

## Inhibitory Effect on *Kaempferia Parviflora* Ethanol Extract of IL-1 $\beta$ Induced Inflammation and MMP Expression in CHON-001 Cells

Jeong Ah Lee<sup>1</sup>, Hye Min Seol<sup>1</sup>, Seong Un Jeong<sup>2</sup>, Jae Hyeon Yoon<sup>2</sup>, Jeong Soo Bae<sup>3</sup>, Tae Hee Kim<sup>2</sup> and Hyeong Soo Kim<sup>1,4\*</sup>

<sup>1</sup>Southeast Medi-Chem Institute, Busan 48308, Korea

<sup>2</sup>Hamsopharm R&D Center, Iksan 54524, Korea

<sup>3</sup>Department of Cardiovascular Laboratory, Dong-A University Hospital, Busan 49201, Korea

<sup>4</sup>Department of Pharmaceutical Science and Technology, Kyungshung University, Busan 48434, Korea

Received July 17, 2024 / Revised August 4, 2024 / Accepted August 7, 2024

The potential therapeutic effects of *Kaempferia Parviflora* ethanol extract (KPE) on osteoarthritis were investigated using the human chondrocyte cell line (CHON-001) to explore its application in functional foods. The CHON-001 cells were pre-treated with either 1  $\mu$ g/ml or 5  $\mu$ g/ml of KPE before exposure to 10 ng/ml of IL-1 $\beta$  to induce osteoarthritis. Results showed that KPE treatment significantly suppressed IL-1 $\beta$ -induced TNF- $\alpha$  production by 66% and 50% at concentrations of 1  $\mu$ g/ml and 5  $\mu$ g/ml KPE, respectively. In addition, COX-2 protein expression was reduced by 26% and 34% compared to control levels. The preservation of chondrocyte-specific matrix proteins, aggrecan, and collagen type II, was notable, with aggrecan and mRNA levels maintained by 5% and 8%, and collagen II levels preserved by 62% and 47% at the same KPE concentrations. This preservation is likely due to the reduced expression of MMP1 and MMP13, enzymes responsible for matrix protein degradation. Overall, the current results suggest that KPE may protect chondrocytes from IL-1 $\beta$ -induced osteoarthritis by suppressing TNF- $\alpha$  production and COX-2 expression while preserving critical matrix proteins like aggrecan and collagen II by suppressing the expressions of their degrading enzymes (MMP-1 and MMP-13). Therefore, KPE holds promise as a candidate for developing functional foods aimed at reducing osteoarthritis.

**Key words :** Anti-inflammatory, *Kaempferia parviflora* ethanol extract (KPE), matrix protein, MMPs, osteoarthritis (OA)

### 서 론

골관절염(osteoarthritis)은 중년부터 노년층에서 흔한 만성 퇴행성 및 진행성 질환이며 귀에서 분리한 연골세포에서 계대 배양이 증가할수록 산화적 스트레스가 증가하여 연골세포의 손상이 나타난다는 선행연구가 있다[10, 12]. 주요한 특징 중 하나는 연골 구조의 손상, 연골 뼈 연화 및 염증, 연골의 점진적인 손실이며 주로 윤활막 손실과 반월판 손실로 나타나고 시간의 경과에 따라 서서히 진행되는 특성상 심각한 관절 손상이 발생할 때 까지 증상이 나타나지 않는 경우가 많다[7, 14]. 치료는 염증성 사

이토카인과 같은 염증 매개체와 Wnt 신호전달 경로를 표적으로 하는데 특히나 interleukin (IL)-1, tumor necrosis factor (TNF)와 같은 염증성 사이토카인은 aggrecan과 collagen type II (collagen II)의 생성을 억제하고 matrix metalloproteinases (MMPs)와 같은 기질 분해 효소의 생성을 촉진함과 동시에 세포 내 산화적 스트레스의 증가는 염증을 유도하는 것으로 알려져 있다[2, 13, 14, 17]. 약리학적으로 사용되는 치료제의 대부분은 통증완화의 역할이며 골관절염의 예방이나 치료에서 명확한 임상효과는 나타나지 않은데다 표적치료도 부족한 실정이다[24, 26].

혹생강의 뿌리줄기는 항염증, 항골관절염, 항암, 항비만 등 광범위한 질병을 치료하는 약제로 전통의학에서 주로 사용된 물질이며 염증성 사이토카인의 발현과 유전자 발현을 감소시키는 항염증 효과가 있다고 알려져 있다[1, 16]. *In vitro* 건선 질환 모델에서 대식세포에서 항염증 효과와 각질형성세포의 증식과 이동을 억제 시키고, 심상성 여드름 환자에게서 항여드름 임상 효과를 확인한 선행 연구결과가 있고 골관절염에서는 MMPs의 억제 효과를 확인한 선행연구는 있으나 항골관절염의 기전과 matrix

#### \*Corresponding author

Tel : +82-51-663-4897, Fax : +82-51-663-4809

E-mail : tomybelief@ks.ac.kr

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.

protein에 대한 연구결과는 아직 미비한 수준이며 아직 밝혀지지 않았다[11, 16, 21]. 이에 본 연구팀에서는 관절염에서 주요 손상부위인 연골세포막의 염증 유발 모델에서의 흑생강 추출물의 염증억제 효과와 함께 연골구성 cellular matrix protein의 분해방지에 대해 확인하기로 하였다.

본 연구에 사용된 사람 연골 기원인 CHON-001 세포는 연골세포에서 분리되었으며 IL-1 $\beta$ 를 처리하였을 때 SOX-9의 mechanism에 의해 연골세포의 증식과 분화를 억제하며 연골 matrix protein의 합성을 억제함과 동시에 MMPs의 생성 증가를 통한 matrix protein의 분해를 촉진하는 것으로 알려져 있다[20, 23]. 따라서, 골관절염의 염증 발병과 직접적으로 관련 있는 사이토카인 중 하나인 TNF- $\alpha$ 와 proteoglycan의 합성을 억제하여 관절염을 유도하는 단백질인 COX-2의 변화를 측정하여 염증조절에 대한 효과를 확인하고자 하였고 관절 조직 내 콜라겐 사이 간격을 채우는 역할을 하는 aggrecan과 연골 특이 collagen II의 생성량 증가에 대한 효과, 그리고 관절염을 판단하는 징후 중 하나로 사용되고 collagen II의 분해를 유도하며 골관절염 발병 시 증가한다고 알려져있는 MMP-1과 MMP-13과 함께 이들의 발현량 변화를 조사하였다[8, 19, 25].

이상으로 본 연구는 콘드로이친, 글루코사민 등 밝혀진 기능성 소재 외 아직 밝혀지지 않은 흑생강의 골관절염 억제 또는 개선의 효과를 확인하고 이에 대한 예방 및 억제 기전을 밝히고자 하였다[4]. 나아가 골관절염은 표적 치료가 쉽지 않은 만큼 뼈 건강증진을 위한 건강기능식품 소재로의 개발가능성을 확인하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 실험재료 및 추출

본 연구에 사용된 시험물질인 흑생강 추출물은 태국에서 수확 및 건조된 원료를 구입 사용하였다. 흑생강 중량 대비 8-10배 부피에 해당하는 40% 주정을 가지고 55-60 $^{\circ}$ C에서 24시간 동안 추출하여 추출물을 수득하였다. 상기 열수 추출물을 여과하여 20 brix 이상 되도록 감압 농축 하였고 농축액은 90 $^{\circ}$ C에서 10분 이상 멸균 후 분무건조한 파우더 형태로 (주)함소아제약에서 제공받았다.

### 사용시약

세포배양에 사용한 dulbecco's modified eagle medium (DMEM)과 fetal bovine serum (FBS)는 Welgene (Welgene, Gyeongsan, Korea)에서 구매하였으며 항생제로 사용한 GENETICIN은 Gibco (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)에서 구매하였으며 양성대조군으로 Celecoxib (MKA-PHR-1683, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 사용하였다. TNF- $\alpha$  측정을 위해 Human TNF-alpha Quantikine ELISA kit (DTA00D, R&D Systems, Minneap-

olis, MN, USA)를 구매하였으며 단백질 발현량 분석을 위한 1차 항체 MMP-1 (sc-21731, Santa Cruz Biotech., Dallas, TX, USA), MMP-13 (sc-30073, Santa Cruz Biotech.), Aggrecan (ab37778, abcam, Cambridge, UK), Collagen II (ab34712, abcam), COX-2 (D5H5, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), GAPDH (sc-365062, Sant Cruz Biotech.) 그리고 2차 항체는 Goat anti-Rabbit HRP Conjugated (A120-101P, BETHYL Laboratories Inc., Waltham, MA, USA)를 사용하였다.

### 세포배양

사람 연골세포주인 CHON-001은 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA)에서 분양받은 것을 사용하였다. CHON-001 세포는 DMEM에 10% FBS 와 0.1 mg/ml의 GENETICIN을 첨가하여 배양하였으며 37 $^{\circ}$ C, 5%, CO $_2$ 의 조건에서 배양하였다.

### 시험물질 처리 농도 설정

시험물질 처리 농도를 설정하기 위해 배양한 세포를 96-well plate에  $1 \times 10^4$  cells/ml로 분주하고 24시간 배양한 후 IL-1 $\beta$ 는 2, 5, 10 및 20 ng/ml의 농도로 처리한 후 72시간, celecoxib는 1, 3, 5, 10, 20 및 100  $\mu$ M의 농도로 처리한 후 24시간, 흑생강 추출물의 농도는 1, 3, 5, 10, 20, 50 및 100  $\mu$ g/ml의 농도로 처리한 후 24시간을 배양하고 1 mg/ml 농도의 MTT reagent (Duchefa-Biochemie, Haarlem, The Netherlands)를 각 50  $\mu$ l 분주한 뒤 4시간동안 37 $^{\circ}$ C, 5%, CO $_2$ 에서 반응시킨 후 2-propanol 100  $\mu$ l를 분주하여 형성된 formazan crystal을 용해시킨 후 570 nm에서 흡광도를 측정하여 각 농도를 설정하였으며 시험 물질을 전처리한 후 IL-1 $\beta$ 로 염증을 유도하여 진행하였다.

### TNF- $\alpha$ 생성량 측정

CHON-001 세포를 6-well plate에  $1 \times 10^6$  cells/well로 분주한 후 celecoxib와 흑생강 추출물을 처리하고 24시간 배양한 뒤 IL-1 $\beta$ 를 처리해 관절염을 유도하기 위해 72시간 배양하였다. 그 후 배양액을 수거하여 -20 $^{\circ}$ C에 보관하였으며 제조사의 지침에 따라 실험을 진행한 후 450 nm에서 흡광도를 측정하고 측정된 흡광도를 바탕으로 생성량을 측정하였다.

### 단백질 발현량 측정

CHON-001 세포를 6-well plate에  $1 \times 10^6$  cells/well로 분주한 후 동일한 조건에서 배양하고 100 $\times$  Protease inhibitor cocktail (BMP1001, Abbkine, USA)를 첨가한 RIPA buffer (R2002, Biosesang, Yongin, Korea)를 처리하여 균질화 한 후 4 $^{\circ}$ C, 12,000 $\times$  g에서 30분간 원심분리 하여 상등액을 얻었다. 이후 Bradford assay를 이용하여 단백질을 정량

하였으며, 30 µg/well의 단백질을 10% acrylamide gel을 이용하여 SDS-PAGE를 통해 크기별로 분리한 후 nitro cellulose membrane (GE healthcare Life science, Chicago, IL, USA)에 transfer하고 5% skim milk에서 1시간 동안 blocking하였다. 1차 항체는 4°C에서 over night하였고 Tris-buffered saline with Tween 20 (TBS-T)에 5분간 4회 세척한 후 2차 항체를 처리하여 상온에서 1시간 반응시킨 후 TBS-T buffer로 10분간 4회 세척한 다음 D-Plus ECL Femto System (ECL-FS100, 동인LS, Seoul, Korea)에 반응시킨 후 Chemi doc XRS System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 이용하여 발현 정도를 측정하였다.

**유전자 발현 분석**

CHON-001 세포를 동일한 조건에서 배양한 후 trizol reagent를 첨가하여 균질화한 후 4°C, 12,000× g에서 원심분리하여 상층액을 얻어 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 Nano drop (Thermo Fisher Scientific)을 이용하여 RNA 정량을 실시하였고 정량한 RNA는 Smartgene compact cDNA synthesis kit (SG-CDNA C100, Smartgene, Daejeon, Korea)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 합성한 cDNA에 MMP-1, MMP-13, aggrecan, collagen II를 첨가하고 control로 GAPDH를 사용하였으며 유전자 발현 정도를 Lightcycler 96 (Roche, Basel, Switzerland)를 이용하여 측정하였다. 사용한 primer의 염기서열은 Table 1과 같다.

**통계처리**

각 군의 실험결과에 대한 통계적 검정은 Statview (ver. 5.0.1) 프로그램을 이용하였고, 측정값은 평균±표준편차 (mean ± SD, n=3)로 나타내었다. 각 분석 항목에 대한 통계적 유의성은 one way ANOVA test 실시 후, p<0.05 수준에서 정규성과 등분산성을 확인 후 Tukey test로 사후 검정하여 군 내 유의성이 있는 결과치에 대해 \*, # 또는 †으로 표시하였다.

**결과 및 고찰**

**IL-1β 유도 관절염 모델 도출 및 시험물질 처리 농도 설정 결과**

연골세포주인 CHON-001 세포를 이용한 관절염모델을 도출하기 위하여 MTT를 수행하였다. 관절염을 유도하는 물질로 사용한 IL-1β는 골관절염이 진행될 때 활막액과 연골에서 발견되는 전염증 인자 중 하나로 proteoglycan과 collagen type II를 분해하는 MMP의 생성을 유도하며 양성대조군으로 사용한 celecoxib는 COX-2를 억제하고 항염증 및 진통완화 특성을 가지는 비 스테로이드계 약물로 일반적으로 골관절염의 치료제로 사용되며 환자에 투약 시 통증과 신체 기능의 개선에 효과가 있다[3, 6, 9, 18].

그 결과, Fig. 1A에 나타난 바와 같이 IL-1β 처리군은 농도 의존적으로 유의하게 세포 생존율이 감소하는 것을 확인하였고 10 ng/ml의 농도에서 세포독성 없이 적용 가능하여 이를 IL-1β 처리 농도로 설정하였다.

Celecoxib의 농도는 Fig. 1B에 나타난 바와 같이 최대 농도인 10 µM까지 비처리군과 통계적으로 유의한 세포독성을 유발하지 않아 최고 농도를 양성대조군으로 설정하였다.

시험물질인 KPE의 농도는 Fig. 1C에 나타난 바와 같이 5 µg/ml의 농도에서부터 80% 수준의 세포생존율이 나타나 1 µg/ml과 5 µg/ml을 SL과 SH로 설정하였다.

이들 결과를 바탕으로 양성대조군은 10 µM의 celecoxib, KPE는 각각 1 µg/ml (SL)과 5 µg/ml (SH)로 처리한 후 10 ng/ml의 IL-1β로 연골세포의 염증을 유도하여 KPE의 *in vitro* 관절염 모델에 미치는 영향을 확인하였다.

**KPE의 농도에 따른 관절염 유도 세포생존율 변화**

IL-1β 유도 관절염 모델에서의 KPE가 세포생존율에 미치는 영향을 확인하고자 MTT를 수행하였다. KPE와 celecoxib가 처리된 세포에서 IL-1β로 관절염을 유도했을 때 나타나는 결과는 Fig. 2와 같이 control군에서 85% 수준으

Table 1. Primer sequences for q-PCR

Gene	Primer	Sequence
Aggrecan	Forward	5' AAGGGCGAGTGGAATGATGT 3'
	Reverse	5' CGCTTCTGTAGTCTGCGTTTGT 3'
Collagen II	Forward	5' ATGCCACACTCAAGTCCCTCA 3'
	Reverse	5' GTCTCGCCAGTCTCCATGTTG 3'
MMP-1	Forward	5' TCAGTTCGTCCTCACTCCAG 3'
	Reverse	5' TTGGTCCACCTGTCATCTTC 3'
MMP-13	Forward	5' CAGAACTCCCAACCGTATTGAT 3'
	Reverse	5' TGTATTCAAAGTATGGGTCCG 3'
GAPDH	Forward	5' CTCTTTGATGTCACGCACGATTTTC 3'
	Reverse	5' ATCGTGGGCCGCTCTAGGCACC 3'

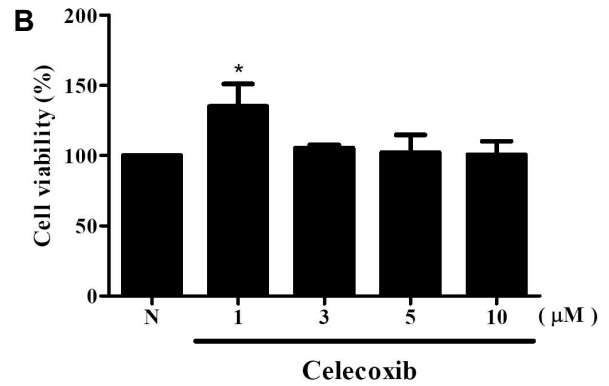
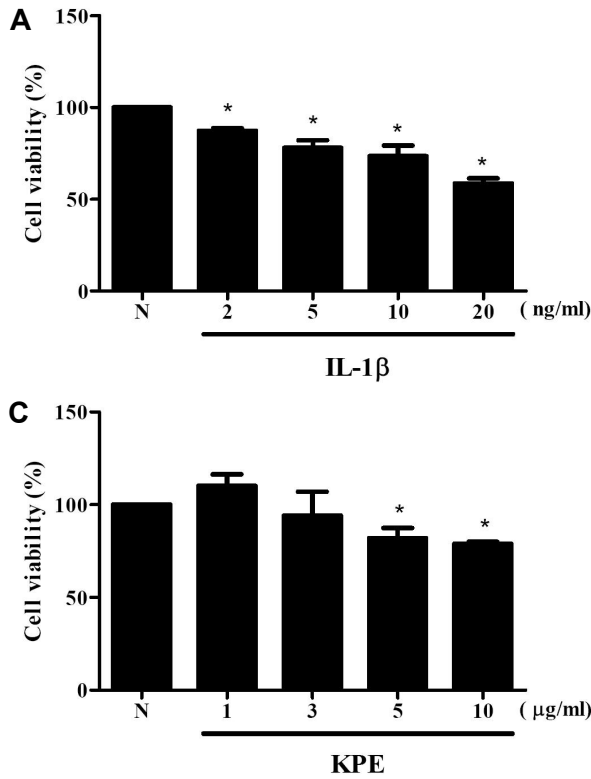


Fig. 1. Cell viability of IL-1 $\beta$ , celecoxib and KPE in CHON-001 cells. After 72 hr of IL-1 $\beta$  treatment, cell viability was evaluated using MTT assay (A), after 24 hr of celecoxib treatment, cell viability was evaluated using MTT assay (B), after 24 hr of *Kaempferia parviflora* ethanol extract, cell viability was evaluated using MTT assay (C). The data represent mean  $\pm$  SD (n=3), \* $p$ < 0.05, vs N.

로 생존율이 낮아지고 celecoxib 처리군에서 생존율 증가가 나타났으며 SL군에서는 95.24%까지 생존율이 증가하였으나 고농도 처리군에서는 80.84%로 다소 감소하는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 동일한 세포주를 사용한 연구에서 IL-1 $\beta$  처리군이 유의하게 세포생존율을 감소시켰으며 celecoxib 처리군에서 세포생존율의 증가가 나타났다고 보고된 경우와 동일한 경향이 나타났다[25]. 반면

방광암세포주인 T24세포에서 KPE는 p53 유전자의 발현을 증가시켜 세포사멸을 유도하여 조직을 보호한다는 연구결과가 있고 연골세포주인 CHON-001에서 KPE는 IL-1 $\beta$ 로 유도된 염증에서 세포를 보호하여 세포생존율을 증가시키는 것을 확인하였다. 특히나 치료약물로 사용되는 celecoxib만큼 세포사멸을 억제하고 생존율을 증가시키는 것을 확인하였다[22].

**IL-1 $\beta$  유도 염증 연골세포에서 염증 감소 효과**

KPE의 염증 감소 효과를 확인하기 위해 TNF- $\alpha$ 와 COX-2를 확인하였다. TNF- $\alpha$ 는 골관절염 발병경로에서 중요하게 작용하는 염증성 사이토카인이며 COX-2 또한 proteoglycan 등의 합성 억제, 만성 염증의 매개체로 작용하며 염증성 관절염을 유도하여 발현이 증가하는 단백질이다[5, 15]. Fig. 3A에서 볼 수 있듯 TNF- $\alpha$ 의 생성량은 IL-1 $\beta$  처리군의 경우 정상군의 1.8배 수준으로 증가하였으며 이 때 양성대조군에서는 정상군의 1.09배, SL 및 SH군은 각각 1.10과 1.24배로 발현이 낮아진 것을 확인하였다. COX-2의 발현은 Fig. 3B에서 보듯 양성대조군에서 IL-1 $\beta$  처리군의 0.7배로 감소하였고 SL 및 SH군은 각각 0.7배와 0.6배로 감소한 것을 확인하였다. TNF- $\alpha$ 와 COX-2는 염증의 진행에 있어서 중요한 역할을 하는 매개체이지만 KPE를 처리함으로써 인해 발현수준이 감소한 것을 확인하였고 이를 통해 IL-1 $\beta$ 가 유도한 염증에서 KPE가 TNF- $\alpha$ 와 COX-2의 생성을 감소시켜 연골세포의 염증 진행을 저

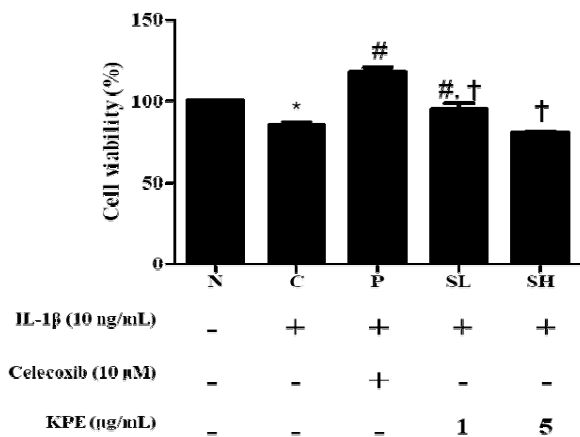


Fig. 2. Cell viability of KPE and IL-1 $\beta$  induced OA model in CHON-001 cells. After 24 hr of celecoxib and KPE, 72 hr of IL-1 $\beta$  induced inflammatory in CHON-001 cells. The data represent means  $\pm$  SD (n=3), \* $p$ <0.05, N vs C, # $p$ <0.05 vs C and † $p$ <0.05 vs P.

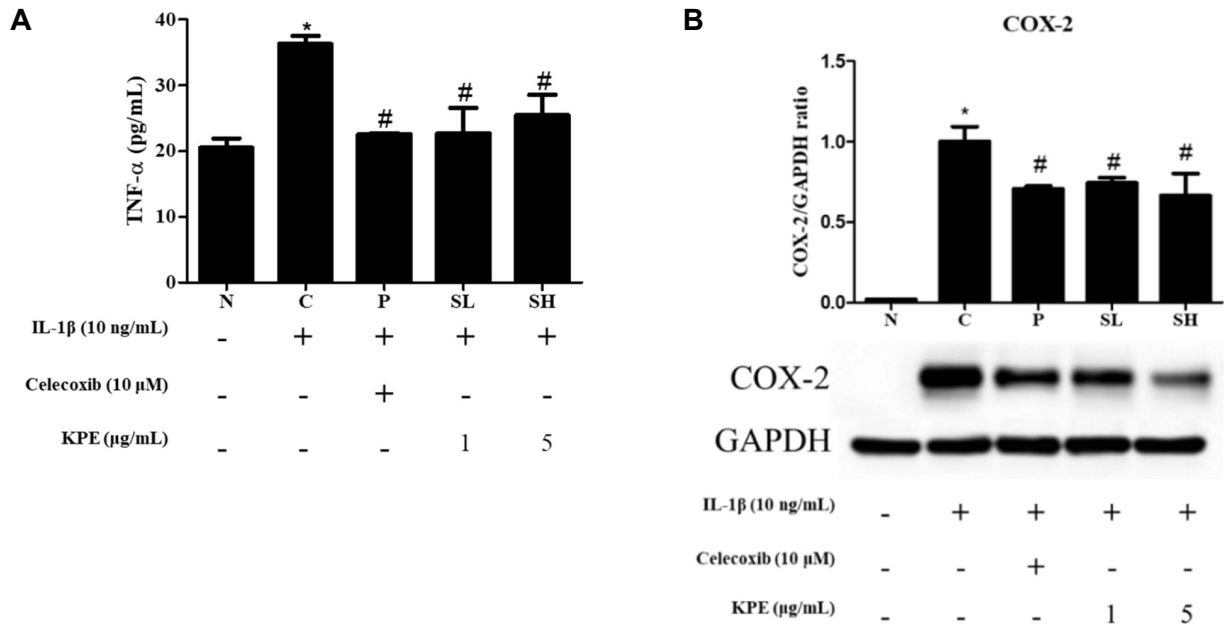


Fig. 3. Effect of inhibitor expression TNF-α cytokine, COX-2 expression levels in IL-1β induced inflammatory model. CHON-001 cells were treated with celecoxib and KPE after 24 hr, IL-1β treated 72 hr. ELISA was performed after 72 hr of treated IL-1β, cell supernatant (A) and the COX-2 proteins in total cell lysates were detected by western blotting (B). The data represent mean ± SD (n=3), \**p*<0.05, N vs C and #*p*<0.05 vs C.

해함을 확인하였으며 더 나아가 관절염의 진행을 억제하는 효과를 가지고 있음을 확인하였다.

**IL-1β 유도 염증 연골세포에서 matrix protein의 보호 효과**

IL-1β 유도 염증에서 연골세포 특이적인 matrix proteins로 골격을 유지하는 aggrecan과 collagen II의 보호효과를 확인하였다. Aggrecan은 관절 조직 내 콜라겐 사이 간격을 채우는 역할을 하며 aggrecan의 분해는 관절염을 판단하는 징후 중 하나로 사용되고, 이들이 분해됨에 따라 collagen type II 역시 감소한다[8, 19]. Aggrecan과 collagen II의 보호 효과를 확인하기 위해 western blot과 q-PCR을 이용하여 확인하였으며 Fig. 4A, Fig. 4C에서 볼 수 있듯 aggrecan의 발현은 IL-1β 처리군에서 11% 감소되었지만 SL군에서 8%, SH군에서 3% 만 감소한 것을 확인하였고 collagen II의 발현은 IL-1β 처리군에서 34% 감소하였지만 SL군에서 62%, SH군에서 47% 증가하는 것을 확인하였다. Fig. 4B와 Fig. 4D와 같이 mRNA 발현정도에서도 aggrecan은 IL-1β 처리군에서 정상군 대비 22%가 감소한 반면 SL군과 SH군에서는 IL-1β 처리군 대비 2%와 12%가 증가하여 KPE 처리군에서 aggrecan 발현 억제가 저해된 것을 확인하였다. Collagen II 또한 IL-1β 처리군은 정상군 대비 15%가 감소하였으나 SL군과 SH군은 IL-1β 처리군 대비 12%와 15%가 증가한 수준으로 정상군과 차이가 없음을 확인하였다. 단백질과 mRNA 발현에서 SL군은 염증으로 인한 발현 저해 억제, SH군에서는 정상군 수준까지

matrix protein 분해 억제효과가 있음을 확인하였다. 이를 통해 KPE는 aggrecan과 collagen type II의 분해를 방지하여 이들 matrix proteins를 보호하는 효과가 있고 이는 세포와 연골의 골격을 유지하는 것에 긍정적인 효과가 있음을 확인하였다.

**Matrix proteins 유지 기전으로의 MMP-1 및 MMP-13 생성 저해 효과**

Aggrecan과 collagen type II의 유지 기전으로 MMP-1 및 MMP-13의 생성 억제를 확인하고자 하였다. MMPs 중 MMP-1과 MMP-13은 연골조직 내 콜라겐을 특이적으로 분해한다고 알려져 있으며 골관절염에서 MMP-1과 MMP-13의 발현이 증가한다고 알려져 있다[19, 25]. MMP-1과 MMP-13의 생성 정도를 western blot과 q-PCR을 이용하여 확인한 결과 Fig. 5A, 5C에서 보는 바와 같이 MMP-1의 발현은 IL-1β 처리군에서 정상군 대비 92% 증가하였고 SL군과 SH군에서 IL-1β 처리군 대비 39%, SH군에서 38% 감소한 것을 확인하였다. MMP-13의 발현은 IL-1β 처리군에서 정상군 대비 59% 증가하였고 SL군과 SH군에서 IL-1β 처리군 대비 27%와 48% 감소한 것을 확인하였다. mRNA의 발현은 Fig. 5B와 5D와 같이 MMP-1은 IL-1β 처리군에서 정상군 대비 37% 증가하였고 SL군과 SH군에서 IL-1β 처리군 대비 10%와 14%가 억제된 것을 확인하였다. MMP-13은 IL-1β 처리군에서 정상군 대비 40%가 증가하였고 SL군과 SH군에서는 IL-1β 처리군 대비 20%와 18%

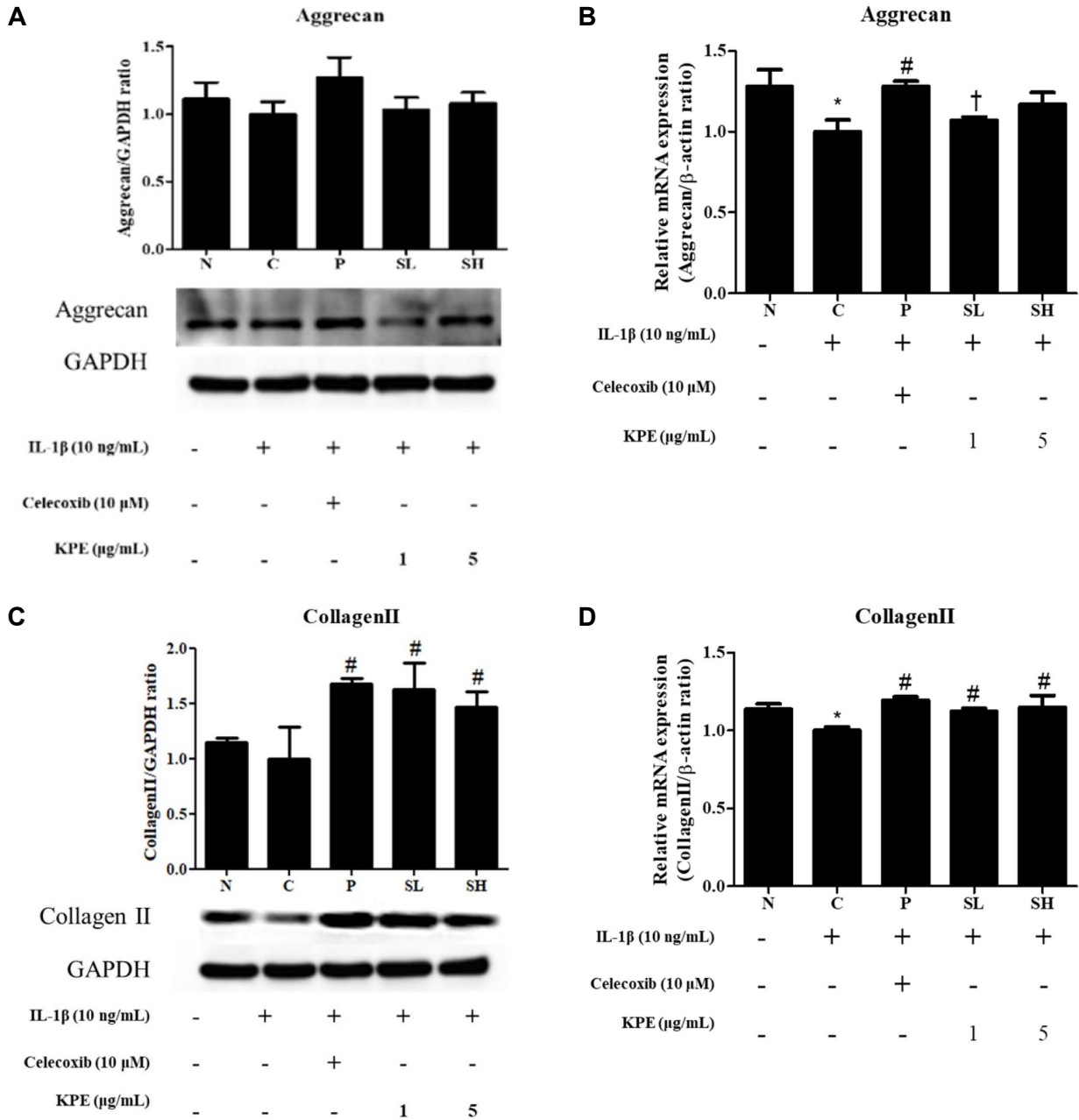


Fig. 4. Effect on matrix protein expression of aggrecan and collagen type II and mRNA expression levels in IL-1β induced inflammatory model. CHON-001 cells were treated with celecoxib and KPE after 24 hr, IL-1β treated 72 hr. aggrecan in total cell lysates were detected by western blotting (A), aggrecan in mRNA were detected by q-PCR (B), collagen type II proteins in total cell lysates were detected by western blotting (C), collagen type II in mRNA were detected by q-PCR (D). The data represent mean ± SD (n=3), \* $p < 0.05$ , N vs C, # $p < 0.05$  vs C and † $p < 0.05$  vs P.

가 감소한 것을 확인하였다. 이러한 결과로 MMP-1과 MMP-13의 발현량은 IL-1β 단독 처리군에서 증가한 것을 확인하였고 SL 및 SH군에서 이들의 생성이 억제되어 발현량이 감소한 것을 확인하였다. 이를 통해 KPE가 연골의 골격을 유지하는 기전으로 matrix proteins을 분해하는 효소의 생성을 저해하면서 연골의 분해를 억제하는 것을 확인하였으며 염증으로부터 연골을 보호하는 효과가 있

음을 의미한다. 종합해보면 KPE는 TNF-α 및 COX-2의 생성을 감소시켜 염증의 진행 수준을 감소시키고 그 기전으로 특이적 분해효소인 MMP-1과 MMP-13의 활성을 저해시켜 aggrecan과 collagen type II와 같은 matrix proteins의 분해를 억제하고 이를 통해 연골세포를 보호하는 효과가 있음을 확인하였고 더 나아가 연골보호제 핵심 성분으로 기대역할을 할 수 있음을 시사한다.

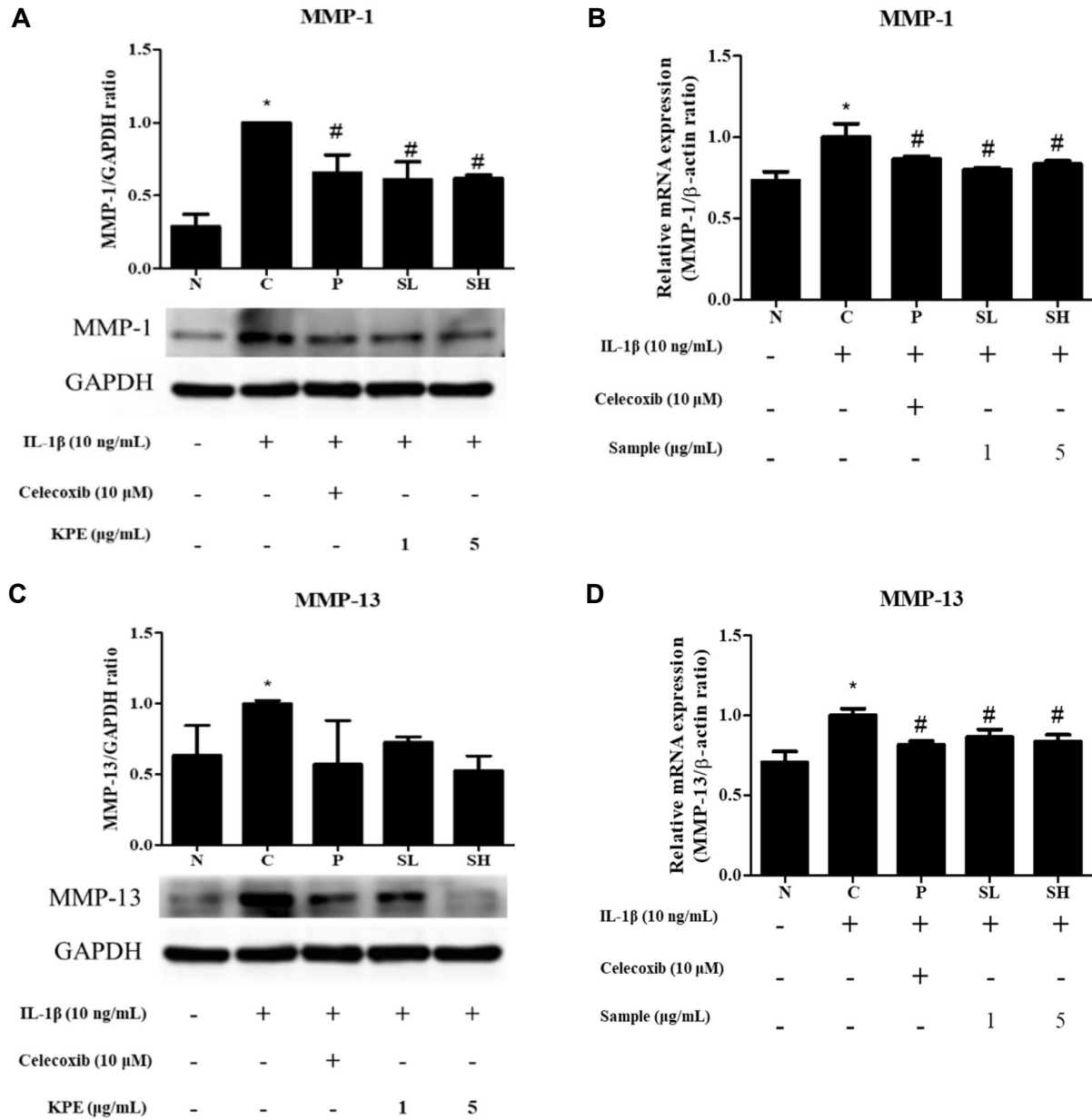


Fig. 5. Effect on inhibitor MMP-1 and MMP-13 expression levels and mRNA expression levels in IL-1β induced inflammatory model. CHON-001 cells were treated with celecoxib and KPE after 24 hr, IL-1β treated 72 hr. MMP-1 in total cell lysates were detected by western blotting (A), MMP-1 in mRNA were detected by q-PCR (B), MMP-13 proteins in total cell lysates were detected by western blotting (C), MMP-13 in mRNA were detected by q-PCR (D). The data represent mean ± SD (n=3), \* $p$ <0.05, N vs C and # $p$ <0.05 vs C.

### 감사의 글

본 연구는 중소벤처기업부와 중소기업기술정보진흥원의 “지역특화산업육성+ (R&D, S3400496)” 사업의 지원을 받아 수행된 연구 결과입니다.

### The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest

with the contents of this article.

### Reference

- Chen, D., Li, H., Li, W., Feng, S and Deng, D. 2018. *Kaempferia parviflora* and its methoxyflavones: Chemistry and biological activities. *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.* **2018**, 4057456.
- Cho, Y. S., Jeong, S. M., Kim, H. K., Kang, D. H., Lee,

- J. Y., Kang, S. B. and Kim, J. H. 2021. Disease-modifying therapeutic strategies in osteoarthritis: Current status and future directions. *Exp Mol. Med.* **53**, 1689-1696.
3. Clemett, D. and Goa, K. L. 2001. Celecoxib: A review of its use in osteoarthritis, rheumatoid arthritis and acute pain. *Drugs* **59**, 957-980.
  4. Colletti, A. and Cicero, A. F. G. 2021. Nutraceutical approach to chronic osteoarthritis: From molecular research to clinical evidence. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 12920.
  5. Crofford, L. J. 1999. COX-2 in synovial tissues. *Osteoarthritis Cartilage* **7**, 406-408.
  6. Goldenberg, M. M. 1999. Celecoxib, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor for the treatment of rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Clin. Ther.* **21**, 1497-1513
  7. Goldring, M. B. and Berenbaum, F. 2015. Emerging targets in osteoarthritis therapy. *Curr. Opin. Pharmacol.* **22**, 51-63.
  8. Huang, K. and Wu, L. D. 2008. Aggrecanase and aggrecan degradation in osteoarthritis: A review. *J. Int. Med. Res.* **36**, 1149-1160.
  9. Kapoor, M., Martel-Pelletier, J., Lajeunesse, D., Pelletier, J. P. and Fahmi, H. 2011. Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* **7**, 33-42.
  10. Kim, K. M., Kim, Y. J., Kim, J. M., Sohn, D. H. and Park, Y. C. 2019. Change in the levels of intracellular antioxidants during aging of articular chondrocytes and cartilage. *J. Life Sci.* **29**, 888-894
  11. Kobayashi, H., Suzuki, R., Sato, K., Ogami, T., Tomozawa, H., Tsubata, M., Ichinose, K., Aburada, M., Ochiai, W., Sugiyama, K. and Shimada, T. 2018. Effect of *Kaempferia parviflora* extract on knee osteoarthritis. *J. Nat. Med.* **72**, 136-144.
  12. Loeser, R. F., Collins, J. A. and Diekman, B. O. 2016. Ageing and the pathogenesis of osteoarthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* **12**, 412-420.
  13. Macías-Hernández, S. I., Morones-Alba, J. D., Miranda-Duarte, A., Coronado-Zarco, R., Soria-Bastida, M. L. A., Nava-Bringas, T., Cruz-Medina, E., Olascoaga-Gómez, A., Tallabs-Almazan, L. V. and Palencia, C. 2017. Glenohumeral osteoarthritis: Overview, therapy, and rehabilitation. *Disabil. Rehabil.* **39**, 1674-1682.
  14. Martin, G., Andriamanalijaona, R., Mathy-Hartert, M., Henrotin, Y. and Pujol, J. P. 2005. Comparative effects of IL-1 $\beta$  and hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) on catabolic and anabolic gene expression in juvenile bovine chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* **13**, 915-924.
  15. Molnar, V., Matišić, V., Kodvanj, I., Bjelica, R., Jeleč, Ž., Hudetz, D., Rod, E., Čukelj, F., Vrdoljak, T., Vidović, D., Starešinić, M., Sabalić, S., Dobričić, B., Petrović, T., Antičević, D., Borić, I., Košir, R., Proxenc Zmrzljak, U. and Primorac, D. 2021. Cytokines and chemokines involved in osteoarthritis pathogenesis. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 9208.
  16. Na Takuathung, M., Potikanond, S., Sookkhee, S., Mung-kornasawakul, P., Jearanaikulvanich, T., Chinda, K., Wikan, N. and Nimlamool, W. 2021. Anti-psoriatic and anti-inflammatory effects of *Kaempferia parviflora* in keratinocytes and macrophage cells. *Biomed. Pharmacother.* **143**, 112229.
  17. Okada, Y. 2000. Matrix-degrading metalloproteinases and their roles in joint destruction. *Mod. Rheumatol.* **10**, 121-128.
  18. Puljak, L., Marin, A., Vrdoljak, D., Markotic F., Utrobicic, A. and Tugwell, P. 2017. Celecoxib for osteoarthritis. *Cochrane. Database. Syst. Rev.* **5**, CD009865.
  19. Sandy, J. D. 2006. A contentious issue finds some clarity: on the independent and complementary roles of aggrecanase activity and MMP activity in human joint aggrecanolysis. *Osteoarthritis Cartilage* **14**, 95-100.
  20. Shimo, T., Takebe, H., Okui, T., Kunisada, Y., Ibaragi, S., Obata, K., Kurio, N., Shamsoun, K., Fujii, S., Hosoya, A., Irie, K., Sasaki, A. and Iwamoto, M. 2020. Expression and role of IL-1 $\beta$  signaling in chondrocytes associated with retinoid signaling during fracture healing. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 2365.
  21. Sitthichai, P., Chanpirom, S., Maneerat, T., Charoensup, R., Tree-Udom, T., Pintathong, P., Laphookhieo, S. and Sripisit, T. 2022. *Kaempferia parviflora* rhizome extract as potential anti-acne ingredient. *Molecules* **27**, 4401.
  22. Tangjitjaroenkun, J., Yahayo, W., Supabphol, S. and Supabphol, R. 2021. Selective cytotoxicity of *Kaempferia parviflora* extracts in human cell lines. *Asian. Pac. J. Cancer. Prev.* **22**, 73-79.
  23. Vincent, T. L. 2019. IL-1 in osteoarthritis: Time for a critical review of the literature. *F1000Res.* **21**, 8.
  24. Wang, B. W., Jiang, Y., Yao, Z. L., Chen, P. S., Yu, B. and Wang, S. N. 2019. Aucubin protects chondrocytes against IL-1 $\beta$ -induced apoptosis *in vitro* and inhibits osteoarthritis in mice model. *Drug. Des. Devel. Ther.* **13**, 3529-3538.
  25. Wang, X., Fan, J., Ding, X., Sun, Y., Cui, Z. and Liu, W. 2019. Tanshinone I inhibits IL-1 $\beta$ -induced apoptosis, inflammation and extracellular matrix degradation in chondrocytes CHON-001 cells and attenuates murine osteoarthritis. *Drug. Des. Devel. Ther.* **15**, 3559-3568.
  26. Xu, W., Zhang, B., Xi, C., Qin, Y., Lin, X., Wang, B., Kong, P. and Yan, J. 2023. Ferroptosis plays a role in human chondrocyte of osteoarthritis induced by IL-1 $\beta$ . *In Vitro. Cartilage* **14**, 455-466.



## 초록 : 흑생강 추출물의 CHON-001 세포에서의 IL-1 $\beta$ 로 유도된 염증과 MMPs 발현 억제 효과

이정아<sup>1</sup> · 설혜민<sup>1</sup> · 정성운<sup>2</sup> · 윤재현<sup>2</sup> · 배정수<sup>3</sup> · 김태희<sup>2</sup> · 김형수<sup>1,4\*</sup>

(<sup>1</sup>(주)동남의화학연구원, <sup>2</sup>합소아제약, <sup>3</sup>동아대학교병원, <sup>4</sup>경성대학교 제약공학과)

*Kaempferia parviflora* ethanol extract (KPE)의 골관절염 유도 연골세포 모델에서의 관절염 개선 효과에 대한 기전을 확인하고 골관절을 보호하는 건강기능성식품의 유효소재로써의 역할을 할 수 있는지 확인하고자 하였다. 사람 연골세포주인 CHON-001에 KPE 1 또는 5  $\mu\text{g/ml}$ 을 선처리하여 배양한 후 IL-1 $\beta$  10 ng/ml을 첨가하여 관절염이 유도되는 경로를 확인하였다. 그 결과 KPE 처리군에서 염증성 사이토카인 TNF- $\alpha$ 의 생성량이 관절염 유도군 대비 SL군과 SH군 각각 약 66%와 50%로 감소하였고, COX-2의 발현량 역시 관절염 유도군 대비 SL군과 SH군에서 약 26%와 34%가 감소하여 염증수준이 감소되는 것을 확인하였다. 또한 연골세포의 matrix protein인 aggrecan의 단백질 발현이 관절염 유도군 대비 각각 SL군은 5%, SH군은 8% 증가하였고, mRNA 발현량은 SL군에서 2%, SH군에서 12% 증가된 것을 확인하였다. Collagen II는 관절염 유도군 대비 단백질 발현량이 SL와 SH군 각각 62%, 47% 증가, mRNA 발현량은 SL군과 SH군 각각 12%와 15%가 증가된 것을 확인하였다. 이는 MMP-1과 MMP-13의 발현이 관절염 KPE 처리군에서 유도군 대비 각각 39%와 38%, 27%와 48% 그리고 mRNA 발현에서 10%와 14%, 20%와 18%가 억제됨을 통해 aggrecan과 collagen II의 분해가 억제되는 것을 확인하여 연골세포 matrix 보호에 대한 가능성을 확인하였다. 본 연구를 통해 KPE는 연골의 염증억제와 연골구성성분의 분해억제를 통해 연골세포 손상으로 인한 관절염으로부터의 개선 효과가 있음을 확인하였고 이를 바탕으로 기능성식품 원료로써 개발가능성을 시사하고 있다.