

Antioxidant Activity and Cell Differentiation Effects of *Monascus purpureus* Pigment on Osteoblast-like MC3T3-E1 Cells

Bokyung Kim¹, Jihye Ryu¹, Seok Oui Jang² and Mihyang Kim^{1*}

¹Department of Food & Nutrition, Silla University, Busan 46958, Korea

²Deok Hua Food Co., Busan 49464, Korea

Received March 2, 2020 / Revised May 20, 2020 / Accepted May 21, 2020

The purpose of this study was to investigate antioxidant activity and cell differentiation effects of *Monascus purpureus* pigment on osteoblast-like MC3T3-E1 cell. In order to examine the antioxidant activities of *Monascus purpureus* pigment, DPPH radical scavenging, ABTS radical scavenging and SOD-like activities were investigated. DPPH radical and ABTS radical scavenging activities of *Monascus purpureus* pigment were increased in a dose-dependent manner, and maximum activity were 94% and 99% at a concentration of 1,000 µg/ml, respectively. Additionally, SOD-like activity of *Monascus purpureus* pigment showed 62% at a concentration of 1,000 µg/ml. MC3T3-E1 cells did not show cytotoxicity in the concentration range of *Monascus purpureus* pigment 1~100 µg/ml. The ALP activity was increased by addition of *Monascus purpureus* pigment, and the maximum activity was 124% as compared with control. In addition, nodule formation, a late differentiation factor for bone formation, was increased by adding *Monascus purpureus* pigment compared to control. These results suggest that *Monascus purpureus* pigment is expected to be a natural source for developing functional materials to prevent bone-related diseases by osteoblast differentiation.

Key words : Antioxidant, bone formation, *Monascus purpureus* pigment, osteoblast differentiation

서론

식품의 색은 식품 선택에 작용하는 중요한 관능 요소가 되며, 식용색소는 관능성 및 상품성 향상을 위하여 널리 사용되고 있는 식품첨가물로 즉석식품 및 간편편의식품 등의 다양한 가공식품 제조에 그 사용이 증가하고 있는 추세이다. 최근 인공 색소에 대한 안전성 문제로 인하여 다양한 천연 유래의 식용색소 사용이 증가되고 있으며, 천연유래색소의 기능성이 알려짐에 따라 부가가치가 높은 식품을 개발하고자 다양한 연구개발이 이루어지고 있다[14, 30, 39]. 즉, 흑미 미강 색소의 지질대사 및 항산화 효소 활성에 미치는 영향[5], 천연색소 함유 식품추출물의 항산화 활성에 관한 연구[16], 맨드라미, 비트 및 홍갓 색소 추출물의 항산화 및 항균 효과 등에 관한 연구[22] 등 천연유래색소 개발에 대한 관심이 높은 실정이다.

활성산소(ROS, Reactive Oxygen Species)는 산소의 환원대사물로서 스트레스, 음주, 흡연, 방사선, 초음파 및 환경오염 등으로 인하여 대사의 불균형이 생기는 경우 과잉 생성되어

세포의 손상을 야기한다[34]. 인체에는 활성산소에 의한 방어 기작인 항산화 시스템을 가지고 있으나, 세포내 항산화시스템을 상회하여 ROS가 다량 생성되는 경우 산화스트레스에 노출된다. 또한, 산화적스트레스는 뇌 질환, 심장질환, 동맥경화, 당뇨병, 폐섬유증, 암, 관절염 및 치매 등의 여러 질환과 노화의 중요 병인으로 알려져 있다[12].

조골세포인 MC3T3-E1세포는 mouse calvaria 유래의 세포로 적절한 자극 하에 골수의 stromal cell이나 결합조직의 mesenchymal stem cell이 분화되어 생긴 것이다. 또한, MC3T3-E1 세포는 조골세포 전구체로부터 전조골세포와 조골세포, 골 내막세포 및 골세포로 분화되는 과정에 속하는 세포로, 골세포의 세포 활성화와 관련된 연구에서 유용하게 이용되고 있다[17].

붉은색의 누룩인 홍국은 홍국 곰팡이인 홍균균을 주로 쌀에 배양하여 건조시켜 사용하고 있으며, 중국에서는 식품뿐만 아니라 술을 비롯한 발효식품 제조에 착색 및 향미 증진 등을 위하여 사용되어 왔다[13]. 홍국에는 monacolin K (lovastatin)라고 하는 콜레스테롤 합성저해제가 함유되어 있는 것으로 알려져 있다[7, 21]. 홍국과 관련된 연구로는 항균효과[31] 및 동맥경화예방 효과[45]와 홍국쌀 추출물 중에 포함되어 있는 dimeric acid, tannin, phenol 및 unsaturated fatty acids 등의 항산화 작용에 대한 보고 등이 있다[2]. 또한, 홍국쌀에는 다양한 색소들(monascin, ankaflavin, rubropunctatin, monascorburin, rubropunctamine 및 monascorburamine)이 함유되어 있는데, 항염증 작용, γ -aminobutyric acid의 신경전달

*Corresponding author

Tel : +82-51-999-5620, Fax : +82-51-999-5657

*E-mail : mihkim@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.

및 혈압 강하 효과 등도 보고되어 있다[1, 19, 38, 40, 43].

이에 본 연구에서는 홍국색소의 항산화 효능을 확인하고, 조골세포인 MC3T3-E1 세포를 이용하여 골아세포의 초기 및 후기 분화 인자에 미치는 영향을 검토한 후 골 형성과 관련된 기능성 소재로의 개발 및 부가가치가 높은 천연색소로의 활용 가능성에 대하여 알아보하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 연구에 사용한 홍국색소는 ES식품원료(Gunpo, Gyeong-gido, Korea)에서 판매하는 제품 중 홍국적색소 100% 분말 제품(Monascus Red 100)으로 최종 색가 E1cm/10%가 1,000 이상인 제품을 구입하여 사용하였다. 항산화 활성 실험 및 그 외 모든 시약은 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였고, 세포 실험에 사용된 시약은 각각의 판매처에서 구입하여 사용하였다.

1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical 소거능 측정

홍국색소의 전자공여능을 검토하기 위해 Blois의 방법[3, 29]을 약간 변형하여 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)에 대한 수소 공여 효과로 측정하였다. 시료는 모두 증류수에 용해한 것을 사용하였다. 96-well plate에 시료와 150 μ M DPPH 시약을 혼합하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후 ELISA Multiscan Reader (Thermo scientific, Vantaa, Finland)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH radical 소거능은 시료를 첨가하지 않은 대조군과 흡광도 차이를 비교하여 free radical의 제거 활성을 백분율로 나타내었다.

$$\text{DPPH radical scavenging activity (\%)} = \frac{\text{대조군 흡광도} - \text{시료 첨가구 흡광도}}{\text{대조군 흡광도}} \times 100$$

ABTS radical 소거능 측정

ABTS 라디칼 소거능은 Lee 등[24]의 방법을 일부 변형하여 측정하였다. 7 mM ABTS 용액과 2.45 mM potassium persulfate를 혼합하여 15시간 동안 암소에 방치하여 ABTS radical을 형성시킨 후 30°C에서 온도 평형을 실시한 다음 734 nm에서 흡광도를 측정하여 값이 1.5가 되도록 증류수로 희석하였다. 희석한 용액에 증류수로 용해한 시료를 혼합하여 실온에서 30분간 반응시킨 후 734 nm에서 흡광도를 측정하여 아래의 산출식을 이용하여 계산하였다.

$$\text{ABTS radical scavenging activity (\%)} = \frac{\text{대조군 흡광도} - \text{시료 첨가구 흡광도}}{\text{대조군 흡광도}} \times 100$$

Superoxide dismutase (SOD) 유사활성 측정

홍국색소의 SOD 유사활성은 Marklund 등의 방법[41]에 따라 과산화수소(H₂O₂)로 전환 시키는 반응을 촉매하는 pyrogallol의 생성량을 측정하여 SOD 유사활성으로 나타내었다. 증류수에 용해한 시료를 농도별로 희석하고 pH 8.5로 보정한 tris-HCl buffer (50 mM tris [hydroxymethyl] anion-methane, 10 mM EDTA, pH 8.5)와 7.2 mM pyrogallol를 첨가하여 25°C에서 10분간 반응시킨 후, 1N HCl를 가하여 반응을 정지시켜 ELISA reader 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. SOD 유사활성능은 아래 계산식에 따라 나타내었다.

$$\text{SOD-like activity (\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료 첨가구의 흡광도}}{\text{시료 무첨가구 흡광도}}\right) \times 100$$

조골세포 배양 및 분화

ATCC (CRL-2593, Rockville, MD, USA)에서 분양 받은 mouse calvaria osteoblast cell인 MC3T3-E1 세포는 10% fetal bovine serum (FBS, ATLAS, USA)와 1% antibiotics를 포함한 Gibco (Grand Island, NY, USA)에서 판매하는 α -MEM (Alpha-minimum essential medium) 배지를 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 세포배양기에서 2~3일 마다 배지를 교환하면서 실험에 사용하였다. 분화 유도를 위해 5 mM β -glycerolphosphate (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)와 50 μ g/ml의 L-ascorbic acid를 배지에 첨가하여 분화유도배지로 사용하였으며 2~3일마다 배지를 교환하였다

조골세포 증식율 측정

세포증식율은 3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide (MTT) assay 방법을 사용하여 측정하였다 [12]. 배양한 MC3T3-E1 세포를 96-well plate에 plating하여 24시간 배양 후 분화유도배지로 교환하여 4일간 분화를 유도하였다. 그 후 배지를 이용하여 농도별로 희석한 시료를 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 세포배양기에서 24시간 배양하였다. 대조군은 시료를 포함하지 않은 배지를 첨가하여 동일하게 배양하였다. 48시간 배양 후 MTT시약을 각각의 well에 첨가하고 37°C, 5% CO₂ 세포배양기에서 4시간 더 배양하였다. 배양 후 배지를 제거하고 dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)를 첨가하여 생성된 불용성의 formazan 결정을 용해시킨 뒤 ELISA reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 세포생존율은 시료의 흡광도를 대조군의 흡광도에 대한 백분율로 나타내었다.

Alkaline phosphatase (ALP)활성 측정

MC3T3-E1 세포를 6-well plate에 24시간 동안 배양한 후 석회화 유도를 위해 분화유도배지로 5일간 배양하였다. 배양 후 농도별로 배지로 희석한 시료를 처리하여 24시간 배양하고, 0.2% triton X-10 (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)

을 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 세포배양기에서 30분간 세포를 용해시켰다. 단백질량은 표준시료로 bovine serum albumin (BSA)을 이용한 Bradford법을 사용하여 표준 곡선을 작성한 후 정량하였다. Thermo (Waltham, Massachusetts, USA)에서 판매하는 p-NPP(p-nitrophenylphosphate)를 구입하여 사용하였으며, 제조사에서 제공한 매뉴얼에 따라 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[23].

Alizarin-Red 염색법에 의한 골석회화 형성도 측정

MC3T3-E1 세포를 6-well plate에 배양한 후 석회화 유도를 위해 분화유도배지로 7일간 배양한 뒤 배지를 이용하여 농도별로 희석한 시료를 첨가 24시간 배양하여 70% ethanol로 4°C에서 1시간 동안 세포를 고정시켰다. Alizarin-Red (AR) solution (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)는 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 chloride (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 포함하는 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0), (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 2 ml/well를 첨가하여 ELISA reader로 550 nm에서 흡광도를 측정하였다[6].

통계처리

실험결과는 통계 SAS package (Statistical Analysis System, Version 9.1, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)를 사용하여 각 시료의 평균과 표준편차를 계산하였고, 일원변량분석(one-way ANOVA)과 Duncan's multiple range test를 실시하고 p<0.05 level에서 시료 간의 유의차를 검정하여 비교하였다.

결과 및 고찰

홍국색소의 DPPH radical 소거능

DPPH radical 소거능은 천연물의 항산화 활성을 평가하는 대표적인 방법[30]으로 free radical인 DPPH가 항산화 활성을 갖는 성분을 만나면 hydrazine 형태로 환원시키는 원리를 이용하여 홍국색소의 항산화능을 검토하였다. 홍국색소의 DPPH radical 소거능을 측정한 결과(Fig. 1), 홍국색소의 농도가 10~1,000 µg/ml 범위일 때 농도의존적으로 증가하였다. 특히, 홍국색소의 농도가 1,000 µg/ml의 농도에서는 최대 94.11%의 높은 소거능을 나타내었으며, IC₅₀값은 양성대조군인 ascorbic acid 가 1.65 µg/ml인데 비하여 홍국적색소의 경우 131.01 µg/ml로 나타났다.

홍국쌀 추출물을 이용한 연구[20]에서 홍국쌀 ethyl acetate

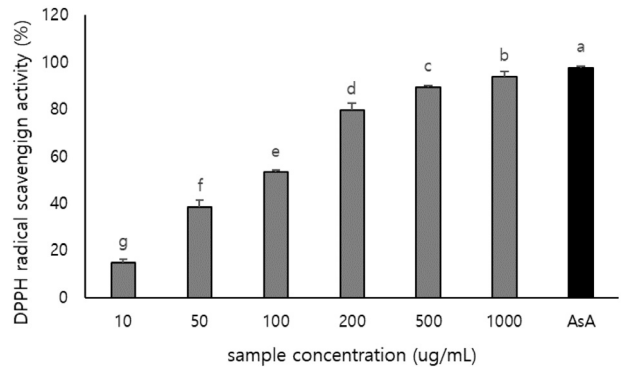


Fig. 1. DPPH free radical scavenging activity of *Monascus purpureus* pigment. Results are mean ± S.D. of triplicate data. AsA (ascorbic acid, 50 µg/ml) is used as positive control. Different letters (a-g) within a total sample differ significantly (p<0.05).

추출물은 0.2 mg/ml 농도에서 85%, 0.5 mg/ml에서 100%의 DPPH radical 소거능을 나타내었으며, methanol, butanol, hexane 추출물에서 0.2~1 mg/ml 농도에서 농도의존적으로 항산화 활성이 증가하였다. 또한, 홍국쌀의 ethanol 추출물에 대한 연구[16]에서도 추출물의 농도가 0.1 mg/ml 일 때 양성대조군인 200 µM 농도의 ascorbic acid 와 유사한 활성을 나타내었다는 보고가 있다. 이와 비교하여 홍국색소 또한 항산화 활성이 대체적으로 높은 것을 알 수 있다.

과도한 free radical은 인체의 항산화 기전의 균형을 깨트리 고, 산화적 스트레스의 유발로 인한 암, 노화, 심장질환, 염증 과 같은 인체 내 피해[5, 42]를 예방하기 위하여 다양한 항산화 기능성 식품이 개발되고 있다. 홍국색소와 같이 인체에 대한 안전성이 확보된 식품 소재가 우수한 항산화 활성을 가진다면 식품산업에 적용 시 발색 효과와 더불어 부가가치가 높은 항산화 기능성 소재로 활용 가능성이 있는 것으로 사료된다.

홍국색소의 ABTS radical 소거능

ABTS radical 소거능은 의도적으로 생성된 radical을 소거하는 능력을 화학적으로 측정해서 항산화 활성을 평가하는 일반적으로 많이 사용하는 방법이다[35]. 홍국색소의 ABTS radical 소거능을 측정한 결과(Fig. 2), 홍국색소의 농도가 10~1,000 µg/ml 범위일 때 농도의존적으로 증가하였다. 특히, 홍국색소의 농도가 1,000 µg/ml 일 때 94.66%로 가장 높은 ABTS radical 소거능을 나타내어 양성대조군인 L-ascorbic acid와 유사한 활성을 나타내었다. 또한, 홍국적색소의 ABTS radical 소거능에 대한 IC₅₀값은 351.97 µg/ml로 나타났으며, 양성대조군인 ascorbic acid 은 10.20 µg/ml으로 나타났다.

DPPH radical 소거능 및 ABTS radical 소거능 실험은 free radical을 소거하는 활성을 가지지만 폴리페놀과 같은 항산화 물질 중에서도 ABTS radical의 소거능을 가지나 DPPH radical 의 소거능을 나타내지 않는다는 보고가 있다[44]. 쌀 품종

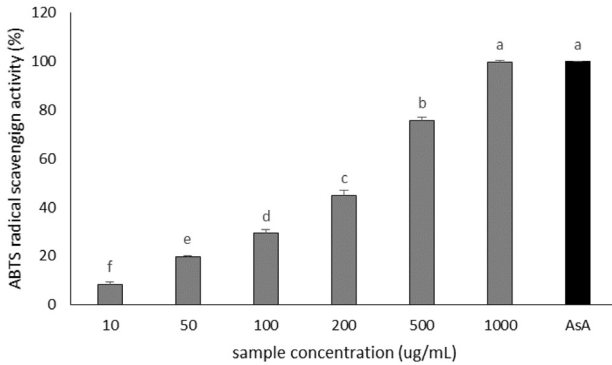


Fig. 2. ABTS radical scavenging activity of *Monascus purpureus* pigment. Results are mean \pm S.D. of triplicate data. AsA (ascorbic acid, 50 $\mu\text{g/ml}$) is used as positive control. Different letters (a-f) within a total sample differ significantly ($p < 0.05$).

에 따라 홍국균을 접종하여 항산화 활성을 연구한 결과에 따르면 DPPH radical 및 ABTS radical 소거능은 비슷하게 높은 것으로 나타났으며, 이는 홍국쌀에 함유되어 있는 폴리페놀, 플라보노이드, 색소성분 및 monacolin k 뿐만 아니라 홍국균의 배양 시 여러가지 활성 물질이 다량으로 생성되어 이러한 효과를 나타낸다고 보고하였다[28]. 본 연구에서도 홍국색소가 DPPH radical 소거능 및 ABTS radical 소거능을 동시에 나타내어 타 소재에 비하여 산업에 적용 가능성이 높은 우수한 항산화 소재로 기대가 된다.

홍국색소의 SOD 유사활성능

SOD는 활성산소를 억제하는 항산화 효소로 반응성이 매우 강한 superoxide radical과 반응하여 hydrogen peroxide (H_2O_2)로 전환시키는 반응을 촉매하는 효소이다. SOD에 의하여 생성된 hydrogen peroxide는 peroxidase나 catalase에 의하여 무해한 물분자와 산소분자로 전환시켜 생체를 보호하는 기능을 한다[11, 32].

홍국색소의 SOD 유사활성능을 측정된 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 홍국색소의 농도가 10~500 $\mu\text{g/ml}$ 범위에서 농도 증가에 따라 활성이 증가하는 경향은 보였으나 유의적인 결과는 나타나지 않았다. 한편, 홍국색소 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서는 62.35%로 비교적 높은 활성을 나타내었다. 한편, 홍국색소의 SOD 유사활성능 대한 IC_{50} 값은 869.58 $\mu\text{g/ml}$ (양성대조군인 ascorbic acid는 66.36 $\mu\text{g/ml}$)로 나타났다. 식물유래 천연색소의 항산화 활성에 대한 연구[4]에서 파프리카 및 오디의 SOD 활성은 농도 100 mg/ml 에서 각각 63.36%, 60.98%로 나타났고, 황치자, 청치자 및 레드비트의 SOD 활성은 농도 100 mg/ml 에서 각각 49.93, 42.37 및 34.68%의 활성을 나타내었다. 이러한 천연색소들의 SOD 유사활성능과 비교하였을 홍국색소는 비교적 높은 SOD 유사활성능을 나타내는 것으로 생각된다.

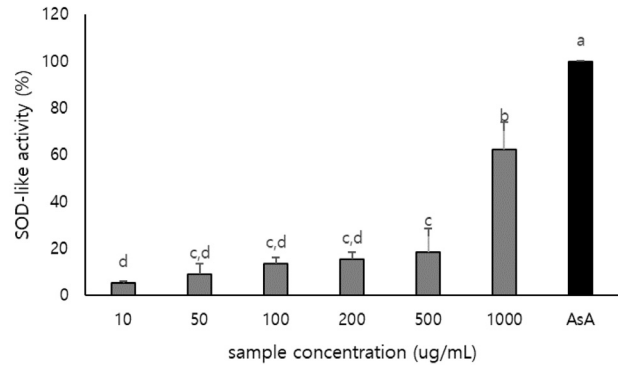


Fig. 3. SOD-like activity of *Monascus purpureus* pigment. Results are mean \pm S.D. of triplicate data. AsA (ascorbic acid, 50 $\mu\text{g/ml}$) is used as positive control. Different letters (a-d) within a total sample differ significantly ($p < 0.05$).

최근 활성산소에 의한 산화적스트레스와 골 건강과의 연관성에 대한 연구가 다수 진행되고 있으며, 55세 이상의 남성과 여성들에게서 산화적 스트레스가 증가함에 따라 골밀도가 감소한다는 보고가 있다[2]. 또한, 항산화활성이 높은 vitamin C를 섭취한 폐경기 여성의 골밀도가 증가되었다는 연구결과가 발표되었으며, 활성산소는 조골세포의 대사를 방해하고 파골세포의 활성도를 증가시켜 골 대사를 방해하는 보고가 있다[9, 10, 27]. DPPH 및 ABTS 라디칼 소거능을 가지는 항산화 활성이 높은 사철쭉을 이용한 연구에서도 천연물의 높은 항산화활성으로 인하여 조골세포의 증식 및 분화를 촉진되는 효과가 있다는 보고가 있다[33]. 이에 본 연구에서는 홍국색소의 높은 항산화 활성이 조골세포의 분화에 어떠한 영향을 미치는지에 대하여 조사하였다.

홍국색소가 조골세포 증식에 미치는 영향

본 연구에 사용된 조골세포주인 MC3T3-E1 세포는 mouse calvaria 유래의 조골세포이며, 골 형성에 있어 세포의 증식, 분화, 석회화 등 골아세포와 유사한 대사적 특징을 가지고 있어 관련 연구에 활발히 사용되고 있다[18]. 홍국색소가 조골세포인 MC3T3-E1세포의 독성에 미치는 영향을 검토하기 위하여 MTT 분석을 통하여 세포 생존율을 측정하였다.

홍국색소를 1~1,000 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 MC3T3-E1 세포에 처리하여 세포 증식율을 측정된 결과(Fig. 4), 시료의 농도가 1~100 $\mu\text{g/ml}$ 일 때 세포 증식율이 100% 이상으로 시료에 의한 세포 독성이 나타나지 않았다. 반면, 시료의 농도가 500 및 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 일 때 80% 이하의 생존율을 나타내어 홍국색소 500 $\mu\text{g/ml}$ 이상 농도에서 세포 독성이 확인되었다. 따라서, 이후 실험에서는 독성을 나타내지 않는 농도인 1~100 $\mu\text{g/ml}$ 에서 실험을 진행하였다. 이러한 결과는 머위 및 여주 추출물을 이용한 연구[26]에서도 추출물 1~100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 MC3T3-E1 세포에 대한 세포독성을 나타내지 않았으나, 그 이상의 농도에서는 세포 독성이 확인되었다는 보고가 있는 것으로 보

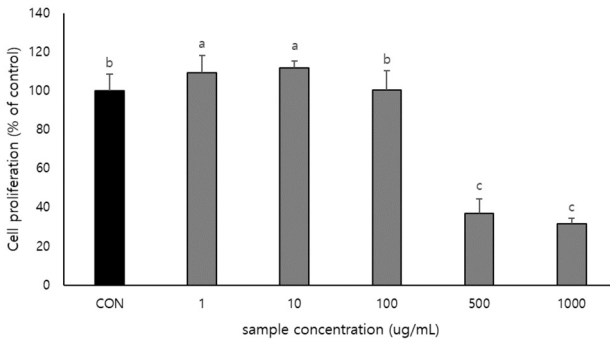


Fig. 4. Effect of the *Monascus purpureus* pigment on cell viability of the MC3T3-E1 osteoblastic cells by the MTT assay. Results are mean \pm S.D. of triplicate data. Different letters (a-c) within a total sample differ significantly ($p < 0.05$).

아, 타 천연 소재와 유사한 경향을 나타내는 것으로 생각된다.

홍국색소가 alkaline phosphatase (ALP) 활성에 미치는 영향

섬유아 세포의 형태에서 장기간 배양 시 높은 alkaline phosphatase 활성을 보이는데 당단백 효소인 alkaline phosphatase (ALP)는 기질 특이성을 나타내며 염기성 pH에서 최적의 활성을 나타낸다. 또한, 세포외막과 석회화 조직의 기질 소포에서 높은 농도로 발견되어 석회화 과정 동안 무기인산의 운반, 세포분열, 분화의 조절인자로서의 기능을 가지는 조골세포 분화의 매우 중요한 초기 표지인자이다[18, 36, 37].

홍국색소가 조골세포인 MC3T3-E1 초기분화 인자인 ALP 효소 활성에 미치는 영향을 검토한 결과(Fig. 5), 시료를 1~100 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 처리하였을 때 모든 농도에서 ALP 효소 활성의 유의적인 증가를 보였다. 특히, 시료의 농도가 100 $\mu\text{g/ml}$ 일 때, 124.33%의 최대 활성을 나타내었다. 천연물의 ALP의 활성에 관한 연구로는 매실열매(*Prunus mume*) 수용성 분획물이 ALP 활성에 미치는 영향을 검토한 연구에서 시료 농도가 100 $\mu\text{g/ml}$ 일 때 대조군 대비 ALP 활성을 30% 증가시켰다는 보고

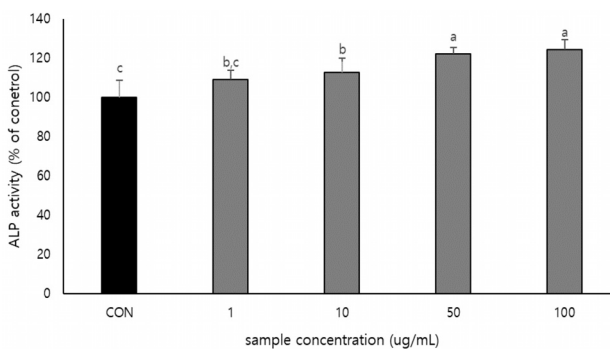


Fig. 5. Effect of the *Monascus purpureus* pigment on ALP activity of the MC3T3-E1 osteoblastic cells. Results are mean \pm S.D. of triplicate data. Different letters (a-c) within a total sample differ significantly ($p < 0.05$).

가 있다[19]. 감국 에탄올 추출물의 경우 ALP 활성이 122%로 향상되었다는 결과도 보고되어 있다[46]. 또한, 미나리과에 속하는 별사상자(*Cnidium monnieri*)에서 분리된 천연 쿠마린 성분인 osthole을 조골세포에 처리한 연구[47]에서도 MC3T3-E1의 ALP 활성이 증가되었음을 나타내었다. 따라서 항산화 활성이 대체적으로 우수하고 색소물질을 함유하고 있는 소재가 ALP 활성을 촉진시키는 이상의 연구결과 등과 마찬가지로 홍국색소 또한 이와 유사한 결과로 해석된다

조골세포는 산화적스트레스 상황에서 apoptosis를 일으켜서 조골세포의 수가 감소하고 분화가 억제되며, 세포막에 존재하는 조골세포 활성의 표식 효소인 ALP 활성을 감소시키거나, 항산화활성을 가지는 소재가 산화적 스트레스 상황에서 ALP 활성을 회복시킨다는 보고가 있다[12, 22, 25]. 또한, 활성산소와 골다공증과의 연관성에 대한 연구결과에 따르면 활성산소로 인한 산화적 스트레스가 증가함에 따라 골 밀도가 감소하고, 항산화제인 ascorbic acid 섭취에 의해 폐경기 여성의 골밀도가 증가된다는 보고도 있다[2, 27]. 이러한 결과들을 미루어 보아 홍국색소의 우수한 항산화 활성이 산화적 스트레스로 인한 ALP 활성 저하에 긍정적인 영향을 미치고 골 밀도 감소에 대한 보호효과를 나타낼 가능성을 시사하고 있다.

홍국색소가 골석회화에 미치는 영향

골석회화는 전조골세포가 골세포로 분화되는 과정에서 기질에 무기질을 형성하는 과정으로 조골세포 분화에 필수적이며 후기 표지인자이기도하다[8]. 조골전구세포의 증식을 통해 collagen matrix 합성과 골 결절 형성을 위한 기반이 형성되고, collagen 합성과 ALP 발현이 증가하면서 matrix의 성숙을 거쳐 최종적으로 석회화 과정이 일어난다. ALP 활성과 골석회화의 연관성을 검토한 연구에서는 ALP 활성이 높은 소재일수록 석회화에서도 높은 활성을 가진다고 보고하고 있다[34].

홍국색소가 조골세포의 분화에 작용하는 후기 표지인자인 골석회화에 미치는 영향을 검토하였다. 분화한 조골세포에 홍국색소를 처리하여 칼슘에 특이적으로 흡착하는 특성을 가지는 alizarin red로 염색한 뒤 현미경으로 관찰 후 10% acetylpyridinium choride로 용해하여 석회화 정도를 수치화 하였다. 석회화 형성 정도를 현미경으로 관찰한 결과, 홍국색소를 1~100 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 처리하였을 때 모든 농도에서 석회화가 형성되었으며, 시료의 농도가 100 $\mu\text{g/ml}$ 일 때 염색된 부분이 가장 많이 관찰되었다(Fig. 6). 석회화 정도를 수치화 한 결과를 Fig. 7에 나타내었다. 그 결과 모든 농도에서 유의적으로 석회화 형성 증가를 보였으며, 시료의 농도가 100 $\mu\text{g/ml}$ 일 때, 152.73%의 최대 활성을 나타내었다.

이러한 결과를 통해 홍국색소는 조골세포의 증식 및 분화를 촉진하는 ALP 활성을 증가시키고, ALP는 조골세포 성장에 관여하는 인자 혹은 골기질 단백질에 영향을 주어 조골세포내 석회화를 유도하여 골 형성에 긍정적인 영향을 미치는 것으로

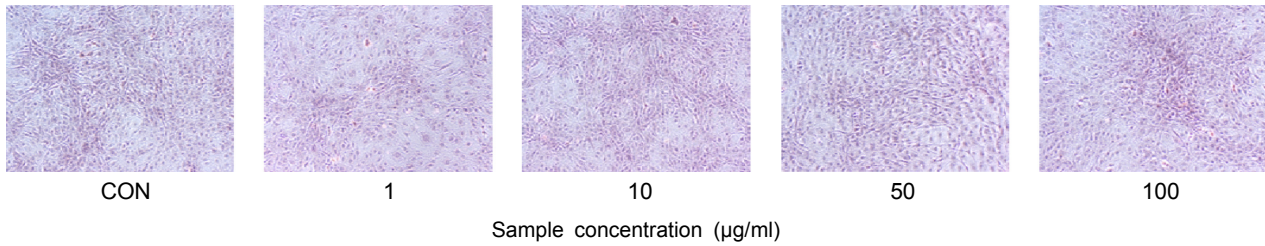


Fig. 6. Alizarin Red S staining of MC3T3-E1 cells for calcification after treatment with the *Monascus purpureus* pigment for 7 days.

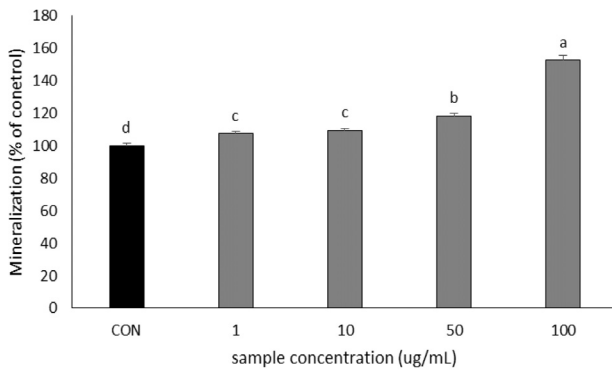


Fig. 7. Effect of the *Monascus purpureus* pigment on mineralization of the MC3T3-E1 osteoblastic cells. Results are mean \pm S.D. of triplicate data. Different letters (a-c) within a total sample differ significantly ($p < 0.05$).

추출된다. 또한, 사철쭉 및 민들레를 이용한 연구에서도 항산화활성이 높은 소재의 경우 산화적 스트레스 상황에서 석회화에 대한 보호효과가 높다는 보고가 있다[33, 34]. 마가목 열매에서 추출한 cryptochlorogenic acid (CCA)를 이용한 연구[15]에서 CCA가 Runx2의 전사 활성을 조절하여 ALP 활성을 증가시키고 석회화를 유도하여 조골세포 분화를 촉진한다는 보고가 있는 것으로 보아 홍국색소의 조골세포 분화효과도 조골세포의 핵심 전사 조절인자인 RUNX 2에 의한 영향으로 생각된다.

그러나 홍국색소가 골 형성과 관련하여 어떠한 분자적 기전을 통하여 조골세포의 분화를 조절하는지를 구명하기 위해서는 향후 단백질 및 유전자 수준의 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

감사의 글

본 논문은 교육부와 한국연구재단(사회 맞춤형 산학협력 선도대학(LINC+) 육성사업) 및 부산광역시(2019년도 BB21+ 사업)의 지원을 받아 수행된 연구결과이며 이에 감사드립니다.

The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

References

1. Akihisa, T., Tokuda, H., Yasukawa, K., Ukiya, M., Kiyota, A., Sakamoto, N., Suzuki, T., Tanabe, N. and Nishino, H. 2005. Azaphilones, furanoisophthalides, and amino acids from the extracts of *Monascus pilosus*-fermented rice (red-mold rice) and their chemopreventive effects. *J. Agric. Food. Chem.* **53**, 562-565.
2. Basu, S., Michaëlsson, K., Olofsson, H., Johansson, S. and Melhus, H. 2001. Association between oxidative stress and bone mineral density. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **288**, 275-279.
3. Blois, M. S. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* **181**, 1199-1200.
4. Boo, H. O., Hwang, S. J., Bae, C. S., Park, S. H. and Song, W. S. 2011. Antioxidant activity according to each kind of natural plant pigments. *Kor. J. Plant Res.* **24**, 105-112.
5. Cho, M. K., Kim, M. H. and Kang, M. Y. 2008. Effects of rice embryo and embryo jelly with black rice bran pigment on lipid metabolism and antioxidant enzyme activity in high cholesterol-fed rats. *Appl. Biol. Chem.* **51**, 200-203.
6. 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.
7. Choi, J. S., Oh, J. I., Hwang, I. T., Kim, S. E., Chun, J. C., Lee, B. H., Kim, J. S., Kim, T. J. and Cho, K. Y. 2003. Application and high throughput screening of DPPH free radical scavenging activity by using 96-well plate. *Kor. J. Pestic. Sci.* **7**, 92-99.
8. 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.
9. Fraser, J. H. E., Helfrich, M. H., Wallace, H. M. and Ralston, S. H. 1996. Hydrogen peroxide, but not superoxide, stimulates bone resorption in mouse calvariae. *Bone* **19**, 223-226.
10. Garrett, I. R., Boyce, B. F., Oreffo, R. O., Bonewald, L., Poser, J. and Mundy, G. R. 1990. Oxygen-derived free radicals stimulate osteoclastic bone resorption in rodent bone *in vitro* and *in vivo*. *J. Clin. Invest.* **85**, 632-639.
11. Halliwell, B. and Gutteridge, J. 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* **219**, 1-4.
12. Hwang, H. J., Jung, B. M. and Kim, M. H. 2011. ROS scavenging effect and cell viability of *Opuntia humifusa* extract

- on osteoblastic MC3T3-E1 cells. *J. Life Sci.* **21**, 1752-1760.
13. Jeong, E. J., Kim, K. P. and Bang, B. H. 2013. Quality characteristics of cookies added with Hongkuk powder. *Kor. J. Food Nutr.* **26**, 177-183.
 14. Kim, H. B., Kim, S. L., Koh, S. H., Seok, Y. S., Kim, Y. S., Sung, G. B. and Kang, P. D. 2011. The development of natural pigment with mulberry fruit as a food additive. *Kor. J. Crop Sci.* **56**, 18-22.
 15. Kim, K. M., Kim, T. H. and Jang, W. G. 2017. Effect of cryptochlorogenic acid extracted from fruits of *sorbus commixta* on osteoblast differentiation. *Kor. J. Food Nutr.* **46**, 314-319.
 16. Kim, Y. S., Suh, H. J. and Park, S. 2015. Antioxidant activity of hot-water extracts and floral waters from natural plant pigments. *Kor. J. Food Preserv.* **22**, 129-133.
 17. Kimble, R. B., Vannice, J. L. and Bloedow, D. C., Hoper, W., Kung, V. T., Brownfield, C. and Pacifici, R. Interleukin-1 receptor antagonist decrease bone loss and resorption in ovariectomized rats. *J. Clin. Invest.* **93**, 1959-1967.
 18. Kodama, H. A., Amagai, Y., Sudo, H., Kasai, S. and Yamamoto, S. 1981. Establishment of a clonal osteogenic cell line from newborn mouse calvaria. *Jap. J. Oral Biol.* **23**, 899-901.
 19. Kono, R., Okuno, Y., Inada, K. I., Tokuda, A., Hashizume, H., Yoshida, M., Nakamura, M. and Utsunomiya, H. 2011. A *Prunus mume* extract stimulated the proliferation and differentiation of osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **75**, 1907-1911.
 20. Kwon, J. S. 2012. Antioxidant properties of red yeast rice (*Monascus purpureus*) extract. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **41**, 437-442.
 21. Lee, C. L., Wang, J. J., Kuo, S. L. and Pan, T. M. 2006. *Monascus* fermentation of dioscorea for increasing the production of cholesterol-lowering agent-monacolin K and anti-inflammation agent-monascin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **72**, 1254-1262.
 22. Lee, D. H., Lim, B. S., Lee, Y. K. and Yang, H. C. 2006. Effect of hydrogen peroxide (H₂O₂) on alkaline phosphatase activity and matrix mineralization of odontoblast and osteoblast cell lines. *Cell Biol. Toxicol.* **22**, 39-46.
 23. 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.
 24. Lee, Y. M., Bae, J. H., Kim, J. B., Kim, S. Y., Chung, M. N., Park, M. Y., Ko, J. S., Song, J. and Kim, J. H. 2012. Changes in the physiological activities of four sweet potato varieties by cooking condition. *Kor. J. Nutr.* **45**, 12-19.
 25. Liu, A. L., Zhang, Z. M., Zhu, B. F., Liao, Z. H. and Liu, Z. 2004. Metallothionein protects bone marrow stromal cells against hydrogen peroxide-induced inhibition of osteoblastic differentiation. *Cell Biol. Int.* **28**, 905-911.
 26. Ji, S. H., Ahn, D. H. and Jun, M. R. 2010. Effects of *Petasites japonicus* and *Momordica charantia* L. extracts on MC3T3-E1 osteoblastic cell. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **39**, 203-209.
 27. Morton, D. J., Barrett Connor, E. L. and Schneider, D. L. 2001. Vitamin C supplement use and bone mineral density in postmenopausal woman. *J. Bone. Miner. Res.* **16**, 135-140.
 28. Park, G. H., Park, J. W., Choi, S. Y., Hong, C. Y., Seo, J. H., Kang, T. S., Lee, J. S. and Jeong, H. S. 2019. Quality characteristics of red yeast rice according to three varieties of rice and fermentation periods. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **48**, 1391-1396.
 29. Park, H. W., Jang, K. H., Hussain, M. and Lee, D. J. 2012. Evaluation of 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging effect, cytotoxicity and tyrosinase inhibition activities in 4 species of herb plants. *J. Appl. Biol. Chem.* **55**, 201-205.
 30. Park, S. K., Lee, T. S. and Park, S. K. 2005. Estimation of daily dietary intake of food red colors. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **38**, 75-80.
 31. Robinson, J. A. 1991. Polyketide synthase complexes: their structure and function in antibiotic biosynthesis. *Philos. Trans. R. Soc. B.* **332**, 107-114.
 32. Salim, A. S. 1990. Oxygen-derived free radicals and the prevention of duodenal ulcer relapse: a new approach. *Am. J. Med. Sci.* **300**, 1-8.
 33. Seo, J. E., Hwang, E. S. and Kim, G. H. 2011. Antioxidative and differentiation effects of *Artemisia capillaris* T. extract on hydrogen peroxide-induced oxidative damage of MC3T3-E1 osteoblast cells. *Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **40**, 1532-1536.
 34. Seo, J. E. and Kim, G. H. 2012. Antioxidant activity and differentiation effect of *Taraxacum mongolicum* extracts against hydrogen peroxide-induced oxidative damage of MC3T3-E1 osteoblast cells. *Kor. J. Food Cook. Sci.* **28**, 311-318.
 35. Soares, D. G., Andrezza, A. C. and Salvador, M. 2003. Sequestering ability of butylated hydroxytoluene, propyl gallate, resveratrol, and vitamins C and E against ABTS, DPPH, and hydroxyl free radicals in chemical and biological systems. *J. Agric.* **51**, 1077-1080.
 36. Stein, G. S., Lian, J. B. and Owen, T. A. 1990. Relationship of cell growth to the regulation for tissue-specific gene expression during osteoblast differentiation. *FASEB. J.* **4**, 3111-3123.
 37. Strutz, F., Okada, H., Lo, C. W., Danoff, T., Carone, R. L., Tomaszewski, J. E. and Neilson, E. G. 1995. Identification and characterization of a fibroblast marker: FSP1. *J. Cell. Biol.* **130**, 393-405.
 38. Taira, J., Miyagi, C. and Aniya, Y. 2002. Dimeric acid as an antioxidant from the mold, *Monascus anka*: the inhibition mechanisms against lipid peroxidation and hemeprotein-mediated oxidation. *Biochem. Pharmacol.* **63**, 1019-1026.
 39. Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L. and Byrne, D. H. 2006. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *J. Food Compos. Anal.* **19**, 669-675.
 40. Martinkova, L., Krent, V., Kucerova, Z., Havlicek, V., Olsovsky, P., Hovorka, O., Rihova, B., Vesely, D., Ulrichova, J. and Olsovsky, P. 1999. Biological activities of oligopeptide pigments of *Monascus purpureus*. *Food Addit. Contam. A.* **16**, 15-24.
 41. Marklund, S. and Marklund, G. 1974. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol

- and a convenient assay for superoxide dismutase. *FEBS J.* **47**, 469-474.
42. Molyneux, P. 2004. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* **26**, 211-219.
43. Oh, H. A., Kim, M. Y., Lee, Y. J., Song, M. S., Lee, J. and Jeong, H. S. 2018. Comparison of monacolin K and antioxidant components of red yeast rice produced by germinated brown rice using normal and processing rice cultivars. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **47**, 1344-1348.
44. Wang, M., Li, J., Rangarajan, M., Shao, Y., LaVoie, E. J., Huang, T. C. and Ho, C. T. 1998. Antioxidative phenolic compounds from sage (*Salvia officinalis*). *J. Agric.* **46**, 4869-4873.
45. Yu, T. S., Kim, H. H. and Yoon, C. G. 2003. Hepatic oxygen free radical metabolizing enzyme activities and serum lipid profile in rats fed diet supplemented with monascus pigment. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **32**, 107-114.
46. 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.
47. Zhang, Z. R., Leung, W. N., Li, G., Kong, S. K., Lu, X., Wong, Y. M. and Chan, C. W. 2017. Osthole enhances osteogenesis in osteoblasts by elevating transcription factor osterix via cAMP/CREB signaling *in vitro* and *in vivo*. *Nutrients* **9**, 588.

초록 : 홍국색소의 항산화 활성 및 조골세포 분화에 미치는 영향

김보경¹ · 류지혜¹ · 장석위² · 김미향^{1*}
 (¹신라대학교 식품영양학과, ²㈜덕화푸드)

본 연구에서는 홍국색소의 항산화 활성 및 조골세포의 분화에 미치는 영향을 검토하였다. 홍국색소의 항산화 활성은 DPPH radical 소거능, ABTS radical 소거능 및 SOD 유사 활성을 측정하여 평가하였다. 홍국색소의 DPPH radical 및 ABTS radical 소거 활성은 농도 의존적으로 증가하였으며, 특히 1,000 µg/ml 농도에서 각각 94% 및 99%의 최대 활성을 나타내었다. 또한 SOD 유사 활성을 검토한 결과에서, 홍국색소 1,000 µg/ml 농도에서 62%의 최대 활성을 나타내었다. 우선 홍국색소 1~1,000 µg/ml의 농도에서 세포독성을 검토하기 위해 MTT assay를 실시한 결과, 1~100 µg/ml 농도의 범위에서 세포 독성은 나타나지 않았다. ALP 활성은 1~100 µg/ml 농도에서 농도의 존적으로 증가하였으며, 100 µg/ml의 농도에서 최대 124%의 활성을 나타내었다. 또한, 석회화 형성능 시험에서도 대조군 대비 모든 농도에서 유의적으로 증가하는 경향이 나타났으며, 100 µg/ml의 농도에서 대조군 대비 1.5배의 석회화 형성 결과가 나타났다. 이러한 결과를 통해 홍국색소는 항산화 활성이 우수하며, 조골세포 분화에 긍정적인 영향을 줌으로써 골다공증 예방 소재로서의 개발 가능성을 가진 부가가치가 높은 천연물 소재로 활용 가능할 것으로 생각된다.