

# Fucoidan Reduces Cellular and Mitochondrial Injury and Improves Impaired Osteogenic Activity in MC3T3-E1 Cells Treated with Advanced Glycation End-products

Tae Hyun Kim and Jae Suk Woo\*

Department of Physiology, College of Medicine, Pusan National University, Yangsan 50612, Korea

Received August 27, 2024 / Revised September 26, 2024 / Accepted September 27, 2024

Fucoidan is a polysaccharide found in brown algae, which is known for its various bioactive effects, including immune enhancement, anti-cancer, and anti-inflammatory properties. In this study, the effects of fucoidan on cellular and mitochondrial damage, as well as changes in osteogenic and osteoclastic activities induced by advanced glycation end-products (AGEs) in MC3T3-E1 osteoblast-like cells, were investigated. Treatment with AGEs resulted in a time- and dose-dependent decrease in MTT reduction capacity, activation of caspases (-3, -8, and -9), and an increase in apoptosis. Pre-treatment with fucoidan significantly alleviated these cellular damage markers caused by AGEs. In addition, fucoidan protected against AGEs-induced mitochondrial dysfunction by significantly mitigating the loss of mitochondrial membrane potential, reduction in intracellular ATP levels, and occurrence of mitochondrial permeability transition in AGEs-treated cells. Fucoidan also markedly suppressed the production of reactive oxygen species and, lipid and protein peroxidation induced by AGEs. In cells exposed to AGEs, gene expression related to osteogenic differentiation and markers of osteogenic activity increased, while markers of osteoclastic activity decreased. Fucoidan significantly moderated these changes. In conclusion, AGEs induce mitochondrial dysfunction and apoptosis in MC3T3-E1 cells, while decreasing osteogenic differentiation and activity, and increasing osteoclastic activity. Fucoidan appears to reduce cellular and mitochondrial damage and improve osteogenic activity impaired by AGEs.

**Key words :** Advanced glycation end-products, fucoidan, mitochondrial injury, osteogenic activity, osteogenic differentiation

## 서 론

뼈는 뼈 형성(bone formation)과 뼈 흡수(bone resorption)로 대별되는 재생 과정을 통해 끊임없이 새로워진다. 오래된 뼈는 파골세포(osteoclasts)에 의해 제거되고, 조골세포(osteoblasts) 분화와 조골 활동에 의한 무기질화 과정을 통해 새로운 뼈가 추가되는데 이 과정을 '뼈 리모델링(bone remodeling)'이라고 한다[27].

당뇨병의 합병증으로 골다공증과 골관절염이 흔히 나타나는데 그 기전의 하나로 조골세포 또는 그 전구세포 수의 감소가 흔히 동반되고[6, 8, 26], 조골세포의 세포 사멸의 증가가 나타나며 이를 억제하면 병변의 진행을 완화

시킬 수 있음이 보고된 바 있는데[10, 12, 29], 이는 세포 사멸이 당뇨병 관련 뼈 질환의 병리에서 중요한 역할을 함을 시사한다.

당뇨병 환자에서 세포 사멸이 유도되는 중요한 기전 중 하나는 최종당산화물(advanced glycation end-products, AGEs)에 의한 자극이다[11, 33]. 최종당산화물은 단백질, 지질, 또는 핵산이 당 분자와 비효소적으로 결합하여 생성되는 물질이다[33]. 이는 주로 고혈당 상태에서 시간이 지나면서 축적되어 세포 기능에 손상을 주고 다양한 질환의 원인이 될 수 있으며, 산화 스트레스와 염증 반응을 유발하는 주요 요인으로 작용한다[11, 33]. 최종당산화물은 관절염에서도 중요한 역할을 할 수 있는 것으로 알려져 있는데, 관절 내 조직, 특히 연골과 활막에 축적되어 염증 반응과 산화 스트레스를 촉진함으로써 연골 손상과 관절의 퇴행을 가속화할 수 있다[5, 18, 31].

후코이단(fucoidan)은 주로 미역, 다시마 등의 갈조류에서 추출되는 물질로, 설포네이트화된 다당류(sulfonated polysaccharide)가 주요 성분이다[17]. 후코이단은 항암, 항염증, 면역력 강화 등 다양한 생리학적 작용을 나타내는

### \*Corresponding author

Tel : +82-51-510-8072, Fax : +82-51-510-8076

E-mail : [jswoo@pusan.ac.kr](mailto:jswoo@pusan.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.

것으로 보고되어 있다[1, 21, 30]. 뼈에서는 조골세포 분화와 활성성을 촉진하여 뼈 형성을 증가시키는[2, 7, 14] 반면에, 파골세포 분화와 활성성을 억제하여 뼈 흡수를 감소시키는[20, 24] 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 특히 골관절염 환자에서 염증을 줄이고 연골 손상을 방지하는 효과를 나타내며, 연골 보호와 염증 억제를 통해 질환의 진행을 늦출 수 있는 것으로 보고되었으나[15, 19, 34] 더 심도 있는 연구가 필요하다. 본 연구에서는 조골세포 유사 특성을 나타내는[25, 28] MC3T3-E1 세포에서 최종당산화물에 의해 유도되는 세포 및 미토콘드리아 손상과 조골세포 분화, 조골 활성성 변화에 미치는 후코이단의 효과를 조사하였다.

## 실험재료 및 방법

### 화학물질 및 시약

세포배양에 필요한 배지와 시약은 Gibco사 제품(Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA)을 사용하였으며, DiOC<sub>6</sub>(3) acetoxymethyl ester (DiOC<sub>6</sub>(3)/AM), 2',7'-Dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA), calcein acetoxymethyl ester (calcein/AM), 그리고 tetramethylrhodamine methyl ester (TMRM)은 Molecular Probes사(Thermo Fisher Scientific, Inc.) 제품을 사용하였다. 최종당산화물과 후코이단, 소 혈청 알부민(bovine serum albumin, BSA)과 이 외 별도로 언급하지 않은 화학 물질과 시약들은 Sigma-Aldrich Chemical사(St. Louis, MO, USA) 제품을 사용하였다.

### 세포 배양 및 최종당산화물 처리

MC3T3-E1 세포는 American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)에서 구입하였고, 열처리한 10% fetal bovine serum, 50 IU/ml 페니실린 G, 50 µg/ml 스트렙토마이신이 포함된 α-MEM 배지가 포함된 플라스틱 배양 플라스크에 배양하였다. 세포가 서로 닿을 정도로 자라면 (대략 4-5일) 0.05% 트립신/0.53 mM EDTA 용액을 사용해 세포를 분리하고, 원래 밀도의 1/5로 재분주하였다. 실험에 사용할 때에는 세포를 50 µg/ml 아스코르브산(ascorbic acid) β-글리세르인산(glycerophosphate), 10 nM 덱사메타손(dexamethasone)으로 구성된 조골세포 분화 자극제 존재 하에 5세대 이상 계대배양 하여 분화를 촉진한 후에 사용하였다. 최종당산화물과 후코이단은 모두 α-MEM을 용매로 사용하였으며 이들 물질 처리 시 음성 대조군에는 동일 양의 소 혈청 알부민 혹은 α-MEM을 첨가하였다. 최종당산화물과 후코이단의 효과를 확인하는 실험들에서는 세포를 1) 두 물질 모두 처리하지 않은 세포군(BSA 군), 2) 후코이단만 처리한 세포군(BSA+FUC 군), 3) 최종당산화물만 처리한 세포군(AGEs 군), 4) 최종당산화물과 후코이단을 함께 처리한 세포군(AGEs+FUC 군)의 4 세포

군으로 나누어 이들 물질들이 나타내는 효과를 비교 관찰하였다.

### 세포 사멸의 측정

세포 사멸은 Hoechst-33258 염색을 통해 평가하였다. 형광 현미경 분석을 위해 콜라겐으로 코팅한 6웰 플레이트에 위치한 유리 커버글라스 위에서 세포를 배양하였다. 배양 후, 실험 절차에 따라 세포를 4% 파라포름알데히드(paraformaldehyde)로 고정하였고, 5 µM Hoechst-33258가 포함된 HBSS 용액에서 37°C에서 30분간 반응시켰다. 커버글라스와 세포는 세척한 후 PBS와 글리세롤(1:1) 혼합 용액을 사용해 슬라이드 글라스에 부착하였으며, 형광 현미경으로 관찰하였다. 응축되거나 분열된 핵을 지닌 세포들을 계수하여 세포 사멸의 정도를 측정하였다.

### 카스파아제 활성의 측정

카스파아제(caspase) 활성의 정량 평가는 R&D사(Minneapolis, MN, USA)에서 제공한 발색 분석 키트를 사용하여 제조사의 지침에 따라 실시하였다. 세포를 차가운 인산완충액(phosphate buffered saline, PBS)으로 세척하고 용해시킨 후, 각 샘플에 25 ml의 반응액을 첨가하고 37°C에서 2시간 동안 반응시켰다. 반응액은 10 mM dithiothreitol과 함께 카스파아제-3, -8, -9에 각각 특이적인 형광 기질들인 Ac-DEVD-pNA, Ac-IETD-pNA, Ac-LEHD-pNA를 6 µM씩 포함하고 있었다. 카스파아제들의 단백질 분해 활성은 발광 분광기(LS50B, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA)를 사용해 여기(excitation) 파장 400 nm, 방출(emission) 파장 505 nm에서 상대적인 형광 강도를 측정하여 평가하였다.

### 미토콘드리아 막전위의 측정

미토콘드리아 막전위는 유세포분석기로 DiOC<sub>6</sub>(3) 형광 신호를 분석하여 측정하였다. DiOC<sub>6</sub>(3)/AM은 세포막을 투과하여 세포 내로 유입된 후 세포 내 에스테르 가수분해 효소(esterases)에 의해 DiOC<sub>6</sub>(3)로 분리되며, 이는 미토콘드리아 막 내부의 음전위에 비례하여 미토콘드리아 내에 축적된다. 암실에서 세포에 50 nM의 최종 농도로 DiOC<sub>6</sub>(3)/AM을 20분 동안 부하시킨 후 세포를 세척하고 PBS에 재현탁한 후, FACsort (Becton, Dickinson and Co., Franklin Lakes, NJ, USA) 유세포분석기로 분석하였다.

### ATP 농도의 측정

루시페라제가 ATP를 촉매로 사용해 루시페린을 산화하고 빛을 방출하는 원리를 이용한 루시페린-루시페라제(luciferin-luciferase) 분석법으로 세포 내 ATP 농도를 측정하였다[22]. 세포를 0.5% Triton X-100 용액에서 용해시킨 후 0.6 M 과염소산(perchloric acid) 100 µl를 가하여 산성화한 후 30분간 냉장고에 두었다. 이후 세포혼합액(cell sus-

pension)을 4 mM MgSO<sub>4</sub>, 10 mM 글루타민산칼륨(potassium glutamate)을 포함한 완충액(pH 7.4)에 희석하였다. 희석한 세포혼합액 10 µl에 20 mg/ml 루시페린-루시페라제 반응액 100 µl를 첨가하고 20초 후에 광 방출을 루미노미터(MicroLumat LB96P, Berthold Technologies GmbH & Co. KG, Bad Wildbad, Germany)로 측정하였다.

**미토콘드리아 막투과성 전이 분석**

미토콘드리아 막투과성 전이(mitochondrial permeability transition, MPT) 현상은 형광 염료인 calcein/AM과 TMRM을 사용한 이중 염색법을 사용하여 분석하였다[16]. 세포를 3 µM TMRM이 포함된 Hank's 균형염 용액(HBSS)에서 37°C에서 30분 동안 배양한 후, 0.5 µM calcein/AM을 추가로 30분 동안 처리하였다. 이후 PBS로 3번 세척한 후, PBS:글리세롤(1:1) 용액을 사용해 슬라이드 글라스에 장착하고, 공초점 현미경(Carl Zeiss, Hertfordshire, UK)으로 관찰하였다.

**반응성 산소종의 측정**

세포 내 반응성 산소종(reactive oxygen species)의 생성은 DCF 형광 분석법으로 측정하였다. 비형광 에스테르형인 DCFH-DA는 세포 내로 들어가면 세포 내 에스테라제(esterases)에 의해 DCFH로 가수분해된다. DCFH는 세포 내 반응성 산소종과 반응하여 고형광성의 2',7'-DCF로 빠르게 산화된다. 24웰 플레이트에 배양한 세포를 암실에서 30 µM의 DCFH-DA가 포함된 반응액에서 37°C에서 1시간 동안 배양하여 DCFH-DA를 부하시켰다. 세포를 세척한 후 PBS에 재현탁하고, FACsort (Becton, Dickinson and Co.) 유세포분석기를 사용하여 DCF 형광 신호를 분석하였다.

**지질 과산화 측정**

세포를 차가운 PBS로 세척한 후 끊어내어 1.15% KCl 용액에서 파쇄하였다. 지질 과산화 과정에서 형성된 malondialdehyde-bis-(dimethylacetal) 1,1,3,3-tetramethoxypropan (MDA)은 thiobarbituric acid (TBA)와 결합하여 발색 복합체를 형성한다. OXitek TBA 반응 물질 측정 키트(Zepto Metrix Co., Buffalo, NY, USA)를 사용하여 MDA 생성량을 측정하였다.

**카보닐 단백질 측정**

카보닐 단백질 생성량은 Cell Biolabs사(San Diego, CA, USA)의 Oxiselect™ 카보닐 단백질 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 키트를 사용하여 측정하였다.

**정량 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응 검사**

조골세포 분화능의 지표로 제2형 뼈형태발생단백(bone morphogenetic protein, BMP2), 알칼리 인산분해효소(alkaline phosphatase, ALP), 오스테오칼신(osteocalcin, OC), 제1형 콜라겐(collagen-I, Col-I)의 mRNA 발현 정도를 정량 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응(qRT-PCR) 검사로 분석하였다. RNA는 Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 사용하여 추출하였다. RNA를 상온에서 15분간 DNase I (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)으로 처리하여 오염 게놈 DNA를 제거하였으며, 65°C에서 10분간 25 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)로 처리하여 반응을 종결하였다. 정량 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응 검사는 LightCycler (Roche Holding AG, Basel, Switzerland)를 사용하여 SYBR Green I 형광 반응 혼합물을 이용한 LightCycler 분석법을 기반으로 시행하였다. PCR 검사에는 총 20 µl의 시료를 사용하였으며, 여기에는 SYBR Green I, Taq DNA 중합효소 반응 용액, 디옥시뉴클레오타이드 삼인산 혼합물(deoxynucleotide triphosphate mixture), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, PCR 등급의 증류수, 2 µl의 주형 DNA, 그리고 프라이머(primer)를 포함하였다. 증폭 프로그램은 95°C에서 60초간 유지(핫 스타트)하는 한 사이클을 시작으로, 95°C에서 0초 유지, 지정된 결합 온도에서 5초 유지, 72°C에서 12초 유지, 지정된 획득 온도에서 2초 유지하는 45 사이클로 구성되었다. 모든 검사는 세 번씩 수행하였으며, 음성 및 양성 대조군을 포함하였다. 글리세르알데하이드-3-인산 탈수소효소(GAPDH) mRNA를 내부 대조군으로 함께 증폭하였으며, 상대적인 mRNA 발현량을 GAPDH 발현량에 대한 비로 정량화하였다. 각 mRNA의 증폭을 위해 사용한 프라이머(primer) 서열은 Table 1에 나타내었다.

**무기질 침착의 분석**

무기질 침착(mineralization) 정도는 12웰 플레이트에서 Alizarin red S 염색을 사용하여 측정하였다. 세포를 70% (v/v) 에탄올로 1시간 동안 고정된 후, 증류수에서 40 mM

Table 1. qRT-PCR Primers

mRNA	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')
BMP2	TGGCCCATTTAGAGGAGAACC	AGGCATGATAGCCCGGAGG
ALP	GTTGCCAAGCTGGGAAGAACAC	GTTGCCAAGCTGGGAAGAACAC
OC	GAACAGACTCCGGCGCTA	AGGGAGGATCAAGTCCCG
Col I	AACATGACCAAAAACCAAAAGTG	GGGTGCACCATACTTATCCA
GAPDH	GACTTCAACAGCAACTCCCAC	TCCACCACCCTGTTGCTGTA

Alizarin red S를 사용하여 10분간 염색하였다. 이후 Alizarin red S 용액을 제거한 후, 세포를 실온에서 PBS로 15분간 회전식 혼합기에서 배양하였고, 신선한 PBS로 한 번 세척하였다. 샘플 내 Alizarin red S 염색 농도는 Alizarin red S 표준물질에서 얻은 흡광도와 비교하여 정량하였다.

**효소면역측정법**

인터루킨-6 (IL-6)와 nuclear factor-kappa B 리간드 수용체 활성 인자(receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand, RANKL)는 Quantikine Human ELISA 키트(R&D 사)를 사용하여 효소면역측정법(ELISA)으로 측정하였다.

**통계 처리**

실험 결과는 평균 ± 표준오차로 나타내었으며, 두 그룹 간의 차이는 Student's t-test를 사용하여 평가하였다. 다중 그룹 비교는 일원분산분석(ANOVA test)과 Tukey 사후테스트(Tukey post hoc test)를 사용하여 평가하였다. *p* 값이 0.05 이하일 때 통계학적으로 유의한 수준의 차이가 있는 것으로 판정하였다.

**결 과**

**최종당산화물에 의한 MTT 환원능 저해와 후코이단의 보호 효과**

최종당산화물에 의한 세포 손상을 평가하기 위해 MTT 환원능을 측정하였다. 최종당산화물로 처리한 세포에서 시간 의존적으로 MTT 환원능의 감소가 관찰되었다(Fig. 1A). 최종당산화물의 효과는 20-300 µg/ml 범위에서 농도 의존적으로 나타났다(Fig. 1B). 이후 실험에서는 최종당산

화물 처리 시 특별한 언급이 없는 경우 200 µg/ml의 농도와 48시간의 처리 시간을 사용하였다. 최종당산화물의 효과가 최종당산화물 수용체(receptors for AGEs, RAGE)와의 상호작용에 의한 것인지를 확인하기 위해 항-RAGE 항체의 효과를 확인하였다. 항-RAGE 항체로 세포를 전처리하였을 때, 최종당산화물에 의한 MTT 환원능 억제 현저히 완화되었으며, 이는 최종당산화물 효과의 상당 부분이 RAGE와의 상호작용에 의해 매개됨을 나타낸다(Fig. 1A).

후코이단을 전처리 시 최종당산화물에 의한 MTT 환원능의 감소가 유의하게 완화되었다. 후코이단의 효과는 20-100 µM 범위에서 농도 의존적으로 나타났다(Fig. 1C). 이는 배양 세포를 이용한 시험관 실험에서 보고된 세포 독성 작용을 나타내지 않으면서 여러 생물학적 작용을 나타내는 농도 범위와 일치하는 결과이며[1, 21, 30], 이후 실험에서는 후코이단을 처리 시 특별한 언급이 없는 경우 100 µg/ml의 농도를 사용하였다.

**최종당산화물에 의한 세포 사멸과 후코이단의 보호 효과**

후코이단이 최종당산화물에 의한 세포 사멸에 미치는 영향을 확인하기 위하여 Hoechst 33258 염색법으로 분석하였다. Fig. 2A와 2B의 결과에서 후코이단이 최종당산화물에 의한 세포 사멸을 현저히 억제함을 보여준다. 후코이단은 100 µg/ml의 농도에서 최종당산화물에 의한 세포 사멸을 43.6%에서 17.2%로 감소시켰다(Fig. 2B).

**최종당산화물에 의한 카스파아제 활성화와 후코이단에 의한 억제**

최종당산화물에 의한 세포 사멸과 후코이단의 억제 효

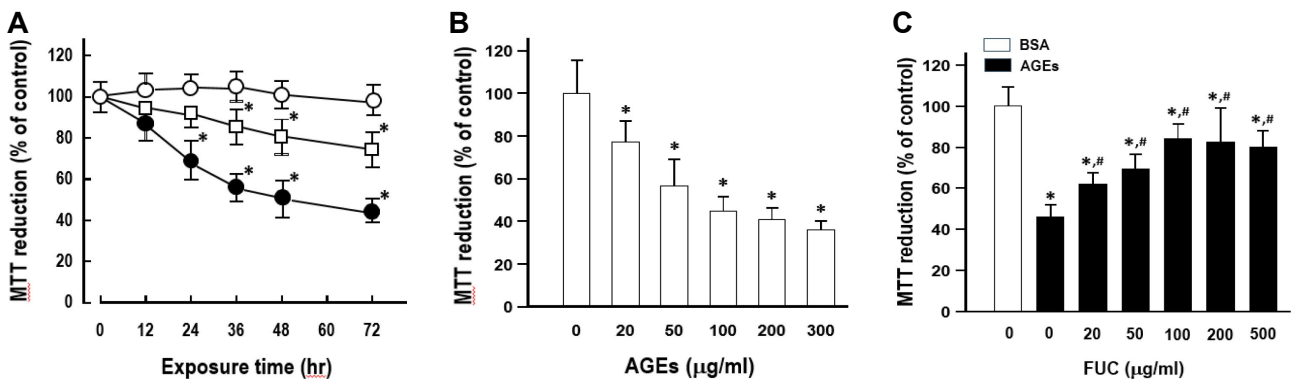


Fig. 1. Effect of AGEs and fucoidan on MTT reduction capacity. (A) Time-dependent effect of AGEs. Cells were treated with 200 mg/ml of AGEs for the indicated time periods. (B) Dose-dependent effect of AGEs on MTT reduction capacity. Cells were treated with the indicated concentrations of AGEs for 48 hr. (C) Dose-dependent effect of fucoidan on AGEs-induced inhibition of MTT reduction capacity. Cells were treated with the indicated concentrations of fucoidan in the absence and presence of 200 mg/ml of AGEs for 48 hr. Data are represented as the mean ± the standard error of the mean of 4 sets of duplicate experiments. \**p*<0.01 vs. the respective BSA control, #*p*<0.01 vs. without fucoidan. Open circle (○), BSA control; solid circle (●), with AGEs (200 mg/ml); open square (□) with AGEs (200 mg/ml) and anti-RAGE antibody (20 mg/ml). AGEs, advanced glycation end-products; BSA, bovine serum albumin; FUC, fucoidan.

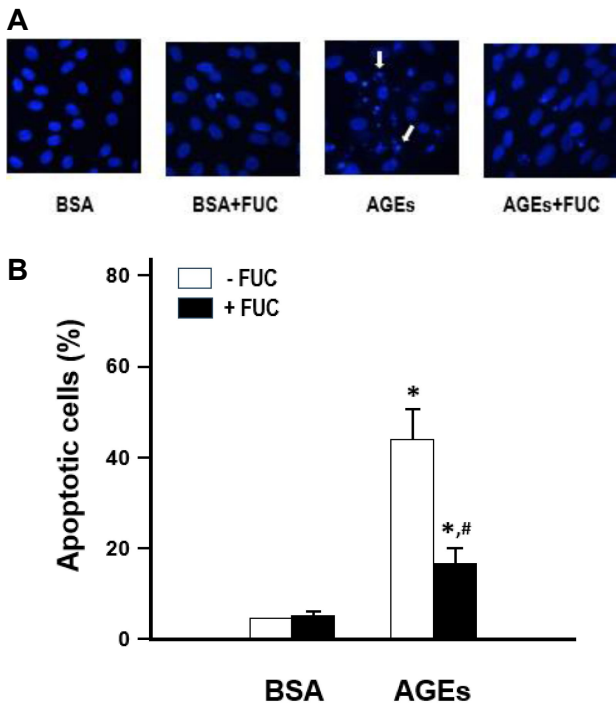


Fig. 2. AGEs-induced apoptotic cell death and its protection by fucoidan. (A) Representative micrographs from microscopic analyses of Hoechst-33258-stained cells, with arrows indicating apoptotic cells characterized by condensed or fragmented nuclei. Cells were treated with 200 mg/ml of AGEs for 48 hr in the presence and absence of 100 mg/ml of fucoidan. The cells were stained with Hoechst-33258, and then analyzed using an inverted microscope. (B) The apoptotic cell counts are presented as a percentage of total cell counts. Data are represented as the mean  $\pm$  the standard error of 4 sets of duplicate experiments. \* $p$ <0.01 vs. the respective BSA control, # $p$ <0.01 vs. AGEs alone. BSA, bovine serum albumin; FUC, fucoidan, AGEs, advanced glycation end-products.

과에 카스파아제가 관여하는지를 확인하기 위해 카스파아제-3, -8, -9의 활성 변화를 조사하였다. 최종당산화물에 노출된 세포에서 카스파아제-3와 -9의 활성화가 카스파아제-8에 비해 더 뚜렷하고 지속적으로 나타났다(Fig. 3A). 후코이단 전처리 시 최종당산화물에 의한 카스파아제 활성화가 유의하게 억제되었다(Fig. 3C).

**후코이단이 최종당산화물에 의한 미토콘드리아 막 전위 감소와 세포 내 ATP 고갈에 미치는 효과**

미토콘드리아 막 전위 감소와 세포 내 ATP 고갈은 미토콘드리아 기능 손상에 동반되는 대표적인 변화이다. 따라서 최종당산화물에 의한 세포 사멸이 미토콘드리아 막 전위 감소와 세포 내 ATP 고갈과 관련이 있는지를 확인하였다. Fig. 4A는 DiOC<sub>6</sub>(3)로 염색한 세포의 유세포 분석

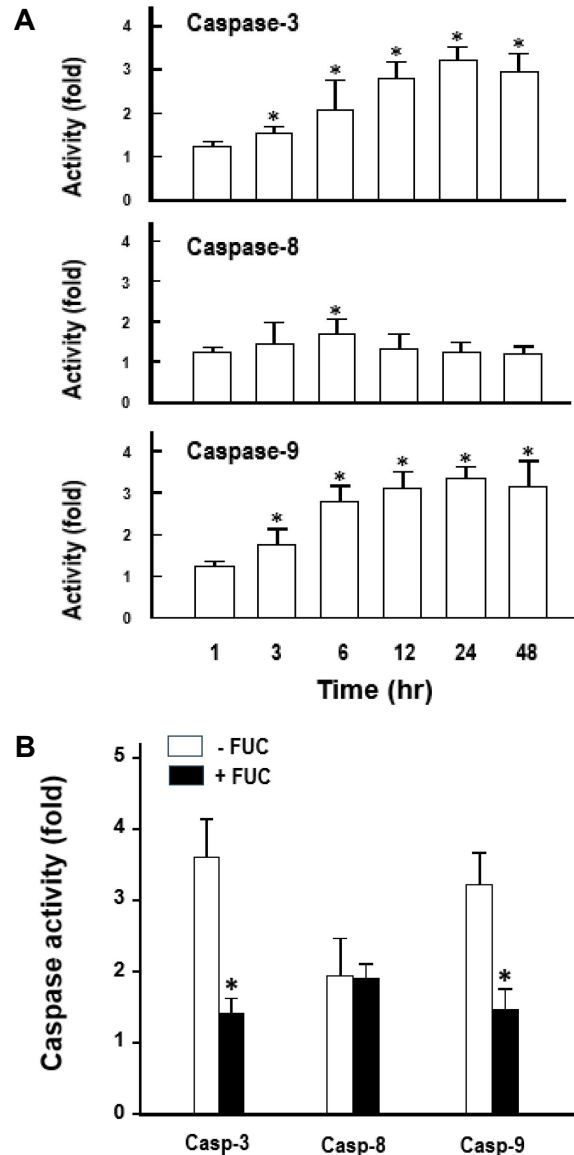


Fig. 3. AGEs-induced activation of caspases and its inhibition by fucoidan. (A) Caspase-3, -8 and -9 activities were determined in cells treated with 200 mg/ml of AGEs for indicated time periods. (B) Cells were treated with 200 mg/ml of AGEs either for 6 hr for caspase-8 or 24 hr for caspase-3 and -9, with or without 100 mg/ml of fucoidan and then caspase activities were assessed. Data are represented as the mean  $\pm$  the standard error of 4 sets of duplicate experiments. \* $p$ <0.01 vs. the respective control. FUC, fucoidan; Casp, Caspase.

결과를 보여준다. 이 그래프에서 DiOC<sub>6</sub>(3) 형광 신호가 강한 우측 영역(M2)에서 형광 신호가 약한 좌측 영역(M1)으로의 세포군 이동은 미토콘드리아 막 전위가 감소함을 의미한다. 최종당산화물은 미토콘드리아 막 전위를 현저히 감소시키는 효과를 보였으며, 후코이단은 최종당산화물에 의한 미토콘드리아 막 전위 감소를 유의하게 억제하

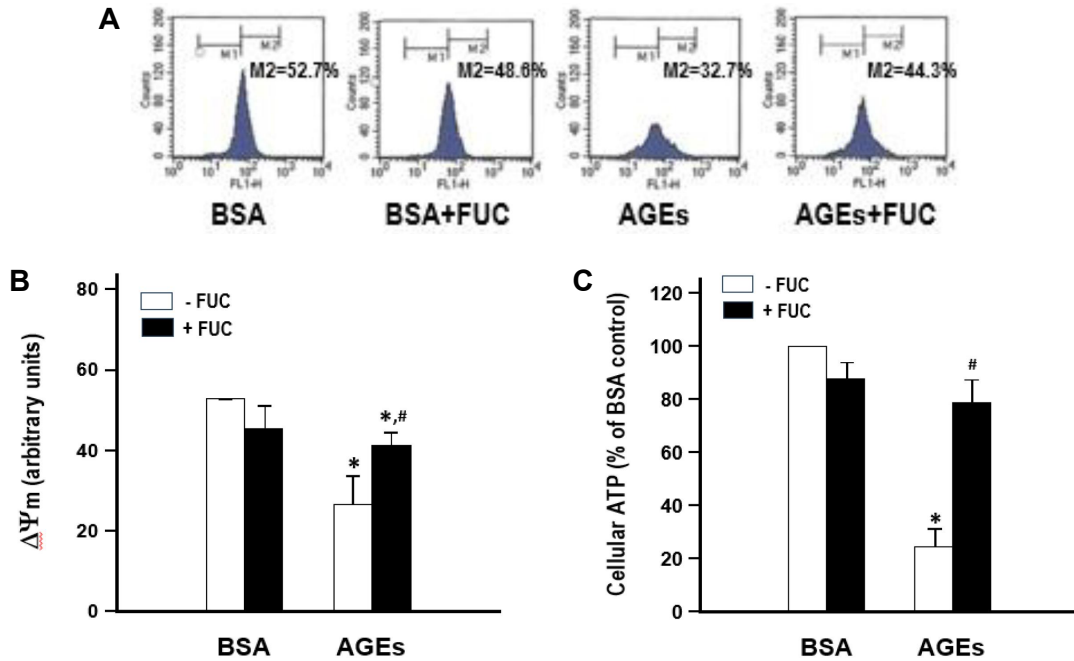


Fig. 4. AGEs-induced mitochondrial dysfunction and its protection by fucoidan assessed by mitochondrial membrane potential and ATP production. (A) Representative graphs from the flow cytometry analyses of DiOC6(3) fluorescence to measure changes in mitochondrial membrane potential. Cells were treated with 200 mg/ml of AGEs for 48 hr in the presence and absence of 100 mg/ml of fucoidan, loaded with DiOC6(3), and then analyzed by flow cytometry. (B) Mitochondrial membrane potential estimated from the flow cytometry analyses is presented in arbitrary units. (C) Cellular ATP content was measured using a luciferin-luciferase assay. Data are represented as the mean  $\pm$  the standard error of 4 sets of duplicate experiments. \* $p$ <0.01 vs. the respective BSA control, # $p$ <0.01 vs. AGEs alone. BSA, bovine serum albumin; FUC, fucoidan; AGEs, advanced glycation end-products.

였다(Fig. 4A, 4B). 또한 최종당산화물로 처리한 세포에서 세포 내 ATP 농도가 정상 세포군의 23.2%로 감소하였으며, 후코이단을 전처리 시 AGEs에 의한 ATP 농도 감소가 정상 세포군의 78.3%까지 완화되어 AGEs에 의한 ATP 고갈을 71.7% 보호하는 효과를 보였다(Fig. 4C).

**최종당산화물에 의한 미토콘드리아 막투과성 전이 유도과 후코이단에 의한 억제**

세포를 TMRM과 calcein/AM으로 이중 염색한 후 공초점 현미경으로 관찰하여 미토콘드리아 막투과성 전이의 형성을 분석하였다. 세포 내에서 TMRM과 calcein/AM은 가수분해되어 각각 TMR과 calcein으로 변환된다. 무결성의 미토콘드리아를 가진 세포에서는 양전하를 띤 TMR이 음 전위를 가진 미토콘드리아 내에 축적되지만, calcein은 미토콘드리아 막을 투과하지 못한다. Fig. 5A에 나타난 사진에서, 무결성 미토콘드리아들은 TMR 축적으로 인해 밝은 주황색 점들로 나타난다. 반면, 손상된 미토콘드리아는 막전위가 감소하고 선택적 투과성이 사라져 그 결과 TMR이 소실되고 calcein이 미토콘드리아 막을 투과하여 축적되어 그 윤곽이 흐려지거나 사라진다. 최종당산화물로 48시간 처리 후 미토콘드리아 막투과성 전이 과정이

유도된 세포 수가 38.2%로 증가하였으며, 후코이단은 이를 유의하게 억제하여 12.8%로 감소시켰다(Fig. 5B).

**최종당산화물에 의한 반응성 산소종과 과산화산물 생성 증가 및 이에 미치는 후코이단의 억제 효과**

후코이단이 최종당산화물을 처리한 세포에서 세포와 미토콘드리아 손상을 완화하는 효과가 항산화 작용과 관련이 있는지를 확인하기 위해 반응성 산소종의 생성과 과산화산물의 생성 변화를 평가하였다. 최종당산화물을 처리한 세포에서는 반응성 산소종의 생성이 현저히 증가하였으며(Fig. 6A), 이러한 효과는 후코이단 전처리에 의해 유의하게 억제되었다. 또한 과산화산물로 MDA와 카보닐 단백(CaPr) 생성을 평가하였는데, 최종당산화물은 MDA와 CaPr 생성을 현저히 증가시킨 반면에, 후코이단은 이를 유의하게 억제하였다(Fig. 6B, 6C).

**최종당산화물에 의한 조골세포 분화 억제와 후코이단의 효과**

최종당산화물과 후코이단이 조골세포 분화에 미치는 영향을 평가하기 위하여, 세포를 아스코르브산을 포함한 조골세포 분화 자극제와 함께 5-6회 계대배양 하고 정량 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응 검사를 통해 조골세포



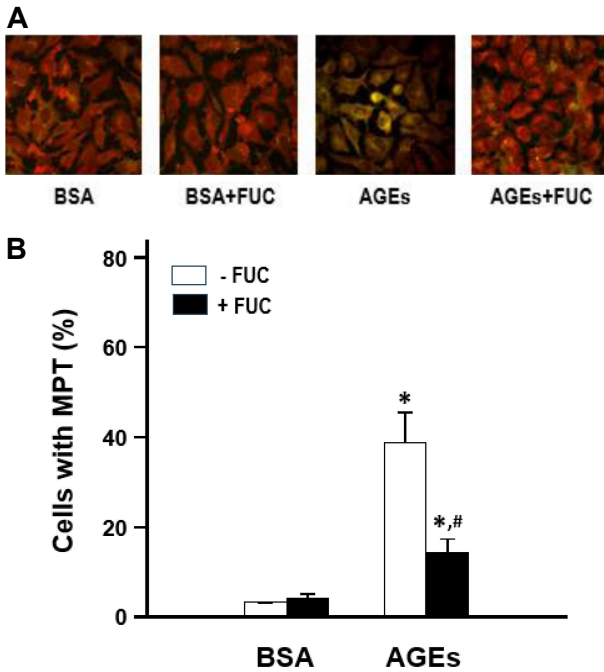


Fig. 5. AGEs-induced mitochondrial permeability transition and its protection by fucoidan. (A) Confocal microscopic images showing cells with intact mitochondria and cells with MPT. Cells were treated with 200 mg/ml of AGEs for 48 hr in the presence or absence of 100 mg/ml of fucoidan. The cells were then double-stained with TMRM and calcein-AM, and analyzed using a confocal microscope. (B) Cells with MPT were counted and were presented as a percentage of total cell counts. Data are represented as the mean  $\pm$  the standard error of 4 sets of duplicate experiments. \* $p$ <0.01 vs. the respective BSA control, # $p$ <0.01 vs. AGEs alone. MPT, mitochondrial permeability transition; BSA, bovine serum albumin; FUC, fucoidan; AGEs, advanced glycation end-products.

분화를 나타내는 지표 유전자들의 mRNA 발현을 분석하였다. BSA로 처리한 대조 세포군과 비교하여, 최종당산화물로 처리한 세포군에서 BMP2, ALP, OC, Col-I mRNA의 발현이 현저히 감소하였다. 그러나 후코이단을 전처리한 세포군에서는 최종당산화물에 의한 이들 지표 mRNA들의 발현 억제가 유의하게 완화되었다(Fig. 7A-7D). 또한 후코이단은 BSA로 처리한 대조군 세포에서도 BMP2, ALP, OC mRNA 발현을 증가시키는 효과를 보였다(Fig. 7A-7C).

#### 최종당산화물에 의한 조골 및 파골 활동성 지표 변화에 미치는 후코이단의 효과

알칼리 인산분해효소 활성과 무기물 침착을 조골 활동성의 기능적 지표로 측정하였다. 최종당산화물을 처리한 세포에서 이들 조골 활동성 지표들이 현저히 억제되어

있었으며, 후코이단 전처리 시 이러한 억제 효과가 유의하게 차단되었다(Fig. 8A, 8B) 이는 앞선 mRNA 발현에서 관찰된 것과 일관된 결과이다. MC3T3-E1 세포는 산화 스트레스에 노출되면 파골 활동성과 관련된 지표들의 발현이 증가하는 것으로 알려져 있다[25, 28]. 최종당산화물로 처리한 세포 배양액에서 파골 활동성과 관련된 대표적 지표들인 IL-6와 RANKL을 ELISA 검사로 측정하였다. 그 결과 최종당산화물로 처리한 세포군에서 IL-6와 RANKL의 분비가 현저히 증가하였으며, 후코이단은 이를 유의하게 억제하였다(Fig. 8C, 8D).

## 고 찰

본 연구에서는 MC3T3-E1 세포에서 최종당산화물에 의해 유도되는 세포와 미토콘드리아 손상, 조골 및 파골 활동성의 변화와 이들에 미치는 후코이단의 보호 효과를 조사하였다. MC3T3-E1 세포는 조골세포와 유사한 생물학적 특성을 보이는 세포로 뼈 형성과 관련된 생리 혹은 병리 연구에 적합한 세포 모델이 될 수 있음은 잘 알려져 있다[25, 28]. 본 연구에서도 MC3T3-E1 세포를 아스코르브산을 포함한 분화 자극제를 처리하여 5-6 세대 계대배양 하면 조골세포 분화와 조골 활동성을 나타내는 유전자와 지표 발현이 증가함을 확인할 수 있었다(Fig. 7A-7D, Fig. 8A, 8B).

최종당산화물은 골다공증, 골관절염 등의 병인에도 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 최종당산화물은 조골세포와 같은 뼈 조직의 세포에 축적되어 세포 사멸(apoptosis)을 유도하고, 이는 뼈 형성의 감소와 뼈 소실을 초래할 수 있다. 또한, 산화 스트레스를 증가시키고 염증 반응을 촉진하여 파골세포의 활성을 높여 뼈 소실을 가속화한다[5, 18, 31]. 본 연구 결과에서 최종당산화물이 MTT 환원능의 저하와 함께 세포 사멸의 증가, 카스파아제의 활성화를 유도함을 관찰할 수 있었다(Fig. 1-3). 이러한 결과는 최종당산화물이 조골세포의 세포 사멸을 유도하여 골다공증 및 골관절염과 같은 뼈 질환에서 중요한 병리학 적 요인으로 작용할 수 있음을 시사한다.

최종당산화물의 세포 내 작용 기전은 주로 RAGE를 통한 신호전달 경로를 통해 이루어진다. RAGE는 최종당산화물과 결합하여 산화 스트레스, 염증성 사이토카인 분비 및 세포 사멸을 유도하는데[4, 32], 이는 결국 뼈의 재형성 과정에서 조골세포의 사멸을 촉진하고, 파골세포의 활성을 증가시켜 뼈 소실을 가속화하는 결과를 초래한다. 본 연구 결과에서도 항-RAGE 항체로 세포를 전처리하였을 때, 최종당산화물에 의한 세포 손상이 현저히 완화되었으며, 이는 최종당산화물 효과의 상당 부분이 RAGE와의 상호작용에 의해 매개됨을 확인해 주는 결과이다(Fig. 1A).

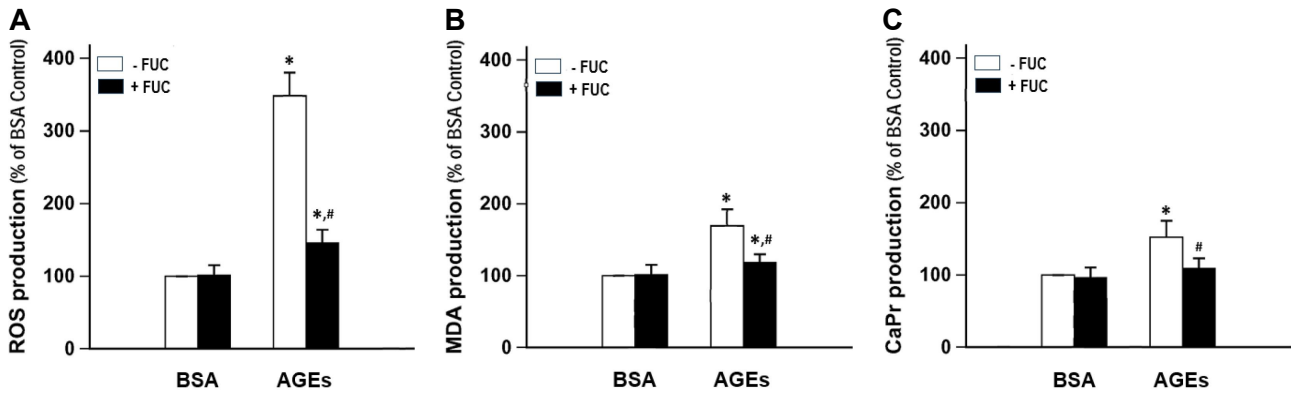


Fig. 6. AGEs-induced ROS and oxidized product accumulation and its inhibition by fucoidan. Cells were treated with 200  $\mu$ g/ml of AGEs for 48 hr in the presence and absence of 100  $\mu$ g/ml fucoidan. (A) ROS production was measured by flow cytometric analysis of DCF fluorescence. (B) Lipid peroxidation was assessed by measuring MDA production by colorimetric analysis. (C) CaPr formation was determined by ELISA. Data are represented as the mean  $\pm$  the standard error of 4 sets of duplicate experiments. \* $p$ <0.01 vs. the respective BSA control, # $p$ <0.01 vs. AGEs alone. ROS, reactive oxygen species; MDA, malondialdehyde; CaPr, carbonyl protein; BSA, bovine serum albumin; FUC, fucoidan; AGEs, advanced glycation end-products.

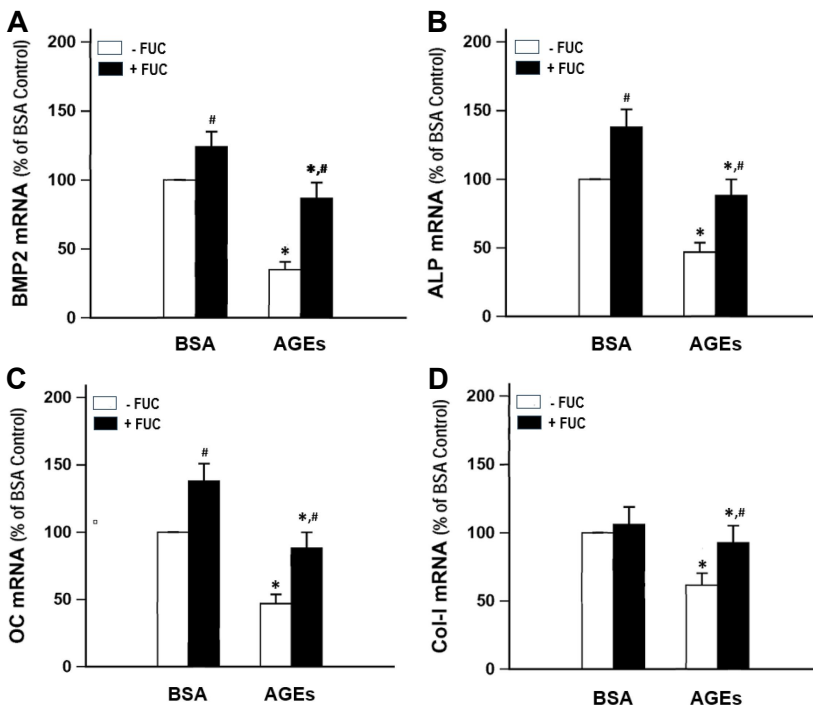


Fig. 7. Effects of AGEs and fucoidan on the expression levels of osteogenic differentiation specific genes. (A-D) Cells were treated with 200  $\mu$ g/ml of AGEs for 48 hr in the presence and absence of 100  $\mu$ g/ml fucoidan and mRNA expression was assessed by qRT-PCR analysis. Expression level was normalized to GAPDH and presented as % of the BSA control without fucoidan. Data are represented as the mean  $\pm$  the standard error of 4 sets of duplicate experiments. \* $p$ <0.01 vs. the respective BSA control, # $p$ <0.01 vs. AGEs alone. BSA, bovine serum albumin; AGEs, advanced glycation end-products; FUC, fucoidan; BMP2, bone morphogenetic protein 2; ALP, alkaline phosphatase; OC, osteocalcin; Col-I, collagen-I.

본 연구에서 후코이단이 최종당산화물에 의해 유도된 세포 손상을 완화하는 효과를 나타냄을 확인할 수 있었다. 후코이단을 전처리한 세포에서는 최종당산화물에 의한 MTT 환원능 저해가 현저히 완화되었으며, 카스파아제 활성화, 세포 사멸 또한 유의하게 방지하는 효과를 보였다(Fig. 1-3). 이러한 결과는 후코이단이 최종당산화물로 인해 유도된 세포 사멸 경로를 차단함으로써 세포 생존성을 유지하는 보호 효과가 있음을 나타낸다. 후코이단의 세포 보호 효과는 최종당산화물로 인한 뼈 손상 및 뼈

질환의 예방 및 치료에서 중요한 역할을 할 수 있음을 시사한다.

후코이단은 최종당산화물에 의한 미토콘드리아 손상에 대해서도 보호 효과를 보였다. 최종당산화물 처리 후 미토콘드리아 막전위의 감소와 세포 내 ATP 농도의 저하가 관찰되었으며(Fig. 4), 미토콘드리아 막투과성 전이 현상이 유도되었다(Fig. 5). 이러한 미토콘드리아의 기능적 손상은 세포의 에너지 대사를 저해하고, 세포 사멸을 촉진하는 중요한 기전 중 하나로 조골세포의 생존성을 저해



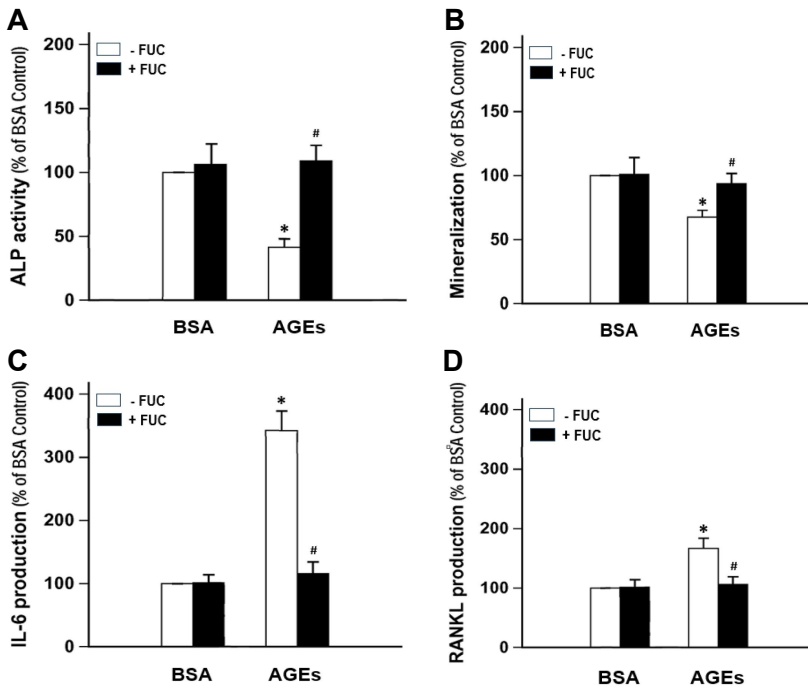


Fig. 8. Effects of AGEs and fucoidan on osteogenic and osteoclastic activity markers. Cells were treated with 200 µg/ml of AGEs for 48 hr in the presence and absence of 100 µg/ml fucoidan. (A) ALP activity was determined by a colorimetric method with a commercial kit. (B) Assay for mineralized matrix formation was determined by ARS staining. (C, D) ELISA analysis was performed to measure IL-6 (C) and RANKL (D). Data are represented as the mean ± the standard error of 4 sets of duplicate experiments. \**p*<0.01 vs. the respective BSA control, #*p*<0.01 vs. AGEs alone. BSA, bovine serum albumin; AGEs, advanced glycation end-products; FUC, fucoidan; ALP, alkaline phosphatase; IL-6, interleukin-6; RANKL, receptor activator of nuclear factor-κB ligand.

하고, 뼈 형성에 부정적인 영향을 미칠 수 있다[3, 9]. 후코이단을 전처리한 세포에서는 최종당산화물로 인한 미토콘드리아 막전위의 감소가 현저히 억제되었으며, ATP 농도 감소도 완화되었다(Fig. 4). 또한, 후코이단은 미토콘드리아 막투과성 전이를 억제하여(Fig. 5) 미토콘드리아의 기능 손상을 보호하는 결과를 보였다. 이러한 결과는 후코이단이 미토콘드리아 기능의 유지에 중요한 역할을 하며, 이를 통해 최종당산화물로 인한 미토콘드리아 손상과 세포 사멸을 완화하는 효과가 있음을 나타낸다.

최종당산화물은 또한 세포 내 활성산소종의 생성을 촉진하여 산화 스트레스를 증가시키고, 지질 및 단백질의 과산화를 유도한다. 반응성 산소종은 세포 내에서 다양한 손상을 유발할 수 있으며, 특히 미토콘드리아 기능 손상 및 세포 사멸의 중요한 원인으로 작용한다. 본 연구에서도 최종당산화물 처리 후 반응성 산소종 생성과 지질 및 단백질 과산화가 증가함을 확인할 수 있다(Fig. 6), 이는 세포 내 산화적 손상이 증가했음을 의미한다. 이러한 산화 스트레스는 뼈 질환에서 조골세포와 파골세포의 균형을 깨뜨려 뼈 손실을 가속화할 수 있다. 후코이단은 최종당산화물로 인해 증가한 반응성 산소종의 생성을 억제하였으며, 지질 및 단백질 과산화 또한 현저히 감소시켰다. 후코이단의 항산화 효과는 최종당산화물로 인해 유도된 산화 스트레스를 완화하고, 이를 통해 세포와 미토콘드리아의 손상을 줄이는 데 중요한 역할을 할 수 있다. 이러한 항산화 작용은 후코이단이 최종당산화물 관련 뼈 질환에서 보호 효과를 나타내는 중요한 기전 중 하나로 작용할 수 있음을 시사한다.

본 연구에서는 최종당산화물로 처리한 세포에서 후코이단이 세포 사멸과 미토콘드리아 손상을 보호하는 효과 외에 조골세포 분화능과 조골 활동성을 유지하는 데 도움을 줄 수 있음을 확인할 수 있었다. 본 연구에 사용한 MC3T3-E1 세포는 조골세포 분화 자극 용액이 존재하는 환경에서 5-6번의 세대배양 과정을 거치면 조골세포 분화 지표 유전자인 BMP2, ALP, OC, Col-1의 mRNA 발현이 높게 나타남을 확인할 수 있다(Fig. 7). 최종당산화물로 처리한 세포에서는 이러한 유전자들의 발현이 현저하게 억제되었다(Fig. 8). 조골 활동도의 지표로 알칼리 인산분해효소 활성과 무기질 침착을 측정된 결과도 mRNA 발현의 변화와 일치하는 결과를 보였다(Fig. 8A, 8B). 이러한 결과는 최종당산화물이 조골세포의 세포 사멸을 유도할 뿐만 아니라 조골세포 분화와 조골 활동성을 억제함을 나타낸다. 후코이단을 전처리했을 때, 최종당산화물로 인한 조골세포 분화와 조골 활동성의 억제 효과가 유의하게 완화되었다. 한편 후코이단은 최종당산화물을 처리하지 않은 세포에서도 BMP, ALP, OC 등 조골세포 분화 지표 mRNA의 발현을 증가시키는 효과를 보인 점도 주목할 만하다.

RANKL은 파골세포의 형성, 융합, 활성화 및 생존을 조절하는 주요 신호로, 결국 뼈 흡수와 뼈 손실을 초래한다[13, 23]. 따라서 RANKL 분비 억제는 다수의 질병에서 뼈 파괴를 예방하고 골다공증, 치주 질환 및 류마티스 관절염과 같은 뼈 질환을 치료 혹은 완화하는 표적이 될 수 있다[13, 23]. 본 연구에서 ELISA 분석 결과, 최종당산화물로 처리한 세포에서 IL-6와 RANKL의 분비가 증가하

였으며, 후코이단은 이를 유의하게 억제하였다(Fig. 8C, 8D). 이러한 결과는 후코이단이 최종당산화물로 유도된 파골세포 분화와 파골 활동성을 억제하는 효과도 있음을 시사한다.

결론적으로 본 연구에서는 후코이단이 최종당산화물에 의해 유도되는 조골세포의 세포 사멸과 미토콘드리아 손상, 산화성 손상 및 조골 활동성 저하를 효과적으로 완화할 수 있음을 보였다. 이러한 결과는 후코이단이 당뇨병과 관련된 뼈 질환, 특히 골다공증과 골관절염의 완화 치료를 위한 잠재적 도구가 될 수 있음을 시사한다.

### 감사의 글

이 과정은 부산대학교 기본연구지원사업(2년)에 의하여 연구되었음.

### The Conflict of Interest Statement

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

### References

1. Apostolova, E., Lukova, P., Baldzhieva, A., Katsarov, P., Nikolova, M., Iliev, I., Peychev, L., Trica, B., Oancea, F., Delattre, C. and Kokova, V. 2020. Immunomodulatory and anti-inflammatory effects of fucoidan: A review. *Polymers* **12**, 2338.
2. Carson, M. A. and Clarke, S. A. 2018. Bioactive compounds from marine organisms: potential for bone growth and healing. *Mar. Drugs* **16**, 340.
3. Cheung, C., Tu, S., Feng, Y., Wan, C., Ai, H. and Chen, Z. 2024. Mitochondrial quality control dysfunction in osteoarthritis: Mechanisms, therapeutic strategies & future prospects. *Arch. Gerontol. Geriatr.* **125**, 105522.
4. Chhipa, A. S., Borse, S. P., Baksi, R., Lalotra, S. and Nivsarkar, M. 2019. Targeting receptors of advanced glycation end products (RAGE): Preventing diabetes induced cancer and diabetic complications. *Pathol. Res. Pract.* **215**, 152643.
5. Courties, A., Gualillo, O., Berenbaum, F. and Sellam, J. 2015. Metabolic stress-induced joint inflammation and osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* **23**, 1955-1965.
6. de Araújo, I. M., Moreira, M. L. M. and de Paula, F. J. A. 2022. Diabetes and bone. *Arch. Endocrinol. Metab.* **66**, 633-641.
7. Devi, G. V. Y., Nagendra, A. H., Shenoy, P. S., Chatterjee, K. and Venkatesan, J. 2022. Fucoidan-incorporated composite scaffold stimulates osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells for bone tissue engineering. *Mar. Drugs* **20**, 589.
8. Farr, J. N. and Khosla, S. 2016. Determinants of bone strength and quality in diabetes mellitus in humans. *Bone* **82**, 28-34.
9. Fernández-Moreno, M., Rego-Pérez, I. and Blanco, F. J. 2022. Is osteoarthritis a mitochondrial disease? What is the evidence. *Curr. Opin. Rheumatol.* **34**, 46-53.
10. He, H., Liu, R., Desta, T., Leone, C., Gerstenfeld, L. and Graves, D. 2004. Diabetes causes decreased osteoclastogenesis, reduced bone formation, and enhanced apoptosis of osteoblastic cells in bacteria stimulated bone loss. *Endocrinology* **145**, 447-452.
11. Khalid, M., Petroianu, G. and Adem, A. 2022. Advanced glycation end products and diabetes mellitus: mechanisms and perspectives. *Biomolecules* **12**, 542.
12. Khan, M. P., Singh, A. K., Joharapurkar, A. A., Yadav, M., Shree, S., Kumar, H., Gurjar, A., Mishra, J. S., Tiwari, M. C., Nagar, G. K., Kumar, S., Ramachandran, R., Sharan, A., Jain, M. R., Trivedi, A. K., Maurya, R., Godbole, M. M., Gayen, J. R., Sanyal, S. and Chattopadhyay, N. 2015. Pathophysiological mechanism of bone loss in type 2 diabetes involves inverse regulation of osteoblast function by PGC-1 $\alpha$  and skeletal muscle atrogenes: AdipoR1 as a potential target for reversing diabetes-induced osteopenia. *Diabetes* **64**, 2609-2623.
13. Komori, T. 2016. Cell death in chondrocytes, osteoblasts, and osteocytes. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, 2045.
14. Kwack, K. H., Ji, J. Y., Park, B. and Heo, J. S. 2022. Fucoidan polydopamine composite-modified surface promotes osteogenic potential of periodontal ligament stem cells. *Mar. Drugs* **20**, 181.
15. Lee, D. G., Park, S. Y., Chung, W. S., Park, J. H., Hwang, E., Mavlonov, G. T., Kim, I. H., Kim, K. Y. and Yi, T. H. 2015. Fucoidan prevents the progression of osteoarthritis in rats. *J. Med. Food* **18**, 1032-1041.
16. Lemasters, J. J., Nieminen, A. L., Qian, T., Trost, L. C., Elmore, S. P., Nishimura, Y., Crowe, R. A., Cascio, W. E., Bradham, C. A., Brenner, D. A. and Herman, B. The mitochondrial permeability transition in cell death: A common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. 1998. *Biochim. Biophys. Acta* **1366**, 177-196.
17. Li, B., Lu, F., Wei, X. and Zhao, R. 2008. Fucoidan: structure and bioactivity. *Molecules* **13**, 1671-1695.
18. Li, Q., Wen, Y., Wang, L., Chen, B., Chen, J., Wang, H. and Chen, L. 2021. Hyperglycemia-induced accumulation of advanced glycosylation end products in fibroblast-like synoviocytes promotes knee osteoarthritis. *Exp. Mol. Med.* **53**, 1735-1747.
19. Li, T., Yang, J., Weng, C., Liu, P., Huang, Y., Meng, S., Li, R., Yang, L., Chen, C. and Gong, X. 2021. Intra-articular injection of anti-inflammatory peptide-loaded glycol chitosan/fucoidan nanogels to inhibit inflammation and attenuate osteoarthritis progression. *Int. J. Biol. Macromol.* **170**, 469-478.
20. Lu, S. H., Hsia, Y. J., Shih, K. C. and Chou, T. C. 2019. Fucoidan prevents RANKL-stimulated osteoclastogenesis and LPS-induced inflammatory bone loss via regulation of Akt/GSK3 $\beta$ /PTEN/NFATc1 signaling pathway and cal-

- cincurin activity. *Mar. Drugs* **17**, 345.
21. Luthuli, S., Wu, S., Cheng, Y., Zheng, X., Wu, M. and Tong, H. 2019. Therapeutic effects of fucoidan: A review on recent studies. *Mar. Drugs* **17**, 487.
  22. Lyman, G. E. and DeVincenzo, J. P. 1967. Determination of picogram amounts of ATP using the luciferin-luciferase enzyme system. *Anal. Biochem.* **21**, 435-443.
  23. Muratovic, D., Atkins, G. J. and Findlay, D. M. 2024. Is RANKL a potential molecular target in osteoarthritis? *Osteoarthritis Cartilage* **32**, 493-500.
  24. Park, B., Yu, S. N., Kim, S. H., Lee, J., Choi, S. J., Chang, J. H., Yang, E. J., Kim, K. Y. and Ahn, S. C. 2022. Inhibitory effect of biotransformed-fucoidan on the differentiation of osteoclasts induced by receptor for activation of nuclear factor- $\kappa$ B ligand. *J. Microbiol. Biotechnol.* **32**, 1017-1025.
  25. Quarles, L. D., Yohay, D. A., Lever, L. W., Caton, R. and Wenstrup, R. J. 1992. Distinct proliferative and differentiated stages of murine MC3T3-E1 cells in culture: an in vitro model of osteoblast development. *J. Bone Miner. Res.* **7**, 683-690.
  26. Rachner, T. D., Khosla, S. and Hofbauer, L. C. 2011. Osteoporosis: now and the future. *Lancet* **377**, 1276-1287.
  27. Raggatt, L. J. and Partridge, N. C. 2010. Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. *J. Biol. Chem.* **285**, 25103-25108.
  28. Sadofev, L. A. and Podgornaia, O. I. 1999. Differentiation of osteogenic cells in culture. *Tsitologiya* **41**, 876-884.
  29. Sanches, C. P., Vianna, A. G. D. and Barreto, F. C. 2017. The impact of type 2 diabetes on bone metabolism. *Diabetol. Metab. Syndr.* **9**, 85.
  30. Sanjeeva, K. K. A., Herath, K. H. I. N. M., Yang, H. W., Choi, C. S. and Jeon, Y. J. 2021. Anti-inflammatory mechanisms of fucoidans to treat inflammatory diseases: A review. *Mar. Drugs* **19**, 678.
  31. Saudek, D. M. and Kay, J. 2003. Advanced glycation end-products and osteoarthritis. *Curr. Rheumatol. Rep.* **5**, 33-40.
  32. Taguchi, K. and Fukami, K. 2023. RAGE signaling regulates the progression of diabetic complications. *Front. Pharmacol.* **14**, 1128872.
  33. Twarda-Clapa, A., Olczak, A., Białkowska A. M. and Koziolkiewicz, M. 2022. Advanced glycation end-products (AGEs): Formation, chemistry, classification, receptors, and diseases related to AGEs. *Cells* **11**, 1312.
  34. Vaamonde-García, C., Capelo-Mera, E., Flórez-Fernández, N., Torres, M. D., Rivas-Murias, B., Mejide-Fáilde, R., Blanco, F. J. and Domínguez, H. 2022. In vitro study of the therapeutic potential of brown crude fucoidans in osteoarthritis treatment. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, 14236.

## 초록 : MC3T3-E1 세포에서 최종당산화물에 의한 세포와 미토콘드리아 손상, 조골세포 분화능, 조골 및 파골 활동성 변화에 미치는 후코이단의 효과

김태현 · 우재석\*

(부산대학교 의과대학 생리학교실)

후코이단(fucoidan)은 갈조류에서 발견되는 다당류로, 면역 증강, 항암, 항염증 등 다양한 생리 활성을 나타내는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 조골세포(osteoblast)와 유사한 생물학적 특성을 지닌 MC3T3-E1 세포에서 최종당산화물에 의해 유도되는 세포와 미토콘드리아 손상, 조골세포 분화, 조골 및 파골 활동성의 변화에 미치는 후코이단의 효과를 관찰하였다. 최종당산화물로 처리한 세포군에서는 MTT 환원능의 감소와 함께 카스파아제(caspase)의 활성화, 세포 사멸의 증가가 관찰되었다. 후코이단을 사전 처리하면 최종당산화물에 의한 이들 세포 손상 지표들이 현저히 완화되었다. 후코이단은 또한 최종당산화물에 의해 유도된 미토콘드리아 막 전위 감소, 세포 내 ATP 고갈, 미토콘드리아 막 투과성 전이 (mitochondrial permeability transition) 형성을 유의하게 억제하여, 미토콘드리아의 기능적 손상을 완화하는 효과를 보였다. 최종당산화물로 처리한 세포군에서는 반응성 산소종(reactive oxygen species)과 과산화 지질 및 과산화 단백질의 생성이 현저히 증가하였으며, 후코이단은 이를 유의하게 억제하였다. 조골세포 분화능의 지표로 뼈형태발생단백-2(bone morphogenetic protein, BMP2), 알칼리 인산분해효소(alkaline phosphatase, ALP), 오스테오칼신 (osteocalcin, OC), 제1형 콜라겐(collagen-I, Col-I)의 mRNA 발현 정도를 정량 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응(qRT-PCR) 검사로 분석한 결과 최종당산화물로 처리 시 이들 mRNA들의 발현이 현저히 감소하였으며, 후코이단은 이들 지표 mRNA들의 발현 감소를 유의하게 차단하였다. 조골 활동성 (osteogenic activity)의 지표로 알칼리 인산분해효소 활성과 무기질 침착을 측정된 결과도 mRNA 발현의 변화와 일치하는 결과를 보였다. 반면에 파골 활동성(osteoclastic activity)을 나타내는 지표들인 인터루킨-6(interleukin-6)와 NF- $\kappa$ B 리간드 수용체 활성 인자(receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand, RANKL)의 분비는 최종당산화물로 처리한 세포군에서 증가하였으며, 후코이단은 이를 유의하게 억제하였다. 이상의 결과를 종합하면 후코이단은 MC3T3-E1 세포에서 최종당산화물에 의해 유도되는 세포 및 미토콘드리아 손상과 조골세포 분화 저해, 조골 활동성 저하를 완화하는 효과를 나타내는 것으로 사료된다.