

The Effects of Medicinal Herbs Extracts on Estrogen-like Activities and Osteoblast Proliferation and Differentiation

Mihyang Kim¹, Bokyung Kim¹, Jae-Deog Kim², A-Ram Kang¹, Chang-Eun Lee², Jungmin Seo¹, Dong-Geun Lee³, Jung-Kwon Jo³, Yuck Yong Kim⁴, Ki Hwan Yu⁴ and Sang-Hyeon Lee^{2,3*}

¹Department of Food and Nutrition, Silla University, Busan 617-736, Korea

²Department of Green-Chemistry Convergence Engineering, Silla University, Busan 617-736, Korea

³Department of Bioscience, Graduate School, Silla University, Busan 617-736, Korea

⁴ISAAC F&B Co., Marine Bio-industry Department Center, Busan 619-912, Korea

Received February 8, 2017 / Revised February 22, 2017 / Accepted February 24, 2017

The purpose of this study was to investigate the effect of 3 types of medicinal herbs (*Glycyrrhizae radix*, *Astragali radix* and *Dioscorea rhizoma*) extracts on estrogen-like activities, proliferation and differentiation in osteoblast. Human breast cancer cell line MCF7 was transfected using an estrogen responsive luciferase reporter plasmid for measure the estrogen-like activity. Estrogen-like activities of extracts were in the range of 1.11~5.73 fold to that of negative control. The extract of *G. radix* showed the strongest estrogen-like activities. The estrogen-like activities of 50 and 500 µg/ml extracts of *G. radix* were similar to that of 10⁻⁸ and 10⁻⁷ M standard solution (17β-estradiol), respectively. *G. radix* extract showed no cytotoxicity against osteoblast MC3T3-E1 cells at 1~1,000 µg/ml. The extract of *A. radix* showed no significant proliferation of osteoblast. However, the extract of *G. radix* and *D. rhizome* showed maximum 148% and 133% proliferation effects. The extract of *G. radix* also increased alkaline phosphatase activity and the maximum was 122% at 100 µg/ml compared to that of control. The nodule formation by the method of the Alizarin red S staining increased compared to control. These results suggest that *G. radix* is able to perform the bone formation and prevent osteoporosis.

Key words : Estrogen-like activity, luciferase, medicinal herbs, menopausal women, osteoblast

서 론

경제수준의 발달과 더불어 과학 및 의료기술의 발달로 인하여 인구고령화의 속도가 매우 급진적으로 진행되고 있으며, 특히, 우리나라의 경우 고령화 진행속도가 다른 나라와 비교하여 매우 빠른 속도로 진행되고 있어 이에 따른 대처가 필요한 실정이다[16]. 여성의 평균수명이 80세를 넘는 국가에서는 폐경을 약 50세 전후로 보고 있으며, 폐경 이후의 기간이 인생의 약 1/3 이상을 소비하고 있어 폐경 이후의 삶이 중요한 문제로 대두되고 있다[9].

폐경 및 갱년기가 시작되면서 난소의 기능이 떨어지고 에스트로젠 분비가 신체의 요구량에 미치지 못해 혈중 저밀도 지단백질 콜레스테롤(LDL-cholesterol) 증가, 홍조, 발한 및 심혈관계 질환 등의 신체적 변화가 일어나게 된다[15].

또한, 폐경 여성에서 매년 2~3%의 골밀도가 감소된다는 보

고가 있으며, 골다공증의 발생으로 인하여 골절의 위험이 높아져 개인적, 사회·경제적으로 매우 중요한 문제가 되고 있다[17]. 폐경 이후 진행되는 골다공증은 여성호르몬인 에스트로젠 감소로 인해 조골세포에 존재하는 유전자의 전사활성의 감소[8], calcitonin 기능의 억제, 파골세포(osteoclast) 기능의 활성화[31], 골 흡수의 증가 및 장에서의 칼슘 흡수가 저하되어 골밀도가 감소됨에 따라 발생한다[22]. 폐경 이후 골다공증의 예방 및 치료를 위하여 호르몬대체요법과 alendronate 및 raloxifene 등이 사용되고 있다[4].

파이토에스트로젠(phytoestrogens)은 식물 유래의 비스테로이드성 화합물[6]로 에스트로젠과 유사한 생물학적 활성을 가져 골손실, 기억상실, 심혈관계 질환과 같은 만성 질환을 막는 중요한 역할을 한다는 보고가 있다[26]. 이로 인해 해조류와 같은 천연물에서 에스트로젠과 유사한 활성을 확인하는 연구가 진행되고 있다[15]. 주로 배당체(glycoside) 형태로 육상식물에서 발견되는 파이토에스트로젠은 *in vitro* 실험에서 에스트로젠과 유사한 구조 및 기능을 나타내어 폐경기 여성의 부족한 에스트로젠을 보충해 주어 폐경기 증상을 완화시키고 골다공증, 유방암, 전립선암, 심장질환 등의 질병 예방에 중요한 역할을 할 뿐만 아니라 알츠하이머 질환을 예방하는데 도움을 줄 수 있다고 알려져 있다[12].

한약재는 오랜 기간 동안 임상적 경험을 토대로 하여 많은

*Corresponding author

Tel : +82-51-999-5624, Fax : +82-51-999-5636

E-mail : slee@silla.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

시행착오를 거쳐 약리활성이 있는 것만을 사용하고 있는 것으로 최근 들어 다양한 생리 활성검색을 통한 신규물질개발을 위한 원료로 가치가 높아지고 있다[26]. 감초(*Glycyrrhizae radix*)는 콩과(Legumiosae) 식물에 속하는 다년생 초본으로 한국, 중국 및 일본에서 한약재로서 널리 이용되고 있는 약용식물로 항산화활성[13], 항균활성[20] 등에 관한 연구가 있었다. 황기(*Astragali radix*)는 국내에서 생산되는 3대 약재의 하나로, 콩과에 속하는 다년생 초본식물인 *Astragalus membranaceus* Bunge와 기타 다른 *Astragalus* 속 식물의 주피를 벗긴 뿌리를 건조한 것으로[18] 혈관 형성에 대한 영향, 간 기능 보호효과[19] 등에 관한 연구가 있었다. 산약(*Dioscorea rhizoma*)은 위점막 손상에 대한 예방적 효과 뿐만 아니라[33], 혈당강하[28] 및 콜레스테롤 저하효과가 있는 것으로 보고되고 있으며, 산약의 주요 성분인 methyl protodioscin, methyl proto-neogracillin, gracillin, dioscin 등은 인간 암세포에 대한 항종양 효과, 면역조절 효과, phospholipase A2 저해작용, 골다공증 억제 효과가 있는 것으로 알려져 있다[32].

일반적으로 에스트로겐 유사물질은 세포질에 존재하는 에스트로겐 수용체(estrogen receptor, ER)와 결합하게 되고, 결합한 수용체-유사물질 복합체는 핵속으로 들어가 특정 DNA 염기서열(estrogen responsive element, ERE)을 인식하여 결합한다[25]. ERE와 에스트로겐 수용체가 결합하게 되면 ERE에 의해 조절되는 유전자의 전사를 촉진하고, 단백질의 발현을 유도하여 세포반응을 나타낸다고 알려져 있다[25].

천연물에 존재하는 에스트로겐 유사물질을 검출하기 위한 여러 가지 방법들 중 리포터 유전자 측정법은 에스트로겐 유사물질의 작용에 대한 리포터 유전자의 활성도를 비교하는 방법으로, 비전통적인 에스트로겐의 작용을 확인할 수 있을 뿐만 아니라 한 번에 많은 시료를 처리할 수 있다는 장점이 있다[27]. 본 연구진은 이전 연구에서 CAT (chloramphenicol acetyltransferase) 리포터를 이용한 *in vitro* 에스트로겐 검출 시스템을 제조하였고 오미자, 택사, 지황 등의 에스트로겐 유사활성을 검증하였다[14]. 하지만 CAT 검출시스템은 CAT-ELISA Kit를 사용하여 단백질 함량을 측정해야 하므로 시간과 비용이 많이 드는 한계가 있었다.

본 연구에서는 에스트로겐 수용체를 다량 생산하는 인체 유방암 세포주에 검출 방법이 간편하고 검출 감도가 높은 luciferase 유전자를 리포터로 사용하는 *in vitro* 검출시스템을 제조하였고, 이를 이용하여 감초(*Glycyrrhizae radix*), 황기(*Astragali radix*) 및 산약(*Dioscorea rhizome*)으로부터 에스트로겐 유사활성을 검증하고, 조골세포의 증식 및 분화에 미치는 영향을 검토하여 갱년기 장애 개선을 위한 감초, 황기, 산약 추출물을 포함하는 식품 소재를 개발을 위한 기초자료를 제시하고자 하였다.

재료 및 방법

한약재 추출물 제조

본 연구에 사용한 한약재는 산림유통(Yongin, Korea)에서 구입한 것을 사용하였으며, 120°C에서 120분간 열수추출을 하였으며, 추출물은 80 Mesh로 조여과를 실시한 뒤 Filter Press (Koreafilter, KFP-600MM-25-16-S, Korea) 과정을 거친 후 농축하였다. 농축된 시료는 72시간 동안 동결건조기(Ilshinbio-base, PVTFD 30R, Korea)를 이용하여 동결건조한 뒤 분쇄하여 냉동실에 보관하면서 실험에 사용하였다.

Luciferase 리포터 플라스미드 구축

에스트로겐 유사활성을 검증하는 유전자(ERE119-Ad2MLP)의 클로닝을 위해서 이전 연구[14]에서 만든 CAT 유전자를 이용한 리포터 플라스미드인 pDsCAT-ERE119-Ad2MLP를 주형으로 하고, ERE119-F (5'-GAGCTCGAGATCAGGTCACAGTGACC-3', *SacI* site underlined)와 Ad2MLP-R (5'-AAGCTTGCTGGCCCTCGCAGAGAGCG-3', *HindIII* site underlined)를 primer로 하여 polymerase chain reaction (PCR)법으로 증폭을 실시한 후(94°C, 5분-[94°C, 1분-55°C, 1분-72°C, 1분] 30 cycles-72°C, 10분), pGEM T-easy vector (Promega, USA)에 ligation시켜 pGEMTe-ERE119-Ad2MLP를 제작하였다.

에스트로겐 유사활성 검증 시스템을 구축하기 위한 stable transfection이 가능하고 luciferase 유전자를 포함한 리포터 벡터는 이전 연구에서 만든 pGL2-Neo 플라스미드를 이용하였다[21]. pGEMTe-ERE119-Ad2MLP를 제한효소 *SacI*과 *HindIII*를 처리하여 생성된 ERE119-Ad2MLP 유전자 단편을 pGL2-Neo 플라스미드에 ligation시켜 에스트로겐을 검출할 수 있는 리포터 플라스미드인 pGL2-Neo-ERE119-Ad2MLP를 제작하였다.

Stable transfection

인체 유방암 세포주인 MCF7 세포를 25T Flask에 90% confluent가 되도록 배양하고 Phosphate Buffered Saline (PBS) 4 ml로 1회 세척한 후, pGL2-Neo-ERE119-Ad2MLP 플라스미드 5 µg이 혼합된 Superfect Transfection Reagent (Qiagen, Valencia, CA, USA)를 Fetal Bovine Serum (FBS, Corning, USA)이 포함되지 않은 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Hyclone, USA) 배지로 교환하여 37°C, 5% CO₂ 세포배양기에서 2시간 배양하였다. 이후 PBS 4 ml로 1회 세척하고 10% FBS 및 0.08 mg/ml 농도의 G418 (LPS solution, Korea)이 포함된 DMEM 배지로 교환하여 37°C, 5% CO₂ 세포배양기에서 세포군집이 형성될 때까지 3일 간격으로 10% FBS 및 0.08 mg/ml 농도의 G418을 포함하는 DMEM 배지로 교환하며 배양하였다. Stable transfection의 결과로 G418 저항성 및 에스트로겐 검증 시스템을 가지는 MCF7 세포를 MCF7/pGL2-Neo-

ERE119-Ad2MLP 세포로 명명하였다.

한약재 추출물의 에스트로겐 유사활성 측정

Estrogen receptor (ER)를 생산하는 인체 유방암 세포주인 MCF7에 luciferase 리포터 플라스미드인 pGL2-Neo-ERE119-Ad2MLP를 도입하여 만든 에스트로겐 *in vitro* 검출시스템을 이용하여 에스트로겐 유사활성을 측정하였다. 형질도입된 세포주인 MCF7/pGL2-Neo-ERE119-Ad2MLP 세포는 10% FBS와 Penicillin-streptomycin (100 units/ml, Corning, USA)이 첨가된 DMEM 배지를 이용하여 37°C, 5% CO₂ 세포배양기에서 배양하였다. 에스트로겐 유사활성을 측정할 때에는 FBS에 포함되어 있는 스테로이드를 흡착시켜 제거하기 위해 Dextran-coated Charcoal (Sigma, USA)로 미리 처리한 Charcoal-stripped FBS (CSF)를 포함하는 DMEM 배지를 이용하여 같은 조건으로 배양하였다. 또한 kanamycin계통의 항생제인 G418에 대해 내성을 가지는 세포만 선택적으로 배양하기 위하여 모든 배지에 G418이 80 µg/ml 농도가 되도록 첨가하였다. 배양된 MCF7/pGL2-Neo-ERE119-Ad2MLP 세포를 60 mm 세포배양용 dish에 3×10⁵ cells/dish로 분주하여 CSF를 포함하는 DMEM 배지에서 24시간 배양하였다. 이후 감초, 황기, 산약의 열수 추출물을 최종농도가 500, 50, 5 µg/ml가 되도록 첨가하였다. 양성대조군으로는 대표적인 에스트로겐 물질인 17β-estradiol을 최종농도가 10⁻⁷ M~10⁻⁹ M이 되도록 에탄올에 녹여 첨가하였다. 음성대조군은 17β-estradiol의 용매인 에탄올을 같은 용량으로 첨가하였다. 그 후 37°C, 5% CO₂ 세포배양기에서 48시간 배양하여 PBS로 세척하고 세포를 회수한 후, 1,700×g에서 5분간 원심분리하여 상층액을 제거하였다. 세포내의 luciferase 단백질을 얻기 위해 Luciferase Assay System (Promega, USA)에 포함된 1X lysis buffer 200 µl를 첨가하여 실온에서 30분간 lysis시킨 후, 6,000 xg에서 1분간 원심분리하여 상층액만을 luciferase 활성측정에 이용하였다. Luciferase 활성측정은 lysis된 세포 상층액 100 µl와 luciferase assay 용액 100 µl를 혼합한 직후 Luminometer (TD-20/20, Turner Biosystems, USA)를 이용하여 측정하였다.

조골세포 배양 및 분화

ATCC에서 분양 받은 mouse calvaria osteoblast cell인 MC3T3-E1 세포는 10% FBS와 Penicillin-streptomycin (100 units/ml)을 포함하는 α-Minimum Essential Medium (MEM, Corning, USA) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 세포배양기에서 2~3일 마다 배지를 교환하면서 실험에 사용하였으며, 분화유도를 위해 5 mM β-glycerolphosphate와 50 µg/ml의 vitamin C를 첨가하였고 2~4일마다 배지를 교환하였다[23, 30].

조골세포 증식을 측정

세포증식은 MTT assay 방법을 사용하여 측정하였다. 배

양한 MC3T3-E1 세포를 96-well plate에 plating 한 후, 24시간 뒤 분화유도 배지로 교환하여 4일간 분화를 유도하였다. 그 후 농도별로 준비된 시료를 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 세포배양기에서 48시간 배양하였다. 대조군은 시료를 포함하지 않은 배지를 첨가하여 동일하게 배양하였다. 48시간 배양 후 MTT 시약을 각각의 well에 첨가하고 37°C, 5% CO₂ 세포배양기에서 4시간 더 배양하였다. 배양 후 배지를 제거하고 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 첨가하여 생성된 불용성의 formazan 결정을 용해시킨 뒤 ELISA reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 세포생존율은 시료의 흡광도를 대조군의 흡광도에 대한 백분율로 나타내었다[11].

Alkaline phosphatase (ALP) 활성 검색

MC3T3-E1 세포를 6 well plate에 배양한 후 석회화 유도를 위해 분화유도 배지로 5일간 배양한 뒤 농도별로 준비된 시료를 처리하여 24시간 배양하여 0.2% triton X-100을 첨가하여 30분간 세포를 용해시켰다. 단백질량은 표준시료로 Bovine Serum Albumin (BSA)을 이용한 Bradford법을 사용하여 표준곡선을 작성한 후 정량하였다. 여기에 0.1N glycine과 100 mM *p*-nitrophenylphosphate (*p*-NPP)를 첨가한 뒤 37°C에서 30분간 반응시켰다. 반응 후 0.1N NaOH를 첨가하여 반응을 정지시킨 다음 405 nm에서 흡광도를 측정하여 ALP 효소에 의해 *p*-nitrophenol로 전환된 양을 산출하였다[24].

Alizarin-Red 염색법에 의한 골석회화 형성도 측정

MC3T3-E1 세포를 6 well plate에 배양한 후 석회화 유도를 위해 분화유도 배지로 7일간 배양한 뒤 농도별로 준비된 시료를 처리하여 24시간 배양하여 70% ethanol로 4°C에서 1시간 동안 세포를 고정시켰다. Alizarin-Red (AR) solution은 10 ml 증류수에 40 mM이 되도록 농도를 맞춘 후 pH 4.2로 조정하였다. 세포를 고정하고 AR solution (2 ml/well)으로 10분간 염색한 후 증류수로 2~3회 세척한 뒤 현미경을 이용하여 관찰하였다. Nodule 형성 확인 후 10% acetylpyridinium chloride를 포함하는 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0) 2 ml/well를 첨가하여 ELISA reader로 550 nm에서 흡광도를 측정하였다[1].

통계처리

본 연구결과 얻어진 모든 실험결과는 Mean±SD로 표시하였으며, SPSS (version 20.0) 통계프로그램을 사용하여 하위그룹 각각의 기술통계치(mean, SD)를 산출하였다. 집단간의 차이를 알아보기 위해 일원변량분석(one-way ANOVA)를 이용하여 분석하였고, 사후검정은 Duncan을 적용하였다. 유의수준은 *p*<0.05 수준으로 검증하였다.

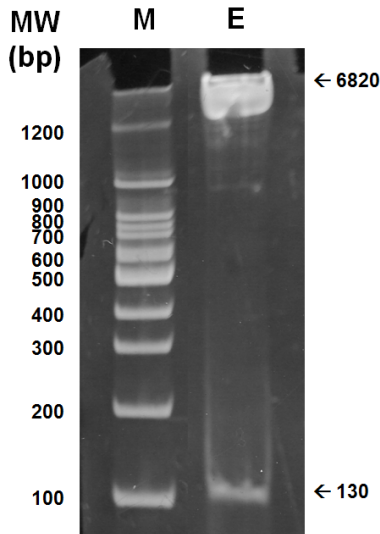


Fig. 1. Confirmation of a luciferase reporter plasmid pGL2-Neo-ERE119-Ad2MLP by restriction enzyme. pGL2-Neo-ERE119-Ad2MLP was digested by restriction enzymes *SacI* and *HindIII*, and a 130 bp ERE119-Ad2MLP fragment and a 6,820 bp pGL2-Neo fragment were confirmed.

결과 및 고찰

에스트로겐 유사활성 검증 리포터 플라스미드의 구축

구축된 pGL2-Neo-ERE119-Ad2MLP를 제한효소 *SacI*과 *HindIII*로 처리한 후 8% acrylamide gel을 이용하여 DNA-PAGE를 실시한 결과, 에스트로겐 유사활성을 검증하는 130 bp의 유전자 단편을 확인할 수 있었다(Fig. 1).

감초, 황기, 산약의 에스트로겐 유사활성검증

에스트로겐에 대한 반응성이 나타나도록 고안된 luciferase 리포터 플라스미드인 pGL2-Neo-ERE119-Ad2MLP가 stable transfection된 인체 유방암 세포주인 MCF7/pGL2-Neo-ERE119-Ad2MLP를 이용한 *in vitro* 검출시스템으로 감초, 황기, 산약에 대해 에스트로겐 유사활성을 검증하였다(Fig. 2). 에스트로겐 유사활성을 측정된 결과, 추출물이 음성대조군에 비해 농도별로 1.11배에서 5.73배 높은 에스트로겐 유사활성을 나타내었다. 동일 농도에서의 활성을 비교하면 산약이 가장 낮고 감초가 가장 높았다. 산약추출물은 농도가 증가하여도 에스트로겐 유사활성의 증가가 미미하여, 산약 500 µg/ml의 농도에서의 활성이 황기 50 µg/ml의 농도에서의 활성과 유사하고 감초 5 µg/ml의 농도에서의 활성보다 낮았다. 감초 열수 추출물은 모든 농도에서 통계적으로 유의하였고, 황기 열수 추출물에서는 50, 500 µg/ml의 농도에서만 통계적으로 유의하였다.

음성대조군과 비교하였을 때 감초>황기>산약 순으로 높은 에스트로겐 유사활성을 나타내었고, 양성대조군과 비교하였을 때는 감초 열수 추출물은 500 µg/ml에서 10^{-8} M 17β-estradiol의 활성 보다 1.27배 높은 활성을 나타내었고, 황기 열수추출물은 500 µg/ml에서 10^{-8} M 17β-estradiol의 활성과 거의 유사한 활성을 나타내었다. 산약은 500 µg/ml에서 10^{-9} M 17β- estradiol의 활성 보다 낮은 활성을 보였다.

이전의 다른 연구와 비교하면 감초와 황기 에탄올 추출물의 경우 500 µg/ml의 농도에서 10^{-8} ~ 10^{-9} M 17β-estradiol의 활성 사이의 에스트로겐 유사활성을 나타낸 반면, 본 연구에서 사용한 열수 추출물의 경우, 감초는 500 µg/ml의 농도에서 10^{-6} ~ 10^{-7} M 17β-estradiol의 활성 사이의 활성을 보였고 황기

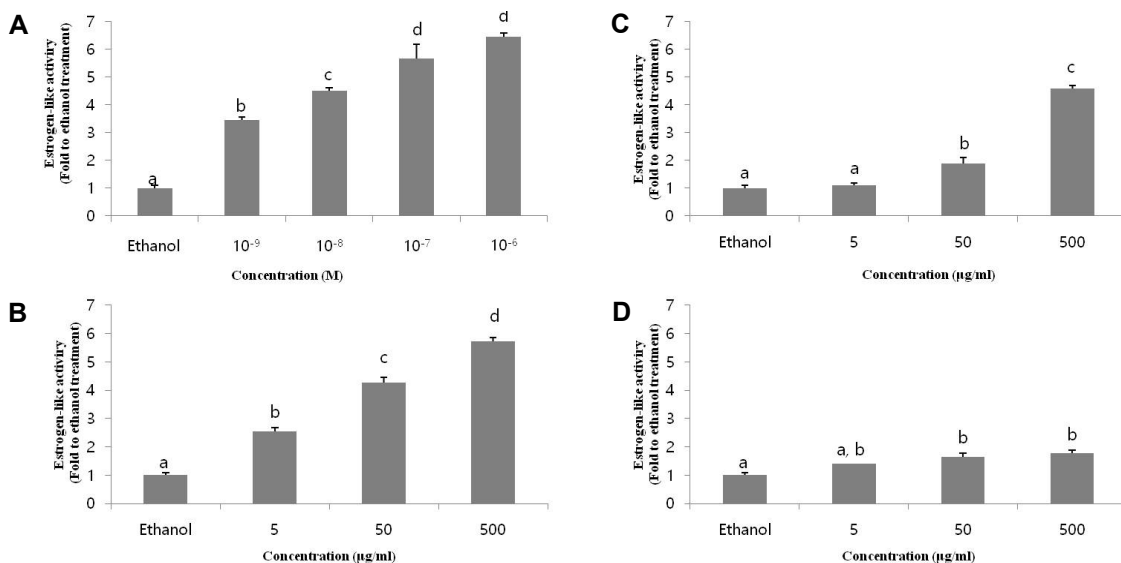


Fig. 2. Effect of medicinal herbs on estrogen-like activity of the MCF7 cell. Means with different subscripts are significantly different at $p < 0.05$ by duncan's multiple range test. A: 17β-estradiol, B: *Glycyrrhizae radix* (Gamcho), C: *Astragali radix* (Hwang-gi), D: *Dioscorea rhizome* (Sanyak).

는 10^{-8} M 17β -estradiol의 활성 정도의 활성을 나타내어 열수 추출물이 에탄올 추출물에 비해 더 높은 활성을 나타내었다 [25].

한약재 추출물의 조골세포 증식유도 효과

한약재 3종 추출물의 조골세포 증식능에 미치는 효과 및 적절한 농도 설정을 위하여 MTT assay 법을 이용하여 증식유도 효과를 검토하였다. MTT assay 법은 세포의 증식과 성장을 알아보는 대표적인 실험방법으로 세포생존율에 비례하여 흡광도를 나타낸 것으로 [29] 측정결과는 Fig. 3과 같다. 감초 추출물이 세포증식에 미치는 영향을 검토한 결과, 감초 추출물의 농도가 1~1,000 $\mu\text{g/ml}$ 범위에서 100% 이상의 증식율을 나타내었으며 모든 농도에서 대조군 대비 통계적으로 높은

증식율을 나타내었다. 황기추출물의 경우 추출물의 농도가 200 $\mu\text{g/ml}$ 일 때를 제외하고 증식율이 100%에 미치지 못하였다. 반면, 산약추출물의 경우 50 $\mu\text{g/ml}$ 일 때 133%의 최대 활성을 나타내었다. 3종류의 한약재 중 감초 추출물의 농도가 50 $\mu\text{g/ml}$ 일 때 최대 148%의 높은 증식율을 나타내었고, 다른 보고에서 감초 에탄올 추출물의 농도가 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 122%의 증식율을 나타낸 결과와 비교하여 [35] 높은 증식율을 보였으므로, 감초 추출물이 조골세포의 생존율에 긍정적인 영향을 미치는 것을 알 수 있었다. 조골세포를 이용한 이후 실험에서는 독성을 보이지 않은 범위인 (>80% cell proliferation인) 1~200 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 실험하였다. 골은 골형성 및 골재흡수에 의한 bone remodeling이 지속적으로 일어나는 역동적인 조직으로, 조골세포의 증식, 분화 및 석회화의 복잡한 과정을 거치며, 이 과정에서 type 1 collagen, alkaline phosphatase (ALP), osteopontin, osteocalcin 등의 유전자가 발현되는 것으로 알려져 있다 [3]. 본 연구에서는 감초, 황기 및 산약 추출물이 조골세포의 증식을 촉진함을 확인하였으므로, 조골세포의 분화 및 석회화에 관한 검토를 진행하였다.

한약재 추출물이 조골세포 분화에 미치는 영향

ALP는 신장, 뼈 등의 여러 조직에 특이적으로 존재하며 조직, 뼈 및 석회질화 연골(calcifying cartilage)의 발달 초기에 세포 표면과 기질 소포에서 관찰되는 효소로 조골세포의 초기 분화에 관련된 대표적인 지표이다 [10].

본 연구에서는 ALP 활성에 대한 영향을 평가하기 위하여 *p*-nitrophenyl phosphate의 가수분해 반응에 ALP가 촉매로 작용하는 원리를 이용하여 가수분해 산물인 *p*-nitrophenol의 양을 측정함으로써 ALP 활성을 검토하였다 (Fig. 4) [24]. 감초 추출물은 100 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 농도에서 그리고 산약추출물은 1 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 약 122%의 최대 활성을 나타내었으며, 이는 감초 에탄올 추출물의 ALP 활성이 122%을 나타낸 것과 유사한 결과였다 [35]. 폐경 후 발생하는 골다공증의 치료를 위하여 estrogen을 투여하는데 이는 에스트로겐이 조골세포의 estrogen receptor α (ER α) 혹은 β (ER β)와 결합한 뒤 핵내로 이동하여 골대사에 관여하는 유전자의 전사활성을 조절해 ALP 활성을 높이고 insulin-like growth factor I (IGF-I)와 같은 성장인자의 생성을 촉진시키는 것으로 알려져 있다 [34]. 본 연구에서 감초 추출물의 처리에 따라 ALP 활성이 높아진 것은 다른 한약재에 비하여 높은 에스트로겐 유사활성으로 인하여 ALP 활성에 영향을 주었을 것으로 사료된다. 따라서 감초 추출물은 조골세포의 증식 및 분화의 표지인자인 ALP의 발현을 증가시켜 조골세포의 분화와 성장을 촉진하는 효과적인 소재임을 알 수 있었다.

한약재 추출물이 조골세포 석회화 형성능에 미치는 영향

조골세포의 표지인자에는 ALP, collagen 및 osteocalcin 등

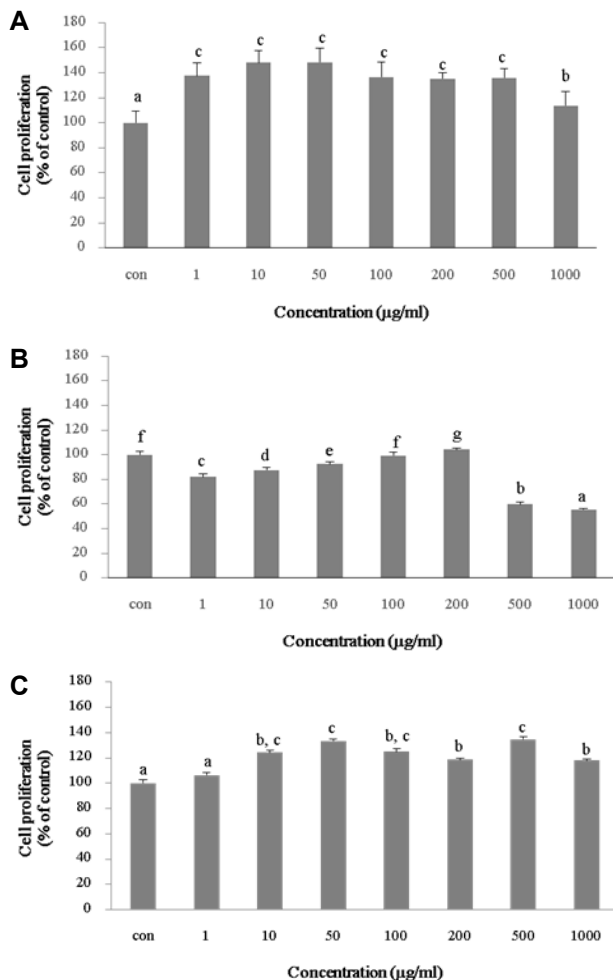


Fig. 3. Effect of medicinal herbs on proliferation of the MC3T3-E1 osteoblastic cells as assessed by the MTT assay. Means with different subscripts are significantly different at $p < 0.05$ by duncan's multiple range test., Con: 0 $\mu\text{g/ml}$ medical herb extracts was added. A: *Glycyrrhizae radix* (Gamcho), B: *Astragali radix* (Hwang-gi), C: *Dioscorea rhizome* (Sanyak).

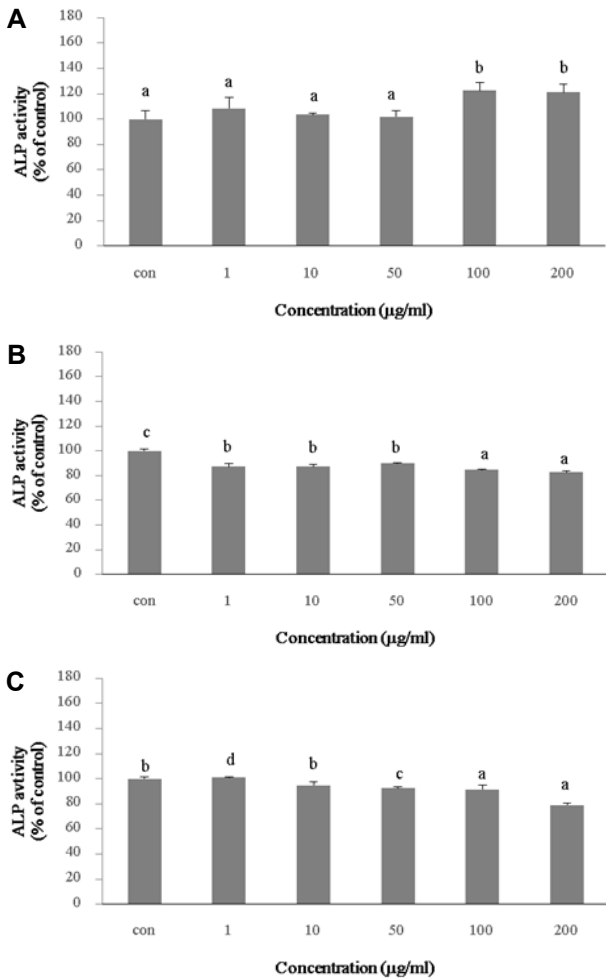


Fig. 4. Effect of medicinal herbs on alkaline phosphatase (ALP) activity of the MC3T3-E1 osteoblastic cells. Means with different subscripts are significantly different at $p < 0.05$ by duncan's multiple range test., Con: 0 µg/ml medicinal herb extracts was added. A: *Glycyrrhizae radix* (Gamcho), B: *Astragali radix* (Hwang-gi), C: *Dioscorea rhizome* (Sanyak).

이 사용되고 있으나, 이러한 지표는 조골세포에 한정된 지표가 아니기 때문에 전조골세포(pre-osteoblast)에서 조골세포의 분화 및 골형성(bone formation)의 지표로 석회화 세포외기질의 형성 정도를 검토하고 있다[7]. 본 연구에서는 석회화 형성능 검토를 위하여 분화 후 시료를 처리하여 고정된 세포에 Alizarin-Red S staining을 실시한 뒤 현미경을 이용하여 nodule 형성을 확인 후 석회화 정도를 수치화하였다(Fig. 5). 감초 추출물의 경우 1 µg/ml의 농도에서부터 석회화가 진행되었으며, 50 µg/ml 농도에서는 최대 148%의 활성을 나타내었다. 황기 추출물의 경우 50 µg/ml 농도에서 석회화가 나타났으며, 100 µg/ml 농도에서 최대 131%의 활성을 나타낸 반면, 산약은 석회화 형성능에 영향을 미치지 않았다. 현미경을 통한 관찰에서도 감초 및 황기 추출물 처리군의 석회화가 진행되었음을 알 수 있었다. 특히, 감초 추출물의 경우 ALP 활성뿐 아니라

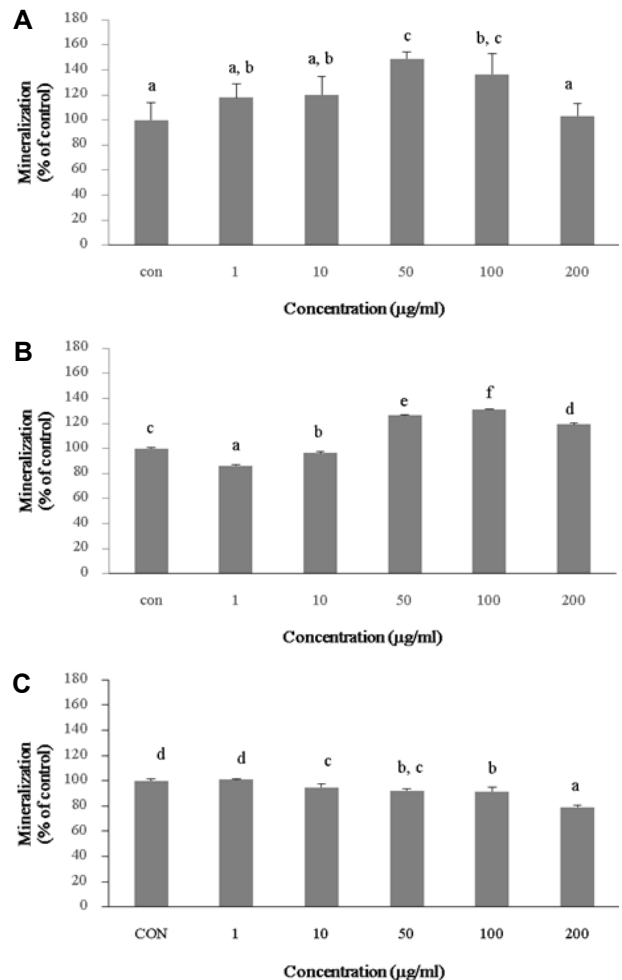


Fig. 5. Effect of medicinal herbs on mineralization of the MC3T3-E1 osteoblastic cells. Means with different subscripts are significantly different at $p < 0.05$ by duncan's multiple range test., Con: 0 µg/ml medicinal herb extracts was added. A: *Glycyrrhizae radix* (Gamcho), B: *Astragali radix* (Hwang-gi), C: *Dioscorea rhizome* (Sanyak).

석회화 형성능에서도 유의적인 활성을 나타내어, 조골세포의 증식을 촉진시킬 수 있는 ALP가 조골세포 성장에 관여하는 인자 혹은 골기질 단백질에 영향을 주어 성장인자에 직접적으로 영향을 주는 것으로 사료된다. 난소절제술 혹은 초기폐경기에는 에스트로겐의 분비가 급작스럽게 저하되어 골소실의 초기 가속기가 진행된다. 그러나 이는 에스트로겐의 투여로 예방될 수 있으며, 에스트로겐은 조골세포에서 IGF-1, TGF-beta 및 procollagen 합성을 증가시키고, 조골세포의 과사를 저해하여 조골세포의 수명을 증가시킨다는 보고가 있어 감초 추출물의 높은 에스트로겐 유사활성이 이러한 역할을 하였을 것으로 추측된다[2]. 그러나 감초 추출물이 bone formation과 관련하여 어떠한 성장인자의 발현을 조절하여 영향을 미치는지는 알 수 없으므로 단백질 및 유전자 수준의 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 산업통상자원부와 한국산업기술진흥원의 지역 특화산업육성사업으로 수행된 결과입니다(과제번호: R0005062).

References

1. Cho, S. H. 1995. The electron microscopic observation of the effects of estrogen on the osteoblast-like cell (Ros-17/2.8-5) differentiation. *J. Kor. Soc. Menopause* **1**, 28-34.
2. Choi, H. 2008. Development and conservation of the female skeleton. *Osteoporosis* **6**, 1-7.
3. Choi, S. Y. 2002. Effects of irradiation on the mRNA expression of the type I collagen and alkaline phosphatase in MC3T3-E1 osteoblastic cell line. *Ph.D. dissertation, Chonbuk University, Jeonju, Korea.*
4. Choi, W. H. 2002. Medical treatment of osteoporosis: Hormone replacement therapy. *Hanyang J. Med.* **22**, 19-25.
5. Choi, G. Y. and Kim, B. W. 2010. Experimental study on the antioxidant and antimicrobial properties of *Dioscoreae Rhizoma*. *Kor. J. Orient. Int. Med.* **31**, 290-297.
6. Davis, S. R., Murkies, A. L. and Wilcox, G. 1998. Phytoestrogens in clinical practice. *Integr. Med.* **1**, 27-34.
7. Declercq, H. A., Verbeeck, R. M., De Ridder, L. I., Schacht, E. H. and Cornelissen, M. J. 2005. Calcification as an indicator of osteoinductive capacity of biomaterials in osteoblastic cell cultures. *Biomaterials* **26**, 4964-4974.
8. Edwards, M. W., Bain, S. D., Bailey, M. C., Lantry, M. M. and Howard, G. A. 1992. 17 β Estradiol stimulation of endosteal bone formation in the ovariectomized mouse: an animal model for the evaluation of bone-targeted estrogens. *Bone* **13**, 29-34.
9. Gerbarg, P. L. and Brown, R. P. 2016. Pause menopause with *Rhodiola rosea*, a natural selective estrogen receptor modulator. *Phytomedicine* **23**, 763-769.
10. Golub, E. E. and Boesze-Battaglia, K. 2007. The role of alkaline phosphatase in mineralization. *Curr. Opin. Orthop.* **18**, 444-448.
11. Green, L. M., Reade, J. L. and Ware, C. F. 1984. Rapid colorimetric assay for cell viability: application to the quantitation of cytotoxic and growth inhibitory lymphokines. *J. Immunol. Methods* **70**, 257-268.
12. Ha, J. M. and Lee, S. H. 2003. Verification of estrogenic activity in ethanol extracts of marine organisms using *in vitro* test system. *J. Life Sci.* **13**, 799-804.
13. Han, S. B., Gu, H. A., Kim, S. J., Kim, H. J., Kwon, S. S., Kim, H. S., Jeon, S. H., Hwang, J. P. and Park, S. N. 2013. Comparative study on antioxidative activity of *Glycyrrhiza uralensis* and *Glycyrrhiza glabra* extracts by country of origin. *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea* **39**, 1-8.
14. Jang, M. K., Lee, O. H., Kim, M. H., Lee, Y. A., Kang, S. R. and Lee, S. H. 2008. Evaluation of the estrogenic activities of natural products. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **43**, 145-148.
15. Jeon, M. J., Kim, S., Kim, B. K., Cheon, J., Park, S. H., Oh, E., Lee, S. H. and Kim, M. 2013. The effects of seaweed gongjindan on estrogen like activities, platelet aggregation and serum lipid levels in ovariectomized rats. *J. Life Sci.* **23**, 1155-1162.
16. Jung, C. S. 2012. Aging society and labor market. *J. Digit. Converg.* **10**, 185-194.
17. Jung, M. 2008. The effect of hormone therapy on bone. *J. Kor. Soc. Osteoporosis* **6**, 71-78.
18. Kim E. J. 2001. Antioxidative effects and their active constituents of *Astragali Radix*. *Ph.D. dissertation, Sookmyung Women's University, Seoul, Korea.*
19. Kim, D. H. 2011. Quality characteristics of fish paste prepared with *Astragalus membranaceus* powder. *Food Eng. Prog.* **15**, 362-369.
20. Kim, H. J., Jang, H. N., Bae, J. Y., Ha, J. H. and Park, S. N. 2014. Antimicrobial activity, quantification and bactericidal activities of licorice active ingredients. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **42**, 386-392.
21. Kim, N. Y., Jang, H. J., Lee, D. G., Jang, M. K., Lee, S. W., Jeon, M. J., Kim, M. H., Kim, S. G. and Lee, S. H. 2011. Establishment of *in vitro* detection system for iNOS expression and the verification of suppressive effect by pine needle extract. *Kor. Soc. Biotechnol. Bioeng. J.* **26**, 172-176.
22. Kim, T. H., Lee, H. H., Chung, S. H. and Park, H. S. 2011. Differentiation in the management of osteoporosis between premenopausal and menopausal women. *J. Kor. Soc. Menopause* **17**, 21-26.
23. Kinto, N., Iwamoto, M., Enomoto-Iwamoto, M., Noji, S., Ohuchi, H., Yoshioka, H., Kataoka, H., Wada, Y., Yahao, G., Takahashi, H. E., Yoshiki, S. and Yamaguchi, A. 1997. Fibroblasts expressing sonic hedgehog induce osteoblast differentiation and ectopic bone formation. *FEBS Lett.* **404**, 319-323.
24. Lee, Y. G., Song, J., Lee, S. B., Kim, K. N. and Choi, S. H. 2003. Influence of calcium phosphate glass for periodontal regeneration on MC3T3-E1 proliferation, differentiation and calcification. *J. Kor. Res. Soc. Dent. Mater.* **30**, 181-188.
25. Lee, S. H. 2003. Verification of estrogenic activities in ethanol extracts of oriental herbal medicines using *in vitro* detection system. *Kor. J. Orient. Physiol. Pathol.* **17**, 1054-1058.
26. Lee, S. H., Jung, B. H., Kim, S. Y. and Chung, B. C. 2004. Determination of phytoestrogens in traditional medicinal herbs using gas chromatography - mass spectrometry. *J. Nutr. Biochem.* **15**, 452-460.
27. Lissin, L. W. and Cooke, J. P. 2000. Phytoestrogens and cardiovascular health. *J. Am. Coll. Cardiol.* **35**, 1403-1410.
28. McAnuff, M. A., Harding, W. W., Omoruyi, F. O., Jacobs, H., Morrison, E. Y. and Asemota, H. N. 2005. Hypoglycemic effects of steroidal saponin isolated from Jamaican bitter yam, *Dioscorea polygonoides*. *Food Chem. Toxicol.* **43**, 1667-1672.
29. Jeon, M. H. and Kim, M. H. 2011. Effect of *Hijikia fusiforme* fractions on proliferation and differentiation in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *J. Life Sci.* **21**, 300-308.
30. Mori, Y., Hiraki, Y., Shukunami, C., Kakudo, S., Shiokawa, M., Kagoshima, M., Mano, H., Hakeda, Y., Kurokawa, T., Suzuki, F. and Kumegawa, M. 1997. Stimulation of osteo-

- blast proliferation by the cartilage derived growth promoting factors chondromodulin I and II. *FEBS Lett.* **406**, 310-314.
31. Park, S. H., Jeon, M. J., Jang, M. K., Lee, S. J., Kim, B. K., Jeon, M. J., Kim, S. Y., Kim, M., Lee, D. G., Lee, T. H., Nam, J. S., Hur, J. W. and Lee, S. H. 2013. Verification of estrogen like activities of herbal medicines using an *in vitro* detection system. *Kor. J. Orient. Physiol. Pathol.* **27**, 752-758.
32. Park, Y. M., Lim, J. H. and Seo, E. W. 2015. Effect of *Dioscorea Rhizoma* on gastritis by acute gastric ulcer in rats. *Kor. J. Plant Res.* **28**, 1-8.
33. Jeong, Y. and Lee, Y. 2009. Protective effect of *Rhizoma dioscoreae* on the gastric mucosal lesions Induced by alcohol in rats. *Kor. J. Orient. Physiol. Pathol.* **23**, 639-644.
34. Yun, J. 2010. Effects of *Chrysanthemum indicum* L. extract on the activity and differentiation of osteoblastic MC3T3-E1 cells. *M.S. Thesis. dissertation, Duksung women's University, Seoul, Korea.*
35. Yun, J. H., Hwang, E. S. and Kim, G. H. 2011. Effects of *Chrysanthemum indicum* L. extract on the growth and differentiation of osteoblastic MC3T3-E1 Cells. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **40**, 1384-1390.

초록 : 한약재 추출물의 에스트로겐 유사활성 및 조골세포 증식과 분화에 미치는 영향

김미향¹ · 김보경¹ · 김재덕² · 강아람¹ · 이창은² · 서정민¹ · 이동근³ · 조정권³ · 김육용⁴ · 유기환⁴ · 이상현^{2,3*}

(¹신라대학교 의생명과학대학 식품영양학과, ²신라대학교 일반대학원 그린화학융합공학과, ³신라대학교 일반대학원 바이오과학과, ⁴㈜이삭에프앤비)

본 연구는 3종의 한약재(감초(*Glycyrrhizae radix*), 황기(*Astragali radix*) 및 산약(*Dioscorea rhizome*)) 추출물의 에스트로겐 유사활성 및 조골세포 증식과 분화에 미치는 영향을 검토하고자 실험을 진행하였다. 에스트로겐 유사활성 측정을 위하여 인체 유방암 세포주인 MCF7 세포를 luciferase 유전자를 리포터로 사용하는 에스트로겐 반응성 리포터 시스템을 가지는 세포로 형질전환하여 사용하였다. 상기 세포를 이용하여 추출물의 에스트로겐 유사활성을 측정된 결과, 한약재 추출물이 음성대조군과 비교하여 1.11배~5.73배 높은 에스트로겐 유사활성을 나타내었다. 그 중 감초 추출물이 가장 높은 에스트로겐 유사활성을 보였다. 감초 추출물의 에스트로겐 유사활성은 추출물의 농도가 50 µg/ml 및 500 µg/ml 일 때 각각 10⁻⁸ M 및 10⁻⁷ M 17β-estradiol과 거의 유사한 활성을 나타내었다. 조골세포주인 MC3T3-E1 세포를 이용한 실험에서는 감초 추출물의 농도가 1~1,000 µg/ml 범위일 때 독성을 나타내지 않았다. 황기 추출물은 조골세포에 있어서 유의적인 세포 증식률을 보이지 않았다. 그러나, 감초 및 산약 추출물은 각각 148% 및 133%의 최대 증식률을 보였다. 또한, 감초 추출물은 대조군과 비교하여 alkaline phosphatase (ALP) 활성이 증가하였으며, 추출물의 농도가 100 µg/ml 일 때 최대 122%의 ALP 활성을 나타내었다. 또한, Alizarin red S 염색법을 이용한 석회화 형성능 측정에서도 대조군과 비교하여 석회화가 증가하였다. 이러한 결과로 미루어 보아 감초 추출물이 골 형성 및 골다공증 예방 효과가 우수한 식품 소재인 것으로 사료된다.