

## 복분자(*Rubus coreanus* Miquel) 추출물이 MC3T3-E1 조골세포의 활성화와 분화에 미치는 영향

이지원 · 이인선<sup>1,\*</sup>

계명대학교 식품공학학과, <sup>1</sup>계명대학교 전통 미생물자원 개발 및 산업화 연구센터

Received October 15, 2004 / Accepted November 24, 2004

**Effects of *Rubus coreanus* Miquel Extracts on the Activity and Differentiation of MC3T3-E1 Osteoblastic Cell.** Ji-Won Lee and In-Seon Lee<sup>1,\*</sup>. The Center for Traditional Microorganism Resources Center, Keimyung University 704-701, Korea, <sup>1</sup>Dept. of Food Science & Technology, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea - The osteoblastic cell activity is important for bone formation, thus, this study was performed to investigate of that the effect of edible sources, *Rubus coreanus* Miquel (RCM), on the proliferation and differentiation of MC3T3-E1 osteoblastic like cell. The effects of RCM extract on cell proliferation were measured by MTT assay. At 1, 10 µg/mL of RCM extract treated, that were elevated of cell proliferation to 103 and 142% via control, respectively. And the cell differentiation were measured as alkaline phosphatase (ALP) activity at 3, 9, 18, and 27 days. As the results, the 10 µg/mL was increased ALP activity more than 2.6 times compared with control, 1.4 times via positive control at 27th day ( $p < 0.05$ ). The optical concentration of RC extract was rechecked by ALP staining and Alizarin Red staining for investigation of the induction of ALP activity, nodule formation by mineralization. mRNA expression analysis showed that the RCM (10µg/mL) increased in SOX9 as well as ALP in MC3T3-E1 cells. These results suggest that RC extract was stimulates the MC3T3-E1 cell proliferation and differentiation.

**Key words** – *Rubus coreanus* Miquel, osteoblast, bone formation, proliferation, alkaline phosphatase, mineralization

인체의 골(骨)은 형성(bone modeling)과 재형성(bone remodeling) 과정을 통하여 그 항상성을 유지하게 된다. 골의 형성은 태생기부터 시작하여 골격이 성숙되어 성장이 끝나는 청장년기까지 지속되며 조골세포(osteoblast)의 활동으로 인한 골형성이 파골세포(osteoclast)의 활동으로 인한 골흡수보다 훨씬 많게 된다(28). 골의 재형성은 이미 성장이 끝난 후 오래된 골을 제거하고 다시 새로운 골로 대체되는 과정으로, 골 개조 단위(bone remodeling unit)에서 이러한 골아세포 활성화와 파골세포 활성의 균형을 통하여 그 항상성이 유지된다. 그러나 골아세포 활성도의 약화로 골형성이 감소되거나 파골세포의 활성도가 강화되어 골의 흡수가 증가되는 경우, 또는 두 가지 요소가 동시에 작용되는 경우에 골대사 질환이 생긴다.

골대사 질환 중 고령화사회에서 큰 문제로 대두되고 있는 골다공증은 골의 화학적 조성에는 큰 변화 없이 단위 용적내의 골량이 감소하여 경미한 충격에도 쉽게 골절을 일으킬 수 있는 질환으로 노인 특히 폐경 후 여성들에게서 가장 그 발생빈도가 높게 나타나서 골다공증의 주요원인으로 에스트로겐의 분비부족이 지적되어 왔다(22). 현대에서는 젊은 연령층 뿐 아니라 남자들도 골다공 증세를 많이 보이는 것으로 보고되고 있으므로(35), 이와 같은 골대사 불균형은 일차적

으로 골아세포의 기능저하에 의한 것인지, 혹은 골흡수의 증가 즉, 파골세포의 활성도 강화에 의한 것인지 대하여는 여러 가지 이론과 주장이 제기되고 있다. 그 중 연령의 증가, 영양결핍, 운동부족, 칼슘 섭취의 부족, 유전적 요소, 약물복용, 호르몬의 영향 등을 꼽을 수 있다(32). 현재 골다공증의 예방과 치료에 가장 많이 이용되고 있는 방법은 estrogen이나 천연에 존재하면서 약한 estrogen 활성을 나타내는 식물유래의 phytoestrogen이 폐경 후 골다공증 예방에 매우 유용하게 처방되고 있다(1). 그 예로서, 콩에 다량 함유된 isoflavone류 중 genistein과 diadzein 등은 estrogen 유사활성 물질로, 콩이 폐경성 골다공증을 예방 할 수 있는 것으로 보고되고 있다(17). 그러나 이 방법 또한 폐경성 골다공증 이외의 원인에는 제한적으로 사용되므로 칼슘보충제, vitamin D 대사산물과 thiazide diuretics 요법, calcitonin 요법, bisphosphonates 및 불소요법 등이 비폐경성 골다공증 치료에 이용되고 있으며(26), 성장인자를 치료와 예방법으로 사용하는 것에 대한 연구도 진행되고 있다(16). 또한 현재 골다공증 예방 및 치료에 사용되고 있는 약제는 대부분 골흡수를 억제하는 작용을 하기 때문에 이미 진행된 골소실을 완전히 회복할 수 없어, 궁극적인 목표인 골다공증의 발생을 완전히 예방할 수 없는 현실이다. 이에 골다공증의 예방과 치료를 위해 골형성 증가에 관한 연구가 많이 이루어지고 있으며 최근 동양의학에서 사용되던 몇몇 생약제제에 대한 효능 및 효과를 근거로 골조직 재생능력에 미치는 영향 등에 대한 과학적인 접근이 시도되

### \*Corresponding author

Tel : +82-53-580-6440, Fax : +82-53-580-6447

E-mail : inseon@kmu.ac.kr

고 있다(7,3).

골아세포의 배양법은 골의 대사 즉 골형성 및 흡수, 골세포의 생성 및 분화 등의 연구와 각종 호르몬이나 성장인자, cytokines 등이 골대사에 미치는 효과 그리고 식품유래 천연물질의 골대사 조절물질을 검색하는데 비교적 간편하면서 유용한 방법으로 소개되고 있다(5,23,30). 골세포의 세포활성과 관련된 연구에서 유용하게 이용되고 있는 Mouse calvaria 유래의 MC3T3-E1 osteoblastic cell은 *in vivo* 골형성 과정 중 세포의 증식, 분화, 석회화 등 골아세포와 유사한 대사적 특징을 가지고 있으며 적절한 자극 하에 골수의 stromal cell이나 결합조직의 mesenchymal stem cell이 분화되어 생긴 것으로, 조골세포 전구체(osteoprogenitor)로부터 전조골세포(pre-osteoblast)와 조골세포, 그리고 골내막세포(bone lining cell) 또는 골세포(osteocyte)로 분화되는 과정에 속하는 세포이다. 조골세포는 골 표면에 근접해 있으며 세포질내에 과립형질내 세망이 발달해 있고, 핵 주위로 골지체가 위치하며, 골지체 바깥 세포질에 사립체가 존재하며, 세포막에 당단백 효소인 alkaline phosphatase (ALP)를 가지고 있다(8). 이 효소는 기질 특이성과 염기성 pH에서 최적의 활성을 나타내며 세포외막과 석회화 조직의 기질세포에서 높은 농도로 발견되어 석회화 과정 동안 무기인산의 운반, 세포분열이나 분화의 조절자로서 역할을 한다.

Stein 등(34)은 골세포 표지인자로 염기성 분해효소 활성도를 측정하여야 하며, 골세포 분화의 표지인자라고 하였으므로, 본 연구에서는 이 세포를 이용한 *in vitro* screening system을 식품유래천연물질 중 조골활성 및 분화인자를 가지는 물질을 검색하는 방법으로 활용하였다.

한편, 복분자(*Rubus coreanus* Miquel)는 장미과의 낙엽 관목이며 6월에 검붉은 열매가 수확된다. 복분자는 식용으로 이용되고 있을 뿐만 아니라 예로부터 한방에서 약재로 사용되어지고 있어(20) 다양한 기능성물질이 함유되어 있을 것으로 생각된다. 복분자 나무에 관한 연구로는 잎과 줄기로부터 tannin 및 flavonoids 화합물 등이 보고된 바 있으며(41), 미숙 복분자 열매에서 gallic acid, 2,3-(S)-HHDP-D-glycopyranose, sanguin 등의 항산화 물질에 대한 연구결과들이 보고(40,29)된 바 있다. 이에 성분분석 및 항산화 활성에 대한 연구를 배경으로 조골세포에 대한 효과 및 골형성에 대한 영향을 살펴보고자 본 연구에서는 우리나라 자생 천연식용자원 중 복분자 추출물이 조골세포인 MC3T3-E1 cell을 이용하여 뼈형성 세포의 증식과 분화 촉진효과를 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 시료조제

본 실험에 사용된 복분자는 대구 약령시장에서 건조된 것을 구입하여 불순물을 제거하고 세척한 다음 동결건조한 후

분말화 하였다. 분말화 된 시료무게의 10배량(w/v)의 80% methanol로 24시간동안 3회 추출하였으며, 추출액은 여과지(Whatman No.3, England)로 2회 여과하고 상등액은 rotary vacuum evaporator (Buchi R-205, Flawil, Switzerland)로 농축한 후 동결건조하여 methanol 추출물을 제조하였다.

## 복분자 추출물을 이용한 조골세포 활성검색

### 세포배양

Mouse calvaria osteoblast cell인 MC3T3-E1 cell은 계명대학교 의과대학 생화학교실에서 분양받아 사용하였다. 최 등(9)의 방법을 참고하여  $\alpha$ -MEM (Gibco BRL, Grand island, N.Y., USA)배지에 10% FBS (Gibco)와 1% antibiotics (Gibco)를 첨가하여 37°C의 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 2-3일 마다 계대 배양하면서 실험에 사용하였으며, 분화유도를 위해 5 mM  $\beta$ -glycerol phosphate (Sigma Chem. Co., St. Louis. Mo., USA)와 50 mg/mL의 vitamin C (Sigma)를 첨가하여 분화유도배지로 사용하였으며, 3일마다 배지를 교환하였다(25,21).

### 조골세포 증식유도 측정

시료의 농도별 처리에 따른 조골세포의 성장 정도는 Green등(14)의 방법에 따라 (3-(3,4-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide 시약의 환원정도를 측정하는 MTT assay로 측정하였다. 먼저 배양한 cell을 0.4% trypan blue를 사용하여 계수한 후  $1 \times 10^5$  cells/well로 조정하여 분주한 다음 각 시료를 최종농도 1, 10, 100, 및 1,000  $\mu$ g/mL 되게 20  $\mu$ L씩 첨가한 후 37°C의 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 48시간 배양하였다. 대조군은 시료 대신 배지를 20  $\mu$ L 첨가하여 동일하게 배양하였다.

배양 후 (3-(3,4-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT; Sigma)시약을 5 mg/mL농도로 10  $\mu$ L를 각 well에 첨가하여 4시간 더 배양한 후 배지를 제거하고 PBS로 2회 세척한 후 DMSO를 100  $\mu$ L씩 첨가하여 생성된 불용성의 formazan 결정을 용해시켜 ELISA reader (Spectra MAX 340 pc, Molecular Device, USA)로 550 nm에서 흡광도를 측정하였고 세포의 증식률은 시료의 흡광도를 대조군의 흡광도에 대한 백분율로 나타내었다.

$$\text{Cell growth (\%)} = \frac{\text{대조군의 흡광도} - \text{시료처리군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \times 100$$

### Alkaline phosphatase 효소활성 측정

포화배양된 MC3T3-E1 세포를  $1 \times 10^5$  cell/well로 조정하여 96well plate에 분주하고 24시간 후 분화유도배지로 교환하여 24시간 배양 후 시료처리를 하였다. 복분자 추출물과 양성대조군을 넣어 각각 3, 9, 18, 27일로 세포를 배양한 후 PBS로 3회 세척한 다음 0.1% Triton X-100을 20  $\mu$ L씩 첨가하

여 37°C에서 30분간 lysis하였다. Lysis된 cell의 상등액 5 µL는 단백질 정량에 사용하였고, 나머지 상등액에 20 µL의 0.1N glycine과 10 µL의 100 mM p-nitrophenylphosphate (p-NPP)를 첨가한 후 다시 37°C에서 30분간 반응시켰다. 반응 후 200 µL의 0.1 N NaOH로 반응을 중지하고 405 nM에서 흡광도를 측정하였다. ALP activity는 p-NPP로부터 생성된 p-nitrophenol (p-NP)를 측정하여 p-NP에 대한 표준그래프를 작성한 후 활성도를 도출하였고, 단백질 량으로 나누어 단위단백질함량 당 효소활성도를 산출하였다(10,18).

**ALP 염색법에 의한 조골세포 활성검색**

ALP 효소의 염색 정도를 측정하기 위해 24 well에 1×10<sup>5</sup> cells/mL로 처리하고 추출물을 적정농도로 희석처리한 후 시간경과에 따른 효소 활성을 측정하였다. 염색은 alkaline phosphatase (AP) kit (Sigma)를 사용하여 측정하였다. 그 방법은 다음과 같다. 먼저, 배지를 제거하고 고정액(citrate-acetone- formaldehyde)을 첨가하여 약 30초간 실온에 보관하였다가 45초간 증류수로 헹구었다. 준비된 diazonium solution (sodium nitrite : FRV-alkaline : naphthol AS-BI alkaline solution = 1:1:1)을 첨가하여 약 15분간 실온에서 방치한 뒤 2분간 증류수로 세척하고 hematoxylin solution으로 2분간 다시 염색한 뒤 흐르는 물로 염색액을 제거한 다음 현미경으로 관찰하였다(11,39,6).

**Alizarin-Red 염색법에 의한 석회화 형성도 검사**

ALP 염색법과 동일하게 24 well에 조골세포를 1×10<sup>5</sup> cells/mL로 처리한 뒤, 배지를 제거하고, PBS로 세척한 뒤, 70% EtOH로 4°C에서 1시간동안 고정시켰다. Alizarine red (AR) solution은 10 mL의 증류수에 40 mM이 되게 농도를 맞춘 뒤 pH를 4.2로 조정하였다. 준비한 AR solution으로 10 분간 염색하고, 증류수로 2번 washing한 뒤 염색되지 않은 부분은 PBS로 씻어주면서 제거해주고 표면이 너무 마르지 않게 PBS로 조금 적셔주면서 현미경으로 nodule형성 정도를 관찰하였다. Nodule 형성 확인 후 10 mM sodium phosphate (pH 7.0)에 10% cetylpyridinium chloride를 첨가하여 15분간 녹이고 염색된 정도는 562 nM에서 흡광도로 측정하였다(19,24,33).

**RT-PCR법에 의한 조골세포 분화 관련 골기질 유전자 발현 조사**

Total RNA는 조골세포를 100 φ dish에 1×10<sup>6</sup> cells/mL로 9일간 배양하여 분리하였다. TRI reagent (Molecular Research Center, Inc.)를 사용하여 제조사의 지침에 따라 분리하였다. 배양된 세포에서 배지를 제거하고 phosphate buffered saline (PBS, pH7.4) 10 mL로 두 번 세척한 후 TRI reagent를 처리하였다. 이것을 1.5 mL tube에 1 mL씩 담고 1-bromo-3-chloropropane을 200 µL 첨가하여 30초간 vortex 하여 원심분리 (3,000 rpm, 15분, 4 °C)하여 상등액을 취해 새로운

tube에 옮겼다. 여기에 동량의 isopropanol을 첨가하여 -20°C에서 2시간 이상 방치하고 나서 원심분리(13,000 rpm, 15분, 4°C)한 후 상등액을 제거하였다. 침전물에 75% 에탄올을 첨가하여 제거한 후 diethyl pyrocarbonate (DEPC) 처리된 증류수를 첨가하여 65°C 수조에서 10분간 반응시켜 침전물을 녹였다. 분리된 RNA는 spectrophotometer와 1% formaldehyde agarose gel 전기영동을 이용하여 정량하고 확인하였다.

분리된 total RNA 2 µg, superscript II RT200 U, 0.5 µg Oligo dT, 0.5 mM dNTP를 첨가하여 42 °C에서 90분간 반응시킨 후 70°C에서 10분간 반응을 종결시켰다.

Total RNA는 역전사되고 결과물인 cDNA는 Table 1의 primer들을 이용한 PCR 방법으로 증폭되었다. PCR의 반응에는 2.5 U Takara Ex. Taq polymerase, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTP를 첨가하여 각각의 primer에 맞는 조건으로 실시하였다.

**통계처리**

실험결과의 통계분석은 SAS program을 이용한 분산분석법을 실시하여 Duncan's multiple range test에 의해 시료간의 유의적 차이를 검정하였다.

**결과 및 고찰**

**복분자 추출물의 조골세포에 대한 증식유도 검색**

복분자 추출물의 시료농도에 따른 추출물의 조골세포 성장에 미치는 영향을 MTT assay (4)로 분석한 결과는 Fig. 1과 같다. MC3T3-E1 cell에 복분자 추출물을 10 µg/mL 처리하였을 때 대조군과 비교하여 140%이상의 증식률을 보였고, 1 µg/mL에서는 100%이상, 반면 0.1 µg/mL에서는 95.6%, 최고 높은 농도인 100 µg/mL에서는 80% 이하의 저해율을 보였다. 따라서 조골세포주에 대한 저해율을 거의 보이지 않은 미역취뿌리 추출물과 분획물의 최적 작용 농도를 0.1~100 µg/mL 로 결정하였다.

최(8)는 대두에탄올추출물을 50~100 µg/mL의 농도로 조

Table 1. Oligonucleotide primers for RT-PCR

Gene	Fragment size (bp)	Oligonucleotides
Alkaline phosphatase	474	F; 5 - CCAAGADGTACAACACCAACGC-3 R; 5 - AAATGCTGATGAGGTCCAGGC-3
Type II collagen	172	F; 5 - CACACTGGTAAGTGGGCAAGACCG-3 R; 5 - GGATTTGTTGTTTCAGGGTTCGGG-3
SOX9	592	F; 5 - GACGTGCAAGCTGGCAAG-3 R; 5 - TGGTCAGCGTAGTCGTAATC-3
Osteocalcin	323	F; 5 - AAATGCTGATGAGGTCCAGGC-3 R; 5 - ACCGTAGATGCGTTTGTAggc-3
Osteopontin	640	F; 5 - GATGAATCTGACGAATCTCAC-3 R; 5 - CTGCTTAATCCTCACTAACAC-3

골세포주에 처리한 결과, 대조군에 비해 최고 117%의 증가를 나타내었다고 보고하였는데 복분자 추출물은 140% 이상의 조골세포의 증식을 보였으므로 대두에탄올추출물 결과보다 훨씬 좋은 조골세포 증식유도를 나타냄을 확인 할 수 있었다.

**복분자 추출물의 조골세포에 대한 분화유도 검색**

**Alkaline phosphatase (ALP) 효소활성 측정**

조골세포를  $1 \times 10^5$  cells/well 이 되도록 한 후 분화배지에 복분자 추출물을 0.1-100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도로 처리하고 3~27일까지 배양하면서 ALP 효소 활성을 조사하였다. 그 결과 Fig. 2에서와 같이 조골세포는 배양후 18일 이후부터 ALP 활성이 유도되는 것을 확인하였으며, 추출물 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도의 경우 27일째에 대조군에 비해 약 2.6배의 ALP 활성이 유도되었으며, 양성대조군인 dexamethasone과 genistein에 비해 약 1.5배 이상 유의적인 ALP 활성이 유도되었다( $p < 0.05$ ).

조골세포배양 시 첨가한 vitamin C와  $\beta$ -glycerol phosphate는 ALP와 세포외기질의 석회화에 영향을 미친다고 알려져 있다. Vitamin C는 MC3T3-E1 세포에서 Type I collagen 발현을 자극하지는 않지만 세포외기질에서 collagen 침착에는 반드시 필요하며, 성숙세포에서 ALP의 활성을 유도하고 그리고  $\beta$ -glycerol phosphate는 vitamin C에 대해 상승효과를 보이며, 분화된 조골세포에서 collagen 축적이나 ALP 활성도를 더욱 증가시킨다고 보고되고 있다(12). 한편 복분자에 대한 몇몇 연구 중 성분분석을 한 연구결과, 영양성분으로는 무기질의 인과 철, 칼륨이 많이 함유하여 있고 특히 유기산과 비타민 C가 많이 포함되어 있으며, phenol 화합물들로 aempferol, quercetin, sanguin H-5, ellagic acid, 3-O- $\beta$ -D-glucuronide 등이 보고(20)되고 있어 이 성분들이 조골세포의 분화에 영향을 미치는 것으로 보인다.

Quarles (31)등은 MC3T3-E1 세포의 분화시 vitamin C와  $\beta$ -glycerol phosphate의 영향에 대하여 연구한 바, vitamin C가 없을 때에는 MC3T3-E1 세포의 성장이 거의 정지되었고, 충분히 분화하지 못하여 세포외기질 형성이나 석회화는 이루어지지 못했다고 하였다.

본 연구의 양성대조군에 첨가한 국소용 부신피질 호르몬 제제인 dexamethasone은 조골세포를 분화시켜 골 형성을 증가시킨다고 하며(2), 쥐의 두개골과 골수에서 채취한 조골성 dexamethasone으로 처리한 경우 골 특이 단백질인 osteopontin과 ALP효소, osteocalcin 등의 합성이 증가한다고 하였다(27). 한편, dexamethasone이 부족한 배지에서는 조골세포 뿐만 아니라 조골유사세포도 결절이나 그와 유사한 치밀한 물질을 형성시키지 못한다고 하는(38) 보고들이 있다. 그러나 본 연구에서는 이러한 여러 결과로 분화능이 입증된 dexamethasone을 처리한 양성대조군의 경우 보다 복분자 추출물을 처리하였을 때 ALP 활성도가 높게 나타났

다. 그러므로 보다 깊은 연구를 통하여 신약개발로의 활용을 모색해 볼 수 있을 것이다.

**ALP 염색법에 의한 조골세포 활성검색**

조골세포내 ALP 효소의 유도를 확인하고자 AZO 색소법(Burstone법)으로 검토했다. 즉, Naphthol AS-BI phosphate 기질은 조직내 존재하는 ALP효소에 의해 가수분해되어 orthophosphate와 naphthol이 유도체로 유리되고, 유리된 naphthol은 반응액에 함유되어 있는 diazonium 염과 즉시 결합하여 AZO dye를 형성하므로 적색의 효소 활성 부위를 나타내게 된다.

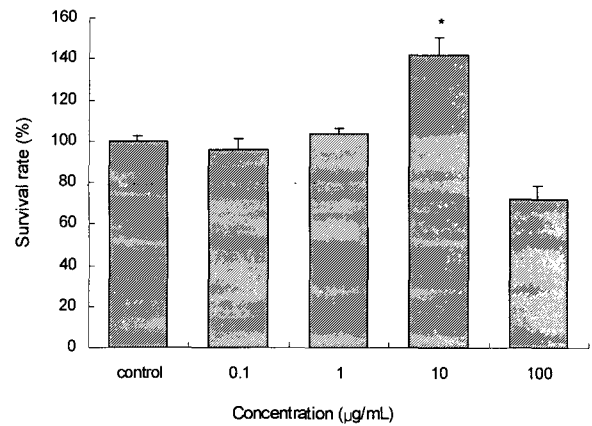


Fig. 1. Effect of RC ext. on the proliferation of MC3T3-E1 cells by the MTT assay. MC3T3-E1 cells were cultured with vehicles or various concentrations of RCM ext. for 48 hr. Data were expressed as a percentage of control.  $p < 0.05$  compared with control.

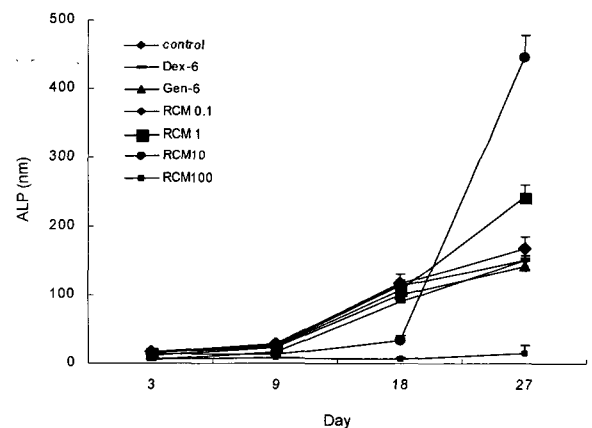


Fig. 2. Effect of RCM extract on the alkaline phosphatase activities of the MC3T3-E1 osteoblastic cells during the differentiation. Cells were cultured in 96 well plates with 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of vitamin C and 10 mM of  $\beta$ -glycerol phosphate.

복분자 추출물을 10 µg/mL의 농도로 첨가하여 역시 3~27 일간 배양한 다음 세포내 ALP 효소의 염색정도를 확인하였다. 결과 Fig. 3과 같이 시료를 처리하지 않은 대조군은 붉은 색의 효소가 많이 형성되지 않은 반면, 메탄올추출물을 처리한 군에서는 9일째부터 효소의 붉은 반점이 많이 생겼으며 27일째까지도 전체적으로 붉게 변하는 것을 확인할 수 있다. 따라서 복분자 추출물이 조골세포내 ALP 효소활성을 유도하는 것을 염색을 통해 확인할 수 있었다.

**Alizarin-Red 염색법에 의한 석회화 형성도 확인**

Bone nodule 형성능은 조골세포의 분화에 중요한 표식인

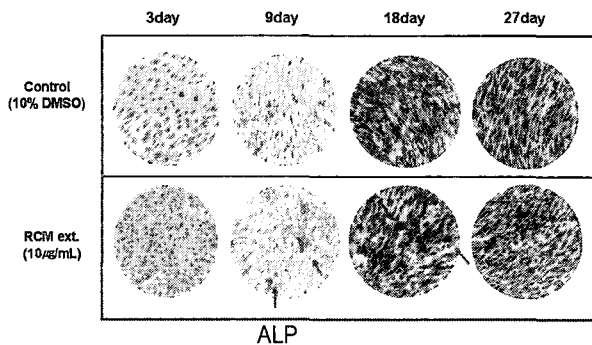


Fig. 3. Effect of RCM extract on the alkaline phosphatase of extracellular matrix by MC3T3-E1 cells. Phase contrast micrographs (×10) were taken by ALP staining after 3, 9, 18, 27 day, respectively. Cells were cultured with α-MEM containing 10% FBS, 50 µg/mL ascorbic acid, and 10 mM β-glycerol phosphate.

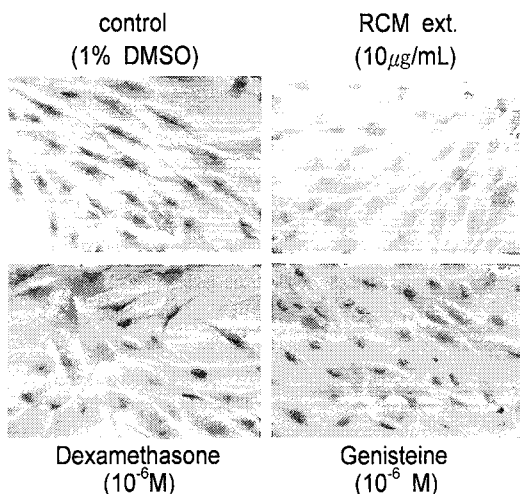


Fig. 4. Histochemical changes during differentiation of MC3T3-E1 cells. Phase contrast micrographs (×40) were taken by alizarin red staining after 3, 9, 18, 27 day, respectively. Cells were cultured with α-MEM containing 10% FBS, 50 µg/mL ascorbic acid, and 10 mM β-glycerol phosphate.

자이다. Alizarin은 식물성 염료로서 calcium에 특이적으로 흡착력이 높다. 이것은 무기질화된 세포의 세포의 기질에 염색되므로 무기질화된 양과 염색된 정도가 상호비례한다(24, 33). 따라서 시간에 따른 무기질화 형성능을 측정하기 위해 Fig. 4 와 같이, alizarin red로 염색하여 염색된 석회화물을 10% cetylpyridinium chloride로 녹여 OD 값을 측정하여 상대활성을 나타내었다(Fig. 5). 역시 복분자 추출물 10 µg/mL 농도에서 시간이 경과할수록 조골세포가 분화됨에 따라 염색된 정도의 흡광도값이 18일째에 대조군에 비해 약 1.6배까지 유의적으로 증가됨을 확인할 수 있었다. 따라서 복분자 추출물은 MC3T3-E1 조골세포의 증식 유도 및 ALP 활성 증가 및 조골세포의 분화와 석회화 형성능을 확인하였다.

**RT-PCR법에 의한 조골세포 분화 관련 골기질 유전자 발현의 변화**

PCR에 의해 얻어진 골기질 단백질을 전기영동으로 확인해 본 결과는 Fig. 6과 같다. MC3T3-E1 세포의 18일간 배양에 따른 분화인자 mRNA 발현양을 나타낸 것으로 SOX9, type 2 collagen, osteopontin, osteocalcin, alkaline phosphatase의 발현이 대조군에 비해 높게 발현되었다. Alkaline phosphatase의 발현은 복분자추출물에서 그 발현이 대조군에 비해 높게 나타남을 확인할 수 있었으며 그 외 골기질 단백질인 Type 2 collagen과 SOX9도 대조군에 비해 높게 발현되었다.

ALP의 발현은 조골세포 분화과정 중 중요한 역할을 하며 그 활성정도는 종종 조골세포의 분화단계를 상대적으로 평가하는 수단으로 사용되어왔다. 조골세포에 의한 석회화과정에서 이 효소의 정확한 기능은 분명하지는 않지만, organic phosphate를 가수분해하고 국소적으로 PO<sub>4</sub> 농도를 증가시킴으로써 석회화의 촉발제 역할을 하는 것으로 보고되었다

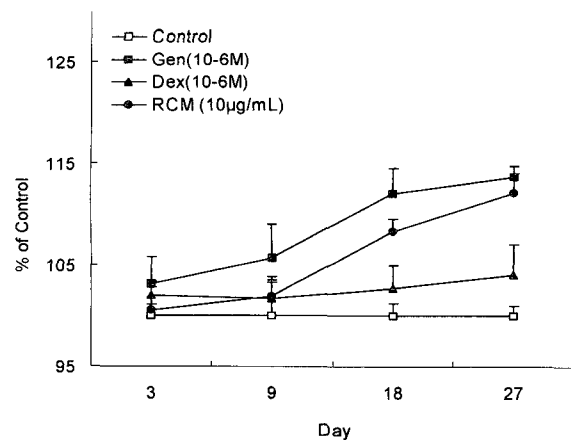


Fig. 5. Expression of staining OD values were analyzed by spectrophotometer on the indicated days from MC3T3-E1 cells. (Relative percentage (%) when control group is considered as 100%)

(15). ALP가 조골세포가 유도하는 석회화에 관여됨을 제시하는 많은 보고들이 있다. Torii (36) 등은 antisense RNA를 이용하여 ALP가 조골세포의 석회화에 관여하는 것을 입증하였다. Weiss (37) 등은 liver/bone/kidney type ALP 유전자의 선천적 결핍으로 인한 저인산효소증에서 골조직 석회화부전을 보고하였다. Fukayama와 Tashjian (13)은 ALP가 몇몇 조골세포주들에서 칼슘섭취에 관여하는 것으로 보고하였으며, 부갑상선호르몬의 신호전달의 조절에도 관여한다고 하였다.

요 약

골조직은 골아세포, 파골세포, 골세포 등으로 구성되며, 골개조시 여러 인자가 세포증식, 분화, 활성화 및 골대사 조절에 관여한다. 이때 조골세포의 활성화는 골형성에 중요하므로, 본 연구에서는 MC3T3-E1 조골세포주를 이용하여 식용자원인 복분자의 조골세포의 증식과 분화활성에 미치는 영향을 조사하였다. 복분자 추출물이 조골세포의 성장에 미치는 영향을 MTT 검색법으로 조사한 결과, 복분자 추출물 10 µg/mL 처리시 대조군과 비교하여 142% 증가하여 조골세포에 대해 높은 성장률을 보였다. 복분자 추출물이 ALP 효소활성에 미치는 영향을 3일 간격으로 배지교환 및 시료처리를 하면서 27일 동안 배양시간에 따른 변화를 측정하여 조사하였다. 그 결과, 농도 1, 10, 100 µg/mL 처리시 100 µg/mL을 제외한 나머지 분획물들이 시간이 지남에 따라 ALP 활성을

증가시켰고, 10 µg/mL 농도의 추출물은 27일째에 대조군에 비해 약 2.6배 이상, 양성대조군에 비해 약 1.5배 이상 ALP 활성을 증가시켰다. 복분자 추출물은 다시 ALP 효소 염색법과 Alizarin Red 염색으로 조골세포의 ALP활성유도, 분화와 석회화 형성능을 재확인하였으며 골기질 유전자의 발현의 변화도 확인하였다. 따라서 종래의 골질환에 좋다고 알려진 식품인 복분자 추출물이 양성대조군에 비해 빠르게 세포 증식과 분화를 유도하고 있어 앞으로 복분자에 대한 좀 더 깊은 분자생물학 수준 등의 구체적인 연구들과 기작연구가 지속적으로 이루어져야 할 것이라 추측된다.

감사의 글

본 연구는 계명대학교 대학원 학생학술연구장학금 및 한국산업기술재단 지역혁신 인력양성사업의 지원에 의해 연구되었음에 감사드립니다.

참고 문헌

1. Aldercreutz, H and Mazur, W. 1996. Phyto-estrogens in relation to cancer and other human health risks. *Proc. Nutr. Soc.* 55, 399-417.
2. Bellows, C. G., Aubin, J. E., Heersche, J. N and Antosz, M. E. 1986. Mineralized bone nodules formed in vitro from enzymatically released rat calvaria cell populations. *Calcif Tissue Int.* 38, 143-154.
3. Boonen, A., Broos, P and Dequeker, J. 1997. The prevention of treatment of age-related osteoporosis in the elderly by systemic recombinant growth factor therapy (rhIGF-I or rhRGF-β):a perspective. *J internal. medicine* 242, 285-290.
4. Carmichael, J., Degraff, W. G and Gadzar, A. F. 1987. Evaluation of a tetrazolium based semiautomated colorimetric assay : Assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* 47, 936-942.
5. Centrella, M., McCartht, T. L and Canalis, E. 1987. 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.
6. Cho, S. H. 1995. The electron microscopic observation of the effects of estrogen on the osteoblast-like cell (Ros-17/2.8-5) differentiation. *Korean Soc. Menopause* 1, 28-34.
7. Cho, S. H., Kim, K. G., Kim, S. R., Lee, J. A., Moon, H and Hwang, Y. Y., et al. 1996. The effects of 17-β estradiol, medroxyprogesterone acetate and parathyroid hormone on the differentiation of osteoblast cell. *Korean Soc. Obst. Gyn.* 39, 1497-1506.
8. Choi, E. M. 2001. Effect of soybean ethanol extract on the function of osteoblastic MC3T3-E1 cells. Ph. D thesis, University of Kyunghee, Seoul, Korea
9. Choi, E. M., Suh, K. S., Kim, Y. S., Choue, R. W and Koo, S. J. 2001. Soybean ethanol extract increases the function of

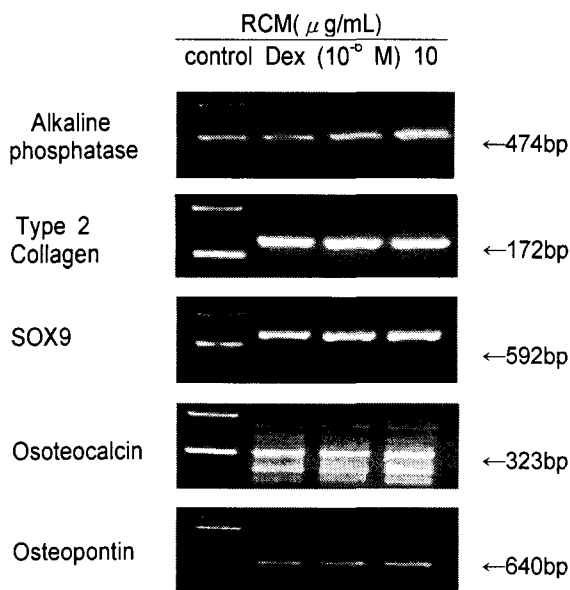


Fig. 6. The expression of SOX9, Type 2 collagen, Osteopontin, Osteocalcin and Alkaline phosphatase mRNA levels treated with RCM extract during differentiation of MC3T3-E1 osteoblastic cells.

- osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Phytochemistry* 56, 733-739.
10. Choi, H. H., Kim, J. K., Kim, S. B and Chung, C. H. 1999. Effects of Platelet - derived Growth Factor on the Activity of Osteoblastic Cells. *J. Periodont. Res.* 29, 785-804.
  11. Choi, J. Y., Lee, B. H., Song, K. B., Park, R. W., Kim, I. S and Sohn, K. Y., et al. 1996. Expression patterns of bone-related proteins during osteoblastic differentiation in MC3T3-E1 cells. *J Cellular Biochemistry* 61, 609-618.
  12. Choi, S. Y. 2002. Effects of irradiation on the mRNA expression of the type I collagen and alkaline phosphatase in MC3T3-E1 osteoblast cell line. PhD thesis., Chonbuk National University.
  13. Fukayama, S and Tashjian, A. H. 1990. Stimulation by parathyroid hormone of  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  uptake in osteoblast-like cells: possible involvement of alkaline phosphatase. *Endocrinology* 126, 1941-1949.
  14. Green, L. M., Reade, J. L and Ware, C. F., 1984. Rapid colometric assay for cell viability : Application to the quantitation of cytotoxic and growth inhibitory lymphokines. *J. Immunol. Meth.* 70, 257.
  15. Harrison, G., Shapiro, I.M and Golub, E.E. 1995. The phosphatidylinositol-glycolipid anchor on alkaline phosphatase facilitates mineralization initiation in vitro. *J. Bone Miner. Res.* 10, 568-573.
  16. Karen, M. P., Carol, C. P and Lawrence, G. R. 1995. Treatment of osteoporosis. *Annu. Rev. Med.* 6, 249-256.
  17. Keum, J. C., Kang, K. H and Kim, S. B. 2001. Effects of estrogen on the tumor necrosis factor- $\alpha$  induced apoptosis and cytokine gene expression in MC3T3-E1 osteoblast. *Korean Soc. Obst. Gyn.* 44, 324-336.
  18. Kim, J. W., Lee, H. J., Kang, J. H., Ohk, S. H., Choi, B. K., Yoo, Y. J., Cho, K. S and Choi, S. H. 2000. The Effect of Cyclosporin A on Osteoblast in vitro. *J. Periodont. Res.* 30, 747-757.
  19. Kim, K. W. 2001. Optimum condition on conversion of aglycones form using  $\beta$ -glucosidase and isoflavones extraction from soybean. Master thesis., National University of Pykyung.
  20. Kim, T. J. 1996. Korean resources plants II. Publishing Department of Seoul University, Seoul, Korea
  21. Kinto, N., Iwamoto, M., Enomoto-Iwamoto, M., Noji, S., Ohuchi, H and Yoshioka, H., et al. 1997. Fibroblasts expressing sonic hedgehog induce osteoblast differentiation and ectopic bone formation. *FEBS Letters* 404, 319-323.
  22. Lee, Y. S. 2001. Effect of isoflavones on proliferation and oxidative stress of MC3T3-E1 osteoblast-like cells. *Korea Soybean Digest* 18, 35-42.
  23. Letton, R. W. 1990. Regulation of 25-hydroxyvitamin D3 metabolism in cultures of osteoblastic cells. *J. Bone Miner. Res.* 5(8), 815-820.
  24. Maeda, T., Matsunuma, A., Kawane, T and Horiuchi, N. 2001. Simvastatin promotes osteoblast differentiation and mineralization in MC3T3-E1 cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 280, 874-877.
  25. Mori, Y., Hiraki, Y., Shukunami, C., Kakudo, S., Shiokawa, M and Kagoshima, M., et al. 1997. Stimulation of osteoblast proliferation by the cartilage-derived growth promoting factors chondromadulin- I and -II. *FEBS Letters* 406, 310-314.
  26. Orcel, P and Krane, S. M. 2000. Secondary osteoporosis and glucocorticoid induced osteoporosis. *Ann. Med. Internal.* 151, 497-502.
  27. Owen, T. A., Aronow, M., Shalhoub, V., Barone, L. M., Wilming, L and Tassinari, M. S., et al. 1990. Progressive development of the rat osteoblast in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. *J Cell Physiol.* 143, 420-430.
  28. Parfitt, A. M. 1994. Osteonal and hemi-osteonal remodeling: The spatial and temporal framework for signal traffic in adult human bone. *J. Cell. Biochem.* 55, 273-286.
  29. Park, J. M and Joo, K. J. 1982. Stability of Anthocyanin Pigment from Juice of Raspberries. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr* 11, 67-74.
  30. Pfeilschifter, J and Wolf, O. 1990. Chemotactic response of osteoblastic cells to Transforming growth factor B. *J Bone. Miner. Res.* 5, 815-823.
  31. 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, 683-692.
  32. Ryan, P. J., Evans, P., Gibson, T and Fogelman, I. 1992. Osteoporosis and chronic back pain: A study with single-photon emission computed tomography bone scintigraphy. *J. Bone Miner. Res.* 7, 1455-1460.
  33. Schiller, P. C., D'ippolito, G., Balkan, W., Roos, B. A and Howard, G. A. 2001. Gap-junctional communication is required for the maturation process of osteoblastic cells in culture. *Bone* 28, 362-369.
  34. Stein, G. S., Lian, J. B and Owen, T. A. 1990. Relationship of cell growth to the regulation for tissue-specific gene expression during osteoblast differentiation. *FASEB J* 4, 3111-3123.
  35. Stein, G. S., Lian, J. B., Wijnen, A. J and Montechino, M. 1996. Transcriptional control of osteoblast growth and differentiation. *Physiol. Rev* 76, 593-629.
  36. Torii, Y., Hitomi, K., Yamagishi, Y and Tsukagoshi, N. 1996. Demonstration of alkaline phosphatase participation in the mineralization of osteoblasts by antisense RNA approach. *Cell Biol. Int.* 20, 459-464.
  37. Weiss, M. J., Ray, K., Fallon, M. D., Whyte, M. P., Fedde, K. N and Lafferty, M. A., et al. 1989. Analysis of liver/bone/kidney phosphatase mRNA, DNA and enzymatic activity in cultured skin fibroblasts from 14 unrelated patients with severe hypophosphatasia. *Am. J. Hum. Genet* 44, 686-694.
  38. Yamashita, Y., Sato, M and Noguchi, T. 1987. Alkaline phosphatase in the periodontal ligament of the rabbit and macaque monkey. *Arch. Oral. Biol.* 32, 677-678.
  39. Yoo, M. C., Han, C. S., Jang, S. G and Han, I. K. 1989. The effects of the several hormones on the MC3T3 osteoblast cells -in vitro study. *J. of Korean Orthop. Assoc* 24, 879-888.

40. Yoon, I., Wee, J. H., Moon, J. H., Ahn, T. H and Park, K. H. 2003. Isolation and Identification of Quercetin with Antioxidative Activity from the Fruits of *Rubus coreanum* Miquel. *J. Food Sci.* 35, 499-502.
41. Yoon, S. R., Jeong, Y. J., Lee, G. D and Kwon, J. H. 2003. Changes in Phenolic Compounds Properties of *Rubi Fructus* Extract Depending on Extraction Conditions. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 32, 338-345.