

저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

• 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건 을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer 🖃





2014 年 8 月 博士學位論文 論文

> MC3T3-E1 골모유사세포의 분화에 대한 산수유 추출물의 효과

> > 朝鮮大學校 大學院

齒醫生命工學科

鄭明珍

MC3T3-E1 골모유사세포의 분화에 대한 산수유 추출물의 효과

Effect of *Cornus officinalis* extract on the differentiation of MC3T3-E1 osteoblast-like cells

2014年 8月 25日

朝鮮大學校 大學院

齒醫生命工學科

鄭明珍



MC3T3-E1 골모유사세포의 분화에 대한 산수유 추출물의 효과

指導教授 金 秉 玉

이 論文을 齒醫學 博士學位신청 論文으로 提出함.

2014年 4月

朝鮮大學校 大學院

齒醫生命工學科

鄭明珍



鄭明珍의 博士學位論文을 認准함

委員	長	朝鮮大學校	敎	授	 即
委	員	朝鮮大學校	敎	授	印
委	員	朝鮮大學校	敎	授	 印
委	員	圓光大學校	博	士	印
委	員	朝鮮大學校	敎	授	印

2014年 6月

朝鮮大學校 大學院



목 차

List of Table ·····	ii
List of Figures ·····	iii
List of abbreviations ·····	·iv
ABSTRACT ·····	V
I. 서 론 ·····	··· 1
Ⅱ. 연구재료 및 방법	·· 4
1. 실험재료 및 시약	·· 4
1.1. 식물 재료	··· 4
1.2. 시약	·· 4
2. 산수유 추출물 제조	·· 5
3. 세포 배양과 분화유도	5
4. 골모세포의 생존력 및 증식률 분석	•• 5
5. Alkaline phosphatase(ALP) 활성도 측정 ·····	··· 6
6. Alkaline phosphatase(ALP) 염색 ······	6
7. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction(RT-PCR) 분석	7
8. Alizarin Red S 염색을 통한 석회화 결절 형성 분석	··· 9
9. 통계처리	··· 9
Ⅲ. 실험 결과	10
Ⅳ. 고 찰 ······	· 24
V. 결 론 ·····	29
참고문헌	• 30
가사이 글	. 35

List of Table



List of Figures

Figure 1.	Effect of Cornus officinalis extract on the proliferation of MC3T3-E1 cells
Figure 2.	Effect of Cornus officinalis extract on the differentiation by ALP activity
	in MC3T3-E1 cells ············14
Figure 3.	Effect of Cornus officinalis extract on ALP staining in MC3T3-E1 cells
	observed under macroscopic image
Figure 4.	Effect of Cornus officinalis extract on ALP staining in MC3T3-E1 cells
	observed under microscope with 10X magnification
Figure 5.	Semi-quantitative RT-PCR analysis of collagen type I(Col-I) mRNA
	expression in MC3T3-E1 cells treated with Cornus officinalis extract \cdots 19
Figure 6.	Semi-quantitative RT-PCR analysis of osteocalcin(OCN) mRNA
	expression in MC3T3-E1 cells treated with Cornus officinalis extract $\cdots 21$
Figure 7.	Effect of Cornus officinalis extract on the formation of mineralized nodule
	in MC3T3-E1 cells observed under macroscopic image
Figure 8.	Effect of Cornus officinalis extract on the bone nodule formation in
	MC3T3-E1 cells observed under microscope with 10X magnification ···· 24



List of abbreviations

ALP Alkaline phosphatase

 α -MEM Alpha minimum essential medium

BMP Bone morphogenetic protein 2

BSP Bone sialoprotein

COE Cornus officinalis extract

Col I Collagen type I

cDNA Complementary DNA

DEPC Diethyl pyrocarbonate

DMSO Dimethyl Sulfoxide

DPBS Dulbecco's phosphate-buffered saline

dNTPs Deoxynucleotide triphosphates

FBS Fetal bovine serum

GAPDH Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

MTT 3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide

OCN Osteocalcin

PDGF Platelet derived growth factor

PCR Polymerase chain reaction

p-NPP P-nitrophenyl phosphate

RT Reverse transcriptase

TGF- β Transforming growth factor beta



ABSTRACT

Effect of *Cornus officinalis* extract on the differentiation of MC3T3-E1 osteoblast-like cells

Ming-Zhen Zheng

Advisor: Prof. Byung-Ock Kim D.D.S., Ph.D.

Department of Bio Dental Engineering,

Graduate School of Chosun University

Various traditional herbal medicines have attracted interests because they have fewer side-effects and are available for safe use, and are relatively inexpensive. *Cornus officinalis* has been widely used as a herbal medicine exerting various pharmacological actions such as diuretic, anti-allergic, hypotensive and antibiotic activities. Thus we studied the effect of *Cornus officinalis* on the proliferation, differentiation and matrix mineralization of MC3T3-E1 osteoblast-like cell line.

To do the experiments, *Cornus officinalis* extract(COE) was prepared using ethanol at different concentrations. The cytotoxic effect and the osteogenic differentiation were examined using MTT assay, alkaline phosphatase (ALP) activity, ALP staining, Alizarin red s staining and reverse transcriptase–polymerase chain reaction for osteogenic differentiation markers such as collagent type I(Col-I), ostoecalcin(OCN).

The results indicated that there was no effect on cell proliferation on both 1st and 3rd days after treatment in MC3T-E1 cells. The level of ALP was significantly higher in COE treated group than non treated group on days 7 and 14, and the



level was highest on day 14. The results from ALP staining, showed basically the same results. The level of Col-I mRNA was higher in COE treated group than non treated group on days 7, 14 and 21, and the level was highest on days 7. The level of OCN mRNA was higher in COE treated group than non treated group on day 14, and it was highest on day 21. Also, the level of mineralized nodule was higher in COE treated group than non treat group on days 21 and 28, and highest on day 28.

Our results suggest that the COE promotes the osteoblast differentiation and mineralization without observable cytotoxicity. Therefore, it may play an important role in osteoblastic bone formation, and may possibly to be an effective measure for bone healing promotion in regenerative applications.



I. 서 론

치주질환으로 인한 치조골 소실, 장기간 동안 사용된 의치로 인한 치조제 위축, 외상으로 인한 치조골 결손 등은 임플란트 식립을 어렵게 하는 요인 중 하나이다¹⁾. 이러한 치조골 결손이나 위축으로 인해 이상적인 혹은 보철적으로 안정적인 위치에 임플란트를 식립하기가 어려운 경우가 종종 발생한다. 만약 잔존하는 골에 맞추어 임플란트를 식립했을 경우 기능적, 심미적으로 적절하지 않은 임플란트 수복이 이루어질 가능성이 높으며 이상적인 위치에 임플란트를 식립하기 위해서는 부가적인 골 재생술식이 필요한 경우가 많다.

이러한 골 결손부의 재건에 있어서 가장 많이 사용되는 것이 골 이식술로 자가골, 동종골, 이종골, 합성골 등이 사용 된다²⁾. 이중 자가골 이식은 골형성, 골유도, 골전도 능력을 가지며 면역 거부반응이 없고 빠른 치유를 보이는 장점을 가지고 있으나, 채취 량이 제한적이고 이식 후 불가피한 흡수와 공여부에 이차 결손을 유발하는 것이 최대 의 단점이다. 동종골의 대표적인 탈회 동결 건조골은 골유도능을 가지는 골형성 단백 질의 존재와 양에 대해 많은 의문이 제기되고 있으며 기증자로부터 질병전염의 가능성 을 전혀 배제할 수 없고 임상 사용시 부적절한 흡수율로 인한 문제점을 가진다³⁾. 이 러한 이유로 현재 이종골이나 합성골과 같은 골대체 생체재료가 많이 개발되고 있다. 또한 이러한 골대체재들은 골전도체로 숙주골이 자라 들어올 수 있는 공간만 유지해 주는 역할만 할뿐 골형성 및 골유도능은 없어 골재생의 치유 시간이 길어지고 광범위 한 결손부의 경우 불완전한 치유가 일어날 가능성이 높다. 이러한 문제를 해결하기 위 하여 골결손부 주위로부터 전구세포나 미분화간엽세포의 이주를 촉진하고 이들 세포를 골모세포로 분화시켜 골 형성을 유도함으로써 골재생을 촉진시키기 위한 여러 가지 연 구들이 지속적으로 보고되어 왔다. 예를 들면 platelet rich plasma(PRP), platelet rich fibrin(PRF)와 같은 자가혈액 응축물을 이용하는 방법^{4,5)}, 저강도 파동형의 초음파를 이용하는 생체물리적인 자극을 가하는 방법⁶⁾, 그리고 발광다이오드를 이용하는 광치 료법⁷⁾ 등이 시도되고 있다.

그 외에 bone morphogenetic protein(BMP), platelet derived growth factor(PDGF), transforming growth factor beta(TGF- β) 등과 같은 생물학적인 성장인자를 이용하는 방법도 활발히 연구되어 왔다. 그중 가장 많이 연구가 되어있는 것이 골형성 단백질 (BMP) 계열이다. 이미 BMP-2는 강력한 골화를 촉진하는 물질로 알려져 있어 이를



이용하여 골조직을 손쉽게 만들기 위한 연구들이 진행되었다⁸⁾. PDGF도 골모세포의 증식을 자극하는 것이 알려졌고 치과 영역에서 골 형성의 뚜렷한 효과를 보이고 있다 ^{9,10)}. TGF- β 역시 골막에서 유래하는 간엽줄기세포의 증식과 분화를 촉진해 연골형성과 골재생을 촉진하기 위해 사용되어 왔다¹¹⁾. 그러나 이러한 생물학적인 성장인자들은 그 투여 용량과 적당한 매개체가 아직 결정되지 않았으며 국소 투여 시에 혈류나 주변조직을 통해 확산되어 인체 내 타 기관에 미칠 수 있는 영향을 잘 알지 못하고 경제적인 면에서도 부담이 된다.

성장인자의 이런 제한점에 반해 부작용이 적고 장기적 사용, 경구 투여가 가능하며 안전하고 경제적이라는 장점을 가진 여러 가지 생약제제들이 주목 받고 있다. 최근 천연물을 이용하여 뼈 형성을 촉진하기 위한 골형성 및 골다공증 치료제로 개발하려는 과학적인 접근이 시도되고 있다. 대표적인 생약제제로 홍화씨, 녹용, 후박, 천궁 등을 들 수 있다¹²⁻¹⁴⁾. 1800년대 중반 방약합편에는 육미지황탕이라는 처방전이 기재되어 있으며 여기에는 6가지 약재인 숙지황, 산약, 산수유, 백복령, 목단피, 택사로 구성되어 있다¹⁵⁾. 육미지황탕의 실험적 연구에는 골다공증 억제기전에 관한 연구, 골형성에 미치는 영향, 인중합체 함량과 골형성 관련유전자의 전사활성에 대한 연구 등이 보고되어 있다¹⁶⁻²⁰⁾. 또한 육미지황탕의 구성 성분중 하나인 산수유도 예로부터 간과 신장을 보호하여 정력을 강화하고 뼈를 강화하는데 도움을 준다고 보고되고 있다.

본 연구에서 사용된 산수유(Cornus officinalis Siebold et Zuccarin)는 층층 나무과 (Cornaceae)에 속하는 낙엽활목으로 주로 약용수로 이용하기 위하여 식재되고 있다. 산수유중 생약재로 이용되는 부분은 열매(Corni Fructus)를 건조한 것으로 늦은 가을과 초겨울에 과피가 홍색으로 변한 것을 채취하여 씨를 제거한 다음 햇볕에 말린 것을 사용한다. 산수유 열매는 편압된 긴 원형이고 길이 1.5-2cm, 너비 약 1cm 이다. 바깥면은 암적색을 띠며 윤이 나고 거친 주름이 있으며 기부에 과병의 자국이 있다. 질은부드러우며 약간 특이한 냄새와 신맛이 있고 약간 달다²¹⁾. 예로부터 다뇨증, 요통, 이명, 폐결핵 등의 치료제로 사용되어 왔으며 과실은 자양, 강장에 약효가 있고 간경(肝經), 신경(腎經)에 좋고 이뇨작용, 혈압강하 작용, 항암 및 항균 작용이 있다고 한의학에서는 보고되어 있다²²⁾. 산수유의 성분으로는 cornin을 비롯하여 loganin, morroniside, tannin, saponin 등의 배당체와 ursolic acid, oleanolic acid, gallic acid, palmitic acid 등의 유기산이 함유되어 있고 그밖에 비타민 A와 다량의 무기질 그리고 풍부한 K, Ca, Mg, 아미노산을 함유하고 있다고 보고되었다^{23,24)}. 산수유의 생리활성에 관한 연구로는 항균 및 항산화성 효과, 동물에서의 항당뇨 및 항염증 효과, 소염작



용과 부종의 억제 효과, 정자의 운동성 증가에 미치는 효과, B16/F10 melanoma 세포주의 멜라닌 생성에 미치는 영향 등이 보고되어 있다 $^{25-28}$.

이처럼 산수유는 다양한 생리활성 물질을 함유하지만 산수유가 골 형성에 미치는 영향에 관한 연구는 미흡한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 세포수준에서 산수유가 골 형성에 미치는 영향을 검토하고자 골모유사세포인 MC3T3-E1 세포를 이용하여 골모세포의 증식, ALP활성도, collagen type I 및 osteocalcin mRNA 발현, 석회화 결절 형성을 관찰함으로써 산수유 추출물이 MC3T3-E1 세포의 골 형성능에 미치는 효과를 평가하였다.



Ⅱ. 연구재료 및 방법

1. 연구 재료 및 시약

1.1. 식물 재료

본 실험에 사용한 재료는 광주 광역시 한의원에서 음건된 형태로 시판되는 국내산 산수유 한약규격품을 구입하여 냉장 보관하며 분쇄한 후 시료로 사용하였다.

1.2. 시약

세포 배양에 사용된 alpha-Minimum Essential Medium(α -MEM)은 Gibco(BRL, Gr and Island, NY, USA)로부터 구입하였으며, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT)시약, dimethyl sulfoxide (DMSO), Alkaline phosphatase st aining kit, Alkaline phosphatase 활성 측정 시약과 Alizarin Red S 염색 시약은 Sigm a-Aldrich(St, Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. Polymerase Chain Reactio n(PCR)에 사용된 Primer는 Bioneer(Bioneer. Co., NY, USA)에서 구입하였고, RNA 추출에 사용된 TRI REAGENT®는 Molecular Research Center Inc.(Cincinnati, OH, US A), Chloroform(JUNSEI, JAPAN), 2-Propanol(SIGMA, USA)를 사용하였으며, cDNA 합성은 M-MLV cDNA Synthesis kit(Enzynomics Co., KOREA), Reverse transcripta se PCR은 Rocke Script Reverse Transcriptase(Bioneer, Co., NY, USA), DNA ladder 는 Bioneer(Bioneer. Co., NY, USA)에서 구입하여 사용하였다. 기타 사용된 시약들은 특급시약들을 구입하여 사용하였다.



2. 산수유 추출물 제조

건조된 산수유 과육을 물에 세척하여 불순물을 제거하고 건조한 후 분쇄하여 사용하였다. 분쇄한 건조 시료 300 g에 95 % 에탄올 2 L를 가하여 실온에서 24시간 진탕하였다. 추출물을 여과지(Advantec. Toyo No.2)로 여과한 후 감압 농축장치(IKA, RV10B, Germany)로 농축하였다. 이상과 같은 과정을 3회 반복하여 추출물을 제조하였으며, 최종적으로 농축된 시료를 동결 건조(Bondiro, Ilsin Lab Co., Korea)한 후, 4 ℃에 보관하며 DMSO에 녹여 실험에 사용하였다.

3. 세포 배양과 분화유도

생쥐 두개골 유래의 골모세포주 MC3T3-E1 세포(RCB1126, osteoblast-like cell line from C57B/6 mouse calvaria)는 10 % fetal bovine serum(FBS, Gibco, BRL, Grand i sland, NY, USA), 1 % 항생제(100 U/mL Penicillin, 100 µg/mL streptomycin)를 함유한 α-MEM (growth medium, GM) 배지를 사용하여 37 ℃, 5 % CO₂ 환경에서 배양하였다. 세포가 80 % 자라면 분화유도를 위하여 10 mM β-glycerol phosphate와 50µg/mL ascobic acid를 첨가하였으며 (differentiation medium, DM), MC3T3-E1 세포의 분화 유무를 확인하기 위하여 음성 대조군(negative control)에는 GM을 넣고 양성 대조군(positive control)에는 DM을 넣어 배양하였다. 각 배지는 3일 간격으로 신선한 것으로 교환하였다.

4. 골모세포의 생존력 및 증식률 분석

산수유 추출물에 의한 MC3T3-E1 세포의 증식률은 MTT assay 방법을 사용하여 측정하였다. 96 well plate에 $1 \times 10^4 / \text{well}$ 의 세포를 분주하고 10% FBS가 함유된 α -MEM 배양액을 넣은 후 배양기에 배양하였다. 세포가 각 well에 80%정도 자랐을 때 실험군에는 각 농도별로 준비된 산수유 추출물을 첨가하여 배양하였고 대조군은 배



지만 넣고 다른 조건은 동일하게 배양하였다. 배양 1일, 3일 후 MTT(5 mg/mL) 시약을 $20~\mu$ L씩 각 well에 첨가하여 4시간동안 배양기에서 배양하였다. 4시간 뒤 반응액을 제거하고 $200~\mu$ L의 dimethyl DMSO를 첨가하여 15분간 실온에서 세포내에 형성된 formazan 결정을 용해한 후 ELISA reader(Biotek Instruments Ltd., KOREA)를 이용하여 $540~\rm nm$ 파장에서 흡광도를 측정하였고 실험군의 흡광도를 대조군의 흡광도에 대한 백분율로 나타내었다.

5. Alkaline phosphatase(ALP) 활성도 측정

산수유 추출물의 골모유사세포에 대한 분화능을 확인하기 위하여 골모세포가 분화과정에 특이적으로 발현하는 ALP 활성을 측정하였다. 6 well plate에 1×10⁶/well의 MC3T3-E1 세포를 분주하고 세포가 각 well에 80 %정도 자라면 음성 대조군에는 성장배지만, 양성 대조군에는 분화배지만, 실험군에는 분화배지에 산수유 추출물을 첨가하여 넣고 배양하였다. 분화유도 1, 7, 14, 21일 후 각군의 배양액을 제거하고 PBS용액으로 3회 세척한 후 scraper로 세포를 수확하여 phosphatase inhibitor가 함유되지 않은 lysis buffer로 현탁하고 4 ℃에서 1시간동안 lysis 시킨 후 12,000 rpm에서 20분간원심분리 하였다. 원심분리한 후 5 μL 상층액을 취하여 BCA protein assay kit를 이용하여 단백질량을 정량 하였다. 정량한 값에 따라 96well plate에 똑같은 양의 단백질을 넣은후 p-nitrophenyl phosphate (p-NPP) solution을 200 μL씩 추가하고 30분간 반응시킨 후 ELISA reader를 이용하여 405 nm 파장에서 흡광도를 측정하였고 실험군의 흡광도를 음성 대조군의 흡광도에 대한 백분율로 나타내었다.

6. Alkaline phosphatase(ALP) 염색

MC3T3-E1 세포를 24 well plate에 1×10^5 /well로 분주하고 세포가 각 well에 80 % 정도 자라면 음성 대조군에는 성장배지만, 양성 대조군에는 분화배지만, 실험군에는 분화배지에 산수유 추출물을 첨가하여 넣고 배양하였다. 분화유도 1, 7, 14, 21일 후 각군의 배양액을 제거하고 PBS 용액으로 세척한 후 Citrate-acetone-formaldehyde 고정



액으로 실온에서 30초간 고정하였다. 다음 멸균 증류수로 세척한 후 alkaline-dye mixture를 첨가하여 빛이 차단된 실온에서 15분간 염색시켰다. 염색 결과는 육안으로 관찰하고 다시 100배 확대율의 현미경(Nikon Instruments Inc. Japan)으로 관찰 후 사진 촬영 하였다.

7. reverse transcriptase-polymerase chain reaction(RT-PCR) 분석

MC3T3-E1 세포를 음성 대조군, 양성 대조군 및 실험군으로 나누어 1, 7, 14, 21일 배양하고 RT-PCR 분석을 통하여 골모세포가 분화과정에서 발현되는 collagen type I 과 osteocalcin 유전자의 발현을 분석하였다. 배양된 세포를 DEPC(diethyl pyrocarbonate) water로 세척한 후 TRIol reagent 1 mL 넣어 RNA를 추출한 후 Chloroform을 200 µL 넣고 10분간 반응 후 12,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상층 액을 수확하였다. 상층액과 동량의 2-propanol을 첨가하여 혼합한 다음 다시 12,000 rpm에서 10분간 원심분리 하였다. 상층액을 버리고 75 % ethanol로 세척하고 pellet을 확인 후 자연 건조시켰다. RNase free water 30 μL에 RNA를 녹이고 60 ℃로 가온 후 정량하고 -80 ℃에 보관하였다. 대조군 및 실험군에서 각각 분리한 1 µg의 total RNA에 Oligo(dT) 1 µL, Rnase free water를 넣은 후 혼합하여 70 ℃ 반응시킨다. 4 °C에서 약 10분간 방치한 다음 10x reverse transcriptase buffer 2 µL, Reverse transcriptase 0.5 μL(200 unit/μL), 2 mM dNTPs(deoxyribonucleoside triposphates) 2 μL, RNase inhibitor 0.5 μL(40 unit/μL), DEPC water를 첨가하여 42 ℃에서 60분간 역전사 반응을 시행하였다. 합성된 cDNA는 GAPDH, collagen type I(Col-I), osteocalcin(OCN)을 Table1.에 나열한 조건에 따라 중합효소연쇄반응 (polymerase chain reaction, PCR)을 시행하였다. 20 μL 반응액 내에는 합성한 cDNA 1 μL, nTaq DNA polymerase 0.2 µL, 10x nTag buffer 1 µL, dNTP mixture 1 µL, primer 1 µL를 포함시켰다. 증폭된 PCR 산물은 6x DNA loading Dye와 혼합하여 1.0 % agarose gel 에서 전기영동 하였으며 EtBr로 염색 후 UV 촬영하였다. 촬영한 band는 Image J program을 사용하여 각각의 Band density를 측정한 후 GAPDH 양을 기준으로 표준 화하여 그래프로 표시하였다.



Table 1. primer sequence for RT-PCR.

Target Genes	Primer sequence		Reaction Condition				PCR	NCBI gene
	Forward	Reverse	Cycle number	Denaturation	Annealing	Extension	product size	Number
Collagen I	5'-AGGCAGAGATGG TGTTGATG-3'	5'-CACCAGGCTGTC CCTTTAAT-3'	28	94℃ (20초)	62℃ (20초)	72℃ (40초)	449bp	NT_007743.2
Osteocalcin	5'-TCATGTCCAAGC AGGAGGGCAATA-3'	5'-TGACACCATACT TGCAGGGCAGA-3'	30	95℃ (20초)	63.3℃ (20초)	72℃ (40초)	223bp	NM_007541.2
GAPDH	5'-AACTTTGGCATT GTGGAAGGGCTC-3'	5'-TGGAAGAGTGGG AGTTGCTGTTGA-3'	30	94℃ (20초)	56℃ (15초)	72℃ (40초)	382bp	NM_039595.8



8. Alizarin Red S 염색을 통한 석회화 결절 형성 분석

MC3T3-E1 골모유사세포의 석회화 결절을 확인하기 위하여 Alizarin Red S 염색을 시행하였다. 6 well plate에 1×10⁶/well로 분주하고 세포가 각 well에 80 %정도 자라면음성 대조군에는 성장배지만, 양성 대조군에는 분화배지만, 실험군에는 분화배지에 산수유 추출물을 첨가하여 넣고 배양하였다. 분화유도 1, 14, 21, 28일 후 세포 배양액을 제거하고 PBS로 세척한 후 4 % paraformaldehyde로 20분 동안 상온에서 고정시켰다. 다음 멸균 증류수로 세척하고 2 % Alizarin Red S 용액(1 % ammonium hydroxide로 pH 4.2)으로 10분 동안 염색하고 멸균 증류수로 세척하여 육안으로 붉은 색의 석회화결절 형성 여부를 대조군과 비교하고 관찰하였으며 100배 확대율의 현미경(Nikon Instruments Inc. Japan)으로 관찰 후 사진 촬영하였다.

9. 통계처리

실험결과는 SPSS 18.0 통계분석 프로그램(SPSS, Chicago, IL, USA)을 사용하여 분석하였다. 모든 실험 결과는 평균 ± 표준편차로 표시하였고 각 군간의 차이에 대한 통계적 유의성 검증은 Dunnett T3 test와 Mann-Whitney U test를 이용하여 시행하고 p<0.05인 경우에서 유의성이 있는 것으로 판정하였다.



Ⅲ. 실험 결과

1. 세포 생존율 분석 결과

산수유 추출물이 MC3T3-E1 세포 증식에 미치는 영향을 관찰한 결과 1, 10, 50, 100, 200 μg/mL의 모든 농도에서 94 % 이상의 생존율을 보여 세포 독성이 없음을 확인하였다. 1일째에 대조군의 생존율은 100.24 ± 7.42, 산수유 추출물 농도 1, 10, 50, 100, 200 μg/mL 군의 생존율은 각각 102.55 ± 8.87, 98.83 ± 6.91, 98.72 ± 5.26, 101.63 ± 5.78, 94.08 ± 5.50이었다. 3일째에는 대조군의 생존율은 100.07 ± 3.87, 산수유 추출물 농도 1, 10, 50, 100, 200 μg/mL 군의 생존율은 각각 109.73 ± 4.92, 108.94 ± 6.66, 111.81 ± 3.62, 112.43 ± 5.45, 95.33 ± 7.64이었다. 1일째에는 산수유 추출물의 농도 증가에 따라 대조군과 통계적으로 유의적인 증가를 보이지 않았다(p>0.05). 3일째에는 산수유 추출물 농도 1, 10, 50, 100 μg/mL 에서는 대조군에 비해 생존율이유의적으로 약간 증가(p<0.05)하였고 200 μg/mL에서는 대조군에 비해 약 4.7 % 낮은생존율을 보였지만 통계적으로 유의적인 결과는 아니었다(p>0.05)(Figure 1). 따라서이후 본 연구에서는 실험군의 산수유 추출물 농도는 100 μg/mL로 적용하였다.



Cornus officinalis extract (µg/mL) 140 cell viability (% of control) 120 100 □ control 80 $\blacksquare 1\mu g/mL$ ■10µg/mL 60 **™** 50μg/mL 40 ■ 100µg/mL 20 □ 200µg/mL 0 1 day 3 day

Figure 1. Effect of *Cornus officinalis* extract(COE) on the proliferation of MC3T3-E1 cells. The cells were cultured in the presence of various concentrations of COE for 1 day and 3 days, respectively, and cell viability was measured by MTT assay. Results were expressed as % of control and data were mean \pm S.D of three independent experiments.*, p<0.05 as compared with control.

2. Alkaline phosphatase(ALP) 활성도 측정 결과

골모세포 분화의 지표인 ALP 활성도를 측정하기 위하여 산수유 추출물을 첨가하여 1, 7, 14, 21일 배양한 후 MC3T3-E1 세포의 ALP 활성도를 분석하였다. 분화 유도 1일째를 제외한 모든 그룹에서 양성 대조군이 음성 대조군보다 통계적으로 유의하게 증가하였는데 분화 7일째부터 ALP의 활성도가 증가하기 시작하였으며, 14일째에 가장높게 증가하였고, 21일째에는 다시 감소하는 경향을 보였다. 분화 유도 7일째에는 산수유 추출물 처리군이 음성 대조군에 비해 3.6배 증가하였고 양성 대조군에 비해 1.2배증가하였으며, 14일째에는 음성 대조군에 비해 4.3배, 양성 대조군에 비해 1.1배 유의성있게 증가하였다. 분화 유도 21일째에는 산수유 추출물 처리군이 음성 대조군에 비해 3.5배 증가하였지만 양성 대조군과 통계적으로 유의한 차이가 없었다. 즉 산수유 추출물 처리군은 분화 유도 7일, 14일째에는 대조군보다 높은 활성도를 보였다(Fig 2).



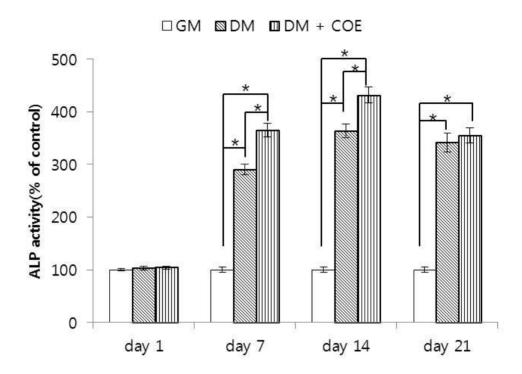


Figure 2. Effect of *Cornus officinalis* extract(COE) treatment on osteoblast differentiation by ALP activity in MC3T3-E1 cells. Cells were cultured in differentiation medium(DM) or with $100\mu g/mL$ of COE(DM+COE). ALP activity was determined on days 1, 7, 14 and 21. Cells cultured in growth medium(GM) alone served as a negative control. The values are expressed as the mean \pm S.D, n=3. *, p < 0.05 as compared with control.

3. Alkaline phosphatase(ALP) 염색 결과

산수유 추출물에 의한 MC3T3-E1 세포의 ALP 변화를 육안으로 확인하기 위해 ALP 염색법을 시행하였다. 각 군별 ALP 염색 결과를 육안으로 관찰시 모든 음성 대조군에서는 거의 염색되지 않았으며 분화 유도 1일째를 제외한 7일, 14일, 21일째에서 모두 양성 대조군 및 산수유 추출물 처리군에서 염색된 것을 관찰할 수 있었다. 분화유도 7일째부터 산수유 추출물 처리군에서 양성 대조군에 비해 더 뚜렷하게 염색되었고 14일째에는 그 차이가 더 뚜렷하였으며 21일째에는 두 그룹간에 선명한 차이가 거의 없었다. 즉 분화 유도 7일, 14일에서는 실험군의 염색 정도가 대조군에 비해 증가하였지만 21일째에는 두 그룹사이에 뚜렷한 차이가 없었다(Fig 3). 100배의 확대율 현미경으로 관찰한 사진에서도 음성 대조군에서는 거의 염색되지 않았으며 분화 유도 7일째부터 대조군과 산수유 추출물 처리군에서 모두 염색되기 시작하였으며, 분화 유도 14일째에는 두 그룹 모두 염색정도가 더 증가하였으며 분화 유도 21일째에는 다시 염색 정도가 감소하였다(Fig 4).



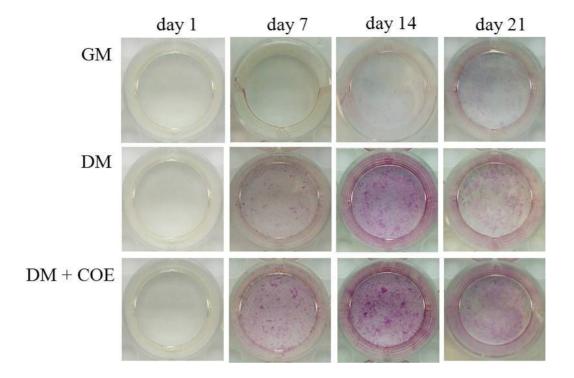


Figure 3. Effect of *Cornus officinalis* extract(COE) treatment on osteoblast differentiation by ALP staining in MC3T3-E1 cells. The result observed under macroscopic images of whole culture dishes. ALP staining intensity was proportional to the content of ALP secreted from MC3T3-E1 cells. Cells were cultured for 1, 7, 14 and 21 days in the differentiation medium(DM) or with $100\mu g/mL$ COE(DM+COE). For the negative control, cells were cultured in growth medium(GM) alone.

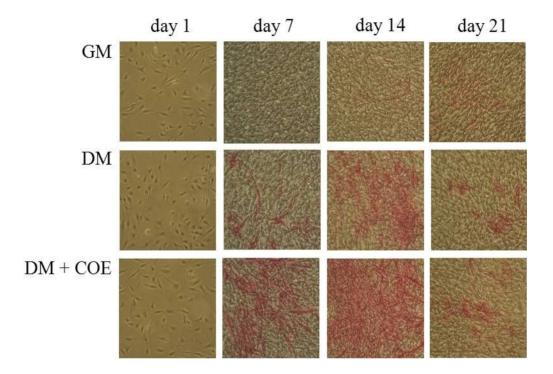


Figure 4. Effect of *Cornus officinalis* extract(COE) treatment on the ALP staining in MC3T3-E1 cells. The result observed under microscope with 10X magnification. Cells were cultured for 1, 7, 14 and 21 days in the differentiation medium(DM) or with $100\mu g/mL$ COE(DM+COE). For the negative control, cells were cultured in growth medium(GM) alone.

4. 골형성 관련 유전자 발현 분석 결과

4.1. Collagen type I mRNA 발현

산수유 추출물 처리에 의한 collagen type I(Col-I) 유전자 발현은 역전사 중합효소 연쇄반응을 통해 분석하였다. 분화 유도 1일째에는 양성 대조군과 산수유 추출물 처리군에서 모두 음성 대조군보다 낮게 발현 되었으며, 분화 유도 7, 14, 21일째에는 양성 대조군이 모두 음성 대조군보다 높게 발현 되었으며 분화 7일째에 가장 높게 발현되고 14일, 21일째로 가면서 점차 감소하였다. 분화 유도 7일째에는 산수유 추출물 처리군에서 음성 대조군보다 2.8배, 양성 대조군보다 1.2배 높게 발현 되었으며, 14일째에는 음성 대조군보다 2.1배, 양성 대조군보다 1.2배 높게 발현 되었고, 21일째에는 음성 대조군보다 1.5배, 양성 대조군보다 1.23배 높게 발현 되었다. 즉 분화 유도 1일째를 제외한 7, 14, 21일째에 collagen type I 유전자 발현이 산수유 추출물 처리군에서 양성 대조군보다 모두 높게 발현 되었다(Fig 5).



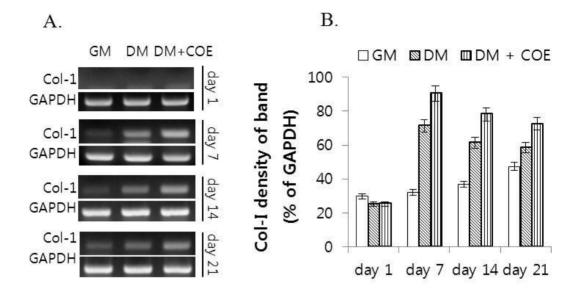


Figure 5. Semi-quantitative RT-PCR analysis of collagen type I(Col-I) mRNA expression in MC3T3-E1 cells treated with *Cornus officinalis* extract(COE). A, Cells were cultured in differentiation medium(DM) or with 100µg/mL of COE(DM+COE) for 1, 7, 14 and 21 days, and cDNA were amplified by PCR using specific primers. The PCR products were electrophoresis on a 1.0% agarose gel, visualized on UV, and photographed. GAPDH was used as the internal control. B, The quantification of mRNA expression was accessed by densitometric analysis using image J software. The percentage of Col-I mRNA expression was calculated as a ratio of GAPDH band.

4.2. Osteocalcin mRNA 발형

osteocalcin(OCN)은 골이나 상아질 및 석회화된 연골에서 발현되는 특이적인 유전자로서 본 연구에서는 산수유 추출물 처리에 의한 OCN 유전자 발현은 역전사 중합효소연쇄반응을 통해 분석하였다. 분화 유도 1일째에는 세 그룹 사이에 큰 차이가 없었으며, 분화 유도 7, 14, 21일째에는 양성 대조군이 모두 음성 대조군보다 높게 발현 되었으며 7일째부터 높게 발현되기 시작하여 21일째에 가장 높게 발현 되었다. 분화 유도 7일째에는 산수유 추출물 처리군에서 음성 대조군보다 1.8배 높게 발현되었고 양성대조군과는 차이가 없었으며, 14일째에는 음성 대조군보다 1.8배 높게 발현되었고 양성대조군보다 1.1배 높게 발현 되었다. 21일째에는 음성 대조군보다 1.8배 높게 발현 되었으나 양성대조군보다 양성 대조군과는 차이가 없었다. 즉 분화 유도 14일째에만 OCN 유전자 발현이산수유 추출물 처리군에서 양성 대조군보다 약간 높게 발현 되었다(Fig 6).



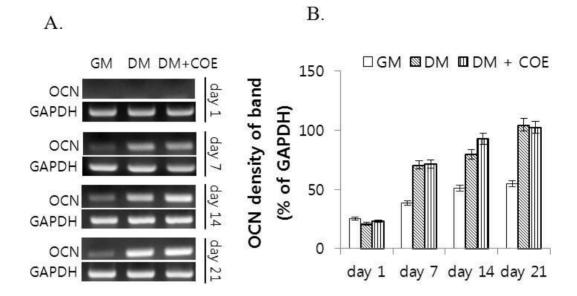


Figure 6. Semi-quantitative RT-PCR analysis of osteocalcin(OCN) mRNA expression in MC3T3-E1 cells treated with *Cornus officinalis* extract(COE). A, Cells were cultured in differentiation medium(DM) or with 100μg/mL of COE(DM+COE) for 1, 7, 14 and 21 days, and cDNA were amplified by PCR using specific primers. The PCR products were electrophoresis on a 1.0% agarose gel, visualized on UV, and photographed. GAPDH was used as the internal control. B, The quantification of mRNA expression was accessed by densitometric analysis using image J software. The percentage of OCN mRNA expression was calculated as a ratio of GAPDH band.



5. 석회화 결절 형성 분석 결과

산수유 추출물에 의한 석회화 결절 형성을 분석하기 위해 칼슘만 특이적으로 염색하는 Alizarin Red S 염색을 시행하였으며 형성된 결절이 석회화 결절인지 현미경으로 재확인하였다. 육안으로 관찰시 분화 유도 1. 14, 21 28일째의 모든 음성 대조군에서는 석회화 결절이 관찰되지 않았으며, 분화 유도 21일째부터 염색 정도가 증가하여 28일째에 양성 대조군과 산수유 추출물 처리군에서 석회화 결절이 형성되기 시작하였다. 분화 유도 1일째와 14일째에는 산수유 추출물 처리군과 양성 대조군사이에 뚜렷한 차이가 없었으며, 분화 유도 21일째부터 산수유 추출물 처리군에서 양성 대조군에 비해약간의 증가를 보이기 시작하였으며, 28일째에는 두 그룹간의 차이가 더 뚜렷하게 관찰되었다(Fig 7). 100배의 확대율 현미경으로 관찰한 사진에서도 음성 대조군에서는 모두 석회화 결절이 관찰되지 않는 반면, 분화 유도 14일째부터 양성 대조군과 산수유추출물 처리군에서 석회화 결절이 형성되기 시작함을 확인할 수 있었으며, 28일째에석회화 정도가 가장 강하게 나타났다. 분화 유도 14일째부터 산수유 추출물 처리군에서 석회화 결절이 형성되기 시작함을 확인할 수 있었으며, 18일째에석회화 정도가 가장 강하게 나타났다. 분화 유도 14일째부터 산수유 추출물 처리군에서는 양성 대조군에 비해 칼슘 축적이 증가하였으며 28일째에는 그 차이가 더 뚜렷하였다. 즉 분화 유도 14, 21, 28일째에 실험군의 석회화 결절 형성 정도가 대조군에 비해 더 뚜렷하게 증가하였다(Fig 8).



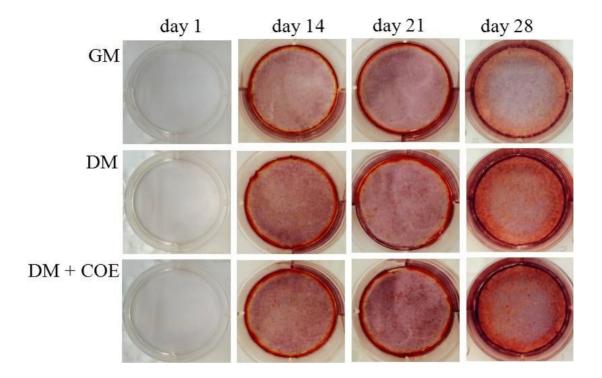


Figure 7. Effect of *Cornus officinalis* extract(COE) treatment on the formation of mineralized nodule in MC3T3-E1 cells. The cells observed under macroscopic images of whole culture dishes. Cell were cultured for 1, 14, 21 and 28 days in the differentiation medium(DM) or with 100μg/mL COE(DM+COE). For the negative control, cells were cultured in growth medium(GM) alone.

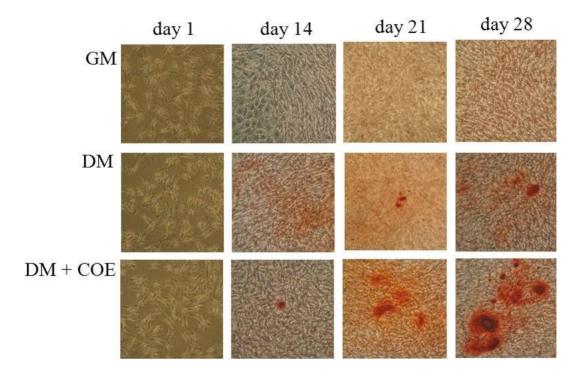


Figure 8. Effect of *Cornus officinalis* extract(COE) treatment on the bone nodule formation in MC3T3-E1 cells. The result observed under microscope with 10X magnification. Cells were cultured for 1, 14, 21 and 28 days in the differentiation medium(DM) or with $100\mu g/mL$ COE(DM+COE). For the negative control, cells were cultured in growth medium(GM) alone.

Ⅳ. 고 찰

일반적으로 광범위한 골 결손부의 회복이나 성공적인 임플란트 시술 등을 위해 필요한 골질과 골량을 얻기 위해 골 이식재를 이용하여 치조골의 재생을 도모하는 술식이 필요하다. 최근에는 조직 공학적 골 형성이 골 결손을 치료할 수 있도록 많은 연구가진행되고 있는데, 이러한 조직공학을 위해서는 골형성 세포와 이러한 세포들이 살 수 있는 기질, 유도분화를 촉진하는 신호전달 물질이 필요하며 각각의 성분은 동시에 영향을 주고 적절한 시간과 환경을 유지해주면 골 조직을 형성할 수 있게 되었다²⁹⁾. 이러한 골 조직 공학을 이용하여 단지 골전도성만 지닌 여러 골대체재의 골형성능을 획기적으로 중진하고자 하는 방법으로 현재 연구의 대세를 차지하고 있는 골형성 단백질 또는 세포부착펩타이드의 적용에 관한 연구가 많이 이루어지고 있다. 또한 현재 상용화된 골형성 단백질이 결합된 콜라젠 스폰지의 경우 일반적인 임상 케이스에 적용하기에는 무리가 있는 고가의 제품이다. 또한 체내 안전성이 입증된 부분적으로 골활성 효과가 있는 후보 물질의 골이식재의 적용에 관해서는 크게 진전된 연구가 없는 실정이며 본 연구에서는 저비용 고효율의 골형성능을 지닌 천연물 후보물질을 탐색하고자 산수유 추출물이 골모세포의 증식 및 분화에 대한 효과를 평가하였다.

골의 생성과정은 골모세포의 증식과 분화, 세포외 기질 형성 및 석회화의 세 단계로이루어 진다^{30,31)}. 골 조직은 교원질이 침착되어 세포외기질이 형성된 후 비교원성 단백질이 침착되고 수산화인회석으로 석회화 된다. 골 표면에 위치하는 골모세포는 세포막에 당단백 효소인 alkaline phosphatase(ALP)가 있고 활성화된 골모세포는 골 기질을 생성하는데 collagen type I(Col-I), osteopontin(OPN), osteonectin(ON), bone sialoprotein(BSP), osteocalcin(OCN) 등과 같은 물질을 합성하여 석회화 과정에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다³²⁾.

본 연구에 사용된 생쥐 두개골 유래의 MC3T3-E1 osteoblast-like cell은 적절한 자극 하에 골수의 stromal cell이나 결합조직의 mesenchymal stem cell이 분화되어 생긴 것으로, 골모세포 전구체(osteoprogenitor)로부터 전골모세포(pre-osteoblast), 골모세포, 골내막세포(bone lining cell) 및 골세포(osteocyte)로 분화되는 과정에 속하는 세포이다 ^{33,34)}. 또한 MC3T3-E1 세포는, 골형성 과정에 나타나는 세포의 증식, 분화, 석회화 등 골모세포와 유사한 대사적 특징을 가지고 있으므로, 골모세포의 분화와 관련된 연구에서 유용하게 이용되고 있다³⁵⁾.



골의 생성과정에서 첫번째 단계인 골모세포의 증식에 대한 산수유 추출물의 효과를 알아보기 위하여 MTT assay를 시행한 결과 $1-200~\mu g/mL$ 의 모든 농도에서 94~% 이상의 생존율을 보여 세포 독성이 없음을 확인하였다. $1일째에는 산수유 추출물의 농도 증가에 따라 대조군보다 유의적인 증가를 보이지 않았으며, <math>3일째에는 산수유 추출물 100~\mu g/mL$ 의 농도에서 112~%의 생존율을 보였으며 $200~\mu g/mL$ 에서는 대조군에 비해 생존율이 약간 감소하였으나 유의적인 차이는 없었다. 따라서 골모세포의 중식을 저해하지 않는 추출물의 적절한 농도가 $100~\mu g/mL$ 라고 생각된다.

골기질의 형성 단계는 Col-I, ALP, OPN, ON 등과 같은 골 분화 표지자로 확인할 수 있으며 본 연구에서는 골모세포의 표지 효소로 보고된 ALP의 활성과 초기분화 표지자인 Col-I 유전자 발현 정도를 분석하였다.

ALP는 골 형성의 지표가 되는 효소로써 그 활성 정도는 골모세포의 분화단계를 상 대적으로 평가하는 수단으로 사용되어 왔다³⁶⁾. ALP는 분화 초기에 발현하며 골의 석 회화가 이루어지는 부위에서 국소적으로 인산이온의 농도를 증가시켜 세포의 기질에 calcium phosphate를 침착시킴으로써 석회화를 유도하는 효소로 알려졌다³⁷⁾. ALP 활 성 측정은 p-nitrophenyl phosphate의 가수분해 반응에 ALP가 촉매로 작용하는 원리 를 이용하여, 가수분해 산물인 p-nitrophenyl의 양을 측정함으로써 ALP 의 농도를 상 대적으로 측정할 수 있다. 본 연구에서 산수유 추출물 처리 후 골모세포의 ALP 활성 도 분석 결과 분화 유도 1일째를 제외한 모든 그룹에서 양성 대조군이 음성 대조군보 다 높은 활성을 보였으며, 이는 분화배지만 넣은 양성 대조군에서 MC3T3-E1 세포가 정상적으로 분화가 일어났음을 의미한다. 또한 양성 대조군의 분화 시간에 따른 ALP 활성도를 살펴보았을 때 Lee 등³⁸⁾은 MC3T3-E1 세포주에서 황기, 계지, 황백처방 (BHH10)의 골형성 촉진 효능 연구에서 분화 7일째에 ALP 활성도가 가장 높았다고 보고한 반면, Ji 등³⁹⁾의 연구에서 머위 추출물을 처리시 분화배지만 넣은 대조군에서 3일째를 기준으로 시간이 경과함에 따라 ALP 활성도가 점차 증가하여 배양 14일째에 효소 활성은 최고에 도달하였고 그 이후 감소하였다고 하였다. 본 연구에서도 분화 1 일째를 기준으로 점차 ALP 활성도가 증가하기 시작하여 14일째에 가장 높게 증가하 였고 21일째에는 다시 감소하는 경향을 보였다. ALP의 활성이 시간 경과에 따라 감소 하는 것은 OCN이 발현되거나 석회화 결절이 형성되기 때문이며 이들이 형성되기 전 ALP 활성은 최고조에 도달한 것으로 생각된다⁴⁰⁾. 양성 대조군과 실험군 사이의 ALP 활성도 비교시 분화 유도 7일째와 14일째에 모두 산수유 추출물 처리군이 양성 대조군 에 비해 활성도가 높았으며, 21일째에는 두 그룹간에 유의적인 차이가 없었다. 이 결과



로 보아 산수유 추출물이 골모세포 분화과정에서 ALP 발현을 증가시켜 골기질의 형성에 촉진 작용이 있음이 예상된다.

MC3T3-E1 세포의 분화과정에서 산수유 추출물에 의한 ALP 발현을 육안으로 확인하기 위하여 ALP 염색법을 시행하였다. 분화 유도 1일부터 21일까지 모든 음성 대조군에서는 거의 염색되지 않았으며 분화 유도 1일째를 제외한 7일, 14일, 21일째에서 양성 대조군 및 산수유 추출물 처리군에서 모두 염색된 것을 관찰할 수 있었다. 이는 양성 대조군과 실험군에서 모두 정상적인 분화가 일어났음을 보여준다. Czekanska 등⁴¹⁾의 연구에 의하면 MC3T3-E1 세포에 분화배지만 넣고 1일부터 28일간 시간 경과에따라 분화시켰을시 14일째에 ALP 염색정도가 가장 높았고 21일째에는 감소하였다고보고하였다. 본 연구에서도 분화 유도 1일째를 기준으로 7일째부터 염색되기 시작하여 14일째에는 염색 정도가 더 강하게 관찰되었으며 21일째에는 감소하였다. 이러한 염색 결과를 통해 ALP 발현이 분화 14일째에 최고조에 도달함을 예상할 수 있으며 이는 ALP 활성도 분석 결과와 거의 유사하게 나타났다. 양성 대조군과 실험군 비교시분화 유도 7일째와 14일째에서 모두 산수유 추출물 처리군이 더 뚜렷하게 염색되었으며 21일째에는 두 그룹간에 큰 차이를 보이지이는 않았다. 마찬가지로 100배의 확대율현미경으로 관찰한 사진에서도 비슷한 결과를 관찰할 수 있으며 이는 산수유 추출물이 골모세포의 분화 과정에서 어느 정도 ALP 생성에 촉진 작용이 있음을 시사한다.

골 형성 과정에 합성되는 골기질 단백질인 Col-I은 분화 초기에 형성되는 것으로써 세포외 기질 중 가장 풍부한 단백질이며 뼈의 구조에 대한 단백질 기초를 제공하고 무기질 침착의 뼈대를 제공한다⁴²⁾. Collagen은 뼈에서 부드러운 골격을 형성하는 단백질이고 인산칼슘 미네랄이 뼈의 골격을 강하고 단단하게 만들어 준다. 또한 collagen은 골조직의 유기물의 대부분을 차지하며 collagen이 적절하게 생성되지 못하는 조건에서는 골조직의 석회화가 일어나지 않을 뿐만 아니라 ALP 활성 저하 및 OCN의 생성 또한 매우 감소하는 것으로 알려져 있다⁴³⁾.

본 연구에서는 Col-I 유전자 발현 분석을 위하여 역전사 중합효소연쇄반응을 시행한결과 분화 유도 1일째를 제외한 7, 14, 21일째에 양성 대조군 및 산수유 추출물 처리군에서 Col-I 유전자가 발현 되었으며 분화 유도 7일째에 가장 높게 발현 되었다. 이는 Czekanska 등⁴¹⁾의 MC3T3-E1의 분화에 대한 연구와 비슷한 결과를 보여준다. 또한산수유 추출물 처리군에서 대조군에 비해 Col-I 유전자 발현이 증가하였으며 이런 결과는 산수유 추출물이 골형성 초기 단계에서 골기질 단백질의 형성에 촉진 작용이 있을것으로 예상된다.



골생성 과정 중 마지막 단계는 석회화 단계로써 성숙한 조골세포에서만 발현하는 OCN, BSP 등 표지자로 확인할 수 있으며 석회화 결절의 형성은 칼슘에 특이적으로 흡착력이 높은 Alizarin Red S를 이용하여 확인할 수 있다^{44,32)}. OCN은 성숙한 조골 세포에 의해 생성되며 세포외 기질의 비교원질 단백질 중 가장 풍부하고 골 기질의 석회화를 촉진하는 요인으로 작용한다⁴⁵⁾.

본 연구에서 OCN mRNA 발현 분석 결과 분화 유도 1일째를 제외한 그룹에서 모두 유전자 발현을 보였으며 분화 유도 7일째부터 유전자 발현이 증가하기 시작하여 21일째에 가장 높게 증가하였다. Lee 등³⁸⁾의 연구에서는 OCN 유전자 발현이 분화 14일째에 가장 높게 나타났다고 하였고, Choi 등⁴⁶⁾은 석회화기인 16-30일 경까지는 OCN의발현이 높게 나타났으며 발현 정도가 28일까지 계속 증가되었다고 보고하였다. 이런 OCN 유전자 발현의 차이는 배양체계, 배지와 세포의 분주량 등의 영향에 기인한 것으로 사료된다. 산수유 추출물에 의한 OCN 유전자 발현은 분화 유도 14일째에만 대조군에 비해 증가하는 양상을 보였으며 그 증가량이 많지 않았다. 이러한 결과로 보아 산수유 추출물은 골모세포의 분화 과정 중 석회화 결절 형성의 초기에만 촉진 작용이 있음이 예상된다.

칼슘 무기물 침착을 평가하기 위하여 Alizarin Red S 염색을 시행하였는데 alizarin 은 식물성 염료로써 칼슘에 높은 흡착력을 가지고 있으며 무기질화된 세포외 기질에 염색되어 석회화 결절을 형성한 양과 염색된 정도가 상호 비례한다. 본 연구에서는 육 안으로 석회화 결절 형성을 관찰하였을 때 모든 음성 대조군에서는 석회화 결절이 관 찰되지 않았으며 분화 유도 28일째에 양성 대조군과 산수유 추출물 처리군에서 석회화 결절이 관찰되기 시작하였다. 이는 골모세포의 분화 마지막 단계에서 석회화가 일어났 음을 의미하며 시간 경과에 따라 석회화 결절 형성 양이 증가함을 알 수 있다. 또한 이런 결과는 Czekanska 등⁴¹⁾의 연구결과와 유사하였으나, Kim 등⁴⁷⁾이 견우자 추출물 이 MC3T3-E1 조골세포 분화에 미치는 영향에 대한 연구에서 분화 25일째에 육안으 로 확인할 수 있는 뚜렷한 석회화 결절이 형성된 결과와는 석회화 결절의 양이나 형성 된 시간적으로 어느 정도 차이를 보인다. 이러한 결과의 차이는 분화배지 및 세포의 분주량 그리고 염색방법의 프로토컬 차이점으로 인한 것으로 고려된다. 석회화 결절 형성을 100배의 확대율 현미경으로 관찰한 결과에서 분화 유도 21일째부터 산수유 추 출물 처리군이 양성 대조군보다 더 많이 염색됨을 관찰할 수 있으며 28일째에는 두 그 룹간의 차이가 더 뚜렷하게 나타났다. 이는 산수유 추출물이 석회화 단계에서 골모세 포의 분화를 촉진시킬 수 있음이 예상된다.



결론적으로 본 연구에서 산수유 추출물은 MC3T3-E1 골모유사세포의 증식에는 영향을 미치지 않았으며 골기질의 형성 및 성숙 단계에서 분화 초기 표지자인 Col-1 유전자 발현 및 골 형성 표지자인 ALP 활성도를 증가시켰고 분화 마지막 단계인 석회화 단계에서 OCN 유전자 발현에는 많은 증가를 보이지 못하였으나 석회화 결절의 형성은 증가시켰다.



V. 결 론

본 연구의 결과를 종합하여 볼 때 산수유 추출물이 MC3T3-E1 골모유사세포의 증식에는 영향을 주지 않았으나 골 형성 관련 유전자의 발현, 칼슘염의 염색 결과에서 실험군에서 대조군보다 더 뚜렷한 결과로 보아 산수유 추출물이 골모세포의 분화에 촉진 작용이 있음이 예상되는바 향후 산수유 추출물로부터 골형성을 유도시키는 단일 물질의 정제 및 분자적 기전에 대한 연구가 필요할 것으로 생각된다.



참고문헌

- 1. Jung RE, Halg GA, Thoma DS, Hammerle CH. A randomized, controlled clinical trial to evaluate a new membrane for guided bone regneration around dental implants. Clin Oral Implants Res. 2009;20(2):162–168.
- 2. Mellonig JT. Autogenous and allogeneic bone grafts in periodontal therapy. Crit Rev Oral Bio Med. 1992;3:333-352.
- 3. Schwart Z, Mellonig MT, Carnes DL, De La, Cocharan DL, Dean DD, Boyan BD. Ability of commercial demineralized freeze-dried bone allograft to induce new bone formation. J Periodontol. 1996;67:918-926.
- Kanno T, Takahashi T, Tsujisawa T, Ariyoshi W, Nishihara T. Platelet-rich plasma enhances human osteoblast-like cell proliferation and differentiation. J Oral Maxillofac Surg. 2005;63(3):362–369.
- 5. Li Q, Pan S, Dangaria SJ, et al. Platelet-rich fibrin promote periodontal regeneration and enhances alveolar bone augmentation. Biomed Res Int. 2013;2013:1–13.
- Sena K, Lenen RM, Mazhar K, Sumner DR, Virdi AS. Early gene response to low-intensity pulsed ultrasound in rat osteoblastic cells. Ultrasound Med Biol. 2005;31(5):703-708.
- 7. Pagin MT, Oliveira FA, Oliveira RC, et al. Laser and light-emitting diode effects on pre-osteoblast growth and differentiation. Laser Med Sci. 2014;29(1):55–59.
- 8. Higuchi T, Kinoshita A, Takahashi K, Dda S, Ishikawa I. Bone regeneration by recombinant human bone morphogenetic protein-2 in rat mandibular defect. An experimental model of defect filling. J Periodontol. 1999;70(9):1026-1031.
- 9. Hughes FJ, Turner W, Belibasakis G, Martuscelli G. Effects of growth factors and cytokines on osteoblast differentiation. Periodontol 2000. 2006;41:48–72.
- Giannobile WV, Lee CS, Tomala MP, Tejeda KM, Zhu Z. Platelet-derived growth factor(PDGF) gene delivery for application in periodontal tissue engineering. J Periodontol. 2001;72:815–823.
- 11. Joyce ME, Roberts AB, Sporn MB, Bolander ME. Transforming growth



- factor-beta and the initiation of chondrogenesis and osteogenesis in the rat femur. J Cell Biol. 1990;110:2195-2207.
- 12. Song HR, Ra DK, Kim JS, Jung TS, Kim YH, Kim EH. Effect of Safflower seed on new bone formation. J Vet Clin. 2002;19(1):66-72.
- 13. Barling PM, Gupta DK, Lim CE. Involvement of phosphodiesterase I in mineralization: histochemical studies using antler from red deer(Cervus elaphus) as a model. Calcif. tissue Int. 1999;65:384–389.
- 14. Shin SY, Lee YM, Ku Y, Bae KH, Chung CP. The biologic effects of magnoliae cortex and safflower seed extract mixture on PDL cells and osteoblasts. J Korean Acad Periodontol. 1998;28:545–559.
- 15. 황도연. 방약합편. 남산당. 1989.
- 16. Xia BJ, Xu B, Sun Y, et al. The effects of Liuwei Dihuang on canonical Wnt/β –catenin signaling pathway in osteoporosis. J Ethnopharmacol. 2014;153:133–141.
- 17. Kang HJ, Kim DI, Lee TK. A study on bone resorption & osteoporosis by Yuki-jihwang-tang-Jahage extracts. Journal of Oriental Obstetrics & Gynecology. 2003;16(1):1-17.
- 18. Jin UH, Kim DI, Lee TK, Lee DN, im JK, Lee IS, Kim CH. Herbal formulation, Yukmi-jihang-tang-Jahage, regulates bone resorption by inhibition of phosphorylation mediated by tyrosine kinase Src and cycloxygenase expression. J Ethnopharmacol. 2006;106:333-343.
- 19. Yang S, Zhou W, Zhang Y, Yan C, Zhao Y. Effect of Liuwei Dihuang decoction on ion channels and synaptic transmission in cultured hippocampal neuron of rat. J Ethnophamacol. 2006;106:166–172.
- 20. Park BC, Cha YY, Lee ES. Study on the Polyphospate content of the Yukmijihwang-tang and its effect on transcription activity of genes related to bone morphogenesis. Korean J. Oriental Physiology & Pathology. 2004;18(5):1769–1776.
- 21. Chung SR, Jeune KH, Park SY, Jang SJ. Toxicity and Lectins Constiuents from the seed of Cornus officinalis. Korean J. Pharmacogen. 1993;24:177–180.
- 22. Xu HQ, Hao HP. Effect of iridoid total glycoside from Cornus officinalis on



- prevention of glomerular overexpression of transforming growth factor beta I and matrixes in an experimental diabetes model. Bio Pharm Bull. 2004;27(7):1014–1018.
- 23. Gui LT, Zhang T, Yang F, Yang I. Separation of gallic acid from Cornus officinalis Sieb. et Zucc by high-speed counter-current chromatography. J. Chromatogr A. 2000;886:309-312.
- 24. Ding X, Zhu FS, Yu ZL, Dong LN, Cai BC. Comparative study on contents of amino acid and major and trace elements in Cornus officinalis before and after being processed. Zhong Yao Cai. 2007;30(4):396–399.
- 25. Jeon YH, Kim MH, Kim MR. Antioxidative, antimutagenic, and cytotoxic activities of ethanol extracts from Cornus officinalis. J Korean Soc Food Sci Nutr. 2008;37(1):1–7.
- 26. Kim OK. Antidiabetic and antioxidative effects of Corni Fructus in streptozotocin-induced diabetic rats. J Korean Oil. Chem. 2005;22:157-167.
- 27. Jeng H, Wu CM, Su SJ, Chang WC. A substance isolate from Cornus officinalis enhances the mobility of human sperm. AM. J. Chinese Med. 1997;25:3-4.
- 28. Burks D, Littleton R. The epidemiology of prostate cancer in black men. Henry Ford Hosp. Med. J. 1992;40:89–92.
- 29. Fleming JE, Cornell CN, Muschler GF: Bone cells and matrices in orthopedic tissue engineering. Orthop Clin North AM. 2000;31:357–374.
- 30. Manolagas SC. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanism and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. Endocr Rev. 2000;21:115–137.
- 31. Stein GS, Lian JB, Stein JL, Van Wijinen AJ, Montecino M. Transcriptional control of osteoblast growth and differentiation. Physiol Rev. 1996;76:593-629.
- 32. Maeda T, Matsunuma A, Kawane T, Hriuchi N. Simvastain promotes osteoblast differentiation and mineralization in MC3T3-E1 cells. Biochem Biophys Res Commun. 2001;280(3):874-877.
- 33. Ernst M, Heath JK, Rodan GA. Estradiol effects on proliferation, messenger ribonucleic acid for collagen and insulin-like growth factor-1, and parathyroid



- hormone-stimulated adenylate cyclase activity in osteoblastic cells from calcariae and long bones. J Endocrinology. 1989;125(2):825-833.
- 34. Sudo H, Kodama HA, Amagai Y, amaoto S, Kasai S. In vitro differentiation and calcification in new clonal osteogenic cell line derived from new bone mouse calvaria. J Cell Biol. 1983;96(1):191–198.
- 35. Kimble RB, Vannice J, Bloedow DC, Thompson RC, Hopfer W, Kung VT, Brownfield C, Pacifici R. Interleukin-1 receptor antagonist decreases bone loss and bone resorption in ovariectomized rats. J Clin Invest. 1994;93(5):1959-1967.
- 36. Lee C, Jang Y, Park J, Yoon S. Antioxidant and cell proliferation effects of Acanthopanax senticosus extract in human osteoblast-like MG-63 cell line. Korean J Food Sci Technol. 2007;39:694-700.
- 37. Harrison G, Shapiro IM, Golub EE. The phosphatidylinositol-glycolipid anchor on alkaline phosphatase facilitates mineralization initiation in vitro. J Bone Miner Res. 1995;10:568-573.
- 38. Lee ML, Huh JE, Nam DW, Seon JI, Kang JW, Choi DY, Lee JD. Effect of Astraglus membranaceus, Innamomum cassia, Phellodendron Amurensis(BHH10) on MC3T3-E1 cells proliferation, differentiation and bone mineralized formation. J Korean Acupuncture & Moxibustion Mdedicine Society. 2012;29:11-21.
- 39. Ji SH, Ahn DH, Jun MR. Effects of Petasites japonicus and Momordica charantia L. extract on MC3T3-E1 osteoblastic cells. J Korean Soc Food Sci Nutr. 2010;39(2):203-209.
- 40. Jang H, Eom H, Roh S, Yun I. Effect of extracts from scafflower seeds on osteoblastic differentiation and intracellular free calcium concentration in MC3T3-E1 cells. Korean J Physiol Pharmacol. 2005;9:55-623.
- 41. Czekanska EM, Stoddart ML, Ralphs JR, Richards RG, Hayes JS. A phenotypic comparison of osteoblast cell lines versus human primary osteoblasts for biomaterials testing. J Bbiomed Mater Res A. 2013;10:1–8.
- 42. Gerstenfeld LC, Chipman SD, Kelly CM, Hodgens KJ, Lee DD, Landis WJ. Collagen expression, ultrastructural assembly, and mineralization in culture of chicken embryo osteoblasts. J Cell Biol. 1988;106:979–989.
- 43. Owen TA, Aronow M, Shalhoub V, Barone LM, Wilming L, Tassinari Ms,



- Kennedy MB, Pockwinse S, Lian JB, Stein GS. Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. J Cell Physiol. 1990;143(3):420–430.
- 44. Yao KL, Todescan R, Sodek J. Temporal changes in matrix protein synthesis and mRNA expression during mineralized tissue formation by adult rat bone marrow cells in culture. J Bone Miner. Res. 1994;9(2):231-240.
- 45. Hauschka PV, Lian JB, Cole DE, Gundberg CM. Osteocalcin and matrix Gla protein: vitamin K-dependent proteins in bone. Physiol Rev. 1989;69:990-1047.
- 46. Choi JY, Lee BH, Song KB, Park RW, Kim IS, Sohn KY, Jo JS, Ryoo HM. Expression patterns of bone-related proteins during osteoblastic differentiation in MC3T3-E1 cells. J Cell Biochem. 1996;61(4):609-618.
- 47. Kim JH, Seong JM, Moon HJ, Hwang JM, Hwang KS, Kwon YD, Kwon IK, Park YD. Effect of Pharbitidis semen extract on osteoblast differentiation in MC3T3-E1 cells. Tissue Eng Regen Med. 2010;7(2):230-236.



감사의 글

한국에 유학 온지 벌써 4 년이라는 시간이 지났습니다. 스케일링과 root planing이 치주의 전부인줄만 알고 있던 제가 조국을 떠나 처음 유학생활을 하면서 치주에 대해 공부하게 되었습니다. 그동안 어려운 일, 힘든 점도 많았지만, 여기서 배우면서 얻은 것에 비하면 너무 의의가 있고 또 여기에서 공부할 수 있게 되었음을 너무 자랑스럽고 뿌듯하고 영광으로 생각하며 많은 분들의 도움이 있었기 때문에 순리롭게 학업을 마칠수 있게 되었습니다. 저의 졸업 논문이 나오기까지 많은 분들의 도움을 받았습니다. 우선 부족하였던 저를 손수 이끌어 주시고 아낌없이 가르침을 주셨으며 앞으로의 삶의 방향을 제시해주신 존경하는 김병옥 교수님께 진심으로 감사의 인사를 드립니다. 또한 항상 따뜻한 관심과 배려를 베풀어주신 유상준 교수님, 김수관 교수님께 진심으로 감사드립니다. 졸업 논문 심사위원을 맡아주시고 소중한 조언을 해주신 김명수 교수님, 방일수 교수님, 김춘성 교수님, 박혁규 박사님께도 깊은 감사를 드립니다.

저한테 한국에 와서 배우고 갈수 있는 기회를 마련해주시고 항상 곁에서 조언을 아끼지 않으신 방현호 교수님, 현운택 교수님께 항상 존경하며 감사함을 이 기회를 빌어전해드리고 싶습니다. 또한 한국에 와서 지금까지 공부하면서 곁에서 많은 조언을 해주시고 도움을 주신 김재성 교수님, 이숙영 교수님, 김도경 교수님, 김흥중 교수님, 국중기 교수님, 김동기 교수님, 황호길 교수님, 장현선 교수님, 오지수 교수님, 문성용 교수님, Timothy 교수님과 여러 교수님들께도 감사의 마음을 전해드리고 싶습니다. 그리고 유학 생활하는 동안 많은 도움을 주신 김성호 원장님, 김세훈 원장님, 박병기 원장님, 김형석 원장님, 이창규 원장님 너무 감사합니다. 그리고 가족적 분위기 속에서 연구생활을 할 수 있도록 도와주신 치주과 의국 선생님들, 실험에 많은 도움을 준 민지, 미라, 다혜, 인하, 복희, 경록, 현정, 박상연 선생님, 장은숙 선생님, 김빈, 혁수(형) 에게도 감사하다는 말 전하고 싶습니다. 또한 저랑 함께 유학 생활을 하면서 고락을 함께하고 서로 의지할 수 있었던 정강이, 한국에 도착한 첫날부터 지금까지 항상 많은 도



움을 준 승찬 이에게도 고마운 마음을 전하고 싶습니다.

친숙하면서도 낯선 고국 땅에 와서 어느덧 4 년이라는 시간이 흘러 드디어 학업을 마치게 되었습니다. 평소에 부끄러워서 말하지 못했지만 항상 저를 믿고 아낌없이 사랑해주시고 응원해주시는 할아버지, 할머니, 아버님, 어머님, 동생 명훈이 그리고 친척분들께 사랑한다는 말과 감사의 뜻을 전해드리고 싶습니다. 그리고 항상 곁에서 지지해주고 힘이 되어주는, 이젠 한 가족이 된 나의 아내에게 특별히 사랑한다는 말 전하고 싶고, 항상 아들처럼 사랑해주시고 아껴주시는 장인어른, 장모님께 감사하다는 말을 전해드리고 싶습니다.

감사의 글을 적으면서 많은 분들의 격려와 도움 속에서 학업을 마쳤다는 생각에 너무 행복하고 감사한 마음이 가득해집니다. 한국에서 보낸 지난 시간들은 앞으로의 저의 인생에서 많은 영향을 주게 될 것입니다. 그리고 기억에 남는 좋은 추억이 될 것입니다. 그동안 많은 것을 배웠고 많은 분들로부터 도움과 사랑을 받았습니다. 앞으로 저도 항상 베푸는 마음으로, 즐거움을 줄 수 있는 사람이 될 수 있도록 끊임없이 노력하고 정진하겠습니다.

지금까지 저를 도와주신 모든 분들께 다시 한번 진심으로 감사의 인사를 드립니다. 감사합니다.



鄭明珍의 博士學位論文을 認准함

2014年 6月

朝鮮大學校 大學院

