ISSN (Print) 1225-9918
ISSN (Online) 2287-3406
Journal of Life Science 2019 Vol. 29. No. 9. 1027~1033 DOI : https://doi.org/10.5352/JLS.2019.29.9.1027

- Note -

Osteoblastogenic Activity of *Tenebrio molitor* Larvae Oil on the MG-63 Osteoblastic Cell

Minchul Seo†, Minhee Baek†, Joon Ha Lee, Hwa Jeong Lee, In-Woo Kim, Sun Young Kim, Jae-Sam Hwang and Mi-Ae Kim*

Department of Agricultural Biology, National Institute of Agricultural Sciences, Rural Development Administration, Wanju-gun, Jeonbuk 55365, Korea

Received August 2, 2019 /Revised September 10, 2019 /Accepted September 16, 2019

Recently, Korea has seen a rapid increase in the elderly population. As a result, osteoporosis, a geriatric disease, has become a social problem. To investigate the novel and natural materials for promoting osteoblastogenesis, we investigated the osteoblastogenic activity of *Tenebrio molitor* larvae oil (TMO) on the MG-63 preosteoblast cells. The cytotoxicity and proliferation effects of TMO on MG-63 cells were measured by MTS assay. There was no cytotoxicity up to 80 μg/ml. At 40 and 80 μg/ml of TMO (treated for 48 hr), cell proliferation was elevated about 120% compared to the control. The osteoblastogenic activity of TMO was measured with alkaline phosphatase (ALP) activity at 5 days. Doses of 5 to 80 μg/ml of TMO increased ALP activities significantly compared with the control. In addition, expression of ALP and Runx2 (osteoblastogenic markers) were markedly increased after treatment of TMO for 5 days. These results provide evidence that TMO promotes osteoblastogenesis by increasing the gene and protein expression of ALP and Runx2, and they suggest that TMO may be a potential agent for bone formation and preventing osteoporosis.

Key words : Alkaline phosphatase, bone formation, MG-63, osteoblastogenesis, *Tenebrio molitor*

서 론

우리나라는 현재 고령화 사회에 접어들었으며 65세 이상 고령인구는 계속하여 증가하고 있는 추세이다. 고령화 사회에서는 골 대사 질환이 큰 문제로 대두되고 있으며 그 중 가장 흔하게 발생하는 골다공증은 골 밀도의 감소와 미세구조의 이상을 특징으로 하며 골 파열 위험의 증가로 경미한 충격에도 쉽게 골절을 일으킬 수 있는 질환이다[8]. 골절이 일어나기 전까지는 자각증상이 거의 없어 더욱 위험한 것으로 알려져 있으며[14], 특히 폐경기 여성의 경우 에스트로겐 결핍에 의해 파골세포에 의한 골 흡수가 많아져 골다공증이 쉽게 유발되는 것으로 보고되고 있다[10, 20]. 현대사회에서는 폐경기 여성뿐만 아니라 나이와 성별을 불문하고 골다공증 발생률이 증가하는 것으로 보고되었으며, 그 요인으로는 연령, 성, 가족력 등과 같은 유전적 요인과 음주, 흡연 및 운동 등 생활습관 요인이 있다[22].

†**Authors contributed equally.**
***Corresponding author**
Tel : +82-63-238-2977, Fax : +82-63-238-3833
E-mail : kimma@korea.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.

뼈는 체내 구조를 이루고 골격계를 구성하는 역할을 하며 칼슘과 인의 혈중 농도 조절 및 조혈작용에도 관여하는 조직이다. 뼈 조직은 골 기질 흡수 작용을 하는 파골세포와 새로운 골 기질을 형성하는 조골세포로 이루어져 있으며 파골 및 조골세포가 서로 균형을 이루면서 칼슘과 인을 이용한 무기질화 과정이 끊임없이 일어남으로써 골 항상성이 유지되며, 이러한 균형이 깨지는 경우 골다공증이 발생하게 된다[19]. 골다공증의 발병 원인이 파골세포의 활성증가인지, 조골세포의 활성감소인지 명확하게 밝혀지지 않았음에도 불구하고 현재 사용되고 있는 골다공증 치료방법은 주로 골 흡수를 억제하는 방법으로 에스트로겐 및 비스포스포네이트 제제가 대부분을 차지하고 있다[24]. 이러한 약제를 사용할 경우 파골세포의 활성을 억제하여 골 조직의 손실을 감소시킬 수 있지만 이미 진행된 골 소실에 대한 회복 효과 또는 새로운 골 조직의 형성과 같은 효과는 기대할 수 없으므로 골다공증의 완전한 예방 및 치료는 불가능한 실정이다[17, 18]. 따라서 골 조직 형성의 증가를 동반한 골다공증 예방 및 치료의 또 다른 방법으로 조골세포 활성 증가를 목적으로 한 연구가 활발해지고 있으며, 천연소재의 경우 복분자, 황금 및 가시오가피 등을 이용하여 조골세포의 활성화에 미치는 효과에 대한 연구가 진행되었다[18, 21, 26].

조골세포는 연골, 지방, 근원세포 및 섬유아세포로 분화될 수 있는 세포로 골수의 간엽줄기세포(mesenchymal stem cell)에서 기원한 세포이다[25]. 조골세포는 칼슘 침착 및 무기질화

를 조절하고 뼈의 세포 외 기질을 합성함으로써 뼈의 형성 및 재형성 과정에서 가장 중요한 역할을 한다[7, 11]. 따라서 조골세포를 이용한 연구는 골다공증 예방 및 치료 효능이 있는 소재의 개발에 도움이 될 것으로 사료된다. 조골세포는 골 표면에 근접하게 분포하며, 세포막에 alkaline phosphatase (ALP)라는 당단백 효소가 존재하는데 이 효소는 염기성 pH에서 최적의 활성을 보이며 기질 특이성이 있다. 또한 무기인산의 운반, 세포분열 및 분화의 조절자로서 세포의 외막과 석회화 조직의 기질 소포에서 높은 농도로 발견이 되며 이를 통해 골세포 분화의 표지인자로 사용되고 있다[8, 9, 28].

현재의 세계적인 인구 증가 및 지구온난화 등 각종 문제로 인해 미래에는 식량 부족 현상이 나타날 것으로 예측되며 이를 해결할 대안으로써 식용곤충이 각광받고 있다. 식용곤충은 단백질과 불포화지방산 함유량이 높으며 탄수화물, 비타민 및 무기질 등 다양한 영양소를 함유하고 있다. 뿐만 아니라 현재의 동물성 단백질 급원인 가축의 생산과정에 비해 온실가스 및 폐기물의 양이 적으며 생장기간은 짧고 개체 수 증가율은 높아 보다 효율적인 식량자원이 될 것으로 사료된다. 또한, 과거의 본초강목, 동의보감 등 문헌을 통해 곤충의 다양한 효능을 확인할 수 있으며, 극한 외부 환경에서 생존해나가는 곤충의 특성 상 체내에 기능성을 가진 대사산물을 함유하고 있을 것으로 추정된다[15].

현재 국내에 7종의 식용곤충이 일반식품으로 식품공전에 등록되어 있으며[1], 최근에는 곤충을 이용한 식품 제조 방법 연구, 곤충 유래의 생리활성 물질에 대한 연구 등이 활발히 진행되고 있어 식용 및 약용으로 곤충의 이용이 증가할 것으로 사료된다[6].

갈색거저리(*Tenebrio molitor*)는 딱정벌레목(Coleoptera) 거저리과(Tenebrionidae)의 곤충으로 갈색거저리의 유충은 대표적인 식용곤충이다. 최근 갈색거저리 유충의 분말을 이용하여 패티, 파스타 및 선식 등 식품에 적용하는 연구[12, 13, 23]가 선행되었으며 갈색거저리 추출물의 항산화, 항균 및 항염 효과 등이 밝혀져있다[2, 31]. 그러나 갈색거저리 유충을 이용한 골 형성 촉진 및 골다공증에 대한 효능 연구는 전무한 실정이다. 갈색거저리 유충은 다른 식용곤충에 비해 지방 및 불포화지방산의 함량이 비교적 높아[30] 갈색거저리 유충 오일의 사용이 보다 용이할 것으로 사료된다.

따라서 본 연구에서는 갈색거저리 유충으로부터 추출한 오일이 MG-63 조골세포 증식 및 활성에 미치는 영향을 분석하고자 하였으며, 이를 통해 갈색거저리 유충 오일의 골다공증 개선 가능성을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

갈색거저리 유충 오일 추출

본 연구에 사용된 갈색거저리 유충(*Tenebrio molitor*)은 경기도 화성 소재 갈색거저리 사육농가에서 구입하여 중적외선 건조기(MS3-6, Lichtzen, Korea)를 이용하여 건조 후 시료로 사용하였다. 수분함량이 3.5%인 건조 갈색거저리 유충을 착유기(명진종합기계)에서 500 kgf/cm^{2}의 압력으로 착유하였다. 시료량은 2 kg씩 나누어 착유하였으며, 착유 시간은 압력도달 시간 15분, 압력지속시간 15분으로 설정하여 착유하였다. 갈색거저리 유충으로부터 착유된 오일(*Tenebrio moritor* larvae oil, TMO)은 사용 전까지 4℃에 냉장보관하여 사용하였다.

세포주

인간유래 조골세포(human osteoblast-like cell, MG-63)는 ATCC (Manassas, VA, USA)에서 구입하였으며, 10% FBS (fetal bovine serum) (Hyclone, Logan, UT, USA)와 1× penicillin-streptomycin (Hyclone)이 첨가된 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Hyclone)을 배양배지로 사용하여 37℃, 5% CO_2의 배양조건에서 배양하였다. 세포의 계대배양은 세포가 충분히 성장하는 2-3일 간격으로 수행하였다.

세포 생존율 측정

TMO가 MG-63의 세포 생존율에 미치는 영향은 Chao 등[4]의 방법에 따라 MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) reagent를 이용하여 확인하였다. MG-63에 대한 TMO의 세포독성 및 세포증식을 확인하기 위하여 MG-63을 96-well plate에 5.0×10^3 cells/well로 분주하여 약 80%의 confluency에 도달할 때까지 10% FBS가 들어있는 배지에서 약 24시간 동안 배양하였다. 그 후 TMO를 5, 10, 20, 40, 80 μg/ml 의 농도로 처리하여 24시간 및 48시간 동안 추가 배양한 후 MTS reagent를 사용하여 세포 생존율을 측정하였다.

ALP (Alkaline phosphatase) 효소 활성 측정

ALP 효소 활성 검사는 *p*-nitrophenyl phosphate (*p*-NPP)의 가수분해 반응에 ALP가 촉매로 작용하는 원리를 이용하여, *p*-nitrophenyl phosphate 의 가수분해 산물인 *p*-nitrophenol의 양을 측정함으로써 ALP의 활성을 간접적으로 확인하는 방법을 사용하였다. MG-63세포를 96-well plate에 1.5×10^4 cells/well 농도로 분주하여 24시간 배양한 다음, TMO를 농도별(5, 10, 20, 40, 80 μg/ml)로 처리하고 2일마다 배지를 갈아주며 5일간 조골세포 분화를 유도하였다. 5일 후 분화가 유도된 세포는 PBS로 세척하고 0.1% Triton X-100을 20 μl씩 분주하여 37℃, 5% CO_2 조건에서 30분간 세포를 lysis 한 후, 100 μl의 *p*-NPP (sigma)을 분주하여 30분간 ALP에 의한 *p*-NPP의 가수분해 반응을 유도하였다. 반응 후 3 M NaOH로 가수분해 반응을 정지시키고 405 nm에서 흡광도를 측정하여 ALP 효소에 의해 *p*-nitrophenol로 전환된 양을 측정하였고 이를 통해 ALP 효소 활성을 산출하였다.

ALP (Alkaline phosphatase) staining

ALP 활성 및 조골세포의 분화 정도를 확인하기 위하여 ALP staining을 통해 염색 정도를 확인하였다. ALP 활성 측정 방법과 동일한 방법으로 세포에 TMO를 처리하여 분화를 유도하였다.. 분화가 유도된 세포는 PBS로 세척하였고 10% formalin을 사용하여 세포를 고정한 후, BCIP/NBT substrate solution (sigma)을 각 well에 분주하고 빛이 없는 조건에서 1-2시간 동안 반응시켰다. 세포에 푸르게 염색된 정도를 통해 조골세포의 분화 및 ALP 활성을 확인하였다.

RT-PCR

MG-63 세포를 3×10^5 cells/well의 농도로 6-well plate에 분주하여 24시간 배양하였다. 그 후 TMO (5, 10, 20, 40, 80 μg/ml) 및 조골세포 분화배지(50 μg/ml ascorbic acid과 10 mM β-glycerophosphate)로 교환하여 2일마다 배지를 갈아주며 3일 및 5일간 조골세포 분화를 유도하였다. RNA의 분리는 TRIzol reagent (Invitrogen Life Technology, USA)를 이용하였으며 RNA의 정량은 분광광도계를 이용하여 260 nm에서 흡광도로 정량하였다. RT-PCR을 위한 cDNA의 합성은 cDNA reverse transcription kit (Thermo Fisher Scientific, USA)를 이용하여 합성하였으며, qPCR Green Mix (ENZO, USA)와 Table 1에 제시한 primer를 사용하여 Real-time PCR 반응을 수행하였다. 측정하고자 하는 목적 유전자의 발현은 Gapdh의 발현 양을 이용하여 정량화 하였다.

Western blot

MG-63 세포를 3×10^5 cells/well의 농도로 6-well plate에 분주하여 24시간 배양하였다. 그 후 TMO (5, 10, 20, 40, 80 μg/ml) 및 조골세포 분화배지로 교환하여 2일마다 배지를 갈아주며 5일간 조골세포 분화를 유도하였다. 배양 후, 세포를 PBS로 세척한 뒤 protease와 phosphatase inhibitor가 함유된 RIPA buffer를 사용하여 세포를 lysis하고 원심분리하여 상등액으로부터 단백질을 회수 한 후 BCA를 이용하여 정량하였다. 회수한 단백질은 SDS-PAGE gel 전기영동을 통해 분자량에 따라 분리하고, PVDF membrane으로 transfer하였다. Membrane을 5% skim milk 용액으로 blocking 한 후 rabbit-anti-ALP 및 rabbit-anti-RUNX2 (Cell Signaling, MA) 항체를 4℃에서 overnight으로 반응시켰으며, 그 후 각 항체에 대한 2차 항체를 반응시킨 후 ECL kit를 이용하여 각각의 단백질 발현 양상을 관찰하였다.

Table 1. The sequences of primers for RT-PCR

Primer	Sequence
GAPDH	F: 5′-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3′ R: 5′-GAAGATGGTGATGGGATTTC-3′
Alpl	F: 5′-AAACCGAGATACAAGCACTC-3′ R: 5′-TCCGTCACGTTGTTCCTGTTCAG-3′
Runx2	F: 5′-GCCTTCAAGGTGGTAGCCC-3′ R: 5′-CGTTACCCGCCATGACAGTA-3′

통계처리

모든 실험 결과는 3회 반복하여 평균과 표준편차(mean ± SD)로 나타냈다. 실험군 간의 유의성은 Student's *t*-test를 통해 검정하였고, $p<0.05$일 때 군 간의 차이가 유의적인 것으로 판단하였다.

결과 및 고찰

조골세포 증식 및 독성 평가

인간 골육종 유래 MG-63 세포는 골 형성 연구에서 primary osteoblast cell을 대체하여 alkaline phosphatase (ALP), runt-related transcription factor 2 (Runx2) 및 osteoprotegerin (OPG) 등 다양한 골 형성 관련 인자들의 발현 확인을 통한 골 형성 연구에서 폭넓게 사용되고 있다[5]. 본 연구에서는 갈색거저리 유충으로부터 추출한 오일(*Tenebrio molitor* larvae oil, TMO)이 MG-63 조골세포의 증식에 미치는 영향을 확인하기 위해서 TMO를 24시간 및 48시간 동안 처리한 후 MTS reagent를 이용하여 세포 생존율을 측정하였다. 그 결과, TMO는 80 μg/ml 농도까지 세포 독성을 유발하지 않았으며 특히 TMO 농도에 따라 세포 생존율이 유의적으로 증가하는 것을 관찰 할 수 있었다(Fig. 1). 따라서 이후 실험에서는 세포독성이 확인된 80 μg/ml 이하의 농도에서 모든 연구를 수행하였다.

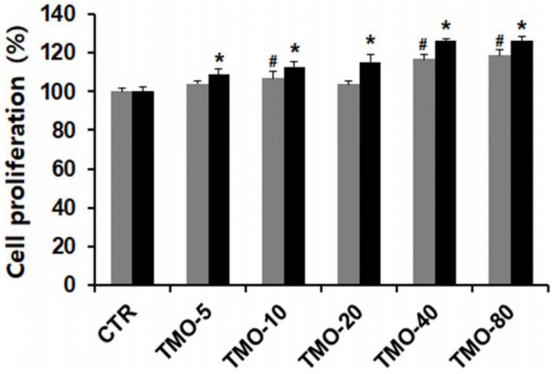

Fig. 1. Effect of *Tenebrio molitor* larvae Oil on the osteoblastic cells proliferation. MG-63 cells were seeded into 96-well plate (5×10^3 cells/well), and then treated with TMO (5-80 μg/ml) for 24 hr and 48 hr. Cell proliferation were determined using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS) assay. Values are the mean ± SD of triplicate. #$p<0.05$, compared with the control of 24 hr. *$p<0.05$, compared with the control of 48 hr. CTR, control; TMO, *Tenebrio molitor* larvae Oil.

Alkaline phosphatase (ALP) 활성에 미치는 영향

조골세포의 분화 활성을 나타내는 표지인자로 사용되는 염기성 인산 분해 효소(alkaline phosphatase, ALP)는 거의 모든 조직에 분포하는 것으로 알려져 있으며, 특히 골 조직에 존재하는 ALP는 골 성장이 활발하게 일어날 때 그 활성이 증가하는 것으로 알려져 있다[3]. 따라서 본 연구에서는 TMO가 조골세포의 골 세포 분화 활성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 조골세포의 분화활성을 나타내는 표지인자인 ALP 활성을 조사하였다.

조골세포의 ALP 활성은 시료처리를 하지 않은 control (CTR) 군에 대한 비율로 나타내었으며 그 결과는 Fig. 2와 같다. TMO를 MG-63 세포에 농도별로 5일간 처리한 결과 5 μg/ml 농도부터 ALP 활성이 대조군(CTR)에 비해 유의적으로 증가함을 확인 할 수 있었다. 이는 이전 연구에서 보고된 가시오가피 추출물(100-150%), 홍화자와 두충 혼합 추출물(100-140%) 및 적송잎(100-140%) 추출물의 ALP 활성 측정 결과에 비해 현저하게 높은 ALP 활성을 나타내고 있다[9, 21, 27]. 또한 풀무치 추출물의 ALP 활성 결과와 비교했을 때, 풀무치 추출물 농도보다 현저하게 낮은 농도임에도 불구하고 비슷한 정도의 ALP 활성을 나타내었다[2]. 다음으로 세포 내 ALP 염색을 통하여 갈색거저리 오일이 ALP 활성에 미치는 영향을 확인한 결과, ALP 활성변화와 유사하게 CTR 군에 비해 TMO 처리군에서 농도 의존적으로 ALP 염색(푸른색)의 진하기가 증가함을 확인할 수 있었다. 따라서 갈색거저리 유충 오일은 MG-63 조골세포의 ALP 활성을 증가시키며 이에 따라 조골세포의 분화가 증가하였음을 확인하였고, 이는 갈색거저리 유충 오일이 골세포 분화 및 성장 촉진에 도움을 줄 수 있는 소재로 사용될 수 있음을 의미하고 있다.

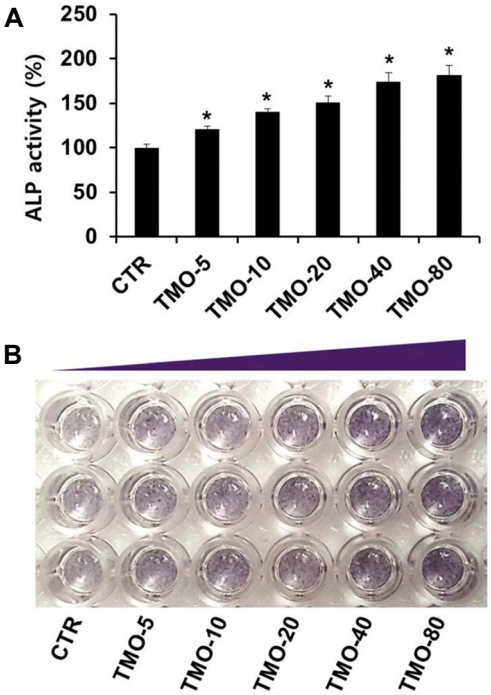

Fig. 2. Effect of *Tenebrio molitor* larvae Oil on the ALP activity and staining of osteoblastic cells. MG-63 cells were seeded into 96-well plate (1.5×10^4 cells/well) and treated with TMO (5-80 μg/ml) for 5 days. (A) Enzyme activity was measured by spectro-photometric method using *p*-nitrophenyl phosphate as a substrate. Values are the mean ± SD of triplicate*$p<0.05$, compared with the control. (B) Cells were stained with BCIP/NBT substrate solution after fixation. CTR, control; TMO, *Tenebrio molitor* larvae Oil.

MG-63 조골세포의 유전자 발현에 미치는 영향

TMO가 조골세포분화 조절 유전자의 발현에 미치는 영향을 검토하기 위하여 TMO를 MG-63 조골세포에 3일간 처리한 후, RNA를 분리하여 골 성장 및 분화와 관련된 유전자의 발현 변화를 확인하였다(Fig. 3). 그 결과 ALP 활성과 관련된 alkaline phosphatase (Alpl) 유전자의 발현은 TMO 20 μg/ml 농도부터 CTR군과 유의적으로 차이가 있었으며 오일의 농도에 의존적으로 조골세포 분화유도 배지(DM, 50 μg/ml ascorbic acid와 10 mM glycerophosphate)와 유사하게 약 2배까지 발현량이 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. 다음으로 전조골세포에서 골 형성 촉진의 핵심조절인자라 알려져 있는 유전자인 runt-related transcription factor 2 (Runx2)의 발현 변화를 확인하였다[16]. 그 결과 Runx2의 유전자는 40 μg/ml 농도의 TMO로부터 CTR군과 유의적인 차이를 보였으며 80 μg/ml 농도에서는 약 4배 정도로 매우 높은 증가율을 나타냈다. 그러

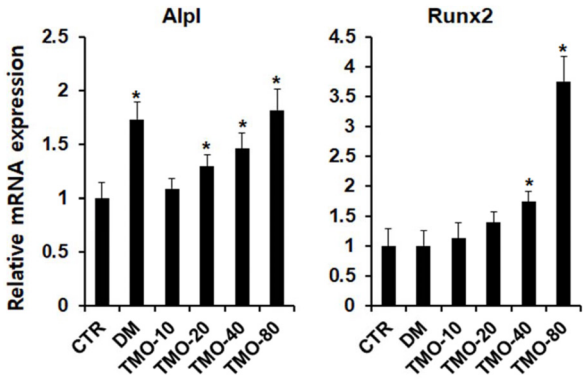

Fig. 3. Effect of *Tenebrio molitor* larvae Oil on the osteoblatogenesis related gene expression. MG-63 cells were seeded into 6-well plate (1.5×10^5 cells/well) and treated with TMO (5-80 μg/ml). RNA was isolated at 3 days after the TMO treatment. The levels of Alpl and Runx2 mRNA were determined by quantitative real-time RT-PCR. The data were normalized to Gapdh. Results are shown as mean ± SD (n=3). *$p<0.05$ in comparison with control group. CTR, control; DM, differentiation medium (50 μg/ml of L-ascorbic acid and 10 mM β-glycerophosphate); TMO, *Tenebrio molitor* larvae Oil.

나 Alpl과는 달리 조골세포 분화 유도배지에서는 발현양의 변화를 관찰 할 수가 없었다. 이러한 결과는 Runx2의 발현이 조골세포분화유도 배지에 사용한 ascorbic acid에 영향을 받지 않는다는 기존 연구결과와 일치한다[29]. 결과적으로 TMO 처리는 조골세포 분화와 밀접한 관련이 있는 Alpl 및 Runx2 유전자의 발현을 증가시킴으로써 조골세포의 분화 및 골 형성을 촉진시킬 것으로 판단된다.

MG-63 조골세포의 단백질 발현에 미치는 영향

TMO가 조골세포 분화 조절 단백질의 발현에 미치는 영향을 검토하고자 TMO를 MG-63 조골세포에 5일 동안 처리한 후 단백질을 추출하여 골 성장 및 분화와 관련된 단백질의 발현을 확인하였으며 그 결과는 Fig. 4와 같다. ALP 단백질 발현을 확인한 결과 40 μg/ml부터 CTR군과 유의적인 차이가 날 정도로 단백질 발현량이 증가하였으며 positive control로 사용한 조골세포 분화 유도 배지(DM)와 비슷한 정도의 발현량을 관찰할 수 있었다. 또한 80 μg/ml 농도에서는 CTR에 비해 약 4배 정도 ALP 단백질의 발현량이 증가하였다. TMO의 농도에 따라 발현량이 증가하는 양상은 앞서 Alpl 유전자 발현을 확인한 결과와 유사하였으며, Alpl 유전자 및 ALP 단백질 발현이 증가함에 따라 앞서 확인한 ALP 활성이 증가하였을 것으로 사료된다. RUNX2 단백질 발현의 경우 TMO 20 μg/ml 농도부터 CTR군에 비해 유의적으로 발현량이 증가하였으며 DM 군보다도 높은 발현량을 보였다. 또한 real-time PCR 결과와 동일하게 positive control인 DM 군에서 RUNX2의 발현량 또한 변화가 없음을 관찰할 수 있었다. 이러한 결과들을 종합해보면, TMO는 MG-63 조골세포에서 ALP 및 RUNX2의 단백질 발현을 증가시키고, 이를 통해 MG-63 조골세포의 분화를 촉진하고 골 형성 기능을 강화하며 결과적으로 골다공증 예방 및 치료에 도움을 줄 수 있을 것으로 사료된다.

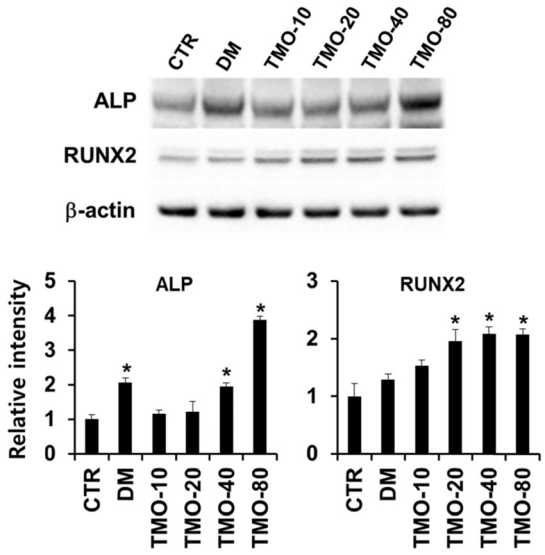

Fig. 4. Effect of *Tenebrio molitor* larvae Oil on the osteoblatogenesis related protein expression. MG-63 cells were seeded into 6-well plate (1.5×10^5 cells/well) and treated with TMO (10-80 μg/ml). Protein was isolated at 5 days after the TMO treatment. The expression level of ALP and RUNX2 protein were determined by Western blot. The data were normalized to *b*-actin. Results of densitometric analysis of Western blot are also shown (lower). Results are shown as mean ± SD (n=3). *$p<0.05$ in comparison with control group. CTR, control; DM, differentiation medium (50 μg/ml of L-ascorbic acid and 10 mM β-glycerophosphate); TMO, *Tenebrio molitor* larvae Oil.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 어젠다 사업(과제 번호: PJ01419801)의 지원에 의해 이루어졌으며, 이에 감사 드립니다.

References

1. Baek, M., Seo, M., Kim, M. A., Yun, E. Y. and Hwang, J. S. 2017. The antioxidant activities and hair-growth promotion effects of *Tenebrio molitor* larvae extracts (TMEs). *J. Life Sci.* **27**, 1269-1275.
2. Baek, M., Seo, M., Lee, J. H., Kim, I. W., Kim, M. A. and Hwang, J. S. 2018. Osteoblastogenic activity on *Locusta migratoria* ethanol extracts on pre-osteoblastic MG-63 cells. *J. Life Sci.* **28**, 1448-1454.
3. Broskey, A. L. 1992. Non-collagen matrix proteins and their role in mineralization. *Bone Miner.* **6**, 111-123.
4. Chao, D., Bahl, P., Houlbrook, S., Hoy, L., Harris, A. and Austyn, J. M. 1999. Human cultured dendritic cells show differential sensitivity to chemotherapy agents as assessed by the MTS assay. *Br. J. Cancer* **81**, 1280-1284.
5. Gong, W., Dong, Y., Wang, S., Gao, X. and Chen, X. 2017. A novel nano-sized bioactive glass stimulates osteogenesis via the MAPK pathway. *RSC Adv.* **7**, 13760-13767.
6. Han, S. M., Lee, S. H., Yun, C. Y., Kang, S. W., Lee, K. G., Kim, I. S., Yun, E. Y, Lee, P. J., Kim, S. Y. and Hwang, J. S. 2006. Inhibition of nitric oxide production by ladybug extracts (*Harmonia axyridis*) in LPS-activated BV-2 cells. *Kor. J. Appl. Entomol.* **45**, 31-36.
7. Hou, X., Shen, Y., Zhang, C., Zhang, L., Qin, Y., Yu, Y., Wang, L. and Sun, X. 2012. A specific oligodeoxynucleotide promotes the differentiation of osteoblasts via ERK and p38 MAPK pathways. *Int. J. Mol. Sci.* **13**, 7902-7914.
8. Jeon, M. H. and Kim, M. 2011. Effect of *Hijikia fusiforme* fraction on proliferation and differentiation in osteoblastic MC3T3-E1. *J. Life Sci.* **21**, 300-308.
9. Jeon, M. H., Kim, Y. K., Park, Y. S., Hwang, H. J., Kim, S. G., Lee, S. H., Choi, I. S. and Kim, M. 2010. Effect of pine (*Pinus densiflora*) needle extracts on synthesis of collagen in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *J. Life Sci.* **20**, 607-613.
10. Jilka, R.L. 1988. Cytokines, bone remodeling and estrogen

deficiency. *Bone* **23**, 75-81.
11. Kim, H. K., Kim, M. G. and Leem, K. H. 2014. Collagen hydrolysates increased osteogenic gene expressions via a MAPK signaling pathway in MG-63 human osteoblasts. *Food Funct.* **5**, 573-578.
12. Kim, H. M., Kim, J. N., Kim, J. S., Jeong, M. Y., Yun, E. Y., Hwang, J. S. and Kim, A. J. 2015. Quality characteristics of patty prepared with mealworm powder. *Kor. J. Food Nutr.* **28**, 813-820.
13. Kim, S. H., Kim, K. B., Noh, J. S., Yun, E. Y. and Choi, S. K. 2014. Quality characteristics of Pasta with addition of mealworm (*Tenebrio molitor*). *FoodServ. Ind. J.* **10**, 55-64.
14. Kim, Y., Kim, J. H. and Cho, D. S. 2015. Gender difference in osteoporosis prevalence, awareness and treatment: Based on the Korea National Health and Nutrition Examination Survey 2008~2011. *J. Kor. Acad. Nurs.* **45**, 293-305.
15. Kim, Y. H., Jung, J. K., Lee, G. S. and Koh, Y. H. 2016. Phylogenetic analysis of *Locusta migratoria* (Orthoptera: Acridae) in Haenam-gun, Jeollanam-do, Korea using two mitochondrial genes. *Kor. J. Appl. Entomol.* **55**, 459-464.
16. Komori, T. 2010. Regulation of osteoblast differentiation by Runx2. *Adv. Exp. Med. Biol.* **658**, 43-49.
17. Koo, H. J., Sohn, E. H. and Kang, S. C. 2013. The optimal combination of the mixture of unripe *Rubus coreanus* and *Astragalus membranaceus* in the activation and differentiation of osteoblastic cells. *Kor. J. Plant Res.* **26**, 658-662.
18. Lee, J. W. and Lee, I. S. 2004. Effects of *Rubus coreanus* Miquel extracts on the activity and differentiation of MC3T3-E1 osteoblastic cell. *J. Life Sci.* **14**, 967-974.
19. Lee, K. H., Sim, M. O., Song, Y. S., Jung, H. K., Jang, J. H., Kim, M. S., Kim, T. M., Lee, H. E., An, B. K. and Jung, W. S. 2016. Effects of poly-gamma glutamate contents Cheonggukjang on osteoblast differentiation. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **45**, 664-670.
20. Lee, S. M., Kim, M. G., Lee, S. Y. and Kang, T, H. 2010. Effects of *Artemisia princeps* Extract on bone metabolism. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **39**, 363-368.
21. Lim, S., Leem, J. Y., Lee, C. S., Jang, Y. J., Park, J. W. and Yoon, S. 2007. Antioxidant and cell proliferation effects of *Acanthopanax senticosus* extract in human osteoblast-like MG-63 cell line. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **39**, 694-700.
22. Oh, H. J. 2011. Development of guideline for life cycle osteoporosis health care. Osong: Korea Centers for Disease Control and Prevention.
23. Park, K. H. and Kim, G. Y. 2018. Quality and characteristic of manufacturing Sunsik with edible insect (mealworm). *Culi. Sci. Hos. Res.* **24**, 13-23.
24. Pertynski, T. and Stachowiak, G. 2006. Menopause-facts and controversies. *Endokrynol. Pol.* **57**, 52-534.
25. Rodriguez-Carballo, E., Gamez, B. and Ventura, F. 2016. P38 MAPK signaling in osteoblast differentiation. *Front. Cell Dev. Biol.* **4**, 40.
26. Shin, J. M., Park, C. K., Shin, E. J., Jo, T. H. and Hwang, I. K. 2008. Effects of *Scutellaria radix* extract on osteoblast differentiation and osteoclast formation. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **40**, 674-679.
27. Sim, J. G., Lee, J. H., Yeo, M. G. and Park, J. S. 2013. Effects of alkaline phosphatase activity on the extract of Carthami Semen and Eucommiae Cortex in human osteoblast-like MG-63 cell line. *J. East Asian Soc. Dietary Life* **23**, 39-43.
28. Stein, G. S., Lian, J. B. and Owen, T. A. 1990. Relationship of cell growth to regulation for tissue-specific gene expression during osteoblast differentiation. *FASEB J.* **4**, 3111-3123.
29. Xing, W., Pourteymoor, S. and Mohan, S. 2011. Ascorbic acid regulates osterix expression in osteoblasts by activation of prolyl hydroxylase and ubiquitination-mediated proteosomal degradation pathway. *Physiol. Genomics* **43**, 749-757.
30. Yoo, J., Hwang, J. S., Goo, T. W. and Yun, E. Y. 2013. Comparative analysis of nutritional and harmful components in Korean and Chinese mealworms (*Tenebrio molitor*). *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **42**, 249-254.
31. Yu, J. M., Jang, J. Y., Kim, H. J., Cho, Y. H., Kim, D. I., Kwon, O. J., Cho, Y. J. and An, B. J. 2016. Antioxidant capacity and Raw 264.7 macrophage anti-inflammatory effect of the *Tenebrio molitor*. *Kor. J. Food Preserv.* **24**, 890-898.

초록 : 갈색거저리 유충 오일이 MG-63 조골세포 분화에 미치는 영향

서민철† · 백민희† · 이준하 · 이화정 · 김인우 · 김선영 · 황재삼 · 김미애*
(농촌진흥청 국립농업과학원 농업생물부)

현재 우리나라는 고령화 사회에 접어들었으며, 이와 함께 골 대사 질환이 큰 문제로 대두되고 있다. 그 중 가장 흔하게 발생하는 골다공증은 여러 요인에 의해 발생하고 있으며 이의 예방 및 치료를 위한 소재 개발 연구가 활발하게 진행되고 있다. 그러나 곤충을 소재로 한 골다공증 예방 및 치료 연구는 미흡한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 골 형성 촉진 효능을 가진 새로운 소재 개발을 위해 갈색거저리 유충 오일의 MG-63 조골세포의 분화 촉진 효과를 연구하였다. 조골세포에서 갈색거저리 유충 오일의 독성 및 증식 효과를 평가하기 위하여 MTS assay를 진행한 결과 80 μg/ml 농도까지 세포 독성이 나타나지 않았으며, 48시간 배양했을 때 40-80 μg/ml 농도에서 120% 정도의 세포 증식 효능을 확인 하였다. 갈색거저리 유충 오일이 조골세포 분화에 미치는 영향을 확인하기 위하여 5일간 갈색거저리 유충 오일을 MG-63 조골세포에 처리한 후 ALP 활성을 측정하였다. 그 결과 80 μg/ml 농도에서 무처리 군에 비해 약 180%의 조골세포 분화 촉진 효능을 관찰 하였다. 이 결과는 ALP staining에서도 유사하게 나타났다. mRNA 발현량의 변화를 측정한 결과, Alpl과 Runx2 유전자 발현량이 증가하였고, 단백질 발현량을 측정했을 때에도 유사한 결과를 확인하였다. 이를 통해 ALP와 Runx2 유전자 및 단백질 발현에 의해서 ALP 활성이 증가하고 조골세포 분화가 촉진되었을 것으로 판단되며, 갈색거저리 유충 오일을 이용한 골 형성 촉진에 따른 골다공증 예방 및 치료 기능성 소재 개발에 대한 가능성을 확인하였다.