In Vivo 실험동물에서 전호잎 열수추출물에 의한 염증 완화 및 관절연골 개선 효능 평가

홍준호¹ · 문성민² · 이미진¹ · 김춘성³

¹(재)전남바이오산업진흥원 나노바이오연구센터

²(주)네츄럴큐어

³조선대학교 치과대학 구강생화학교실

Efficacy of Aqueous Extract of *Anthriscus sylvestris* Leaves in Alleviating inflammation and Improving Articular Cartilage in an *In Vivo* Experimental Model

Joon Ho Hong¹, Sung Min Moon², Mi Jin Lee¹, and Chun Sung Kim³

¹Nano Bio Research Center, Jeonnam Bioindustry Foundation

²NaturalCure Co., Ltd.

³Department of Oral Biochemistry, College of Dentistry, Chosun University

ABSTRACT The objective of this study was to investigate the molecular biological efficacy of aqueous extract of *Anthriscus sylvestris* leaves (AE-ASL) in alleviating inflammation and improving articular cartilage in Sprague-Dawley (SD) rat experimental models with carrageen-induced paw edema and destabilization of the medial meniscus (DMM). In the carrageen-induced paw edema model, AE-ASL significantly inhibited the protein expression levels of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2) in the experimental groups (orally administered 50, 100, 200 mg/kg of body weight for weeks) compared to the control group (1% carrageenan-induced paw edema model in rats). In the DMM, AE-ASL (50, 100, 200 mg/kg of body weight for 8 weeks) was orally administered daily and the normal and placebo groups were orally administered drinking water daily. AE-ASL significantly inhibited the protein expression levels of matrix metalloproteinase-1, -3, -13 (MMP-1, MMP-3, MMP-13) and disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 4 (ADAMTS-4) in the experimental groups compared to the groups administered drinking water. Moreover, it was confirmed at each serum level, that the amounts of aggrecan and collagen type II increased in the experimental group compared with the groups administered drinking water. Based on these results, it was confirmed that AE-ASL was effective in alleviating inflammation and improving joints in *in vivo* experiments. Taken together, the results suggest that AE-ASL may be used as a health functional food for the improvement of articular cartilage.

Key words: aqueous extract of *Anthriscus sylvestris* leaves (AE-ASL), destabilization of the medial meniscus (DMM) model, carrageen-induced paw edema model, inflammation, osteoarthritis

서 론

고령화 시대에 접어들면서 퇴행성 관절염(골관절염), 당뇨병, 고혈압, 노인성 치매, 골다공증과 같은 노인성 질환이 증가하고 있다(Kweon 등, 2014). 이러한 노인성 질환 중에 퇴행성 관절염 유병률은 2017년 기준으로 65세 이상 인구

에서 30.9%로 노인성 질환 유병률 2위를 차지하고 있으며 연령이 증가함에 따라 퇴행성 관절염 유병률이 계속적으로 급증하고 있는 추세이다(O'Neill 등, 2018; Kim과 Bae 등, 2014). 최근 우리나라 노인인구 비율은 2020년 6월 기준 16.0%로 빠르게 급증하고 있으며 기대수명의 증가로 인하여 퇴행성 관절염 유병률과 유병 기간에 따른 국가적인 질병

Received 13 December 2021; Revised 26 January 2022; Accepted 26 January 2022

Corresponding author: Chun Sung Kim, Department of Oral Biochemistry, College of Dentistry, Chosun University, 309, Pilmun-daero, Dong-gu, Gwangju 61452, Korea, E-mail: cskim2@chosun.ac.kr

Author information: Chun Sung Kim (Professor)

© 2022 The Korean Society of Food Science and Nutrition.

This is Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

부담은 더욱 커질 것으로 예측되어 고령인구 건강 관련 삶의 질에 큰 위협이 되고 있다(Oh와 Yi, 2014). 현재 고령화로 인해 발병되는 질병으로 인하여 발생하는 국가적인 문제를 해결하고자 퇴행성 관절염 예방 및 치료에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다. 관절연골은 두 개 이상의 뼈를 이어주는 조직체로서 신체의 움직임을 조절하며, 관절 운동을 매끄럽게 하는 윤활 작용과 골격에 가해지는 물리적 힘을 완충시키는 역할을 한다. 퇴행성 관절염은 관절연골이 마모되어 관절연골 아래 뼈가 노출되어 관절 주변 활액막에 염증이 유발되어 생기는 통증과 관절연골 변형이 발생하는 퇴행성 질환 중 하나이다(van den Berg, 2000; Loeser 등, 2012). 분자생물학적 수준에서 퇴행성 관절염의 다인성 발병 기전 중 하나로 알려져있는 활성 산소종(ROS) 및 반응성 질소종(RNS)의 과잉 생산에 의한 산화 및 질산화 스트레스 증가 및 염증 매개인자의 증가에 의하여 염증 및 통증이 유발된다(Khan 등, 2017). 이와 같은 요인들은 연골세포 내의 다양한 분자생물학적 신호 전달을 통해 연골세포 내 이화 및 동화작용 간의 불균형을 초래하게 된다(Bian 등, 2012). 특히 관절 퇴행으로 인하여 연골세포는 염증성 사이토카인을 분비하고 이와 함께 다양한 종류의 기질 금속 단백분해효소(matrix metalloproteinase) 및 기질 연골 단백분해효소(a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 4, ADAMTS-4)의 발현을 증가시킨다(Neuhold 등, 2001; Goldring 등, 2011; Majumdar 등, 2007; Glasson 등, 2005). 증가한 기질 금속 단백분해효소 및 기질 연골 단백분해효소는 연골세포를 둘러싸고 있는 세포외기질(aggreacan과 collagen type II)을 직접적으로 분해함으로써 관절연골을 손상시키며 점차적으로 관절 퇴행을 유도한다(Knudson과 Knudson, 2001; Akhtar 등, 2017). 현재 퇴행성 관절염으로 인하여 생기는 통증 완화 및 뻣뻣한 관절연골의 움직임을 개선하는데 비스테로이드성 항염증제(non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs)를 복용하거나 무릎관절 치환술과 같은 외과적 수술을 권고하고 있다. 그러나 NSAIDs를 장기간 복용 시 퇴행성 관절염 증상을 완화시키는 것보다 위장 및 신장 기능 손상과 같은 부작용을 초래한다. 이러한 부작용을 해결하고자 여러 연구자들은 부작용이 적은 천연 약용식물에서 퇴행성 관절염 진행을 지연시키고 증상을 완화시킬 수 있는 천연물 의약품 소재 및 건강기능식품 기능성 원료 개발을 활발하게 진행하고 있다.

전호(*Anthriscus sylvestris* (L.) Hoffm)는 미나리과(산형과)에 속하는 여러해살이 식물로서 숙명의 anthriscus는 고대 로마명으로 anthriskon이라는 그리스의 식물명에서 유래되었고, 종소명 *syvestris*는 ‘숲속에서 자라는’ 또는 ‘야생의’라는 의미를 가지고 있다. 국내에서 전호는 만들전호, 등지, 생치나물로 알려져 있으며 남해안의 도서 지역과 깊은 산, 산기슭, 구릉지대, 들판, 강기슭 등 습한 곳에 군락을 이루어 자생하고 있다(Khaled 등, 2013). 국외로는 일본과 중국, 사할린, 시베리아, 중앙아시아, 동부 유럽에도 분포한다

(Olaru 등, 2015). 전호의 어린 순과 잎, 줄기는 나물로 데쳐 식용하고 있고 칼슘과 칼륨, 비타민 C와 같은 성분을 다량 함유하고 있어 두통과 신장결석에 대한 효능 및 천연 자양강장제로 사용되고 있으며(Allen과 Hatfield, 2004; Wahida 등, 2011), 인도에서는 자연요법으로 전호가 류마티스 관절염 치료제로 사용되고 있다(Gairola 등, 2014). 또한 한약재로 쓰이고 있는 뿌리는 안트리신, 이소안트리신, 환원당, 자당 및 전분 등의 성분을 함유하고 있으며 폐담이 쌓인 천식, 가슴이 답답하고 가래가 나오지 않는 증상, 발열, 두통에 쓰이고 있으며, 약리작용으로는 항암, 항염증, 항바이러스, 항균, 간 기능 보호와 같은 다양한 효능이 보고되었다(Milovanovic 등, 1996; Dall'Acqua 등, 2006).

본 연구진은 전호잎 열수추출물(AE-ASL)의 효능 선행연구로서 RAW 264.7 마우스 대식세포에 내독소(endotoxin)로 알려진 LPS를 처리하여 세포 내 염증 유도 후 전호잎 열수추출물을 처리하여 염증 및 통증 매개인자로 알려진 iNOS와 COX-2에 대한 발현을 확인하였고, 카라기난 염증 부종 동물모델을 사용하여 염증으로 인한 부종이 전호잎 열수추출물에 의하여 억제됨을 확인하였다(Lee 등, 2018a). 또한 생후 5일이 지난 백서 뒷다리 관절연골에서 분리한 연골세포에 관절연골 퇴행 유발인자 중 하나인 IL-1 β 처리 후 증가한 단백분해효소(MMPs, ADMATS-4)들이 전호잎 열수추출물에 의하여 감소함을 확인하였으며, 생후 8주 백서 뒷다리 내측 반월상 연골 절개(destabilization of the medial meniscus, DMM)에 의한 퇴행성 관절염을 유도 후 전호잎 열수추출물 경구투여 후 Safranin-O 염색을 통해 관절연골 구성 성분으로 알려져 있는 proteoglycan 합성이 증가하는 것을 보고하였다(Lee 등, 2018b). 전호잎 열수추출물의 생리활성 평가와 함께 기능성 원료 개발을 위해 전호잎 열수추출물의 지표성분으로 cynaroside를 제시하고 분석법의 유효성 검증(method validation)을 완료하여 원료 표준화를 확립하였다(Hong 등, 2021). 이에 본 연구는 이미 보고된 세포수준에서 염증 매개인자 및 관절연골 개선 바이오마커 확인과 실험동물에서 부종억제 및 관절연골 개선에 대한 조직형태학적 효능을 기반으로, 카라기난 유도 염증부종 및 내측 반월상 연골 절개(DMM) 퇴행성 관절염 유도 실험동물에서 전호잎 열수추출물 섭취에 의한 염증 매개인자 및 관절연골 개선 바이오마커 확인을 통해 향후 건강기능식품 기능성 원료 인정을 위한 기초자료 확보와 천연의약품 소재 활용 가능성을 확인하고자 수행하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에서 사용한 전호잎 열수추출물(AE-ASL)은 (주)씨에스텍(Gwangju, Korea)에서 제공받아 실험동물에 투여하였다. AE-ASL은 전호 원물을 50°C에서 열풍건조하여 수분함량 10%로 건조한 후 저장 보관하였으며 원물 대비 30

배수의 음용수를 가하여 90°C에서 3시간 동안 추출하고 50 µm 백필터(bag filter)로 여과한 다음 원심박막농축기(CEP-LABO, Okawahara Mfg. Co., Ltd., Shizuoka, Japan)로 농축 과정을 거친 후 동결건조 분말로 제조한 것을 사용하였다.

카라기난 유도 염증부종 실험동물

실험동물은 수컷으로 무게는 300 g의 SD 랫트를 Kotech (Pyeongtaek, Korea)에서 구입하였다. 실험동물은 온도 25±2°C 및 습도 55±5%에 12시간 명암 주기로 제어되는 사육장에서 1주일 동안 안정화시켰다. 모든 실험동물의 취급 절차는 National Institutes of Health Guide for Care 및 조선대학교 동물실험윤리위원회 승인(IACUC2017-A001)을 받고 동물실험을 진행하였다. SD 랫트 카라기난 염증부종은 카라기난 유형 IV 시약을 생리식염수를 사용하여 1% (w/v) 녹인 후 백서 뒷다리 발바닥에 100 µL 피하주사로 염증부종을 유도하였다. 염증부종 유도 후 AE-ASL을 경구 투여하였다. 실험동물군은 각 그룹당 4마리씩 배치하여 Group 1(정상, 0.9% 생리식염수), Group 2(염증부종, 생리식염수), Group 3~5(염증 부종, 50, 100 및 200 mg/kg body-weight, AE-ASL) 및 Group 6(염증 부종, 10 mg/kg 디클로페낙 나트륨)으로 6개 그룹으로 나누어 실험을 수행하였다. AE-ASL 투여 24시간 후 2% isoflurane을 이용하여 각각 그룹에서 무작위로 한 마리씩 마취 처리로 희생시킨 후 척수를 분리하여 초저온 냉동고(-85±2°C)에서 보관하였다.

내측 반월상 연골 절개(DMM)에 의한 퇴행성 관절염 실험동물

실험동물은 수컷으로 8주령의 SD 랫트를 다물 사이언스 (Daejeon, Korea)에서 구입하였다. 실험동물은 온도 25±2°C 및 습도 55±5%에서 12시간 명암 주기로 제어되는 사육장에 1주일 동안 안정화하였다. 모든 실험동물의 취급 절차는 National Institutes of Health Guide for Care 및 조선대학교 동물실험윤리위원회 승인(IACUC 2016-S0029)을 받고 동물실험을 진행하였다. DMM 퇴행성 관절염 동물모델은 2.5% isoflurane으로 실험동물을 마취하고 외과적으로 실험동물 뒷다리 내측 반월상 연골(MMTL)을 절개하는 퇴행성 관절염을 유발하였다. Sham군은 MMTL을 들어낸 후 절개하지 않고 피부를 봉합하였다. 실험동물군은 각 그룹당 4마리씩 배치하여 Group 1(정상, 음용수), Group 2(sham, 음용수), Group 3(DMM 퇴행성 관절염 동물모델, 음용수), Group 4~6(DMM 퇴행성 관절염 동물모델, 50, 100 및 200 mg/kg body-weight, AE-ASL)으로 6개 그룹으로 나누어 실험을 수행하였다. 시험물질 투여 8주 마지막 날 2% isoflurane을 이용하여 각각 그룹에서 무작위로 한 마리씩 마취 처리로 희생시켜 양쪽 뒷다리 연골을 적출 후 초저온 냉동고에 보관하였다.

혈청 내 aggrecan, collagen type II 측정

퇴행성 관절염 실험동물의 혈액에서 혈청을 분리하여 aggrecan과 collagen type II ELISA assay kit(MyBioSource Inc., San Diego, CA, USA)을 사용하여 aggrecan과 collagen type II 농도 변화를 측정하였다. Aggrecan과 collagen type II를 측정하기 위해서 혈청(혹은 표준물질) 50 µL를 각 well에 분주하고 100 µL의 HRP-conjugated reagent를 가하여 37°C에서 60분간 반응시켰다. 반응액을 모두 제거한 뒤 4회 반복 세척 후 chromogen solution A와 B를 각각 50 µL씩 첨가하여 빛을 차단한 상태로 37°C에서 15분간 반응시킨 후 50 µL의 stop solution을 가하여 반응을 종료시켰다. 최종 확인은 microplate spectrophotometer(Epoch 2, BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Western blot 분석

초저온 냉동고에 보관된 조직은 액체질소로 동결하고 PRO-PREPTM protein extraction solution(iNtRON Biotechnology, Sungnam, Korea)을 첨가하여 분쇄한 다음 4°C에서 15,000 rpm으로 20분 동안 원심분리하고 상층액을 취하여 총 단백질을 분리하였다. 분리된 총 단백질은 BCA protein assay kit(Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA)을 사용하여 정량하고 각각의 총 단백질 10 µg을 pre-casting(4~20%) gel을 사용하여 전기영동 하였다. 전기영동이 끝난 gel을 polyvinylidene fluoride(PVDF) membrane에 90분 동안 옮긴 후 PVDF membrane을 5% BSA blocking buffer(5% bovine serum albumin in TBS containing 0.1% Tween-20)에 1시간 동안 blocking 하고, 일차 항체인 iNOS, COX-2, MMP-1, MMP-3, MMP-13, ADAMTS-4, GAPDH를 TBS-T에 1:1,000으로 희석하여 4°C에서 12~15시간 반응하였다. 이후 TBS-T로 5분간 3회 반복 세척한 다음 이차항체인 anti-rabbit IgG와 anti-mouse IgG를 1:4,000으로 희석하여 실온에서 1시간 동안 반응처리 후 TBS-T로 5분간 3회 세척하였다. 세척된 membrane은 ECL kit(Millipore, Bedford, MA, USA)을 이용하여 Micro Chemi 4.2(DNR Bio-Imaging Systems Ltd., Jerusalem, Israel)를 통해 총 단백질 밴드를 가시화하였다.

통계분석

실험 결과는 SPSS(version 20.0, IBM Corp., Armonk, NY, USA)를 사용하여 검정하였다. 정상군, sham군과 실험군 간의 유의성을 확인하기 위하여 one-way analysis of variance(one-way ANOVA)를 실시한 후 Dunnett's t-test의 다중 사후검정을 하였고 시험물질 투여군(50, 100 및 200 mg/kg body-weight, AE-ASL)은 independent t-test를 실시하였다.

Fig. 1. Effects of aqueous extract of *Anthriscus sylvestris* leaves (AE-ASL) on the protein expression levels of iNOS and COX-2 in spinal cord on carrageenan-induced left hind paw edema animal models. Paw edema was induced by a subcutaneous injection of a 1% carrageenan solution (100 μ L/animal) into the left hind paw 1 h after oral administration of AE-ASL (50, 100, and 200 mg/kg) or diclofenac sodium (10 mg/kg).

결과 및 고찰

카라기난 유도 염증부종 실험동물에서 염증 매개인자 단백질 발현 억제 확인

염증성 매개인자로 알려진 iNOS와 COX-2 단백질 발현 변화를 확인하기 위하여 카라기난 유도 염증부종 실험동물 각각의 그룹에서 분리한 총 단백질을 염색 매개인자 발현을 확인한 결과, 카라기난으로 유도된 실험동물 대조군(음용수)에서 iNOS와 COX-2 단백질 발현이 현저히 증가하였

으나 전호잎 열수추출물 투여군(50, 100 및 200 mg/kg bodyweight, AE-ASL)에서 농도 의존적으로 감소함을 확인하였다(Fig. 1). 앞서 전호잎 열수추출물을 RAW 264.7 마우스 대식세포에서 LPS에 의해 염증 유도 시 증가하는 iNOS와 COX-2 발현이 전호잎 열수추출물 처리 시 억제됨을 확인하였고 또한 카라기난을 백서 발바닥에 주입 후 급성 염증으로 인해 생긴 부종이 전호잎 열수추출물 200 mg/kg 경구투여군에서 Diclofenac 비스테로이드성 항염증 약물(NSAIDs) 투여군과 비슷하게 억제됨을 확인하였다(Lee 등, 2018a). 이에 따라 실험동물에서 분리한 총 단백질에서 전호잎 열수추출물 경구투여 시 iNOS와 COX-2 단백질 발현이 감소함으로써 급성염증이 감소하여 부종이 완화되는 효과가 있는 것으로 생각된다.

퇴행성 관절염 동물모델 혈액 내 aggrecan, collagen type II 측정

관절연골 조직은 연골 세포와 이를 둘러싸고 있는 세포외 기질 3종류(물, collagen type II, aggrecan)로 구성된 단순한 구조이다(van den Berg, 2000). 퇴행성 관절염은 관절연골 퇴행으로 인하여 조직 내 동화작용(anabolism)과 이화작용(catabolism)의 불균형으로 인하여 연골 손상이 가속화된다(Loeser 등, 2012). 동화작용은 aggrecan을 포함하는 proteoglycan과 collagen type II 등이 관여하고 있으며 이화작용은 기질 금속 단백분해효소(MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-8, MMP-9 및 MMP-13)와 기질 연골 단백분해효소(ADAMTS-4, -5) 등이 관여한다(Majumdar 등, 2007; Glasson 등, 2005). 본 실험에서는 전호잎 열수추출물이 DMM으로 유도된 퇴행성 관절염 실험동물의 관절연골 조직에서 동화작용에 관여하는 인자들의 농도 변화를 확인하기

Fig. 2. Effects of aqueous extract of *Anthriscus sylvestris* leaves (AE-ASL) on the protein expression levels of aggrecan and collagen type II in serum of destabilization of the medial meniscus (DMM)-induced osteoarthritis animal model. Normal and sham oral administrated with drinking water; DMM group oral administrated with AE-ASL (AE-ASL 50 mg/kg, 100 mg/kg, 200 mg/kg). Data represented mean $\pm$ standard error. ^{##} P <0.01, significant difference from the Normal and Sham group by independent t-test. ^{*} P <0.05, ^{**} P <0.01, significant difference from the Normal group by Dunnett's one-way ANOVA.

위하여 각각 실험동물에서 분리한 혈청에서 ELISA assay를 수행하여 확인하였다. 전호일 열수추출물이 DMM으로 유도된 퇴행성 관절염 실험동물에서 aggrecan 농도를 확인한 결과 sham군에서 98.10 ± 5.01 ng/mg 농도로 측정되었고, DMM 퇴행성 관절염 실험동물 대조군(음용수)에서는 60.41 ± 3.11 ng/mg 농도로 약 37.7 ng/mg 감소함을 확인하였다. 그러나 DMM으로 유도된 퇴행성 관절염군에서 전호일 열수추출물 50 mg/kg 경구투여군부터 감소한 aggrecan 농도가 유의적으로 증가함을 확인하였다(Fig. 2A). 또한 collagen type II 농도는 sham군에서 9.01 ± 0.3 ng/mg 농도로 측정되었고 DMM 퇴행성 관절염 실험동물 대조군(음용수)에서 6.03 ± 0.12 ng/mg 농도로 약 3 ng/mg 감소함을 확인하였으나, 전호일 열수추출물 50 mg/kg 경구투여군부터 collagen type II 농도가 유의적으로 증가함을 확인하였다(Fig. 2B). 본 실험 결과는 전호일 열수추출물이 백서 뒷다리 관절연골에서 분리한 초대배양 연골세포에서 IL-1 β 처리 시 감소한 aggrecan과 collagen type II 농도를 증가시킨다고 이전 연구 보고 결과를 뒷받침하였다(Lee 등, 2018b). 이러한 결과를 통해 전호일 열수추출물이 연골조직 내 동화작용에 관여하는 aggrecan과 collagen type II 합성을 증가시킴으로써 연골 보호 효과가 있는 것으로 생각된다.

관절연골 조직 염증 매개인자 단백질 발현 억제 확인

퇴행성 관절염은 관절 퇴행으로 인하여 연골조직에서 염증 매개인자 발현이 증가하여 관절연골 퇴행을 악화시켜 연골조직 내 염증 및 통증을 유발한다. 이와 관련된 염증 매개인자로 iNOS와 COX-2가 알려져 있다(Khan 등, 2017). DMM으로 유도된 퇴행성 관절염 실험동물에서 증가한 iNOS와 COX-2 단백질 발현이 전호일 열수추출물 경구투여 시 단백질 발현이 억제됨을 확인하였다. 정상군과 sham군에서 iNOS와 COX-2 단백질 발현이 거의 발현되지 않았으나, DMM 퇴행성 관절염 실험동물 대조군(음용수)에서 현저하게 증가함을 확인하였다. 그러나 DMM 퇴행성 관절염 실험동물에 전호일 열수추출물 50 mg/kg 경구투여군부터 iNOS와 COX-2 발현이 농도 의존적으로 감소함을 확인하였다(Fig. 3). 이전 연구 결과 보고에 의하면 전호일 열수추출물이 백서 뒷다리 관절연골에서 분리한 초대배양 연골세포에 IL-1 β 처리 시 증가한 iNOS와 COX-2 단백질 발현이 감소함을 보고하였다(Lee 등, 2018b). 이러한 결과를 통해 전호일 열수추출물이 관절 퇴행으로 인해 생기는 연골조직 내 염증을 감소하는 효과가 있는 것을 확인할 수 있었다.

관절연골 조직 분해 단백질 발현 억제 확인

정상적인 관절연골 세포는 연골 특이적인 세포외기질 단백질을 정상적으로 합성한다. 하지만 퇴행성 관절염이 진행되는 관절연골 조직에서는 기질 금속 단백분해효소(MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-8, MMP-9 및 MMP-13) 발현이 증가하여 관절연골 조직 파괴를 유발한다. 특히 기질 금속

Fig. 3. Effects of aqueous extract of *Anthriscus sylvestris* leaves (AE-ASL) on the protein expression levels of iNOS and COX-2 in cartilage tissue of destabilization of the medial meniscus (DMM)-induced osteoarthritis animal model. Normal and sham oral administrated with drinking water; DMM group oral administrated with AE-ASL (50 mg/kg, 100 mg/kg, 200 mg/kg).

단백분해효소의 증가는 관절연골을 구성하는 콜라겐 matrix 손상을 유발하여 퇴행성 관절염을 악화시키는 것으로 보고된 바 있다(Majumdar 등, 2007; Glasson 등, 2005). 이전 본 연구자들이 전호일 열수추출물에 의하여 백서 뒷다리 관절연골에서 분리한 초대 배양 연골세포에서 기질 금속 단백분해효소 및 기질 연골 단백분해효소 발현을 보고하였으며, 또한 DMM 퇴행성 관절염 실험동물에서 관절연골을 구성하는 proteoglycan을 Safranin-O 염색을 수행하여 전호일 열수추출물 투여 시 proteoglycan 합성이 증가함을 조직학적으로 보고하였다(Lee 등, 2018b). 그러나 퇴행성 관절염 실험동물에서 전호일 열수추출물에 의하여 관절연골을 분해하는 기질 금속 단백분해효소 분해효소(MMP-1, MMP-3, MMP-1)와 기질 연골 단백분해효소(ADAMTS-4) 발현에 미치는 연구가 보고된 바가 없었다. 본 실험에서는 전호일 열수추출물이 DMM으로 유도된 퇴행성 관절염을 실험동물에서 관절연골을 분해하는 효소들이 어떠한 영향을 미치는지를 조사하기 위해 각각 실험동물에서 분리한 총 단백질 발현 변화를 확인하였다. Fig. 4에 나타난 바와 같이, 정상군과 sham군에서 기질 금속 단백분해효소(MMP-1, MMP-3, MMP-13)와 기질 연골 단백분해효소(ADAMTS-4) 발현이 거의 나타나지 않았으나, DMM으로 유도된 퇴행성 관절염 실험동물 대조군(음용수)에서 현저하게 증가함을 확인하였다. 그러나 DMM으로 유도된 퇴행성 관절염군에 전호일 열수추출물 50 mg/kg 경구투여군부터 기질 금속 단백분해효소(MMP-1, MMP-3, MMP-13)와 기질 연골 단백분해효소(ADAMTS-4) 발현이 현저히 감소함을 확인하였다. 이러한 결과는 기질 금속 단백분해효소 및 기질 연골 단백분해효소 감소로 인하여 연골을 구성하는 aggrecan과 collagen type II 분해를 억제함으로써 관절연골을 개선하

Fig. 4. Effects of aqueous extract of *Anthriscus sylvestris* leaves (AE-ASL) on the protein expression levels of MMP-1, MMP-3, MMP-13, and ADAMTS-4 in cartilage of destabilization of the medial meniscus (DMM)-induced osteoarthritis animal model. Normal and sham oral administrated with drinking water; DMM group oral administrated with AE-ASL (50 mg/kg, 100 mg/kg, 200 mg/kg).

는 것으로 판단되었다.

요 약

본 연구에서는 전호잎 열수추출물(AE-ASL)의 관절 및 연골 개선 건강기능식품 기능성 원료 인정을 위한 기초 자료로 활용하기 위하여 카라기난 유도 염증부종 실험동물 및 내측 반월상 연골 절개(destabilization of the medial meniscus, DMM) 퇴행성 관절염 실험동물을 사용하여 관절 개선 바이오마커 발현 변화를 확인하였다. 카라기난 유도 염증부종 실험동물에서 전호잎 열수추출물 경구투여 시 염증 매개 인자 iNOS 및 COX-2 발현이 현저하게 감소함을 확인하였다. 또한 관절연골을 구성하는 중요성분으로 알려져 있는 aggrecan과 collagen type II 농도를 실험동물의 혈청에서 측정된 결과 DMM으로 유도된 퇴행성 관절염 군에서 감소하였던 aggrecan과 collagen type II의 농도가 전호잎 열수추출물을 경구투여한 실험군에서 농도 의존적으로 증가하였다. 또한 교원질 합성을 억제하고 분해를 촉진하는 기질 금속 단백분해효소(MMP-1, MMP-3, MMP-13) 및 기질 연골 단백분해효소(ADAMTS-4)의 발현 변화를 확인한 결과 전호잎 열수추출물 50 mg/kg 경구투여군부터 현저하게 감소하는 결과를 보여주었다. 본 실험 결과를 통하여 전호잎 열수추출물이 DMM으로 유도된 퇴행성 관절염에서 관절연골을 구성하는 aggrecan과 collagen type II를 증가시키고 단백분해효소를 억제하여 결국 관절연골 파괴 감소와 더불어 염증을 완하시킴으로써 퇴행성 관절염에 대한 관절연골 개선 및 통증 억제 효과가 있을 것으로 판단되며, 향후 관절

및 연골 개선 건강기능식품 기능성 원료 인정을 위한 기능성 평가 자료 및 천연물 의약품 소재로 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

감사의 글

본 과제(결과물)는 교육부와 한국연구재단의 재원으로 지원을 받아 수행된 조선대학교 사회 맞춤형 산학협력 선도대학(LINC+) 육성사업의 연구결과입니다.

REFERENCES

- Akhtar N, Khan NM, Ashruf OS, Haqqi TM. Inhibition of cartilage degradation and suppression of PGE₂ and MMPs expression by pomegranate fruit extract in a model of post-traumatic osteoarthritis. *Nutrition*. 2017. 33:1-13.
- Allen DE, Hatfield G. Medicinal plants in folk tradition – an ethnobotany of Britain & Ireland. *J Nat Prod* 2004. 67:2154.
- Bian Q, Wang YJ, Liu S, Li YP. Osteoarthritis: genetic factors, animal models, mechanisms, and therapies. *Front Biosci Elite Ed*. 2012. 4:74-100.
- Dall'Acqua S, Giorgetti M, Cervellati R, Innocenti G. Deoxypodophyllotoxin content and antioxidant activity of aerial parts of *Anthriscus sylvestris* Hoffm. *Z Naturforsch C J Biosci*. 2006. 61:658-662.
- Gairola S, Sharma J, Bedi YS. A cross-cultural analysis of Jammu, Kashmir and Ladakh (India) medicinal plant use. *J Ethnopharmacol*. 2014. 155:925-986.
- Glasson SS, Askew R, Sheppard B, Carito B, Blanchet T, Ma HL, et al. Deletion of active ADAMTS5 prevents cartilage degradation in a murine model of osteoarthritis. *Nature*. 2005. 434:644-648.
- Goldring MB, Otero M, Plumb DA, Dragomir C, Favero M, El Hachem KE, et al. Roles of inflammatory and anabolic cytokines in cartilage metabolism: signals and multiple effectors converge upon MMP-13 regulation in osteoarthritis. *Eur Cells Mater*. 2011. 21:202-220.
- Hong JH, Lee MJ, Jo YI, Moon SM, Lee SA, Kim CS. Analytical method validation of cynaroside in domestic *Anthriscus sylvestris* (L.) Hoffm. Leaves extract for standardization as a functional ingredient using RP-HPLC. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2021. 50:395-402.
- Khaled M, Jiang ZZ, Zhang LY. Deoxypodophyllotoxin: A promising therapeutic agent from herbal medicine. *J Ethnopharmacol*. 2013. 149:24-34.
- Khan NM, Haseeb A, Ansari MY, Haqqi TM. A wogonin-rich fraction of *Scutellaria baicalensis* root extract exerts chondroprotective effects by suppressing IL-1 β -induced activation of AP-1 in human OA chondrocytes. *Sci Rep*. 2017. 7:43789. <https://doi.org/10.1038/srep43789>
- Kim M, Bae SH. Factors influencing health-related quality of life in older adults with osteoarthritis: Based on the 2010-2011 Korea National Health and Nutrition Examination Survey. *J Muscle JT Health*. 2014. 21:195-205.
- Knudson CB, Knudson W. Cartilage proteoglycans. *Semin Cell Dev Biol*. 2001. 12:69-78.
- Kweon S, Kim Y, Jang M, Kim Y, Kim K, Choi S, et al. Data resource profile: The Korea National Health and Nutrition Examination Survey (KNHANES). *Int J Epidemiol*. 2014. 43:69-77.
- Lee SA, Moon SM, Han SH, Hwang EJ, Hong JH, Park BR,

- et al. In vivo and in vitro anti-inflammatory effects of aqueous extract of *Anthriscus sylvestris* leaves. J Med Food. 2018a. 21:585-595.
- Lee SA, Moon SM, Han SH, Hwang EJ, Park BR, Kim JS, et al. Chondroprotective effects of aqueous extract of *Anthriscus sylvestris* leaves on osteoarthritis *in vitro* and *in vivo* through MAPKs and NF- κ B signaling inhibition. Biomed Pharmacother. 2018b. 103:1202-1211.
- Loeser RF, Goldring SR, Scanzello CR, Goldring MB. Osteoarthritis: A disease of the joint as an organ. Arthritis Rheumatol. 2012. 64:1697-1707.
- Majumdar MK, Askew R, Schelling S, Stedman N, Blanchet T, Hopkins B, et al. Double-knockout of ADAMTS-4 and ADAMTS-5 in mice results in physiologically normal animals and prevents the progression of osteoarthritis. Arthritis Rheum. 2007. 56:3670-3674.
- Milovanovic M, Picuric-Jovanovic K, Vucelic-Radovic B, Vrbaski Z. Antioxidant effects of flavonoids of *Anthriscus sylvestris* in lard. J Am Oil Chem Soc. 1996. 73:773-776.
- Neuhold LA, Killar L, Zhao W, Sung MLA, Warner L, Kulik J, et al. Postnatal expression in hyaline cartilage of constitutively active human collagenase-3 (MMP-13) induces osteoarthritis in mice. J Clin Invest. 2001. 107:35-44.
- O'Neill TW, McCabe PS, McBeth J. Update on the epidemiology, risk factors and disease outcomes of osteoarthritis. Best Pract Res Clin Rheumatol. 2018. 32:312-326.
- Oh J, Yi M. Structural equation modeling on quality of life in older adults with osteoarthritis. J Korean Acad Nurs. 2014. 44:75-85.
- Olaru OT, Nițulescu GM, Orțan A, Dinu-Pîrvu CE. Ethnomedicinal, phytochemical and pharmacological profile of *Anthriscus sylvestris* as an alternative source for anticancer lignans. Molecules. 2015. 20:15003-15022.
- van den Berg WB. Pathophysiology of osteoarthritis. Jt Bone Spine. 2000. 67:555-556.
- Wahida B, Amor M, Nabil C. An inventory of ethnomedicinal plants used in Tunisia. In: Rai M, Acharya D, Rios JL, editors. Ethnomedicinal Plants: Revitalization of Traditional Knowledge of Herbs. CRC Press, Boca Raton, FL, USA. 2011. p 336.