

소리쟁이 잎과 뿌리 성분 분석 및 사람 조골 유사 MG-63 세포 분화에 미치는 효과 비교

박혜진 · 정재훈 · 현한빛 · 김지혜 · 김해성 · 오현일 · 황혜성 · 김하형[#]

중앙대학교 약학대학

(Received August 21, 2014; Revised September 24, 2014; Accepted September 24, 2014)

Comparative Analysis of the Constituents of the Leaves and Roots of *Rumex crispus* and their Effects on the Differentiation of Human Osteoblast-like MG-63 Cells

Heajin Park, Jaehoon Jeong, Hanbit Hyun, Jihye Kim, Haesung Kim, Hyun Il Oh, Hye Seong Hwang and Ha Hyung Kim[#]
College of Pharmacy, Chung-Ang University, Seoul 156-756, Korea

Abstract — *Rumex crispus* (curled dock), which is a perennial wild plant, has long been used as a laxative, astringent, and medicine to treat blood and skin diseases. We recently reported that the roots of *R. crispus* are an effective nutraceutical for bone. This study prepared ethanol extracts of the leaves and roots of *R. crispus*, and analyzed the major constituents using liquid chromatography and mass spectrometry. In addition, their effects on the proliferation and differentiation of human osteoblast-like MG-63 cells, such as cell viability, alkaline phosphatase (ALP) activity, collagen content, and mineralization, were compared. The chromatograms of the chemical constituents of the two extracts exhibited quite different profiles: quercetin and quercitrin were identified as major peaks in the leaf extract, whereas cinnamtannin B1 and procyanidin isomers were the major peaks for the root extract. Neither extract was cytotoxic at concentrations of <25 µg/ml. ALP activity and collagen synthesis—which are markers of the early stage of osteogenesis—in MG-63 cells were significantly increased upon the addition of the root extract compared with the addition of the leaf extract. In contrast, the leaf extract had a more stimulatory effect on mineralization—which is marker of the late stage of osteogenesis—in MG-63 cells than did the root extract. In conclusion, extracts of both leaves and roots of *R. crispus* stimulated the bone-forming activity of osteoblasts; in particular, the root extract was more effective in the early stage of osteoblast differentiation, while the leaf extract was more effective in the late stage. This difference in anabolic activity may be due to differences in the constituents of the leaves and roots. The leaves and roots of *R. crispus* appear to complement each other as stimulators of bone formation.

Keywords □ *Rumex crispus*, human osteoblast-like MG-63 cells, chemical constituents, alkaline phosphatase, collagen, mineralization

골조직은 역동적인 조직으로서 낡은 뼈가 제거되고 새로운 뼈가 생성되는 골 재형성 과정을 통해 골 항상성을 유지하며 골량은 뼈를 흡수하는 파골세포와 뼈기질을 합성하고 채우는 조골세포의 상반된 작용에 의해 결정된다. 골 재형성 과정은 국소적으로 좁은 부위에서 일정한 주기로 일어나고, 골격계의 구조와 기능은 전신적인 호르몬과 국소적 인자 사이의 상호작용에 의해 조절된다.^{1,2)} 골 흡수량과 골 형성량 사이의 균형이 파괴되면 골격의 이상이 발생하게 된다.

골다공증은 골량의 감소와 미세구조의 이상으로 인해 뼈가 약해져 쉽게 부러질 수 있는 상태를 증가시키는 전신적인 골격계 질환으로 골절 위험성 뿐 만 아니라 노인인구에서 생명을 위협하는 외상과 관련된 심각한 합병증의 발현을 증가시킨다.³⁾ 2011년 질병관리본부의 국민건강 영양조사 결과 발표에 따르면 우리나라 50세 이상의 골다공증 유병률은 전체 인구의 22.5%, 여자 37.5%, 남자 7.5%로 여자가 남자보다 5배 정도 높았으며, 연령대가 높아질수록 급격히 증가하였다.⁴⁾ 고령화에 따른 골다공증 유병률의 증가는 병적 골절로 인해 환자 개인의 삶의 질을 저하시킬 뿐 아니라 사회의 의료비 부담을 가중시키므로, 골다공증의 예방 및 조기진단과 치료에 대한 관심이 고조되고 있다.

골다공증 치료제는 칼시토닌, 비스포스포네이트, 에스트로젠으로 대표되는 골흡수 억제제(antiresorptive drug)와 부갑상선 호

[#]Corresponding Author

Ha Hyung Kim
College of Pharmacy, Chung-Ang University, Seoul 156-756, Korea
Tel.: 02-820-5612 Fax.: 02-823-5612
E-mail: hahyung@cau.ac.kr

르몬으로 대표되는 골형성 자극제(bone formation stimulator)로 분류된다. 골흡수 억제제는 파골세포를 억제하여 골 교체율을 감소시키며, 현재 사용되고 있는 치료제의 대부분을 차지하고 있다.³⁾ 이와 달리, 조골세포에 작용하여 골형성을 증가시킴으로써 골다공증 치료효과를 보이는 골형성 자극제는 임상적으로 사용되는 것으로 부갑상선 호르몬이 유일한 것으로 알려져 있다.⁵⁾ 부갑상선 호르몬은 골흡수 억제제가 효과를 보이기 어려운 경우에 적용가능하다는 장점을 지니지만,⁶⁾ 매우 제한적인 상황에서만 사용해야 하는 단점이 있다.⁷⁾ 따라서 골형성을 촉진시키는 골다공증 치료제 및 기능성 식품의 개발이 필요한 실정이며 그 원료로서 이용 가능한 천연물 소재에 대한 관심이 고조되고 있다.

소리쟁이(*Rumex crispus*, L)는 마디풀과(Polygonaceae)의 다년생 초본으로 우리나라 및 중국, 일본에 분포하며 습한 곳에서 잘 자라는 식물로, 높이는 60~100 cm 정도이고 잎은 장타원형으로 10~25 cm에 이르며, 꽃은 5~7월에 열은 녹색으로 피는 원추화서이다.⁸⁾ 소리쟁이 지상부의 생리활성으로는 *Staphylococcus aureus*와 *Bacillus subtilis*에 대한 항생 효과,⁹⁾ 종자의 진통, 항염증, 간보호 효과¹⁰⁾ 및 항산화효과¹¹⁾ 등이 보고된 바 있다. 뿌리는 양재근이라 불리며 민간에서 대황의 대용으로 사용하거나 완하약으로 사용하거나 습을 피부병에 외용하며,⁸⁾ 항말라리아, 항균,¹²⁾ 항산화,¹³⁾ 항암 및 carbohydase 저해 효과¹⁴⁾ 등이 보고되어 있다. 또한, 최근 본 연구실에서는 소리쟁이 뿌리 추출물의 단당분석과 저농도에서 골 석회화 형성능 및 ethyl acetate 분획물과 chloroform 분획물이 조골세포 분화에 미치는 영향을 확인하여 보고한 바 있다.¹⁵⁾

본 연구에서는 소리쟁이의 식용으로 사용하는 잎과 약용으로 사용하는 뿌리 추출물의 조골세포 분화 활성에 대해 비교하고자, liquid chromatography-mass spectrometry(LC-MS) 분석을 통하여 두 추출물의 성분상 차이점을 비교하고, 사람 조골 유사 MG-63 세포에 각 추출물을 처리하여 세포 증식율, alkaline phosphatase(ALP) 활성, collagen 합량, 석회화 결절 형성을 확인하였다.

실험방법

소리쟁이 추출물 제조

본 실험에 사용된 소리쟁이는 제주도 소재 제주자연식물산업연구소에서 구입하여 외부 형태를 비교한 후 사용하였다. 소리쟁이를 3차 증류수로 깨끗이 수세하고 잎과 뿌리 부분으로 분리한 후 세절하여 3일간 음건한 후 분쇄하였다. 소리쟁이 잎과 뿌리의 분쇄물을 각각 3 g 씩 취하고 70% ethanol 30 ml를 가한 후 실온에서 교반하며 72시간 동안 추출하였다. 이 추출액을 770×g, 60분간 원심분리하여 얻은 상층액을 0.45 μm filter를 사용하여 여과하였다. 여과된 추출액을 rotary evaporator로 감압,

농축하여 얻은 농축액을 -50°C에서 동결 건조하여 ethanol 추출 분말을 얻었으며, -20°C에서 냉동 보관하고 실험에 사용하였다.

소리쟁이 잎과 뿌리 에탄올 추출물의 LC-MS 분석

소리쟁이의 잎과 뿌리 성분을 비교하기 위해 Ultimate 3000 Rapid Separation LC system(UPLC, Thermo Scientific Dionex)과 Orbitrap Q exactive mass spectrometer(Thermo Scientific Dionex)를 이용한 LC-MS 분석을 실행하였다. 이동상 A는 0.1% formic acid, 이동상 B는 0.1% formic acid/acetonitrile로 하였으며 Waters ACQUITY UPLC BEH C18(2.1×150 mm 1.7 μm) column을 온도가 40°C로 유지된 상태에서 사용하였다. 이동상의 유속은 0.3 ml/min으로 유지하고, gradient는 5%의 이동상 B로 시작하여 30분에 70%로 도달하도록 하였고, 30분 이후에는 column의 세척과 안정화를 하였다. 소리쟁이 뿌리 또는 잎 에탄올 추출 분말을 이동상 A에 10 mg/ml의 농도로 녹이고 그 중 10 μl를 각각 주입하였다. 측정 m/z의 범위는 150~1000 m/z로 하였고, 데이터는 Xcalibur 2.1 software(Thermo Scientific)를 이용하여 분석하였다.

조골세포 배양

Human osteoblast-like MG-63 cell은 한국 세포주 은행에서 구입하였다. 배양배지는 Dulbecco's modification of Eagle's medium(DMEM, Corning)에 10%의 FBS(Gibco BRL)와 1%의 penicillin 및 streptomycin(Gibco BRL)를 혼합하여 사용하였다. 세포는 37°C, 5% CO₂의 환경에서 배양하였으며, 세포가 충분한 증식이 일어나는 3~4일 간격으로 계대 배양하였다.

세포 생존율 측정

추출물의 세포독성은 Tominaga 방법¹⁶⁾에 따라 2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt(WST-8, Dojindo) assay로 측정하였다. 배양한 세포를 trypan blue 염색법으로 세포수를 측정하고 96-well plate에 4×10³ cells/well의 농도로 200 μl씩 분주하고 세포들이 부착할 수 있도록 24시간 배양 후 배지를 제거하였다. 추출물을 농도별로 희석하여 첨가한 DMEM 배지를 각 well에 100 μl씩 분주하고 아무 처리하지 않은 DMEM 배지를 처리한 세포군을 대조군으로 하여 72시간 동안 배양하였다. 배양 종료 후 배지를 제거하고 각 well에 10 μl/ml 농도의 WST-8 용액을 첨가한 다음 3시간 동안 배양 후 microplate reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

조골세포의 ALP 활성 측정

추출물이 조골세포의 ALP의 활성에 미치는 영향을 관찰하기 위해 *p*-nitrophenyl phosphate(Sigma)의 가수분해 반응에 ALP

가 촉매로 작용하여 생성되는 산물인 *p*-nitrophenol의 양을 측정하여 ALP의 농도를 간접적으로 산출하였다. MG-63 세포를 24-well plate에 3×10^4 cells/well의 농도로 분주하고 세포들이 부착할 수 있도록 24시간 배양 후 추출물을 각각 농도별로 첨가한 배지 또는 아무것도 처리 하지 않은 DMEM 배지(대조군)로 교환하여 72시간 동안 배양하였다. 배양 종료 후 각 well에서 배양액을 제거하고 0.1% Triton X-100(Sigma)을 첨가해 세포를 분리하였다. 세포의 현탁액을 -70°C 에서 동결하고 37°C 에서 해동하여 세포막을 파괴한 후 4°C , $14,000 \times g$ 에서 10분간 원심분리하여 상층액만 취하였다. 용해된 세포의 상층액과 기질인 *p*-nitrophenyl phosphate를 30분간 37°C 에서 반응시킨 후 microplate reader를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하고 단백질량으로 나누어 단위단백질 함량 당 효소 활성도를 산출하였다.^{17,18)} 단백질 양은 bovine serum albumin을 표준 단백질로 bicinchoninic acid protein assay kit(iNtRON Biotechnology)를 사용하여 측정하였으며, ALP 활성도는 대조군에 대한 백분율로 나타내었다.

Collagen 함량 측정

추출물이 조골세포의 collagen 형성에 미치는 영향을 평가하기 위하여 Sirius red 염색법을 이용하였다. MG-63 세포를 24-well plate에 3×10^4 cells/well의 농도로 분주하고 세포들이 부착할 수 있도록 24시간 동안 배양한 후, $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ ascorbic acid(Sigma), 10 mM β -glycerophosphate(Sigma), 10^{-7} M dexamethasone(Sigma)이 포함된 DMEM 배지에 추출물을 농도별로 첨가한 새 배양액으로 교환하였으며 추출물을 포함하지 않은 배지를 대조군으로 하였다. 3일간 배양한 후 PBS로 세척하고 실온에서 Bouin's fluid(Sigma)로 1시간 동안 고정하였다. Sirius red(Sigma) 50 mg을 saturated picric acid(Sigma) 50 ml에 용해하여 만든 Sirius red 용액을 각 well에 가하고 1시간 동안 실온에서 약하게 교반하여 염색하였다. 비특이적인 염색을 줄이기 위해 0.01 M hydrochloric acid로 세척하고 건조한 후 0.1 M sodium hydroxide 용액으로 30분 간 용해하여 얻은 추출액을 96-well plate로 옮겨 550 nm 에서 흡광도를 측정하였다.¹⁹⁾

석회화 결절 형성 측정

추출물이 조골세포의 석회화 결절 형성에 미치는 영향을 관찰하기 위해 Alizarin red S 염색법을 이용하였다. MG-63 세포를 24-well plate에 3×10^4 cells/well의 농도로 분주하고 세포들이 부착할 수 있도록 24시간 동안 배양한 후, $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ ascorbic acid, 10 mM β -glycerophosphate, 10^{-7} M dexamethasone이 포함된 DMEM 배지에 추출물을 농도별로 첨가한 새 배양액으로 교환하였다. 이 후 3~4일마다 추출물을 포함한 배양액으로 교환하면서 8일간 배양하였으며 추출물을 포함하지 않은 DMEM 배지에서 배양한 세포군을 대조군으로 하였다. 배양 종료 후 배

지를 제거하고 PBS로 세척한 후 70% ethanol로 4°C 에서 1시간 동안 고정하고 40 mM Alizarin red solution(pH 4.2)(Sigma)으로 실온에서 10분간 염색하였다. 염색된 세포를 증류수로 세척 후 PBS를 가하고 15분 동안 방치하여 비특이적인 염색을 줄이도록 하였다. PBS를 제거하고 10%(w/v) cetylpyridinium chloride(Sigma)를 첨가한 10 mM sodium phosphate(pH 7.0) 용액으로 15분간 Alizarin red S를 용해한 후 용액을 96-well plate로 옮겨 562 nm 에서 흡광도를 측정하였다.^{20,21)}

통계 분석

본 실험의 정량적인 결과는 평균값과 표준편차로 표시하였으며 통계적인 차이는 Student's *t*-test를 이용하여 분석하였다. 통계 처리 후 *p* 값이 0.05 이하인 경우 통계적으로 유의성이 있다고 판정하였다.

실험결과 및 고찰

소리쟁이 추출

소리쟁이 잎과 뿌리를 분리하여 각각 3 g씩 취하고 70% ethanol에서 3일 동안 추출하여 얻은 추출액을 여과 후 감압 농축, 동결 건조하여 각각의 추출 분말을 얻었다. 소리쟁이 잎 추출 분말은 337.0 mg (수득률 11.2%)이고, 뿌리 추출 분말은 365.2 mg (수득률 12.2%)이었으며 -20°C 에서 냉동보관하고, 분석과 세포 실험에 사용하였다.

소리쟁이 잎과 뿌리 에탄올 추출물의 LC-MS 분석

소리쟁이 잎과 뿌리 에탄올 추출물의 ultra performance liquid chromatography(UPLC) chromatogram의 패턴은 확연히 다르게 나타났다(Fig. 1). 소리쟁이 잎 에탄올 추출물의 경우 12.52분에 하나의 주요 피크가 존재하는 반면, 소리쟁이 뿌리 에탄올 추출물은 주된 분석시간인 5분~20분 사이에 다양한 물질에 의한 피

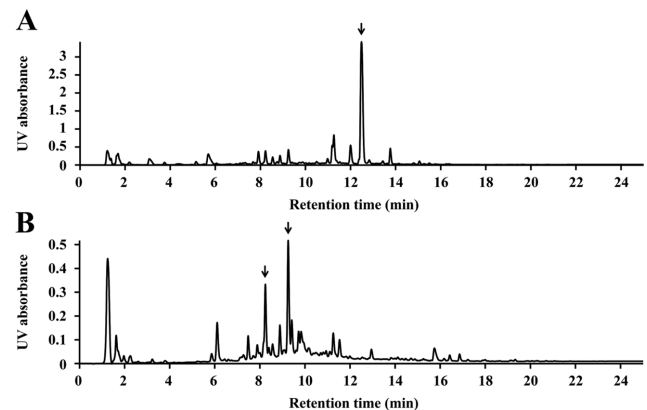


Fig. 1 – UPLC chromatogram of ethanol extracts of (A) leaves and (B) roots of *R. crispus*.

Table I – Summary of liquid chromatography and mass spectrometry analysis of extracts of the leaves and roots of *R. crispus*

Extract	Retention time	Proposed compound	Chemical formula	Exact mass (M+H) ⁺	Accurate mass (M+H) ⁺	Mass error (ppm)
Leaves	12.52	Quercetin	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	303.0499	303.0497	0.7
	12.52	Quercitrin	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	449.1078	449.1076	0.4
Roots	9.26	Cinnamtannin B1	C ₄₅ H ₃₆ O ₁₈	865.1974	865.1968	0.7
	8.24	Procyanidin B1, B2, B3, B4, B5, B7	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	579.1497	579.1495	0.3

크가 존재하였다. 보다 상세한 분석의 결과로 피크 높이가 0.05 UV absorbance 이상인 피크들의 수는 소리쟁이 잎에서 16개, 소리쟁이 뿌리에서 21개로 나타났으며, retention time(RT)이 정확히 일치하는 피크는 전혀 없었다. 단, RT가 ±0.05분인 범위에서 서로 일치하는 피크는 6개로 나타났으나 동일한 성분인 것으로는 확인되지 않았다. 특히 소리쟁이 잎에서 전체 피크의 대부분을 차지하는 12.52분의 피크는 소리쟁이 뿌리에 전혀 나타나지 않았다.

소리쟁이 잎 추출물의 분석 결과, RT 12.52분에서 2개의 m/z 값을 갖는 피크가 확인되었으며, 그 중 하나는 분자에 수소가 하나 첨가되어 이온화된 303.0497 m/z 값으로 검출되었고, 이 물질의 화학식은 C₁₅H₁₀O₇이며, flavonoid 중 하나인 quercetin으로 확인되었다. 또한 다른 하나는 449.1076 m/z 값으로 검출되었고, 이 물질의 화학식은 C₂₁H₂₀O₁₁이며, quercitrin으로 대표되는 quercetin의 배당체 형태로 확인되었다(Table I). 상기 확인된 물질들은 LC-MS로 분석한 결과를 바탕으로 선행 연구들과 데이터베이스 METLIN(Metablite and Tandem MS Database)²²⁾을 활용하였다.

소리쟁이 뿌리 추출물의 분석 결과, RT 9.26분에서 분자에 수소가 하나 첨가되어 이온화된 865.1968의 m/z 값이 검출되었고 이 물질의 화학식은 C₄₅H₃₆O₁₈이며, 이와 같은 화학식은 데이터베이스와 문헌조사를 통해 tannin류 임이 확인되었으며, 소리쟁이와 같은 미디풀과 소리쟁이속의 식물인 수영의 성분 분석에서 865.1의 m/z 값과 NMR에 의해 cinnamtannin B1이 있음이 보고되어²³⁾ 동일 물질일 가능성이 확인되었다. RT 8.24분에서는 579.1495의 m/z 값이 검출되었고 이 물질의 화학식은 C₃₀H₂₆O₁₂이며, 이 화학식은 데이터베이스에서 procyanidin 들과 flavonoid의 coumarin 유도체들의 가능성이 제기되었으나, 수영에 procyanidin B1, B2, B3, B4, B5, B7이 들어있음이 보고된 것과,²³⁾ MS/MS 데이터로부터 이 피크는 procyanidin의 이성질체 B1, B2, B3, B4, B5, B7 중 하나 혹은 둘 이상의 복합체로 확인되었다.

조골세포 생존율 및 증식률에 미치는 영향

소리쟁이 잎과 뿌리 추출물이 사람 조골세포인 MG-63의 생존율에 미치는 영향을 평가하고 조골세포 활성 및 분화 실험에 사용할 추출물의 적절한 농도 범위를 결정하기 위하여 WST-8

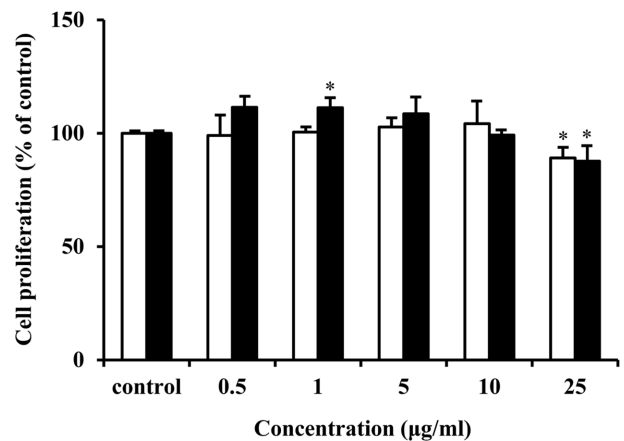


Fig. 2 – Effects of *R. crispus* extracts on the proliferation of human osteoblast-like MG-63 cells (□, leaves; ■, roots). Cells were incubated with each extract for 3 days in 96-well plates, and cell viability was measured by WST-8 assay. Data shown are the mean and SD values of three independent samples. **p*<0.05.

assay를 실시하였다. 추출물을 처리하고 3일 배양 후 MG-63 세포에 WST-8을 첨가하였을 때 WST-8 formazan으로 환원된 정도를 측정하고 대조군에 대한 백분율로 나타내었다. 소리쟁이 잎 추출물은 10 µg/ml 이하의 농도에서는 세포 독성을 나타내지 않았으며 25 µg/ml 농도로 처리한 군의 세포생존율은 89.1%로 나타났다. 소리쟁이 뿌리 추출물은 10 µg/ml 이하의 농도에서는 세포 독성을 나타내지 않았으며 1 µg/ml 농도로 처리한 군의 세포생존율은 111.3%로 유의하게 증가하였고 25 µg/ml의 농도에서 세포생존율은 대조군에 비하여 87.7%로 나타났다(Fig. 2). 이 결과를 바탕으로 소리쟁이 잎과 뿌리 추출물이 MG-63 세포의 ALP 활성, collagen 형성, 석회화 결절 형성에 미치는 영향을 관찰하는 실험에서는 추출물 농도를 25 µg/ml 미만으로 배지에 희석하여 처리하였다.

조골세포의 ALP 활성에 미치는 영향

ALP는 유골의 형성과 무기질화 과정에서 중요한 역할을 하는 효소로서 조골세포 활성의 생화학적 마커로 널리 이용된다.²⁴⁾ Fig. 3에 나타난 바와 같이 소리쟁이 잎과 뿌리 추출물은 0.5 µg/ml에서 5 µg/ml 사이의 농도 범위에서 MG-63 세포의 ALP 활성을 유의하게 증가시켰으며 소리쟁이 잎 추출물보다 뿌리 추출

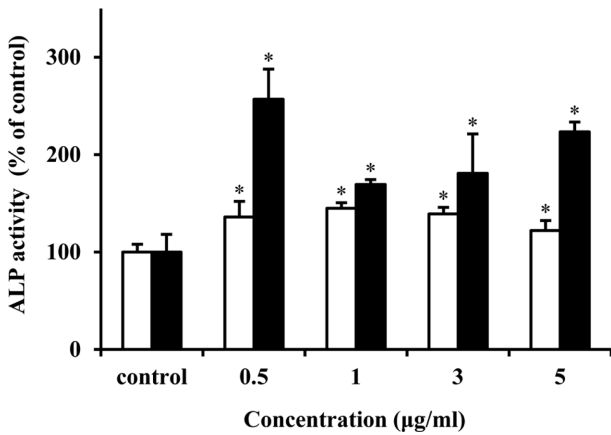


Fig. 3 – Effects of *R. crispus* on the ALP activities of human osteoblast-like MG-63 cells (□, leaves; ■, roots). Cells were incubated with each extract for 3 days in 24-well plates. Data shown are the mean and SD values of three independent samples. **p*<0.05.

물이 더 높은 상승효과를 나타내었다. 특히, 소리쟁이 잎 추출물은 1 µg/ml에서 144.9%의 ALP 활성 증가 효과를 보였으며 소리쟁이 뿌리 추출물은 0.5 µg/ml에서 256.9%의 ALP 활성 증가 효과를 나타내었다.

조골세포의 collagen 형성에 미치는 영향

조골세포 분화에 필요한 ascorbic acid와 β-glycerophosphate 이 포함된 DMEM 배지에 소리쟁이 잎과 뿌리 추출물을 각각 희석하여 MG-63 세포에 처리하고 3일 동안 배양 후 Sirius red 염색법을 이용하여 collagen 함량을 측정하였다. 소리쟁이 잎과 뿌리 추출물은 0.5 µg/ml에서 10 µg/ml 사이의 농도 범위에서 MG-

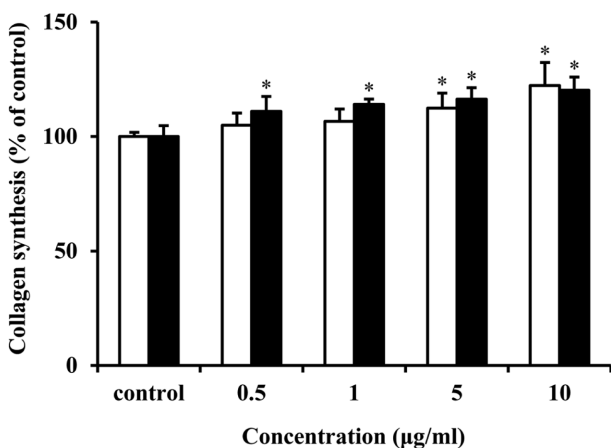


Fig. 4 – Effects of *R. crispus* extracts on collagen synthesis by human osteoblast-like MG-63 cells (□, leaves; ■, roots). Cells were incubated with each extract for 3 days in 24-well plates, and collagen content was measured by Sirius red staining. Data shown are the mean and SD values of three independent samples. **p*<0.05.

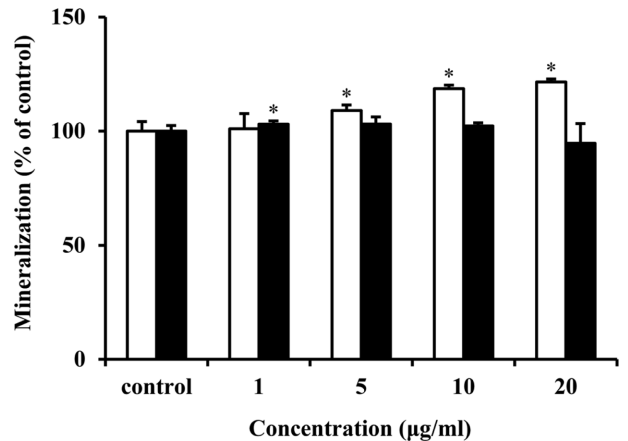


Fig. 5 – Effects of *R. crispus* extracts on mineralization of human osteoblast-like MG-63 cells (□, leaves; ■, roots). Cells were incubated with each extract for 8 days in 24-well plates, and the level of mineralization was measured by Alizarin red S staining. Data shown are the mean and SD values of three independent samples. **p*<0.05.

63 세포의 collagen 형성을 농도 의존적으로 유의하게 상승시켰다(Fig. 4). 즉, 0.5 µg/ml, 1 µg/ml, 5 µg/ml의 농도에서 대조군과 비교한 collagen 형성 상승 정도는 소리쟁이 잎 추출물의 경우 각각 104.9%, 106.6%, 112.3%, 뿌리 추출물의 경우 각각 110.9%, 114.0%, 116.3%로 뿌리 추출물이 잎 추출물보다 더 높은 효과를 나타냈으며, 10 µg/ml의 농도 처리시에는 collagen 함량의 증가는 뿌리 추출물이 120.2%, 잎 추출물이 122.3%로 잎 추출물의 효과가 다소 높게 나타났다.

조골세포의 골석회화 형성능에 미치는 영향

소리쟁이 잎과 뿌리 추출물을 각각 조골세포 분화 배지에 희석하여 MG-63 세포에 처리하고 8일 동안 배양 후 무기질화된 세포 기질의 칼슘에 특이적으로 결합하는 Alizarin red S로 염색하여 석회화 결절 형성 정도를 측정하였다. 소리쟁이 잎 추출물은 1 µg/ml에서 20 µg/ml 사이의 농도 범위에서 MG-63 세포의 석회화 결절 형성을 농도 의존적으로 유의하게 증가시켰으며, 특히 20 µg/ml 처리시 대조군에 비해 석회화 형성을 121.5% 증가시켰다(Fig. 5). 뿌리 추출물은 1 µg/ml 농도에서 석회화 결절 형성을 103.0% 상승시켰으며 5 µg/ml에서 20 µg/ml 사이의 농도 범위에서는 유의한 효과를 나타내지 않았다.

결 론

본 연구에서는 소리쟁이 잎과 뿌리 각각의 ethanol 추출물을 대상으로 UPLC, LC-MS를 이용하여 성분을 분석하고 사람 조골 유사세포인 MG-63 세포를 이용하여 세포 생존율과 ALP 활성, collagen 형성, 석회화 결절 형성 정도에 미치는 영향을 연구

하였다.

소리쟁이 뿌리 추출물은 잎과는 서로 다른 종류의 성분들을 함유하고 있으며 특히 뿌리의 주요성분이 잎에서는 확인되지 않은 것으로부터, 소리쟁이 뿌리 추출물이 골세포에 미치는 유효한 작용은 잎의 그것과는 본질적인 차이가 있으며 이 효과는 단일성분 혹은 복합성분에 의한 것으로 확인된다.

소리쟁이 잎과 뿌리 추출물은 25 µg/ml보다 낮은 범위에서 세포 독성을 나타내지 않았으며 뿌리 추출물은 1 µg/ml 농도에서 세포 생존율을 유의하게 증가시켰다. 세포 생존율 실험을 시행한 농도 범위 내에서 낮은 농도 처리시 뿌리 추출물이 잎 추출물보다 MG-63의 세포 생존율에 긍정적인 효과를 나타냈으며, 세포 생존율 실험에서 독성을 나타내지 않는 범위에서 조골세포의 활성화와 분화 실험을 진행하였다.

골의 형성 단계에서 조골세포는 골 전구세포의 증식, 세포외 기질의 성숙, 석회화 유도 과정을 거쳐 분화하며 조골세포의 활성을 반영하는 대표적인 생화학적 마커로는 ALP, type 1 collagen, 석회화 결절이 있다.²⁵⁾ 그 중 ALP와 type 1 collagen은 세포 증식 말기와 세포외 기질 형성 단계에서 높게 발현되므로 조골세포의 초기 분화 마커로 이용되고,²⁶⁾ 석회화 결절의 형성은 조골세포 분화의 최종 단계에서 나타나므로 후기 분화 마커로 이용된다.²⁷⁾ 소리쟁이 잎과 뿌리 추출물 모두 세포 독성을 나타내지 않는 범위에서 ALP 활성을 유의하게 증가시켰으며 뿌리 추출물이 잎 추출물보다 높은 효과를 보였다. MG-63 세포에서 collagen 형성은 잎과 뿌리 추출물에 의해 농도 의존적으로 유의하게 상승하였으며 0.5 µg/ml에서 5 µg/ml 사이의 농도 범위에서는 뿌리 추출물이, 10 µg/ml의 농도에서는 잎 추출물의 효과가 더 높았다. 잎 추출물은 실험 농도 범위 내에서 농도 의존적으로 유의하게 석회화 결절 형성을 증가시켰으며 그 효과는 뿌리 추출물보다 높았다. 초기 분화 마커인 ALP 활성과 collagen 형성에 미치는 영향은 뿌리 추출물이 잎 추출물보다 높았으며 후기 분화 마커인 석회화 결절 형성은 잎 추출물이 뿌리 추출물보다 높은 것으로부터, 뿌리 추출물은 조골세포 분화의 초기 단계에, 잎 추출물은 후기 단계에 더 많은 영향을 미치는 것으로 판단된다.

이상의 결과를 종합하면, 소리쟁이 잎과 뿌리 추출물은 조골세포의 증식과 분화에 관여하는 우수한 소재로서 서로 상호보완적인 효과를 가지며, 조골세포 분화 단계에 따라 다르게 나타나는 효과는 성분의 차이에서 기인한 것으로 보인다. 결론적으로 소리쟁이 잎과 뿌리는 골다공증 예방 및 치료제로서의 개발 가능성을 가진 우수한 천연물 소재로 평가된다.

감사의 말씀

본 연구는 2014년도 농촌진흥청 연구개발비 지원(PJ009843)

에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

References

- 1) Canalis, E., McCarthy, T. and Centrella, M. : Growth factors and the regulation of bone remodeling. *J. Clin. Invest.* **81**, 277 (1988).
- 2) CIBA Foundation Symposium : Cell and molecular biology of vertebrate hard tissues, John Wiley & Sons Ltd., Chichester, p. 266 (1988).
- 3) Rodan, G. A. and Martin, T. J. : Therapeutic approaches to bone diseases. *Science* **289**, 1508 (2000).
- 4) 질병관리본부 : 국민건강 영양조사 (2011).
- 5) Gallagher, J. C. and Sai, A. J. : Molecular biology of bone remodeling: implications for new therapeutic targets for osteoporosis. *Maturitas* **65**, 301 (2010).
- 6) Moon, J. S. and Won, K. C. : The diagnosis and treatment of osteoporosis. *Yeungnam Univ. J. Med.* **25**, 19 (2008).
- 7) 대한골대사학회 : 골다공증의 진단 및 치료 지침 2011 (2011).
- 8) 한국 약용식물학 연구회 : 종합 약용식물학, 학창사, 서울 p. 153 (2000).
- 9) Yildirim, A., Mavi, A. and Kara, A. A. : Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 4083 (2001).
- 10) Lee, S. S., Kim, D. H., Yim, D. S. and Lee, S. K. : Anti-inflammatory, analgesic and hepatoprotective effect of semen of *Rumex crispus*. *Kor. J. Pharmacogn.* **38**, 334 (2007).
- 11) Suh, H. J., Lee, K. S., Kim, S. R., Shin, M. H. and Park, S. : Determination of singlet oxygen quenching and protection of biological systems by various extracts from seed of *Rumex crispus* L. *J. Photochem. Photobiol. B* **102**, 102 (2011).
- 12) Choi, G. J., Lee, S. W., Jang, K. S., Kim, J. S., Cho, K. Y. and Kim, J. C. : Effects of chrysophanol, parietin, and nepodin of *Rumex crispus* on barley and cucumber powdery mildews. *Crop. Protection* **23**, 1215 (2004).
- 13) Yun, Y. S. and Jeong, K. S. : Polyphenol contents of *Rumex crispus* root extract with hot water and its antioxidative effect. *J. Environmental Sciences* **21**, 1265 (2012).
- 14) Shiwani, S., Singh, N. K. and Wang, M. H. : Carbohydrase inhibition and anti-cancerous and free radical scavenging properties along with DNA and protein protection ability of methanolic root extracts of *Rumex crispus*. *Nutr. Res. Pract.* **6**, 389 (2012).
- 15) Park, H. J., Jeong, J. H., Hyun, H. B., Hwang, H. S. and Kim, H. H. : The stimulatory effects on the osteoblast cells of the root constituents from *Rumex crispus*. *Yakhak Hoeji* **57**, 406 (2013).
- 16) Tominaga, H., Ishiyama, M., Ohseto, F., Sasamoto, K., Hamamoto, T., Suzuki, K. and Watanabe, M. : A water-soluble

- tetrazolium salt useful for colorimetric cell viability assay. *Anal. Commun.* **36**, 47 (1999).
- 17) Abe, T., Abe, Y., Aida, Y., Hara, Y. and Maeda, K. : Extracellular matrix regulates induction of alkaline phosphatase expression by ascorbic acid in human fibroblasts. *J. Cell. Physiol.* **189**, 144 (2001).
- 18) Sitharaman, B., Avti, P. K., Schaefer, K., Talukdar, Y. and Longtin, J. P. : A novel nanoparticle-enhanced photoacoustic stimulus for bone tissue engineering. *Tissue Eng. Part A* **17**, 1851 (2011).
- 19) Tullberg-Reinert, H. and Jundt, G. : In situ measurement of collagen synthesis by human bone cells with a sirius red-based colorimetric microassay: effects of transforming growth factor beta 2 and ascorbic acid 2-phosphate. *Histochem. Cell Biol.* **112**, 271 (1999).
- 20) Gregory, C. A., Gunn, W. G., Peister, A. and Prockop, D. J. : An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Anal. Biochem.* **329**, 77 (2004).
- 21) Stanford, C. M., Jacobson, P. A., Eanes, E. D., Lembke, L. A. and Midura, R. J. : Rapidly forming apatitic mineral in an osteoblastic cell line (UMR 106-01 BSP). *J. Biol. Chem.* **270**, 9420 (1995).
- 22) METLIN : Metablite and Tandem MS Database, <http://metlin.scripps.edu/index.php>. In.
- 23) Bicker, J., Petereit, F. and Hensel, A. : Proanthocyanidins and a phloroglucinol derivative from *Rumex acetosa* L. *Fitoterapia* **80**, 483 (2009).
- 24) Stein, G. S., Lian, J. B. and Owen, T. A. : Relationship of cell growth to the regulation of tissue-specific gene expression during osteoblast differentiation. *FASEB J.* **4**, 3111 (1990).
- 25) Huang, W., Yang, S., Shao, J. and Li, Y. P. : Signaling and transcriptional regulation in osteoblast commitment and differentiation. *Front Biosci.* **12**, 3068 (2007).
- 26) zur Nieden, N. I., Kempka, G. and Ahr, H. J. : *In vitro* differentiation of embryonic stem cells into mineralized osteoblasts. *Differentiation* **71**, 18 (2003).
- 27) Declercq, H. A., Verbeeck, R. M., De Ridder, L. I., Schacht, E. H. and Cornelissen, M. J. : Calcification as an indicator of osteoinductive capacity of biomaterials in osteoblastic cell cultures. *Biomaterials* **26**, 4964 (2005).