

상심자추출물 등 복합물의 퇴행성관절염 억제효과

서형호* · 정종문**†

*주벤스랩 중앙연구소, **수원대학교 생명과학과

Inhibitory Effects of Complex of Mulberry Extract on Degenerative Arthritis

Hyeong Ho Seo* and Jong Moon Jeong**†

*Research Center of Ben's Lab Co., Ltd., Hwasung 445-743, Korea.

**Department of Life Science, The University of Suwon, Hwasung 445-743, Korea.

ABSTRACT : Complex of mulberry extract (CME) is composed of extracts of mulberry (*Morus alba* L.) fruit, mulberry leaves and black beans (*Glycine max* (L.) Merr.). In this study, we investigated prevention effects of CME on degenerative arthritis. The SC₅₀ value of DPPH radical scavenging by CME was 158.49 ± 11.35 µg/mL. We found that CME significantly reduced the production of nitric oxide (NO) and protein expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) in RAW 264.7 cells which were activated by LPS. Experiments using animal model of degenerative arthritis showed that CME (400 mg/kg body weight) inhibited the production of TNF-α (77.5%) and IL-1β (95.0%). Furthermore, it was observed that CME reduced to 85.9% of paw edema induced by carrageenan. These results suggest that CME could improve degenerative arthritis.

Key Words : Mulberry, Black Beans, Arthritis, Edema, Nitric Oxide, Cyclooxygenase-2

서 언

퇴행성관절염 (degenerative arthritis, degenerative joint disease)이란 골관절염 (osteoarthritis)이라고도 하며 외상, 관절 기형, 유전적 요소, 비만, 생활습관으로 발병하는 경우도 있으나 환자의 대다수는 노화로 인해 관절을 보호하는 연골의 퇴행성 손상으로 염증 및 통증을 유발하는 경우이다 (Chang *et al.*, 2005; Kraan and Berg, 2008; Yeom, 2013).

염증 및 통증은 아라키돈산 (arachidonic acid)을 기질로 사용해서 cyclooxygenase (COX) 또는 lipooxygenase (LO)에 의해 생성되는 프로스타글란딘 (prostaglandin) 및 류코트리엔 (leukotriene)과 같은 생리활성물질, TNF-α 및 IL-1β와 같은 사이토카인, NO (nitric oxide)와 같은 자유라디칼 등에 의해 발생 한다 (Mandhane *et al.*, 2011). 현재까지 알려진 염증 및 통증의 기전은 세포손상으로 인한 히스타민 (histamine) 및 키닌 (kinin) 등의 방출로 혈관확장, 모세혈관 투과성 증가 및 염증부위로 대식세포의 집결, 염증부위에 혈류량 증가, 부종,

면역세포와 항체의 이동, 통증 및 발열 등의 현상이 일어난다고 보고되고 있다 (Lee *et al.*, 2011; Carey *et al.*, 2003; Sud'ina *et al.*, 2008; Pecchi *et al.*, 2009).

퇴행성관절염의 치료는 중증인 경우 관절경을 이용하여 유리체와 활액막을 제거, 활막 절제술, 소파관절 성형술, 다발성 천공술, 인공관절 치환술과 같은 수술적 치료가 이루어지며 중증이 아닌 경우 약물요법이 주로 이루어진다 (Castaneda *et al.*, 2012). 퇴행성관절염의 치료제로 사용하는 약물에는 아세트아미노펜 (acetaminophen)과 같은 진통제, ibuprofen 및 indomethacin과 같은 비스테로이드성 항염제 (non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs), 관절 내에 주사하는 히알루론산 (hyaluronic acid) 및 스테로이드 (steroid) 등이 있으나 치료효과가 일시적이거나 단순 증상완화, 과민반응, 면역체계 약화 등의 부작용이 많이 보고되고 있다 (Laine *et al.*, 2008; Boer *et al.*, 2009; Bdouet *et al.*, 2011).

상심자는 뽕나무과 (Moraceae), 뽕나무속 (*Morus*)에 속하는 뽕나무 (*Morus alba* L.)의 열매로서 오디, 상실 또는 흑심이라

†Corresponding author: (Phone) +82-31-222-6514 (E-mail) jmjeong@suwon.ac.kr

Received 2014 February 17 / 1st Revised 2014 March 22 / 2nd Revised 2014 May 9 / 3rd Revised 2014 May 23 / 4th Received 2014 June 11 / Accepted 2014 June 13

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

고도 불린다. 상심자는 다른 식물에 비해 cyanidin-3-glucoside와 cyanidin-3-rutinoside와 같은 안토시아닌 (anthocyanin) 계통의 색소 및 다양한 유기산과 폴리페놀(polyphenol) 등이 다량 함유되어 있다 (Park *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 2003a, 2010). 현재까지 알려진 상심자의 생리활성 기능들에는 항당뇨 (Kim *et al.*, 1996), 항산화, 숙취해소 (Lee and Bae, 2011), 혈관신생억제 (Lee and Kim, 2008) 효과 등이 있다.

상엽은 뽕나무의 잎으로서 철선자 또는 잠엽으로 불린다. 상엽에는 kaempferol 3-(6-malonylglucoside), chlorogenic acid, quercetin 3-(6-malonylglucoside) 및 rutin 등의 폴리페놀이 다량 함유되어 있다 (Katsube *et al.*, 2009). 현재까지 알려진 상엽의 생리활성 기능들에는 항당뇨 (Kim and Jeong, 2006), 항암활성 (Bae and Ye, 2010) 및 간보호 (Kim *et al.*, 2003b) 효과 등이 있다.

서리태 (*Glycine max* (L.) Merr.)는 흑두 또는 검정콩으로 불리며 다른 식물에 비해 특징적으로 daidzein 및 genistein과 같은 isoflavone이 다량 함유되어 있고 일반 대두에 비해 안토시아닌을 많이 함유하고 있다 (Oh *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2006). 현재까지 알려진 서리태의 생리활성 기능들에는 암세포독성 (Kim *et al.*, 2006) 및 노인성 치매예방 (Shin *et al.*, 2001) 효과 등이 있다.

선행 연구로부터 식용 가능한 천연물 중에서 항산화 및 항염증 효과가 뛰어난 32종의 천연물을 탐색한 결과, 상심자, 상엽 및 서리태가 퇴행성관절염의 개선효과가 탁월하였다. 상심자의 NO 생성 및 COX-2의 발현 억제, 상엽의 NO, TNF- α 및 IL-1 β 생성 억제, 서리태의 Carrageenan으로 급성염증이 유도된 동물모델 족부 부종 억제 등 효과들이 상호보완적으로 항염증효과를 충족시킬 것으로 예상되어 상심자, 상엽, 서리태 추출물을 배합한 상심자추출물 등 복합물을 대상으로 퇴행성관절염의 개선효과를 연구하였다.

재료 및 방법

1. 상심자추출분말의 제조

상심자 (*Morus alba* L.)는 전라북도 부안군 농업기술센터에서 1 kg 구입하였다. 상심자 생과를 식품용 분쇄기를 이용하여 700 rpm으로 5분간 분쇄 후 분쇄된 상심자 즙에 3배량 (w/v)의 40% 에탄올 수용액으로 50°C에서 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°C에서 60 brix까지 감압 농축하고 여기서 얻어진 농축액을 동결건조하여 상심자 추출분말을 113.2 g 수득하였다.

2. 상엽추출분말의 제조

상엽 추출물은 상엽을 전라북도 부안군 농업기술센터에서 1 kg 구입하여 다음과 같이 제조하였다. 상엽을 정제수로 세척 후 50°C, 24시간 건조하고 식품용 분쇄기를 이용하여 700 rpm으로 5분간 분쇄 후 분쇄된 분말에 4배량 (w/v)의 50% 에탄올 수용액으로 60°C에서 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°C에서 30 brix까지 감압 농축하고 여기서 얻어진 농축액을 동결건조하여 상엽 추출분말을 76.4 g 수득하였다.

3. 서리태추출분말의 제조

서리태 (*Glycine max* (L.) Merr.)추출물은 서리태를 경상남도 함양농협에서 1 kg 구입하여 다음과 같이 제조하였다. 서리태를 세척 후 서리태의 4배량 (w/v)의 30% 에탄올 수용액으로 60°C에서 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°C에서 30 brix까지 감압 농축하고 여기서 얻어진 농축액을 동결건조하여 서리태 추출분말을 134.7 g 수득하였다.

4. Complex of Mulberry Extract (CME)의 제조

상심자추출물, 상엽추출물 및 서리태추출물 중 퇴행성관절염 개선에 필요한 항염증효과물질들의 함량을 고려하여 상심자추출물 등 복합물을 제조하였다. 상심자추출물 중 안토시아닌 (ca. 1%), 서리태 추출물 중 이소플라본 (ca. 0.2%), 상엽추출물 중 루틴 (ca. 1%)의 함량을 고려하여 상심자추출분말 70 g, 상엽추출분말 14 g, 서리태추출분말 16 g을 혼합하여 상심자추출물 등 복합물을 제조하였고 이를 Complex of Mulberry Extract (CME)라 명하였다.

5. DPPH Radical 소거능 측정

DPPH radical 소거능의 측정은 Blios (1958)의 방법에 의해 실행되었다. 각 농도별 시료 75 μ L를 에탄올에 0.2 mM의 농도로 녹인 DPPH (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Missouri, USA)용액 750 μ L에 첨가하고 다시 3차 정제수 675 μ L를 넣고 혼합하였다. 상온에서 30분간 반응하고 96 well plate에 반응액 200 μ L를 옮긴 후, ELISA reader (Molecular Devices, LLC, Sunnyvale, California, USA)를 사용하여 520 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 양성대조군으로는 EGCG (epigallocatechin gallate)와 Vitamin C를 사용하였다. DPPH 라디칼 소거활성 (%)은 (1-시료 첨가구의 흡광도/시료 무첨가

구의 흡광도) × 100의 계산식을 사용하였다. SC₅₀값은 발생한 라디칼을 50% 소거하는데 필요한 최소농도를 $\mu\text{g/mL}$ 단위로 표시한 것이다.

6. 세포주 배양

마우스 대식세포주인 RAW 264.7 세포와 인간 간세포주인 HepG2 세포는 한국세포주은행 (Seoul, Korea)에서 분양받았으며, 세포배양을 위해 penicillin (100 IU/mL)과 streptomycin (100 $\mu\text{g/mL}$) 및 10% FBS (Fetal Bovine Serum)를 포함하는 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, California, USA) 배지를 사용하였다 (Bao *et al.*, 2009). 세포는 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양 (SANYO Electric Co., Ltd., Osaka, Japan)하였다.

7. 세포 (Raw 264.7) 독성 측정

Raw264.7 세포와 HepG2 세포에 대한 CME의 독성 측정은 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide)법을 실시하여 측정하였다 (Sladowski *et al.*, 1993). Raw 264.7 세포를 96well plate에 5×10^4 cells/well로 분주한 다음, 37°C, 5% CO₂에서 24시간 동안 배양하였다. 24시간 후 이전 배양에 사용된 배지를 제거하고 시료를 각 농도별로 용해한 배지를 분주한 후 37°C, 5% CO₂에서 24시간 동안 배양하였다. 24시간 후 각 well 당 0.2% MTT용액 (in PBS)을 20 μL 씩 첨가하여 37°C, 5% CO₂의 조건으로 배양기에서 3시간 동안 반응시켰다. 반응 후 배지를 모두 제거하고 생성된 formazan을 DMSO (Dimethyl sulfoxide) 200 μL 로 10분간 녹인 다음 ELISA reader를 이용하여 570 nm에서 흡광도의 변화를 측정하였다. 세포 생존율 (%)은 (시료 처리군의 흡광도/시료 무처리군의 흡광도) × 100의 식을 사용하였다.

8. Lipopolysaccharide (LPS) 유도 NO 생성량 측정

각 시료가 염증유발 물질인 NO의 생성을 억제하는 효과는 마우스 대식세포 유래의 Raw 264.7 세포에 Lipopolysaccharide (LPS)를 처리함으로써 배양액에서 생성되는 NO의 안정화된 형태인 NO₂⁻의 농도를 Griess 반응을 이용하여 측정하였다 (Kwak *et al.*, 2008). 먼저, FBS와 항생제가 함유된 DMEM 배지를 사용하여 96well plate에 1×10^4 cells/well로 세포를 분주 후 37°C, 5% CO₂항온기에서 24시간동안 배양하였다. 24시간 후, 이전 배양에 사용된 배지를 제거하고 FBS와 항생제가 함유되지 않은 새로운 배지를 분주한 후 CME를 200 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리하였다. 1시간 후 1 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 LPS를 첨가하여 24시간 배양하였다. 세포배양액 50 μL 와 Griess시약 50 μL 를 혼합하여 10분 동안 반응시킨 후 ELISA reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Nitric oxide 소

거능 (%)은 (1-시료를 첨가한 반응군의 흡광도/시료를 첨가하지 않은 대조군의 흡광도) × 100의 계산식을 이용하여 나타내었다.

9. Western Blotting에 의한 COX-2의 발현 측정

Cell culture dish (100 mm)에 5×10^4 cells/mL로 Raw 264.7 세포를 분주하고 37°C, 5% CO₂ 조건에서 24시간동안 배양한 후, 이전 배양에 사용된 배지를 제거하고 FBS와 항생제가 함유되지 않은 새로운 배지를 분주하고 CME를 200 $\mu\text{g/mL}$ 및 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 Raw 264.7 세포에 1시간 처리한 후 LPS를 1 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 추가로 처리하여 COX-2의 발현을 유도하였다. 24시간 후, 세포를 Lysis buffer (20 mM Tris, 50 mM NaCl, 0.05 mM EDTA, 10 mM MgCl₂, 0.1% SDS, 1% Triton X-100, pH 7.5)로 용해시키고 4°C에서 20분간 4,000 g로 원심분리한 후 총 단백질을 정량하였다. 동일한 농도로 희석한 각 단백질을 Western blotting하였다. 각 well당 1 mg의 총 단백질을 10% SDS-PAGE로 전기영동한 후 nitro-cellulose 막에 옮긴 다음, Blocking 완충용액 (5% Skim milk, 0.5% Tween in PBS)에 넣고 상온에서 1시간 교반한 후, TBS-T 완충용액 (20 mM Tris, 137 mM NaCl, 0.1% Tween 20, pH 7.4)에 1/1,000으로 희석한 anti-COX-2 (Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, Massachusetts, USA) 용액에서 4°C, 24시간 반응시켰다. TBS-T 완충용액으로 3회 세척하고 TBS-T 완충용액에 1/2,000으로 희석한 이차 항체 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, Texas, USA)로 상온에서 1시간 반응시킨 후 TBS-T 완충용액으로 3회 세척하고 화학발광키트 (Pierce, Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, Illinois, USA)를 이용하여 X-ray필름에 현상하였고 총 단백질량의 동일성은 β -actin (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, Texas, USA)의 양으로 검증하였다. 각 단백질의 발현량은 ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) 프로그램을 이용하여 정량하였다.

10. MIA 유도 퇴행성관절염 동물모델 제작 및 CME 경구투여

Sprague Dauley계 흰쥐에 MIA (Mono sodium iodoacetate, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Missouri, USA)를 무릎 관절강 내 intra-articular injection함으로써 chondrocyte의 metabolism를 저해하고 이로 인해 cartilage, ligament 및 tendon의 손상을 유발시켜 골관절염을 발생시키는 원리를 이용하였다 (Janusz *et al.*, 2001). 즉, 실험동물 수는 각 군당 10 마리로 하여 체중 300 g-350 g의 흰쥐의 무릎 관절강내로 1 mL 주사기를 사용하여 실험군 (CME 400 mg/ 체중 kg 경구투여), 음성대조군 (정제수 경구투여), 양성대조군 (Ibuprofen 20 mg/ 체중 kg 경구투여)에는 MIA (40 mg/mL)를 50 μL 씩 주사하고 Sham군에는

Table 1. Induction of degenerative arthritis by MIA and oral dose of sample.

Induction of arthritis	Groups	Oral dose of sample/day (for 14 days)	Number of animals
Treated with PBS	Sham	Distilled water (DW)	10
	Negative control	Distilled water (DW)	10
Treated with MIA (40 mg/mL, 50 µL/rat)	Positive control	Ibuprofen 20 mg/kg body weight	10
	CME100	CME 100 mg/kg body weight	10
	CME400	CME 400 mg/kg body weight	10

Table 2. Induction of acute inflammation by carrageenan and oral dose of sample.

Induction of acute inflammation	Groups	Oral dose of sample/day (for 3 days)	Number of animals
Treated with PBS	Sham	DW	5
	Negative control	DW	5
Treated with carrageenan (1%/saline, 100 µL/rat)	Positive control	Ibuprofen 20 mg/kg body weight	5
	CME100	CME 100 mg/kg body weight	5
	CME400	CME 400 mg/kg body weight	5

MIA 대신 PBS를 주사하였다. 24시간 후부터 Table 1에 나타낸 바와 같이 각 군별로 정제수 또는 CME 또는 ibuprofen을 14일간 매일 정해진 투여량으로 경구투여하였다.

11. TNF-α 및 IL-1β 생성억제 측정

MIA유도 퇴행성관절염 동물모델을 대상으로 TNF-α 또는 IL-1β sandwich ELISA kit (eBioscience, Inc., San Diego, California, USA)을 사용하여 측정하였다. 즉, 각 시료를 경구투여한 MIA유도 퇴행성관절염 동물모델을 희생하고 채혈 및 혈장분리를 한 다음 혈장내에 존재하는 TNF-α 또는 IL-1β의 농도를 ELISA kit의 제조회사가 제시한 방법을 응용하여 측정하였다. 먼저, 96 well plate에 코팅 되어 있는 anti-rat TNF-α 또는 IL-1β antibody에 혈장에 존재하는 TNF-α 또는 IL-1β를 4°C, 24시간 결합시키고 각 well을 5번 세척한 후 biotin-conjugated anti-rat TNF-α 또는 IL-1β antibody를 상온에서 1시간 반응시킨 후 각 well을 5번 세척하고 streptavidin-HRP를 40분간 처리하고 최종적으로 tetramethyl-benzidine으로 발색하여 ELISA reader를 이용해서 450 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. TNF-α 또는 IL-1β의 양은 ELISA kit에 포함된 표준 재조합 TNF-α 또는 IL-1β의 반응표준곡선을 이용하여 산술비례적으로 구하였다.

12. Carrageenan 유도 급성염증 동물모델 제작 및 CME 경구투여

Carrageenan 유도 족부 부종억제 실험은 Winter 등 (1962)의 방법을 응용하여 실험하였다. 즉, SD계 흰쥐를 대상으로 Table 2에 나타낸 바와 같이 각 군의 개체수를 10마리로 하여

시료를 각 농도별로 1일 1회 3일간 경구투여하고 마지막 경구투여 1시간 후 Digimatic micrometer (Mitutoyo Corporation, Kanagawa, Japan)를 사용하여 족부종을 유발하기 전의 족부 두께를 측정하고 1% Carrageenan을 용해한 생리식염수를 100 µL의 양으로 좌측 족저부에 주사하여 족부 부종을 유도하고 5시간 후 다시 족부 두께를 측정하였다.

13. 통계학적 분석

실험결과는 3회 반복하여 평균 ± 표준오차 (Mean ± SE)로 나타냈으며, SPSS (version 21) 통계프로그램으로 Student's *t*-test를 이용하여 *p* < 0.05일 때 유의한 것으로 판정하였고, one-way ANOVA를 실시한 후 *p* < 0.05의 유의수준에서 Duncan's Multiple Range Test (DMRT)에 의하여 각 실험군의 평균치간의 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

1. DPPH Radical 소거능 측정

CME가 DPPH 라디칼을 50% 소거하는 SC₅₀값을 µg/mL 단위로 Table 3에 나타내었다. DPPH는 비교적 안정한 자유라디칼로서, 항산화 물질에 의해 환원되어 탈색되므로 항산화능을 측정할 때 DPPH 라디칼 포착능 측정법이 많이 이용된다. CME의 SC₅₀값은 158.49 ± 11.35 µg/mL으로 양성대조군으로 사용한 단일물질인 EGCG 및 비타민 C의 SC₅₀값인 6.24 ± 1.10 µg/mL 및 5.88 ± 0.69 µg/mL보다 높았다. CME의 원료인 상심자, 상엽 및 서리태에서 항산화 효과에 기여할 것으로 예상되는 polyphenol에는 anthocyanin, rutin, quercetin

Table 3. DPPH radical scavenging effects of CME.

DPPH radical scavenging activities SC ₅₀ ¹⁾ (μg/mL)	
CME	158.49 ± 11.35*
EGCG ²⁾	6.24 ± 1.10
Vitamin C ³⁾	5.88 ± 0.69

*Results were represented as mean ± SE (n = 3).

¹⁾SC₅₀; 50% scavenging concentration. ^{2), 3)}Positive control.

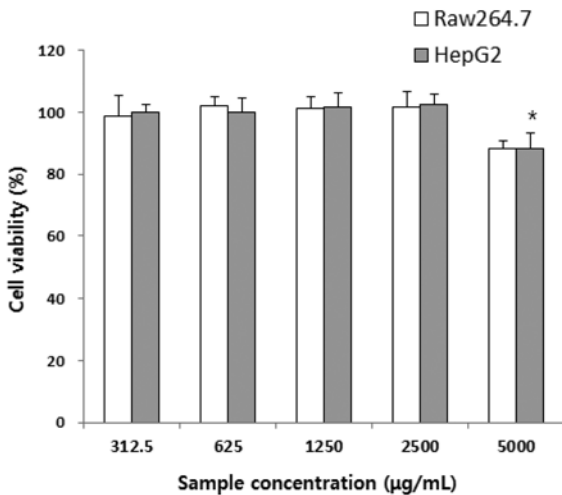


Fig. 1. Effect of CME on the cell viability of RAW 264.7 and HepG2 cells. RAW 264.7 and HepG2 cells were treated with various concentrations (312.5, 625, 1,250, 2,500, 5,000 μg/mL) of CME for 24 hours. Cell viability was measured by MTT assay. Data were obtained from three independent experiments and are expressed as the mean ± SE. *Significantly different from the sham control at $p < 0.05$.

및 isoflavone 등이 있을 것으로 기존의 연구를 통하여 예측할 수 있다 (Ryu and Kwon, 2012; Bae *et al.*, 2011; Oh *et al.*, 2002).

2. 세포 (Raw 264.7) 독성 측정

RAW 264.7 세포와 HepG2에 대한 CME의 세포독성을 알아 보기 위하여 MTT assay를 실시하였다. CME를 농도별 (312.5, 625, 1,250, 2,500, 5,000 μg/mL)로 24시간 동안 각각 처리한 결과는 Fig. 1에 나타내었다. CME를 5,000 μg/mL 처리한 경우, RAW 264.7 세포의 생존율은 90.42 ± 3.11%이었으며 HepG2세포의 생존율은 90.21 ± 1.14%로 약간의 생존율 저하가 있었으나 2500 μg/mL이하의 농도를 처리한 경우, 세포독성을 보이지 않았다. 이는 식품의약품안전처에서 식용이 허용된 대부분의 천연물보다 안전한 수준이다. 또한, 이는 CME의 원료인 상삼자, 상엽 및 서리태의 세포안전성에 관한 기존의 연구 (Lee, 2013; Park, 2009; Jeon *et al.*, 2011)와 일치되며 이러한 원료를 혼합한 CME의 세포안전성도 확인한 결과라 할 수 있다.

Table 4. Effect of CME on the inhibition of NO production in RAW 264.7 cells.

NO production (μM)	
PBS	25.03 ± 5.31* ^{**}
PBS + LPS (1 μg/mL)	144.22 ± 16.48
CME (200 μg/mL) + LPS (1 μg/mL)	45.79 ± 4.81*

*Results were represented as mean ± SE (n = 3).

^{**}Significantly different from the negative control group (PBS and LPS treated group) at $p < 0.05$.

3. Lipopolysaccharide (LPS) 유도 NO 생성량 측정

RAW 264.7 세포에서 LPS를 처리하여 생성된 염증유발물질인 NO는 LPS 처리 후 PBS를 처리한 음성대조군의 경우 144.22 ± 16.48 μM이었으며 LPS 처리 후 CME를 200 μg/mL 처리한 경우 45.79 ± 4.81 μM로 나타나 음성대조군에 대비하여 약 68.25% NO 생성억제 효과를 보였다 (Table 4). Park 등 (2013)은 동결건조 상엽 에탄올추출물을 50 μg/mL의 농도로 RAW 264.7 세포에 처리하였을 때 NO 생성이 약 44% 감소되었다고 보고하였다. Korhonen 등 (2005)에 의하면 pro-inflammatory cytokine이나 염증성 자극에 의해 iNOS (inducible Nitric Oxide Synthase)의 발현이 증가되면 NO가 과량 분비되어 정상세포를 손상시키고 염증을 악화시킨다. CME 처리가 LPS로 유도된 RAW 264.7 세포에서 NO의 생성을 억제하는 것은 iNOS의 발현을 저해하여 나타난 결과라고 사료된다.

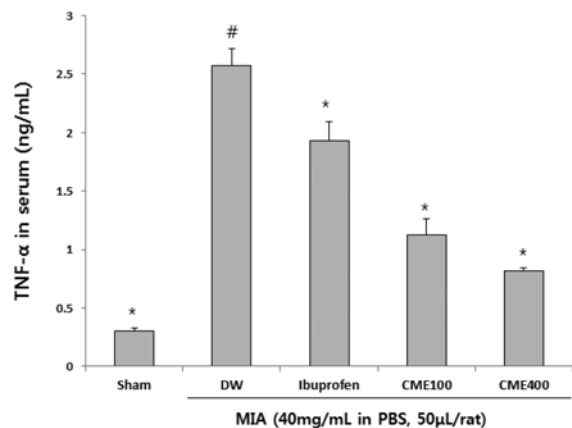


Fig. 2. Effect of CME on the inhibition of TNF-α production. The degenerative arthritis was induced by MIA only (DW), MIA and 20 mg/kg body weight of ibuprofen for 14 days (Ibuprofen), MIA and 100 mg/kg body weight of CME for 14 days (CME100), MIA and 400 mg/kg body weight of CME for 14 days (CME400), respectively. Data were obtained from three independent experiments and are expressed as the mean ± SE. #Negative control group. *Significantly different from the negative control group at $p < 0.05$.

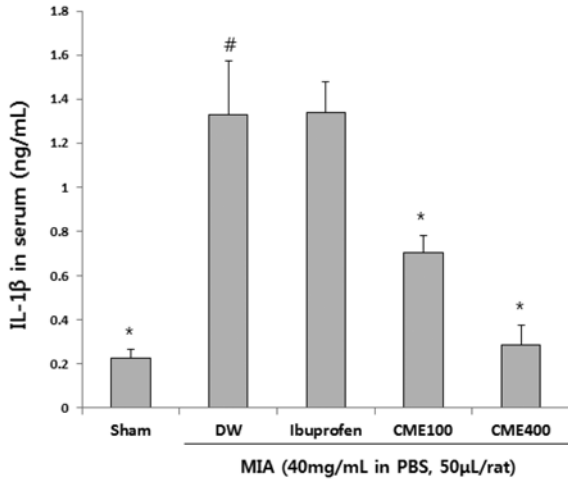


Fig. 3. Effect of CME on the inhibition of IL-1 β production. The degenerative arthritis was induced by MIA only (DW), MIA and 20 mg/kg body weight of ibuprofen for 14 days (Ibuprofen), MIA and 100 mg/kg body weight of CME for 14 days (CME100), MIA and 400 mg/kg body weight of CME for 14 days (CME400), respectively. Data were obtained from three independent experiments and are expressed as the mean \pm SE. #Negative control group. *Significantly different from the negative control group at $p < 0.05$.

4. TNF- α 및 IL-1 β 생성억제 측정

CME가 MIA유도 퇴행성관절염 동물모델에서 염증유발 사이토카인인 TNF- α 및 IL-1 β 의 생체내 발현을 감소시키는 효과는 Fig. 2 및 Fig. 3에 나타내었다. 즉, MIA를 처리하고 정제수를 14일간 경구투여한 음성대조군의 경우, 혈중 TNF- α 및 IL-1 β 는 각각 2.57 ± 0.15 ng/mL 및 1.33 ± 0.25 ng/mL이었으며 관절염 치료제로 사용되는 합성의약품인 ibuprofen을 20 mg/kg 체중의 투여량으로 14일간 경구투여한 경우, 1.93 ± 0.16 ng/mL 및 1.34 ± 0.14 ng/mL으로 미미한 TNF- α 및 IL-1 β 감소효과를 보였으나 CME를 400 mg/kg체중의 투여량으로 14일간 경구투여한 경우, 각각 0.82 ± 0.03 ng/mL 및 0.29 ± 0.09 ng/mL으로 현저한 TNF- α 및 IL-1 β 감소효과를 보였다. CME 100 mg/kg 체중 투여군의 TNF- α 는 1.13 ± 0.14 ng/mL로서 대조군에 비해 63.7% 억제된 것으로 나타났다. Park 등 (2013)은 상업 에탄올 추출물을 LPS로 염증이 유도된 마우스 대식세포에 처리한 결과 TNF- α 의 발현을 20%, IL-1 β 발현을 35%이상 감소시켰다고 보고하였다. 급성 또는 만성 염증반응에서 TNF- α 및 IL-1 β 와 같은 pro-inflammatory cytokine은 림프구간의 신호를 서로 전달하여 면역세포를 활성화시키고 lymphokine과 같은 면역인자들의 생산 및 분비를 유도하여 염증반응을 활성화한다 (Feghali and Wright, 1997; Dinarello, 2000). 본 연구의 퇴행성관절염 동물모델에서 CME의 TNF- α 및 IL-1 β 생성억제 효과는 이러한 cytokine에 의

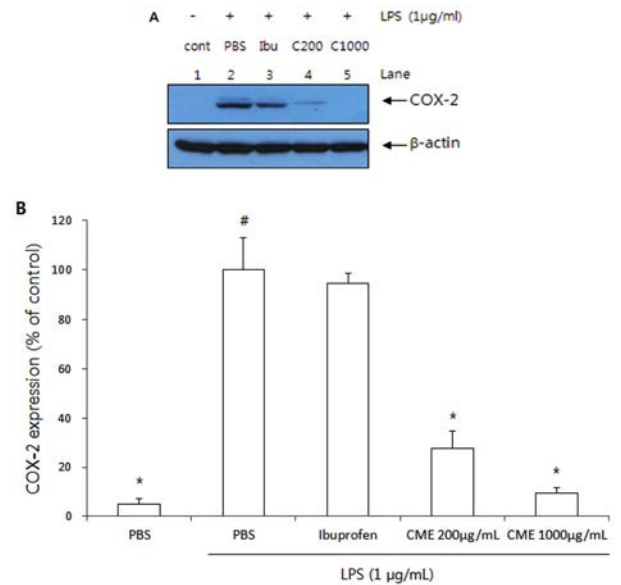


Fig. 4. Western blot analysis of COX-2 in RAW 264.7 cells. The COX-2 protein expression was induced by LPS only (1 μ g/mL, lane 2), LPS and ibuprofen (10 μ g/mL, lane 3), LPS and CME (200 μ g/mL, lane 4), LPS and CME (1,000 μ g/mL, lane 5), respectively. The total protein was fractionated by 10% SDS-PAGE, and the blotted membrane was reacted with anti-COX-2 IgG. Anti-IgG-HRP was used as secondary antibody and immunoreactive protein was detected by chemiluminescence. Data were obtained from three independent experiments and are expressed as the mean \pm SE. #Negative control group. *Significantly different from the negative control group at $p < 0.05$.

해 유도되는 염증반응의 활성화를 CME에 의해 억제시키는 효과를 기대할 수 있게 한다.

5. COX-2의 세포내 발현억제 측정

Fig. 4는 LPS에 의하여 활성화된 RAW 264.7 세포에서 발현이 증가된 COX-2를 ibuprofen을 10 μ g/mL 처리한 경우, COX-2의 발현을 거의 감소시키지 못했지만 CME를 각각 200 μ g/mL 및 1,000 μ g/mL 처리한 경우, COX-2를 농도 의존적으로 현저하게 감소시켰다. 이는 Park 등 (2013)이 동결건조 상업 에탄올추출물 (50 μ g/mL)을 LPS로 염증이 유도된 RAW 264.7 세포에 처리하였을 때 COX-2의 생성을 저해한다고 보고한 것과 비슷한 결과이다. Botting (2006)에 의하면 활성화된 macrophages에서 발현이 증가된 COX-2에 의해 생성된 PGE₂가 혈관확장, 발열 및 통증을 유발하고 관절염이나 다발성 경화증과 같은 질병을 야기하거나 악화시킨다. CME는 이러한 COX-2의 발현을 억제함으로써 PGE₂의 생성을 감소시켜 관절염과 같은 염증성 질환의 악화를 방지할 것으로 기대된다.

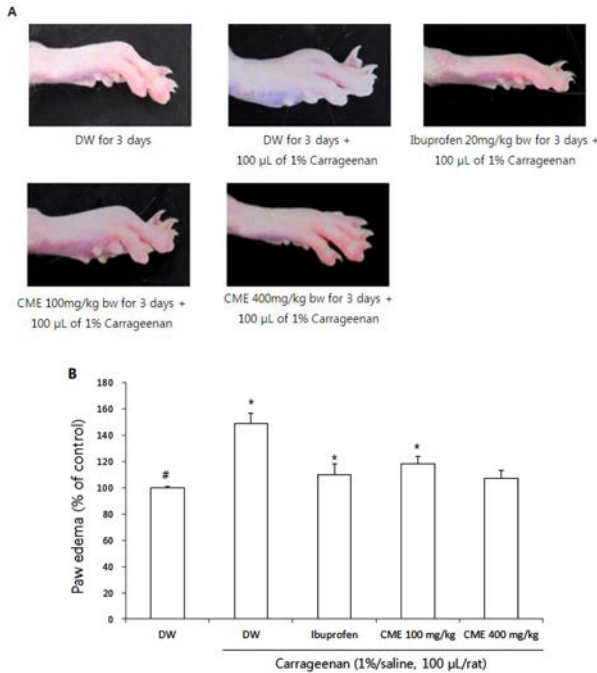


Fig. 5. Effect of CME on the prevention of paw edema in SD rats. The raw edema was induced by carrageenan (1%/saline, 100 μL/rat) only, carrageenan and ibuprofen, carrageenan and 100 mg/kg body weight of CME, carrageenan and 400 mg/kg body weight of CME, respectively. Data were obtained from animal experiments and were expressed as the mean ± SE (n = 5). #Negative control group. *Significantly different from the negative control group at $p < 0.05$.

6. Carrageenan 유도 급성염증 동물모델의 족부 부종억제 측정

Fig. 5에 나타난 바와 같이 정제수를 3일간 경구투여하고 Carrageenan으로 급성염증을 유도한 음성대조군의 경우, Carrageenan 주사 5시간 후 족부 부종율은 $149.20 \pm 7.50\%$ 이 있었으며 ibuprofen을 20 mg/kg체중, 3일간 경구투여한 양성대조군의 경우, 족부 부종율은 $110.15 \pm 8.07\%$ 이었고 CME를 100 또는 400 mg/kg체중, 3일간 경구투여한 실험군의 경우, 족부 부종율은 각각 $118.14 \pm 5.76\%$ 및 $106.94 \pm 6.26\%$ 로 나타났다. Anandakumar 등 (2014)은 강황추출물의 경구투여가 carrageenan으로 급성염증이 유도된 동물의 족부 부종 억제에 효과가 있음을 보고하였다. 부종은 histamine, serotonin, bradykinin 및 prostaglandins와 같은 염증 매개체에 의한 혈관 투과성 증가와 혈관확장 증상의 급성염증 반응이다 (Vane and Botting, 1987). 대표적인 소염진통제로 사용되는 단일성분인 Ibuprofen보다는 CME의 부종억제율이 우수하지 않지만 CME가 정제되지 않은 복합물질임을 고려할 때, 매우 우수한 급성염증성 부종억제 효과가 있다고 사료된다.

REFERENCES

Anandakumar S, Joseph JA, Bethapudi B, Agarwal A and Jung EB. (2014). Anti-inflammatory effects of turmeric (*Curcuma longa* L.) extract on acute and chronic inflammation models. Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition. 43:612-617.

Bae HA, Baek H, Park HI, Choung MG, Sohn EH, Kim SH, Kim DS, Chung IM, Seong ES, Yu CY and Lim JD. (2011). Effect of fermentation time on the chemical composition of mulberry(*Morus alba* L.) leaf teas. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 19:276-286.

Bae MJ and Ye EJ. (2010). Antioxidant activity and in vitro anticancer effects of manufactured fermented mulberry leaf tea. Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition. 39:796-804.

Bao Y, Yang Y, Wang L, Gao L, Jiang W, Wang L, Si S and Hong B. (2009). Identification of trichostatin A as a novel transcriptional up-regulator of scavenger receptor BI both in HepG2 and RAW 264.7 cells. Atherosclerosis. 204:127-135.

Bdout L, Pascale F, Bonneau M, Wassef M and Laurent A. (2011). *In vitro* evaluation of (S)-ibuprofen toxicity on joint cells and explants of cartilage and synovial membrane. Toxicology in Vitro. 25:1944-1952.

Boer TN, Huisman AM, Polak AA, Niehoff AG, Rinsum AC, Saris D, Bijlsma JWW, Lafeber FJPG and Mastbergen SC. (2009). The chondroprotective effect of selective COX-2 inhibition in osteoarthritis: *Ex vivo* evaluation of human cartilage tissue after *in vivo* treatment. Osteoarthritis and Cartilage. 17:482-488.

Blios MS. (1959). Antioxidant determination by the use of a stable free radical. Nature 181:1199-1200.

Botting RM. (2006). Inhibitors of cyclooxygenases: Mechanisms, selectivity and uses. Journal of Physiology and Pharmacology. 5:113-124.

Carey MA, Germolec DR, Langenbach R and Zeldin DC. (2003). Cyclooxygenase enzymes in allergic inflammation and asthma. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids. 69:157-162.

Castaneda S, Blas JAR, Largo R and Beaumont GH. (2012). Subchondral bone as a key target for osteoarthritis treatment. Biochemical Pharmacology. 83:315-323.

Chang MC, Hung SC, Chen YK, Chen TL, Lee CF, Lee HC, Wang KL, Chiou CC and Wei YH. (2005). Accumulation of mitochondrial DNA with 4977-bp deletion in knee cartilage: an association with idiopathic osteoarthritis. Osteoarthritis and Cartilage. 13:1004-1011.

Dinarello CA. (2000). Proinflammatory cytokines. Chest. 118:503-508.

Feghali CA and Wright TM. (1997). Cytokines in acute and chronic inflammation. Frontiers in Bioscience. 2:12-26.

Janusz MJ, Hookfin EB, Heitmeyer SA, Woessner JF, Freemont AJ, Hoyland JA, Brown KK, Hsieh LC, Almstead NG, De B, Natchus MG, Pikul S and Taiwo YO. (2001). Moderation of iodoacetate-induced experimental osteoarthritis in rats by matrix metalloproteinase inhibitors. Osteoarthritis and

- Cartilage. 9:751-760.
- Jeon YH, Won JH, Kwon JE and Kim MR.** (2011). Antioxidant activity and cytotoxic effect of an ethanol extract from *Seoritae*. Korean Journal of Food and Cookery Science. 27:1-10.
- Katsube T, Tsurunaga Y, Sugiyama M, Furuno T and Yamasaki Y.** (2009). Effect of air-drying temperature on antioxidant capacity and stability of polyphenolic compounds in mulberry(*Morus alba* L.) leaves. Food Chemistry. 113:964-969.
- Kim EO, Lee YJ, Leem HH, Seo IH, Yu MH, Kang DH and Choi SW.** (2010). Comparison of nutritional and functional constituents, and physicochemical characteristics of mulberry from seven different *Morus alba* L. cultivars. Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition. 39:1467-1475.
- Kim HB, Kim AJ and Kim SY.** (2003a). The analysis of functional materials in mulberry fruit and food product development trends. Food Science and Industry. 36:49-60.
- Kim HJ, Kim JK, Whang WK, Ham IH and Kwon SH.** (2003b). Effects of *Mori folium* and *Crataegus pinnatifida* leave extracts on CCl₄-induced hepatotoxicity in rats. Yakhak Hoeji. 47:2006-2011.
- Kim OG and Jeong JC.** (2006). Effects of *Mori folium* extract in streptozotocin-induced diabetic rats. Journal of Korean Oriental Internal Medicine. 27:811-821.
- Kim TW, Kwon YB, Lee JH, Yang IS, Youm JK, Lee HS and Moon JY.** (1996). A study on the antidiabetic effect of mulberry fruits. Journal of Sericultural and Entomological Science. 38:100-107.
- Kim YH, Lee JH, Lee YS and Yun HT.** (2006). Antioxidant activity and extraction efficiency of anthocyanin pigments in black colored soybean. Korean Soybean Digest. 23:1-9.
- Korhonen R, Lahti A, Kankaanranta H and Moilanen E.** (2005). Nitric oxide production and signaling in inflammation. Current Drug Targets-Inflammation & Allergy. 4:471-479.
- Kraan PM and Berg WB.** (2008). Osteoarthritis in the context of ageing and evolution loss of chondrocyte differentiation block during ageing. Ageing Research Reviews. 7:106-113.
- Kwak HY, Lee SJ, Lee DY, Jung L, Bae NH, Hong SY, Kim GW and Baek NI.** (2008). Cytotoxic and anti-inflammatory activities of lipids from the Nuruk(*Rhizopus oryzae* KSD-815). Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry. 51:142-147.
- Laine L, White WB, Rostom A and Hochberg M.** (2008). COX-2 selective inhibitors in the treatment of osteoarthritis. Seminars in Arthritis and Rheumatism. 38:165-187.
- Lee EJ and Bae JH.** (2011). Study on the alleviation of an alcohol induced hangover and the antioxidant activity by mulberry fruit. Korean Journal of Food And Nutrition. 24:204-209.
- Lee JS.** (2013). Isolation, characterization, and immune stimulating activity of a water-soluble polysaccharide purified from Korean mulberry fruits. Master Thesis. Catholic University of Daegu. p.1-96.
- Lee SE, Lee JH, Kim JK, Kim GS, Kim YO, Soe JS, Choi JH, Lee ES, Noh HJ and Kim SY.** (2011). Anti-inflammatory activity of medicinal plant extracts. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 19:217-226.
- Lee SH and Kim GH.** (2008). Inhibitory effect of mulberry extracts on angiogenesis in porcine artery endothelial cells. Journal of Life Sciences. 18:653-659.
- Mandhane SN, Shah JH and Thennati R.** (2011). Allergic rhinitis: An update on disease, present treatments and future prospects. International Immunopharmacology. 11:1646-1662.
- Oh HS, Park YH and Kim JH.** (2002). Isoflavone contents, antioxidative and fibrinolytic activities of some commercial cooking-with-race soybeans. Korean Journal of Food Science and Technology. 34:498-504.
- Park E, Lee SM, Lee JE and Kim JH.** (2013). Anti-inflammatory activity of mulberry leaf extract through inhibition of NF- κ B. Journal of Functional Foods. 5:178-186.
- Park SW, Jung YS and Ko KC.** (1997). Quantitative analysis of anthocyanins among mulberry cultivars and their pharmacological screening. Journal of the Korean Society for Horticultural Science. 38:722-724.
- Park SY.** (2009). Whitening effects of *Mori ramulus*, *Mori cortex radices* and *Mori folium* herbal-acupuncture solution after fermentation and heating. Master Thesis. Daegu Haany University. p.1-37.
- Pecchi E, Dallaporta M, Jean A, Thirion S and Troadec JD.** (2009). Prostaglandins and sickness behavior: Old story, new insights. Physiology & Behavior. 97:279-292.
- Ryu IH and Kwon TO.** (2012). Sensory characteristics of granular tea and the components of mulberry fruit extracts by different extraction process. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 20:331-338.
- Shin HC, Sung HS, Lee YS and Sohn HS.** (2001). Nutritional adequacy and beneficial effects of soy formula. Korea Soybean Digest. 18:10-25.
- Sladowski D, Steer SJ, Clothier RH and Balls M.** (1993). An improved MTT assay. Journal of Immunological Methods. 157:203-207.
- Sud'ina GE, Pushkareva MA, Shephard P and Klein T.** (2008). Cyclooxygenase(COX) and 5-lipoxygenase(5-LOX) selectivity of COX inhibitors. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids. 78:99-108.
- Vane J and Botting R.** (1987). Inflammation and Mechanism of action of antiinflammatory drugs. FASEB Journal. 1:89-96.
- Winter CA, Risky EA and Nuss GW.** (1962). Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. 111:544-547.
- Yeom HE.** (2013). Symptoms, aging-stereotyped beliefs, and health-promoting behaviors of older women with and without osteoarthritis. Geriatric Nursing. 20:1-7.