

大気圧窒素プラズマ刺激は **osterix, osteocalcin** と **ALP**  
発現増加および **iNOS** と **COX-2** 発現低下に  
よって骨芽細胞の分化を促進する

日本大学大学院歯学研究科歯学専攻

佐藤 諒 一

(指導：納村泰弘専任講師，田邊奈津子准教授，

鈴木直人教授，本吉満教授)

## 目 次

概要	.....	2
緒言	.....	3
材料および方法	.....	5
成績	.....	8
考察	.....	10
結論	.....	14
謝辞	.....	15
文献	.....	16
表および図	.....	20

なお、本論文は *Journal of Hard Tissue Biology* に掲載予定の論文（Ryoichi Sato, Yasuhiro Namura, Natsuko Tanabe, Mayu Sakai, Akihisa Utsu, Keiko Tomita, Naoto Suzuki and Mitsuru Motoyoshi. Atmospheric-pressure plasma treatment with nitrogen induces osteoblast differentiation and reduces iNOS and COX-2 expressions, in press）を基幹論文とし、窒素ガスを用いた大気圧プラズマ照射後の細胞培養培地の pH 測定結果を新たな実験データとして加えて総括したものである。

## 概 要

大気圧プラズマジェット (atmospheric pressure plasma jet; APPJ) は医療機器の滅菌, 癌細胞への特異的な細胞増殖抑制および創傷治癒など医療用として広く利用されている。特に, 低温 APPJ は, 被照射体が熱によるダメージを受けることなく, 生体への使用が可能であることから, 新しい医療器具として期待されている。APPJ は様々な気体を使用することが可能で, 細胞への APPJ 照射の影響は, 使用される気体の種類によって異なっている。しかし, 窒素ガスを用いた APPJ (N-APPJ) 照射が骨芽細胞分化に及ぼす影響についての詳細なメカニズムは不明である。そこで, N-APPJ 照射が骨芽細胞の分化に及ぼす影響を細胞生物学的に検討することを目的として, 本研究を企図した。具体的には, マウス骨芽細胞様細胞 (MC3T3-E1 細胞) の alkaline phosphatase (ALP) 活性, 骨芽細胞分化促進関連転写因子として runt-related transcription factor 2 および osterix, 細胞外マトリックスタンパクとして type I collagen および osteocalcin (OCN), 加えて inducible nitric oxide synthase (iNOS) および cyclooxygenase-2 (COX-2) の遺伝子およびタンパク発現を調べた。N-APPJ 照射を受けた培地は, MC3T3-E1 細胞の osterix, OCN と ALP の発現を促進し, また, ALP 活性を増加させる一方で, iNOS と COX-2 の発現を抑制した。これらの結果は, 培養培地への N-APPJ 照射が, MC3T3-E1 細胞の骨芽細胞への分化を促進させることを示唆している。

## 緒 言

プラズマは、狭義では、部分的あるいは完全に電離しイオン化した気体であり、物理的特性が通常の気体とは異なり、固体、液体、気体に次ぐ第 4 の状態として定義されている<sup>1)</sup>。プラズマの性質は、圧力、温度、密度、純度やガス種などの条件によって異なる。酸素や窒素のような非貴ガスのプラズマは、弱い紫外線や活性酸素など多くの反応種を発生することが知られ<sup>2)</sup>、被照射体への生理活性効果が期待される。

生体へのプラズマ適用について、Lackmann ら<sup>1)</sup>は、大気圧プラズマジェット (APPJ) 照射による細菌不活性化が、DNA、タンパク質、細胞膜および細胞壁などへの複合的影響によると報告している。また、Kaneko ら<sup>3)</sup>は、低温大気圧プラズマによって生成された水酸化物イオンの細胞膜透過性向上が生じると報告している。さらに大気圧プラズマは、c-Jun N 末端キナーゼ (JNK) と p38 キナーゼが関与するシグナル伝達経路を介して生成される活性酸素/窒素種 (ROS / RNS) が、ミトコンドリアの摂動を促進することで癌細胞のアポトーシスを引き起こすともされる<sup>4)</sup>。これらの報告は、大気圧プラズマによって直接的に生成された ROS / RNS の毒性によってアポトーシスが誘発され細胞死をもたらすことを示唆しているもので、大気圧プラズマの間接的な影響を調べたものではない。大気圧プラズマでは、設定条件や使用するガス種によって生じるプラズマの性質が異なる。このため、非貴ガスによるプラズマが細胞分化や機能亢進などに働く可能性も考えられるが、骨芽細胞に対しての生物学的有効性に関する研究は少ない。

骨代謝および骨リモデリングは、骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収が動的平衡を保つことで維持されている。骨芽細胞は、細胞分化を促進させる様々な転写因子や石灰化物形成に関与する細胞外マトリックスタンパク

(extracellular matrix proteins; ECMPs) を産生することで骨形成を調節している。骨芽細胞分化の主要な転写因子である runt-related transcription factor 2 (Runx2) とその下流の転写因子 osterix は、骨芽細胞による骨形成で重要な役割を担っており<sup>5)</sup>、さらに osteocalcin (OCN) は骨芽細胞分化後期の石灰化物形成開始後に産生される ECMP である。そこで、本研究は窒素ガスを用いた APPJ (N-APPJ) が、骨芽細胞分化に及ぼす影響を検討した。具体的には N-APPJ を照射した細胞培養培地でマウス骨芽細胞様細胞 (MC3T3-E1 細胞) を刺激し、骨芽細胞分化に関与する転写因子、石灰化物形成に関与する ECMPs と alkaline phosphatase (ALP) の遺伝子発現、タンパク発現および活性を調べた。加えて ROS / RNS への影響を調べるために N-APPJ 照射した細胞培養培地が inducible nitric oxide synthase (iNOS) と cyclooxygenase-2 (COX-2) の遺伝子およびタンパク発現と ALP 活性に及ぼす影響について調べた。

## 材料および方法

### 1. N-APPJ 照射と照射後の細胞培養培地の pH 測定

細胞培養培地 20 mL に大気圧窒素プラズマとして N-APPJ (outflow 6 L/ min; Damage-Free-Multi-Gas Plasma Jet, PCT-DFJM-02; Plasma Concept Tokyo) を 0, 60, 120 および 180 秒照射し, 培地を bubbling させた (Fig. 1)。なお, 照射の距離は培地の表面から約 5-10 mm 以内で照射され, 非照射群は照射を行わなかった細胞培養培地を使用した。細胞培養培地の pH の測定は N-APPJ 照射後 0, 5, 10, 15, 30, 60 および 180 分で, pH メーター (pHasion; Model C-73, AS ONE Co.) を用いて調べた。

### 2. 細胞培養

MC3T3-E1 細胞の培養は先行研究に準じて行った<sup>6)</sup>。すなわち, 細胞を 96 穴または 6 穴プレートに  $2.0 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> の密度で播種し, 10% ウシ胎児血清 (FBS; Hyclone), 1% ペニシリン/ストレプトマイシン/アンホテリシン B (富士フィルム和光純薬) を添加した alpha modified Eagle's medium ( $\alpha$ -MEM) を培地として用い, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 存在下で 24 時間培養し, 細胞の生着を確認した後, APPJ 照射培地の存在または非存在下で 1, 3, 5, 7, 10 および 14 日間培養した。なお, APPJ 照射培地の交換は 3 日毎に行った。

### 3. 細胞増殖と ALP 活性

MC3T3-E1 細胞を 96 穴プレートに  $2.0 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> の密度で播種し, N-APPJ を 0, 60, 120 および 180 秒照射した細胞培養培地で 1, 3, 5, 7, 10 および 14 日間培養したものを用いた。細胞数は cell-counting kit-8 (同仁化学) を用いて調べた。ALP 活性は, *p*-ニトロフェニルリン酸を基質として酵素反応の結果生じる *p*-ニ

トロフェノール量を測定して調べた<sup>7)</sup>。

#### 4. Real-time polymerase chain reaction (real-time PCR)

N-APPJ 照射をした培地で刺激した細胞から RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて全 RNA を抽出し、分光光度計 NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific) で RNA 濃度を測定した。Prime Script RT Master Mix (Takara Bio) を用いて 500 ng/mL の RNA から complementary DNA (cDNA) を作成し、SYBR Green I による real-time PCR を行った。すなわち、cDNA 溶液 2  $\mu$ L と Table 1 に示すプライマーを含む SYBR Premix Taq (Takara Bio) 溶液 23  $\mu$ L で、Thermal Cycler Dice Real-Time System (Takara Bio) を用いて PCR 反応した。反応は、95°C で 5 秒間および 60°C で 30 秒からなるサイクルを 35 回繰り返した。PCR 産物の特異性は融解曲線分析を Thermal Cycler Dice Real-Time System のソフトウェアで分析・確認した。その結果から  $2\Delta\Delta C_t$  法で遺伝子の増幅量を求め、ハウスキーピング遺伝子である  $\beta$ -actin の増幅量で補正した値を遺伝子発現量とした。

#### 5. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) および Western Blotting

細胞溶解液の総タンパク量 40-80  $\mu$ g 相当量を SDS-PAGE の試料とした。SDS-PAGE は 10%ポリアクリルアミドゲルを用いて行い、電気泳動後、ゲル上のタンパクを PVDF 膜に転写した。

Western Blotting において、1 次抗体として Runx2, osterix, type I collagen (ColI), OCN, iNOS, COX-2 および  $\beta$ -actin 抗体 (Santa Cruz Biotechnology), また 2 次抗体としてビオチン標識のウサギまたはマウス抗体 (Santa Cruz Biotechnology) を用いた。さらに、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン溶液を加えた後 ECL prime reagents (GE Healthcare) で発光反応を行い、Chemidoc

XRS (Bio-Rad) で PVDF 膜を撮影し、それぞれのタンパク発現を調べた。バンドで示される発現の強さは Image J ソフトウェアで数値化した。なお、それぞれのタンパク発現量は、 $\beta$ -actin のタンパク発現量を内部標準として補正した値を使用した。

## 6. 統計学的分析

すべての実験の結果は平均値と標準偏差で表した。統計処理は、結果の正規性は Shapiro-Wilk の正規性検定、等分散は F 検定または Bartlett 検定で確認した後、t 検定、一元配置分散分析後 Tukey の多重比較、またはノンパラメトリック検定としてボンフェローニ補正した Mann-Whitney U 検定を行い、危険率 5%未満を統計学的有意差とした。これらの統計学的分析は EZR ソフトウェアを用いた (EZR 1.23; Jichi Medical University Saitama Medical Center)。



## 成 績

### 1. N-APPJ 照射が MC3T3-E1 細胞の細胞増殖, ALP 活性および培養培地の pH に及ぼす影響

MC3T3-E1 細胞の増殖は, 14 日間の培養期間において, 培養培地への APPJ 照射の有無による差異は認められなかった (Fig. 2a)。ALP 活性は, 照射群および非照射群いずれの条件においても培養 14 日目まで経日的に上昇した。また, 120 秒の照射群は, 培養 14 日目において非照射群と比較して有意に上昇した (Fig. 2b)。次に, APPJ 照射培地による ALP 活性上昇に細胞培養培地の pH 変化が影響している可能性が考えられたため, N-APPJ 照射後に APPJ 照射培地の pH を調べた。その結果, APPJ 照射培地は, 照射後 60 分まで照射時間依存的に pH の上昇を認めた。60, 120 および 180 秒の照射群では, 照射後 5 分において, 非照射群と比較して有意な pH の上昇が認められた。さらに, 120 および 180 秒の照射群は, 照射後 5, 10, 15 および 30 分で非照射群と比較して, pH の有意な上昇が認められた (Fig. 2c)。そこで, ALP 活性への影響が大きかった 120 秒の照射を行った細胞培養培地を, 以後の実験で用いた。

### 2. N-APPJ 照射が MC3T3-E1 細胞の骨芽細胞分化促進関連転写因子および細胞外マトリックスタンパク発現に及ぼす影響

照射群は非照射群と比較して, MC3T3-E1 細胞の骨芽細胞分化促進関連転写因子 *osterix* の遺伝子およびタンパク発現を, 培養 7 日目に有意に増加させた (Fig. 3a, e)。一方, *Runx2* の遺伝子発現には照射培地による影響は認められなかった (Fig. 3b)。

次に, 照射培地が MC3T3-E1 細胞の細胞外マトリックスタンパク発現に及ぼす影響を調べた結果, 照射群は非照射群と比較して, 培養 14 日目の OCN の遺

伝子およびタンパク発現は有意に増加した (Fig. 3c, f)。一方, ColII の発現には, 照射培地による影響は認められなかった (Fig. 3d)。

### **3. N-APPJ 照射が MC3T3-E1 細胞の ALP, iNOS および COX-2 発現に及ぼす影響**

照射群は非照射群と比較して, MC3T3-E1 細胞の ALP の遺伝子およびタンパク発現を培養 7 日目に有意に増加させた (Fig. 4a, d)。一方, iNOS と COX-2 の遺伝子およびタンパク発現は, 照射群においては, 非照射群と比較して, 培養 14 日目に有意に減少した (Fig. 4b, c, e, f)。

## 考 察

大気圧プラズマは、物理、工学および産業など様々な分野で利用されており、特に医療分野ではアルゴンを用いた大気圧プラズマが、ポリープ除去や開腹手術での止血のために利用されている<sup>1)</sup>。こうした背景のもと、その発生装置である APPJ は、医療分野での臨床的使用のために多様な開発が行われ、試用されている。本研究では、臨床への適用を目的の一つとして、APPJ を用いて直接被照射体である骨芽細胞へ照射するのではなく、N-APPJ を用いて窒素による大気圧プラズマを細胞培養培地に照射し、骨芽細胞への N-APPJ の間接的な効果を調べた。本研究と同様に、APPJ を液体に照射して細胞へ刺激した間接的 APPJ 照射は、APPJ 照射において生成される活性酸素などの反応種が、細胞膜透過性を有することで活性反応種の作用が期待できると報告している<sup>3)</sup>。Canal ら<sup>10)</sup>は、細胞培養溶液へのヘリウムガスを用いた大気圧プラズマ刺激はヒト骨肉腫細胞株 (Saos-2) のアポトーシスを誘導するが、ヒト骨芽細胞にはアポトーシスが認められなかったと報告している。また、大気圧プラズマや、それによってポリ乳酸やシリカなどのナノ粒子をコーティングしたチタン合金やポリプララクトンフィルムは、線維芽細胞や骨芽細胞の細胞接着を促進することが示されている<sup>11,12)</sup>。大気圧プラズマの骨芽細胞分化への影響を調べた研究は、Tominami ら<sup>13)</sup>が、ヘリウムガスを用いた直接的 APPJ 照射が、照射時間依存的に過酸化水素を増加させることで骨芽細胞分化を促進させると報告している。さらに、Han と Choi<sup>14)</sup>は、窒素ガスを用いた直接的 APPJ 照射は骨芽細胞の骨形成を促進することを報告している。しかしながら、APPJ 照射を行った細胞培養培地による間接的的刺激が骨芽細胞分化および ROS/RNS に及ぼす影響を調べた報告はない。そこで、本研究は細胞培養培地への N-APPJ 照射が MC3T3-E1 細胞の分化および iNOS と COX-2 発現に及ぼす影響を検討した。

Runx2 は未分化間葉細胞から骨芽細胞への分化を誘導し、さらに骨芽細胞による骨化を誘導するマスター転写因子であり、osterix もまた Runx2 の下流で作用する C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>型 zinc フィンガーを含む骨芽細胞分化に関与する転写因子である<sup>5)</sup>。本研究では、APPJ 照射培地は osterix の遺伝子およびタンパク発現を上昇させた (Fig. 3a, e)。このことは、APPJ 照射培地が、osterix の発現を増加させることで骨芽細胞の分化を促進する可能性を示唆した。

そこで、次に APPJ 照射培地が ECMPs 及ぼす影響を調べた。OCN は、骨に含まれる非コラーゲン性タンパクの約 15%を占め、 $\gamma$ -カルボキシグルタミン酸残基を持つ低分子量のタンパクである。OCN は石灰化を抑制する作用を有し、石灰化物形成開始後の骨芽細胞分化後期に発現する<sup>15)</sup>。本研究で、APPJ 照射培地は MC3T3-E1 細胞の培養後期に OCN の遺伝子およびタンパク発現を上昇させた (Fig. 3c, f)。骨芽細胞の石灰化物形成は、はじめに骨芽細胞に由来する基質小胞中でヒドロキシアパタイトの結晶が形成され、その後コラーゲン線維間にも沈着が開始することによって生じる。さらに、骨芽細胞が発現・分泌する非コラーゲン性タンパクは、石灰化物形成において、ヒドロキシアパタイト結晶形成やその成長を調節する重要な働きを担っている<sup>16)</sup>。一方で、ピロリン酸は、ヒドロキシアパタイトの成長を阻害する<sup>17)</sup>。骨芽細胞においての高い ALP 活性は、石灰化に必要な局所におけるリン酸濃度の上昇と、ピロリン酸の分解を介して骨芽細胞の石灰化を上昇させる<sup>17)</sup>。さらに、Gerstenfeld ら<sup>18)</sup>は、石灰化開始時期に高い ALP 活性を維持することが骨芽細胞の石灰化において重要であること示している。本研究では、APPJ 照射培地は MC3T3-E1 細胞の ALP 活性の上昇だけでなく、ALP の遺伝子およびタンパク発現を上昇させた (Fig. 2b, 4a, d)。さらに、ALP はアルカリ性下で有機リン酸エステル化合物を加水分解する酵素であり、至適 pH はアルカリ性であることから、APPJ 照射培地の pH を測定し

た結果、照射時間依存的に、照射後 0 分を上昇のピークとして 180 分まで pH が上昇した (Fig. 2c)。したがって、APPJ 照射培地の pH 上昇が、MC3T3-E1 細胞の ALP 活性上昇に関与することが考えられる。

直接的な APPJ 照射が、様々な細胞で ROS/RNS を介して、細胞死またはアポトーシスを引き起こすことが過去の研究で示されている<sup>2,4)</sup>。nitric oxide synthase は短命種のフリーラジカルである nitric oxide を生成する<sup>19,20)</sup>。細胞の内毒素または interleukin-1 (IL-1), tumor necrosis factor および interferon- $\gamma$  などの炎症性サイトカインは、種々の細胞で iNOS 発現を促進すると報告されている<sup>21)</sup>。これらの報告より、N-APPJ 照射が、MC3T3-E1 細胞の ROS/RNS の発現に影響を及ぼすのではないかと考え、APPJ 照射培地で MC3T3-E1 細胞の iNOS の遺伝子およびタンパク発現を調べた結果、APPJ 照射培地は、MC3T3-E1 細胞の iNOS 発現を低下させた (Fig. 4c, f)。骨芽細胞を含む様々な細胞の iNOS 発現上昇は prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) 産生と PGE<sub>2</sub> 合成酵素 COX-2 を誘導することが報告されている<sup>22-26)</sup>。PGE<sub>2</sub> は、ほとんどすべての細胞が産生するエイコサノイドファミリーに属している脂質メディエーターである。また、PGE<sub>2</sub> は外傷、刺激およびシグナル伝達因子に反応し、細胞膜のアラキドン酸から PGE<sub>2</sub> 合成酵素 cyclooxygenase を介して生成される<sup>27)</sup>。そこで本研究は、N-APPJ 照射が COX-2 の遺伝子およびタンパク発現に及ぼす影響を調べた。その結果、APPJ 照射培地は MC3T3-E1 細胞の COX-2 遺伝子およびタンパク発現を低下させた (Fig. 4c, f)。Tanabe ら<sup>7, 28)</sup>は、IL-1 $\alpha$  がラットの骨肉腫由来細胞株で ROS 17/2.8 細胞の ALP 活性の低下および石灰化物形成を抑制し、PGE<sub>2</sub> 発現を上昇させることを報告した。また、タツノオトシゴから生成された抗炎症ペプチドが、12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate で誘導された iNOS および COX-2 発現の上昇を抑制し、ヒト骨芽細胞の分化と ALP 活性を上昇させたと報告されている<sup>29)</sup>。

これらのことから、APPJ 照射培地刺激による iNOS および COX-2 発現低下は、骨芽細胞の分化を促進することが考えられた。加えて、大気圧プラズマの直接照射が細胞に及ぼす影響を調べた過去の研究では、アポトーシスなどの細胞死を誘導すると報告されている<sup>4,10)</sup>。しかしながら、N-APPJ の間接照射を行った本研究では細胞増殖に影響は認められなかった (Fig. 2a)。加えて、これらの相違については、APPJ の照射時間やガス種が異なっていることも細胞増殖に影響していると考えられた。

## 結 論

本研究では、窒素ガスを用いた APPJ を照射した APPJ 照射培地で MC3T3-E1 細胞を刺激し、その影響を検討した。その結果以下のことが示された。

1. APPJ 照射培地は MC3T3-E1 細胞の増殖には影響を示さなかった。
2. APPJ 照射培地は MC3T3-E1 細胞の ALP 遺伝子発現および活性を上昇させた。
3. APPJ 照射培地は MC3T3-E1 細胞の osterix の遺伝子およびタンパク発現を上昇させた一方、Runx2 の発現には影響を示さなかった。
4. APPJ 照射培地は MC3T3-E1 細胞の OCN の遺伝子およびタンパク発現を上昇させた一方、ColI 発現には影響を示さなかった。
5. APPJ 照射培地は MC3T3-E1 細胞の iNOS および COX-2 の遺伝子およびタンパク発現を低下させた。

以上の結果から、N-APPJ 照射が osterix, OCN, および ALP 発現と ALP 活性を促進する一方で、iNOS および COX-2 発現を抑制することが示唆された。

これらの知見は、APPJ 照射培地が骨芽細胞の分化を促進することで、骨形成促進作用に応用できる可能性を示唆した。

## 謝 辞

稿を終えるに、本研究遂行にあたり、格別たるご指導ご鞭撻を賜りました日本大学歯学部矯正学講座の本吉満教授，生化学講座教授の鈴木直人教授に謹んで心より感謝申し上げます。

また、本研究を通じ多大なるご協力とご助言を賜りました本学部生化学講座の田邊奈津子准教授，矯正学講座の納村泰弘専任講師，日本大学理工学部の浅井朋彦教授，本学部解剖学第一講座の藤原恭子准教授を始め，矯正学講座および生化学講座の皆様に深く感謝致します。



## 文 献

1. Lackmann JW and Bandow JE. Inactivation of microbes and macromolecules by atmospheric-pressure plasma jets, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98: 6205-6213, 2014
2. Liebmann J, Scherer J, Bibinov N, Rajasekaran P, Kovacs R, Gesche R, Awakowicz P, Kolb-Bachofen V. Biological effects of nitric oxide generated by an atmospheric pressure gas-plasma on human skin cells. *Nitric Oxide. Chem.* 24: 8-16, 2011
3. Kaneko T, Sasaki S, Takashima K, Kanzaki M. Gas-liquid interfacial plasmas producing reactive species for cell membrane permeabilization. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 60: 3-11, 2017
4. Ahn HJ, Kim KI, Hoan NN, Kim CH, Moon E, Choi KS, Yang SS, Lee JS. Targeting cancer cells with reactive oxygen and nitrogen species generated by atmospheric-pressure air plasma. *PLoS One.* 9: e86173, 2014
5. Long F. Building strong bones: Molecular regulation of the osteoblast lineage, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13: 27-38, 2012
6. Kariya T, Tanabe N, Shionome C, Manaka S, Kawato T, Zhao N, Maeno M, Suzuki N, Shimizu N. Tension force-induced ATP promotes osteogenesis through P2X7 receptor in osteoblasts. *J. Cell. Biochem.* 116: 12-21, 2015
7. Tanabe N, Ito-Kato E, Suzuki N, Nakayama A, Ogiso B, Maeno M, Ito K. IL-1 $\alpha$  affects mineralized nodule formation by rat osteoblasts. *Life Sci.* 75: 2317-2327, 2004
8. Torigoe G, Nagao M, Tanabe N, Manaka S, Kariya T, Kawato T, Sekino J, Kato S, Maeno M, Suzuki N, Shimizu N. PYK2 mediates BzATP-induced extracellular matrix proteins synthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 494: 663-667, 2017

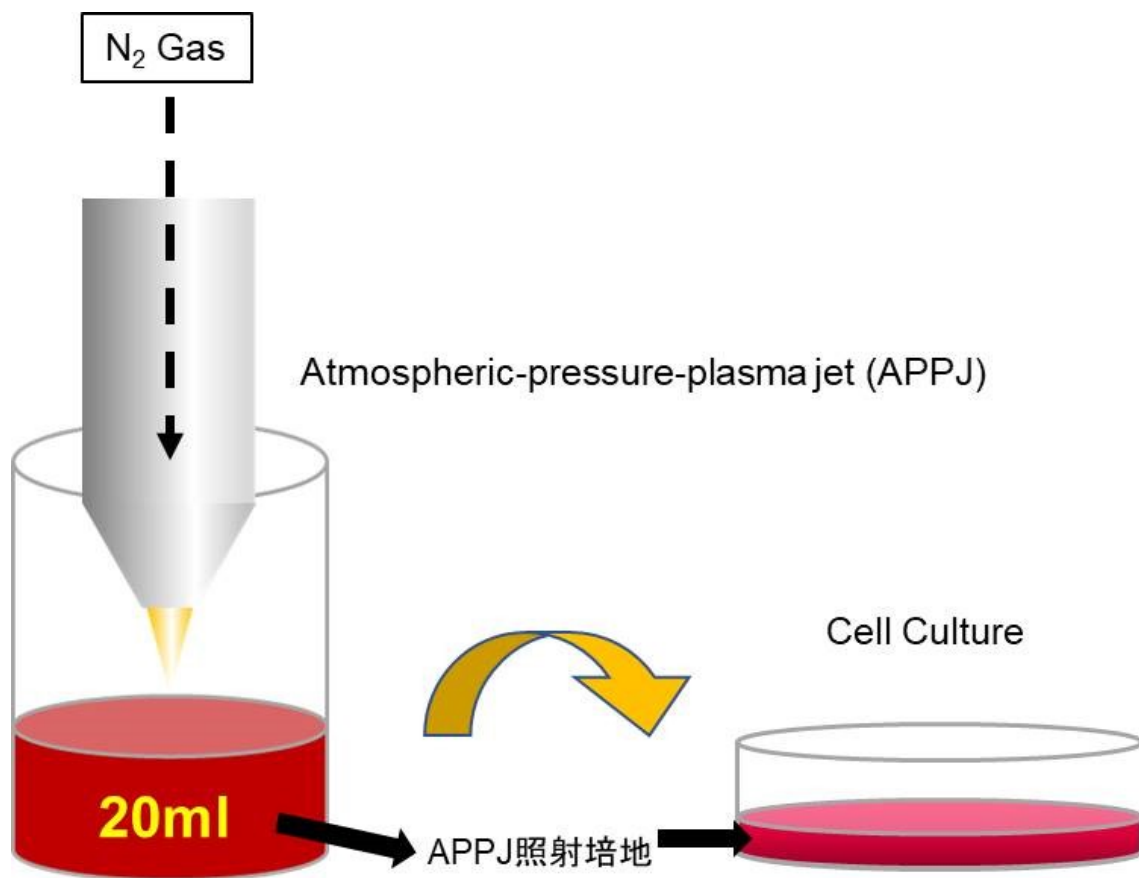
9. Kanda Y, Investigation of the freely available easy-to-use software “EZR” for medical statistics. *Bone Marrow Transplant.* 48: 452-458, 2013
10. Canal C, Fontelo R, Hamouda I, Guillem-Marti J, Cvelbar U, Ginebra MP. Plasma-induced selectivity in bone cancer cells death. *Free Radic. Biol. Med.* 110: 72-78, 2017
11. Lee JH and Kim KN. Effects of a nonthermal atmospheric pressure plasma jet on human gingival fibroblasts for biomedical application. *Biomed Res. Int.* 2016: 2876916, 2016
12. Patelli A, Mussano F, Brun P, Genova T, Ambrosi, E Michieli N, Mattei G, Scopece P, Moroni L. Nanoroughness, surface chemistry, and drug delivery control by atmospheric plasma jet on implantable devices. *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 10: 39512-39523, 2018
13. Tominami K, Kanetaka H, Sasaki S, Mokudai T, Kaneko T, Niwano Y. Cold atmospheric plasma enhances osteoblast differentiation. *PLoS One.* 12: e0180507, 2017
14. Han I and Choi EH. The role of non-thermal atmospheric pressure biocompatible plasma in the differentiation of osteoblastic precursor cells, MC3T3-E1. *Oncotarget.* 8: 36399-36409, 2017
15. Wolf G. Function of the bone protein osteocalcin: definitive evidence. *Nutr. Rev.* 54: 332-333, 2009
16. Boskey AL. Mineral-matrix interactions in bone and cartilage. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 281: 244-274, 1992
17. Orimo H. The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease. *J. Nippon Med. Sch.* 77: 4-12, 2010

18. Gerstenfeld LC, Chipman SD, Glowacki J, Lian JB. Expression of differentiated function by mineralizing cultures of chicken osteoblasts. *Dev. Biol.* 122: 49-60, 1987
19. Epstein FH, Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N. Engl. J. Med.* 329: 2002-2012, 1993
20. Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* 6: 3051-3064, 1992
21. Zhang X, Laubach VE, Alley EW, Edwards KA, Sherman PA, Russell SW, Murphy WJ. Transcriptional basis for hyporesponsiveness of the human inducible nitric oxide synthase gene to lipopolysaccharide/interferon- $\gamma$ . *J. Leukoc. Biol.* 59: 575-585, 1996
22. Surh YJ, Chun KS, Cha HH, Han SS, Keum YS, Park KK, Lee SS. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: Down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF- $\kappa$ B activation. *Mutat Res.* 480-481: 243-268, 2001
23. Murakami A and Ohigashi H. Targeting NOX, INOS and COX-2 in inflammatory cells: Chemoprevention using food phytochemicals. *Int. J. Cancer.* 121: 2357-2363, 2007
24. Chen YC, Sosnoski DM, Gandhi UH, Novinger LJ, Prabhu KS, Mastro AM. Selenium modifies the osteoblast inflammatory stress response to bone metastatic breast cancer. *Carcinogenesis.* 30: 1941-1948, 2009
25. Kim TG, Lee YH, Bhattari G, Lee NH, Lee KW, Yi HK, Yu MK. PPAR $\gamma$  inhibits inflammation and RANKL expression in epoxy resin-based sealer-induced osteoblast precursor cells E1 cells. *Arch. Oral Biol.* 58: 28-34, 2013

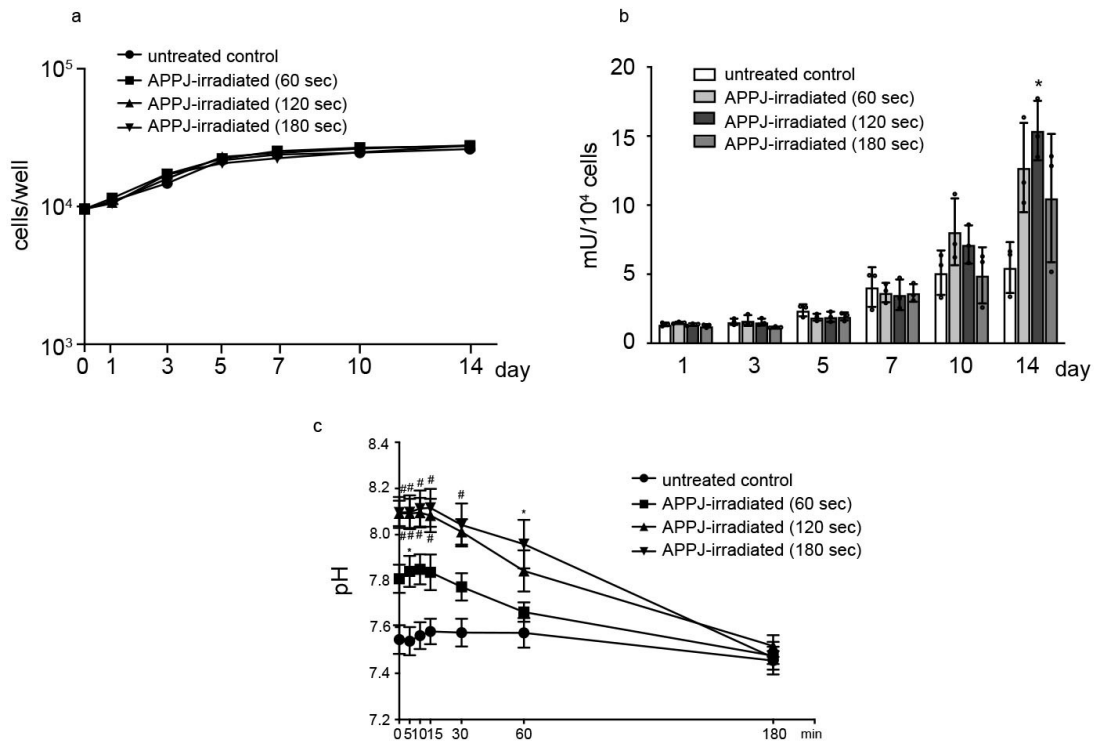
26. Zhang Z, Lv G, Du L. Avicularin reduces the expression of mediators of inflammation and oxidative stress in bradykinin-treated MG-63 human osteoblastic osteosarcoma cells. *Med. Sci. Monit.* 26: e921957, 2020
27. Funk CD. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science* 294: 1871-1875, 2001
28. Tanabe N, Maeno M, Suzuki N, Fujisaki K, Tanaka H, Ogiso B, Ito K. IL-1 $\alpha$  stimulates the formation of osteoclast-like cells by increasing M-CSF and PGE2 production and decreasing OPG production by osteoblasts. *Life Sci.* 77: 615-626, 2005
29. Ryu B, Qian Z-J, Kim S-K. Purification of a peptide from seahorse, that inhibits TPA-induced MMP, iNOS and COX-2 expression through MAPK and NF- $\kappa$ B activation, and induces human osteoblastic and chondrocytic differentiation. *Chem. Biol. Interact.* 184: 413-422, 2010

**Table 1. PCR primers used in the experiments**

<b>Target</b>	<b>Primers</b>
Runx2	5'-CACTCTGGCTTTGGGAAGAG-3' 5'-GCAGTTCCCAAGCATTTCAT-3'
Osterix	5'-GGTAGGCGTCCCCCATGGTTT-3' 5'-AGACGGGACAGCCAACCCTAG-3'
ColI	5'-AGAAGGATTGGTCAGAGCAGTG-3' 5'-ACAACAGGTGTCAGGGTGTT-3'
OCN	5'-CAGACACCATGAGGACCA-3' 5'-AAGGCTTTGTCAGACTCAGGG-3'
ALP	5'-GTGGCCGCAAGTTCATGTTTC-3' 5'-AGCTCTGAGCGGTTCCAAACAT-3'
iNOS	5'-CAAGCTGAACTTGAGCGAGGA-3' 5'-TTTACTCAGTGCCAGAAGCTGGA-3'
COX-2	5'-GCCAGGCTGAACTTCGAAACA-3' 5'-GCTCACGAGGCCACTGATACCTA-3'
$\beta$ -actin	5'-CATCCGTAAAGACCTCTATGCCAAC-3' 5'-ATGGAGCCACCGATCCACA-3'

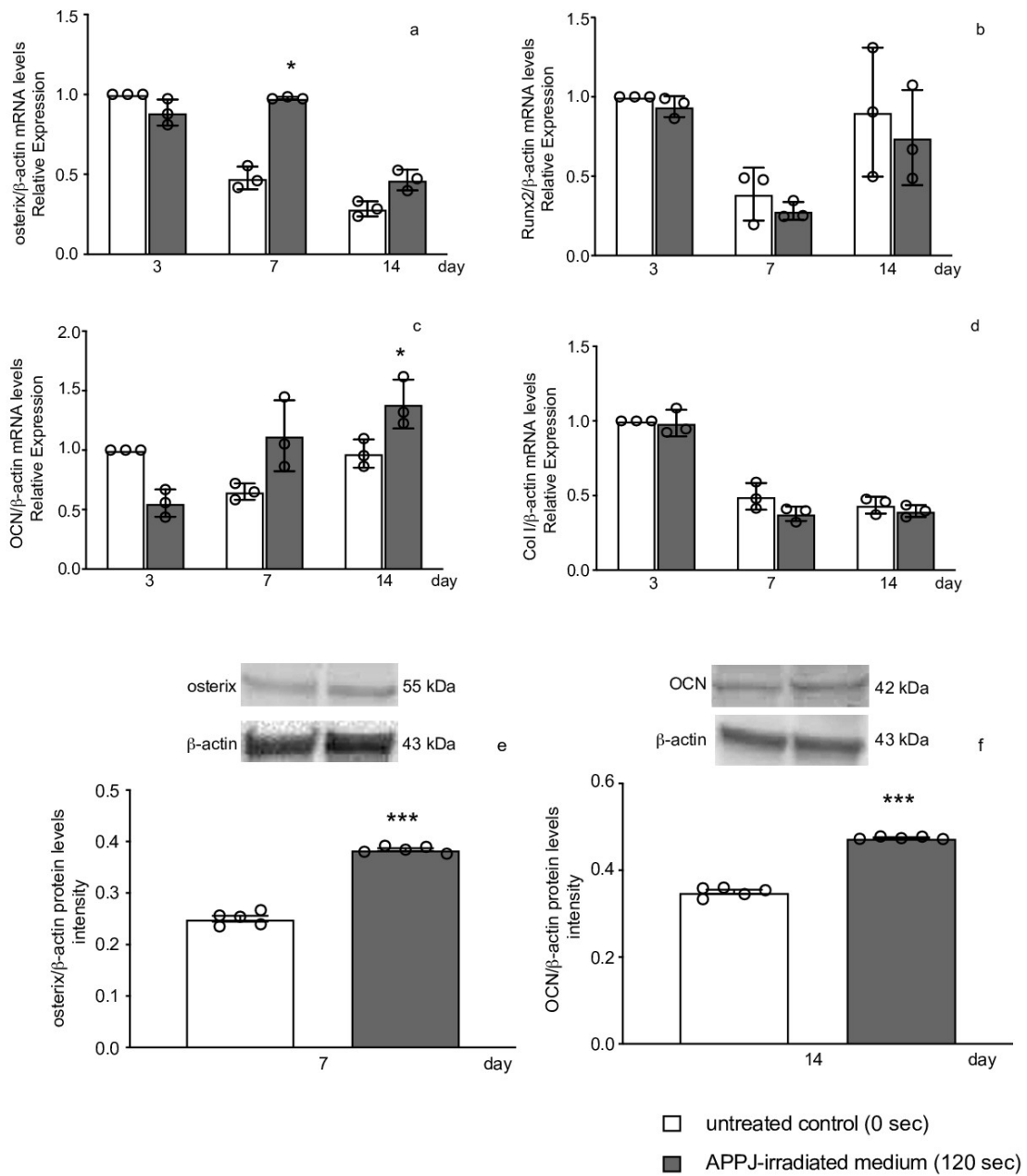


**Figure 1. N-APPJ irradiation**



**Figure 2. Cell viability, ALP activity and cell culture medium pH of N-APPJ.**

MC3T3-E1 cells were cultured with APPJ-irradiated medium (0, 60, 120, and 180 sec) for 1, 3, 5, 7, 10, and 14 days. The 20-mL culture medium was irradiated with APPJ for 0, 60, 120, and 180 sec. pH were measured on 0, 5, 10, 15, 30, 60, and 180 min after irradiation with N-APPJ. Data are expressed as the mean  $\pm$  SD of three independent experiments performed in triplicate (cell viability: a, ALP activity: b, and cell culture medium pH: c); \* $p < 0.05$  (Mann-Whitney U-test with Bonferroni correction), APPJ-irradiated medium vs. untreated control. (n = 3)



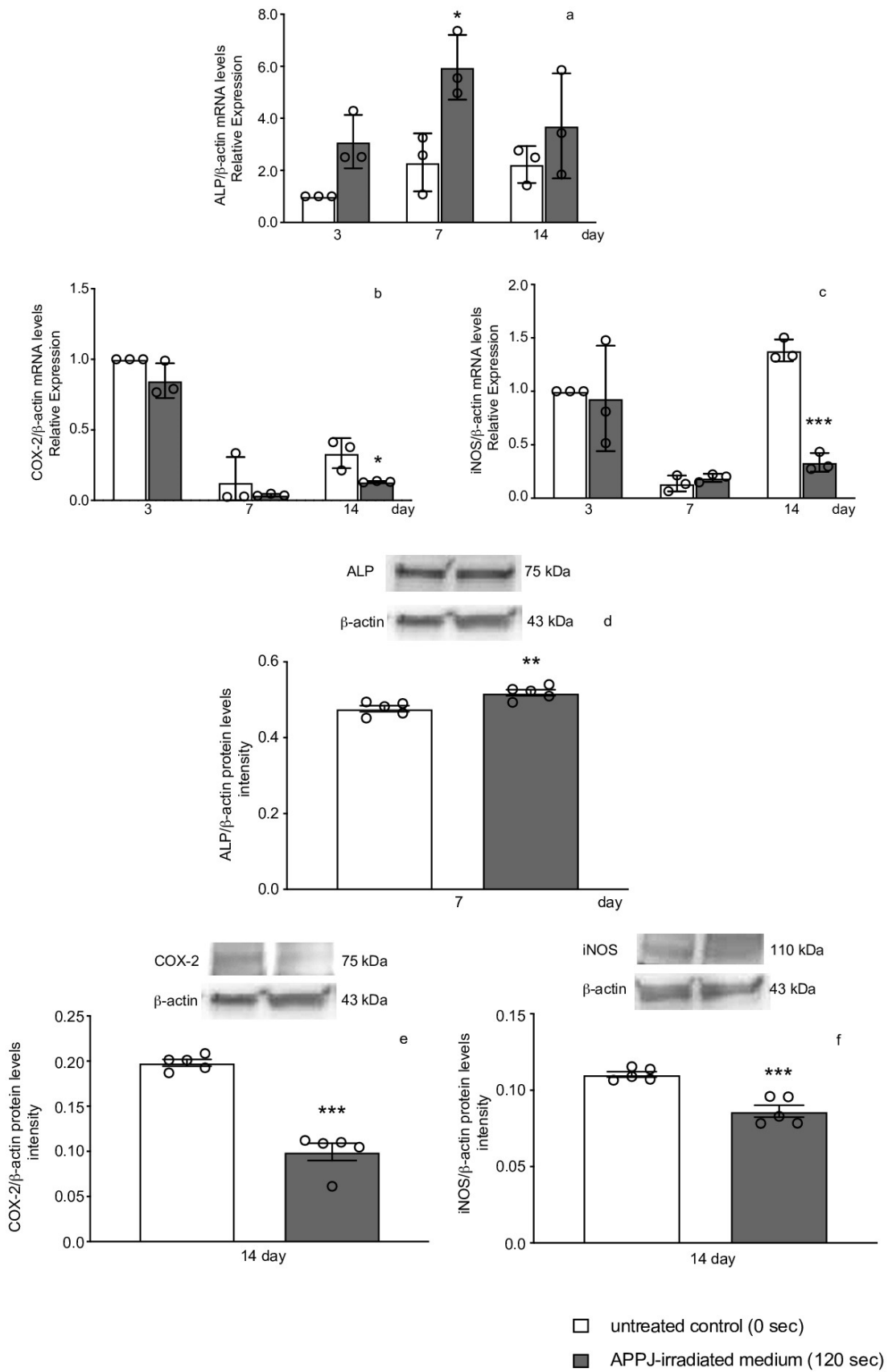
**Figure 3. Effects of N-APPJ on gene and protein expressions of RUNX2, osterix, and ECMPs.**

MC3T3-E1 cells were treated with APPJ-irradiated medium (120 sec) for 3, 7, and 14 days and mRNA expression of genes encoding Runx2 (a), osterix (b), Col1 (c), and OCN (d) were determined at 3, 7, and 14 days of culture using real-time PCR. Data are



expressed as mean  $\pm$  SD of three independent experiments performed in triplicate:  $*p < 0.05$  (student *t*-test), APPJ-irradiated medium vs. untreated control.

MC3T3-E1 cells were treated with APPJ irradiation medium (120 sec) for 3 or 7 days of culture. Protein expression was assessed by Western blotting (upper images in e and f). Bar graph showed the protein band intensity of osterix (e) and OCN (f). Data are expressed as mean  $\pm$  SD for three independent experiments, and intensities of the bands were examined five times;  $***p < 0.001$  (Mann-Whitney U-test), APPJ-irradiated medium vs. untreated control. (n = 3)



**Figure 4. Effects of N-APPJ on gene and protein expressions of ALP, COX-2, and iNOS.**

MC3T3-E1 cells were treated with APPJ-irradiated medium (120 sec) for 3, 7, and 14 days, and mRNA expression of ALP (a), COX-2 (b), and iNOS (c) were determined at 3, 7, and 14 days of culture using real-time PCR. Data are expressed as the mean  $\pm$  SD of three independent experiments performed in triplicate; \* $p$  < 0.05, \*\*\* $p$  < 0.001 (student  $t$ -test), APPJ-irradiated medium vs. untreated control.

MC3T3-E1 cells were treated with or without APPJ (120 sec) for 7 or 14 days. Protein expression was assessed by Western blotting (upper images in d-f). Bar graph showed that the protein band intensity of ALP (d), COX-2 (e), and iNOS (f). Data are expressed as the mean  $\pm$  SD for three independent experiments, and intensities of the bands were examined five times: \*\* $p$  < 0.01, \*\*\* $p$  < 0.001 (Mann-Whitney U-test), APPJ-irradiated medium vs. untreated control. (n = 3)