption)의 불균형 때문에 단위용적 내의 골량(bone quantity)이 감소하여 쉽게 골절을 일으키는 질환인 것이다[16]. 이러한 불균형의 원인은 골 흡수작용을 하는 파골세포의 활성도는 증가하고 골 형성에 관여하는 조골세포의 활성도가 감소하기 때문이나 현재 골다공증의 예방 및 치료제로 사용되고 있는 약제는 대부분 골 흡수를 억제하는 작용을 하므로 이미 진행된 골 소실을 완전히 회복할 수 없어 궁극적인 목표인 골다공증의 발생을 완전히 예방할 수 없는 현실이다[2, 9]. 따라서 골다공증의 치료에 있어 파골세포의 분화를 억제하거나 조골세포의 활성을 증가시키는 것은 매우 중요한 사항이며[19], 최근에는 파괴된 골의 재생을 목적으로 조골세포 분화를 유도하는 성장인자와 동시에 파골세포의 분화는 억제하여 효과적인 골 생성을 유도하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다[1, 17]. 녹용 추출물을 이용하여 칼슘과 골세포를 연결하는 연구, 구 척 보골 탕 추출물의 뼈 모세포 증식 및 석회화, 녹용의 골 석회화 등의 조골세포 분화 유도 관련 연구와 하고초의 ursolic acid가 파골세포 분화 억제에 미치는 영향, 동충하초를 이용한 파골세포 분화와 유전자 발현에 미치는 영향, 황금추출물을 이용한 조골 및 파골세포의 영향과 같은 파골세포의 분화 억제 등 많은 연구가 보고된 바 있다[1, 8, 12, 14, 29]. 그러나 연산 오골계 추출물이 조골세포 분화를 통한 골 형성과 파골세포 분화 억제 능력에 미치는 영향에 대해서는 연구는 보고되지 않았다.

본 연구에서는 골 강화가 본격적으로 필요한 성인들과 성장기 어린이를 위한 골 기능 개선용 연산 오골계 제품을 개발하기 위한 기초연구로 사용하고자 연산 오골계 물 추출물을 제조하였고 골 강화 효능평가를 위해 MG-63 조골세포를 이용한 조골세포의 분화 촉진 활성과 골수세포 유래 파골세포의 분화 억제 활성을 비교 분석함으로써 연산 오골계 물 추출물의 조골세포 골 형성과 파골세포 분화 억제 능력에 대하여 연구하였다.

재료 및 방법

연산 오골계 추출물의 제조

본 실험에 사용된 연산 오골계는 충남 논산시 화악리 지산농원에서 제공받아 육질과 껍질로 나누어 각각 200 g씩 정량하였고 물 700 ml를 가한 뒤 121°C에서 30분간 가열 처리하여 추출하였으며 추출액은 여과지(Whatman, Maidstone, UK)로 여과하고 농축한 뒤 동결 건조하여 물 추출물을 제조하였다. 사용한 시료는 1년산 수탉 육질(Cock Flesh-1 year, CF-1), 1년산 수탉 껍질(Cock Skin-1 year, CS-1), 3년산 수탉 육질(Cock Flesh-3 year, CF-3), 3년산 수탉 껍질(Cock Skin-3 year, CS-3), 3년산 암탉 육질(Hen Flesh-3 year, HF-3), 3년산 암탉 껍질(Hen Skin-3 year, HS-3)로 나누어 사용하였으며 실험은 한 마리의 개체로부터 추출하여 얻은 추출물 시료를 세포 주에 한번 처리할 때 동일 농도를 3번씩 3 반복하여 실험하였다.

일반성분 분석

일반성분은 수분함량, 조 단백질, 조 지방, 조 회분, 탄수화물을 측정하였다. 수분함량은 105°C 상압 건조법, 조 단백질 함량은 식품공전 중의 micro-Kjeldahl법, 조 지방 함량은 에테르 추출법을 이용하여 분석하였고, 조 회분 함량은 550°C에서 도가니에 회화하는 직접 회화법을 이용하였다. 총 당질 함량은 차감 법으로 계산하였다.

조골세포 배양

인간 유래 조골세포인 MG-63 세포는 서울대학교 한국 세포 주 은행(KCLB 21427)으로부터 분양받아 RPMI 배지(Welgene, Daegu, Korea)에 10%의 FBS(Hyclone, Logan, UT, USA)와 1%의 penicillin 및 streptomycin(GIBCO, Grand Island, NY, USA)을 첨가하여 37°C의 CO₂ 배양기(CO₂ incubator MC-15AC, Sanyo, Sakata, Japan)에서 2-3일 마다 계대배양하고, 분화 유도를 위해 10 mM β-glycerol phosphate(Sigma Co., St. Louis, MO, USA)와 50 mg/ml의 ascorbic acid(Sigma Co.)를 첨가하여 분화 유도 배지로 사용하였으며, 3일마다 배지를 교환하였다.

Alkaline phosphatase(ALP) 활성

배양된 MG-63 세포를 5×10^4 cells/ml로 조정하여 96웰 플레이트에 분주한 다음 24시간 후 분화 유도 배지로 교환하고 농도별로 시료 처리를 하였다. 4일 동안 배양한 뒤 배양액을 제거하고 종류수로 세척한 다음 0.1% Triton X-100을 20 μl씩 첨가하여 37°C에서 30분간 용해하였다. 용해된 세포의 상층액에 0.1 N glycine과 100 mM의 p-nitrophenylphosphate(p-NPP)를 첨가한 뒤 37°C 배양기에서 30분간 반응시켰다. 반

응 후 0.1 N NaOH을 넣어 반응을 정지시킨 다음, 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

골 석회화 형성도 측정

배양한 MG-63 세포를 5×10^4 cells/ml로 조정하여 96웰 플레이트에 배양한 후 석회화 유도를 위해 분화 유도 배지와 추출물을 농도별로 첨가하여 3일마다 배지를 갈아주며 14일 동안 배양하였다. 배양 후 배지를 제거하고 증류수로 세척한 뒤 고정 용액(citrate 용액 + acetone + formaldehyde)으로 1시간 고정시켰다. alizarin red 용액은 alizarin red (Sigma Co.)를 증류수에 녹여 40 mM로 농도를 맞추고 pH 4.2로 조정하였다, 고정된 세포에 alizarin red 용액으로 실온에서 10분간 염색하고 증류수로 5번 세척한 뒤 PBS를 가하고 15분간 방치하였다. PBS를 제거한 뒤 현미경으로 석회화 형성 정도를 관찰하고 10% cetylpyridinium chloride를 첨가한 10 mM sodium phosphate(pH 7.0) 용액을 200 μ l/well로 첨가하여 15분간 녹이고 얻은 흡광도를 570 nm에서 측정하였다. 골 석회화 형성 능력은 대조군의 흡광도를 기준으로 계산하였다.

파골세포의 배양

쥐의 대식세포에서 유래한 RAW 264.7 세포는 서울대학교 한국 세포주 은행(KCLB 40071)에서 분양받았으며 DMEM 배지(Welgene Co.)에 10% FBS(Hyclone, Co.)와 1% penicillin 및 streptomycin(GIBCO Co.)을 첨가하여 37°C의 CO₂ 배양기에서 2-3일 마다 계대배양하면서 실험에 사용하였으며 분화 유도를 위해 RANKL(receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand) 50 ng/ml, 10 μ M PD98059를 첨가하여 분화 유도 배지로 사용하였으며, 3일마다 배지를 교환하였다.

파골세포의 TRAP(tartrate resistant acid phosphatase) 활성과 염색

RAW 264.7 세포를 5×10^4 cells/ml로 조정하여 96웰 플

레이트에 분주하여 24시간 배양하였다. 배지를 제거하고 DMEM 배지에 분화 인자인 RANKL 50 ng/ml, 10 μ M PD98059와 시료를 농도별로 처리하여 4일간 배양하였다. 이후 배지를 제거하고 PBS로 세척한 후 고정 용액(citrate 용액 + acetone + formaldehyde)으로 세포를 고정하였고 기질 용액으로는 1.36 mg/ml 4-nitrophenyl phosphate disodium salt, 10 mM tartrate를 포함하는 50 mM citrate buffer (pH 4.6)를 제조하여 고정한 세포에 분주하였다. 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 30분간 반응 후 효소 반응액을 0.1 N NaOH로 반응을 중지시키고 ELISA reader로 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. TRAP 활성은 시료의 흡광도를 대조군에 대한 백분율로 표시하였다.

TRAP 염색은 기질로 50 mM tartrate acid를 포함하는 50 mM sodium acetate buffer에 naphthol AS-BI phosphate (Sigma Co.)를 사용하였고, 염색제로는 fast garnet GBC (Sigma Co.) 용액을 사용하여 37°C에서 30분간 염색 후 현미경으로 관찰하였다.

통계처리

실험 결과는 통계 처리하여 평균치와 표준편차를 계산하였으며, 각 군 간의 유의성 검정은 SPSS 18.0(SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 프로그램을 이용하여 분산분석(ANOVA)법을 실행하였으며, 실험군 간의 유의성은 Duncan의 다중범위 시험법(Duncan's multiple range test)으로 $p < 0.05$ 수준에서 유의적 차이를 검증하였다.

결과 및 고찰

일반성분 분석

연산 오골계를 육질과 껍질로 나누어 분석한 결과(Table 1), 수분함량은 10.35-16.58%, 조 회분은 1.29-3.08%로 그룹 간 유의적 차이가 보이지 않았으며 조 지방 함량은 19.14%로 3년산 암탉 껍질이 가장 높았고 1년산 수탉 육질이 5.84%로 가장 낮았으며 조 단백질 함량은 21.92-56.59%로 그룹 간

Table 1. General composition of Yeonsan ogolgye extract.

(Unit: %)

Composition	CF-1*	CS-1*	CF-3*	CS-3*	HF-3*	HS-3*
Moisture	13.58 ± 2.25 ^a	16.58 ± 5.82 ^a	11.98 ± 1.61 ^a	10.35 ± 2.87 ^a	15.61 ± 4.13 ^a	16.7 ± 5.25 ^a
Protein	33.43 ± 4.15 ^c	26.68 ± 1.63 ^d	45.98 ± 2.26 ^b	21.92 ± 3.79 ^d	56.59 ± 4.01 ^a	37.16 ± 0.75 ^c
Lipids	5.84 ± 1.17 ^c	9.6 ± 2.01 ^b	10.19 ± 1.97 ^b	17.17 ± 2.32 ^a	13.23 ± 3.11 ^b	19.14 ± 2.73 ^a
Ash	3.0 ± 0.13 ^a	1.29 ± 0.21 ^c	2.6 ± 0.2 ^a	3.08 ± 0.14 ^a	2.93 ± 0.31 ^a	2.12 ± 0.21 ^a
Carbohydrate	44.15 ± 4.43 ^a	45.85 ± 3.91 ^a	22.27 ± 3.15 ^b	54.46 ± 4.07 ^a	11.64 ± 4.76 ^c	24.88 ± 3.98 ^b

*Cock Flesh-1 year: CF-1, Cock Skin-1 year: CS-1, Cock Flesh-3 year: CF-3, Cock Skin-3 year: CS-3, Hen Flesh-3 year: HF-3, Hen Skin-3 year: HS-3.

Means in the same row (a-c) bearing different superscript in samples are significantly different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

에 차이를 보였다. 흑염소 추출물[30]의 단백질 함량은 평균 16.6%로 보고되었고, 백봉 오골계 육[7]의 단백질 함량은 20.5%, 연산 오골계의 단백질 함량은 17.9%로 보고된 것에 비해 본 실험에서 사용한 연산 오골계 열수 추출물은 수분 함량이 평균 14.1%, 단백질 함량은 평균 37.29%로 기존 보고보다 평균 16.79% 높은 단백질 함량을 나타냈다. 특히 연산 오골계의 육질에서 단백질 함량이 평균 45.33%, 껍질이 21.44%로 육질이 껍질보다 평균 23.89% 높았으며 3년산 육질의 단백질 함량은 평균 40.41%로 1년산 육질보다 평균 9.35% 높았고, 암탉의 단백질 함량이 수탉보다 평균 14.37% 높았다. 탄수화물 함량은 3년산 수탉 껍질이 54.46%로 가장 높았고 3년산 암탉이 11.64%로 가장 낮았다.

Alkaline phosphatase(ALP) 활성 측정

ALP는 신체의 대부분 조직에 존재하고 있으며 특히 골이 생성되는 과정에서 활성이 활발하게 일어난다[33]. 때문에 일반적으로 ALP의 발현은 조골세포 분화 과정 중 중요한 역할을 하며 그 활성 정도는 종종 조골세포의 분화 단계를 상대적으로 평가하는 수단으로 사용되어왔다[33]. 따라서 본 실험에서 연산 오골계 물 추출물들이 ALP 활성에 미치는 영향은 모든 물 추출물들에서 대조군(100%)에 비해 80.6–99.3%로 낮은 ALP 활성을 나타냈으며 전체적으로 농도가 증가함에 따라 ALP 활성이 증가한 경향을 보였다(Fig. 1). 또한, 연산 오골계 물 추출물들의 농도를 250, 500, 1000 µg/ml로 조정하여 세포 생존율 실험을 분석한 결과 MG-63 세포에서 시료의 독성은 나타나지 않았다(데이터는 제시하지 않음).

육질과 껍질을 비교하였을 때 500 µg/ml에서 3년산 암탉 육질(133.8%)이 껍질(124.4%)보다 ALP 활성이 11.4% 증가함을 나타냈고 1000 µg/ml의 3년산 암탉 육질(128.5%)이 껍

질(113.9%)보다 ALP 활성이 14.6% 증가하였다. 3년산 수탉 육질 역시 500 µg/ml에서 122.5%로 껍질의 ALP 활성 96.5%보다 36%나 높은 것으로 나타나 껍질보다 육질에서 ALP 활성이 높았다. 그러나 1년산 수탉에서는 육질과 껍질 간의 유의적 차이를 보이지 않았다. 이러한 결과를 분석하면 연산 오골계는 1년 이상 생육하였을 때부터 ALP 활성이 나타나기 시작하는 것을 알 수 있고 육질이 껍질보다 ALP 활성이 우수함을 알 수 있다.

1년산과 3년산을 비교하였을 때 500 µg/ml 농도에서는 1년산 수탉의 육질(110.5%)보다 3년산 암탉 육질(133.8%)과 3년산 수탉 육질(122.5%)에서 ALP 활성이 다소 높게 나타났으나 껍질에서는 1년간 수탉 껍질(140.6%)이 3년산 암탉(113.9%), 수탉(121.4%) 껍질보다 ALP 활성이 높았다. 육질은 연령이 증가할수록 ALP 활성이 12.5–23.5% 증가하였으나 껍질은 1년산이 3년산보다 19.2–26.7% 증가함을 확인하였다. 그리고 성별 간 차이를 비교해 보았을 때 250 µg/ml 농도에서는 성별 간 유의적 차이를 보이지 않았으나 500 µg/ml 농도에서는 암탉(124.4–133.8%)이 수탉(96.5–122.5%)보다 높은 ALP 활성이 보여 성별 비교에서는 암컷이 골 성장 활성이 우수하였다. 흑염소 추출물[30]의 육질은 갈슘 9.3 mg%와 단백질 16.6%로 칼슘과 단백질이 골 대사 증식에 영향을 주는 것으로 보고하였으며 본 실험에서는 연산 오골계의 껍질보다 육질에서 평균 20.6% 높은 단백질의 함량을 보였고, 3년산이 1년산보다 평균 9.3% 높은 단백질 함량을 나타내었으며 암탉이 수탉보다 평균 14.3% 높은 단백질 함량을 나타내었다. 이는 껍질보다 육질이, 1년산보다 3년산이, 수탉보다 암탉의 단백질 함량이 높을수록 ALP 활성이 증가함을 보여주었다. 이는 단백질이 조골세포의 분화능력에 기여하며 단백질이 조골세포 분화를 촉진시키는 것으로 보인다.

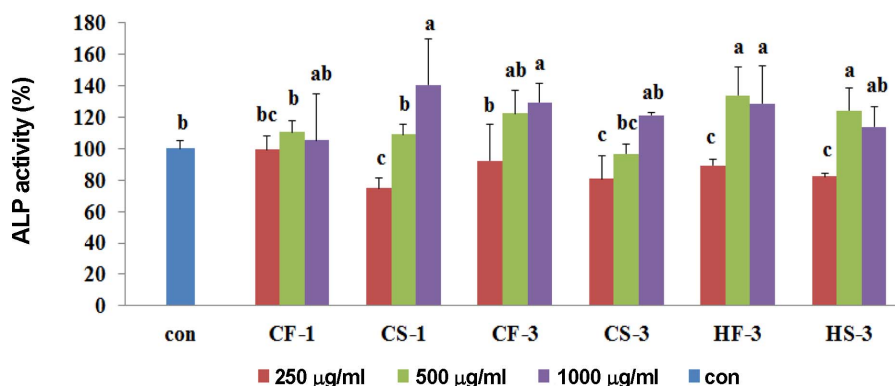


Fig. 1. Effects of water extracts of Yeosan ogolye on the alkaline phosphatase activities of the MG-63 osteoblastic cell during the differentiation. Data were expressed as percentage of control. Cock Flesh-1 year: CF-1, Cock Skin-1 year: CS-1, Cock Flesh-3 year: CF-3, Cock Skin-3 year: CS-3, Hen Flesh-3 year: HF-3, Hen Skin-3 year: HS-3. Values with different letters were significantly different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

일반적으로 뼈는 주로 콜라겐과 칼슘으로 구성되어 있으며, 계속 성장하며 살아있는 조직이다. 콜라겐은 뼈에서 부드러운 골격을 형성하는 단백질이고 인산칼슘이라는 미네랄이 뼈의 골격을 강하고 단단하게 만들어 준다. 또한, 콜라겐은 골조직의 유기물 대부분을 차지하며 특히 조골세포에서 합성되는 1형 콜라겐은 전체 골 단백질의 85-90%를 차지하여 적절하게 생성되지 못하는 조건에서는 ALP 활성 저하 및 오스테오칼신의 생성이 매우 감소하는 것으로 알려져 있다 [3, 4, 23, 26]. 일반 육계[21]의 육질과 껍질에서 콜라겐이 다량 함유되어 있는 것으로 보고되었으며 본 연구에서 사용된 연산 오골계 역시 단백질 성분 중 콜라겐 함량이 조골세포의 ALP 활성에 영향을 미치는 것으로 사료되며 연산 오골계의 단백질이 매우 우수한 단백질로 기능성 제품 개발을 위한 소재로 사용될 수 있을 것으로 보인다.

조골세포의 골 석회화 형성 능력

Alizarin은 식물성 염료로서 칼슘에 특이적으로 흡착력이 높다. 이것은 무기질화된 세포의 기질에 염색되므로 석회화된 양과 염색 정도가 상호 비례한다[20]. 연산 오골계 물 추출물들의 골 석회화 형성 능력을 나타낸 결과를 나타내었다 (Fig. 2).

육질과 껍질을 비교하였을 때 1000 µg/ml에서 1년산 수탉 육질(109.2%)이 1년산 수탉 껍질(96.7%)보다 12.5% 높은 골 석회화 형성 능력을 나타냈고 3년산 수탉의 육질과 껍질 사이에 유의적 차이가 나타나지 않았으며 3년산 암탉의 육질과 껍질 사이에도 유의적 차이가 나타나지 않았다.

1년산과 3년산을 비교하였을 때 1년산에서만 유의적 차이를 나타냈고 250 µg/ml의 3년산 암탉 육질(122.9%)이 1년산

수탉 육질(84.8%)보다 38.1% 높은 골 석회화 형성 능력을 나타냈다. 또한, 250 µg/ml의 3년산 암탉 육질(124.3%)이 1년산 수탉 육질(85.8%)보다 38.5% 높은 골 석회화 형성 능력을 나타내어 3년산이 1년산보다 골 석회화 형성 능력이 좋은 것으로 나타났다.

그리고 성별 간 차이를 비교해 보았을 때 250 µg/ml의 3년산 암탉 육질(122.9%)이 3년산 수탉 육질(94.4%)보다 28.5% 높은 골 석회화 형성 능력을 나타냈고 500 µg/ml의 3년산 암탉 껍질(111.5%)이 3년산 수탉 껍질(93.2%)보다 18.3% 높은 골 석회화 형성 능력을 나타내어 3년산 수탉 육질보다 3년산 암탉 육질에서 골 석회화 능력이 좋은 것으로 보인다.

조골세포에 의한 석회화 과정에서 ALP의 정확한 기능은 분명하지는 않지만, 유기 인산염을 가수분해하고 국소적으로 PO₄ 농도를 증가시킴으로써 석회화의 촉발제 역할을 하는 것으로 보고되었다[13]. 또한, 안티센스 RNA를 이용하여 ALP가 조골세포의 석회화에 관여하며[23] liver/bone/kidney type ALP 유전자의 선천적 결핍으로 인한 저 인산효소 증에서 골 조직 석회화 부전을 보고하였다[28].

본 실험에서 MG-63 세포에 연산 오골계 물 추출물을 처리한 뒤 14일 동안 분화시킨 결과 석회화 결절이 관찰되었으며 이는 MG-63 세포 분화 14일째에 stain 하였을 때 석회화 결절이 관찰되었다는 earthworm(*Pheretima aspergillum*) 추출물의 연구와 유사했다[11]. 그러므로 연산 오골계 물 추출물에 대하여 다른 여러 가지 생화학적 인자를 확인하지는 못하여도 연산 오골계 물 추출물의 조골세포 증식을 촉진하는 작용을 하는 것은 염기성인 인산분해효소가 다른 성장인자나 골 기질 단백질에 영향을 주어 성장인자에 직접적으로 영향을 주는 것으로 생각된다.

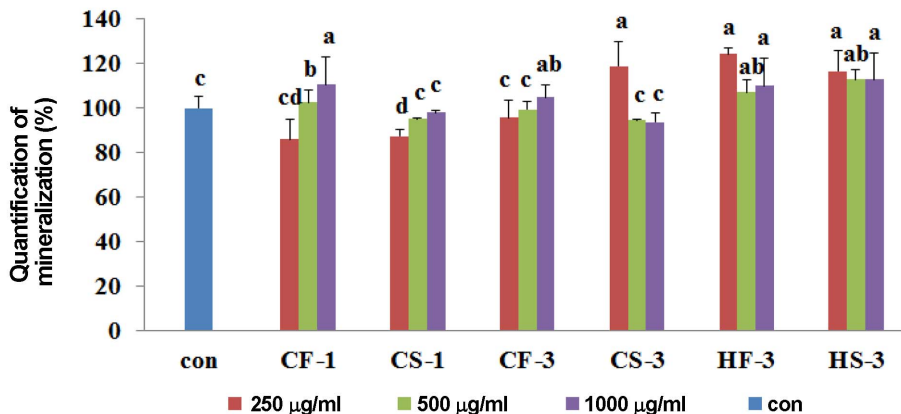


Fig. 2. Quantification of mineralization on water extracts of Yeosan ogolge in MG-63 cells during differentiation 14 days. Data were expressed as percentage of control. Cock Flesh-1 year: CF-1, Cock Skin-1 year: CS-1, Cock Flesh-3 year: CF-3, Cock Skin-3 year: CS-3, Hen Flesh-3 year: HF-3, Hen Skin-3 year: HS-3. Values with different letters were significantly different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

파골세포의 TRAP 활성에 미치는 영향

파골세포는 분화가 진행되면서 단핵의 전 파골세포를 형성하지만, 세포가 융합되면서 다핵의 성숙 파골세포를 형성하게 되고 이는 골 표면에 부착하여 골을 흡수하는 작용을 한다[24]. 파골세포는 TRAP와 칼시토닌 수용체를 가지며, 산 생성이 활발한 특징을 가진다. 이에 TRAP는 파골세포의 표지 인자로 널리 사용되고 있다[18, 34]. 본 실험에서는 쥐의 대식세포에서 유래한 RAW 264.7 세포를 이용하여 연산 오골계의 TRAP 활성과 염색을 하였고 그 결과를 나타내었다(Fig. 3).

일반적으로 TRAP 염색을 하게 되면 RANKL 처리를 하지 않은 대조군은 RAW 264.7 세포가 구 모양을 유지한 채 증식하며, TRAP 염색에서도 음성반응을 보여 연한 갈색이나

황토색을 띤다. 이에 반해 RANKL을 처리한 세포에서는 진한 암갈색이나 적갈색으로 염색된 TRAP(+) 다핵세포가 관찰된다[32]. TRAP 염색 결과 RANKL 처리 세포군에서는 3개 이상의 핵을 가지는 TRAP(+) 다핵세포로 분화가 유도되었고, RANKL과 연산 오골계 물 추출물을 처리한 세포군에서는 파골세포로의 분화가 억제되었다(Fig. 4). 물 추출물들에서는 대조군(100%)에 비해 전체적으로 75.9-31.8%의 TRAP 억제 활성을 나타냈으며 농도에 따른 유의적 차이는 나타나지 않았다. 또한, 연산 오골계 물 추출물들의 농도를 250, 500, 1000 µg/ml로 조정하여 세포 생존율 실험을 분석한 결과 RAW 264.7 세포에서 시료의 독성은 나타나지 않았다(데이터는 제시하지 않음).

육질과 껍질을 비교하였을 때 250 µg/ml의 1년산 수탉 육

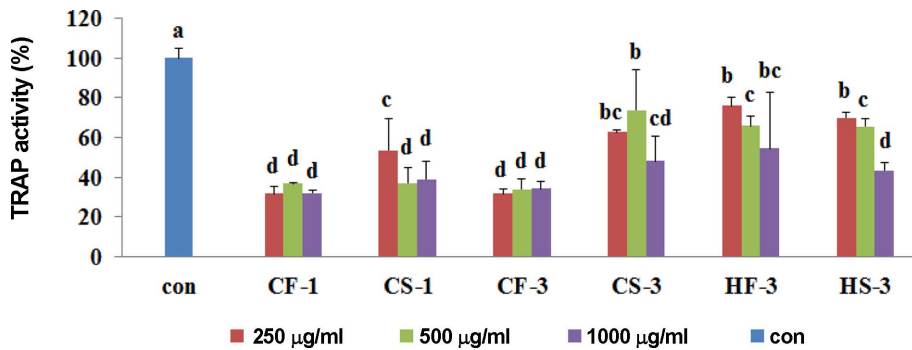


Fig. 3. Effect of Yeonsan ogolye water extract on the RAW 264.7 osteoclastic cell generation. Cock Flesh-1 year: CF-1, Cock Skin-1 year: CS-1, Cock Flesh-3 year: CF-3, Cock Skin-3 year: CS-3, Hen Flesh-3 year: HF-3, Hen Skin-3 year: HS-3. Values with different letters were significantly different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

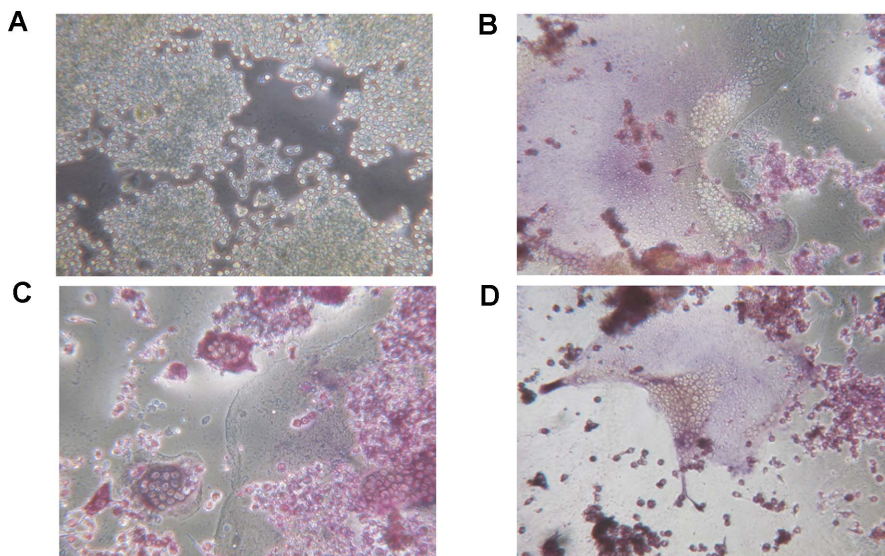


Fig. 4. The morphology of cell at the end of cell cultures after tartrate-resistant acid phosphatase staining by addition of Yeonsan ogolye water extract. Cock Flesh-1 year: CF-1, Cock Skin-1 year: CS-1, Cock Flesh-3 year: CF-3, Cock Skin-3 year: CS-3, Hen Flesh-3 year: HF-3, Hen Skin-3 year: HS-3. (A) RAW 264.7 cells + no treated (standard). (B) RANKL + PD98059 (con). (C) RANKL + PD98059 + CF-1. (D) RANKL + PD98059 + HF-3.

질(31.8%)이 1년산 수탉 껍질(53.4%)보다 TRAP 활성을 21.6% 이상 억제하는 것으로 나타났고 250 µg/ml의 3년산 수탉 육질(31.8%)이 3년산 수탉 껍질(62.7%)보다 TRAP 활성을 30.9% 이상 억제하는 것으로 나타나 껍질보다 육질에서 TRAP 활성 억제 효과가 뛰어남을 보였다. 또한, ALP 활성과 비교해 볼 때 3년산 수탉 육질이 3년산 수탉 껍질보다 우수한 결과를 나타내어 육질이 껍질보다 골 강화에 효과적이었다.

1년산과 3년산을 비교하였을 때 1년산과 3년산 수탉은 유의적 차이를 보이지 않았으나 250 µg/ml 농도의 1년산 수탉 육질과 3년산 암탉 육질을 비교하였을 때 1년산 수탉 육질(31.8%)이 3년산 암탉 육질(75.9%)보다 TRAP 활성을 44.1% 이상 억제하는 것으로 나타나 1년산 수탉 육질이 3년산 암탉 육질보다 TRAP 활성 억제 효과가 좋았다.

성별 간 차이를 비교해 보았을 때 250 µg/ml 농도에서 3년산 수탉 육질(31.8%)이 3년산 암탉 육질(75.9%)보다 TRAP 활성을 44.1% 이상 억제하는 것으로 나타나 암탉보다 수탉에서 TRAP 활성 억제 효과가 우수하였다.

본 실험에서 RAW 264.7 세포에 연산 오골계 물 추출물을 처리하여 TRAP 억제 활성을 관찰하였고 earthworm(*P. aspergillum*) 연구[11]에서 500 µg/ml 농도의 earthworm(*P. aspergillum*) 추출물이 76%의 TRAP 활성을 가지지만 본 실험에서의 3년산 수탉 육질은 500 µg/ml에서 TRAP 활성이 31.8%로 TRAP 억제 활성이 2배 이상 뛰어난 결과를 보였다. 그러므로 연산 오골계 물 추출물이 파골세포의 증식을 억제하는 작용이 있음을 확인하였다.

요 약

본 연구는 연산 오골계의 물 추출물을 이용하여 MG-63 조골세포와 RAW 264.7 파골세포의 분화에 미치는 영향을 분석하였다. 조골세포의 분화에 미치는 영향을 관찰하기 위해 ALP 활성 분석과 alizarin red 염색을 통해 골 석회화를 측정하였다. 그리고 RAW 264.7 파골세포의 분화 억제 활성을 확인하기 위해 TRAP 활성과 염색을 분석 측정하였다. 연산 오골계 물 추출물을 농도별(250–1,000 µg/ml)로 처리한 결과 조골세포와 파골세포에서 세포독성을 나타내지 않았다. ALP 활성은 3년산 암탉 육질이 133.8%, 3년산 수탉 육질은 129.6%로 육질이 껍질보다 조골세포 분화능력이 높았다. 그리고 육질에서는 3년산이 1년산보다 ALP 활성이 높으나 껍질에서는 1년산이 3년산보다 조골세포 분화능력이 높았다. 성별 간 ALP 활성은 전체적으로 암탉이 수탉보다 높은 ALP 활성을 보였다. 또한, 골 석회화 능력은 3년산 암탉 육질이 연령과 성별을 통틀어 124.3%로 가장 뛰어났으며 TRAP 활성은 3년산 수탉 육질이 31.8%로 연령과 성별을 통틀어 억

제 활성이 가장 뛰어났다. 연산 오골계 물 추출물은 조골세포 분화능력이 뛰어나 골의 석회화를 촉진하는 능력이 뛰어나며 파골세포의 분화를 억제하여 골 흡수를 억제하는 능력이 뛰어났다. 이에 연산 오골계는 골 기능 강화와 골 관련 질환에 대한 예방과 치료에 효과가 있을 것으로 보인다.

Acknowledgments

This research was supported by High Value-added Food Technology Development Program (314040-03-1-HD030) Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (MAFRA).

References

1. Barling P, Gupta D, Lim CE. 1999. Involvement of phosphodiesterase I in mineralization: histochemical studies using antler from red deer (*Cervus elaphus*) as a model. *Calcif. Tissue Int.* **65**: 384–389.
2. Boonen A, Broos P, Dequeker J. 1997. The prevention of treatment of age-related osteoporosis in the elderly by systemic recombinant growth factor therapy (rhIGF-I or rhRGF-β): a perspective. *J. Int. Med. Res.* **242**: 285–290.
3. Canalis E. 1983. The hormonal and local regulation of bone formation. *Endocr. Rev.* **4**: 62–77.
4. Canalis E. 1985. Effect of growth factors on bone cell replication and differentiation. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **193**: 246–263.
5. Chae HS, Ahn CN, Yoo YM, Ham JS, Lee JM, Yoon SK, et al. 2004. The effects of the high pressure boiled extracts (HPBE) of the ogol chicken with herbs on the hormones, cytokine, specific antibody of serum in rat. *Korean J. Food Sci. Ani.* **24**: 283–292.
6. Chae HS, Ahn CN, Yoo YM, Park BY, Cho SH, Kim JH, et al. 2002. Quality stability of high pressure boiled extract of ogol chicken during storage periods. *Korean J. Poult. Sci.* **29**: 279–286.
7. Cho CM, Park CK, Lee MY, Lew ID. 2006. Physicochemical characteristics of silky fowl (*Gallus domesticus* var. silkies). *Korean J. Food Sci. Ani.* **26**: 306–314.
8. Choi KH, Yoo JE, Hwang GS, Yoo DY. 2012. Effects of *Cordyceps militaris* (CM) on osteoclastogenesis and gene expression. *J. Orient. Obstet. Gynecol.* **25**: 16–26.
9. Cho SH, Kim KG, Kim SR, Lee JA, Moon H, Hwang YY. 1996. The effects of 17-β estradiol, medroxyprogesterone acetate and parathyroid hormone on the differentiation of osteoblast cell. *Korean Soc. Obst. Gyn.* **39**: 1497–1506.
10. Fukayama S, Tashjian A. 1990. Stimulation by parathyroid hormone of ⁴⁵Ca²⁺ uptake in osteoblast-like cells: possible involvement of alkaline phosphatase. *Endocrinology* **126**: 1941–1949.
11. Fu YT, Chen KY, Chen YS, Yao CH. 2014. Earthworm (*Pher-*

- tima aspergillum*) extract stimulates osteoblast activity and inhibits osteoclast differentiation. *BMC Comp. Alter. Med.* **14**: 440.
12. Han DH, Kang HJ, An JJ, Jo HK, Yoo HR, Seol IC, *et al.* 2008. Effect of gucheokbogol-tang in proliferation and calcification of osteoblast. *Korean J. Ori. Phys. Path.* **22**: 142–147.
 13. Harrison G, Shapiro IM, Golub EE. 1995. The phosphatidylinositol-glycolipid anchor on alkaline phosphatase facilitates mineralization initiation in vitro. *J. Bone Miner.* **10**: 568–573.
 14. Heo JK, Hwang DS, Lee JM, Lee CH, Jang JB, Lee KS. 2014. Inhibitory effects of ursolic acid from *Prunella Vulgaris* on osteoclast differentiation. *J. Korean Obstet. Gynecol.* **27**: 59–70.
 15. Hitoshi H, Eiko S, Kazuhiro K, Kan S, Kenichiro M, Hideki K, *et al.* 2002. U0126 and PD98059, specific inhibitors of MEK, accelerate differentiation of RAW 264.7 cells into osteoclast-like cells. *J. Biol. Chem.* **277**: 47366–47372.
 16. Jeon MH, Kim M. 2011. Effect of *Hijikia fusiforme* fractions on proliferation and differentiation in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *J. Life Sci.* **21**: 300–308.
 17. Karen M, Carol C, Lawrence G. 1995. Treatment of osteoporosis. *Annu. Rev. Med.* **6**: 249–256.
 18. Karst M, Gorny G, Galvin RJ, Oursler MJ. 2004. Roles of stromal cell RANKL, OPG and M-CSF expression in biphasic TGF- β regulation of osteoclast differentiation. *J. Cell Physiol.* **200**: 99–106.
 19. Koo HJ, Sohn EH, Kang SC. 2013. The optimal combination of the mixture of unripe *Rubus coreanus* and *Astragalus membranaceus* in the activation and differentiation of osteoblastic cells. *Korean J. Plant Res.* **26**: 658–662.
 20. 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.
 21. Lee KH, Jung YK, Jung S, Lee JH, Heo KN, Jo CU. 2011. Physicochemical characteristics of the meat from Korean native chicken and broiler reared and slaughtered as the same conditions. *Korean J. Poult. sci.* **38**: 225–230.
 22. Liu JH, Xie MY. 2011. Study on antioxidation, anti-hypertension and hematopoiesis of taihe black-bone silky fowl (*Gallus gallus Domesticus Brission*) bioactive peptides. PhD thesis. Nanchang University. Nanchang. China.
 23. Maeda T, Matsunuma A, Kawane T, Horiuchi N. 2001. Simvastatin promotes osteoblast differentiation and mineralization in MC3T3-E1 cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **280**: 874–877.
 24. Mok SK, Shin IS. 1996. The effects of prostaglandin and dibutyryl cAMP in osteoclastic cell activity and osteoclast generation. *J. Wonkwang Dent. Res.* **6**: 43–62.
 25. Mundy GR, Roodman GD. 1987. Osteoclast ontogeny and function. *J. Bone Miner. Res.* **5**: 209–279.
 26. Noriyoshi K, Seichi I, Mamoru K, Yoshiyuki H, Katsumi I, Masuoshi K. 1986. Effect of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on osteoblastic MC3T3-E1 cell. *Endocrinology* **118**: 940–947.
 27. Parfitt A. 1994. Osteonal and hemi-osteonal remodeling: The spatial and temporal framework for signal traffic in adult human bone. *J. Cell Biochem.* **55**: 273–286.
 28. 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.
 29. Shin JM, Park CK, Shin EJ, Jo TH, Hwang IK. 2008. Effects of *Scutellaria radix* extract on osteoblast differentiation and osteoclast formation. *Korean J. Food Sci. Tech.* **40**: 674–679.
 30. Song HN, Leem KH, Kwun IS. 2015. Effect of water extract and distillate from the mixture of black goat meat and medicinal herb on osteoblast proliferation and osteoclast formation. *J. Nutr. Health* **48**: 157–166.
 31. Solt D. 1991. The pathogenesis, oral manifestations, and implications for dentistry of metabolic bone disease. *Curr. Opin. Dent.* **1**: 783–791.
 32. Sriarj W, Aoki K, Ohya K, Takahashi M, Takagi Y, Shimokawa H. 2015. TGF- β in dentin matrix extract induces osteoclastogenesis in vitro. *Odontology* **103**: 9–18.
 33. 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.
 34. Vananen HK, Horton M. 1995. The osteoclast clear zone is a specialized cell extracellular matrix adhesion structure. *J. Cell Sci.* **108**: 2729–2732.
 35. Wang Y, Xieming Y. 2012. Study on several functionalities of taihe black-bone silky fowl peptides. Master thesis. Nanchang University. Nanchang. China.