

오가피(*Eleutherococcus sessiliflorus*)의 전연골성 ATDC5 세포의 분화 유도

스레스타 사로즈쿠마^{1#}, 송정빈^{2#}, 이성현³, 이동현⁴, 김호철^{2*}, 소운조^{5*}

1 : 전북대학교 치과대학, 2 : 경희대학교 한의과대학 본초학교실, 3 : (주)뉴메드 중앙연구소
4 : 가천대학교 한의과대학 본초학교실, 5 : 전북대학교 약학대학

Eleutherococcus sessiliflorus induces differentiation of prechondrogenic ATDC5 Cells

Saroj Kumar Shrestha^{1#}, Jungbin Song^{2#}, Sung Hyun Lee³, Donghun Lee⁴
Hocheol Kim^{2*}, Yunjo Soh^{1*}

1 : School of Dentistry, Jeonbuk National University
2 : Department of Herbal Pharmacology, College of Korean Medicine, Kyung Hee University
3 : NEUMED R&BD Institute
4 : Department of Herbal Pharmacology, College of Korean Medicine, Gachon University
5 : School of Pharmacy, Jeonbuk National University

ABSTRACT

Objectives : The process through which mesenchymal cells condense and differentiate into chondrocytes to form new bone is known as endochondral bone formation. Chondrogenic differentiation and hypertrophy are essential steps in bone formation and are influenced by various factors. The stem bark and root bark of *Eleutherococcus sessiliflorus* (ES) have been widely used to treat growth retardation and arthritis in traditional Korean Medicine. In this study, we aimed to investigate the possible role of the stem bark of ES in the stimulation of chondrogenic differentiation in clonal murine chondrogenic ATDC5 cells.

Methods : In ATDC5 cells treated with ES extract, cell viability and extracellular matrix production were determined using CCK-8 assay and Alcian blue staining, respectively, and alkaline phosphatase activity was measured. We also examined mRNA and protein expression levels of genes related to chondrogenic expression in ATDC5 cells using reverse transcription-polymerase chain reaction and western blot analyses.

Results : ES extract increased the accumulation of Alcian blue-stained cartilage nodules and alkaline phosphatase activity in ATDC5 cells. It increased the mRNA expressions of chondrogenic markers including bone sialoprotein (BSP), cartilage collagens, Runt-related transcription factor-2 (RUNX-2), osteocalcin (OCN), β -catenin, and bone morphogenetic protein-2 (BMP-2), as well as the protein expressions of β -catenin, RUNX-2, BMP-2, and alkaline phosphatase (ALP).

*Corresponding author : Hocheol Kim, Department of Herbal Pharmacology, College of Korean Medicine, Kyung Hee University, 26 Kyungheedaero, Dongdaemun-gu, Seoul 02447, Republic of Korea.
· Tel. : +82-2-961-0419 · E-mail : hckim@khu.ac.kr

Yunjo Soh, Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Jeonbuk National University, 567 Baekje-daero, Deokjin-gu, Jeonju-si, Jeollabuk-do 54896, Republic of Korea.
· Tel. : +82-63-270-4038 · E-mail : ysoh@jbnu.ac.kr

#First author : Saroj Kumar Shrestha, School of Dentistry, Jeonbuk National University, 567 Baekje-daero, Deokjin-gu, Jeonju-si, Jeollabuk-do, 54896 Republic of Korea.
· Tel. : +82-63-270-4037 · E-mail : thesaroj8@gmail.com

Jungbin Song, Department of Herbal Pharmacology, College of Korean Medicine, Kyung Hee University, 26 Kyungheedaero, Dongdaemun-gu, Seoul 02447, Republic of Korea.
· Tel. : +82-2-961-9394 · E-mail : jbsong@khu.ac.kr

· Received : 30 December 2021

· Revised : 18 January 2022

· Accepted : 25 January 2022

Conclusion : Taken together, these results suggest that ES extract exhibits a chondromodulating activity and therefore may be a possible agent for the treatment of bone growth disorders.

Key words : *Eleutherococcus sessiliflorus*, endochondral bone formation, ATDC5 cells, chondrogenesis, chondrogenic differentiation, BMP-2

I. 서론

연골(cartilage)은 혈관(vascular), 신경(neural) 및 림프 조직(lymphatic tissues)이 없는 독특한 하중 지지조직(unique load-bearing tissue)이며, 연골 손상 시 연골조직 내에 연골 하골(subchondral bone)이 지나가지 않아 연골재생(cartilage regeneration)에 필요한 혈액공급 또는 간엽줄기세포(mesenchymal stem cells, MSCs)에 의한 자연적인 재생이 불가능하다^{1,2)}. 따라서 많은 연구자들에 의해 연골을 치료하기 위한 여러 가지 기술들이 개발되었지만³⁾ 대부분의 기술들은 섬유연골(fibrocartilage) 형성과 연골퇴화와 같은 부작용을 야기한다⁴⁾. 또한 연골치료를 위해 자가연골이식(autologous chondrocyte implantation)을 할 경우 제한된 연골 세포수와 수술 시 발생하는 연골조직의 추가적 손상 및 이식된 부위에서 발생하는 섬유연골(fibrocartilage)의 형성을 초래하여 치료에 어려움이 있다⁵⁾. 따라서 배아(embryonic stem cells) 및 간엽 줄기세포는 연골재생에 대안으로 떠오르며 많은 연구에서 사용되고 있다⁶⁾. 그러나 줄기세포의 분화를 유도하고 분화된 세포의 기능을 오래 지속시키는 방법에 대한 문제는 아직 해결되고 있지 않다.

줄기세포의 분화 능력은 세포 출처(embryonic or MSCs) 및 계대⁷⁾와 같은 다양한 조건에 따라 달라져 서로 상충되는 결과를 나타낸다. 예를 들어 연골형성 유도인자로 불리는 TGF- β 3는 세포 출처에 따라 연골형성을 촉진하지 않거나 억제하는 경우도 있다^{8,9)}. 따라서 균질한 안정성뿐만 아니라 무한하고 빠른 증식과 같은 특성을 가진 또 다른 안정적인 세포주가 필요하다. ATDC5는 1990년 Atsumi et al에 의해 AT805 기형암종 세포주에서 파생되었고¹⁰⁾, 많은 연구에서 ATDC5 세포주가 MSCs와 거의 동일한 연골 형성 특성을 갖는다는 것이 입증되었다. 또한 ATDC5 세포주는 C3H10T1/2 및 RJC3.1 연골 세포주에 비해 연골 세포 분화가 우수하여 체외실험을 통한 연골재생의 모델로 사용된다. 따라서 ATDC5 세포주를 이용하여 체외에서 연골세포의 재생에 대한 연구는 줄기세포주를 사용한 연구 및 자가연골이식을 통한 문제점을 해결할 것으로 기대된다.

최근 천연물을 이용한 신약개발이 활발히 진행되고 있다. 해양생물 및 식물 등은 다양한 생식환경 및 외부 환경에 대한 방어체계에 따른 독특한 생리활성 물질을 포함하고 있기 때문에 추출물이나 용매분획물을 의약품으로 이용하거나 단일 화합물 또는 유도체를 합성하여 새로운 의약품으로 개발이 시도되고 있다¹¹⁾.

두릅나무과(Araliaceae)에 속한 오갈피나무속(*Eleutherococcus*) 식물들은 한국, 중국, 일본, 러시아 극동 지방 등에 분포하며 잎, 줄기, 뿌리, 열매 등 다양한 부위가

널리 약용되어 왔다. 그중 오갈피나무 *Eleutherococcus sessiliflorus* (Rupr. & Maxim.) S.Y.Hu의 줄기껍질과 뿌리껍질은 한의학에서 오가피(五加皮)로 불리며 거풍습(祛風濕), 보간신강근골(補肝腎強筋骨) 효능으로 풍습비통(風濕痺痛), 근골위약(筋骨痿弱), 요슬산통(腰膝酸痛), 소아행지(小兒行遲) 등 근골격계 질환에 사용되었다¹²⁾. 오가피의 약리작용으로는 면역증진¹³⁾, 항보체활성¹⁴⁾, 항콜린^{15,16)} 및 진정작용¹⁷⁾ 등이 있으며, 근골격계 관련 연구로 오가피가 난소절제 흰쥐에서 골밀도 감소를 억제하고 골미세구조를 개선시키는 것이 보고되었고¹⁸⁾, 이러한 항골다공증 효능의 유효성분으로 lignan 계열인 eleutheroside E 및 B 등이 밝혀졌다^{19,20)}. 또한 eleutheroside E는 collagen 유도 관절염 마우스에서 관절염 개선 효과가 보고되어 있다²¹⁾. 그러나 현재까지 오가피의 연골 재생에 관한 연구는 거의 이루어지지 않았으며, 그 작용기전 또한 밝혀진 바가 없다.

본 연구에서는 ATDC5 세포주에서 오가피 추출물이 연골 분화를 유도하는지 확인하고 연골 분화 관련 유전자 발현에 미치는 영향을 평가하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 오가피 추출물 제조

오갈피나무(*E. sessiliflorus*)의 줄기 껍질을 씨케이(씨)에서 구입하여 경희대학교 한의과대학 본초학교실에서 검증한 후 사용하였다. 절단한 줄기껍질(60.0 g)에 30% 에탄올을 8배량 넣고 환류냉각장치가 부착된 히팅맨틀(MS-EAMD 9403-06, Misung Scientific Co., Ltd., Gyeonggi-do, Korea)을 이용하여 85°C에서 5시간 동안 1차 환류 추출한 다음 여과하였다. 다시 줄기껍질에 30% 에탄올을 3배량 넣고 85°C에서 2시간 동안 2차 환류 추출한 다음 여과하였다. 1차 및 2차 여과액을 합하여 감압농축한 후 동결건조기(FDCF-12012, Operon Co., Ltd., Gyeonggi-do, Korea)로 건조하여 분말 상태로 제조하였다. 추출 수율은 5.5%였으며, 4°C에서 보관하였다.

2. High performance liquid chromatography (HPLC) 분석

Eluetheroside E는 오갈피나무속 식물의 주요 약리 성분으로 밝혀져 있어²²⁾ 지표성분으로 선정되었으며, HPLC를 이용하여 추출물 내 eluetheroside E 함량을 측정하였다. 분석 기기는 Agilent 1260 Infinity II (Agilent Technology,

Santa Clara, CA, USA)를 사용하였으며, ZORBAX Eclipse Plus C18 (4.6 × 250 mm, 5µm; Agilent Technology)으로 분석을 진행하였다. 이동상은 0.1% phosphoric acid (A)와 acetonitrile (B)을 사용하였으며, 용매의 기울기는 0-18-20-35-36-45 min, 용매 B 12-17-32-38-12-12%였다. 유속은 1.0 mL/min, 주입부피는 10 µL였으며, eluetheroside E는 205 nm에서 측정하였다. 오가피 추출분말 500 mg을 메탄올과 dimethyl sulfoxide가 9:1 (v/v)로 혼합된 용액 10 mL에 녹인 후 syringe filter (pore size 0.45 µm, polyvinylidene fluoride; Merck Millipore, Burlington, MA, USA)로 여과하여 검액으로 사용하였다.

3. ATDC5 세포의 배양 및 분화

ATDC5 세포주는 RIKEN BioResource Research Center (Tsukuba, Ibaraki, Japan)에서 구입하여 사용하였다. ATDC5 세포주는 Dulbecco's modified Eagle medium과 Ham's F-12가 1:1로 섞여 있는 배지(Gibco; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)에 5% heat-inactivated fetal bovine serum (Gibco)과 1% penicillin (100 U/mL)-streptomycin (100 µg/mL) (HyClone, GE Healthcare, Chicago, IL, USA)을 첨가하여 37°C, 5% CO₂, 95% 습도 조건에서 배양하였다. 오가피 추출물의 세포분화 촉진 효과를 확인하기 위해 배지에 추출물을 첨가하여 최대 21일간 분화를 유도하였으며, 2일 간격으로 배지를 교환하였다.

4. 세포생존을 측정

ATDC5 세포주를 96-well plate에 5 × 10³ cells/well로 분주한 후, 오가피 추출물을 농도별(1.25 ~ 20 µg/mL)로 처리하고 24시간 동안 배양하였다. Phosphate-buffered saline (PBS) 세척 후 CCK-8 solution (Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan)이 포함된 fresh medium을 넣고 37°C에서 2시간 동안 배양하였다. 흡광도는 microplate reader (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA)를 이용하여 450 nm에서 측정하였으며, 세포 생존율은 대조군에 대한 백분율로 표시하였다.

5. Alcian blue 염색

세포 배지를 제거하고 1 × PBS로 세척한 후 5분 동안 -20°C에서 95% 메탄올로 고정시키고, 0.1M hydrochloric acid에 1% Alcian-blue 8GX (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 첨가하여 16시간 염색하였다. 염색용액 제거 후 3% acetic acid로 30초 동안 세 번 세척하고 염색 정도를 확인하기 위하여 현미경 관찰 및 사진을 찍고, 10% acetic acid로 염색을 녹여 낸 후 650 nm에서 흡광도를 측정하였다.

6. Alkaline phosphatase (ALP) 활성

오가피 추출물을 처리하여 배양한 세포를 harvest한 후 lysis buffer (50 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA)를 첨가하여 용해시켰다. 세포용해물(lysate suspension)을 4°C에서 12,000 × g로 15분간 원심분리하였고, 상층액은 Bradford assay로 단백질을 정량하고 ALP 활성을 측정하였다. ALP 활성은 *p*-nitrophenyl phosphate (Sigma-Aldrich)을 기질로 사용하여 측정하였으며, 흡광도 변화는 405 nm에서 UV-visible spectrophotometer (Shimadzu Corp., Tokyo, Japan)로 관찰되었다.

7. RNA 추출 및 유전자 중합효소 연쇄반응 (RT-PCR)

TRIzol reagent (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)를 이용하여 세포로부터 total RNA를 추출하였으며, SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen)를 사용하여 추출한 RNA로부터 cDNA를 합성하였다. PCR primer는 Table 1과 같이 Bioneer Corp. (Daejeon, Korea)에서 제작하여 사용하였으며, primer 염기 서열과 PCR 반응 조건은 Table 1과 같다. 반응 후 증폭된 PCR 산물은 Tris-acetic acid-EDTA buffer로 만든 1% agarose gel에서 전기영동을 실시하였으며, ethidium bromide로 염색한 후 UV 하에서 확인하였다. Band intensity는 phosphoimager (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 및 Quantity One software (Bio-Rad)를 이용하여 측정하였다.

Table 1. Primer sequences and conditions for RT-PCR.

Target genes (Accession number)	Primers (mouse)		PCR condition		
	Forward	Reverse	Tm (°C)	Cycles	Size (bp)
Collagen I (NM_007742)	5'-ttctcctggtaaagatggtgc-3'	5'-tgttaaaggatgatgctggtcc-3'	50	35	254
Collagen II (NM_031163)	5'-ctgtaagaacagcatcgctacctg-3'	5'-caggaatttggtgtggacataggg-3'	60	27	271
Collagen X (NM_009925)	5'-cgtctctgcttttactgtca-3'	5'-ctcacagaaaatgaccaggt-3'	48	35	300
RUNX-2 (NM_009820)	5'-actttctccaggaagactgc-3'	5'-acagcaacagcaacaacagc-3'	50	35	366
β-catenin (NM_007614)	5'-ggtggactgcagaaaatggt-3'	5'-ccttgggactctagtgcagc-3'	52	27	394
BSP (NM_008318)	5'-gagccaggactgccaaaggaa-3'	5'-gcagcagcggaggagaaacgg-3'	60	27	653
OCN (NM_001032298)	5'-cagcttggtgcacacctagc-3'	5'-ggagcagtgctcacgttaacct-3'	58	30	242
BMP-2	5'-gcaccacaaacgagaaaagc-3'	5'-agcaaggggaaaaggacact-3'	65	40	1182
β-actin (NM_007393)	5'-ttctacaatgagctgcgtgt-3'	5'-ctcatagctcttctccaggg-3'	50	26	1889

8. Western Blot 분석

배양한 세포를 ice-cold PBS로 3회 세척한 후 lysis buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 137 mM NaCl, 10% glycerol, 1% Triton X-100, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM phenylmethylsulfonylfluoride, 1×protease inhibitor cocktail)를 넣어 4℃에서 30 분간 반응시키고 16,000×g에서 15분간 원심분리하여 상층액을 시료로 사용하였다. 각 시료의 단백질 정량은 Bradford protein assay 방법을 사용하여 595 nm에서 흡광도를 측정하여 실시하였다. 동일한 양의 단백질을 8~10% SDS-PAGE로 분리시킨 후, 분리된 단백질을 polyvinylidene difluoride membrane (Bio-Rad)에 transfer하였다. 항체의 비특이적 결합을 차단하기 위하여 membrane을 blocking buffer [5% non-fat milk 및 0.1% Tween 20이 함유된 Tris-buffered saline (TBS)]와 18℃에서 1시간 동안 반응시킨 후, β -catenin, RUNX-2, ALP에 대한 1차 항체(cat. no. sc7963, sc10758, sc73839; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA; 1:1000)와 BMP-2에 대한 1차 항체(cat. no. ab14933; Abcam, Cambridge, UK; 1:1000)를 가하여 4℃에서 16시간 반응시켰다. 이어서 0.1% Tween 20이 함유된 TBS 용액으로 10분간 3회 세척한 다음, 이차 항체와 실온에서 2시간 반응시켰다. 2차 항체로는 horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit 또는 mouse antibody (Santa Cruz Biotechnology)를 5% non-fat milk 및 0.1% Tween 20이 함유된 TBS에 1:3000로 희석하여 사용

하였다. 그 후 ECL Plus kit (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA)로 반응시킨 후 X-ray film 상에서 단백질을 확인하였으며, ImageJ software (NIH, Bethesda, MD, USA)를 이용하여 분석하였다.

9. 통계처리

모든 실험은 3회 반복 시행하였으며, 측정값은 평균±표준편차로 나타내었다. 군간 유의성 검정을 위해 one-way analysis of variance (사후검정: Tukey's multiple comparisons test) 또는 independent *t*-test를 실시하였다. 통계분석은 Prism software (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA)를 이용하여 수행되었으며, *P*-value가 0.05 미만인 경우를 통계적으로 유의하다고 판정하였다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. 오가피 추출물의 HPLC 성분분석

표준용액과 오가피 추출물의 HPLC 크로마토그램은 Figure 1과 같다. 오가피의 지표성분인 Eleutheroside E는 16.2분에 검출되었으며, 함량은 13.52 mg/g으로 나타났다.

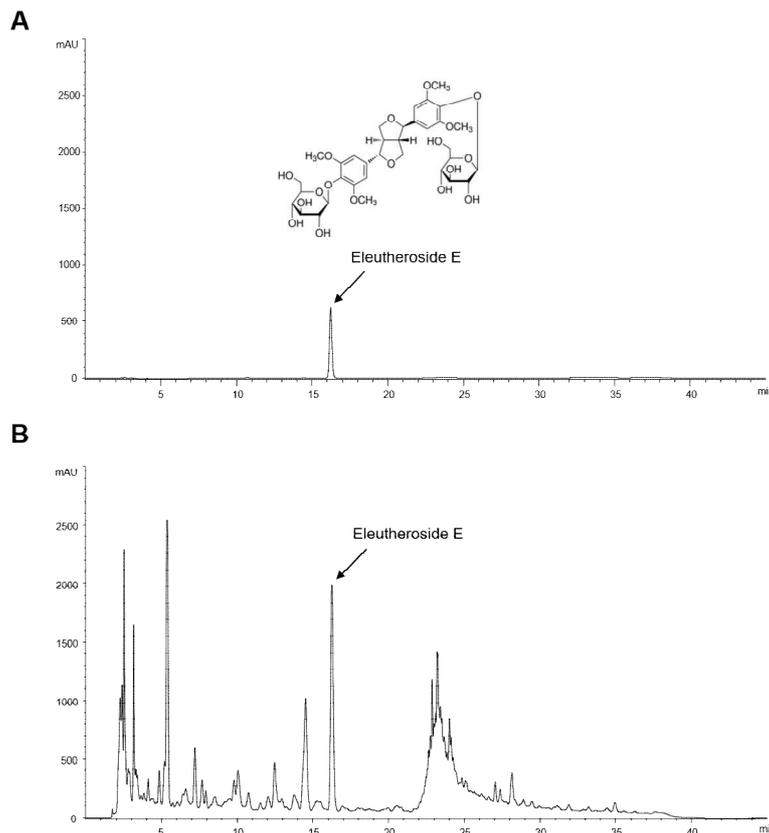


Figure 1. High-performance liquid chromatograms of the standard compound (A) and *Eleutherococcus sessiliflorus* ethanolic extract (B) at 205 nm.

2. 오가피 추출물 처리유무에 따른 ATDC5 세포 주의 proliferation과 differentiation 영향 평가

오가피는 많은 생리활성 물질을 포함하고 있다. 그중 대표적으로 eleutheroside B와 eleutheroside E가 있으며, 외부 스트레스에 대한 비특이적 적응력을 갖는 adaptogenic activity을 가지고 있고 부작용 등의 독성은 거의 없다고 보고되었다²²⁾. 하지만 ATDC5 세포주에 대한 세포 내 독성평가 및 적정 농도에 대한 연구는 거의 없다. 그러므로 본 연구에서는 오가피 추출물에 대한 세포 내 독성평가와 ATDC5 세포 주의 연골 분화 시 적정 농도를 평가하기 위해 세포생존율 측정과 Alcian blue 염색을 수행하였다.

오가피 추출물 처리유무에 따른 ATDC5 세포주의 세포 내 독성을 확인하기 위해 CCK8-kit를 사용하여 세포생존율을 측정하였다. 세포생존율은 오가피 추출물을 1.25~5 µg/mL 농도로 처리한 경우 대조군과 차이가 없었으나, 10 µg/mL 처리 시 감소 경향을 보였으며 20 µg/mL 처리 시 85.5 ± 3.8%로 대조군 대비 유의하게 감소하였다($P < 0.01$, Figure 2). 따라서 본 실험에서 ATDC5 세포주에서 추출물 처리 시 적정 농도를 2.5 및 5 µg/mL로 판단하여 실험을 진행하였다.

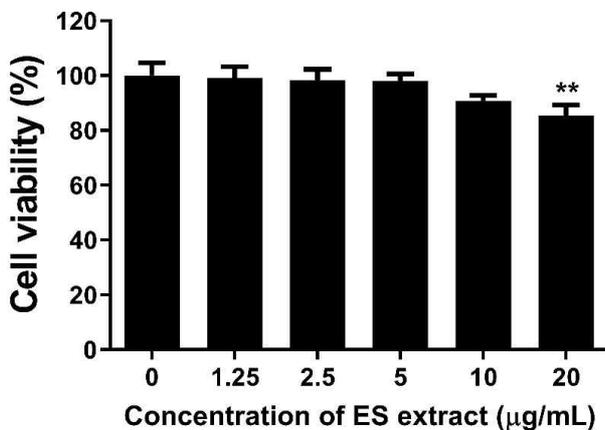


Figure 2. Effect of *Eleutherococcus sessiliflorus* extract on the cell viability of ATDC5 cells. Cell viability was measured with CCK-8 assay. Values are expressed as the mean ± SD (n=3). ** $P < 0.01$ vs. control by ANOVA with Tukey's multiple comparisons test. ES, *E. sessiliflorus*.

ATDC5 세포는 분화 시 다중과정(multi-step)을 거쳐 연골세포로 분화가 된다²³⁾. 초기 ATDC5 세포주는 spindle-like shape을 가지며 초기 분화과정 시 cell aggregate가 형성되어 cartilage nodule이 형성된다. 중기에는 round 형태로 변화하며 이때 collagen type II, aggrecan과 다른 extracellular matrix (ECM) 분자들이 발현된다. 후기는 hypertrophic chondrocyte를 형성하며, matrix mineralization 과정을 통해 collagen type X가 발현된다. 따라서 본 실험에서는 초기(7일), 중기(14일), 후기(21일)로 구분하여 오가피 추출물이 ATDC5 세포주의 분화에 미치는 영향을 확인하고자 하였다.

오가피 추출물이 처리된 배지에서 세포를 7일, 14일, 21일 동안 배양한 후 Alcian blue 염색을 실시한 결과, 대조군은

21일까지 낮은 staining intensity를 보였지만 추출물 처리군에서 cartilage nodule 형성이 증가하였다(Figure 3A). 특히 21일째에 대조군과 추출물 처리군의 차이가 7일 및 14일보다 뚜렷하였고, 농도 의존적인 효과를 보였다. 분화 활성 정도를 추출물을 처리하지 않은 대조군으로 normalization을 한 결과, 오가피 추출물 2.5 µg/mL 처리군에서 21일째에 대조군과 대비 분화활성도가 1.9배 증가하였다($P < 0.01$, Figure 3B). 추출물을 5 µg/mL 농도로 처리한 군에서는 분화 활성이 대조군과 대비 7일째에 1.3배($P < 0.01$), 14일째에 1.5배($P < 0.01$), 21일째에 3.1배($P < 0.001$) 증가하였다. 이러한 결과를 바탕으로 후속 실험(Figure 4~6)에서는 처리 농도를 5 µg/mL로 설정하였다.

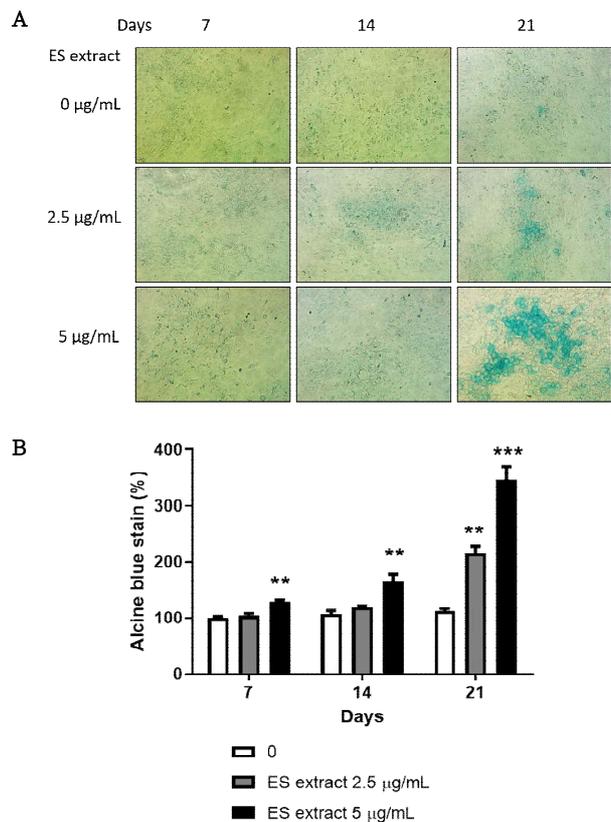


Figure 3. Alcian blue staining of ATDC5 cells treated with *Eleutherococcus sessiliflorus* (ES) extract. (a) Untreated cells or cells treated with ES extract (2.5 or 5 µg/mL) were incubated for 7, 14, and 21 days, rinsed with phosphate-buffered saline twice, fixed with 95% methanol, and then stained with 1% acetic acid for 30 s three times, then photographed ($\times 100$). (b) The histogram represents the levels of Alcian blue staining compared to the control group on different time points. Results are presented as means ± SD (n = 3). ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ indicate significant differences from ES extract-treated groups with control.

3. 오가피 추출물 처리유무에 따른 ATDC5 세포 주의 ALP 활성

ALP는 cartilage ECM의 mineralization을 유도하고²⁴⁾ prehypertrophic chondrocytes의 중요한 marker 중 하나

다²⁵⁾. ALP는 중기 분화부터 후기까지 발현되며, ALP의 발현 정도에 따라 연골 분화 활성도를 측정할 수 있다. 본 연구에서 오가피 추출물이 5 µg/mL의 농도로 처리된 배지에서 세포를 각각 7일, 14일, 21일 동안 배양한 후 ALP의 효소 활성을 측정하였다. 오가피 추출물은 ALP 활성을 대조군 대비 14일째에 1.5배 ($P < 0.01$), 21일째에 2.1배($P < 0.001$) 증가시켰다 (Figure 4). 오가피 추출물에 의한 ATDC5 세포주의 분화 유도 시 초기(7일)에서는 효과가 없었으며 중기(14일)에서부터 후기(21일)까지 높은 ALP 활성을 나타냈기 때문에 추출물의 연골 분화 효과는 특히 중기에서 후기까지 영향을 주는 것으로 판단되며, ATDC5 세포주의 분화 시 21일간 추출물을 처리하는 것이 더 높은 효율로 연골세포의 분화를 유도함을 확인하였다.

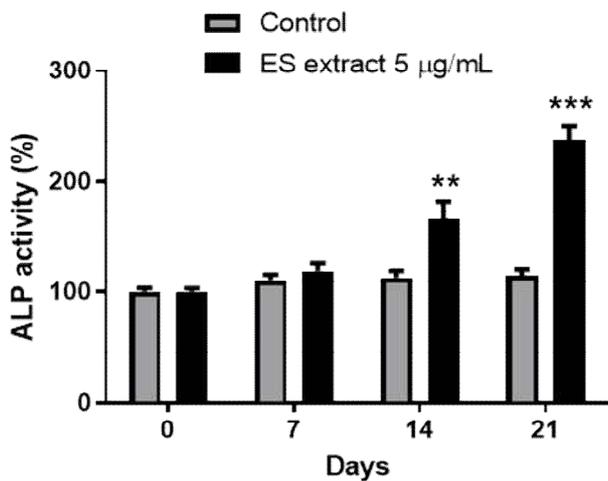


Figure 4. Effect of *Eleutherococcus sessiliflorus* (ES) extract on alkaline phosphatase (ALP) activity in ATDC5 cells. Cells were treated with 5 µg/mL ES extract for 0, 7, 14, and 21 days, and their ALP activities were measured. Values are presented as means ± SD (n = 3). ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ indicate significant differences from ES extract-treated groups with control determined by independent t -test.

4. 오가피 추출물 처리유무에 따른 ATDC5 세포의 연골 분화 관련 maker gene들의 mRNA level 영향 평가

Bone morphogenetic proteins (BMP)는 TGF- β superfamily로서 뼈와 연골의 형성을 촉진시킨다. 특히 BMP-2는 Runt-related transcription factor-2 (RUNX-2)에 의해 조절되는 nuclear factor- κ B ligand (RANKL) promoter의 활성을 유도하여 RANKL 발현을 촉진시킨다. 이는 후기 연골분화 과정 중 calcified matrix와 osteoclastogenesis 유도 역제를 통해 hypertrophic chondrocyte를 유지하는데 중요하게 작용함을 의미한다²⁶⁾. Collagen I, II는 proteoglycan과 같이 중기 연골 분화에서 중요하게 작용하며, Collagen X, BSP, OCN과 β -catenin는 후기 연골 분화에 matrix mineralization과 관련하여 중요하게 작용한다²³⁾. 따라서 본 연구에서는 연골 분화 관련 maker gene들을 분화과정 동안 발현 정도를 분석하였다.

연골 분화 관련 maker gene들의 mRNA level을 비교 분석한 결과(Figure 5), 오가피 추출물은 7, 14, 21일에 Collagen II 발현을 대조군 대비 유의하게 증가시켰다. 또한 OCN, β -catenin, BMP-2 및 RUNX-2 발현은 14 및 21일에 대조군 대비 추출물 처리군에서 유의하게 증가하였다. Collagen I 및 X의 발현은 추출물 처리군에서 대조군 대비 7일째 감소하였으나 14일째에 증가하여 추출물 처리 시 중기에 활성화되는 것으로 판단된다. 21일째에 Collagen I 발현은 다시 감소했지만, Collagen X의 발현은 증가를 유지하였다.

이 결과를 바탕으로 오가피 추출물은 ATDC5 연골 분화 시 초기 7일간 큰 영향을 주지 않지만, 중기에는 Collagen I와 Collagen II을 활성화시키며 후기에는 β -catenin, BMP-2, RUNX-2, collagen X, BSP과 OCN의 발현을 증가시켜 연골 분화를 촉진시키는 것으로 판단된다.

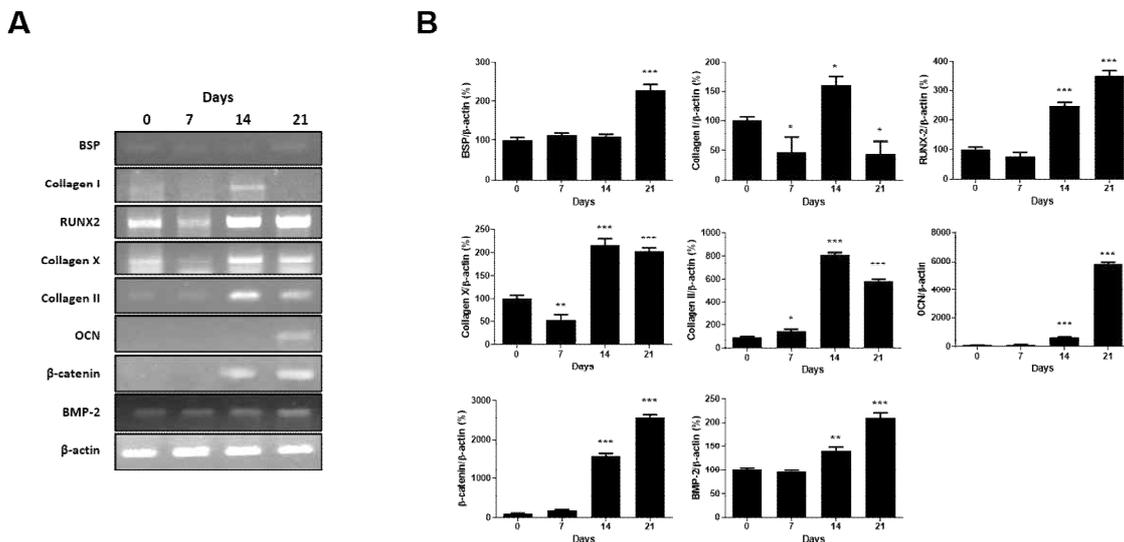


Figure 5. Effects of *Eleutherococcus sessiliflorus* (ES) extract on mRNA levels of chondrogenic marker genes in ATDC5 cells. ATDC5 cell were treated with 5 µg/mL ES extract for 0, 7, 14, and 21 days. Relative expression of genes was observed by RT-PCR analysis and compared to β -actin. Results are presented as means ± SD (n = 3). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$ indicate significant differences from ES extract-treated groups with day 0.

5. 오가피 추출물 처리유무에 따른 ATDC5 세포주의 chondrogenic differentiation 관련 단백질 발현 영향 검토

BMP 신호전달 경로는 MSCs의 aggregation과 size를 증가시킨다고 보고되어 있으며²⁷⁾, Kwon 등²⁸⁾의 보고에서 BMP signal pathway와 TGFβ-1 간의 aggregation의 차이를 나타냈다. TGFβ-1에 의한 MSCs의 aggregate는 영향이 없었고 BMP-2가 MSCs의 aggregate에 더 중요하게 작용하는 것으로 나타났다. β-catenin, RUNX-2, ALP는 chondrogenic differentiation에 관여하는 인단백질로서, 후기 연골 분화에 중요하게 작용한다. 따라서 ES extract를 처리 시 ATDC5 세포주의 분화과정 시 BMP-2, β-catenin, RUNX-2 및 ALP의 단백질 발현 정도를 조사하여 오가피 추출물이 연골 분화에 미치는 효과를 확인하였다.

오가피 추출물은 β-catenin, BMP-2 및 ALP의 단백질 발현을 7, 14, 21일차에 모두 증가시켰다(Figure 6). 대조군과 비교해 7일째부터 β-catenin는 1.7배($P < 0.01$), BMP-2는 1.4배($P < 0.01$) 그리고 ALP는 1.5배($P < 0.01$)로 높게 발현이 나타났으며, 14일째는 β-catenin는 2.0배($P < 0.001$), BMP-2는 1.4배($P < 0.05$) 그리고 ALP는 1.4배($P < 0.01$)로 높게

발현이 나타났다. 21일째는 β-catenin는 3.1배($P < 0.001$), BMP-2는 1.9배($P < 0.001$) 그리고 ALP는 1.8배($P < 0.001$). RUNX-2는 14일째까지 변화가 없다가 21일째 1.6배 더 높게 나타났다($P < 0.001$).

이 결과는 ATDC5 세포주의 연골 분화 시 오가피 추출물이 중기에는 BMP-2를 통해 aggregation을 유도하며, 후기에는 β-catenin, RUNX-2와 ALP를 증가시켜 matrix mineralization을 유도하는 것을 나타낸다. 따라서 오가피 추출물은 연골 분화 시 중기에 aggregation을 유도하며, 후기에는 matrix mineralization을 유도하여 연골 분화를 유지하는 것으로 판단된다.

Eleutheroside E 등을 포함한 eleutherosides는 오갈피나 무속 식물의 여러 약리작용을 대표하는 성분으로 보고되었으나¹⁹⁻²²⁾, 연골분화에 미치는 영향에 대해서는 아직 밝혀진 바가 없다. 후속 연구를 통해 eleutherosides가 오가피 추출물의 연골분화 촉진 작용에 기여하는지 밝히는 것이 필요하다.

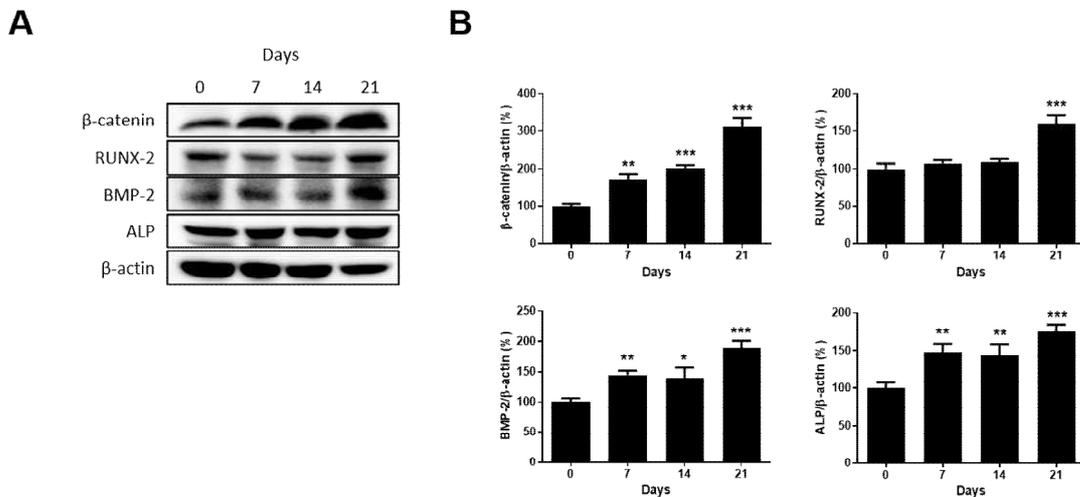


Figure 6. Effects of *Eleutherococcus sessiliflorus* (ES) extract on protein expression of chondrogenic markers in ATDC5 cells. Cells were treated with 5 μg/mL ES extract for 0, 7, 14, and 21 days. Relative expressions of genes were observed by western blot analysis and compared to β-actin. Results are presented as means ± SD (n = 3). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$ indicate significant differences from ES extract-treated groups with day 0.

IV. 결 론

본 연구에서는 오가피 추출물이 연골 분화에 미치는 효능을 평가하기 위하여 전연골성 ATDC5 세포에 오가피 에탄올 추출물을 처리한 후 proliferation 및 differentiation, ALP 활성, 연골 분화 관련 maker gene의 mRNA level 및 단백질 발현을 확인하였으며, 실험 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 오가피 추출물은 ATDC5 세포주의 연골 분화를 촉진할 수 있다.

2. 연골 분화과정 중 중기에는 Collagen I, II의 유전자 발현을 증가시켜 proteoglycan의 발현을 유도하며, BMP-2 단백질 발현의 증가를 통해 aggregation을 유도한다.
3. 연골 분화과정 중 후기에는 RUNX-2, BSP, collagen X, Collagen II, OCN, β-catenin과 BMP-2의 유전자 발현을 증가시켜 matrix mineralization을 증가시켜 hypertrophic chondrocyte를 유지할 수 있게 한다. 특히 BMP-2는 중기와 후기 모두 관여하여 연골 분화에 중요하게 작용하는 것으로 판단된다.

본 연구결과는 오가피가 articular cartilage disorders 치료를 위해 중요한 역할을 할 수 있음을 시사한다. 하지만 아직까지 연골 분화와 관련된 연구가 미흡한 상황이며 향후 동물 실험을 통해 오가피 추출물 경구투여 조건으로 투여 시 자연적 재생이 발생하는지에 대한 연구가 필요하다.

감사의 글

이 논문은 2021 전북대학교의 학술연구지원을 받아 수행된 연구로 이에 감사드립니다. 또한 본 연구는 보건복지부의 재원으로 한국보건산업진흥원의 한의약선도기술개발사업 지원에 의하여 이루어진 것입니다(HI14C0976).

References

- O'Driscoll SW. The healing and regeneration of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am*. 1998;80:1795–812.
- Mandelbaum BR, Browne JE, Fu F, Micheli L, Mosely JB Jr, Erggelet C, Minas T, Peterson L. Articular cartilage lesions of the knee. *Am J Sports Med*. 1998;26:853–61.
- Smith GD, Knutsen G, Richardson JB. A clinical review of cartilage repair techniques. *J Bone Joint Surg Br*. 2005;87:445–9.
- Kuroda R, Ishida K, Matsumoto T, Akisue T, Fujioka H, Mizuno K, Ohgushi H, Wakitani S, Kurosaka M. Treatment of a full-thickness articular cartilage defect in the femoral condyle of an athlete with autologous bone-marrow stromal cells. *Osteoarthritis Cartilage*. 2007;15:226–31.
- Wood JJ, Malek MA, Frassica FJ, Polder JA, Mohan AK, Bloom ET, Braun MM, Coté TR. Autologous cultured chondrocytes: adverse events reported to the United States Food and Drug Administration. *J Bone Joint Surg Am*. 2006;88:503–7.
- Koga H, Engebretsen L, Brinchmann JE, Muneta T, Sekiya I. Mesenchymal stem cell-based therapy for cartilage repair: a review. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2009;17:1289–97.
- Ankrum J, Karp JM. Mesenchymal stem cell therapy: Two steps forward, one step back. *Trends Mol Med*. 2010;16:203–9.
- Bosnakovski D, Mizuno M, Kim G, Ishiguro T, Okumura M, Iwanaga T, Kadosawa T, Fujinaga T. Chondrogenic differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stem cells in pellet cultural system. *Exp Hematol*. 2004;32:502–9.
- Jin EJ, Park KS, Kim D, Lee YS, Sonn JK, Jung JC, Bang OS, Kang SS. TGF- β 3 inhibits chondrogenesis by suppressing precartilage condensation through stimulation of N-cadherin shedding and reduction of *cRREB-1* expression. *Mol Cells*. 2010 Apr;29(4):425–32.
- Atsumi T, Miwa Y, Kimata K, Ikawa Y. A chondrogenic cell line derived from a differentiating culture of AT805 teratocarcinoma cells. *Cell Differ Dev*. 1990;30:109–16.
- Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J Nat Prod*. 2007;70(3):461–77.
- The textbook compilation committee of Korean herbology. *Korean herbology*. Seoul: Younglimsa. 2020:320.
- Kim JH, Shin EH, Lee HY, Lee BG, Park SH, Moon DI, Goo GC, Kwon DY, Yang HJ, Kim OJ, Oh HG. Immunostimulating effects of extract of *Acanthopanax sessiliflorus*. *Exp Anim*. 2013;62:247–53.
- Jeong SC, Yang BK, Jeong YT, Rao KS, Song CH. Isolation and characterization of biopolymers extracted from the bark of *Acanthopanax sessiliflorus* and their anticomplement activity. *J Microbiol Biotechnol*. 2007;17:21–8.
- Za ʘ uski D, Kuźniewski R. *In vitro* anti-AChE, anti-BuChE, and antioxidant activity of 12 extracts of *Eleutherococcus* species. *Oxid Med Cell Longev*. 2016 ; 2016:4135135.
- Adamczyk K, Olech M, Abramek J, Pietrzak W, Kuźniewski R, Bogucka-Kocka A, Nowak R, Ptaszyńska AA, Rapacka-Gackowska A, Skalski T, Strzemski M, Sowa I, Wójciak-Kosior M, Feldo M, Za ʘ uski D. *Eleutherococcus* species cultivated in Europe: a new source of compounds with antiacetylcholinesterase, antihyaluronidase, anti-DPPH, and cytotoxic activities. *Oxid Med Cell Longev*. 2019 ; 2019 : 8673521.
- Song Y, Yang CJ, Wang ZB, Zhao N, Feng XS, Meng FH. Chemical constituents of *Eleutherococcus sessiliflorus* extract and its sedative-hypnotic effect. *Nat Prod Res*. 2017;31:1995–2000.
- Han SY, Kim JH, Jo EH, Kim YK. *Eleutherococcus sessiliflorus* inhibits receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL)-induced osteoclast differentiation and prevents ovariectomy (OVX)-Induced Bone Loss. *Molecules*. 2021;26:1886.
- Liu J, Zhang Z, Guo Q, Dong Y, Zhao Q, Ma X. Syringin prevents bone loss in ovariectomized mice *via* TRAF6 mediated inhibition of NF- κ B and stimulation of PI3K/AKT. *Phytomedicine*. 2018;42:43–50.

20. Ma YS, Hou ZJ, Li Y, Zheng BB, Wang JM, Wang WB. Unveiling the pharmacological mechanisms of eleutheroside E against postmenopausal osteoporosis through UPLC-Q/TOF-MS-based metabolomics. *Front Pharmacol*. 2020;11:1316.
21. He C, Chen X, Zhao C, Qie Y, Yan Z, Zhu X. Eleutheroside E ameliorates arthritis severity in collagen-induced arthritis mice model by suppressing inflammatory cytokine release. *Inflammation*. 2014;37:1533-43.
22. Murthy HN, Kim YS, Georgiev MI, Paek KY. Biotechnological production of eleutherosides: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2014; 98:7319-29.
23. Tare RS, Howard D, Pound JC, Roach HI, Oreffo ROC. ATDC5: An ideal cell line for development of tissue engineering strategies aimed at cartilage generation. *Eur Cell Mater* 2005;10:22.
24. Mackie EJ, Tatarczuch L, Mirams M. The skeleton: a multi-functional complex organ: The growth plate chondrocyte and endochondral ossification. *J Endocrinol*. 2011;211:109-121
25. Chikuda H, Kugimiya F, Hoshi K, Ikeda T, Ogasawara T, Shimoaka T, Kawano H, Kamekura S, Tsuchida A, Yokoi N, Nakamura K, Komeda K, Chung UI, Kawaguchi H. Cyclic GMP-dependent protein kinase II is a molecular switch from proliferation to hypertrophic differentiation of chondrocytes. *Genes Dev*. 2004;18:2418-29.
26. Usui M, Xing L, Drissi H, Zuscik M, O'Keefe R, Chen D, Boyce BF. Murine and chicken chondrocytes regulate osteoclastogenesis by producing RANKL in response to BMP2. *J Bone Miner Res*. 2008;23:314-25.
27. Shen B, Wei A, Tao H, Diwan AD, Ma DD. BMP-2 enhances TGF- β 3-mediated chondrogenic differentiation of human bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells in alginate bead culture. *Tissue Eng Part A*. 2009;15:1311-20.
28. Tabe S, Hikiji H, Ariyoshi W, Hashidate-Yoshida T, Shindou H, Shimizu T, Okinaga T, Seta Y, Tominaga K, Nishihara T. Lysophosphatidylcholine acyltransferase 4 is involved in chondrogenic differentiation of ATDC5 cells. *Sci Rep*. 2017;7:16701.