

산양삼(cultivated wild *Panax ginseng*) 추출물이 조골세포 활성화에 미치는 영향

서현주^{1†}, 어현지^{2†}, 김현준³, 전권석⁴, 박광훈³, 홍세철⁵, 정진부^{6*}

¹국립안동대학교 농업기술과학연구소, 박사후연구원, ²국립산림과학원 산림약용자원연구소, 박사후연구원, ³연구사, ⁴연구관,
⁵구미전자정보기술원, 선임연구원, ⁶국립안동대학교 생약자원학과, 교수

Effects of Cultivated Wild *Panax ginseng* Extract on the Proliferation, Differentiation and Mineralization of Osteoblastic MC3T3-E1 Cells

Hyun-Ju Seo^{1†}, Hyun Ji Eo^{2†}, Hyun Jun Kim³, Kwon Seok Jeon⁴, Gwang Hun Park³,
Se Chul Hong⁵ and Jin Boo Jeong^{6*}

¹Post-doc, Institute of Agricultural Science and Technology, Andong National University, Andong 36729, Korea
²Post-doc, ³Researcher and ⁴Senior Researcher, Forest Medicinal Resources Research Center, National Institute of Forest Science, Yeongju 36040, Korea

⁵Senior Researcher, Gumi Electronics & Information Technology Research Institute, Gumi 39171, Korea

⁶Professor, Department of Medicinal Plant Resources, Andong National University, Andong 36729, Korea

Abstract - *Panax ginseng* C.A. Meyer (*P. ginseng*) is known to exert a wide range of pharmacological effects both *in vitro* and *in vivo*. Although studies on ginsenoside, antioxidant activity, and anticancer effect of the cultivated wild *Panax ginseng* (CWP) have been conducted, there is little research on the effect of CWP extract on bone metabolism. In this study, we investigated the potential anti-osteoporotic properties of CWP on the growth and differentiation of MC3T3-E1 cells. CWP significantly increased the viability and proliferation of MC3T3-E1 cells. CWP activated intracellular alkaline phosphatase (ALP) activity in MC3T3-E1 cells. In addition, CWP increased the mineralized nodules in MC3T3-E1 cells. Furthermore, CWP increased the expression of genes such as *Runx2*, *ALP*, *OPN* and *OCN* associated with osteoblast growth and differentiation in a dose-dependent manner.

Key words – Cultivated wild *Panax ginseng*, Osteoporosis, Osteoblast differentiation

서 언

골조직의 항상성(skeletal homeostasis)은 끊임없는 골형성과 골흡수에 의해 유지된다. 골의 재형성(bone remodeling)에는 조골세포와 파골세포가 관여하는데, 조골세포는 골기질을 합성하는 반면 파골세포는 골을 흡수하는 역할을 한다. 골재형성(bone remodeling)은 조골세포와 파골세포의 작용에 의해 일정한 주기로 골격계의 구조를 유지하는데 이러한 골격계의 구조와 기능은 전신적인 호르몬과 국소적 인자들의 상호작용에

의해 조절된다(Canalis *et al.*, 1988; Raisz, 1988). 조골세포와 파골세포 작용간의 불균형은 전체적인 골감소(osteoporosis)나 증가(osteosclerosis)로 인한 골격의 이상으로 나타난다(Jeong *et al.*, 2008).

우리나라 고령인구가 전체 인구의 7%를 넘어선 2000년 이후 사회 각 분야에서 고령인구에 대한 관심이 증가하고 있다. 특히, 한국여성의 경우 2013년 기준 평균수명이 85.06세로 OECD 회원국의 평균 수명보다 4.86세 높은 수준을 나타내고 있다(Yoon and Han, 2013). 고령사회에서 노년기 건강의 큰 문제로 대두되고 있는 골다공증은 골의 석회 성분 감소로 밀도가 떨어져서 경미한 충격에도 쉽게 골절을 일으킬 수 있는 질환으로, 2008-2009년 국민건강영양조사에 따르면 50세 이상 성인의 골다공증

*교신저자: E-mail jjb0403@anu.ac.kr

Tel. +82-54-820-7757

† These authors contributed equally to this work.

유병률은 여성에서 35.5%, 남성에서 7.5%로 여성이 남성에 비해 4배 이상 높았으며, 노인 특히 폐경 후 여성들에게서 가장 그 발생빈도가 높게 나타났으며, 폐경 후 여성들에게서 나타나는 골다공증은 estrogen의 분비부족에 기인하는 것으로 알려져 있다(Choi *et al.*, 2012; Jilka, 1998). 현재 폐경성 골다공증의 치료에는 천연 식물 유래의 phytoestrogen이 유효하다는 보고가 있고(Davis *et al.*, 1998; Ha and Lee, 2003; Jeon *et al.*, 2013; Keum *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2004), 비 폐경성 골다공증 치료에는 칼슘보충제, vitamin D 대사산물, calcitonin 요법, bisphosphonates 및 불소요법, 성장인자 등이 보고되었다(Kim, 2013; Min, 2016; Orsel and Krane, 2000; Prestwood *et al.*, 1995). 현재 골다공증 예방 및 치료에 사용되고 있는 약제는 대부분 골흡수 억제제이며, 이는 이미 진행된 골소실을 회복 시킬 수는 없기 때문에 골다공증에 대한 예방 및 치료가 어려운 실정이다(Choi and Koo, 2002; Jeon and Kim, 2011; Kim, 2011). 이에 골형성 증가를 통한 골다공증 예방과 치료에 관한 연구가 활발히 이루어졌으며(Jeong *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2017; Yun *et al.*, 2012), 특히 한의학에서 골관련질환에 처방되었던 약용식물들에 대한 효능 연구들과(Choi *et al.*, 2001; Lee, 2001), 산화 억제 및 유리기(free radical) 소거능과 골다공증 예방에 대한 논문도 보고되고 있다(Boskey *et al.*, 1992; Choi and Koo, 2002; Kenney *et al.*, 1994).

인삼(人蔘: *Panax ginseng* C.A. Mayer)은 오갈피나무과(Araliaceae) 인삼속(*Panax*)에 속하는 다년생 초본이다. 현재 인삼, 산삼(wild *Panax ginseng*), 산양삼(cultivated wild *Panax ginseng*)의 정의를 보면, 인삼은 발삼을 의미하고, 산삼은 산에서 인공적인 요소가 전혀 없이 자라는 삼을 가리키며, 산양삼은 산지관리법에 따라 국내 산지에서 재배하는 삼으로 정의된다(Kim *et al.*, 2019). 인삼은 과거로부터 효능이 인정된 약용식물로 인삼의 구성 성분인 사포닌(saponin) 성분과 비사포닌 성분인 페놀, 플라보노이드, 산성다당체 등의 효과가 널리 알려져 있다(Kim and Kim 2005a; Lee *et al.*, 2000; Yoo *et al.*, 2000). 인삼의 생리활성은 체계적인 약리학적 접근으로 심혈관계, 면역계, 신경계에 대한 효능과 해독작용, 항암 작용 그리고 항당뇨작용 등이 알려져 있고(Kang *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2007), 최근 인삼열수추출물의 조골세포 골화 촉진효과(Kim *et al.*, 2015)와 발효홍삼추출물의 ALP활성 증가 효과와 Type I 콜라겐의 mRNA 발현 수준 증가 효과가 보고되었다(Siddiqi *et al.*, 2015). 산양삼은 일반적인 인삼과는 다르게 약리적인 활성이 높고 향이 강한 특징을 갖는다고 알려져 있으며(Bae *et al.*, 2009), 간 기능 활성화,

혈당 강하, 암세포 성장억제, 혈압 강하 및 동맥경화 예방, 면역 기능 활성화, 빈혈예방, 신진대사 촉진, 피부장벽 강화, 중추 신경 자극 및 진전을 통한 학습능력과 기억력 촉진, 스트레스와 피로 해소 효과 등으로 매우 다양한 효능을 가지고 있는 것으로 보고되고 있다(Joo, 1995; Kim *et al.*, 1999; Kimura and Suzuki, 1985; Nam, 1996).

산양삼에 대한 연구는 다수가 원기회복, 자양강장 및 면역증강 효과 등에 대한 것이며(Kim and Kim, 2006; Kim, 2009; Park *et al.*, 2003; Sohn *et al.*, 2012), 인삼과 산삼 및 산양삼 등의 효능을 비교 연구하였거나(Jang *et al.*, 2008; Joo, 1995; Kim *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2004; Kim and Kim, 2006; Kimura and Suzuki, 1985; Lee, 2000; Lee *et al.*, 2000; Nam, 1996; Pan *et al.*, 2013; Yoo *et al.*, 2000) 산양삼 감별법(Seo *et al.*, 2004)과 제품품질 특성(Kim and Kim, 2005b)과 관련된 논문 등은 있으나 골대사에 미치는 영향에 대한 연구는 거의 없는 실정이다. 이에 본 연구에서는 산양삼의 다양한 생리활성 효능 등이 조골세포에 미치는 영향에 대해 알아보고 선행된 연구(Kim *et al.*, 2015; Siddiqi *et al.*, 2015)에서 열수추출물의 효능이 검증된 바 산양삼 열수추출물이 골관련 유전자 발현에 미치는 영향을 확인함으로써 골다공증 예방 및 치료 효과를 갖는 천연 소재로의 활용 가능성을 검토하고자 하였다.

재료 및 방법

산양삼 추출물의 제조

본 실험에 사용된 산양삼(cultivated wild *Panax ginseng*)은 산림약용자원연구소로부터 제공받았으며, 산양삼 분말시료에 20배량(w/v)의 증류수를 첨가한 후, 25℃에서 72시간 동안 추출을 수행하였으며, 추출액을 여과지(Whatman, Maidstone, UK)를 이용하여 2회 여과하여 rotary vacuum evaporator (EYELA, Tokyo, Japan)로 감압 농축한 후 동결건조장치(Ilshin BioBase, Gwangju, Korea)를 사용하여 동결건조하였다.

MC3T3-E1 조골세포의 배양 및 분화

Mouse calvaria osteoblast 세포인 MC3T3-E1 세포는 American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)에서 구입하였고 10% FBS (Gibco BRL, Grand island, NY, USA)와 1% antibiotics (Gibco BRL, Grand island, NY, USA)가 포함된 α -MEM (Gibco BRL, Grand island, NY, USA) 배지를 사용하여 37℃, 5% CO₂ incubator에서 배양하면서 실험에 사용하였

다. 분화유도를 위해 α -MEM배지에 10 mM β -glycerol Phosphate (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), 50 μ g/mL의 vitamin C (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)를 첨가하였다. 3일마다 배지를 교환하였고 증식, 분화 및 무기질화에 미치는 영향을 확인하기 위하여 1일에서 21일까지 배양하며 실험을 진행하였다.

세포생존률 및 세포증식 유도 측정

산양삼 추출물이 조골세포 생존 및 증식에 미치는 영향을 알아보기 위해 Green 등(Green *et al.*, 1984)의 방법에 따라 3-(3,4-dimethylthiazoly-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 시약의 환원정도를 측정하는 MTT assay를 실시하였다. 먼저 MC3T3-E1 세포를 24 well plate에 분주한 후 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양 후, 세포생존률을 확인하기 위하여 배지를 제거하고 FBS가 첨가되지 않은 배지에 산양삼 추출물을 농도별(25, 50, 100 μ g/mL) 첨가하여 만든 새로운 배양액을 분주하여 48시간 배양하였다. 산양삼 추출물의 세포증식을 확인을 위해 MC3T3-E1 세포를 24 well plate에 분주한 후 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양 후, 배지를 제거하고 FBS가 첨가된 배지에 산양삼 추출물을 농도별(25, 50, 100 μ g/mL) 첨가하여 만든 새로운 배양액을 분주하여 7일간 배양하였다. 실험 종료 후 배지를 제거하고 5 mg/mL 농도의 MTT시약 100 μ L를 각 well에 첨가하여 3시간 더 배양한 후 배지를 제거하고 DMSO (dimethyl sulfoxide)를 500 μ L를 첨가하여 생성된 불용성의 formazan 결정을 용해시켜 UV/Visible spectrophotometer (Xma-3000PC, Human Corporation Co., Seoul, Korea)로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Alkaline phosphatase (ALP) 활성 측정

산양삼 추출물이 조골세포 활성화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 염기성 인산분해효소(alkaline phosphatase, ALP) 활성을 측정하였다. 염기성 인산분해효소는 조골세포 분화에 발현되는 표식인자이므로 산양삼 추출물의 조골세포 분화 촉진 효과를 알아볼 수 있다. 포화 배양된 MC3T3-E1 cell를 6 well plate에 분주하고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양 후, 배지를 제거하고 10% FBS, 1% 항생제가 첨가된 배지에 산양삼 추출물을 농도 별로 배분시켜 만든 새로운 배양액을 분주하였다. 7일간 배양 후 배양액을 제거하고 0.1% Triton X-100/0.9% NaCl 용액을 첨가하여 세포를 분리하였다. 세포 현탁액을 14,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상등액만 취하여 ALP 효소 활성

과 단백질 정량에 사용하였다. 상등액에 1 M Tris-HCl 500 μ L와 5 mM MgCl₂ 100 μ L와 Lysis buffer 250 μ L와 5 mM p-nitrophenolphosphate (p-NPP)를 첨가한 후 37°C에서 30 분간 반응시킨 후 1 N NaOH 250 μ L로 반응을 중지하고, 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. ALP activity는 p-NPP로부터 생성된 p-nitrophenol (PNP)를 측정하여 p-NP에 대한 표준그래프를 작성한 후 활성도를 도출하였고, 단백질은 bovine serum albumin을 표준물질로 사용하여 Brad-ford (Bio-Rad Laboratories, Inc, USA)법으로 정량하였다. 측정된 ALP activity를 단백질량으로 나누어 단위 단백질당 효소활성도(U activity/mg protein)를 산출하였다.

Alizarin-Red 염색법에 의한 골 석회화 형성도 측정

조골세포 분화의 주요 표식인자인 골석회화 형성도를 측정하기 위해 Alizarin-red 염색법을 실시하였다. 24-well plate에 조골세포(MC3T3-E1 cell)를 분주한 후, 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양 후, 배지를 제거하고 PBS로 세척한 뒤, 석회화 유도를 위해 50 μ g/ml ascorbic acid, 10 mM β -glycerol phosphate가 포함된 농도별 산양삼 추출물 배양액을 분주하고 21일까지 incubator에서 배양하였다. 배양 후, 배지를 제거하고 PBS로 세척한 뒤 80% EtOH로 4°C에서 1시간 동안 고정시켰다. 증류수에 alizarin red (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)를 녹여 40 mM Alizarin Red Solution (pH 4.2) 제조한 후, 고정이 끝나면 준비한 AR solution으로 shaker위에서 속도 120 rpm으로 30분간 염색하였다. 염색이 끝난 뒤 증류수로 5번 세척한 후 현미경으로 nodule 정도를 관찰하였다. 석회화 형성 인 후 10% cetylpyridinium chloride를 첨가한 10 mM sodium phosphate (pH 7.0) 용액을 첨가하여 15분간 용출 후, 염색된 정도를 UV/Visible spectrophotometer (Xma-3000PC, Human Corporation Co., Seoul, Korea)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

정량 Real-time PCR 분석

세포분화와 석회화가 유도된 각 실험군의 MC3T3-E1 세포주에서 mRNA 발현을 정량 PCR 분석으로 확인하였다. RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA)를 이용하여 total RNA를 추출하였고 cDNA를 합성하기 위하여 Verso cDNA Kit (Thermo Scientific, Pittsburgh, PA, USA)를 이용하였다. Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green qRT-PCR master mix (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)를 이용하여 cDNA 1 μ g,

Table 1. Sequence of oligonucleotide primers used for qRT-PCR

Gene Name	Sequence
<i>RUNX2</i>	Forward 5'-CCGCACGACAACCGCACCAT-3' Reverse 5'-CGCTCCGGCCACAAATCTC-3'
<i>ALP</i>	Forward 5'-GCTGATCATTCCCAGGTTTT-3' Reverse 5'-CTGGGCTGGTAGTTGTTGT-3'
<i>Osteopontin</i>	Forward 5'-TGCACCCAGATCTAGCC-3' Reverse 5'-CTCCATCGTCATCATCATCG-3'
<i>Osteocalcin</i>	Forward 5'-CCTCAGTCCCCAGCCCAGATCC-3' Reverse 5'-CAGGGCAGAGAGAGAGGACAGG-3'

2x SYBR Green master mix 10 μ L, 각 primer 1 μ L, 100 mM DTT 0.2 μ L RT/RNase block 1 μ L를 혼합한 후, 전체 부피가 20 μ L가 되도록 DEPC를 처리한 물로 적정하였다. Exicycler™ 96 (Bioneer co., Daejeon, Korea)을 이용하여 95°C에서 3분간 반응시킨 후, 94°C에서 15초, 60°C에서 25초, 70°C에서 15초를 40회 반복하여 반응시켰다. 정량 PCR 결과를 qcalculator 1.0 program (Institute of Pharmacology & Toxicology, University of Bonn, Bonn, Germany)을 이용하여 Ct값에 따른 mRNA양을 정량적으로 계산하여 분석하였다. 정량을 위한 내부 대조군(internal control)으로는 GAPDH를 이용하였으며, 정량 PCR 분석에 사용한 primer sequence는 Table 1에 나타내었다.

통계분석

실험결과는 평균과 표준오차로 나타내었으며, 통계분석은 SPSS program을 이용한 one-way ANOVA ($p < 0.05$)을 실시하여 Duncan's multiple range test에 의해 시료간의 유의적 차이를 검정하였다.

결과 및 고찰

산양삼 추출물이 조골세포의 증식에 미치는 영향

미분화간엽세포로부터 유래하는 조골세포는 골기질 성분을 주로 합성하여 석회화과정을 촉진하며(Martin and Matthews, 1970; Owen, 1985), 세포막에 당단백 효소인 염기성인산분해 효소를 갖고 있다(Jeong *et al.*, 2008). 확립된 골조직유래 여러 가지 세포주 중 골세포의 세포활성과 관련된 연구에서 유용하게 이용되고 있는 mouse calvaria 유래의 MC3T3-E1 osteoblastic cell은 적절한 자극 하에 골수의 stromal cell이나 결합조직의 mesenchymal stem cell이 분화되어 생긴 것으로, *in vivo* 골형

성 과정 중 세포의 증식, 분화, 석회화 등 골아세포와 유사한 대사적 특징을 가지고 있으며, 조골세포 전구체(osteoprogenitor)로부터 전조골세포(pre-osteoblast)와 조골세포, 그리고 골내막 세포(bone lining cell) 또는 골세포(osteocyte)로 분화되는 과정에 속하는 세포이다(Ernst *et al.*, 1989; Jeong *et al.*, 2008; Sudo *et al.*, 1983). 특히 세포외기질에 무기질을 형성(mineralization of matrix)하는 성질을 가지고 있으므로(Kim *et al.*, 1991) 본 연구에서는 MC3T3-E1 세포주를 이용하였다. 산양삼 추출물 처리가 조골 세포의 증식에 미치는 영향을 알아보기 위해 MIT assay를 실시하였고, MC3T3-E1 세포생존률은 대조군과 산양삼 추출물을 처리한 실험군 모두에서 동일한 수준으로 나타났으며 이로써 산양삼 추출물의 안전성을 확인할 수 있었다(Fig. 1A). 또한 산양삼 추출물을 처리한 실험군과 대조군의 세포증식률을 비교하였을 때 산양삼 추출물 50 μ g/mL 농도 처리군에서 유의적으로 세포증식이 촉진되었으며 25 μ g/mL과 100 μ g/mL 농도 처리군에서도 대조군보다 높은 경향을 나타내었다(Fig. 1B).

산양삼 추출물이 조골세포의 활성화에 미치는 영향

산양삼 추출물이 조골 세포의 활성화에 미치는 영향을 알아보기 위해 조골세포의 분화초기에 나타나는 표지인자인 Alkaline phosphatase (*ALP*) 활성을 측정하였다(Kim *et al.*, 2001; Min, 2016). 전 조골세포(pre-osteoblast)에서 성숙 조골세포(mature osteoblast)로 가는 초기 과정의 분화 인자인 *ALP*는 당단백 효소이며(Delany and Canalis, 1998; Ju, 2008; Kim, 2014), 이 효소는 기질 특이성과 염기성 pH에서 최적의 활성을 나타내며 세포외막과 석회화조직에서 높은 농도로 발견된다. 특히 석회화 과정 동안 무기인산을 운반하고 인산칼슘의 침착을 도와주며 세포분열이나 분화의 조절자 역할을 담당하므로 다수의 논

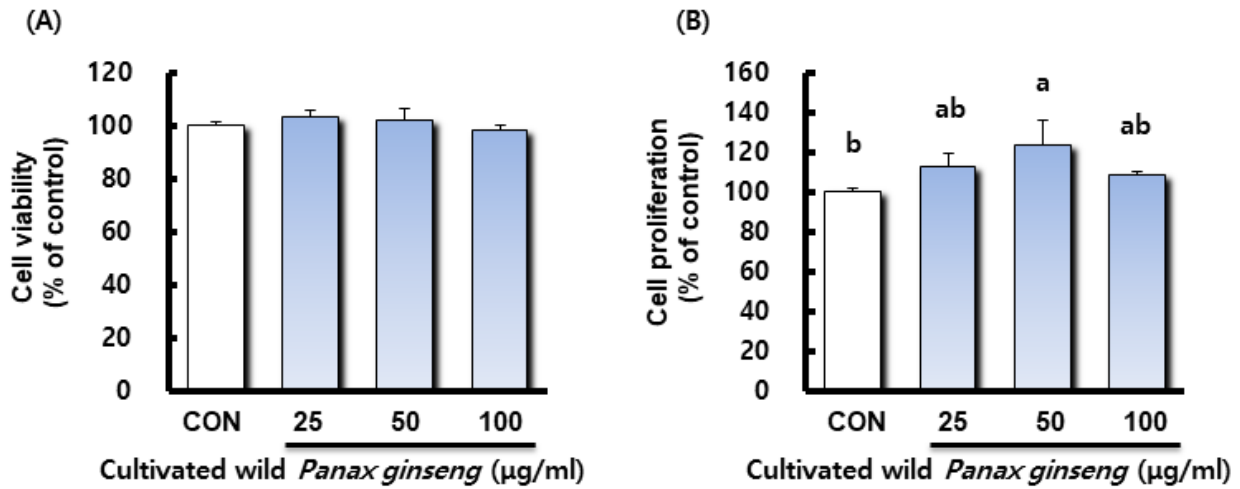


Fig. 1. Effect of cultivated wild *Panax ginseng* on cell viability (A) and proliferation (B) of osteoblastic-like MC3T3-E1 cells. Data presented as Mean \pm SEM (n=4). Different letter superscripts mean significantly different CWP concentration as analyzed by one-way ANOVA, Tukey test ($p < 0.05$).

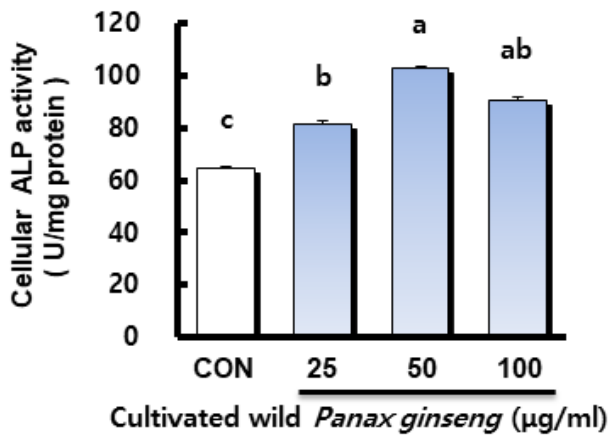


Fig. 2. Effect of cultivated wild *Panax ginseng* on intracellular alkaline phosphatase (ALP) activity in osteoblastic-like MC3T3-E1 cells. Data presented as Mean \pm SEM (n=3). Different letter superscripts mean significantly different CWP concentration as analyzed by one-way ANOVA, Tukey test ($p < 0.05$). Cellular ALP 1 unit(U)(1 nmole *p*-nitrophenyl phosphate/mg protein/min).

문이 조골세포의 활성을 측정하기 위한 도구로 ALP 활성도를 사용하였다(Choi *et al.*, 2001; Choi and Koo, 2002; Park and Shin, 2001; Stein *et al.*, 1990; Sudo *et al.*, 1983). 산양삼 추출물을 처리한 MC3T3-E1 세포의 ALP 활성 결과는 Fig. 2와 같다. 모든 산양삼 추출물 처리군이 대조군과 비교하여 유의적으로 높은 활성을 나타내었으며 특히 산양삼 추출물 50 µg/mL 농도

처리군에서 가장 높은 활성을 나타내었다. 이는 Siddiqi *et al.* (2015)의 연구에서 홍삼 및 발효홍삼 추출물이 조골세포의 ALP 활성을 증가시켰다는 결과와 일치한다. ALP가 조골세포의 분화초기에 나타나는 표지인자이므로 이 결과로 산양삼 추출물이 조골세포의 분화를 촉진한 것으로 사료되며, 향후 분화 촉진과 관련된 산양삼의 유효성분에 대한 후속 연구를 통해 분화 촉진 기전과 유효성분 규명이 필요할 것으로 보인다.

산양삼 추출물이 조골세포의 골 석회화 형성에 미치는 영향

골의 발생은 간엽줄기세포로부터 골모세포로의 분화가 연골 내골화와 막내골화라는 두 과정을 거쳐 일어나면서 골모세포에서 만들어진 기질에 무기질이 침착되어 생성된다. 일반적으로 증식기, 기질 성숙기, 석회화의 3단계 과정을 거쳐 골을 형성하는데 조골세포는 5일 정도부터 분화되기 시작하여 15일 이후로 골석회화가 진행된다(Jeong *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2001; Min, 2016). 조골세포의 표지인자에는 ALP, collagen 및 osteocalcin 등이 사용되고 있으나 이러한 지표는 조골세포에 한정된 지표가 아니기 때문에 전조골세포(pre-osteoblast)에서 조골세포의 분화 및 골형성(bone formation)의 지표로 세포외기질의 석회화 형성능을 검토하고 있다(Declercq *et al.*, 2005). 본 연구에서는 산양삼 추출물의 농도에 따른 석회화 형성도를 확인하기 위해 무기질화된 세포의 기질을 alizarin red로 염색하였고, 염색된 석회화물은 10% cetylpyridinium chloride로 녹여 흡광도 값을 측정하여 상대활성을 Fig. 3에 나타내었다. 산양삼

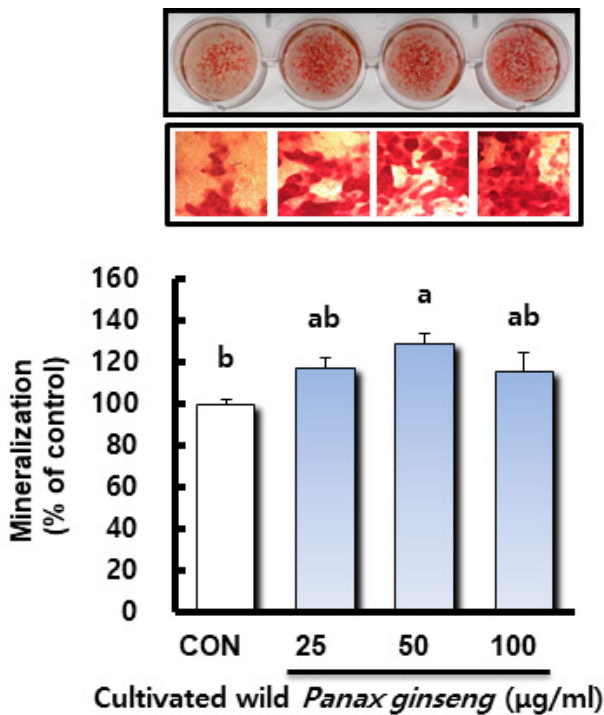


Fig. 3. Effect of cultivated wild *Panax ginseng* on mineralized nodules in osteoblastic-like MC3T3-E1 cells. Data presented as Mean \pm SEM (n=3). Different letter superscripts mean significantly different CWP concentration as analyzed by one-way ANOVA, Tukey test ($p < 0.05$).

추출물을 처리한 실험군과 대조군과의 석회화 형성도를 비교하였을 때 산양삼 추출물 50 µg/mL 농도 처리군에서 유의적으로 석회화 형성이 촉진되었으며 25 µg/mL와 100 µg/mL 농도 처리군에서도 대조군보다 높은 경향을 나타내었다. Kim *et al.* (2015)은 인삼열수추출물이 조골세포의 칼슘 축적 형성을 유도하여 골화를 촉진한다고 보고하였고, Kim *et al.* (2012)은 진세노사이드 Rd가 AMPK와 BMP-2 신호전달 경로의 활성을 통하여 조골세포 분화를 유도한다고 보고하였다. 따라서 본 연구결과 산양삼 추출물이 MC3T3-E1 조골세포의 분화를 촉진하고, 석회화 형성능이 있음을 확인하였으나 산양삼 추출물의 분화 촉진과 석회화 형성능이 산양삼의 사포닌계 진세노사이드 성분의 영향인지에 대한 후속 연구가 필요할 것으로 사료된다.

산양삼 추출물이 조골세포에서 골 형성 관련 유전자 발현에 미치는 영향

전 조골세포(pre-osteoblast)에서 성숙 조골세포(mature osteoblast)로 가는 초기 과정의 분화 인자로는 당단백 효소인

ALP가 있으며, 조골세포 분화 조절 인자인 *osterix*, *Runx2* 및 *collagen I* 등은 골 형성을 촉진시키며, 성숙 조골세포(mature osteoblast)에서 골세포(osteocyte)화 되는 과정에서는 골 형성 단백질인 Bone morphogenetic proteins (*BMP*), osteopontin (*OPN*), osteocalcin (*OCN*) 등의 세포 외 기질 단백질을 생성하여 골세포의 기질을 석회화 하는 것으로 알려져 있다(Delany and Canalis, 1998; Ju, 2008; Kim, 2014). *Runx2*와 *osterix*의 발현은 세포 분화 조절에 관련하며(Komori, 2006), collagen I (Tognarini *et al.*, 2008)는 초기 분화 마커이고 *OPN*과 *OCN*은 후기 분화 마커이다(Ducy and Karsenty, 1998). 본 연구에서는 산양삼 추출물이 MC3T3-E1 조골세포에서 골 형성 관련 유전자 발현에 미치는 영향을 확인하기 위해 *Runx2*, *ALP*, *OPN*, *OCN* 등의 유전자를 정량 real-time PCR을 통해 분석하였고 그 결과는 Fig. 4에 나타내었다. 먼저 골형성 전사인자인 *Runx2* 유전자 발현에서는 대조군과 비교하여 모든 산양삼 추출물 처리군에서 농도 의존적이고 유의적으로 발현이 증가되었다. 더불어 조골세포는 세포막에 당단백효소인 ALP를 가지고 있는데, 이는 무기 인산을 운반하고 인산 칼슘의 침착을 도와주며 세포외 기질이 석회화할 수 있는 조건을 만들어주어 조골세포의 분화에 관여하는 것으로 알려져 있다(Bellows *et al.*, 1991; de Bernard *et al.*, 1986). ALP 유전자 발현에서는 모든 산양삼 추출물 처리군이 대조군과 비교하여 유의적으로 높은 발현 양상을 보였으며, 특히 산양삼 추출물 50 µg/mL 농도 처리군에서 가장 높은 발현량을 나타내었다. 후기 분화 마커인 *OPN*과 *OCN*은 골세포의 분화가 이루어짐에 따라 발현이 증가하여 조골세포의 석회화를 촉진하고 골의 세포외 기질 안에 축적되거나 합성된 일부가 혈중으로 방출되기도 한다(Ganss *et al.*, 1999). *OPN* 유전자 발현은 ALP 유전자 발현의 양상과 유사하며 대조군과 비교하여 산양삼 추출물 50 µg/mL 농도 처리군에서 유의적으로 발현이 증가되었다. *OCN*은 골이나 상아질 및 석회화된 연골에서 발현되는 특이적인 유전자(Zheng, 2014)로 본 실험결과에서는 대조군과 비교하여 모든 산양삼 추출물 처리군에서 농도 의존적이고 유의적으로 발현이 증가되었다. 따라서 본 연구에서는 산양삼 추출물이 조골세포의 골 형성 관련 유전자인 *Runx2*, *ALP*, *OPN*, *OCN* 발현을 증가시켜 조골세포의 분화를 촉진하고, 골 석회화 형성 촉진에 기여하였을 것으로 사료된다. 그러나 산양삼 추출물이 골형성과 관련하여 어떠한 기전으로 유전자의 발현을 조절하였는지에 대한 유전자 및 단백질 수준의 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

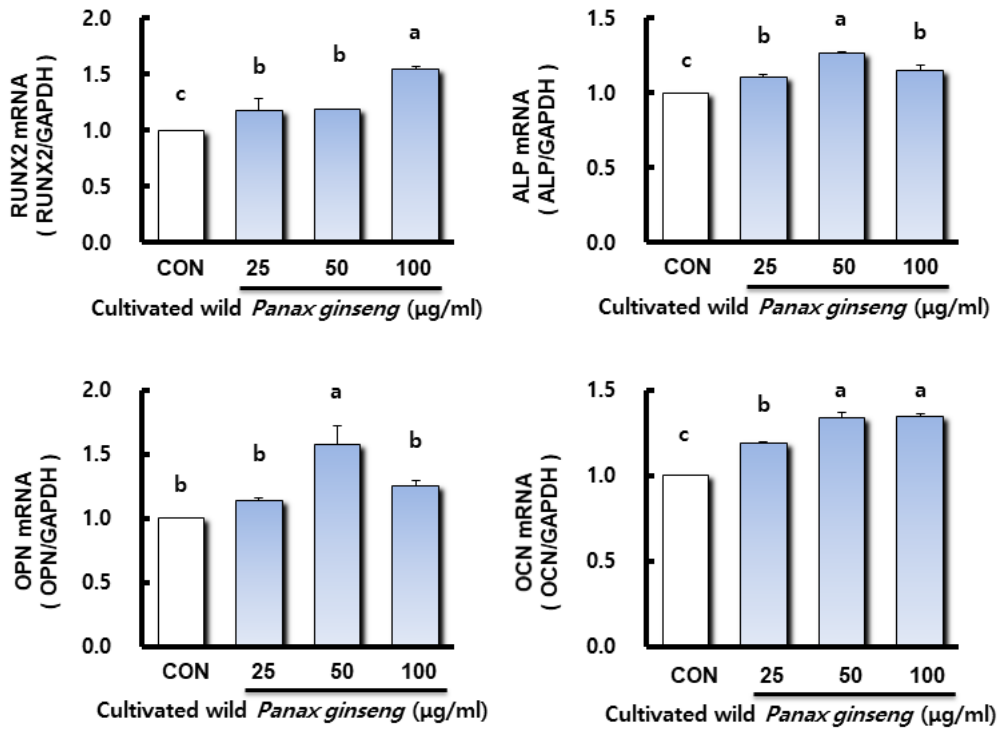


Fig. 4. Effect of cultivated wild *Panax ginseng* on the expression of bone-related genes in osteoblastic-like MC3T3-E1 cells. Results are reported as fold change or relative quantification of target mRNA expression, normalized to an endogenous control (GAPDH). Different letter superscripts mean significantly different CWP concentration as analyzed by one-way ANOVA, Tukey test ($p < 0.05$).

적 요

고령사회에서 노년기 건강의 큰 문제로 대두되고 있는 골다공증은 특히 폐경 후 여성들에게서 가장 그 발생빈도가 높게 나타났으며, 현재 골다공증 예방 및 치료에 사용되고 있는 약제는 대부분 골흡수 억제제로써 진행된 골소실을 회복 시킬 수는 없기 때문에 골형성 증가를 통한 골다공증 예방과 치료에 관한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 산양삼(cultivated wild *Panax ginseng*, CWP)에 대한 연구는 다수가 원기회복, 자양강장 및 면역증강 효과 등에 대한 것이나 골대사에 미치는 영향에 대한 연구는 거의 없는 실정이다. 이에 본 연구에서는 산양삼 추출물이 조골세포에서 골관련 유전자 발현에 미치는 영향을 확인함으로써 골다공증 예방 및 치료 효과를 갖는 천연 소재로의 활용 가능성을 검토하고자 하였다. 산양삼 추출물 처리가 조골 세포의 증식에 미치는 영향을 알아보기 위해 MTT assay를 실시하였고, MC3T3-E1 세포생존률은 FBS가 첨가되지 않은 배양액만 처리한 대조군과 산양삼 추출물을 처리한 실험군 모두에서 동일한 수준으로 나타났으며 이로써 산양삼 추출물의 안전성을

확인할 수 있었다. 또한 산양삼 추출물을 처리한 실험군과 대조군과의 세포증식률을 비교하였을 때 산양삼 추출물 50 µg/mL 농도 처리군에서 유의적으로 세포증식이 촉진되었으며 25 µg/mL과 100 µg/mL 농도 처리군에서도 대조군보다 높은 경향을 나타내었다. 산양삼 추출물이 조골 세포의 활성화에 미치는 영향을 알아보기 위해 조골세포의 분화초기 표지인자인 ALP 활성을 측정하였으며 그 결과 모든 산양삼 추출물 처리군이 대조군과 비교하여 유의적으로 높은 활성을 나타내었으며 특히 산양삼 추출물 50 µg/mL 농도 처리군에서 가장 높은 활성을 나타내었다. 산양삼 추출물의 농도에 따른 석회화 형성도를 확인하기 위해 무기질화된 세포의 기질을 alizarin red로 염색하였고 산양삼 추출물을 처리한 실험군과 대조군과의 석회화 형성도를 비교하였을 때 산양삼 추출물 50 µg/mL 농도 처리군에서 유의적으로 석회화 형성이 촉진되었으며 25 µg/mL과 100 µg/mL 농도 처리군에서도 대조군보다 높은 경향을 나타내었다. 산양삼 추출물이 MC3T3-E1 조골세포에서 골 형성 관련 유전자 발현에 미치는 영향을 확인하기 위해 *Runx2*, *ALP*, *OPN*, *OCN* 등의 유전자를 정량 real-time PCR을 통해 분석하였으며 대조군과 비

교하여 모든 산양삼 추출물 처리군에서 농도 의존적이고 유의적으로 골 형성 관련 유전자발현이 증가되었다. 따라서 산양삼 추출물이 골 형성 관련 유전자인 *Runx2*, *ALP*, *OPN*, *OCN* 발현을 증가시켜 MC3T3-E1 조골세포의 분화를 촉진하고, 골 석회화 형성 촉진에 기여하였을 것으로 사료된다. 그러나 산양삼 추출물이 골형성과 관련하여 어떠한 기전으로 유전자의 발현을 조절하였는지에 대한 유전자 및 단백질 수준의 추가적인 연구와 산양삼 추출물의 분화 촉진과 석회화 형성능이 산양삼의 사포닌계 진세노사이드 성분의 영향인지에 대한 후속 연구가 필요할 것으로 사료된다.

사 사

본 연구는 한국연구재단 이공분야 기초연구사업 지역대학우 수과학자 후속지원사업(NRF-2019R1D1A3A03103685)과 중점 연구소지원사업(NRF-2018R1A6A1A03024862)의 지원에 의해 이루어진 결과로 이에 감사드립니다.

Conflicts of Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

Bae, M.J., S.J. Kim, E.J. Ye, H.S. Nam and E.M. Park. 2009. Antioxidant activity of tea made from Korean mountain-cultivated leaves and its influence on lipid metabolism. *Korean J. Food Culture* 24(1):77-83.

Bellow, C.G., J.E. Aubin and J.N. Heersche. 1991. Initiation and progression of mineralization of bone nodules formed in vitro the role of alkaline phosphatase and organic phosphate. *Bone and Mineral* 14(1):27-40.

Boskey, A.L., C.M. Rinnac, M. Bansal, M. Federman, J. Lian and B.D. Boyan. 1992. Effect of short-term hypomagnesemia on the chemical and mechanical properties of rat bone. *J. Orthopedic. Res.* 10(6):774-783.

Canalis, E., T. McCarthy and M. Centrella. 1988. Growth factors and the regulation of bone remodeling. *J. Clin. Invest.* 81(2):277-281.

Choi, E.M. and S.J. Koo. 2002. Effects of soybean ethanol extraction the prostaglandin E2 and interleukin-6 production in osteoblastic cells. *Food Res. Int.* 35(9):893-896.

Choi, E.M., K.S. Suh, Y.S. Kim, R.W. Choue and S.J. Koo. 2001. Soybean ethanol extract increases the function of osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Phytochemistry* 56(7):733-739.

Choi, Y.J., H.J. Oh, D.J. Kim, Y. Lee and Y.S. Chung. 2012. The prevalence of osteoporosis in Korean adults aged 50 years or older and the higher diagnosis rates in women who were beneficiaries of a national screening program: the Korea National Health and Nutrition Examination Survey 2008-2009. *J. Bone Miner. Res.* 27(9):1879-1886.

Davis, S.R., A.L. Murkies and G. Wilcox. 1998. Phytoestrogens in clinical practice. *Integr. Med.* 1(1):27-34.

de Bernard, B., P. Bianco, E. Bonucci, M. Costantini, G.C. Lunazzi, P. Martinuzzi, C. Modricky, L. Moro, E. Panfili, P. PoHeseHo, N. Stagni and F. Vittur. 1986. Biochemical and immunochemical evidence that in cartilage an alkaline phosphatase is a Ca²⁺ binding glycoprotein. *J. Cell Biol.* 103(4):1615-1623.

Declercq, H.A., R.M. Verbeeck, L.I. De Ridder, E.H. Schacht and M.J. Cornelissen. 2005. Calcification as an indicator of osteoinductive capacity of biomaterials in osteoblastic cell cultures. *Biomaterials* 26(24):4964-4974.

Delany, A.M. and E. Canalis. 1998. Basic fibroblast growth factor destabilizes osteonec-tin mRNA in osteoblasts. *Am. J. Physiol.* 274(3):C734-740.

Ernst, M., J.K. Heath and G.A. Lodan. 1989. Estradiol effects on proliferation messenger ribonucleic acid collagen and insulin-like growth factor-I and parathyroid hormone-stimulated adenylate cyclase activity in osteoblastic cells from calvariae and long bones. *Endocrinology* 125(2):822-833.

Ganss, B., R. Kim and J. Sodek. 1999. Bone sialoprotein. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 10(1):79-98.

Green, L.M., J.L. Reade and C.F. Ware. 1984. Rapid colometric assay for cell viability: Application to the quantitation of cytotoxic and growth inhibitory lymphokines. *J. Immunol. Methods* 70(2):257-268.

Ha, J.M. and S.H. Lee. 2003. Verification of estrogenic activity in ethanol extracts of marine organisms using *in vitro* test system. *J. Life Sci.* 13(6):799-804.

Jang, H.Y., H.S. Park, K.R. Kwon and T.J. Rhim. 2008. A study on the comparison of antioxidant effects among wild ginseng, cultivated wild ginseng, and cultivated ginseng extracts. *J. Kor. Inst. Herb. Acupunc.* 11(3):67-78.

Jeon, M.H. and M.H. Kim. 2011. Effect of *Hijikia fusiforme* fractions on proliferation and differentiation in osteoblastic MC3T3-E1 Cells. *J. Life Sci.* 21(2):300-308.

Jeon, M.J., S. Kim, B.K. Kim, J. Cheon, S.H. Park, E. Oh, S.H.

- Lee and M. Kim. 2013. The effects of seaweed gongjindan on estrogen like activities, platelet aggregation and serum lipid levels in ovariectomized rats. *J. Life Sci.* 23(9):1155-1162.
- Jeong, M.S., C.K. Park, E.J. Shin, T.H. Jo and I.K. Hwang. 2008. Effects of *Scutellaria radix* extract on osteoblast differentiation and osteoclast formation. *Korean J. Food Sci. Technol.* 40(6):674-679.
- Jilka, R.L. 1998. Cytokines, bone remodeling and estrogen deficiency. *Bone* 23(2):75-81.
- Joo, C.N. 1995. *Hongsam eui Shinbi*. Moonjung Press, Seoul, Korea. p. 11.
- Ju, W.C. 2008. Soybean enhances the selective secretion of interleukin-1 and osteoprotegerin in MC3T3-E1 osteoblasts. Department of Medical Nutrition, MS Thesis, Kyunghee University, Seoul, Korea. pp. 6-7.
- Kang, K.S., N. Yamabe, H.Y. Kim, J.H. Park and T. Yokozawa. 2008. Therapeutic potential of 20(S)-ginsenoside Rg(3) against streptozotocin-induced diabetic renal damage in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 591(1-3):266-272.
- Kenney, M.A., H. McCoy, L. Williams. 1994. Effects of magnesium deficiency on strength, mass and composition of rat femur. *Calcif. Tissue Int.* 54(1):44-49.
- Keum, J.C., K.H. Kang and S.B. Kim. 2001. Effects of estrogen on the tumor necrosis factor- α induced apoptosis and cytokine gene expression MC3T3-E1 osteoblast. *Korean J. Obstet. Gynecol.* 44(2):324-336.
- Kim, D.H. 2009. Metabolism of ginsenosides to bioactive compounds by intestinal microflora and its industrial application. *J. Ginseng Res.* 33(3):165-176.
- Kim, D.Y. 2014. The effects of collagen and collagen-containing foods on bone metabolism. Department of Biology Education. MS Thesis, Sookmyung Women's University, Seoul, Korea. pp. 2-3.
- Kim, D.Y., Y.G. Park, H.Y. Quan, S.J. Kim, M.S. Jung and S.H. Chung. 2012. Ginsenoside Rd stimulates the differentiation and mineralization of osteoblastic MC3T3-E1 cells by activating AMP-activated protein kinase via the BMP-2 signaling pathway. *Fitoterapia* 83:215-222.
- Kim, E.K. 2011. The effect of carthami semen on osteoclastogenesis. Department of Clinical Research of Korean Medicine. MS Thesis, Kyung Hee University, Seoul, Korea. p. 1.
- Kim, J.H. and J.K. Kim. 2005a. Effect of extracting conditions on chemical compositions of Korean mountain ginseng extract. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 34(6):862-868.
- _____. 2005b. Quality characteristics of candy products added with hot-water extracts of Korean mountain ginsengs. *Korean J. Food Preserv.* 12(4):336-343.
- _____. 2006. Antioxidant activity and functional component analysis of Korean mountain ginseng's different sections. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 35(10):1315-1321.
- Kim, J.S., S.W. Lee, Y.O. Kim, M.S. Bang, C.H. Oh and C.T. Kim. 2015. Effects of the hot water extract mixtures from *achyrantes bidentata* blume and *Panax ginseng* on osteoclast and osteoblast differentiation. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 23(2): 117-124.
- Kim, K., Y. Um, D.H. Jeong, H.J. Kim, M.J. Kim and K.S. Jeon. 2019. The correlation between growth characteristics and location environment of wild-simulated ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer). *Korean J. Plant Res.* 32(5):463-470.
- Kim, K.T., K.M. Yoo, J.W. Lee, S.H. Eom, I.K. Hwang and C.Y. Lee. 2007. Protective effect of steamed American ginseng (*Panax quinquefolius* L.) on V79-4 cells induced by oxidative stress. *J. Ethnopharmacol.* 111(3):443-450.
- Kim, K.Y., C.S. Lee, S.H. Lee, J.D. Lee and G.S. Kim. 1991. Primary culture of osteoblast. *J. Korean Orthop. Assoc.* 26(6):1860-1863.
- Kim, M., B. Kim, J.D. Kim, A.R. Kang, C.E. Lee, J. Seo, D.G. Lee, J.K. Jo, Y.Y. Kim, K.H. Yu and S.H. Lee. 2017. The effects of medicinal herbs extracts on estrogen-like activities and osteoblast proliferation and differentiation. *J. Life Sci.* 27(4):456-463.
- Kim, N.J., H.M. Ryoo, H.J. Kim, Y.J. Kim and S.H. Nam. 2001. The effect of BMP regulated SMAD protein on alkaline phosphatase gene expression. *J. Korean Acad. Pediatr. Dent.* 28(2):238-246.
- Kim, S., M.J. Jeon, J. Cheon, S.H. Lee, C. Kong, Y.Y. Kim, K.H. Yu and M. Kim. 2014. Effects of *Eisenia bicyclis* extracts on the proliferation and activity of osteoblasts and osteoclasts. *J. Life Sci.* 24(3): 297-303.
- Kim, S.H., D.H. Kim and T.H. Lee. 1999. Herbal and pharmacological effects of ginseng radix and strategy for future research. *J. Ginseng Res.* 23(1):21-37.
- Kim, S.J., S.S. Shin, B.I. Seo and S.Y. Jee. 2004. Effect of mountain grown Ginseng Radix, mountain-cultivated ginseng Radix, and cultivated Ginseng Radix on apoptosis of HL-60 cells. *Korean J. Herbol.* 19(2):41-50.
- Kim, S.W. 2013. Management of osteoporosis: Who to treat, What to use, and for How long?. *Korean J. Med.* 85(4):364-373.
- Kimura, M. and J. Suzuki. 1985. The pharmacological role of ginseng in the blend effect of traditional chinese medicine in

- hyperglycemia (Advances in Chinese Medicinal Materials Research). World Scientific Publ. Co., Singapore. pp. 181-192.
- Komori, T. 2006. Regulation of osteoblast differentiation by transcription factors. *Biochem. J. Cell. Biochem.* 99:1233-1239.
- Lee, H.J. 2000. Studies on the comparison of bioactive compounds and cell cultures of *Panax ginseng* C.A. Meyer and mountain ginseng. Department of Biotechnology, MS Thesis, Ajou University, Korea.
- Lee, H.J., B.S. Yoo and S.Y. Byun. 2000. Differences in free amino acids between Korean ginseng and mountain ginseng. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 15(3):323-328.
- Lee, S.H., B.H. Jung, S.Y. Kim and B.C. Chung. 2004. Determination of phytoestrogens in traditional medicinal herbs using gas chromatography-mass spectrometry. *J. Nutr. Biochem.* 15:452-460.
- Lee, Y.S. 2001. Effect of isoflavones on proliferation and oxidative stress of MC3T3-E1 osteoblastic like cells. *Korea Soybean Digest.* 18(1):35-42.
- Martin, J.H. and J.L. Matthews. 1970. Mitochondrial granules in chondrocytes, osteoblasts and osteocytes. An ultra-structural and microincineration study. *Clin. Orthop. Relat. R.* 68:237-278.
- Min, H.Y. 2016. Mechanism of osteoblast differentiation by biological rhythm regulatory gene. Department of Biotechnology, MS Thesis, Daegu University, Korea.
- Min, Y.K. 2016. Pharmacologic treatment of osteoporosis. *J. Korean Med.* 59(11):847-856.
- Nam, K.Y. 1996. *Choishin corea insam*. Chonil Press, Seoul, Korea. pp. 4-79.
- Orcel, P. and S.M. Krane. 2000. Secondary osteoporosis and glucocorticoid include osteoporosis. *Ann. Med. Interne.* 151:497-502.
- Owen, M.E. 1985. Lineage of osteogenic cells and their relationship to the stromal system. *In* Peck, W.A. (ed.), *Bone and Mineral Research*, Elsevier Science Publisher, Amsterdam, Netherlands. pp. 1-25.
- Pan, H.Y., Y. Qu, J.K. Zhang, T.G. Kang and D.Q. Dou. 2013. Antioxidant activity of ginseng cultivated under mountainous forest with different growing years. *J. Ginseng Res.* 37: 355-360.
- Park, C.K., B.S. Jeon and J.W. Yang. 2003. The chemical components of Korean ginseng. *Food Ind. Nutr.* 8(2):10-23.
- Park, S.K. and H.S. Shin. 2001. Effects of extract of natural products on alkaline phosphatase activity of MC3T3-E1 cells. *Wonkwang Dental Medicine* 10:89-100.
- Prestwood, K.M., C.C. Pilbeam and L.G. Raisz. 1995. Treatment of osteoporosis. *Annu. Rev. Med.* 46:249-256.
- Seo, J.C., K.H. Leem and S. Han. 2004. Genetical identification of Korean wild ginseng and American wild ginseng by using pyrosequencing method. *Korean J. Herbol.* 19(4):45-50.
- Siddiqi, M.Z., M.H. Siddiqi, Y. Kim, Y. Jin, Md. A. Huq and D. Yang. 2015. Effect of fermented red ginseng extract enriched in ginsenoside Rg3 on the differentiation and mineralization of preosteoblastic MC3T3-E1 cells. *J. Med. Food* 18(5): 542-548.
- Sohn, E.H., Y.J. Yang, H.J. Koo, D.W. Park, Y.J. Kim, K.H. Jang, K.S. Nam and S.C. Kang. 2012. Effects of Korean ginseng and wild simulated cultivation ginseng for muscle strength and endurance. *Korean J. Plant Res.* 25(6):657-663.
- Stein, G.S., J.B. Lian and T.A. Owen. 1990. Relationship of cell growth to the regulation for tissue-specific gene expression during osteoblast differentiation. *FASEB J.* 4:3111-3123.
- Sudo, H., H. Kodama, Y. Amagai, S. Yamamoto and S. Kasai. 1983. *In vitro* differentiation and calcification in new clonal osteogenic cell line derived from newborn mouse calvaria. *J. Cell Biol.* 96:191-198.
- Tognarini, I., S. Sorace, R. Zonefrati, G. Galli, A. Gozzini, S. Carbonell Sala, G.D. Thyron, A.M. Carossino, A. Tanini, C. Mavilia, C. Azzari, F. Sbaiz, A. Facchini, R. Capanna and M.L. Brandi. 2008. *In vitro* differentiation of human mesenchymal stem cells on Ti6Al4V surfaces. *Biomaterials* 29: 809-824.
- Yoo, B.S., H.J. Lee and S.Y. Byun. 2000. Differences in phenolic compounds between Korean ginseng and mountain ginseng. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 15(2):120-124.
- Yoon, J.H. and J.H. Han. 2013. A study on the psychological phenomenon experienced by menopausal middle-aged women. *Korea Journal of Counseling* 14:2195-2212.
- Yun, J.H., E.S. Hwang and G.H. Kim. 2012. Effects of *Chrysanthemum indicum* L. extract on the function of osteoblastic MC3T3-E1 cells under oxidative stress induced by hydrogen peroxide. *Korean J. Food Sci. Technol.* 44(1):82-88.
- Zheng, M.Z. 2014. Effect of *Cornus officinalis* extract on the differentiation of MC3T3-E1 osteoblast-like cells. Department of Bio Dental Engineering, Ph.D. Thesis, Graduate School of Chosun University, Korea. p. 19.

(Received 16 January 2020 ; Revised 26 March 2020 ; Accepted 2 April 2020)