

지치의 초임계추출물, Shikonin 및 Acetylshikonin의 연골세포 및 MIA 유도 관절염 모델에서의 효과

김금숙* · 김화진** · 이대영* · 최승민** · 이승은* · 노형준* · 최종길** · 최수임**†

*농촌진흥청 국립원예특작과학원 인삼특작부, **주와이디생명과학연구소

Effects of Supercritical Fluid Extract, Shikonin and Acetylshikonin from *Lithospermum erythrorhizon* on Chondrocytes and MIA-Induced Osteoarthritis in Rats

Geum Soog Kim*, Hwa Jin Kim**, Dae Young Lee*, Seung Min Choi**, Seung Eun Lee*, Hyung Jun Noh*, Jong Gil Choi** and Soo Im Choi**†

*Department of Herbal Crop Research, NIHHS, RDA, Eumseong 369-873, Korea.

**YD Life Science Research Institute, YD Life Science Co. Ltd., Seoul 139-743, Korea.

ABSTRACT : This study investigates the effect of supercritical fluid extract (CMPB803-C) of *Lithospermum erythrorhizon*, shikonin and acetylshikonin isolated from *Lithospermum erythrorhizon* on IL-1 β -induced chondrocytes and monosodium iodoacetate (MIA)-induced osteoarthritis in rat. Shikonin (50 μ M) and acetylshikonin (3 μ M) treatment reduced significantly the mRNA expression and enzyme activity of matrix metalloproteinase (MMP)-1, -3 and -13 in IL-1 β -induced SW1353 chondrosarcoma cells. The chondro-protective effects of CMPB803-C and acetylshikonin were than analyzed in a rat OA model using a single intra-articular injection of MIA (1 mg) in the right knee joint. CMPB803-C (200 mg/kg) or acetylshikonin (5 mg/kg) was orally administered daily for two weeks starting after 1 week of MIA injection. In the histological observation, CMPB803-C and acetylshikonin clearly improved OA lesions being comparable to or better than control group. Our results demonstrated that CMPB803-C and acetylshikonin as active compound of *Lithospermum erythrorhizon* have a strong chondro-protective effect in OA rats, which likely attributes to its anti-inflammatory activity and inhibition of MMPs production.

Key Words : *Lithospermum erythrorhizon*, Shikonin, Acetylshikonin, Osteoarthritis, MIA, MMP

서 언

지치 (*Lithospermum erythrorhizon* Sieb. et Zucc.)는 지치과의 다년생 초본 식물로서 우리나라의 강원도, 체천 등의 야산에 주로 자생하고 지치 뿌리는 예로부터 한국, 중국과 일본에서 한약재와 식용색소로 이용되었다. 한방에서 혈액순화 촉진, 해열, 해독 작용에 주로 이용하거나 토혈, 혈뇨, 변비, 화상, 습진, 요로 감염 등을 치료하는데 사용하여왔다 (Ahn *et al.*, 2009). 지치의 약리작용으로는 뿌리 추출물에서 항암작용 (Rajasekar S *et al.*, 2012), 항산화 작용 (Pan *et al.*, 2004), 항염증작용 (Chung *et al.*, 2005), 간개선 효과 (Lee *et al.*,

2010) 등이 보고되고 있다. 주요 성분으로는 acetylshikonin, shikonin, alkanann, isobutyryl-shikonin, β , β -dimethylacrylshikonin, β -hydroxy isovaleryl shikonin, teracrylshikonin 등의 다양한 shikonin 유도체들이 함유되어 있는 것으로 알려지고 있다 (Han *et al.*, 2008). 지치의 acetylshikonin 등을 포함한 shikonin 유도체 성분은 항산화활성 (Weng *et al.*, 2000; Han *et al.*, 2008)을 비롯하여, 항염증 활성 (Staniforth *et al.*, 2004), 혈전용집억제활성 (Chang *et al.*, 1993), 항암활성 (Kim and Kim, 2008; Andújar *et al.*, 2013), LDL 산화 저해활성과 FPTase 저해활성 (Kim *et al.*, 2009), 항인플루엔자 A 바이러스 효과 (Tian *et al.*, 2011) 등이 보고된 바

†Corresponding author: (Phone) +82-2-944-6331 (E-mail) sichoi74@ydlifescience.com

Received 2013October 10 / 1st Revised 2013 November 14 / 2nd Revised 2013 November 20 / 3rd Revised November 25 / Accepted 2013 Revised November 26

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.

있다. 최근, 지치의 생육시기별 시코닌 색소 함량 및 항산화 활성에 대해 보고되기도 하였다 (Kim *et al.*, 2011). 이와 같이 지치 및 이로부터 분리된 활성 성분은 다양한 약리효능을 지니고 있으나 아직까지 국내에서는 다양한 성분 분석 및 그 작용기작에 관한 연구는 미약한 실정이다.

골관절염은 국소적인 관절에 점진적인 관절연골의 소실 및 그와 관련된 2차적인 변화와 통증 증상을 동반하는 가장 흔한 질환으로 한국 성인 중 10% 이상이 골관절염을 앓고 있으며 연령에 따라 비율이 증가하여 60-70대에서 60% 이상, 80대에서는 35%에 이르는 것으로 추정되고 있다. 또한 과거 노령인구층에서 주로 나타난 것과 달리 발생인구 연령이 낮아지고 있으며, 그 환자수도 매년 급증하고 있어 사회적 문제로 대두되고 있다 (Jhun *et al.*, 2010). 관절연골의 점진적 소실 및 연골세포 사멸의 지속 작용으로 인해 관절염은 진행이 촉진되는데 연골의 파괴, 골극 형성, 연골하 골경화 및 미세골절, 경증의 활막염증 등과 같은 특징적인 병리학적 소견을 보인다 (Berenbaum, 2013). 일반적으로 재활치료를 포함한 약물 치료 및 수술적인 방법이 시행되고 있으나, 만성적이고 진행성인 질환의 특성상 통증 조절이나 관리가 어려운 실정이다. 최근에는 관절염에 대한 효과적인 치료법 및 발병기전 등에 대한 연구가 발전되면서 연골의 파괴를 억제하고 질병의 진행을 예방하기 위한 새로운 천연약물 소재의 개발이 활발하게 이루어지고 있다 (Altman, 2008; Alaaeddine *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2012; Huh *et al.*, 2012).

이에 본 연구에서는 지치 초임계추출물 (CMPB803-C) 및 지치의 주요 성분으로 알려진 shikonin 및 acetylshikonin의 연골세포에 대한 보호효과 및 monosodium iodoacetate (MIA)로 유발된 흰쥐의 골관절염 통증 모델에서 이들 투여에 의한 체중변화, 육안소견 및 병리조직학적 분석을 통해 유의한 결과를 얻었기에 이에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 지치의 지표성분 분리정제

지치뿌리는 1년근 재배 지치를 구입하여 사용하였으며, voucher specimen (증거표본, MPS000071)은 식물 표본실에 보관중이다. 지치의 주요성분인 acetylshikonin의 분리정제는 Kim 등 (2009)의 방법과 동일하게 실시하였다. 즉, 분쇄된 지치뿌리 시료 3 kg을 취하고 hexane 12 L 가한 후 10일 동안 상온에 방치하여 총 4회 동일 방법으로 추출하고, 여과한 후 진공 농축하였다. 5-6회 추출은 남아있는 시료 잔사에 용매 6 L를 추가하여 상온 진탕 추출한 후 여과하여 진공 농축하였다. 핵산 농축액 (26 g)은 silica gel이 충전된 column (5 × 40 cm)에서 column chromatography를 실시하였다. 용출용매로는 Hexane : EtOAc (30 : 1 → 1 : 11) 혼합용매와 EtOAc :

MeOH (25 : 1 → 1 : 2) 혼합용매를 사용하여 기울기 용리하여 최종 acetylshikonin (1.1 g)을 분리, 정제하였다. Acetylshikonin의 NMR 분석 데이터는 문헌 (Cheng *et al.*, 1995; Hwang *et al.*, 2000)에 기재된 데이터와 일치함을 확인하였다.

2. 지치 초임계추출물의 제조

지치의 초임계추출물은 초임계추출 전문업체인 (주)그린텍 21에 위탁제조하였다. 지치 건재 분쇄시료 4.3 kg을 10 L extractor에서 400 bar, 60°C 조건에서 5시간 동안 초임계 추출하였고 최종 초임계추출물 CMPB803-C를 얻었다.

3. 지표성분의 HPLC 분석

지치 지표성분으로 shikonin 표준품 (ChromaDex® Inc., USA)과 acetylshikonin 표준품 (Nacalai tesque, Inc., Japan)은 구입하여 사용하였다. Acetonitrile은 HPLC급 용매 (J. T. Baker®, Neverland)를 사용하였다. 지치 초임계 추출물 2 mg을 2 mL의 MeOH에 녹여 0.45 µm membrane filter로 여과한 후 HPLC 분석 시료액으로 분석하였다. 지치의 색소성분의 정량 분석에는 Agilent 1100 series HPLC system (Agilent Technologies, Santa Clara, USA)이 사용되었다. HPLC 컬럼은 Waters사의 Zorbax Eclipse XDB-C18 (4.6 × 150 mm, 5 µm)을 사용하여 25°C에서 분석하였고, 이동상은 0-17분: 55 → 1 : 11) 혼합용매와 80% acetonitrile, 17-22분: 80 → 1 : 11) 혼합용매와 100%, 22-25분: 55% acetonitrile의 조건으로 기울기 용리하였다. 이때 유속은 0.8 mL/min으로 하고, UV/Vis 검출기의 520 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

4. 세포 독성

SW1353 연골육종 세포는 American Type Culture Collection (ATCC, USA)로부터 구입하여 10% fetal bovine serum (FBS)와 1% penicillin/Streptomycin가 첨가된 DMEM 배지를 이용하여 5% CO₂ 37°C incubation에서 배양하였다. SW1353 연골육종 세포에 대한 세포생존율은 MTT (methylthiazol tetrazolium bromide) 검정법으로 측정하였다. CMPB803-C, Shikonin과 acetylshikonin을 96 well plate에 1 × 10⁵ cell 개로 배양한 SW1353 세포에 시료를 각각 농도별로 처리하고 37°C incubator에서 24시간 배양 후에 세포생존율을 확인하였다.

5. RT-PCR mRNA 발현 분석

6 well에 4 × 10⁵ cell 배양한 SW1353 연골육종 세포에 IL-1β 20 ng/mL (R&D Systems Inc., USA)를 처리한 후 CMPB803-C (5 µg/mL), shikonin (50 µM) 및 acetylshikonin (3 µM)을 각각 세포에 처리하였다. 37°C incubator에서 24시간 배양한 후, PBS로 세척하고 0.05% Trypsin-EDTA와 원심분리기를 이용하여 연골세포를 회수하였다. 회수된 세포로부터 RNA의

분리는 TRIzol 시약 (Invitrogen Corp., USA)을 사용하여 추출하였고, 모든 RT reaction은 추출한 2 µg RNA를 주형으로 하여 RT-PCR kit (Invitrogen Corp., USA)의 프로토콜에 따라 실시하였다. 세포에서의 mRNA 발현은 MMP (Matrix metalloproteinases)-1, -3, -13 및 TIMP-2 (Tissue inhibitors of MMP-2)에 대하여 실시하였다. PCR product는 2.0% agarose gel을 이용하여 전기영동한 후 ethidium bromide로 염색하여 관찰하였다. 실험에 사용한 primer와 반응 조건은 각각 다음과 같다.

MMP-1: (F) AGTGACTGGGAAACCAGATGA/(R) CGTCTTGCCAAATCTGGCCTGTAA (Annealing Temperature: 60°C, 35 cycle), MMP-3: (F) ATTCCATGGAGCCAGGCTTTC/(R) CATTTGGGTCAAACCTCCACTGTG (57°C, 35 cycle), MMP-13: (F) AAATTATGGAGGAGATGCCATT/(R) TCCTTGAGTGGTCAAGACCTAA (56°C, 35 cycle), TIMP-2: (F)GTAGTGATCAGGGCCAAAGC/(R) GGGGGCCGTGATAAACT (53°C, 35 cycle), GAPDH: (F) AGAAGGCTGGGGCTCATTTG/(R) AGGGGCCATCAGTCTTC (57°C, 30 cycle). PCR 결과물은 2% agarose gel에 30분 동안 전기영동을 시행한 후, UV transilluminator (UVP ChemiDoc-It, USA)로 mRNA band를 관찰하였고 VisionWorksLS (version 7.1) 프로그램을 이용하여 밴드를 수치화하였다.

6. MMP-1, -3, -13 정량 분석

6 well에 4×10^5 cell로 배양한 SW1353 연골육종 세포에 IL-1β 20 ng/mL 와 함께 CMPB803-C (5 µg/mL), shikonin (50 µM) 및 acetylshikonin (3 µM)을 각각 세포에 처리한 후 37°C incubator에서 24시간 배양하였다. 배양 후 각각의 시료가 처리된 세포로부터 상층액을 얻어 세포로부터 생성된 MMP-1, -3, -13을 MMP fluorimetric assay kit (AnaSpec, Inc., USA)를 사용하여 30분 동안 측정하고 증가되는 수치는 RFU (relative fluorescence unit)로 나타내었다.

7. 골관절염의 유발

120-140 g 내외의 수컷 Wistar계 흰쥐 (Orient-bio Inc., Korea)를 구입하여 청정동물사육실 (온도 $23 \pm 1^\circ\text{C}$, 습도 $55 \pm 5\%$) 내에서 1주일간 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 실험기간 동안 사료와 음수는 자유롭게 섭취하도록 하였다. 흰쥐를 이용한 골관절염 유도 모델은 Bove 등 (2003)의 방법에 따라 유발시켰다. Monosodium iodoacetate (MIA) (Sigma-aldrich, USA) 용액은 주사용 생리식염수에 5 mg/mL의 농도로 제조하였다. 시험 개시일 (D0)에 Zoletile: Rumpun (2:1)을 근육주사하여 마취시키고 오른쪽 슬관절 부위를 중심으로 전면을 제모하고 소독한 후 슬관절강내로 각 개체당 MIA 용액 (1 mg/50 µL)을 hemilton syringe (26 gauge)에 취하여 무릎

연골 중앙부위에 정확히 주사하였다. 이때 정상군은 슬관절강내로 주사용 생리식염수 동일한 방법으로 주사하였다.

8. 실험군의 분류 및 경구투여

MIA 유도 골관절염을 유발 (D0)한 7일 후 (D7)에 각 개체의 체중을 측정하였고, 육안관찰을 통해 체중과 유발정도가 크게 8마리씩 군 배정한 후 다음과 같이 처치하였다. 정상군 (normal group)은 corn oil만 경구투여하였고, 대조군 (control group)은 MIA를 처리한 후 corn oil을, 처치군 (treated group)은 MIA를 처리한 후 CMPB803-C (200 mg/kg b.w.) 및 acetylshikonin (5 mg/kg b.w.)을 각각 corn oil에 녹여 경구투여하였다. 체중은 2주 (D7-D21)동안 주 2회 측정하였으며, D22일째 (Bar-Yehuda *et al.*, 2009)에 심장채혈한 후 혈액으로부터 혈청을 분리하여 -70°C 에 보관하였고, 슬관절 조직은 분리하여 각각 10% formalin에 담가 48시간 고정시켰다.

9. 병리조직학적 골관절염 지수의 평가

MIA 유도 골관절염이 유발된 각 개체로부터 슬관절을 분리하여 고정시키고 탈회 과정을 거친 후 paraffin으로 포매하였다. 포매가 완료된 블록은 microtome을 사용해 4 µm 두께로 절편을 제작하였다. 박절한 절편은 H & E (Hematoxyline & Eosin) 염색 후 현미경을 통해 관절연골 조직을 관찰하였다. 조직병리 검경 항목은 Guzman 등 (2003)의 방법에 따라 연골하골 변화 (Subchondral bone change), 연골세포 괴사 (chondrocyte necrosis), 연골 침식 (cartilage erosion), 골극 형성 (osteophyte formation) 및 연골 갈라짐 (cartilage cleft)으로 각 항목당 0-5점까지 총 25점으로 평가하였다. 조직 검경은 독성병리전문가 (오리엔트바이오 해은비임상시험연구소)에 의해 수행되었다.

10. 통계처리

모든 측정 결과는 평균 및 표준편차 (Mean ± S.D.)로 나타내었으며, 실험군 간의 차이는 student's *t*-test 및 비모수통계법인 Kruskal-Wallis test를 이용하여 검정하였다. Kruskal-Wallis test 결과 유의수준이 $p < 0.05$ 일 경우, 각 군간의 통계는 Dunn's Multiple comparison test를 이용하여 검정하였다. 각 군간의 통계처리는 GraphPad PRISM Version 4.0 (Graph Pad Software, USA)을 사용하여 실시하였다. $p < 0.05$ 값인 경우에 통계적으로 유의성이 있는 것으로 판단하여 결과를 분석하였다.

결과 및 고찰

1. 지치 초임계추출물의 제조 및 성분 분석

지치의 shikonin 유도체 화합물은 anthraquinone계 비극성

물질이기 때문에 극성이 높은 에탄올 추출보다는 CO₂ 초임계 추출로 추출효율을 높일 수 있었다. 초임계 추출물 CMPB803-C는 지치 건재 분쇄시료 4.3 kg을 초임계 추출했을 때 추출물 47.35 g으로서 1.1%의 수율을 나타내었다. CMPB803-C 중 주요 shikonin계 성분이자 지표성분인 acetylshikonin 함량은 약 210 ± 10 µg/mg (수율 21%) 정도였다 (Fig. 1).

2. 연골세포에 대한 세포 독성

지치 추출물 및 주요성분의 연골세포에 대한 보호효능을 확인하기 위하여 일차적으로 배양된 SW1353 연골육종 세포에 CMPB803-C, shikonin 및 acetylshikonin을 다양한 농도로 처리하여 세포 생육에 미치는 영향을 확인하였다. 추출물은 shikonin 색소를 다량 함유한 지치 초임계추출물 (CMPB803-C), 이로부터 분리된 acetylshikonin 및 지치 내 함유량은 적지만 류마티즘 관절염 동물모델에서 연골보호 효과 (Kim *et al.*, 2010)가 보고된 바 있는 shikonin을 구입하여 활성평가에 사용하였다. 그 결과, CMPB803-C는 5 µg/mL 이상에서 세포에 영향을 나타냈으며, Shikonin 및 acetylshikonin은 각각 50 µM 및 3 µM 이상 농도에서 세포생육에 대한 영향을 나타내었다 (Fig. 2). 이들 결과에 따라 연골세포주 보호 효과에 대한 효능 평가는 상기 설정 농도 이하로 처리하여 수행하였다.

3. MMP-1, -3, -13에 대한 mRNA 발현 측정

CMPB803-C, shikonin 및 acetylshikonin의 연골세포에서의 MMPs 발현에 미치는 영향을 확인하기 위해 SW1353 세포에 IL-1β (20 ng/mL)를 처리하고 MMP-1, -3 및 -13의 발현양

상을 RT-PCR로 확인하였다. Shikonin (50 µM)를 처리한 결과, MMP-3에 대해 약간의 발현 감소를 보였고, MMP-13 발현 양상은 IL-1β만 처리한 대조군보다 유의하게 감소 (25.3%) 되었으며 acetylshikonin (3 µM)를 처리한 경우도, MMP-1 (36.3%), MMP-3 (42.9%) 및 MMP-13 (22.5%) 발현을 모두 현저하게 억제시켰다. 반면 CMPB803-C는 5 µg/mL 처리 농도에서 MMP-1, -3, -13에 대해서 발현 억제 효과를 보이지 않았다. 또한 MMPs를 비활성화 시키는 TIMPs는 모든 시료 처리에서 발현 패턴의 변화를 보이지 않았다 (Fig. 3). 골절의 치유 반응에는 세포 외 기질 (extracellular matrix)의 생성과 흡수의 과정이 필요하며 이 과정에는 단백질효소인 MMP가 관여한다. MMP는 정상적으로 성장 시 또는 골 손상 후 수복 시 재형성에 관여하는 효소이나, 관절염에서는 연골의 세포외 기질의 성분을 분해하는 대표적인 단백 분해효소로 기질에 따라 collagenase, gelatinase, stromelysin의 세 종류로 구분되고, 최근에는 세포막형 MMP (membrane type matrix metalloproteinase)도 알려져 있다 (Burrage *et al.*, 2006). 이들 중 중요한 연골세포 기질 분해 효소로서 MMP-1 (collagenase-1)은 주로 교원질을 분해시키며, MMP-3 (stromelysin-1)은 단백다당 (glycoprotein)을 분해시키고 잠재성 MMP-1을 활성화시킴으로써 교원질 (collagen)과 단백다당을 분해시켜 관절연골 연골기질의 원섬유화 (fibrillation), 미란 (erision), 균열 (cleft)을 초래한다. 특히 MMP-13 (collagenase-3)은 사람의 악성 유방암에서 밝혀진 것으로 연골의 주성분인 Type II collagen에 대한 강한 분해작용이 있어 골관절염 발생에 있어 중요한 약리학적 치료의 표적이 되고 있다. 인체의 골관절염 시 정도가 심해질

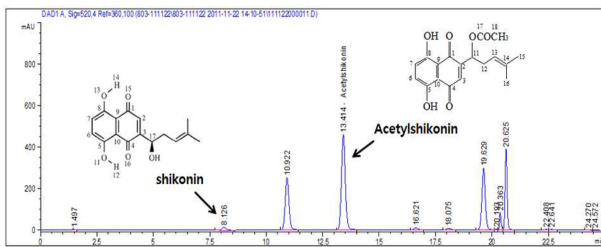


Fig. 1. HPLC Chromatogram of schikonin and acetylshikonin in supercritical fluid extract (CMPB803-C) from *Lithospermi radix*.

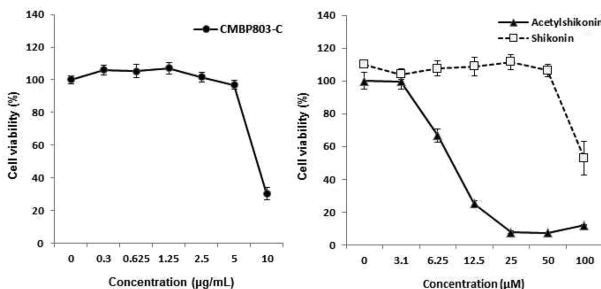


Fig. 2. Cell viability of SW1353 chondrosarcoma cells, treated with CMPB803-C, shikonin and acetylshikonin.

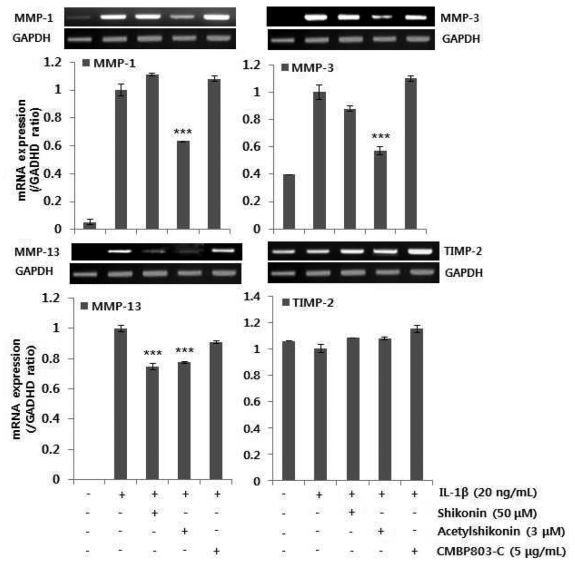


Fig. 3. RT-PCR analysis of MMP-1, -3, -13 and TIMP-2 gene expressionon in IL-1β-induced SW1353 chondrosarcoma cells, treated with CMPB803-C, shikonin and acetylshikonin.

수록 골관절염의 정도와 비례하여 이들 MMPs의 발현율이 관절 표층에서 전 층으로 발현이 확대된다고 알려져 있다. 또한 활성화된 MMPs는 정상 상태에서 천연의 조직억제제 TIMPs에 의해 비활성화된다 (Shingleton *et al.*, 2000; Billingham *et al.*, 2000; Piecha *et al.*, 2010).

4. MMP-1, -3, -13에 대한 효소 활성 측정

MMP-1, -3, -13 유전자의 RNA 단계에서의 억제와 MMP 효소 활성과의 연관성을 확인하기 위해 연골세포의 배양매지에 생성된 MMP-1, -3, -13을 측정하고 MMP 효소 활성 억제능을 정량하였다. 배양한 SW1353 세포에 IL-1 β 와 함께 CMPB803-C (5 μ g/mL), shikonin (50 μ M) 및 acetylshikonin (3 μ M)을 각각 처리한 결과, mRNA 발현과 유사하게 shikonin 및 acetylshikonin은 IL-1 β 만 처리한 대조군에 비해 이들 MMP-1, -3, -13 생성을 현저히 억제하였다 (Fig. 4). 특히 acetylshikonin은 정상군에 가까운 수준의 활성 억제 효능 ($p < 0.001$)을 보였다. 이들 결과로부터 지치추출물로부터 분리된 shikonin 및 acetylshikonin은 MMP-1, -3, 및 -13에 대하여 유의한 활성억제를 나타냈으며, 또한 이들 MMPs의 활성 억제를 통한 항염증 효과에 의해 손상된 연골조직의 보호 효과가 있는 것으로 사료된다. 반면에 본 연구에서의 CMPB803-C의 MMPs에 대한 억제 활성은 확인되지 않아 항

후 CMPB803-C의 관절염증 관련된 MMPs 외의 다른 기전에 대한 연구가 추가로 필요할 것으로 사료된다.

5. MIA 유도 랫드 골관절염 모델에서의 항관절염 효과 측정

CMPB803-C 및 이로부터 분리된 acetylshikonin의 연골보호 효과를 MIA 유도 골관절염 유발 동물모델에서 확인하였다. MIA는 관절강 내에 주입 시 관절연골세포에서 진행되는 해당 과정의 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 활성을 억제하여, 관절연골세포에서 진행되는 관절연골의 대사과정을 저해시키고, 관절연골의 변성을 일으켜 골관절염을 유도하는 물질로, 쥐를 대상으로 한 골관절염 유발실험에서 관절연골의 손상, 관절의 기능장애, 통증 등의 양상이 사람의 골관절염과 매우 유사하다고 보고되었다 (Guzman *et al.*, 2003; Combe *et al.*, 2004). 본 실험에 사용된 MIA 주입 용량은 예비실험을 통해 골관절염의 정도를 확인한 후 최종 MIA 1 mg으로 투여하였다. MIA 관절염 유도 후 각 개체의 체중은 시료의 경구 투여가 시작된 D7부터 2주간 측정하였다 (N = 8). 골관절염이 유도된 대조군은 정상군에 비해 시험기간 동안 체중이 유의적 ($p < 0.05$)으로 낮았다. Acetylshikonin (5 mg/kg) 투여군은 실험기간 동안 체중 증가 양상은 대조군에 비해 높고 정상군과 유사한 증가 패턴을 보였고 통계적으로 유의적인 차이는 없었다. 반면, CMPB803-C (200 mg/kg) 투여군은 시료 투여 4일

Table 1. Effects of CMPB803-C and acetylshikonin treatment on the body weights of monosodium iodoacetate (MIA)-induced osteoarthritis (OA) rats (N = 8/group).

Group ¹⁾	Body weights ²⁾ (g) / days				
	D7	D11	D14	D17	D21
Normal	252.2 \pm 14.9	281.8 \pm 15.3	308.6 \pm 11.1	330.6 \pm 11.4	357.2 \pm 13.3**
Control	248.4 \pm 7.2	274.0 \pm 9.5	291.8 \pm 10.0 [#]	308.7 \pm 13.8 [#]	321.9 \pm 18.0 [#]
CMPB803-C (200 mg/kg)	242.8 \pm 10.0	243.5 \pm 9.8*	263.1 \pm 9.8*	273.2 \pm 10.5*	292.1 \pm 12.1*
Acetylshikonin (5 mg/kg)	252.6 \pm 12.0	279.3 \pm 16.8	303.9 \pm 15.3	326.0 \pm 15.5	343.9 \pm 15.2

¹⁾Normal group; saline injected and treated with corn oil, Control group; MIA injected and treated with corn oil, Treated group 1; MIA injected and treated with CMPB803-C (200 mg/kg), Treated group 2; MIA injected and treated with acetylshikonin (5 mg/kg).

²⁾Body weights of MIA-induced OA rats was measured for 2 weeks (D7-D21) after MIA injection (DO).

[#];Statistically significant compared with normal control ($p < 0.05$), *; Statistically significant compared with control group ($p < 0.05$).

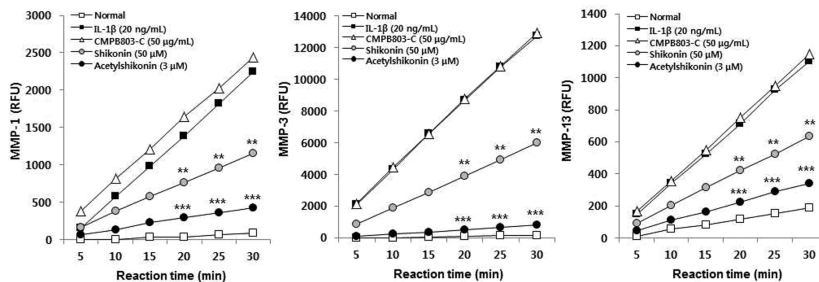


Fig. 4. MMP-1, -3 and -13 contents in culture media of SW1353 chondrosarcoma cells, treated with CMPB803-C, shikonin and acetylshikonin (RFU: Relative fluorescence unit).

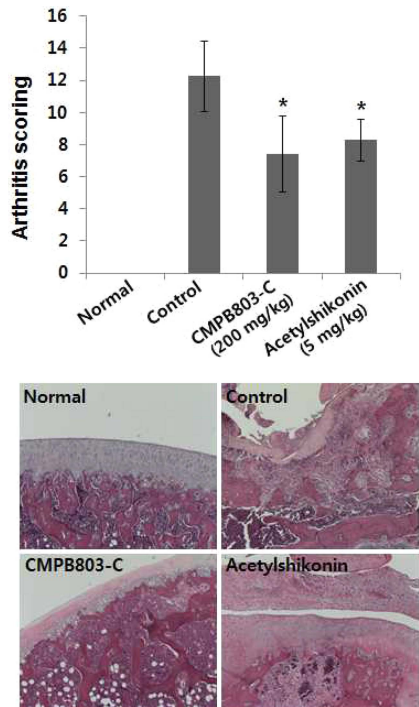


Fig. 5. Histological pathogenesis of articular cartilage the femoral-tibial knee joint from rats with monosodium iodoacetate (MIA)-induced osteoarthritis. Wister rats were subjected to intra-articular injection MIA (1 mg/animal) and fed orally with corn oil, CMPB803-C in corn oil (200 mg/kg b.w.) and acetylshikonin in corn oil (5 mg/kg b.w.) everyday for 2 weeks. The histological sections (Magnification × 400) of articular cartilages were stained with hematoxyline & eosin (H & E).

제 (D11)부터 대조군에 비해 실험기간동안 체중이 유의적 ($p < 0.05$)으로 낮았다 (Table 1).

정상군과 유발군의 슬관절을 분리하여 그 형태를 육안으로 관찰한 결과, 슬관절강내에 saline 만을 주입한 정상군의 경우, 슬관절의 경골 근위단 관절연골 표면은 윤기가 있고 매끈한 상태였다. 반면 대조군의 모든 개체에서 관절 주변의 염증으로 인해 비후되었고, 슬관절의 연골표면의 윤기는 정상군에 비해서 감소되었으며 표면은 고르지 않고 선상 또는 불규칙한 형태로 연골 표면의 탈락도 관찰되었다. 또한 여러 부위에서 연골의 색조 변색이 있었다. 또한 연골하 골조직의 파괴 및 파골세포의 증식과 섬유조직의 증식도 관찰되었다. CMPB803-C 및 acetylshikonin 처치군의 육안소견은 대조군과 유사하였으나, 변색의 범위가 감소되었고, 육안적인 연골표면의 탈락은 관찰되지 않았다.

분리된 슬관절연골조직에 대한 조직염색을 실시하였고 각군에 대해 연골세포 및 조직의 병리학적 분석을 실시하였다. 결과 정상군에서는 슬관절을 구성하는 대퇴골과 경골의 관절연골과 관절반월판의 섬유연골 및 관절낭의 활막도 모두 정상적인 범위에 있었다. 반면 MIA를 슬관절강내에 주입한 대조군

에서는 대퇴골 관절연골, 경골 관절연골 및 슬개골 관절연골의 대부분이 변성 및 괴사되어 연골세포의 형태가 사라져 연골층이 균질한 형태로 염색되어 나타내었으며, 변성괴사된 연골의 주변 연골에는 핵이 농염된 연골세포가 밀집되어 증식되어 관찰되었다. 또한 많은 부위에서 변성된 관절연골이 소실되고 관절연골하 골조직이 관절강으로 그대로 노출되어 있었다. 활막은 활막세포의 증식으로 인해 비후되어 있었으며 만성염증세포가 침윤되어 있었다. CMPB803-C 처치군과 acetylshikonin 처치군에서의 관절연골은 기본적인 병리학적 소견은 대조군과 유사하였으나 변성괴사된 부위가 관절연골의 범위가 감소되어 있었고 연골층의 탈락으로 인한 관절연골하 골조직의 노출 경우는 관찰되지 않았다. 병리조직학적 관절염 지수 (arthritis scoring)는 대조군 (12.3 ± 2.2)과 비교하여 CMPB803-C 처치군과 acetylshikonin 처치군에서 각각 7.4 ± 2.4 와 8.3 ± 1.3 의 수치를 나타냈고, 통계적으로 유의성 ($p < 0.05$) 있게 관절염 지수 개선 효과를 나타내었다 (Fig. 5). 따라서 CMPB803-C 및 지치로부터 분리된 acetylshikonin의 투여가 흰쥐의 MIA 유발 골관절염 모델에서 염증억제 및 관절염 지수의 감소에서 유의성 있는 결과를 보임에 따라 관절염 초기 및 관절연골 개선에 그 효과가 크게 작용할 것으로 사료된다. 지치추출물 및 이들 shikonin 및 acetylshikonin에 대한 항염증 효능이 지속적으로 보고되고 있다. Chung 등 (2005)은 항염증 작용으로서 지치추출물이 NF- κ B의 활성을 억제함으로써 LPS/ $\text{IFN-}\gamma$ 유도된 생성되는 nitric oxide (NO)와 tumor necrosis factor- α (TNF- α)의 생성을 억제한다고 보고하였다. 또한 acetylshikonin은 polymyxin B 유도 흰쥐 발부종 모델에서의 부종 억제 효능 (Wang *et al.*, 1995)이 보고되었고, Staniforth 등 (2004)은 shikonin이 *in vivo*에서 TNF- α 를 억제한다고 보고하였으며, Cheng 등 (2008)은 LPS 유도 Raw 264.7 세포에서의 MAPK/NF- κ B 기전을 통한 shikonin 유도체들의 iNOS 활성 억제 효능을 보고하였다.

본 연구를 통해 지치추출물로부터 분리된 acetylshikonin은 현재 관절염 예방 및 치료제의 주요 타겟으로 알려진 MMPs의 효소활성 억제 및 항염 효과도 나타낸다는 것을 시사하였고, 이를 통해 손상된 연골조직 및 연골세포에 대한 보호효과가 나타나는 것으로 사료된다. 지치초임계추출물 (CMPB803-C)는 상기 MMPs에 대한 활성 억제 효과는 보이지 않았으나, 관절염 모델에서의 관절염 지수를 유의적으로 낮추어 향후 투여 농도, 그의 정확한 작용기전 및 장기 투여 시 안전성 등에 대한 추가적인 연구를 통해 골관절염의 치료와 예방에 효과적으로 활용될 수 있을 것이다.

감사의 글

본 논문은 농촌진흥청 공동연구사업 농업현장실용화기술개발

발 과제(PJ008465)의 지원에 의해 수행된 연구결과의 일부로서 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Ahn YH, Jin YH, Choe CY, Lee MK and Lee S. (2009). Ecological characteristics of *Lithospermum erythrorhizon* population in habitats. Korean Journal of Pharmacognosy. 40:289-297.
- Alaeddine N, Okais J, Ballane L and Baddoura RM. (2012). Use of complementary and alternative therapy among patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. Journal of Clinical Nursing. 21:198-204.
- Altman RD. (2008). The future of herbal medicine in the treatment of osteoarthritis. Osteoarthritis and Cartilage. 16:S10-S11.
- Andújar I, Recio MC, Giner RM and Ríos JL. (2013). Traditional chinese medicine remedy to jury: The pharmacological basis for the use of shikonin as an anticancer therapy. Current Medicinal Chemistry. 20:2892-2898.
- Bar-Yehuda S, Rath-Wolfson L, Del Valle L, Ochaion A, Cohen S, Patoka R, Zozulya G, Barer F, Atar E, Pina-Oviedo S, Perez-Liz G, Castel D and Fishman P. (2009). Induction of an anti-inflammatory effect and prevention of cartilage damage in rat knee osteoarthritis by CF101 Treatment. Arthritis & Rheumatism. 60:3061-3071.
- Berenbaum F. (2013). Osteoarthritis as an inflammatory disease (osteoarthritis is not osteoarthrosis). Osteoarthritis and Cartilage. 21:16-21.
- Billinghurst RC, Wu W, Ionescu M, Reiner A, Dahlberg L, Chen J, van Wart H and Poole AR. (2000). Comparison of the degradation of type II collagen and proteoglycan in nasal and articular cartilages induced by interleukin-1 and the selective inhibition of type II collagen cleavage by collagenase. Arthritis & Rheumatism. 43:664-672.
- Bove SE, Calcaterra S, Huber C, Guzman RE, Schrier DJ and Kilgore KS. (2003). Weight bearing as a measure of disease progression and efficacy of anti-inflammatory compound in a model of monosodium iodoacetate induced osteoarthritis. Osteoarthritis and Cartilage. 11:821-830.
- Burrage PS, Mix KS and Brinckerhoff CE. (2006). Matrix metalloproteinases: Role in arthritis. Frontiers in Bioscience. 11:529-543.
- Chang YS, Kuo SC, Weng SH, Jan SC, Ko FN and Teng CM. (1993). Inhibition of platelet aggregation by shikonin derivatives isolated from *Arnebia euchromoma*. Planta Medica. 59:401-404.
- Cheng HW, Chen FA, Hsu HC and Chen CY. (1995). Photochemical decomposition of alkannin/shikonin enantiomers. International Journal of Pharmaceutics. 120:137-144.
- Cheng YW, Chang CY, Lin KL, Huc CM, Lin CH and Kang JJ. (2008). Shikonin derivatives inhibited LPS-induced NOS in RAW264.7 cells via down-regulation of MAPK/NF- κ B signaling. Journal of Ethnopharmacology. 120:264-271.
- Chung HS, Kang M, Cho C, Park S, Kim H, Yoon YS, Kang J, Shin MK, Hong MC and Bae H. (2005). Inhibition of lipopolysaccharide and interferon-gamma-induced expression of inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor-alpha by *Lithospermum radix* in mouse peritoneal macrophages. Journal of Ethnopharmacology. 102:412-417.
- Combe R, Bramwell S and Field MJ. (2004). The monosodium iodoacetate model of osteoarthritis. Neuroscience Letter. 370:236-240.
- Guzman RE, Evans MG, Bove S, Morenko B and Kilgore K. (2003). Mono-iodoacetate-induced histologic changes in subchondral bone and articular cartilage of rat femorotibial Joints: An animal model of osteoarthritis. Toxicologic Pathology. 31:619-624.
- Han J, Weng X and Bi K. (2008). Antioxidants from a Chinese medicinal herb-*Lithospermum erythrorhizon*. Food Chemistry. 106:2-10.
- Huh JE, Park YC, Seo BK, Lee JD, Baek YH, Choi DY and Park DS. (2012). Cartilage protective and chondrogenic capacity of WIN-34B, a new herbal agent, in the collagenase-induced osteoarthritis rabbit model and in progenitor cells from subchondral bone. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2013:1-12.
- Hwang SY, Hwang BY, Kang SS, Kim CM, Park JH, Bae KH, Son KH, Lee SH, Chang SY, Kang SJ, Ro JS and Lee KS. (2000). Isolation and quantitative analysis of acetylshikonin from *Lithospermum Radix*. Korean Journal of Pharmacognosy. 31:295-299.
- Jhun HJ, Ahn K and Lee SC. (2010). Estimation of the prevalence of osteoarthritis in Korean adults based on the data from the fourth Korea national health and nutrition examination survey. Anesthesia and Pain Medicine. 5:201-206.
- Kim GS, Jeong TS, Kwon BM, Kim YO, Cha SW, Song KS and Baek NI. (2009). Inhibitory effect of acetylshikonin from *Lithospermum erythrorhizon* on LDL oxidation and FPTase activity. Journal of Applied Biological Chemistry. 52:221-225.
- Kim GS, Park CG, Lee KH, Choi J, Lee SE, Noh HJ, Lee JH and Kim SY. (2011). Investigation of shikonin pigments and antioxidant activity of the roots from *Lithospermum erythrorhizon* according to the different growth stages and areas of cultivation. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 19:435-440.
- Kim JY and Kim SH. (2008). Shikonin, acetylshikonin, and isobutyrylshikonin inhibit VEGF-induced angiogenesis and suppress tumor growth in lewis lung carcinoma-bearing mice. Yakugaku Zasshi. 128:1681-1688.
- Kim YO, Hong SJ and Yim SV. (2010). The efficacy of shikonin on cartilage protection in a mouse model of rheumatoid arthritis. Korean Journal of Physiology & Pharmacology. 14:199-204.
- Li D, Yuan T, Zhang X, Xiao Y, Wang R, Fan Y and Zhang X. (2012). Icaritin: A potential promoting compound for cartilage tissue engineering. Osteoarthritis and Cartilage. 20:1647-56.
- Lee HH, Yoon JS and Song SY. (2010). Protective effect of *Lithospermum erythrorhizon* on galactosamine induced liver injury. Korean Journal of Microscopy. 40:29-35.
- Pan YM, Liang Y, Wang HS and Liang M. (2004). Antioxidant activities of several Chinese medicine herbs. Food Chemistry. 88:347-350.
- Piecha D, Weik J, Kheil H, Becher G, Timmermann A, Jaworski A, Burger M and Hofmann MW. (2010). Novel selective MMP-13 inhibitors reduce collagen degradation in bovine articular and human osteoarthritis cartilage explants.

- Inflammation Research. 59:379-389.
- Rajasekar S, Park da J, Park C, Park S, Park YH, Kim ST, Choi YH and Choi YW.** (2012). *In vitro* and *in vivo* anticancer effects of *Lithospermum erythrorhizon* extract on B16F10 murine melanoma. Journal of Ethnopharmacology. 21:335-345.
- Shingleton WD, Ellis AJ, Rowan AD and Cawston TE.** (2000). Retinoic acid combines with interleukin-1 to promote the degradation of collagen from bovine nasal cartilage: Matrix metalloproteinase-1 and 13 are involved in cartilage breakdown. Journal of Cellular Biochemistry. 79:519-531.
- Staniforth V, Wang SY, Shyur LF and Yang NS.** (2004). Shikonins, phytochemicals from *Lithospermum erythrorhizon*, inhibit the transcriptional activation of human TNF- α promoter *in vivo*. The Journal of Biological Chemistry. 279:5877-5885.
- Tian L, Wang Z, Wu H, Wang S, Wang Y, Wang Y, Xu J, Wang L, Qi F, Fang M, Yu D and Fang X.** (2011). Evaluation of the anti-neuraminidase activity of the traditional Chinese medicines and determination of the anti-influenza virus effects of the neuraminidase inhibitory TCMs *in vitro* and *in vivo*. Journal of Ethnopharmacology. 137:534-542.
- Wang JP, Raung SL, Chang LC and Kuo SC.** (1995). Inhibition of hind-paw edema and cutaneous vascular plasma extravasation in mice by acetylshikonin. European Journal of Pharmacology. 272:87-95.
- Weng XC, Xiang GQ, Jiang AL, Liu YP, Wu LL, Dong XW and Duan S.** (2000). Antioxidant properties of components extracted from puccoon(*Lithospermum erythrorhizon* Sieb. et Zucc.). Food Chemistry. 69:143-146.