

In vitro 실험모델에서 생산지에 따른 로즈힙 추출물의 골관절염 억제효과 비교 연구

남다운¹ · 이민재² · 강남길² · 박금덕³ · 이정민^{1,4*}

¹경희대학교 의학영양학과, ²(주)뉴트리플랜
³(주)서흥캡슐 중앙연구소, ⁴경희대학교 임상영양연구소

A Comparative Study of Rose Hip Extracts on Osteoarthritis in Cartilage Cells

Da-Eun Nam¹, Min-Jae Lee², Namgil Kang², Geumduck Park³, and Jeongmin Lee^{1,4*}

¹Dept. of Medical Nutrition, Kyung Hee University, Gyeonggi 446-701, Korea

²NutriPlan Co., Ltd., Gyeonggi 410-837, Korea

³Suheung Capsule R&D Center, Seoul 130-845, Korea

⁴Research Institute of Medical Nutrition, Kyung Hee University, Seoul 130-701, Korea

Abstract

The inhibitory effects of rose hip (*Rosa canina* L.) water extracts from two different manufactures on osteoarthritis was comparatively investigated in primary cultures of rat cartilage cells. To identify the effects of rose hip extracts against H₂O₂ (300 μM, 2 hr) treatment, cell survival was measured by the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. Cell survival increased by rose hip extracts in the range of 100 to 600 μg/mL of H₂O₂ treatment. To determine the anti-inflammatory effects of rose hip extracts, tumor necrosis factor alpha (TNF-α), nitric oxide (NO), and Cox-2 expression were measured after lipopolysaccharide (LPS) activation. TNF-α level with rose hip extract treatment was decreased by 27.4% and 31.9% at 600 μg/mL of H₂O₂ treatment. Nitric oxide was inhibited by rose hip extract at 100~600 μg/mL of H₂O₂ treatment in a dose-dependent manner. In addition, Cox-2 protein expression was dose-dependently decreased while Cox-1 had no change in expression level. The severity of osteoarthritis is controlled by a balance between anabolic and catabolic factors in an articulation, therefore the expression of these factors plays a critical role in preventing osteoarthritis. In measuring anabolic factors, the genetic expression of collagen type I increased with rose hip treatment, while the genetic expression of collagen II did not change. In addition, the genetic expression of aggrecan (proteoglycan core protein) was significantly increased, while the genetic expression of matrix metalloproteinase (MMP) 3, 7 and 13, known catabolic factors, was significantly inhibited by treatment with rose hip extract. The expression of MMP13 was especially highly influenced. In conclusion, rose hip water extracts show inhibitory effects on cell death by H₂O₂ mediated oxidative stress, which is related to inhibitory effects on inflammation due to TNF-α, NO, and Cox-2. The ability of rose hip extracts to ameliorate inflammation in primary cultures of cartilage cells seems to associate with an increased genetic expression of specific anabolic factors, collagen type I and aggrecan, and a decreased expression of catabolic factors, MMPs (3, 7, and 13). However, there were no significant differences between rose hip extracts from the two manufacturers.

Key words: *Rosa canina* L., osteoarthritis, primary culture, proteoglycan, MMPs

서 론

과거 1998년과 2001년도 국민건강영양조사에 의하면 관절염은 45세 이상에서 흔한 만성질환이었으며 관절염의 유병률은 연령에 따라 증가하여 65세 이상 인구에서는 1998년 천명당 356.7명, 2001년 364.2명을 차지하였다(1). 최근 '2010년 고령자 통계'에 따르면 우리나라 65세 이상 노인인구 비율은 11%로써 인구구조의 고령화에 따라 만성퇴행성 질환 유병률 또한 증가하고 있고, 연간 유병률이 높은 만성질환으로서 관절염이 43.1% 이상 차지하고 있다(2). 관절염이란

관절에 일어난 염증으로 흔히 통증, 강직 및 부종이 동반되고 그 원인은 퇴행성 변화, 면역계 이상, 감염, 외상, 대사장애 등이며 그 종류는 100여 가지가 넘는다(3). 그중 골관절염(osteoarthritis)과 류마티스(rheumatoid arthritis, RA) 관절염이 전체 관절염의 80%를 차지하고 있으며 근골격계 질환으로 인한 부담 중 가장 많은 부분을 차지한다. 퇴행성관절염의 발병과 관련된 인자들을 크게 분류해 보면 단백질 가수분해효소(proteolytic enzymes), 사이토카인 그리고 nitric oxide(NO)가 주요 인자들로 알려져 있다.

로즈힙(*Rosa canina*, dog rose)은 주로 유럽과 남미에 자

*Corresponding author. E-mail: az121899@empal.com
Phone: 82-31-201-3838, Fax: 82-31-204-8119

생하는 장미과나무의 열매로서 일반적으로 봄에 열매가 맺기 시작해 늦은 여름이나 초가을에 성숙해진다. 전통적으로 하루에 2~5 g 정도의 분말을 섭취하는 것으로 알려져 있고 그 효과는 매우 다양하게 연구되어져 있으며 특히 항산화작용, 항염작용, 항비만작용, 항당뇨작용, 항피양성위염작용, 항미생물작용, 항암·항돌연변이작용 등이 최근까지 관심을 끌어왔다(4). 로즈힙의 주요 성분으로는 마그네슘(Mg, 1,909 mg/kg) 외 13종의 미네랄이 포함되어 있고 펙틴(pectin), β -carotene, β -sitosterol 등이 다량 함유되어 있는 것으로 확인되었다(5).

최근 들어 관절염에 대한 건강기능식품의 기호도 및 수요가 고령화 사회의 흐름에 부합하여 급격히 증가하고 있으며 대다수의 경우 glucosamine과 chondroitin이 시장성을 형성하고 있다. 하지만 일부 의학계에서 기능성식품으로서의 glucosamine 효과에 대한 의문점을 제기한 바 있고 향후 지속적인 관절염 건강기능식품의 시장을 유지 형성하기 위해서는 이를 대체할 방안이 필요한 시점에서 로즈힙에 대한 관심이 증대되고 있다. 현재 국내에 수입되고 있는 로즈힙은 씨와 열매각질로부터 분말화되었거나 물추출물을 분말화한 형태로 표준화한 것으로서 주로 덴마크와 칠레에서 생산된 것으로 확인된다. 본 연구에서는 pubmed 문헌조사를 통해 확인된 로즈힙의 여러 생물학적 효과를 파악한 기존의 자료를 바탕으로 현재까지 연구가 미진했던 퇴행성관절염에 대해 덴마크와 칠레에서 수입되는 로즈힙을 대상으로 *in vitro* 실험모델에서 효과의 유무 및 정도를 비교적 관점에서 우선적으로 검증하고자 하였다.

재료 및 방법

재료 및 시약

표준화된 로즈힙 분말은 각각 Hyben Vital Aps(Tullebolle, Denmark)와 칠레(Los Angeles, Chile)로부터 수입된 원료를 (주)서흥캡셀(서울)에서 분말화한 제품을 분양받아 실험하였다. 로즈힙 분말 10 g을 150 mL 증류수에 넣고 환류장치에서 100°C, 5시간 동안 추출한 후 감압증류기에서 농축하여 동결건조 한 후 실험에 사용하였다. 4~6주령된 Sprague-Dawley rat은 (주)중앙동물실험(Seoul)로부터 구입하였고 세포배양에 필요한 FBS, DMEM, penicillin/streptomycin 등을 Hyclone Laboratories(Logan, UT, USA)로부터 구입하였으며 nitric oxide(NO) 측정을 위한 Griess reagent는 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)로부터, Cox-1와 Cox-2 항체는 Cell Signaling(Danvers, MA, USA)으로부터 구입하여 사용하였다.

연골세포의 분리 및 배양

연골 채취를 위한 실험동물은 4~6주령 무게 약 180~200 g 정도의 male Sprague-Dawley rat을 경추탈골 하여 70% 알코올로 피부를 소독하여 절개한 후 관절연골을 2~3 mm

정도 크기로 채취하였고 채취한 연골조직은 phosphate buffer saline(Hyclone Laboratories) 용액에서 보관하여 clean bench로 옮겼다. 0.1% EDTA-CDMF(Sigma-Aldrich) 용액에 30분씩 2회 incubation시키고(37°C, 5% CO₂), 0.25% trypsin으로 1시간 incubation(37°C, 5% CO₂)하였다. 2 mg/mL collagenase type I(Sigma-Aldrich)을 첨가하여 shaker에 120 rpm으로 12시간 동안 처리하였다. 이렇게 해서 얻어진 세포 부유액을 100 μ m pore size cell strainer(BD Falcon, Franklin lakes, NJ, USA)에 여과한 후 1,600 rpm으로 10분간 원심분리 하여 원심분리 된 세포를 Hank's balanced salt solution(Hyclone Laboratories)으로 3회 세척한 후 연골세포를 분리하였다. 분리된 연골세포는 10% FBS와 DMEM에 1% penicillin-streptomycin과 1% L-glutamine(Hyclone Laboratories) 그리고 0.1% gentamycin(Gibco, Grand Island, NY, USA)을 첨가하여 75T flask에 넣고 37°C, 5% CO₂의 조건 하에서 배양하였다. 이때 2~3일에 한 번씩 배지를 갈아주고 약 4~5일에 계대하였으며 세포의 passage는 5 이하로 사용하였다.

Cell viability 측정

실험동물에서 분리한 연골세포를 96 well plate에 5×10^3 cells/well의 농도로 10% FBS를 첨가한 DMEM 배양액에 분주하여 12시간 동안 안정화시킨 후, 로즈힙 열수추출물을 산지별, 농도별로 처리하여 24시간(독성시험) 또는 2시간(H₂O₂ 처리 후 세포재생시험) 동안 배양하였다. 3-(4,5-Methylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) 시약을 20 μ L 처리하여 최대 3시간 37°C incubator에서 배양한 후 배지와 MTT 시약을 제거하고, DMSO 시약 200 μ L를 가하여 560 nm에서 ELISA reader(VERSAM-AXSL-20, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 측정하였으며 3회의 측정으로 그에 대한 평균값과 표준오차를 구하였다.

ELISA 방법에 의한 사이토카인 측정

Proinflammatory cytokine의 하나인 TNF- α 의 발현 확인을 위해 실험동물에서 분리한 연골세포를 96 well plate에 5×10^3 cells/well의 농도로 10% FBS를 첨가한 DMEM 배양액에 분주하여 12시간 동안 안정화시킨 후 로즈힙 열수추출물을 산지별, 농도별로 처리하고 lipopolysaccharide(Sigma-Aldrich) 50 μ g/mL 처리하여 24시간 배양 후에 상층액을 따서 TNF- α 를 측정하였다. TNF- α 측정을 위해 R&D Systems의 rat TNF- α /TNFSF1A DuoSet ELISA kit(Minneapolis, MN, USA)을 이용하여 R&D Systems의 general ELISA protocol을 따라서 ELISA reader(Molecular Devices)를 이용하여 측정하였다.

Real-time polymerase chain reaction에 의한 유전자 발현 측정

실험동물에서 분리한 연골세포를 6 well plate에 5×10^6

Table 1. Primer set sequence used for Real-Time PCR

Sequence name	Forward sequence	Reverse sequence	NCBI reference
Collagen type I	GAG CGG AGA GTA CTG GAT CGA	CTG ACC TGT CTC CAT GTT GCA	BC133728
Collagen type II	GCA ACA GCA GGT TCA CGT ACA	TCG GTA CTC GAT GAT GGT CTT G	L48440
GAPDH	TGG CCT CCA AGG AGT AAG AAA C	CAG CAA CTG AGG GCC TCT CT	BC087743.1
MMP-3	GAG TGT GGA TTC TGC CAT TGA G	TTA TGT CAG CCT CTC CTT CAG AGA	NM_133523.1
MMP-13	ACG TTC AAG GAA TCC AGT CTC TCT	GGA TAG GGC TGG GTC ACA CTT	NM_133530.1
MMP-7	ACT CTA GGC CAT GCC TTT GC	CCA TCC GTC CAG TAC TCA TCC T	NM_012864.2

cells/well의 농도로 10% FBS를 첨가한 DMEM 배양액에 분주하여 12시간 동안 안정화시킨 후, 산지별 로즈힙 열수 추출물을 H₂O₂와 함께 연골세포에 2시간 동안 처리한 후 0.25% trypsin-EDTA로 세포를 수집하여 RNeasy extraction kit(QIAGEN, Maryland, MD, USA)로 제조사의 manual에 따라 total RNA를 추출하고 cDNA의 합성을 위해 iScript Select cDNA Synthesis kit(BIO-RAD, Hercules, CA, USA)을 이용하여 5 µg의 total RNA에 5×iScript Select reaction mix를 4 µL, Oligo(dT) primer set 2 µL(Table 1), RNA sample 5 µL, nuclease-free water 8 µL를 각각 넣고 마지막에 iScript reverse transcriptase 1 µL를 넣어 pipet로 up&down 하여 골고루 섞어주었다. 42°C에서 60분, 85°C에서 5분간 반응시킨 후 합성된 cDNA를 PCR 반응에 사용하였다. Real-Time PCR 실험 시 사용한 기계는 Step One Real-Time PCR system(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)이며 iQ SYBR Green Supermix(BIO-RAD)로 제품의 protocol에 따라 반응하였다. PCR을 위한 혼합액 최종 농도는 cDNA 2 µL(10~100 ng), 2X iQ SYBR Green Supermix 10 µL, forward&reverse primer 각 1 µL(250 nM), H₂O 7 µL가 되도록 하였다. 95°C에서 10분간 hot start 한 후 95°C에서 15초간, 55°C에서 15초, 72°C에서 30초간 40 cycling으로 PCR을 수행한 후 마지막으로 95°C에서 15초, 60°C에서 1분, 95°C 15초간 polishing step을 거쳐 PCR 분석을 시행하였다.

Nitric oxide(NO)의 측정

NO의 측정은 Promega NO assay kit(Madison, WI, USA)로 수행하였으며 생성된 nitrite는 550 nm에서 측정하였다.

Western blot analysis

Cox-1과 Cox-2의 발현을 단백질 수준에서 확인하기 위해 로즈힙 추출물을 세포에 처리한 후 0.25% trypsin-EDTA로 세포를 분리 수집하고 RIPA lysis buffer를 이용하여 total protein을 추출하여 Bradford method에 따라 단백질을 정량하였다. Western blot을 위하여 biotinylated molecular weight standard marker와 함께 SDS-PAGE 전기영동을 수행하고 electroblotting apparatus를 이용하여 1시간 동안 introcellulose membrane으로 blot하였다. Blot된 membrane은 blocking buffer(1×TBS, 0.1% tween-20 with

blocking reagent, 5% skim milk)에 soaking 한 후 일차항체로 4°C에서 밤새 반응시켰다. Membrane을 HRP가 중합된 이차항체에 120분간 반응시킨 후 세척한 다음 chemiluminescent detection system(Phototope-HRP western blot detection kit, New England Biolab, Beverly, MA, USA)을 이용하여 현상하였다.

통계처리

모든 실험은 3회 반복 실시하였으며 얻어진 결과는 SPSS 12.0 software(IBM, Armonk, NY, USA)를 이용하여 유의적 차이를 확인한 후 그룹간의 통계적 유의성을 Duncan's multiple range test를 수행하였고 두 그룹간의 차이는 Student's *t*-test를 이용하여 분석하였으며 5% 이내에서 통계적 유의성을 부여하였다(p<0.05).

결과 및 고찰

MTT에 의한 실험 적정농도의 결정

Primary culture된 연골세포에 대한 로즈힙 추출물의 적정농도를 결정하기 위해 MTT assay를 수행하였다. 칠레산과 덴마크산 로즈힙 추출물의 세포독성은 유사한 패턴을 나타내었는데 800 µg/mL 이후 농도에서 독성을 나타내기 시작하여 1,000 µg/mL의 농도에서는 73.0±10.9%와 75.3±6.2%를 나타내어 각각 약 27%와 24.7%의 세포생존율을 감소시켰다(Fig. 1). 또한 800 µg/mL의 농도에서 통계적 유의성은 나타나지 않았지만 세포생존율이 계속적으로 감소하는 경향을 보였기 때문에 보다 안전한 실험을 위해 600 µg/mL 이하의 농도에서 사용하기로 하였다.

H₂O₂ 산화적 독성에 대한 세포사멸 억제효과

골관절염 실험에 대한 *in vitro* 모델은 LPS 또는 H₂O₂로 염증을 유발하는 것이 일반적으로 알려져 있다(6). 골관절염에 있어서 가장 중요하게 여겨지는 점은 연골세포의 사멸억제와 세포재생에 초점이 맞추어져 있다. 단순히 염증만을 유발할 경우는 LPS로도 충분하겠지만 세포사멸을 유도하기 위해서는 H₂O₂로 실험하는 것이 적절할 것으로 판단하여 시간별, 농도별로 실험한 결과, H₂O₂ 300 µM에서 2시간을 처리할 경우 시험대조군에서 50~68% 정도의 사멸을 나타내는 것으로 확인되었다(data not shown). 따라서 이러한 기존의 실험을 바탕으로 칠레산과 덴마크산 로즈힙 추출물

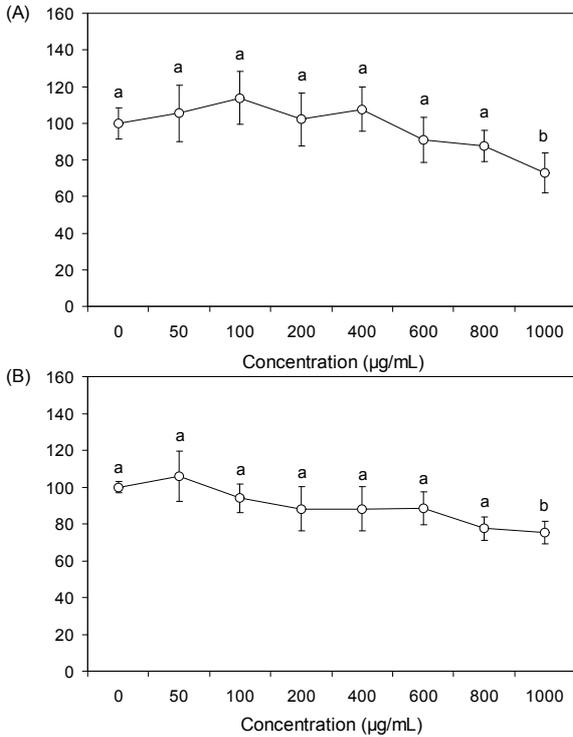


Fig. 1. Cell viability of primary cultured rat cartilage cells, determined by MTT reagent, with treatment of *Rosa canina* L. extract at various concentrations. (A) Extract by Chile manufacture, (B) Extract by Denmark manufacture. Significant differences were determined by Duncan's multiple range test at $p < 0.05$.

을 처리한 결과, 칠레산 로즈힙 추출물의 경우 100~600 µg/mL 전체 농도에서 H₂O₂ 비처리 정상세포군의 수준까지 연골세포사멸 억제효과가 나타났지만 농도의존적인 결과는 나타나지 않았다(Fig. 2). 이러한 결과는 칠레산 로즈힙 추출물의 세포사멸 억제효과가 100~600 µg/mL 범위 내에서는 포화된 것으로 생각되며 향후 100 µg/mL 이하의 농도에서 실험해야 할 필요성을 제시하는 것으로 생각된다. 덴마크산 로즈힙 추출물의 경우 100~300 µg/mL 농도에서는 세포사멸을 억제하는 경향은 있었지만 통계적 유의성은 나타나지

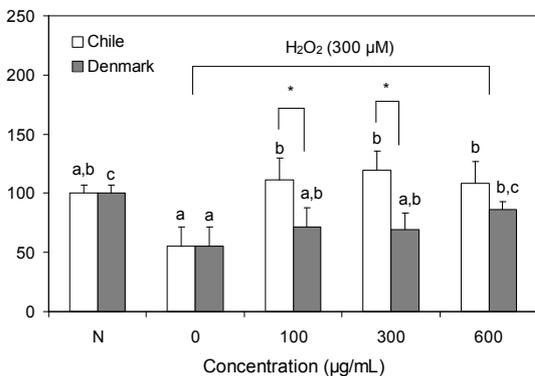


Fig. 2. Effect of *Rosa canina* L. extract on cell survival against 300 µM H₂O₂ treatment. Significant differences were determined by Duncan's multiple range test and Student's t-test between the manufactures at $p < 0.05$.

않았지만 600 µg/mL의 농도에서 유의적으로 연골세포사멸을 억제하는 것으로 나타났다(Fig. 2). 칠레산과 덴마크산 로즈힙 추출물 그룹 간의 비교에서는 100 µg/mL와 300 µg/mL 농도에서 유의적인 차이를 보였지만 600 µg/mL 농도에서는 유의적 차이를 나타내지 않았다. 이것은 일정농도 이상에서는 두 가지 로즈힙 추출물의 효과가 동일하게 나타나는 것을 의미하며 향후 동물실험 또는 임상적인 사용에 있어서 적정농도를 결정하는 것이 중요한 인자가 됨을 암시하는 것으로 여겨진다.

TNF-α, NO, Cox-2 생성 억제효과

사이토카인은 세포에서 분비되는 수용성 단백질로 특정 신호물질에 의해 발현되며 효소와는 구별되게 주변 세포에 의해 영향을 받으며 반감기가 매우 짧아 그 작용하는 범위도 사이토카인이 분비되는 인접한 세포들로 국한되는 특징을 가지고 있다. 관절염에 있어서 interleukin(IL)-1, tumor necrosis factor(TNF)-α, IL-17은 연골세포조직의 이화작용에 영향을 주는 사이토카인으로 알려져 있다(7). 반면 transforming growth factor(TGF)-β와 insulin-like growth factor(IGF)는 연골세포조직의 재생에 관련된 사이토카인이다. IL-1은 연골세포조직의 이화작용에서 금속단백분해효소(metalloproteinase, MMP)의 발현을 유도하고 serum TGF-β가 연골세포를 증식시키도록 하는 것을 방해한다(8). 퇴행성관절염에서는 연골세포가 IL-1 수용체를 2배 이상 발현하는 특징이 있는데 이를 통해 IL-1은 연골생성에 관련된 collagen type II와 proteoglycan의 합성을 저해한다. TNF-α는 연골세포에서 IL-1과 비슷한 역할을 하는데 IL-1에 의해서 TNF-α 수용체가 연골세포와 관절강 조직세포에서 발현되는 것으로 알려져 있다(9).

지난 약 10년간 염증과 관련된 TNF-α의 역할에 대해 광범위하게 연구되어져 왔다. 대부분의 염증반응은 Cox-2, inducible nitric oxide(iNOS)와 IL-1β, IL-6, TNF-α 등의 염증유발 사이토카인이 관련된 것으로 알려져 있다. 실험적인 측면에서 염증유발은 대개 LPS를 통해 이루어지는데 그 활성화 경로의 중심에는 nuclear factor κB(NF-κB)가 자리 잡고 있다. 우선 LPS 수용체를 통해 전달된 활성화 신호는 inhibitor κB(I-κB) kinase(IKK)를 통해 I-κB를 인산화 시킴으로 NF-κB를 활성화 시키는 것으로 인식되고 있다(10, 11). 또한 활성화된 NF-κB는 핵으로 이전하여 TNF-α를 생성시키는데 이렇게 생성된 TNF-α는 다시 NF-κB를 재활성화 시키는데 이용되어 iNOS와 Cox-2를 유전적으로 합성하여 염증반응을 가속화시키는 것으로 알려져 있다. 따라서 TNF-α의 적절한 생성조절은 염증반응을 조절하는 중요한 인자가 되고 있다. 또한 골관절염의 경우 관절강 내에서 대식세포 등에 의한 일련의 염증반응으로 TNF-α와 Cox-2 등이 과다 생성되는 것으로도 알려져 있다. 본 실험에서는 연골조직세포의 특징상 고농도의 LPS처리가 필요하였고 실험 결과 50 µg/mL에서 최적의 TNF-α 생성효과를 확인하

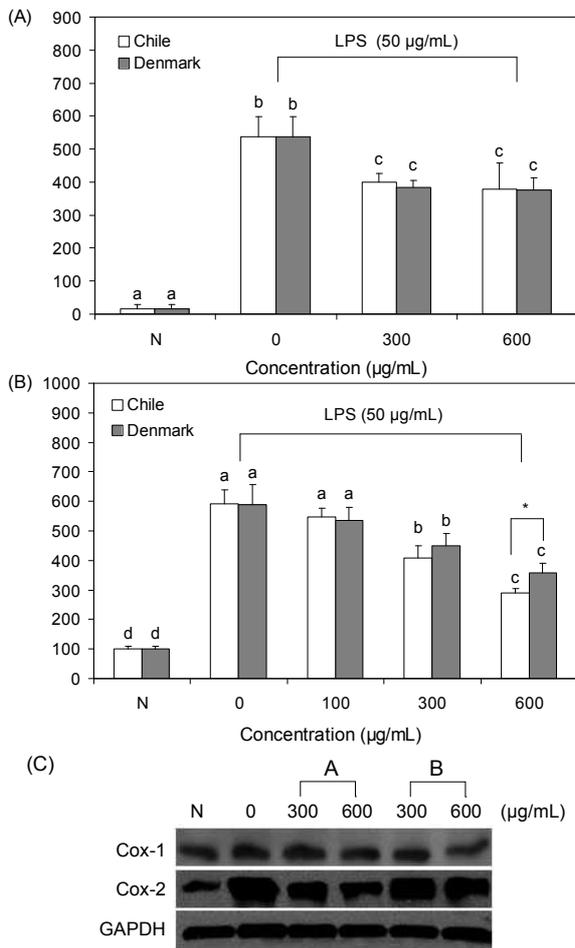


Fig. 3. Inhibitory effect of *Rosa canina* L. extract on TNF- α , NO, and Cox-2 expression. (A) TNF- α , (B) NO, (C) Cox-2. Significant differences were determined by Duncan's multiple range test at $p < 0.05$.

였다(data not shown). 이를 바탕으로 칠레산과 덴마크산 로즈힙 추출물의 TNF- α 생성 억제효과를 확인한 결과, 각각 300 $\mu\text{g/mL}$ (27.4%, 30.2%)와 600 $\mu\text{g/mL}$ (31.7%, 31.9%) 농도에서 모두 유의적인 감소를 나타내었다(Fig. 3A). 하지만 칠레산과 덴마크산 로즈힙 추출물 그룹 간의 비교에 있어서는 유의적인 차이는 보이지 않았다.

NOS에 의해 정상적으로 생성된 NO는 일차면역 방어체계에 중요한 역할을 하며 혈관확장 등 생리조절에 중요한 역할을 담당하고 있다(12). 하지만 LPS와 TNF- α 등의 외부인자에 의해서 iNOS가 생성될 경우 과도한 NO의 생성으로 염증반응과 세포괴사를 연결하게 된다. 또한 NO는 퇴행성관절염의 발생에 있어서 관절의 혈관 확장과 침투성을 증가시켜서 백혈구로부터의 발현된 TNF- α 와 IL- β 가 관절에 침투하는 것을 증가시키며 연골세포의 apoptosis(programmed cell death)를 유도하기도 한다(13). 본 실험에서는 두 종류의 로즈힙 추출물 모두 300 $\mu\text{g/mL}$ 와 600 $\mu\text{g/mL}$ 에서 농도의존적인 NO 생성억제효과가 나타났으며 특히 600 $\mu\text{g/mL}$ 에서는 두 종류 간에도 유의성이 나타났다(Fig. 3B).

Prostaglandin E₂(PGE₂) 생성을 촉진하여 염증을 유발시키는 Cox 효소는 Cox-1과 Cox-2의 두가지 형태가 존재한다(14,15). Cox-1은 지속적으로 일정량 생성되어 여러 종류의 prostaglandin의 합성에 관여하여 혈장의 항상성, 위액분비, 혈소판응고 등에 관여하는 반면, Cox-2의 경우는 TNF- α 와 LPS 등의 외부 인자에 의해 일시적으로 유도되어 생성되어 염증에 관여하는 것으로 알려져 있다. 본 실험에서는 연골조직세포에 LPS를 처리한 후 두 종류의 로즈힙 추출물을 처리한 결과, Cox-1의 발현은 큰 변화를 보이지 않은 반면, Cox-2의 발현은 300 $\mu\text{g/mL}$ 와 600 $\mu\text{g/mL}$ 에서 농도의존적인 감소를 보인 것으로 확인되었다(Fig. 3C). 이러한 결과는 두 종류의 로즈힙 추출물 모두 Cox-2 억제를 통한 염증발현을 제어하는 것을 의미하기도 한다.

연골세포 조직의 동화작용 및 이화작용에 관여하는 인자의 측정

연골세포 조직의 생리학적, 물리학적 작용을 유지시키는 것은 조직의 동화작용(anabolism)과 이화작용(catabolism)의 균형에 의한 것으로 인식된다. 동화작용에 관여하는 것으로는 collagens, 금속단백분해효소 조직억제(tissue inhibitors of metalloproteinases, TIMPs), aggrecan을 포함하는 proteoglycan 등이 해당되는 반면, 이화작용에는 금속단백분해효소(MMP), nitric oxide(NO), TNF- α , collagenase, aggrecanase 등이 해당된다.

본 실험에서 동화작용 인자로서 확인한 collagen type I은 연골세포 뿐만 아니라 일반적으로 인체세포에서 가장 많이 분포하고 있는 형태이며 collagen type II는 연골조직 단백질의 50%를 차지하고 있으며 연골에 분포하고 있는 collagen 종류 중 약 85~90%를 차지하고 있는 단백질이다. 따라서 collagen type I과 II의 형성은 연골조직의 상태를 결정하는 중요한 인자가 되고 있다. 본 실험에서 연골조직세포에 대한 H₂O₂ 300 μM 의 처리는 유의적인 collagen type I 유전자의 발현을 감소시킨 것으로 확인되었다(Fig. 4A). 두 종류의 로즈힙 추출물을 처리한 결과 100~200 $\mu\text{g/mL}$ 에서는 유의적인 차이를 나타내지 않은 반면, 600 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 거의 정상세포의 수준으로 유의적인 증가를 나타낸 것이 확인되었다. 반면 collagen type II 유전자 발현의 경우 로즈힙 추출물 처리 농도에 따라 증가하는 경향은 보였지만 통계적 유의성은 확인되지 않았다(Fig. 4B). 이러한 결과는 비록 collagen type I이 증가하였다 하더라도 연골조직에서는 collagen type II가 대부분을 차지하고 있다는 점을 감안할 때 collagen 합성으로 인한 효과발현은 그다지 크지 않을 것으로 생각된다. Aggrecan은 연골조직에서 대표적으로 합성되는 proteoglycan core protein의 하나로서 aggregation, hyaluronan binding, cell adhesion과 chondrocyte apoptosis에 관여하는 구상단백질인 G1, G2 그리고 G3로 구성되어 있으며 주로 관절에서 외부의 압력(compressive load)으로부터 저항성을 나타내어 관절을 유지시키는 기능을 하는 것으로 알

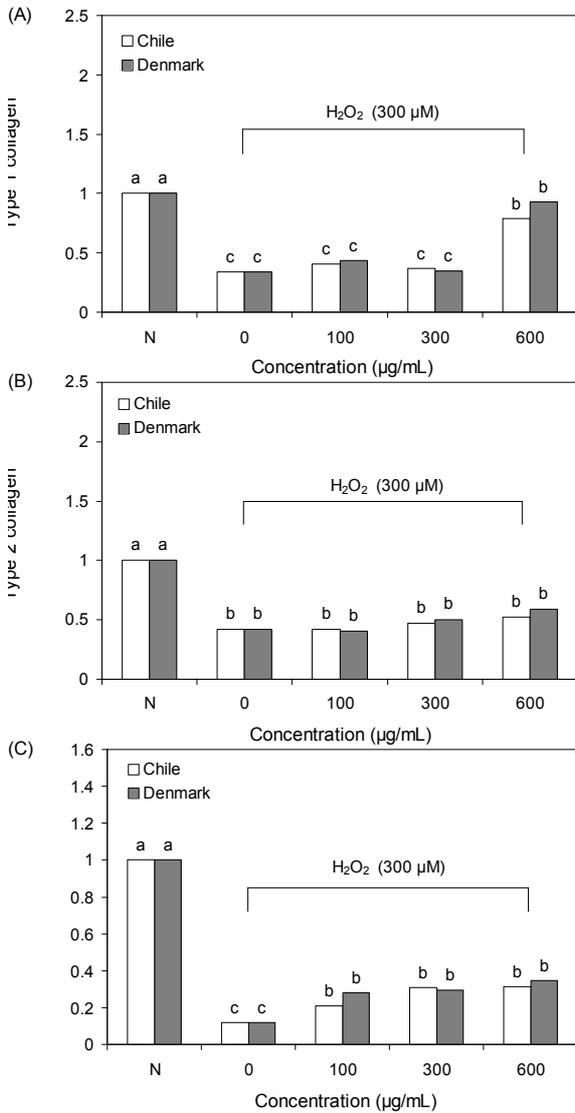


Fig. 4. Effect of *Rosa canina* L. on genetic expression of anabolic factors in primary cultured cells. (A) Type I collagen, (B) Type II collagen, (C) Aggrecan. Significant differences were determined by Duncan's multiple range test at $p < 0.05$.

려져 있다(16-20). 본 실험에서 H_2O_2 를 처리한 후 두 종류의 로즈힙 추출물을 처리하여 aggrecan 유전자의 발현을 측정 한 결과, 100~600 $\mu\text{g/mL}$ 범위에서 유의적으로 증가한 것을 확인할 수 있었고 특히 600 $\mu\text{g/mL}$ 에서 H_2O_2 처리군에 비해 각각 290%, 308% 증가한 것으로 나타났다(Fig. 4C). 하지만 덴마크산 로즈힙 추출물에서 보다 효과적인 경향을 보였지만 통계적 유의성은 확인되지 않았다.

퇴행성관절염의 발생에 있어서 단백질 가수분해 효소 (proteolytic enzymes)는 연골질의 퇴화에 가장 핵심적인 역할을 하며 그중 가장 대표적인 것이 금속단백분해효소(MMP)이다(21). MMP-3(stromelysin)은 proteoglycan의 퇴화에 결정적인 역할을 하는 금속단백분해효소이며 관절강 내 MMP-3 level의 증가는 심각한 연골손상과도 연관 지을 수 있다. 금속단백분해효소의 활성화는 촉진제(activator)와 억제

제(inhibitor)에 의해 조절되는데, 금속단백분해효소의 억제에 관여하는 것이 TIMPs로 TIMPs는 관절의 연골세포에서 분비된다. 정상적인 기능의 연골세포는 metalloproteinases와 inhibitor인 TIMPs가 균형을 이루면서 기능을 한다. 단백질 가수분해 효소인 aggrecanase 역시 proteoglycan을 분해하는 효소로서 관절강(synovial fluids)에서 확인할 수 있다. 본 실험에서는 MMP3, 7, 13의 유전자 발현을 측정하였는데 전반적으로 H_2O_2 의 처리는 MMPs의 발현을 정상세포군에 비해 약 52~415%까지 증가한 것으로 확인되었다. MMP3의 경우 두 종류의 로즈힙 추출물을 처리한 결과 주로 300~600 $\mu\text{g/mL}$ 범위에서 유의적인 감소를 나타내었다(Fig. 5A). 특히 600 $\mu\text{g/mL}$ 에서는 두 종류의 로즈힙 추출물 그룹 간에 유의적 차이가 나타났으며 덴마크산이 칠레산보다 효과적으로 MMP3를 감소시킨 것으로 확인되었다. MMP7의 경우

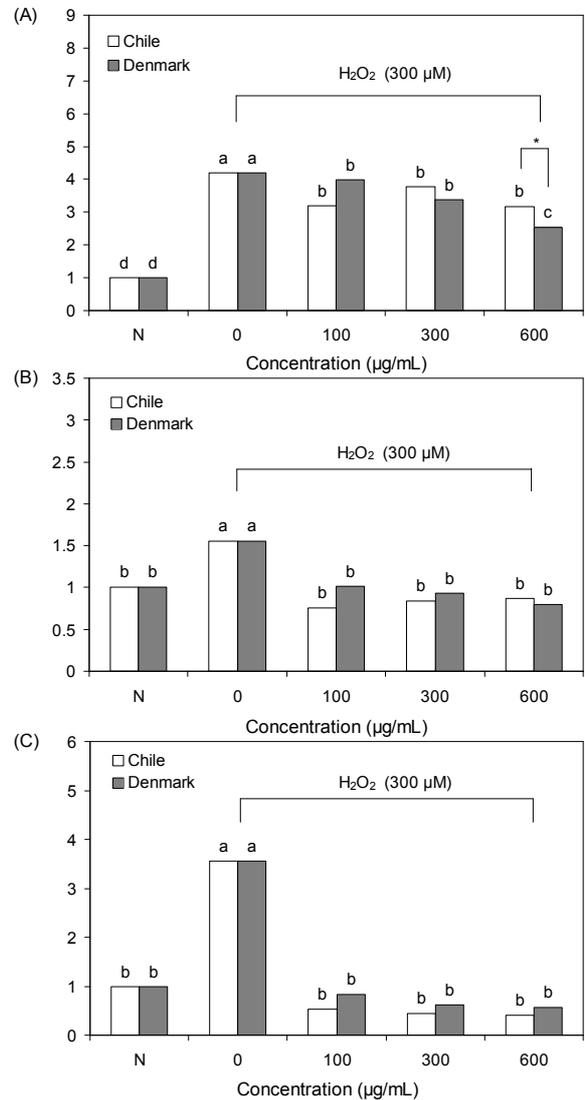


Fig. 5. Effect of *Rosa canina* L. on genetic expression of catabolic factors (MMPs) in primary cultured cells. (A) MMP3, (B) MMP7, (C) MMP13. Significant differences were determined by Duncan's multiple range test and Student's t-test between the manufactures at $p < 0.05$.

는 H₂O₂ 처리군에 비해 100~600 µg/mL의 농도에서 정상세포군의 수준으로 감소시킨 것으로 확인되었지만 농도의존성은 없었으며 두 종류의 시료 그룹 간에는 유의성이 나타나지 않았다(Fig. 5B). MMP13의 경우도 마찬가지로 H₂O₂ 처리군에 비해 100~600 µg/mL의 농도에서 정상세포군의 수준으로 감소시킨 것으로 확인되었지만 농도의존성은 없었으며 두 종류의 시료 그룹 간에도 유의성은 나타나지 않았다(Fig. 5C). 이러한 결과는 로즈힙 추출물이 MMPs의 유전자 발현을 억제함으로 연골세포조직의 파괴를 억제시키는 효과가 있을 것으로 생각되며 두 종류의 시료 간에는 큰 차이가 나타나지 않은 것으로 확인되었다.

요 약

Primary culture된 연골세포 *in vitro* 실험모델을 이용하여 칠레와 덴마크 두 지역으로부터 생산된 로즈힙 추출물의 관절염 관련 효과를 비교 확인하였다. 먼저 MTT 시험법을 통해 세포 사용 적정농도를 600 µg/mL 이하로 결정하였고 이를 근간으로 연골세포사멸억제, 염증관련인자(TNF-α, NO, Cox-2) 및 연골세포조직의 이화작용과 동화작용에 관여하는 인자의 유전적 발현을 측정하였다. H₂O₂ 처리에 따른 산화적 독성으로 연골세포 사멸을 유도한 실험에서 로즈힙 추출물은 정상세포 수준으로 사멸을 억제하였으며 이러한 효과는 칠레산에서 비교적 높게 나타났다. TNF-α의 생성 억제는 로즈힙 추출물 처리 시 27.4~31.9% 정도의 저해 효과가 나타났지만 농도 의존적이지는 않았으며 두 지역 간의 유의성도 나타나지 않았다. NO의 생성 억제의 경우 농도 의존적인 감소를 보였으며 고농도에서는 덴마크산이 보다 효과적인 것으로 확인되었다. Cox-2의 발현억제는 농도의존적인 경향을 나타내었으며 칠레산에서 다소 효과적인 것으로 여겨졌다. 연골세포조직의 동화작용과 이화작용에 관여하는 인자들 중 동화작용 인자인 collagen type I의 경우 고농도에서 정상세포 수준으로 발현을 촉진시킨 것으로 나타났지만 collagen type II의 발현에는 영향이 없었음을 확인하였다. 특히 aggrecan의 경우는 정상세포군에 비해서는 미비하였지만 H₂O₂ 처리군에 비해서는 유의적으로 증가한 것으로 나타났다. 하지만 측정하였던 동화작용 인자들 중에서는 지역적인 차이를 나타내지는 않았다. 이화작용에 관여하는 인자로서 MMP3, 7, 13의 유전자 발현을 측정한 결과 H₂O₂ 처리군에 비해 유의적으로 감소시킨 것으로 확인되었는데, 특히 MMP13에서 가장 큰 감소 효과를 나타내었다. 두 지역 간의 비교에서는 MMP3의 경우 고농도에서 덴마크산이 다소 효과가 높은 것으로 인지된 반면, MMP7, 13의 경우는 지역적인 차이가 유의적으로 나타나지는 않았다. 실험한 결과를 종합해 보면 로즈힙 추출물은 primary culture된 *in vitro* 실험모델에서 관절염 형성 억제효과가 있을 것으로 확인되었지만 지역적인 차이는 크지 않은 것으로 생각된다.

다. 본 실험의 한계점으로는 기존에 사용되던 관절염 치료제 또는 건강기능식품을 양성대조군으로 사용하지 못하였기 때문에 로즈힙 추출물의 효과를 정량화하여 비교하지 못한 점이 있으므로 향후 이 점을 보완할 필요성이 있을 것으로 생각된다.

문 헌

1. Korea National Health and Nutrition Examination Survey. 2001. Ministry of Health and Welfare, Seoul, Korea. p 51.
2. Senior Statistical Reports. 2010. The Statistics Korea, Daejeon, Korea. p 5.
3. Garner BC, Stoker AM, Kuroki K, Evans R, Cook CR, Cook JL. 2011. Using animal models in osteoarthritis biomarker research. *J Knee Surg* 24: 251-264.
4. Chrubasik C, Roufogalis BD, Muller-Lander U, Chrubasik S. 2008. A systematic review on the *Rosa canina* effect and efficacy profiles. *Phytother Res* 22: 725-733.
5. Basgel S, Erdemoğlu SB. 2006. Determination of mineral and trace elements in some medicinal herbs and their infusions consumed in Turkey. *Sci Total Environ* 359: 82-89.
6. Mathy-Hartert M, Martin G, Devel P, Deby-Dupont G, Pujol JP, Reginster JY, Henrotin Y. 2003. Reactive oxygen species downregulate the expression of pro-inflammatory genes by human chondrocytes. *Inflamm Res* 52: 111-118.
7. Jotanovic Z, Mihelic R, Sestan B, Dembic Z. 2012. Role of interleukin-1 inhibitors in osteoarthritis: an evidence-based review. *Drugs Aging* 29: 343-358.
8. Baugé C, Girard N, Leclercq S, Galéra P, Boumédiène K. 2012. Regulatory mechanism of transforming growth factor beta receptor type II degradation by interleukin-1 in primary chondrocytes. *Biochim Biophys Acta* 1823: 983-986.
9. Kapoor M, Martel-Pelletier J, Lajeunesse D, Pelletier JP, Fahmi H. 2011. Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* 7: 33-42.
10. Gilmore TD. 1999. The Rel/NF-κB signal transduction pathway: introduction. *Oncogene* 18: 6842-6844.
11. Kim CS, Kawada T, Kim BS, Han IS, Choe SY, Kurata T, Yu R. 2003. Capsaicin exhibits anti-inflammatory property by inhibiting IκB-α degradation in LPS-stimulated peritoneal macrophages. *Cell Signal* 15: 299-306.
12. Wink DA, Hines HB, Cheng RY, Switzer CH, Flores-Santana W, Vitek MP, Ridnour LA, Colton CA. 2011. Nitric oxide and redox mechanisms in the immune response. *J Leukoc Biol* 89: 873-891.
13. Thomas CM, Fuller CJ, Whittles CE, Sharif M. 2011. Chondrocyte death by apoptosis is associated with the initiation and severity of articular cartilage degradation. *Int J Rheum Dis* 14: 191-198.
14. Dixon DA, Kaplan CD, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM. 2000. Post-transcriptional control of cyclooxygenase-2 gene expression. The role of the 3'-untranslated region. *J Biol Chem* 275: 11750-11757.
15. Newton R, Kuitert LM, Bergmann M, Adcock IM, Barnes PJ. 1997. Evidence for involvement of NF-kappaB in the transcriptional control of COX-2 gene expression by IL-1β. *Biochem Biophys Res Commun* 237: 28-32.
16. Lee V, Cao L, Zhang Y, Kiani C, Adams ME, Yang BB. 2000. The roles of matrix molecules in mediating chondrocyte aggregation, attachment, and spreading. *J Cell Biochem* 79: 322-333.
17. Abaskharoun M, Bellemare M, Lau E, Margolis RU. 2010.

- Expression of hyaluronan and the hyaluronan-binding proteoglycans neurocan, aggrecan, and versican by neural stem cells and neural cells derived from embryonic stem cells. *Brain Res* 1327: 6-15.
18. Keller TC, Hogan MV, Kesturu G, James R, Balian G, Chhabra AB. 2011. Growth/differentiation factor-5 modulates the synthesis and expression of extracellular matrix and cell-adhesion-related molecules of rat Achilles tendon fibroblasts. *Connect Tissue Res* 52: 353-364.
19. Opolka A, Straub RH, Pasoldt A, Grifka J, Grässel S. 2012. Substance P and norepinephrine modulate murine chondrocyte proliferation and apoptosis. *Arthritis Rheum* 64: 729-739.
20. Ariyoshi W, Knudson CB, Luo N, Fosang AJ, Knudson W. 2010. Internalization of aggrecan G1 domain neoepitope ITEGE in chondrocytes requires CD44. *J Biol Chem* 285: 36216-36224.
21. Okada A, Okada Y. 2009. Progress of research in osteoarthritis. Metalloproteinases in osteoarthritis. *Clin Calcium* 19: 1593-1601.

(2012년 9월 4일 접수; 2012년 12월 3일 채택)