감국(*Chrysanthemum indicum* L.) 추출물이 H₂O₂로 유도한 산화적 스트레스에서 MC3T3-E1 조골세포 기능에 미치는 영향

윤지혜 · 황은선¹ · 김건희*

덕성여자대학교 식품영양학과, ¹한경대학교 영양조리과학과

Effects of *Chrysanthemum indicum* L. Extract on the Function of Osteoblastic MC3T3-E1 Cells under Oxidative Stress Induced by Hydrogen Peroxide

Jee Hye Yun, Eun-Sun Hwang¹, and Gun-Hee Kim*

Department of Food and Nutrition, Duksung Women's University

¹Department of Nutrition and Culinary Science, Hankyong National University

Abstract *Chrysanthemum indicum* L. (Asteraceae) is a traditional herbal medicine that has been used for the treatment of inflammation, hypertension, and respiratory diseases due to its strong antagonistic activity against inflammatory cytokines. The effects of *Chrysanthemum indicum* L. Extract (CIE) for increasing cell growth, alkaline phosphatase (ALP) activity, and collagen content were totally inhibited, suggesting that the effect of CIE might be partly involved with estrogen activity. Furthermore, the protective effects of CIE on the response of osteoblasts to oxidative stress were evaluated. Osteoblastic MC3T3-E1 cells were incubated with hydrogen peroxide and/or CIE, and markers of osteoblast function and oxidative damage were examined. CIE significantly increased cell survival, ALP activity, and calcium deposition, and decreased the production of Reactive Oxygen Species (ROS) and Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) in osteoblasts. Taken together, these results indicate that the enhancement of osteoblast function by CIE may prevent osteoporosis and inflammatory bone diseases.

Keywords: *Chrysanthemum indicum* L., osteoblast, MC3T3-E1 cell, oxidative stress, hydrogen peroxide

서 론

활성산소(reactive oxygen species, ROS)는 산소의 환원 대사물로서 미토콘드리아나 peroxisome 등의 정상 세포 내 대사과정이나 세포질 내 효소들의 작용으로 내부로부터 형성되거나, 다양한 외부 요소에 의해 형성된다(1,2). 활성산소는 화학적 반응성이 매우 강한 물질로 세포구성 성분인 DNA, 단백질, 지질 등에 대하여 비선택적, 비가역적 파괴 작용을 함으로써 암을 비롯하여 뇌졸중, 파킨슨씨병 등의 뇌질환과 심장질환, 동맥경화, 염증 등의 각종 질병과 노화를 야기시키는 것으로 알려져 있다(1,2). 특히 과산화수소(H₂O₂)는 조골세포에서 DNA합성의 감소와(3) 석회화 과정에 관여하는 ALP 및 석회화된 골기질(mineralized bone matrix)의 활성을 감소시키며(4,5), 염증성 매개물질로 작용하는 cytokine인 tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6(IL-6), nitric oxide(NO) 등의 생성을 촉진하여 세포 독성을 유발하는 것으로 보고되고 있다(6).

골조직은 조골세포(osteoblast), 파골세포(osteoclast), 골세포(osteocyte), 교원질(collagen), 비교원성단백질(noncollagenous proteins) 등으로 구성되어 있는 매우 복잡하고 활동적인 조직으로서, 조골세포와 파골세포의 작용을 매개로 일생동안 끊임없이 형성(formation)과 흡수(resorption)를 반복하며 골재형성(bone remodeling) 과정을 진행해 나간다(7). 조골세포는 골기질 합성과 석회화에 관여하는 세포로써, 골단백의 85-90%를 차지하는 type I collagen을 비롯한 proteoglycans, osteocalcin, osteopontin, osteonectin, bone sialoprotein을 합성하며, 여러 cytokine의 분비를 통해 파골세포의 활성을 조절한다(8). 골다공증(osteoporosis)은 대표적인 골대사질환으로, 골대사에 이상을 일으키는 질환이나 약물복용 유무에 따라 원발성과 속발성으로 구분된다(9). 원발성 골다공증은 다시 폐경 이후 급격한 estrogen 감소로 인해 골흡수가 증가되어 골량이 감소하는 제 1형 폐경성 골다공증과 70세 이후 골흡수는 그리 심하지 않으나 골형성능이 감소하여 골량 감소를 초래하는 제 2형 노인성 골다공증으로 분류할 수 있다(10,11).

골다공증이 산화적 스트레스와 상호 밀접한 관계가 있음이 밝혀지며(12,13) 관심이 모아져 여러 연구들이 진행되고 있는데, 산화적 스트레스의 증가와 골밀도 간의 유의한 음의 상관관계와(14) 골다공증 여성에서 혈중 항산화제의 농도가 감소되었으며(15), 항산화비타민을 섭취한 경우 골밀도가 높다는 연구결과들이 보고되었다(16). 또한 *in vitro* 연구에서도 ROS는 파골세포의 활성도를 증가시키고(17,18) 조골세포의 대사를 저해함이 보고되기

*Corresponding author: Gun-Hee Kim, Department of Food and Nutrition, Duksung Women's University, Seoul 132-714, Korea
Tel: 82-2-901-8496
Fax: 82-2-901-8661
E-mail: ghkim@duksung.ac.kr

Received July 26, 2011; revised October 5, 2011;
accepted October 6, 2011

도 하였다. Mody 등(19)은 H_2O_2 를 이용한 연구에서 세포 내 산화적 스트레스의 증가는 전구조골세포주인 MC3T3-E1 세포와 골수기질세포주인 M2-10B4 세포의 조골세포로의 분화를 저해함을 밝혔고, Nicholson 등(20)도 H_2O_2 처리 후 조골세포의 수와 분화가 감소되었고, 이러한 산화적 스트레스로 인한 조골세포 대사의 저해는 항산화제의 투여로 차단되었음을 보고하였다.

H_2O_2 에 의해 생성이 촉진되는 TNF- α 는 조골세포의 collagen (21,22) 및 ALP 합성을 억제하고(23), osteocalcin 유전자발현을 억제하며(24,25), IL-6(26,27)와 대식세포집락자극인자(macrophage-colony stimulating factor, M-CSF)를 증진시켜(28,29) 파골세포로의 분화를 증강시키고 골의 흡수를 촉진하는 것으로 알려져 있다. 더욱이 estrogen이 부족하거나 류마티스 관절염과 같은 병적인 상태에서의 TNF- α 의 증가는 골다공증 및 골 파괴의 원인이 되는 것으로 지적되고 있으며 TNF- α 는 그 자체의 합성을 촉진할 뿐 아니라 다른 cytokine의 생성을 촉진하여 상승효과를 나타내는데, 특히 IL-1 β 공조하여 TNF- α 와 IL-6의 생성을 강력히 촉진하여 골 흡수를 증강시키는 것으로 보고되고 있다(30-33). 따라서 산화적 스트레스(oxidative stress)로부터 세포손상을 보호하고, 염증성 매개물질을 억제하는 것은 골다공증의 예방 및 치료 측면에서 의미가 있다.

감국(*Chrysanthemum indicum* L.)은 국화과(Compositae)에 속하는 다년생 초본으로 우리나라에서는 중부 이남의 산간지역에 널리 분포하는 야생국화이다. 꽃잎은 황색을 띄며 6-10월에 걸쳐 개화하고 크기가 1.5 cm 내외인 꽃봉우리가 줄기 끝부분에 밀집되어 있다. 한방에서는 주로 약재로 사용하는 꽃 부분에 감미(甘味)가 있어 감국(甘菊)이라 하였고, 약용 외에도 민간에서는 향기가 좋아 떡 등에 첨가하거나 향료, 국화주 등으로 이용하기도 하였다(34). 중국에서는 국화를 장수식품(35)으로 여겨 국화주를 담아 먹거나 국화차로 음용하기도 한다(34). 한의학에서는 해열, 소염, 혈압강하, 두통 완화 등을 목적으로 이용되고 있으며(36,37) 최근 여러 연구들을 통해 항균(38), 항염(39,40), 면역조절(41-44), 항산화(45,46), 항암(47) 활성 등이 밝혀지고 있다.

본 연구에서는 mouse calvaria 유래의 MC3T3-E1 조골세포를 이용하여 감국 에탄올 추출물이 산화적 스트레스 상황에서의 조골세포의 증식 및 분화에 미치는 영향을 측정하고 ROS생성 및 cytokine 등에 미치는 영향을 분석하였다.

재료 및 방법

실험재료

감국(*Chrysanthemum indicum* L.)은 경북 영주시 풍기읍에서 2008년 7월에 구매하여 음건(陰乾) 후 사용하였다. 추출용 에탄올을 비롯한 실험에 사용한 시약들은 모두 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)의 특급시약을 사용하였다.

감국추출물 제조

음건된 감국에 시료무게의 10배(w/v)의 70% ethanol을 첨가하여 100°C 항온수조에서 3시간 동안 환류추출하였고, 이 과정을 3회 반복하였다. 추출액은 여과지(Whatman No.1, England)로 여과하여 rotary vacuum evaporator(EYELA, Tokyo Rikakikai Co., Ltd, Japan)로 감압농축한 후 동결건조하여 분말시료를 얻었고(yield: 25.3%, w/w), 이를 100% dimethylsulfoxide(DMSO)에 녹인 후 여과(Whatman PVDF 0.45 μ m)하여 실험에 사용하였다.

조골세포 배양

MC3T3-E1 조골세포(RCB1126, osteoblast-like cell line from C57BL/6 mouse calvaria)는 10% heat-inactivated fetal bovine serum(FBS), 1% 항생제(100 U/mL penicillin-100 μ g/mL streptomycin)를 함유한 α -modified minimal essential medium(α -MEM; Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) 배지로 37°C, 5% CO_2 하에서 배양하며 세포밀도가 90% 정도 포화되면 0.02% EDTA-0.05% trypsin용액을 사용하여 계대배양 하면서 실험에 사용하였다. 분화유도를 위하여 10 mM β -glycerol phosphate와 50 μ g/mL ascorbic acid를 첨가하여 분화유도 배지로 사용하였으며, 2-3일 간격으로 배지를 교환해주었다.

조골세포 증식유도 측정

48 well plate에 2×10^4 /well의 조골세포를 분주하여 2일간 배양한 후, 시료의 최종 농도가 3, 10, 30, 100 및 200 μ g/mL이 되도록 배양액에 첨가한 군과 tamoxifen(1 μ M) 처리 시료군, 각 농도별 시료와 0.3 mM H_2O_2 를 함께 처리한 군으로 나누어 48시간동안 배양하였다. 배양 후 MTT 시약을 5 mg/mL 농도로 20 μ L를 각 well에 첨가하여 2시간 더 배양한 후 배지를 제거하고 DMSO를 200 μ L씩 첨가하여 생성된 불용성의 formazan 결정을 용해시켜 ELISA reader(Spectra MAX M2, Molecular Device, Sunnyvale, CA, USA)로 570 nm에서 흡광도(OD)를 측정하였다. 세포의 증식률은 시료의 흡광도를 대조군의 흡광도에 대한 백분율로 나타내었다.

Alkaline phosphatase(ALP) 활성 측정

MC3T3-E1 세포를 2×10^4 cell/well 농도로 48 well plate에 분주한 후 세포가 90% 포화되게 자라면 10 mM β -glycerophosphate와 50 μ g/mL ascorbic acid를 함유한 배지로 교환하여 2일마다 배지를 갈아주며 분화를 유도하고, 6일 후 각 농도별 시료와 tamoxifen(1 μ M) 처리 시료군 및 0.3 mM H_2O_2 를 함께 처리한 군으로 나누어 48시간 배양하였다. 배양한 세포는 Dulbecco's Phosphate Buffered Saline(DPBS)로 세척한 후 0.1% Triton X-100을 첨가해 30분간 세포를 lysis시킨 후 13,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상등액을 취하고 ALP kit(Asanpharm, Seoul, Korea)를 사용하여 ALP 활성을 측정하였다. 단백질량은 상등액 50 μ L 중 5 μ L를 96 well plate에 넣은 후 bovine serum albumin protein assay reagent를 이용하여 정량하였고, *p*-nitrophenol에 대한 표준 곡선그래프와 500 nm에서 측정한 각 시료 처리군별 *p*-nitrophenol의 흡광도(OD)로부터 산출한 활성도를 정량한 단백질량으로 나누어 단위단백질 함량 당 효소 활성도(unit/mg protein)를 산출하였다. 효소활성은 대조군에 대한 백분율로 나타내었다.

Collagen 함량 측정

MC3T3-E1 세포를 2×10^4 cell/well 농도로 48 well plate에 분주한 후 세포가 90% 포화되게 자라면 10 mM β -glycerophosphate와 50 μ g/mL ascorbic acid를 함유한 배지로 교환하여 2일마다 배지를 갈아주며 분화를 유도하고, 6일 후 각 농도별 시료와 tamoxifen(1 μ M) 처리 시료군 및 0.3 mM H_2O_2 를 함께 처리한 군으로 나누어 48시간 배양하였다. 배양한 세포는 DPBS로 세척한 후 주로 동물조직 고정에 사용되는 bouin's fluid(saturated picric acid:35% formaldehyde:glacial acetic acid=15:5:1)로 1시간 고정하였다. 이후 3차 증류수로 세척한 후 건조하여 sirius red 염색액

(1 mg/mL saturated picric acid)으로 1시간 동안 흔들어주며 염색하고 0.01 N HCl로 세척 후 0.1 N NaOH 0.2 mL을 첨가하여 용해시켜 ELISA reader(Spectra MAX M2)를 사용하여 550 nm에서 흡광도(OD)를 측정하였다. Collagen 함량(μg per 2×10^4 cell)은 대조군에 대한 백분율로 나타내었다.

Mineralization 측정

MC3T3-E1 세포를 2×10^4 cell/well 농도로 48 well plate에 분주한 후 세포가 90% 포화되게 자라면 10 mM β -glycerophosphate와 50 $\mu\text{g/mL}$ ascorbic acid를 함유한 배지로 교환하여 2일마다 배지를 갈아주며 분화를 유도하고, 10일 후 각 농도별 시료 처리군과 시료 및 0.3 mM H_2O_2 를 함께 처리한 군으로 나누어 48시간 배양하였다. 분석을 위해 배지를 제거하고, Phosphate Buffered Saline(PBS)로 세척한 뒤, 70% EtOH로 실온에서 1시간 동안 고정시켰다. 세포를 고정시킨 후 40 mM alizarine red(AR) solution으로 10분간 염색하고 3차 증류수로 세척한 뒤 10% cetylpyridinium chloride를 첨가하여 15분간 녹색 염색된 정도를 ELISA reader (Spectra MAX M2)를 이용하여 561 nm에서 흡광도(OD)를 측정하였다. 석회화(Mineralization) 정도는 대조군에 대한 백분율로 나타내었다.

ROS(reactive oxygen species) 함량 측정

세포 내 H_2O_2 의 생성은 2,7-dichlorofluorescein diacetate(DCF-DA)가 esterase 또는 산화적 가수분해에 의해 비형광성인 DCFH로 탈아세틸화 되고 DCFH는 활성산소에 의해 산화되어 강한 형광물질인 2,7-dichloro-fluorescein(DCF)로 전환되는 원리를 이용한 DCF-DA assay로 ROS 생성수준을 측정하였다.

MC3T3-E1 세포를 배양접시에 분주하여 배양한 후 80-90% 포화되게 자라면 배지를 제거하고 DPBS로 세척한 후 0.02% EDTA-0.05% trypsin 용액을 사용하여 수확하였다. 수확된 세포는 원심분리하여 상층액을 제거하고 hank's balanced saline solution(HBSS)을 넣어 세포를 부유시킨 다음 최종 농도가 5 μM 이 되도록 DCF-DA를 첨가하여 형광발광을 막기 위해 conical tube를 호일로 감싸고 37°C 항온수조에서 2시간 동안 shaking incubation 시켰다. 이후 원심분리하여 HBSS를 제거하고 DPBS를 첨가하여 2회 세척한 후 DPBS를 다시 첨가하여 DCF-DA로 labelling된 세포액을 마련하고, fluorescence spectrometer(F-4500 FL Spectrophotometer, Hitachi, Japan)를 이용하여 excitation 485 nm, emission 530 nm에서 세포에 농도별로 감광 에탄올 추출물을 처리한 후 0.3 mM H_2O_2 투여하고 1,800초까지의 fluorescence intensity 변화를 측정하였다.

Cytokine(TNF- α) immunoassay

MC3T3-E1 세포를 2×10^4 cell/well 농도로 48 well plate에 분주한 후 세포가 90% 포화되게 자라면 10 mM β -glycerophosphate와 50 $\mu\text{g/mL}$ ascorbic acid를 함유한 배지로 교환하여 2일마다 배지를 갈아주며 분화를 유도하고, 6일 후 0.3 mM H_2O_2 와 각 농도별 시료를 처리하여 48시간 동안 배양하였다. 이후 각 well에서 TNF- α 를 함유한 배지(medium)를 취하여 enzyme immunoassay system(R&D System Inc., Minneapolis, MN, USA)를 이용하여 제조사의 안내 방법에 따라 TNF- α 를 측정하였다.

통계처리

실험결과는 평균과 표준오차(mean $\pm$ SEM, n=6)로 나타내었으며, 통계분석은 SAS program을 이용한 one-way ANOVA

Fig. 1. Effect of CIE on the growth of MC3T3-E1 cells under the H_2O_2 -induced oxidative stress. MC3T3-E1 cells were cultured with vehicle or CIE in the presence of 0.3 mM H_2O_2 for 48 h. Data shown are mean $\pm$ SEM, expressed as a percentage of control and the control value was 0.33 ± 0.003 OD per 2×10^4 cells. Different marks (#, *) within treatments indicate significant differences ($p < 0.05$). CIE: *Chrysanthemum indicum* L. extract

Fig. 2. Effect of CIE on the alkaline phosphatase activity of MC3T3-E1 cells in the presence of H_2O_2 . MC3T3-E1 cells were cultured with vehicle or CIE in the presence of 0.3 mM H_2O_2 for 48 h. Data shown are mean $\pm$ SEM, expressed as a percentage of control and the control value was 8.33 ± 0.55 unit/mg protein. Different marks (#, *) within treatments indicate significant differences ($p < 0.05$). CIE: *Chrysanthemum indicum* L. extract

($p < 0.05$)을 실시하여 Duncan's multiple range test에 의해 시료간의 유의적 차이를 검정하였다.

결과 및 고찰

조골세포 증식에 대한 영향

감광 에탄올 추출물이 H_2O_2 로 유도한 산화적 스트레스 상태에서 조골세포의 증식 정도에 미치는 영향을 알아보기 위해, 먼저 세포 밀도에 따른 H_2O_2 에 대한 반응도를 알아보기로 Cho(48)의 연구를 참조하여 2×10^3 , 2×10^4 , 2×10^5 cell/well 농도로 세포를 seeding 하고 0, 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1 mM 농도의 H_2O_2 를 처리하여 48시간 배양한 후 세포 생존정도를 관찰하였다. 그 결과 2×10^3 cell/well 군은 0.1 mM H_2O_2 농도, 2×10^4 cell/well 군은 0.3 mM H_2O_2 농도에서 50% 이하의 세포생존율을 나타내었고, 2×10^5 cell/well 군은 0.5 mM H_2O_2 농도에서도 유의적 감소를 보이지 않아 Cho(48)의 연구와 유사한 결과를 나타냄을 확인하였다. 본 실험에서는 2×10^4 cell/well 군을 주로 사용하였으므로 H_2O_2 처리농도를 0.3 mM 로 결정하여 연구를 진행하였다.

H_2O_2 로 유도한 산화적 스트레스 상태에서 감광 에탄올 추출물이 조골세포의 증식에 미치는 영향을 측정하였다(Fig. 1). H_2O_2 를

처리함으로써 MC3T3-E1 조골세포의 성장이 유의적으로 감소하였고, 감소되었던 성장이 감국 에탄올 추출물 처리에 의해 농도 의존적으로 증가 하여 30-100 µg/mL 농도에서 대조군(-/+)에 비해 유의적 차이를 나타내었으며 100 µg/mL 농도에서 H₂O₂를 처리하지 않은 세포군(-/-)대비 최대 98% 수준으로 회복되었다.

이러한 결과는 0.3 mM H₂O₂ 처리 후 MC3T3-E1 조골세포의 증식이 유의적으로 감소하였으며 10 µM apigenin 투여에 의해 감소된 증식이 회복되었음을 보고한 Cho(48)의 연구와 0.3 mM과 0.5 mM의 H₂O₂ 처리 후 사람 골수기질세포 유래 조골세포의 증식이 대조군에 비해 유의적으로 감소하였으며 5 mM의 NAC(anti-oxidant)를 0.5 mM H₂O₂ 처리군에 병합 투여 시 0.5 mM H₂O₂ 단독 처리군에 비해 증식이 유의적으로 증가했음을 보고한 Oh(49)의 연구와 유사한 경향을 보인 것이며, 산화적 스트레스가 골다공증의 원인이 된다는 여러 연구결과들을 MC3T3-E1 조골세포의 증식 감소 측면에서 확인한 결과라 할 수 있겠다. 또한 감국 에탄올 추출물이 30-100 µg/mL 농도에서 H₂O₂로 유도한 산화적 스트레스 상황의 조골세포 증식을 유의적으로 증가시킨 것은 항산화 기능을 통한 세포손상 방어 효과를 나타낸 것이라 사료되었다. 이는 감국 에탄올 추출물 농도가 100 µg/mL 이하에서는 항산화 기능을 보이나 농도가 200 µg/mL 이상 증가하면 항산화 작용이 감소하는 것으로 해석된다.

Alkaline phosphatase(ALP) 활성에 대한 영향

감국 에탄올 추출물이 H₂O₂로 유도한 산화적 스트레스 상태에서 조골세포의 분화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 ALP 활성을 측정하였다(Fig. 2). MC3T3-E1 조골세포의 ALP 활성이 0.3 mM H₂O₂ 처리에 의해 유의적으로 감소됨을 확인할 수 있었다. 그러나 감소된 ALP 활성은 감국 에탄올 추출물 처리에 의해 농도 의존적으로 증가하는 경향을 보여 200 µg/mL 농도에서는 대조군(-/+) 대비 153%의 ALP 활성 수준을 나타냄으로써 유의적 차이를 보였다.

H₂O₂에 의한 ALP 활성의 유의적 감소는 0.1-0.2 mM H₂O₂ 처리 시 토끼 골수기질세포와 두개골 유래 조골세포의 ALP 활성 감소에 의한 분화지해(50) 및 쥐 두개골 유래 조골세포의 ALP 활성 감소로 인한 분화 감소(51)와 유사한 결과로써, 산화적 스트레스가 골형성에 관여하는 ALP 활성을 저하시킴으로써 골형성 부진의 원인이 될 가능성을 확인한 것이라 사료되었다. 그리고 H₂O₂에 의해 감소된 조골세포의 ALP 활성을 농도 의존적으로 증가시킨 결과는 감국 에탄올 추출물의 항산화기능을 통한 세포기능 손상 방어 가능성을 시사한 것이며, 그 효과 정도는 0.3 mM H₂O₂로 유도한 산화적 스트레스 상황에서 최대 115% ALP 활성 촉진 결과를 나타낸 창출(국화과)뿌리 추출물(10 µg/mL)(52)과 비교할 때 높은 수준을 보여 다른 분화지표에 비해 ALP 활성촉진에 더 효과가 있음을 확인하였다.

Collagen 합성에 대한 영향

감국 에탄올 추출물이 H₂O₂로 유도한 산화적 스트레스 상태에서 조골세포의 collagen 합성능을 측정하였다(Fig. 3). 배양액만 처리한 세포(-/-)에 비해 0.3 mM H₂O₂를 처리한 세포의 collagen 함량이 유의적으로 감소하였으며, 감국 에탄올 추출물 처리에 의한 collagen 함량은 유의적 차이를 보이지 않았다.

H₂O₂ 투여에 의한 collagen 함량의 유의적 감소 결과는 산화적 스트레스에 의해 골기질 감소가 초래될 수 있음을 시사하는 것이며, H₂O₂에 의해 유도된 조골세포의 collagen 합성 저하를 억제하는 효과를 보인다면 골기질 감소와 골다공증 예방에 효과가

Fig. 3. Effect of CIE on the collagen synthesis of MC3T3-E1 cells in the presence of H₂O₂. MC3T3-E1 cells were cultured with vehicle or CIE in the presence of 0.3 mM H₂O₂ for 48 h. Data shown are mean±SEM, expressed as a percentage of control and the control value was 3.26±0.12 µg per 2×10⁴ cells. Different marks (#, *) within treatments indicate significant differences (*p*<0.05). CIE: *Chrysanthemum indicum* L. extract

Fig. 4. Effect of CIE on the mineralization of MC3T3-E1 cells in the presence of H₂O₂. MC3T3-E1 cells were cultured with vehicle or CIE in the presence of 0.3 mM H₂O₂ for 48 h. Calcium forms an alizarin red-calcium complex in a chelation process. Data shown are mean±SEM, expressed as a percentage of control and the control value was 0.355±0.005 OD per 2×10⁴ cells. Different marks (#, *) within treatments indicate significant differences (*p*<0.05). CIE: *Chrysanthemum indicum* L. extract

있을 것으로 사료된다. 그러나 본 연구의 감국 에탄올 추출물 처리 농도와 분화시기(6일)에서는 H₂O₂에 의한 조골세포의 저하된 collagen 합성능을 유의적으로 증가시키지는 못하였다.

Mineralization에 대한 영향

감국 에탄올 추출물이 H₂O₂로 유도한 산화적 스트레스 상태에서의 조골세포의 mineralization에 미치는 영향을 측정한 결과는 Fig. 4와 같다. H₂O₂ 처리 시 배양액만 처리한 세포(-/-)에 비해 mineralization은 유의적으로 감소하였고, 감국 에탄올 추출물 처리에 의해 농도 의존적으로 mineralization의 증가 경향을 보여 200 µg/mL 농도에서 배양액만 처리한 세포군(-/-) 수준을 회복하며 대조군(-/+)과 유의적인 차이를 보였다.

이러한 H₂O₂에 의한 mineralization의 유의적 감소는 0.5 mM H₂O₂ 투여로 조골세포 분화지표인 기질 calcium 함량의 유의적 감소를 보고한 Oh(49)의 연구와 유사한 결과였으며, 산화적 스트레스가 골다공증의 원인이 된다는 여러 연구의 가설들을 본 연구의 H₂O₂에 의한 조골세포의 활성저하와 calcium 함량 감소 측면에서도 검증한 것이라 볼 수 있다. 그리고 감국 에탄올 추출물이 H₂O₂로 유도한 산화적 스트레스 상황에서 조골세포의 miner-

Fig. 5. Effect of CIE on H_2O_2 -induced reactive oxygen species (ROS) production in MC3T3-E1 cells. Loading MC3T3-E1 cells with DCF-DA were treated with or without CIE, followed by addition of 0.3 mM H_2O_2 to cuvette for the quantitation of the fluorescence intensity, which was detected by fluorescence spectrometer with a magnetic stirring device. Trolox (20 μ M) was used as a positive control for reduction of ROS production.

alization을 증가시킨 결과는 산화적 스트레스에 의한 세포손상 방어기능성을 시사한 것이며, 그 효과 정도는 위액분비조절, 관절염, 항염 활성 등이 있는 것으로 보고된 창출(국화과)뿌리 추출물(10 μ g/mL)의 0.3 mM H_2O_2 처리하의 MC3T3-E1 조골세포의 mineralization 수준을 배양액 처리군 대비 96% 정도로 회복시킨 결과(52)와 비슷한 수준인 것으로 나타났다. 이러한 결과들로부터 감국 에탄올 추출물의 골다공증 예방과 증세 개선측면에서 긍정적인 효과를 기대할 수 있을 것으로 사료되었다.

세포 내 ROS(reactive oxygen species) 생성에 대한 영향

감국 에탄올 추출물이 H_2O_2 로 유도한 산화적 스트레스 상태에서 조골세포 내의 ROS 생성에 미치는 영향을 측정한 결과는 Fig. 5와 같다. 0.3 mM H_2O_2 투여 후의 조골세포 내의 ROS 생성 수준은 1,800 초경 DCF-DA 형광 강도가 99.5 정도로 증가하나 감국 에탄올 추출물 처리에 의해 농도 의존적으로 형광 강도가 감소하는 경향을 보였으며, 감국 에탄올 추출물 최저 처리 농도인 3 μ g/mL 농도에서 대조군의 1/4 수준인 37.9를 나타냈다. 또한 30 μ g/mL 농도에서는 항산화제인 trolox 20 μ M 투여시의 ROS 생성 정도와 비슷한 수준을 나타내었다.

감국 에탄올 추출물의 항산화 활성은 100 μ g/mL 농도에서 nitric oxide(NO) 발생을 48% 억제하여 antioxidant인 Vitamin C의 20% 억제수준보다 효과적으로 NO 발생을 억제했다는 보고(54)와 lipopolysaccharide(LPS)로 유도한 RAW 264.7 macrophages의 염증성 상황에서 25-200 μ g/mL 농도의 감국 에탄올 추출물이 농도 의존적으로 NO 생성을 감소시켰다는 보고(55) 및 0.3 mM H_2O_2 로 유도한 MC3T3-E1 조골세포의 ROS 발생을 감국의 주요 성분인

Fig. 6. Effect of CIE on H_2O_2 -induced TNF- α production of MC3T3-E1 cells. MC3T3-E1 cells were cultured with vehicle or CIE in the presence of 0.3 mM H_2O_2 for 48 h. TNF- α concentrations were measured in the conditioned medium. Data shown are mean $\pm$ SEM, expressed as a percentage of control and the control value was 121.98 ± 3.56 pg/mg protein. Different marks (#, *) within treatments indicate significant differences ($p < 0.05$). CIE: *Chrysanthemum indicum* L. extract

apigenin 0.1 μ M이 H_2O_2 만 처리한 세포군의 ROS 발생량 대비 약 46% 수준, 10 μ M이 61% 수준으로 억제한 보고에서도 확인할 수 있었다(48).

Cytokine TNF- α 생성저해에 대한 영향

감국 에탄올 추출물이 H_2O_2 로 유도한 산화적 스트레스 상태에서 조골세포의 TNF- α 생성에 미치는 영향을 측정한 결과는 Fig. 6과 같다. H_2O_2 투여 시 염증성 매개 cytokine인 TNF- α 는 배양액만 처리한 세포군(-/-)에 비해 유의적으로 증가하였고, 감국 에탄올 추출물 처리에 의해 농도 의존적으로 감소하는 경향을 보여 200 μ g/mL 농도에서는 대조군(-/-) 대비 89%의 TNF- α 수준을 나타냄으로써 유의적 차이를 보였다.

TNF- α 의 생성 억제작용은 골 파괴 및 골다공증을 막고 염증 매개 상황을 차단하는데 중요한 기능이라 할 수 있으며, 본 연구 결과에서 보인 감국 에탄올 추출물의 TNF- α 생성 감소 결과는 산화적 스트레스에 의한염증매개성 cytokine인 TNF- α 생성과 조골세포의 분화기능 저해를 억제할 수 있는 가능성을 보인 것으로 사료된다.

감국의 TNF- α 억제 효과는 LPS로 유도한 RAW 264.7 macrophages의 염증성 상황에서 감국 에탄올 추출물 25-200 μ g/mL 농도에서 농도 의존적으로 TNF- α 와 IL-1 β 생성이 유의적으로 감소되었다고 보고한 Cheon 등(40)의 연구와 감국 에탄올 추출물 100 μ g/mL 농도에서 LPS로 유도한 RAW 264.7 macrophages의 IL-6 생성 억제를 보고한 Nam 등(55)의 연구에서도 확인할 수 있었다.

요 약

감국 에탄올 추출물이 H_2O_2 로 유도한 산화적 스트레스 상황에서 MC3T3-E1 조골세포의 증식 및 분화, ROS 생성 및 염증 매개성 cytokine인 TNF- α 생성 등에 미치는 영향을 분석하였다. H_2O_2 로 유도한 산화적 스트레스 상황에서 감국 에탄올 추출물은 30-100 μ g/mL 농도 범위에서 조골세포의 증식을 유의적으로 증가시켰다. 또한, 감국 에탄올 추출물 200 μ g/mL 농도에서 ALP 활성이 약 1.5배 유의적인 증가를 나타냈다. 그러나 collagen 합성에는 유의적 차이를 보이지 않았다. Mineralization 측정에서는 200 μ g/mL 농도에서 대조군에 비해 유의적 증가를 보였다. H_2O_2

로 유도한 산화적 스트레스 상황에서 감국 에탄올 추출물이 intracellular ROS 생성에 미치는 영향을 측정해본 결과, 30 µg/mL 농도에서 antioxidant인 trolox 20 µM과 유사한 ROS 생성수준을 나타내어 유사한 항산화 효과를 보였으며, 그 이상의 농도에서는 더 높은 항산화 효과를 나타냈다. H₂O₂로 유도한 산화적 스트레스 상황에서 조골세포의 collagen 및 ALP의 합성을 억제하고 파골세포로의 분화 증강과 골흡수를 촉진시키는 것으로 알려진 TNF-α 생성정도를 측정한 결과, 감국 에탄올 추출물 처리에 의해 농도 의존적으로 생성이 감소되었으며, 200 µg/mL 농도에서 대조군 대비 89% 수준을 나타내어 유의적 차이를 보였다. 이상의 결과를 통해 감국 에탄올 추출물은 H₂O₂로 유도된 산화적 스트레스 상황에서 세포 내 ROS 생성과 염증매개 cytokine인 TNF-α 생성을 감소시킴으로써 조골세포 손상과 활성 감소를 억제하고, 증식과 분화를 촉진시키는 효과가 있는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 감국 에탄올 추출물의 골다공증 예방을 위한 식물성 에스트로젠(phytoestrogen) 및 항산화 소재로의 이용 가능성이 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2010년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 대학중점연구소 지원으로 수행된 연구(2010-0029692)임.

문헌

1. Beckman KB, Ames BN. The free radical theory of aging matures. *Physiol. Rev.* 78: 547-581 (1998)
2. Stadtman ER, Berlett BS. Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. *Drug Metab. Rev.* 30: 325-243 (1998)
3. Egawa K, Yoshiwara M, Shibamura M, Nose K. Isolation of a novel ras-reversion gene that is induced by hydrogen peroxide from a mouse osteoblastic cell line, MC3T3-E1. *FEBS Lett.* 372: 74-77 (1995)
4. Lee DH, Lim BS, Lee YK, Yang HC. Effect of hydrogen peroxide (H₂O₂) on alkaline phosphatase activity and matrix mineralization of odontoblast and osteoblast cell lines. *Cell Biol. Toxicol.* 22: 39-46 (2006)
5. Liu AL, Zhang ZM, Zhu BF, Liao ZH, Liu Z. Metallothionein protects bone marrow stromal cells against hydrogen peroxide-induced inhibition of osteoblastic differentiation. *Cell Biol. Int.* 28: 905-911 (2004)
6. Lee KH, Choi EM. Biochanin A. Stimulates osteoblastic differentiation and inhibits hydrogen peroxide-induced production of inflammatory mediators in MC3T3-E1 cells *Biol. Pharm. Bull.* 28: 1948-1953 (2005)
7. Parfitt AM. Osteonal and hemi-osteonal remodeling: The spatial and temporal framework for signal traffic in adult human bone. *J. Cell Biochem.* 55: 273-86 (1994)
8. Mone Z. Skeletal remodeling in health and disease. *Nat. Med.* 13: 791-801 (2007)
9. Han IG. Osteoporosis diagnosis and medicinal remedy. *J. Korean Acad. Fam. Med.* 14: 348-355 (1993)
10. Kim KS, Min BK, Lee SP, Kim IS, Kim HY, Sim JR. Evaluation of biochemical markers of bone turnover in postmenopausal osteoporotic women to alendronate treatment. *J. Korean Soc. Menopause* 6: 36-42 (2000)
11. Rogers J. Estrogens in the menopause and postmenopause. *New Engl. J. Med.* 280: 364-367 (1967)
12. Tolmasoff JM, Ono T, Cutler RG. Superoxide dismutase: Correlation with life-span and specific metabolic rate in primate species. *P. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 2777-2781 (1980)
13. Sohal RS, Allen RG. Oxidative stress as a causal factor in differentiation and aging: A unifying hypothesis. *Exp. Gerontol.* 25:

- 499-522 (1990)
14. Basu S, Michaelsson K, Olofsson H, Johansson S, Melhus H. Association between oxidative stress and bone mineral density. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 288: 275-279 (2001)
15. Maggio D, Barabani M, Pierandrei M, Polidori C, Catani M, Mecocci P, Senin U, Pacifici R, Cherubini A. Marked decrease in plasma antioxidants in aged osteoporotic women: Results of a cross-sectional study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88: 1523-1527 (2003)
16. Morton D, Barrett-Connor EL, Schneider DL. Vitamin C supplement use and bone mineral density in postmenopausal women. *J. Bone Miner. Res.* 16: 135-140 (2001)
17. Garrett IR, Boyce BF, Oreffo ROC, Bonewald L, Poser J, Mundy GR. Oxygen-derived free radicals stimulate osteoclastic bone resorption in rodent bone *in vitro* and *in vivo*. *J. Clin. Invest.* 85: 632-639 (1990)
18. Fraser JHE, Helfrich MH, Wallace HM, Ralston S. Hydrogen peroxide, but not superoxide, stimulates bone resorption in mouse calvariae. *Bone* 19: 223-226 (1996)
19. Mody L, Parhami F, Sarafian TA, Demer LL. Oxidative stress modulates osteoblastic differentiation of vascular and bone cells. *Free Radical Bio. Med.* 31: 509-519 (2001)
20. Nicholson NC, Ramp WK, Kneisl JS, Kaysinger KK. Hydrogen peroxide inhibits giant cell tumor and osteoblast metabolism *in vitro*. *Clin. Orthop. Relat. R.* 347: 250-260 (1998)
21. Smith DD, Gowen M, Mundy GR. Effects of interferon-γ and other cytokines in collagen synthesis in fetal rat bone cultures. *Endocrinology* 120: 2494-2499 (1987)
22. Centrella M, McCarthy TL, Canalis E. Tumor necrosis factor-α inhibits collagen synthesis and alkaline phosphatase activity independently of its effect on deoxyribonucleic acid synthesis in osteoblast-enriched bone cell cultures. *Endocrinology* 123: 1442-1448 (1988)
23. Nanes MS, Rubin J, Titus L, Hendy GN, Catherwood B. Tumor necrosis factor-α inhibits 1,25-dihydroxyvitamin D₃-stimulated bone Gla protein synthesis in rat osteosarcoma cells by a pre-translational mechanism. *Endocrinology* 128: 2577-2582 (1991)
24. Kuno H, Kurian SM, Hendy GN, White J, DeLuca HF, Evans CO. Inhibition of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ stimulated osteoclast gene translocation by tumor necrosis factor-α: Structural determinants within the vitamin D response element. *Endocrinology* 134: 2524-2531 (1994)
25. Kuroiuchi K, Kambe F, Yasukawa K, Izumi R, Ishiguro N, Iwata H. TNF-α increases expression of IL-6 and ICAM-1 genes through activation of NK-B in osteoblast-like ROS17/2.8 cells. *J. Bone Miner. Res.* 13: 1290-1299 (1998)
26. Ishimi Y, Miyaura C, Jin CH, Akatsu T, Abe E, Nakamura Y, Yamaguchi A. IL-6 is produced by osteoblasts and induces bone resorption. *J. Immunol.* 145: 3297-3303 (1990)
27. Passeri G, Girasole G, Manolagas SC, Jilka RL. Endogenous production of tumor necrosis factor γ primary cultures of murine clivial cells: Influence on IL-6 production and osteoclast development. *Bone Miner.* 24: 109-126 (1994)
28. Felix R, Fleisch H, Elford PR. Bone-resorbing cytokines enhance release of macrophage colony-stimulating activity by the osteoblastic cell MB3T3-E1. *Calcified Tissue Int.* 41: 356-360 (1989)
29. Jilka RL, Hangoc G, Girasole G, Passeri G, Williams DC, Abrams JS, Boyce B. Increased osteoclast development after estrogen loss: Mediation by interleukin-6. *Science* 257: 88-91 (1992)
30. Stein B, Yang MX. Repression of the interleukin-6 promoter by estrogen receptor is mediated by NK-B and C/EBP β. *Mol. Cell Biol.* 15: 4971-4979 (1995)
31. Ammann P, Rizzoli R, Bonjour JP, Bourrin S, Meyer JM, Vassalli P. Transgenic mice expressing soluble tumor necrosis factor-receptor are protected against bone loss caused by estrogen deficiency. *J. Clin. Invest.* 99: 1699-1703 (1997)
32. Vassalli P. The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annu. Rev. Immunol.* 10: 411-452 (1992)
33. Centrella M, McCarthy TL, Canalis E. Transforming growth factor B is a bifunctional regulator of replication and collagen synthesis in osteoblast-enriched cell cultures from fetal rat bone. *J. Biol. Chem.* 262: 2869-2874 (1987)

34. Shin YJ, Jeon JR, Park GS. Physicochemical properties of *gamgug* (*Chrysanthemum indicum* L.). J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 33: 146-151 (2004)
35. Park CS. *Chrysanthemum* Raise & Tubular. Chungwoon Publishing Company, Seoul, Korea. p. 21 (1965)
36. Hong UC. Essential oil compositions *Chrysanthemum boreale* and *Chrysanthemum indicum*. J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol. 45: 108-113 (2002)
37. Jang DS, Park KH, Lee JR, Ha TJ, Park YB, Nam SH, Yang MS. Antimicrobial activities of sesquiterpene lactones isolated from *Hemisteptia lyrata*, *Chrysanthemum zawadskii*, and *Chrysanthemum boreale*. J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol. 44: 137-142 (1999)
38. Shunying Z, Yang Y, Huaidong Y, Yue Y, Guolin Z. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Chrysanthemum indicum*. J. Ethnopharmacol. 96: 151-158 (2005)
39. Lee DY, Choi GY, Yoon TS, Cheon MS, Choo BK, Kim HK. Anti-inflammatory activity of *Chrysanthemum indicum* extract in acute and chronic cutaneous inflammation. J. Ethnopharmacol. 123: 149-154 (2009)
40. Cheon MS, Yoon TS, Lee DY, Choi GY, Moon BC, Lee AY, Choo BK, Kim HK. *Chrysanthemum indicum* Linné extract inhibits the inflammatory response by suppressing NF- κ B and MAPKs activation in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 macrophages. J. Ethnopharmacol. 122: 473-477 (2009)
41. Ren, AN, Wang, ZG, Lu ZC, Wang, LW, Wu YL. Study on bacteriostasis and antiviral of flowers *Chrysanthemum indicum*. Pharmaceutical Biotechnol. 6: 241-244 (1999)
42. Kong LD, Cai Y, Huang WW, Cheng CH, Tan RX. Inhibition of xanthine oxidase by some Chinese medicinal plants used to treat gout. J. Ethnopharmacol. 73: 199-207 (2000)
43. Wang ZG, Ren AN, Xu L, Sun XJ, Hua XB. The experimental study on the immunological and anti-inflammatory activities of *Chrysanthemum indicum*. Chinese J. Traditional Med. Sci. Technol. 2: 92-93 (2000)
44. Cheng W, Li J, You T, Hu C. Anti-inflammatory and immunomodulatory activities of the extracts from the inflorescence of *Chrysanthemum indicum* Linné. J. Ethnopharmacol. 101: 334-337 (2005)
45. Yoshikawa M, Morikawa T, Toguchida I, Harima S, Matsuda H. Medicinal flowers. II. Inhibitors of nitric oxide production and absolute stereostructures of five new germacrene-type sesquiterpenes, kikkanol D, D monoacetate, E, F, and F monoacetate from the flowers of *Chrysanthemum indicum* L. Chem. Pharm. Bull. 48: 651-656 (2002)
46. Lee SH, Hwang IG, Nho JW, Chang WD, Lee CH, Woo KS, Jeong HS. Quality characteristics and antioxidant activity of *Chrysanthemum indicum* L., *Chrysanthemum boreale* M. and *Chrysanthemum zawadskii* K. powdered teas. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 38: 824-831 (2009)
47. Li ZF, Wang ZD, Ji YY, Zhang S, Huang C, Li J, Xia XM. Induction of apoptosis and cell cycle arrest in human HCC MHCC97H cells with *Chrysanthemum indicum* extract. World J. Gastroenterol. 15: 4538-4546 (2009)
48. Cho MS. Effects of apigenin (4', 5, 7-trihydroxyflavone) on the inhibition of H₂O₂-induced cell death in MC3T3-E1 osteoblast cells. Ph.D thesis, Dongguk University, Seoul, Korea (2008)
49. Oh ES, Baek KH, Lee WY, Oh KW, Kim HS, Han JH, Lee KW, Son HY, Kang SK, Kang MI. The effect of oxidative stress on the proliferation and differentiation of human bone marrow stromal cell-derived osteoblasts. J. Korean Soc. Endocrinol. 21: 222-232 (2006)
50. Bai XC, Lu D, Liu AL, Zhang ZM, Li XM, Zou ZP, Zeng WS, Cheng BL, Luo SQ. Reactive oxygen species stimulates receptor activator of NF- κ B ligand expression in osteoblast. J. Biol. Chem. 280: 17497-17506 (2005)
51. Park YH, Han DW, Suh H, Ryu GH, Hyon SH, Cho BK, Park JC. Protective effects of green tea polyphenol against reactive oxygen species-induced oxidative stress in cultured rat calvarial osteoblast. Cell Biol. Toxicol. 19: 325-337 (2003)
52. Choi EM, Kim GH, Lee YS. Atractylodes japonica root extract protects osteoblastic MC3T3-E1 Cells against hydrogen peroxide-induced inhibition of osteoblastic differentiation. Phytother. Res. 23: 1537-1542 (2009)
53. Poljsak B, Gazdag Z, Pesti M, Jenko-Brinovec S, Belagyi J, Plesnicara S, Raspor P. Pro-oxidative versus antioxidative reactions between Trolox and Cr(VI): The role of H₂O₂. Environ. Toxicol. Phar. 22: 15-19 (2006)
54. Sung JY. Study on the anti-oxidant activity of extracts from the *Chrysanthemum indicum* L. J. App. Orient Med. 7: 1-5 (2007)
55. Nam JY, Lee HS, Lee SW, Chung MY, Yoo ES, Rho MC, Kim YK. Effect of kikkanol F monoacetate and 5-hydroxy-6,7,3',4'-tetramethoxyflavone isolated from *Chrysanthemum indicum* L. on IL-6 production. Korean J. Pharmacogn. 36: 186-190 (2005)