

식물추출복합물(CME)의 퇴행성관절염 개선효과

서형호^{1#}, 정종문^{2*}

1 : (주)벤스랩 중앙연구소, 2 : 수원대학교 생명과학과

Beneficial Effects of Phyto-Extract Complex (CME) on Degenerative Arthritis

Hyeong-Ho Seo^{1#}, Jong-Moon Jeong^{2*}

1 : Research Center of Ben's Lab Co., Ltd., 2 : Dept. of Life Science, The University of Suwon

ABSTRACT

Objectives : Degenerative arthritis arises from several physiological factors. The purpose of this study is to investigate the beneficial effects of Phyto-extract Complex (CME) on degenerative arthritis.

Methods : CME is composed of extracts of mulberry (*Morus alba* L.) fruit, mulberry leaves and black beans (*Glycine max* (L.) Merr.). To measure the toxicity of CME, we performed the single-dose toxicity study. For the evaluation of its effects on degenerative arthritis, we examined the inhibition of cyclooxygenase-2 (COX-2) activity, using *in vitro* enzyme activity assay, the reduction of protein expression of COX-2, 5-lipoxygenase (5-LO), and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in RAW264.7 cells which were stimulated by lipopolysaccharide (LPS). We also examined the serum level of prostaglandins (PGs) and injury of the knee joint cartilage, using animal model of degenerative arthritis induced by mono-sodium iodoacetate (MIA).

Results : CME did not have any toxicity in single-dose toxicity study. The CME inhibited the activity of COX-2 and could reduce the protein expression of COX-2, 5-LO and iNOS in RAW264.7 cells. The CME also reduced the serum level of PGs and prevented from the cartilage injury of knee joint in animal model of degenerative arthritis induced by MIA.

Conclusions : Taken altogether, the CME could be useful for the improvement of degenerative arthritis through its various anti-inflammatory activities and prevention from the cartilage injury of knee joint.

Key words : Mulberry, Arthritis, Cyclooxygenase-2, Anti-inflammation, Prostaglandins, Cartilage.

서론

桑椹子是 오디, 桑實 또는 黑椹이라고도 하며 뽕나무과 (*Moraceae*), 뽕나무속(*Morus*)에 속하는 뽕나무(*Morus alba* L.)의 열매이다. 桑椹子에는 다양한 유기산과 폴리페놀(polyphenol) 등이 다량 함유되어 있으며 특히, cyanidin-3-glucoside, delphinidin-3-glucoside 및 cyanidin-3-rutinoside와 같은 안토시아닌(anthocyanin) 계열의 색소가 다량 함유되어 있다¹⁻⁵⁾. 안토시아닌의 알려진 생리활성 기능들에는 항산화, 혈중 중성지방 및 LDL-콜레스테롤 감소, 항당뇨, 항염증, 간기능 개선효과 등이 있다⁶⁻⁷⁾.

桑葉은 뽕나무의 잎으로서 鐵扇子 또는 蠶葉이라고도 한다.

桑葉에는 Kaempferol 3-(6-malonylglucoside), Chlorogenic acid, Quercetin 3-(6-malonylglucoside) 및 Rutin 등의 폴리페놀이 다량 함유되어 있다⁸⁾. 현재까지 알려진 桑葉의 생리활성 기능들에는 중추신경계에서의 amyloid β -peptide 형성억제, 항당뇨, 항암활성, 간보호 및 불면증 완화 효과 등이 있다⁹⁻¹⁴⁾.

서리태(*Glycine max* (L.) Merr.)는黑豆 또는 검정콩이라고도 하며 껍질은 검정색이지만 속은 푸르다고 해서 속청이라고도 불린다. 서리태에는 여성호르몬인 에스트로젠(estrogen)과 유사한 생리기능을 하는 것으로 연구된 daidzein 및 genistein과 같은 isoflavone이 다량 함유되어 있고 일반 대두에 비해 안토시아닌을 많이 함유하고 있다¹⁵⁾. 현재까지 알려진 서리태의 생리활성 기능들에는 혈전용해, 암세포에 대한

*교신저자 : 정종문, 경기도 화성시 봉담읍 와우안길 17, 수원대학교 생명과학과.
· Tel : 031-222-6514 · Fax : 031-222-6552 · E-mail : jmjeong@suwon.ac.kr
#제1저자 : 서형호, 경기도 화성시 봉담읍 와우안길 17, 수원대학교 첨단과학기술원 115호
· Tel : 031-222-6514 · Fax : 031-222-6552 · E-mail : chaos72@naver.com
· 접수 : 2013년 10월 15일 · 수정 : 2013년 11월 17일 · 채택 : 2013년 11월 20일

독성, 퇴행성 치매예방 효과 등이 있다¹⁶⁻¹⁸⁾.

골관절염(osteoarthritis)이라고도 하는 퇴행성관절염(degenerative arthritis, degenerative joint disease)은 관절을 보호하는 연골의 퇴행성 손상으로 병변부위에 국소적인 염증과 통증을 유발하는 질환이다. 발병원인은 외상, 관절기형, 유전적 요소, 비만 등인 경우도 있으나 대부분은 노화이다¹⁹⁻²¹⁾.

퇴행성관절염의 치료제로는 ibuprofen 및 indomethacin과 같은 비스테로이드성 항염제(non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs), 아세트아미노펜(acetaminophen)과 같은 진통제, 관절강에 주사하는 히알루론산(hyaluronic acid) 및 스테로이드(steroid) 등이 있으나 치료효과가 일시적이거나 단순 증상완화에 그치고 과민반응, 면역체계 악화 등의 부작용이 많이 보고되고 있다²²⁻²⁶⁾.

본 연구소의 선행연구에서 퇴행성관절염 개선제를 개발하기 위해 32종의 천연물을 탐색한 결과, 桑椹子, 桑葉 및 서리태가 퇴행성관절염의 개선에 필요한 여러 조건을 상호보완적으로 충족시킴을 확인하였다. 이에 이들을 배합한 桑椹子추출물 등 복합물(이하, CME)을 대상으로 퇴행성관절염의 개선 효과를 연구하였다.

재료 및 방법

1. 시료(CME)의 제조

桑椹子是 전라북도 부안군 농업기술센터에서 1kg 구입하였다. 桑椹子 생과를 식품용 분쇄기를 이용하여 700 rpm으로 5분간 분쇄 후 분쇄된 桑椹子 즙에 3배량(w/v)의 40% 에탄올 수용액으로 50℃에서 4시간, 총 3회 추출한 다음 냉각하고 0.125 mm(80 mesh) 규격의 스테인레스 스틸 거름망을 사용하여 여과하고 여기에서 얻은 여과액을 다시 여과지(Whatman No. 2)를 사용하여 재여과하였다. 얻어진 여액을 60℃에서 60 brix까지 감압 농축하고 여기서 얻어진 농축액을 동결건조하여 桑椹子 추출분말을 113.2g 수득하였다.

桑葉 추출물은 桑葉을 전라북도 부안군 농업기술센터에서 1kg 구입하였다. 桑葉을 정제수로 세척 후 50℃, 24시간 건조하고 식품용 분쇄기를 이용하여 700 rpm으로 5분간 분쇄 후 분쇄된 분말에 4배량(w/v)의 50% 에탄올 수용액으로 60℃에서 4시간, 총 3회 추출한 다음 냉각하고 0.125 mm(80 mesh) 규격의 스테인레스 스틸 거름망을 사용하여 여과하고 여기에서 얻은 여과액을 다시 여과지(Whatman No. 2)를 사용하여 여과하였다. 얻어진 여액을 60℃에서 30 brix까지 감압 농축하고 여기서 얻어진 농축액을 동결건조하여 桑葉 추출분말을 76.4g을 수득하였다.

서리태는 경상남도 함양농협에서 1kg 구입하였다. 서리태를 정제수로 세척 후 서리태의 4배량(w/v)의 30% 에탄올 수용액으로 60℃에서 4시간, 총 3회 추출한 다음 냉각하고 0.125 mm(80 mesh) 규격의 스테인레스 스틸 거름망을 사용하여 여과하고 여기에서 얻은 여과액을 다시 여과지(Whatman No. 2)를 사용하여 여과하였다. 얻어진 여액을 60℃에서 30 brix까지 감압 농축하고 여기서 얻어진 농축액을 동결건조하여 서리태 추출분말을 134.7g을 수득하였다.

桑椹子추출물, 桑葉추출물 및 서리태추출물이 퇴행성관절

염의 개선에 필요한 여러 조건들 각각의 중요도와 각 추출물이 가지는 효과의 정도를 고려하여 桑椹子추출물 : 桑葉추출물 : 서리태추출물 = 70 : 14 : 16의 중량비로 배합하여 제조하고 이를 CME라 명하였다.

2. 단회투여독성 시험

실험동물은 6주령 Sprague Dawley(SD) 계통의 rat (Samtako, Korea)로, 시험군은 암컷과 수컷 각 5마리씩 대조군과 CME 투여군으로 정하였다. 이 동물들은 인수 시 및 적응 기간 동안 일반증상의 이상이 관찰되지 않았다. 사육조건을 온도 22±2℃, 상대습도 55±10%, 조명시간 12시간(오전 6시~오후 6시)으로 설정 한 뒤 시험하였고 실험동물용 고형사료(Samtako, Korea)와 정수시스템을 사용한 물을 자유 섭취 하도록 하였다.

CME 투여군과 대조군은 시료 투여 12시간 전에 절식시키고 2 g/kg으로 1회 경구투여 한 후 14일 동안 임상증상을 식품의약품안전청의 독성시험기준 및 OECD test guideline 420 (TG 420)에 따라서 관찰하였다. 즉, 모든 실험동물은 시료투여 당일 날에 투여 후 6시간 동안 매 시간마다 동물의 일반상태의 변화, 중독증상의 발현 및 사망유무를 관찰 하였으며, 다음날부터 14일까지는 1일 1회씩 관찰하였다. 또한 시험물질 투여 당일과 14일째의 체중변화를 측정하였다. 시험 종료 후 실험동물을 마취하고 치사 시킨 다음 외관 및 내부장기의 이상 유무를 육안으로 관찰하였다.

3. COX-2 enzyme activity assay

아라키돈산을 기질로 하여 prostaglandin을 생성하는 COX-2의 효소활성을 측정하기 위하여 COX inhibitor screening assay kit (Cayman chemical, MI, USA)을 사용하였다. 먼저, 1.5 mL 튜브에 COX-2 효소(30 units/mL) 10μL, heme 용액(150 μM/mL) 10μL, 반응 완충액(0.1M Tris-HCl, 5mM EDTA, 2 mM phenol, pH 8.0) 950 μL을 넣고 여기에 순차적인 농도별로 희석된 샘플 20 μL를 첨가한 후 5분간 37℃에서 안정화하였다. 여기에 아라키돈산 10 μL를 넣고 2분간 37℃에서 반응시킨 후 1 M HCl 50 μL를 넣고 반응을 정지하였다. SnCl₂ 용액(50 mg/mL) 100 μL를 넣고 잘 섞어준 후 상온에서 5분간 반응시켰다. 상기 반응에서 생성된 prostaglandin으로 경쟁적 ELISA를 실시하기 위하여 상기 반응액을 EIA 완충액(0.1 M phosphate, 0.1% BSA, 0.4 M NaCl, 1 mM EDTA, 0.01% sodium azide)으로 2,000배 또는 4,000배 희석하고 이를 anti-prostaglandin 항체가 코팅된 96 well plate에 50 μL씩 분주 후 PGs screening AChE tracer를 50 μL와 antiserum을 50 μL씩 첨가한 후 18시간 동안 상온에서 반응시켰다. 96 well을 완충액으로 5회 세척한 후 Ellman's reagent를 200 μL씩 넣고 60분간 발색한 후 ELISA reader (VERSAmax, Molecular Devices, CA, USA) 기기를 이용하여 410 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. COX-2 활성억제의 정도는 kit 제조사의 방법을 준용하여 계산하였으며 50% 억제하는 농도인 IC₅₀(ppm)값으로 나타내었다.

4. 세포주 배양

마우스의 대식세포주인 RAW 264.7 세포는 한국 세포주 은행(Seoul, Korea)으로부터 분양받았으며, 세포배양을 위해 penicillin (100 IU/mL)과 streptomycin (100 µg/mL) 및 10% Fetal Bovine Serum (FBS)를 포함하는 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco-BRL, MD, USA)배지를 사용하였다. 세포는 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양(MCO-17AIC, SANYO, Osaka, Japan)하였다.

5. 면역세포화학염색

24 well plate에 12mm 원형 cover slip을 넣은 후 RAW 264.7 세포를 1×10⁴ cells/mL의 농도로 각 well에 1 ml씩 seeding하고 37°C, 5% CO₂ 조건에서 24시간 배양하였다. 각 시료를 처리하고 1시간 후 1 µg/mL의 농도로 LPS를 처리 후 다시 24시간 배양하였다. 배지를 PBS로 3회 수세하고 4% formalin (in PBS, pH 7.4)로 고정하고 일차항체인 COX-2 (Cell signaling Technology, MA, USA) 또는 5-LO (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) 또는 iNOS (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)와 2차 항체(Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)를 이용하여 항원을 표지하고 3,3'-Diaminobenzidine (DAB, Sigma Chemical, MO, USA)으로 발색하였다. 배경염색은 Mayer's hematoxylin으로 하고 광학현미경(200배 배율)으로 촬영하였다.

6. MIA 유도 퇴행성관절염 동물모델 제작 및 CME 경구투여

7주령 Sprague dauley(SD)계 흰쥐에 Table 1.에 표기한 바와 같이 대조군과 실험군을 나누어 MIA(Sigma Chemical, MO, USA)를 무릎 관절강내 주사(intra-articular injection)함으로써 chondrocyte의 대사를 저해하고 이로 인해 cartilage, ligament 및 tendon의 손상을 유발시켜 골관절염을 발생시키는 원리를 이용하였다. 즉, 실험동물 수는 각 군당 10 마리로 하여 7주령, 체중 300g~350g의 SD계 흰쥐의 무릎 관절강내로 27 gauge의 주사바늘이 있는 1 mL 주사기를 사용하여 실험군, 음성대조군, 양성대조군에는 MIA (40 mg/mL)를 50 µL씩 주사하고 Sham군에는 MIA 대신 PBS를 주사하였다. 24시간 후부터 1일 1회씩 실험군은 CME를 100 mg/kg 체중 또는 CME 400 mg/kg 체중, 음성대조군은 정제수 2 mL, 양성대조군은 ibuprofen을 20 mg/kg 체중, Sham군은 정제수 2 mL을 14일간 경구투여하였다.

Table 1. Induction of Degenerative Arthritis by Mono-sodium Iodoacetate and Oral Dose.

Induction of degenerative arthritis	Groups	Oral dose/day (for 14 days)
Treated with PBS	Sham	DW
	Negative control	DW
Treated with mono-sodium Iodoacetate (40mg/mL, 50µL/rat)	Positive control	Ibuprofen 20mg/kg body weight
	CME100	CME 100mg/kg body weight
	CME400	CME 400mg/kg body weight

7. 혈중 prostaglandins 농도측정

MIA를 이용한 퇴행성관절염 동물모델에서 염증 및 통증유발인자인 prostaglandin의 생성을 억제하는 효능을 측정하기 위해 Prostaglandin screening EIA Kit (Cayman Chemical, MI, USA)를 사용하였다. 먼저, kit에 포함된 Prostaglandin AChE Tracer와 antiserum을 anti-PGs antibody가 코팅된 96 well plate에 넣고 표준 prostaglandin 또는 각 실험군의 동물에서 얻은 혈청을 50 µl씩 첨가한 후 18시간 상온에서 반응시키고 각 well을 5번 세척하고 Ellman's Reagent를 200 µl씩 넣고 70분간 발색하고 ELISA reader (Molecular Devices)를 이용하여 420 nm의 파장에서 흡광도를 측정한다. prostaglandins의 양은 ELISA kit에 포함된 표준곡선을 이용하여 산술비례적으로 구하였다.

8. 슬관절 H&E 염색

각 시료를 경구투여한 MIA유도 퇴행성관절염 동물모델의 슬관절 조직을 절취하여 4% 포르말린(pH 7.4)으로 고정하고 5% formic acid로 칼슘을 제거한 후 에탄올 수용액(50%, 70%, 95%, 100%)으로 순차적 탈수 및 xylene으로 투명화하고 파라핀 포매하였다. 포매된 조직을 6µm의 두께로 박절하고 슬라이드에 부착한 후 Gill's Hematoxylin 및 Eosin을 이용하여 H&E 염색을 하고 광학현미경(200배)으로 관찰하였다.

9. 통계학적 분석

실험결과는 3회 반복하여 평균±표준오차(mean±SEM)로 나타냈으며, Student's t-test로 통계처리하여 비교하였다. 통계처리에서 p값이 0.05 미만일 경우(p<0.05) 통계적인 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. CME의 안전성

식품의약품안전처의 독성시험기준 및 OECD test guideline 420(TG 420)에 따라 실시한 단회투여독성 시험에서 음성대조군과 비교하여 CME의 경구투여에 따른 수컷과 암컷의 체중 및 장기(비장, 신장, 간)의 무게는 오차범위 안의 변화로써 거의 변화가 없었다(Fig. 1, Fig. 2, Fig. 3).

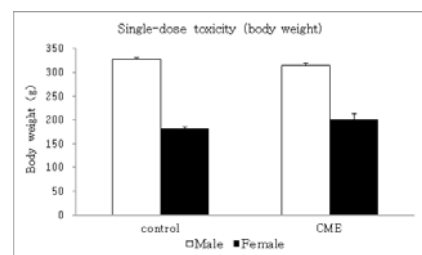


Fig. 1. Body weight change in single-dose toxicity study. The rats were treated with 2 g of CME/kg body weight. All data are presented as mean ± SD for 5 rats. There was no statistical difference.

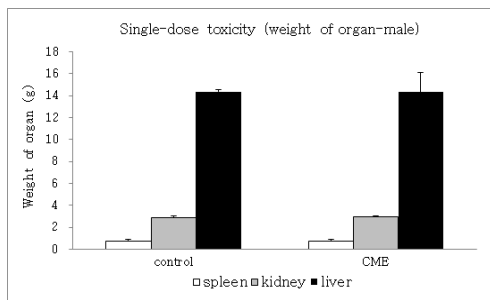


Fig. 2. Male organ weight change in single-dose toxicity study. The rats were treated with 2 g of CME/kg body weight. All data are presented as mean \pm SD for 5 rats. There was no statistical difference.

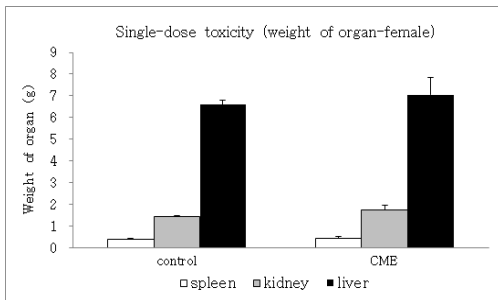


Fig. 3. Female organ weight change in single-dose toxicity study. The rats were treated with 2 g of CME/kg body weight. All data are presented as mean \pm SD for 5 rats. There was no statistical difference.

2. COX-2 활성저해

COX-2를 50% 저해하는 농도인 IC₅₀값은 CME의 경우 180.74 \pm 45.81 ppm으로 대표적인 COX-2 저해제로 시판중인 ibuprofen (41.75 \pm 6.88) 및 aspirin (78.19 \pm 33.72 ppm)보다는 IC₅₀값이 낮지 않았다(Fig. 4).

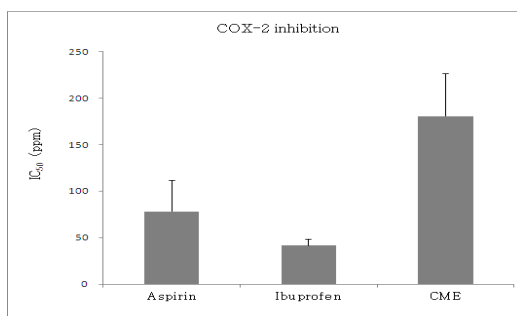


Fig. 4. Effect of CME on the inhibition of COX-2 activity. IC₅₀ : the half maximal inhibitory concentration. All data are presented as means \pm SDs of three independent experiments.

3. COX-2, 5-LO 및 iNOS 발현억제

면역세포화학 염색 실험결과, 마우스 대식세포주인 RAW264.7세포 LPS를 이용하여 염증반응을 유도한 다음 세포내 발현이 증가한 COX-2 (Fig. 5), 5-LO (Fig. 6) 및 iNOS (Fig. 7)를 ibuprofen은 발현을 억제하지 않았지만 CME는 효과적으로 발현을 감소시켰다.

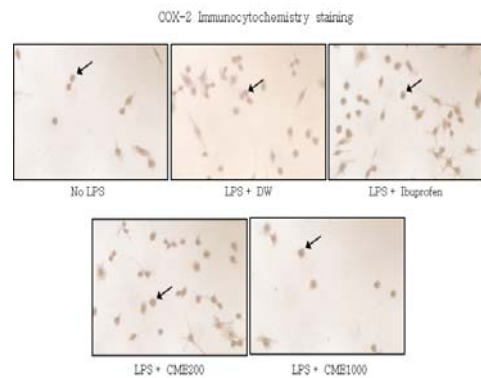


Fig. 5. Inhibitory effect of CME on COX-2 expression in RAW264.7 cells which were activated by lipopolysaccharide. The COX-2 protein expression was induced by LPS only (LPS + DW), LPS and ibuprofen of 10 ppm (LPS + ibuprofen), LPS and CME of 200 ppm (LPS + CME200), LPS and CME of 1,000 ppm (LPS + CME1000), respectively. Arrows indicate COX-2 overexpressed cells (3,3'-Diaminobenzidine stained cells).

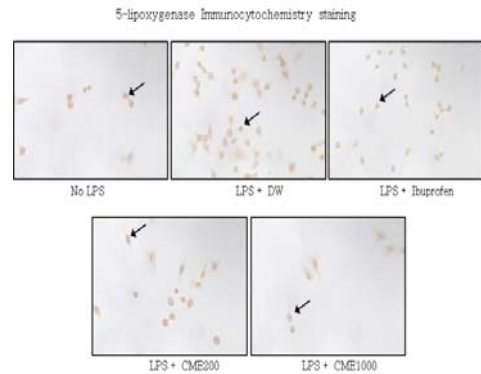


Fig. 6. Inhibitory effect of CME on 5-lipoxygenase expression in RAW264.7 cells which were activated by lipopolysaccharide. The 5-lipoxygenase protein expression was induced by LPS only (LPS + DW), LPS and ibuprofen of 10 ppm (LPS + ibuprofen), LPS and CME of 200 ppm (LPS + CME200), LPS and CME of 1,000 ppm (LPS + CME1000), respectively. Arrows indicate 5-LO overexpressed cells (3,3'-Diaminobenzidine stained cells).

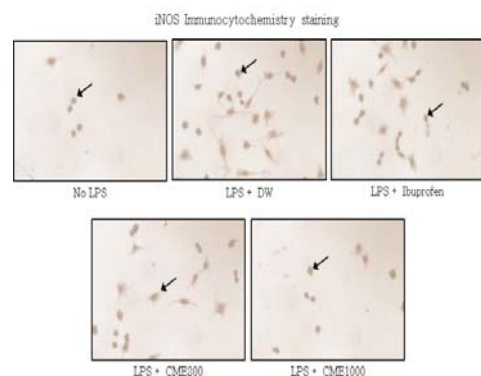


Fig. 7. Inhibitory effect of CME on iNOS expression in RAW264.7 cells which were activated by lipopolysaccharide. The iNOS protein expression was induced by LPS only (LPS + DW), LPS and ibuprofen of 10 ppm (LPS + ibuprofen), LPS and CME of 200 ppm (LPS + CME200), LPS and CME of 1,000 ppm (LPS + CME1000), respectively. Arrows indicate iNOS overexpressed cells (3,3'-Diaminobenzidine stained cells).

4. Prostaglandins 생성억제

MIA로 유도한 퇴행성관절염 동물모델에서 CME를 경구투여한 동물의 혈청 prostaglandin 농도(CME 100 mg/kg 체중 투여군 : 1430.05±446.17, CME 400 mg/kg 체중 투여군 : 857.78±254.91)는 ibuprofen을 경구투여한 양성대조군(ibuprofen 20 mg/kg 체중 투여군 : 266.06±176.81)에 비해 높았지만 정제수를 경구투여한 음성대조군(DW 2 mL/rat 투여군 : 2908.15±195.06)의 50% 이하로 감소하였고 CME의 경구투여량에 의존적인 prostaglandins 감소효과를 보였다(Fig. 8).

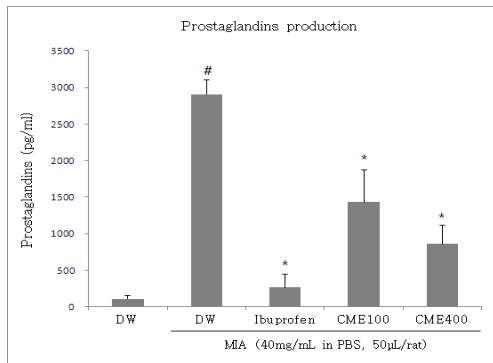


Fig. 8. Effect of CME on the inhibition of prostaglandins production in animal model of degenerative arthritis. The degenerative arthritis was induced by mono-sodium iodoacetate (MIA) only (DW), MIA and 20 mg/kg body weight of ibuprofen for 14 days (ibuprofen), MIA and 100 mg/kg body weight of CME for 14 days (CME100), MIA and 400 mg/kg body weight of CME for 14 days (CME400), respectively. All data are presented as means ± SDs of three independent experiments. *P<0.05, compared with the MIA-treated group. #P<0.05, compared with the MIA-nontreated group.

5. 퇴행성관절염 조직형태학적 개선

MIA로 유도한 퇴행성관절염 동물모델에서 적출한 슬관절을 H&E 염색을 하고 광학현미경으로 200배율에서 관찰한 결과, 정제수를 경구투여한 음성대조군에 비해 양성대조군(ibuprofen 경구투여) 및 실험군(CME 경구투여)에서 MIA에 의한 슬관절 연골의 손상이 감소되었다(Fig. 9).

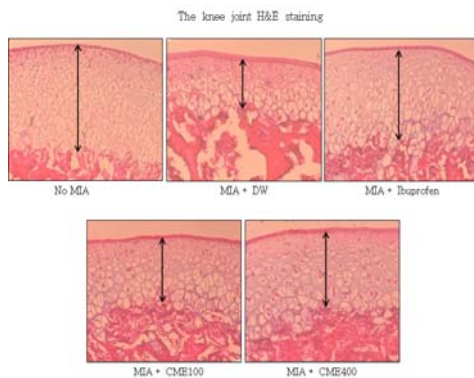


Fig. 9. Effect of CME on the prevention of injury of the knee joint cartilage in animal model of degenerative arthritis. The degenerative arthritis was induced by mono-sodium iodoacetate (MIA) only (MIA + DW), MIA and 20 mg/kg body weight of ibuprofen for 14 days (MIA + ibuprofen), MIA and 100 mg/kg body weight of CME for 14 days (MIA + CME100), MIA and 400 mg/kg body weight of CME for 14 days (MIA + CME400), respectively.

고찰

식물추출복합물인 CME는 桑椹子추출물, 桑葉추출물 및 서리태추출물이 70 : 14 : 16의 중량비로 배합된 것이다.

桑椹子の 풍부한 안토시아닌 성분은 항염증 작용이 있는 것으로 연구되었다¹⁻⁵⁾. 桑葉은 예로부터 발열, 두통, 안구충혈 및 피부 두드러기 등에 사용되었는데 이러한 사실에서 상염은 염증 및 통증의 유발과 관련된 COX-2 및 5-LO의 활성을 저해할 것으로 추론된다. 또한, 서리태의 풍부한 isoflavone은 에스트로겐과 유사한 생리기능을 하는 것으로 알려져 폐경기 여성의 골다공증 예방에 사용되고 있다. 따라서 이러한 식물추출물의 복합물은 퇴행성관절염과 같은 염증성 질환을 개선하는 효과가 있을 것으로 사료되어 본 연구를 수행하였다.

본 연구의 실험결과, CME는 aspirin이나 ibuprofen보다 염증유발 효소인 COX-2를 더 많이 억제하지 못했지만 단일 물질이 아닌 복합물질임을 감안하면 매우 우수한 COX-2 활성저해 효과가 있는 것으로 사료된다.

면역세포화학염색 실험에서 CME는 RAW264.7 세포에서 LPS에 의해서 발현이 증가되는 염증유발 효소인 COX-2, 5-LO 및 iNOS의 발현증가를 억제하였는데 이는 CME가 발현된 염증유발 효소들의 활성저해 이전에 ibuprofen과는 달리 세포내 발현단계를 억제함으로써 보다 효과적으로 염증 및 통증을 감소시킬 수 있을 것으로 기대된다.

또한, CME는 MIA를 이용한 관절염 동물모델에서 비록 단일물질이며 합성의약품인 ibuprofen보다는 염증과 통증을 유발하는 prostaglandins 감소시키는 효과가 있지 않지만 CME가 천연식물 추출물로 이루어진 복합물질임을 감안하면 매우 우수한 prostaglandins 감소효과가 있다고 판단된다.

CME가 MIA에 의해 손상되는 슬관절의 퇴행성 변형을 억제하는 조직학적 실험결과는 CME의 COX-2 활성저해, COX-2, 5-LO 및 iNOS 발현억제, 혈중 prostaglandins 생성억제 효과가 복합적으로 관절염 동물모델에 영향을 미친 결과라고 사료된다.

결론

본 연구에서 확인한 CME가 퇴행성관절염의 개선에 미치는 영향은 다음과 같다.

1. CME는 염증유발 효소인 COX-2의 활성을 억제하였다.
 2. CME는 RAW264.7 세포에서 LPS에 의해서 발현이 증가되는 염증유발 효소인 COX-2, 5-LO 및 iNOS의 발현증가를 억제하였다.
 3. CME는 SD rat에서 MIA에 의해서 생성이 증가되는 prostaglandins의 생성증가를 억제하였다.
 4. CME는 MIA에 의해서 손상되는 슬관절의 손상을 감소시켰다.
- 또한, 단회투여독성 시험에서 CME의 안전성을 확인하였다.

감사의 글

본 연구는 (주)벤스랩의 지원으로 수행하였으며 이에 감사를 드립니다.

References

1. Park SW, Jung YS, Ko KC. Quantitative analysis of anthocyanins among mulberry cultivars and their pharmacological screening. *J Korean Hort Sci.* 1997 ; 38 : 722-4.
2. Kim HB, Kim SL. Identification of C3G (cyanidin-3 glucoside) from mulberry fruits and quantification with different varieties. *Korean J Breed.* 2003 ; 45 : 1-5.
3. Kim EO, Lee YJ, Leem HH, Seo IH, Yu MH, Kang DH, Choi SW. Comparison of nutritional and functional constituents, and physicochemical characteristics of mulberry from seven different *Morus alba* L. cultivars. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2010 ; 39 : 1467-75.
4. Kim HB, Kim AJ, Kim SY. The analysis of functional materials in mulberry fruit and food product development trends. *Food Sci Industry.* 2003 ; 36 : 49-60.
5. Kim MH, Ko KC, Lim SH, Yu YS. Study on the usability of mulberry fruit. Fruit characteristics of mulberry. *Coll of Agric Bull SNU.* 1980 ; 5 : 221-3.
6. Kim TW, Kwon YB, Lee JH, Yang IS, Youm JK, Lee HS, Moon JY. A study on the antidiabetic effect of mulberry fruits. *Korean J Seric Sci.* 1996 ; 38 : 100-7.
7. Lee SH, Kim GH. Inhibitory Effect of mulberry extracts on angiogenesis in porcine artery endothelial cells. *J Life Sci.* 2008 ; 18 : 653-9.
8. Katsube T, Tsurunaga Y, Sugiyama M, Furuno T, Yamasaki Y. Effect of air-drying temperature on antioxidant capacity and stability of polyphenolic compounds in mulberry(*Morus alba* L.) leaves. *Food Chemistry.* 2009 ; 113 : 964-9.
9. Niidome T, Takahashi K, Goto Y, Goh S, Tanaka N, Kamei K, Ichida M, Hara S, Akaike A, Kihara T, Sugimoto H. Mulberry leaf extract prevents amyloid beta-peptide fibril formation and neurotoxicity. *Neuroreport.* 2007 ; 18(8) : 813-6.
10. Pirvulescu MM, Gan AM, Stan D, Simion V, Calin M, Butoi E, Tirgoviste CI, Manduteanu I. Curcumin and a *Morus alba* extract reduce pro-inflammatory effects of resistin in human endothelial cells. *Phytother Res.* 2011 ; 25 : 1737-42.
11. Park JS, Park CH, Jun CY, Choi YK, Hwang GS, Kim DW. The anti-diabetes and vasoelasticity effects Mori folium and Aurantii fructus in streptozotocin induced type II diabetes mellitus model. *Korean J Orient Int Med.* 2007 ; 28(3) : 544-59.
12. Kim OG, Jeong JC. Effects of Mori folium extract in streptozotocin-induced diabetic rats. *Korean J Orient Int Med.* 2006 ; 27(4) : 811-21.
13. Bae MJ, Ye EJ. Antioxidant activity and *in vitro* anticancer effects of manufactured fermented mulberry leaf tea. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2010 ; 39(6) : 796-804.
14. Kim HJ, Kim JK, Whang WK, Ham IH, Kwon SH. Effects of Mori folium and Crataegus pinnatifida leave extracts on CCl4-induced hepatotoxicity in rats. *Yakhak Hoeji.* 2003 ; 47(4) : 2006-11.
15. Oh HS, Park YH, Kim JH. Isoflavone contents, antioxidative and fibrinolytic activities of some commercial cooking-with-race soybeans. *Korean J Food Sci, Technol.* 2002 ; 34(3) : 498-504.
16. Kim YH, Kim DS, Woo SS, Kim HH, Lee YS, Kim HS, Ko KO, Lee SK. Antioxidant activity and cytotoxicity on human cancer cells of anthocyanin extracted from black soybean. *Korean J Crop Sci.* 2008 ; 53(4) : 407-12.
17. Jeon YH, Won JH, Kwon JE, Kim MR. Antioxidant activity and cytotoxic effect of an ethanol extract from Seoritae. *Korean J Food Cookery Sci.* 2011 ; 27(3) : 1-10.
18. Shin HC, Sung HS, Lee YS, Sohn HS. Nutritional adequacy and beneficial effects of soy formula. *Korea Soybean Digest.* 2001 ; 18 : 10-25.
19. Chang MC, Hung SC, Chen YK, Chen TL, Lee CF, Lee HC, Wang KL, Chiou CC, Wei YH. Accumulation of mitochondrial DNA with 4977-bp deletion in knee cartilage e an association with idiopathic osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2005 ; 13 : 1004-11.
20. Kraan PM, Berg WB. Osteoarthritis in the context of ageing and evolution Loss of chondrocyte differentiation block during ageing. *Ageing Res Rev.* 2008 ; 7 : 106-13.
21. Yeom HE. Symptoms, aging-stereotyped beliefs, and health-promoting behaviors of older women with and without osteoarthritis. *Geriatr Nurs.* 2013 ; 34(4) : 307-13.
22. Laine L, White WB, Rostom A, Hochberg M. COX-2 selective inhibitors in the treatment of osteoarthritis. *Semin Arthritis Rheum.* 2008 ; 38(3) : 165-87.
23. de Boer TN, Huisman AM, Polak AA, Niehoff AG, van Rinsum AC, Saris D, Bijlsma JW, Lafeber FJ, Mastbergen SC. The chondroprotective effect of selective COX-2 inhibition in osteoarthritis: ex vivo evaluation of human cartilage tissue after in

- vivo treatment. *Osteoarthritis Cartilage*. 2009 ; 17(4) : 482-8.
24. Bédouet L, Pascale F, Bonneau M, Wassef M, Laurent A. In vitro evaluation of (S)-ibuprofen toxicity on joint cells and explants of cartilage and synovial membrane. *Toxicol In Vitro*. 2011 ; 25(8) : 1944-52.
25. Galliard-Grigioni KS, Reinhart WH. A randomized, controlled study on the influence of acetaminophen, diclofenac, or naproxen on aspirin-induced inhibition of platelet aggregation. *Eur J Pharmacol*. 2009 ; 609(1-3) : 96-9.
26. Wang S, ChenY, He D, He L, Yang Y, Chen J, Wang X. Inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation by serum from rats treated orally with *Gastrodia* and *Uncaria* decoction, a traditional Chinese formulation. *J Ethnopharmacol*. 2007 ; 114(3) : 458-62.