

MG 63 조골세포에서 약콩과 대두의 천연 에스트로겐 효과 비교*

조윤희 · 박수진 · 신호정 · 장기효 · 강순아 · 조여원[§]

경희대학교 동서의학대학원 임상영양전공

Comparative Estrogenic Effects of Yak-Kong and Soy Bean on the Proliferation of Human Osteoblastic Cell Line, MG-63*

Cho, Yunhi · Park, Soojin · Shin, Hojung · Jang, Ki-Hyo · Kang, Soon Ah · Choue, Ryowon[§]

Department of Medical Nutrition, Graduate School of East-West Medical Science, Kyung Hee University, Seoul 130-701, Korea

ABSTRACT

Phytoestrogens, especially soy-derived isoflavones, are receiving great scrutiny as a food supplement for preventing hormone dependent diseases such as cardiovascular diseases, cancer, and osteoporosis. These beneficial effects of phytoestrogens are caused by functioning as partial agonists or antagonists of estrogens. In contrast to the common usage of soy bean, Yak-kong(*Rhynchosia Molubilis* : 鼠目太) has been used as supplements of estrogen for preventing postmenopausal osteoporosis in Oriental medicine. To investigate estrogenic effects of Yak-kong and soy bean on the proliferation of MG-63 osteoblastic cells, each bean was extracted with 70% methanol and dried by freeze-drying. Yak-kong treatment of MG-63 cells resulted in an increase of cell proliferation to a maximum of 76% compared to 68% of soy bean treatment. Treatment of MG-63 cells with Yak-kong extract also resulted in an increase of transactivation of an ERE(estrogen response element)-luciferase reporter plasmid and IGF-I expression selectively. Despite increased effects of both bean treatments on the expression of estrogen receptor α (ER α) and β (ER β), soy bean treatment decreased transactivation of an ERE-luciferase reporter plasmid and did not further enhance IGF-I expression. Together, our data demonstrates that the greater estrogenic response of Yak-kong extract for MG-63 cell proliferation is mediated by ER derived transactivation of ERE and selective induction of IGF-I expression. (*Korean J Nutrition* 34(8) : 905~911, 2001)

KEY WORDS: Yak-kong, soy bean, isoflavones, MG-63 osteoblastic cells, IGF-I.

서론

일생을 두고 지속되는 골조직의 활발한 대사는 파골세포(osteoclast)에 의한 골흡수(bone resorption)와 조골세포(osteoblast)에 의한 골형성(bone formation)이 연계되어 일어나는 골의 재형성(bone remodeling)으로 설명된다.¹⁾ 골의 재형성 과정은 부갑상선 호르몬, 칼시토닌, 활성비타민 D₃, 에스트로겐 등과 같은 호르몬과 골조직에서 분비되는 IGF-I(insulin-like growth factor-1), TGF β (transforming growth factor- β), IL-1(interleukin-1), IL-6(interleukin-6) 등의 국소 인자에 의해 조절된다.²⁾

정상인에서는 골흡수와 골형성이 균형을 이루고 있으나

접수일 : 2001년 8월 27일

채택일 : 2001년 10월 15일

*This work was supported by the Brain Korea 21 project in 2000.

[§]To whom correspondence should be addressed.

유전적, 생리적, 환경적 인자의 변화와 더불어 파골세포의 작용이 상대적으로 증가하면 골흡수가 증가되어 골밀도가 낮아지게 되고 이 현상이 지속되면 골다공증으로 이어진다.^{1,3)} 골다공증은 어떤 연령층에서도 발생할 수 있으나 남성과 여성 모두 노화과정에서 파골세포 작용의 증가로 인하여 유병률이 증가하며, 특히 폐경 이후에 여성 호르몬인 에스트로겐 분비의 감소에 의해 폐경 여성에서 높게 나타난다.^{4,5)} 에스트로겐은 조골세포 내에서 ER α (estrogen receptor α) 혹은 ER β 수용체와 결합한 후⁶⁾ 핵으로 이동하여 골대사에 관여하는 국소인자 유전자의 ERE(estrogen response element)를 인지하여 전사 활성을 조절한다.⁷⁾ 폐경 후 에스트로겐 분비의 저하는 조골세포에서 국소인자의 발현 저하를 유도하고 그 결과 파골세포 작용의 상대적 증가로 인한 골흡수 증가와 함께 골다공증을 유발시킨다.^{1,3)}

폐경기 골다공증의 치료법으로 호르몬 대체요법인 에스트로겐 보충이 시도되어 왔으며 골량 유지에 효과적인 것으로 보고되고 있다.⁸⁾ 그러나 이 치료는 60세 이상의 고령층

에서는 골량 감소 억제효과가 폐경 초기에 비하여 낮으며, 최소 5년 이상의 장기 치료를 요하고, 불규칙한 자궁 출혈, 유방암, 자궁내막암 및 고혈압 발생 빈도 증가 등의 위험이 있는 것으로 지적되고 있다.⁸⁾ 한편, 칼슘과 비타민 D, 칼시토닌, bisphosphate, androgen 및 flavonoid 등을 이용한 골다공증 치료제에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으나 아직까지 어떠한 약물도 감소된 골량을 완전히 회복시킬 수 없으며 치료 방법도 제한되어 있는 실정이다.⁹⁾ 따라서 골다공증은 발병 후의 치료보다 예방의 중요성이 강조되고 있다.⁸⁾

최근에는 에스트로겐 투여에 의한 위험성을 보완하기 위해 한약재 및 식품 등 천연물의 활성성분을 이용한 대체요법에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.⁹⁻¹⁴⁾ 폐경기 골다공증의 예방 및 치료를 위한 대표적인 대체요법으로 식물성 에스트로겐(phytoestrogen)의 경구 투여 또는 이를 다량 함유하고 있는 식품의 섭취가 시도되고 있다.^{9,10)} 식물성 에스트로겐은 알파파(alfafa), 완두콩,オート밀, 팥, 쌀 및 대두 등에 다량 함유되어 있으며 특히 이소플라본(isoflavone)계 식물성 에스트로겐은 콩류에 많이 함유되어 있다.¹⁵⁾ 이소플라본은 aglycone인 genistein, daidzein, glycitin과 이들에 당이 결합된 배당체 등 지금까지 12 종류가 밝혀져 있고^{9,10)} 이들 중 daidzein과 genistein은 에스트로겐과 유사한 구조를 가지고 있어 세포 내에서 에스트로겐 수용체와 결합하여¹⁶⁾ 에스트로겐 효과 뿐 아니라 항에스트로겐 효과를 동시에 나타내는 것으로 밝혀졌다.^{9,10)} 따라서 에스트로겐 투여에 의한 여러 가지 부작용을 유발하지 않는 장점에 골다공증 예방을 위한 에스트로겐 대체물질로 각광을 받고 있다.^{9,10)} 이와 같이 서양에서는 이소플라본의 생리작용을 규명하고 이와 더불어 골다공증 환자들에게 이소플라본을 보충식으로 급여해야 한다는 주장이 현실화되고 있다.^{9,10)} 또한 골다공증 환자의 혈액 및 뇨에 함유된 이소플라본의 농도를 정량하여 골다공증과의 연관성에 대한 연구도 진행되고 있다.^{17,18)}

골다공증의 예방을 위해 서양에서는 대두가 널리 소비되고 있는 반면, 한의학이나 민간요법에서는 두충, 홍화, 약콩(*Rhynchosia Molubilis*: 鼠目太: 쥐눈이콩)이 사용되어 왔다.¹¹⁻¹⁴⁾ 골다공증과 연관된 약제들의 과학적 연구는 홍화나 약콩의 추출물 급여가 난소를 절제한 흰쥐에서 골생성 증진을 유도하거나 홍화 또는 두충 추출물 처리에 의해 조골세포의 증식이 증가된다는 보고가 있을 뿐¹¹⁻¹⁴⁾ 이소플라본계 식물성 에스트로겐을 다량 함유하고 있는 약콩과^{15,19)} 대두에 관한 연구는 미비한 실정이다. 또한 daidzein과 genistein이 조골세포의 활성을 증가시키는 것으로 알려져 있으나^{20,21)} 이들이 조골세포 내의 ER β 와 결합하는 것 이외

의¹⁶⁾ 작용기전에 대한 연구도 미비한 실정이다.

본 연구에서는 약콩과 대두 추출물, 에스트로겐, daidzein 및 genistein의 농도에 따라 MG-63 조골세포의 증식에 미치는 영향을 비교·분석하였다. 또한 이들 물질이 에스트로겐 수용체의 발현 및 조골세포의 증식 관련인자에 미치는 영향을 조사하여 식물성 에스트로겐의 작용기전을 제시하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 재료 및 시약

약콩은 건조된 것으로 강원도 정선산을 구입하였고, 대두는 경기도 양주산을 구입하였다. 표준 단일 물질로는 17- β estradiol(E2), genistein, daidzein(Sigma Chem. Co.)을 사용하였다. 추출용 메탄올은 Merck사(Damstandt, Germany)의 제품을 사용하였고 그 외의 시약들은 시약용 시약들을 사용하였다. 본 실험에 사용한 MG-63 human osteoblast cell은 한국 세포주 은행(서울대학교 의과대학)에서 분양 받아 본 연구실에서 계대 배양하여 사용하였다.

2. 약콩 및 대두의 추출 및 시료

약콩 및 대두 1kg에 5배 가량의 70% 메탄올로 추출하여 여과하고 여액을 감압 농축 후 72시간 동결 건조한 것을 약콩 메탄올 추출물(1.12% isoflavone 함유) 및 대두 메탄올 추출물(0.69% isoflavone 함유)로 하였다.^{15,19)} 약콩 및 대두 메탄올 추출물은 dimethylsulfoxide(DMSO, Sigma Chem, Co., 최종 농도 < 0.05%, v/v)에 녹이고 filter(0.22 μ m pore size, Millipore)로 여과 멸균하여 사용하였다. 표준 단일 물질인 17- β estradiol(E2), genistein, daidzein을 DMSO에 녹여 10⁻⁹~10⁻⁶M의 농도로 사용하였다. 약콩 및 대두 추출물의 농도는 예비 실험을 통하여 결정한 0.001, 0.01, 0.1mg/ml로 하여 실험하였다.

각 표준 단일 물질의 농도는 하루에 이소플라본 50mg을 함유하고 있는 식품을 섭취하고 있는 성인의 혈중 이소플라본 농도인 50~800ng/ml(0.2~3 \times 10⁻⁶M)와 성인 여성의 혈중 에스트로겐 농도인 40-80 pg/ml(0.15~0.3 \times 10⁻⁶M)를 기준으로 하여¹⁰⁾ 처리농도를 10⁻⁹~10⁻⁶M로 실험하였다.

3. 조골세포

MG-63 human osteoblast 세포를 polystyrene 세포 배양접시에 부착시키고 penicillin 및 streptomycin이 함유된 1% antibacterial-antifungal solution(Gibco, USA)과 10% FBS(Gibco, USA)를 첨가한 DMEM(Gibco, USA)을 사용하여 배양하였다.⁶⁾ 배양시 습도는 95%, 온도는 37 $^{\circ}$ C

를 유지하면서 5% CO₂를 계속 공급하였다.

4. 조골세포의 증식 측정

조골세포의 증식 측정은 단기간에 대량 검색이 가능한 MTS(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulphophenyl)-2H-tetrazolium) colorimetric assay 방법(Cell Titer 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay: Promega)을 사용하여 측정하였다. 96 well plate에 0.5×10^4 cells/well의 농도로 분주하고 24시간 후에 약콩 및 대두 메탄올 추출물, E2, daidzein, genistein을 농도별로 투여하여 5일간 배양하였다. 5일째 되는 날 MTS(30 μ l/well) 시약을 첨가하고 2시간 30분 동안 37 $^{\circ}$ C에서 배양한 후 MTS가 formazan으로 분해되는 양을 ELISA reader를 이용하여 490nm에서 흡광도를 측정하여 결정하였다. 각각의 처리 군을 12 well씩 준비하고 3회 반복 실험을 하였으며 각 약제에 대한 세포 증식 효과는 3번 반복 실험의 평균값을 취한 후 DMSO만을 처리한 대조군에 대한 백분율로 표시하였다.

5. ERE-Luciferase assay

ERE-luciferase 활성은 transient transfection assay에 의해 측정하였다.^{22,23)} MG-63 세포를 2×10^5 cells/35mm plate의 농도로 분주하고 pGL2-ERE-luciferase plasmid(1 μ g)²¹⁾(Haruna Sasaki-Iwaoka, Yama-nouchi Pharmaceutical Co., Japan)와 transfection의 효율성 측정을 위한 pCMV- β -galactosidase plasmid(0.25 μ g)(Clontech)를 2X HEPES buffer와 혼합하여 calcium-phosphate 방법으로 반응시켰다. 16시간 후 세포를 15% glycerol이 함유된 PBS로 2번 세척하고 배양액과 함께 약콩과 대두 메탄올 추출물 및 기타 약제를 각각의 농도별로 투여하여 48시간 동안 배양하였다.

48시간 후 세포를 PBS로 2회 세척하고 reporter lysis buffer(Promega)로 용해시켰다. Luciferase 활성은 Luciferase Assay System(Promega)를 이용하여 측정하였고 β -galactosidase 활성도 결과를 기준으로 표준화하였다.

6. Western blot analysis

에스트로겐 수용체 α 와 β 및 증식 관련 국소 인자들의 발현을 Western blot analysis에 의해 관찰하였다.^{24,25)} 약콩과 대두 메탄올 추출물 및 기타 약제를 5일간 처리한 MG-63 세포를 1ml의 RIPA buffer(20mM Tris-HCl, pH 8, 150mM NaCl, 10mM NaPO₄, 10% glycerol, 100 μ M Na₂VO₄, 100 μ M ammonium molybdate, 1% NP-40, 0.1% SDS)에 4 $^{\circ}$ C 상태로 풀어놓고, 초음파 파쇄기를 이용하여

낮은 강도로 5초 동안 세포벽을 파괴시킨 다음 16시간 동안 -20 $^{\circ}$ C에서 보관하였다. 해동 후 그 균질액을 1500 \times g에서 5분간 원심분리하여 상층액을 단백질 추출액으로 준비하였다. 조골세포에서 합성된 후 분비되는 증식 관련 국소 인자들의 발현을 보기 위한 단백질 시료는약콩과 대두 메탄올 추출물 및 기타 약제를 5일간 처리한 MG-63 세포의 배양액을 Centriplus column(Amicon Cat No. 4420)으로 농축하여 준비하였다. 단백질 양은 bovine serum albumin을 표준으로 하여 Bio-Rad protein assay를 이용하여 595 nm에서 흡광도를 측정하여 결정하였다.

준비된 단백질을 2 x sample buffer에 혼합하고 95 $^{\circ}$ C에서 5분간 끓인 다음 SDS-PAGE(polyacrylamide gel electrophoresis)에서 전기 영동시킨 후 Hybond ECL nitrocellulose membrane에 흡착시켰다. 1차 항체(ER α , ER β , IGF-1: Santa Cruz Biotech Inc.)는 5% skim milk, 0.1% Tween 20을 함유한 PBS에 희석시켜서 4 $^{\circ}$ C에서 16시간 동안 반응시킨 후, 0.1% Tween-20을 함유한 PBS로 15분씩 3차례 세척하였다. Blocking solution으로 1:5000배로 희석시킨 peroxidase-conjugated anti-IgG 이차 항체와 실온에서 1시간 동안 반응시킨 후 0.1% Tween-20을 함유한 PBS로 3차례 세척하고 발색은 ECL hyperfilm으로 확인하였다.

7. 통계분석

실험 결과는 SAS 통계 프로그램(SAS institute, 1987)을 이용하여 분석하였으며 그 결과는 평균 \pm 표준 오차로 표시하였다. 대조군과 처리군간의 조골세포의 증식 증가 효과에 대한 유의성은 general linear model(GLM)의 Duncan's multiple range test를 이용하여 $p < 0.05$ 수준에서 검증하였고 ERE-luciferase 반응성에 대한 유의성은 10⁻⁶M E2 처리를 기준으로 students' t-test를 이용하여 검증하였다.

결과 및 고찰

1. 약콩이 세포 증식에 미치는 영향

약콩과 대두의 추출물이 MG-63 조골세포의 증식에 미치는 영향을 단일 물질인 에스트로겐, daidzein, genistein과 비교하였다(Table 1). 대조군을 기준으로 10⁻⁹~10⁻⁷M 농도의 에스트로겐 처리는 세포의 증식을 유의적으로 증가시켰으나 농도와 역의 상관관계를 나타냈다. 이와 같은 경향은 같은 농도의 genistein 처리에도 나타났다. 고농도(10⁻⁶M)의 에스트로겐과 genistein 처리는 대조군에 비하여 증식

을 유의적으로 억제하였다. Daidzein 처리는 농도 의존적인 경향으로 156.9%까지 조골세포의 증식을 증가시켰으나 에스트로겐 및 genistein 처리에 의한 최대 증가치에는 미치지 못하였다. 이 결과는 genistein과 daidzein이 농도에 따라 에스트로겐 효과뿐 아니라 항에스트로겐 효과를 나타내는 이중적인 성질에 의해 세포 증식에 증가 및 억제 효과를 나타냄을 제시한다.^{9,10} 즉 genistein은 저농도인 10^{-9} ~ 10^{-7} M에서는 조골세포의 증식을 증가시키는 효과를 나타내나 10^{-6} M의 고농도에서는 증식을 억제하는 효과를 나타내며, daidzein의 증식효과는 고농도에서 더욱 현저하나 genistein에 비해 미약한 것으로 생각된다.

약콩 추출물은 0.001과 0.01mg/ml 농도에서 모두 조골세포의 증식을 증가시켰고 0.1mg/ml 농도에서는 증식억제 효과를 나타냈다. 대두 추출물은 0.001, 0.01 및 0.1mg/ml 농도에서 대조군에 비해 모두 유의적으로 증식을 증가시켰

으며 증가 최대치는 167.5%이었다.

약콩 추출물 처리에 의한 증식 증가 최대치는 176.4%로 이는 10^{-9} M genistein의 단일 처리에 의한 증가 효과에 상응하였다. 약콩과 대두 추출물에 함유되어 있는 이소플라본은 혼합체이므로 각각의 단일 이소플라본 함유량을 산출한 결과 0.001mg/ml의 약콩 추출물은 0.4×10^{-14} M genistein과 0.354×10^{-14} M daidzein을 포함하고 있었으며, 0.001mg/ml의 대두 추출물은 0.04×10^{-14} M genistein과 0.2×10^{-14} M daidzein을 포함하고 있었다.^{15,19} 이 결과는 약콩 및 대두에 함유되어 있는 저농도의 단일 이소플라본의 혼합물은 혼합체들간에 시너지 효과를 나타내어 10^{-6} M~ 10^{-9} M 농도의 이소플라본 단일 처리에 상응하는 조골세포의 증식 증가 효과를 나타냄을 의미한다.

Table 1. Proliferation of MG-63 cells with Yak-kong or soy bean extracts

Treatment	Concentration	Proliferation(% control)
Control	-	100 ^c
Estrogen(E2)	10^{-9} M	162.5 ± 9.19 ^{1a}
	10^{-8} M	122.2 ± 8.35 ^b
	10^{-7} M	119.5 ± 12.54 ^b
	10^{-6} M	74.2 ± 15.61 ^c
Control	-	100 ^b
Genistein	10^{-9} M	173.7 ± 15.34 ^a
	10^{-8} M	93.7 ± 9.87 ^b
	10^{-7} M	100.3 ± 13.54 ^b
	10^{-6} M	61.3 ± 10.55 ^c
Control	-	100 ^a
Daidzein	10^{-9} M	113.3 ± 9.60 ^{cd}
	10^{-8} M	142.2 ± 41.75 ^{ab}
	10^{-7} M	130.0 ± 11.07 ^{bc}
	10^{-6} M	156.9 ± 19.47 ^a
Control	-	100 ^b
Yak-kong	0.001mg/ml	176.4 ± 5.20 ^a
	0.01mg/ml	176.3 ± 5.60 ^a
	0.1mg/ml	85.1 ± 29.72 ^c
Control	-	100 ^a
Soy bean	0.001mg/ml	165.9 ± 12.55 ^a
	0.01mg/ml	167.5 ± 14.08 ^a
	0.1mg/ml	133.8 ± 41.96 ^b

1) Values are mean ± S.D. (%) from three independent experiments done in 12 samples/treatment
 2) Values in the same treatment with different superscript are significantly different at $p < 0.01$.
 3) MG-63 cells were plated at 0.5×10^4 cells/well. After 24 hrs, each treatment was added at indicated concentration. After 5 days, cells were trypsinized, MTS solution was added and absorbance was measured at 490 nm.

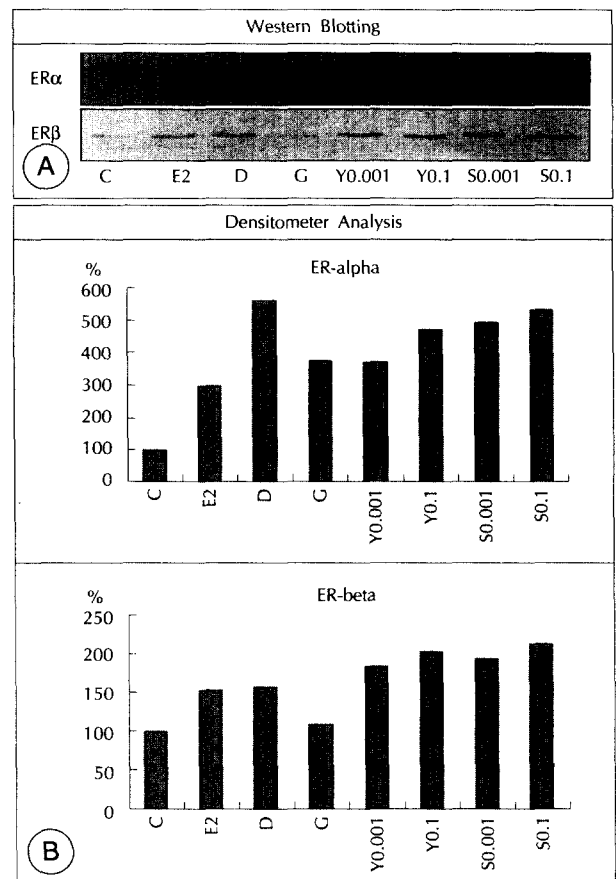


Fig. 1. Representative expression of estrogen receptor α and β in MG-63 cells. A : Protein extracts(15 μ g/lane) from control(C), E2(E : 10^{-7} M), daidzein(D : 10^{-7} M), genistein(G : 10^{-7} M) Yak-kong(0.001, 0.1mg/ml) and soy bean(0.001, 0.1mg/ml) treated MG-63 cells were subjected to 10% SDS-PAGE and immunoblotting with ER α and ER β specific antibodies. The region of each gel shown was between the Mr. 67,000 and 83,000 prestained molecular weight markers. B : The signal intensity from a representative experiment(A) was quantified and the integrated areas were percentized to the signal observed in control cells(100%). The values(%) are plotted for each treatment.

2. 약콩 및 대두 처리에 의한 에스트로겐 수용체 발현

약콩 및 대두의 추출물 처리가 MG-63 조골세포에서 에스트로겐 수용체인 ER α 및 ER β 의 발현에 미치는 영향을 살펴보았다(Fig. 1). 10⁻⁷M 농도의 에스트로겐과 daidzein 및 genistein의 처리는 ER α 의 발현을 대조군에 비해 각각 294, 556, 372% 증가시켰고 약콩과 대두 추출물 처리는 농도 의존적으로 ER α 의 발현을 증가시켰다. 약콩 추출물 0.001 및 0.1mg/ml 처리에 의해 ER α 의 발현은 대조군에 비해 366, 469% 증가하였고 대두 추출물 0.001 및 0.1mg/ml 처리에 의해서는 각각 488, 527% 증가하여 ER α 의 발현은 대두 추출물 처리에 의해 더욱 현저히 증가됨을 나타내었다.

ER β 의 발현도 10⁻⁷M 농도의 에스트로겐과 daidzein 및 genistein 처리에 의해 각각 154%, 157%, 108% 증가하였으나 ER α 발현 증가에 비해 미약하였다. ER α 의 발현뿐 아니라 ER β 의 발현도 약콩과 대두 추출물에 의해 농도 의존적으로 증가하였는데 약콩 추출물 0.001 및 0.1mg/ml 처리에 의해 각각 184, 203% 증가하였고 대두 추출물 0.001 및 0.1mg/ml 처리에 의해 각각 192, 212% 증가하였다. 이 결과는 약콩과 대두 추출물 처리는 농도 의존적으로 ER α 및 ER β 의 발현을 증가시켰고 특히 그 효과는 대두 추출물 처리에 의해 더욱 현저하였음을 나타낸다.

세포 내로 유입된 에스트로겐은 우선적으로 핵 내의 고유 수용체인 ER α 나 최근에 밝혀진 ER β 에 결합한다.⁶⁾ 에스트로겐은 ER α 수용체에 대한 친화력이 큰 반면, 에스트로겐과 유사 구조를 갖는 daidzein과 genistein은 주로 ER β 수용체에 대한 결합을 통하여¹⁶⁾ 세포내의 에스트로겐 효과뿐 아니라 항에스트로겐 효과를 동시에 초래하는 것으로 알려져 있다.^{9,10)} 최근에는 MG-63 세포를 비롯한 여러 조골세포에서 ER β 의 발현이 검증되었다.⁶⁾

3. 약콩 및 대두 처리에 의한 ERE 반응성

약콩 및 대두의 추출물 처리가 MG-63 조골세포에서 ERE-promoter의 활성화에 미치는 영향을 살펴기 위해 표준 물질과 약콩 및 대두 추출물을 투여하여 luciferase 활성의 증가와 억제를 백분율로 표시하였다(Table 2). 대조군에서는 ERE-luciferase의 활성이 측정되지 않았으며, 10⁻⁹M 에스트로겐 처리를 기준으로 10⁻⁶M 에스트로겐 처리에서는 135%, 10⁻⁹M genistein 처리에서는 128% 증가하였다. 10⁻⁹M 에스트로겐 처리를 기준으로 10⁻⁶M genistein 처리는 ERE-luciferase 활성을 증가시키지 않았고 daidzein 처리는 농도와 무관하게 활성을 증가시키지 않았다. 따라서 이 결과는 genistein과 daidzein이 농도에 따라 에스트로겐 효과뿐만 아니라 항에스트로겐 효과를 나타내는 이중적

Table 2. Increased ERE-luciferase activity with treatment of Yak-kong extracts

Treatment	Concentration	ERE-luciferase activity (% 10 ⁻⁹ M Estrogen)
Estrogen(E2)	10 ⁻⁹ M	100.2 ± 6.00 ¹⁾
	10 ⁻⁶ M	135.0 ± 19.65*
Genistein	10 ⁻⁹ M	128.0 ± 17.82*
	10 ⁻⁶ M	92.5 ± 38.35
Daidzein	10 ⁻⁹ M	90.0 ± 10.45
	10 ⁻⁶ M	100.0 ± 11.21
Yak-kong	0.001mg/ml	122.0 ± 10.75*
	0.1mg/ml	62.0 ± 11.66*
Soy bean	0.001mg/ml	75.0 ± 10.75*
	0.1mg/ml	57.0 ± 11.31*

1) Values are mean ± S.D. (%) from two independent experiments done in 6 samples/treatment.

2)* showing significant by t-test at p < 0.01 respectively.

3) MG-63 cells were plated at 2 × 10⁵ cells/35mm dish. After 24hrs, cells are transiently transfected with pGL2-ERE-luciferase and pCMV- β -galactosidase by calcium-phosphate method. After 16hr exposure to DNA, cells were washed and each treatment was added for an additional 48 hours. Luciferase activities were measured and normalized by the β -galactosidase activities to correct for the transfection efficiency. The results are shown as % based on 10⁻⁹M estrogen treatment.

인 성질을 가지는 물질임을 확인하여 주었고^{9,10)} 저농도의 (10⁻⁹M) genistein 처리에 의한 MG-63세포의 증식효과는 (Table 1) ERE 반응성 증가를 수반하고 있음을 (Table 2) 제시하는 것으로 사료된다.

약콩과 대두 추출물 처리에 의한 ERE-luciferase 활성의 변화를 비교했을 때 10⁻⁹M 에스트로겐 처리를 기준으로 대두 추출물 처리는 농도에 관계없이 ERE의 반응성을 억제한 반면, 0.001 mg/ml의 약콩 추출물 처리는 ERE 반응성을 122% 증가시켰는데 이는 10⁻⁹M genistein 처리에 의하여 ERE-반응성이 128% 증가된 결과와 유사한 효과였다. 또한 이 결과는 Table 1에서 0.001 mg/ml 약콩 추출물 처리에 의한 조골세포의 증식이 ERE 반응성 증가를 수반하였음을 제시한다(Table 1, 2). 한편, 0.1 mg/ml 약콩 추출물 처리는 조골세포에 대한 증식 억제뿐 아니라 ERE의 반응성을 억제하였다(Table 1, 2). 즉, ERE-luciferase 활성 측정에 의한 Table 2의 결과는 저농도의 약콩 추출물 처리는 에스트로겐 반응성을 증가시켰고 반면에 대두 추출물은 농도에 관계없이 에스트로겐 반응성을 억제함을 나타내었다.

4. 약콩 및 대두 처리에 의한 IGF-I 발현

IGF-1의 발현은 10⁻⁷M의 E2와 daidzein 및 genistein 처리에서 각각 112%, 140%, 143%가 증가되었다(Fig. 2).

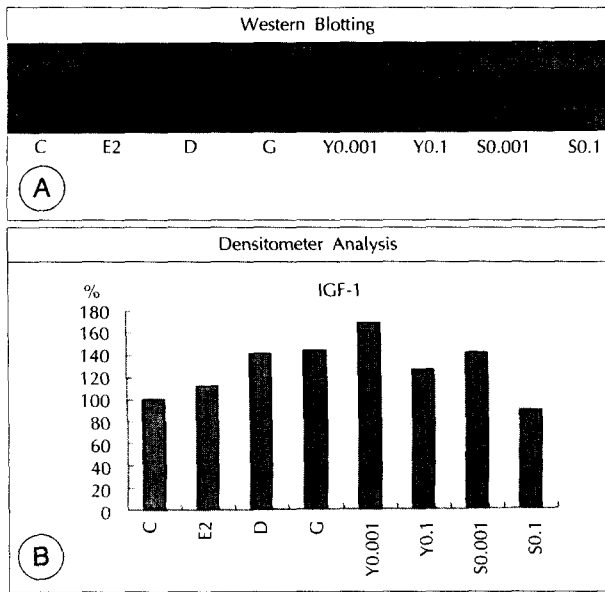


Fig. 2. Representative expression of IGF-1 in MG-63 cells. A : Protein samples(15µg/lane) were prepared by concentration of collected media from control(C), E2(E : 10⁻⁷M), daidzein(D : 10⁻⁷M), genistein (G : 10⁻⁷M) Yak-kong(0.001, 0.1mg/ml) and soy bean(0.001, 0.1mg/ml) extract treated MG-63 cells. Proteins were subjected to 15% SDS-PAGE and immunoblotting with IGF-1 specific antibodies. The region of each gel shown was between the Mr. 14,500 and 6,500 prestained molecular weight markers. B : The signal intensity from a representative experiment(A) was quantified and the integrated areas were percentized to the signal observed in control cells(= 100%). The values(%) are plotted for each treatment.

특히 IGF-I의 발현은 0.001mg/ml 약콩 추출물 처리에 의해 가장 현저히 증가하였는데(168% : Fig. 2) 이는 약콩에 함유되어 있는 저농도의 이소플라본 혼합체가 10⁻⁷M daidzein이나 genistein 표준 단일 물질 처리보다 더욱 현저히 IGF-I의 발현을 증가시킴을 나타낸다. 0.001mg/ml 대두 추출물 처리는 IGF-I의 발현을 141% 증가시켰고 이 효과는 10⁻⁷M의 daidzein과 genistein 처리와 유사하였으나 고농도의 대두 추출물 처리는 IGF-I의 발현을 억제하였다. 0.001mg/ml 약콩 추출물에 의한 IGF-I의 발현 증가는 Table 1과 2에 제시한 MG-63 조골세포의 증식 및 ERE 반응성 증가와 일치하였고 이 결과는 저농도의 약콩 추출물이 MG-63 조골세포에서 ERE의 반응성을 크게 증가시키고 IGF-I의 발현을 선택적으로 유도하여 현저한 증식 증가를 초래함을 제안한다. 대두 추출물 처리에 의한 조골세포의 증식 증가는 에스트로겐 수용체(ERα : ERβ)의 발현 증가에도 불구하고 ERE 반응성이나 IGF-I의 발현 증가와의 연관성은 미비하였다.

Estrogen에 의한 세포 증식 유도 기전에 대한 연구 결과들은 estrogen이 직접 증식을 유도하기보다는 growth factor와 growth factor 수용체의 발현 및 mitogenic activity를

증가시킴으로써 세포의 증식을 유도함을 제안하였는데^{26,27)} 본 실험의 결과는 약콩에 함유되어 있는 저농도의 단일 이소플라본의 혼합물이 선택적으로 IGF-I 증식 유도인자의 발현을 증가시켜 현저한 증식 증가를 초래함을 나타낸다.

요약 및 결론

본 논문에서는 약콩 및 대두 추출물 처리에 의한 조골세포의 증식 작용기전을 식물성 에스트로겐의 관점에서 연구하고자 MG-63 osteoblast 세포주에 약콩 및 대두 메탄올 추출물을 처리하여 에스트로겐 수용체 발현, ERE-luciferase의 활성 및 증식 관련 인자들의 발현을 조사하였으며, 그 결과를 요약하면 다음과 같다.

1) MG-63 세포에 0.001, 0.01, 0.1mg/ml 농도의 약콩 또는 대두의 메탄올 추출물을 처리한 결과 저농도(0.001, 0.01mg/ml)에서는 ~70%의 증식 증가 효과를 나타내었다.

2) 0.001과 0.1mg/ml 농도의 약콩 또는 대두 추출물을 처리한 MG-63 세포에서 에스트로겐 수용체의 발현 변화를 살펴본 결과 ERα와 ERβ의 발현은 약콩과 대두 추출물 처리에 의해 모두 증가하였고 특히 이 효과는 대두 추출물 처리에 의해 더욱 현저하였다.

3) 저농도(0.001mg/ml)의 약콩 추출물 처리는 ERE-luciferase의 활성을 22% 증가시킨 반면, 대두 추출물 처리는 농도에 관계없이 ERE 활성을 억제하였다.

4) 약콩 및 대두 추출물 0.001과 0.1mg/ml 농도에서 IGF-I 이외의 국소인자들의 발현은 나타나지 않았다. IGF-I의 발현은 약콩 및 대두 추출물뿐만 아니라 표준 물질인 17-βestradiol, daidzein, genistein 처리에 의해 모두 증가하였는데 특히 저농도의(0.001mg/ml) 약콩 추출물에 의해 증가 최대치(68%)를 나타내었다.

이상의 결과를 종합해 보면 이소플라본 혼합체인 약콩 추출물은 저농도에서 ERE 반응성을 증가시키고 IGF-I의 발현을 선택적으로 유도하여 MG-63 조골세포의 증식을 유도하였다. 반면에 대두 추출물 처리에 의한 조골세포의 증식은 에스트로겐 수용체(ERα : ERβ)의 발현 증가에도 불구하고 ERE 반응성이나 IGF-I의 발현과의 연관성은 미비하였다.

Literature cited

- 1) Park JS. Physiological effect of isoflavone(II): osteoporosis and postmenopausal symptom. *Natl Nutr* 215: 25-31, 2000
- 2) Spelsberg TC, Subramanian M, Riggs BL, Khosla S. The actions and interactions of sex steroids and growth factors/cytokines on the

- skeleton. *J Mol Endocrinol* 13(6): 19-828, 1999
- 3) Kim KS. Osteoporosis. The Women's News. Seoul. 39, 1998
 - 4) 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(1): 36-42, 2000
 - 5) Rogers J. Estrogens in the menopause and postmenopause. *N Eng J Med* 280: 364-367, 1967
 - 6) Vidal O, Kindblom LG, Ohlsson C. Expression and localization of estrogen receptor- β in murine and human bone. *J Bone Miner Res* 14(6): 923-929, 1999
 - 7) Sasaki-Iwaoka H, Maruyama K, Endoh H, Komori T, Kato S, Kawashima H. A trans-acting enhancer modulates estrogen-mediated transcription of reporter genes in osteoblasts. *J Bone Miner Res* 14(2): 248-255, 1999
 - 8) Kim KS. Osteoporosis. The Women's News. Seoul. 10-11, 1998
 - 9) Anderson JJB, Garner SC. Phytoestrogens and bone. *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 12(4): 543-557, 1998
 - 10) Setchell KDR, Cassidy A. Dietary isoflavones: biological effects and relevance to human health. *J Nutr* 129: 758S-767S, 1999
 - 11) Lee HK. Effect of black bean and sam-ryung-bak-chul-san(蔘苓白朮散) on ovariectomy- induced postmenopausal osteoporotic rats. Doctoral Thesis. The Graduate School of Kyung Hee University, 1998
 - 12) Ryu IC, Lee YM, Koo Y, Bae KW, Chung CP. Effect of safflower extracts on activity of PDL cells and MG-63 cells. *J Korean Acad Periodontology* 27(4): 867-882, 1997
 - 13) Ho JY. Cell proliferation effects of eucommiae cortex and acanthopanax cortex methanol extracts on the osteoblast-like cell lines, MG-63 and Saos-2. Master thesis. The Graduate School of Kyung Hee University, 2001
 - 14) Kim MR, Yang CH, Seo BI. Effects of safflower seeds on bone mineral density in ovariectomy-induced postmenopausal osteoporotic rats. *Korean J Herbology* 13(2): 37-43, 1998
 - 15) Kim CS, Lee YS, Kim JS, Hahn YH. High performance liquid chromatographic analysis of isoflavones in soybean foods. *Korean J Food Sci Technol* 32(1): 25-30, 2000
 - 16) Miksicki RJ. Interaction of naturally occurring nonsteroidal estrogens with expressed recombinant human estrogen receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol* 49: 153-160, 1994
 - 17) Potter SM, Baum JA, Teng H, Stillman RJ, Shay NF, Erdman JW. Soy protein and isoflavones: their effects on blood lipids and bone density in postmenopausal women. *Am J Clin Nutr* 68: 1375S-1379S, 1998
 - 18) Pansini F, Bonaccorsi G, Albertazzi P, Constantino D, Valerio A, Negri C, Ferrazzini S, Boncuore I, De Aloysio D, Fontana A, Pansini N, Mollica G. Soy phytoestrogen and bone. In: Proceedings of North American Menopause Society, p44(abs), 1997
 - 19) Kang SA, Jang KH, Cho YH, Hong KH, Kong SH, Choue RW. High performance liquid chromatographic analysis of isoflavones in soybean and blackbean. *J ARAHE* 8: 44-48, 2001
 - 20) Blair HC, Jordan SE, Peterson TG, Barnes S. Variable effects of tyrosine kinase inhibitors on avian osteoblastic activity and reduction of bone loss in ovariectomized rats. *J Cell Biochem* 61: 629-637, 1996
 - 21) Fantì P, Monier-Faugere MC, Geng Z, Schmidt J, Morris PE, Cohen D, Malluche HH. The phytoestrogen genistein reduces bone loss in short-term ovariectomized rats. *Osteoporosis Int* 8: 274-281, 1998
 - 22) Cho Y, Talmage DA. Protein kinase C α expression confers retinoic acid sensitivity on MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Exp Cell Biol* 269: 97-108, 2001
 - 23) Graham FL, Van Der Eb AJ. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 52: 456-467, 1973
 - 24) Cho Y, Tighe AP, Talmage DA. Retinoic acid induced growth arrest of human breast carcinoma cells requires protein kinase C α expression and activity. *J Cell Physiol* 172: 306-313, 1997
 - 25) Khuri FR, Cho Y, Talmage DA. Retinoic acid-induced transition from protein kinase C β to protein kinase C α in differentiated F9 cells: correlation with altered regulation of proto-oncogene expression by phorbol esters. *Cell Growth Differ* 7: 595-602, 1996
 - 26) Halter SA, Dempsey P, Matsui Y, Strokes MK, Graves-Deal R, Hogan BL, Coffey RJ. Distinctive patterns of hyperplasia in transgenic mice with mouse mammary tumor virus transforming growth factor- α . Characterization of mammary gland and skin proliferation. *Am J Pathol* 140: 1131-1146, 1992
 - 27) Daly RJ, Binder MD, Sutherland RL. Over-expression of Grb2 gene in human breast cancer cell lines. *Oncogene* 9: 2723-2727, 1994