

馬家子 추출물의 연골 보호 및 항염 효과에 관한 연구

박동준^{1#}, 이흥구¹, 고충호², 박형국¹, 진무현¹, 조호성^{1*}

1 : LG생활건강 기술연구원, 2 : 국립수목원 정원식물자원과

Chondro-protective and Anti-inflammatory Effects of Sorbi Commixtae Fructus Extract

Dongjun Park^{1#}, Hong Gu Lee¹, Chung Ho Ko², Hyoungkook Park¹, Mu Hyun Jin¹
Ho Song Cho^{1*}

1 : LG H&H Co., Ltd., 70, Magokjungang 10-ro, Gangseo-gu, Seoul, 07795, Republic of Korea

2 : Garden and Plant Resources Division, Korea National Arboretum, 21-4, Dudam-gil, Yongmun-myeon,
Yangpyong-gun, Gyeonggi-do, 12519, Republic of Korea

ABSTRACT

Objectives : From this study, we sight to identify chondro-protective and anti-inflammatory effects of Sorbi Commixtae Fructus extract and its compound, chlorogenic acid.

Methods : Sorbi Commixtae Fructus were extracted by 50% ethanol. And chlorogenic acid in Sorbi Commixtae Fructus 50% extract was quantified by high performance liquid chromatography (HPLC). To investigate chondro-protective effects, we treated Sorbi Commixtae Fructus 50% ethanol extract and chlorogenic acid in TNF α -activated ATDC5 murine chondrogenic cells. After 24 hours, protein level of matrix metalloproteinase-3 (MMP3) and mRNA level of matrix metalloproteinase-13 (MMP13) were measured by using ELISA or reverse transcription PCR, respectively. To examine anti-inflammatory effects, we treated Sorbi Commixtae Fructus 50% ethanol extract and chlorogenic acid in LPS-induced RAW 264,7 murine macrophages. We measured the level of inflammatory mediators, such as Prostaglandin E2 (PGE2), Interleukin-6 (IL6) by ELISA and nitric oxide (NO) by Griess reagent assay.

Results : A concentration of chlorogenic acid in Sorbi Commixtae Fructus 50% ethanol extract was 3.9 mg/g. Sorbi Commixtae Fructus 50% ethanol extract and chlorogenic acid attenuated protein level of MMP3 and mRNA level of MMP13 in TNF α -activated ATDC5 cells. Sorbi commixtae Fructus 50% ethanol extract inhibited the level of PGE2, IL6 and NO in LPS-activated RAW 264,7 cells in dose dependent manner, but chlorogenic acid has no anti-inflammatory effects.

Conclusions : These findings demonstrated that Sorbi Commixtae Fructus 50% ethanol extract has chondro-protective and anti-inflammatory effects showing possible therapeutics to ease the symptoms related with osteoarthritis.

Key words : Sorbi Commixtae Fructus, Chlorogenic acid, Chondro-protection, Anti-inflammation

*Corresponding author : Ho Song Cho, LG H&H Co., Ltd., 70, Magokjungang 10-ro, Gangseo-gu, Seoul, 07795, Republic of Korea.

· Tel : +82-2-6980-1711

· Fax : +82-2-6980-1602

· E-mail : hscho@lghnh.com

#First author : Dongjun Park, LG H&H Co., Ltd., 70, Magokjungang 10-ro, Gangseo-gu, Seoul, 07795, Republic of Korea.

· Tel : +82-2-6980-1710

· Fax : +82-2-6980-1602

· E-mail : djun2@lghnh.com

· Received : 18 August 2022

· Revised : 07 November 2022

· Accepted : 25 November 2022

I. 서론

퇴행성관절염은 관절을 구성하고 있는 연골, 뼈, 활액, 활막 그리고 인대 등의 퇴행에 의하여 발생하는 복합 질병이다¹⁾. 퇴행성관절염 진행 시 염증에 의하여 연골을 구성하는 물질들이 지속적으로 분해되는데, 염증은 유전적 요인, 환경 요인, 물리적 충격 등에 발생한다²⁾.

무릎에서 발생하는 퇴행성관절염을 한의학에서는 肝主筋腎主骨로 규정하여 肝腎 기능이 俱虛하여 筋骨이 痿緩한데 風寒濕의 邪氣가 來侵하여 膝部의 筋骨, 肌肉, 關節에 疼痛, 酸脹, 腫痛, 麻木, 關節의 腫大, 屈伸不利 등의 증상을 수반하는 것으로 보고 있다³⁾. 증상의 정도에 따라 痺症, 鶴膝風, 歷節風로 구분하고, 肝, 腎, 二臟의 상태 개선을 목표로 祛風勝濕, 溫經通絡, 消腫止痛 처방을 사용하고 있다⁴⁾.

퇴행성관절염을 앓고 있는 환자에게 가장 빈번하게 사용되는 약은 비스테로이드성 진통소염제인데 이는 장기간 섭취 시 위장, 간 및 신기능에 부작용을 일으킬 수 있다⁵⁾. 이에 반하여 장기간 식품으로 섭취해 온 이력이 있는 천연 식물 소재는 장복 시에도 부작용이 적고 다양한 성분이 함유되어 있어 다수 요인에 의하여 병세가 악화되는 퇴행성관절염 치료에 다양한 효능을 보일 가능성이 높다⁶⁾.

본 연구에서는 산림청 국립수목원의 '전통식물자원의 발굴 및 보전' 사업을 통하여 증식된 유용자원식물로, 국립수목원 자생식물증식보전센터로부터 제안 받은 천연물 소재 중 하나인 馬家木을 사용하였다. 馬家木 (*Sorbus commixta* Hedl.)은 장미과 식물로 나무껍질은 丁公皮로 불리고 性은 寒하고 味는 苦하다. 丁公皮는 強壯, 祛風, 鎮咳 효능이 있어 신체 허약, 요슬통, 해수, 백발 치료를 위하여 한방 처방에 사용되어 왔다⁷⁾. 馬家木의 열매는 馬家子로 일컬으며 국내에서 식용이 가능한 소재로 등재되어 있다. 性은 平하고 味는 甘苦하다. 효능은 鎮咳, 祛痰, 利水, 止瀉, 強壯으로 알려져 있다⁷⁾.

馬家子에는 chlorogenic acid, neochlorogenic acid, rutin, hyperoside 및 isoquercetin이 함유되어 있다고 보고된 바 있는데⁸⁾, 본 연구에서는 馬家子の 지표기능성분으로 항염 효능이 선행 연구된 바 있는⁹⁾ chlorogenic acid를 선정하여 馬家子 50% 주정 추출물 내 함량 및 효능을 확인하고자 하였다.

본 연구에서는 馬家子 50% 주정 추출물(SCE)을 제조하고 추출물 내 chlorogenic acid 함량을 분석한 뒤 세포 수준의 퇴행성관절염 model에 馬家子 50% 주정 추출물 및 chlorogenic acid를 처리한 이후 유의한 개선 효과를 얻었기에 이에 관하여 보고하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 시료

시약은 Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 배지 (Gibco BRL, USA), 우태아혈청(FBS : Invitrogen, USA), 지질다당체(LPS : Sigma Aldrich, USA), TNF α 재조합단백질(Peprotech, USA), cell counting kit-8 (CCK8 : Dojindo

Molecular Technologies, JAPAN), penicillin-streptomycin (Gibco BRL, USA), Dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS : Gibco BRL, USA), Griess reagent (Sigma Aldrich, USA), Prostaglandin E2 (PGE2) ELISA (Enzo Life Sciences, USA), Interleukin-6 (IL6) ELISA kit (R&D systems, USA), matrix metalloproteinase-3 (MMP3) ELISA kit (R&D systems, USA), AccuPrep[®] universal RNA extraction kit (Bioneer, South Korea), cDNA 합성 kit (Phile Korea technology, South Korea)를 사용하였다. 흡광도 측정은 microplate UV spectrometer (Synergy H1MF, Biotek, USA)를 사용하였다.

2. 추출물 제조

충북 제천에서 재배된 馬家子를 (주)휴먼허브에서 구입한 후 馬家子 100 g에 50% 주정 2 L를 넣고 60℃에서 6시간 추출하였다. 추출물을 여과한 후 농축하였고 수율은 12%였다.

3. High performance liquid chromatography (HPLC)

본 시험에서는 馬家子 50% 주정 추출물의 chlorogenic acid 함량을 분석하기 위하여 HPLC를 사용하였다. Chlorogenic acid 표준품은 Sigma-Aldrich (USA)에서 구입하였다. 분석 조건은 시료를 메탄올에 용해 후 Agilent Poroshell 120 EC-C18 column (C18, 2.7 μ m, 4.6 mm \times 50 mm)을 사용하여 40℃에서 0.1% 인산이 함유된 물과 acetonitrile을 이동상으로 사용하였다. Chlorogenic acid의 표준품에 대한 자외선 검출 파장은 327 nm이었다.

4. 세포 배양

생쥐 유래 대식세포주 RAW 264.7 세포는 한국세포주은행 (Korea)으로부터 분양받았으며, 세포는 10% FBS와 1% penicillin-streptomycin으로 조성된 RPMI 1640 배지로 2-3일 주기로 계대 배양하였다. 생쥐 유래 연골세포주 ATDC5 세포는 Sigma Aldrich (USA)에서 구매하였으며, 10% FBS와 1% penicillin-streptomycin으로 조성된 RPMI 1640 배지로 2-3일 주기로 계대 배양하였다.

5. 세포 독성 측정

ATDC5와 RAW 264.7 세포를 각각 96 well plate에 5 \times 10⁴ cells/well, 8 \times 10⁴ cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양하였다. 배양 배지를 제거한 후 FBS 미포함 RPMI 1640 배지에 馬家子 50% 주정 추출물 12.5, 25, 50, 100 μ g/ml, chlorogenic acid 0.05, 0.1, 0.2, 5, 10, 20 μ g/ml를 더하여 각 세포에 처리한 후 24시간 배양하였다. 배양 후 CCK8 용액 20 μ l을 첨가하여 세포배양기 37℃, 5% CO₂ 조건에서 30분간 반응시켰다. 반응 후 450 nm 파장으로 흡광도를 측정하고 후 대조군에 대한 세포 생존율을 백분율로 표시하였다.

6. MMP3 생성량 측정

ATDC5 세포를 96 well plate에 5×10^4 cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양하였다. 배양 배지를 제거한 후 TNF α 10 ng/ml 함유된 FBS 미포함 RPMI 1640 배지에 馬家子 50% 주정 추출물 50, 100, 200 μ g/ml, chlorogenic acid 0.05, 1, 2 μ g/ml을 더하여 세포에 처리하고 24시간 배양하였다. 이후 1,000 rpm에서 3분 간 원심 분리하여 획득한 상층액을 이용하여 ELISA kit에 포함된 제조회사의 실험법대로 실험을 수행하여 MMP3 생성량을 분석하였다.

7. MMP13 mRNA 발현 측정

ATDC5 세포를 24 well plate에 2×10^5 cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양하였다. 배양 배지를 제거한 후 TNF α 10 ng/ml 이 함유된 FBS 미포함 RPMI 1640 배지에 馬家子 50% 주정 추출물 25 μ g/ml, chlorogenic acid 0.1 μ g/ml을 더하여 세포에 처리하고 24시간 배양하였다. AccuPrep[®] universal RNA extraction kit를 사용하여 RNA를 분리하고, cDNA 합성 kit로 cDNA를 합성하였다. 그 후 RT-PCR을 수행한 후 1% agarose gel에 PCR 결과물을 투입하고, 25분 간 100V로 전기영동을 수행하였다. RT-PCR에 사용한 MMP13, β -actin의 PCR primer는 Bioneer (South Korea)에서 제작하였으며, 정보는 Table 1과 같다.

Primer	Primer Sequence (5'-3')
MMP-13	F : AGAAGTCTACAGTGACCTCCACAGTT
	R : GACTCTACAATGCGATTACTCC
β -actin	F : TCGTGCGTGACATCAAAGAG
	R : TGGACAGTGAGGCCAGGATG

Table 1. Sequence information of MMP13 and β -actin PCR primers.

전기영동 수행 후 결과로 도출된 gel 내 band의 강도는 ImageJ (ver. 1.53a)로 분석하였다.

8. PGE2, IL6, Nitric oxide 측정

RAW 264.7 세포를 96 well plate에 8×10^4 cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양하였다. 배양 배지를 제거한 후 LPS 1 μ g/ml이 함유된 FBS 미포함 RPMI 1640 배지에 馬家子 50% 주정 추출물 12.5, 25, 50 μ g/ml 또는 chlorogenic acid 5, 10, 20 μ g/ml을 더하여 세포에 처리하고 추가로 24시간 배양하였다. 이후 1,000 rpm에서 3분 간 원심 분리하여 획득한 상층액을 이용하여 PGE2, IL6 농도를 각 ELISA kit에 포함된 제조회사의 실험법대로 실험을 수행한 뒤 분석하였다. 결과는 대조군 대비 실험군 내 물질의 농도를 비교하여 백분율로 표시하였다. Nitric oxide (NO) 생성량은 상층액과 Griess reagent를 1 : 1 비율로 반응시킨 후 15분 뒤 540 nm 파장으로 흡광도를 측정하여 대조군 대비 실험군의 값을 상대 비교하여 백분율로 표시하였다.

9. 통계 분석

각각의 실험군은 3번 이상 반복 수행하였고 결과는 평균 \pm 표준 편차로 나타내었다. 결과 사이의 통계적 유의성은 독립적인 t-테스트를 사용하였으며 통계적 차이는 $p < 0.05$ 일 때 유의적인 것으로 간주되었다.

III. 결 과

1. 馬家子 50% 주정 추출물의 chlorogenic acid 함량 분석 결과

馬家子 50% 주정 추출물을 HPLC를 사용하여 chlorogenic acid 함량을 분석한 결과, 3.9 mg/g였다(Figure 1).

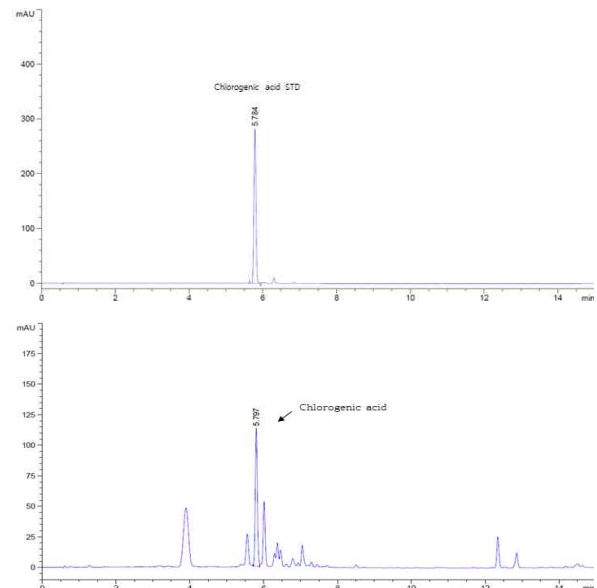


Fig. 1. HPLC chromatogram of chlorogenic acid standard and Sorbi Commixtae Fructus 50% ethanol extract.

2. 馬家子 50% 주정 추출물, chlorogenic acid의 세포 독성 평가

馬家子 50% 주정 추출물의 세포 독성을 RAW 264.7, ATDC5 세포에서 확인한 결과 RAW 264.7 세포에서는 100 μ g/ml에서 대조군 대비 통계적으로 유의한 독성이 나타났고, ATDC5 세포에서는 최고 100 μ g/ml까지 독성이 나타나지 않았다(Figure 2A, 2B). 추후 실험 진행 시 RAW 264.7 세포에는 馬家子 50% 주정 추출물을 50 μ g/ml 이하 농도로 처리하였고 ATDC5 세포에는 100 μ g/ml 이하 농도로 처리하였다. 또한 chlorogenic acid의 세포 독성을 파악하고자 실험한 결과, RAW 264.7 세포에선 최대 20 μ g/ml, ATDC5 세포에선 최대 0.2 μ g/ml까지 대조군 대비 유의한 세포 독성이 발생하지 않았다(Figure 2C, 2D).

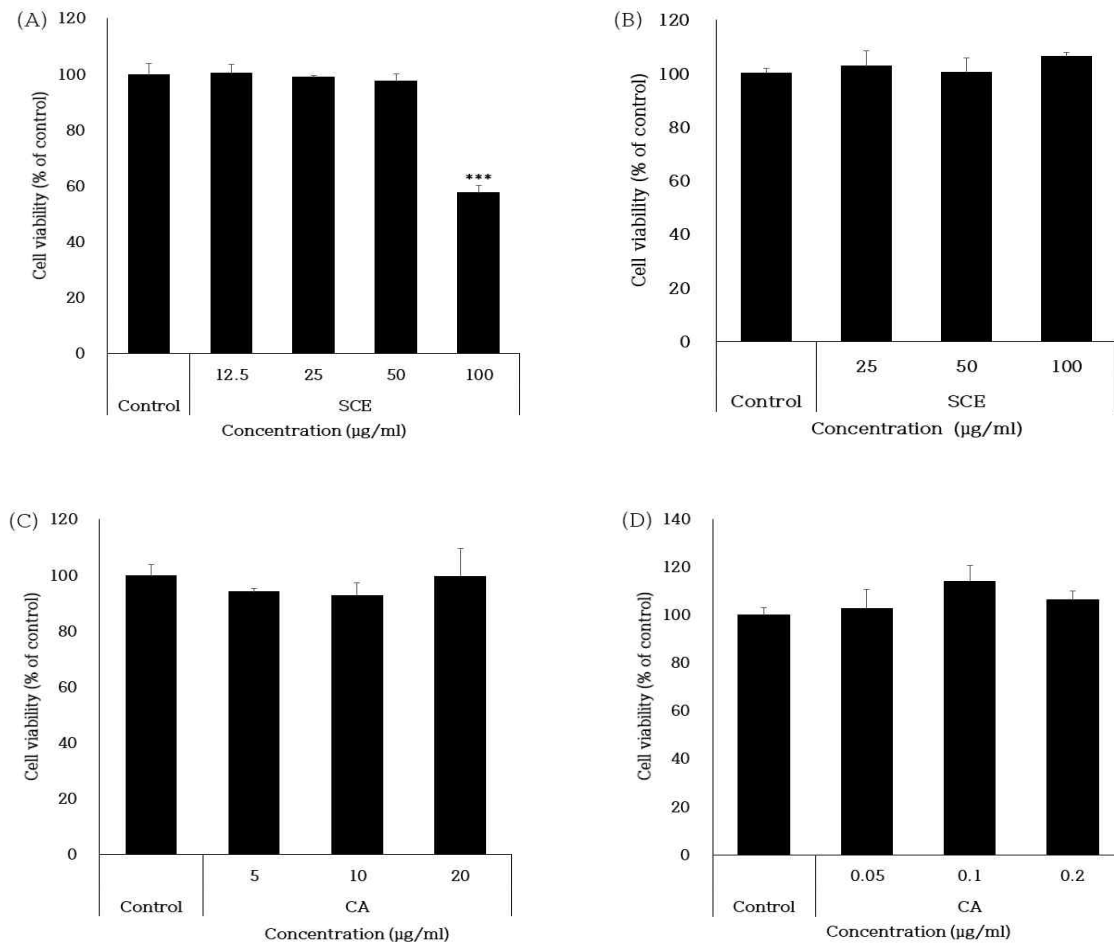


Fig. 2. Effect of Sorbi Commixtae Fructus 50% ethanol extract and chlorogenic acid on cell viability. SCE: Sorbi Commixtae Fructus 50% ethanol extract, CA: chlorogenic acid. Bar graphs meant relative cell viability (%) compared to control. The results presented as the mean \pm SD from three independent experiments. The statistical significance of differences between control and sample groups (***: $p < 0.001$).

3. 馬家子 50% 주정 추출물, chlorogenic acid가 TNF α 자극에 의해 증가한 연골세포 MMP3 생성에 미치는 영향

馬家子 50% 주정 추출물, chlorogenic acid의 MMP3 생성 억제 효과를 보고자 ATDC5 세포에 염증성 cytokine TNF α 10 ng/ml을 처리하여 MMP3 생성을 유도하고 동시에 馬家子 50% 주정 추출물 12.5, 25, 50 μ g/ml, chlorogenic acid 0.05, 0.1, 0.2 μ g/ml을 처리한 결과 馬家子 50% 주정 추출물 최저 12.5 μ g/ml에서($p < 0.001$) 대조군 대비 유의한 효과가 있었고 50 μ g/ml 처리 시 최고 36.5% 억제 효과를 보였다($p < 0.001$)(Figure 3A). Chlorogenic acid는 최소 0.1 μ g/ml 처리 시 대조군 대비 유의한 억제 효과가 있었고($p < 0.05$), 0.2 μ g/ml 처리 시 19.5% 억제 효과를 보였다($p < 0.05$)(Figure 3B).

4. 馬家子 50% 주정 추출물, chlorogenic acid가 TNF α 자극에 의해 증가한 연골세포 MMP13 mRNA 발현에 미치는 영향

馬家子 50% 주정 추출물, chlorogenic acid의 MMP13 억제 효과를 보고자 ATDC5 세포에 염증성 cytokine TNF α 10 ng/ml을 처리하여 MMP13 mRNA 발현을 유도하고 동시에 馬家子 50% 주정 추출물 25 μ g/ml 처리한 결과, 유의차는 없었지만 control 대비 band 강도가 감소하는 경향을 보였고($p = 0.2$), chlorogenic acid 0.1 μ g/ml 처리 시 대조군 대비 유의하게 감소하였다($p < 0.01$)(Figure 4B).

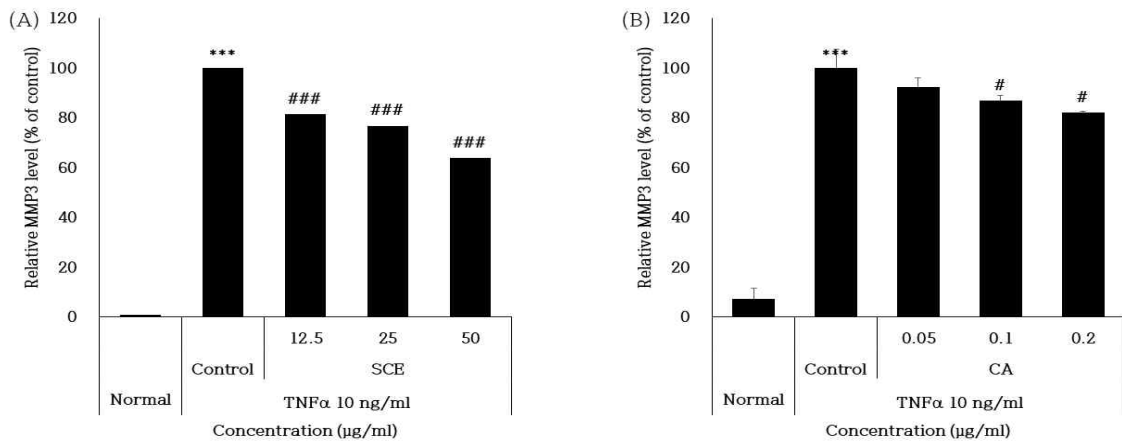


Fig. 3. Effect of Sorbi Commixtae Fructus 50% ethanol extract and chlorogenic acid on TNF α induced MMP3 production in ATDC5 cells, SCE: Sorbi Commixtae Fructus 50% ethanol extract, CA: chlorogenic acid, TNF α : tumor necrosis factor α , MMP3: matrix metalloproteinase-3. Bar graphs meant relative MMP3 level (%) compared to control. The results presented as the mean \pm SD from three independent experiments. The statistical significance of differences between normal and control groups (***: $p < 0.001$) or control and sample groups (#: $p < 0.05$, ###: $p < 0.001$).

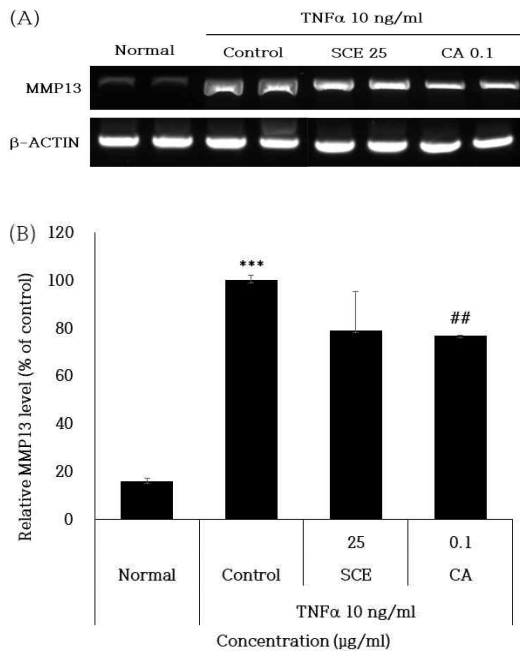


Fig. 4. Effect of Sorbi Commixtae Fructus 50% ethanol extract and chlorogenic acid on TNF α induced MMP13 mRNA expression in ATDC5 cells, SCE: Sorbi Commixtae Fructus 50% ethanol extract, CA: chlorogenic acid, MMP13: matrix metalloproteinase-13 (A) Representative RT-PCR result; (B) Bar graphs meant relative MMP13 : β -actin ratio compared to control based on band intensity of PCR product. The results presented as the mean \pm SD from two independent experiments. The statistical significance of differences between normal and control groups (***: $p < 0.001$) or control and sample groups (##: $p < 0.01$).

5. 馬家子 50% 주정 추출물, chlorogenic acid가 LPS 자극에 의해 증가한 대식세포 PGE2 생성에 미치는 영향

馬家子 50% 주정 추출물과 chlorogenic acid의 PGE2 생성 억제 효과를 확인하고자 RAW 264.7 세포에 LPS 1 μ g/ml를 처리하여 염증 반응을 유발함과 동시에 馬家子 50% 주정 추출물 12.5, 25, 50 μ g/ml, chlorogenic acid 5, 10, 20 μ g/ml을 처리한 결과 馬家子 50% 주정 추출물 최소 25 μ g/ml 이상에서 대조군 대비 유의한 억제 효과가 있었고($p < 0.05$), 50 μ g/ml에서는 최고 36% 수준으로 억제하였다($p < 0.01$) (Figure 5). Chlorogenic acid는 모든 농도에서 억제 효과가 없었다(data not shown)

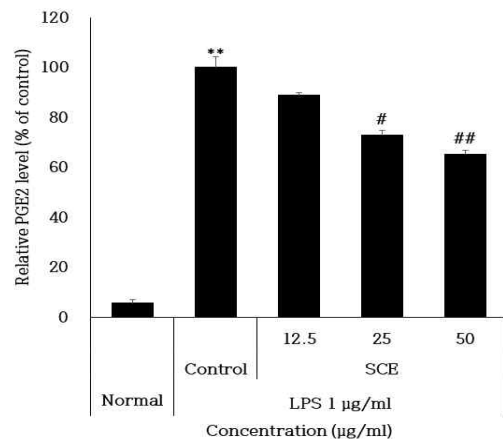


Fig. 5. Effect of Sorbi Commixtae Fructus 50% ethanol extract on LPS induced PGE2 production in RAW 264.7 cells. SCE: Sorbi Commixtae Fructus 50% ethanol extract, LPS: Lipopolysaccharide, PGE2: prostaglandin E2. Bar graphs meant relative PGE2 level (%) compared to control. The results presented as the mean \pm SD from three independent experiments. The statistical significance of differences between normal and control groups (**: $p < 0.01$) or control and sample groups (#: $p < 0.05$, ##: $p < 0.01$).

6. 馬家子 50% 주정 추출물, chlorogenic acid가 LPS 자극에 의해 증가한 대식세포의 NO 생성에 미치는 영향

馬家子 50% 주정 추출물, chlorogenic acid의 NO 생성 억제 효과를 보고자 RAW 264.7 세포에 LPS 1 $\mu\text{g/ml}$ 을 처리하여 염증 반응을 유발함과 동시에 馬家子 50% 주정 추출물 12.5, 25, 50 $\mu\text{g/ml}$, chlorogenic acid 5, 10, 20 $\mu\text{g/ml}$ 을 처리한 결과 馬家子 50% 주정 추출물 최소 12.5 $\mu\text{g/ml}$ 에서 대조군 대비 유의한 억제 효과가 있었고($p < 0.001$), 최고 50 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 42% 억제율을 보였다($p < 0.001$)(Figure 6). Chlorogenic acid는 모든 처리 농도에서 억제 효과가 없었다(data not shown).

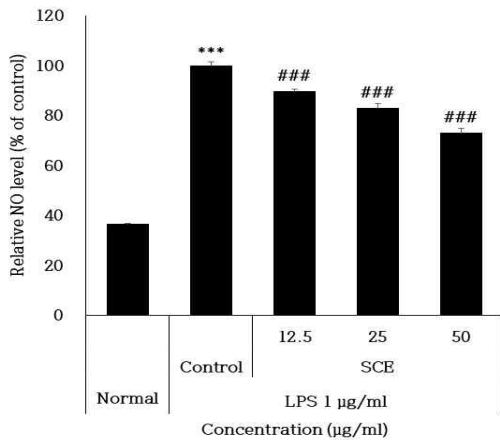


Fig. 6. Effect of Sorbi Commixtae Fructus 50% ethanol extract on LPS induced nitric oxide production in RAW 264.7 cells. SCE: Sorbi Commixtae Fructus 50% ethanol extract, LPS: lipopolysaccharide, NO: nitric oxide. Bar graphs meant relative NO level (%) compared to control. The results presented as the mean \pm SD from three independent experiments. The statistical significance of differences between normal and control groups (***) : $p < 0.001$ or control and sample groups (###) : $p < 0.001$.

7. 馬家子 50% 주정 추출물, chlorogenic acid가 LPS 자극에 의해 증가한 대식세포의 IL6 생성에 미치는 영향

馬家子 50% 주정 추출물, chlorogenic acid의 IL6 생성 억제 효과를 보고자 RAW 264.7 세포에 LPS 1 $\mu\text{g/ml}$ 을 처리하여 염증 반응을 유발함과 동시에 馬家子 50% 주정 추출물 12.5, 25, 50 $\mu\text{g/ml}$, chlorogenic acid 5, 10, 20 $\mu\text{g/ml}$ 을 처리한 결과 馬家子 50% 주정 추출물 25 $\mu\text{g/ml}$ 이상에서 대조군 대비 유의한 억제 효과가 있었고($p < 0.05$), 50 $\mu\text{g/ml}$ 처리 시 53% 억제 효과가 있었다($p < 0.01$)(Figure 7). Chlorogenic acid는 모든 처리 농도에서 억제 효과가 없었다(data not shown).

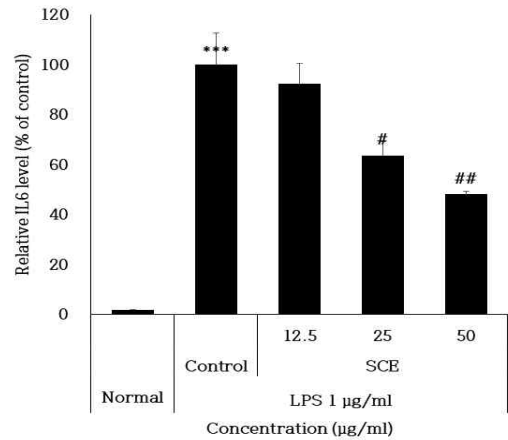


Fig. 7. Effect of Sorbi Commixtae Fructus 50% ethanol extract on LPS induced IL6 production in RAW 264.7 cells. SCE: Sorbi Commixtae Fructus 50% ethanol extract, LPS: lipopolysaccharide, IL6: interleukine 6. Bar graphs meant relative IL6 level (%) compared to control. The results presented as the mean \pm SD from three independent experiments. The statistical significance of differences between normal and control groups (***) : $p < 0.001$ or control and sample groups (#) : $p < 0.05$, (##) : $p < 0.01$.

IV. 고 찰

퇴행성관절염이 발병하게 되면 관절에 상주하던 대식세포는 물리적 자극, 연골 퇴행, 감염 등 다양한 악화 요인에 의하여 활성화 되면서¹⁰ 각종 염증성 cytokine, PGE2, NO 등 염증 물질들을 생성하여 관절 내 염증을 유발한다¹¹. 생성된 염증 물질은 연골세포에서 Nuclear Factor- κ B (NF- κ B), Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) 신호전달회로를 활성화시켜 MMP3, MMP13의 생성을 촉진하여 연골기질을 분해하고¹², 주변 세포의 손상을 촉진한다¹³. 퇴행성관절염 환자의 연골에서 채취한 MMP3, MMP13 유전자의 non-methylated site 비율이 정상인 대비 각각 2배, 4배 이상 증가하여, 유전자 활성이 증가하여 있음을 보여준 연구 결과도 있다¹⁴.

본 연구에서는 우선 ATDC5 세포에 TNF α 10 ng/ml을 처리하여 MMP3 생성 및 MMP13 발현을 촉진한 후 馬家子 50% 주정 추출물과 chlorogenic acid의 억제 효능을 평가하였다.

MMP3 생성의 경우 馬家子 50% 주정 추출물은 최대 36.5% (50 $\mu\text{g/ml}$ 처리 시)($p < 0.001$), chlorogenic acid는 최대 20% (0.2 $\mu\text{g/ml}$ 처리 시)($p < 0.05$) 억제 효과를 보였다(Figure 3).

MMP13 유전자 발현의 경우 馬家子 50% 주정 추출물 25 $\mu\text{g/ml}$ 처리 시 대조군 대비 25% 감소하였고($p = 0.2$), chlorogenic acid 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 처리로 대조군 대비 27% 유의하게 감소하였다($p < 0.01$)(Figure 4).

추가로 馬家子 50% 주정 추출물과 chlorogenic acid의 LPS 자극을 받은 RAW 264.7 세포 유래 염증 물질 생성 억제 효능을 평가한 결과, 馬家子 50% 주정 추출물 50 $\mu\text{g/ml}$ 처리 시 PGE2를 최대 36% ($p < 0.01$)(Figure 5), NO를 최대 42% ($p < 0.001$)(Figure 6), IL6를 최대 53% ($p < 0.01$)(Figure 7) 억제하였다.

Chlorogenic acid가 馬家子 50% 주정 추출물의 주요 기능 성분인지 파악하고자 HPLC 분석한 결과, 馬家子 50% 주정 추출물에 chlorogenic acid가 3.9 mg/g 함유되어 있음을 확인하였다(Figure 1).

馬家子 50% 주정 추출물의 효능 농도(12.5, 25, 50 $\mu\text{g/ml}$) 범위 내 포함된 chlorogenic acid 함량(0.05, 0.1, 0.2 $\mu\text{g/ml}$)을 ATDC5 세포에 $\text{TNF}\alpha$ 와 동시 처리 후 MMP3 생성 및 MMP13 발현을 확인한 결과 유사한 억제 효과를 확인할 수 있었다(Figure 3B, 4B).

그러나 동량의 chlorogenic acid (0.05, 0.1, 0.2 $\mu\text{g/ml}$)를 LPS 자극을 통하여 활성화된 RAW 264.7 세포에 처리한 경우 염증물질인 NO, PGE2, IL6 생성 억제 효과가 없었다(data not shown). 따라서 선행 문헌 조사 결과 LPS 자극을 통하여 활성화된 RAW 264.7 세포의 nitric oxide (NO) 생성, COX-2 (PGE2 생성 효소) 발현, IL6 및 $\text{TNF}\alpha$ 발현이 chlorogenic acid 5, 20 μM (약 1.77, 7.08 $\mu\text{g/ml}$) 처리에 의하여 억제 되었음이 보고된 바 있어⁹⁾ 선행 연구의 유사 농도(5, 10, 20 $\mu\text{g/ml}$)를 처리하였지만 결과가 재현되진 않았다(data not shown).

결과 차이를 고찰해보건대, 선행 연구에서는 NO 생성 실험의 경우 RAW 264.7 세포에 chlorogenic acid를 1시간 먼저 처리한 후 LPS와 함께 chlorogenic acid를 24시간 동시 처리하여 NO 생성량을 측정하였고 COX-2, IL6, $\text{TNF}\alpha$ 생성 실험의 경우 chlorogenic acid를 6시간 먼저 처리한 이후 LPS와 함께 chlorogenic acid를 24시간 동시 처리하여 mRNA 발현량을 분석하였다. Chlorogenic acid를 미리 처리함으로써 효과가 선제적으로 발휘되었기에 본 연구의 LPS와 chlorogenic acid 동시 처리 방법 대비 우월한 효과를 보일 수 있을 것이라 판단된다. 더군다나 선행 연구의 경우 COX-2, IL6, $\text{TNF}\alpha$ 발현을 유전자 수준에서 확인하여 짧은 시간과 낮은 용량으로도 억제 효과를 보였으나 본 연구에서는 ELISA 방법을 통하여 세포 배지 내에 24시간 동안 축적된 IL6, PGE2, NO 물질의 생성 억제 효과를 확인하기엔 chlorogenic acid의 효과가 부족하였던 것이라 판단된다. 결론적으로 chlorogenic acid는 馬家子 50% 주정 추출물의 효능 성분 중 하나이긴 하지만 전체 효능을 대변하지는 않았다.

馬家木 수피인 丁公皮的 열수 추출물과¹⁵⁾ 70% 주정 추출물의¹⁶⁾ LPS 자극으로 활성화된 RAW 264.7 세포의 PGE2, NO, $\text{TNF}\alpha$ 생성 억제 효과 및 馬家木 줄기의 열수 및 주정 추출물의 항산화 효과¹⁷⁾에 관하여 이미 보고된 바 있는데, 본 연구에선 국내 식용 가능 소재로 등재되어 있는 馬家木의 열매인 馬家子の 50% 주정 추출물을 이용하여 연구를 진행하였다.

국소적으로 관절 내에서 발생할 수 있는 염증 반응과 그로 인한 연골 분해 악화 발병 기전을 모사하고자 $\text{TNF}\alpha$ 자극에 의한 연골세포의 MMP3, MMP13 효소 생성을 통한 연골 분해 기전과 LPS 자극에 의하여 활성화된 RAW 264.7 세포에서 생성되는 PGE2, 염증성 cytokine IL6, NO 등을 고루 표적으로 삼아 馬家子 50% 주정 추출물 및 chlorogenic acid의 효능을 확인하였다.

퇴행성관절염의 통증 및 염증 완화를 위하여 현재 비스테로이드성 진통소염제가 가장 빈번하게 처방되고 있지만 여전히 오랜 기간 섭취 경험이 있는 각종 식용 및 약용 가능 천연물

소재의 항염증 작용에 관한 연구가 다수 진행되고 있다¹⁸⁻¹⁹⁾. 식경험이 있는 천연 소재 추출물은 장기간 섭취하여도 안전하고 다양한 성분을 지니고 있어 복합적 요인에 의하여 발생하는 퇴행성관절염 치료에 장점이 있기 때문이다.

본 연구를 통하여 밝혀진 馬家子 50% 주정 추출물의 효과가 추가 연구를 통하여 비임상, 임상 수준에서 검증된다면 안전성이 담보된 천연물 신약 및 건강기능식품의 기능성 원료로 산업적으로 사용될 수 있을 것이다.

V. 결 론

본 연구에서 馬家子 50% 주정 추출물과 성분인 chlorogenic acid의 세포 독성, 염증성 cytokine 자극에 의하여 증가된 생쥐 연골세포의 MMP3, MMP13 생성 억제 및 LPS 자극에 의하여 증가한 생쥐 대식세포주의 염증 물질(PGE2, IL6, NO) 생성 억제 효능을 확인하고자 하였고 그 결과는 다음과 같다.

1. 馬家子 50% 주정 추출물은 대식세포에서는 최고 50 $\mu\text{g/ml}$, 연골세포에서는 100 $\mu\text{g/ml}$ 까지 통계적으로 유의한 세포 독성을 보이지 않았고, chlorogenic acid는 대식세포에서는 최고 20 $\mu\text{g/ml}$, 연골세포에서는 최고 0.4 $\mu\text{g/ml}$ 까지 통계적으로 유의한 세포 독성을 보이지 않았다.
2. 馬家子 50% 주정 추출물과 chlorogenic acid는 $\text{TNF}\alpha$ 자극에 의하여 증가한 연골세포의 MMP3 생성을 대조군 대비 각각 최고 36.5%, 20% 유의한 억제 효과를 보였고 chlorogenic acid는 MMP13 발현 수준을 대조군 대비 25% 유의하게 감소시켰다.
3. 馬家子 50% 주정 추출물은 LPS 자극에 의하여 활성화된 대식세포에서 분비되는 염증 인자(PGE2, IL6, NO)에 관하여 각각 최대 IL6 53%, NO 42%, PGE2 36% 억제 효과를 보였다.

馬家子 50% 주정 추출물과 chlorogenic acid는 $\text{TNF}\alpha$ 자극에 의하여 증가된 연골세포의 연골분해효소 생성을 유의하게 억제하였고, 馬家子 50% 주정 추출물은 LPS 자극에 의하여 증가된 대식세포의 염증 물질 생성을 유의하게 억제하였다.

References

1. Zhong L, Huang X, Karperien M, Post JN. Correlation between Gene Expression and Osteoarthritis Progression in Human. *Int. J. Mol. Sci.* 2016 ; 17 : 1126
2. Goldring MB, Goldring SR. Osteoarthritis. *J. Cell.*

- Physiol. 2007 ; 213(3) : 626–34.
3. Kim TY, Kim JH, Park JH, Lee JK, Han C, Kum CJ, Oh JW. The Domestic Trends of Traditional Korean Medicine Treatments on Degenerative Knee Arthritis, *Journal of Korea CHUNA Manual Medicine*. 2014 ; 9(2) : 69–79.
 4. Jang JH, Kim KH. A Study on Osteoarthritis of the Knee. *J Acupunct Res*. 1998 ; 15(2) : 493–509.
 5. Fosslien E. Adverse effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on the gastrointestinal system. *Ann Clin Lab Sci*. 1998 ; 28(2) : 67–81.
 6. Ameye LG, Chee WSS. Osteoarthritis and nutrition, From nutraceuticals to functional foods: a systematic review of the scientific evidence. *Arthritis Res Ther*. 2006 ; 8(4) : R127.
 7. Bae KH. *The medicinal plants of korea*. 1st ed, Seoul : Kyo-hak publishing co ltd. 2000 : 236.
 8. Gaivelyte K, Jakstas V, Razukas A, Janulis V. Variation in the contents of neochlorogenic acid, chlorogenic acid and three quercetin glycosides in leaves and fruits of Rowan (*Sorbus*) species and varieties from collections in Lithuania. *Nat. Prod. Commun*. 2013 ; 8(8) : 1105–10.
 9. Hwang SJ, Kim YW, Park YH, Lee HJ, Kim KW. Anti-inflammatory effects of chlorogenic acid in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells. *Inflamm. Res*. 2014 ; 63 : 81–90.
 10. Donell S. Subchondral bone remodelling in osteoarthritis. *EFORT Open Rev*. 2019 ; 4(6) : 221–29.
 11. Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, Taghadosi M, Esmaeili SA, Mardani F, Seifi B, Mohammadi A, Afshari JT, Sahebkar A. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J Cell Physiol*. 2018 ; 233(9) : 6425–40.
 12. Vincenti MP, Brinckerhoff CE. Transcriptional regulation of collagenase (MMP-1, MMP-13) genes in arthritis: integration of complex signaling pathways for the recruitment of gene-specific transcription factors. *Arthritis Res*. 2002 ; 4(3) : 157–64.
 13. Sokolove J, Lepus CM. Role of inflammation in the pathogenesis of osteoarthritis: latest findings and interpretations. *Ther Adv Musculoskelet Dis*. 2013 ; 5(2) : 77–94.
 14. Roach HI, Yamada N, Cheung KSC, Tilley S, Clarke NMP, Oreffo ROC, Kokubun S, Bronner F. Association between the abnormal expression of matrix-degrading enzymes by human osteoarthritic chondrocytes and demethylation of specific CpG sites in the promoter regions. *Arthritis Rheum*. 2005 ; 52(10) : 3110–24.
 15. Yu T, Lee YJ, Jang HJ, Kim AR, Hong SY, Kim TW, Kim MY, Lee JH, Lee YG, Cho JY. Anti-inflammatory activity of *Sorbus commixta* water extract and its molecular inhibitory mechanism. *J. Ethnopharmacol*. 2011 ; 134 : 493–500.
 16. Yu T, Lee YJ, Cho JY. Inhibitory effect of *Sorbus commixta* extract on lipopolysaccharide-induced Pro-inflammatory events in macrophages. *J. Med. Plant. Res*. 2009 ; 3(8) : 600–7.
 17. Yoo JH, Doh ES, Chang JP, Kil KJ. Antioxidant Activities of Hot Water and Ethanol Extracts from the stem of *Sorbus commixta* Heal. *Kor. J. Herbol*. 2017 ; 32(3) : 29–36.
 18. Lee YK, Kim CT, Choi HJ. Anti-Inflammatory Effect of *Anemarrhenae Rhizoma* 80% Ethanol Extract in RAW 264.7 cells. *Kor. J. Herbol*. 2017 ; 32(3) : 97–103.
 19. Park YK. Inhibitory effects of *Zanthoxylum piperitum* on the LPS-induced production of nitric oxide and proinflammatory cytokines in RAW264.7 cells. *Kor. J. Herbol*. 2006 ; 21(4) : 69–76.