

<https://doi.org/10.15433/ksmb.2023.15.1.024>

ISSN 2383-5400 (Online)

MC3T3-E1 골아세포에서 발효 다시마 추출물에 의한 조골세포 분화의 촉진

Fermented sea tangle (*Laminaria japonica* Aresch) Accelerates Osteoblast Differentiation in murine osteoblastic MC3T3-E1 Cells

정나라¹, 최영현^{1,2*}Nara Jeong¹, Yung Hyun Choi^{1,2*}¹연구원, 동의대학교 항노화연구소, 부산광역시 부산진구 엄광로 176, 47340, 대한민국²교수, 동의대학교 한의과대학 생화학교실, 부산광역시 부산진구 양정로 52-57, 47227, 대한민국¹Anti-Aging Research Center, Dong-eui University, Busan 47340, Korea²Department of Biochemistry, Dong-eui University College of Korean Medicine, Busan, 47227, Korea

(Received 15 May 2023, Revised 23 May 2023, Accepted 29 May 2023)

Abstract The *Laminaria japonica* Aresch (Sea tangle) belongs to the brown algae and has a long history as a food material in Asia, including Korea. Recent studies have found that the fermented Sea tangle extract (FST) inhibited the differentiation of osteoclasts and protected osteoblasts from oxidative damage. This study aims to explore the possibility that FST can induce the differentiation of osteoblasts and identify the responsible mechanism. According to our results, FST induced differentiation into osteogenic cells in the presence of osteoblastic MC3T3-E1 cells under non-toxic conditions. This finding was confirmed by phalloidin staining, increased alkaline phosphatase activity, and calcium deposition. Additionally, it was found that this process was achieved by increasing the expression of key factors involved in osteoblast differentiation, such as runt-related transcription factor-2, osterix, β -catenin, and bone morphogenetic protein-2. Moreover, FST increased autophagy, which may contribute to the maintenance of the bone formation homeostasis, and is associated with the activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and mitogen-activated protein kinase signaling pathways. Although further research about the bioactive substances contained in FST and the tests of their efficacy are required, the results of this study indicate that FST has incredible applicability as a functional material for maintaining the bone homeostasis.

Keywords : Fermented Sea tangle extract, osteoblast differentiation, autophagy, bone homeostasis

서 론

뼈는 조골세포(osteoblasts)와 파골세포(osteoclasts)에 의한 골 형성과 흡수를 통해 지속적으로 전환되는 광물 결합 조직(mineral connective tissue)이다

[1,2]. 일반적으로 파골세포의 골 흡수와 조골세포의 형성 사이의 균형은 골량의 항상성을 정상 상태로 유지할 수 있지만, 조골세포의 활성 감소에 따른 파골세포 활성화에 의한 불균형한 골 회전율은 골량 감소 및 골절 위험 증가를 특징으로 하는 골다공증

* Corresponding author

Phone: +82-51-890-3319 Fax: +82-51-890-3333

E-mail: choiyh@deu.ac.kr

This is an open-access journal distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>)

(osteoporosis)과 같은 심각한 장애를 유발할 수 있다 [1,3]. 현재까지 골다공증의 예방 및 치료를 위해서는 골 흡수를 억제하여 골의 양을 유지하고자 하는 것을 주요 목표로였지만, 이러한 약물의 장기간 사용은 암과 심장질환의 위험을 증가시킬 수 있다. 따라서 부작용이 없으면서 골의 흡수를 억제하고 조골세포의 분화를 유도하여 골 형성을 촉진하는 후보 물질의 발굴에 의한 골량 증가 및 골 미세구조 결합 개선에 효과적인 치료법이 절실히 요구된다[3,4].

조골세포의 분화는 다양한 전사 인자들에 의하여 엄격하게 조절되는 복잡한 과정이며, 그들의 활성에 의하여 골 형성 세포의 분화 및 골 무기화의 강화가 이루어진다[5-8]. 동시에 세포 환경을 둘러싼 세포 내 신호계의 활성과 연계된 조골세포의 생존 전략과도 밀접한 연관성을 가진다[9-12]. 따라서 이들은 모두 골 항상성을 유지하여 골다공증과 같은 심각한 골 흡수를 예방 및 치료하기 위한 전략적 표적이며, 안전성이 검증된 천연물의 활용에 대한 관심이 최근 증대하고 있다[13-15]. 최근 본 연구실에서는 조골세포의 분화를 유도하면서 파골세포의 활성을 억제하기 위한 전략으로 해양 천연물의 탐색을 수행 중이며, *Lactobacillus brevis*를 이용한 발효 다시마 (*Laminaria japonica* Aresch.) 추출물(fermented extract of sea tangle, FST)이 nuclear factor- κ B (NF- κ B) ligand로 유도된 파골세포의 분화를 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)의 생성 차단을 통하여 억제하였음을 보고한 바 있다[16]. 아울러 FST는 산화적 손상에 의한 조골세포(MC3T3-E1 cells)의 사멸을 유의적으로 차단하였으며, 이는 nuclear factor erythroid 2-related factor 2 의존적 heme oxygenase-1의 활성에 따른 항산화 활성의 증가에 의한 것이었다[17]. 비록 적정 수준의 ROS는 세포 내 신호 분자로서 중요한 역할을 하지만, 골의 재흡수를 강화하고 골 형성을 감소시키는 기여한다[18,19]. 또한, 과도한 수준의 ROS는 다양한 장기에 산화적 손상을 일으키고 골다공증을 비롯한 여러 산화적 스트레스 매개 질병의 병인 및 진행에 관여한다[19,20]. 즉 FST는 조골세포의 분화 유도제로서의 골 항상성 유지에 기여할 잠재력이 매우 높지만, 이에 대한 연구는 이루어진 바 없다. 따라서 본 연구에서는 MC3T3-E1 세포(murine osteoblastic MC3T3-E1 cell line)를 이용하여 FST의

조골세포 분화 가능성을 조사하였으며, 조골세포 분화 유도에 관여하는 유전자들의 발현 및 이와 연관된 세포 내 신호 전달계의 역할을 조사하였다.

재료 및 방법

세포배양 및 FST 처리

MC3T3-E1 세포는 American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)에서 구입하여 10% fetal bovine serum (FBS) 및 penicillin-streptomycin 용액을 포함하는 α -MEM (α -Modification of Eagle's Minimum Essential Media, WELGENE Inc., Gyeongsan, Republic of Korea)에서 배양하였다. FST는 Marine Bioprocess Co., Ltd. (Busan, Korea)에서 제공받았으며[21], α -MEM에 적정 농도로 희석하여 처리하였다. FST의 제조를 위하여 효모 추출물과 포도당이 1:15 (w/v)의 비율로 포함된 증류수에 건조 다시마를 첨가하여 121°C에서 30분 동안 멸균하였다. 멸균 후, *L. brevis* BJ20 (기탁 번호 KCTC 11377BP)의 배양액을 1.2% (v/v)의 농도로 혼합물에 첨가하고 37°C에서 2일 동안 배양하였다. 배양된 발효물을 여과하여 동결건조한 후, 건조 추출물(FST)을 Milli-Q Water에 용해하여 10 mg/mL stock solution으로 제작하고, 세포배양 배지에 적정 농도로 희석하여 처리하였다[21].

조골세포 분화 유도

FST에 의한 MC3T3-E1 세포의 분화 유도 효과를 조사하기 위하여 6-well culture plate에 세포(5×10^4 cells/mL)를 분주하고 24시간 후, 분화 유도 배지(osteogenic medium, OGM; α -MEM containing 10% FBS supplemented with 10 mmol/L β -glycerophosphate and 50 μ g/mL ascorbic acid, WELGENE Inc.) 또는 FST가 함유된 배지를 이틀간 교체하면서 7일간 배양하였다.

세포 생존을 분석

FST의 처리 농도 설정을 위하여 MC3T3-E1 세포를 96-well culture plates (5×10^4 cells/mL)에 분주하고 24시간 배양 후 다양한 농도의 FST가 함유된 배지로 교체하여 72시간 동안 배양하였다. 세포 생존율은 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium

bromide, MTT) 분석(Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)을 사용하여 측정하였으며, 제조사의 지침에 따라 형성된 formazan crystal을 dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)에 녹인 후, microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 검출하였다.

Phalloidin 염색

배양이 끝난 MC3T3-E1 세포들의 filamentous actin (F-actin) 염색을 위한 형광 probe인 phalloidin (Alexa Fluor™ 488 Phalloidin)은 Thermo Fisher Scientific Inc.에서 구입하였다. 제조사의 지침에 따라 phosphate buffered saline (PBS)으로 세포를 수세 후 상온에서 4%의 formaldehyde로 고정시켰다. 이어서 blocking solution (1% bovine serum albumin, 0.3% Triton-X, 10 mM PBS)을 처리한 다음 phalloidin 용액 (1:200 dilution in PBS)으로 1시간 염색하였다. Phalloidin 염색 후, 5분간 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma-Aldrich Co.) 용액으로 핵을 추가로 염색하였으며 PBS로 세포를 수세 후, 형광 강도의 차이를 형광현미경(Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)을 이용하여 관찰하였다.

Alkaline phosphatase (ALP) 및 Alizarin Red S 염색

ALP의 활성과 칼슘 침착의 정도를 평가하기 위하여 배양이 끝난 세포를 PBS로 수세하고, 4% formaldehyde로 고정시켰다. 이어서 TRACP & ALP Double-stain Kit (Takara Bio Inc., Kusatsu, Shiga, Japan)를 이용한 ALP 활성을 측정하기 위하여 제조업체의 지침에 따라 ALP 기질을 첨가하고 37°C에서 배양하였다. 아울러, 동일 조건에서 배양된 세포를 2% Alizarin Red S 용액(Sigma-Aldrich Co.)으로 30분 동안 염색하였다. 그리고 염색된 세포 이미지는 위상차 현미경(phase-contrast microscopy, Carl Zeiss) 하에서 획득하였다.

단백질 발현 분석

배양이 끝난 세포를 모아서 protease inhibitors를 포함하는 RIPA (radioimmunoprecipitation assay) 용액(Thermo Fisher Scientific Inc.)을 사용하여 총 단백질

을 추출하였다. Bio-Rad Protein Assay Reagent (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)로 단백질을 정량한 후, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel 전기영동으로 동량의 단백질을 분리하고 polyvinylidene difluoride membrane (Thermo Fisher Scientific)으로 옮긴 다음 검출 대상 단백질의 1차 항체 및 2차 항체로 사용하여 순차적으로 반응시켰다. 해당 단백질의 시각화를 위해 Enhanced Chemiluminescence Plus Kit (Thermo Fisher Scientific)를 사용하였고 Fusion FX Image System (Vilber Lourmat, Torcy, France)을 사용하여 이미지를 획득하였다.

형광 염색

자가포식(autophagy)의 핵심적인 바이오 마크인 microtubule-associated protein one light chain 3 (LC3)의 발현에 미치는 FST의 영향을 조사하기 위하여 정상 배지 및 FST가 함유된 배지에서 배양된 MC3T3-E1 세포를 대상으로 LC3 Detection Kit (Thermo Fisher Scientific Inc.)를 이용하여 제조사의 지침에 따라 LC3를 염색하였다. 이를 위하여 세포를 4% formalin으로 고정 후, 실온에서 1시간 동안 LC3 항체 및 2차 항체(Alexa Fluor 488 goat-anti-rabbit)와 반응시키고 DAPI 용액을 이용하여 핵을 염색하였다. 염색이 끝난 세포를 PBS로 수세 후 형광현미경 하에서 LC3 형광 이미지를 관찰하였다.

통계 분석

GraphPad Prism Ver. 5.0 (Graphpad Inc., San Diego, CA, USA)를 사용하여 실험 결과의 통계 분석을 실시하였으며, 실험 결과는 평균 ± 표준 편차(standard deviation, SD)로 표현하였고, 통계적 유의성의 검정은 $p < 0.05$ 수준으로 하였다.

결과 및 고찰

MC3T3-E1 세포의 F-actin 발현에 미치는 FST의 영향

FST가 MC3T3-E1 세포의 분화에 미치는 영향을 평가하기 위한 적정 처리 농도의 선정을 위하여 다양한 농도의 FST가 함유된 배지에서 72시간 동안 배양된 세포를 대상으로 MTT 분석을 실시하였다. Figure 1A에 나타난 결과에서 알 수 있듯이, 60 μ

g/mL 이하의 FST가 포함된 배지에서 배양된 MC3T3-E1 세포의 생존율은 대조군 대비 유의적인 차이점이 없었지만, 80 µg/mL 이상의 FST가 처리된 세포에서는 대조군에 비하여 세포 생존율이 유의적으로 억제되었다. 따라서, 추후 실험을 위한 FST 처리 농도는 60 µg/mL로 설정하였다.

F-actin은 진핵 세포의 단백질 섬유 네트워크 (protein fiber network)를 대별하는 세포골격의 구조적 및 기능적 구성 요소이며[22], 인간 간질 줄기세포(stromal stem cells)에서 조골세포의 분화와 뼈 형성의 향상에 기여한다[23,24]. 따라서 FST가 세포골격 형성에 미치는 영향을 확인하기 위해 F-actin의 발현을 phalloidin 형광 염색으로 관찰하였으며, 비록 분화 유도 배지에서 배양된 세포에 비하여 F-actin의 형광 강도가 다소 낮게 나타났지만, FST가 함유된 배지에서 배양된 MC3T3-E1 세포의 세포질 전체에 F-actin의 발현이 대조군에 비하여 증가하였음을 알 수 있었다(Figure 1B). 이러한 결과는 FST가 골 형성 세포의 접착, 퍼짐 및 증식에 유리함을 나타내며 [25], 특히 F-actin에 대한 phalloidin의 친화력은 ALP 활성 및 광물화(mineralization) 의존적으로 증가되기 때문에[26] FST가 MC3T3-E1 세포의 뼈 형성 활성을 촉진할 수 있음을 보여주는 결과이다.

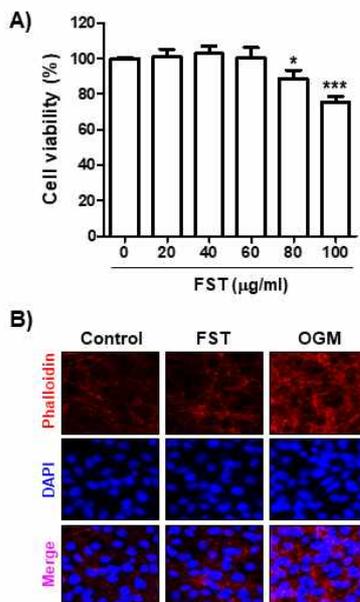


Figure 1. Effects of FST on the cell viability and cytoskeleton morphology in MC3T3-E1 preosteoblasts. (A) Cells were cultured for 72 h in FST-containing α-MEM. (A) Cell viability was assessed by MTT assay. Data were presented

as mean ± SD and representative of at least three independent experiments (**P* < 0.01 and ****P* < 0.001 relative to the α-MEM control). (B) Cells were cultured for 72 h in FST-containing α-MEM or OGM. After fixation, cells were stained with Alexa Fluor™ 488 Phalloidin, and nuclei were labeled with DAPI and then observed under a fluorescence microscope.

MC3T3-E1 세포에서 FST에 의한 ALP의 활성과 칼슘 침착의 증가

조골세포 분화 유도 초기에 요구되는 ALP의 활성과 골의 광물화(mineralization)를 위한 칼슘의 침착은 조골세포 분화 활성을 평가하기 위한 바이오 마커로 활용된다[5,6]. 따라서 FST에 의하여 MC3T3-E1 세포가 조골세포로 분화되었는지를 확인하기 위하여 FST가 함유된 배지에서 배양된 세포를 대상으로 ALP 및 Alizarin Red S 염색을 실시하였다. Figure 2A에 제시된 결과에서 알 수 있듯이, FST는 대조군 대비 ALP의 활성을 유의적으로 증가시켰다. 또한, 칼슘 침착을 의미하는 Alizarin Red S 염색의 강도도 대조군 대비 5배 이상 증가하였다(Figure 2B). Figure 1B의 phalloidin 염색 강도에서처럼 ALP 활성 및 칼슘 침착이 분화 유도 배지에서 배양된 MC3T3-E1 세포에 비하여 다소 낮게 나타났지만, 본 연구의 결과는 FST가 뼈 형성을 위한 조골세포의 분화를 유도하였음을 의미한다.

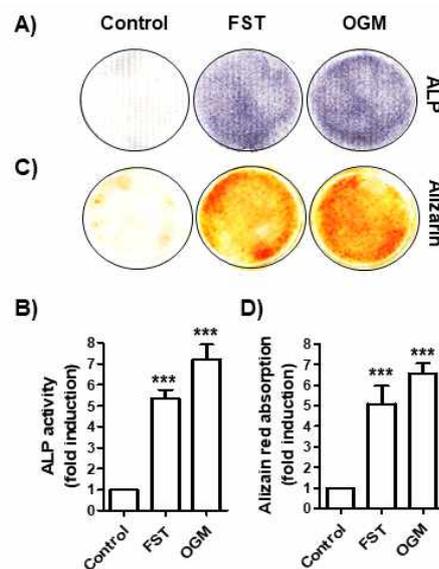


Figure 2. Effects of FST on the ALP activity and calcification in MC3T3-E1 preosteoblasts. After culturing the cells in

FST-containing medium α -MEM or OGM alone for 7 days, the cells were stained for ALP activity using a TRACP & ALP Double-stain Kit (A and B) and for calcification using Alizarin Red S solution (C and D) according to the manufacturer's instructions. (A and C) Representative images were captured using a fluorescence microscope. (B) For quantification of ALP activity, cell lysates were separated from cells, incubated with alkaline phosphatase yellow (pNPP) liquid substrate, measured at 405 nm with a microplate reader, and presented as fold activity of control cells. (D) Calcium deposition was quantified based on Alizarin Red S staining and the results were calculated as fold induction of control cells. Data were presented as mean \pm SD (** P < 0.001 relative to the α -MEM control).

뼈 기능 향상과 연관된 FST를 이용한 선행 연구에 의하면, FST는 파골세포의 분화를 현저하게 감소시켰으며, 이는 산화적 스트레스 차단과 연관성이 있었다[16]. 또한, MC3T3-E1 세포에서 FST는 ROS 생성 억제를 통해 미토콘드리아 기능을 유지함으로써 산화적 손상으로부터 세포를 보호할 수 있었다[17]. ROS의 과잉 생산으로 대별되는 산화적 스트레스는 골다공증을 포함한 많은 질병의 발병 원인이며, 특히 ROS는 조골세포와 골세포의 세포사멸을 유도하는 반면, 파골세포 형성을 촉진하고 광물화와 골 형성을 억제한다[19,27]. 따라서 FST에 의한 조골세포의 분화 유도 활성을 FST의 항산화 활성과 최소한 연관성이 있을 것으로 추측된다.

MC3T3-E1 세포에서 조골세포 분화 유도 유전자 발현에 미치는 FST의 영향

조골세포 형성(osteoblastogenesis)인 조골세포의 분화 과정에는 다양한 유전자들의 발현이 연속적으로 관여하며, 이들은 전사 수준에서 정교하게 조절된다. 따라서 FST에 의한 MC3T3-E1 세포의 조골세포 분화 유도 과정에 이들 핵심 전사 인자인 Runx2-related transcription factor-2 (Runx2) 및 osterix (Osx)의 발현 변화를 먼저 조사하였다. Immunoblotting 결과에 의하면 FST가 처리된 MC3T3-E1 세포에서 Runx2와 Osx의 발현이 대조군에 비하여 모두 증가되었다 (Figure 3). 잘 알려진 바와 같이, Runx2와 Osx는 type I collagen, osteocalcin, osteopontin 및 ALP를 포함하는 골 형성 마커 유전자들의 활성을 증가시켜 조골세포 분화 및 골 무기질화를 유도한다[28,29]. 따라서

FST에 의한 ALP의 활성과 칼슘 침착의 증가는 최소한 Runx2와 Osx의 전사 활성 증가와 연관이 있음을 알 수 있다.

한편, Wntless-related integration site (Wnt)/ β -catenin 신호 전달계 역시 조골세포 분화 조절에 핵심적인 역할을 하는데, 이 신호계가 활성화되면 β -catenin의 분해가 억제되면서 핵으로 전이된다. 핵 내에서 β -catenin은 Runx2 및 OSX와 같은 골 형성 분화 관련 전사 인자의 발현을 촉진하며, 이는 Wnt/ β -catenin 신호계의 활성화가 조골세포 분화 초기 단계 및 골 형성 촉진에 중요한 역할을 함을 의미한다 [7,8]. 아울러 bone morphogenetic protein (BMP) sub-family 중에서 골 형성에 가장 중요한 역할을 하는 BMP-2는 Runx2와 Wnt/ β -catenin 신호계의 활성과 근원세포(myogenic cells)로부터 골 형성 세포로의 분화에도 관여하는 골 특이적 기질 단백질 생산에서 가장 핵심적인 조절자이다[30,31]. 따라서 FST가 Runx2와 Osx 뿐만 아니라 이들 신호계에 관여하는 인자들의 발현도 증대시킬 것으로 추측되며, β -catenin 및 BMP-2의 발현이 FST 처리 농도 의존적으로 향상되었음을 immunoblotting 결과로 확인하였다. 따라서 본 연구의 결과는 FST에 의한 조골세포 분화에 따른 골 형성 과정에는 이들 유전자의 활성이 동시에 관여하고 있음을 의미한다.

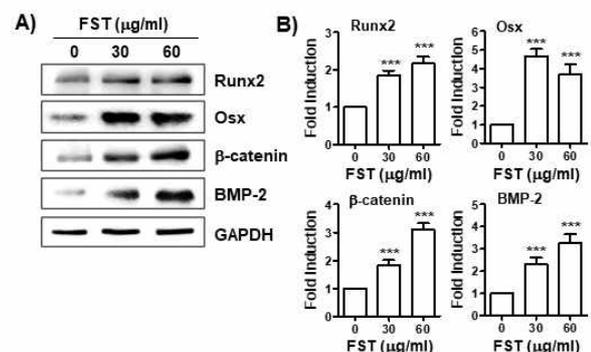


Figure 3. Effects of FST on the expression of osteogenic differentiation-related proteins in MC3T3-E1 preosteoblasts. After culturing the cells in FST-containing α -MEM for 7 days, the levels of Runx2, β -catenin and BMP-2 protein expression were detected by Western blot analysis (A) and their relative expression was normalized to glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) as an internal control (B). Data were presented as mean \pm SD (** P < 0.001 relative to the α -MEM control).

FST에 의한 MC3T3-E1 세포의 조골세포 분화와 자

자가포식의 연관성

자가포식은 리소좀 경로를 통해 손상된 소기관, 결합 단백질, 침입한 병원체 및 기타 독성 세포질 구성 요소를 재활용하여 세포 내 환경의 항상성을 유지하는 기본 메커니즘으로 조골세포 분화 및 광물화의 조절을 통하여 골 리모델링에 참여한다[9,32]. 선행 연구에 따르면 골 형성 분화 동안 자가포식이 활성화되고 자가포식의 억제제는 골 형성 분화 과정을 억제하는 것으로 나타났다[10]. 따라서 FST에 의한 조골세포의 분화에 자가포식이 관여하는지를 조사하였으며, Figure 4A의 결과에서 알 수 있듯이 FST 처리 농도 증가에 따라 LC3의 발현이 증가하였다. 자가포식의 유도를 위하여 LC3는 LC3-I이 LC3-II로 전환되면서 자가포식의 핵심적인 과정인 자가포식 소체(autophagosome)의 막에 결합하기 때문에 LC3-II의 발현 증가는 자가포식의 지표이다. 이 과정을 통하여 자가포식의 후기 단계로 이어질 수 있으며[33,34], immunoblotting의 결과에 의하면, FST가 존재하는 조건에서 LC3-I과 LC3-II의 발현이 모두 증가하였다(Figure 4B 및 C). 이는 FST는 LC3의 발현을 증가시키면서 LC3-II로의 전환을 유도하였음을 의미한다.

was normalized to GAPDH as an internal control (C). Data were presented as mean ± SD (***P* < 0.001 relative to the α-MEM control).

LC3-II와 함께 Beclin 1 또한 자가포식 소체의 형성에 관여하는 바이오 마커이며, ubiquitin 결합 단백질인 p62/sequestosome 1 (SQSTM1)은 선택적 자가포식 수용체이다. 자가포식 개시와 자가포식 소체의 형성 과정 동안 LC3-II와 결합하고 p62와 상호 작용하여 자가포식을 완성한다[33,35]. 본 연구의 결과에 의하면, p62와 Beclin 1의 발현 또한 FST 노출 농도의 증가에 따라 모두 발현이 증가되었다(Figure 4B 및 C). 비록 자가포식이 세포의 생존과 세포사멸 유도에서 양면성이 있지만, 높은 포도당 및 산화적 스트레스 조건에 노출된 MC3T3-E1 세포에서 자가포식은 세포 생존에 관여하는 것으로 밝혀졌으며, 이는 소포체의 기능 유지와도 연관성이 있었다[36-38]. 따라서 FST에 의한 자가포식의 유도는 조골세포 분화에 동반되는 조직 광물화 및 골 항상성에 기여할 것으로 추정된다.

FST에 의한 MC3T3-E1 세포의 조골세포 분화와 세포 내 신호 전달계의 연관성

조골세포의 분화 과정은 다양한 세포 내 신호전달에 의한 유전자 발현의 조절을 포함하는 복잡한 과정에 의해 조절된다. 비록, 골 형성과 흡수 과정에 관여하는 다양한 세포 내 신호계 중에서 NF-κB와 함께 phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt 및 mitogen-activated protein kinases (MAPKs) 신호계는 파골세포의 분화에도 관여하지만, 조골세포 분화와 골 성장을 위한 표적 유전자의 발현을 위해서도 그들의 활성화가 요구된다[11,12]. FST에 의한 MC3T3-E1 세포의 분화 과정에서 이들 신호계의 활성이 관여하는지를 조사하기 위하여 두 신호계 구성 단백질의 인산화 정도를 조사하였다. Figure 5A 및 B의 결과에서 알 수 있듯이, PI3K 및 Akt의 총단백질 발현은 큰 변화가 없었지만, 그들이 활성화되었음을 의미하는 인산화형인 phosphorylated (p)-PI3K 및 p-Akt의 발현은 FST 처리 농도 증가에 따라 유의적으로 증가하였다. 이와 유사하게 MAPKs에 속하는 3가지 kinase인 extracellular signal-regulated kinase (ERK), c-Jun N-terminal kinase (JNK) 및 p38 MAPK의 인산

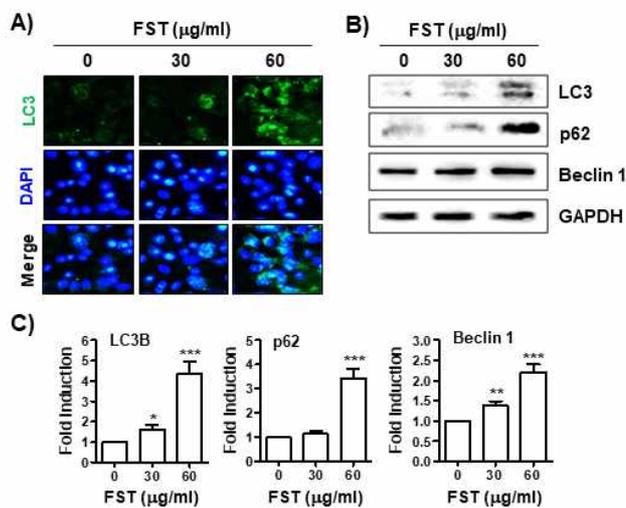


Figure 4. Effects of FST on the expression of autophagy-related proteins in MC3T3-E1 preosteoblasts. (A) After culturing the cells in FST-containing α-MEM for 7 days, immunofluorescence staining was performed using the LC3 antibody and representative images obtained under a fluorescence microscope are presented. (B and C) The levels of LC3, p62 and Beclin 1 protein expression were detected by Western blot analysis (B) and their relative expression

화 정도 그들의 총 단백질 발현 변화 없이 FST 처리 농도 의존적으로 증가되어(Figure 5C 및 D), FST 존재 하에서 두 신호가 모두 활성화되었음을 알 수 있다.

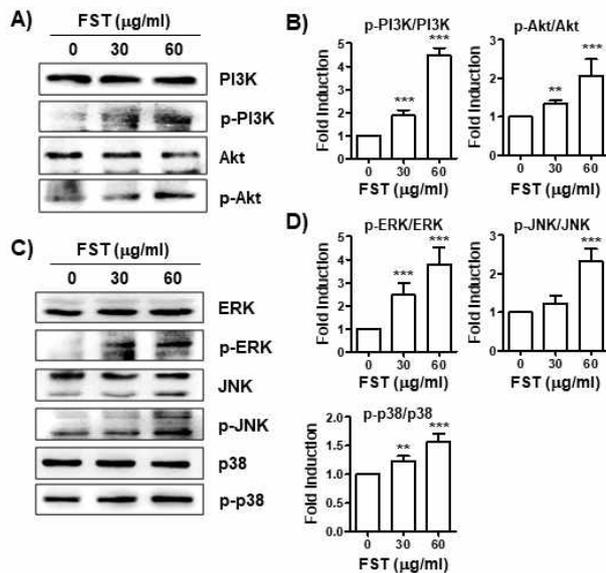


Figure 5. Effects of FST on the expression of PI3K/Akt and MAPKs-related proteins in MC3T3-E1 preosteoblasts. After culturing the cells in FST-containing α -MEM for 7 days, Western blot analysis was used to detect levels of total and phosphorylated proteins using antibodies against the indicated proteins (A and C) and the relative expression of the phosphorylated form to total protein of the presented proteins was quantified (B and C). Data were presented as mean \pm SD (** $P < 0.001$ relative to the α -MEM control).

선행 연구들에 의하면, PI3K/Akt 신호계의 활성화는 Smad의 핵 전이 통하여 Runx2와 Osx의 전사 활성을 증가시키며, BMP-2 유도 골아세포 형성에 관여함이 밝혀졌다[39,40]. 이와 동시에 다양한 조골세포의 분화 유도제에 의한 골 형성의 촉진에는 PI3K/Akt 경로 활성이 동반됨이 보고된 바 있다 [41,42]. 또한, MAPKs 중에서, ERK와 p38 MAPK은 조골세포 분화에서 Runx2 경로 활성과 BMP-2의 발현에 상위조절자로 작용하는 것으로 밝혀졌다 [11,12]. 아울러 JNK를 포함한 이들 kinase는 c-fos 및 AP-1 경로를 통한 골아세포 특이적인 유전자 발현 조절자로 작용한다[41,43]. 이러한 결과들은 FST에 의한 조골세포의 분화 유도 유전자 발현과 골 형성 과정에 이들 신호계의 활성이 최소한 관여하고 있음을 의미한다. 특히, 발효 전과 비교하여 FST에는 γ

-aminobutyric acid (GABA)의 함량이 증가되었음이 보고된 바 있으며[44], GABA는 조골세포의 분화 유도에 핵심적인 작용을 할 수 있음이 최근 밝혀진 바 있다[45,46]. 따라서 FST에 풍부하게 함유된 GABA가 조골세포 분화에 핵심적인 역할을 하였을 가능성이 매우 높다. 그러나 FST의 상위 신호계 탐색을 위해 각 신호계의 제어에 따른 구체적인 기전 연구가 추가로 수행되어야 할 것이다.

결론

본 연구에서는 MC3T3-E1 세포에서 FST가 독성이 없는 조건에서 조골세포 분화에 요구되는 주요 유전자의 발현을 증가시켜 골 형성 세포로의 유도를 촉진시켰음을 phalloidin 염색과 ALP의 활성 및 칼슘 침착의 증가로 확인하였다. 이는 조골세포 분화에 관여하는 주요 인자인 Runx2, Osx, β -catenin 및 BMP-2의 발현을 증가에 의하여 이루어졌음을 제시하였다. 아울러 FST에 의한 자가포식의 활성화는 골 형성 항상성 유지에 기여할 것이라 추측되며, FST의 이러한 과정에는 PI3K/Akt와 MAPKs 신호계의 활성이 관여하고 있었다. 비록 본 연구에서는 MC3T3-E1 세포에서 FST 처리에 따른 조골세포 분화 및 골 형성 과정에서 나타나는 단편적인 현상만을 제시하였지만, FST는 향후 골 항상성 유지를 위한 기능성 소재로서의 적용 가능성이 우수함을 알 수 있다.

References

1. Suzuki, A., Minamide, M., Iwaya, C., Ogata, K., Iwata, J. 2020. Role of metabolism in bone development and homeostasis. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 8992.
2. Florencio-Silva, R., Sasso, G. R., Sasso-Cerri, E., Simões, M. J., Cerri, P. S. 2015. Biology of bone tissue: Structure, function, and factors that influence bone cells. *Biomed. Res. Int.* **2015**, 421746.
3. Song, S., Guo, Y., Yang, Y., Fu, D. 2022. Advances in pathogenesis and therapeutic strategies for osteoporosis. *Pharmacol. Ther.* **237**, 108168.
4. Martiniakova, M., Babikova, M., Omelka, R. 2020. Pharmacological agents and natural compounds: available treatments for osteoporosis. *J. Physiol. Pharmacol.* **71**, 307-320.
5. Arora, S., Cooper, P. R., Ratnayake, J. T., Friedlander,

- L. T., Rizwan, S. B., Seo, B., Hussaini, H. M. 2022. A critical review of *in vitro* research methodologies used to study mineralization in human dental pulp cell culture s. *Int. Endod. J.* **55** (Suppl 1), 3-13.
6. Patel, U., Macri-Pellizzeri, L., Zakir Hossain, K. M., Scammell, B. E., Grant, D. M., Scotchford, C. A., Hannon, A. C., Kennedy, A. R., Barney, E. R., Ahmed, I., Sottile, V. 2019. *In vitro* cellular testing of strontium/calcium substituted phosphate glass discs and microspheres shows potential for bone regeneration. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **13**, 396-405.
7. Kobayashi, Y., Uehara, S., Koide, M., Takahashi, N. 2015. The regulation of osteoclast differentiation by Wnt signals. *Bonekey Rep.* **4**, 713.
8. Kobayashi, Y., Uehara, S., Udagawa, N., Takahashi, N. 2016. Regulation of bone metabolism by Wnt signals. *J. Biochem.* **159**, 387-392.
9. Yin, X., Zhou, C. C., Li, J. T., Liu, R. K., Shi, B., Yuan, Q., Zou, S. J. 2019. Autophagy in bone homeostasis and the onset of osteoporosis. *Bone Res.* **7**, 28.
10. Zhang, K., Liu, F. W., Jin, D. 2019. Autophagy preserves the osteogenic ability of periodontal ligament stem cells under high glucose conditions in rats. *Arch. Oral. Biol.* **101**, 172-179.
11. Franceschi, R. T., Ge, C. 2017. Control of the osteoblast lineage by mitogen-activated protein kinase signaling. *Curr. Mol. Biol. Rep.* **3**, 122-132.
12. Greenblatt MB, Shim JH, Glimcher LH. Mitogen-activated protein kinase pathways in osteoblasts. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2013; **29**: 63-79.
13. El-Desoky, A. H. H., Tsukamoto, S. 2022. Marine natural products that inhibit osteoclastogenesis and promote osteoblast differentiation. *J. Nat. Med.* **76**, 575-583.
14. Zhao, X., Patil, S., Xu, F., Lin, X., Qian, A. 2021. Role of biomolecules in osteoclasts and their therapeutic potential for osteoporosis. *Biomolecules* **11**, 747.
15. Raut, N., Wicks, S. M., Lawal, T. O., Mahady, G. B. 2019. Epigenetic regulation of bone remodeling by natural compounds. *Pharmacol. Res.* **147**, 104350.
16. Jeong, J. W., Ji, S. Y., Lee, H., Hong, S. H., Kim, G. Y., Park, C., Lee, B. J., Park, E. K., Hyun, J. W., Jeon, Y. J., Choi, Y. H. 2019. Fermented sea tangle (*Laminaria japonica* Aresch) suppresses RANKL-induced osteoclastogenesis by scavenging ROS in RAW 264.7 cells. *Food* **8**, 290.
17. Kim, S. Y., Cha, H. J., Hwangbo, H., Park, C., Lee, H., Song, K. S., Shim, J. H., Noh, J. S., Kim, H. S., Lee, B. J., Kim, S., Kim, G. Y., Jeon, Y. J., Choi, Y. H. 2021. Protection against oxidative stress-induced apoptosis by fermented sea tangle (*Laminaria japonica* Aresch) in osteoblastic MC3T3-E1 cells through activation of Nrf2 signaling pathway. *Foods* **10**, 2807.
18. Tao, H., Ge, G., Liang, X., Zhang, W., Sun, H., Li, M., Geng, D. 2020. ROS signaling cascades: Dual regulations for osteoclast and osteoblast. *Acta. Biochim. Biophys. Sin.* **52**, 1055-1062.
19. Domazetovic, V., Marcucci, G., Iantomasi, T., Brandi, M. L., Vincenzini, M. T. 2017. Oxidative stress in bone remodeling: Role of antioxidants. *Clin. Cases Miner. Bone Metab.* **14**, 209-216.
20. Agidigbi, T. S., Kim, C. 2019. Reactive oxygen species in osteoclast differentiation and possible pharmaceutical targets of ROS-mediated osteoclast diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 3576.
21. Choi, W. C., Reid, S. N. S., Ryu, J. K., Kim, Y., Jo, Y. H., Jeon, B. H. 2016. Effects of γ -aminobutyric acid-enriched fermented sea tangle (*Laminaria japonica*) on brain derived neurotrophic factor-related muscle growth and lipolysis in middle aged women. *Algae* **31**, 175-187.
22. Melak, M., Plessner, M., Grosse, R. 2017. Actin visualization at a glance. *J. Cell Sci.* **130**, 525-530.
23. Khan, A. U., Qu, R., Fan, T., Ouyang, J., Dai, J. 2020. A glance on the role of actin in osteogenic and adipogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res. Ther.* **11**, 283.
24. Rodríguez, J. P., González, M., Ríos, S., Cambiazo, V. 2004. Cytoskeletal organization of human mesenchymal stem cells (MSC) changes during their osteogenic differentiation. *J. Cell. Biochem.* **93**, 721-731.
25. Xu, G., Shen, C., Lin, H., Zhou, J., Wang, T., Wan, B., Binshabaib, M., Forouzanfar, T., Xu, G., Alharbi, N., Wu, G. 2022. Development, *in-vitro* characterization and *in-vivo* osteoinductive efficacy of a novel biomimetically-precipitated nanocrystalline calcium phosphate with internally-incorporated bone morphogenetic protein-2. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **10**, 920696.
26. Chen, L., Shi, K., Frary, C. E., Ditzel, N., Hu, H., Qiu, W., Kassem, M. 2015. Inhibiting actin depolymerization enhances osteoblast differentiation and bone formation in human stromal stem cells. *Stem Cell Res.* **15**, 281-289.
27. Bădilă, A. E., Rădulescu, D. M., Ilie, A., Niculescu, A. G., Grumezescu, A. M., Rădulescu, A. R. 2022. Bone

- regeneration and oxidative stress: An updated overview. *Antioxidants (Basel)* **11**, 318.
28. Shahi, M., Peymani, A., 2017. Sahmani M. Regulation of bone metabolism. *Rep. Biochem. Mol. Biol.* **5**, 73-82.
 29. Nishimura, R., Hata, K., Nakamura, E., Murakami, T., Takahata, Y. 2018. Transcriptional network systems in cartilage development and disease. *Histochem. Cell. Biol.* **149**, 353-363.
 30. Lin, D. P. L., Carnagarin, R., Dharmarajan, A., Dass, C. R. 2017. Transdifferentiation of myoblasts into osteoblasts - Possible use for bone therapy. *J. Pharm. Pharmacol.* **69**, 1661-1671.
 31. Ryoo, H. M., Lee, M. H., Kim, Y. J. 2006. Critical molecular switches involved in BMP-2-induced osteogenic differentiation of mesenchymal cells. *Gene* **366**, 51-57.
 32. Kroemer, G., Mariño, G., Levine, B. 2010. Autophagy and the integrated stress response. *Mol. Cell* **40**, 280-293.
 33. Yoshii, S. R., Mizushima, N. 2017. Monitoring and measuring autophagy. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, 1865.
 34. Tanida, I. 2011. Autophagosome formation and molecular mechanism of autophagy. *Antioxid. Redox Signal.* **14**, 2201-2214.
 35. Park, J. M., Huang, S., Wu, T. T., Foster, N. R., Sinicropo, F. A. 2013. Prognostic impact of Beclin 1, p62/sequestosome 1 and LC3 protein expression in colon carcinomas from patients receiving 5-fluorouracil as adjuvant chemotherapy. *Cancer Biol. Ther.* **14**, 100-107.
 36. Li, D. Y., Yu, J. C., Xiao, L., Miao, W., Ji, K., Wang, S. C., Geng, Y. X. 2017. Autophagy attenuates the oxidative stress-induced apoptosis of Mc3T3-E1 osteoblasts. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **21**, 5548-5556.
 37. Bartolomé, A., López-Herradón, A., Portal-Núñez, S., García-Aguilar, A., Esbrit, P., Benito, M., Guillén, C. 2013. Autophagy impairment aggravates the inhibitory effects of high glucose on osteoblast viability and function. *Biochem. J.* **455**, 329-337.
 38. Lai, E. H., Hong, C. Y., Kok, S. H., Hou, K. L., Chao, L. H., Lin, L. D., Chen, M. H., Wu, P. H., Lin, S. K. 2012. Simvastatin alleviates the progression of periapical lesions by modulating autophagy and apoptosis in osteoblasts. *J. Endod.* **38**, 757-763.
 39. Zhang, S., Shen, S., Ma, P., Fan, D. 2022. Biochemical targets and molecular mechanism of ginsenoside compound K in treating osteoporosis based on network pharmacology. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, 13921.
 40. Cheng, Y. H., Dong, J. C., Bian, Q. 2019. Small molecules for mesenchymal stem cell fate determination. *World J. Stem Cells* **11**, 1084-1103.
 41. Hipskind, R. A., Bilbe, G. 1998. MAP kinase signaling cascades and gene expression in osteoblasts. *Front. Biosci.* **3**, d804-816.
 41. Takeno, A., Kanazawa, I., Tanaka, K. I., Notsu, M., Sugimoto, T. 2019. Phloretin suppresses bone morphogenetic protein-2-induced osteoblastogenesis and mineralization via inhibition of phosphatidylinositol 3-kinases/Akt pathway. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 2481.
 42. Ghosh-Choudhury, N., Abboud, S. L., Nishimura, R., Celeste, A., Mahimainathan, L., Choudhury, G. G. 2002. Requirement of BMP-2-induced phosphatidylinositol 3-kinase and Akt serine/threonine kinase in osteoblast differentiation and Smad-dependent BMP-2 gene transcription. *J. Biol. Chem.* **277**, 33361-33368.
 42. Songjang, W., Nensat, C., Tohtong, R., Suthiphongchai, T., Phimsen, S., Rattanasinganchan, P., Methenukul, P., Kasekarn, W., Jiraviriyakul, A. 2022. Porcine placenta extract induced Akt, ERK, and JNK signaling to heighten the osteogenic activity of human osteoblasts. *J. App. Pharm. Sci.* **12**, 18-25.
 43. Salaszyk, R. M., Klees, R. F., Hughlock, M. K., Plopper, G. E. 2004. ERK signaling pathways regulate the osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells on collagen I and vitronectin. *Cell Commun. Adhes.* **11**, 137-153.
 44. Reid, S. N. S., Ryu, J. K., Kim, Y., Jeon, B. H. 2018. GABA-enriched fermented *Laminaria japonica* improves cognitive impairment and neuroplasticity in scopolamine- and ethanol-induced dementia model mice. *Nutr. Res. Pract.* **12**, 199-207.
 45. Molagoda, I. M. N., Athapaththu, A. M. G. K., Park, E. K., Choi, Y. H., Jeon, Y. J., Kim, G. Y. 2022. Fermented oyster (*Crassostrea gigas*) extract cures and prevents prednisolone-induced bone resorption by activating osteoblast differentiation. *Foods* **11**, 678.
 46. Li, H., Wu, Y., Huang, N., Zhao, Q., Yuan, Q., Shao, B. 2020. γ -Aminobutyric acid promotes osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells by inducing TNFAIP3. *Curr. Gene Ther.* **20**, 152-161.