

마가목 열매에서 추출한 Cryptochlorogenic Acid 처리에 의한 조골세포 분화 촉진 효능

김경민^{1,2} · 김태훈³ · 장원구^{1,2}

¹대구대학교 생명공학과

²대구대학교 항노화연구소

³대구대학교 식품공학과

Effect of Cryptochlorogenic Acid Extracted from Fruits of *Sorbus commixta* on Osteoblast Differentiation

Kyeong-Min Kim^{1,2}, Tae Hoon Kim³, and Won-Gu Jang^{1,2}

¹Department of Biotechnology, ²Research of Institute of Anti-Aging, and

³Department of Food Engineering, Daegu University

ABSTRACT Chlorogenic acid, a well-known polyphenol, and its derivatives, ester of caffeic acid on quinic acid moiety, are abundant in coffee, tea, fruits, and various vegetables. This study examined the effects of cryptochlorogenic acid (CCA) on osteoblast differentiation. CCA-induced mRNA expression levels of osteogenic genes in MC3T3E1 and C3H10T1/2 cells were determined by RT-PCR and qPCR. CCA regulated expression of key osteogenic genes in the early stage of differentiation, including distal-less homeobox 5 (Dlx5), DNA-binding protein inhibitor (Id1), and runt-related transcription factor 2 (Runx2). These results suggest that CCA may enhance osteoblast differentiation through expression of osteogenic genes such as Id1, Dlx5, and Runx2, especially in the early stage.

Key words: cryptochlorogenic acid, osteoblast differentiation, mesenchymal stem cell, preosteoblast, Runx2

서 론

현대사회는 평균 수명의 연장으로 인해 노인성 질환자의 수가 계속해서 증가하고 있다. 그에 따라 노인성 질환의 관리가 중요하며, 그중 골다공증, 퇴행성관절염과 같은 골 질환은 식이, 생활방식과 같은 환경적 요인과 유전적 원인에 의해 영향을 받는 질병이다. 특히 여성의 경우 폐경 이후 호르몬 변화로 인하여 그 발생빈도가 높게 나타나고 있다. 이러한 골 질환 환자들의 원인은 다양할 뿐만 아니라 치료를 위해 많은 비용과 노력이 요구된다. 이에 따라 골다공증 치료를 위한 보조제 및 건강 기능성 식품 개발이 요구되고 있다(1-3).

뼈는 신체 구조를 이루고 파골세포의 골 흡수와 조골세포의 골 형성이 균형을 이루는 과정이 끊임없이 일어나는 동적인 조직이다(4). 일반적으로 성인은 골 흡수와 형성이 항상성을 유지하고, 뼈는 주기성을 가지고 재형성을 이룬다(5). 골의 재형성은 이미 성장이 끝난 후 오래된 골을 새로운 골

로 바꿔주는 과정으로 조골세포와 파골세포 활성의 균형에 따라 항상성이 유지되는데, 조골세포의 활성이 약해지거나 파골세포의 활성이 강해지는 두 가지 현상이 함께 작용되면 골 대사 질환이 발생한다.

조골세포 분화는 호르몬, bone morphogenetic proteins (BMPs)과 같은 사이토카인, inhibitors of DNA binding/differentiation(Id1), distal-less homeobox 5(Dlx5), runt-related transcription factor 2(Runx2), alkaline phosphatase(ALP), osteocalcin(OC)과 같은 다양한 전사인자에 의해서 조절된다(6-8). 그중에서도 Id1, Dlx5, Runx2는 조골세포 분화 초기에 발현되는 필수적인 유전자로 이들 유전자의 발현은 조골세포 분화가 가속화됨을 의미한다(9).

Cryptochlorogenic acid(CCA)는 neochlorogenic acid (NCA), chlorogenic acid(CA)와 더불어 자두와 같은 과일류에 많이 함유되어 있다(10,11). 위의 세 물질 모두 항산화능을 가지고 있는데 여러 가지 활성산소종 중에서 superoxide anion(O₂⁻)을 분해하는 능력을 가지고 있다(12,13). 그리고 일산화질소 생성을 감소시키고, cyclooxygenase-2(COX-2)의 유전자 발현을 감소시키면서 염증 반응을 억제한다고 밝혀지기도 했다(14).

따라서 본 연구에서는 마가목에서 추출한 CA의 생물전환 물질인 CCA에 의한 조골세포 분화 효능을 검증하고자 하였

Received 30 September 2016; Accepted 13 January 2017

Corresponding author: Won-Gu Jang, Department of Biotechnology, College of Engineering, Daegu University, Gyeongsan, Gyeongbuk 38453, Korea

E-mail: jangwg@daegu.ac.kr, Phone: +82-53-850-6552

다. 이를 위하여 다분화능 세포 C3H10T1/2와 조골전구세포 MC3T3-E1에 CCA 처리 후 조골세포 분화 마커 유전자의 발현 패턴을 분석하여 결과를 도출하였으며, 이 결과는 CCA의 골 관련 질환의 예방 및 치료 관련 소재로서의 이용 가능성을 시사한다.

재료 및 방법

Cryptochlorogenic acid의 추출 및 분획

울릉도 자생의 신선한 마가목 열매 1.0 kg을 분쇄기로 잘게 마쇄하고 80% methyl alcohol(MeOH) 3 L로 3일간 3회 반복 추출한 후 얻어진 결과물(47.0 g)에 유기용매를 사용하여 극성에 따른 분획은 80% MeOH 추출물을 감압 농축하여 MeOH을 제거하고 물에 현탁된 추출시료를 저극성 용매인 n-hexane으로 먼저 추출한 후 수용층을 다시 ethyl acetate(EtOAc), n-butyl alcohol(n-BuOH)을 이용하여 각각 순차적으로 3회 분획하여 추출하였다. 각 용매추출 분획을 감압 농축하여 건조시킨 후 n-hexane 가용분획(4.1 g), EtOAc 가용분획(7.2 g), n-BuOH 가용분획(8.2 g), H₂O 가용분획(25.5 g)을 각각 얻었다. EtOAc 가용분획 7.2 g을 H₂O-MeOH 혼합용매를 용출용매로 사용하여 Toyopearl HW-40(coarse grade; 1.5 cm i.d.×60 cm)을 사용한 column chromatography를 실시하여 총 6개의 용리액[SC-1, H₂O-MeOH(100:0); SC-2, H₂O-MeOH(7:3); SC-3, H₂O-MeOH(1:1); SC-4, H₂O-MeOH(3:7); SC-5, H₂O-MeOH(0:10); SC-6, H₂O-Me₂CO(3:7)]를 얻었으며, YMC gel ODS AQ 120S(1.1 cm i.d.×40 cm, YMC Co., Ltd., Tokyo, Japan)를 이용한 칼럼크로마토그래피 및 ODS column(YMC gel ODS A-323, 4.6 mm×150 mm, YMC Co., Ltd.)을 이용한 SEi-preparative HPLC를 수행하여 cryptochlorogenic acid(17.2 mg)를 분리하였다. 이동상 용매로는 1% HCOOH (solvent A)와 acetonitrile(solvent B)을 92:8의 비율로 혼합하여 isocratic mode로 분석하였으며, 이동상의 유속은 1.0 mL/min을 유지하였고 280 nm에서 화합물을 검출하였다.

Cryptochlorogenic acid(Fig. 1): White amorphous powder; FAB-MS m/z 355 [M+H]⁺; ¹H NMR(600 MHz, CD₃OD) δ 7.57(1H, d, J=15.6 Hz, H-7'), 7.05(1H, d, J=2.0 Hz, H-2'), 6.96(1H, dd, J=8.0, 2.0 Hz, H-6'), 6.74

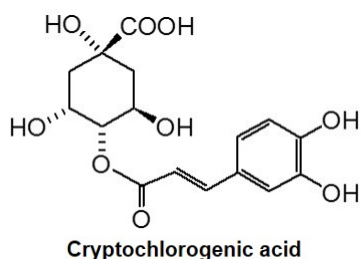


Fig. 1. Structure of cryptochlorogenic acid (CCA).

(1H, d, J=8.0 Hz, H-5'), 6.35(1H, d, J=15.6Hz, H-8'), 4.77(1H, m, H-5), 4.27(1H, m, H-3), 4.25(1H, dd, J=10.2, 3.6 Hz, H-5), 2.20(1H, m, H-6), 2.15(1H, m, H-2), 2.03(1H, m, H-2), 2.00(1H, m, H-6). ¹³C NMR(150 MHz, CD₃OD) δ 177.4(C-7), 169.3(C-9'), 149.5(C-4'), 146.5(C-7'), 146.3(C-3'), 127.5(C-1'), 123.1(C-6'), 117.0(C-5'), 115.5(C-8'), 115.0(C-2'), 78.8(C-4), 74.7(C-1), 70.1(C-3), 65.2(C-5), 41.0(C-6), 37.7(C-2).

세포 배양

Mouse calvaria 유래 조골세포인 MC3T3-E1 세포는 ATCC CRL-2593(American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)을 구입하여 사용하였다. 유지 시에는 α-minimum essential medium(α-MEM, Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) 배지에 10% fetal bovine serum(FBS, Atlas Biologicals, Fort Collins, CO, USA)과 1% 항생제 [100 U/mL penicillin-100 µg/mL streptomycin(Gibco BRL)]를 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 조건인 incubator에서 배양하였다. Mouse embryo 유래 다분화능 세포인 C3H10T1/2 세포는 ATCC CCL-266(American Type Culture Collection)을 구입하여 사용하였다. 유지 시에는 Dulbecco's modified Eagle's medium(Gibco BRL)과 10% FBS 및 1% 항생제를 혼합하여 37°C, 5% CO₂ 조건인 incubator에서 배양하였다.

세포독성 시험

CCA가 조골세포 및 다분화능 세포의 증식에 미치는 영향을 알아보기 위하여 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) assay를 실시하였다. MC3T3-E1 cell과 C3H10T1/2 cell을 48-well plate에 well당 1×10⁴개로 접종하고, 24시간 배양 후 CCA를 1, 2, 5, 10 µM의 농도로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. MTT(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)를 0.05 mg/mL의 농도로 처리하여 같은 조건에서 1시간 더 배양한 후 배지를 제거하고 불용성 formazan 결정을 dimethylsulfoxide(DMSO, Duchefa, Haarlem, The Netherlands)로 용해시켜 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

유전자 발현 분석법

Tri-solution(Bioscience Technology, Gyeongsan, Korea)을 이용하여 MC3T3-E1 세포와 C3H10T1/2 세포로부터 전체 RNA를 추출 및 분리하였다. 3 µg RNA를 TOPscriptTMRT DryMIX(Enzygnomics, Daejeon, Korea)를 이용하여 complementary DNA(cDNA)를 합성하였다. Emerald Amp GT PCR Master Mix(TaKaRa Bio Inc., Tokyo, Japan)와 primer가 포함된 혼합물 19 µL와 cDNA 1 µL를 polymerase chain reaction(PCR) 사이클을 30회 수행하였다. PCR 반응 조건은 95°C에서 10분 후 95°C에서 30초,

Table 1. Oligonucleotide sequence of mouse primer

Gene	Forward primer	Reverse primer	
Id1	ATGAAGGTCGCCAGTGGCAGT	ACTTTGCGGTTCTGGGGCAGG	RT-PCR
Dlx5	CAGAAGAGTCCCAAGCATCC	GAGCGCTTTGCCATAAGAAG	
Runx2	CCGCACGACAACCGCACCAT	CGCTCCGGCCACAAATCTC	
β -Actin	TTCTTTGCAGCTCCTTCGTTGCCG	TGGATGGCTACGTACATGGCTGGG	
Id1	CTTCAGGAGGCAAGAGGAAA	CAAACCTCTACCCACTGGA	qPCR
Dlx5	GCCCACCAACCAGCCAGAGA	GCGAGGTAAGTCTTCTGAAACC	
Runx2	AGATGACATCCCCATCCATC	GTGAGGGATGAAATGCTGG	
β -Actin	TTCTACAATGAGCTGCGTGTG	GGGGTGTGAAGGTCTCAA	

어닐링 온도에서 30초, 72°C에서 30초 후 72°C에서 5분을 수행하였다. qPCR은 AmpGene™ qPCR Green Mix Hi-ROX(Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA)와 primer가 포함된 혼합물 19 μ L와 cDNA 1 μ L를 polymerase chain reaction(PCR) 사이클을 40회 수행하였다. 증합 효소 반응에 쓰인 primer의 정보는 Table 1에서 나타내었다.

Runx2 유전자의 전사활성 분석

C3H10T1/2 세포와 MC3T3-E1 세포에 Runx2-luc reporter plasmid를 형질 도입하여 CCA에 의한 Runx2의 전사활성을 확인해보았다. 세포는 24-well test plate에 1×10^5 의 수로 접종하였고 Lipofectamine 2000(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 이용하여 0.4 μ g의 plasmid를 형질 도입하였다. 24시간 후에 세포를 회수하여 Dual Luciferase Reporter Assay System(Promega Co., Madison, WI, USA)을 이용하여 확인하였다.

통계처리

본 연구에서 얻은 결과는 표준편차로 표시하였고, 통계 처리는 Student's *t*-test를 이용하였으며, $P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$ 인 경우 대조군과 CCA 처리군 사이에 유의성이 있음을 인정하였다.

결과 및 고찰

세포독성 시험

MC3T3-E1 세포는 mouse calvaria로부터 유래한 조골 세포 세포주로서 조골세포의 증식, 분화, 석회화 등의 대사

적 특징을 갖고 있어 골 형성과 관련된 연구에서 사용되고 있다(15-17). C3H10T1/2는 mouse embryo 유래의 다분화능 줄기세포로부터 여러 가지 사이토카인의 작용을 통해 조골세포로 분화한다(18-22). MTT 시험법을 통해 C3H10T1/2 세포와 MC3T3-E1 세포에서 CCA의 독성 여부를 확인하였다(Fig. 2). 1, 2, 5, 10 μ M의 농도에서 세포독성 여부를 알아본 결과 1, 2, 5 μ M의 농도에서는 독성을 나타내지 않았지만 10 μ M의 농도에서 독성을 나타내었다. 따라서 이후 실험에서는 5 μ M의 농도를 사용하여 실험을 진행하였다.

CCA의 유전자 발현

조골세포 분화 표지 유전자 발현량 차이를 통해 CCA의 조골세포 분화 효과를 확인하고자 조골세포 분화 조절 유전자인 Id1은 조골세포에서 세포의 성장과 분화 사이의 균형에 영향을 미치는 전사인자이고, 조골세포 특이적 분화에 있어서 초기 단계에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(23,24). 그뿐만 아니라 근원세포, 중간엽 줄기세포에서 조골세포 분화로 전환될 때 Id1 유전자 발현의 조절에 따라 분화가 촉진된다(25). Dlx5 또한 뼈에 의해 유도되며 Runx2의 프로모터에 직접적으로 결합하여 전사를 조절하고(26), 조골세포 분화의 후기 표지 유전자인 OC의 유전자 발현을 조절함으로써 조골세포 분화를 조절한다(27). 그리고 조골세포 분화에 있어 중요한 조절자로 많이 알려진 Runx2의 발현량 차이를 측정하였다. Runx2는 runt domain 유전자의 종류이며 다분화능세포 또는 조골전구세포에서 ALP, OC 그리고 bone sialoprotein과 같은 유전자를 조절함으로써 조골세포 분화를 촉진하는 유전자이다(8,28,29). RT-PCR과 qPCR에서 모두 대조군에 비해 높은 발현량을 나타내었

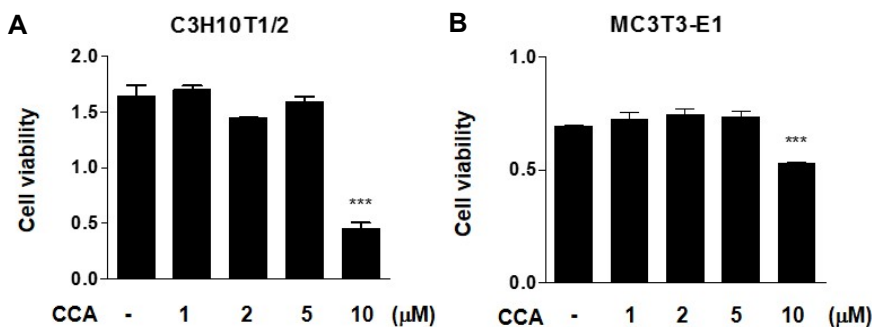


Fig. 2. Cytotoxicity of cryptochlorogenic acid (CCA) in C3H10T1/2 and MC3T3-E1 cells. Cell viability in C3H10T1/2 and MC3T3-E1 cells was determined using MTT assay after incubation with 1, 2, 5, and 10 μ M CCA for 24 h. CCA (10 μ M) significantly reduced cell viability in both C3H10T1/2 and MC3T3-E1 cells. *** $P < 0.005$ compared to the untreated control, respectively. Results were presented as mean \pm SE ($n \geq 3$).

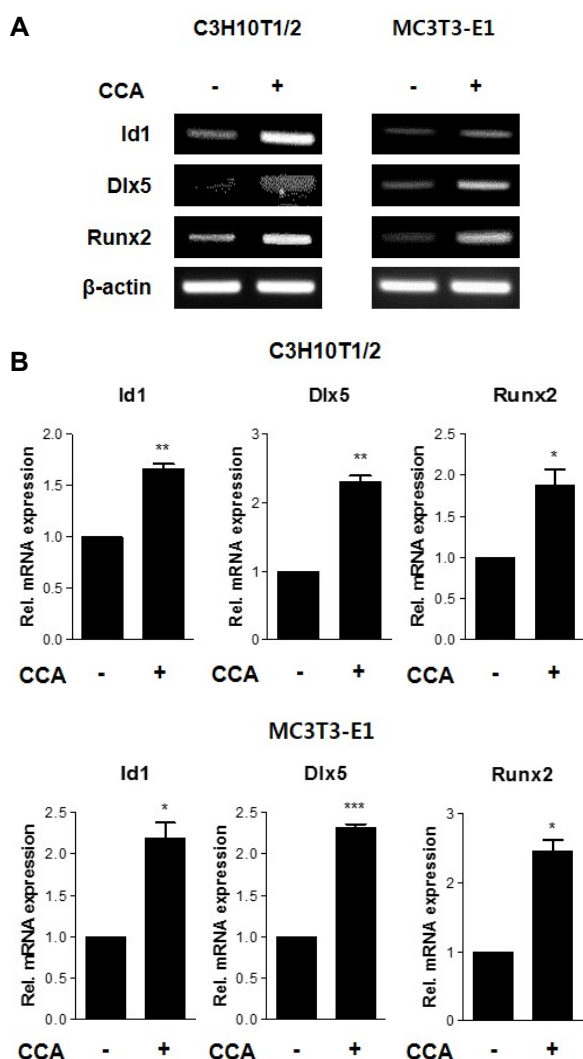


Fig. 3. Cryptochlorogenic acid (CCA) induces mRNA expression of osteoblast marker gene. C3H10T1/2 and MC3T3-E1 cells were incubated with 5 μ M CCA for 2 days, after which cells were harvested for total RNA isolation. RT-PCR was carried out using mouse β -actin, Id1, Dlx5, and Runx2 primers. * P <0.05, ** P <0.01, and *** P <0.005 compared to the untreated control, respectively. Results were presented as mean \pm SE (n \geq 3).

고 유의적인 차이를 보였다(Fig. 3).

CCA에 의한 Runx2 전사활성

전사인자로 잘 알려진 Runx2는 runt family polypeptide 이고 이전 연구에서 조골세포 분화에 필요한 것으로 많이 알려져 있다(30). Runx2가 결여된 쥐에서 후기 발현 유전자들이 발현을 멈춰 조골세포 분화가 일어나지 않는다는 연구 결과도 있다(31). 또한, Runx2는 collagen type 1(coll1)의 발현을 유도하여 뼈의 무기질화를 촉진한다(32). Runx2의 전사활성은 인산화와 아세틸화의 정도에 의해 변하는데 Runx2의 serine 247의 인산화는 fibroblast growth factor 2(FGF2)가 자극하는 protein kinase C δ (PKC δ)에 의해 반응한다(33,34). CCA에 의한 Runx2-luc의 활성은 Fig. 4에

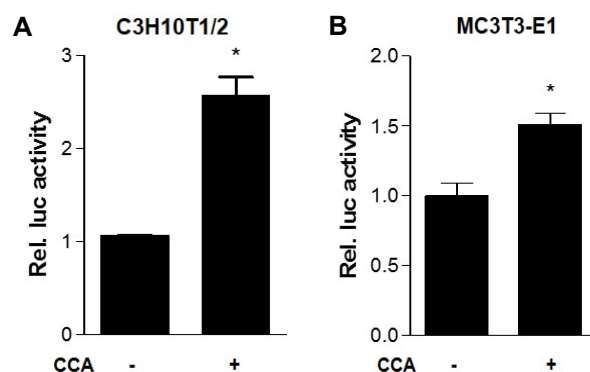


Fig. 4. Cryptochlorogenic acid (CCA) increases transcriptional activity of Runx2. C3H10T1/2 and MC3T3-E1 cells were transfected with Runx2-luc. Cells were treated 5 μ M of CCA. * P <0.05 compared to the untreated control, respectively. Results were presented as mean \pm SE (n \geq 3).

나타난 대로 대조군과 비교해서 유의차 있게 증가하였다. 이것은 CCA가 Runx2의 전사활성을 조절할 수 있음을 나타내며 조골세포 분화를 유도할 수 있음을 의미한다.

CCA의 다분화능 세포와 조골세포에 대한 분화 효과에 대하여 조사하였다. 결과에서 나타나듯 CCA는 조골세포 분화의 표지 유전자들을 상향 조절하였고, 그중 Runx2의 전사활성을 높였다. 아직 어떠한 분자적 기전을 통하여 CCA가 조골세포 분화를 촉진시키는데 대해서는 추후 연구가 필요할 것이다. 그 외에도 기준에 보고된 항산화능이 조골세포 분화에 어떠한 영향을 미치는지에 대해서도 추가적인 실험이 필요할 것이다.

요약

본 연구에서는 마가목 열매에서 추출한 chlorogenic acid의 유사체인 cryptochlorogenic acid(CCA)가 조골세포 분화에 미치는 영향에 대해서 알아보았다. 먼저 세포독성 여부를 확인하기 위해 MTT assay를 수행하였고 독성이 없다고 확인된 5 μ M의 농도에서 실험을 진행하였다. 그리고 조골세포로 분화할 수 있는 다분화능 세포인 C3H10T1/2와 조골세포인 MC3T3-E1에 CCA를 처리하여 표지 유전자인 Id1, Dlx5, Runx2의 발현을 확인하였다. 확인한 결과 표지 유전자들의 발현이 대조군에 비교해서 증가한 것을 확인하였고, 그중 조골세포의 핵심 전사조절인자인 Runx2의 전사활성에 미치는 영향을 알아보기 위해 promoter assay를 수행하여 Runx2의 전사활성이 증가하는 것을 재확인하였다. 이러한 결과들을 토대로 CCA는 조골세포 분화를 촉진한다는 것을 알게 되었고, 골 질환 관련 제제로 CCA가 이용 가능할 수 있다고 생각된다.

감사의 글

이 논문은 2013학년도 대구대학교 학술연구비지원에 의한

논문임을 밝히며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Seo J, Hwang ES, Kim GH. 2011. Antioxidative and differentiation effects of *Artemisia capillaris* T. extract on hydrogen peroxide-induced oxidative damage of MC3T3-E1 osteoblast cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 40: 1532-1536.
- Kim MJ, Im NK, Yu MH, Kim HJ, Lee IS. 2011. Effects of extracts from sarcocarp, peels, and seeds of avocado on osteoblast differentiation and osteoclast formation. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 40: 919-927.
- 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 Technol* 40: 674-679.
- Canalis E. 1985. Effect of growth factors on bone cell replication and differentiation. *Clin Orthop Relat Res* 193: 246-263.
- Canalis E, McCarthy T, Centrella M. 1988. Growth factors and the regulation of bone remodeling. *J Clin Invest* 81: 277-281.
- Chen C, Qin Y, Fang JP, Ni XY, Yao J, Wang HY, Ding K. 2015. WSS25, a sulfated polysaccharide, inhibits RANKL-induced mouse osteoclast formation by blocking SMAD/ID1 signaling. *Acta Pharmacol Sin* 36: 1053-1064.
- Yamaguchi A, Komori T, Suda T. 2000. Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehogs, and Cbfa1. *Endocr Rev* 21: 393-411.
- Franceschi RT, Ge C, Xiao G, Roca H, Jiang D. 2007. Transcriptional regulation of osteoblasts. *Ann N Y Acad Sci* 1116: 196-207.
- de Jong DS, Vaes BL, Dechering KJ, Feijen A, Hendriks JM, Wehrens R, Mummery CL, van Zoelen EJ, Olijve W, Steegenga WT. 2004. Identification of novel regulators associated with early-phase osteoblast differentiation. *J Bone Miner Res* 19: 947-958.
- Herrmann K. 1989. Occurrence and content of hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acid compounds in foods. *Crit Rev Food Sci Nutr* 28: 315-347.
- Hu YJ, Chen CH, Zhou S, Bai AM, Ou-Yang Y. 2012. The specific binding of chlorogenic acid to human serum albumin. *Mol Biol Rep* 39: 2781-2787.
- Nakatani N, Kayano S, Kikuzaki H, Sumino K, Katagiri K, Mitani T. 2000. Identification, quantitative determination, and antioxidative activities of chlorogenic acid isomers in prune (*Prunus domestica* L.). *J Agric Food Chem* 48: 5512-5516.
- Mullen W, Nemzer B, Ou B, Stalmach A, Hunter J, Clifford MN, Combet E. 2011. The antioxidant and chlorogenic acid profiles of whole coffee fruits are influenced by the extraction procedures. *J Agric Food Chem* 59: 3754-3762.
- Seo CS, Lim HS, Jeong SJ, Ha H, Shin HK. 2013. HPLC-PDA analysis and anti-inflammatory effects of Mori Cortex Radicis. *Nat Prod Commun* 8: 1443-1446.
- Pols HA, Felsenberg D, Hanley DA, Stepán J, Muñoz-Torres M, Wilkin TJ, Qin-sheng G, Galich AM, Vandormael K, Yates AJ, Stych B. 1999. Multinational, placebo-controlled, randomized trial of the effects of alendronate on bone density and fracture risk in postmenopausal women with low bone mass: results of the FOSIT study. Fosamax International Trial Study Group. *Osteoporos Int* 9: 461-468.
- Centrella M, McCarthy TL, Canalis E. 1987. Transforming growth factor beta is a bifunctional regulator of replication and collagen synthesis in osteoblast-enriched cell cultures from fetal rat bone. *J Biol Chem* 262: 2869-2874.
- Letton RW, Fanti P, Malluche HH. 1990. Regulation of 25-hydroxyvitamin D3 metabolism in cultures of osteoblastic cells. *J Bone Miner Res* 5: 815-823.
- Yin T, Li L. 2006. The stem cell niches in bone. *J Clin Invest* 116: 1195-1201.
- Cohen MM Jr. 2002. Bone morphogenetic proteins with some comments on fibrodysplasia ossificans progressiva and NOGGIN. *Am J Med Genet* 109: 87-92.
- Bodine PV, Zhao W, Kharode YP, Bex FJ, Lambert AJ, Goad MB, Gaur T, Stein GS, Lian JB, Komm BS. 2004. The Wnt antagonist secreted frizzled-related protein-1 is a negative regulator of trabecular bone formation in adult mice. *Mol Endocrinol* 18: 1222-1237.
- Baron R, Rawadi G, Roman-Roman S. 2006. Wnt signaling: a key regulator of bone mass. *Curr Top Dev Biol* 76: 103-127.
- Hu H, Hilton MJ, Tu X, Yu K, Ornitz DM, Long F. 2005. Sequential roles of Hedgehog and Wnt signaling in osteoblast development. *Development* 132: 49-60.
- Peng Y, Kang Q, Luo Q, Jiang W, Si W, Liu BA, Luu HH, Park JK, Li X, Luo J, Montag AG, Haydon RC, He TC. 2004. Inhibitor of DNA binding/differentiation helix-loop-helix proteins mediate bone morphogenetic protein-induced osteoblast differentiation of mesenchymal stem cells. *J Biol Chem* 279: 32941-32949.
- Maeda Y, Tsuji K, Nifuji A, Noda M. 2004. Inhibitory helix-loop-helix transcription factors Id1/Id3 promote bone formation *in vivo*. *J Cell Biochem* 93: 337-344.
- Katagiri T, Yamaguchi A, Komaki M, Abe E, Takahashi N, Ikeda T, Rosen V, Wozney JM, Fujisawa-Sehara A, Suda T. 1994. Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage. *J Cell Biol* 27: 1755-1766.
- Lee MH, Kim YJ, Yoon WJ, Kim JI, Kim BG, Hwang YS, Wozney JM, Chi XZ, Bae SC, Choi KY, Cho JY, Choi JY, Ryoo HM. 2005. Dlx5 specifically regulates Runx2 type II expression by binding to homeodomain-response elements in the Runx2 distal promoter. *J Biol Chem* 280: 35579-35587.
- Ryoo HM, Hoffmann HM, Beumer T, Frenkel B, Towler DA, Stein GS, Stein JL, van Wijnen AJ, Lian JB. 1997. Stage-specific expression of Dlx-5 during osteoblast differentiation: involvement in regulation of osteocalcin gene expression. *Mol Endocrinol* 11: 1681-1694.
- Komori T. 2005. Regulation of skeletal development by the Runx family of transcription factors. *J Cell Biochem* 95: 445-453.
- Marie PJ. 2008. Transcription factors controlling osteoblastogenesis. *Arch Biochem Biophys* 473: 98-105.
- Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, Shimizu Y, Bronson RT, Gao YH, Inada M, Sato M, Okamoto R, Kitamura Y, Yoshiki S, Kishimoto T. 1997. Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* 89: 755-764.
- Otto F, Thornell AP, Crompton T, Denzel A, Gilmour KC, Rosewell IR, Stamp GW, Bedington RS, Mundlos S, Olsen BR, Selby PB, Owen MJ. 1997. Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell* 89: 765-771.

32. Yang HM, Seo HS. 2013. Effects of ascorbic acid on osteoblast differentiation in MC3T3-E1 cells. *Soonchunhyang Med Sci* 19: 93-98.
33. Kim BG, Kim HJ, Park HJ, Kim YJ, Yoon WJ, Lee SJ, Ryoo HM, Cho JY. 2006. Runx2 phosphorylation induced by fibroblast growth factor-2/protein kinase C pathways. *Proteomics* 6: 1166-1174.
34. Jeon EJ, Lee KY, Choi NS, Lee MH, Kim HN, Jin YH, Ryoo HM, Choi JY, Yoshida M, Nishino N, Oh BC, Lee KS, Lee YH, Bae SC. 2006. Bone morphogenetic protein-2 stimulates Runx2 acetylation. *J Biol Chem* 281: 16502-16511.