Vanillic Acid의 MC3T3-E1 조골세포 분화 및 무기질화에 미치는 영향

서현주^{1,2*} · 손건호^{2*} · 황진현² · 김동하² · 박유성² · 권인숙² · 조영은^{1,2}

¹국립안동대학교 농업과학기술연구소

²국립안동대학교 식품영양학과

Effects of Vanillic Acid on the Differentiation and Mineralization of Osteoblastic MC3T3-E1 Cells

Hyun-Ju Seo^{1,2*}, Kun Ho Son^{2*}, Jin-hyeon Hwang², Dong-ha Kim²,
Yu Seong Park², In-Sook Kwun², and Young-Eun Cho^{1,2}

¹Institute of Agricultural Science and Technology and

²Department of Food and Nutrition, Andong National University

ABSTRACT Vanillic acid (VA), namely 4-hydroxy-3-methoxy benzoic acid, is one of the major compounds isolated from the bioactive fraction of Vitis Fructus. VA is derived from dihydroxybenzoic acid, an oxidized form of vanillin. Although studies on the antioxidant, anti-inflammatory, and anticancer pharmacologic properties of VA have been conducted, there is little research on the effect of VA on bone metabolism. The objective of the present study was to investigate the potential anti-osteoporotic properties of VA on the differentiation and mineralization in osteoblastic MC3T3-E1 cells. These cells were cultured in 0, 0.1, 1, 10 µg/mL VA for 3, 6, and 9 days. The MTT assay results showed that VA had not changed the osteoblastic cell proliferation. Extracellular alkaline phosphatase (ALP) activity increased as VA concentration increased at 9 days. ALP staining was also elevated as VA concentration increased at 6 and 9 days. Markedly, VA significantly increased the mineralized nodules in a dose-dependent manner at 3, 6, and 9 days. In addition, VA significantly increased the expression of the bone differentiation marker ALP at 3 days. The expression of the bone-specific transcription factor Runx2 protein was also elevated in the VA-treated osteoblastic MC3T3-E1 cells at 3 days. The expression of the downstream regulator of bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) signaling, phosphorylation of ERK (p-ERK) was slightly elevated in VA-treated osteoblastic MC3T3-E1 cells at 3 days. Our results suggest that VA regulates osteoblast differentiation and mineralization in osteoblastic MC3T3-E1 cells. Taken together, our results clearly demonstrate that VA may be useful in preventing osteoporosis through the stimulation of osteoblastic differentiation and mineralization.

Key words: vanillic acid, osteoblastic MC3T3-E1, differentiation, mineralization, BMP-2 signaling

서 론

뼈는 정상적인 골격 구조와 기능을 유지하기 위해 재성형(bone remodeling)이라는 과정을 지속해서 겪는다(Chen 등, 2018). 뼈의 재성형 과정에는 많은 유형의 세포와 요인이 관여하는데, 조골세포(osteoblast)와 파골세포(osteoclast)는 재성형에 참여하는 주요 세포이다. 조골세포는 새로운 뼈 형성을 담당하고 파골세포는 노화된 뼈 흡수를 담당하는

데(Matsuoka 등, 2014), 뼈의 흡수(resorption) 및 형성(formation)은 생리적 조건에서 뼈 조직의 항상성(skeletal homeostasis) 유지를 위해 끊임없이 상호작용을 한다(Mori, 2017; Chen 등, 2018). 그러나 조골세포와 파골세포 작용간의 불균형은 뼈 감소(osteoporosis)나 증가(osteosclerosis)로 인한 골격의 이상으로 뼈 질환을 유발한다(Song, 2017; Sang 등, 2017).

골다공증(osteoporosis)은 뼈 질량이 낮고 뼈 조직이 구

Received 2 April 2021; Revised 14 May 2021; Accepted 14 May 2021

Corresponding author: Young-Eun Cho, Department of Food Science and Nutrition, Andong National University, 1375 Kyungdong Road, Andong, Gyeongbuk 36729, Korea, E-mail: yecho@anu.ac.kr

Author information: Hyun-Ju Seo (Researcher), Kun Ho Son (Professor), Jin-hyeon Hwang (Graduate student), Dong-ha Kim (Graduate student), Yu Seong Park (Student), In-Sook Kwun (Professor), Young-Eun Cho (Professor)

*These authors contributed equally to this work.

Copyright © 2021 by The Korean Society of Food Science and Nutrition. All rights Reserved.

This is Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

조적으로 악화하여 뼈가 약해지고 골절 위험이 증가하는 만성 대사성 골질환이다(Kanis 등, 2013). 전 세계적으로 거의 2억 명의 사람들이 골다공증의 영향을 받고 있으며 매년 그 비율이 크게 증가하고 있다(Law 등, 2016). 골다공증의 유병률은 노인 인구(노인성 골다공증), 특히 에스트로겐 결핍으로 인한 폐경기 여성(폐경 후 골다공증)에서 더 높은 것으로 보고되었다(Liu 등, 2014). 현재 골다공증 예방 및 치료에 사용되는 대부분의 약물은 뼈 흡수 억제제인데, 이는 뼈 손실 진행을 완전히 예방할 수 없다(Kim, 2011). 최근 골다공증 예방과 치료를 위해 뼈 형성 증가에 대한 연구가 주목받고 있으며(Kim 등, 2014; Kim 등, 2017), 특히 한의학에 사용되는 일부 한약재의 골조직 재생 능력에 관한 연구가 보고된 바 있다(Choi 등, 2001; Lee, 2001).

마편초과(Verbenaceae)에 속하는 순비기나무(*Vitex rotundifolia* L.)의 열매를 건조한 만형자(Viticis Fructus)는 오래전부터 감기, 두통, 편두통, 눈의 통증, 근육통 및 염증 치료를 위해 사용된 약용식물 자원이다(Lee 등, 2013). 만형자에 대한 연구로는 약 76개의 에센셜 오일 성분, monoterpene류(Jang 등, 2002), 플라보노이드 및 페놀 화합물 등이 분리되어 보고된 바 있으며(Yoshioka 등, 2004), 모발 성장 촉진 효과(Shin 등, 2009), 염증 및 알레르기 반응(Yeon 등, 2013)에 대한 영향이 보고되었다. 또한 세포독성(cytotoxic), 항염증(anti-inflammatory), 항미생물(anti-microbial), 항통각(anti-nociceptive), 항고프로락틴혈증(anti-hyperprolactinemia) 활성 등 다양한 약리 활성을 나타내는 것으로 보고되었다(Hu 등, 2007; Sohn 등, 2009).

Vanillic acid(VA; 4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid)는 만형자의 생리활성 분획에서 분리된 주요 화합물 중 하나이다(Kondo 등, 1986; Kouno 등, 1988). VA는 vanillin의 산화형이며 와인, 식초 및 아르간 오일의 구성 성분으로 항산화, 항염증 및 항암 활성 등이 있는 것으로 보고되었다(Sinha 등, 2008; Calixto-Campos 등, 2015; Sindhu 등, 2015). Hsu와 Yen(2007)의 연구에서 VA가 3T3-L1 세포에서 세포 내 triglyceride를 억제하는 것으로 나타났으며, Xiao 등(2014)의 연구에서는 VA가 쥐 조골세포 유사 UMR-106 세포의 alkaline phosphatase 활성을 증가시켰고 조골세포 활성 및 파골세포 형성에 관련된 유전자의 mRNA 발현 조절에 관여함이 입증되었다.

따라서 본 연구에서는 만형자에서 분리 정제한 VA가 전 조골세포인 MC3T3-E1 세포의 분화 및 무기질화에 미치는 영향을 확인하고, 만형자가 골다공증과 같은 골 질환을 치료하기 위한 유망한 후보 물질임을 확인하고자 실시하였다.

재료 및 방법

시료 제조

VA 추출 및 정제는 보고된 논문과 동일한 방법으로 분리 사용하였다(Choi 등, 1991). 만형자는 국내에서 자생하는

순비기나무로부터 채취된 열매를 대구 약령시장에서 구입하여 분쇄기로 분말화하였다. 분말 시료를 메탄올(methanol, MeOH)에 72시간 동안 실온에서 침지시켜 조추출물을 얻었으며 이 조작을 3회 실시하였다. 여기서 얻어진 메탄올 조추출물은 노르말 헥산(n-hexane), 디클로로메탄(dichloromethane, CH₂Cl₂), 에틸아세테이트(ethyl acetate, EtOAc) 및 부탄올(butanol, BuOH) 등의 용매를 사용하여 순차 연속 추출하여 분획하였다. 각 분획은 column chromatography를 통해 MeOH-CHCl₃로 기울기 용리시켜 화합물들을 분리하고 이를 메탄올로 재결정을 반복하며 백색 결정성 분말을 얻었다. 분리한 화합물의 ¹H, ¹³C-NMR(nuclear magneticresonance) spectrum은 Bruker AMX-300(300, 400 MHz; Bruker, Karlsruhe, Germany)과 Varian의 Gemini 2000(75.5, 100 MHz; Varian Inc., Palo Alto, CA, USA)을 사용하여 측정하였으며, UV spectrum은 Hitachi의 U-3010 spectrophotometer(Hitachi, Tokyo, Japan)를 사용하여 측정하였다. 정제한 VA는 dimethyl sulfoxide(DMSO, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)로 1 mg/mL 농도로 희석하여 농도별 실험에 맞게 희석하여 사용하였다.

실험재료

본 실험에 사용된 모든 시약은 Sigma-Aldrich에서 구입하였다. 세포 실험에 사용된 α-MEM, penicillin & streptomycin, fetal bovine serum(FBS)은 Gibco Laboratories(Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)에서 구입하여 사용하였고, 단백질 발현에 대한 1차 항체와 2차 항체인 horse-radish peroxidase가 결합한 anti-rabbit IgG, anti-mouse IgG 등은 Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz, San Francisco, CA, USA)에서 구입하여 사용하였다.

세포배양 및 분화

Murine pre-osteoblastic MC3T3-E1 subclone 4 세포는 American Type Culture Collection(ATCC, Manassas, VA, USA)에서 구입하였고, 10% FBS(Gibco BRL)와 100 U/mL penicillin, 100 mg/mL streptomycin(Gibco BRL)이 포함된 α-MEM(Gibco BRL) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하면서 실험에 사용하였다. 분화유도를 위해 α-MEM 배지에 10 mM β-glycerol phosphate(Sigma-Aldrich), 50 µg/mL의 vitamin C(Sigma-Aldrich)를 첨가하였다. 만형자에서 분리 정제한 VA(0, 0.1, 1, 10 µg/mL)를 배지에 첨가한 후 세포에 처리하였으며, 3일마다 배지를 교환하였고 증식, 분화 및 무기질화에 미치는 영향을 확인하기 위하여 9일까지 배양하며 실험을 진행하였다.

세포증식 유도 측정

만형자에서 분리 정제한 VA가 조골세포 생존 및 증식에 미치는 영향을 알아보기 위해 3-(3,4-dimethylthiazoly-

2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT, Sigma-Aldrich) 시약의 환원 정도를 측정하는 MTT assay를 실시하였다. 먼저 MC3T3-E1 세포를 96 well plate에 1×10^4 cells/well로 분주한 후 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양 후 배지를 제거하고, 세포를 PBS로 2회 세척한 다음 0, 0.1, 1, 10 µg/mL의 VA가 포함된 분화배지로 교체하였다. VA 처리한 세포는 3일, 6일 그리고 9일 배양 후 5 mg/mL 농도의 MTT시약 10 µL를 각 well에 첨가하여 3시간 더 배양한 후 배지를 제거하고 DMSO를 200 µL 첨가하여 생성된 불용성의 formazan 결정을 용해시켜 microplate reader(Infinite M200 Pro, Tecan Group Ltd., San Jose, CA, USA)로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Alkaline phosphatase 활성 측정

만형자에서 분리 정제한 VA가 조골세포 활성화에 미치는 영향을 알아보기 위해 염기성 인산분해효소(alkaline phosphatase, ALP) 활성을 측정하였다. MC3T3-E1 세포를 12 well plate에 1×10^5 cells/well로 분주하고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양 후 배지를 제거한 다음, 10% FBS, 1% 항생제가 첨가된 분화배지에 VA를 농도별(0, 0.1, 1, 10 µg/mL)로 처리한 새로운 배양액을 분주하였다. 3일, 6일 및 9일간 배양 후 배양액을 제거하고 protease inhibitor cocktail(Sigma-Aldrich)과 phosphatase inhibitor cocktail(Sigma-Aldrich)이 첨가된 radioimmunoprecipitation assay(RIPA) buffer(Boston Bio Products, Ashland, MA, USA)를 첨가하여 세포를 분리하였다. 세포 현탁액을 12,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상등액만 취하여 ALP 효소 활성과 단백질 정량에 사용하였다. 상등액에 1 M Tris-HCl 500 µL와 5 mM MgCl₂ 100 µL, lysis buffer 250 µL, 5 mM *p*-nitrophenolphosphate(*p*-NPP)를 첨가한 후 37°C에서 30분간 반응시킨 다음, 1 N NaOH 250 µL로 반응을 중지하고 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. ALP 활성은 *p*-NPP로부터 생성된 *p*-nitrophenol(PNP)을 측정하여 *p*-NP에 대한 표준그래프를 작성한 후 활성도를 도출하였고, 단백질은 bovine serum albumin을 표준물질로 사용하여 bicinchoninic acid(BCA) protein assay(Pierce, Rockford, IL, USA)로 정량하였다. 측정된 ALP 활성을 단백질량으로 나누어 단위 단백질량당 효소활성도를 산출하여 Unit으로 나타내었다.

Alizarin-Red 염색법에 의한 골 무기질화 형성도 측정

조골세포 분화의 주요 표식인자인 골 무기질화 형성도를 측정하기 위해 Alizarin-Red 염색법을 실시하였다. Alizarin-Red 염색은 Ca와 복합체를 형성하기 때문에 무기질화된 세포외기질을 확인하는 데 사용된다. 12 well plate에 MC3T3-E1 세포를 분주한 후, 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 안정화한 다음 배지를 제거하고 PBS로 세척한 뒤, 무기질화 유도를 위해 50 µg/mL ascorbic acid, 10 mM β-

glycerol phosphate가 포함된 분화배지에 농도별 VA를 첨가한 배양액을 처리하여 9일까지 incubator에서 배양하였다. 배양 후 배지를 제거하고 PBS로 세척한 뒤 70% 에탄올로 4°C에서 1시간 동안 고정시켰다. 고정이 끝나면 40 mM Alizarin Red solution(pH 4.2, Sigma-Aldrich)으로 10분간 염색 후 증류수로 세척하고 현미경으로 nodule 정도를 관찰하였다. 무기질화 형성 확인 후 10% cetylpyridinium chloride를 첨가한 10 mM sodium phosphate(pH 7.0) 용액을 첨가하여 15분간 용출한 다음, 염색된 정도를 microplate reader(Infinite M200 Pro, Tecan Group Ltd., San Jose, CA, USA)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Von Kossa 염색법

세포외기질의 무기질화를 확인하기 위해 Von Kossa 염색법을 실시하였다. Von Kossa 염색은 세포배양 조건에서 칼슘과 함께 인산 이온의 침착을 평가하는 방법이다. MC3T3-E1 세포(1×10^5 cells/well)를 12 well plate에 분주하고 세포가 100% confluency 될 때 0, 0.1, 1, 10 µg/mL VA가 첨가된 분화배지로 3일, 6일 및 9일 동안 배양하였다. 세포를 PBS로 세척 후 70% 에탄올로 4°C에서 10분 동안 고정시킨 후, 3% 질산은 용액을 처리하여 1시간 동안 UV 광선 아래에서 반응시켰다. 질산은 용액을 제거하고 증류수로 세척 후 광학현미경(Leica MC120 HD, Leica, Buffalo Grove, IL, USA)으로 관찰하였다. 골 무기질화된 결절(nodules)은 두꺼운 암갈색 줄무늬로 나타난다.

ALP 염색법

분화된 MC3T3-E1 세포의 ALP 활성은 ALP 염색법으로 평가하였다. ALP의 활성에 대한 염색은 0, 0.1, 1, 10 µg/mL의 VA 처리 3일, 6일 및 9일 후에 수행되었다. 세포를 PBS로 세척 후 naphthol AS-Mx phosphate disodium salt, N,N-dimethyl formamide 및 fast red salt의 혼합물을 사용하여 37°C에서 30분 동안 또는 외관이 노랗게 될 때까지 염색하였다(Burnstone, 1960). 증류수로 세척한 후 세포를 광학현미경으로 관찰하였다. ALP 활성 세포는 적색/보라색으로 염색된다.

Western blot analysis

만형자에서 분리 정제한 VA를 3일 처리한 세포에서 단백질을 추출하기 위해 세포를 PBS로 2회 세척하고, protease inhibitor cocktail(Sigma-Aldrich)과 phosphatase inhibitor cocktail(Sigma-Aldrich)이 포함된 RIPA buffer(Boston Bio Products, Ashland, MA, USA)를 첨가하여 4°C에서 30분간 처리한 후 lysis 시켜 단백질을 추출하였다. 추출된 단백질의 농도는 BCA protein assay(Thermo, Rockford, IL, USA)를 사용하여 정량하였다. 동량의 단백질을 10% SDS-PAGE에서 분리하고 PVDF membrane(Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA)으로 이

동시킨 다음, 0.05% Tween 20(TBS-T)을 함유하는 Tris 완충액에서 5% non-fat dry milk로 실온에서 2시간 동안 blocking 후 1차 항체와 함께 4°C에서 15시간 반응시켰다. Membrane을 TBS-T로 세척하고 2차 항체와 1시간 반응시킨 후 chemiluminescence kit(Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA)을 이용하여 단백질을 확인하였다. 소프트웨어 Fusion solo 6X basic 0.84(Vilber, Collegien, Paris, France)를 사용하여 각 밴드의 밀도 측정 스캐닝으로 정량하였다.

통계처리

모든 실험 결과는 SPSS 24.0(Statistical Package for Social Science, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) software package 프로그램을 이용하여 통계처리 하였다. 통계의 결과는 평균과 표준오차로 나타내었으며, 유의성 분석은 ANOVA 검정을 실시하여 Duncan's multiple range test로 $P < 0.05$ 수준에서 유의차를 검정하였다.

결과 및 고찰

VA의 조골세포 증식 유도 측정

본 연구에 이용된 MC3T3-E1 세포주는 mouse calvaria 유래의 pre-osteoblastic MC3T3-E1 세포로 적절한 자극 하에 골수의 stromal cell이나 결합조직의 mesenchymal stem cell로부터 분화되어 생성되며, 세포의 증식과 분화 및 세포외기질에 무기질을 형성(mineralization of matrix)하여 골 형성 과정에 결정적인 역할을 담당한다(Kim 등, 1991). 만형자에서 분리 정제한 VA 처리가 조골세포의 증식에 미치는 영향을 확인하기 위해 MTT assay를 실시하였다. MC3T3-E1 세포증식률을 VA 무처리군과 비교했을 때, VA 처리 3일차에서는 VA 농도가 증가함에 따라 각각 101.43%, 100.30%, 97.38% 세포증식률을 나타내었고, VA 처리 6일차에서는 99.84%, 99.46%, 99.45%의 세포증식률을, VA 처리 9일차에서는 96.48%, 94.97%, 95.42% 수준의 세포증식률을 나타냈으므로 VA가 조골세포 증식에 안전한 소재임을 확인할 수 있었다(Fig. 1A).

VA의 ALP 활성 측정

조골세포의 분화 초기에 나타나는 표지인자인 ALP 활성을 측정하여 VA 처리가 조골세포의 활성화에 미치는 영향을 확인하였다(Kim 등, 2001; Min, 2015). ALP는 당단백 효소로 전조골세포(pre-osteoblast)가 성숙 조골세포(mature

Fig. 1. Cell proliferation, ALP activity, and ALP staining by VA in osteoblastic MC3T3-E1 cells. (A) Cell proliferation was measured using MTT assay. $P < 0.05$ compared to the cells without the treatment. Data presented as mean $\pm$ SEM (n=8). (B) The enzyme activity of ALP within cells were measured. Data presented as mean $\pm$ SEM (n=3). One unit of *p*-nitrophenol as products being converted from *p*-nitrophenyl phosphate as substrate for 30 minute reaction time. Cellular ALP 1 unit (U)=1 nmole *p*-nitrophenol/mg of protein/30 min. (C) Alkaline phosphatase stain of MC3T3-E1 cells for 3, 6, and 9 days of VA treatment by ALP staining. Cells were cultured at 12-well plates for 3, 6, and 9 days with the 0~10 µg/mL vanillic acid treatment. Magnification rate, $\times 100$ (3 days) or $\times 40$ (6, 9 days). Different letters above bars mean significantly different VA concentration as analyzed by one-way ANOVA, Tukey test ($P < 0.05$).

osteoblast)로 분화하는 과정에 관여하며(Kim, 2014), 기질 특이성과 염기성 pH에서 최적으로 활성화되고 세포외막과 석회화 조직에서 높은 농도로 존재한다. 특히 석회화 과정 중 무기인산 운반과 인산칼슘 침착에 관여하므로 다수의 논문이 조골세포의 활성을 측정하기 위한 도구로 ALP 활성도를 사용하였다(Cho 등, 2010; Cho와 Kwun, 2018a; Cho와 Kwun, 2018b). VA를 처리한 MC3T3-E1 세포의 ALP 활성 결과는 Fig. 1B와 같다. VA 처리 3일차에서는 VA 무처리군(8.00 ± 0.27)이 VA 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 처리군(6.94 ± 0.09)과 10 $\mu\text{g/mL}$ 처리군(6.91 ± 0.33)보다 유의적으로 높았으며, VA 처리 6일차에는 모든 VA 처리군(13.51 ± 0.70 , 14.14 ± 0.16 , 13.52 ± 0.28)이 VA 무처리군(13.22 ± 0.68)보다 높은 경향을 나타내었으나 유의적 차이는 없었다. VA 처리 9일차에서는 VA 10 $\mu\text{g/mL}$ 처리군(7.51 ± 0.18)이 유의적으로 가장 높은 활성을 나타내었고 유의적 차이는 없었으나, 1 $\mu\text{g/mL}$ 처리군(6.41 ± 0.27)과 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 처리군(6.06 ± 0.39) 순으로 높은 활성을 나타내었다. 또한 ALP 활성은 VA 처리 후 6일차에 가장 높은 활성을 보였으며 9일차에서는 감소하는 것으로 나타났다.

조골세포 분화의 중요한 골 표지자로 ALP는 조골세포에서 합성된 후 세포외기질로 분비된다. ALP 염색을 사용하여 VA 처리에 의한 ALP 활성 변화를 Fig. 1C에 나타내었다. ALP 염색의 결과 VA 처리 후 6일차에 가장 높은 활성을 나타내었으며 이 결과는 ALP 효소 활성 결과(Fig. 1B)와도 일치하였다. 또한 VA 처리 9일차에서는 VA 10 $\mu\text{g/mL}$ 처리군에서 ALP 염색에 의한 활성이 높은 것으로 나타났으며 9일차 ALP 효소 활성 결과(Fig. 1B)에서도 유의적인 차이를 확인할 수 있었다. Xiao 등(2014)은 MC3T3-E1 세포에 10^{-12} M VA를 7일간 처리했을 때 대조군보다 유의적으로 ($P < 0.01$) ALP 활성이 증가한다고 보고하였으며, 본 연구 결과에서도 10 $\mu\text{g/mL}$ VA를 9일간 처리했을 때 VA 무처리군보다 유의적으로 ALP 활성이 증가하는 것을 ALP 효소 활성과 염색 결과에서 모두 확인함으로써 만형자에서 분리 정제한 VA가 조골세포의 분화를 촉진한 것으로 사료된다.

Von Kossa와 Alizarin-Red 염색법에 의한 골 무기질화 형성도 측정

미분화된 mesenchymal stem cell로부터 유래하는 조골세포는 골기질 성분을 주로 합성하여 무기질 침착을 촉진한다(Seo 등, 2020). 조골세포의 표지인자에는 ALP, collagen 및 osteocalcin 등이 사용되고 있으나, 이러한 지표는 조골세포에만 한정된 지표가 아니므로 전조골세포에서 조골세포의 분화 및 골 형성(bone formation)의 지표로 세포외기질의 무기질화를 이용하고 있다(Declercq 등, 2005). 본 연구에서는 만형자에서 분리 정제한 VA 처리가 무기질화에 미치는 영향을 확인하기 위해 무기질화된 세포의 기질을 Von Kossa 및 Alizarin Red로 염색하여 확인하였다(Fig. 2).

Von Kossa는 세포외기질에서 인산염을 염색하기 때문에 칼슘과 함께 인산 이온의 침착을 평가하기 위해 Von Kossa 염색을 실시하였다(Fig. 2A). Von Kossa 염색에서는 VA 처리 6일차에 무기질화된 nodules의 증가가 확인되었으며, VA 처리 9일차에서는 특히 VA 1 $\mu\text{g/mL}$ 처리군에서 증가한 것으로 나타났다.

Alizarin Red 염색에서는 VA 처리 3일차에 무기질화된 nodules의 증가가 농도 의존적으로 증가하였다(Fig. 2B). 염색된 무기질화된 결절 생성물은 10% cetylpyridinium chloride로 용해 후 흡광도 값을 측정하여 VA 무처리군에 대한 상대 활성으로 나타내었다(Fig. 2C). VA 처리 3일차에서는 VA 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 처리군(126.87%), 1 $\mu\text{g/mL}$ 처리군(128.27%), 10 $\mu\text{g/mL}$ 처리군(121.97%) 모두에서 무기질 결절 형성이 유의적으로 증가하였으며, 6일차에서는 VA 10 $\mu\text{g/mL}$ 처리군(116.99%)에서 유의적인 증가를 보였고 VA 1 $\mu\text{g/mL}$ 처리군(107.60%)에서는 유의적 차이가 없었으나 높은 경향을 나타내었다. 9일차 무기질 결절 형성에서는 VA 무처리군보다 VA 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 처리군(113.78%)과 10 $\mu\text{g/mL}$ 처리군(126.71%)이 유의적으로 증가하였고, VA 1 $\mu\text{g/mL}$ 처리군(111.90%)은 높은 경향을 나타내었다. 따라서 본 연구에서는 만형자에서 분리 정제한 VA의 처리가 MC3T3-E1 조골세포의 분화를 촉진하고 무기질화를 증가시킴을 확인하였다.

VA의 조골세포에서 골 형성 관련 단백질 발현에 미치는 영향

조골세포의 분화과정에는 다양한 단백질들이 관여한다. 당단백 효소인 ALP는 전조골세포에서 성숙 조골세포로 가는 과정의 초기 분화인자이며, Runx2와 collagen type I (COL1)은 골 형성을 촉진하는 조골세포 분화 조절인자이다(Komori, 2006; Tognarini 등, 2008). 성숙 조골세포에서 골세포(osteocyte)화 되는 과정에는 골 형성 단백질인 bone morphogenetic proteins(BMP), osteopontin(OPN), osteocalcin(OCN) 등의 세포외기질 단백질을 분비하여 골세포의 기질을 무기질화한다(Kim, 2014). 본 연구에서는 만형자에서 분리 정제한 VA 처리가 MC3T3-E1 조골세포에서 골 형성 관련 단백질 발현에 미치는 영향을 확인하기 위해 Runx2, OPN, ALP, Pro COL1 등의 단백질 발현을 분석하였고 그 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 골 형성 전사인자인 Runx2 단백질 발현량은 VA 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 처리군(1.4배), 1 $\mu\text{g/mL}$ 처리군(1.7배), 10 $\mu\text{g/mL}$ 처리군(1.5배) 모두에서 VA 무처리군보다 유의적인 증가를 나타내었다. 조골세포의 무기질화를 촉진하는 후기 분화 마커인 OPN은 뼈의 세포외기질 안에 축적되거나 합성된 일부가 혈중으로 방출되기도 한다(Ganss 등, 1999). OPN 단백질 발현량은 ALP 단백질 발현 양상과 반대로 VA 무처리군과 비교하여 VA 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 처리군(1.79 배)에서 가장 증가하였으나 유의적 차이는 없었다. 조골세포의 세포막 당단백 효소인 ALP는 인산칼슘

Fig. 2. Morphological characteristics by VA in osteoblastic MC3T3-E1 cells. Representative image of 3 replicates in 12-well plate. (A) Mineralized nodules by Von Kossa stain. Cells were cultured at 12-well plates for 3, 6, and 9 days with the 0~10 $\mu\text{g/mL}$ VA treatment. Extracellular matrix P deposits for matrix mineralization was measured using Von Kossa stain which binds with P. Magnification rate, $\times 100$. (B) Cells were cultured at 12-well plates for 3, 6, and 9 days with the 0~10 $\mu\text{g/mL}$ VA treatment. Magnification rate, $\times 100$. Representative image of 3 replicates in 12-well plate. (C) Extracellular matrix Ca deposits for matrix mineralization was measured using Alizarin red S dye which binds with Ca. Different letters above bars mean significantly different VA concentration as analyzed by one-way ANOVA, Tukey test ($P < 0.05$).

Fig. 3. Bone-related protein expression by VA treated in osteoblastic MC3T3-E1 cells for 3 days. Data presented as mean $\pm$ SEM (n=3). Different letters above bars mean significantly different VA concentration as analyzed by oneway ANOVA, Tukey test ($P < 0.05$).

침착을 통해 세포외기질의 무기질화를 촉진하여 조골세포의 분화에 관여한다(Seo 등, 2020). MC3T3-E1 세포에 VA를 처리한 후 3일차의 ALP 단백질 발현량은 모든 VA 처리군이 VA 무처리군보다 농도 의존적으로 증가하였으며, 특히 VA 1 µg/mL 처리군(1.95배)과 10 µg/mL 처리군(1.95배)에서 유의적인 증가를 나타내었다. 조골세포에서 세포외기질의 콜라겐 합성 및 축적 증가는 골기질과 조골세포 성숙을 자극하는 신호이므로(Seo 등, 2010) Pro COLI 단백질의 발현량을 확인하였고, VA 무처리군보다 VA 0.1 µg/mL 처리군(1.3배), 1 µg/mL 처리군(1.3배), 10 µg/mL 처리군(1.3배) 모두에서 Pro COLI 단백질의 발현량이 유의적으로 증가하였다.

BMP 2/4는 조골세포에 의해 합성되고 분비되어 ALP 활성과 OCN의 발현을 자극하는 것으로 보고되었다(Centrella 등, 1994; Cho와 Kwun, 2018c; Stein과 Lian, 1993). BMP는 type-I 또는 type-II 수용체와 결합하여 BMP-MAPK 신호 경로를 활성화하고, JNK 1과 2/3, ERK 1/2를 통해 신호를 핵으로 전달한다. 이 신호전달경로는 BMP에 의한 골 형성에 중요한 역할을 수행하며(Nohe 등, 2004), Gallea 등(2001)은 MAPK(Erk1/2)와 p38 신호경로가 C2C12 세포의 조골세포로의 분화 유도에 결정적인 역할을 한다고 보고하였다. 본 연구에서는 MC3T3-E1 조골세포의 골 형성 촉진을 위한 신호전달경로를 확인하기 위해 만형자에서 분

리 정제된 VA를 처리한 후 3일차의 BMP 2/4 단백질 발현량을 확인하였다(Fig. 4). VA 무처리군과 비교하여 모든 VA 처리군의 BMP 2/4 단백질 발현량이 증가하였고, 특히 VA 0.1 µg/mL 처리군(1.8배)과 1 µg/mL 처리군(1.8배)에서 유의적인 증가를 보였다. 또한, p-ERK 단백질 발현량도 BMP 2/4 단백질 발현 양상처럼 VA 무처리군보다 모든 VA 처리군이 증가하였으며, 특히 VA 0.1 µg/mL 처리군(1.3배)과 1 µg/mL 처리군(1.3배)에서 유의적인 증가를 나타내었다. 따라서 본 연구에서는 만형자에서 분리 정제된 VA가 조골세포의 골 형성 관련 단백질인 Runx2, OPN, ALP, Pro COLI의 발현량을 증가시켜 조골세포의 분화를 촉진하고 골 무기질 결절 형성 촉진에 기여하였을 것으로 사료된다. Xiao 등(2014)은 VA가 쥐 조골세포 유사 UMR-106 세포의 ALP 활성을 증가시켰고 MAPK/ERK 신호전달경로의 활성화를 확인하였다고 보고하였는데, 본 연구 결과에서도 VA 처리가 BMP-MAPK/ERK 신호경로를 활성화하여 조골세포 분화를 촉진한 것으로 보인다. 그러나 만형자의 유효 활성 성분인 VA가 골 형성과 관련하여 어떠한 기전으로 단백질의 발현을 조절하였는지에 대한 유전자 및 단백질 수준의 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

요 약

마편초과(Verbenaceae)에 속하는 순비기나무(*Vitex rotundifolia* L.)의 열매를 건조한 만형자(Viticis Fructus)는 오래전부터 감기, 두통, 편두통, 눈의 통증, 근육통 및 염증 치료를 위해 사용된 약용식물 자원이다. Vanillic acid(VA; 4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid)는 만형자의 생리활성 분획에서 분리된 주요 화합물 중 하나이며, vanillin의 산화형으로 항산화, 항염증 및 항암 활성 등의 약리학적 특성에 대한 연구가 진행되었지만, VA가 골 대사에 미치는 영향에 대한 연구는 거의 없는 실정이다. 본 연구에서는 조골세포 MC3T3-E1 세포의 분화 및 무기질화에 대한 VA의 잠재적인 항골다공증 특성을 조사하였다. MC3T3-E1 세포는 분화배지에 0, 0.1, 1, 10 µg/mL 농도의 VA를 처리하여 3일, 6일 및 9일 동안 배양되었고, ALP 활성도, Von Kossa 및 Alizarin Red 염색법 등에 의해 조골세포의 활성 변화를 분석하였다. 골 관련 단백질 발현량은 western blot에 의해 분석되었다. MC3T3-E1 세포에서 9일 동안 10 µg/mL 농도의 VA를 처리했을 때 ALP 활성이 유의적으로 증가하였다. Von Kossa와 Alizarin Red 염색 결과 VA 처리 후 3일, 6일 및 9일차의 무기질화된 결절이 유의적으로 증가하였다. 또한, VA는 조골세포 성장 및 분화와 관련된 Runx2, ALP, Pro COLI, BMP 2/4 및 p-ERK와 같은 단백질의 발현량을 유의적으로 증가시켰다. 본 연구 결과를 종합해볼 때 VA가 MC3T3-E1 조골세포에서 골 관련 단백질 발현량을 조절할 수 있음을 확인하였으며, 따라서 VA가 조골세포 분화 및 무기질화를 자극하여 항골다공증 효과를 발휘할 수 있을 것

Fig. 4. BMP 2/4 signaling proteins activation by VA treated in osteoblastic MC3T3-E1 cells for 3 days. Data presented as mean $\pm$ SEM (n=3). Different letters above bars mean significantly different VA concentration as analyzed by oneway ANOVA, Tukey test ($P<0.05$).

으로 사료된다.

감사의 글

본 논문은 안동대학교 기본연구지원 사업에 의하여 연구되었음.

REFERENCES

- Burnstone MS. Postcoupling, noncoupling, and fluorescence techniques for the demonstration of alkaline phosphatase. *J Natl Cancer Inst.* 1960. 24:1199-1217.
- Calixto-Campos C, Carvalho TT, Hohmann MSN, Pinho-Ribeiro FA, Fattori V, Manchope MF, et al. Vanillic acid inhibits inflammatory pain by inhibiting neutrophil recruitment, oxidative stress, cytokine production, and NF κ B activation in mice. *J Nat Prod.* 2015. 78:1799-1808.
- Centrella M, Horowitz MC, Wozney JM, McCarthy TL. Transforming growth factor- β gene family members and bone. *Endocr Rev.* 1994. 15:27-39.
- Chen X, Wang Z, Duan N, Zhu G, Schwarz EM, Xie C. Osteoblast-osteoclast interactions. *Connect Tissue Res.* 2018. 59:99-107.
- Cho YE, Alcantara E, Kumaran S, Son KH, Sohn HY, Lee JH, et al. Red yeast rice stimulates osteoblast proliferation and increases alkaline phosphatase activity in MC3T3-E1 cells. *Nutr Res.* 2010. 30:501-510.
- Cho YE, Kwun IS. Cellular zinc deficiency inhibits the mineralized nodule formation and downregulates bone-specific gene expression in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *J Nutr Health.* 2018a. 51:379-385.
- Cho YE, Kwun IS. *Glycyrrhiza uralensis* (licorice) extracts increase cell proliferation and bone marker enzyme alkaline phosphatase activity in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *J Nutr Health.* 2018b. 51:316-322.
- Cho YE, Kwun IS. Zinc upregulates bone-specific transcription factor Runx-2 expression via BMP-2 signaling and Smad-1 phosphorylation in osteoblasts. *J Nutr Health.* 2018c. 51:23-30.
- Choi EM, Suh KS, Kim YS, Choue RW, Koo SJ. Soybean ethanol extract increases the function of osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Phytochemistry.* 2001. 56:733-739.
- Choi YS, Son KH, Do JC. Triterpenoids from the roots of *Rubus parvifolius*. *Arch Pharm Res.* 1991. 14:225-230.
- Declercq HA, Verbeeck RMH, De Ridder LIFJM, Schacht EH, Cornelissen MJ. Calcification as an indicator of osteoinductive capacity of biomaterials in osteoblastic cell cultures. *Biomaterials.* 2005. 26:4964-4974.
- Gallea S, Lallemand F, Atfi A, Rawadi G, Ramez V, Spinella-Jaegle S, et al. Activation of mitogen-activated protein kinase cascades is involved in regulation of bone morphogenetic protein-2-induced osteoblast differentiation in pluripotent C2C12 cells. *Bone.* 2001. 28:491-498.
- Ganss B, Kim RH, Sodek J. Bone sialoprotein. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1999. 10:79-98.
- Hsu CL, Yen GC. Effects of flavonoids and phenolic acids on the inhibition of adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes. *J Agric Food Chem.* 2007. 55:8404-8410.
- Hu Y, Xin HL, Zhang QY, Zheng HC, Rahman K, Qin LP. Antinociceptive and anti-hyperprolactinemia activities of Fructus Vitis and its effective fractions and chemical constituents. *Phytomedicine.* 2007. 14:668-674.
- Jang SJ, Kim YH, Kim MK, Kim KW, Yun SE. Essential oil composition from leaves, flowers, stems, and fruits of *Vitex rotundifolia* L. fil. *J Korean Soc Agric Chem Biotechnol.* 2002. 45:101-107.
- Kanis JA, McCloskey EV, Johansson H, Cooper C, Rizzoli R, Reginster JY. European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women. *Osteoporos Int.* 2013. 24:23-57.
- Kim D. The effects of collagen and collagen-containing foods on bone metabolism. Master's thesis. Sookmyung Women's University, Seoul, Korea. 2014.
- Kim E. The effect of Carthami semen on osteoclastogenesis. Master's thesis. Kyung Hee University, Seoul, Korea. 2011.
- Kim KY, Lee CS, Lee SH, Lee JD, Kim GS. Primary culture of osteoblast. *J Korean Orthop Assoc.* 1991. 26:1860-1863.
- Kim M, Kim B, Kim JD, Kang AR, Lee CE, Seo J, et al. The effects of medicinal herbs extracts on estrogen-like activities and osteoblast proliferation and differentiation. *J Life Sci.* 2017. 27:456-463.
- Kim NJ, Ryoo HM, Kim HJ, Kim YJ, Nam SH. The effect of BMP regulated SMAD protein on alkaline phosphatase gene expression. *J Korean Acad Pediatr Dent.* 2001. 28:238-246.
- Kim S, Jeon MJ, Cheon J, Lee SH, Kong C, Kim YY, et al. Effects of *Eisenia bicyclis* extracts on the proliferation and activity of osteoblasts and osteoclasts. *J Life Sci.* 2014. 24:297-303.
- Komori T. Regulation of osteoblast differentiation by transcription factors. *J Cell Biochem.* 2006. 99:1233-1239.
- Kondo Y, Sugiyama K, Nozoe S. Studies on the constituents of *Vitex rotundifolia* L. fil. *Chem Pharm Bull.* 1986. 34:4829-4832.
- Kouno I, Inoue M, Onizuka Y, Fujisaki T, Kawano N. Iridoid and phenolic glucoside from *Vitex rotundifolia*. *Phytochemistry.* 1988. 27:611-612.
- Law YY, Chiu HF, Lee HH, Shen YC, Venkatakrishnan K, Wang CK. Consumption of onion juice modulates oxidative stress and attenuates the risk of bone disorders in middle-aged and post-menopausal healthy subjects. *Food Funct.* 2016. 7:902-912.
- Lee C, Lee JW, Jin Q, Lee HJ, Lee SJ, Lee D, et al. Anti-inflammatory constituents from the fruits of *Vitex rotundifolia*. *Bioorg Med Chem Lett.* 2013. 23:6010-6014.
- Lee YS. Effect of isoflavones on proliferation and oxidative stress of MC3T3-E1 osteoblast-like cells. *Korea Soybean Digest.* 2001. 18:35-42.
- Liu X, Zhang R, Zhou Y, Yang Y, Si H, Li X, et al. The effect of *Astragalus* extractive on alveolar bone rebuilding progress of tooth extracted socket of ovariectomized rats. *Afr J Tradit Complement Altern Med.* 2014. 11:91-98.
- Matsuoka K, Park K, Ito M, Ikeda K, Takeshita S. Osteoclast-derived complement component 3a stimulates osteoblast differentiation. *J Bone Miner Res.* 2014. 29:1522-1530.
- Min HY. Mechanism of osteoblast differentiation by biological rhythm regulatory gene. Master's thesis. Daegu University, Gyeongbuk, Korea. 2015.
- Mori S. Aging and homeostasis. Aging of bone. *Clin Calcium.* 2017. 27:917-923.
- Nohe A, Keating E, Knaus P, Petersen NO. Signal transduction of bone morphogenetic protein receptors. *Cell Signal.* 2004. 16:291-299.
- Sang C, Zhang J, Zhang Y, Chen F, Cao X, Guo L. TNF- α promotes osteoclastogenesis through JNK signaling-dependent induction of Semaphorin3D expression in estrogen-deficiency induced osteoporosis. *J Cell Physiol.* 2017. 232:3396-3408.

- Seo HJ, Cho YE, Kim T, Shin HI, Kwun IS. Zinc may increase bone formation through stimulating cell proliferation, alkaline phosphatase activity and collagen synthesis in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Nutr Res Pract*. 2010. 4:356-361.
- Seo HJ, Eo HJ, Kim HJ, Jeon KS, Park GH, Hong SC, et al. Effects of cultivated wild *Panax ginseng* extract on the proliferation, differentiation and mineralization of osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Korean J Plant Res*. 2020. 33:227-236.
- Shin HS, Lee KJ, Yi TH. Effect of *Vitex rotundifolia* on hair regeneration: *in vitro* and *in vivo* study. *J Invest Cosmetol*. 2009. 5:1-5.
- Sindhu G, Nishanthi E, Sharmila R. Nephroprotective effect of vanillic acid against cisplatin induced nephrotoxicity in wistar rats: a biochemical and molecular study. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2015. 39:392-404.
- Sinha AK, Sharma UK, Sharma N. A comprehensive review on vanilla flavor: extraction, isolation and quantification of vanillin and others constituents. *Int J Food Sci Nutr*. 2008. 59:299-326.
- Sohn SH, Ko E, Oh BG, Kim SH, Kim Y, Shin M, et al. Inhibition effects of *Vitex rotundifolia* on inflammatory gene expression in A549 human epithelial cells. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2009. 103:152-159.
- Song L. Calcium and bone metabolism indices. *Adv Clin Chem*. 2017. 82:1-46.
- Stein GS, Lian JB. Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation interrelationship during progressive development of the osteoblastic phenotype. *Endocr Rev*. 1993. 14: 424-442.
- Tognarini I, Sorace S, Zonefrati R, Galli G, Gozzini A, Carbonell Sala S, et al. *In vitro* differentiation of human mesenchymal stem cells on Ti6Al4V surfaces. *Biomaterials*. 2008. 29:809-824.
- Xiao HH, Gao QG, Zhang Y, Wong KC, Dai Y, Yao XS, et al. Vanillic acid exerts oestrogen-like activities in osteoblast-like UMR 106 cells through MAP kinase (MEK/ERK)-mediated ER signaling pathway. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2014. 144:382-391.
- Yeon KJ, Jung HA, Roh SS. The effects of *Vitex rotundifolia* Linne fil. extract on the inflammatory and allergic reactions. *Journal of Haehwa Medicine*. 2013. 22:145-170.
- Yoshioka T, Inokuchi T, Fujioka S, Kimura Y. Phenolic compounds and flavonoids as plant growth regulators from fruit and leaf of *Vitex rotundifolia*. *Z Naturforsch C J Biosci*. 2004. 59:509-514.