[UCI]I804:24011-200000264156

2014年 2月
碩士學位論文

MC3T3-E1 조골세포에서 가자 추출물에 의한 골형성능 분석

朝鮮大學校 大學院

齒醫生命工學科

朴 祥 連

MC3T3-E1 조골세포에서 가자 추출물에 의한 골형성능 분석

Osteogenic effect of *Terminalia cebula* Retzius extract in pre-osteoblastic cell, MC3T3-E1

2014年 2月 25日

朝鮮大學校 大學院

齒醫生命工學科

朴 祥 連

MC3T3-E1 조골세포에서 가자 추출물에 의한 골형성능 분석

指導敎授 金 秀 官

이 論文을 理學碩士學位신청 論文으로 제출함

2013年 10月

朝鮮大學校 大學院

齒醫生命工學科

朴 祥 連

朴祥連의 碩士學位論文을 認准함

委員長　朝鮮大學校 敎　授　김도경 (인)

委　員　朝鮮大學校 敎　授　김재성 (인)

委　員　朝鮮大學校 敎　授　김수관 (인)

2013年 11月

朝鮮大學校 大學院

목 차

LIST OF TABLE ····· ii
LIST OF FIGURE ····· iii
ABBREVIATIONS ····· iv
ABSTRACT ····· v

제 1장. 서 론 ····· 1

제 2장. 연구재료 및 방법 ····· 5
1. 실험 재료 및 시약 ····· 5
2. 가자 추출물의 제조 ····· 5
3. 조골세포 및 정상세포의 배양 ····· 6
4. 조골세포의 증식률 및 세포 독성 분석 ····· 6
5. Alkaline phosphatase(ALP) 활성 측정 ····· 7
6. Collagen 함량 측정 ····· 7
7. Mineralization 측정 ····· 8
8. Total RNA 분리 및 정량 ····· 9
9. cDNA 제조 ····· 9
10. PCR(Polymerase Chain Reaction) 분석 ····· 9
11. 통계처리 ····· 10

제 3장. 연구결과 ····· 12
1. 추출물의 세포 독성 분석 ····· 12
2. Alkaline phosphatase(ALP) 활성 측정 ····· 14
3. Mineralization 측정 ····· 16
4. Collagen 함량 측정 ····· 18

제 4장. 결론 및 고찰 ····· 20
제 5장. 참고문헌 ····· 22

LIST OF TABLES

Table 1. PCR primer sequences and PCR condition ····· 11

LIST OF FIGURES

Figure 1. The cytotoxicity of TCE on the human normal oral keratinocytes (HNOKs) and MC3T3-E1 cells ····· 13
Figure 2. The up-regulation of activity and mRNA induction of alkaline phosphatase in MC3T3-E1 osteoblastic cells stimulated with TCP as the dose-dependent manner ····· 15
Figure 3. The TCE-induced mineralization in MC3T3-E1 cells ····· 15
Figure 4. The up-regulation of collagen content in MC3T3-E1 cells stimulated with TCE ····· 17

ABBREVIATIONS

ALP ····· Alkaline phosphatase
IGF-I ····· Insulin-like growth factor I
SOD ····· Superoxide dismutase
ROS ····· Reactive oxygen species
TNF-α ····· Tumor necrosis factor-a
IL-6 ····· Interleukin-6
NO ····· Nitric oxide
α-MEM ····· Alpha-Minimum Essential Medium
MTT ····· 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromide
DMSO ····· Dimethyl sulfoxide
OD ····· Otical density
DPPH ····· 2,2-Dipheny-1-picrtlhydrazyl
BHT ····· Butylated hydroxytoluene
ROS ····· Reactive oxygen species
dNTPs ····· Deoxyribonucleoside triposphates
DTT ····· Dithiothretol
RT ····· Reverse transcriptase
DEPC ····· Diethyl pyrocarbonate
PCR ····· Polymerase chain reaction

ABSTRACT

Osteogenic effect of *Terminalia cebula* Retzius extract in pre-osteoblastic cell, MC3T3-E1

Sang-Yoen Park
Advisor : Prof. Su-Gwan Kim, DDS, Ph.D.
Department of Dental Biology
Graduates School of Chosun University

The World Health Organization (WHO) has advised that the use of natural products and plant extracts be investigated and a number of clinical studies have shown the effects of bone formation prepared from extracts of herbs. The plant *Terminalia chebula* (family Combretaceae, *T. chebula*) has been reported to possess antimicrobial and anticariogenic properties in addition to its antidiabetic, hepatoprotective, anti-inflammatory, antioxidant and many other effects. The ripe fruits of *T. chebula* have been used in the prevention and treatment of dental caries, gingivitis and stomatitis and previous studies demonstrated that *T. chebula* containing mouth rinses have antimicrobial effects against oral bacteria. The plant has a long history of use and is considered safe. As the increasing of elderly population due to development of clinical health care increases and the lifestyle of westernized eating, patients with requirement of bone graft in the periodental disease have being rapidly increased in the modern society. Therefore, the screening of medicinal herbal plants associated with bone formation have being required to

develop the therapeutic clinical reagent in the dental science.

In the present study, *T. chebula* Retzius extracts have been shown the similar metabolic features that appear in the process of bone formation *in vivo* and osteoblast cell proliferation, differentiation, and calcification in mouse calvaria-derived MC3T3-E1 osteoblast cells. The detailed results are as follows.

1. To access the cell cytotoxicity of *T. chebula*, both human normal oral keratinocytes and MC3T3-E1 mouse osteoblastic cells were stimulated with 10, 50 and 100 μg/mL of *T. chebula* methanol extract for 24 hrs. After stimulation, the cell cytotoxicity on the both cells were accessed by MTT assay and Cell live & Dead assay. The methanol extract of *T. chebula* did not show the cell cytotoxicity in both cells. Furthermore, cell linve & dead assay have been showed the similar results with MTT assay.

2. The activities and mRNA level of alkaline phosphatase were accessed by Alkaline phosphatase activity assay and quantitative PCR, respectively. The alkaline phsophatase activity was significantly up-regulated by *T. chebula* in the MC3T3-E1 mouse osteoblastic cells as the dose dependent manner. Furthermore, the mRNA level of alkaline phsophatse was increased by *T. chebula* as well as the result of alkaline phosphatase activity, dose-dependently. To evaluate day-course of ALP activity of *T. chebula* extracts.

3. The mineralization of MC3T3-E1 mouse osteoblistic cells was accessed by Alizarin Red staining. The mineralization of MC3T3-E1 cell stimulated with 50 μg/mL *T. chebula* methanol extract was significantly up-regulated as the day-dependent manner compared with control. Furthermore, the mRNA level of osteocalcin, which is a marker of calcification, was significantly up-regulated by *T. chebula* methanol extract compared with control. In addition, the mRNA level of collagen Type I and type X, which are a major component of extracellular matrix in the osteoblast, were increased by *T. chebula* methanol extract

as the dose-dependent manner in the MC3T3-E1 mouse osteoblastic cells.

These results showed that the crude extracts of *T. chebula* Retzius roots could be use as a useful material for the osteoblast cell differentiation and calcification in osteoblast cells. Furthermore, this study suggested that the extracts of *T. chebula* can use as a natural material of functional foods for the osteoporosis. However, biological compounds with bone formation should be identified through more research in the future.

제 1장 서론

골조직은 교원질(Collagen), 비교원성단백질(Noncollagenous proteins) 및 무기질인 수산화인회석(Hydroxyapatite, HA, $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$) 등으로 구성된 세포 외 기질(Extracellular matrix)[1]과 조골세포(Osteobalat), 파골세포(Osteocalst), 골세포(Osteocyte) 등 여러 종류의 세포들로 구성되어 있는 매우 복잡하고 활동적인 조직으로서, 조골세포와 파골세포의 작용을 매개로 일생동안 지속적인 형성과 흡수를 반복하며 골재형성 과정을 반복 한다[2].

조골세포는 뼈의 신생(新生)에 관여하는 세포로서 과립구계(顆.粒球系)나 적아구계(赤芽球系)의 세포부담은 크고 핵(核)이 편재하며, 형질세포와 닮은 형태를 말한다[3]. 이러한 조골세포는 인접하는 세포나 골조직을 향하여 세포질 돌기를 늘리며 골세포 등과 간극결합을 하고, 이것에 의해 Ca 이온을 비롯하여 여러 가지 물질을 이동, 또는 호르몬 등의 자극을 골조직을 구성하고 있는 세포에 빠르게 전달시킨다[4].

골격계는 크게 다른 두 가지 구조를 포함하는 기관이다. 골의 외부는 석회화된 기질인 견고한 결합조직으로 구성되어 있으며 내부쪽은 골수로 불리는 세포성 결합조직으로 이루어져 있다. 그리고 골조직은 생체의 주요한 지지조직으로 충분한 강도를 요하며 골강도는 기본구조인 HA의 인산칼슘 결정이 질서 있게 배열하여 기질단백질에 의해 형성되는 골의 기질이 된다, 이러한 골격계는 조골세포에 의한 골기질 단백질 합성 작용과 파골세포에 의한 무기질화된 뼈의 흡수가 연계되어 일어나는 골개조(Bone remodeling)가 일생동안 계속되며 평형을 유지하게 된다[2].

현대인들에게는 스트레스, 흡연, 음주, 환경오염물질, 방사선 등의 유해물질에 다양한 경로로 노출이 되어 인체면역기능이 상당히 약화되어 있다. 또한, 유전적, 생리적, 환경적 인자의 변화와 더불어 조골세포의 활성도가 약화되어 골형성이 감소되거나 파골세포의 활성도 강화로 골흡수가 증가되는 경우, 또는 두 가지 요소가 동시에 작용되는 경우에 골대사질환이 발생하게 된다[5].

대표적인 골대사질환의 골다공증(Osteoporosis)은 골대사에 이상을 일으키는 질환이나 약물복용 유무에 따라 원발성과 속발성으로 나눌 수 있으며, 원발성 골다공증은 다시 폐경 이후 급격한 estrogen 감소로 인해 골흡수가 증가되어 골량이 감소하는 제 1 형 폐경성 골다공증 (Postmenopausal osteoporosis; type Ⅰ osteoporosis)과 70 세 이후 골흡수는 그리 심하지 않으나 골형성능이 감소하여 골량 감소를 초래하는 제 2 형 노인성 골다공증 (Senile osteoporsis; type Ⅱ osteoporsis)으로 분류할 수 있다[6]. 폐경성 골다공증의 치료를 위해 투여되는 estrogen은 생체 내에서 성호르몬의 기능 외에도 조골세포의 estrogen receptor α(ER α) 혹은 β(ER β)와 결합한 후 핵으로 이동하여 골대사에 관여하는 국소인자 유전자의 전사활성을 조절할 뿐만 아니라, Collagen 발현, 칼슘과 인 대사에 관여하는 Alkaline phosphatase (ALP)의 활성 및 성장인자인 Insulin-like growth factor Ⅰ(IGF-I)의 생성과 유전자의 발현을 증가시킴으로써 골 형성에 관여하는 것으로 보고되고 있다[7-12]. 그리고 조골세포를 자극하여 골의 mineralization을 촉진하고, 파골세포의 생성을 촉진하는 Receptor activator for nuclear gactor κ B ligand (RANKL)의 분비를 억제하여 새로운 파골세포의 생성을 억제하는 한편, 기생성된 파골세포의 세포사멸(Apoptosis)를 촉진하는 것으로 보고된 바 있다[1]. 하지만 장기간 사용 시 오심, 체증증가, 불규칙한 자궁출혈, 자궁내막암 및 유방암과 같은 부작용을 유발하기도 하여 최근에는 그 위험성을 보완하기 위해 다른 부작용 없이 골손실을 최소화하면서 골형성을 촉진할 수 있는 한약재 및 식품 등의 천연물유래 활성성분을 이용한 대체요법 연구가 활발히 진행되고 있다[13-17].

현재 콩과식물(Legumes)과 곡물(Whole grains)에 널리 존재하는 Genistein, Daidzein을 비롯하여[18-19], Luteolin[20], Apigenin[21], Resveratrol[22] 등의 Estrogen 유사 효과 등이 보고되고 있으며, 이를 다량 함유한 식품의 섭취를 통한 식물성 에스트로젠(Phytoestrogen) 대체요법이 시도되고 있다[23-24]. 이렇듯 다양하게 유발되는 건강문제를 해결할 방안으로 생약제재에 대한 관심이 증가되고 있는 추세이다. 이는 생약제재에 대한 관심 증가는 현대의학이 가지고 있는 질병치료의 한계 및 합성의약품이 지니는 부작용 등 여러 문제점을 대체의학으로서 기대가 증가하고 있기 때문이다.

가자(*Terminalia chebula Retzius ; T. chebula Retzius*)는 인도, 미얀마, 말레이시아, 중국 사천성 등에 자생하는 열대성 큰키나무로서 성숙한 열매에서 씨를 제거하고 말린 과실이다. 성상은 긴 원형 또는 남원형이고 길이 2 ~ 4cm, 지름 2 ~ 2.5cm이다. 표면은 황갈색이고 조금의 광택이 나며 세로로 능선이 5 ~ 6 줄 융기해 있고 불규칙적인 주름이 나있으며, 기부(基部)에는 원형의 과병(果柄)의 흔적이 있고 질은 단단하며 과육은 두께가 2 ~ 4 mm 다갈색 또는 황갈색을 띠고 있다. 과핵(果核)이 붙어 있지 않아 쉽게 박리되며, 긴 방추형이고 길이는 1.5 ~ 2.5cm, 지름은 1 ~ 1.5cm이며 담황색을 띠고 거칠고 단단하다. 핵각(核殼)의 두께는 3 ~ 4mm이고, 핵각(核殼)을 깨면 막질(膜質)의 내종피가 보이며 자엽(子葉)은 2편, 백색이고 겹쳐 감겨있다. 약성은 쓰고 조금 떫으며 따뜻한 성질을 가지고 있으며, 이명으로는 가여륵(訶黎勒, *Chebulinic fructus*) 이라는 약재로 사용되고 있다. 이에 대한 주요 약리활성물질로써는 Chebulinic acid, Corilagin, Glucogallin, Terchebin, Ellagic acid 등등이 함유되어 있다고 알려져 있다[25]. 한방약리효능으로는 수렴(收斂)작용, 지혈, 전해제로서 만성 후두염, 장출혈, 치루 출혈, 후두 결핵, 부녀자궁출혈, 만성 자궁염, 대하(帶下), 이질, 구해천급(久咳喘急), 실음(失音) 등의 증세에 사용되고 있다. 또한 삽(澁)한 맛과 온(溫)한 약성은 허약한 장관(腸管)을 따뜻하게 하므로 설사와 이질을 그치게 하여, 폐의 기능이 감퇴되어 일어나는 천식, 해수 및 오랜 기침으로 음성이 변한 것을 치료한다고 한다[26-28]. 이밖에도 가자는 적혈구를 응집시키는 물질, 적혈구 응집소라고 불리는 렉틴이 존재한다고 알려져 있다. 렉틴(Lectin)은 면역계가 발달되지 않는 식물계, 미생물계 및 하등 척추동물에서 항체대신 외부 침입에 대한 자기 방어 기작으로 생성되는 물질로 세포막 표면의 당과 결합하여 적혈구나 다른 여러 종류의 세포들을 응집시키는 성질을 가지고 있다고 한다. 일반적으로 렉틴은 포유동물의 적혈구에 대하여 선택적으로 혹은 비선택적으로 응집현상이 있는 것으로 보고된 바 있다[29].

약리학적 연구로 가자의 과실에는 Tannin이 함유 되어 있어 수렴지사(收斂止瀉) 작용이 있다고 보고된바가 있으며, 녹농균, 디프테리아균, 황색포도상구균, 용혈성연쇄상구균에 억제작용을 일으킨다고 알려져 있다[30-32].

활성산소(Reactive oxygen species, ROS)는 화학적 반응성이 매우 강한 물질로써, 세포구성 성분인 지질, 단백질, 당, DNA 등에 대하여 비선택적, 비가

역적 파괴 작용을 함으로써 암을 비롯하여 뇌졸중, 파킨슨병(Parkinson's Disease)등의 뇌질환과 심장질환, 동맥경화, 염증 등의 각종 질병과 노화를 야기 시키는 것으로 알려져 있다[33-34]. 특히 과산화수소(H_2O_2)는 조골세포에서 DNA합성의 감소와 석회화 과정에 관여하는 ALP 및 석회화된 골기질(Mineralized bone matrix)의 활성을 감소시키며, 염증성 매개물질로 작용하는 Cytokine인 Tumor necrosis factor-a (TNF-α), Interleukin-6 (IL-6), nitric oxide (NO) 등의 생성을 유발하는 것으로 보고되고 있다[35-38]. 따라서 이러한 활성산소로부터 세포를 보호하고, 염증성 매개물질을 억제하는 것은 골다공증의 예방 및 치료에 의미가 있다.

이에 본 연구에서 사용한 Mouse calvaria 유래의 MC3T3-E1 Osteoblastic cell은 *in vivo* 뼈형성 과정에서 나타나는 세포의 증식, 분화, 석회화 등 조골세포와 유사한 대사적 특징을 가지고 있는 MC3T3-E1 조골세포를 이용하여 가자 추출물이 조골세포에 미치는 영향을 확인하고자 하였다.

제 2장. 실험재료 및 방법

1. 연구 재료 및 시약

가. 식물 재료

본 실험에 사용한 재료는 전남 화순군 “전남생약협동조합”에서 전량 확보하였다. 확보한 가자는 온대나 열대지방에서 서식하는 식물로서 전량 수입한 것으로 건조시켜 분쇄한 후, 500g의 가자 가루를 얻어 이 실험에 사용하였다.

나. 시약

세포배양에 사용된 Minimum Essential Medium (α-MEM)는 Gibco (BRL, Grand Island, NY, USA)로부터 구입하였으며, 세포 증식검사에 사용된 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromide (MTT) 시약 그리고 ALP 효소측정과 염색에 사용한 시약은 모두 SIGMA(Sigma co, St. louis, MO, USA)의 제품을 사용하였다. Polymerase Chain Reaction (PCR)에 사용된 Primer는 Bioneer (Bioneer. Co., N.Y, USA)사로부터, RNA추출을 위하여 사용한 시약은 Trizol solution (Molecular Research Center, Inc. Ohio, USA), Chloroform (JUNSEI, JAPAN), 2-Propanol (SIGMA, USA)를 사용하였으며, Reverse transcriptase - PCR은 Rocke Script Reverse Trancriptase(Bioneer, co., NY., USA), cDNA 합성은 M-MLV cDNA Synsthesis kit (Enzynomics Co., KOREA), DNA ladder는 Nanohelix (Nanohelix Co., KOREA)사의 제품을 구입하여 사용하였다.

2. 가자 추출물의 제조

500 g의 건조된 과육을 물로 수세하여 1 차 증류수로 다시 수세한 후, 분

쇄하여 사용 하였다. 분쇄된 시료에 99%의 에탄올을 5배 용량으로 첨가하여 50℃에서 약 10시간 Sonication (KODO, FD8508) 한 후, Filter paper로 여과한 다음, 감압농축장치(IKA, RV10B) 플라스크에 담아 농축하였다. 이상과 같은 과정을 3회 반복하여 추출물을 조제하였으며, 최종적으로 농축된 시료를 Deep freezer (-80℃: Ilshin Lag Co, FD8508)에서 12시간 반응시킨 후, Freezing dryer (Ilshin Lag Co. FD8505)로 동결 건조하여 사용하였다.

3. 조골세포 및 정상세포의 배양

MC3T3-E1 세포(RCB1126, ostoblast-like cell line from C57BL/6 mouse calvaria)는 세포 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 1% 항생제 (100 U/mL penicillin-100 μg/mL streptomycin)를 함유한 α-MEM (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) 배지로 37℃, 5% CO_2 이하에서 배양하며 세포밀도가 70%정도 포화되면 0.02% EDTA-0.05% Trypsin 용액을 사용하여 계대배양하면서 실험에 시용하였다. 분화유도를 위하여 10mM β-glycerol phosphate 50μg/mL, ascorbic acid를 첨가하여 분화유도배지로 사용하였으며, 6일간 배지를 교환해주었다.

Human Normal Oral Keratinocyte (HNOK)는 ScienCell Research Laboratories (ATCC, Manassas, VA, USA)로부터 구입하여 사용하였으며 HNOK 배양 방법은 제조회사로부터 제공된 세포 배양법 및 성장인자가 포함된 Keratinocyte Growth Media (KGM, Clonetics Co., San Diego, CA) 로 5 % CO_2, 95% 습도가 유지되는 항온항습기에서 배양하였다.

4. 조골세포의 증식률 및 세포 독성 분석

시료의 농도별 처리에 따른 조골세포의 증식 정도는 3-(3,4-dimethylthiazolyl-2)-2, 5-disphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay로 측정하였다. MTT assay는 Mitochondria의 탈수소효소작용에 의하여 노란색의 수용성 기질인 MTT가 불용성의 Formazan으로 환원되는 원리를 이용하여 생성된 Formazan을 DMSO에 현탁시킨 후 이에 대한 상대적인

흡광도로 세포증식률을 비교하였다.

먼저 96well plate에 1×10^5/well의 조골세포를 분주하여 2일간 배양한 후, 시료의 최종 농도가 3, 10, 30, 100 및 200㎍/mL이 되도록 배양약에 첨가하여 20시간 동안 배양하였다. 배양 후 MTT 시약을 5mg/mL 농도로 20㎕ 각 well에 첨가하여 4시간 더 배양한 후 배지를 제거하고 DMSO (Dimethyl sulfoxide)를 200㎕씩 첨가하여 생성된 불용성의 Formazan 결정을 용해시켜 ELISA reader (Biotek Instruments Ltd., KOREA)로 540nm에서 흡광도 (Optical Density, OD)를 측정하였다. 세포의 증식률은 시료의 흡광도를 대조군의 흡광도에 대한 백분율로 나타내었다.

5. Alkaline phosphatase (ALP) 활성 측정

염기성 인산분해효소 (Alkaline phosphate; ALP)의 활성측정은 *p*-nitrophenyl phosphate의 가수분해 반응에 ALP가 촉매로 작용하는 원리를 이용하여, 가수분해 산물인 *p*-nitrophenyl의 양을 측정함으로써 ALP의 농도를 산출하는 방법이다. MC3T3-E1 세포를 2×10^4cell/well 농도로 96well plate에 분주한 후 세포가 90% 포화되게 자라면 5mM β-glycerophosphate와 50㎍/mL ascorbic acid를 함유한 배지로 교환하여 2일 마다 배지를 갈아주며 분화를 유도하고, 6일 후 각 농도별 시료와 48시간 배양하였다. 배양한 세포는 DPBS로 세척한 후 0. 1% Triron X-100을 첨가해 30분간 세포를 lysis 시킨 후 13,000rpm에서 5분간 원심분리하여 상등액을 취하고 ALP kit (아산제약)를 사용하여 ALP 활성을 측정하였다. 단백질량은 상등액 50㎕ 중 5㎕를 취하여 96well plate에 넣은 후 BCA protein assay kit를 이용하여 정량하였고, *p*-nitrophenol의 흡광도(Optical Density, OD)로부터 산출한 활성도를 정량한 단백질량으로 나누어 단위단백질 함량 당 효소 활성도 (Unit/mg protein)를 산출하였다. 효소활성은 대조군에 대한 백분율로 나타내었다.

6. Collagen 함량 측정

조골세포의 Collagen 합성능력은 Tullberg-Reinert 등의 방법에 따라

Sirius red-based colorimetric assay를 측정하였다. MC3T3-E1 세포를 2 × 10^4cells/well 농도로 48well plate에 분주한 후 세포가 90% 포화되게 자라면 10mM β-glycerophosphate와 50μg/mL ascorbic acid를 함유한 배지로 교환하여 2일마다 배지를 갈아주며 분화를 유도하고, 6일 후 각 농도별 시료와 배양한 세포는 Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS)로 세척한 후 주로 동물조직 고정에 사용되는 Bouin's fluid (Saturated picric acid: 35% Formaldehyde : Glacial acetic acid = 15 : 5 : 1)로 1시간 고정하였다. 이 후 3 차 증류수로 세척한 후 건조하여 Sirius red 염색액(1 mg/mL sarurared picric acid)으로 1시간 동안 흔들어주며 염색하고 0.01 N HCl로 세척한 후 0.1 N NaOH 0.2mL을 첨가하여 용해시켜 ELISA reader (Biotek Instruments Ltd, KOREA)를 사용하여 550nm에서 흡광도를 측정하였다. Collagen 함량(μg per 2×10^4 cell)은 대조군에 대한 백분율로 나타내었다.

7. Mineralization 측정

Bone 형성능은 조골세포의 분화에 중요한 표식인자이다. Alizarin은 식물성 염료로서 Calcuim에 높은 흡착력을 가지고 있다. 이것은 무기질화된 세포의 세포외 기질에 염색되므로 무기질화 된 양과 염색된 정도가 상호 비례한다[47,48]. MC3T3-E1 세포를 1 × 10^4cells/well 농도로 6cm diameter에 분주한 후 세포가 90% 포화되게 자라면 10mM β-glycerophosphate와 50μg/mL Ascorbic acid를 함유한 배지로 교환하여 2일마다 배지를 갈아주며 분화를 유도하고, 7일 후 각 농도별 시료 처리군과 시효 및 0.3mM H_20_2를 함께 처리한 군으로 나누어 24시간 배양하였다. 분석을 위해 배지를 제거하고, PBS로 세척한 뒤, 70% EtOH로 실온에서 1시간 동안 고정시켰다. 세포를 고정시킨 후 40mM Alzarine red (AR) solution으로 10분간 염색하고 PBS로 세척한 뒤 염색된 정도를 ELISA reader (Spectra MAX M2, Molecular Device, USA)를 이용하여 561nm에서 흡광도를 측정하였다. 석회화 (Mineralization) 정도는 대조군에 대한 백분율로 나타내었다.

8. Total RNA 분리 및 정량

세포를 RNase free water로 washing 세척한 후 1㎖ TRIzol reagent (Invitrogen, USA)를 처리하여 총 RNA를 분리하였다. 분리한 RNA 용액에 200 의 Chloroform을 넣고 ice에서 반응시켰다가 12,000rpm으로 원심분리하여 상층액 500㎕를 분리하였다. 0.5㎖ Isopropyl alcohol을 가하여 -20℃에서 12시간을 침전시킨 후 12,000rpm으로 10분간 원심 분리하였다. 상층액을 버린 후80% 에탄올로 세척하고 자연 건조시켰다. RNase free water에서 RNA를 녹인후 -80℃에서 저장하였다.

9. cDNA 제조

대조군 및 실험군에서 각각 분리한 Total RNA 액 1㎕(1 ㎍ RNA)에 dNTPs (deoxyribonucleoside triposphates) 2㎕, DTT (Dithiothreitol) 2㎕, Reaction buffer 4㎕, Reverse transcriptase (RT) Enzyme 1 unit/㎕, Rnase inhibitor 0.5㎕ Diethyl pyrocarbonate (DEPC) 8.5㎕을 넣은 후 혼합한 다음 37℃에서 1분간 Incubation하였다. Primer가 Annealing 하도록 4℃에서 약 5분간 방치한 다음, RT buffer, dNTP, RNase inhibitor, DTT (100nM), Reverse transcriptase (M-MLV 200 unit/㎍)을 첨가하여 혼합하였다. 이 후. 42℃ 에서 90분간 Incubation 한 후, 95℃에서 5분간 처리한 후 합성된 cDNA를 정량 PCR을 위한 Template로 사용하였다.

10. PCR (Polymerase Chain Reaction) 분석

PCR은 total volume 20㎕에 10X PCR buffer, 10 mM dNTPs, 10 pmole의 GAPDH, Collagen Ⅰ, Collagen X, Osteocalcin primer를 각각 넣은 혼합액에 cDNA와 1 Unit의 Taq polymerase (Promega, NY. USA)을 넣어 PCR을 시행하였으며 각각의 유전자에 대한 Primer Sequence 및 반응 조건은 Table 1. 과 같다.

증폭된 PCR 산물을 1.0% Agarose gel에 전기영동하였다. 전기영동 결과

나온 Band를 Density 분석 프로그램인 Gel-Pro analyzer 3.1(Media Cybernetics. USA)을 이용하여 각각의 유전자에 대한 증감여부를 분석하였다.

11. 통계처리

본 실험결과는 3 회 이상의 반복 실험을 걸쳐 평균±표준편차로 표시하였다. 자료의 통계분석은 SPSS 18.0 software (SPSS, Chicago, IL, USA)를 사용하였다. 유의적 차이를 확인하기 위해 One-way ANOVA를 수행하였고, 군별 차이는 Duncan의 다중검정법을 이용하여 시려간 유의적 차이를 $p < 0.01$에서 검증하였다.

Table 1. PCR primer sequence and PCR condition

Gene name	Primer sequence		Reaction Condition				PCR product size	NCBI gene Number
	Forward	Reverse	Cycle number	Denaturation	Annealing	Extention		
GAPDH	5'-AACTTTGGCATT GTGGAAGGGCTC-3'	5'-TGGAAGAGTGGG AGTTGCTGTTGA-3'	38	94℃ (40초)	55℃ (20초)	75℃ (50초)	382bp	NT_039595.8
Collagen I	5'-TGGCATAGCAAC TAAGGGCCTCAA-3'	5'-TGAAGCCTGATC CAGGTAGCCTTT-3'	35	95℃ (20초)	55℃ (40초)	72℃ (40초)	204bp	NM_000089.3
Collagen X	5'-TGGCATAGCAAC TAAGGGCCTCAA-3'	5'-TGAAGCCTGATC CAGGTAGCCTTT-3'	35	95℃ (20초)	55℃ (40초)	72℃ (40초)	478bp	NM_000493.3
Osteocalcin	5'-TCATGTCCAAGC AGGAGGGCAATA-3'	5'-TGACATCCATAC TTGCAGGGCAGA-3'	35	95℃ (20초)	63℃ (40초)	72℃ (40초)	223bp	NM_007541.2

제 3장. 연구결과

1. 추출물의 세포 독성 분석

가자 추출물이 조골세포 증식에 미치는 영향을 분석하기 앞서 정상세포와 MC3T3-E1에서 가자 추출물의 독성평가를 수행하였다. 정상세포의 독성평가는 Fig. 1.과 같이 배양전 HNOK와 MC3T3-E1에 가자 추출물 0, 10, 50 및 100μg/mL을 각각 처리 후 24시간 후에 MTT 방법으로 세포독성을 분석한 결과 10μg/mL, 50μg/mL에서 Control과 유사한 세포생존율을 나타내었으며 Fig. 1C.와 같이 100μg/mL은 Control에 비하여 약 5%의 세포생존율이 감소하였으나 유의적인 차이는 없었다.

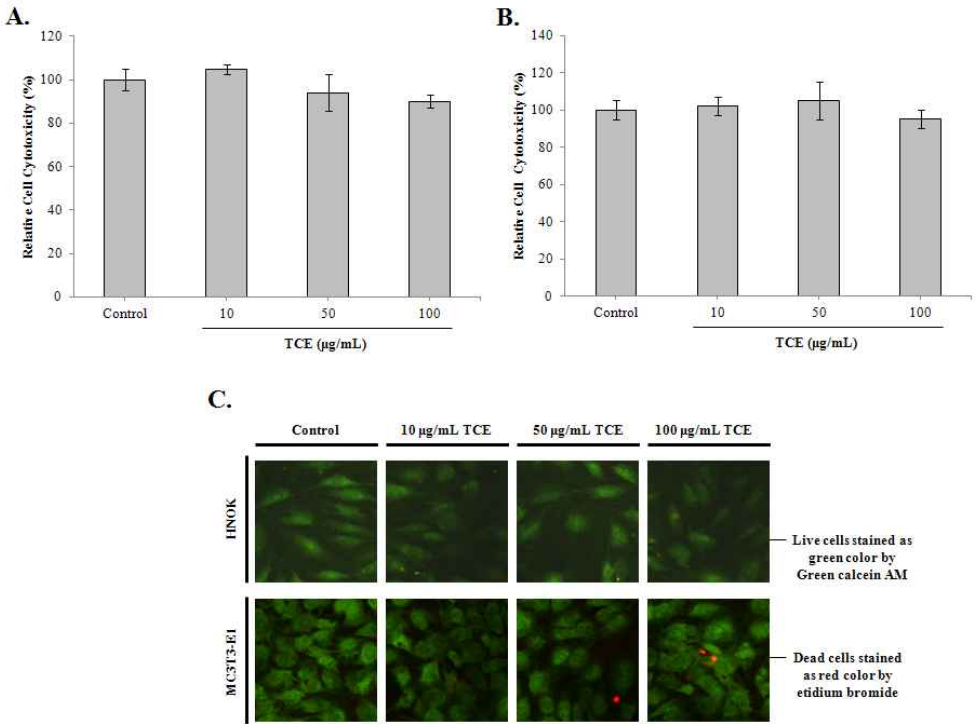

Figure 1. The cytotoxicity of TCE on the human normal oral keratinocytes (HNOKs) and MC3T3-E1 cells. TCE did not affect the cell viability and proliferation on both HNOKs (A) and MC3T3-E1 (B). Cells were cultivated and stimulated with defined concentration of TCE for 24 hrs. Cell cytotoxicity was measured by MTT assay. Analysis of variance was performed using StatView 5.0 software. *p*-values lower than 0.05 were considered significant. C, cell survial assay was measured using Green calcein AM to stain live cells, and ethidium bromide homodimer to stain dead cells.

2. Alkaline phosphatase (ALP) 활성 측정

ALP는 칼슘과 인 대사에 관여하는 효소로서, 세포외막과 석회화 조직의 기질세포에서 높은 농도로 발견 되며 염기성 pH 8-10 에서 최적의 활성을 나타낸다. 가자 추출물의 조골세포 활성 및 분화효과를 확인하기 위한 지표로 ALP 활성을 측정한 결과 Fig. 2 와 같이 10, 50 및 100μg/mL 농도에서 농도 의존적인 증가 경향을 보였으며 100μg/mL 농도에서 가장 많이 ALP 활성이 나타내는 것을 확인하였다 ($p < 0.05$).

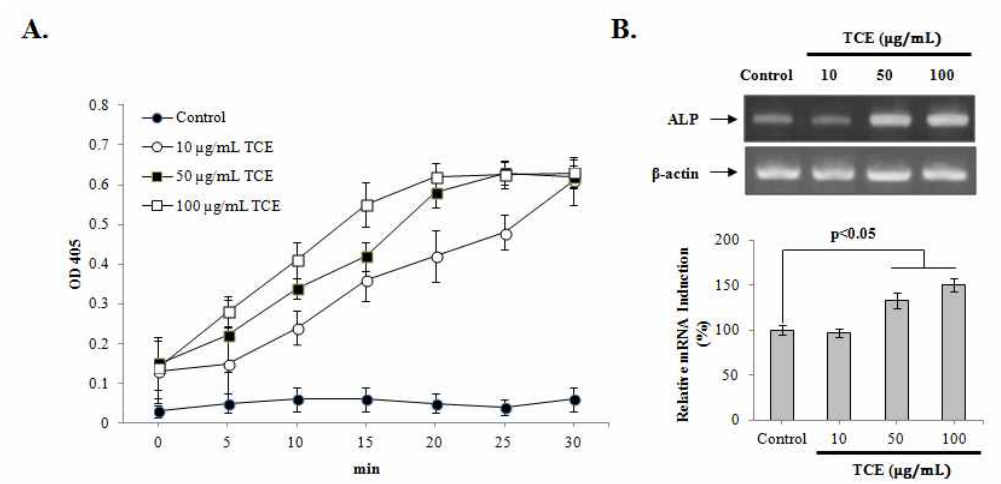

Figure 2. The up-regulation of activity and mRNA induction of alkaline phosphatase in MC3T3-E1 osteoblastic cells stimulated with TCE as the dose-dependent manner. A, MC3T3-E1 cells were cultivated and stimulated with defined concentration of TCP. The activity of alkaline phosphatase was accessed at defined time points. B, The mRNA induction of alkaline phosphatase was accessed by quantitative PCR after stimulation with defined concentration of TCP for 24 hrs. PCR products were electrophorized in 1.2% agarose gel, visualized on UV, and photographed. The quantification of mRNA induction was accessed by densitomatric analysis using imageJ software. Analysis of variance was performed using StatView 5.0 software. p-values lower than 0.05 were considered significant.

3. Mineralization 측정

조골세포의 분화를 확인하기 위해 Alizarine Red S staining을 이용하여 골 형성능을 평가하였다. MC3T3-E1에 가자 추출물 50μg/mL을 0, 7 및 14일 동안 처리한 결과 mineralized nodule이 형성됨을 확인하였다 (Fig. 3A). 또한 colorimetric spectrophotometry을 이용하여 Fig .3B와 같이 석회화를 정량한 결과 7, 14일에 유의적 차이를 나타냄을 확인하였다($p < 0.05$). 이를 바탕으로 MC3T3-E1에 가자 추출물 0, 10 및 50μg/mL을 24시간 동안 처리하여 osteocalicin의 함량을 quantitative PCR로 확인하였다. 그 결과 Fig .3C와 같이 가자 추출물 10μg/mL, 50μg/mL을 처리하였을 때 유의적 차이를 나타내었다($p < 0.05$).

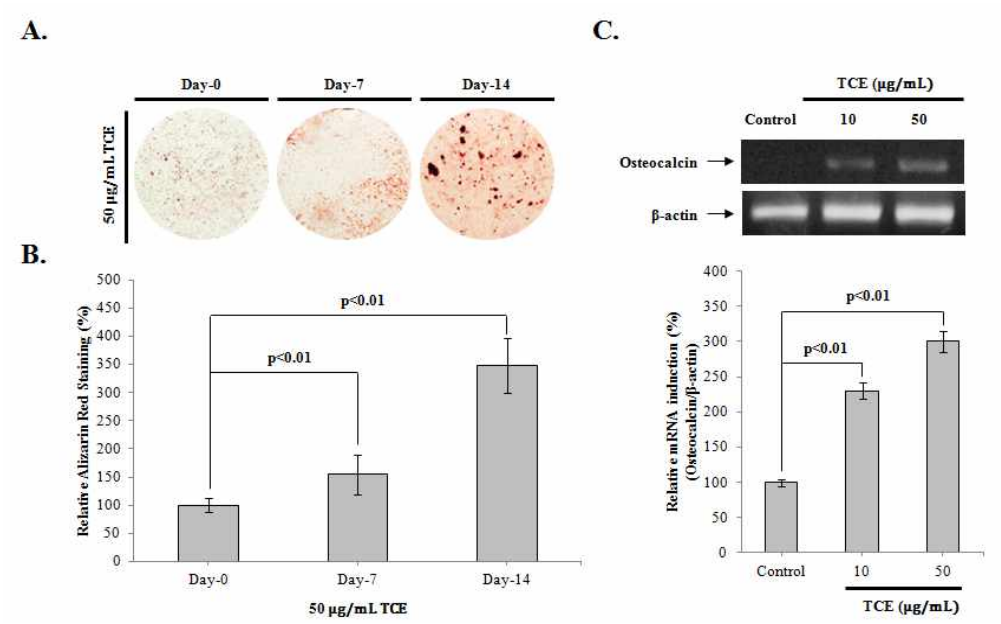

Figure 3. The TCE-induced mineralization in MC3T3-E1 cells. A, Mineralized nodule formation in MC3T3-E1 cells. MC3T3-E1 cells were stimulated with 50 μg/mL TCE for defined culture periods, and mineralization was evaluated by Alizarin Red S staining. B, The mineralization was quantified by colorimetric spectrophotometry. C. The quantification of osteocalcin by quantitative PCR. The mRNA induction of osteocalcin was accessed by quantitative PCR after stimulation with defined concentration of TCP for 24 hrs. PCR products were electrophorized in 1.2% agarose gel, visualized on UV, and photographed. The quantification of mRNA induction was accessed by densitomatric analysis using imageJ software. Analysis of variance was performed using StatView 5.0 software. *p*-values lower than 0.05 were considered significant.

4. Collagen 함량 측정

가자 추출물 처리 시 Collagen 함량은 Fig. 4A와 같이 농도 의존적인 증가 경향을 보였으며 50μg/mL 농도에서 Control에 비해 60.92%의 함량 증가를 나타내어 유의적인 차이를 보였다($p < 0.05$). 조골세포의 초기 본화 지표인 ALP 활성 측정 결과에서와 마찬가지로 가자 추출물이 조골세포의 Collagen 합성능을 증가 시키는 가능성이 있음을 유추해볼 수 있다.

PCR에 의해 얻어진 골기질 단백질을 전기영동으로 확인해 본 결과Fig. 4. B. 와 같이 MC3T3-E1 세포의 6일간 배양에 따른 분화인자 mRNA 발현양을 나타낸 것으로 Collagen Type I, Collagen Type X 및 Osteocalcin의 발현이 대조군에 비해 높게 발현 되었다.

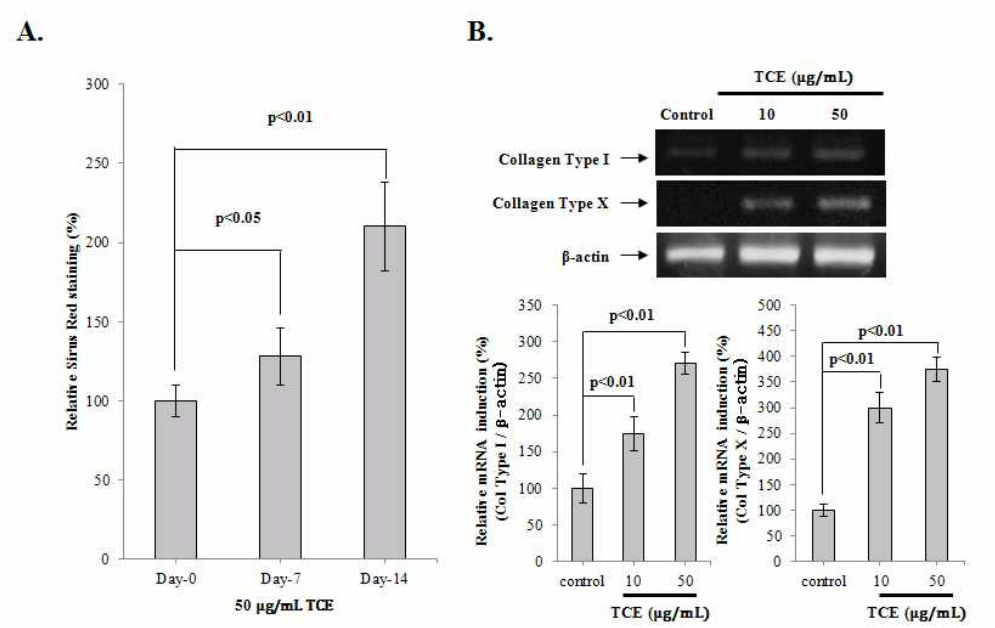

Figure 4. The up-regulation of collagen content in MC3T3-E1 cells stimulated with TCE. A, The measurement of collagen content in MC3T3-E1 cells after stimulation with TCE. MC3T3-E1 cells were stimulated with 50μg/mL TCE for defined culture periods. The collagen contents were evaluated by Sirus Red staining. B, The induction of collagen type I & X were quantified by quantitative PCR after stimulation with defined concentration of TCP for 24 hrs. PCR products were electrophorized in 1.2% agarose gel, visualized on UV, and photographed. The quantification of mRNA induction was accessed by densitomatric analysis using imageJ software. Analysis of variance was performed using StatView 5.0 software. *p*-values lower than 0.05 were considered significant.

제 4장. 결론 및 고찰

최근 고령인구 증가와 서구화된 식습관에 의해 치주질환환자의 급격한 증가에따라 골손실을 최소화하면서 골형성을 촉진할 수 있는 한약재 및 식품등의 천연물유래 활성성분을 이용한 대체요법 연구가 활발히 진행되고 있다. 생약제재에 대한 관심 증가는 현대의학이 가지고 있는 질병치료의 한계 및 합성의학이 지니는 부작용 등 여러 문제점을 대체의학로서 기대가 증가하고 있기 때문이라 생각한다.

가자 추출물의 조골세포 활성 및 분화효과를 확인하기 위한 지표로 ALP 활성을 측정한 결과 대조군에 비해 1 ~ 100μg/mL 농도에서 농도 의존적인 증가 경향을 보였으며 100μg/mL 농도에서 가장 많이 ALP 활성을 나타내는 것을 확인하였다 ($p < 0.01$)

천연물유래 활성성분 연구 보고중 대두에탄올추출물 50μg/mL의 농도롤 조골세포주에 처리시, 대조군에 비해 최고 380%로 조골세포주의 ALP 할성을 증가시켰다고 보고하였으며 천궁, 오서각, 골쇄보의 추출물이 ALP 활성을 증가시켰다고 보고하였다[39,40]. 이러한 결과의 비교는 추출물의 처리시간, 세포배양시간등 실험조건에서 차이가 많이 나므로 직접적인 비교는 어렵고 간접적인 비교는 가능하리라 사료된다.

가자 추출물이 조골세포 증식에 미치는 영향을 분석하기 앞서 정상세포에서의 가자 추출물의 독성평가를 수행하여 분석한 결과 10 및 50μg/mL에서 control과 유사한 세포생존율을 나타내었으며 100μg/mL은 control에 비하여 약 5%의 세포생존율이 감소하였으나 유의적인 차이는 없었으며 가자 추출물이 조골세포 증식에 미치는 영향을 분석하기 위하여 가자 추출물을 처리한 결과 10 및 50μg/mL는 control에 비해서 각기 8%, 14%의 세포 증식을 확인하였으나 유의적 차이는 없는 반면 100μg/mL의 가자 추출물 처리에서는 control에 비하여 약 48%의 세포 증식을 확인하였으며 $p < 0.01$의 유의적인 차이를 나타내었다.

가자 추출물 처리 시 Collagen 함량 측정 결과는 농도 의존적인 증가 경향을 보였으며 50μg/mL 농도에서 control에 비해 60.92%의 함량 증가를 나타내어 유의적인 차이를 보였다 ($p < 0.01$). 조골세포의 초기 본화 지표인 ALP

활성 측정 결과에서와 마찬가지로 가자 추출물이 조골세포의 Collagen 합성능을 증가 시켰다.

PCR에 의해 얻어진 골기질 단백질을 전기영동으로 확인해 본 결과 MC3T3-E1 세포의 6일 간 배양에 따른 분화인자 mRNA 발현양을 나타낸 것으로 Collagen Type I, Collagen Type X 및 Osteocalcin의 발현이 대조군에 비해 높게 발현 되었다.

Collagen은 인체 각 결합 조직에 분포하는 중요한 단백질로서, Collagen Type I은 피부, 골 및 인대에 풍부하게 존재하며 조골세포에 의해 주로 합성되고 전체 골단백의 85 ~ 90%를 차지한다고 알려져 있다[41,42]. 또한, 조직내의 Collagen 손상은 연골조직의 노화와 골관절염, 골다공증의 원인이 되는 것으로 보고된바 있다[43].

본 연구에서 확인하고자 하였던 가자추출물이 MC3T3-E1 조골세포에 증식에 미치는 영향은 조골세포 증식에 효과적이며 골형성과 관련 유전자인 Collagen 함량 측정 결과 역시 대조군에 비해 증가함을 확인하였다.

또한 골형성 단백질 유전자의 발현 역시 대조군에 비해 높게 발현됨으로써 가자추출물에 의한 골형성능이 유도됨을 확인하였으며 향후 가자추출물로부터 골형성능을 유도시키는 단일 화합물의 정제 및 분석이 필요하다고 사료된다.

제 5장. 참고문헌

1. Stuart IF, Bone deposition and resorption In : Human physiology 9th ed., *McGraw-Hill Inc. New York, NY* 2008:652-657.
2. Parfitt AM. Osteonal and hemi-osteonal remodeling: The spatial andremporal Framework for signal traffic in adult human bone. *J Cell Biochem* 1994;55:273-286.
3. 간호대학사전, 대한간호학회편, 한국사전연구사.(1996)
4. 강영희, 생명과학대전, 아카데미서적.(2008)
5. Mone Z. Skeletal remodeling in health and disease. *Nat. Med.* 2007;13 (7):791-801.
6. 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.* 2000;6(1):36-42.
7. Vidal O, Kindblom LG, Ohlsson C. Expression and localization of estrogen receptor-β in murine and human bone. *J Bone Miner Res.* 1999;14(6):923-929.
8. Edward MW, Bain SD, Bailey MC, Lantry MM, Howard GA. 17β -estradiol stimulation of endosreal bone formation in the ovari-ectomized mouse: an animal model for evaluation of bone targeted estrogens. *Bone.* 1992;13:29-34.
9. Ernst M, Heath JK, Rodan GA. Estradiol effects on proliferation, messenger ribonucleic acid for collagen and insulin-like growth factor-I, and parathyroid hormone-stimulated adnylate cyclase activity in osteoblastic cells from calvariae and long bones. *Endocrinology* 1989;125:825-833.
10. Tomkinson A, Reeve J, Shaw RW, Noble BS. The death of osteocytes via apoptosis accompanies estrogen withdrawal in human bone. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:3128-3135.
11. Vedi S, Purdie DW, Ballard P, Bord S, Cooper AC, Compston JE.

Bone remodeling and structure in postmenopausal women treated with long-tern, high-dose estrogen therapy. *Osteoporos int.* 1999;10:52-58.

12. McCarthy TL, centrella M. Regulation of IGF activity in bone. *Adv EXP Med Bio* 1993;343:407-414.
13. Genant HK, Batlink DJ, Gallagher JC. Estrogens in the prevention of osteoporosis in postmenopausal women. *Am J Obstet Gynecol.* 1989;161:1842-1846.
14. Murphy LJ, Ghahary A. Uterine insulin-like growth factor-1: regulation of expression and its role in estrogen induced uterine proliferation. *Endocrine Rev.* 1990;11:443-453.
15. Anderson JJ, Anthony MS, Cline JM, Washburn SA, Garner SC. Health potential of soy isoflavones for menopausal women. *Public Heath Nut.* 1999;489-504.
16. Anderson JJ, Garner SC. Phytoestrogen and bone. *Baillieres Clin Endocrinol Metab.* 1998;12:543-557.
17. Adlercreutz H, Mazur W. Phytooestrogens and Western diseases. *Ann Med.* 1997;29:95-120.
18. Arjmandi BH, Alekel L, Hollis BW, Amin D, Stacewicz-Sapuntzakis M, Guo P, Kukreja SC. Dietary soybean protein prevents bone loss in an ovariectomized rat model of dsteoporosis. *J Nurt.* 1996;126:162-17.
19. Gao YH, Yamaguchi M. Anabolic effect of daidzein on cortical in tissue culture; Comparison with genistein effect. *Mol Cell Biochem.* 1999;194:93-98.
20. Choi EM. Modulatory effects of luteolin on osteoblastic function and inflammatory mediators in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Cell Biology International.* 2007;31:870-877.
21. Choi EM. Apigenin increases osteoblastic differentiation and inhibits tumor necrosis factor-α-induced production of interleukin-6 and nitric oxide in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Pharmazie.* 2007;62(3):216-220.
22. Gehn BD, McAndrews JM, Chein PY, Jamesom JL. Resveratrol, a polyphenolic compound Found in grapes and wine, is an agonist for

the estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997;94: 14138-14143.
23. Anderson JJB, Garner SC. Phytoestrogen and bone. *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 1998;12(4):543-557.
24. Setchell KDR. Phytoestrogens: the biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavones. *Am J clin Nutr.* 1998;68:1333-1346.
25. Yeung H., Hand book of Chinese Herbs and Formulas, Vol. 1, Los Angeles; Intitute of chinese Medicine.(1985)
26. Bensky D, Gamble A. Chinese Herbal midicine, Eastland Press, InC.(1986)
27. 李時珍, 本草綱目, 高文社(1973)
28. 許浚, 東醫寶鑑 湯液篇, 大成文化社(1993)
29. Park, J. O, Lee S. O. : M. S. thesis of Kyungsung University.(1992)
30. 顔正華 : 中藥學, 北京, 人民衛生出版社 : 881-882(1991)
31. 江蘇新醫學院 : 中藥大辭典, 香港, 上海科學技術出版社 : 1175(1978)
32. 李昌福 著. 大韓植物圖鑑, 鄉友社(1982)
33. Beckman KB Ames BN. the free radical theory of aging matures. *Physiol. Reviews.* 1998;78:547-581.
34. Stadtman ER, Berlett BS. Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. *Drug Metabolism Reviews.* 1998;30:325-243.
35. Egawa K, Yoshiwara M, Shibanuma M, Nose K, Isolation of a novel ras recision gene that is induced by hydrogen peroxide from a mouse osteoblastic cell line, MC3T3-E1. *FEBS Lett.* 1995;372:74-77.
36. Lee DH, Lim BS, Lee, YK, Yang HC. Effect of hydrogen peroxide(H_2O_2) on alkaline phosphatase activity and matrix mineralzation of odontblast and osteoblast cell lines. *Cell Biol Toxicol.* 2006;22:39-46.
37. Liu AL, Zhang ZM, Zhu BF, LiaonZH, Liu Z. Metallothionein protects bone marrow stromal cells against hydrogen peroxide-induced inhibition of osteoblastic differentiation. *Cell Biol Int.* 2004;28:905-911.
38. Lee KH, Choi Em, Biochanin A. Stimulates Osteoblastic differentiation

and inhibits Hydrogen Peroxide-induced production of inflammatory mediators in MC3T3-E1 Cells. *Biol. Pharm. Bull.* 2005;28(10): 1948-1953

39. Choi EM, Effect of soybean ethanol extract on the function of osteoblast MC3T3-E1 cells. Kyung Hee university, Seoul. 2001.
40. Park SK, Kim DK, You SH, Kim HA, Kim MD, You HK, Shin HS. Effect of Extracts of Natural Products on Alkaline Phosphatase Activity of MC3T3-E1 Cells. *Korean academy of periodontology.* 2001;31(1):123-135.
41. Lubec O, Labudova O. Alpha-methyl-proline restores normal levels of bone Collagen Type I synthesis in ovariectomized rats. *Life sciences.* 1992;57(24):2245-2253.
42. Husain SR, Cillard J, Cillard P. Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. Phytochemistry 1987;26:2489-2492.
43. Tiku ML, Allison GT. Malondialdehyde oxidation of cartilage collagen by chondrocytes. *OsteoArthritis Research Soc. Int.* 2003;11:159-166.