

골담초꽃 추출물의 연골 보호 및 염증 억제 효과에 관한 연구

박동준^{1#}, 이홍구¹, 고충호², 박형국¹, 진무현¹, 조호성^{1*}

1 : LG생활건강 기술연구원, 2 : 국립수목원 정원식물자원과

Study on Chondro-protective and Anti-inflammatory Effects of Caraganae Sinicae Flos Extract

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

1 : LG Household and Healthcare 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 : This research aimed to investigate chondro-protective and anti-inflammatory effects of Caraganae Sinicae Flos 50% ethanol extract and its compound, tilianin.

Methods : Caraganae Sinicae Flos was extracted with 50% ethanol. Tilianin in Caraganae Sinicae Flos 50% ethanol extract was quantified by HPLC analysis method. To investigate chondro-protective effects of Caraganae Sinicae Flos 50% ethanol extract, ATDC5 chondrogenic cells were co-treated with Caraganae Sinicae Flos 50% ethanol extract (or tilianin) and tumor necrosis factor- α (TNF α) for 24 hours. After treatment for 24 hours, media supernatant was used for quantifying protein level of matrix metalloproteinase-3 (MMP3) by ELISA and harvested cells were used for analyzing mRNA expression level of matrix metalloproteinase-13 (MMP13) by reverse transcription PCR. To identify anti-inflammatory effects of Caraganae Sinicae Flos 50% ethanol extract, RAW 264.7 macrophage cells were co-treated with Caraganae Sinicae Flos 50% ethanol extract (or tilianin) and lipopolysaccharide (LPS) for 24 hours. media was used for quantifying the level of prostaglandin E2 (PGE2), interleukin-6 (IL6) by ELISA and nitric oxide by Griess reagent assay.

Results : Caraganae Sinicae Flos 50% ethanol extract and tilianin attenuated protein level of MMP3 and mRNA expression level of MMP13 in TNF α -activated ATDC5 cells. Caraganae Sinicae Flos 50% ethanol extract inhibited the level of PGE2, IL6 and NO in LPS-activated RAW 264.7 cells in dose dependent manner, though tilianin inhibited PGE2 only.

Conclusions : These results presented that Caraganae Sinicae Flos 50% ethanol extract could be used as natural medicines for osteoarthritis.

Key words : Caraganae Sinicae Flos, Tilianin, Chondro-protective effects, Anti-inflammatory Activities

*Corresponding author : Ho Song Cho, LG Household & Healthcare 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 Household & Healthcare 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 : 16 September 2022

· Revised : 31 October 2022

· Accepted : 25 November 2022

I. 서론

퇴행성관절염이란 관절에 오랜 기간 물리적인 충격이 가해지면서 연골이 닳아 뼈가 드러나는 질환이다¹⁾. 관절을 이루고 있는 연골, 인대, 뼈 등에 손상을 입어 생기는 통증과 염증이 주된 증상이고²⁾, 노화에 의한 퇴행성 변화, 감염, 외상 등이 원인이다³⁾. 퇴행성관절염이 발생하면 관절에 조직학적 변화가 발생하는데 비정상 혈관 신생, 연골세포 과다생성(hypertrophy)으로 인한 기형적 연골 구조인 골극(osteophyte) 형성, 연골을 둘러싸고 있는 활막의 염증 발생이 대표적이다⁴⁻⁶⁾.

한의학에서는 슬관절의 퇴행성관절염을 肝主筋 腎主骨이라 하여 肝腎 기능이 俱虛하여 筋骨이 痿緩한데 風寒濕의 邪氣가 발생하며 膝部の 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 있다⁷⁾. 증상에 따라 痺症, 鶴膝風, 歷節風 등으로 구분하고, 치료법으로 祛風勝濕, 溫經通絡, 消腫止痛의 방법을 사용하고 있다⁸⁾.

수 세기동안 동양의학에서 사용되어온 천연물 소재를 활용한 항염증 작용에 관한 연구가 오랜 기간 진행되어왔고⁹⁻¹¹⁾, 뛰어난 효과를 지닌 천연물을 활용한 관절염 치료제가 존재하는데도 불구하고 퇴행성관절염 환자의 경우 기존 비스테로이드성 진통소염제를 장복하여 위장, 간 및 신기능에 장애를 일으키는 부작용을 일으키는 경우가 많다. 하지만 천연소재의 경우는 안전하고 부작용이 적다는 장점이 있다.

본 연구에서는 국립수목원 자생식물증식보전센터로부터 제안 받은 유용 식물 소재 중 하나인 골담초를 사용하였다. 골담초(*Caragana sinica* (Buc'hoz) Rehder)는 콩과 식물로 국내에서는 뿌리를 약으로 사용하고, 꽃은 식용 가능하다. 골담초의性は 평하며, 味는 苦하다. 골담초의 뿌리는 주로 肝, 脾, 肺에 작용하며 혈액순환을 도와 통증을 다스리는 活血通脈 효과가 있다고 알려져 있으며, 오랜 기간 중국에서 고혈압, 신경통, 관절염 등 민간 전통 치료제로 사용되어 왔다¹²⁾. 이에 반하여 골담초꽃은 전통적으로 陰氣를 보하는 滋陰, 혈액순환과 소화를 돕는 和血祛風, 健脾의 효능이 있는 것으로 알려져 있지만¹³⁾. 퇴행성관절염 효과에 관해선 보고된 바 없다.

골담초의 성분은 잎에는 tilianin, apigetrin, rutin¹⁴⁾, 뿌리에는 wistin, pseudobaptigenin, formononetin 및 6,3'-Dimethoxy-7,5'-dihydroxyisoflavone¹⁵⁻¹⁶⁾, 지상부에는 Carasiphenol A, Carasiphenol B, Carasiphenol C, Carasiphenol D이 있다고 보고된 바 있으나¹⁷⁾ 꽃의 성분 관해선 보고된 바 없었다.

본 연구에서는 골담초꽃 50% 주정 추출물을 제조하고 추출물 내 성분 함량을 분석한 다음 세포 수준의 퇴행성관절염 model에 골담초꽃 주정 추출물과 성분을 처리한 이후 유의한 억제 효과를 획득했기에 그에 관하여 보고하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 시료

시약은 Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium (Gibco BRL, Grand Island, USA), 우태아혈청

(FBS ; Invitrogen, Waltham, USA), 지질다당체(LPS ; Sigma Aldrich, St. Louis, USA), TNF α 재조합단백질 (Peprotech, Rocky Hill, USA), cell counting kit-8 (CCK-8 ; Dojindo Molecular Technologies, Kumamoto, Japan), penicillin-streptomycin (Gibco BRL, Grand Island, USA), Griess reagent (Sigma Aldrich, St. Louis, USA), PGE2 ELISA (Enzo Life Sciences, Farmingdale, USA), IL6 ELISA kit (R&D systems, Minneapolis, USA), MMP3 ELISA kit (R&D systems, Minneapolis, USA), AccuPrep[®] universal RNA extraction kit (Bioneer, Daejeon, South Korea), cDNA 합성 kit (PhileKorea technology, Daejeon, South Korea)를 사용하였다. 흡광도 측정은 microplate UV spectrometer (Synergy H1MF; Biotek, Winooski, USA)를 사용하였다.

2. 추출물 제조

국내 국립수목원에서 재배된 골담초꽃을 수령하여 골담초꽃 건조물 100 g에 50% 주정 2 L를 넣고 60°C에서 6시간 추출하였다. 추출물을 여과한 후 농축하였고 수율은 36%였다. 농축물을 48시간 질소 치환(purging) 처리하여 주정 용매를 모두 제거하고 고형분 무게를 측정하였으며 DMSO에 녹인 후 처리 농도 별로 희석하여 실험에 사용하였다.

3. High performance liquid chromatography (HPLC) 분석

골담초꽃 50% 주정 추출물은 flavonoid 중 tilianin을 주요 성분으로 함유하고 있다. 본 시험에서는 골담초꽃 50% 주정 추출물의 주요 성분을 분석하기 위하여 HPLC-DAD system (Agilent 1260 Infinity LC System, Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, USA)을 사용하였다. Tilianin 표준품은 Chemface (Wuhan, China)에서 구입하였다. 시료 0.1 g을 methanol 5 mL에 용해시킨 후 Agilent Poroshell 120 EC-C18 column (C18, 2.7 μ m, 4.6 mm X 50 mm)(Santa Clara, USA)에 용해물 2 μ L 주입 후 0.1% 인산이 함유된 물과 acetonitrile 75 : 25 비율의 이동상을 40°C에서 10분 간 흘려주었다. 자외선 검출기의 검출 파장은 327 nm이었다. 그 결과 골담초꽃 50% 주정 추출물의 tilianin 함유량은 0.19%였다.

4. RAW 264.7 대식세포주 및 ATDC5 연골세포주 배양

생쥐 유래 대식세포주 RAW 264.7는 한국세포주은행 (Seoul, South Korea)으로부터 분양받았으며, 10% FBS와 1% penicillin-streptomycin으로 조성된 RPMI 1640 배지로 2-3일 주기로 계대 배양하였다. 생쥐 유래 연골세포주 ATDC5는 Sigma Aldrich (St. Louis, USA)에서 구매하였으며, 10% FBS와 1% penicillin-streptomycin으로 조성된 RPMI 1640 배지로 2-3일 주기로 계대 배양하였다.

5. 세포 독성 측정

ATDC5와 RAW 264.7를 각각 96 well plate에 5×10^4 cells/well, 8×10^4 cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양하였다. 배양 배지를 제거한 후 FBS 미포함 RPMI 1640 배지에 골담초꽃 50% 주정 추출물 100, 200, 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 과 tilianin 5, 10, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 을 더하여 RAW 264.7에 처리하고 골담초꽃 50% 주정 추출물 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 과 tilianin 0.05, 0.1, 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 을 더하여 ATDC5에 처리하여 24시간 배양하였다. 배양 후 CCK-8 용액 20 μL 을 첨가하여 세포 배양기 37°C, 5% CO₂ 조건 하에서 30분 간 반응 시켰다. 반응 후 450 nm 파장으로 흡광도를 측정한 후 대조군에 대한 세포 생존율을 백분율로 표시하였다.

6. TNF α 로 자극한 ATDC5의 배양액 내 MMP3 생성량 측정

ATDC5를 5×10^4 cells/well (96well plate)로 분주하여 24시간 동안 배양하였다. 배양 배지를 제거한 후 TNF α 10 ng/mL이 함유된 FBS 미포함 RPMI 1640 배지에 골담초꽃 50% 주정 추출물 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, tilianin 0.05, 1, 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 을 더하여 세포에 처리하고 24 시간 배양하였다. 이 후

1,000 rpm에서 3분간 원심 분리하여 획득한 상층액을 이용하여 MMP3 농도를 ELISA kit에 포함된 제조회사의 실험법대로 실험을 수행하여 분석하였다.

7. MMP13 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 골담초꽃 50% 주정 추출물 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, tilianin 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 을 더하여 세포에 처리하고 24 시간 배양하였다. AccuPrep[®] universal RNA extraction kit를 이용하여 제조사의 사용법을 따라 RNA를 분리하고, cDNA 합성 kit (Phile Korea, Daejeon, South Korea)로 제조사의 사용법을 따라 cDNA를 합성하였다. RT-PCR을 수행한 후 1% agarose gel에 PCR 결과물을 투입하고, 25분 간 100V로 전기영동을 수행하였다. 역전사 PCR에 사용한 MMP13, β -actin의 PCR primer는 Bioneer (Daejeon, South Korea)에서 제작했으며, 정보는 Table 1과 같다. 전기영동 수행 후 결과로 도출된 gel 내 PCR band의 강도는 ImageJ program (ver. 1.53a)(National Institutes of Health, Bethesda, USA)으로 분석하였다.

Primer	Primer Sequence (5'-3')	Annealing Temp.	Cycles
MMP-13	F : AGAAGTCTACAGTGACCTCCACAGTT	58 °C	35
	R : GACTCTCACAATGCGATTACTCC		
β -actin	F : TCGTGCGTGACATCAAAGAG	58 °C	35
	R : TGGACAGTGAGGCCAGGATG		

8. LPS로 자극한 RAW 264.7 배양액 내 PGE2, IL6, Nitric oxide 생성량 측정

RAW 264.7를 96 well plate에 8×10^4 cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양하였다. 배양 배지를 제거한 후 LPS 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이 함유된 FBS 미포함 RPMI 1640 배지에 골담초꽃 50% 주정 추출물 100, 200, 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$, tilianin 5, 10, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 을 더하여 세포에 처리하고 추가로 24시간 배양하였다. 이 후 1,000 rpm에서 3분 간 원심 분리하여 획득한 상층액을 이용하여 PGE2, IL6 농도를 각 ELISA kit에 포함된 제조회사의 실험법대로 실험을 수행하여 분석하였다. 결과는 대조군 대비 실험군 내 물질의 농도를 비교하여 백분율로 표시하였다. Nitric oxide 생성량은 정제수에 40 mg/mL로 녹인 Griess reagent를 상층액과 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 R program (ver 4.2.1, R-foundation, Vienna, Austria)을 이용하였다. 일원배치 분산분석법(One-way ANOVA)을 이용하여 통계적 유의성을 검증하였으며, 군 간 다중 비교는 Tukey HSD 방법으로 사후 검증 하였다. $p < 0.05$ 에서 통계적으로 유의하다고 판정하였다.

III. 결 과

1. 세포 독성

골담초꽃 50% 주정 추출물과 tilianin의 세포 독성을 RAW 264.7과 ATDC5에서 확인한 결과, RAW 264.7에서는 최대 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($p = 1$), ATDC5에서는 최대 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($p = 0.146$)까지 대조군 대비 통계적으로 유의한 독성이 나타나지 않았다(Figure 1A, 1B). 또한 tilianin의 세포 독성을 파악하고자 실험한 결과, RAW 264.7에선 최대 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($p = 0.08$), ATDC5에선 최대 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 까지 대조군 대비 유의한 세포 독성이 발생하지 않았다(Figure 1C, 1D).

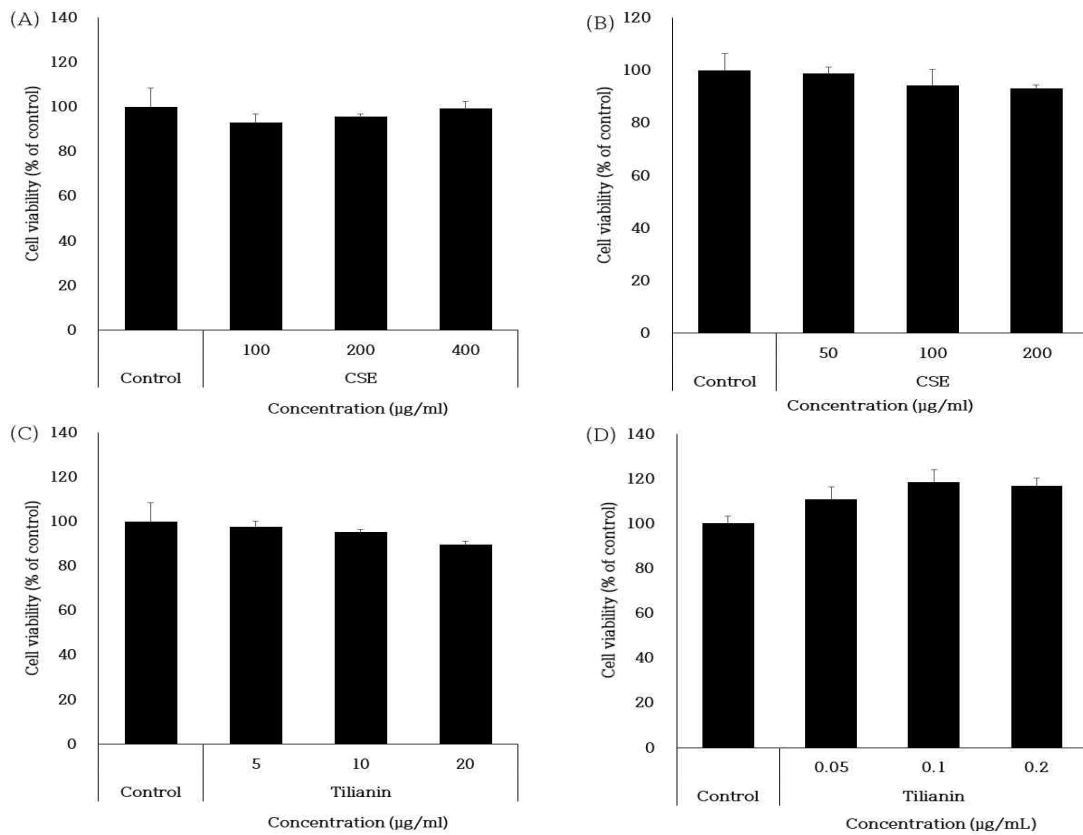


Fig. 1. Effect of *Caraganae Sinicae* Flos 50% ethanol extract and tilianin on cell viability. (A) RAW 264.7 were treated with 100, 200, 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ or (B) ATDC5 were treated with 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of *Caraganae Sinicae* Flos 50% ethanol extract (CSE) for 24 h. (C) RAW 264.7 were treated with 5, 10, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of tilianin or (D) ATDC5 were treated with 0.05, 0.1, 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of tilianin. The results presented as the mean \pm SD from three independent experiments.

2. MMP3 생성

골담초꽃 50% 주정 추출물과 tilianin의 MMP3 생성 억제 효과를 보고자 ATDC5에 $\text{TNF}\alpha$ 10 ng/mL과 골담초꽃 50% 주정 추출물 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 또는 tilianin 0.05, 0.1, 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 을 처리한 결과 골담초꽃 50% 주정 추출물 최소 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 대조군 대비 통계적 유의한 효과가 있었고($p <$

0.001), 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리 시 29.1% 최대 억제효과를 보였다 ($p < 0.001$)(Figure 2A). 그리고 tilianin은 최소 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 대조군 대비 통계적 유의한 억제 효과가 있었고($p < 0.05$), 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리 시 최대 20.8% 억제 효과가 있었다($p < 0.01$)(Figure 2B).

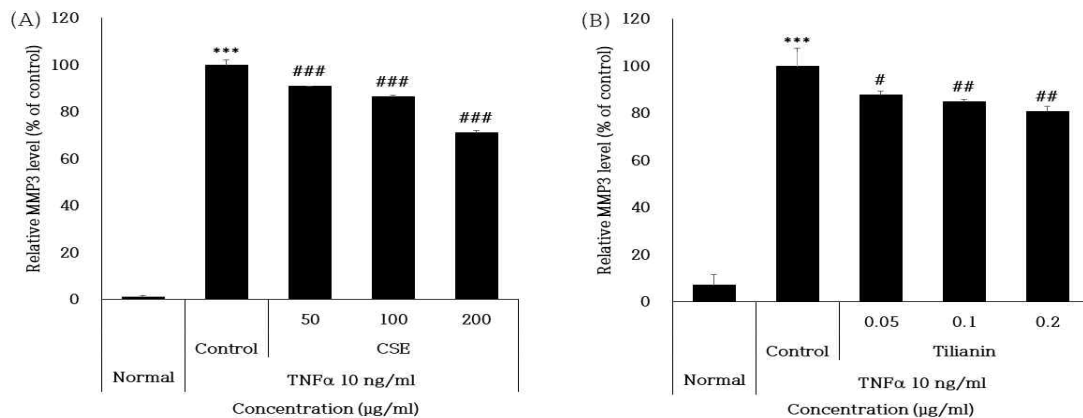


Fig. 2. Effect of *Caraganae Sinicae* Flos 50% ethanol extract and tilianin on $\text{TNF}\alpha$ -induced MMP3 production in ATDC5. ATDC5 were treated with (A) 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of *Caraganae Sinicae* Flos 50% ethanol extract (CSE) or (B) 0.05, 0.1, 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of tilianin and $\text{TNF}\alpha$ (Tumor necrosis factor α) 10 ng/mL for 24 h. 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 (#: $p < 0.05$, ##: $p < 0.01$, ###: $p < 0.001$).

3. MMP13 발현

골담초꽃 50% 주정 추출물, tilianin의 MMP13 발현 억제 효과를 보고자 ATDC5에 TNF α 10 ng/mL을 처리하여 MMP13 발현을 유도함과 동시에 골담초꽃 50% 주정 추출물 100 μ g/mL 또는 tilianin 0.2 μ g/mL을 24시간 처리한 후 역전사 PCR을 수행하였고 그 뒤 gel 전기영동을 수행하였다

(Figure 3A). Band의 강도를 imageJ program을 통하여 분석한 결과, MMP13 발현이 대조군 대비 골담초꽃 50% 주정 추출물 100 μ g/mL 처리 시 55.7% 유의하게 감소하였고($p < 0.05$), tilianin 0.2 μ g/mL 처리에 의하여 57.8% 유의하게 감소하였다($p < 0.05$) (Figure 3B).

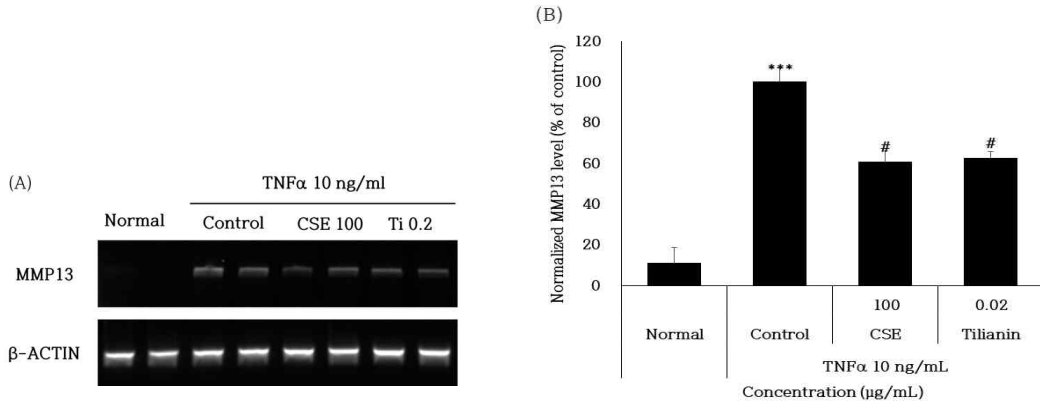


Fig. 3. Effect of Caraganae Sinicae Flos 50% ethanol extract and tilianin on TNF α induced MMP13 expression in ATDC5. CSE: Caraganae Sinicae Flos 50% ethanol extract, MMP13: matrix metalloproteinase-13 mRNA. (A) Representative result of gel electrophoresis, (B) Bar graphs meant relative MMP13 level compared to control based on band intensity of PCR product and normalized by β -actin. 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 (: $p < 0.05$).

4. PGE2 생성

골담초꽃 50% 주정 추출물과 tilianin의 PGE2 생성 억제 효과를 확인하고자 RAW 264.7에 LPS 1 μ g/mL과 골담초꽃 50% 주정 추출물 100, 200, 400 μ g/mL 또는 tilianin 5, 10, 20 μ g/mL을 처리한 결과 골담초꽃 50% 주정 추출물이 대조군 대비 통계적으로 유의한 억제 효과가 나타난 최소 농

도는 100 μ g/mL이었고($p < 0.01$), 400 μ g/mL 처리 시 최고 53.3% 억제 효과를 보였다($p < 0.001$)(Figure 4A). Tilianin의 대조군 대비 통계적으로 유의한 억제 효과를 보인 최소 농도는 5 μ g/mL이었고($p < 0.001$), 20 μ g/mL 처리 시 73.7% 억제 효과를 보였다($p < 0.001$)(Figure 4B).

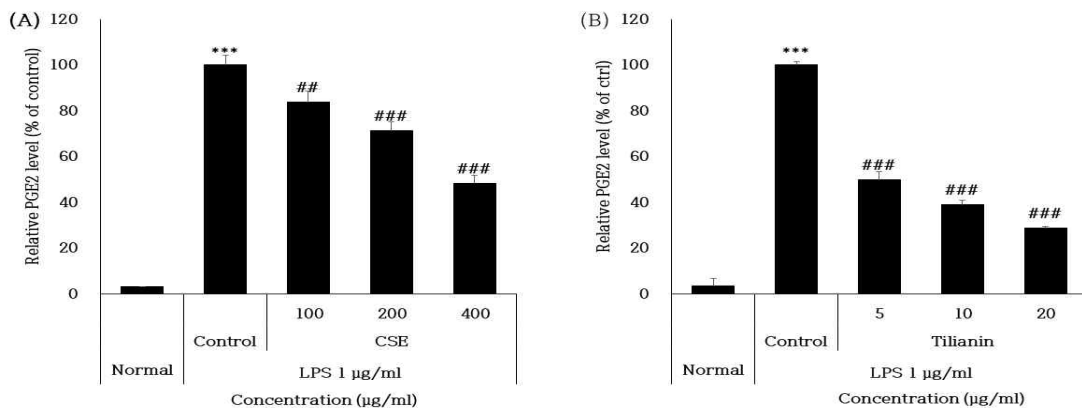


Fig. 4. Effect of Caraganae Sinicae Flos 50% ethanol extract on LPS-induced PGE2 production in RAW 264.7. RAW 264.7 were treated with (A) 100, 200, 400 μ g/mL of Caraganae Sinicae Flos 50% ethanol extract (CSE) or (B) 5, 10, 20 μ g/mL of tilianin and LPS (lipopolysaccharide) 1 μ g/mL for 24 h. The results 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 (###: $p < 0.001$).

5. Nitric oxide 생성

골담초꽃 50% 주정 추출물과 tilianin의 NO 생성 억제 효과를 보고자 RAW 264.7에 LPS 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 과 골담초꽃 50% 주정 추출물 100, 200, 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 또는 tilianin 5, 10, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 을 처리한 결과 골담초꽃 50% 주정 추출물을 최소 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리 시 대조군 대비 유의한 억제 효과가 있었고 ($p < 0.05$), 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리 시 최고 24.4% 억제 효과를 보였다 ($p < 0.001$) (Figure 5). Tilianin은 모든 농도에서 억제 효과가 없었다 (data not shown).

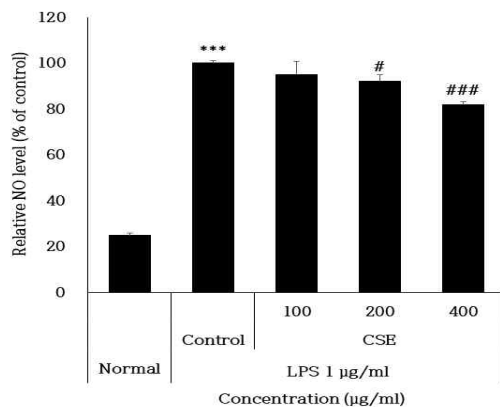


Fig. 5. Effect of Caraganae Sinicae Flos 50% ethanol extract on LPS-induced nitric oxide production in RAW 264.7. RAW 264.7 were treated with 100, 200, 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of Caraganae Sinicae Flos 50% ethanol extract (CSE) and LPS (lipopolysaccharide) 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 24 h. The 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 (#: $p < 0.05$. ###: $p < 0.001$).

6. IL6 생성

골담초꽃 50% 주정 추출물과 tilianin의 IL6 생성 억제 효과를 보고자 RAW 264.7에 LPS 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 과 골담초꽃 50% 주정 추출물 100, 200, 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 또는 tilianin 5, 10, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$

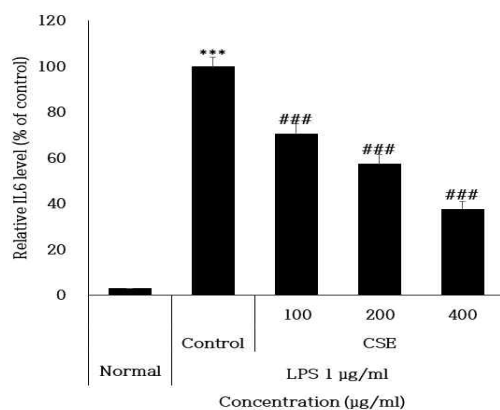


Fig. 6. Effect of Caraganae Sinicae Flos 50% ethanol extract on LPS-induced IL6 production in RAW 264.7. RAW 264.7 were treated with 100, 200, 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of Caraganae Sinicae Flos 50% ethanol extract (CSE) and LPS (lipopolysaccharide) 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 24 h. The results presented 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 (###: $p < 0.001$).

을 처리한 결과 골담초꽃 50% 주정 추출물 최소 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 대조군 대비 유의한 억제 효과가 있었고 ($p < 0.01$), 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리 시 최대 64.5% 억제하였다 ($p < 0.001$) (Figure 6). Tilianin은 모든 농도에서 억제 효과가 없었다 (data not shown).

IV. 고찰

퇴행성관절염 발생의 주요 원인인 감염증, 퇴행성 변화, 외상 등은 관절 연골을 구성하는 세포들을 손상시키고 활막의 염증 반응을 유도한다³⁾. 염증 반응이 일어난 활막의 대식세포에서 과량 분비된 염증성 cytokine은 세포외기질 분해 효소인 matrix metalloproteinase (MMP) 생성을 촉진하여 주변 조직의 손상을 유발한다¹⁸⁾.

염증성 cytokine인 $\text{TNF}\alpha$ 에 의하여 증가된 ATDC5의 MMP3 생성량이 골담초꽃 50% 주정 추출물의 최대 비독성 농도인 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리에 의하여 대조군 대비 최대 29% 억제되었고 ($p < 0.001$) (Figure 2A), MMP13 발현이 대조군 대비 55.7% 억제되었다 ($p < 0.05$) (Figure 3B). 위 실험 결과를 통하여 골담초꽃 50% 주정 추출물의 연골세포 내 MMP3 생성 및 MMP13 발현 억제 효과를 확인하였다.

MMP는 주변 세포들의 세포외기질 내 제2형 콜라겐¹⁹⁻²⁰⁾, aggrecan²¹⁾ 등을 분해하는데, 분해된 물질들의 파편을 Damage-Associated Molecular Patterns (DAMPs)라 일컫는다. 생성된 DAMPs는 연골 내에 상주하는 대식세포를 자극하여 염증성 cytokine과 chemokine을 분비하게끔 만들어 분해된 연골세포의 세포외기질 회복을 방해하여²²⁾, 연골의 연화를 일으켜 퇴행성 변화를 유도한다²³⁾.

골담초꽃 50% 주정 추출물을 최고 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 처리하여 활성화된 RAW 264.7에서 분비되는 PGE2 생성이 최대 53.3% ($p < 0.001$) (Figure 4A), NO 생성이 최대 24.4% ($p < 0.001$) (Figure 5), IL6 생성이 최대 64.5% ($p < 0.005$) (Figure 6) 억제되었다.

연골의 활막에 상주하며, 염증 자극에 의하여 활성화되는 대식세포가 분비하는 IL6, $\text{TNF}\alpha$ 등 염증성 cytokine과 PGE2, NO 등은 대표적인 염증 유발 물질인데²⁴⁾, 본 연구를 통하여 골담초꽃 50% 주정 추출물의 억제 효과를 확인할 수 있었다.

본 연구에서 골담초꽃 50% 주정 추출물에 tilianin이 0.19% 함유되어 있음을 HPLC 분석을 통하여 확인하였다. Tilianin 0.1, 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 $\text{TNF}\alpha$ 자극에 의하여 증가한 연골세포의 MMP3 생성 억제 효과는 각각 16.2% ($p < 0.01$), 20.8% ($p < 0.01$) (Figure 2B)로, 골담초꽃 50% 주정 추출물의 대응 농도인 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 억제 효과인 9.2% ($p < 0.001$), 13.8% ($p < 0.001$)보다 높았다 (Figure 2A). 또한 $\text{TNF}\alpha$ 자극에 의하여 증가한 MMP13 발현은 골담초꽃 50% 주정 추출물 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, tilianin 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리에 의하여 각각 55.7% ($p < 0.05$), 57.8% ($p < 0.05$)로 유사하게 억제되었으므로 (Figure 3B), tilianin이 골담초꽃 50% 주정 추출물의 연골세포의 MMP3 생성과 MMP13 발현 억제에 관한 기능성 분이라 볼 수 있다.

그러나 tilianin은 LPS 자극에 의하여 활성화된 대식세포의 NO, IL6 생성 억제 효과는 없었고(data not shown) PGE2 억제에만 효과가 있었는데(Figure 4B), 골담초꽃 50% 주정 추출물 100, 200, 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에 대응하는 함량인 tilianin 0.2, 0.4, 0.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리 시에는 효과가 없었고(data not shown), 농도를 높여 최소 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상을 처리해야 대조군 대비 통계적으로 유의한 PGE2 감소 효과를 확인할 수 있었다 ($p < 0.001$)(Figure 4B).

선행 연구에 따르면²⁵⁾, RAW 264.7에 LPS 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 와 tilianin 10, 20 μM (4.5, 9 $\mu\text{g}/\text{mL}$)을 동시 처리하였을 때 LPS 처리에 의하여 상승하였던 염증성 cytokine (IL-1 β , IL6), PGE2 생성 효소인 COX-2, 그리고 NO 생성 효소인 iNOS의 유전자 발현이 감소하였다. 따라서 본 연구에서도 5, 10, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 을 처리해보았으나 COX-2에 의하여 생성되는 PGE2 외 IL6, NO 생성 억제 효과는 없었다. 선행 연구의 10, 20 μM (4.5, 9 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 농도의 tilianin은 LPS 자극에 의하여 상승한 RAW 264.7의 염증 지표들을 유전자 수준에서 억제하기엔 충분하였으나, 본 실험처럼 물질 수준의 생성을 억제하기에는 동일 농도 대비 생성 억제 효과가 충분하지 않은 것으로 판단된다. 따라서 tilianin은 활성화된 대식세포로부터 생성이 촉진된 PGE2를 억제하는 효능을 지닌 기능 성분 중 하나이긴 하나 추출물 대응 농도 대비 고농도를 처리해야 효과가 나타났고 그 외 IL6, NO를 억제하는 효능은 없었으므로 골담초꽃 50% 주정 추출물의 대식세포 염증 억제 효능 전체를 대변할 수 있는 기능성분은 아니라고 판단된다.

수 세기 간 퇴행성관절염 관련된 한방 처방에 사용되었던 골담초 뿌리에 반해 꽃 부위는 사용된 바 없다. 선행 연구에서도 골담초 꽃 추출물의 TLR4/NF- κ B, MAPK 신호전달회로를 통한 염증성 위궤양 억제 효과와²⁶⁾ xanthine oxidase 저해 활성을 통한 통풍 억제와 관련된 효과가²⁷⁾ 보고된 바 있지만 관절염 개선 효능에 관해선 보고된 바 없다.

본 연구를 통하여 LPS에 의하여 활성화된 대식세포의 염증 물질(PGE2, IL6, NO) 생성, 그리고 염증 자극을 받은 연골 세포의 MMP3, MMP13 생성에 관한 세포 수준의 퇴행성관절염 model을 이용하여 골담초 꽃 50% 주정 추출물의 퇴행성관절염에 관한 세포 수준의 유의적 효능을 확인하였다. 골담초꽃 50% 주정 추출물의 효과가 추가 연구를 통하여 전임상, 임상 수준에서도 재현이 된다면 안전성이 담보된 천연물 신약 혹은 건강기능식품 기능성 원료로 개발 가능성이 높아질 것이라 사료된다.

V. 결 론

본 연구에서 골담초꽃 50% 주정 추출물과 성분인 tilianin의 세포 수준의 안전성과 염증성 cytokine 자극에 의하여 증가된 쥐 연골세포(ATDC5)의 DAMPs 생성 효소인 MMP3 억제 효능 및 LPS 자극에 의하여 활성화된 쥐 대식세포주(RAW 264.7)의 염증 인자(PGE2, IL6, NO) 억제 효능을 확인하고자 하였고 그 결과는 다음과 같다.

1. 골담초꽃 50% 주정 추출물은 대식세포에서는 최고 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 연골세포에서는 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 까지 통계적으로 유의한 세포 독성을 보이지 않았고, tilianin은 대식세포에서는 최고 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 연골세포에서는 최고 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 까지 통계적으로 유의한 세포 독성을 보이지 않았다.
2. 골담초꽃 50% 주정 추출물과 tilianin은 TNF α 자극에 의하여 증가한 연골세포의 DAMPs 생성 효소 MMP3 생성을 대조군 대비 각각 최고 29.1%, 20.8% 그리고 MMP13 발현을 55.7%, 57.8% 통계적으로 유의한 억제 효과를 보였다.
3. 골담초꽃 50% 주정 추출물은 LPS 자극에 의하여 활성화된 대식세포에서 분비되는 염증 인자(PGE2, IL6, NO) 생성을 대조군 대비 통계적으로 유의하게 억제하였고 본 연구 내 실험 농도 내 최대 PGE2 53.3%, IL6 64.5%, NO 24.4% 억제 효과를 보였고, tilianin은 LPS 자극에 의하여 활성화된 대식세포에서 분비되는 염증 인자 중 PGE2 억제에만 효과를 보였는데 본 연구 내 최대 억제율은 73.7%였다.

References

1. Zhang H, Wang H, Zeng C, Yan B, Ouyang J, Liu X, et al. mTORC1 activation downregulates FGFR3 and PTH/PTHrP receptor in articular chondrocytes to initiate osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2017 ; 25(6) : 952-63.
2. Robinson WH, Lepus CM, Wang Q, Raghu H, Mao R, Lindstrom TM, Sokolove J. Low-grade inflammation as a key mediator of the pathogenesis of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2016 ; 12(10) : 580-92.
3. Donell S. Subchondral bone remodelling in osteoarthritis. *EFORT Open Rev*. 2019 ; 4(6) : 221-29.
4. Lu J, Zhang H, Cai D, Zeng C, Lai P, Shao Y, et al. Positive feedback regulation of subchondral H-type vessel formation by chondrocyte promotes osteoarthritis development in mice. *J Bone Miner Res*. 2018 ; 33 : 909-20.
5. Cui Z, Crane J, Xie H, Jin X, Zhen G, Li C, et al. Halofuginone attenuates osteoarthritis by inhibition of TGF-beta activity and H-type vessel formation in subchondral bone. *Ann Rheum Dis*. 2016 ; 75 : 1714-21.
6. Hügle T, Geurts J. What drives osteoarthritis - synovial versus subchondral bone pathology. *Rheumatology*. 2017 ; 56(9) : 1461-71.
7. 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.
8. Jang JH, Kim KH. A Study on Osteoarthritis of the Knee. *J Acupunct Res*, 1998 ; 15(2) : 493-509.
 9. 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.
 10. Bae GC, Bae DY. The anti-inflammatory effects of ethanol extract of *Allium Hookeri* cultivated in South Korea. *Kor. J. Herbol*, 2012 ; 27(6) : 55-61.
 11. 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.
 12. Chae YA, et al. Medicinal plant biology. Seoul : Hyangmunsa CO, 2007 : 1.
 13. KIM TJ. Korean resources plants II. Seoul : Seoul National University press, 1997 : 11.
 14. Ma CW, Ham I, Whang WK. The flavonoids from the *Caragana chamlagu* leaves. *Yakhak Hoechi*, 1999 ; 43(2) : 143-9.
 15. Zhang LP, Ju MH, Hu CQ. Studies on isoflavones from Chinese peashrub (*Caragana sinica*). *Chinese Traditional Herbal Drugs*, 1994 ; 24 : 134-6.
 16. Qi JB, Shu N, Ma DY, Hu CQ. Isoflavonoid compounds from roots of *Caragana sinica*. *Zhongguo Tianran Yaowu*, 2007 ; 5 : 101-4.
 17. Wang S, Ma D, Hu C. Three new compounds from the aerial parts of *Caragana sinica*. *Helvetica Chimica Acta*, 2005 ; 88 : 2315-21.
 18. 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.
 19. Klatt AR, Paul-Klausch B, Klinger G, Kuhn G, Renno JH, Banerjee M, Malchau G, Wielckens K. A critical role for collagen II in cartilage matrix degradation: collagen II induces pro-inflammatory cytokines and MMPs in primary human chondrocytes. *J Orthop Res*, 2009 ; 27 : 65-70.
 20. Lambert C, Borderie D, Dubuc JE, Rannou F, Henrotin Y. Type II collagen peptide Coll2-1 is an actor of synovitis. *Osteoarthr Cartil*, 2019 ; 27 : 1680-91.
 21. Lees S, Golub SB, Last K, Zeng W, Jackson DC, Sutton P, Fosang AJ. Bioactivity in an Aggrecan 32-mer fragment is mediated via toll-like receptor 2. *Arthritis Rheumatol*, 2015 ; 67(5) : 1240-9.
 22. Rubartelli A, Lotze MT. Inside, outside, upside down: damage-associated molecular-pattern molecules (DAMPs) and redox. *Trends immunol*, 2007 ; 28(10) : 429-36.
 23. Zhang H, Cai D, Bai X. Macrophages regulate the progression of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*, 2020 ; 28(5) : 555-61.
 24. Latourte A, Cherifi C, Maillet J, Ea HK, Bouaziz W, Funck-Brentano T, Cohen-Solal M, Hay E, Richette P. Systemic inhibition of IL-6/Stat3 signalling protects against experimental osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*, 2017 ; 76(4) : 748-55.
 25. Zhang Y, Fu Z. Role of tilianin against acute lung injury in In vitro LPS-induced alveolar macrophage cells and an in vivo C57BL/6 mice model. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*, 2020 ; 39(4) : 335-44.
 26. Li T, Zou QP, Huang F, Cheng GG, Mao ZW, Wang T, Dong FW, Li BJ, He HP, Li YP. Flower extract of *Caragana sinica*, ameliorates DSS-induced ulcerative colitis by affecting TLR4/NF- κ B and TLR4/MAPK signaling pathway in a mouse model. *Iran J Basic Med Sci*, 2021 ; 24(5) : 595-603.
 27. Jeon YS, Jo BS, Park HJ, Kang SA, Cho YJ. Screening of Biological Activity of *Caragana sinica* Extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 2012 ; 41(9) : 1211-9.