

<https://doi.org/10.15433/ksmb.2020.12.2.075>

ISSN 2383-5400 (Online)

바위수염 추출물의 파골세포 분화 억제 및 에스트라디올 활성 평가

Inhibitory Effect of Osteoclastogenesis and Estradiol Activity of *Myelophycus simplex* Extract

하현주^{1,†}, 임형진^{2,†}, 김민경³, 박선경², 노문철⁴, 정선희⁵, 이승재^{6,*}, 이상훈^{7,*}

Hyun Joo Ha^{1,†}, Hyung Jin Lim^{2,†}, Min Gyeong Kim³, Seon Gyeong Bak^{2,4}, Mun-Chual Rho⁴, Sun Hee Cheong⁵, Seung-Jae Lee^{6,*}, Sang-Hoon Lee^{7,*}

¹교수, 동아대학교 식품영양학과, 부산광역시 사하구 낙동대로 550번길 37, 49315, 대한민국

²대학원생, 한국생명공학연구원 면역조절소재연구센터, 전북 정읍시 입신길 181, 56212, 대한민국

³대학원생, 과학기술연합대학원대학교 식품생명공학전공, 대전광역시 유성구 가정로 217, 34113, 대한민국

⁴책임연구원, 한국생명공학연구원 면역조절소재연구센터, 전북 정읍시 입신길 181, 56212, 대한민국

⁵교수, 전남대학교 해양바이오식품학과, 전남 여주시 대학로 50, 59626, 대한민국

⁶선임연구원, 한국생명공학연구원 면역조절소재연구센터, 전북 정읍시 입신길 181, 56212, 대한민국

⁷책임연구원, 한국식품연구원 식품기능연구본부, 전북 완주군 농생명로 245, 55365, 대한민국

¹Department of Food Science & Nutrition, Dong-A University, Busan 49315, Korea

^{2,4,6}Immunoregulatory Material Research Center, Korea Institute of Bioscience and Biotechnology, Jeongeup 56212, Korea

³Department of Food Biotechnology, University of Science and Technology, Daejeon 34113, Korea

⁵Department of Marine Bio Food Science, Chonnam National University, Yeosu 59626, Korea

⁷Division of Food Functionality Research, Korea Food Research Institute, Wanju 55365, Korea

† Both authors contributed equally to this work

(Received 7 August 2020, Revised 24 August 2020, Accepted 26 August 2020)

Abstract In the present study, the estrogenic activity and anti-osteoclastogenic activity of the *Myelophycus simplex* extract were evaluated using T47D-Kbluc cells and bone marrow-derived macrophages (BMMs). As a result of the measurement of the estrogenic activity in the T47D-Kbluc cell line, the *Myelophycus simplex* extract showed increased estrogenic activity in a dose-dependent manner in association with its concentration. To confirm the regulatory effect of the *Myelophycus simplex* extract on the estrogen-responsive gene, the *Myelophycus simplex* extract showed a similar tendency to estradiol: the expression of estrogen receptor 1 (ESR1) was significantly decreased while the expression of estrogen receptor 2 (ESR2) was increased. Furthermore, the *Myelophycus simplex* extract exhibited an inhibitory effect on osteoclast differentiation. In conclusion, these *Myelophycus simplex* extracts might be regarded as candidates for further studies or the development of functional food products or medicine to prevent or avoid postmenopausal symptoms for women.

Keywords : *Myelophycus simplex*, Estrogen receptor, Estradiol activity, Anti-osteoclastogenesis

서 론

최근 급격한 경제성장으로 인해 여성의 사회활동

* Corresponding author

Phone: +82-63-570-5267, +82-63-219-9357 Fax: +82-63-570-5239

E-mail: seung99@kribb.re.kr, shnlee@kfri.re.kr

This is an open-access journal distributed under the terms of the Creative

Commons Attribution Non-Commercial License

(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>)

이 증가하고 있으며 의료기술의 발달로 인간 수명이 길어짐에 따라 자연적으로 발생하는 여성 질환에 대한 관심이 높다. 그 중 여성 갱년기 증상은 에스트로겐 결핍에 의해 다양한 타 증상을 수반하는데, 대표적으로 우울증, 불안감, 수면장애, 기억력 감퇴, 피로감, 질 건조감, 심혈관계 질환 및 골다공증과 같은 골질환 등의 신체적 기능 이상 및 증상이 나타나는 것으로 알려져 있다 [1]. 이러한 여성 갱년기 증상은 그 자체로 특별한 질병은 아니며 단순히 신체적으로 허약할 때 나타나는 증상들과 유사하여 개인 스스로 그 증상의 정도를 깊이 인식하고 적극적으로 적응하려는 노력이 없으면 방치되기 쉬운 특징을 지니고 있어 증상 악화로 인해 일상생활에 지속적 고통을 수반하는 것으로 알려져 있다 [2]. 이에 여성 갱년기 증상 완화를 위해 호르몬 보충요법(일부 골절 및 심장암 억제 효과)이 사용되지만 관상동맥질환, 담낭염, 유방암, 자궁내막암 등의 부작용을 유발할 수 있다는 연구가 제기되고 있다 [3]. 이러한 이유로 부작용이 적은 생물자원을 이용한 식품 및 소재개발에 관심이 높아지고 있으며 이에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다 [4,5]. 특히 최근에는 에스트로겐 활성 분석을 위해 luciferase를 이용한 천연 생물자원의 에스트로겐 수용체가 ERE에 결합하는 정도를 검색하는 방법들이 개발되었는데 [6], 이 방법은 에스트로겐 agonist 또는 antagonist로 작용하는지를 확인할 수 있는 장점이 있으며 천연 생물자원 및 후보소재들의 대량 검색이 가능한 특징을 지닌다.

최근 많은 연구에서 해양생물자원을 이용한 연구들이 활발히 진행중으로 식용, 약용, 및 화장품 등 다양한 용도로 이용하는 추세로, 해양생물자원을 활용한 제품들의 출시로 소비자들에게 큰 인기를 끌고 있다 [7]. 이에 우리는 국내 남해에 분포되어 있는 바위수염에 대한 연구를 진행하였다.

바위수염(*Myelophycus simplex*)은 갈조류의 넓은 미역쇠과에 속하며, 갈색 또는 흑갈색의 바늘 모양으로 외가닥이며 여러 개가 모여 다발을 이룬다.

사상형 또는 비틀어진 형태로 구성되어 있으며 북태평양 서안과 우리나라의 남부해안 전역 및 일본에 분포하는 것으로 알려져 있고 봄철 조간대 상부에 불등풀가사리와 함께 생육하는 것으로 보고되고 있다 [8]. 갈조류는 다양한 생리활성을 나타내는 것으로 알려져 있으나 [9,10], 바위수염에 대한 연구는 현재까지 신경세포 보호효과 및 비만에 대한 연구 [11] 외에는 거의 없는 실정이다.

따라서 본 연구에서는 해양생물자원인 바위수염 추출물을 이용하여 사회적 이슈인 여성갱년기 증상 개선용 소재의 효능 평가를 위해 T47D-KBluc 유방암 세포주를 이용하여 에스트로겐 수용체의 활성에 미치는 영향을 통해 에스트로겐 활성 및 여성갱년기 증상으로부터 파생될 수 있는 골질환 중 파골세포 분화 억제 활성을 분석하여 소재의 우수한 효능을 입증하고자 한다.

재료 및 방법

시료

본 실험에 사용한 바위수염 에탄올 추출물 (*Myelophycus simplex* ethanol extracts)은 국립해양생물자원관(National Marine Biodiversity Institute of Korea)에서 분양받아 효능 평가를 수행하였다.

실험재료

Estradiol은 Sigma (St Louis, MO, USA)로부터 구입하였고 Luciferase assay kit는 promega (Madison, WI, USA)에서, FBS와 RPMI1640 배지는 Hyclone (Logan, Utah, USA), PureLink RNA mini kit는 Invitrogen (San Diego, CA, USA)과 cDNA 합성에 필요한 PrimeScript 1st strand cDNA synthesis kit는 Takara (Shiga, Japan)에서 구매하였다. 그 외에 사용된 시약은 모두 일급 또는 특급을 구입하여 사용하였다.pcr

세포배양

에스트로겐 유사물질 검정을 위해 에스트라디올 특이적 세포주인 T47D-KBluc 세포주(ATCC® CRL-2865™)와 T47D (ATCC® HTB-133™) 세포주들

사용하였다(Rockville, MD, USA). 본 세포주들은 0.2 Unit/ml bovine insulin, 1% penicillin-streptomycin과 10% Fetal bovine serum (FBS)를 포함하는 RPMI1640 배지를 이용하여 37°C, 5%의 CO₂ 인큐베이터에서 배양하였다.

에스트로겐 활성 평가

바위수염 추출물의 에스트로겐 활성 평가를 위해 안정화 시킨 T47D-KBluc 세포를 seeding 전 1% penicillin-streptomycin과 10% Charcoal stripped FBS (CSF)를 포함하는 RPMI1640 배지로 교체 후 24시간 인큐베이터에서 배양하고 96 well plate에 3×10^4 cell/well로 seeding하여 overnight하였다. 이 후 바위수염 추출물을 처리하고 다시 24시간 인큐베이터에서 배양하여 상등액 제거 과정을 거쳐 1x lysis buffer 60 µL/well로 30분간 lysis 시키고 96 well white plate에 cell lysate 25 µL 처리 후 luminescent microplate reader로 검출하였다. 이 때 조건은 substrate volume이 25 µL, duration이 1s, counting time은 2s로 설정하였다.

에스트로겐 반응 유전자 분석

에스트로겐 유도 유전자 발현을 분석하기 위해 T47D 세포를 1% penicillin-streptomycin과 10% Charcoal stripped FBS (CSF)를 포함하는 RPMI1640 배지로 교체 후 24시간 인큐베이터에서 배양하고 6 well plate에 1×10^6 cell/well로 seeding하여 overnight하였다. 그 후 바위수염 추출물을 농도별로 처리하고 24시간 동안 배양 후 total RNA를 추출하여 얻어진 RNA는 cDNA 합성을 통해 StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems)에서 PCR을 수행하였다.

파골세포 분화

5주령의 ICR마우스 골수에서 확보한 세포를 배양하여 M-CSF (30 ng/mL)과 RANKL (100 ng/mL)와 함께 두 농도의 추출물을 처리하였다. 5일 후 세포를 10% 포름알데히드로 고정시키고 1시간 TRAP으로 염색하여 분석하였다.

통계 처리

모든 실험은 3회 반복 실험에 의해 얻어진 결과에 대해 통계 분석을 실시하였고 평균과 표준편차로 계산하여 나타내었다. 통계분석은 프리즘5 소프트웨어(GraphPad Software, San Diego, CA)로 수행되었다 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

결과 및 고찰

에스트라디올 활성 분석

에스트로겐 활성을 측정하기 위하여 estrogen response element (ERE) inducible luciferase 활성을 갖는 T47D-KBluc 세포주를 이용하여 연구를 수행하였다. 세포는 seeding 24시간 전 charcoal dextran stripped FBS 배지로 교환하고 96 well plate에 3×10^4 /well로 seeding 후 12시간 동안 세포를 안정화 시킨 후 30, 60 µg/mL 농도로 추출물을 처리하였다. 추출물 처리 24시간 후 세포를 lysis 한 후 luciferase substrate와 반응 시키고 발광면역분석기로 luciferase 활성을 측정한 결과 바위수염에탄올 추출물이 농도 의존적으로 증가하였고, 독성은 나타나지 않았다(Fig. 1). 이에 본 연구는 바위수염 에탄올 추출물의 연구를 추가적으로 진행하였다.

에스트로겐 수용체 분석

바위수염 에탄올 추출물이 에스트로겐 신호전달에 의해 조절되는 유전자에 미치는 영향을 측정하고자 세포를 전과 동일한 방법으로 처리 및 안정화 시킨 후 30, 60 µg/ml 농도로 추출물을 처리하였다. 추출물 처리 후 얻어진 세포를 Lysis 하여 RNA를 분리한 후 cDNA를 합성하여 Realtime PCR을 진행한 결과 estradiol 처리에 의해 ESR1이 유의적으로 감소하고, ESR2는 증가하는 것을 확인 하였으며 이는 바위수염 추출물이 estradiol과 유사한 경향의 ESR1 및 ESR2 유전자가 발현됨이 확인되었다(Fig. 2). 에스트로겐 신호전달은 estrogen receptor complex가 DNA의 ERE sequence에 binding 하여 estrogen responsible gene을 조절하는 경로와 PI3K나 ERK등의 인산화를 조절하여 ERE가 아닌 다른 transcription factor sequence에 binding하여 유전자를 조절하는 경로로 나눠져 있다 [12]. ESR1과 ESR2는 각각 estrogen re-

ceptor α (ER α)와 estrogen receptor β (ER β)의 유전자로 ER α 와 ER β 의 분포와 역할은 조직에 따라 달라진다. 하지만 일반적으로 ER α 와 ER β 모두 난소의 발달과 기능에 영향을 주는 것으로 알려져 있다. ER α 의 경우 자궁과 자궁의 발달 및 세포 증식에 관여하

는 반면 ER β 는 중추신경 및 면역계에 더 깊게 관여되고 ER α 에 의한 hyperproliferation을 억제하는 것으로 알려져 있다 [13].

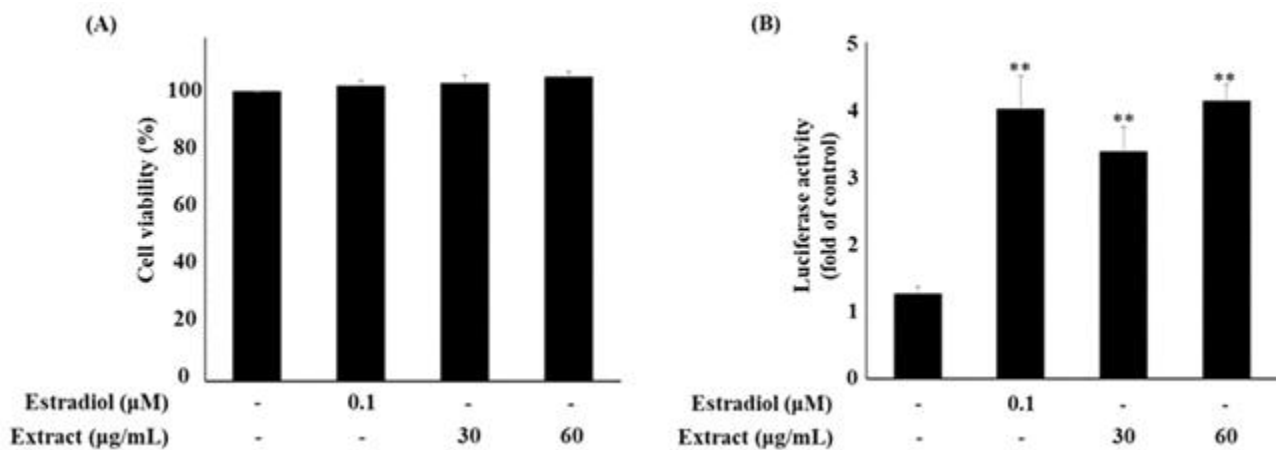


Figure 1. Cytotoxicity and estrogenic activity of *Myelophycus simplex* extract. (A) Cytotoxicity of *Myelophycus simplex* extract. T47D cells were seeded and treated with indicated concentrations of estradiol and *Myelophycus simplex* extract for 24 h. Cytotoxicity was measured by MTT assay. (B) Estrogenic activity of *Myelophycus simplex* extract. T47D-Kbluc cells were seeded in 96 well plate and incubated with RPMI1640 supplemented with 10% charcoal dextran stripped FBS for 24 h. Then, cells were treated with indicated concentrations of estradiol and *Myelophycus simplex* extract for 24 h. estrogenic activity was measured by luciferase assay. Values are presented as the mean \pm SD of three individual experiments. * p <0.05, ** p <0.01 compared with non-treated group.

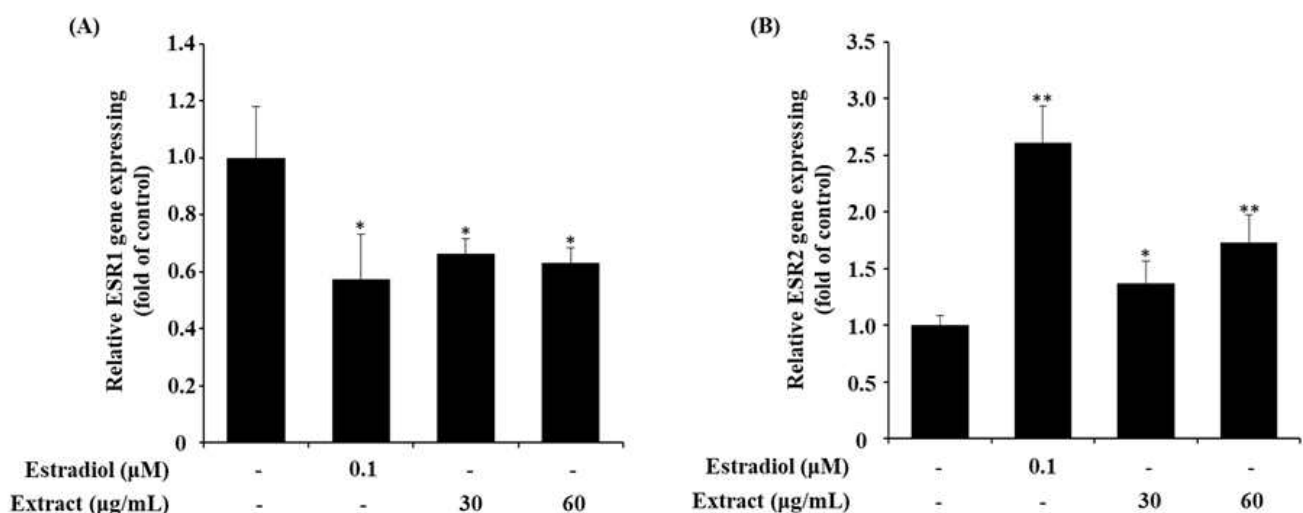


Figure 2. Regulation of estrogen responsive gene expression by *Myelophycus simplex* extract. T47D cells were seeded and incubated with RPMI1640 supplemented with 10% charcoal dextran stripped FBS for 24 h. Then, cells were treated with indicated concentrations of estradiol and *Myelophycus simplex* extract for 24 h. The gene expression level of (A) ESR1 and (B) ESR2 were determined by real-time PCR analysis. Values are presented as the mean \pm SD of three individual experiments. * p <0.05, ** p <0.01 compared with non-treated group.

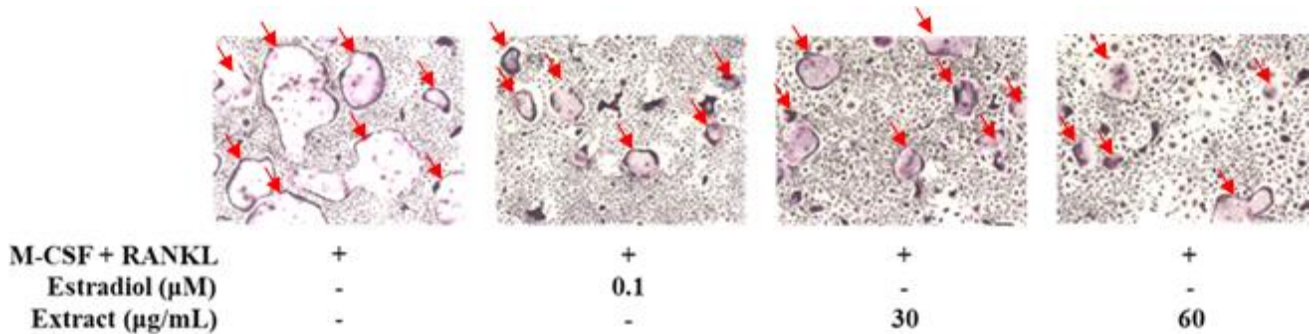


Figure 3. Anti-osteoclastogenesis activity of *Myelophycus simplex* extract. BMMs were incubated with α -MEM supplemented with 10% FBS, M-CSF (30 ng/mL) and RANKL (100 ng/mL) in the presence of the indicated concentration of estradiol and extract for 4 days. Then, cells were fixed and stained with TRAP staining solution and TRAP positive multinuclear cells (arrows) were observed.

파골세포 분화억제 분석

골다공증은 에스트로겐 결핍에 의해 파골세포의 증식 및 활성화에 영향을 미쳐 골 재흡수를 촉진하는 것으로 알려져 있다 [14]. 이에 본 연구에서는 바위수염 추출물의 에스트라디올 및 수용체의 효능을 확인하였고 연관성이 깊은 골질환에 대하여 파골세포 분화억제 효능을 분석하여 그 결과를 Fig. 3에 제시하였다. 바위수염 추출물의 파골세포 분화억제 효과는 고농도에서 그 효능이 우수한 것을 확인하였으며 대조군인 estradiol을 처리한 그룹과 유사한 결과를 나타내었다.

여성 갱년기 증상은 일반적으로 여성 호르몬인 에스트로겐의 주기적인 생성이 중단되어 발생하는 것으로 알려져 있는데 여성 호르몬 결핍에 따라 에스트로겐 수용체를 갖는 조직 및 기관이 영향을 받아 체지방량과 인슐린 저항성이 증가함은 물론 복부비만, 당뇨병, 고혈압, 고중성지방혈증 등 대사질환 및 심혈관질환의 위험성을 증가시키는 것으로 보고되고 있다 [15]. 여성 갱년기 증상의 가장 잘 알려진 치료 방법인 직접적 호르몬 처방의 부작용이 다양한 연구에서 밝혀짐에 따라 최근 갱년기 증상을 완화 및 개선 또는 치료를 목적으로 천연 생물자원을 활용한 보고가 되고 있다 [16,17]. 타 연구에서는 식물성 에스트로겐 효능이 알려진 천연 생물자원을 이용한 연구가 수행 중으로 식물 자원 중 갈근을 이용한 에스트로겐 결핍 동물모델에서의 호르몬 변화를 분석하여 천연물의 효능을 밝힌 사례와 생강과의 건강 추출물을 이용하여 난소절제 동물모델에서 혈액 및

조직학적 분석을 통한 연구 외에도 다양한 방면으로 여성 갱년기 증상에 대한 개선 효능에 대한 소재 개발이 최근 활발하게 진행되어지고 있지만 [18,19] 본 연구와 방법이 다른 점은 여성 갱년기 증상은 여러 요인에 의해 발생되기 때문에 비교가 쉽지 않고 여성 갱년기 증상 치료 소재는 최근 연구가 활발히 진행되고 있지만 명확한 치료제가 미흡한 실정이며 특히 해양생명자원을 이용한 사례는 거의 전무하다. 따라서 본 연구결과를 기반으로 해양 생물자원을 이용한 여성 갱년기 증상 개선 및 치료용 소재를 발굴하는 것은 사회적, 경제적으로 발전 가능성이 매우 높을 것으로 판단된다.

결론

본 연구 결과 갈조류인 바위수염 추출물이 *in vitro* 모델에서 에스트라디올을 증가시키고 파골세포 분화를 억제하는 것으로 나타나 여성 갱년기 증상 개선용 해양 천연 소재로서의 가치가 충분하다고 판단되지만 명확한 기전연구 및 여성갱년기 증상으로 파생될 수 있는 다양한 증상들의 연구가 필요하고 여성갱년기 증상을 예방할 수 있는 기능성 소재의 개발 및 부작용이 없는 천연 해양생물자원의 활용이 기대된다.

감사의 글

이 논문은 이 논문은 2020년 해양수산부 재원으로 해양수산과학기술진흥원의 지원을 받아 수행된 연구(켈러스 기반 불레기말을 이용한 여성 갱년기 증

상 개선용 소재 개발)와 2019년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(2016R1D1A1B01006822).

References

1. Shin, D., Hong, S. B., Geum, J. H., Ma, J. Y. and Chung, H. S. 2016. Effects of schisandrae fructus on menopause symptoms in ovariectomized mice. *J. Korean. Med.* **37**(3), 39-46.
2. 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. *Korean J. Orient. Physiol. Pathol.* **27**(6), 752-758.
3. Ross, R. K., Paganini-Hill, A., Wan, P. C. and Pike, M. C. 2000. Effect of hormone replacement therapy on breast cancer risk: estrogen versus estrogen plus progestin. *J. Natl. Cancer Inst.* **92**(4), 328-332.
4. Bae, I. Y., Lee, J. Y., Kwak, B. Y. and Lee, H. G. 2011. Estrogenic effects of various extracts from Chamdanggui (*Angelica gigas Nakai*) and Sogdan (*Phlomis umbrosa Turcz.*). *Food Sci. Biotechnol.* **20**, 1113-1118.
5. Choi, Y. J., Kim, H. S., Je, J. G., Wang, L. and Jeon, Y. J. 2019. Antioxidant activity of brown seaweed, *Ecklonia maxima*, collected from south Africa. *J. Mar. Biosci. Biotechnol.* **11**(1), 29-35.
6. Wilson, V. S., Bobseine, K. and Gray, L. E. 2004. Development and characterization of a cell line that stably Expresses and Estrogen-Responsive Luciferase Reporter for the Detection of Estrogen Receptor Agonist and Antagonists. *Toxicol. Sci.* **81**, 69-77.
7. Sanjeeva, K. K. A., Lee, J. S., Kim, W. S. and Jeon, Y. J. 2017. The potential of brown-algae polysaccharides for the development of anticancer agents: An update on anticancer effects reported for fucoidan and laminaran. *Carbohydr Polym.* **177**, 451-459.
8. Oh, B. G., Lee, J. W. and Lee, H. B. 2002. A summer marine benthic algal flora and community of Uninhabited islands in Henamgun, southern coast of Korea. *J. Kor Fish Soc.* **35**, 57-63.
9. Noda, H., Amano, H., Arshima, K., Hashimoto, S. and Nisizawa, W. 1989. Studies on the antitumor activity of marine algae. *Bull. Japan Soc.Sic. Fish.* **55**, 1259-1264.
10. Schwartzmann, G., Brodani, D. R. A., Berlinck, R. G. and Jimeno, J. 2001. Marine organisms as a source of new anticancer agents. *Lancet Oncol.* **2**, 221-225.
11. Shi, D. B., Han, E. H. and Park, S. S. 2014. Cytoprotective effects of phaeophyta extracts from the coast of Jeju island in HT-22 mouse neuronal cell. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **43**, 224-230.
12. Fuentes, N. and Silveyra, P. 2019. Estrogen receptor signaling mechanisms. *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.* **116**, 135-170.
13. Lee, H. R., Kim, T. H., and Choi, K. C. 2012. Functions and physiological roles of two types of estrogen receptors, ER and ER, identified by estrogen receptor knockout mouse. *Lab. Ani. Res.* **28**, 71-76
14. Jilka, R. L. 1998. Cytokines, bone remodeling and estrogen deficiency. *Bone* **23**, 75-81.
15. Pedersen, S. B., Kristensen, K., Hermann, P. A., Katzenellenbogen, J. A., Richelsen, B. 2004. Estrogen controls lipolysis by up-regulating alpha2A adrenergic receptors directly in human adipose tissue through the estrogen receptor alpha. Implications for the female fat distribution. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **89**(4), 1869 - 1878.
16. You, Y. O. 2004. Side effects and management of postmenopausal hormone replacement therapy. *J. Menopausal Med.* **10**(1), 14-20.
17. Kim, D. I. 2002. What can we do for menopausal women-A review of recent research about HRT and a proposal of alternative therapies for treating climacteric or menopausal syndrome-. *J. Orient Obstetrics & Gynecology.* **17**(3), 105-115.
18. Back, S. E., Back, J. Y., Kang, K. S. and Yoo, J. E. 2017. Effect of *Pueraria lobata* on obesity related hormones in rats with estrogen deficiency. *J. Korean Med. Obes. Res.* **17**(2), 111-118.
19. Park, C. H. and Lim, H. H. 2018. The experimental study of the beneficial effect of *Zingiberis rhizoma* on post-menopausal obesity using ovariectomized rats. *J. Korean Med.* **39**(2), 106-118.