

MIA로 퇴행성관절염을 유도한 랫드에 방사선 형질전환 차조기가 증상 예방 및 완화에 미치는 효과

심부용^{1,*} · 주인환² · 김성규³ · 지중구^{4,†}

¹중부대학교 바이오융합학부, 강사

²대전대학교 한의과대학, 박사후 연구원

³주에스에프씨바이오

⁴중부대학교 한방보건제약학과, 교수

(2020년 8월 6일 접수: 2020년 8월 24일 수정: 2020년 8월 25일 채택)

Effects of Radiation Mutant *Perilla frutescens* var. *crispa* in Preventing and Alleviating Symptoms in a Monosodium Iodoacetate-Induced Osteoarthritis Rat Model

Boo-Yong Sim^{1,*} · In-Hwan Joo² · Sung-Kyu Kim³ · Joong-Gu Ji^{4,†}

¹Division of Integrated Biotechnology, Joongbu University

²College of Oriental Medicine, Daejeon University

³SFC bio Co., LTD

⁴Department of Herbal Health & Pharmacy, Joongbu University

(Received August 6, 2020; Revised August 24, 2020; Accepted August 25, 2020)

요 약 : 본 연구는 MIA로 퇴행성관절염을 유도한 랫드에 방사선 형질전환 차조기가 골 대사 및 염증 반응에 미치는 효과를 평가하였다. 방사선 형질전환 차조기를 2주 동안 25, 50, 100 mg/kg/day의 용량으로 경구 투여하고 랫드의 우측 관절 내 공간에 MIA를 주입하였다. 이후 동일한 용량을 4주 동안 지속 투여하였다. 혈청 바이오마커와 무릎 관절 분석의 형태학 및 조직병리학적 분석에 기초한 치료 효과를 평가하였다. 대조군 랫드와 비교하였을 때 방사선 형질전환 차조기는 혈청 내 염증 및 골 대사 마커(COX-2, LTB₄, MMP-3, COMP)의 생성량을 유의하게 감소시켰다. 이와는 다르게 TIMP-1 및 calcitonin의 생성이 크게 증가하였다. 또한, 방사선 형질전환 차조기는 무릎 연골과 활막을 효과적으로 보존하였다. 그 결과, 방사선 형질전환 차조기는 퇴행성관절염 증상을 예방하고 완화하였다. 따라서, 방사선 형질전환 차조기는 퇴행성관절염 관리를 위한 식·의약품 소재로 사용될 수 있다.

주제어 : 골 대사, 식·의약품 소재, 방사선 형질전환 차조기, 퇴행성관절염, 항염증

[†]Corresponding author

(E-mail: jjg1970@joongbu.ac.kr)

Abstract : The present study aimed to evaluate the effect of radiation mutant *Perilla frutescens* var. *crispa* on bone metabolism and the inflammatory response in a monosodium iodoacetate-induced rat model of osteoarthritis. radiation mutant *Perilla frutescens* var. *crispa* was administered orally at doses of 25, 50 or 100 mg/kg/day for 2 weeks before direct injection of monosodium iodoacetate (3 mg/50 μ l of 0.9% saline) into the intra-articular space of the rats' right knees. The rats subsequently received the same doses of oral radiation mutant *Perilla frutescens* var. *crispa* for another 4 weeks. It was evaluated that the treatment effects based on serum biomarkers, and morphological and histopathological analysis of the knee joints. Compared with those in control rats, the radiation mutant *Perilla frutescens* var. *crispa* treatments significantly reduced the serum levels of inflammation, bone metabolism markers (i.e., COX-2, LTB₄, MMP-3, and COMP), and the amount of fibrous tissue. Otherwise, it was significantly increased the concentration of TIMP-1 and calcitonin. In addition, the radiation mutant *Perilla frutescens* var. *crispa* treatments effectively preserved the knee cartilage and synovial membrane. As a result, it indicates that radiation mutant *Perilla frutescens* var. *crispa* prevented and alleviated osteoarthritis symptoms. Thus, radiation mutant *Perilla frutescens* var. *crispa* can be used in food and drug material for the management of osteoarthritis.

Keywords : bone metabolism, food and drug material, osteoarthritis, radiation mutant *Perilla frutescens* var. *crispa*, osteoarthritis, anti-inflammatory

1. 서론

대한민국은 2018년에 고령화 사회로 진입함에 따라 인지능력, 뇌혈관, 퇴행성 등 노인성 질환과 관련된 식·의약품 소재개발 연구가 활발하게 진행되고 있다[1]. 특히, 노인성 질환으로 알려진 퇴행성 관절염은 손목, 어깨, 무릎 등 다양한 부위에서 발생하는데, 이 중 가장 많은 발병이 나타나는 무릎 부위는 환자 수와 진료비가 2013년 당시 약 247만 명, 949억 원에서 2018년 기준 약 287만 명, 1,506억 원으로 지속적인 증가가 나타나고 있다[2]. 이처럼 무릎 부위의 퇴행성관절염은 연령 이외에도 비만, 호르몬 변화, 골밀도, 관절의 생역학적 변화 등의 원인으로 무릎 내 염증 및 기질 손상과 같은 기전에 의해 관절 내 이상이 발병함으로써 통증을 수반하는 것이 특징이다[3,4].

현재 퇴행성관절염의 치료는 단순 진통제가 일반적으로 활용되고 있으며, 비스테로이드성 항소염제(NSAID)는 효과적이기는 하나 위장장애, 심혈관 등의 부작용을 일으킬 우려가 있어 안전성과 효능을 동시에 나타내는 천연물 소재 개발을 위한 기초연구가 필요하다[5,6].

차조기(*Perilla frutescens* var. *crispa*)는 꿀풀과(Lamiaceae)에 속하는 일년생의 초본으로 주로 약용작물과 향신채 등으로 활용되고 있으며[7], 대표적 성분인 isoegomaketone은 항암을 비롯한 항염증, apoptosis 등에 효과가 있는 것으로 보고된 바 있다[8-10]. 특히, 본 연구에서 사용된 방사선 형질전환 차조기는 기존 차조기의 지표 성분인 isoegomaketone 함량을 높인 것으로 이전 연구에서 세포실험을 통해 활성산소 및 NF- κ B, COX-2, 염증성 사이토카인 등의 생성을 유의적으로 억제하는 결과를 보고하였으며[11], 백출과의 복합물을 통해 collagen type II로 유도한 류마티스성 관절염 동물모델을 통해 항관절염 효능을 제시한 바 있다[12].

따라서 본 연구에서는 앞선 연구 결과에 착안하여 monosodium iodoacetate (MIA)로 퇴행성관절염을 유도한 동물모델에 차조기 단일추출물을 경구 투여한 후 혈액 바이오마커와 방사선 및 조직병리학적 검사 등을 진행함으로써 퇴행성관절염에 대한 식·의약품 소재로서의 가능성을 평가하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 시료

방사선 형질전환 차조기(이하, 차조기) 추출물은 SFC바이오(Korea)가 충남 예산에서 계약재배를 통해 수확한 잎(수분 82.2%)을 열풍 건조기에서 50°C, 48시간의 조건으로 건조한 건조물(수분 5.8%)을 60 mesh로 분쇄하였다. 이후 파일코일 바이오텍 코리아(주)(Korea)에 의뢰하여 추출(압력 400 bar, 온도 50°C), 분리(압력 40 bar, 온도 40°C), CO₂ 유량(550 ml / 12 min)의 조건에서 총 3시간 동안 초임계 유체 추출을 진행 후 획득한 추출물을 수분 제거하여 4°C에서 냉장 보관하며 실험에 사용하였다.

2.2. 시약 및 기기

시약은 monosodium iodoacetate (MIA ; Sigma, U.S.A.), LTB₄ Parameter Assay Kit (R&D systems, U.S.A.), Rat cyclooxygenase-2 (COX-2) ELISA Kit (Mybiousource, U.S.A.), Rat MMP-3 (Matrix Metalloproteinase 3) ELISA Kit (Mybiousource, U.S.A.), Rat TIMP-1 (TIMP metalloproteinase inhibitor 1) ELISA Kit (Mybiousource, U.S.A.), Rat cartilage oligomeric matrix protein (COMP) ELISA Kit (Mybiousource, U.S.A.), Rat calcitonin (CT) ELISA Kit (Mybiousource, U.S.A.)등을 사용하였다. 또한, 기기는 plate shaker (Lab-Line Co., U.S.A.), ELISA reader (Molecular Devices Co., U.S.A.) 등을 사용하였다.

2.3. 동물 및 사료

본 실험을 위하여 사용된 SD-Rat(6주령, 수컷, 170~200 g)은 라온바이오(Korea)에서 구입하여 사용하였다. 실험동물은 2주간의 안정기를 가지면서 순화를 시켰으며, 안정기 및 실험 기간에 모든 실험군에는 일반 사료(ENVIGO, U.S.A.)를 자유식이 하며 물을 충분히 공급하였다. 2주간의 안정기 이후 8주령부터 동물 실험을 진행하였다. 동물 사육실의 조건은 conventional system으로 22±2°C, 1일 중 12시간은 200~300 Lux로 조명하고, 12시간은 모든 빛을 차단하였다. 본 실험은 동물실험윤리 위원회의 승인 (승인번호 DJUAR2019-030)을 받아 동물윤리준칙에 의거하여 실험하였다.

2.4. 그룹 배분 및 관절염 유발, 시료 투여

실험 그룹은 관절염 유발과 경구 투여를 진행하지 않는 정상군(Normal), 관절염 유발 후 증류수만을 경구투여하는 음성대조군(Negative Control; NC), indomethacin 2 mg/kg/day의 농도로 투여하는 양성대조군(Positive Control; PC), 차조기 추출물을 25, 50, 100 mg/kg/day 농도로 경구투여하는 실험군 등 총 6개의 그룹으로 나누고 그룹당 10마리의 동물을 배정하였다.

시료 투여는 MIA로 관절염을 유발하기 전 음성대조군과 실험군을 매일 1회 2 ml씩 oral zonde를 이용하여 2주간 각각의 시료를 경구 투여하였다. 2주간의 경구 투여가 종료된 이후 실험동물을 마취하고 SD-Rat의 우측 무릎을 제모하여 우측 무릎 관절낭에 0.9% 생리식염수에 용해한 monosodium iodoacetate (MIA)를 당뇨 주사기에 넣어 3mg/50 µl씩 주입함으로써 관절염을 유발하였다. 관절염 유발 후 양성대조군을 포함하여 추가로 4주간 경구 투여를 진행하였다.

2.5. 혈액 분석

실험 종료 후 심장에서 채혈한 혈액을 30분간 상온에서 굳혀 3,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 혈청을 분리한 후 혈청 바이오마커 측정에 필요한 용량만큼 1.5 ml tube에 넣어 초저온 냉동고 (-80°C)에 보관하였다.

2.5.1. MMP-3 및 TIMP-1 생성량 측정

96 well plate에 분리한 혈청과 standard를 각각 100 µl씩 넣고 37°C에서 90분간 반응시키고 세척 작업 후 detection antibody를 각각 100 µl씩 추가하여 37°C에서 60분간 반응시켰다. 다시 세척 작업을 진행하고 HRP-conjugate를 각각 100 µl씩 넣어 37°C에서 30분간 반응시킨 뒤 세척하였다. Substrate reagent를 90 µl씩 넣은 후, 빛을 차단하여 37°C에서 15분간 반응시키고 stop solution를 50 µl씩 추가하여 ELISA reader 기기에서 450 nm로 흡광도를 측정하였으며, standard curve 기준 결과 값을 확보하였다.

2.6.2. LTB₄ 생성량 측정

96 well plate에 분리한 혈청과 standard를 각각 50 µl씩 넣고 antibody solution을 50 µl씩 추가하여 상온에서 60분간 반응시킨 뒤 conjugate를 50 µl씩 추가하여 상온에서 180분간 반응시켰다. 세척 작업 후 substrate solution을 200 µl씩 넣

은 후, 빛을 차단하여 37°C에서 30분간 반응시키고 stop solution를 100 μ l씩 추가하여 ELISA reader 기기에서 450 nm로 흡광도를 측정하였으며, standard curve 기준 결과 값을 확보하였다.

2.6.3. COX-2 및 COMP 생성량 측정

96 well plate에 분리한 혈청과 standard를 각각 100 μ l씩 넣고 37°C에서 90분간 반응시키고 세척 작업 후 antibody를 각각 100 μ l씩 넣고 37°C에서 60분간 반응시켰다. 다시 세척 작업을 진행하고 enzyme-conjugate를 각각 100 μ l씩 넣어 37°C에서 30분간 반응시킨 뒤 세척하였다. Color reagent A와 B를 각각 50 μ l씩 넣은 후, 빛을 차단하여 37°C에서 15분간 반응시키고 color reagent C를 100 μ l씩 추가하여 ELISA reader 기기에서 450 nm로 흡광도를 측정하였으며, standard curve를 기준 결과 값을 확보하였다.

2.6.3. Calcitonin 생성량 측정

96 well plate에 분리한 혈청과 standard를 각각 50 μ l씩 넣고 HRP-conjugate를 100 μ l씩 넣어 37°C에서 60분간 반응시키고 세척 작업 후 chromogen solution A와 B를 각각 50 μ l씩 넣은 후, 빛을 차단하여 37°C에서 15분간 반응시켰다. 이후, stop solution을 50 μ l씩 추가하여 ELISA reader 기기에서 450 nm로 흡광도를 측정하였으며, standard curve를 기준 결과 값을 확보하였다.

2.7. Micro-CT 촬영 및 조직 병리 검사

실험 종료 후 우측 대퇴골과 경골 부위를 절단하고 피부 및 근육을 제거하여 10% 포르말린에 고정된 조직을 시험 검사 기관인 KPNT (Korea)에 Micro-CT와 조직 염색을 의뢰하였다. 이후, Micro-CT 촬영 결과를 3D로 변환하여 연골 부위를 판독하였다.

Micro 촬영이 종료된 조직을 H&E 염색과 Safranin-O 염색하여 슬라이드 제작과 스캐닝 작업을 진행하고 Motic DSAssistant (Motic VM V1 Viewer 2.0, HK) 프로그램을 통해 조직 관찰과 이미지 추출을 진행하였다.

2.8. 통계처리

모든 실험 결과는 평균값±표준편차(mean±S.D)로 표시하였다. 그룹별 비교는 one-way analysis of variance (ANOVA) 방법을 이용하였고,

student's t-test를 사용하여 통계적 유의성을 검증하였다(*** p <0.001, ** p <0.01, * p <0.05).

3. 결과 및 고찰

3.1. MMP-3 및 TIMP-1 생성량

퇴행성관절염은 제2형 교원질, 프로테오글리칸(proteoglycan, 단백질당), 물, 당단백 등 관절연골을 대부분 구성하는 연골 기질의 분해로 인해 발생하는 질환이다[2]. 이러한 연골 기질을 분해하는 matrix metalloproteinase (MMP) family의 과도한 생산이 관절염 유발과 악화에 주된 원인이며, 반대로 길항작용을 통해 MMP의 과생성을 억제하는 tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)는 관절염 유발을 방어하는 매개체로써 TIMP 대비 MMP 생성량의 변화가 연골 파괴 발생을 결정하게 된다[7,13].

특히, Laver 등의 연구에 따르면, 퇴행성 관절염 환자의 역학조사 결과에서 무릎 연골과 혈액에서 MMP-3 바이오마커 발현이 특징적으로 나타난다고 보고하여, MMP-3와 TIMP 생성 변화는 관절염 질환의 발병과 방어에 중요한 매개체라 할 수 있다[14].

본 연구 종료 후 혈청 내 MMP-3 및 TIMP-1 생성량을 확인한 결과, 차조기 추출물은 음성대조군 대비 모든 농도에서 MMP-3 생성을 억제와 TIMP-1 생성을 증가시켰으며, 특히 양성대조군으로 사용된 indomethacin보다 우수한 결과가 나타났다(Fig. 1). 이와 같은 결과는 차조기 추출물의 섭취가 MMP와 TIMP 생성의 길항작용을 통해 퇴행성관절염의 주된 증상이자 원인인 연골 파괴에 관한 방어와 개선에 도움을 줄 수 있으며, 나아가 치료제로 활용되는 양성대조군과 유사하거나 우수한 결과는 상대적으로 부작용이 적다고 알려진 천연물이라는 측면에서 효능과 안전성을 동시에 갖는 식·의약품 소재로서의 활용 가치가 높을 것으로 기대된다.

3.2. LTB₄ 및 COX-2 생성량

퇴행성관절염 증상은 초기 단계가 지나면 관절이 붓고 지속적인 통증을 수반하게 되는데[4], LTB₄와 COX-2는 관절의 통증과 염증 증상에 관여하는 대표적 매개체로써 LTB₄는 인체의 염증 촉진 화학 주성 인자로 관절염, 치주염 등과 같은 질환에서 증가하는 혈액 지표이며[15,16],

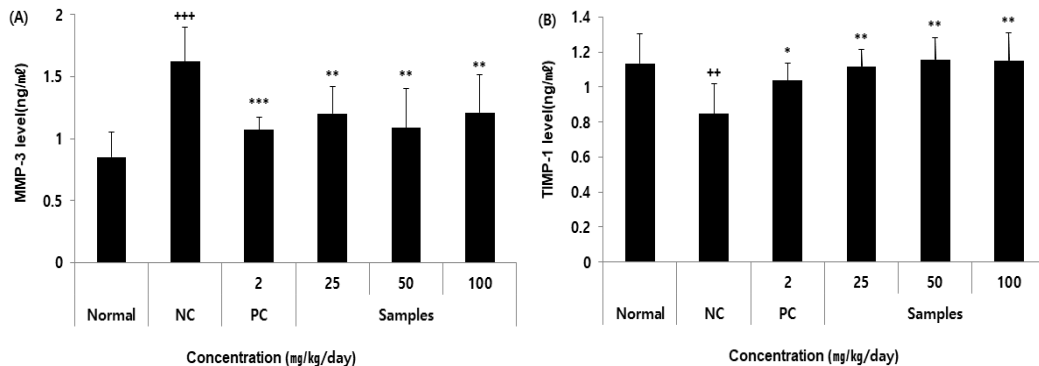


Fig. 1. Effects of radiation mutant *Perilla frutescens* var. *crispa* on the serum level of matrix metalloproteinase-3 (A) and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (B) in a monosodium iodoacetate-induced rat model of osteoarthritis. Enzyme-linked immunosorbent assays was used to measure the serum levels of metalloproteinase-3 (MMP-3) and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1). The measured levels were expressed as the mean \pm standard deviation ($n = 10$ /group). $+++p < 0.001$, $++p < 0.01$ indicates a significant difference from the normal group, $***p < 0.001$, $**p < 0.01$, $*p < 0.05$ indicates a significant difference from the negative control group (NC).

COX-2는 염증 조절, 혈관 수축, 염증 해소 등에 관여하는 스프로스타노이드(prostanoid)의 전환 촉매제로, 연골세포의 염증과 손상된 조직의 통증에 관여한다[17].

본 연구 종료 후 혈청 내 LTB_4 및 COX-2 생성량을 확인한 결과, 차조기 추출물은 음성대조군 대비 LTB_4 생성을 50, 100 mg/kg/day 농도에서, COX-2 생성은 모든 농도에서 억제하여 LTB_4 의 25 mg/kg/day를 제외하고는 양성대조군과 유사한 효능이 나타났다(Fig. 2). 이와 같은 결과는 차조기 추출물의 섭취가 50 mg/kg/day의 농도 이상이 LTB_4 및 COX-2 생성을 동시에 억제할 수 있는 최적의 농도이며, 퇴행성관절염의 또다른 발병 원인 중 하나인 염증 연관 매개체 감소에 의한 개선 효과를 보여주고 있다. 특히, 현재 실제 임상에서 치료제로 많이 사용되고 있는 NSAIDs 치료제의 주요 치료 기전이 COX-2 활성 억제를 통한 치료이며, 양성대조군인 indomethacin이 NSAIDs 계열이라는 점에서 본 연구 결과는 앞선 연골 파괴 관련 지표 결과와 더불어 퇴행성관절염에 활용 가능한 소재로서의 가능성을 더욱 증명하고 있다[18].

3.3. COMP 및 calcitonin 생성량

COMP는 관절 조직 또는 연골 세포 외 기질

의 분해 시 혈액으로 방출된 후 혈청에 흡수되는 인자로서, 임상에서 관절염의 진행 여부 판단에 활용되는 혈액학적 바이오마커이다[19]. 반대로 갑상선에서 분비하는 calcitonin은 뼈를 구성하는 칼슘의 손실을 예방하는 호르몬으로, 혈액을 통해 칼슘이 뼈로 유입되어 관절의 손상 시 이를 보완하는 역할을 한다[20].

본 연구 종료 후 혈청 내 COMP 및 calcitonin 생성량을 확인한 결과, 차조기 추출물은 음성대조군 대비 모든 농도에서 COMP 생성을 억제하였으며, calcitonin 생성은 50, 100 mg/kg/day 농도에서 증가시켜 calcitonin의 25 mg/kg/day를 제외한 농도에서 양성대조군보다 우수한 효능이 나타났다(Fig. 3). 이와 같은 결과는 차조기 추출물의 섭취는 앞서 진행한 염증 관련 지표 분석과 부합되는 50 mg/kg/day 농도 이상에서 퇴행성관절염 유관 지표의 유의적인 효과를 통해 예방과 개선이 진행되고 있음을 COMP 및 calcitonin 결과를 통해 보여주고 있다. 특히, calcitonin 생성은 음성대조군과 양성대조군 사이에 유의성이 나타나지는 않았으나, 차조기 추출물이 유의적으로 증가하고 있는 점은 매우 고무적이며, 기존 치료약물이 가진 기전과는 달리 개발 범위를 높일 수 있는 신규 치료제로서의 가능성을 보여주고 있다.

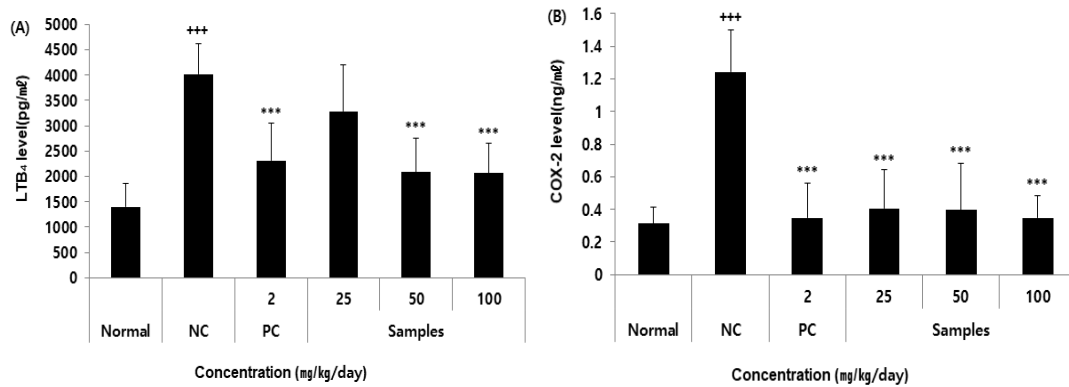


Fig. 2. Effects of radiation mutant *Perilla frutescens* var. *crispa* on the serum level of leukotriene B₄(A) and cyclooxygenase-2(B) in a monosodium iodoacetate-induced rat model of osteoarthritis. Enzyme-linked immunosorbent assays was used to measure the serum levels of leukotriene B₄ (LTB₄) and cyclooxygenase-2 (COX-2). The measured levels were expressed as the mean±standard deviation ($n = 10/\text{group}$). $^{+++}p < 0.001$ indicates a significant difference from the normal group, $^{***}p < 0.001$ indicates a significant difference from the negative control group (NC).

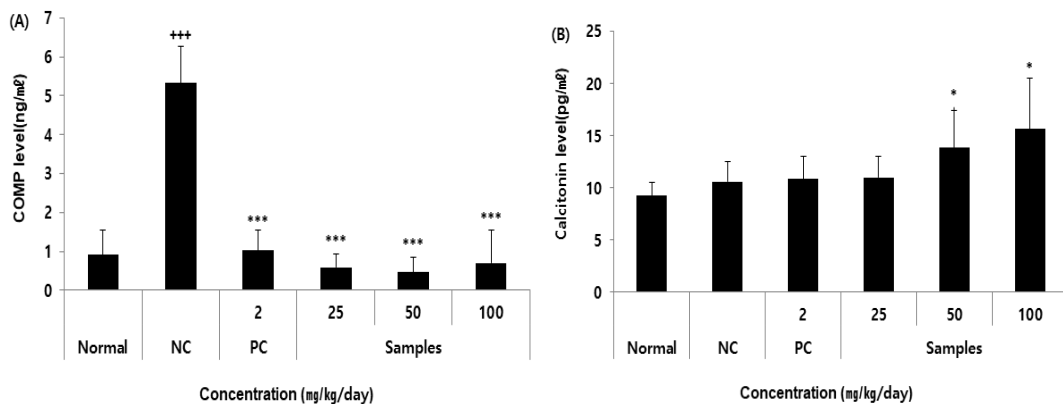


Fig. 3. Effects of radiation mutant *Perilla frutescens* var. *crispa* on the serum level of cartilage oligomeric matrix protein(A) and calcitonin(B) in a monosodium iodoacetate-induced rat model of osteoarthritis. Enzyme-linked immunosorbent assays was used to measure the serum levels of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) and calcitonin. The measured levels were expressed as the mean±standard deviation ($n = 10/\text{group}$). $^{+++}p < 0.001$ indicates a significant difference from the normal group, $^{***}p < 0.001$, $^*p < 0.05$ indicates a significant difference from the negative control group (NC).

3.4. 방사선 및 조직병리학 검사

본 연구 종료 후 진행한 무릎 관절의 micro CT 촬영을 진행한 결과, 정상군 대비 음성 및 양성 대조군과 실험군의 연골 양(cartilage volume)이 많이 감소한 것을 확인할 수 있었으나 상대적으로

로 실험군이 음성대조군보다 연골 양이 더 보존된 것이 확인되었다. 또한, 음성 및 양성대조군과 실험군은 정상군 대비 대퇴골의 하단 측의 골의 부식과 파괴가 심하게 일어났으나 실험군은 음성군보다 골의 부식이나 파괴가 적은 것이 확인되

었다(Fig. 4A).

조직병리학 검사를 위해 H&E 염색을 진행한 결과, 정상군 대비 음성 및 양성대조군, 실험군은 micro CT 결과와 동일하게 연골(Fig. 4B-원형)의 소실이 많고 연골 주변으로 침윤 세포(infiltrating cells, Fig. 4B-세모)가 많이 생성된 것을 확인할 수 있었으나 상대적으로 실험군이 음성대조군보다 침윤 세포의 범위나 밀집도(Fig. 4B-네모)가 적음이 관찰되었다(Fig. 4B). 또한, Safranin-O 염색을 진행한 결과, 정상군 대비 음성 및 양성대조군, 실험군은 연골(cartilage) 주변과 활막(synovial membrane) 내에 붉은색으로 염색된 proteoglycan(Fig. 4C-화살표)이 고르게 형성되어 있지 않게 형성된 것이 관찰되었으나 상대적으로 실험군은 음성대조군보다 연골 주변과 활막 내 proteoglycan(Fig. 4C-원형)의 분포가 많음이 관찰되었다(Fig. 4C). 이와 같은 결과는 차조기 추출물의 투여가 혈액 바이오마커를 통해 확인된 퇴행성관절염의 예방과 개선에 관한 농도의 의존적인 결과가 방사선 및 조직병리학 검사 결과를 근거로 증명하고 있다.

4. 결론

본 연구는 방사선 형질전환 차조기의 초임계 유체 추출물(이하, 차조기 추출물)이 퇴행성관절염 질환의 식·의약품 소재로서 활용 가능성을 객관적으로 검증하고자 혈액 바이오마커 분석, 방사선 및 조직학적 평가 등을 진행한 결과는 다음과 같다.

퇴행성관절염 유발 2주 전과 유발 후 4주 동안 차조기 추출물을 25, 50, 100 (mg/kg/day) 농도로 투여 후 진행한 혈액 바이오마커 평가에서 음성대조군 대비 MMP-3와 COX-2, COMP 생성을 모든 농도에서, LTB4 생성은 50, 100 (mg/kg/day) 농도에서 유의적으로 억제시켰다. 또한, TIMP-1 생성은 모든 농도에서, calcitonin 생성은 50, 100 (mg/kg/day) 농도에서 유의적으로 증가시켰다. 마지막으로 진행된 방사선 및 조직병리학 검사에서 차조기 추출물은 음성대조군 대비 연골 양이 더 많게 보존되었으며, 골 끝의 부식과 파괴, 침윤 세포의 범위나 밀집도가 적은 것이 확인되었고, 연골 주변의 proteoglycan 분포가 많은 것이 관찰되었다.

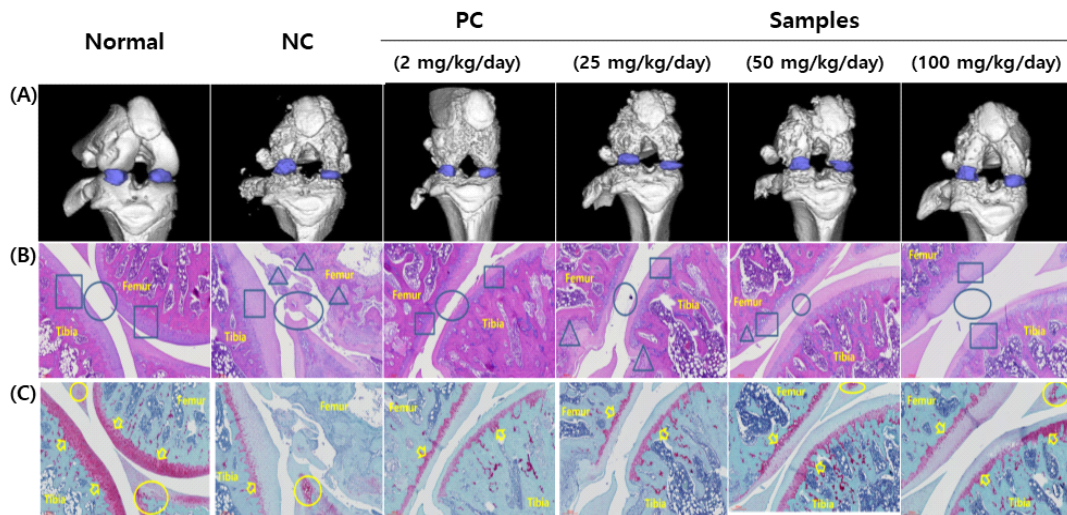


Fig. 4. Effects of radiation mutant *Perilla frutescens* var. *crispa* on the micro CT(A) and histopathological(B, C) in a monosodium iodoacetate-induced rat model of osteoarthritis. Representative morphological(A) and histological(B, C) images of the knee joint tissues were obtained by three-dimension micro-computed tomography or stained using hematoxylin and eosin (B) or Safranin-O (C) (magnification, 200x).

이상의 결과를 종합해 볼 때, 차조기는 앞선 세포실험을 통해 진행된 안전성과 염증성 매개체의 감소 연구 결과와 더불어 동물을 활용한 퇴행성관절염 관련 혈액 매개체와 방사선, 조직병리학적으로 효능 등 전임상 단계에서 식·의약품 소재로서의 가능성이 과학적으로 확보되었다. 이와 같은 결과를 바탕으로 건강기능식품 또는 의약 소재개발을 위해 추가로 필요한 투여용량 설정실험, 독성 평가, 인체 적용시험(임상 1상) 등의 연구를 진행할 수 있는 유의적인 결과가 증명되었기에 본 연구 결과는 퇴행성관절염에 관한 기초적 자료로 다양하게 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 산업통상자원부와 한국산업기술진흥원이 지원하는 광역협력권산업육성사업(2019-P0006184)으로 수행된 연구 결과입니다.

References

1. National Statistical Office(NSO), Statistics of Senior Citizens, (2019).
2. National Health Insurance Service, Korean Statistical Information Service [Internet], Available From: http://kosis.kr/statHtml/statHtml.do?orgId=350&tblId=DT_35001_A074111&conn_path=I2. (accessed Dec., 18, 2019).
3. S. Glyn-Jones, A. J. R. Palmer, R. Agricola, A. J. Price, T. L. Vincent, H. Weinans, A. J. Carr, "Osteoarthritis", *The Lancet*, Vol. 386, No. 9991, pp. 376-387, (2015).
4. B. J. Park, H. J. Choi, B. Y. Sim, M. Y. Yun, I. H. Yoo, D. H. Kim, "Effects of KV Pharmacopuncture on MIA-induced Osteoarthritis Rat", *Journal of Physiology & Pathology in Korean Medicine*, Vol. 31, No. 1, pp. 46-51, (2017).
5. W. Zhang, G. Nuki, R. W. Moskowitz, S. Abramson, R. D. Altman, N. K. Arden, M. Dougados, "OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis: part III: Changes in evidence following systematic cumulative update of research published through January 2009", *Osteoarthritis and cartilage*, Vol. 18, No. 4, pp. 476-499, (2010).
6. A. Ghouri, P. G. Conaghan, "Prospects for Therapies in Osteoarthritis", *Calcified Tissue International*, 1-12. (2020).
7. Y. I. Lee, I. C. Shin, I. K. Lee, D. S. Kim, "Variation of Leaf Pigment Contents in Progenies of Perilla Mutants Induced by Gamma Ray", *Plant Breeding & Biotechnology*, Vol. 31, No. 2, pp. 110-113, (1999).
8. M. Hosoi, M. Ito, T. Yagura, R. P. Adams, G. Honda, "cDNA isolation and functional expression of myrcene synthase from *Perilla frutescens*", *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, Vol. 27, No. 12, pp. 1979-1985. (2004).
9. C. H. Jin, H. J. Lee, Y. D. Park, D. S. Choi, D. S. Kim, S. Y. Kang, I. Y. Jeong, "Isoegomaketone inhibits lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages through the heme oxygenase-1 induction and inhibition of the interferon- β -STAT-1 pathway", *Journal of agricultural and food chemistry*, Vol. 58, No. 2, pp. 860-867, (2009).
10. B. O. Cho, C. H. Jin, Y. D. Park, H. W. Ryu, M. W. Byun, K. I. Seo, I. Y. Jeong, "Isoegomaketone induces apoptosis through caspase-dependent and caspase-independent pathways in human DLD1 cells", *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, Vol. 75, No. 7, pp. 1306-1311, (2011).
11. B. Y. Sim, J. H. Park, S. K. Kim, J. G. Ji, "Effects of anti-inflammatory on *Perilla frutescens* var. *crispa* Induced by mutants with γ -Ray". *Journal of the Korean Applied Science and Technology*, Vol. 36, No. 2, pp. 488-497, (2019).
12. M. H. Park, C. J. Kim, J. Y. Lee, C. Y. Keum, I. S. Kim, C. H. Jin, S. K. Kim, "Anti-Arthritic Effect of Radiation Mutant *Perilla frutescens* var. *crispa* and *Atractylodes*

- macrophala koidz”, *Journal of the Korean Applied Science and Technology*, Vol. 37, No. 1, pp. 102–113, (2020).
13. S. Y. Jin, S. S. Kang, D. W. Lee, S. J. Yim, Y. H. Yun, B. I. Lee, “Expression of Matrix Metalloproteinase (MMP)-1, MMP-3 Nitrotyrosine and Apoptosis in Articular Cartilage of Human Osteoarthritis”, *The Korean Journal of Pathology*, Vol. 35, No. 4, pp. 319–329, (2001).
 14. I. Pengas, S. Eldridge, A. Assiotis, M. McNicholas, J. E. Mendes, L. Laver, “MMP-3 in the peripheral serum as a biomarker of knee osteoarthritis, 40 years after open total knee meniscectomy”, *Journal of experimental orthopaedics*, Vol. 5, No. 1, p. 21, (2018).
 15. M. Peters-Golden, W. R. Henderson Jr, “Leukotrienes”, *New England Journal of Medicine*, Vol. 357, No. 18, pp. 1841–1854, (2007).
 16. V. Karlapudi, A. V. V. Prasad Mungara, K. Sengupta, B. A. Davis, S. P. Raychaudhuri, “A placebo-controlled double-blind study demonstrates the clinical efficacy of a novel herbal formulation for relieving joint discomfort in human subjects with osteoarthritis of knee”, *Journal of medicinal food*, Vol. 21, No. 5, pp. 511–520, (2018).
 17. G. D. Anderson, K. L. Keys, P. A. De Ciechi, J. L. Masferrer, “Combination therapies that inhibit cyclooxygenase-2 and leukotriene synthesis prevent disease in murine collagen induced arthritis”, *Inflammation Research*, Vol. 58, No. 2, pp. 109–117, (2009).
 18. N. E. Lane, “Pain management in osteoarthritis: the role of COX-2 inhibitors”, *Journal of Rheumatology*, Vol. 24, No. 49, pp. 20–24, (1997).
 19. M. Reijman, J. M. W. Hazes, S. M. A. Bierma-Zeinstra, B. W. Koes, S. Christgau, C. Christiansen, H. A. P. Pols, “A new marker for osteoarthritis: cross-sectional and longitudinal approach”, *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology*, Vol. 50, No. 8, pp. 2471–2478, (2004).
 20. M. A. Karsdal, B. C. Sondergaard, M. Arnold, C. Christiansen, “Calcitonin affects both bone and cartilage: a dual action treatment for osteoarthritis?”, *Annals of the New York Academy of Sciences*, Vol. 1117, No. 1, pp. 181–195, (2007).