

Inhibitory effect of *Angelica gigas* extract powder on induced inflammatory cytokines in rats osteoarthritis

Jin-Hwan Kwon¹, Min-Seok Han¹, Bu-Min Lee² and Yong-Moon Lee^{2, *}

¹Natural Products Medical Research Institute, Nutragen Co., Anyang 431-810, Korea

²College of Pharmacy, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

(Received July 7, 2015; Revised August 8, 2015; Accepted August 8, 2015)

참당귀 추출분말의 골관절염 흰쥐의 염증성 사이토카인류의 억제활성

권진환¹ · 한민석¹ · 이부민² · 이용문^{2, *}

¹뉴트라젠 천연물의학연구소, ²충북대학교 약학대학 생물분석화학교실

(2015. 7. 7. 접수, 2015. 8. 8. 수정, 2015. 8. 8. 승인)

Abstract: The protective effects of extract powder of *Angelica gigas* on the degeneration of the articular cartilage in rats was investigated with monosodium iodoacetate (MIA)-induced osteoarthritis. The treatment of high concentration (50 µg/mL) of *Angelica gigas* effectively inhibited nitric oxide (NO) production induced by interleukin-1α (IL-1α) without any cytotoxicity. Specifically, mRNA and protein expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2) were dose dependently reduced by extract powder of *Angelica gigas*. Importantly, mRNA expression in articular cartilage of inflammatory cytokines, tumor necrosis factor-α (TNF-α), interleukin-1β (IL-1β) and interleukin-6 (IL-6) were clearly reduced. The inflammatory cytokines in blood were also reduced as well. These results suggested that the protective effects on the degeneration of the articular cartilage was derived from the inhibitory effects of mRNA and protein expression of tested inflammatory cytokines which is linked to prevent the degradation of proteoglycan (PG), the main matrix content in articular cartilage. Meanwhile, the 2 hrs incubation of decursin, a major compound of extract powder in rat whole blood rapidly converted decursin into decursinol which shows strong anti-inflammatory activity. The converted decursinol was detected after 8 hrs in whole blood by LC-MS/MS. Conclusively, the inhibitory effects of inflammatory cytokines production in osteoarthritis may be derived from the production of decursinol, which performs against inflammatory cytokines like TNF-α, IL-1β, and IL-6.

요 약: 골관절염에 대한 참당귀 추출분말의 치료효과를 검토하고자 흰쥐의 monosodium iodoacetate (MIA)로 유발된 골관절염 부위에서 시료를 채취하여 염증관련 효소 및 염증성 cytokines의 발현에 대하여 참당귀 추출분말의 억제효능을 검토하였다. 고농도의 참당귀 추출분말 (50 µg/mL) 투여에서도 독성

★ Corresponding author

Phone : +82-(0)43-261-2825 Fax : +82-(0)43-268-2732

E-mail : ymleefn@chungbuk.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.

이 관찰되지 않았으며, 동일조건하에서 interleukin-1 α (IL-1 α)로 유발된 nitric oxide (NO)의 생성을 효과적으로 억제하였다. 특히, 관절연골 조직의 inducible nitric oxide synthase (iNOS) 및 cyclooxygenase-2 (COX-2)의 발현을 농도 의존적으로 억제하였다. 따라서 참당귀 추출분말은 항염증 효능을 나타내는 농도에서 독성 없이 사용할 수 있으며, iNOS 발현을 억제하여 방출되는 신호전달 물질인 NO의 생성을 억제하였다. 또한 참당귀 추출분말의 처리로 염증유발 부위에서 염증성 cytokines으로 알려진 tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β) 및 interleukin-6 (IL-6)의 발현이 억제됨을 확인하였다. 참당귀 추출분말의 항 염증효과는 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6의 혈중농도를 낮추어 염증부위뿐만 아니라 전체적으로 항염증효과를 나타내었다. 본 실험결과, 참당귀 추출분말의 투여는 MIA 또는 IL-1 α 로 유발되는 골관절염 동물모델에서 염증인자, 관련 효소의 발현 및 관련 신호전달 물질의 생성을 효과적으로 억제하여, 슬관절의 활액 내 glycosaminoglycan (GAG) 및 관절연골의 proteoglycan (PG)의 분해를 방지하여 골관절염의 발생을 억제할 것으로 추정되었다. 한편, 참당귀 추출분말의 주성분인 decursin은 혈중에서 2 시간 이내에 decursinol로 전환되어 8 시간이상 LC-MS/MS로 검출되었다, 따라서 참당귀 추출분말에 의한 염증성 사이토카인 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6의 억제활성은 항염증활성이 큰 decursinol에 의한 것으로 추정된다.

Key words: *Angelica gigas*, osteoarthritis, inflammatory cytokines, TNF- α , decursin, decursinol

1. 서 론

염증(inflammation)은 외상이나 세균의 침입과 같은 외부로부터의 자극에 대하여 생체조직이 방어하는 반응 중 대표적인 현상으로, 주로 조직의 변질, 순환장애 및 조직 증식 등 다양한 질환의 형태를 동반하게 된다. 염증반응이 일어나면 다양한 염증매개인자들(pro-inflammatory mediators)의 생성이 급격히 증가하게 되며, 이로 인하여 발적, 종창, 동통 및 기능장애 등과 같은 임상적 증상들이 나타난다.^{1,2} 이와같은 염증반응 유발과 동반하여 증가되는 대표적인 염증매개인자들은 TNF- α , IL-1 β , IL-6 등이 있으며, 대식세포(macrophage) 등이 이들을 분비하여 다양한 염증반응을 매개하고 있다.^{3,4} 대식세포는 체내에서 다양한 숙주의 방어 및 항상성 유지에 관여하며, 염증반응 시에는 앞서 언급한 염증매개인자 이외에도 NO, prostaglandin E₂ (PGE₂) 등을 생산하여 감염초기 생체 방어에 중요한 역할을 하는 세포로 알려져 있다.^{5,6}

골관절염(osteoarthritis)은 관절연골을 구성하는 세포외기질(extracellular matrix)의 변성으로 인하여 관절연골이 서서히 손상되어 염증 및 통증을 유발하는 만성 퇴행성 질환이다.⁷ 골관절염은 중년이후의 연령대에서 주로 발생하는데, 국내의 골관절염 발병률은 만 50세 이상의 연령대에서 약 40%정도에 달하며, 연령의 증가와 더불어 남성보다는 여성에게서 더 높게 발병한다.⁸ 골관절염의 원인으로는 퇴행성 변화, 면역계 이상, 감염, 외상 및 대사 장애 등 다양하며, 골관절염

의 발병과 관련된 인자들로는 NO, 염증성 사이토카인류 및 단백질 가수분해효소(proteolytic enzymes) 등이 알려져 있다. 특히, 비만은 무릎관절에 체중부하를 주어 골관절염 유발의 가정 중요하고 위험한 인자이다. 또한 유전적 요인으로 직계 여성 가족중 골관절염 환자가 있는 경우, 발병가능성이 2~5 배 증가한다고 알려져 있다.^{9,10}

골관절염 연구를 위한 최근의 실험동물 모델로 흰쥐를 사용하며, 연골을 구성하는 세포의 해당과정 억제제를 통하여 연골세포의 사멸을 유도하는 것으로 알려진 monosodium iodoacetate (MIA)를 흰쥐의 슬관절강 내로 투여함으로써 골관절염을 유발하는 모델을 많이 사용하고 있다.^{11,12}

당귀는 산형과에 속하는 다년생 초본식물로서, 주로 한국, 일본, 중국 등지에서 약용을 목적으로 재배되고 있다. 당귀는 그 산지에 따라 한국에서 생산되는 참당귀(*Angelica gigas* Nakai), 일본에서 생산되는 일당귀(*Angelica acutiloba* Kitagaw), 그리고 중국에서 생산되는 중국당귀(*Angelica sinensis* Diels)로 구분되나, 그 성분과 약리적 효과는 상이한 것으로 알려져 있다. 예로부터 당귀는 어린 순을 나물로 식용하고, 뿌리를 진통, 항암, 신장 독성경감, 간기능 개선, 당뇨병 고혈압 치료, 혈액순환 개선 등 다양한 질환에 대한 약제로 사용하고 있다. 당귀의 함유성분으로서는 decursin, decursinol angelate, nodakentin, nodakenin, umbelliferon, β -sitosterol, α -pinene, limonene 등이 알려져 있다.¹³

본 연구에서는 MIA로 골관절염이 유도된 흰쥐 모

텔에서 참당귀 추출분말 투여에 따른 관절연골에서의 iNOS 및 COX-2 효소활성과 유전자 변화를 모니터링 하였으며, 나아가 혈청내의 염증성 사이토카인류, TNF- α , IL-1 β 및 IL-6의 변화량을 측정하여 참당귀 추출분말이 골관절염의 개선에 미치는 영향을 조사하였다.

2. 실험재료 및 방법

2.1. 실험재료

시험물질로 사용된 참당귀 추출분말은 뉴트라젠으로부터 공급받았다. 골관절염 유발에 사용된 MIA는 Sigma Co. (St. Louis, MI, USA)에서, 동물마취제인 Zoletil과 Rompun은 바이엘코리아(Seoul, Korea)에서 구입하였다. 세포독성 측정에 사용된 water-soluble tetrazolium salt (WST-8) 실험은 Cell Counting Kit-8 (Dojindo, Japan)를 사용하였으며, 염증성 사이토카인의 측정은 각각의 assay kit를 구입하여 ELISA Reader 또는 Western blot으로 검출하였다.

2.2. 실험동물

6 주령의 수컷 Sprague-Dawley계 흰쥐(Orientbio, Korea) 60 마리를 구입하여 충북대학교 동물사육실 내에서 온도 23 ± 2 °C, 습도 $55 \pm 5\%$, 12 시간 주기의 명암 조건에서 1 주간 적응시킨 후, 실험에 사용하였다. 실험기간 동안 사료는 실험동물용 사료(Samyang Co., Korea)와 멸균된 음용수를 자유로이 공급하였다.

2.3. 골관절염 유발

사육실에서 1 주간 적응을 거친 실험동물의 체중을 측정하여 각 군당 12 마리씩 5 개군(정상군, 대조군, 처리군 1, 처리군 2 및 처리군 3)으로 고르게 배정하였다. 골관절염 유발을 위하여 Zoletil과 Rompun이 2:1 비율로 희석된 마취제를 흰쥐에 투여하여 마취시킨 후, 양쪽 무릎주변을 깨끗이 제모하고 1 mL 주사기를 이용하여 양쪽 슬관절강 내에 생리식염수로 희석된 MIA (30 mg/mL 용액) 0.1 mL을 주사하였다. 정상군(N)은 양쪽 슬관절강 내에 각각 주사용 생리식염수 0.1 mL을 주사하고, 증류수 1 mL을 3 주간 1일 1 회씩 경구 투여하였다. 대조군(C)은 양쪽 슬관절강 내에 MIA 용액 0.1 mL을 주사하여 골관절염을 유발시키면서 증류수 1 mL을 3 주간 1일 1회씩 경구 투여하였다. 참당귀 추출분말 처리군은 양쪽 슬관절강 내에 MIA 용액 0.1 mL을 주사하여 골관절염을 유발시

키면서 참당귀 추출분말을 각각 25, 50 및 100 mg/kg 농도로 희석한 시험물질 1 mL을 3주간 1일 1회씩 경구 투여하였다.

2.4. 세포독성 측정

본 연구에 사용된 토끼 연골조직세포(chondrocyte)는 2~3주령 New Zealand white 토끼 관절로부터 연골조직을 분리하여 1차 배양한 후, 사용하였다. 토끼 연골세포는 10% 우태아혈청(fetal bovine serum, Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)이 포함된 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Gibco BRL) 배지를 사용하여 37 °C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

참당귀 추출분말의 세포독성 유무를 알아보기 위하여 Cell Counting Kit-8 (Dojindo, Japan)를 이용하여 WST assay를 실시하였다. 연골조직세포를 96 well plate에 1×10^5 cells/well로 분주하고 12 시간 배양한 다음, 참당귀 추출분말을 농도별(0, 5, 10, 25 및 50 μ g/mL)로 처리하여 24 시간 배양하였다. 각 well 당 10 μ L의 WST-8 용액을 첨가하여 37 °C, 5% CO₂ 조건에서 3 시간 반응시킨 후, ELISA reader (BIO-TEK Instruments Inc., Power wave X340, Winooski, VT, USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 실험값은 참당귀 추출분말을 처리하지 않은 대조군에 대한 백분율로 표시하였다.¹⁴

2.5. Nitric oxide (NO) 생성량 측정

참당귀 추출분말의 NO 생성 억제능을 알아보기 위하여 Griess reagent 반응법을 이용하였다. 토끼 연골 조직세포를 96 well plate에 1×10^5 cells/well로 접종하고 12 시간 배양한 다음, IL-1 α (interleukin-1 α , Miltenyi Biotec., Germany)를 단독 또는 다양한 농도(0, 5, 10, 25 및 50 μ g/mL)의 참당귀 추출분말과 함께 처리하여 24 시간 배양하였다. 배양액에 동일한 양의 Griess reagent (1% sulfanilamide 및 0.1% N-[1-naphthyl] ethylenediamine dihydrochloride in 5% phosphoric acid)를 첨가하고 실온에서 10 분간 반응시킨 후, ELISA reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. NO 농도는 NaNO₂ 표준액을 이용하여 정량곡선을 작성한 후, 이를 기준으로 계산하였다.

2.6. iNOS, COX-2, TNF- α , IL-1 β 및 IL-6 mRNA 측정

참당귀 추출분말이 iNOS (inducible nitric oxide), COX-2 (cyclooxygenase-2), TNF- α (tumor necrosis factor-

Table 1. RT-PCR primers for inflammatory enzymes and cytokines

Gene	Primer sequence	Product length (bp)
iNOS	Forward TTCTTTGCTTCTGTGCTTAATGCG Reverse GTTGTTGCTGAACTTCCAATCGT	1061
COX-2	Forward CTGCATGTGGCTGATGTCATC Reverse AGGACCCGTCATCTCCAGGGTAATC	1061
TNF- α	Forward GTAGCCCACGTCGAGCAAA Reverse CCCTTCTCCAGCTGGAAGAC	346
IL-1 β	Forward TGATGTTCCCATAGACAGC Reverse GAGGTGCTGATGTACCAGTT	378
IL-10	Forward CAGTCAGCCAGACCCACAT Reverse GCTCCACTGCCTTGCTTT	322
β -actin	Forward TTGTAACCAACTGGGACGATATGG Reverse GATCTTGATCTTCATGGTGCTAG	764

α), IL-1 β (interleukin-1 β) 및 IL-6 (interleukin-6) 유전자 발현 억제에 미치는 영향을 알아보기 위하여 RT-PCR을 수행하였다. 참당귀 추출분말이 투여된 흰쥐에 MIA를 주사하고 2일이 경과한 시점에서 연골을 적출하여 분쇄한 후, total RNA extraction kit (iNtRON Biotechnology Inc., Korea)를 이용하여 연골조직으로부터 total RNA를 분리하였다. Total RNA를 정량하고, RT-PreMix (iNtRON Biotechnology Inc.)를 이용하여 1 μ g씩 동일한 양의 각 total RNA로부터 각각의 cDNA를 합성하였다. iNOS, COX-2, TNF- α , IL-1 β , IL-6 및 β -actin 등 각각의 유전자에 해당되는 프라이머를 사용하여 94 °C 1분, 50~65 °C 45초, 72 °C 1분, 총 30 cycles 조건으로 RT-PCR을 수행하였다(Table 1).¹⁵

2.7. iNOS 및 COX-2 단백질 발현 측정

참당귀 추출분말이 iNOS 및 COX-2 단백질 발현 억제에 미치는 영향을 알아보기 위하여 western blot analysis를 수행하였다. 참당귀 추출분말이 투여된 흰쥐에 MIA를 주사하고 2일이 경과한 시점에서 연골을 적출하여 분쇄한 후, Lysis buffer (Cell Signaling, Danvers, MA, USA)를 이용하여 연골조직 내 단백질을 수집하였다. BCA protein assay reagent kit (Pierce, Rockford, IL, USA)를 이용하여 단백질 농도를 측정 한 후, 20 μ g씩 동일한 양의 각 단백질을 10% SDS-PAGE gel에 전기영동하고, nitrocellulose membrane (Whatman, Dassel, Germany) 상으로 이동시켰다. 항체의 비특이적 결합을 차단하기 위하여 membrane에 5% 탈지분유를 넣고 1시간 반응시킨 다음, iNOS

(BD, USA), COX-2 (Santa Cruz Biotechnology Inc, CA, USA) 및 β -actin (Sigma) 항체가 첨가된 5% 탈지분유로 교체하여 4 °C에서 12 시간 반응시켰다. TBST (50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20)로 5 분간 3 회 세척하고 각각에 대한 이차 항체로 실온에서 1 시간 반응시킨 후, ECL 용액 (Amersham Pharmacia Biotech., NJ, USA)을 이용하여 각 단백질의 발현을 확인하였다.

2.8. 흰쥐 혈청중 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6 함량 측정

MIA 주사 후 2일이 경과한 흰쥐의 혈액에서 혈청을 분리한 뒤, 염증성 지표로서 TNF- α , IL-1 β , IL-6 등을 ELISA assay kit (R&D Systems, Minneapolis, MI, USA)를 이용하여 측정하였다.

2.9. 참당귀 추출물 성분분석

혈액 내의 decursin과 decursinol의 분석을 위한 LC-MS/MS는 기기는 LCQ FLEET ESI-Ion trap mass (Thermo scientific, FL, USA)를 사용하였으며, Plus (Thermo scientific, FL, USA)를 연결하여 system을 사용하였으며 소프트웨어는 X-calibur software (Thermo scientific, FL, USA)를 사용하여 분석하였다. 분석에 이용된 컬럼은 LUNA C18 (2.0 $\times$ 150 mm, 5 μ m, Phenomenex, USA)를 사용하였다.

이동상 조건은 0.1% 개미산 수용액 (A)과 0.1% 개미산을 함유한 아세토니트릴 용액(B)로 구성되어 gradient 분리 방법을 사용하였다. 용매 비율은 0-4 min (30 $\rightarrow$ 90, B), 4-4.5 min (90 $\rightarrow$ 30, B)로 설정되었으

며, 유속은 0.3 mL/min으로 하였고, 주입량은 10 μ L였다.

LC/MS/MS 분석 조건으로 MRM (Multiple Reaction Monitoring) mode에서 monitor되었으며, electrospray ionization (ESI) positive ion mode를 사용하였다. Decursin과 decursinol 분석은 positive ion mode에서 시행하였으며 decursin의 이온화 monitoring은 m/z 329>229>211로 decursinol의 이온화 monitoring은 m/z 247>229로 분석하였다.

Desolvation gas로 질소를 사용하였으며, decursin과 decursinol 분석을 위한 collision energy는 각각 23와 17%이었으며, ESI source temperature는 300 $^{\circ}$ C로 설정하였다.

참당귀 추출분말의 주성분인 decursin의 혈장내의 농도변화를 관찰하기 위하여 decursin 0.2 mg을 전혈, 혈장 및 세포배양한 여액에서 2 시간 배양한후, decursin (m/z 329 $\rightarrow$ 229 $\rightarrow$ 211) 및 decursinol (m/z 247 $\rightarrow$ 229)을 LC-MS/MS로 모니터링하였다. 혈중 농도를 측정하기 위하여 흰쥐에 decursin (10 mg/kg)을 i.p.주입 후 시간 경과에 따른 decursinol의 함량을 LC-MS/MS로 측정하였다.

2.10. 통계처리

본 연구에서 얻은 정량적인 결과는 SPSS 11.0의 unpaired student's t-test를 이용하여 통계처리하였으며, 유의성은 * p <0.05 및 ** p <0.01수준에서 검정하였고 그 값은 평균(mean) $\pm$ 표준편차(standard deviation)로 표기하였다.

3. 실험결과 및 고찰

3.1. 세포독성 측정

토끼 연골조직세포에 참당귀 추출분말을 농도별(0, 5, 10, 25 및 50 μ g/mL)로 처리하여 24 시간 배양한 후, WST방법으로 세포생존율을 측정하였다. 그 결과 Fig. 1에 나타난 바와 같이 세포 증식에 영향을 미치지 않았으며 실험에 사용된 모든 농도에서 100% 이상의 세포생존율을 보임에 따라 참당귀 추출분말 처리에 따른 연골조직세포에 독성을 유발하지 않았다.

3.2. NO 생성 억제

IL-1 α 처리로 염증을 유발한 토끼 연골조직세포에 참당귀 추출분말을 농도별(0, 5, 10, 25 및 50 μ g/mL)로 처리하여 24 시간 배양한 후, NO 생성량을 측정하

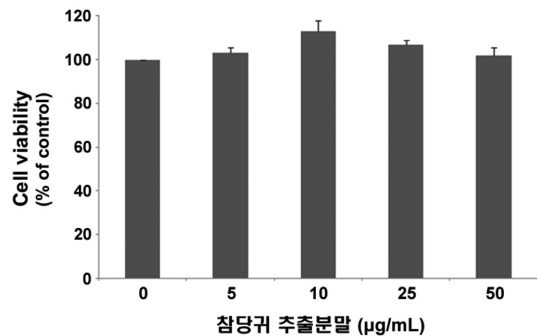


Fig. 1. Effect of *Angelica gigas* extract powder on the viability of rabbit chondrocytes. Rabbit chondrocytes were incubated with the indicated concentrations of *Angelica gigas* extract powder for 24 hr. Cell viability was determined by the WST assay.

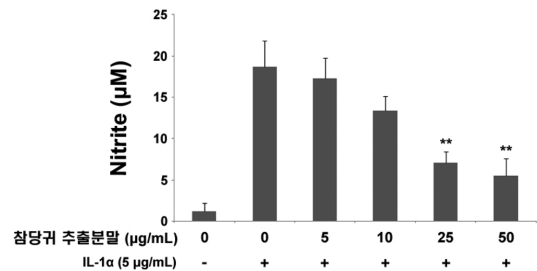


Fig. 2. Effect of *Angelica gigas* extract powder on the production of NO in IL-1 α -stimulated rabbit chondrocytes. Rabbit chondrocytes were stimulated with *Angelica gigas* extract powder (0-50 μ g/mL) in the presence or absence of IL-1 α (5 μ g/mL) for 24 hr. Supernatants were collected and the NO concentration from the supernatants was determined by the Griess reagent assay. Data are expressed as the percentage of control. All values were presented as mean $\pm$ S.D (n=6). Values with asterisk are significantly different at ** P <0.01 by Student's t-test.

였다. 그 결과 Fig. 2에 나타난 바와 같이 IL-1 α 만 처리한 군의 NO 생성량은 약 18 μ M로서 IL-1 α 를 처리하지 않은 군에 비해 약 10 배 가량 NO 생성량이 증가하였다. 따라서 IL-1 α 처리 농도 (5 μ g/mL)에서 효과적으로 염증유발 효과가 유발되는 것을 확인 할 수 있었다. 본 실험 계에서의 NO생성은 참당귀 추출분말 처리로 농도 의존적으로 감소하였으며, 25 μ g/mL 이상의 농도에서는 통계학적 유의성 및 효과적으로 NO 생성을 억제하였다. 따라서 강력한 염증성 cytokine인 IL-1 α 처리로 급격하게 생성된 NO함량은 참당귀 추출분말 50 μ g/mL 처리로 약 6.0 μ M 농도까지 감소하였으며 비처리군 (약 1.8 μ M)에 대하여 3 배 정도의

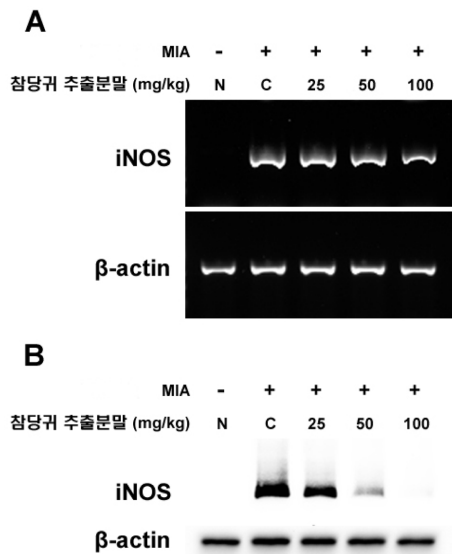


Fig. 3. Effect of Angelica gigas extract powder on the mRNA and protein expressions of iNOS in cartilage from knee joints of rats at 2 day after MIA injection. The mRNA (A) and protein (B) expressions of iNOS in cartilage from knee joints of rats at 2day after MIA injection was determined by RT-PCR and western blot. Data are shown as Mean±S.D (n=10). N: intra-articular saline injected and treated with distilled water. C: intra-articular MIA injected and treated distilled water. 25: intra-articular MIA infected and treated with Angelica gigas extract powder (25 mg/kg). 50: intra-articular MIA infected and treated with Angelica gigas extract powder (50 mg/kg). 100: intra-articular MIA infected and treated with Angelica gigas extract powder (100 mg/kg).

량까지 NO생성을 효과적으로 억제하였다.

3.3. iNOS의 mRNA 및 단백질 발현 억제

참당귀 추출분말 투여에 의한 NO 생성의 억제 기전을 조사하기 위하여, 참당귀 추출분말이 투여된 흰쥐에 MIA를 주사하고 48 시간 경과후, 연골조직 내 NO생성 효소인 iNOS의 mRNA (A) 및 단백질 (B) 발현정도를 조사하였다(Fig. 3). MIA만 투여한 대조군(C)에서는 iNOS의 mRNA 및 단백질 발현이 모두 크게 증가하였으며, 참당귀 추출분말 처리(25, 50 및 100 mg/kg)는 iNOS mRNA 및 단백질 발현을 농도 의존적으로 억제하였다. 따라서 참당귀 추출분말은 iNOS를 유전자 레벨에서 발현을 억제하여 MIA치료로 유도된 염증유발인자 NO의 생성을 차단하는 것으로 밝혀졌다. 즉, 참당귀 추출분말은 이미 알려져 있는 염증신호전달 경로에서 중요한 역할을 담당하는

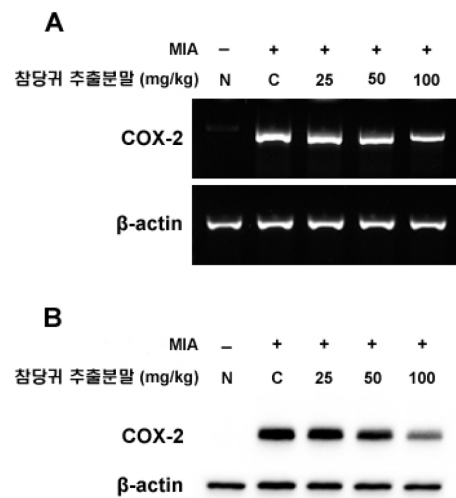


Fig. 4. Effect of Angelica gigas extract powder on the mRNA and protein expressions of COX-2 in cartilage from knee joints of rats at 2 day after MIA injection. The mRNA (A) and protein (B) expressions of COX-2 in cartilage from knee joints of rats at 2 day after MIA injection was determined by RT-PCR and western blot. Data are shown as Mean±S.D (n=10). N: intra-articular saline injected and treated with distilled water. C: intra-articular MIA injected and treated distilled water. 25: intra-articular MIA infected and treated with Angelica gigas extract powder (25 mg/kg). 50: intra-articular MIA infected and treated with Angelica gigas extract powder (50 mg/kg). 100: intra-articular MIA infected and treated with Angelica gigas extract powder (100 mg/kg).

MAP kinases활성화를 통하여(JNK 및 p38) 핵내의 AP-1에 다다른 경로의 일부를 억제할 것으로 추정할 수 있다.¹⁶

3.4. COX-2 mRNA 및 단백질 발현 억제

참당귀 추출분말이 iNOS발현과 공통 신호전달 경로를 갖는 COX-2 유전자 및 단백질 발현에서도 재현성 있게 억제하는 지를 확인하기 위하여 참당귀 추출분말이 투여된 흰쥐에 MIA를 주사하고 48 시간 경과후, 연골조직 내 COX-2의 mRNA (A) 및 단백질 (B) 발현을 측정하였다. Fig. 4A, B에 나타낸 바와 같이, 정상군(N)에서 COX-2 mRNA 및 단백질 발현은 아주 미약하였으며 대조군(C)에서는 MIA치료로 인하여 COX-2의 mRNA 및 단백질 발현이 크게 증가되었다. 동일한 조건에서 참당귀 추출분말을 농도 의존적으로 처리(25, 50 및 100 mg/kg)한 결과, COX-2 mRNA 및 단백질 발현이 농도 의존적으로 감소하였다. 특히

COX-2 단백질 발현의 감소(Fig. 4B)는 염증성 prostaglandin(예를 들어 PGE₂)류를 다량 생성하여 염증반응을 증폭하여 염증성 백혈구를 동원하게 되어 염증의 악화를 초래하므로¹⁷ 본 실험결과, 참당귀 추출분말은 이 단계를 효과적으로 차단할 수 있을 것으로 생각한다.

3.5. TNF- α , IL-1 β 및 IL-6의 mRNA 발현 억제

LPS등으로 유발되는 염증인자인 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6의 유전자 발현을 억제하는지 확인하기 위하여 참당귀 추출분말이 투여된 흰쥐에 MIA를 주사하고 48 시간 경과 후, 연골조직 내 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6의 mRNA 발현을 RT-PCR로 측정하였다. 그 결과 정상군(N)에서는 염증성 인자들의 발현이 매우 미약한 반면, MIA를 처리하면 대조군(C)의 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6의 mRNA 발현이 공통적으로 매우 증가하였다. 참당귀 추출분말을 농도 의존적으로 처리한 결과 모든 염증성 인자의 발현이 감소됨을 확인할 수 있었다(Fig. 5). 참당귀 추출분말은 TNF- α mRNA 발현은 미약하게 감소하였으나 IL-1 β 및 IL-6의 mRNA 발현은 크게 억제하였다. 따라서 참당귀 추출분말은 TNF- α 발현에 직접 작용하는 것이 아니라 TNF- α 신호전달계의 하류에 위치한 IL-1 β 및 IL-6의 생성경로를 차단하

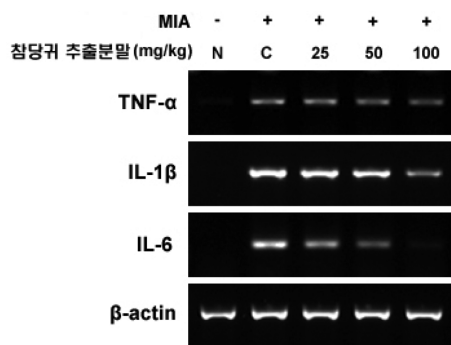


Fig. 5. Effect of Angelica gigas extract powder on the mRNA expression of pro-inflammatory cytokines in cartilage from knee joints of rats at 2 day after MIA injection. The mRNA expression of pro-inflammatory cytokines in cartilage from knee joints of rats at 2 day after MIA injection was determined by semi-quantitative RT-PCR. Data are shown as Mean $\pm$ S.D (n=10). N: intra-articular saline injected and treated with distilled water. C: intra-articular MIA injected and treated distilled water. 25: intra-articular MIA infected and treated with Angelica gigas extract powder (25 mg/kg). 50: intra-articular MIA infected and treated with Angelica gigas extract powder (50 mg/kg). 100: intra-articular MIA infected and treated with Angelica gigas extract powder (100 mg/kg).

는 것으로 추정할 수 있었다.

3.6. 혈청 내 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6 단백질 농도에 미치는 영향

참당귀 추출분말의 항염증효과가 염증부위에만 국소적으로 작용하는지 전체적으로 항염증효과를 발휘하는지 구분하기 위하여 동일한 조건에서 MIA 주사 후, 48 시간 경과 후, 심장에서 채취한 흰쥐의 혈청에

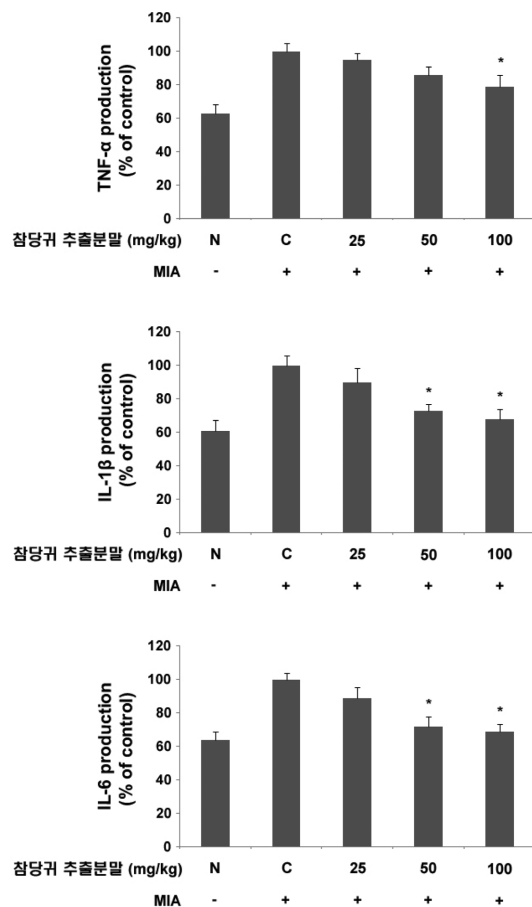


Fig. 6. Effect of Angelica gigas extract powder on the production of pro-inflammatory cytokines in the serum of rats at 2 day after MIA injection. Data are shown as Mean $\pm$ S.D (n=10). N: intra-articular saline injected and treated with distilled water. C: intra-articular MIA injected and treated distilled water. 25: intra-articular MIA infected and treated with Angelica gigas extract powder (25 mg/kg). 50: intra-articular MIA infected and treated with Angelica gigas extract powder (50 mg/kg). 100: intra-articular MIA infected and treated with Angelica gigas extract powder (100 mg/kg). Statistically significant value compared with control by t-test (*p<0.05).

서 $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ 및 IL-6 함량을 측정하였다. $\text{TNF-}\alpha$ 의 함량은 대조군(C)에서 $100 \pm 4.9\%$ 였을 때, 정상군(N)은 $63.2 \pm 5.2\%$, 처리군 각각은 95 ± 3.8 , 87.6 ± 5.1 및 $79.2 \pm 6.7\%$ 로 나타남에 따라, 참당귀 추출분말이 혈청내의 염증성 인자의 감소를 초래함을 알 수 있었다(Fig. 6). $\text{IL-1}\beta$ 의 함량 변화도 유사한 패턴을 나타냈으며 대조군에서 $100 \pm 5.8\%$ 의 값에 비하여 정상군은 $61.2 \pm 6.4\%$, 처리군 각각은 90.5 ± 8.2 , 73.1 ± 4.1 및 $68.4 \pm 6.0\%$ 로 감소하였다. 마찬가지로 IL-6 의 함량은 대조군에서 $100 \pm 3.9\%$ 였을 때, 정상군은 $63.9 \pm 4.7\%$, 처리군 각각은 89.0 ± 6.5 , 72.6 ± 6.1 및 $69.3 \pm 4.2\%$ 로 나타남에 따라, 참당귀 추출분말은 혈액중 염증성 인자들의 농도를 유의성있게 낮추는 것을 확인하였다. 따라서 참당귀 추출분말의 효능은 염증성 국

소부위에 머물지 않고 몸 전체의 염증성 신호전달 경로를 차단하는 사실을 확인하였다.

우리는 이전의 결과에서 골관절염 발병의 바이오마커로서 활액내 연골조직의 주성분인 glycosaminoglycan (GAG)의 함량 및 관절연골 조직내 proteoglycan (PG)의 함량이 MIA의 염증유발에 의하여 줄어드는 현상이 참당귀 추출분말을 함께 투여함으로써 개선된 결과를 발표한 바 있다.¹⁸ 염증성 cytokines, $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ 및 IL-6 등의 발현이 증가하면 관절연골의 생성에 관여하는 chondrocytes의 PG생성 및 collagen type II의 생성 등이 억제되면서 결과적으로 chondrocyte의 사멸 및 골관절 부위의 파괴가 일어나기 시작한다. 참당귀 추출분말은 염증 발병 초기단계에 급격히 생성되는 염증성 cytokines과 염증성 매개물질인 NO,

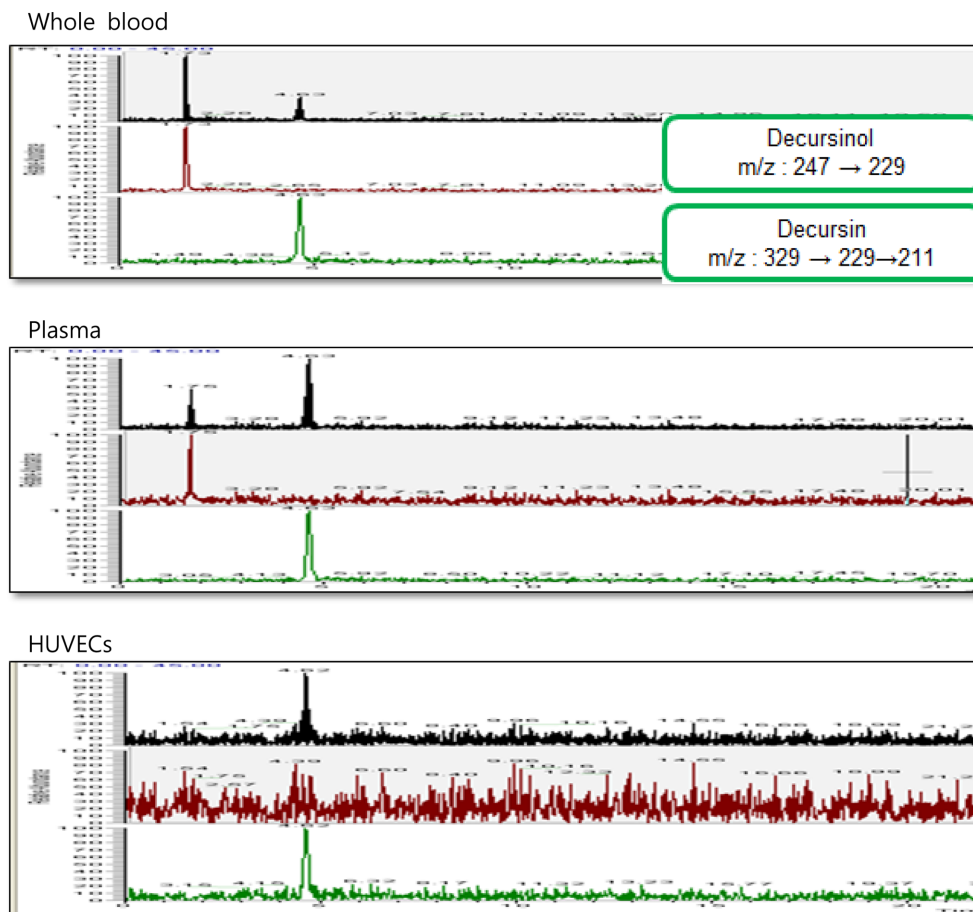


Fig. 7. Decursin was converted in decursinol in whole blood, rat plasma, and not in HUVECs media in 2 hrs incubation. Decursinol and decursin were analyzed by LC-MS/MS in indicated MRM mode. HUVECs: human umbilical vein endothelial cells.

prostaglandins을 생성하는 iNOS 및 COX-2의 발현 및 활성을 억제함으로써, MIA로 유발된 골관절염 유발을 초기단계에서 예방할 수 있음을 확인하였다.

3.7. 참당귀 추출분말 성분의 분석

참당귀 추출분말의 주성분인 decursin을 전혈, 혈장 및 HUVEC세포 배양액에서 2 시간 후 decursin을 LC-MS/MS로 분석한 결과, decursin은 전혈에서 약 75% 및 혈장에서 약 30% 정도 decursinol로 전환되었다. 한편, 세포배양액에서는 decursinol이 생성되지 않았다(Fig. 7). 따라서 참당귀추출물 투여시 decursin의 일부가 decursinol로 전환되어 항염증 활성을 나타내는 것으로 추정된다. Decursinol이 Caco-2세포 단층막 투과실험에서 높은 투과율($>14 \times 10^{-6}$ cm/s)을 보이고, 경구투여시 45%이상의 높은 생체이용률(bioavailability)을 나타냄에 따라,¹⁹ 참당귀 추출분말의 decursin이 decursinol로 전환, 흡수되어 골관절염으로 유발된 염증성 cytokines을 억제하는 것으로 추정할 수 있다.

한편, decursin (10 mg/kg)을 흰쥐에 복강투여 후, 전환된 decursinol의 혈중 농도를 모니터링한 결과, 혈장 최대농도 2.75 µg/mL (30 min)로 나타났으며, 약 8 시간 후에도 혈장 중에 잔류함을 알 수 있었다(Fig. 8). 본 논문에서는 decursin을 단독 투여하는 경우와 decursinol을 단독 투여하는 경우에 대한 항염증 활성을 비교하지 않았으나, 본 연구에 사용한 참당귀 추출분말에는 decursin: decursinol angelate의 함량비가 약 2:1 이므로,¹⁸ 이들중 흡수된 성분의 대부분이 2 시간

이내에 decursinol로 전환되는 것으로 추정된다.

4. 결 론

참당귀 추출분말이 골관절염을 예방하는 효능을 MIA로 골관절염을 유발한 흰쥐 동물모델에서 무릎관절 연골조직 내 iNOS 및 COX-2 유전자 및 단백질 발현량을 측정하였다. 또한 염증성 사이토카인인 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6의 유전자 발현 및 혈청 내 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6 함량을 측정하였다. 그 결과, 참당귀 추출분말은 측정된 염증성 cytokines의 발현 및 관련 효소군의 발현을 유의성있게 농도 의존적으로 억제하였다. 이전의 보고에서 MIA로 골관절염을 유도한 흰쥐에서 감소되는 슬관절의 활액 내 GAG의 함량 및 관절연골의 PG의 함량이 참당귀 추출분말의 항염증효과에 의하여 어느정도 회복됨을 보고한 바 있다. 이번 결과는 이전 결과를 명확히 검토하기 위하여 참당귀 추출분말의 항염증효과를 염증 유발 신호 전달 기작의 각 단계별로 관여하는 cytokines 및 효소군의 mRNA 및 단백질량이 감소함을 실험적으로 증명하였다. 특히 iNOS의 활성 억제 및 IL-6의 발현억제가 명확하게 나타나, 참당귀 추출분말의 항염증효능은 이들과 관련된 염증 유발 신호전달 기작을 좀 더 면밀하게 검토할 필요가 있다. 또한, 참당귀 추출분말 투여시 주성분인 decursin 및 decursinol angelate는 체내 흡수 후, 강한 항염증 활성성분인 decursinol로 전환됨을 알 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 2013년도 충북대학교 학술연구비에 의하여 수행된 연구결과입니다.

References

1. R. Mardones, C. M. Jofré and J. J. Minguell, *Int. J. Stem. Cells.*, **8**(1), 48-53 (2015).
2. D. Pereira, E. Ramos and J. Branco, *Acta Med. Port.*, **28**(1), 99-106 (2015).
3. M. Schuliga, *Biomolecules*, **5**(3), 1266-1283 (2015).
4. M. L. Buckley and D. P. Ramji, *Biochim Biophys Acta*, **1852**(7), 1498-1510 (2015).
5. B. Song, G. Huang, Y. Xiong, J. Liu, L. Xu, Z. Wang, G. Li, J. Lu and S. Guan, *J. Med. Food.*, **16**(11), 997-

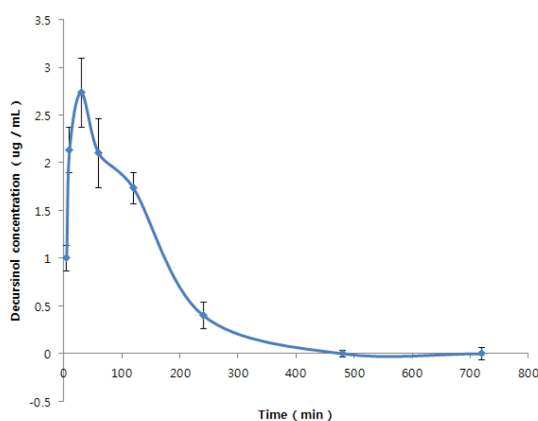


Fig. 8. Blood concentration of decursinol *in vivo* after *i.p.* injection of decursin. The intraperitoneal (*i.p.*) injection of decursin (10 mg/kg; 100 µL injection) was effectively converted into decursinol which shows maximum concentration at 30 min.

- 1003 (2013).
6. M. Endale, S.C. Park, S. Kim, S.H. Kim, Y. Yang, J.Y. Cho and M.H. Rhee, *Immunobiology*, **218**(12), 1452-1467 (2013).
7. C. Y. Wenham, M. McDermott and P.G. Conaghan, *Curr Pharm Des.*, **21**(17), 2206-2215 (2015).
8. O. Ham, C. Y. Lee, R. Kim, J. Lee, S. Oh, M. Y. Lee, J. Kim, K. C. Hwang, L. S. Maeng and W. Chang, *Int. J. Mol Sci.*, **16**(7), 14961-14978 (2015).
9. T. Leroux, J. Chahal, D. Wasserstein, N. N. Verma, A. A. Romeo. *Sports Health*, **7**(4), 303-307 (2015).
10. T. Manyanga, M. Froese, R. Zarychanski, A. Abou-Setta, C. Friesen, M. Tennenhouse, B. L. Shay, *BMC Complement Altern Med.*, **14**, 312 (2014).
11. N. Schuelert and J. J. McDougall, *Neurosci. Lett.*, **465**(2), 184-188 (2009).
12. O. V. Nemirovskiy, M. R. Radabaugh, P. Aggarwal, C. L. Funckes-Shippy, S. J. Mnich, D. M. Meyer, T. Sunyer, W. Rodney Mathews and T. P. Misko. *Nitric Oxide.*, **20**(3), 150-156 (2009).
13. S. Y. Jeong, H. M. Kim, K. H. Lee, K. Y. Kim, D. S. Huang, J. H. Kim and R. S. Seong, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **63**(7), 504-511 (2015).
14. K. Tomiyama, A. Yamaguchi, T. Kuriyama and Y. Arakawa, *J. Immunotoxicol*, **6**(3), 184-193 (2009).
15. Y. Huang, Y. Lu, L. Zhang, J. Yan, J. Jiang and H. Jiang, *Int. J. Mol. Sci.*, **15**(3), 4049-4059 (2014).
16. M. Kim, Y. G. Park, H. J. Lee, S. J. Lim and C. W. Nho, *J. Agric. Food Chem.*, **63**(22), 5428-5438 (2015).
17. Y. Shen, S. Yang, Z. Shi, T. Lin, H. Zhu, F. Bi, A. Liu, X. Ying, H. Liu, K. Yu and S. Yan, *Inflammation*, **38**(2), 736-744 (2015).
18. J. H. Kwon, M. S. Han, B. M. Lee and Y. M. Lee, *Anal. Sci. Tech.*, **28**(1), 72-77 (2015).
19. J. S. Song, J. W. Chae, K. R. Lee, B. H. Lee, E. J. Choi, S. H. Ahn, K. I. Kwon and M. A. Bae, *Xenobiotica*, **41**(10), 895-902 (2011).