

방사선 형질전환 차조기와 백출 복합추출물이 퇴행성관절염 관련 매개체에 미치는 영향

심부용^{1,*} · 주인환² · 김성규³ · 지중구^{4,†}

¹중부대학교 바이오융합학부, 강사

²대전대학교 한의과대학, 박사후 연구원

³(주)에스에프씨바이오

⁴중부대학교 한방보건제약학과, 교수

(2021년 4월 3일 접수: 2021년 4월 23일 수정: 2021년 4월 26일 채택)

Effects of Radiation Mutant *Perilla frutescens* var. *crispa* and *Attractylodes macrocephala* Koidzumi Complex Extract on the Mediators Related to Degenerative Arthritis

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 April 3, 2021; Revised April 23, 2021; Accepted April 26, 2021)

요 약 : 본 연구는 방사선 형질전환 차조기와 백출복합물(차조기 복합물)이 퇴행성관절염 관련 매개체에 미치는 영향을 확인하고자 MIA(monosodium iodoacetate)로 퇴행성관절염을 유도한 랫드로 평가하였다. 차조기 복합추출물을 2주 동안 25, 50, 100 mg/kg/day의 용량으로 경구 투여하고 랫드의 우측 관절 내 공간에 MIA를 주입한 후 동일 용량을 4주 동안 지속 투여하였다. 이후, 혈청 바이오마커와 무릎 관절 분석의 형태학 및 조직병리학적 분석에 기초한 치료 효과를 평가하였다. 대조군 랫드와 비교하였을 때 차조기 복합추출물은 혈청 내 염증 및 골 대사 마커(TNF- α , MMP-3, COX-2, PGE₂, COMP, Aggrecan)의 생성량을 유의하게 감소시켰다. 이와는 반대로 연골 흡수 매개체인 CTX-2 생성을 증가시켰으며, 방사선 형질전환 차조기는 무릎 연골과 활막을 효과적으로 보존하였다. 그 결과, 차조기 복합물은 퇴행성관절염 증상을 개선하였다. 따라서, 차조기 복합물은 퇴행성관절염 관리를 위한 식품소재로 사용될 수 있다.

주제어 : 골 대사, 백출, 방사선 형질전환 차조기, 식품 소재, 퇴행성관절염

[†]Corresponding author

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

Abstract : The present study aimed to evaluate the effects of radiation mutant *Perilla frutescens* var. *crispa* and *Atractylodes macrocephala* Koidzumi complex extract (*Perilla frutescens* var. *crispa* complex extract) on the mediators related to degenerative arthritis in a monosodium iodoacetate-induced rat model of degenerative arthritis. *Perilla frutescens* var. *crispa* complex extract 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 *Perilla frutescens* var. *crispa* complex extract for another 4 weeks. It was evaluated that the treatment effects based on serum bio-markers, and morphological and histopathological analysis of the knee joints. Compared with those in negative control rats, the *Perilla frutescens* var. *crispa* complex extract treatments significantly reduced the serum levels of inflammation, bone metabolism markers (i.e., TNF- α , MMP-3, COX-2, PGE₂, COMP, and Aggrecan). Otherwise, it was significantly increased the production of CTX-2 in cartilage absorption mediators. In addition, the *Perilla frutescens* var. *crispa* complex extract treatments effectively preserved the knee cartilage and synovial membrane. As a result, it indicates that the *Perilla frutescens* var. *crispa* complex extract improved degenerative arthritis symptoms. Thus, the *Perilla frutescens* var. *crispa* complex can be used in food material for the management of degenerative arthritis.

Keywords : bone metabolism, *Atractylodes macrocephala* Koidzumi, radiation mutant *Perilla frutescens* var. *crispa*, food material, degenerative arthritis

1. 서론

한국경제연구원 보도자료에 따르면, 대한민국은 OECD 국가 중 최근 10년간 고령 인구 증가속도가 가장 빠른 것으로 나타나 노인성 질환에 대한 관심도가 고조되고 있다[1].

다양한 노인성 질환 중 관절 질환은 고령화로 인해 호르몬 변화 및 골밀도 저하, 관절 변화 등이 발생하여 연골 감소, 골 관련 기질 손상, 통증을 수반되는 질환으로 알려져 있다[2,3].

2018년 통계청의 '65세 이상 노인 질병 급여현황' 자료에 따르면, 관절(연골) 관련 질환은 무릎관절증(5위)을 포함한 14개 질환에 관한 진료 인원과 진료비 등이 타 질환 대비 높게 형성되어 사회·경제적 손실이 많은 것으로 보고되어 관절 질환에 관한 소재개발의 필요성을 보여주고 있다[4]. 이와 같은 관절 질환 개선을 위한 노력은 식품 업계에서도 활발하게 진행되고 있는데, 최근에는 기존의 관절 맞춤형 건강기능식품뿐만 아니라 유동식, 분말식, 점도 증진제 등과 같은 유형의 고령친화식과 관절-면역, 관절-영양 등과 같은 복합 기능을 가진 제품 개발도 진행되고 있어 신규 소재는 정제되어 있는 식품계의 활로 모색과

함께 국민의 사회적 비용 감소가 동시에 가능하다. 특히, 2017년 한국농촌경제연구원의 '고령친화식품시장 현황 및 활성화 방안' 자료에 따르면, 관절염 질환은 고령친화식품 형성과 활성화로 연간 총 505억 원의 사회적 질병비용을 줄일 수 있다고 보고하여 안전성과 효능이 입증된 소재개발의 중요성을 더욱 뒷받침하고 있다[5].

본 연구에서 사용된 차조기(*Perilla frutescens* var. *crispa*)와 백출(*Atractylodes macrocephala* Koidzumi)을 살펴보면, 차조기는 방사선 형질전환을 통해 항염증, 항암 효능을 갖는 지표 물질인 isoegomaketone을 높여 COX-2, 염증성 사이토카인 등의 매개체 감소시켰으며, 백출과의 복합물은 collagen type II로 유도한 류마티스성 관절염 동물모델에서의 효능과 파골세포의 분화 억제 효과가 확인되어 퇴행성관절염에 관한 가능성을 나타낸 바 있다[6-10].

따라서 본 연구에서는 앞선 차조기와 백출 복합물 연구의 가설을 실험적으로 입증하고자 퇴행성관절염을 유도한 동물 모델을 통해 항염증과 연골과 골 대사 등의 바이오마커의 혈액학적 평가와 더불어 micro-CT, 조직 염색 등을 통한 방사선·조직학적 평가를 진행하였고 이에 대한 유의

미한 결과가 도출되어 식품 소재로서의 과학적 근거를 제공하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 시료

방사선 형질전환 차조기는 SFC 바이오 (Korea)에서 충남 예산에 계약재배를 통하여 재배 후 수확하였으며, 건조물을 제분하여 초임계 추출에 사용하였으며, 백출은 동명당제약 (Korea)에서 구매 후 제분하여 사용하였다. 초임계 유체 추출은 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 진행하였다. 추출 후 수분을 제거한 원료를 -4°C에서 냉장 보관하며 실험에 이용하였다. 차조기와 백출 복합추출물(이하, 차조기 복합물)은 각각의 추출물을 혼합하여 제조하였으며, 차조기와 백출의 지표 물질인 isogomaketone (IK), atracylenolide I의 함량이 각각 18-27 mg/g, 2.8-4.2 mg/g이 되도록 제조하여 사용하였다(Fig. 1). 이후 제조된 혼합물을 -18°C에서 냉동 보관하며 실험에 이용하였다.

2.2. 시약 및 기기

시약은 monosodium iodoacetate (MIA ; Sigma, U.S.A.), Rat TNF- α ELISA Kit (Komabiotech Co., Korea), PGE₂ (Prostaglandin E2) ELISA kit (Elabscience Co., U.S.A.), Rat COX-2 (cyclooxygenase-2) ELISA Kit (Mybiousource, U.S.A.), Rat MMP-3 (Matrix Metalloproteinase 3) ELISA Kit (Mybiousource, U.S.A.), Rat CTX-II (Rat Cross-Linked C-Terminal Telopeptides of Type II Collagen) ELISA Kit (Mybiousource, U.S.A.), Rat COMP (cartilage oligomeric matrix protein) ELISA Kit (Mybiousource, U.S.A.), Rat aggrecan ELISA Kit (Mybiousource, U.S.A.) 등을 사용하였으며, 기기는 ELISA reader (Molecular Devices Co., U.S.A.)를 사용하였다.

2.3. 동물 및 사료

본 실험을 위하여 사용된 SD-Rat(6주령, 수컷, 170~200 g)은 라온바이오(Korea)에서 구매하여 사용하였다. 실험동물은 2주간의 안정기를 가지

면서 순화를 시켰으며, 안정기 및 실험 기간에 모든 실험군에는 일반 사료(ENVIGO, U.S.A.)를 자유 식이하며 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 DJUAR2020-035)을 받아 동물윤리준칙에 의거하여 실험하였다.

2.4. 그룹 배분 및 관절염 유발, 시료 투여

실험 그룹은 관절염 유발과 경구 투여를 진행하지 않는 정상군(이하, Normal로 표기), 관절염 유발 후 증류수만을 경구투여하는 음성대조군 (Negative Control: 이하, NC로 표기), indomethacin 2 mg/kg/day의 농도로 투여하는 양성대조군(Positive Control: 이하, PC로 표기), 차조기+백출 복합물(이하, 차조기 복합물, Complex extract로 표기)을 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 3 mg/50 μ l씩 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 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. TNF- α 생성량 측정

96 well plate에 분리한 혈청과 standard를 각각 100 μ l씩 넣고 37°C에서 120분간 반응시키고 세척 작업 후 detection antibody를 각각 100 μ l씩 추가하여 37°C에서 120분간 반응시켰다. 다시

세척 작업을 진행하고 Streptavidin-HRP 용액을 100 μ l씩 넣어 37°C에서 30분간 반응시킨 뒤 세척하였다. 이후 TMB 용액과 stop solution 용액을 순차적으로 각각 100 μ l씩 넣은 후, ELISA reader 기기에서 450 nm로 흡광도를 측정하였으며, standard curve 기준 결과 값을 확보하였다.

2.5.2. MMP-3 생성량 측정

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

2.5.3. PGE₂ 생성량 측정

96 well plate에 분리한 혈청과 standard를 각각 50 μ l씩 넣고 Biotynylated Detection AB working solution을 50 μ l씩 추가하여 37°C에서 45분간 반응시킨 뒤 세척하였다. 세척 작업 후 HRP Conjugate working solution을 100 μ l씩 넣은 후 37°C에서 30분간 반응시키고 세척하여 Substrate reagent를 90 μ l씩 넣은 후, 빛을 차단하여 37°C에서 15분간 반응시키고 stop solution를 50 μ l씩 추가하여 ELISA reader 기기에서 450 nm로 흡광도를 측정하였으며, standard curve 기준 결과 값을 확보하였다.

2.5.4. COX-2 및 COMP, CTX-II, Aggrecan 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. 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-CT 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.

2.7. 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. TNF- α 및 MMP-3 생성량

퇴행성관절염은 염증세포가 매개되어 TNF- α 와 같은 사이토카인에 의해 연골세포와 활막 세포로부터 연골 기질을 분해하는 MMP의 합성이 촉진되어 관절 연골의 구성요소인 proteoglycan (단백당)과 collagen의 분해를 촉진시키는 것이 중요한 병인으로 알려져 있다[2,11]. 실제 퇴행성관절염 환자의 역학조사 결과, 혈액과 연골에서 MMP-3의 발현이 높아 MMP-3와 TNF- α 의 생성 감소는 퇴행성관절염 개선에 중요하다고 할 수 있다[12].

본 연구에서 관절염 동물의 TNF- α 및 MMP-3 생성량을 확인한 결과, 차조기 복합물의 투여는 음성대조군 대비 TNF- α 생성(약 21~42%, Fig. 1A)과 MMP-3 생성(약 29~30%, Fig. 1B)을 모든 투여군에서 유의적인(** p <0.01, * p <0.05) 억제 효과가 나타났으며, 농도의존적으로 양성대조군으로 사용된 indomethacin과 유사한 결과가 나타났다(Fig. 1). 이와 같은 결과는 차조기 복합물의 섭취가 퇴행성관절염의 주된 병인 기전인 TNF- α 와 MMP-3의 상관관계를 볼 때 연골 기질의 파괴 요인인 MMP-3 생성을 미연에 방지하여 연골 보호 효능을 나타낼 수 있음

을 보여주고 있으며, 나아가 양성대조군과의 유사한 결과는 천연물의 장점을 활용한 소재로서 활용도가 높을 것으로 기대된다.

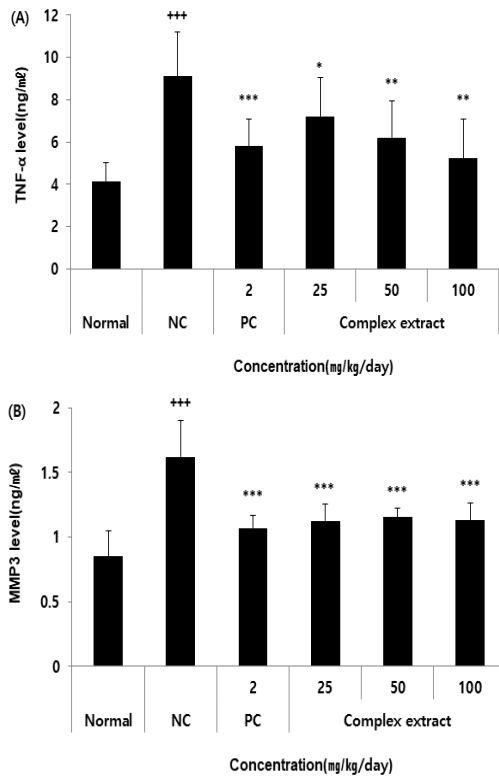


Fig. 1. Effects of radiation mutant *Perilla frutescens* var. *crispa* and *Atractylodes macrocephala* Koidzumii complex extract on the serum level of TNF- α (A) and MMP-3 (B) in a monosodium iodoacetate-induced rat model of degenerative arthritis. Enzyme-linked immunosorbent assays was used to measure the serum levels of TNF- α and MMP-3. The measured levels were expressed as the mean \pm standard deviation ($n = 10$ /group). $^{+++}p < 0.001$ 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).

3.2. COX-2 및 PGE₂ 생성량

퇴행성관절염의 주요 바이오마커 중 하나인 COX-2는 연골세포에서 IL-1, TNF- α 와 같은 염증 매개체에 의해 PGE₂ 합성과 MMP family 생성에 관여하여, 주된 증상인 조직 손상, 통증, 발열 등을 유발함으로써 만성 질환을 야기하는 것으로 알려져 있다[13,14]. 이와 같은 기전을 바탕으로 현재 사용되는 NSAIDs 치료제는 COX-2 억제제를 통해 PGE₂와 MMP 생성을 감소시켜 proteoglycan의 연골 생성 작용을 진행시키는 약물로 활용되고 있으나, 장기간 사용 시 장기와 혈액학적 부작용이 보고되고 있어 이와 유사한 기전과 효능을 가진 소재가 필요한 실정이다[15,16].

본 연구에서 관절염 동물의 COX-2 및 PGE₂ 생성량을 확인한 결과, 차조기 복합물의 투여는 음성대조군 대비 COX-2 생성(약 68~73%, Fig. 2A)과 PGE₂ 생성(약 48~51%, Fig. 2B)을 모든 투여군에서 유의적인($^{***}p < 0.001$) 억제 효과가 나타났으며, 농도 의존적으로 양성대조군으로 사용된 indomethacin과 유사한 결과가 나타났다(Fig. 2). 이와 같은 결과는 앞선 결과와 종합해볼 때, 차조기 복합물의 투여로 인해 TNF- α 생성을 억제시켜 COX-2의 활성이 저하되었고 이를 통해 PGE₂, MMP-3 생성도 억제됨으로써 연골 생성과 보호에 관한 이론적 배경과 일치되는 결과가 도출되었다. 따라서 본 연구에서 사용된 양성대조군이 현재 임상에서 사용되고 있는 NSAIDs 계열이라는 점에서, 차조기 복합물은 기존 치료제와 유사한 기전을 통해 효능을 가지는 천연복합물 소재임을 보여주고 있다.

3.3. 방사선 및 조직병리학 검사

본 연구 종료 후 진행한 무릎 관절의 micro CT 촬영을 진행한 결과, 정상군 대비 음성 및 양성대조군과 차조기 복합물의 투여는 연골 양(cartilage volume)이 많이 감소한 것을 확인할 수 있었으나 상대적으로 차조기 복합물의 투여가 음성대조군보다 연골 양이 더 보존된 것이 확인되었다. 또한, 음성 및 양성대조군과 차조기 복합물의 투여는 정상군 대비 대퇴골의 하단 측의 골의 부식과 파괴가 심하게 일어났으나 실험군은 음성군보다 골의 부식이나 파괴가 적은 것이 확인되었다(Fig. 3A).

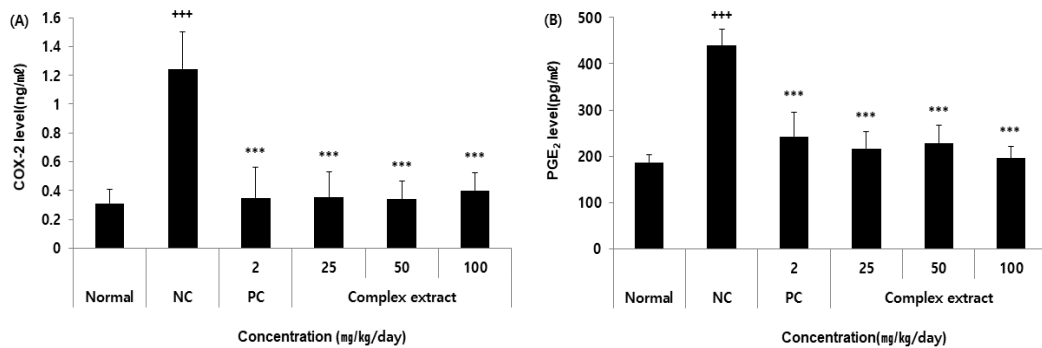


Fig. 2. Effects of radiation mutant *Perilla frutescens* var. *crispa* and *Atractylodes macrocephala* *Koidzumi* complex extract on the serum level of COX-2(A) and PGE₂(B) in a monosodium iodoacetate-induced rat model of degenerative arthritis. Enzyme-linked immunosorbent assays was used to measure the serum levels of COX-2 and PGE₂. 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).

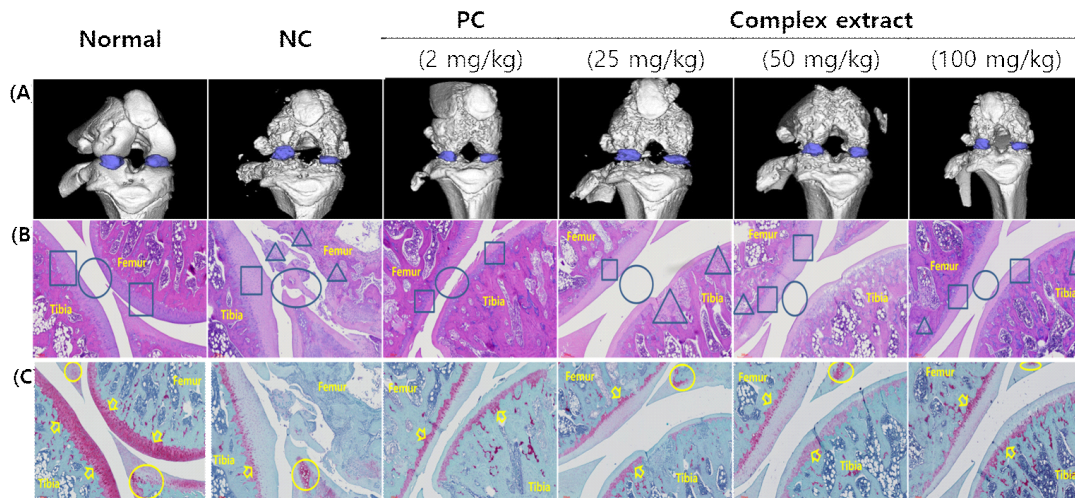


Fig. 3. Effects of radiation mutant *Perilla frutescens* var. *crispa* and *Atractylodes macrocephala* *Koidzumi* complex extract on the micro CT(A) and histopathological(B, C) in a monosodium iodoacetate-induced rat model of degenerative arthritis. Representative morphological(A) and histological(B, C) images of the knee joint tissues were obtained by three-dimensional micro-computed tomography or stained using hematoxylin and eosin (B) or Safranin-O (C) (magnification, 200x).

조직병리학 검사를 위해 H&E 염색을 진행한 결과, 정상군 대비 음성 및 양성대조군, 차조기 복합물의 투여는 micro CT 결과와 유사하게 연골(Fig. 3B-원형)의 소실이 많고 연골 주변으로

침윤 세포(infiltrating cells, Fig. 3B-세모)가 많이 생성된 것을 확인할 수 있었으나 상대적으로 차조기 복합물의 투여가 음성대조군보다 침윤 세포의 범위나 밀집도(Fig. 3B-네모)가 적음이 관

찰되었다(Fig. 3B). 또한, Safranin-O 염색을 진행한 결과, 정상군 대비 음성 및 양성대조군, 차조기 복합물의 투여는 연골(cartilage) 주변과 활막(synovial membrane) 내에 붉은색으로 염색된 proteoglycan(Fig. 3C-화살표)이 고르게 형성되어 있지 않게 형성된 것이 관찰되었으나 상대적으로 차조기 복합물의 투여는 음성대조군보다 연골 주변과 활막 내 proteoglycan(Fig. 3C-원형)의 분포가 많음이 관찰되었다(Fig. 3C). 이와 같은 결과는 차조기 복합물의 투여가 혈액 바이오마커 결과를 통해 나타난 퇴행성관절염 질환 개선에 활용될 수 있는 소재임을 방사선 및 조직병리학 검사 결과로 증명되고 있다.

3.4. COMP 및 CTX-II, Aggrecan 생성량

퇴행성관절염이 발병하게 되면, 관절의 구성요소인 뼈는 이를 생성하기 위해 인체 내 파골세포가 낡은 뼈를 녹여 흡수하는 작용을 통해 회복을 진행하게 된다[17]. 이러한 과정에서 COMP는 관절 조직 또는 연골 세포 외 기질의 분해 시 활액으로 방출된 후 혈청에 흡수되는 인자이며, CTX-II는 파골세포가 새로운 뼈를 생성 시에 골 흡수와 재생을 확인할 수 있는 매개체로 작용하게 된다[18,19]. 이를 통해 최종적으로 연골을 구성하는 성분인 aggrecan의 생성량을 확인하여 퇴행성관절염 치료 진행 여부를 판단할 수 있게 된다[20].

본 연구에서 관절염 동물의 COMP 및 CTX-II, aggrecan 생성량을 확인한 결과, 차조기 복합물의 투여는 음성대조군 대비 COMP 생성(약 84~89%, Fig. 4A)과 aggrecan 생성(약 38~42%, Fig. 4C)을 모든 농도에서 유의적인($^{***}p<0.001$) 감소가 나타났으며, CTX-II 생성(약 51%, Fig. 4B)은 100 mg/kg/day 농도에서 유의적인($^{**}p<0.01$) 증가가 나타났다(Fig. 4). 이와 같은 결과는 이전 연구 결과[파골세포 참고문헌]인 파골세포 효능과 앞선 방사선 및 조직병리학 검사 결과를 미루어볼 때, 차조기 복합물의 투여가 연골의 손상 후 가능한 범위에서 회복이 음성대조군 보다 신속하게 진행되었기에 혈액 측정 당시 골 분해 요소의 생성이 적었으며, 파골세포의 골 흡수와 재생이 활발하게 이루어진 까닭에 연골 구성 성분의 검출도 적었을 것으로 판단된다. 다만, 이와 같은 견해는 방사선 결과를 통해

확보된 육안적 평가를 근거로 확인되는 바, 추후 재연구를 통해 실험 종료 후가 아닌 실험 기간 내 채혈을 통해 측정함으로써 증명해야 할 사항으로 남아있다.

4. 결론

본 연구는 방사선 형질전환 차조기와 백출 복합추출물(차조기 복합물)이 퇴행성관절염 질환에 관한 식품 소재로서의 활용도를 과학적으로 검증하고자 혈액 바이오마커 분석, 방사선 및 조직병리학 평가 등을 진행한 결과는 다음과 같다.

퇴행성관절염 유발 2주 전과 유발 후 4주 동안 차조기 복합물을 25, 50, 100 (mg/kg/day) 농도로 투여한 후 진행한 혈액 바이오마커 평가에서 음성대조군 대비 TNF- α 및 MMP-3, COX-2, PGE2, COMP, aggrecan 등 염증 및 연골, 골 약화와 관련된 매개체 생성을 모든 농도에서 유의적으로 억제시켰다. 반대로 골(연골) 흡수와 관련된 매개체인 CTX-2 생성은 100 mg/kg/day 농도에서 유의적으로 증가시켰다. 마지막으로 방사선 및 조직병리학 검사에서 차조기 복합물은 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.

이상의 결과를 종합해 볼 때, 차조기 복합물은 이전 세포실험을 통해 진행된 안전성과 파골세포의 유의적인 결과와 더불어 퇴행성관절염을 유도한 동물의 혈액 바이오마커를 통해 현재까지 알려진 발병 기전의 이론적 배경에 입각한 효능을 나타내었다. 이를 구체화하기 위해 진행한 방사선 및 조직병리학 검사에서도 연골과 주변 조직의 효과가 입증되어 전임상 단계에서 식품 소재로서의 가능성을 과학적으로 확보하였다. 이와 같은 결과를 바탕으로 건강기능식품 소재개발을 위해 추가로 필요한 GLP 기관에서의 독성 평가와 인체 적용시험(임상 1상)이 진행되고 있어 추후 연구 결과를 보고하고자 하나, 본 연구 결과는 양성대조군이자 현재 치료제로 활용되고 있는 NSAIDs 계열 약물의 치료 기전과 유사하다는 점에서 퇴행성관절염에 관한 소재개발에 다양하게 활용될 수 있을 것으로 보인다.

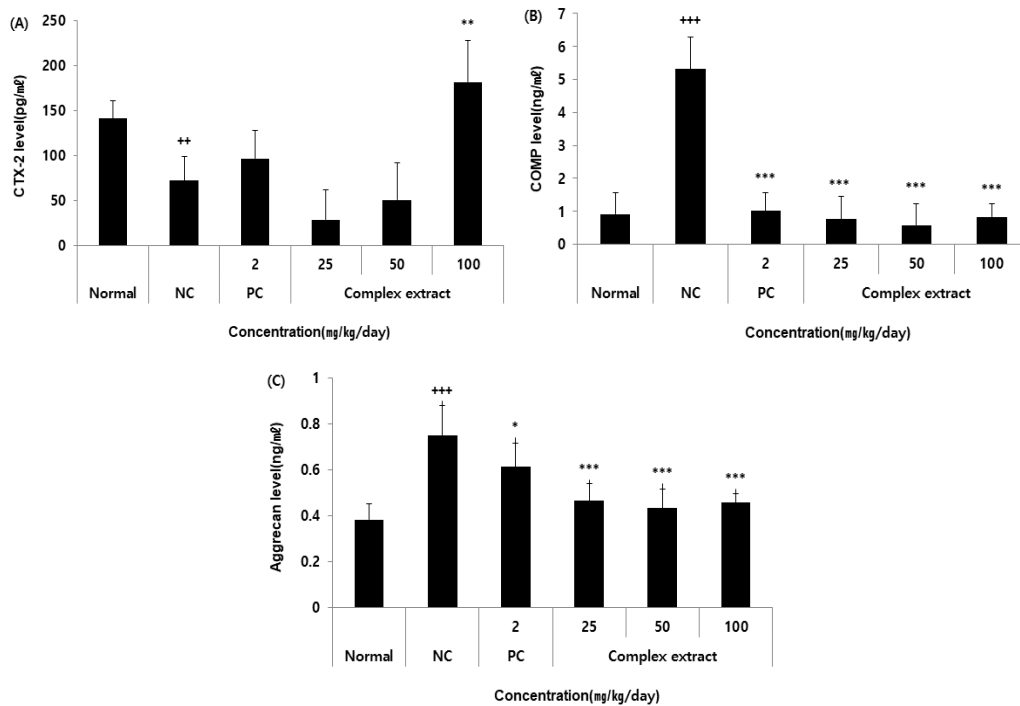


Fig. 4. Effects of radiation mutant *Perilla frutescens* var. *crispa* and *Atractylodes macrocephala* *Koidzumi* complex extract on the serum level of CTX-2(A), COMP(B) and aggrecan(C) in a monosodium iodoacetate-induced rat model of degenerative arthritis. Enzyme-linked immunosorbent assays was used to measure the serum levels of CTX-2, COMP and aggrecan. The measured levels were expressed as the mean±standard deviation ($n = 10/\text{group}$). $^{***}p < 0.001$, $^{**}p < 0.01$ indicates a significant difference from the normal group, $^{***}p < 0.001$, $^{**}p < 0.01$ indicates a significant difference from the negative control group(NC).

감사의 글

본 연구는 산업통상자원부와 한국산업기술진흥원이 지원하는 광역협력권산업육성사업(2020-P0006184)으로 수행된 연구 결과입니다.

References

1. Korea Economic Research Institute(KERI), Press release, (2021).
2. 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).
3. 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).
4. National Health Insurance Service, Korean Statistical Information Service [Internet], Available From: http://kosis.kr/statHtml/statHtml.do?orgId=350&tblId=DT_35001_A_074111&conn_path=I2. (accessed Dec., 18, 2019).

5. S. H. Kim, Y. S. Lee, S. Y. Heo, *Senior-friendly Food Market and Its Vitalization*. pp. 184-185, Korea Rural Economic Institute, (2017).
6. 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).
7. 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).
8. 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).
9. 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).
10. 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).
11. 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).
12. 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).
13. J. P. Pelletier, J. Martel-Pelletier, S. B. Abramson, "Osteoarthritis, an inflammatory disease: potential implication for the selection of new therapeutic targets", *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology*, Vol. 44, No. 6, pp. 1237-1247, (2001).
14. 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).
15. N. E. Lane, "Pain management in osteoarthritis: the role of COX-2 inhibitors", *Journal of Rheumatology*, Vol. 24, No. 49, pp. 20-24, (1997).
16. B. Y. Sim, I. H. Joo, S. K. Kim, J. G. Ji, "Effects of Radiation Mutant *Perilla frutescens* var. *crispa* in Preventing and Alleviating Symptoms in a Monosodium Iodoacetate-Induced Osteoarthritis Rat Model", *Journal of the Korean Applied Science and Technology*, Vol. 37, No. 4, pp. 830-838, (2020).
17. S. K. Mok, H. K. You, H. S. Shin, "The effects of prostaglandin and dibutyryl cAMP on osteoblastic cell activity and osteoclast generation", *Journal of Periodontal and Implant Science*, Vol. 26, No. 2, pp. 448-468, (1996).
18. 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).
19. G. Y. Min, J. M. Park, I. H. Joo, B. Y. Sim, H. J. Choi, H. Y. Kim, D. H. Kim, “Effects of Chondroitin on Blood Related Pathologic Factor and Weight Bearing in MIA Osteoarthritis Model”, *Journal of The Korean Society of Food Science and Nutrition*, Vol. 48, No. 3, pp. 306–312, (2018).
20. M. B. Goldring, M. Otero, D. A. Plumb, C. Dragomir, M. Favero, K. El Hachem, K. B. Marcu, “Roles of inflammatory and anabolic cytokines in cartilage metabolism: signals and multiple effectors converge upon MMP-13 regulation in osteoarthritis”, *European cells & materials*, Vol. 21, No. 1, pp. 202–220, (2011).